亜硝酸のウナギに対する毒性について

誌名	水産増殖
ISSN	03714217
著者名	山形,陽一 丹羽,誠
発行元	水産増殖談話会
巻/号	27巻1号
掲載ページ	p. 5-11
発行年月	1979年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

〔水産増殖27巻1号(1979)〕
〔THE AQUICULTURE〕

亜硝酸のウナギに対する毒性について

山形陽一・丹羽誠
(三重県内水面水産試験場)

さきに筆者らは循環沪過池におけるウナギの飼育量と水質との関係について調査を行い，無機態窒素の蓄積が溶存酸素量の低下とともに生産の制限要因となる可能性が大きいことを示した[1]。しかし，これらの水質要因がウナギの成長や生理状態にどのような影響をおよぼすかについてはほとんど明らかにされていない。これら水質要因のウナギに対する許容限界を求めることは，循環沪過式飼育池における水質管理上極めて重要なことである。そこで溶存無機能窒素の中で沪過槽での硝酸化成反応の中間生成物である亜硝酸について，そのウナギに対する毒性について実験を行った。

亜硝酸の魚類に対する毒性については，すでに多くの報告がなされており[2)3)4)5)6)]，サケ科魚類やアユ仔魚に対して強い毒性を示すことが判明している。しかし，これらの研究はいずれも比較的短時間で致死作用を現わす急性毒性についてのものが多く，養魚のためには致死濃度以下での影響を知ることが必要である。本実験では，亜硝酸のウナギに対する急性毒性とともに，慢性的影響として，低濃度の亜硝酸溶液中で長期間飼育した場合の成長および生理状態におよぼす影響について検討を行ったので報告する。

本文に入るに先立ち，本稿を校閲の上，有益な助言を与えられた長崎大学水産学部平山和次助教授，終始御指導を賜った三重大学水産学部岩井寿夫助教授，組織学的検査の所見について有益な助言を与えられた三重大学水産学部窪田三朗教授に対して厚く感謝する。また，研究に際していろいろと便宜を計っていただいた当水試鈴木喜三郎場長はじめ場員の方々に深謝する。

材料および方法

急性毒性

実験には，当場の野外池で飼育した日本ウナギ *Anguilla japonica*（平均体重 3.6±1.3 g）とヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla*(平均体重2.4±0.8 g)を用いた。これらのウナギは実験前2日間 100 *l* ガラス水槽で馴致・絶食させた後実験に供した。亜硝酸としては試薬特級亜硝酸ナトリウムを用いた。実験には 30×60×37 cm のアクリル製水槽を用い，水量を40 *l* とし，24時間実験水温（25℃）で十分通気した後，0 (control)，115, 155, 210, 280, 370, 490 mg/*l* NO_2-N の濃度段階になるよう亜硝酸ナトリウムを加えた。これらの供試液中にウナギを20尾ずつ入れ，24, 48, 72, および96時間後のウナギの活動状態とへい死魚数を観察記録し，各実験濃度における生残数を求めた。なお，へい死魚は確認と同時に実験水槽から取り出した。この結果からProbit法[7)]によって，24～96時間の両魚種の半数致死濃度(TL_m)を計算した。また，供試魚の一部は10%ホルマリン水で固定後，H・E染色とマロリー染色により組織標本を作製し，病理組織学的な検討を行った。

A. japonica および *A. anguilla* の野外飼育池での飼育水温はともに24～27℃であったが，本実験はすべて25±1℃に調整して行った。実験期間中の各水槽には，エアーストーンを通してゆるやかに通気した。期間中の溶存酸素量とpHは，E・I・L Model 15AD・O メーターと東亜 Model HM5B pH メーターにより24時間毎に測定した。亜硝酸態窒素とアンモニア態窒素はSTRICKLAND

& PARSONS の方法とネスラー法にしたがい，24時間後と96時間後もしくは最後の魚がへい死した時に測定した。実験期間中の溶存酸素量は飽和度で86%以上あり，pHは6.9～7.7，アンモニア態窒素も 2.6 mg/l 以下で，ウナギに影響をおよぼす範囲には致らなかった。また，亜硝酸態窒素の実測値は各設定濃度に対して5%以内の変動にとどまった。

