

合成洗剤成分のヒメダカへの影響 (4)

——電子顕微鏡観察を中心として——

藤野裕弘・市田恵美^{*1}

1. はじめに

日本の洗剤などの製品販売量は、2003年の1年間で約205万トンに及んでおり¹⁾、環境への影響が懸念されている。なかでも、生活排水中の合成洗剤は水質汚染の代表的化学物質である。合成洗剤の販売量は、2003年の1年間で約107万トン²⁾、その内の洗濯用合成洗剤は、約75万トンである³⁾。

合成洗剤は、第二次世界大戦の油脂不足で油脂以外の原料によって洗剤を製造する必要性から生まれ、その生産量は、1963年に石鹼の生産量を越えている⁴⁾。日本においては、1950年にアメリカから、合成洗剤の主成分である合成界面活性剤 ABS (分岐型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム) が輸入されている。

この合成界面活性剤には毒性があり、ABS は、下水処理場や河川での泡の問題や⁵⁾、生物毒性の問題により^{4, 6)}、分解性の高い LAS に置き換わり、1974年頃までにこの問題は解決された。しかしながら、LAS に関する生物毒性の問題は残されたままとなっており⁷⁾、LAS の分子構造による毒性の違いも報告されている⁸⁾。この魚毒性については、界面活性剤と結合した蛋白質 (生物体内の血液や細胞・酵素・遺伝子など) が変性し、魚が死に至ることが報告されている⁹⁾。その後、LAS にかわる低刺激性の非イオン界面活性剤 POAE (ポリオキシエチレンアルキルエーテル: POER 又は AE とも略される) が注目されたが、POAE が原因と考えられるコイの大量斃死が問題となった¹⁰⁾。

現在は、陰イオン界面活性剤である LAS と、POAE が合成洗剤の主要な界面活性剤として使用されている。PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) による化学物質排出移動量届出制度2002年度データによれば、日本で1年間に排出された洗濯用合成洗剤の主成分である LAS (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム) は約2万トンに達するとされており¹¹⁾、その量は、2004年度においても減少が見られていない¹²⁾。さらに、日本の洗剤などの1年間の製品販売量は、2006年には約211万トンと増加している¹³⁾。

当研究室では、2005年度に LAS の急性毒性と薬品メーカーによる毒性の相違を¹⁴⁾、2006

提出日2008年8月27日 受理日2008年10月1日

*1 教養学部生活学科学学生 (現在は卒業)

年度に市販の各種粉末合成洗剤自体のヒメダカに対する急性毒性を¹⁵⁾、2007年度に急性毒性試験を行ったヒメダカ組織の光学顕微鏡観察結果を¹⁶⁾ 報告した。今回は、2005年度に報告した急性毒試験を行ったヒメダカ組織に関して走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) で観察したので、その結果を中心に報告する。

2. 材料

供試魚としてはヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。急性毒性試験に用いた陰イオン界面活性剤は、和光純薬工業株式会社の直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム標準品 (LAS: Sodium linear-Dodecylbenzene-sulfonate Standard, $C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na=348.48$, Lot-KSH9275) と関東化学株式会社のドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS: Sodium Dodecylbenzensulfonate, $C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na=348.48$) を使用した。

3. 方法

3-1 急性毒性試験方法^{14, 17)}

急性毒性^{18, 19)} とは、化学物質を動物に1回または短時間に反復投与した場合の毒性である。具体的には、各群に異なった用量の化学物質を経口投与し、症状の種類、程度、持続時間、推移および死亡状態を観察する。一般に用いられる指標は、母集団の動物の半数を死亡させる化学物質質量であり、この半数致死量 (LD50: 50% Lethal Dose) をもって急性毒性の強さの比較が行われる。また、水生生物に対する毒性を調べる魚類急性毒性もある。

半数致死濃度^{18, 19)} とは、ガス体または水に溶解した状態の化学物質に曝露された生物の半数 (50%) が試験期間内に死亡する濃度のことである。魚類急性毒性試験における半数致死濃度 (LC50: 50% Lethal Concentration) は、試験に用いられた魚種の50%が死亡する化学物質の濃度であり、数値の低い方が、毒性が強いことになる。魚毒性試験の場合、薬剤を段階的に希釈した試料水中で、特定の供試魚 (ヒメダカやコイなど) を一定時間 (24, 48, 96時間) 飼育し、供試魚の半数が死亡する濃度を TLm (Median Tolerance Limit) と表現する。

今回は、藤野他¹⁴⁾ の報告で実施された急性毒性試験で LAS と ABS の TLm24 (24時間後の半数致死濃度) を求めたヒメダカに関して、走査型電子顕微鏡による観察を行った。試験には、健康状態を確認し、試験開始の24時間前から、餌の投与を中止したヒメダカを用いた。また、水温は、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ になるように自動調節した。なお、エチルバイオレットを用いた EVAS (エチルバイオレット活性物質) 法で試験水の LAS 濃度を測定し^{14, 20)}、合成洗剤の界面活性剤含有率から推定される計算値と大きな差がないことを確認した。

3-2 走査型電子顕微鏡観察用組織標本作成法²¹⁻²³⁾

3-2-1 概要

生物試料は、通常水分を多く含んでいる。走査型電子顕微鏡で観察する場合、観察時に試料

が真空中におかれる為、試料は変形してしまう事が多い。そこで、試料の変形を最小限にとどめる為前処理を行う。

前処理の方法には、臨界点乾燥法と凍結乾燥法がある。臨界点乾燥法とは、生物試料中の水分を、エチルアルコールなどの有機溶媒から酢酸イソアミルに置換し、更に液化二酸化炭素に置換した後、表面張力が零のまま液体から気体に変化する温度（31.4℃：臨界温度）に上昇させ、温度を維持しながら徐々に二酸化炭素を放出して試料を乾燥させる方法である。SEM 用試料乾燥方法としては、国内で30年の実績を持っている。凍結乾燥法とは、生物試料中の水分をエチルアルコールに置換し、更に t -ブチルアルコールに置換して凍結させ、13.3pa 程度の真空中で、 t -ブチルアルコールを昇華・乾燥させる方法である。

臨界点乾燥法は歴史があるが若干の試料収縮が認められ、液化二酸化炭素を使用する為、充分な安全管理を必要とするなどの問題点がある。凍結乾燥法は臨界点乾燥法に比べて歴史が浅いが、最小限の試料収縮ですむため、前処理の方法として、 t -ブチルアルコール凍結乾燥法を選択した。

