

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：82627

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289325

研究課題名(和文)日本の海域で適応可能なBiotic Ligand Modelの構築

研究課題名(英文)The investigation for adaptive possibility of Biotic Ligand Model in Japanese sea area

研究代表者

山口 良隆 (YAMAGUCHI, Yoshitaka)

国立研究開発法人 海上技術安全研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20344236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：船舶の燃費向上のため、船底に銅化合物を防汚物質として含有した塗料が、使用されている。そして防汚物質の銅が、海洋環境中に溶出する。そのため海洋環境中における銅の生物に対するリスク評価が必要である。そこで海洋環境中の実態を把握するために、東京港における実際の海水中の銅状態や濃度、及び性状について分析を行った。さらに生物毒性の指標を得るために、海水中に生息する甲殻類のアルテミアで銅の毒性試験を行った。本研究で得られた結果は、海水中の生物についての銅リスク評価に活用できるものである。

研究成果の概要(英文)：The anti-fouling paint include copper compound is useful system for the improvement of ship's fuel efficiency, whereas some vessels are one of copper contamination source to seawater in the marine environment. Therefore, the risk assessment of copper for marine organisms is required. In this study, copper species and characters were analyzed in seawater from the Port of Tokyo. And brine shrimp, which is a kind of crustacean, acute toxicity test was examined. The result of this study is useful for the copper risk assessment of marine organisms.

研究分野：海洋環境分析

キーワード：船底防汚物質 銅 化学形態 生物毒性試験 生物リスク評価

1. 研究開始当初の背景

船舶の燃費の向上、言い換えれば、地球温暖化ガス排出削減のため、船底に防汚塗料が使用されている。そのメカニズムは、防汚塗料中に含まれる防汚物質が、塗膜から微量に溶出し、生物を忌避させ、塗膜表面の生物汚損を防ぐ。この効果を利用して、船底の摩擦抵抗を増加させないようにしている。近年、性能及びコストの面から防汚物質は亜酸化銅が広く使用されている。しかしサンディエゴ湾の調査で、船舶が起源と推測される銅が海水中のバックグラウンドより比較的高い濃度で検出されており¹⁾、水生生物への影響が懸念されている。同様な事象について世界各地から報告²⁾があり、生物に対する銅リスク評価の必要性が高まっている。

また海水中に溶解している銅は、多数の化学形態で存在し、さらに生物に対して一般的な毒性は、銅の形態に依存し、式(1)の通りと言われている。

銅イオン (Cu^+ , Cu^{2+}) > 無機銅 >> 有機銅化合物 (1)

そのため港湾等の海洋環境中における銅の生物へのリスクを評価するには、海水中の銅化学形態を考慮する必要がある。式(1)で生物に作用する銅は、銅イオンと無機銅を合わせたグループであり、これらは labile 銅とよばれている。つまり船底塗料用防汚物質の銅について海生生物に対するリスクを評価するには、labile 銅濃度について実際の海洋環境で計測を行うか、またはシミュレーション計算等で海洋環境中の状態を見積る必要がある。

近年、国際海事機関の周辺で、今後の防汚物質のあり方の議論が起こっている。また銅の防汚物質の水生生物に対するリスク評価として、欧州では、labile 銅及び溶解している全銅濃度の実測値と生物毒性試験の半数致死濃度(LC₅₀)、半数効果濃度(EC₅₀)を収集し、データを統計処理してリスク評価を行っている。さらに米国では、Biotic Ligand Model (BLM)を用い labile 銅濃度の計算を行い、生物試験と比較してリスク評価を行っている。

一方、日本において生物への銅リスク評価に採用が可能な海洋環境中の銅化学形態別分析結果や、さらに生物を用いた銅の毒性データがほとんどない状態である。さらに電気化学的な labile 銅の直接計測は、分析が容易ではなく、モニタリングに広く適応することが難しいことや、環境指標生物の適正な選択などのいくつかの課題がある。しかしながら日本においても、船底塗料用防汚物質起源の海洋環境中での銅状態や毒性試験の結果を用いてリスク評価を行う必要がある。

