

アトラジンによるカエルの雌雄同体：室内研究と野外研究との連携

タイロン B. ヘイズ

米国 カリフォルニア大学バークレー校

最初に、素晴らしい会議を開催し、私を招待してくださった主催者にお礼申し上げます。本日この場で私の研究についてお話できることを光栄に思います。

私は、アトラジンの作用についていくつかお話し、アトラジンが少なくともカエルの 1 種において、そしておそらく他の種でも雌雄同体を引き起すことを説明します。それから、野外研究と室内研究を連携させることを試みたモデルを示します。

このモデルは、作用そのものよりも重要性があると思います。というのも、様々な目的に使用可能だと思われるからです。まず最初は、特に室内モデルの話から始めます。室内モデルをどのように用いて比較試験を実施するのか、それから別の種で調べるべき事が分かった後は、野外での評価をどのように行うのか、また、野外のシミュレーションを室内で行うのには、野外で得た情報をどのように用いるのか、最後に、その情報をどのように用いれば化学物質の野外での濃度による影響を室内で扱えるようになるのか、ということをお話します。

私が実例として取り上げる物質はアトラジンです。これがその構造式です。アトラジンは、トウモロコシやモロコシなどの単子葉植物や核果類用の除草剤として、40 年間にわたって用いられています。米国では年間 1 億 5,000 万ポンドすなわち 75,000 メートルトンが用いられています。また、日本を含む 80 ヶ国以上で用いられています。

私がこれから話すモデル動物はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) です。アトラジンは、私の昨年 の報告にあるように、我々が雌雄同体と呼んでいる間性を、曝露個体の 20% に引き起します。

ここで雌雄の形態についてお見せします。これが雄でこちらが雌です。これは腎臓の組織です。性腺ですが、雄の精巣は短く、表面が滑らかで分葉していません。雌の卵巣は細長く、黒い色素が中に散在しており、分葉しています。

組織切片では、精巣には精細管があります。卵巣には、輪状の結合組織があり、中心には卵巣腔という空所があります。従って、性別は、剖検や組織検査で容易に判別することができます。

次のように 0.1 ppb で曝露しても雌雄同体が引き起されることがあります。これが腎臓で、これが 2 個の精巣で、それに続いて 2 個の卵巣があります。精巣は巨大で、2 個の卵巣も巨大です。黒い線に沿った組織切片では、これらが 2 個の精巣であり、これらは 2 個の卵巣であることが確認できます。卵巣には卵巣腔があります。巨大な精巣には複数の輸精管があります。1 個の卵巣、そして最後にまた 2 個の卵巣です。

我々は、アトラジン 0.1 ppb への曝露に伴って、いろいろなタイプの性腺異常を見いだしました。その中の一つに、単性の多性腺すなわち多発精巣がありました。この個体には精巣が 6 個あります。一方の側に精巣が、もう一方の側に卵巣がある左右型雌雄同体、前側に精巣が、後側に卵巣がある前後型雌雄同体、最初にお見せしたような混合型雌雄同体もありました。これらはすべて組織学的に確認したものであり、その割合は 0.1 ppb で曝露させた個体の 20% におよび、おそらくは雄の 40% です。そうした異常のタイプをこれからお見せします。

こうした性腺の異常には、喉頭の脱雄性化も同時に見られますが、それについては本日は触れません。

我々は、アトラジン作用のメカニズムを次のように考えています。正常な精巣においてはテストステロンが合成され分泌されます。アトラジン存在下ではアロマトラーゼが誘導されて、エストロゲンになるのだと考えられます。そして性腺のテストステロンが消費されて性腺からエストロゲンが分泌されます。テストステロンがエストロゲン産生の基質になっています。

以前我々はアトラジンの作用は、アロマトラーゼの誘導によって発揮されると報告したことがありますが、今回もそれだと考えています。その証拠をお見せします。

まずは、成体をアトラジン 25 ppb に曝露させたデータです。これは、単回の実験によるコントロール雄の血漿テストステロンです。こちらがアトラジン処置した雄のものです。アトラジン曝露した雄のテストステロン

濃度は30日後に統計的に有意に減少し、コントロール雌と差がなくなるまで減少しました。このデータは1回の実験によるものですが、我々は各回に4匹ずつを用いた実験をこれまでに3回繰り返しました。

