

平成11年度

内分泌攪乱化学物質等の影響等調査研究
報 告 書

平成12年3月

財団法人 日本公衆衛生協会

目 次

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明 千葉大学医学部解剖学 湯浅 茂樹 ……………	1
2. 核内転写調節 (PPAR) を介した外因性内分泌攪乱化学物質の 生殖毒性作用の機構および安全性の研究 信州大学医学部 那須 民江 ……………	24
3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響とその分子機構の解析に関する研究 長崎大学医学部 小路 武彦 ……………	32
4. 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究 北海道大学医学部 岸 玲子 ……………	42
5. 生殖発達毒性に関する研究 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 鈴木 勝士 ……………	50
6. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価 九州大学大学院医学研究院 大村 実 ……………	55
7. 環境生物の免疫影響に関する研究 国立環境研究所環境健康部 小林 隆弘 ……………	81
8. 鳥類の内分泌攪乱化学物質影響調査 東京医科歯科大学教養部 和田 勝 ……………	148
9. レポーター遺伝子を導入した細胞培養系の確立 東京大学分子細胞生物学部研究所 加藤 茂明 ……………	156

胞に直接には作用しないこと、精母細胞の減数分裂にも影響をおよぼさないことも明らかにした。これらの所見は、 β -estradiol 3-benzoate がステップ7精子細胞より幼若な生殖細胞に作用して、その影響が分化が進んだ精子細胞の形態形成の障害を誘導することを示している。エストロゲン受容体 β は精母細胞ならびに幼若な精子細胞に発現することが報告されており、この段階で β 受容体を介して作用した β -estradiol 3-benzoate の影響がステップ7精子細胞以降に現れると考えられる(図 29)。これとともに、セルトリ細胞の特殊接合装置の形成も異常を示し、DES のひきおこす障害とも共通性があり、 β -estradiol 3-benzoate は複数の作用点を持つことが示唆された。

3) 正常ラットの精巣発達過程における DES 曝露による精子形成障害の機構

ectoplasmic specialization はセルトリ細胞間およびセルトリ細胞と後期精子細胞間にみられる特殊な構造である。セルトリ細胞間の ectoplasmic specialization は、セルトリ細胞の細胞膜、その内側に存在するアクチン線維層、さらに内側の滑面小胞体から成る。セルトリ細胞と後期精子細胞間の ectoplasmic specialization では、セルトリ細胞側のみに上記の構造が存在する。セルトリ細胞間の ectoplasmic specialization には更に tight junction が存在し、これは血液-精巣関門 (blood-testis barrier) として働いている。この ectoplasmic specialization は精上皮を管腔領域 (adluminal compartment) と基底領域 (basal compartment) に分離し、生殖細胞が減数分裂を行うためにはこの adluminal compartment の存在が必須である。

セルトリ細胞の発達障害: 対照ラットでは 24 日齢で ectoplasmic specialization が完成し adluminal compartment が確立され、同じく 24 日齢では減数分裂像および step 1 精子細胞がみられた。これに対し DES 投与ラットでは 24 日齢から 49 日齢までは生殖細胞の分化が pachytene 精母細胞で留まっていた。

これとともに、DES 投与ラットでは生後 49 日まで ectoplasmic specialization の形成が未発達のみであり、対照ラットの 22 日齢の発達状態に留まっていた。したがって、24 日齢から 49 日齢の DES 投与ラットで、pachytene より後の減数分裂前期が進行しないのは、ectoplasmic specialization の発達が DES の作用によって遅滞し、adluminal compartment が確立されないためと考えられる。DES の新生仔ラットへの投与がセルトリ細胞の正常な増殖を抑制するという報告があるが、本研究の所見から、DES はセルトリ細胞の正常な分化発達をも障害すると考えられる。DES による精子形成障害が可逆的に修復可能であるのか、不可逆的変化であるかの検討が今後の課題である。

DES 投与 32 日齢から 49 日齢の精細管の内腔にセルトリ細胞の板状の突起がみられる。未発達な ectoplasmic specialization が内腔側のセルトリ細胞の板状の突起間にみられる理由として、対照群で精子細胞が出現している時期に一致することから、精子細胞を包むべきセルトリ細胞の葉状突起は発達したものの、本来支持すべき精子細胞が存在しないためと考えられる。これは、正常なラットでも生殖細胞の分化が進んでいない幼若な精巣の精細管や、生殖細胞の存在しないミュータントマウスの精細管にもみられており、DES の直接の作用による可能性は低い。

DES 投与 32 日齢から 49 日齢で精上皮の基底部に多数の B 型精祖細胞がみられたことは、B 型精祖細胞から preleptotene 精母細胞への分化が正常に行われなかったためと考えられる。これは、セルトリ細胞の分化、増殖が抑制され、セルトリ細胞に比して相対的に B 型精祖細胞が過剰となって、B 型精祖細胞の分化の進行が阻害された可能性が考えられる。

DES の作用機序: 本研究では DES の生殖細胞に対する作用について新たな知見が得られた。これまで、DES を新生仔雄ラットに過量投与した場合の作用機序として、DES が gonadotropin (FSH) 分泌を抑制すること

によりセルトリ細胞の正常な発育を抑制する可能性や、DES がエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) を介してセルトリ細胞へ直接作用する可能性が考えられている。ER については ER α と ER β の 2 つのサブタイプがあることが報告されている。ER α は主に精巣網の上皮細胞の核に存在する。これに対し、最近発見された ER β は種々の組織に発現していて、なかでもセルトリ細胞と A 型精祖細胞の核に発現していることから、DES の作用点としての可能性を示すものと言える。これに対し、ER β 遺伝子ノックアウトマウス (β ERKO) の表現型には何の異常もみられず、受精能も正常であったため、ER β が内因性エストロゲンの作用発現にどう関与しているかは現時点では不明である。しかし、過量のエストロゲン化合物が投与された場合は、ER β と結合して障害作用を及ぼす可能性がある。さらに、ER α 遺伝子ノックアウトマウス (α ERKO) に DES を過量投与したときに、同様の処置をした正常マウスでみられるような精巣の異常がみられなかったことから、DES は ER β ではなく ER α を介して作用する可能性が示唆されている。ただし、ER α の局在が精細管内には認められず、DES の障害作用機序のすべてを説明できないことも確かである。

現時点では ER と DES との関係は不明であり、したがって DES がいずれの経路を介してセルトリ細胞の障害を引き起こすかについては、ノックアウトマウスを用いた ER の研究とともに、次項に述べる細胞内シグナル伝達系の検討が必要になってくる。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における DES 曝露の影響の解析

エストロゲン化合物の作用機構として、細胞質内の受容体と結合して核内へ移行し、転写因子として遺伝子発現の制御に関わると考えられてきた。しかし、最近、エストロゲン受容体は細胞膜にも局在するものがあり、エストロゲン化合物が膜受容体と結合後、src ファミリーのチロシンキナーゼが関与する細

胞内情報伝達系を活性化することが示唆されるようになった (図 30)。代表的なエストロゲン化合物の一つである DES の精子形成障害作用の機序を解析する上でこの考え方を検討するために、src ファミリーのチロシンキナーゼの一つである *fyn* 遺伝子を欠失したマウスを用いて、このマウスにおいて DES 投与によって引き起こされる精子形成障害について調べた。その結果、*fyn* 遺伝子欠損マウスでは対照マウス精巣に比して DES による障害作用が軽度であった。この所見は、*Fyn* が DES による精子形成障害に関与することを示唆している。*Fyn* が細胞内骨格と共存し、セルトリ細胞の特殊接合装置でアクチンフィラメントと共存すること、DES による精子形成障害の機構の一つとしてセルトリ細胞の特殊接合装置の形成遅延が関与していることから、*Fyn* の活性制御機構が DES の作用点の一つであることが強く示唆される。

5) 神経系の形成における *Fyn* の機能と DES 曝露の影響

Fyn は精子形成におけるセルトリ細胞の接着構造形成と、これを介する生殖細胞の発達に関与するとともに神経細胞移動にも関与し、両者とも細胞骨格蛋白、とくに actin filament の制御を共通のメカニズムとすると考えられる (図 31)。本研究でも、*fyn* 欠損で生ずる扁桃体の形成障害に類似した異常が、DES 投与により引き起こされた。

以上の結果を総合的に考察すると、DES は下垂体からの FSH 分泌系に対する攪乱作用だけでなく、*fyn* が強く発現する精巣、扁桃体を含む大脳辺縁系、視床下部に直接作用して生殖機能障害を引き起こすとともに、高次脳機能障害を引き起こす可能性が考えられる (図 32)。

E. 結 論

内分泌攪乱化学物質の代表的な化合物であるエストロゲン化合物の diethylstilbestrol ならびに β -estradiol 3-benzoate の精子形成障害作用のメカニズムを光学顕微鏡、電子顕微鏡、

レーザー顕微鏡による形態学的解析ならびに生化学的解析により検討し、成体精巣においては生殖細胞に対する直接的障害、発達過程においては支持細胞であるセルトリ細胞の分化発達障害が重要な作用点であることを明らかにした。これとともに、分子細胞生物学的レベルでは、セルトリ細胞間の特殊接合装置の形成障害、発達遅延が生殖細胞分化の進行に重大な影響を与えていることを明らかにした。さらに、遺伝子ノックアウトマウスの形態学、生化学的解析、上記内分泌攪乱化学物質の投与効果の解析から、エストロゲン化合物はチロシンリン酸化酵素を介する細胞内シグナル伝達系を介してセルトリ細胞の機能調節に影響し、これが生殖細胞形成障害を引き起こす可能性を示唆した。fyn, presenilin-1, mel-18 のような細胞分化にかかわる遺伝子は生殖細胞の特定の発達段階に発現し、今後、その発現パターンと作用機序の解明は、エストロゲン化合物による生殖細胞障害とその可逆性、修復能の指標の開発に発展する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan Q-W, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M, Senda T, Taguchi O, Yamamura K, Arimura K, Muramatsu T.
A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Developmental Biology* vol.194, 152-165, 1998
2. Maekawa M, Suzuki-Toyota F, Toyama Y, Kadomatsu K, Hagihara M, Kuno N, Muramatsu T, Dohmae K, Yuasa S.
Stage-specific localization of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, during mouse spermatogenesis.
Archives of Histology and Cytology vol.61,

No.5, 405-415, 1998

3. Suzuki-Toyota F, Ishibashi K, Yuasa S.
Immunohistochemical localization of a water channel protein, aquaporin 7 (AQP7), in the rat testis.
Cell and Tissue Research vol.295, No.2, 279-285, 1999
4. Toyama Y, Maekawa M, Kadomatsu K, Miyauchi T, Muramatsu T, Yuasa S.
Histological characterization of defective spermatogenesis in mice lacking the basigin gene.
Anat.Histol.Embryol. vol.28, No.3, 205-213, 1999
5. 湯浅茂樹、前川真見子、八木 健
Fyn 欠損マウスに neurogenesis と spermatogenesis の接点を探る
アニテックス vol.11, No.3, 138-145, 1999
6. Toyama Y, Iwamoto T, Yajima M, Baba K, Yuasa S.
Decapitated and decaudated spermatozoa in man and pathogenesis based on the ultrastructure.
International Journal of Andrology vol.23, 109-115, 2000
7. Toyama Y, Hosoi I, Ichikawa S, Maruoka M, Yashiro E, Ito H, Yuasa S.
 β -Estradiol 3-benzoate affects spermatogenesis in the adult mouse.
Journal of Molecular and Cellular Endocrinology, in press
8. Toyama Y, Maekawa M, Ohkawa M, Oku R, Yuasa S.
Neonataly administered diethylstilbestrol retards the development of ectoplasmic specialization in the rat testis.
Journal of Andrology, submitted

2. 学会発表

(シンポジウム)

1. 湯浅茂樹

分子細胞生物学からみた精子形成とその障害

第一回生殖毒性シンポジウム (1999 年 1 月 20 日)

講演記録「環境化学物質の生殖毒性」
p.40-45

2. 前川眞見子、湯浅茂樹

精子形成における Fyn tyrosine kinase の機能解析

第 104 回日本解剖学会全国学術集会 (1999 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.74, No.1 p.36 (1999)

3. Shigeki Yuasa

Both spermatogenesis and neurogenesis are defective in the Fyn-deficient mice: a prospect on the possible common molecular mechanisms related to environmental endocrine disruptors.

International symposium on environmental endocrine disruptors '99 (1999.12.9)

Abstracts p.67-70

4. 湯浅茂樹

環境ホルモンの精子形成と神経発生への障害メカニズム: 遺伝子欠損マウスからの分子細胞生物学的アプローチ

日本獣医学会学術集会シンポジウム (2000 年 4 月 4 日)

講演要旨集 p.21

(一般発表)

1. 丸岡美貴、市川壮一郎、矢代英子、外山芳郎、湯浅茂樹

マウス精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の影響

第 104 回日本解剖学会全国学術集会 (1999 年 3 月 29 日)

解剖学雑誌 vol.74, No.1 p.71 (1999)

2. 奥 伶子、大川雅樹、前川眞見子、湯浅茂樹、外山芳郎

ラット新生仔への diethylstilbestrol (DES) 投与による精巣生後発達の障害メカニズム

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 31 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.63 (2000)

3. 外山芳郎、前川眞見子、湯浅茂樹

精細管内腔への細胞骨格毒注入によるセルトリ細胞の特殊接合装置の機能の解析

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.142 (2000)

4. 前川眞見子、湯浅茂樹

プレセニリン-1 の精巣内局在と精巣発達における機能

第 105 回日本解剖学会全国学術集会 (2000 年 3 月 30 日)

解剖学雑誌 vol.75, No.1 p.143 (2000)

5. Yuasa S, Maekawa M, Hosoi I, Ito H, Shirasawa T.

Immunolocalization and function of presenilin-1 in the mouse testis.

The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)

International Journal of Urology vol.7 Suppl. S64 (2000)

6. Maekawa M, Yagi T, Hosoi I, Ito H, Yuasa S.

Fyn tyrosine kinase in the mouse testis: localization and possible function in the spermatogenesis.

The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)

International Journal of Urology vol.7 Suppl. S64 (2000)

7. Toyama Y, Maekawa M, Hosoi I, Ito H, Yuasa S.
Effects of diethylstilbestrol to postnatal development of the rat testis.
The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)
International Journal of Urology vol.7 Suppl. S65 (2000)

8. Hosoi I, Toyama Y, Yuasa S, Ito H.
Effects of β -estradiol 3-benzoate to spermatogenesis in the mouse.
The Third Asian and Oceanic Congress of Andrology (24-27, May 2000)
International Journal of Urology vol.7 Suppl. S65 (2000)

Molecular and cellular biological mechanisms of the defective spermatogenesis due to the exposure to the endocrine disruptors

Shigeki Yuasa

Chiba University School of Medicine, Department of Anatomy and Developmental Biology

Professor and Chairman

Key Words :

signal transduction, diethylstilbestrol, β -estradiol 3-benzoate, ectoplasmic specialization, spermatogenesis, tyrosine kinase, gene targeting, endocrine disruptors

Abstract:

It has been established that various estrogenic chemicals affect spermatogenesis as the endocrine disruptors. However, the mechanisms of harmful actions of such estrogenic endocrine disruptors are not clear at the level of cellular and molecular biology. It is necessary to elucidate the action mechanisms of the estrogenic chemicals for the detection of harmful chemicals and prevention of the hazards. Estrogenic chemicals exert the effects through the binding to the nuclear estrogen receptors and the regulation of gene transcription. Recently, another mechanisms of estrogen actions which exert the effects by binding to the membrane estrogen receptor and activating the tyrosine kinase-mediated intracellular signal transduction cascade have been proposed. In this project, we have examined biochemically and morphologically the mechanisms of the defective spermatogenesis in the Fyn tyrosine kinase-gene knockout mice, in combination with the analysis of the harmful actions of representative estrogenic chemicals such as β -estradiol 3-benzoate and diethylstilbestrol (DES). We have found that the affected development of the adhesion structures on the Sertoli cells, i.e. the ectoplasmic specialization should be involved both in the defective spermatogenesis due to Fyn tyrosine kinase deficiency and also due to the neonatal administration of DES. The possible involvement of Fyn tyrosine kinase in the formation of ectoplasmic specialization in the developmental process was also suggested. In addition to such developmental stage, it was also found that estrogenic chemicals affect the spermatogenesis of the adult testis by the action on the early stage of spermatid differentiation and defective formation of the ectoplasmic specialization is also involved. On the other hand, DES administration to the neonatal rodents elicited defective neural structure in the limbic system, and such defects were also found in the Fyn deficient mice. Above findings indicated that the crossover points between the Fyn tyrosine kinase-mediated signal transduction system and the cell adhesion-cytoskeletal system might be one of the new targets of harmful estrogenic compounds. Furthermore, DES might affect the neural development and induce defects in the higher brain function including memory and emotion.

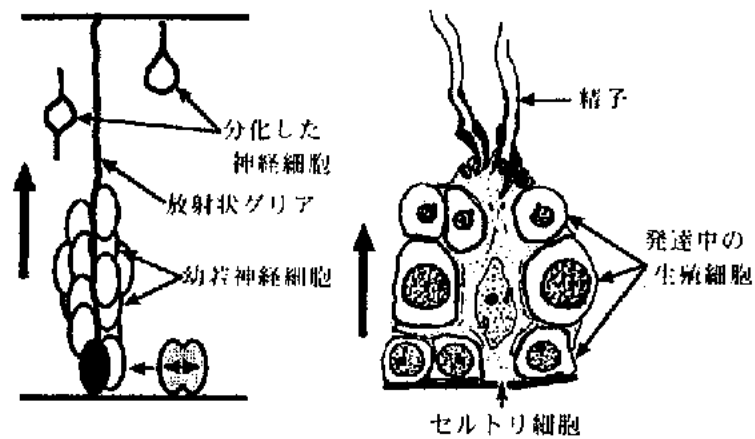


図 1 中枢神経発生過程における放射状グリアにガイドされた幼若神経細胞移動（左）と精子形成過程におけるセトリ細胞に接して進行する生殖細胞分化（右）は細胞生物学的に多くの共通性を示す。

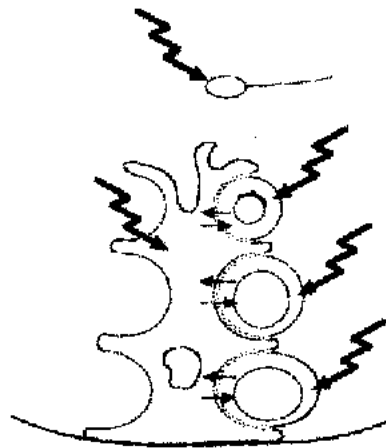


図 2 内分泌攪乱化学物質は下垂体を中心とする内分泌ホメオスターシスを障害するとともに、造精細胞あるいは支持細胞に直接作用する可能性がある。

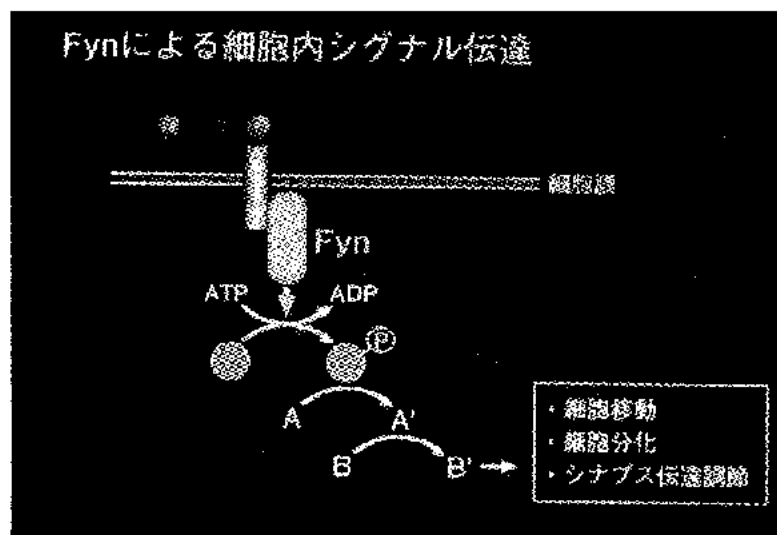


図 3 Fyn チロシンキナーゼを介する細胞内情報伝達システム。このシステムは脳、精巣、免疫系に強く発現している。

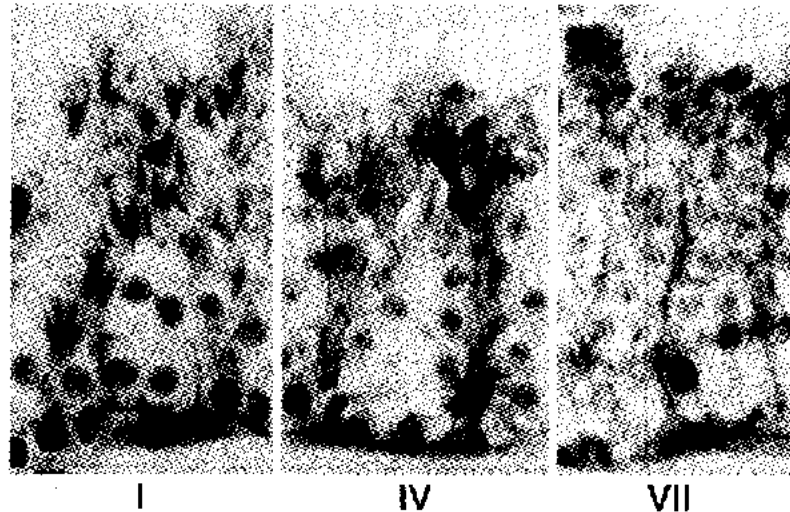


図 4 成体マウス精巣の抗 Fyn 抗体による免疫染色像。各ステージでセルトリ細胞に局在していることがわかる。

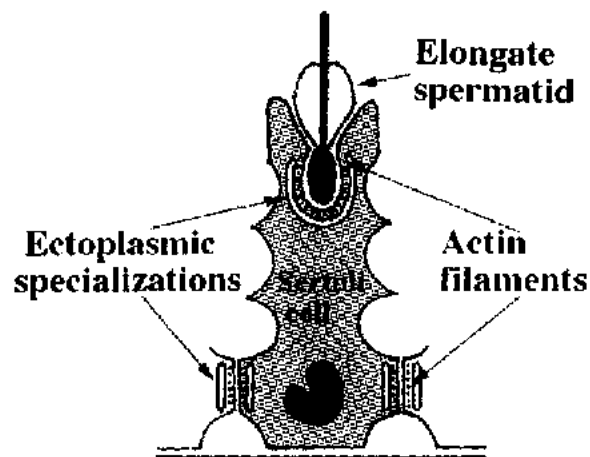


図 5 セルトリ細胞が形成する特殊接合装置 (ectoplasmic specialization) の模式図。精子細胞頭部-セルトリ細胞間、隣接するセルトリ細胞基部間に形成され、細胞膜直下にアクチンフィラメント、その直下に小胞体が局在する。

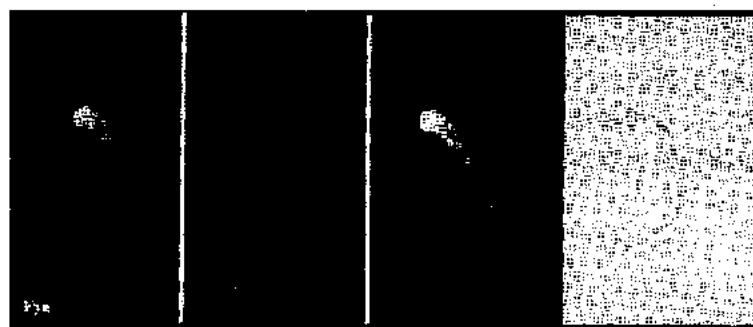


図 6 単離した精子細胞頭部-セルトリ細胞の結合部の FITC 標識抗 Fyn 抗体ならびに rhodamin 標識ファロイジンによる二重標識。両者が ectoplasmic specialization において共存することを示す。

10. 内分泌攪乱化学物質をはじめとする環境汚染物質の野生動物
に対する影響と環境評価
ーバイオマーカーを用いた新環境リスク評価システム確立に向けてー
北海道大学大学院獣医学研究科 藤田 正一 160
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
広島大学理学部附属両生類研究施設 中村 正久 168
12. 内分泌攪乱化学物質等の試験に用いるメダカ系統の(d-rR改良型
および透明メダカの)開発に関する研究
名古屋大学生物分子応答研究センター 若松 佑子 215
13. 魚類を用いた内分泌攪乱化学物質評価法に関する研究
熊本県立大学環境共生学部 有蘭 幸司 217
14. メダカに対する内分泌攪乱物質の短期暴露に関する研究
東京都環境科学研究所基盤研究部 若林 明子 227

1. 内分泌攪乱化学物質による精子形成障害の分子生物学的機構の解明

研究者 湯浅 茂樹（千葉大学医学部解剖学第二講座教授）

研究要旨

内分泌攪乱化学物質としてのエストロゲン化合物が精子形成障害を引き起こすことは確立されているが、障害作用の分子細胞生物学的レベルでのメカニズムは不明である。有害物質の検索、障害の予防にはエストロゲン化合物の精巣に対する作用機構を解明する必要がある。最近ではエストロゲン化合物はエストロゲン受容体に結合後、転写制御に関わるだけでなく、チロシンリン酸化酵素を介する細胞内情報伝達系にも作用する可能性が示されるようになった。

本研究では細胞内情報伝達に関わる *fyn* tyrosine kinase 遺伝子ノックアウトマウスにおける精子形成障害の機構と、代表的なエストロゲン化合物である β -estradiol 3-benzoate, diethylstilbestrol (DES) の精子形成障害作用の機構を生化学、形態学の両面から解析した。その結果、精巣発達過程における生殖細胞の形成障害には、支持細胞であるセルトリ細胞の接着構造 (ectoplasmic specialization) の形成異常が共通して関与しており、この過程には *fyn* tyrosine kinase による制御が必要であることが示唆された。また、成体の精巣に対してはエストロゲン化合物は生殖細胞のうち精子細胞の初期の発達段階に作用して精子の形態形成異常を引き起こすことが示唆された。これらの所見は、精巣内の細胞内情報伝達系と細胞接着構造—細胞骨格システムの接点が、新たにエストロゲン化合物作用の標的の一つとなりうることを示している。さらに、精子形成と神経発生における細胞間相互作用ならびに分子機構の類似性から、内分泌攪乱化学物質の脳形成過程への影響についても検討し考察を行った。

研究者協力者

外山 芳郎（千葉大学医学部解剖学第二講座講師）
前川 眞見子（千葉大学医学部解剖学第二講座助手）
古関 明彦（千葉大学医学部発生生物学講座教授）
赤坂 武（千葉大学医学部発生生物学講座助手）
八木 健（岡崎国立共同研究機構生理学研究所助教授）

A. 研究目的

現在、内分泌攪乱化学物質に関しては生物環境ならびに人の健康に対する脅威が、主に精子数の減少と環境生物の生殖障害の観点から注目されている。今後、これらの物質がなぜ有害であるのかをその作用機構の点から明かにする努力が、国民の不安を解消し安全な生活の確保を図る上で必要である。

本研究では環境ホルモンの作用機序と遺伝子異常による精子形成障害の機序の接点から、環境ホルモンの健康障害に関する分子生物学的マーカーならびに障害の分子細胞生物学的

レベルでのメカニズムを解明することを目的とする。このために、遺伝子ノックアウトマウスの精子形成障害の分子生物学的機構の解析をおこなうとともに、内分泌攪乱化学物質の作用機序の細胞生物学的解析、遺伝子欠損マウスに対する環境ホルモン投与の影響を検討する。

また、精子形成と神経発生における細胞間相互作用の高い類似性から（図 1）、内分泌攪乱化学物質が精子形成障害を引き起こすメカニズムが共通して神経発生、ひいては高次脳機能に影響する可能性も念頭に置いて解析を進める。

内分泌攪乱化学物質は内分泌系のホメオスタシスを乱すとともに、精子形成過程で生殖細胞分化の種々の段階、支持細胞への直接的効果（図 2）も考慮する必要がある。本研究は代表的な内分泌攪乱化学物質の作用の分子

レベルでの解明の糸口を作るものとして、作用の本態にもとづいた客観的な体系的検索方法の開発に貢献することが期待できる。

B. 研究方法

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス、presenilin-1 欠損マウス、mel-18 欠損マウスは各々の遺伝子の蛋白質のコード領域の相同組み換えにより作製した。fyn tyrosine kinase 欠損マウスに関しては、ホモ接合体と野生型について発達過程の精巣重量の変化、ならびに精巣のブアン固定による光学顕微鏡標本の検討を行なうとともに電子顕微鏡観察をおこなった。さらに、精巣蛋白のウエスタンブロットにより Fyn 蛋白の細胞内局在、チロシンリン酸化蛋白の変化について検討した。

presenilin-1 欠損マウスに関しては、ホモ接合体は出生後に死亡するため胎生期の精巣原基の光学顕微鏡標本による検討を行なった。また、正常成体マウス精巣における presenilin-1 の発現に関する検討も行なった。

mel-18 欠損マウスに関しては、成体のホモ接合体ならびに野生型について精巣ならびに卵巣のブアン固定による光学顕微鏡標本の検討を行なった。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用の機序

β -estradiol 3-benzoate をオリーブ油に溶かし成体の雄 ICR マウスに腹腔内投与した。投与期間は 2 日、3 日、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間で、投与量は各投与期間につき 10, 16, 20, 40, 80, 160 μ g/kg 体重とした。対照群にはオリーブ油のみを投与した。マウスはエーテルまたは Nembutal (Abbott Labs.) で深麻酔し、経心的に 10 mM ヘパス緩衝 3% グルタルアルデヒドを注入して灌流固定し、精巣を摘出し重量を計測した後、精巣を約 1mm 角に細切しさらに 2 時間グルタルアルデヒド固定を続けた。次にヘパス緩衝液で洗浄後、1%四酸化オスミウムで 1 時間固定

した。その後、脱水しエポンに包埋した。エポン試料はウルトラミクロトームで、光学顕微鏡用には厚さ 1 μ m の準超薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色した。また、電子顕微鏡用には厚さ約 70 nm の超薄切片を作製し、クエン酸鉛と酢酸ウランの二重染色をした。

3) 正常ラットの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露による精子形成障害の機構

Wistar 系の雄新生仔ラット 1 匹あたり、オリーブ油 40 μ l に溶かした diethylstilbestrol (DES, Sigma) 10 μ g を、生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に皮下注射により投与した。対照群として、オリーブ油 40 μ l を同様に投与したラットを用いた。生後 5, 14, 18, 22, 24, 32, 35, 42, 49, 56 日齢の DES 投与ラットとそれに対応する対照群のラットの光学顕微鏡および電子顕微鏡用試料を上記のマウス精巣標本と同様の手順で作製した。光学顕微鏡用切片として、ブアン氏液による固定を行った精巣を脱水、透徹し、パラフィンに包埋し切片を作成した。また、一部の標本については、4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定後、凍結切片を作成し、蛍光標識ファロイジンを用いてアクチンフィラメントの標識を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露の影響の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス、mel-18 欠損マウスのホモ接合体ならびに野生型の新生仔に上記のラット新生仔の実験と同様にオリーブ油 40 μ l に溶かした diethylstilbestrol (DES, Sigma) 10 μ g を、生後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日齢に皮下注射により投与した。そして、生後 4-5 週でブアン固定により光学顕微鏡標本を作成し、精巣発達について検討した。これとともに、野生型マウスに新生仔期に DES を投与した場合と、オリーブ油のみを投与した場合について、生後 5 週に精巣の Fyn 蛋白、チ

ロシンリン酸化蛋白、特に p80 の発現についてウエスタンブロットにより検討した。

5) 倫理面への配慮

マウス、ラットを用いる動物実験で、灌流固定ならびに組織標本採取に際してはエーテルあるいはネンプタルによる深麻酔下で苦痛のない状態で、かつ短時間のうちに操作を行なった。なお、この動物実験手技は千葉大学亥鼻地区動物福祉特別委員会で承認されている。

C. 研究結果

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

Fyn 欠損マウス：Fyn は Src ファミリーに属する非受容体型チロシンリン酸化酵素で、受容体刺激によって細胞内情報伝達系のチロシンリン酸化の引き金を引き、細胞分化の制御に関与する（図 3）。Fyn 蛋白は精巣ではセルトリ細胞に局在し（図 4）、細胞骨格蛋白の actin filament の分布と特徴的な対応を示した。すなわち、成熟精子細胞の頭部とセルトリ細胞との接触部位で、セルトリ細胞側に形成される ectoplasmic specialization (junctional specialization) とよばれる細胞膜裏打ち構造（図 5）において、actin filament と Fyn との共存が認められた（図 6）。また、セルトリ細胞同士の間形成される同様の特殊接合装置の actin filament にも Fyn が共存することがわかった。生化学的解析により Fyn は Triton X-100 不溶性分画に回収され生後 3~4 週にもっとも発現が強いことが明らかになった。

Fyn 欠損マウスは雌雄ともに生殖能力があり、これまで精子形成には異常がないと考えられてきた。しかし、生後の精巣発達を詳しく調べた結果、Fyn 欠損マウスが一過性の精子形成障害を示すことが明らかになった。すなわち、生後 3 週前後の精巣内で精子細胞が成熟する時期に精巣重量の増加が正常マウスに比較して一過性に遅延し（図 7）、生殖細胞の一部に変性が起こることが明らかになっ

た（図 8）。さらに、電子顕微鏡的観察により、この時期にはセルトリ細胞-精子細胞間に形成される特殊接合装置（ectoplasmic specialization）の形成異常も認められた（図 9、10）。精巣のチロシンリン酸化蛋白をウエスタンブロットにより解析した結果、Fyn 欠損マウスでは Triton X-100 不溶性画分の 80kD 蛋白（p80）のリン酸化が野生型に比べて著しく低下していることが明らかになった（図 11）。このように、Fyn は精巣において生殖細胞とセルトリ細胞の間の相互作用に関わっており、セルトリ細胞の機能を介して生殖細胞の分化、生存に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

プレセニン-1 欠損マウス：プレセニン-1 は若年発症アルツハイマー病の病因遺伝子として単離され、細胞分化制御因子 Notch-1 の活性調節を行うことが明らかにされている（図 12）。胎生期精巣原基の幼若生殖細胞はホモ接合体のほうが野生型にくらべて数の増大が認められた。また、成体の精巣におけるプレセニン-1 の発現は精子細胞の細胞質に局限して認められ、これに対してプレセニン-1 によって活性化される分化制御因子 Notch-1 の発現は精母細胞から精子細胞の核に局在していた（図 13）。さらに、ウエスタンブロットにより、精巣には脳と同一分子量を示すものの他に、分子量の異なる精巣特異的な分子種が含まれることが明らかになった（図 14）。

mel-18 欠損マウス：精巣には異常が認められなかったが、成体の卵巣において減数分裂の異常が認められた。すなわち、卵母細胞は正常な卵巣内では減数分裂前期でとどまっているはずであるが、ホモ接合体では減数分裂中期まで進行した卵母細胞が多数認められた。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用機序

β -estradiol 3-benzoate の投与により、精子形成の細胞周期が一部の精細管で障害されており、とくに分化の進んだ精子細胞で核やア

クロソームの形成異常が認められ（図 15, 16）、精子細胞とセルトリ細胞間の特殊接合装置の異常も認められた。しかし、幼若な精子細胞には形態学的異常が認められなかった。このような、特定の発達段階以降の精子細胞の形態異常は β -estradiol 3-benzoate の投与期間の長短にかかわらず認められ、投与期間の延長によって、より分化が進行した精子細胞にまで形態学的異常が認められた（表 1）。

3) 正常ラットの精巣発達過程における diethylstilbestrol (DES) 曝露による精子形成障害の機構

精巣は対照群のラットでは生後 35 日前後で陰嚢に下降するが、DES 投与ラットでは 56 日齢においても陰嚢までは下降せず、鼠径部に留まっていた。精巣重量は DES 投与ラットの 14 日齢以降で、各々の対照に比べて少なく、差が最も大きい時（35 日齢）では対照の 10%であった。

精子形成の異常：5 日から 22 日齢の DES 投与ラットと対照ラットの精上皮の発達段階は同じであった。すなわち 5 日齢では精巣索（精細管原基）には多数の未分化セルトリ細胞と少数の原始生殖細胞がみとめられた。14 日齢では生殖細胞としては原始生殖細胞に加えて A 型、中間型、B 型精祖細胞および前細糸期（preleptotene）精母細胞がみられた。18 日齢では厚糸期（pachytene）精母細胞まで発達した一次精母細胞がみられた。しかし、DES 投与ラットの精上皮には多くの変性した pachytene 精母細胞がみられた。24 日齢から 49 日齢の DES 投与ラットの精上皮では、生殖細胞の発達程度は 22 日齢の対照ラットと基本的には同じで、分化は pachytene 精母細胞まで進行した状態で停止していた（図 17）。この pachytene 精母細胞の多くは変性をおこしていた。また、32 日齢から 49 日齢ではこの精上皮の基底側には多数の B 型精祖細胞が重層していた。対照ラットでは 18 日齢で減数分裂像およびそれに続く step 1 精子細胞が現れたのに対し、DES 投与ラットでは 56 日齢になって初めて減数分裂像と step

5 までの精子細胞がみられた。

精細管内腔の異常：対照ラットでは 18 日齢以降で精細管の内腔が形成されているのに対し、DES 投与ラットでは 32 日齢以降で内腔が形成されていたが、その内腔には正常には認められない絨毛状の細胞性の突起が無数にみられた。電子顕微鏡観察により、この絨毛様構造はセルトリ細胞の板状の突起であった。

特殊接合装置（ectoplasmic specialization）の異常：対照ラット 22 日齢では ectoplasmic specialization は未発達であるが、24 日齢以降では発達した接合装置がセルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さに認められた。DES 投与ラット 24 日齢から 49 日齢では、対照ラット 22 日齢以前に対応するような未発達の ectoplasmic specialization が、セルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さにみられた。すなわち、短いもの、片側だけが形成されたもの、actin filament のないものなどである（図 18, 19）。この未発達な ectoplasmic specialization が機能的に血液-精巣関門の機能を果たしているかどうかを、血管内投与されたチトクローム C の精細管内腔への移行の有無で調べたところ、血液-精巣関門の機能が破綻していることが明らかになった（図 20）。DES 投与ラット 32 日齢から 49 日齢では、未発達の ectoplasmic specialization は内腔を満たすセルトリ細胞の板状突起間で多数認められた。DES 投与ラットでは 56 日齢になると、対照ラットの 24 日齢以降に対応するような発達した ectoplasmic specialization が、セルトリ細胞間でセルトリ細胞の核の高さに多数認められるようになった。

