

アオウキクサ《*Lemna*》を利用した環境モニタリングの基礎研究

— カドミウム, 銅, 鉄の吸収蓄積における相互作用 —

釘本 完*, 那須 裕*, 田中 修**, 柳瀬大輔**, 滝本 敦**

Basic studies on environment monitoring using *Lemna paucicostata*.

— Influence of cadmium, copper and iron coexisting on their absorption —

Mamoru KUGIMOTO*, Yutaka NASU*, Osamu TANAKA**,
Daisuke YANASE** and Atsushi TAKIMOTO**

ABSTRACT

The absorption of copper by *Lemna paucicostata* 6746 was not influenced by the presence of cadmium in the medium, but that of cadmium was reduced considerably with increasing concentration of copper in the medium. The flower-inducing activity of copper ion in this plant was nullified by simultaneous application of cadmium which does not suppress either copper absorption or short-day induced flowering.

The absence of iron in the medium caused an increase in the amount of copper or cadmium absorbed by *Lemna*, and this resulted in a great suppression of the frond multiplication. The lack of tartaric acid, a chelating agent for iron, in the medium intensified the growth inhibition caused by cadmium, but not the inhibition caused by copper.

緒 言

アオウキクサは小型で扱い易く実験用高等植物として最適である事が知られており, これを用いた多数の植物生理・生態学研究がある。近年はウキクサの, 生育環境条件変化に敏感な反応を示すという特質を生かして, 環境モニタリングへの応用が試みられており, 又一方では水中の汚濁物質を積極的に吸収する特質に注目して, 水汚染物質の除去・回収に利用する試みも開始されている(釘本・那須1980, 1981, 釘本他1982, 松本1981, Hillman & Culley 1978, Nasu & Kugimoto 1981, Nasu et al. 1983a, 1983b, Tanaka et al. 1982a, 1982b)。

我々はこれまで水汚染物質中重金属を取り上げ, ウキクサによる吸収蓄積の検討を行ってきた。前報では(釘本他1982)銅とカドミウムの二種重金属についてウキクサへの吸収蓄積メカニズムを比較検討し, 同じ二価の重金属ではあっても, 吸収様式, ウキクサの反応には著しい差異のある事を示した。

水俣病, イタイイタイ病のごとき, 水の重金属汚染に関わる人の健康障害の実態が明らかにされて以後, 各種微量元素の生体影響, 生体毒性発現機構解明は, 以前に

増して重要性を持って環境科学の中で位置づけられるようになった。この研究はラット, マウス等, 動物を用いた実験を通じて行なわれてきた(Banis et al. 1969, Bunn & Matrone 1966)。又, 細胞レベルでの毒性発現機構検討と, それを利用した汚染指標化の検討のためには, テトラヒメナ(福島他1979a, 1979b, 福島1980, 福田他1981, 米山・永田1976, 米山他1981), KB-cells(飯塚他1982, Meshitsuka & Ishizawa 1978, 1980), 各種細菌(石川・中原1972, 中原他1977, 坂口他1977)等が用いられてきた。植物を用いたものには, 水草による重金属汚染モニタリング研究(渡辺・渡辺1981, Kovács 1978), 附着藻類による研究(河野ら1978)等, 汚染指標植物としての観点からの検討があり, 植物体への重金属吸収と体内動態をみたものとしては, 茅野(1973), 皆川(1978)の水稻へのカドミウム吸収についての研究がある。しかし植物と微量元素との関係を, バイオカイネティックスの観点より把握しようとする試みは, 既して少ないように思われる。

本研究は水の重金属汚染指標, 或は重金属汚染除去にウキクサを利用する為の基礎データ蓄積を行なっているが, 同時に重金属の毒性発現・毒性抑制の機構解明に関する検討をも, ウキクサを用いて行なう事を目指す。

微量元素は環境中で単独で存在する事よりも, いくつ

* 信州大学医学部 Fac. Med. Shinshu Univ.

