数種の淡水魚に対するオイゲノールの 麻酔作用に関する研究

遠藤俊夫・荻島健次・田中 久・大島 慧

(1972 年 2 月 29 日受理)

Studies on the Anesthetic Effect of Eugenol in Some Fresh Water Fishes

Toshio ENDO, Kenji OGISHIMA, Hisashi TANAKA,
and Satoshi OHSHIMA*

Eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) was found to exhibit an anesthetic effect on various fishes.

Carp, *Cyprinus carpio*, medaka, *Oryzias latipes*, crucian carp, *Carassius auratus* and rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus* were anesthetized in a short time in water containing 12.5 to 100 ppm of eugenol as added to water in the form of FA-100 (a pharmaceutical preparation of 10% eugenol). Eugenol was effective at only one fourth the concentration of MS-222 that would give comparable effects in gold fish, *Carassius auratus*, medaka and crucian carp. Anesthesia by FA-100 and recovery from it required longer time at low water temperatures (5 and 10°C) than at normal temperature (24.5°C).

水棲動物に対し、安全かつ有効な麻酔剤¹⁾は研究用としても、業務用としても、強く要望されてきた。現在まで、ウレタン、キナルディン²⁾、MS-222³⁾などが実用に供されてきたが、さらに効果が強く、取り扱いが容易で、かつ魚体がそれを含有していたとしても、食用に供して人体に無害な薬剤が望ましいことは言を俟たない。著者らは、種々検討を重ねた結果、植物性香料の一種であるオイゲノール (4-allyl-2-methoxyphenol) に、魚に対する強い麻酔作用のあることを見出した。オイゲノールは古くから歯科用鎮痛剤として、また食品添加剤として使われており、人体には比較的害の少ない化合物である。

本報ではオイゲノールと、それを容易に水中に分散溶解するようにした製剤 FA-100 を、メダカ *Oryzias latipes*、キンギョ *Carassius auratus*、フナ *Carassius auratus*、コイ *Cyprinus carpio*、ニジマス *Salmo gairdnerii irideus* に使用してその麻酔効果と毒性を調べた結果、水温と FA-100 の麻酔効果につきメダカを用いて調べた結果などにつき報告する。

実験方法

オイゲノールは水に難溶なので、当初は界面活性剤ベグノール (東邦化学) を等量加え、少量の水を入れ、フラッシュ・ミキサーなどを用いて可溶にしてから、所定の濃度に希釈して実験に供した。(以下、オイゲノール (+ベグノール) と略。その後、水に容易に分散溶解するオイゲノールの 10 v/v % 製剤 FA-100 が作られたので、それを使用した。対照薬剤として、MS-222 (*m*-amino-benzoic acid ethylester methane-sulfonate) を用いた。

メダカ、キンギョ、コイ、フナおよびニジマスを実験に供したが、ニジマスは群馬県水産試験場川場養魚場で飼育中のものを、他の4種は、当研究所で飼育中のものを用いた。

実験時の水温は、水温と麻酔効果の関係を調べた場合を除き、特に調節せず飼育水温と同温の水を使用し

* 田辺製薬株式会社生物研究所 (Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda-shi Saitama, Japan)

Table 1. The anesthetic effect of eugenol and MS-222 on various fishes. Eugenol was dissolved with a equal amount of Pegnol (surface active agent). The concentration is expressed as ppm of eugenol in this and other tables. Water temperature was 19.5~22.0°C. Average body weight-body length of gold fish and crucian carp were 4.8 g-1.6 cm and 2.5 g-1.3 cm, respectively.

