

## アサリの受精卵とD型幼生に対する有機スズ化合物の影響

黒田伸郎

Effects of the organotin compounds on embryos and D larvae of short-necked clam (*Tapes philippinarum*)

KURODA Nobuo

## Abstract

Effects of tributyltin chloride (TBTC) and triphenyltin chloride (TPTC) to embryos and D larvae of short-necked clam (*Tapes philippinarum*) were investigated. After a few hours exposure, morphologically abnormal and/or unmoving embryos were significantly more in 0.27  $\mu\text{g}/\ell$  of TBTC and 0.06  $\mu\text{g}/\ell$  of TPTC than in control, and almost of the embryos were abnormal in 33  $\mu\text{g}/\ell$  of TBTC and 7.9  $\mu\text{g}/\ell$  of TPTC. After a day exposure, hatchability was observed significantly lower in 0.27  $\mu\text{g}/\ell$  of TBTC and 0.06  $\mu\text{g}/\ell$  of TPTC than in control. The  $\text{LC}_{50}$  of TBTC and TPTC for 48 hours on D larvae of the shellfish were 17.5 and 32.7  $\mu\text{g}/\ell$ , respectively. These results indicated that the concentration of the organotin compounds affecting the development period of the short-necked clam is considerably lower than that affecting its adult.

キーワード：アサリ，発生初期，D型幼生，有機スズ，毒性試験，奇形

## はじめに

トリブチルスズ (TBT)，トリフェニルスズ (TPT) に代表される有機スズ化合物は船底の防汚塗料として1960年頃から広く使用されてきたといわれている。これらの物質の魚介類に対する毒性や蓄積性，環境での残留性については早くから指摘され段階的に使用や生産の規制がなされ，現在は事実上ほとんど沿岸域での使用はできない。<sup>1)</sup> しかし，伊勢・三河湾における筆者ら<sup>2)</sup> の1994年の汚染実態調査によれば，TPTは海水・底泥いずれからも検出されなかったものの，TBTは海水においては18検体中7検体で0.004~0.014  $\mu\text{g}/\ell$  の範囲で微量ながら検出されており，底泥においては12検体全てで4.3~185.8  $\mu\text{g}/\ell$  の範囲で検出され (いずれも塩化物換算) 依然として残留していることがわかっている。

魚介類に対するこれらの物質の急性毒性，蓄積性については多くの研究がなされ，さまざまな魚介類に対し，極めて低い濃度で影響を与えることが明らかになっている。<sup>3,4)</sup> しかし愛知県的主要水産生物であるアサリについては，成貝に対する急性毒性試験がなされている<sup>5)</sup> だ

けで，感受性が強いと考えられる発生の初期段階に与える影響については知られていない。そこで本研究では有機スズ化合物がアサリの初期発生に及ぼす影響を明らかにするために，アサリ受精卵の奇形や運動能力への影響試験およびD型幼生の  $\text{LC}_{50}$  の測定を行った。

## 材料と方法

## 海水

アサリ成貝の飼育には三谷地先で採水した海水をそのまま用いた。受精卵およびD型幼生の飼育，塩化トリブチルスズ (TBTC)・塩化トリフェニルスズ (TPTC) を含む試験海水の調整には三谷地先の海水をワットマン GF/C ガラス濾紙で濾過したものをを用いた。これらの海水の TBTC・TPTC 濃度はそれぞれ 0.001  $\mu\text{g}/\ell$ ，0.01  $\mu\text{g}/\ell$  以下であった。

## 供試生物の調整

## 1) アサリ受精卵の調整

1994年10月に三河湾福江地先で採取したアサリ成熟成貝約100個体 (殻長  $38.0 \pm 3.8$  cm，殻つき重量  $11.9 \pm$

3.5 g) を、海水を満たした 10 l アクリル水槽に収容した。エアレーションをしながらヒーターで水温を 15°C から 30°C まで約 0.5°C/分の割合で昇温した後、水温 15°C の水と交換した。この昇温刺激を数回繰り返して放精・放卵させた。受精卵が浮遊した海水を直ちに目合 20  $\mu\text{m}$  のナイロンネットで緩やかに濾過し、ネット上に受精卵を集めた。これを濾過海水で緩やかに 3 回洗浄し、濾過海水に懸濁して受精卵影響試験に供した。

