

ヒメダカのカドミウム耐性に及ぼす銅と亜鉛の影響

亭島博彦・永田昭廣

環境水中の重金属は、魚類の生理、生化学的機能に大きな影響を与えることが知られている¹⁾。コイ *Cyprinus carpio* では、毒性発現量以下のCd、Zn含有水で飼育した個体で、Cd毒性に対する抵抗力が高まったと報告されている²⁾。本実験は、魚類に対する環境水中の重金属の影響を調べることを目的として、ヒメダカ *Oryzias latipes* を毒性発現量以下のCuおよびZn含有水で飼育し、Cd毒性に対する抵抗力への影響とCu、ZnおよびCdの体内蓄積量を調べたものである。

1 試験方法

(1) 供試魚と予備飼育

東京都世田谷区の養殖業者より平均体重0.43gのヒメダカ成魚を約450尾購入し、雌雄の区別なく供試した。予備飼育は60l容のプラスチック水槽3基を用い、水温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、白色蛍光灯による明暗12時間サイクルの条件下で市販飼料を投与しながら10日間止水で行った。飼育水には、チオ硫酸ナトリウムで脱塩素した水道水を用い、水質の悪化を防ぐため1日約1/3量の水交換と酸素供給のための弱いエアレーションを行った。

(2) 重金属馴致

予備飼育の6日目に供試魚の一部を取り出し、CuとZnの急性毒性発現量を調べるために96時間の毒性試験を行った。その結果、Cuでは1mg/l、Znでは4mg/l以下の濃度で死亡魚が認められなかったため、重金属馴致のCu、Zn濃度は0.25および0.5mg/lとした。

予備飼育の後、5基の60l容プラスチック水槽に供試魚を40尾ずつ収容した。1水槽1実

験区とし、脱塩素水道水のみを対照区、Cu濃度0.25mg/lのCu-0.25区と0.5mg/lのCu-0.5区、Zn濃度が0.25mg/lのZn-0.25区と0.5mg/lのZn-0.5区の5実験区を設けた。なお、CuとZn濃度の調整には $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ と ZnCl_2 を用いた。

その他の飼育条件は予備飼育と同じとし、7日間馴致飼育を行った。また、馴致開始時と終了時にCu、CdおよびZnの蓄積量を調べるため、各実験区より6~10尾のサンプリングを行った。

(3) Cd毒性に対する耐性実験

重金属馴致した供試魚を1試験区あたり2基の10lガラス水槽に8~14尾ずつ収容した。飼育水は $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ でCd濃度を70mg/l(供試魚のCdにおける96時間 LC_{50} は約60mg/lであった。)に調整し、90時間後の生残率よりCd毒性に対する耐性を検討した。なお、弊死魚は直ちに取り出し、実験終了時の生残魚とともにCdの蓄積量を測定した。また、生残魚についてはCu、Znの蓄積量も測定した。

(4) Cu、ZnおよびCd蓄積量の測定

取り上げたサンプルは体重を測定した後、体表に吸着している金属分を除去するため10mMの $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$ 溶液で5分間洗浄³⁾し、分析に用いるまで -20°C で凍結保存した。分析は試料を HNO_3 - HClO_4 で湿式分解した後、日立170-10型原子吸光光度計を用いて直接法により行った。

(5) 統計処理

スチューデントのt検定によった。

2 結果

重金属馴致開始時と終了時のCuおよびZn蓄積量をTable 1に示した。飼育終了時のCu蓄積量は対照区に対しいずれの実験区とも有意な差は認められず、開始時との差も小さかった。Zn蓄積量はCu-0.5区とZn-0.5区で対照区に比べ有意に高かったが、開始時の値との有意差は見られなかった。なお、Cdはいずれの供試魚からも検出されなかった。

Cd毒性に対する耐性実験の生残率の経時変化をFig. 1に示した。Cu-0.25, Zn-0.25, Zn-0.5および対照区は実験期間中ほぼ同様の生残率で推移し、最終生残率も44.0から52.4%の範囲にあった。これに対し、Cu-0.5区は42時間後まで死亡は認められず、最終生残率も82.4%と高かった。

Table 2にCd耐性実験における致死時間とCd蓄積量との関係を示した。各実験区とも致死時間とCd蓄積量との間に高い相関が認めら

れ、Cdは経時増加を示した。また、Cdの蓄積速度は対照区の0.122に対しいずれの実験区とも有意差は見られなかったが、Cu-0.5区は0.045と他区に比べ低かった。

Table 3にCd耐性実験における生残魚のCu, ZnおよびCd蓄積量を示した。Cu, Zn蓄積量はいずれも区間差が小さく、それぞれ2.8~4.6 $\mu\text{g/g}$, 54.5~59.8 $\mu\text{g/g}$ の範囲にあった。Cd蓄積量はCu-0.25区で5.8 $\mu\text{g/g}$, Cu-0.5区で4.3 $\mu\text{g/g}$ と他区に比べ低く、対照区との間に有意な差が認められた。

