

LASの金魚におよぼす毒性に関する病理組織学的研究

福田 芳生^{*}、西沢 寛昭^{**}、三上 進^{***}

1. はじめに

近年、合成洗剤として、直鎖系のアルキルベンゼンサルフォネートが広く各家庭で用いられ、これが河川・湖沼等に流入し、水質汚濁の原因ともなっている。

一方、水道法の水質基準では陰イオン活性剤の許容量は0.5ppmであるとされている。そこで、この許容量での生体影響を知ることは、公衆衛生にたずさわる者にとって必要なことであろう。著者等は0.5ppmの許容量の最大濃度で魚類を飼育し、魚体に障害が現われる期間及びその障害像を調べる目的で、以下の実験を行なったので、その結果について報告する。

II. 材 料

供試薬：直鎖系アルキルベンゼンサルフォネート (linear alkylate benzen sulfonate) 標準品 (和光純薬製、以下LASと略称する)。

供試魚：重量10g、体長8cm前後の健康な市販の和金 (*Carassius auratus*)、性別不詳24匹を用いた。

III. 実験方法

予め十分に曝気し、塩素分を除去した水道水に、LASを0.5mg/lの濃度に加えて飼育水をつくり、容量30ℓ (縦45cm、横24cm、高さ30cm) のガラス製容器にとり試験槽とした。

供試魚は24匹を用い、これを実験期間によって10日後、30日後、50日後に剖検に付する3つのグループと対照群との4群に分けた。LAS中で飼育される3群は、それぞれ試験槽中に投入された。

対照群とした残りの1群は、LAS無添加の同じ大きさの水槽において、実験期間最長のグループの終了時まで飼育した。実験期間中飼料は、市販の乾燥ブラインドシュリンプを1群あたり0.2gを1日1回与え、食べ残しは翌日除去した。飼育は室温 (20℃前後) で、2日毎

に規定濃度に調整された試験水中に投入されて行なわれた。

所定の実験期間を終了したグループは、剖検の上、鰓、肝臓、腎臓、消化管を摘出し、ブアン氏液 (Bouin 氏液、フォルマリン2、酢酸1、蒸溜水7の混合液) 中に投入した。

それらの資料はアルコール系列を通して脱水の後、パラフィン包埋し、5μの厚さの切片を作製した。切片はヘマトキシリン染色、Azan染色、PAS染色を施し検鏡に供した。

IV. 実験結果

対照群を含め各実験群とも、その間に死亡したものは認めなかった。しかし、LAS添加試験槽内のものにあつては日数が経過するに従がい、食欲の低下するものが目立ち、運動も鈍くなって来た。

(1) 肉眼的所見

10日群では鰓は、特有な鮮紅色の色調がやや失なわれていたが、各鰓弁・鰓薄板とも明瞭に識別することができた。

肝臓は、全体に軽度の腫脹が認められた。腎臓は、対照群のものほとんど変るところが無かった。消化管は、腸管前部外壁に充血が認められた。

30日群のものでは、鰓は全例ともやや鮮紅色を帯び、各鰓弁は棍棒状となり、鰓薄板の構造は不明瞭であった。

肝臓は、臓器特有の色調が失なわれ、全体に淡褐色を呈し、腫脹していた。また、組織の弾力性が消失し、脆弱であった。腎臓は全体に赤味が強く、腫脹していた。消化管は、腸管前部及び後部とも激しい外壁の充血が認められた。

50日群のものでは、鰓は全例とも強い鮮紅色を帯び、鰓弁の先端部に点状の出血斑が認められた。また、鰓薄板の構造は不明瞭であった。

肝臓は、30日群のものと比較すると、腫脹が著しく、剖面では血管腔の拡張は減少し、濃い暗褐色を呈していた。腎臓では、腫脹と組織の脆弱化が目立った。消化管は、30日群のものほとんど変らなかつた。

* 千葉県衛生研究所

** 中央大学理工学部

*** よみうりランド海水水族館

(1978年2月18日受理)

(2) 顕微鏡的所見

a. 10日群の所見

鰓では、全例において鰓薄板中央部に位置する毛細血管網から呼吸上皮が遊離し、その間に広い腔所が形成され、組織液の貯溜が認められる(図1)。

この組織液内にはしばしば小型のリンパ球、鰓組織の崩壊産物が認められる。浮腫の存在しない部分では、強い炎症像が観察される(図2の矢印)。鰓薄板の基部では、全例に鰓上皮の増殖(Proliferation)による肥厚(hypertrophy)が認められ、対照群において通常3層前後の鰓上皮が、2倍ほどの層数に達している。

