

2 2

助成番号 0022

水圏生態系における新規防汚剤の究極的運命

助成研究者：岡村 秀雄 (岡山大学 資源生物科学研究所)
共同研究者：青山 勳 (岡山大学 資源生物科学研究所)

船底や漁網等の防汚を目的とした有機スズ化合物の使用が厳しく制限されるようになって約10年が経過し、この間に代替の新規防汚剤が開発され、使用されている。しかし、我が国で生産および使用されている代替防汚剤の種類や量等に関するデータは公表されておらず、これらの水環境における運命や生態系に及ぼす影響についてのオープンデータは少ない。新規防汚剤の一つである Irgarol 1051 (2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine) はヨーロッパの水系において1990年代初頭から検出されはじめ、1999年には瀬戸内海およびオーストラリアの海水中での残留が報告され、世界的に広く使用されている防汚剤の一つである。我々は既に、本物質がある経路によって容易に分解して安定な分解産物 M1 (2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-amino-*s*-triazine) を生成すること、Irgarol および M1 が瀬戸内海の海水中に残留すること、両化合物は共に水圏の一次生産に対して強い影響を及ぼすことを報告した。本研究では、水圏生態系における Irgarol の究極的運命を評価すること、また数種類の新規防汚剤が魚類に及ぼす影響を評価することを目的として研究を行った。超純水に溶解した Irgarol は紫外線 UV-A 照射によって分解しなかったが、ベンゾフェノン、天然腐植酸、過酸化水素が共存した場合には容易に光分解した。一方、M1 はベンゾフェノンおよび過酸化水素の共存によって光分解したが、天然腐植酸が共存しても分解しなかった。供試腐植酸は Irgarol を光分解して M1 を生成したが、生成した M1 に対しては光増感作用を示さなかった。分解実験の結果から、M1 は親化合物よりも紫外線に対する安定性が高いので、さらに光分解を受けることなく最終的に底質に移行するものと考えられる。このように、天然水中に普遍的に存在している天然腐植物質は、塗料から水に溶出した Irgarol の運命に決定的な影響を及ぼすことが示された。次に、魚類に対する影響を評価するために浮遊培養細胞 CHSE-sp を用いた毒性試験を開発した。この培養細胞を用いた試験およびニジマス個体を用いた初期生活段階試験で評価した5種類の新規防汚剤の毒性の強さには高い相関が認められた。そこで、数日間で開催可能な魚類細胞試験は約1ヶ月間を要する魚類個体試験のスクリーニングとして有用であると考えた。防汚剤の魚毒性は、強いグループ(Zinc pyrethione, Copper pyrethione)、弱いグループ(Irgarol, Diuron)、その中間(KH101)の3グループに分類できた。供試防汚剤のいくつかは化学分析が困難であるので、このような簡便迅速なバイオアッセイを活用して環境内運命を評価することが期待される。

2 2

助成番号 0022

水圏生態系における新規防汚剤の究極的運命

助成研究者：岡村 秀雄 (岡山大学 資源生物科学研究所)

共同研究者：青山 勳 (岡山大学 資源生物科学研究所)

1. 研究目的

船舶や魚網用の防汚剤として用いられてきた有機スズ剤の使用は 1980 年代後半から世界的に厳しく制限され、現在はその代替品として新規防汚剤が使用されている。しかし、実際に用いられている防汚剤の種類や使用量に関する情報はオープンになっていない。使用されている新規防汚剤そのものの情報が十分に公表されていないだけでなく、さらにその環境内運命や生態系影響に関する知見はほとんどない。したがって、これら新規防汚剤による汚染状況を把握し、水圏生態系に及ぼす影響を総合的に評価することは、我が国の国土保全を図り、化学物質の国際管理を図る上で極めて緊急を要する課題である。