慢性毒性

供試魚には，500 l パンライト水槽で飼育した *A. japonica*（平均体重5.8±1.1 g）を用いた。これらの供試魚は実験水槽で約1週間馴致し，十分摂餌するのを確認した後，各水槽に20尾ずつ収容し，25℃の水温で9週間飼育を行った。実験には50×50×60 cm のガラス水槽を用い，飼育水量は100 l とした。実験濃度は，0 (control)，1，3，10，および 30 mg/l NO_2-N の5段階とした。飼育水中の亜硝酸濃度を設定濃度に保つため，飼育水は毎日50～75 l をあらかじめ25℃に加温し，設定濃濃度になるよう亜硝酸ナトリウムを加えた水と交換した。しかし，飼育水槽の汚れにともない，1 mg/l NO_2-N 以上の濃度区で硝化作用による亜硝酸の減少が著しかったため，飼育3週目からはあらかじめ24時間中の亜硝酸の減少量を推定し，それに見合う亜硝酸ナトリウム溶液を滴下して減少分を補なった。飼料には糸ミミズを用い，毎日1回飽食量を給餌し，残餌が出た場合は取り上げ計量を行い，給餌量から残餌量を差し引いた値を摂餌量とした。各区の供試魚は実験開始時と終了時には個体別に体重を測定し，さらに3週および6週後にも取り上げて総体重を測定した。

実験終了時には各区から成長の良い10尾を抽出し，混合採血を行い，ヘマトクリット値（ミクロヘマトクリット法），血色素量(シアンメトヘモグロビン法)，血漿蛋白量(アタゴ血清蛋白屈折計)，および赤血球数（血球計算板）を測定した。同時に供試魚の一部を任意抽出し，急性毒性実験と同様の方法で組織標本を作製し，病理組織学的な検討を行った。

実験期間中の水温，pH，溶存酸素量および亜硝酸態窒素は2～3日毎に，アンモニア態窒素については週1回，それぞれ急性毒性実験と同様の方法で測定した。

飼育水の水質は第1表に示すとおりで，亜硝酸以外の水質要因については各区ともほぼ等しく，これらの値もウナギの飼育に影響をおよぼす範囲には致らなかった。亜硝酸態窒素の濃度は各区ともに変動がみられたが平均値ではいずれも設定濃度より若干低下したにとどまった。

結　果

急性毒性

亜硝酸溶液中での *A. japonica* および *A. anguilla* の生残率は第2,3表に示した。この生残率から求めた両魚種に対する亜硝酸態窒素の TL_m を第4表に示した。

平均体重3.6±1.3 g の *A. japonica* の水温25±1℃における24, 48, 72, および96時間 TL_m はそれぞれ 460, 299, 245, および 205 mg/l NO_2-N であった。一方，平均体重2.4±0.8 g の *A. anguilla* の各 TL_m は 351, 279, 210, および 150 mg/l NO_2-N であった。このように，水温25±1℃では，*A. anguilla* の亜硝酸に対する感受性は *A. japonica* のそれより高い傾向がみられた。

第1表　実験期間中の飼育水の水質

NO_2-N 濃度 (mg/l)	水温(℃)	pH	D. O 飽和度(%)	NH_4-N(mg/l)	NO_2-N(mg/l)
	平均値(範囲)	平均値(範囲)	平均値(範囲)	平均値(範囲)	平均値(範囲)
0	24.6(22.0～27.2)	6.9(6.2～7.3)	77.4(69.0～85.0)	0.36(0.07～0.83)	0.14(0.05～ 0.45)
1	25.4(22.8～27.6)	7.2(6.9～7.5)	73.4(65.0～81.0)	0.37(0.07～0.91)	0.80(0.53～ 1.17)
3	25.1(22.8～27.4)	7.3(6.7～7.6)	73.4(68.0～81.0)	0.35(0.03～0.78)	2.60(1.68～ 3.30)
10	25.5(23.0～26.8)	7.4(7.1～7.6)	74.1(67.0～85.0)	0.42(0.06～1.42)	9.10(5.18～12.70)
30	25.3(23.0～27.6)	7.4(7.1～7.7)	70.8(56.0～82.0)	0.52(0.07～1.28)	29.00(18.81～37.75)

