

# 魚および水生底生動物へのクロルピリホス毒性試験

廣田敏郎・坂口寛

福岡市保健環境研究所環境科学部門

## Toxic examination to the Fish and the Bottom Fauna by Chlorpyrifos

Toshiro HIROTA and Yutaka SAKAGUCHI

Environmental Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

### Summary

The mass death of fish in the small river occurred and soon after, Chlorpyrifos of 30 $\mu$ g/L was detected in river water. The Chlorpyrifos toxic examination was performed to the *Zacco platypus* and *Cyprinus speculais*. The *Zacco platypus* were died in 3 hours to 4 days by 0.06 mg/L, pesticide adsorption to gills was observed in correlation with time and concentration. *Gammarus nipponensis* and *Ephemerella okuma* were remarkably decreased compared with the pollution point and upper stream point. The toxic examination in laboratory was performed about these bottom fauna too. The 50% value mortality rate of *Gammarus nipponensis* was 0.24 $\mu$ g/L and *Ephemerella okuma* was 1.5 $\mu$ g/L in 24 hours.

**Key Words** : クロルピリホス Chlorpyrifos, 毒性試験 Toxic examination, オイカワ *Zacco platypus*, 錦鯉 *Cyprinus speculais*, ニッポンヨコエビ *Gammarus nipponensis*, オオクマダラカゲロウ *Ephemerella okuma*

### はじめに

昨年福岡市内の小河川でオイカワ、錦鯉、モズクガニ等の大量死事故が発生し、原因調査を行ったところ河川水から最高 30  $\mu$  g/L のクロルピリホスが検出された<sup>1)</sup>。クロルピリホスの毒性についての知見はあるがオイカワ、錦鯉への毒性については知られていない<sup>2)</sup>。そこで新たに知見をえるためオイカワ、錦鯉の毒性試験を行った。また、事故後半年経過後底生動物の回復状況を把握するため底生動物調査を行なったところ、汚染箇所付近でニッポンヨコエビ、オオクマダラカゲロウの減少がみられた<sup>3)</sup>。このことからこの2種についても毒性試験を行ったので報告する。

### 測定方法

#### 1. 検体

#### 1) オイカワ

平成15年8月に福岡市内河川那珂川で採取したものを持ち帰り1週間水槽で飼育したものをを用いた。

#### 2) 錦鯉

平成15年9月に購入した、奈良および日田産の錦鯉を1週間水槽で飼育したものをを用いた。

#### 3) ニッポンヨコエビ

福岡市内河川油山川上流で採取したものをを用いた。

#### 4) オオクマダラカゲロウ

福岡市内河川油山川上流で採取したものをを用いた。

### 2. クロルピリホス毒性試験

#### 1) オイカワへの毒性試験

オイカワの写真をFig. 1に示す。

DO飽和水10Lが入った水槽にダウ・ケミカル日本株式会社製クロルピリホス乳剤(40%)でクロルピリホス濃度を0, 0.06, 0.6mg/Lに調整し、オイカワ(重量5.3~10.1g)を1槽に5匹ずつ投入した。水温は20~25とし3時間経過後から

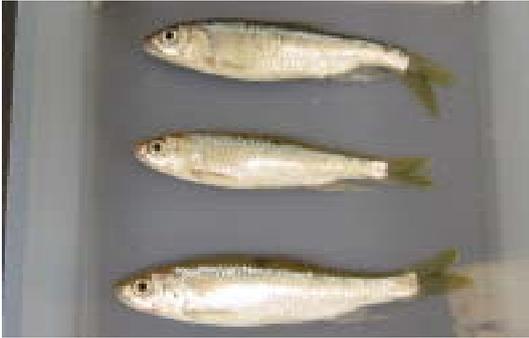


Fig. 1 *Zacco platypus*



Fig. 2 *Cyprinus speculais*



Fig. 3 *Gammarus nipponensis*



Fig. 4 *Ephemerella okuma*

バブリングを開始し、濃度は1日1回測定後濃度補正し、死亡するまでの経過時間を測った。

## 2) 錦鯉への毒性試験

錦鯉の写真をFig. 2に示す。

水15Lが入った水槽に1)で用いた乳剤でクロルピリホス濃度を0.03, 0.06, 0.12, 0.24mg/Lに調整し、錦鯉(体長5.0~6.9cm)を1槽に5匹ずつ投入した。水温は20~25でバブリングし、濃度は1日1回測定後濃度補正し、死亡するまで定時に観察した。

