

試水の毒性解析法

狩谷 貞二

自然水域における魚族の斃死事件の原因究明に際して現場で採取した水の中に少量の原因物質が残っているかどうかを確かめるために、濃縮毒性試験法と呼ぶ検査法を実施している。その水に毒性があるならば、次に毒性解析法と呼ぶ生物試験法を実施し、その毒性物質がどのような性格をもつかを知ることによって、どの種類の毒物群に属するかを確定したうえで、化学分析によってその毒物の定量を行い、再現試験を行って確かめ、斃死原因を確定する方法をつくってきた。これらの方法は斃死事件解明のためには欠くことのできない方法であるが、水質条件を比較・総合してとらえることができる点で、河川水質の把握にも役立つ面があるように思われる。

(1) 濃縮毒性試験

試水 1.8ℓ を 2ℓ ナス型フラスコに入れ、-12~-20℃の冷却液中にフラスコの $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ を浸漬し、はじめは毎分 100 回転程度で回転させ、フラスコ内の試水が壁面に結氷しはじめたら 50~60 回転/分に回転数を落とす。(図-1) 内部の液が 70ml 以下になったら、容器中の液をメスシリンダーに移し、容器壁面の氷の表面に 5ml 程度の蒸留水をそそぎ、洗浄してこの液を前に取ったメスシリンダー中の液と合する。このような洗浄を 5 回繰り返して、全液を併せてさらに蒸留水をそそいで 100ml にする。この液を 1800% 濃縮液と呼ぶ。原液は 100% 液、2 倍濃縮を 200% 液、10 倍濃縮を 1000% とする。

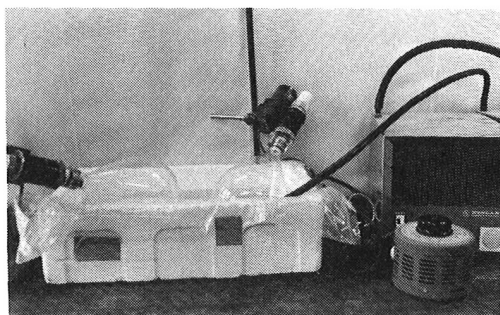


図-1

濃縮液 100ml を径 12cm のガラスシャーレに入れ、水温 25℃ に保ち、7 尾のアカヒレ (*Tanichthys albonubes*) を入れて飼育する。さらに、1800% 濃縮液を蒸留水で希釈して 1000%, 320%, 180% 液を作成し、原水すなわち 100% 液と対照として蒸留水のおのおの 100ml に 7 尾のアカヒレを入れて 48 時間飼育する。アカヒレは広東産の熱帯魚で、体長 2.60cm、体重 0.260g で、試験用には体長 1.5cm、体重 0.050g 程度の個体がいよい。

飼育試験開始後 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間の各時間経過後に観察し、生存魚は(+), 横転魚(±), 死亡魚(-)で表示し、死亡状況表を作成する。

(表-1) 死亡表から図-2 に従って各時間の半数致死濃度を求める。また、観察時に死亡した個体は取り出すが、瀕死または死後 30 分以

表-1

NH ₄ (PPM)	4	10	20	40	120
0 HR	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
0.5	+++++	+++++	+++++	-----	-----
1.0	+++++	+++++	+++++		
2.0	+++++	+++++	+++++		
3.0	+++++	+++++	+++++		
6.0	+++++	+++++	+++++		
12.0	+++++	+++++	+++++		
24.0	+++++	+++++	+++++		
48.0	+++++	+++++	+++++		
pH	9.55	9.95	10.10	10.32	11.61

TANICHTHYS ALBONUBES(アカヒレ)48HR-TL 17PPM

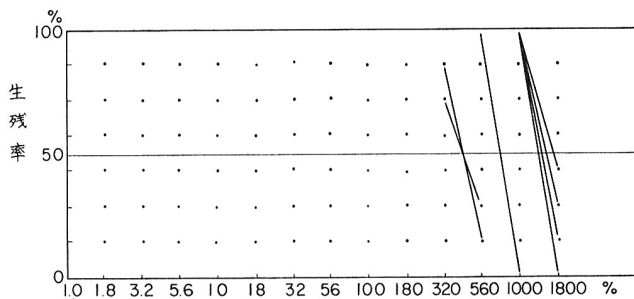


図-2 濃縮毒性 TLm 計算図

内の個体は Susa 液で固定し、パラフィン切片として H-E 染色（ヘマトキシリン-エオジン）を施して、永久標本とする。（図-3）

1000%液で48時間飼育後、半数以上の死亡がなければ、水産用水基準の急性毒に対する基本的な考え方からこの原水は水産用水基準に適合していることになる。

この濃縮毒性測定を阿武隈川に適用したところ、図-4に示すように白河、郡山、福島的主要都市を通過すると阿武隈川の濃縮毒性が強くなり、その後急激に弱まって、下流の都市までは毒性が及んでいないことが知られた。また、三菱製紙白河工場の排水を受ける堀川（st. 2）の水は紫色に変色して泡があり、COD（アルカリ法）は40ppm以上あるが、濃縮毒性1300%と安定しており、毒性に関する限り水産用水基準に適合している。堀川合流点より上流の本川の濃縮毒性は1000%以下であった。この地点の水は常に清澄であるが、その後小規模なメッキ業があることがわかった。図-4からわかるように濃縮毒性とCODとは、ほとんど関係がないと言える。

福島県原町市には特別都市下水路がつくられ、8事業場排水を集めて、海に直接放流している。これら事業場の排水のCODおよび48時間TLm値を調査した結果を表-2に示した。48時間TLm値が100%以下のものは染色、し尿処理、メッキの三事業場で、全事業場のうち最も毒性のないものはパルプで、ほぼ水産用水基準に適

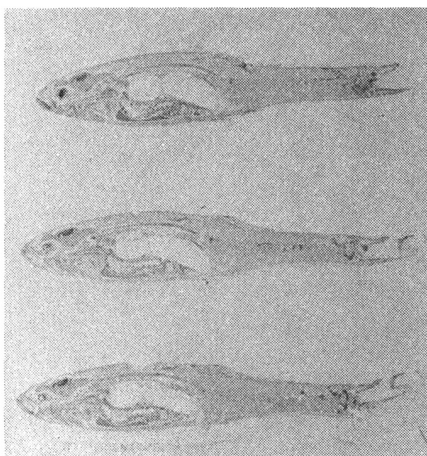
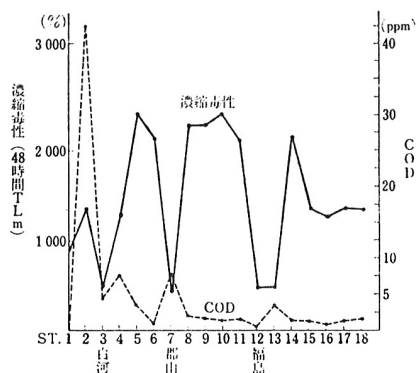


