コイにおけるカドミウムの腸管吸収

山脇啓輔, 小山次朗, 池田弥生, 尾崎久雄

(1985 年 7 月 5 日受理)

Cadmium Absorption by the Intestine of Carp

Keisuke Yamawaki,*¹ Jiro Koyama,*² Yayoi Ikeda,*¹
and Hisao Ozaki*¹

Intestinal absorption of cadmium (Cd) *in vitro* was measured using perfused intact segments of carp *Cyprinus carpio* (about 470 g in body weight) intestine. Cd absorption rate at 25°C was about three times higher in posterior than in anterior segment. Absorption rate varied in proportion to Cd concentrations of 0.5 and 1.0 µg/ml in the medium. But such proportion was not seen in other concentrations (1.5 and 1.8 µg/ml). No difference in Cd absorption was noted between pH 7.3 and 9.3 of the media. However, absorption rate was approximately two times higher in the medium of pH 5.3 than in other media (pH 7.3 and 9.3). Absorption and transport increased remarkably with the rising of medium temperature from 5 to 25°C, and calculated Q_{10} values were in the range of 2.2 to 2.5. Inhibition in Cd absorption was seen and the inhibitory rate was about 30% using the following agents; 2,4-dinitrophenol (DNP), ouabain, florigin and *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB).

These results suggest that diffusion and active transport were involved in the process of Cd absorption in carp intestine.

従来の魚類に対するカドミウム (以下 Cd と略記) の薬理作用の研究は、主にその毒性に関するものであって、毒性の機序に関する研究は少ない。また、Cd 曝露の研究でも水溶液中におけるものが多く、経口投与によるものは少ない。水に溶存した Cd は、主に鰓からの吸収により魚体に作用すると考えられる。一方、淡水魚でも水を飲むこと、Cd を高濃度に蓄積した水生生物を餌料として摂取する場合もありうることなどから、Cd の経口摂取も考えられる。しかし、魚類の腸管からの Cd 吸収機構に関する研究はほとんど行われていない。本研究は、コイの反転腸管を用いて、*in vitro* における Cd の吸収機構を調べたものである。

材料及び方法

供試魚には体長 26 cm, 体重 470 g 平均のコイ *Cyprinus carpio* を用い、実験は 1~3 月に行った。この間の飼育水温は 9~12°C であった。供試魚は延髄を切断して即殺後、直ちに腸管を取り出し、その前部 1/3 あるいは後部 1/3 を用いた。腸管は摘出後、生理食塩水で洗浄、重量を測定した後、反転した。この腸管を、あらかじめガラス管の先端まで淡水魚用リンゲル液を満たした

Fig. 1 の灌流装置に装着し、次いで所定の濃度となるように塩化カドミウム $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ を溶解した生理食塩水 (0.75% NaCl 水溶液を NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 で pH 7.3 に調整したもの) を粘膜側 (Fig. 1 の A) に注入した。実験中生理食塩水 (A) に通気し、灌流装置は恒温槽中に置いて所定の温度に保持した。実験開始後 30 分間隔で採水管 (B) から粘膜側溶液を採取して、Cd 定量用試料とした。灌流は 3 時間行い、漿膜側の灌流速度は Wood *et al.*¹⁾ がニジマス *Salmo gairdneri* で求めている血流速度を参考にした。灌流終了後腸管は生理食塩水で 2~3 回洗浄して Cd 測定時まで -20°C で凍結保存した。

採取した粘膜側溶液中の Cd の定量は、原子吸光度計 (島津 AA-640-01 型) を用いて直接噴霧法により行った。また、腸管は低温灰化装置 (International Plasma Corp. 社製 1101 型) で灰化後、 HNO_3 に溶解し、酢酸 *n*-ブチルで抽出した後、上記の方法で Cd 量を定量した。

結果の表示は、粘膜側の Cd 濃度の低下量と液量から Cd 消失量を求め、それを腸管湿重量で割ったものを吸収量とし、この値からさらに組織内蓄積量を減じたもの

*¹ 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7, Minato, Tokyo 108, Japan).