** 京都大学農学部 Fac. Agr. Kyoto Univ.

かの種類が共存している場合の方が圧倒的に多い。又、重金属等毒性物質の生体への取りこみと作用は、共存物質との相互作用により変化する事が多くの例で報告されている。

これまで行ってきた銅とカドミウムのウキクサへの吸収・蓄積とそれによる形態形成・増殖度の変化の検討をもとに、今報では、銅とカドミウムの共存時に、これらが如何なる変様を示すかを検討し考察した。又一方、essentialな金属の代表というべき鉄を取り上げ、鉄の有無がカドミウム・銅の吸収と作用にもたらす影響についても検討を行なった。

材料・方法

実験用のアオウキクサ育成培養液として、Modified Hoagland medium(M-medium)を使用した。この培養液には $20\mu\text{M}$ の FeCl_3 が、同じく $20\mu\text{M}$ のTartaric Acid(酒石酸)と共に含まれている。これに1% Sucroseを添加しpH4.1に調整してから50ml三角フラスコに25ml入れ、ガラスキャップでふたをしてから1.2気圧で10分間、高压滅菌して用いた。

カリフォルニア原産のアオウキクサ *Lemna paucicostata* 6746を $\frac{1}{2}$ Hutner's mediumに1% Sucroseを添加しpH6.1に調整した培養液で 25°C 全日照明下10-14日培養したものから、三枚の葉状体から成る1コロニーを選んで実験用培養液に植え込み 25°C 4000 lux全日照明下で一週間無菌培養し、開花率、増殖量を測定した。

ウキクサ体内重金属濃度測定は次の手順により行なった。培養後のウキクサを蒸留水、1% EDTA溶液(pH5.0)、蒸留水の順に10分づつ攪拌洗滌し、ろ紙で水分を取った後、Wet Weightを測定した。続いて HNO_3 250 μl を加えて加熱溶解し、 HNO_3 蒸発後、蒸留水で稀釈し、原子吸光分光光度計 PERKIN-ELMER 4000により重金属濃度を測定した。試料の前処理は、野本、佐藤による方法(1980)に準拠して行なった。

結果

1. 銅とカドミウムの相互作用

図1-1は各種濃度で銅とカドミウムが混在する培養液で7日間育成した *Lemna paucicostata* 6746の増殖度を三角フラスコ一個当たりの葉状体(frond)数で示しており、図1-2は、同じく三角フラスコ一個あたりのウキクサの生体重(Wet Weight)で示している。又、この時の各実験区における、花芽をつけた葉状体の割合(FL%)を図1-3に示す。

