

ニジマスに経口投与したカドミウムの毒性に及ぼす アスコルビン酸投与の効果

山本義和
井上雅代*

1. 緒言

カドミウム (Cd) は環境中に放出される量が多く、しかも生体に蓄積されやすく、毒性も強いので水銀、鉛などと共に環境汚染物質として重要視されている重金属の一つである。これらの重金属や PCB, DDT などの有機合成化合物が生体に与える影響は栄養条件によって異なり、適切な栄養摂取によってこれらの物質による悪影響はかなり軽減されることが証明され、この方面の研究が注目されている¹⁾。栄養素の中でも特に L-アスコルビン酸 (AsA) は陸上高等動物においてカドミウム^{2,3)}、ニッケル⁴⁾、鉛⁵⁾、銅⁶⁾、バナジウム⁷⁾などの中毒症状を緩和する効果を有することが知られている。著者らもコイ⁸⁾およびニジマス⁹⁾などの魚類においても AsA が銅の体内蓄積を抑制し、銅の毒性を緩和する作用を有することを明らかにした。本報では、まずカドミウム含量の異なる飼料でニジマスを飼育して、斃死率、カドミウムの体内への蓄積、貧血症の発現などから、中毒症の発現状態を知り、次いでカドミウム中毒に対する AsA 投与の影響を調べた。

2. 試料および実験方法

2.1. 実験 I

供試魚 市販配合飼料で養成したふ化後 5 カ月のニジマス *Salmo gairdneri* を試験用配合飼料 (Table 1) で 2 週間予備飼育したのち、体長・体重が比較的そろって肉眼的に異常の認められない個体 60 尾 (平均体重 6.5 g) を選別し、供試魚とした。

試験区と飼料組成 供試魚 10 尾ずつを 50 ℥ 容のアクリル水槽 6 個に収容し、それぞれ Table 1 に示した組成の基本飼料 (対照区) および基本飼料にカドミウム ($CdCl_2 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$) を 20, 50, 200, 500, 2000 $\mu g/g$ diet 添加して調製した試験飼料を投与した。なお基本飼料の AsA 含量は 200mg/100 g であった。投餌量は 1 日当たり体重の 4 % とし、朝夕 2 回に分けて投与した。飼育水は活性炭でろ過した水道水を用い、流水式で十分に通気した。試験期間中の水温は 15~19°C であった。上記の条件下で 18 日間飼育したのち、以下の分析に供した。

カドミウムの定量 細織を硝酸-過塩素酸 (1 : 1) で湿式分解後、日立 170-30 型原子吸光光度計を用いて定量した。

ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の測定 血液は尾柄部切断により採取した。ヘモグロビン濃度はシアソメトヘモグロビン法によるキットで測定した。ヘマトクリット値は毛細管に

採取した血液をヘマトクリット用遠心機で遠心分離(12,000 rpm, 10 min)して測定した。

Table 1. Composition of the basal diet

Component	Parts (%)
Milk casein(vitamin-free)	54
Dextrin	16
α -Starch	15
α -Cellulose	4
Soybean oil	3
Cod-liver oil	2
Mineral mixture* ¹	4
Vitamin mixture* ²	2

*¹ U.S.P.XII Salt mixture No.2 with trace metals.

*² Vitamin mixture contained(mg/100g diet): thiamine-HCl 6, riboflavine 10, nicotinic acid 40, calcium pantothenate 10, vitamin B₁₂ 0.01, menadion 5, biotin 5, pyridoxine-HCl 4, inositol 400, choline chloride 800, folic acid 1.5, vitamin A acetate 2000IU, α -tocopherol 50, L-ascorbic acid 200. α -Cellulose was used as a carrier for the vitamin mixture.