2. 研究の目的

このような社会的背景より、本研究では、

日本の船舶が存在する海域で、銅の毒性に関連する labile 銅分布の把握と環境指標になりうるような生物種の銅に対する毒性を明らかにすることである。

日本の港湾等の海域で海水を採水し、銅の化学形態別分析や海水性状の分析を行った。また比較的容易に多数の labile 銅濃度データを取得できる前処理・分析手法の可能性を調べるために、固相抽出法を利用した実験を行った。また、海水・塩水に生息する生物種のアルテミアを用いて生物毒性試験を行った。さらに毒性試験系の labile 銅濃度や海水の性状などの把握も同時に行った。生物毒性試験で得られた全銅と labile 銅の濃度のそれぞれの毒性値より、生物学的利用能の把握を行った。

簡易的ではあるが環境中の銅濃度と生物毒性試験の結果や、環境基準値を利用してリスク評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 実海域での海水採水

日本の港湾(東京港、大阪港、神戸港等)で、試料海水を採水可能な場所について 20カ所以上の実地等の調査を行った。海域における船舶の航行や停泊の有無、海水採水のしやすさ、海域の特徴等を考慮して、最終的に、東京港の晴海埠頭、青海埠頭、芝浦運河、勝島運河の4か所に決定した。そして2015年から2016年に東京港の4か所で定期的に海水の採水を行った。海水は、投げ込み式のプラスチックバケツで表層の海水を採水した。採水した試料海水を2Lポリエチレンボトルに保存した。ポリエチレン瓶は、前もって酸洗浄の後に超純水でよくすすいだものを使用した。それぞれの測定点について、試料を3本採取した。採水した試料海水を0.45 μmメンブレンフィルターで、吸引ろ過を行った後、各種の分析に使用した。

全銅分析のための前処理は、次の通りである。はじめに200 mlの試料海水に4 mlの2 mol/L硝酸を添加して、95以上で、6時間程度の酸分解を行った。その後、試料海水について超純水で200 mlに定容を行い、さらにpHを6近辺に調整した。次に、試料海水を固相カートリッジ(InertSep ME-2)に通水し、脱塩・濃縮を行った。その後、硝酸を用いて固相カートリッジから銅を回収し、定容を行った。

Diffusive gradients in thin films (DGT)を用いた海水からの銅採取の操作は、次の通りである。試料の入った1Lのポリエチレン容器にDGTを入れて、24時間後にDGTを溶液から引き上げた。次にDGT内部から高分子層を取り出し、そこに捕集された銅を硝酸で回収し、硝酸を用いて5 mlに定容を行った。

固相カートリッジを用いた labile 銅採取は、現実の海水中における銅化学形態を保持したまま回収するために、試料海水をそのまま

固相カートリッジに通水を行った。その後の操作は、全銅の前処理と同じである。

それぞれの前処理で得られた銅硝酸溶液について誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP/MS) を用いて定量分析を行った。また各試料海水の性状として水素イオン濃度 (pH)、溶存有機炭素 (DOC)、アルカリ度、塩分濃度及び酸化・還元電位 (ORP) の計測を行った。

(2) 毒性試験

アルテミアの毒性試験は、OECD ガイドライン TG202 を改良した方法に従い、行った³⁾。銅を添加した溶液を 25 に設定したインキュベーター内に水温を安定にするため 24 時間静置した。そして各濃度区にアルテミアを 10 固体ずつ加え、暗条件下、無給餌の条件で暴露試験を行った。実験開始後、0~48 時間目に生存数の確認を行った。

人工海水は、Marine Art SF-1 を使用した。また天然海水は、神奈川県三浦市の城ヶ島、同県横浜市のベイサイドマリーナ及び東京都品川区の台場付近 (都立潮風公園) で採水し、0.45 μm のメンブランフィルターでろ過したものを使用した。

