メダカ卵の銅、マンガンおよび亜鉛イオン蓄積様式

中川久機, 石尾真弥

(1988年6月30日受付)

Aspects of Accumulation of Copper, Manganese and Zinc Ions in the Egg of Medaka *Oryzias latipes*

Hisaki Nakagawa* and Shinya Ishio*

Whether or not accumulation phenomena of copper (Cu^{2+}), manganese (Mn^{2+}), zinc (Zn^{2+}) and cadmium (Cd^{2+}) ions by the egg of medaka *Oryzias latipes* were represented as the Langmuir's adsorption isotherm was studied.

The amounts of these heavy metals accumulated by the eggs reached stable levels, depending on the exposure concentrations within 24 to 48 hours. The contents at equilibrium for each heavy metal in the eggs were represented as function of their ambient concentrations. The defined equation of this relationship corresponds to the Langmuir's adsorption isotherm. Cd^{2+} had the strongest binding affinity to the eggs, followed by Zn^{2+} , Cu^{2+} , and Mn^{2+} . The maximum amounts of heavy metals accumulated by the eggs ranged from 5.0 to 8.2 nmole/egg. The accumulated heavy metals were mostly bound to the egg membrane, while a lesser amount contained in the interior parts of the egg.

Thus, accumulation of these heavy metals by the eggs could be explained as the sorption phenomenon characteristic to the simultaneous occurrence of the adsorption to the egg surface and the absorption into the interior parts of eggs.

メダカ卵による水中のカドミウムイオン (以下, Cd^{2+} と略記) の蓄積はラングミュアの吸着等温式に従う吸着現象であるとともに, 卵の内部へのカドミウム (以下, Cd と略記) の吸収が同時に起こる収着現象であった。¹⁾ ラングミュアの吸着等温式は固体表面に対し, 溶質が単分子層を作る吸着現象に当てはまるから, メダカ卵の Cd^{2+} 蓄積は, 主に卵膜に起こる吸着現象として捉えることができた。¹⁾

Wedemeyer²⁾ は coho salmon の卵に蓄積した ^{65}Zn の大部分は卵膜に存在すると報告した。また, 道端・堀³⁾ はメダカ卵のマンガンイオン (以下, Mn^{2+} と略記) 蓄積量は水中の Mn^{2+} 濃度に応じた一定値に達すると報告している。従って, メダカ卵と Cd^{2+} との間で起こった吸着現象は, 他の重金属イオンでも成立することが予想された。

本研究では, メダカ卵の銅イオン, 亜鉛イオン (以下, Cu^{2+} , Zn^{2+} と略記) および Mn^{2+} 蓄積現象がラングミュアの吸着等温式に従うかどうかを調べた。なお, 卵とこれら重金属イオンとの結合の親和力および卵による最大重金属イオン蓄積量を比較するために, 既報¹⁾ に引き続

き, Cd^{2+} についても再度試験を行った。

実験方法

供試卵 既報¹⁾ に述べた方法に従って, 胞胚期の供試卵を得た。

供試水の調製 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 および $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ (それぞれ試薬特級, 和光純薬製) を脱イオン水に溶解して, Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} としてそれぞれ 1 mg/ml の溶液をつくり, 原液とした。 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} の各供試水は各原液を脱イオン水で試験濃度まで希釈し, それに pH 8.0 のトリス-塩酸緩衝液をトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンとして最終濃度が 5 mM になるように加えて得た。

卵の Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} 蓄積試験 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} の供試水各 1 l に 200 個の卵を入れ, 25°C に保温した。6, 24, 48, 72 および 96 時間後に, 死卵を除き, 40 個の卵を取り上げ, 脱イオン水で洗浄後, 卵の Cu, Mn, Zn および Cd 含量の分析用試料とした。供試水は毎日換えた。なお, Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} を蓄積した卵から, 卵膜を取り出すには既

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

報¹⁾に述べた方法に従った。

卵および卵膜の Cu, Mn, Zn および Cd の定量法
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⁾ この硝酸溶液を直接、原子吸光分析にかけ、含まれる重金属の含量を測定した。なお、この硝酸溶液中の卵の分解産物による定量妨害が心配されたので、100 個の卵に既知量の Cu^{2+} , Mn^{2+} および Zn^{2+} を加え、同じ操作を経てそれぞれ重金属の回収率を調べたが、その回収率は 99~100% であった。本研究では 1 分析試料に用いた卵の数は 40 個以下であったので、卵の分解産物による定量の妨害はなかったと考えられた。なお、卵の Cd 含量の測定の場合、直接、原子吸光分析にかけ、 Cd^{2+} 濃度を測定しても卵の分解産物による定量の妨害はなかった。¹⁾