Fish	Drug	Concentration of drug (ppm)	Time (min.) required for anesthesia: median (range)	Time (min.) in drug sloution after anesthesia	Ratio of recovery (recovered /used)	Time (min.) to recover after transfer to fresh water: median (range)
Medaka	Eugenol	25	5.5 (1.5~7.5)	10	5/5	6.0(4.0~ 7.5)
				20	5/5	9.0(5.0~ 15.0)
				40	4/5	19.5(6.0~ 20.0)
				80	5/5	47.0(37.0~ 65.0)
	50	3.0 (1.5~5.0)	10	5/5	9.0(5.0~ 11.5)	
			20	5/5	11.5(7.5~ 33.0)	
			40	5/5	9.0(4.5~ 13.5)	
			80	2/5	—(58.0~132.5)	
MS-222	100	11.5 (5.0~18.0)	10	5/5	4.0(1.5~ 13.0)	
			20	5/5	6.5(4.0~ 18.0)	
			40	4/5	5.0(3.0~ 6.0)	
			80	3/5	5.0(4.0~ 26.0)	
200	1.5 (0.5~4.5)	10	5/5	10.5(4.5~ 16.0)		
		20	4/5	12.0(6.0~ 30.5)		
		40	2/5	—(7.0~ 32.0)		
		80	0/5	—		
Gold fish	Eugenol	25	8.0 (5.0~10.5)	10	5/5	8.0(6.0~ 11.5)
				20	5/5	12.0(6.0~ 26.0)
	50	5.0 (3.5~6.0)	10	1/5	21.0(—)	
MS-222	100	5.0 (3.5~6.0)	10	5/5	3.0(2.0~ 4.0)	
			20	5/5	7.0(5.0~ 34.0)	
Crucian carp	Eugenol	25	4.5 (1.0~8.0)	10	5/5	13.0(10.0~ 16.0)
				20	3/5	23.5(22.5~ 29.0)
				40	1/5	62.0(—)
				80	0/5	—
	50	1.5 (0.5~4.0)	10	0/5	—	
			20	0/5	—	
			40	0/5	—	
			80	0/5	—	
	MS-222	100	3.5 (2.0~7.0)	10	4/5	37.5(12.0~ 40.0)
				20	2/5	—(20.0~ 81.5)
				40	5/6	47.0(14.0~ 80.0)
				80	2/4	—(51.5~ 60.0)
200	1.0 (0.5~2.0)	10	3/5	29.5(9.0~ 32.0)		
		20	2/5	—(24.5~ 34.0)		
		40	2/5	—(36.5~ 53.0)		
		80	0/5	—		

Table 2. The anesthetic effect of FA-100* on various fishes. Water temperature were 14.0°C for rainbow trout and 20.0°C for others. Body weight and body length of fishes were as follows; gold fish, 6.0~8.0 g and 5.1~5.8 cm, crucian carp, 5.0~9.0 g and 6.0~7.2 cm, rainbow trout—(1), 3.1~3.6 g and 5.5~5.8 cm, and rainbow trout—(2), 9.1~12.4 g and 9.0~10.4 cm.

Fish	Concentration of eugenol (ppm)	Time (min.) required for anesthesia: median (range)	Time (min.) in FA-100* solution after anesthesia	Ratio of recovery (recovered /used)	Time (min.) to recover after transfer to fresh water: median (range)
Medaka	25	2.0 (0.5~7.5)	10	5/5	4.0(1.5~ 6.5)
			20	5/5	5.0(3.5~ 6.0)
			40	5/5	5.0(4.5~ 8.0)
			80	5/5	4.5(3.5~ 14.5)
	50	0.5 (0.5~1.0)	10	5/5	3.5(3.5~ 7.0)
			20	5/5	9.5(7.0~ 13.5)
			40	5/5	7.5(3.5~ 39.5)
			80	5/5	105.5(55.0~200.0)
Gold fish	25	4.5 (1.0~7.5)	10	5/5	6.5(5.0~ 7.0)
			20	9/10	12.5(5.5~ 196.5)
	50	1.5 (1.5~3.5)	10	5/5	6.0(4.5~ 11.5)
			20	6/10	95.5(10.5~288.5)
Carp	25	8.0 (2.0~21.5)	10	5/5	4.5(3.0~ 7.0)
			20	5/5	5.0(3.5~ 6.5)
			40	5/5	6.5(3.5~ 10.0)
			80	4/5	11.0(6.0~ 11.0)
	50	1.5 (0.5~4.5)	10	5/5	11.5(11.0~ 33.0)
			20	5/5	8.0(5.0~ 13.0)
			40	4/5	27.0(13.5~ 48.0)
			80	0/5	—
Rainbow trout—(1)	12.5	1.0 (0.5~1.5)	10	5/5	5.0(2.5~ 6.5)
			20	5/5	2.5(2.0~ 3.5)
			60	5/5	4.0(2.5~ 7.0)
	25	2.5 (1.0~5.0)	5	10/10	4.5(2.5~ 6.5)
			10	4/5	7.5(4.0~ 10.0)
	50	1.0 (1.0~2.0)	5	3/5	8.5(4.0~ 17.0)
	100	0.5	5	0/5	—
Rainbow trout—(2)	12.5	1.5** (1.0~3.0)	5	5/5	4.5(4.0~ 5.0)
			30	5/5	2.0(1.0~ 2.5)
	25	2.5 (2.0~4.0)	5	5/5	5.5(3.5~ 6.5)
			10	5/5	5.5(2.5~ 6.5)
			30	0/5	—
	50	1.0	5	5/5	6.0(5.0~ 10.5)

* A pharmaceutical preparation of 10% eugenol.