同様に、アロマターゼの誘導も明らかになりました。これはコントロール雄の濃度ですが、背景値と差がありません。こちらはアトラジン処置した雄の、*in vitro*での性腺アロマターゼ活性を調べたデータです。

このデータは、今年の講演でもお見せしたものです。今年は、これらの個体の一部が成長して性成熟に達しました。そこで今度は、幼生期にアトラジンに曝露した個体を1年間成長させた場合の結果をお見せします。

これは正常な雄です。これが精巣、これが本来の喉頭です。この筋肉に注目してください。喉頭筋と言います。こちらは前肢に本来ある構造です。これは総排泄腔の本来の構造です。正常な雄ではテストステロンによって喉頭や前肢の交配腺が雄性化します。このように、テストステロンに反応して喉頭が大きくなります。これが太くなった筋肉です。

ここで雌の本来の形態も見ておきましょう。こちらは外因性ないしは内因性のアンドロゲンに曝露した雌です。このように筋肉の肥大と喉頭の肥大、褐色の交配腺の形成が観察できます。

テストステロンは、精子産生を誘導する役割もあります。この切片は、8ヶ月齢のコントロール雄の性腺のものです。輪郭線で示しているのは、1本の精巣精細管です。この輪郭線をたどってみます。こちらの輪郭線は、核が濃染したセルトリ細胞を表わしています。こちらの輪郭線は発生途中の精原細胞です。精子の頭部が濃染しているのが見て取れます。これが正常の雄の様子です。

アトラジン処理した場合です。先ほど、30日以内にテストステロンが減少するのをお見せしましたが、今度の場合は幼生期に曝露した個体です。テストステロンは回復していません。喉頭も肥大していません。ご覧のように、喉頭の構造は萎縮しています。交配腺も同様に萎縮するか消失しており、発達が認められません。比べてください。こちらが正常な雄、こちらがアトラジンに曝露してテストステロンが減少した雄です。

また、アトラジン処置した雄の精巣では精子や細胞構造がすべて見られません。これは1本の精細管ですが、濃染した精子頭部、核が濃染したセルトリ細胞、神経細胞がまったくありません。テストステロンの減少に伴って、喉頭、交配腺、精巣の脱雄性化が見られます。さらに、エストロゲンの産生によって、曝露個体の20%で卵巣の発達が誘発されました。雌型の総排泄腔もエストロゲンによって誘発されたと思われ、曝露個体の20%で見られました。

喉頭、前肢、精巣の脱雄性化現象と、卵形成とその後の雌型総排泄腔の形成という雌性化現象の両方が同時に見られました。

この実験の意義について述べます。この実験は室内実験で室内モデルを用いましたが、我々は幼生実験を5回反復しており、アトラジン処理を51回反復しました。動物は複数のところから入手し、データ分析はすべて盲検化して行いました。つまり、全部を色コードと数字コードにし、処理を実行する人間と、分析を行う人間に対して盲検化したわけです。

現在我々は、この室内モデルを用いて、別の動物種でも同様に作用が起きるのかという比較研究にとりかかっており、何を調べるべきかということも分っています。我々は別のグループの動物種を採用しています。これは我々の室内モデルである *Xenopus laevis* ですが、ヒョウガエル (*Rana pipiens*) や、北米アマガエル (*Hyla regilla*) のいくつかの種についても調べました。我々がこれらの動物種を選んだ理由は、これらの種が両生類全体の広範な多様性を代表しており、調べる作用がカエル全体に及ぶものなのか、一つの種に特異的なものなのかを確かめることができると考えたからです。

時間に限りがありますので、本日はヒョウガエルについてお話しします。

これは研究室で飼育している正常の雄と雌です。これは精巣の構造です。卵巣は精巣より大きい構造です。組織切片がこれです。写真を拡大したのがこれです。雄には発達中の精巣精細管が、雌には卵巣腔と卵母細胞、発達中の卵が見られます。

今度は調べるべきことが分っています。ヒョウガエルでの正常とはどのようなものなのか、野外調査を行って調べました。これは米国の地図です。赤い色の濃い地域は、アトラジンが大量に使用された地域を表わしています。灰色と白の地域は、アトラジンが使用されなかった地域です。この地図は、アトラジンの販売量に基づいて作成しました。

