

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310019

研究課題名（和文）：海事活動による港湾底質の汚染評価に関する研究

研究課題名（英文）：Port sediment pollution by maritime activity

## 研究代表者名

岡村 秀雄（OKAMURA HIDEO）

神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授

研究者番号：90253020

## 研究成果の概要（和文）：

海事活動の盛んな港湾部の底質汚染を環境生物を用いたバイモニタリング手法を用いて評価したところ、底質の汚染は海産発光細菌を用いて定量的に評価することができた。港湾底質中に残留する有害化学物質として、有機スズ代替防汚剤および石油や排ガス由来の多環芳香族炭化水素化合物を対象としたが、これらの化学物質によって毒性を説明することは困難であった。このことは、港湾底質に残留し、水生生物に影響を及ぼす有害化学物質が多種多様であることを示している。

## 研究成果の概要（英文）：

Biomonitoring procedure using some environmental organisms was applied to assess pollution of port sediments collected at high maritime activity. Some sediments were very toxic to marine photobacteria, which could respond according to the quality of the port sediments. It was, however, difficult to ascertain the observed toxicity with residues of some antifouling compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in the toxic sediments. It was suggested that a wide variety of toxic compounds existed in port sediments.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：海洋環境管理

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：船底防汚剤、原油、多環芳香族炭化水素、塗料廃棄物、生態毒性、変異原性

## 1. 研究開始当初の背景

沿岸域は、船舶運行に伴って排出される汚水・油・ディーゼル排ガス、船底塗料等に由来する防汚剤や有機溶媒、船舶修繕時の廃棄物、廃船時の廃棄物等の海事活動に由来する種々の化学物質に加えて、陸域での産業活動に由来する種々の化学物質の

負荷を受けている。特に、港湾部は船舶の繋留や修繕が行われるために船底防汚剤や排ガス由来の多環芳香族炭化水素等の有害化学物質が底質に残留すると共に、2次的な汚染源となっていると考えられる。

申請者は、予備的に岩手県大槌湾や大阪湾からの50試料の底質について海産発光

細菌に対する毒性を3年間にわたって評価した。大阪湾の全底質が有意な毒性を示し、この内の40%の底質の毒性が極めて強かった。これに対して大槌湾底質には毒性は認められなかった。このように底質試料によって顕著に有害性が異なったことから、大阪湾底質に観察された強い毒性が何に由来するかに興味を持たれた。

## 2. 研究の目的

本研究では、船舶由来の有害物質（防汚剤および多環芳香族炭化水素）に着目し、生態毒性・変異原性を指標とした環境毒性的アプローチにより港湾底質の汚染を定量的に評価することを目的とし、未知の有害化学物質を探索し、将来にわたる汚染底質の浄化を視野に入れた底質の環境管理に資することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) バイオアッセイ

海産発光細菌 *Aliivibrio fischeri*、海産底生藻類 *Cylindrotheca closterium*、水生植物 *Lemna gibba* G3 を用いて、底質を直接供試して試験する方法を開発した。変異原性は *Salmonella typhimurium* NM2009 株を用いたウムラック AT により評価した。

### (2) 化学分析

11 種類の代替防汚剤（銅ピリチオン、亜鉛ピリチオン、トリフェニルボランピリジン、シーナイン 211、ジウロン、Thiram、Iragrol 1051、M1、Dichlofluanid、Tolylfluanid、TCPM）の分析方法を開発した。15 種類の多環芳香族炭化水素（PAH: NAP, ACE, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DahA, BghiP, IND）および 11 種類のニトロ化 PAH（1N-NAP, 2N-NAP, 2N-FLU, 9N-ANT, 1, 6DN-PYR, 1, 8DN-PYR, 1, 3DN-PYR, 1N-PYR, 6N-CHR, 7N-BaA, 6N-BaP）の分析法を開発した。

### (3) バイオモニタリング

主に港湾底質を試料として供試し、その他に塗料廃棄物、船舶排ガス由来粒子状物質（PM）を供試した。採取した港湾底質をそのままあるいは凍結乾燥してバイオアッセイに供して、毒性を評価した。また、乾燥底質、塗料廃棄物、PM はジクロロメタン（DCM）を用いて高速溶媒抽出し、防汚剤あるいは PAH 濃度を測定した。

## 4. 研究成果

港湾底質に残留が推定される有害成分として、船底防汚剤（銅ピリチオン、亜鉛ピリチオン、シーナイン 211 などの有機防汚剤）および石油および排ガス中の PAH、ニトロ化 PAH に着目した。海事活動の盛んな港湾として大阪湾を対象と

