

魚類に見られる脾血鉄症と化学工場排水との 関連に関する一考察

村地四郎, 平岡幸夫*, 高橋正雄, 難波憲二
(広島大学水畜産学部 水産学科)

A Consideration on the Relation of the Hemosiderosis in the Spleen of Fishes to the Waste from Chemical Plants

Shiro MURACHI, Yukio HIRAOKA*, Masao TAKAHASHI
and Kenji NANBA

*Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal
Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama*
(Figs. 1-16, Table 1)

近来、沿岸・内水面の水質汚染はますます急速に進み、漁業被害は一層深刻な様相を呈して来たが、これら水質汚染の問題は従来より主として水質分析的な面から行なわれ、多くの貴重な資料が得られて居るが、それらの結果は、本質的に各個の汚染成分についての断続的な記録である事は免れない。魚類への長期間に亘る連続した総合的な影響を適確に把握するためには、魚類自体に見られる様々な病変を色々な方面から精査する必要がある。更に、夫々の汚染源について、より特異的と考え得る様な病変が認められるならば、その発現機序を明らかにする事によって、逆に、魚の病態から、その水域における汚染源を推定して、漁業への影響を明らかにするための、大きな手掛りを得る事も出来よう。

筆者らは、此の様な観点から広島県沿岸水域を中心とした瀬戸内海に於ける各種魚類の組織病変を検討して居るが、広島県呉市安芸灘に面した広湾に流入する東大川と西大川で、1972年11月から'73年12月まで約1ヶ年間に採捕したマハゼの組織像を比較した処、化学工場排水による汚染が甚だしいと考えられる東大川の材料では、著しい脾血鉄症が見られたのに対し、西大川の材料には脾血鉄症が全く見られないと云う事実を明らかにした。此の点を更に追求するために、テラピアを材料とする室内実験を行ない、福山市の内港に排出して居る日本化薬KK福山工場の排水、及びその一主成分であるフェノールによって、極端な貧血を伴う脾血鉄症が惹起される事を確認したので、此処に報告する。尚、本論文に於いては、化学汚染と脾血鉄症との関連に重点を置いたので、他の組織病変や、其の他の所見に関しては、主題に関係の有る場合に限り概説するに留める。本論に入るに先立ち、血液検査に関し協力を受けた当水産動物学研究室院生山本千裕氏に感謝の意を表する。又、此の研究費の一部を、文部省総合研究費、並びに福山市水道局よりの受託研究費に仰いだ事を付記して感謝する。

I. 呉市東大川のマハゼに見られる脾血鉄症

材料および採捕地点の概況

広湾には東大川と西大川が流入して居るが、東大川は殆ど停滞し、而もその河岸には、大きなパルプ工場

* 現在：福山暁の星学院栄養専門学校 (Fukuyama Akenohoshi Dietetics College)

を中心として化学廃液を排出する工場が多く、河底には悪臭を発するヘドロが多量に沈積して居り、極端な化学汚染水域と云える。一方、西大川は流量もかなり多く、その河岸には化学廃液を排出する工場は殆ど見られず、底質も比較的きれいな砂粒である。材料のマハゼ *Acanthogobius flavimanus* は、1972年11月11日、73年5月16日、9月25日、12月12日の4回に亘り、東と西の大川より釣で夫々数尾乃至数十尾を採捕した。その内から、外見上は全く異常の認められない1~3尾を選び、組織標本を作製して検鏡した。

方 法

マハゼを採捕した直後に必要組織の固定を行なった。ヘマトキシリン (Mallory)・エオジン染色を行なう材料と、PAS染色を行なう材料は Gendre 液で固定し、ヘモジデリンの存在を確認するためのベルリン青反応を検査する材料は Lillie 液で固定し、いずれもパラフィン埋没法により薄片を作製した。脂肪の存在を確認するためには、ホルマリン・カルシウム (Baker) で固定、凍結薄切し、ズダン黒B染色を行なった。検査した組織は、鰓、脾臓、肝臓、腎臓である。

結 果

東大川のマハゼが、西大川のマハゼに比較して、水質汚染の悪影響を甚だしく受けて居る事は、外見上の異常からも明らかであった。たとえば、72年11月11日のマハゼの内、何らかの外部損傷や異形の認められたものは、東大川では27尾中14尾 (51.8%) に及び、西大川では70尾中2尾 (2.8%) であった。

既に述べた通り、外見上は全く異常の認められないマハゼを選んで組織標本を作製したが、その結果、東大川と西大川とのマハゼ組織像の著しい相違点は、脾細胞内へのヘモジデリン沈着状態の相違である。東大川のマハゼの総べての脾臓組織標本には、弱拡大で、かなり大きな塊状のヘモジデリンの沈着が各所に認められ (Fig. 2)、明らかに脾血鉄症と云うべき症状を呈して居る。