4. 研究成果

(1) 東京湾海水分析

東京港の勝島運河、芝浦運河、晴海埠頭、及び青海埠頭での採水した海水中の全銅濃度、固相カートリッジで採取した labile 銅濃度 (固相-labile 銅濃度)、DGT で採取した labile 銅濃度 (DGT-labile 銅濃度) の結果を図 I に示した。

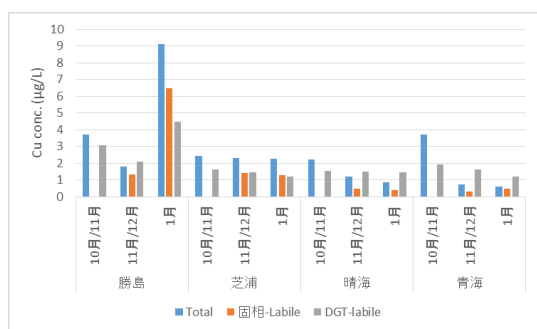


図 I 各採取場所の銅形態別濃度

今回の計測における東京湾海水中の全銅濃度、固相-labile 銅濃度及び DGT-labile 銅濃度は、それぞれ 0.58~9.13 μg/L、0.28~6.46 μg/L、及び 1.18~4.46 μg/L の濃度範囲となった。

いくつかの銅分析のデータにおいて海水中の全銅濃度より DGT-labile 銅濃度の方が高い結果が得られた。これらの場合の DGT-labile 銅濃度は、1~2 μg/L 程度であった。このように DGT で得られた銅濃度が同じ濃度レベルであることから、DGT 自体が

銅のバックグラウンドを持っていると考えられる。また一般的分析法で、バックグラウンド濃度以下の目的物質計測を行うことは、難しい。しかし、低濃度の銅が生物へ影響を及ぼす事象も見つかっている⁴⁾。低濃度での生物学的利用能を判断するために、より低濃度の labile 銅分析法も必要である。また本研究で使用している固相カートリッジは、キレート樹脂を使用しており、海水中の金属イオンを主とした化学形態の捕集が可能である。そのため海水中の銅イオンと有機銅の分離を行える可能性がある。そこで固相カートリッジについても、あわせて labile 銅の採取を行った。天然海水中の銅について得られた結果で、両者が比較可能な濃度レベルは、勝島運河の 1 月のみのデータではあるが、十分に検出可能な濃度で DGT-labile 銅濃度と固相-labile 銅濃度は、類似の傾向があった。またキレート樹脂系の固相カートリッジは、濃縮が可能であるために低濃度の金属イオン種の回収に対応可能である。さらに海水中からの固相カートリッジで採取可能な銅の化学形態について検証等を行うことにより、低濃度域の labile 銅の指標を計測するツールになる可能性があることを見出した。

(2) 生物毒性

・人工海水の特徴と DGT による銅の生物利用能について

人工海水に硝酸銅(II)を添加した 0.1~100 mg/L 溶液について、DGT で銅の計測を行った。0.1~100 mg/L 溶液について生物学的利用能と相関があるとされている DGT-labile 銅濃度の結果は、0.01~10 mg/L のオーダーとなった。また、添加した銅濃度と DGT-labile 銅濃度の間には正の相関があり、良い直線関係であった。

人工海水に対して銅を添加し、固相抽出法で銅の回収試験を行った。その結果、添加した銅について回収率が最大 45% となった。他の海水では、銅がほぼ 100% で回収される。しかし生物試験のために生物飼育用の海水を使用しており、この回収試験結果より、人工海水に含まれる有機物等の成分に銅が捕集される特徴があることが分かった。添加した銅量、人工海水中的の実際の銅濃度、DGT-labile 銅濃度の関係がわかり、実験に使用する人工海水の特徴が明らかとなった。

