

Linear Alkylbenzenesulfonate によって誘導される 魚の鰓の特異反応

福田 芳 生

Specific Reaction of Gold Fish Gills Exposed to Linear Alkylbenzenesulfonate

Yoshio Fukuda

(Received February 15, 1982)

Reports of hyperplasia of the secondary gill lamellae resulting from specific reactions of individual fishes to various chemical substances contained in water have recently appeared. Therefore, this histological study was undertaken to determine the formation process of hyperplasia of the gill lamellae and whether or not it was reversible.

Forty goldfish (*Carassius auratus*) weighing approximately 10 g and 8 cm in total length were used. They were divided into four groups. Three groups (excluding the control) were bred for 10, 30, and 50 days, respectively in water that contained 0.5 ppm of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) as a substance causing a specific change in the gill. Following this, half of the fish in each experimental group were bred in water not containing LAS for five, 10 and 15 days, respectively, to determine indications of the reaction of the gill. Light and scanning electron microscopic examinations revealed marked edema on the respiratory epithelium of the secondary gill lamellae and hyperplasia of global cell masses that originated from the gill filament epithelium corresponding to the base of the secondary gill lamellae in the 10-day breeding group. The spaces between the secondary gill lamellae were almost filled with cell masses. Retention of large quantities of mucous-like substances within the proliferated cells and a slight structural relation between the cell masses and the respiratory epithelium composing the secondary gill lamellae were noted in the 30-day breeding group. In the 50-day breeding group, in addition to hyperplasia, edema and slight bleeding were observed in some fish. However, when these fish were bred in water not containing LAS, edema of the respiratory epithelium disappeared within 5 days and the proliferative cell masses filling the spaces between the secondary gill lamellae shed readily within 10 days.

(Chiba Prefectural Institute of Public Health, Chiba 280, Japan)

水中に混入した化学物質によって魚類の鰓にしばしば強い上皮の増殖 (hyperplasia) が招来される。この鰓の病変は水中に溶存する環境汚染物質について調べる上に良い指標となる。この増殖はどのような過程を経て形成されるのか、また、それは可逆的なものであるのか不可逆的なものであるのかを知ることを目的として、界面活性剤によって誘導された魚類の鰓の増殖について、光学ならびに走査型電子顕微鏡により観察した。

材料および方法

供試薬 直鎖系アルキルベンゼンサルフォネート (Linear Alkylbenzenesulfonate) の代表である Sodium n-Dodecylbenzenesulfonate (和光純薬製、以下 LAS と

略称する) を用いた。

供試魚 重量 10 g、体長 8 cm 前後の健全な市販のキンギョ (*Carassius auratus*)、性別を区別せずに 40 尾を用いた。

実験方法 予め十分に曝気して塩素分を除去した水道水に LAS を 0.5 mg/l の濃度に加えた飼育水を、容量 30 l (縦 45 cm、横 24 cm、高さ 30 cm) のガラス製試験水槽とした。本実験で用いることとした LAS の 0.5 ppm の濃度は現在水道法の水質基準で定められている陰イオン活性剤の最大許容量に相当する。

供試魚 40 尾は、曝露日数 10 日、30 日、50 日の 10 尾 3 群と対照群の計 4 群に分けた。所定の実験期間終了後、各群の半数のものを LAS 無添加水槽に移し、更に

5 日, 10 日, 15 日間飼育した. 対照群は同じ大きさの LAS 無添加水槽に飼育し, 最長実験期間の終了時まで飼育した. 実験期間中飼料は市販のブラインシュリンプを 10 尾あたり 0.5 g を 1 日 1 回与え, 水底に沈下した食べ残しは翌日除去した. 全飼育期間を通し水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持した. 試験水は 2 日毎に更新した.

