

## 化学物質に対する海水魚の感受性とその種間差に関する研究\*<sup>1</sup>

角埜 彰\*<sup>2</sup>

### The Study on the Susceptibility for Chemicals and Their Difference between Marine Test Fishes

Akira KAKUNO

**Abstract** : Recently, studies on fish toxicity has shifted from acute to chronic tests since long-term effects of chemicals on fish appear to be more important than short-term effects. Yet the protocols for chronic toxicity tests using marine fish have developed slowly compared to their freshwater counterparts. In addition, the difficulty of handling fry has restricted the development of a chronic toxicity test using an early life stage of a Japanese marine fish. These situations have now interfered in the conduct of environmental risk assessments of chemicals in the coastal environments of Japan. Thus, acute and chronic toxicity tests were conducted using Japanese marine fish, red sea bream (*Pagrus major*), and American marine fish, mummichog (*Fundulus heteroclitus*) for 4 chemicals: bis-n-tributyltin oxide (TBTO), triphenyltin chloride (TPTC), cadmium (Cd), and naphthalene (Nap). Median lethal concentrations (LC50) were derived from acute toxicity tests. On the other hand, chronic tests were early life stage toxicity test (ELS) and long-term toxicity test (LT) for mummichog and red sea bream juvenile, respectively, with growth (body length and weight) as test endpoints. Results show that relationship between LC50s and chronic toxicity values for both red sea bream and mummichog were linear implying that chronic toxicity values can be estimated through their acute-to-chronic toxicity ratios. Moreover, red sea bream was adversely affected at lower concentrations of the chemicals than mummichog suggesting that LT can replace ELS as chronic toxicity test for red sea bream juvenile. Hematological parameters such as red blood cell count, hematocrit, or hemoglobin concentration were also efficient when used for evaluating non-lethal toxicity of the chemicals in red sea bream. Additionally, we determined the bioconcentration factors (BCF) of TBTO, TPTC, Cd and Nap in both mummichog and red sea bream to investigate the cause of the differences in their susceptibility to these 4 chemicals. The critical body residues (CBR), which were calculated from BCF and LC50 values, were also compared to the dead fish body residues (DFBR) collected during the acute toxicity tests. Results show that it took about six weeks for TBTO, TPTC and Cd to reach their steady state while Nap reached steady state within 1 week only and was quickly eliminated. Interestingly, the concentrations of the test chemicals in dead mummichog were higher than in dead red sea bream for all chemicals. In addition, CBRs were comparatively higher than DFBRs for all chemicals except for Nap. Hence, it seems toxicity was underestimated by CBR. It was, however, evident that DFBR of the test chemicals in the acute toxicity test and 96hr-LC50 were very strongly correlated. For instance, red sea bream, which has a lower 96hr-LC50, die at a lower body residue concentration than mummichog. This indicates that red sea bream is a more sensitive marine test fish compared to mummichog. Finally, body residue such as DFBR is a useful indicator of fish susceptibility to chemicals.

**Key words** : chemicals, marine fish, toxicity test, susceptibility, critical body residues

2010年6月4日受理 (Received on June 4, 2010)

\*<sup>1</sup> 鹿児島大学審査学位論文 (掲載に際し投稿規定に沿って一部修正した)

\*<sup>2</sup> 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 廿日市丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5, Maruishi, Hatsukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan)

## 目 次

|        |  |
|--------|--|
| 第1章    | 緒 言  |
| 1.1.   | 研究の背景と目的   |
| 1.2.   | 試験魚の選定   |
| 1.3.   | 試験物質の選定  |
| 第2章    | 毒性試験における毒性値の比較   |
| 2.1.   | 急性毒性試験   |
| 2.2.   | 慢性毒性試験   |
| 2.2.1. | 初期生活段階毒性試験－マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験－                                  |
| 2.2.2. | 慢性毒性試験－マダイを用いた長期毒性試験－  |
| 2.3.   | マダイにおける血液性状による慢性毒性評価   |
| 2.4.   | 慢性毒性値の比較   |
| 2.5.   | まとめ  |
| 第3章    | 急性毒性値と慢性毒性値の比較－急性慢性毒性比の比較－                                       |
| 第4章    | 生物濃縮試験及び臨界体内濃度による感受性の検討－海水魚マミチヨグ及びマダイに対する4種の環境汚染物質の生物濃縮性と毒性との関連－ |
| 第5章    | 総合考察   |
|        | 謝 辞  |
|        | 文 献  |
|        | 要 約  |

## 第1章 緒 言

## 1.1. 研究の背景と目的

人類の繁栄は多くの化学物質とともにあるといっても過言ではない。化学物質は我々の身の回りに約5万種があるとされており、さらに毎年約2,000種の新規化学物質が追加されている。このような化学物質は我々の日常生活において、医薬品、農薬、水産薬、洗剤等として多方面で使用されている。製造、流通、使用、廃棄の各段階から、環境中に放出された化学物質が問題となったものが新聞紙上をにぎわした公害問題である。現在では、化学物質の使用に対する規制が強化されたことにより、高濃度の化学物質による環境汚染とその生態影響は見られなくなっているが、低濃度の化学物質による影響については、環境ホルモン問題のように何らかのかたちでその影響が顕在化する可能性がある。

化学物質は使用されることによって、大気、土壌等に拡散するとともに、河川水流入、大気からの沈

降により海域へと移行している。世界的にも化学物質の流入先となる水域に対する影響評価が重要視されて来ており、底質、冷水域、と並んで海域のリスクアセスメントが重要視されている (Hutchinson et al., 1994; Ward, 1995; OECD, 1998)。特に、わが国は、34000kmにも及ぶ非常に長い海岸線を有しており (海上保安庁, 2009)、人口のほとんどが海岸に近い地域に集中していることから、沿岸域を中心とした地域の生活環境の保全是非常に関心が高い問題となってきた。また、沿岸域はわが国の水産業を支える重要な海域であることから、生活、産業の両面で沿岸域の環境保全是重要な案件となってきた。

化学物質は、本来の使用目的以外の面で様々な影響を人類や環境に対して及ぼすことが知られている。その目的外の影響は医薬品では副作用として現れ、農薬等では非標的生物である水生生物等への毒性影響等として現れる。化学物質の生物に対する有害性等を事前評価するため、化審法で物理化学的性状やげっ歯類等に対する毒性等は検討されている。しかし、環境中に放出された化学物質は多種多様な生物に影響を与える可能もあることから、有害性評価のためにはほ乳類以外の動物等を用いた毒性試験の実施も必要不可欠となっている。このような有害性評価のために、日本ではJIS工場排水試験法 (日本工業標準調査会, 1993) 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) の生態影響試験実施に関する基準 (生態影響 GLP) における魚類急性毒性試験 (環境省総合環境政策局環境保健部企画課化学物質審査室, 2009) 等がある。これらは、淡水魚を用いて生死を基準とした高濃度の化学物質の急性的な毒性の評価に利用されている。しかし、近年では低濃度の化学物質の影響を評価するための毒性試験の実施が必須となりつつある。

一方、有機スズ化合物をはじめとする多くの化学物質は海域も汚染しており、その有害性評価は淡水魚のみでは不十分であることが指摘された (水産庁, 1995)。そこで小山らは我が国で養殖対象となっている海水魚を対象として、毒性試験法の開発を行った (小山, 1998)。海水魚を用いた毒性試験をさらに発展させるためには、化学物質に対する感受性の淡水魚と海水魚による違い、海水魚間での違いがどの程度あるのか、魚種間感受性差の原因、急性毒性値と慢性毒性値の関連性等の問題が残されている。そこで、わが国沿岸域生態系保全のため本研究では、海水魚に対する化学物質の各種毒性値の意義、魚種による化学物質に対する感受性の相違とその原因に

ついて検討を加え、海水魚類の毒性試験が抱える問題点の解明を図った。

## 1.2. 試験魚の選定

魚類を用いた毒性試験には、急性毒性試験と慢性毒性試験がある。急性毒性試験では、96時間、小型水槽を用いて止水、半止水または流水式の試験装置により試験物質に暴露するため、小型水槽に収容できる稚魚を用いることができる。急性毒性試験法として、日本の工場排水試験法(JIS K0102)(梅崎ら, 1982)、米国のStandard methods (APHA-AWWA-WPCF, 1998)、OECD法(OECD, 1992a)、FAO法(FAO, 1987)、ISO法(ISO, 1996)、ヨーロッパのEIFAC法(EIFAC, 1975)等がある。これらの試験法で推奨されている供試魚のほとんどが、コイ(*Cyprinus carpio*)、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)、fathead minnow (*Pimephales promelas*)等の淡水魚である。一方、慢性毒性試験では、受精卵から成魚にいたるまでの全生活環を通して試験(全生活環毒性試験)を実施するものであり、Mount and Stephan(1967)によりfathead minnow (*Pimephales ptomelas*)を用いた研究が始められ、Eaton(1970)はさらにbluegill (*Lepomis macrochirus*)を用いる手法を発表し、その後McKim and Benoit(1971)がbrook trout (*Salvelinus fontinalis*)を用いる手法を、さらにSmith(1973)がflagfish (*Jordanella floridae*)を用いる手法を報告しているが、これらはいずれも淡水魚である。全生活環毒性試験は試験期間が長期間に亘り、たとえばヒメダカ等の小型魚でも試験には3ヶ月程度を要し、労力や金銭的負担もかなり大きくなっていく。一般に、成長段階の初期に化学物質に対して感受性が高いといわれており、淡水魚の初期生活段階毒性試験について、多くのデータをとりまとめたMcKim(1977)によると、魚類で最も感受性が高い成長段階は、ふ化仔魚から前期稚魚期とされている。このことから、全生活環の中で最も感受性が高い仔稚魚期に比べてより短期間で試験が完結する初期生活段階毒性試験がOECD化学製品テストガイドライン(OECD, 1992b)に定められ、淡水魚のfathead minnow等の数種の推奨される魚種が挙げられている(Benoit et al., 1982)。

このように、急性毒性試験及び慢性毒性試験ともに、試験に供されている魚種のほとんどが淡水魚である。淡水魚における毒性値を利用して、淡水域における各種化学物質の魚類に対する環境評価は実施できる。しかし、ダイアジノン、PAP等

の有機リン系農薬では、海水魚で得られた半数致死濃度(LC50)が、コイ・ヒメダカ等の淡水魚に比較して低く(奈良・山下, 1973; 広瀬・橘川, 1976)、また、淡水魚のbluegillと海水魚のtidewater silverside (*Menidia peninsulae*)の化学物質に対する感受性を比較した結果、多くの物質において海水魚の感受性が淡水魚に比較して高いこと(Dawson et al., 1975/1977)、さらにマミチヨグ(mummichog) (*Fundulus heteroclitus*)において、塩分濃度に増加にともないナフタレンに対する感受性が增大すること(Levitan and Taylor, 1979)等から、化学物質に対する感受性は淡水魚と海水とでは異なる可能性が指摘(Leung et al., 2001)されており、海域における影響評価には海水魚に関する毒性値が必須である。そこで、近年は試験に供することのできる海水魚として、sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*)、マミチヨグ、Atlantic silverside (*Menidia menidia*)等が挙げられている(APHA-AWWA-WPCF, 1998)。しかし、海水魚を用いて求めた毒性データは非常に少ないのが現状であり、海水魚における毒性データの蓄積を推し進めることが急務となっている。

そこで、本研究に用いる試験魚の一つとして、上記推奨魚種であるマミチヨグに着目した。マミチヨグは、北米東海岸の原産であり、セントローレンス湾からフロリダ半島にまで広く分布する汽水域魚(Leim and Scott, 1966)であるが、海水で再生産が可能のため海水魚として扱うことができる。マミチヨグは、ヒメダカと異なり受精卵に付着糸及び付着毛がないため、卵膜を透して胚の発達が容易に観察できるため、発生過程も詳細に検討され(Armstrong and Child, 1965)、また、生殖生理等についても詳細な検討(Shimizu, 1997)がなされている。その一方で、カドミウム等の各種化学物質の毒性についての研究も多い(Eisler, 1986)。また、環境ホルモンの試験においても試験魚に供されており、本種を初期生活段階毒性試験に利用する意義は大きい。マミチヨグは、独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所で系代飼育をしており、受精卵、稚魚を試験に供することができる。

一方、日本産の海水魚については、急性毒性試験に使用できる魚種は、ある程度まとまった尾数の入手が必要でありことから種苗生産されている魚種が中心となる。この種苗生産されている魚種は60~70種(福所, 私信)あるとされている。現在、日本産海水魚で各種毒性試験に用いられている魚種には、マダイ(*Pagrus major*)、シロギス(*Sillago*



*japonica*), ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*), クロダイ (*Acanthopagrus schlegeli*) 等がある。これらの海水魚について、試験魚としての適性等の検討もなされている。山田・高柳 (1995) は生物濃縮試験に用いる試験魚として、アミメハギ (*Rudarius ercodes*), シロギス, ボラ (*Mugil cephalus*), マダイの中からマダイ及びシロギスを挙げている。小山ら (1992) は、汚染物質の毒性評価のための海水魚を選定しており、広範に種苗が生産されていること、カドミウム (Cd) 及び有機リン系農薬のフェニトロチオン (MEP) に対する感受性が高いことからマダイを試験魚として推奨している。

そこで、本研究に用いるもう一種の供試魚としてマダイを選定した。マダイは、日本では最も広範に種苗生産されている魚種であり、また、近年の栽培漁業技術の進歩によりほぼ通年仔稚魚を入手することができる。しかし、初期生活段階毒性試験に供する試験魚の条件としては、飼育しやすい、受精卵が容易に入手できる、ふ化仔魚の生残率が高い、等の条件が挙げられるが、これらを満たす日本産の海水魚は見当たらない。そこで、マダイの稚魚を用いて急性毒性試験、長期暴露試験及び血液学的な影響評価を行い、得られた毒性値とマミチヨグの毒性値との比較を行った。また、急性毒性値と慢性毒性値との比である急性慢性毒性比は、汚染物質ごとに一定である (Rand et al., 1995) ことが知られていることから、この比率を用いることにより急性毒性値から慢性毒性試験を推定することが可能とされている。マミチヨグで求めたこの急性慢性毒性比を日本産の魚種であるマダイにも適用できるか否かについても検討を加えた。マミチヨグの急性慢性毒性比とマダイの急性毒性値からマダイの慢性毒性値を推定することにより、我が国の沿岸域の環境保全に資することが可能となる。

### 1.3. 試験物質の選定

本研究における海水魚を用いた毒性試験において毒性を検討する試験物質については、海域における汚染実態やこれまでに報告されてきた毒性値等について検討し、以下に示す海域への3つの流入経路及び化学物質の物性から4種の化学物質を選定した。

一つ目が、海域に存在する人工物に含まれる化学物質の海域への溶出である。特に、船舶、魚網等の漁業用資材には、藻類、フジツボ類等の付着防止にさまざまな殺生物剤が配合された塗料が塗布されており、実際にこれらの殺生物剤の効果により、船底での藻類等の付着が阻止されており、こ

れらの殺生物剤の海域における環境影響評価は必須にもものと考えられる。この殺生物剤として大きな問題となった物質として有機スズ化合物が挙げられる。有機スズ化合物は有機金属化合物の一種であり、魚類に対しても非常に強い毒性を有していること (小山・清水, 1992), また、新腹足目巻貝に imposex を引き起こす (堀口, 1992; 堀口・清水, 1992) こと等が知られている。この有機スズ化合物は、非常に強い毒性を有し、大きい生物濃縮係数 (BCF, Bioconcentration Factor) を示す (Yamada and Takayanagi, 1992) こと等から現在は使用禁止となっているが、環境省の海洋環境モニタリング調査の対象物質に指定されており (環境省, 2009), いまだに海域において検出される (隠塚ら, 2004) ことが知られている。本研究では、有機スズ化合物の中でも、わが国において各種防汚塗料の主な殺生物剤として使用されていた、酸化トリブチルスズ (TBTO; Bis (tributyltin) oxide, MW 290.036, 純度 96%, Sigma-Aldrich Corporation, USA, MO) 及び塩化トリフェニルスズ (TPTC; Triphenyltin chloride, MW 350.0068, 純度 >98%, 東京化成工業株式会社, 東京) を選定し試験に用いた。

二つ目の経路が河川から海域への流入である。河川にはさまざまな化学物質が流出し、過去においてはさまざまな公害問題として河川の汚染が取り上げられ、我々人間生活をも脅かす公害病も発生した。それらの中で河川を汚染した化学物質のひとつに、安中公害訴訟、イタイイタイ病等で問題となったカドミウムが挙げられる。カドミウムについては、古くからの毒性についての研究 (Friberg, 1948) がなされている。現在では、カドミウムは土壤の汚染物質として知られており、環境省の海洋環境モニタリング調査の対象物質 (環境省, 2009) に指定され、特に海域においても底質への蓄積が知られている。カドミウムは海水でもカドミウムイオンとして溶存態をとり、また魚類に対する毒性について多くの報告 (板沢・小山, 1982) がある。これらのことから、環境汚染化学物質の中で重金属として、カドミウムを本研究の試験物質に選定した。試験には塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , 以下 Cd と略記, Cd として原子量 112.4, 純度 >98%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。

三つ目が、何らかの事故による海域汚染が挙げられる。海上保安庁の報告 (2009) によれば、海洋汚染の発生件数のうち半数以上を占めるものが油流出によるものであり、平成 20 年度の海洋汚染発生件

数 555 件のうち 60%以上を占める 373 件の発生があったものが油流出である。特に、1997 年の 1 月に日本海で発生したロシア船籍のタンカー ナホトカ号の船体破損に伴う C 重油流出事故は大きな問題となった。また、海外でも、1989 年にアラスカで発生したエクソンバルディーズ号の大規模原油流出事故等があり、油による海洋汚染は大きな問題となっている。流出油の成分の中でも多環芳香族炭化水素は毒性が強いことで知られている (Anderson et al., 1974)。多環芳香族炭化水素の中でも、水溶性が比較的水溶性が高く、また、毒性等の研究例もあるナフタレンを試験物質に選定した。試験にはナフタレン (以下 Nap と略記, MW 128.164, 純度 >99%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。

ここで選定した 2 種類の試験魚及び 4 種類の試験物質により、まず、急性毒性試験を実施し、急性毒性値を明らかにする。次に、慢性毒性試験を実施して慢性毒性値を明らかにし、先に求めた急性毒性値と慢性毒性値の関係を調べるとともに、毒性値を比較することにより試験物質に対する試験魚の感受性の差を調べる。さらに、試験物質の生物濃縮性及び急性毒性試験における死亡個体中の蓄積量を調べることにより、試験物質に対する試験魚の感受性差の原因の一つとして体内蓄積量が関連しているか否かを検討する。これらの成果が得られることにより、日本沿岸における各種化学物質の環境影響評価に適した海水魚種を選定することができる。また、化学物質に対する魚種間感受性差の原因の一つを明らかにすることができる。

## 第 2 章 毒性試験における毒性値の比較

魚類を用いた毒性試験には、高濃度で短期間の影響を調べる急性毒性試験と、低濃度で長期間に亘る影響を調べる慢性毒性試験があるが、これらは水域環境における各種化学物質の影響評価には欠かせない試験法となっている。中でも急性毒性試験によって、これまでに種々の淡水魚を中心に各種化学物質の毒性影響が検討されている。日本においては、淡水魚を用いた農薬等の急性毒性については種々の報告例があり、毒性試験の重要な柱となっている。しかしながら、現在ではより低い濃度での化学物質の生物影響や、沿岸域を中心とした海域の環境評価が着目されるようになり、急性毒性試験のみならず海産生物を用いた慢性毒性試験の重要性が増してきている。海水魚を用いた急性毒性試験及び慢性毒性試

験については、OECD のテストガイドライン等においても数種の魚種が試験魚として推奨されている。しかしながら、わが国においては海水魚を用いた急性毒性値の報告例は多くはなく、慢性毒性試験についてはほとんど実施されていないのが現状であった。特に、日本産の海水魚については、その入手が種苗として生産されている魚種や、稚魚を採取しやすい魚種等に限定されており、入手の時期がごく限られていたことから、急性毒性試験の普及が遅れていた。さらに、代表的な慢性毒性試験である初期生活段階毒性試験となると、受精卵～ふ化仔魚の飼育が小型水槽では高い生残率を維持することが難しいため、この期間の毒性試験の実施は困難であった。

そこで、本研究では沿岸域の海水魚を用いた影響評価に資することを目的として、まず、近年種苗生産技術の発達により実験魚として入手しやすく、わが国を代表する海水魚であるマダイ (*Pagrus major*) を用いて 4 種の化学物質についての急性毒性試験、稚魚の長期間暴露試験を実施した。さらに外国産の実験魚マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) を用いて同様の試験を実施し、魚種間の感受性の比較を行った。さらには化学物質に鋭敏に影響されることが期待される血液性状の影響評価項目としての有用性を、マダイを試験魚として検討した。

### 2.1. 急性毒性試験

魚類を用いた各種化学物質の毒性試験は、環境汚染が問題となった当初、汚染源のほとんどが工場排水で、それが河川に排出されていたために河川域への影響等を検討するため、主に淡水魚を用いて実施されてきた。河川に流出した化学物質は最終的に海に流入するが、近年、沿岸域における環境への関心が高まる中で、わが国では人口密集地域は沿岸域に分布しており、また、沿岸域の環境は漁業とも密接に関係していることから、海水魚への各種化学物質の影響評価の重要性が高まっている。各種の海産生物による毒性試験が実施され始めているが、魚類を用いた毒性試験については欧米においてもあまり普及していないのが現状であり、また、日本でも実施例はあまり多くはないのが実情である。そこで、ここでは各種試験に用いられている米国産メダカ目の海水魚マミチヨグとわが国を代表する海水魚であるマダイについて選定した 4 種の化学物質に対する感受性の比較を行った。

#### 2.1.1. 実験材料及び方法

マダイ：供試魚としてアーマリン近大 (和歌山) か



ら購入したマダイを用いた。急性毒性試験法は、OECD 化学品テストガイドライン 203 魚類急性毒性試験（通商産業省基礎産業局化学品安全課監修, 1984a: OECD, 1992a）に準じて水温 20℃ の条件下で、試験物質として選定した酸化トリブチルスズ（以下 TBTO と略記）、塩化トリフェニルスズ（TPTC）及び塩化カドミウム（ $\text{CdCl}_2$ 、以下 Cd と略記）は半止水式（24 時間毎に換水）、ナフタレン（以下 Nap と略記）は流水式で各試験を行った。TBTO 及び TPTC の試験原液はアセトン（残留農薬試験用 300, 和光純薬工業株式会社, 大阪）に TBTO（純度 96%, Sigma-Aldrich Corporation, USA, MO）、TPTC（純度 >98%, 東京化成工業株式会社, 東京）それぞれを溶解して調製した。Cd の試験原液は  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ （純度 >98%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪）を蒸留水に溶解して作製した。Nap の試験原液は、Nap（純度 >99%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪）をアセトン（残留農薬試験用 300, 和光純薬工業株式会社, 大阪）に溶解した後、Nap-アセトン溶液の 1.6 倍容の医薬用硬化ひまし油（HCO-40, 日光ケミカルズ株式会社, 東京）と混溶して作製した。試験に供したマダイの平均体重はそれぞれ TBTO:1.0g, TPTC:1.7g, Cd:0.16g, Nap:1.8g であった。半止水式の試験では、20℃ に設定した大型のウォータバスに 25L 容のガラス水槽を 1 濃度区あたり 1 個ずつ収容し、これに砂ろ過及び活性炭ろ過の海水を 20L 入れるとともに予め調製しておいた試験原液を公比 2 で設定した所定の試験濃度となるよう添加し攪拌して試験水を調製し、これに試験魚 10 尾ずつ収容し試験を開始した。24 時間ごとに、新たに調製した試験水に試験魚を移し通気を行わずに 96 時間の暴露を行った。流水式試験は流水式試験装置（Kimura et al., 1971; 角埜・小山, 2004）により実施し死亡率を調べた。この試験装置には 25L 容のガラス水槽を各濃度区に 1 個用意し、各水槽に 20℃ に調温した砂ろ過及び活性炭ろ過海水を毎分 200mL 注入するとともに、25L 容のガラス製水槽を用いて水道水及び試験原液により調製した試験液をガラス製微量定量ポンプ（Glass Pump GMW-A, 東京理東京理器械株式会社, 東京）によりガラスパイプまたはテフロンパイプを通じ各水槽に 2mL ずつ各水槽に注入した。海水及び試験液は試験用水槽に導入される際に、設置されているガラス製ロート内において試験液が海水により 100 倍希釈され所定の濃度となることにより一定の濃度を維持することができる。このよう設定した流水式試験装置の各試験用水槽に

試験魚を 1 濃度区あたり 10 尾収容し 96 時間暴露を行った。毒性試験には無添加対照区に加え助剤対照も設置し、2 回繰り返して実施した。暴露期間中、試験物質の実測濃度と累積死亡率から、プロビット法により 96 時間半数致死濃度を求めた。

マミチヨグ：供試魚として、瀬戸内海区水産研究所で飼育中のマミチヨグ稚魚を用いた。供試魚であるマミチヨグ稚魚の体重はそれぞれ、TBTO：平均 0.97g, TPTC：平均 0.97g, Cd：平均 1.0g, Nap：平均 0.45g であった。マミチヨグにおいてもマダイと同様に試験区に供試魚を 10 尾ずつ収容して、96 時間暴露の急性毒性試験を行い、死亡率を調べた。実測濃度及び死亡率からプロビット法により 96 時間半数致死濃度を求めた。また、死亡個体の一部は体内濃度分析用のサンプルとして凍結保存を行い、第 4 章において死亡個体中の試験物質の蓄積濃度の分析を行った。

試験における水中の各試験物質濃度は試験開始時及び試験終了時に測定した。TBTO 及び TPTC については、Harino and Fukushima (1992) の手法に準じて分析した。まず、海水 1L に対し NaCl（試薬特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪）100g 及び濃塩酸（有害金属測定用, 和光純薬工業株式会社, 大阪）5mL を添加攪拌の後、0.1% トロポロン（和光純薬工業株式会社, 大阪）含有のベンゼン（ベンゼン 300 残留農薬・PCB 試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪）50mL により 2 回抽出を行った。抽出液を減圧濃縮後、n-プロピルマグネシウムブロミド（東京化成工業株式会社, 東京）1mL でプロピル処理を行い、TBT または TPT のプロピル誘導体を n-ヘキサン（ヘキサン 300 残留農薬試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪）10mL で 2 回抽出した。抽出液を 5mL まで濃縮し、あらかじめ n-ヘキサン 10mL で洗浄した Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Florisil<sup>®</sup> cartridge（Waters Corporation, MA, USA）に導入し n-ヘキサン 10mL で溶出した。溶出液全てを集め、0.5mL まで窒素を吹き付けて濃縮し、テトラブチルスズを内部標準物質（和光純薬工業株式会社, 大阪）とし炎光光度計（島津製作所製 FPD, 同社製 610nm スズフィルター付）付きガスクロマトグラフ分析装置（HRGC-15A, 島津製作所, 京都）で測定した。

試験水中の Cd は JIS 工場排水試験法（日本工業標準調査会, 1993）に準じて測定した。試験水は 0.45  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルター（Millipore Corporate, MA, USA）でろ過したものを分析サンプルとした。分析サンプルは偏光ゼーマン原子吸光分光光度計（Z-8000, 株式会社日立ハイテクノロジー, 東京）

に導入し、空気-アセチレンバーナーによるフレイム法により試験水中のCd濃度を定量した。

Napについては分光光度法 (Neff and Anderson, 1975) または、立石の手法 (立石, 2000) によりGC-MS法で測定した。分光光度法については、試験水にn-ヘキサンを加えて振とう混和によりNapを抽出し、無水硫酸ナトリウム (残留農薬・PCB試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪) によりこの抽出液を脱水処理して分析サンプルとして、石英セルを用いてUV-VIS分光光度計 (UV-1200, 島津製作所, 京都) により紫外域220.2nm及び276nmの吸光度を測定し試験水中のNap濃度を定量した。GS-MS法については以下の通りである。試験水のサンプル5ないし10mLを供栓試験管に取り、サロゲートとして250 $\mu$ g/Lの $d_8$ -Naphthalene溶液50 $\mu$ L加えた後10mLのヘキサンを添加して10分間振とうし、Napをヘキサンに転溶した後にヘキサン層を分取した。分取したヘキサンに25ppmの $d_{10}$ -Fluorene 1.0 $\mu$ Lを内標準物質として加えた後、最終溶液を約0.5mLに濃縮しGC-MSによる分析に供した。キャピラリーカラムとしてDB5-MS, 30m, 0.25mmID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を装着したGC/MS (Hewlett Packard 5890 series II and Hewlett Packard 5972 series, Palo Alto, CA, USA) 用い、SIMモードで以下の条件により分析した。注入口の温度は280 $^{\circ}$ Cとし、検出器の部分に300 $^{\circ}$ Cの温度をかけ、質量分析計のイオン源部分に190 $^{\circ}$ Cの温度を得た。カラム温度は60 $^{\circ}$ Cで1分間保持した後、10 $^{\circ}$ C/分で120 $^{\circ}$ Cまで昇温、引き続き5 $^{\circ}$ C/分で210 $^{\circ}$ Cまで昇温後、6 $^{\circ}$ C/分で300 $^{\circ}$ Cまで昇温し、10分間保持した。分析時間は50分であった。

試験期間中、溶存酸素計 (Dissolved oxygen meter, YSI model 58, YSI Incorporated, OH, USA) により水温及び溶存酸素濃度を、pH計 (Horiba

D-21, 株式会社堀場製作所, 京都) によりpHを、ハンディS-C-Tメーター (YSI model 30, YSI Incorporated, OH, USA) により塩分をそれぞれ測定し、マダいの試験では水温は22.1  $\pm$  0.1 $^{\circ}$ C、溶存酸素濃度は6.8  $\pm$  0.1 mg/L、酸素飽和度は94  $\pm$  3 %、pHは8.1  $\pm$  0.0、塩分濃度は31.0  $\pm$  0.4、マミチヨグの試験では水温は20.0  $\pm$  0.09 $^{\circ}$ C、溶存酸素濃度は7.2  $\pm$  0.1 mg/L、酸素飽和度は97  $\pm$  2 %、pHは7.8  $\pm$  0.0、塩分濃度は31.6  $\pm$  0.4であった。

## 2.1.2. 結 果

マミチヨグ稚魚及びマダイ稚魚に対する各試験

Table 2.1-1. Acute toxicity of TBTO, TPTC, cadmium and naphthalene for mummichog and red sea bream

| Chemicals   | 96hrLC50 ( $\mu$ g/L) |               |
|-------------|-----------------------|---------------|
|             | mummichog             | red sea bream |
| TBTO*       | 13                    | 1.3           |
| TPTC**      | 67                    | 92            |
| Cadmium     | 32000                 | 650           |
| Naphthalene | 5900                  | 670           |

\*:value were expressed as TBT

\*\*value were expressed as TPT

物質の急性毒性値を Table 2.1-1 に示した。TBTOについては、マダいの急性毒性値はマミチヨグの10分の1であった。TPTCについては、マミチヨグに比較したマダいの急性毒性値がやや高かった。Cdについては、マダいの急性毒性値はマミチヨグの50分の1であった。Napについてはマダいの急性毒性値はマミチヨグの9分の1であった。総じてマダいのほうがマミチヨグに比較してこれらの試験物質に対する感受性は高い傾向を示した。また、マダイ、マミチヨグともに最も強い毒性を示した試験物質はTBTOであり、次いでTPTCであった。モル濃度に基づき急性毒性値を計算すると、マミチヨグ及びマダいの値はそれぞれ、TBTOでは0.045及び0.0045 $\mu$ mol/L、TPTCでは0.19及び0.26 $\mu$ mol/L、Cdでは220及び4.5 $\mu$ mol/L、Napでは46及び5.2 $\mu$ mol/Lであった。モル濃度に基づき物質間の毒性の比較を行うと、マダイでは、CdとNapは同程度の毒性を示していたが、マミチヨグではNapのほうがCdに比較して5倍程度強い毒性を示していた。

## 2.1.3. 考 察

すでに報告されている4種類の試験物質の魚類に対する急性毒性値を Table 2.1-2 ~ 2.1-6 に示した。日本産の海水魚を用いた急性毒性値では、メジナ (*Girella punctata*) (角埜・木村, 1987) 及びアゴハゼ (*Chasmichthys dolichognathus*) (清水・木村, 1987) のTBTOに対する急性毒性値がそれぞれ、3.2 $\mu$ g/L及び4.0 $\mu$ g/Lとの報告がある。また、TPTCに対するアゴハゼの急性毒性値は18 $\mu$ g/L (清水・木村, 1991) (Table 2.1-3)、Cdに対するメジナの急性毒性値が15700 $\mu$ g/L (Kuroshima and Kimura, 1990) 及びマダいの700 $\mu$ g/L (Kuroshima et al., 1993) がそれぞれ報告されている (Table 2.1-4 及び 2.1-5)。本試験結果では、マダイに対するTBTOの急性毒性値1.3 $\mu$ g/Lは、前述の日本産海水魚類の既報値よりも低く、また、Table 2.1-2 に示す日本産以外の魚類に対する急性

毒性値と比較して最も低い値であった。本試験におけるマダイのCdに対する急性毒性値  $650\mu\text{g/L}$  は、先述のCdに対する日本産海水魚類に対する急性毒性値 (Table 2.1-5) よりも低く、また、Table 2.1-5 に示す日本産以外の海水魚に対する急性毒性値と比較しても低い値を示していた。本試験におけるマダイに対するNapの急性毒性値  $670\mu\text{g/L}$  は、Table 2.1-6 に示す既報の急性毒性値と比較して一桁以上低い値を示した。その一方で、マダイのTPTCに対する急性毒性値  $92\mu\text{g/L}$  は前述の日本産魚類の毒性値や Table 2.1-3 に示す値よりもやや大きい値を示していた。

マミチヨグについては、Table 2.1-2 に示すようにTBTOについての急性毒性値は、 $17.2 \sim 24\mu\text{g/L}$  (Bushong et al., 1988 ; Pinkney et al., 1989 ; ECOTOX, 2007) という報告がある。また、Cdについては、マミチヨグを用いた報告が比較的多く、急

性毒性値は  $12000 \sim 30000\mu\text{g/L}$  (Voyer, 1975 ; Gill and Epple, 1992) の範囲にあった。これらTBTO及びCdについてのマミチヨグに対する既報の急性毒性値と、本試験結果TBTO :  $13\mu\text{g/L}$ , Cd :  $32000\mu\text{g/L}$  とを比較するとほぼ同様の値を示していた。しかし、TPTC及びNapについては既報値が得られなかったため、本結果との比較はできなかった。

海産の試験魚としては、メダカ目のsheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) がよく知られており、OECDのテストガイドラインでは初期生活段階毒性試験の推奨魚として挙げられている。そこで、sheepshead minnowとマミチヨグとの感受性の比較を試みた。まず、96hrLC50について、TBTOでは、sheepshead minnowが  $16\mu\text{g/L}$  (ECOTOX, 2007)、マミチヨグが  $17.2\mu\text{g/L}$  (Pinkney et al., 1989) 及び本試験結果の  $13\mu\text{g/L}$  という値であり両魚種の値は

Table 2.1-2. Previously reported TBTO acute toxicity values for fish

| Species   | 96hLC50<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | Reference  |
|---|--------------------------------|--|
| <b>Freshwater fish</b>                                  |                                |  |
| Guppy<br><i>Poecilia reticulata</i>                     | 21, 31                         | Ecotox, 2007   |
| Medaka<br><i>Oryzias latipes</i>                        | 16, 17                         | Ecotox, 2007   |
| <b>Marine fish</b>                                      |                                |  |
| Bleak<br><i>Alburnus alburnus</i>                       | 15                             | Linden et al., 1979  |
| Chinook salmon<br><i>Oncorhynchus tshawytscha</i>       | 1.5                            | Short and Thrower, 1987                                      |
| Girella<br><i>Girella punctata</i>                      | 3.2                            | Kakuno and Kimura, 1987                                      |
| Mummichog<br><i>Fundulus heteroclitus</i>               | 17.2<br>18, 24<br>23.4, 23.8   | Pinkney et al., 1989<br>Ecotox, 2007<br>Bushong et al., 1988 |
| Saltwater goby<br><i>Chasmichthys dolichognathus</i>    | 4                              | Shimizu and Kimura, 1987                                     |
| Sheepshead minnow<br><i>Cyprinodon variegatus</i>       | 16                             | Ecotox, 2007   |
| Threespine stickleback<br><i>Gasterosteus aculeatus</i> | 13, 19                         | Ecotox. 2007   |



Table 2.1-3. Previously reported TPTC acute toxicity values for fish

| Species  | 96hrLC50<br>( $\mu$ g/L) | Reference                |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <b>Freshwater fish</b>                               |                          |                          |
| Common carp<br><i>Cyprinus carpio</i>                | 19                       | Ecotox, 2007             |
| Rainbow trout<br><i>Oncorhynchus mykiss</i>          | 37                       | Ecotox, 2007             |
| <b>Marine fish</b>                                   |                          |                          |
| Saltwater goby<br><i>Chasmichthys dolichognathus</i> | 18-27                    | Shimizu and Kimura, 1991 |

Table 2.1-4. Previously reported cadmium acute toxicity values for freshwater fish

| Species  | 96hrLC50<br>( $\mu$ g/L)                                 | Reference   |
|--|--|---|
| <b>Freshwater fish</b>                         |  |   |
| Hawk fish<br><i>Cirrhinus mrigala</i>          | 5300   | Verma et al., 1984<br>Verma et al., 1984  |
| Fountain darter<br><i>Etheostoma fonticola</i> | 11.77-15.7   | Ecotox, 2007  |
| Flagfish<br><i>Jordanella floridae</i>         | 2500<br>2500   | Spehar, 1976<br>Ecotox, 2007  |
| Fathead minnow<br><i>Pimephales promelas</i>   | 67-12580<br>80-90<br>630-72600<br>1390-7160<br>2200-3510 | Ecotox, 2007<br>Hall et al., 1986<br>Pickering and Henderson,<br>1966<br>Benson and Birge, 1983<br>Sherman et al., 1987 |
| Brook trout<br><i>Salvelinus fontinalis</i>    | 5080   | Holcombe et al., 1983   |

Table 2.1-5. Previously reported cadmium acute toxicity values for marine fish

| Species                       | 96hrLC50<br>( $\mu$ g/L) | Reference                  |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Marine fish</b>            |                          |                            |
| Sheepshead minnow             | 180.3-312.4              | Ecotox, 2007               |
| <i>Cyprinodon variegatus</i>  | 1230                     | Hutchinson et al., 1994    |
|                               | 15900                    | Roberts et al, 1982        |
|                               | 50000                    | Eisler, 1971               |
| Mummichog                     | 12200                    | Gill and Epple, 1992       |
| <i>Fundulus heteroclitus</i>  | 1300-3000                | Voyer et al., 1975         |
|                               | 22000                    | Eisler and Hennekey, 1977  |
|                               | 23000-36000              | Ecotox, 2007               |
|                               | 27000                    | Jackim et al., 1970        |
|                               | 30000-114000             | Voyer, 1975                |
|                               | 55000                    | Eisler, 1971               |
| Striped killifish             | 21000                    | Eisler, 1971               |
| <i>Fundulus majalis</i>       |                          |                            |
| Green fish                    | 15700-25900              | Kuroshima and Kimura, 1990 |
| <i>Girella punctata</i>       |                          |                            |
| Giant perch                   | 1990-19000               | Shazili, 1995.             |
| <i>Lates calcarifer</i>       |                          |                            |
| Menidia menidia               | 6400                     | Roberts et al., 1982       |
| <i>Atlantic silverside</i>    |                          |                            |
| Tidewater silverside          | 310                      | Ecotox, 2007               |
| <i>Menidia peninsulae</i>     |                          |                            |
| Striped bass                  | 75                       | Palawski et al., 1985      |
| <i>Morone saxatilis</i>       | 19900                    | Ecotox, 2007               |
| White mullet                  | 12000                    | Ecotox, 2007               |
| <i>Mugil curema</i>           |                          |                            |
| Coho salmon                   | 1480                     | Ecotox, 2007               |
| <i>Oncorhynchus kisutch</i>   | 1500                     | Dinnel et al., 1989        |
| Red Sea Bream                 | 700-19500                | Kuroshima et al., 1993     |
| <i>Pagrus major</i>           |                          |                            |
| Guaru                         | 27000                    | Chung, 1983                |
| <i>Poecilia vivipara</i>      |                          |                            |
| Rivulus                       | 800-32200                | Park et al., 1994          |
| <i>Rivulus marmoratus</i>     |                          |                            |
| Flatfish                      | 10000                    | George et al., 1996        |
| <i>Scophthalmus maximus</i>   |                          |                            |
| Scorpionfish                  | 62000                    | Brown et al., 1984         |
| <i>Scorpaena guttata</i>      |                          |                            |
| Cunner                        | 25900                    | Ecotox, 2007               |
| <i>Tautoglabrus adspersus</i> |                          |                            |

Table 2.1-6. Previously reported naphthalene acute toxicity values for fish

| Species                       | 96hrLC50<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | Reference            |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>Freshwater fish</b>        |                                 |                      |
| Coho salmon, silver salmon    | 2100                            | Moles et al., 1981   |
| <i>Oncorhynchus kisutch</i>   | 2100                            | Ecotox, 2007         |
|                               | 3220                            | Moles, 1980          |
|                               | 5600                            | Ecotox               |
| <b>Marine fish</b>            |                                 |                      |
| Pink salmon                   | 1200                            | Moles and Rice, 1983 |
| <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> | 1240-1840                       | Korn et al., 1979    |
| Tigerfish                     | 15500                           | Ecotox, 2007         |
| <i>Therapon jarbua</i>        |                                 |                      |

近似していた。Cdについては sheepshead minnow で 180.3 ~ 50000 $\mu\text{g/L}$  (Eisler, 1971; ECOTO, 2007), マミチヨグで 1300 ~ 55000 $\mu\text{g/L}$  (Eisler, 1971; Voyer et al., 1975) 及び本試験結果 32000 $\mu\text{g/L}$  であり, 両魚種の値は近似していた。TPTC 及び Nap については sheepshead minnow の値が報告されていないため両魚種の比較はできなかったが, sheepshead minnow とマミチヨグはほぼ同じ感受性を示すものと推定された。以上の結果から, マダイの感受性が非常に高いことが明らかとなり, 日本の沿岸域における各種の汚染化学物質の影響を評価するための試験生物として, マダイが有用な試験魚であることがうかがえる。小山ら (1992) もマダイが各種汚染化学物質に対して鋭敏で試験魚に適していることを述べており, 本試験においてその高い感受性からマダイが試験魚として優れていることが確認された。

