

## ナホトカ号重油流出事故により海岸に漂着した 重油の変異原性及びPAH含量について

後藤 純雄<sup>1)</sup>, 峯木 茂<sup>2)</sup>, 杉田 和俊<sup>1)</sup>, 遠藤 治<sup>1)</sup>,  
村山留美子<sup>1)</sup>, 内山 巖雄<sup>1)</sup>, 田中 基裕<sup>3)</sup>, 早川 和一<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>国立公衆衛生院 (〒108 東京都港区白金台4-6-1)

<sup>2)</sup>東京理科大学 (〒278 千葉県野田市山崎2641)

<sup>3)</sup>金沢大学 (〒920 石川県金沢市宝町13-1)

[平成9年7月24日受理]

### Mutagenicity and PAH Contents of the Heavy Oil that Drifted Ashore on the Coast from the Tanker Nakhodka

Sumio GOTO<sup>1)</sup>, Shigeru MINEKI<sup>2)</sup>, Kazutoshi SUGITA<sup>1)</sup>, Osamu ENDO<sup>1)</sup>  
Rumiko MURAYAMA<sup>1)</sup>, Iwao UCHIYAMA<sup>1)</sup>, Motohiro TANAKA<sup>3)</sup> and Kazuichi HAYAKAWA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>National Institute of Public Health  
(4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108)

<sup>2)</sup>Science University of Tokyo  
(2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278)

<sup>3)</sup>Kanazawa University  
(13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 920)

[Received July 24, 1997]

#### Summary

As a part of research studies on the pollution at heavy-oil coated parts of the Sea of Japan coastline, resulting from the wrecked Russian tanker Nakhodka on Jan. 2, the following experiments were performed using three heavy oil samples. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) were analyzed by HPLC in the heavy oil that washed ashore, which was collected at Mikuni-cho in Fukui Prefecture on Jan. 16, 1997, heavy oil in the oil compartment of the bow of the tanker, and commercial heavy oil (class C).

Mutagenicities of the extracts of these oil samples were also measured. The amount of benzo(*a*) pyrene (BaP) contained in the heavy oil that washed ashore was about a quarter of the average in 51 soil extracted samples, which were collected at an urban area in Tokyo in 1984, and mutagenicity of the extract from the oil was about 4-fold higher than the average in the extracts from the soil samples.

**Key words:** tanker Nakhodka, mutagenicity, heavy oil, preincubation assay, benzo(*a*) pyrene, *S. typhimurium* TA100

## 1. はじめに

ロシア船籍ナホトカ号から流出し、日本海沿岸に漂着した重油はC重油とされている。この重油は、精留した原油製品、A重油やB重油などと較べるとその引火点や粘度が高く、また、硫黄分や灰分などの精留残渣が多く含まれている。重油中には高分子量の炭化水素類の他変異原性や発がん性を示す多環芳香族炭化水素 (PAH) 類<sup>1)</sup>などが多種含まれることが知られており、今回漂着した重油にもそれらが含まれる可能性が高い。

そこで本研究では、日本海沿岸に漂着した重油中の有害成分の検出及びそれによる環境汚染や人体影響の対策に関する研究の一環として、福井県三国町の海岸に漂着し回収された重油の変異原性及びPAH含量を測定した。また、ナホトカ号船首部分から抜き取られた重油及び日本国内で市販されているC重油についてもその変異原性及びPAH含量を測定し比較検討した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試薬類

PAHの標準試薬として、ベンゾ(a)ピレン (BaP)、ベンゾ(a)アントラセン (BaA)、ピレン (Pyrene) は、和光純薬工業製、ベンゾ(k)フルオランテン (BkF)、ベンゾ(b)クリセン (BbC) は Koch Light Laboratories 社製、ベンゾ(ghi)ペリレン (BghiP) は Aldrich 社製、およびジベンゾ(a, h)アントラセン (dBahA) は L.Light 社製のものをそれぞれ用いた。

連続抽出用の溶媒には、残留農薬試験用メタノール (和光純薬工業製) を用い、変異原性物質及びPAHの液-液分配抽出には残留農薬試験用シクロヘキサン (和光純薬工業製) 及び蛍光分析用ジメチルスルフォキシド (DMSO; 同仁化学研究所製) をそれぞれ用いた。

