メダカ卵のカドミウムイオン蓄積様式

中 川 久 機, 石 尾 真 弥

(1988 年 6 月 15 日受付)

Aspects of Accumulation of Cadmium Ion in the Egg of Medaka *Oryzias latipes*

Hisaki Nakagawa* and Shinya Ishio*

The aspects of Cd^{2+} accumulation by eggs of *Oryzias latipes* were examined when the eggs were exposed to the test solutions of Cd^{2+} concentrations of $4.0 \sim 100 \mu\text{M}$ made with Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} water containing 5 mM Tris buffer solution (pH 8.0). The amounts of Cd^{2+} accumulated by the eggs reached stable levels, depending on the Cd^{2+} concentrations of the test solutions within 24 to 48 hours after exposure. The relationship between the stable Cd levels of eggs and the Cd^{2+} concentrations of test solutions was expressed by the Langmuir's adsorption isotherm. The binding affinity of Cd^{2+} to the binding sites of eggs became weak by the co-existence of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} in the Cd^{2+} test solutions. Consequently, the amounts of Cd^{2+} accumulated by the eggs were lowered. The Cd^{2+} accumulated in the egg was mostly bound to the chorion, while 8.1 to 26.8% of the Cd content of the egg contained in the embryo and yolk.

Thus, Cd^{2+} accumulation in the egg could be explained as the sorption phenomenon characteristic of the simultaneous occurrence of the adsorption of Cd^{2+} to the egg surface and the absorption of Cd through the chorion into the interior parts of the egg.

メダカの卵を種々な濃度のカドミウムイオン (以下, Cd^{2+} と略記) 水に保てば, 卵は急速に Cd^{2+} を蓄積し, 卵の Cd^{2+} 蓄積量は水中の Cd^{2+} 濃度に応じた安定レベルに達した。¹⁾ この現象は Atlantic salmon,^{2,3)} ニン, ^{4,5)} flounder⁶⁾ および garpike⁷⁾ の卵でも同様である。

著者らは, これら魚類の卵の Cd^{2+} 蓄積量が安定レベルに達したところでは, 卵 (Egg) に蓄積した Cd (Egg-Cd) と水中の Cd^{2+} との間には次に示すような平衡関係が成立していると考えた。

ここで, k_1 および k_2 は正反応および逆反応の反応速度定数である。

そこで, 一定温度における吸着量と平衡濃度との関係を表わす式としてよく知られているラングミュアの吸着等温式に, 魚類の卵による Cd^{2+} 蓄積量と平衡 Cd^{2+} 濃度との関係を当てはめてみた。ラングミュアの吸着等温式は気体の固体への吸着現象をあつかった式であるが, 希薄溶液中の溶質の固体への吸着にも適用できる。この

式では吸着剤 1 g に吸着される溶質のモル数 (X) は平衡状態にある希薄溶液中 C の濃度をもつ溶質と次に示す関係を有する。^{8,9)}

$$\frac{1}{X} = \frac{1}{b \cdot X_m} \cdot \frac{1}{C} + \frac{1}{X_m}$$

ここで, X_m は吸着剤 1 g に吸着されて完全な単分子層を作る溶質のモル数を表し, b は吸着定数を示す。

したがって, メダカの卵を吸着剤とすると, 卵 1 個に吸着される Cd^{2+} のモル数, すなわち Cd^{2+} 蓄積量 [Egg-Cd] と平衡状態にある Cd^{2+} 濃度 $[\text{Cd}^{2+}]$ とは次式で表わせる。

$$\frac{1}{[\text{Egg-Cd}]} = \frac{K}{[\text{Egg-Cd}]_{\max}} \cdot \frac{1}{[\text{Cd}^{2+}]} + \frac{1}{[\text{Egg-Cd}]_{\max}} \quad (2)$$