新規防汚剤のひとつである Irgarol 1051 (イルガロール 1051) は、除草剤として使用されている s-triazine 系化合物に属する。環境試料中の Irgarol 1051 の残留分析はヨーロッパ各地で行われており、地中海北部・西部沿岸(Readman *et al.*, 1993; Tolosa *et al.*, 1996; Ferrer *et al.*, 1997)、イギリス東部・南部沿岸(Gough *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1996; Scarlett *et al.*, 1997)、スイスの湖 (Toth *et al.*, 1996)、スウェーデン沿岸(Dahl and Blanck, 1996)において報告されてきた。最近、瀬戸内海沿岸港湾部(Liu *et al.*, 1999b)、オーストラリアの北東部沿岸(Scarlett *et al.*, 1999)、ドイツ北部沿岸(Biselli, *et al.*, 2000)においても残留が報告された。これらの報告によって、本物質がヨーロッパだけでなくアジアやオセアニアにおいても使用されていることが明らかとなった。しかしながら、本物質が水生生物に及ぼす影響についてのオープンデータは少なく、水環境における本物質の運命に関する研究は皆無である。このような状況の中、我々は既に、本物質が白色腐朽菌によって生分解して残留性の高い分解産物 M1 を生成することを報告し (Liu *et al.* 1997)、この分解反応が水銀化合物による加水分解(Liu *et al.*, 1999a)、また太陽光紫外線による光分解 (Okamura *et al.*, 1999) によっても生じることを報告した。その後、親化合物と分解産物 M1 が共に瀬戸内海沿岸海水に残留すること (Okamura *et al.*, 2000a)、海藻やウキクサなど植物に対する影響が強いので水圏生態系に対する影響が懸念されること(Okamura *et al.*, 2000b)を報告してきた。

本研究では我が国で使用されている新規防汚剤の環境管理のための基礎的知見を得ることを目指し、水圏生態系における新規防汚剤の究極的運命を明らかにするとともに生態系に及ぼす影響を評価することを目的として、以下の課題について検討した。

1) Irgarol 1051 の光分解性評価

2) 新規防汚剤が魚類に及ぼす影響評価

2. 研究方法

2.1 Irgarol 1051 およびその分解産物 M1 の光分解性評価

2.1.1 供試化学物質

Irgarol 1051 とその分解産物 M1 を供試した。これら供試物質を水に溶解させ、既知の光増感物質であるベンゾフェノン、天然の光増感物質である腐植酸（土壌由来の標準フミン酸 (HA) およびフルボ酸(FA)、河川水由来のフルボ酸)、活性酸素である過酸化水素 (H_2O_2) の共存下で紫外線ランプを照射した。土壌（イノガシラ、ダンド）由来の4種類の腐植酸は日本腐植物質研究協会から購入し、岡山県高梁川河川水由来の2種類のフルボ酸は姫路工業大学の杉山裕子博士が分離精製したものを分譲頂いた。腐植酸の供試濃度は全有機態炭素量として 5 mg TOC/L (約 10 mg dry weight/L) とした。

2.1.2 光分解実験

水中での Irgarol 1051 およびその分解産物 M1 の光分解性を、UV-A ランプを用いて評価した。アセトニトリルに溶解して 10,000 mg/L に調製した Irgarol 1051 あるいは M1 を、1 mg/L となるよう超純水に添加した。供試水を 50 mL の共栓付ガラス遠心管に入れ、水平方向から UV-A ランプ (20 w, National) を 48 時間連続照射した。ランプ側のガラス遠心管表面の紫外線強度が 2000 $\mu W/cm^2$ となるよう、ランプの位置を調製した。この紫外線強度は初夏の太陽光紫外線強度に匹敵する。UV-A ランプは 352nm に極大発光スペクトルを有しており、太陽光近紫外線 (UV-A 領域: 波長 320~400 nm) を模擬するために用いた。この照射光にわずかに含まれる UV-B 領域の紫外線 (波長 290~320 nm) はガラス遠心管によって遮蔽されるため、内部の水試料には到達していないと考えられる。光照射開始時から 48 時間後まで試料を定期的に採取し、Irgarol 1051 および M1 濃度を HPLC により定量し、各物質の分解性を評価した。3種類の物質 (ベンゾフェノン、天然腐植酸、 H_2O_2) を共存させた場合には、Irgarol 1051 濃度だけでなく、分解によって生成した M1 の濃度も定量した。

2.2 新規防汚剤が魚類に及ぼす影響評価

2.2.1 供試化学物質

供試新規防汚剤として、Irgarol 1051 (2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine)、KH101 (pyridine triphenylborane)、diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)、Zinc pyriithione (ZnPT)、Copper pyriithione (CuPT) を用いた。これらの化合物は新規防汚剤として紹介されている (米原、2000)。毒性を比較するための標準化学物質として、界面活性剤 (SDS) および 6 種類のトリアジン系除草剤 (Atrazine、Simazine、Simetryn、Terbutryn、Terbutylazine、Terbumeton) を用いた。SDS は水に溶解し、それ以外は DMSO に溶解して用いた。

