

228 カキ発生に与える有機スズ代替船底防汚剤の影響

広島市衛生研究所 ○常政 典貴 神戸大学大学院 海事科学研究科 岡村 秀雄

1. はじめに

従来、船底防汚剤として使用されてきた TBT 等の有機スズ化合物 (TBT) は、その高い残留性、生物蓄積性、毒性から問題となり、2008 年 9 月には世界的に使用禁止となった。我が国においては、1990 年以降、TBT の製造輸入は中止されており、それに代わる有機スズ代替防汚剤が使用されてきた。これらの物質は、有機スズ化合物に比べて分解性が良いと言われて来たが、近年、底質への蓄積例が報告され、海洋生物への影響が懸念される状況となっている。本研究では、広島湾に生息するカキを用い、カキ受精卵に及ぼす 3 種類の有機スズ代替化合物および 2 種類の有機スズ化合物の毒性を評価した。

2. 実験材料および実験方法

供試防汚剤は Irgarol 1051: 2-methylthio-4-tert-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine (イルガロール)、Diuron: 3-(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea (ジウロン)、Sea-nine 211; 4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H)isothiazolone (シーナイン) の 3 種類とした。また比較のために、有機スズ化合物の TBT、TPT も用いた。それぞれジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して、1000 mg/L の原液を作成し、人工海水で多段階に希釈して試験溶液とした。

カキは 2008 年 7 月に広島湾で採取したマガキ (*Crassostrea gigas*) を用いた。毒性試験には 24 穴マイクロプレートを用い、試験溶液 1ml に卵を加えた後に、精子を添加して受精させ、25°C の暗所で 24 時間、静置培養した。2 時間後、各ウェルの受精卵 200 個の発生状況を顕微鏡で観察した。24 時間後、2% アルカリ性ホルマリン溶液 25 μ l を各ウェルに添加して固定後に顕微鏡で観察し、200 個の受精卵について D 型幼生の数、D 型幼生にならなかった数、奇形卵の数をそれぞれ計数した。これをもとに LC10 (10% 死亡濃度) および LC50 (50% 死亡濃度) を ECOTOX-STATICS プログラム (日本環境毒性学会) を用いて計算した。

3. 実験結果および考察

Fig. 1 には試験開始 2 時間後および 24 時間後の受精卵を示す。A, B が 2 時間後、C, D, E が 24 時間後の観察結果である。このように、受精 2 時間後の卵分割および 24 時間後の D 型幼生への発生を毒性指標として、防汚剤の毒性を評価した。

カキ受精卵の観察結果から、各供試防汚剤の LC10、LC50 を計算した (Table 1)。イルガロールおよびジウロンは最高供試濃度 (1000 μ g/L) においてもカキ受精卵に影響を及ぼさなかった。24 時間後の LC50 を比較すると、シーナインが 13 μ g/L であるのに対し、TBT、TPT はそれぞれ 2.5 μ g/L、3.3 μ g/L であり、有機スズ化合物の方が 4 ~ 5 倍程度、毒性が強かった。24 時間後の LC10 では、シーナインが 1.3 μ g/L であるのに対し、TPT はほぼ同程度、TBT は約 2 倍の毒性を示した。奇形は TBT、TPT のみならず、シーナインでも確認された。しかも、高濃度だけでなく低濃度においても、生存している個体すべてが奇形となっており、今後の発生段階で影響の出ることが予想される。以上の結果から、カキ受精卵の発生に及ぼす影響に関しては、シーナインと TPT はほぼ同程度の毒性を示すことが明らかとなった。

Table 1 Lethal effects of antifouling compounds on oyster embryo				
	2h		24h	
	LC10	LC50	LC10	LC50
TBT	2.7 (2.6-2.9)	14 (13-16)	0.69 (0.64-0.70)	3.3 (2.9-3.7)
TPT	4.1 (3.9-4.3)	13 (12-14)	1.4 (1.4-1.5)	2.5 (2.4-2.7)
Sea-nine 211	4.3 (4.0-4.5)	27 (24-30)	1.3 (1.2-1.3)	13 (11-15)
Diuron	>1000	>1000	>1000	>1000
Irgarol 1051	>1000	>1000	>1000	>1000
LC50 : 50% lethal concentration(μ g/L) (): 95% confidence interval LC10 : 10% lethal concentration(μ g/L)				

