

発表番号 39

バイオアッセイを活用した新規防汚剤の分解性評価

助成研究者：岡村秀雄（神戸商船大学商船学部）

防汚剤としての有機スズ剤の使用は世界的に厳しく制限されるに至り、代替の新規防汚剤が使用されていると考えられる。しかし、我が国で生産・使用されている代替化合物の種類や量等に関するデータは公表されておらず、個々の化合物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極めて少ない。代替防汚剤である2種類の金属ピリチオン（亜鉛ピリチオン、銅ピリチオン）は、世界的に使用されていると言われているが、環境中での運命や生態系に対する影響に関する報告は極めて少ない。特に、環境中での微量残留分析法が確立していないことは、これらの物質の研究を困難にしている。そこで、本研究では、バイオアッセイを活用して、毒性の変化から当該物質の分解性を評価することを試みた。アセトニトリルに溶解した金属ピリチオンを UV-A ランプを用いて一定時間、光照射し、毒性を評価した。バイオアッセイでは、ウニ受精卵の発生に及ぼす影響、およびワムシに対する致死影響を指標とした。

ウニ受精卵に対する亜鉛ピリチオンの 27-hour EC_{50} は 7~10 fg/L と極めて低かった。光照射しないで溶媒蒸発操作のみを行った亜鉛ピリチオンの EC_{50} は 2.1 ng/L となり、毒性は大幅に減少した。光照射した試料では、光照射時間に依存して亜鉛ピリチオンの毒性は弱くなった。2 時間照射した試料では、紫外線吸収スペクトルから判断するとほぼ完全分解していると予想されたが、 EC_{50} は 28 ng/L であった。ウニに対する亜鉛の毒性の文献値 (EC_{50} : 8.5 μ g/L) から、光分解に伴って脱離した亜鉛のみで毒性を説明することはできなかつたので、光反応生成物が毒性を生じていると考えられた。ウニ受精卵に対する銅ピリチオンの 27-hour EC_{50} は 2.3 ng/L であった。亜鉛ピリチオンで認められたような溶媒蒸発操作による毒性の減少はなかつた。亜鉛ピリチオンと同様、光照射時間に依存して毒性は減少し、2 時間照射した試料では、紫外線吸収スペクトルからはほぼ完全分解していることが予想されたが、 EC_{50} は 60 ng/L であった。銅の毒性の文献値 (EC_{50} : 13 μ g/L) から、光分解に伴って脱離した銅のみで毒性を説明することはできなかつたので、亜鉛ピリチオンと同様、光反応生成物が生じていると考えられた。ワムシの致死に対しては、亜鉛ピリチオン (LC_{50} : 11-12 μ g/L) よりも銅ピリチオン (LC_{50} : 4.6-5.2 μ g/L) の方が毒性がやや強く、溶媒蒸発操作による毒性の変化は認められなかつた。光照射した試料では、両ピリチオン化合物共に光照射時間に依存して毒性が減少した。2 時間照射した亜鉛ピリチオンは供試最高濃度 100 μ g/L で全個体が生存していたが、2 時間照射した銅ピリチオンの毒性は強く LC_{50} が 29 μ g/L であった。このように、バイオアッセイを活用して毒性の変化から金属ピリチオンの光分解性を評価することができた。

21

助成番号 0221

バイオアッセイを活用した新規防汚剤の分解性評価

助成研究者：岡村秀雄（神戸商船大学商船学部）

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、我が国では現在、その代替品である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量に関する情報は極めて乏しい。使用されていると予想され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に関する情報はほとんどない。したがって、これら新規防汚剤による汚染状況を把握し、海洋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、漁業への影響を評価する上で、また化学物質の国際管理の面からも極めて緊急を要する課題である。