各種化学物質の魚類への毒性影響に関する毒性評価については, 淡水魚を試験魚として実施されてきた。そこで, 本試験で試験物質として選定した 4 種類の化学物質について淡水魚と海水魚における毒性値の比較を試みた。その結果, Table 2.1-2, 2.1-3 及び 2.1-6 に示したこれまでの既報値について淡水魚と海水魚の毒性値を比較した結果, TBTO, TPTC 及び Nap いずれの試験物質においても, 海水魚の方がより低い毒性値を示していた。特に, TBTO については, 本試験におけるマダイの急性毒性値も含め一桁以上低い値を示していた。その一方で,

Table 2.1-4 及び 2.1-5 に示す Cd の既報の急性毒性値について, 淡水魚と海水魚の値を比較すると, 淡水魚の方が海水魚に比較して一桁以上低い値を示していた。Carroll et al. (1979) は淡水魚であるカワマス (*Salvelinus fontinalis*) に対する Cd の毒性が, カルシウムイオンの存在により弱められることを指摘しており, 田端 (1969) もヒメダカ (*Oryzias latipes*), ソウギヨ (*Ctenopharyngodon idellus*), モツゴ (*Pseudorasbora parva*) 及びニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に対する亜鉛及び Cd の急性毒性が, 塩化カルシウム, 硫酸マグネシウム等の存在により弱められることを指摘している。さらに, 小山 (1997) は, 銅, 亜鉛及び Cd について淡水魚と海水魚における急性毒性値を比較検討した結果, 淡水魚でより低い毒性値が得られることを報告している。このように, 淡水魚と海水魚では試験物質に対する感受性が大きく異なる場合があるため, 淡水域の各種化学物質の魚類への影響評価には淡水魚を用いることが必須であり, 同様に海域の各種化学物質の魚類への影響評価には海水魚を用いることが必須であることは明らかである。

ここで明らかになったように, マダイは急性毒性試験魚には非常に適しているが, ふ化仔魚の飼育が困難であり, また餌料の確保に労力を要する等の理由から, 最も鋭敏な時期に毒性試験を行う初期生活段階毒性試験に用いることはできない。そこで, マダイの慢性毒性値を求めるために, 稚魚期からの長期暴露による影響評価を次項以降で行



う。また、従来、影響評価項目として用いられてきた成長あるいは死亡の他に、生理学的な影響評価についても次項以降で検討を行うとともに、物質毎に急性毒性値と慢性毒性値との比がほぼ一定である (Rand et al., 1995) ことを利用して、マミチヨグで求めた急性毒性値及び次項で求める慢性毒性値である最小影響濃度 (LOEC, Lowest Observed Effect Concentration) 及び無影響濃度 (NOEC, No Observed Effect Concentration) を用いて、マダイの慢性毒性値の推定の可能性についても次項以降で検討を加える。

## 2.2. 慢性毒性試験

各種汚染物質の魚類に対する毒性評価では、OECD テストガイドライン (通商産業省基礎産業局化学品安全課, 1984a) 等の急性毒性試験が基本的な試験として実施されている。急性毒性試験は、生死を評価基準に供試物質の毒性を調べるため、得られた毒性値は高濃度となる。この急性毒性値に安全係数を乗じて無影響濃度を推定する方法はよく用いられるが、低濃度の供試物質に長期間暴露して直接、無影響濃度を調べるべきであることは言うまでもないことである。近年では公害が社会問題となっていた頃に比較して、高濃度の化学物質が河川等に流出し、魚類等の大量斃死等が起きる事はほとんどなくなってきている。そのため、各種化学物質の毒性評価についても、生死の判定によって試験物質の毒性を調べる急性毒性試験から、低濃度で長期間続く影響を調べる慢性毒性試験に重きが置かれるようになってきている。慢性毒性試験である全生活環毒性試験に用いられる試験魚の代表として、コイ目の淡水魚 fathead minnow (*Pimephales promelas*) がよく知られている。全生活環毒性試験は受精卵から成魚にいたるまでの全生活環を通して試験を続けるもので、この fathead minnow を試験魚として用いる場合には、試験期間は約 300 日を要することが知られている (Rand et al., 1995)。このように、慢性毒性試験の実施には急性毒性試験に比較して時間が掛ることから、より簡便な手法が求められるようになり、特に感受性が高いふ化～稚魚期を含む初期生活段階に限定して試験を実施する初期生活段階毒性試験が OECD のテストガイドライン 210 (OECD, 1992b) に定められ、本手法であれば 2 ヶ月程度の試験により慢性影響を評価することができる (Rand et al., 1995) ようになった。また、漁網防汚剤、船底塗料あるいは流出油等の汚染問題を契機に、各種化学物質の水生生物に与える影響の評価対象範囲

も淡水域から沿岸域～海域へと広がってきており、海域における汚染物質の慢性影響評価の重要性も高まっている (Hutchinson et al., 1994; Ward, 1995; OECD, 1998)。特に、わが国では、沿岸域は重要な漁場でもあり、日本の沿岸域の各種化学物質の慢性影響の評価は重要な問題となってきている。しかしながら、日本産の海水魚についてはその仔稚魚期飼育の困難さから、慢性影響を評価するためのより簡便な試験法である初期生活段階毒性試験にさえ供する試験魚は見当たらない。そこで、本研究では、まず、選定した 4 種類の化学物質の魚類に対する慢性毒性値を求めるために、海産の試験魚として挙げられている (APHA-AWWA-WPCF, 1998) マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) を試験魚として、初期生活段階毒性試験を実施した。次に、初期生活段階毒性試験が実施困難なマダイ (*Pagrus major*) については、比較的感受性が高い (小山ら, 1992) とされる稚魚期個体を用いて、慢性毒性試験に代わる試験として 8 週間暴露試験を行った。さらに、マダイを試験魚として 8 週間程度の暴露試験を実施し、成長、生残以外の血液学的検査により慢性毒性を調べた。これらの結果を基に、魚種間の感受性の差異、また、慢性毒性の影響評価項目についても検討を加えた。

### 2.2.1. 初期生活段階毒性試験—マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験—

アメリカ東海岸の汽水から海水域に生息するメダカ目のマミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) を試験魚として用い、TBTO 等の選定した数種の物質について初期生活段階毒性試験を実施し、無影響濃度 (NOEC, No Observed Effect Concentration) 及び最低影響濃度 (LOEC, Lowest Observed Effect Concentration) を求めた。

#### 2.2.1.1. 実験材料及び方法

初期生活段階毒性試験法は、OECD 化学品テストガイドライン 210 魚類の初期生活段階毒性試験 (通商産業省基礎産業局化学品安全課監修, 1984b) に準じ、水温 20℃ の条件下で受精後 24 時間以内のマミチヨグ受精卵を用いて実施した。試験物質として選定した、酸化トリブチルスズ (Bis (tributyltin) oxide, 以下 TBTO と略記)、塩化トリフェニルスズ (TPTC) 及び塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , 以下 Cd と略記) は半止水式 (24 時間毎に換水)、ナフタレン (以下 Nap と略記) は流水式で各試験を行った。試験濃度は、急性毒性試験で得た 96 時

間半数致死濃度の1/1000から1/100を上限として公比3で濃度を設定し、対照区を含めて、TBTO:7濃度区, 0 (control), 0.012, 0.12, 0.38, 1.2, 3.8及び12 $\mu$ gTBT/L, TPTC:5濃度区, 0 (control), 0.31, 1, 3.1及び10 $\mu$ gTPT/L, Cd:7濃度区, 0 (control), 20, 63, 200, 630及び2000 $\mu$ g/L, Nap:4濃度区, 0 (control), 60, 190, 及び600 $\mu$ g/Lとした。TBTO及びTPTCの試験原液はアセトン(残留農薬試験用300, 和光純薬工業株式会社, 大阪)にTBTO(純度96%, Sigma-Aldrich Corporation, USA, MO), TPTC(純度>98%, 東京化成工業株式会社, 東京)それぞれを溶解して調製した。Cdの試験原液はCdCl<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O(純度>98%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪)を蒸留水に溶解して作製した。Napの試験原液は, Nap(純度>99%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪)をアセトン(残留農薬試験用300, 和光純薬工業株式会社, 大阪)に溶解した後, Nap-アセトン溶液の1.6倍容の医薬用硬化ひまし油(HCO-40, 日光ケミカルズ株式会社, 東京)と混溶して作製した。試験は, 試験物質を溶解させたアセトン溶液を水道水に溶解して調製した試験液をガラス製定量ポンプ(Glass Pump GMW-A, 東京理東京理器械株式会社, 東京)により各水槽に注入し, 所定の濃度となるように設定した流水式試験装置を用いて弱く通気を行いながら実施した(角埜ら, 2001; 角埜・清水, 2002)。この試験装置には試験には60L容のガラス水槽を用意し, 各水槽に20℃に調温した砂ろ過及び活性炭ろ過海水を毎分300mL注入するとともに, 60L容のガラス製水槽を用いて水道水及び試験原液により調製した試験液をガラス製微量定量ポンプ(Glass Pump GMW-A, 東京理東京理器械株式会社, 東京)によりガラスパイプまたはテフロンパイプを通じ各水槽に3mLずつ各水槽に注入した。海水及び試験液は試験用水槽に導入される際に, 設置されているガラス製ロート内において試験液が海水により100倍希釈され所定の濃度となり, 連続的に希釈が起こることにより一定の濃度を維持することができる。このよう設定した流水式試験装置の各試験用水槽に熱帯魚用ネットを設けてこれに受精卵を80個ずつ収容して試験を開始した。ふ化から4週目までの仔稚魚には, ふ化後24時間以内のアルテミア幼生(北米産, ミヤコ化学株式会社, 東京)を投与し, それ以降は, 配合飼料(海水魚用初期飼料C-700, 協和発酵バイオ株式会社, 東京)を朝に過剰量投餌して夕方残餌を除去することにより飽食させた。評価項目は, ふ化率, 生残率, 成長(体

重, 全長), 肥満度, 奇形率とした。TBTOについてはまず, 死亡率の高かった12 $\mu$ gTBT/L区を除き各試験区で試験開始4週目に生残魚の1/3を取り上げ, MS222(meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA)で麻酔した後, 全長をノギスで測定し, さらに, ペーパータオルの上で海水を除去して各個体の体重を測定した。また, 試験区ごとに肉眼的な形態異常の認められる個体を記録した。8週目に生残魚は全て取り上げ, TBTOの4週目同様に全長, 体重の測定, 及び形態異常の記録を行った。さらに次式により肥満度を求めた。

$$\text{肥満度 (condition factor)} = \frac{\text{体重 (g)}}{\text{全長 (mm)}^3} \times 1000000$$

TPTC, Cd及びNapのサンプリングについてはTBTOの試験結果を参考に, 4週目に比較して8週目でより影響が明確となったことから8週目のみのサンプリングとし, サンプリング方法等はTBTOの試験に準じた。

無影響濃度(NOEC)は, Duncanの多重比較により対照区と暴露区とを比較して, 有意水準5%で有意差の認められない最も高い濃度区の実測濃度とし, 最低影響濃度(LOEC)はこの濃度のすぐ上の試験区の実測濃度とした。

各試験における試験水中の試験物質濃度は, 試験開始時, 4週目 8週目の3回採水を行い以下のようにそれぞれ測定した。TBTO及びTPTCについては, 高見ら(1988)の手法に準じて, 試験海水1Lに対し酢酸エチル(酢酸エチル300, 残留農薬試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪) - n-ヘキサン(ヘキサン300 残留農薬試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪)(3:2v/v)50mLを添加し振とう攪拌する抽出操作を2回行い, 抽出液を合わせて抽減圧濃縮後, n-プロピルマグネシウムブロミド(東京化成工業株式会社, 東京)1mLでプロピル処理を行い, TBTまたはTPTのプロピル誘導体をn-ヘキサン(ヘキサン300 残留農薬試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪)10mLで2回抽出した。抽出液を5mLまで濃縮し, あらかじめn-ヘキサン10mLで洗浄したSep-Pak® Plus Florisil® cartridge(Waters Corporation, MA, USA)に導入しn-ヘキサン10mLで溶出した。溶出液全てを集め, 0.5mLまで窒素を吹き付けて濃縮し, テトラブチルスズを内部標準物質(和光純薬工業株式会社, 大阪)とし蛍光光度計(島津製作所製 FPD,

同社製 610nm スズフィルター付) 付きガスクロマトグラフ分析装置 (HRGC-15A, 島津製作所, 京都) で測定した。分離カラムは Ultra-1 GCカラム (liquid phase: crosslinked methyl silicone gum, 0.32mm. d. × 25m) (Hewlett-Packard, CA, USA) は, 検出器及び試料注入口温度: 260℃, カラム温度は 80℃ (4min) から 250℃ に 8℃ /min で昇温して使用した。

試験水中の Cd は JIS 工場排水試験法 (日本工業標準調査会, 1993) に準じて測定した。試験水は 0.45 μm のミリポアフィルター (Millipore Corporate, MA, USA) でろ過したものを分析サンプルとした。分析サンプルは偏光ゼーマン原子吸光分光光度計 (Z-8000, 株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京) に導入し, 空気-アセチレンバーナーによるフレイム法により試験水中の Cd 濃度を定量した。

Nap については分光光度法 (Neff and Anderson, 1975) より測定した。試験水に n-ヘキサンを加えて振とう混和により Nap を抽出し, 無水硫酸ナトリウム (残留農薬・PCB 試験用, 和光純薬工業株式会社, 大阪) によりこの抽出液を脱水処理し分析サンプルとして, 石英セルを用いて UV-VIS 分光光度計 (UV-1200, 島津製作所, 京都) により紫外域 220.2nm 及び 276nm の吸光度を測定し試験水中の Nap 濃度を定量した。

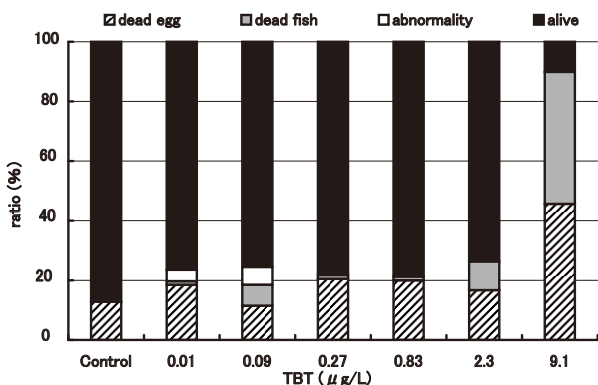


Fig. 2.2.1-1. TBTO effects on hatchability and survival mummichog in ELS test.

2.2.1.2. 結 果

TBTO: 試験期間中の対照区を含む各試験区の実測濃度 (平均値 ± 標準偏差) はそれぞれ <0.0001, 0.01 ± 0.002, 0.09 ± 0.004, 0.27 ± 0.011, 0.83 ± 0.03, 2.3 ± 0.41 及び 9.1 ± 0.17 μg TBT/L であった。TBTO を試験物質とした初期生活段階毒性試験の結果について, ふ化率, 生残率への影響を Fig.2.2.1-1 に, 体重, 全長及び肥満度を指標とした成長への影響を Fig.2.2.1-2 ~ 4 に示した。ふ化率は, 9.1 μg TBT/L 区を除きいずれの試験区においても 80% 程度であったが, 9.1 μg TBT/L 区では 50% にも達しておらず 5% の有意水準で有意な減少を示した (コ克蘭・アーミテッジの傾向検定) (Fig. 2.2.1-1)。

また, 9.1 μg TBT/L 区においては, ふ化した個体も, 全体で 40% 程度は死滅しており, 全期間を通じた生残率は 10% 程度であった。

成長については, 体重及び全長を調べた。体重 (Fig.2.2.1-2) については, 4 週目では 0.83 μg TBT/L 以上の濃度区で濃度依存的に体重が減少していた。8 週目ではより低い濃度区においても影響が認められるようになり 0.09 μg TBT/L 以上の濃度区で濃度依存的に体重が減少していた。全長 (Fig.2.2.1-3) についても体重と同様に, 4 週目では 0.83 μg TBT/L 以上の濃度区で濃度依存的に全長が減少していた。

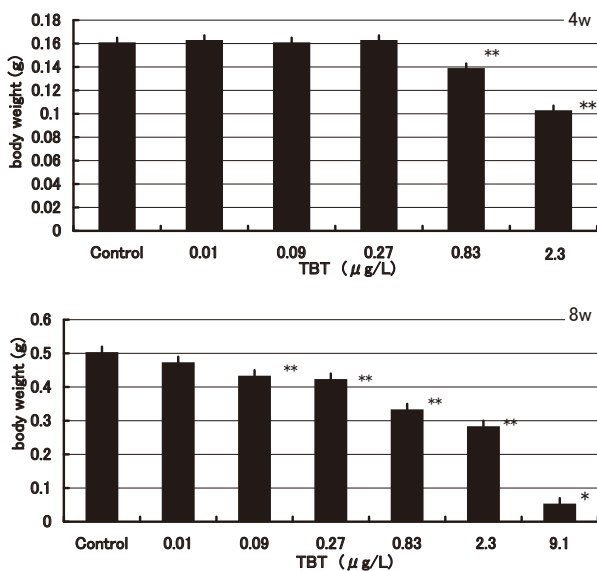


Fig. 2.2.1-2. TBTO effects on body weight of mummichog in ELS test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01) .



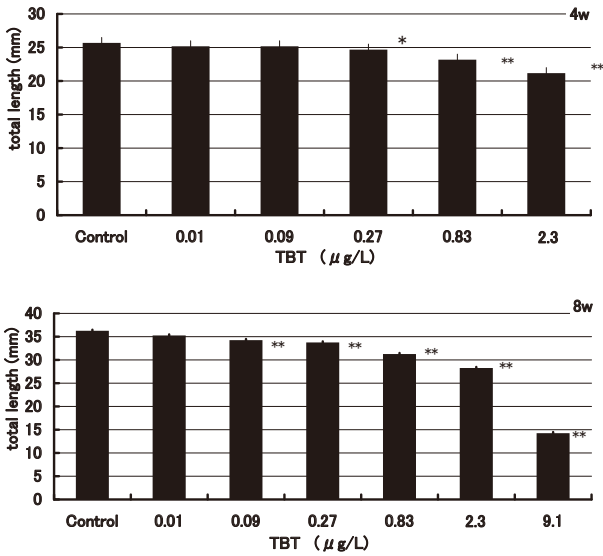


Fig. 2.2.1-3. TBTO effects on total length of mummichog in ELS test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01) .

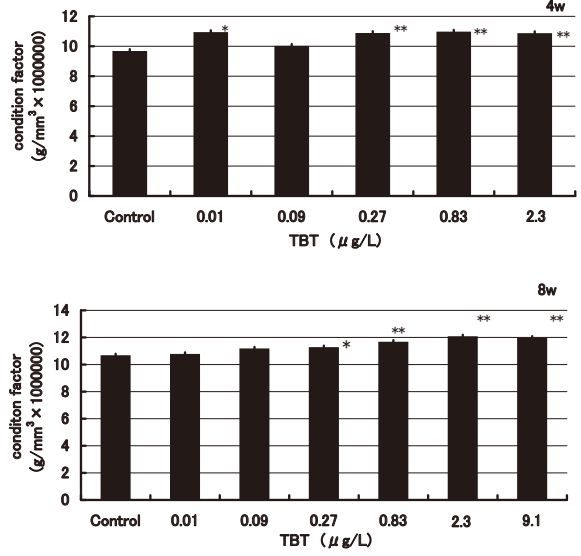


Fig. 2.2.1-4. TBTO effects on condition factor of mummichog in ELS test (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01) .

Table 2.2.1-1. NOEC and LOEC of TBTO for mummichog ELS test

| parameter        | NOEC µg/L* | LOEC µg/L* |
|------------------|------------|------------|
| hatching rate    | 2.3        | 9.1        |
| survival rate    | 2.3        | 9.1        |
| abnormality rate | -          | -          |
| total length     | 0.01       | 0.09       |
| body weight      | 0.01       | 0.09       |
| condition factor | 0.01       | 0.09       |

\*: results are expressed as TBT concentration

8週目ではより低い濃度区においても影響が認められるようになり0.09µg TBT/L以上の濃度区で濃度依存的に全長が減少していた。また、0.01µg TBT/L区では眼球異常、0.09µg TBT/L区では脊椎湾曲または短軀症をそれぞれ示す形態異常個体が認められたが、これらの他に形態異常は認められず試験濃度との関連が認められなかった (Fig.2.2.1-1)。一方、肥満度 (Fig.2.2.1-4) については、0.27µg TBT/L以上の濃度区において、濃度依存的に値が増加する傾向が認められた。これら、ふ化率、生残、成長へのTBTOの影響が認められた濃度及び影響が認められなかった濃度からLOEC及びNOECを調べた結果、Table 2.2.1-1に示すように成長 (体重または全長) への影響を指標とした場合に最も小さいNOEC : 0.01µg TBT/L及びLOEC : 0.09µg TBT/Lが得られた。

TPTC : 試験期間中の対照区を含む各試験区の実測濃度 (平均値 ± 標準偏差) はそれぞれ <0.0001, 0.16 ± 0.004, 0.7 ± 0.07, 2.2 ± 0.42 及び 3.7 ± 0.70

µg TPT/Lであった。TPTCを試験物質とした初期生活段階毒性試験の結果について、ふ化率、生残率への影響を Fig.2.2.1-5に、体重、全長及び肥満度を指標とした成長への影響を Fig.2.2.1-6 ~ 8に示した。ふ化率は、対照区では70%程度であったが、暴露区では60%程度であったが、コ克蘭・アーミテッジの傾向検定では有意水準5%で差異は認められなかった。形態異常の有無に関しては、いずれの試験区においても形態異常を発症した個体は観察されなかった。3.7µg TPT/L区では、ふ化仔魚は試験開始4週目までにすべて死亡した (Fig.2.2.1-5)。成長への影響を体重及び全長を指標として調べた。体重 (Fig.2.2.1-6) 及び全長 (Fig.2.2.1-7) について、暴露区と対照区とを比較すると、濃度依存的に体重または全長が低下する傾向が認められ、2.2 µg TPT/L区では対照区に比較して有意な低下を示した。肥満度 (Fig.2.2.1-8) については、TPTCの影響は認められなかった。これら、ふ化率、生残、成長へのTPTCの影響が認められた濃度及び影響

が認められなかった濃度から LOEC 及び NOEC を調べた結果、Table 2.2.1-2 に示すように成長（体重または全長）への影響を指標とした場合に最も小さい NOEC : 0.7 μg TPT/L 及び LOEC : 2.2 μg TPT/L が得られた。

Cd : 試験期間中の対照区を含む各試験区の実測濃度（平均値 ± 標準偏差）はそれぞれ <3, 16 ± 4, 60 ± 14, 150 ± 8, 530 ± 110 及び 2000 ± 200 μg/L であった。Cd を試験物質とした初期生活段階毒性試験の結果について、ふ化率、生残率への影響を Fig. 2.2.1-9 に、体重、全長及び肥満度を指標とした成長への影響を Fig.2.2.1-10 ~ 12 に示した。ふ化率は

ずれの試験区においても 70%以上を示していたが、2000 μg/L 区では、ふ化後、半数以上の仔魚が死亡し、生残魚のほとんどが脊椎の湾曲を伴う形態異常を発症していた (Fig.2.2.1-9)。この脊椎湾曲を伴う形態異常の発症は 530 μg/L 以上の濃度区で顕著であった。

成長への影響を体重または全長から調べた結果、2000 μg/L 区において体重 (Fig.2.2.1-10) 及び全長 (Fig.2.2.1-11) の有意な低下が認められたが、530 μg/L 以下の試験区においては、Cd の影響と思われる有意な差異は認められなかった。また、肥満度については、530 及び 2000 μg/L において濃度依存

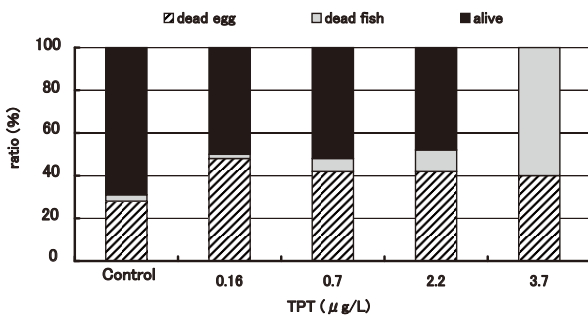


Fig. 2.2.1-5. TPTC effects on hatchability and survival of mummichog in ELS test.

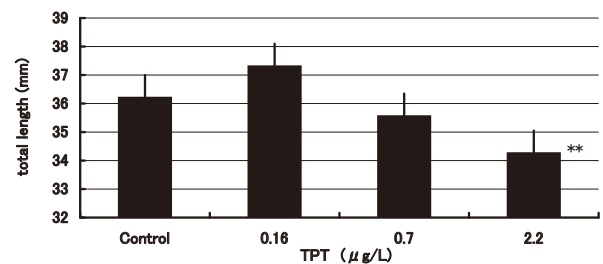


Fig. 2.2.1-7. TPTC effects on total length of mummichog in ELS test (\*\* : p<0.01) .

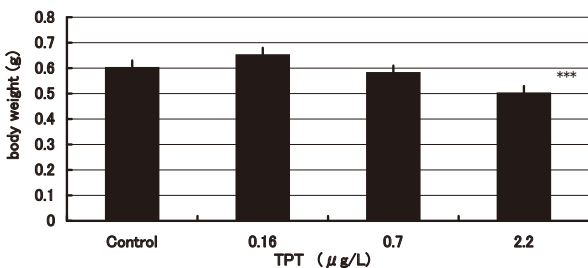


Fig. 2.2.1-6. TPTC effects on body weight of mummichog in ELS test (\*\*\*) : p<0.001) .

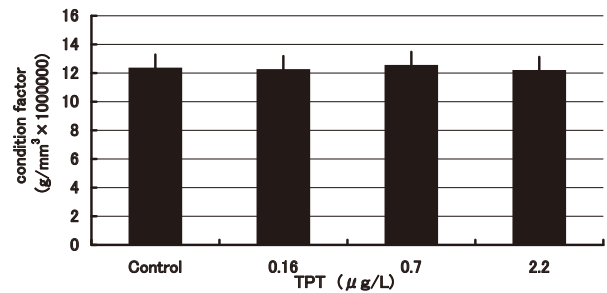


Fig. 2.2.1-8. TPTC effects on condition factor of mummichog in ELS test.

Table 2.2.1-2. NOEC and LOEC of TPTC for mummichog ELS test

| parameter        | NOEC μg/L* | LOEC μg/L* |
|------------------|------------|------------|
| hatching rate    | -          | -          |
| survival rate    | 2.2        | 3.7        |
| abnormality rate | -          | -          |
| total length     | 0.7        | 2.2        |
| body weight      | 0.7        | 2.2        |
| condition factor | -          | -          |

\*: results are expressed as TPT concentration

的增加する傾向が認められた。これら、ふ化率、生残、形態異常の発症、成長へCdの影響が認められた濃度及び影響が認められなかった濃度から LOEC 及び NOEC を調べた結果、Table 2.2.1-3 に示すように形態異常の発症を指標とした場合に最も小さい NOEC: 150 $\mu\text{g/L}$  及び LOEC: 530 $\mu\text{g/L}$  が得られた。Nap: 試験期間中の対照区を含む各試験区の実測濃度 (平均値 $\pm$ 標準偏差) はそれぞれ <5, 48  $\pm$  13, 120  $\pm$  22 及び 480  $\pm$  120 $\mu\text{g/L}$  であった。Nap を試験物質とした初期生活段階毒性試験の結果について、ふ化率、生残率への影響を Fig.2.2.1-13 に、体重、全長及び肥満度を指標とした成長への影響を Fig.

2.2.1-14 ~ 16 に示した。ふ化率については、480 $\mu\text{g/L}$  区で 60% をやや下回っており、コクラン・アーミテッジの傾向検定では 5% の有意水準で有意な影響が認められたが、その他の試験区では対照区とほぼ同じ 70% 程度のふ化率を示しており、5% の有意水準で有意な差異は認められなかった (Fig.2.2.1-13)。生残率については、480 $\mu\text{g/L}$  区で 49% でありコクラン・アーミテッジの傾向検定では 5% の有意水準で有意な影響が認められたが、その他の試験区では対照区とほぼ同じ 70% 程度の生残率を示し、5% の有意水準で有意な差異は認められなかった (Fig.2.2.1-13)。すべての試験区において、形態異常

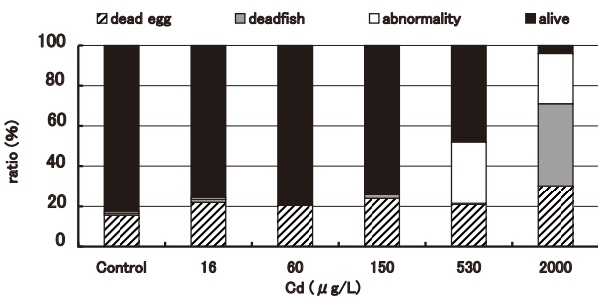


Fig. 2.2.1-9. Cadmium effects on hatchability and survival of mummichog in ELS test.

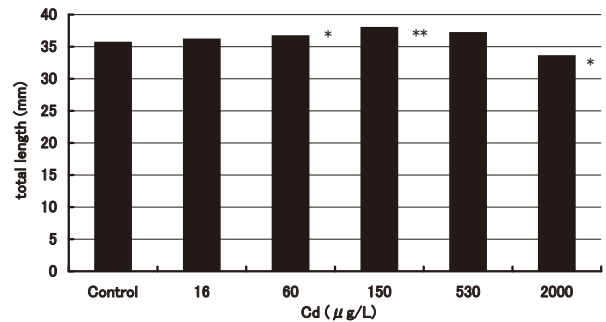


Fig. 2.2.1-11. Cadmium effects on total length of mummichog in ELS test (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

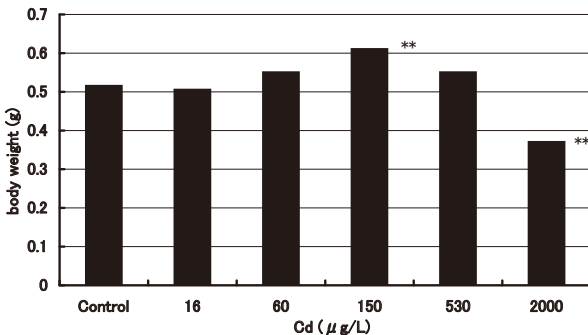


Fig. 2.2.1-10. Cadmium effects on body weight of mummichog in ELS test (\*\* :  $p < 0.01$ ).

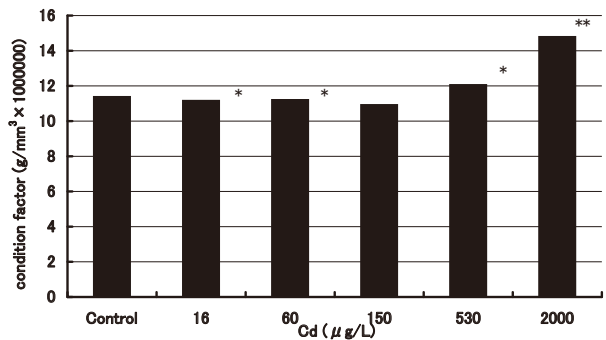


Fig. 2.2.1-12. Cadmium effects on condition factor of mummichog in ELS test (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

Table 2.2.1-3. NOEC and LOEC of cadmium for mummichog ELS test

| parameter        | NOEC $\mu\text{g/L}$ | LOEC $\mu\text{g/L}$ |
|------------------|----------------------|----------------------|
| hatching rate    | 530                  | 2000                 |
| survival rate    | 530                  | 2000                 |
| abnormality rate | 150                  | 530                  |
| total length     | 530                  | 2000                 |
| body weight      | 530                  | 2000                 |
| condition factor | 530                  | 2000                 |



を発生した個体は観察されなかった (Fig.2.2.1-13)。成長への影響について、体重及び全長を調べることにより検討した結果、120 及び 480 $\mu\text{g/L}$  区で濃度依存的に体重 (Fig.2.2.1-14) または全長 (Fig.2.2.1-15) の有意な減少が認められた。また、肥満度については 480 $\mu\text{g/L}$  区でのみ有意な減少が認められた (Fig. 2.2.1-16)。これら、ふ化率、生残、成長への Nap の影響が認められた濃度及び影響が認められなかった濃度から LOEC 及び NOEC を調べた結果、Table 2.2.1-4 に示すように成長 (体重または全長) への影響を指標とした場合に最も小さい NOEC : 48 $\mu\text{g/L}$  及び LOEC : 120 $\mu\text{g/L}$  が得られた。

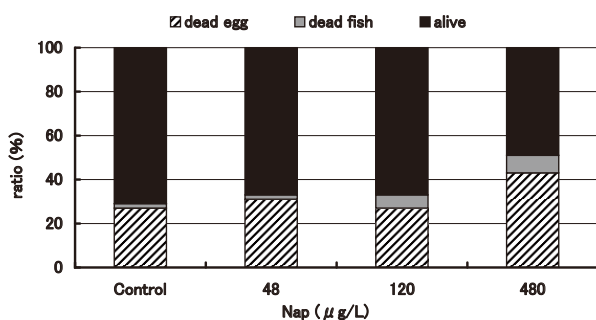


Fig. 2.2.1-13. Naphthalene effects on hatchability and survival of mummichog in ELS test.

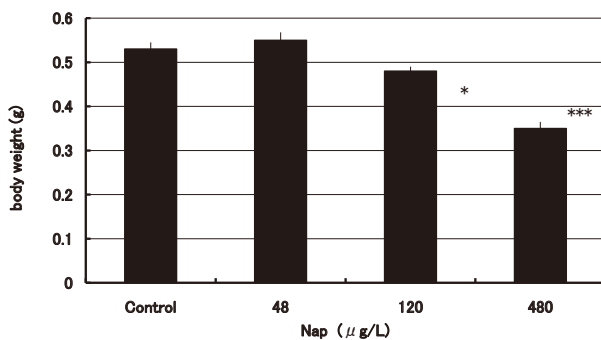


Fig. 2.2.1-14. Naphthalene effects on body weight of mummichog in ELS test (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

### 2.2.1.3. 考 察

慢性毒性試験として実施される初期生活段階毒性試験、全生活環毒性試験について、これまでに少ないながらも慢性毒性値が報告されている。TBTO を試験物質とした例では、海水魚である sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*) の全生活環毒性試験 (Manning et al., 1999) における成長を指標とした NOEC : 1.3 $\mu\text{g/L}$  及び LOEC : 3.2 $\mu\text{g/L}$ 。Cd を試験物質とした例では、淡水魚の flagfish (*Jordanella floridae*) を用いて胚から成熟産卵に至るまでを暴露した試験 (Spehar, 1976) における産卵を指標とした NOEC : 4.1 $\mu\text{g/L}$  及び

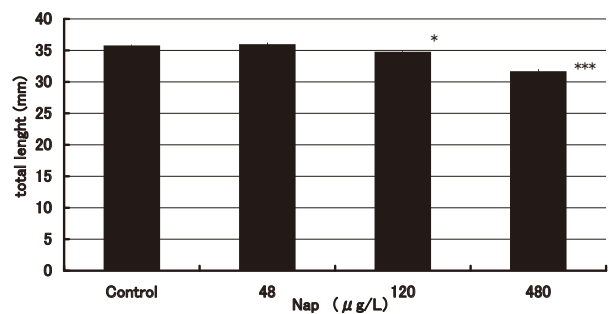


Fig. 2.2.1-15. Naphthalene effects on total length of mummichog in ELS test (\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

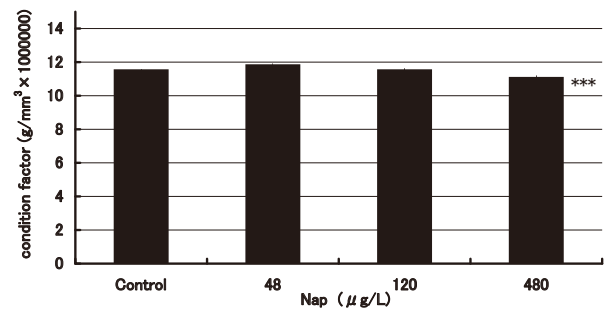


Fig. 2.2.1-16. Naphthalene effects on condition factor of mummichog in ELS test (\*\*\*) :  $p < 0.001$

Table 2.2.1-4. NOEC and LOEC of naphthalene for mummichog ELS test

| parameter        | NOEC $\mu\text{g/L}$ | LOEC $\mu\text{g/L}$ |
|------------------|----------------------|----------------------|
| hatching rate    | 120                  | 480                  |
| survival rate    | 120                  | 480                  |
| abnormality rate | -                    | -                    |
| total length     | 48                   | 120                  |
| body weight      | 48                   | 120                  |
| condition factor | 120                  | 480                  |

LOEC : 8.1 $\mu$ g/L, 成長を指標とした NOEC : 16  $\mu$ g/L 及び LOEC : 31 $\mu$ g/L, 淡水魚であるカワマス (*Salvelinus fontinalis*) を用いて3世代に渡って Cd に暴露を行った試験 (Benoit et al., 1976) における成長を指標とした NOEC : 1.7 $\mu$ g/L 及び LOEC : 3.4 $\mu$ g/L がある。これら既報の全生活環毒性試験では、いずれも 100 日程度の試験期間で成長が重要な評価項目として評価に用いられている。これらの報告以外にも、各種化学物質に対する感受性が高いふ化仔魚及び稚魚を試験魚に用いた毒性試験が報告されている。TPTC を試験物質としてニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) のふ化仔魚を試験魚とした 110 日間の試験 (Vries et al., 1991) では、成長を指標とした場合の NOEC :  $\geq 1.2\mu$ g/L が報告されている。Cd を試験物質として淡水魚 bluegill (*Lepomis macrochirus*) の稚魚を用いた 22 日間の試験 (Bryan et al., 1995) では、成長を指標とした LOEC : 37.3 $\mu$ g/L が報告されている。さらに、Nap を試験物質した場合には、淡水魚 coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) を用いた 40 日間の試験 (Moles et al., 1981) で成長を指標とした NOEC : 370 $\mu$ g/L 及び LOEC : 670 $\mu$ g/L, 海水飼育の pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) の稚魚を用いた 30 日間の試験 (Moles et al., 1981) で成長を指標とした NOEC : 120 $\mu$ g/L 及び LOEC : 380 $\mu$ g/L がそれぞれ報告されており、これらの毒性値はいずれも成長を指標としている。

ここに挙げた試験でも明らかなように、これらの慢性毒性試験において成長は重要な指標として利用されており、McKim (1995) も成長及び生残が慢性毒性試験の重要な評価項目であるとしている。本試験結果においても、Cd を除く TBTO, TPTC 及び Nap について得られた最も低い NOEC 及び LOEC はいずれも成長を指標とした場合の値であった。初期生活段階毒性試験、全生活環毒性試験等ではいずれも小さい個体について検査を行う必要があることから、体重や全長の測定は簡便な点からも評価項目として重要性が高いといえる。本試験結果の Cd の NOEC 及び LOEC が成長を指標とした NOEC 及び LOEC よりも低い値となったことの原因のひとつには、Cd の毒性発現のメカニズムが異なるため、形態異常は胚への毒性影響による遺伝子傷害あるいは他の作用のためであり、成長阻害は胚よりはむしろふ化後の仔稚魚への影響の結果と考えられる。Cd 暴露で形態異常発症を指標とした場合、成長よりも低い影響濃度が得られたが、ふ化率、生残率を指標とした場合と比較した場合、成長

によるそれと同じ値であったことから、他の試験物質と同様に成長を指標とした NOEC 及び LOEC の重要性は失われていないと考えられる。なお、Middaugh et al. (1988) は, inland silverside (*Menedia beryllina*) の胚を 1 週間 Nap に暴露することで形態異常が発症することを認めており、本試験のように初期胚から暴露を開始してふ化するまでに 14 日程度を要する暴露試験では、胚での暴露期間がより長期となるためより低濃度でも形態異常が発症しやすくなることも推察された。

本試験においてマミチヨグを試験魚として得られた慢性毒性値である NOEC 及び LOEC はいずれも低い値を示しており、感度よく試験物質の慢性影響を評価できたと考えられた。現時点では、慢性毒性に関する研究例はあまり多くはないため、海水魚との比較等は検討しにくい状況であるが、今後は、慢性影響試験の重要度が増すにつれ、慢性毒性値も蓄積され、それらに基づいた環境影響評価が広まるものと考えられた。また、本試験では、日本産の海産魚で実施不可能である初期生活段階毒性試験を米国産の海水魚マミチヨグを用いて選定した試験物質の影響を主に成長を評価項目として試験を実施した。この海産の試験魚であるマミチヨグは、これらの毒性試験の他にも実験魚として多方面で利用されており、約 10 年前に社会問題となっていた環境ホルモンの影響評価を行うための試験魚としても利用されており (Kelly and Giulio, 2000; 角埜ら, 2001), 今後も各種化学物質の影響評価を実施する際の試験魚として有益な魚種であると考えられた。

慢性毒性試験において、成長は重要な測定項目であり、さらに既報の仔稚魚を用いた毒性試験においても成長を評価項目として毒性値が求められていることから、次項以降では、マダイの稚魚を用いた長期暴露試験についてもこの成長を重要な評価項目に位置づけて 4 種類の試験物質の慢性毒性値を求めこととした。また、成長以外にも生理学的な評価項目、たとえば血液学的手法についても報告例があることから、採血可能なより大型のマダイを用いた試験を実施して血液学的評価項目から毒性値を求め、成長等の影響評価項目から求めた影響濃度との比較を行い、評価項目としての感受性を検討する。

## 2.2.2. 慢性毒性試験

### — マダイを用いた長期毒性試験 —

慢性毒性試験には、受精卵から仔稚魚期までの期間を試験物質に暴露する初期生活段階毒性試験、受精卵から成熟産卵するまでの期間について暴

露を行う全生活環毒性試験等がある。これら試験には数種類の海水魚が試験魚として用いられており、sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) (Manning et al., 1999), pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Moles et al., 1981) について TBTO 及び Nap の慢性毒性値がそれぞれ報告されている。また、各種化学物質に対する感受性が高い仔稚魚期からの慢性毒性試験についても淡水魚を用いて実施されており、rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Vries et al., 1991), bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Bryan et al., 1995), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Moles et al., 1981) について、成長への影響を調べることによってそれぞれ TPTC, Cd 及び Nap の慢性毒性値が報告されている。ここでエンドポイントとなっている成長、生残等は生活段階の初期における非常に重要な評価項目 (McKim, 1995) とされている。日本の海水魚では初期生活段階を試験することは困難ではあるが、安定して飼育できる稚魚期からの長期毒性試験を実施し成長等を指標に毒性値を求めることは十分可能である。そこで、受精卵からの試験が実施できない海産の試験魚について、稚魚期からの長期暴露毒性試験の初期生活環毒性試験等の慢性毒性試験の代替法としての有効性を検討するため、急性毒性試験において試験物質と選定した TBTO, TPTC, Cd 及び Nap について感受性が高かったマダイの稚魚を試験魚として、これら 4 種類の試験物質の長期毒性試験を実施して成長等を評価項目として無影響濃度 (NOEC) 及び最低影響濃度 (LOEC) を明らかにし、マミチヨグの慢性毒性値及び既報の毒性値との比較検討を行った。

