

# メダカの胚および稚魚に対するカドミウムの効果

青 木 一 子

280 千葉市・放射線医学総合研究所養成訓練部

1977年 8月 1日 受 領

1977年 9月 3日 再受領

Effects of Cadmium on Embryos and Fry of the Medaka, *Oryzias latipes*. KAZUKO AOKI (Training School, National Institute of Radiological Sciences, Chiba 280)

**ABSTRACT** Effects of cadmium on survival, hatchability, and histological characters of the brain, and uptake of  $^{109}\text{Cd}$  by eggs were studied using embryos or fry of the medaka, *Oryzias latipes*. When the embryos and the fry were exposed to cadmium at a concentration of 0.06 mg/l, survival time was shortened. With increasing concentration of cadmium, survival time decreased even more. The fry were more sensitive to cadmium than embryos or adult fish. Hatchability was also decreased at a dose of 0.06 mg/l cadmium, and almost no fry were hatched when exposed to 0.61 mg/l. Pycnoses were seen during 1-4 days after hatch in the brains of fry exposed to a particularly high concentration of cadmium. (*Zool. Mag.* 87: 91-97, 1978)

飼育水の Cd イオンの魚類に対する影響については、濃度-生存関係 (Pickering and Henderson, 1966; Ball, 1967; Brown, 1968; Eisler, 1971; Pickering and Gast, 1972), 病理的变化 (Gardner and Yevich, 1969 and 1970) などが何種かの成魚で調べられている。本実験では  $\text{CdCl}_2$  溶液中で餌育したヒメダカの胚および稚魚について、(1) 濃度-生存関係、(2) 孵化率、(3) 卵胚への  $^{109}\text{Cd}^{++}$  の取り込み、(4) 脳の組織像などを調べたので報告する。

## 材 料 と 方 法

材料は1年齢のヒメダカ, *Oryzias latipes* (放射線医学総合研究所にて自繁) から得られた卵胚と稚魚を用いた。親魚は人工照明付きの 25°C の恒温室で飼い、つねに一定条件の下で産卵させた。胚は産卵後 5~8 時間 (桑実期) のものを、稚魚は孵化後 24 時間以内に蓋つきの径 8.5 cm の腰高シャーレに 50 個体ずつ入れ、溶液は 100 ml とし、1 日おきにかえた。成魚を用いた実験は、径 15 cm のガラス製シャーレに溶液 500 ml を入れ、年齢 1 年 5 ヶ月のものを 5 匹ずつとし、2 日おきに液をかえた。脱

イオン水 (銅釜で蒸溜したのちイオン交換樹脂を通したもの、pH 5.6) に  $\text{CdCl}_2$  を  $\text{Cd}^{++}$  として 0.06~4.90 mg/l とかした液を主として用いた。井戸水を利用した実験では、千葉市の本研究所の井戸水 (pH 6.5) を用い、井戸水および使用した  $\text{Cd}^{++}$  溶液の  $\text{Cd}^{++}$  量を原子吸光法でチェックした。実験はすべて水温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  で行ない、餌は実験期間中全く与えず、死亡率と孵化率を記録した。組織学的観察のために稚魚をブアン固定し、5  $\mu\text{m}$  のパラフィン横断切片を作り、ヘマトキシリン・エオジン (H. E.) およびルクトールファストブルー・クレシールファストバイオレット染色を行なった。 $\text{Cd}^{++}$  の卵胚への取り込みは  $^{109}\text{Cd}$  (EC,  $\gamma$ : 0.088 MeV) を用い、0.4  $\mu\text{Ci/ml}$  のキャリアフリー液 50 ml に受精後 6 日の卵を入れ、5 秒、16 時間、54 時間後にブアン液で固定した。エタノールで 3 回洗い、双眼顕微鏡の下で卵殻と胚・卵黄部分に分け乾燥し、1 処理に対し 60 個の卵を  $\gamma$ -多重波高分析器で測定した。

