

濃縮毒性試験法と毒性解析試験法

東北大学農学部水産生物学研究室 狩谷 貞二

1. 本試験法の生い立ち

濃縮毒性試験法とは試水を凍結濃縮し、その濃縮液に魚を2日間飼育し、どの程度の濃縮液まで生残しうるかを知ることによって、試水に含まれる潜在する稀薄な毒性を検出定量するものである。

この試験は河川・湖沼などの淡水域で、水質汚濁のために魚族の死亡事故が発生した場合に死亡原因を探索するため、採取した試水のなかに極く微量残存する不明毒物を確認するために開発された手法である。魚族が死亡してから、この死亡を発見し、通報され、現場で採水するまでには、一般にかなりの時間が経過しているのが普通である。したがって、作用した毒物は既に流下して、現場には存在しないか、存在しても極く微量に過ぎない。採水した試水に毒物が残っていないければ、この水質を刻明に分析してみても、加害原因に出会うわけにはゆかない。分析して意味のある水であるか否かを判別する必要がある。

稀薄な毒性を検出するためには感受性の鋭敏な生物種を探しだすか、溶液中の毒性物質濃度を濃縮によって高める方法が考えられる。前者ではこれまで各種の生物およびその生物の生育時期について、多くの研究結果が報告されている。しかし、その結果、生物種には感受性についても種特異性があり、ある薬物に対しAなる生物がBなる生物よりも感受性が鋭敏である場合に、他の薬物すべてにAがBより感受性が鋭敏であるとはいえないことが知られている。このことがまた、生物種に対して選択的に作用するような農薬が開発されることの可能な理由でもある。したがって、ある実験種の感受性を他の種の感受性に換算しようとする試みは徒労である。むしろ、このことを利用して次のような使い方ができる。川で魚の死亡事故が起ると例えば図1にみられるような死亡種類数の分布がみられることがある。一地点に投入された毒物は図2に示すような濃度変化を示しながら下流の点を通過するから、感受性の鈍い種は低濃度の通過点では死ななくなるので、図1のような zoning が現われる。前述のように毒物の種類によって生物種の感受性は変化するから、薬物種類によって死亡する種類数の内訳が変化する。この死亡種類数の内訳によって逆に作用毒物を類型化することが可能である。いま6種の生物を用いて、5種、4種、3種、2種、1種死亡の該当生物種を求め、作用薬物などを分類してみた1例を表1に示した。

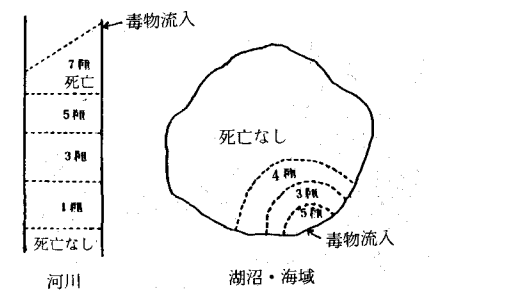


図1 死亡種類数の分布

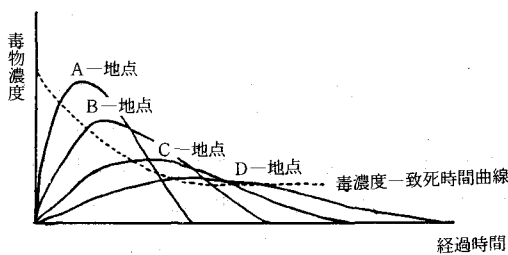


図2 河川4地点を通過する時の濃度変化

表1 水族死亡パターンによる加害原因類型

死亡種類数	1	2	3	4	5
死亡原因	1A	2A	3A	4A	5A
Ca (OH)	1A		3A	4A	5A
Al (SO)	1A		3A	4A	5A
HCl	1A・1B		3A	4A	5A
CuSO	1A	2A	3B	4A	5A
NH ₄ OH	1A	2D	3B	4A	5A
ABS	1A	2A	3C	4A	5A
PCP	1A		3C	4B	5A
Phenol	1A	2C	3D	4B	5A
NEP	1A	2E	3C	4C	5B
KCN	1A	2B		4B	5B
CH ₃ COOH	1B	2A	3A	4A	
FeCl	1B		3A	4A	
残存濃度欠乏	1C	2C	3D	4B	5B