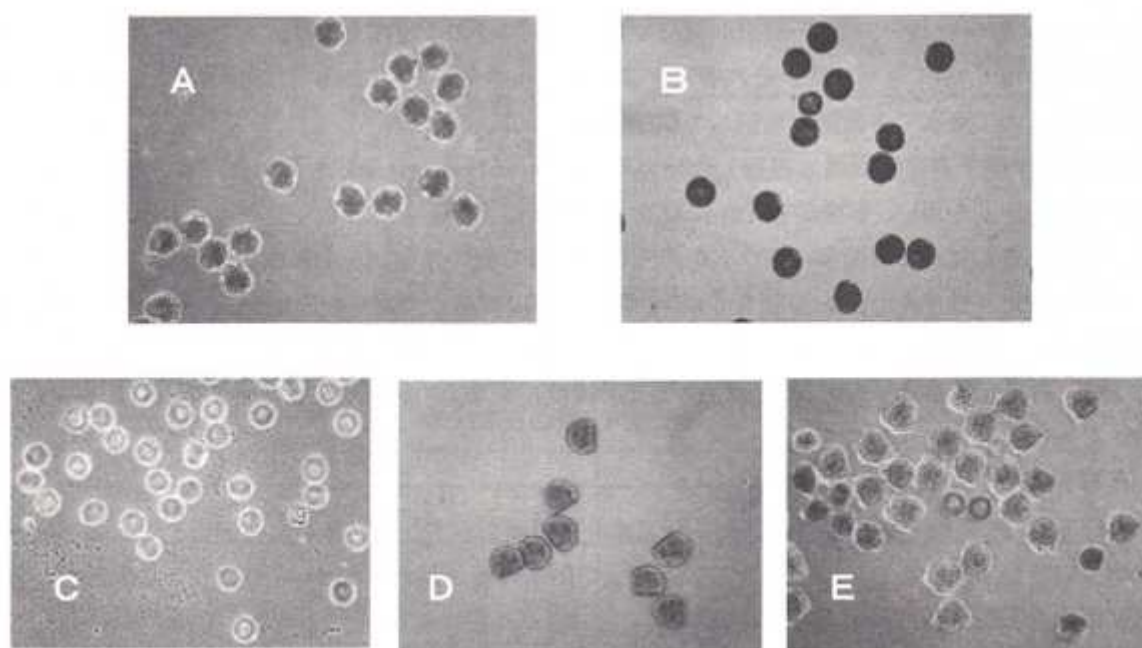


Fig. 1 試験開始 2 時間後および 24 時間後の受精卵

A : 卵分割が進んでいるカキ卵 (Sea-nine, 1.0ppb, 2hour) 、 B : 卵分割が見られないカキ卵 (TBT, 100ppb, 2hour) C : まったく発生が進んでいないカキ卵 (Sea-nine, 100ppb, 24hour) 、 D : 正常な D 型幼生 (Control, 24hour) E : 奇形のある D 型幼生 (TBT, 10ppb, 24hour)

 : 100 μ m

An aerial photograph of a coastal region, likely in Japan, showing a river flowing into the sea. The river is dark and winding, surrounded by green vegetation and some urban development. The text is overlaid on the upper part of the image.

カキ発生に与える 有機スズ代替防汚剤の影響

第79回学術講演会
2009年9月18日
メルパルク広島

広島市衛生研究所

○常政 典貴

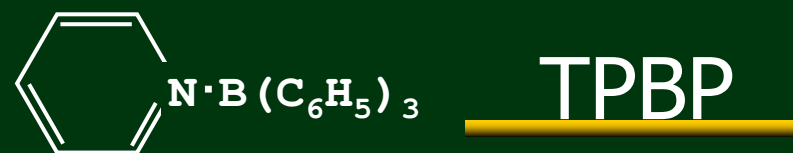
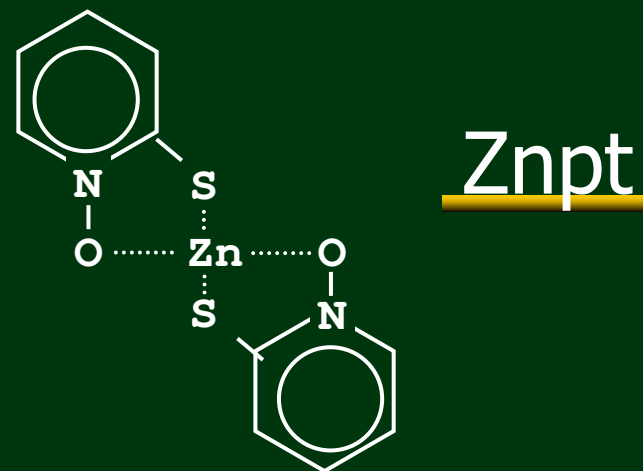
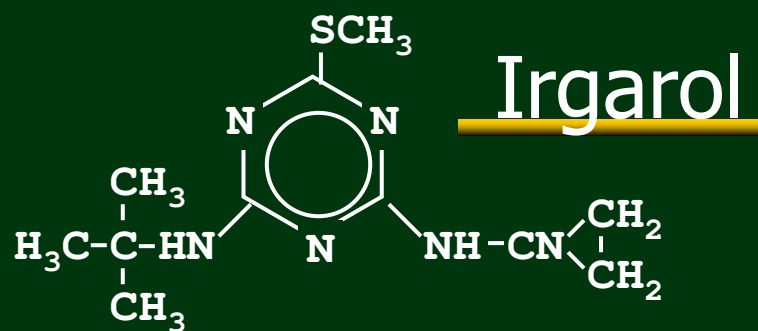
神戸大学大学院 海事科学研究科

岡村 秀雄

研究の背景と目的

- ・ 有機スズ化合物は、高い環境残留性、毒性及び生物蓄積性から使用が禁止されている。
- ・ 有機スズ化合物に代わる代替物質の研究が行われ、現在はそれらが使われている。
- ・ 本研究は、代替防汚剤の環境安全性を明らかにすることを目的とする。

