

に過剰発現させて CYP 蛋白の機能解析に用いた。各海棲哺乳類 CYP を過剰発現させた細胞から抽出したミクロソーム画分による EROD 代謝活性を、ラット CYP1A1 の活性値と比較した。クラカケアザラシ CYP1A1 の代謝活性はイシイルカあるいはラット CYP1A1 の代謝活性能と比べ有意に低いことが明らかになった。

E. 結論

以上の研究より、海棲哺乳類 CYP について次の結果および結論が導かれた。北海道に回遊してくるゴマフアザラシには高濃度の PCB や DDT 等が蓄積していた。この汚染は、オホーツク海ロシア沿岸域の都市における PCB、DDT 濃度が北海道のそれにくらべ非常に高いことから、アザラシが春から秋にかけて過ごすこの地域で汚染されたものと推察された。アザラシの体脂肪の PCB 濃度と、CYP1A1 依存の活性には正の相関が認められた。逆に、CYP1A1 およびその活性は動物の PCB 汚染のバイオマーカーとなることが示された。更に、アザラシでは、CYP2B がほとんど無く、ラットにおいては CYP2B 依存であるはずの酵素活性も、アザラシでは CYP1A1 が触媒していることが明らかになった。言い換えれば、アザラシ CYP1A1 は、ラットにおける CYP1A1 活性も CYP2B 活性もあわせ持つ酵素である。この酵素の特殊性については、更に検討しなければならない。幅広い解毒能力を持つ酵素は汚染物質の除去に応用可能であると考えられる。

アザラシをはじめとする海棲哺乳類の CYP について遺伝子レベルで検討するため、まず 5 種の海棲哺乳類の肝臓において CYP1A および CYP3A サブファミリーに属する分子種の存在を確認した。これら海棲哺乳類 CYP 断片から予想されるアミノ酸配列を用いて、他の動物種の CYP を交えた系統解析を行ったところ、鯨類 CYP は偶蹄類 CYP と、鰭脚類 CYP はイヌの CYP と近縁の関係にあることが明らかとなった。更に、クラカケアザラシ CYP1A1 とイシイルカ CYP1A1 の代謝能に

は有意な差がみられた。当然のことながら、CYP 活性を生体の汚染の指標として用いるにあたり、CYP 活性の動物種差、系統差を考慮することの重要性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chiba, I., Sakakibara, A., Goto, Y., Isono, T., Yamamoto, Y., Iwata, H., Tanabe, S., Shimazaki, K., Akahori, F., Kazusaka, A., Fujita, S., Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seals from the coast of Hokkaido, Japan. (submitted).
- 2) Teramitsu, I., Yamamoto, Y., Chiba, I., Iwata, H., Tanabe, S., Fujise, Y., Kazusaka, A., Akahori, F., Fujita, S., Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. *Aquatic Toxicology*, (in press)
- 3) Yoon, S., Kazusaka, A., Fujita, S.; Accumulation of diacylglycerole in the liver membrane of Long-Evance cinnamon (LEC) rat with hepatitis. *Cancer Lett.*, (in press)
- 4) Yoon, S., Kazusaka, A., Fujita, S.; FT-IR spectroscopic and HPLC chromatographic studies of CCl₄-induced acute hepatitis in rat -Damage in liver phospholipid membrane-, *Biospectroscopy*, (in press)
- 5) Yoon, S., Kazusaka, A., Fujita, S.; Application of FT-IR and ESR spectroscopic techniques to the study of CCl₄-induced peroxidation in rat liver microsomes. *Jpn. J. Vet. Res.*, 47, 151-154 (2000)
- 6) Yoon, S., Kazusaka, A., Fujita, S.; Accumulation of diacylglycerole induced by CCl₄-derived radicals in rat liver membrane and its inhibition with radical trapping reagent -FT-IR spectroscopic and HPLC chromatographic observations- *Jpn. J. Vet. Res.*, 47, 135-144 (2000)