結果および考察

Fig. 1~4 はメダカ卵の Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} 蓄積量の経時的变化を示している。いずれの重金属でも、卵の重金属蓄積量は試験後 24~48 時間で、水中の重金属イオン濃度に応じた平衡値に達した。この状態はメダカの卵を Egg, 水中の重金属イオンを M^{2+} , 卵に蓄積された重金属を Egg-M で表すと、次の式で示すことができる。

$$\text{Egg} + \text{M}^{2+} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} \text{Egg-M} \quad (1)$$

ここで、 k_1 および k_2 は正反応の速度定数 k_1 と逆反応の速度定数 k_2 を示す。

平衡に達した時点で、種々な重金属イオン濃度における卵の重金属イオン蓄積量を求め、その逆数を縦軸に、

Fig. 1. Accumulation of Cu^{2+} by eggs of *Oryzias latipes* exposed to water with different concentrations of Cu^{2+} and 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

水中の重金属イオン濃度の逆数を横軸にとって、方眼紙上にプロットすると、Fig. 5~8 に示すような直線関係が得られた。これらの直線関係は卵の各重金属イオン蓄積量を $[\text{Egg-M}]$, その逆数を $1/[\text{Egg-M}]$, 水中の各重金属イオンの濃度を $[\text{M}^{2+}]$, その逆数を $1/[\text{M}^{2+}]$, (1) 式における反応の平衡定数を K とすると、次のような式にまとめることができる。

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

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

Reciprocals of equilibrated content of Cu in egg ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{egg}$)

Fig. 5. Relationship between the reciprocals of ambient concentrations of Cu^{2+} and those of equilibrated contents of Cu in eggs of *Oryzias latipes*.

$$\frac{1}{[\text{Egg-M}]} = \frac{K}{[\text{Egg-M}]_{\max}} \cdot \frac{1}{[\text{M}^{2+}]} + \frac{1}{[\text{Egg-M}]_{\max}}$$

この式は、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報告¹⁾に示してある(2)式と一致する。従って、メダカ卵の Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} および Cd^{2+} 蓄積現象もラングミュアの吸着等温式に従う吸着現象である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はならなかったと報告されている。⁴⁾

Fig. 5~8 から既報¹⁾に述べた方法に従って、横軸との交点 $-1/K$ および縦軸との交点 $-1/[\text{Egg-M}]_{\max}$ から、メダカ卵とこれら重金属イオンとの反応の平衡定数 K および卵の最大重金属蓄積量 $[\text{Egg-M}]_{\max}$ を求める

Reciprocals of equilibrated content of Mn in egg ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{egg}$)

Fig. 6. Relationship between the reciprocals of ambient concentrations of Mn^{2+} and those of equilibrated contents of Mn in eggs of *Oryzias latipes*.

Reciprocals of equilibrated content of Zn in egg ($\text{nmol}^{-1} \cdot \text{egg}$)

Fig. 7. Relationship between the reciprocals of ambient concentrations of Zn^{2+} and those of equilibrated contents of Zn in eggs of *Oryzias latipes*.

と、Table 1 を得る。

平衡定数 K は(1)式における正反応の速度定数 k_1 と逆反応の速度定数 k_2 との比、すなわち、 k_2/k_1 であるから、平衡定数 K が小さいほど、卵の重金属結合部位が重金属イオンのより低濃度で飽和されることになる。すなわち、卵は重金属イオンに対してより強い結合の親和力を有することになる。卵と Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} および Mn^{2+} との間の平衡定数はそれぞれ 0.36×10^{-5} , 0.86×10^{-5} , 1.3×10^{-5} および 6.8×10^{-5} であり、 $\text{Cd}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Mn}^{2+}$ の順に大きくなった。従って、メダカの卵における重金属イオンの吸着は Cd^{2+} が最も強く、これに続いて Zn^{2+} , Cu^{2+} および Mn^{2+} と弱くなっていく

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

ことを示している。

卵の各重金属イオンの最大蓄積量は Cu^{2+} が 5.0 nmol/egg, Mn^{2+} が 8.2 nmol/egg, Zn^{2+} が 7.0 nmol/egg, また, Cd^{2+} が 5.0 nmol/egg であった。既報¹⁾では, メダカ卵の最大 Cd^{2+} 蓄積量は 6.9 nmol/egg であったが, 今回は 5.0 nmol/egg となった。このような変動を考慮すれば, 卵の重金属イオン最大蓄積量は大体同程度と考えてよさそうである。もしそうならば, メダカの卵は 1 個当り 5.0~8.2 nmol の重金属を最大限度蓄積できるものと推測される。