### 2.2.2.1. 実験材料及び方法

マダイ稚魚は、和歌山県にある (株) アーマリン近大から購入した。購入の後、約 1 ヶ月間順化を行い、長期暴露毒性試験に供した。慢性毒性試験は 1 試験区につき 60L 容量のガラス水槽に設けた流水試験装置により実施した (角埜・小山, 2004)。試験に先立ち実施した急性毒性試験の値及び既報値 (角埜・木村, 1987) を参考に 50 尾の供試魚 (平均体重 0.59g) を、TBTO の試験では 0 (control), 1.2, 8.4, 及び 50 ng TBT/L に、TPTC の試験では 0 (control), 0.084, 0.5 及び 3.0 µg TPT/L に、Cd の試験では 0 (control), 27, 50, 84 µg/L に、Nap の試験では 0 (control), 2, 10 及び 50 µg/L にそれぞれ濃度を設定した試験区に 8 週間暴露した。TBTO 及び TPTC の試験原液はアセトン (残留農薬試験用 300, 和光純薬工

業株式会社, 大阪) に TBTO (純度 96%, Sigma-Aldrich Corporation, USA, MO), TPTC (純度 >98%, 東京化成工業株式会社, 東京) それぞれを溶解して調製した。Cd の試験原液は CdCl<sub>2</sub> · 2.5H<sub>2</sub>O (純度 >98%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を蒸留水に溶解して作製した。Nap の試験原液は、Nap (純度 >99%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) をアセトン (残留農薬試験用 300, 和光純薬工業株式会社, 大阪) に溶解した後、Nap-アセトン溶液の 1.6 倍容の医薬用硬化ひまし油 (HCO-40, 日光ケミカルズ株式会社, 東京) と混溶して作製した。活性炭ろ過海水を各濃度区に 400mL/min で注入するとともに試験原液を水道水に添加分散させた試験液 (20L ガラス水槽に貯留) をガラス微量定量ポンプ (Glass Pump GMW-A, 東京理東京理器械株式会社, 東京) にて 1.8mL/min で注入し、一定の濃度を保った。試験期間中、海水魚用初期試料 (協和発酵バイオ株式会社, 東京) を 1 日に 1 回飽食するまであたえた。試験期間中は試験開始 4 週目に供試魚を取り上げ、300mg/L MS222 (meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) 海水溶液による麻酔の後、個体ごとに体長及び体重を測定した。試験終了時には生残魚すべてを取り上げ、麻酔の後、体長及び体重を個体ごとに測定した。さらに次式により肥満度を求めた。

肥満度 (condition factor) =

$$\text{体重 (g)} \div \text{体長 (mm)}^3 \times 1000000$$

これらを比較することにより成長への影響を調べ、無影響濃度 (NOEC) 及び最低影響濃度 (LOEC) をダネットの多重比較により求めた。

試験における水中の各試験物質濃度は試験開始時及び試験終了時に測定した。TBTO 及び TPTC については、Harino and Fukushima (1992) に準じて MS 検出器 (Hewlett Packard 5972 series, Palo Alto, CA, USA) 付のガスクロマトグラフ分析装置 (Hewlett Packard 5890 series II, Palo Alto, CA, USA) により測定した。Cd については JIS 工場排水試験法 (日本工業標準調査会, 1993) により、原子分光光度計 (Hitachi Z80000 Polarized Zeeman, Atomic Absorption Spectrophotometer, Tokyo, Japan) により測定した。Nap については立石の手法 (立石, 2000) により GC-MS 法で測定した。なお、試験期間中、溶存酸素計 (Dissolved oxygen meter,

YSI model 58, YSI Incorporated, OH, USA) により水温及び溶存酸素濃度を, pH 計 (Horiba D-21, 株式会社堀場製作所, 京都) により pH を, ハンディ S-C-T メーター (YSI model 30, YSI Incorporated, OH, USA) または, により塩分をそれぞれ測定し, 水温は  $20.0 \pm 0.09^\circ\text{C}$ , 溶存酸素濃度は  $7.2 \pm 0.1 \text{ mg/L}$ , 酸素飽和度は  $97 \pm 2 \%$ , pH は  $7.8 \pm 0.0$ , 塩分濃度は  $31.0 \pm 0.4$  であった。

2.2.2.2. 結 果

TBTO: 試験期間中の試験水の TBTO の実測濃度 (平均値  $\pm$  標準偏差) は設定値の 0 (対照区), 1.2, 8.4 及び 50ngTBT/L に対しそれぞれ  $<0.1$ ,  $0.97 \pm 0.041$ ,  $3.6 \pm 0.66$  及び  $29 \pm 5.5 \text{ ng TBT /L}$  であった。試験開始 4 週目及び 8 週目の各濃度区におけるマダイ稚魚の体長, 体重及び肥満度への影響について, Fig. 2.2.2-1 に体重を, Fig. 2.2.2-2 に体長を, Fig. 2.2.2-3 に肥満度をそれぞれ示した。体重については, 4 週目では明確な影響は認められなかったが, 暴露開始 4 週目から 8 週目にかけて TBTO 暴露区では 29 ng TBT/L 区において試験魚がすべて死亡した。また, 8 週目の 3.6 ng TBT/L では有意水準 1% で有意な体重の減少が認められた。体長についても, 体重と同様に 4 週目までは影響は認められなかった

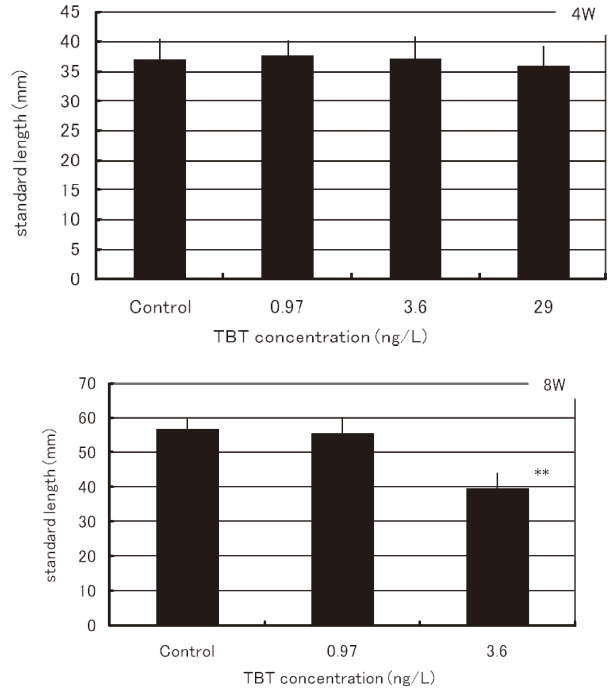


Fig. 2.2.2-2. Standard length of juvenile red sea bream exposed to TBTO for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\* : P < 0.01.

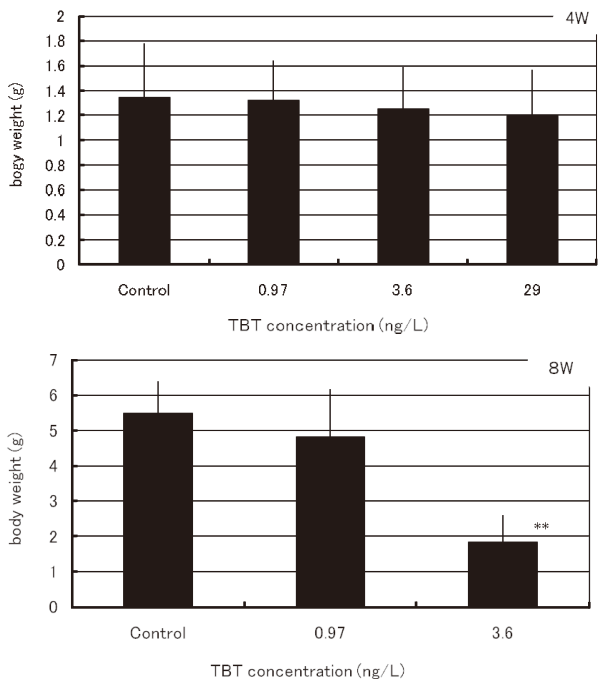


Fig. 2.2.2-1. Body weight of juvenile red sea bream exposed to TBTO for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\*P < 0.01.

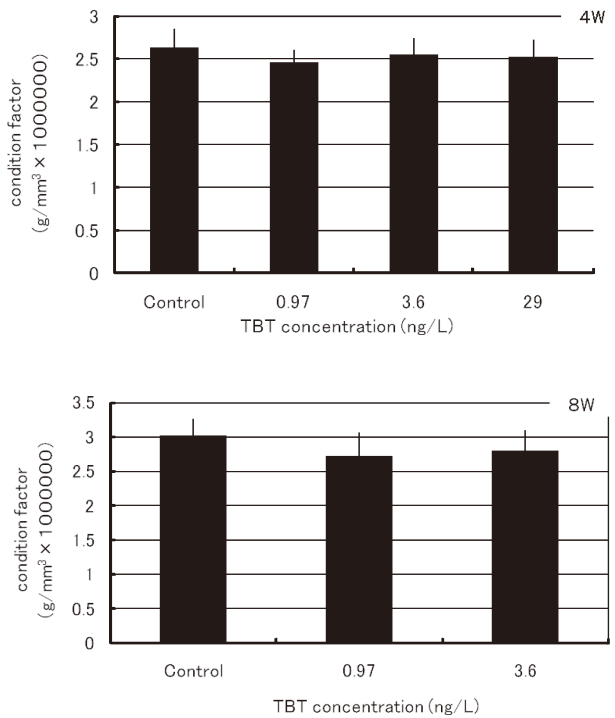


Fig. 2.2.2-3. Condition factor of juvenile red sea bream exposed to TBTO for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations.



が、8週目の3.6 ng TBT/Lでは有意 ( $p < 0.01$ ) な減少が認められた。一方、肥満度については、4週目及び8週目いずれにおいても有意な影響は認められなかった。以上の結果から、成長(体重または体長)を指標とした場合、長期暴露試験毒性値はNOEC: 0.97 ng TBT/L 及び LOEC: 3.6 ng TBT/L であり、生残を指標とした場合に長期暴露試験毒性値はNOEC: 3.6 ng TBT/L 及び LOEC: 29 ng TBT/L であった。

TPTC: 試験期間中の試験水のTPTCの実測濃度(平均値±標準偏差)は設定値の0(対照区), 0.084, 0.50及び3.0 $\mu\text{g}$ TPT/Lに対しそれぞれ $<0.0001$ ,  $0.057 \pm 0.028$ ,  $0.34 \pm 0.019$ 及び $1.9 \pm 0.36 \mu\text{g}$  TPT/Lであった。試験開始4週目及び8週目の各濃度区におけるマダイ稚魚の体長、体重及び肥満度への影響について、Fig. 2.2.2-4に体重を、Fig. 2.2.2-5に体長を、Fig. 2.2.2-6に肥満度をそれぞれ示した。TPTC暴露では体重、体長及び肥満度に対する影響が4週目及び8週目いずれにおいても明確ではなかった。しかし、1.9  $\mu\text{g}$  TPT/L区において4週目までにすべての供試魚が死亡した。これらの結果から、生残を指標とした場合に長期暴露試験毒性値はNOEC: 0.34  $\mu\text{g}$  TPT/L 及び LOEC: 1.9  $\mu\text{g}$  TPT/L であった。

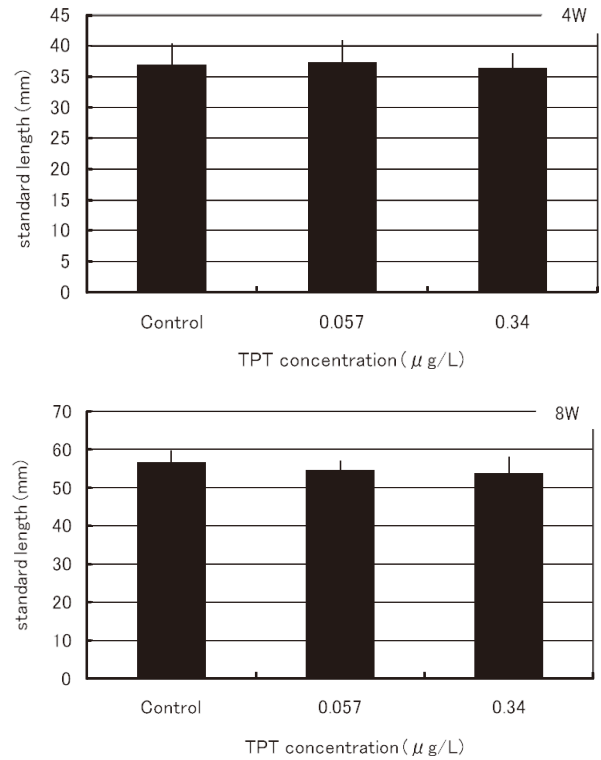


Fig. 2.2.2-5. Standard length of juvenile red sea bream exposed to TPTC for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations.

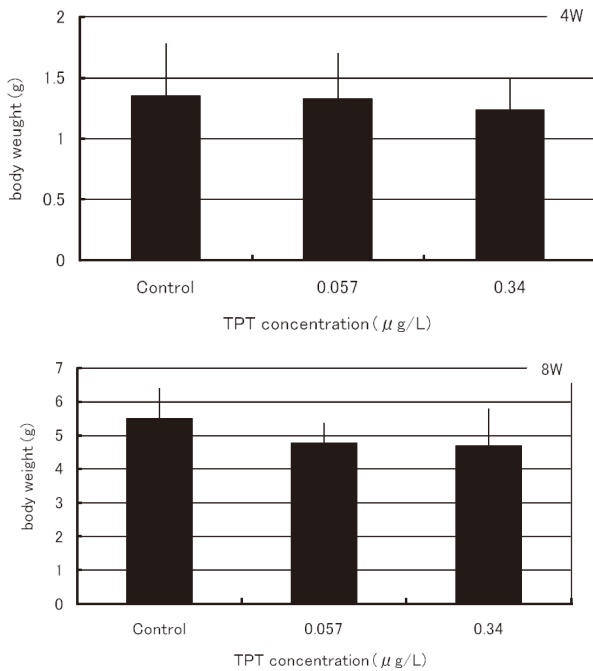


Fig. 2.2.2-4 Body weight of juvenile red sea bream exposed to TPTC for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations.

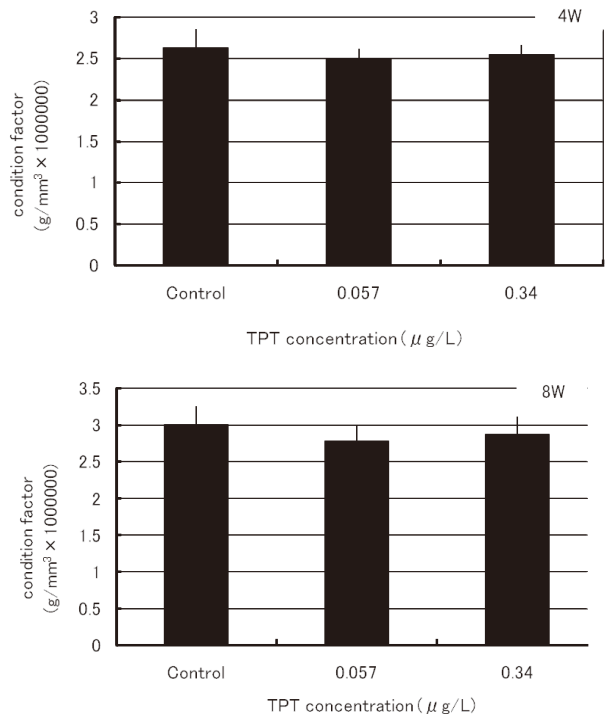


Fig. 2.2.2-6. Condition factor of juvenile red sea bream exposed to TPTC for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations.

Cd：試験期間中の試験水のCdの実測濃度（平均値±標準偏差）は設定値の0（対照区）、27、50及び84 $\mu\text{g/L}$ に対しそれぞれ $<3$ 、 $27 \pm 6$ 、 $50 \pm 12$ 及び $84 \pm 8\mu\text{g/L}$ であった。試験開始4週目及び8週目の各濃度区におけるマダイ稚魚の体長、体重及び肥満度への影響について、Fig. 2.2.2-7に体重を、Fig. 2.2.2-8に体長を、Fig. 2.2.2-9に肥満度をそれぞれ示した。体重については、4週目の時点ではCdの影響は明確ではなかったが、8週目の時点では50 $\mu\text{g/L}$ 区及び84 $\mu\text{g/L}$ 区で有意（ $p<0.01$ ）な濃度依存的な減少が認められた。体長についても体重同様に4週目ではCdの影響は明らかではなかったが、8週目において有意（ $p<0.01$ ）な減少が認められ、その減少は濃度依存적であった。

一方、肥満度については、4週目の時点でCdの影響は明確ではなかったが、8週目において27 $\mu\text{g/L}$ 区及び84 $\mu\text{g/L}$ 区で有意な減少がみとめられた(Fig. 2.2.2-9)。このことは、統計処理では有意とならなかった体重の減少を反映した結果であると考えられる。つまり、Fig.2.2.2-7において統計的には有意と判断できなかったが8週目の27 $\mu\text{g/L}$ 区の体重は対照区と比較すると減少傾向にあり、また、Fig.2.2.2-8において8週目の27 $\mu\text{g/L}$ 区では対照区

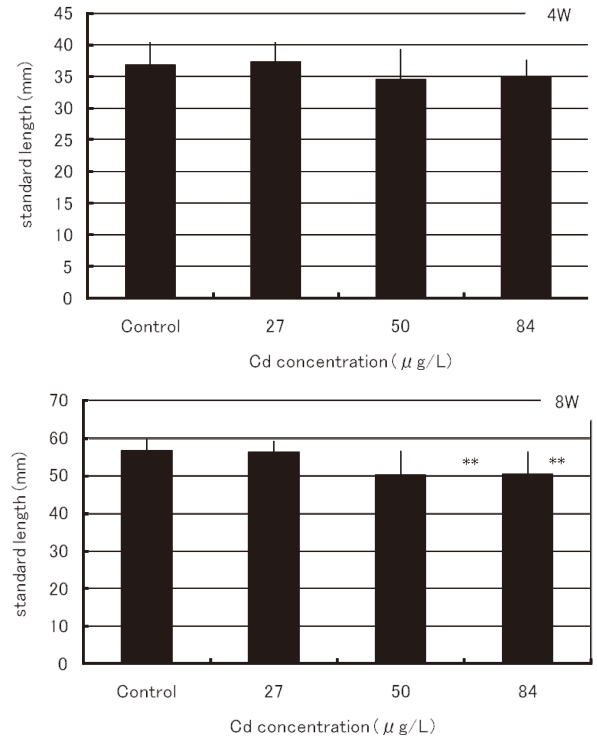


Fig. 2.2.2-8. Standard length of juvenile red sea bream exposed to Cd for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\*:  $P < 0.01$ .

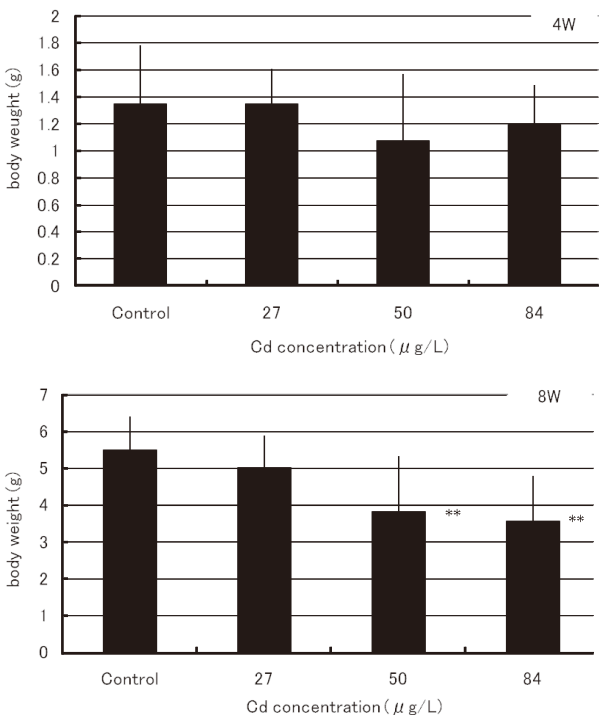


Fig. 2.2.2-7. Body weight of juvenile red sea bream exposed to Cd for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\*:  $P < 0.01$ .

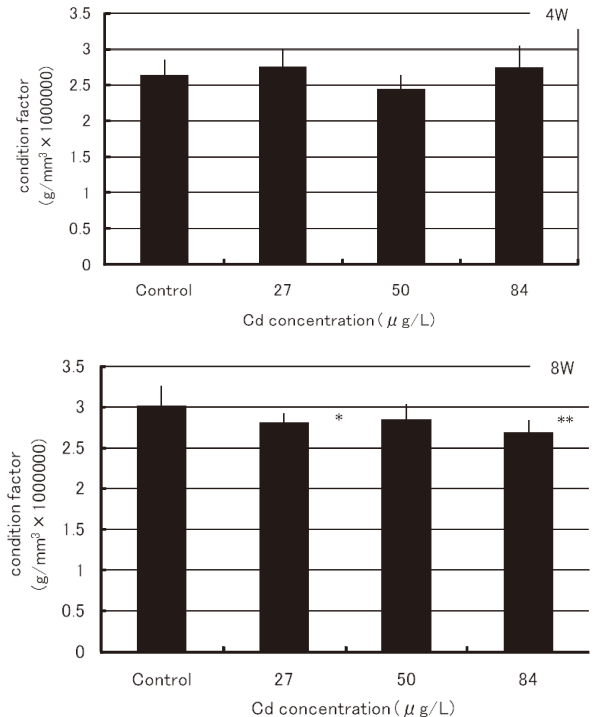


Fig. 2.2.2-9. Condition factor of juvenile red sea bream exposed to Cd for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

との差異はほとんど認められないため、計算処理により  $27\mu\text{g/L}$  区の 8 週目の肥満度が減少した値を示したことを反映したものと考えられる。本研究におけるこれまで成長を指標とした影響評価では、全て統計処理に基づき判断しているため、成長に対する Cd の影響は  $50\mu\text{g/L}$  以上の濃度で認められたと判断した。以上の結果から、成長を指標とした場合に長期暴露試験毒性値は NOEC :  $27\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $50\mu\text{g/L}$  であった。

**Nap** : 試験期間中の試験水の Nap の実測濃度 (平均値  $\pm$  標準偏差) は設定値の 0 (対照区), 2, 10 及び  $50\mu\text{g/L}$  に対しそれぞれ  $<0.01$ ,  $1.1 \pm 0.3$ ,  $7.4 \pm 1.4$  及び  $31 \pm 8.2\mu\text{g/L}$  であった。試験開始 4 週目及び 8 週目の各濃度区におけるマダイ稚魚の体長, 体重及び肥満度への影響について, Fig. 2.2.2-10 に体重を, Fig. 2.2.2-11 に体長を, Fig. 2.2.2-12 に肥満度をそれぞれ示した。体重への影響は 4 週目では明確ではなかったが, 8 週目では対照区に比較して濃度依存的に減少しており,  $31\mu\text{g/L}$  区では 1% の有意水準で有意であった。

体長については, 4 週目においては Nap の影響は明確ではなかったが, 8 週目において 5% の有意

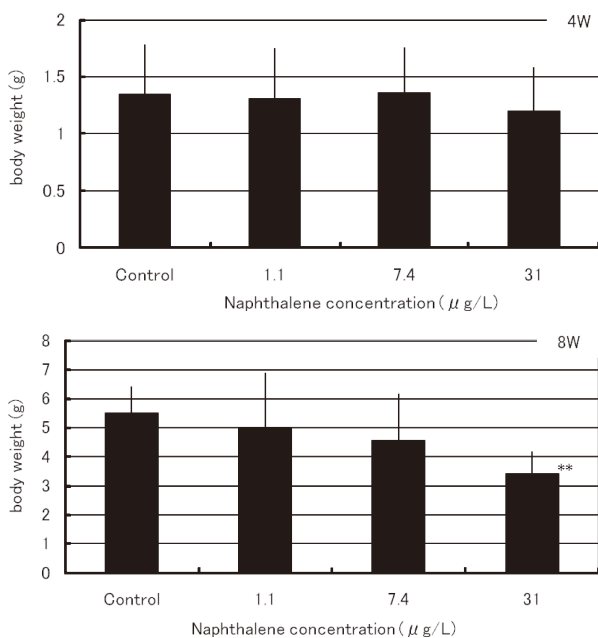


Fig. 2.2.2-10. Body weight of juvenile red sea bream exposed to naphthalene for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\* :  $P < 0.01$ .

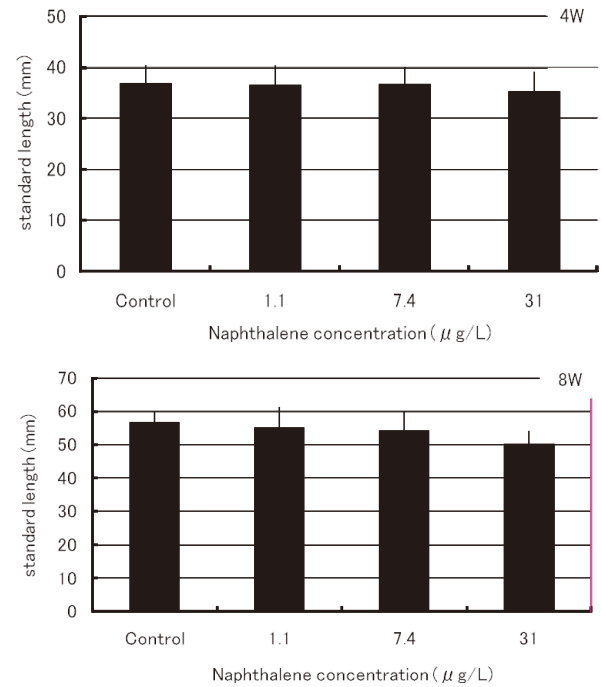


Fig. 2.2.2-11. Standard length of juvenile red sea bream exposed to naphthalene for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations.

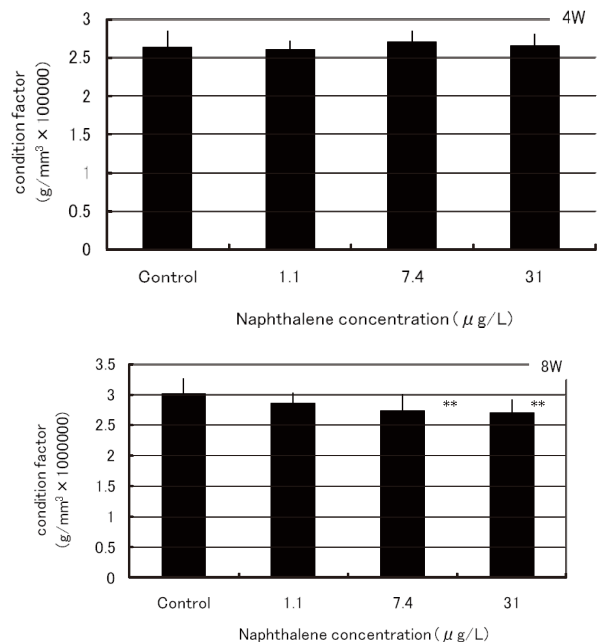


Fig. 2.2.2-12. Condition factor of juvenile red sea bream exposed to naphthalene for 4 and 8 weeks. Error bars on figure expressed as standard deviations, \*\* :  $P < 0.01$ .

水準において統計的な有意差は認められないものの高濃度の31 $\mu\text{g/L}$ 区で体長が減少する傾向が認められた。肥満度については、4週目では顕著な差異は認められなかったが、8週目では7.4 $\mu\text{g/L}$ 区及び31 $\mu\text{g/L}$ 区において有意な減少が認められた。以上の結果から、成長を指標とした場合に長期暴露試験毒性値はNOEC:7.4 $\mu\text{g/L}$ 及びLOEC:31 TPT  $\mu\text{g/L}$ であった。なお、肥満度については、7.4 $\mu\text{g/L}$ 区8週目の体重の減少傾向を反映したために、8週目の7.4 $\mu\text{g/L}$ 区で計算上有意な際として現れた可能性もあるため、体重への影響を判断基準としてNOEC及びLOECを求めた。

2.2.2.3. 考 察

マダイの稚魚を用いて、4種類の長期暴露毒性試験の結果、Table 2.2.2.1に示す慢性毒性値を得ることができた。マダイにおいて、長期暴露毒性試験はTBTO, Cd及びNapともに成長を指標とした場合に最も小さく、TPTCについては生残により長期暴露試験毒性値を得ることができた。一方、マミチヨグの初期生活段階毒性試験により得られた4種の試験物質に対するNOEC及びLOECについて評価項目毎にまとめたTable 2.2.2-2においては、Cdを除き、TBTO, TPTC及びNapともに成長を指標とした場合の慢性毒性値が、ふ化率、生残及び奇形率に比較して最も小さい値を示した。一方Cdの慢性毒性は奇形率により最も感度よく影響を評価することができた。

しかし、奇形率は、他のTBTO, TPTC及びNapについては必ずしも明確に影響を評価することはできなかったことから、Cdのような胚に特異的な影響与える化学物質について鋭敏に影響を評価できる項目であると推察された。また、これまでの試験結果から、4種類の試験物質に対するマダイとマミチヨグの長期暴露試験（あるいは慢性）毒性値を比較すると、TBTO, Nap及びCdについては、マダイはマミチヨグに比較して10分の1程度毒性値が小さく、TPTCの毒性についてマダイはマミチヨグに比較して2分の1倍程度小さい値を示した。このマダイとマミチヨグの毒性値の差異については、両魚種について急性毒性値を調べた前出の2.1. 急性毒性試験における結果で認められた傾向と類似していた。つまり、急性毒性試験の結果でも、TBTO, Cd及びNapにおける急性毒性値はマダイのほうがマミチヨグに比較して10分の1程度小さく、TPTCについては、マダイ、マミチヨグともに近似した毒性値を示していた。この結果は、物質ごとに、慢性毒性値と急性毒性値の比率がほぼ一定であることを示すものであり、Rand et al. (1995)が述べている物質毎に急性毒性値と慢性毒性値との比がほぼ一定であるということが、改めて日本産の海水魚においても確認できた。

TBTOの既報値では、海水魚sheepshead minnow (*Cyprinodon variegates*)の成長を指標としたNOEC:3.2 $\mu\text{g/L}$ 及びLOEC:1.3 $\mu\text{g/L}$ (Manning et al., 1999)、TPTCではニジマス (*Oncorhynchus*

Table 2.2.2-1. Chronic toxicity values of four chemicals to juvenile red sea bream

| Chemicals | Parameter   | NOEC $\mu\text{g/L}$ | LOEC $\mu\text{g/L}$ |
|-----------|-------------|----------------------|----------------------|
| TBTO      | body weight | 0.00097*             | 0.0036*              |
|           | body length | 0.00097*             | 0.0036*              |
|           | survival    | 0.0036*              | 0.029*               |
| TPTC      | body weight | >0.34**              | -                    |
|           | body length | >0.34**              | -                    |
|           | survival    | 0.34**               | 1.9**                |
| Cd        | body weight | 27                   | 50                   |
|           | body length | 27                   | 50                   |
|           | survival    | $\geq 84$            | >84                  |
| Nap       | body weight | 7.4                  | 31                   |
|           | body length | 7.4                  | 31                   |
|           | survival    | $\geq 31$            | >31                  |

\*: expressed as  $\mu\text{g TBT /L}$

\*\* : expressed as  $\mu\text{g TPT /L}$

Table 2.2.2-2. Chronic toxicity values of four chemicals that estimated with early life toxicity test

| Chemicals | Parameter        | NOEC $\mu\text{g/L}$ | LOEC $\mu\text{g/L}$ |
|-----------|------------------|----------------------|----------------------|
| TBTO      | hatching rate    | 2.3*                 | 9.1*                 |
|           | survival rate    | 2.3*                 | 9.1*                 |
|           | abnormality rate | -                    | -                    |
|           | total length     | 0.01*                | 0.09*                |
|           | body weight      | 0.01*                | 0.09*                |
|           | condition factor | 0.01*                | 0.09*                |
| TPTC      | hatching rate    | -                    | -                    |
|           | survival rate    | 2.2**                | 3.7**                |
|           | abnormality rate | -                    | -                    |
|           | total length     | 0.7**                | 2.2**                |
|           | body weight      | 0.7**                | 2.2**                |
|           | condition factor | -                    | -                    |
| Cd        | hatching rate    | 530                  | 2000                 |
|           | survival rate    | 530                  | 2000                 |
|           | abnormality rate | 150                  | 530                  |
|           | total length     | 530                  | 2000                 |
|           | body weight      | 530                  | 2000                 |
|           | condition factor | 530                  | 2000                 |
| Nap       | hatching rate    | 120                  | 480                  |
|           | survival rate    | 48                   | 120                  |
|           | abnormality rate | -                    | -                    |
|           | total length     | 48                   | 120                  |
|           | body weight      | 48                   | 120                  |
|           | condition factor | 120                  | 48                   |

\*: expressed as  $\mu\text{g TBT /L}$

\*\* : expressed as  $\mu\text{g TPT /L}$



*mykiss*) のふ化仔魚の成長を指標とした場合の NOEC :  $\geq 1.2\mu\text{g/L}$  (Vries et al., 1991), Cd では、淡水魚の flagfish (*Jordanella floridae*) の産卵を指標とした NOEC :  $4.1\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $8.1\mu\text{g/L}$  (Spehar, 1976), 成長を指標とした NOEC :  $16\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $31\mu\text{g/L}$  (Spehar, 1976), 淡水魚であるカワマス (*Salvelinus fontinalis*) の成長を指標とした NOEC :  $1.7\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $3.4\mu\text{g/L}$  (Benoit et al., 1976), 淡水魚 bluegill (*Lepomis macrochirus*) の稚魚の成長を指標とした LOEC :  $37.3\mu\text{g/L}$  (Bryan et al., 1995), Nap では、淡水魚 coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) の成長を指標とした NOEC :  $370\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $670\mu\text{g/L}$  (Moles et al., 1981), 海水飼育の pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) の稚魚の成長を指標とした NOEC :  $120\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $380\mu\text{g/L}$  (Moles et al., 1981) がそれぞれ報告されている。本試験結果のマダイ稚魚を用いた長期暴露毒性試験により得られた毒性値について既報値との比較を行うと、TBTO, TPTC 及び Nap については、前出のマミチヨグによる初期生活段階毒性試験の慢性毒性値を含めてもマダイが最も低い毒性値を示していた。一方、Cd については、マダイは他の海水魚と比較しても感度良く影響を評価できることが明らかであったが、淡水魚の方がより低い毒性値を示していた。Cd 等の重金属について、Ca イオン, Mg イオン等の存在によりその毒性値が弱められることが Jones (1938), Carinns and Scheier (1957), Lloyd (1960), 田端 (1969) 等の報告がある。淡水魚が海水魚と比較して Cd に対して感受性が高い傾向を示す原因には、淡水に比較して海水には非常に多くの Mg イオン (約 0.13%), Ca イオン (約 0.04%) (荒木ら, 1985) 等の 2 価イオンが含まれていることが大きく寄与するものと考えられ、Ca あるいは Mg イオンに影響を受ける重金属の毒性評価に当たっては、淡水魚との単純な比較が困難であることを常に念頭に置くべきである。

以上の結果から、マダイは試験魚として非常に感受性が高く、また、稚魚の長期暴露試験を実施して、成長を指標とすることにより感度良く化学物質の長期暴露影響を評価できることが明らかとなった。したがって、マダイ稚魚の長期間暴露試験はマミチヨグの初期生活段階毒性試験の代替法として使用できるものと考えられる。その一方で、Johansson-Sjöbeck and Larsson (1978) は海水魚 flounder (*Pleuronectes flesus*) を Cd に 9 週間暴露する試験を実施し、血液学的な検査を行うことで LOEC : 6.2

$\mu\text{g/L}$  という非常に低い毒性値を報告している。そこで、次項において、マダイを試験魚として血液学的な検査項目による 4 種類の試験物質に対する慢性毒性値を求め、成長等の指標との検査項目による影響評価の感度の違いについても検討を加える。さらに、マダイ及びマミチヨグで確認された慢性毒性値と急性毒性値の比率が一定であることを利用した慢性毒性値の推定についても次項以降で検討を加える。

### 2.3. マダイにおける血液性状による慢性毒性評価

我々の周りにおける化学物質の取扱い等については、地球環境への影響を減らすように種々の検査、規制等の取り組みがなされてはいる。しかし、水生生物への各種汚染物質の低濃度で長期にわたる影響について懸念されるようになり、急性毒性値から慢性毒性値を推定するのではなく、慢性毒性試験を実際に行う実施して得られた慢性毒性値の重要性が増している。慢性毒性試験では、ふ化率、成長等への影響をより低い濃度で長期間にわたり供試物質に暴露して調べるが、この他にも、死亡率以外で、生理学的、生化学的項目等による影響評価を行う方法があり (Benoit et al., 1976; Larsson et al., 1976; 田端, 1980; Bruggemann, 1995), 中でも生理、生化学的項目の重要性が指摘されている (Larsson et al., 1985)。生理、生化学的項目の中には、有機リン系農薬-コリンエステラーゼ (馬場・奈良, 1977), 環境エストロゲン-ビテロジェニン (清水, 1999) 等特異的に、かつ鋭敏に影響を検出できる項目も知られている。また、ほ乳類を用いた OECD テストガイドライン (通商産業省基礎産業局化学品安全課, 1984c) 及び化審法における試験 (厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室, 1987) では、毒性試験の過程で有害物質のもつ有害性を生化学レベルで検索する重要な技法として血液検査が位置づけられており (小島, 1975), 魚類においても広範な化学物質の影響を調べるためには、血液検査の利用は有益であると考えられる。各種生理生化学的な検査項目の中でも、血液を中心とした検査は検査法が最も進歩しており、ヒトに用いられる手法がある程度そのまま魚類にも転用できるため、比較的簡便な検査である。魚類における生理、生化学的研究においても、種々の汚染物質の影響により貧血、血漿成分の変動等が生じることが報告されている (Wedemeyer and McLeay, 1981; 山本, 1981)。これらの症状が重篤になると個体は死に至ることもあることから、血液性状の変動は慢性影響を反映するものと考え

Table 2.3-1. Previous reported LOEC and NOEC values based on growth, hematological and histopathological parameters of fish

| Chemical               | Species                        | Duration                  | Effect measurement | NOEC ( $\mu\text{g/L}$ ) | LOEC       | Ref.                                |
|------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|------------|-------------------------------------|
| <b>TBTO</b>            |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
| <b>Freshwater fish</b> |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | 28days                    | Ht                 |                          | 1          | Bruggemann et al., 1995             |
|                        | <i>Oryzias latipes</i>         | 4 weeks                   | Histopathology     | 0.32                     | 1          | Wester et al., 1990                 |
|                        | <i>Poecilia reticulata</i>     | 1month                    | Histopathology     | 0.1                      | 0.32       | Wester et al., 1990                 |
| <b>Saltwater fish</b>  |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Cyprinodon variegatus</i>   | 90 days                   | Growth(l)          | 1.3                      | 3.2        | Manning et al., 1999                |
| <b>TPTC</b>            |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
| <b>Freshwater fish</b> |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | 110days                   | Growth(wt.)        | $\geq 1.2$               | $>1.2$     | Vries et al., 1991                  |
| <b>Cd</b>              |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
| <b>Freshwater fish</b> |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Jordanella floridae</i>     | 100days                   | Spawning           | 4.1                      | 8.1        | Spehar, 1976                        |
|                        | <i>Jordanella floridae</i>     | 100days                   | Growth(l)          | 16                       | 31         | Spehar, 1976                        |
|                        | <i>Lopomis macrochirus</i>     | 22days                    | Growth(l, wt.)     | $<37.3$                  | 37.3       | Bryan et al., 1995                  |
|                        | <i>Lopomis macrochirus</i>     | 22days                    | Feeding            | $<37.3$                  | 37.3       | Bryan et al., 1995                  |
|                        | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | 21days                    | RBC                | 4                        | 12         | Lowe-Jinde and Niimi, 1986          |
|                        | <i>Oncorhynchus mykiss</i>     | 18weeks                   | Ht                 |                          | 10         | Haux and Larsson, 1984              |
|                        | <i>Pimephales promelas</i>     | 14day                     | Growth(wt.)        | 3                        | $>3$       | Suedel et al., 1997                 |
|                        | <i>Puntius conchonius</i>      | 30days                    | RBC, Hb            | $<630$                   | 630        | Gill and Pant, 1985                 |
|                        | <i>Salvelinus fontinalis</i>   | 8weeks                    | Hb                 | $\geq 6.35$              | $>6.35$    | Christensen et al., 1977            |
|                        | <i>Salvelinus fontinalis</i>   | 2nd generation<br>16weeks | Growth(wt.)        | 1.7                      | 3.4        | Benoit et al., 1976                 |
| <b>Saltwater fish</b>  |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Cyprinodon variegatus</i>   | 7days                     | Growth(wt.)        | 560                      | 1000       | Hutchinson et al., 1994             |
|                        | <i>Pleuronectes flesus</i>     | 9weeks                    | RBC, Ht, Hb        | $<6.2$                   | 6.2        | Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1978 |
|                        | <i>Pleuronectes flesus</i>     | 15days                    | Ht                 | 100                      | 1000       | Larsson et al., 1976                |
| <b>Naphthalene</b>     |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
| <b>Freshwater fish</b> |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Oncorhynchus kisutch</i>    | 40days                    | Growth(l, wt.)     | 370                      | 670        | Moles et al., 1981                  |
|                        | <i>Pimephales promelas</i>     | 30days                    | Growth             | 450                      | 850        | DeGraeve et al.,                    |
| <b>Saltwater fish</b>  |                                |                           |                    |                          |            |                                     |
|                        | <i>Menidia beryllina</i>       | 7,8days                   | Abnormality        | 550                      | -          | Middaugh et al. 1988                |
|                        | <i>Micropogonias undulatus</i> | 5,8weeks                  | GSI                |                          | $\leq 500$ | Thomas and Budiantara, 1995         |
|                        | <i>Oncorhynchus gorbuscha</i>  | 30days                    | Growth(wt.)        | 120                      | 380        | Moles et al., 1981                  |