し、船舶修繕ドック周辺の底質の汚染を定量的に評価し、未知の有害成分を探索した。

### (1) 港湾底質の毒性評価

海産発光細菌 *A. fischeri* を用いた発光阻害試験、海産底生藻類 *C. closterium* を用いた増殖阻害試験、*S. typhimurium* NM2009 株を用いた変異原性試験（ウムラック AT）をそれぞれ実施した。有害化学物質の毒性を評価した後に、実試料の毒性を評価した。

まず、分析対象とした有害化学物質（11 種類の代替防汚剤と 41 種類の PAH 誘導体）の海産発光細菌に対する毒性を評価したところ、数種類の防汚剤（トリフェニルボランピリジン、銅ピリチオン、亜鉛ピリチオン、シーナイン 211）は極めて強い発光阻害を示したが、PAH 誘導体の発光阻害は弱かった。次に、変異原性を評価した。直接変異原性を示したのは、19 種類の PAH の内の 1 種および 22 種類の NPAH の内の 12 種類であった。間接変異原性を示したのは、2 種類の PAH および 10 種類の NPAH であった。直接および間接変異原性の両方を示したのは、1 種類の PAH および 9 種類の NPAH であった。一方、全ての防汚剤および予想される分解産物には変異原性は認められなかった。

港湾底質として大阪湾の造船所および修繕ドック等の 20 か所で 2005 年から 2011 年に採取した表層底質約 100 試料を用いた。また、大阪湾の船舶修繕ドックで採取した塗料廃棄物 3 種類、ディーゼル排ガス由来ススや PM の変異原性、生態毒性を評価した。C 重油を燃料とした実験用エンジンからの PM およびエンジンの冷却器付着ススは、直接および間接変異原性を示した。これに対して、A 重油を燃料とした練習船深江丸の煙突付着ススは変異原性を示さなかった。また、港湾底質（湿底質 2g）の DCM 抽出物にも変異原性は認められなかった。このように、変異原性は C 重油を燃料とするエンジンからのススや PM にのみ認められ、港湾底質には認められなかった。

港湾底質に海産発光細菌を直接接触させ、底質の色や粒子の影響を補正して測定した細菌発光量から、底質の汚染を定量化した。2010 年に採取した試料の 60-min EC50（湿泥重量）は 0.80 mg/L~260 mg/L の範囲にあり、平均 34 mg/L であった。同様にして、港湾底質に海産底生藻類を直接接触させ、水中の藻類量を *in vivo* chlorophyll 量として測定して、底質の汚染を評価した。2010 年に大阪湾の 10 か所で採取した乾燥底質の底生藻類への毒性（72-h EC50）は 0.14~1.8 g/l であった。

これに対して、同一試料の海産発光細菌への毒性は0.009~0.17 g/Lであったので、発光細菌試験の方が感度が10倍程度高かった。しかし、両試験結果には強い相関が認められなかったことから、それぞれ試験で検出できる化学物質が異なると考えられた。

塗料廃棄物および底質の有機溶媒抽出物は発光細菌に対して阻害を示したが、変異原性は示さなかった。また、底質を直接供試しても発光細菌への阻害を示したことから、有機溶媒抽出物には細菌の発光を阻害する成分が抽出されたと考えられた。

#### (2) PAH関連化合物の港湾底質への残留

15種類のPAHおよび11種類のNPAHを対象とし、HPLC-FD(蛍光検出器)-CD(化学発光検出器)を用いた分析方法を開発した。PAHはFDで定量し、NPAHはオンラインで還元させたアミノ化体をFDあるいはCDで定量した。多くのNPAHはFDよりもCDで高感度に検出できたが、1N-PYR(1-nitropyrene)のみはFDの方が感度が高かった。船舶PMをDCMを用いて高速溶媒抽出し、アミノプロピルカラムで前処理した後に、アミノシアノカラムを用いた分取HPLCにより3画分に分画し、前記の分析方法によりPAHおよびNPAHを分析する手法を開発した。船舶ディーゼルエンジンからのPMやススにはPAH、NPAHが検出され、変異原性との関連が示されたが、港湾底質中の濃度は極めて低く、これらPAH関連化合物が生態毒性を示す原因物質とは考えられなかった。

#### (3) 代替防汚剤の港湾底質への残留

11種類の防汚剤を対象とし、HPLC-DAD(三次元検出器)を用いた分析法を開発した。銅ピリチオンと亜鉛ピリチオンはPDS/EDTAを用いた誘導体化法で、トリフェニルボラン化合物はTBAPを用いたイオンペア法で、その他の防汚剤は一斉分析した。銅ピリチオンとその分解産物(PT2, HPT, PS2, HPS, PSA, PO)の誘導体化反応により生成するPPMDは、ピリチオン1分子に対して化学量論的に生成することを見出した。有害性の高い銅ピリチオン、PT2, HPTの定量限界(IQL)はいずれも約1.0 µg/lと算出された。