** Deeply sedate but not anesthetized.

Fig. 1. Relation between the concentration of eugenol (FA-100*) and the time for anesthetization in carp. Carp were not anesthetized within 24 hours at 10 ppm. The vertical line is the range of times required for anesthetization.

* A pharmaceutical preparation of 10% eugenol.

移す実験も行なった。

実験結果と考察

オイゲノール（+ベグノール）と MS-222 の麻酔効果の比較： メダカ、キンギョおよびフナを用いて、オイゲノール（+ベグノール）と MS-222 の麻酔効果ならびに毒性を比較したところ、Table 1 に示すとき結果を得た。

薬剤濃度の高い方が、短時間で麻酔に入り回復に要する時間が長くなり、回復率が低下すること、薬液に浸漬した時間が長いと回復に要する時間が長くなる傾向があること等は両薬剤共同様であった。これら3種の魚種に対する両薬剤の麻酔所要時間、回復所要時間ならびに回復率を、各濃度、各浸漬時間についてみれば、オイゲノール（+ベグノール）の 25 および 50 ppm がそれぞれ MS-222 の 100 および 200 ppm とおおよそ一致した。魚種による回復率の差からみて、キンギョが両薬剤に対して最も弱く、オイゲノール 25 ppm、MS-222 100 ppm に 40 分間浸漬すると、全数死亡した。次いでフナの回復率が低く、オイゲノール 25、50 ppm と MS-222 100、200 ppm をそれぞれ比較すると、オイゲノールの回復率が低かった。メダカは最も回復率が高かったが、フナの場合と同様な比較を行なえば、MS-222 の死亡率の方が高かった。

FA-100 の麻酔効果： オイゲノールを 10 v/v % 含有する製剤 FA-100 を、コイ、メダカ、キンギョおよびニジマス稚魚に対して使用した結果、Fig. 1 および Table 2 に示すとき麻酔効果と回復率を得た。

1) コイに対する FA-100 の麻酔効果： 実験に供したコイの体重は平均 6.9 g (5.5-9.4 g) であり、各濃度につき 15 尾のコイを使用した。実験水温は 13.5-17.0°C であった。オイゲノール換算濃度（以下 FA-100 使用の場合、濃度は全てオイゲノール濃度に換算し表記した。）10 ppm では、コイは游泳濃度が緩慢になったり、一時、平衡状態を失ったりしたが 24 時間以内では完全な麻酔状態には入らなかった。また 200 ppm では全て 1 分以内に麻酔に入った。麻酔所要時間の幅は、100 ppm で 1.0-1.5 分、50 ppm では 1.5-2.5 分とその範囲は狭いが、30 ppm で 3.0-9.5 分、20 ppm では 3.5-22.0 分と濃度が低下

た。水温と効果の関係は、24.5°C（飼育水温）の他、10°C および 5°C で観察したが、実験水温への馴致は、10°C の場合は、飼育水温より徐々に水温を 10°C に下げ、3 日間、5°C の場合は先ず飼育水温より 10°C に水温を下げ 1 日、続いて 5°C で 3 日間とした。麻酔からの回復の観察にも、それぞれ同温の清水を用いた。

メダカ、キンギョは 100 ml 腰高シャーレ、フナ、コイは 300 ml 容ビーカー、ニジマス稚魚は 1 l 容、成魚は 30 l 容ポリエチレン容器にそれぞれ適当量の所定濃度の薬液を入れ、魚を収容した。回復の観察にも、それぞれ同様の容器を使用した。

魚を薬液に入れてから、鰓蓋の運動以外のすべての運動が消失し、横転あるいは容器の底に静止して、外部からの刺激に対して連続的に反応を示さなくなるまでの時間を、麻酔所要時間とした。その後、一定時間毎に薬液中より魚を清水に移し、正常の游泳を開始するまでの時間を計測して、回復所要時間とした。ニジマス成魚の場合には、一時大気中に放置後、清水に

Table 3. The influence of water temperature on the anesthetic effect of FA-100* and recovery in medaka.