第2表 亜硝酸溶液中での *A. japonica* の生残率(%)

処理時間 (hours)	NO_2-N 濃度 (mg/*l*)				
	155	210	250	370	490
24	100	90	100	80	40
48	90	80	75	25	10
72	75	65	45	25	5
96	70	45	35	10	0

注) 対照区は100%生残

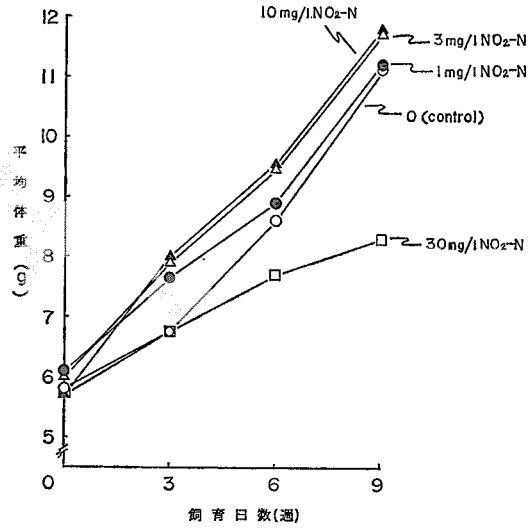
第3表 亜硝酸溶液中での *A. anguilla* の生残率(%)

処理時間 (hours)	NO_2-N 濃度 (mg/*l*)				
	115	155	210	280	370
24	100	100	100	70	45
48	100	100	90	50	10
72	90	80	55	25	0
96	80	40	20	0	—

注) 対照区は100%生残

第4表 *A. japonica* および *A. anguilla* に対する亜硝酸態窒素の TL_m

処理時間 (hours)	*A. japonica*		*A. anguilla*	
	TL_m(mg/*l*)	95%信頼区間	TL_m(mg/*l*)	95%信頼区間
24	460	408～628	351	—
48	299	265～340	279	255～306
72	245	206～286	210	188～262
96	205	160～241	150	128～172



第1図 *A. japonica* の成長

A. japonica および *A. anguilla* は投入初期にはいずれの濃度においても特に異常な行動は示さなかったが，時間の経過とともに，高濃度では狂奔遊泳する個体がみられた。へい死直前の個体はいずれも痙攣状態で体が硬直し，水槽の底に横臥した。へい死魚は体色並びに内臓諸器管の肉眼的観察では，特に異常は認められなかったが，体表面の粘液分泌は著しかった。

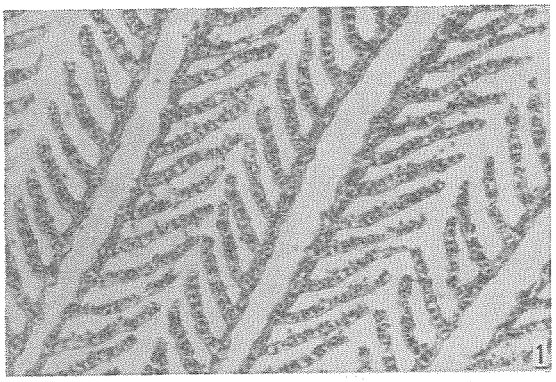
病理組織学的な所見では，腎臓および腸管には著変はみられなかったが，鰓および肝臓には対照区を除く各区に何らかの変性が認められた。即ち，鰓には鰓薄板における毛細血管の拡張と血液のうっ帯が局所的にみられ，280 mg/*l* NO_2-N 以上の濃度では鰓薄板に浮腫があらわれていた（図版Ⅰ，2, 3)。肝臓には370および490 mg/*l* NO_2-N ではうっ血と類洞の拡張がみられ，さらに実質細胞の萎縮と軽度な脂肪変性もみられた（図版Ⅰ, 5)。なお，これらの組織変性は両魚種に共通的なものであった。