## 結 果

**濃度-生存関係** 本実験はおもに脱イオン水を用いたが、脱イオン水の魚に対する影響を知るために、

井戸水を用いた場合と稚魚の生存に対する効果を比較した (Fig. 1)。稚魚には餌を与えなかったため、最終的には全個体が死亡したが、平均生存日数は井戸水で  $10.7 \pm 1.7$  日、脱イオン水では  $7.1 \pm 1.8$  日であった。

ヒメダカの胚を  $0.06 \sim 1.23$  mg/l の  $\text{Cd}^{++}$  溶液に入れ、その濃度—生存関係を Fig. 2 に示した。 $1.23$  mg/l では全胚が死ぬが、 $0.06 \sim 0.61$  mg/l の

濃度では死ぬ個体と発生が進んで孵化する個体があり、濃度が高いほど死亡率が高かった。次に稚魚を  $0.06 \sim 2.45$  mg/l の濃度で飼ったばあいの濃度—生存関係を Fig. 3 に示した。飼を与えなかったため魚は12日以内に全て死んだが、その生存時間は濃度が高くなるとともに短くなった。胚や稚魚の比較として1年歳の成魚についての濃度—生存関係をFig. 4 に示した。成魚は脱イオン水中餌を与えなくても

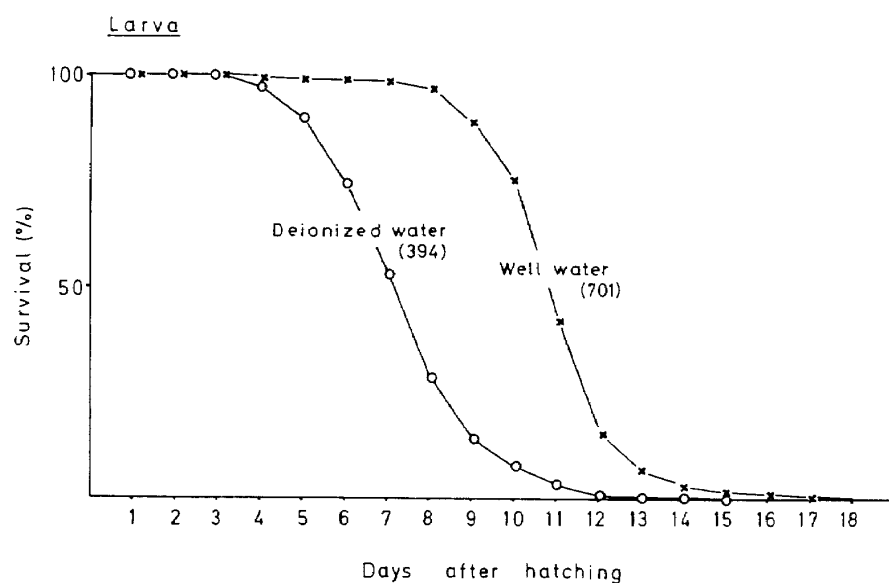


Fig. 1. Survival curves of the fry kept in deionized water (o) or well water (x) from the day of hatching without food. The number of fry is parenthesized.