HPLCの移動相には、液体クロマトグラフィー用アセトニトリル (和光純薬工業製) 及び蒸留水を用いた。

変異原性試験 S9mix 調製用コファクターには、オリエンタル酵母工業製の Cofactor-I を用いた。

### 2. 2 試料の調製<sup>2)</sup>

冷蔵庫 (約 4℃) に保存しておいた三国町の越前松島岩場に漂着した重油 (以下漂着重油)、ナホトカ号船首部分の重油 (以下船首重油) 及び市販C重油 (以下C重油) の 5.0g ずつを容量 500ml の丸底フラスコに秤取した。この丸底フラスコに約 3mmφ のガラスビーズを 50ml 程度入れて、これに重油を塗した。丸底フラスコを朝比奈式連続抽出器にセットし、メタノールを約 700ml 加えて抽出した。抽出は、1日8時間ずつ6日間 (計48時間) 行った。この抽出操作を3回繰り返し、それぞれの抽出溶液を得た。各抽出溶液をロータリーエ

バポレーターで減圧濃縮して抽出溶媒を留去したのち、得られたタール状物質にシクロヘキサン 4ml を加えて溶解した。この溶液をスキープ形分液ロートに移し入れ、これに DMSO 2ml を加えて、液-液分配抽出を行った。DMSO 層を分取し、更に残りのシクロヘキサン層に DMSO を 1ml 加えて、再度液-液分配抽出を行い、この DMSO 層を先の DMSO 層に併せた。この DMSO 溶液を変異原性試験および PAH 分析に供するまで冷凍保存 (-20℃) した。

### 2. 3 変異原性試験

変異原性試験は、Ames らの方法を一部改良したプレインキュベーション法<sup>3)</sup>で行った。試験菌株には、*Salmonella typhimurium* TA100, TA98 及び TA104<sup>5)</sup> の 3 菌株をニュートリエントブロスで約 16 時間振盪培養したもの (菌懸濁液) を用いた。代謝活性化酵素系 S9mix は、Ames らの方法<sup>4)</sup> に準じて、Sprague-Dawley 系雄ラットの PCB (KC-500) で酵素誘導した肝臓から得られた S9 およびコファクターを用いて調製した。

### 2. 4 PAHの分析

PAHの分析には、マルチカラム HPLC/蛍光検出法<sup>6)</sup>を用いた。すなわち、ポンプ (LC-6A) 3台、分光蛍光光度計 (RF-540)、高圧6方流路切換バルブ (FCV-2AH; 以上島津製作所) などから成る装置を用い、濃縮カラムには、ODS 60-5 (東京化成工業) を充填した内径 4.6mm、長さ 30mm のステンレスカラムを用いた。分離カラムには、同じ ODS 60-5 を充填した内径 4.6mm、長さ 250mm のステンレスカラムを用いた。移動相には、アセトニトリル-水系を用い、試料液注入後 5 分間は、アセトニトリル-水 = 1 : 1 (v/v) の条件で PAH を濃縮カラムに濃縮し、次いでアセトニトリル-水 = 4 : 1 (v/v) に変えて PAH を分離カラムに導入し、分離し蛍光検出を行った。各 PAH の検出は分析対象 PAH の適的な励起および蛍光波長で行った。

## 3. 結果及び考察

ナホトカ号から流出した重油は原油精製の最終分留画分に近い精製の残渣含有量が多く、その残渣中には比較的多量に PAH などの生体影響物質が含まれている可能性が高い。このため重油回収作業員に対しては直接重油に接触しないよう指示がなされている状況にあった。本検討では、平成 9 年 1 月 16 日に福井県三国町の越前松島岩場で採取された漂着重油、ナホトカ号船首部分の重油および C 重油中からメタノール可溶成分をそれぞれ抽出し、その変異原性と代表的発がん性物質のベンゾ(a)ピレン (BaP) など PAH 7 種類を分析することとした。

### 3. 1 試験菌株の検討

今回の重油の変異原性の検索に当たって、試験に用いる菌株及び代謝活性化の必要性などについての検討を行った。この検討には、Ames法で広く用いられる菌株のTA100株及びTA98株に加えて、酸化物の変異原性検