Structures of antifouling compounds



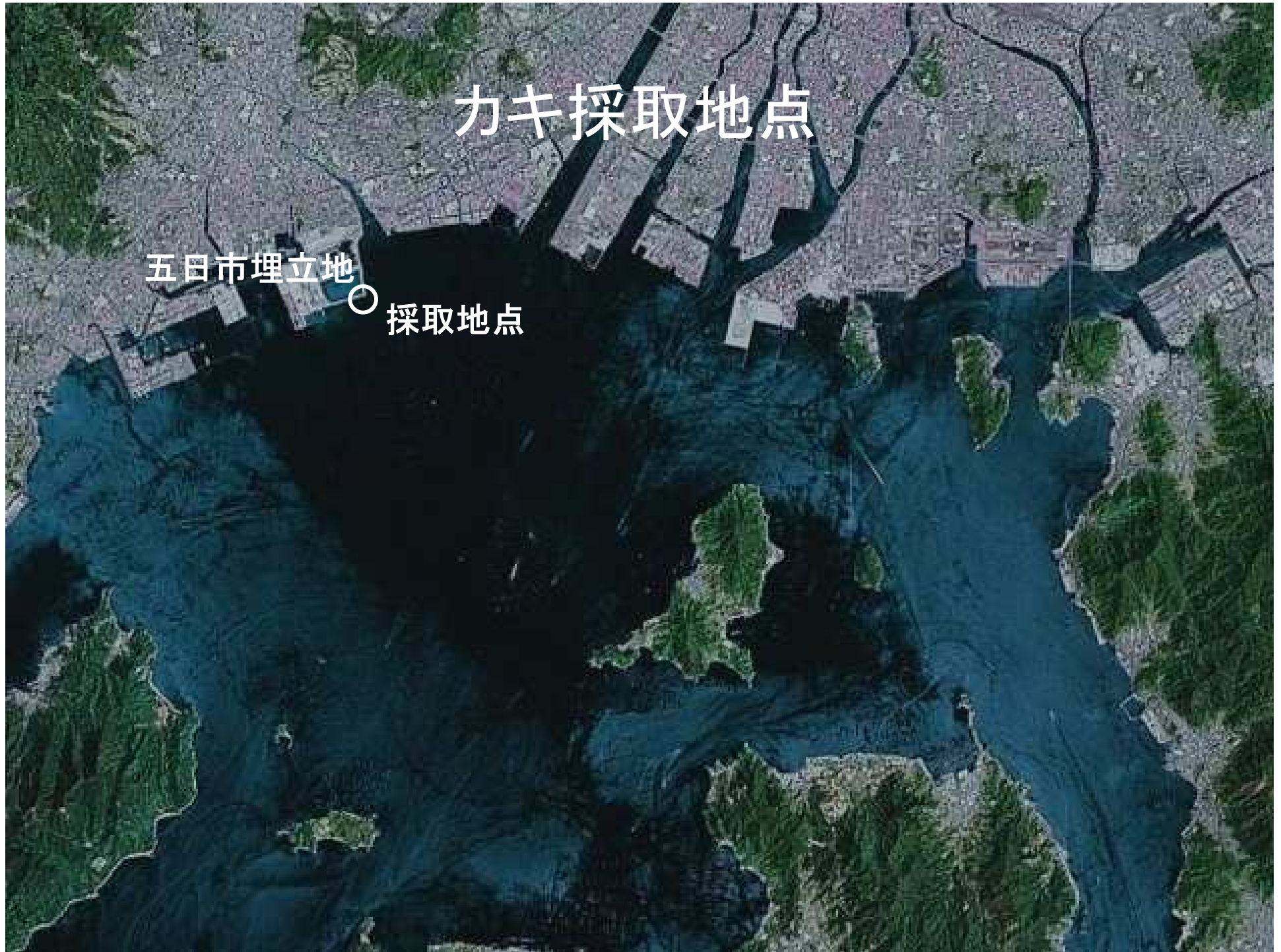
2.1 試薬及び実験材料

- ・供試防汚剤は、Irgarol 1051(イルガロール)、Diuron(ジuron)、Sea-nine211(シーナイン)とした。
また比較のために、TBT、TPTの試験も行った。
- ・カキは、五日市埋立地沖の防波堤に付着しているものを用いた。

力牛採取地点

五日市埋立地

採取地点









2.2 実験機器

- ・生物顕微鏡はOLYMPUS CK40を使用し、100倍で検鏡した。
- ・写真撮影時には、画像解析ソフトSHIMADZU moticam 2000を使用した。