4) 遺伝子ノックアウトマウスの精巣発達過程における DES 曝露の影響の解析

Fyn 欠損マウスならびに野生型マウスの新生仔期から発達期に DES を投与して生後 4 週で精巣発達の進行を組織学的に比較したところ、野生型マウスではラットの場合と同様に精母細胞の段階で発達が停止しており、精細管の管腔形成も認められなかった。これに

対し、Fyn 欠損マウスでは生殖細胞の発達が精母細胞の段階で停止しているのは野生型と同様であったが管腔形成が認められ、DES 投与による発達障害の程度は野生型の場合と比べて軽度であった (図 21, 22)。また、野生型マウスの発達期に DES を投与し、生後 5 週で精巣内の Fyn ならびにチロシンリン酸化蛋白の発現をウエスタンブロットにより調べたところ、Fyn, p80 いずれもその発現が 1.5 倍に亢進していた。

5) 神経系の形成における fyn の機能と DES 曝露の影響

fyn は中枢神経発生過程において移動中の神経細胞の先導突起に強く局在する (図 23)。幼若神経細胞が放射状グリア突起にガイドされて移動する過程において、fyn は神経細胞移動を誘導する因子 Reelin の受容体からのシグナルを、チロシンリン酸化を介する細胞内情報伝達系によって細胞骨格蛋白、特に actin filament の配列をコントロールすることにより細胞移動を促進すると考えられる (図 24)。Fyn 遺伝子欠損マウスは、海馬においては歯状回ならびにアンモン角の形成異常 (図 25)、扁桃体では中心核の形成異常 (図 26) が calbindin 免疫染色で明らかになった。

このように、fyn 遺伝子欠損マウスでは大脳辺縁系の発生異常を示すため、チロシンキナーゼによる細胞内情報伝達系に影響を及ぼすと考えられる DES の脳発達期における投与は、fyn の関与する脳発生分化の過程にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、新生仔期における DES 投与後に精子形成異常をきたしたマウスの脳を生後 5 週で調べたところ、扁桃体の全体の構築には著明な異常を見いだせなかったが (図 27)、calbindin 免疫染色で基底外側核の calbindin 陽性ニューロンの数の減少が認められた (図 28)。

D. 考察

1) 遺伝子欠損マウスにおける生殖細胞の発達障害の解析

fyn tyrosine kinase 欠損マウス：セルトリ細

胞における Fyn の機能が生殖細胞の分化、成熟に関与することが明らかになった。現時点ではその分子機構は不明であるが、Fyn によるチロシンリン酸化がセルトリ細胞の特殊接合装置の形成調節を介して生殖細胞の発達に関与することが強く示唆される。Fyn によって特異的にリン酸化される p80 はこの細胞内情報伝達の過程に関与すると考えられ、現在、この分子の同定、cDNA クローニングを行っている。また、セルトリ細胞による生殖細胞栄養因子の産生と分泌が Fyn によって制御されている可能性も考えられる。

presenilin-1 欠損マウス：ホモ接合体は出生直後に死亡するため成体の精子形成に関する解析はできない。しかし、成体精巣において presenilin-1 は精子細胞の細胞質に特異的に発現し、一方 presenilin-1 によって活性化される分化制御因子 Notch-1 は精母細胞から精子細胞の核に局限して発現しており、生殖細胞の特定段階における発現パターンは、エストロゲン化合物に対する生殖細胞の反応の指標となる可能性があり、現在検討中である。

mel-18 欠損マウス：生殖細胞のうち卵母細胞の減数分裂に異常を見出しており、今後、卵巣におけるエストロゲン化合物の影響の検討にマーカーとして使用できるか検討中である。

2) 正常成体マウスの精子形成に対する β -estradiol 3-benzoate の障害作用機序

エストロゲン化合物による精子形成の障害に関しては多数の報告があるが、外因性エストロゲンの生殖細胞に対する作用を明確に検討した報告はほとんどない。本研究で明らかとなった新たな知見は、成体マウスに β -estradiol 3-benzoate を投与した場合、投与期間の長短にかかわらず生殖細胞の異常は常にステップ 7 の精子細胞から認められ、核ならびにアクロゾームに形態学的異常が検出されたことである。しかも、この異常は投与期間が延長するほど、より分化の進んだ生殖細胞にまで拡張して認められるようになった。また β -estradiol 3-benzoate はステップ 7 精子細

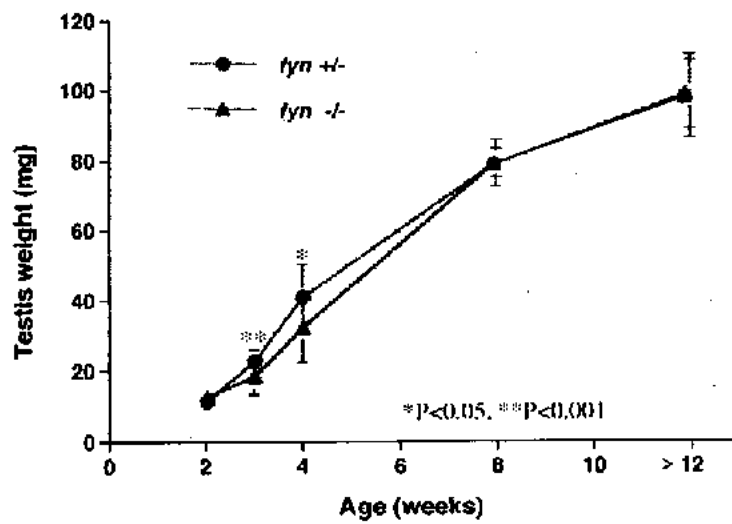


図 7 対照 *fyn* (+/+) マウスならびに *fyn* 遺伝子欠損マウス *fyn* (-/-) の生後発達過程における精巣重量の変化。生後 3~4 週で *fyn* (-/-) の精巣重量増加が一過性に遅延する。

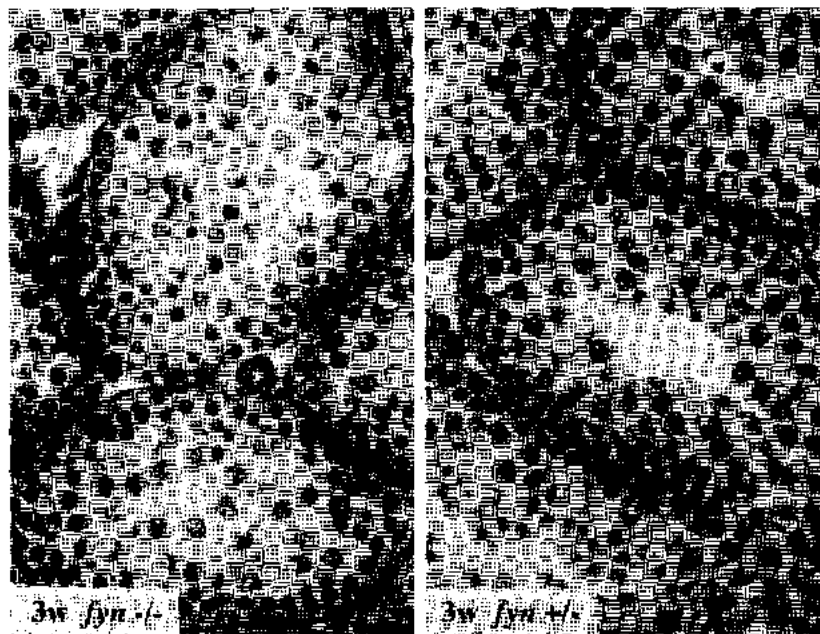


図 8 生後 3 週における *fyn* (-/-) マウスおよび *fyn* (+/+) マウスの精巣の HE 染色による組織像。 *fyn* (-/-) マウス精巣では管腔形成の遅延と変性した生殖細胞の出現が認められる。



図 9 *fyn* (-/-) マウス精巣の精子細胞頭部-セルトリ細胞の結合部の電子顕微鏡像。



図 10 図 9 の ectoplasmic specialization の強拡大像。アクチンフィラメントの間に空胞が形成され特殊接合装置の形成異常が認められる。

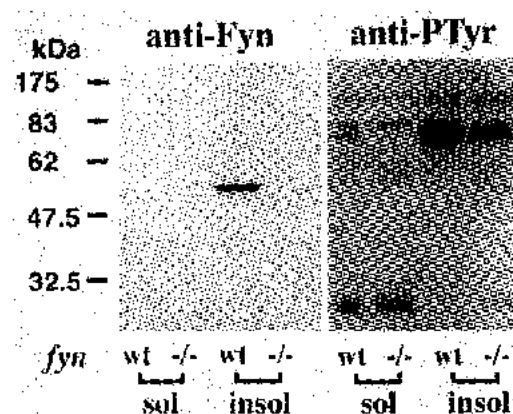


図 11 精巣蛋白の抗 Fyn 抗体、抗 phosphotyrosine 抗体による Western blotting。Fyn 蛋白は Triton X-100 不溶性細胞骨格分画に回収される。*fyn* (+/-) マウス精巣において 80kD 蛋白のチロシンリン酸化が著明であるが、*fyn* (-/-) マウス精巣ではこの蛋白のチロシンリン酸化が著しく低下している。

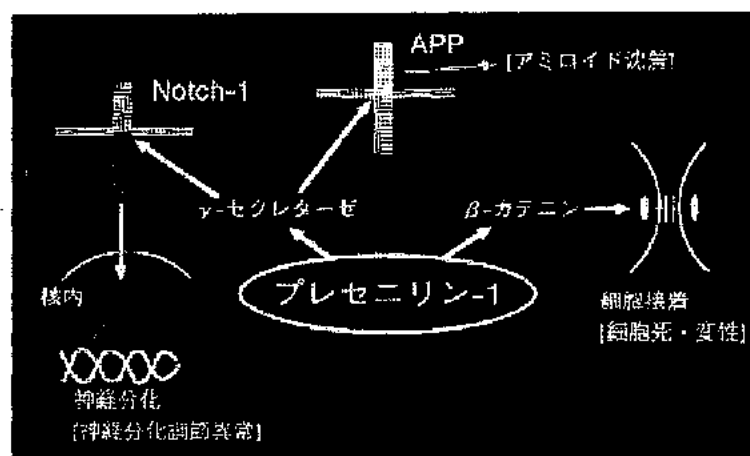


図 12 プレセニリン-1 の作用機構。神経系では Notch-1 のプロセッシングにより神経細胞分化に関与する。

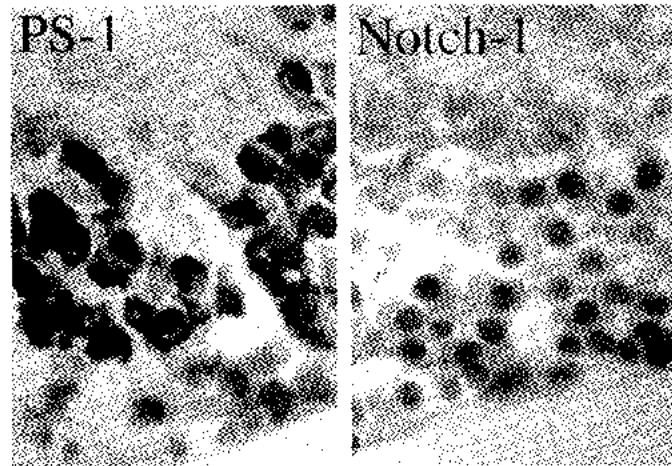


図 13 成体マウス精巣の抗 presenilin-1 (PS-1) 抗体、抗 Notch-1 抗体による免疫染色像。PS-1 は精子細胞の細胞質に局在し、Notch-1 は精母細胞、精子細胞の核に局限した発現を示す。

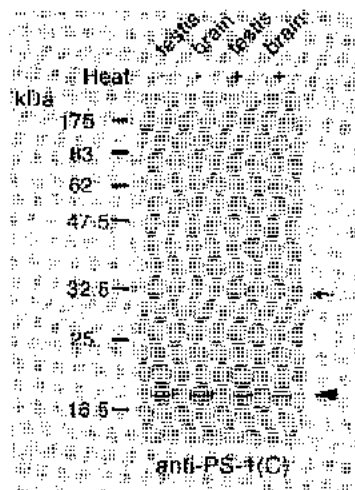


図 14 抗 presenilin-1 (PS-1) 抗体による精巣および脳蛋白の Western blotting。精巣には脳と共通の分子種とともに精巣特異的な約 30kD のバンドが認められた。

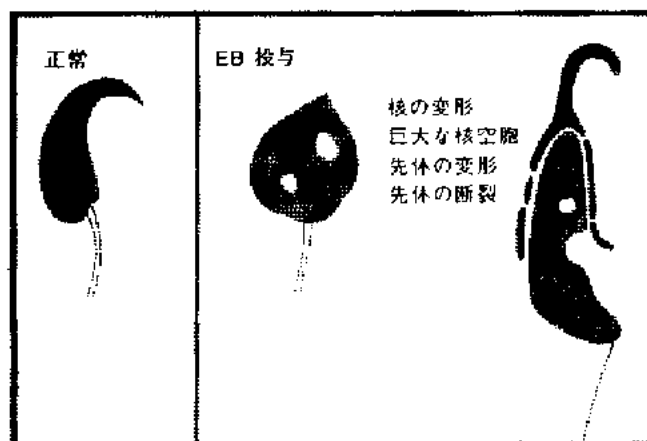


図 15 成体マウスへの β -estradiol 3-benzoate 投与により引き起こされる精子細胞ならびに精子の形態異常。



図 16 成体マウスへの β -estradiol 3-benzoate 投与により引き起こされ精子細胞の核の変形を示す電子顕微鏡像。

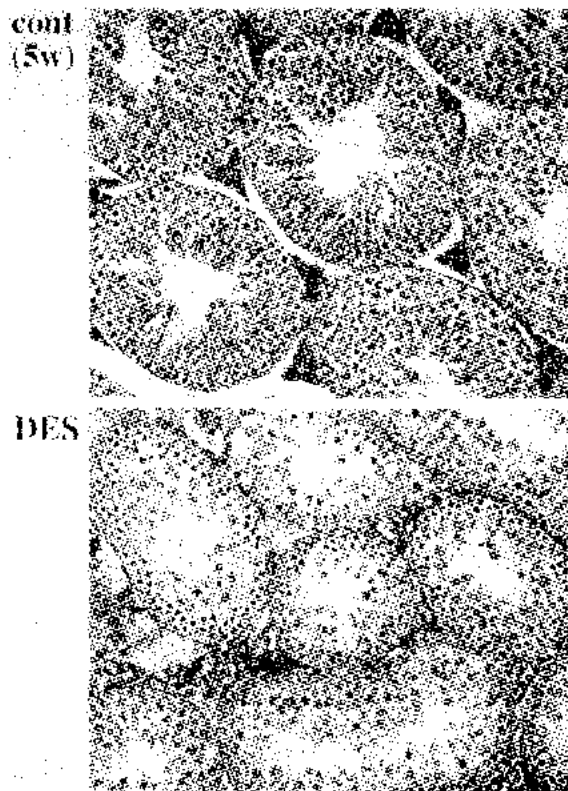


図 17 新生仔期に diethylstilbestrol (DES) に曝露されたラット精巣の生後 5 週齢における組織像 (HE 染色)。対照ラットでは精子細胞の形成まで分化が進んでいるが、DES 投与ラットでは精母細胞の段階で減数分裂の進行が停止している。

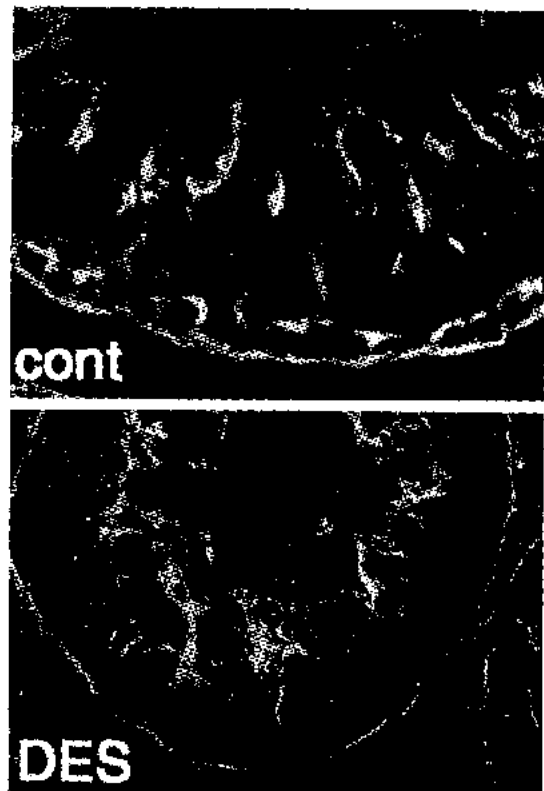


図 18 図 17 の精巣組織の FITC 標識ファロイジン染色によるアクチンフィラメントの分布を示す共焦点レーザー顕微鏡像。対照ラットではセルトリ細胞基底部と精子細胞頭部-セルトリ細胞結合部の ectoplasmic specialization にアクチンフィラメントの束が形成されているが、DES 投与ラットではセルトリ細胞基底部におけるアクチンフィラメントの集積が認められない。

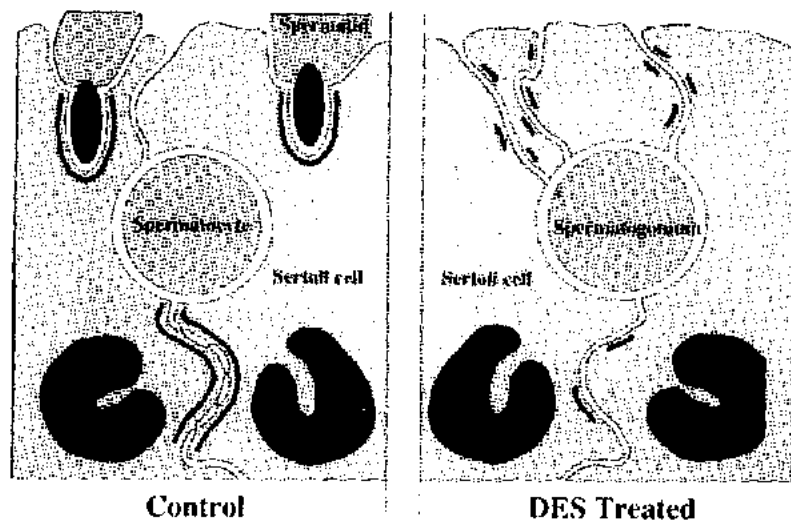


図 19 対照ならびに DES 投与ラット精巣における ectoplasmic specialization の形成と分布。DES 投与精巣ではセルトリ細胞間の特殊接合装置の形成遅延が起こる。また、精子細胞への分化も著明に遅れるため、精細管内腔に面したセルトリ細胞突起間に異所性の接着構造が形成される。

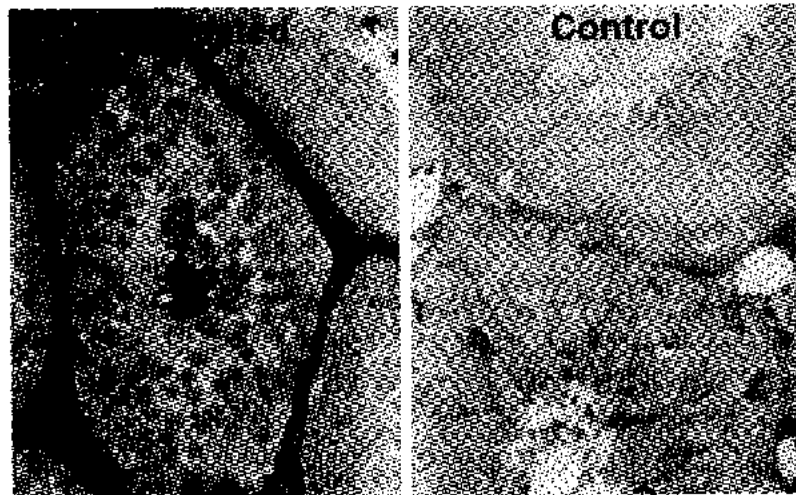


図 20 ectoplasmic specialization の精巣-血液関門としての機能をチトクローム C の透過実験で検討した。対照ラット精巣では血管から精細管内腔への移行はほとんど認められないが、DES 投与ラット精巣では大量のチトクロームが血管から内腔へ移行しており、精巣-血液関門の破綻が明らかとなった。

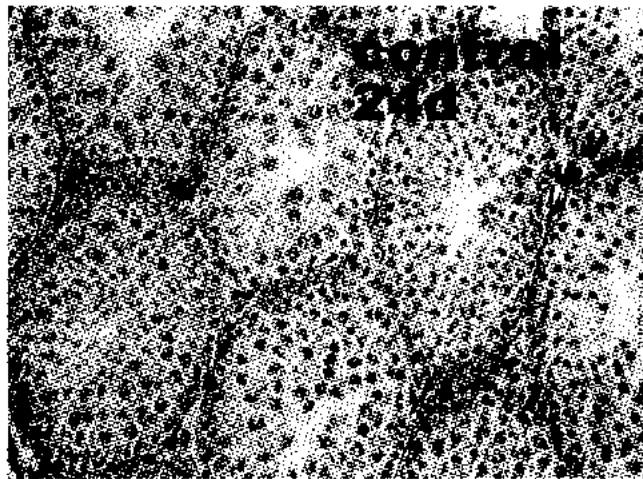


図 21 対照マウス生後 24 日の精巣組織標本 (HE 染色)。生殖細胞の分化は減数分裂を経て精子細胞まで進んでいる。

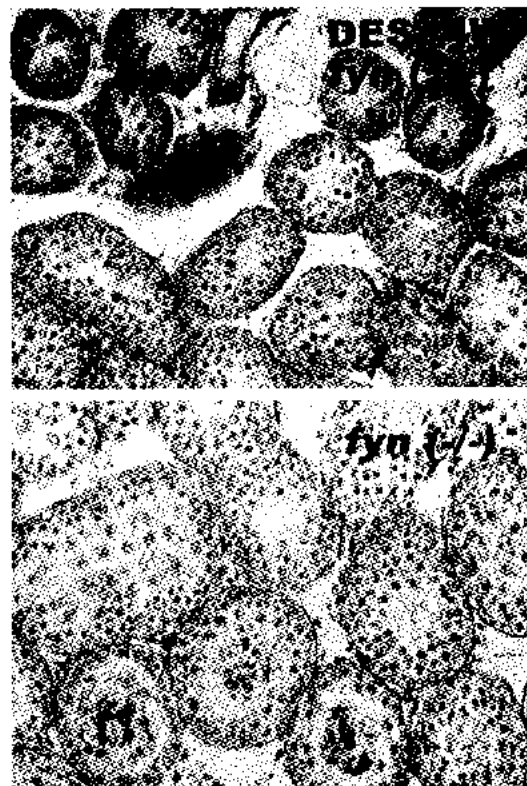


図 22 新生仔期に DES 投与を受けた対照マウス *fyn* (+/+) ならびに *fyn* 遺伝子欠損マウス *fyn* (-/-) の生後 4 週齢における精巣組織標本 (HE 染色)。いずれも生殖細胞分化は精母細胞の段階で停止しているが、*fyn* (+/+) マウス精巣では精細管径も小さく管腔も形成されていないのに対し、*fyn* (-/-) マウス精巣では対照より精細管径が大きく管腔も形成されていて障害の程度が軽い。



図 23 マウス胎仔大脳新皮質の抗 Fyn 抗体による免疫染色像。移動中の神経細胞の先端突起に強い反応が認められる。

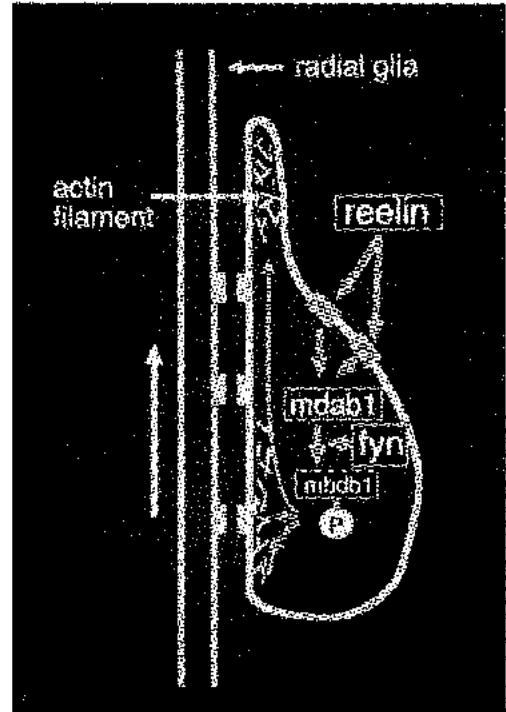


図 24 放射状グリアにガイドされて移動する幼若神経細胞の模式図。ガイドに関連する Reelin 分子の受容体からのシグナルをチロシンリン酸化系を介してアクチンフィラメントに伝達する過程に fyn が関与すると考えられる。

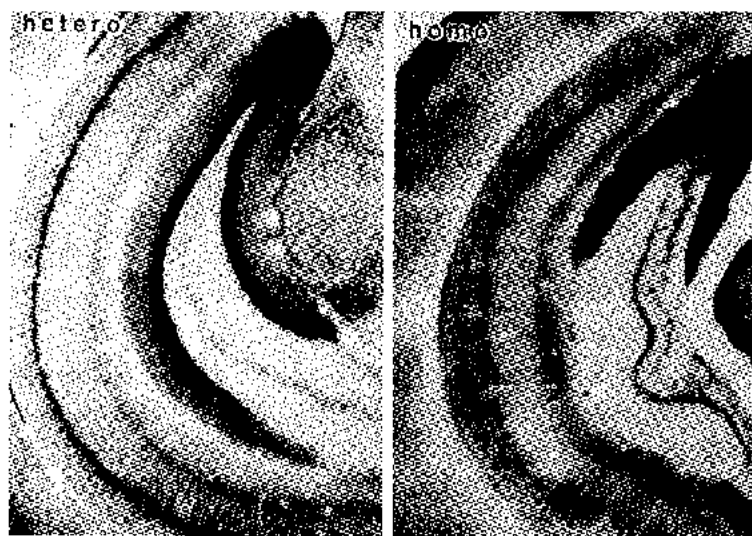


図 25 対照マウス *fyn* (+/-) ならびに *fyn* 遺伝子欠損マウス *fyn* (-/-) の成体海馬の抗 calbindin 抗体による免疫染色像。 *fyn* (-/-) マウス海馬では歯状回ならびにアンモン角の形成異常が認められる。

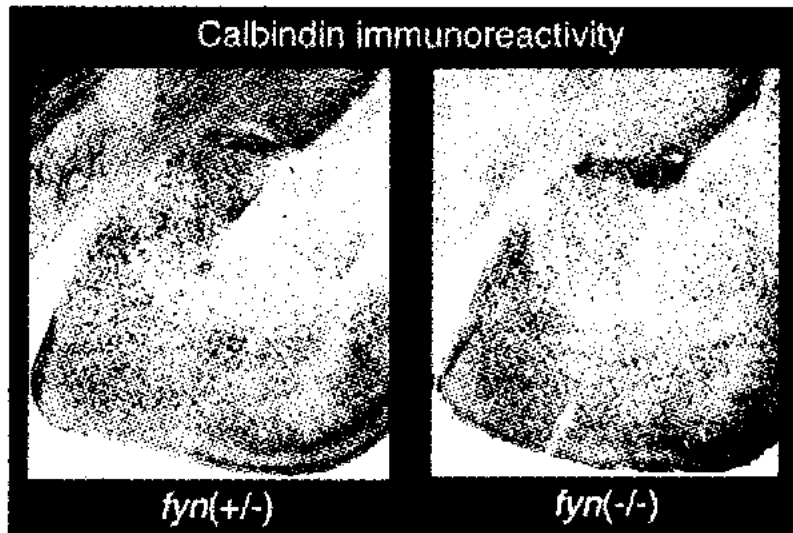


図 26 対照マウス *fyn* (+/-) ならびに *fyn* 遺伝子欠損マウス *fyn* (-/-) の成体扁桃体の抗 calbindin 抗体による免疫染色像。 *fyn* (-/-) マウス海馬では中心核の形成異常が認められる。

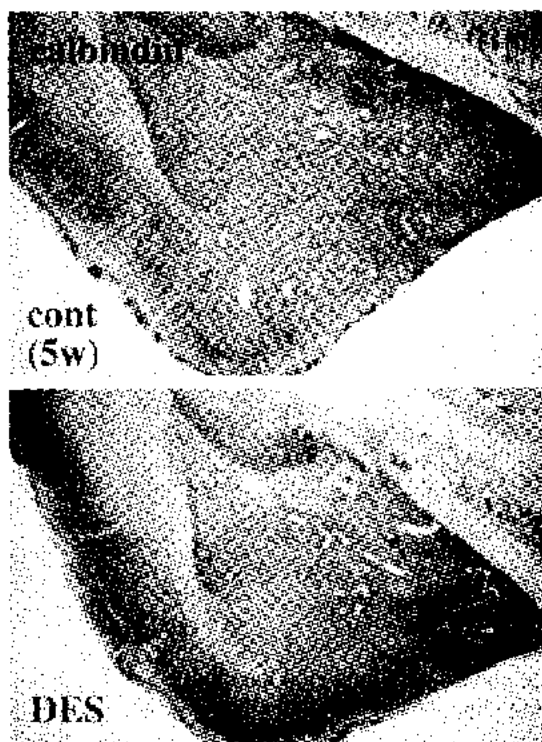


図 27 新生仔期に DES を投与したマウスと対照マウスの生後 5 週齢の扁桃体の抗 calbindin 抗体による免疫染色像。扁桃体の全体的な構築には変化は認められない。

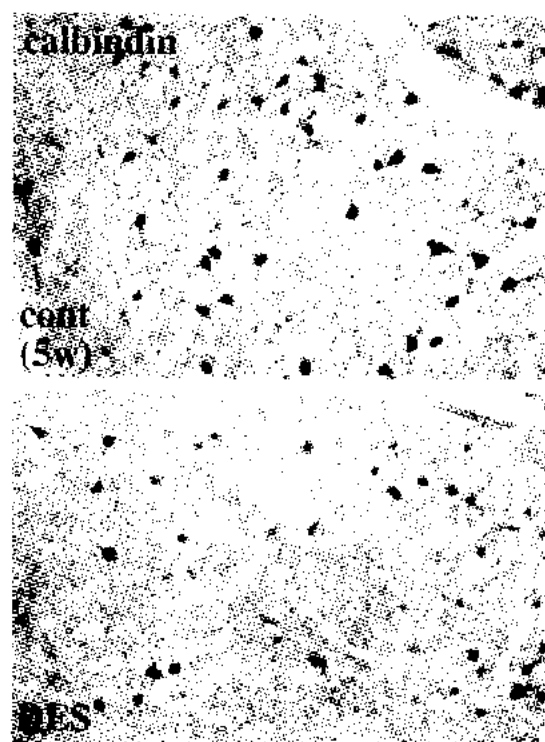


図 28 図 27 の扁桃体基底外側核の強拡大像。DES 投与マウスにおいては calbindin 陽性ニューロンの数が減少していた。

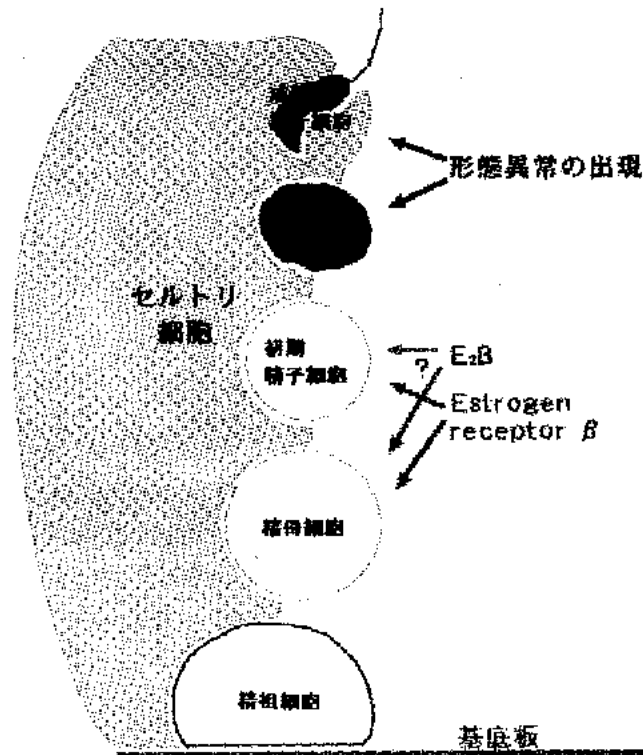


図 29 β -estradiol 3-benzoate の作用点と形態異常発現との相関についての仮説。
estrogen β 受容体は精母細胞、初期精子細胞に発現しており、これらの分化段階の細胞に対する β -estradiol 3-benzoate の効果が、さらに分化が進んだ後期精子細胞、成熟精子細胞の段階で形態学的異常として出現してくると思われる。

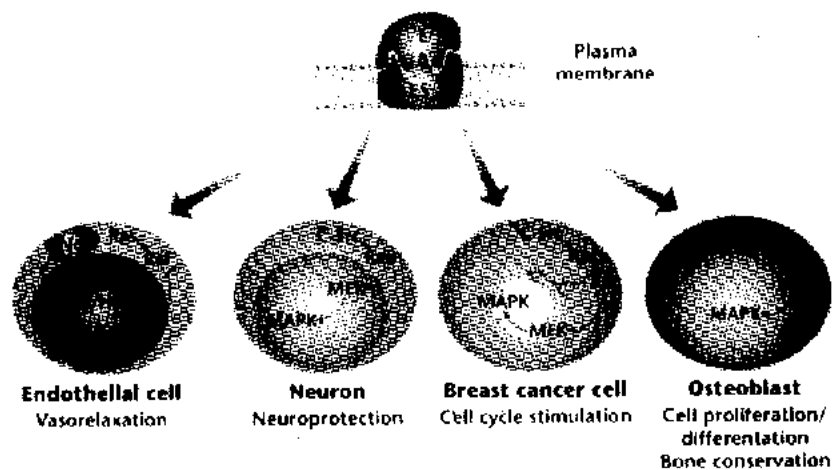


図 30 estrogen 受容体は細胞質内だけでなく細胞膜に局在する分子種が存在することが明らかになりつつあり、これまでの転写制御因子としての機能とともに、チロシンリン酸化経路を介するシグナル伝達により種々の細胞に作用することが予想される。

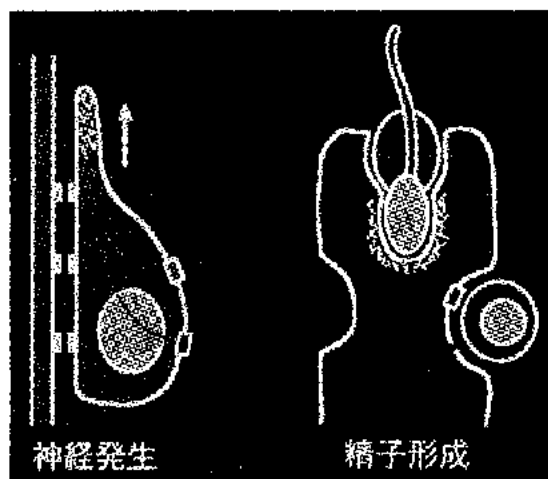


図 31 Fyn チロシンリン酸化酵素は神経細胞移動、セルトリ細胞接着構造の形成のような、アクチンフィラメントが関与する過程の制御を行なうと考えられる。

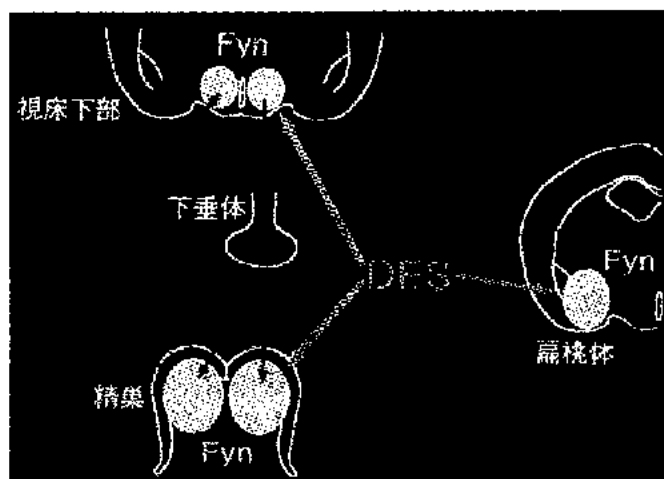


図 32 DES は視床下部-下垂体-精巣系を攪乱して FSH の分泌制御システムを障害するとともに、精巣、大脳辺縁系、視床下部などの Fyn を強く発現する部位に直接に作用する可能性がある。

表 1 E2B 投与期間と形態異常精子細胞の出現

投与期間	精子細胞のステップ																精子	
	1	2/3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		精巣内	上体内
2日間																		
3日間						X	X	X										
1週間						X	X	X	X	X	X	X	X					
2週間						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
4週間						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X
8週間						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X

β -estradiol 3-benzoate 投与期間と精子細胞の形態異常出現時期の相関
投与期間の長さにかかわらず、ステップ 7 精子細胞から形態異常が出現し、投与期間が長いほど、より分化の進んだ生殖細胞にまで形態異常が現れた。

2. 核内転写調節 (PPAR) を介した外因性内分泌攪乱化学物質の生殖毒性作用の機構および安全性の研究

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学講師)

