

公害研資料

No. 36

魚類指標による排水評価のための
技 術 要 領

昭和57年3月

横 浜 市

目 次

第1 採 取	1
1. 採取の方法	1
2. 容器の大きさ等	1
3. 検査前の措置	1
第2 検 査	2
1. 生・死についての検査	2
(1) 生 ・ 死	2
ア. 概 要	2
イ. 死亡率および非生残率	2
2. 健康状態についての検査	3
(1) 成 長	3
ア. 概 要	3
イ. 体長および体重	3
(2) 形 態	5
ア. 概 要	5
イ. 外観異常出現率	5
ウ. 内観異常出現率	6
(3) 血 液	9
ア. 概 要	9
イ. 採 血 法	9
ウ. 検 査 手 順	10
エ. ヘマトクリット値	10
オ. ヘモグロビン濃度	11
カ. 赤 血 球 数	12
キ. 赤 血 球 恒 数	13

3. 蓄積についての検査	14
(1) 重金属およびその化合物	14
ア. 概 要	14
イ. 被検物調整法	14
ウ. 鉛およびその化合物	15
エ. カドミウムおよびその化合物	15
オ. 水銀およびその化合物	15
カ. そ の 他	17
(2) 化 学 物 質	17
ア. 概 要	17
イ. 被検物調整法	17
ウ. 非水溶性成分	17
エ. 水溶性成分	20
第3 比 較	21
1. 出現率の差の検定	21
(1) 対象検査項目	21
(2) 比 較 法	21
2. 平均値の差の検定	22
(1) 対象検査項目	22
(2) 比 較 法	22

この技術要領は、本市が定める「魚類指標による排水評価指針」の運用に係わる検査方法等について示したものである。

第 1 採 取

1 採取の方法

採取とは検査等に供するために対照区及び排水区の両区から指標魚を取り上げることである。

魚の採取の方法としては、釣、たも網等があり、検査の目的により選択する必要がある。たも網による方法は、釣に比べてストレスが大きいですが、短時間に多数の魚の採取が可能となる利点から、本要領では、たも網による採取法を用いることとした。

したがって、採取にあたっては、できるだけ魚をあばれさせずに、すみやかにおこなうこと。そのためには、まず池の水位を下げ、魚を魚だまりに集めた後、感触のやわらかい生地のたも網を使用しておこなう。

2 容器の大きさ等

採取した魚を入れる容器は、できるだけ容量の大きなもの（80ℓのポリバケツ等）を使用する。さらに、酸素不足をきたさないように散気等の措置をおこなうことが必要である。

3 検査前の措置

成長の検査のみを行う場合は、魚体をできるだけ傷つけないために、測定は麻酔をかけておこなう。形態、血液の検査等をおこなう場合は麻酔をかけずにおこなう。

第 2 検 査

1 生・死についての検査

(1) 生 ・ 死

ア. 概 要

魚類の生死の把握は、魚類集団中の状況を端的に判断するために有効なものであり、一般的に死亡率をもって表わされる。魚類集団は、死亡によって数を減少するほか、病原生物性の疾病の慢延を防止するために除去したり、人為的な傷害による除去等によってその数を減少する。このため、本要領では集団中の死亡数に除去数等を加えた非生残尾数の割合で表示される非生残率と先の死亡率とを用いる。

イ. 死亡率および非生残率

死亡率：終了時までの死亡尾数の飼育開始時尾数に対する割合

非生残率：終了時までの非生残尾数の飼育開始時尾数に対する割合

(ウ) 定 義

死亡魚：飼育魚のうち、死亡した魚およびひん死の魚の両者を死亡魚とする。ただし、ひん死の魚とは、遊泳力がなくなって水面もしくは水底に長時間横向きになっている魚とする。

除去魚：飼育魚のうち、病原生物性の疾病の慢延を防止する上で除去が必要と判断されたものおよび採取時の取り扱いの不注意等による傷害により除去したものを除去魚とする。

不明魚：原因不明により消失した魚を不明魚として扱う。

非生残魚：死亡魚、除去魚および不明魚を合わせたものとする。

(イ) 方法・まとめ

飼育中の死亡魚、除去魚は、様式 1 に従って記録する。

死亡率、非生残率は、原則として体長・体重測定時毎に、生残尾数、死亡尾数、除去尾数、不明尾数の確認をおこない、様式 2 にもとづいて記録する。

2 健康状態についての検査

(1) 成長

ア. 概要

魚類の健康状態を総合的に評価する方法として、成長によるものがある。これは通常、体長・体重およびこれらから算出される肥満度で示される。成長の大きさは水温、溶存酸素量等の物理化学的環境条件、給餌条件等によって左右される。そのため、両区の排水水質以外の諸条件をできるだけそろえることにより、成長の検査は、魚類に及ぼす排水の慢性的影響を知る上で重要となる。本要領では体長・体重を成長の検査項目として用いた。

イ. 体長および体重

(ア) 測定範囲

体長は、被鱗体長（吻端から尾柄部のうろこの末端までの長さ）を用いる。体長・体重の単位は、*cm*および*g*で表わす。ただし、体長10*cm*、体重10*g*未満の場合は、少数点以下1ケタまで測定するものとする。

(イ) 測定尾数

測定尾数は、飼育開始時および終了時においては、飼育魚の全尾数を対象とする。飼育期間中における成長量の把握、および予定給餌量の算出を目的とした飼育期間途中時における測定は、1区あたり約30尾とし無作為抽出により採取して行う。

(ウ) 測定器具

- a. 麻醉剤を溶かした容器（20*l*用バット等）
- b. 清水の入った容器（20*l*用バット等）
- c. ノギス又は魚体測定板
- d. 上ざら天秤
- e. ガーゼ
- f. 記録用紙、筆記用具等