出に有利な菌株であるTA104株の3種を用いて、S9mixを加えて代謝活性化した場合としない場合について試験を行った。

Fig. 1に得られた結果を示してある。なお、この図の横軸は、液-液分配抽出後のDMSO溶液量に相当する。

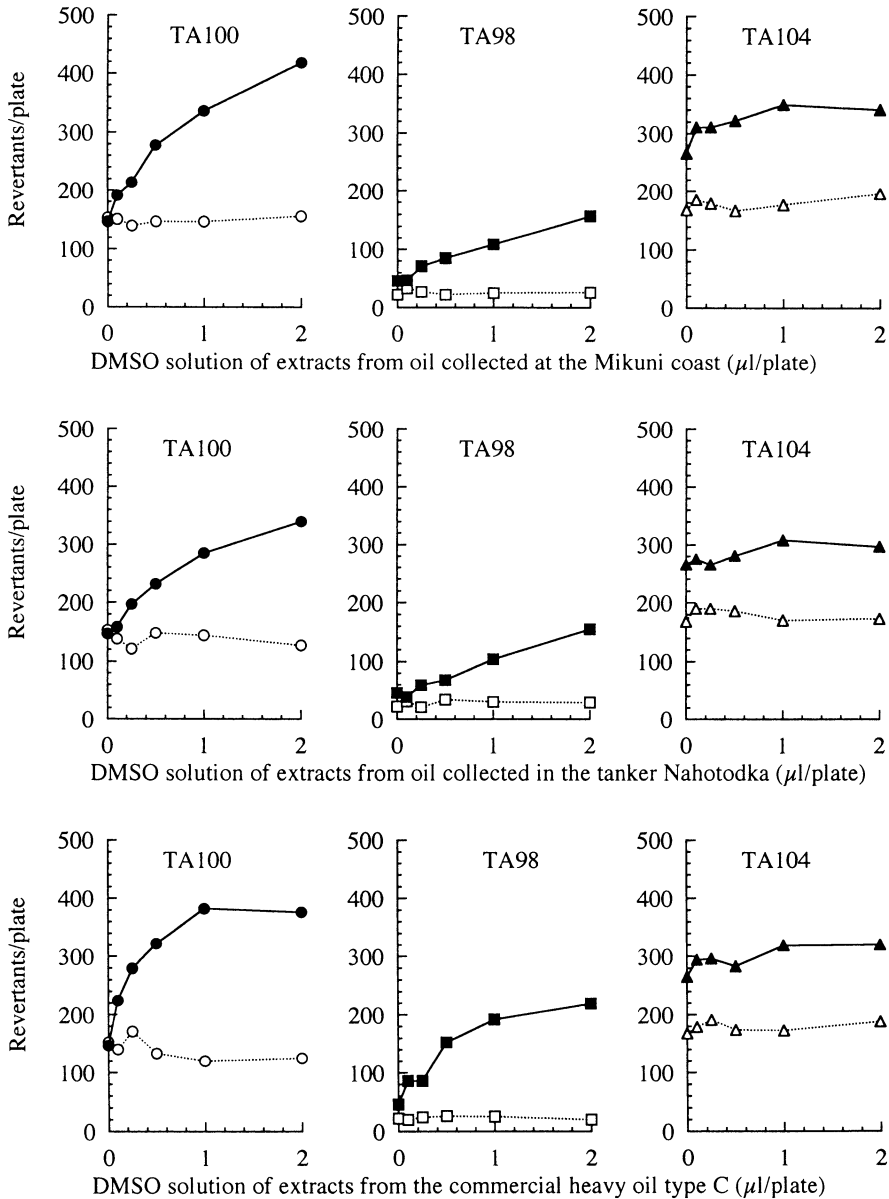


Fig. 1 Results of a preliminary assay for detecting the mutagenicity of heavy oils with *S. typhimurium* strains

The assay was carried out with preincubation method.

- : TA100, with S9mix, ○ : TA100, without S9mix,
- : TA98, with S9mix, □ : TA98, without S9mix,
- ▲ : TA104, with S9mix, △ : TA104, without S9mix.