3 考察

多くの魚類においてCuとZnは必要な元素で⁴⁾、体内量はZnがCuよりも約10数倍ほど多いことが知られている⁵⁾。本実験の馴致開始時のZn/Cu比は16.6であった。馴致終了時のCuの蓄積量は、開始時の値との差がほとんど無く、区間差も小さかった。これは曝露量や時間が

Table 1 Accumulations of Cu and Zn by *Oryzias latipes* exposed to water with two levels of Cu or Zn

| Group | Cu ($\mu\text{g/g}$) | | Zn ($\mu\text{g/g}$) | |
|---------|------------------------|---------------|------------------------|-----------------------------|
| | Initial | Final | Initial | Final |
| | 3.5 \pm 0.8 | | 54.9 \pm 4.8 | |
| Control | | 3.2 \pm 0.9 | | 50.0 \pm 6.5 |
| Cu-0.25 | | 4.4 \pm 2.1 | | 55.8 \pm 15.3 |
| Cu-0.5 | | 4.2 \pm 0.7 | | 62.2 \pm 6.0 ^a |
| Zn-0.25 | | 3.4 \pm 1.4 | | 56.3 \pm 9.3 |
| Zn-0.5 | | 2.2 \pm 0.8 | | 63.9 \pm 8.6 ^b |

Values are mean \pm SD.

^a: significantly different from Control ($P < 0.05$).

^b: significantly different from Control ($P < 0.01$).

少なかったためと思われる。また、Znの蓄積量に関しては、Cu-0.5区とZn-0.5区が対照区に比べ有意に高かったが、開始時の値と有意差が無かったことから飼育水のちがいにより有意差が生じたとは考えられない。

Cd毒性に対する耐性実験の結果、Cu-0.5区が他区に比べて高い生残率を示した。これはCu曝露によりCd耐性が高まったためと考えら

れる。鬼頭ら²⁾は、Zn 5 ppmで14日間曝露したコイでCd耐性が高まったと報告しているが、本実験ではZn曝露によるCd耐性の上昇は見られなかった。しかし、ヒメダカのZn/Cu比からZnの体内量の多さを考慮して曝露量を増やすことにより、ヒメダカでもZn曝露によりCd耐性が高まる可能性がある。

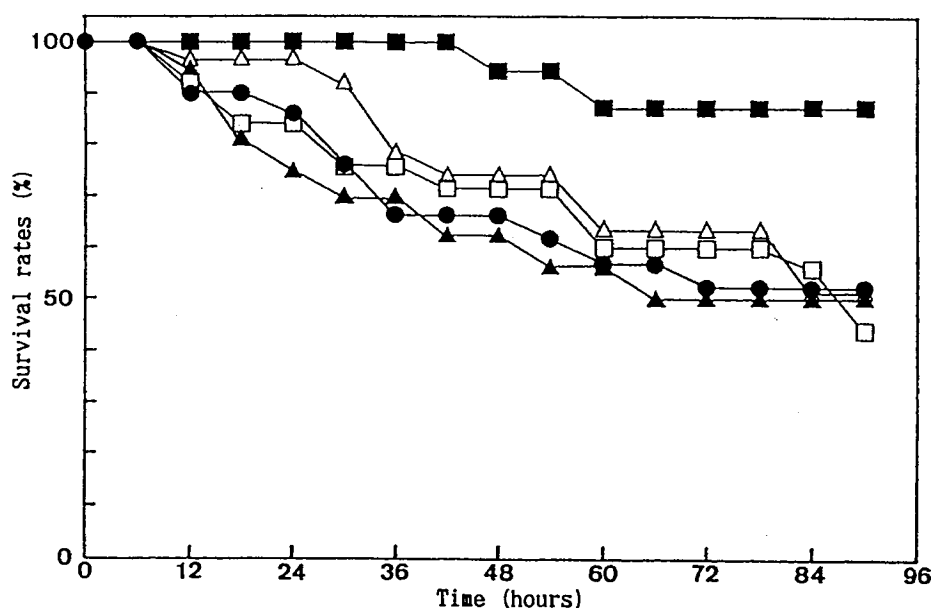


Fig. 1 Survival rates (90 hours) of *Oryzias latipes* exposed to Cd at concentration of 70mg/ℓ. Symbols of each groups are: ●, Control; □, Cu-0.25; ■, Cu-0.5; △, Zn-0.25; ▲, Zn-0.5.

Table 2 Relationship between Cd content(Y) and lethal time(X) of *Oryzias latipes* exposed to Cd at concentration of 70mg/ℓ

| Group | Regression equation | Correlation coefficient | Cd accumulation rate ¹⁾ |
|---------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Control | $Y=0.035X+1.39$ n=11 ²⁾ | 0.733 | 0.122 ± 0.068 ³⁾ |
| Cu-0.25 | $Y=0.072X+1.23$ n=14 | 0.712 | 0.129 ± 0.064 |
| Cu-0.5 | $Y=0.027X+1.00$ n=4 | 0.675 | 0.045 ± 0.008 |
| Zn-0.25 | $Y=0.037X+1.69$ n=14 | 0.574 | 0.096 ± 0.064 |
| Zn-0.5 | $Y=0.074X+1.73$ n=9 | 0.612 | 0.176 ± 0.107 |

¹⁾ Cd content in dead fish (ug/g)/Lethal time (hours)

²⁾ Number of dead fish.

