界面活性剤の魚に対する作用について

富 山 新 一

(1974年9月9日受理)

Effects of Surfactants on Fish

Shin-ichi TOMIYAMA*

When fish were exposed to a solution containing RSO_3^- , RSO_4^- -type surfactants, these surfactants were particularly adsorbed on to the surface of fish gills, causing increased numbers of red blood cells in the treated fish. Death caused by these types of surface active agents was delayed by the addition of protein to the surfactant solution.

These results suggest that the toxicity of RSO_3^- , RSO_4^- -type surfactants for fish might be due to the formation of a surfactant-protein complex upon contact with gill protein.

近年、鉱油による海水の汚染、また、石油タンカー事故による海水汚濁の処理法として、界面活性剤が散布使用されている^{1,2)}。しかし、散布した界面活性剤による海岸地区における水棲生物への影響が問題とされている³⁾。また、濃厚・多量の界面活性剤の河川流入などによる魚類への影響も時に問題を生じている。著者は、 RSO_3^- , RSO_4^- 系界面活性剤および現在最も多く消費されている直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩についてはその生分解過程に想定される短鎖アルキル誘導体を含めて、魚に対する作用を検討した。その結果、興味ある所見を得たので以下に報告する。

実験の部

TLm 測定

1. 試料 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩：アルキル基は C_4 , C_6 , C_8 , C_{10} および C_{12} のもの。LAS と略称し、本文中ではとくに断わらぬ限り C_{12} 主体のものを指すこととする。

アルキル硫酸エステルナトリウム塩： RSO_4Na 、本文中 AS と略称する。アルキル基は C_{12} が主体。

アルキルエトキシ硫酸エステルナトリウム塩： $\text{R-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{SO}_3\text{Na}$ 。本文中 AES と略称する。アルキル基は C_{12} ，エチレンオキシド付加数 (n) は 3 モルが主体。

ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル： $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ 。本文中 NPEO と略称する。アルキル基は C_9 が主体で、エチレンオキシド付加数 (n) は 9 モルが中心。

試料にはそのほか、比較のため石鹼を使用した。

2. 供試魚 体重 0.2 g のヒメダカ *Oryzias latipes*。試験 1 カ月前より 25°C の順応槽で飼育し、2 日前に餌止めした。

3. 方法 工場排水試験法 (JIS・K 0102-1971) に準じ、等比級数的に濃度を希釈した界面活性剤水溶液 2 l 中にヒメダカ 5 尾を入れ、 25°C の恒温槽中で 24 時間、48 時間後取出し死亡率を観察し常法により TLm 値を求めた。

* ライオン油脂(株) (Lion Fat and Oil Co. Ltd., Hirai 7, Edogawa-ku, Tokyo).

鰓への吸着の検討

1. 供試界面活性剤

^{35}S —LAS 分子量 348.5 比放射能 9.24 m Ci/m mol 第一化学薬品社製。

^{14}C —AOS アルファオレフィンスルホン酸ナトリウム塩 分子量 308.0 比放射能

1.95 m Ci/m mol 第一化学薬品社製。本文中 ^{14}C —AOS と略称する。

非放射性 AOS はアルキレン基 $\text{C}_{15}\sim\text{C}_{18}$ のもの。

2. 供試魚 体重約 30 g, 体長 12 cm のワキン *Carassius auratus*。

3. 方法 全身オートラジオグラフィによる吸着分布の観察については, ^{35}S —LAS では 5 ppm 水溶液 6.4 l (実測値 629 μCi), ^{14}C —AOS では 20 ppm 水溶液 10 l (実測値 1.27 m Ci) 中にワキン 4 尾を入れ 3 時間後取出す。ドライアイス—アセトンで凍結後, クリオスタット (ブライツ社製) で厚さ 20 μ の全身組織標本を調製, その切片を凍結乾燥後, X 線用フィルム (富士フィルム社製) に 3 日間密着させて感光黒化度より試料の体内分布を観察した。界面活性剤の吸着量測定については, ^{35}S —LAS を用いたときは上記の溶液に暴露したワキンの鰓を切出し, “ソルエン” (バッカード社製) で溶解し液体シンチレーションカウンターを用いて放射能強度より吸着量を測定した。

非放射性 AOS を用いたときは 10 ppm 水溶液 15 l 中にワキン 30 尾を入れ, 30 分, 1 時間, 3 時間後, それぞれ 10 尾ずつを取出し, 純水中に 1 分入れてゆるく付着した AOS を除いたのち解剖し鰓はそのまま消化管は内容物を除去後, 魚体に吸着した AOS を 70% エチルアルコール 60 ml で 30 秒抽出液からエチルアルコールを留去後メチレンブルー比色法⁹⁾で定量して, AOS の吸着量を測定した。

