カドミウム曝露コイの重金属体内分布

池田 弥生,^{*1} 小山 次朗,^{*2} 尾崎 久雄^{*1}

(1986 年 5 月 13 日受理)

Heavy Metal Levels in Tissues of Fish Exposed to Cadmium

Yayoi Ikeda,^{*1} Jiro Koyama,^{*2} and Hisao Ozaki^{*1}

The present study was carried out to determine Cd, Zn and Cu levels in various tissues and to examine their correlation to and effects on alkaline phosphatase activity. Carp (*Cyprinus carpio*, 131 g in mean body weight) were exposed to Cd (0, 2, 10 and 42 $\mu\text{g/l}$) for 15, 29, 64 and 120 days in Exp. I and carp (340 g in mean body weight) were exposed to Cd (0 and 50 $\mu\text{g/l}$) for 14 and 42 days in Exp. II.

In control fish, Cd was not detectable, while Cd levels in tissues showed higher values as exposure days elapsed in higher Cd concentrations. Cd levels were the highest in kidney and second highest in hepatopancreas and gill. Kidney and gill had the highest Zn level in control fish and Zn levels in tissues of Cd exposed fish significantly decreased as exposure days were increased, while Cu levels in hepatopancreas and digestive tract did not change. In hepatopancreas, correlation coefficients between Cd and Zn levels and between Cd level and alkaline phosphatase activity were negative, while positive between Zn level and alkaline phosphatase activity, although the significant correlation at 1% level was rare.

The decrease of Zn level in tissues in Cd exposed carp was considered to be due to replacing Zn with Cd in metallothionein and alkaline phosphatase. Because Cd inhibits alkaline phosphatase activity and the decreased Zn level in hepatopancreas resulted in decreased alkaline phosphatase activity, the decreased alkaline phosphatase activity in hepatopancreas was considered to be due to the increased Cd level and the decreased Zn level.

小山ら¹⁾はカドミウム(以下 Cd と略記)曝露コイの血清および鰓でアルカリ性フォスファターゼ(Al-P)活性が低下することを認め、その原因としてラットでも報告されている²⁾ように、亜鉛(Zn)が関係しているものと推測した。このようにCd曝露した魚類にみられる生理学的変化は体内に吸収されたCdのみでなく、他の重金属とも関係している可能性がある。本研究では2回のCd曝露実験を通じて魚類のCd, Znおよび銅(Cu)の体内分布およびそれぞれの相互関係を調べ、さらにAl-P活性との関係についても検討を加えた。

材料および方法

実験 I 平均体重 131 g のコイ *Cyprinus carpio* を 0, 2, 10 および 42 $\mu\text{g Cd/l}$ の水中で 15, 29, 64 および 120 日間飼育した。飼育終了後各供試魚の鰓、肝臓、腎臓および消化管を摘出した。消化管についてはそ

の内容物を蒸留水で洗い去った後、他の組織と同様に表面の水分をろ紙で取り除き、湿重量を計ってサンプルとした。なお、飼育条件等の詳細については山脇ら³⁾を参照されたい。

実験 II 平均体重 304 g のコイを 0 および 50 $\mu\text{g Cd/l}$ の水中で 14 および 42 日間飼育した。飼育終了後各供試魚の肝臓および消化管を摘出し、消化管についてはその内部を蒸留水で洗い、110°C で乾燥後、重量を求めサンプルとした。なお、飼育条件等の詳細については小山ら¹⁾を参照されたい。

各サンプルは硝酸・過塩素酸で湿式灰化した後、JIS K 0102⁴⁾ の操作に従ってジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム、酢酸 *n*-ブチルで各重金属の抽出を行い、溶媒噴霧によって測定した。なお、実験 I では各組織中の単位湿重量当りの Cd および Zn 含量、実験 II では単位乾燥重量当りの Cd, Zn および Cu 含量を求め

^{*1} 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan).

^{*2} 栃木県公害研究所 (The Tochigi Prefectural Research Institute for Environmental Pollution, Sakura, Utsunomiya, Tochigi 320, Japan).