使用種魚6種：タモロコ・ヒル・ミズムシ・ドジョウ
フナ・サリガニ

- 1A タモロコ
- 1B ヒル
- 1C ミズムシ
- 2A タモロコ・ヒル
- 2B タモロコ・ドジョウ
- 2C タモロコ・ミズムシ
- 2D タモロコ・フナ
- 2E タモロコ・サリガニ
- 3A タモロコ・ヒル・ドジョウ
- 3B タモロコ・ヒル・ミズムシ
- 3C タモロコ・フナ・ドジョウ
- 3D タモロコ・ドジョウ・ミズムシ
- 4A タモロコ・ヒル・フナ・ドジョウ
- 4B タモロコ・ミズムシ・フナ・ドジョウ
- 4C タモロコ・ドジョウ・フナ・サリガニ
- 5A タモロコ・ヒル・フナ・ドジョウ・ミズムシ
- 5B タモロコ・フナ・ドジョウ・ミズムシ・サリガニ

一番下流で1種が死んでいる zone に毒物が残存している可能性が強く、また、この種が作用毒物に対し、6種のうちでは最も感受性が鋭敏であることを示している。表1にみられるようにタモロコは多くの毒物で感受性が鋭敏ではあるが、酢酸やFeCl₃中毒ではヒルが、溶存酸素欠乏ではミズムシが最も鋭敏である。

以上のように感受性のよい生物種が得られることは望ましいけれども、各種毒物のいずれに対しても最も鋭敏な種は1種ではないので、次ぎに溶存毒濃度を高めることによって検出限界を下げる努力が必要となる。濃縮には毒性物質のみが濃縮できれば都合がよいが、未だ知られない毒物群に対し、そんな具合の良い方法があるわけではない。とすれば全溶質を濃縮し、毒性を確認した後に、その毒性物質を分画操作によって分離し、その挙動によって毒性物質の性格を知り、何であるかを同定すれば良いことになる。これが毒性解析法である。

これらの方法は、もともと魚族死亡事故原因の探索のために開発して来たが、操作が改善されるにつれて定性から定量へと進み、公害における環境指標として用いられているCOD、BODなどの間接的指標と異なり、また、各種薬物濃度だけでなく、その形態も含めた有毒性を直接に評価するという利点から、魚の生息可能か否かを知るためにはこれまでの諸項目よりもはるかに適していることが知られるようになって来た。また、水系においてどの毒性負荷が魚の生息環境を決定的に阻害しているかが知られると共に、これをどの程度に制御すれば魚が生息できるかを予測計算することも可能で、いかなる水処理方法が排水の毒性を除去するかをも実験的に確かめることができる。

2. 濃縮毒性試験法

濃縮には全溶質を濃縮しうること、毒物の構造上の変化を極力抑えること、揮散も避けたいことから、凍結濃縮法を採用した。凍結濃縮法についてはBaker等の方法がある。分解し易い溶質を濃縮するのに低温による安定性の利点を加味して開発された方法であったが、図3に示すように、濃度が高くなるにつれて回収率が悪くなる点が欠点で、製品の作成には不向きのまま放置されて来た方法である。しかし、観点をかえれば、我々が必要とする濃度は魚が48時間で死亡する程度の濃度であって、それ以上無暗に濃縮する必要はないから、この程度の濃縮で回収率が良ければ十分に有用であることになる。図3にアカヒレという魚の48時間半数生残濃度LC₅₀は回収率の低下する濃度よりはるかに低いことを示している。ここでは回収率は95%以上である。このことは稀薄溶液ほど回収率が良く、毒性の強い物質ほど回収率が良いことを暗示している。

