グッピーの稚魚による数種の殺貝剤の 毒性試験について

広瀬 吉 則* 安野 正 之**

* 徳島市医師会防蚊対策研究室 (〒 770 徳島市幸町 3-61)

東京大学医科学研究所寄生虫研究部 (〒 108 東京都港区白金台 4-6-1)

** 国立公害研究所生物環境部 (〒 300-21 茨城県筑波郡谷田部町大字館野)

(受領: 1978年12月22日)

Toxicity test of some molluscicides with juveniles of the guppy, *Poecilia reticulata*

Yoshinori HIROSE and Masayuki YASUNO

* *Laboratory for Mosquito Control, Saiwai-cho, Tokushima 770, Japan*
Department of Parasitology, Institute of Medical Science, University of
Tokyo, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

** *Division of Environmental Biology, National Institute for*
Environmental Studies, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 300-21, Japan

住血吸虫の中間宿主である貝類に対して用いられている殺貝剤は、一般的に魚毒性が高い。現在、広く用いられている Niclosamide や Frescon (N-tritylmorpholine) でも魚毒性が低いとはいえない。たとえば、Niclosamide などは殺貝効果を示す濃度で多くの魚類に対して毒性を示すという (Muirhead-Thomson, 1971)。こうした魚毒性によって、殺貝剤を処理した水域が環境悪化を起こしたり、処理水域での漁業被害の問題などを生じてくることも危惧される。このため、高い殺貝効果を示す一方、魚毒性の低い殺貝剤が望まれている。

一方、これまで魚毒性の試験には種々の魚が用いられてきたが、それに用いる魚の種類はもちろん、試験方法などもまちまちで確固とした標準的な方法は確立されていない。このことは、殺貝剤での魚毒性試験に限ったわけではなく、魚毒性試験全般に言えることである。ここでは殺貝剤を取り扱っているが、グッピーの稚魚を利用した毒性試験法の開発を目的としてもいる。グッピーは工場排水の生物試験に用いられたり (Henderson and Tarzwell, 1957)、あるいは発癌性化学物質の実験動物として考慮されたり (Sato *et al.*, 1973) しているが、毒性試験においてその稚魚を用いたのは宮下 (1977) が最初である。グッピーは水温を 20~25°C に保てば一年

を通じて増殖し、常に稚魚を得ることができる。また、稚魚を試験魚とすることで成魚まで飼育する手間が省かれ、体長の均一な個体を一度に多数得ることができる。このようなことから、グッピーの稚魚による毒性試験は今後試験方法を標準化するうえで重要であると思われる。成魚と稚魚による毒性試験結果の比較については別に報告される (春日, 未発表)。また宮下 (1977) の報告においては稚魚の令の幅が広がったことから、ここではグッピーの出生後の日令による薬剤感受性の変化について研究した。

材料と方法

殺貝剤は Niclosamide, B-2, Yurimin の3種類を用いた。Niclosamide (5,2'-dichloro-4-nitro-salicylic-anilide, 別名 Bayluscide) は70% wettable powder (バイエル社製) を、B-2 (Sodium 2,5-dichloro-4-bromophenol) は10%液剤 (日本化学工業 K.K. 製)、そして Yurimin (3,5-dibromo-4-hydroxy-4'-nitroazobenzene, 別名 P-99) は5%顆粒剤 (中外製薬 K.K. 製) のものを使用した。なお、Niclosamide は殺貝剤として広く用いられているが、B-2 と Yurimin はそれぞれ防黴剤、殺虫剤としても開発されたものである。

Table 1 Body weight and body length of the juveniles of the guppy used for the experiment

Days after parturition	Batch with food		Batch without food	
	Body weight $\pm$ SD (mg)	Total length $\pm$ SD (mm)	Body weight $\pm$ SD (mg)	Total length $\pm$ SD (mm)
0	—	—	5.85 $\pm$ 0.77	8.34 $\pm$ 0.45
2	5.97 $\pm$ 1.21	8.65 $\pm$ 0.65	4.40 $\pm$ 0.98	7.92 $\pm$ 0.75
6	6.39 $\pm$ 1.00	9.22 $\pm$ 0.77	4.17 $\pm$ 0.48	8.71 $\pm$ 0.44
10	7.21 $\pm$ 1.82	9.34 $\pm$ 0.82	4.17 $\pm$ 0.93	8.87 $\pm$ 0.68
14	4.74 $\pm$ 1.00	8.78 $\pm$ 0.58	4.65 $\pm$ 1.32	8.79 $\pm$ 0.62
18	5.60 $\pm$ 0.91	9.23 $\pm$ 0.51	2.29 $\pm$ 0.44	8.53 $\pm$ 0.44