一方、西大川の標本では、脾臓に於けるヘモジデリンの異常沈着は全く見られず、僅かにヘモジデリンを沈着した少数の細胞が点在するに過ぎない (Fig. 3)。

血鉄症は、1尾の例外を除いて、肝臓と腎臓には全く見られなかった。此の例外的1例は、73年12月12日に西大川で採捕したものの内の1尾で、腎臓組織内各所に、かなりの大きさのヘモジデリンの沈着が見られたが、脾臓と肝臓には全く認められない。然し、鰓に於ける粘液の異常分泌、鰓薄板の異常、腎臓尿管上皮の変性、肝細胞の壊死その他、様々な病変が認められたものであって、此処には例外的な1例として記述するに留める。

東大川と西大川の両方の、殆どの材料に肝細胞の脂肪化 (Fig. 4)、と鰓組織の損傷 (Fig. 5) が認められたが、その症状は一般に東大川の方が重症であった。更に各個体に見られた精細な病的組織像の記述は、本論文の主題では無いので省略する。

II. テラピアを用いての室内実験

材 料

上述の通り、化学工場排水の影響が甚だしいと考えられる東大川のマハゼに於いて、特異的に脾血鉄症の発現する事を明らかにしたので、此の点を更に詳しく検討する目的で、広塩性魚類であり室内飼育も容易なテラピア *Tilapia mossambica* を実験材料として室内実験を実施した。テラピアは、体長約4cm、体重約2gの小さなものから、体長約15cm、体重約100gに至るまで、成長段階の様々なものを用いて実験を繰返し検討した。

汚染飼育水の調製

化学工場の排水としては、福山市の内港に排水して居る薬品製造工場の一つである日本化薬KK福山工場の排水を適時採取して使用した。此の排水は採取時によって、その色や臭気にかかなりの相違が有り、当然その組成にも変動の有る事は推察されるが、筆者らは長期間に亘る排水全体としての影響を検討すると云う観点から、そのこまかい変動については拘泥しなかった。然し飼育水の基準として出来るだけ一定の濃度のものを定めたいと考え、排水を稀釈水で薄めて、340 μ に於ける吸光度が0.25~0.22の間に在る様にしたものを「日化排水基準飼育水」と定め、色々の濃度の飼育水を作製する上の基準とした。吸光度を測定する際

に、340 m μ を選んだ理由は、排水の最大吸収波長が、340 m μ 付近に在って比較的一定して居るからである。此の「基準飼育水」は pH の変動が大きく、pH=5.2~7.2 の範囲に亘り、アンモニア態窒素を 4~7 ppm 含んで居るが、この中でテラピアは 6 ヶ月以上に亘り外見上は正常に生活し、受精も産卵も行なう。然し産出された稚魚は次第に死滅した。排水の影響を吟味する実験の際には、飼育水の浸透圧を、福山内港の排水口附近の浸透圧に合わせて、30~150 mOsm になる様に調節した。

此の工場排水中には、2~15 ppm のフェノールが見出される事が多いので、フェノールの慢性中毒症状（フェノール濃度 2 ppm）と、急性中毒症状（フェノール濃度 50 ppm）を比較検討した。此の場合の飼育水は淡水を用い、pH は、夫々 pH=7.2 及び pH=5.3 であった。

飼育方法

実験に使用したテラピアの大きさ及び量に応じて、20~60 l の飼育水を入れた水槽中で実験飼育を行なった。水温は、25°~27°C、酸素飽和度は90%以上に保った。飼育水は、濃度の変動を出来るだけ少なくする目的で、場合によっては毎日水を更新し、長くとも1週間に1度は水を更新した。すべての実験に並行して清浄水での対照飼育を実施した。

結果

対照飼育テラピアの組織像 汚染飼育水にて飼育した試験魚を取りあげて検査する際には、並行して清浄水で飼育して居る対照魚も必ず1尾以上取りあげ、試験魚と同様の検査を行ない、外部所見、剖見、組織像などを比較した。対照魚に関しては、これらの異常所見は認めなかった。尚、テラピアでは、対照魚に於いても、脾臓にヘモジデリンが、幾分見出され、此の点が前述のマハゼと多少違って居た。然しヘモジデリンが認められるにしても、その状態は、組織内に小さな点状で散在する程度であって、大きな塊状となる事はない。脾洞内には、ヘモジデリンを摂った大食細胞の集合が塊状となって見られる事も有るが、その大きさも小さく、分布状態も疎である (Fig. 6)。脾臓に於けるヘモジデリンの此の程度の出現は、健全と思われる総べてのテラピアに見られるので、テラピアに於いては生理的なものと考えられる。