培養液中の銅、カドミウム濃度上昇に伴って、生長すなわちWet Weight増加に対する阻害が現れ、かつ葉状体数増加に対する阻害も生じる。

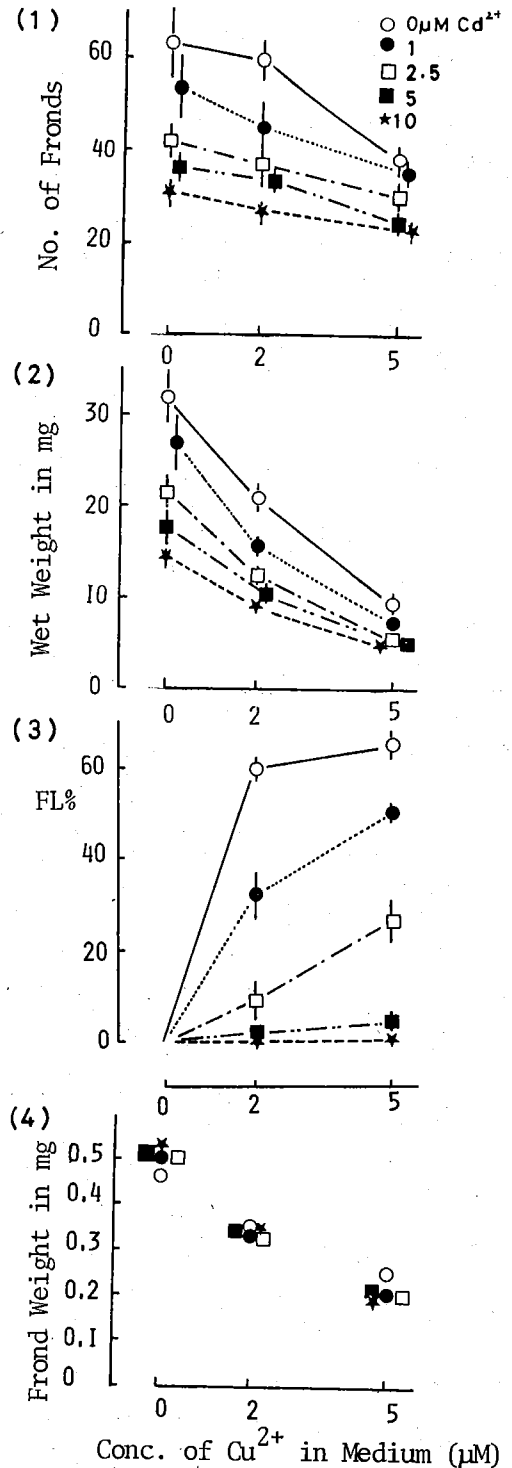


図1. カドミウム、銅共存時のウキクサ増殖度、形態形成変化

ここで用いている *L. paucicostata* 6746 は、M-mediumで育成する時は短日性植物としての開花特性を示す。ところがM-mediumに銅を添加して育成すると、葉状体数増加抑制と共に、全日照明下、すなわち長日条件下にあっても花をつけるようになる。(Hillman 1962, Takimoto and Tanaka 1973, Tanaka et al. 1979)。ところが、図1-3に示すごとく、銅による花成誘導効果は、培養液にカドミウムが共存する時、抑制を受け、10 μM のカドミウム共存下では完全にこの効果は消滅してしまう。花成誘導におけるこの様な銅とカドミウムとの拮抗的作用については、1962年Hillmanも言及している。

銅だけを添加した培養液においては、銅濃度が高くなるに伴って葉状体のサイズは小さくなる。しかし、カドミウムだけを添加した培養液では、カドミウム濃度が高くとも葉状体サイズには変化は見られない。図1-4は1フラスコ当たりの葉状体数と葉状体生体重量から計算した、1葉状体当たりの生体重 (Fronde Weight) を示す。銅濃度上昇により Fronde Weight の低下が見られるが、カドミウム濃度上昇によっては Fronde Weight は影響を受けていない事が示されている。

次に、2 μM 、5 μM の CuSO_4 を含む培養液に各種濃度の CdCl_2 を添加してウキクサを一週間育成した時の、ウキクサ中の銅取り込み濃度を図2に示す。培養液中の銅濃度が高い程、ウキクサ中銅濃度も高くなる事は、前報(釘本他 1982)にも示した。更にここでは、ウキクサによる銅の吸収蓄積は、培養液中に共存するカドミウムによっては全く影響を受けていない事が示されている。

培養液に植え込んでから24時間後のウキクサ中体の重金属濃度測定値によって、ほぼその条件下での重金属吸収速度が指標され得る(釘本・那須 1981)。そこで24時間後の銅濃度を測定した処、一週間後の濃度と全く同様の傾向を示した(図は省略)。