*² 栃木県公害研究所 (The Tochigi Prefectural Research Institute for Environmental Pollution, Sakura 2-2-28, Utsunomiya, Tochigi 320, Japan).

Fig. 1. Perfusion apparatus for carp intestine segment. Mucosal solution (A) containing Cd was sampled every 30 min during 3 h perfusion period through B.

を輸送量とした。

以上の方法により, 次の事項を検討した。

(1) 腸管の部位による差をみるために, 同一個体の腸管前部と後部での Cd 吸収量を 5 個体について調べた。粘膜側の生理食塩水中の Cd 濃度は $0.5 \mu\text{g/ml}$ とし, 25°C 下で灌流した。

(2) 粘膜側生理食塩水中の Cd 濃度を $0.5, 1.0, 1.5, 1.8 \mu\text{g/ml}$ とかえた時の吸収量を比較した。腸管は前部を用い, 25°C 下で各濃度とも 5 例ずつ調べた。さらに, 灌流終了後, 腸管組織内に蓄積された Cd 量も測定した。

(3) pH による吸収量の差異をみるため, $0.5 \mu\text{g/ml}$ の Cd を含む溶液の pH を, 0.01 M の HCl または NaOH 水溶液を用いて, $5.3, 7.3$ 及び 9.3 に調整し, 25°C 下で腸管前部を用い, それぞれ 5 例について調べた。

(4) 温度の影響をみるために, 腸管前部を用い, Cd 濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 液からの吸収を, $5, 15$ 及び 25°C について, それぞれ 5 例ずつ調べた。なお, 灌流終了後, 腸管組織内の Cd 量も測定した。

(5) 吸収機構を調べるため, 種々の代謝阻害剤を用いた。実験には腸管前部を用い, Cd 濃度は $0.5 \mu\text{g/ml}$ で 25°C に設定し, 灌流開始 30 分後に以下の代謝阻害剤を粘膜側生理食塩水中に加え, 他の実験と同様 30 分毎に試料を採取した。用いた代謝阻害剤及びその使用濃度は, 2,4-ジニトロフェノール (以下, DNP と略記, 東京化成工業製) の 10^{-4} 及び 10^{-3} M , ウアパイン (メルク社製) の 10^{-6} 及び 10^{-4} M , フロリジン (半井化学薬

品製) の $4.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 及びパラクロルマーキュリー安息香酸 (以下, PCMB と略記, 東京化成工業製) の 10^{-5} M である。なお, いずれの場合もそれぞれ 5 例ずつ調べた。

結果及び考察

腸管の部位による差 結果は, Fig. 2 に示した。灌流開始後 30 分では腸管前部, 後部とも Cd 吸収量にほとんど差は認められなかったが, その後は腸管後部の吸収量が直線的に増加しているのに対し, 前部の吸収量は少なく, 3 時間後の結果では 3 倍以上の差がみられた。

児島ら²⁾は, Cd の腸透過速度が部位によって異なり, 腸上部の方が大きいことをラットでみている。Fe についても哺乳類では同様のことが報告されている。³⁾ この部位による差は, 胃酸の影響が残されているために吸収を促進すること,³⁾ 腸上部の粘膜表面にはメタロチオネイン様の SH タンパクがあり, これが重金属と結合するため吸収を増大させること⁴⁻⁶⁾ などによると考えられる。

本結果は哺乳類の結果とは異なったが, コイには胃がないため, 腸上部でも酸性にならないことが主な原因と考えられる。また, 魚類の腸管後部は, 哺乳類と同様に水の吸収や内容物の濃縮化と糞の形成を行う部位であり,⁷⁾ この時 Cd の吸収があること, また, コイの大腸あるいは直腸と呼ばれる部位が哺乳類のそれらのように分化しておらず, 種々の物質の吸収能力があること等が考えられる。

Fig. 2. Absorption of Cd in anterior and posterior intestine segments using $0.5 \mu\text{g/ml}$ Cd in media adjusted to pH 7.3 at 25°C . Results were presented as mean $\pm$ S.E. from 5 samples.