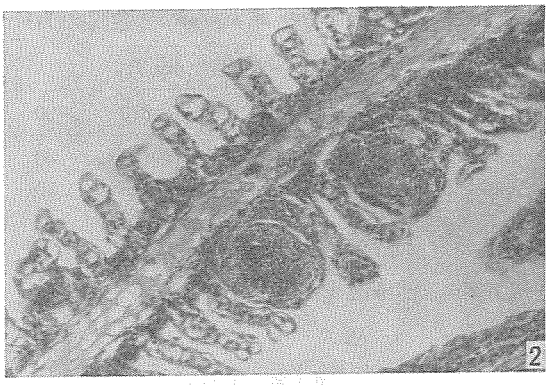
96時間後の実験終了時に生存していた魚を清水にもどしたところ，280 mg/*l* NO_2-N 以上の濃度での生残魚は，ほとんど24時間以内にへい死したが，115, 155, および 210 mg/*l* NO_2-N での生残魚は，24時間後にはほぼ正常に遊泳する状態まで回復した。

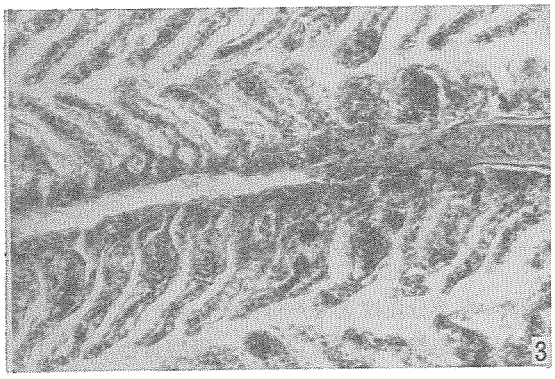
慢性毒性

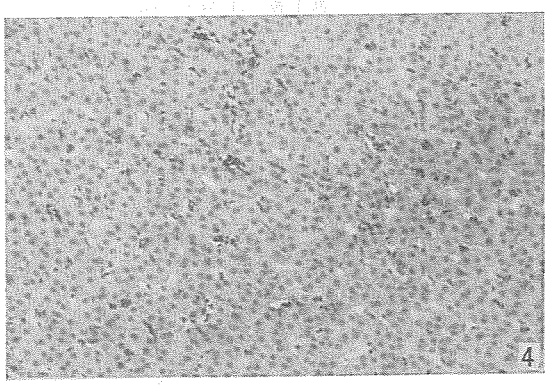
0～30 mg/*l* NO_2-N 溶液中で糸ミミズを飼料に9週間飼育した *A. japonica* の飼育結果は総括して第5表に，供試魚の成長は第1図に示した。

