

## コンプレキサンによる重金属の毒性緩和及び 除去性に関する基礎的研究 第1報

重金属 (Cd, Zn, Cu, Pb) の比較的高濃度水に  
おける水産動物への集積及び毒性に対する  
コンプレキサンの影響

村 本 茂 樹

エチレンジアミンテトラアセチックアシッド (以下 EDTA と略記) が 1937 年に、ドイツの I. G. 染料会社の R. Fick と、H. Ulrick により発明され、繊維工業において硬水軟化剤として使用されたのが、コンプレキサン実用の端緒であるといわれている。現在ではあらゆる産業に金属イオン封鎖剤として広く用いられており、また食品の酸化や腐敗の防止剤、メッキ工業のシアン電解浴に替る金属表面処理剤、写真工業、各種化粧品工業、および抗生物質など医薬品の安定剤としての需要も非常に拡大しつつある。

米国における最近 5 カ年間 (1965—1970 年) のニトリロトリアセチックアシッド (NTA と略記) の使用量<sup>1,2,3)</sup> は 45,000 トン、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA と略記) などの鉄キレート肥料をはじめとする合成キレート肥料のそれは<sup>4)</sup> 40,000 トンに達するといわれる。また米国では食品添加剤として、1964 年より、マヨネーズなど 11 品目に認可されている。日本におけるこれらコンプレキサン使用量は正確には把握されていないが、米国の 1/10 量に相当するのではないかと考えられる。このようにコンプレキサンの消費増大にともない環境汚染物質としても、食物連鎖系への影響の検討が緊急課題となりつつある。

さて、微量金属の急性・慢性毒性に関して、魚類に対する致死量および半数致死濃度 (LD<sub>50</sub>) などの生物学的試験については従来から多くの研究報告<sup>5,6,7)</sup> がみられるが、金属の毒性緩和、蓄積抑制に関する研究に関しては、抗汚染剤として NTA が有効であるとするカワマスを用いた Sprague の生物的試験<sup>8)</sup> や銅鉱山排水について西川、田端らの EDTA によるミジンコ、モツゴに対する除毒実験<sup>9)</sup> があるが、断片的であり十分な知見は得られてはいない。

そこで著者は、NTA, EDTA, DTPA などのコンプレキサンを用いて、淡水魚 (鯉) 飼育実験を行なって、重金属の魚体への蓄積性、除去性および毒性に及ぼす影響を解明するために、(1) 金属高濃度<sup>5)</sup>、短期間暴露 (急性、亜急性毒) におけるコンプレキサンの影響、(2) 低濃度、長期間暴露 (慢性毒性) におけるコンプレキサンの影響、(3) 既汚染魚からのコンプレキサンによる重金属排出除去試験などについての実験を行なった。

対象金属は Cd, Zn, Pb, Cu とし、金属濃度に対し、各 3 倍モル量のコンプレキサンを用いそれらの添加処理区とし、金属単独処理区との間の斃死率、魚体の重金属含有量比較

などを行なって、金属毒性との関連性を検討した。

まず、斃死については、NTA, EDTA, DTPA ともにその添加処理により斃死率が低減し、金属毒性緩和が示唆された。次に、重金属の含有量については、エラ（鰓）、内臓、その他（エラ、内臓を除いた部分）に分け、金属含有量を測定した。その結果、コンプレキサン添加処理により魚体各部位の金属濃度は低下し、金属集積に対する抑制効果が見出された。本報はこれらのうち、比較的高濃度金属区、短期間（48時間）暴露の金属毒性及び集積性におよぼすコンプレキサンの影響について報告する。

この報告の原稿を御校閲賜った当研究所森井助教ならびに飼育試験を担当して頂いた愛知県水産試験場 戸倉正人技師に深謝し、資料の提供を頂いた帝国化学産業株式会社辻章氏に謝意を表す。

## 材料および方法

### 1. 飼育実験

(1) 供試魚および飼育法：供試魚として体長約13 cm, 体重7.7 g の稚鯉 (*Cyprinus carpio* L.) を選び、各区 8~10 尾ずつを 60 l 容ガラス水槽（愛知県水試）中で飼育した。飼育法は重金属として Cu, Cd, Pb, Zn を用い、比較的高濃度区（急性、亜急性毒）各3区とこれに3種類のコンプレキサンを用い、各3倍モル量添加した処理区および対照区の計49処理区である。飼育期間の水温は14.5~16.5°C であった。飼育水は水道水を用い使用前3日間エアレーションした。飼育水の水質を第1表に示す。換水は24時間毎、投餌は稚鯉入手後ベレット3号を用い1週間飼育、馴化させ、実験開始4日前に中止した。斃死魚は24時間毎（開始後24時間以内、24~48時間、48時間以上）の観察を行ない呼吸停止を死亡とみなし、体表面を蒸留水で洗滌後、ポリエチレン袋に入れ、直ちに-20°Cフリーザーに冷凍保存した。また、生存魚は実験終了後、斃死魚と同様、冷凍保存した。

(2) 重金属およびコンプレキサンの種類と濃度：重金属としては、Cd, Zn, Cu, Pb を（それらの48時間、半数の致死量は Cu 0.1 ppm, Cd 1.0 ppm, Zn 7 ppm, Pb 10 ppm といわれているが<sup>10)</sup> 用い、第2表に示す濃度区を設

第1表 飼育水の水質 (mg/l)

Ca	4.7
Mg	1.4
Na	3.6
K	0.88
SO <sub>4</sub>	3.0
Cl	2.6
SiO <sub>2</sub>	13.3
PO <sub>4</sub>	0.005
NO <sub>3</sub> -N	0.17
NH <sub>4</sub> -N	0.04
Fe	0.04
アルカリ度 (CaCO <sub>3</sub> として)	15.3
蒸発残留物	41.1
pH	6.9
Cd	0.001
Zn	0.09
Pb	<0.05
Cu	0.005

第2表 供試重金属塩と濃度区

金属塩	化学式	重金属濃度区 (mg/l)		
硫酸銅	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.1,	0.3,	0.6
塩化カドミウム	CdCl <sub>2</sub> · 2½H <sub>2</sub> O	2.0,	4.0,	8.0
硝酸鉛	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.0,	10.0,	20.0
塩化亜鉛	ZnCl <sub>2</sub>	5.0,	10.0,	20.0

第3表 供試コンプレキサン

コンプレキサン	化学式	分子量 (g)
Ethylendiaminetetraacetic Acid tetrasodium salt	$\begin{array}{c} \text{NaOOCH}_2\text{C} \\ \text{NaOOCH}_2\text{C} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{NCH}_2-\text{CH}_2\text{N} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \end{array} \right.$	452.2
Nitritotriacetic Acid Trisodium salt	$\text{N} \begin{cases} \text{CH}_2\text{COONa} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \end{cases}$	275
Diethylentriaminepentaacetic Acid Pentasodium salt	$\begin{array}{c} \text{NaOOCH}_2\text{C} \\ \text{NaOOCH}_2\text{C} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{NCH}_2\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \\ \text{CH}_2\text{COONa} \end{array} \right.$	503.3