主要な代替防汚剤として2種類の金属ピリチオンが使用されていると言われている（米原 2000; Omae, 2003; Thomas, 2001; Voulvoulis et al., 1999）。これら金属ピリチオンは付着生物を初めとした海産生物に対して比較的強い毒性を有するが、環境中では主として太陽光分解により、極めて迅速に分解すると言われている（Turley et al., 2000）。一方、海水、底質、生物などの環境試料中での微量残留分析は極めて困難であり、現在までに環境中での残留は報告されていない。亜鉛ピリチオンはシャンプーの防フケ成分として世界中で長い間使用されてきており、銅ピリチオンは防汚剤としてのみ使用されていると言われている。しかしながら、これらの物質が水生生物に対する影響についてはデータが少なく、水環境における運命に関する研究は前記の報告（Turley et al., 2000）を除けば少ない。市販シャンプーの魚毒性を調査した研究では、毒性の原因成分として亜鉛ピリチオンが見いだされている（Goka, 1999）。我々は、金属ピリチオンが生態系に及ぼす影響を評価してきており、魚類（Okamura et al., 2002）、ウニ（Kobayashi and Okamura, 2002）、非標的植物（Okamura et al. in press）に対する影響を評価し、いずれの生物に対しても強い毒性を示すことを報告した。特に、亜鉛ピリチオンはウニ受精卵の発生に対して極低濃度で影響を及ぼすので、環境中での運命には強い興味もたれる。しかし、前述の通り、微量での残留分析法が確立していないので、極微量の金属ピリチオンの環境動態を化学分析によって明らかにすることは極めて困難である。そこで、金属ピリチオンの有する強い毒性を指標として、何らかの分解処理（加熱処理、紫外線照射、酵素処理など）を行った金属ピリチオンの毒性が変化すれば、供試化合物の分解性を間接的に評価することができると考えた。

本研究では、我が国で新規防汚剤として使用されていると考えられる金属ピリチオン（亜鉛ピリチオン、銅ピリチオン）の環境管理のための基礎的知見を得ることを目指し、バイ

オアッセイを活用してこれら化合物の分解性を評価した。自然界で生じ得る分解として、太陽光に含まれる近紫外線領域の波長 (UV-A 領域) による光分解に着目し、UV-A ランプを用いて光照射処理した金属ピリチオンについて、以下の2つのバイオアッセイにより、毒性を定量的に評価した。

- 1) 金属ピリチオンのウニ受精卵の発生に対する影響
- 2) 金属ピリチオンのワムシに対する影響

2. 研究方法

2.1 供試材料

金属ピリチオン化合物として、亜鉛ピリチオン(2-mercaptopyridine N-oxide zinc salt, 98%, 東京化成工業、ZnPT)と銅ピリチオン(2-mercaptopyridine N-oxide copper salt, 98.7%, 林純薬工業、CuPT)を用い、アセトニトリル(MeCN)に溶解して100 mg/Lとした。3 mLをフタ付き石英角セル(光路長1 cm)に入れ、水平方向からUV-Aランプ(20 W, National)を連続的に照射した。デジタルUV-Aメーター(Model UV-103, Macam)を用いて、セルの光源側表面部のUV-Aの紫外線強度が2,000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (20 W/m^2)となるように、光源とセルの位置を調整した。この紫外線強度は岡山県南で夏に観察される太陽光紫外線強度の範囲内にある(Okamura et al., 1999)。

光照射した試料を0, 0.5, 1, 2時間後に採取し、1部(0.03 mL)を100倍に希釈して、紫外線吸収スペクトルを測定した。所定時間光照射した試料の残量(2.97 mL)を40°C以下のホットブロックバス中で窒素気流下でアセトニトリルを蒸発させた後、2.97 mLのジメチルスルフォキシド(DMSO)に溶解させて、毒性試験用試料とした。このようにして、以下の試料を調製した(ただし、Me: Zn, Cu)。

MePT-control	光照射なし、蒸発操作なし
MePT-0	光照射なし、蒸発操作あり
MePT-0.5	光照射あり、蒸発操作あり
MePT-1	光照射あり、蒸発操作あり
MePT-2	光照射あり、蒸発操作あり