ここで, [Egg] は卵 1 個の Cd^{2+} 結合物質の中で Cd^{2+} と結合していない結合物質の量であり, $[\text{Egg-Cd}]_{\max}$ は卵の Cd^{2+} 結合物質が Cd^{2+} で飽和された場合に得られる卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量, K は反応式 (1) の平衡定数 k_2/k_1 と理解される。

(2) 式は水中の Cd^{2+} 濃度の逆数 $1/[\text{Cd}^{2+}]$ を横軸に, 卵の Cd^{2+} 蓄積量の逆数 $1/[\text{Egg-Cd}]$ を縦軸にとって,

* 九州大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi, Fukuoka 812, Japan).

方眼紙上にプロットすると、直線を与える。そしてこの直線の横軸との交点は $-1/K$, すなわち平衡定数の逆数を、縦軸との交点は $1/[\text{Egg-Cd}]_{\text{max}}$, すなわち卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量の逆数を示す。

本研究ではメダカの卵の Cd^{2+} 蓄積量が水中の Cd^{2+} 濃度の関数として、ラングミュアの吸着等温式に、すなわち (2) 式に従うかどうかを確かめた。また、(2) 式に示した卵の Cd^{2+} 蓄積様式に対するナトリウム、カリウム、カルシウムおよびマグネシウムイオン (以下、 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} と略記) の影響を調べた。

実験方法

供試卵 中川・石尾¹⁾の報告に従って、メダカの胞胚期の供試卵を得た。卵による Cd^{2+} 蓄積に対する Na^+ , K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} の影響を調べた試験の供試卵約 1000 個から、無作為に 10 個の卵を取り、卵径および卵の湿重量を測定した。その平均の卵径は 1.25 ± 0.04 mm, 平均の湿重量は 1.54 ± 0.12 mg であった。

希釈水 1) 九州大学農学部構内の井水を脱イオン水で希釈した EDTA 硬度 130 ppm (CaCO_3) の水, 2) 脱イオン水, 3) 1.0 および 10 mM の Na^+ を含む水, 0.1 および 1.0 mM の Ca^{2+} を含む水を希釈水として用いた。

なお、 Na^+ 水および Ca^{2+} 水、そしてその濃度は以下のような理由で決めた。卵の Cd^{2+} 蓄積量と水中の Cd^{2+} 濃度との関係を示した (2) 式はアルカリ金属イオンである Na^+ および K^+ , アルカリ土類金属イオンである Ca^{2+} および Mg^{2+} によって影響されることが予想される。そこで、 NaCl , KCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ および $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (試薬特級, 和光純薬製) を脱イオン水に溶解し、0.01, 0.1, 1.0 および 10 mM の Na^+ , K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} 水を調製した。これらのイオン水で、Cd として

1 mg/ml の Cd 原液¹⁾を希釈し、トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、20 μM の Cd^{2+} 供試水を調製した。そしてこれら Cd^{2+} 供試水 100 ml に卵 50 個を入れ、24 時間、25°C に保温し、卵の Cd^{2+} 蓄積に対する、 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} 濃度の影響を調べた。その結果を Fig. 1 に示す。 Cd^{2+} 供試水に Na^+ および K^+ が 1.0 mM, Ca^{2+} および Mg^{2+} が 0.1 mM 以上存在すると、卵の Cd^{2+} 蓄積量は低下することが明らかであり、その低下効果は共存イオンの濃度と共に増大した。そしてその低下効果は Na^+ および K^+ よりも Ca^{2+} および Mg^{2+} の方が強く現れた。いずれにしても、 Na^+ および K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} はそれぞれ同様な機構で、卵の Cd^{2+} 蓄積に影響していることが考えられる。以上のことから、(2) 式に対するアルカリ金属およびアルカリ土類金属イオンの影響を試験する場合、 Na^+ の濃度を 1.0 および 10 mM, Ca^{2+} の濃度を 0.1 および 1.0 mM とすることにした。なお、1), 2) および 3) で述べた希釈水は使用前に充分通気した。