## 2) D型幼生の調整

1) で得た受精卵からふ化した幼生を 1 l ビーカーに 10 個体/ml の密度になるように収容し、エアレーションを行いながら 20°C で飼育した。受精 3 日後から *Isocrysis* spp. を適量給餌しながら飼育を続け、D型幼生を得た。

## 影響試験

### 1) 受精卵の発生に与える影響試験

TBTC(関東化学, 1 mg/ml トルエン溶液), TPTC(関東化学, 1 mg/ml トルエン溶液)をエタノールで希釈して 1000  $\mu\text{g}/\text{l}$  原液を作成した。この原液を濾過海水で希釈して濃度段階系列を作成し、それぞれ 24 穴のポリスチレン製マイクロプレートに 0.5 ml ずつ分注し、採卵 1 時間後の受精卵を懸濁した海水 0.5 ml を加えて、1.0 ml の濃度段階試験区とした。試験区の最終濃度は TBTC は 0.053, 0.27, 1.3, 6.7, 33  $\mu\text{g}/\text{l}$ , TPTC は 0.064, 0.32, 1.6, 8.0, 40  $\mu\text{g}/\text{l}$  に設定した。なお試験区濃度は以下に述べるものも含めてすべて設定濃度であり、実測はしていない。

マイクロプレートを受精卵収容後直ちに 20°C の恒温槽内に静置し、24 時間後までの発生状況を倒立顕微鏡下で観察した。試験は 1 濃度について 4 穴を用い、1 穴あたりの受精卵は 60~70 個体とした。

受精卵は対照区において、試験開始 1 時間後に桑実胚となり、2 時間後には球形の胚の周囲に繊毛を生じて回転するようになった。5 時間後にはベリジャーとなって遊泳を開始した。そこで 2~3 時間後に各濃度区において、形態が完全な球形で回転を行っている「正常個体」と、形状が完全な球形でなかったり、回転を行っていない「異常個体」をそれぞれ計数した。また 22~25 時間後には、ベリジャー幼生の形態をしていて活発に遊泳している「正常個体」、遊泳しているが明らかに形態に異常が見られる「奇形個体」、全く遊泳しなかったり、明らかに途中で発生が停止した「未ふ化個体」を計数した。

### 2) D型幼生に与える影響試験

1) と同様に、マイクロプレートにあらかじめ調整し

た希釈試験海水を 0.5 ml ずつ分注しておき、これに受精後 6 日経過した D型幼生を懸濁した海水を 0.5 ml 加えて各濃度試験区を作成した。試験区の最終濃度は、TBTC は 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{g}/\text{l}$ , TPTC は 11.5, 23, 34.5, 46  $\mu\text{g}/\text{l}$  に設定した。試験は 1 濃度区について 3~4 穴を用い、1 穴あたりの正常個体数は 10 個体程度としたが、遊泳している幼生を定量ピペットで採集して移したため、各区の個体数にはばらつきが多かった。

はじめに各試験区における正常個体、死亡個体を倒立顕微鏡下で計数してから、マイクロプレートを 20°C の恒温槽に静置して飼育を行った。生死の判定は、明らかに形態に異常が見られ全く動かないもの、形態に異常がなくても 30 秒程度の観察中に全く動かないものを死亡個体とした。

48 時間後に再び倒立顕微鏡下で正常個体、死亡個体を計数し実験開始時の計数結果と比較して、実験期間中に死亡した個体数、生残した個体数を算出した。

## 結 果

### 受精卵の発生に与える影響

図 1 に実験開始 2~3 時間後の両化合物の各濃度段階での全個体数に対する異常個体の割合（以下「異常発生率」と呼ぶ）を 4 穴の平均値で示した。各濃度段階における平均値と対照区の平均値との差に対する t-検定の結果を合わせて示した。すなわち、対照区との有意差がみられない濃度区の記号は白抜きで、1% または 5% の有意差がみられる濃度区は黒塗りで示した。