2.2 ウニ受精卵の発生に及ぼす影響評価

ムラサキウニ *Anthocidaris crassispina* を供試し、既報 (Kobayashi and Okamura, 2002) に従ってバイオアッセイを行った。供試試料は京都大学瀬戸臨海実験所付近の海岸にて、2002年8月に採取し、実験に供試した。受精卵の初期分裂、ブルテウスの形成や異常を観察した。DMSOに溶解した供試試料を公比10倍で希釈して数段階の希釈列を作成し、1濃度当たり200の受精卵を供試した。供試濃度は、光分解処理前の濃度とした。温度26°C

では受精後 50～60 分に最初の分裂が生じるので、初期分裂として非分裂細胞と正常な 2 分裂細胞の割合を計数した。また、受精後 27 時間後には細胞を 5%のホルムアルデヒドで固定し、正常なプルテウス形成、遅れ、異常、前プルテウス胚の割合を計数した。正常なプルテウス形成率を指標として、供試試料の 27-hour EC_{50} を算出した。バイオアッセイは実施時期の異なる 3 つの実験とし、それぞれ 3 回繰り返した。また、試料調整後 50 日の内に実施された。

2.3 ワムシに及ぼす影響評価

淡水産ワムシ *Brachionus calyciflorus* に及ぼす影響を評価した。試験には市販の毒性試験キットである Rotoxkit F を用いた。供試濃度は、光分解処理前の設定濃度として、8 段階濃度 (100, 50, 25, 12, 6.3, 3.1, 1.6, 0 $\mu\text{g/L}$) に固定した。48 穴マイクロプレートの 1 ウエル当たり 0.3 mL の試験液量とし、各ウエルに 10 頭の個体をいれて 3 回の繰り返し (1 濃度あたり 30 頭の個体を供試) とした。マイクロプレートを 20°C の暗所に静置し、暴露 24 時間後に各ウエルの個体の生死を実体顕微鏡下で観察し、24-hour LC_{50} を算出した。バイオアッセイは実施時期の異なる 3 つの繰り返し実験とした。また、試料の長期保管による毒性の変化を評価するため、試料調製後 135 日の内にバイオアッセイを実施した。

3 実験結果および考察

3-1 光分解による紫外線吸収スペクトル

光照射試料の紫外線吸収スペクトルを図 1 に示す。光照射後の試料をアセトニトリルで 100 倍に希釈したので、無処理区での試料濃度は 1 mg/L である。アセトニトリル中での亜鉛ピリチオンの極大吸収波長は、240, 275, 325 nm であった。1 時間以内の光照射では吸光度が減少し、極大吸収波長に変化はなかった。2 時間照射では、吸光度はさらに減少し、極大吸収波長も短波長側に移動した。アセトニトリル中での銅ピリチオンの極大吸収波長は、250, 320 nm であった。光照射によって長波長の極大吸収波長 (320 nm) は変化しなかったが、短波長の極大吸収波長 (250 nm) は光照射時間に応じてより短波長側に移動した。光照射時間に応じて極大波長域での吸光度は減少したが、200 nm 付近の短波長域での吸光度は増加した。このように、近紫外光照射によって両ピリチオンの紫外線吸収スペクトルは変化し、2 時間の光照射によってほぼ完全に分解していると考えられた。