Analysis of variance of mean body weight

	S.S.	D.F.	M.S.	F
Between groups	313.8	1	313.8	262.1**
Between ages	106.8	4	26.7	22.3**
Interaction	100.2	4	25.0	20.9**
Error	347.2	290		

Analysis of variance of mean total length

	S.S.	D.F.	M.S.	F
Between groups	17.3	1	17.3	42.2**
Between ages	23.5	4	5.9	14.3**
Interaction	4.3	4	1.1	2.6*
Error	118.3	290		

供試魚としてのグッピー *Poecilia reticulata* Peters の稚魚は国立公害研究所でイエロー系として選別されたものである。

薬剤の希釈液としては人工軟水*を用いた。

供試魚として生後0, 2, 6, 10, 14, 18日目のものを給餌した場合と、しない場合の2条件で試験した。給餌した場合は60 $\times$ 29.5 $\times$ 36cmの中型ガラス製水槽に水10lを加え、60~70尾の稚魚を入れた。餌として稚魚用のテトラミン (Tetra Werke, West Germany) を魚体重あたり10%の割合で1日1回与え、通気はごく弱く行った。給餌しない場合は17 $\times$ 30 $\times$ 25cmの小型ガラス製水槽に5lの水を加え、60~70尾の稚魚を入れた。この水槽では運動量を最小にするため、通気を行わなかった。なお、これらの水槽は25°C, 8時間明期の恒温室に置き、水槽の水として井戸水を用い、死亡した個体はす

みやかに取り除いた。

試験は径6cm, 高さ8.5cmのビーカーに試験水200mlと供試魚10尾を入れ、25°C $\pm$ 2°Cの恒温室に置き24時間後の魚の死亡数をチェックした。試験は公比1.15倍の等比級数による希釈段階で行い、1段階に40尾を用いた。なお、試験中は魚に餌を与えていない。薬剤のB-2は水溶性でしかも水溶液としても安定な物質であるので調製に問題はないが、Niclosamideは難水溶性で水溶液は不安定であるため、使用するときはその直前に100ppmの濃度のものを調製した。Yuriminは水に難溶性であることから今回の実験では、50ppmを試験時に調製し使用した。なお、この薬剤はNaPCPに比べて紫外線による破壊の度合いが低いという (Yasuraoka *et al.*, 1968)。

試験に用いた稚魚の各令の各群から、それぞれ30尾をホルマリンで殺し、ただちに湿重量と全長を測定した。また、魚の死亡率については給餌した場合と、しない場合のそれぞれについて18日目まで観察した。

なお、50%致死濃度 (LC₅₀) とプロビットの回帰直線はプロビット法 (Bliss, 1935) によりもとめた。

* 蒸留水10lあたりにA液 (CaCl₂·2H₂O 26.1gを水で100mlとする), B液 (MgSO₄·7H₂O 17.7gとK₂SO₄ 1.1gを水で100mlとする) それぞれ1mlずつとNaHCO₃ 0.25gを加えて調製する。なお、この人工軟水はpH約7, 硬度25ppmである。

結 果

1. 稚魚の出生後の体重, 体長および死亡率の変化

稚魚は出生直後ではまだ卵黄を持っていて, 7日目位まではそれから栄養分をとっている. このことから実験に用いる稚魚は餌を与えないでもある程度は生存可能であり, むしろ個体の変動幅は少ないと考えられる. Table 1は, 実験に供したグッピー稚魚の出生後のそれぞれの日令における体重と体長を示している. 体重, 体長とも出生後14日目くらいまでは大きな差が見られない. 日令のちがいよりも, むしろ仔魚の出生日による差がみられている. しかし, 餌を与えない場合, 18日目では明らかに体重の減少がみられる. また, 餌を与えた群と与えない群全体ではやはり, 有意な差が見られる.

実験に供する稚魚のストックにおける死亡率は特に, 餌を与えない場合には見逃すことはできない. Fig. 1に示されるように, 餌を与えている場合にはストックにおける死亡率は無視できるほどに小さいが, 餌を与えない群のストックでは14日目に急に死亡する個体が多数あらわれる. したがって, この場合には実験に用いることのできるのは出生後10日までと結論されよう.

Fig. 1 Mortality of the stock population of juveniles of the guppy

A, The stock population with food; B, The stock population without food. Vertical bars indicate the 95% confidence intervals of mortality.

Fig. 2 Change in the values of 24-hour LC_{50} of molluscicides to juveniles of the guppy according to age

A broken line indicates a test using a batch with food and solid lines indicate tests using a batch without food. A and B, B-2; C, Niclosamide; D, Yurimin. Vertical bars indicate the 95% confidence intervals of LC_{50} .