3-2-2 操作

(1) 洗浄

生理食塩水（魚類の生理食塩水は0.85%）の入ったスクリー管瓶にヒメダカを入れ、上下に数回振る。生存個体は、氷水につけた後に洗浄する。

(2) 固定

スクリー管瓶の生理食塩水を10%ホルマリンと入れ替え、暗所で固定する。24時間後に10%ホルマリンを交換する。

(3) 試料の摘出と切り出し

固定後のメダカ組織片の観察部位を露出させる。鰓の場合は以下の方法をとる。

- ①マイスタールーペを覗きながら、ピンセットを使って鰓蓋を取り除き、次にメダカの頭部全体を取り除く。
- ②鰓以外のいらぬ部分をきれいに切り除く。
- ③ハサミを用いて試料台にのる大きさに切断する。試料台に載せた時に観察面が、試料台に対して平行になるように切断する。

(4) 水洗

スクリー管瓶の中に組織片と蒸留水を入れ、10分間マルチミキサーにかけ洗浄する。これを3回繰り返す。

(5) 脱水

凍結乾燥法で用いる t -ブチルアルコールは水に溶けやすいことから、エチルアルコールで脱水しておく必要がある。

- ①水洗後の組織片を、50, 60, 70, 80, 90, 95%エチルアルコールの順に入れ、それぞれ10分間マルチミキサーで振盪する。
- ②組織片を無水アルコールに浸し、20分間マルチミキサーにかける。これを3回繰り返す。

(6) 置換

凍結乾燥法で用いる t -ブチルアルコールを組織片に浸透させる。

- ①脱水後の組織片を、無水アルコールと t -ブチルアルコールの同量を混ぜた液に浸し、30分間マルチミキサーにかける。
- ②組織片を t -ブチルアルコール溶液に浸し、30分間マルチミキサーにかける。これを3回繰り返す。

(7) 凍結乾燥

凍結乾燥には、ES-2030形日立フリーズドライヤー（凍結真空乾燥装置）を用いた。

- ①試料瓶一つにつき組織片一つを入れ、駒込ピペットで試料瓶の淵まで t -ブチルアルコールを注ぐ。
- ②試料瓶を冷凍庫に入れ、 t -ブチルアルコールを凍結させる。冷凍庫内で保管する場合は、ラップなどで包み乾燥を防ぐ。
- ③ES-2030形日立フリーズドライヤーの操作マニュアルに従い、組織片を凍結乾燥する。

3-3 走査型電子顕微鏡（SEM）による観察

観察は、S-3200N 走査型電子顕微鏡（日立）を用いた。

光学顕微鏡と電子顕微鏡の大きな違いは、利用する媒体が光（波長 = $0.5\ \mu\text{m}$ ）であるか、電子（波長 = $0.00005\sim 0.000003\ \mu\text{m}$ ）であるかという事である。

走査型電子顕微鏡は、電子線を細く絞って試料表面上を走査し、電子線の照射によって発生する信号を検出し、スクリーン上に映し出す電子顕微鏡である。試料に電子線を照射した時、得られる主要な信号のうち、強度が大きく形態の観察に利用されているのは、二次電子と反射電子である。

二次電子は、試料の外形に忠実でSEMの最高分解能を持つ。試料を構成する原子の外郭電子が、一次電子の照射により引き出されたもので、初速は数ボルトと小さく、試料の表面近くから発生する割合が大きいため、試料の外形に最も忠実な信号といえる。発生量は最も多く、通常SEMの信号として一般的に用いられるが、低真空観察では、放電によるノイズが生じるため後段加速がかけられず、この信号は使う事が出来ない。

一方、反射電子は後段加速の必要がないため、低真空観察の時に使用する。照射電子が試料の原子によって、弾性的に跳ね返されたもので、加速電圧の強さや試料の密度によるが、試料の表面から少し入ったところから出てくるため、外形に対する忠実性は二次電子よりいくらか劣る。初速が照射電子の加速電圧とほぼ同じであるため、後段加速の必要がない。しかし、加速電圧が低い場合は反射電子の速度も小さく、検出効率は二次電子より悪くなる。反射電子の発生量は、試料を構成する物質の密度（平均原子番号）と結晶の方向に影響される。このため、外形が平坦であっても画像にはコントラストが生じたりする。

高真空と低真空ともに、S-3200N 走査型電子顕微鏡（日立）の手順書にしたがって観察を行った。

4. 結果

4-1 半数致死濃度について

和光純薬工業株式会社の LAS の急性毒性試験結果は、表 1 にまとめて示した。それぞれの試験結果を平均すると、24 時間後の半数致死濃度 (TLm24) は 5.75ppm となった。

関東化学株式会社の ABS の急性毒性試験結果は、表 2 にまとめて示した。それぞれの試験結果を平均すると、24 時間後の半数致死濃度 (TLm24) は 36.99ppm となった。

表 1 LAS (和光純薬) の TLm24 測定結果

	1 回目		2 回目		3 回目	
濃度 (ppm)	5.70	6.00	5.70	6.00	5.70	6.00
生存数 (尾)	6	2	9	1	6	1
死亡数 (尾)	4	8	1	9	4	9
死亡率 (%)	40	80	10	90	40	90
TLm24	7.76ppm		5.85ppm		5.61ppm	
TLm24平均			5.75ppm			

表 2 ABS (関東化学) の TLm24 測定結果

	1 回目		2 回目		3 回目	
濃度 (ppm)	36.00	38.00	36.00	37.50	36.00	38.00
生存数 (尾)	8	1	7	4	9	2
死亡数 (尾)	2	9	3	6	1	8
死亡率 (%)	20	90	30	60	10	80
TLm24	36.85ppm		37.00ppm		37.13ppm	
TLm24平均	36.99ppm					

4-2 鰓について

光学顕微鏡では、急性毒性試験を行ったメダカの鰓で、対照魚には見られない二次鰓弁の棍棒化が認められた¹⁶⁾。走査型電子顕微鏡を用いた組織観察でも対照魚には見られない鰓弁の棍棒化が認められた。

対照魚の鰓では、一次鰓弁が櫛状に並んだ状態であり (図 1)、一次鰓弁を拡大した図 2 では、一次鰓弁の両端に櫛の歯のように二次鰓弁が規則正しく並んでいる様子が確認された。