卵に蓄積した各重金属について, 卵膜およびそれ以外の部位における Cu, Mn, Zn および Cd の分布をそれぞれ Table 2~5 に示した。卵膜に蓄積された Cu, Mn, Zn および Cd の割合は平均値でそれぞれ 70.9%, 57.9%, 76.3% および 85.5% であり, 卵膜が卵における主要な蓄積部位であるが, 卵膜以外の部位にも Cu で平均

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

Metal ion	$-1/K$	K	$1/[\text{Egg-M}]_{\max}$	$[\text{Egg-M}]_{\max}$ (nmol/egg)
Cu^{2+}	0.77×10^5	1.30×10^{-5}	0.20×10^9	5.0
Mn^{2+}	0.15×10^5	6.80×10^{-5}	0.12×10^9	8.2
Zn^{2+}	1.16×10^5	0.86×10^{-5}	0.14×10^9	7.0
Cd^{2+}	2.78×10^5	0.36×10^{-5}	0.20×10^9	5.0
Cd^{2+} in previous test*	1.85×10^5	0.54×10^{-5}	0.14×10^9	6.9

* Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 2159-2164 (1988).

Table 2. Distribution of Cu accumulated in eggs of *Oryzias latipes* exposed for 48 h to Cu^{2+} in different concentrations

Ambient Cu^{2+} ($\times 10^{-5}$ M)	Cu content (nmol/individual)			Chorion	Insides
	Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)	Intact egg (%)	Intact egg (%)
1.0	1.97	1.40	0.57	71.1	28.9
2.0	2.99	2.00	0.99	66.9	33.1
4.0	3.60	2.69	0.91	74.7	25.3
				Av. 70.9	29.1

Table 3. Distribution of Mn accumulated in eggs of *Oryzias latipes* exposed for 48 h to Mn^{2+} in different concentrations

Ambient Mn^{2+} ($\times 10^{-5}$ M)	Mn content (nmol/individual)			Chorion	Insides
	Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)	Intact egg (%)	Intact egg (%)
0.5	0.78	0.54	0.25	68.4	31.6
5.0	3.70	1.97	1.73	53.2	46.8
10.0	4.67	2.62	2.05	56.1	43.9
50.0	7.03	3.78	3.25	53.8	46.2
				Av. 57.9	42.1

Table 4. Distribution of Zn accumulated in eggs of *Oryzias latipes* exposed for 48 h to Zn^{2+} in different concentrations

Ambient Zn^{2+} ($\times 10^{-5}$ M)	Zn content (nmol/individual)			Chorion	Insides
	Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)	Intact egg (%)	Intact egg (%)
0.5	2.44	1.84	0.60	75.4	24.6
1.0	3.53	2.77	0.76	78.5	21.5
5.0	6.15	4.62	1.53	75.1	24.9
				Av. 76.3	23.7

Table 5. Distribution of Cd accumulated in eggs of *Oryzias latipes* exposed for 48 h to Cd^{2+} in different concentrations

Ambient Cd^{2+} ($\times 10^{-5}$ M)	Cd content (nmol/individual)			Chorion	Insides
	Intact egg (A)	Chorion (B)	Insides (A-B)	Intact egg (%)	Intact egg (%)
0.05	0.25	0.22	0.03	88.0	12.0
0.1	0.48	0.42	0.06	87.5	12.5
0.5	2.09	1.85	0.24	88.5	11.5
1.0	3.18	2.58	0.60	81.1	18.9
				Av. 85.5	14.5

29.1%, Mn で 42.1%, Zn で 23.7% および Cd で 14.5% と比較的多量に蓄積された。卵に蓄積した Cd^{2+} の大部分が卵膜に存在することについては多数の報告がある。⁴⁻⁹⁾ また coho salmon の卵では、卵に蓄積した ^{65}Zn の 70% は卵膜に存在すると言う。²⁾ このように重金属イオンのメダカ卵における主要な吸着部位は卵膜であったが、卵膜以外の部位にも相当量の重金属が分布する。このことから、メダカ卵の重金属イオン蓄積現象は、卵膜への吸着と同時に卵内部への重金属の吸収を伴う収着現象であると考えられる。

文 献

- 1) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2159-2164 (1988).
- 2) G. Wedemeyer: *Comp. Biochem. Physiol.*, **26**, 271-279 (1968).
- 3) 道端 齊, 堀 令司: 動雑, **88**, 92-94 (1979).
- 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) P. J. Rombough and E. T. Garside: *Can. J. Zool.*, **60**, 2006-2014 (1982).
- 8) H. Michibata: *J. Fish Biol.*, **19**, 691-696 (1981).
- 9) H. Michibata: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **27**, 187-192 (1981).