ニジマスの急性カドミウム中毒に対するアスコルビン酸 およびデヒドロアスコルビン酸投与の効果

山 本 義 和・井 上 雅 代

(1985 年 1 月 5 日受理)

Effects of Dietary Ascorbic Acid and Dehydro-Ascorbic Acid on the Acute Cadmium Toxicity in Rainbow trout

Yoshikazu YAMAMOTO* and Masayo INOUE*

This paper deals with the protective effects of dietary L-ascorbic acid (AsA) and dehydro-L-ascorbic acid (DAsA) on acute cadmium toxicity in rainbow trout *Salmo gairdneri*.

Five groups of thirty-five fish, which had been fed on AsA or DAsA-supplemented diets and the AsA and DAsA-free diet for 24 days, were exposed to 0.14 ppm cadmium solution. The survival times of fish fed on diets containing 600 mg/100 g of AsA or DAsA were significantly extended as compared with those of fish fed on AsA and DAsA-free diet. The total-AsA contents in the whole bodies of dead fish were proportional to the survival times of the fish.

These results indicate that large amounts of dietary AsA or DAsA reduce the acute cadmium toxicity in rainbow trout.

著者らは、L-アスコルビン酸 (AsA) をコイやニジマスに経口投与すると、Cd や Cu などの毒性が緩和されることを報告した。¹⁻³⁾ 現在、ビタミン栄養学の領域では、AsA の酸化型であるデヒドロ-L-アスコルビン酸 (DAsA) の生理効果が AsA と比較してどの程度であるかが注目されている。

また、養魚という観点からみると、人工配合飼料に添加された AsA は調製、保存中に酸化されて、かなりの量が DAsA として検出される。したがって、人工配合飼料で養成される養殖魚は DAsA をかなり摂取していると考えられる。そこで本報では、DAsA が AsA と同様に魚類に対する重金属の毒性緩和効果を有するかどうかを知るために、AsA あるいは DAsA 含有量が異なる試験用配合飼料でニジマス稚魚を 24 日間飼育後、Cd に対する急性毒性試験をおこなった。

試料および実験方法

供試魚 滋賀県醒ヶ井養鱒場から入手したニジマス *Salmo gairdneri* の発眼卵を著者の魚類飼育室においてふ化させたのち、市販配合飼料で養成した平均体重 3.0 g のものを供試魚とした。

試験区と飼料組成 供試魚 35 尾ずつを 50 l 容のアクリル水槽 6 個に収容し、I ~ VI 区 (Table 1) とした。I 区には Table 2 に示した AsA および DAsA 無添

Table 1. Test groups

Group	No. of fish	AsA*1 or DAsA*2 contents in the diet	
		AsA (mg/100 g)	DAsA (mg/100 g)
I	35	0	0
II	35	50	0
III	35	600	0
IV	35	0	50
V	35	0	600
VI	35	Commercial diet	

*1 L-Ascorbic acid

*2 Dehydro-L-ascorbic acid

加の基本飼料を、II, III 区には AsA をそれぞれ 50, 600 mg/100 g, IV, V 区には DAsA をそれぞれ 50, 600 mg/100 g 添加した飼料を投与した。なお、DAsA は飼料を調製する直前に AsA 水溶液を臭素酸化して調製した。VI 区には参考のためにニジマス用市販配合飼料を投与した。試験飼料は一度に 3 日分を調製して -20°C で保存し、投与直前に解凍した。投餌量は 1 日当り体重の 4% とし、朝夕 2 回に分けて投与した。飼育水には活性炭で脱塩素した水道水を用いて、流水式で十分に通気した。試験期間中の水温は 18~19°C であった。このような条件下で 24 日間飼育したのち、各試験区の供試魚に対して Cd の急性毒性試験を行った。

* 神戸女学院大学家政学部食物学科 (Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Kobe College, Nishinomiya 662, Japan).