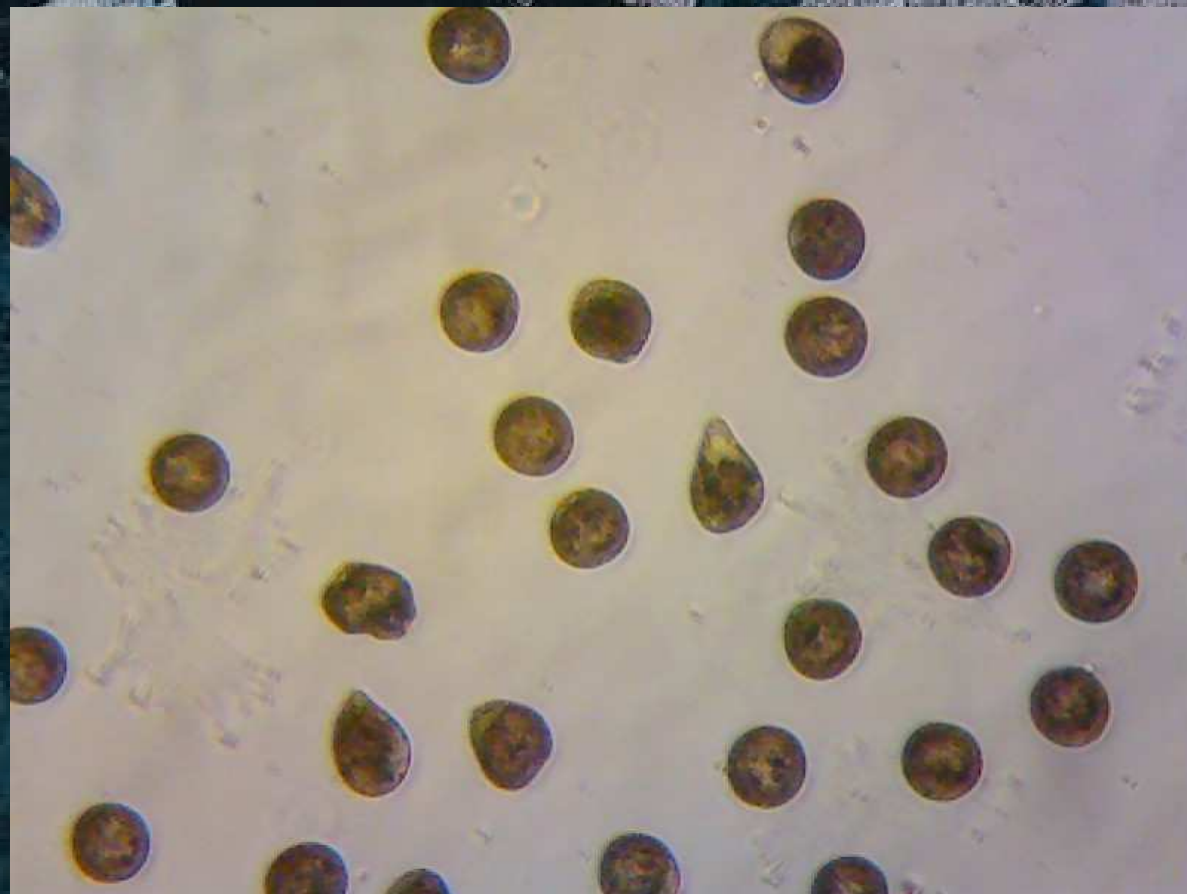
2.3 毒性試験の手順

- ・人工海水は、ダイゴ人工海水SPをイオン交換水に溶解して作成し、2時間程度ばっ気した。
- ・取り出した生殖器は、雄の場合はシャーレに取り、冷蔵庫に保管した。雌の場合は、人工海水を入れたビーカーの上に目の細かいネットを敷き、その上で切開し、人工海水で洗いながら卵を取り出した。
- ・卵は、人工海水で数回洗浄した。
- ・供試物質はジメチルホルムアミドに溶解後、人工海水で希釈し、多段階の濃度に調整した。

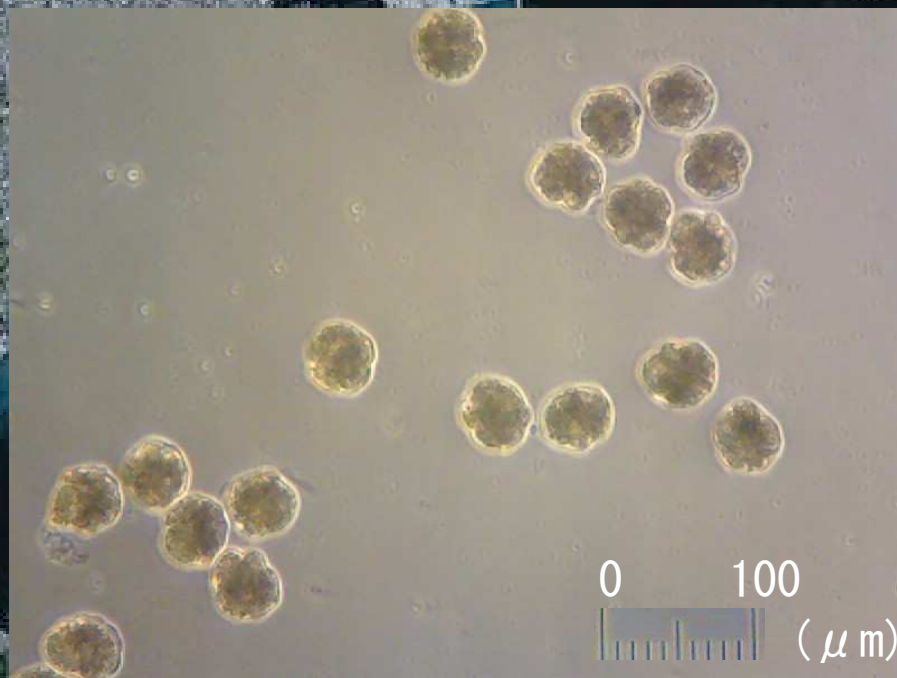
2.3 毒性試験の手順つづき

- ・試験溶液を24穴マイクロプレートに1mlずつ入れた。同濃度につき3ウェルを用いた。
- ・成熟卵を各ウェルに25 μ lずつ入れた。
- ・精子を人工海水で1000倍に希釈し、各ウェルに25 μ lずつ入れた。
- ・2時間後、ウェルを顕微鏡で観察し、卵の発生状況を200個確認した。
- ・24時間後、ホルマリン溶液で固定後、顕微鏡で観察し、D型幼生の奇形の有無と、幼生にならなかった卵の数を合計200個確認した。