2.2.2 魚類細胞試験

キングサーモン *Oncorhynchus tshawytscha* 胚由来の浮遊培養細胞 CHSE-sp を供給

するALPS培養細胞キットを使用した（羽曾部、1999）。供試した魚類浮遊培養細胞は、東京水産大学の羽曾部正豪博士が魚類培養細胞としてはじめて樹立した株化細胞である（Karasawa et al., 1991）。毒性試験方法を開発するため、次の3点について最適な試験条件を検討した。

- ① 初期細胞数（96穴プレートでの1ウェルあたりの細胞数の決定）
- ② アラマブルーとの反応時間（アラマブルー添加後の測定時間の決定）
- ③ 有害化学物質への暴露時間（暴露時間の決定）。

まず、初期細胞数とアラマブルーとの反応時間を検討した。初期細胞数を48,000 cells/well、24,000 cells/well、9,600 cells/wellの3段階に設定し、マイクロプレート各ウェルへ100 μ Lずつ播種して接着伸展させた後に10%アラマブルーを添加した。アラマブルー添加後の最適測定時間を決定するために、48時間後まで経時的に吸光度を測定した。次に、初期細胞数を20,000 cells/wellに調整し、SDS濃度を0,2,5,10,20 mg/Lの5段階に調整した培地に交換し（100 μ L/well）、24時間後に10%アラマブルーを含む培地に交換した。アラマブルーはミトコンドリア内で行われている呼吸代謝系の還元反応によって極大吸収波長が600 nmから570 nmにシフトするので、それぞれの波長の吸光度を測定することにより相対的に細胞量を知ることができるため、哺乳動物細胞、魚類細胞の生細胞量の評価に用いられている。

以上の基礎的条件検討の結果を踏まえ、新規防汚剤の毒性評価を次のとおり行った。H-WM-3培地（Hepes緩衝Waymouth培地、3%FBS）で培養した浮遊細胞の培養器をボルテックスミキサーで約5秒間振動させて細胞を回収し、ピペッティングにより単離分散させ、顕微鏡下で細胞数を計数した。96wellマイクロプレートの1well当たり細胞数が 2×10^4 cellsとなるように細胞数を調整して1well当たり100 μ Lを播種し、24時間インキュベートして細胞を培養器底面に十分に接着伸展させた。その後、培地を捨てて供試化学物質を含む無血清培地（H-WM-0）に置換した。供試化学物質に24時間暴露させた後に再び培地を捨て、10%アラマブルーを含むH-WM-3培地に置換した。24時間インキュベート後にマイクロプレートリーダーで各ウェルの吸光度（570nm-600nm）を測定した。培養および毒性試験は20°Cの暗所で行った。10%アラマブルーを含むH-WM-3培地（細胞を含まない）をブランクとし、すべてのウェルからブランクの吸光度を差し引いた後、1濃度区当たり8wellの吸光度の平均値を求めて対照区の吸光度に対する障害率を算出し、24-hour EC_{50} を求めた。

2.2.3 魚類初期生活段階試験

ニジマス *Oncorhynchus mykiss* の発眼卵を用いた試験を行った（菊地と若林、1995）。供試発眼卵は（株）林養魚場（福島県西白河郡）および（財）山形県水産振興協会 内水面水産センターから分譲いただいた。冷蔵宅配便で発眼卵約500粒を受け取った後、直ちにネोजン液の200倍希釈溶液で約15分間消毒した後、消毒済みの水槽に飼育水4L