LAS 濃度 5.7ppm 溶液中で急性毒性試験後に生き残った個体では、一次鰓弁が櫛状に並んだ状態ではあるが (図 3)、対照魚と比較すると鰓の上皮に損傷が認められた (図 4)。LAS 濃度 6.0ppm 溶液中で急性毒性試験中に死亡した個体では、一次鰓弁の大部分が粘液でおおわれ棍棒化しており (図 5)、部分的に二次鰓弁が確認できるのみであった (図 6)。

ABS 濃度 36.0ppm 溶液中で急性毒性試験中に死亡した個体では、一次鰓弁に棍棒化が認められ (図 7)、二次鰓弁の上皮が壊死して櫛状の構造が崩壊している部分も観察された (図 8)。

棍棒化は、分泌された粘液が二次鰓弁間を湿潤する現象で、鰓弁間に水が流れず、結果的に窒息することになる。この棍棒化は、程度の違いはあるものの、組織標本とした急性毒性試験魚に共通に認められた。

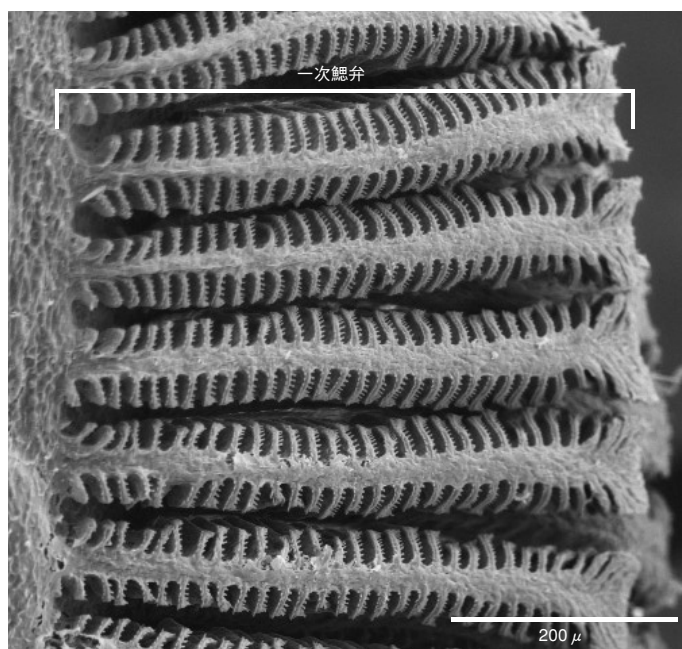


図1 対照魚の鰓

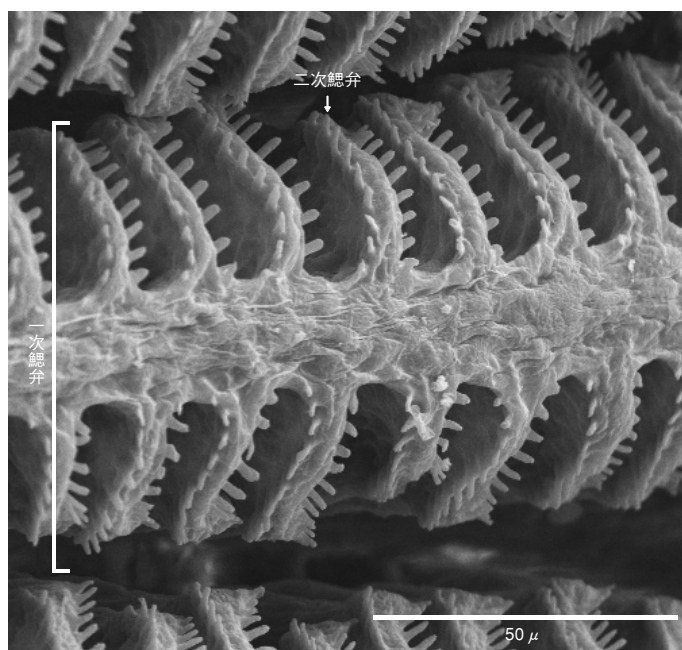


図2 対照魚の鰓

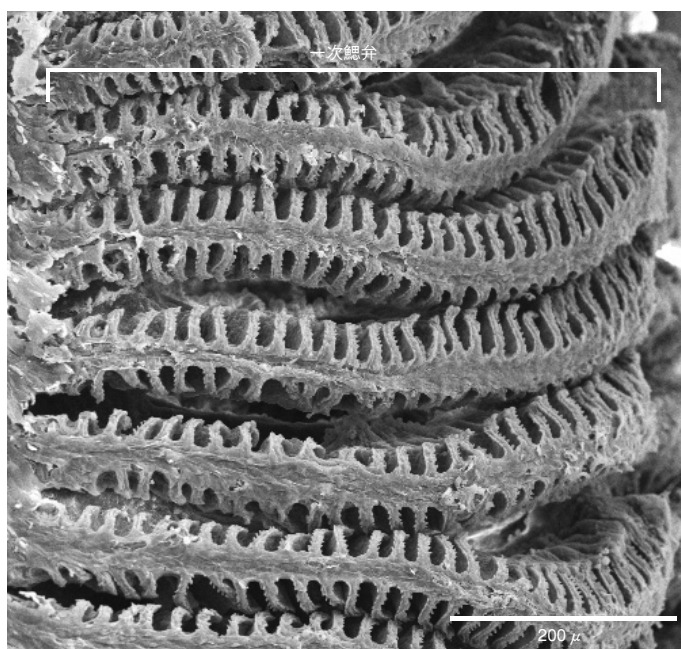


図3 急性毒性試験魚の鰓 (LAS5.7ppm 溶液で生存)

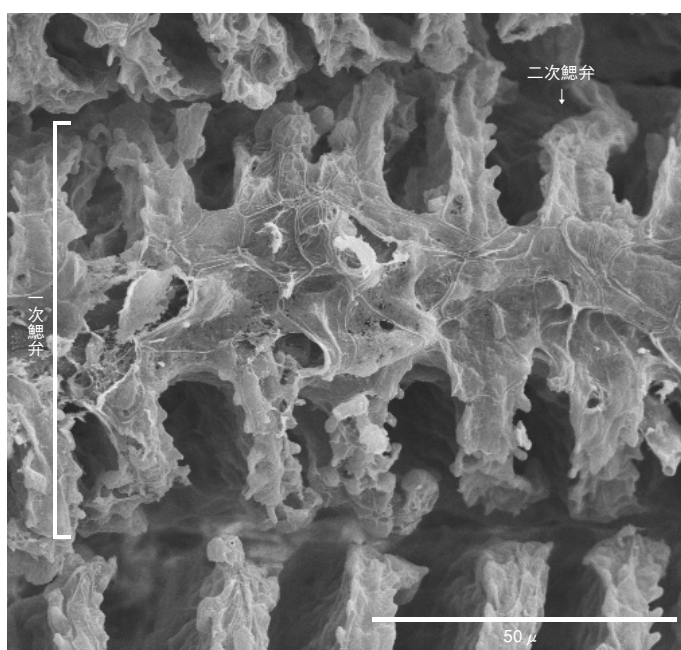


図4 急性毒性試験魚の鰓 (LAS5.7ppm 溶液で生存)