定し、各金属濃度に対し3倍モル量使用するコンプレキサンは第3表のようである。

## 2. 分析方法

(1) 装置及び測定条件：原子吸光分析装置 Nippon Jarrel Ash AA-1 Mark II 型 (日本ジャーレルアッシュ(株)製) を用い、ガスは空気—アセチレン、光源はウェスチングハウス社製ホローカソードランプを用いた。測定条件は第4表に示した。

### (2) 試薬

第4表 原子吸光測定条件

カドミウム標準原液

(1,000 ppm 貯蔵用)：

105~110°C で乾燥し、恒量とした酸化カドミウム 1.1422 g を塩酸に溶解し、水を加えて 1ℓ (2N 塩酸酸性) とする。使用のつど 0.1~1.0 ppm に

希釈 (0.1N 塩酸酸性) し、標準溶液とする。

亜鉛標準原液 (1,000 ppm 貯蔵用)：乾燥恒量とした酸化亜鉛の 1.2488 g を塩酸に溶解し、水を加えて 1ℓ (2N 塩酸酸性) とする。使用のつど 0.1~1.0 ppm に希釈 (0.1N 塩酸酸性) し、標準溶液とする。

鉛標準原液 (1,000 ppm 貯蔵用)：乾燥恒量とした硝酸鉛 1.5986 g を塩酸に溶解し、水を加えて 1ℓ (2N 塩酸酸性) とする。使用のつど 2.5~10.0 ppm に希釈 (0.1N 塩酸酸性) し、標準液とする。

APDC (ammonium pyrolidine dithiocarbamate)：原子吸光分析用高純度特級試薬 (和光純薬(株)製)

MIBK (methyl iso-butyl ketone)：試薬特級、あらかじめ水を飽和したもの

クエン酸三アンモニウム溶液 (30%)：30%水溶液を調製し、1% APDC 溶液を用いて重金属を除去したものを用いる。

その他、硝酸、過塩素酸、アンモニアなどはすべて試薬特級を用い、水は再蒸留水、ガラス器具類は硬質を使用した。

	Cd	Zn	Cu	Pb
波長 (nm)	228.8	213.8	324.7	217.0
ランプ電流 (mA)	7	7	8	8
スリット幅 (μ)	100	100	100	100
空気流量 (L/min)	12	12	12	12
アセチレン流量 (L/min)	3	3	3	3
感度	0	0	0	0

### (3) 試料溶液の調製および定量方法

凍結試料は分析時に室温で解凍し、解剖メスにてエラ、内臓、その他の部分に解剖した。それぞれを恒量にした磁製ルツボに取り、生重量を秤量後、熱風乾燥器で60°C、24時間乾燥し、乾燥重量を秤り、電気炉で450°C、24時間灰化後再び秤量し灰重量とした。この灰試料のエラと内臓は全量を、その他は0.5gをビーカーに秤取し、HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> (2:1)の混酸にて分解後、0.1N-HClを用い一定容とし、試料溶液とした。Znは直接法により、Cd、Pb、Cuは試料溶液の25mlを用い、APDC-MIBK抽出法を行ないそれぞれ原子吸光法により測定した。

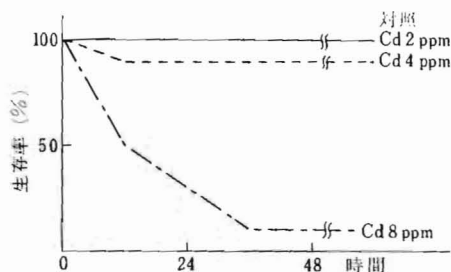
## 結果と考察

### 1. 重金属濃度と斃死率との関係

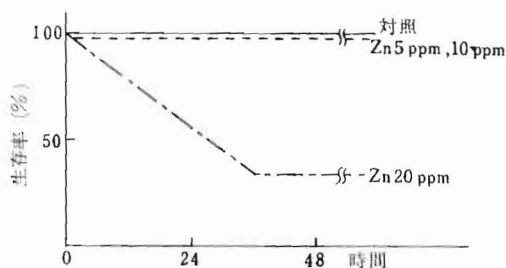
各重金属濃度区の48時間以上の生存数、供試魚の平均生体重、平均全体長および乾燥重量/灰重量比を第5表に示し、斃死の出現した各重金属単独区(Cd、Zn、Cu)の24時間毎の生存率(%)を第1図、2図、3図に示した。

本実験の重金属濃度は比較的高濃度であり、金属量の3倍モル量のコンプレキサン添加の影響についてみると、第5表のように、Zn区ではZn単独の場合、Zn 5.0 ppm、10 ppm区とも斃死率は0%で全魚体が48時間以上生存したが、Zn 20 ppm区では24~48時間に斃死率30%を示した。これに対し、コンプレキサン添加区では各区とも48時間以上の生存を示し、コンプレキサン添加処理による毒性緩和現象がみられた。

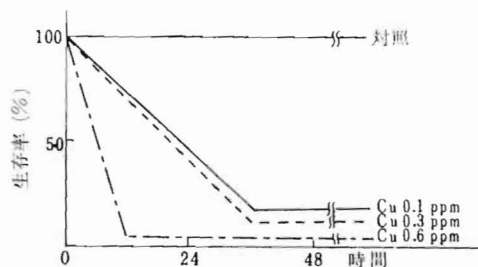
Cd区では、Cd 2 ppm単独区には斃死魚はみられず、全供試魚は48時間以上生存した。しかし、Cd 4.0 ppm区では24時間以内に斃死率10%を示し、Cd 8.0 ppm区ではCd毒性が顕著に現われ、24時間以内50%、24~48時間40%と斃死率が上昇し、48時間以上の生存率はわずかに10%であった。これに対し、各コンプレキサン添加区ではいずれも48時間以内の斃死魚は出現せず生存率100%で明らかに毒性緩和現象が確認された。



第1図 CdCl<sub>2</sub>·2 1/2 H<sub>2</sub>O 暴露に対するコイの生存率



第2図 ZnCl<sub>2</sub> 暴露に対するコイの生存率



第3図 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 暴露に対するコイの生存率

また Cu 区では、Cu は Cd, Zn に比し強毒性を示し、Cu 単独区の場合 Cu 0.1 ppm 区でも 24~48 時間の斃死率は 37.5% を、Cu 0.3 ppm 区では 24 時間以内に 75%、24~48 時間には 12.5% の斃死率を示し、Cu 濃度上昇とともに漸次その毒性が増し、Cu 0.6 ppm 区では 24 時間以内に全供試魚が斃死した。これに対し、コンプレキサン処理区ではいずれについても Cu 濃度の 0.1, 0.3, 0.6 ppm の各区において、48 時間内斃死率は 0% を示し、Cu 毒性に対してこれらコンプレキサンによる毒性緩和効果がみられた。

Pb 区では、Pb 2 ppm, 10 ppm, 20 ppm の各濃度区において、Pb 単独区は EDTA, NTA, DTPA 添加処理区のいずれにおいても 48 時間以上の生存率は 100% を示し、低毒性金属<sup>9)</sup>であることが確認された。