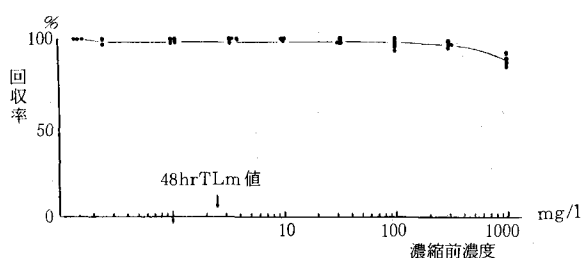


図3 100%濃縮における濃縮前濃度と回収率(フェノール)

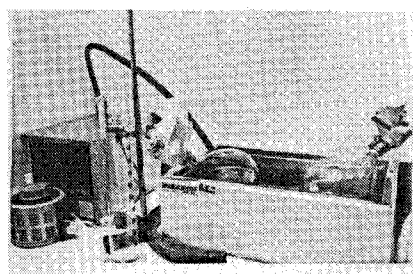


図4 凍結濃縮操作

2.1 試験液の調製

凍結濃縮法には外部から冷却する方法や、内部から冷却する方法などが考えられるが、試水の濃縮毒性測定には容量で1/18濃縮を限度と考えているから、2〜3ℓ容ナス型フラスコを-10〜-20℃の冷媒に浸漬して行っている。図4に示すようにナス型フラスコに試水を1800ml入れ、フラスコの一部を冷媒に浸して、毎秒数回転程度で回転させるとフラスコ内壁に透明な氷が附着し、次第に氷層が厚くなる。氷が白濁したり、シャーベット状になれば溶質の水への取込みが行われていることを示している。ゆっくり凍結してゆくことが必要で、急冷す

れば溶質の取込みが起る。取込みがあれば視覚的に認められるので都合がよい。試水 1800 ml を 80 ml 程度に濃縮するのに 2 時間程度が良い。80 ml 程度に内容液が減少したところで、フラスコをはずし、内容液をメスリンダーに入れ、さらに蒸留水 5 ml 程度で 5 回以上フラスコ内の水の表面を洗浄しながら、全洗浄液を前記内容液と合し、さらに 100 ml にメスアップする。これが 1/18 濃縮液である。濃度段階は 1/4 対数分割を用いているので、1/1 (原水)、1/1.8、1/3.2、1/5.6、1/10、1/18 とし、これを夫々 100 % (原水)、180 %, 320 %, 560 %, 1000 %, 1800 % 液と呼んでいる。これを 25°C に加温し、12 cm シャーレーに入れ、25°C 恒温槽内で魚を 48 時間 (時には 96 時間) 飼育し、その生死を計測する。

2.2 試験魚

飼育液は濃縮する関係上無暗に容量を増すわけにはゆかない。もし 1/18 濃縮するとすれば 1.8 ℓ の原水が 100 ml になるので、100 ml 容量以上にすることは、後述する毒性解析試験で繰り返し同一試水を濃縮する必要のある場合には、現場調査の際大量の試水を数地点に亘って採取することとなり、実施上困難である。

100 ml 中に魚を飼うためには、当然、魚は小さい必要がある。各種の魚を検討した結果、mosquito fish と呼ばれる一群の体長の小さい魚のなかで、縦断組織標本のつくり易いこと、体重が小さく感受性の悪くないこと、一年中産卵し、飼育の楽なことから *Tanichthys albonubes* という広東産熱帯魚が適当である。アカヒレと通称している。一般に魚類は春季に秋季に産卵期を持ち、一年中産卵するものは少い。農薬取締法では試験魚としてコイを指定しているが、コイは 4～5 月に産卵し、年内に体長 30 cm 以上に生長する。体長 5 cm を試験サイズとすると、普通養魚池の生長では体長 5 cm は 7 月中に通過するから、一年中試験をするためには餌を控えて生長をとどめ、夏から 4～5 月までは飢餓状態にある魚を用いて試験せざるを得ないことになる。生物試験では再現性を慮り、諸条件をやかましくいう人があるが、上記のように生理状態の異なる試験魚を用いて、他の条件を細かく規定しても、あまり意味があるとは思われない。