日本化薬工場排水による慢性中毒症状 既に述べた通り、「日化排水基準飼育水」中では6ヶ月以上に亘り、外見上は全く正常な生活を営んで居るが、取りあげて少し精査すると、中には、鰭や鰓にかなりの損傷の有るもの、腹部の異常な膨張、或は逆に腹部が極端に凹んだものも見られた。外部の異常所見の有無に拘らず、脾臓は例外無しに甚だしい血鉄症状を呈し、組織内の各所に、大きな塊状のヘモジデリン沈着が見られ、脾洞内はヘモジデリンを沈着した細胞が充満して居る (Fig. 7)。此の様な症状のテラピアと、対照魚との血液性状を測定した1例を Table 1 と、Fig. 1 に示した。

Fig. 1 の血球容積分布曲線は Coulter Counter Model B により計測した血球の累積粒度分布曲線よ

Table 1. Some hematological parameters of *Tilapia*, exposed to dilution of the waste from the Fukuyama plant of the Nihon Kayaku K. K. for 6 months.

Hematological parameters	Control	Treated
Hemoglobin g/dl	5.3	1.3
Hematocrit %	24.0	6.5
Erythrocyte count (million/mm ³)	1.31	0.67
MCV μ^3	183	97
MCH $\gamma\gamma$	41	19
MCHC %	22	20

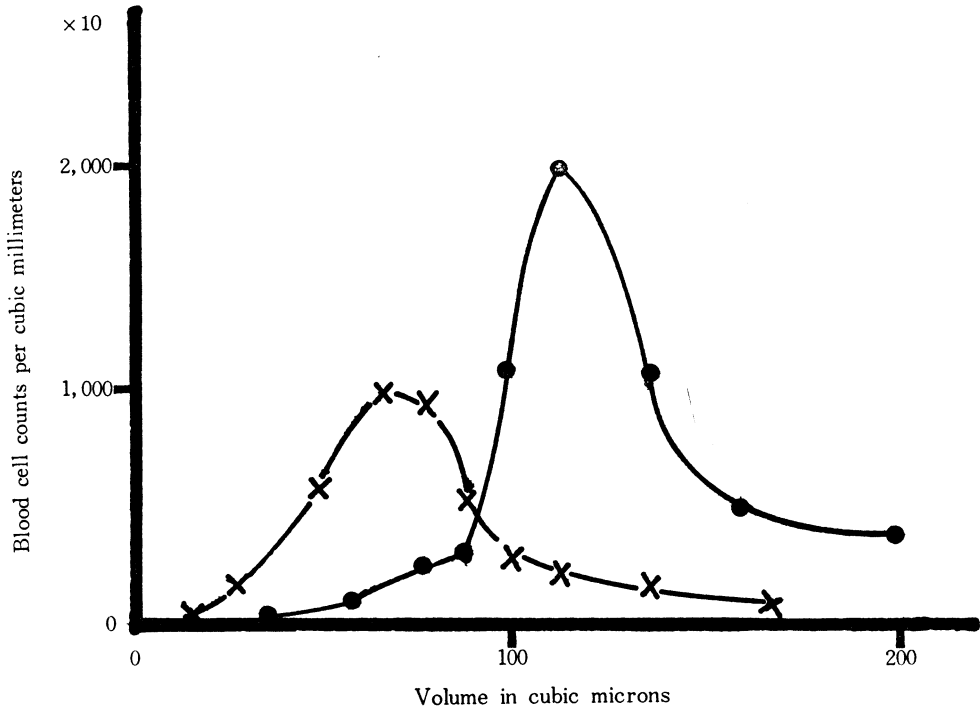


Fig. 1. Volume frequency distributions of blood cells of *Tilapia mossambica*, based on analyses of Colter Counter data.

● — ● : the control fish

× — × : the fish exposed for 6 months to "standard solution" of the waste from the chemical plant of Nihon Kayaku K. K.

り算出したものであり、赤血球以外の血球も含まれて居るが、ヘマトクリット値測定時に於ける白血球層の状況から考えても、此の分布曲線を以て、赤血球容積分布曲線としても、それ程大きな誤りは無いであろう。この結果から、試験魚は極端な貧血状態で、赤血球数は半減し、小球性・低色性である事が明らかである。

「日化排水基準飼育水」で飼育開始1ヶ月後では、外観は精査しても殆ど異常は認められない。然し、総べてのテラピアに顕著な脾血鉄症状が認められる (Fig. 8)。

「日化排水基準飼育水」を稀釈してテラピアを飼育すると、その稀釈の程度につれて、脾血鉄症状は軽減する。Fig. 9 は、上記「基準飼育水」を1.5倍に稀釈した水中で1ヶ月間、Fig. 10 は3倍に稀釈した水中で1ヶ月間飼育したテラピアの脾臓組織のベルリン青反応の標本であるが、1.5倍稀釈飼育水中のものでは、ヘモジデリン沈着量はかなり減少し、3倍稀釈水中のものは、対照魚 (Fig. 6) に比較すれば、僅かにヘモジデリンの沈着が多いと云う程度である。

