

# メダカの卵および仔魚に対するカドミウムの毒性および蓄積性に及ぼす水のpHの影響

|       |                |
|-------|----------------|
| 誌名    | 日本水産学会誌        |
| ISSN  | 00215392       |
| 著者名   | 中川,久機<br>石尾,真弥 |
| 発行元   | 日本水産学会         |
| 巻/号   | 55巻2号          |
| 掲載ページ | p. 327-331     |
| 発行年月  | 1989年2月        |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



メダカの卵および仔魚に対するカドミウムの毒性  
および蓄積性に及ぼす水の pH の影響

中川久機, 石尾真弥

(1988年8月3日受付)

Effects of Water pH on the Toxicity and Accumulation of Cadmium in  
Eggs and Larvae of Medaka *Oryzias latipes*

Hisaki Nakagawa\* and Shinya Ishio\*

Effects of water pH on the toxicity and accumulation of cadmium in the eggs and the larvae of *Oryzias latipes* were studied. Within the range of pH 4.5-7.0, the toxic effects of  $Cd^{2+}$  on the eggs increased in groups with a lower pH. On the contrary, those effects on the larvae were ameliorated. However, at pH 4.0, the eggs hardly hatched and abnormal symptoms were observed in all larvae of all test groups including control. In the same ranges of pH, the amounts of  $Cd^{2+}$  accumulated by the eggs and the larvae were depressed with lowering pH. Thus, the toxic effects of  $Cd^{2+}$  on the larvae were ameliorated because the amounts of  $Cd^{2+}$  accumulated by the larvae were depressed with lowering water pH. Nevertheless, the reason that the toxic effects of  $Cd^{2+}$  on the eggs increased with lowering water pH could not be explained from the result of  $Cd^{2+}$  accumulation test.

既報<sup>1)</sup>に述べたように、メダカ卵の卵膜は弱酸性陽イオン交換体の性質を有することが明らかである。従って、環境水の弱酸性 pH では水素イオンによってメダカ卵膜の  $Cd^{2+}$  結合部位が中和され、卵の  $Cd^{2+}$  蓄積性も影響を受けるので、卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は変化すると推測される。また、中性の pH 領域では、魚類の鰓上皮は負電荷を有し、環境水の酸性化は鰓上皮の負電荷を中和し、ナトリウムイオン等のイオン輸送を阻害すると言う。<sup>2)</sup> メダカ仔魚の鰓上皮も負に帯電していると考えられるので、弱酸性下では、仔魚の鰓上皮の負電荷も水素イオンによって中和され、仔魚による  $Cd^{2+}$  の取り込みも影響を受けるので、仔魚に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は変化すると推測される。

本研究では、メダカの卵および仔魚について、 $Cd^{2+}$  の毒性発現に対する水の弱酸性 pH の影響に関する推測を確かめることを目的とした。

## 実験方法

**供試卵および仔魚** 既報<sup>3)</sup>に述べた方法に従って、胞胚期の供試卵を得た。供試仔魚は希釈水を  $Cd^{2+}$  供試水と同じ pH に調整し、それらの水に胞胚期の卵を保温し、孵化させて得た。供試仔魚は孵化後6時間以内のも

のを用いた。pH 4.0 では、大部分の卵は孵化せず、この場合に限り、pH 4.5 で孵化した仔魚を供試仔魚とした。

**希釈水の調製** 既報<sup>4)</sup>に述べた方法に従って、水の硬度が 29.8 ppm ( $CaCO_3$ ) の希釈水を調製した。

**供試水の調製** 既報<sup>5)</sup>に述べたように、1 mg/ml の Cd 原液をつくり、この原液を希釈水で供試濃度まで希釈し、0.1 N 硫酸および重炭酸ナトリウム溶液で pH を 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 および 7.0 に調整し、供試水とした。なお、本研究での pH の値は実験開始時の pH 値で表した。

**卵および仔魚に対する  $Cd^{2+}$  の毒性試験** 卵および仔魚に対する  $Cd^{2+}$  の毒性試験は卵の試験の場合、各試験濃度に 30 個ずつの卵を用いた以外は、既報<sup>6)</sup>に述べた方法に従って、行った。

**卵と仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積試験** 蓄積性試験は 1 l 容のガラスのビーカーに種々な pH の  $Cd^{2+}$  供試水 1 l を取り、卵および仔魚をそれぞれ 300 個および 300 尾入れて行った。 $Cd^{2+}$  濃度は卵の場合、4.5 および 1.0 ppm、仔魚の場合、3.0 および 0.3 ppm であった。卵および仔魚の Cd 含量の分析用試料は適当な時間間隔で卵 50 個および仔魚 50 尾ずつ取り上げ、脱イオン水でよく洗って得た。また、卵膜を透過して卵内部に蓄積した Cd 量は、

