

ニジマスの初期生活段階毒性試験によるいくつかの界面活性剤の毒性評価 (その1)

菊地 幹夫 若林 明子

要 旨

ニジマスのふ化後1日以内の仔魚を用いて、界面活性剤(直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム LAS, ポリオキシエチレンアルキルエーテル AE)について、前期仔魚期28日間の毒性試験を行った。LASまたはAEの2.0mg/ℓへの曝露では多くの魚が死亡した。また、AE 1.0mg/ℓでは死に至らないまでも身体を旋回したり、刺激に対して動きがにぶいなど遊泳挙動に異常が見られた。28日間半数致死濃度を求めたところ、LASとAEのいずれでも1.4 mg/ℓとなった。28日間曝露後に生存した魚の体重を測定したが、濃度と体重減少のレスポンスは認められず、生長阻害は毒性評価の指標にはならなかった。致死と遊泳挙動を指標とすると、最大無影響濃度はLASでは1.0mg/ℓ、AEでは0.5mg/ℓとなった。

Toxicity Evaluation of Some Surfactants by Early Life-Stage Toxicity Test with Rainbow Trout (Part 1)

Mikio Kikuchi and Meiko Wakabayashi

Summary

To assess the effects of detergents in domestic use on fish, toxicity of LAS(linear alkylbenzenesulfonates) and AE (alkyl ethoxylates) was assayed by early life-stage toxicity test with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The larvae less than 1 day-old were exposed for 0.1 to 2.0 mg/ℓ of LAS or AE for 28 days. Almost all fish exposed to 2.0 mg/ℓ of LAS or AE died. The fish exposed to 1.0 mg/ℓ of AE sometimes turned their bodies but they lived. 28days median lethal concentration was 1.4 mg/ℓ for LAS or AE. Dose-weight loss response was not clear for LAS or AE. The growth effect was not a good indicator for the toxicity evaluation. Based on survival and behavior, maximum no effect concentrations were estimated to be 1.0 mg/ℓ for LAS and 0.5 mg/ℓ for AE.

1 はじめに

近年、化学物質による水環境の汚染に関する関心が高まり、行政的には人の健康の保護の観点からゴルフ場農業についての暫定指導指針の作成や水質環境基準の見直しなどの対策がとられてきた。しかし、水生生物や水生生態系への影響に着目した水質環境基準はなく、その設定についての検討は今後の重要な課題となっている¹⁾。

水環境を汚染する化学物質の水生生物への毒性は主に魚類を用いた急性毒性試験により多くのデータが集めら

れてきた。しかし、魚の発育に伴って感受性に大きな変化がある場合には、急性毒性試験から毒性を評価することは注意を要する。近年、経済協力開発機構(OECD)により魚類の初期生活段階毒性試験方法²⁾が制定され、代表的な試験魚としてファットヘッドミノウ(コイ科)、メダカ、ニジマスなどが推奨されている。毒性を評価し無影響濃度を的確に求めるには、急性毒性試験より長期の試験が好ましいことは言うまでもない。そこで著者らは、ニジマスが下記のように試験魚として優れているこ

とから、この魚を用いて、初期生活段階毒性試験により界面活性剤の毒性を評価し、得られたデータを急性毒性試験等の結果と比較検討すること、及び試験実施上の留意点を明らかにすることを試みた。なお、今回の試験では、OECDの試験方法で定めている試験期間（受精直後の胚期から自由に餌を食べるようになるまで）の一部（前期仔魚期のみ）で検討した。後期仔魚期から稚魚期にかけての試験結果はすでに報告した^{3,4)}。また胚期については、別途に検討する予定である。

ニジマスを試験魚として用いる利点としては、①ニジマスは化学物質に対して感受性が比較的高い。②代表的な冷水魚であり、また水産としても重要魚種である。③このため数千尾の単位で容易に入手できる。④飼育技術が確立されており、室内で胚期から稚魚期まで容易に飼育でき、病気にかかることも少ない。⑤低水温での曝露試験であるため、曝露時における溶存酸素や化学物質の濃度低下を少なくすることができる、等が挙げられる。また、界面活性剤は、水質汚濁物質として重要であるとともに、溶解補助剤や分散剤を使わないで曝露溶液をつくることができ、その濃度を高感度で測定することが可能なことから、試験物質とした。