TBTC に対しては、0.27  $\mu\text{g}/\text{l}$  までは異常発生率に対照区との有意差はみられず、1.3  $\mu\text{g}/\text{l}$  以上で対照区との有意差がみられた。しかし、6.7  $\mu\text{g}/\text{l}$  までは異常発生率の大きな変化は見られず、33  $\mu\text{g}/\text{l}$  では全ての個体に形態の異常や、発生の停止などの異常がみられた。

TPTC に対しては 0.06  $\mu\text{g}/\text{l}$  というきわめて低い濃度から異常発生率の対照区との有意差がみられ、7.9  $\mu\text{g}/\text{l}$  では平均で 82.5%、40  $\mu\text{g}/\text{l}$  では 100% の個体に何らかの発生異常がみられた。

図 2 に、約 24 時間後の TBTC 各濃度における全個体数に対するふ化個体数の割合（以下「ふ化率」と呼ぶ）、および全個体数に対する奇形個体数の割合（以下「奇形率」と呼ぶ）を示した。ここで全個体数とは正常個体数、奇形個体数、未ふ化個体数の合計、ふ化個体数とは正常個体数と奇形個体数の合計である。また図にはふ化率について対照区との平均値の有意差の検定結果を合わせて示した。すなわち、白抜きの記号は対照区と有意差がみ

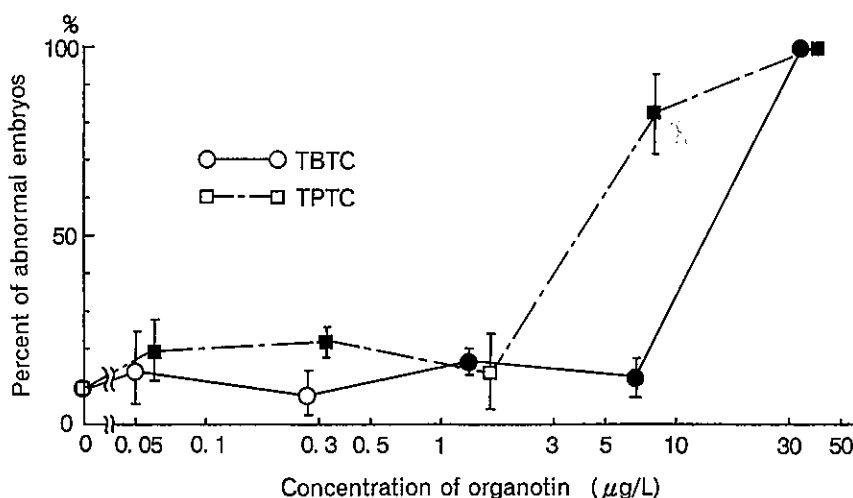


Fig. 1. Effects of the organotin compounds to embryos of the short-necked clam in several hours exposure.

Morphologically abnormal and/or unmoved embryos were regarded as abnormal. Solid squares and circles represent that the value significantly differed from the control experiment with 1% or 5% confidence level by t-test. Vertical bars indicate standard deviation.

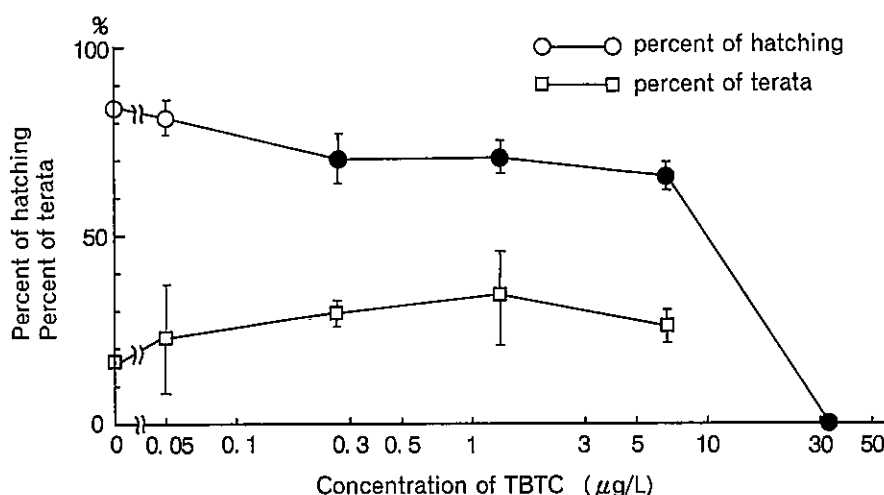


Fig. 2. Effects of TBTC to the hatchability and terata of the short-necked clam in a day exposure.