に対し約 100 粒となるように分けて入れた。飼育水には、10 L の水道水にチオ硫酸ナトリウム 2.5 g を添加して脱塩素した水を使用した。10 °C の暗所でインキュベートし、2 ~ 3 日毎に飼育水を全量交換しながら発眼卵の孵化を待ち、7-10 日後に孵化した個体を毒性試験に供した。DMSO に溶解した供試化学物質（SDS を除く）を飼育水で 5 段階の濃度にそれぞれ希釈した試験区、および対照区の合計 6 段階の濃度区を設定した。1 L の試験水に対して 24 時間以内に孵化した個体 20 匹を入れて実験を開始し、水温 10 °C の暗所で 28 日間の暴露試験を行った。試験中の試験水の蒸発を防ぐためにビーカー上部を大型ろ紙で覆い、24 時間毎に供試魚の観察を行い、魚の生死を記録するとともに死亡魚を取り出した。試験水は 2~3 日毎（もしくは 1 週間毎）に新たに調製し、全量を交換した。Ecotox-Statics を用いたプロビット法により、各濃度区における死亡率から半数致死濃度（28-day LC_{50} ）を算出した。OECD による魚類初期生活段階試験方法では、受精直後の胚期から自由に餌を食べようになるまでの試験期間が定められているが、本研究では無給餌とし、前期仔魚期のみの試験とした。

3. 研究結果

3.1 Irgarol 1051 の光分解性評価

UV-A ランプによる照射下では、超純水に溶解させた Irgarol 1051 および M1 は 48 時間後にそれぞれ 95 %、80 % 以上が残存していた。暗所においては、Irgarol 1051 は共存物質（ベンゾフェノン、天然腐植酸、 H_2O_2 ）の存在に関わらず 48 時間後にもほぼ 100 % であったが、M1 は最高供試濃度のベンゾフェノン共存下（30 mg/L）において約 75 % となった。このように、供試物質は UV-A ランプによる紫外線に対して安定であり、また、暗所でも共存物質による分解は小さいと考えた。以下に、共存物質毎に Irgarol 1051 および M1 の分解結果を述べる。

3mg/L のベンゾフェノンが存在する場合、Irgarol 1051 は 24 時間後に 100 % が分解したが、M1 は 48 時間後に約 60 % が分解したのみであった（Fig.1）。ベンゾフェノンが 10mg/L 共存する場合、Irgarol 1051 は 8 時間後に完全分解したが、M1 は 8 時間後に 40 % が分解したのみで、48 時間後に完全分解した。このようにベンゾフェノンの共存によって Irgarol 1051 は比較

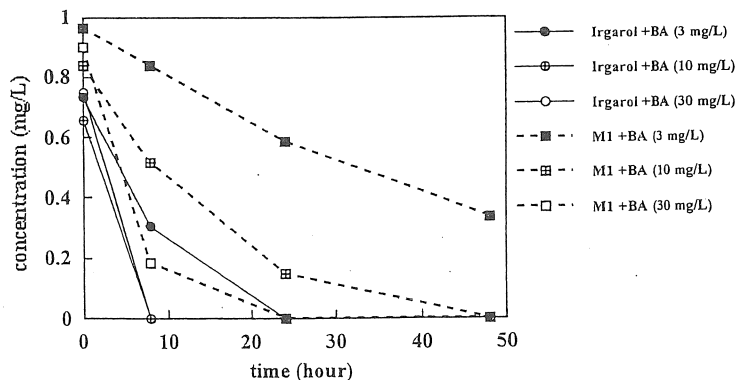


Fig.1 Photosensitizing degradation of antifouling compounds in the presence of benzophenone (BA) under UV-A irradiation.

的容易に分解したが、M1はこの分解反応をうけにくかった。

6種類の天然腐植酸(5 mg TOC/L)共存下では、Irgarolは48時間後に50%以上が分解したが(Fig.2)、M1はいずれの腐植酸共存下でも有意な分解は認められなかった。

Irgarol 1051の光分解によって同時に生成したM1濃度は経時的に増加し、土壌由来のフミン酸(HA-I)で最高濃度0.36mg/Lとなった(Fig.3)。

10 mg/Lの H_2O_2 が存在する場合、Irgarol 1051は48時間後に90%以上が分解したが、M1の分解

は10%程度であった。 H_2O_2 が100 mg/Lでは、Irgarol 1051は24時間後に完全分解したが、M1の分解は約60%であった。同じ H_2O_2 濃度の時、Irgarol 1051の光分解によって同時に生成したM1は6時間後に0.03 mg/Lとなり、24時間後には完全分解した。10 mg/Lの H_2O_2 濃度では、生成したM1濃度は24時間以降0.06~0.07 mg/Lであった。1 mg/Lの H_2O_2 濃度では、Irgarol 1051は30%が分解し、M1は経時的に増加して48時間後に0.03 mg/Lとなった。