実験前のカキ卵



実験開始後2時間後のカキ受精卵

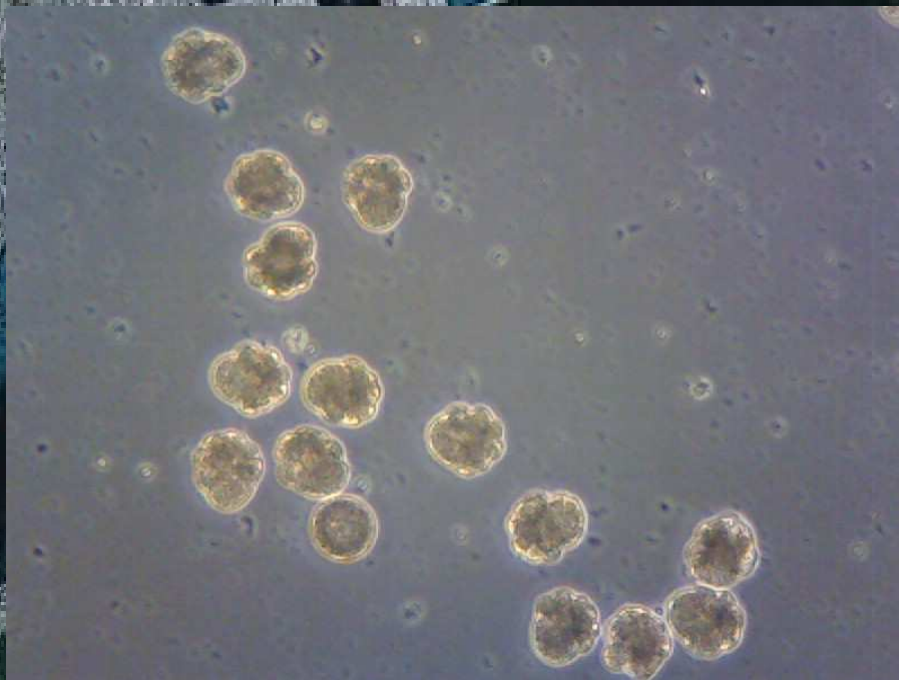


発生が進んでいるカキ受精卵
(Sea-Nine211, 1.0ppb, 2hour)

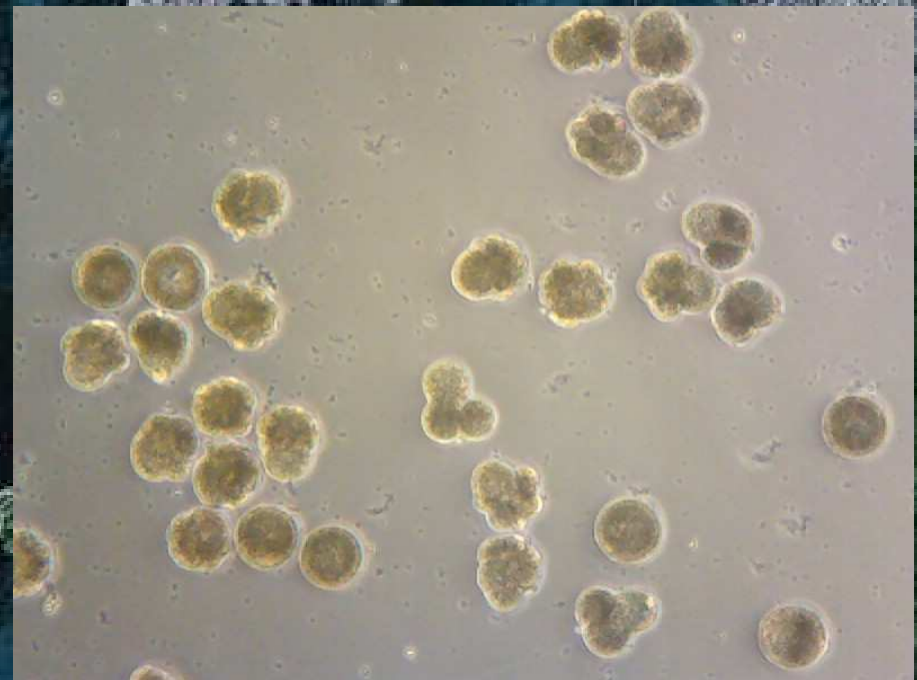


発生が見られないカキ卵
(TBT, 100ppb, 2hour)