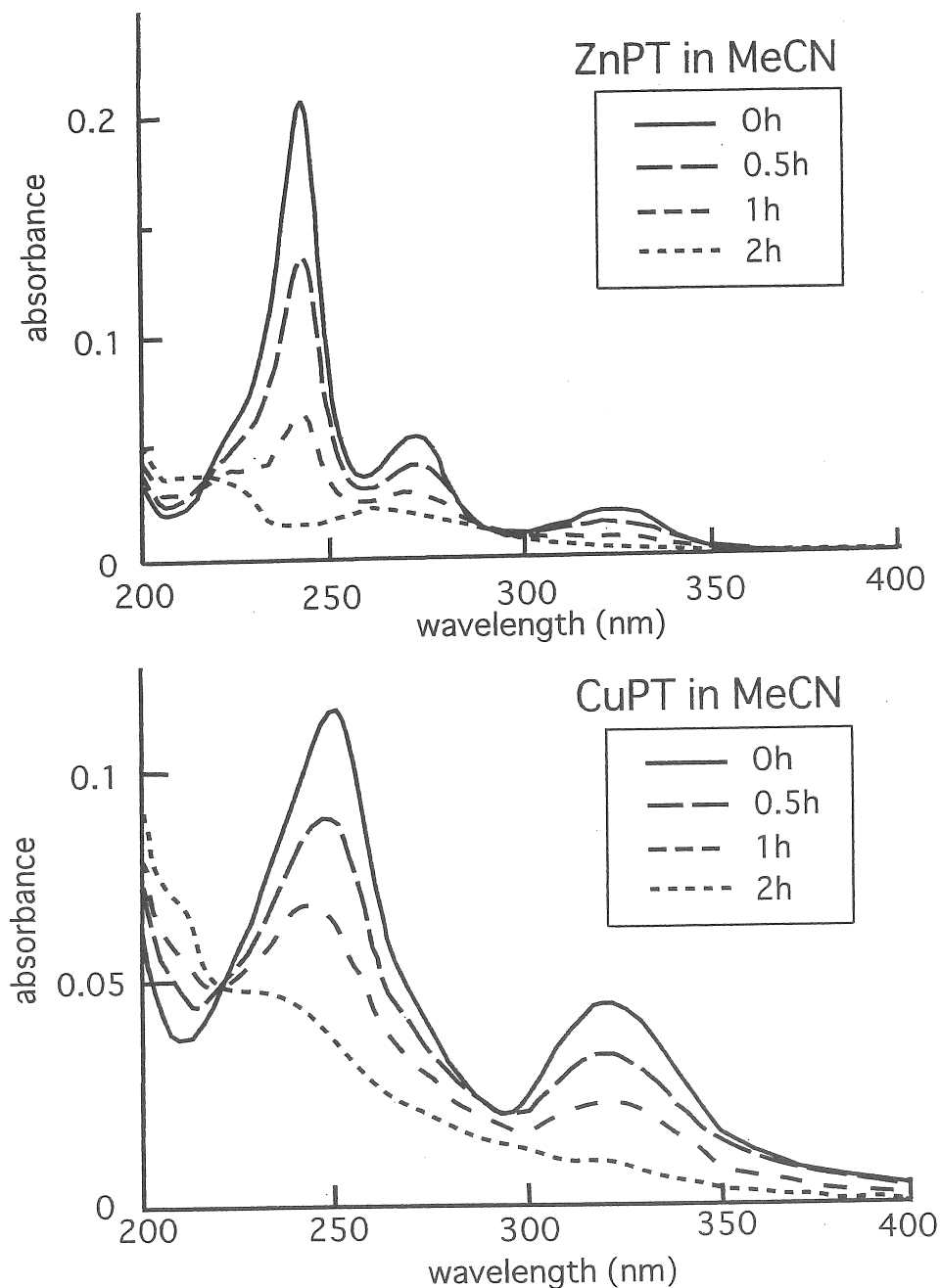


Fig.1 UV spectra of metal pyriethiones irradiated with UV-A lamp.

3-2 ウニ受精卵の発生に対する影響

ウニ受精卵の発生阻害に対する亜鉛ピリチオンおよび銅ピリチオンの影響を、それぞれ図2、3に示す。両図から、両金属ピリチオンともに、供試濃度の増加に従って正常なブルテウス形成が阻害されていることは明らかである。