研究要旨

di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の繁殖力への影響とその機構について、野生型の SV/129 マウスと同種の peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) -null マウスを用いて検討した。DEHP は市販の固形試料に混ぜ (0.05%)、全実験期間自由摂食させ、2 世代生殖毒性実験を行った。4 週間 DEHP 食を食べさせた後、雄と雌 (F_0) を交配させた。誕生した仔の数、16 週間生存した仔 (F_1) の数、及び性について検討した。 F_0 と同じ年齢に達したところで、 F_1 の雄、雌を交配し、誕生した仔 (F_2) について、 F_1 と同様の観察をした。野生型マウスの DEHP 群は雄雌ともに体重の増加の遅延、PPAR α 標的酵素蛋白 (脂肪酸 β 酸化系酵素) の誘導が観察され、PPAR α が誘導されていることが伺えた。 F_1 において、新生仔の死亡率が増加する傾向が、 F_2 においてはその死亡率が明らかに増加し、殆どが誕生 2 日以内の死亡であった。この死亡率の増加は特に雄マウスに顕著であった。一方、PPAR α -null マウスにおいては DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加はみられなかった。従って、DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加は PPAR α に依存していることが推察された。 F_0 から F_2 までの雄の精巣、雌の卵巣と子宮には形態的異常は認められなかった。野生型マウスの胎仔肝では DEHP による PPAR α 標的酵素遺伝子発現 (脂肪酸 β 酸化系酵素) の誘導は観察されず、雄ではむしろ発現が抑制されていた。DEHP は新生仔マウス肝の PPAR α 標的酵素遺伝子発現にも影響を与えることはなかった。この結果、DEHP 群の雄における新生仔と胎仔肝の PPAR α 標的酵素遺伝子発現の差は対照群より大きく、この違いが DEHP 群の雄新生仔の死亡率の増加の一因かもしれない。

研究者協力者

青山 俊文 (信州大学医学部教授)
福嶋 義光 (信州大学医学部教授)
大村 実 (九州大学大学院医学系研究科助手)
佐々木一敏 (長野県衛生公害研究所主任研究員)
畑 由紀子 (信州大学医学部大学院生)

A. 研究目的

di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, CAS-No. 117-81-7) は *o*-フタル酸のジエステル化合物 (分子量=390.56) で、若干黄色みを帯びた無色透明の液体である。比較的疎水性であり、揮発性は低い。1930 年代から日本、アメリカで生産が開始され、1994 年にはその生産量は 1 年間に百~4 百万トンと見積もられている。主にポリビニルクロライド (PVC) 製品の可塑性や弾力性を増強するた

めに使用され、この製品には、10~60% (w/w) 程度含有されている。DEHP の疎水性、低揮発性の性質から、環境汚染は少ないとされている。例えば、0.1mm の厚さの PVC シートから 25℃において 27 年間にたった 10%流出したのみであった。しかし、高温や脂溶性物質の存在化ではもっと流出するとみなされており、環境条件によって汚染の程度は広がる可能性がある。

ヒトの曝露形態として、医療 (血液透析)、職業、一般生活環境 (PVC-舗装室内環境、食品、プラスチック製品、玩具、舗道、廃棄物など) が考えられる。Turnbull and Rodricks によると、特別な曝露がない場の DEHP の 1 日の曝露量は 0.1~790 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{b.w.}$ であるという。

DEHP はペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) に配位し、ペルオキシゾームを誘導するとともに、PPAR 標的遺伝子の発現 (ω -1 酸化、 β -酸化など) に影響を与える。即ち、短期間投与では肝の肥大、種々の酵素活性の増大、CYP4A1 とエポキシドヒドラーゼ、脂肪酸 β -酸化酵素活性の著しい上昇がみられる。一方、長期投与においては生殖器障害、肝障害、腎障害、肝がんが発生する。

PPAR には α 、 β (δ) γ の 3 種のサブタイプがあり、それぞれ特徴的な臓器分布を有す。例えば、精巣には PPAR β が多く発現しているが、PPAR α の発現は弱く、PPAR γ は殆ど検出されない。また、卵巣の卵胞には PPAR α と β がかなり高い濃度で発現しているが、 γ の発現は弱い。

DEHP の生殖毒性に関する報告は多い。Ward らは精子形成の低下、精巣上体に巨大細胞の出現をマウスで確認している。Lamb らはマウスを用いた研究から、精子数の減少、異常精子数の増加、精子運動性の低下に加えて、繁殖力の低下を報告している。これらの報告に反して、Kurata らはマーモセットを用いた研究で、DEHP によるペルオキシゾームの誘導も生殖障害も認められなかったと報告している。以上の結果は DEHP による生殖障害、特に繁殖力への影響、は比較的低濃度で観察され、ペルオキシゾームの増殖、換言すれば、PPAR α の誘導に関連していることを示唆する。

最近、PPAR α -null mice が米国 NIH の Gonzalez 博士のグループによって開発され、PPAR α の核内受容体としての役割の解明に有効であることが証明された。私どもも、この動物種を用いて、トリクロロエチレンの代謝物であるトリクロロ酢酸によるペルオキシゾームの誘導が PPAR α に支配されており、この誘導がトリクロロエチレンの肝がん発生と関連する可能性を明らかにした。即ち、この動物種を用いた研究がトリクロロエチレンのリスク評価に有用であることが判明した (Nakajima T. et al., 2000)。本研究は DEHP

による繁殖力への影響が核内受容体である PPAR α に制御されているかを明らかにし、その機構を解明し、リスク評価の知見を得ることを目的に計画された。

B. 研究方法

1) 実験動物

動物実験はすべて信州大学中央実験動物施設の動物実験ガイドラインに沿って行われた。雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type mice) と PPAR α -null mice (KO mice) を使用した。動物は温度、湿度、明暗が管理されたクリーンルームで市販の固形飼料と水を自由に与えられながら飼育された。それぞれの雄と雌を交配し、仔が 12 週齢に達したところで、0.05% DEHP 含有固形飼料に切り替えられた。この餌で 4 週間飼育したところで、雄、雌 (この群を F_0 とした) を交配した (図 1)。実験期間中、対照群以外のすべてのマウスはなんらかの形で (餌、経胎盤、母乳) DEHP 曝露を受けた。 F_1 が 16 週齢に達したところで、雄と雌を再び交配した。

F_0 は 36 週齢で、 F_1 と F_2 は 16 週齢で解剖した。 F_1 、 F_2 の新生仔の生存数を求め、生存率を計算した。生殖器の障害の情報を得るために、精巣、精巣上体、精のう腺 (雄)、卵巣、子宮 (雌) を、PPAR α の誘導を検索するために肝を、性ホルモンおよび脂質代謝 (トリグリセライド) の情報を得るために血清を採取した。

残りの F_2 の雄雌を交配し、18~19 日目の胎仔と生後 2 ヶ月目の新生仔マウスを解剖し、肝を採取してトリグリセライドレベルを測定すると共に、DNA を抽出し、性の決定に使用した。

2) 病理的観察

採取された精巣はブアン固定、他の臓器 (子宮、卵巣) は 10% 緩衝ホルマリン固定をし、所定の方法で病理標本を作成し、0.05% DEHP の臓器障害性を顕微鏡下で検討した。

3) 血清性ホルモン

0.05%DEHP 曝露による繁殖力の低下と性ホルモンレベルとの関係を明らかにするために、血清テストステロンおよびエストラジオールのレベルが測定された（三菱化学ピーシーエルに委託）。

4) 性の決定

マウスの胎仔、新生仔は、生殖器の発達が未熟なため、肉眼的に性別を判定することが困難である。そこで、胎仔、新生仔の組織から、DNA を抽出し、Y 番染色体上の雄性決定遺伝子である *Sry* gene を PCR 法で確認することで、胎仔、新生仔の性の決定とした。胎仔、新生仔の肝組織から QIA amp DNA Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA の抽出を行った。Y-specific target sequence として *Sry* gene を、control sequence として muscle-specific regulatory factor である myogenin を使用し、Yano (1993) の方法に従いプライマーを設定した。次に、PCR system PE9700 (Perkin Elmer 社製) にて 35 回増幅した後、PCR product を、2.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し確認した。即ち、*Sry* gene および myogenin が陽性の場合を雄、myogenin のみ陽性の場合を雌とした。

5) PPAR α の誘導

ペルオキシゾームの増殖および脂肪酸 β 酸化系酵素は PPAR α に強く制御されている (Aoyama et al. 1998)。投与された DEHP が親、胎仔、新生仔マウス肝の PPAR α を誘導し、ペルオキシゾームおよびミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系酵素を誘導しているかを評価するために、Western blot 分析を行った。親および胎仔、新生仔の肝蛋白を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。各種抗体(ペルオキシゾーム酵素抗体として、peroxisomal thiolase, PT; peroxisomal bifunctional protein, PH; D-type bifunctional protein, DBF に対する抗体およびミトコンドリア β -酸化系酵素抗体として極長鎖アシル CoA 合成酵素、

VLACS; 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素、LVCAD; 長鎖アシル CoA 脱水素酵素 LCAD; 中鎖アシル CoA 脱水素酵素、MCAD; 短鎖アシル CoA 脱水素酵素、SCAD に対する抗体、前信州大学医学部教授橋本 隆教授より供与された)を用いて、それぞれの酵素の発現を調べ、脂質代謝と PPAR α の誘導の指標とした。

6) 肝および血清のトリグリセライドの測定

DEHP による PPAR α の誘導、これに伴う脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導の肝と血清のトリグリセライドレベルへの影響を評価した。肝のトリグリセライドは脂肪をクロロホルム-メタノールで抽出後、血清は抽出操作なしに、和光のトリグリセライド測定キット(トリグリセライドGテストワコー)を使用して測定した。

C. 研究結果

1) 0.05%DEHP による PPAR α の誘導

DEHP による肝のペルオキシゾームの誘導を知るために、3 種のペルオキシゾーム酵素レベルを western blot 分析で解析した。雄雌共に、16 週齢、36 週齢の成熟マウス肝において、DEHP 投与群の検討した酵素 (PT, PH, DBF) の発現量は対照群より多く、ペルオキシゾームが誘導されていることが判明した。これに反して、妊娠マウスと出産後のマウスを除けば、DEHP 群と対照群の間にはミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系の酵素の発現量に差は認められなかった。一方、PPAR α -null マウスにおいては DEHP 処理によるこれらの酵素の誘導は観察されなかった。

野生型マウス胎仔肝においては、ペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差が見られ、雄の発現量は雌の約 2 倍であった。このような現象は PPAR α -null マウス胎仔肝では観察されず、PPAR α が胎仔肝の酵素発現量の性差を決定している可能性が伺えた。

野生型の妊娠マウスへの DEHP 投与は、

雄雌胎仔肝のペルオキシゾーム酵素と雌のミトコンドリア系酵素の発現には影響をあたえないが、雄のミトコンドリア系酵素の発現量を低下させた。しかし、新生仔マウス肝においては、雌雄両者の間にこれらの酵素の発現量に差は認められず、親マウスの DEHP 処理の影響も殆ど認められなかった。以上から、次の結論を得た。

- ① 0.05% DEHP は野生型成熟マウスおよび親マウス（妊娠マウス、産褥マウス）肝のペルオキシゾーム系酵素を誘導する。
- ② 0.05% DEHP は新生仔肝のペルオキシゾーム系酵素およびミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素には殆ど影響を与えず、野生型雄の胎仔肝のミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素の発現量をむしろ低下させる。この結果、野生型雄の DEHP 処理群では胎仔と新生仔の間にミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素発現量の差異がみられる（胎仔<新生仔）。
- ③ 野生型マウス胎仔肝におけるペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差が見られ、雄>雌である。
- ④ PPAR α -null マウスにおいてはペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差も認められず、DEHP 処理による影響もない。

2) 0.05% DEHP の繁殖力への影響

野生型マウスにおいて、1 親当たりの誕生した新生仔の数は F2 において減少傾向を示したが、有意差は認められなかった（表 1）。一方、16 週齢まで生存した仔の数は明らかに減少し、生存率は対照群の 96.2% に対して 52.8% であった。新生仔の死亡は殆ど 2 日以内に観察された。興味深いのは生存した仔マウスの性をみると、雌の方が雄より圧倒的に多く、対照群の性比（雌：雄）1：0.83 に対し、DEHP 群は F1 で 1：1.4、F2 で 1：1.8 であった。一方、PPAR α -null マウスにおいては、DEHP 曝露の生まれてくる仔の数や生存率への有意な影響は観察されなかった。しかし、F2 において性比に若干の影響が観察

され、対照群の性比 1：0.91 に対し、DEHP 群は 1：1.35 であった。

野生型マウスにおいて観察された DEHP による生存率の低下、特に雄の生存率の低下が、雌より雄の死亡率が高いことに起因するか否かを検討するために、妊娠 18～19 日目胎仔と生後 2 日目の新生仔の数と性について検討した。表 2 に示すように、野生型マウスでは、対照群と DEHP 群の間に妊娠 18～19 日目の胎仔期の性比の差は認められなかった。一方、誕生 2 日目の性比は対照群 1：0.95 に対し、DEHP 群は 1：1.89 であった。同様に、PPAR α -null マウスにおいても DEHP 群の新生仔の性比は雌>雄であった。以上から次の結論が得られた。

- ① DEHP は F₂ における繁殖力を著しく低下させる。これは野生型マウスにのみ誕生直後の死亡率の増加として観察され、PPAR α -null マウスでは観察されない。
- ② DEHP は野生型の雄の死亡率を高め、性比に影響を与える。これは野生型マウスに特徴的に見られるが、PPAR α -null マウスでも若干観察される。

3) 0.05% DEHP の血清性ホルモンへの影響

雄対照群において、いずれの週齢（16 週齢、36 週齢）においても PPAR α -null マウスのテストステロン濃度は野生型の 1/6 から 1/10 であり、エストラジオール濃度も低値を示す傾向であった。DEHP は野生型雄マウスのテストステロン濃度を約 1/3 に低下させたが、エストラジオール濃度には影響を与えなかった。一方、DEHP は雄 PPAR α -null マウスのテストステロンやエストラジオール濃度に影響を与えなかった。

雌の性ホルモン（エストラジオール）は性周期に左右される。今回の研究では性周期をマッチさせていないので参考値である。対照群において、野生型と PPAR α -null マウスの間に血清エストラジオール濃度の差は認められなかった。DEHP 投与は野生型においてのみエストラジオール濃度を上昇させた。

以上の結果から、次の結論が得られた。

- ① 雄の PPAR α -null マウスのテストステロン濃度は野生型より低い
- ② 0.05%DEHP は野生型マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させる

4) 0.05%DEHP の生殖器障害性について
DEHP 投与はいかなる世代 (F₀, F₁, F₂) においても、野生型、PPAR α -null マウスの雄の生殖器 (精巣、精巣上体、精のう腺)、雌の生殖器 (卵巣、子宮) の体重当たりの重量比率に影響を与えなかった。同様に、DEHP 曝露による精巣、卵巣、子宮に病理学的変化も認められなかった。以上の結果より、0.05% DEHP は雄、雌の生殖器に対する障害性を示さないといえる。

- 5) 0.05%DEHP の肝および血清トリグリセライド濃度への影響について

肝や血清のトリグリセライド濃度は PPAR α に強力に調節されているので、DEHP による野生型親マウス肝 PPAR α の誘導がトリグリセライド濃度に与える影響を検討した。0.05%DEHP は妊娠マウス肝、授乳期母マウス肝 (2 日目) および成熟雌マウス肝のトリグリセライドには影響を与えなかった。驚いたことに、妊娠後期の親マウス血清トリグリセライド濃度を 1.5 倍に上昇させた。授乳期母マウス血清トリグリセライド濃度は DEHP 群の方が低く、成熟雌マウスにおいても低い傾向を示した。

PPAR α -null マウスの肝トリグリセライドは野生型より高い傾向を示した。PPAR α -null マウスの血清トリグリセライド濃度は野生型より明らかに高かったが、DEHP 曝露の影響は認められなかった。

D. 考察

0.05%DEHP は雄雌マウスの生殖器に形態的な障害を起こすことなく、繁殖力、とくに雄マウスの生存率に影響を与えることが明らかとなった。この現象は野生型マウスの新生仔期 (殆どが 2 日以内) にのみ死亡率の増加

という形で現れ、PPAR α -null マウスでは観察されなかった。従って、DEHP 投与による新生仔死亡率の増加は PPAR α が関与していると思われる。

野生型マウスで観察された DEHP 投与による新生仔死亡率の増加は F₁ 世代より F₂ 世代においての方が明らかであった。F₀ と F₁ 世代の妊娠マウス F₀ 世代のマウスより発生期の段階から、しかも長期間にわたり DEHP 曝露を受けている。このことが一因かもしれない。

PPAR α の標的遺伝子として脂肪酸 β 酸化系酵素、 ω 水酸化酵素、リポ蛋白代謝酵素遺伝子等が知られている。「DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加の一因が脂質代謝異常にある」との仮説をたて、その妥当性について考察した。DEHP 曝露は野生型マウス胎仔肝の脂肪酸 β 酸化系酵素を誘導する事はなく、雄においてはむしろその発現を抑制した。DEHP 曝露は新生仔マウス肝の脂肪酸 β 酸化系酵素も誘導することなく、DEHP の経母乳曝露のこれらの酵素系の発現に対する影響はないものと推察された。この結果、対照群の雄において、胎仔と新生仔肝の間に脂肪酸 β 酸化系酵素の発現に差異がみられないが、DEHP 群においては新生仔肝 > 胎仔肝であった。このような傾向は雌では観察されず、対照群、DEHP 群ともに脂肪酸 β 酸化系酵素の発現は胎仔肝、新生仔肝殆ど同じであった。これらの結果は、雄の野生型マウスにおいては、誕生直後に脂肪酸の酸化が急激に高まることを示す。推測にすぎないが、このことが、新生雄マウスの死亡率の増加の一因かもしれない。実際、野生型において、DEHP 群の雄胎仔肝、2 日齢の雄マウス肝のトリグリセライドは対照群より低かった。

雄 PPAR α -null マウスの血清のテストステロン濃度は野生型の 1/6 から 1/10 であった。さらに、DEHP 曝露は野生型雄マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させた。これらの結果は血清テストステロン濃度も PPAR α に強く支配されていることを示唆する。しかし、今回観察された新生仔雄マウス

の死亡率の増加には直接関係ないと思われる。雄血清テストステロン濃度がどのような機構で PPAR α に支配されているのか、今のところ不明である。

Lamb らはマウスに 0.01%から 0.3%の DEHP を餌に混ぜて与え、繁殖力への影響および雄の生殖器への影響を検討した。DEHP は量-反応的に新生仔の数と生存率の減少を招き、繁殖力を低下させた。この現象は 0.1%の DEHP 曝露濃度で観察された。高濃度の DEHP は精子濃度の低下や運動性を減少させ、異常精子の割合を増加させることも明らかとなった。さらに精巣の萎縮を誘発していた。興味深いことは、対照群の雄と 0.3%DEHP 曝露群の雌を交配しても仔は全く生まれませんが、DEHP 曝露群の雄と対照群の雌を交配すると 20%のマウスが出産をしたことである。DEHP は確かに雄雌の生殖器障害性をもっているが、その影響レベルは雌の方が低いのかかもしれない。即ちこの場合、DEHP の繁殖力への影響は雄よりも雌に原因があると考えられる。

ラットの DEHP の最小影響量はペルオキシゾームの誘導からみた場合、50mg/kg、無影響量は 25mg/kg とされている。発がんという観点からみた場合の最小毒性量は 300mg/kg、無毒性量は 50-100mg/kg と報告されている。今回の実験ではまだ、NOAEL, LOAEL を求めることは出来ないが、仮に生殖毒性（繁殖試験）の LOAEL が 0.05% DEHP 餌とすると、マウスの餌の摂取量からみて、約 80mg/kg の投与量に相当する。種の違いはあるが、ペルオキシゾームの誘導と生殖毒性の最小影響レベルが類似して

いる点が注目される。PPAR の発現には種差がみられ、ヒトでの発現はマウスよりはるかに低いと報告されている。従って、野生型マウスで得られた結果をそのままヒトに外挿することは難しい。ヒトの PPAR の発現が PPAR α -null mice に近い場合は、野生型にみられた様な DEHP の生殖毒性はみられないかもしれない。

今後、濃度を変えた生殖毒性実験を行い、DEHP の NOAEL あるいは LOAEL を設定すると共に、他のプラスチック可塑剤の生殖毒性の比較実験を行う予定である。

E. 結論

0.05%DEHP は新生仔マウスの死亡率を高め、繁殖力を低下させる。この現象は特に雄マウスに特徴的である。この現象には核内受容体の PPAR α が深くかかわっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中島民江 PPAR を介した環境ホルモンによる生殖器障害 細胞 31: 239-242, 1999
- 2) Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Carcinogenesis 21: 677-682, 2000.

2. 学会発表

なし

Reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals and the mechanism via peroxisome proliferator-activated receptor in relation to the risk assessment

Tamie Nasu (Nakajima), Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, Lecturer

Key word :

di (2-ethylhexyl) phthalate, estradiol, fatty acid β -oxidation enzymes, knockout mice, peroxisome proliferator-activated receptor, reproductive toxicity, testosterone, triglyceride,

Abstract:

Reproductive toxicity of di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and the mechanism were investigated using wild-type Sv/129 mice and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)-null mice on the same genetic background. A 0.05% DEHP diet was prepared with commercial rodent chow. Mice of the DEHP group were given this diet throughout the experiment, and those of the control group were given the commercial rodent diet without DEHP. Male and female mice (F_0 generation) of control and DEHP groups were mated after four weeks' feeding of each diet, and the number of newborn pups and live pups for 16 weeks and their sex were investigated (F_1 generation). Male and female mice of F_1 generation of DEHP group were again mated at the same age as the F_0 generation, and the number of newborn pups and live pups and their sex of the F_2 generation were also investigated. No significant morphological changes were observed in testis, ovary and uterus of all mice. The growth retardation and induction of PPAR α -target gene products (peroxisomal enzymes) were seen in all male and female wild-type mice with 0.05% DEHP diet, suggesting the induction of PPAR α by the DEHP diet. The DEHP diet tended to decrease the number of live pups per pair in the wild-type mice at the F_1 generation and clearly decreased at the F_2 generation. The death of the pups was seen in the male superiority within two days after birth. In contrast, no significant change in fertility was seen in PPAR α -null mice fed the 0.05%DEHP diet at any generation. These results suggest that the increase in the mortality of newborn pups is closely related to the expression of PPAR α .

The DEHP diet investigated did not induce the PPAR α -target gene products (fatty acid β -oxidation enzymes) in the fetus liver of the wild-type mice; the DEHP diet suppressed the enzyme levels in the male fetus liver. DEHP also did not induce the levels in the liver from the two-day-old newborn mice. This indicates that the difference in the levels of PPAR α -target gene products was significantly larger in the two-day-old wild-type male mice than in those of the fetus mouse liver. The difference may be a cause of the increase in the death of newborn pups.

3. マウス生殖細胞死への環境毒性物質の影響と その分子機構の解析に関する研究

研究者 小路 武彦（長崎大学医学部第三解剖学教授）

研究要旨

平成 11 年度は、特に成熟マウス精子形成過程で生じる生殖細胞アポトーシスの光顕的及び電顕的解析を進めると共に、エストロゲン並びにジエチルスチルベストロール（DES）の影響を検討し、精子形成過程精母細胞の減数分裂期前後でのアポトーシスの顕著な誘導を明らかにした。更にその誘導分子機構として Fas/Fas ligand 系の関与を見い出した。また平成 12 年度の本格的実験に向けて、ビスフェノール A 等他の環境毒性或いは生殖毒性物質の投与条件の検討、妊娠動物或いは胎仔への投与条件の検討、生殖器系の構造と機能を制御する視床下部－下垂体系への影響の評価系の検討並びにこれら化学物質代謝で発生する活性酸素への防御反応系の評価システム等の検討を行った。

研究者協力者

菱川 善隆（長崎大学医学部第三解剖学講師）
進 正志（長崎大学医学部第三解剖学助手）
和泉 伸一（長崎大学医学部第三解剖学助手）
近藤 宇史（長崎大学医学部病態生化学教授）
植田 弘師（長崎大学薬学部分子薬理学教授）
佐藤 浩（長崎大学医学部実験動物学助教授）

A. 研究目的

「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」（環境庁）でも指摘されているように、内分泌攪乱物質或いは環境毒性物質の作用に関する多くの知見が、科学的な因果関係の直接的証明がないためしばしば一つの可能性として語られている。既に約 70 種類以上の化学物質がその容疑者として数え上げられており、特にこれらの物質が生殖細胞障害や生殖器系異常を誘発する事から、人類に対し世代を越えた深刻な影響をもたらす可能性が高く、それらの危険性の評価は現在最も急務な内分泌学並びに生殖生物学上の問題である。そこで本研究に於いては、胎仔期から成熟期に至るマウス発生の様々な過程で毒性物質を投与し雌雄生殖細胞死特に精子形成過程への影響を検討すると共にその分子機構の解明を行う。

B. 研究方法

平成 11 年度は、エストロゲンとして estradiol-3-benzoate（EB）を用い、エストロゲン活性を強く示す内分泌攪乱物質として知られる diethylstilbestrol（DES）の効果を中心として解析し、更にビスフェノール A（BPA）に関し投与プロトコルの基礎的検討とこれら化学物質の作用機構の解析方法の予備的検討を行った。具体的には、成熟雄マウスへ EB 並びに DES を種々の量で投与し、精子形成細胞死への影響を terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling（TUNEL）法を中心として検討した。また雌雄胎仔生殖細胞死への影響を検討するための予備調査として、妊娠マウスへの腹腔投与による胎仔発育過程への影響を解剖学的に検討した。更に EB 及び DES による生殖細胞死誘導機構として Fas/Fas ligand 発現の関与を免疫組織化学的に検討した。また、これら環境毒性物質による活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構への作用を検討するため、グルタチオン、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）やスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）活性の測定条件の最適化並びにス

テロイドによる受容体・G 蛋白質活性化の指標である $^{[35]}\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合活性に対するこれら環境毒性化学物質の効果を検討する為の予備的研究を行った。

尚、これら環境毒性物質の研究の施行に当たり、長崎大学医学部動物実験施設動物実験委員会より安全面と倫理面での審査が行われ本動物実験計画の実行許可を与えられている。

C. 研究結果

1) 30, 60, 120 $\mu\text{g/head}$ の EB を 5 日毎に成熟マウスに投与したところ、120 $\mu\text{g/head}$ では 20 日で精巣重量は半減し、精子細胞以降の生殖細胞の消失が観察された。30 $\mu\text{g/head}$ の投与では、30 日あたりから精子形成過程の阻害が認められ、60-90 日では顕著な TUNEL 陽性細胞の増大と精子細胞以降の生殖細胞の消失が観察された (図 1)。連続切片を用いた詳細な検討により、この生殖細胞死は Fas 発現を介するものであり、セルトリ細胞より発現された Fas ligand により誘導されていることが明らかとなった。また 20mg 及び 100mg/kg の DES を 5 日毎に成熟マウスに皮下投与したところ、low dose 投与マウスにおいて投与後 20 日で精子形成細胞での TUNEL 陽性細胞数の有意な増大を検出した (図 2)。しかし面白いことに、high dose 投与マウス精巣ではむしろ精子形成細胞死の頻度低下が認められた。

2) 妊娠マウス (妊娠 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 日目) に、3.4 mg/kg (LD50 の 1/10 量) と 17mg/kg (LD50 の 1/2 量) の DES を腹腔投与し、20 日目にその胎仔に対する影響を検討したところ、high dose では全ての胎仔が吸収されており、low dose でも 2/3 の個体で全ての胎仔が吸収されていた (表 1)。また胎仔を得た個体でもその匹数は通常の 1/5-1/4 程度であった。一方、ビスフェノール A を同様に 15 mg/kg (LD50 の 1/10 量) と 75 mg/kg (LD50 の 1/2 量) で投与したところ全ての妊娠マウスより一見正常な胎仔を得た。EB (0.33 $\mu\text{g/kg}$ と 3.3 $\mu\text{g/kg}$) 投与群でも同様であった。

3) 活性酸素障害に対する生殖細胞防御機構として、グルタチオン量、GST 活性、GPX 活性並びに SOD 活性の測定条件を以下のように確立した。

A) グルタチオンの定量：グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンの三つのアミノ酸から成るトリペプチドで、ほとんどの細胞に高濃度に存在して、活性酸素による細胞障害の防御、生理活性物質の合成や DNA の合成、癌細胞の抗癌剤耐性の獲得などにおいて重要な役割を果たすなど、多彩な生理的機能を有する物質である。表 2 にその機能を示す。グルタチオンは、二段階の酵素反応によって合成される。その第一段階を触媒する酵素は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS) で、第二段階を触媒する酵素は、グルタチオン合成酵素であるが、グルタチオン合成を律速するのは、第一段階を触媒する γ -GCS である。グルタチオンは、還元型 (GSH) と酸化型 (GSSG) が存在するが、細胞内では大多数が GSH で、GSSG は数%以下である。定量は、DTNB-酵素リサイクリング法と呼ばれる以下の方法で行う。まず、測定試料は、トリクロロ酢酸 (TCA) などのタンパク変性剤による処理を行い、タンパク質を除く。除タンパク試料中の過剰の TCA は、ジエチルエーテルで除去する。これに、5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を加えると、試料中の GSH と反応して 2-ニトロ-5-安息香酸が生成される。2-ニトロ-5-安息香酸は、412nm に吸収を持つので、生成量を分光光度計で測定できる。しかし、実際には、GSH と DTNB の反応の際に副反応的に GSSG が生じて DTNB との反応が進まなくなる。そこで、反応系にグルタチオン還元酵素を加えて、生じた GSSG を GSH に還元し DTNB と連続的に反

応させ、412 nm の吸光の増加速度を測定する。この 412nm の吸光の増加速度は、存在する GSH と GSSG の総量に比例することから、これらの総グルタチオン量を測定することができる。GSSG のみを測定するためには、除タンパク試料に N-エチルマレイミドを加えて高濃度に存在する GSH をマスキングする前処理が必要となる。

B) GST 活性の測定：GST は、種々の薬剤のグルタチオン抱合を触媒する他に、脂質や核酸の過酸化物の還元を触媒するなど、生体の解毒酵素として働く一方、生理活性物質の合成に関わるなど、多機能酵素として知られる。GST は、昆虫から哺乳類に至る動物一般に広く分布するほか、トウモロコシなどの植物にも存在する。GST には多くの分子種が存在するが、各分子種の発現は臓器によって異なる。各分子種の基質特異性は低く、一つの基質に対し、多くの分子種が活性を示す。GST 活性は、多くの分子種の基質となる、1-クロロ 2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を用いて、GSH と CDNB との反応物 (CDNB のグルタチオン抱合体、ジニトロフェニルグルタチオン (GS-DNP)) の生成を測定する。GS-DNP は、340nm に吸収を持つので、分光光度計で測定することができる。CDNB は前述の通り、多くの GST 分子種の基質となり感度も高いので、総 GST 活性の測定に用いられる。活性は、GS-DNP のモル吸光係数を基に計算する。

C) GPX 活性測定：GPX は、必須微量元素セレンを含有する酵素で、セレンはその活性中心にセレノシステインの形で存在する。本酵素は、GSH の酸化に共役して、過酸化水素、脂肪酸過酸化物、リン脂質過酸化物などの種々のヒドロペルオキシド (ROOH) を還元す

ることで、活性酸素の消去や細胞膜などの酸化損傷を除去し、生体防御に重要な役割を担っている。この反応に伴って生じた GSSG は、GSH サイクルを構成するグルタチオン還元酵素 (GR) により還元されて GSH に再生される。この際、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型 (NADPH) が消費されるが、NADPH はペントースリン酸経路より再生される。そこで GPX の活性は、反応系に GR、NADPH を共存させ、基質として t-ブチルヒドロペルオキシドを用い、反応の結果生成する GSSG を GR で還元する際に起こる NADPH の減少を 340nm の吸光の変化として測定する。活性は、NADPH のモル吸光係数を基に計算する。本法では、セレン依存性の GPX 活性の他に、セレン非依存性の GPX (ある種の GST) 活性も測定される。セレン依存性の GPX 活性のみを測定する場合には、基質として t-ブチルヒドロペルオキシドではなく、過酸化水素を用いる。

D) SOD 活性測定：SOD は、活性酸素の一種である O_2^- を不均化する酵素で、生体内に広く存在する。哺乳類の細胞内には、細胞質に局在し、分子内に銅と亜鉛を含有する Cu,Zn-SOD とミトコンドリアに局在し、分子内にマンガン含有する Mn-SOD が存在する (表 3)。その反応は、 $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ である。SOD の活性測定では、基質の O_2^- が不安定であるため、通常以下のようにして行う。まず、キサンチンとキサンチンオキシダーゼの存在下で O_2^- を産生させ、これにニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を共存させて、 O_2^- の産生量に比例して NBT が発色する系を設ける。この系に活性測定用試料を加えると、試料中に存在する SOD が O_2^- の産生を阻害するので、NBT の発

色が抑えられる。この阻害が 50%である時、SOD の酵素活性が 1 ユニットあると定義する。Cu,Zn-SOD と Mn-SOD の区別は、シアンにより Cu,Zn-SOD の活性が阻害されるため、反応系にシアンを加えて活性測定を行えば、Mn-SOD のみの活性が得られる。

4) [35 S]GTP γ S 結合活性の測定条件を以下のように確立した。

環境毒性化学物質による神経系への作用を解析することを目的として、主として受容体 G 蛋白質連関に着目した [35 S]GTP γ S 結合活性測定法の開発・改良を行った。内分泌攪乱化学物質の作用点として、神経系のステロイドであるニューロステロイドの細胞膜受容体に着目しているが、まずこの受容体を共有するシグマリガンドによる G 蛋白質活性化能について解析を行った。

脳の膜標品にシグマ受容体アゴニストである (+)-pentazocine を作用させ、その [35 S]GTP γ S 結合活性の変化と検討したところ、アゴニスト濃度依存的に [35 S]GTP γ S 結合量の増大が観察された。この G 蛋白質活性化は百日咳毒素処理により消失した。関連する G 蛋白質の同定を行うため、この百日咳毒素処理により活性を消失した膜標品に、バキュロウイルス発現系により作製した組換え G 蛋白質を再構成し、アゴニスト依存的な [35 S]GTP γ S 結合活性の変化を測定したところ、G α i1 再構成により [35 S]GTP γ S 結合能の回復が見られたが、G α A 再構成によっては回復が見られなかった。このことから脳膜標品に存在するシグマ受容体は G α i1 と機能的連関がある受容体であることが明らかとなった。次に、臓器別のシグマ受容体アゴニストによる [35 S]GTP γ S 結合活性の変化を検討した。脳膜標品には比較的多くの [35 S]GTP γ S 結合活性が認められた。脳以外の部位については (+)-pentazocine 結合量の多い肝臓において [35 S]GTP γ S 結合活性が著しく少なく、脾臓、精巣において [35 S]GTP γ S 結合活性が多いことが明らかとなった。活性の多かった、脾臓について *in situ* [35 S]GTP γ S オー

トラジオグラムによる解析を行ったところ (+)-pentazocine 依存的な [35 S]GTP γ S 結合活性の上昇が観察された。

一方、G 蛋白質活性化の *in vivo* アッセイ系として、末梢性疼痛試験法を利用できる可能性について検討するため、この試験法で見られる応答の基礎的な情報伝達機構について解析を行った。その結果、非常に低用量で G 蛋白質連関型受容体刺激を検出でき、G α i あるいは G α q の活性化、ホスホリパーゼ C、IP $_3$ 、Ca $^{2+}$ 動員系の活性化の関与が *in vivo* において解析できる系であることを明らかにした。

D. 考察

成熟マウス精巣への EB 及び DES の効果は、ラットやハムスター等の結果と比較してそれ程重篤ではないが、長期投与によって特に減数分裂を前後して生殖細胞の消失が認められた。その本質はアポトーシスの誘導であり、原因遺伝子として Fas/Fas ligand 系の関与を見いだした。一方、幹細胞である精粗細胞は消滅することなく、高濃度の EB や DES 存在下でも長期間ほぼ正常に細胞分裂を行い精子形成細胞を供給していることも明らかとなった。これらの結果を基に、1) 更にこれらホルモンの低濃度の影響を検討すると共に、幼若並びに胎仔精巣への影響の全体像を明らかにする、2) 他の生殖毒性物質の影響をこれらホルモンの効果との比較に於いて評価する、3) *in vitro* での胎仔へのこれら毒性物質の直接的影響を検討することが必要と思われる。

本研究結果での特筆すべき事実は、DES 投与による成熟マウス精子形成細胞死誘導作用において high dose ではむしろ生殖細胞アポトーシス頻度を低下させるという現象であり、この点に関しては更なる実験の追加による詳細な検討を必要とする。本報告書では詳細しないが、研究協力者である近藤等による予備実験によりマウス肝でのグルタチオン量が low dose の DES 投与では半減するが high dose では逆に倍増する知見が得られており活性酸素への細胞死防御機構の観点から興味ある知見と考える。更に、通常毒性の影響の検討に

おいてしばしば高濃度の毒性物質投与が行われ有害・無害が論じられる訳であるが、本研究の結果は低濃度で特に強い生殖毒性が認められる場合の存在を示唆しており研究計画作成上の新たな指針を示していると考えられる。

また生殖毒性を考える上で視床下部一下垂体系への検討が必要であるが、今後それらのG蛋白系への効果を指標とした研究が可能となっており、種々の下垂体ホルモンの発現状況と比較検討する予定である。更に、卵子形成細胞へのこれら毒性物質の影響の検討も不可避であり、生殖細胞死の誘導機構への洞察を広げるためのBcl-2/Bax系の関与や活性酸素障害への防御機構の検討を進め、毒性の人為的な中和法などの開発に取り組む必要がある。

E. 結 論

成熟雄マウスへのエストロゲン及びその類似物質の精巣への影響を検討し、その中心的な作用点が精母細胞減数分裂過程であり、アポトーシスのFas/Fas ligand系を介した誘導が明らかとなった。またDESによる生殖細胞アポトーシス誘導がhigh doseでむしろ抑制されることを見出し、今後の更なる検討が必要となった。また更に、今回得られた基礎的投与条件の検討結果を基に、幼若並びに胎仔マウスへのこれら環境生殖毒性物質の検討を行うと共に他の毒性物質の検討も行いこれらの生殖細胞死誘導効果に於ける異同を明らかにしたい。