## 2. 各処理区の pH 値と斃死魚体数との関係

鯉の生育の最適 pH 域は一般淡水魚と同様 pH 6.5~8.5 の範囲にある<sup>10)</sup>とされているが、第 5 表にみられるように、各処理区により pH 値が異なるので、pH の斃死魚に及ぼす影響を知るために、pH 値と魚体斃死率との関係を検討した。

Zn 単独区では、Zn 5 ppm 区は pH 6.8, Zn 10 ppm 区および、20 ppm 区は pH 6.8~6.9 の範囲で、コンプレキサン添加により各濃度区ともわずかに pH 値が高くなる。その傾向の最も大きいものは DTPA であって、Zn 5 ppm 区は pH 7.5, Zn 20 ppm 区は pH 9.4 を示した。

Cd 区では、Cd 2 ppm 区 pH 7.3, Cd 8 ppm 区 pH 7.1 と金属単独の場合、金属濃度による pH 値の変動はほとんどなかった。EDTA, NTA 添加処理区では pH 変動は少ないが金属単独区に比し、わずかな pH 変動を示す傾向にあった。しかし DTPA 添加区は Cd 2 ppm 区 pH 7.4, Cd 8 ppm 区 pH 7.7 と漸次上昇の傾向にあった。

Cu 区は Cd とほぼ同様の傾向にあり、単独区は濃度に関係なく pH 7.1 であり、EDTA 処理区は Cu 0.1 ppm 区 pH 7.3, Cu 0.6 ppm 区 pH 7.5 であった。NTA 処理区もほぼ同様の値を示したが、DTPA 処理区は Cu 0.1 ppm 区 pH 7.3, Cu 0.6 ppm 区 pH 7.7 と pH の上昇がみられた。

Pb 区は Zn 区とほぼ同様の傾向を示した。しかし、いずれの区においても pH 値変動による斃死魚への影響は 48 時間以内では認められなかった。

## 3. 供試魚の平均体重および灰重量/乾燥重量 (%) の各金属間の有意差

第 5 表より各金属間の供試魚 (実験終了時) の平均体重 (斃死魚を含む) の比較を行ない第 6 表に示す。

平均体重は Pb 区の 16.59 g を除いては対照区の 11 g に対し 10.81~12.24 g の範囲であり、全供試魚はほぼ一定重であった。したがって、[Zn]—[Cd], [Zn]—[Cu], [Cd]—[Cu] には有意差 ( $p < 0.01$ ) は認められず、各区間の平均生体重の順は  $Pb > Cu \geq Zn \geq Cd$  の関係にあった。さらに、魚体各部位の灰重量/乾燥重量 (%) の比の各金属間の比較を行ない第 7 表に示す。

これより、内臓では各金属間の灰重量/乾燥重量 (%) は [Zn]—[Cd] と [Cd]—[Cu] の間以外はいずれも有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められ、 $Cu \geq Cd > Zn > Pb$  の関係を示した。エラでは [Zn]—[Cd] 以外はすべて各金属間の有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められ、 $Cu > Cd \geq Zn > Pb$  の関係を示した。また、その他の部分では [Zn]—[Pb], [Cu]—[Pb] のみに有

第5表 金属単独区およびコンプレキサン処理区における斃死魚数.

金属属	No.	処 理 区	pH	斃 死 状 況			平均生体重 (g)		
				斃 死 魚 数		生存魚数	0 24h	24 48h	48h
				0 24h	24 48h				
Zn (ZnCl <sub>2</sub> )	A-1	Zn 5 ppm	6.8	0	0	10			11.3
	A-2	Zn 5 ppm + EDTA	7.1	0	0	10			11.1
	A-3	Zn 5 ppm + NTA	7.1	0	0	10			11.5
	A-4	Zn 5 ppm + DTPA	7.5	0	0	10			10.3
	B-1	Zn 10 ppm	6.9	0	0	10			10.8
	B-2	Zn 10 ppm + EDTA	7.1	0	0	10			11.6
	B-3	Zn 10 ppm + NTA	7.2	0	0	10			11.3
	B-4	Zn 10 ppm + DTPA	8.2	0	0	10			10.7
	C-1	Zn 20 ppm	6.8	0	3	7		12.3	12.5
	C-2	Zn 20 ppm + EDTA	7.4	0	0	10			13.6
	C-3	Zn 20 ppm + NTA	7.6	0	0	10			11.8
	C-4	Zn 20 ppm + DTPA	9.4	0	0	10			12.8
Cd (CdCl <sub>2</sub> ·2 1/2 H <sub>2</sub> O)	A-1	Cd 2 ppm	7.3	0	0	10			10.3
	A-2	Cd 2 ppm + EDTA	7.4	0	0	10			11.0
	A-3	Cd 2 ppm + NTA	7.4	0	0	10			10.7
	A-4	Cd 2 ppm + DTPA	7.4	0	0	10			11.2
	B-1	Cd 4 ppm	7.2	1	0	9		8.4	11.0
	B-2	Cd 4 ppm + EDTA	7.3	0	0	10			11.6
	B-3	Cd 4 ppm + NTA	7.3	0	0	10			10.0
	B-4	Cd 4 ppm + DTPA	7.6	0	0	10			9.8
	C-1	Cd 8 ppm	7.1	5	4	1		11.0	13.4
	C-2	Cd 8 ppm + EDTA	7.4	0	0	10			10.6
	C-3	Cd 8 ppm + NTA	7.4	0	0	10			10.7
	C-4	Cd 8 ppm + DTPA	7.7	0	0	10			9.6
Cu (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	A-1	Cu 0.1 ppm	7.1	0	3	5		14.8	12.2
	A-2	Cu 0.1 ppm + EDTA	7.3	0	0	8			14.2
	A-3	Cu 0.1 ppm + NTA	7.3	0	0	8			12.1
	A-4	Cu 0.1 ppm + DTPA	7.3	0	0	8			12.4
	B-1	Cu 0.3 ppm	7.1	6	1	1		12.5	12.2
	B-2	Cu 0.3 ppm + EDTA	7.5	0	0	8			11.6
	B-3	Cu 0.3 ppm + NTA	7.4	0	0	8			11.9
	B-4	Cu 0.3 ppm + DTPA	7.5	0	0	8			11.2
	C-1	Cu 0.6 ppm	7.1	8	0	0		12.5	
	C-2	Cu 0.6 ppm + EDTA	7.5	0	0	8			14.4
	C-3	Cu 0.6 ppm + NTA	7.4	0	0	8			10.1
	C-4	Cu 0.6 ppm + DTPA	7.7	0	0	8			10.1
Pb Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	A-1	Pb 2 ppm	7.1	0	0	10			19.8
	A-2	Pb 2 ppm + EDTA	7.3	0	0	10			18.9
	A-3	Pb 2 ppm + NTA	7.5	0	0	10			17.8
	A-4	Pb 2 ppm + DTPA	7.7	0	0	10			16.0
	B-1	Pb 10 ppm	6.9	0	0	10			16.9
	B-2	Pb 10 ppm + EDTA	7.6	0	0	10			19.6
	B-3	Pb 10 ppm + NTA	7.6	0	0	10			13.0
	B-4	Pb 10 ppm + DTPA	8.4	0	0	10			16.4
	C-1	Pb 20 ppm	6.9	0	0	10			17.4
	C-2	Pb 20 ppm + EDTA	7.8	0	0	10			14.3
	C-3	Pb 20 ppm + NTA	7.7	0	0	10			14.7
	C-4	Pb 20 ppm + DTPA	9.0	0	0	10			14.3
対 照 (正常魚)			6.9	0	0	10			11.7