(エ) 測定手順

- a. あらかじめ、麻醉剤を所定の濃度に調整した容器1ケ、清水の入った容器2ケを用意しておく。

- b. 次に、測定する魚を数尾ずつ麻酔液に数分間浸し、麻酔をする。液に長く浸しすぎると死亡する場合もあるので、自発運動がなくなったら、直ちに清水に移し、麻酔液を洗い流す。
- c. 麻酔された魚は、魚体測定板にねかせ、被鱗体長を測定する。特にノギス等で測定する場合は、魚をいためないよう充分注意する。
- d. 次に、ガーゼで体表面の水分を軽くふきとり、上ざら天秤で体重を測定する。
- e. 測定終了後ただちに、散気してある清水の入った容器に移して、覚せいするのをまつ。
- f. 十分に覚せいしたところで、寄生虫および細菌感染予防のための薬浴等をおこない、各々の池に戻す。

(4) ま と め

飼育期間中および終了時の体長、体重は様式3に従って記録し、平均値、標準偏差、不偏分散、総重量を求める。

ただし、終了時において水温差等により対照区と排水区における1尾あたりの総給餌量(♀/尾)が異なる場合は、給餌量の多い区に対して次により補正体重を求める。

補正方法については以下に示す通りである。

まず、全飼育期間における対照区と排水区の1尾あたりの総給餌量の差($\Delta F♀$)を求める。

次に、給餌量の多い区について、全飼育期間の飼料効率(E%)を求め、給餌量の差からくる補正のための増重量($\Delta W♀$)を求める。

$$\Delta W = \Delta F \times E \times \frac{1}{100}$$

そして、給餌量の多い区の各個体体重から各個体の補正のための増重量を差し引き、各個体の補正体重を求める。

すなわち、 $W_1 - \Delta W$, $W_2 - \Delta W$, ……………, $W_n - \Delta W$ となる。

ただし、 W_1, W_2, \dots, W_n は個体数が n のときの各個体の体重を示す。

(2) 形 態

ア. 概 要

形態学的検査は、体表面、眼球などの性状等の外部観察と各臓器の位置や周囲との関係、大きさ、重さと表面、内面、割面の性状及び内容物の質や量の内部観察により形態異常の有無を主として視覚的に調べることにある。

本要領における形態学的検査は、肉眼的に明らかに異常と判断できるものとし、外観および内観の異常出現率によって表わすこととする。

イ. 外観異常出現率

外観異常出現率：30尾以上の個体の外部形態を観察し、そこに現われた異常魚の割合

ウ. 定 義

外観異常魚：下記に示す a から e のいずれかに該当する場合とする。

a. 体形異常（やせ・せこけあるいは骨まがり）

やせ・せこけ： 外観的に見て、はっきりとやせ・せこけと判断できるものとする。肥満度（体重×1,000／体長の三乗）で20以下のものを目安とする。

骨まがり： 外観的に見て、骨格がまがっていると判断できるものとする。

b. 体表異常（ビラン・潰瘍・欠損あるいは立鱗）

ビラン・潰瘍・欠損： 体表の皮膚がはがれている場合（ビラン）、体表の損傷が真皮ないしは真皮下に及ぶ場合（潰瘍）、あるいは鰓蓋ないしは各ひれのうち、2ヶ所以上に欠損が見られる場合とする。

立 鱗： 鱗が逆だつて、まつかさ状を呈する場合とする。

c. 眼球異常（白濁・出血あるいは突出・脱落）

白濁・出血：眼球の部分が白く濁っている場合、あるいは眼球に出血が見られる場合とする。

突出・脱落：左・右眼球のいずれか一方ないしは両方が突出あるいは脱落している場合とする。

d. 肛門異常（腫脹・発赤・出血）

肛門の部分が普通より腫脹し、発赤ないしは出血をおこしている場合とする。

e. その他の異常

種々の腫瘍等が見られる場合とする。

(イ) 観察方法

外観は、背側、腹側、体側とそえぞれの側から、体形、体表、眼球、肛門の順に観察をおこなう（図 1）。この場合、水中に入れた状態で観察すると立鱗等の項目については、観察しやすくなる。

(ウ) まとめ

外観異常の出現は、各個体について、体形、体表、眼球、肛門のいずれか一つに異常が見られた場合とし、様式 4 に従って該当する部分に十印を入れ、異常出現尾数、異常出現率を求める。

また、寄生虫等を確認した場合は、備考に記録するものとする。

ウ. 内観異常出現率

内観異常出現率：10尾以上の個体の内部形態を観察し、そこに現われた異常魚の割合

(ア) 定義

内観異常魚：下記に示す a から c のいずれかに該当する場合とする。

色の表示は、JIS規格に基づくマルセル記号とする。

a. 鰓の異常（色の異常あるいは白濁・損傷）

色の異常：肉眼的に鰓の色が暗赤色化（例えば 3.5 R 3.5 / 6.0 より濃い）した場合あるいは色が褪色（例えば 2.5 R 6.5 / 8.5 よりうすい）した場合とする。

白濁・損傷：鰓の一部ないしは大部分が白濁したり、損傷を受けたりする場合とする。

b. 肝臓の異常（色の異常、混濁・凝固あるいは凹凸）

色の異常：淡紅色（例えば 1.0 YR 8.0 / 6.0），にぶ橙色（例えば 6.5 YR 7.5 / 6.0）よりうすくなっている場合、あるいはにぶ赤味橙色（例えば 6.0 R 6.0 / 6.0）になる場合とする。