日化排水の影響によって惹起される脾血鉄症以外の病変は、個体により区々であるが、鰓では、鰓薄板上皮の剥離、肥厚、癒着、鬱血 (Fig. 11, 12) の見られる事が多かった。

腎臓では糸球体上皮や尿管上皮が硝子様化して居るもの、尿管中に血球その他の細胞が多く見られるもの、更に糸球体が著るしいPAS陽性反応を示すものなどが見られた。

肝臓では、様々な病変が見られ、一定した傾向は見られ無かった。主な症状を列記すれば次の通りである。肝細胞の著るしい脂肪化 (Fig. 13)、硝子様変性、壊死、PAS陽性物質の異常増加、鬱血、其の他。

日本化薬工場廃水による急性中毒症状 「日化排水基準飼育水」の5倍程度の濃度中では、テラピアは20時間で死亡する。此の際は、外観上も、組織標本からも、余り顕著な病変は見られず、鰓での粘液の異常分泌が認められる程度である。勿論、脾血鉄症は見られない。

フェノールの影響 50 ppm のフェノールを含んだ飼育水中では、テラピアは飼育開始15分後に既に横転し、1時間30分～2時間後には動きを停止するので、その時点で検査を実施した。肉眼的には、鰓粘液の異常分泌が認められる程度であった。組織標本では、鰓、腎臓、肝臓に甚だしい鬱血、出血が見られた (Fig. 14, 15)。脾血鉄症は全く見られなかった。

フェノール 2 ppm 含有の飼育水中では、テラピアは1ヶ月経過後も外観上は正常に生活し、肉眼的な検査では全く異常が認められなかったが、組織検査の結果では、例外無しに、甚だしい脾血鉄症を呈して居た (Fig. 16)。その他には、日本化薬工場廃水による慢性中毒症状と同じ傾向の病変が認められた。

考察および結語

脾血鉄症は、赤血球の破壊が旺盛に行われる悪性貧血症や、細菌毒、薬物其他による中毒症の際に主として見られるものであって、*Ichthyophthiriasis* の寄生したカガミゴイ¹⁾、腹水症の養殖ウナギ²⁾などいくつかの例が報告されて居る。得丸³⁾は、カドミウムの影響を受けたキンギョの腎臓に、ヘモジデリンの異常沈着を認めて居る。この様に、脾臓その他に脾血鉄症を起させる1次的要因は、色々なものが考えられる。然しながら、筆者らが調査した、広湾の東大川と西大川のマハゼに於いては、両河川が極めて接近して居るにも拘らず、東大川のものにも著しい脾血鉄症が認められたのに対し、西大川のものでは全く見られなかった。此の両河川の水質汚染面での大きな相違は、東大川の方が化学工場排水で極度に汚染されて居る事である。更に室内実験によって、福山内港に排出される日本化薬KK福山工場排水の影響を長期に亘り受けたテラピアに、顕著な脾血鉄症が発現し、その症状の軽重は、排水の濃度に影響される事を確かめ、又、ヘモジデリンの異常沈着部位は、脾臓組織に殆ど限定され、腎臓、肝臓などには、余り見られず、しかも、その沈着量は、上述のカガミゴイ¹⁾、養殖ウナギ²⁾の例と比較にならない程に多量である事を明らかにした。この様な結果から、化学工場排水の中には、魚に脾血鉄症を特異的に発現させる物質の含まれて居る事が多いと考えても、それ程大きな誤りは無いであろう。一方、これら工場排水の成分や濃度は常に変動して居るのは云うまでも無い事であって、その結果として、既述した如く、脾血鉄症以外に、様々な症状が見られたのは当然と云って良からう。

更に、魚が数時間から数十時間内に死亡する様な、排水濃度の高い急性中毒死の際には脾血鉄症の見られない点は注意すべきである。

慢性的な日化排水中毒症のテラピア血漿の肉眼的観察結果では、多量の溶血の存在は考えられなかった。又、20時間前後で死亡する急性中毒の際の、組織標本検査その他の結果からも溶血は認められなかった。典型的な溶血性貧血の人間に於いては、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、及び平均赤血球色素濃度 (MCHC) が正常か或は幾分大きいとされているが^{4) 5)}、「日化排水基準飼育水」中で6ヶ月飼育したテラピアでは、すべての数値が減少して居る。これらの事は、排水中に含まれて居るところの、脾血鉄症の要因となる物質が魚の赤血球に対し、強い溶血作用をもって居るものとは考えられない。日化排水中にしばしば見出されるフェノールは、人間に対しては、赤血球の直接溶血作用を有すると共に、色素の非可逆的な酸化 (メトヘモグロビン血症)、及びグロビンの変性 (ハインツ小体) を来す溶血性貧血を招来するとされて居る⁶⁾。テラピアのフェノール慢性中毒症状は、日化排水の場合と極めて良く似ているので、日化排水による脾血鉄症の要因の一つとして、フェノールが考えられる事は間違いない所であるが、フェノール中毒症のテラピアの赤血球中のハインツ小体、或は類似物質の存在と、メトヘモグロビン症の確認は未だして居ない。フェノールの急性中毒症に於いても、慢性中毒症に於いても、眼立つ溶血現象は認められなかった。フェノールによって脾血鉄症が招来される過程については、さらに検討を加える予定である。