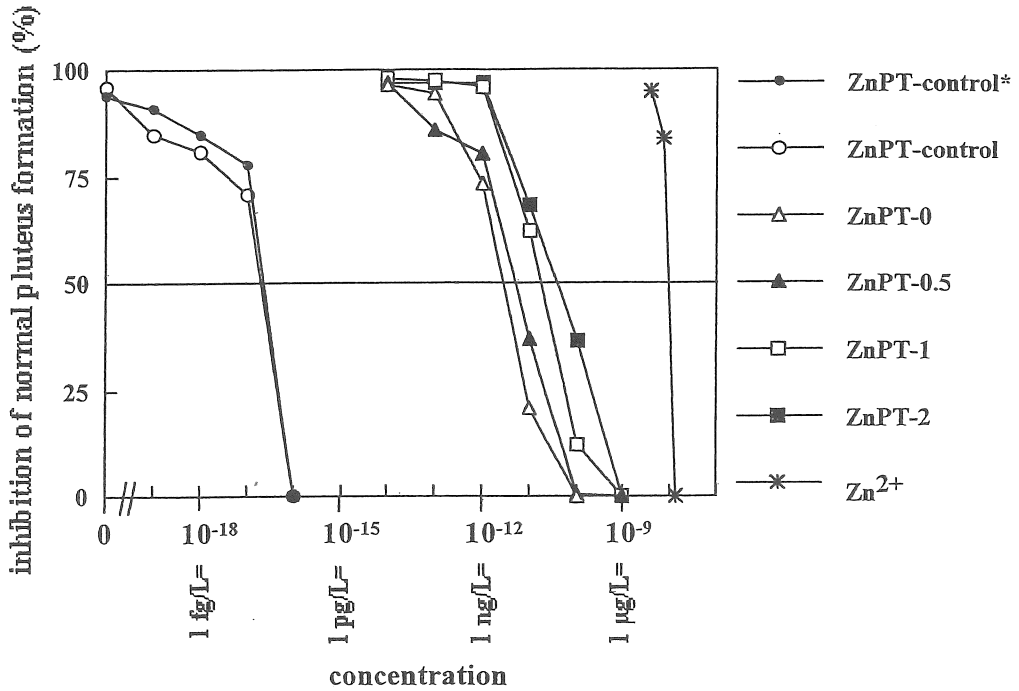


Fig.2 Inhibition of zinc pyruithione on normal pluteus formation of sea urchin.