³⁾ Mean ± SD.

Table 3に示した通り、生残魚のCuおよびZnの蓄積量はいずれの実験区とも同レベルにあったが、Cdの蓄積量はCu-0.25区とCu-0.5区が対照区に比べ有意に低かった。Cdの蓄積速度(Table 2)は蓄積量と同じ傾向を示し、有意差こそ見られなかったがCu-0.5区が5実験区中最も低かった。

哺乳類では重金属の摂取により重金属の解毒作用を有するメタロチオネインが誘導合成され、続いて摂取された重金属への耐性が高まることが知られている⁹⁾。また、多くの魚類でも重金属毒に対するメタロチオネインの解毒作用が確認されている⁷⁾ことから、Cd毒性に対する抵抗力実験でのCu-0.5区の高生残率はメタロチオネインの誘導合成による可能性も考えられる。しかし、重金属毒性に対するメタロチオネインの主な解毒機構と考えられているBrown and Parson⁸⁾のSpillover理論やLeber⁹⁾の理論では、Cu-0.5区で見られた低Cd蓄積速度、低Cd蓄積量、そして他区と同レベルのCu、Zn蓄積量からCd耐性の上昇を説明するのは困

難である。すなわち、Spillover理論によれば、重金属の蓄積速度がメタロチオネインの合成速度を越えたときにその重金属の毒性が発現する。そのためCu-0.5区のように、Cdの蓄積速度そのものが遅い場合にはSpillover理論に当てはまらない。一方、Leberの理論では、CdやHg等の強毒重金属の侵入により、メタロチオネインと結合しているCuやZn等の弱毒重金属が放出され、代わりに強毒重金属とメタロチオネインが結合することで強毒重金属の毒性が抑えられる。よって、Cu-0.5区の低Cd蓄積量やCu、Znの蓄積量から、この区でメタロチオネインの誘導合成が促進されていたとは考えにくい。

ヒメダカは取扱いが容易なため基礎生物学的研究の進んだ魚種であり¹⁰⁾、環境汚染物質や農薬等の毒性試験にもよく用いられる¹¹⁾。本実験で示されたCu-0.5区の低Cd蓄積量(速度)やメタロチオネインの誘導合成だけでは説明しにくいCd耐性の上昇がどのような生理的作用によるのか、今後解明すべき問題である。

Table 3 Concentrations of Cu, Zn and Cd of survived *Oryzias latipes* exposed to Cd at concentration of 70mg/ℓ for 90 hours

| Group | Cu | Zn | Cd |
|---------|-----------|------------|------------------------|
| | | (μg/g) | |
| Control | 3.8 ± 1.8 | 54.5 ± 7.8 | 11.3 ± 7.6 |
| Cu-0.25 | 3.7 ± 1.4 | 55.5 ± 7.8 | 5.8 ± 1.9 ^a |
| Cu-0.5 | 4.5 ± 1.4 | 58.4 ± 6.8 | 4.3 ± 1.7 ^b |
| Zn-0.25 | 3.1 ± 1.5 | 58.6 ± 5.9 | 11.3 ± 9.1 |
| Zn-0.5 | 2.8 ± 1.5 | 59.8 ± 5.9 | 12.6 ± 6.2 |

Values are mean ± SD.

^a: significantly different from Control (P < 0.05).

^b: significantly different from Control (P < 0.01).

参考文献

- 1) 山本義和, 魚介類の微量成分 (池田静徳編), 1981, 恒星社厚生閣: pp209~269.
- 2) 鬼頭英明・小瀬洋喜・佐藤孝彦・石川哲也, 1982, 魚体内のメタロチオネイン, 生態化学, 5: 21~37.
- 3) 山本義和・井上雅代・小林桂子・永井京子, 1982, ヒメダカに対するカドミムの蓄積に及ぼす水温の影響 -特に弊死個体について-, 生態化学, 5: 15~20.
- 4) 荻野珍吉, 魚類の栄養と飼料 (荻野珍吉編), 1980, 恒星社厚生閣: pp232~242
- 5) H.J.M.Bowen.1966. Trace elements in biochemistry, Acad.Press: pp70~71.
- 6) 鈴木修一・左右田健次, 微量元素と生態, 1987, 秀潤社: pp62~64.
- 7) Takeda, H., and C.Shimizu. 1982. Existence of metallothionein-like protein in various fish tissues. Bull.Japan.Soc.Fish. 48: 711~715.
- 8) Brown, D.A., and T.R.Parsons. 1978. Relationship Between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effect to zooplankton and Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. J.Fish.Res.Board Can. 35: 880~884.
- 9) Leber, A.P. 1974. A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: involvement metallothionein. Ph. Diss. Purdue University, Ann Arbor, Mick.University Microfilms. 72p.
- 10) 富田英夫, 実験動物としての魚類 (江上信雄編), 1981, ソフトサイエンス社: pp129~137.
- 11) 日本規格協会, 1985, 工場排水試験方法, JIS K 0102. pp221~224.