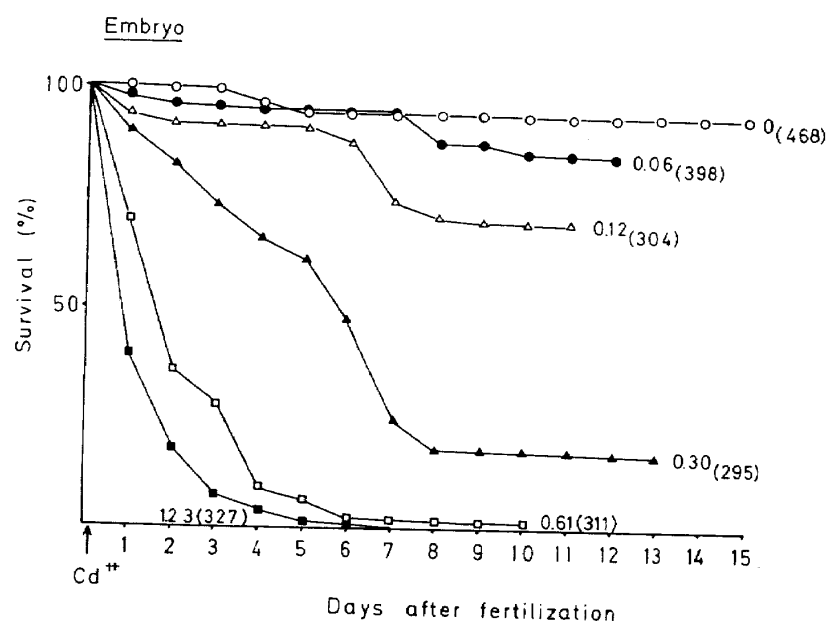


Fig. 2. Survival curves of embryos exposed to cadmium. Concentration: mg/l  $\text{Cd}^{++}$ . The number of embryos is parenthesized.

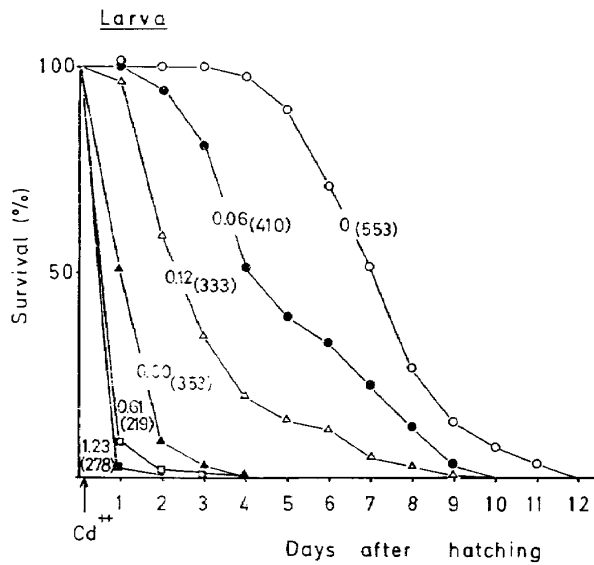


Fig. 3. Survival curves of the fry exposed to cadmium. Concentration: mg/l  $\text{Cd}^{++}$ . The number of fry is parenthesized.

2ヶ月以上生存する個体もあったが、0.06 mg/l の  $\text{Cd}^{++}$  処理で生存時間が対照群より短くなった。Fig. 2, 3, 4 から96時間  $\text{TL}_{50}$  値 (median tolerance limit), すなわち96時間に50%生存になるような  $\text{Cd}^{++}$  の濃度 (mg/l) を求めると、胚で0.35, 稚魚で0.06, 成魚で0.20 mg/l となった。稚魚の

$\text{TL}_{50}$  値は成魚の約 1/3, 胚の 1/6 と低く, 稚魚の  $\text{Cd}^{++}$  に対する感受性の高いことが判明した。

**孵化率**  $\text{Cd}^{++}$  濃度と孵化関係を Fig. 5 に示した。濃度が高くなると孵化率は低下し, 1.23 mg/l では胚はすべて死んだ。 $\text{Cd}^{++}$  0.06~0.12 mg/l 処理では対照群よりも早く孵化する傾向がみられ, 孵化終了の時期も対照群より早かった。

**$^{109}\text{Cd}^{++}$  の卵胚への取込み** 胚中への  $\text{Cd}^{++}$  の侵入を知るため, 受精後6日の胚の  $^{109}\text{Cd}$  の取込みを調べた (Table 1)。5秒後でも  $^{109}\text{Cd}$  は胚・卵黄部にわずかながら取込まれ, 時間的経過にともなう多く取込まれた。この卵内の  $^{109}\text{Cd}$  濃度は外液の1/22 (16時間後) ないし1/10 (54時間後) に相当した。