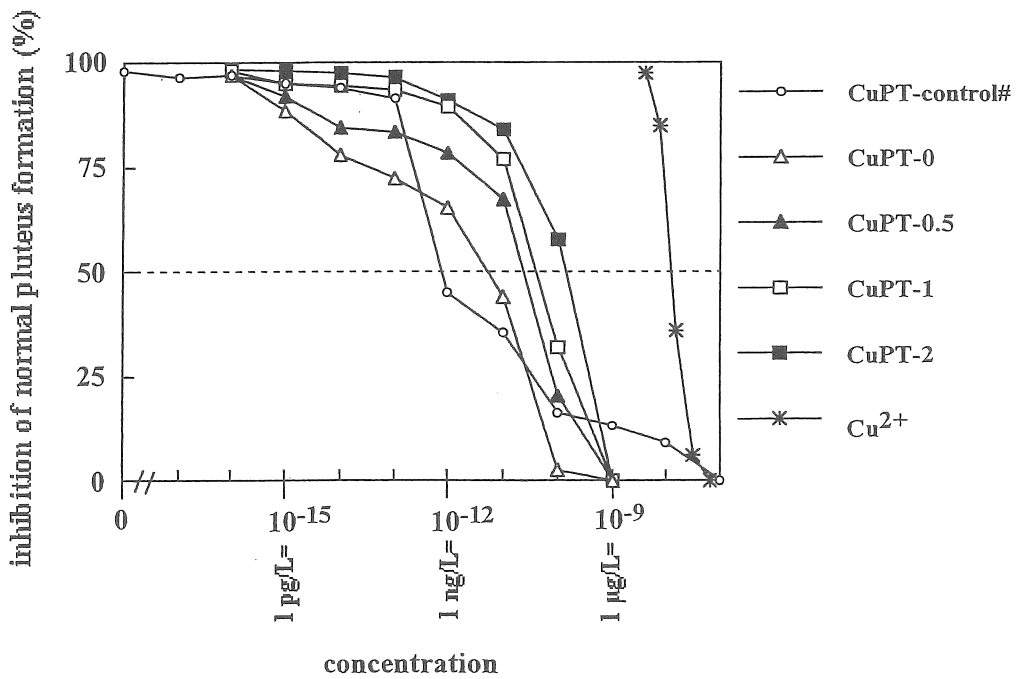


Fig.3 Inhibition of copper pyruithione on normal pluteus formation of sea urchin.

図2, 3に示す濃度-影響曲線から算出した50%影響濃度(EC_{50})を表1に示す。亜鉛ピリチオンの27-hour EC_{50} は7~10 fg/Lと極めて低く、銅ピリチオンの毒性(EC_{50} : 2.3 ng/L)の220,000~310,000倍であった。照射しないで溶媒蒸発操作のみを行った亜鉛ピリチオンの EC_{50} は2.1 ng/Lであり、毒性は大幅に減少して銅ピリチオンの毒性とほぼ同等となった。照射した試料では、照射時間に依存して亜鉛ピリチオンの毒性は弱くなった。2時間照射した試料では、紫外線吸収スペクトルからほぼ完全分解していることが予想されたが、 EC_{50} は28 ng/Lであった。光処理した試料には金属が残存していると考えられるので、亜鉛のウニに対する毒性を評価した。ウニ受精卵に対する亜鉛の毒性(EC_{50} : 8.5 μ g/L)から、光分解によって脱離した亜鉛のみで毒性を説明することはできず、光反応生成物が毒性を生じていると予想された。

ウニ受精卵に対する銅ピリチオンの27-hour EC_{50} は2.3 ng/Lであった。亜鉛ピリチオンで認められたような溶媒蒸発操作による毒性の変化はなかった。亜鉛ピリチオンと同様、照射時間に依存して毒性は減少し、2時間照射した試料では、紫外線吸収スペクトルからはほぼ完全分解していることが予想されたが、 EC_{50} は60 ng/Lであった。ウニに対する銅の毒性(EC_{50} : 13 μ g/L)から、光分解に伴って脱離した銅のみで毒性を説明することはできず、亜鉛ピリチオンと同様に光反応生成物によるものと予想された。

Table 1 EC_{50} of metal pyrithione on sea urchin *Anthocidaris crassispina* egg development.

	light-evaporation	Me=Zn	Me=Cu
MePT-control*	no-no	10×10^{-6} (7.6~14* 10^{-6})	2.3 (1.7~3.2)#
MePT-control	no-no	7.1×10^{-6} (5.3~9.8* 10^{-6})	nd
MePT-0	no-yes	2.2 (1.7~2.7)	1.8 (1.3~2.5)
MePT-0.5	0.5h-yes	3.0 (2.4~4.0)	9.1 (6.7~12)
MePT-1	1h-yes	14 (11~17)	24 (19~32)
MePT-2	2h-yes	28 (21~36)	60 (46~79)
metal ion*	no-no	8500 (8100~9000)	13000 (12000~14000)#

27-hour EC_{50} (ng/L) with 95% confidence intervals in parentheses,

MePT: metal pyrithione, nd: not determined

* data obtained from different experiment in 2001.

data obtained by *Hemicentrotus pulcherrimus*

3-3 ワムシに対する影響

ワムシに対する試験結果を表2に示す。無処理の両化合物の LC_{50} を比較すると、銅ピリチオンの毒性(LC_{50} : 4.6-5.2 μ g/L)は亜鉛ピリチオン(LC_{50} : 11-12 μ g/L)よりも2~3倍程度強かった。両化合物とも、溶媒蒸発操作による毒性の変化は認められなかった。照射