アカヒレは 1 尾の重量が生物学的最小型で 0.05 g である。これを 7 尾使用して 0.35 g が 100 ml の環境水中に収容されることになる。1 g/ℓ という考え方からすれば、約 3.5 倍になっているが、繁殖をしていれば 0.02 g の魚体重の幼魚まで試験に使用されうるから、5 尾使用ならば 1 g/ℓ にあわせることができる。アカヒレは水温 14°C 以上で周年産卵するが、25°C 程度が適温である。孵化後 1 月半で 0.05 g に達し、試験に使用することができる。0.05 g 以上で生殖巣が発達しはじめるが、親魚としては体重 0.3 g 程度が望ましい。雌雄は鱗の形で識別することができる。卵は沈性卵で、放卵後 25°C で、4～5 日で稚魚として浮上する。現在は系統繁殖した試験魚を用いることができる。

今 1 つの試験生物としてヌカエビ *Paratya compressa improvisa* も研究室内で繁殖しており、アカヒレと全く同様に使用できる。農薬取締法ではミジンコが試験生物としてあげられているが、ミジンコでは単為生殖をすることもあって 3 時間の飼育試験であるため、コイの結果と絶対値で比較し得ない。ヌカエビでは 48 時間飼育ができるので、アカヒレと感受性の比較をすることができる。一般に重金属・フェノールなどの毒物ではアカヒレの方が感受性が鋭敏であるが、農薬類特に殺虫剤ではヌカエビの方がはるかに感受性がよくなる。この差を用いて毒性解析に役立てることができる。

2.3 生物試験結果の整理

生物試験に入る前に試験液の pH を測定し、水温を一定に保った後、試験魚を収容して恒温槽に入れるが、試験魚を入れた直後を 0 時間とし、以後 0.5、1、2、3、6、12、24、48、72、96 時間後に魚の生死を判定する。この場合、生きているものを (+)、死んでいるものを (-)、横転して生きているものを (±) と表示する。試験が終了後、Doudoroff の作図法によって 48 時間半数生残濃度を求める。後述するように毒性解析法において 3 時半数横転濃度を求めるが、この場合も半数生残濃度の求め方と同様である。

2.4 各水域の濃縮毒性値

阿武隈川：阿武隈川は福島県那須岳の裏の甲子温泉から発し、白河市・須賀川市・郡山市・福島市をへて宮城県に入り、丸森町・岩沼市を経て、太平洋に注ぐ（図5）。この間の各地点で昭和49年と昭和55年の濃縮毒性値を比較したものが図6である。このうちSt. 2は堀川という支流で、この支流には三菱製紙白河工場の排水し、