船舶修繕ドックで採取した塗料廃棄物のDCM抽出物には防汚剤(トリフェニルボランピリジン、銅ピリチオン、ジウロン、シーナイン211)と分解産物(ベンゼン、フェノールなど)の残留が認められた。塗料廃棄物抽出物中の化学物質の内、海産発光細菌の発光阻害への寄与率が高かったのはシーナイン211および銅ピリチオンで

あった。発光阻害の強い大阪湾底質をDCM抽出し、フロリジルカラム処理して銅ピリチオン濃度を定量したところ、最高濃度は2.6 µg/lであり、文献に報告されているLCMSMSによる定量限界値と同等の濃度で検出された。しかしながら、銅ピリチオンが検出された底質を除くと、港湾底質には防汚剤が検出されなかったことから、これら防汚剤および関連化合物が生態毒性を示す原因物質であるとは考えられなかった。

#### (4) まとめ

港湾底質の汚染を環境生物を用いたバイオアッセイによって定量的に評価することができた。有害物質に対する発光細菌の感度は比較的高く、また短時間で結果を得ることができるので、底質試料を採取して短時間の内に毒性の定量化が可能である。一方で、底質に観察された毒性を、化学分析の対象とした防汚剤やPAH関連化合物で説明することはできなかった。このことは、港湾底質に残留する汚染物質が多種多様であることを示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

- ① Okamura, H., Togosmaa, L., Sawamoto, T., Fukushima, K., Nishida, T., and Beppu, T. (2012) Effects of metal pyriithione antifoulants on freshwater macrophyte Lemna gibba G3 determined by image analysis. *Ecotoxicology* 21:1102-1111.
- ② Okamura, H., Yagi, M., Kawachi, M., Hanyuda, T., Kawai, H. and Walker, I. (2012) Application of rotating cylinder method for ecotoxicological evaluation of antifouling paints. *Toxicological and Environmental Chemistry* 94: 545-556.
- ③ Suda, T., Hata, T., kawai, S., Okamura, H., and Nishida, T. (2012) Treatment of tetracycline antibiotics by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Bioresource Technology*. 103: 498-501.
- ④ 高山敦好、影山明久、藤田浩嗣、原野亘 (2012) PM充電器と静電水スクラバによるNOx, PMの低減—スクラバ水滴挙動によるPM捕集効率の変化—、環境技術 41: 90-96.
- ⑤ Tunemasa, N. and Okamura, H. (2011) Effects of organotin alternative