## 3) ニッポンヨコエビ, オオクマダラカゲロウへの毒性試験

ニッポンヨコエビの写真を Fig. 3 にオオクマダラカゲロウを Fig. 4 に示す。

汚染の影響がなかった地点の河川水 200mL をピーカに入れ、ダズバン乳剤(40%)でクロルピリホスを高濃度条件(0, 3, 30, 300 µg/L: n = 5), 低濃度条件(0, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 µg/L: n = 10)に調整し汚染箇所のすぐ上の上流で採取したニッポンヨコエビ, オオクマダラカゲロウを1匹ずつ水温20の条件で毒性試験を行った<sup>5)</sup>。

## 3. 魚のエラに付着した農薬の測定

魚のエラをスピッツ管に取りアセトン 5mL で 10min 超音波抽出した後、蒸留水 50mL, 塩化ナトリウム 1.5g, を加え n-ヘキサン 10mL を加え 10 分間振とうを 2 回繰り返し n-ヘキサンに転溶, 無水硫酸ナトリウム加え脱水後窒素吹きつけ濃縮した。これを Sep-Pak フロリジルでクリーンアップした後濃縮し, GC / MS で測定した。

### GC/MS測定条件

(GC/MS) HP6890/Automass sun300

(注入方法) スプリットレス

(測定カラム) ULTRA2(i.d.0.2mm × 25m, 0.33 µm)

(注入温度) 220 (キャリアガス流量) He1.5mL/min

(GC 負荷量) 2 µL (カラム温度) 50 -15 /min-105 -4 /min-205 -8 /min-280 (3min)<sup>4)</sup>。

## 実験結果

### 1. クロルピリホス毒性試験

#### 1) オイカワへの毒性試験

Table 1 Toxic examination to *Zacco platypus* by Chlorpyrifos

	Weight(g)	Gills(g)	Amount of adsorption(ug) per weight of 1g(ug)	Amount of adsorption per gills of 1g(ug)	Survival Time
0.06mg/LA1	6.8	0.28	0.85	0.12	3.0 3hours
A2	4.5	0.21	1.3	0.29	6.2 27hours
A3	5.3	0.29	2.6	0.49	9.0 43hours
A4	8.8	0.30	4.8	0.55	16.0 86hours
A5	8.4	0.33	6.9	0.82	20.9 90hours
0.6mg/LB1	5.9	0.31	19.8	3.4	63.9 3hours 20minutes
B2	4.5	0.30	20.3	4.5	67.7 3hours 20minutes
B3	7.4	0.33	23.1	3.1	70.0 3hours 30minutes
B4	10.1	0.65	27.4	2.7	42.2 3hours 30minutes

Table 2 Toxic examination to *Cyprinus speculais* by Chlorpyrifos

Chlorpyrifos conc	No(Seed name)	Weight(g)	Gills weight(g)	Amount of adsorption of gills(μg)	Amount of adsorption per 1g of gills(μg/g)	Survival Time (hr)
0.03mg/L	A1(Sarasa)	23.0	0.99	0.44	0.44	50
	A2(Taisyousansyoku)	27.7	0.70	0.49	0.71	67
	A3(Taisyousansyoku)	21.1	0.72	1.0	1.4	67
	A4(Taisyousansyoku)	11.8	0.48	0.44	0.91	67
	A5(Taisyousansyoku)	19.1	0.64	0.26	0.41	67
0.06mg/L	B1(Syouwasansyoku)	16.8	0.66	0.90	1.4	28
	B2(Taisyousansyoku)	10.7	0.36	0.67	1.9	67
	B3(Sarasa)	14.4	0.50	2.3	4.6	67
	B4(Kouhaku)	20.6	0.74	1.0	1.4	67
	B5(Hibekko)	23.6	0.89	4.9	5.5	91
0.12mg/L	C1(Syouwasansyoku)	11.0	0.32	1.2	3.7	5
	C2(Hibekko)	9.0	0.74	1.8	2.4	11
	C3(Sarasa)	16.4	0.65	14	22	67
	C4(Taisyousansyoku)	11.0	0.43	8.6	20	67
	C5(Taisyousansyoku)	19.9	0.52	6.8	13	67
0.24mg/L	D1(Syouwasansyoku)	15.9	0.54	2.8	5.1	4
	D2(Taisyousansyoku)	20.5	1.04	26	25	79
	D3(Sarasa)	8.3	0.30	13	44	79
	D4(Taisyousansyoku)	16.3	0.58	18	31	79
	D5(Taisyousansyoku)	9.8	0.28	15	55	79