供試魚は断頭屠殺の後剖検し, 光学顕微鏡による組織学的観察のため, 鰓の他に脳, 肝臓, 腎臓, 消化管をそれぞれ摘出し, 10% 中性ホルマリン溶液で固定し, アルコール系列を経て脱水の後, パラフィン包埋し, 組織切片を作製した. 各切片はヘマトキシリン・エオジン染色を施し検鏡に供した.

走査型電子顕微鏡による観察のための試料はホルマリン固定した鰓の一部を $5 \times 5 \text{ mm}$ 大に細切し, アルコールによる脱水の後純アセトン液を経てアミルアルコールに移し, 臨界点乾燥装置 (日立製 HCP-II 型) により組織中の液体成分を完全に除去した. その後試料はイオンコーター (エイコーエンジニアリング製, IB-II 型) により 15 分間金を蒸着した. これらの試料は走査型電子顕微鏡 (日立製 S 450 型) により観察と写真撮影に供した. その時の加速電圧は 20 kV である.

結 果

無処置対照群の鰓の構造 鰓蓋の内側に 5 対の鰓弓 (gill arch) があり, その内の前 4 対に鮮紅色を帯びた鰓弁 (gill filament) が 2 列に並ぶ. 鰓弓の内部には硝子様軟骨の支柱と鰓導出動脈 (efferent branchial artery) と鰓導入動脈 (afferent branchial artery) が収納されている. それらからの分岐血管は鰓弁内部に侵入する. 各鰓弁はその両面に二次鰓弁と呼ばれる葉状の突起を持ち, 厚さ $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の 1~2 層の扁平な呼吸上皮によって被われ, 内側には複雑な毛細血管網が存在する. 二次鰓弁の断面では (Fig. 1) 内部の毛細血管網は高さ $3 \sim 4 \mu\text{m}$, 幅 $2 \mu\text{m}$ 前後の仕切りによって細分されているように見える. この仕切りは柱細胞 (pillar cell) と呼ばれ, 血管内皮の変型したものであり, 内部に張原繊維 (tonofilament) を富有し, 二次鰓弁に伸縮性を付与している (Newstead, 1967). 二次鰓弁の走査型電子顕微鏡に見る表面の規則的な楕円形の窪みは柱細胞が存在していない部分の毛細血管腔に当る. 隣接する二次鰓弁の基部は通常厚さ $5 \sim 10 \mu\text{m}$ の 2~3 層の上皮細胞によって被覆されている. Fig. 2A, B, C には光顕と電顕の種々な拡大での二次鰓弁列像を示した.

LAS に曝露した鰓の肉眼的観察 各実験群とも実験期間に死亡したものはなかった. しかし, 実験期間の延

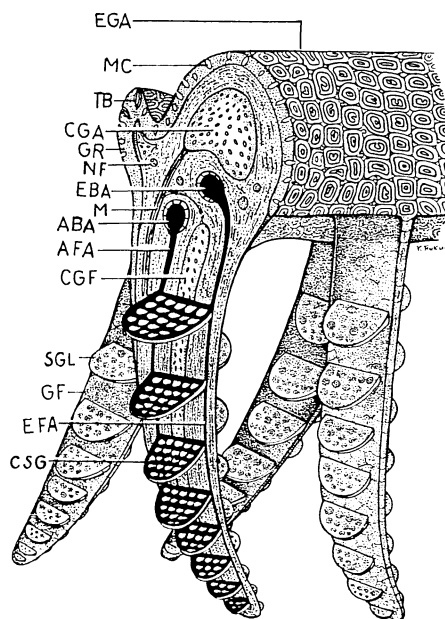


Fig. 1. Scheme of the gill structure of a goldfish. ABA, afferent branchial artery; AFA, afferent gill filament artery; CGA, cartilage of gill arch; CSG, capillary net of secondary gill lamellae; EBA, efferent branchial artery; EFA, efferent gill filament artery; EGA, epithelium of gill arch; GF, gill filament; GR, gill raker; M, muscle; MC, mucous cell; NF, nerve fiber; SGL, secondary gill lamellae; TB, taste bud.