2 実験方法

2.1 試薬および試験水

界面活性剤は、ライオン㈱の提供によるものであり、その組成は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムではアルキル基の炭素数は10のものが約9モル%、11のものが約31%、12のものが約35%、13のものが約25%であり、平均で11.8（以下ではC11.8-LASと略す）、ポリオキシエチレンアルキルエーテルではアルキル基の炭素数=12、エチレンオキッド平均付加モル数=7.0（以下ではC12-AE (7.0) と略す）である。

希釈水は硬度25mg/ℓの人工軟水⁵⁾を用い、これに一定量の界面活性剤を溶かして試験水とした。

2.2 試験魚

ふ化後24時間以内のニジマス仔魚を用いた。試験開始翌日での体重は、平均 0.0846 g（標準偏差 0.0114 g, n=52）である。

2.3 試験

OECDテストガイドライン²⁾に準じて以下のように行った。公比 2 ~ 2.5 で 5 段階の濃度の試験水を調製し、

その 5 ℓ をガラス製ビーカーにとり、ニジマスを 20 尾ずつ入れ、暗条件で 28 日間曝露した。なお対象は二群用いた。試験水は 2 日毎に全量を交換し、試験水 1 ℓ あたりの魚の体重は 0.6 g/ℓ 以下とした。また試験中に餌は与えなかったが、この期間魚は卵黄を吸収しながら生長する。試験時は、水温、溶存酸素、pH を隔日に測定し、界面活性剤濃度を週一回測定した。魚の心臓が停止したものあるいはガラス棒で触れても動かないものを死亡とした。28 日間曝露後における半数致死濃度 (28d-LC₅₀) は、片対数グラフに濃度と生存率についてプロットし、50% の前後の点を直線で結んで算出した。

3 結果と考察

試験時の水温は 10℃、溶存酸素濃度は最も低いときで 5.7 mg/ℓ、pH は 6.9 ~ 7.5 であり、ニジマスの発育時の水質として適切であった。

3.1 曝露濃度

曝露時の界面活性剤濃度の測定結果を表 1 に示す。試験時、C11.8-LAS の曝露濃度は変動が少なかったが、C12-AE (7.0) の曝露濃度は変動し、試験水の交換時には設定値の 7 割程度まで低下した。これは流水式ではなく、バッチ式で曝露水を交換したためであるが、少なくとも C12-AE (7.0) ではもっと高い頻度で曝露水を交換することが望ましいことが分かる。なお、致死濃度等の算出には全て設定濃度を用いた。

表 1 毒性試験における曝露濃度の測定結果

初期設定濃度, mg/ℓ	48 時間曝露後の濃度 (平均), mg/ℓ
C11.8-LAS 2	2.0, 2.0, 2.0, 2.0 (2.0)
1	0.99, 0.97, 0.98, 0.96 (0.98)
0.5	0.50, 0.50, 0.46, 0.48 (0.49)
0.2	0.19, 0.19, 0.18, 0.18 (0.19)
0.1	0.10, 0.10, 0.088, 0.096 (0.096)
C12-AE(7.0) 2	1.6, 1.6, 1.1 (1.4)
1	0.89, 0.53, 0.29, 0.63 (0.59)
0.5	0.45, 0.32, 0.28, 0.22 (0.32)
0.2	0.16, 0.20, 0.18, 0.15 (0.17)
0.1	0.093, 0.050, 0.073, 0.058 (0.069)

3.2 曝露時の魚の様子と致死濃度

試験した濃度のうち、C11.8-LAS 2.0mg/ℓ では曝露 4 日後から死亡する個体が出始め、10 日後には生存魚は 1 個体のみとなった。また C12-AE (7.0) 2.0mg/ℓ では曝露 5 日後から死亡する個体が出始め、20 日後に