3.2 新規防汚剤が魚類に及ぼす影響評価

ALPS培養系で供給されるCHSE-sp細胞を用いた毒性試験を開発するために、いくつかの条件検討を行った。初期細胞数が20,000 cells/well以上では、アラマブルーとの反応時間が24時間より長くなると吸光度が0.2前後となったので、この条件下で安定した測定が可能と考えた。界面活性剤SDSの影響を、試験実施日をかえて5回の繰り返しを行ったところ、24-hour EC_{50} は8.6(±2.0) mg/Lとなった。同じ魚類細胞を用いて細胞量をニュートラルレッドで評価した場合のSDSの24-hour EC_{50} は8.7 mg/Lと報告されており(Mori *et al.*1998)、アラマブルーを用いてもほぼ同じ値が得られた。

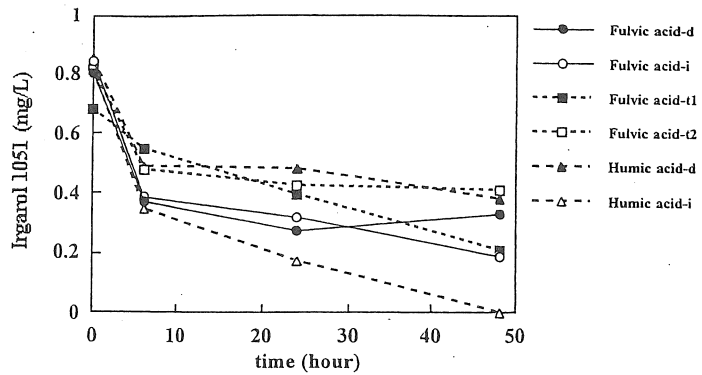


Fig.2 Photosensitizing degradation of Irgarol in the presence of humic substances under UV-A irradiation.

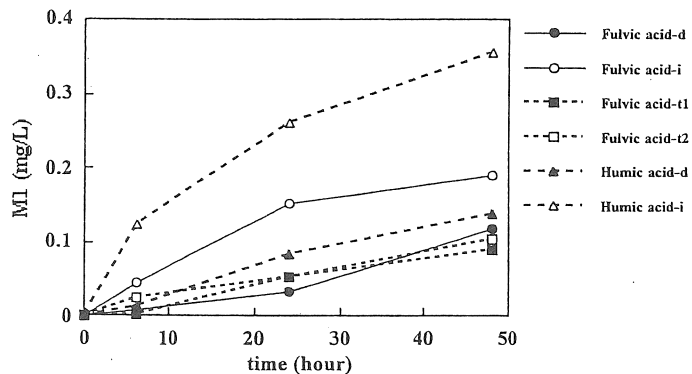


Fig.3 Production of M1 in the presence of humic substances under UV-A irradiation.

これらの条件検討の結果、毒性試験における初期細胞数を 20,000 cells/well、暴露時間を 24 時間、アラマブルー添加後の吸光度測定を 24 時間後とした。

ここで開発した試験法に基づき、5 種類の防汚剤が魚類細胞に及ぼす影響を評価した (Table 1)。5 種類の防汚剤のうち CuPT の毒性が最も強く (24-hour EC_{50} : 0.10 mg/L)、次いで ZnPT、KH101 であり、Irgarol 1051 と Diuron は同程度の毒性を示した。Irgarol 1051 の関連化合物として用いた 6 種類のトリアジン化合物はいずれも CHSE-sp 細胞に対して強い毒性を及ぼさなかった (24-hour EC_{50} > 100 mg/L)。孵化直後の個体を用いた前期仔魚期のニジマスの生存に及ぼす 5 種類の新規防汚剤の影響を同じ表 (Table 1) に示す。前期仔魚期の魚類個体に対しても CuPT の毒性が最も強く (28-day LC_{50} : 1.3 μ g/L)、ついで ZnPT、KH101、Irgarol 1051、Diuron であった。

Table 1 Toxicity of the new antifouling compounds to fish.