Solid circles represent the hatchability significantly different from the control experiment. Vertical bars indicate standard deviation.

られず、黒塗り記号は1%または5%の有意差があることを示している。ふ化率は6.7 µg/lまでゆるやかに減少し、33 µg/lでは全個体が発生途中で死亡した。また、0.27 µg/l以上の濃度では対照区より有意にふ化率が小さかった。奇形率は1.3 µg/lまでゆるやかに増加し、ふ化率はゆるやかにではあるが減少したので、ふ化しても奇形である個体は濃度とともに増加し、1.3 µg/lではふ化した個体のほぼ半分が奇形個体であった。

図3に、約24時間後のTPTC各濃度におけるふ化率と奇形率を示した。ふ化率は、1.6 µg/lまでゆるやかに減少し、7.9 µg/lでは8.8%まで低下した。またすべての濃度段階で、ふ化率は対照区より有意に小さかった。

奇形率は1.6 µg/lまでほぼ横ばいであったが、ふ化した個体に対する奇形個体の割合は濃度とともに増加し、7.9 µg/lではふ化した個体のほとんどが奇形であった。

#### D型幼生に与える影響

図4に両有機スズ化合物の各濃度段階におけるアサリD型幼生の48時間後の生残率を示した。両化合物ともアサリD型幼生が100%生残する濃度と、死滅する濃度の範囲は狭く、TBTCに対しては30 µg/lですべての個体が、TPTCに対しては46 µg/lで92%の個体が死亡した。これらの結果からTBTCのアサリD型幼生に対する48時間LC<sub>50</sub>は17.5 µg/l、TPTCのそれは、32.

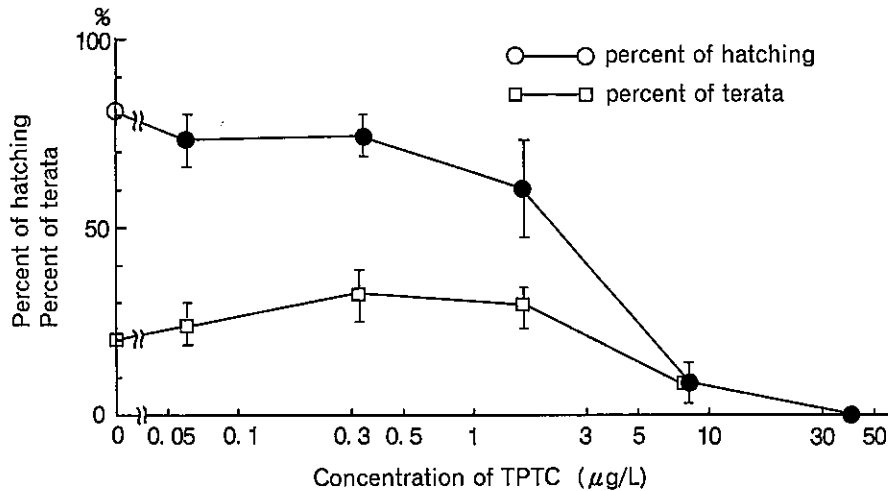


Fig. 3. Effects of TPTC to the hatchability and terata of the short-necked clam in a day exposure. Solid circles represent the hatchability significantly different from the control experiment. Vertical bars indicate standard deviation.