また、実験例のほぼ半数のものに、鰓弁片中央を流れる鰓血管(Branchial blood vessels)の部分に、中程度の血管腔の拡張が認められる。

消化管は、特に前部の胃膨大部(金魚を含むコイ科の魚類では明確に胃と呼ばれる部分が存在しないが、胃に相当すると考えられる箇所が他の消化管よりも内腔が広く、上皮高も低く止るため、胃膨大部、あるいは胃域、Stomach regionと呼称される)の粘膜壁(mucosal folds)の先端部が壊死に陥入り、消失している個体(図3上方の矢印)が実験群全例に認められ、それらの粘膜壁上縁はP A S染色では陰性であった。上述の崩壊した上皮片が消化管腔内に貯溜しているのが観察される(図3下方の矢印)。また、粘膜下織の部分に軽度な炎症が認められる。

消化管後部では、上皮は高さを増し、典型的な高門柱上皮の形をとる。この群では、消化管後部の障害像は全例とも認め得ない。

肝臓は、肝静脈の強度な拡張とうっ血が観察される。(図4の矢印)。それらのうっ血像の一部に溶血が認められる。肝細胞は腫大し、核濃縮を伴うもの(図5の矢印)がしばしば認められる。

腎臓は全例とも糸球体が腫大し、糸球体腔の減少が観察される。尿細管主部の管腔内にエオジン嗜好性のコロイド状物質の貯溜がしばしば観察される。尿細管周囲の腎細静脈の拡張が認められる。

この腎臓の高倍率像は、糸球体内葉細胞の肥厚(図6の右側の矢印)を示し、尿細管の間質組織に限界明瞭な円型~楕円型の壊死巣(図6左側の矢印)が散在しているのが観察される。それらの壊死巣は、P A S染色により、濃赤紫色に染まる。

b. 30日群の所見

鰓は、全例とも10日群において観察した強い鰓薄板の部分の浮腫は減少し、代って鰓薄板基部の上皮の激しい増殖による多層化(metaplasia)が顕著となる。そのた

め、層数は8~9層に達し、厚さも200 μ 前後となる。このような鰓薄板基部の上皮の増殖により、元来分離している鰓薄板は基部から2/3近くまで融合し、各鰓弁片は肉眼的観察の項で述べた棍棒状を呈して見える原因となっている(図7)。

鰓弁片の中央を流れる鰓血管は中程度~強度の拡張が認められる。上皮の増殖により多層化した鰓では、炎症像は観察されない。

消化管は、10日群のものに比較すると、上皮の壊死は一層激しくなる。10日群においては、胃膨大部粘膜壁の先端部に壊死性の変性が限局されていたが、この30日群のものでは、胃膨大部の粘膜上皮全域に及び、剥離崩壊した上皮片が内腔に貯溜するようになる(図8の矢印)。しかし、この消化管の変性は主として上皮の部分に止まり、下層の粘膜下織や筋層の部分にまでは及んでいない。

高門柱上皮により被覆される消化管後部の粘膜壁の先端部に、壊死性の変性が出現してきた。この後部の粘膜壁先端部の変性は、10日群では見られなかったものである(図9の矢印)。

肝臓は、全例とも10日群のものと同様な肝静脈の拡張、うっ血、溶血等が観察されるが、この他に肝静脈洞の拡張、肝細胞の変性が著明となる。

特に肝細胞の腫大と、胞体内に空胞の形成があり、肝組織は全体に明調化する。この空胞(図10の矢印)は、P A S染色によっては染まらない。核は全体に小型化し、染色性が高まる。