Fig. 3. Effect of medium Cd concentration on absorption and transport in anterior intestine segment after 3 h perfusion at 25°C. Media pH were adjusted to 7.3. Mean $\pm$ S.E. (N=5).

Table 1. Effect of medium Cd concentration on absorption, transport and tissue content of Cd in anterior intestine segment after 3 h perfusion at 25°C. Media pH were adjusted to 7.3. Results were presented as mean $\pm$ S.E. from 5 samples

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorption ($\mu\text{g/g wet tissue}$)	(%)	Transport ($\mu\text{g/g wet tissue}$)	(%)	Tissue content ($\mu\text{g/g wet tissue}$)	(%)
0.5	5.75 $\pm$ 0.45	100	4.91 $\pm$ 0.22	84.7	0.84 $\pm$ 0.05	15.3
1.0	8.98 $\pm$ 0.69	100	6.94 $\pm$ 0.62	77.3	2.07 $\pm$ 0.21	22.7
1.5	10.05 $\pm$ 0.97	100	7.84 $\pm$ 0.72	78.3	2.21 $\pm$ 0.36	21.7
1.8	12.72 $\pm$ 1.36	100	8.35 $\pm$ 1.25	64.9	4.38 $\pm$ 0.57	35.1

Cd 濃度の影響 Fig. 3 をみると, Cd 濃度が 0.5–1.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では腸管湿重量当りの吸収量と濃度との間には, ほぼ比例関係が認められたが, それ以上の濃度では濃度の増加につれて吸収量は限界値に近づく傾向が認められた。灌流開始後 3 時間の間に腸管組織中に取り込まれた Cd 量は, Cd 濃度が増すと共に増加する傾向が認められた (Fig. 3 及び Table 1)。組織蓄積率は, Table 1 に示したように 15.3~35.1% の範囲であった。

本実験結果では Cd 濃度が増すにつれて Cd 吸収量は次第に一定値に近づく傾向がみられた。曲線を外挿してみると, Cd 濃度が約 3.2 $\mu\text{g/ml}$ のところで吸収量は一定値になった。同様の現象はラットにおいてもみられている。^{8,9)} 一般に拡散では輸送速度が基質濃度に対して直線性を示すことがラットの反転腸管による Cd 吸収⁹⁾ やニジマスの灌流鰓¹⁰⁾ でみられている。

高濃度のところで吸収速度が小さくなった原因として, 一つには Cd の組織に対する薬理作用のため吸収能が低下したこと, また, 腸管組織の Cd 吸収能と運搬能

に限界があるということ等が考えられる。

pH の影響 結果は, Fig. 4 に各時間における Cd 吸収量の回帰直線で示した。pH 7.3 と 9.3 での吸収量はほぼ同じであったが, pH 5.3 での吸収量は著しく大きく, pH 7.3 と pH 9.3 の値に比較して 2 時間後で 1.5 倍, 3 時間で 2 倍に達した。このように pH が酸性側の時に明らかに Cd 吸収が増大することは, 鉄などの金属イオンの吸収が pH の低い時に促進されることや, ヒトで胃切除後に貧血症が多くみられること等から, Cd も他の金属イオンと同様に溶液中の pH が酸性側の時にイオンの解離定数が大きくなるため, 吸収量が増大するものと推測される。しかし, 低い pH 下では組織障害が起こるために吸収が促進されるという報告¹¹⁾ もあり, また, コイの腸管は酸性に馴れていないことなども考え併せると, 組織障害を完全に否定することもできない。

温度の影響 Fig. 5 にみられるように, 温度が上がるにつれて Cd の吸収量は増大した。灌流開始初期には腸管の切断, 装着による取扱いの影響が考えられるので,

Fig. 4. Effect of pH on mucosal Cd absorption in anterior intestine segment using 0.5 µg/ml Cd in media at 25°C. Mean $\pm$ S.E. (N=5).