F. 研究発表

1) 論文発表

- ・ Koji, T. (1999) In situ localization of gene-specific transcription regulatory factors by Southwestern histochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.*, 32 (3) ; 255-260.
- ・ Ejima, K., Koji, T., Nanri, H., Kashimura, M. and Ikeda, M. (1999) Expression of thioredoxin and thioredoxin reductase in placenta of pregnant mice exposed to lipopolysaccharide. *Placenta*, 20 (7) ; 561-566.
- ・ Razzaque, M. S., Koji, T., Harada, T. and Taguchi, T. (1999) Localization in situ of type VI collagen protein and its mRNA in mesangial proliferative glomerulonephritis using formalin-fixed paraffin embedded renal biopsy sections. *Histochem. Cell Biol.*, 111; 1-6.
- ・ Sakai, H., Tsurusaki, T., Kanda, S., Koji, T., Xuan, J. W. and Saito, Y. (1999) Prognostic significance of β -microseminoprotein mRNA expression in prostate cancer. *Prostate*, 38; 278-284.
- ・ Tsurusaki, T., Kanda S., Sakai, H., Kanetake, H., Saito, Y., Alitalo, K. and Koji, T. (1999) Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Brit. J. Cancer*, 80 () ; 309-313.
- ・ Baba, N., Koji, T., Itoh, M. and Mizuno, A. (1999) Reciprocal changes in the expression of Bcl-2 and Bax in hypoglossal nucleus after axotomy in adult rats: possible involvement in the induction of neuronal cell death. *Brain Res.*, 827 (2) ; 122-129.
- ・ Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T. and Tamura, T. (1999) A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 274 (22) ; 15329-15335.
- ・ Razzaque, M. S., Koji, T., Kumatori, A. and Taguchi, T. (1999) Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem. Cell Biol.*, 111; 359-365.
- ・ Shiraishi, M., Hiroyasu, S., Koji, T., Muto, Y. and Koyama, Y. (1999) Early detection of the Fas-FasL system in hepatic graft-versus-host disease after small-bowel transplantation. *Transplant Proc.*, 31 (1/2) ; 567-568.
- ・ Hiroyasu, S., Shiraishi, M., Koji, T., Mamadi, T., Sugawa, H., Hye H. and Muto, Y. (1999) Analysis of the Fas system and Bcl-2 in rat

- liver allograft rejection. *J. Surg. Res.*, 84 (2); 204-211.
- **Hishikawa, Y., Koji, T., Dhar, D. K., Kinugawa, S., Yamaguchi, M. and Nagasue, N.** (1999) Metallothionein expression correlates with metastatic and proliferative potential in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Brit. J. Cancer*, 81 (4); 712-720.
 - **Razzaque, M. S., Shimokawa, I., Koji, T., Higami, Y. and Taguchi, T.** (1999) Life-long caloric restriction suppresses age-associated Fas expression in the Fischer 344 rat kidney. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 1; 82-85.
 - **Sugimoto, Y., Koji, T. and Miyoshi S.** (1999) Modification of expression of stem cell factor by various cytokines. *J. Cell. Physiol.*, 181 (2); 285-294.
 - **Hiroyasu, S., Shiraishi, M., Koji, T., Mamadi, T., Sugawa, H., Tomori, H. and Muto, Y.** (1999) Analysis of Fas system in pulmonary injury of graft-versus-host disease after rat intestinal transplantation. *Transplantation*, 68 (7); 933-938.
 - **Ejima, K., Koji, T., Tsuruta, D., Kashimura, M. and Ikeda, M.** (2000) Induction of apoptosis in placentas of pregnant mice exposed to lipopolysaccharides: Possible involvement of Fas/Fas ligand system. *Biol. Reprod.*, 62; 178-185.
 - **Nishihara, E., Nagayama, Y., Inoue, S., Hiroi H., Muramatsu, M., Yamashita, S. and Koji, T.** (2000) Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor α and β in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology*, 141 (2); 615-620.
 - **小路武彦** (1999) 精子形成とアポトーシス。産婦人科の世界, 51 (1); 49-58.
 - **小路武彦** (1999) 分子組織細胞化学の最近の進歩。解剖学雑誌, 74; 399-409.
 - **小路武彦** (1999) In situ hybridization: 原理と基本操作。[組織細胞化学 1999] (日本組織細胞化学会編)、学際企画、東京、pp. 120-129.
 - **大庭茂喜、小路武彦** (1999) アポトーシス関連タンパク質などの免疫組織化学染色。[新アポトーシス実験法] (辻本賀英、刀祢重信、山田武編)、羊土社、pp. 37-41.
 - **小路武彦** (2000) 精巣とアポトーシス。In: 臓器別アポトーシス証明法 (大槻勝紀、小路武彦、渡辺慶一編)、pp.180-183、南江堂。
 - **Kondo, T., Higashiyama, Y., Goto, S., Iida, T., Cho, S., Iwanaga, M., Mori, K., Tani, M. and Urata, Y.** (1999) Regulation of g-Glutamylcysteine synthetase expression in response to oxidative stress. *Free Rad. Res.*, 31; 325-334.
 - **Goto, S., Iida, T., Cho, S., Oka, M., Kohno, S. and Kondo, T.** (1999) Overexpression of glutathione S-transferase p enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Rad. Res.*, 31; 549-558.
 - **Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Iida, T., Cho, S., Honma, K. and Kondo, T.** (1999) Melatonin induces g-glutamylcysteine synthetase mediated by activator proteine-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 27 (7/8); 838-849.
 - **Beutler, E., Gelbart, T., Kondo, T. and Matsunaga, A. T.** (1999) The molecular basis of a case of g-glutamylcysteine synthetase deficiency. *Blood*, 94 (8); 1-7.
 - **Tanaka, T., Uchiumi, T., Nomoto, M., Kohno, K., Kondo, T., Nishio, K., Saijo, N., Kuwano, M.** (1999) Cellular balance of glutathione levels through the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione thiol transferatse genes in human hepatic cells resistant to a glutathione poison. *Biochim. Biophys. Acta*, 1427 (3); 367-377.
 - **Sakamaki, H., Akazawa, S., Ishibashi, M., Izumino, K., Takino, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., Goto, S., Urata, Y., Kondo, T. and Nagataki, S.** (1999) Significance of glutathione-dependent antioxidant system in

- diabetes-induced embryonic malformations. *Diabetes*, 48; 1138-1144.
- Cho, S., Hazama, M., Urata, Y., Goto, S., Horiuchi, S., Sumikawa, K. and Kondo, T. (1999) Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 26; 589-602.
 - Yoshida, A. and Ueda, H. (1999) Activation of Gi1 by lysophosphatidic acid receptor without ligand in the baculovirus expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259; 78-84.
 - Tokuyama, S., Hirata, K., Yoshida, A., Maruo, J., Matsuno, K., Mita, S. and Ueda, H. (1999) Selective coupling of mouse brain metabotropic sigma (s) receptor with recombinant Gi1. *Neurosci. Lett.*, 268; 85-88.
 - Maruo, J., Yoshida, A., Shimohira, I., Matsuno, K., Mita, S. and Ueda, H. (2000) Binding of [³⁵S]GTPγS stimulated by (+)-pentazocine, sigma receptor agonist, is abundant in the guinea pig spleen. *Life Sciences*, in press.
 - Inoue, M., Yamada, T. and Ueda, H. (1999) Low dose of kyotorphin (tyrosine-arginine) induces nociceptive responses through a substance P release from nociceptive endings. *Mol. Brain Res.*, 69; 302-305.
 - Renback, K., Inoue, M. and Ueda, H. (1999) Lysophosphatidic acid-induced, pertussis toxin-sensitive nociception through a substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Neurosci. Lett.*, 270; 59-61.
 - Inoue, M., Shimohira, I., Yoshida, A., Zimmer, A., Takeshima, H., Sakurada, T. and Ueda, H. (1999) Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P-nociception in the nociceptors and spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291; 308-313.
 - Ueda, H. and Inoue, M. (2000) In vivo signal transduction of nociceptive response by kyotorphin (tyrosine-arginine) through Gai1 and inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ influx. *Mol. Pharmacol.*, 57; 108-115.
- ## 2) 学会発表
- Koji, T., Izumi, S., Shin, M., Hishikawa, Y. (1999) Localization in situ specific RNA by light and electron microscopy. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, Roma. (シンポジウム)
 - Ejima, K., Koji, T., Nanri, H., Kashimura, M., Ikeda, M. (1999) LPS induces the expression of thioredoxin, thioredoxin reductase, and protein disulfide isomerase in mouse placenta. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, Roma.
 - 江島邦彰、小路武彦、南里宏樹、柴田英治、柏村正道、池田正春。(1999) 炎症胎盤モデルにおける酸化ストレスと apoptosis。第 8 回アポトーシス研究会。
 - 鶴田大輔、小路武彦、小林裕美、寺前佳洋子、村上正基、石井正光。(1999) マウス毛再生モデルにおける毛包開口部ケラチノサイトアポトーシスの誘導機構。第 8 回アポトーシス研究会。
 - 小路武彦。(1999) RNA 検出への応用上考慮されるべき基礎条件。第 40 回日本組織細胞化学会総会。(ワークショップ)
 - 山本智美、柴田恭明、進正志、菱川善隆、山口朗、小林俊光、小路武彦。(1999) 硬組織への TUNEL 法の応用：マウス硬口蓋における脱灰操作の至適条件の検討。第 40 回日本組織細胞化学会総会。
 - 和泉伸一、仙波祐子、進正志、菱川善隆、小路武彦。(1999) プロラクチン遺伝子転写調節因子 Pit-1 のラット胎盤における細胞内局在と機能的分化の関連。第 40 回日本組織細胞化学会総会。
 - 菱川善隆、永末直文、小路武彦。(1999) 食道癌における metallothionein (MT) 発現の免疫組織化学的及び分子組織化学的検討。第 40 回日本組織細胞化学会総会。

- ・ 小路武彦。(1999) 組織化学的遺伝子発現解析法の最近の進歩。第 99 回九州医師会医学会第 3 分科会産婦人科学会。(特別講演)
- ・ 和泉伸一、進正志、菱川善隆、小路武彦。(2000) 胎盤におけるプロラクチン遺伝子転写調節因子の電顕レベルの組織化学による細胞内分布の解析。第 105 回日本解剖学会総会。
- ・ 進正志、和泉伸一、菱川善隆、小路武彦。(2000) ラット再生肝モデルにおける CREB 及び PCNA の発現検索。第 105 回日本解剖学会総会。
- ・ 菱川善隆、進正志、和泉伸一、井上聡、村松正実、小路武彦。(2000) マウス精巣における estrogen receptor (ER) $\alpha\beta$ 発現の免疫組織化学的及び分子組織化学的検討。第 105 回日本解剖学会総会。

Effect of environmental toxic compounds including endocrine disruptors upon mouse spermatogenic cell death and its possible molecular mechanisms

Takehiko Koji · Department of Histology and Cell Biology, Nagasaki University School of Medicine · Professor and Chairman

Key word :

estrogen, diethylstilbestrol, spermatogenesis, germ cell death, Fas, Fas ligand, adult mouse

Abstract

For a better understanding of the effects of various environmental toxic compounds including endocrine disruptors on mammalian reproduction, the study on germ cell death in fetal, neonatal and adult animals would be required. In the project of this year, we addressed whether repetitive injections of excessive dose of estradiol-3-benzoate (EB; 30 - 120 μ g/head, every 5 days) and diethylstilbestrol (DES; 0.4 - 2 mg/head, every 5 days) may affect spermatogenic cell apoptosis in adult mice, and if so, the Fas/Fas ligand system can be involved in the induction of germ cell apoptosis. Consequently, those estrogenic compounds generally increased the frequency of TUNEL positive germ cells, especially at the stage of spermatocyte around meiosis and we found that the occurrence of germ cell apoptosis seemed to be temporally and spatially associated with the expression of Fas and Fas ligand, which were expressed in germ cells and Sertoli cells, respectively. Very surprisingly, however, DES at a high dose did not increase the occurrence of germ cell apoptosis, raising a possibility that the degree of toxic effects may not be always correlated with the concentrations of toxic compounds. In addition, we conducted preliminary experiments with these compounds and the other endocrine disruptors such as bisphenol A in pregnant mice to extend the similar approach to fetal and neonatal mice.

Effect of estrogen on adult testis (TUNEL staining)

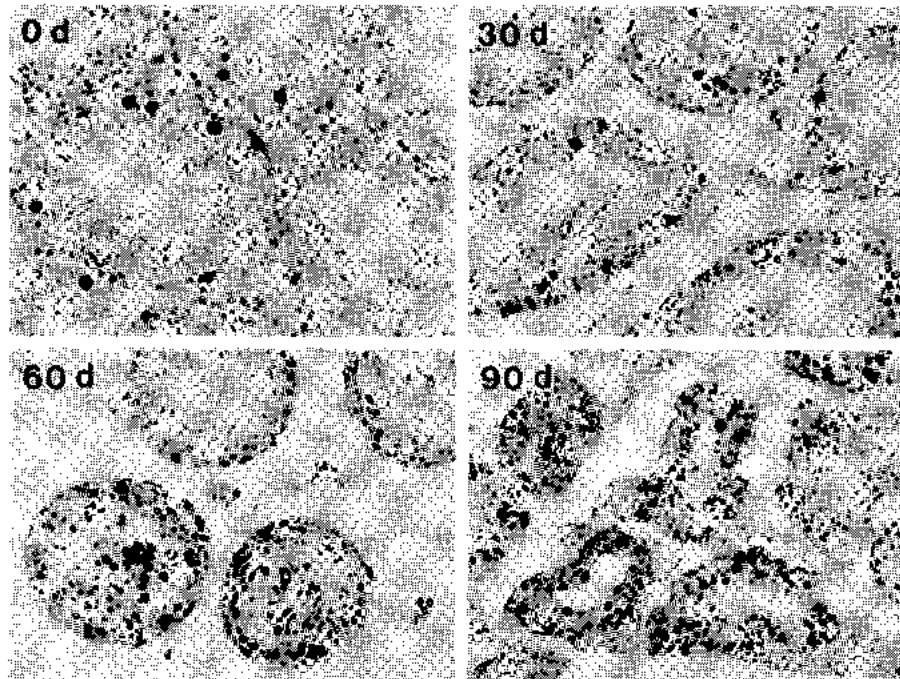


図1：成熟マウス精巣精子形成細胞アポトーシスへのEBの影響

A/J 成熟雄マウスに $30 \mu\text{g/head}$ の EB を 5 H 毎に皮下投与し、経時的 (0, 30, 60, 90 日後) に TUNEL 染色法によりアポトーシス細胞の出現を観察したもの (各群 3-4 匹)。黒色に呈色した核として、アポトーシス細胞が同定される。特に精母細胞でのアポトーシス頻度の増大を認め、精子細胞以降の精子形成細胞の消失が顕著であるが、精粗細胞の多くは健在であった。

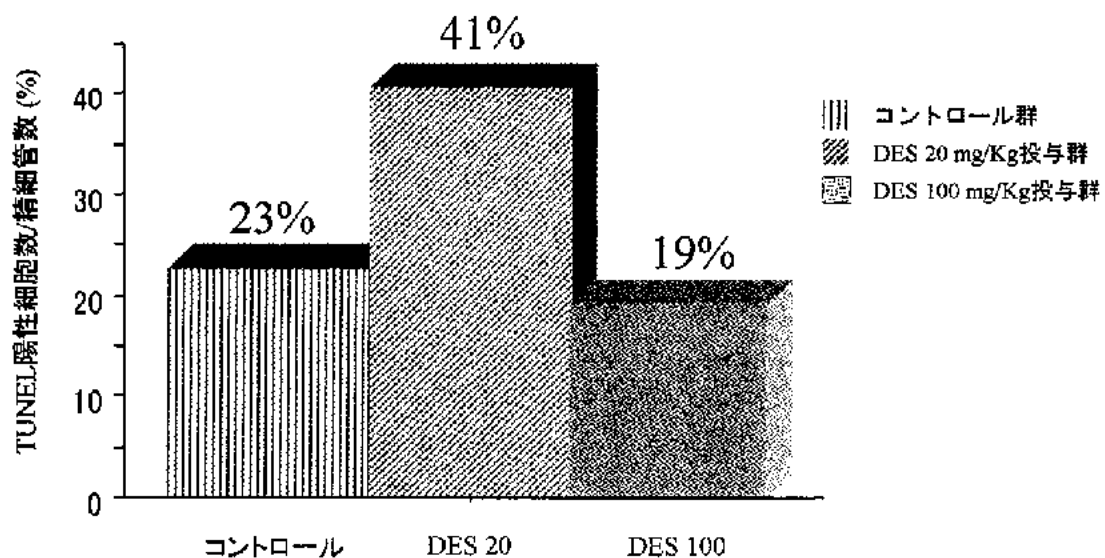


図2：成熟マウス精巣精子形成細胞アポトーシスへのDESの影響

ICR 成熟雄マウスに 20 mg/kg (low dose) 及び 100 mg/kg (high dose) の DES を 5 日毎に皮下投与し、対照としては corn oil のみを投与した (各群 3 匹)。投与後 20 日で組織を採集し、TUNEL 染色後、精細管断面数当たりの陽性細胞数を測定し%で表示した。その結果、low dose では有意な精子形成細胞アポトーシスの増大を認めたが、high dose 群ではむしろ減少傾向を示した。

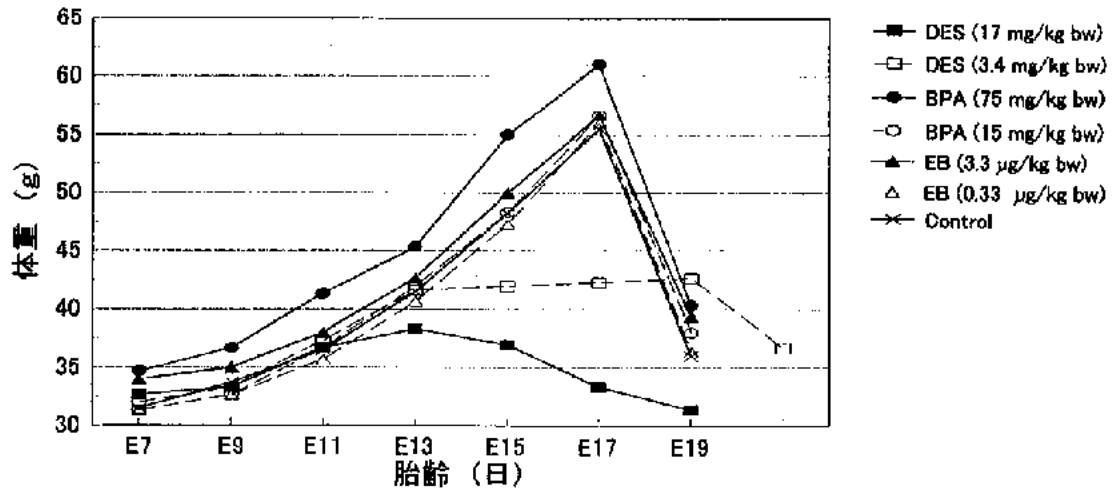


図3：環境毒性物質の妊娠マウス投与による母体の体重変化

ICR 妊娠マウスに、EB、DES、BPA を 5% ethanol/corn oil に溶解後、図に示した量で腹腔内に投与し、母体体重の変化を計測した。対照としては、5% ethanol/corn oil のみを同様に投与した（各群 3-4 匹）。その結果、高濃度の BPA では若干の体重増加を観察したが、EB 投与では対照群との差異は認められなかった。一方、DES は妊娠 13 日辺りから体重を低下させたが、これは胎仔の死亡・吸収を示しているものと思われる。

表1 妊娠マウスへの種々の環境毒性物質投与による出生仔数並びに体重への影響

処 置	平均仔数(匹)	新生児平均体重(g)
DES (17 mg/kg bw)	0	—
DES (3.4 mg/kg bw)	1	—
BPA (75 mg/kg bw)	12	1.76
BPA (15 mg/kg bw)	12.7	1.62
EB (3.3 µg/kg bw)	11.7	1.71
EB (0.33 µg/kg bw)	10.7	1.71
Control	12.3	1.68

表2 グルタチオンの機能

グルタチオンはあらゆる細胞に高濃度に存在し、細胞内の反応物を還元することに役立っている。

その主な機能は

- (1) ミトコンドリア障害の防御
- (2) 肺の活性酸素障害の防御
- (3) 膜脂質の過酸化に対する防御
- (4) 親電位化合物による細胞障害の防御
- (5) 蛋白質の SH 基の保護
- (6) 免疫反応における役割
- (7) DNA 障害の保護
- (8) 細胞へのシステインの供給
- (9) 抗酸化酵素の基質

グルタチオン レダクターゼ (GSSG を GSH へ還元)

グルタチオン ペルオキシダーゼ (GSH を GSSG へ酸化し H_2O_2 を消去)

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (薬物と GSH の抱合体を形成)

表3 SOD の性質

	Cu,Zn-SOD	Mn-SOD	EC-SOD
局在性	細胞質	ミトコンドリア	血漿
分子量 (ゲル濾過)	32,000	88,600	135,000
サブユニット構造	二量体	四量体	四量体
含有金属	Cu,Zn	Mn	Cu,Zn
KCN処理	失活	—	失活
H_2O_2 処理	失活	—	失活

4. 生殖毒性の早期影響マーカーとしての神経内分泌動態と次世代影響に関する研究

研究者 岸 玲子（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授）
本間研一（北海道大学医学部総合生理学講座時間生物学分野教授）
佐田文宏（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野講師）
小橋 元（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野助手）
片倉洋子（北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野）

研究要旨

近年内分泌攪乱物質問題が重要視され、その多くは生殖毒性に加え、催奇形性や神経発達異常など次世代影響が大きいのが特徴である。人では精子数減少、不妊、不育症、子宮内膜症、尿道下裂、停留睾丸などの先天性異常などさまざまな疾患の要因となる可能性もありうるとして検討、報告されている。しかし内分泌攪乱物質の実際の曝露と発症の関連性についてはその因果関係などを明らかにした報告はない。内分泌攪乱物質も含めた環境化学物質曝露による神経内分泌物質の動態と、生殖毒性の発現について知見を得ることが必要と考える。当教室では内分泌攪乱化学物質と生殖毒性について人での疫学的研究を行うと同時に血液などの生体試料中の内分泌攪乱物質の濃度測定、薬物代謝酵素遺伝子の遺伝子多型、NK細胞の活性などさまざまな方向から検討、研究を行っている。今年度の研究では因果関係をより明確にするために条件制限を設定しやすい動物実験での解明を試みた。有機溶剤スチレン類は産業的にも種々の用途に広範囲に使用され、日常生活でも食品トレー、ポリスチレン製食器など多量に使われている。そのため職業上でもスチレン類を取り扱い作業を行う者の数も多い。最近では女性労働者の多業種職場への進出や、妊娠中も職場で働く女性も増加する傾向にある。スチレン類は変異原性や催奇形成についての疑いもあり、人の疫学でも月経障害などへの影響について検討されている。実験的に発生の初期から、成長後までそれぞれの時期に対応した鋭敏な次世代影響の検出方法の開発、今まで毒性試験などでも扱われにくい神経行動学的評価にもつながるような次世代影響を引き起こすメカニズムについても考慮し、有機溶剤スチレンモノマーを妊娠ラットへ曝露をおこない、実験的に母ラットの生殖毒性、仔ラットの生理的発達毒性、神経化学物質動態、薬物代謝酵素の変化などの検討を行った。

研究者協力者

池田 聡子（札幌医科大学医学部公衆衛生学講座講師）
三宅 浩次（北海道医療大学看護福祉学部教授）

A. 研究目的

本研究は、近年の内分泌攪乱化学物質の問題における重要視性を考え、その多くが生殖毒性に加え、催奇形性や神経発達異常など次世代影響が大きいのが特徴である。人では精子数減少、不妊、不育症、子宮内膜症、尿

道下裂、停留睾丸などの先天性異常などさまざまな疾患の可能性もあり得るとして調査、報告されている。しかし内分泌攪乱物質の曝露と疾患の発症の関連性についてはその因果関係などを明らかにした報告はない。内分泌攪乱化学物質も含めた環境化学物質曝露による神経内分泌化学物質の生体内動態と、生殖毒性の発現について今まで以上により詳しい知見を得る必要があると考えられる。神経内分泌物質の動態と生殖毒性発現の関連性、

及び量反応関係の検討を行い、生殖影響のマーカーとなりうる血中、尿中の化学物質の濃度や、代謝物質濃度を測定すること、また生殖毒性の早期影響を評価するのに適切な予防医学的マーカーとしての有効性を評価する。内分泌攪乱作用による次世代影響を評価するのに適切なより感度の高い生後の発達時期にあわせた神経機能や学習行動を調べる鋭敏な方法を開発するなどの目的で、今回は実験動物を用いて開始した。

種々な産業労働現場で広範囲に使用され、また女性労働者の種々の産業現場への進出、増加に伴い、生殖毒性の有無が疑われ、最近では環境中での内分泌攪乱化学物質として次世代への影響の懸念もある有機溶剤スチレンモノマーを用いて、生殖、妊娠と胎児への影響、生後発達、行動奇形学的影響などの解析を行った。生後生理的発達に遅れなどが見られたことから、これに基づき神経化学的影響を摂食条件を考慮してラットを用いて実験を行い次世代影響の検討を行った。また、内分泌攪乱化学物質の生体内での代謝に関与している薬物代謝酵素チトクローム P450 についても未成熟ラットの酵素量、妊娠にともなう変化などについても検討を行いたいと考えている。

今後、本研究で得られた結果をふまえて、生殖毒性を未然に防ぐための予知マーカーを見つけ、次世代影響のマーカーとして有効かどうかを検討し、生殖障害の発現を未然に検知する新しい指標とする事ができるよう実験を行っていきたい。

B. 研究方法

1) 動物、溶剤曝露方法

動物は Wistar 系ラット（雄：5 週令、雌：6 週令）を用い、少なくとも 1 週以上の昼夜逆転リズムで慣化を行った。妊娠ラットはブラグ確認日を妊娠 0 日として、個別ケージにて飼育をおこなった。妊娠 6 日目から 20 日目までスチール製の噴霧式曝露チャンバー（70×70×120 cm）を用いて一日 6 時間の吸入曝露を 0ppm（空気）、スチレンモノマー

50ppm、300ppm で行った。対照群として通常の餌自由摂取群の他、栄養状態により生じるバイアスを避けるため 300ppm 群の摂取量と同量の餌を与えた pair feeding の対照群と 2 群を用いた。50ppm 群にも 300ppm と同量の餌を与えた。妊娠ラットは体重、餌摂取量、分娩後は新生仔死亡、仔の母当たり生存数、仔の体重、仔の総体重などを観察した。生後第一日目に新生仔ラットを母当たり 8 匹とし、以降 20 日目まで体重増加、生理的発達（耳介開示、開眼時期、上下歯芽萌出）、起きあがり反射、について観察を行った。

2) 脳内化学物質の分析

生後第一日目に新生仔ラットの全脳摘出（母当たり 2、3 匹）を行い、急速冷凍し、-80℃で保存した。残りの仔ラットはその後離乳期 21 日目に断頭を行い、新生仔ラットと同様に保存した。各脳部位（生後直後は大脳、小脳に 2 分割、生後 21 日目は前頭葉皮質、線条体、海馬、視床下部、中脳を Heffner et al. の方法により、15 ゲージの針でパンチアウトを行った）。その後、ホモジナイズ、遠心（15000g × 1min）を行い、上清を HPLC-ECD で脳内アミン及びその代謝物（セロトニン：5-HT、5-ヒドロキシインドール酸：5-HIAA、ドーパミン：DA、3,4 ジヒドロキシフェニル酸：DOPAC、ホモバニリン酸：HVA、ノルアドレナリン：NA）を定量した。タンパク質は Lowry et al の方法で測定を行った。

組織病理学的変化は出産後ラット、0 日、21 日令仔ラットの脳、肝臓、肺、腎臓、の各組織でホルマリン固定を行い、ヘマトキシリン-エオシン染色、ニッスル染色し検鏡した。

（札幌医大動物実験倫理委員会、北海道大学倫理委員会の指針に従って実験を行った）

C. 研究結果

1) スチレンモノマー曝露母ラットには明らかな有機溶剤曝露にともなう中毒症状は見られなかった。母ラットの妊娠中摂食量については、300ppm 曝露群で餌自由摂取対照群

に比べて有意に少なかった。また妊娠中体重増加には差はなかった (table 1)。妊娠期間、新生仔ラット死亡数、死産はスチレンモノマー 300ppm 曝露群で pair feeding の対照群と有意差が見られ、スチレンモノマー曝露に関連した影響とみられた。各曝露群の新生仔の数、母当たりの仔の総体重、仔の生下時体重、離乳期 21 日目までの仔の体重増加などでは各群間に差はみられなかった (table 2)。生後直後の大脳重量はスチレンモノマー 300ppm 群のみ餌自由摂取対照群に比べてやや減少傾向にあった (table 3)。

2) 仔の生理的発達では歯芽萌出時期 (上、下)、開眼口、起きあがり反射行動でスチレンモノマー 300ppm 曝露群で両対照群に比べて有意な遅れが見られた。50ppm 群では起きあがり反射行動で餌自由摂取群との間で有意な遅れが見られた (table 4)。

3) 神経化学的分析結果では、生下時仔ラット大脳ではセロトニンが 300ppm 群で餌自由摂取のコントロール群に比べて有意に低かった。ドーパミン系ではドーパミン代謝物の HVA が 300ppm 群で餌自由摂取対照群と pair feeding の対照群に比べて有意に低い濃度であった (figure 1)。小脳では差は見られなかった。

神経化学的分析結果・生後 21 日令では前頭葉皮質でセロトニンは各群との間には差はみられてなかったが、線条体では 50ppm 曝露群で両対照群に比べて増加していた。セロトニンの代謝物である 5-HIAA では前頭葉皮質と海馬で 300ppm 群が低い濃度であった。ドーパミン系では線条体でドーパミンが有意に増加していた。ドーパミンの代謝物 HVA は高い傾向にはあったが有意差は見られなかった。代謝率を示す、5-HIAA/5-HT 比では 300ppm, 50ppm 群ともに海馬で両対照群に比べて代謝速度に遅れが見られた。

D. 考 察

妊娠中スチレンモノマー曝露を受けた母ラ

ットの妊娠への影響として、妊娠期間の延長、新生仔死亡の増加では、摂食量の減少による影響に加えてスチレンモノマー自体の影響が大きくみられた。また仔ラットの生理的発達でもスチレンモノマーの影響が歯芽萌出 (上下)、開眼時期の遅れ、起きあがり反射行動にみられた。このことから仔の脳内神経伝達化学物質を分析しところ、生後直後のラットの脳はまだ未分化であるために大脳、小脳全体の分析を行ったが、スチレンモノマー 300ppm 曝露群で大脳セロトニン量の低下が見られた。セロトニンは特に胎児期から新生仔にかけて濃度でも他の発達時期、成獣期に比べても高く、他の脳内アミン類の発達を含めて胎児期において成長因子の一つとしての役割が大きいと言われている、このことから生理的発達実験で見られた胎児、生後発達、反射の遅れにも関与していると思われる。

21 日目の離乳期ではセロトニンの代謝物である 5-HIAA が減少しており、セロトニンからの代謝速度の遅れも両対照群に対して顕著であった。これは栄養状態に関わらず、胎仔期において神経伝達物質に対してスチレンモノマーそのものが影響をあたえたためと考えられる。カテコールアミン系では生下時の HVA の減少が 21 日目では線条体で増加していた。これは前に行った行動奇形の解析で見られた 'catch up' に関連しているとも思われる。

内分泌攪乱化学物質の代謝に関連のあると考えられている薬物代謝酵素チトクローム P450 量でも、特に妊娠中ではチトクローム P450 量、代謝酵素活性とも減少していることが考えられる。妊娠中での低下などは内分泌攪乱化学物質によって受ける生体側の影響を大きくする一つの要因となることが考えられ、今後この面からも検討を行う必要があると考えている。今回の研究の結果から内分泌の体内動態に関連のある神経伝達化学物質の変動がスチレンモノマー曝露によって起きる可能性があるということから、異常を通して、この作用機序的な面からの検討が必要であると思われる。生体内化学物質の変動から早期

に生殖影響のマーカーとなりうる血中、尿中の化学物質、代謝物質濃度を評価することも検討したい。

E. 結 論

- 1) 実験的に妊娠中有機溶剤スチレンモノマー曝露を行い高濃度曝露群では妊娠状態への影響が見られた。
- 2) 高濃度曝露群の仔ラットでは生理的発達指標に遅れが見られた。
- 3) 高濃度曝露群仔ラットの大脳内での神経伝達化学物質、セロトニンの含有量が減少していた。
- 4) 離乳期の仔ラットではセロトニンの代謝物 5-HIAA の減少が有意であった。5-HIAA/5-HT 比も低くなっていた。

妊娠中の胎仔脳の発達にとって鋭敏な時期における神経障害作用のある化学物質の曝露

は仔の生後発達に影響を与える可能性があると思われる。これからの産業現場で使用される化学物質の許容濃度等の検討には生殖毒性、発達毒性も考慮した討論が必要と考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. Katakura Y. Kishi R. Ikeda T. Miyake H. (1999) : Effects of prenatal exposure to styrene on neurochemical levels in rat brain. Toxicology Letters 105, 239-249
2. Katakura Y. Kishi R. Ikeda T. Miyake H (in print) : Effects of prenatal styrene exposure on postnatal development and brain serotonin and catecholamine levels in rats. Environ.Res.83

Developmental effects and neuroendocrine regulation as early markers of reproductive toxicity.

Kishi R, Honnma K, Sata F, Kobashi G, Katakura Y, Ikeda T, Miyake H

Key word : styrene, prenatal exposure, maternal toxicity, developmental effects, serotonin, dopamin

Abstract:

Maternal reproductive effects in Wistar rats exposed to 0, 50, 300ppm styrene for 6 h/day during gestational days 6 to 20 were evaluated. Their offspring were observed postnatally for neurochemical changes, growth, and physical landmarks of development. Mothers exposed to styrene were compared with pair-fed and ad-lib-fed controls in order to adjust nutrient conditions. Prolongation of the gestational period, food intake, and the number of neonatal deaths or stillbirths in 300ppm-exposed dams showed evidence of styrene-related effects. Other reproductive parameters, such as litter size, birth weight, and sex ratio, were found to exhibit no effects within the variation range studied. A neurochemical effect was observed in that the 5-HT and HVA concentrations in cerebrum were significantly decreased. Incisor eruption (mandible), eye opening, and the air-righting reflex were delayed in rat pups born to dams receiving 300ppm styrene exposure compared with the pair-fed and ad lib control groups. Pups born to dams delayed air-righting reflex compared with ad lib controls. These results suggest that the offspring developmental landmarks even when nutritional effects were controlled.

TABLE 1. Effects of prenatal styrene exposure on maternal food intake and body weight gain

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(9)	(14)
Food intake (g/day)				
GD 6-13	18.0 ± 2.3	(pair-fed)	(pair-fed)	15.0 ± 2.4 **
GD 14-20	21.4 ± 4.5	(pair-fed)	(pair-fed)	18.9 ± 1.0 **
Total weight gain during exposure (g)	94.3 ± 15.7	89.3 ± 13.7	78.9 ± 24.3	86.3 ± 9.5

values are expressed as means(g) ± S.D. GD: Gestation day

Control-1: ad lib. control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene exposure group (pair-fed)

** : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (P<0.01)

TABLE 2. Results of reproductive toxicity of prenatal styrene exposure on gestation day 6 to 20 in female rats

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(9)	(14)
Length of gestation (day)	21.6 ± 0.5	22.0 ± 0.7	22.0 ± 0.7	22.1 ± 0.6 *
% of Neonatal death (rate)	1.2 (2/173)	1.3 (2/152)	2.8 (3/107)	7.3 (12/164) **
No of live-born offspring (/litter)	12.4 ± 1.5	12.7 ± 1.8	11.9 ± 3.1	11.7 ± 2.2
% of male pups	49.2 ± 0.1	48.0 ± 0.1	45.4 ± 0.1	41.6 ± 0.1

Values are expressed as mean ± S.D. of litters

Number in parenthesis is total number of neonatal death among all litters of each group

Control-1: ad lib. control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene exposure group (pair-fed)

: Statistically significant in comparisons with pair-feeding controls (p<0.05)
by cumulative chi-square method

* : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (p<0.05)

TABLE 3. Effects of prenatal styrene exposure on postnatal body weight and brain weight in newborn offspring

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad. lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	(14)	(12)	(10)	(14)
No of live born offspring(/litter)	12.4 ± 1.5	12.7 ± 1.8	11.9 ± 3.1	11.7 ± 2.2
Body weight at birth (g)	5.2 ± 0.5	5.1 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.1 ± 0.5
Body weight at 21st (male, g)	39.6 ± 5.4	37.9 ± 3.8	35.1 ± 2.6	34.9 ± 3.4 ^{#*}
Cerebrum weight of brain (mg)	159.0 ± 11.8	144.3 ± 16.9	151.8 ± 14.8	138.1 ± 13.1 *
Cerebellum weight of brain (mg)	56.9 ± 6.6	64.5 ± 18.5	59.5 ± 10.2	59.6 ± 9.7

values are expressed as means ± S.D.

Control-1: ad.lib.control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consupction with 300 ppm styrene-exposure group (pair-fed)

: Statistically significant in comparisons with pair feeding controls (p<0.05)

* : Statistically significant in comparisons with ad.lib feeding controls (p<0.05)

TABLE 4. Effects of prenatal styrene exposure on postnatal physiological development and reflexes in offspring.