長と共に摂餌能の低下する個体が出現し, また, 運動能力も減衰した. LAS 曝露によるキンギョの鰓を観察すると 10 日群では特有な鮮紅色の色調がかなり失われていた. 30 日群では鰓はやや鮮紅色を帯び, 各鰓弁は棍棒状を呈していた. 50 日群では鰓は強い鮮紅色を帯び, 鰓弁の先端部分に点状の出血斑を伴う個体が出現した.

10 日, 30 日, 50 日曝露後 LAS 無添加水槽に移したキンギョは各実験群とも 5~10 日後には鰓の肉眼的な所見は無処置対照群のものとはほとんど変わりがなかった.

実験群の組織学的観察 光学顕微鏡観察によると (Fig. 2D), 10 日群の鰓では全例に二次鰓弁の強い浮腫が認められ, 各二次鰓弁はバルーン状に膨隆し隣接する二次鰓弁との間隙は狭くなっていた. 二次鰓弁中央部に位置する毛細血管網と呼吸上皮の間に顕著な液体成分の貯溜が起り, 広い腔所が形成された. 腔所内部にはエオジンに淡染するコロイド状物質, 呼吸上皮に由来すると考えられる不定型の崩壊産物が観察された. しかし, 組

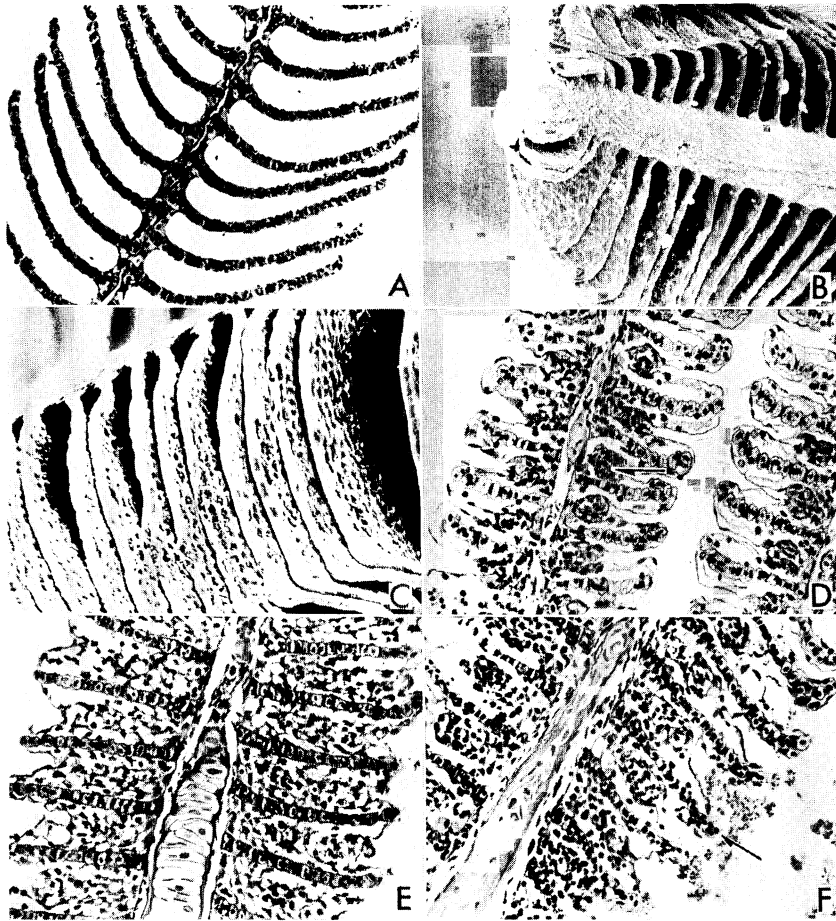


Fig. 2. Light microscopic and scanning electron microscopic findings of the gill lamellae of goldfish without treatment and with LAS exposure. A, a light micrograph of the gill lamellae of a control $\times 120$. B, a scanning electron micrograph of the tip region of the gill lamellae of a control. $\times 156$. C, a scanning electron micrograph of the secondary gill lamellae of a control. $\times 192$. D, a light micrograph of the secondary gill lamellae 10 days after exposure to 0.5 ppm LAS. Severe edema and a