図-3



（昭和48年9月27日）

図-4 阿武隈川の濃縮毒性とCOD

表-2 原町特別都市下水路

工場業種	排水量 (m ³ /日)	COD (ppm)		48hr TLm (%)		COD 負荷量 (kg/日)		COD 負荷量 (%)		毒性寄与率 (%)	
		12/5	1/14	12/5	1/14	12/5	1/14	12/5	1/14	12/5	1/14
パ ル プ	6500	190	180	940	1400	1235	1170	51	53	4	2
抄 紙	20000	41	43	470	470	820	860	34	38	20	21
染 色	2500	130	68	75	84	325	170	14	8	16	15
し尿処理	800	17	13	23	24	13.6	10.4	0	0	17	17
金属表面加工	80	16	25	3.4	0.9	1.2	2.0	0	0	11	44
抄 紙	1900	16	7.3	28	420	30	14	1	1	32	1
電 子 I	101	8	0.1	660	420	0	0	0	0	0	0
電 子 II	—	6.4	1.7	340	750	—	—	—	—	—	—
特別都市下水路	計 算 値	76	70	152	160	2425.6	2226.4				
	実 測 値	60	59	340	420	1920	1880				
	合成排水				750						

合していた。排水をすべて受け入れた後の特別都市下水路の濃縮毒性は340～420%であったから、水量の大きいパルプおよび抄紙排水によって、毒性は強いが水量の少ない染色、し尿処理およびメッキ排水が希釈されていることがわかる。COD寄与率では全負荷量の50%をパルプが占め、さらに抄紙の1つが34～38%を占めているから、CODと毒性との関連性は乏しい。

また、2つ以上の排水の毒性と排水量から、合流後の予想毒性を求め、実験的に再現した毒性値との関係からこれら排水に含まれる毒性が相互に付加的に働くか、相乗的に働くか、拮抗的に働くかをすることもできる。2つの排水の48時間TLmと水量がおのおの $a\%$ 、 $A\text{ m}^3/\text{日}$ および $b\%$ 、 $B\text{ m}^3/\text{日}$ であるとき、混合排水の48時間TLm($Y\%$)は次式で計算できる。

$$A \frac{1000}{a} + B \frac{1000}{b} = (A+B) \frac{1000}{Y}$$

混合排水の48時間TLmの実測値が $X\%$ であれば

$X = Y$ のときは相加的

$X < Y$ のときは相乗的

$X > Y$ のときは拮抗的(独立)

と判定できる。表-2をみると、原町特別都市下水路において毒性が拮抗的に作用していることがわかる。

(2) 毒性解析法

この方法の骨子は、毒性のある試水を化学的・物理的に分画操作を加え、これらの分画を生物試験にかけることによって、毒性がいずれの分画に移ったかを知り、その移行性格から毒性物質を類型化し、試水中に含まれる毒性物質がどの類型に属するものから成り立つかを知ることである(図-5)。さらに、これと同時にアカヒレ死亡魚の病理組織的变化から、同様に毒物群の分類のいずれに該当するかを検査する。両者の結果から、おおよそいかなる毒性物質であるかが知られたうえで化学分析を実施し、定量を行うことになる。一種とは限らない毒性物質のおのおのの濃度が知られたのち、これら毒物による再現液を作成し、元来の毒性の強さが再現できるかどうかを病理組織的变化をも含めて検討し、再現できたうえで死亡原因を確定する。

分画手段にはいろいろな方法が考えられるが、現在使用されている方法は次のようなものである。

pH調整試験、通気試験、蒸留試験、加熱復元試験、有機溶媒抽出試験、ジチゾン抽出試験、蒸留乾固再溶解試験、チオ硫酸ソーダ添加試験などである。そのほか汙過分離法とか、イオン交換法などを用いることができるであろうが、今後さらに技術的進歩に伴って、生物試験に適した分画法を組み込むよう改善が望まれる。

pH調整試験は、試水または濃縮液をHClまたはNaOHでpH5およびpH10付近に調整して、アカヒレによる生物試験にかける。通気試験ではグラスフィルター3G4を水中に入れて、通気を30分間行い、生物試験にかける。蒸留試験は、試水200mlをHClでpH3付近に調整し、水蒸気蒸留する。受器のメスシリンダーにはpH11程度のNaOH液10mlを入れておく。留液が100mlに達したならば蒸留をやめ、留液と残液をおのおの200mlに蒸留水でメスアップする。両液について生物試験にかける。留液に毒性があり、残液に毒性が消失すれば酸性で蒸留される毒物である。留液にも毒性が消失すれば、酸性で加熱によって構造上の変化を生ずる物質である可能性が強い。その際は、中性で30分間沸騰させ、室温に冷却後蒸留水を加えて、もとの量にもどして生物試験を行ってさらに確かめる。これが加熱復元試験である。有機溶媒抽出試験では、試水100mlを分液ロートにとり、HClを用いてpH3付近に調整し、これに有機溶媒10mlを加えて3分間激しく振盪し、15分間静置後、水と有機溶媒層とを分離する。この操作を3回行って、水層に30分間通気した後、pH7付近にNaOHを添加して中和する。これをA分画とする。A分画は蒸留水を加えて100mlにしておく。一方、有機溶媒層をpH11付近のNaOH水30mlで3分間激しく振盪し、上法と同様に分離し、これを2回繰り返す、合わせた水層を通気・中和・100mlにメスアップしてB分画とする。これらを生物試験にかける。ジチゾン・四塩化炭素抽出試験では、前述の有機溶媒抽出試験でA分画に毒性が残存する場合、A分画に含まれている金属イオンを、ジチゾンとキレートをつくらせて、四塩化炭素で抽出する分画法で、pH3、pH6で抽出を行う。以上の試験法以外に残留塩素のある試水には過量のチオ硫酸ソーダを添加すれば、特に高濃度でない限り、毒性を消失できる。これなどは、いわば添加試験法とも名付けられるべきもので、今後この方法にはいろいろの手段が開発されてよい。

アカヒレ死体の組織検査法では、アカヒレは死後Susa液で固定され、パラフィン法で4~5μの厚さに縦断し、切片とする。これをH-E染色を施し永久標本とする。この標本は、体のすべての器