Table 2. Composition of the basal diet

Component	Parts (%)
Milk casein (vitamin-free)	54
Dextrin	16
α -Starch	15
α -Cellulose	4
Soybean oil	3
Cod-liver oil	2
Mineral mixture* ¹	4
Vitamin Mixture* ²	2

*¹ U.S.P. XII Salt mixture No. 2 with trace metals.

*² Vitamin mixture contained (mg/100 g diet): thiamine HCl 6, riboflavin 10, nicotinic acid 40, calcium pantothenate 10, Vitamin B₁₂ 0.01, menadion 5, biotin 0.6, pyridoxine-HCl 4, inositol 400, choline chloride 800, folic acid 1.5, Vitamin A acetate 2000 IU, α -tocopherol 50.

α -Cellulose was used as a carrier for the vitamin mixture.

Cd の急性毒性試験 50 l 容のアクリル水槽 6 個に活性炭で脱塩素した水道水を入れ、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を Cd 濃度が 0.14 ppm (実測値) になるように添加した。この 6 個の水槽に I ~ VI 区の供試魚を移して、1~2 時間毎に死の様子を 53 時間にわたって観察した。供試魚の生死の判定については、呼吸運動が停止し、ガラス棒での物理的刺激に対して反応しなくなった状態をもって死と判定した。死死個体は発見後ただちに取出し、以下の分析に供した。なお、毒性試験中は試験水の換水をおこなわず、水温は 18~19°C であった。

死死個体の Cd の定量 死死個体を発見後ただちに体表面に吸着している Cd を除去するために 10 mM EDTA で洗浄し、濃硝酸-濃過塩素酸 (1:1) で湿式分解して日立 170-30 型原子吸光光度計を用いて Cd 含量を測定した。⁴⁾

死死個体および試験飼料のアスコルビン酸の定量 死死個体については total AsA 量を、試験飼料については AsA と DAsA 量を、ヒドラジン法によって測定した。⁵⁾

結果および考察

試験飼料の AsA および DAsA 含有量 試験飼料に添加した AsA および DAsA は飼料中で酸化あるいは還元される可能性がある。そこで II ~ V 区の試験飼料中の AsA と DAsA の含有量を飼料を調製した当日と 2 日後に測定した (Fig. 1)。AsA を 50 mg あるいは 600 mg/100 g 添加した場合、添加量のそれぞれ約 40% と 8~9% が DAsA として検出された。一方 DAsA を 50 mg あるいは 600 mg/100 g 添加した場合には、添加量のそれぞれ 10~20% と 2~4% が AsA として検出された。なお、飼料を調製した当日と 2 日後では分析値

Fig. 1. Recoveries of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in the test diets. Test diets were stored at -20°C after preparation.

にほとんど差異が認められなかった。したがって、今回の実験条件においては II ~ V 区の供試魚は AsA と DAsA の混合物を摂取したことになる。しかし、AsA あるいは DAsA を 600 mg/100 g 添加の場合にはその大部分が添加した還元型あるいは酸化型の状態で摂取されることがわかる。

体重増加曲線 試験飼料を投与期間中の各試験区の平均体重の変化を Fig. 2 に示した。各試験区とも 24 日間で体重は開始時の 1.3~1.5 倍に増加したが、最も良好な成長を示したのは市販配合飼料を投与した VI 区であった。AsA および DAsA 無添加の I 区も、この期間には良好な成長を示した。

Cd の急性毒性試験 24 日間試験飼料を投与後、各試験区の供試魚 35 尾を Cd 濃度 0.14 ppm の試験水に移して、経時的に死死魚の発生状態を調べた (Fig. 3)。Table 3 には、各試験区の生存時間の平均値と標準偏差を示した。なお、V 区では 53 時間後においても 3 尾が生きていたが、この 3 尾は 53 時間で死死したとして生存時間を計算した。Table 4 には、各試験区間の平均値の有意差を t 検定によって調べた結果を示す。AsA 50 mg/100 g 添加の II 区および DAsA 50 mg/100 g 添加の IV 区では、AsA および DAsA 無添加の I 区と比較して、生存時間に差異が認められなかった。しかし、AsA あるいは DAsA を 600 mg/100 g 添加した III 区と V 区では、I 区に比べて Table 3, 4 から明らかなよ

Fig. 2. Effects of test diets on the body weight increase of rainbow trout. I, II, III, IV, V, and VI represent the test groups shown in Table 1.