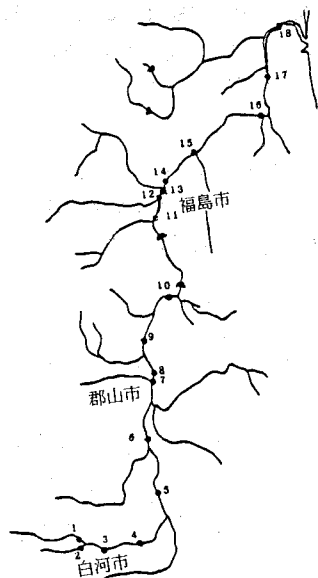


図5 阿武隈川採水地点

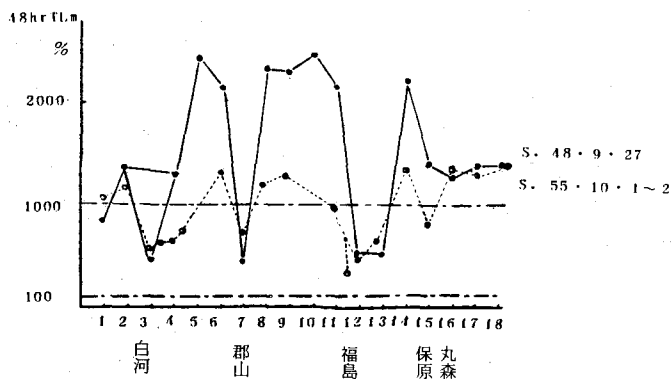


図6 阿武隈川の濃縮毒性

着色し、泡が浮いている場合が多い。昭和39年には排水は原水で死亡し、St. 2からSt. 4まで全く魚の生息をみなかったが、その後、活性汚泥処理を拡大し、昭和49年にはCOD40ppm程度であるにも拘らず、濃縮毒性値は1350%と1000%を上回り、毒性値は著しく低くなった。堀川合流前の本流がSt. 1であるが、清澄でCOD値も1ppm前後と近い値を示すが、濃縮毒性値は1000%を下回り、わずかではあるが毒性が強い。堀川を合流して白河市に入り、白河市のはずれがSt. 3であるが、著しく毒性が強くなる。しかし流下するにつれて再び毒性は低下し、郡山市に入ると再び毒性は強くなり、市外に出ると毒性が弱まり、福島市に入るとまた毒性が強くなる。都市の排水によって毒性が強くなり、郊外に出ると回復するのが良くわかる。7年後の昭和56年の傾向も全く同様であるが、都市の毒性はわずかに軽減されており、特にこの間郡山市の下水処理場が完成している。これに対し、郡部は1000%以上というものの毒性が増加したことがみられ、これは住宅団地の郡部への拡大が原因と思われる。このような図から郡山市の毒性の主力は福島にはとどいていないことも明らかである。これまでは原水（100%）で死ななければ、毒性を評価し得なかったものが、濃縮毒性測定によって始めて可能となった。

公害諸規制の基盤に水産用水基準があるが、此处では各種薬物の48時間半数生残濃度を1/10に稀釈した濃度を環境水として適合していると置いている。1/10を適用係数とも安全率とも呼ぶが、これまでこの係数が現実の自然水域で妥当であるか否かを検討することができなかった。水産用水の考え方からすれば、1000%以上の濃縮毒性値は環境水として適しているということになる。阿武隈川では都市周辺は水産用水基準に合格せず、郡部は水産用水基準の考え方に適合していることになる。また、堀川は高CODで、着色しているにも拘らず、濃縮毒性値は昭和49年以降常に適合し、また、アユ・ウグイなどの魚が生息している。濃縮毒性値が最も魚の生息とよく一致する。

霞ヶ浦：霞ヶ浦周辺には小河川が多数流入しているが、これらの河川は図7に示すようにいずれも毒性が強く、

時には 100 以下で魚の生息し得ない毒性値のところもある。いずれも 1000 %には満たない。これが霞ヶ浦の中では最近 750 %で、1000 %を上回った毒性値を示すことが多い。このことはアオコの繁殖も生物処理の一形式ともいえるもので、毒性を低下させる可能性を示唆するものと思われる。

各水域を広く調査してみると相模川のアユ漁場は 750 %程度で、アユ・ヤマメの生息環境としては 700 %以上であれば良く、コイ・フナは手賀沼・霞ヶ浦・綾瀬川の値などから 200 %以上であれば生息でき、漁場として望ましいのは 400 %以上といえる。このことは安全係数がアユ・ヤマメでは 1/7、コイ・フナでは 1/4 で良いということになる。

2.5 濃縮毒性値の予測

2 つ以上の水系の合流後の濃縮毒性値は次のような計算によって予測することができる。

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

A, B, C, : 3 種の排水の濃縮毒性値 (%)
A, B, C, : 3 種の排水の水量 (m³/日)
Y : 混合排水の濃縮毒性値 (%)