平均全体長，平均生体重および各部位の灰重/乾燥重(%)

平均全体長 (cm)			灰重/乾燥重 (%)								
			内 臓			エ ラ			そ の 他		
0 } 24h	24 } 48h	48h }	0 } 24h	24 } 48h	48h }	0 } 24h	24 } 48h	48h }	0 } 24h	24 } 48h	48h }
		7.4			7.03			12.07			17.39
		7.4			6.63			13.76			24.44
		7.5			6.94			12.64			15.56
		7.1			6.17			12.67			11.96
		7.5			5.38			11.98			12.96
		7.5			5.93			11.85			11.32
		7.3			6.55			14.21			24.44
		7.4			5.68			12.64			17.78
	7.7	7.6		5.26	5.11		10.78	10.92		21.43	16.13
		7.8			5.36			11.57			12.50
		7.5			6.80			12.33			13.95
		7.7			6.12			12.88			20.37
		7.2			8.27			12.78			14.29
		7.4			8.37			13.47			14.29
		7.3			7.09			12.64			13.51
		7.5			13.01			12.17			12.20
7.3		7.3	11.51		7.37	9.28		12.76	10.00		16.22
		7.6			9.32			13.02			16.67
		7.4			8.59			13.37			15.00
		7.6			7.59			13.16			14.58
7.7	7.8	7.9	5.30	18.04	8.86	15.36	14.39	11.34	10.53	15.00	33.33
		7.5			7.59			12.69			11.90
		7.7			6.38			12.41			9.52
		7.2			6.63			8.80			10.53
	7.8	7.4		9.27	7.55		17.01	14.75		9.09	21.05
		7.8			8.56			14.28			13.64
		7.6			15.93			15.64			22.22
		7.6			11.17			22.88			19.44
7.8	7.5	7.3	7.81	9.59	19.01	14.71	17.53	18.11	11.11	25.00	33.33
		7.6			9.58			14.16			18.42
		7.4			8.60			14.12			15.00
		7.5			7.63			12.21			11.11
8.0		7.9	9.47		8.24	13.33		13.97	14.63		13.73
		7.2			9.66			12.80			20.00
		7.4			7.58			13.58			19.44
		8.4			3.49			10.52			8.05
		8.4			3.36			9.76			10.59
		8.6			4.40			10.56			11.76
		8.0			4.53			10.33			7.35
		7.6			4.51			9.99			17.07
		8.8			3.35			9.68			6.59
		7.6			4.52			10.43			9.01
		8.5			4.66			11.67			9.46
		8.0			4.75			9.99			10.26
		7.8			5.93			11.84			7.69
		7.9			4.89			12.52			7.02
		7.6			6.30			11.96			9.62
		7.6			9.67			11.20			15.21

第6表 各金属間における供試魚生体重の有意差

処理区間 [x]-[y]	t	試料数	平均体重 ± 標準偏差	
			[x ± S. D.] - [y ± S. D.]	
[Zn]-[Cd]	2.0097	120	[11.68 ± 0.97]	- [10.81 ± 1.22]
[Zn]-[Cu]	-1.1991	96	[11.68 ± 0.97]	- [12.24 ± 1.38]
[Zn]-[Pb]	-7.032***	120	[11.68 ± 0.97]	- [16.59 ± 2.22]
[Cd]-[Cu]	-3.012	96	[10.81 ± 1.22]	- [12.24 ± 1.38]
[Cd]-[Pb]	-8.6912***	120	[10.81 ± 1.22]	- [16.59 ± 2.22]
[Cu]-[Pb]	-6.2435	96	[12.24 ± 1.38]	- [16.59 ± 2.22]

\*\*\*:  $p < 0.01$

第7表 各処理における魚体の灰重量/乾燥重量(%)の有意差

処理区間	内 臓	エ ラ	そ の 他	試 料 数
[Zn]-[Cd]	-2.592	-0.334	1.235	120
[Zn]-[Cu]	-4.234***	-3.714***	-0.417	96
[Zn]-[Pb]	4.748***	3.995***	4.817***	120
[Cd]-[Cu]	-1.130	-3.358***	-1.514	96
[Cd]-[Pb]	3.942***	3.167***	2.755	120
[Cu]-[Pb]	5.574***	5.475***	4.223***	96

\*\*\*:  $p < 0.01$

有意差が認められ、 $Cu \geq Zn \geq Cd \geq Pb$  の関係を示した。

4. 水中金属濃度と魚体中各部位の金属濃度との関係に及ぼすコンプレキサンの影響

魚体、各部位中の金属濃度(灰分中  $\mu\text{g/g}$ )は第8表の通りであり、飼育水濃度との関係は第4, 5, 6, 7図に示し、金属単独区及びコンプレキサン添加区中で飼育された魚体

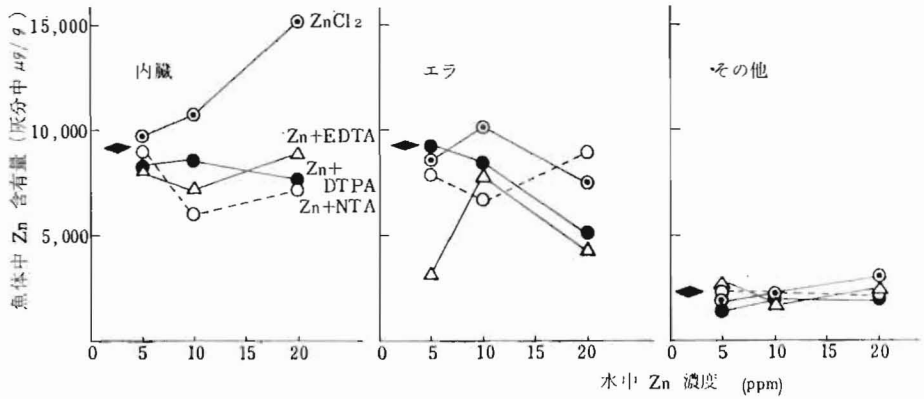
第8表 魚体各部位中の金属濃度

金属	No.	処 理 区	金 属 含 有 量 (灰中 $\mu\text{g/g}$ )								
			内 臓			エ ラ			そ の 他		
			0 24h	24 48h	48h }	0 24h	24 48h	48h }	0 24h	24 48h	48h }
Zn (ZnCl <sub>2</sub> )	A-1	Zn 5 ppm			9724			8996			1722
	A-2	Zn 5 ppm + EDTA			8170			3306			2158
	A-3	Zn 5 ppm + NTA			9232			8586			1913
	A-4	Zn 5 ppm + DTPA			8378			8848			1399
	B-1	Zn 10 ppm			10826			9106			2120
	B-2	Zn 10 ppm + EDTA			7112			7783			2077
	B-3	Zn 10 ppm + NTA			6020			6715			2111
	B-4	Zn 10 ppm + DTPA			9402			8388			1945
C-1	Zn 20 ppm		10309	15170		10701	7462		2995	2994	
C-2	Zn 20 ppm + EDTA			8704			4500			2598	
C-3	Zn 20 ppm + NTA			7313			8783			2476	
C-4	Zn 20 ppm + DTPA			7520			5078			2390	
対 照				9220			9370			2050	