この図から、各重油抽出物の変異原性は、TA104株では殆ど認められないがTA98株では良好な dose-response と共にコントロールの2倍以上の復帰変異コロニー数を与えその変異原性が認められ、更にTA100株では強い変異原性が認められることが判った。また、S9mixを添加して代謝活性化した時にその変異原性が認められるようになることなども判った。今回の重油の変異原性の検出には、S9mixが必要であることや塩基対置換型のTA100株の方が検出能が高いことなどが認められたが、1989年3月のアラスカで発生したエクソン社のタンカーからの原油の流失事故3ヶ月後に採取された海岸試料（6月、7月及び9月）の試験結果では、S9mix無添加系のTA100株で変異原性が検出されることがU.S. EPAのClaxtonらにより報告されている<sup>7)</sup>。このため、以下の試験ではすべてTA100株を用いることとし、S9mixについては添加した場合としない場合について行うこととした。

### 3. 2 各重油の変異原性

漂着重油を用いてこれにDMSOを加えて、直接抽出した予備的検討から、重油中にはDMSO不溶物が多量に含まれることが認められた。その不溶物が変異原性試験操作を妨げることやこの方法では安定かつ定量的な抽出が困難であることが懸念されたため、今回は朝比奈式連続抽出器を用いて抽出を行うこととした。朝比奈式の連続抽出の予備的検討では、重油10.0gを用いて2日間づつ2回（合計4日間）メタノール抽出を行ったが、2回目の抽出量（変異原性及びPAH含量とも）は1回目より低下しないことが認められた。そこで、被抽出重油量を5.0gと少なくし、この重油をガラスビーズに塗して重油とメタノールの接触表面積を増やすとともに抽出時間を1回当たり48時間（1日8時間ずつ6日間）と長くした。この抽出を3回繰り返して、得られた抽出物の変異原性をTA100、S9mix添加及び無添加条件下で測定した。

Fig. 2には、その変異原性試験から得られた dose-response 曲線を示してある。これらの図から抽出回数が増加するにしたがってその変異原性が低下していくことが認められた。また、Fig. 1の場合と同様に各抽出物は、S9mixを添加して代謝活性化した場合に変異原性を示すいわゆる promutagens を多く含んでいることが示唆された。

抽出回数にしたがってその抽出量が等比級数的に減少すると仮定し、各重油抽出物の変異原性の強さを求めた。同じ抽出物に対して2回の独立した変異原性試験を行って得られた結果をTable 1に示す。Table 1から、漂着重油の場合は、230,000rev/gの比較的高い変異原性比活性を与えることが判った。この変異原性（TA100、

S9mix 添加）の強さは都市部土砂の溶媒抽出物（東京都；55,990rev/g：1984年 n=51<sup>8)</sup>、81,230rev/g：1996年 n=9：未発表）の約3～4倍であった。なお、今回の試料は各1試料であったため、その代表値とは言い切れないものの、得られた変異原性は、C重油>漂着重油>船首重油の順となった。

### 3. 3 重油中のPAHの分析

代表的PAHであるBaPはDMSOとシクロヘキサンで液-液分配抽出を行った場合に、シクロヘキサン層に13%ほど残ることが報告されている<sup>1)</sup>。今回の液-液分配抽出ではその操作を2回ほど行っているため、殆どのBaPや他のPAHはDMSO層に移行しているものと考えられる。そこで、今回は、変異原性試験に供したDMSO溶液をPAH分析に供することとした。

Table 2には、PAH7種の分析結果を示してある。この表から、各重油とも今回測定対象としたPAH6種が全て含まれていること、48時間ずつ3回の連続抽出操作で殆どの当該PAHが抽出されること、また、代表値としては問題があるが単位重量当たりのBaP量はC重油>漂着重油>船首部分の重油となることなどが認められた。また、今回の漂着重油中のBaP含量（10,800ng/g）は都市部土砂の溶媒抽出物（東京都；44,400ng/g：1984年<sup>8)</sup>）の約1/4であった。

また、BaPが通常のAmes法で示す変異原比活性（TA100、S9mix 添加）は、約100rev/1 $\mu$ gであるから、この漂着重油の変異原性（230,000rev/g）に及ぼすBaPの変異原性の寄与率は単純計算では1%にも満たないことが推察された。

以上の結果から、重油中には都市部土砂の溶媒抽出物の場合と同様、BaPなどのPAH類が多く含まれその危険性が指摘されている<sup>9)</sup>ものの、BaP以外の強い変異原性を有する物質群も含まれていることが示唆された。

今回、漂着した重油の殆どは自衛隊、漁業関係、地方自治体、ボランティアなど多くの人々の手作業により回収されたが、海岸の砂浜等にしみ込んでしまったために回収困難となった重油も少なくないものと考えられる。TA100、S9mix無添加条件下で変異原性が認められたアラスカ試料に関するU.S. EPAの報告などを考慮すると、今後は海岸の砂などに残留する重油のBaP含有量やその変異原性を都市部の土砂の場合と比較しつつ測定していく必要がある。