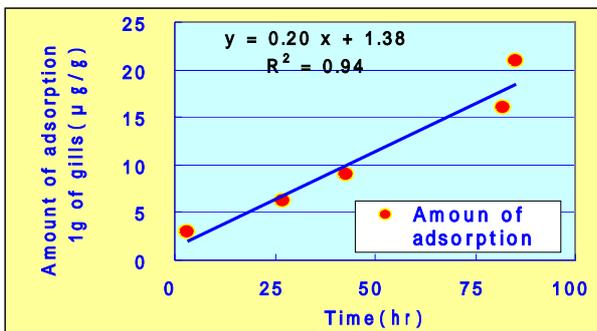


Fig. 5 Relation between the amount of adsorption, and survival time to *Zacco platypus* by Chlorpyrifos (0.06mg/L)

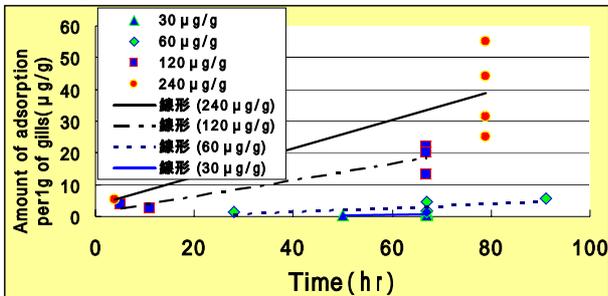


Fig. 6 Relation between the amount of adsorption, and survival time to *Cyprinus speculais* by Chlorpyrifos

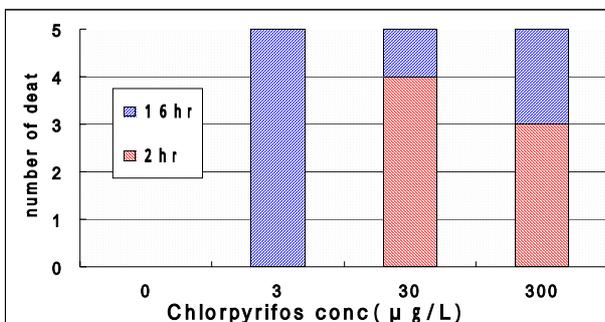


Fig. 7 Relation between the survival time of *Gammarus nipponensis*, and Chlorpyrifos concentration  
 毒性試験結果を Table 1 に示す .

クロルピリホス濃度0.06mg/Lに投入したオイカワは4日間で全て死亡し、0.6mg/Lに投入したものは全て3hr~4hrで死亡した。0.06mg/Lの条件ではエラ1g中の吸着量は3.0~20.9 μgであった。また0.6mg/Lの条件では42.2~70 μgであった。これを、クロルピリホス濃度0.06mg/Lでのエラの吸着量と生存時間との関係をFig. 5に示す。この結果クロルピリホスのエラへの吸着量と死亡までの経過時間に高い相関がみられた。

### 2) 錦鯉への毒性試験

毒性試験結果をTable 2, Fig. 6に示す。

クロルピリホス濃度0.03mg/Lに投入したオイカワは3日間で全て死亡し、0.06mg/Lに投入したものは4日間で全て死亡し、0.12mg/Lに投入したものは3日間で全て死亡し、0.24mg/Lに投入したものは3~4日間で死亡した。またクロルピリホス濃度0.03mg/Lの条件でのエラ1g中の吸着量は0.44~1.4 μg, 0.06mg/Lの条件では1.4~5.5 μg, 0.12mg/Lの条件では2.4~22 μg, 0.24mg/Lの条件では5.1~55 μgであった。錦鯉は単一品種ではなかったがクロルピリホス濃度とエラの吸着量は相関性がうかがわれた。また、0.12mg/L, 0.24mg/Lでの毒性試験結果で死亡時間がほぼ同じなのにエラへのクロルピリホス吸着量に差がみられた。