化学工場排水中には、フェノールの他にも脾血鉄症を特異的に発現させる物質が存在する事は当然考えら

れる処であり, その一つ一つを解明して行くと共に, 此の様に慢性的な貧血を伴なう脾血鉄症の魚の生活力の減退が, 漁業資源にどのような影響を与えるかについても吟味を加える必要の有る事を痛感する。

文 献

- 1) HINES, R. S. and SPIRA, D. T.: *J. Fish. Biol.*, **6**, 189-196 (1974).
- 2) 舟橋紀男・宮崎照雄・窪田三郎: 魚病研究, **8**, 68—78 (1973).
- 3) 得丸三岐子・江藤久美・日比谷京: 昭和49年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 191, (1974).
- 4) 吉利和: 臨床検査の意義と解釈, 第2版, 40—41, 医学書院, 東京 (1968).
- 5) 日本血液学会: 日本血液学全書, 第4巻, 貧血・免疫血液・遺伝, 18—19, 612—613, 丸善, 東京(1965).

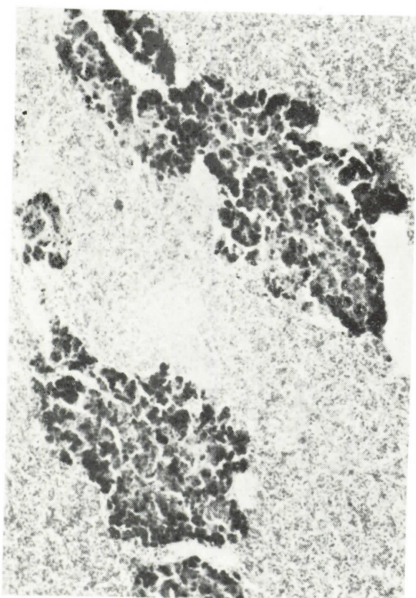


Fig. 2



Fig. 3

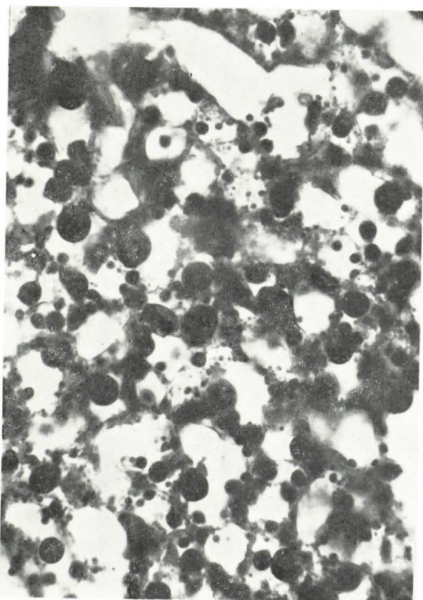


Fig. 4

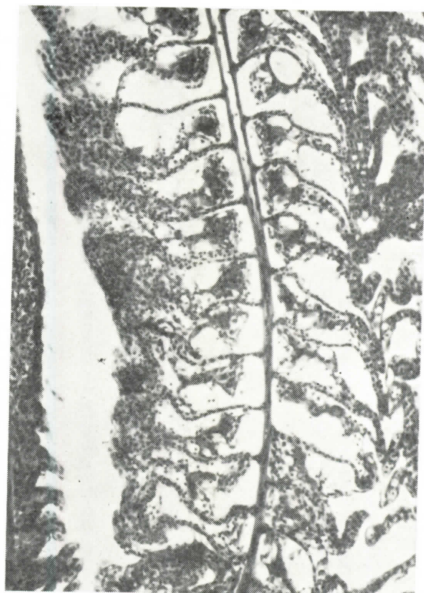


Fig. 5

- Fig. 2. Serious hemosiderosis in the spleen of *Acanthogobius flavimanus* from the Higashi-okawa (prussian blue stain, $\times 100$).
- Fig. 3. Small amount of hemosiderin deposited in the spleen of *Acanthogobius flavimanus* from the Nishi-okawa (prussian blue stain, $\times 100$).
- Fig. 4. Accumulation of fat in the hepatopancreas of *Acanthogobius flavimanus* from the Higashi-okawa (Sudan black B stain, $\times 400$).
- Fig. 5. Gill filaments of *Acanthogobius flavimanus* from the Higashi-okawa. Note some damages at the basement lamina (H & E stain, $\times 100$).