一方、銅とカドミウムの共存培養液におけるウキクサの、一週間培養後のカドミウム取り込み濃度を図3に示した。培養液中のカドミウム濃度上昇に伴いウキクサ中のカドミウム濃度も高くなるが、銅イオンが培養液中に共存する時には、ウキクサ中のカドミウム濃度は、銅イオンが共存していない場合に比べて著しく低くなっており、銅イオン共存によりカドミウムイオン吸収が阻害されている事が示唆される。5 μM のカドミウム培養液では一週間でウキクサは 600 μM の濃度までカドミウムを蓄積するのに対し、同じく 5 μM の銅培養液では、約 1000 μM の濃度に銅を蓄積する事から、銅はカドミウムよりもウキクサに吸収され易いと推察される。

植え込み後24時間目のウキクサ中カドミウム濃度も一週間目のそれと同じく、銅イオン共存により吸収低下させられる事が示された(図は省略)。

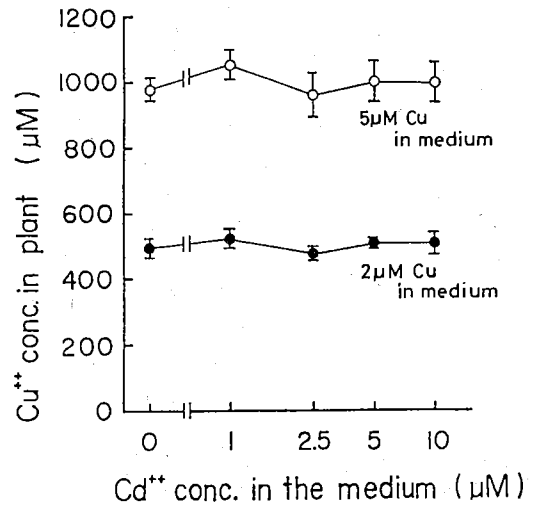


図2. カドミウム、銅共存培養液における一週間後のウキクサ中銅濃度

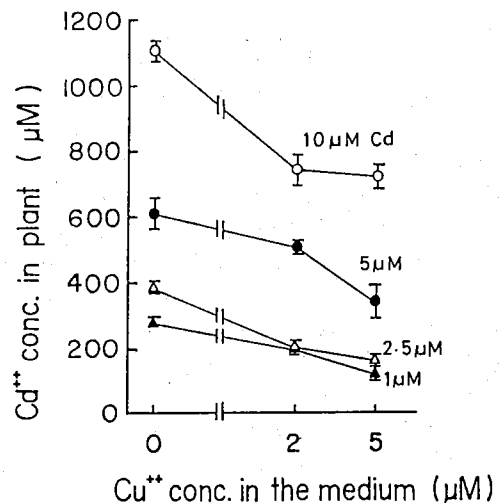


図3. カドミウム、銅共存培養液における一週間後のウキクサ中カドミウム濃度

2. カドミウム、銅の吸収蓄積に及ぼす鉄の影響

M-mediumには、20 μM の FeCl_3 と、20 μM の酒石酸 (Tartaric Acid, 図中では T. A. と略) とが通常含まれている。酒石酸は鉄の沈澱を防ぐキレート剤としての役割を持つ。この培養液には他に亜鉛、マンガン、モリブデン等の微量元素が含まれているが、鉄はこれらより遥かに高濃度で存在しており、その有無と存在形態とは、ウキクサの生育・増殖にも、又、重金属のウキクサへの吸収にも、大きな影響を及ぼすと思われる。

そこで、鉄と酒石酸の双方を含む培養液、鉄のみ含む(酒石酸を欠いた)培養液、それに酒石酸のみ含む(鉄を欠いた)培養液の各々について、カドミウム及び銅のウキクサへの吸収と、それによるウキクサの増殖阻害度を調べた。