sign of proliferation in the epithelium of the basal part of the secondary gill lamellae (arrow) are observed. $\times 120$. E, a light micrograph of the secondary gill lamellae 30 days after exposure to LAS. The gap between the secondary gill lamellae is filled with proliferative tissue consisting of mucoid cells. $\times 120$. F, a light micrograph of the secondary gill lamellae 50 days after exposure to LAS. Moderate edema occurs again and bleeding also occurs as a result of the destruction of the respiratory epithelium of the tip region of the secondary gill lamellae (arrow). $\times 120$.

織内への遊走細胞の浸潤は極く軽微であった。二次鰓弁中央部の毛細血管は拡張し、その内腔は楕円形を呈していた。毛細血管の間に存在する柱細胞は不明瞭となっていた。

二次鰓弁の基部に当る鰓弁上皮は球状の細胞塊を形成し、無処置対照群のものが3層前後であるのに対して、その2倍ほどの層数に達し、次第に高度な増殖へ進行する過程にあることを示していた (Fig. 2D 矢印)。

走査型電子顕微鏡像では (Fig. 3A, B, C), 光学顕微鏡像と同様、強い浮腫を来した二次鰓弁の間隙は著しくせばまり、表面の呼吸上皮は外方に向って半円型に膨隆していた。それらの呼吸上皮表面には、低い微絨毛 (microvilli) 様の突起が疎らに認められるにすぎない。この様子は陸上動物の肺胞表面に類似する (Wang and Thurlbeck, 1970; Nowell and Tyler, 1971)。膨隆した二次鰓弁の呼吸上皮表面に不定型の物質が付着していた。