**脳の組織像** 光学顕微鏡により稚魚 (孵化後0~4日) の組織像に対する  $\text{Cd}^{++}$  の影響を調べた。この実験には井戸水を用いた。その結果脳, 眼, 肝の細胞に異常が認められたが, そのうちとくに変化の著しかった脳について述べる。孵化後0~4日の稚魚の脳は, 終脳, 視蓋, 小脳, 下葉, 間脳, 顔面葉が見わけられた。Figs. 6A と B は正常魚の孵化後1日の小脳および顔面葉の横断切片で, 核には異常はみられなかった。分裂像はときどき認められた。神経細胞とグリア細胞はこの時期ではまだ判別できなかった。Figs. 6C と D は, 孵化後3日間  $\text{Cd}^{++}$  0.61mg/l の濃度で飼育したものの脳で核濃縮がみられる。傷害を受けた核は球形に濃縮し, へ

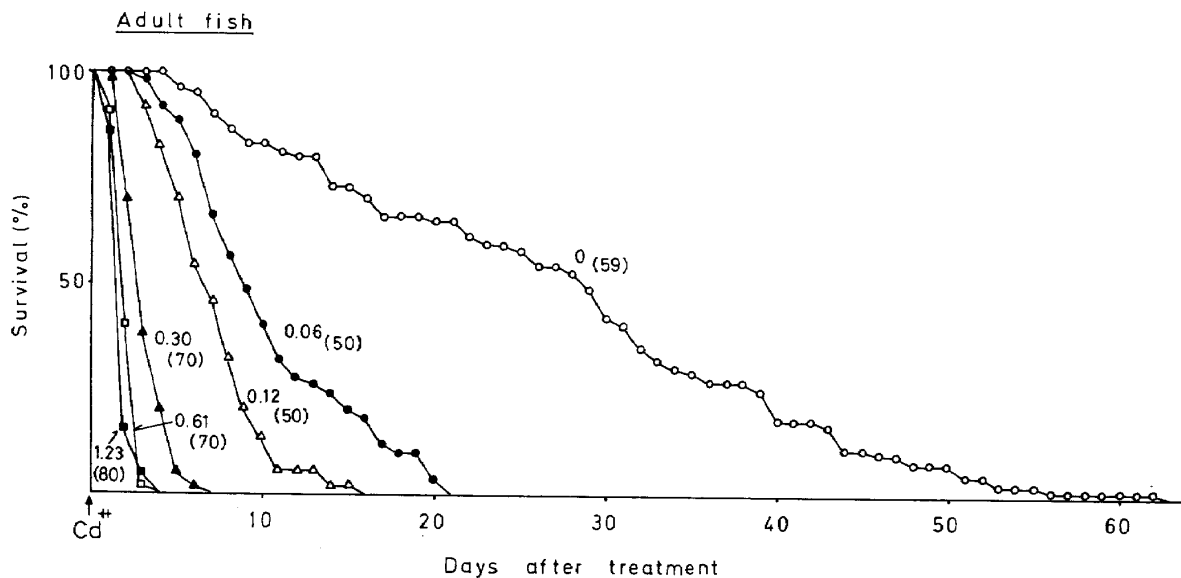


Fig. 4. Survival curves of the adult fish exposed to cadmium. Concentration: mg/l  $\text{Cd}^{++}$ . The number of fish is parenthesized.