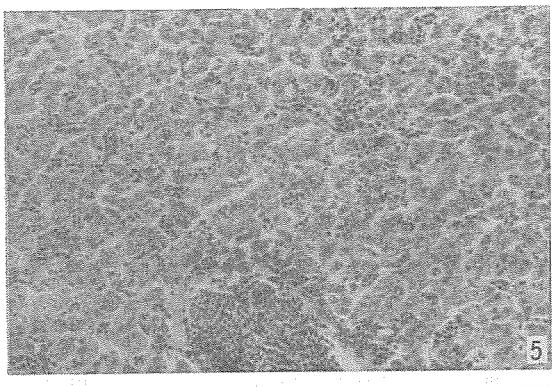
1, 3, および 10 mg/*l* NO_2-N の成長は対照区と











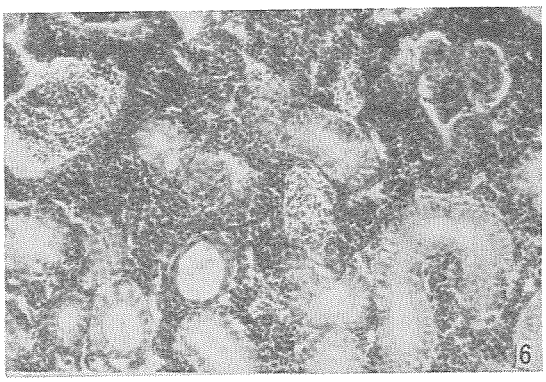


図 版 I

1. 対照区の鰓弁。HE 染色，×150
2. 鰓薄板毛細血管に血栓がみられる。155 mg/l NO_2-N 4日目検査，HE 染色，×150
3. 鰓薄板毛細血管の拡張と血液のうっ滞および鰓薄板に浮腫が現われている。280 mg/l NO_2-N 4日目検査，HE 染色，×150
4. 対照区の肝臓。HE 染色，×150
5. 肝細胞の萎縮と軽度な脂肪変性。490 mg/l NO_2-N 2日目検査，HE 染色，×150
6. 対照区の腎臓。HE 染色，×150
7. 著変はみられない。210 mg/l NO_2-N，4日目検査，HE 染色，×150

第5表 *A. japonica* の飼育結果

NO_2-N 濃度 (mg/l)	尾数	平均体重±標準偏差		t 検定* ($p<0.05$)	成長倍率 (%)	摂餌量 (g)	飼料効率 (%)	死亡率 (%)
		開始時	終了時					
0	20	5.8±1.0	11.1±2.9	—	193	934.1	11.43	0
1	20	6.1±1.0	11.2±2.7	有意差なし	184	975.8	10.51	0
3	20	6.0±1.0	11.7±4.7	〃	194	1,070.6	10.58	0
10	20	5.7±0.9	11.8±5.2	〃	209	1,076.9	11.46	0
30	20	5.7±1.2	8.3±2.4	有意差有	146	811.2	6.45	0

* 終了時の平均体重についての t 検定

第6表 実験終了時の *A. iaponica* の血液一般性状検査結果

NO_2-N 濃度 (mg/l)	全長 cm (範囲)	体重 g (範囲)	ヘマトクリット値 (%)	血漿蛋白 (g/dl)	血色素量 (g/dl)	赤血球数 ($\times 10^4$mm^3)
0	17.4～24.0	5.3～13.8	32.6	8.5	8.4	247
1	20.0～25.5	9.8～16.6	32.0	7.0	7.0	227
3	20.0～27.8	7.7～24.5	35.0	7.4	8.4	253
10	21.0～28.5	9.0～28.2	29.5	7.0	8.2	270
30	18.8～21.6	6.3～10.3	19.5	7.7	3.5	170

大差なかったが，30 mg/l NO_2-N では飼育3週目から成長の低下がみられた。実験終了時の平均体重は対照区よりかなり劣り，危険率5％で有意差が認められた。また，飼料効率も成長と同様の傾向がみられ，1～10 mg/l NO_2-N では 10.5～11.5％の範囲で対照区と大差なかったが，30 mg/l NO_2-N では6.4％となり，対照区よりかなり劣った。実験期間中のへい死はいずれの区にもみられなかったが，長期間 30 mg/l NO_2-N の亜硝酸溶液中においた場合，*A. japonica* の成長は明らかに阻害された。

実験終了時の各区の供試魚の血液性状検査結果は第6表に示すとおりである。

養殖ウナギの血液性状の正常値は大上[8]によると，赤血球数は187～245万/mm^3（血球計算板），血色素量は8.2～11.9 g/dl（ザーリー法），ヘマトクリット値は26.0～37.0％（ミクロヘマトクリット法），および血清蛋白量は6.2～8.3 g/dl（屈折計）とされており，本実験での測定値を大上の示した上記正常値と比較すると，対照区を含め 10 mg/l NO_2-N までの濃度では，赤血球数は227～270万/mm^3，ヘマトクリット値は29.5～35.0％，血清蛋白量は 7.0～8.5 g/dl となり，ほぼ正常値の範囲に含まれた。これらの区の血色素量は7.00～8.40 g/dl となり，大上の示した値より若干低下しているが，一般にザーリー法はシアンメトヘモグロビン法より過大値をとることが知られており[9]，両者の測定法の違いを考慮すれば，これらの区における血色素量もほぼ正常値とみなし得る。これに較べて，30 mg/l NO_2-N では血清蛋白量は正常値と大差ないものの，血色素量，赤血球数，およびヘマトクリット値は正常値より著しく低かった。特に，血色素量は 3.50 g/dl しかなく，対照区の血色素量の41％に低下した。また，血液の色調も他区と異なり chocolate brown を呈していた。