Treatment	control groups		styrene exposure groups	
	control-1 (ad lib.)	control-2 (pair-fed)	50 ppm (pair-fed)	300 ppm (pair-fed)
Number of litters	14	12	9	14
Number of offspring	(112)	(96)	(72)	(112)
Body weight (21-day) (g)	38.8 ± 5.4	37.1 ± 3.8	34.7 ± 2.5	34.9 ± 3.4
Incisor Eruption				
Upper (day)	10.3 ± 1.5	11.7 ± 2.3	12.3 ± 2.0	12.7 ± 3.2 *
Lower (day)	9.0 ± 1.4	9.2 ± 1.8	10.2 ± 2.2	11.3 ± 2.4 ^{#*}
Eye opening (day)	14.7 ± 1.3	14.5 ± 1.4	14.6 ± 1.3	15.6 ± 1.5 [#]
Air righting reflex (day)	18.4 ± 0.7	18.7 ± 0.6	19.1 ± 0.2 *	19.4 ± 0.6 ^{**}

Values are expressed as mean ± SD of litters

: Statistically significant in comparisons with pair feeding controls (p<0.05)

* : Statistically significant in comparisons with ad lib. feeding controls (p<0.05)

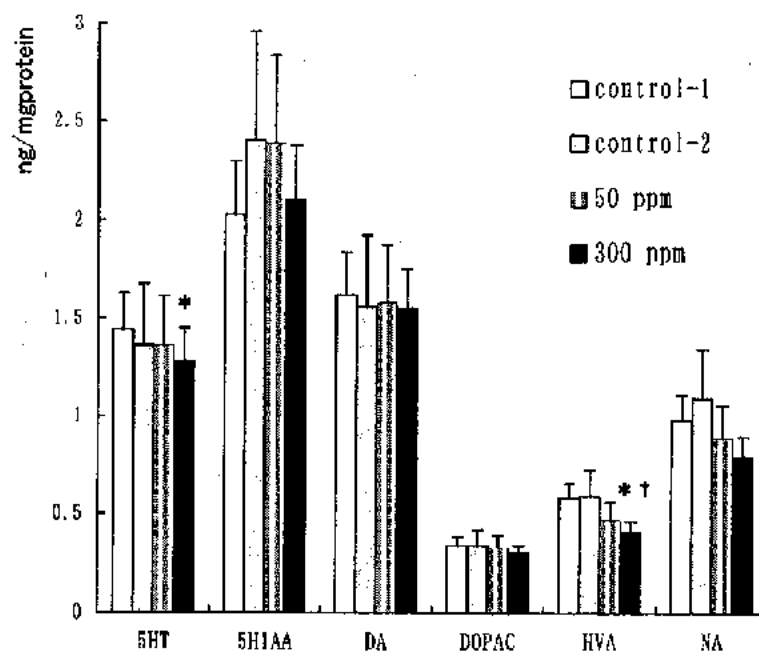


Fig.1 The neurochemical effects of prenatal styrene in newborn offspring cerebrum

Control-1: ad lib.control, Control-2 and 50 ppm group were given same quantity of food consumption with 300 ppm styrene-exposure group (pair-fed). † : Statistically significant in comparisons with pair feeding controls ($p < 0.05$). * : Statistically significant in comparisons with ad lib.feeding controls($p < 0.05$)

Abbreviations: 5-HT(5-hydroxytryptamine), 5-HIAA(5-hydroxyindoleacetic acid), DA(Dopamine), DOPAC(3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA(Homovanillic acid), NA(Norepinephrine)

5. 生殖発達毒性に関する研究

研究者 鈴木 勝士（日本獣医畜産大学獣医畜産学部獣医生理学教授）

研究要旨

内分泌攪乱化学物質等の悪影響として懸念されるいくつかの生物作用すなわち、発生過程そのものの遺伝子による制御と環境による修飾というテーマ（生殖過程での本来のプログラムが不可逆的に破壊される現象の解明、生後の免疫系の発達、脳神経系の発達などにかかわる現象の解明）のうち、今年は、特に生殖過程における異常に注目し、遺伝子突然変異に起因する生殖器異常（hgn/hgn ラット）と in utero TCDD 暴露により誘発される生殖器系の異常について、検討した。

hgn/hgn 系統ではその原因遺伝子が BN 系との戻し交配とマイクロサテライトリンケージにより、第 10 染色体にマップされ、完全連鎖する複数のマイクロサテライトマーカーが RH パネルにより比較的狭い範囲で配列決定された。マウスの相同な染色体の情報に基づき精巣で発現している遺伝子について調査する必要性が生じた。既知の精巣発生に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子発現が確認され、hgn の正常対立遺伝子が、セルトリ細胞の増殖や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が高くなった。精巣発生に関わる遺伝子で環境により影響される遺伝子の探索がよりいっそう重要になると考えられる結果が得られた。

TCDD の発生影響については、予備実験ながら、精巣上体の部分欠損、精子数と運動のうには異常なしとの既報の成績は再現されるとともに、交尾行動は過剰なのに射精障害があり、精子に授精能がないという新知見が得られた。精巣上体など副生殖器に関する機能異常を解明する必要と、組織特異的な転写調節にかかわる環境影響という新たなテーマが生じた。

研究者協力者

鈴木 浩悦（日本獣医畜産大学 助手）
斎藤 賢一（日本医科大学医療技術専門学校 助教授）
尼崎 肇（日本獣医畜産大学 助教授）
川西 廣明（（財）動物繁殖研究所 研究員）

A. 研究目的

生殖機構の発達と生殖細胞の分化には遺伝と環境が関わっている。発生中あるいは生後初期にこれらの遺伝的に制御された分化過程が環境により影響されると、本来のプログラムが変更され、形態的にも機能的にも不可逆的な異常が生じる可能性がある。内分泌攪乱化学物質についてはこのような有害影響が懸念されている。近年、ノックアウト動物など新規の分子的手法等の開発に伴い、分子発生学の長足な進歩があり、一方で内分泌攪乱化

合物の野生動物とヒトの健康影響に関する研究が進展するとともに、エストロゲン受容体を介する反応に代表されるようにいくつかの作用機序が判明しつつあるとともに、さらに謎が謎を生む状況が生じている。既知の機序だけではこれらの全体像は説明できない。これらの化学物質が極めて多様多様で未知の生物作用が含まれていると想定されることと、発生過程を制御している遺伝子の種類とその発現カスケードがまだ解明されておらず、いずれの過程が環境により影響を受けやすいかなどについてもまだ分かっていないことが多いからである。

本研究の最終的な目的は、環境と遺伝子の応答あるいは応答する機能の中で有害作用との関連で重要な分子について、特殊な事例と普遍的な事例の両面から情報を得ることであ

る。遺伝的な因子に関しては、当教室の環境において突然変異が発生したと考えられ、既に近交化されている雄の生殖腺の低形成と不妊を主徴とし、それらの異常が常染色体性単純劣性で遺伝するラットの系統 (hgn 系) を用いて、その病理発生の解明と原因遺伝子の同定を行う。環境因子としては、他の研究費により TCDD の in utero 単回投与により誘発された生殖器系に形態レベルと機能レベルで異常をもつラットあるいは、初期発生に関する有害影響に関する研究が進行しており、将来的に本研究とドッキングすることになる。当面は、病理発生の解明を主体とする。これらの、遺伝的異常と環境誘発性の異常において、正常動物と異常動物との間で既知および未知の遺伝子の発現レベルを質的および量的に比較評価し、毒性マーカーとして有用な分子を検索する。

B. 研究方法

1) 突然変異ラットの遺伝解析：

精巣形成不全症ラット (hgn/hgn) は常染色体性単純劣性で発症し、雄にのみ不妊症を引き起こす。これまでの病態解析から、原因遺伝子は生殖腺の発達および生殖細胞の分化にとって重要な因子であると考えられる。このため、本年度は、原因遺伝子の同定を目指して、hgn 遺伝子の染色体への当てはめと、hgn 遺伝子座周辺の詳細なリンケージマップの作成を行った。精巣の異常と併発する腎臓の低形成症を確認することにより、雌の hgn/hgn を同定し、これに Brown Norway (BN) 系統の雄を交配し、得られた F1 の雄をさらに雌の hgn/hgn に戻し交配することで、総数 1000 匹以上の戻し交配世代の動物を作成した。連鎖解析には、この内、精巣で異常を判定できる雄 500 匹を用いた。解析に用いたマイクロサテライトのプライマーは、Research Genetics 社から購入した。PCR および電気泳動によるタイピングは常法に従った。500 匹以上の戻し交配動物でもなお hgn と完全連鎖するマイクロサテライトマーカーに関しては Rat/Hamster Radiation Hybrid panel (RH パネル) により配列した。hgn 遺伝子のマウスゲノム上

での位置を推定するために、ラットとマウスで共用できるマイクロサテライトを検索し、(ALS×JF1) F1×ALS のマウスバッククロスを用いて、タイピングを行った。hgn 遺伝子座存在領域と相同なマウス第 11 染色体の領域にマップされているいくつかの候補遺伝子について、正常および発症の精巣と腎臓でその発現を調査した。

2) 突然変異ラットの生後初期精巣における病態解析：

本症ラットにおける生後初期の精巣に関して、抗-PCNA 抗体によりセルトリ細胞と始原生殖細胞の増殖活性を評価するとともに、TUNEL 法 (in situ apoptosis detection kit ; TaKaRa) によりアポトーシスを呈する細胞を検出した。さらに、生殖腺分化に重要な転写調節因子である WT-1、AdBP/SF1、Sox9、および DAX-1 の発現を出生仔の正常および発症ラットの精巣で調査した。

3) TCDD の生殖発達毒性に関する予備実験：

Wistar Imamichi rat の近交系を用いて、1 群 3 匹の妊娠 15 日ラットに TCDD (1、2、または 4 μ /g) を 1 回投与し、雄性生殖器の発達過程に対する毒性を調査した。

(倫理面への配慮)

TCDD の取り扱いに関し、環境汚染を防止するためにヘパフィルター付きの陰圧チェンバー内で実験し、動物を含む TCDD 汚染物については安全な焼却法が開発されるまで、凍結保存する。

C. 研究結果

1) 突然変異ラットの遺伝解析：

現在までに精巣形成不全症ラットの病因遺伝子 hgn をラット第 10 染色体上の D10Rat159 から D10Rat68 の 1.4cM の範囲に絞り込み、連鎖するマイクロサテライトを RH パネルを用いて配列できたため、YAC ないし BAC によるコンテイング作成のための準備が整った。また、hgn が存在する染色体領域と相同なマウス第 11 染

染色体上では、hgn 遺伝子座は、D11Mit364 (44cM) と Nos2 (NO 合成酵素) (45.6cM) の間に位置することが判明した。この領域にマップされたマウスの遺伝子の内、精巣で発現が確認されているもの (Ywhae および Supt6h など) に関して、ラットの遺伝子を単離するとともに、発症精巣での発現を確認した。

2) 突然変異ラットの生後初期精巣における病態解析:

発症精巣の病態解析では、生後初期精巣においてセルトリ細胞の増殖低下とアポトーシス、始原生殖細胞の異常分裂とネクロティックな細胞死が認められた。WT-1、AdBP/SF1、Sox9、および DAX-1 は、発症精巣において発現が認められた。

3) TCDD の生殖発達毒性に関する予備実験:

雄の出世仔において、精巣上体の部分欠損を含む生殖器の異常と成熟後の生殖器重量の用量相関的な減少、交尾行動の異常を伴う妊孕能の消失を認めた。

D. 考 察

突然変異ラットの遺伝解析では、今回の実験で病因遺伝子 hgn を同定するための条件を整備することに成功した。これまでの病態解析から hgn の正常アليلは、生殖腺の発生分化および生殖細胞の維持に関して重要な新規の分子をコードしている可能性が高い。従って、今後は、hgn 存在領域を網羅するコンテイングの作成と人およびマウスの染色体相同領域にマップされている候補遺伝子の検索を行う必要がある。内分泌攪乱物質等の雄に対するエストロゲン様作用は、胎生期および生後成熟期のセルトリ細胞の数の減少や機能低下を通じて、生殖細胞の減少を引き起こすことが示唆されている。しかし、それを直接証明した報告はほとんど見られず、胎生期のセルトリ細胞の増殖を制御する因子も、精巣内に存在することが示唆されているが未だ同定されていない。

この点では、今回本症ラットで、他の突然変異動物では報告されていないセルトリ細胞の増殖低下やアポトーシスが認められたことは、本症の精巣形成不全のモデルとしての有効性を証明している。今回の実験から、明らかに本症ラットはセルトリ細胞の増殖と機能維持にとって重要な因子を消失しており、そのことが減数分裂開始以前の本来細胞分裂休止時期にある始原生殖細胞 (前精祖細胞) の異常分裂とその後の細胞死を生じている可能性を示している。従って、今後本症ラットの原因遺伝子の同定とともに、本症ラットの精巣で発現が低下あるいは消失している分子を検索することにより、セルトリ細胞の増殖および機能維持に働く因子あるいはセルトリ細胞自体の機能マーカーを同定できる可能性がある。

TCDD の子宮内曝露実験では、2 μ g/kg 用量の1回投与が、雄の精巣と副生殖器の低形成だけでなく、雄の交尾行動の異常 (過剰) と精子運動性や数には異常がないのに妊孕能の消失を引き起こすことを明らかにした。Hgn の場合とは対照的に、精巣上体が精子の成熟過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの異常の成立のメカニズムについては、ミュータントラットの解析と同様に、形態学的手法のみならず、蛋白の2次元電気泳動法や、mRNA のサブトラクト、ディファレンシャルディスプレイによる新規分子の同定、マイクロアレイによる発現差異のある分子の検索を行うことが有効であろうと思われる。

E. 結 論

内分泌攪乱化学物質等の影響に関する調査研究として、その悪影響として懸念されるいくつかの生物作用のうち、特に発生過程そのものの遺伝子による制御と環境による修飾というテーマには、生殖過程での本来のプログラムが不可逆的に破壊される現象の解明以外に、生後の免疫系の発達、脳神経系の発達などにかかわる現象の解明も含まれる。今年は、特に生殖過程における異常について、遺伝子

突然変異に起因する異常と in utero TCDD 暴露により誘発される生殖器系の異常が、この分野での研究モデルになりうるかという観点から検討した。

その結果、hgn/hgn の原因遺伝子が BN 系との戻し交配とマイクロサテライトリンケージにより、第 10 染色体にマップされ、完全連鎖する複数のマイクロサテライトマーカーが RH パネルにより比較的狭い範囲で配列決定された。マウスの相同な染色体からの情報に基づき精巣で発現している遺伝子について調査する必要性が生じた。既知の精巣発生に重要な役割を果たしていると考えられる遺伝子発現が確認され、hgn の正常対立遺伝子が、セルトリ細胞の増殖や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が高くなった。精巣発生に関わる遺伝子で環境により影響される遺伝子の探索がよりいっそう重要になると考えられる結果が得られた。

TCDD の発生影響については、予備実験ながら、精巣上体の部分欠損、精子数と運動のうちには異常なしという成績が再現されたが、交尾行動は過剰なのに射精障害があり、精子に受精能がないという新知見が得られた。精巣上体など副生殖器に関する機能異常を解明する必要と、組織特異的な転写調節にかかわる環境影響という新たなテーマが生じた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki H, Fukaya S, Saito K, and Suzuki K (2000) Mapping of a locus on rat chromosome 11 responsible for osteochondrodysplasia (ocd). Mammalian Genome (in submission)
2. Akimoto T, Suzuki H, Arai Y, Nakama K and Suzuki K (2000) A locus responsible for dominant hairless gene (Ht) is located on rat chromosome 10. Experimental Animal (accepted)
3. 鈴木勝士 (1999) エストロンの初期鶏胚の発生に及ぼす影響、内分泌攪乱物質学会ニュースレター、4: 2-3.

4. Suzuki H, Kokado M, Saito K, Kunieda T and Suzuki K (1999) A locus responsible for hypogonadism (hgn) Mammalian Genome 10 (11) :1106-1107.
5. 板垣昌志、阿部省吾、阿部榮、酒井 淳一、鈴木勝士 (1999) 乳牛の潜在性乳房炎と乳頭口異常の関連、日本獣医師会雑誌 52 (9) 561-564.
6. 鈴木勝士 (1999) 環境ホルモンと獣医師の役割、アニマリタリオン、vol.9:1.

2. 学会発表

1. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (2000) マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位 (第 2 報)、子情報通信学会、ME とバイオサイバネティクス研究会
2. 斉藤賢一、雑賀寿和、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一 (1999) マイクロ波照射がウサギおよびサル之眼におよぼす影響、電気学会計測研究会 IM99-66 p39-42
3. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、横山修一 (1999) EI および ddY マウス脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発反応 (ABR) の解析、電気学会計測研究会 IM99-65 p.33-37
4. 斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士、内堀雅隆、横山修一、辻 隆之 (1999) 先天性癲癇モデル動物 (EI Mouse) の睡眠時脳波における加齢に伴う変化、第 31 回成長談話会大会 (抄録 p22)
5. 高須正規、高橋純子、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士 (1999) EI および ddY マウスの脳硬膜上からの短潜時聴覚脳幹誘発反応 (ABR) の解析、第 127 回日本獣医学会
6. 深谷幸代、鈴木浩悦、高橋純子、丸ひろみ、井出雅子、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士 (1999) 骨軟骨形成不全症 (ocd/ocd) ラットの原因遺伝子は第 11 染色体上に存在し D11Mgh3 と連鎖している、第 127 回日本獣医学会
7. 醍醐久美、鈴木浩悦、中宮英次郎、八木

- 未央、岡田美香、新井豊、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：hgn 遺伝子の雌表現型におよぼす影響の評価、第 127 回日本獣医学会
8. 太田千春、徳力剛、高須正規、平林美紀、鈴木浩悦、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）腎低形成症の腎不全状態の基礎的評価、第 127 回日本獣医学会
 9. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、新井豊、八木未央、竹中基郎（1999）鶏胚でのエストロンによる発生かく乱とエストロゲンレセプター mRNA の発現、第 127 回日本獣医学会
 10. 鈴木浩悦、中宮英次郎、醍醐久美、岡田美香、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索：連鎖するマーカーの整列化とマウス 11 番染色体上での位置の推定、第 127 回日本獣医学会
 11. 尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、小川実幸、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程におけるテネイシンと NCAM の発現分布、第 127 回日本獣医学会
 12. Saito, K., H. Suzuki and K. Suzuki (1999) Adverse developmental effects of low intensity radio frequency radiation at 428MHz on chick embryo. 2nd joint international symposium of Congenital Anomalies in Korea. (10/1~10/2: chunchon)
 13. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラット精巢形成不全症病因遺伝子の探索、日本アンドロロジー学会
 14. 鈴木勝士、斉藤賢一、鈴木浩悦、竹中基郎、八木未央（1999）鶏胚でのエストロゲンレセプター mRNA の発現とエストロンによる発生かく乱、第 39 回日本先天異常学会
 15. 斉藤賢一、醍醐久美、横山修一、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）直流磁場照射のマウス胎子におよぼす影響、第 39 回日本先天異常学会
 16. 小川実幸、尼崎肇、鷹栖雅峰、岩間良子、日比佐知子、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程にみられる上皮細胞の増殖とアポトーシス、第 2 回日本組織工学会
 17. 鈴木浩悦、斉藤賢一、国枝哲夫、鈴木勝士（1999）ラットの第 10 染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：高度に連鎖するマーカーの検索とマウス第 11 染色体上での位置の推定、第 46 回日本実験動物学会
 18. 中宮英次郎、鈴木浩悦、醍醐久美、八木未央、平林美紀、斉藤賢一、鈴木勝士（1999）ラット 10 番染色体上に存在する精巢形成不全症病因遺伝子の探索：病原因遺伝子周辺のマップ作成、第 126 回日本獣医学会
 19. 松倉克仁、鷺巣 誠、倉繁裕美、尼崎 肇、中條真二郎、清水一政、浦川紀元、鈴木勝士（1999）犬糸状虫感染犬の肺動脈病変形成に対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬およびアンギオテンシン・受容体拮抗薬の効果、第 126 回日本獣医学会
 20. 岩間良子、小川実幸、日比佐知子、尼崎 肇、鷹栖雅峰、福島正則、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウス口蓋ヒダ形成過程における上皮プラコード領域での上皮細胞の増殖と移動、第 126 回日本獣医学会
 21. 高橋純子、高須正規、斉藤賢一、鈴木浩悦、鈴木勝士（1999）マウスの脳硬膜上からの聴覚脳幹誘発電位、ME とバイオサイバネティクス研究会、信学技報 Technical Report of IEICE, MEB98-126
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. 実用新案登録
なし。

6. 塩素化芳香族による生殖機能への影響評価

研究者 大村 実 (九州大学大学院医学研究院 助手)

研究要旨

廃棄物焼却の際にはダイオキシン以外にも様々な塩素化芳香族化合物が発生するが、そのうちの一つであるポリ塩化ナフタレン類が哺乳動物の生殖機能に与える影響を検討した。体重 1 kg あたり 1 μ g の 1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン (1,2,3,4,6,7-HxCN) を妊娠 14 日目-16 日目のラットに投与した結果、オスの仔ラットでは精子発生開始時期の早期化が認められた。オスの仔ラットでは血清ゴナドトロピン濃度の上昇開始時期も早まっていたと考えられ、ゴナドトロピン分泌に対する影響が精子発生開始時期早期化の原因ではないかと推定された。

研究者協力者

増田 義人 (第一薬科大学物理分析学教授)
平田美由紀 (九州大学大学院医学研究院助手)
尾方 里香 (九州大学大学院医学研究院大学院生)
松浦 俊明 (九州大学大学院医学研究院大学院生)

Such remarkable changes in semen quality...is more probably due to environmental rather than genetic factors. Some common prenatal influences could be responsible both for the decline in sperm density...

A. 研究目的

「ヒトの精子が年々減少しており、私たちの身の回りにある様々な化学物質がその原因なのではないか？」

こういった危機感がここ数年、社会的に強まっている。いわゆる“環境ホルモン問題”に関連して、野生生物での生殖異変の事実や、ヒトでの生殖異変の可能性を示しているのかもしれない研究結果がマスコミによって大々的に取り上げられたことがその原因である。野生生物での生殖異変についてはここでは触れないが、ヒトでの生殖異変、特に精子の減少でその火付け役となったのが、1992 年に BMJ に発表された Skakkebaek らの論文である [1]。この論文の内容はこの 50 年間でヒトの精液中の精子濃度が半減したという衝撃的なものであり、研究者の間だけでなく社会的にも大きな反響を巻き起こした。また、著者らはこの論文の考察の部分で、

と述べており、胎児期における（化学物質を含む）何らかの環境要因による影響が精子濃度低下の原因である可能性を指摘している。確かに多くの化学物質が実験動物では精子の減少を引き起こすことが報告されており、1,2-ジブロモ-3-クロロプロパン [2] や 2-ブロモプロパン [3] などのようにヒトでも精子の減少を引き起こすことが確認されている化学物質もいくつか存在する。特に近年大きな注目を集めているのが内分泌かく乱化学物質（いわゆる“環境ホルモン”）である。内分泌かく乱化学物質とは「生物の内分泌系をかく乱することによって生物やその子孫に何らかの悪影響を与える化学物質」のことであり、現在知られている内分泌かく乱化学物質のほとんどは女性ホルモン様の作用を有する可能性が指摘されている。胎児期に女性ホルモン様の作用を有する化学物質に曝された場合には、男性の生殖器系に不可逆的な悪影響が発生するという仮説があり ([4]、図 1)、このためヒトへの悪影響としては特に男性の生殖

器系への影響の可能性が指摘されている。

しかし、“化学物質に起因するヒト精子の減少”については、現時点では科学的なリスクアセスメントが為されないまま可能性だけが独り歩きしている状態である。まず、ヒトの精子が本当に減っているのかどうかについてだが、Skakkebaek らの論文以降、精子数の経年的推移を検討した同様の論文が数多く発表されたが、精子数の減少を認めたものはむしろ少数である [5]。ヒトの精子数については“現在の各国（各地域）の平均的な精子数はどのくらいか？”というような基礎的なことすら分かっていない状態であり、その減少の有無について云々できるような段階にはない。一方、精子の減少を認めた動物実験では体重 1 kg あたりで 1 日に数十 mg～数百 mg という極めて大量の化学物質が投与されている場合がほとんどである。この投与量をヒトに外挿すると 1 日に数 g から数十 g という摂取量になり、事故に巻き込まれるか自殺しようとしたのでもなければ、摂取することはまず考えられない量となる。このような動物実験のデータからは“その化学物質が精子を減少させるような作用を有するかどうか（ハザードアセスメント）”については判定できるが、“その化学物質に起因する精子の減少が現実には起きうるのか、起きうるとしたらその危険性はどの程度なのか（リスクアセスメント）”については判定できない。要するに、ヒトの精子の減少やそれに対する化学物質の関与について社会的にも非常に関心が高まっており、“科学的な”回答が切に求められているにもかかわらず、科学者はそれに応えきれていないというのが現状だと言える。我々のような toxicologist は、リスクアセスメントに結びつくような動物実験のデータを提供することが求められていると言って良いだろう。そこで本研究では (1) ヒトでの現実的な負荷量を考慮し、(2) 生殖器系への影響を考えた場合に最も影響を受けやすいと考えられる胎児期曝露を想定して、化学物質による生殖器系へ影響を検討する動物実験を行った。

数多くの化学物質の中で、ヒトでも起きうるような低い胎児期の負荷量で実験動物では精子の減少を引き起こすことが最もはっきりしているのが 2,3,7,8-TCDD である。2,3,7,8-TCDD を妊娠メスラットに投与し、オス仔ラットの生殖器系への影響を検討したこれまでの報告を表 1 にまとめた [6-12]。ラットの妊娠期間は 21 日だが、妊娠 15 日目のラットに体重 1 kg あたり数十 ng～1,000ng の 2,3,7,8-TCDD を 1 回投与するだけで仔ラットの精子は減少する。最も低い負荷量で精子の減少を認めたのは 1997 年に発表された Gray らの研究であり、体重 1 kg あたり 50 ng という投与量で射精精液中の精子の減少を認めている。なお、1998 年に WHO のダイオキシンの 1 日耐容摂取量の勧告値が体重 1 kg あたり 1-4 pg と改訂され、これに合わせて 1999 年には我が国の 1 日耐容摂取量も法律で定められたが、体重 1 kg あたり 1 pg という値はこの Gray らの研究結果が根拠となっている。我々が摂取するダイオキシン類の大部分は廃棄物の焼却過程で発生したものであると考えられている。そのため、廃棄物焼却排ガス中のダイオキシン類に対しては社会的にも大きな関心が払われており、詳細なリスクアセスメントも行われている。しかし、我々にとっては意外なのだが、廃棄物の焼却排ガス中にはダイオキシン類以外にも様々な塩素化芳香族化合物が含まれていることにはあまり関心が払われていない。Takasuga らの調査 [13] によると、定常状態で運転中の一般廃棄物焼却炉から発生する排ガス中の塩素化芳香族化合物のうち最も発生量の多いのはポリ塩化フェノール類であり、ついでポリ塩化ベンゼン類、ポリ塩化ナフタレン類、ポリ塩化ピレン類、ポリ塩化ダイベンゾフラン類、そしてダイオキシン類の順となり、上位 3 つの発生量はダイオキシン類よりも 10 倍～100 倍以上も多い。廃棄物焼却排ガスはダイオキシン類の発生源として重要であるが、排ガス中にはダイオキシン類以外にも様々な塩素化芳香族化合物が含まれており、その中にはダイオキシン類と同じ生体作用を有する物質も

含まれていることは無視すべきではない。そこで本研究では廃棄物焼却排ガス中の様々な塩素化芳香族化合物のうち(1)ダイオキシン類よりも10倍あまり発生量が多く、(2)ダイオキシン類と同じ生体作用を有するポリ塩化ナフタレン類を検討対象とした。

ポリ塩化ナフタレン類(以下、PCNsと省略する)とは、図2に示したようにナフタレン環に2-8個の塩素が結合した塩素化芳香族化合物である。PCNsはかつてはHalowaxという商品名で、ケーブルの絶縁被覆材・木材保護剤(シロアリ防除)・潤滑油・可塑剤などに利用するため大量に生産されたが[14]、職業性曝露による塩素性座瘡の多発[14]などが問題となり、現在は生産されていない。ただ、PCNsもダイオキシン類と同様に廃棄物の焼却などに際して非意図的に生成されるため[15]、現在でも環境中に放出されていると考えられる。PCNsは自然環境中に幅広く存在しており[16-18]、最高では河川水中で数ppt、下水中で数ppb、河川堆積物中で数百ppb、下水堆積物中で数ppmというオーダーで検出されている。また、魚肉中からも数十ppt~数千ppt(脂肪あたりに換算すると数ppb~数十ppb)というオーダーで検出されている。また、PCNsは一般人の体内からも検出される。これまでに報告されているヒトの脂肪組織中のPCNsの分析結果を表2に示す[19-21]。だいたいにおいてヒトの脂肪組織中からも数ppbのオーダーでPCNsは検出されている。なお、PCNsはその他の組織と比較して脂肪組織への残留性が特に高く[22-25]、なかでも1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレンは極めて高い残留性を示すことがヒトでも[21]実験動物でも[25]報告されている。

PCNsに曝露された場合にはダイオキシンと同じく塩素性座瘡や肝障害などが発生する[14, 27-29]。また、ダイオキシンはAh受容体を介して様々な酵素活性を誘導し、特にP4501A1の作用によるAryl Hydrocarbon Hydroxylase(AHH)やEthoxyresorufin O-deethylase(EROD)といった酵素活性はダイ

オキシンによって誘導される代表的な酵素活性として知られているが、これらはPCNsによっても誘導される[30-33]。以上の点から、PCNsへの胎児期曝露によっても2,3,7,8-TCDDの場合と同様に仔ラットの生殖器系が影響を受ける可能性が考えられるが、これについては現在までのところ報告がない(正確に言うと、PCNsに成獣が曝露した場合の生殖器系への影響についてさえ全く報告がない)。

B. 研究方法

1. 被験物質

PCNsの異性体のうち、1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン(以下、1,2,3,4,6,7-HxCNと省略する)を被験物質とした。これは、1,2,3,4,6,7-HxCNがAHH活性やEROD活性を最も強く誘導するPCNsの一つであり[33]、また、PCNsの中でも飛び抜けて生体残留性が高いためである[20, 21, 25]。なお、実験に用いた1,2,3,4,6,7-HxCNはCambridge Isotope Laboratoriesより購入した。

2. 実験動物

妊娠12日目のWistar系ラット(Kud:Wistar)14匹を購入し、ランダムに7匹ずつ対照群と1,2,3,4,6,7-HxCN群に分けた。動物は1匹ずつアルミ製ケージに入れ、室温20-24℃、湿度30-60%に保持した部屋で飼育した。飲料水(水道水)および飼料(CE-2、日本クレア)は自由摂取とした。なお、飼料そのものが1,2,3,4,6,7-HxCNやその他の内分泌かく乱化学物質で汚染されている可能性が考えられたので、ランダムに抜き取った飼料について1,2,3,4,6,7-HxCN、DDE、PCBsの分析を後述する方法によって計6回行った。その分析結果を表3に示す。飼料中からは約200pptの濃度でDDEやPCBsが検出されたが、いずれの試料についても1,2,3,4,6,7-HxCNの濃度は検出限界以下であった。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCNの投与スケジュール

1,2,3,4,6,7-HxCNはコーンオイルに溶解し、

体重 1 kg あたり 1 日 1.0 μ g を妊娠 14 日目-16 日目の 3 日間にわたって妊娠ラットに強制経口投与した（投与はラットの胃袋の内容物がほぼなくなっていると考えられる午後 4 時-午後 5 時の間に行った）。購入した 1,2,3,4,6,7-HxCN は n-ノナンに溶解されていたので、対照群には等量の n-ノナン（体重 1 kg あたり 1 日 0.01 ml、純度 >99%、東京化成）をコーンオイルに溶解して同様に投与した。1,2,3,4,6,7-HxCN の投与量を体重 1 kg あたり 1 日 1.0 μ g としたのは、2,3,7,8-TCDD の妊娠ラットへの投与実験の多くでこの投与量が用いられていたためである [6, 10, 11]。また、投与時期を妊娠 14 日目-16 日目としたのは、ラットではこの時期に胎仔の性分化が始まるからである。出生後、直ちに仔ラットの数・生死の区別・性別・外表奇形の有無を調べ、可能な限り 1 母胎あたりの仔ラットの数をオス 5 匹・メス 5 匹の計 10 匹に調整した。

4. オス・メスラットに対する影響評価

(1) オスラット

オスの仔ラットでの雄性生殖器系への影響の評価スケジュールを図 3 に示す。体重および肛門性器間距離は生後 1 日目、4 日目、21 日目に測定し、開眼の有無は生後 14 日目に降に調べた。仔ラットの離乳は生後 21 日目に行った。生後 31 日目、48 日目、62 日目、89 日目に、同じ母ラットから生まれた仔ラットからランダムに 1 匹を選んで炭酸ガスによって安楽死させた。安楽死の際に後大静脈から採取した血液から血清を分離し、-80°C で保存した。また、安楽死の際に精巣、精巣上体、前立腺前葉、精嚢を摘除し、計量した。なお、本実験では肛門性器間距離を、その絶対値と、体格の影響を考慮した補正値の二つで比較した。肛門性器間距離は体長に比例すると考えられるため、絶対値のみでの比較には問題があり、体格の影響を考慮した補正が必要とされる。補正値としては絶対値を頭頂部-臀部間の距離で割った値が一般的には用いられるが、仔ラットの体動が激しく頭頂部-臀部間の距離

の測定が困難だったため、本実験では体重の三乗根で割ることで補正を行った。このような補正を行ったのは体重が体長の三乗に比例すると考えたためである。図 4 は、生後 1 日目の無処置ラット（本実験の対照群ではない）の肛門性器間距離の絶対値、絶対値/体重、絶対値/[体重]^{1/3} を体重別に比較したものである。絶対値および絶対値/体重が体重の影響を強く受けているのに対して、絶対値/[体重]^{1/3} は体重の影響をほとんど受けておらず、肛門性器間距離に与える体格の影響を補正できているものと考えられた。

雄性生殖器系への影響の評価は、生殖器および副生殖器の重量に加えて、homogenization-resistant な精巣の精細胞数および精巣上体尾部の精子数、精子の運動能、精巣の病理組織学的評価、および血清の内分泌学的評価によって行った。

Waring blender で破砕すると通常の細胞は跡形もなく破砕されてしまうが、精子は濃縮して硬くなった細胞核を持つためにその頭部（細胞核に相当）が破砕されずに残る。また、精巣の精細管内に存在する生殖細胞のうち精祖細胞や精母細胞は通常の細胞と同じように Waring blender で破砕されてしまうが、精細胞のうち精子形成が進んだもの（具体的にはステップ 17-19 精細胞）では核の濃縮・硬化が進み、破砕されなくなる。破砕処理をしても破砕されないこのような精細胞を homogenization-resistant な精細胞（以下、破砕抵抗性精細胞と省略する）といい、本実験ではその数を数えることで精子形成が進んだ精細胞の割合を評価した。

精子の運動能は以下のような手順で評価した。精巣上体尾部に切を入れ、これを 0.5% の牛血清アルブミンを加えた 37°C の M199 培養液（Hank's salts および L-グルタミン添加。GIBCO）に 15 分間浸して精子を遊出させた。これを同じ培養液で希釈した後、光学顕微鏡下で 100-150 コの精子を観察した。精子は (a) 前進運動をしている精子、(b) 動いてはいるが前進はしていない精子、(c) 動いていない精子の三つに分類し、(a) および

(b) の割合で精子の運動能を評価した。

精巣の病理組織学的評価には、ブアン液固定・パラフィン包埋・PAS-ヘマトキシリン染色を行った精巣の薄切切片を用いた。そして、(1) 一般的な病理組織学的変化の有無、

(2) すでに二次精母細胞の最初の減数分裂を終えて精細胞が出現している精細管(以下、post-meiotic 精細管と省略する)の割合、(3) Leydig 細胞の密度(一定面積当たりの Leydig 細胞の数)を評価した。

血清中の LH, FSH, テストステロンの濃度はラジオイムノアッセイ法によって測定した。それぞれのホルモン濃度の測定に用いた測定キットは以下のものである: LH; Biotrak rat luteinizing hormone (rLH) [^{125}I] assay system (Amersham Life Science Ltd)、FSH; Biotrak rat follicle stimulating hormone (rFSH) [^{125}I] assay system (Amersham Life Science Ltd)、テストステロン; DPC total testosterone kit (Diagnostic Products Corporation)。

(2) メスラット

メスの仔ラットは出生直後、離乳直後、生後 89 日目に安楽死させ、1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs 分析用の脂肪試料を採取し、 -80°C で保存した(出生直後の仔ラットでは全身丸ごと、それ以外の仔ラットでは腹部脂肪を試料とした)。また、仔ラットが離乳した直後に母ラットも安楽死させ、その腹部脂肪を分析用試料として採取・保存した。

試料からの 1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs の抽出およびクリーンアップのフローシートを図 5 に示す。腹部脂肪(メスの仔ラット(離乳直後、生後 89 日目)および母ラット)、出生直後のメス仔ラット、動物用飼料はアセトン・ヘキサン混合溶媒で抽出し、さらにこの抽出液に水を加えてヘキサン層を分離した。ヘキサン抽出液は無水硫酸ナトリウムによって脱水し、さらに 1-2 日間 50°C に加温してヘキサンを蒸発させた後、試料中の脂肪分を秤量した。精秤した脂肪に内部標準物質として 2,2',3,4,5,5',6-heptaCB 5.0 ng を添加し、KOH/エタノールによってけん化分解した。

これに水を加えて n-ヘキサンで 2-3 回抽出した後、n-ヘキサン抽出液をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、さらに 1 ml 以下にまで濃縮した。1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs の分析は電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフィー(島津 GC-14A, AOC-14)で行った。測定条件を以下に示す。

カラム: J&W Scientific DB5MS (0.25 mm $\times$ 60 m)、カラム温度: 70°C (2 分) — 20°C / 分 — 240°C — 4°C / 分 — 290°C (30 分)、キャリアーガス: 窒素 (99.999%) 0.7 ml / 分

なお、1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE および PCBs の標準物質は Cambridge Isotope Laboratories、関東化学、Analabs Inc. よりそれぞれ購入した。また、n-ヘキサン、アセトン、エタノール、無水硫酸ナトリウム(いずれも PCB 分析用特級)は関東化学から購入した。

5. 統計学的解析

実験結果の統計学的な有意差の検定には t 検定を用いた。そして、5%の危険率で有意差を判定した。

(倫理面への配慮)

この実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、「九州大学医学部における動物実験に関する指針」、「動物の保護および保管に関する法律」(法律第 105 号)および「動物実験の飼養および保管に関する基準」(総理府告示第 6 号)の規制に基づいて行われた。

C. 研究結果

1. 母ラットの出産成績(表 4)および授乳期仔ラットの体重、開眼時期、肛門性器間距離(表 5)

対照群、1,2,3,4,6,7-HxCN 群とも全ての母ラットが出産し、妊娠期間についても二群間に差は認められなかった。対照群の母ラット 1 匹で死産が見られたが(出産仔 15 匹中 2 匹が死産)それ以外の母ラットでは死産は見られず、出産仔数も対照群 12.6 ± 1.9 匹、1,2,3,4,6,7-HxCN 群 13.9 ± 2.3 匹と二群間に差

は認められなかった。また、出産仔の性比(%オス)も対照群 $48.4 \pm 14.9\%$ 、1,2,3,4,6,7-HxCN 群 $49.1 \pm 12.9\%$ であり、二群間に差は認められなかった。なお、明らかな外表奇形はいずれの群の出産仔にも見られなかった。

仔ラットの体重増加および開眼時期については二群間に差は認められなかった。肛門性器間距離についても、絶対値および補正值(絶対値/[体重]^{1/3})のどちらで比較した場合でも、二群間に差は認められなかった。

2. オス仔ラットに対する影響

1) 生殖器・副生殖器重量、精巣上体尾部精子数および精子運動能(表6)