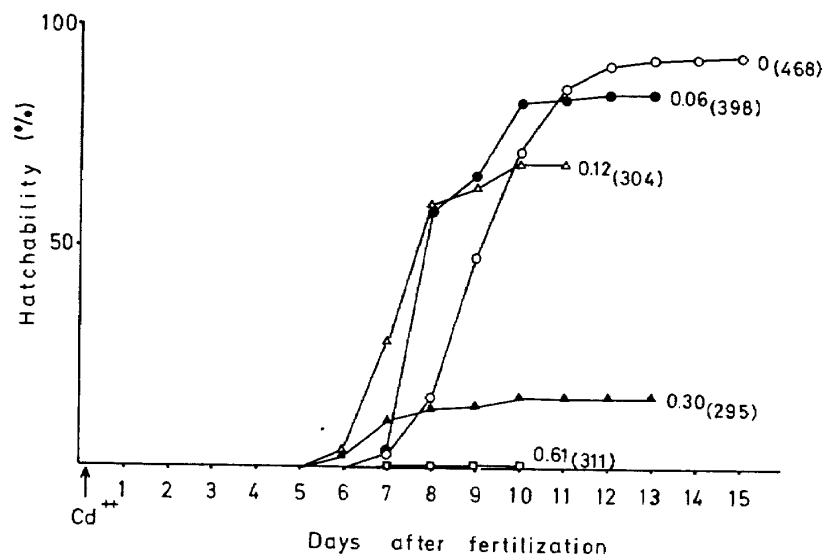


Fig. 5. Hatchability of eggs exposed to cadmium. Concentration: mg/l  $\text{Cd}^{++}$ . The number of eggs is parenthesized.

Table 1. Uptake of  $^{109}\text{Cd}$  by eggs.

| $\text{Dose}$<br>$\mu\text{Ci/ml}$ | No. of eggs | Time of treatment<br>with $^{109}\text{Cd}$ | Chorion<br>$\text{cpm/egg} \pm \text{S. D.}$ | Embryo and yolk<br>$\text{cpm/egg} \pm \text{S. D. } (\mu\text{Ci/ml})$ |
|------------------------------------|-------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 0.4                                | 60          | 5 sec                                       | 0 $\pm 0.00$                                 | 0.93 $\pm 0.47$ (0.0016)                                                |
| 0.4                                | 60          | 16 hr                                       | 0.91 $\pm 0.15$                              | 10.61 $\pm 0.25$ (0.0179)                                               |
| 0.4                                | 60          | 54 hr                                       | 2.43 $\pm 0.20$                              | 23.26 $\pm 0.34$ (0.0393)                                               |

マトキシリンに濃染した。Figs. 6E と F は孵化後 24 時間以内に  $\text{Cd}^{++}$  0.61 mg/l 処理をして後 5 日の魚で、傷害の程度が著しく、多数の細胞が核濃縮をおこしている。傷害を受ける部位は個体により程度の差はあったが、終脳の中心部、視蓋の腹側、間脳の中央および腹側周辺部、円形核、下葉の周辺部、顔面葉の中心部等細胞の集っている部分であった。ごく一部のみに傷害がみられるようなことはなく、脳全体にわたっていた。

このような傷害を受けた魚の脳が  $\text{Cd}^{++}$  処理後魚を水に戻したとき回復するか否かを知るために、予備的に孵化後 2 日間  $\text{Cd}^{++}$  0.61 mg/l 濃度液で処理し、その後井戸水中で餌としてテトラミンを与え 1 ヶ月間飼育、生き残った 8 個体について組織像を観察した。その結果光学顕微鏡では異常な細胞はみられず、神経細胞とグリア細胞の分化も進んでいた。

Fig. 7 には孵化後 0～4 日の稚魚の脳にみられた核濃縮の出現頻度を示した。0.61-a および 1.23～4.90 mg/l 群は産卵後から続けて  $\text{Cd}^{++}$  処理を

し、孵化後もそのまま飼ったもので、3～4 日で出現頻度が高くなった。0.61-b 群は孵化してから  $\text{Cd}^{++}$  処理をしたもので、孵化前から処理した 0.61-a 群よりも頻度が高く、3～4 日で 100% となった。

## 考 察

魚に対する重金属の毒性は、魚の種や飼育に用いた水の硬度によってかなり異なる (Pickering and Henderson, 1966; Brown, 1968; Eisler, 1971)。本実験では  $\text{Cd}^{++}$  のみの効果をみるために脱イオン水を用いたが、これは魚にとって  $\text{Ca}^{++}$  イオンなどの欠乏を招き、加えて餌も与えなかったので生存にはよい条件ではなかった。それ故、無処理群との比較によってのみその影響を検討した。 $\text{Cd}^{++}$  の毒性に関しては、成魚でいくつかの報告があるが、胚や稚魚について、とくに組織学的にはあまり多く研究されていない。