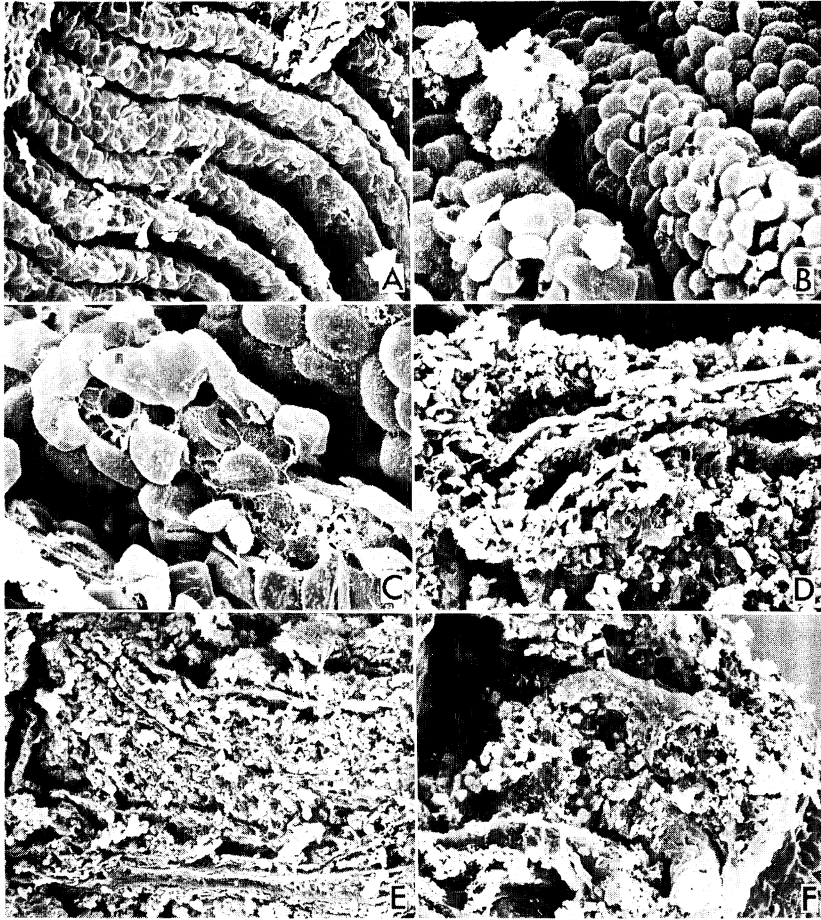


Fig. 3. A scanning electron micrograph showing damage to the secondary gill lamellae of a goldfish exposed to 0.5 ppm LAS. A, this figure shows severe edema in the secondary gill lamellae 10 days after exposure to LAS. $\times 240$. B, a secondary gill lamellae 10 days after exposure to LAS. The respiratory epithelium is swollen and elevated due to severe edema. $\times 600$. C, a secondary gill lamellae 10 days after exposure to LAS. The swollen respiratory epithelium is partially detached and subepithelial collagen layers are exposed. $\times 720$. D, E, the proliferation from the epithelium of the gill lamellae 30 days after exposure to LAS changes into mucoid cells and they completely fill the gaps between the secondary gill lamellae. D, $\times 204$; E, $\times 192$. F, bleeding in the tip region of the secondary gill lamellae 50 days after exposure to LAS. $\times 240$.

それらは恐らく呼吸上皮の崩壊産物や粘液物質に由来するものであることが考えられる。事実、部分的に呼吸上皮が剥落消失し、下層の薄いコラーゲン繊維層が露出している箇所があった。そのような部分では上皮表面の微絨毛様の突起が完全に失われていた。

30日群の鯉では (Fig. 2E), 10日群において観察された強度の二次鰓弁の浮腫は減退し、代って二次鰓弁基部上皮の激しい増殖による多層化が著明となっていた。この層数は平均 8~10 層に達し、厚さも 200 μm を越えた。かような二次鰓弁基部上皮の増殖により本来明瞭

に分離している二次鰓弁は基部から 2/3 近くまで完全に融合していた。30日群の各鰓弁が肉眼的な観察によってあたかも棍棒状を呈して見えるのはこのことによる。この増殖の主体をなす細胞は直径 20 μm 前後の楕円型ないし球型の明調な細胞で、核は一側に偏在し、胞体内に大量の粘液様物質を貯溜していた。このことは、LAS 曝露 10 日後の二次鰓弁基部に認められた増殖の萌芽とも言い得る細胞塊が粘液様細胞に代ったことを示唆している。二次鰓弁中央部の毛細血管の所見は無処置対照群のものに近く、それを被覆する呼吸上皮も本来の形態を