2.2. 実験Ⅱ

供試魚 ふ化後6カ月のニジマスを実験Ⅰと同じ条件で予備飼育したのち、320尾(平均体重15 g)を選別して供試魚とした。

試験区と飼料組成 供試魚20尾ずつを50ℓ容のアクリル水槽に収容し、飼料へのカドミウム添加量の相違およびAsA添加の有無によってⅠ～VIの試験区を設定した(Table 2)。なお、IV区とVI区は2個、その他の試験区は3個の水槽に供試魚を収容した。投餌量は3週目までは1日当たり体重の4%とした。その後摂餌活動が低下したので、4週目以降は3%，8週目以降は2%とした。その他の条件は実験Ⅰに準じて10週間飼育し、3週目、6週目、10週目に以下の分析に供した。

Table 2. Experimental conditions for each group

Group	No. of fish	Cd and AsA* ¹ contents in diet	
		Cd(μg/g diet)	AsA(mg/100g diet)
I	60	0	0
II	60	0	200
III	60	50	0
IV	40	50	200
V	60	200	0
VI	40	200	200

*¹ L-Ascorbic acid

カドミウムと鉄の定量 実験Ⅰに準じて行った。

ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の測定 実験Ⅰに準じて行った。

AsAの定量 ヒドラジン法¹⁰⁾によって肝臓と血清の総AsA量を測定した。

3. 結果および考察

3.1. 実験 I

斃死状況および摂餌状態 カドミウム 2000 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区においては 3 日以内に激しいケイレン状態を示しながら、すべての供試魚が斃死し、カドミウム 500 $\mu\text{g/g}$ diet の試験区においても実験終了時までに 4 尾が斃死した。他の試験区においては斃死する個体がなかったので、カドミウム投与の影響により斃死したと考えられる。摂餌状態は、カドミウム 500 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区で投与開始後 14 日目から急激に悪化したが、カドミウム添加量 200 $\mu\text{g/g}$ diet 以下の試験区では良好であった。

各組織のカドミウム含有量 飼育 18 日目に各区から生存個体をとりあげて、全魚体および鰓、肝臓、腎臓、消化管（胃および腸）、筋肉、脊椎骨のカドミウム含有量を測定した (Table 3)。全魚体および前記の組織のカドミウム含有量は、飼料中のカドミウム濃度が 0~200 $\mu\text{g/g}$ diet に増加するに従って増加した。カドミウム 500 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区では 200 $\mu\text{g/g}$ diet の試験区に比べて鰓、肝臓、筋肉、脊椎骨のカドミウム含有量が低下した。これは前述したように摂餌状態の悪化によって、カドミウムの経口摂取量が減少したことによると考えられる。カドミウムが最も高濃度に蓄積されたのは消化管であり、鰓、肝臓および腎臓にもかなりの蓄積が認められた。筋肉と脊椎骨のカドミウム蓄積量はわずかであった。KUMADA¹¹⁾らもニジマスに数種のカドミウム化合物を経口的に投与して体内各組織へのカドミウムの蓄積を調べた結果、本報の実験結果とほぼ同様の傾向を認めている。

Table 3. Cadmium contents in whole body and several tissues of rainbow trout

Group Cd($\mu\text{g/g}$ diet)	Cd content ($\mu\text{g/g}$ wet tissue) ^{*1}						
	Whole body	Gill	Liver	Kidney	Gastrointestinal tract	Muscle	Vertebrae
0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.09 ± 0.03	0.6 ± 0.4
20	0.8 ± 0.2	3.0 ± 1.0	1.0 ± 0.3	3.4 ± 1.0	8.6 ± 3.0	0.03 ± 0.02	0.7 ± 0.1
50	1.4 ± 0.2	4.9 ± 2.2	1.9 ± 0.5	4.9 ± 0.8	13.3 ± 4.8	0.08 ± 0.05	1.2 ± 0.5
200	2.0 ± 1.0	6.9 ± 1.6	6.0 ± 1.1	15.3 ± 6.0	39.0 ± 12.5	0.25 ± 0.09	1.4 ± 0.3
500	N.D. ^{*2}	3.8 ± 1.0	5.0 ± 1.5	18.2 ± 7.7	40.0 ± 13.8	0.18 ± 0.08	1.3 ± 0.4

*1 Values are expressed as mean ± S.D. for 4 or 5 fish.