$\text{Cd}^{++}$  に対するヒメダカの濃度-生存関係については、他の魚の場合と飼育条件が全く異なるので比

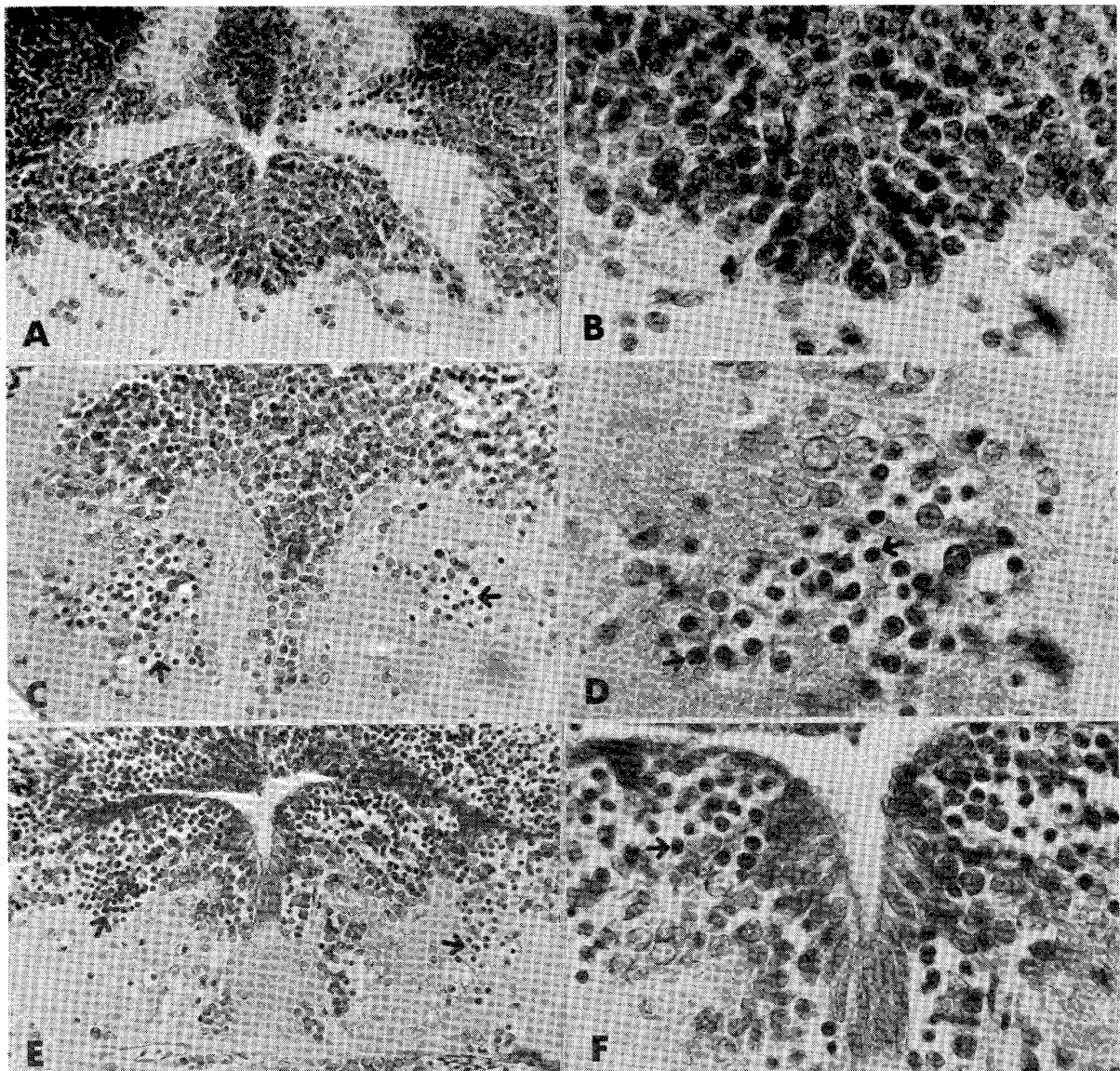


Fig. 6 Changes in brain of the fry exposed to cadmium. A and B, cross section of brain of normal fry 1 day after hatching, including cerebellum and vagal lobe of medulla oblongata. C and D, brain of fry treated with cadmium in well water solution for 3 days after hatching. Arrow indicates pycnotic cells. E and F, brain of fry treated with cadmium in well water solution for 5 days after hatching. A-F, H.E. stain. A, C and E,  $\times 300$ . B, D and F,  $\times 765$ .

較できないが、 $0.06 \text{ mg/l}$  の濃度で生存時間の短縮がみられ、かなり毒性が高い。またヒメダカでは稚魚>成魚>卵胚の順で $\text{Cd}^{++}$  に対する感受性が高かったが、fathead minnow では胚の時期が一番感受性が高い (Pickering and Gast, 1972) といわれている。

孵化に対する  $\text{Cd}^{++}$  の効果として、 $0.06 \sim 0.30 \text{ mg/l}$  の濃度で孵化時期が早くなる傾向がみられた。このことは脱イオン水を用いたための他のイオン欠