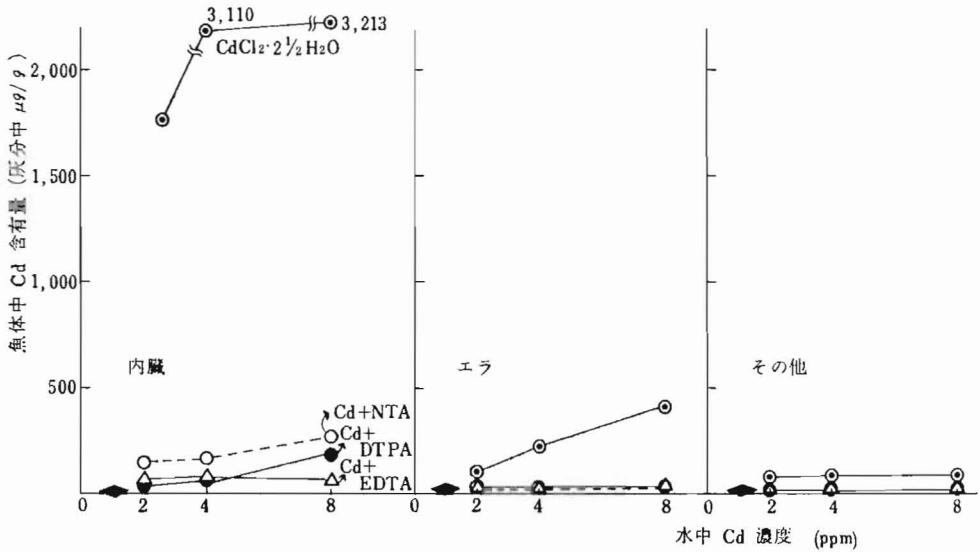


金属	No.	処 理 区	金属含有量 (灰中 $\mu\text{g/g}$ )								
			内 臓			エ ラ			そ の 他		
			0 } 24 h	24 } 48 h	48 h }	0 } 24 h	24 } 48 h	48 h }	0 } 24 h	24 } 48 h	48 h }
Cd  ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ )	A-1	Cd 2 ppm			1749			107			24
	A-2	Cd 2 ppm + EDTA			50			3			0.7
	A-3	Cd 2 ppm + NTA			137			0.4			2
	A-4	Cd 2 ppm + DTPA			43			10			2
	B-1	Cd 4 ppm	305		3110	1098		216	70		18
	B-2	Cd 4 ppm + EDTA			74			4			2
	B-3	Cd 4 ppm + NTA			154			16			6
	B-4	Cd 4 ppm + DTPA			73			3			3
	C-1	Cd 8 ppm	731	340	3213	1020	920	388	13	34	60
	C-2	Cd 8 ppm + EDTA			63			9			4
	C-3	Cd 8 ppm + NTA			262			27			10
	C-4	Cd 8 ppm + DTPA			181			12			0.2
対 照					2.2			3.0			0.8
Cu  ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	A-1	Cu 0.1 ppm		323	265		154	202		65	40
	A-2	Cu 0.1 ppm + EDTA			211			42			71
	A-3	Cu 0.1 ppm + NTA			107			40			25
	A-4	Cu 0.1 ppm + DTPA			117			44			37
	B-1	Cu 0.3 ppm	172	1473	344	209	543	511	58	46	41
	B-2	Cu 0.3 ppm + EDTA			155			75			30
	B-3	Cu 0.3 ppm + NTA			202			60			38
	B-4	Cu 0.3 ppm + DTPA			173			146			30
	C-1	Cu 0.6 ppm	180		—	169		—	60		—
	C-2	Cu 0.6 ppm + EDTA			253			77			44
	C-3	Cu 0.6 ppm + NTA			157			117			52
	C-4	Cu 0.6 ppm + DTPA			434			202			42
対 照					81			24			22
Pb  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	A-1	Pb 2 ppm			1846			548			50
	A-2	Pb 2 ppm + EDTA			236			68			1
	A-3	Pb 2 ppm + NTA			339			216			1
	A-4	Pb 2 ppm + DTPA			82			165			1
	B-1	Pb 10 ppm			86045			3170			165
	B-2	Pb 10 ppm + EDTA			158			963			1
	B-3	Pb 10 ppm + NTA			187			588			2
	B-4	Pb 10 ppm + DTPA			122			224			1
	C-1	Pb 20 ppm			42180			4560			359
	C-2	Pb 20 ppm + EDTA			686			645			1
	C-3	Pb 20 ppm + NTA			399			298			1
	C-4	Pb 20 ppm + DTPA			690			312			1
対 照					207			131			53

各部位の灰中重金属濃度と水中濃度との相関を第9表に示す。これより、Zn単独区では、内臓、エラ、その他のいずれも水中濃度の増加にともない魚体各部位中のZn濃度増加が認められた。これに対し、コンプレキサン処理区ではZnの蓄積濃度は減少傾向を示した。すなわち、EDTA添加処理区では内臓中の含有量は有意に( $p < 0.05$ )増加したが、エラではその関係は見られず含有量低下現象がみられた。NTA処理区では更にその



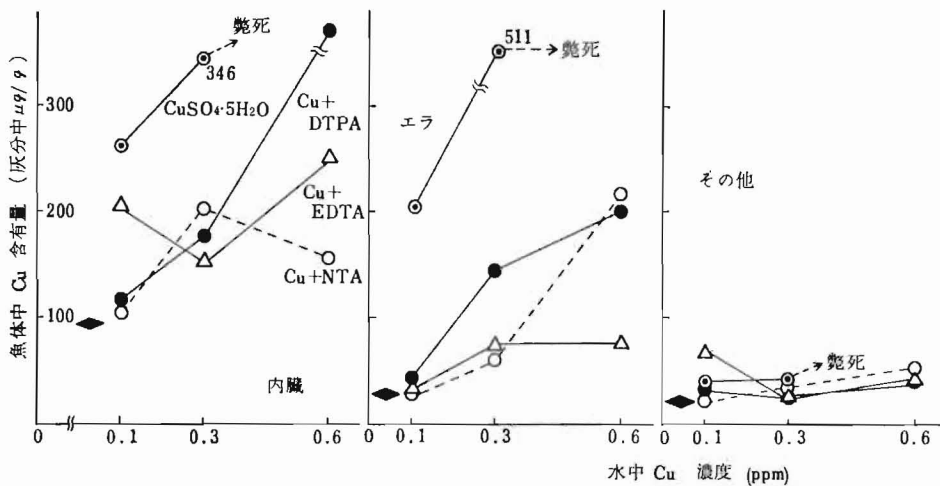
第4図 Zn 単独およびコンプレキサン処理区におけるコイ各部位灰中 Zn 含有量比較 (48時間暴露時の生存魚) ◆ : 対照