### 3) ニッポンヨコエビ, オオクマダラカゲロウへの毒性試験

高濃度条件でのニッポンヨコエビの毒性試験結果をFig. 7に、オオクマダラカゲロウの毒性試験結果をFig. 8に示す。

クロルピリホス高濃度毒性試験(急性毒性試験)ではニッポンヨコエビは30 μg/Lの濃度で2時間内に50%以上が死亡した。また、ニッポンヨコエビ, オオクマダラカゲロウは3 μg/Lでも16時間内に死亡した。

次に低濃度条件での毒性試験結果をニッポンヨコエビはFig. 9, オオクマダラカゲロウはFig. 10に示す。ニッポンヨコエビは毒性試験濃度は0.5 μg/Lで開始後24時間

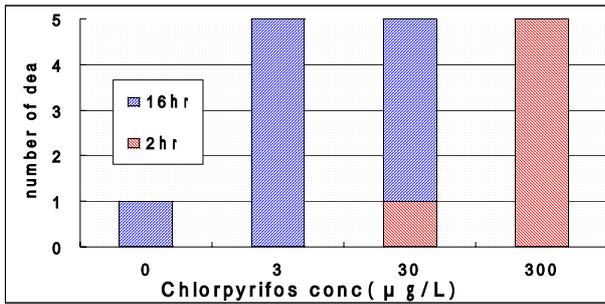


Fig. 8 Relation between the survival time of *Ephemera okuma*, and Chlorpyrifos concentration

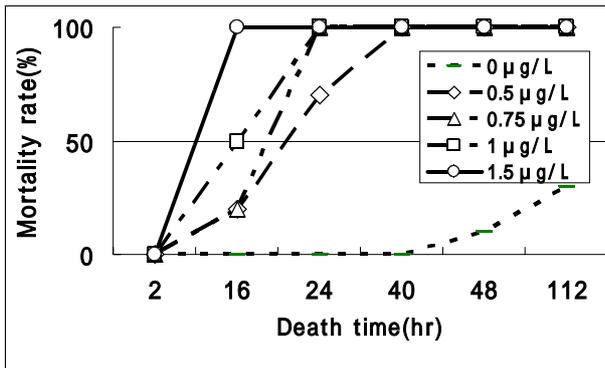


Fig. 9 The relation of the mortality rate of *Gammarus nipponensis* and survival time by Chlorpyrifos concentration

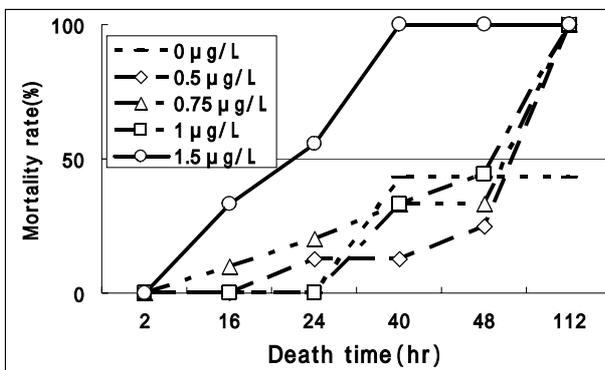


Fig. 10 The relation of the mortality rate of *Ephemera okuma* and survival time by Chlorpyrifos concentration

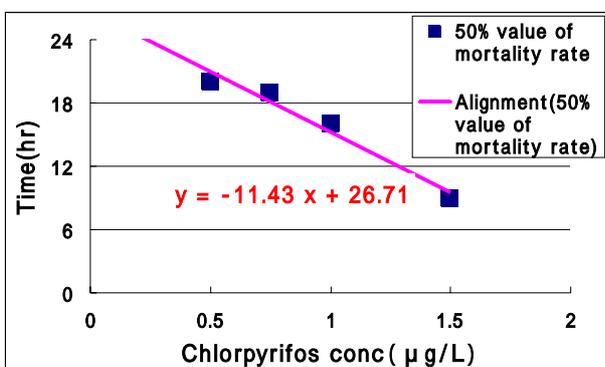


Fig. 11 The relation of the survival time of 50% of mortality rate and Chlorpyrifos concentration by