これに、ヒョウガエルの生息域を重ね合わせます。ヒョウガエルはこの地域の大部分で実際に絶滅の危機にあります。青い点は、我々が標本採取した地点を表わしており、2001年7月に米国中を車で走り回って、これらの地点でカエルを100個体採取しました。時間がありませんので、その地点を全部示しませんが、要点だけを話します。これがアトラジン未使用地点の一つで、こちらはアトラジン大量使用地域であるネブラスカ州の地点です。事実、トウモロコシ畑から流出してきています。

これは、民間および大学の研究所2箇所では別個に測定したアトラジン濃度です。アトラジン未使用地域であっても、我々の室内研究で作用が見られた0.1 ppbの濃度がありました。トウモロコシ畑からの流出濃度は、ppmの範囲に達することがありますが、今回の場合、我々が採取したこの日の濃度は15 ppbでした。

再びこれは、我々が調べた野生のヒョウガエルです。我々は各地点から集めた100匹を処理しました。すべて変態期の個体のみで、成体ではありません。これらの全地域で、正常の雄がいることが分かりました。精巣は腎臓とは異なる滑らかで丸みを帯びた構造をしています。変態期の雌の卵巣は細長く、分葉しており、卵母細胞、発達中の卵胞を確認することができます。

組織を調べますと、精巣は完全に正常のようにも見えるものでした。さらに拡大すると、精巣精細管がありますが、この中にあるのは精子ではなく、ご覧のように卵母細胞でした。ここで疑問です。野外で見られたこうした現象はアトラジンによるものなのでしょうか？

これが正常でないことを示す証拠の一つは、室内で飼育された雄の個体にはこのような像が見られることはないということです。これが精巣精細管であり、発達中の精原細胞があります。正常の雌ではこのように発達中の卵母細胞があります。室内で飼育したコントロール個体では、卵母細胞が精巣精細管の中に見られるようなことはありません。

また、この赤い丸は、精巣内に卵母細胞が見つかった個体を採取した地点を表わしています。全100個体の中で、精巣に卵母細胞を持つ個体がまったく見つからなかった地点もありますが、これらの地点の大部分では、採取した個体の100%において精巣内に少なくとも1個の卵母細胞がありました。この作用を室内で起こさせようとすると、性分化に対する干渉が起こりますので、間性現象は正常のものではないことが証明されています。実際、間性現象はアトラジンの使用があった地域のみで見られます。アトラジンは少なくとも原因の一部にはなっているだろうと、我々は考えています。

次の段階は、野外のシミュレーションの実施です。これらの地点とこれらの地点で、野外において使用された懸念がある農薬のすべてについて化学分析を行いました。これは、トウモロコシ畑で得られたデータ例のひとつです。性分化障害に関して我々が得た閾値レベルがこれです。アトラジンとメトクロルは、我々が調べた中で少なくともこの1地点で併用されており残留していますが、その他の使用された懸念のある化学物質はすべて、沼沢中で検出レベル未満でした。

この点について、こうした濃度を試験する室内シミュレーションを行っているところです。我々は、この室内モデルを用いて比較実験を行い、これら他種において何が正常なのかを判定できるようにするために、これらの種に対する処理実験を室内で行いました。そして、室内で観察された作用が野外でも起きるかどうかを判定するために、野外実験も行いました。さらに、野外シミュレーションを行い、これは現在進行中ですが、我々がこれらの野外地点で観察した異常が、室内でも再現できるかどうかを判定しようとしています。

最後の実験では、野外から室内に立ち戻り、次のようなことを行っています。ネブラスカ州のトウモロコシ畑やこのワイオミング州のコントロール地点といった複数の地点の各々から、5ガロン(18.9リットル)のバケツ200個分以上の水を採取しました。その水をバケツに入れたまま-20°Cに保って輸送車で運びました。我々は今、すでに我々が室内モデルで明らかにしたような作用をこの水が及ぼすかどうかを、室内で調べているところです。

重要なのは、両生類に有害作用をもたらすと考えられる化学物質を同定するだけでなく、そのメカニズムが脊椎動物に共通する化学物質を同定し、その他の脊椎動物グループにも悪影響を及ぼすと考えられるのかどうかを明らかにすることだと思います。また、我々が開発したモデルは、個々の化学物質もしくは化学物質混合物の作用を室内で評価できるものだと思います。これを足がかりにすれば、環境に関連する混合物を予測し、それらを室内で試験することができるようになると思います。

