

カドミウムによって誘発された脊椎骨異常魚の カルシウム、燐、マグネシウムおよび カドミウム含有量の変化

村 本 茂 樹

環境水中の毒性物質による魚の形態的異常については、脊椎骨彎曲、体色異常などの報告^{5,6,10)}があるが、その発生原因については多様な因子が作用するために複雑で、ことに天然水域においては不明の部分が多い。主な原因としては、農薬、重金属、PCBなどの環境汚染物質や物理的刺激²⁴⁾などが考えられる。実験例では農薬による脊椎骨異常発症の報告例^{14,15,22)}が多数を占める。

一方、重金属によるものとしては、筆者らのカドミウムによるコイ (*Cyprinus carpio* L.) の脊椎骨異常の発症例^{18,16,17,19)}のほか、ウグイ (*Tribolodon nakonensis*)²¹⁾、グッピー⁸⁾の骨異常例などがみられる。いずれも、公共用水域における環境基準値 (Cd 0.01 mg/l) で骨異常発症が確認された。他に fathead minnow²³⁾、bluegill⁷⁾でも骨異常例の報告がある。鉛による例は、brook trout (*Salverinus fontinalis*)⁹⁾ および rainbow trout (*Salmo gairdneri*)⁴⁾ の尾部脊椎側彎発生の報告がある。また亜鉛では minnow (*Phoxinus phoxinus*)²⁾ の脊椎骨折の報告がある。

前報¹⁶⁾において、高濃度のカドミウム (Cd) による脊椎骨異常魚は正常魚に対し魚体各部位の灰重/乾燥重 (%) が著しく低下する傾向が認められたことから、骨組織からの脱灰現象を推察した。そこで本報では低濃度の Cd 水中での長期間暴露による骨異常発症魚の脊椎骨、内臓、えら中のカルシウム (Ca)、燐 (P)、マグネシウム (Mg)、カドミウム (Cd) 量について、正常魚との比較検討を行なった。また骨異常魚の出現を繰り返し実験によって確認した。

本研究をすすめるに当たり御教示を賜った小林 純岡山大学名誉教授並びに本稿をまとめるに際して御助言を頂いた矢木博前信州大学教授、当農業生物研究所森井ふじ教授、青山 勲助教授、実験に御協力頂いた戸倉正人愛知県水産試験場技師の各位に対して深謝の意を表す。

材料および方法

1. 飼育方法

第1実験により Cd 水暴露による骨異常魚の発生を検討し、別実験でも発生し得るかどうかを知るために第2実験を行なった。

飼育第1実験 供試魚は体長約 6.5 cm、体重約 9 g の稚鯉 (*Cyprinus carpio* L.) を用い、各区 10 尾を 60 l 容ガラス水槽中で飼育した。実験区は、 $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ の水中濃度が Cd 0.01, 0.05, 0.1 mg/l となるように設定した Cd 投与区の 3 区と対照区の計 4 区である。飼育水は水道水 (第1表) を別の大水槽中で使用前 3 日間エアレーションした。換

昭和 56 年 1 月 26 日受理

水は1週間に2度、投餌は日本配合飼料株式会社製、養鯉用No.4飼料(Cd 0.05 μg/g)を用い隔日に行なった。飼育水温は全期間(100日間)を通じ、18.0~19.5°Cに保持した。

飼育第2実験 供試魚は体長約7.0 cm、体重約10 gの稚鯉(*Cyprinus carpio* L.)各10尾を用いた。これらをCd投与区(CdCl₂·2 $\frac{1}{2}$ H₂Oを用い、その水中濃度 Cd 0.01, 0.05 mg/l)の2区および対照区の計3実験区で100日間飼育した。飼育水温は18.0~20.0°Cに保持した。換水および投餌については飼育第1実験と同一方法で飼育を行なった。