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

既報<sup>4)</sup>に示した方法に従って、卵全体の Cd 含量から卵膜の Cd 含量を差し引いて求めた。なお、毒性および蓄積性試験ともに、供試水は 2 日毎に換えた。試験温度は 21~25°C とした。

**Cd の分析法** 卵、卵膜および仔魚の Cd 含量は既報<sup>4)</sup>に述べた方法に従って、卵、卵膜および仔魚を湿式灰化し、塩酸溶液とし、原子吸光法によって測定した。

結 果

**卵に及ぼす Cd<sup>2+</sup> の毒性と弱酸性 pH の影響** メダカ卵の孵化に及ぼす Cd<sup>2+</sup> の影響濃度と弱酸性 pH の関係を Fig. 1 に示す。pH 4.0 の場合、対照で 13.3%, 0.3 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度で 8.3% の孵化があったが、1.0~10.0 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度では卵の孵化はなかった。pH 4.0 の環境は大部分のメダカ卵にとって生存不可能であり、胚発生中に斃死が目立った。一方、pH 4.5~7.0 の場合、卵の孵化に及ぼす Cd<sup>2+</sup> の影響は pH 4.5 および 5.0 で 3.0 ppm, pH 6.0 および 7.0 で 4.5 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度から現われた。そして 50% 孵化率を与える Cd<sup>2+</sup> 濃度は pH 4.5, 5.0, 6.0 および 7.0 でそれぞれ 3.5, 3.2, 6.0 および 6.2 ppm と推定された。すなわち、卵の孵化に対する Cd<sup>2+</sup> の毒性は pH が低下すると強く現われた。10 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度ではいずれの pH でも卵は孵化しなかった。

**メダカ仔魚に及ぼす Cd<sup>2+</sup> の毒性と弱酸性 pH の影響** 種々な pH をもつ Cd<sup>2+</sup> 供試水に仔魚を 5 日間保温した時、仔魚に現われた異常症状と Cd<sup>2+</sup> 濃度との関係を

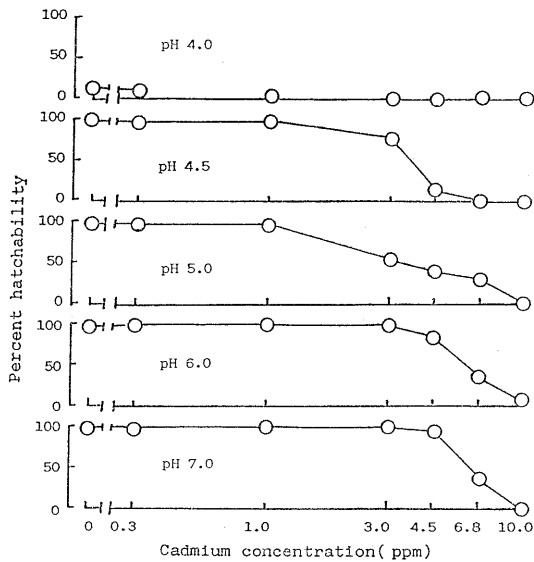


Fig. 1. Hatchability of eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions consisting of combinations of five levels of pH and seven Cd<sup>2+</sup> concentrations.

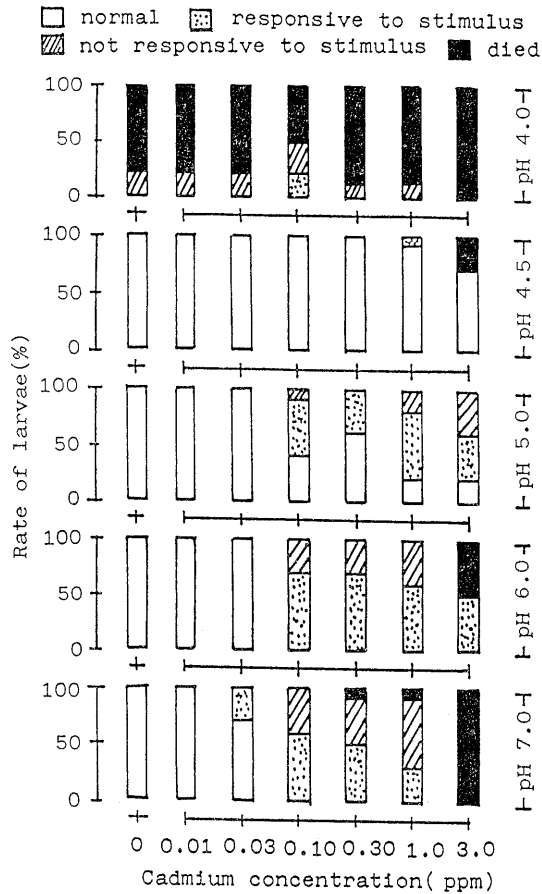


Fig. 2. Rates of normal and abnormal larvae of *Oryzias latipes* exposed for 5 days to test solutions consisting of combinations of five levels of pH and seven Cd<sup>2+</sup> concentrations.