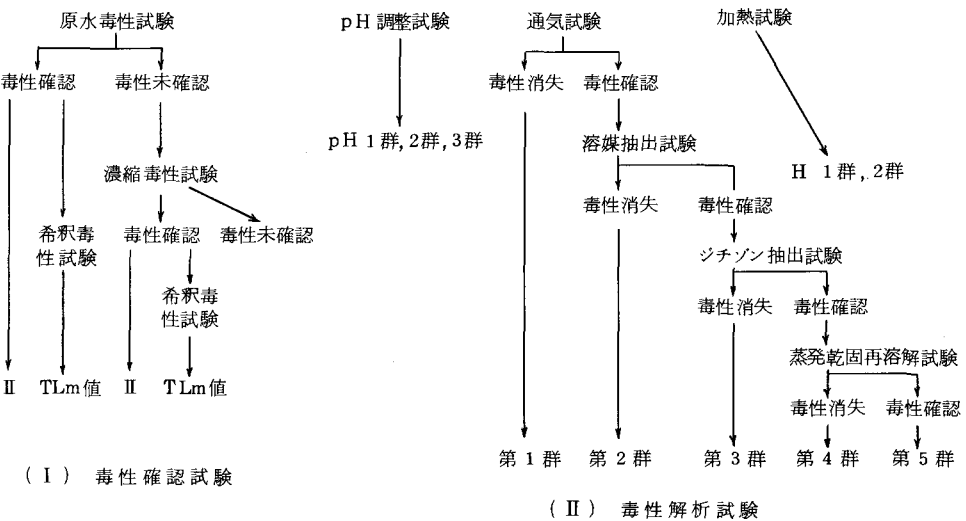


図-5 毒性確認試験および毒性解析試験

官に起った病理組織的变化を観察することができる利点をもっている(図-6)。

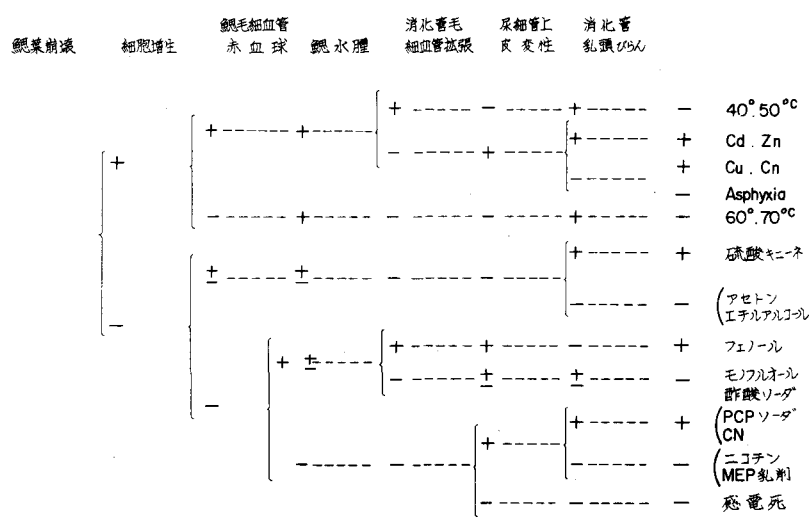


図-6

茨城県七会村を流れる高取川で、上流にあるタングステン鉱山排水は処理されて法規上問題がないにもかかわらず、下流部で魚の生息をみないとの訴えがあった。上記の毒性解析法を実施し、表-3に示すように原水で3~6時間でアカヒレの死亡が確認された。pH調節試験にあっては、pH9以上では48時間全数生存する。加熱復元試験、*n*-ヘキサン抽出試験では毒性の変化がなく、pH3によるジチゾン抽出試験で水層から毒性が消失した。金属分析の結果、表-4に示すようにCuが毒性本体で0.86ppm含まれていた。Cu 0.86ppmの再現液ではほぼ同じ毒性を示した。(表-5) ジエチル・ジチオカルバマートを指示薬として河川水中のCuの出所を調査したところ、ある沢の流入する本川河床から湧出するものであることが知られ、沢水にはCuの流入はなかった。

表-3 毒性解析試験結果

(48時間 TLm 14%)

試験法	原水	pH 調整 試験					加熱復元試験	<i>n</i> -ヘキサン抽出試験	ジチゾン抽出試験 抽出 pH 3
		pH 5	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10			
半数致死時間	3-6	3-6	48	48 6/7生残	48 全数生残	48 全数生残	3-6	3	48全数生残
毒性変動		-	±	±	+	+	-	-	+

注：+ 毒性除去， ± 毒性減少， - 毒性変動なし を示す。

表－４ 重金属分析結果

(原 水)		
金 属 種	濃 度 (ppm)	48時間 TLm (ppm)
Cu	0.86	0.09
Zn	0.14	5.2
Mn	4.4	1400
Cd	0.13	0.63
Ni	0.15	38
Fe	0.04	(10～100)
Pb	0.02	12
Cr	ND	1.2

表－５ 再現試験結果

区 分	原 水	再現液
Cu(ppm)	0.86	0.86
pH	5.8	5.9
経過時間(h)	致 死 率 (%)	
0	0	0
2	0	14
3	43	57
6	100	86
12		100

(3) 検屍法

公共水域で正常な水質を保っている場合には、魚をはじめとして多くの水生生物が生息している。今ある毒物を河川に排出したとすると、その濃度が生命に危険なほどに達すれば、多くの水生生物は逃避するか、又は死亡する。毒物が定常的に流されていれば、水域からSamplingした水を分析することによって、その濃度を知ることができる。しかし、一般に工場の排水などでないと定常的に流されているような条件はなく、著しい濃度変動をしており、多くの場合は一時的にのみ毒物が通過をする。したがってSamplingした水の中に毒物が入っているかいないかは偶然性に支配される。このため常時観測がなされ、多くの機器が開発されつつある。しかし、ここでも濃縮毒性試験の項で述べたように、分析手法上では目的とする1項目については正確な値が観測されようが、その他の魚族にとって有害なすべての項目を知るわけにはいかないという欠点を保有している。そこで公共水域で水生生物の挙動から、その場の変動する水質環境のcriticalな水準を重視した観測方法を作ろうとする研究がある。現在このような調査法は大別して3種類あるように思われる。その1つは生息している種の分布状況に視点をあてるもので、故津田松苗博士らによって体系化されている水生昆虫類を指標とした水質の類型分けが代表である。この手法は細菌・原虫類・藻類・水草・輪虫類・甲殻類・貝類・多毛類などをも指標として研究されている。この考え方の延長線上に水産生物を指標とした公共用水域の類型化の適用目的としての水産1級・2級・3級がある。

その2は、マスコミなどでよく報じられる魚族の斃死事故に焦点をあてた見方である。これまで魚の死亡事故に当たっては、発見時に採水したものの中に毒物を検出し得なければ、その原因を知ることができなかったが、残された死体から魚が出合った環境条件の反映を見出す方法が開発されてきた。このことはいいかえれば、自然に生息する魚族の死を指標として一時的環境の悪化を観測する方法とみることができる。