2. 給餌されない稚魚による試験

B-2の魚毒性は, 試験魚の24時間後の LC_{50} であらわすとほぼ0.9ppmである (Fig. 2). 出生直後のものから10日目までは大きな差がみられないが, 14日目のはプロビットの直線の傾きも緩やかになり10日目までのと大変違ってくる (Table 2, Fig. 3).

Niclosamide の場合は B-2 とやや異なって10日目までもかなり変化し, プロビットの直線も次第に緩やかとなる (Table 2, Fig. 3). LC_{50} は0.2 ppm から0.4 ppm くらいの間にある (Fig. 2).

Yurimin についても0日と10日の間でかなり違いがみられる (Table 2, Fig. 3). この殺貝剤は3者の間では最も毒性が高く, LC_{50} は0.2ppm 以下である (Fig. 2).

3. 給餌された稚魚による試験

B-2についてのみ試験を行った. Table 2, Fig. 3中に示されるように, プロビットの直線の傾きは急で LC_{50} 中は1 ppm から1.5ppm の間に入り, あまり大きな差はみられない (Fig. 2). しかし, Fig. 2にみられるように, 18日目の稚魚は他の令の稚魚に比較して耐性が高まっていることは明瞭で, 給餌の効果がここに現れていると思われる.

4. 給餌と無給餌の稚魚の比較

B-2についてのみ給餌された稚魚とされない稚魚の両

Table 2 Concentration-mortality regression line by probits of molluscicides to the juveniles of the guppy for 24-hour exposure

Days after parturition	B-2	B-2	Niclosamide	Yurimin
	Batch with food	Batch without food	Batch without food	Batch without food
0	—	$Y=19.325X+4.348$	$Y=25.221X+14.226$	$Y=9.811X+11.736$
2	$Y=22.437X+5.069$	$Y=21.790X+5.441$	$Y=11.486X+9.636$	—
6	$Y=30.143X+2.907$	$Y=24.028X+5.623$	$Y=9.449X+10.018$	—
10	$Y=26.572X+3.905$	$Y=15.151X+5.479$	$Y=5.488X+8.996$	$Y=11.619X+15.353$
14	$Y=17.168X+3.411$	$Y=4.366X+5.554$	—	—
18	$Y=17.370X+2.171$	—	—	—

Fig. 3 Concentration-mortality regression line by probits of molluscicides to the guppy of 10 days after parturition

A broken line indicates a batch with food and solid lines indicate a batch without food. A and B, B-2; C, Niclosamide; D, Yurimin.

者について試験を行ったので、この2者の間の比較を試みた。Fig. 2に示されるように出生直後(0日目)のものは、2日目のものに比べ常に LC_{50} は高い。餌を与えない群は14日目にこの LC_{50} が減少する。なお、18日目については死亡する個体が多く、試験を行っていないがさらに落ち込むものと思われる。餌を与えられた群は対照的に、14日目から LC_{50} が上昇する。全般的には6日目以降から両者の間では有意な差がみられる。しかし、その差は10日目までは0.3ppm以下である。

考察および結論

魚毒性試験は各種の魚が用いられ、その試験方法の標準化が求められてきた(Doudoroff and Katz, 1953; 田端, 1972, 1973)。魚を用いる試験法における問題点は、その材料が常にまたどこでも同じ性質のものであるとい

う保障がないことである。このことは遺伝的均質性の問題とともに、それぞれの魚の飼育条件からくる個体の歴史という問題をも含んでいるからである。この問題を解決する一助として国立公害研究所でグッピーの一系統を分離しつつあるが、ここで用いた材料はその過程のものである(春日, 未発表)。グッピーの稚魚を毒性試験に用いたのは宮下(1977)が最初であるが、成魚に比べてやや感受性が高いものの相対的には大きな差がみられないことから、試験魚としては十分に条件を満たすものであろう。今回の実験にみられるように、魚の感受性は出生後、1日1日と変わっていくことがわかるが、10日目くらいまではあまり顕著な違いが認められなくて10日目を過ぎると魚の殺貝剤に対する感受性は餌を与えた場合も与えない場合も変化してくる。餌なしの場合には死亡する個体も増えることから、10日目を越えたものは試験には適さない。給餌については餌の種類による感受性の差が報じられている(Mehrle *et al.*, 1974)が、出生後10日目くらいまでの稚魚では差が出ないかもしれない。しかし、より厳密な標準的試験方法を考慮するならば、グッピーの稚魚を出生後ただちに分離し、餌を与えない2日目から10日目までのものを試験材料とすることが望ましい。Niclosamideの場合は餌を与えないものは、6日目、10日目と次第に感受性が高くなるが、このようなことが薬剤の種類による特性であるのかどうかはさだかでなく、さらに他の薬剤によって確認する必要がある。稚魚は酸素要求も少なく、また容器中の毒物の濃度変化を引き起こすことも考慮しないですむので、大きな容器を必要とせず扱いやすい。さらに、グッピーの稚魚は一年を通じて、いつでもかなりの数を用意することができ、急性毒性試験のように大量の供試魚によった方がよい結果が得られる試験には向いていると結論できる。