2. 分析方法

骨異常発症魚も未発症魚も100日間飼育後、内臓、えら、脊椎骨およびその他の部位に分け、熱風乾燥器中で60°C、24時間乾燥後、秤量し乾燥重とし、電気炉中で450°C、24時間灰化後再び秤量し灰重量とした。この灰試料をHNO₃-HClO₄(2:1)混酸にて分解後、0.1N-HClを用いて一定容とし、試料溶液とした。Pの測定はBoltzら³⁾のリンバナドモリブデン酸法により定量し、Ca, Mgは磷酸塩の妨害を妨ぐためにLaCl₃を添加し、原子吸光装置にて測定した。またCaは湿式灰化試料をAPDC-MIBK抽出後原子吸光法により測定した。

3. 試薬および装置

試薬はいずれも特級試薬を用い、標準溶液はCdにはCdO, CaにはCa₃(PO₄)₂, MgにはMgO, PにはKH₂PO₄をそれぞれ用いて作製した。CaおよびMg定量用のマスキング剤としてはLaCl₃·7H₂Oを用いた。P発色用のバナジン酸はNH₄VO₃を、モリブデン酸は(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂Oを用いた。原子吸光装置はNippon Jarrell Ash AA-1 Mark II型(日本ジャーレルアッシュ株式会社製)を用い、比色計は日立101型比色計を用いた。X線写真撮影にはSOFTEX(日本ソフテックス社製)を用いた。

第1表 飼育水の平均水質(mg/l)

項 目	飼 育 水	日本の河川水*
Ca	4.6	8.8
Mg	1.5	1.9
Na	3.9	6.7
K	0.78	1.19
SO ₄	2.8	10.6
Cl	3.3	5.8
SiO ₂	12.7	19.0
PO ₄	0.005	0.021
NO ₃ -N	0.19	0.26
NH ₄ -N	0.06	0.05
Fe	0.03	0.24
アルカリ度 (CaCO ₃ として)	14.8	25.4
蒸 発 残 留 物	42.2	74.8
Cd	0.001	—
Cu	0.004	—
Zn	0.07	—
Pb	<0.05	—
pH	6.8	—

*: 文献 19)より引用。

—: 分析値なし。

結果および考察

1. 脊椎骨異常魚の出現

飼育中に肉眼で明らかに骨格異常の観察された魚を「異常発症魚」とし、異常の生じない魚を「未発症魚」、水道水のみで飼育した魚を「対照魚」とした。飼育第一実験における



第1図 Cd 0.1 mg/ℓ 区に出現した脊椎骨異常魚の拡大X線写真(実験1)



第2図 Cd 0.05 mg/ℓ 区に出現した脊椎骨異常魚の拡大X線写真(実験2)

脊椎骨異常魚のX線写真の1例を第1図に示す。異常発症魚はCd 0.01, 0.05, 0.1 mg/ℓ 区に出現し、それぞれ実験開始後47日, 85日, 73日目に各1尾観察された。異常発症魚は遊泳が不活発となり、水槽底面で腹を上にした状態となったが斃死には至らず、いずれも100日間生育した。飼育第2実験における脊椎骨異常魚の骨のX線写真の1例を第2図に示す。異常発症魚はCd 0.01, Cd 0.05 mg/ℓ の両区に各1尾、実験開始後58日, 95日目に観察されたが、実験終了時まで(100日間)生育した。脊椎骨のX線写真から、脊椎彎曲は第7~19関節に集中してみられた。

2. 魚体中の Cd, Ca, Mg, P 含有濃度

飼育第1実験および第2実験における魚体の内臓、えら、脊椎骨のCd, Ca, Mg, P含有濃度(灰中 μg/g)の分析結果をそれぞれ第2表, および第3表に示す。まず第1実験より、対照魚, 異常発症魚および未発症魚の金属含有濃度の比較を行なう。

Cdについてみると、対照魚に対し、Cd投与魚は内臓、えら、脊椎骨ともに高濃度を

第2表 飼育第1実験、骨異常発症魚および未発症魚中の Cd, Ca, Mg, P 濃度

(灰中 μg/g)