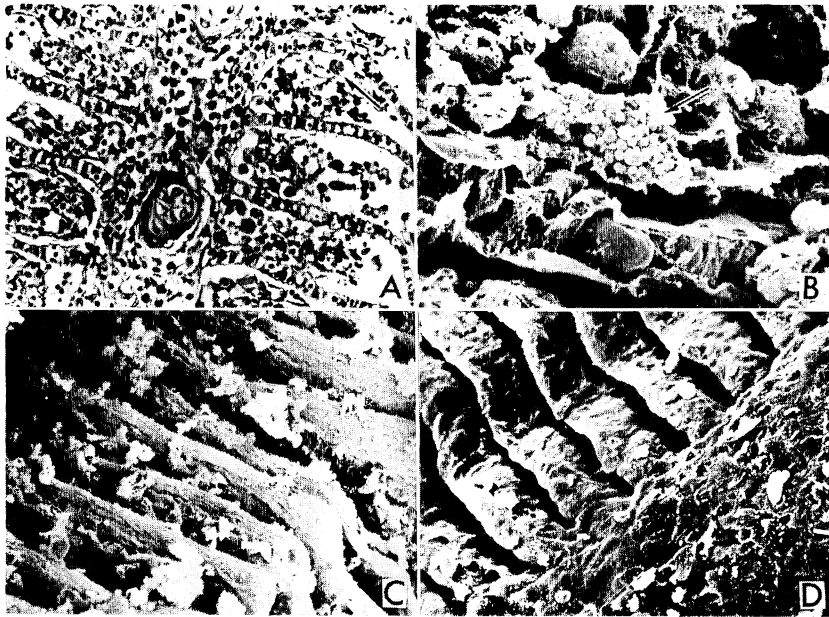


Fig. 4. Light microscopic and scanning electron microscopic findings showing the repair process of the secondary gill lamellae of a goldfish which was transferred to a water tank without LAS, after exposure to LAS. A, a light micrograph showing the secondary gill lamellae five days later. Eosinophilic phagocytes are infiltrating between proliferative cell mass in the process of the destruction (arrow). $\times 120$. B, a scanning electron micrograph showing a section of the secondary gill lamellae five days later. The granular structure on the surface of the respiratory epithelium covered with proliferative cell masses in the process of the destruction originates from eosinophilic phagocytes (arrow). $\times 1,560$. C, a scanning electron micrograph showing the proliferative cell masses which fill the gaps between the secondary gill lamellae detaching and disappearing from the surface of the respiratory epithelium $\times 180$. D, a scanning electron micrograph of the secondary gill lamellae which are almost restored to the pre-experimental condition, 10 days later. $\times 192$.

維持していた。実験 30 日後の組織像は増殖を引き起した粘液様細胞と呼吸上皮との構造的な関連が微弱であることを示しており、このことから LAS により招来された二次鰓弁の増殖は呼吸上皮に由来するものではないことを示唆している。

高度な増殖を示した二次鰓弁の走査型電子顕微鏡像 (Fig. 3D, E) では、各二次鰓弁の間隙は不定型の粘液様細胞で埋め尽くされていることを示した。しかし、呼吸上皮は無処置対照群のものに近く、ほぼ正常な形を維持していた。増殖の主体をなす細胞塊との構造的な関連は弱く、このことから光学顕微鏡像と同様、LAS によって誘導された二次鰓弁の増殖は呼吸上皮に由来するものではないことを示している。

実験群の中の最長期間に当たる 50 日群の鰓では (Fig. 2F) 二次鰓弁基部の増殖は 30 日群以上には進行せず、減少の傾向を示した。そして再び二次鰓弁の中央部分に強い浮腫が出現していた。5 尾中 2 尾で二次鰓弁先端部

の破壊による部分的な出血像が観察された。これは肉眼的に血斑として認められた病変に相当している。

この時期の走査型電子顕微鏡像では (Fig. 3F) 二次鰓弁先端部の呼吸上皮表面は上皮の崩壊産物や粘液物質が付着し、LAS 曝露 10 日群の単純な浮腫のものとはかなり異なった像を呈していた。また、二次鰓弁先端部の呼吸上皮および毛細血管の部分的な破壊による出血像が呼吸上皮表面に付着した血球の小塊として認められた。

鰓と同時に摘出した脳、肝臓、腎臓、消化管は、LAS 曝露 10 日～30 日群ではその障害像は極く軽微なものであったが、50 日群は全例において消化管上皮の一部に壊死像が観察された。恐らくそれは長期間にわたって経口的に摂取された LAS によるものであろう。この消化管上皮の障害が摂餌能の低下を招いたのであろう。

二次鰓弁の増殖の修復に関する組織学的観察 LAS 曝露 10 日後、30 日後、50 日後の実験群の各 5 尾を LAS 無添加の水槽に移し、5 日後、10 日後、15 日後