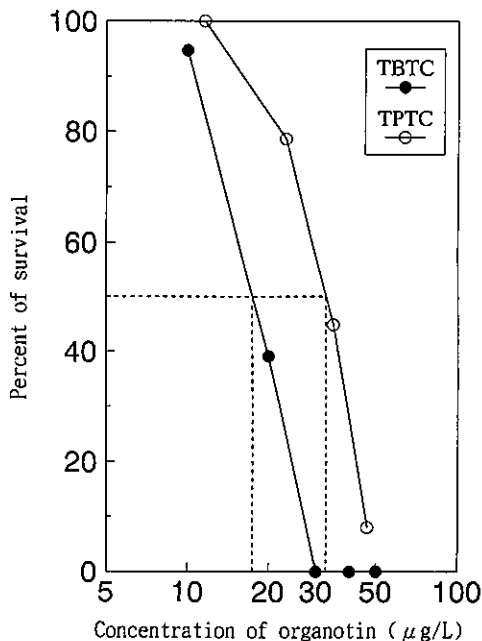


Fig. 4. Effects of the organotin compounds to the survival of the D larvae of the short-necked clam in 48 hour. Dotted lines indicate  $LC_{50}$ .

7  $\mu\text{g}/\ell$  と計算された。TBTC の急性毒性の方が TPTC のそれよりも高いのは、アサリ成貝、クルマエビ稚エビ、クロダイ稚魚等他の生物に対する毒性の傾向と同様であった。<sup>5-7)</sup>

#### 考 察

筆者ら<sup>9)</sup> のアサリ成貝に対する有機スズ化合物の急性毒性試験によれば、TBTC の 96 時間  $LC_{50}$  が約 400

$\mu\text{g}/\ell$ 、TPTC の 72 時間  $LC_{50}$  が約 800  $\mu\text{g}/\ell$  で、今回得られたアサリ D 型幼生に対する  $LC_{50}$  値は、成貝に対するそれに比べいずれも約 1/20 程度であった。海産魚介類では有機スズ化合物に対し、成体に比べ稚仔の方がきわめて感受性が高いことがよく知られており、<sup>4,9)</sup> アサリについても同様の傾向があることが確かめられた。また、同じ二枚貝であるマガキの D 型幼生について、TBTO (酸化トリブチルスズ) の 24 時間  $LC_{50}$  で 15  $\mu\text{g}/\ell$ 、TPTC の 24 時間  $LC_{50}$  で 5.3  $\mu\text{g}/\ell$  という報告があり、<sup>8)</sup> アサリ D 型幼生の感受性はマガキに比べ同程度かやや低いと考えられる。

受精卵の発生に与える有機スズ化合物の影響をみると、約 1 日後のふ化率は TBTC では 0.27  $\mu\text{g}/\ell$ 、TPTC では 0.06  $\mu\text{g}/\ell$  で対照区より有意に低く、1  $\mu\text{g}/\ell$  以下というきわめて低い濃度で影響がみられた(図 2, 3)。濃度の増加に伴うふ化率の減少は TBTC より TPTC の方が急激であり、アサリ D 型幼生や他の魚介類に対する急性毒性と異なり、アサリ発生初期に与える影響は TBTC より TPTC の方が深刻であると考えられる。また表 1 に示したように、発生のごく初期(受精後 3~4 時間)に観察された異常胚の割合と 1 日後のふ化率の合計がどの濃度区でもほぼ 90~100% であることから、発生の初期の数時間でダメージを受けた胚は結局ふ化できないと考えられる。さらに、約 1 日後のふ化個体に占める奇形個体の割合が濃度の増加とともに上昇することは、受精卵はたとえごく初期の有機スズのダメージをくぐり抜けて発生を続けられたとしても有機スズ化合物による影響を受け続けており、ふ化できた個体が成貝まで成長できる可能性が低められていることを示唆している。

Table 1. Relationships between abnormal segmentation and hatchability in development of short-necked clam

concentration ( $\mu\text{g}/\ell$ )	abnormal embryo* (A)	hatchability** (B)	A+B
TBTC			
Control	8.9	83.8	92.7
0.05	13.8	80.9	94.7
0.27	7.5	70.2	77.7
1.3	16.3	70.6	86.9
6.7	12.5	66.2	88.7
33	100		100
TPTC			
Control	8.8	80.9	89.7
0.06	18.8	73.2	92.0
0.32	21.3	74.3	95.6
1.6	13.8	60.3	74.1
7.9	82.5	8.8	91.3
40	100		100

\* percent of morphologically abnormal and unmobile embryos to total embryos after several hours exposure.