えられる。Table 2.3-1 には既報の慢性毒性値を取りまとめたものである。

本研究で選定している世界的に問題となっている環境汚染物質である有機スズ化合物の中で酸化トリブチルスズ (Bis (tributyltin) oxide, 以下 TBTO と略記) では淡水魚及び海水魚について、塩化トリフェニルスズ (Triphenyltin Chloride, 以下 TPTC と略記) では淡水魚について、未だに汚染が問題になっているカドミウム (以下 Cd と略記) では多くの淡水魚について、油汚染に関連するナフタレン (以下 Nap と略記) では淡水魚及び海水魚について、それぞれ慢性毒性値である最低影響濃度 (LOEC), 無影響濃度 (NOEC) がいくつかそれぞれ報告されている。淡水魚ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に対する Cd の影響を調べた研究 (Lowe-Jinde and

Niimi, 1986) では赤血球数を指標として、試験物質による赤血球数の減少という貧血の発症から慢性毒性値 NOEC :  $4\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $12\mu\text{g/L}$  を示しており、海水魚 flounder (*Pleuronectes flesus*) に対する Cd の影響を調べた研究 (Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1978) においても、血液性状の赤血球数、相対赤血球容積 (ヘマトクリット, 以下 Ht と略記) 及び血色素量 (ヘモグロビン量, 以下 Hb と略記) を調べこれらの低下、つまり貧血の発症の指標に NOEC :  $< 6.2\mu\text{g/L}$  及び LOEC :  $6.2\mu\text{g/L}$  という非常に低い毒性値が明らかにされている。これらのことから、血液性状はかなり鋭敏に汚染物質の影響を評価できる項目であると考えられる。しかし、慢性毒性試験については、古くから水生生物に関する毒性が研究されている Cd についても報告例は多

いとはいえない。さらに、海域の影響に必須な海水魚を用いた生理、生化学的影響評価を含めた慢性毒性試験の報告究は非常に少ないのが現状である。

これまでの本研究結果から、日本産の海水魚マダイを試験魚として急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施した結果、試験物質として選定したTBTO, TPTC, Cd及びNapについて、マダイの示す毒性値はこれまでに報告されている毒性値に比較してかなり低い値を示していた。マダイは化学物質による影響を鋭敏に示す試験魚であることが明らかになりつつあり、生残、成長以外の項目として検査が簡便な血液性状による影響評価がマダイについても応用できれば、各種化学物質の魚類に対する多角的な影響評価にも繋げることができるためその意義は大きいと考えられる。そこで、血液性状の評価項目としての感度等を調べるため、採血可能なマダイを用いて4種類の試験物質についての慢性毒性試験を実施して最低影響濃度(LOEC)、無影響濃度(NOEC)を求めるとともに、暴露期間、試験魚の大きさ等による感度の違いを検討するとともに、本章の最後で、種々の影響評価項目の感度等についても考察を加えた。

### 2.3.1. 実験材料及び方法

試験魚であるマダイは、財団法人静岡県温水利用研究センターまたは神奈川県栽培漁業協会から入手して中央水産研究所横須賀庁舎で蓄養したものを試験に供した。試験開始時のマダイ体重は、TBTO暴露では、1回目が $11.7 \pm 1.1$ g(平均値 $\pm$ 標準偏差)、2回目が $87.2 \pm 22.1$ g、TPTC暴露では $272.4 \pm 32.9$ g、Cd暴露では $149.0 \pm 15.7$ g、Nap暴露では $68.0 \pm 10.7$ gであった。

**TBTO 暴露試験:** TBTO 暴露は流水式の希釈装置(Kimura et al., 1971)を用意し、1濃度区当たり1水槽(小型魚:60L容ガラス製水槽、大型魚:180L容ガラス製水槽)を用意した。試験は、1回目:小型魚の暴露、2及び3回目:大型魚の暴露の合計3回を実施した。既報の文献値(角埜・木村,1987)及びあらかじめ実施した平均体重380gマダイを用いた48時間急性毒性試験の結果を参考にして各濃度を設定し、1回目: $2\mu\text{g}$  TBT/L、 $0.7\mu\text{g}$  TBT/L及び無添加対照区に平均体重11.7gのマダイを11尾ずつ、2回目: $0.120\mu\text{g}$  TBT/L、 $0.04\mu\text{g}$  TBT/L及び無添加対照区に平均体重87.2gのマダイを5尾ずつ収容し4週間馴致後の9週間暴露、3回目: $2\mu\text{g}$  TBT/L、 $0.7\mu\text{g}$  TBT/L及び対照区に平均体重87.2gのマダイを7尾ずつ収容し4週間馴

致後の8週間暴露を行った。各濃度区水槽(180L容)には、アセトン(残留農薬試験用300,和光純薬工業株式会社,大阪)に溶解したTBTO(純度96%,Sigma-Aldrich Corporation,MO,USA)を、遮光したガラス瓶中の脱塩素した水道水に添加分散させた試験原液を、ガラス製微量定量ポンプ(Glass Pump GMW-A,東京理東京理器械株式会社,東京)により、各水槽に注入する海水(約300mL/分)に添加し所定濃度の試験水を調製した。なお、水槽中の水の交換率は11回/日であった。試験中の水温は約20°Cに調整し、少量の通気を行い、体重の3%の日本農産工業(株)製マダイ育成用配合飼料を1日1回与えた。試験期間中の溶存酸素濃度は溶存酸素計(Dissolved oxygen meter,YSI model 58,YSI Incorporated,OH,USA)により測定し、全ての暴露区で $5.4\text{mg/L}$ (酸素飽和度80%)以上であった。なお、試験水のTBTO濃度は1週間毎にガスクロマトグラフ法(高見ら,1998)により測定した。**TPTC 暴露試験:** TPTC 暴露も上記TBTO暴露と同様に流水式で実施した。試験は1濃度区につき1水槽(180L容ガラス製水槽)とした。あらかじめ実施した平均体重240gのマダイを用いた48時間急性毒性試験の結果を参考にして、設定値で $3.6\mu\text{g}$  TPTC/L、 $1.2\mu\text{g}$  TPTC/L、 $0.4\mu\text{g}$  TPTC/L及び無添加対照区に平均体重272.4gのマダイを10尾ずつ( $0.4\mu\text{g/L}$ のみ9尾)収容し、4週間の予備飼育の後、8週間暴露を行った。各濃度区水槽には、アセトン(残留農薬試験用300,和光純薬工業株式会社,大阪)に溶解したTPTC(純度>98%,東京化成工業株式会社,東京)を、遮光したガラス瓶中の脱塩素した水道水に添加分散させた試験原液を、ガラス製微量定量ポンプ(Glass Pump GMW-A,東京理東京理器械株式会社,東京)により、各水槽に注入する海水(約300mL/分)に添加し所定濃度の試験水を調製した。なお、水槽中の水の交換率は11回/日であった。試験中の水温は約20°Cに調整し、少量の通気を行い、体重の1~1.5%の日本農産工業(株)製マダイ育成用配合飼料を1日1回与えた。試験期間中の溶存酸素濃度は全ての暴露区で $5.4\text{mg/L}$ (酸素飽和度80%)以上であった。なお、飼育水のTPTC濃度は1週間毎にガスクロマトグラフ法(高見ら,1998)により測定した。

**Cd 暴露試験:** Cd 暴露も流水式で実施した。試験は1濃度区につき1水槽(180L容ガラス製水槽)とした。あらかじめ実施した平均体重531gのマダイを用いた48時間急性毒性試験の結果及び既報値(小山ら1992)を参考にして、設定値で $0.36\text{mg/L}$ ,



0.06mg/L, 0.01mg/L 及び無添加対照区に平均体重 149.0g のマダイを 12 尾ずつ収容し, 4 週間の予備飼育の後, 8 週間暴露を行った。各濃度区水槽には, 遮光したガラス瓶中の脱塩素した水道水に  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (純度 >98%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を添加溶解させた試験原液を, ガラス製微量定量ポンプにより, 各水槽に添加すると同時に海水も注水し所定濃度の試験水を調製した。なお, 水槽中の水の交換率は約 10 回 / 日であった。試験中の水温は約 20°C に調整し, 少量の通気を行い, 体重の 3% の日本農産工業 (株) 製マダイ育成用配合飼料を 1 日 1 回与えた。試験期間中の溶存酸素濃度は溶存酸素計 (Dissolved oxygen meter, YSI model 58, YSI Incorporated, OH, USA) により測定し, 全ての暴露区で 5.4mg/L (酸素飽和度 80%) 以上であった。なお, 試験水の Cd 濃度は 1 週間毎に JIS 工場排水試験法 (日本工業標準調査会, 1993) に準じて空気-アセチレンバーナーによるフレイム法により測定した。

**Nap 暴露試験:** Nap 暴露は流水式とし, 1 濃度区当たり 1 水槽 (180L 容ガラス製水槽) を用意した。あらかじめ実施した平均体重 45g のマダイを用いた 96 時間急性毒性試験の結果を参考にして, 本試験では平均体重 68g のマダイを用いて設定値で 4mg/L, 1mg/L, 0.25mg/L, 0.07mg/L 及び無添加対照区にマダイを 18 尾ずつ, 助剤対照区 (試験水中の助剤の濃度は, アセトン: 8.7mL/L 及び HCO-40: 17.3mg/L) には 7 尾を収容し, 4 週間の予備飼育の後, 8 週間暴露を行った。試験原液は, Nap (純度 >99%, 特級, 和光純薬工業株式会社, 大阪): 1g に対して, 分散剤としてアセトン (残留農薬試験用 300, 和光純薬工業株式会社, 大阪): 5mL 及び医薬用硬化ひまし油 (HCO-40, 日光ケミカルズ株式会社, 東京): 8g の割合で混合した液体を, 脱塩素した水道水に分散させて作製した。試験原液をガラス製微量定量ポンプ (Glass Pump GMW-A, 東京理東京理化器械株式会社, 東京) により, 各水槽に注入する海水 (約 300mL/分) に添加して試験液を調製した。また, アセトン及び HCO-40 のみを加えた助剤対照区と, 無添加対照区も設けた。なお, 水槽中の水の交換率は 12 回 / 日であった。試験中の水温は約 20°C に調整し, 少量の通気を行い, 体重の 2% の日本農産工業 (株) 製マダイ育成用配合飼料を 1 日 1 回与えた。試験期間中の溶存酸素濃度は溶存酸素計 (Dissolved oxygen meter, YSI model 58, YSI Incorporated, OH, USA) により測定し, 全ての暴露区で 5.4mg/L (酸素飽和度 80%) 以上

であった。なお, 試験水の Nap 濃度は, Neff and Anderson (1975) の方法に準じて UV 吸光光度法により 1 週間毎に測定した。

**検査項目等:** 試験魚はそれぞれ所定の尾数を取り上げて, MS222 (meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) (500 $\mu\text{g/L}$ ) またはフェノキシエタノール (和光純薬工業株式会社, 大阪) (500 $\mu\text{g/L}$ ) の海水溶液により麻酔をかけた後, ヘパリンを塗布したプラスチック製ディスプレイシリンジ (注射針 20G) を用いて尾柄部の血管穿刺により採血を行った。血液性状の検査項目は, 全血について, 赤血球数 (以下 RBC と略記) (トーマの算定盤 (山口, 1970)), Ht 値 (マイクロヘマトクリット法 (McGovern et al., 1955)), 及び Hb 量 (SLS - ヘモグロビン法 (大城ら, 1981)) である。また, 赤血球数, Hb 量及び Ht 値の低下として把握される貧血について, Wintrobe の赤血球恒数による分類 (Wintrobe et al., 1974) に基づいた診断が現実的かつ重要と考えられている (宮崎, 1979)。そこで, 以下の式から赤血球恒数である赤血球の平均的な大きさを表す平均赤血球容積 (MCV), 赤血球 1 個に含まれる平均的な Hb の量である平均赤血球血色素量 (MCH), 及び全赤血球 (容積) に含まれる Hb の平均的な濃度である平均赤血球血色素濃度 (MCHC) をそれぞれ算出した。

$$\text{MCV}(\mu\text{m}^3) = \text{Ht}(\%) / \text{RBC}(10^4/\text{mm}^3) \times 1000,$$

$$\text{MCH}(\text{pg}) = \text{Hb}(\text{g/dL}) / \text{RBC}(10^4/\text{mm}^3) \times 1000,$$

$$\text{MCHC}(\%) = \text{Hb}(\text{g/dL}) / \text{Ht}(\%) \times 100$$

貧血とは, その個体の全血液量と全赤血球容積の絶対的な減少をさし, ヒトの場合には血液性状の正常値の下限値を下回る場合に貧血と判断される (宮崎, 1979)。魚類の場合, ヒトの場合のような正常値が明確になっていないため, 対照区との比較により統計的に有意な減少が RBC, Hb 量または Ht 値に認められれば貧血として影響を評価することができる。また, ヒトの場合, 貧血の発症が認められたときにこれらの赤血球恒数により, MCV が 80 $\mu\text{m}^3$  > の場合に小球性, 80 ~ 100 $\mu\text{m}^3$  の場合に正球性, 100 $\mu\text{m}^3$  < の場合に大球性にまた, MCHC についても 30% > の場合に低色素性, 30 ~ 36% の場合が正色素性, 36% < の場合に高色素性に, それぞれ貧血が分類される。魚類においては, ヒトのような正常



範囲が明らかではないので、対照区の MCV または MCHC と比較して統計的に有意な差異があった場合、Wintrobe の赤血球恒数による分類に準じてそれぞれ貧血を分類することとした。

得られた結果は、Dunett の多重比較により対照区と暴露区の平均値の有意差検定を行い、上記の貧血の発症の有無及び貧血の分類を行った。また、全ての暴露試験の排水は排水処理施設にて処理を行った。

### 2.3.2. 結 果

**TBTO 暴露：**暴露期間中の各濃度区の TBTO 実測濃度は TBT 換算で、1 回目は設定濃度  $2\mu\text{g/L}$  が  $1.59 \pm 0.29\mu\text{g/L}$ 、 $0.7\mu\text{g/L}$  が  $0.66 \pm 0.06\mu\text{g/L}$ 、2 回目は設定濃度  $0.120\mu\text{g/L}$  が  $0.112 \pm 0.009\mu\text{g/L}$ 、 $0.04\mu\text{g/L}$  が  $0.031 \pm 0.006\mu\text{g/L}$ 、3 回目は  $2\mu\text{g/L}$  が設定濃度  $1.98 \pm 0.45\mu\text{g/L}$ 、 $0.7\mu\text{g/L}$  が  $0.52 \pm 0.05\mu\text{g/L}$ 、対照区は検出限界 ( $<0.001\mu\text{g/L}$ ) 以下であった。

1 回目の小型マダイ (平均体重  $11.7\text{g}$ ) の暴露では、8 週目までに  $0.66\mu\text{g/L}$  区で 2 尾の死亡が認められたほか、 $1.59\mu\text{g/L}$  区では 4 週目に引き上げなかった全個体 6 尾が 6 週目までに全て死亡した。血液性状についての結果は Table 2.3-2 に示すように、4 週目では  $1.59\mu\text{g/L}$  区で RBC が対照区の 60% に、Ht 値は 40% 強に、Hb 量は 60% にそれぞれ有意 ( $p<0.01$ ) に減少しており、また、MCV も有意に減少、MCHC は有意 ( $p<0.01$ ) に増加していた。8 週目

の  $0.66\mu\text{g/L}$  区では、RBC、Ht 値、Hb 量、MCV、MCH 及び MCHC に有意な差異は認められなかった。従って、RBC、Ht 値及び Hb 量の減少から判断して 4 週目の  $1.59\mu\text{g/L}$  区で貧血が発症したと考えられ、また、MCV の減少及び MCHC の増加が認められたためその貧血は小球性高色素性の貧血に分類された。

2 回目の大型魚 (平均体重  $87.2\text{g}$ ) の試験では暴露終了までに  $0.112\mu\text{g/L}$  区では 1 尾、対照区では水槽から飛び出したことにより 1 尾が死亡したが、 $0.031$  及び  $0.1124\mu\text{g/L}$  の 9 週間暴露では貧血の発症は認められなかった (Table 2.3-3)。3 回目の大型魚 (平均体重  $87.2\text{g}$ ) の試験では、 $1.98\mu\text{g/L}$  区で 1 尾、 $0.52\mu\text{g/L}$  区では 1 尾の死亡がそれぞれ認められた。血液性状についての結果は Table 2.3-4 に示した。4 週目の  $1.98\mu\text{g/L}$  区において Ht 値が対照区の 70% にまで有意 ( $P<0.05$ ) に減少していた。8 週目では、 $0.52\mu\text{g/L}$  区で Ht 値が対照区の 76% に有意な減少し、 $1.98\mu\text{g/L}$  区では RBC が対照区の 80% に、Ht 値が 65% に、MCV の有意な減少及び MCHC の有意 ( $P<0.01$ ) な増加がそれぞれ認められた。Ht 値の有意な減少から 4 週目では  $1.98\mu\text{g/L}$  区で、8 週目では  $0.52\mu\text{g/L}$  区以上でそれぞれ貧血が発症したと判断された。

また、このときの貧血について赤血球恒数に基づく分類を行うと、4 週目の  $1.98\mu\text{g/L}$  区では統計的に有意差はないものの MCV がやや減少し MCHC

Table 2.3-2. Effects of bis(tri-n-butyltin) oxide (TBTO) on hematological parameters (mean  $\pm$  SD) of red seabream (BW:  $11.7\text{g}$ ).

| TBTO                                  | RBC                    | Ht                  | Hb                 | MCV                 | MCH             | MCHC                |
|---------------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| nominal (determined)<br>concentration |                        |                     |                    |                     |                 |                     |
| ( $\mu\text{gTBT/L}$ )                | ( $10^4/\text{mm}^3$ ) | (%)                 | ( $\text{g/dL}$ )  | ( $\mu\text{m}^3$ ) | ( $\text{pg}$ ) | (%)                 |
| 4 weeks                               |                        |                     |                    |                     |                 |                     |
| Control (n=5)                         | $274 \pm 40$           | $46.6 \pm 4.3$      | $6.5 \pm 0.4$      | $172 \pm 23$        | $24.2 \pm 3.7$  | $14.1 \pm 1.7$      |
| 0.7 (0.66) (n=5)                      | $203 \pm 62$           | $37.0 \pm 5.7$      | $5.7 \pm 1.2$      | $167 \pm 42$        | $27.5 \pm 2.3$  | $17.0 \pm 3.1$      |
| 2 (1.59) (n=5)                        | $167 \pm 35^{**}$      | $20.2 \pm 4.7^{**}$ | $3.9 \pm 0.8^{**}$ | $120 \pm 17^{**}$   | $23.7 \pm 2.6$  | $20.2 \pm 2.8^{**}$ |
| 8 weeks                               |                        |                     |                    |                     |                 |                     |
| Control (n=6)                         | $382 \pm 110$          | $43.7 \pm 8.5$      | $7.0 \pm 1.6$      | $139 \pm 27$        | $21.9 \pm 3.4$  | $16.2 \pm 3.8$      |
| 0.7 (0.66) (n=4)                      | $275 \pm 9$            | $33.3 \pm 9.9$      | $5.7 \pm 1.3$      | $121 \pm 37$        | $20.7 \pm 4.7$  | $17.5 \pm 2.3$      |

\*\* : Significantly different from control ( $p<0.01$ ).

がやや増加する傾向にあることから小球性高色素性の貧血に、8週目の0.52 $\mu\text{g/L}$ 区ではMCVがやや低下傾向にありMCHCには影響が認められないことから小球性正色素性に貧血に、1.98 $\mu\text{g/L}$ 区ではMCVが減少しMCHCが増加したことから小球性高色素性の貧血にそれぞれ分類された。TBTOに対するマダイ慢性毒性試験の結果から得られた慢性毒性値をTable 2.3-5に取りまとめた。生残を指標とすると6週目におけるはNOEC:0.66 $\mu\text{g/L}$ 及びLOEC:1.59 $\mu\text{g/L}$ であるが、最も低い慢性毒性値は8週目におけるHt値を指標としたNOEC:0.112 $\mu\text{g/L}$ 及びLOEC:0.52 $\mu\text{g/L}$ であった。

**TPTC 暴露**: 暴露期間中のTPTCの各暴露区における濃度は、TPTC換算で、設定濃度3.6 $\mu\text{g/L}$ が3.23 $\pm$ 0.79 $\mu\text{g/L}$ 、1.2 $\mu\text{g/L}$ が1.16 $\pm$ 0.30 $\mu\text{g/L}$ 、0.4 $\mu\text{g/L}$ が0.13 $\pm$ 0.07 $\mu\text{g/L}$ 、無添加対照区は検出限界(<0.001 $\mu\text{g/L}$ )以下であった。暴露期間中、0.13 $\mu\text{g/L}$ 区で1尾が水槽外に飛び出したことにより死亡したが、この他には死亡魚は認められなかった。血液性状の結果はTable 2.3-6に示した。4週目では、0.13、1.16及び3.23 $\mu\text{g/L}$ 区のMCHに有意(P<0.05)な減少が認められたが、RBC、Ht値及びHb量には有意な低下が認められず、貧血の発症は認められなかった。一方、赤血球恒数については、MCHが対照区

Table 2.3-3. Effects of TBTO on hematological parameters (mean  $\pm$  SD) of red sea bream (BW: 87.2g).

| TBTO<br>nominal (determined)<br>concentration<br>( $\mu\text{gTBTO/L}$ ) |       | RBC<br>( $10^4/\text{mm}^3$ ) | Ht<br>(%)      | Hb<br>(g/dL)  | MCV<br>( $\mu\text{m}^3$ ) | MCH<br>(pg)    | MCHC<br>(%)    |
|--|-------|-------------------------------|----------------|---------------|----------------------------|----------------|----------------|
| 9 weeks  |       |                               |                |               |                            |                |                |
| Control  | (n=3) | 208 $\pm$ 18                  | 23.5 $\pm$ 4.2 | 5.6 $\pm$ 0.9 | 140 $\pm$ 6                | 29.0 $\pm$ 1.0 | 21.5 $\pm$ 1.7 |
| 0.04 (0.031)   | (n=5) | 217 $\pm$ 25                  | 23.7 $\pm$ 2.7 | 5.1 $\pm$ 1.0 | 123 $\pm$ 8                | 23.7 $\pm$ 5.4 | 21.3 $\pm$ 2.8 |
| 0.12 (0.112)   | (n=4) | 213 $\pm$ 8                   | 22.3 $\pm$ 3.2 | 5.0 $\pm$ 0.6 | 126 $\pm$ 21               | 23.5 $\pm$ 1.1 | 19.9 $\pm$ 2.3 |

Table 2.3-4. Effects of TBTO on hematological parameters (mean  $\pm$  SD) of red sea bream (BW: 87.2g).

| TBTO<br>nominal (determined)<br>concentration<br>( $\mu\text{gTBTO/L}$ ) |       | RBC<br>( $10^4/\text{mm}^3$ ) | Ht<br>(%)        | Hb<br>(g/dL)  | MCV<br>( $\mu\text{m}^3$ ) | MCH<br>(pg)    | MCHC<br>(%)      |
|--|-------|-------------------------------|------------------|---------------|----------------------------|----------------|------------------|
| 4 weeks  |       |                               |                  |               |                            |                |                  |
| Control  | (n=3) | 215 $\pm$ 52                  | 24.8 $\pm$ 0.4   | 5.5 $\pm$ 0.9 | 111 $\pm$ 14               | 24.6 $\pm$ 4.3 | 23.0 $\pm$ 2.8   |
| 0.7 (0.52)   | (n=3) | 205 $\pm$ 68                  | 24.7 $\pm$ 5.0   | 5.8 $\pm$ 0.4 | 111 $\pm$ 7                | 23.7 $\pm$ 4.7 | 24.2 $\pm$ 5.9   |
| 2 (1.98)   | (n=3) | 188 $\pm$ 21                  | 17.3 $\pm$ 2.5*  | 4.4 $\pm$ 0.6 | 92 $\pm$ 12                | 23.6 $\pm$ 1.9 | 25.7 $\pm$ 1.6   |
| 8 weeks  |       |                               |                  |               |                            |                |                  |
| Control  | (n=3) | 231 $\pm$ 10                  | 24.6 $\pm$ 0.8   | 5.4 $\pm$ 0.6 | 105 $\pm$ 6                | 23.6 $\pm$ 3.6 | 22.5 $\pm$ 2.1   |
| 0.7 (0.52)   | (n=3) | 221 $\pm$ 55                  | 18.8 $\pm$ 4.6*  | 5.1 $\pm$ 1.6 | 96 $\pm$ 20                | 21.2 $\pm$ 3.2 | 22.2 $\pm$ 1.3   |
| 2 (1.98)   | (n=3) | 185 $\pm$ 3*                  | 16.0 $\pm$ 1.4** | 4.9 $\pm$ 0.3 | 86 $\pm$ 6*                | 26.5 $\pm$ 2.1 | 30.9 $\pm$ 4.6** |

\* : Significantly different from control (p<0.05).

\*\* : Significantly different from control (p<0.01).

と比較して有意に低下していた。このときの対照区の MCH は 36.9pg であり、先述の TBTO の試験における対照区の MCH が示した 24 ~ 29pg と比較して著しく高かった。従って、TPTC 暴露区で認められた MCH の有意な低下は TPTC による影響を反映したものではなく、対照区の MCH が何らかの影響で高い値を示した結果であると考えられた。8 週目の結果では、3.23 $\mu$ g/L 区において Ht 値が対照区の 80% に、Hb 量が 75% にそれぞれ有意に低下しており、貧血が発症していると考えられた。このときの貧血について赤血球恒数に基づく分類を行う

と、MCV 及び MCHC とともに対照区と比較して有意な差異は求められなかったことから、正球性正色素性貧血に分類された。TPTC のマダイに対する慢性毒性試験の結果から得られた慢性毒性値を評価項目ごとにまとめたものが Table 2.3-7 である。最も低い慢性毒性値は 8 週目における Ht 値及び Hb 量から判断した NOEC : 1.16 $\mu$ g/L 及び LOEC : 3.23  $\mu$ g/L となった。

**Cd 暴露** : 暴露期間中の各濃度区における Cd の実測値は、設定濃度 0.36mg/L が  $0.37 \pm 0.07$ mg/L, 0.06mg/L が  $0.06 \pm 0.01$ mg/L, 0.01mg/L が  $0.01 \pm$

Table 2.3-5. Chronic toxicity values of TBTO that estimated with hemotological parameters and survival

| Chemicals | Parameter | Duration (week) | NOEC $\mu$ g/L | LOEC $\mu$ g/L |
|-----------|-----------|-----------------|----------------|----------------|
| TBTO      | RBC       | 4               | 0.66*          | 1.59*          |
|           | RBC       | 8               | 0.52*          | 1.98*          |
|           | Ht        | 4               | 0.66*          | 1.59*          |
|           | <b>Ht</b> | <b>8</b>        | <b>0.112*</b>  | <b>0.52*</b>   |
|           | Hb        | 4               | 0.66*          | 1.59*          |
|           | Hb        | 8               | $\geq 1.98^*$  | $> 1.98^*$     |
|           | survival  | 6               | 0.66*          | 1.59*          |

\* : expressed as  $\mu$ g TBT /L.

Table 2.3-6. Effects of TPTC on hematological parameters (mean  $\pm$  SD) of red sea bream.

| TPTC concentration ( $\mu$ g/L) | RBC ( $10^4$ /mm <sup>3</sup> ) | Ht (%)          | Hb (g/dL)       | MCV ( $\mu$ m <sup>3</sup> ) | MCH (pg)         | MCHC (%)       |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------|----------------|
| nominal (determined)            |                                 |                 |                 |                              |                  |                |
| 4 weeks                         |                                 |                 |                 |                              |                  |                |
| Control (n=5)                   | 237 $\pm$ 7                     | 34.0 $\pm$ 4.2  | 7.7 $\pm$ 1.2   | 150 $\pm$ 14                 | 36.9 $\pm$ 1.9   | 23.7 $\pm$ 2.2 |
| 0.4 (0.13) (n=4)                | 252 $\pm$ 68                    | 32.7 $\pm$ 3.2  | 7.4 $\pm$ 0.1   | 138 $\pm$ 28                 | 26.0 $\pm$ 2.9** | 21.5 $\pm$ 0.9 |
| 1.2 (1.16) (n=5)                | 246 $\pm$ 14                    | 31.5 $\pm$ 2.6  | 7.2 $\pm$ 0.3   | 129 $\pm$ 21                 | 27.0 $\pm$ 2.8** | 22.3 $\pm$ 1.5 |
| 3.6 (3.23) (n=5)                | 247 $\pm$ 21                    | 32.2 $\pm$ 2.8  | 8.0 $\pm$ 0.4   | 126 $\pm$ 9                  | 28.0 $\pm$ 2.1** | 24.0 $\pm$ 2.3 |
| 8 weeks                         |                                 |                 |                 |                              |                  |                |
| Control (n=5)                   | 266 $\pm$ 9                     | 30.3 $\pm$ 3.6  | 7.7 $\pm$ 0.4   | 115 $\pm$ 16                 | 27.4 $\pm$ 4.4   | 23.0 $\pm$ 0.7 |
| 0.4 (0.13) (n=4)                | 258 $\pm$ 34                    | 29.3 $\pm$ 1.0  | 7.0 $\pm$ 0.3   | 120 $\pm$ 8                  | 27.4 $\pm$ 2.5   | 23.9 $\pm$ 0.9 |
| 1.2 (1.16) (n=5)                | 228 $\pm$ 40                    | 28.8 $\pm$ 6.2  | 6.8 $\pm$ 1.0   | 127 $\pm$ 13                 | 25.7 $\pm$ 4.6   | 20.5 $\pm$ 1.9 |
| 3.6 (3.23) (n=5)                | 222 $\pm$ 45                    | 24.8 $\pm$ 3.0* | 5.8 $\pm$ 0.5** | 122 $\pm$ 10                 | 27.0 $\pm$ 4.7   | 23.8 $\pm$ 2.4 |

\* : Significantly different from control (p<0.05).

\*\* : Significantly different from control (p<0.01).

0.002mg/L, 対照区は検出限界 (0.003mg/L) 以下であった。暴露期間中の死亡魚は認められなかった。血液性状についての結果は Table 2.3-8 に示した。4 週目では, RBC, Ht 値及び Hb 量とも対照区と暴露区の間で差が認められず, 貧血の発症は認められなかった。8 週目では, 0.37mg/L 区において RBC が対照区の 73% に, Ht 値が対照区の 78% に, Hb 量が対照区の 65% にまでそれぞれ有意な減少を示し, このときに貧血状態にあったと考えられた。また, この貧血が認められたときの赤血球恒数に基づく分類を行うと, MCV 及び MCHC とともに対照

区と比較して有意な差異は認められなかったことから, 正球性正色素性貧血に分類された。発症が認められていた。Cd のマダイに対する慢性毒性試験の結果から評価項目ごとに慢性毒性値を取りまとめると Table 2.3-9 となり, 最も低い慢性毒性値は 8 週目における RBC, Ht 値及び Hb 量から判断した NOEC: 0.06mg/L 及び LOEC: 0.37mg/L であった。**Nap 暴露**: 暴露期間中の各濃度区における Nap の実測値は, 設定濃度 4mg/L が  $2.42 \pm 0.20$ mg/L, 1mg/L が  $0.80 \pm 0.40$ mg/L, 0.25mg/L が  $0.21 \pm 0.06$ mg/L, 0.07mg/L が  $0.06 \pm 0.01$ mg/L, 対照

Table 2.3-7. Chronic toxicity values of TPTC that estimated with hemotological parameters and survival

| Chemicals | Parameter | Duration (week) | NOEC $\mu$ g/L | LOEC $\mu$ g/L |
|-----------|-----------|-----------------|----------------|----------------|
| TPTC      | RBC       | 4               | $\geq 3.23$    | $> 3.23$       |
|           | RBC       | 8               | $\geq 3.23$    | $> 3.23$       |
|           | Ht        | 4               | $\geq 3.23$    | $> 3.23$       |
|           | Ht        | 8               | <b>1.16</b>    | <b>3.23</b>    |
|           | Hb        | 4               | $\geq 3.23$    | $> 3.23$       |
|           | Hb        | 8               | <b>1.16</b>    | <b>3.23</b>    |
|           | survival  | 8               | $\geq 3.23$    | $> 3.23$       |

Table 2.3-8. Effects of cadmium on hematological parameters (mean  $\pm$  SD) of red sea bream.

| Cadmium   | RBC                    | Ht               | Hb             | MCV                 | MCH            | MCHC           |
|---|------------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------|----------------|
| nominal (determined)<br>concentration<br>(mg/L) | ( $10^4/\text{mm}^3$ ) | (%)              | (g/dL)         | ( $\mu\text{m}^3$ ) | (pg)           | (%)            |
| 4 weeks   |                        |                  |                |                     |                |                |
| Control (n=6)                                   | 265 $\pm$ 31           | 31.8 $\pm$ 3.5   | 6.3 $\pm$ 0.5  | 115 $\pm$ 9         | 23.0 $\pm$ 2.7 | 20.0 $\pm$ 1.9 |
| 0.01 (0.01) (n=6)                               | 274 $\pm$ 32           | 31.8 $\pm$ 1.7   | 5.8 $\pm$ 0.3  | 112 $\pm$ 13        | 20.1 $\pm$ 2.6 | 18.0 $\pm$ 0.8 |
| 0.06 (0.06) (n=6)                               | 272 $\pm$ 29           | 32.5 $\pm$ 3.3   | 6.1 $\pm$ 0.5  | 120 $\pm$ 14        | 22.7 $\pm$ 3.9 | 18.9 $\pm$ 2.2 |
| 0.36 (0.37) (n=6)                               | 237 $\pm$ 17           | 32.6 $\pm$ 2.2   | 6.3 $\pm$ 0.4  | 125 $\pm$ 15        | 25.8 $\pm$ 3.2 | 19.9 $\pm$ 1.6 |
| 8 weeks   |                        |                  |                |                     |                |                |
| Control (n=6)                                   | 266 $\pm$ 38           | 32.8 $\pm$ 2.0   | 6.4 $\pm$ 0.4  | 120 $\pm$ 16        | 24.5 $\pm$ 3.3 | 20.5 $\pm$ 1.4 |
| 0.01 (0.01) (n=6)                               | 271 $\pm$ 36           | 32.7 $\pm$ 2.1   | 6.2 $\pm$ 0.7  | 122 $\pm$ 18        | 23.1 $\pm$ 3.1 | 19.0 $\pm$ 1.7 |
| 0.06 (0.06) (n=6)                               | 218 $\pm$ 66           | 32.1 $\pm$ 4.5   | 6.2 $\pm$ 1.4  | 127 $\pm$ 8         | 27.7 $\pm$ 4.4 | 19.5 $\pm$ 4.0 |
| 0.36 (0.37) (n=6)                               | 194 $\pm$ 45*          | 25.7 $\pm$ 4.2** | 4.2 $\pm$ 2.1* | 124 $\pm$ 30        | 20.6 $\pm$ 7.7 | 17.8 $\pm$ 7.4 |

\* : Significantly different from control (p<0.05).

\*\* : Significantly different from control (p<0.01).



Table 2.3-9. Chronic toxicity values of Cd that estimated with hemotological parameters and survival

| Chemicals | Parameter  | Duration (week) | NOEC $\mu$ g/L | LOEC $\mu$ g/L |
|-----------|------------|-----------------|----------------|----------------|
| Cd        | RBC        | 4               | $\geq 370$     | $> 370$        |
|           | <b>RBC</b> | <b>8</b>        | <b>60</b>      | <b>370</b>     |
|           | Ht         | 4               | $\geq 370$     | $> 370$        |
|           | <b>Ht</b>  | <b>8</b>        | <b>60</b>      | <b>370</b>     |
|           | Hb         | 4               | $\geq 370$     | $> 370$        |
|           | <b>Hb</b>  | <b>8</b>        | <b>60</b>      | <b>370</b>     |
|           | survival   | 8               | $\geq 370$     | $> 370$        |

Table 2.3-10. Effects of naphthalene on hematological indices (mean  $\pm$  SD) of red sea bream

| Naphthalene  | RBC                    | Ht               | Hb               | MCV                 | MCH             | MCHC           |
|--|------------------------|------------------|------------------|---------------------|-----------------|----------------|
| nominal<br>(determined)<br>concentration<br>(mg/L) | ( $10^4/\text{mm}^3$ ) | (%)              | (g/dL)           | ( $\mu\text{m}^3$ ) | (pg)            | (%)            |
| 2 weeks  |                        |                  |                  |                     |                 |                |
| Control (n=6)                                      | 232 $\pm$ 21           | 33.8 $\pm$ 1.9   | 6.8 $\pm$ 0.5    | 147 $\pm$ 12        | 29.3 $\pm$ 1.2  | 20.0 $\pm$ 1.4 |
| 0.07 (0.06) (n=6)                                  | 203 $\pm$ 6            | 29.5 $\pm$ 3.2   | 5.9 $\pm$ 0.9    | 159 $\pm$ 15        | 31.6 $\pm$ 1.4  | 20.0 $\pm$ 1.7 |
| 0.25 (0.21) (n=6)                                  | 234 $\pm$ 21           | 29.6 $\pm$ 3.3   | 6.3 $\pm$ 1.6    | 129 $\pm$ 10*       | 28.6 $\pm$ 4.6  | 21.1 $\pm$ 4.0 |
| 1 (0.80) (n=6)                                     | 179 $\pm$ 19**         | 27.1 $\pm$ 3.8** | 6.3 $\pm$ 0.8    | 147 $\pm$ 11        | 32.2 $\pm$ 2.7  | 22.1 $\pm$ 0.7 |
| 4 (2.42) (n=6)                                     | 169 $\pm$ 25***        | 20.1 $\pm$ 2.8** | 4.2 $\pm$ 0.9*** | 119 $\pm$ 10***     | 24.7 $\pm$ 2.8* | 20.7 $\pm$ 1.8 |
| 19 days  |                        |                  |                  |                     |                 |                |
| 4 (2.42) (n=6)                                     | 144 $\pm$ 29           | 12.3 $\pm$ 2.0   | 3.6 $\pm$ 0.5    | 86 $\pm$ 6          | 25.5 $\pm$ 2.3  | 29.6 $\pm$ 2.9 |
| 4 weeks  |                        |                  |                  |                     |                 |                |
| Control (n=6)                                      | 234 $\pm$ 23           | 29.3 $\pm$ 3.7   | 6.5 $\pm$ 1.3    | 129 $\pm$ 13        | 29.5 $\pm$ 3.0  | 22.0 $\pm$ 3.4 |
| 0.07 (0.06) (n=6)                                  | 201 $\pm$ 22           | 31.5 $\pm$ 4.2   | 6.9 $\pm$ 0.8    | 169 $\pm$ 54***     | 35.5 $\pm$ 1.1* | 21.6 $\pm$ 1.6 |
| 0.25 (0.21) (n=6)                                  | 204 $\pm$ 15           | 30.3 $\pm$ 3.6   | 6.6 $\pm$ 1.1    | 148 $\pm$ 12*       | 32.2 $\pm$ 5.0  | 21.7 $\pm$ 2.7 |
| 1 (0.80) (n=6)                                     | 181 $\pm$ 36**         | 22.5 $\pm$ 3.2*  | 5.6 $\pm$ 0.8    | 126 $\pm$ 12        | 31.6 $\pm$ 4.6  | 25.0 $\pm$ 1.3 |
| 8 weeks  |                        |                  |                  |                     |                 |                |
| Control (n=6)                                      | 229 $\pm$ 42           | 30.8 $\pm$ 3.8   | 6.8 $\pm$ 0.6    | 136 $\pm$ 18        | 30.2 $\pm$ 3.4  | 22.3 $\pm$ 2.5 |
| Solvent C (n=7)                                    | 222 $\pm$ 14           | 32.8 $\pm$ 1.8   | 6.8 $\pm$ 0.5    | 149 $\pm$ 17        | 31.0 $\pm$ 4.0  | 20.9 $\pm$ 1.3 |
| 0.07 (0.06) (n=6)                                  | 217 $\pm$ 45           | 30.9 $\pm$ 4.1   | 6.4 $\pm$ 1.0    | 144 $\pm$ 16        | 30.0 $\pm$ 3.7  | 20.8 $\pm$ 1.5 |
| 0.25 (0.21) (n=6)                                  | 227 $\pm$ 47           | 28.1 $\pm$ 2.9   | 6.3 $\pm$ 0.6    | 128 $\pm$ 16        | 28.7 $\pm$ 6.3  | 22.2 $\pm$ 2.7 |
| 1 (0.80) (n=6)                                     | 194 $\pm$ 19           | 23.3 $\pm$ 3.1** | 5.4 $\pm$ 0.6**  | 120 $\pm$ 10        | 27.8 $\pm$ 3.5  | 23.1 $\pm$ 2.4 |

\* : Significantly different from control (p&lt;0.05).

\*\* : Significantly different from control (p&lt;0.01).

\*\*\* : Significantly different from control (p&lt;0.001).