金属	魚体の部位	Cd 0.01 mg/ℓ	Cd 0.05 mg/ℓ	Cd 0.1 mg/ℓ	対 照
Cd	内 臓	16.2 (40.5)	44.6 (34.3)	61.3 (65.9)	0.221
	え ら	13.0 (14.5)	11.8 (25.7)	15.8 (51.4)	0.286
	脊 椎 骨	4.18(10.8)	5.74(7.51)	5.93(11.5)	0.122
Ca	内 臓	74.6 (65.9)	56.2 (58.2)	65.8 (65.9)	84.4
	え ら	505 (488)	435 (409)	519 (398)	669
	脊 椎 骨	186860 (130540)	176130 (138400)	178100 (124800)	213400
Mg	内 臓	10.9 (10.7)	10.3 (9.4)	11.8 (13.9)	10.5
	え ら	25.8 (27.0)	25.3 (26.1)	27.3 (27.2)	23.2
	脊 椎 骨	3955 (3965)	3926 (3876)	3863 (3811)	3776
P	内 臓	45.4 (52.5)	48.0 (38.8)	43.6 (32.5)	51.6
	え ら	348 (359)	319 (303)	366 (349)	468
	脊 椎 骨	93080 (73130)	86450 (75880)	85260 (78660)	104080

(): 骨異常発症魚.

第3表 飼育第2実験、骨異常発症魚および未発症魚中の Cd, Ca, Mg, P 濃度

(灰中 $\mu\text{g/g}$)

金属	魚体の部位	Cd 0.01 mg/l	Cd 0.05 mg/l	対 照
Cd	内臓	17.8 (35.1)	57.2 (59.9)	0.227
	えら	11.2 (21.1)	12.4 (56.8)	0.311
	脊椎骨	5.76(12.8)	6.39(8.33)	0.14
Ca	内臓	73.0 (64.7)	60.6 (71.8)	83.3
	えら	566 (439)	449 (432)	681
	脊椎骨	187740 (132980)	178630 (144200)	223300
Mg	内臓	10.6 (11.0)	9.2 (10.5)	10.2
	えら	25.1 (25.8)	25.6 (27.3)	23.6
	脊椎骨	3980 (3880)	3945 (4093)	3790
P	内臓	47.4 (43.4)	47.5 (40.8)	59.1
	えら	378 (357)	361 (338)	414
	脊椎骨	93120 (74060)	95260 (79700)	106310

() : 骨異常発症魚.

示した。また、えら部位以外では飼育水中の Cd 濃度の上昇に伴って、魚体中の Cd 含有濃度も上昇した^{16,18,19,20}。骨異常発症魚と未発症魚との間には、内臓では Cd 濃度の顕著な差は見られなかった。えらでは水中の Cd 濃度が低い実験区では大きな差は認められなかったが、Cd 0.05 mg/l 区では2倍、Cd 0.1 mg/l 区では3倍以上の差が生じた。また脊椎骨では未発症魚に比べ異常発症魚で、えらと同様に高濃度の Cd が認められた。

また Ca 濃度は対照魚に対し Cd 投与魚の内臓、えら、脊椎骨ともに減少傾向にあった。異常発症魚と未発症魚とでは内臓、えらの Ca 濃度に差はないが、脊椎骨では顕著な減少がみられた。

Mg は対照魚に対し、Cd 投与魚のえら、内臓では異常発症魚、未発症魚とともにほとんど濃度の差はみられないが、えらでは11~18%程度、脊椎骨では1~5%程度の増加の傾向にあった。

また P は、対照魚に対し Cd 投与魚は内臓、えら、脊椎骨ともに Ca と同様、濃度の減少傾向にあり、脊椎骨では異常発症魚の P 濃度が未発症魚のそれに対しさらに低濃度を示した。

同様に、第2実験は第1実験とほぼ類似傾向にあったが、Cd 濃度はえら、脊椎骨ともに骨異常発症魚に高い傾向を示した。Ca, P は第1実験と同様に、Cd による魚体各部位中の濃度減少がみられた。Mg も異常魚と対照魚間の差は少ないが、えら、脊椎骨にやや濃度増加がみられた。