生後 31 日目、48 日目、62 日目、89 日目のいずれの日齢でも、体重に二群間で差は認められなかった。精巣重量および精巣上体重量については、有意な差ではなかったが、精巣重量は生後 31 日目および 48 日目で、精巣上体重量は生後 62 日目で 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の方が重かった。副生殖器の重量については、精囊重量は生後 31 日目、48 日目、62 日目で、前立腺前葉重量は生後 62 日目で 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の方が重く、有意差または傾向差が認められた。精巣上体尾部精子数については生後 89 日目では二群間に差は認められなかった。しかし、生後 62 日目では対照群では $24.7 \pm 8.2 \times 10^6$ だったのに対して 1,2,3,4,6,7-HxCN 群では $45.6 \pm 10.6 \times 10^6$ であり、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では精巣上体尾部精子数が 80%以上も増加していた。なお、精子の運動能については二群間で差は認められなかった。

2) 破碎抵抗性精細胞数および post-meiotic 精細管の割合(図6)

破碎抵抗性精細胞数については生後 62 日目、89 日目では二群間で差は認められなかった(対照群の破碎抵抗性精細胞数および post-meiotic 精細管の割合は表7に示す)。しかし、生後 48 日目では対照群では $36.3 \pm 19.3 \times 10^6$ だったのに対して 1,2,3,4,6,7-HxCN 群では $56.7 \pm 3.9 \times 10^6$ であり、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では破碎抵抗

性精細胞数が約 60%増加していた。つまり生後 48 日目では、1,2,3,4,6,7-HxCN 群でより多くの精細胞が破碎処理によって破碎されないまで精子形成が進んでいたものと考えられた。

post-meiotic 精細管の割合については、生後 48 日目では二群ともほぼ全ての精細管で二次精母細胞の最初の減数分裂が終了しており、二群間で差は認められなかった。ただ、ステップ 19 精細胞(最も精子形成の進んだ精細胞)を含む精細管の割合について見てみると、対照群では $18.3 \pm 11.7\%$ だったのに対して 1,2,3,4,6,7-HxCN 群では $29.0 \pm 2.7\%$ であり、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では約 60%増加していた。これは破碎抵抗性精細胞数についての結果と符合するものである。一方、生後 31 日目では対照群の post-meiotic 精細管の割合が $24.9 \pm 18.6\%$ だったのに対して 1,2,3,4,6,7-HxCN 群では $46.7 \pm 14.4\%$ であり、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では対照群よりも約 90%増加していた。特にステップ7以上に精子形成が進んだ精細胞を有する精細管の割合では 1,2,3,4,6,7-HxCN 群は 7 倍にも増加していた(対照群 $0.4 \pm 0.8\%$ vs. 1,2,3,4,6,7-HxCN 群 $2.8 \pm 3.5\%$)。

3) 出産仔数および性比(%オス)と精巣上体尾部精子数(生後 62 日目)、破碎抵抗性精細胞数(生後 48 日目)、post-meiotic 精細管の割合(生後 31 日目)との関係(図7、8)

本実験では 1,2,3,4,6,7-HxCN 群において、(1) post-meiotic 精細管の割合は生後 31 日目でのみ、(2) 破碎抵抗性精細胞数は生後 48 日目でのみ、(3) 精巣上体尾部精子数は生後 62 日目でのみ、増加していた。(1) - (3) がいずれも永続的な変化ではなく一過性の変化であることから考えると、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では対照群よりも精子発生が常に先行していた=精子発生の開始時期が早まっていた、と推定された(詳細については考察の部分で述べる)。ただ、精子発生の開始時期にはかなりの個体差があり、胎児期の性ホルモンのレベル(子宮内でのオス・メスの位置関係が

影響。両隣がメスの場合には通常よりも高いレベルの女性ホルモンに曝される)や発育の程度(胎仔数に反比例する)によって大きく影響される[34-36]。1,2,3,4,6,7-HxCN 群における精子発生開始時期の早期化にもこれらが関与している可能性が考えられたので、その関与の有無について検討を行った。胎仔数については出産仔数で代表させた。本実験では出産時に帝王切開を行っておらず、子宮内でのオス・メスの位置関係は分からなかった。ただ、オスの比率が高ければより多くのオスがオスに隣接している確率が高まると考えられたので、子宮内でのオス・メスの位置関係については出産時の性比(%オス)で代表させた。図7に出産仔数との関係、図8に出産時の性比との関係を個体別に示す。精巣上体精子数(生後62日目)、破碎抵抗性精細胞数(生後48日目)、post-meiotic 精細管の割合(生後31日目)のいずれにおいても、出産仔数や性比にかかわらず1,2,3,4,6,7-HxCN 群は対照群より増加しており、同群における精子発生開始時期の早期化は胎仔数や子宮内でのオス・メスの位置関係の影響によるものではないと考えられた。

4) 血清中の LH, FSH, テストステロン濃度および精巣の Leydig 細胞密度(表8)

血清中の LH や FSH の濃度は、対照群においては生後31日目ではまだ上昇中であり、生後48日目に最高値に達した後、LH の濃度は横ばい、FSH の濃度は漸減傾向を示した。これは、これまでに報告されているラットの血清 LH 濃度・FSH 濃度の推移と同じであった[37, 38]。これに対して、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では LH 濃度・FSH 濃度ともすでに生後31日目で最高値に達していた。血清中のテストステロンは、対照群においては生後31日目では全個体で検出限界以下だったのに対して、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では7匹中4匹で検出された。1,2,3,4,6,7-HxCN 群の血清テストステロン濃度は生後48日目、62日目、89日目のいずれの日齢でも高値を示し、生後89日目では対照群の約3倍の値

を示した。生後48日日以降では二群間の血清 LH 濃度に差がないにもかかわらず1,2,3,4,6,7-HxCN 群の血清テストステロン濃度が高値を示したことから、同群では Leydig 細胞の過形成が発生している可能性が考えられた。1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精巣の Leydig 細胞密度は生後31日目では対照群よりも高い値を示し、これは血清中の LH 濃度やテストステロン濃度の高値と符合するものであった。しかし、生後48日日以降では二群間に Leydig 細胞密度の差は認められず、Leydig 細胞の過形成はなかったものと考えられた。

3. メスラットにおける 1,2,3,4,6,7-HxCN の体内への蓄積(表9、表10)

母ラットおよびメス仔ラットの脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs 濃度を表9に示す。DDE および PCBs は対照群および1,2,3,4,6,7-HxCN 群の仔ラット・母ラットのいずれからも検出されたが、二群間で濃度の差は認められなかった。一方、1,2,3,4,6,7-HxCN は対照群からは全く検出されず、1,2,3,4,6,7-HxCN 群からのみ検出された。仔ラットの脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度は、出生直後で 22.18 ± 6.59 ppb、離乳直後で 9.78 ± 2.86 ppb、生後89日目で 0.45 ± 0.08 ppb であった。また母ラット(仔ラット離乳直後)の脂肪中の濃度は 5.75 ± 2.81 ppb であった。脂肪に含まれる1,2,3,4,6,7-HxCN の個体あたりの総量を表10に示す。出生直後の仔ラットでは一頭丸ごとを抽出に用いたため、表10に示した値は実測値である。ただ、離乳直後・生後89日目の仔ラットおよび母ラットでは腹部脂肪だけを抽出に用いたので、体重および体重に占める脂肪重量の割合[39-42]から総量の推定値を計算した。その結果、仔ラットの脂肪に含まれる1,2,3,4,6,7-HxCN の総量は、出生直後では 1.48 ± 1.64 ng だったのに対して、離乳直後では13.1-26.2 ng と推定され、離乳直後の値は出生直後と比べると10倍から20倍高い値であった。これは、1,2,3,4,6,7-HxCN の母ラットから仔ラットへの移行では、母乳経由の移行の方が胎盤経由

の移行よりも多いことを示している。一方、仔ラットの離乳直後の母ラットの脂肪に含まれる 1,2,3,4,6,7-HxCN の総量が 178-214 ng と推定されたのに対して、1,2,3,4,6,7-HxCN の仔ラットの脂肪への総移行量（母ラット 1 匹あたり）は出生時までで 19.0 ± 21.3 ng、離乳時までで 133-264 ng と推定された。1,2,3,4,6,7-HxCN の母ラットへの総投与量は 3 日間で 927 ± 42 ng なので、(1) 母ラットに経口投与された 1,2,3,4,6,7-HxCN の 30-50% が消化管から吸収されて脂肪組織に移行し、(2) そのうちの 4-6% が胎盤経由で 35-55% が母乳経由で、仔ラットの脂肪組織に移行したものと推定された。

D. 考 察

PCNs はダイオキシン類と同じく塩素性座瘡や肝障害などの障害を引き起こし、また Ah 受容体を介して誘導される様々な酵素活性を誘導することが知られている [14, 27-33]。そして、代表的なダイオキシンである 2,3,7,8-TCDD では妊娠ラットへの投与によって、仔ラットで精子の減少などの生殖器系の障害が引き起こされることが明らかになっている [6-12]。本実験では PCNs の異性体の一つである 1,2,3,4,6,7-HxCN を妊娠ラットに投与して、オスの仔ラットについて生殖器系への影響を評価したが、これは上述のような根拠から 1,2,3,4,6,7-HxCN でも 2,3,7,8-TCDD と同様に精子の減少などの雄性生殖器系への悪影響が発生することを想定したからであった。しかし予想とは異なり、性的に成熟したと考えられる生後 89 日目では、1,2,3,4,6,7-HxCN 群のラットで精子数（精巣上体尾部）を含めて雄性生殖器系への明らかな影響を認めなかった。ただ、1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精巣上体尾部の精子数は、生後 89 日目では対照群との間に差を認めなかったが、生後 62 日目では対照群よりも 80% 以上も増加していた。これは何を意味するのだろうか？

1. なぜ、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では生後 62 日目で精巣上体尾部の精子数が一過性に増加したのか？

発生機序としては二つのものが考えられた。一つは、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子産生能が増加し（Sertoli 細胞が増加するなど）、そのために精巣上体尾部の精子も増加した、というものである。しかし、この考え方が正しいのであれば、精巣上体尾部精子数の増加は永続的なはずであるが、実際には 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精巣上体尾部精子数の増加は生後 62 日目だけの一過性のものであった。よって、この機序では本現象は説明できない。もう一つは、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子発生の開始時期が早まったというものである。精子発生の開始時期が早まれば精巣上体尾部に精子が出現する時期も早まるため、この部位に精子が現れ始めるあたりの時期ではこの部位の精子数が一過性に増加することになる（ラットで生後 62 日目というのは、精巣上体尾部に精子が現れ始めてから数日後に相当する [37, 43]）。もし、この考え方が正しいのであれば、生後 62 日目より前の時期でも精子発生開始時期の早期化を示す所見が観察されているはずである。本実験で生後 62 日目よりも前では、生後 31 日目と 48 日目に安楽死させた動物がいる。ラットでは、生後 31 日目は post-meiotic 精細管が精巣に出現してから約 1 週間後に相当し、生後 48 日目は破碎抵抗性精細胞が精細管に出現してから約 1 週間後に相当する [37, 44, 45]。つまり、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子発生の開始時期が本当に早まっていたのであれば、生後 31 日目では post-meiotic 精細管の割合が、生後 48 日目では破碎抵抗性精細胞の数が増加しているはずである。そして、図 6 に示したように、1,2,3,4,6,7-HxCN 群ではこれらが実際に認められたのであった。1,2,3,4,6,7-HxCN 群では、生後 31 日目では post-meiotic 精細管の割合が対照群よりも約 90% 増加しており、また、生後 48 日目では破碎抵抗性精細胞の数が約 60% 増加してい

た。本実験では精子発生の開始時期を実際には確認していない。しかし、図 9 に示した 5 コママンガを見れば分かるように、本実験の結果は 1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子発生の開始時期が早まったことを強く示唆するものである。注意しなければならないのは精子発生の開始時期にはかなりの個体差があり、胎児期の性ホルモンのレベル（子宮内でのオス・メスの位置関係が影響。両隣がメスの場合には通常よりも高いレベルの女性ホルモンに曝される）や発育の程度（胎仔数に反比例する）の影響を強く受けるということである [34-36]。しかし、図 7・図 8 で示したように、1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精子発生開始時期の早期化は胎仔数や子宮内でのオス・メスの位置関係の影響によるものではないと考えられた。

1,2,3,4,6,7-HxCN のラットへの胎児期-授乳期曝露では、2,3,7,8-TCDD のような精子の減少などの雄性生殖器系への“悪影響”は認めなかったが、精子発生開始時期の早期化が認められた。悪影響といえるかどうかは分からないが、1,2,3,4,6,7-HxCN の胎児期-授乳期曝露はラットの雄性生殖器系に影響を与えていたのである。

2. なぜ、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子発生の開始時期が早まったのか？

精子発生の制御機構についてはまだよく分かっていないというのが正確なところだが、精子発生は Leydig 細胞から分泌されるテストステロンが（Sertoli 細胞への作用を介して）主に制御しており、さらにテストステロンの分泌は脳下垂体から分泌される LH によって調節されている、と考えられている（図 10a [46]）。脳下垂体からは FSH も分泌され、やはり精子発生の制御に関わっているとされるが、その関与の割合は低いと考えられている。ただ、これは性的に成熟した動物の場合である。性的に未成熟な動物（ラットでは生後 2-3 週間くらいまで）では、FSH が Sertoli 細胞や Leydig 細胞の増殖や機能の制御を主

に行っていると考えられており（図 10b [46]）、また、精子発生の開始も脳下垂体からの FSH の分泌増加が引き金になると考えられている [46]。本実験の対照群の血清 LH 濃度や FSH 濃度は、生後 31 日目ではまだ上昇中であり、生後 48 日目に最高値に達した後、LH 濃度は横ばい、FSH 濃度は漸減傾向を示した。これは、これまでに報告されているラットの血清 LH 濃度・FSH 濃度の推移と同じである [37, 38]。これに対して、1,2,3,4,6,7-HxCN 群の血清 LH 濃度や FSH 濃度は生後 31 日目ですでに最高値に達していた（生後 48 日目以降の推移については対照群と同じであった）。これらの結果は、1,2,3,4,6,7-HxCN 群では脳下垂体からの LH や FSH の分泌開始時期も早まっていたことを示唆するものである。そして、脳下垂体からの FSH の分泌増加が精子発生開始の引き金になる事から考えると、FSH の分泌開始時期が早まったことが 1,2,3,4,6,7-HxCN 群で精子発生の開始時期が早まった原因であると推定された。同様の現象は他の研究者からも報告されている。Almiron らによると [47]、男性ホルモンを単独で生後 5 日目から 35 日にかけてラットの皮下に注射した場合には精子発生の遅れが見られた。しかし、ヒト胎盤ゴナドトロピン（FSH と LH の混合物）を同時に投与した場合には精子発生は逆に促進されていた。Almiron らの実験結果は性的に未成熟な動物での血清 FSH の高値が精子発生を促進することを示しており、これは我々の推論を支持するものである。ただし、今回の我々の研究でも示されたように 1,2,3,4,6,7-HxCN は極めて脂肪組織への残留性が高い物質である。つまり、仔ラットは胎児期・乳仔期には胎盤・母乳經由で 1,2,3,4,6,7-HxCN の曝露を受けていたが、離乳した後も自らの体内に残留している 1,2,3,4,6,7-HxCN の曝露を受け続けていたのである。これは、1) 1,2,3,4,6,7-HxCN 投与群で精子発生が一過性に先行していたのは離乳期以降の曝露が原因であり、2) この現象は精子発生開始時期の早期化によって引き起こされたのではなく、

精子発生速度の上昇によって引き起こされた、という可能性も否定できないことを示す。この点を明らかにするため、現在、我々は研究協力者の松浦を中心として、離乳期以降の1,2,3,4,6,7-HxCN 曝露によるオス・メスラットの生殖器系への影響について検討を進めているところである。

3. 1,2,3,4,6,7-HxCN の母ラットから仔ラットへの移行は？

本実験では DDE および PCBs が対照群および 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の仔ラットや母ラットの脂肪から検出されたが、二群間で濃度の差はなかった。表 3 に示したように本実験で用いた動物用飼料には約 200 ppt の濃度で DDE や PCBs が含まれており、脂肪中の DDE や PCBs は動物用飼料に由来するものと考えられた。なお、市販の動物用飼料の中には高濃度の植物性エストロゲンを含むものがあることが報告されている [48, 49]。つまり、今回の実験は厳密に言えば 1,2,3,4,6,7-HxCN の単独投与実験ではなく、1,2,3,4,6,7-HxCN と様々な“ホルモン活性物質”の“複合投与実験”とも言えるわけであり、本実験で見られた現象が 1,2,3,4,6,7-HxCN 単独の影響ではない可能性もあるわけである。これまで報告されている同様の実験で“ホルモン活性物質”を除去した合成飼料を使用したものは全くと言って良いほど無い。この点は、内分泌かく乱作用に注目した動物実験での今後の留意点と言えるだろう（ただ、実験費がとんでもなく嵩みそうだが...）。

2,3,7,8-TCDD では、母動物から仔動物への移行で母乳経由の割合が胎盤経由の割合よりものはるかに多いことが分かっているが [50]、1,2,3,4,6,7-HxCN ではどうだろうか？ 仔ラットの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度は、出生直後で 22.18 ± 6.59 ppb、離乳直後で 9.78 ± 2.86 ppb であった。つまり、脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度は、離乳直後の時点では出生直後の時点と比較すると半分以下にまで低下していた。ただ、仔ラットは加齢とともに体重が増加し、また、体重に占める脂肪

重量の割合も増加していく [42]。つまり、加齢とともに脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度はどんどん“希釈”されていくわけであり、脂肪中の濃度では母ラットから仔ラットへの移行を論じることが出来ない。そこで脂肪に含まれる 1,2,3,4,6,7-HxCN の 1 個体あたりの総量を比較したのが表 10 である。仔ラットの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN の総量は、出生直後では 1.48 ± 1.64 ng だったのに対して、離乳直後では $13.1-26.2$ ng と推定された。つまり、脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN の総量では、離乳直後の時点では出生直後の時点と比較すると 10 倍から 20 倍も増加していたのである。以上の結果から、1,2,3,4,6,7-HxCN も 2,3,7,8-TCDD、PCBs、PCDFs といったその他の塩素化芳香族化合物と同様に [50-53] 母動物から仔動物への移行で母乳経由の割合が胎盤経由の割合よりも多いことが示された。

4. 1,2,3,4,6,7-HxCN がヒトの生殖器系に与える影響についてどう考えたら良いだろうか？

本実験で、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-授乳期曝露によって精子発生の開始時期が早まることがラットでは示された。それでは、同様の現象がヒトでも起きうるのであるか？ これを検証するためには、本実験でのラットの 1,2,3,4,6,7-HxCN 負荷量と一般人の 1,2,3,4,6,7-HxCN 負荷量を比較する必要がある。本実験で仔ラット離乳直後の母ラット脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度は 5.75 ± 2.81 ppb であった。一方、ヒトの脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度については表 2 に示した三つの研究がこれまでに報告されている [19-21]。Takeshita と Yoshida の研究 [19] は、1970 年代半ばに日本で法医解剖に付された検死体の脂肪を分析したものであり、平均濃度で 6.5 ± 4.5 ppb の PCNs を検出している。Williams らの研究 [20] は、カナダの七つの地域で一般人（1990 年前後？検死体？）の脂肪中の PCNs 濃度を比較したものであり、七地域での PCNs 濃度の平均値は最低 0.56 ppb・最高 4.89 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCN

の平均値（両異性体の濃度を合わせた値。この当時は分析上この両異性体の分離が困難であった）は最低 0.43 ppb・最高 1.04 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCN を除いた六塩化ナフタレンの平均値は最低 0.02 ppb・最高 0.48 ppb であった。Haglundらの研究 [21] は、一般人ではなく、あるカネミ油症患者の脂肪を分析したものであり、PCNs 濃度として 1.401 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCN 濃度として 0.605 ppb を検出している。これらを見る限りでは、本実験での仔ラット離乳直後の母ラット脂肪中の 1,2,3,4,6,7-HxCN 濃度は一般人の 5-10 倍ということになる。また、動物実験の結果から化学物質のヒトへの影響を類推する場合には、種差の存在を無視してはならない。特に 1,2,3,4,6,7-HxCN については毒性や体内動態のデータが乏しく、この種差をどう考えればよいのかは現時点では分からないと言って良い。以上の点から、1,2,3,4,6,7-HxCN がヒトの生殖機能に与える影響について結論を下すには、更なる研究が必要だと考えられた。

E. 結 論

1,2,3,4,6,7-HxCN への胎児期-乳児期曝露で、ラットでは精子発生開始時期の早期化が発生した。脳下垂体からのゴナドトロピン分泌開始時期の早期化がその原因であると推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Minoru Omura, Yoshito Masuda, Miyuki Hirata, Akiyo Tanaka, Yuji Makita, Rika Ogata, and Naohide Inoue. Onset of Spermatogenesis Is Accelerated by Gestational Administration of 1,2,3,4,6,7-Hexachlorinated Naphthalene in Male Rat Offspring. *Environ Health Perspect* 108:539-544 (2000)

2. 学会発表

- ・ 大村 実、増田 義人、平田美由紀、田中 昭

代、尾方 里香、横田 裕之、井上 尚英：1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン胎児期曝露による精巣障害の検討。第 4 回精子形成・精巣毒性研究会。1999 年 7 月 1 日-3 日。東京

- ・ 大村 実：六塩化ナフタレンへの胎児期-授乳期曝露による精子発生開始時期の早期化。第 2 回生殖毒性シンポジウム。1999 年 12 月 4 日。名古屋

G. 参考文献

1. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE : Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305 : 609-613, 1992.
2. Whorton D, Krauss RM, Marshall S, Milby TH : Infertility in male pesticide workers. *Lancet* 2 : 1259-1261, 1977.
3. Kim Y, Jung K, Hwang T, Jung G, Kim H, Park J, Kim J, Park J, Park D, Park S, Choi K, Moon Y : Hematopoietic and reproductive hazards of Korean electronic workers exposed to solvents containing 2-bromopropane. *Scand J work Environ Health* 22 : 387-391, 1996.
4. Sharp RM and Skakkebaek NE : Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 : 1392-1395, 1993.
5. 大村 実：精子は減少しているのか？
福岡医学雑誌 89 : 201-206, 1998.
6. Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol* 114: 118-126 (1992) .
7. Bjerke DL and Peterson RE : Reproductive toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male rats: different effects of in utero versus lactational exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 127 : 241-249, 1994.

8. Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, Peterson RE : Effects of in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol* 127 : 250-257, 1994.
9. Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS : Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 131 : 108-118, 1995.
10. Sommer RJ, Ippolito DL, Peterson RE : In utero and lactational exposure of the male Holzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. *Toxicol Appl Pharmacol* 140 : 146-153, 1996.
11. Gray LE Jr, Ostby JS, Kelce WR : A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 146 : 11-20, 1997
12. Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I : Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. *Toxicol Appl Pharmacol* 150 : 383-392, 1998.
13. Takasuga T, Inoue T, Ohi E, Ireland P, Suzuki T, Takeda N : Determination of halogenated aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons formed during MSW incineration. *Organohalogen Compounds* 19 : 41-44, 1994.
14. Tindall JP. Chloracne and chloracnegens : *J Am Acad Dermatol* 13 : 539-558, 1985.
15. Jarnberg U, Asplund L, de Wit C, Grafstrom AK, Haglund P, Jansson B, Lexen K, Strandell M, Olsson M, Jonsson B : Polychlorinated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in Swedish sediment and biota: Levels, patterns, and time trends. *Environ Sci Technol* 27 : 1364-1374, 1993.
16. Jansson B, Asplund L, Olsson M : Analysis of polychlorinated naphthalenes in environmental samples. *Chemosphere* 13 : 33-41, 1984.
17. Jarnberg U, Asplund L, de Wit C, Grafstrom AK, Haglund P, Jansson B, Lexen K, Strandell M, Olsson M, Jonsson B : Polychlorinated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in Swedish sediment and biota: Levels, patterns, and time trends. *Environ Sci Technol* 27 : 1364-1374, 1993.
18. Takeshita R and Yoshida H : Studies on environmental contamination by polychlorinated naphthalenes (PCN) . IV. Contamination of marine fishes by PCN. *Eisei Kagaku* 25 : 29-33, 1979 (in Japanese) .
19. Takeshita R and Yoshida H : Studies on environmental contamination by polychlorinated naphthalenes (PCN) . III. Contamination of human body by PCN. *Eisei Kagaku* 25 : 24-28, 1979 (in Japanese) .
20. Williams DT, Kennedy B, LeBel GL : Chlorinated naphthalenes in human adipose tissue from Ontario municipalities. *Chemosphere* 27 : 795-806, 1993.
21. Haglund P, Jakobsson E, Masuda Y : Isomer-specific analysis of polychlorinated naphthalenes in Kanechlor KC 400 Yusho rice oil, and adipose tissue of a Yusho victim. *Organohalogen Compounds* 26 : 405-410, 1995.
22. Chu I, Secours V, Villeneuve DC, Andre V : Metabolism and tissue distribution of (1,4,5,8-14C) -1,2-dichloronaphthalene in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 18 : 177-183, 1977.

23. Ruzo LO, Safe S, Jones D, Platonow N : Uptake and distribution of chloronaphthalenes and their metabolites in pigs. *Bull Environ Contam Toxicol* 16 : 233-239, 1976.
24. Oishi H and Oishi S : Tissue distribution and elimination of chlorinated naphthalenes in mice. *Toxicol Lett* 15 : 119-122, 1983.
25. Asplund L, Jansson B, Sundstrom G, Brandt I, Brinkman UAT : Characterisation of a strongly bioaccumulating hexachloronaphthalene. *Chemosphere* 15 : 619-628, 1986.
26. Kimbrough RD : Toxicity of chlorinated hydrocarbons and related compounds. A review including chlorinated dibenzodioxins and chlorinated dibenzofurans. *Arch Environ Health* 25 : 125-131, 1972.
27. McConnell EE : Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various species of animals. *Environ Health Perspect* 60 : 29-33, 1985.
28. Ward EM, Ruder AM, Suruda A, Smith AB, Fessler-Flesch CA, Zahm SH : Acute and chronic liver toxicity resulting from exposure to chlorinated naphthalenes at a cable manufacturing plant during World War II. *Am J Ind Med* 30 : 225-233, 1996.
29. Popp W, Korpoth K, Vahrenholz C, Hamm S, Balfanz E, Theisen J : Polychlorinated naphthalene exposures and liver function changes. *Am J Ind Med* 32 : 413-416, 1997.
30. Campbell AM, Bandiera S, Robertson L, Parkinson A, Safe S : Octachloronaphthalene induction of hepatic microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the immature male rat. *Toxicology* 22 : 123-132, 1981.
31. Campbell AM, Bandiera S, Robertson L, Parkinson A, Safe S : Hepta-, Hexa-, Tetra- and dichloronaphthalene congeners as inducers of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes. *Toxicology* 26 : 193-205, 1983.
32. Engwall M, Brunstrom B, Jakobsson EX : Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) - inducing potency and lethality of chlorinated naphthalenes in chicken (*Gallus domesticus*) and eider duck (*Somateria mollissima*) embryos. *Arch Toxicol* 69 : 37-42, 1983.
33. Hanberg A, Waern F, Asplund L, Haglund E, Safe S : Swedish dioxin survey: Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors for some polychlorinated biphenyls and naphthalenes using biological tests. *Chemosphere* 20 : 1161-1164, 1990.
34. vom Saal FS : Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J Anim Sci* 67 : 1824-1840, 1989.
35. Even MD, Dhar MG, vom Saal FS : Transport of steroids between fetuses via amniotic fluid in relation to the intrauterine position phenomenon in rats. *J Reprod Fertil* 96 : 709-716, 1992.
36. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS : Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401 : 763-764, 1999.
37. Zanato VF, Martins MP, Anselmo-Franci JA, Petenussi SO, Lamano-Carvalho TL : Sexual development of male Wistar rats. *Brazilian J Med Biol Res* 27 : 1273-1280, 1994.
38. De Jong FH and Sharpe RM : The onset and establishment of spermatogenesis in rats in relation to gonadotrophin and testosterone levels. *J Endocr* 75 : 197-207, 1977.
39. Deuel HJ Jr, ed : The occurrence of lipids in the animal as a whole. In: *The lipids. Vol. II: Biochemistry*. New York: Interscience Publishers Inc., 1955 ; 521-706.
40. Ferrell CL and Koong J : Influence of plane of nutrition on body composition, organ size and energy utilization of Sprague-Dawley

- rats. *J Nutr* 116 : 2525-2535, 1986.
41. Clark RG and Tarttelin MF : Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat. *Physiol Behavior* 28 : 963-969, 1980.
 42. Shoeffner DJ, Warren DA, Muralidhara S, Bruckner JV : Organ weights and fat volume in rats as a function of strain and age. *J Toxicol Environ Health, Part A* 56 : 449-462, 1999.
 43. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR : Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathetectomy. *Biol Reprod* 59 : 890-896, 1998.
 44. De Jong FH and Sharpe RM : The onset and establishment of spermatogenesis in rats in relation to gonadotrophin and testosterone levels. *J Endocr* 75 : 197-207, 1977.
 45. Zhengwei Y, Wreford NG, de Kretser DM : A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biol Reprod* 43 : 629-635, 1990.
 46. Sharpe RM: Regulation of spermatogenesis. In: *The Physiology of Reproduction* (Knobil E and Neill JD, eds-in-chief) . New York: Raven Press, Ltd, 1994; 1363-1434.
 47. Almiron I, Domene H, Chemes HE : The hormonal regulation of premeiotic steps of spermatogenesis in the newborn rat. *J Androl* 5 : 235-242, 1983.
 48. Boettger-Tong H, Murthy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S : A case of laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. *Environ Health Perspect* 106 : 369-373, 1998.
 49. Thigpen JE, Setchell KDR, Goelz MF, Forsythe DB : The phytoestrogen content of rodent diets. *Environ Health Perspect* 107 : A182-A183, 1999.
 50. Nau H, Bass R, Neubert D : Transfer of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) via placenta and milk, and postnatal toxicity in the mouse. *Arch Toxicol* 59 : 36-40, 1986.
 51. Masuda Y, Kagawa R, Kuroki H, Kuratsune M, Yoshimura T, Taki I, Kusuda M, Yamashita F, Hayashi M : Transfer of polychlorinated biphenyls from mothers to fetuses and infants. *Fd Cosmet Toxicol* 16 : 543-546, 1978.
 52. Masuda Y, Kagawa R, Kuroki H, Tokudome S, Kuratsune M : Transfer of various polychlorinated biphenyls to the fetuses and offspring of mice. *Fd Cosmet Toxicol* 17 : 623-627, 1979.
 53. Nagayama J, Tokudome S, Kuratsune M, Masuda Y : Transfer of polychlorinated dibenzofurans to the fetuses and offspring of mice. *Fd Cosmet Toxicol* 18 : 153-157, 1980.

Risk assessment of the effects of polychlorinated naphthalenes on reproduction

Minoru OMURA, Department of Hygiene, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University,
Instructor

Key word : Polychlorinated naphthalenes, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene , in utero and lactational exposure, onset of spermatogenesis, gonadotropins , endocrine disruption, rats

Abstract

One μ g/kg of 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene (1,2,3,4,6,7-HxCN) was given to pregnant rats on Days 14-16 of gestation and the effects on the reproductive system of their male offsprings were examined at various phases of sexual maturation. Sperm count in the cauda epididymidis did not change in 1,2,3,4,6,7-HxCN group at postnatal day 89, the age of sexual maturity, but increased to about 180% of the control value at postnatal day 62.

In addition, homogenization-resistant testicular spermatid increased to about 160% of the control value at postnatal day 48 and % post-meiotic tubules increased to about 190% of the control value at postnatal day 31 in this group. These results indicated that the onset of spermatogenesis was accelerated in 1,2,3,4,6,7-HxCN group. Serum concentrations of LH and FSH had already reached the plateau level or maximum level at postnatal day 31 in 1,2,3,4,6,7-HxCN group, suggesting that the onset of LH and FSH secretions from the pituitary gland was also accelerated and that this endocrine disruption was the cause of early onset of spermatogenesis in this group. In the fat of 1,2,3,4,6,7-HxCN-treated dam, 5.75 ± 2.81 ppb of 1,2,3,4,6,7-HxCN was detected at the weaning of their offsprings. This concentration was not so high compared with that in human adipose tissue indicating that 1,2,3,4,6,7-HxCN-induced endocrine disruption may actually occur in human.

下垂体が強い女性ホルモン様作用に曝されることになる。そして、FSHというホルモンの下垂体からの分泌にネガティブフィードバックがかかってしまう（“下垂体からのFSHの分泌は女性ホルモン・男性ホルモンのネガティブフィードバックで調節される”という点が仇となっている）

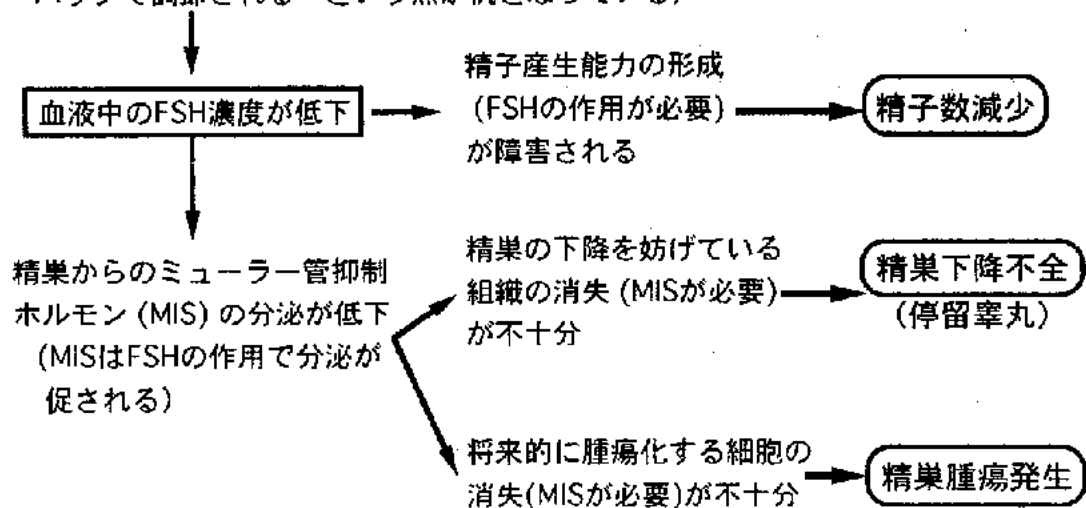


図1 胎児期に女性ホルモン様作用を持つ内分泌かく乱物質に曝露するとどうなるか？
(Sharpe RM & Skkakebaek NS (1993) *Lancet*341, 1392-1395)

表1 2,3,7,8-TCDDを妊娠ラットに投与してオスの仔ラットの生殖器系に影響を認めた研究

報告者(発表年)	文献	影響が出た最小量	最小量で見られた影響
Mablyら(1992)	6	64 ng/kg×1日	精子数減少, 精巣・副生殖器重量減少, 性行動異常など
Bjerkeら(1994)	7	1,000 ng/kg×1日	精子数減少, 精巣・副生殖器重量減少, 性行動異常など
Bjerkeら(1994)	8	700 ng/kg×1日	性行動異常
Grayら(1995)	9	1,000 ng/kg×1日	精子数減少, 精巣・副生殖器重量減少, 性行動異常など
Sommerら(1996)	10	1,000 ng/kg×1日	精子数減少, 精巣・副生殖器重量減少
Grayら(1997)	11	50 ng/kg×1日	射精精液の精子数減少
Faqiら(1998)	12	25 ng/kg×1日+α*	副生殖器重量減少

* 初回投与後も維持量として5 ng/kg/週の2,3,7,8-TCDDの投与を仔ラットの離乳時まで受けている。

ポリ塩化ナフタレンとは？

- 一般廃棄物焼却起源の塩素化芳香族化合物の中ではポリ塩化フェノール、ポリ塩化ベンゼンに次いで生成量が多い。
- 河川・湖沼の底土や野生生物への蓄積が報告されており、ヒトの脂肪組織からも数ppbの濃度で検出される。特に1,2,3,4,6,7/1,2,3,5,6,7-六塩化ナフタレンは脂肪組織への残留性が非常に高い。
- 毒性としては塩素座瘡 (chloracne) や肝障害が認められ、また、AHHやERODといった酵素類の誘導も引き起こすなど、その生体影響はダイオキシンの場合と非常によく似ている。ポリ塩化ナフタレンの中で1,2,3,5,6,7-六塩化ナフタレンが最も生体影響が強い(それでもダイオキシンと比べたら数百分の1の強さ)。

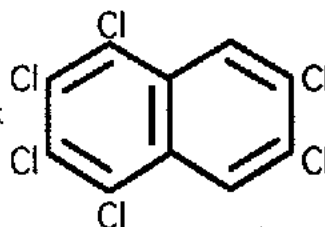


図2 ポリ塩化ナフタレンとは何か？

表2 ヒト脂肪組織中のポリ塩化ナフタレンの分析結果

- (1) 日本人検死体脂肪中のポリ塩化ナフタレン濃度の平均値 (1979年)
PCNs; 6.5 ± 4.5 ppb
- (2) カナダ人検死体脂肪中のHxCN濃度の平均値 (1993年)
PCNs; 0.56-4.89 ppb, 1,2,3,4,6,7-HxCN; 0.43-1.04 ppb
- (3) あるカネミ油症患者の脂肪中のHxCN濃度 (1995年)
PCNs; 1.401 ppb, 1,2,3,4,6,7-HxCN; 0.605 ppb
- (4) 日本人剖検体脂肪中のポリ塩化ナフタレン濃度の平均値 (1999年)
PCNs; 24.5 ppb (愛媛県; 5.9 ppb, 大阪府; 32.0 ppb)
最高値で250 ppb!