混濁・凝固：一部ないしは全体が濁ったり、かたくもろい場合とする。

凹 凸：広範囲に凹凸が顕著に現われている場合とする。

c. その他の異常

腹腔内に水がたまっていたり、腹腔壁と内蔵表面に癒着が見られる場合あるいは種々の腫瘍等が見られる場合とする。

(i) 観察用器具

- a. 解剖皿
- b. ピンセット
- c. 解剖ハサミ，小型眼科用ハサミ，メス
- d. 色別表

(ii) 観察方法

魚の腹部を上にし、肛門直前にハサミを入れ、腹部の正中線を心臓付近まで腹壁をやや持ち上げる感じで切る。次に魚体の左側を上にして横に倒し、肛門の前より背方に向けてハサミを入れ体高の半分位までを切る。次に腹側の囲心腔直後の切り口から、鰓蓋後縁の後側に沿って背方に向ってハサミを入れる。これにより、左側体壁の下半分を持ち上げることによって図2に示すように内臓の諸器官が観察できる。観察は、魚体を水中に入れた状態で、鰓、肝臓等の順序でおこなう。

(iii) まとめ

内臓異常の出現は、各個体について、鰓、肝臓等のいずれか一つに異常が見られた場合とし、様式5に従って該当する部分に十印を入れ、異常

出現尾数，異常出現率を求める。

また，寄生虫等を確認した場合は，備考に記録するものとする。

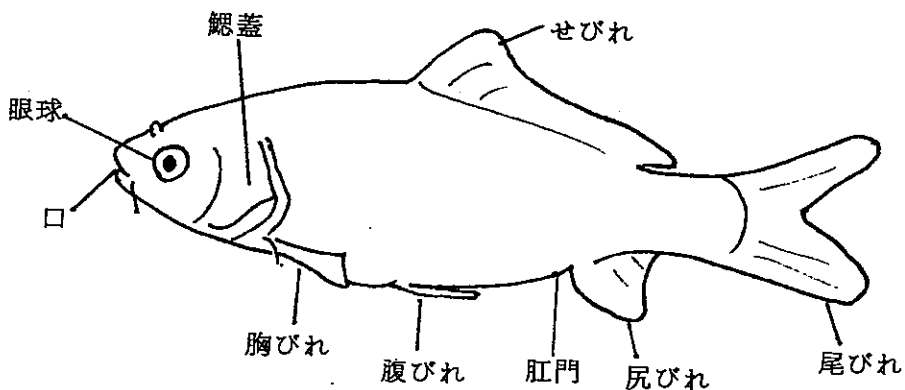
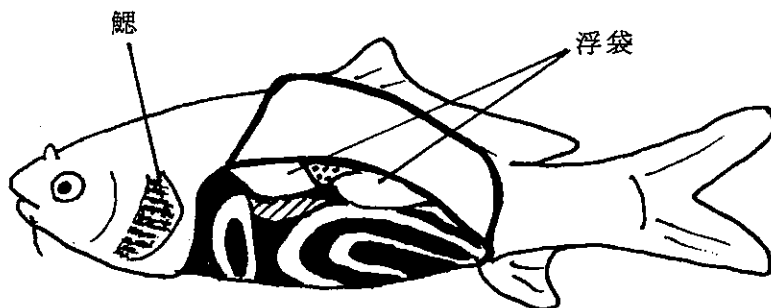


図 1 外 観







- | | |
|---|--|
|  腎臓 |  脾臓 |
|  肝臓および脂肪組織 | |
|  消化管 | |

図 2 内 観

(3) 血液

ア. 概要

魚類の健康状態を生理学的側面から評価する方法には、種々の診断技法がある。その中で血液検査は、検査法が確立し、比較的簡単に検査することができることから魚類においても適用されている。血液検査には、形態学的検査と生化学的検査があるが、本要領では、形態学的側面から赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)を主要な検査項目とした。これらの検査項目は、魚類の貧血症等の一般的健康診断には有効なものである。

イ. 採血法

(ア) 採血尾数

検査尾数は各区10尾以上とする。

(イ) 採血用器具

- a ツベルクリン注射筒(容量2~5ml)
- b 注射針, 静脈針(太)
- c 共栓遠沈管又は共栓小試験管(容量5~10ml)

(ロ) 凝固防止剤入り注射筒

魚類の血液は、体外に流出するとすみやかに凝固する。そのため血液検査をおこなう場合は、凝固防止処置をする必要がある。凝固防止剤にはヘパリンを用いる。その操作手順は、ヘパリンソーダ1万単位を蒸留水50mlに溶かし、注射器にその適当量(0.05~0.15ml)を吸い込み、注射筒の円壁に塗布する。その後定温(50℃)で乾燥させる。

(ハ) 採血部位

採血部位は、心臓、動脈球、腹側大動脈、Cuvier氏管、尾動脈又は尾静脈などがあるが、ここでは尾部の血管(尾動脈又は尾静脈)から採血する。

(ニ) 採血

魚体を湿った布で包み、尾部を露出させる。採血は魚体を横にねかせたまま尾部の側線上より穿刺しておこなう。採血時、血液の流入速度を高め

ようとして過度の陰圧をかけると溶血をおこし、また注射器の中に気泡を発生させるから注意が必要である。採血した血液は、注射筒内で軽く攪拌し、凝固防止剤を血液に充分溶解させ、共栓遠沈管又は共栓小試験管に入れ、栓をする。この時注射針をはずし、血液を管壁に沿って流し込むと良い。保存、運搬する場合は、冷蔵庫あるいはアイスボックス等に入れ低温（5℃程度）でおこなう。

ウ. 検査手順

検査項目の中には、血液の取り扱い、保存条件で変動するものもあり、なるべくすみやかに測定する。さらに検査手順は基準化して行っていくことが望ましく、以下にその手順を記す。

魚採取→採血→ヘマトクリット値→ヘモグロビン濃度、赤血球数

エ. ヘマトクリット値（毛細管法）

血液を遠沈して得られる赤血球の血液に対する容積の割合で示したもの

(ア) 測定器具

- a. ヘマトクリット用毛細管
- b. シール剤
- c. ヘマトクリット用遠心分離器
- d. ノギス又は専用計測器

(イ) 測定手順

- a. 血液を毛細管に2/3ほど吸入する。
- b. 毛細管の一方をシール剤で密封をする。
- c. 10,000rpmで5分間遠心分離器にかける
- d. 図3のA, Bを測定し、ヘマトクリット値(%)を求める。