*2 Not determined.

血液性状 飼育 18 日目に各区から 5~8 尾をとりあげて、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値を測定した (Table 4)。ヘモグロビン濃度は飼料中のカドミウム濃度が増加するに従って、低下する傾向を示し、カドミウム 200, 500 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区では対照区よりも統計上有意に低下した ($P < 0.01$)。ヘマトクリット値はカドミウム 20, 50 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区で対照区よりもやや増加したが、200, 500 $\mu\text{g/g}$ diet を投与した試験区では対照区よりも有意に低下した ($P < 0.01$)。これらのことから 200 $\mu\text{g/g}$ diet 以上のカドミウムを投与した試験区では貧血症状を発現することがわかった。カドミウム中毒による貧血は、腸管からの鉄吸収の阻害による鉄の欠乏が最大の原因であり、これにカドミウムによる赤血球破壊の亢進や溶血、さらにはヘモグロビン生合成の阻害などの因子が加わっていると考えられる¹²⁾。

実験 I の結果より、次の実験 II では飼料へのカドミウム添加量を 50 および 200 $\mu\text{g/g}$ diet として、カドミウム中毒に対する AsA 投与の効果を調べることにした。

Table 4. Effects of dietary cadmium on hemoglobin level and hematocrit value

Group Cd ($\mu\text{g/g diet}$)	Hemoglobin* ¹ (g/dl)	Hematocrit* ¹ (%)
0	7.2 \pm 0.8 (7)* ²	49 \pm 8 (8)
20	6.7 \pm 0.5 (7)	57 \pm 10 (7)
50	6.4 \pm 0.5 (7)	53 \pm 12 (7)
200	5.5 \pm 0.8* ³ (7)	34 \pm 7* ³ (7)
500	5.1 \pm 0.8* ³ (4)	26 \pm 8* ³ (5)

*¹ Values are expressed as mean \pm S.D..

*² Number of fish assayed.

*³ Significantly different from control group.

2.2 実験II

摂餌状態および体重増加率 ニジマスの成長に及ぼすカドミウムおよび AsA の影響を調べるために、一定期間ごとに各区の平均体重を測定した (Fig. 1)。結果は試験開始時の体重を 1 として、増加率で示した。各区とも試験期間中は順調な体重増加を示し、開始時の 1.5~2.5 倍に増重した。カドミウムを 200 $\mu\text{g/g diet}$ 添加した試験区ではやや体重増加率が低いが、カドミウムによる成長率の低下は顕著には認められなかった。

なお、魚類においてはカドミウム中毒¹³⁾や AsA 欠乏¹⁴⁾によっていわゆる“骨曲がり”といわれる奇形の発現することが知られているが、いずれの試験区においても奇形の発現は認められなかった。