2. 学会発表

- 1) 寺光郁子、千葉一成、岩田久人、田辺信介、藤瀬良弘、数坂昭夫、藤田正一、海棲哺乳類シトクロム P450 遺伝子の同定と蛋白機能解析、第 129 回日本獣医学会学術集会
- 2) 尹碩柱、丸山 豊、数坂昭夫、藤田正一、四塩化炭素由来フリーラジカルによる肝炎発症に伴う細胞内情報伝達過程の活性化機序、第 129 回日本獣医学会学術集会
- 3) 丸山 豊、太田利男、寺岡宏樹、竹花一成、平賀武夫、岩永敏彦、藤田正一、ブタ十二指腸腺細胞におけるムスカリン受容体刺激を介した細胞内 Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流、第 129 回日本獣医学会学術集会

3. 参考文献

- 1) Dietz, R., Heide-Jorgensen, M. P. & Harkonen, T. *Ambio* 18, 258-264 (1989).
- 2) Bargman, A. & Olsson, M., *Finn. Game Res.* 44, 47-62 (1985).
- 3) Reijnders, Peter J. H. *Nature* 324, 4 (1986).
- 4) de Swart, R. L., Ross, P. S., Vedder, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S., Loveren, H. V., Vos, J. G., Reijnders, P. J. H. & Osterhaus, A. D. M. E. *Ambio* 23, 155-159 (1994)
- 5) de Swart, R. L., Ross, P. S., Vos, J. G., & Osterhaus, A. D. M. E. *Environ. Health Perspect.* 104, 823-828 (1996).
- 6) Nims, R. W. & Lubet, R. A. *J. Toxicol. and Environ. Health* 46, 271-292 (1995).
- 7) Boon, J. P., Van Arnhem, E., Jansen, S., Kannan, N., Petrick, G., Schulz, D., Duinker, J. C., Reijnders, P. J. H. & Goksoyr, A. In "Persistent Pollutants in Marine Ecosystems" (eds Walker, C. H. & Livingstone, D. R.) 119-159 (Oxford, 1992)
- 8) van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T. C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. *Environ. Health Perspect.* 106(12), 775-92 (1998)

Effect of Environmental Endocrine Disruptors and Other Environmental Pollutants on Wild Animals and Its Evaluation.

- For the Establishment of the Environmental Risk Assessment System Using Biomarkers-

Fujita, S., Kazusaka, A., Masuda, M., Iwata, H., Chiba, I, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Possibility of the use of hepatic drug metabolizing enzyme, cytochrome P450 and its activities as the biomarker of the impact of environmental pollution on wild animals was investigated. From our earlier finding that fish eating Stellar's Sea Eagles which migrate from Siberia to northern Japan in winter highly accumulated PCBs and DDTs in their body, we thought that seals which share the same gaming ground with the eagles might accumulate these chemical pollutants. Therefore, an isozyme of P450, CYP 1A1 contents and activities in the liver microsomes of the seals were determined immunochemically and enzymatically. The high individual variations were observed in the contents as well as in the activities. However, these values showed statistically significant correlation with the coplanar PCB levels accumulated in the fat of the seals, indicating that the levels of P450 and its activities in the liver of wild animals can be good biomarkers of PCB exposure. In order to characterize the P450 isozymes of the seals, we have cloned cDNA of CYP 1A1 and 3A from the liver of seals and whales. The phylogenetic trees were constructed based on the sequences of these cDNA. These trees showed good agreement with the taxonomically constructed phylogenetic trees. CYP 1A1s from seals and whales were expressed in 293T cells, and the activities were compared. Ethoxyresorufine O-deethylase (EROD) activity turn-over number of seal CYP 1A1 was lower than that of rats as well as whales. The seal CYP 1A1 had an activity of pentoxyresorufine O-depentylase activity, normally CYP 2B dependent activity in rats. It was concluded that hepatic contents and activities of P450 can be a good biomarker of pollution in wild animals, but the use of activities alone should require caution because of species differences in metabolic rates as well as substrate specificities.