腎臓は、尿細管の間質を構成する造血組織に、P A S染色に強染する果粒状の壊死巣(図11の矢印)が散在していることは、10日群のものと同じ。また、10日群に比しても糸球体の腫大は更に増強され、糸球体腔のほとんどが消失したのも見られるようになる(図12)。尿細管主部上皮に核濃縮が認められる。また、実験群の約半数のものに腎細静脈の拡張と溶血が認められる。

c. 50日群の所見

実験群の中の最長期間に当る50日群のものに鰓では、全例共に鰓薄板基部の鰓上皮の増殖による肥厚が認められるが、再び鰓薄板に強い浮腫が出現して来る。

その結果、50日群の2/3のものに鰓薄板先端部の破綻による出血が認められる(図13の矢印)。このような出血像は、特に各鰓弁片の末端部に近い1/3の部分に観察される。鰓血管の拡張は全例とも中程度に止まる。鰓弁片の末端部を除いては、炎症性の反応は弱い。

50日群では消化管は10日群、30日群の実験群において認められたのと同様な、消化管上皮の壊死像が全例に観察されるが、消化管前部に位置する胃膨大部では、変性は

深部の粘膜下織にまで及んでいるのが認められる。

粘膜壁の円柱上皮は壊死に陥り全く消失し、ために粘膜下織が直接消化管腔に露出するようになる。この粘膜下織は、結合組織が溶解することにより、疎になり、全体に明調化してくる。

更に深部の平滑筋層のエオジンに対する染色性も減少し、軽度な変性に陥っていることを示している(図14の矢印)。

消化管後部では、壊死性の変性は粘膜壁先端部から更に深部に及び(図15の矢印)、剝離崩壊した上皮片が消化管腔に充満するようになる。50日群では、この消化管後部の粘膜上皮の壊死と平行して、実験群の2/3の個体に下層の結合織に軽度の変性が認められる。

50日群の肝臓は10日群、30日群に認められた肝静脈の異常な拡張とうっ血は姿を消し、全例とも全体に激しい腫張が認められ(図16)、各肝細胞は腫大し、多数の果粒状構造が胞体内に観察された。この肝細胞全体にわたる腫大により、肝静脈洞は強く圧迫され、その内腔は狭くなっている。これらの肝細胞の間に、しばしば細胞単位の壊死像(Spotted necrosis)が観察される(図17の矢印)。

腎臓では、尿細管の萎縮と腎細静脈の拡張、うっ血が激しくなり、造血組織の結節状の壊死巣の増加が全例に認められる。また、糸球体の腫大も一層増強される。萎縮した尿細管では部分的に上皮間隙が増大し、それらの上皮細胞の核の多くは、核濃縮に陥っている。各尿細管腔内には、エオジンに濃染するコロイド状の物質が貯留しているのが認められる。(図18の矢印)

V. 考 察

まず、L A S 0.5ppmの水道法による許容量の最大濃度で飼育した魚は、10日後既に組織学的な変化をみせ始めた。日が経つと共にその変化は増大した。時間的に見ると、鰓は10日後鰓薄板の浮腫、鰓薄板基部の上皮の増殖、鰓血管の拡張等が現われ、30日後その障害の程度が増強されて行く像を示した。その末期には再び鰓薄板の浮腫が出現し、出血像が認められるようになる。この鰓薄板基部の上皮の増殖は、化学物質に対する魚の防禦的反応と考えられ(Plehn,¹ 1924, Burrows,² 1964), 50日後のものより30日後のものに増殖が激しかった。これは50日後では、単に上皮の増殖というような手段のみで、界面活性剤の毒性から魚体を護り切れないことを示唆しており、出血も鰓上皮の破綻の結果起ったものと思われる。

消化器系に対する界面活性剤(L A S)の顕微鏡的な

障害像も、10日後既に発現し、日数の経過と共に増強している。比較的早期(10日目)に、消化管前部の胃膨大部に上皮端の壊死が認められる。これは恐らく餌と共に経口的に採取された界面活性剤(L A S)は、まず消化管前部で吸収され、その際、界面活性剤に接触している上皮端の部分に、壊死が起ったものと思われる。

初期、鰓にそれ程の障害が現われない時期に、消化管上皮に壊死が見られるのは、他の化学物質でも観察されている。Charlie & Piper³⁾(1975)はアンモニア、1.6ppmの溶液で飼育した魚において、鰓は鰓上皮の増殖というような防禦的な反応を経るが、消化管では直接壊死に導かれることを報告している。

また、消化管上皮端では、10日後既にP A S染色に陽性の粘液物質が失なわれていたが、このことは消化管の保護物質として常時粘膜面を被覆している粘液多糖類が、界面活性剤(L A S)と置換し、障害を早めたものと思われる。