最初の0.5時間を除いて各時刻におけるCd吸収量の温度係数を求めると、どの温度の組合せでも $Q_{10}=2.2\sim 2.5$ であった。また、腸管に蓄積したCd量 (Table 2) をみると15°Cと25°Cの間には差が認められなかったが、5°Cではこれらの半分以下であった。以上の結果より、コイの腸管からのCd吸収は温度に依存しており、何らかの生化学的機序が関与している可能性が示唆された。また、腸管組織のCd蓄積量が高温の方が多いこと、漿膜側灌流液中への移行が高温ほど高いことなども、Cd吸収とその後の腸管内での運搬に温度効果があることを示している。

代謝阻害剤による影響 酸化的リン酸化の阻害剤であるDNPを添加後0.5時間 (灌流開始後1時間) では、 10^{-4} Mと対照の間には有意差が認められなかったが、 10^{-3} MではCd吸収が抑制される傾向がみられた。添加後2.5時間後には 10^{-4} Mで27.2%、 10^{-3} Mで31.8%が抑制された。

Fig. 5. Effect of temperature on mucosal Cd absorption in anterior intestine segment using 0.5 µg/ml Cd in media (pH 7.3). Mean $\pm$ S.E. (N=5).

ATPaseの阻害剤であるウアバインでもCd吸収は抑制されたが、 10^{-4} Mの方が抑制は強かった。添加2.5時間後の抑制率は 10^{-8} Mで8.7%、 10^{-4} Mで23.5%であり、濃度が100倍になると抑制率は約3倍に増加した。

六単糖のリン酸化を阻害するフロリジンの抑制率は、添加2.5時間後で11.7%であった。SH基阻害剤であるPCMBの抑制率は、添加後2.5時間で17.2%であった。

腸管のCd吸収がDNP及びウアバインによって抑制されることから、腸管のCd吸収はそのエネルギーの一部を酸化的リン酸化によって生ずるATPに負っているものと考えられる。

Cordier *et al.*¹²⁾ は *Tinca vulgaris* の *in situ* の腸管での糖吸収に対して phlorizoside が抑制効果を持つことから、六単糖の吸収にリン酸化過程が介在することを推測している。同様にコイの腸管からのCd吸収もリン酸化と関係のあることがうかがわれる。

PCMBは、Cd吸収を部分的に抑制した。このことはCd吸収にSH基が何らかの形で関与していると推測さ

Table 2. Effect of temperature on absorption, transport and tissue content of Cd in anterior intestine segment after 3 h perfusion using 0.5 µg/ml Cd in media (pH 7.3). Mean $\pm$ S.E. (N=5).

Temp. (°C)	Absorption		Transport		Tissue content	
	(µg/g wet tissue)	(%)	(µg/g wet tissue)	(%)	(µg/g wet tissue)	(%)
5	2.08 $\pm$ 0.20	100	1.63 $\pm$ 0.25	79.4	0.41 $\pm$ 0.03	20.6
15	3.41 $\pm$ 0.67	100	2.49 $\pm$ 5.03	70.7	0.85 $\pm$ 0.10	29.3
25	5.75 $\pm$ 0.45	100	4.91 $\pm$ 0.22	84.7	0.84 $\pm$ 0.05	15.3

Table 3. Influence of various inhibitors: 2,4-dinitrophenol (DNP), ouabain, florizine and *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB), on mucosal Cd absorption in anterior intestine segment using 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Cd in media (pH 7.3) at 25°C. Values ($\mu\text{g/g}$ wet tissue) are given mean $\pm$ S.E. ($N=5$)