はすべての魚が死亡した。また死に至らないまでも、C12-AE (7.0) 1.0mg/ℓでは身体を旋回したり、刺激に対して動きがにぶいなど遊泳挙動に異常が見られた。

28d-LC₅₀を求めたところ、C11.8-LAS と C12-AE (7.0) のいずれでも1.4 mg/ℓとなった。

若林らは、この試験に用いた界面活性剤と化学構造がほとんど同じものを用いて約1月令の後期仔魚期のニジマスについて試験し、28d-LC₅₀をC11.7-LAS では3 mg/ℓ、C12-AE (6.5) では1.2mg/ℓと報告している^{3,4)}。今回の値を若林らの値と比較すると、AEでは両者の値は一致するが、LAS では2倍ほど異なることから、前期仔魚期のニジマスは後期仔魚期のそれよりもや感受性が高いことが分かる。

また、発育段階が異なった場合の96h-LC₅₀について、若林らはC11.7-LASを用い、卵では5 mg/ℓ、4日令仔魚では2.1mg/ℓ、19日令仔魚で3.4mg/ℓ⁶⁾、約1月令仔魚で4.7 mg/ℓ⁷⁾と報告している。またC12-AE (6.5) では、卵で36mg/ℓ、4日令仔魚で2.5mg/ℓ、19日令仔魚で1.2mg/ℓ⁶⁾、約1月令仔魚で2.3mg/ℓ⁷⁾と報告している。この急性毒性試験の結果からも、前期仔魚の感受性が一番高いことが分かる。前期仔魚期を曝露期間とした今回の28d-LC₅₀値を、上記若林らの96h-LC₅₀値のうちの前期仔魚期での最低値と比較すると、28d-LC₅₀値は96h-LC₅₀値の10~7割程度の値となった。

3.3 生長阻害濃度

生残した魚について曝露28日後に体重を測定し、図1及び図2に示した。各曝露群について対照と比較しながら一元配置の分散分析を行ったところ、*印で示した曝露群では対照と統計的に有意な差が認められた。

C11.8-LASでは0.1 mg/ℓ曝露群では対照と有意な差はないが、0.2 mg/ℓでは有意に体重が増加し、0.5 mg/ℓでは有意な差はまたなくなり、そして1mg/ℓ曝露群では有意に体重が減少する。

C12-AE (7.0) では0.1 mg/ℓ曝露群では対照と有意な差はないが、0.2 mg/ℓと0.5 mg/ℓでは体重が有意に減少し、そしてまた1 mg/ℓ曝露群では対照と差がなくなった。

このように曝露した魚では、用量効果関係を検討したところ、濃度と体重減少のレスポンスは認められず、生長阻害は毒性評価の指標にはならなかった。

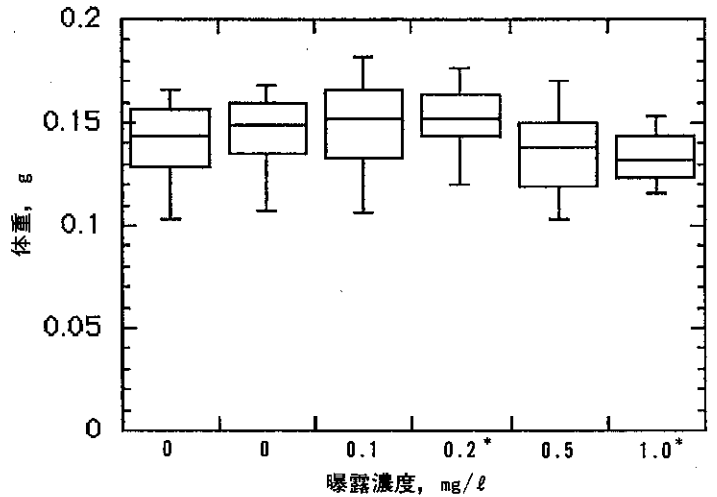


図1 C11.8-LASに28日間曝露したニジマスの平均体重 (n=19~20)