区が検出限界 (0.01mg/L) 以下であった。Nap の 2.42mg/L 区では、暴露開始 2 週目以降死亡魚が 6 尾に達したため、暴露開始 19 日目に生残魚全てを取り上げ、暴露を終了した。血液性状の結果については Table 2.3-10 に示した。2 週目では、RBC は 0.80mg/L 区で対照区の 77% に、2.42mg/L 区では対照区の 73% にまでそれぞれ有意な減少を示した。Ht 値は、0.80mg/L 区で対照区の 80% に、2.42mg/L 区で対照区の 60% にまでそれぞれ有意に減少し、Hb 量は 2.42mg/L 区で対照区の 62% にまで有意に減少していた。これらの結果から Nap 暴露 2 週目目において、0.80mg/L 以上の暴露区で貧血が発症していたと考えられた。2 週目で認められた貧血について赤血球恒数に基づく分類を行うと、0.80mg/L 区では MCV 及び MCH ともに対照区との差異が認められなかったことから正球性正色素性貧血に、2.42mg/L 区では MCV が有意な減少を示し MCHC には対照区との差異が認められなかったことから小球性正色素性貧血にそれぞれ分類された。2.42mg/L 区の RBC、Ht 値及び Hb 量は、2 週、19 日目と暴露期間に準じて経時的減少を示しており、特に 19 日目の値は 2 週及び 4 週目の対照区の平均値に対し、それぞれ 62、39 及び 54% まで減少した。これらのことから、2.42mg/L 区では強度の貧血が進行していたことが推察された。4 週目では、0.80mg/L 区の RBC 及び Ht 値はいずれも対照区の値の 77% にまで有意な減少を示したことから、このときに貧血が発症していると考えられた。

この貧血について赤血球恒数に基づく分類を行うと、MCV 及び MAHC ともに対照区との有意な差異が認められなかったことから、この貧血は正球性正色素性貧血に分類された。8 週目では、0.80mg/L

区の Ht 値で対照区の 76% に Hb 量で対照区の 79% にまでそれぞれ有意な減少を示していた。このときに貧血が発症していると考えられ、赤血球恒数に基づく分類では MCV 及び MCHC ともに対照区と比較して有意な差異が認められなかったことから正球性正色素性貧血と分類された。以上の結果、RBC、Ht 値及び Hb 量の減少から、0.8mg/L 区以上で貧血が発症し、特に、2.42mg/L 区では 2 週及び 19 日目で強度の貧血が進行したと考えられる。Nap の暴露試験により得られた慢性毒性値を評価項目ごとに取りまとめたものが Table 2.3-11 である。Ht 値は 0.8mg/L 区において 2 週目、4 週目及び 8 週目いずれも有意な低下を示していたことから、Nap の最も低い慢性毒性値は、2 週目、4 週目及び 8 週目いずれにおいても NOEC : 0.21mg/L 及び LOEC : 0.8mg/L となった。

### 2.3.3 考 察

**TBTO 及び TPTC 暴露** : Wintrobe による貧血の形態学的分類では、赤血球恒数である MCV 及び MCHC の値の組み合わせにより貧血の型を分類し、それぞれの型ごとに関連する基礎疾患、臨床症例等を整理してとりまとめが行われている (宮崎, 1979)。この分類において指標となる赤血球恒数はヒトについてのみ調べられているのではなく、赤血球を有する実験動物一般に広く調べられている (関ら, 1981)。魚類においても貧血の発症の確認を含む血液学的検査項目が汚染物質の影響評価に有効であるとする報告もある (Larsson et al., 1985)。本研究における TBTO 暴露により発症した貧血は、Wintrobe の赤血球恒数に基づく分類で小球性貧血に、TPTC による貧血は正球性貧血にそ

Table 2.3-11. Chronic toxicity values of Nap that estimated with hemotological parameters and survival

| Chemicals | Parameter | Duration (week) | NOEC $\mu$ g/L | LOEC $\mu$ g/L |
|-----------|-----------|-----------------|----------------|----------------|
| Nap       | RBC       | 2               | 210            | 800            |
|           | RBC       | 4               | 210            | 800            |
|           | RBC       | 8               | $\geq$ 800     | >800           |
|           | Ht        | 2               | 210            | 800            |
|           | Ht        | 4               | 210            | 800            |
|           | Ht        | 8               | 210            | 800            |
|           | Hb        | 2               | 800            | 2420           |
|           | Hb        | 4               | $\geq$ 800     | >800           |
|           | Hb        | 8               | 210            | 800            |
|           | survival  | 4               | 800            | 2420           |

れぞれ分類された。小球性の貧血の原因については、ヘム合成障害、グロビン合成障害、出血等が、正球性貧血の原因には血液の喪失、溶血、血漿の増大、内分泌異常、腎疾患、肝疾患等がそれぞれ挙げられている(宮崎, 1979)。TBTO, TPTC等の有機スズ化合物の血液性状への影響については Table 2.3-1 に示したように、TBTOに暴露したニジマスについて、Ht 値を指標に慢性毒性値 LOEC:  $1\mu\text{g/L}$  を求めた報告(Bruggemann et al., 1995)があり、本試験で用いた有機スズ化合物とは異なるが、Seinen et al. (1981) は  $0.2\mu\text{g/L}$  の塩化トリブチルスズ(TBTC)に暴露したニジマスの前期仔魚(yolk sac fry)で、Hb 量及びRBCの減少を認めている。有機スズ化合物の血液に与える影響等については、Byington et al. (1974) がトリアルキルスズに溶血作用があることを認めており、また、Oshima et al. (1997) は TBT が血液に特異的に高濃度で蓄積することを報告している。さらに、 $1.59\mu\text{g/L}$  の TBTO に 4 週間暴露した小型のマダイでは脾臓における造血組織の顕著な減少がみられており(清水・角埜, 1994)、これらのことから、TBTO, TPTC 暴露により、造血組織、赤血球等に影響が及び、造血過程での異常や、溶血等が引き金となって貧血が発症したのではないかと推察された。また、TBTO 暴露では、小型の個体と大型の個体とを試験に用いて影響を調べた。体重が  $11.7\text{g}$  の小型マダイは、濃度  $1.59\mu\text{g/L}$  区で暴露 4 週目に貧血を発症し、その後 8 週目には全て死に至った。一方、体重  $87.2\text{g}$  の大型のマダイでは  $1.98\mu\text{g/L}$  区で暴露 4 及び 8 週目に貧血を発症しており、8 週目では  $0.52\mu\text{g/L}$  区でも貧血が認められた。体重が異なれば毒性が現れる濃度も当然異なり、成長段階が早い時期の体重がより小さい個体では感受性が高いが、貧血が発症した濃度だけを見てみると、このことに矛盾するようにも見える。小型のマダイは  $1.59\mu\text{g/L}$  区で 4 週目の貧血発症後、6 週目で全て死亡しており、また、 $0.66\mu\text{g/L}$  区においても、対照区の値のばらつきが大きいために統計的に有意とはみなされなかったが、RBC は対照区の 72%、Ht 値は 76%、Hb 量は 81% といずれも低下傾向を示した。これに比べ、大型個体では、 $1.98\mu\text{g/L}$  区での死亡はわずか 1 個体のみであり、 $0.52\mu\text{g/L}$  区で RBC が 96%、Ht 値 76%、Hb 量は 94% と唯一 Ht 値のみの低下にとどまっていた。従って、TBTO のマダイに対する影響についても、従来から一般的に小型魚のほうで感受性が高いという体重と感受性との関係に矛盾するものではないといえる。また、TBTO 及び TPTC は数

週間で体内濃度が平衡状態に達することが知られている(Yamada and Takayanagi, 1992)。TBTO 暴露では小型魚及び大型魚はそれぞれ 4 週目の  $1.59\mu\text{g TBT/L}$  区及び  $1.98\mu\text{g TBT/L}$  区で貧血の発症がみとめられ、TPTC では  $3.23\mu\text{g/L}$  区の 8 週目に貧血の発症が認められた。同じ有機スズ化合物である TBTO と TPTC では貧血の発症濃度が後者で高くまた有意な影響の発現までにより時間がかかっており、毒性の発現に差異が認められた。Yamada and Takayanagi (1992) によれば、マダイを用いた TBTO 及び TPTC の生物濃縮試験の結果から、TBT の取り込み速度は TPT に比較して 2.7 倍速いことが明らかにされており、このことは TBT の体内濃度の上昇が TPT よりも早いことを示している。さらに、生物濃縮係数である BCF (Bioconcentration factor) が TBT でより大きいことから、分子構造から示す毒性が両者ともに近似していたとしても、蓄積性の差異が大きいことから TBT の毒性が強く発現した可能性が推測された。本試験に先立ち実施した予備試験では、体重  $300\sim 400\text{g}$  程度のマダイを  $27$  及び  $18\mu\text{g TBT/L}$  の濃度に 48 時間暴露した結果、 $27\mu\text{g TBT/L}$  では試験魚全てが死亡し、 $18\mu\text{g TBT/L}$  では 1 尾の死亡が認められたが貧血の発症は認められなかった。また、体重約  $300\text{g}$  のマダイを  $45$  及び  $87\mu\text{g TPT/L}$  の濃度に 48 時間暴露した結果においても生残魚に貧血の発症は認められなかった。これらの予備試験の結果及び本試験の結果から、低濃度で長期間の暴露試験では、高濃度の短期間の暴露試験とは異なり、急性毒性試験では認められないような影響が現れることとなり、慢性毒性試験の重要性が改めて示された。

**Cd 暴露:** Cd 暴露の結果では  $0.37\text{mg/L}$  で 8 週間暴露した場合に RBC, Ht 値及び Hb 量を指標として貧血の発症が確認された。この時の貧血は MCV 及び MCHC に大きな変化が認められないことから、Wintrobe の正球性正色素性貧血であると分類できた。Cd は数週間で体内濃度が平衡状態になることが知られている(Kumada et al., 1980)。また、予備的に実施した 48 時間の急性毒性試験の生残魚において全く貧血が認められなかったことから、貧血は Cd の体内濃度が緩やかに上昇していく過程で生じる種々の事象により発症したものと考えられた。Cd の血液性状への影響については、Table 2.3-1 に示したように、淡水魚ではニジマスを試験魚とした報告について、21 日暴露試験では RBC を評価項目に NOEC:  $4\mu\text{g/L}$  及び LOEC:  $12\mu\text{g/L}$  (Lowe-Jinde and Niimi, 1986)、18 週暴露では Ht を指標として

LOEC:10 $\mu$ g/L (Haux and Larsson, 1984), (*Puntius conchonius*) を試験魚として30日間の暴露試験を行いRBC及びHb量を指標としてLOEC:630 $\mu$ g/L (Gill and Pant, 1985)が, brook troutを試験魚とした8週間の暴露試験ではNOEC: $\geq$ 6.35 $\mu$ g/L (Christensen et al., 1977)がそれぞれ報告されている。一方, 海水魚を試験に用いた研究も少ないが報告されている。Larsson et al. (1976)がEnglish flounder (*Pleuronectes flesus*)を用いて, Cd濃度1mg/Lに15日間または0.05mg/Lに4週間の暴露することによりHt値の有意な低下を認めている。このときの貧血はMCHCの減少を伴わないことから, 正球性正色素性貧血に分類されている。さらに, Johansson-Sjöbeck and Larsson (1978)はEnglish flounderを用いて, Ht値及びHb量の有意な減少がCd濃度50及び500 $\mu$ g/Lでの4週間暴露及びCd濃度5 $\mu$ g/L以上での9週間暴露で生じ, RBCの有意な減少は, 500 $\mu$ g/Lの4週間暴露及び5 $\mu$ g/L以上の9週間暴露で生じることを認めている。このときの貧血は, MCV及びMCHCに有意な差異が認められなかったことから, 正球性正色素性に分類できるとしている。正球性正色素性貧血の原因には血液の喪失, 溶血, 血漿の増大, 内分泌異常, 腎疾患, 肝疾患等がそれぞれ挙げられている(宮崎, 1979)。魚類においても造血機能へのCdの影響については検討されており, 造血に重要な $\delta$ -アミノレブリン酸脱水素酵素がCdにより活性阻害を受けない(Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1978)等の報告がある。その他にもCd暴露により消化管が損傷を受ける(Gardner and Yevich, 1970)との報告もあり, Cdによる貧血は, これらの影響が複合的に作用した結果であろうと推察された。また, 海水魚における貧血の発症は, 淡水魚での貧血の発症濃度と比較すると高い濃度になる傾向が認められた。重金属の淡水魚と海水魚に対する毒性は, 前者で高いことが報告(小山, 1997)されており, そこで推測されているように海水中のカルシウム等の硬度成分と重金属が拮抗作用を示したため, 海水魚に対するNOEC, LOECが淡水魚に比較して高くなったものと考えられる。

**Nap 暴露:** Nap暴露の結果, 2週目の0.80及び2.42mg/L区, 19日目の2.42mg/L区, 4及び8週目の0.80mg/L区でHt値を主な指標として貧血の発症が確認された。Nap暴露による貧血は19日目を除いてMCHCの値には大きな変化が認められないことから, Wintrobeの正球性正色素性貧血に分類できた。この血液の喪失, 溶血, 血漿の増大, 内

Table 2.3-12. Chronic toxicity values of four chemicals that estimated with hemotological parameters and survival

| Chemicals | Parameter | NOEC $\mu$ g/L                   | LOEC $\mu$ g/L                   |
|-----------|-----------|----------------------------------|----------------------------------|
| TBTO      | RBC       | 0.66*                            | 1.59*                            |
|           | Ht        | <b>0.112*</b>                    | <b>0.52*</b>                     |
|           | Hb        | 0.66*                            | 1.59*                            |
|           | survival  | 0.66*                            | 1.59*                            |
| TPTC      | Ht        | <b>1.16</b><br>( <b>1.06**</b> ) | <b>3.23</b><br>( <b>2.94**</b> ) |
|           | HB        | <b>1.16</b><br>( <b>1.06**</b> ) | <b>3.23</b><br>( <b>2.94**</b> ) |
|           |           |                                  |                                  |
| Cd        | RBC       | <b>60</b>                        | <b>370</b>                       |
|           | Ht        | <b>60</b>                        | <b>370</b>                       |
|           | Hb        | <b>60</b>                        | <b>370</b>                       |
| Nap       | RBC       | <b>210</b>                       | <b>800</b>                       |
|           | Ht        | <b>210</b>                       | <b>800</b>                       |
|           | Hb        | 800                              | 2420                             |
|           | Hb        | <b>210</b>                       | <b>800</b>                       |
|           | survival  | 800                              | 2420                             |

\*: expressed as  $\mu$ g TBT /L

\*\*: expressed as  $\mu$ g TPT /L

分泌異常, 腎疾患, 肝疾患等がそれぞれ挙げられている(宮崎, 1979)。Napに関しては, 魚類を用いた血液性状への影響に関する研究例がほとんどない。わずかに, Alkindi et al. (1996)がNapを含む原油の水溶性画分にEnglish flounderを暴露して, 鰓損傷等による赤血球の流出及び溶血等を原因とするHt値及びHb量の有意な減少を認めた報告があるのみである。今回の試験におけるNap暴露による貧血の発症もおそらく鰓の損傷に伴う出血や溶血等が原因として考えられるが, 今後の詳細な検討が必要と思われた。Napでは2.42mg/L区で貧血が発症しているとともに死亡個体が続出しており, この濃度は死に至るような重篤な状態であると思われた。Napは環境水中から速やかに魚体内へ取り込まれることが知られている(McCarthy and Jimenez, 1985)。予備的に実施した96時間急性毒性試験の生残魚では貧血の発症が全く認められなかった。一方, 本研究における低濃度の0.80mg/L区では暴露後2週目に発症した貧血が暴露8週間後まで継続していたが死亡には至らなかった。これらのことから, Napの体内濃度が致死レベルに達していない場合でも, ある一定のレベル以上の体内濃度が比較的長時間継続することによって貧血が発症することが考えられる。また, 2週目の0.21mg/L区, 4週目の0.06及び0.21mg/L区で認められたMCV, MCHの有意な変化は, 貧血の発症を伴わないこと, 用量-反応関係が認められないことから, TBTの暴露でも認められたMCHの変化と同様に試験物質暴露の影響によるものとは思われなかったが, 原因は不明である。MCV, MCH及びMCHCはRBC, Ht値及びHb量から算出されたものであり, この値の変化だけで貧血を論じることは出来ず, 貧血の分類に利用される数値にすぎないことから, これらの数値に影響評価に用いることはできないと考えられた。



本研究の結果、100g 程度のマダイを用いて TBTO, TPTC, Nap 及び Cd の 8 週間暴露を実施し得られた慢性毒性値を評価項目ごとにまとめたものが Table 2.3-12 である。この結果から Ht 値を指標とした場合に、RBC 及び Hb 量の場合に比較してより低濃度の LOEC 及び NOEC を導くことが可能であった。また、各毒性試験の結果から濃度依存的に Ht 値の減少も認められたことから、4 種の供試物質の LOEC 及び NOEC は Ht 値を指標として求めることができた。マイクロヘマトクリット法 (McGovern et al., 1955) により測定した Ht 値は血液学的パラメーターの中でも種々の試験に利用しやすいことは Snieszko (1960) が報告している。特に Ht 値を指標とすることにより、試験物質の慢性影響をより鋭敏に評価することができ、Ht 値を含む血液検査による化学物質の影響評価の有効性が確認された。血液性状を用いることによって赤血球の持つ酸素運搬に関連する機能や呼吸等への影響についても有用な情報が得られることから、血液性状も一つの有益な化学物質影響評価項目と考えられる。また、血液性状の測定には採血が必須であるため、暴露に用いる魚体の大きさは採血可能な大きさが必要となる。血液性状は Ht 値、Hb 量及び RBC の測定に最低でも 0.2mL 程度の血液が必要 (川津, 1981) である。一般に魚類の場合は採血可能な量が体重の 1~2% (尾崎, 1978) とされており、今回 TBTO 暴露で用いた 11.7g 程度の大きさが血液性状を測定する場合の採血可能な下限と思われる。この 11.7g の個体では 1.59 $\mu$ g/L 区の 4 週目で、これ

より大型の 60.8g の個体でも 1.98 $\mu$ g/L 区の 4 週目で貧血の発症が確認されており、ともに貧血は 1.8  $\mu$ g/L 前後で影響が現れていた。一般に小型の個体の方が大型の個体に比較して各種汚染物質に対する感受性は高いことが知られているが、このように 10g から 100g 程度の個体を用いた場合、体重の違いにより貧血が生じる濃度に大きな差異はないと思われた。従って、10g から 100g 程度の個体を用いれば、体重による感度の差異の影響を受けずに慢性影響の評価が血液性状により可能であると考えられた。従来、日本の海水魚のほとんどが、ふ化仔魚の飼育が困難、成魚が大型のため小型水槽で飼育、成熟、産卵させることできない等の理由により全生活環毒性試験、または初期生活段階毒性試験等の実施が不可能であった。しかし、全生活環毒性試験、または初期生活段階毒性試験に代わる慢性影響評価法として、小型水槽で暴露可能な 10~100g 程度の試験魚を用いて、8 週間の暴露を行い、測定が簡便な Ht 値を指標とすることで日本産海水魚における影響評価の可能性が示唆された。

#### 2.4. 慢性毒性値の比較

これまでに本研究において、4 種類の試験物質 TBTO, TPTC, Cd 及び Nap についてマミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験、マダイ稚魚を用いた長期暴露毒性試験及びマダイにおける血液性状による長期暴露毒性評価を実施して、成長、生残、血液性状等を指標として慢性毒性値を得ることができた。得られた毒性値である NOEC 及び LOEC につ

Table 2.4-1. Previous reported LOEC and NOEC of TBTO estimated with growth, survival, hematological and histopathological parameters in fish

| Species                      | Duration | Effect measurement | LOEC ( $\mu$ g TBT /L) | NOEC    | Ref.                     |
|------------------------------|----------|--------------------|------------------------|---------|--------------------------|
| <b>Freshwater fish</b>       |          |                    |                        |         |                          |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | 28days   | Ht                 | 1                      |         | Bruggemann et al., 1995  |
| <i>Oryzias latipes</i>       | 4 weeks  | Histopathology     | 1                      | 0.32    | Wester et al., 1990      |
| <i>Poecilia reticulata</i>   | 1month   | Histopathology     | 0.32                   | 0.1     | Wester et al., 1990      |
| <b>Saltwater fish</b>        |          |                    |                        |         |                          |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | 90 days  | Growth(l.)         | 3.2                    | 1.3     | Manning et al., 1999     |
| <i>Pagrus major</i>          | 4weeks   | Histopathology     | $\leq$ 1.59            |         | Shimizu and Kakuno, 1994 |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | 8weeks   | Growth(l., wt.)    | 0.09                   | 0.01    | this study               |
|                              |          | Hatchig rate       | 9.1                    | 2.3     | this study               |
|                              |          | Survival           | 9.1                    | 2.3     | this study               |
| <i>Pagrus major</i>          | 8weeks   | Growth(l.)         | 0.0036                 | 0.00097 | this study               |
|                              |          | Survival           | 0.029                  | 0.0036  | this study               |
| <i>Pagrus major</i>          | 8weeks   | Ht                 | 0.52                   | 0.112   | this study               |
|                              |          | RBC, Hb            | 1.59                   | 0.66    | this study               |
|                              |          | Survival           | 1.59                   | 0.66    | this study               |

いて、既報の評価項目と毒性値とともに取りまとめ、評価項目の感度等について比較を試みた。

TBTO : TBTO についての本研究で得られた慢性毒性値を既報値とともに取りまとめたものが Table 2.4-1 である。これまでの報告では、血液性状、組織観察、成長を指標にして毒性値が求められている。これらの毒性値の中では、マダイを用いて成長を評価項目とした場合に最も低い慢性毒性値 LOEC :

0.0036 $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.00097 $\mu$ g TBT/L が得られた。また、評価項目別に慢性毒性値を比較すると、成長で LOEC : 0.0036 ~ 3.2 $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.00097 ~ 1.3 $\mu$ g TBT/L, 生残で LOEC : 0.029 ~ 9.1 $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.0036 ~ 2.3 $\mu$ g TBT/L, 生残で LOEC : 0.029 ~ 9.1 $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.0036 ~ 2.3 $\mu$ g TBT/L, 組織観察で LOEC : 0.32 ~ 1.59 $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.1 ~

Table 2.4-2. Previous reported LOEC and NOEC of TPTC estimated with growth, survival, hematological and histopathological parameters in fish

| Species                      | Duration | Effect measurement | LOEC ( $\mu$ g TPT /L) | NOEC       | Ref.               |
|------------------------------|----------|--------------------|------------------------|------------|--------------------|
| <b>Freshwater fish</b>       |          |                    |                        |            |                    |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | 110days  | Growth(wt.)        | >1.2                   | $\geq$ 1.2 | Vries et al., 1991 |
| <b>Saltwater fish</b>        |          |                    |                        |            |                    |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | 8weeks   | Growth(l., wt.)    | 2.2                    | 0.7        | this study         |
|                              |          | Survival           | 3.7                    | 2.2        | this study         |
| <i>Pagrus major</i>          | 8weeks   | Survival           | 1.9                    | 0.34       | this study         |
|                              |          | Growth(wt.)        |                        | >0.34      | this study         |
| <i>Pagrus major</i>          | 8weeks   | Ht, Hb             | 2.94                   | 1.06       | this study         |

Table 2.4-3. Previous reported LOEC and NOEC of Cd estimated with growth, survival, hematological and histopathological parameters in fish

| Species                      | Duration                  | Effect measurement | LOEC ( $\mu$ g/L) | NOEC        | Ref.                                |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|-------------|-------------------------------------|
| <b>Freshwater fish</b>       |                           |                    |                   |             |                                     |
| <i>Jordanella floridae</i>   | 100days                   | Spawning           | 8.1               | 4.1         | Spehar, 1976                        |
| <i>Jordanella floridae</i>   | 100days                   | Growth(l.)         | 31                | 16          | Spehar, 1976                        |
| <i>Lopomis macrochirus</i>   | 22days                    | Growth(l., wt.)    | 37.3              | <37.3       | Bryan et al., 1995                  |
| <i>Lopomis macrochirus</i>   | 22days                    | Feeding            | 37.3              | <37.3       | Bryan et al., 1995                  |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | 21days                    | RBC                | 12                | 4           | Lowe-Jinde and Niimi, 1986          |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i>   | 18weeks                   | Ht                 | 10                |             | Haux and Larsson, 1984              |
| <i>Pimephales promelas</i>   | 14day                     | Growth(wt.)        | >3                | 3           | Suedel et al., 1997                 |
| <i>Puntius conchoniis</i>    | 30days                    | RBC, Hb            | 630               | <630        | Gill and Pant, 1985                 |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | 8weeks                    | Hb                 | >6.35             | $\geq$ 6.35 | Christensen et al., 1977            |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | 2nd generation<br>16weeks | Growth(wt.)        | 3.4               | 1.7         | Benoit et al., 1976                 |
| <b>Saltwater fish</b>        |                           |                    |                   |             |                                     |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | 7days                     | Growth(wt.)        | 1000              | 560         | Hutchinson et al., 1994             |
| <i>Pleuronectes flesus</i>   | 9weeks                    | RBC, Ht, Hb        | 6.2               | <6.2        | Johansson-Sjöbeck and Larsson, 1978 |
| <i>Pleuronectes flesus</i>   | 15days                    | Ht                 | 1000              | 100         | Larsson et al., 1976                |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | 8weeks                    | Abnormality        | 530               | 150         | this study                          |
|                              |                           | Growth(l., wt.)    | 2000              | 530         | this study                          |
|                              |                           | Survival           | 2000              | 530         | this study                          |
|                              |                           | Hatchig rate       | 2000              | 530         | this study                          |
| <i>Pagrus major</i>          | 8weeks                    | Growth(l., wt.)    | 50                | 27          | this study                          |
|                              |                           | Survival           | >84               | $\geq$ 84   | this study                          |
| <i>Pagrus major</i>          | 4weeks                    | RBC, Ht, Hb        | 370               | 60          | this study                          |

0.32 $\mu$ g TBT/L 及び血液性状で LOEC : 0.52 ~ 1.59  $\mu$ g TBT/L 及び NOEC : 0.112 ~ 0.66 $\mu$ g TBT/L であった。これらの評価項目の中では、成長が最も感度がよく、生残、組織観察、血液性状の順であり、組織観察は血液性状と同程度であった。魚種間について感受性の比較を行うと、マダイ、マミチヨグ、guppy (*Poecilia reticulata*), ヒメダカ (*Oryzias latipes*) 及びニジマス (*Oncorhynchus mykiss*), sheepshead minnow の順であり、総じて海水魚のほうが TBTO に対する感受性が高い傾向が認められた。

TPTC : TPTC について得られた本研究における慢性毒性値を既報の毒性値とともに取りまとめたものが Table 2.4-2 である。これらの毒性値の中では、マダイの生残を指標とした場合に最も低い毒性値 LOEC : 1.9 $\mu$ g TPT/L 及び NOEC : 0.34 $\mu$ g TPT/L が得られていた。評価項目別に慢性毒性値を比較すると、生残の LOEC : 1.9 ~ 3.7 $\mu$ g TPT/L 及び NOEC : 0.34 ~ 0.7 $\mu$ g TPT/L, 成長の LOEC : > 1.2 ~ 2.2 $\mu$ g TPT/L 及び NOEC : 0.7 ~  $\geq$  1.2 $\mu$ g TPT/L, 血液性状の LOEC : 2.94 $\mu$ g TPT/L 及び NOEC : 1.06  $\mu$ g TPT/L の順に値が大きくなる傾向があったが、極端な感受性の差異は認められなかった。魚種間の感受性については、マダイが比較的感受性が高く次いで、マミチヨグ、ニジマスの順であったが、魚種間の感度の差異は小さい傾向にあった。TPTC に関しては研究例が非常に少ないため、評価項目、魚種間の比較について検討するにはデータが乏しい状況にある。今後はより多くの魚種についての研究を進める必要があると考えられた。

Cd : Cd について得られた本研究における慢性毒性値を既報の毒性値とともに取りまとめたものが Table 2.4-3 である。これらの毒性値の中では、カワマスの成長を指標とした場合に最も低い毒性値 LOEC : 3.4 $\mu$ g/L 及び NOEC : 1.7 $\mu$ g/L, が得られていた。評価項目別に慢性毒性値を比較すると、成長の LOEC : 3.4 ~ 2000 $\mu$ g/L 及び NOEC : 1.7 ~ 560 $\mu$ g/L, 血液性状の LOEC : 6.2 ~ 630 $\mu$ g/L 及び NOEC : < 6.2 ~ < 630 $\mu$ g/L, 産卵で LOEC : 8.1  $\mu$ g/L 及び NOEC : 4.1 $\mu$ g/L, 摂餌で LOEC : 37.3  $\mu$ g/L 及び NOEC : < 37.3 $\mu$ g/L, 生残の LOEC : > 84 ~ 2000 $\mu$ g/L 及び NOEC :  $\geq$  84 ~ 530 $\mu$ g/L, 奇形の発症率で LOEC : 530 $\mu$ g/L 及び NOEC : 150  $\mu$ g/L, ふ化率及び生残で 2000 $\mu$ g/L 及び NOEC : 530 $\mu$ g/L の順に毒性値が大きくなる傾向が認められた。魚種間の感受性の差異については、カワマスが最も感受性が高く、flounder (*Pleuronectes flesus*), flagfish (*Jordanella floridae*), ニジマス, bluegill (*Lepomis macrochirus*), マダイ, マミチヨグ, (*Puntius conchonius*) の順であった。淡水魚と海水魚との感受性を比較すると、総じて淡水魚の感受性が高い傾向が認められた。重金属の淡水魚と海水魚に対する毒性は、前者で高いことが報告 (小山, 1997) されており、そこで推測されているように海水中のカルシウム等の硬度成分と重金属が拮抗作用を示したため、海水魚に対する NOEC, LOEC が淡水魚に比較して高くなったものと考えられた。また、淡水魚について成長と血液性状の評価項目としての感度については、成長の LOEC : 3.4 ~ 37.3 $\mu$ g/L 及び NOEC : 1.7 ~ <

Table 2.4-4. Previous reported LOEC and NOEC of Nap estimated with growth, survival, hematological and histopathological parameters in fish

| Species                        | Duration   | Effect measurement | LOEC ( $\mu$ g/L) | NOEC ( $\mu$ g/L) | Ref.                        |
|--------------------------------|------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| <b>Freshwater fish</b>         |            |                    |                   |                   |                             |
| <i>Oncorhynchus kisutch</i>    | 40days     | Growth(l, wt.)     | 670               | 370               | Moles et al., 1981          |
| <i>Pimephales promelas</i>     | 30days     | Growth             | 850               | 450               | DeGraeve et al., 1982       |
| <b>Saltwater fish</b>          |            |                    |                   |                   |                             |
| <i>Menidia beryllina</i>       | 7,8days    | Abnormality        | -                 | 550               | Middaugh et al. 1988        |
| <i>Micropogonias undulatus</i> | 5,8weeks   | GSI                | $\leq$ 500        |                   | Thomas and Budiantara, 1995 |
| <i>Oncorhynchus gorboscha</i>  | 30days     | Growth(wt.)        | 380               | 120               | Moles et al., 1981          |
| <i>Fundulus heteroclitus</i>   | 8weeks     | Survival           | 120               | 48                | this study                  |
|                                |            | Hatchig rate       | 480               | 120               | this study                  |
|                                |            | Growth(l, wt.)     | 31                | 7.4               | this study                  |
| <i>Pagrus major</i>            | 8weeks     | Survival           | >31               | $\geq$ 31         | this study                  |
|                                |            | RBC, Ht            | 800               | 210               | this study                  |
| <i>Pagrus major</i>            | 2,4,8weeks | Hb                 | 2420              | 800               | this study                  |



37.3 $\mu\text{g/L}$ , 血液性状の LOEC :  $> 6.35 \sim 630\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $\geq 6.35 \sim < 630\mu\text{g/L}$  であり, 血液性状は成長に次いで比較的感度良く Cd の影響を評価できるようであった。一方, 海水魚については, 成長の LOEC :  $50 \sim 2000\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $27 \sim 560\mu\text{g/L}$ , 血液性状の LOEC :  $6.2 \sim 370\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $< 6.2 \sim 60\mu\text{g/L}$  であり, 血液性状の感度が良いようであった。なおマダイについては, 成長に対する NOEC, LOEC が  $50, 27\mu\text{g/L}$  であり, 同様に血液のそれら  $370, 60\mu\text{g/L}$  よりは低く, 成長の感度が高かった。

**Nap** : Nap について得られた本研究における慢性毒性値を既報の毒性値とともに取りまとめたものが Table 2.4.4 である。これらの毒性値の中では, 成長で LOEC :  $31 \sim 850\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $7.4 \sim 450\mu\text{g/L}$ , 生残の LOEC :  $> 31 \sim 120\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $\geq 31 \sim 48\mu\text{g/L}$ , 血液性状で LOEC :  $800\mu\text{g/L}$  及び NOEC :  $210\mu\text{g/L}$  の順に毒性値が大きくなる傾向が認められた。魚種間の感受性については, マダイが最も高く, マミチヨグ, pink salmon (*Oncorhynchus gorbusha*), Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), ニジマス, bluegill の順であった。淡水魚と海水魚との感受性を比較すると, 総じて海水魚の感受性が高い傾向が認められた。

淡水魚に比較して, 海水魚の方が総じて毒性値が低く, 各種化学物質に対する感受性が高い傾向を示す原因のひとつには, 海水魚が浸透圧調節のために積極的に海水を飲み, 濃い尿を排出し, 体内の水分保持を行っていることも関連があるのではないかと考えられた。一般的に, 化学物質が魚体内に取り込まれる経路には, 鰓からの取り込み及び消化管からの取り込みが考えられている。魚類は呼吸を鰓により行っておりことから淡水魚も海水魚も最も影響を受けやすい組織器官が鰓であり, このことは TBTO による暴露試験において, 淡水魚のニジマス (Hall et al., 1988), 海水魚のマミチヨグ (Pinkney, et al., 1989) の鰓組織の損傷を報告している。鰓以外にも TBTO 暴露により広範の表皮の細胞死も観察されている (清水 私信) ことから, 飲み込んだ海水に含まれる化学物質が消化管の上皮に影響を及ぼすことも十分に考えられる。本研究においても, マダイ及びマミチヨグを用いた急性毒性試験において, 無給餌試験を実施しているにもかかわらず, 白色の糞 (消化管上皮が剥離したものと考えられる) の排泄が観察され, 消化管に何らかの影響があったことが推察された。これらのことから, 淡水魚に比

較して, 海水魚は鰓のみならず消化管等への影響も受けやすいことが考えられ, 各種組織器官への影響が重複しより強く毒性が発現しやすい可能性もあると推察された。

以上の結果から, Cd を除く TBTO, TPTC 及び Nap では, 海水魚に対する NOEC が淡水魚のそれに比較して低い場合が認められた。このことは, 淡水魚のみによる各種化学物質の環境影響評価を海域にまで広げることには無理があることを示しており, 海域においては海水魚による化学物質影響評価を実施する必要があることを示すものである。このことから海域の各種化学物質の影響評価には, 淡水魚の値を用いるのではなく, 海水魚を用いた毒性試験を実施して得られた毒性値を持って評価を行うこと重要性が改めて確認され, 受精卵から仔魚期にかけて小型水槽での飼育が困難な日本産の海水魚についても稚魚期の長期暴露試験を実施し成長等の評価項目により毒性値を求めれば, 慢性毒性値に準ずる毒性値を得ることができることが明らかとなった。また, 慢性毒性を評価する項目について TBTO 及び Nap については成長を指標とした場合, TPTC については成長または生残を指標とした場合, にもっとも低い LOEC 及び NOEC が得られ, Cd についても成長が有効な指標であることが明らかとなった。成長等を指標とした影響評価に比較して若干感度が劣るものの, 血液性状を評価項目として試験物質の毒性を調べることによって, 赤血球持酸素運搬に関連する機能や呼吸等生理学的影響についても有用な情報が得られることから, 血液性状も一つの有益な影響評価項目であると考えられた。また, 前項で TBTO と TPTC の毒性の違いに生物濃縮係数 (BCF) や取り込み速度等の関連や, Cd 及び Nap においても貧血の発症と試験物質の体内濃度との関連が示唆された。このことは, 各種化学物質の毒性発現に体内濃度との関連があることを類推させるものである。そこで, 次項以降で, 今回選定した試験物質について, 生物濃縮試験を実施し, 取り込み速度, 排泄速度, BCF 等を調べ, 試験魚の感受性差の原因について検討を加えることとした。

## 2.5. まとめ

本章においては, 海産魚を用いた各種化学物質に対する沿岸環境の影響評価に資することを目的として, 日本沿岸域で問題となっている化学物質である有機スズ化合物の TBTO 及び TPTC, 公害問題で問題となっていた Cd, さらに船舶の座礁事故等により突発的に発生する流出油の成分のひとつである



Nap を試験物質として選定し、まず、近年種苗生産技術の発達により実験魚として入手しやすく、我が国を代表する海水魚であるマダイを用いて急性毒性試験、稚魚の長期間暴露試験を実施した。さらに外国産の実験魚マミチヨグを用いて同様の試験を実施し、魚種間の感受性の比較を行った。さらには化学物質に鋭敏に影響されることが期待される血液性状による影響評価を行い、その有用性についてマダイを用いて検討した。その結果、急性毒性試験において試験魚としてマダイを用いることにより4種類の試験物質について感度良く影響を評価することが可能であった。マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験では成長を評価項目とすることにより感度良く試験物質の影響を評価できることが確認され、成長を評価項目としたマダイ稚魚を用いた慢性毒性試験を実施し、マダイは試験魚として非常に感受性が高く、また、稚魚の長期暴露試験を実施して、成長を指標とすることで感度良く化学物質の慢性影響を評価できることが明らかとなった。さらに試験魚として鋭敏なマダイを用いて、血液学的な影響評価についても検討を加えた結果、成長等を指標とした影響評価に比較して若干感度が劣るが、血液性状を評価項目として試験物質の毒性を調べることによって、赤血球が持つ酸素運搬に関連する機能や呼吸等生理学的影響についても有用な情報が得られることから、血液性状も一つの有益な影響評価項目であると考えられた。

マダイは、試験魚として各種化学物質に対する感

受性が高いことが明らかとなったが、ふ化仔魚の飼育が困難であり、また餌料の確保に労力を有する等の理由から、最も鋭敏な時期に毒性試験を行う初期生活段階毒性試験の試験魚には不向きである。そこで、物質毎に急性毒性値と慢性毒性値との比がほぼ一定である (Rand et al., 1995) ことを利用して、マミチヨグで求めた急性毒性値、及び次項で求めた慢性毒性値である NOEC 及び LOEC を用いて、感度良く調べることができるマダイの急性毒性値を用いてマミチヨグで求めた急性慢性毒性比を用いてマダイの慢性毒性値の推定の可能性についても次項以降で検討を加える。さらに、血液性状への影響の発現に関して、試験物質の体内濃度との関連が示唆され、また、マダイがマミチヨグに比較して感度良く影響を評価できることに試験物質の体内濃度との関連性も考えられた。そこで、次項以降で、今回選定した試験物質について、生物濃縮試験を実施し、取り込み速度、排泄速度、生物濃縮係数 (BCF) 等を調べ、試験魚の感受性との関連について検討を加えることとした。

### 第3章 急性毒性値と慢性毒性値の比較 — 急性慢性毒性比の比較 —

これまでにマミチヨグ及びマダイ供試魚として急性毒性試験及び慢性毒性試験を種々の毒性試験を行った結果、マミチヨグの急性毒性値と慢性毒性値、マダイの急性毒性値と慢性毒性値 (稚魚長期暴露試

Table 3-1. Chronic toxicity and ACR of four chemicals for red sea bream and mummichog

| Chemicals     | NOEC     | LOEC    | MATC    | ACR |
|---------------|----------|---------|---------|-----|
|               | μg/L     |         |         |     |
| red sea bream |          |         |         |     |
| TBTO          | 0.00097* | 0.0036* | 0.0019* | 670 |
| TPTC          | 0.34**   | 1.9**   | 0.80**  | 120 |
| Cd            | 27       | 50      | 37      | 18  |
| Nap           | 7.4      | 31      | 15      | 44  |
| mummichog     |          |         |         |     |
| TBTO          | 0.010*   | 0.090*  | 0.030*  | 430 |
| TPTC          | 0.7**    | 2.2**   | 1.2**   | 61  |
| Cd            | 530      | 2000    | 1000    | 31  |
| Nap           | 48       | 120     | 76      | 78  |

\* : expressed as μgTBT /L  
\*\* : expressed as μgTPT /L

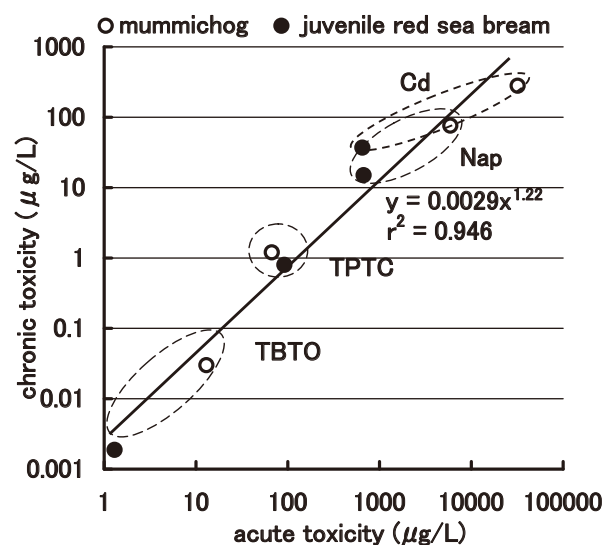


Fig. 3-1. The relationship between acute and chronic toxicity values for mummichog and juvenile red sea bream.