その3は、生息している魚族の形態的生理的異常性を指標として環境を評価する手法である。この手法は現在さらに3手法に分類されよう。1つは形態的異常をとりあつかうものであり、特に現在は脊椎骨異常に焦点があてられている。主として有機リン系農薬に遭遇することによってウグイ・ボラが特に骨折し易いことを利用するわけであるが、骨折の原因が必須アミノ酸欠乏、ビタミン欠乏、Cd、有機スズ、カルバメート剤、有機塩素系農薬などに遭遇することなど多数の報告があり、これらの辨

別及び骨折条件などに対する知見は不十分である。2には、生理的異常をとらえる手法で、生きている魚体に電極を挿入し、魚体電流を測定する手法である。これは今後技術化が進められてよい手法である。3は生体濃縮を利用し、成分異常を指標とする手法である。海域に流入する極めて低濃度のCuをカキがよく濃縮する。水産用水基準によれば、 $0.075\mu\text{m}-\text{Cu}$ 以上であればカキのCu含有量は高くなることが知られている。しかしCuを蓄積したミドリガキの発生する海域でホタテガイにはCuの蓄積は認められない。したがってカキの極めて敏感なCu蓄積能力を利用して海域Cu量の監視をすることが可能である。また各種魚類がHg及び有機塩素剤を濃縮することは良く知られている事実である。特にウグイではHg汚染のない水域とHg汚染のある水域とではHg含有量と体長との相関に相違があるが、これを利用してHg汚染の有無を探索している。

ここでは公共用水域で有害成分が一過的に通過することによって発生する死亡事件の死体から有害成分を確定する方法について述べる。

検屍法は、調査手法の上から、病理形態検査法、生理機能検査法、分析検査法の3手法に大別される。これらは、それぞれに長所・短所をあわせ持つが、相互に有機的に組合せることにより効果を上げて使用することができる。

検屍の目的は、死の病因論的分類のいずれに該当するかを決定することを目的とする。死の分類は次の10項目にしておくのが便利と考えている。

(1)創傷死・(2)寄生体症による死・(3)感染症による死・(4)栄養性疾患による死・(5)窒息死・(6)熱による死・(8)圧力変化による死・(9)中毒死・(10)放射能汚染による死

以上の分類は相互に明瞭に判別し得るとは限らないし、また魚族の死因のすべてを網羅しているわけでもない。斃死事故の原因をつきとめるために、死体に残された形態の症候から機能的異常へ、さらに成分的異常の探査へと進めてゆく過程において、これまで得られている知見に照らし、該当しない原因を消去して真の原因を見出すための手掛りとしての分類である。したがって将来多数の例証があつまり、また探査技術の進歩にとともに、さらに便利な分類法に改善されるべきものである。ここにあげた順序は、若い番号ほど形態的異常を認めやすく、順を追って行くほど機能的、分析的技法を導入しなければ異常を認め難いものである。また、これらの死因は同時に2項目以上に該当する場合もでてくる。このような場合には、どれがより直接的であり、将来予防措置を講ずるためには、どの原因を除去することが適当であるかという死因の比重を明らかにすることが望ましい。

(3)－1 現場調査

現場調査は、斃死事件に当って最初に行われ、かつ極めて重要な調査である。その目的は、被害の実態すなわち被害種、被害範囲、被害量を知り、次いで加害原因ならびにその作用方向、作用日時、作用形式を推定するための証拠の収集である。

初動調査は、斃死事故発生後でできる限り速やかにとりかかることが望ましいのであるが、発見・通報までに不特定な時間が経過することは避けられない。この間現場は刻々と変貌するものと考えられるが、また一方、かなりの日時が経過した後でも、それなりに捜査に役立つ資料をあつめることができ、全く証拠のなくなるのには予想以上長い時間を要するものであることを銘記しておきたい。現場百遍という刑事捜査上の言いならわしは、魚族斃死事件の捜査にあたっても鉄則である。それゆえ、速やかに現場調査にかかると同時に、現場保存についても十分配慮しなければならない。

調査にあたっては、現場における被害体並びに環境の異常性を捉え、記録と保存に万全を期すのであるが、収集した資料は後日の重要な証拠となり、その多少が以後の捜査の成否にかかわるのである。捉えられた事実の中には、一見事件とは無関係と思われるものもあるが、調査を進めてゆく過程で、

事件解明の重要な手がかりを与えることもある。それゆえ、その時気付いた事実は、すべて収集し資料とすることを心掛けるべきである。

(a) 試料の採集

(a-1) 現場採水

斃死事故が発生してから、発見され通報によって現場に出動して採水するに至るまでには、かなりの時間を要する。この間、自然水域では、環境阻害要因は流失するか、または拡散希釈される。したがって、一刻も早く、最も毒物残留の可能性が高いと考えられる場所で採水することが肝要である。試水は、順次生物試験にかけながら調査を進めるので、できるだけ多量であることが望ましく、海水の場合は特に20ℓ、淡水の場合には5ℓを最低限の量とする。瓶は良く洗浄しておき、現場の水で2回以上洗浄した後、注入口まで一杯に採水し、空気との接触面をできる少なくする。採水後なるべく早く冷暗所に保存する。同時に溶存酸素の定量のために酸素瓶に注意深く採水し、定法により固定する。また、現場水温の測定を行う。溶存酸素量を飽和度で求める場合には、汽水・海水ではさらに塩素量の測定も行う。

(a-2) 斃死魚の採集

斃死魚は、水中にあるものの中から完全に死んだもので、かつ泥のつかない個体を選び、洗浄することなく1尾ずつポリ袋に収納し、採集位置および時間を記入する。重要なことは、体表粘液には作用毒物が濃縮されている場合が多いので、粘液の散逸を防ぎ、また他から汚染されることのないようにすることである。

分析検査にかけるためには、1項目の分析に平均5gを必要と考えれば、少なくとも魚種ごとに5g以上の個体を20尾以上採集する。魚体が小さい場合は、数個体あわせて分析試料とすることも考慮する。さらに粘液検査法にも使用すること、体長・体重を測定して肥満度を出す必要もあることから、試料はできるだけ多く採集し冷蔵または冷凍して保存する。

斃死魚の新鮮な個体は、病理組織検査にかけるため、魚体容積の20倍量の10～20%ホルマリン液で固定する。魚体は腹部の片側の肉片を除去し、内臓の固定が迅速に行われるようにする。試料数は各魚種ごとに5個体位あればよい。