Table 1 Monooxygenase activities (pmol/min/mg protein) in liver microsomes of two seal species^a

Monooxygenase activities	Largha seal Male (n=7)	Female (n=6)	Ribbon seal Male (n=6)	Female (n=6)
Alkoxyresorufin O-dealkylation				
MROD	0-29	0-25	0-11	0-4.1
EROD	0-733	0-459	108-389	0-251
PROD	0-3.5	0-2.8	0.75-2.2	0-2.4
BROD	0-12	0-7.2	0-5.8	0-4.9
Testosterone hydroxylation				
2 β -Hydroxylation	0-8.6	0-2.6	0-0.3	0
6 β -Hydroxylation	0-85	0-42	0-27	0-21
16 β -Hydroxylation	0-4.1	0-2.5	0	0

Values are ranges from minimum value to maximum value. Activities of undetectable samples were regarded as 0.

^aSpecified are methoxy-, ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxy resorufin O -dealkylation activities (MROD, EROD, PROD, and BROD, respectively), and testosterone hydroxylation activities (at the 2 β , 6 β , and 16 β positions)

Table 2 Spearman rank correlations between CYP contents or monooxygenase activities in liver microsomes and PCB concentrations (lipid weight basis) in blubber of largha seals^a

	total TEQ	total PCB	non-ortho PCB		mono-ortho PCB			di-ortho PCB	
			PCB77	PCB125	PCB105	PCB115	PCB155	PCB170	PCB180
Monooxygenase activities									
Alkoxyresorufin O-dealkylation									
MROD	○	○	○	○	○	○	○	-	-
EROD	○	-	○	○	○	○	○	-	-
PROD	○	○	○	○	○	○	○	-	-
BROD	○	-	○	○	○	○	-	-	-
Testosterone hydroxylation									
2 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP contents									
1A1	○	○	○	○	○	○	○	-	-
1A2	-	○	○	-	-	-	-	○	○
2B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Open circles show significant positive correlations (Spearman rank correlation, $p < 0.05$).

^a Explanations for abbreviations are shown in Table 1.

Table 3 Spearman rank correlations CYP contents or monooxygenase activities in liver microsomes and organochlorine concentrations (lipid weight basis) in blubber or largha seals^a

	HCB	HCH				CHL						DDT			
	α -	β -	γ -	total HCH	oxy	trans-	cis-	trans-nons	cis-nons	total CHL	p,p'-DDE	p,p'-DDD	p,p'-DDT	total DDT	
Monooxygenase activities															
Aflatoxin B ₁ D-dealkylation															
MROD	-	○	-	-	-	○	-	-	-	○	○	-	-	-	
EROD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PROD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	
BRD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Testosterone hydroxylation															
2 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16 β -hydroxylation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CYP contents															
1A1	-	-	-	-	○	○	-	-	-	○	○	-	-	-	
1A2	○	-	○	-	○	○	-	-	○	○	○	○	-	○	
2B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-	-	
3A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Open circles show significant positive correlations (Spearman rank correlation, $p < 0.05$). Closed circle shows significant negative correlation (Spearman rank correlation, $p < 0.05$).
^a Explanations for abbreviations are shown in Table 1.

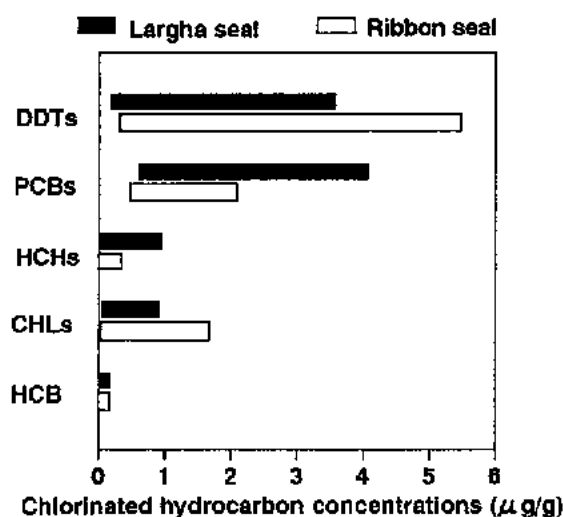


Fig. 1 Chlorinated hydrocarbon concentrations (lipid weight basis) in blubber of two seal species.