Table 1. Cadmium level in organs of cadmium exposed carp

($\mu\text{g/g}$ wet weight)

Organ	Exposure days	Control	2 ppb	10 ppb	42 ppb
Gill	15	ND* ¹ (5)	4.9 $\pm$ 2.3* ² (5)* ³	3.1 $\pm$ 3.3 (5)	8.3 $\pm$ 6.7 (5)
	29	ND (6)	3.8 $\pm$ 1.2 (5)	3.2 $\pm$ 3.5 (5)	17.5 $\pm$ 18.4 (4)
	64	ND (5)	1.4 $\pm$ 0.7 (6)	9.5 $\pm$ 2.8 (5)	—
	120	ND (7)	8.9 $\pm$ 9.0 (8)	20.7 $\pm$ 11.1 (4)	—
Hepatopancreas	15	ND (5)	1.0 $\pm$ 0.3 (5)	2.8 $\pm$ 1.0 (5)	12.0 $\pm$ 4.6 (5)
	29	ND (6)	1.1 $\pm$ 0.7 (5)	0.3 $\pm$ 0.5 (5)	20.5 $\pm$ 7.0 (4)
	64	ND (5)	2.6 $\pm$ 1.1 (4)	5.9 $\pm$ 0.6 (4)	—
	120	ND (6)	3.9 $\pm$ 0.6 (8)	9.9 $\pm$ 2.1 (4)	—
Kidney	15	ND (5)	5.2 $\pm$ 1.3 (3)	10.9 $\pm$ 3.0 (4)	42.1 $\pm$ 11.1 (5)
	29	ND (5)	4.4 $\pm$ 0.7 (5)	17.2 $\pm$ 4.0 (5)	57.8 $\pm$ 14.4 (4)
	64	ND (6)	ND (6)	9.9 $\pm$ 8.1 (4)	—
	120	ND (7)	21.7 $\pm$ 5.0 (8)	43.1 $\pm$ 7.5 (4)	—
Digestive tract	15	ND (5)	ND (5)	1.7 $\pm$ 0.4 (5)	5.3 $\pm$ 1.7 (5)
	29	ND (6)	0.6 $\pm$ 0.6 (5)	ND (5)	3.0 $\pm$ 4.1 (4)
	64	ND (5)	1.2 $\pm$ 0.4 (4)	2.3 $\pm$ 0.2 (4)	—
	120	ND (6)	1.1 $\pm$ 0.4 (8)	2.4 $\pm$ 0.3 (4)	—

*¹: Non detectable.*²: Mean $\pm$ SD.*³: Number of fish.

Table 2. Zinc level in organs of cadmium exposed carp

($\mu\text{g/g}$ wet weight)

Organ	Exposure days	Control	2 ppb	10 ppb	42 ppb
Gill	15	260 $\pm$ 194* ¹ (5)* ²	239 $\pm$ 87 (5)	261 $\pm$ 174 (5)	229 $\pm$ 67 (5)
	29	286 $\pm$ 76 (6)	290 $\pm$ 120 (5)	215 $\pm$ 130 (5)	247 $\pm$ 89 (4)
	64	453 $\pm$ 78 (5)	260 $\pm$ 100 (5)* ⁴	271 $\pm$ 110 (5)* ³	—
	120	220 $\pm$ 80 (7)	156 $\pm$ 48 (8)	156 $\pm$ 60 (4)	—
Hepatopancreas	15	152 $\pm$ 106 (5)	135 $\pm$ 54 (5)	135 $\pm$ 43 (5)	158 $\pm$ 48 (5)
	29	106 $\pm$ 27 (6)	123 $\pm$ 51 (5)	141 $\pm$ 86 (5)	169 $\pm$ 58 (4)* ³
	64	187 $\pm$ 42 (5)	185 $\pm$ 13 (4)	139 $\pm$ 62 (4)	—
	120	151 $\pm$ 50 (6)	84 $\pm$ 49 (8)* ³	66 $\pm$ 11 (4)* ³	—
Kidney	15	403 $\pm$ 285 (5)	431 $\pm$ 390 (4)	318 $\pm$ 159 (4)	323 $\pm$ 138 (4)
	29	367 $\pm$ 301 (6)	321 $\pm$ 104 (5)	252 $\pm$ 87 (5)	434 $\pm$ 264 (4)
	64	231 $\pm$ 88 (5)	184 $\pm$ 69 (5)	147 $\pm$ 45 (4)	—
	120	365 $\pm$ 248 (7)	295 $\pm$ 126 (8)	307 $\pm$ 106 (4)	—
Digestive tract	15	212 $\pm$ 227 (5)	230 $\pm$ 104 (5)	226 $\pm$ 101 (5)	224 $\pm$ 28 (5)
	29	218 $\pm$ 89 (6)	354 $\pm$ 256 (5)	217 $\pm$ 95 (5)	317 $\pm$ 163 (4)
	64	139 $\pm$ 45 (5)	121 $\pm$ 27 (5)	103 $\pm$ 17 (4)	—
	120	302 $\pm$ 48 (6)	229 $\pm$ 85 (8)	224 $\pm$ 43 (4)* ³	—

*¹: Mean $\pm$ SD.*²: Number of fish.*³: Significantly different from control ($P<0.05$).*⁴: Significantly different from control ($P<0.01$).