死後時間経過の長いと思われる個体と短いと思われる斃死体から、それぞれ10尾以上一方の眼球を取り出し固定する。固定液はSusa液が望ましいが、止むを得ない場合には、10～20%ホルマリン液で固定し、実験室に持ち帰ってから、ハサミで網膜を切り取り、Susa液に固定し直す。斃死時間帯を網膜の色素移動状態から判断するためのものであるから、斃死の発生した初期から終期に至る個体を集めることが望まれるわけである。病理組織検査にかける試料と異なり、死体現象が相当に進行し、自己消化が進んでいても、網膜色素の動態を知ること¹⁾は可能である。

CaおよびAl等の粘液検査法にかけるため、斃死体の鰓蓋をハサミで切り取り鰓を露出させ、鰓粘液をカバーガラスでかきとり、塗抹標本を作成する。1尾について4枚ずつ、5尾以上の塗抹標本を作成する。

(a-3) 現場で生きている魚の採集(衰弱魚を含む)

横転して生きている魚がいたら、静かにタモ網で採集し、飼育用コンテナに清澄な水を5cm程はった中に放っておき、30分以上経過後、正常に復したか否かを検査する。多くの毒物や溶存酸素欠乏が原因であれば、横転初期に清水に入れるとほとんどの個体は回復する。しかし、酸・アルカリのような腐蝕性の強い毒物では横転後回復する個体はほとんどない。この実験は現場で行う実験なのでなかなか面倒なことではあるが、毒物の推定に1つのヒントを与える。

衰弱している魚がいたら、タモ網で採集する。これは病理組織検査に最も適している試料である。採集魚の心臓から採血し、血液塗抹標本を作成する。その後魚体は10～20%ホルマリン液に固定する。この血液塗抹標本からは、血球組成比・赤血球径の測定および血液像の観察を行い、貧血その他の診断をすることができる。

また、斃死事故の発生した周辺区域の魚も各種の網で採集し、1尾ずつポリ袋に入れて持ち帰る。これらの魚は斃死した魚の対照試料として用いる。特に体長・体重を測定し、斃死した魚のそれと比較することによって、斃死魚が特にやせているか否かを検討する。もし斃死体がやせている場合には、感染症・寄生体症および慢性中毒が疑われるが、急性中毒の場合には、斃死体も生きている個体も同様の体長・体重の相関を示す。

(b) 被害生物種組成

現場で斃死している生物種の組成は、斃死原因およびその動態と深いかわりあいを持っている。したがって、被害生物組成を明瞭に記載し、記録として写真等に撮って残すことが、現場の証拠保存の観点から重要である。一般に、アユのような経済性の高い魚類の斃死が起ると、アユだけが重視され、ウグイ・オイカワ・タナゴ等の経済性の低い魚類の斃死は見過されることが多い。それゆえ、底生生物等の小動物の死体・藻類・水草の状況に至るまで意識して積極的に調べ、記録しなければならない。

大別して被害生物種組成には、三つの場合がある。

- 1) 棲息種のほとんどすべての種が被害を受けている場合。
- 2) 棲息種の中で特定の数種が被害を受けている場合。
- 3) 棲息種の中で特定の1種が被害を受けている場合。

1) および2) の場合は環境障害の可能性が強い。これはあく迄も可能性であって、明確に区別できるものではないが、その後の捜査に大いに役立つものである。

環境障害の場合には被害を受けた種と、受けない種との感受性および耐性の差について考えてみる必要がある。一般に耐性の低い生物ほど、被害は広範囲にわたる。

(c) 被害体の分布

被害体の分散状況はできるだけ刻明に記載すべきである。被害体の分散状況は、加害原因がどの方向から侵入し、どの方向に去ったかを知る上に重要である。河川の場合は、斃死体の存在する最上流部において、その分散が左岸から始まっているか、右岸から始まっているかを調べる。それによって加害要因がどの位置から侵入したのかを知ることができる。昭和51年7月、仙台市内の小河川で、凝集剤の硫酸アルミニウムの原液の放出による斃死事故があった。この場合、最上流部の斃死体は左岸排水管用直下に分散しており、右岸排水管用側には斃死体は見られず底生生物が石の裏に多数生息するのが認められ、後に、加害原因物質は左岸排水管用から放出されたものであることが明らかになった。

被害体が網の中とか、湾入部のみで発生する場合がある。このような場合には2つの型がある。1つは比較的毒濃度が低く、他の場所では魚族が逃避して斃死に至らず、限られた場所で逃避できず斃死する場合。もう一つの例は、加害原因がその区域内で発生した事例である。前者の例は、鬼怒川で遡上稚アユが簀建網の中で斃死した事件である。上流左岸の工場排水中に、CNが混入したため起った事故であったが、網の中以外には、斃死は全く認められなかった。工場排水口より着色水を流してみると、図-7では点線で示してあるように流下し、網は排水拡散区域の中につつまれた。

斃死体は必ずしも水中だけに見られるものとは限らない。河川では川岸の水際より高い場所に散在することがある。このような場合は、最も高い位置にある死体を結んだ線に水位があった時点より前

に斃死が起ったことを示している。自記水位計の設置してあるような河川では後にその時刻を確定することができる。

斃死体が、観察時、水中に浮いているか、沈んでいるかを記載することも、加害原因・死後経過時間など推定するのに有力な場合がある。²⁾

(d) 被害体の形態

斃死体の形態上の異常に関する所見は、実験室に持ち帰ってから刻明に調べるのであるが、現場でもできる限り詳細に観察しながら捜査を進めなければならない。

(3) - 2 中毒死

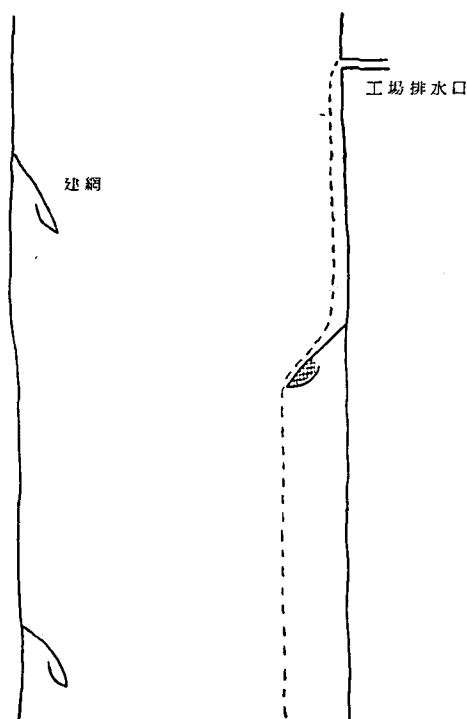
工場排水による魚族の死亡は、ほとんどがこの死に属し、その原因となる物質も無機物・有機物と極めて広範囲にわたる。