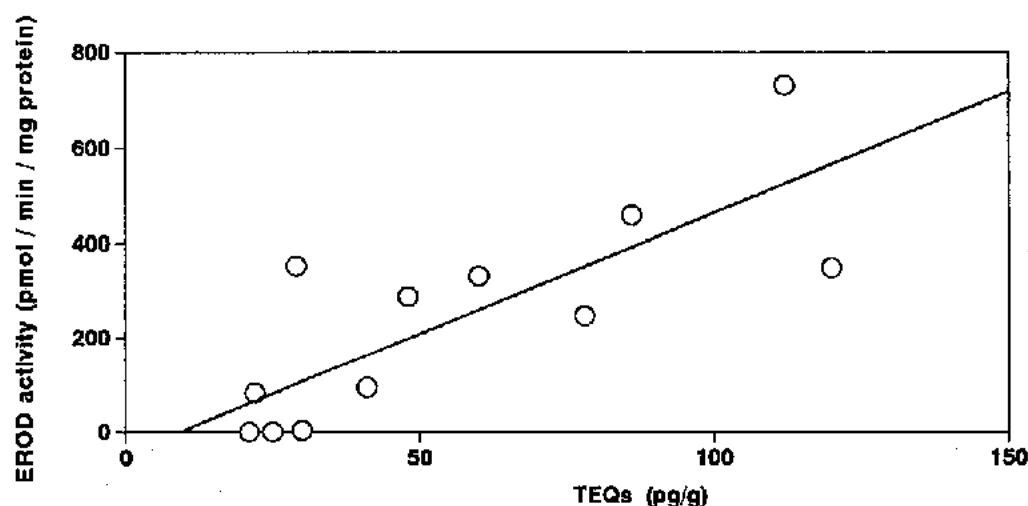


Fig. 2 Relationship between hepatic EROD activity and blubber TEQ (lipid weight basis). TEQs were calculated using polychlorinated biphenyl isomer concentrations and TEF values (van den Berg et al, 1998). Statistical analyses were examined by Spearman rank correlation.

11. 絶滅が危惧される両生類の国内実態調査と情報ネットワークの作成 及び環境汚染モニター動物の作製に関する研究

研究者 中村 正久 (広島大学理学部附属両生類研究施設・教授)

研究要旨

本研究は(1)両生類(カエル、イモリ)の分布実態調査とネットワーク作り、(2)北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明、(3)環境汚染モニター動物としてのトランスジェニックカエルの作製の3つのテーマを骨子として行われた。(1)のネットワーク作りについては奇形カエルの情報収集を目的としてホームページを開設(<http://www.ipc.hiroshima-u.ac.jp/~nakamra/>)した。情報も得られている。分布実態調査は、関東地方、北陸地方、東海地方、四国地方、沖縄地方の区域を選び、カエル、イモリの生息状況を調べた。その結果、どの地方もカエルの個体数が減少している様子が窺えた。また、関東地方では短期間の調査に関わらず、6例の奇形ウシガエルが発見された。(2)では北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明のため、カエル卵塊のダイオキシン類等化学物質の分析を行った。その結果、カエル体内に蓄積された有機塩素系農薬、PCB、ダイオキシン類が脂肪とともに卵に移行していることが確認された。これらの物質が胚発生時に悪影響を及ぼし、奇形カエルが発生する可能性がある。(3)についてはGFPをレポーターとしてカエル*FTZ-F1*遺伝子の転写調節領域をアフリカツメガエル卵に導入した。その結果、トランスジェニック胚で部域特異的にGFPが発現していることが確認できた。しかし、胚が死んだため、性腺で*FTZ-F1*遺伝子が発現するかどうかを確認することができなかった。

研究者協力者

三浦 郁夫 (広島大学・理学部・講師)
高瀬 稔 (広島大学・理学部・助手)
田中 滋康 (静岡大学・理学部・教授)
弓削 昌弘 (福岡女子大学・人間環境学部・講師)
門上希和夫 (北九州市環境科学研究所・水質環境係長)
千木良芳範 (沖縄県教育庁文化課・課長補佐)
大内 一人 (埼玉県三郷市・白営業)
武石 全慈 (北九州市立自然史博物館・学芸員)
倉本 満 (福岡教育大学名誉教授)
小野 勇一 (九州大学名誉教授)