図4は各培養液条件におけるカドミウムによる増殖阻害度を、1フラスコ当たりのウキクサの生体重(Wet Weight)で示してある。Control(カドミウムを含まぬ培養液での増殖度)の値は、鉄(+)
酒石酸(+)>鉄(+)
酒石酸(-)>鉄(-)
酒石酸(+)
の順に大きい。酒石酸を含まぬ培養液でも、鉄が全く吸収されない訳ではない事が推察される。しかしここにカドミウムが添加されると、鉄(+)
酒石酸(+)
においては1μMカドミウムにより増殖度がControlの80%に抑えられるのに対し、鉄(+)
酒石酸(-)
では50%、鉄(-)
酒石酸(+)
では45%に低下している。又、5μMのカドミウム添加時には、鉄(+)
酒石酸(+)
で50%であるのに対し、鉄(+)
酒石酸(-)
で30%、鉄(-)
酒石酸(+)
で38%となる。この結果は、カドミウムによる増殖阻害度は、鉄が培養液中に存在しないか、或は存在していても吸収されにくい状態にある時には、鉄と酒石酸が在る場合よりも、遥かに大きくなる事を示している。一週間育成したウキクサ中のカドミウム濃度は、図6に示す如く、鉄のない、又は酒石酸のない培養液において高い値を示している。カドミウム1μMの培養液では鉄(+)
酒石酸(+)
の条件下で300μMのカドミウムがウキクサに取り込まれているのに対し、鉄(-)
或は酒石酸(-)
の条件下では1000μM近くの濃度で取り込まれている。カドミウム5μMの培養液では、500μMに対し、1800、1400μMという値である。又、培養開始後24時間目のウキクサ中カドミウム濃度も、全く同じ傾向を示した。

図5はカドミウムの場合と同様、鉄(+)
酒石酸(+)
、鉄(+)
酒石酸(-)
、鉄(-)
酒石酸(+)
の三条件下における銅による増殖阻害を示す。カドミウムの場合と異なり、銅では、鉄(+)
酒石酸(-)
の条件下にあっても、鉄(+)
酒石酸(+)
の条件の時と同程度の

増殖阻害しか示さない。しかし、銅の一週間目の吸収濃度を比較すると(図7)、カドミウムの場合程の大きな差こそ見られないが、やはり鉄(-)
又は酒石酸(-)
の条件下での銅取り込み濃度が高くなっている。この傾向は植え込み後24時間目の銅濃度のデータにも、同様に示されている(図は略)。