## 謝 辞

この調査研究は、厚生省厚生科学特別研究費、環境庁国立機関公害防止等試験研究費によってまかなわれ、また、多くの方々の情報提供や試料採取協力などで実施することが出来ました。関係各位に謝意を表します。

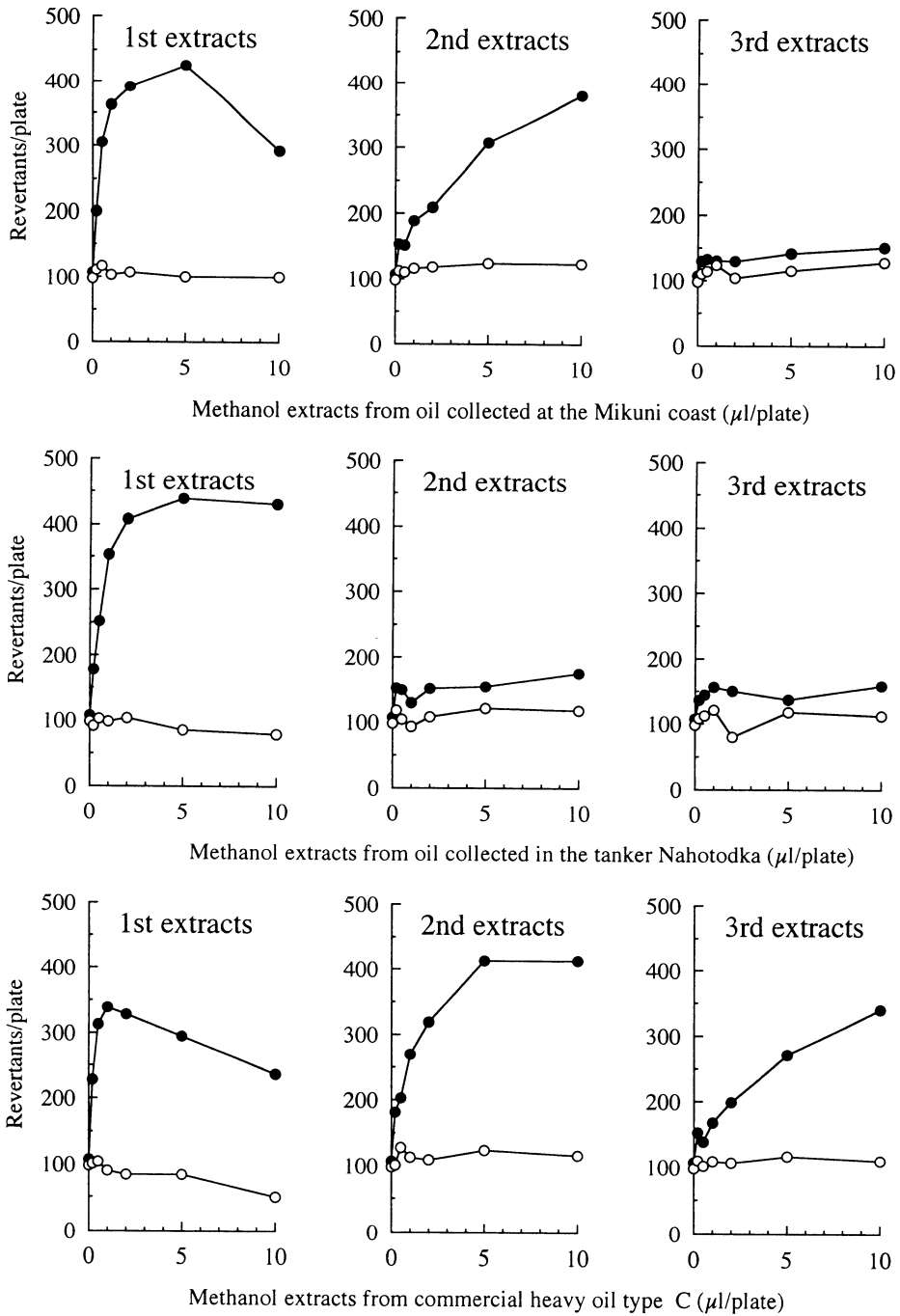


Fig. 2 Mutagenicity of the methanol extracts from heavy oils by the preincubation assay employing *S. typhimurium* TA100