実験開始後2時間後のカキ受精卵

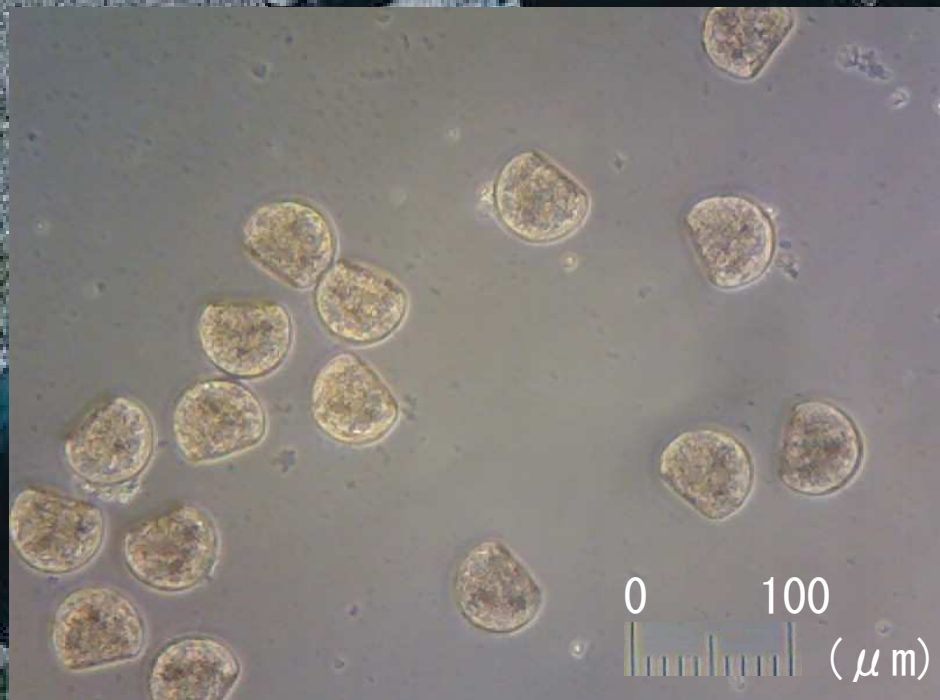


(TBT, 1ppb, 2hour)



(TBT, 10ppb, 2hour)

実験開始24時間後のカキ受精卵



D型幼生となったカキ受精卵
(Control, 24hour)



発生が進んでいないカキ受精卵
(Sea-Nine211, 100ppb, 24hour)

毒性の比較

Table Leathal effects of antifouling compounds to oyster embryo

($\mu\text{g}/\ell$)	2h		24h	
	LC10	LC50	LC10	LC50
Sea-nine211	4.3(4.0-4.5)	27(24-30)	1.3(1.2-1.3)	13(11-15)
TPT	4.1(3.9-4.3)	13(12-14)	1.4(1.4-1.5)	2.5(2.4-2.7)
TBT	2.7(2.6-2.9)	14(13-16)	0.69(0.64-0.70)	3.3(2.9-3.7)
Diuron	>1000	>1000	>1000	>1000
Irgarol	>1000	>1000	>1000	>1000

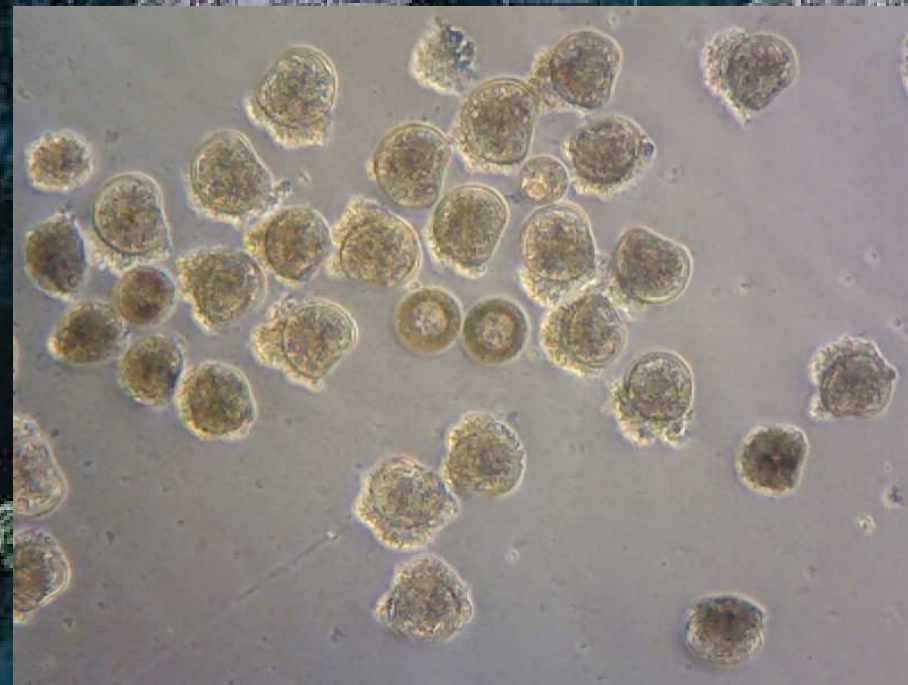
LC10 : 10%の個体が死亡する濃度

LC50 : 50%の個体が死亡する濃度

D 型 幼 生



正常なD型幼生
(Control, 24hour)

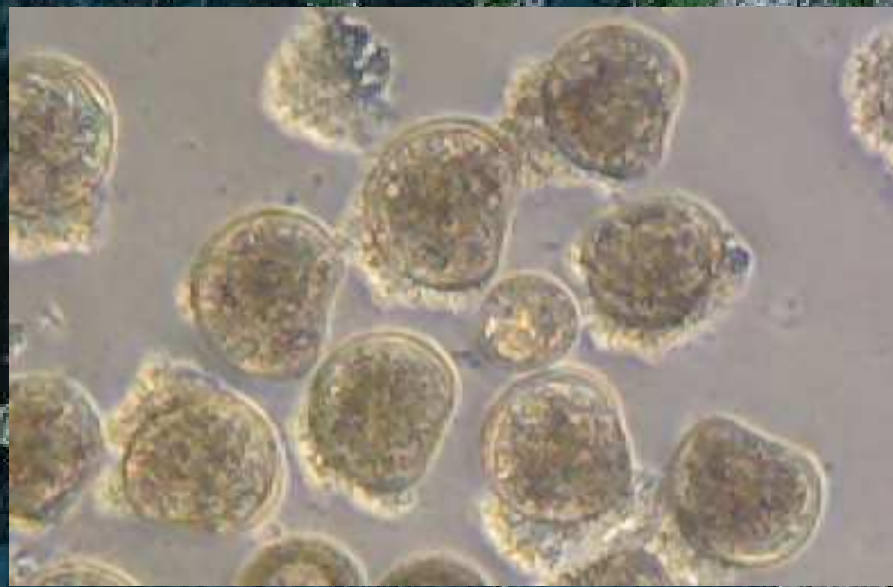


奇形を生じたD型幼生
(TBT, 5ppb, 24hour)