・人工海水を用いた毒性試験

アルテミアの急性毒性試験の結果、コントロール区で、実験開始から 48 時間目で全ての個体が生存した。0.1 mg/L 区では、生残率が 48 時間目で 100% または低下した。1 mg/L 区においては、24~48 時間目に生存率が低下した。10 mg/L 区では、12~24 時間目に生存率が低下した。100 mg/L 区では、6~12 時間目から生存率が低下した。生存率は、コントロール区 = 0.1 mg/L 区 > 1.0 mg/L 区 > 10 mg/L 区 > 100 mg/L 区であった。添加濃

度と DGT-labile 銅の得られた結果を解析し、48 時間 LC₅₀ 値を算出した結果、それぞれ、1 mg/L 及び 0.1 mg/L のオーダーとなった。本研究で得られた 48 時間 LC₅₀ 値を比較した結果、銅の生物学的利用能は約 16% であることが分かった。

また実験上の問題点として生物毒性試験水槽に DGT を同時に直接入れて銅を採取した場合と、試験溶液を 2 つに分けて、一つは生物毒性試験、もう一つは DGT で銅採取を同時刻に別々に行った場合で、後者の方が DGT-labile 銅濃度が低下した。そのためそれぞれの系について全銅や labile 銅の実効濃度の見積り方法や生物毒性試験と DGT 試験に適した人工海水について、さらに検討をする必要がある。

・天然海水を用いた毒性試験

毒性試験に用いた天然海水は、城ヶ島、横浜ベイサイドマリーナ及び台場で採水を行った。

城ヶ島の海水を用いたアルテミアの銅毒性試験では、コントロール区及び 0.1 mg/L 区では全ての個体の生存が確認された。また 1 mg/L 区では、24 時間目から生存率が低下した。さらに 10 mg/L 区及び 100 mg/L 区では、12 時間目から生存率が低下した。この結果より算出した溶液への銅添加濃度と DGT-labile 銅濃度での 48 時間 LC₅₀ 値は、両者ともに 0.1 mg/L のオーダーであったが、銅添加濃度 > DGT-labile 銅濃度となった。

横浜ベイサイドマリーナの海水をアルテミアの毒性試験では、コントロール区及び 0.1 mg/L 区では全ての個体の生存が確認された。また 1 mg/L 区では、12 時間目から生存率が低下した。さらに 10 mg/L 区及び 100 mg/L 区においては、6~12 時間目から生存率が低下した。この結果より算出した溶液への銅添加濃度と DGT-labile 銅濃度での 48 時間 LC₅₀ 値は、両者ともに 0.1 mg/L のオーダーであったが、銅添加濃度 > DGT-labile 銅濃度となった。

台場の海水をアルテミアの毒性試験では、コントロール区及び 0.1 mg/L 区では全ての個体の生存が確認された。また 1 mg/L 区及び 10 mg/L 区では、12 時間目から生存率が低下した。100 mg/L 区においては、6 時間目から生存率が低下した。この結果より算出した溶液への銅添加濃度と DGT-labile 銅濃度での 48 時間 LC₅₀ 値は、両者ともに 0.1 mg/L のオーダーであったが、銅添加濃度 > DGT-labile 銅濃度となった。

今回得られた海水を使用したアルテミアの銅毒性試験で、銅添加濃度と DGT-labile 銅濃度の LC₅₀ の関係は、全ての結果において、銅添加濃度 > DGT-labile 銅濃度、となった。また今回の実験結果では、毒性試験で 48 時間 LC₅₀ 値が若干ながら差が出た。定性的ではあるが、城ヶ島 > 横浜ベイサイドマリーナ > 台場の順番となった。本研究で使用した