最後に、まとめの前に、これらの研究に協力してくれた研究スタッフに感謝したいと思います。青い服は全員が学生で、学部生です。我々は学生達がとても若いときから研究に参加してもらっています。また、研究の資金を提供してくださった全国科学基金、ハワード・ヒュー・プログラム、オールトン・ジョーンズ財団、世界自然保護基金、ローズ財団のみなさんにもお礼申し上げます。それから、サンプル採取に協力してくださった、魚類・狩猟鳥獣・野生生物・天然資源局にもお礼申し上げます。ご静聴ありがとうございました。質問をお受けします。ありがとうございました。

質疑応答

井口：フィールドと実験室とを行ったり来たりしながら検証していくという、教科書的なお話でしたが、何かご質問のある方はどうぞ。

川崎：大阪にあります環境監視研究所の川崎と申します。大変貴重な発表をありがとうございました。私どもの研究所ではアトラジン进行分析しております。特に河川水と水道水の分析をしており、先生のご発表にありました 0.1 ppb の濃度で、日本の水道水から検出しております。

それでちょっとお聞きしたいわけですが、先生のご発表で、0.1 ppb の濃度でカエルに異常が出ておりますが、それはどれくらいの期間曝露したことによって発現したものか。それから、同じアトラジン以外のトリアジン系の農薬ですが、シマジンの研究はされておられますかということです。よろしくお願いたします。

ヘイズ：アトラジン 0.1 ppb に関するご質問ですね。我々が雌雄同体を観察した実験では、幼生期を通じて曝露しています。孵化時から変態期まで曝露しています。*Xenopus laevis* では6~8週間です。

おっしゃるとおり水道水や地下水から 0.1 ppb 以上が検出されることがあり、雨水からは 1 ppb 以上が検出されることがあります。アイオワのある調査では、40 ppb の濃度でした。ネブラスカの水道水は、確かに 0.1 ppb を超えています。我々はこれをまさしくリスクだと考えています。これでお答えになっていますでしょうか？

川崎：シマジンとか、ほかのトリアジン系の農薬については研究されておられますか。まだでしょうか。

ヘイズ：ちょうど今、カリフォルニアで使用されたシマジンの調査がいくつか終わったところです。投与は完了しましたが、結果の分析がまだです。その他に、広く共通して存在する少なくとも 3 種類のアトラジン代謝産物について調べているところです。代謝産物それ自体に活性があるのかどうかはまだ分かっていません。

川崎：どうもありがとうございました。

ピックフォード：アストラゼネカのダン・ピックフォードです。大変興味深い話でした。質問が一つあります。アトラジンに曝露した *Xenopus* の変態期について、いろいろな種類の間性というか雌雄同体の写真を見せてもらいましたが、あなたはそれを多発精巣と呼んでおられました。

あなたがそれを分裂精巣ではなく多発精巣と呼ばれたことに興味があります。あなたが調べられた変態期より前のもっと早い発生段階において性腺の分化を調べることはなさらなかったのですか？発達している精巣が本当に別個のものなのか、それとも最初は正常に発生していたのが途中で分裂したのかどうかを、遡って確認されましたか？あなたがそれらを、異常な長さになった 1 個の精巣ではなく、別個の精巣と呼んだことに興味があります。

ヘイズ：あれをなぜ異常精巣と呼んだか、というご質問ですね…

ピックフォード：多発精巣です。あれは個々の精巣なのか、それとも 1 個の精巣が発生段階で何らかの分裂を起こして、その組織が発生する場所でないところで見つかったものか、ということです。

ヘイズ：質問の前半部分に答えますと、我々は早い段階での観察はしていません。我々が調べた個体はすべてステージ 66 のもので、発生の最終段階にあたります。

質問の後半部分に答えますと、我々は個体の組織チェックを行っています。この部分の矢状断面を調べ、この一群の矢状断面を調べますと、我々が多発精巣と呼んだものでは、連結がないのです。例えば、この構造を見てみると、この 2 つの精巣の間にはまったく連結がありません。これらの性腺間をつなげる管腔もありません。従って、我々はこれを多発性腺と呼んだのです。