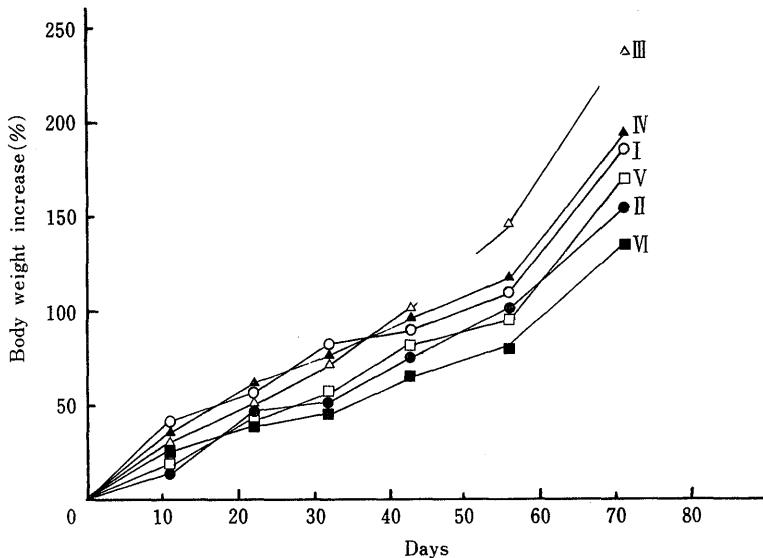


Fig. 1. Effects of cadmium and L-ascorbic acid on the body weight increase of rainbow trout. I, II, III, IV, V, and VI represent the test groups shown in Table 2.

各組織のカドミウム含有量 飼育 3, 6, 10 週目に各区からそれぞれ 6, 6, 11 尾をとりあげ、鰓、肝臓、腎臓、消化管、筋肉、脊椎骨のカドミウム含有量を測定した (Table 5)。飼料中に

カドミウムを添加したⅢ, Ⅳ, Ⅴ, Ⅵ区における各組織のカドミウム含有量は3, 6, 10週目のいずれにおいても、飼料中にカドミウム無添加のⅠおよびⅡ区のそれよりも明らかに高く、カドミウム負荷の影響が認められた。しかし、Ⅲ区(AsA欠乏)とⅣ区(AsA投与), Ⅴ区(AsA欠乏)とⅥ区(AsA投与)との間にはカドミウム含有量の相違がほとんどなかったことから、今回の実験条件下ではAsAが組織へのカドミウム蓄積を抑制する効果は認められなかつた。

Table 5. Changes of cadmium contents in several tissues

Experimental period	Group	Cd contents ($\mu\text{g/g}$ wet tissue) ^{*1}					
		Gill	Liver	Kidney	Gastrointestinal tract	Muscle	Vertebrae
3 weeks	I	N.D. ^{*2}	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	N.D.	N.D.	0.6 ± 0.1
	II	N.D.	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	N.D.	N.D.	0.6 ± 0.1
	III	N.D.	1.5 ± 0.3	4.2 ± 0.6	N.D.	N.D.	0.7 ± 0.1
	IV	N.D.	1.6 ± 0.3	5.4 ± 2.4	N.D.	N.D.	0.7 ± 0.1
	V	N.D.	5.8 ± 1.2	13.6 ± 2.8	N.D.	0.13 ± 0.04	1.2 ± 0.0
	VI	N.D.	6.1 ± 2.1	17.8 ± 2.8	N.D.	0.19 ± 0.07	1.3 ± 0.3
6 weeks	I	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.05 ± 0.01	0.6 ± 0.1
	II	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.05 ± 0.03	0.5 ± 0.0
	III	4.3 ± 0.7	2.2 ± 0.4	6.9 ± 1.4	10.1 ± 4.2	0.09 ± 0.03	1.1 ± 0.4
	IV	3.9 ± 0.8	2.4 ± 0.6	6.3 ± 1.8	7.9 ± 3.6	0.11 ± 0.04	0.9 ± 0.1
	V	8.7 ± 1.8	8.0 ± 1.9	22.1 ± 5.6	35.6 ± 15.8	0.23 ± 0.12	1.4 ± 0.5
	VI	8.2 ± 2.6	11.7 ± 4.5	30.3 ± 5.4	40.4 ± 20.3	0.26 ± 0.13	0.9 ± 0.2
10 weeks	I	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.08 ± 0.05	0.7 ± 0.1
	II	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.06 ± 0.03	0.7 ± 0.1
	III	2.7 ± 0.4	3.6 ± 0.6	8.9 ± 3.9	8.2 ± 5.4	0.12 ± 0.05	0.9 ± 0.1
	IV	2.9 ± 1.1	3.5 ± 1.1	9.6 ± 2.7	10.8 ± 4.4	0.11 ± 0.04	1.0 ± 0.1
	V	5.5 ± 2.5	12.4 ± 3.9	24.8 ± 4.7	16.9 ± 7.7	0.17 ± 0.03	1.2 ± 0.2
	VI	5.2 ± 2.7	9.6 ± 2.6	21.8 ± 10.7	15.3 ± 8.5	0.19 ± 0.06	1.3 ± 0.2

*1 Values are expressed as mean ± S.D. for 6 or 11 fish.