B-2は殺貝剤としてNiclosamideほどの効果がないとしても、Niclosamideに比して魚毒性が約2~3倍低いことが示された。しかしながら、B-2そのものの魚毒

性はその類似物である PCP-Na と大差ない(西内, 1973) ところから, 決して低毒性のものとは言えない。

殺貝剤は概して魚毒性が高いが, それゆえにまたプロビットによる LC_{50} 等のデータが十分にとられていない。そのデータを得るために, ここでは 1.15 を公比とする希釈率をとらねばならなかった。また, 逆にこのような小さな希釈率をとったことにより, 出生後の日令による魚の感受性の差が見つけ出され, その傾向がつかめたわけであるが, 上に述べたように稚魚を用いるということの利点が大きく寄与しているものと思われる。

この研究を行うにあたり資料ならびに多くの助言を与えられた筑波大学の安羅岡一男教授, 東京大学医科学研究所寄生虫研究部の田中寛教授また供試薬剤の提供と助言をして下さった国立予防衛生研究所寄生虫部の保坂幸男室長らにここに深謝いたします。

なお, 終始この研究に助言, 助力して下さった国立公害研究所生物環境部の春日清一博士に感謝します。

引用文献

- Bliss, C. I. (1935) : The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.*, **22** : 134-167.
- Doudoroff, P. and M. Katz (1953) : Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. II. The metals, as salts. *Sewage Ind. Wastes*, **25**(7) : 802-839.
- Henderson, C. and C. M. Tarzwell (1957) : Industrial wastes. Bio-assays for control of industrial effluents. *Sewage Ind. Wastes*, **29**(9) : 1002-1017.
- Mehrle, P. M., W. W. Johnson and F. L. Mayer, Jr. (1974) : Nutritional effects on chlordane toxicity in Rainbow trout. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **12**(5) : 513-517.
- 宮下衛 (1977) : グッピーの稚魚を用いた重金属類の急性毒性試験. 日本公衛誌, **24**(7) : 423-429.
- Muirhead-Thomson, R. C. (1971) : Pesticides and freshwater fauna, 248 pp., Academic Press, London and New York.
- 西内康治 (1973) : 農薬製剤の数種淡水産動物に対する毒性 XIV. 水産増殖, **20**(2) : 59-67.
- Sato, S., T. Matsushima, N. Tanaka, T. Sugimura, and F. Takashima (1973) : Hepatic tumors in the Guppy (*Lebistes reticulatus*) induced by Aflatoxin B₁, Dimethylnitrosamine and 2-Acetylaminofluorene. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**(3) : 765-778.
- 田端健二 (1972) : ヒメダカを供試魚とする TLm 標準試験法の提案. 用水と廃水, **14**(10), 51-57.
- 田端健二 (1973) : 水棲生物による工場排水の毒性試験方法 (その 1). 魚類による TLm 試験法について. 工業用水, **177** : 49-56.
- Yasuraoka, K., Y. Hosaka, and Y. Komiya (1968) : Some laboratory investigations on Yurimin P-99 as an experimental molluscicide. *Jap. J. Parasit.*, **17**(5) : 376-381.

Summary

Niclosamide(5,2'-dichloro-4-nitro-salicylicamide), B-2 (Sodium 2,5-dichloro-4-bromophenol) and Yurimin (3,5-dibromo-4-hydroxy-4'-nitroazobenzene) were tested for their toxicity against fish using juveniles of the guppy. The juveniles provided for this test were those of a yellow strain selected at National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan. The juveniles had been separated into two groups soon after parturition, one with food and another without food and they had been kept until 18 th day when high mortality occurred among the preserved population without food.

Among the three chemicals tested, Yurimin and Niclosamide had high toxicity to the juveniles and B-2 was slightly lower in its toxicity. In the case of B-2, LC_{50} values between the batch with food and that without food did not differ till 2 days after parturition but thereafter differentiated with age. Namely, the batch with food increased gradually the tolerance against the chemical, whereas the starved batch did not change the susceptibility up to 10 days after parturition. On the contrary, the LC_{50} value decreased lineally with the age of juveniles, when Niclosamide was tested. The results would suggest the usefulness of the juveniles of the guppy as a standard fish in testing the toxicity of chemicals.