実験群の30日後、50日後のものにおいて消化管後部の上皮に壊死が出現して来るのは、初期の段階では、主として消化管前部において界面活性剤の吸収が行なわれ、その障害の進行と共に、界面活性剤の吸収が後部の消化管に移って行ったものと思われる。

肝臓でもその障害は、10日後既に現われ時間の経過と共に増強された。10日後、30日後のものに肝静脈の異常な拡張、肝細胞の腫大が観察された。

すなわち、除草剤(2,4-D)による中毒時の魚においても報告されているように(Cope⁴⁾ et al, 1970), 本実験でも生体は、この時期に血管を拡張させ、肝臓に対する還流血液量を増加させることにより、界面活性剤を体外に排除するように働いたと考えられる。

50日後の肝臓では、肝細胞内に多数の果粒状構造が増加し、その腫大の最も激しい時期に相当している。

坂下⁵⁾(1975)は、界面活性剤(L A S)原液を皮膚表面に塗布したネズミの肝臓について、透過型電子顕微鏡による詳細な観察を行ない、塗布3日後既に肝細胞膜が破れ、糸粒体が胞体外へ脱出していることを観察しているが、本実験では10日後及び30日後に、この肝障害に相当すると考えられる所見を得ている。更に、坂下⁵⁾(1975)は塗布後30日後のものでは、肝細胞は腫大し、胞体内に糸粒体が異常に増加し、また解毒作用に重要な意義を持つ滑面小胞体の増殖が激しく、界面活性剤に対して肝細胞レベルでの対応が最も活発化してくることを観察している。

本実験50日後のものが、坂下⁵⁾(1975)による30日後の細胞小器管の増加する時期に当たると考えられ、肝細胞

の腫大と肝細胞内の果粒状構造の増加は、糸粒体・滑面小胞体等の増加して来たことと関連があるように思われる。50日後の肝臓にみられた点状壊死の出現は、細胞自体の界面活性剤に対する適応の失敗によるものと考えられる (Vos & Beems⁶⁾ 1971)。それが部分的に止まり広範囲に及ばないのは、本実験では 0.5 ppm という極く微量であったためと思われる。

腎臓でも10日後既に病変が現われており、この障害は時間の経過と共に増強されている。初期では腎細静脈の拡張、うっ血を主とした変化であり、肝臓における肝静脈の拡張と軌を一にしている。

しかし、50日群において尿管の萎縮が観察されるのは、糸球体・尿管の変性、うっ血等により、腎の代謝機能が低下したことに原因があるのかもしれない。また、Valinet⁷⁾ al(1968)は、殺虫剤の一種 Milex 1.0 ppm 溶液中で飼育した魚において、56日後に尿管の強い拡張を観察している。しかし、L A S では50日群においても、そのような拡張は認め得なかった。尿管の部分的な上皮間隙の増大は、主部にみられ、それは飼育期間の延長と共に増強されることが予想できる。

今回の実験に使用した L A S の濃度は水質基準の限度の値を用いたが、更に低濃度での魚類の反応について病理学ばかりではなく、生理学的にも、生化学的にも調べられなくてはならない。また、水質基準の限界の値で、もっと飼育期間が長くなったらどうなるか、生体内で濃縮が起りうるかなど、今後解決すべき問題が多く残されていることを示した。

VI. ま と め

直鎖系アルキルベンゼンサルフォネート (lineal alkylate benzen sulfonate) 0.5 ppm 溶液中において10日、30日、50日間金魚を飼育した。しかし50日間で死亡するものはなかったが、L A S 添加水槽内の金魚の病理組織学的な観察の結果、10日後既に変化が現われ始め、日と共にそれらの変化は増強された。病理組織学的な変化としては、10日群では鰓薄板の浮腫が目立ち、消化管前部を構成する胃膨大部の上皮の壊死が認められた。肝臓では肝静脈の強い拡張とうっ血を中心とする障害が観察され、腎臓では腎静脈の拡張、糸球体の腫大、尿管腔内

のエオジン嗜好性のコロイド状物質の貯溜が認められた。

30日群では強い鰓上皮の増殖と、それに伴う融合が観察された。消化管前部及び後部の上皮の壊死が目立った。肝臓では肝静脈の拡張、うっ血の他に肝細胞内に空胞の形成されて来るものが増加した。腎臓では、10日群のものよりも更に病変は増悪した。