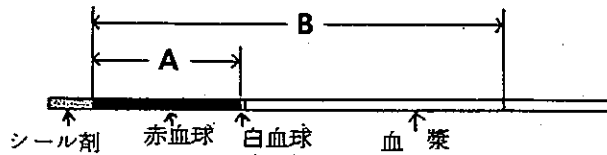


図3 ヘマトクリット値の測定

(ウ) ま と め

ヘマトクリット値 (Ht) = $A/B \times 100$ (%) で求め、様式6に従って記録し、平均値、標準偏差、不偏分散を求める。

オ. ヘモグロビン濃度 (ジアンメトヘモグロビン法)

血液 100 ml 中のヘモグロビンの量を示したもの。

(ア) 測 定 器 具

- a. ザーリピペット
- b. 5 ml のホールピペット
- c. 小試験管
- d. 光電比色計
- e. 比色管

(イ) 測 定 試 薬

- a. シアンメトヘモグロビン用試薬 (炭酸ナトリウム 1 g, フェ^{II}シアン化カリウム 0.2 g, シアン化カリウム 0.05 g を蒸留水に溶かして 1 l とする。)

かつ色びんに保存する (4°C の暗所に保存すれば 1 ヶ月、室温で 1 週間有効)。

- b. 標準ヘモグロビン溶液 (市販品)

(ウ) 測 定 手 順

- a. 比色管に、試薬 5 ml 注ぐ (安全ピペットを用いる)。
- b. ザーリピペットで血液を 0.02 ml 吸い取り、ピペットの外壁の付着血液をよくふき取り、試薬内に吹き出す。その際、吸入・吹き出しの操作を 2 ないし 3 回くり返しピペット内の血液をすべて洗い出す。
- c. 混和後、10 分間放置する。

d. 光電比色計で、540 nmの波長で吸光度を測定する。ブランクは、シアンメトヘモグロビン用試薬を用いる。

標準には標準ヘモグロビン溶液を用いる。

e. 検量線は、標準ヘモグロビン溶液を無希釈とシアンメトヘモグロビン用試薬で2倍希釈したものについてdと同様に測定し求める。

(±) ま と め

求めた検量線を用い、検体の吸光度からヘモグロビン濃度を求める。

$$y = ax + b$$

y : ヘモグロビン濃度 (g / 100 ml)

x : 吸光度

a, b : 定数

測定値は様式6に従って記録し、平均値、標準偏差、不偏分散を求める。

カ. 赤 血 球 数

血液 1 ml 中の赤血球の数を示したもの

(ア) 測 定 器 具

- a. 5 ml 小試験管
- b. ザーリピペット
- c. ビュルケルチュルク又はトーマの血液計算板
- d. 光学顕微鏡 (接眼×15, 対物×20)
- e. カウンター

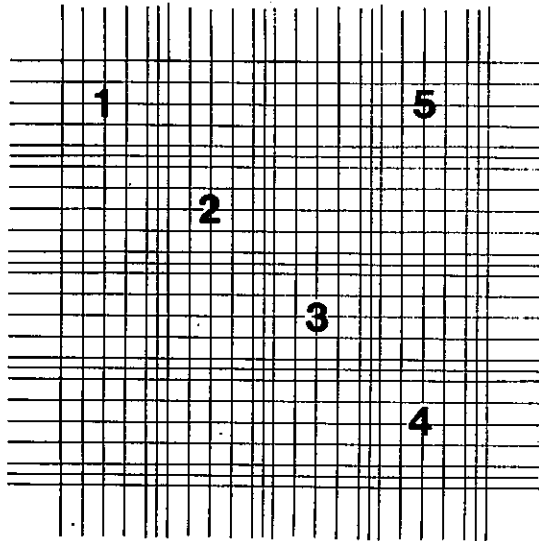
(イ) 測 定 試 薬

ヘンドリック試薬 (硫酸ナトリウム 10.0 g, 塩化ナトリウム 2.5 g, クエン酸ナトリウム 1.5 g, 氷酢酸 50.0 ml, 蒸留水 500 ml)

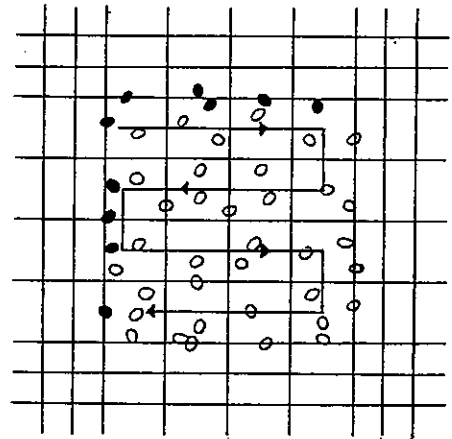
(ウ) 測 定 手 順

- a. 小試験管に試薬を 4 ml 注ぐ。
- b. ザーリピペットで血液 0.02 ml を小試験管に注ぐ (オ.ウ). bと同操作)。
- c. よく混和後、ただちにザーリピペットでビュルケルチュルク又はトーマの血球計算板に入れる。

- d. 検鏡：2～3分間静置後，計算板上の分画の中，5分画（図4-(1)，(2)）について赤血球数を顕微鏡によりカウンターで計数する。この時，計算室内の赤血球は均等に分布されていなければならない。