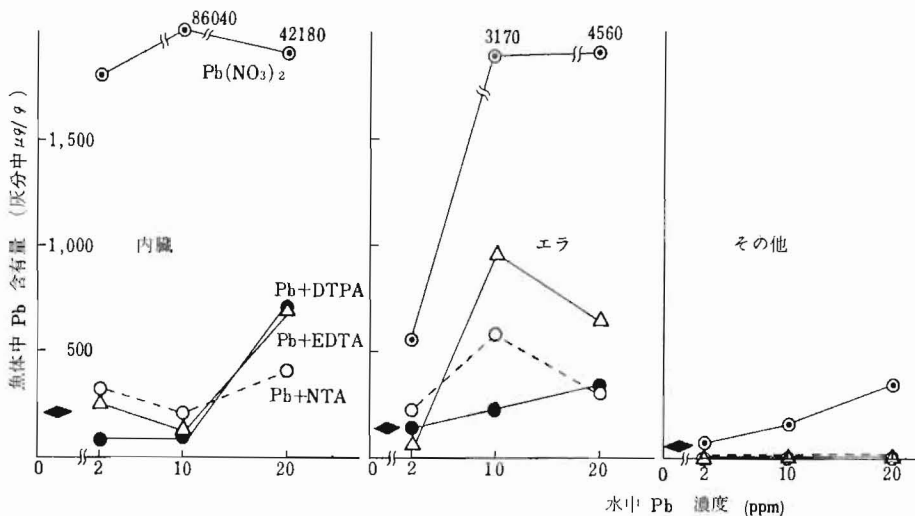
第5図 Cd 単独およびコンプレキサン処理区におけるコイ各部位灰中の Cd 含有量比較 (48時間暴露時の生存魚) ◆ : 対照

傾向が大で、飼育水の Zn 濃度増大とは逆に内臓中 Zn 濃度は減少し、エラは飼育水中 Zn 濃度とはほとんど無関係に濃度が一定であった。同様に、DTPA 処理区は内臓、エラの各部位において飼育水中 Zn 濃度とは有意な負相関 ( $p < 0.05$ ) を示し、Zn 含有量減少が認められた。しかし、その他の部位については EDTA, NTA, DTPA 処理区ともに Zn 単独区同様、飼育水中濃度とは正相関 ( $p < 0.01$ ) が認められた。

Cd 区では、Cd 単独の場合、内臓、エラ、その他ともに有意な正の相関 ( $p < 0.01$ ) が認められ、飼育水中 Cd 濃度の増加につれ魚体各部位中の濃度は増加した。これに対し、



第6図 Cu 単独およびコンプレキサン処理区におけるコイ各部位灰中 Cu 含有量比較 (48時間暴露時の生存魚) ◆ : 対照



第7図 Pb 単独およびコンプレキサン処理区におけるコイ各部位灰中 Pb 含有量比較 (48時間暴露時の生存魚) ◆ : 対照

EDTA, NTA, DTPA 処理区では EDTA 処理区の内臓, DTPA 区のエラ以外はすべて有意な正の相関 ( $p < 0.01$ ) が認められた。しかし Zn の場合と同様, 金属単独区に比し EDTA 等のコンプレキサン処理区は濃度低下現象が認められた。この点は次の各処理区の比較の項目で述べる。

また, Cu 区では, Cu 単独の場合, 内臓, エラ, その他ともに飼育水中濃度の増加により魚体各部位の濃度は有意に ( $p < 0.01$ ) 増加した。これに対し EDTA 処理区ではエラで有意な正の相関 ( $p < 0.05$ ) を示した他は内臓, その他の部分ともに Cu は濃度減少の

第9表 水中金属濃度とコイ各部位灰中含有量との相関関係 (48時間生存魚)

金属区	[x]-[y]	試料数	内 臓			エ ラ			そ の 他		
			y=ax+b		相関係数	y=ax+b		相関係数	y=ax+b		相関係数
			a	b		a	b		a	b	
Zn	(Zn)-(Zn)	27	373.3	7552	0.99**	-111.1	9818	0.92**	85.17	1285	0.99**
	(Zn)-(EDTA)	27	53.3	7374	0.50	21.3	4948	0.07	27.94	2035	0.99**
	(Zn)-(NTA)	27	-91.2	8585	-0.43	40.8	7552	0.27	37.39	1730	0.99**
	(Zn)-(DTPA)	27	-75.9	9319	-0.62**	-262	10500	-0.98**	1564	2190	0.98**
Cd	(Cd)-(Cd)	20	212.8	1697	0.80**	46.3	21	0.99**	6.64	3.0	0.80**
	(Cd)-(EDTA)	20	1.46	55.5	0.37	1.04	0.50	0.98**	0.54	-0.29	0.99**
	(Cd)-(NTA)	20	21.71	83.0	0.98**	4.19	-5.10	0.96**	1.29	0	0.98**
	(Cd)-(DTPA)	20	23.57	-10.9	0.99**	0.61	5.50	0.39*	0.36	3.4	0.77**
Cu	(Cu)-(Cu)	6	405.0	224.5	0.99**	1545	47.5	1.00**	-35.0	40.0	0.99**
	(Cu)-(EDTA)	6	103.2	171.9	0.53	64.9	43.0	0.83**	-46.1	0	-0.56
	(Cu)-(NTA)	6	80.3	128.6	0.43	156.8	20.1	0.99**	53.42	20.53	0.92**
	(Cu)-(DTPA)	6	652.6	23.8	0.97**	305.8	28.7	0.96**	12.37	32.21	0.52
Pb	(Pb)-(Pb)	30	1969	22353	0.42	219.5	418.5	0.97**	17.26	7.25	0.99**
	(Pb)-(EDTA)	30	26.14	81.18	0.83**	29.44	244.7	0.59**	0	0	0
	(Pb)-(NTA)	30	4.06	265.0	0.34	3.18	333.4	0.15	0.012	-0.13	0.06
	(Pb)-(DTPA)	30	34.72	-72.4	0.92**	8.29	144.5	0	0	0	0

\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$

傾向を示した。また NTA 処理区はエラとその他において正の相関を示したが、内臓では相関は認められなかった。DTPA 処理区は内臓、エラは飼育水中 Cu 濃度と正の相関 ( $p < 0.01$ ) が認められたが、その他では有意な相関は認められなかった。

Pb 区では、Pb 単独区の場合、エラ、その他の金属濃度と飼育水濃度とは正の相関が認められた。これに対し NTA 処理区ではエラ、内臓、その他のいずれの部位においても飼育水中の濃度との相関は認められなかった。また EDTA と DTPA にはほぼ同様の関係を示し、内臓およびエラでは飼育水中濃度と正の相関 ( $p < 0.01$ ) 関係にあった。その他ではその関係は全く認められず、ことにコンプレキサン処理による魚体各部位への金属量減少効果は顕著であった。