- antifoulants on oyster embryo. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 61: 128-134.
- ⑥ Ryu, Y., Dan, T., Mizukura, M., Asano, I., Combustion and Emission Characteristics of Diesel Engine by Mixing DME and Marine C Heavy Fuel Oil, 9th International Symposium on Marine Engineering, D2-1, pp.1-6.
- ⑦ Shikimi, K., Dan, T., Asano, I., Hashimoto, M., Combustion Characteristics of Water Emulsified Jatropa Curcas Oil in Variation of Water Droplet Distribution, 9th International Symposium on Marine Engineering, D2-3, pp.1-6.
- ⑧ 西田修身, Kartika, K. H., 藤田浩嗣, 原野 亘, 柳 東勲, 中西哲也, 千田哲也, 古川 匡, 池田真俊, 岡本寛己, 岡田英晃, 斎藤真梨子 (2011) 石炭油燃焼による排出 PM の低減について— 2 段燃焼の効果、日本マリンエンジニアリング学会誌 46(3): 142-147.
- ⑨ Hata, T., Shintate, H., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T. (2010) Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole, Journal of Hazardous Materials 181: 1175-1178.
- ⑩ Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., and Nishida, T. (2010) Removal of diclofenac and mefenamic acid by white rot fungus Phanerochaete sordida YK-624 and identification of their metabolites after fungal treatment. Biodegradation 21(5): 681-689.
- ⑪ Inoue, Y., Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., and Nishida, T. (2010) Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. Journal of Hazardous Materials. 180: 764-767.
- ⑫ Fukushi, K, Yakushi, Y., Okamura, H., Hashimoto, Y., Saito, K. (2010) Simultaneous determination of a pyridine-triphenylborane anti-fouling agent and its estimated degradation products using capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1217: 2187-2190.
- ⑬ 薬師寺雄樹, 福士惠一, 岡村秀雄, 橋本陽一, 宮道隆, 斎藤惠逸 (2009) キャピラリーゾーン電気泳動法による有機ホウ素系防汚剤のアセトニトリル中における分解性評価. 分析化学. 58: 301-304.
- ⑭ 川井浩史, 羽生田岳昭, 岡村秀雄, 河地正伸, 功刀正行, 出村幹英 (2010) 遺伝子マーカーを用いた船体付着藻類の多様性解析と防汚塗料の違いが付着藻類の種組成に及ぼす影響について. 日本マリンエンジニアリング学会誌. 45: 86-90.
- ⑮ 岡村秀雄 (2009) バイオモニタリングを活用した汚染された水環境の評価と管理. 日本海水学会誌. 63: 307-311.
- ⑯ 岡村秀雄 (2009) 船底防汚塗料に用いられる亜鉛ピリチオンおよび銅ピリチオンの環境影響. 付着生物学会誌. 26: 33-41.
- ⑰ Okamura, H., Kitano, S., Toyota, S., Harino, H., and Thomas, K. V. (2009) Ecotoxicity of the degradation products of triphenylborane pyridine (TPBP) antifouling agent. Chemosphere 74: 1275-1278.
- ⑱ 常政典貴, 上野博昭, 久保田明利, 岡村秀雄 (2008) 有機スズ代替船底防汚剤による広島湾北部海域の底質汚染状況について, 環境化学. 18 (1): 19-27.
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Okamura, H., Sawamoto, T., Dan, T., and Fujita, H. Can dimethyl ether diminish environmental impacts of diesel exhaust particulates from marine diesel oil? C5-3, 9th International Symposium on Marine Engineering, Kobe, Japan 2011. 10.17-20
- ② Okamura, H. Marine pollution by chemicals and protection of marine environment. Marine environmental deterioration by ship. Yangzhou University, China 2010. 9.14-17
- ③ Tsunemasa, N. and Okamura, H. Concentration of antifouling biocides and heavy metals in sediment core samples in the northern part of Hiroshima Bay. Pacificchem Honolulu, Hawaii, USA 2010. 12.15-20
- ④ Tsunemasa, N. and Okamura, H. (2010) Effects of organic boron antifoulants on oyster embryo. Proceedings in SETAC Europe 20th Annual Meeting. Seville, Spain 2010. 5.23-27
- ⑤ Okamura, H., Kawachi, M., Hanyuda, T.,

- and Kawai, H. Ecotoxicity assessment of new biocide-free antifouling paints. 14th International Symposium on Toxicity Assessment. 62. Metz, France 2009. 8. 30-9. 4
- ⑥ Tsunemasa, N. and Okamura, H. The influence of organotin alternative antifoulants on the oyster's embryology. 14th International Symposium on Toxicity Assessment. 62. Metz, France 2009. 8. 30-9. 4
- ⑦ Okamura, H. and Kitano, S. Fate of triphenylborane-pyridine antifouling agent in sediments. 5th SETAC World Congress, Sydney, Australia 2008. 8. 3-7
- ⑧ Tsuboi, A., Okamura, H., Harino, H., Tsunemasa, N., Thomas, K., Shim, WJ. Triphenylborane-pyridine antifouling agent degrades by metal ions? 14th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 30. Kobe, Japan 2008. 7. 27-31
- ⑨ Fukushi, K., Yakushiji, Y., Okamura, H., Hashimoto, Y. Simultaneous determination of pyridine triphenylborane (TPBP) antifouling agent and its estimated degradation products by capillary zone electrophoresis. 14th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 31. Kobe, Japan 2008. 7. 27-31
- ⑩ Tsunemasa, N., and Okamura, H. Contamination of organotin alternative antifoulants in coastal seawater and sediment of Hiroshima Bay. 14th International Congress on

Marine Corrosion and Fouling. 9. Kobe, Japan 2009. 8. 30-9. 4

[図書] (計2件)

- ① Nishida, T. and Okamura, H. (2008) Detoxification of steroidal hormones in the aquatic environment. Drinking water: Contamination, toxicity, and treatment (Eds. Romero, J. D., Molina, P. S.). 213-221. NOVA Publishers
- ② Nagata, S., Zhou, X., Okamura, H. (2008) Antagonistic and synergistic effects of antifouling chemicals in mixture. Ecotoxicology. Vol.1 of Encyclopedia of Ecology (Eds. Jorgensen, S. E. and Fath, B. D.). 5 vols. pp.194-203. Oxford: Elsevier.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡村 秀雄 (OKAMURA HIDEO)  
神戸大学・内海域環境教育研究センター・教授  
研究者番号：90253020

### (2) 研究分担者

段 智久 (DAN TOMOHISA)  
神戸大学・大学院海事科学研究科・准教授  
研究者番号：80314516

藤田 浩嗣 (FUJITA HIROTSUGU)  
神戸大学・大学院海事科学研究科・教授  
研究者番号：60199338