このメカニズムが、分節が消失したものなのか、それとも分節が単に発達しなかったものなのかは分かりません。今のところまだ調べていません。私が 5 年以上前に行った研究では、発生のごく初期段階でのエストロゲンによってもこれが誘発されることが分っています。それゆえに、我々は最初に、アロマトーゼ誘導を調べようと思ったわけです。

ピックフォード：もう一つ、短い質問をいたします。ヨーロッパや英国のヒョウガエルについて私とクルーズ先生が調べたところによると、あなたが調べたステージ 66 とは厳密には異なりますが、変態期における性腺の分化の程度はそれほど大きくないようです。あなたが調べた変態が終了したばかりの幼生期では、どちらともとれるような、間性的な性腺の出現率がかかなり高くなるのではないのでしょうか。あなたの研究室の分析では、コントロール動物も調べられましたか？アトラジン曝露ヒョウガエルでの判定が、何らかの影響を受けていたということはないでしょうか？

ヘイズ：我々がこれらのものを異常だと判定した方法では、1000 個体以上にわたって盲検化しました。そして、見えたものをすべて記録します。例えば、これのように細長くて色素のない精巣とか、お見せしてもいいんですが、色素のない卵巣とかです。

それが済んだら、すべてを符号化します。コントロール群とアトラジン処理群とで出現率が同じであったものは何であれ、異常であるとはしませんでした。私が異常として挙げたものはすべて、コントロール群では見られなかったものです。多発性腺などがそうです。

ヒョウガエルの場合には、変態期における変異が明らかにずっと少ないです。現在我々はこの研究を延長して、その個体を 1 ヶ月飼育しています。現時点で申し上げられるのは、室内で飼育した個体では、精巣精細管に卵母細胞は見られないということです。ネブラスカ州西部でも卵母細胞は見られません。

ピックフォード：ありがとうございました。

井口：ほかにご質問はございませんでしょうか。お 2 人、大丈夫ですのでどうぞ。

田村：名城大学の田村廣人です。解毒過程の第 1 段階では、P450 が重要な役割を果します。質問は、アロマトーゼの誘導がアトラジンによって特異的に誘導されたものなのかどうかということです。

ヘイズ：アトラジンによって特異的に誘導されるかということですか？

田村：はい。P450 は、我々の体内にあるすべての外因性化学物質によって誘導され、それを無毒化しま

す。先生はアトラジンがアロマトーゼを誘導することを明らかにされました。アロマトーゼは P450 でもあります。

ヘイズ：そうですね。

田村：従って、アトラジンによって特異的に誘導されるのでしょうか？

ヘイズ：ご質問を飲み込めたかどうか確信はありませんが、アトラジン曝露個体に対して我々は生化学アッセイを行いました。トリチウム化 1-βアトラジンアッセイによれば、アトラジンはコントロール群では決して見られないアロマトーゼ活性を実際に誘導します。我々は現在、アロマトーゼのスクリーニングのための mRNA を共同研究で調べていますが、現時点では、分子データがまだありません。

私が言えますのは、この生化学的活性はアトラジンによって誘導されたものであり、コントロール群の性腺では決してみられない、少なくとも我々の研究室では見られない、ということです。これでよろしいでしょうか？

田村：あとはフロアでも。ありがとうございました。

質問：日本語でやらせていただきたいと思いますが、よろしいですか。

屋外で曝露された場合は、インターセックスというよりも性転換の方が起こるのではないかと考えられるのですが、その辺の性転換について起こったかどうか。100 個体調べられたと思うのですが、比が変わったかどうかを調べられているかを教えていただきたいのです。

ヘイズ：ご質問はおそらく、性比に変化があったかということですね。ありませんでした。

我々は、雄と雌、その雌雄同体を観察していますが、動物に完全な性転換がわずかな割合でもあったとするならば、その個体が例えば性別が元に戻った雌なのか、はたまた雌に性転換した雄なのかを、判別する方法は現在ありません。我々は、雄と雌と雌雄同体をともに観察しています。雌の中には遺伝的には雄であるものがあるかもしれません。そうした場合を判定する手段は、今のところ知られていませ