赤血球数の測定

1. 供試界面活性剤 LAS

2. 供試魚 体重 1 kg, 体長 30 cm のコイ *Cyprinus carpio*, 養魚場から購入後 10 日間 15°C で飼育したもの。および体重 30 g, 体長 12 cm のワキン。

3. 方法 LAS の 80 ppm 水溶液 60 l にコイ 2 尾を入れ, または 20 ppm 水溶液 10 l にワキン 2 尾を入れ, 死亡直後の魚の赤血球数を測定した。対照として, ドライアイスを添加することにより酸素欠乏状態となった液に暴露した。あるいは, LAS の 40 ppm 水溶液 60 l にコイ 2 尾を入れ鰓蓋運動の衰弱および横臥の状態を示したときに採血し赤血球数を測定した。対照として, 純水 60 l にコイ 4 尾を入れ, 溶存酸素測定により認められた酸素欠乏による死亡の直後に採血した。採血法は注射針で直接動脈球から 1 ml 採血し 1% EDTA 2 カリウム塩溶液 1 ml と混合し “コールターカウンター” (コールターエレクトロニクス社製) を用いてまたは Bürker-Türk 算定板で計数した。溶存酸素は DO メーター (東芝—Beckman 社製) を用いて測定した。

卵白の毒性低下作用

1. 供試界面活性剤 AOS

2. 供試魚 体重 0.2 g のヒメダカ。

3. 方法 各所定濃度の AOS 水溶液 2 l 中に卵黄を除いた生卵卵白を加え, ヒメダカ 5 尾を入れ, 各所定時間後の生存率を観察した。卵白中のアルブミン含量は 7% として計算した。

結 果

TLm LAS, 各種鎖長のアルキル基をもつた直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩, AS, AES, NPEO のヒメダカに対する 24 時間と 48 時間 TLm 値を Table 1 に示した。

C_{10} 以下の短鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩は, 4 種の界面活性剤が魚に対し急速な作用を示したことについて, 著しく高い TLm 値を示した。なお, これらの短鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩はいずれも LAS の生分解過程で想定されるものである。

Plate I. Macroautoradiographic view of goldfish kept in a AOS solution for 30 min.

Plate II. Macroautoradiographic view of goldfish kept in a AOS solution for 3 hr.

Plate III. Macroautoradiographic view of goldfish kept in a LAS solution for 3 hr.

Table 1. TLm of surfactants and related substances for "Himedaka"
Oryzias latipes

Surfactants		TLm	
		24 hr	48 hr
LAS	C ₁₂	4.0 ppm	4.0 ppm
	C ₁₀	> 50	> 50
	C ₈	> 50	> 50
	C ₆	> 50	> 50
	C ₄	> 50	> 50
AS		10	10
AES		10	10
NPEO		18	18
Soap		11	11

LAS: Linear alkylate sulfonate (Na)

AS: Alkyl sulfate (Na)

AES: Alkyl ethoxylate sulfate (Na)

NPEO: Poly (9) oxyethylene nonyl phenol ether

Table 2. Adsorption of AOS on gills and alimentary canals of goldfish

Organs	Time of exposure to 10 ppm AOS soln.	Amount of AOS adsorbed ($\mu\text{g/g}$ organ)
Gills	0.5 hr	0.3
	1	2.5
	3	48.3
Alimentary canals	0.5	0.0
	1	0.0
	3	0.0

* This experiment was carried out by use of ^{14}C -AOS.

鰓への吸着

^{35}S -LAS, ^{14}C -AOS を用いてワキンへの体内吸着, 吸着部位を検討した。LAS に 3 時間, AOS に 30 分, および 3 時間暴露したワキンのオートラジオグラムを Plate I, II, III に示した。写真から, LAS, AOS が体表, 口辺ともに鰓の部位に大量に吸着することを認めた。

コイ鰓への ^{35}S -LAS の吸着量は鰓湿重量 1 g 当りの放射能 $3228 \times 10^4 \mu\text{Ci}$ より LAS として $24.3 \mu\text{g}$ であった。

また, ワキンの鰓ならびに消化管への AOS 吸着量を経時的に測定し, その結果を Table 2 に示した。AOS の鰓への吸着量は経時的に増加することを認めたが, 消化管への吸着はなかつた。

赤血球数

魚は一般に酸素欠乏状態になると, 赤血球数が増加し, この速度は驚くほど速やかであることが認められている⁵⁾。界面活性剤が鰓の表面に結合することにより鰓の機能低下が起り, 酸素欠乏の症状を示すにいたることが考えられる。そこで, 界面活性剤で処理し, 横臥の状態を示した時または死亡直後の魚の赤血球数を測定した。対照として, 飼育水中にドライアイスを追加, または飼育水量を少量とすることにより酸素の供給を制限または欠乏の状態とした液に魚を暴露した場合についても検討した。結果を Table 3, 4 に示した。

LAS 処理により死亡した魚の赤血球数は増加を示し, 酸素欠乏症と同様の結果であった。

Table 3. Change in the erythrocyte count of carp and goldfish by the exposure to LAS

Fishes	Exposure solution	Erythrocyte Counts* ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Time up to death
Carp	Water	7.8	No death (>48 hr)
	80 ppm LAS	12.7	30 min
	Dryice added	11.7	1 min
Goldfish	Water	13.3	No death (>48 hr)
	20 ppm LAS	17.3	90 min

* Counted with a Coulter Counter.