天然海水は、3 地点であるが、採水場所により毒性が異なるため、海水中の性状が銅の毒性と関連している可能性がある。そこで毒性、DOC、pH、アルカリ度、ORP の関係の比較を行った。まず DOC は、銅と結合し生物学的利用能を減じることが報告されている⁵⁻⁶⁾。今回、得られた結果も類似しており、DOC と銅の結合により LC₅₀ が変化していることが要因の一つであると考えられる。また pH やアルカリ度の大きい地点ほど、また ORP が小さい地点ほど、毒性が高くなった。そのため海水性状の要因がいくつか連動して銅の毒性を決めているとことが示唆された。

また人工海水と天然海水では、DGT-labile 銅との傾向が異なる。現時点は推測の域は出ないが、人工海水中の DOC 等を構成している有機物が天然物とは異なり、また他の塩等の溶存成分についても若干違う可能性があり、その影響で両者の間にずれが生じていると考えられる。

(3) リスク評価

東京港で採水した海水中の銅濃度計測結果とアルテミアの生物毒性試験より得られた結果を用いて、予測環境濃度 (PEC) と予測無影響濃度 (PNEC) の比較を行った。東京港の環境計測で得られた最大値を PEC とし、さらにアルテミアの LC₅₀ で得られた範囲で取りうる最低値を PNEC に採用した。

一般のリスク評価に使用される PEC/PNEC 比について、本研究で得られた環境分析値、及び、全銅・labile 銅濃度に基づいた LC₅₀ 値を用いて算出した結果、1 以下となった。しかし、これからも環境変化をモニタリングする観点から動物種の中では感受性の高いアルテミアや植物も含めた他の環境指標生物の動向に注視していく必要がある。

水生生物の影響を考慮した化学物質の基準値として、水生生物に短時間暴露によって有害性を及ぼさない濃度 (Criteria Maximum Concentration, CMC) 及び長期暴露によって影響を及ぼさない最大濃度 (Criterion Continuous Concentration, CCC) がある。また環境中に存在する銅の基準値として US EPA による Aquatic Life Copper Criteria がある。その中で saltwater 中の全銅における CMC と CCC は、それぞれ 3.1 µg/L と 1.9 µg/L と公表されている⁷⁾。

東京港表層の海水について分析で得られた全銅濃度データと CMC、CCC の比較を行ったものを図 II に示す。東京港の比較的開かれた海域にある晴海埠頭や青海埠頭では CCC 以下の銅濃度の計測値が多い。船舶の航行や停泊があることから、東京湾からの海水の流入による希釈などの効果で、銅に対して自浄作用があると考えられる。しかし運河のようなさらに閉鎖された海域では、CMC、CCC を超える分析値が得られた。この理由と

しては、海水などの流入が少ないためと考えられる。

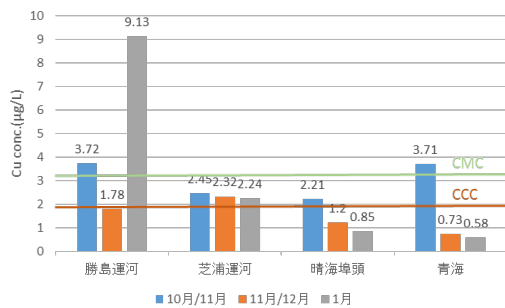


図 II 海洋環境中の銅のリスク評価

今後、船舶由来の海水中の銅状態について Marine Antifoulant Model to Predict Environmental Concentrations (MAM-PEC) 等のシミュレーションで計算を行い、船舶起源の銅が環境中にどれくらい影響しているかを見積ること重要である。また銅の環境分析値等と比較により、他の銅排出源からの影響と切り分けを行い、環境中に存在する銅の起源を明らかにすることが必要である。