金属とコンプレキサンの安定度定数<sup>1)</sup>の順位は  $Cu \geq Pb > Zn \geq Cd$  の関係にある。しかし、Cu と Zn の魚体中金属含有量減少よりも、低い順位にある Cd が顕著に減少したのは興味ある結果であった。

なお対照区 (正常魚) に対する各金属単独区の 48 時間生存魚の灰中金属含有量の倍率比較を行なうと次の様である。

Cd では、内臓は 795~1460 倍量、エラは 36~129 倍量、その他は 22~75 倍量の値を示し、Cu では、内臓は 3.3~4.3 倍量、エラは 8.3~21 倍量、その他は 1.8~1.9 倍量であり、同様に Pb では、内臓は 8.9~415 倍量、エラは 4.2~35 倍量、その他は 0.9~6.8 倍量の含有量増加がみられた。概して、水中金属濃度増加とともに、魚体各部位中含有量は増加の傾向にあった。しかし、Zn では内臓は 1.1~1.6 倍量と Cu 区に比し、さらに対照

区との差は少なく，エラは0.8~1.0倍量，その他は0.8~1.5倍量であり，対照区とほぼ同量か，逆に含有量の減少がみられた。これはCu, Znが魚体の必須元素であるため金属処理による魚体内含有量変動が少なく，正常魚とほぼ同値を示したものと考えられる。

### 5. 金属単独区とコンプレキサン処理区における魚体中金属濃度の有意差

金属単独区とコンプレキサン処理区とにおける魚体3部位の灰中の金属含有量の有意差を第10表に示す。

第10表 コイ各部位中の金属含有量の金属単独区とコンプレキサン処理区間の有意差(48時間生存魚)

金属区	[金属単独区]-[処理区]	内 臓	エ ラ	そ の 他	試 料 数
Zn	(Zn)-(EDTA)	2.265**	2.309**	0.002	27
	(Zn)-(NTA)	2.230**	0.583	0.272	27
	(Zn)-(DTPA)	1.986*	0.833	0.777	27
Cd	(Cd)-(EDTA)	3.474***	2.833**	2.416**	20
	(Cd)-(NTA)	3.250***	2.709**	2.103**	20
	(Cd)-(DTPA)	3.400***	2.794**	2.456**	20
Cu	(Cu)-(EDTA)	2.488**	1.918	-0.488	6
	(Cu)-(NTA)	2.419	1.980*	1.381	6
	(Cu)-(DTPA)	3.260**	1.607	1.979*	6
Pb	(Pb)-(EDTA)	1.768*	1.826*	2.111**	30
	(Pb)-(NPA)	1.771*	2.024*	2.122**	30
	(pb)-(DTPA)	1.771*	2.146	2.111**	30

\*\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.10$

これよりZn区では，Zn単独区に比し，コンプレキサン処理により内臓，エラ，その他においては含有量は減少の傾向にあった。ことに内臓においてはEDTA, NTA添加処理により5%の危険率で，DTPA添加処理により10%危険率で，濃度減少が認められた。エラでもEDTA処理により有意に( $p < 0.05$ )減少した。

また，Cd区では内臓，エラ，その他ともにコンプレキサン添加による濃度減少の傾向を示した。とくに内臓においてはEDTA, NTA, DTPA添加処理のいずれの区もCd単独区に比し有意差( $p < 0.01$ )が認められた。またエラ，全身，その他においても有意差( $p < 0.05$ )が認められ，Cdに対してはコンプレキサンによる濃度減少効果が顕著であった。

Cu区では，内臓において，EDTA, DTPA添加はCu単独区に比し，有意差( $p < 0.05$ )が認められ，エラではNTA添加処理区で( $p < 0.10$ )，その他ではDTPA処理区で有意差( $p < 0.10$ )が認められた。

Pb区では，Cd区の場合と同様，コンプレキサン添加処理により，内臓，エラ，その他ともにPb単独区に比し有意な( $p < 0.10$ )濃度減少が認められた。なかでも，その他ではEDTA, NTA, DTPAいずれのコンプレキサン処理区でも，またエラではDTPA添加処理区に有意差( $p < 0.05$ )が認められた。

以上から，コンプレキサン添加処理により，Cd, Zn, Pb, Cuいずれの金属についても，

金属単独区に比し、金属濃度の低下現象が認められた。これはコンプレキサンを各金属の3倍モル量添加したことにより、重金属は単独イオンとしては存在せず、コンプレキサンによる錯体を形成し魚体への取入れが低下したと考えられる。すなわち、金属錯体形成が優先により、魚体蛋白質との結合は第二次的となり、金属コンプレキサンの型で魚体内を通過するために貯留現象が生じないものと推定される。したがって、コンプレキサン安定度定数の高いPb区にそれが顕著に現われたと考えられる。またCd区がこれに次ぐが、Zn, Cu区ではコンプレキサン添加処理による濃度減少は部分的で、エラでは顕著な差が認められなかったのはZn, Cuが心須元素であり、本来魚体中には相当量が存在する(第8表)ため、その変動は少なかったものと推測される。

## 6. 魚体各部位灰間の金属分布の有意差

各金属の単独区、コンプレキサン添加区における魚体各部位灰間の金属濃度の有意差検定を行ない第11表に示した。

第11表 各処理区におけるコイ各部位灰中金属含有量間の有意差(48時間生存魚)

金属	比較部位	試料数	金属単独	EDTA	NTA	DTPA
Zn	[内臓—エラ]	27	1.154	1.974*	-0.443	0.762
	[エラ—その他]	27	9.602***	2.165**	8.629***	4.524***
	[内臓—その他]	27	5.649***	11.55***	5.652***	10.607***
Cd	[内臓—エラ]	20	3.474***	7.938***	4.258***	2.159***
	[エラ—その他]	20	3.451**	1.484	1.051	2.317**
	[内臓—その他]	20	3.524**	8.585	4.548***	2.321**
Cu	[内臓—エラ]	6	-0.447	4.634***	2.316*	1.024
	[エラ—その他]	6	2.045*	0.988	1.396	2.034*
	[内臓—その他]	6	6.543***	5.125***	4.102***	2.097*
Pb	[内臓—エラ]	30	1.668	-0.642	-0.456	0.323
	[エラ—その他]	30	2.177**	2.129*	4.887***	5.364***
	[内臓—その他]	30	1.775*	1.126	3.255***	1.513

\*\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.05$ , \*:  $p < 0.10$

これよりZn区では、金属単独区EDTA, NTA, DTPA添加処理区のいずれにおいても内臓とエラ中のZn量には有意差は認められず[内臓—その他], [エラ—その他]の間には有意差( $p < 0.05$ )が認められた。したがって、各処理区とも魚体中Zn濃度の分布は内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他の関係を示した。

またCd区では、Cd単独の場合、内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他の関係にあるが、コンプレキサン添加処理区では各部位の濃度減少がみられ、特に内臓における濃度減少が著明であった。コンプレキサン添加処理における各部位の濃度関係はEDTA, NTA区が内臓  $>$  エラ  $\geq$  その他, DTPA区が内臓  $>$  エラ  $>$  その他の関係にあった。