Fig. 3. Mortality of rainbow trout exposed to 0.14 ppm cadmium solution.

うに統計的有意差をもって生存時間の延長が認められた。Ⅲ区とⅤ区との比較では、Ⅴ区の方が生存時間が長かった。これらの実験結果から、DAsAもAsAと同様に飼料中に多量に添加した場合には、Cdの急性毒性

に対して緩和効果を示すことがわかった。

なお、ニジマス用市販配合飼料を投与したⅥ区では、試験用配合飼料を投与したⅠ～Ⅴ区よりもかなり早く斃死した。このことはAsAやDAsA以外の飼料成分も

Table 3. Average survival times of test groups

Group	Survival time* ¹ (h)
I	33.5±4.9
II	34.7±5.2
III	36.5±5.6
IV	35.6±5.2
V	40.7±6.1* ²
VI	29.5±4.1

*¹ Values are expressed as mean±S.D. for 35 fish.*² Contain 3 fish survived for 53 h.

Table 4. Results of "t test" between test groups shown in Table 3

	II	III	IV	V	VI
I	1.13	2.32* ¹	1.63	5.46* ²	3.72* ²
II		1.30	0.61	4.26* ²	4.61* ²
III			0.71	2.91* ²	5.86* ²
IV				3.66* ²	5.29* ²
V					8.78* ²

*¹ $P < 0.05$, *² $P < 0.01$.

Cd の急性毒性に対して影響を及ぼすことを示している。今回の実験からはその成分を推測できないが、Cd の毒性緩和効果を有する栄養素として、タンパク質、Ca, Fe, Cu, Zn, Se などが知られている。⁹⁾

斃死個体の total AsA 含有量と生存時間との関係 各試験区における斃死個体の total AsA 含有量を Fig. 4 に示した。AsA, DAsA 無添加の I 区と市販配合飼料を投与した VI 区の total AsA 含有量は、他の試験区に比べて低い値を示した。II 区および IV 区の total AsA 含有量は 85 µg/g 前後、III 区および V 区の total AsA

Fig. 4. Total ascorbic acid contents in the whole bodies of dead fish. Results were expressed as mean±S.D. for 7 fish.

含有量は 105 µg/g 前後であり、AsA 投与と DAsA 投与の差異はほとんど認められなかった。投与量 50 mg/100 g と 600 mg/100 g との間にはわずかな相違しか認められなかったが、これは total AsA の体内飽和量に限界があるためと考えられる。なお、今回おこなった魚体の total AsA 含有量の測定においては、アスコルビン酸のオサゾンを経アルミナカラムで精製しなかった。したがって、AsA, DAsA およびジケト-L-グルコン酸以外のオサゾンも定量している可能性がある⁵⁾ので、Fig. 4 に示した値は真の total AsA 含有量よりも少し高いと思われる。

斃死個体の total AsA 含有量とその個体の生存時間との関係を I ~ V 区の供試魚について調べた (Fig. 5)。total AsA 含有量 (y) と生存時間 (x) との関係は $y = 1.95x + 11.28$, $r = 0.36$ で表わされ、両者に正の相関性が認められた。このことは、生体が保持している total AsA 含有量が多い個体ほど、Cd の急性毒性に対する抵抗性が大きい傾向にあることを示している。

Fig. 5. Relation between survival times and total ascorbic acid contents in the whole bodies of dead fish.