	CHSE-sp. 24-hour EC_{50} (mg/L)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> 28-day LC_{50} (mg/L)
Irgarol 1051	100 <	0.88 (0.46-1.3)
Diuron	50 <	0.84 (0.18-1.4)
KH101	1.4 (1.3-1.5)	0.042 (0.036-0.050)
ZnPT	0.18 (0.15-0.19)	0.002
CuPT	0.10 (0.09-0.11)	0.0013 (0.00030-0.0017)
SDS	8.6 (6.6-10.6)	nd

4. 考察

4.1 水環境における Irgarol 1051 の運命

超純水に溶解した新規防汚剤 Irgarol 1051 は UV-A 照射によってそれ自身は光分解しなかったが、ベンゾフェノン、天然腐植酸、 H_2O_2 が共存した場合には比較的容易に光分解した。共存物質の重量濃度で比較すると、Irgarol 1051 の分解が最も高かったのはベンゾフェノンであり、続いて、 H_2O_2 、天然腐植酸であった。M1 はベンゾフェノンおよび H_2O_2 の共存によって光分解したが、天然腐植酸が共存しても分解しなかった。Irgarol 1051 の光分解によって同時に生成した分解産物 M1 は、親化合物よりも紫外光に対して安定であった。ベンゾフェノンは光増感物質として知られており、最近では環境ホルモン様作用が懸念されている環境汚染物質である。 H_2O_2 は活性酸素の一つであり、紫外光によってヒドロキシラジカルを生成することが知られている。ベンゾフェノンおよび H_2O_2 は共に実環境中では通常、極微量で検出されるが、ここでは極めて高濃度の溶液を用いて照射実験を行った。これに対して、本研究で用いた腐植酸はすべて天然由来の化合物 (4 種は土壌由来、2 種は河川水由来) であり、水環境に存在する濃度で光分解実験を行っ

た。紫外線ランプを用いた室内実験によって Irgarol 1051 が腐植酸の共存下で容易に分解して M1 を生成したことは、既に報告した太陽光下での野外実験の結果 (Okamura *et al.*, 1999) を支持する、つまり、これら供試腐植酸が天然の光増感物質として作用することを示すものである。この実験結果から、環境水中に普遍的に存在している天然の腐植物質は塗料から水に溶出した Irgarol 1051 の運命に決定的な影響を及ぼしていると考えられ、以下のことが推測された。

- ① 水の表層において太陽光近紫外線と天然腐植物質との光増感反応によって Irgarol 1051 は光分解し、同時に M1 を生成する。
- ② 生成した M1 は、さらに太陽光分解をうけにくい。
- ③ M1 は最終的には底質に移行、残留する。

4.2 新規防汚剤の生態系影響

5 種類の防汚剤は、いずれも魚類培養細胞に対するよりも前期仔魚期の魚類個体に対して強い毒性を示した。これら 2 種類の魚類試験から得られた防汚剤の毒性の強さ (24-hour EC_{50} と 28-day LC_{50}) を両対数軸上にプロットしたところ、高い相関 (相関係数 $r=0.99$) が認められた。このことは、約 1 ヶ月間を要する魚類個体試験を数日間で実施可能な魚類培養細胞試験に代替できる可能性を示している。ALPS 培養系細胞は魚類では初めて樹立された浮遊培養細胞であり、接着性細胞を用いる際に必要となるトリプシン処理等の操作の煩雑さが無い。また、細胞量をアラマブルーを用いて測定することにより、従来から行われているニュートラルレッド等の色素を用いる場合に必要となる固定、抽出等の煩雑な操作を必要としない。このような簡便、迅速な魚類細胞アッセイは、新規防汚剤を初めとした多種多様な有害化学物質の毒性のスクリーニングに活用できることが期待される。

いくつかの防汚剤については魚類に対する毒性が報告されている。Irgarol 1051 のニジマス個体に対する 96-hour LC_{50} は 0.79 mg/L であり (Hall *et al.*, 1999)、本研究で得られた 28-day LC_{50} と同等である。EXTOXNET によると、Diuron のニジマスに対する 96-hour LC_{50} は 3.5 mg/L である。また、ZnPT の魚毒性 (催奇形性) は、ゼブラフィッシュに対する 7-day EC_{50} として 0.009 mg/L、メダカに対する 20-day EC_{50} として 0.005 mg/L が報告されている (Goka 1999)。ZnPT はニジマスに対しても強い毒性を示したことから、魚毒性についてさらに詳細な情報を得ることが必要である。これに対し、CuPT および KH101 の魚毒性に関するオープンデータはない。