如によるものか、 $\text{Cd}^{++}$  自体の効果によるものか問題が残される。Hyodo-Taguchi *et al.* (1973) はメダカの卵に速中性子を照射すると、 $100 \sim 750 \text{ rad}$  で孵化の時期が早くなることを報告し、孵化酵素の合成及び分泌が速中性子によって影響を受けると示唆した。 $\text{Cd}^{++}$  のばあいも同じような理由が考えられる。

$^{109}\text{Cd}$  の卵胚への取込みに関しては、卵内の $\text{Cd}^{++}$  濃度が54時間後でも外液の $1/10$ であった。胚の感受

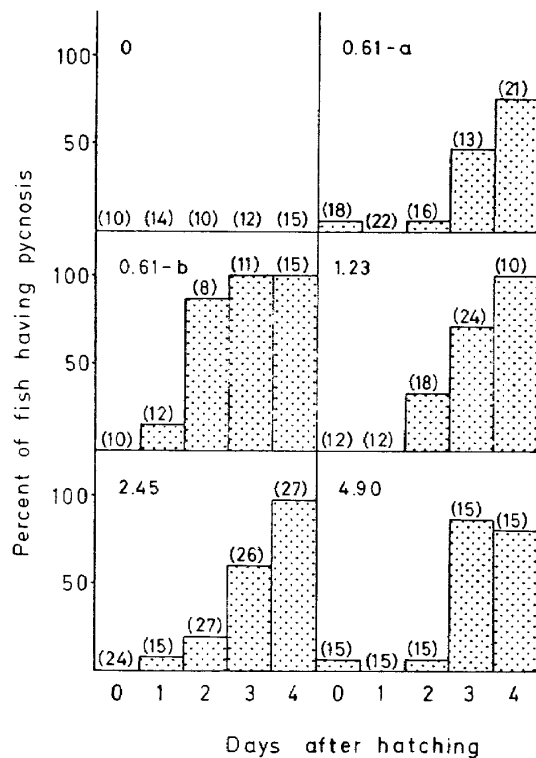


Fig. 7. Frequency of pycnoses in the brain of cadmium-treated fry. 0, untreated control kept in well water; 0.61-a, exposed to  $\text{Cd}^{++}$  (0.61 mg/l) after fertilization; 0.61-b, exposed to  $\text{Cd}^{++}$  (0.61 mg/l) after hatching; 1.23, 2.45 and 4.90 indicate the concentrations of  $\text{Cd}^{++}$ . Exposure to  $\text{Cd}^{++}$  were made after hatching. The number of fry is parenthesized.