従って銅、カドミウムは共に、ウキクサへの吸収過程において鉄の影響を受けるという事が出来る。

考 察

銅とカドミウムは重金属の中ではウキクサに対する毒性が最も高い(低濃度でウキクサに毒性発現を生ぜしめる)重金属であるが、ウキクサ生育に対する作用は各々

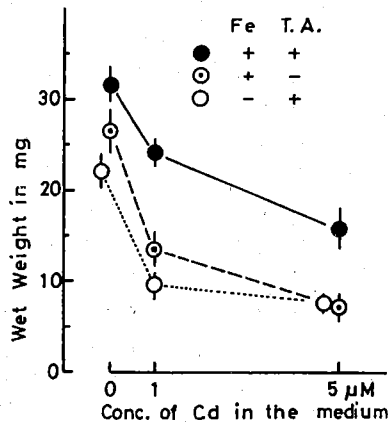


図4. 鉄、酒石酸の有無によるカドミウムの増殖阻害度のちがい

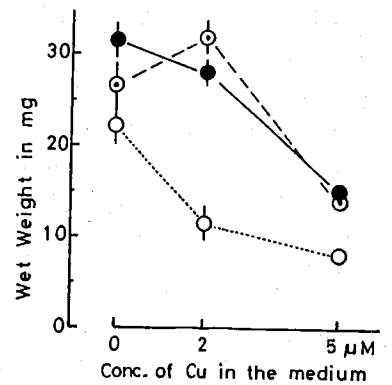


図5. 鉄、酒石酸の有無による銅の増殖阻害度のちがい

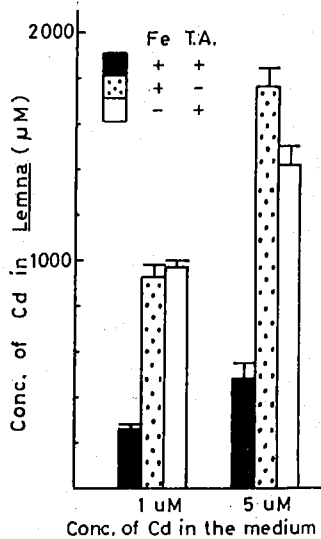


図6. 鉄、酒石酸の有無によるカドミウム吸収のちがい

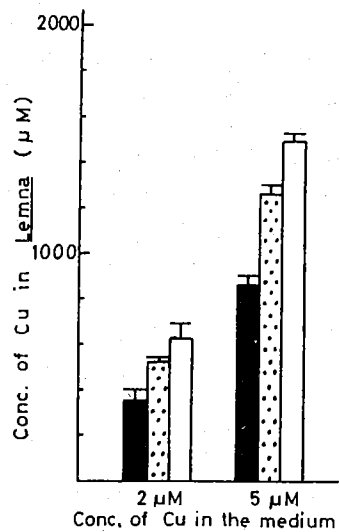


図7. 鉄、酒石酸の有無による銅吸収のちがい

全く異なる。銅は葉状体増殖、葉状体生長の双方を抑制する働きを持つのにに対し、カドミウムは葉状体増殖を抑制するが葉状体生長には影響を及ぼさない事が明らかとなった。カドミウム・銅が共存する時には、葉状体増殖は吸収された銅とカドミウムの濃度に従って阻害を受けたが、葉状体生育は銅濃度の影響のみを受けた。この事から、カドミウムと銅とは異なったメカニズムを通じて、各々独立してウキクサの生育阻害を行なっている事が示唆される。

しかしながら、銅によるウキクサの花成誘導は、カドミウムが共存する時、抑制され、消滅する。カドミウムは銅の吸収を阻害するわけではなく(図2)、又、短日下条件においてもたらされる花成誘導を、カドミウムは阻害しない(Hillman 1962)事が明らかであるにもかかわらずである。

銅と亜鉛が、さとうきびの葉組織や小麦の芽ばえにより競合的に吸収される事が報告されており(Bowen 1969, Brar and Sekhon 1976, Chaudhry and Loneragan 1972)、そらまめのニッケル吸収が培養液中の銅の共存によって阻害される事も知られている(Cataldo et al. 1978)。しかし今回の実験においては、銅吸収はカドミウム共存の影響を受けていない。すなわち、植物の金属イオン吸収様式は、共存する金属種のちがいで、植物の種類のちがいで異なると思われる。

金属同志の相互作用ばかりでなく、植物体への吸収の容易さも、金属種により異なると考えられる。例えば銅は、図3と図4との比較において明らかなように、カドミウムより容易にウキクサに取り込まれる。

カドミウムは有毒な元素として知られ、銅は生体にとって必須の微量元素であるが、わずかでも過剰に在ると強い毒性を発揮する。これに対し鉄は、必須重金属であり、ウキクサ体内には常に500~1000 μM 含まれている。培養液に20 μM 含まれる事が、ウキクサ生育にとって最適条件であり、鉄が増殖阻害を生ぜしめる培養液中濃度は100 μM 前後である。M-mediumにおける鉄は常に酒石酸と共に在る事が必要で、これによりキレートされて吸収可能な状態に置かれていると考えられる。

鉄の有無は、銅、カドミウムのウキクサによる吸収に大きな影響を示す事が明らかになった。そしてキレート物質である酒石酸が無い時は、培養液中に鉄が在ってもあたかも鉄も存在しないかのようにカドミウム、銅の吸収度は大きくなった。すなわち、鉄がウキクサに吸収され易い状態にある場合に、銅、カドミウムのウキクサへの吸収は抑制を受けるのである。抑制の度合はカドミウムに対してより大であると思われる。