斃死個体の Cd 蓄積量と生存時間との関係 各試験区における斃死個体の Cd 蓄積量を Table 5 に示した。生存時間の延長が認められた III 区と V 区では、他の試験区よりも Cd 蓄積量が大であった。このことから、AsA および DAsA が有する Cd の急性毒性緩和効果は、生体への Cd の蓄積を抑制する作用によるのではないと考えられる。

斃死個体の Cd 蓄積量 (y) と、その個体の生存時間 (x) との関係を I ~ V 区の供試魚 85 尾について調べると、 $y = 0.0077x + 0.0599$, $r = 0.518$ の関係式が成立し、両者に明らかな相関性が認められた (Fig. 6)。このこと

Table 5. Cadmium content in the whole body of dead fish

Group	Cd content* ¹ ($\mu\text{g/g}$ body weight)
I	0.31 ± 0.11 (17)
II	0.31 ± 0.09 (16)
III	$0.37 \pm 0.03^{*2}$ (17)
IV	0.33 ± 0.06 (17)
V	$0.41 \pm 0.08^{*2}$ (18)
VI	0.37 ± 0.06 (17)

*¹ Results were expressed as mean $\pm$ S.D. for 16~18 fish.*² Significantly higher than group I, II, and IV. ($P < 0.05$) **Fig. 6.** Relation between survival times and cadmium contents in the whole bodies of dead fish.

は、生存時間が延長する程、供試魚が Cd と接触する時間も長くなり、体内に取り込む Cd 量が増加した結果と解釈できる。Ⅲ区およびⅤ区においても生存時間が延長した結果、生存時間の短い他の試験区よりも Cd 蓄積量が高くなったと考えられる。

以上の実験結果から、DAsA をニジマスに多量投与した場合にも AsA と同様に Cd の急性毒性が緩和されることがわかった。AsA が有する Cd 中毒の緩和機構については不明な点も多いが、AsA は消化管からの Cd の吸収に影響を与えないが、⁷⁾ AsA には Fe の生体内

での利用を促進する効果があるため、Cd 中毒によって発生する Fe 欠乏性の貧血症を防ぐ^{8,9)}ことが知られている。しかしながら、本報で明らかになったニジマスの急性 Cd 中毒に対する AsA および DAsA の効果についての作用機構は不明である。著者らは魚類に ¹⁴C でラベルした DAsA を投与すると生体内でその一部は還元され、肝臓や腎臓に GSH を水素供与体とする DAsA 還元酵素が存在することを明らかにしている。^{10,11)}したがって、ニジマスに経口投与した DAsA が生体内で還元されて、それが生理効果を発揮するのか、あるいは DAsA そのものが生体内で生理効果を有するのか関心がもたれる。この点については今後の研究課題にしたい。

謝 辞

本研究には神戸女学院大学の鹿島直子、尾上直子、酒井雅代、関口千恵美の諸姉の協力を得た。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 山本義和・石井知幾・佐藤 守・池田静徳：日水誌，**43**，989-993 (1977)。
- 2) 山本義和・早山萬彦・池田静徳：日水誌，**47**，1085-1089 (1981)。
- 3) 山本義和・井上雅代：神戸女学院大学論集，**29**，99-106 (1982)。
- 4) 山本義和・井上雅代・小林桂子・永井京子：生態化学，**5**(2)，15-21 (1982)。
- 5) 池田静徳・佐藤 守・木村良太郎：日水誌，**29**，757-764 (1963)。
- 6) I. BREMNER: in "The chemistry, biochemistry and biology of cadmium" (ed. by M. WEBB), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979, pp. 185-193.
- 7) V. LYALL, V. P. S. CHAUHAN, A. K. SARKAR, and R. NATH: *Toxicol Letters*, **9**, 403-407 (1981)。
- 8) M. R. S. FOX, R. M. JACOBS, A. O. L. JONES, B. E. FRY, JR., and C. L. STONE: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **355**, 249-261 (1980)。
- 9) T. SUZUKI and A. YOSHIDA: *Am. J. Clin. Nutr.*, **31**, 1491-1498 (1978)。
- 10) Y. YAMAMOTO, M. SATO, and S. IKEDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 53-57 (1977)。
- 11) Y. YAMAMOTO, M. SATO, and S. IKEDA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 59-67 (1977)。