(1) Bürker-Türk の分画



(2) 分画の拡大図
→の方向に計数していく
○は計数，●は計数しない

図4 Bürker-Türk 計算板による赤血球の教え方

(±) ま と め

5分画の各計数値の合計をTとすると1mm³中の赤血球数xは次式によって求まる。

$$x = T \times \frac{400}{80} (\text{全区画}) \div 0.1 (\text{計算板の深さ}) \times 200 (\text{希釈倍数})$$

$$= T \times 10,000$$

赤血球数は万個/mm³で示し，様式6に従って記録し，平均値，標準偏差，不偏分散を求める。

キ. 赤血球恒数

ヘマトクリット値，ヘモグロビン濃度，赤血球数の検査により貧血の有無が決められるが，さらにこれらの検査項目を組み合わせることによって貧血の種類のおおまかな推定も可能である。ここでは参考として示す。

(ア) 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)

赤血球の細胞質の単位体積当たりのヘモグロビンの濃度を意味する。

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb}}{\text{Ht}} \times 100 \quad (\text{g} / 100\text{ml})$$

(イ) 平均赤血球容積 (MCV)

赤血球 1 個当たりの容積を意味する。

$$\text{MCV} = \frac{\text{Ht}}{\text{RBC}} \times 10^7 \quad (\mu^3)$$

(ウ) 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)

赤血球 1 個当たりのヘモグロビンの量を意味する。

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb}}{\text{RBC}} \times 10^7 \quad (10^{-12}\text{g})$$

3 蓄積についての検査

(1) 重金属およびその化合物

ア. 概 要

魚体中の重金属量を測定することは、その魚の生活環境、特に排水中の重金属量を知る上で有効な手段である。その中で特に蓄積性が認められ、環境汚染等の点で主要なものとなっている水銀、カドミウムおよび鉛を検査項目とした。又、これらの重金属について、その水中での存在形態によって、蓄積部位等に差が認められているため、本要領では全魚体をその検査試料とした。

イ. 被検物調整法

(ア) 検査尾数

検査尾数は各区 10 尾以上とする。

(イ) 調整法

原則として、検査は一尾ごとに魚全体をホモジナイザーを用いてホモジナイズし、全体をよく混合し、被検物とする。

(ウ) 含水量

被検物を20g秤取し、恒量のビーカーに入れ105℃で2時間乾燥し、デシケーター放冷する。この乾燥前後の重量から次式により、被検物の含水量を%表示により算出する。

$$\text{含水率(\%)} = \left\{ 1 - \frac{(\text{乾燥後の被検物内在ビーカー重量}) - (\text{ビーカーのみの重量})}{(\text{乾燥前の被検物内在ビーカー重量}) - (\text{ビーカーのみの重量})} \right\} \times 100$$

ウ. 鉛およびその化合物

(ア) 前 処 理

被検物を20g精秤し、硫酸20mlと硝酸10mlを加え硫酸白煙が発生し、有機物が分解するまで加熱する。有機物の分解が困難なときは更に硝酸10mlを加え、有機物が分解するまで同様に繰返し加熱する。

(イ) 試 験 装 作

前処理を行った試料について、JISK-0102-54による方法で試料中の鉛の量を測定する。

(ウ) 計 算

湿および乾被検物のg当りの鉛の量を μg として算出し、その結果を様式7に記録し、平均値、標準偏差、不偏分散を求める。

エ. カドミウムおよびその化合物

(ア) 前 処 理

ウ. 鉛およびその化合物(ア)と同様な方法で処理する。

(イ) 試 験 操 作

前処理を行った試料について、JISK-0102-55による方法で試料中のカドミウムの量を測定する。

(ウ) 計 算

ウ. 鉛およびその化合物(ウ)と同様な方法でカドミウム量を算出し、その結果を様式7に記録し、平均値、標準偏差、不偏分散を求める。

オ. 水銀およびその化合物

(ア) 前 処 理

被検物を20g精秤し、1ℓフラスコ(図5-C)に入れ、過マンガン酸カリウム溶液(5w/v%)100mlおよび硫酸20mlを加え、濃

縮器（図 5 - E）（コック（図 5 - B）はフラスコ内に環流する方向）及び環流冷却器（図 5 - A）を付けて直火にて加熱し、充分沸騰した後、濃縮器のコックを濃縮できる方向にし、硫酸白煙が発生してから 10 分間更に加熱し分解する。赤紫色が消失した場合は、冷却後過マンガン酸カリウム溶液（5 w / v %）10 ml を加え同様に加熱し、赤紫色が残るまで繰返す。