組織学的な所見では，対照区を含め 10 mg/l NO_2-N までは鰓および内臓諸器管に変性はみられなかったが，30 mg/l NO_2-N では鰓薄板に軽度の変性がみられた。

考　察

淡水魚に対する亜硝酸の急性毒性は，WESTIN[2] および BROWN et al.[3] がサケ科魚類について，

KONIKOFF[4]が Channel catfish (Ictalurus punctatus) について，伊藤[5]がアユ仔魚 (Plecoglossus altivelis)について，それぞれ報告している。これらの魚種の中で亜硝酸に対する抵抗力がもっとも大きな Channel catfish でさえ，亜硝酸の24時間 TL_m は 10.3 mg/l NO_2-N であった。本実験の *A. japonica* および *A. anguilla* に対する亜硝酸の24時間 TL_m は，それぞれ 460mg/l NO_2-N および 351 mg/l NO_2-N で，この値は淡水魚の中では極めて大きく，海産魚のマダイ仔魚(Chryshphrys major)について報告されている値[6]にほぼ等しかった。

PERRONE et al.[10]によれば，水中の亜硝酸は鰓と表皮を通して体内に浸透するとしており，体液の浸透圧が外界より低張な海産魚では，表皮からの亜硝酸の浸透が少ないため，表皮からの浸透をたえず受ける淡水魚に較べて亜硝酸の影響は小さいと考えられる。また，岩井[11]がアユ仔魚に対する亜硝酸の毒性を調べた報告では，外界の塩分濃度が高くなるにしたがい毒性は低下するとしており，亜硝酸の毒性が外界の浸透圧に影響されることを示唆している。ウナギの場合，粘膜と鱗が不透性の膜となり，水を透さない役目をはたしているため[12]，海産魚と同じように表皮から亜硝酸が浸透するのは困難で，このため，ウナギは淡水においても亜硝酸に対して強い抵抗性を示したものと思われる。

BROWN et al.[3]はニジマスに対する亜硝酸の害作用を調べ，亜硝酸の濃度が増すにしたがい，総ヘモグロビンの低下とともに酸素との結合能を有しないメトヘモグロビンが増加すると報告している。本実験中の慢性毒性実験において，30 mg/l NO_2-N では血色素量が低下し，血液の色調も Chocolate brown を呈していたことから，ウナギにおいてもニジマスにみられたメトヘモグロビンの増加は十分考えられる。しかし，ウナギは運動性が小さく，低酸素にも強いため，メトロヘモグロビンの増加により血液の酸素含量が低下しても，運動性の大きなニジマスに較べてその影響は少ないであろう。

亜硝酸の害作用は，このようなメトヘモグロビン血症による血液の酸素含量の低下に起因するとされているが，鰓および肝臓における組織変性からみて，亜硝酸自体の害作用も少なからず存在するのではないかと考えられる。

A. japonica に対する亜硝酸の慢性的な影響については，9週間の飼育結果から，30 mg/l NO_2-Nでは成長の阻害とヘマトクリット値・血色素量・赤血球数の低下，および鰓における組織変性が認められ，この濃度ではへい死までには致らないが，明らかに害作用のあることが判明した。これに対して，10 mg/l NO_2-N 以下の濃度では成長および生理状態ともに対照区と大差はなく，したがって，*A. japonica* に対する亜硝酸の安全濃度は，本実験条件のもとでは 10 mg/l NO_2-N とみなして良いと思われる。しかし，アユ仔魚においては飼育水に Ca, Mg, および K を添加することにより毒性が低下する[11]ことが，また，Cohos-almon (*Oncorhynchus kisutch*) やニジマスにおいても塩素イオンが亜硝酸の毒性に対して拮抗的に作用することが知られている[10]。このように，亜硝酸の毒性は飼育水の水質により変化する可能性があるため，ウナギに対する安全濃度については，他の水質要因も十分考慮して判断する必要があろう。