射した試料では、両ピリチオン化合物共に光照射時間に依存して毒性が減少した。2 時間光照射した亜鉛ピリチオンは供試最高濃度（100 $\mu\text{g/L}$ ）で全個体が生存していたが、2 時間光照射した銅ピリチオンの毒性は依然として強く、 LC_{50} が 29 $\mu\text{g/L}$ であった。

表 2 には、試料調製後にバイオアッセイを実施した期間（DAP）を示す。各試料は表中 DAP の内に、3 回繰り返して供試された。両金属ピリチオンとも、Control 1 と 2 の LC_{50} に有意な差はなかったので、室温で暗所に 4 ヶ月間保管しても分解は生じていないと判断される。

Table 2 LC_{50} of metal pyrithione on *Brachionus calyciflorus* .

treatment	light-evaporation	ZnPT		CuPT	
		$\text{LC}_{50}\pm\text{sd}$	DAP*	$\text{LC}_{50}\pm\text{sd}$	DAP*
MePT-control 1	no-no	12 \pm 3.6	11-43	5.2 \pm 0.3	0-34
MePT-control 2	no-no	11 \pm 2.4	94-114	4.6 \pm 0.7	96-123
MePT-0	no-yes	12 \pm 5.3	87-114	6.0 \pm 2.3	96-123
MePT-0.5	0.5h-yes	14 \pm 3.8	87-114	7.6 \pm 0.9	96-123
MePT-1	1h-yes	29 \pm 11	94-120	11 \pm 0.8	100-135
MePT-2	2h-yes	>100	94-120	29 \pm 7.8	100-135
metal ion*	no-no	nd#		nd#	

24-hour LC_{50} ($\mu\text{g/L}$) with standard deviation

* days after preparation of MePT sample

not determined

4. 考 察

防汚剤として使用されている金属ピリチオンの環境内運命に関する知見を得るため、光照射した金属ピリチオンの毒性の変化から、分解性を間接的に評価した。バイオアッセイとして海産生物ウニ受精卵と淡水産ワムシを用いた試験を行った。無処理（DMSO に溶解した対照区）の場合、亜鉛ピリチオンのウニに対する毒性は極めて強く（ EC_{50} : ca. 10 fg/L）、 EC_{50} で比較すると銅ピリチオン（ EC_{50} : ca. 2 ng/L）の 21~31 万倍であった。これに対してワムシに対する影響は相対的に弱く、亜鉛ピリチオンで LC_{50} が約 10 $\mu\text{g/L}$ 、銅ピリチオンで LC_{50} が約 5 $\mu\text{g/L}$ であり、銅ピリチオンの方が毒性が強かった。

光照射しないで溶媒（アセトニトリル）の蒸発操作のみを行った亜鉛ピリチオンでは、無処理に比較してウニに対する毒性が大幅に減少し、無処理の銅ピリチオンの毒性と同等となった。溶媒蒸発操作によるウニに対する毒性の減少は銅ピリチオンでは観察されず、また、溶媒蒸発操作によるワムシに対する毒性の変化は両ピリチオンとも認められなかつ

た。また、光分解処理した試料について長期間にわたる保管(室温・暗所)による毒性への影響を評価したところ、ワムシ試験では約4ヶ月間保管しても毒性に変化が生じなかった。

亜鉛ピリチオンを2時間光照射した場合、ウニに対する毒性は1/10程度となり、ワムシに対しては1/10以下となった。銅ピリチオンを2時間光照射した場合には、ウニに対する毒性が1/30程度、ワムシに対しては1/6程度となった。このように、近紫外光の照射時間に依存して両金属ピリチオンの毒性は弱くなった。一方、光照射処理した両金属ピリチオンの紫外線吸収スペクトルは特徴的な変化を示し、最長2時間の光照射では両化合物ともほぼ分解していることが予想されたが、前記のように未だ毒性を有していた。そこで、光分解によって脱離した金属が毒性を及ぼしている可能性が考えられたが、両金属のウニに対する毒性は弱かったため、光反応生成物が毒性を生じたものと予想された。今後、バイオアッセイと化学分画の手法を用いて、金属ピリチオンに由来する光反応生成物を明らかにすることが必要である。