に採集し、二次鰓弁の修復の様子を組織学的に検討した。その結果によると、10日群の二次鰓弁に観察された強度の浮腫は5日後に全例ともほぼ消失した。30日群および50日群の高度な増殖を伴う二次鰓弁は5日後には呼吸上皮に被覆された中心部の毛細血管の周囲から剝離し始め、次第に萎縮する傾向にあった。この萎縮過程にある増殖組織内にはエオジンに濃染する直径20 μ m前後の酸好性顆粒細胞が多数浸潤していた (Fig. 4A)。

この時期の走査型電子顕微鏡像では (Fig. 4B, C, D) 良く保存された二次鰓弁の呼吸上皮表面にある萎縮した粘液様細胞の間に、酸好性顆粒細胞の崩壊による直径0.5~1.0 μ m前後の大きさの限界明瞭な顆粒群が認められた。各二次鰓弁の間をほぼ完全に埋め尽くしていた増殖組織の一部が未だ残存しているものの、各二次鰓弁の呼吸上皮は無処置対照群のものと比較してもほとんど変るところがなかった。LAS無添加の水槽に移し10日後および15日後のものでは二次鰓弁間の増殖に由来する組織片は完全に消失していた。

0.5 ppmの現行の水道法による最大許容量のLAS溶液中で飼育したキンギョは当初鰓の二次鰓弁の部分に強い浮腫を引き起し、次いで増殖に導かれる。しかし、この二次鰓弁の増殖は魚にとって環境が改善された場合、比較的速やかに消失し、可逆的なものであることがこの修復実験によってわかった。

考 察

LAS曝露による鰓の組織学的変化 魚の鰓は水中の環境汚染物質によって種々の障害を受ける。この障害像についてはこれまでも繰返し報告されてきた。しかし、二次鰓弁に観察される増殖についてはそれが鰓のどの部分に起源を有するのか、それが可逆的なものであるのか、不可逆的なものであるのかは十分説明されていない。

本実験において0.5 ppm LAS曝露キンギョでは10日後に二次鰓弁に強度な浮腫が発現する。アンモニア (Smart, 1976) やZn (Matthiessen and Brafield, 1973), CuおよびCd (Baker, 1969; Bilinski and Jonas, 1973), 塩化メチル水銀 (Wobeser, 1975), 洗剤 (SLS=Sodium lauryl sulphate) (Abel, 1976), 原油曝露 (Solangi and Overstreet, 1982)の魚においても二次鰓弁の浮腫が報告されている。この浮腫について Skidmore and Tovell (1972) は、炎症性の反応とみなし、Morgan and Tovell (1973) は呼吸上皮と血管との間に形成された腔所は、有害な物質が血管内に侵入するのを妨げることにあと考えている。本実験において観察された呼吸上皮と血管

との間の貯溜液は、外界から侵入したものなのか、血管由来のものであるのかは明確ではない。

富山 (1974) はLASが呼吸上皮表面に吸着し鰓に直接的な障害を与えることを示唆した。Abel (1976) はSLS曝露 *Salmo trutta* において呼吸上皮および毛細管の破壊を報告している。本実験においてもLAS曝露10日後の二次鰓弁上皮の一部の剝離消失が観察され、水分が呼吸上皮の膜透過性の変化の他に、破壊部位から侵入したことを示唆している。

LAS曝露30日後最も顕著となるキンギョの鰓の増殖は、二次鰓弁基部の鰓弁上皮に起源を有する。そしてLASによって誘起された増殖組織は粘液様細胞の形をとる。それは原油曝露の魚の鰓の増殖組織内に粘液細胞が増加してくることと類似する (Solangi and Overstreet, 1982)。塩化メチル水銀曝露の *Salmo gairdneri* では二次鰓弁末端の呼吸上皮より増殖が起り (Wobeser, 1975), それはアンモニア (Smart, 1976) や原油曝露 (Solangi and Overstreet, 1982)の魚においても観察されている。