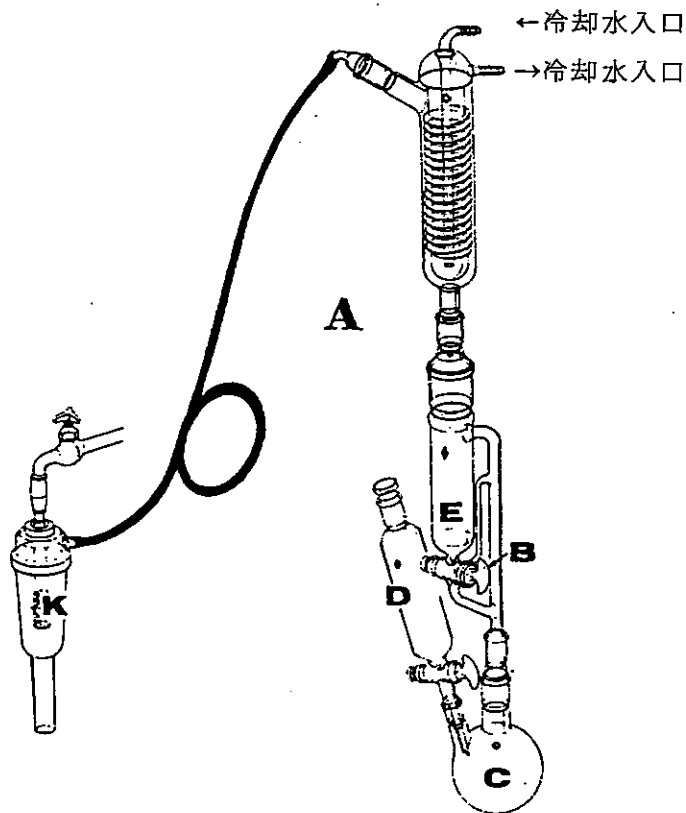


図 5 水銀分解装置

A : 還流冷却器 B : 濃縮用コック C : 1 l 二口フラスコ
 D : 薬液投入器 E : 濃縮器 K : 水流ポンプ

(i) 試験操作

前処理を行った試料について、JISK-0102-66 による方法で試料中の水銀の量を測定する。

(ii) 計算

ウ. 鉛およびその化合物(ウ)と同様な方法で水銀量を算出し、その結果を様式7に記録し、平均値、標準偏差、不偏分散を求める。

カ そ の 他

その他の物質については、検査の必要性に応じて別途定める。

(2) 化 学 物 質

ア 概 要

魚体中の化学物質を測定し、対照区と排水区とを比較することは、排水中の化学物質特性を知る有効な手段であり、又、その量により、その化学物質の蓄積性を知ることが出来る。化学物質の中にはPCB等のように、その蓄積性が明らかにされたものもあるが、これらはまだほんの一部にすぎない。そこで本要領では、ガスクロマトグラム-質量分析法で分離同定可能な化学物質群を測定する方法を採用した。ただし、その手順の難易性等の点から、特に難揮発性物質を選び、非水溶性および水溶性物質に別けて測定項目とした。

なお、この測定法は環境庁委託研究報告書『難分解性化学物質検索調査』に基づく。

イ 被検物調整法

(ア) 検 査 尾 数

検査尾数は各区5尾以上とする。

(イ) 調 整 法

(1) 重金属およびその化合物のイ. 被検物調整法(イ)の項に準ずる。

ウ 非水溶性成分

(ア) 試 薬

a. クロロホルム：特級，蒸留して用いる。

b. メタノール：特級，2回蒸留して用いる。

c. 無水硫酸ナトリウム：クロロホルム+メタノール(1:1)を用いソックスレー抽出器で24時間洗浄した後500℃

で2時間加熱する。

(i) 前 処 理

被検物100gを500ml分液ロートに入れ、その中へ100mlのクロロホルム+メタノール溶液(1:1)を加え、振とう機を用いて30分間抽出操作を行う。そして遠心分離管に移し、3,000rpmで5分間遠心分離を行い、クロロホルム層を注射器で分取する。この抽出液を無水硫酸ナトリウムを充てんしたクロマト管(5cm×2cmφ)中を通し脱水する。脱水したクロロホルム抽出液をKD濃縮器を用いて70℃に加温しながら5mlまで濃縮する。なおメタノール+水層については水溶性物質の分析試料とする。

試料のクリーナップは次のようにして行う。

一昼夜、エージングを行ったOV-17及び水酸化ストロンチウムをコーティング(2wt%)したガラスビーズを充てんしたガラス管(内径3mm,長さ5cm)内に、クロロホルム抽出液20μlを注入し、針を接続、200℃で加熱追い出し分析を行う。なお、加熱の際、針がはずれるのを防ぐためにシールテープでガラス管と針の接続部分をしっかりと巻いておく。導入方法の概要を図6に示す。また、希釈試料の場合には、試料100μlをマイクロシリンジで採り、プレカラムに注入後、純チッ素を500ml流し溶媒を飛ばして試料の濃縮を行う。

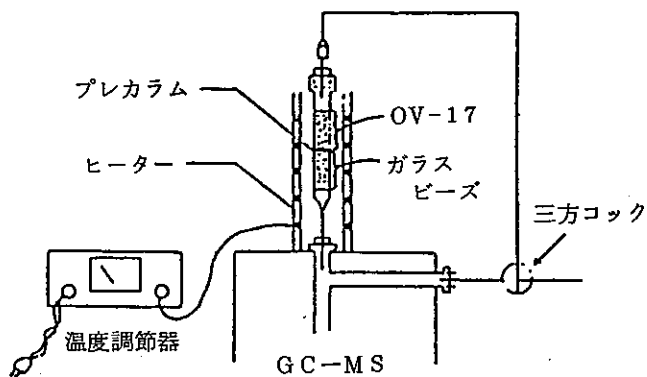


図6 プレカラム導入方法

(b) ガスクロマトグラム—質量分析法 (GC—MS 法)

前処理により化学物質を捕集した試料濃縮管を図 6, 7 に示すように GC—MS のキャリアーガスセパレータのバルブを閉じ、数分間、キャリアーガスの濃縮管に通して濃縮管中に捕集された空気、炭酸ガスを追い出す。その後キャリアーガスセパレータのバルブを開き、試料濃縮管を 30℃ から 200℃ まで約 5 分間で加熱昇温させ濃縮試料を GC—MS に導入する。なお、試料濃縮管を加熱している約 5 分間、試料濃縮管に若干、残留している空気、水、炭酸ガスが GC—MS に導入されるので、トータルイオンコレクター (以下 TIC) の応答量によって、セパレータのバルブを開閉し、水がカラムから溶出した後、バルブを全開にして化学物質の GC—MS の分析を行う。