表3 動物飼料中の1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs 濃度 (ppb, n=6)

1,2,3,4,6,7-HxCN	<0.01
DDE	0.21 ± 0.03
PCBs	0.15 ± 0.01

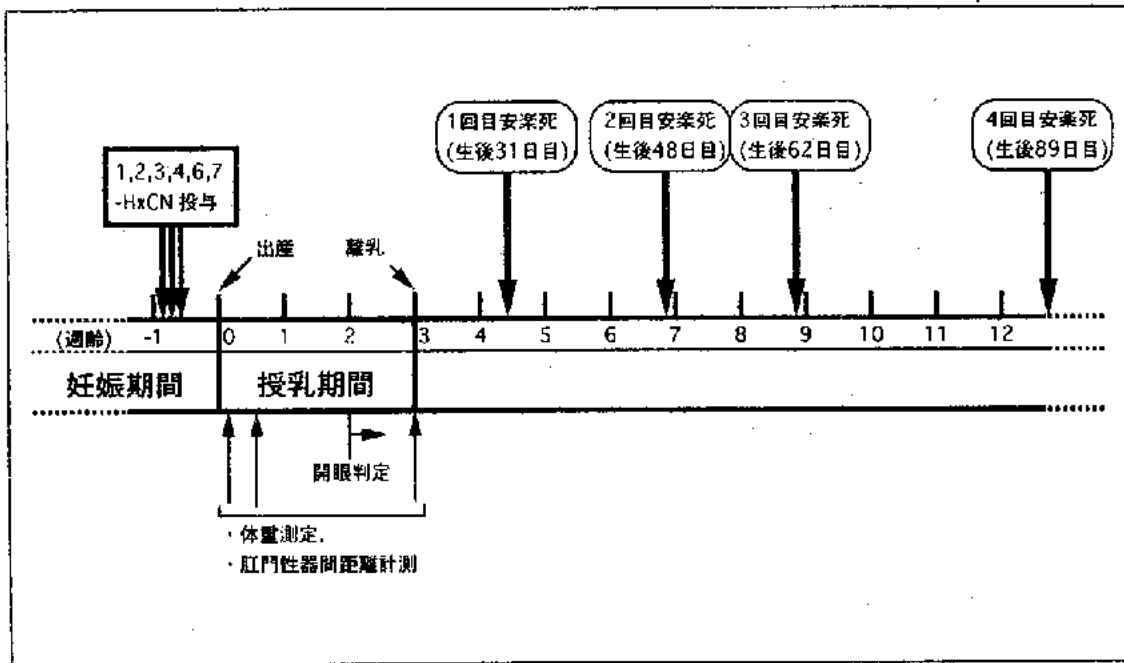


図3 1,2,3,4,6,7-HxCN の投与および仔ラットの評価スケジュール

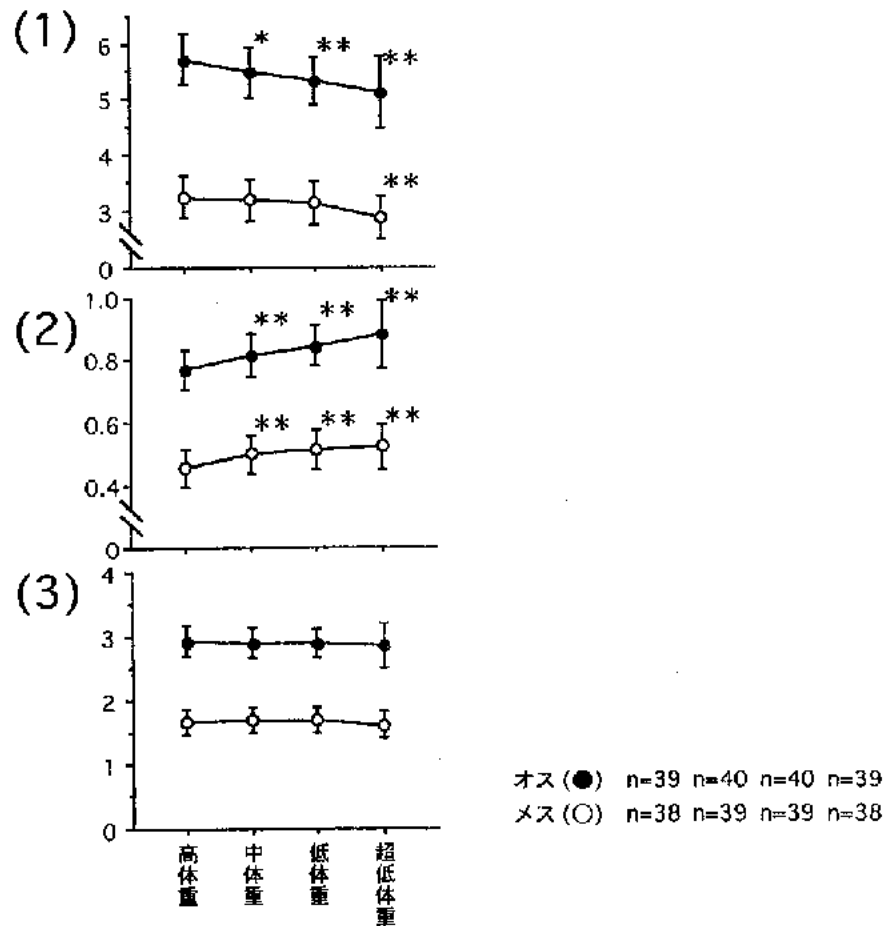


図4 肛門性器間距離の評価指標としての(1)絶対値(mm)、(2)絶対値÷体重(mm/g)、(3)絶対値÷ $\sqrt[3]{\text{体重}}$ (mm/g)の比較(平均値±標準偏差)生後1日目の無処置ラットを体重順に高体重群、中体重群、低体重群、超低体重群に四等分、ANOVA+Fisher's PLSDで高体重群との間の値の有意差を検定(*p<0.05, **p<0.01)

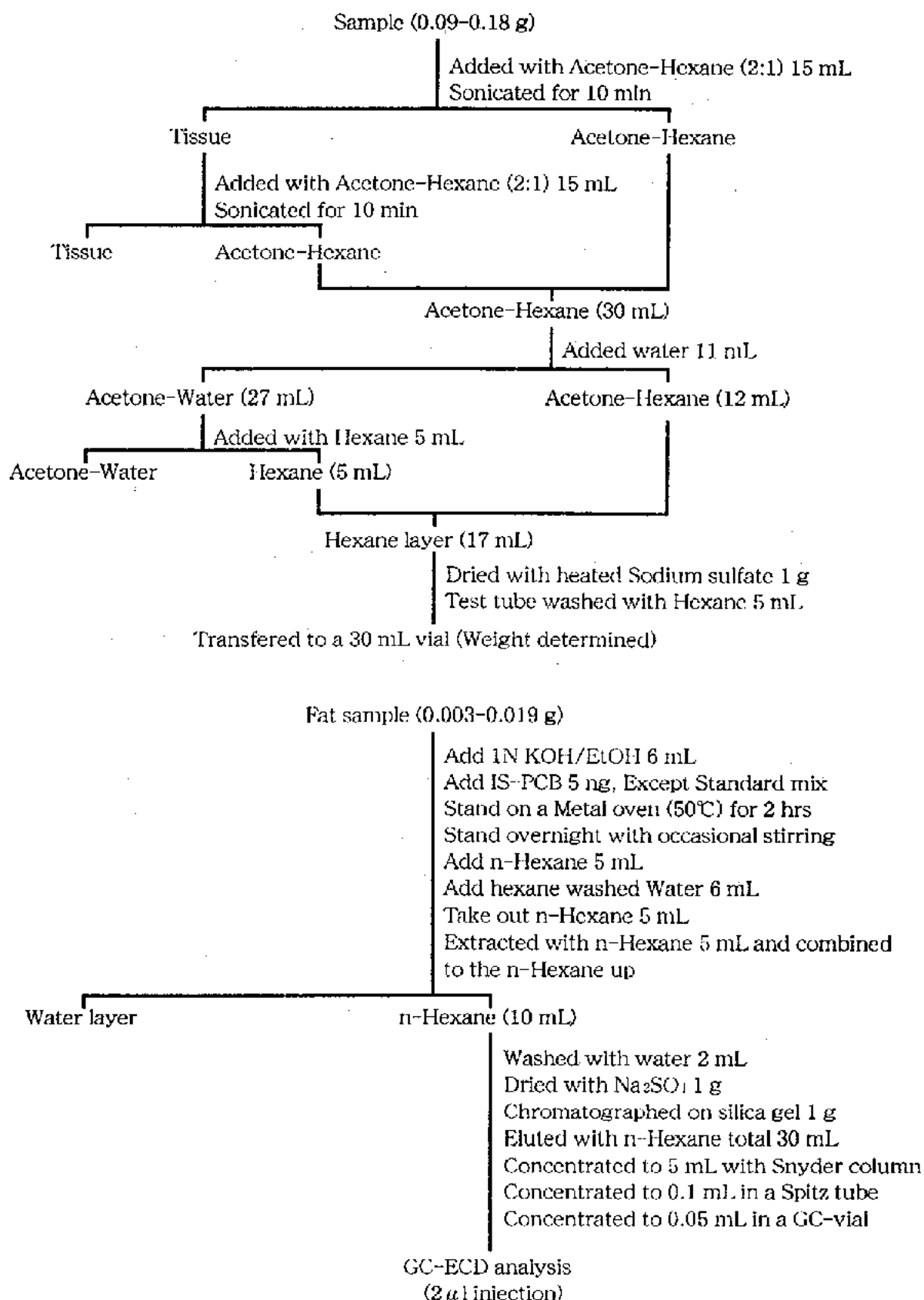


図5 1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs の抽出・クリーンアップ (離乳直後仔ラット)

表4 母ラットの出産成績

妊娠期間 (日)	21.6±1.7	21.0±0.6
出産仔数 (匹)	12.6±1.9	13.9±2.3
出生率 (%)	97.1±4.7	100
性比 (%オス)	48.4±14.9	49.1±12.9

平均値±標準偏差 (n=7)

表5 授乳期仔ラットの体重、開眼時期、肛門性器間距離

	Male offsprings		Female offsprings	
	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN
Body weight (g)				
PND 1	6.7±0.7	6.9±0.7	6.5±0.8	6.7±0.8
PND 4	9.7±1.6	10.7±1.4	9.4±1.8	10.5±1.4
PND 21	44.1±4.3	47.1±6.7	43.2±3.2	46.2±6.5
AGD (mm)				
PND 1	5.1±0.4	4.9±0.3	2.8±0.2	2.7±0.2
PND 4	6.6±0.5	6.6±0.2	3.8±0.3	3.9±0.4
PND 21	14.7±0.7	15.6±0.1	9.9±0.4	10.1±1.1
AGD (mm/g ^{1/3}) ^a				
PND 1	2.7±0.2	2.6±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1
PND 4	3.1±0.3	3.0±0.2	1.8±0.2	2.0±0.5
PND 21	4.2±0.1	4.3±0.1	2.8±0.1	2.8±0.2
Eye Opening (postnatal day)	16.2±0.5	15.9±0.5	16.0±0.5	15.7±0.4

Abbreviations: 1,2,3,4,6,7-HxCN, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene; PND, postnatal day; AGD, ano-genital distance.

All values were calculated and were analyzed using litter means. Results are expressed as mean ± SD (n=7).

^a AGD(mm/g^{1/3})=AGD(mm) / [Body weight(g)]^{1/3}

表6 (副) 生殖器重量、精巣上体尾部精子数、精子運動能

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN
Body weight (g)		
PND31	99.4±13.6	99.8±13.2
PND48	229.9±23.4	242.7±18.1
PND62	332.9±29.4	332.9±19.3
PND89	453.1±29.7	458.5±14.3
Testes weight (g)		
PND 31	0.613±0.175	0.758±0.197
PND 48	2.234±0.274	2.427±0.242
PND 62	3.129±0.209	3.207±0.303
PND 89	3.599±0.343	3.522±0.237
Epididymes weight (g)		
PND 31	0.080±0.013	0.086±0.014
PND 48	0.263±0.045	0.279±0.037
PND 62	0.609±0.067	0.653±0.075
PND 89	1.148±0.167	1.077±0.051
Seminal vesicle weight (g/100 g body weight)		
PND 31	0.019±0.003	0.023±0.003
PND 48	0.067±0.015	0.089±0.021*
PND 62	0.172±0.033	0.205±0.033
PND 89	0.241±0.066	0.261±0.035
Ventral prostate weight (g/100 g body weight)		
PND 31	0.036±0.007	0.043±0.014
PND 48	0.052±0.014	0.052±0.011
PND 62	0.065±0.013	0.079±0.012*
PND 89	0.088±0.021	0.086±0.017
Caudal sperm count (×10 ⁶)		
PND 62	24.7± 8.2	45.6±10.3**
PND 89	170.0±20.9	178.7±11.3
Sperm motility		
%motile sperm		
PND62	82.5±10.8	87.0± 2.6
PND89	86.6± 5.5	88.4± 3.3
%progressively motile sperm		
PND62	49.8±27.5	46.1±23.7
PND89	63.6±26.8	48.2±31.1

Abbreviations: 1,2,3,4,6,7-HxCN, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene; PND, postnatal day.

Results are expressed as mean ± SD (n=7). Statistical significance is analyzed with Student's t-test; * p<0.05, **p<0.01.

表7 対照群の破碎抵抗性精細胞数、post-meiotic 精細管の割合

	PND31	PND48	PND62	PND89
% post-meiotic tubules	24.9±18.6	99.9±0.1	(n.e.)	(n.e.)
Homogenization-resistant testicular spermatid count (×10 ⁶ /testis)	(n.e.)	36.3±19.3	98.8±15.0	150.2±18.0

Abbreviation: PND, postnatal day; n.e., not examined.

Results are expressed as mean±SD (n=7 except at PND 62 (n=6)).

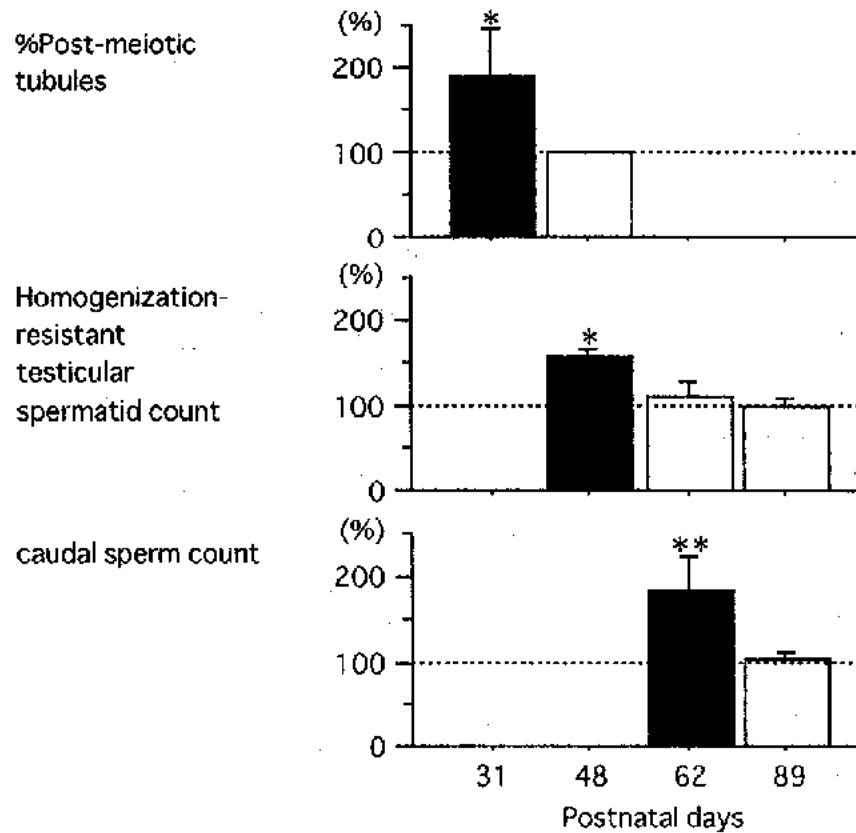


図 6 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の精巣上体尾部精子数、破碎抵抗性精細胞数、post-meiotic 精細管の割合 (%対照群値で表示、平均値±標準偏差)

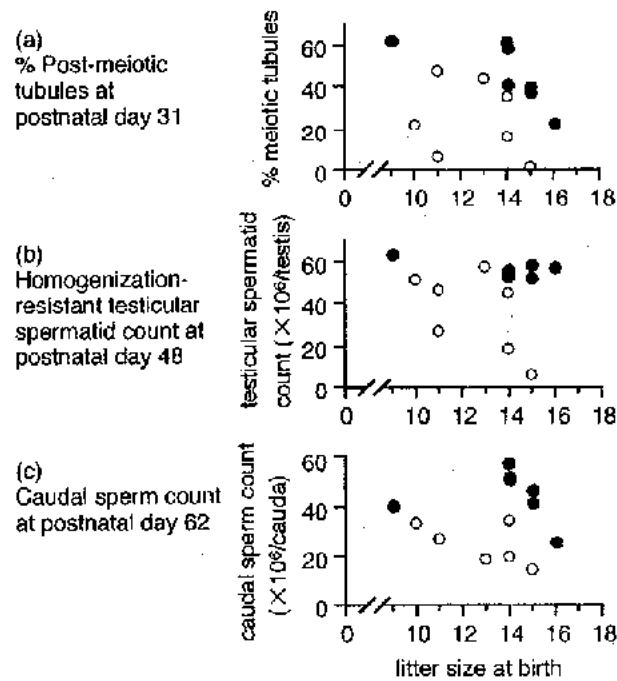


図 7 出産仔数と (a) post-meiotic 精細管の割合(生後 31 日目)、(b) 破碎抵抗性精細胞数 (生後 48 日目)、(c) 精巣上体尾部精子数 (生後 62 日目) との関係。○ ; 対照群、● ; 1,2,3,4,6,7-HxCN 群

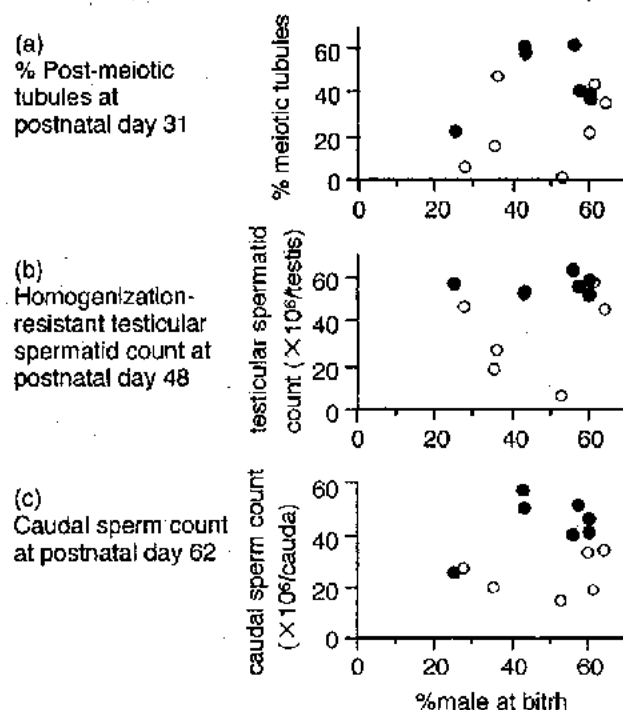


図 8 性比 (%オス) と (a) post-meiotic 精細管の割合(生後 31 日目)、(b) 破砕抵抗性精細胞数 (生後 48 日目)、(c) 精巣上体尾部精子数 (生後 62 日目) との関係。○ ; 対照群、● ; 1,2,3,4,6,7-HxCN 群

表 8 血清中 LH, FSH, テストステロン濃度および精巣の Leydig 細胞密度

		PND 31	PND 48	PND 62	PND 89
Testosterone					
>0.05 ng/ml	Control	0/7	6/7	6/6	7/7
	1,2,3,4,6,7-HxCN	4/7	6/7	7/7	7/7
mean $\pm$ SD ^a	Control	---	15.1 $\pm$ 2.7	119.5 $\pm$ 81.3	83.6 $\pm$ 61.6
	1,2,3,4,6,7-HxCN	16.9 $\pm$ 6.7	37.0 $\pm$ 32.8	219.0 $\pm$ 163.2	237.3 $\pm$ 149.8*
LH (ng/ml) ^a					
	Control	1.9 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 1.3	3.6 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 1.2
	1,2,3,4,6,7-HxCN	3.3 $\pm$ 1.1*	3.4 $\pm$ 1.4	3.7 $\pm$ 1.2	3.6 $\pm$ 0.8
FSH (ng/ml) ^a					
	Control	13.7 $\pm$ 5.3	17.3 $\pm$ 5.9	13.9 $\pm$ 4.7	13.0 $\pm$ 3.7
	1,2,3,4,6,7-HxCN	19.1 $\pm$ 1.7*	18.8 $\pm$ 8.2	14.9 $\pm$ 7.8	11.3 $\pm$ 2.1
Density of Leydig cells (numbers /10,000 μ m ²) ^a					
	Control	2.2 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.5
	1,2,3,4,6,7-HxCN	3.0 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.5	3.1 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.4

Abbreviations: 1,2,3,4,6,7-HxCN, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene; PND, postnatal day. Statistical significance is analyzed with Student's t-test; * p<0.05, **p<0.01.

^aResults are expressed as mean $\pm$ SD.

表9 脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCBs 濃度

		1,2,3,4,6,7-HxCN	DDE	PCBs
Female offsprings				
PND 0	Control	n.d.	10.52±4.89	6.36±1.00
	1,2,3,4,6,7-HxCN	22.18±6.59	13.49±6.37	6.73±3.17
PND 21	Control	n.d.	35.56±12.86	13.59±4.81
	1,2,3,4,6,7-HxCN	9.78±2.86	27.98±9.39	9.28±3.89
PND 89	Control	n.d.	16.44±2.88	9.01±1.07
	1,2,3,4,6,7-HxCN	0.45±0.08	15.86±3.40	9.70±1.01
Dam	Control	n.d.	15.78±2.98	14.06±5.17
	1,2,3,4,6,7-HxCN	5.75±2.81	15.43±3.11	14.57±3.95

Abbreviations: 1,2,3,4,6,7-HxCN, 1,2,3,4,6,7-hexachlorinated naphthalene; PND, postnatal day; n.d., not detected.

Results are expressed as mean ± SD (n=7).

The detection limits of 1,2,3,4,6,7-HxCN were 5 ppb for PND 0 offspring, 2 ppb for PND 21 offspring, 0.05 ppb for PND offspring, and 0.1 ppb for dam.

表10 1,2,3,4,6,7-HxCN 群の母仔ラットの全脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN 量

(1) 出生直後仔ラット (／匹)	1.48±1.64 ng
(2) 離乳直後仔ラット (／匹)	13.1-26.2 ng (推定) ¹⁾
(3) 離乳直後母ラット (／匹)	178-214 ng (推定) ²⁾
(4) 出生時までの全仔ラットへの 移行量	19.0±21.3 ng ³⁾
(5) 離乳時までの全仔ラットへの 移行量	133-264 ng (推定) ⁴⁾

※母ラットへの1,2,3,4,6,7-HxCNの総投与量 927±42 ng

¹⁾ 離乳直後での脂肪の割合を体重の3-6%と仮定,

平均体重 オス; 47.1±6.7 g, メス; 46.2±6.5 g

²⁾ 離乳直後の母ラットの脂肪の割合を体重の10-12%, 体重を310 gと仮定

³⁾ (1)×出生仔数

⁴⁾ [(2)×(授乳したラットの数)] + [(1)×(出生直後に間引きしたラットの数)]

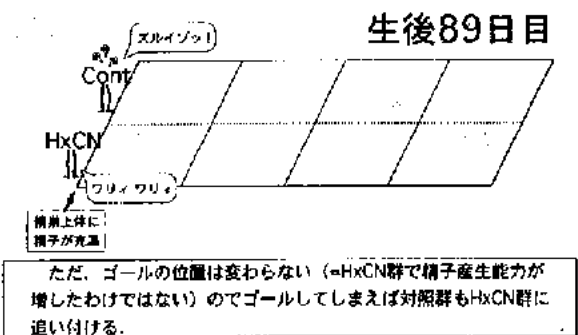
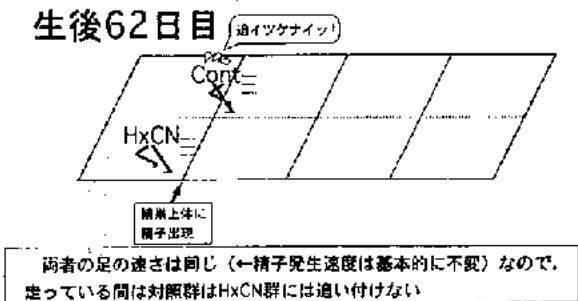
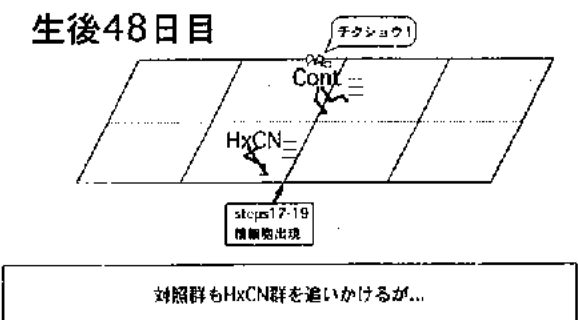
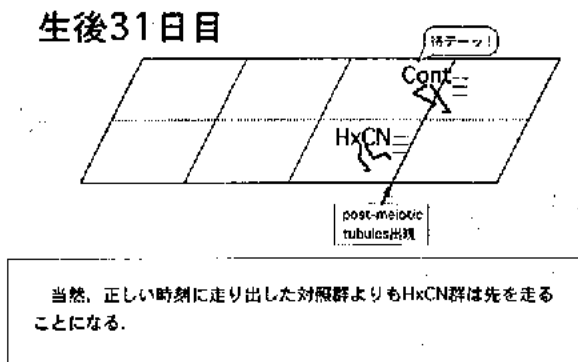
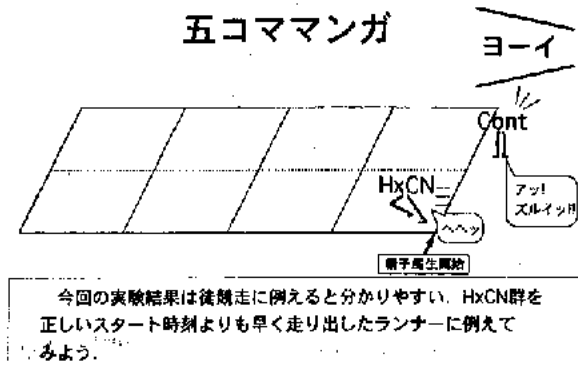
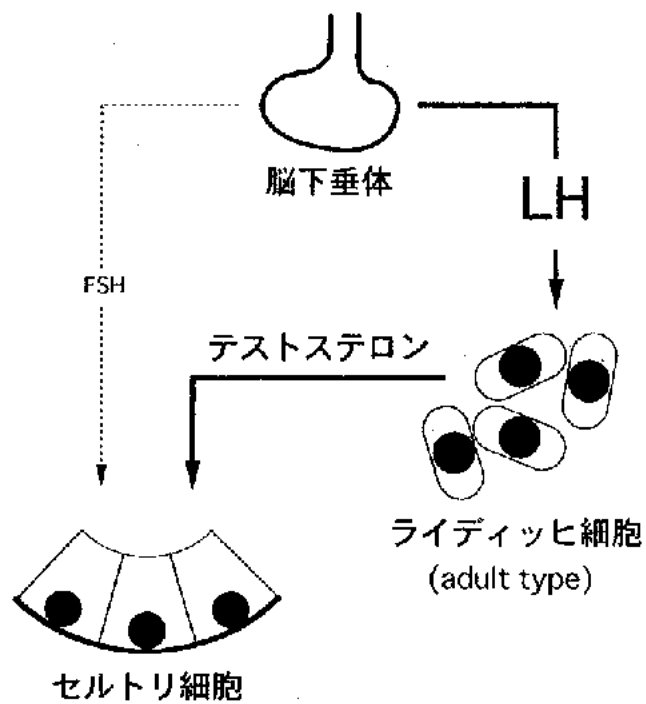
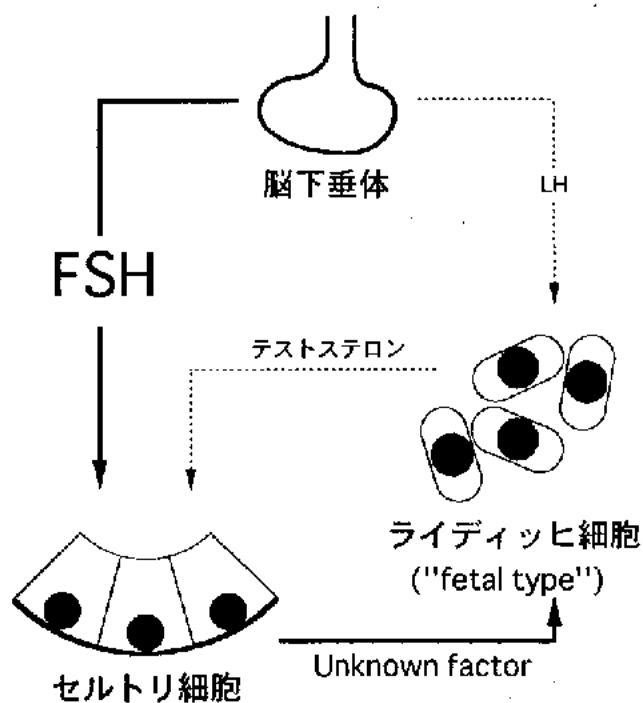


図9 なぜ精子発生開始時期が早まると今回のような実験結果になるのか？



精子発生はセルトリ細胞を介して内分泌学的には制御されており、また、セルトリ細胞の機能は主にLH-テストステロン系の支配下にある。

図 10a セルトリ細胞機能の制御（性成熟後）



ただし、胎児期から生後2週間くらいまではセルトリ細胞の機能は主にFSHの支配下にあり、最初の精子発生の開始もFSHの濃度上昇が引き金となる（ラットの場合）。

図 10b セルトリ細胞機能の制御（生後約2週間まで）

7. 環境生物の免疫影響に関する研究

研究者 小林 隆弘（国立環境研究所）
菊池 慎一（千葉大学海洋バイオシステムセンター）
小宮山一雄（日本大学歯学部）
高橋 慎司（国立環境研究所）
平野靖史郎（国立環境研究所）
古田恵美子（獨協医科大学）
吉田 貴彦（旭川医科大学）
和合 治久（埼玉医科大学短期大学）

研究要旨

生物は免疫機能を発達させ、微生物の侵入を排除し生活している。この免疫機能が低下することは潜在的に病原性のある微生物の侵入を許し、生物にとって致命的な影響を与える可能性がある。バルト海など汚染が進んでいる海域での海棲哺乳動物の大量死は有害化学物質の汚染により免疫機能が低下したことによる感染が原因と推定された。これまで、化学物質が免疫機能におよぼす影響に関する研究のほとんどがマウスなどの実験動物を使ったもので、多様な生物の免疫機能にどのような影響があるかについての検討はほとんどなされていないといっても過言ではない。生物の免疫機能は共通するものと各生物に特異的なものがあるため化学物質の影響の受けかたが異なってくることが予想される。そこで、本研究では、環境汚染有害化学物質が各種生物の免疫機能にどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とし、1) いくつかの指標生物を中心とした生物の免疫機能についての文献調査、2) 有害化学物質が各種生物の免疫機能におよぼす影響についての文献調査、および、3) 今後の研究について考察した。1) については脊椎動物として哺乳類、鳥類、両生類、魚類、また、無脊椎動物として軟体動物、節足動物、環形動物の免疫機能について検討した。2) についても環境汚染有害化学物質の上記の生物への影響を検討するとともに大量死が見られた海棲哺乳類の知見についてもまとめた。これらの調査結果をもとに 3) 今後の研究の方向性について考察し、有害化学物質による環境生物の免疫機能におよぼす影響の研究を強力に推進する必要があることを明らかにした。

研究者協力者

遠藤 直紀（筑波大学）
瀬尾 直美（東京医科大学）
高木 尚（東北大学）
中村 弘明（東京歯科大学）
山口恵一郎（獨協医科大学）

環境中に排出、拡散、蓄積しわれわれの健康だけでなく、自然環境のなかにいる多くの生物の“健康”にも影響を与えている。絶滅の危機に瀕している野生生物が非常に多いことは危機がわれわれ自身にもおよぶ可能性を予感させるものである。

A. 研究目的

工業生産される化学物質は世界で 10 万種、日本でも 5 万種といわれている。化学物質は製造、使用、廃棄の過程で多くの汚染物質を

世界の各地で起きた海棲哺乳動物の大量死は有害化学物質の汚染により免疫機能が低下し病原菌の感染によるものと推定されている。免疫機能の低下は潜在的に病原性のある微生物

物に囲まれて生活している野生生物にとって致命的なものになる可能性がある。ヒトは多くの生物に支えられて生存している。有害化学物質の環境汚染により野生生物が絶滅の危機に瀕することはその支えを失うことにもなりことは重大である。これまで、化学物質が免疫機能におよぼす影響に関する研究のほとんどがマウスなどの実験動物を使ったもので、多様な生物の免疫機能にどのような影響があるかについての検討はほとんどなされていないといっても過言ではない。そこで、本研究では、環境汚染有害化学物質が各種生物の免疫機能にどのような影響を及ぼすかを解明するプロジェクトを立ち上げることを目的とし、いくつかの指標生物を中心とした生物の免疫機能についての調査と有害化学物質が各種生物の免疫機能におよぼす影響についての文献調査を行い、今後の研究をどのようにしていく必要があるかを提言するものである。

B. 研究方法

指標生物を中心とした生物の免疫機能と有害化学物質が各種生物の免疫機能におよぼす影響についての調査はメドラインを中心としたデータベースおよび各研究協力者の専門の書籍などから検討した。

C. 研究結果

1. 環境生物の免疫機能

1.1. 脊椎動物

1.1.1. 哺乳類 (平野靖史郎)

ほ乳類の免疫は、自然免疫と獲得免疫に大きく分けられる。自然免疫とは、生体がもっている原始的異物排除機構であり無脊椎動物にも存在している。一方、獲得免疫は、主要組織適合遺伝子複合体とリンパ球で構成される高次の免疫系であり、脊椎動物でもヤツメウナギのような無顎類や多くの無脊椎動物には存在しない。ほ乳類における自然免疫系と獲得免疫系の概略を表 1-1-1-1 に示す。

ほ乳類の免疫細胞は、多能性幹細胞から各種サイトカインの刺激により産生される (図 1-1-1-1)。図 1-1-1-1 において顆粒球 (好塩基

球、好酸球、好中球)、単球やマクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞が自然免疫系において、T リンパ球、B リンパ球、形質細胞が獲得免疫系においてそれぞれその機能を果たしている。

獲得免疫系における主たる液性免疫は、抗体すなわち免疫グロブリンである。抗体は遺伝子の組み換えにより様々な抗原に対応できるように調整されている。ヒトにおける免疫グロブリンの諸性質を表 1-1-1-2 に示した。一方、自然免疫系における液性免疫の主たるものは補体である。ただし、補体系には抗体分子を認識して獲得免疫系と連動して機能する古典的経路と、分子認識を必要としない第 2 経路がある。また最近ではレクチンを認識して補体を活性化する第 3 経路が発見されたが、第 2、第 3 経路は自然免疫の中でも重要な役割を果たしている。これら補体活性化における 3 つの経路の概略を図 1-1-1-2 に示した。補体は棘皮動物やホヤなどの原索動物においても重要な生体防御機構を荷っていることが知られている。

感染抵抗に関して最も重要なものは、環境汚染物質がほ乳類の免疫系に影響を及ぼす多くの場合において、液性あるいは細胞性免疫機能の低下が起こり、その結果として感染抵抗性が低下することが知られている。貧食細胞による殺菌機構であるが、細胞内に取り込まれた細菌等はリソゾーム中に入り、ファゴソームを形成する。この中では NADPH オキシダーゼより産生されたスーパーオキシド、あるいはそこから派生してくるヒドロキシラジカル、好中球ミエロパーオキシターゼ (MPO) の作用により産生される次亜塩素酸 (HOCl)、一酸化窒素、あるいは中性プロテアーゼなどが作用し殺菌作用を示すものと考えられている (図 1-1-1-3)。また、細菌は補体の作用により殺菌されるほか、オプソナイズされマクロファージ等に貪食されることにより排除される。(図 1-1-1-4)

一方、ウイルスの主たる排除機構は抗体を介するものと考えられている。マクロファージなどの貧食細胞は、抗体の Fc 部分に対す

るレセプターをもっており、抗体と反応したウイルスを貪食する。あるいはこのウイルス抗体複合体に補体が結合した場合さらに効率よくウイルスを貪食するものと考えられる。ウイルスに侵入された細胞は、細胞障害性Tリンパ球やNK細胞によりアポトーシスを起こすことが報告されている。これらの生体からのウイルス排除機構について図 1-1-1-5 に示した。一方、ウイルスの主たる排除機構は抗体を介するものと考えられている。マクロファージなどの貪食細胞は、抗体のFc部分に対するレセプターをもっており、抗体と反応したウイルスを貪食する。あるいはこのウイルス抗体複合体に補体が結合した場合さらに効率よくウイルスを貪食するものと考えられる。ウイルスに侵入された細胞は、細胞障害性Tリンパ球やNK細胞によりアポトーシスを起こすことが報告されている。これらの生体からのウイルス排除機構について図 1-1-1-5 に示した。

寄生虫感染に関しては好酸球(Eo)が主たる役割を演じている。寄生虫に対する抗体であるIgGやIgEは寄生虫表面に結合するが、これら抗体のFc部分に対するレセプターをもつ好酸球は、抗体を介して寄生虫に接着しヒスタミンや主要塩基性タンパク質を(MBP)を産生し、寄生虫に障害を与える(図 1-1-1-6)。

MBPは寄生虫のみならず正常細胞をも傷害することが報告されている。

一般に、環境汚染物質に曝露した生体においては感染時と極めて近い炎症反応がみられる。図 1-1-1-7 は肺におけるマクロファージや好中球の炎症応答を示している。マクロファージからは、好中球遊走因子や好中球の血管内皮細胞への接着を促進する因子が産生される。好中球はこれらの因子の作用により血管腔から肺胞腔内に浸潤する。刺激を受けたマクロファージは肺胞腔内において一過性に肺胞上皮細胞への接着が高まり気管支肺胞洗浄液中の数が低下する。その後、また浸潤した好中球を貪食するとともに、それ自身も単球の遊走や細胞分裂をすることによりその数を増やすことが知られている。ヒトや実験動物の免疫に関する知見は分子生物学の発展に伴い激増しているが、ここでは環境生物の免疫機能を考えるうえでのほ乳類の免疫に関して主要な知見をまとめた。

参考文献

- 1) 日本生化学会編 細胞機能と代謝マップ 東京化学同人(1998)、東京
- 2) I. Roit, J. Brostoff, and D. Male 著(多田 富雄 訳) 免疫学イラストレイテッド 南江堂(1987)、東京