上記の計算は夫々の毒性は相加的に働くとして仮定してあるが、現実には拮抗的に働く場合もあり、極めて稀には相乗的に働く場合もある。相互の毒性の働き方を検討する場合にはそれらの排水を A : B : C の水量比で混合し、その濃縮毒性を実測する。この実測値を X %とすれば

- X = Y のとき相加的
- X < Y のとき相乗的
- X > Y のとき拮抗的 (独立的)

と判定することができる。表 2 に原町特別都市下水路の例を示したが、相互の毒性は拮抗的に作用していることが判る。

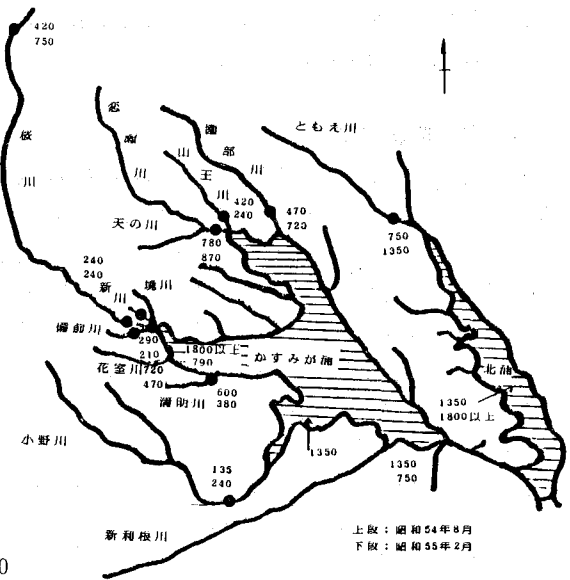


図 7 霞ヶ浦流入河川の濃縮毒性 (48時間 TLm 値 %)

表 2 原町特別都市下水路

工場業種	排水量 (m³/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						

本邦河川のうちに最も汚濁されているといわれている綾瀬川で濃縮毒性を測定した結果を図8に示した。各地点での濃縮毒性値と流量との測定があれば、各地点間に添加される流量と負荷毒性を算出することができる。

3. 毒性解析試験法

毒性の存在が確認された場合には、その毒性の本体を知ることが必要となる。これには現在、大別して3通りの方法が作られている。その1は濃縮毒性を測定中に浸透圧と横転時間と各時間の LG_{50} 曲線型によって推測する方法である。その2は分画法を用いての探索法であり、その3は死亡直後の魚の病理組織学的検査によって類推する方法である。いずれの方法も作用薬物群を類型化し、どの類型に合致するかを求めるものであるから、ある特定の1種に同

定されるわけではなく、その類型の中の何であるかは化学分析によって確定することが必要である。未知の毒性本体をさがす時、当初から化学分析を行うことは、余程運のよい場合でないと本体に辿りつけない。化学分析は、分析項目については正確な情報を与えはするが、それ以外の情報は全く与えないので、目的物に到達するには偶然性に支配される。また、毒性本体が知られたのち、これらを総合して再現試験により確める。

3.1 各時間 LC_{50} 曲線型・横転継続時間・浸透圧を用いての毒性解析法

3時間・6時間・12時間・24時間・48時間・96時間 LC_{50} を求め、横軸に時間・縦軸に濃度の対数をとると、図9に示す如き4種類の線が画ける。直線をI型、曲線をII型・III型、S字状曲線をIV型とし、さらに直線はその角度によって細分化できる。作用薬物種によってこのような類型化が可能である。

次にフェノール類では横転してから死に至るまでの時間が長い。麻酔的に働く薬物はいずれもこのような性格をもっている。これを階級別にするために図10に示すように半数横転濃度—時間曲線を求め、特に3時間半数横転濃度における図中aの時間を求め、これを横転継続時間とする。横転継続時間を3時間以下、3時間から9時間まで、9時間以上の3階級に分けると、各種薬物は3類型に分類しうる。