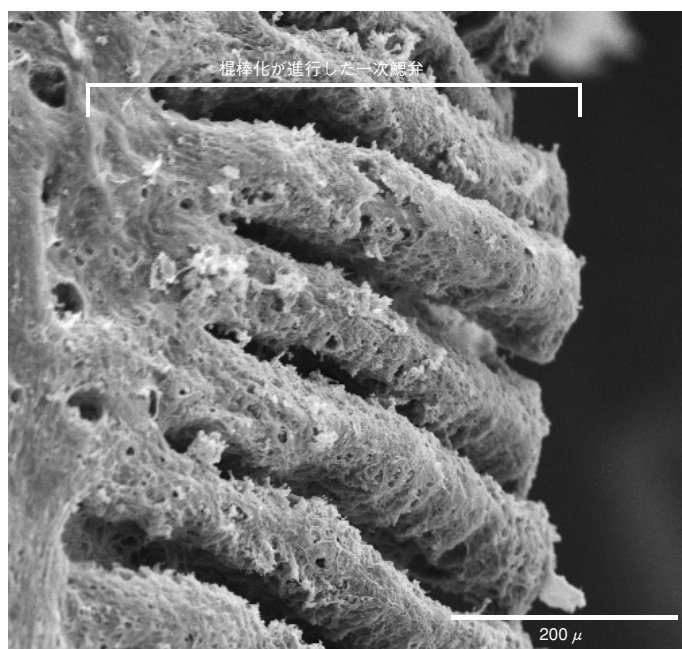


図5 急性毒性試験魚の鰓（LAS6.0ppm 溶液で死亡）

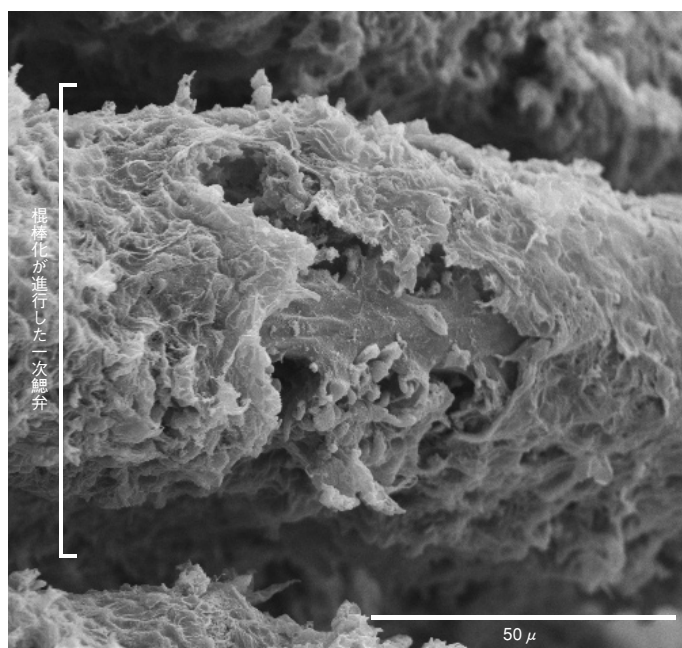


図6 急性毒性試験魚の鰓（LAS6.0ppm 溶液で死亡）

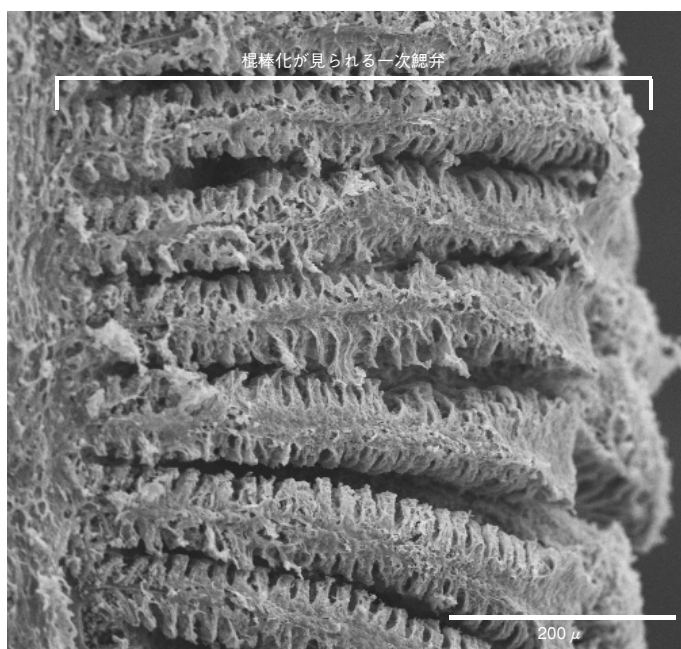


図7 急性毒性試験魚の鰓 (ABS36.0ppm 溶液で死亡)

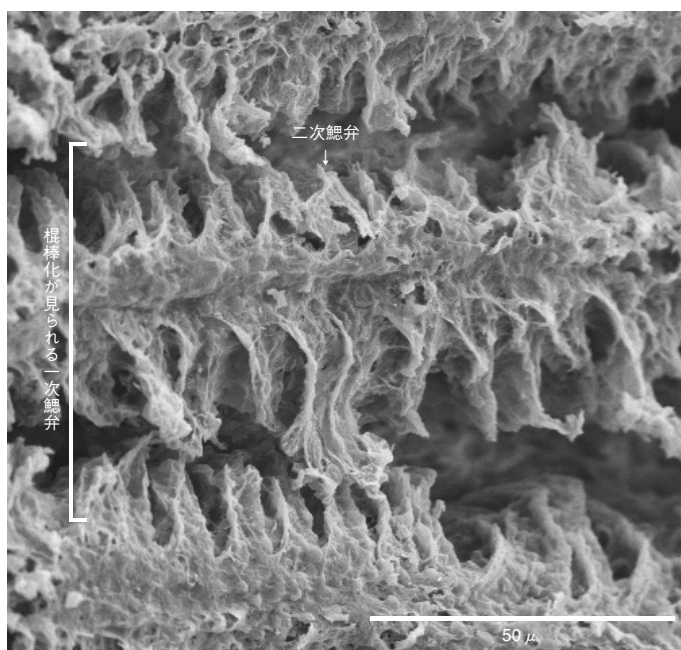


図8 急性毒性試験魚の鰓 (ABS36.0ppm 溶液で死亡)