銅のウキクサへの吸収は、キレート剤なしで鉄が存在する時には、鉄とキレート剤と一緒に在る時よりも大き

な値を示すが、それによる増殖阻害度は、鉄、キレート剤共存時と殆んど変わらない。これは、この条件下では吸収された銅がウキクサ体内で十分作用しない為とも考えられる。又、銅の共存下ではウキクサは、より多くの鉄を取り込む事を示唆するデータを得ており(未発表)同量の銅が体内に在っても、同時に鉄がどれだけ取り込まれるかによって、銅の毒性発現様式が異なるという事も推察される。

ウキクサは水汚染指標植物として、或は廃水処理用植物として、更にバイオマス資源植物としても、将来の利用が期待されるが、水汚染物質の吸収蓄積能や汚染物質吸収による毒性発現様式は、汚染物質の種類のみならず共存物質によっても異なる事が示された。上記目的にウキクサを応用してゆく為に、更に汚染物質間の相互作用を明らかにする事が必要である。それは又人体と汚染物質との関わりを研究する上での示唆にもなり得ると考える。

本研究の一部は、第41回日本公衆衛生学会(1982)、第47回日本植物学会(1982)にて発表した。又、第53回日本衛生学会(1983)、第17回日本水質汚濁学会(1983)にて発表の予定である。

又、一部をEnvironmental Pollution (Series A)に投稿中である。

本研究の一部は、文部省科学研究費 Grant No. 57570226 (1982)によって行なわれた。

参 考 文 献

- 茅野充男(1973)重金属の吸収時期および吸収経路と水稻玄米中への重金属とりこみ量との関係
土肥誌 44, 204-210.
- 福田三則, 岡三知夫, 森下日出旗(1981)重金属による *Tetrahymena Pyriformis* の生長阻害。日本公衛誌 28, 171-177.
- 福島晋一, 塩田千代, 小川 博, 笹川祐成(1979)重金属の *Paramecium tetraurelia* に対する影響 日衛誌 34, 507-511.
- 福島晋一, 小川 博, 塩田千代, 笹川祐成(1979)変異原物質の *Paramecium tetraurelia* によるスクリーニング法。日衛誌 34, 664-669.
- 福島晋一(1980)重金属の *Paramecium tetraurelia* に対する影響II, カドミウムと亜鉛・カルシウムとの相互作用。日衛誌 34, 743-750.
- 石川友章, 中原英臣(1972)細菌における重金属イオン耐性 — 公害との交点をめぐって — モダンメディア 18, 553-565.
- 河野行雄, 石川 儀, 赤尾秀雄, 真山喜登子(1978)附着