Mean values obtained from three fish in each case.

Table 4. Change in the erythrocyte count of carp by exposure to LAS

Treatment	Red blood cell ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Exposure time	Dissolved Oxygen	
			Initial	After exposure
LAS 40 ppm	26.6	80 min	11 ppm	11 ppm
	27.4	110 min	11	10.5
Suffocated fish	30.6	24 hr	11	0.9
	25.2	24 hr	11	0.9
Control	18.6	—	11	11
	21.6	—	11	11

Water temperature 15°C: Blood cell counter (Bürker-Türk).

Table 5. Decrease in the toxicity of AOS to fish due to addition of egg albumin

Test solutions	L _T O	L _T 100
AOS (5 ppm)	0.5 hr	2 hr
AOS (5 ppm) added with egg albumin (2100 ppm)	>48	—
AOS (10 ppm)	0.5	1
AOS (10 ppm) added with egg albumin (2100 ppm)	2	3
AOS (10 ppm) added with egg albumin (4200 ppm)	2	6

L_TO: 100% survival time.L_T100: 100% dead time.

卵白の毒性低下作用

界面活性剤の作用を低下させることを検討するため、界面活性剤の鰓、タンパク質への結合を少なくする考えからつぎの実験を行なった。すなわち、あらかじめ卵白アルブミンを RSO₃ 系界面活性剤 AOS 水溶液に pH 7 付近で混合し、その溶液の魚への影響を AOS と比較して調べた結果その作用が低下した (Table 5)。この実験の結果は界面活性剤の鰓への吸着が複合体形成により低減したことによるものと予想される。

考 察

RSO₃, RSO₄ 系界面活性剤は、魚の鰓に短時間に特異的に吸着することを示し、また、界面活性剤によりへい死した魚の赤血球数が増加することを示した。すなわち界面活性剤が鰓の粘膜あるいは各種のタンパク質に吸着することによつて鰓の呼吸機能低下がおこり酸素欠乏状態となつて死に至ることが予想される。

この界面活性剤の魚にたいする作用にはタンパク質との複合体形成の機構⁹⁾が関係すると考察した。複合体形成の基礎的研究として、著者らはこれらのアルキルベンゼンスルホン酸塩類の卵白アルブミンとの結合に関する実験を行ない、LASは結合するがオクチル以下のアルキルの同族体では結合が認められないとの結果をえている*。すなわち、アルキル鎖長が短かくなるとタンパク質との複合体形成がみとめられない。一方、LASの生分解過程で想定される短鎖のアルキルベンゼンスルホン酸塩の魚に対する作用は高濃度でも認められなかつた。このことから魚に対する作用は鰓タンパク質との複合体形成の程度に関係し、LASの生分解中間体(ほぼC₉以下のアルキルをもつたアルキルベンゼンスルホン酸塩)では吸着による呼吸機能の低下の原因が消滅しているものと思われる。またあらかじめ、RSO₄系界面活性剤とタンパク質とを混合し、その溶液について魚に作用をみた結果、界面活性剤の鰓への結合が阻止されて致死時間が遅延することも認めた。この実験においても、界面活性剤の複合体形成が魚に対する毒性に関係することが考えられる。非イオン系界面活性剤の作用が若干低いことについては、従来の文献⁷⁾にも示されるように複合体形成作用が弱く結合したタンパク質の変性もみとめられないことから理解される。

本実験にあたって協力されたライオン生物実験センター室長飯森正秀博士に感謝する。

文 献

- 1) 富山新一: 油化学, **16**, 203-204 (1967).
- 2) 富山新一・高尾正保: 同誌, **16**, 376-378 (1967).
- 3) Her Majesty's Stationery Office: Rept. of the Comm. of Scientists on the Sci. and Technol. Aspects of the Torrey Canyon Disaster "The Torrey Canyon", London, 1967.
- 4) D. C. ABBOTT: *Analyst*, **87**, 286-293 (1962).
- 5) 川本信之: 魚類生理, 恒星社厚生閣, 東京, 1970, p. 33-34.
- 6) PUTNAM, F. W. & H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1992 (1944).
- 7) 青木幸一郎: 油化学, **17**, 184-192 (1968).

* 藤井徹也・大場健吉・富山新一: 昭和41年度日本農芸化学会講演要旨集 p. 217.