D 型 幼 生

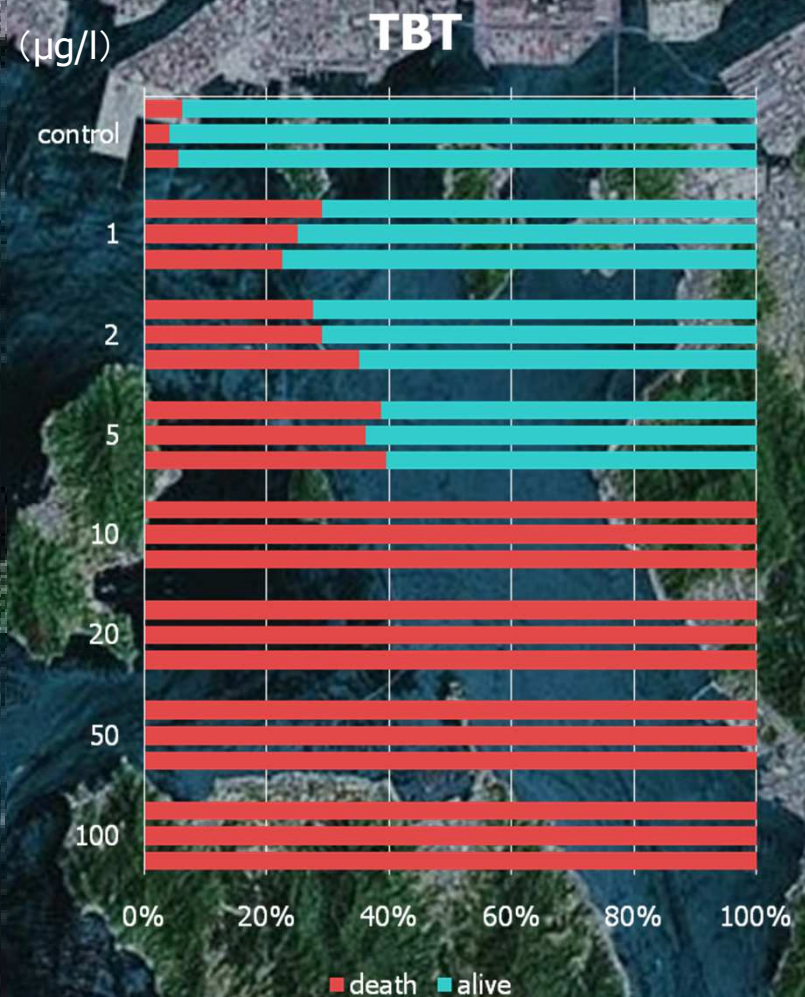
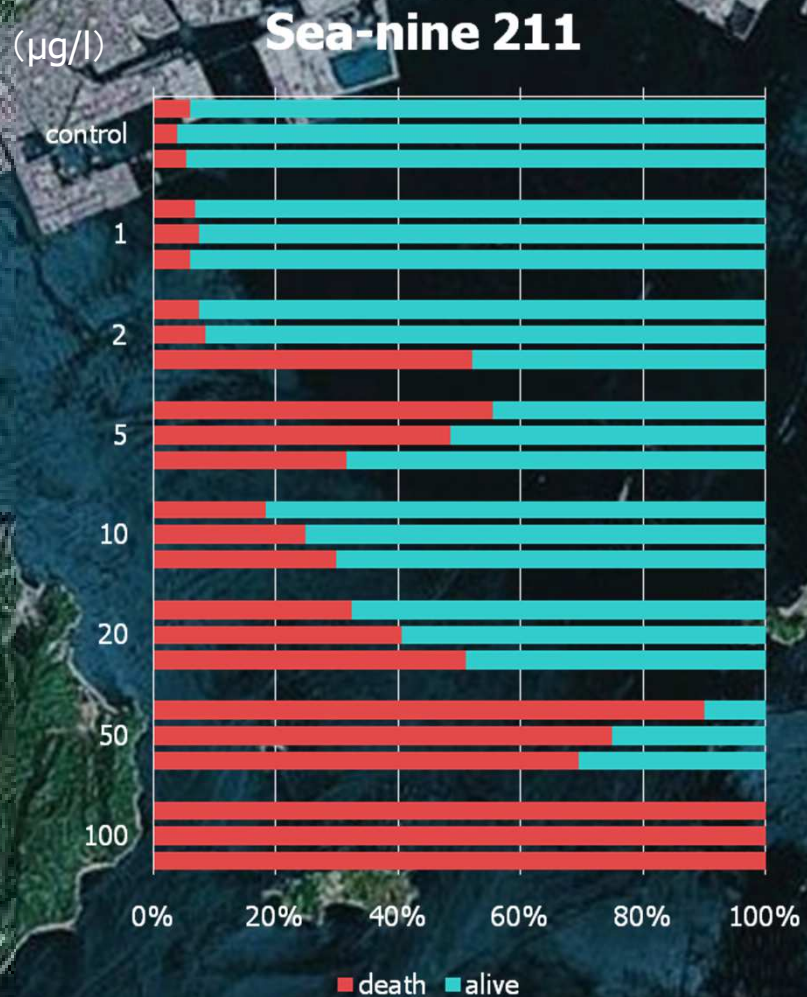