験で得られた値、以下、慢性毒性値と呼ぶ)を得ることができた。これら急性毒性値と慢性毒性値の比である急性慢性毒性比(ACR, Acute-to-Chronic Toxicity Ratio)は物質ごとにほぼ一定の値を示すことが知られている(Rand et al., 1995)が、同様のことがマミチヨグあるいはマダイにも当てはまるのかは明らかではない。ACRが一定という考え方がマミチヨグあるいはマダイに適用できれば、例えばマミチヨグのような急性毒性試験及び慢性毒性試験の両方が実施できる海産魚の毒性値から求めたACRを用いて、種々の海産魚の急性毒性値から、慢性毒性値の推測が可能となる。そこで、マミチヨグ及びマダイの急性毒性値と慢性毒性値の間にどのような関係があるか検討した。

### 3.1. 試験方法

マダイ及びマミチヨグで求めたTBTO, TPTC, Cd及びNapこれら4種類の試験物質に対し、もっとも鋭敏に影響を把握できた項目から得られたLOEC及びNOECを用い、その幾何平均である最大許容濃度(MATC, Maximum Acceptable Toxicant Concentration,  $NOEC \times LOEC$ の平方根)を算出した。このMATCでマダイの急性毒性値である96hrLC50, TBTO:  $1.3\mu\text{g TBT/L}$ , TPTC:  $92\mu\text{g TPT/L}$ , Cd:  $650\mu\text{g/L}$ , Nap:  $670\text{ /L}$ , 及びマミチヨグの急性毒性値である96hrLC50, TBTO:  $13\mu\text{g TBT/L}$ ,  $67\mu\text{g TPT/L}$ ,  $32000\mu\text{g/L}$ 及び $5900\mu\text{g/L}$ (角埜・清水, 2002)をそれぞれ除してACRを求めた。

### 3.2. 結果

マダイ及びマミチヨグで求めた成長を指標とした場合の慢性毒性値であるLOEC及びNOECから求めたMATC並びにMATCを急性毒性値で除したACRを求めてTable 3-1に示した。TBTOについてのACRは両魚種ともに高い傾向を示したのに対して、CdのACRは両魚種ともに最も小さかった。魚種間の比較では、TBTOについてはマダイとマミチヨグのACRの比は1.6倍、TPTCではほぼ2倍、Cdでは1.7倍、Napでは1.8倍であり、両魚種間のACRは近似した値をとっていた。これらの結果からマダイとマミチヨグのACRは、物質間での差異が2倍以内と小さく、ほぼ一定であることが明らかとなった。

### 3.3. 考察

本研究において得られた急性毒性値である

96hrLC50及び慢性毒性値であるMATCの関係をFig.3-1に示した。両者の比、つまり96hrLC50をMATCで除した値がACRとなる。マダイの毒性値とマミチヨグの毒性値について、急性毒性値と慢性毒性値とを比較すると、Fig. 3-1に示すように両魚種の毒性値の絶対値は異なるものの、これらの値が同一直線に回帰でき、マミチヨグ急性、慢性毒性値とマダイ急性毒性値から、マダイ慢性値の大まかな推定が可能であることを示している。全体ではその値ACR値はTBTOでは100を越え、TPTC, Cd及びNapでは10から100の間であり、総じて100前後に分布することが明らかとなった。また、Fig.3-1において、TBTOの各毒性値は左下、TPTCが中程、CdとNapが図の右上に分布しており、試験物質毎に1つのグループを形成している傾向が伺える。これらの結果からACRは魚種に関係なく、物質ごとに一定の値であるという考え方はマミチヨグおよびマダイにも適用可能であると考えられた。

また、既報の急性毒性値及び慢性毒性値をTable 3-2に示した。評価項目によっては影響を検出する感度が異なるために、得られる慢性毒性値に差異が生じ、計算に用いる慢性毒性値によりACRの値も変動する。本研究結果においても、マミチヨグにおけるCdの慢性影響評価の場合、奇形率を指標として得られた慢性毒性値(MATC):  $280\mu\text{g/L}$ を用いて算出したACRは110であるのに対し、成長を指標として得られた慢性毒性値(MATC):  $1000\mu\text{g/L}$ を用いて算出したACRは31であった。本研究結果ではマミチヨグにおいて奇形率も慢性影響を感度良く検出できたが、既報の慢性毒性値においてはTable 3-2に示すように評価項目により得られる慢性毒性値に差異が生じることが確認された。種々の影響評価項目の中で成長は感度良く慢性毒性値を求めることができるが、本研究で、Cdの慢性毒性値が奇形率によってもより感度良く検出できたことから、種々の評価項目を用いて多角的に慢性影響を評価する必要があることも明らかとなった。

これまでの研究ではACRについて田端(1979)がとりまとめを行っており、Table 3-3はその値を抜粋してまとめたものである。田端(1979)はこれらの値から淡水魚について種々の化学物質についてのACRを示し、その逆数を適応係数(application factor)として化学物質の分類を行っている。この適応係数は米国の水質基準(NAS and NAE, 1974)における96hrLC50に乗すべき係数であり、この値を用いて水質基準を定めている。彼の分類によると、

Table 3-2. Previous reported cute toxicity and MATC values of four chemicals for marine fish

| Chemicals   | Species  | 96hrLC50<br>( $\mu$ g/L) | MATC<br>( $\mu$ g/L) | Toxic effects                     | Reference  |
|---|--|--------------------------|----------------------|-----------------------------------|--|
| TBTO*   | Bleak ( <i>Alburnus alburnus</i> )                         | 15 <sup>+</sup>          |                      |                                   | Linden et al., 1979                                  |
|   | Chinook salmon<br>( <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> )      | 1.5                      |                      |                                   | Short & Thrower, 1987                                |
|   | Fork tongue goby<br>( <i>Chasmichthys dolichognathus</i> ) | 4                        | 0.1 <sup>++</sup>    | atrophy of thymus                 | Shimizu and Kimura, 1987<br>Shimizu and Kimura, 1992 |
|   | Girella ( <i>Girella punctata</i> )                        | 3.2                      |                      |                                   | Kakuno & Kimura, 1987                                |
|   | Inland silverside<br>( <i>Menidia beryllina</i> )          |                          | 0.093 <sup>++</sup>  | growth inhibition                 | Hall et al., 1988                                    |
|   | Mummichog<br>( <i>Fundulus heteroclitus</i> )              | 17.2                     |                      |                                   | Pinkney et al., 1989                                 |
|   |  |                          | 3.7                  | suppression of<br>spermatogenesis | Mochida et al., 2007                                 |
|   |  | <b>13</b>                | <b>0.030</b>         | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |
|   | Sheepshead minnow<br>( <i>Cyprinodon variegatus</i> )      | 16                       |                      |                                   | ECOTOX, 2007   |
|   |  |                          | 3.0                  | survival                          | Ward et al., 1981                                    |
|   |  |                          | 0.52                 |                                   | Manning et al., 1999                                 |
|   | Striped bass<br>( <i>Morone saxatilis</i> )                |                          | 0.067 <sup>++</sup>  | growth inhibition                 | Pinkney et al., 1990                                 |
|   | Red sea bream<br>( <i>Pagrus major</i> )                   |                          |                      | 0.66 <sup>++</sup>                | atrophy of thymus                                    |
|   |  |                          | 0.24                 | anemia                            | Kakuno and Koyama, 2004                              |
|   |  | <b>1.25</b>              | <b>0.0019</b>        | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |
| TPTC**  | Fork tongue goby   | 18                       |                      |                                   | Shimizu and Kimura, 1991                             |
|   | Mummichog  | <b>67</b>                | <b>1.2</b>           | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |
|   | Pink salmon<br>( <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> )           | 1200                     |                      |                                   | Korn et al., 1979                                    |
|   | Red sea bream  | <b>92</b>                | <b>0.80</b>          | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |
| Cd  | Atlantic silverside<br>( <i>Menidia menidia</i> )          |                          | 690                  | survival, growth<br>inhibition    | Voyer et al., 1979                                   |
|   | Coho salmon<br>( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )             | 1500                     |                      |                                   | Dinnel et al., 1989                                  |
|   | Flounder<br>( <i>Platichthys flesus</i> )                  |                          | 1410                 | survival, growth<br>inhibition    | Von Westerhagen and<br>Dethlefsen, 1975              |
|   | Mummichog  | 1300                     |                      |                                   | Voyer et al., 1975                                   |
|   |  | 55000 <sup>+</sup>       |                      |                                   | Eisler, 1971   |
|   |  | <b>32000</b>             | <b>1000</b>          | <b>abnormality</b>                | <b>present study</b>                                 |
|   | Red sea bream  | 650                      |                      |                                   | Koyama et al., 1992                                  |
|   |  |                          | 149                  | anemia                            | Kakuno and Koyama, 2004                              |
|   |  | <b>650</b>               | <b>37</b>            | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |
|   | Sheepshead minnow  | 180.3                    |                      |                                   | ECOTOX, 2007   |
|   |  | 50000 <sup>+</sup>       |                      |                                   | Eisler, 1971   |
|   |  |                          | 750                  | survival, growth<br>inhibition    | Hutchinson et al., 1994                              |
|   |  | 150                      |                      | Meteyer et al., 1988              |  |
| Shiner perch<br>( <i>Cymatogaster aggregata</i> ) |  | 11000 <sup>+</sup>       |                      |                                   | Dinnel et al., 1989                                  |
|   | Striped killifish<br>( <i>Fundulus majalis</i> )           | 21000 <sup>+</sup>       |                      |                                   | Eisler, 1971   |
|   | Nap  | Mummichog                | <b>5900</b>          | <b>76</b>                         | <b>growth inhibition</b>                             |
| Red sea bream                                     |  |                          | 41                   | anemia                            | Kakuno and Koyama, 2004                              |
|   |  | <b>670</b>               | <b>15</b>            | <b>growth inhibition</b>          | <b>present study</b>                                 |

\* : Toxicity values of TBTO were expressed as  $\mu$ g TBT/L.\*\* : Toxicity values of TPTC were expressed as  $\mu$ g TPT/L.

+ : Nominal concentration.

++ : LOEC.

Table 3-3. Comparisons of acute subchronic and chronic toxicity test (Tabata, 1979)

| Chemical                  | Species                       | 96hLC50<br>( $\mu$ g/L) | MATC<br>( $\mu$ g/L) | ACR  | Application<br>factor<br>(1/ACR) | Reference                    |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------|------|----------------------------------|------------------------------|
| Hydrogen cyanide          | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 94                      | 8.3                  | 11   | 0.088                            | Konedt et al, 1997           |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 120                     | 5.1                  | 24   | 0.042                            | Lind et al, 1977             |
| Lead                      | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 3360                    | 57                   | 59   | 0.017                            | Holcombe et al, 1976         |
|                           | <i>Oncorhynchus mykiss</i>    | 1170                    | 5.6                  | 210  | 0.0048                           | Davis et al 1976             |
| Chromium                  | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 59000                   | 265                  | 223  | 0.0045                           | Benoit, 1976                 |
|                           | <i>Oncorhynchus mykiss</i>    | 69000                   | 261                  | 265  | 0.0038                           | Benoit, 1976                 |
| Copper                    | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 100                     | 13                   | 8    | 0.13                             | McKim and Benoit, 1971       |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 84                      | 14                   | 6    | 0.17                             | Mount and Stephan, 1969      |
|                           | <i>Lopomis macrochirus</i>    | 1100                    | 29                   | 38   | 0.026                            | Benoit 1975                  |
| Zinc                      | <i>Jordanella floridae</i>    | 1500                    | 36                   | 41   | 0.024                            | Spehar, 1976                 |
|                           |                               |                         |                      |      |                                  |                              |
| Cadmium                   | <i>Pimephales promelas</i>    | 7200                    | 46                   | 157  | 0.0064                           | Pickering and Gast, 1972     |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 1500                    | 16                   | 96   | 0.0104                           | Carlson, 1971                |
|                           | <i>Lopomis macrochirus</i>    | 20400                   | 50                   | 410  | 0.0024                           | Eaton, 1974                  |
|                           | <i>Jordanella floridae</i>    | 2500                    | 5.8                  | 434  | 0.0023                           | Spehar, 1976                 |
| Methylmercury chloride    | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 75                      | 0.52                 | 144  | 0.0069                           | Mckim et al., 1976           |
|                           | <i>Oncorhynchus mykiss</i>    | 31                      | 0.012                | 2583 | 0.00039                          | Matida et al, 1972           |
| Linear alkylate sulfonate | <i>Pimephales promelas</i>    | 4350                    | 869                  | 5    | 0.20                             | Pickering and Thatcher, 1970 |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 3400                    | 742                  | 5    | 0.22                             | McKim et al, 1975            |
|                           | <i>Esox lucius</i>            | 3700                    | 775                  | 5    | 0.21                             | McKim et al, 1975            |
| Atrazine                  | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 4900                    | 88                   | 55   | 0.018                            | Macek et al, 1976b           |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 15000                   | 427                  | 35   | 0.028                            | Macek et al, 1976b           |
|                           | <i>Lopomis macrochirus</i>    | 6700                    | 218                  | 31   | 0.033                            | Macek et al, 1976b           |
| Lindane                   | <i>Salvelinus fontinalis</i>  | 26                      | 12                   | 2    | 0.46                             | Macek et al, 1976a           |
|                           | <i>Pimephales promelas</i>    | 69                      | 15                   | 5    | 0.21                             | Macek et al, 1976a           |
|                           | <i>Lopomis macrochirus</i>    | 30                      | 11                   | 3    | 0.36                             | Macek et al, 1976a           |
| Malathion                 | <i>Pimephales promelas</i>    | 9000                    | 341                  | 26   | 0.038                            | Mount and Stephan, 1967      |
|                           | <i>Lopomis macrochirus</i>    | 110                     | 5.2                  | 21   | 0.047                            | Eaton, 1970                  |
| PCP-Na                    | <i>Oncorhynchus nerka</i>     | 63                      | 1.7                  | 37   | 0.027                            | Webb and Brett, 1973         |
|                           | <i>Plecoglossus altivelis</i> | 68                      | 2.6                  | 26   | 0.038                            | Matida et al, 1970           |



本研究でも試験物質として毒性試験を行った Cd は適応係数が 0.003 群の物質に分類されており、このことからその 0.003 の逆数である ACR は 333 となり淡水魚において慢性毒性値は急性毒性値の 333 分の 1 程度の値を示すことを意味している。本研究で海水魚を試験魚として求めた ACR はマダイでは 18、マミチヨグでは 31 であり、田端の報告した値と大きく異なっていた。Cd という単独の物質についての結果であるが、淡水魚と海水魚の ACR には差があることが示唆された。

Leung et al. (2001) は、海水の生物における毒性値を淡水の生物の毒性値から推定可能か検討を行った結果、生物の持つ化学物質に対する感受性の違いから推測が難しいことを述べており、さらに、急性毒性値からの慢性毒性値の推定には海水魚の ACR を用いる必要があることを Voyer et al. (1975) が指摘している。マダイはわが国を代表する海水魚であり、各種試験物質に対して感受性も高く、また、広く種苗生産が実施されていることから試験魚としても入手しやすい。しかし、マダイの種苗は数十 t 規模の大型水槽により数百万粒の受精卵を用いて生産されており、熟練した担当者が携わっても受精卵からの飼育を開始して 50 数日後の生残率は 30% 程度（藍ら、2005）である。マダイの卵を小型水槽に収容し、ふ化仔魚にワムシ、アルテミア等の餌料生物を与えながら数週間、死亡率を低く保つことは難しく、したがって初期生活段階毒性試験を行うことはかなり困難であり、さらに、受精卵から再生産に至るまで 4 年程度の全生活間毒性試験の実施は不可能といっても過言ではない。そこで、急性毒性試験では感度良く毒性値を得ることができるが、受精卵からの飼育が困難なため初期生活段階毒性試験が実施できないマダイについての慢性毒性値を推定する方法を検討するために、マダイとマミチヨグを試験魚として ACR が試験物質ごとにほぼ一定か否かを調べた。その結果、Fig. 3-1 に示すように、両魚種の ACR が近似しており、マミチヨグの ACR とマダイの急性毒性値からマダイの慢性毒性値が推定できることが明らかとなった。このことから、ある魚種の急性毒性値及び慢性毒性値が明らかとなっている場合に急性毒性値を慢性毒性値で除して ACR を算出し、別の魚種で求めた急性毒性値を先の ACR で除して慢性毒性値を推定することの可能性が示された。特に、日本の海水魚ではその飼育の困難さのために慢性毒性試験の実施例が極めて少なかったことから、この ACR を用いた慢性毒性値の推定の可能性が示された意義は大きいと考える。

#### 第 4 章 生物濃縮試験及び臨界体内濃度による感受性の検討

##### —海水魚マミチヨグ及びマダイに対する 4 種の環境汚染物質の生物濃縮性と毒性との関連—

各種汚染物質の毒性については多くの報告例があり、またその値は広範にわたっている。魚類だけについても汚染物質に対する急性毒性値は魚種によって著しく異なっている。汚染物質に対する毒性値の違いは、汚染物質に対する生物の感受性差に起因すると表現されており、この感受性差が何に起因するのかについては、種々の研究がなされているが未だに十分には明らかにされてはいない。体内に速やかに取り込まれるベンゼン類、PAH 類等の物質については、その急性毒性は発現の形態により種々の分類がなされている (McKim et al., 1987a; McKim et al., 1987b; Bradbury et al., 1989; Bradbury et al., 1991)。また、毒性の発現と生物体内の濃度とは密接に関連する (Rand et al., 1995) ことも知られており、臨界体内残留量 (CBR, Critical Body Residue) から死亡の原因を説明する研究 (McCarty et al., 1992; McCarty and Mackay, 1993) がなされている。

本研究においては、その使用が禁止されているが極めて強い毒性を示す代表的な有機スズ化合物である酸化トリブチルスズ (TBTO) 及び塩化トリフェニルスズ (TPTC)、古典的な汚染物質であるカドミウム (Cd)、現在も海洋汚染で問題となる流出油の主成分の一つである多環芳香族炭化水素のナフタレン (Nap) を試験物質として選定し、これらについて日本において広く種苗生産がなされ、また、水産業においても重要な海水魚種であり、環境省が生態毒性試験魚として推奨しているマダイ (*Pagrus major*) と、環境モニタリング等広く生物学的試験に利用され、我々の研究室で毒性データが豊富なアメリカ東海岸原産の海産のメダカ的一种、マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) を試験生物として選定し、急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施した。その結果、試験物質ごとの急性毒性値と慢性毒性値の比である急性慢性毒性比 (ACR) は近似していたが、マダイとマミチヨグの急性あるいは慢性毒性値が大きく異なっていた。そこで、ここではこの試験物質に対するマダイ及びマミチヨグの毒性値の差異が試験物質の体内残留量に密接に関連するとの仮説を立て、本研究を実施した。本研究では、これまでに毒性試験を実施してきた 4 種類の試験物質について、先ず体内へどれだけ蓄積しやすいのかを明らかにす

るために生物濃縮試験を実施した。生物濃縮試験よりもとめた生物濃縮係数 (BCF, Bioconcentration factor), 吸収速度定数 ( $k_1$ ) 及び排泄速度定数 ( $k_2$ ) と毒性値の関連について検討を加えた。さらに, 急性毒性値及び BCF から CBR を算出して, 急性毒性試験において死亡した個体中の試験物質濃度との比較等を行い仮説の検証を行った。

#### 4.1. 試験方法

**試験生物:** マミチヨグ稚魚は瀬戸内海区水産研究所で飼育中の個体を試験に供した。マダイ稚魚は, アーマリン近大から購入した個体を試験に供した。Table 4-1 に示すように試験開始時の試験魚の体重はそれぞれ, マミチヨグでは TBTO で  $0.87 \pm 0.15\text{g}$ , TPTC で  $0.92 \pm 0.12\text{g}$ , Cd で  $1.8 \pm 0.1\text{g}$ , Nap で  $0.80 \pm 0.15\text{g}$ , マダイでは Cd で  $2.7 \pm 0.3\text{g}$ , Nap で  $1.2 \pm 0.2\text{g}$  であった。

**試験物質:** 試験した化学物質は, 酸化トリブチルスズ (TBTO; Bis (tributyltin) oxide, 純度 96%, MW 290.036, Sigma-Aldrich Corporation, USA, MO), 塩化トリフェニルスズ (TPTC; Triphenyltin chloride, 純度 >98%, MW 350.0068, 和光純薬工業株式会社, 大阪), 塩化カドミウム ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , 以下 Cd と略記, 純度 >98%, Cd として MW 112.4, 和光純薬工業株式会社, 大阪), さらに, ナフタレン (以下 Nap と略記, 純度 >99%, MW 128.164, 和光純薬工業株式会社, 大阪), 以上 4 物質である。

**急性毒性試験:** 生物濃縮試験に先立ち, マミチヨグ及びマダイを用いた急性毒性試験を流水式試験装置により実施した (Kakuno et al., 2009)。詳細は前出の 2. 1. 急性毒性試験に記載した。試験期間中の死亡魚は取り上げ, 試験物質の体内濃度分析のためのサンプルとした。試験開始 24 時間後及び試験終了直前に採水した海水試料について, 試験物質の濃度を測定した。死亡率及び測定濃度の平均値からプロビット法により 96 時間半数致死濃度を求めた。求めた急性毒性値は生物濃縮試験における濃度設定の参考とした。96 時間半数致死濃度 (Kakuno et al., 2009) 及び以下に述べる生物濃縮試験で求めた生物濃縮係数から, 後述する式により臨界体内残留量 CBR を算出した (McCarty et al., 1992)。

**マミチヨグを用いた生物濃縮試験:** 試験濃度は, 急性毒性試験で得たマミチヨグの 96 時間半数致死濃度及び Yamada and Takayanagi (1992) 等を参考に, TBTO では  $0.12\mu\text{g TBT /L}$ , TPTC では  $0.12\mu\text{g TPT /L}$ , Cd では  $0.1\text{ mg/L}$ , Nap では  $0.2\text{mg/L}$

に設定した。被検物質の TBTO 及び TPTC はジメチルスルフォキシド (DMSO, 和光純薬工業株式会社, 大阪) に溶解後, 塩化カドミウムは蒸留水に溶解後, Nap はアセトン (残留農薬試験用 300, 和光純薬工業株式会社, 大阪) 1 容に溶解しさらに 9 容の医薬用硬化ひまし油 (HCO-40, 日光ケミカルズ株式会社, 東京) を添加混合した後, それぞれ所定量を水道水に添加して試験液を作製した。この試験液をガラス製定量ポンプ (Glass Pump GMW-A, 東京理東京理化器械株式会社, 東京) により一定の流量で試験水槽に注入し, 同時に  $20^\circ\text{C}$  に調温した活性炭ろ過海水も各水槽に注入し所定の濃度となるように設定した。各試験水槽にマミチヨグ稚魚を収容し, Table 4-1 に示すように TBTO, TPTC 及び Cd で 8 週間の取込試験に続き清浄海水に移し 4 週間の排泄試験を, Nap の試験では 2 週間の取込試験の後清浄海水に移し 1 週間の排泄試験をそれぞれ実施した。試験期間中は通気を行い試験水の溶存酸素濃度の低下を防止するとともに, 体重の 1%量の協和発酵製海水魚用初期飼料を毎日与えた。3 尾ずつ供試魚をサンプリングし, MS222 (meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) の  $500\text{mg/L}$  の海水溶液により麻酔して体重測定の後, 体内の試験物質濃度の測定を行った。試験期間中は水中の試験物質濃度の測定を 2 週毎に行った。

**マダイを用いた生物濃縮試験:** マダイの TBTO 及び TPTC 生物濃縮データは, Yamada and Takayanagi (1992) の結果を用いた。一方, Cd 及び Nap についてはマダイを用いて生物濃縮試験を実施した。試験濃度は小山ら (1992) のマダイにおける Cd の急性毒性値及び本研究のマダイを用いて実施した急性毒性の結果を参考に Cd では  $0.1\text{mg/L}$ , Nap では  $0.05\text{mg/L}$  に設定した。暴露方法はマミチヨグと同様で, Table 4-1 に示すように Cd では 8 週間の取込試験の後清浄海水に移し 6 週間の排泄試験を, Nap は 2 週間の取込試験の後清浄海水に移し 3 日間の排泄試験をそれぞれ実施した。3 尾ずつ供試魚をサンプリングし, MS222 (meta aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate, Sigma-Aldrich Corporation, MO, USA) の  $500\text{mg/L}$  の海水溶液により麻酔して体重測定の後, 体内の試験物質濃度の測定を行った。試験期間中は水中の試験物質濃度の測定を 2 週毎に行った。

##### 4.1.1. 分析方法

TBTO 及び TPTC: 試験水の TBT 及び TPT 分

析は、北九州市環境科学研究所（1998）及び岩村（1999）の方法に準じて以下の通り行った。試料 500mL にサロゲート溶液 100 $\mu$ L（26.7 $\mu$ g/L トリブチルスズクロライド（TBTCI）-d<sub>27</sub>（林純薬工業株式会社，大阪）及び 413 $\mu$ g/L トリフェニルスズクロライド（TPTCI）-d<sub>15</sub>（林純薬工業株式会社，大阪）の混合 n-ヘキサン（ヘキサン 300 残留農薬試験用，和光純薬工業株式会社，大阪）溶液）及び pH5 に調整した 2M 酢酸-酢酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社，大阪）緩衝液 10mL を添加攪拌後，誘導化剤である 10%テトラエチルホウ酸ナトリウム（NaBEt<sub>4</sub>，Strem Chemicals，Newburyport，MA，USA）1mL を加え 20 分間振とう混和した。ヘキサン 100mL を加え 10 分振とう混和し，ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム（残留農薬・PCB 試験用，和光純薬工業株式会社，大阪）で脱水した後 200mL 容量のターボバップ用の濃縮管に採取した。ヘキサン分取後の水層にさらにヘキサン 50mL を添加，10 分間の振とう混和後，ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水し，前のヘキサンと合わせた。ヘキサンは濃縮装置（Turbo Vap II，Zymark Corp.，Hopkinton，MA，USA）で約 0.5mL まで濃縮した。ヘキサンでコンディショニングしたフロリジルカラム（Sep-Pak+ florisil，Waters，Milford，MA，USA）に濃縮液を添加し，5%ジエチルエーテル添加ヘキサン 6mL で溶出した。内標準混合溶液として 813 $\mu$ g/L のテトラブチルスズ -d<sub>36</sub> 及び 1020  $\mu$ g/L のテトラフェニルスズ -d<sub>20</sub> の混合ヘキサン溶液 100 $\mu$ L を添加，窒素気流下で 0.5mL まで濃縮し，GC/MS の試料とした。

魚体中の TBT 及び TPT については北九州市環境科学研究所（1998）方法及び岩村ら（2000）の方法に準じ，1 個体全てをホモジネートし，そこ

から分析サンプルとして秤量した 1g にサロゲート溶液（5.34ng TBTCI-d<sub>27</sub>，8.25ng TPTCI-d<sub>15</sub>）を 100 $\mu$ L 添加後，1M 臭化水素酸-メタノール/酢酸（1:1）を 15mL 添加し 30 分間振とう攪拌した。攪拌後，飽和 NaBr 溶液 20mL を入れた 100mL 分液ロートに No.5A ろ紙で吸引ろ過してろ液を採取し，酢酸エチル/ヘキサン（3:2）混液 5mL を添加 10 分間振とう抽出し，有機溶媒層を分取した。水層に再度酢酸エチル/ヘキサン（3:2）混合液 5mL を加えて 10 分間振とう抽出して有機溶媒層を分取し，前の有機溶媒と合わせた。有機溶媒は無水硫酸ナトリウムで脱水後，ロータリーエバポレータで 5mL まで濃縮した。濃縮液に乾固ないように窒素ガスを穏やかに吹き付けて溶媒を揮散させた後，残渣にエタノール 5mL を添加，溶解しこれを試料前処理液とした。試料前処理液は少量のエタノールにより洗い込んで 200mL 分液ロートに入れ，酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（pH5）5mL 及び蒸留水 10mL を添加混合後，10% NaBEt<sub>4</sub> 溶液 1mL を添加，10 分間振とうして誘導体化を行った。1MKOH-エタノール溶液 40mL を加えて 1 時間振とう・アルカリ分解後，蒸留水を 25mL 添加し，さらにヘキサン 40mL を添加して 10 分間振とう後ヘキサン層を分取した。水層にさらにヘキサン 40mL を加え 10 分間振とう後ヘキサン層を分取し，前のヘキサンを合わせた。ヘキサンは無水硫酸ナトリウムで脱水後，濃縮装置（Turbo Vap II，Zymark Corp.，Hopkinton，MA，USA）で 2mL に濃縮後，予めヘキサンでコンディショニングしたフロジリルカートリッジに負荷し流出液を回収した。カートリッジにさらに 5%ジエチルエーテル-ヘキサン 6mL を負荷し流出液を回収した。溶出液を合わせ，100 $\mu$ L の内標準混合溶液を添加後，N<sub>2</sub> で 1mL まで濃縮し GC/MS の試料とし

Table 4-1. Experiments on bioaccumulation and elimination on chemicals by mummichog and red sea bream

| Chemicals | Species       | Initial body weight (g) | Nominal concentration ( $\mu$ g/L) | Duration of experiment (week) |            |
|-----------|---------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------|
|           |               |                         |                                    | Exposure                      | Depuration |
| TBTO      | Mummichog     | 0.87 $\pm$ 0.15         | 0.1                                | 8                             | 4          |
| TPTC      | Mummichog     | 0.92 $\pm$ 0.12         | 0.1                                | 8                             | 4          |
| Cd        | Mummichog     | 1.8 $\pm$ 0.1           | 100                                | 8                             | 2          |
|           | Red sea bream | 2.7 $\pm$ 0.3           | 100                                | 8                             | 6          |
| Nap       | Mummichog     | 0.80 $\pm$ 0.15         | 150                                | 2                             | 1          |
|           | Red sea bream | 1.2 $\pm$ 0.2           | 50                                 | 2                             | 3-days     |



た。

キャピラリーカラムとして DB5-MS (長さ 30m, 0.25mmID, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を装着した GC/MS (Hewlett Packard 5890 series II and Hewlett Packard 5972 series, Palo Alto, CA, USA) 用い, 以下の条件で分析した。注入口の温度は 290℃ とし, 検出器の部分に 300℃ の温度をかけた。カラム温度は 60℃ で 2 分間保持した後, 20℃ / 分で 130℃ まで昇温, 引き続き 10℃ / 分で 210℃ まで昇温後, 5℃ / 分で 300℃ まで昇温し, 2 分間保持のプログラムによった。1 検体に要する分析時間は 30 分であった。SIM モードで TBT または TPT とそれぞれの d 体, TeBT-d<sub>36</sub>, TePT-d<sub>20</sub> を定量した。モニターイオン, 確認イオンはそれぞれ m/z で TBT : 263, 261, TPT : 313, 301, TBTCI-d<sub>27</sub> : 318, 316, TPTCI-d<sub>15</sub> : 366, 364, TeBT-d<sub>36</sub> : 318, 316, TePT-d<sub>20</sub> : 366, 364 とした。内標準物質で有機スズと d 体の定量値を補正後, 有機スズに対応する d 体の回収率で定量値を補正し, 標準試料を基準にして検量線を作成し濃度を計算した。

**Cd** : Cd の分析は JIS 工場排水試験法 (日本工業標準調査会, 1993) に準じて測定した。試験水の Cd は 0.45μm のミリポアフィルターでろ過したものを分析サンプルとした。魚体中の Cd 分析のための前処理は湿式灰化とし, 秤量した 1 個体全てについてその体重の 5 倍量の有害金属測定用硝酸 (和光純薬工業株式会社, 大阪) を添加して一晩放置した後, 120℃ のサンドバスより 4 時間加熱して完全に溶解させたものを分析サンプルとした。分析サンプルは Polarized Zeeman Atomic Absorption Spectrophotometer Z-8000 (Hitachi, Tokyo, Japan) に導入し, 空気-アセチレンバーナーによるフレイム法により定量した。

**Nap** : 試験水及び魚体中の Nap の分析は立石 (2000) の方法に準じた。試験水はサンプル 5 ないし 10mL を共栓試験管に取り, サロゲートとして 250ppb の d<sub>8</sub>-Naphthalene の混合溶液 50μL を加えた後 10mL のヘキサンを添加して 10 分間振とうし, Nap をヘキサンに転溶した後にヘキサン層を分取した。分取したヘキサンに 25ppm の d<sub>10</sub>-Fluorene 1.0μL を内標準物質として加えた後, 最終溶液を約 0.5mL に濃縮し GC-MS による分析に供した。

魚体サンプルの分析は以下の通りである。1 個体全てを分析サンプルとして 200mL 三角フラスコに取り, サロゲートとして 250ppb の d<sub>8</sub>-Naphthalene の混合溶液 100μL を添加した。これに, 1N 水酸化

カリウム/エタノール溶液 100mL を加え, ウォーターバス上 80℃ で一時間還流しアルカリ分解を行った。分解後, 溶液を 500mL の分液ロートに移して 100mL のヘキサン及び蒸留水を添加して 10 分間振とうし, Nap をヘキサンに転溶した。ヘキサン層を 100mL の蒸留水で 3 回水洗し, 濃縮後シリカゲルクリーンアップ (Supelclean LC-Si : 1g 6mL, SUPELCO INC. Bellefonte, PA, USA) を行った。シリカゲルを 10mL のヘキサンでコンディショニングし, 濃縮液をカラムに添加後, 9mL のヘキサンで Nap を溶出した。25ppm の d<sub>10</sub>-Fluorene 1.0μL を内標準物質として加えた後, 最終溶液を約 0.5mL に濃縮し GC-MS による分析に供した。

キャピラリーカラムとして DB5-MS, 30m, 0.25mmID (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を装着した GC/MS (Hewlett Packard 5890 series II and Hewlett Packard 5972 series, Palo Alto, CA, USA) 用い, SIM モードで以下の条件により分析した。注入口の温度は 280℃ とし, 検出器の部分に 300℃ の温度をかけ, 質量分析計のイオン源部分に 190℃ の温度を得た。カラム温度は 60℃ で 1 分間保持した後, 10℃ / 分で 120℃ まで昇温, 引き続き 5℃ / 分で 210℃ まで昇温後, 6℃ / 分で 300℃ まで昇温し, 10 分間保持した。分析時間は 50 分であった。

#### 4.1.2. 解析方法

**生物濃縮係数 (BCF, Bioconcentration Factor)** : 試験水と魚体中の被検物質濃度の測定結果から, (1-1) 式を用いて BCF を計算した。TBT 及び TPT は, 試験開始時の魚体から検出されなかったため BCF の計算において対照試験の魚体中濃度 (Cf<sub>0</sub>) で補正しなかった。

$$BCF = (Cf_1 - Cf_0) / Cw \quad (1-1)$$

BCF : 生物濃縮係数

Cf<sub>1</sub> : 平衡状態に達した時の試験区の魚体中の被検物質濃度

Cf<sub>0</sub> : 対照区の魚体中の被検物質濃度

Cw : 試験水の被検物質濃度

蓄積試験及び排泄試験における魚体中の被検物質濃度の経時変化を指数関数モデル ((1-2), (1-3) 及び (1-4)) に当てはめて, 取り込み速度定数 (k<sub>1</sub>), 排泄速度定数 (k<sub>2</sub>) 及び平衡状態での BCF (BCF<sub>eq</sub>) を算出した。



$$Cf_1 = (k_1 / k_2) Cw (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1-2)$$

$$Cf_2 = Cf_3 e^{-k_2 t} \quad (1-3)$$

$$BCF_{eq} = k_1 / k_2 \quad (1-4)$$

$Cf_1$  : 蓄積試験における魚体中の被検物質濃度

$Cf_2$  : 排泄試験における魚体中の被検物質濃度

$Cf_3$  : 排泄試験開始時における魚体中の被検物質濃度

$k_1$  : 取り込み速度定数

$k_2$  : 排泄速度定数

CBR : CBRは急性毒性試験により得られた96hrLC50及び生物濃縮試験により得られたBCFから以下の式により算出した。

$$CBR \text{ (mM)} = BCF \times 96hrLC50 \text{ (mM)}$$

#### 4.2. 結 果

生物濃縮係数 : マミチヨグの生物濃縮試験における試験物質の水中濃度はそれぞれTBTOが $0.063 \pm 0.011 \mu\text{g TBT/L}$ , TPTCが $0.075 \pm 0.014 \mu\text{g TPT/L}$ , Cdが $78 \pm 10 \mu\text{g/L}$ , Napが $133 \mu\text{g/L}$ であった。マミチヨグにおけるTBTO及びTPTCの濃度推移はFig.4-1に、マミチヨグにおけるCd及びNapの濃度推移はFig.4-2にそれぞれ示した。

マミチヨグではTBTO, TPTC及びCdの体内濃度は取込試験6週目に平衡状態に達していると考えられた。8週目以降、試験魚を清浄海水に移すと、TBTO, TPTC及びCdともに緩やかに体内濃度が低下した。NapについてはTBTO, TPTC及びCdと比較して速やかに体内濃度が上昇し、試験開始1日目から3日目で平衡状態に達しているようであった。排泄試験に移行後は体内からの排泄も速く、速やかに体内濃度が低下した。

マダイの生物濃縮試験における試験物質の水中濃度はそれぞれCdが $80 \pm 10 \mu\text{g/L}$ 及びNapが $31 \pm 8.2 \mu\text{g/L}$ であった。マダイにおけるCd及びNapの体内濃度の推移をFig.4-3にそれぞれ示した。マミチヨグと同様に、マダイにおいてもCdの体内濃度が平衡に達するまでには時間が掛かり、試験開始6週目で体内濃度は平衡に達していると考えられた。Napについては速やかに体内濃度が上昇し、試験開始1日目から3日目には体内濃度が平衡状態に達している途考えられた。また、排泄試験において試験魚を清浄海水に移すとNapの体内濃度は速やかに低下した。これらの濃度推移の結果から、TBTO, TPTC及びCdについては平衡状態に達したと考え

られた6週目の値を $Cf_1$ として、また、Napについては3日目の値を $Cf_1$ としてそれぞれコンパートメントモデルに当てはめて $k_1$ 及び $k_2$ を求めてBCFを算出し、既報のYamada and Takayanagi (1992)の値とともにTable 4-2にまとめて示した。

TBTOについて、 $k_1$ 及び $k_2$ の値はマミチヨグではマダイの約2倍及び3倍の値を示し、BCFではマミチヨグの $8000 \pm 1000$ 及びマダイの $9400 \pm 100$  (Yamada and Takayanagi, 1992)であり、t検定を行ったところTBTOではマダイのBCFのほうがマミチヨグと比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に大きかった。また、 $k_1/k_2$ の値もマミチヨグと比較してマダイの方が大きかった。

TPTCについて、 $k_1$ 及び $k_2$ の値はマミチヨグとマダイで近似した値を示し、BCFはマミチヨグで $3500 \pm 400$ , マダイで $3100 \pm 200$  (Yamada and

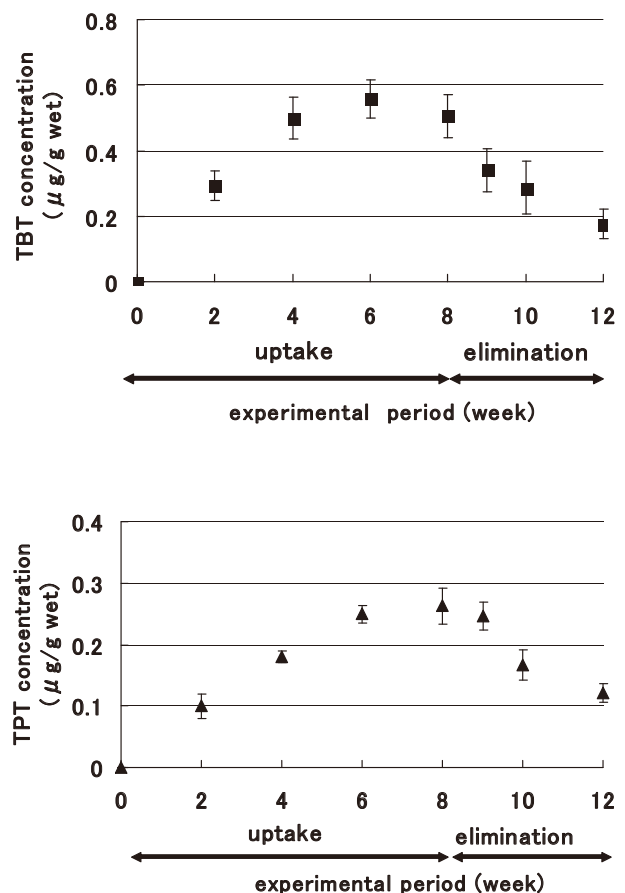


Fig. 4-1. Bis (tributyltin) oxide (TBTO) and triphenyltin chloride (TPTC) concentrations in mummichog during bioconcentration and elimination test. Values were expressed mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). Square, TBT; Triangle, TPT.

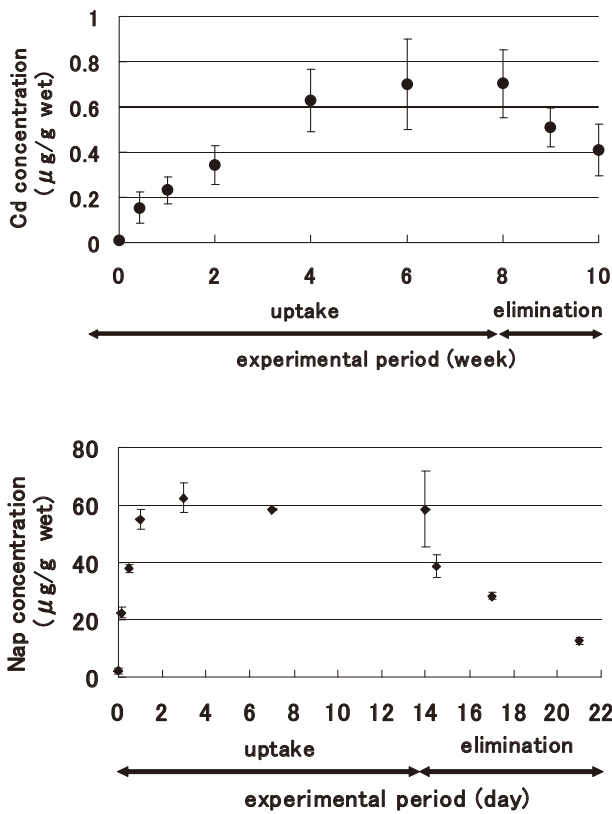


Fig. 4-2. Cadmium chloride 2.5-hydrate (Cd) and naphthalene (Nap) concentrations in mummichog during bioconcentration and elimination test. Values were expressed mean  $\pm$  standard deviation (n=3) . Circle, Cd; Diamond, Nap.

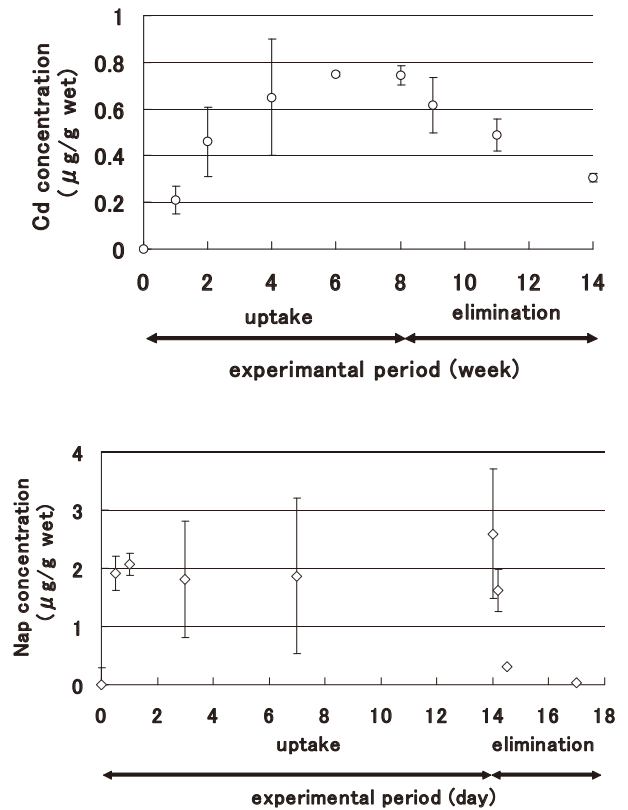


Fig. 4-3. Cadmium chloride 2.5-hydrate (Cd) and naphthalene (Nap) concentrations in red sea bream during bioconcentration and elimination test. Values were expressed mean  $\pm$  standard deviation (n=3) . Circle, Cd; Diamond, Nap.

Table 4-2. The BCF values of TBTO, TPTC, Cd and Nap for mummichog and red sea bream

| Chemicals | Species        | Uptake rate constant (k <sub>1</sub> ) | Eliminate rate constant (k <sub>2</sub> ) | BCF             | k <sub>1</sub> /k <sub>2</sub> |
|-----------|----------------|--|---|-----------------|--------------------------------|
| TBTO      | Mummichog      | 630                                    | 0.077                                     | 8000 $\pm$ 1000 | 8200                           |
|           | Red sea bream* | 320                                    | 0.024                                     | 9400 $\pm$ 100  | 14000                          |
| TPTC      | Mummichog      | 130                                    | 0.038                                     | 3500 $\pm$ 400  | 3500                           |
|           | Red sea bream* | 120                                    | 0.037                                     | 3100 $\pm$ 200  | 3200                           |
| Cd        | Mummichog      | 0.71                                   | 0.080                                     | 8.9 $\pm$ 1.9   | 8.9                            |
|           | Red sea bream  | 0.65                                   | 0.070                                     | 9.3 $\pm$ 0.5   | 9.3                            |
| Nap       | Mummichog      | 3600                                   | 6.4                                       | 430 $\pm$ 90    | 330                            |
|           | Red sea bream  | 370                                    | 4.5                                       | 84 $\pm$ 43     | 82                             |

k<sub>1</sub> and k<sub>2</sub> were calculated by using the concentration in fish expressed in the unit of ng/g fish. The unit of k<sub>1</sub> and k<sub>2</sub> is mL/g fish/day and /day , respectively.