た。使用した試薬は、硝酸およびアンモニア水が有害金属測定用、過塩素酸、クエン酸アンモニウムおよびメタクレゾールパープルが特級、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムおよび酢酸 *n*-ブチルが原子吸光分析用であり、いずれも和光純薬工業 K. K. 製のものをを用いた。なお、酢酸 *n*-ブチルの添加量を 20 ml とし、これを原子吸光度計 (日立 180-30 型) にかけた時、各重金属の濃度が 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 未満となった場合、これを検出

限界未満とし、不検出 (ND) と表示した。

結 果

実験 I Table 1 に示すように対照区では全組織に Cd は検出されなかった。一方、Cd 曝露区では 15 日目の 2 ppb 区および 29 日目の 10 ppb 区の消化管と 64 日目の 2 ppb 区の腎臓を除いてすべての組織で Cd が検出された。なお、42 ppb 区では 29 日目までには

Table 3. Correlation coefficient between cadmium and zinc level in organs of cadmium exposed carp

	Exposure days	
	0-120	64-120
Gill	-0.191 (73)* ¹	-0.301 (33)
Hepatopancreas	0.082 (71)	-0.522* ² (31)
Kidney	0.064 (70)	0.117 (33)
Digestive tract	-0.112 (71)	-0.327 (31)

*¹: Number of fish.*²: Significant ($P < 0.01$).

とんどの個体が死亡したため、それ以降の実験を中止した。組織別にみた場合、Cd 含量の最も高いのは腎臓であり、次いで鰓あるいは肝臓となり、最も低いのは消化管であった。各組織とも Cd 曝露濃度の増加に伴って Cd 含量の増加する傾向がみられた。また、腎臓および 10 ppb 区の鰓では 120 日目まで Cd 含量は増加し続けたが、それ以外の組織の Cd 含量は 64 日目まで増加傾向にあり、それ以降はほとんど増加しなかった。

各曝露区の組織別 Zn 含量は、Table 2 に示すとおりであった。対照区の値でみると、Zn 含量の最も高い組織は腎臓であり、他の組織ではその多少の順位に一定の傾向がみられなかった。各曝露区とも 15 および 29 日目まで各組織の Zn 含量は対照区に比較して有意差

を示すものはほとんどなく、一定の変動傾向は認められなかった。しかし、64 および 120 日目には各組織とも低下傾向を示し、特に 64 日目の 2 および 10 ppb 区の鰓、120 日目の 2 および 10 ppb 区の肝臓と 10 ppb 区の消化管で対照区に比較して有意な低下がみられた。

各組織の Cd および Zn 含量の相関係数は Table 3 に示すとおりであった。腎臓の相関係数は 0.064 および 0.117 で正の値であったが小さな値であった。その他の組織の相関係数はほとんど負の値であり、曝露期間の長い 64 および 120 日目のデータから相関係数を求めた場合、その値の高くなる傾向が認められ、特に肝臓では $r = -0.522$ と比較的高い値となった。

実験 II 肝臓および消化管の Cd, Zn および Cu 含量は、Table 4 に示すとおりであった。両組織とも対照区では Cd は検出されなかったが、Cd 曝露区では検出され、肝臓に比較して消化管で高い Cd 含量が認められた。また、肝臓中 Cd 含量は曝露期間 14 日間と 42 日間とは差がなく、消化管 Cd 含量は後者の平均値が前者の約 3 倍であった。

両組織の Zn 含量は、14 日目の結果では Cd 曝露区で増加傾向が認められたが有意な変動ではなかった。一方、42 日目には逆に低下傾向がみられ、特に肝臓では Cd 曝露区で対照区に比較して有意な低下が認められ

Table 4. Cadmium, zinc and copper levels in hepatopancreas and digestive tract of cadmium exposed carp ($\mu\text{g/g}$ dry weight)

Exposure days	14 days			64 days		
	Cd	Zn	Cu	Cd	Zn	Cu
Hepatopancreas						
Control	ND* ¹	201 $\pm$ 85* ²	69 $\pm$ 26	ND	219 $\pm$ 35	29 $\pm$ 16
Cd-exposed	4.7 $\pm$ 3.0	279 $\pm$ 160	50 $\pm$ 30	5.4 $\pm$ 2.4	125 $\pm$ 32* ¹	33 $\pm$ 21
Digestive tract						
Control	ND	338 $\pm$ 111	11 $\pm$ 3	ND	389 $\pm$ 181	10 $\pm$ 2
Cd-exposed	10.7 $\pm$ 10.6	493 $\pm$ 142	14 $\pm$ 6	30.0 $\pm$ 16.0	293 $\pm$ 127	12 $\pm$ 3