Fig. 2 に示す。仔魚の異常症状は既報<sup>4)</sup>において述べた Cd 中毒症状と同様な症状であった。そこで既報<sup>4)</sup>に述べたように、仔魚の異常症状を 1) 機械的な刺激に対して反応的、2) 非反応的、3) 致命的と分けた。pH 4.0 では対照を含め、0.01~3.0 ppm のいずれの Cd<sup>2+</sup> 濃度でも斃死を含んだ異常が全仔魚に現われた。pH 4.0 の水素イオン濃度はメダカ仔魚にとって生存不可能であった。これに対して、4.5~7.0 の pH 範囲では、仔魚の異常は pH 4.5, 5.0, 6.0 および 7.0 で、それぞれ 1.0, 0.1, 0.1 および 0.03 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度から現われた。すなわち、仔魚に対する Cd<sup>2+</sup> の毒性は pH が低下すると弱くなった。これは卵の場合と全く反対の結果であった。

**メダカ卵の Cd<sup>2+</sup> 蓄積に及ぼす弱酸性 pH の影響** 種々な pH をもつ 4.5 および 1.0 ppm の Cd<sup>2+</sup> 濃度の供試水にメダカ卵を保温した時の卵の Cd<sup>2+</sup> 蓄積量をそれぞれ Figs. 3 と 4 に示す。メダカ卵の Cd<sup>2+</sup> の蓄積量は最初の 1 日間以降、極めて緩やかな減少を示すか、一定

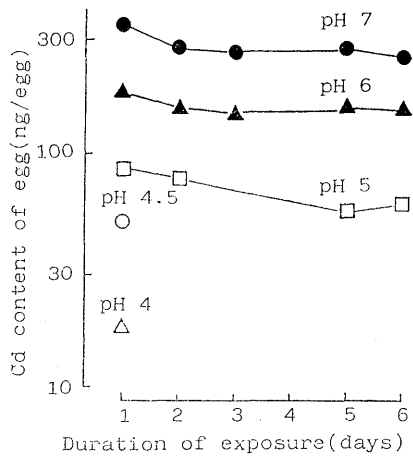


Fig. 3. Accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  by eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with different levels of pH and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of 4.5 ppm.

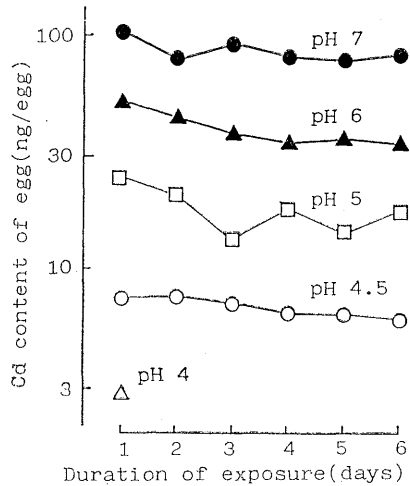


Fig. 4. Accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  by eggs of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with different levels of pH and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of 1.0 ppm.

レベルになっている。卵の  $\text{Cd}^{2+}$  蓄積量は pH が低下すると減少し、供試水の  $\text{Cd}^{2+}$  濃度が上昇すると増大した。しかし 4.5 ppm の  $\text{Cd}^{2+}$  濃度の場合、pH 4.0 および 4.5、1.0 ppm の  $\text{Cd}^{2+}$  濃度の場合、pH 4.0 では保温 2 日後、卵は全滅したので、Cd 分析用試料を得ることができなかった。

卵膜および卵内部の  $\text{Cd}^{2+}$  蓄積と環境水 pH 種々な pH をもつ 1.0 ppm の  $\text{Cd}^{2+}$  濃度の供試水に卵を 48 時間保温した時の卵、卵膜および卵内部に蓄積した  $\text{Cd}^{2+}$  量を Table 1 に示した。Figs. 3 と 4 に示す結果と同様に、pH 4.5~7.0 の範囲では、pH が低下すると卵の

