〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
29 (5) 280-285 (1983)

アニリン系化合物による魚の仮死現象 (I)
魚類による半数致死試験実施上の問題点

外海泰秀, 小川俊次郎
伊藤誉志男, 慶田雅洋
国立衛生試験所大阪支所

Studies of the Syncopic Effect of Aniline Derivatives on Fish. I.
The Problem Concerning the Determination of
Median Lethal Concentration in Fish

YASUhide TONOGAI, SHUNJIRO OGAWA,
YOSHIO ITO and MASAHIRO IWAIDA
National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch
1-1-43, Hoenzaka, Higashi-ku, Osaka 540, Japan

(Received April 13, 1983)

Five kinds of aniline derivatives were chosen and subjected to LC_{50} test using both static and flow water systems. The flow water system was more appropriate than the static one for volatile compounds, because 37% of *N,N*-dimethyl aniline in the test solution was lost during LC_{50} test for 48 h.

N-Methyl aniline, *N,N*-dimethyl aniline and 2,6-xylidine were found to turn fish sideways producing syncope, and the states were observed during the test for 48 h. Median syncope concentration; SC_{50} values of aniline derivatives for 48 h were determined and compared with LC_{50} values. Large differences were observed between SC_{50} and LC_{50} values in *N,N*-dimethyl aniline and 2,6-xylidine.

A rapid determination method of aniline derivatives in fish (killifish, gold fish and carp) using FTD-GC was developed and excretion of aniline derivatives accumulated in fish were determined. All compounds except *N,N*-dimethyl aniline were excreted within 4 h from fish body.

Keywords — median lethal concentration; flow water system; syncope effect; aniline; *o*-toluidine; 2,6-xylidine; *N*-methyl aniline; *N,N*-dimethyl aniline

緒 言

アミン類等の有機含窒素化合物は広く工業界で使用されており、環境中に排出される機会も多く、これらによる環境汚染については十分な配慮が必要である。著者らは先に有機含窒素化合物による環境水の汚染を考慮し、魚類に与える影響を調べる目的で約80種の含窒素化合物であるアミン類、アミド類、ニトリル類及びタール系色素類について、ヒメダカを用いた静水系における急性毒性試験を行なった。¹⁾ その中で特に芳香族アミン類に強い魚毒性を認めた。

しかし、静水系の試験では、沸点の低い化合物の試験

溶液を48時間放置する間に、溶解した化合物が一部揮散して濃度の変化する恐れがあった。また、ある種のアニリン系化合物では供試魚が死なないで、長時間横転したままの状態が見られ、この状態の魚はガラス棒でつつく等の外的刺激を与えても反応しなくなる。しかし、真水にもどすと約30分以内に回復し、再び遊泳するようになるものがあった。この状態を仮りに仮死状態と名付けた場合、このような供試化学物質では、従来の半数致死濃度を求める際の死の判定に困難を生ずる事がしばしば生じた。

そこで、これら魚類試験法実施上の問題点を明らかに

する目的で、構造類似性のある5種のアニリンメチル誘導体を選び、まず静水系と流水系の比較を半数致死濃度 LC_{50} 値を基に調べた。つぎに魚が仮死状態になる化学物質の半数仮死有効濃度を median synoptic concentration (SC_{50}) と設定して求め、 LC_{50} 値との関係を調べた。さらに仮死状態となった魚を真水にもどした時の供試化学物質の経時的な排泄パターンを測定し、魚体の回復性を調べた。

実験の部

1. 実験材料 ヒメダカ、ワキン及びコイは、いずれも奈良県大和郡山産の同年度生れのものを用い、平均体長及び体重はそれぞれヒメダカが3 cm, 0.3 g, ワキンが5 cm, 2.5 g, コイが10 cm, 16.5 gであった。各魚種は順化水槽で10日間以上飼育した後、実験に供した。

2. 試薬 アニリン、*N,N*-ジメチルアニリンは石津製薬(株)製、*N*-メチルアニリン、*o*-トルイジン及び2,6-キシリジンは東京化成工業(株)製の試薬特級品を用い、いずれもガスクロマトグラフィーにより、単一ピークを示すことを確認した後に使用した。その他の試薬は全て市販特級品をそのまま用いた。

3. 装置 ガスクロマトグラフ——島津製作所(株)製のGC-7AG (FTD 検出器付き)を用いた。カラムは20% PEG-20M+3% NaOH/celite 545 (40—60 mesh), 3 mm I. D.×1.6 mを用い、カラム温度150°C、注入口及