*印は統計的に有意な差 (P=0.05) があることを示す。

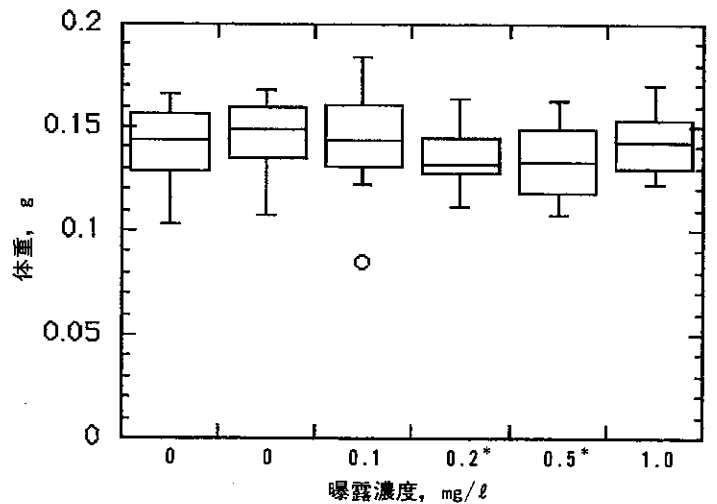


図2 C12-AE (7.0)に28日間曝露したニジマスの平均体重 (n=19~20)

*印は統計的に有意な差 (P=0.05) があることを示す

すでに、Mckim ら⁸⁾は、LAS を主成分とする合成洗剤 (LAS=14%, AE=2.3%, 脂肪酸塩=2.5%) が4種の魚 (仔魚) の30日間の成長に及ぼす影響を検討し、smallmouth bass では低濃度曝露で体重が増加することを報告している。

また、若林ら^{3,4)}はニジマスの後期仔魚 (約1月令) を用いて生長への最大無影響濃度を、C11.7-LAS では0.7mg/ℓ未満、C12-AE (6.5) では0.7 mg/ℓと

報告している。

以上のことから、エサを食べない前期仔魚期での最大無影響濃度を C11.7-LAS で、1.0mg/ℓ、C12-AE (7.0) で0.5mg/ℓとした。

3.4 実験に当たっての留意点

曝露濃度は試験中一定にすることが望ましい。しかしこの試験では、C11.8-LAS の曝露濃度はほぼ一定に保つことができたが、C12-AE (7.0) の濃度は必ずしも一定濃度に保つことはできなかった。濃度が低下することは生分解等によると考えているが、このような物質の濃度の維持方法については今後の検討を必要とする。

試験に用いたニジマスは東京都水産試験場から、また界面活性剤はライオン㈱から供与していただいたものであり、感謝いたします。また、実験に協力いただいた当研究所の方々に感謝します。

参考文献

- 1) 早水輝好：水質環境基準の改定について、水環境学会誌、16、p.224 ~230(1993)。
- 2) OECD Guidelines for Testing of Chemicals No.210.
- 3) 若林明子、溝呂木昇：界面活性剤のニジマスに対する亜急性影響について、東京都環境科学研究所年報、1988、p.129 ~131.
- 4) 若林明子、溝呂木昇：化学物質のニジマスに対する亜急性影響について、東京都環境科学研究所年報、1989、p.167 ~169.
- 5) 田端健二：ヒメダカを供試魚とする TLm 標準試験方法の提案、用水と廃水、14、p.1297-1303(1972)。
- 6) 若林明子、鬼塚聡：魚類の急性毒性に影響を与えるいくつかの因子について、東京都環境科学研究所年報、1986、p.102 ~104.
- 7) 若林明子ら：洗剤に用いられる界面活性剤の魚毒性に関する研究、東京都環境科学研究所年報、1984、p.114 ~118.
- 8) J.M.Mckim, et al. : Toxicity of a linear alkylate sulfonate detergent to larvae of four species of fresh water fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 14 ,p.1 ~7.