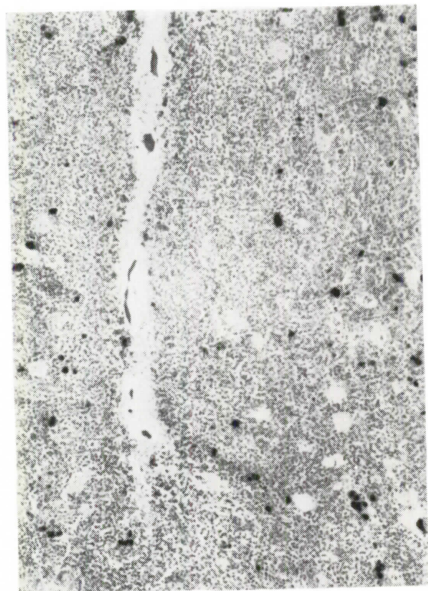


Fig. 6

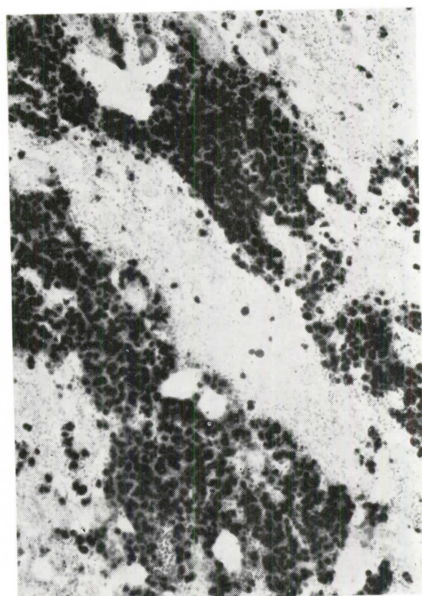


Fig. 7

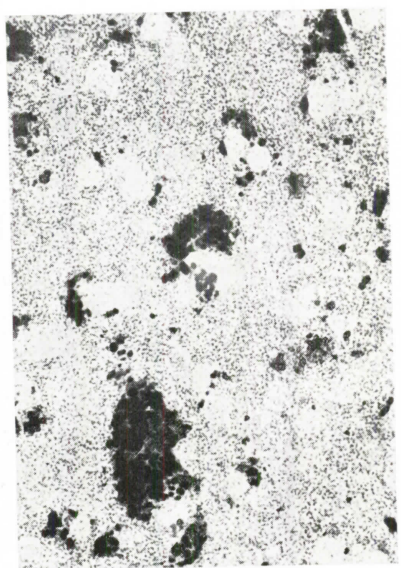


Fig. 8

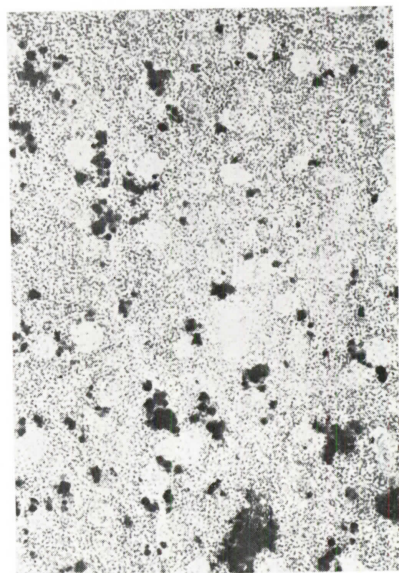


Fig. 9

Fig. 6. Normal spleen of *Tilapia mossambica*. Note a weak deposition of hemosiderin even in the normal spleen. (prussian blue stain, $\times 100$).

Fig. 7. Far advanced hemosiderosis in the spleen of *Tilapia mossambica* exposed for 6 months to the "standard solution" of the waste from the chemical plant of Nihon Kayaku K.K. (prussian blue stain, $\times 100$).

Fig. 8. Noticeable hemosiderosis in the spleen of *Tilapia mossambica* for one month to the "standard solution". (prussian blue stain, $\times 100$).

Fig. 9. Moderate deposition of hemosiderin in the spleen of *Tilapia mossambica* exposed for one month to 1.5-fold dilution of the "standard solution". (prussian blue stain, $\times 100$).