化学物質等の要因が考えられる。このような状況にあって、国内各地のカエルの動態に関する組織的な実態調査やそれらの情報に関するネットワーク作りは殆ど行われていない。

本研究は、環境汚染と両生類の実態を把握するため、国内のいくつかの地域を選んでモデル地区とし、①両生類(カエル、イモリ)の分布実態調査とネットワーク作り、②北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明、③環境汚染モニター動物としてのトランスジェニックカエルの作製、について行うことを目的とする。

A. 研究目的

近年、数多くの動物種の絶滅が危惧されているが、両生類も例外ではなく、世界各地でカエルのいくつかの種の絶滅、急減、及び奇形の発生が報告されている。この原因として人間による自然破壊や活動産物による生息地の減少のみならず、オゾン層の破壊による紫外線増加、酸性雨、病気、寄生虫や環境汚染

B. 研究方法

【1】両生類(カエル及びイモリ)の分布実態調査とネットワーク作り

(A) 調査ネットワークの構築

- 1) ホームページの作成
- 2) インターネットによる情報の収集

3) 収集した情報の整理と公開

(B) 分布実態調査

実態調査①：北陸地方・佐渡島

(ツチガエル)

佐渡島は東西の環境に大きな違いがあり環境汚染とカエルの動態変化を調査するうえで貴重な地区である。ここに生息するツチガエルは外部形態や生殖行動が本土のものと著しく異なっている。この貴重なカエルも年々数が減少しているので、次の事項について調査を行う。

- 1) 生息地と生息数の調査
- 2) 佐渡系統と新潟系統の遺伝的差異の解析

実態調査②：四国地方・高知市

(ヌマガエル、アマガエル)

1999 年初夏に高知市で全身白色ヌマガエル(本来は褐色)のオタマジャクシとアマガエルの尾部赤色オタマジャクシが同地区から数多く発見された。本年度はこれらのカエルについて実態調査を行う。

- 1) 色彩異常と生息場所の調査

実態調査③：関東地方(奇形ウシガエル)

千葉県、茨城県では高頻度で奇形ウシガエルが発見されている(大内研究員、私信)。本研究では次の事項について調査する。

- 1) 奇形ウシガエルの発生場所の実態調査
- 2) 関東地方・北陸地方におけるカエルの種類、生息数、奇形カエルの有無などの実態調査

実態調査④：北陸地方・東海地方

(カエル、イモリ)

東海地方ではカエルの実態調査、新潟県村上市ではイモリの生息数及び奇形イモリの発生について調査する。

- 1) カエル、イモリの分布実態調査

実態調査⑤：沖縄地方・沖縄本島、宮古島

(オオヒキガエル、ミヤコヒキガエル)

沖縄県沖縄本島や宮古島にはオオヒキガエル、ミヤコヒキガエル等の貴重種が棲息している。沖縄群島は土地開発が急速に進んでおり、これらの種の絶滅や減少が危惧されている。にもかかわらず、組織的な実態調査が行われていない。そこで、沖縄在住の研究員の協力を得て実態調査を行う。また、オオヒキガエル、ミヤコヒキガエルは、南大東島にも棲息していることから、地理的に大きく離れた両島におけるこれらの種の実態を比較する。

1) 沖縄本島、宮古島、南大東島におけるオオヒキガエル、ミヤコヒキガエルの分布実態調査

【2】北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明

(A) 卵塊中の化学物質の分析目的

平成10年度の山田緑地及び対照2地域を対象としてカエル及び生息地のダイオキシン類等化学物質の分析調査を行ったところ、オスにおける検出濃度がメスに比べ有意に高いことが分かった。そこで、検出物質の卵中濃度を測定して、卵の汚染実態を明らかにすると共に、性差分の濃度が卵に移行しているかどうかを検討する。

(B) 研究方法

平成10年度に調査したメスガエルの内、体内濃度が比較的高濃度であった20個体から採取した以下の卵塊。なお、試料採取から分析までの間は、-20℃で保存した。

(1) 分析試料

(a) ダイオキシン類(含むコプラナーPCB)分析用(10卵塊)