- 藻類による河川の汚染判定 — 河川の重金属汚染と緑藻類の重金属含有量との関係 — 用水と廃水 20, 945-950.
- 飯塚舜介, 大城 等, 田中俊行, 杉山恭子, 能勢隆行, 石沢正一 (1982) 培養細胞によるカドミウムの取込みと放出 (第4報) 日衛誌 37-1. 255.
- 皆川興栄 (1978) カドミウム汚染米中の重金属の化学形態 日本公衛誌 25, 97-102.
- 中原英臣, 石川友章, 四井靖長, 近藤 勇, 沢畑辰男, 伊藤一広, 鶴田良子 (1977) 黄色ブドウ球菌, 緑膿菌, 大腸菌ならびに肺炎桿菌における重金属耐性菌の分布, 医学のあゆみ 100-6, 517-519.
- 野本昭三, 佐藤守俊 (1980) 生体組織中微量金属測定における試料前処理法の改良に関する検討 信大・医短・紀要 6-2 21-29.
- 坂口 平, 天野倫子, 高下 忍, 横田勝司 (1977) 重金属, シアンの存在における *Geotrichum candidum* の発育と菌体構成成分について. 日衛誌 32, 451-458.
- 渡辺義人, 渡辺圭子 (1981) 河川の水生植物における Cu, Zn の濃度とその吸収. 昭和55年度特定研究 信州の自然環境モニタリングと環境科学の総合化に関する研究 21-26.
- 米山京子, 永田久紀 (1976) 諸化学物質の有害性のテトラヒメナによる簡易迅速検査法, 日本公衛誌 22, 331-337.
- 米山京子, 永田久紀, 山田寿子 (1981) 諸化学物質の有害性のテトラヒメナによる簡易迅速検査法 — 培養条件の検討 日本公衛誌 28, 49-51.
- Banis, R. J., W. G. Pond, E. F. Walker & J. R. O'Connor (1969) Dietary cadmium, iron, and zinc interactions in the growing rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130:802-806.
- Bowen, H. J. M. (1966) Absorption of copper, zinc, and manganese by sugarcane leaf tissue. Plant Physiol. 44: 255-261.
- Brar, M. S. & G. S. Sekhon (1976) Interaction of zinc with other micronutrient cations. I. Effect of copper on zinc-65 absorption by wheat seedlings and its translocation within the plants. Plant Soil 45: 137-143.
- Bunn, C. R. & G. Matrone (1966) In vivo interaction of cadmium, copper, zinc and iron in the mouse and rat. J. Nutrition 90:395-399.
- Cataldo, D. A., T. R. Garland & R. E. Wildung (1978) Nickel in plants. I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. Plant Physiol. 62:563-565.
- Chaudhry, F. M. & J. F. Loneragan (1972) Zinc absorption by wheat seedlings. II. Inhibition by hydrogen ions and by micronutrient cations. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36:327-331.
- Hillman, W. S. (1962) Experimental control of flowering in *Lemna*. IV. Inhibition of photoperiodic sensitivity by copper. Amer. J. Bot. 49:892-897.
- Hillman W. S. & D. D. Culley, Jr. (1978) The uses of duckweed. American Scientist 66:442-451.
- Kovács, M. (1978) The element accumulation in submerged aquatic plant species in lake Balaton. Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae 24:273-283.
- Meshitsuka, S. & M. Ishizawa (1978) Consecutive uptake of cadmium by KB cells in culture. Toxicol. Appl. Pharmacol. 46:807-810.
- Meshitsuka, S. & M. Ishizawa (1980) Differences between the uptake of toxic and essential metal ions by KB cells in culture. Ind. Med. 22: 206-207.
- Nasu, Y. & M. Kugimoto (1981) *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10:159-169.
- Nasu, Y., O. Tanaka, M. Kugimoto & A. Takimoto (1983a) Comparative studies on the absorption of cadmium and copper in *Lemna paucicostata*. Env. Pol. (Ser. A) in press
- Nasu, Y., M. Kugimoto, O. Tanaka, D. Yanase & A. Takimoto (1983b) Effect of cadmium and copper coexisting in the medium on the growth and flowering of *Lemna paucicostata* 6746 in relation to their absorption. Submitted to Env. Poll. (Ser. A)
- Takimoto, A. & O. Tanaka (1973) Effects of some SH-inhibitors and EDTA on flowering in *Lemna perpusilla* 6746. Plant & Cell Physiol. 14:1133-1141.
- Tanaka, O., C. F. Cleland & W. S. Hillman (1979) Inhibition of flowering in the long-day plant *Lemna gibba* G3 by Hutner's medium and its reversal by salicylic acid. Plant & Cell Physiol. 20:839-846.
- Tanaka, O., Y. Nasu, A. Takimoto & M. Kugimoto (1982a) Absorption of copper by *Lemna* as influenced by some factors which nullify the copper effect on flowering and growth. Plant & Cell Physiol. 23:1291-1296.
- Tanaka, O., Y. Nasu, D. Yanase, A. Takimoto & M. Kugimoto (1982b) pH dependence of copper effect on flowering, growth and chlorophyll content in *Lemna paucicostata* 6746. Plant & Cell Physiol. 23:1479-1482.