正常なD型幼生



奇形を生じたD型幼生

24時間後の生存率と奇形率



24時間後の生存率と奇形率

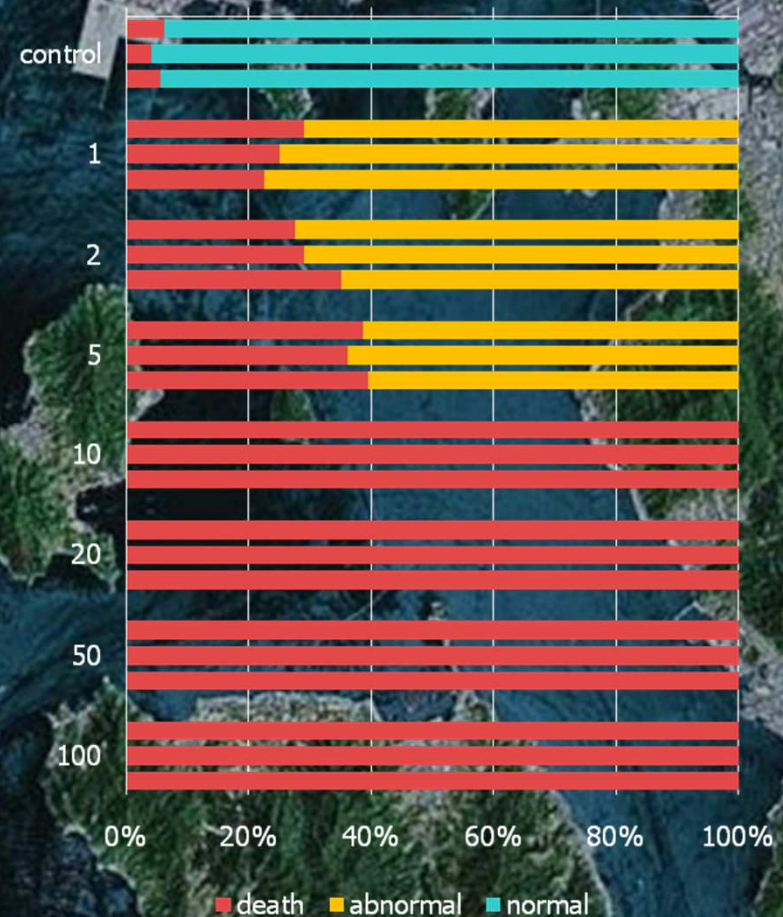
($\mu\text{g/l}$)

Sea-nine 211



($\mu\text{g/l}$)

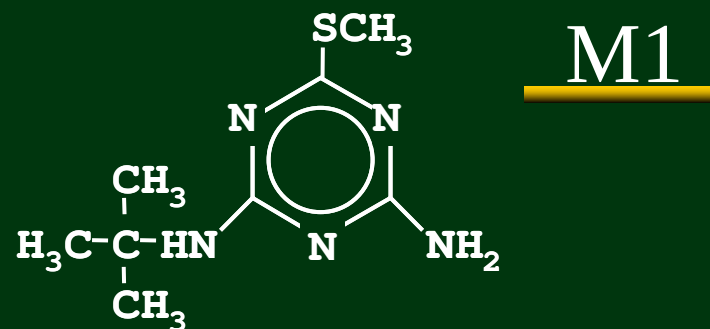
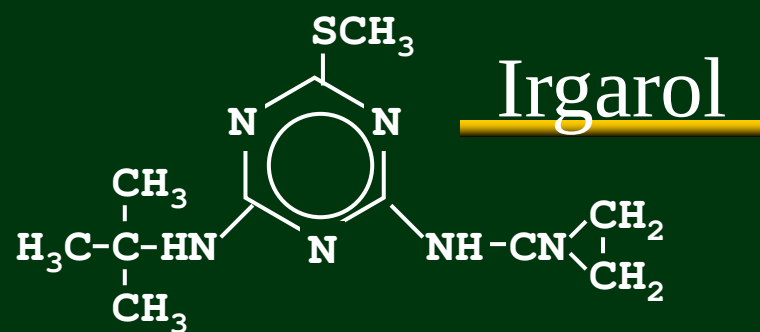
TBT



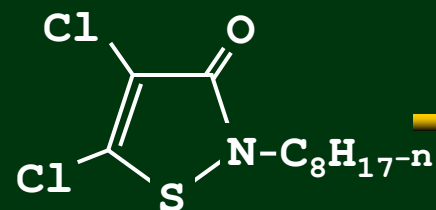
まとめ

- ・カキ受精卵を用いて、イルガロール、ジウロン、シーナイン、TBT、TPTの毒性試験を行った。
- ・イルガロール、ジウロンの毒性は弱く、シーナインはTPTとほぼ同程度の毒性があることが明らかとなった。
- ・生き残ったD型幼生のほとんどが奇形となっており、その後の発生に影響が出る可能性が示唆された。

Structures of antifouling compounds



Diuron



Sea-Nine 211