\*\*percent of hatching larvae to total larvae after a day exposure.

アサリ成貝に対する TBTC・TPTC の  $LC_{50}$  は数百  $\mu\text{g}/\ell$  と他の魚介類に比し耐性が強く、<sup>3,5-7)</sup> この濃度は実海域で検出される濃度<sup>2)</sup> より 1000 倍以上高いので、三河湾においてアサリ成貝に対し有機スズ化合物が影響を与えているとは考えられない。しかし、本研究で観察されたようにアサリの発生初期にはごく低い有機スズ濃度で深刻な影響を受けることが示唆され、今後も慎重に有機スズ化合物の漁場における汚染の実態を観察していく必要があると考えられる。

## 謝 辞

本稿をまとめるにあたり、校閲および貴重な助言を賜った、中央水産研究所山田久博士に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

1) 杉田昭夫(1992)問題の経緯. 「有機スズ汚染と生物影響」(里

見至弘・清水誠編), 水産学シリーズ 92, 恒星社厚生閣, 東京, 9-19.

- 2) 黒田伸郎・向井良吉・原 保・中村雅廣・倉地正・波多野秀之・岩瀬重元(1995)有機スズ化合物実態調査. 平成 6 年度愛知県水産試験場業務報告, 89-90.
- 3) 須藤俊造・相良順一郎・小川良徳・梅林 脩・荒木公一(1970)トリブチルティンオキサイドおよびジクロロニトロサリチルアニリドの海産生物に対する影響. 水産増殖, 18, 163-176.
- 4) 里見至弘(1985)有機スズ化合物の水生生物に対する毒性. 水産の研究, 4(6), 54-66.
- 5) 黒田伸郎・蒲原聰・井野川仲男(1991)水産生物に対する有機スズ化合物の毒性試験. 平成 2 年度愛知県水産試験場業務報告, 113-114.
- 6) 黒田伸郎・蒲原聰・井野川仲男(1992)水産生物に対する有機スズ化合物の毒性試験. 平成 3 年度愛知県水産試験場業務報告, 92-93.
- 7) 黒田伸郎・石田基雄・向井良吉・原 保(1994)水産生物に対する有機スズ化合物の毒性試験. 平成 5 年度愛知県水産試験場業務報告, 74.
- 8) 堀口敏宏・清水誠(1992)貝類及び他の水生生物. 「有機スズ汚染と生物影響」(里見至弘・清水誠編), 水産学シリーズ 92, 恒星社厚生閣, 東京, 99-135.

## 要 約

塩化トリブチルスズ (TBTC) と塩化トリフェニルスズ (TPTC) のアサリ発生期に与える影響を知るため、受精卵の受精後 1 日までに与える影響試験と D 型幼生に対する急性毒性試験を行った。受精数時間後の胚に形態異常や発生停止など異常が発生した率は、TBTC では  $1.3 \mu\text{g}/\ell$ 、TPTC では  $0.06 \mu\text{g}/\ell$  の濃度区で対照区に比べ、有意に高かった。また、TBTC の  $33 \mu\text{g}/\ell$ 、TPTC の  $7.9 \mu\text{g}/\ell$  区ではほとんどの胚に異常がみられた。1 日後のふ化率は、TBTC の  $0.27 \mu\text{g}/\ell$  以上、TPTC の  $0.06 \mu\text{g}/\ell$  以上の濃度区で対照区より有意に低かった。ふ化した胚に占める奇形胚の割合も濃度とともに増加した。D 型幼生に対する 48 時間  $LC_{50}$  は TBTC が  $17.5 \mu\text{g}/\ell$ 、TPTC が  $32.7 \mu\text{g}/\ell$  であった。これらの結果から、アサリ発生期に及ぼす有機スズの影響濃度は成体に対する影響濃度よりはるかに小さいことが示された。