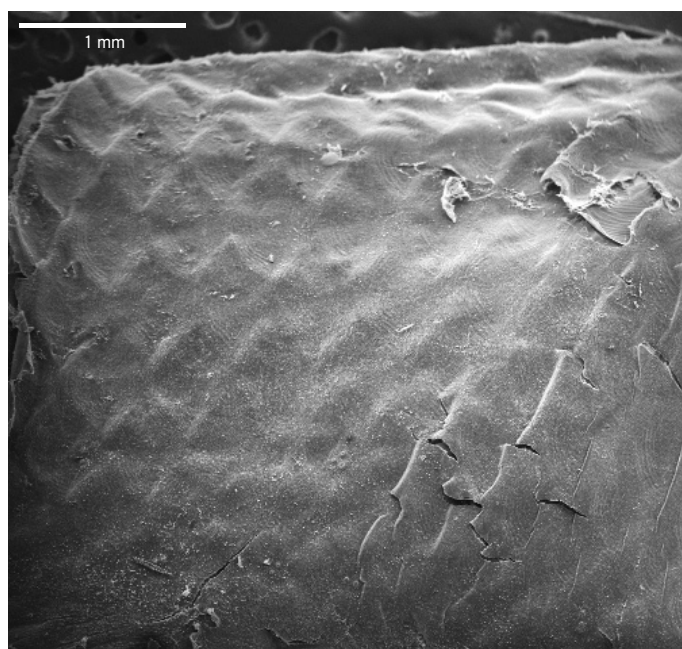


図9 対照魚の腹部表皮

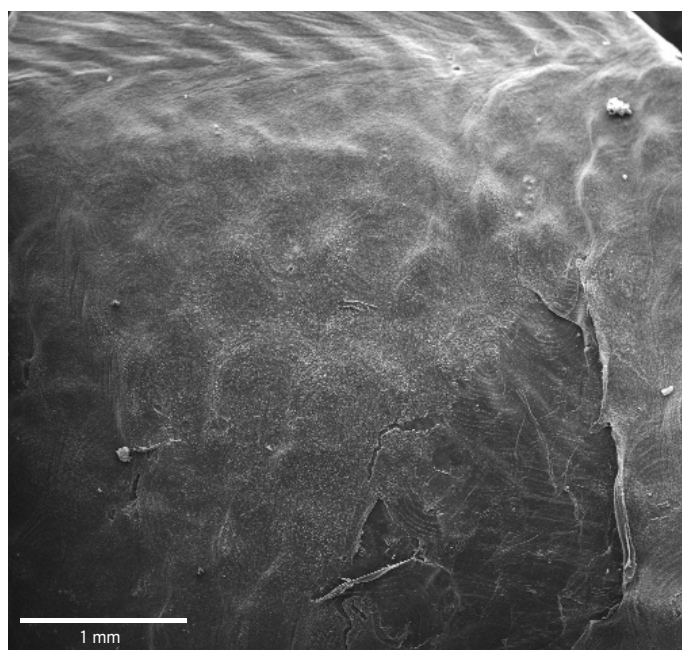


図10 急性毒性試験魚の腹部表皮 (LAS5.7ppm 溶液で生存)

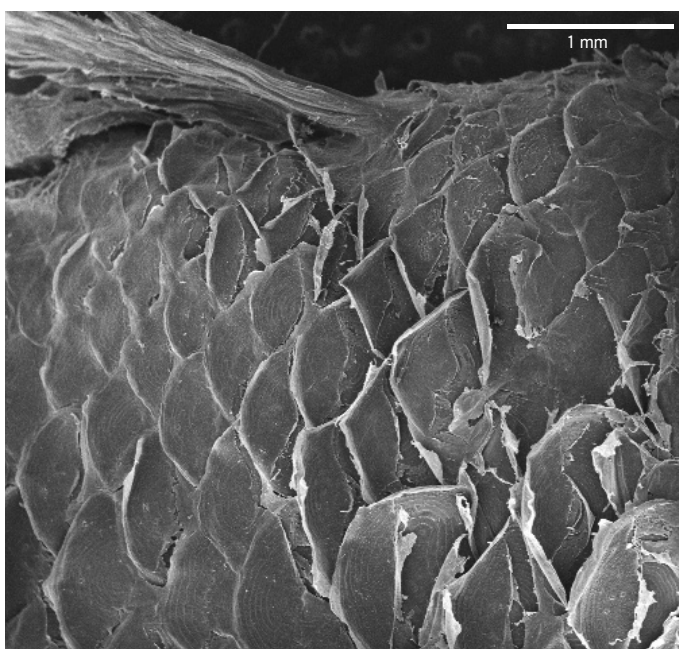


図11 急性毒性試験魚の腹部表皮 (LAS5.7ppm 溶液で死亡)

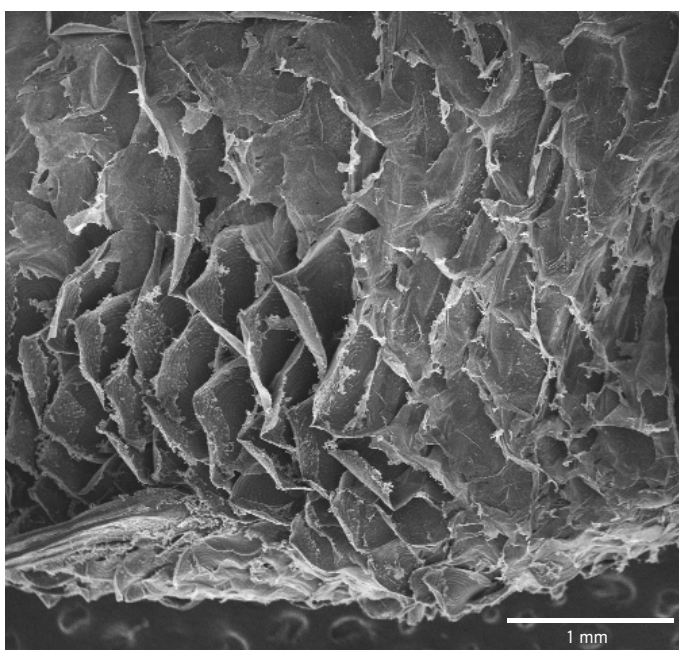


図12 急性毒性試験魚の腹部表皮 (ABS36.0ppm 溶液で死亡)