### *Gammarus nipponensis*

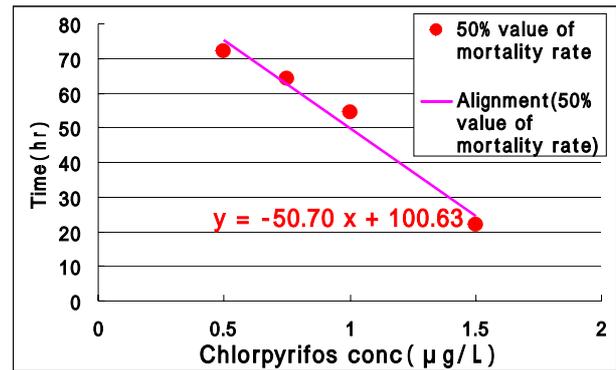


Fig. 12 The relation of the survival time of 50% of mortality rate and Chlorpyrifos concentration by *Ephemera okuma*

内に死亡率が 50 %を超えたが、オオクマダラカゲロウは 1.5 µg/L が 24 時間での死亡率 50 % 値であった。この結果はニッポンヨコエビはオオクマダラカゲロウと比べてクロルピリホスに対して弱いことを示している。

次に、低濃度 4 段階で死亡率が 50 % になるまでの経過時間をプロットしたグラフを Fig. 11, Fig. 12 に示す。ニッポンヨコエビは外挿になったが 0.24 µg/L, オオクマダラカゲロウは 1.5 µg/L であった。いずれの値も魚へい死時のクロルピリホス初期濃度 30 µg/L と比較するときわめて低い値であった。

### 考 察

クロルピリホスの生物への影響を把握するために、オイカワ、錦鯉、ニッポンヨコエビおよびオオクマダラカゲロウへの毒性試験を行なった。

オイカワでは水槽中のクロルピリホス濃度が 0.06mg/L では、エラ 1g 当りの吸着量は平均 11mg/g であり死亡まで 3hr ~ 4days を要し、生存時間とエラ 1g あたりのクロルピリホスに高い相関があった。このことはいったんエラに吸着したクロルピリホスがそのまま保持されていることを表している。またこの濃度が 0.6mg/L では、エラ 1g 当りの吸着量は平均 61mg/g と高い値であり死亡まで 3hr ~ 4hr を要した。水槽中濃度が 0.6mg/L の場合、短時間でいっせいに痙攣後の死亡したことは急性毒性によると思われる。しかし、0.06mg/L の場合、死亡時間に幅があり 4 日間におよぶ魚もいたことからクロルピリホスの蓄積により死亡したと考えられた。

錦鯉ではクロルピリホス濃度 0.03 ~ 0.24mg/L とオイカワより低い濃度で行なった。濃度による生存時間の差

は見られなかったが死亡までの経過の中で仮死状態が長く続く錦鯉が多数見られた。たとえば 0.12mg/L および 0.24mg/L 投入でほぼ同じ時間に死亡したのにエラ 1g あたりのクロルピリホス吸着量に差がでた。これは仮死時間が長かったものとそうではなかったものとの差によるものであった。自然界で仮死状態のものはほとんど死んだ状態と考えると仮死に至るまでの時間をおさえる必要があった。

ニッポンヨコエビおよびオオクマダラカゲロウの水槽中のクロルピリホス濃度が 1.5  $\mu$  g/L 以下の実験では濃度と死亡率 50 % 時間に直線性が見られた。この近似直線からニッポンヨコエビの 24 時間死亡率 50 % 値は 0.24  $\mu$  g/L, オオクマダラカゲロウのその濃度は 1.5  $\mu$  g/L と考えられた。ニッポンヨコエビはオオクマダラカゲロウと比べるとクロルピリホスに対して感受性が強く、比較的簡単に上流域で集団で見つかり多量に入手しやすく、また取り扱いやすいので、クロルピリホス等

の毒性試験として有効な生物ではないかと考える。

## 文 献

- 1) 廣田敏郎・中牟田啓子・坂口寛・廣中博見：クロルピリホスが原因と思われる魚へい死事故について、第 30 回環境保全・公害防止研究発表会、54-55 (2003)
- 2) 田中二良：水生生物と農薬、サイエンティスト社
- 3) 廣田敏郎・坂口寛：クロルピリホス等農薬と水生底生動物について、日本水環境学会九州支部研究発表会、20-21 (2004)
- 4) 廣田敏郎・木下誠・廣中博見：へい死魚のエラに付着した農薬の分析法の検討、福岡市保健環境研究所所報第 27 号、91-96 (2002)
- 5) 西内康浩：続・水生生物と農薬、サイエンティスト社