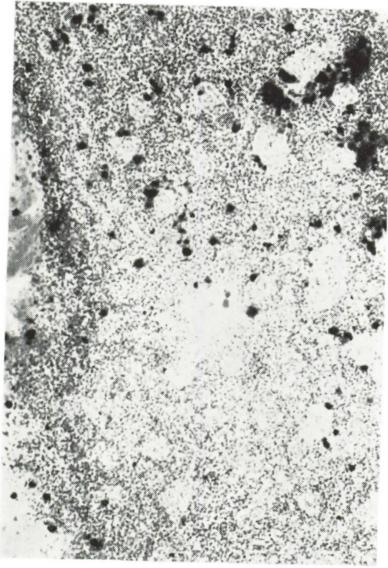


Fig. 10

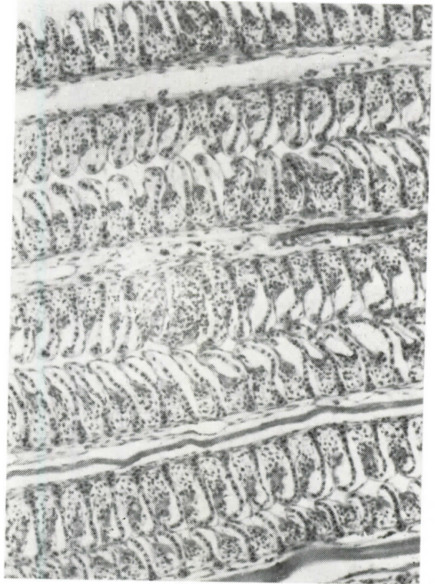


Fig. 11

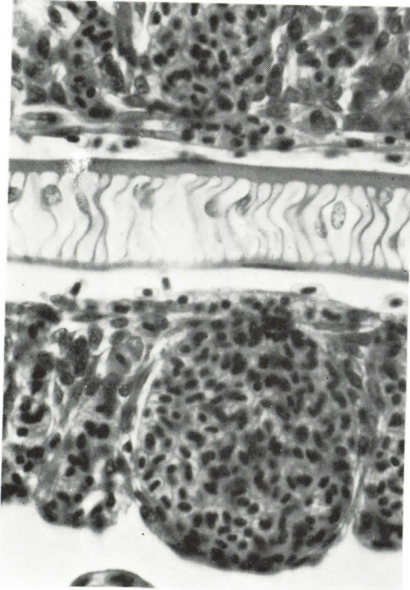


Fig. 12— a

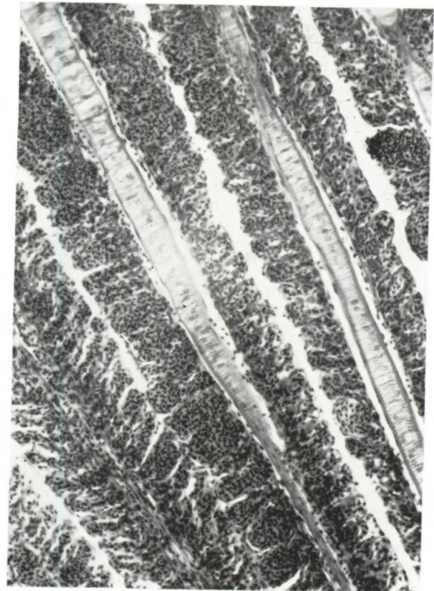


Fig. 12— b

- Fig. 10. Moderate deposition of hemosiderin in the spleen of *Tilapia mossambica* exposed for one month to 3-fold dilution of the "standard solution". Note the deposition at almost the same degree as that in Fig. 9. (prussian blue stain, $\times 100$).
- Fig. 11. Epithelium detached from the gill lamellae of *Tilapia mossambica* exposed for one month to the "standard solution". (H & E stain, $\times 100$).
- Fig. 12. Gill lamellae swelled up with erythrocytes in *Tilapia mossambica* exposed for 6 months to the "standard solution". (H & E stain): a $\times 400$, b $\times 100$