Concentration of eugenol (ppm)	Water temperature (°C)	Time (min.) required for anesthesia: median (range)	Time (min.) in FA-100* solution after anesthesia	Ratio of recovery (recovered /used)	Time (min.) to recover after transfer to fresh water: median (range)
25	5	18.0 (2.5~27.0)	10	5/5	19.0(12.0~ 38.0)
			20	5/5	50.5(20.0~ 78.5)
			40	4/4**	52.5(5.0~ 102.5)
			80	3/4**	79.0(68.5~ 120.0)
	10	6.5 (3.0~23.5)	10	3/3***	9.0(7.0~ 11.0)
			20	5/5	16.0(9.5~ 28.0)
			40	5/5	26.0(13.0~ 32.0)
	24.5	5.5 (1.0~12.5)	10	5/5	2.5(1.0~ 4.5)
			20	5/5	4.0(2.0~ 5.0)
			40	4/4**	4.5(2.5~ 11.0)
			80	5/5	4.5(2.5~ 8.5)
50	5	11.5 (2.5~21.5)	10	5/5	18.5(12.0~ 27.5)
			20	5/5	51.5(32.0~ 69.0)
			40	5/5	94.5(48.5~ 127.0)
			80	5/5	(90.0~1440.0)
	10	1.5 (0.5~12.0)	10	5/5	22.0(14.0~ 29.0)
			20	5/5	24.5(17.0~ 30.0)
			40	5/5	41.0(38.5~ 46.5)
			80	5/5	74.5(60.5~ 102.0)
	24.5	1.5 (0.5~ 5.5)	10	5/5	3.5(2.5~ 5.5)
			20	5/5	4.5(3.5~ 8.0)
			40	5/5	7.5(4.5~ 11.0)
			80	0/5	—

* A pharmaceutical preparation of 10% eugenol.

** One or ***two fish were only deeply sedate.

するごとにその範囲は広がった。なお、平均麻酔所要時間の標準偏差は 100 ppm で 0.2 分, 50 ppm で 0.4 分であった。

2) メダカ、コイ、キンギョ、ニジマスに対する麻酔効果の比較: 4 種の魚種間に大きな差は認められなかったが、メダカは麻酔に入るのも、回復するのも速く、コイはオイゲノール濃度 25 ppm で麻酔に入るのに長時間を要し、キンギョとニジマス稚魚は、高濃度、長時間浸漬で、回復率がやや低かった。

メダカとキンギョについて、オイゲノール (+ベグノール) と FA-100 との同じオイゲノール濃度の数値を比較すると、後者の方が、麻酔所要時間、回復所要時間共に短かく、回復率も高かった。FA-100 においては、分散溶解がベグノールを使用した場合より秀れており、このためオイゲノールの吸収、排泄速度が速くなったものと推察される。溶解補助剤自体の毒性の違いも、回復率の差に関連している可能性も否定できない。

水温と FA-100 の麻酔効果の関係: メダカを用いて、水温と FA-100 の麻酔効果との関係を調べたところ、Table 3 に示すごとく結果を得た。

低水温における麻酔および回復所要時間を飼育水温 (24.5°C) におけるそれと比較すると、5°C においては、両者とも長く、10°C においては、回復所要時間のみ長かった。水温が低いために、メダカの薬物に対する吸収、代謝、排泄機能が低下したためであろうと推定される。

ニジマス成魚を FA-100 麻酔後大気中に曝露した場合: ニジマス成魚の採卵時の操作を麻酔により容易

Table 4. The effect of FA-100* on adult rainbow trout under the condition used for stripping. Water temperature was 10°C.

Concentration of eugenol (ppm)	Time (min.) required for anesthesia: median (range)	Time (min.) in air	Ratio of recovery (recovered/used)	Time (min.) to recover after transferred to fresh water: median (range)
50	2.0(1.5~2.0)	—	5/5	4.0(3.5~5.0)
75	1.5(1.0~1.5)	—	5/5	5.0(3.5~6.0)
100	1.5(1.0~1.5)	—	5/5	5.0(3.5~6.0)
50	2.0(2.0~2.5)	5	5/5	3.0(1.5~5.0)
75	1.5(1.5~2.0)	5	5/5	3.0(2.5~4.5)
100	1.5(1.0~1.5)	5	5/5	4.5(3.5~6.0)
100	0.5**	5	10/10***	3.0(1.0~4.5)
	1.0**	5	10/10***	4.5(3.5~6.0)
150	0.5**	5	10/10	3.5(2.0~7.5)
	1.0**	5	10/10	5.0(3.0~8.0)
200	0.3**	5	3/5****	4.5(4.0~6.5)
	0.5**	5	0/5*****	—
400	0.1**	5	0/5*****	—

* A pharmaceutical preparation of 10% eugenol.