び検出器温度200°C、窒素流量50 ml/min、注入量5 μ lで行なった。

静水式試験水槽——容量10 lの箱型を用いた。

連続流水式試験水槽——容量10 lで金沢の装置²⁾の試薬混合槽をマグネチックスターラーで攪拌できるように改良して使用した。供試化学物質の濃厚溶液(試験濃度の10倍濃度)と水が1:9の割合で混合し、かつ、全体の流量が10 ml/min となるように調節した。試作した装置をFig. 1に示した。

4. 試験方法 4-1. 試験溶液の調製——蒸留水を一夜通気したもの供試化学物質を少量のエタノールに溶かして加え、よく攪拌し、均一にして用いた。エタノール濃度は0.5%以下とした。pHは6—7, 溶存酸素約8 ppm, 水温15°Cで行なった。試験溶液量は、魚体重1 g当り100 mlとした。

4-2. 魚の生死の判定——試験溶液に、一定時間暴露後、正常に遊泳している魚を遊泳魚(生魚)とした。横転状態にある魚は真水に移し、4時間以内に正常な遊泳を取り戻すものを仮死魚と定め、その他は死魚とした。

4-3. 半数致死濃度 LC_{50} の測定——1試行当り10匹の魚を用い、48時間後の半数死魚濃度をDoudoroff³⁾の方法に従って求めた。

4-4. 半数仮死有効濃度 SC_{50} の測定—— LC_{50} 値の測定法に準じて求めた。ただし、片対数グラフの対数目盛に供試化学物質の濃度を、普通目盛に横転した仮死魚数

Fig. 1. Outline of Flow Water System

の全供試魚数に対する比率をとり、比率が0.5を示す濃度を SC_{50} 値とした。暴露時間は2及び48時間とした。

4-5. アニリン系化合物の魚体からの分析法——ヒメダカ：魚5匹の総重量を秤り、乳鉢に入れ、無水硫酸ナトリウム1gを加えすりつぶす。ここへ酢酸エチル5mlを加え、冷所で再びよく混和して抽出した後、酢酸エチル層を分取した。酢酸エチルで定容とした後、ガスクロマトグラフィー (GC) で測定した。

ワキン：魚5匹の総重量を秤り、ホモジナイザーカップに入れ、無水硫酸ナトリウム10g及び酢酸エチル50mlを加える。冷却しながら磨砕抽出した後、上澄液を濾紙で濾過し、酢酸エチルで定容とした後、GCで測定した。

コイ：ワキンの方法に準じて行なった。ただし、魚は3匹、無水硫酸ナトリウムは20g、酢酸エチルは100mlを使用した。

4-6. 横転魚から化学物質の排泄実験—— LC_{50} 値の試験溶液に魚を2時間暴露し、ヒメダカ及びワキンは横転魚100匹、コイは横転魚60匹をとり出し、その一部については、ただちに化学物質の魚体内量を測定しAとした。残りは魚体重1gあたり100mlの真水に移し、以後、経時的に一部の魚を取り出し、魚体内の化学物質量を測定しBとした。また、この真水中の化学物質量は、食塩を飽和させた後、酢酸エチルで抽出し、定容とした後、GCにて測定しCとした。ここに $(C/A-B) \times 100$ を横転魚体からの排泄率とした。

実験結果と考察

1. 静水系と流水系による暴露実験の比較

魚類による化学物質の毒性評価法として、その半数致死濃度 LC_{50} を求める際に、魚種、水温、pH、溶存酸素などが測定値に影響を及ぼすと言われている⁹⁾が、その他にも試験期間中における化学物質の減少が考えられる。

実験に用いたアニリン誘導体の中には、揮発性の高いものがあるため、暴露実験期間中に揮散または魚類による消費により試験溶液濃度の減少する可能性があった。そこで静水系及び流水系について、各化合物の LC_{50} 値付近濃度で48時間後の減少率を比較した。

連続流水系では、いずれの試験溶液においてもその濃度変化は認められなかったが、静水系では *o*-トルイジン6%、2,6-キシリジン8%、*N*-メチルアニリン14%、*N,N*-ジメチルアニリン37%の減少が認められた。

また、ヒメダカを用いて静水系と流水系における48時間 LC_{50} 値を比較すると、Table I に示したように、静水系では流水系に比し、みかけの LC_{50} 値が高くなる

TABLE I. LC_{50} Values of Aniline Derivatives Determined by Static or Flow Water System

Test compound	LC_{50} value for 48 h (mg/l)	
	Static water system	Flow water system
Aniline	113.0	115.0
<i>o</i> -Toluidine	102.7	100.0
2,6-Xylidine	130.4	125.0
<i>N</i> -Methyl aniline	91.2	85.0
<i>N,N</i> -Dimethyl aniline	98.0	78.0

Note: Ten killifish were used per trial.
 LC_{50} values were determined at 25°C after 48 h.