*¹: Non detectable.*²: Mean $\pm$ SD ($n = 6$).*³: Significantly different from control ($P < 0.001$).**Table 5.** Correlation coefficient between cadmium, zinc and copper levels and alkaline phosphatase (Al-P) activity in hepatopancreas of cadmium exposed carp

	Zinc	Copper	Al-P activity
Cadmium	-0.719* ¹ (12)* ²	0.146 (12)	-0.318 (12)
	-0.270 (22)	-0.088 (22)	-0.191 (22)
Zinc	—	0.191 (12)	0.309 (12)
	—	0.303 (22)	-0.134 (22)
Copper	—	—	0.024 (12)
	—	—	0.220 (22)

The upper values from data of 42-day exposure, under values from those of 14- and 42-day exposure.

*¹: Significant ($P < 0.01$).*²: Number of fish.

Table 6. Correlation coefficient between cadmium, zinc and copper levels in digestive tract of cadmium exposed carp

	Zinc	Copper
Cadmium	-0.144 (12)* ¹ 0.021 (24)	0.313 (12) 0.061 (24)
Zinc	—	-0.063 (12) -0.061 (24)

The upper and under values are in the same manner as Table 5.
*1: Number of fish.

た。また、両組織の Cu 含量は対照区と Cd 曝露区の間有意差を示さず、さらに一定の変動傾向も示さなかった。

肝臓中重金属含量および Al-P 活性値相互間の相関係数は、Table 5 に示すとおりであった。なお、Al-P 活性値は同一個体について小山ら¹¹⁾ が測定した値を用いた。42 日目のデータのみによって算出した相関係数は、14 日および 42 日目のデータから算出したそれよりも高い値を示す傾向が認められた。特に、42 日目のデータのみより算出した Cd-Zn の相関係数は、-0.719 と比較的高い値であった。

消化管中の各重金属含量相互間の相関係数は、Table 6 に示すとおりであった。42 日目のデータのみから算出した Cd-Cu の相関係数にやや高い値がみられるものの、他の値は小さかった。

考 察

魚類に対する Cd 曝露の方法が飼育水への添加である場合、最も高い Cd 含量を示す組織はほとんどの例で腎臓であり、次いで肝臓および鰓である。⁵⁻⁹⁾ 本研究の実験 I でも同様の結果を得ている。一方、Cd を餌に添加して投与、¹⁰⁾ あるいは消化管内に直接注入した場合、¹¹⁾ 最高値を示す組織は消化管、腎臓および肝臓であり、鰓からはほとんど検出されなかった。このように Cd 曝露方法によって Cd 含量の高い組織が一部異なるのは、それぞれの主な吸収部位が異なるためで、飼育水に添加の場合には鰓、餌に添加の場合には消化管であり、したがってそれぞれの組織に比較的多くの Cd 蓄積が起こるためと考えられる。しかし、Cd 水溶液中で飼育した bluegill *Lepomis macrochirus* の生残個体の鰓の Cd 含量が死亡個体のそれより低いこと¹²⁾ および消化管から吸収された Cd が短時間後に鰓に出現し、急激に減少していくこと¹³⁾ から、鰓中 Cd は鰓表面に単に吸着しているのみでなく、内部に吸収された後もすみやかに血液によって他の器官へ運搬されるものと考えられる。また、実験 I, II の結果から、水をほとんど飲まないと言われるコイの消化管からも Cd が検出されたが、これは主に胆汁に由来する Cd が消化管で吸収されたため、¹³⁾ と考

えられ、さらに飲み込んだ少量の水等から吸収したものもその一部を成すと考えられる。

実験 I では 2 および 10 ppb 区で腎臓以外の組織の Cd 蓄積量が、64 日目にはほぼ一定の値を示した。他方、腎臓では実験終了まで Cd 蓄積量は増加し続けた。これは腎臓が Cd を最終的に蓄積する器官であり、他の器官から Cd が移行してくるため、他の組織に比べ Cd 蓄積量が一定に達するのが遅れたものと考えられる。