○山田緑地

ヤマアカガエル：山田3、山田5、山田10

ニホンアカガエル：山田12、山田17

○田代(対照地1)

ヤマアカガエル：田代13、田代15、田代19

○小敷(対照地2)

ニホンアカガエル：小敷1、小敷15

(b) 有機塩素系農薬等分析用 (10 卵塊)

○山田緑地

ヤマアカガエル：山田 7、山田 8、山田 9

ニホンアカガエル：山田 11、山田 13、山田 14、山田 16、山田 18

○田代 (対照地 1)

ヤマアカガエル：田代 17

○小敷 (対照地 2)

ニホンアカガエル：小敷 18

(2) 分析項目

平成 10 年度調査でのカエル分析項目の内、以下の項目。

(a) 卵塊重量、脂肪分 (有機塩素系農薬用試料のみ)

(b) ダイオキシン類 (含コプラナーPCB)

(c) 有機塩素系農薬：DDT とその代謝物計 6 種、ヘプタクロル、オキシクロルデン、ディルドリン、ヘプタクロルエポキシド、クロルデン (シス及びトランス型)、ノナクロル (シス及びトランス型)、HCH4 種、HCB

(d) PCB (有機塩素系農薬用試料と同一試料)

(3) 分析方法

試料の分析は、(財)日本食品分析センターに依頼した。分析は、PCB 及び有機塩素系農薬が「外因性内分泌攪乱化学物質暫定マニュアル」に、ダイオキシン類及びコプラナーPCB が「野生生物のダイオキシン類汚染状況調査マニュアル」にそれぞれ準拠して行った。

【3】環境汚染モニター (トランスジェニックカエル) 動物の作製

(A) 研究目的

環境破壊及び環境汚染化学物質によってカエルの生息数が著しく減少し、いくつかの種の絶滅が危惧されている。特に環境ホルモンは、動物の性分化異常を引き起こすため、生来の生殖活動ができないことから種の絶滅速度が益々早くなると予想される。環境ホルモン等の様々な物質による環境汚染は我々の気づかないうちに進行していることが多く、早

急に汚染モニター動物の作製が必要となる。例えば、性腺で特異的に発現する遺伝子の発現変化を継続的に捉えることができるようなモニター動物を作製すれば汚染の進行を知ることができ、それによって汚染の予防も可能となる。本研究は環境ホルモン汚染のモニター動物として性分化調節遺伝子を性腺で特異的に発現するトランスジェニックカエルの作製を目的とする。

(B) 研究方法

(1) モニター動物 (トランスジェニックカエル) の作製方法

緑色蛍光蛋白 (GFP) 遺伝子が入ったベクター (pEGFP) の上流に性腺分化調節遺伝子を挿入した DNA コンストラクトを未受精卵内に注入する (図 1 参照)。GFP の蛍光をモニターにすれば導入遺伝子の発現異常 (性分化異常) を継続的に観察できるからである。トランスジェニックカエルの作製方法は技術的には確立されているが (Kroll & Amaya, Development 122 (1996) 3173-83)、注入遺伝子が全て発現するとは限らない。我々の使用した遺伝子は *FTZ-F1* 遺伝子である。*FTZ-F1* 蛋白は最初、ショウジョウバエの体節形成に関与する *fushi tarazu* 遺伝子の転写調節因子として発見された。脊椎動物でも類似遺伝子が単離されていたが、機能は不明であった。中嶋等はこの遺伝子が両生類の性腺で強く発現することを世界で初めて見出した (Gene, 2000、印刷中) (図 2)。そこで、この遺伝子の転写調節領域を単離し (図 3)、この DNA 断片と GFP ベクターとの DNA コンストラクトを作成した (図 4)。この DNA コンストラクトをアフリカツメガエルの未受精卵に注入して発生させた。