● : with S9mix, ○ : without S9mix

Table 1 Relationship between mutagenic activity and the extraction time

heavy oil sample	mutagenic activity (rev/g. oil)		
	no. of fraction (extraction time)		
	I (0-48hr)	II (48-96hr)	III (96-144hr)
oil collected at Mikuni coast	139.000 (157.000)	2.040 (1.020)	neg. (neg.)
oil collected from the tanker Nakhodka	179.000 238.000 (209.000)	18.300 22.400 (20.400)	1.850 neg. 926
commercial heavy oil type C	318.000 251.000 (285.000)	63.800 93.900 (78.900)	21.400 18.400 (19.900)

Parenthesis indicates the average.

Table 2 Relationship between PAH contents and the extraction time

heavy oil sample	PAHs	PAH concentration (ng/g. oil)		
		no. of fraction (extraction time)		
		I (0-48hr)	II (48-96hr)	III (96-144hr)
oil collected at Mikuni coast	Pyrene	16.000	1.480	n. d.
	BaA	15.300	1.560	n. d.
	BkF	1.290	241	n. d.
	BaP	9.510	1.280	14
	dBahA	2.770	n. d.	n. d.
	BbC	6.000	n. d.	n. d.
	BghiP	6.330	3.420	80
oil collected from the tanker Nakhodka	Pyrene	8.960	288	9
	BaA	8.400	266	n. d.
	BkF	811	25	n. d.
	BaP	4.940	189	n. d.
	dBahA	1.260	58	n. d.
	BbC	3.000	144	n. d.
	BghiP	9.320	460	n. d.
commercial heavy oil type C	Pyrene	55.900	4.960	797
	BaA	32.000	3.120	n. d.
	BkF	3.050	456	81
	BaP	16.400	3.420	776
	dBahA	n. d.	n. d.	n. d.
	BbC	n. d.	n. d.	n. d.
	BghiP	35.300	11.000	2.960

n. d. : not detected

## 要 約

ナホトカ号から流出し日本海沿岸に漂着した重油の汚染状況を把握するための調査研究の一環として、平成9年1月16日に採取した漂着重油、ナホトカ号船首部分の重油および市販C重油中に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAH) の分析及び抽出物の変異原性を測定した。その結果、漂着重油のベンゾ(a)ピレン (BaP) 含有量は1984年に採取された東京都市部の土砂51試料の平均値の約1/4であることやその変異原比活性は同土砂の約4倍であることなどを認めた。

## 文 献

- 1) 松下秀鶴：石油中の多環芳香族炭化水素の分析法，燃料協会誌，**51**，25-35 (1972)
- 2) 高木敬彦，遠藤 治，後藤純雄，河合昭宏，村田元秀，松下秀鶴：ガソリンおよびディーゼルエンジンオイルの変異原性，大気汚染学会誌，**21**，312-321 (1986)
- 3) Yahagi, T., Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T., Sugimura, T. and Okada, M.: Mutagenicities of N-nitrosoamines on *Salmonella*. *Mutat. Res.*, **48**, 121-130 (1977)
- 4) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364 (1975)
- 5) Marnett, L.J., Hurd, H.K., Hollstein, M.C., Levin, D.E., Esterbauer, H. and Ames, B.N.: Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res.*, **148**, 25-34 (1985)
- 6) 田辺 潔，郭 錦堂，今宮俊一郎，松下秀鶴：カラム濃縮－高速液体クロマトグラフィー－分光蛍光法による極微量空気浮遊粒子のPAHの分析，大気汚染学会誌，**22**，334-339 (1987)
- 7) Claxton, L.D., Houk, V.S., Williams, R. and Kremer, F.: Effect of bioremediation on the mutagenicity of oil spilled in Prince William Sound, Alaska. *Chemosphere*, **23**，643-650 (1991)
- 8) 西村哲治，後藤純雄，加藤幸彦，奥貫正美，松下秀鶴：東京都の土砂中の変異原性とBaP含量，大気汚染学会誌，**19**，228-238 (1984)
- 9) Attias, L., Bucchi, A.R., Maranghi, F., Holt, S., Marcello, I. and Zapponi, G.A.: Crude oil spill in sea water: An assesment of the risk for bathers correlated to benzo(a)pyrene exposure. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth*, **3**，142-145 (1995)