通常，ウナギの露地飼育池では10 mg/l 以上の亜硝酸態窒素が検出されることはほとんどないが，飼育水を循環沪過により再利用する場合には，沪過槽の熟成過程でかなり高濃度の亜硝酸が蓄積することが平山[13]により報告されており，その濃度は 10 mg/l NO_2-N 以上に達している。したがって，循環沪過方式によるウナギの飼育池では，アンモニアとともに亜硝酸が生産の制限要因となる可能性は十分考えられる。

要　約

1) 水温25℃におけるウナギに対する亜硝酸の急性毒性と低濃度の亜硝酸溶液中でウナギを長期間飼育した場合の成長および生理状態におよぼす影響について検討した。

2) *A. japonica* および *A. anguilla* に対する亜硝酸態窒素の 24 時間 TL_m は，460 mg/l およ

び 351 mg/l となり，いずれの魚種も亜硝酸に対して強い抵抗性を示した。また，これら致死濃度の亜硝酸溶液中においたウナギは，鰓および肝臓組織に変性がみられた。

3) 9週間の飼育結果から，*A. japonica* の成長を阻害する亜硝酸の濃度は 30 mg/l NO_2-N であることが判った。この濃度ではヘマトクリット値・血色素量・赤血球数が著しく低下し，鰓組織にも変性がみられた。

4) *A. japonica* に対する亜硝酸の安全濃度は，本実験条件では 10 mg/l NO_2-N と考えられる。

文　献

1) 山形陽一・丹羽　誠・山本光男，1975：循環沪過式飼育池におけるウナギ養殖実態調査，昭和50年度三重県内水面水試年報，63～83.
2) WESTIN, D. T. 1974: Nitrate and nitrite toxicity to salmonoid fishes, Prog. Fish-Cult. 36(2), 86～89.
3) BROWN, D. A. and MCLEAY, D. J. 1975: Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout, Prog. Fish-Cult. 37(1), 36～38.
4) KONIKOFF, M. 1975: Toxicity of nitrite to Channel catfish, Prog. Fish-Cult. 37(2), 96～98.
5) 伊藤　隆・岩井寿夫，1965：アユ種苗の人工生産に関する研究-IX. 人工孵化仔魚の各種水質要素に対する抵抗性，木曽三川河口資源調査報告書，2，883～914.
6) 馬渡健二・平山和次，1975：水産生物幼生の無機態窒素に対する抵抗力の成長に伴う変化，長崎大学水産学部研究報告，39，1～6.
7) 木村正康他，1976：生物検定法入門，南江堂，東京.
8) 大上皓久・幡谷雅之・村松高明，1969：養殖ウナギの血液性状に関する研究-I. 健康状態と2,3の血液性状との関係について，静岡水試研究報告，3，57～67.
9) 松里寿彦・北島　力，1971：魚病診断のための血色素量測定法の比較，本誌，19(3)，121～127.
10) PERRONE, S. J. and MEADE, T. L. 1977: Protective effect of chloride on nitrite toxicity to Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), J. Fish. Res. Board Can., 34, 486～492.
11) 岩井寿夫・伊藤　隆・田村憲二，1974：アユのふ化仔魚に対する亜硝酸塩の毒性および飼育水の塩分濃度について，三重大学水産学部研究報告，1，43～51
12) 松井　魁，1972：鰻学(生物学的研究篇)，恒星社厚生閣，東京，215～224.
13) HIRAYAMA, K. 1974: Watercontrol by filtration in closed culture systems, Aquaculture, 4, 369～385.