*2 Not determined.

肝臓と腎臓における鉄含有量、およびカドミウム含有量との関係 カドミウムと同時に肝臓と腎臓の鉄含有量を測定した(Table 6)。肝臓と腎臓における鉄の含有量は、各週ともにカドミウム無添加でAsAを添加したⅡ区が最も高かった。Ⅲ区とⅣ区との比較では6週目の肝臓と10週目の腎臓で、Ⅴ区とⅥ区との比較では3週目の腎臓、6週目および10週目の肝臓と腎臓で、それぞれAsAを添加したⅣ区とⅥ区の方が高い鉄含有量を示す傾向がみられた。

Fig. 2は10週目に分析した全個体の肝臓と腎臓について、カドミウム含有量をx軸に、鉄含有量をy軸にとってプロットし、両金属の相関性を調べた結果である。肝臓、腎臓においてそれぞれ $y = -1.18x + 74.1$, $y = -1.11x + 167.8$ の式で表わされる回帰直線が求められた。このことから肝臓、腎臓のカドミウム含有量と鉄の含有量との間には負の相関関係が存在することがわかった。

これらのことから、AsAはカドミウムによる組織中の鉄含有量の低下を回復するわずかな効果を有することがわかった。カドミウム毒性の緩和にはAsAの単独投与よりもAsAと鉄の同時投与の方が顕著な回復効果がみられるという報告^{15~17)}が多くあり、AsAは組織への鉄の貯留と利用をコントロールしていることも知られている¹⁸⁾ので、カドミウムとAsAの相互作用を調べるために飼料中の鉄の量をコントロールする必要があると考えられる。ニジマスの

Table 6. Changes of iron contents in liver and kidney

Experimental period	Group	Fe contents ($\mu\text{g/g}$ wet tissue)* ¹	
		Liver	Kidney
3 weeks	I	58 ± 21	123 ± 24* ²
	II	72 ± 33	225 ± 89
	III	66 ± 20	193 ± 46
	IV	58 ± 10	134 ± 33* ²
	V	46 ± 9	105 ± 19* ²
	VI	46 ± 4	114 ± 15* ²
6 weeks	I	46 ± 4* ²	116 ± 19* ²
	II	79 ± 28	167 ± 43
	III	67 ± 26	161 ± 22
	IV	75 ± 36	135 ± 46
	V	48 ± 8* ²	103 ± 28* ²
	VI	59 ± 12	143 ± 42
10 weeks	I	73 ± 15* ²	160 ± 37* ²
	II	91 ± 17	203 ± 52
	III	65 ± 25* ²	122 ± 43* ²
	IV	61 ± 23	158 ± 35* ²
	V	53 ± 12* ²	140 ± 31* ²
	VI	68 ± 23* ²	149 ± 30* ²

*¹ Values are expressed as mean ± S.D. for 6 or 11 fish.

*² Significantly different from group II($p < 0.05$).