50日群では再び鰓の浮腫が起り、出血像が認められた。消化管では、粘膜下織にまで変性が及ぶものが出現して来た。肝臓では、各肝細胞は果粒状を呈し、腫大化する傾向にあった。腎臓では尿管の萎縮、上皮間隙の拡大が観察された。

VII. 文 献

- 1) Plehn, M. : *Praktikum der Fischkrankheiten*, Stuttgart, E. Schweizerbart, 1924
- 2) Burrows, R. E. : *Effects of accumulated excretory products on hatcheryreared salmonids*, U S. Fish Wildlife Serv., Res. Rep., 66, 1~12, 1964
- 3) Charlie, E. S. & Piper, R. G. : *Lesions associated with chronic exposure to ammonia*, Part IV. Chemical and Physical agents. (Ribelin, E. & Migaki, ed.), *The pathology of fishes*, The Univ. of Wisconsin Press, Wisconsin, 497-514, 1975
- 4) Cope, O. B. et al : *Some chronic effects of 2,4 -D on the blue gill (Lepomis macrochirus)*, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99, 1-12, 1970
- 5) 坂下栄 : *洗剤による肝細胞の変化の微細構造*, *細胞*, 7, 200-210, 1975.
- 6) Vos, J. G. & Beems, R. B. : *Dermal toxicity studies of technical polychlorinated biphenyls and fractions there of in rabbits*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 19, 617-633, 1971
- 7) Valin, V. C. C. et al. : *Some effects of mirex on two warmwater fishes*, *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 97, 185-196, 1968

Histopathological Observations on Goldfish Exposed to LAS

Yoshio FUKUDA, Hiroaki NISHIZAWA and Susumu MIKAMI

Summary

Pathological changes attributable to the LAS (lineal alkylate benzen sulfonate) poisoning were observed in the gill, intestine, liver, and kidneys of goldfish (*Crassius auratus*) after exposing the poisoning solution of 0.5 ppm of the surfactant. After 10 days of such exposure, edematous swellings appeared in the gill, and the respiratory epithelium exfoliated from some parts of central capillaries.

As for the damage to digestive tracts, the anterior part of intestinal mucosa began to show necrotic columnar epithelium, and the sloughed cells appeared in the intestinal lumen. Pathological changes in the liver showed occasionally swollen liver parenchymal cells, enlargement of hepatic vein and aggregation of blood cell mass in it. Damage to kidney appeared as the enlargement of renal veins, as the swelling of glomerulus and as the deposition of eosinophile colloidal substance in the renal tubules. The majority of specimens exposed for 30—50 days showed a continued progression of lesions.