供試水の調製 既述の Cd として 1 mg/ml の Cd 原液を希釈水で希釈し、4.0~100 μM の Cd^{2+} 供試水を調製した。供試水はトリス-塩酸緩衝液をトリス (ヒドロキシル) アミノメタンとして 5 mM になるように加え、pH 8.0 に調整した。なお、Cd 原液を希釈水によって希釈し、種々な濃度の Cd^{2+} 供試水を調製する場合、用いた Cd 原液の量によって希釈水のイオン濃度が 0.04~1.1% 薄くなる。本研究では簡単のために、希釈水の濃度は最初に用いた希釈水の濃度で表わした。

卵の Cd^{2+} 蓄積試験 供試水 1 l に、200 個のメダカ胞胚期の卵を入れ、25°C に保温した。24, 48, 72 および 96 時間後に、死卵を除き、50 個ずつの卵を取り上げ、脱イオン水で洗浄後、卵の Cd 含量を測定した。供試水

Fig. 1. Effect of cations for accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes*. The eggs were exposed for 24 hours to different cation solutions with Cd^{2+} concentration of 20 μM and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

は毎日換水した。また、取りあげた卵から卵膜を取り出すには、卵を脱イオン水で洗浄後、時計皿内の少量の脱イオン水中に置き、双眼顕微鏡下にピンセットで卵を割り、内容物を脱イオン水中で洗い、卵膜を得た。

卵および卵膜の Cd 含量の測定 卵および卵膜は王水-過塩素酸により湿式灰化後乾固し、0.5 N 硝酸溶液に溶解した。¹⁾ この溶液を直接原子吸光分析にかけ、Cd

濃度を測定した。念のために、卵 90 個の分解産物の 0.5 N 硝酸溶液に一定量の Cd を添加し、0.5 N 硝酸溶液で 10 ml として、Cd の回収率を調べたが、その回収率は 98~100% であった。本研究では硝酸溶液 10 ml 当り、50 個以下の卵を用いたので、卵の分解産物による Cd 定量の妨害はなかったものと考えられる。

結果および考察

Fig. 2~7 はメダカ卵の Cd^{2+} 蓄積量の経時的变化を示している。供試水が 1.0 mM の Na^+ 含有水の場合、

Fig. 2. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cd^{2+} and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 4. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cd^{2+} , 1.0 mM of Na^+ and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 3. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to well water with different concentrations of Cd^{2+} and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 5. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cd^{2+} , 10 mM of Na^+ and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 6. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cd^{2+} , 0.1 mM of Ca^{2+} and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 7. Accumulation of Cd^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cd^{2+} , 1.0 mM of Ca^{2+} and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Fig. 8. Relationship between the equilibrated Cd contents of eggs of *Oryzias latipes* and ambient Cd^{2+} concentrations.

Fig. 4 に示すように、卵の Cd^{2+} 蓄積量は多少のパラッキが見られたが、いずれの Cd^{2+} 濃度でも卵の Cd^{2+} 蓄積量は 24~48 時間後、平衡値に達した。卵の Cd^{2+} 蓄積量が平衡値に達したところで、供試水中の Cd^{2+} 濃度

の逆数を横軸に、卵の Cd^{2+} 蓄積量の逆数を縦軸にとって、方眼紙上にプロットすると、Fig. 8 に示すような直線関係が得られた。以上のことは、メダカ卵の Cd^{2+} 蓄積量と水中の Cd^{2+} 濃度の間には (2) 式で示される直線

Table 1. Values of $-1/K$ and $1/[Egg-Cd]_{max}$, and consequent values of K and $[Egg-Cd]_{max}$

Dilution water*	$-1/K (\times 10^3)$	$K (\times 10^{-5})$	$1/[Egg-Cd] (\times 10^0)$	$[Egg-Cd]_{max}$ (nmol/egg)
Well water	-0.32	3.10	0.196	5.1
1.0 mM Ca^{2+} water	-0.48	2.08	0.220	5.0
0.1 mM Ca^{2+} water	-0.84	1.19	0.170	5.9
10 mM Na^+ water	-0.98	1.02	0.260	3.9
1.0 mM Na^+ water	-1.72	0.58	0.160	6.1
5 mM Tris buffer	-1.85	0.54	0.140	6.9

* All kinds of dilution water contain 5 mM Tris-HCl buffer.