Table 1. Cd contents of eggs of *Oryzias latipes* exposed for 48 hours to test solutions with different levels of pH and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of 1.0 ppm

| Ambient pH | Cd content (ng Cd/egg) |             |               |
|------------|------------------------|-------------|---------------|
|            | Intact egg (A)         | Chorion (B) | Insides (A-B) |
| 4.5        | 5.7                    | 1.4         | 4.3           |
| 5.0        | 15.5                   | 5.2         | 10.3          |
| 6.0        | 38.1                   | 23.2        | 14.9          |
| 7.0        | 102.3                  | 60.9        | 41.4          |

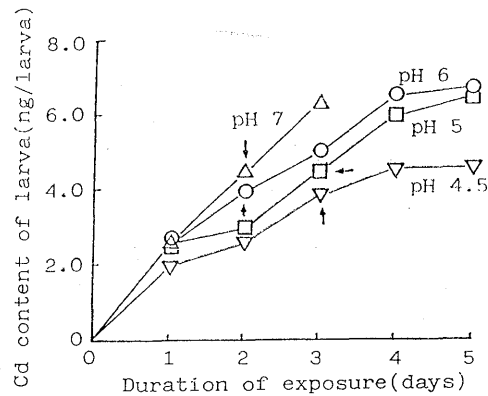


Fig. 5. Accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  by larvae of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with different levels of pH and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of 3.0 ppm. Arrows indicate the emergency of abnormal symptoms on the larvae.

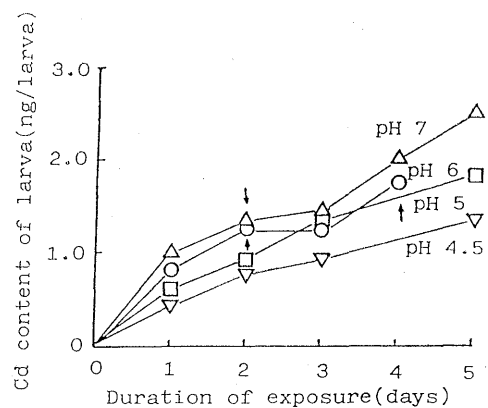


Fig. 6. Accumulation of  $\text{Cd}^{2+}$  by larvae of *Oryzias latipes* exposed to test solutions with different levels of pH and  $\text{Cd}^{2+}$  concentration of 0.3 ppm. Arrows indicate the emergency of abnormal symptoms on the larvae.

$\text{Cd}^{2+}$  蓄積量は減少した。また、卵膜の  $\text{Cd}^{2+}$  蓄積量および卵内部に蓄積された Cd も pH の低下にともない減少

した。

仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積に及ぼす弱酸性 pH の影響 種々な弱酸性 pH をもつ 3.0 および 0.3 ppm の  $Cd^{2+}$  濃度の供試水に仔魚を保温した時、仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積量の経時的变化をそれぞれ Figs. 5 と 6 に示す。仔魚の  $Cd^{2+}$  の蓄積量は時間の経過とともに増大する。また、 $Cd^{2+}$  の蓄積速度は pH 4.5~7.0 の範囲では pH が低下すると低下した。pH が低下すると Cd 異常症状の出現は遅れた。

### 考 察

メダカ卵の孵化に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は pH 4.5~7.0 の範囲では供試水の pH が低下すると強く現われ、 $Cd^{2+}$  濃度の上昇によって強化された (Fig. 1)。魚類の卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は卵膜を通して胚に達した Cd によって発現すると考えられる。また、胚に達する Cd 量は卵膜の  $Cd^{2+}$  蓄積量に依存する。<sup>9)</sup> メダカ卵の  $Cd^{2+}$  蓄積量は、pH 4.5~7.0 の範囲では pH が低下すると減少した (Figs. 4, 5 および Table 1)。卵膜の  $Cd^{2+}$  蓄積量および卵膜を透過し卵内部に蓄積された Cd 量も、卵の場合と同様であった (Table 1)。メダカの卵膜は弱酸性陽イオン交換体の性質を有するので、<sup>4)</sup> pH の低下、すなわち水素イオン濃度が增大すると卵膜の結合部位は非解離の状態となり、 $Cd^{2+}$  の結合が妨げられ、卵膜の  $Cd^{2+}$  蓄積量が低下する。そして、pH の低下にもなり卵膜の  $Cd^{2+}$  蓄積量の減少が、卵内部の  $Cd^{2+}$  蓄積量を低下させたと考えられる (Table 1)。しかし卵、卵膜および卵内部における  $Cd^{2+}$  の蓄積量からは pH の低下にもなって卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性が強まることを説明できない。すなわち、メダカ卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は pH が低い場合、見かけ上少量の蓄積 Cd で、また、pH が高い場合、多量の蓄積 Cd で発現することになる。一方、Atlantic salmon 卵<sup>7)</sup> でもメダカ卵と同様に、pH の低下にもなって卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性が強まり、卵および卵膜の  $Cd^{2+}$  蓄積量は低下した。しかしメダカ卵の場合と同様に、pH が低下すると卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性が何故強まるか理由は明らかでない。pH 4.5~7.0 の範囲では、メダカ卵の胚発生は正常であるが、低 pH、すなわち、水素イオン濃度の増大は魚類の卵にとって不利な環境条件であり、卵はイオンおよび酸塩基平衡などの調節機構の維持に、過大なエネルギーを消費する。そのような不利な条件では Cd の少量で卵に有害作用を及ぼすと考えられる。