自然条件のもとで、魚の棲所に毒物を含んだ水が流入してきた時に、魚は多くの場合、ある濃度以上であれば逃避行動を示すであろう。したがって、魚が識別嫌忌し得る毒物による斃死事故は、突発的に、かつ急速に毒水によって魚がとりにかこまれて効果的に逃避できない状態になった場合にのみ起きるものであろう。火事のように、煙にむせびながら、逃げ場を失って焼死するのと同様であろうと想像される。したがって、常時毒水が流れているという条件では、案外斃死事故とはならないものである。

毒溶液に入れられた魚は、体表粘液分泌が刺激され、分泌された粘液は、溶液中の多くの物質と結合し、時には変性して、体から脱落する。魚が活着している時には、次々と新しい粘液を分泌するから、体表粘液中にはあまり毒物の濃縮は起こらず、死亡して体表粘液の分泌が停止した後で残っている体表粘液には、死亡時点以降の環境水中の種々の物質が収着され濃縮されている。この現象の利用が粘液検査法であると共に、死体採集の際に、粘液を失うことのない様に留意する理由でもある。

一方、腐蝕毒は、上皮とか粘膜の表面局所組織に障害を与える。これには体表粘液・口腔・咽頭・食道・胃・腸・鰓などが含まれる。鰓上皮では、薬物によって刺激されて、上皮細胞の細胞増加が起ったり、また溶液を呑みこむことによって消化管乳頭上皮が腐蝕され損傷される。この現象が病理組織学的検査に利用される。このような症状のうちで、第1群症候と呼ぶ。第1群症候に関する研究は極めて多数にのぼり、これらの報告はいずれも、鰓上皮細胞増生、粘液生産過剰、顆粒白血球侵潤を含む炎症、水腫、毛細血管拡張、鰓導出導入動脈拡張、充血、球状鰓弁片、隣接鰓弁片癒着、上皮細胞壊死・脱落等の症状を述べている。また狩谷・津川(1977)³⁾がアカヒレの病理組織学的変化を調べ、毒性解析法に利用したことは既に述べた。

粘液の防御反応にもかかわらず、環境水中の毒物は、鰓または消化管から体内に侵入し、血液によ



■ 死体分散区域

図-7

って体の各部に運ばれ代謝される。毒物が餌のような形で経口的にとり入れられたか、環境水中から鰓および消化管を通じてとり入れられたかは、体の各部の毒物量を測定することにより、ある程度判別しうる。すなわち、敦賀(1963)⁴⁾は、Hg-203を入れた海水中で飼育したムラサキガイを、17日間コイに食べさせ、その後のHgの分布を調べた。この結果は、消化管>頭腎=腎臓>鰓=肝臓>その他の器管、の順であった。一方、芳賀ら(1970)⁵⁾は、2種のHg濃度(10ppm, 0.5ppm)の飼育水中で殺したフナの各部のHg量を測定し、どちらの濃度でも、鰓>腎臓>皮膚=脾臓>消化管>その他の器管の順であった。したがって両者の結論から、環境水より侵入した場合には鰓に多く、経口的に与えられた場合には消化管に最も多いことが知られる。

局所から吸収されて排泄するまでに、途中通過した臓器組織にあたる障害を第2群症候と呼ぶ。多くの場合、血液・肝臓・腎臓に種々の障害をひき起こす。狩谷・津川(1977)³⁾によって報告されたアカヒレの病理組織学的変化の類型化の指標として用いられている尿管上皮の退行変性は、多くの場合この第2群症候に含まれる。

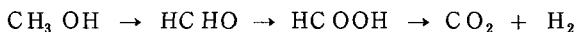
毒物の吸収作用の結果、一定臓器に対する毒物の特殊作用が現われてくる場合を、第3群症候と呼ぶ。たとえば、吸収された毒物が脳髄に作用し、そこに興奮の影響があれば、心臓搏動数の減少・吸収障害・間代性けいれんなどの症状が生ずる。

毒物吸収の結果、全身の諸臓器に影響が現われてくる場合を、第4群症候と呼ぶ。これは肝臓および腎臓の炎症とか、呼吸の興奮とか、無選択的に広く全身に作用がおよぶ場合の症状で、きわめて複雑な様相の症状である。

これらの症候はいずれも生体が死に至る過程で示す異常な特徴であり、死とともにこれらの症状の一部は消失し、死体現象が進行することになる。したがって病理形態の調査の場合には、その時点、その時点で残っている症候を見出し、その原因を類推するわけであるから、現場調査の際に生きているもの、または瀕死のものが存在する場合には、その行動ならびに症状を細かく観察し、記載することが重要である。

死に至る時点で、分析化学的に体内の薬物分布を調べ、生前に作用した薬物が急性的に生体内を通過しつつあった証拠を見出そうとするのが分析化学的検査法である。薬物は、また、体内を通過する過程で、種々の代謝を受ける。CNは肝臓で $CN + S \rightarrow SCN$ の形にかわり、PCPは硫酸と結びついてエステル形に変わる。代謝の結果、このような形式の産物のできることを考慮して、前処理定量法を選び、分析値の意味するものを検討しなければならない。

メチルアルコールは生体内で、次のように酸化されて著しい毒性を示す。



ホルムアルデヒドの場合も酸化して右の方に進行する。この場合も、分析法によって検討できる。生体内の薬物代謝が解毒的に働く場合には、薬物の生体内侵入速度と解毒速度との具合が死を決定することになるであろう。たとえば、魚のCN中毒の場合には、魚族が横転した時直ちに清水に移せば、ほとんどの個体は回復する。したがって、地方によってはCNを用いて生きた魚を捕獲することが行われていたことがある。しかし、一方強い腐蝕毒では、短時間高濃度にさらされると、直ちに環境は回復したとしても、時間の経過にもなって漸次死亡することがある。キンギョをpH3の酢酸溶液に1分間浸漬しただけで、1時間後には1尾死ぬに過ぎないものの、6時間後には過半数が死亡する。このように薬物が作用してから死亡に至るまでの時間の長い場合には、原因究明は極めて難しい。

魚体は、死亡後、死体現象が進行する。法医学の分野で、人体の死体現象については、死後時間の

推定の目的もあって、刻明な研究が行われ経験も積み重ねられてきているが、魚体の場合には少ない。

魚は死の瞬間に水中で浮くものもあれば、沈むものもある。狩谷・津田(1977)²⁾は、全死亡個体中の浮上個体の百分率を浮上率として、浮上率が、死亡率から時間の経過にともなって変動することを報告している。アカヒレのPCP溶液に入れて死亡させた後の浮上率は図-8にみられるが、これらの浮上率の時間的変化は、魚種によっても、水温によっても変動し、その変動様相から死亡原因の類型化を試み、死後経過時間を推定するのにも有用なことがわかった。