次に魚体中の金属含有量(乾物中 μg) (第4表) を比較すると、骨異常発症魚が未発症魚に比べ、高含有量を示した金属は内臓では Cd であり、ほぼ同値を示したものは Mg であり、逆に低含有量を示したものは Ca, P であった。また、えらでは骨異常発症魚の方が高含有量を示した金属は Cd, Mg, P であり、ほぼ同値を示したものは Ca であったが、これらの金属含有量については、いずれも異常発症魚と未発症魚間の有意差は認め

第4表 骨異常発症魚、未発症魚および対照魚のCd, Ca, Mg, P含有量(乾物中 μg)の平均値および灰重/乾燥重比

金属	魚体中部位	Cd 0.01 mg/ℓ	Cd 0.05 mg/ℓ	Cd 0.1 mg/ℓ	対 照
Cd	内 臓	0.476 (1.09)	1.52 (1.43)	1.99 (2.23)	0.006
	え ら	0.154 (0.225)	0.162 (0.505)	0.213 (0.730)	0.004
	脊 椎 骨	0.062 (0.133)	0.076 (0.108)	0.075 (0.137)	0.002
Ca	内 臓	2.09 (1.87)	1.20 (2.18)	2.13 (2.56)	2.44
	え ら	6.81 (5.93)	5.91 (5.25)	7.01 (5.65)	9.32
	脊 椎 骨	2374 (1482)	2375 (1648)	2262 (1485)	3226
Mg	内 臓	0.305 (0.302)	0.290 (0.271)	0.382 (0.360)	0.284
	え ら	0.323 (0.337)	0.340 (0.609)	0.369 (0.386)	0.323
	脊 椎 骨	49.4 (44.2)	52.7 (48.4)	49.1 (45.4)	56.0
P	内 臓	1.32 (1.38)	1.45 (1.24)	1.41 (1.10)	1.62
	え ら	4.62 (4.57)	4.55 (4.00)	4.94 (4.96)	6.08
	脊 椎 骨	1159 (828)	1212 (869)	1083 (936)	1556
灰重/ 乾燥重 (%)	内 臓	6.6 (6.7)	6.9 (6.2)	7.2 (6.4)	7.0
	え ら	13.7 (13.6)	12.6 (10.9)	12.7 (8.1)	14.7
	脊 椎 骨	16.2 (12.3)	16.8 (11.0)	16.7 (11.7)	17.9

() : 骨異常発症魚.

られなかった。しかし、脊椎骨ではCdは異常発症魚が危険率5%以下($p < 0.05$)で有意に増加し、逆にCaは危険率1%以下で、Mg, Pは危険率5%以下($p < 0.05$)で有意に減少した(第5表)。またこれらの元素を対照魚と比較すると、Cdは魚体各部位で増加し、Mgがえら、脊椎骨でやや増加する他は、Ca, P, Mgは異常発症魚および未発症魚ともに減少傾向を示した。

また魚体各部位の灰重/乾燥重(%)は脊椎骨において、骨異常魚が危険率1%以下($p < 0.01$)で有意な減少を示し、Ca, Mg, Pなどの骨中無機元素の含有量の減少と対応した。

3. 魚体中Ca/P含有濃度比

骨異常発症魚、未発症魚および対照魚の内臓、えら、脊椎骨中のCa/P含有濃度比を第6表に示す。

骨異常魚のCa/P比は対照魚に比べ、内臓では約10%高く、えら、脊椎骨では約15%低い傾向にあった。また未発症魚に対しても、内臓では約30%高いが、えら、脊椎骨ではそれぞれ8%、14%低い傾向にあった。とくに、脊椎骨では対照魚の2.08に対して、1.76と危険率1%以下($p < 0.01$)で有意に低い含有比を示した。すなわち、対照魚の脊椎骨中Ca/P比

第5表 骨異常発症魚と未発症魚間のCd, Ca, Mg, P含有量(乾物中 μg)平均値の差($n=5$)

金属	魚体中部位	含有量差
Cd	内 臓	-0.275
	え ら	-0.331
	脊 椎 骨	-0.007*
Ca	内 臓	1.509
	え ら	0.35
	脊 椎 骨	719 **
Mg	内 臓	-0.094
	え ら	-0.127
	脊 椎 骨	3.6 *
P	内 臓	0.105
	え ら	-0.095
	脊 椎 骨	223 *

*: $p < 0.05$.