Fig. 1 に示すように、pH 4.0 では卵は胚発生中に斃死が目立ち、13.3% の卵が孵化したに過ぎなかった。pH 4.0 で、卵の大部分が胚発生中に斃死し、孵化まで至らなかったのは、水素イオンにより卵のイオンおよび酸塩基調節機構が乱されたために卵が斃死し、また生残し

た卵でも低 pH による孵化酵素合成阻害<sup>8)</sup> および孵化酵素の活性不足<sup>9)</sup> のために、卵が孵化しなかったと考えられる。

メダカ仔魚に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は pH 4.5~7.0 の範囲では pH が低下すると弱くなった (Fig. 2)。同様な結果は steelhead trout fry で報告されている。<sup>10)</sup> 一般に、魚類に対する  $Cd^{2+}$  の毒性は水中の  $Cd^{2+}$  濃度ではなくて、魚体に蓄積される  $Cd^{2+}$  によって、その毒性が発現すると考えられる。Figs. 5 および 6 に示すように、仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積量は pH の低下にもなって減少した。従って、pH の低下とともに、メダカ仔魚に対する  $Cd^{2+}$  の毒性が弱まることは、仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積量が減少することから説明される。また、pH が低下すると仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積量が減少することはすでに推測したように、鰓の  $Cd^{2+}$  取り込み経路の上皮の負荷電が、pH の低下、すなわち水素イオン濃度の増加によって中和されるので、上皮の結合部位に  $Cd^{2+}$  が結合できず、そのために仔魚の  $Cd^{2+}$  蓄積量が減少するものと考えられる。

Fig. 2 に示すように、pH 4.0 ではメダカの全仔魚に斃死を含む異常が現われた。pH 4.0 でメダカ仔魚が全滅したのは、McDonald<sup>2)</sup> が述べているように、低 pH によって鰓のイオン調節機構が乱されたためと考えられる。

魚類に対する重金属イオンの毒性が供試水の pH 上昇とともに強まることは、ニジマス若年魚に対する亜鉛の毒性試験、<sup>11)</sup> steelhead trout の仔魚に対する銅および亜鉛の毒性試験<sup>10)</sup> に報告されている。従って、魚類の仔魚、若年魚および成魚に対する重金属イオンの毒性は、pH の上昇によって強められると考えられる。それに対して、4.5~7.0 の pH 範囲であるが、pH の上昇でメダカの卵に対する  $Cd^{2+}$  の毒性が弱くなった (Fig. 1)。このことは卵の時代は魚類の成長段階の中でも特殊な段階であることを示している。今後、弱酸性 pH が卵のイオンおよび酸塩基平衡などの調節機構および種々な生化学反応に及ぼす影響、並びにそのような pH 環境条件での Cd を含めた重金属の毒性の変化について明らかにする必要がある。

### 文 献

- 1) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **55**, 123-129 (1989).
- 2) D. G. McDonald: *Can. J. Zool.*, **61**, 691-703 (1983).
- 3) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2153-2158 (1988).
- 4) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **55**, 321-326 (1989).
- 5) 中川久機, 石尾真弥: 日水誌, **54**, 2159-2164 (1988).
- 6) H. Westernhagen, H. Rosenthal, and K. R. Sperling: *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **26**,

- 268-282 (1974).
- 7) R. H. Peterson, J. L. Metcalfe, and S. Ray: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 359-368 (1985).
- 8) J. A. Nelson: *J. Fish Biol.*, **20**, 359-372 (1982).
- 9) R. H. Peterson, P. G. Daye, and J. L. Metcalfe: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 770-774 (1980).
- 10) R. F. Cusimano, D. F. Brakke, and G. A. Chapman: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**, 1497-1503 (1986).
- 11) R. W. Bradley and J. B. Sprague: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**, 731-736 (1985).