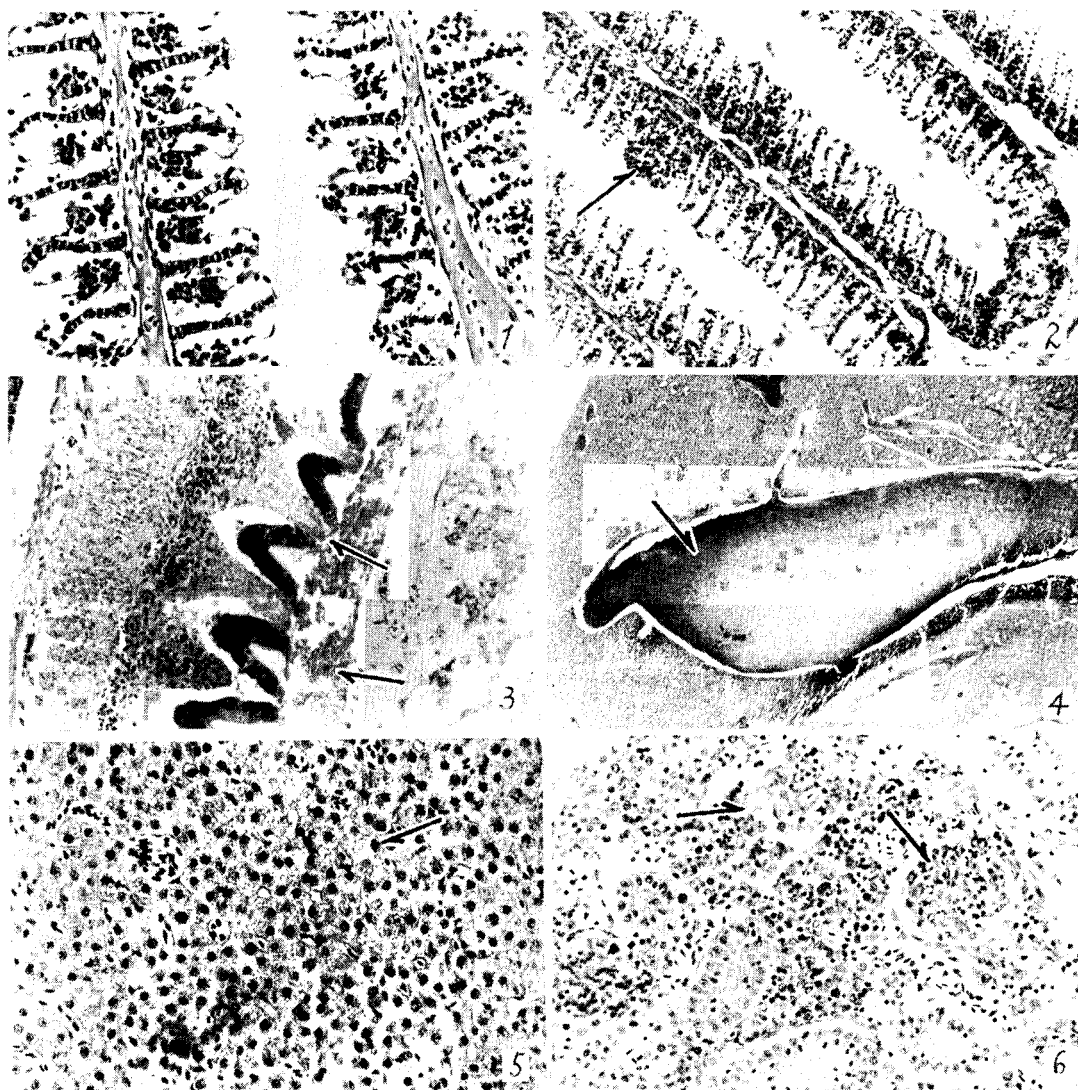


図 の 説 明

L A S 0.5ppm 溶液で飼育10日目の各臓器の病理組織像を示す。

- 図1. 鰓薄板の浮腫を示す。中央部の毛細血管網から呼吸上皮が剝離し、その間に形成された腔所にリンパ球、組織の崩壊産物が認められる。Azan染色。×200.
- 図2. 中程度の鰓薄板基部の上皮の増殖、強い炎症像が部分的に認められる (矢印)。H.E染色。×100.
- 図3. 消化管前部の胃膨大部上皮端の壊死 (矢印) を示す。剝離、溶解した上皮片が内腔に認められる。Azan染色。×100.
- 図4. 肝静脈の強度な拡張 (矢印)、うっ血が認められる。H.E染色。×20.
- 図5. 肝細胞の腫大・核濃縮 (矢印) を示す。H.E染色。×200.
- 図6. 糸球体内葉細胞の肥厚 (右上側の矢印)、間質の壊死巣 (左側の矢印) を示す。H.E染色。×200.