近年、精度が高いと言われている重金属の生態毒性予測モデルとして Biotic Ligand Model (BLM)がある。河川での銅をはじめとする重金属のリスク評価では広く用いられている。海水分析で得られたデータを利用し、BLM での金属スペシエーションの計算を行ったところ、入力パラメーターに相当する分析値が入力範囲外であるなどの問題があった。また現在、海水版 BLM は開発中であり、現時点では、一般には公開されていない。また淡水版 BLM では、現実系に近づけるために、いくつかの課題があり、その中で実環境の分析データを利用し問題の解決の手がかりになるものがある。その一つに淡水版の BLM に付属する化学形態を算出する計算プログラムは、いくつかあり、同じパラメーター入力をして、差のある計算結果が得られる場合がある⁸⁾。将来的に海水版を利用する場合においても同様の問題が起こることが想定される。そこで本研究では、化学形態の計算プログラムに入力するパラメーターに相当する多数の分析項目についてデータの取得を行った。そのため本研究で得られたデータは、化学形態計算の正確性や精度の評価を含む計算結果の検証、さらに港湾の特徴を考慮したプログラムのチューニング等に利用が可能である。現時点で、本研究のデータは、日本における BLM の銅化学形態計算に利用可能で、かつ実際の海洋環境中での銅状態を明らかにした数少ない、かつ詳細な事例であると思われる。さらに、実際の海域データで検証作業を行ったプログラムを使用することで、より正確な、そして数多くのシチ

ュエーションにおける化学形態の計算やリスク評価が可能となる。

また BLM の毒性側の問題点のひとつとして、毒性評価が可能な生物がファットヘッドミノール等の数種類と非常に少ない⁹⁾。本研究において、海生生物のアルテミアについて labile 銅濃度を制御した系で毒性試験を行えたため、金属の形態を考慮した試験においても環境指標生物として利用が可能であることがわかった。今後、アルテミアの毒性のメカニズムの議論や海水性状等の条件を変えた毒性試験のデータを蓄積することで、BLM 等の銅の生物リスク評価に役立てられると考える。

<引用文献>

- 1) A. C. Blake et al., Estuaries, 23, 2004, pp.437.
- 2) D. Claisse and Cl. Alzieu, Marine Pollution Bulletin, 54, 2007, pp. 395.
- 3) OECD, TG202 (ミジンコ類急性遊泳阻害試験及び繁殖試験) 1984.
- 4) S. J. Brooks et al., Environmental Toxicology and Chemistry, 26, 2007, pp.1756
- 5) W. R. Arnold et al., Environmental Toxicology, 21, 2006, pp. 65.
- 6) S. G. S. DePama et al, Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 2011, pp23.
- 7) USEPA, 2003 Draft Update of Ambient Water Quality Criteria for Copper, 2003.
- 8) 加茂ら、環境毒性学会誌、14, 2011, pp.127
- 9) 加茂ら、環境毒性学会誌、14, 2011, pp.25

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 山口 良隆, 国内港湾における銅化合物の存在状態について-船底防汚塗料中の銅の環境リスク評価に向けて-, 海上技術安全研究所報告、査読無、第15巻第2号、2015、pp.211-218

(2) Y. Yamaguchi, T. Nishino, M. Ohji, H. Harino, H. Okamura, The measurements of copper concentrations with a potentially toxic fraction in Tokyo Bay. The Proceedings of the International Symposium on Marine Engineering, 査読有、2014、p130(6ページ)

〔学会発表〕(計1件)

(1) Y. Yamaguchi, Behavior of antifouling chemicals in the marine environment, The seminar of the Institute of Advanced Marine Materials, The Harbin Engineering University, 19 Sep. 2014, Harbin (China)、2014、招待講演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 良隆 (YOSHITAKA YAMAGUCHI)
海上技術安全研究所 その他部局等 研
究員
研究者番号：20344236

(2)研究分担者

石村 恵以子 (ISHIMURA EIKO)
海上技術安全研究所 その他部局等 研
究員
研究者番号：20415798
大地 まどか (OHCHI MADOKA)
東京農工大学・(連合)農学研究科(研究
員)准教授
研究者番号：40447511