GC—MS の分析条件は表 1 に示す。

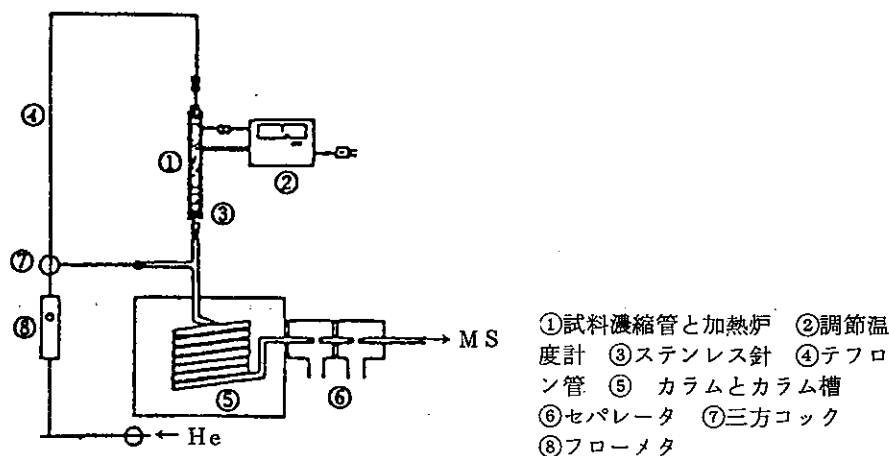


図 7 試料導入系統図

(c) ま と め

GC—MS 分析結果から、マススペクトル解析を行い、各物質を同定する。又、同定結果から、その物質の純物質を用いた GC—MS 分析を行いそのピーク高に従って定量を行う。

同定結果と定量結果を対照区および排水区に分けて各物質ごとに様式 8, 9 に記録する。

エ 水溶性成分

(ア) 試 薬

ウ. 非水溶性成分の(ア)に準ずる。

(イ) 前 処 理

非水溶性物質の残液であるメタノール+水層に濃塩酸 0.5 ml を加え、pH 2~3 に調整した後、クロロホルム 50 ml で 30 分間抽出を行う。水層とクロロホルム層に分離し、水層は塩基性物質の分析試料に供した。クロロホルム層はエマルジョンになっているため、3000rpm 5 分間遠心分離を行った後、脱水、濃縮を行い酸性物質分析用試料とする。

酸性抽出物の抽出残液である水層に、0.1 N 水酸化ナトリウム 15 ml を加え pH 12~13 に調整した後、同様の方法で分析を行い、塩基性分析用試料とする。

各々についてウ. 非水溶性成分 (イ) 前処理の項のクリンナップを行なう。

(ウ) GC-MS 分析法およびまとめ

ウ. 非水溶性成分の(ウ), (イ)項に準じて、GC-MS分析およびまとめを行う。

表 1 難揮発性成分の GC, GC-MS 分析条件
(島津 LKB-9000 の場合)

	中性, 塩基性成分	酸性成分
カラム	OV-17, 2% 担体 Chromosorb W AW, DMCS, 60 ~80 mesh, 3 m 3mmφ ガラスカラム	Thermon-1000, 2% 担体 Chromosorb W AW, DMCS, 80 ~100 mesh, 3 m, 3mmφ ガラスカラム
カラム温度	50°C → 270°C, 10°C/min 昇温	50°C → 200°C, 10°C/min 昇温
試料注入口温度	280°C	以下同左
セパレータ温度	300°C	
イオン源温度	310°C	
キャリアガス流量	He, 30ml/min	
トラップ電流	60 μA	
加速電圧	3.5 KV	
スキャンスピード	1~1200 m/z / 2 sec	
スキャン間隔	4 秒	
イオン化電圧	70 eV	
検出器	TIC	

第 3 比 較

1 出現率の差の検定

(1) 対象検査項目

生・死：死亡率，非生残率

形 態：外観異常出現率，内観異常出現率

(2) 比 較 法

終了検査時における上記項目の値について，対照区と排水区で比較する。

比較は，出現率の差の検定法を用い，有意水準は5%でおこなう。以下，計算法を示す。

(例)

	対照区(A)	排水区(B)
出現していない尾数 (n-r)	$(n-r)_A$	$(n-r)_B$
出 現 尾 数 (r)	r_A	r_B
計 (n)	n_A	n_B

手順(1) 対照区，排水区全体の出現率は

$$P = \frac{r_A + r_B}{n_A + n_B}$$

手順(2) 次式により U_0 を計算する。

$$U_0 = \frac{r_A / n_A - r_B / n_B}{\sqrt{P \times (1-P) \{ (1/n_A) + (1/n_B) \}}}$$

手順(3) 正規分布表から有意水準5%に対する $U(0.05)$ の値を求める。

$$U(0.05) = 1.96$$

よって $U_0 \leq 1.96$ であれば，5%有意水準で差なし

$U_0 > 1.96$ であれば，5%有意水準で差あり

と判定する。

2 平均値の差の検定

(1) 対象検査項目

成長：体長，体重

血液：ヘマトクリット値，ヘモグロビン濃度

蓄積：重金属およびその化合物，化学物質

(2) 比較法

終了検査時における上記項目の値について，対照区と排水区で比較する。比較は，平均値の差の検定法を用い，有意水準は5%でおこなう。以下，計算法を示す。

ア. 標本数が多い場合 ($n \geq 30$)

対照区の

標本数 n_A ，標本標準偏差 σ_A ，標本平均値 \bar{x}_A

排水区の

標本数 n_B ，標本標準偏差 σ_B ，標本平均値 \bar{x}_B

とすれば， t_0 は次式により計算する。

$$t_0 = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{\sigma_A^2}{n_A} + \frac{\sigma_B^2}{n_B}}}$$

t 分布表から有意水準5%に対する $t(0.05)$ の値を求める。

$$t(0.05) = 1.96$$

よって， $t_0 \leq 1.96$ なら，5%有意水準で差なし

$t_0 > 1.96$ なら，5%有意水準で差あり

と判定する。

イ. 標本数が少ない場合 ($n < 30$)