実験 I および II における組織中の Cd 含量と Zn 含量との相関係数は、腎臓を除いて負の値であり、実験 I では 64 日以上、実験 II では 42 日間の実験期間の長いデータで計算した場合、他に比較してより高い負の相関係数が認められた。さらに Cd 曝露区の各組織中 Zn 含量が対照区に比較して有意に低下した例も認められており、Cd 曝露区の各組織中 Zn 含量は対照区に比較して低下傾向を示しているものと考えられる。同様の現象は 50 µg Cd/l の水中で 3 カ月間飼育したコイ¹⁴⁾、7 mg Cd/l の水中で 72 時間飼育したコイおよび CdCl₂ を 2 mg Cd/kg body wt. の割合で連続 3 日間腹腔内投与したコイ¹⁵⁾ でも認められている。これは Cd 曝露以前からコイ体内に存在したメタロチオネイン¹⁶⁾ および Al-P 中の Zn が Cd と置換したためではないかと考えられる。一方、哺乳動物の知見によると Cd を投与したラットやマウスの血清 Zn 濃度は低下しているものの肝臓あるいは腎臓の Zn 含量は増加すると報告されており、^{2, 17)} 本研究の結果と異なったものとなっているがその原因は明らかではない。

小山ら¹¹⁾ は 50 µg Cd/l の水中で飼育したコイの血清および鰓で Al-P 活性が低下し、これは Al-P の活性化に関係する Zn と Cd が競合関係にあったためではないかと推測した。そこで実験 II の各個体の肝臓について Cd および Zn 含量と Al-P 活性値の相関係数を求めたところ、Table 5 にみられるように Cd-Al-P で $r = -0.318$ 、Zn-Al-P で $r = 0.309$ であり、Al-P に対し Cd は阻害、Zn は促進作用を及ぼすことが示唆された。このことから Cd 曝露区の個体の血清あるいは組織中 Al-P は、その組織中に存在する Cd によって阻害され、また Cd 曝露による組織中 Zn 含量低下によって活性化が抑制され、活性値の低下を招いたものと考えられる。

なお、Cu 含量と Cd、Zn 含量および Al-P 活性値の間には明瞭な関係は認められなかった。

以上のように、Cd 曝露コイに見られた Al-P 活性の変化は、Cd のみならず Zn 含量とも関係していることが推測され、今後魚類に対する Cd 毒性を検討する場合、Zn 等の他の重金属についても注意を要することが明らかとなった。

文 献

- 1) 小山次朗, 山脇啓輔, 舞田正志, 若林慶子, 池田弥生, 尾崎久雄: 日水誌, **51**, 1255-1260 (1985).
- 2) 佐二木順子, 福島悦子: 衛生化学, **30**, 309-312 (1984).
- 3) 山脇啓輔, 橋本 互, 藤井清文, 小山次朗, 池田弥生, 尾崎久雄: 日水誌, **52**, 459-466 (1986).
- 4) 日本工業規格協会: 工業排水試験法 JIS K 0102-1981, 日本規格協会, 東京, pp. 152-163.
- 5) D. A. Benoit, E. N. Leonard, G. M. Christensen, and J. T. Fiandt: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **105**, 550-560 (1976).
- 6) J. G. Eaton: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **103**, 729-735 (1974).
- 7) F. Noël-Lambot and J. M. Bouquengneau: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **18**, 418-424 (1977).
- 8) D. G. Thomas, A. Cryer, J. F. De L. G. Solbe, and J. Kay: *Comp. Biochem. Physiol.*, **76C**, 241-246 (1983).
- 9) H. Kumada, S. Kimura, M. Yokote, and Y. Matida: *Bull. Freshwater Res. Lab.*, **22**, 157-165 (1973).
- 10) 板沢靖男, 小山次朗: 日水誌, **44**, 891-895 (1978).
- 11) D. W. Rowe and E. J. Massar: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **11**, 244-249 (1974).
- 12) D. I. Mount and C. E. Stephan: *J. Wildlife Management*, **31**, 168-172 (1967).
- 13) 小山次朗: 水生生物と重金属 [2] カドミウム, 尾崎久雄監修, サイエнтиスト社, 東京, 1982, pp. 92-94.
- 14) S. Muramoto: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **25**, 828-831 (1980).
- 15) 鬼頭英明, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦, 石川哲也, 永瀬久光: 衛生化学, **30**, 183-188 (1984).
- 16) 鬼頭英明, 小瀬洋喜, 佐藤孝彦, 石川哲也: 生態化学, **5**(2), 21-37 (1982).
- 17) 佐藤勝昌, 坂口早苗, 坂口武洋, 渡辺隆司, 松平清治: 日本公衛誌, **32**, 8-16 (1985).