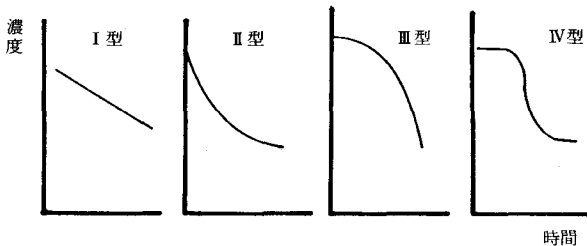


図9 LG_{50} 曲線型

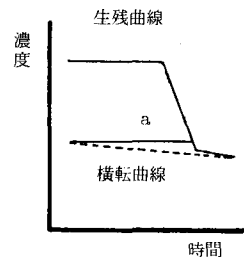


図10 横転継続時間

48時間 LC_{50} の浸透圧の測定を行い、500mOs/kg 以上、500～400、400～300、300～200、200～100、100～50、50以下の7階級に区別することができる。毒性の弱い物質は多量に含有しなければ、アカヒレを48時間で死に至らしめることができず、毒性の強いものは少量溶解しただけで十分有害であるから浸透圧は上らない。

以上の3種類の類型をくみ合せると表3のように21類型に分類することができる。

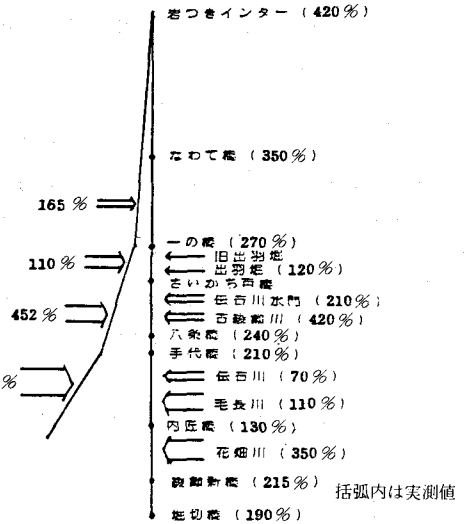


図8 綾瀬川の濃縮毒性と毒性負荷

表3 浸透圧・横転継続時間・LG₅₀ 曲線型による類型化

浸透圧 mOsm/kg	横転継続時間 hr	TL ₅₀ 時間 型	薬 剤
501以上	3~9	I (2)	硫酸ナトリウム
500~401	0~3	IV	塩化ナトリウム
400~301	9以上	I (1)	エチルアルコール
	0~3	II	ホウ酸
300~201	9以上	III	硫酸マグネシウム
	3~9	I (1)	アセトン
	0~3	II	モノフルオール酢酸ナトリウム
200~101	0~3	I (2)	塩化カルシウム
100~50	0~3	I (3)	フッ化ナトリウム
50未満	9以上	I (1)	フェノール・ニコチン酸
		I (3)	酢酸ストリキニーネ
		III	m-クレゾール・p-クロロフェノール
		IV	o-プロモフェノール・o-クロロフェノール・o-クレゾール・クレオソート
	3~9	I (1)	アンモニア・p-クレゾール
		II	重クロム酸カリウム
		III	p-クロロフェノール・ピロカテコール・タンニン酸
	0~3	I (1)	PCP・酢酸・塩酸水
		I (2)	過マンガン酸カリウム・ハイドロキノ・ホルムアルデヒド
		I (3)	レゾルシノール
		I (4)	ピロガロール・マーキュロクロム
		III	メチレンブルー・硝酸亜鉛・塩化カドミウム
		IV	硫酸アルミニウムカリウム・シアン化カリウム

3.2 分画法による毒性解析法

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、蒸発乾固再溶解試験、チオ硫酸ソーダ添加試験などである。このほか汙過分離法とか、イオン交換法などを用いることもできる。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。これらの方法によって毒性物質がいずれの分画に移動するかを知り、どの群に入るかを調べる。フローを図11に示した。