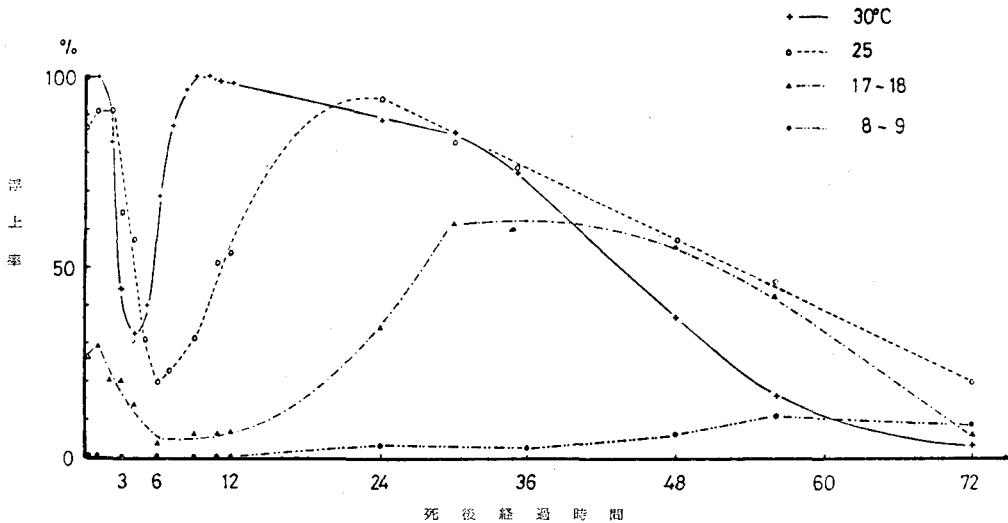


図-8

毒物の類型化は、その作用機構からする分け方(毒物学)と、分析化学的検索方法による分け方(裁判化学)とがある。前者では、腐蝕毒・実質毒・酵素毒・血液毒・神経毒等に分類し、病理組織学的検査では、この分類が有用である。後者では、第1属毒物、第2属毒物、第3属毒物、第4属毒物の4属に分類する。

a) 第1属毒物

水蒸気蒸留により留出してくる毒物である。酸性で蒸留されるものに、黄リンおよびリン化合物、シアンおよびシアン化合物、揮発性ハロゲン化合物、アルコール類、アルデヒド類、フェノール類、炭化水素等がある。

黄リンについては、カナダの磷酸製造工場から排出され、ニシン・タラ・ウナギ・オヒョウ等が大量に死亡した例がある。ニシンは黄リンで中毒すると体表が赤く着色し、特に口吻および眼に著しい。黄リンの致死濃度は弱い魚では0.0005 ppmで、シアンより毒性が強い。黄リンは肝臓中に著しく蓄積が認められるので、この現象を利用して鑑別しうる。

シアンは、メッキ工場及び乾留工業関係の排水に含まれ、また時に魚捕りに用いられて、全国でも被害例が極めて多い。狩谷ら(1967)⁶⁾はキンギョを用いて、各濃度のKCN溶液中で殺し、死体中のCN濃度をピリジン・ピラゾロン法で測定し、低濃度でも検出しうることを報告している。定性的には、狩谷ら(1959)⁷⁾によるベンチジン試験紙法、奈良・馬場(1966)⁸⁾によるグアヤク脂試験紙法があ

る。

アルデヒド類については、フェノール樹脂工場の下流でフナが斃死し、ホルマリン中毒によるものではないかと疑われたことがある。芳賀ら(1972)⁹⁾は、コイ・フナ・ニジマス他 11 種の魚類及びテナガエビ・イサザアミの 48 時間 TLm が 25~50 ppm の範囲にあることを報告した。ホルムアルデヒドによる斃死魚では、高濃度の場合、角膜は白濁し、鰓蓋及び体表に皮下出血し、鰓葉には腐蝕が認められた。また 48 時間 TLm 値付近の濃度に接触した魚類のほとんどが、生死にかかわらず、鰭の遊離縁辺部が黒化し、種によっては体表に黒斑の見られるものもあった。また、ニジマスの中毒魚では、網膜の錐体ミオイド内に空胞を生ずる。魚体内ホルムアルデヒドを硫酸酸性で蒸留し、NaHSO₃ 溶液で受け、クロモトロブ酸法で定量し、正常魚の測定値と比較すると、中毒魚でははるかに高い検出量のホルムアルデヒドが認められることを報告した。

フェノール類は、石油化学工業で広く用いられると同時に、乾留工業からも排出される。ガス製造工場からの排出によって、過去に各地で多数の斃死事故が発生したことがあり、さらに小規模では病院における殺菌剤としてのフェノール類の廃棄による斃死事故もあった。

狩谷ら(1968)¹⁰⁾は、ワキン・ニジマス・稚アユを用いて、フェノールの 48 時間 TLm を求め、ワキンでは 50 ppm 以下ニジマスでは 4 ppm 付近、アユでは 9 ppm 付近であった。斃死した魚体の外観は、肉眼的には特に変化が認められず、死に至るまでの過程で、横転後死亡するまでの時間の長いことに特徴がある。中毒魚の死体を、リン酸性で水蒸気蒸留し、留出液についてギブス法でフェノールの定量を行うと、中毒魚ではいずれもフェノールを検出した。魚体内分布は、肝臓・鰓・皮膚・脾臓に多く、腎臓がこれにつぎ、消化管及び筋肉に少なかった。一方窒息死の後でフェノールの作用した個体の場合には、皮膚・鰓・筋肉に少量検出され、消化管・肝臓・脾臓・腎臓からは検出されず、生前作用したものか、死後作用したものかを区別しうる。なお斃死魚体からフェノール類を検出する場合の一つに、著者は、赤潮による死亡と考えられる魚体から多量のフェノール類の検出される例を度々経験している。このフェノール類の蓄積する機構は全く不明であるが、今後の精査を期待したい。

b) 第 2 属毒物

酸性のエチルアルコールで抽出される毒物である。この属は、Stas-otto 法でさらに 4 族に分類される。すなわち、酒石酸酸性の水溶液からエーテルに移行する毒物を含む第 1 族、アルカリ性水溶液からエーテルに移行する毒物を含む第 2 族、アンモニアルカリ性水溶液からエーテルまたは温アミルアルコールに移行する第 3 族、第 1 族から第 3 族までの溶媒に移行しないで、水溶液中に残存する毒物を含む第 4 族とである。水質汚濁に 1 番関係の深いものは、ほとんど第 1 族に含まれ、ストリキニーネなどのアルカロイドの一部、ニトロ化合物・有機燐剤・有機塩素剤・有機フッ素剤などが含まれる。第 2 族はニコチン・キニーネ等のアルカロイド・アンチピリン・アンフェタミン等の医薬品、第 3 族はモルヒネ、第 4 族はクラリン・ナルセイン等が含まれる。