(魚毒性が低くなる) 傾向が見られた。

ゆえに揮散性の高い化学物質の暴露実験には流水系試験槽を使用する必要性を認めたので、以下の実験は全て流水系で行なった。

2. アニリン系化合物の魚体からの分析

5種類の構造類似アニリン誘導体の分析条件を検討し、N化合物に特異的に高感度を持つフレイムサーミオン検出器 (FTD 検出器) 付 GC により、各化合物を良好に分離できた。そのチャートを Fig. 2 に示した。

ヒメダカ、ワキン、コイに各化合物100ppmを添加した時の回収率を求めた。

回収率は *N,N*-ジメチルアニリンを除き、いずれも95.8%以上と良好であった。*N,N*-ジメチルアニリンに関しては回収率90.4—91.3%とやや低めであり、これは分析操作中の揮散による損失があるものと思われた。

3. へい死魚の判定方法について

工場排水試験方法⁹⁾では「魚のへい死を確認するにはガラス棒で軽く突き、魚体が反応を示さなくなった時にへい死したと確認する」とあり、水質汚濁調査指針⁶⁾では「死亡と認められるものはガラス棒の先などで軽く突いて何ら反応を示さなくなった時を基準にする」とある。しかし、これらの方法では生と死以外の外観的異常の認められるものについて、何ら考慮されないことになる。

著者らの取扱った約80種の含窒素有機化合物の大多数のものについては、¹⁾ その試験溶液濃度を高めるに従い遊泳していた魚はやがて横転し、水中に浮上または沈下し、比較的短時間で死に至った。しかし、ある種のアニリン系化合物では、その試験溶液濃度を高めるに従い、魚は横転し外的刺激を与えても反応しなくなり、一見、へい死した様に見えるが、これらの横転した魚を真水に

Fig. 2. Gas Chromatogram of Aniline Derivatives

- 1: *N,N*-Dimethyl aniline (10 $\mu\text{g/ml}$).
- 2: *N*-Methyl aniline (25 $\mu\text{g/ml}$).
- 3: Aniline (100 $\mu\text{g/ml}$).
- 4: *o*-Toluidine (200 $\mu\text{g/ml}$).
- 5: 2,6-Xylidine (100 $\mu\text{g/ml}$).

もどすと、約30分以内に再び遊泳するようになる現象が見られた。このように横転からへい死までの間に時間的及び濃度的に間隔のある化合物のあることが認められた。

TABLE II. LC_{50} and SC_{50} Values of Aniline and Its Derivatives in Fish

Test compound	Fish	SC_{50} (mg/l)	LC_{50} (mg/l)
Aniline	Killifish	-	115.0
	Gold fish	-	104.0
	Carp	-	126.5
<i>o</i> -Toluidine	Killifish	-	100.0
	Gold fish	-	124.0
	Carp	-	78.5
2,6-Xylidine	Killifish	76.0	125.0
	Gold fish	78.0	130.0
	Carp	66.0	112.0
<i>N</i> -Methyl aniline	Killifish	72.6	85.5
	Gold fish	79.4	88.0
	Carp	46.0	55.0
<i>N,N</i> -Dimethyl aniline	Killifish	64.0	78.0
	Gold fish	56.0	69.0
	Carp	56.6	69.0

LC_{50} : The concentration of test solution causing 50 % of the test fish to death in 48 h.

SC_{50} : The concentration of the test solution causing 50% of the test fish to turn sideway (still alive) in 48 h.

また、水系の環境汚染では、魚の生死にかかわらず、魚体の浮上や横転の現象は、周辺住民に与える心理的影響が大きいと考えられ、化学物質の LC_{50} 値だけでは不十分と思われた。従って、この仮死現象の現われる化学物質の影響を表示する方法として、著者らは供試魚の半数が仮死状態になる化学物質濃度、すなわち、半数仮死有効濃度を SC_{50} と定め、その算出を試みた。

4. 3魚種における LC_{50} 値と SC_{50} 値の比較

ヒメダカを一定濃度のアニリン系化合物溶液に暴露したとき、1—3時間で魚は横転状態となるが、2,6-キシリジン、*N*-メチルアニリン及び *N,N*-ジメチルアニリンでは、この横転した魚の仮死状態が48時間後も持続することが Table I の実験で認められた。また、ヒメダカの他にワキン、コイにも同様の仮死状態が見られるかどうかを調べることにした。そこで3種の魚を用い、48時間 LC_{50} 値及び SC_{50} 値を求め、その結果を Table II に示した。

48時間後のアニリン及び *o*-トルイジン溶液では横転している魚は全てへい死しており、仮死魚は存在せず、従って SC_{50} 値は求められなかった。他の3種の化合物では魚の仮死現象が認められた。なお、ブランクとなる0.5%エタノール溶液では48時間後も魚の仮死、またはへい死は全く見られなかった。

Fig. 3. Excretion of Aniline and Its Derivatives Once Accumulated in Fish

Note: The test fish were previously exposed by the test solution of each compound to cause syncope.