性が稚魚より低いのは、胚の方が直接外液に触れないためとも考えられる。用いた  $^{109}\text{Cd}$  の重量は  $0.4 \mu\text{Ci}$  が  $7.65 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  に相当し、毒性がはっきりと示される濃度はヒメダカの場合  $6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{ml}$  位からであるから、 $\text{Cd}$  自体の毒性のために取込みが低くなったのではないと推定される。

成魚での  $\text{Cd}^{++}$  による組織学的変化については、Gardner and Yevich (1969 and 1970) が *Fundulus heteroclitus* で腸、腎、鰓に傷害の起こることを観察している。哺乳類では雄の生殖腺に著しい傷害のおこることが多数報告されており、また骨にも影響のあることが知られている (Yoshiki *et al.*, 1975)。ヒメダカの稚魚のばあいには腸や肝にも変化がみられたが、もっとも著しいのは脳の細胞であった。Gabbiani *et al.* (1967) がラットと兎で生後

ごく初期のみに  $\text{Cd}^{++}$  による脳傷害がおこり、とくに小脳の顆粒層の細胞に核濃縮が見られることを報告している。またヒト胎児の脳にも  $\text{Cd}^{++}$  が取込まれることも知られている (Chaube *et al.*, 1973)。ヒメダカでも今回の観察から、孵化後の脳細胞は哺乳類と同様な反応を  $\text{Cd}^{++}$  に対して示すことが明らかとなった。幼時における脳の傷害が成長したときどの程度の影響を与えるかについては、結果に述べたように、 $\text{Cd}^{++}$  処理後1ヶ月に生き残ったものでは組織像に異常が認められなかったが、機能的な面からさらに調べなければならない。なお、結果では触れなかったが、1.5年位位の成魚を  $\text{Cd}^{++}$  溶液中で飼育しても、本実験で用いた濃度の範囲では、稚魚にみられたような核濃縮は脳にみられなかった。

## 謝 辞

本研究にあたり、御指導御便宜をおかり下さいました東京大学江上信雄教授ならびに種々御助言下さいました本研究所松平寛通生物研究部長に厚く御礼申し上げます。また原子吸光法の測定にあたって下さいました本研究所環境放射生態学研究部河村日佐男氏に御礼申し上げます。

## 文 献

- BALL, I. R. (1967) The toxicity of cadmium to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*, Richardson). *Water Res.* 1: 805-806.
- BROWN, V. M. (1968) The calculation of the acute toxicity of mixture of poisons to rainbow trout. *Water Res.* 2: 723-733.
- CHAUBE, S., H. NISHIMURA AND C. A. SWINYARD (1973) Zinc and cadmium in normal human embryos and fetuses. *Arch. Environ. Health* 26: 237-240.
- EISLER, R. (1971) Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) and other marine organisms. *J. Fish. Res. Board Can.* 28: 1225-1234.
- GABBIANI, G., D. BAIC AND C. DEZIEL (1967) Toxicity of cadmium for the central nervous system. *Exp. Neurol.* 18: 154-160.
- GARDNER, G. R. AND P. P. YEVICH (1969) Toxicological effects of cadmium on *Fundulus heteroclitus* under various oxygen, pH, salinity and temperature regimes.

- Amer. Zool.* **9**: 1096.
- AND ——— (1970) Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium. *J. Fish. Res. Board Can.* **27**: 2185-2196.
- HYODO-TAGUCHI, Y., H. ETOH AND N. EGAMI (1973) RBE of fast neutrons for inhibition of hatchability in fish embryos irradiated at different developmental stages. *Radiat. Res.* **53**: 385-391.
- PICKERING, Q. H. AND C. HENDERSON (1966) The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes. *Air Water Pollut. Int. J.* **10**: 453-563.
- AND M. H. GAST (1972) Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *J. Fish. Res. Board Can.* **29**: 1099-1106.
- YOSHIKI, S., T. YANAGISAWA, M. KIMURA, N. OTAKI, M. SUZUKI AND T. SUDA (1975) Bone and kidney lesions in experimental cadmium intoxication. *Arch. Environ. Health* **30**: 559-562.