Table 2. Distribution of Cd accumulated in eggs of *Oryzias latipes* exposed for 24 h to Cd^{2+} solutions in concentration of 20 μM in different dilution water (Unit: nmol/individual)

	Dilution water*					
	5 mM Tris buffer	Well Water	Na^+ water (mM)		Ca^{2+} water (mM)	
			1.0	10	0.10	1.0
Intact egg (A)	5.54	1.88	4.77	2.74	3.67	1.82
Chorion (B)	4.06	1.72	4.16	2.48	3.26	1.65
Insides (A-B)	1.48	0.16	0.61	0.26	0.41	0.17

* All kinds of dilution water contain 5 mM Tris-HCl buffer.

関係が存在することは明らかである。したがって、試験された Cd^{2+} 濃度範囲ではメダカの卵の Cd^{2+} 蓄積現象はラングミュアの吸着等温式に従うことは明らかである。しかしニシン卵の Cd^{2+} 蓄積現象は典型的なラングミュアの吸着等温式に当てはまらなかった。⁴⁾

Fig. 8 に示す直線の外挿により、横軸および縦軸との交点は $-1/K$ および $1/[Egg-Cd]_{max}$ の値である。したがって、平衡定数 K および卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量 $[Egg-Cd]_{max}$ を求めることができ、それらの値を Table 1 に示した。平衡定数 K は希釈水として脱イオン水を用いた場合よりも、 Na^+ 、 Ca^{2+} あるいは井水を用いた場合の方が増大した。しかも Na^+ および Ca^{2+} の濃度の増大によって平衡定数 K は共に増大した。(2) 式に示した平衡定数 K は (1) 式の反応の正反応の速度定数と逆反応の速度定数の比 (k_2/k_1) であるから、 K の値が小さいことは生成された Egg-Cd が安定しており、左辺、すなわち $Egg + Cd^{2+}$ には変化し難い事を示し、 K の値が大きいことは生成された Egg-Cd は不安定で $Egg + Cd^{2+}$ に変化し易いことを示す。希釈水として脱イオン水に 5 mM のトリス緩衝液を加えた場合、 K の値は最も小さいから Egg-Cd は安定している。 Na^+ の 1.0 mM の時も K の値は小さいから Egg-Cd は安定している。しかし Na^+ の 10 mM では Ca^{2+} の 0.1 mM と同程度であり、 Ca^{2+} の 1.0 mM の時は更に大きくなる。つまりこれらの濃度が 10 倍に増大すると K の値は約 2 倍近くに増大することが判る。 Ca^{2+} は Na^+ の約 1/100 の濃度で Egg-Cd の安定に影響する。このことは Ca^{2+} は Na^+ に比較し、Egg-Cd を $Egg + Cd^{2+}$ に変えようとする力が Na^+ の約 100 倍も強いことを示している。井水の場合、

K の値は Ca^{2+} の 1.0 mM の時よりも更に大きな値となる。EDTA 硬度として 130 ppm (as $CaCO_3$) は Ca^{2+} として 1.3 mM に相当する。井水は Ca^{2+} のほかに更に Na^+ 、 K^+ などを含むために $K=3.1 \times 10^{-5}$ の大きな値となるものと推測される。すなわち、アルカリ金属イオンあるいはアルカリ土類金属イオンによる Egg-Cd の安定性への影響は、卵の Cd^{2+} 結合物質に対して Cd^{2+} と Na^+ あるいは Ca^{2+} が競争して結合するために、卵と Cd^{2+} の親和力が弱められたことを暗示している。そして、その効果は Na^+ よりも Ca^{2+} の方が強く、また、それらイオンの濃度の増大はこの効果を大きくすることを示している。

卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量 $[Egg-Cd]_{max}$ は希釈水として脱イオン水を用いた場合よりも、 Na^+ 、 Ca^{2+} 水あるいは井水を用いた場合の方が低下した。卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量は卵における Cd^{2+} 結合物質が Cd^{2+} で完全に飽和された時に達せられる。 Cd^{2+} と Na^+ および Ca^{2+} の共存は卵と Cd^{2+} の親和力を弱めるので、 Na^+ および Ca^{2+} が共存する場合、卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量が低下する。また Fig. 1 に示すように、 Cd^{2+} 供試水に K^+ および Mg^{2+} が共存すると、卵の Cd^{2+} の蓄積量は低下した。その効果は K^+ と Na^+ 、 Ca^{2+} と Mg^{2+} は同程度であった。したがって、 Na^+ および Ca^{2+} は卵の Cd^{2+} 結合物質と Cd^{2+} の結合の親和力を弱めたが、 K^+ および Mg^{2+} も同じ効果を示すことが暗示される。

Table 2 は卵に蓄積した Cd の卵膜とそれ以外の部分における分布を示している。なお、卵膜以外の部分における Cd の存在量は完全な卵の Cd 含量から卵膜の Cd 含量を差し引くことによって求めた。卵膜における Cd

の存在割合は Cd^{2+} 供試水に共存する Na^+ および Ca^{2+} 濃度の増大と共に増大した。しかし卵に蓄積した Cd の 73.2~91.9% は卵膜にあり、卵膜が卵における Cd^{2+} 蓄積の主要部位であることを示している。魚類の卵の主な Cd 蓄積部位が卵膜であることはメダカの卵^{10,11)}のほか、多数の魚卵で例示される。^{2-7,12)}

先に、メダカ卵の Cd^{2+} 蓄積現象はラングミュアの吸着等温式に従うことを明らかにしたが、このことは卵の表面、すなわち卵膜に Cd^{2+} が単分子層を作って吸着することを意味する。しかし Table 2 に示すように、卵に蓄積された Cd の 8.1~26.8% が卵膜以外に分布することは、メダカ卵における Cd^{2+} 蓄積は卵膜への Cd^{2+} の吸着と同時に卵内部への Cd の移行が起こる収着現象と考えられる。

文 献

- 1) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2153-2158 (1988).
- 2) R. H. Peterson, J. L. Metcalfe, and S. Ray: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 359-368 (1985).
- 3) P. J. Rombough and E. T. Garside: *Can. J. Zool.*, **60**, 2006-2014 (1982).
- 4) H. Rosenthal and K. R. Sperling: in "The Early Life History of Fish" (ed. by J.H.S. Blaxter), Springer, Berlin, 1974, pp. 383-396.
- 5) H. Westernhagen, H. Rosenthal, and K. R. Sperling: *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **26**, 416-433 (1974).
- 6) H. Westernhagen and V. Dethlefsen: *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **55**, 945-957 (1975).
- 7) H. Westernhagen, V. Dethlefsen, and H. Rosenthal: *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **27**, 268-282 (1975).
- 8) 慶伊富長: 吸着, 共立出版, 東京, 1981, pp. 27-35.
- 9) I. J. Tinsley: 環境汚染の北学—環境科学特論 (山県 登訳), 産業図書, 東京, 1982, pp. 16-18.
- 10) H. Michibata: *J. Fish Biol.*, **19**, 691-696 (1981).
- 11) H. Michibata: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 187-192 (1981).
- 12) J. H. Beattie and D. Pascoe: *J. Fish Biol.*, **13**, 631-637 (1978).