C. 研究結果、及び D. 考察

【1】両生類 (カエル及びイモリ) の分布
実態調査とネットワーク作り

(A) 調査ネットワークの構築

奇形カエルの発生地域の情報収集に関してはホームページを平成 12 年 2 月に開設し、イ

トランスジェニックカエルの作製法とそれを応用したEDC新検定法

例：性腺への影響の検定

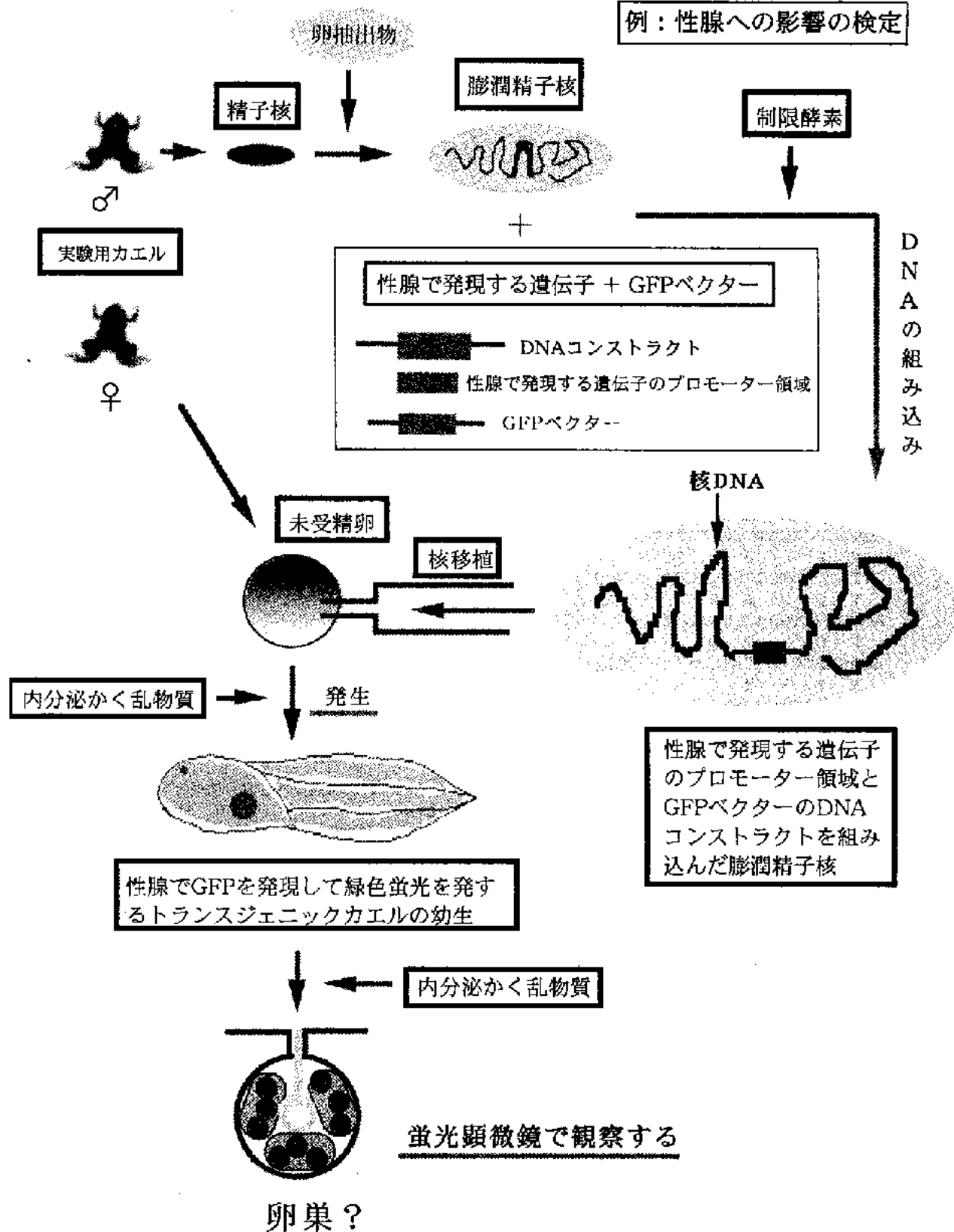


図1