5 種類の新規防汚剤が生態系に及ぼす影響を、文献値 (Okamura *et al.*, in preparation) とともに Fig. 4 に示す。微細藻類とウキクサに強い毒性を及ぼす防汚剤 (Irgarol1051、Diuron) は魚類に対する毒性が弱く、一方、微細藻類とウキクサに比較的毒性の弱い金属ピリチオン化合物 (CuPT、ZnPT) は魚類に対して強い毒性を及ぼす。これら 2 グループの化合物に対して、KH101 は植物と魚類の両方に対して比較的強い毒性を示す。このように防汚剤の生態系影響評価では、単一の生物種からの試験だけでは不十分であり、数

種類の生物種に対する試験結果を総合的に評価することが必要である。

5. 今後の課題

5.1 新規防汚剤の生物濃縮性評価

5.2 新規防汚剤の暴露解析

5.3 新規防汚剤のリスクアセスメントおよびリスクマネージメント

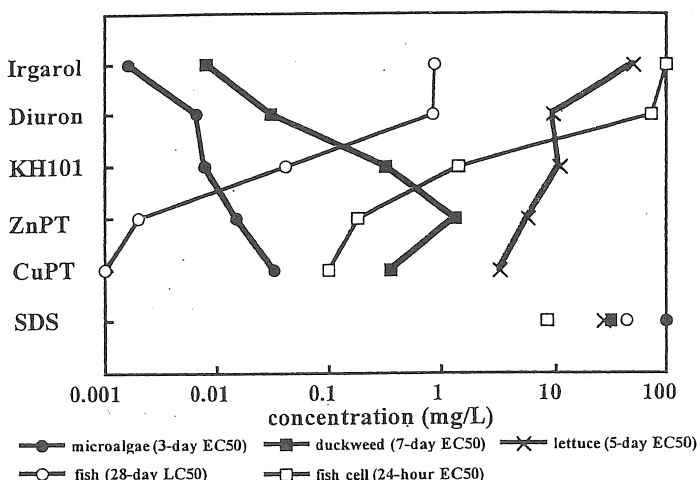


Fig.4 Ecotoxicity of the new antifouling compounds.

謝辞

本研究はカナダ環境省 Dr.Liu らとの共同研究の一部として行われた。魚類浮遊培養細胞(ALPS 培養細胞キット)は東京水産大学水族病理学研究室の羽曾部正豪博士より分譲いただき、毒性試験法の開発について終始暖かい御指導をいただいた。ニジマス発眼卵は福島県西白河郡の(株)林養魚場 林総一郎氏ならびに(財)山形県水産振興会 佐藤文彦氏から分譲頂いた。高梁川河川水由来の2種類のフルボ酸は姫路工業大学人間環境学部の杉山裕子博士が分離精製されたものを分譲頂いた。KH101は(株)北興化学工業から、Irgarol 1051はカナダ国立陸水学研究所からそれぞれ分譲頂いた。これらの方々には深く感謝申し上げます。

参考文献

Biselli,S., Bester,K., Huhnerfuss,H., and Fent,K. (2000) *Marine Pollut.Bull.* 40: 233-243
 Dahl,B. and Blanck,H. (1996) *Marine Pollut. Bull.* 32: 342-350
 Ferrer ,I., Ballesteros, B., Marco, M.P. and Barcelo, D. (1997) *Environ.Sci.Technol.* 31: 3530-3535
 Goka,K. (1999) *Environ.Res.Sect.A*, 81: 81-83
 Gough,M.A., Fothergill,J. and Hendrie,J.D. (1994) *Marine Pollut. Bull.* 28: 613-620
 Hall,L.W.Jr., Giddings,J.M., Solomon,K.R., Balcomb,R (1999) *Toxicol.* 29: 367-437
 羽曾部正豪 (1999) *化学と生物* 37: 547-551
 Karasawa,H, Hasobe,M, Fukuda,H, and Sano,T: (1991) *Bull .Eur. Ass. Fish Pathol,* 11:142-144