謝辞

ウニ受精卵を用いたバイオアッセイは同志社大学名誉教授 小林直正先生によって実施された。記して感謝申し上げます。

参考文献

- Goka, K. 1999. Embryotoxicity of zinc pyrithione, an antidandruff chemical, in fish. *Environ. Res. A* 81: 81-83.
- Kobayashi, N. and Okamura, H. 2002. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 748-751.
- Okamura, H., Nishida, T., Ono, Y., Shim, W. J. (in press) Phytotoxic effects of antifouling compounds on non-target plant species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*
- Okamura, H., Watanabe, T., Aoyama, I., Hasobe, M. 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46: 945-951.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R. J., Pacepavicius, G. J., and Lau, Y. L. 1999. Photodegradation of Irgarol 1051 in Water. *J. Environ. Sci. Health, B34*: 225-238
- Omae, I. 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl. Organomet. Chem.* 17: 81-105.
- Thomas, K. V. 2001. The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling* 17: 73-86.

- Turley, P. A., Fenn, R. J., Ritter, J. C. 2000. Pyrithiones as antifoulants: environmental chemistry and preliminary risk assessment. *Biofouling* 15: 175-182.
- Voulvoulis, N., Schrimshaw, M. D., Lester, J. N. 1999. Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.* 13: 135-143.
- 米原洋一. 2000. 防汚塗料の最近の動向. *日本海水学会誌* 54: 7-12.

Degradation of antifouling booster biocides evaluated with bioassay

Hideo Okamura

Kobe University of Mercantile Marine, Kobe, Japan

Summary

Some organic booster biocides are intended as replacement for the highly toxic antifouling agent tributyltin, which has been regulated internationally. Zinc pyrithione (ZnPT) has been used as antifouling agents for ship hull as well as as antidandruff stuff in shampoo. Copper pyrithione (CuPT) is likely used only for antifoulants. There is little information available on the environmental fate and ecotoxicity of the metal pyrithiones. Another difficulty is a lack of chemical analysis established for them. In this study, photodegradation of the pyrithiones was evaluated with bioassay in terms of toxicity alteration. Two bioassays, sea urchin egg development test and freshwater rotifer lethality test, were employed for the pyrithiones, which were irradiated with UV-A lamp for up to two hours.

The 27-h EC_{50} s of ZnPT and CuPT on sea urchin were 7~10 fg/L and 2.3 ng/L, respectively. The toxicity of ZnPT was extremely high but dramatically decreased (2.1 ng/L as EC_{50}) only by solvent evaporation without irradiation. This phenomena was not observed for CuPT. Weaker toxicity was observed with longer irradiation period for both compounds. The toxicities of 2-hour irradiated ZnPT and CuPT decreased in comparison with the controls but were much higher than the toxicity of each metal, although their UV spectra suggested significant destruction of their mother moiety. Some intermediates produced by photochemical reaction may have contributed the toxicity. The 24-hour LC_{50} s of ZnPT and CuPT on rotifer were 12 μ g/L and 5 μ g/L, respectively. CuPT gave a slightly higher toxicity to rotifer than ZnPT did. It was, however, apparent that the sensitivity of freshwater rotifer test to metal pyrithiones was much lower than that of sea urchin test. There was no change in toxicity by solvent evaporation without irradiation and weaker toxicity was observed with longer irradiation period for both compounds. The toxicity of 2-hour irradiated ZnPT dramatically decreased to give no mortality at the highest concentration tested (100 μ g/L). On the other hand, the LC_{50} of 2-hour irradiated CuPT was 29 μ g/L although the UV spectra suggested significant destruction of their mother moiety. This suggests that some photochemical intermediates contributed the toxicity. Thus, the bioassay could evaluate the degradation of metal pyrithiones by photochemical reaction. It is needed to clarify what the intermediates are by using both chemical analysis and bioassay.