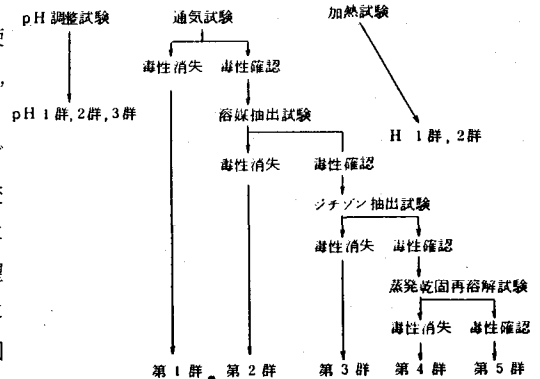


図11 分画法による毒性解析

3.3 病理組織検査による毒性解析法

濃縮毒性試験において、6時間程度で死亡したアカヒレの死体をSusa液で固定し、パラフィン法で4~5μの厚さに縦断し、切片とする。これにヘマトキシリン-エオシン2重染色を施し、永久標本とする。この標本は身体のある器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。現在、図12に示すように

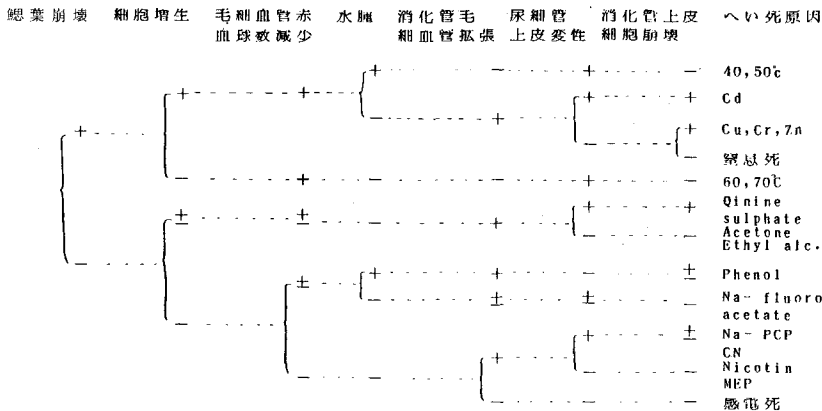


図12 病理組織変化による作用毒物類型

鰓における鰓葉崩壊・鰓葉間細胞増生・鰓弁片上皮の水腫・鰓弁片毛細血管内の赤血球異常と消化管における乳頭上皮崩壊・粘膜下組織毛細血管拡大の1次症状と腎臓尿管上皮変性の2次症状を指標として作用原因を12類型に分けられる。上記以外の組織変化像が種々認められるが、今後さらに系統的検索法が充実される必要がある。

4. あとがき

濃縮毒性試験は毒物を濃縮して、生物試験にかけるために、慢性毒性を示す濃度を急性毒性に置きかえて検出するという意味をも含んでいる。なお、これまで淡水について述べて来たが、海水の場合には多量の塩類を含むために凍結濃縮による回収率は悪くなるという欠点がある。しかし海水魚も海水を1/115以下に濃縮すれば生存が不可能である。したがって、分画操作によって含有する塩類と毒物を分離することによって測定することができる。図13に酸性蒸留によって蒸留され得る裁判化学でいわれる第1属毒物の分離濃縮の図を示したが、CNの海中からの回収率は海水中濃度の10倍に濃縮して、回収率90%以上であった。有機溶媒抽出による第2属毒物についても、同様に塩類と分離して海水中の濃縮毒性をアカヒレで測定することができる。ただし分画操作によっては本来毒性の低い構造をもっていたものが、より高い毒性を示す形に変化する場合があるので、十分な吟味を必要とする。

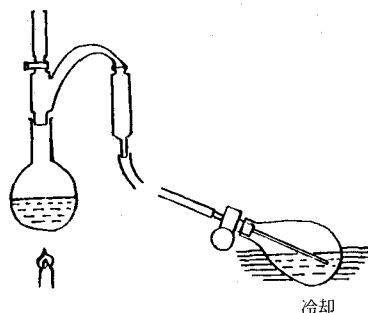


図13 海水中の蒸留分画成分濃縮法