** : $p < 0.01$.

第6表 Cd水暴露魚と対照魚の魚体各部位中Ca/P含有濃度比

部 位	骨異常発症魚			未発症魚			対 照 魚		
	第1 実験	第2 実験	平均	第1 実験	第2 実験	平均	第1 実験	第2 実験	平均
内 臓	1.72	1.61	1.67	1.42	0.93	1.18	1.63	1.41	1.52
え ら	1.28	1.30	1.29	1.41	1.37	1.39	1.43	1.65	1.54
脊 椎 骨	1.71	1.81	1.76	2.04	1.98	2.01	2.05	2.10	2.08

が、ラットの成骨中のCa/P比の1.8~2.0²⁵⁾とほぼ同値を示すのに対し、骨異常魚ではCdによる骨中Ca量の著しい減少により低い値を示したためと考えられる。

また未発症魚では対照魚に比べ内臓中Ca量は28%減少しているが、異常発症魚では10%増加の傾向を示し、その増加は骨組織から内臓へのCa溶出によるものではないかと推察される。

これらのことから、低濃度のCd水での、長期間暴露によるCdの魚体中、とくに内臓への集積²⁰⁾により、Ca骨代謝に何らかの障害が与えられ、骨組織からのCa, P, Mgなどの無機元素の溶脱による脱灰が惹起され、骨格の軟弱化が生じるものと推察される。またこれに魚の遊泳運動による筋肉の牽引が伴い骨格の変形が助長され、外見的にも骨曲がり魚の出現が観察されるに至るものと考えられる。これに対し、未発症魚は異常発症魚同様、Cdの集積により骨代謝異常は進行しつつあるが、異常発症魚に比し骨中Ca, P, Mg等の減少程度が少なく、骨曲がり発症の出現に至らないものと推測される。

一方、温血動物についても本実験と類似の現象が報告されている。ラットを用いて飼料の1/10,000濃度にCdを混入させ、これを投餌して飼育したところ、Ca収支が負を示し、骨の脱灰を推察した報告¹²⁾、またCdによるラットの脊椎骨彎曲を観察し、骨中Cd量の増加およびCa量の軽度の減少とMg, Znの減少を認めた報告¹¹⁾がある。したがって、本実験において、温血動物のみならず魚類においてもCdによる骨異常発症ならびに骨組織からの脱灰現象がつきとめられた。

摘 要

低濃度のCd水中での長期間暴露による異常発症魚の魚体中のCa, P, Mg, およびCd量の変化を測定した。またX線写真による脊椎骨異常の確認を行ないCa溶脱による骨異常発症の機序について検討を加えた。また繰り返し実験によりCd水による骨異常魚の再出現の可能性を調べた。

1) 骨異常魚の出現は、第1実験ではCd 0.01, 0.05, 0.1 mg/l区にみられ、第2実験ではCd 0.01, 0.05 mg/l区に各1尾観察された。脊椎骨彎曲は第7~19関節にみられ、特に遊泳運動の屈曲部に集中した。

2) Cd水での暴露により、魚体中のCd量は増加し、Ca, Pは減少傾向を示した。特に脊椎骨中のCa, Pが著しく減少し、Mgがやや増加した。これはラットの場合と同様に、CdによるCa骨代謝異常に伴う脱灰現象と考えられ、異常発症魚において骨の灰重/乾燥重(%)も有意な低下を示し、前報¹⁶⁾で推測した骨組織からの無機元素の溶脱が明確にされた。

3) これらの結果から、脊椎骨異常魚は、Cdの慢性毒により骨代謝異常が誘起され、骨中Caの溶脱に伴う骨組織の軟弱化と同時に遊泳による魚の筋肉運動の牽引のために、脊椎骨の彎曲が助長され出現するものと考えられた。