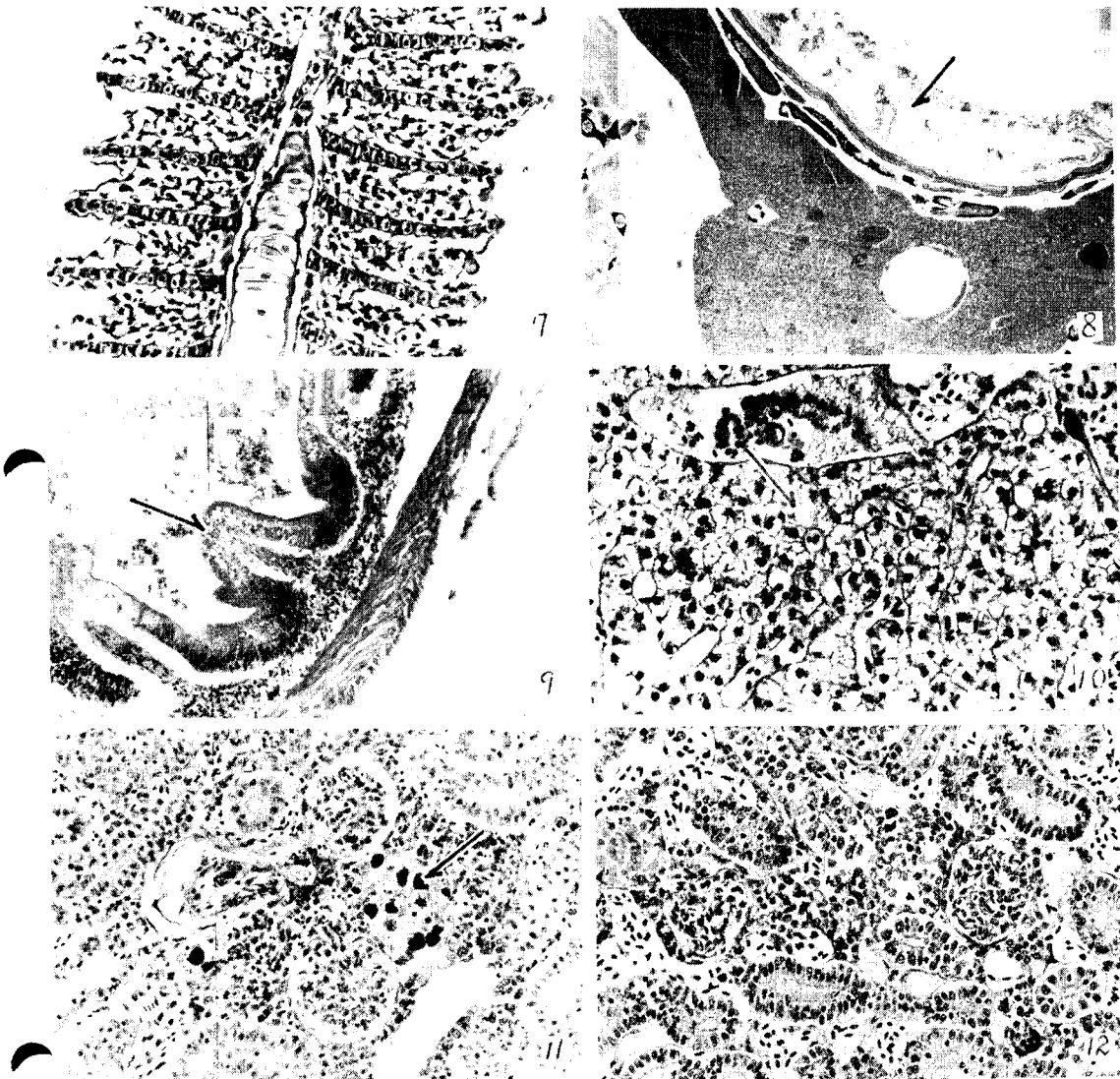


図 の 説 明

L A S 0.5ppm 溶液で飼育30日後の各臓器の病理組織像を示す。

図7. 鰓薄板の浮腫は減少し、代って強い鰓薄板基部の上皮の増殖が起り、各鰓薄板の融合が激しい。Azan 染色。×200.

図8. 消化管前部の胃膨大部の上皮は崩壊し、消化管内腔に、それらの上皮片が貯っている (矢印)。H.E 染色。×20.

図9. 30日群において初めて、消化管後部の上皮端に壊死が認められるようになる (矢印)。Azan染色。×200.

図10. 肝細胞は空胞化し (矢印)、肝静脈洞の拡張が著るしい。H.E 染色。×200.

図11. 腎臓間質のP A S 染色に強染する壊死巣 (矢印) を示す。H.E 染色+P A S 染色。×200.

図12. 腎細静脈の拡張、溶血、強い糸球体の腫大を示す。H.E 染色。×200.