Inhibitor	Conc. (M)	Incubation time (h)						
		0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
DNP	0 (control)	0	1.31 $\pm$ 0.16	2.28 $\pm$ 0.30	3.17 $\pm$ 0.22	3.72 $\pm$ 0.13	4.60 $\pm$ 0.12	5.52 $\pm$ 0.10
	10 ⁻⁴			2.19 $\pm$ 0.22	2.37 $\pm$ 0.11	2.86 $\pm$ 0.06	3.40 $\pm$ 0.15	3.97 $\pm$ 0.26
	10 ⁻³			1.81 $\pm$ 0.14	2.25 $\pm$ 0.13	2.83 $\pm$ 0.08	3.21 $\pm$ 0.10	3.77 $\pm$ 0.15
Ouabain	0 (control)	0	1.54 $\pm$ 0.19	2.51 $\pm$ 0.30	3.40 $\pm$ 0.22	3.95 $\pm$ 0.13	4.83 $\pm$ 0.12	5.57 $\pm$ 0.10
	10 ⁻⁶			2.23 $\pm$ 0.14	2.84 $\pm$ 0.09	3.62 $\pm$ 0.29	4.37 $\pm$ 0.22	5.25 $\pm$ 0.10
	10 ⁻⁴			1.87 $\pm$ 0.18	2.36 $\pm$ 0.23	3.05 $\pm$ 0.21	3.67 $\pm$ 0.14	4.39 $\pm$ 0.21
Florizine	0 (control)	0	1.35 $\pm$ 0.25	2.32 $\pm$ 0.30	3.21 $\pm$ 0.22	3.76 $\pm$ 0.13	4.64 $\pm$ 0.12	5.56 $\pm$ 0.10
	4.5 $\times$ 10 ⁻⁵			2.40 $\pm$ 0.33	2.73 $\pm$ 0.24	2.98 $\pm$ 0.10	3.74 $\pm$ 0.22	3.90 $\pm$ 0.13
PCMB	0 (control)	0	1.59 $\pm$ 0.27	2.56 $\pm$ 0.30	3.45 $\pm$ 0.22	4.00 $\pm$ 0.13	4.88 $\pm$ 0.12	5.80 $\pm$ 0.10
	10 ⁻⁵			2.44 $\pm$ 0.29	2.86 $\pm$ 0.11	3.48 $\pm$ 0.21	4.06 $\pm$ 0.16	4.80 $\pm$ 0.15

れ, Evans¹³⁾も消化管からのCu吸収にSH基が関与していると推測している。また、経口投与されたCdも十二指腸粘膜中の高分子化合物と結合する¹⁴⁾といわれ、このCd結合タンパクがCdの吸収に重要な役割を果たしている¹⁵⁾と考えられる。タンパクとCdの吸収がどのような形をとるのかは不明であるが、SH結合もありうるであろう。PCMBによるCd吸収の部分的抑制は、このような吸収過程への作用によると推測される。

以上のように、コイの腸管によるCd吸収機構には拡散の他に能動輸送に依存している部分もあることが明らかとなった。この知見は他の重金属のみならず、Fe, Cu, Mn等の必須金属の吸収機構の解明にも役立つであろう。

文 献

- 1) C. M. Wood, B. R. McMahon, and D. G. McDonald: *Am. J. Physiol.*, **234**, 201-208 (1978).
- 2) 児島昭次, 浄住護雄: 薬学雑誌, **94**, 695-701 (1974).
- 3) S. Granick: *Am. Nat.*, **87**, 65-75 (1953).
- 4) F. A. Suso and H. M. Edwards, Jr.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**, 157-162 (1971).
- 5) M. P. Richards and R. J. Cousins: *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1215-1223 (1975).
- 6) T. Taguchi and S. Suzuki: *Jap. J. Hygiene*, **33**, 467-472 (1978).
- 7) 尾崎久雄, 荒木 公, 小川健二郎: 科学, **25**, 584 (1955).
- 8) B. M. Sahagian, J. Harding-Barlow, and H. M. Perry, Jr.: *J. Nutr.*, **90**, 259-267 (1966).
- 9) E. C. Foulkes: *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **3**, 471-481 (1980).
- 10) P. Pärt and O. Svanberg: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **38**, 917-924 (1981).
- 11) D. Cordier and J. F. Worbe: *C. R. Soc. Biol. Paris*, **151**, 121 (1957).
- 12) D. Cordier and A. Maurice: *C. R. Soc. Biol. Paris*, **154**, 642 (1960).
- 13) G. W. Evans: *Physiol. Rev.*, **53**, 535-570 (1973).
- 14) 田中慶一, 西田香里, 岡原国雄: 衛生化学, **19**, 202 (1973).