—△—: Aniline, —▲—: *N*-Methylaniline, ...□...: *N,N*-Dimethylaniline, —●—: *o*-Toluidine, ...○...: 2,6-Xylydine.

3 魚種間における各化合物の SC_{50} または LC_{50} 値を比較すると、アニリンの LC_{50} 値を除いて、いずれもワキン>ヒメダカ>コイの順になる傾向が見られたが、一般的に見て、コイでの *N*-メチルアニリンの SC_{50} と LC_{50} 及び *o*-トルイジンの LC_{50} 値以外では、魚種間の著名な差は見られなかった。

各化合物の SC_{50} 値と LC_{50} 値を比較すると、その差は 2,6-キシリジン>*N,N*-ジメチルアニリン>*N*-メチルアニリンの順であり、仮死効果の強いことがわかった。また、メチル基のベンゼン環への置換位置も仮死作用に影響すると考えられたので、*p*-トルイジンや 2,4-キシリジンなど置換位置の異なるものについても今後検討する必要があると考えられた。

5. 横転魚から化学物質の排泄速度とその排泄型

横転状態の魚を真水にもどし、初期の魚体中濃度を 100% とした時の経時的な減少率を調べ、Fig. 3 に示した。

ヒメダカに蓄積された各化合物は速かに排泄され、約 2 時間後にはほとんど魚体内に検出されなかった。*N,N*-ジメチルアニリンのみは排泄がやや遅く、24 時間後も 3.1 ppm が残存した。ワキン及びコイではヒメダカに比し排泄はやや遅く、魚体内から大部分の化学物質が排泄されるのにそれぞれ 4 時間または 3 時間を要した。いずれの場合にも *N,N*-ジメチルアニリンの排泄が最もおそい。

この様に魚体から各化合物の排泄にはいずれの場合にも 2~4 時間を要するのに対して、横転状態の各魚は真

水にもどした後約 30 分以内に再び遊泳を開始した。

ま と め

1. 5 種類のアニリン誘導体を選んで静水系と流水系における LC_{50} 値を比較した結果、特に *N,N*-ジメチルアニリンについては静水系で揮散による試験溶液濃度の減少が著しく、両系の LC_{50} 値間に 20 mg/l の差が生じた。

2. 魚体内の化学物質濃度と魚に対する作用との関係を明らかにするため、FTD 付き GC を用いた魚体中アニリン誘導体の分析法を作成した。

3. アニリン誘導体のうち 2,6-キシリジン、*N*-メチルアニリン、*N,N*-ジメチルアニリン溶液では魚が横転し仮死する現象が見られ、この状態が長時間持続した。

4. 3) の化合物で 48 時間後に供試魚の 50% が横転、仮死する濃度 SC_{50} 値を求め、 LC_{50} 値と比較したところ、2,6-キシリジン及び *N,N*-ジメチルアニリンで大きな差が見られた。

5. 横転状態にある供試魚を真水にもどしたとき、魚は約 30 分後に再び遊泳を始めたのに対して、供試したアニリン系化合物の大部分が魚体中から排泄されるのに約 4 時間を要した。

謝辞 本研究にあたり終始御助言を戴いた国立衛生試験所食品部 内山 充部長並びに武田明治室長に深く感謝致します。なお、本研究は、環境庁公害防止委託研究、人工水棲生態系における環境汚染物の動態に関する研究（昭和 54—56 年度）の一環として行なわれたものである。

引用文献

- 1) Y. Tonogai, S. Ogawa, Y. Ito, M. Iwaida, *J. Toxicol. Sci.*, **7**, 193 (1982).
- 2) 金沢 純, 田中二良, “水生生物と農薬, 理論応用編,” サイエンティスト社, 東京, 1979, p. 22.
- 3) P. Doudoroff, *Sewage and Ind. Waters*, **23**, 1380 (1956).
- 4) 田端健二, 水処理技術, **5**, 37 (1964).
- 5) 日本工業標準調査会, 工場排水試験方法, JIS K0102, 日本規格協会, 東京, 1974, p. 154.
- 6) 松江吉行編, “公共用水域保全のための水質汚濁調査指針,” 恒星社厚生閣, 東京, 1961, p. 261.