** Immersion time in FA-100 solution.

*** Fishes were only sedate.

**** Two out of 5 fish recovered once, but died thereafter.

***** Immediately died.

Table 5. Acute toxicity of FA-100* in carp. Fish (5.5~9.4 g) were transferred to fresh water after immersion in FA-100 solution for 30, 60, 90 and 120 minutes and the survival was scored after 24 hours. Water temperature was 13.5~17.5°C.

Concentration of eugenol (ppm)	Survival ratio (recovered/used)			
	Time (min.) in FA-100* solution			
	30	60	90	120
20	5/5	5/5	3/5	5/5
30	5/5	1/5	0/5	—
50	4/5	1/5	0/5	—
100	3/5	1/5	0/5	—
200	0/5	0/5	—	—
TLm (ppm of eugenol)	112	26	21	—

* A pharmaceutical preparation of 10% eugenol.

にし、魚体の損傷をも防ぐことを想定して実験を行ない、Table 4 に示すごとき結果を得た。

FA-100 溶液中に短時間浸漬し、その後5分間大気中に放置してから、清水に戻す実験で、50-150 ppm, 2.0-1.5 分浸漬が、安全に目的に達し得る条件であることが明らかになった。200 ppm 以上では、魚は死亡した。

FA-100 のコイに対する急性毒性： 急性毒性の試験には、DOUDOROFF⁴⁾の方法を用いた。

所定濃度の FA-100 溶液 4 l を入れた 5 l 水槽に一日絶食させたコイを投じ、30, 60, 90, 120 分の浸漬時間で清水に戻し、24 時間後その生死を判定した。使用したコイの体重は 5.5-9.4 g, 実験水温は 13.5-17.0°C であった。結果は Table 5 に示すとおりで、半数致死濃度 (TLm) は 30 分浸漬では、112 ppm, 60 分浸漬では、26 ppm, 90 分浸漬では、21 ppm であった。

水棲動物の麻酔剤には、外科的手術を行なう際の麻酔、採卵、標識つけなどを容易にし、魚の損傷を防ぐための麻酔、活魚輸送の際の麻酔等の応用範囲が考えられている。以上の成績だけでは、オイゲノールあるいは FA-100 の応用可能な範囲は必ずしも明らかではないが、ウナギ⁵⁾、ハマチ⁶⁾、海産のメダカ⁷⁾、およびアユ⁷⁾に有効なことが明らかにされており、特に興味をひくことは、MS-222 の無効なコウライエビ⁸⁾などの甲殻類に有効なことである。今後、さらに多種の魚種に試用されることにより、オイゲノールあるいは FA-100 の応用の可能性は明らかになろう。

要 約

1. オイゲノール (4-allyl-2-methoxyphenol) に魚を麻酔させる作用があることを発見した。
2. オイゲノールはメダカ、キンギョ、フナに対し、MS-222 (*m*-aminobenzoic acid ethylester methansulfonate) の約 1/4 の濃度で同等の効果を示した。
3. オイゲノールを 10 v/v % 含有する製剤 FA-100 はメダカ、キンギョ、コイ、ニジマスに対し秀れた麻酔効果を示し、回復も順調であった。

稿を終えるにあたり、種々貴重な御意見を賜わった当研究所の道家信道氏に深謝する。ニジマスの材料を提供頂き、多くの御協力を賜わった群馬県水産試験場川場養魚場、堀賢平技師ならびに同養魚場の諸氏に感謝する。

文 献

- 1) W. N. MCFARLAND and G. W. KLONZ: *Federation Proceedings*, **28**, 1535-1540 (1953).
- 2) B. MUENCH: *Progressive Fish-Culturist*, **20**, 42-44 (1958).
- 3) SANDOZ, L. T. D.: *Information Bulletin* (1963).
- 4) P. DOUDOROFF and et al: *Sewage and Industrial waste*, **23**, 1380-1397 (1951).
- 5) 千葉健治: FA-100 文献集, 田辺製薬株式会社, 7-9 (1971).
- 6) 木村正雄: 同文献集, 10-11 (1971).
- 7) 和田 功: 同文献集, 12-14 (1971).
- 8) 和田 功・山川文男・石岡清英: 同文献集, 17-19 (1971).