近時斃死事件で最も頻度が高かったのは農薬であるが、毒性の強さと入手のし易さから PCP の事故が多かった。ニジマスに対する毒性は 10 日間 TLm 値で 0.06 ppm 程度の毒物である。PCP による斃死体は外部に表われる形態的証拠も見出されない。48 時間 TLm 値付近で 7~10 ppm 程度の PCP が魚体中に見出される。死体を 24 時間水洗いしても、3~5 ppm 程度は残るので斃死体から PCP を確認することは容易である。PCP は体内侵入後、硫酸エステルとなって腎臓より排出され、かつこの型になったものでも、酸性水蒸気蒸留によって PCP として回収されるから、生体に作用した場合には腎臓からかなりの量が検出される¹¹⁾。DDT については、カナダ・アメリカで多くの報告が見られる。

c) 第3 属毒物

金属化合物の毒物である。水質汚濁としては、金属工業・鉱山・メッキ工業関係の工場から排出され、時には毒流しとして硫酸銅が用いられたこともある。砒素・水銀・アンチモン・鉛・銅・亜鉛・クロム・錫などの化合物が含まれる。これら金属イオンの、魚族におよぼす影響濃度に関する研究は極めて多数にのぼっている。病理組織的变化に関する研究も、他の薬物に比べて、比較的多数の研究がある。いずれも金属イオンが腐蝕毒として示す第1群症候についての記載がある。

中毒魚の各金属含有に関する研究は、いずれも死体における金属の分布が、体表および鰓に多いことを報告している。したがって、正常魚はほとんど含まれない金属の場合は、体全体を分析することで鑑別しうが、Cu, Zn, Hgのように、生体内に常在する金属では、正常魚体に含まれる含量を差引くか、または環境水から由来した金属のみを検出することが必要となる。例えば、Cuでは、一般に淡水魚体中には、1.3ppm程度存在し、最大は2.2ppmのものもあった。したがって、2.2ppm以上を判定基準とし、これ以上検出されれば、Cuが作用したと推定しうる。しかしその境界線における判定は微妙である欠点がある。Mount (1968)¹²⁾は、Zn中毒死の場合、Znの生体含有量が多く、かつ個体差が大きいの鰓のZn含有量と、鰓蓋骨のZn含有量との比を求め、慢性的中毒では、この値は正常魚の値と変わりなく、それぞれの絶対量が多く出るが、急性中毒では、鰓のZn含有量が著しく多くなり、比は大きくなることで識別しうると報じている。

一方、後者に関する報告としては、日比谷 (1959)¹³⁾によるZnについての組織化学的研究と、狩谷ら (1959)^{7) 14)}による有機試薬を用いて、体表粘液から、Cr, Mn, Pb, Cu, Ni, Feの検出を行った報告がある。ただし、これらの方法では、他の原因により死亡した後で、金属イオンを含んだ水に死体が接すると、金属中毒死体と同様に検出される欠点がある。

d) 第4 属毒物

特殊な方法で確認しなければならない毒物を一括している。この毒物には、酸・アルカリ・塩素およびガス類等が含まれている。例えば、アルカリの1つとしてCa(OH)₂はゼラチン工場、カーバイト工場から排出されたり、セメント関係による被害の要素である。芳賀ら (1977)¹⁵⁾によれば、斃死の粘液の塗抹標本を作成し、アリザリンSで染色し、酸で辨色すると、粘液中のCa, Alが赤色に染って認められる。次いで、AlとCaの判別は、アルミノン法で赤く染まればAlで、N-N法で青く染まればCaである。また魚体中のAlの分析によっても確められる。また、一酸化炭素については、狩谷・佐藤 (1969)¹³⁾は、アユ・ニジマス・コイの24時間TLm値を求め、おのおの0.15ppm, 0.16ppm, 3.7ppmで、コイは耐性が大なことを報告した。判定例としては、死体の血液について、Hand Spectroscopic法、Photometric法、微量拡散法の検討を行い、微量拡散法により、Pd薄膜の有無を判定することが最も良いと述べている。また、残留塩素については、狩谷ら (1973)¹⁰⁷⁾は、水生生物に対する毒性を調べ、斃死魚体の体表粘液中に残存する遊離および結合型の残留塩素を検出し、残留塩素による死と確認しうる限界を報告している。

(4) 考 察

以上、生物試験を利用して環境の異常状態を知る2つの方法について述べてきた。即ち、毒性解析法では採水した水の中に存在する毒性本体をつきとめる方法であり、検死法では魚の死を指標として、過去に一過的に通過した毒物をつきとめる方法である。

これまで原水について以外は、生物試験を実施できなかったものが、濃縮という考え方の導入によって、自然河川水に内在するものをある程度求められるようになったと考えている。濃縮ということ

は、毒濃度の面からみれば、慢性毒性を示す濃度を急性毒性におきかえて、短期に検出するという意味を含んでいる。また、自然河川の濃縮毒性は、一方では毒物質の希釈状況を示しているから、希釈水の減少がどの程度になれば魚族死亡事故が発生するかの目安ともなる。また工場排水による生物監視が次第に多くなっているが、監視以前に濃縮毒性を測定しておくことが重要である。工場内部の部位、部位から排水される毒性物質をとらえることも可能であって、特に反応中間物の毒性挙動を知るためには便利である。

(文献)

- 1) 関野ら (1974) 日水会誌 40 ; 363 ~ 368
- 2) 津田・狩谷 (1977) 日水春季大会講演要旨集 ; 114
- 3) 狩谷・津川 (1977) 日水春季大会講演要旨集 ; 117
- 4) 敦賀 (1963) 日水会誌 29 ; 403 ~ 406
- 5) 芳賀ら (1970) 日水会誌 36 ; 225 ~ 231
- 6) 狩谷ら (1967) 日水会誌 33 ; 311 ~ 314
- 7) 狩谷ら (1959) 水産増殖 7 (1) ; 46 ~ 53
- 8) 奈良・馬場 (1966) 昭和40年静岡水試事業報告 ; 63 ~ 67
- 9) 芳賀ら (1972) 日水春季大会講演要旨集 ; 160
- 10) 狩谷ら (1968) 日水会誌 34 ; 764 ~ 769
- 11) 津田・狩谷 (1963) 日水会誌 29 ; 828 ~ 833
- 12) Mount. D. I (1964) Trans. Am. Fish. Soc., 93 ; 174
- 13) 狩谷・佐藤 (1969) 魚病研究 3 ; 24 ~ 29
- 14) 狩谷ら (1959) 水産増殖 7 (2) ; 41 ~ 47
- 15) 芳賀ら (1977) 日水春季大会講演要旨集 ; 115
- 16) 狩谷ら (1974) 日水春季大会講演要旨集 ; 97