一方、Cd曝露の *S. gairdneri* ではLASと同様に二次鰓弁基部の鰓弁上皮に起源を有する増殖が報告されている (Bilinski and Jonas, 1973)。このことは魚の鰓に見られる増殖の発現の様相は化学物質の性状と関連のあることを示唆している。この鰓の増殖は水中の環境汚染物質に対する魚の防禦的反応ともみられるが、ガス交換の効率の低下が指摘されており (Hughes, 1972; Mayer and Kramer, 1973), 障害像の一種ともみなすことができる。

鰓の修復 LAS曝露キンギョの鰓の増殖は無添加の水に移して10日後に無処置対照群のものとはほとんど変るところがないまでに修復する。その間、崩壊しつつある増殖組織の間に酸好性顆粒細胞の浸潤が観察される。この顆粒細胞は強い貪食能を持つものであることが、Weinreb (1963) により指摘されていることから、崩壊過程にある増殖組織片を吸収することを示唆している。使命を終えたそれらの顆粒細胞は胞体内の顆粒を放出し消失する運命を辿るとみられる。原油曝露の魚においても清浄な海水に移した場合、17日後に常態に復することが知られている (Solangi and Overstreet, 1982)。LASにより誘起されたキンギョの鰓の増殖は原油曝露と同様、可逆的なものであることを指摘しうる。

謝 辞

本稿をまとめるに当たり、ご校閲をいただいた東京医科大学教授前川久太郎博士と本研究に有益な助言と数々の

貴重な文献を御恵贈くださった東京水産大学教授尾崎久雄博士，国立科学博物館の上野輝弥博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Abel, P. D. 1976. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). J. Fish Biol., 9: 441~446.
- Baker, J. T. P. 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). J. Fish. Res. Bd. Can., 26: 2785~2793.
- Bilinski, E. and R. E. E. Jonas. 1973. Effects of cadmium and copper on the oxidation of lactate by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills. J. Fish. Res. Bd. Can., 30: 1553~1558.
- Hughes, G. M. 1972. Morphometrics of fish gills. Resp. Physiol., 14: 1~26.
- Mayer, F. L. and R. H. Kramer. 1973. Effects of hatchery water re-use on rainbow trout metabolism. Prog. Fish. Cult., 35: 9~10.
- Matthiessen, P. and A. E. Brafield. 1973. The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* (L.). J. Fish Biol., 5: 607~613.
- Morgan, M. and P.W.A. Tovell. 1973. The structure of the gill of the trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). Z. Zellforsch., 142: 147~162.
- Newstead, J. D. 1967. Fine structure of respiratory lamellae of teleostean gills. Z. Zellforsch., 79: 396~428.
- Nowell, J. A. and W. S. Tyler. 1971. Scanning electron microscopy of the surface morphology of mammalian lungs. Am. Rev. Respir. Dis., 103: 313~328.
- Skidmore, J. F. and P. W. A. Tovell. 1972. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. Wat. Res., 6: 217~230.
- Smart, G. 1976. The effect of ammonia exposure on gill structure of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Biol., 8: 471~475.
- Solangi, M. A. and R. M. Overstreet. 1982. Histo-pathological changes in two estuarine fishes, *Menidia beryllina* (Cope) and *Trinectes waculatus* (Bloch and Schneider), exposed to crude oil and its water-soluble fractions. J. Fish Diseases, 5: 13~35.
- 富山新一. 1974. 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.
- Wang, N. and W. M. Thurlbeck. 1970. Scanning electron microscopy of the lung. Human Path., 1: 227~231.
- Weinreb, E. L. 1963. Studies on the fine structure of teleost blood cells. 1. Peripheral blood. Anat. Rec., 147: 219~238.
- Wobeser, G. 1975. Acute toxicity of methyl mercury chloride and mercuric chloride for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry and fingerlings. J. Fish. Res. Bd. Can., 32: 2005~2013.

(280 千葉市仁戸名町 666-2 千葉県衛生研究所)