\*: Yamada & Takayanagi, 1992

Takayanagi, 1992) であり, t 検定による有意な差異は認められなかった。また,  $k_1/k_2$  の値もマミチヨグとマダイではほぼ同じ値を示した。

Cd について,  $k_1$  及び  $k_2$  の値はマミチヨグとマダイで近似した値を示し, BCF はマミチヨグが  $8.9 \pm 1.9$ , マダイが  $9.3 \pm 0.5$  であり, t 検定による有意な差異は認められなかった。また,  $k_1/k_2$  の値もマミチヨグとマダイではほぼ同じ値を示した。

Nap について,  $k_1$  の値はマミチヨグではマダイの約 10 倍,  $k_2$  の値はマミチヨグではマダイよりやや高い値を示した。BCF ではマミチヨグが  $430 \pm 90$ , マダイが  $84 \pm 43$  でマミチヨグの BCF はマダイの約 5 倍の値を示した。また,  $k_1/k_2$  の値もマミチヨグの方がマダイの約 4 倍大きい値を示していた。

**臨界体内残留量 (CBR, Critical body residue)** : マミチヨグとマダイでは本研究で選定した 4 種類の試験物質に対する 96hrLC50 をモル濃度で Table 4-3 に示した。この 96hrLC50 に生物濃縮試験により得られた BCF を乗じて算出した CBR 及び 4 種類の試験物質について急性毒性試験の死亡個体中の体内濃度をまとめて示したものが Table 4-4 である。また, これらのデータに各試験物質の 4 日 (96 時間) 目の蓄積量を加えて図示したものが Fig. 4-4 であ

る。

まず, 96hrLC50 について, TBTO では, マダイの急性毒性値はマミチヨグの 10 分の 1 であった。TPTC については, マミチヨグに比較してマダイの急性毒性値がやや高かった。Cd については, マダイの急性毒性値はマミチヨグの 50 分の 1 であった。Nap についてはマダイの急性毒性値はマミチヨグの 9 分の 1 であった。これらの結果から, 総じてマダイのほうがマミチヨグに比較してこれらの試験物質に対する感受性は高い傾向を示していた。またマダイ, マミチヨグともにもっと強い毒性を示した試験物質は TBTO であり, 次いで TPTC であった。マダイでは, Cd と Nap は同程度の毒性を示していたが, マミチヨグでは Nap のほうが Cd に比較して 5 倍程度強い毒性を示していた。CBR については, TPTC をのぞく TBTO, Cd 及び Nap のいずれにおいてもマダイよりマミチヨグの方が大きい値を示していた。TPTC についてはマダイの方がマミチヨグに比較してやや大きな値を示した。死亡個体中の試験物質の濃度をマミチヨグとマダイで比較すると, マミチヨグの方がいずれの物質においても高くなっており, TBTO ではマダイの 3 倍, TPTC ではマダイの 4 倍, Cd ではマダイの 20 倍, Nap ではマダイの 6 倍以上の高い濃度であった。死亡個体中の

Table 4-3. Acute toxicity of TBTO, TPTC, cadmium and naphthalene for mummichog and red sea bream

| Chemicals   | 96hrLC50 ( $\mu$ M) |               |
|-------------|---------------------|---------------|
|             | mummichog           | red sea bream |
| TBTO*       | 0.045               | 0.0045        |
| TPTC**      | 0.19                | 0.26          |
| Cadmium     | 220                 | 4.5           |
| Naphthalene | 46                  | 5.2           |

\*:value were expressed as TBT

\*\* :value were expressed as TPT

Table 4-4. The comparison between the critical body residue (CBR) and dead fish body residue of TBTO, TPTC, Cd and Nap in mummichog and red sea bream.

| Chemicals | Species        | CBR ( $\mu$ mol/g) | Dead fish body residue ( $\mu$ mol/g) |
|-----------|----------------|--------------------|---------------------------------------|
| TBTO      | Mummichog      | 0.36               | $0.040 \pm 0.010$                     |
|           | Red sea bream* | 0.042              | $0.013 \pm 0.002$                     |
| TPTC      | Mummichog      | 0.67               | $0.079 \pm 0.007$                     |
|           | Red sea bream* | 0.81               | $0.017 \pm 0.005$                     |
| Cd        | Mummichog      | 2.0                | $0.070 \pm 0.027$                     |
|           | Red sea bream  | 0.042              | $0.003 \pm 0.001$                     |
| Nap       | Mummichog      | 20                 | $5.6 \pm 0.6$                         |
|           | Red sea bream  | 0.44               | $0.9 \pm 0.2$                         |

\*: Yamada & Takayanagi, 1992

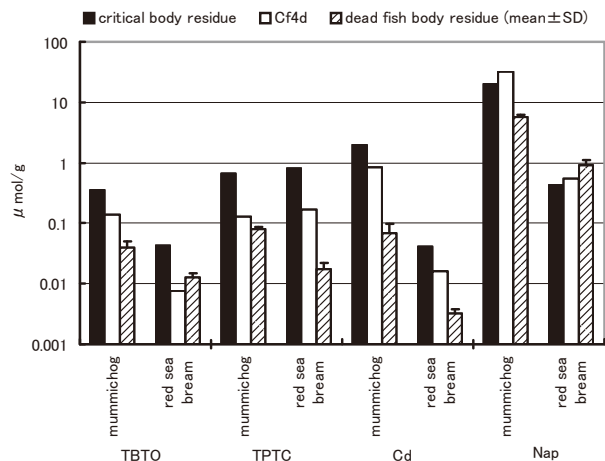


Fig. 4-4. The comparison among the critical body residue (CBR), the dead fish body residue and calculated concentration of test substance in experimental fish at 4th day (Cf4d) at lethal concentrations of 4 chemicals (bis (tributyltin) oxide, TBTO; triphenyltin chloride, TPTC; cadmium chloride 2.5-hydrate, Cd; and naphthalene, Nap) in mummichog (n=5) and red sea bream (n=5).

濃度と CBR とを比較すると、TBTO では CBR と死亡個体中の濃度の比はマミチヨグで 9 分の 1、マダイでは 3 分の 1、TPTC ではマミチヨグで 8 分の 1、マダイで 48 分の 1、Cd ではマミチヨグで 20 分の 1、マダイで 14 分の 1、Nap ではマミチヨグで 4 分の 1、マダイでは CBR のほうが死亡個体中の濃度の約 2 倍大きくなっていった (Fig. 4.4.)。

### 4.3. 考 察

生物濃縮：Table 4-5 では、マダイ及びマミチヨグの蓄積性と他魚種との比較を行うため、Table 4-2 に示した本研究結果と既報の  $k_1$ 、 $k_2$ 、BCF 及び  $k_1/k_2$  をまとめて示した。

TBTO では、シロギス (*Sillago japonica*) (山田・高柳, 1995) と本試験結果のマミチヨグとは  $k_1$ 、

Table 4-5. The BCF values of TBTO, TPTC, Cd and Nap for marine fish.

| Chemicals          | Species                             | uptake rate constant (k1) | elimination rate constant (k2) | BCF        | k1/k2 | Ref.                        |
|--------------------|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------|-------|-----------------------------|
| <b>TBTO</b>        |                                     |                           |                                |            |       |                             |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 | 320                       | 0.024                          | 9400±100   | 14000 | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 |                           |                                | 3900       |       | Shimizu and Kakuno, 1994    |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 |                           |                                | 4100       |       | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Sillago japonica</i>             | 580                       | 0.07                           | 8400±800   | 8300  | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Rudarius ercodes</i>             | 360                       | 0.094                          | 3200±400   | 3800  | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Mugil cephalus</i>               | 430                       | 0.17                           | 3000±200   | 250   | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Chasmichothys dolichognathus</i> |                           |                                | 900        |       | Shimizu and Kimura, 1992    |
|                    | <i>Chasmichothys dolichognathus</i> |                           |                                | 1400       |       | Shimizu and Kimura, 1992    |
|                    | <i>Chasmichothys dolichognathus</i> |                           |                                | 3000       |       | Shimizu and Kimura, 1992    |
|                    | <i>Chasmichothys dolichognathus</i> |                           |                                | 3000-5000  |       | Shimizu and Kimura, 1987    |
|                    | <i>Chasmichothys dolichognathus</i> |                           |                                | 8000-11000 |       | Shimizu and Kimura, 1987    |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        | 630                       | 0.077                          | 8000±1000  | 8200  | This study                  |
| <b>TPTC</b>        |                                     |                           |                                |            |       |                             |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 | 120                       | 0.037                          | 3100±200   | 3200  | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Sillago japonica</i>             | 100                       | 0.024                          | 4000±200   | 4200  | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Rudarius ercodes</i>             | 120                       | 0.039                          | 2200±200   | 3100  | Yamada and Takayanagi, 1995 |
|                    | <i>Lebistes reticulatus</i>         |                           | 0.3                            | 530        |       | Tuda et al., 1990           |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        | 130                       | 0.038                          | 3500±400   | 3500  | This study                  |
| <b>Cadmium</b>     |                                     |                           |                                |            |       |                             |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        |                           |                                | <1         |       | Eisler, 1974                |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        |                           |                                | 1.6        |       | Eisler, 1974                |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        |                           |                                | 0.84       |       | Eisler, 1974                |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 | 0.65                      | 0.070                          | 9.3± 0.5   | 9.3   | This study                  |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        | 0.71                      | 0.080                          | 8.9± 1.9   | 8.9   | This study                  |
| <b>Naphthalene</b> |                                     |                           |                                |            |       |                             |
|                    | <i>Pagrus major</i>                 | 370                       | 4.5                            | 84± 43     | 82    | This study                  |
|                    | <i>Fundulus heteroclitus</i>        | 3600                      | 6.4                            | 430± 90    | 330   | This study                  |



$k_2$ , BCF 及び  $k_1/k_2$  ともに近似した値を示していた。また、マダイ、シロギス及びマミチヨグは BCF が 8000 ~ 9400 であり、これらの魚種では TBTO の蓄積性が高いことが明らかとなった。一方、アゴハゼ (*Chasmichthys dolichognathus*) では BCF の値が 900 から 11000 まで広範な値 (清水・木村, 1987; 清水・木村, 1992) を示していた。さらに、アミメハギ (*Rudarius ercodes*) 及びボラ (*Mugil cephalus*) の BCF はマダイ、シロギス及びマミチヨグの半分以下である 3000 程度の値を示しており、これらアミメハギおよびボラでは、マダイに比較すると TBTO の蓄積性は低いと考えられた。マダイは BCF が大きいことから比較的 TBTO を蓄積しやすい魚種であり、また、マダイの  $k_2$  はボラ、シロギス、アミメハギ及びマミチヨグと比較してより小さな値を示していたことから、マダイは他の魚種に比較して TBTO を排泄しにくい魚種であることも明らかとなった。特に  $k_2$  が大きいアミメハギ及びボラでは BCF の値も小さいことから、TBTO を排泄しやすい魚種は TBTO を蓄積しにくいものと推察された。

TPTC については、マダイ、シロギス、アミメハギ及びマミチヨグともに BCF は 2200 ~ 4000 であり魚種の差異は小さかった。また  $k_1$  及び  $k_2$  の値から、マダイ、シロギス、アミメハギ、マミチヨグともに値が近似しており  $k_2$  が小さいことから TPTC はやや排泄されにくいことが明らかとなった。同じ有機スズ化合物である TBTO と TPTC について、マダイにおける BCF は TBTO で大きく TPTC ではこれに比較して小さかった。これはマダイの TBTO に対する  $k_1$  が TPTC のそれに比較して大きく、一方、 $k_2$  がその逆であったためと考えられる。一方、マミチヨグについては BCF,  $k_1$  及び  $k_2$  いずれも TPTC に比較して TBTO で大きく、特に、TBTO では  $k_1/k_2$  が TPTC に比較して大きいために BCF が大きくなったものと考えられる。また一方で、アミメハギの BCF は TBTO と TPTC で比較的近似した値を示していた。この魚種間の TBTO 及び TPTC の BCF 及び  $k_2$  の相違については、TBTO 及び TPTC の代謝能が大きく関与するものと考えられた。TBTO と TPTC の代謝能が魚種により異なることが推察され、代謝能の差異も BCF の魚種間差の大きな要因と考えられた。TBTO 等の有機スズ化合物についてはその代謝経路について魚類での研究はあまり進んでおらず、今後の研究が待たれる。

Cd については、Eisler (1974) がマミチヨグの

BCF についてのみの報告を行っており、1 前後の小さな値を示している。本試験結果ではマダイ、マミチヨグともに一桁台の小さな値を示していた。このことから Cd は TBTO 及び TPTC に比較すると蓄積されにくい物質であることが明らかとなった。また、また  $k_1$  及び  $k_2$  の値は、マダイとマミチヨグで大きな差異はなく、両魚種での吸収速度及び  $k_2$  は近似していると考えられた。

Nap については既報の値がほとんどなかったが、BCF の値から、マミチヨグはマダイに比較して Nap を蓄積しやすいことが明らかとなった。これはマミチヨグの  $k_1$  がマダイのそれより 10 倍大きいのに対し、両魚種の  $k_2$  の差が比較的小さいことに起因しているものと考えられる。

海水魚は浸透圧調節のために海水を飲み濃い尿を排出することで体内の水分の維持を行っていることはよく知られている。そのため、これら試験物質の生物濃縮の経路として消化管からの可能性も考えられた。この点について、山田 (1999) は TBTO についてマダイの蓄積経路の検討を行い、主に鰓からの吸収が行われ、消化管からの吸収は少ないことを見ている。海水魚における取り込みについては鰓が主な経路であることは立川・澤村 (1988) も見ており、海水魚において各種化学物質は主に鰓から取り込まれると考えられている。一方、淡水魚については、Williams and Giesy (1978) がカドミウムの Topminnow (*Gambusia affinis*) において、カドミウムが主に鰓から取り込まれることを見ている。このことは、Kumada et al. (1973) も見ており、McKim et al. (1985) は鰓が水溶性の各種化学物質の主経路としている。これらのことから、海水魚も淡水魚も試験物質が体内に取り込まれる経路は主に鰓であると考えられ、取り込み経路の違いが海水魚と淡水魚において大きな差異はないと考えられた。また、カドミウムについては、毒性が淡水魚で強く海水で毒性が弱まることが知られており (田端, 1969), この原因として小山 (1997) は重金属と 2 価イオンとの拮抗作用を指摘している。各種化学物質の海産魚を用いた毒性試験について、現時点ではあまり報告例が多くはないが、今後種々の毒性試験の実施に伴い、試験物質の生体内への取り込み等についても今後明らかにして行く必要があると考えられた。

以上の結果から、本研究での試験魚であるマダイとマミチヨグの生物濃縮性についてまとめると、TBTO について、マダイはマミチヨグより排泄しにくいいため、その BCF が高くなることが明らかと

なった。TPTCについては、吸収速度及びBCF蓄積性はマダイとマミチヨグで大きな差異はない。Cdについては、蓄積性、吸収速度及び $k_2$ いずれもマダイとマミチヨグの差異は小さいと考えられた。Napについては、両魚種の $k_2$ に大きな差は無いものの、マミチヨグの $k_2$ がマダイに比較して10倍大きいことからマミチヨグのBCFが大きくなった。

また、式1-1（試験物質の濃度と試験水中の濃度の $C_f/C_w$ ）（85ページ参照）を用いて計算した急性毒性試験における死亡個体中の試験物質の濃度と試験水中の濃度の比であるBCFと式1-4（ $k_1/k_2$ ）（85ページ参照）から計算した $BCF_{eq}$ とを比較しても、Table 4-2に示すように試験期間が長い生物濃縮試験では $C_f/C_w$ から計算したBCFと $k_1/k_2$ から計算した $BCF_{eq}$ は良く一致していたが、Fig.4-2及び4-3に示すように速やかに体内濃度が上昇するNapではBCFと $BCF_{eq}$ はほぼ一致するが、平衡状態に達するまでに長時間かかるTBTO、TPTC及びCdでは計算値と実際の試験ではずれが生じてBCFよりも $BCF_{eq}$ の方がより低い値を示すことになったと考えられた。

CBR：CBRではnarcotic chemicalsについてMcCarty et al. (1992)が報告しているが、これらの報告における試験対象物質はベンゼン類、PAH類等体内に速やかに取り込まれる物質についての研究成果についてである。そのために、本研究におけるTBTO及びTPTC及びCdのような体内濃度が平衡状態に達するまでに時間がかかる物質については、ほとんど検討されてはいなかった。本研究の結果、Fig. 4-4に示すように体内に速やかに取り込まれるNapについては、マダイ、マミチヨグともに死亡個体中の死亡個体中のNap濃度はCBRと近似した値を示していた。Napは体内濃度が数日で平衡状態に達するため、McCarty et al. (1992)が示すようにCBRと死亡個体中の濃度がマミチヨグ及びマダイともに一致したものと考えられた。一方、体内濃度が平衡に達するまでに時間がかかるTBTO、TPTC及びCdについては、死亡個体中の体内濃度はCBRに達しておらず、体内濃度がCBRに至らないうちに死に至るような毒性作用が生じたものと考えられた。これらの結果から、Napについては、CBRが死亡個体の体内濃度と近似しており、この値と試験物質の影響濃度とを関連付けることにより感受性の差異を明らかにする可能性が考えられた。しかし、体内に取り込まれにくい物質では、CBRに達する前に死に至ることが明らかとなり、マミチヨグに比較して、マダイではより低い体内濃度に

おいて死に至ることが明らかとなった。これらの結果から、マダイとマミチヨグの試験物質に対する感受性の差異は体内の蓄積濃度に密接に関連することが考えられた。

急性毒性と生物濃縮：TPTCを除く3種類の物質においてマミチヨグよりマダイの方が96hrLC50の値は小さく、マミチヨグに比較してマダイの方がこれらの試験物質に対する感受性が高いことが明らかとなった。選定した4種類の試験物質のマダイ、マミチヨグに対する急性毒性の差異と、前項で調べた生物濃縮性との関連を調べるために、生物濃縮性に関連するBCF、 $k_1$ 及び $k_2$ と96hrLC50の関係を図示し比較検討した。

まず、96hrLC50と $k_1$ について両者の関係を示したものがFig.4-5である。 $k_1$ が比較的大きくて吸収されやすいTBTO、TPTC及びNapについては、図中の上部に分布し、吸収されにくいCdについては図の下部に分布していたが、96hrLC50と $k_1$ との相関は認められなかった。次に、急性毒性と $k_2$ について両者の関係を示したものがFig.4-6である。Napが排泄されやすいことを反映し、Napの値が図の上部に分布したが、96hrLC50と $k_2$ との相関は認められなかった。さらに、急性毒性とBCFの平均値について両者の関係を示したものがFig.4-7である。96hrLC50とBCFについては負の相関が認められ、96hrLC50が小さい、つまり毒性が強い物質ほどBCFが大きく、96hrLC50が大きい、つまり毒性が弱い物質ほどBCFが小さい傾向があることが明らかとなった。t検定ではTBTOについてマダイとマミチヨグのBCFに差があることが確認されたが、Fig.4-7では、両魚種のBCFの差はマダイとマミチヨグの毒性値の差を説明できるほど大きく乖離していなかった。更にCdについてはほぼ同じBCFであるにもかかわらず両魚種の急性毒性値は大きな差があった。以上のことから、BCFから両魚種の急性毒性における感受性の差異を説明することは困難であると考えられた。

CBRは、LC50値と同様に暴露時間、暴露濃度等の実験条件にはほとんど左右されないことが知られている（Sijm et al., 1993）。そこで、マミチヨグとマダイにおけるLC50と急性毒性試験死亡個体中の試験物質の体内濃度との関係を調べると、Fig.4-8に示すように、TBTO、TPTC及びNapについては、LC50と死亡個体中の試験物質濃度は高い相関を示し、これらの関係が同一の直線上に分布することが明らかとなり、これらの物質は同一の傾向を示す物質群属である可能性が示唆された。一方、Cd

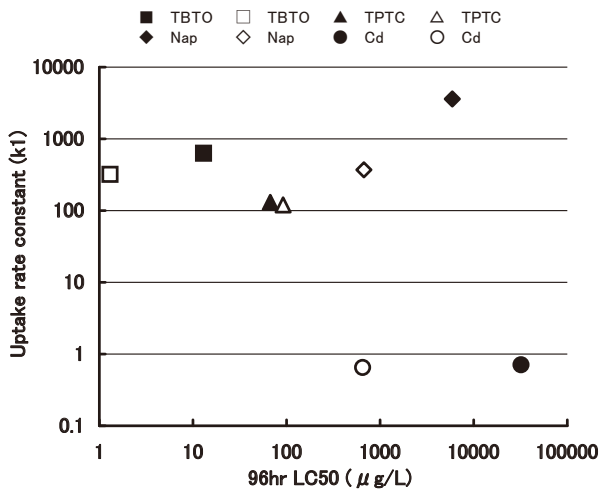


Fig. 4-5. The relationship between acute toxicity (96hrLC50) and uptake rate constant ( $k_1$ ). Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively ( $k_1$  values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))

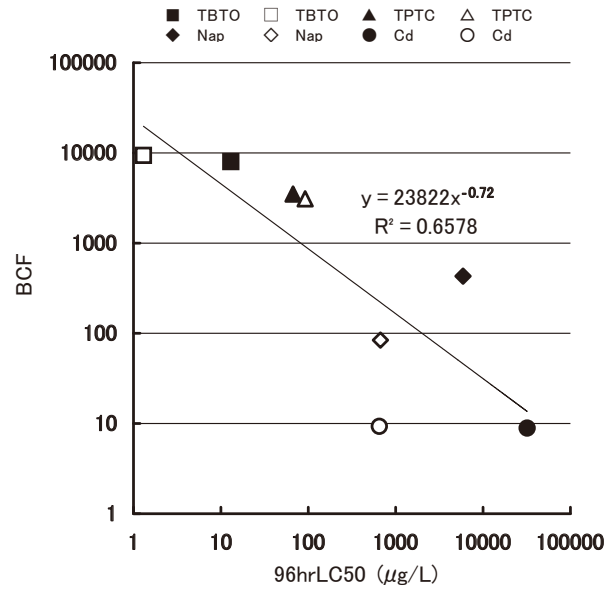


Fig. 4-7. The relationship between acute toxicity (96hrLC50) and mean BCF. Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively (BCF values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))

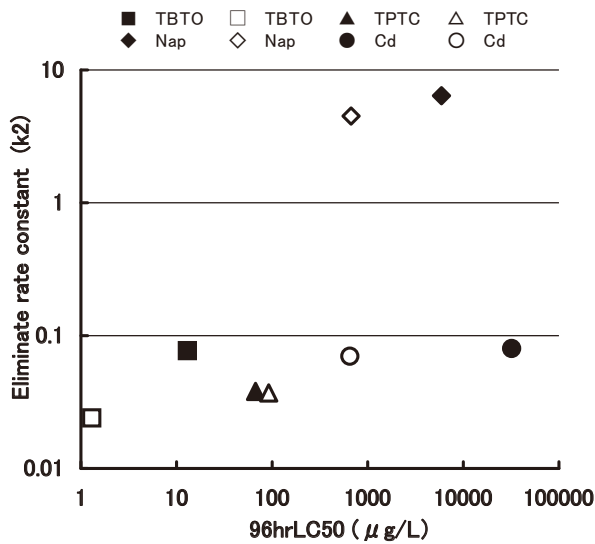


Fig. 4-6. The relationship between acute toxicity (96hrLC50) and eliminate rate constant ( $k_2$ ). Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively ( $k_2$  values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))

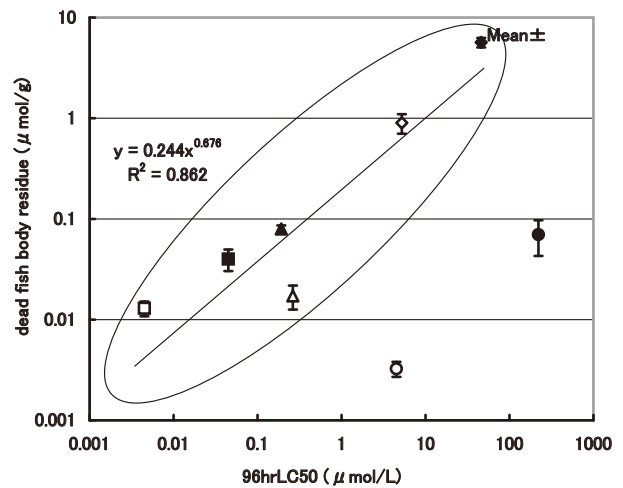


Fig. 4-8. Correlation between acute toxicity (96hrLC50) and dead fish body residue. Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap. Solid marks and open marks were expressed as mummichog and red sea bream, respectively. Note that the data from TBTO, TPTC and Nap exposed fish formed a group (solid-line circle) distinguishable from that of the Cd exposed fish group.

については、TBTO, TPTC 及び Nap の毒性値と死亡個体中濃度の関連とを示す直線上には分布しないため、TBTO, TPTC 及び Nap とは一線を画す別のグループに分類される可能性が示唆された。また、TPTC を除き、マダイの 96hrLC50 値及び死亡個体体内濃度がマミチヨグのそれらより小さかった。これらのことから、マダイでは、試験物質の体内濃度が低くても死亡しており、より低い水中濃度でも死亡する (LC50 値が小さい) するのは、致死体内濃度が低いことに起因しているものと考えられる。死亡個体の体内濃度と感受性は密接に関連し、体内濃度が低いレベルでも死にたる魚種は感受性が高く、その一方、ある程度高濃度にならないと死亡しない魚種は感受性が低いことが示唆された。

McCarty et al. (1992) が報告し、本研究でも認められたように、Nap のような narcotic chemicals では CBR が致死魚の実測体内濃度と近似し、その値と各魚種に対する化学物質の影響濃度を関連づけることによって、魚種の感受性差を明らかにすることが可能と考えられる。しかし、有機金属である TBTO, TPTC あるいは重金属である Cd については上記のような関連づけが難しく、致死魚の実測体内濃度と影響濃度の関連づけから、化学物質に対する感受性の魚種間差を明らかにすることが可能と考えられる。

慢性毒性と生物濃縮：本研究で求めた4種類の試験物質に対するマダイ及びマミチヨグの慢性毒性値 (Maximum Acceptable Toxicant Concentration, MATC) 及び急性慢性毒性比 (Acute - to - Chronic Toxicity Ratio, ACR) をまとめたものが Table 4-6 である。MATC と  $k_1$  の関係を示したものが Fig.4-9, MATC と  $k_2$  の関係を示したものが Fig.4-10 である。96hrLC50 と  $k_1$  の関係と同様に、MATC と  $k_1$  の関係では吸収されやすい TBTO, TPTC 及び Nap については、図中の上部に分布し、比較的吸収されにくい Cd については図の下部に分布していた (Fig.4-9)。MATC と  $k_2$  の関係では、Nap は排泄されやすいことを反映して、Nap の値のみ図の上部に分布した。MATC とこれら  $k_1$  及び  $k_2$  との相関は認められなかった。MATC と BCF の関係を図示したものが Fig.4-11 である。MATC と BCF についても負の相関が認められ、MATC が小さい、つまり MATC が大きい物質ほど BCF が大きい傾向があることが明らかとなった。急性毒性値の場合と同様に、t 検定では TBTO についてマダイとマイチヨグの BCF に差があることが確認されたが、Fig.4-11 では、両魚種の BCF の差はマダイとマミチヨグの毒性値の差を説明できるほど大きく乖離してはならず、また、ほぼ同じ BCF を示した Cd については両魚種の MATC には大きな差

Table 4-6. Chronic toxicity and ACR of four chemicals for red sea bream and mummichog

| Chemicals     | NOEC            | LOEC    | MATC    | ACR |
|---------------|-----------------|---------|---------|-----|
|               | $\mu\text{g/L}$ |         |         |     |
| red sea bream |                 |         |         |     |
| TBTO          | 0.00097*        | 0.0036* | 0.0019* | 670 |
| TPTC          | 0.34**          | 1.9**   | 0.80**  | 120 |
| Cd            | 27              | 50      | 37      | 18  |
| Nap           | 7.4             | 31      | 15      | 44  |
| mummichog     |                 |         |         |     |
| TBTO          | 0.010*          | 0.090*  | 0.030*  | 430 |
| TPTC          | 0.7**           | 2.2**   | 1.2**   | 61  |
| Cd            | 530             | 2000    | 1000    | 31  |
| Nap           | 48              | 120     | 76      | 78  |

\* : expressed as  $\mu\text{g TBT/L}$ .  
 \*\* : expressed as  $\mu\text{g TPT/L}$

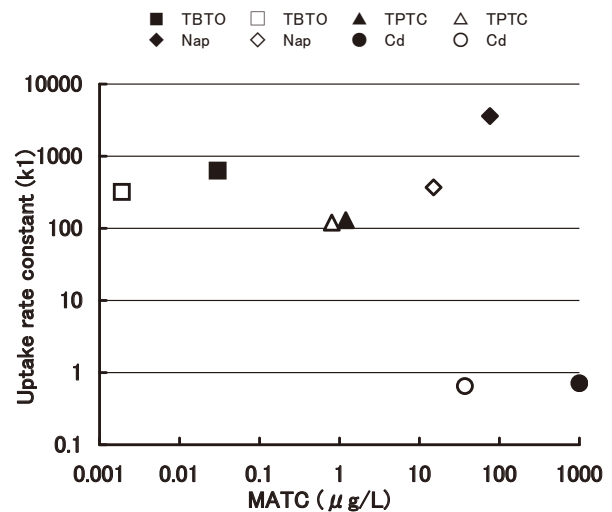


Fig. 4-9. The relationship between MATC and uptake rate constant ( $k_1$ ). Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively ( $k_1$  values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))



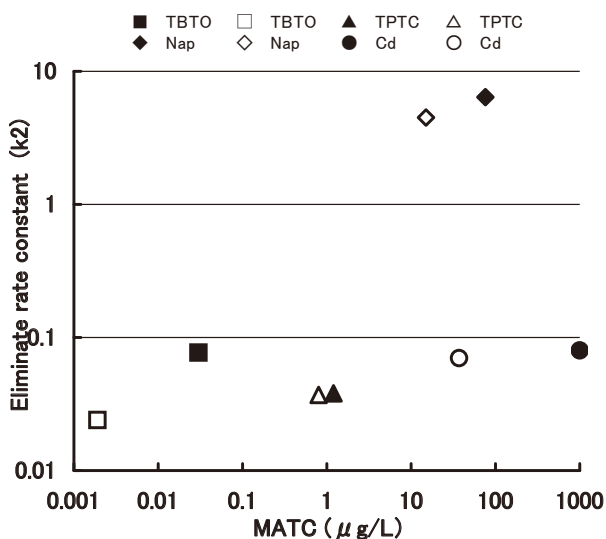


Fig. 4-10. The relationship between MATC and eliminate rate constant ( $k_2$ ). Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively ( $k_2$  values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))

があった。これらのことから、BCFから両魚種の慢性毒性についての感受性の差異を説明することは困難であると考えられた。

### 第5章 総合考察

日本の海水魚を用いた毒性試験を実施して得られた毒性値に基づき、わが国の沿岸域における各種化学物質の影響評価の実施に資することを目的として、本研究を実施した。

試験を実施する際の対象とする試験物質については、その使用が禁止されているが極めて強い毒性を示す代表的な有機スズ化合物である酸化トリブチルスズ (TBTO), TBTO同様に海水魚に対する毒性の強い塩化トリフェニルスズ (TPTC), 古典的な汚染物質であるカドミウム (Cd), 現在も海洋汚染で問題となる流出油の主成分の一つである多環芳香族炭化水素のナフタレン (Nap) を試験物質として選定した。また、試験生物としては、日本において広く種苗生産がなされ、また、水産業においても重要な海水魚種であり、環境省が生態毒性試験魚として推奨しているマダイ (*Pagrus major*) と、環境モニタリング等広く生物学的試験に利用され、我々

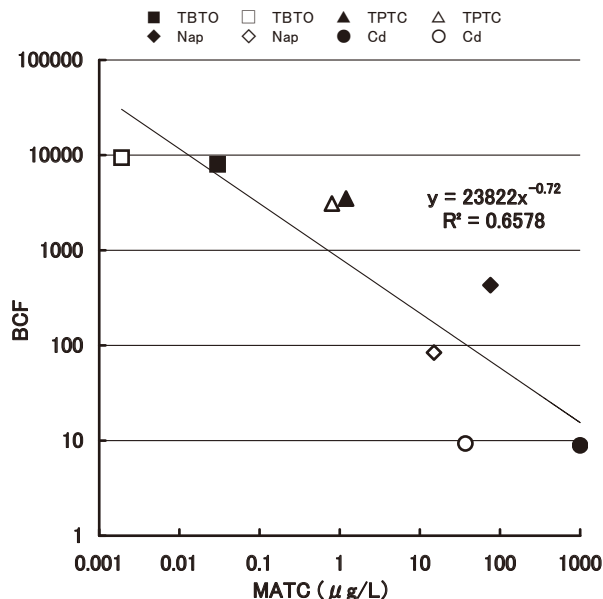


Fig. 4-11. The relationship between MATC and mean BCF. Square, TBTO; triangle, TPTC; circle, Cd; diamond, Nap; and solid marks were expressed as mummichog, open marks were expressed as red sea bream, respectively (BCF values of TBTO and TPTC in red sea bream were quoted from Yamada and Takayanagi (1992))

の研究室で毒性データが豊富なアメリカ東海岸原産の海産のメダカの種類、マミチヨグ (*Fundulus heteroclitus*) を選定した。

まず、急性毒性試験を実施し、マダイ及びマミチヨグを用いて4種類の試験物質に対する急性毒性値である96hrLC50を求めた。その結果、マダイは感度よく試験物質に対する影響を評価することができ、これまでに試験魚として利用された種々の魚種について報告された毒性値の中でも最も低い値を示していた。これらのことから、マダイは急性毒性試験に適した海水魚であることが明らかとなった。しかしながら、マダイはふ化仔魚の飼育が困難であり、また餌料の確保に労力を有する等の理由から、最も鋭敏な時期に毒性試験を行う初期生活段階毒性試験の試験魚には不向きである。そこで、初期生活段階毒性試験の代わりに稚魚を用いた長期暴露毒性試験を実施し、成長等を指標とした場合と、生理学的検査、特に血液検査による慢性影響評価について検討を加え、マダイを慢性毒性試験の試験魚として用いる際の評価法について検討を加えることとした。さらに、マダイとマミチヨグについて、急性毒性試験で認められた感受性の差異について、慢性毒性試験においても調べた。

慢性毒性試験については、まず、OECD です で試験法が確立されている初期生活段階毒性試験（通商産業省基礎産業局化学品安全課監修，1984）を、マミチヨグを試験魚として4種類の試験物質について実施し、ふ化率、生残率、奇形率、成長への影響を指標として慢性毒性値である最小影響濃度（LOEC, Lowest Observed Effect Concentration）及び無影響濃度（NOEC, No Observed Effect Concentration）を求めた。その結果、Cdについては奇形率が最も感度良く、次いで成長が影響評価に適していることが明らかとなった。Cdを除く3種類の試験物質については検討した評価項目の中で成長が最も感度良く影響を評価することができた。既報の慢性毒性試験においても評価項目として成長は重要な指標として利用されており、McKim(1995)も成長及び生残が慢性毒性試験の重要な評価項目であるとしている。これらの結果から、マミチヨグを用いた初期生活段階毒性試験において、成長または奇形率を影響評価項目とすることにより、感度良くNOEC及びLOECを求めることができることが明らかとなった。

マダイを用いた長期暴露毒性試験ではマミチヨグでの結果を踏まえ、成長及び生残率を評価項目として4種類の試験物質について稚魚からの長期暴露試験を実施して、NOEC及びLOECを求めてマミチヨグの慢性毒性値及び既報の慢性毒性値との比較を試みた。その結果、TPTCでは生残率により、そのほかの試験物質では成長によりマダイの慢性毒性値（長期暴露毒性値）を求めることができた。他魚種との比較においても、マダイは長期暴露毒性試験における試験魚としても非常に感受性が高いことが明らかとなった。このことから、マダイのように初期生活段階毒性試験の実施が困難な海水魚においても、稚魚の長期暴露試験を実施して、成長を指標とすることにより感度良く化学物質の慢性影響を評価できることが明らかとなった。

血液学的な化学物質の毒性評価もこれまでに種々の報告がなされていることから、感受性が高い試験魚であることが明らかとなったマダイを用いて、血液学的な検査項目による影響評価を実施した。その結果、相対赤血球容積（Ht値）を評価項目とすることで比較的感度良く試験物質の影響を評価できることが明らかとなった。

これまでに種々の毒性試験において求めた毒性値及び既報の毒性値等から本研究において選定した試験物質の示す毒性について比較検討した。その結果、TBTOの影響を評価する項目として感度の良い順

位に並べると、成長が最も感度が良く、生残、組織観察、血液性状の順であり、組織観察は血液性状と同程度であった。魚種間について感受性の比較を行うと、マダイが最も感度が良く、総じて海水魚のほうがTBTOに対する感受性が高い傾向が認められた。TPTCについては報告例が少ないため今後の研究が望まれるが、魚種間の感受性については、マダイが比較的感受性が高く次いで、マミチヨグ、ニジマスの順であったが、魚種間の感度の差異は小さい傾向にあった。Cdについては、血液性状による影響評価が成長に次いで比較的感度が良いことが明らかとなった。小山(1997)が報告しているように、Cdの淡水魚と海水魚に対する毒性は、前者で高いことが確認され、この原因としては海水中のカルシウム等の硬度成分と重金属が拮抗作用を示すことにより海水中での毒性がやや弱まると考えられている。Napについては、成長による影響評価が最も低い毒性値を示し、ついで血液性状も感度良く影響を評価することができることが明らかとなった。また、海水魚のほうが淡水魚に比較してNapに対する感受性が高い傾向が認められた。これらのことから、各種化学物質の魚類に対する毒性を評価するためには、淡水魚の値だけを用いるのではなく、海域における影響評価には海水魚の利用が必須であり、成長、生残、血液性状等多方面からの影響評価の重要性が改めて確認された。

マダイ等の多くの日本産の海水魚においては、種苗生産の対象魚種においても初期生活段階を小型試験水槽での飼育を継続することは困難である。そこで、急性毒性値と慢性毒性値の比である急性慢性毒性比（ACR, Acute-to-Chronic Toxicity Ratio）は物質ごとにほぼ一定の値を示すことが知られている（Rand et al., 1995）ことから、これを日本産の海水魚についても当てはめることができるかを調べるために、これまでに明らかにしてきたマダイ及びマミチヨグの急性毒性値及び慢性毒性値を用いてこれら毒性値の関連について検討した。その結果、外国産の試験魚マミチヨグで求めた4種の試験物質に対する急性毒性値と慢性毒性値の比であるACRが、日本産の魚種であるマダイにおいても物質ごとにほぼ一定の値を示す傾向があることが明らかとなった。このことから日本の海水魚ではその飼育の困難さのため、初期生活段階毒性試験等の慢性毒性試験の実施例が極めて少なかったが、マダイを用いて急性毒性値を求めることができれば、マミチヨグで求めたACRを利用してマダイの慢性毒性値についての推定が可能となり、海域ごとの化学物質に対するより

現場に即した環境影響評価の可能性が示唆された。

本研究では、マダイ及びマミチヨグを用いた急性毒性試験及び慢性毒性試験を実施し、急性毒性値及び慢性毒性値を選定した4種類の試験物質について明らかにしてきた。得られた毒性値を比較すると、マダイで毒性値が低くマミチヨグでは毒性値が高いという試験物質に対する感受性の差異が認められた。この感受性の差異については、マダイにおける血液性状による慢性毒性評価において、TBTOとTPTCの毒性の違いに生物濃縮係数(BCF, Bioconcentration Factor)や取り込み速度等の関連や、Cd及びNapにおいても貧血の発症と試験物質の体内濃度との関連が示唆された。そこで、マダイ及びマミチヨグの毒性値の差異の原因は試験物質の体内残留量に密接に関連するという仮説を立てて、これを確認するために、急性毒性値及びBCFから臨界体内残留量(CBR, Critical Body Residue)を算出して、急性毒性試験において死亡した個体中の試験物質濃度との比較等を行い仮説の検証を行うとともに、得られたBCF、 $k_1$ 及び $k_2$ と毒性値の関連について検討を加えた。その結果、死亡個体中の試験物質の濃度をマミチヨグとマダイで比較すると、マミチヨグの方が4種類の試験物質すべてにおいて高くなっており、マダイに比較してマミチヨグではより高濃度の蓄積により死に至ることが明らかとなった。また、死亡個体中の濃度とCBRとを比較すると、Napを除き死亡個体中の濃度の方がCBRよりも低くなっており、Napのように体内濃度が数日で平衡状態に達するような化学物質では、CBRと死亡個体中の蓄積量は近似するが、体内に取り込まれにくい物質では、CBRに達する前に死に至ることが明らかとなった。さらに、96hrLC50と死亡個体中の試験物質濃度は高い相関を示していたことから、マダイとマミチヨグの試験物質に対する感受性の差異は体内の蓄積濃度に密接に関連することが考えられ、当初仮説を立てた「マダイ及びマミチヨグの毒性値の差異の原因は試験物質の体内残留量に密接に関連する」との仮説が成立する可能性の高いことが確認できた。これらの結果から、例えばNapのようなnarcotic chemicalsではCBRが致死魚の実測体内濃度と近似し、その値と各魚種に対する化学物質の影響濃度を関連づけることによって、魚種の感受性差を明らかにすることが可能と考えられるが、有機金属であるTBTO、TPTCあるいは重金属であるCdについては上記のような関連づけが難しく、致死魚の実測体内濃度と影響濃度の関連づけから、化学物質に対する感受性の魚種間差を明らか

にすることが可能と考えられた。さらに、急性毒性値及び慢性毒性値はBCFと負の相関を示し、その一方でACRはBCFと正の相関を示したことから、急性毒性値と慢性毒性値が一定の比を示すものではないことが示唆された。このことは急性毒性試験により得た急性毒性値をある一定の値で除して慢性毒性値を推定することの危険性を示すものであり、ACRが大きい物質の場合には、慢性毒性値を過小評価する危険がある。従って、基本的には慢性毒性試験により予測無影響濃度(PNEC, Predicted No Effect Concentration)を推測し、急性毒性値のみからその予測をする場合、適応係数(安全係数)をより大きくとる必要のあることが明らかとなった。