文 献

1. 阿部登茂子, 田中清介, 糸川嘉則. 1972. 実験的カドミウム中毒に関する研究(2). 低たんぱく質, カルシウム欠乏がラットのカドミウム中毒に及ぼす影響. 日衛誌 27: 308-315.
2. Bengtsson, B. E. 1974. Vertebral damage to minnow *Phoxinus phoxinus* exposed to zinc. *Oikos* 25: 134-139.
3. Boltz, D. F. 1958. Colorimetric determination of nonmetals. p. 36 Interscience Pub. Inc., New York.
4. Davies, P. H., Goettl, J. P., Sinley, Jr. and Smith, N. F. 1975. Acute and Chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri* in hard water. *Water Res.* 10: 199-206.
5. Dawson, C. E. 1964. A Bibliography of abnormalities of fishes. *Gulf. Res. Repts.* 1: 308-399.
6. Dawson, C. E. 1966. A Bibliography of abnormalities of fishes. *Gulf. Res. Repts.* 2: 169-176.
7. Eaton, J. G. 1974. Chronic cadmium toxicity to bluegill (*Lepomis macrochirus Rafinesque*). *Trans. Amer. Fish Soc.* 103: 729-735.
8. 藤田正澄, 大田原純子, 片山信二. 1975. グッピーに及ぼすカドミウムの慢性毒性に関する研究. 日衛誌 21: 587-591.
9. Holcombe, G. W., Benoit, D. A., Leonard E. N. and McKim, J. M. 1976. Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1731-1741.
10. 今田和史, 吉住喜好. 1973. 魚類の脊椎骨異常 I. 道内で発見された奇形魚について. 水産研報: 2845-2855.
11. Kobayashi, J. 1960. Chemical study of average quality and characteristics of river waters of Japan. *Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ.* 2: 313-358.
12. 小林 純. 1969. イタイイタイ病の原因の追究 I. カドミウムをめぐる生物地球化学. 科学 39: 286-293.
13. 小林 純, 森井ふじ, 村本茂樹, 中島 進, 原 一恵, 戸倉正人. 1972. 魚類の重金属蓄積に及ぼすキレート剤の影響(第2報). 日衛誌 27: 224.
14. Mehrle, P. M. and Meyer, Jr. F. L. 1975. Toxaphene effects on growth and development of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 593-598.
15. Meyer, F. P. 1966. A new control of anchor parasite, *Lernea cyprinacea*. *Progr. Fish Cult.* 28: 33-39.
16. 村本茂樹. 1979. 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2報 低濃度重金属(Cd, Cu)水における水生動物へのこれら重金属の集積及び毒性に対するコンプレキサンの影響. 農学研究 58: 31-42.

17. Muramoto, S. 1980. Decrease in cadmium concentration in a Cd-contaminated fish by short-term exposure to EDTA. Bull. Environ. Contamn. Toxicol. 25 : 828-832.
18. Muramoto, S. 1980. Effect of complexans (EDTA, NTA and DTPA) on the exposure of carp to high concentrations of heavy metals (Cd, Cu, Zn, and Pb) in water. Bull. Environ. Contamn. Toxicol. 25 : 941-946.
19. Muramoto, S. 1981. Vertebral column damage and damage and decrease of calcium concentration in fish exposed experimentally to cadmium. Env. Poll. series-A 24 : 125-133.
20. Muramoto, S. 1981. Influence of complexans (EDTA, DTPA) on the toxicity of cadmium to the fish at chronic levels. Bull. Environ. Contamn. Toxicol. 27 (in press).
21. 中村 亮. 1975. カドミウムのウグイ体内蓄積に関する実験的研究. 日衛誌 21 : 321-327.
22. 西内康浩. 1971. 農薬製剤の数種淡水産動物に対する毒性—XI. 水産増殖 19 : 151-157.
23. Pickering, Q. H. and Gast, M. H. 1972. Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). J. Fish. Res. Board Can. 29 : 1099-1160.
24. Spencer, S. L. 1967. Internal injuries of largemouth bass and bluegills caused by electricity. Progr. Fish Cult. 29 : 168-169.
25. 菅原直毅, 長野千枝子, 照井和幸, 岡田 晃. 1973. カドミウムと分娩負荷によるラットの骨塩変化について. 日衛誌 28 : 270-275.