Cu区ではコンプレキサン添加処理により魚体各部位への濃度減少傾向にあるが、Cd, Zn区に比し、各部位における濃度差は明確でない。すなわち、Cu単独区では内臓  $>$  エラ  $\geq$  その他, DTPA添加区では内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他の関係を示した。

また Pb 区では、Cu 区と同様、各部位における濃度は Pb 単独区に比し、コンプレキサン添加区では極めて低い値を示すが、各部位間の濃度差は顕著ではない。すなわち、Pb 単独区は内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他、EDTA 添加区はエラ  $\geq$  内臓  $\geq$  その他、NTA 添加区はエラ  $\geq$  内臓  $>$  その他、DTPA 添加区は内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他の順であった。

以上より、比較的高濃度、短期間（48 時間）暴露における生存魚の魚体中金属分布は Cd 区では内臓  $>$  エラ  $>$  その他の関係にあり、各部位間差が顕著であったが、Cu, Pb, Zn では内臓とエラの濃度は近接し、内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他の関係を示した。

### 7. 斃死魚と生存魚の各部位灰中金属濃度の比較及び斃死要因

Cd, Zn, Cu 単独区での斃死魚の出現した区における斃死魚と 48 時間生存魚との間における各部位灰中の金属濃度分布の関係を第 12 表に示す。

第 12 表 斃死魚出現の金属単独濃度区における生存魚（48 時間）と斃死魚との各部位中金属含有量比較（灰分中  $\mu\text{g/g}$ ）

金属濃度	魚体中部位 斃死魚・生存魚	内 臓			エ ラ			そ の 他		
		斃 死 魚		生 存 魚	斃 死 魚		生 存 魚	斃 死 魚		生 存 魚
		0~24 時間	24~48 時間	48時間 ~	0~24 時間	24~48 時間	48時間 ~	0~24 時間	24~48 時間	48時間 ~
Zn	20 ppm	—	10310 (3)	15170 (7)	—	10700 (3)	7462 (7)	—	2995 (3)	2994 (7)
		305 (1)	—	3110 (9)	1098 (1)	—	216 (9)	70 (1)	—	18 (9)
Cd	4 ppm	731 (5)	340 (4)	3213 (1)	1020 (5)	920 (4)	388 (1)	13 (5)	34 (4)	60 (1)
	8 ppm	—	323 (3)	265 (5)	—	154 (3)	202 (5)	—	65 (2)	40 (6)
Cu	0.1 ppm	172 (6)	1473 (1)	346 (1)	209 (6)	543 (1)	511 (1)	58 (6)	46 (1)	41 (1)
	0.3 ppm	180 (8)	—	—	169 (8)	—	—	60 (8)	—	—
	0.6 ppm	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(注)：( ) 内数値は魚体数を示す。

Zn 区では Zn 20 ppm 区で、24~48 時間内の斃死魚はエラ  $\geq$  内臓  $>$  その他、生存魚は内臓  $>$  エラ  $>$  その他の関係にあり、斃死魚は特にエラ組織中への Zn の吸着、沈着<sup>12, 13)</sup>が考えられた。

Cd 区では、Cd 4 ppm 区で 0~24 時間内の斃死魚はエラ  $>$  内臓  $>$  その他、生存魚は内臓  $>$  エラ  $>$  その他の関係を示し、Cd 8 ppm の場合にその傾向が顕著で、0~24 時間内斃死魚、さらに 24~48 時間内斃死魚においてその関係が著明で、エラ組織への Cd 吸着に基因するエラ組織損傷による、呼吸障害が考えられた。

Cu 区では、Cd, Zn の場合とは異なり、エラへの Cu 吸着は 48 時間生存魚に比し顕著ではない。したがって、エラ呼吸の障害による斃死ではなく、Cu の場合、強毒性金属であることからの斃死要因が大であると考えられる。

## 摘 要

重金属 (Cu, Cd, Pb, Zn) の比較的高濃度 (急性, 亜急性毒性) における魚体各部位中への集積性と斃死に対するコンプレキサン (EDTA, NTA, DTPA) の影響を鯉飼育実験により検討した。

1) 金属毒性は  $Cu > Cd > Zn > Pb$  の関係を示し, 蓄積性は,  $Cu$  は内臓  $>$  エラ  $>$  その他,  $Cd$  は内臓  $>$  エラ  $>$  その他,  $Zn$  は内臓  $\geq$  エラ  $>$  その他,  $Pb$  は内臓  $>$  エラ  $>$  その他の分布を示した。

2)  $Cu, Cd, Zn$  の稚鯉に対する毒性は大であるが, コンプレキサン添加により斃死率の低下が認められ, 魚体中各部位への集積性も抑制現象を示した。ことに  $Pb$  区,  $Cd$  区においてそれが顕著であり, 必須元素の  $Zn, Cu$  区ではその差が部分的であった。

3) 斃死因は金属により異なり,  $Cd, Zn$  はエラ組織への沈着により, エラ呼吸障害を惹起し,  $Cu$  は強毒性による生育障害から斃死因が考えられた。また  $Pb$  は低毒性金属であることが確認された。

4) コンプレキサン添加による pH 上昇の影響は, DTPA 3倍モル量添加時 ( $Zn$  20 ppm 区) の pH 9.4 が最高であったが, いずれの金属区でも 48 時間内の斃死への影響は認められなかった。

## 文 献

1. Pollard, R. R. 1969. Soap Chem. Spec. 42: 58.
2. 橋崎英雄. 1967. 化学と工業 20: 92.
3. 鈴木二郎. 1970. 化学と工業 22: 853.
4. Wallace, A. 1963. J. Agr. Food Chem. 11: 63.
5. Doundroff P. and Katz M. 1953. Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. I. Bio-assay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sewage Ind Wastes, 23, 11: 1380-1397. II. The metals, as salts. Sewage Ind. Wastes, 25: 802-839.
6. Mount D. I. 1968. Chronic toxicity of copper to fathead minnows (*Pimephales promela* RAFINESQUE). Water Res. 2: 215-223.
7. Pickering Q. H. and Heuderson C. 1966. The acute toxicity of some heavy metals to different species of warmwater fishes. Air wat. Pollut. Int. J. 10: 453-463.
8. Sprague J. B. 1968. Promising anti-pollutant: chelating agent NTA protects fish from copper and zinc. Nature 22: 1345-1346.
9. 西川克夫, 田端健二. 1969. 水産動物に及ぼす重金属の毒性とその緩和要因に関する研究-III. 数種重金属錯体の低毒性, 東海水研報, 58: 233-246.
10. 日本水産資源保護協会. 1972. 水産環境水質基準: 1-87. 社団法人日本水産資源保護協会.
11. 坂口武一, 上野景平. 1965. 金属キレート安定度, 金属キレート [I], 71-145. 南江堂.
12. Lloyd, R. 1960. The toxicity of zinc sulfate to Rainbow Trout. Ann. Appl. Biol., 48: 84.
13. Skidmore J. F. and Tovell P. W. A. 1972. Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout. Water Res., 6: 217-230.