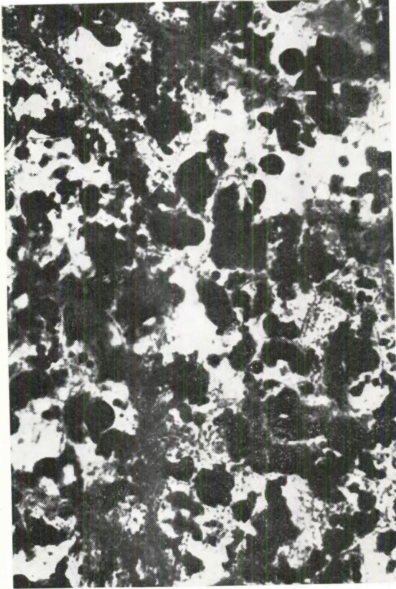


Fig. 13

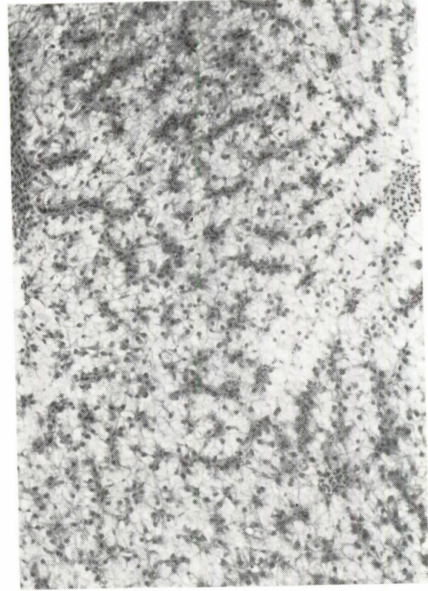


Fig. 14

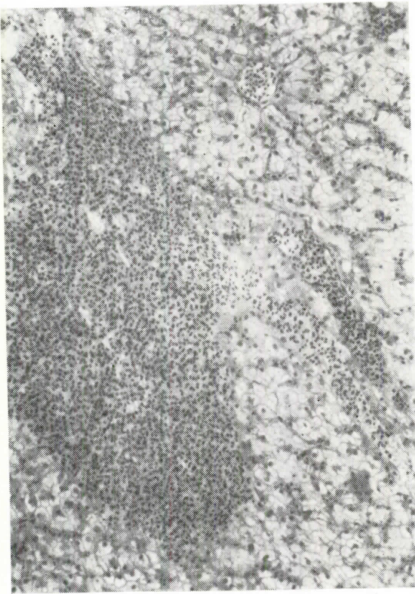


Fig. 15



Fig. 16

- Fig. 13. Remarkable accumulation of fat in the hepatopancreas of *Tilapia mossambica* exposed for 6 months to the "standard solution". (Sudan black B stain, $\times 400$).
- Fig. 14. Many clusters of erythrocytes among hepatic cell cords in the hepatopancreas of *Tilapia mossambica* died in the phenol solution of acute toxic concentration, 50 ppm. (H & E stain, $\times 100$).
- Fig. 15. Hemorrhage at the hepatic portions in the hepatopancreas of *Tilapia mossambica* which died in a phenol solution of acute toxic concentration, 50 ppm. (H & E stain, $\times 100$).
- Fig. 16. Noticeable hemosiderosis in the spleen of *Tilapia mossambica* exposed for one month to the phenol solution of chronic toxic concentration, 2 ppm. (prussian blue stain, $\times 100$).

SUMMARY

1. Histological examinations were made on the common gobbies, *Acanthogobius flavimanus*, collected in the period from November of 1972 to December of 1973, from two rivers, the Higashi-okawa and the Nishi-okawa. Both the rivers flow, at Kure City, Hiroshima Prefecture, into the Hiro Bay adjoining the Aki-nada in the Seto Inland Sea. The Higashi-okawa was expected to be severely polluted by the waste from big chemical plants built along its banks, whereas the Nishi-okawa was not.

The results of the examinations were as follows;

A manifest hemosiderosis was observed in the spleens of all specimens from the Higashi-okawa but no such symptom was found in those from the Nishi-okawa. These results suggested some relation between the hemosiderosis in the spleens of fishes and a pollution caused by waste from chemical plant.

2. A series of experiments on a laboratory scale were carried out on *Tilapia mossambica*, a euryhaline species easier to handle in a laboratory than the goby, for the purpose of verifying the above suggested relation of the hemosiderosis in the spleens of fishes to chemical pollution.

The results were as follows;

a) A hemosiderosis was observed markedly in the spleens of the animals which had been exposed for only one month to dilutions of the waste from the Fukuyama plant of the Nihon Kayaku K.K. though the animals could keep their vital and spawning functions at normal level for more than six months in these dilutions: The degree of development of hemosiderosis appeared to depend upon concentration of waste in the dilutions. A hematological examination on the animals which showed hemosiderosis in the spleens revealed a hypochromic and microcytic anemia.

In the case of sudden death within 20 hours or so of exposure to dilutions of higher concentrations of waste, no hemosiderosis was found in the spleens of the animals, but other types of histopathological symptoms were noticed.

b) Phenol, one of the principal components of the waste from the Fukuyama plant of the Nihon Kayaku K.K., was found to be the causing factor of the hemosiderosis in the spleen of the animal; when exposed to a phenol solution with a chronic toxic level of concentration (2 ppm), the animal showed a manifest hemosiderosis in the spleen. However, at higher concentration above the acute toxic level (50 ppm), the exposure of the animals to phenol solution did not result in the hemosiderosis in the spleen but in other types of histopathological symptoms.

In conclusion, it should be emphasized that in the spleen of fishes exposed to waste from chemical plants, hemosiderosis will develop as a result of chronic hemolytic anemias even though the fishes themselves do not show any apparent abnormality, also that phenol can be one of the causes of such hemosiderosis.