- 菊地幹夫, 若林明子 (1995) *東京都環境科学研究所年報*, 104-107
- Liu,D., Pacepavicius,G.J., Maguire,R.J., Lau,Y.L., Okamura,H., and Aoyama,I. (1999a)
Water Res. 33:155-163
- Liu,D., Pacepavicius,G.J., Maguire,R.J., Lau,Y.L., Okamura,H., and Aoyama,I. (1999b)
Water Res. 33: 2833-2843
- Liu,D., Maguire,R.J., Lau,Y.L., Pacepavicius,G.J., Okamura,H., and Aoyama,I. (1997)
Water Res. 31: 2363-2369
- Mori,M., Wakabayashi,M., Kaneko,Y., and Hasobe,M. (1998) *Fisheries Science*, 64
(6): 991-992
- Okamura,H., Aoyama,I., Liu,D., Maguire,R.J., Pacepavicius,G.J. Lau,Y.L. (2000a)
Water Res. 34 : 3523-3530
- Okamura,H., Aoyama,I. Takami,T., Maruyama,T., Suzuki,Y., Matsumoto,M.,
Katsuyama,I., Hamada,J., Beppu,T., Tanaka,O., Maguire, R.J., Liu,D., Lau,Y.L. and
Pacepavicius,G.J. (2000b) *Marine Pollut.Bull.* 40 (9): 754-763
- Okamura,H., Aoyama,I., Liu,D., Maguire,R.J., Pacepavicius,G.J., and Lau,Y.L. (1999)
J. Environ. Sci. Health B34: 225-238
- Readman,J.W., Kwong,L.L.W., Grondin,D., Bartocci,J., Villeneuve,J.P. and Mee L.D.
(1993) *Environ.Sci. Technol.* 27:1940-1942
- Scarlett,A., Donkin,P., Fileman,T.W., Morris,R.J. (1999) *Marine Pollut.Bull.* 38: 687-
691
- Scarlett,A., Donkin,M.E., Fileman,T.W., and Donkin,P. (1997) *Marine Pollut.Bull.* 34:
645-651
- Tolosa,I., Readman,J.W., Blaevoet,A., Ghilini,S., Bartocci,J. and Horvat,M. (1996)
Marine Pollut.Bull. 32: 335-341
- Toth,S., van Slooten,B., Spack,L., de Alencastro,L.F. and Tarradellas,J. (1996) *Bull.*
Environ. Contam.Toxicol. 57:426-433
- 米原洋一 (2000) *日本海水学会誌*, 54: 7-12
- Zhou,J.L., Fileman,T.W., Evans,S., Donkin,P., Mantoura,R.F.C. and Rowland,S.J.
(1996) *Marine Pollut.Bull.* 32: 599-608

Fate of the new antifouling compound in aquatic environment.

Hideo Okamura and Isao Aoyama

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Okayama, Japan

Summary

New antifouling compounds are intended as replacement for the highly toxic antifouling agent tributyltin, which has been regulated internationally. Irgarol 1051 (2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-cyclopropylamino-*s*-triazine), one of the new antifoulants, has emerged as a new aquatic contaminant in Europe, Australia, and Japan with the recent fall in ambient concentrations of organotins. We reported that the compound degraded via three different pathways including biodegradation by white rot fungi, mercuric chloride-catalyzed hydrolysis, and sunlight degradation, and that the degradation product M1 (2-methylthio-4-*tert*-butylamino-6-amino-*s*-triazine) was the major product in each degradation pathway. Both Irgarol and M1 were frequently found in fishery harbours as well as in marinas in the Seto Inland Sea, suggesting that ship bottom paint is a possible source of contamination. Photodegradation experiments using UV-A lamp showed that Irgarol degraded in the presence of some photosensitizing agents such as benzophenone, natural humic substances, and hydrogen peroxide. M1 itself also degraded in the presence of benzophenone and hydrogen peroxide but not in the natural humic substances. M1, simultaneously produced from Irgarol in the presence of photosensitizer, could be more stable than the parent compound and it probably accumulates in the sediments. Natural humic substances in water are the ubiquitous components which affect the fate of Irgarol released from ship bottom paints. To assess the ecotoxicity of five antifouling compounds, a new microbiotest using suspension cultured-fish cells CHSE-sp has been developed. The 24-hour EC50 values to the fish cells were highly correlated with the 28-day LC50 values to juvenile rainbow trout. The short-term test using CHSE-sp cells can be used for toxicity screening of chemicals. One group (Zinc pyrithione and Copper pyrithione) was quite toxic to the fish species and the other group (Irgarol and Diuron) showed weak toxicity. The toxicity of KH101 (triphenylborane pyridine) was middle between the two groups. Thus, the microbiotest could be used for the fate study of antifouling chemicals because the concentrations of some compounds can not be determined by chemical analysis.