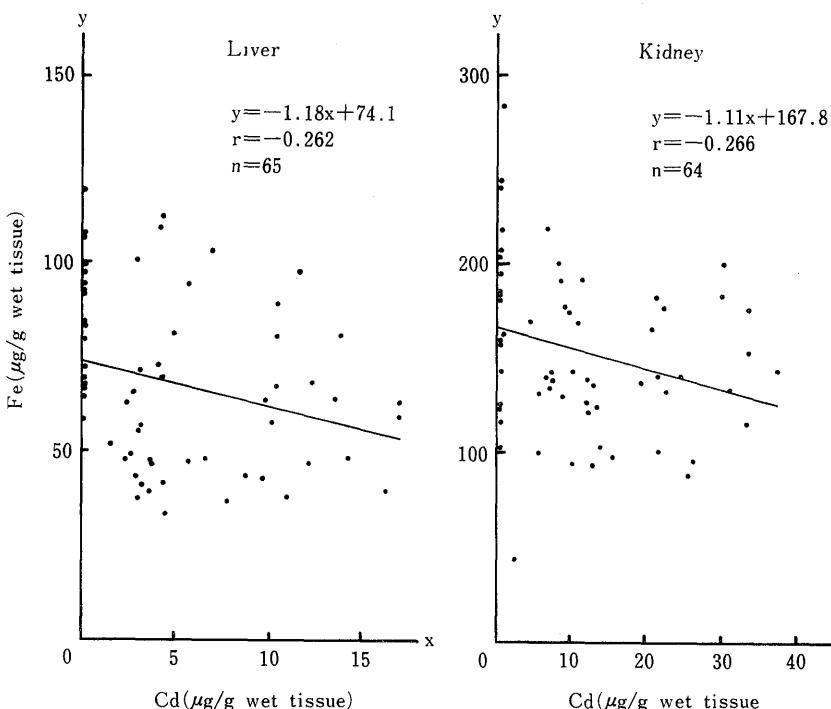


Fig. 2. Relations between cadmium and iron contents in liver and kidney of rainbow trout after feeding on the experimental diets for 10 weeks.

鉄の必要量についての報告はみていないが、今回の試験では 19.6 mg/100 g diet の鉄をクエン酸第二鉄の形で投与しており、生体内の鉄の維持量として十分な量であったと考えられる。また、飼育水中にも相当量の鉄が含まれていた可能性がある。

肝臓と血清の AsA 含有量 飼育 6 週目と 10 週目に、肝臓と血清の総 AsA 含有量を測定した(Table 7)。肝臓の AsA 含有量は 6 週目、10 週目で AsA 無添加の I, III, V 区に対して AsA を添加した II, IV, VI 区でそれぞれ有意に高かった ($P < 0.001$)。しかし、飼料中のカドミウム濃度の相違による AsA 含有量の変化は認められなかった。血清の AsA についても同様の傾向が認められた。

Table 7. Total ascorbic acid contents in liver and serum

Group	Total AsA in liver* ¹ ($\mu\text{g/g}$)		Total AsA in serum* ² ($\mu\text{g/ml}$)	
	6 weeks	10 weeks	6 weeks	10 weeks
I	35 ± 7	38 ± 7	10	14
II	288 ± 28* ³	282 ± 34* ³	67	58
III	29 ± 7	37 ± 7	9	14
IV	236 ± 43* ³	313 ± 104* ³	45	50
V	46 ± 5	37 ± 12	13	9
VI	346 ± 30* ³	309 ± 48* ³	59	52

*¹ Values are expressed as mean ± S.D. for 5 or 6 fish.

*² Pooled serum sample from 5 or 6 fish.

*³ Significantly different from group I, III, and V, respectively ($p < 0.001$).

血液性状 カドミウムによる血液性状の変化とそれに対する AsA の影響を調べた (Table 8)。全体的には飼料中にカドミウムを添加することによってヘモグロビン濃度とヘマトクリット値はやや低下した。10 週目において V 区のヘモグロビン濃度とヘマトクリット値は II 区より低い値を示した。一方 AsA を添加した VI 区のヘモグロビン濃度とヘマトクリット値は AsA 無添加の V 区よりも高い値を示した。このことから、カドミウムによるヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の低下を AsA が若干緩和していると推察される。

Table 8. Effects of dietary cadmium and L-ascorbic acid on hemoglobin level and hematocrit value