4-3 表皮（上皮細胞層）について

光学顕微鏡では、急性毒性試験を行ったメダカの真皮組織を覆っている表皮の粘液細胞群の剥離が認められ、上皮細胞層が薄くなっていた¹⁶⁾。これに対して、対照魚の粘液細胞群には十分な厚みが認められた¹⁶⁾。走査型電子顕微鏡を用いた組織観察でも対照魚には見られない表皮の異常が認められた。

対照魚の表皮は均一に粘液細胞群に覆われおり、その下の鱗は輪郭が認められるのみであった（図9）。

LAS 濃度5.7ppm 溶液中で急性毒性試験後に生き残った個体表皮でも粘液細胞群が鱗を覆っていたが、一部に剥離が認められた（図10）。同じ LAS 濃度5.7ppm 溶液中で急性毒性試験中に死亡した個体表皮では、粘液細胞群の大部分が剥がれて鱗がむき出しとなっており、その鱗の一部が反り返って規則正しく並んでいない状態であった（図11）。

ABS 濃度36.0ppm 溶液中で急性毒性試験中に死亡した個体表皮では、粘液細胞群がほとんど認められず、鱗の大部分が反り返り表皮の組織構造が破壊されていた（図12）。

5. 考察

5-1 半数致死濃度について

LAS（TLm24は5.75ppm）と ABS（TLm24は36.99ppm）の半数致死濃度に大きな違いが認められたことから、試薬メーカーに対する聞き取り調査を行い¹⁵⁾、LAS（和光純薬工業株式会社）は、①アルキル基の12個の炭素は直鎖でつながっており、②フェニル基位置異性体の割合は1φが一番多いと思われる（分析は行っていない）との回答を得ている。アルキル鎖の炭素数は Dodecyl という名称からして12個と考えられるが、大場他は、同じ C₁₂ の LAS の TLm24 を7.9ppm と報告している⁷⁾。LAS は、フェニルの位置により、1φ、2φ、3φ、4φ、5φ、6φ と呼ばれる異性体に分けられる。大場他が用いた LAS 中のフェニル基位置異性体の割合は、1φが0%、2φが28%、3φが19%、4φが16%、5φが17%、6φが17%となっており、一番毒性の強い1φが含まれていない。1φのみの C₁₂LAS の TLm24は1.6ppm と報告されている⁷⁾。今回使用した LAS は、1φが一番多い可能性が高い。また、大場他は、使用した活性汚泥が LAS を吸着したと思われることや、実験中水を流し続けたので流水していない状態よりも早く分解されたと思われることを報告している⁷⁾。従って、これらの要因により、和光純薬工業株式会社の LAS の毒性が強くなったと考えられる。

ABS（関東化学株式会社）は、①分岐型の ABS のみであり、②分子構造の詳細は不明との回答を得た。ABS は、その構造から多くの異性体を持つが、一般的に LAS より毒性は弱いとされている。堀口によるヒメダカを用いた ABS の毒性実験では、TLm24は30～35ppm と報告されている⁸⁾。ABS は LAS より生分解性が悪といわれているが、LAS の TLm24と比較すると、ABS の毒性が非常に低いことがわかる。

5-2 組織について

光学顕微鏡による観察と同じく¹⁶⁾、走査型電子顕微鏡観察で急性毒性試験魚の鰓弁や表皮(上皮細胞層)に異常が認められた。この二つの組織は、LASやABSに直接触れることになるため、影響が大きく表れる組織と予想できる。

鰓弁の異常は棍棒化が中心であり、鰓を防御するため分泌された粘液と水中の異物によって鰓弁が完全に覆われている様子が立体的に観察できる(図5~8)。棍棒化は、鰓を防御するため分泌された粘液が二次鰓弁間を湿潤し、粘液の持つ粘着力によって、二次鰓弁間への水中の異物の付着や鰓弁同士の癒着を生じさせ、その結果、酸素欠乏や窒息死を引き起こしてしまう現象であり²⁴⁾、その症状の形態から棍棒(club-shape)という表現が用いられている。鰓弁が完全に覆われている状況から、櫛状に並んだ二次鰓弁間に水が流れず酸素の供給ができないことが直接の死亡原因と推測できる。富山は、界面活性剤(LAS)の蛋白質変性作用により、魚の鰓蛋白質とLASが結合し、鰓の組織や呼吸機能を破壊して窒息死することを報告している⁹⁾。今回の試験でも、鰓の上皮細胞に損傷や壊死が認められた個体も存在したことから(図4, 8)、同様の理由で死に至った可能性が高い。また、急性毒性試験で生き残った個体の観察では、鰓上皮の一部に損傷が認められるものの、棍棒化せずに二次鰓弁の櫛状構造を残しているものが多く、窒息死を免れたのではないかと考えられる。

表皮(上皮細胞層)の異常は粘液細胞群の剥離と鱗配列の乱れが中心である(図11, 12)。上皮細胞層は、体全体の防御機能を担う非常に重要な組織であり、特に、粘液細胞群の剥離と鱗配列の乱れは、異物の体内侵入を防ぐ最初の防御機構が消失することを意味する。従って、真皮層が直接異物にさらされることになり、細菌やウィルスによる感染症への罹患が増加すると予想される。また、光学顕微鏡観察では、真皮層に続く筋肉組織にも、筋繊維の並びの乱れや筋繊維組織の萎縮、細胞の壊死が認められていることから¹⁶⁾、界面活性剤は体内にも侵入して組織に影響を及ぼし死亡原因の一つになると予想できる。加えて、界面活性剤は、カルシウムを減少させてしまうという有害性も有しており、カルシウムが減少し、神経伝達物質ノルアドレナリンがうまく伝わらず、結果的に筋肉に異常が現われた可能性がある⁴⁾。なお、急性毒性試験で生き残った個体の観察では、粘液細胞群の一部に剥離が認められるものの、対照魚と差は少なく、防御機構は機能しているものと考えられる。