また、本研究結果及びこれまでに報告された毒性値を比較検討すると、Cdを除くTBTO、TPTC及びNapについては淡水魚に比較して海水魚の毒性値が低くなっている傾向があった。化学物質が魚体中に吸収される際の主な経路は鰓とされており、急性毒性等では化学物質により影響を受けやすい器官が鰓であることはよく知られている。これに加え、海水魚では浸透圧に維持のために積極的に海水を飲み、濃い尿を排泄することで水分を補給している。そのため、低い濃度であっても消化管が化学物質を含む海水に晒されることとなり、淡水魚ではあまり影響を受けにくい消化管も海水魚では影響を受けやすいといえる。従って、海水魚は淡水魚に比較するとより化学物質の影響を受けやすい生物学的特長があるといえる。一方で、カドミウムの毒性が淡水魚に比較して海水魚で弱まることは海水中のカルシウム等の2価イオンの拮抗作用によること考えられており(小山, 1997)、海域における影響評価に際しては、海域の環境、特に海水についても考慮しておく必要があるといえる。

本研究の成果は、以下のようにまとめることができる。

1. 各種化学物質の沿岸域の環境影響評価には、海水魚を試験に用いる必要がある。
2. 試験に利用することが可能な試験魚としては、入手しやすく、尾数が揃っている必要があることから、種苗生産されている魚種が便利である。
3. 種苗生産されている魚種としては、マダイ(*Pagrus major*)、クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)、マコガレイ(*Pleuronectes yokohamae*)、メバル(*Sebastes inermis*)等が挙げられる。
4. マダイ稚魚を用いた毒性試験では感度よく96hrLC50を求めることができる。



5. 急性毒性試験の際に死亡した個体中の試験物質濃度を調べることで、感受性の魚種間差を明らかにする際のデータとすることができる。
6. マダイの稚魚を用いて慢性毒性試験を実施し成長及び生残を指標とすることによって、慢性毒性値である NOEC 及び LOEC を感度良く得ることができる。
7. 小型水槽で暴露可能な 10～100g のマダイを用いて 8 週間の暴露試験を行い、測定が簡便な Ht 値を指標とすることで成長以外の項目による影響評価も可能である。
8. 毒性試験の実施に際しては、ふ化率、生残率、奇形率、成長(体重、体長)、血液性状等の評価項目を用いて多角的に影響を評価することも重要である。
9. やむを得ず、マダイ急性慢性値のみしか得られない場合には、マミチヨグで求めた急性慢性毒性比である ACR を用い、マダイの 96hrLC50 からその魚慢性毒性値のおおよその推定も可能である。
10. 毒性試験の他に、化学物質の蓄積性の検討も必要となり、得られた生物濃縮係数、吸収速度定数、排泄速度定数、体内残留量等の値から、化学物質に対する感受性の魚種間差を推定することが可能である。

海域には、様々な化学物質が流入しており、また、油流出事故のように非常に影響が大きくまた、突発的な汚染の発生する危険性が指摘されている(小山ら、1998)。本研究では、毒性評価のために、代表的な化学物質を選定してその毒性を検討してきた。その中で、各種化学物質の環境中の濃度等については、環境省の「化学物質と環境」等を利用することにより情報を得ることは出来る。しかしながら、海水魚の毒性値が非常に少ないため、リスク評価が進まないでいる。現在では、徐々にではあるが海域における各種化学物質の影響評価が始まりつつあり、今後は、日本産の海水魚を用いた毒性試験の実施を推進し、環境影響評価に繋げられるように種々のデータの蓄積が急務となっている。日本産の海水魚で試験に利用しやすい魚種は、種苗生産される魚種等があり、これらの魚種、特にマダイを用いることで海水魚による各種毒性試験は今後広く実施可能になっていくものと考えられる。従来は、日本産の海水魚のほとんどは、初期生活段階での飼育が困難であるため、小型水槽を用いる毒性試験を長期間にわたり実施することは困難と考えられてきたが、本研究の成果から稚魚期マダイの長期暴露試験や、マミ

チヨグで求めた ACR を用いたマダイ急性毒性値からの慢性毒性値がおおよその推定が可能となり、得られた毒性値に基づく日本沿岸の化学物質のリスク評価が、今後さらに発展していくと考えられる。

## 謝 辞

本研究をまとめるにあたって適切なるご助言と懇切なご指導を賜った鹿児島大学水産学部小山次朗教授に心より感謝の意を表します。

本研究は、著者が水産庁東海区水産研究所(現独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所)において、海産魚を用いた毒性試験法の確立、海産魚を用いた慢性影響評価法の確立に携わる過程から開始した。共同研究者として試験魚類の飼育、毒性試験の実施において多大なご協力をいただき、また、研究を遂行する上で多くの貴重なご助言を賜った清水昭男博士(現独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所生理特性研究室長)に深甚なる謝意を表します。

海産魚を用いた急性毒性試験、慢性毒性試験について試験法の検討等に際して諸条件の設定、毒性値の解析等について多くの貴重な御助言及び示唆に富むご教授を頂きました元水産庁中央水産研究所環境保全部長里見至弘博士、故水産庁中央水産研究所環境保全部長田端健二博士、元水産庁中央水産研究所環境保全部生物検定研究室長木村関男氏及び元南西海区水産研究所企画連絡室長梅津武司氏には厚く御礼申し上げます。

研究の遂行に際して終始懇篤なるご指導並びに絶大なご支援を賜った元独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所長山田久博士(現財団法人海洋生物環境研究所)及び元独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所化学環境部長有馬郷司博士には謹んで御礼申し上げます。また、研究の取りまとめに際し絶大なご支援を賜った独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所長高柳和史博士及び独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所業務推進部長岸田達博士には謹んで御礼申し上げます。

研究に際して有機スズ化合物、ナフタレンの分析等にご協力をいただいた独立行政法人瀬戸内海区水産研究所化学環境部の河野久美子氏、隠塚俊満氏、財団法人日本冷凍食品検査協会の堀英夫氏には厚く御礼申し上げます。

研究の遂行において、多くのご教示や示唆に富ん



だ討議をいただいた藤井一則博士、持田和彦博士をはじめ独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所化学環境部の職員の方々には厚く感謝の意を表します。最後に、本研究で使用した試験魚の飼育管理等に多大なご協力を賜った元水産庁中央水産研究所総務部の遠藤 正氏、梶ヶ谷義一氏及び木部里子氏、並びに独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所化学環境部の平本千秋氏、高場由美子氏及び正田美紀氏に心から御礼申し上げます。

## 文 献

- 藍 憲一郎, 高山敬介, 原田泰顯, 2005 : マダイ種苗生産, 千葉県栽セ業報 平成 16 年度, 9-16.
- Alkindi A. Y. A., Brown J. A., Waring C. P. and Collins J. E., 1996 : Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. *J. Fish Biol.*, **49**, 1291-1305.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), 1998 : Part 8000 Toxicity, 8910 Fish, in "Standard Method for the Examination of Water and Wastewater", American Public Health Association, Washington, DC, pp. 8-122-8-131.
- Anderson J. W., Neff J. M., Cox B. A., Tatem H. E. and Hightower G. N., 1974 : Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Mar. Biol.*, **27**, 75-88.
- 荒木 峻, 沼田 眞, 和田 攻, 1985 : 環境科学辞典. 東京化学同人, 東京, 1015pp.
- Armstrong P. B. and Child J. S., 1965 : Stages in the normal development of *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.*, **128** (2), 143-168.
- 馬場啓輔, 奈良正人, 1977 : 農薬の海水魚に対する毒性-V. PAPとBPMCのブリ稚魚に対する慢性毒性. 静岡水試研報, **11**, 59-69.
- Benoit D. A., 1975 : Chronic effects of copper on survival, growth, and reproduction of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **104**, 353-358.
- Benoit D. A., 1976 : Toxic effects of hexavalent chromium on brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Res.*, **10**, 497-500.
- Benoit D. A., Leonard E. N., Christensen G. M. and Fiandt J. T., 1976 : Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **105** (4), 550-560.
- Benoit D. A., Puglisi F. A. and Olson D. L., 1982 : A fathead minnow *Pimephales promelas* early stage toxicity test method evaluation and exposure to four organic chemicals. *Environ. Pollut. Ser. A.*, **28**, 189-197.
- Benson W. H. and Birge W. J., 1983 : Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4** (2), 209-217.
- Bruggemann R., Schwaiger J. and Negele R. D., 1995 : Applying hasse diagram technique for the evaluation of toxicological fish tests. *Chemosphere*, **30** (9), 1767-1780.
- Bradbury S. P., Henry T.R., Niemi G. J., Carlson R. W. and Snarski V. M., 1989 : Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish : part 3. polar narcotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, **8** (3), 247-261.
- Bradbury S. P., Carlson R.W., Niemi G. J. and Henry T. R., 1991 : Use of respiratory cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish : part 4. central nervous system seizure agents. *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, 115-131.
- Brown D.A., Bay S. M., Alfafara J., Hershelman G. P. and Rosenthal K. D., 1984 : Detoxification/toxification of cadmium in scorpionfish (*Scorpaena guttata*) : acute exposure. *Aquat. Toxicol.*, **5** (2), 93-107.
- Bryan M. D., Atchison G. and Sandheinrich M. B., 1995 : Effects of cadmium on the foraging behavior and growth of juvenile bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **52**, 1630-1638.
- Bushong S. J., Hall L. W. Jr., Hall W. S., ohnson W.E. Jand Herman R. L., 1988 : Acute Toxicity of Tributyltin to Selected Chesapeake Bay Fish

- and Invertebrates. *Water Res.*, **22** (8) , 1027-1032.
- Byington K. H., Yeh R. Y. and Forte L. R., 1974 : The hemolytic activity of trialkyltin and triphenyltin compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 230-240.
- Cairns J. Jr. and Scheier A., 1957 : The effects of temperature and hardness of water upon the toxicity of zinc to the common bluegill, (*Lepomis macrochirus Raf.*) . *Not. Nat. Acad. Nat. Sci. Phila.*, **299**, 1-12.
- Carlson A. R., 1971 : Effects of long-term exposure to carbaryl (sevin) on survival, growth, and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) , *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 583-587.
- Carroll J. J., Ellis S. J. and Oliver W. S., 1979 : Influence of hardness constituents on the acute toxicity of cadmium to brook trout (*Salverinus fontinalis*) . *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, **22**, 575-581.
- Christensen G., Hunt E. and Fiant J., 1977 : The effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride, and lead nitrate on six biochemical factors of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) , *Toxicol. App. Pharmacol.*, **42**, 523-530.
- Chung K. S., 1983 : Lethal effects of cadmium in tropical Fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49** (10) , 1565-1568.
- Davies P. H., Goettl J. P. Jr., Sineley J. R. and Smith N. F., 1976 : Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water. *Water Res.*, **10**, 199-206.
- Dawson G. W., Jennings A. L., Drozdowski D. and Rinder E., 1995/1977 : The acute toxicity of 47 industrial chemicals to fresh and saltwater fishes. *J. Hazardous Materials*, **1**, 33-308.
- DeGraeve G. M., Elder R. G., Woods D. C. and Bergman H. L., 1982 : Effects of naphthalene and benzene on fathead minnow and rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **11** (4) , 487-490.
- Dinnel P. A., Link K. M., Stober Q. J., Letourneau M. W. and Roberts W. E., 1989 : Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassay to metals and pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **18** (5) , 748-755.
- Eaton J. G., 1970 : Chronic malathion toxicity to the bluegill (*Lepomis macrochirus rafinesque*) . *Water Res.*, **4**, 673-684.
- Eaton J. G., 1974 : Chronic cadmium toxicity to the bluegill (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) . *Trans, Amer. Fish. Soc.*, **103** (4) , 729-735.
- ECOTOX, 2007 : Ecotoxicology database, US EPA/ORD/NHEER, [http : //www.epa.gov/ecotox/](http://www.epa.gov/ecotox/).
- EIFAC, 1975 : Report on fish toxicity testing procedures, FAO, Rome.
- Eisler R., 1971 : Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces : *Cyprinodontidae*) and other marine organisms. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **28**, 1225-1234.
- Eisler R., 1974 : Radiocadmium exchange with seawater by *Fundulus heteroclitus* (L.) (Pisces : *Cyprinodontidae*) . *J. Fish Biol.*, **6**, 606-612.
- Eisler R. and Hennekey R.J., 1977 : Acute toxicities of Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> to estuarine macrofauna. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **6** (2/3) , 315-323.
- Eisler R., 1986 : Use of *Fundulus heteroclitus* in pollution studies. *Am. Zool.*, **26**, 283-288.
- FAO (1987) Manual of methods in aquatic environmental research, Part 10 – short term static bioassay. [http : //ia331308.us.archive.org/1/items/ manualofmethods034741mbp/manualofmethods034741mbp.pdf](http://ia331308.us.archive.org/1/items/manualofmethods034741mbp/manualofmethods034741mbp.pdf), 81 pp.
- Friberg L., 1948 : Proteinuria and kidney injury among workmen exposed to cadmium and nickel dust. *J. industry. Hyg. Toxicol.*, **30**, 32-36.
- Gardner R. G. and Yevich P. P., 1970 : Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27** (12) , 2185-2196.
- George S. G., Hodgson P. A., Tytker P. and Todd K., 1996 : Inducibility of metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in larvae of marine teleost, the Turbot (*Scophthalmus maximus*) . *Fund. Appl. Toxicol.*, **33**, 91-99.
- Gill T. S. and Pant J. C., 1985 : Erythrocyte and leukocyte responses to cadmium poisoning in a fresh water fish *Puntius conchonius Ham*,

- Environ. Res.*, **36**, 327-337.
- Gill T. S. and Epple A., 1992 : Impact of cadmium on the mummichog *Fundulus heteroclitus* and the role of calcium suppressing heavy metal toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, **101C** (3) , 519-523.
- Hall W. S., Paulson R. L., Hall L. W. Jr. and Burton D. T., 1986 : Acute toxicity of cadmium and sodium pentachlorophenate to Daphnids and fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 308-316.
- Hall L. W. Jr., Bushong A. J., Ziegenfuss M. C. and Johnson W. E., 1988 : Chronic toxicity of tributyltin to Chesapeake Bay biota. *Water Air Soil Poll.*, **39**, 365-376.
- Harino H. and Fukushima M., 1992 : Simultaneous determination of butyltin and phenyltin compounds in the aquatic environment by gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **264**, 91-96.
- Haux C. and Larsson Å., 1984 : Long-term sublethal physiological effects on rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during exposure to cadmium and after subsequent recovery. *Aquat. Toxicol.*, **5**, 129-142.
- 広瀬啓二, 橘川宗彦, 1976 : 農薬の海産魚に対する急性毒性, 特に TLm 値と脊椎骨異常に嗣いで. 東海水研報, **84**, 11-20.
- Holcombe G. W., Benoit D. A., Leonard E. N. and McKim J. M., 1976 : Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) . *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 1731-1741.
- Holcombe G. W., Phipps G. L. and Fiandt J.T., 1983 : Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **7** (4) , 400-409.
- 堀口敏宏, 1992 : 有機スズ化合物による海産巻貝の imposex. 東京大学博士学位論文, 東京, pp. 18-26.
- 堀口敏宏, 清水 誠, 1992 : IV 水生生物に対する影響, 7. 貝類および他の水生生物. 「有機スズ汚染と水生生物影響」(里見至弘・清水 誠編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 99-135.
- Hutchinson T. H., Williams T. D. and Eagles G. J., 1994 : Toxicity of cadmium, hexavalent chromium, and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*) . *Mar. Environ. Res.*, **38**, 275-290.
- ISO, 1996 : International Organization for Standardization. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) ]. ISO 7346-3 : Flow-through method. Available : [http://www.iso.org].
- 板沢靖男, 小山次朗, 1982 : 水生生物と重金属 [2] カドミウム. (尾崎久雄 監修), サイエンス社, 東京, 192pp.
- 岩村幸美, 門上希和夫, 陣矢大助, 花田喜文, 鈴木 學, 1999 : 同位体希釈 / ガスクロマトグラフィー / 質量分析法による水質及び底質中の有機スズ化合物の一斉分析 (<特集> 環境ホルモンと分析化学). *分析化学*, **48** (6) , 555-561.
- 岩村幸美, 門上希和夫, 陣矢大助, 棚田京子, 2000 : エチル誘導体化 / ガスクロマトグラフィー / 質量分析法による生物試料中の有機スズ化合物の一斉分析. *分析化学*, **49** (7) , 523-528.
- Jackim E., Hamlin J. M. and Sonis S., 1970 : Effects of metal poisoning on five liver enzymes in the killifish (*Fundulus heteroclitus*) . *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **27** (2) , 383-390.
- Johansson-Sjöbeck M. L. and Larsson Å., 1978 : The effects of cadmium on the Hematology and on the activity of aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in blood and hematopoietic tissues of flounder, *Pleuronectes flesus* L. *Environ. Res.*, **17**, 191-204.
- Jones J. R. E., 1938 : The relative toxicity of salts of lead, zinc and copper to the stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) and the effect of calcium in the toxicity of lead and zinc salts. *J. Expt. Biol.*, **15**, 394-407.
- 海上保安庁 警備救難部環境防災課・刑事課, 2009 : 海洋汚染の現状, <http://www.kaiho.mlit.go.jp/info/kouhou/h21/k20090408/k090408.pdf>, 19pp.
- 角埜 彰, 木村関男, 1987 : メジナに対する酸化トリブチルスズの急性毒性. 東海水研報, **123**, 41-44.
- 角埜 彰, 藤井一則, 小山次朗, 2001 : ノニルフェノールのマミチヨグ仔稚魚への影響. *環境毒理学学会誌* **4** (1) , 55-66.
- 角埜 彰, 清水昭男, 2002 : II -5 海産魚類慢性毒

- 性試験法（初期生活段階毒性試験法）。「有害物質の水域生態系影響評価と生態毒性試験法」, 瀬戸内海区水産研究所研究調査叢書, 第2号, 66-75.
- 角埜 彰, 小山次朗, 2004: マダイの血液性状を指標とした汚染物質の影響評価. 環境毒性学会誌, **7 (2)**, 81-95.
- Kakuno A, Shimizu A., Koyama J., Onduka T., Mochida K. and Fujii K., 2009: Comparison of acute-to-chronic toxicity ratios of four chemicals between red sea bream (*Pagrus major*) and mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Aquaculture Sci.*, **57 (2)**, 201-209.
- 環境省, 2009: 平成19年度海洋環境モニタリング調査結果について. [http://www.env.go.jp/press/file\\_view.php?serial=13327&hou\\_id=10989](http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=13327&hou_id=10989).
- 環境省総合環境政策局環境保健部企画課化学物質審査室, 2009: 生態毒性試験に関する情報(化審法関係), 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律について. [http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/seitai\\_index.html](http://www.env.go.jp/chemi/kagaku/seitai_index.html).
- 川津浩嗣, 1981: II. 飼育管理と実験手技 4. 魚類試験法. 「実験動物としての魚類」, (江上信雄 編), ソフトサイエンス社, 東京, pp. 228-242.
- Kelly S. A. and Giulio R. T. D., 2000: Developmental Toxicity of estrogenic alkylphenols in killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **19 (10)**, 2564-2570.
- Kimura S., Yokote M. and Machida Y., 1971: Study on the toxicity of agricultural control chemicals in relation to freshwater fishes management No.6. Chronic toxicity of dieldrin, lindane, and dipterex to cherry salmon fingerlings. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **21**, 107-116.
- 北九州市環境科学研究所, 1998: ジブチルスズ化合物, トリブチルスズ化合物, フェニルスズ化合物, ジフェニルスズ化合物, トリフェニルスズ化合物. 平成9年度化学物質分析法開発調査報告書(増補・改訂版), 環境庁環境保健部環境安全課, pp. 1-33.
- 小島建一, 1975: 臨床学的検査. 「新しい特性試験と安全性の評価」, (白須泰彦・松岡 理 編), ソフトサイエンス社, 東京, pp. 169-230.
- Konedt W. M., Smith L. L. Jr. and Broderius S. T., 1997: Effect of chronic exposure of brook trout to sublethal concentration of hydrogen cyanide. *Environ. Sci. and Tech.*, **11**, 883-887.
- Korn S., Moles D. A. and Rice S. D., 1979: Effects of temperature on the median tolerance limit of pink salmon and shrimp exposed to toluene, naphthalene, and Cook Inlet crude oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 521-525.
- 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室監修, 1987: ほ乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験. 「化審法 毒性試験法の解説」, 化学工業日報社, 東京, pp. 23-42.
- 小山次朗, 黒島良介, 石松 惇, 1992: 汚染物質毒性評価のための指標海産魚選定. 水環境学会誌, **15 (11)**, 804-813.
- 小山次朗, 清水昭男, 1992: IV 水生生物に対する影響 6. 魚類. 「有機スズ汚染と水生生物影響」(里見至弘、清水 誠 編)、恒星社厚生閣、東京、pp. 86-98.
- 小山次朗, 1997: 淡水魚及び海産魚に対する重金属毒性の相違. 中央水産研究所研究報告, **10**, 123-133.
- 小山次朗, 1998: 海産魚介類を用いた生態毒性試験. 環境毒性学会誌, **1 (2)**, 15-25.
- Kumada H., Kimura S., Yokote M. and Matida Y., 1973: Acute and chronic toxicity, uptake and retention of cadmium in freshwater organisms. *Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab.*, **22**, 157-165.
- Kumada H., Kimura S. and Yokote M., 1980: Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout. *Bull. Jap. Sco. Sci. Fish.*, **46 (1)**, 97-103.
- Kuroshima R. and Kimura S., 1990: Changes in toxicity of Cd and its accumulation in girella and goby with their growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56 (3)**, 431-435.
- Kuroshima R., Kimura S., Date K. and Yamamoto Y., 1993: Kinetic analysis of cadmium toxicity to red sea bream, *Pagrus major*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **25 (3)**, 300-314.
- Larsson Å., engtsson B.-E. Band Svanberg O., 1976: Some haematological and biochemical effects of cadmium on fish, in "Effects of pollutants on aquatic organisms" (ed. by Lockwood A. P. M.), Cambridge University



- Press, Cambridge, pp. 35-46.
- Larsson Å., Haux C. and Sjöbeck M.-J., 1985 : Fish physiology and metal pollution : Results and experiences from laboratory and Field Studies., *Ecotox. Environ. Saf.*, **9**, 250-281.
- Leim, A. H. and Scott W. B., 1966 : Fishes of the Atlantic coast of Canada. *Bull. Fish Res. Board Can.*, **155**, 1-32.
- Leung K. M. Y., Morritt D., Wheeler J. R., Whitehouse P., Sorokin N., Toy R., Holt M. and Crane M., 2001 : Can saltwater toxicity be predicted from freshwater data? *Mar. Poll. Bull.* **42 (11)** , 1077-1013.
- Levitan W. M. and Taylor M. H., 1979 : Physiology of salinity-dependent naphthalene toxicity in *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **36**, 615-620.
- Lind D. T., Smith L. L. Jr. and Broderius S. J., 1977 : Chronic effects of hydrogen cyanide on the Fathead minnow. *J. Wat. Poll. Cont. Feder.*, **49**, 262-268.
- Linden E., Bengtsson B.-E., Svanberg O. and Sundstrom G., 1979 : The acute toxicity of 78 chemicals and pesticide formulations against two brackish water organisms, the bleak (*Alburnus alburnus*) and the harpacticoid *Nitocra spinipes*. *Chemosphere*, **11/12**, 843-851.
- Lloyd R., 1960 : The toxicity of zinc sulfate to rainbow trout. *Ann. Appl. Biol.*, **48**, 84-94.
- Lowe-Jinde L. and Niimi A. J., 1986 : Hematological characteristics of rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson) , in response to cadmium exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 375-381.
- Macek K. J., Buxton K. S., Derr S. K., Fean J. W. and Sauter S., 1976a : Chronic toxicity of lindane to selected aquatic invertebrates and fish. EPA Ecol. Res. Ser., EPA-600/3-76-046, pp. 1-49.
- Macek K. J., Buxton K. S., Sauter S., Gnilka S. and Dean J. W., 1976b : Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fish. EPA. Ecol. Res. Ser., EPA-600/3-76-047, pp. 1-49.
- Manning C. S., Lytle T. F., Walker W. W. and Lytle J. S., 1999 : Life-cycle toxicity of bis(tributyltin) oxide to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) . *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 258-266.
- Matida Y., Kiumra S., Yokote M., Kumada H. and Tanaka H., 1970 : Study on the toxicity of agricultural control chemicals in relation to freshwater fisheries management No.5. Some effects of sodium pentachlorophenate to freshwater fishes. *Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab.*, **20 (2)** , 127-146.
- Matida Y., Kumada H., Kimura S., Saiga Y., Nose T., Yokote M. and Kawatsu H., 1972 : Toxicity of mercury compounds to aquatic organisms and accumulations of the compounds by the organisms. *Bull. Freshwater. Fish. Res. Lab.*, **21 (2)** , 197-227.
- McCarthy J. F. and Jimenez B. D., 1985 : Reduction in bioavailability to bluegills of polycyclic aromatic hydrocarbons bound to dissolved humic material. *Environ. Toxicol. Chem.*, **4**, 511-521.
- McCarty L. S., Mackay D., Smith A. D., Ozburn G. W. and Dixon D. G., 1992 : Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARs from aquatic bioassay : neutral narcotic organics. *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 917-930.
- McCarty L. S. and Mackay D., 1993 : Enhancing ecotoxicological modeling and assessment : body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1719-1728.
- McGovern J. J., Jones A. R. and Steinberg A. G., 1955 : The hematocrit of capillary blood. *New Eng. J. Med.*, **253 (8)** , 308-312.
- McKim J. M. and Benoit D. A., 1971 : Effects of long-term exposure to copper on survival, growth, and reproduction of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) . *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **28**, 655-662.
- McKim J. M., Arthur J. W. and Thoeslund T. W., 1975 : Toxicity of a linear alkylate sulfonate detergent to larvae of four species of freshwater fish. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, **14 (1)** , 1-7.
- McKim J. M., Olson G. F., Holcombe G. W. and Hunt E. P., 1976 : Long-term effects of methylmercuric chloride on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) :

- Toxicity, accumulation, distribution, and elimination. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 2726-2769.
- McKim J. M., 1977 : Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long-term toxicology. *J. Fish Res. Brd. Can.*, **34**, 1148-1154.
- McKim J., Schminder P. and Veith G., 1985 : Absorption dynamics of organic chemical transport across trout gills as related to octanol-water partition coefficient. *Toxicology Appl. Pharmacol.*, **77**, 1-10.
- McKim J. M., Schmieder P. K., Carlson R. W., Hunt E. P. and Niemi G. J., 1987a : Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish : part 1. pentachlorophenol, 2,4-dinitrophenol, tricaine metanesulfonate and 1-octanol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **6**, 295-312.
- McKim J. M., Schmieder P. K., Niemi G. J., Carlson R. W. and Henry T. R., 1987b : Use of respiratory-cardiovascular responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in identifying acute toxicity syndromes in fish : Part 2. malathion, carbaryl, acrolein and benzaldehyde. *Environ. Toxicol. Chem.*, **6**, 313-328.
- McKim J. M., 1995 : Appendix B : Early life stage toxicity tests, in "Fundamentals of Aquatic Toxicology : effects, environmental fate, and risk assessment" (ed. by Rand G. M.) , Taylor & Francis, Washington, D. C., pp. 974-1011.
- Meteyer M., Wright D. A. and Martin F. D., 1988 : Effect of cadmium on early developmental stages of the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) . *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**, 321-328.
- Middaugh D. P., Hemmer M. J. and Lores E. M., 1988 : Teratological effects of 2,4-dinitrophenol, 'produced water' and naphthalene on embryos of the inland silverside *Menedia beryllina*. *Dise. Aquat. Org.*, **4**, 53-65.
- 宮崎 保, 1979: 貧血の系統診断法. 「内科セミナー BLD2 貧血」, (織田 敏次, 阿部 裕, 中川 昌一, 滝島 任, 堀内 淑彦, 鎮目 和夫, 古川 俊之, 祖父江 逸郎, 内野 治人, 尾前 照雄 編), 永井書店, 大阪, pp. 1-26.
- Mochida K., Ito K., Kono K., Onduka T., Kakuno A. and Fujii K., 2007 : Molecular and histological evaluation of tributyltin toxicity on spermatogenesis in a marine fish, the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) . *Aquat. Toxicol.*, **83**, 73-83.
- Moles A., 1980 : Sensitivity of parasitized coho salmon fry to crude oil, toluene, and naphthalene. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 293-297.
- Moles A., Bates S., Rice S. D. and Korn S., 1981 : Reduced growth of coho salmon fry exposed to two petroleum components, toluene and naphthalene, in fresh water. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **110**, 430-436.
- Moles A. and Rice S. D., 1983 : Effects of crude oil and naphthalene on growth, caloric content, and fat content of pink salmon juveniles in seawater. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **112**, 205-211.
- Mount D. I. and Stephan C. E., 1967 : A method for establishing acceptable toxicant limits for fish-Malathion and the Butoxyethanol ester of 2,4-D. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **96**, 185-193.
- Mount D. I. and Stephan C. E., 1969 : Chronic toxicity of copper to fathead minnow (*Pimephales promelas*) in soft water. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **26**, 2449-2457.
- 奈良正人, 山下一臣, 1973 : 農薬の海産魚に対する毒性 - I. 静岡水試研報, **6**, 45-52.
- National Academy of Science and National Academy of Engineering (NAS and NAE) , 1974 : Water Quality Criteria 1972. EPA Ecol. Res. Ser., EPA-R3-03-033, pp. 106-296.
- 日本工業標準調査会, 1993 : カドミウム. 「工場排水試験法 JIS K 0102」, 日本規格協会, 東京, pp. 218-223.
- Neff J. M. and Anderson J. W., 1975 : An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of naphthalene and alkylnaphthalenes in the tissues of oil-contaminated marine animals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **14** (1), 122-128.
- 隠塚俊満, 河野久美子, 市橋秀樹, 上野大介, 2004 : 広島湾における環境中有機スズ化合物の存在状態. 第13回環境化学討論会講演要旨集, 122

- 123.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 1992a : OECD Guidelines for Testing Chemicals, No.203 Fish, Acute Toxicity Test (Adopted by the Council on 17th July 1992) , 12pp.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 1992b : OECD Guidelines for Testing Chemicals, No. 210 Fish : Early-life Stage Toxicity Test (Adopted by the Council on 17th July 1992) , 18pp.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998 : OECD series on testing and assessment. Number 11 : Detailed review paper on aquatic testing method for pesticides and industrial chemicals, part 1—report, ENV/MC/CHEM (98) 19/PART1, 260pp.
- Oshima Y., Nirmala K., Go J., Yokota Y., Koyama J., Imada N., Honjo N. and Kobayashi K., 1997 : High accumulation of tributyltin in blood among the tissues of fish and applicability to environmental monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1515-1517.
- 大城 巖, 筒井道夫, 藤井万吉, 植山 実, 竹中 徹, 前田次郎, 1981 : 新しいヘモグロビン測定法, *臨床病理*, **19** (2) , 203-209.
- 尾崎久雄 (1978) 1. 血液. 「魚類生理学講座」, 緑書房, 東京, pp1-19.
- Palawski D., Hunn J. B. and Dwyer F.J., 1985 : Sensitivity of young striped bass to organic and inorganic contaminants in fresh and saline waters. *Trans.Am.Fish.Soc.*, **114** (5) , 748-753.
- Park E.-H., Chang H.-H., Joo W. N., Chung H.-S. and Kwak H.-S., 1994 : Assessment of the estuarine hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus* as a useful euryhaline species for acute toxicity tests as shown using cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **51**, 280-285.
- Pickering Q. H. and Henderson C., 1966 : The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. *Air Wat. Pollut. Int. J.*, **10**, 453-463.
- Pickering G. H. and Thatcher T. Q., 1970 : The chronic toxicity of linear alkylate sulfonate (LAS) to *Pimephales promelas*, Rafinesque. *J. Wat. Poll. Cont. Feder.*, **42**, 243-254.
- Pickering Q. H. and Gast M. H., 1972 : Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) . *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **29** (8) , 1099-1106.
- Pinkney A. E., Wright D. A. and Hughes G. M., 1989 : A morphometric study of the effects of tributyltin compounds on the gill of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *J. Fish Biol.*, **34**, 665-677.
- Pinkney A. E., Matteson L. L. and Wright D. A., 1990 : Effects of tributyltin on survival, growth, morphometry, and RNA-DNA ratio of larval striped bass, *Morone saxatilis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 235-240.
- Rand G. M., Well P. G. and McCarty L. S., 1995 : Chapter 1 - Introduction to aquatic toxicology. in "Fundamentals of Aquatic Toxicology : effects, environmental fate, and risk assessment" (ed. by Rand G. M.) , Taylor & Francis, Washington, D. C., pp. 3-67.
- Reinert R.E., Stone L.J. and Willford W.A., 1974 : Effect of Temperature on Accumulation of Methyl-Mercuric Chloride and p,p'-DDT by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) . *J.Fish. Res.Board Can.*, **31** (10) , 1649-1652.
- Roberts M. H. Jr., Warinner J.E., Tsai C. F., Wright D. and Cronin L.E., 1982 : Comparison of estuarine species sensitivities to three toxicants. *Arch.Environ.Contam.Toxicol.*, **11** (6) , 681-692.
- Seinen W., Helder T., Vernij H., Penninks A. and Leeuwangh P., 1981 : Short term toxicity of tri-n-butyltinchloride in rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) yolk sac fry. *Sci. Total Environ.*, **19**, 155-166.
- 関 正利, 平嶋 邦猛, 小林 好作 編, 1981 : 実験動物の血液学, ソフトサイエンス社, 東京, 468pp.
- Shazili N.A.M., 1995 : Effects of salinity and pre-exposure on acute cadmium toxicity to seabass, *Lates calcarifer*. *Bull.Environ. Contam. Toxicol.*, **54** (1) , 22-28.
- Sherman R. E., Gloss S. P. and Lion L. W., 1987 : A comparison of toxicity tests conducted in the laboratory and in experimental ponds using cadmium and the fathead minnow (*Pimephales*

- promelas*). *Water Res.*, **21** (3), 317-323.
- 清水昭男, 木村関男, 1987: 酸化トリブチルスズがアゴハゼの成熟に及ぼす影響—成熟開始時期からの暴露. *東海水研報*, **123**, 45-49.
- 清水昭男, 木村関男, 1991: 天然海水及び人工海水における塩化トリフェニルスズのアゴハゼに対する急性毒性. *中央水研報*, **2**, 33-39.
- 清水昭男, 木村関男, 1992: 酸化トリブチルスズがアゴハゼの成熟と諸器官組織に及ぼす長期的影響. *日本水産学会誌*, **58** (9), 1595-1602.
- 清水昭男, 角埜 彰, 1994: 酸化トリブチルスズがマダイの各器官組織に及ぼす長期的影響. *中央水研報*, **6**, 47-55.
- Shimizu A., 1997: Reproductive cycles in a reared strain of the mummichog, a daily spawner. *J. Fish Biol.*, **51**, 724-737.
- 清水昭男, 1999: 環境エストロジェンが魚類の成熟再生産に及ぼす影響, *中央水研報*, **13**, 79-97.
- Short J. W. and Thrower F. P., 1987: Toxicity of tri-n-butyltin to Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, adapted to seawater. *Aquaculture*, **61**, 193-200.
- Sijm D. T. H. M., Schipper M. and Opperhuizen A., 1993: Toxicokinetics of halogenated benzenes in fish: lethal body burden as a toxicological end point. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 1117-1127.
- Smith W. E., 1973: A cyprinodontid fish *Jordanella floridae*, as a laboratory animal for rapid chronic bioassays. *J. Fish Res. Bd. Can.*, **30**, 329-330.
- Snieszko S. F., 1960: Microhematocrit as a tool in fishery research and management. *Spec. Scient. Rep. Fish.*, No.341, U. S. Dep. Int. Fish Wild. Serv., 13pp.
- Spehar R. L., 1976: Cadmium and zinc toxicity to flagfish, *Jordanella floridae*, *J. Fish Res. Bd. Can.*, **33** (9), 1939-1945.
- Suedel B. C., Rodgers J. H. Jr. and Deaver E., 1997: Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **33** (2), 188-193.
- 水産庁, 1995: 海産魚短期毒性試験法確立事業総合報告書 平成7年3月, p234.
- 田端健二, 1969: 水産動物に及ぼす重金属の毒性とその緩和要因に関する研究—II. *東海水研報*, **55**, 215-232.
- 田端健二, 1979: 水生生物に対する各種水質汚染物質の半数致死濃度と長期影響限界濃度との関係. *東海水研報*, **98**, 1-22.
- 田端健二, 1980: 水生生物に及ぼす各種水質汚染物質の亜急性・慢性毒性について. *水処理技術*, **21** (6), 541-60.
- 立川真理子, 澤村良二, 1988: 魚類における化学環境物質の吸収と排泄. *水質汚濁研究*, **11**, 681-685.
- 高見勝重, 奥村為男, 山崎裕康, 中本雅雄, 1998: ガスクロマトグラフによる魚貝類のトリフェニルスズ及びトリブチルスズ化合物の定量. *分析科学*, **37**, 449-455.
- 立石昌浩, 2000: 6. 油分及び流出油成分の分析法  
6.2 流出油成分 6.2.2 高沸点成分 (n-アルカン, 多環芳香族炭化水素類 (PAHs), 有機硫黄化合物). 「流出油の海洋生態系に及ぼす影響調査法」, 瀬戸内海区水産研究所調査研究叢書 第1号, pp. 69-76.
- Thomas P. and Budiantara L., 1995: Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker. *Mar. Environ. Res.*, **39**, 147-150.
- 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修, 1984a: 203 魚類急性毒性試験. 「OECD 化学品テストガイドラインデータ解釈指針」, pp. 857-874.
- 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修, 1984b: 210 魚類の初期生活段階毒性試験. 「OECD 化学品テストガイドラインデータ解釈指針」, pp. 931-950.
- 通商産業省基礎産業局化学品安全課監修, 1984c: 407 げっ歯類における 28 日間反復経口投与毒性試験. 「OECD 化学品テストガイドラインデータ解釈指針」, pp. 2681-2700.
- Tuda T., Aoki S., Kojima M. and Yamada H., 1990: Differences between freshwater and seawater-accumulated guppies in the accumulation and excretion of tri-n-butyltin chloride and triphenyltin chloride. *Water Res.*, **24** (11), 1373-1376.
- 梅崎芳美, 坂本 務, 並木 博, 西村耕一, 米倉茂男, 1982: 7. 1 魚類による急性毒性試験. 「詳解 工場排水試験方法」, 日本規格協会, 東京, pp. 451-455.
- Verma S. R., Tonl I. P., Gupta A. K. and Saxena M.,



- 1984 : Evaluation of an application factor for determining the concentration of agricultural and industrial chemicals. *Water Res.*, **18** (1) , 111-115.
- Von Westerhagen H. and Dethlefsen N., 1975 : Combined effects of cadmium and salinity on development and survival of flounder (*Platichthys flesus*) eggs. *J. Marine Biol.*, **55**, 945-957.
- Voyer R. A., 1975 : Effect of dissolved oxygen concentration on the acute toxicity of cadmium to the mummichog, *Fundulus heteroclitus* (L.), at various salinities. *Trans, Amer. Fish. Soc.*, **104** (1) , 129-134.
- Voyer R. A., Yevich P. P. and Barszcz C. A., 1975 : Histological and toxicological responses of the mummichog, *Fundulus heteroclitus* (L) to combinations of levels of cadmium and dissolved oxygen in a freshwater. *Water Res.*, **9**, 1069-1074.
- Voyer R. A., Heltsche J. F. and Kraus R. A., 1979 : Hatching success and larval mortality in an estuarine teleost, *Menidia menidia* (Linnaeus), exposed to cadmium in constant and fluctuating salinity regimes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 475-481.
- Vries H. De, Penninks A. H., Snoeij N. J. and Seinen W. , 1991 : Comparative toxicity of organotin compounds to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) yolk sac fry. *Sci. Total Environ.*, **103**, 229-243.
- Ward G. S., Cramm G. C., Parrish P. R., Trachman H. and Slesinger A., 1981 : Bioaccumulation and chronic toxicity of bis (tributyltin) oxide (TBTO) : tests with a saltwater fish, in "Aquatic Toxicology and Hazard Assessment : Fourth Conference, ASTM STP 737" (ed. by Branason D. R. and Dickson K. L.) , American Society for Testing and Materials Philadelphia, pp. 183-200.
- Webb P. W. and Brett J. R., 1973 : Effects of sublethal concentrations of sodium pentachlorophenate on growth rate, food conversion efficiency, and swimming performance in underyearing sockeye salmon (*Onchorhynchus nerka*) . *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **30**, 499-507.
- Wedemeyer G. A. and McLeay D. J., 1981 : Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, in "Stress and Fish" (ed. by Pickering S. D.) , Academic Press, London, pp. 247-275.
- Wester P. W., Canton J. H., Van Iersel A. A. J., Krajnc E. I. and Vaessen H.A.M.G., 1990 : The toxicity of bis (tri-n-butyltin) oxide (TBTO) and di-n-butyltin chloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (Medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy) . *Aquat. Toxicol.*, **16**, 53-72.
- Williams D. R. and Giesy J. P. Jr., 1978 : Relative importance of cadmium uptake by *Gambusia affinis* (Poeciliidae) . *Environ Res.*, **16**, 326-332.
- Wintrobe M. M., Lee G. R., Boggs D. R., Bithell T. C. and Foester J. W., 1974 : Clinical Hematology, 7th ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 1377-1404.
- Yamada H. and Takayanagi K., 1992 : Bioconcentration and elimination of bis (tributyltin) oxide (TBTO) and triphenyltin chloride (TPTC) in several marine fish species. *Water Res.*, **26** (12) , 1589-1595.
- 山田 久, 高柳 和史, 1995 : 有害化学物質の生物濃縮試験に用いる試験海産魚の適性評価. *日水誌*, **61** (6) , 895-904.
- 山田 久, 1999 : 有機スズ化合物の海域環境における挙動と魚類による生物濃縮に関する研究. 瀬戸内海区水産研究所研究報告, **1**, 97-162.
- 山口延男, 1970 : 採血と血算. *臨床検査*, **14** (2) , 1257-1274.
- 山本義和, 1981 : Ⅲ. 魚類を使った毒性試験 4. 生化学的毒性試験法. 「実験動物としての魚類」, (江上信雄 編), ソフトサイエンス社, 東京, pp. 420-448.