Group	Hemoglobin (g/dl)* ¹			Hematocrit (%)* ¹		
	3 weeks	6 weeks	10 weeks	3 weeks	6 weeks	10 weeks
I	6.8 ± 0.6	6.2 ± 0.3	6.9 ± 0.9	42 ± 3	40 ± 6	43 ± 4
II	6.4 ± 0.8	7.8 ± 0.9	7.5 ± 0.8	41 ± 5	43 ± 5	45 ± 6
III	5.6 ± 1.0	5.9 ± 1.2	6.7 ± 0.6	36 ± 5	42 ± 6	44 ± 6
IV	5.7 ± 0.8	6.6 ± 1.2	6.3 ± 0.6	36 ± 5	43 ± 4	40 ± 6
V	6.2 ± 0.3	6.2 ± 1.1	5.6 ± 0.7	39 ± 4	34 ± 6	36 ± 5
VI	6.2 ± 0.4	6.4 ± 0.4	6.0 ± 0.9	34 ± 3	48 ± 4	40 ± 5

*¹ Values are expressed as mean ± S.D. for 11 fish.

本報における実験結果から、ニジマスのカドミウム中毒に対して AsA はごくわずかな緩和効果を示すことがわかった。しかし、AsA のこの効果を更に明らかにするためには、飼料へ

のカドミウム、鉄およびAsA 添加量などを段階的に変えて再検討する必要がある。このことについては今後の研究課題としたい。

4. 謝 辞

本実験には中山喜世、瀬戸美砂子、水野美也子の諸姉の協力を得た。また、この研究は神戸女学院大学研究助成金によって行った。記して感謝の意を表する。

*神戸女学院大学嘱託職員

文 献

- 1) 鈴木継美、井村伸正、鈴木庄亮編集：中毒学と栄養学、篠原出版（1978）。
- 2) M.R.S. FOX and B.E. FRY, Jr. : *Science*, **169**, 989-991 (1970)。
- 3) G.C. CHATTERJEE, S.K. BANERJEE, and D. RUDRA PAL. : *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **43**, 370-377 (1973)。
- 4) K. CHATTERJEE, D. CHAKARBORTY, K. MAJUMDAR, A. BHATTACHARYYA, and G. C. CHATTERJEE : *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **49**, 264-275 (1979)。
- 5) T. SUZUKI and A. YOSHIDA : *J. Nutr.*, **109**, 1974-1978 (1979)。
- 6) 土屋治美、鈴江緑江郎：ビタミン，**45**, 333-337 (1975)。
- 7) D. CHAKRBORTY, A. BHATTACHARYYA, K. MAJUMDAR, and G. C. CHATTERJEE : *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **47**, 81-87 (1977)。
- 8) 山本義和、石井知幾、佐藤守、池田静徳：日水誌，**43**, 989-993 (1977)。
- 9) 山本義和、早山萬彦、池田静徳：日水誌，**47**, 1085-1089 (1981)。
- 10) 池田静徳、佐藤 守、木村良太郎：日水誌，**29**, 757-764 (1963)。
- 11) H. KUMADA, S. KIMURA, and M. YOKOTE : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**, 97-103 (1980)。
- 12) 田丸忠良：日衛誌，**35**, 573-583 (1980)。
- 13) B.E. BENGTSSON, C.H. CARLIN, Å. LARSSON, and O. SVANBERG : AMBIO, **4**, 166-168 (1975)。
- 14) M. SATO, R. YOSHINAKA, and S. IKEDA : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1029-1035 (1978)。
- 15) T. SUZUKI and A. YOSHIDA : *Amer. J. Clin. Nutr.*, **31**, 1491-1498 (1978)。
- 16) T. MAJI and A. YOSHIDA : *Nutr. Rep. Internat.*, **10**, 139-149 (1974)。
- 17) M. R.S. FOX, R. M. JACOBS, A. O. L. JONES, B.E. FRY, Jr., and C.L. STONE : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **355**, 249-261 (1980)。
- 18) 佐藤 守：魚介類の微量元素（池田静徳編），pp. 199-200，恒星社厚生閣（1981）。

原稿受理 1982年9月14日