以上より、合成洗剤の主剤である合成界面活性剤の毒性が、電子顕微鏡観察でも確認できたとと言える。

5-3 合成界面活性剤の問題点と現状、今後について

合成界面活性剤の問題点は、水環境中に排出された時に生物毒性により水中生態系に悪影響を及ぼすことである。富山は界面活性剤水溶液中に同時に卵白アルブミン(タンパク質)を入れた場合、界面活性剤の鰓への吸着が阻害されたと報告している⁹⁾。これは、界面活性剤がタンパク質と結合するという事であり、界面活性剤と結合したタンパク質は変性する。生物の体内の血液や細胞の一部および酵素は、タンパク質で出来ているため、それらが変性してしまうと水生生物は死に至る。このように、LASなどの界面活性剤の生物毒性は、水中生態系に大

きな影響を与えることになる。

現在、合成洗剤の主成分である合成界面活性剤には、LAS と POAE が使用されている。ここ40年間の合成洗剤を巡る動きとしては、界面活性剤の ABS から LAS と POAE への切り替え^{13, 14)}、琵琶湖富栄養化防止条例の制定（1979年）などに代表される無リン化などがあるが、合成洗剤の使用量は増加している。洗剤メーカーは合成洗剤に含まれる合成界面活性剤の割合を減少させる傾向にあるが²⁵⁾、汚れ落ちを補うために蛍光増白剤を増加させるという問題も生じている²⁶⁾。ABS より生分解性がよいといわれる LAS であるが、一次分解に8日を要し、洗剤成分の究極分解（無機化）に達する割合は、30日経過しても70%に過ぎない⁸⁾。さらに日本の下水道普及率が約70%であることから、水環境中に排出された LAS は、そのまま長期間残留することになる。また、MBAS（メチレンブルー活性物質）分析法で測定した下水処理場における LAS などの陰イオン系界面活性剤除去率は97%である。2000年の LAS の国内生産量は約167,000トンであることから¹¹⁾、排水すべてが下水処理されていたとしても、LAS だけで1年間に約5,000トンが水環境中に流れ出している計算になる。

通常、LAS は、他の雑排水による希釈・汚水管内での沈殿物への吸着などの作用を受け、河川流入後も河川水による希釈・河川水中での生分解・河床堆積物への吸着などの作用を受ける。そのため、河川水中の LAS は、排出直後の10数分の1以下の濃度になる。しかしながら、LAS の環境中の残留濃度は低いとはいえない状況である。当研究室の水質調査では、秦野市の大根地区を流れる大根川の小田急東海大学前付近では、最低で0.95ppm（1995年）、最高で6.06ppm（1993年）の LAS 濃度を測定している²⁷⁻³³⁾。最近の調査においても、0.72~2.70ppm（2004年7月~2005年12月）という値を測定している。また、その大根川が合流する金目川では、相模湾に流入する最下流部の花水橋付近で、0.45~2.16ppm（1996年）を示している³³⁾。更に、秦野市内にある流入する河川の無い震生湖においても、最高で0.99ppm（1997年）の LAS が測定されている³⁴⁾。以前と比較して、水環境中の LAS 濃度は減少傾向にあるが、水生生態系に影響を与えない状況になったかは、疑問の残るところである。一時的にでも半数致死濃度以上になる河川には、魚は生息しにくいと考えられる。また、日本の河川は流れが急で、距離が短く、水量が多くないため、河川の中での生分解性が良くないという点も問題である。加えて、人間の活動域が広がることにより、新たな場所に汚染が生じる可能性もあり、注意が必要である。加えて、より強い生物毒性が疑われる界面活性剤の使用の問題や³⁵⁾、POAE が LAS に置き換わるなど、使用される界面活性剤の状況も変化しており、環境に与える影響については、今後とも調査していく必要がある。

最後に、合成洗剤ならびに界面活性剤には生物毒性があり、現在も身近な環境中に存在していることが再確認できた。しかし同時に、こういった毒性のある物質が身近にあるだけではなく、我々が常用しているという事実は、充分認識すべきである。これらの問題は直接的に影響が感じられないため、なかなか実感が湧かないのが現実である。しかしながら、人間が食べ物や食器、水や皮膚から一日に摂取すると考えられる LAS の最大摂取量は、都立衛生研究所によると0.29mg / kg と推定されており、体重50kg の大人で14.5mg となる。合成洗剤や界面活性剤のヒメダカへの影響から、合成洗剤成分がヒトの体内に吸収された場合の影響を具体的に

予測することは困難であるが、今後はリスク回避の観点から対応する必要がある。

6. 要約

水環境を悪化させる大きな原因の一つである市販の合成洗剤の主剤である合成界面活性剤 (LAS, ABS) の急性毒性試験を行った結果, LAS に強い生物毒性が認められた。

また, 組織標本の走査型電子顕微鏡による観察の結果, 対照のヒメダカには異常が認められず, 急性毒性試験を行ったヒメダカに異常が認められた。鰓においては, 鰓弁に棍棒化が認められた。棍棒化は, 鰓を防御するため分泌された粘液が二次鰓弁間を湿潤し, 粘液の持つ粘着力によって, 二次鰓弁間への水中の異物の付着や鰓弁同士の癒着を生じさせ, その結果, 酸素欠乏や窒息死を引き起こすことから, 死に至る可能性が高いと考えられた。上皮細胞層には, 粘液細胞群の剥離と鱗配列の乱れが認められ, 水中の異物に対する防御が不可能になると予想された。

合成洗剤に含まれる界面活性剤は減少傾向にあるが, 水環境中の LAS 濃度は, 水中生態系に影響を及ぼさない程度に減少したとは言い難い現状である。更に, 使用される界面活性剤の状況も変化しており, 環境に与える影響については, 今後とも調査していく必要がある。

また, 顕微鏡による観察結果から, 合成洗剤の使用に関しては, 危険に関するリスク回避の観点から再考する必要があると考えられた。

謝 辞

急性毒性試験に助力いただいた, 片岡弘子, 阿部淳一, 椎野操, 金井恭子, 窪田史帆の諸氏に感謝いたします。また, 電子顕微鏡観察にご協力いただいた内田晴久教授に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 資料: 経済産業省鉱工業動態統計調査室, 作表: 日本石鹼洗剤工業会, 「2003 年 1 月～12 月洗浄剤等の製品販売統計」, http://www.jsda.org/5toukei_1.htm 参照。
- 2) 経済産業省鉱工業動態統計調査室編集: 「化学工業統計年報<平成 16 年>」, 経済産業調査会, 2005, 244p.
- 3) 資料: 経済産業省鉱工業動態統計調査室, 作表: 日本石鹼洗剤工業会, 「洗剤の販売推移 (1987～2004 年)」, http://www.jsda.org/5toukei_1.htm 参照。
- 4) 坂下栄, 石川貞二, 鈴木紀雄: 「合成洗剤の話 本当のことを知っていますか?」, 三一書房, 1991, 206p.
- 5) 山田春美・古武家善成・山根昌子・窪田葉子・吉川サナエ: 「身近な環境問題—環境と人にやさしい洗剤を求めて—」, 環境技術研究協会, 1994, 195p.
- 6) 三上美樹・藤原那達・小林勇: 「洗剤の毒性と環境影響」, 合同出版, 1986, 428p.
- 7) 大場健吉・杉山豊樹・三浦千明・森崎やよい: 生分解過程における LAS の魚毒性, 日本水産学会誌, 43, 1001-1008 (1977).