ん。雌雄同体の出現率以外には、性比の統計的有意な移動は調べていません。

質問：ありがとうございました。

質問：日本語でお伺いしたいのですが、北九州の門上と申します。

日本でもこのような両生類の調査をしており、昨日の内山先生のご発表でもありましたように、若干の精巣卵が見つかっているのです。それで我々としては、化学物質の影響の可能性もあるとは思いますが、もともと両生類において、いわゆる自然界で化学物質の影響等がない場合でも、どれぐらいの精巣卵の発生率があるかを、ご存じならば教えていただきたいのが第1点です。

それから、あるならば化学物質以外に、どのような原因でそういうものが自然界で発生するのか、その2点をご存じならば教えてください。

ヘイズ：*Xenopus laevis* の場合には、自然環境における雌雄同体あるいは間性の発生率についてはデータを持っていません。我々が1年あたり1万匹以上を調べた中では、コントロール群に性腺の異常はまったく見つかりませんでした。*Rana pipiens* については、我々が行った100匹を対象とする1回の実験や米国中の1,000匹を調べた場合には、アトラジンが使用された地域の西部であるネブラスカ州西部には精巣卵は見られませんでした。

アイオワ州では我々が採取した雄の100%に見られました。我々が採取した地域の個体の100%にそれが見られたのはネブラスカ州では少なくとも1箇所、その他の地域、ただしアトラジン使用域の西部、すなわちネブラスカ州西部以外の地域ではもっと少ない割合で見られました。他のエストロゲン様化合物について、その他何が原因となり得るのか私は知りません。これらその他の異常はすべて、低用量のエストロゲンで誘発可能であることは、以前に我々が示しました。ありがとうございます。

門上：ありがとうございます。

井口：ご質問でしょうか。ではこれを最後に一つだけ。

質問：その精巣卵、インターセックスが起こった個体における、もし繁殖など次世代への影響があると

するのであれば、もしそういうデータをお持ちであれば教えていただきたいのです。

もう1つは、それらのフィールドで曝露された個体が、実際精巣における性分化の異常以外に、何かエストロゲンとか、アトラジンはエストロゲン作用ではないと思うのですが、そういった違う作用や異常を起こしているかということにはなかったのかを、教えていただきたいのです。

ヘイズ：質問の一部は、生殖に対してどのように影響するかということですね。答えの一部は、これら1年齢の個体、すなわち我々の研究室で飼育している1年齢の*Xenopus laevis* です。現在我々は、雄と雌とを交配させて、繁殖率を調べているところです。少しのデータを得ていますが、まだ実験は1回だけで、1処理あたり5個体しか実験していませんので、現時点ではまだそのデータを議論する準備ができていません。繁殖率への影響を示す徴候をいくつか得ています。また我々は発声についても調べています。

野生の個体については、もちろんデータはありません。しかし横断的調査をしてみると、一部の個体群において別の異常がありました。寄生虫感染率と四肢奇形率が、ネブラスカ州西部ではとても高かったのです。これは間性作用とはまったく逆です。例えば、アトラジンが存在しないユタ州やワイオミング州よりも、四肢奇形や腎臓への寄生虫感染率がずっと高かったのです。しかし現時点ではこれぐらいしかデータを持っていません。

質問：ドイツのIGBです。短い質問です。室内モデルとしても*Xenopus* を用いておられるのですか？あなたの説では、芳香族のアトラジンがエストロゲン類の濃度の亢進を誘導するということでしたが、*Xenopus* は、雌性化を誘発させれば性比が雌化のほうに移動することがよく知られていますので、あなたの説が正しいのか疑問に思います。あなたの説が正しいとするならば、少なくとも雌型の表現型の数が増加するはずですが、したがって、あなたの説は拮抗すぎかもしれません。

ヘイズ：はい。私が言いたいのは、誘導されたアロマターゼによりエストロゲンが産生されるのはおそらくステージ52~54であって、100%の個体に性転換が起きる段階では作用を表わさないということです。これらのデータの基になっているのは、性腺が分化する時期(ステージ52~54)に動物を低濃度のエスト

ロゲンに曝露させると、まったく同じタイプの異常が出現したという事実です。動物に 1 ng/ml 未満のエストラジオールを投与する場合、投与がステージ 52~54 の間でのみ、多発性腺と雌雄同体が見られますが、完全な性転換は見られません。

井口：たいへんありがとうございました。