対照区の

n_A ：標本数

σ_A ：標本標準偏差

\bar{x}_A ：標本平均値

V_A : 標本不偏分散

S_A : 偏差 2 乗和

排水区の

n_B : 標本数

σ_B : 標本標準偏差

\bar{x}_B : 標本平均値

V_B : 標本不偏分散

S_B : 偏差 2 乗和

手順(1) バラツキの違いの検定 - F 検定

$$F_0 = \frac{V_A}{V_B} \quad \text{有意水準 } \alpha = 0.05 \text{ として}$$

F 分布表より $F(n_A-1, n_B-1; \alpha/2)$ の値, すなわち

$F(n_A-1, n_B-1; 0.025)$ を求める。

ただし, n_A-1, n_B-1 は自由度

この場合 $F_0 \leq F$ ならバラツキに差なし

$F_0 > F$ ならバラツキに差あり

手順(2) バラツキに差のない場合の平均値の差の検定

t_0 を次式により計算する。

$$t_0 = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{S_A + S_B}{n_A + n_B - 2} \left(\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_B} \right)}}$$

t 分布表から有意率 5% に対する $t(n_A + n_B - 2, 0.05)$ の値
を求める。

(ただし, $n_A + n_B - 2$ は自由度)

$t_0 \leq t(n_A + n_B - 2, 0.05)$ なら, 5% 有意水準で差なし

$t_0 > t(n_A + n_B - 2, 0.05)$ なら, 5% 有意水準で差あり

と判定する。

手順(3) バラツキに差が見られる場合の平均値の差の検定 (Welch-Aspin
の方法)

t_0 を次式により計算する。

$$t_0 = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{(V_A/n_A) + (V_B/n_B)}}$$

t 分布表から有意水準5%に対する $t(\phi, 0.05)$ の値を求める。

$$\text{ただし, } \phi = \frac{1}{\{C^2/(n_A - 1)\} + \{(C - 1)^2/(n_B - 1)\}}$$

$$C = \frac{V_A/n_A}{(V_A/n_A) + (V_B/n_B)}$$

$t_0 \leq t(\phi, 0.05)$ なら, 5%有意水準で差なし

$t_0 > t(\phi, 0.05)$ なら, 5%有意水準で差あり

と判定する。

様式1 死亡魚・除去魚の観察

観察年月日	死亡・除去魚の区分	体 長	体 重	肥 満 度	備 考

様式2 死亡率・非生残率等

測定年月日	飼育開始 時尾数	生 残 数	死 亡 尾 数	除 去 尾 数	不 明 尾 数	累積非 生残率	累積死 亡 率	備 考
合 計								

様式3 成長量(対照区・排水区)

№	体長	体重	備考	№	体長	体重	備考
1				55			
2				56			
3				57			
4				58			
5				59			
6				60			
7				61			
8				62			
〃							
48							
49							
50				100			
51				合計			
52				平均値			
53				標準偏差			
54				不偏分散			

様式4 外観異常の有・無(対照区・排水区)

項目	個体№	〃						〃		29	30	〃
		1	2	3	4	5	6					
体形	やせ・せこけ											
	骨まがり											
体表	ピラン・潰瘍類											
	立鱗											
眼球	白濁・出血											
	突出・脱落											
肛門	腫脹・発赤出血											
その他												
外観異常の有無												
外観異常尾数		備考										
外観異常出限率												

様式5 内観異常の有・無(対照区・排水区)

項目	個体	№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
鰓	色の異常											
	白濁・損傷											
肝 脾 臓	色の異常											
	混濁・凝固											
	凹凸											
その他												
内観異常の有無												
内観異常尾数			備考									
内観異常出現率												

注 該当する部分に+印を入れる。内観異常の有・無は上記項目のいずれか1項目以上に出現した場合に(有)とする。

様式6 血液性状

対 照 区				排 水 区			
№	ヘマトクリット 値 (%)	ヘモグロビン 濃 度 (g/100mℓ)	赤血球数 (10^4 個/ mm^3)	№	ヘマトクリット 値 (%)	ヘモグロビン 濃 度 (g/100mℓ)	赤血球数 (10^4 個/ mm^3)
1				1			
2				2			
3				3			
4				4			
5				5			
6				6			
7				7			
8				8			
9				9			
10				10			
平均 値				平均 値			
標準 偏差				標準 偏差			
不偏 分散				不偏 分散			

様式7 重金属およびその化合物

No	対 照 区			排 水 区		
	鉛	カドミウム	水 銀	鉛	カドミウム	水 銀
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
平均値						
標準偏差						
不偏分散						

様式 8 化学物質定性分析結果（中性，酸性あるいは塩基性）

族	成 分 物 質 名	対 照 区					排 水 区					備 考	
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
多環芳香族	物質 1. 物質 2. ⋮	* <input checked="" type="checkbox"/>		* <input checked="" type="checkbox"/>									
フタル酸エステル	物質 1. 物質 2. ⋮												
脂肪酸脂肪酸エステル	物質 1. 物質 2. ⋮												
ハロゲン化合物	物質 1. 物質 2. ⋮												
⋮													
その他の	物質 1. 物質 2. ⋮												

※例のように検出，同定された箇所○印をつける

様式 9 化学物質定量分析結果（中性，酸性あるいは塩基性）

物質名	対 照 区					排 水 区					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
物質 1											
物質 2											
⋮											
⋮											
⋮											
⋮											

単位：ng/g (ppb)

「魚類指標による排水評価のための技術要領」

編集構成員

魚類指標排水規制基礎研究会

代表 四 竈 安 正（観音崎水産生物研究所）

尾 崎 久 雄（東京水産大学）

田 端 健 二（東海区水産研究所）

鈴 木 規 夫（前神奈川県淡水魚増殖試験場）

協力 池 田 弥 生（東京水産大学）

磯 貝 純 夫（観音崎水産生物研究所）

横浜市公害対策局水質課

横浜市公害研究所水質部門

魚類指標による排水評価のための技術要領

昭和57年3月31日発行

編集 魚類指標排水規制基礎研究会
横浜市公害対策局水質課，公害研究所水質部門

発行 横浜市公害研究所
〒235 横浜市磯子区滝頭1-2-15

TEL (045)752-2605

印刷 樹国際マイクロフォト研究所
〒231 横浜市中区尾上町3-29

TEL (045)681-0719 (代)