- 8) 堀口博:「新界面活性剤」. 三共出版株式会社, 1975, 871p.
- 9) 富山新一:「界面活性剤の魚に対する作用について」. 日本水産学会誌, 40, 1291-1296 (1974).
- 10) 小林勇:「非イオン系合成洗剤」. 合同出版株式会社, 1995, 142p.
- 11) 環境省環境保健部環境安全課編:「化学物質ファクトシート—2003年度版—」. 環境省, 2003, pp21.
- 12) 環境省環境保健部環境安全課編:「化学物質ファクトシート—2005年度版—」. 環境省, 2005, pp65-68.
- 13) 資料:「経済産業省鉱工業動態統計調査室, 作表:日本石鹼洗剤工業会, 「2006年1月～12月洗浄剤等の製品販売統計」. http://www.jsda.org/5toukei_1.htm 参照.
- 14) 藤野裕弘・片岡弘子・阿部淳一・市田恵美:「合成洗剤成分のヒメダカへの影響 (1) —陰イオン海面活性剤の半数致死濃度を中心として—」. 東海大学紀要教養学部, (36), 201-210 (2005).
- 15) 藤野裕弘:「合成洗剤成分のヒメダカへの影響 (2) —合成洗剤数種の半数致死濃度を中心として—」. 東海大学紀要教養学部, (37), 181-191 (2006).
- 16) 藤野裕弘・片岡弘子・阿部淳一:「合成洗剤成分のヒメダカへの影響 (3) —光学顕微鏡観察による組織への影響を中心として—」. 東海大学紀要教養学部, (38), 1-12 (2007).
- 17) 並木博他:「詳解工場排水試験方法」. 日本規格協会, 1986, pp490 - 494.
- 18) 日本環境毒性学会編:「生態影響試験ハンドブック—化学物質の環境リスク評価—」. 朝倉書店株式会社, 2003, pp289-324.
- 19) 北原文雄:「界面活性剤の分析と試験方法」. 講談社株式会社, 1982, pp289-324.
- 20) 桐栄恭二:「環境水中にある微量陰イオン界面活性剤の分析」. ぶんせき, 11, 826-867 (1982).
- 21) 田中敬一・永谷隆:「図説走査電子顕微鏡／生物試料作製法」. 朝倉書店, 1986, 282p.
- 22) M. A. Hayat・鈴木昭男:「医学・生物学の為に走査電子顕微鏡入門」. 丸善, 1979, 314p.
- 23) 関西電子顕微鏡応用技術研究会編:「現場で役立つ電子顕微鏡試料作製法」. 金芳堂, 1999, 399p.
- 24) 奥山春彦・皆川基:「洗剤・洗浄の辞典」. 朝倉書店, 1990, 東京, pp16-688.
- 25) 合成洗剤研究会編:「新書版 洗剤の事典」. 合同出版, 1991, 東京, pp34-163.
- 26) 船瀬俊介:「だから, せっけんを使う」. 三一書房, 1991, 東京, pp58-61.
- 27) 藤野裕弘・宇波淳夫・佐々木園子・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (1)」. 東海大学紀要教養学部, (22), 173-201 (1991).
- 28) 藤野裕弘・宇波淳夫・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (2)」. 東海大学紀要教養学部, (23), 285-310 (1992).
- 29) 藤野裕弘・宇波淳夫・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (3)」. 東海大学紀要教養学部, (24), 321-350 (1993).
- 30) 藤野裕弘・宇波淳夫・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (4)」. 東海大学紀要教養学部, (25), 139-156 (1994).
- 31) 藤野裕弘・宇波淳夫・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (5)」. 東海大学紀要教養学部, (26), 301-316 (1995).
- 32) 藤野裕弘・宇波淳夫・渡辺哲男:「大根川の水質と汚染状況 (6) —6年間のまとめ—」. 東海大学紀要教養学部, (27), 191-210 (1996).
- 33) 藤野裕弘・宇波淳夫・北見秀明・渡辺哲男:「金目川水系の水質 (1996年の調査報告)」. 東海大学紀要教養学部, (28), 255-264 (1997).
- 34) 藤野裕弘:「震生湖の水質 (1997年)」. 東海大学紀要教養学部, (29), 149-162 (1998).
- 35) 藤野裕弘:「界面活性剤の淡水魚に対する毒性とその試験方法—ノニルフェノールの魚類への影響 (毒性試験を中心に)—」. 東海大学紀要教養学部, (34), 327-329 (2003).

Abstract**Influence of a component synthetic detergent on Himedaka: *Oryzias latipes* (4)**

—— Influence on tissue with observation by SEM(Scanning electron microscope) ——

Yasuhiro FUJINO and Megumi ICHIDA

The acute toxicity test on the negative ion surface-active agents contained in a synthetic detergent was conducted.

As a result, TLm24(Median tolerance limit) of LAS(Sodium linear-Dodecylbenzene-sulfonate Standard) became 5.75ppm. And, TLm24 of ABS(Sodium Dodecylbenzensulfonate) became 36.99ppm. In this experiment, the fish toxicity of LAS was stronger than that of ABS.

Moreover, influence on tissue of Himedaka was observed with the SEM(Scanning electron microscope). As a result, abnormality was not admitted in Himedaka of contrast fish. Abnormality was admitted in the gill filament (secondary gill lamella) and the epidermis (flat epithelial cell layer) of Himedaka that had done the acute toxicity test. The club-shape was admitted in the gill filament and the desquamation was admitted in the flat epithelial cell layer.

However, the LAS density in water environment has not necessarily decreased. In addition, the kind of surface-active agent contained in synthetic detergent has been changed. Therefore, it will be necessary to investigate the density and kind of the surface-active agents in water the environment in the future.