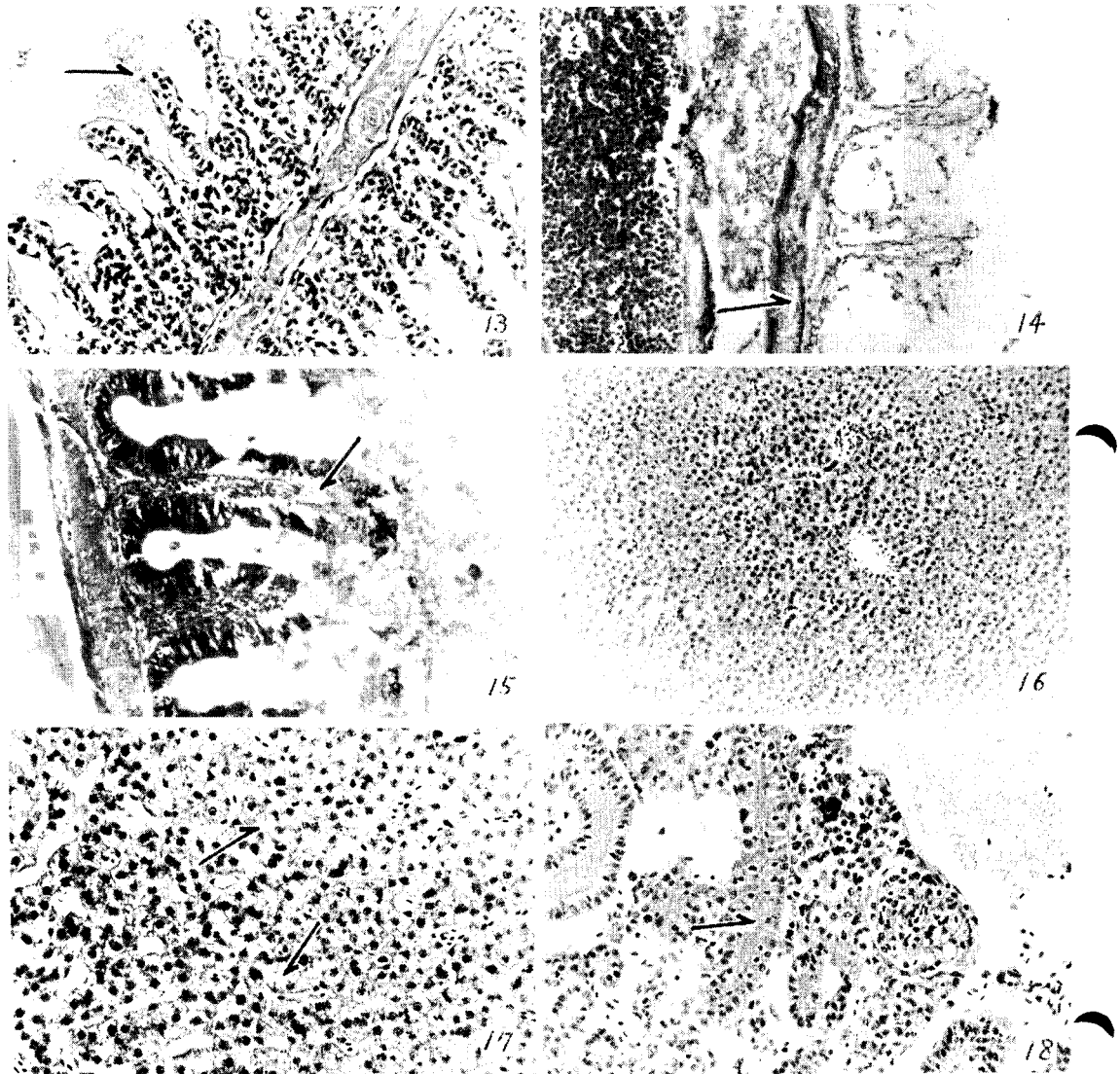


図 の 説 明

LA S 0.5ppm 溶液で飼育50日後の各臓器の病理組織像を示す。

図13. 50日群において、再び鰓薄板の浮腫が起り、先端部の上皮が破綻し（矢印）、出血し始める。×200.

Azan 染色。

図14. 消化管前部の上皮は完全に消失し、変性は粘膜下織、筋層にまで及んでいる（矢印）。Azan染色。×200.

図15. 50日群では、消化管後部の上皮の壊死は更に増強され、粘膜壁中心部の結合織層にまで変性が及んでいる（矢印）。H.E 染色。×200.

図16. 肝細胞は全体に激しい腫大を示すH.E 染色。×100.

図17. その拡大像では、各肝細胞は果粒状を呈し、その間に点状壊死（矢印）が認められる。Azan染色。×200.

図18. 尿細管は萎縮し、内部にエオジン嗜好性のコロイド状物質が貯溜し（矢印）、細胞間隙が増加する。H.E 染色。×200.