表 1-1-1-1 ほ乳類における自然免疫と獲得免疫

	自然免疫系	獲得免疫系
液性免疫	リゾチーム、補体第2経路、レクチン、急性反応期蛋白(CRP、インターフェロンなど)	抗体、補体古典的経路
細胞性免疫	食細胞 ナチュラルキラー(NK)細胞	T細胞、B細胞
2次刺激に対する応答	小	大
特異的記憶	なし	あり

表 1-1-1-2 ほ乳類における免疫グロブリンの諸性質

免疫グロブリン	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2	sIgA	IgD	IgE
H鎖	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$	$\gamma 4$	μ	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1$ or $\alpha 2$	δ	ϵ
血液中の平均的濃度 (mg/ml)	9	3	1	0.6	1.5	3.0	0.5	0.05	0.03	0.00005
分子量	146,000	146,000	170,000	146,000	970,000	160,000	160,000	385,000	184,000	188,000
糖含量 (%)	2-3	2-3	2-3	2-3	12	7-11	7-11	7-11	9-14	12

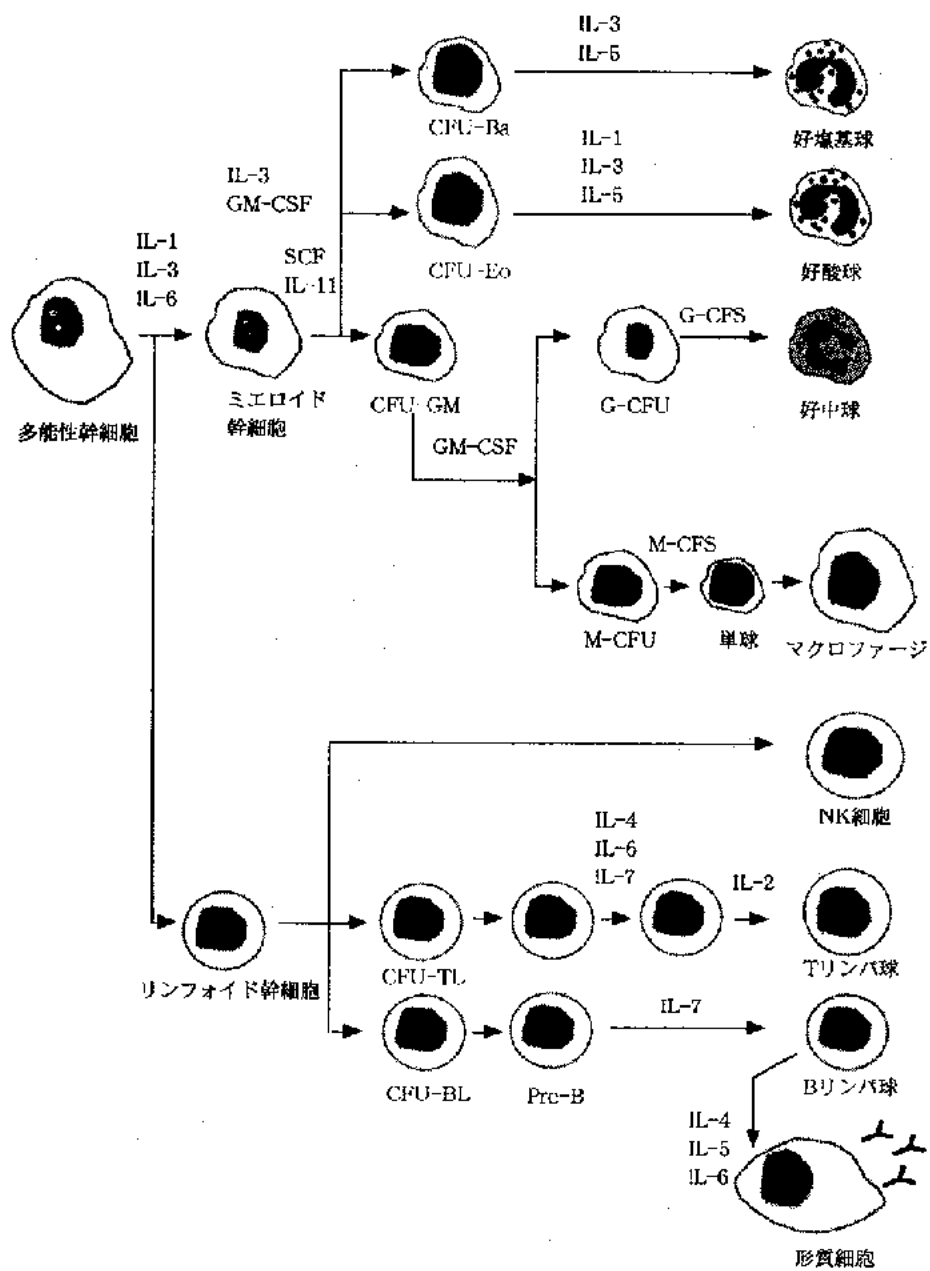


図 1-1-1-1 多能性細胞から免疫担当細胞への分化

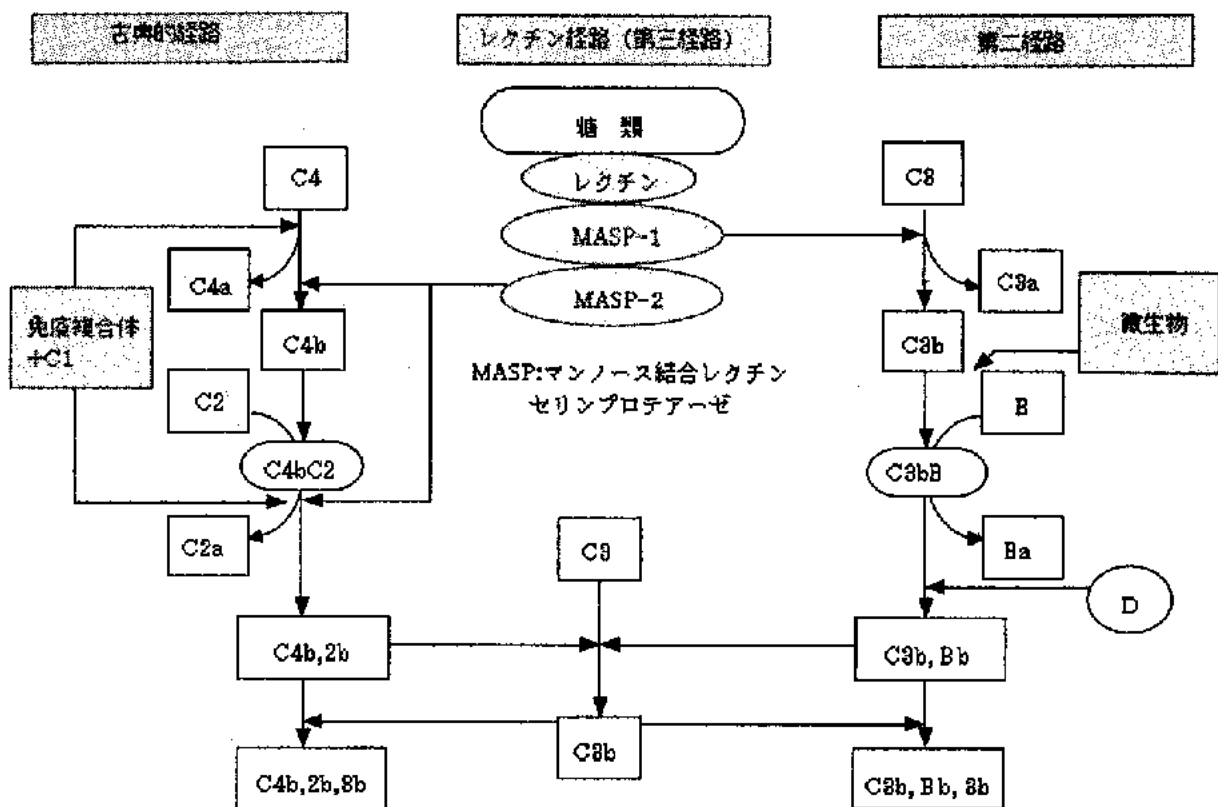


図 1-1-1-2 ほ乳類における古典的、第二、第三経路を介した補体活性化機構

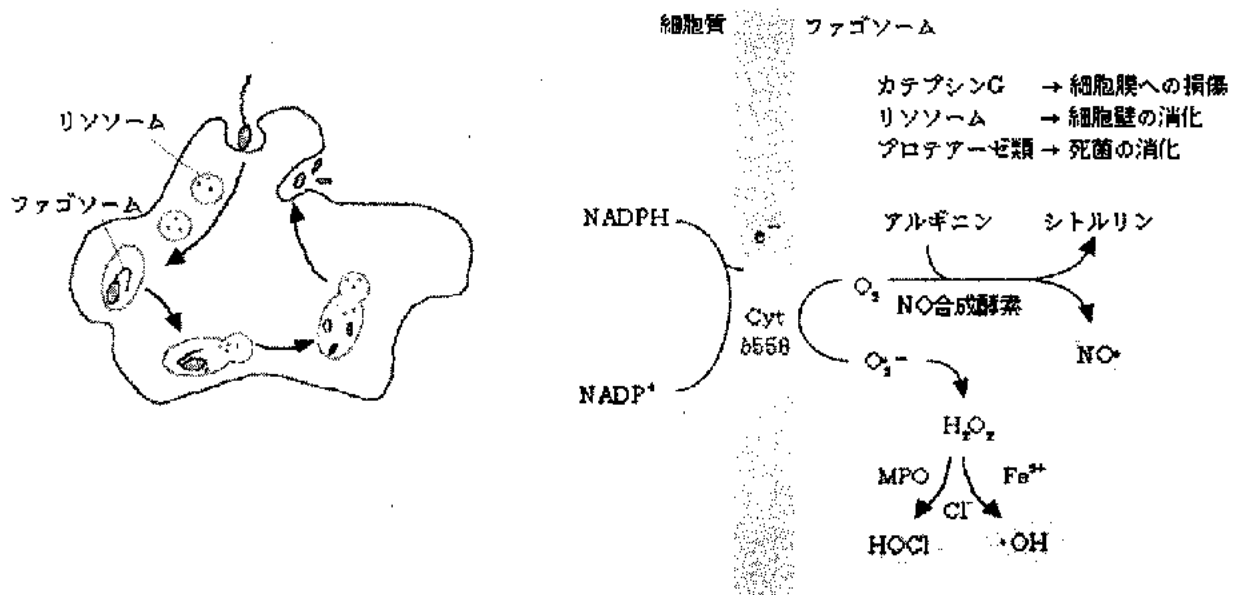


図 1-1-1-3 マクロファージや好中球による殺菌機構

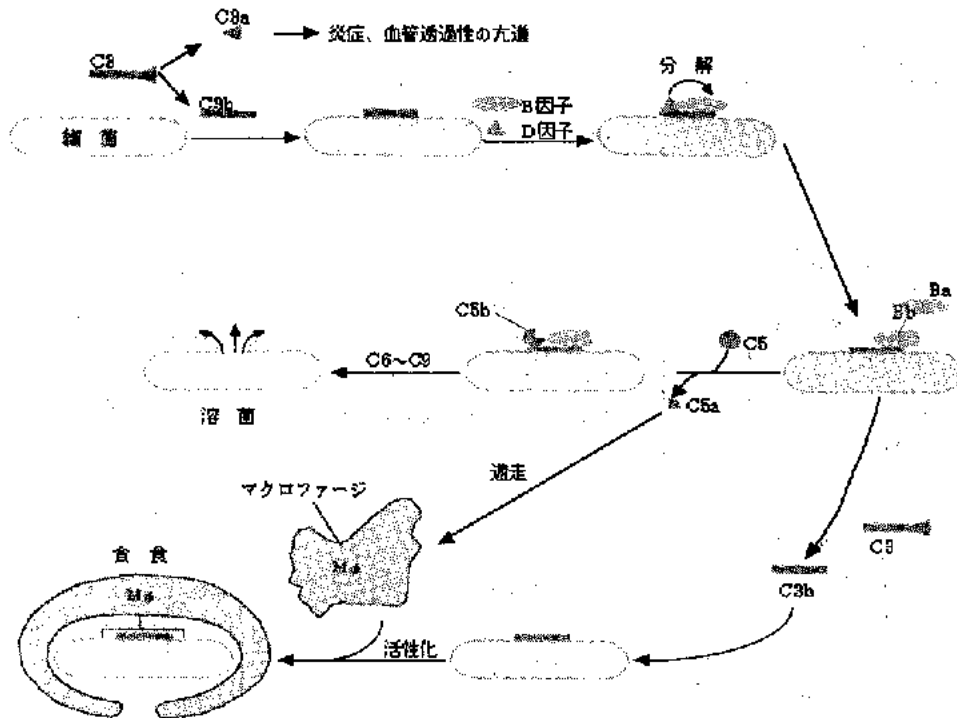
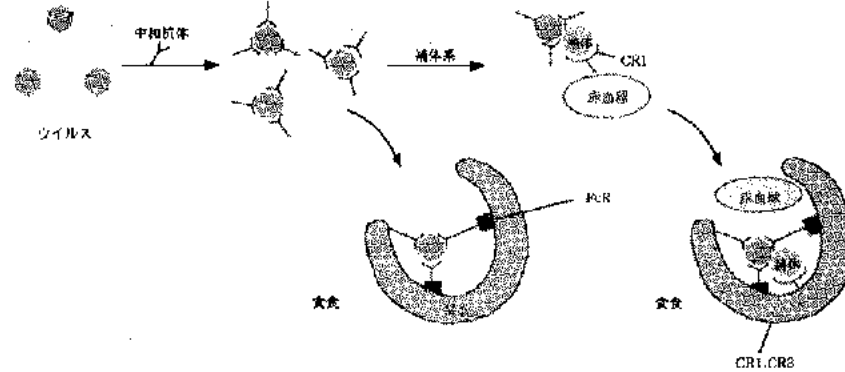


図 1-1-1-4 補体第二経路とマクロファージによる細菌の除去機構

(a) マクロファージにおけるウイルス除去機構



(b) 細胞障害性Tリンパ球 (CTL) やNK細胞によるウイルス除去機構

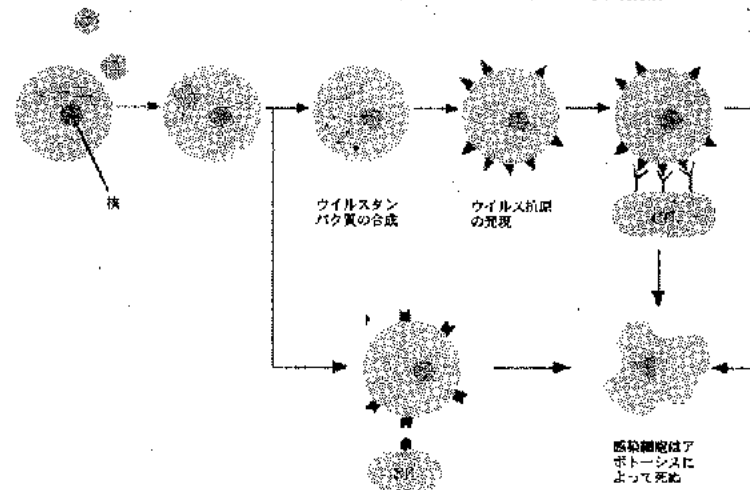


図 1-1-1-5 ほ乳類におけるウイルス除去機構

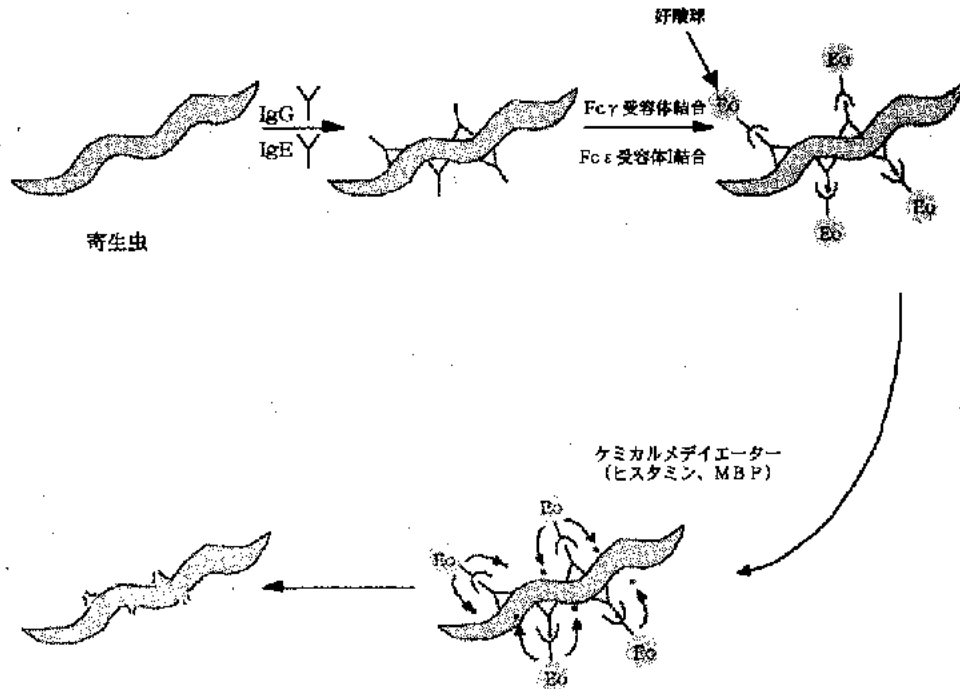


図 1-1-1-6 好酸球による寄生虫除去機構

血流から肺胞腔への好中球の浸潤過程

肺の炎症に伴い気管支肺胞洗滌液中に現れる好中球とマクロファージ数の変化

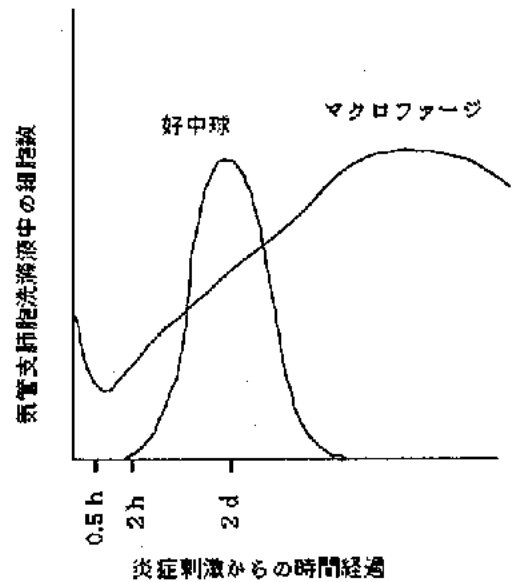
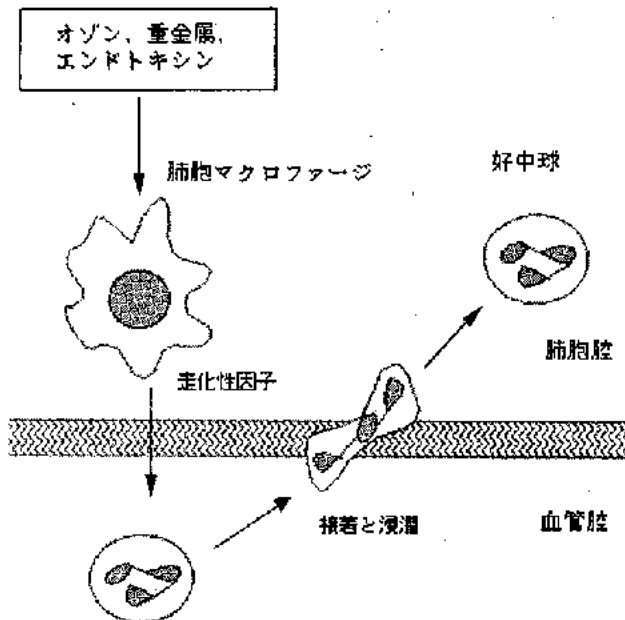


図 1-1-1-7 肺における免疫細胞の炎症応答

1.1.2. 鳥類

(高橋慎司)

鳥類は免疫担当器官としてファブリシウム (Burusa of Fabricius, BF) を持ち、液性免疫の機構解明に有利な面を持っている。また、細胞免疫の中核器官としては胸腺があり、頸椎に対称して存在し肉眼での摘出も容易である。すなわち、鳥類は免疫機能の進化のうえで哺乳類の次にランキングされており、環境生物の免疫機能を研究するうえでも重要な位置にあると考えられる。

そこで、鳥類の免疫機能について、以下に概略する。

免疫機能に関する細胞

単球とマクロファージ：鳥類では哺乳類と異なり、ガラス粘着性が低く、形態学的にも区別できる。また、MHC 抗原 (B-L antigen) がマクロマクロファージの 60~80% に表現されている。MHC 構造は、クラス I、II、III、IV に分類できるが、哺乳類の MHC (クラス I、II) とは分子量・染色体分布などで差異がある。また、鳥類でもニワトリ (B システム) は、特異的に進化しており、家禽化された歴史が長いと考えられている。

リンパ球：鳥類にも T 及び B-細胞が識別できる。T 細胞は、鳥類でも胸腺にバックされ、ニワトリでは孵化後 24 週令までには、各臓器に出現するようになる。T 細胞の機能 (ヘルパー、サプレッサー、細胞毒性) を調べるには、GVH (Graft-Versus-Host) 反応が有用であり、脾臓の肥大化を指標にする。

B 細胞は、鳥類特有の BF で、発達し、液性免疫を発現する。例えば、発生 13 日令のニワトリ胚では、末梢血中の B-細胞は IgM⁺ となる。BF は孵化後 20~30 週令で退化し、液性免疫の中核器官としての役目を終了すると考えられている。リンパ球のマイトゲン (mitogen) 活性は、哺乳類と同様に認められ、T 細胞は、PHA や Con A に反応する。また、LPS には B 細胞が特異的活性を示す。

細胞毒性 T 細胞は、骨髓、胸腺及び脾臓に出現し、BF には認められない。NK 細胞の存在は鳥類でも報告されており、少なくと

も数種類はリンパ球の形態を示している。

リンパ器官

骨髓：ニワトリでは、発生 12 日令胚に骨髓由来細胞 (Bone marrow cell) が存在することが報告されている。胸腺由来細胞 (Tcell) への分化の特徴が詳細に研究され、特に、ウズラとニワトリとのキメラを用いた実験から、T 細胞は発生 12 日令に抗原認識能を獲得することがわかった。

BF: Glick ら (1956) は、BF が免疫担当器官の中核であることを BF 摘切ニワトリで証明した。現在では、BF が液性免疫の中核器官であり、胸腺が細胞性免疫の中核器官であることが認識され、それらの機能性や免疫応答機構が解明されつつある。

脾臓：鳥類の脾臓は、やや複雑な働きをしており、発生初期には顆粒球や赤血球の造成を行う。赤色髄質と白色髄質とからなり、T および B 細胞が両質を移動している。

液性免疫

鳥類の抗体産生は、可溶性・不可溶性抗原に拘らず良好に行われ、T 細胞非依存性抗原でも充分に応答する。これらの抗体産生能は遺伝支配にあることが知られている。鳥類は哺乳類と比較して、抗体産生は急激に起こり早めに抗体が消失する。この理由として、鳥類では体温が 40℃ と高いことであるとされている。

T 細胞依存性抗原は 1 次応答として IgM 抗体を産生させ、後は 2 次応答として分子量の低い IgY (IgG 相当) を産生させる。

免疫グロブリン分類

鳥類の免疫グロブリンを分類すると、IgA (IgB)、IgM、IgY (G)、IgD が報告されている。

移行抗体の消長

鳥類では移行抗体が卵黄から発生胚へと IgY として供給される。IgM と IgA (IgB) は、卵白分泌物としてアルブミンから移行さ

れる。これらの移行抗体は、常染色体によって制御されていると報告されている。

細胞性免疫

細胞毒性 T 細胞とサイトカインは、哺乳類よりも急激で急性的に動く。ニワトリの GVH 反応は、MHC (B システム) の統制下にあり、MHC 抗原とリンクしている。また、GVH 反応は宿主の免疫機構の発達を促進すると報告されている。

遅延型過敏症は鳥類でも報告されており、ヒトのガンマグロブリンの免疫で、無ガンマグロブリン血症鳥でさえも、過敏症になる。

免疫寛容

免疫寛容は鳥類でも出現する。例えば、BF 摘除ニワトリでは、抗体産生が阻止されて免疫寛容となる。

MHC 複合体

ニワトリの MHC は B 複合体と呼ばれ、クラス I (B-F) とクラス II (B-L) 遺伝子にコードされている。また、B-G とクラス IV の複合体が細胞表面に出現し、ダイマー抗原とリンクしている。クラス I・II は哺乳類と同様の動き (キラー T 細胞・ヘルパー T 細胞) を行い、クラス IV (B-G) は役割が分かっていない。

サイトカイン

抗ウィルス性及び抗腫瘍性のインターフェロンがニワトリ細胞より検出されている。また MIF (Migration Inhibiting Factor) もニワトリと七面鳥の細胞から分離できた。インターロイキン (IL) -1 と 2 もニワトリ細胞から分離され、各々 Mitogen 活性が種特異的に認められた (哺乳類では無作用であった)。

過敏症

アナフィラキシー反応が、蛋白抗原で免疫されたニワトリで認められている。この感受性は血清に移行され、好塩基球と IgE または IgY の存在下で、I 型アナフィラキシー反応

を引き起こした。なお、この反応にはヒスタミンが関与している。

II 型細胞毒性過敏症は、補体関与が鳥類では必須となる。また、IV 型細胞毒性過敏症も同様に認められ、無ガンマグロブリン血症鶏でさえも、ヒトのガンマグロブリン (完全 Freund's adjuvant 免疫) で引き起こされている。

自己免疫症

肥満鶏は、自然発症的な甲状腺自己免疫症であることが研究されている。この自己免疫症は、ヒトの橋本病と類似している。自己免疫抗体は卵を経由して母体から移行する。この疾病は IL-2 により増進される。

国立環境研究所では環境生物としてニホンウズラに注目し、1980 年以来 20 年に亘って遺伝学的及び微生物学的純化を推進している。近年、ニホンウズラの有用性は OECD でも認められ、環境有害化学物質の生態影響評価試験を推奨されている。そこで、国立環境研究所動物実験施設で系統維持されている近交系ウズラを例として免疫学的特性を以下にまとめた。

- ①親からの移行抗体は卵黄を通してヒナに与えられ、ヒナから約 3 週間で消失する。
- ②ワクチン接種による免疫抗体は哺乳類と同様に、1 次応答 (IgM) 及び 2 次応答 (IgY) が認められる。
- ③細胞性免疫も哺乳類とほぼ同様であるが、T 細胞の詳細はマウスほどには明らかにされていない。
- ④ウズラではロゼット形式 T 細胞の存在が羊・家兎赤血球との間で認められているが、マウスのそれとは異なっていることが示唆されている。なお、Mitogen 活性は ConA 及び LPS などでマウスと同様に認められる。
- ⑤マクロファージは哺乳類と同様に生体内に分布しているが、ガラス粘着性が少ないことや形態学的にも異なっていることで、哺乳類とは区別して考える必要がある。
- ⑥NK 細胞が存在することは確かであるが、ウズラでの報告例は少なく、NK 細胞の詳細

細には今後の展開が必要である。

⑦感染抵抗性はニワトリよりも高いと考えられている。例えば、ニューカッスル病ウイルス感染に対しては LD_{50} 値がウズラでは2倍以上も高い。ウズラでは、鳥類の感染実験モニターとして有用性が高く、また人畜共通伝染病も少ないことより、感染モデル動物として有望と考えられる。

このように、ウズラは鳥類の実験動物としての有用性が高く、欧米で多用されているボブホワイトよりも性成熟が短いなど有利な点が多いので、環境生物の免疫機能に関する研究には適していると考えられる。

1.1.3. 両生類

(菊池慎一)

現在、多くの生物種が環境の悪化による絶滅の危機に直面している。両生類の生息環境もきわめて深刻な状況にある。特に生殖と初期発生、幼生の時期の生育環境に水が不可欠なこの動物群では、護岸や側溝工事などによる湿地湖沼の人為的な破壊は、種の存続に致命的なダメージを与えている。カエルは窮地に陥っても、噛みつくような他を攻撃するような手段を持たず、逃避によって他の攻撃を回避する受動的な穏健な動物である。かつては脊椎動物の基本的な構造を学ぶために、生物学の実習の一般的な材料とされてきたが、いまでは一般実習に野生のトノサマガエルやヒキガエルを集めることは困難にさえなっている。

両生類は水中で鰓で呼吸する幼生から、肺で空気呼吸をする陸生の成体へ劇的な変態をする。これは水生の動物が上陸して陸生動物に進化した過程を、個体発生で再現しているモデルとみることもできる。現世の両生類は有尾類(イモリやサンショウオ)と無尾類(カエル)の2つの大きなグループに分けられる。これらは共通の先祖から分かれたと考えられているが、その生理機能はかなり異なり、後者の方が前者よりも進化が進んだものとみることができる。19世紀後半以来、両生類はその卵や初期胚を使った実験発生学の膨大な研究成果が蓄積されて来た。ことに1950年代

からは、終生水中生活をする、飼育の容易なアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) が実験動物として定着して、継代飼育によって遺伝的な背景のはっきりした近交系がつくられてからは、恒温脊椎動物のモデル実験動物として定着したマウスに匹敵する、変温脊椎動物のモデル実験動物として使われるようになって、免疫の研究も飛躍的に進展した。

両生類の免疫機能は、補体系や特異・非特異的免疫系など全般的にみて、ヒトをはじめマウスなどの哺乳類の様式と基本的には共通である。魚類では鰭であった外肢が前後2対の四肢が発達し、その中軸に長骨を生じる。*Rana* 属(トノサマガエル)や *Bufo* 属(ヒキガエル)のカエルでは、長骨の芯、骨髄では造血機能がみられる。有尾類にはみられないが、無尾類では不完全ではあるが、リンパ節も発達している。

免疫グロブリンは6量体のIgMが主体であるが、分子量の小さい、IgYがみられる。比較免疫学、免疫進化の上で、興味ある材料である。この種では幼生のときに、胸腺が外からもよく見えるので、胚の胸腺原基の除去実験によって免疫機能の発生が追求された(Tochinai Nagata, 198X)。また、細胞発生的な細胞標識法(Kawahara et al., 1978)を導入して、胸腺がリンパ球(T細胞)の教育の場であることが脊椎動物共通のものであることが証明された。両生類は変温動物であり、低温下で冬眠することはよく知られているが、免疫機能も温度に依存する。

1.1.4. 魚類

(菊池慎一)

魚類にも特異的および非特異的防御系が存在する。

非特異的防御系

(a) 液性防御因子

魚類の液性防御因子としては、リゾチーム、補体、C反応性タンパク、インターフェロン、トランスフェリン、レクチンなどがある。

a-1) リゾチーム

リゾチームは、バクテリアの細胞壁を破壊する抗菌性酵素である。魚類のリゾチームは、

好中球、単球、クロファージによって生産され、血清中、粘液中に広く分布している。体液中のリゾチームの濃度は、水温、季節、生殖周期によって変動し、また、細菌感染によって著しく増加することも知られている。魚種による濃度差も大きいといわれる。

a-2) 補体

補体は、溶菌、ウイルスの中和、毒素の中和、白血球の食作用促進（オプソニン効果）・走化性などの作用を示す、血清中のタンパク質/酵素群である。補体系は、抗体と協力して働く経路（古典経路）と、抗体の関与なしで菌体成分によって直接活性化される経路（第二経路）がある。魚類の補体も、溶菌、ウイルスや毒素の中和、オプソニン活性を示すことが知られている。コイ、アユ、ニジマス、マダイ、アメリカナマズなどで、古典経路と第二経路の存在が確認されている。哺乳類に比べて、魚類の補体第二経路の活性は著しく高いことから、魚類においては、第二経路がより重要な役割を果たしていると考えられる。

コイでは、補体の成分である C1～C9、および D 因子・B 因子が単離され、分子量やサブユニットの構造解析が進められている。魚類の補体は、哺乳類補体よりも熱に不安定で、コイ・キンギョなどでは 45～50℃で、ニジマスでは 40～45℃で失活する反面、多くの魚種では、低温環境（0～4℃）でも溶血活性が認められるなどの特徴がある。

a-3) C 反応性タンパク（CRP）

C 反応性タンパク（CRP）は、肺炎双球菌の細胞壁の型特異的 C 多糖類と反応する、急性炎症期に血液中出现するタンパク（ β -グロブリン）で、細菌や真菌などの表面構造に Ca^{++} 依存的に結合する。魚類の CRP は、食細胞に対するオプソニン効果、補体の活性化、抗体の細胞表面への結合促進などの機能を持つ。

a-4) インターフェロン

インターフェロンはウイルスの増殖阻害の他、NK 細胞の活性化、マクロファージの活性化、抗腫瘍活性など、多くの生物学的活性

を示す。魚類では、主にサケ科魚類の培養細胞を用いた実験で、インターフェロンの産生が確認されており、ウイルスに対する感染防御の役割を果たしていると考えられている。

a-5) トランスフェリン

細菌はその増殖の際に鉄を必要とするが、トランスフェリンによって錯化された鉄は利用できず、そのため魚体内での菌の増殖が抑えられると考えられている。ウナギやサケ科魚類のトランスフェリンについても、遺伝的多型がみられる。ギンザケでは、5 種の異なる遺伝的多型と、細菌性腎臓病やビブリオ病に対する抵抗性との関連が報告されている。

a-6) レクチン

レクチンは血清、粘液、卵から検出されているが、魚種によってその作用や分子の特性などが著しく異なっている。アナゴの体表粘液中には、ガラクトース特異的な凝集素（congerin）が含まれており、海産バクテリアの *Vibrio anguillarum* を凝集するという。

(b) 細胞性因子

硬骨魚類の白血球は、哺乳類に準じて、顆粒球、リンパ球、単球に分類される。栓球と呼ばれる、血小板に相当する有核の紡錘細胞も末梢血中に存在する。顆粒球はさらに、好中球、好酸球、好塩基球に分けられるが、好酸球、好塩基球を持たない魚種も多く知られている。これらの血球のうち、非特異的な生体防御を行うものは、好中球、好酸球、好塩基球、単球（マクロファージ）である。栓球に異物取り込み能があるとした報告もあるが、一般的ではないと考えられる。

魚類のマクロファージは主に腎臓で生産される。発生学的には、腎臓の形成以前にマクロファージの出現をみることから、卵黄嚢由来のマクロファージの存在も示唆されているが、詳細は今後の研究に待たれるところである。魚類マクロファージの同定には、その特異的な細胞表面マーカーが、未だ作製されていないことから、酵素組織化学法による非特異的エステラーゼや酸性フォスファターゼ活性の有無が、よい同定法となっている。貪食

活性と併せて、リンパ球に対する抗原提示機能や、IL-1 や $\text{TNF}\alpha$ などのサイトカイン産生能についての報告も、コイやニジマスでなされている。抗菌活性に伴う活性酸素や NO の産生も知られている。単球-マクロファージ系の循環貪食細胞の他に、常在性のマクロファージは、脾臓、腎臓内の造血組織に加えて、鰓、心臓、腹腔などに広く分布していることが、多くの魚種で確認されている。肝臓クッパー細胞の存在は、多くの魚種で否定的である。タイ科の魚類では、腹腔内に多数の常在性マクロファージを持つことが知られている。さらに、魚類はメラノマクロファージと呼ばれる、黒色褐色色素を含んだマクロファージを持つ。含有色素はリポフスチン、ヘモシデリンそしてメラニンが主体をなすと考えられており、細胞は脾臓、腎臓、肝臓、心臓などの中にメラノマクロファージセンター (MMC) と呼ばれる結節状の集塊として認められる。メラノマクロファージセンターは、抗原-抗体複合体を捕捉し、かつ長期間それを保持する機能を持つことから、MMC を哺乳類リンパ組織の胚中心の原型とみる指摘もなされてきたが、現在では、メラノマクロファージセンターを魚類リンパ組織における単なるゴミ箱的存在であるとする考え方が強くなってきている。

好中球は、活発な貪食能をもち、哺乳動物の場合と同様に、硬骨魚類においても、異物侵入部位に真っ先に集合してくる細胞である。分葉核、特殊顆粒、高いペルオキシダーゼ活性など、哺乳類好中球と多くの類似性を示す魚種が多いようであるが、一方では既成の血球分類基準に適合しない場合も或る。マダイの好中球に相当する細胞は、好酸性の顆粒を持つので、染色性をもとにした細胞名を適用すると、好酸球=好中球ということになり、誤解を生じやすい。今後、魚類に適した細胞分類の再検討が必要である。

特異的防御系

(a) 抗体

抗体は、B リンパ球が産生・分泌する抗原

特異的なタンパク質で、その分子量と性質から、5つのタイプ(IgM、IgG、IgA、IgE、IgD)に分けられている。

硬骨魚類の持つ抗体は IgM の 1 種類のみで、4 量体からなる分子である。アメリカナマズの IgM 分子についての、モノクローナル抗体を用いた研究によると、その H 鎖と L 鎖においてアイソタイプが見出されている。サケやニジマスの H 鎖、L 鎖においても、複数のアイソタイプの存在が報告されている。このように、硬骨魚類の段階ですでに免疫グロブリンのサブクラス分化が起きていることがわかる。

抗体産生は、抗原接種後 5~7 日程経過すると起こるが、この液性免疫応答も、他の生理機能と同様に、水温の影響を顕著に受けている。比較的温水性の魚種、コイやナマズでは、10~12℃で完全に抗体産生が抑制される。

(b) 細胞因子と免疫器官

特異的防御を行う細胞は、B リンパ球と T リンパ球である。

B リンパ球は、抗原の侵入に対して特異的タンパクである抗体を分泌する細胞で、形質細胞に分化する。T リンパ球は胸腺で生産され、細胞性免疫において移植片拒絶や免疫機能の統御にあたっている。

硬骨魚類の免疫器官として重要なものは、T リンパ球の生産にあたる胸腺、B リンパ球や顆粒球の生産にあたる脾臓と腎臓があげられる。

参考文献

- 1) 児玉 洋 (1987) 魚類の防御免疫機構、獣医学、176-187.
- 2) 松崎 貴 (1991) 魚類の生体防御機構。臨床免疫、23 (11)、1635-1643.
- 3) 中村弘明・菊池慎一 (1992)：魚類-無脊椎動物の対照として-無脊椎動物の生体防御、村松繁ほか編、学会出版センター、pp.263-283.
- 4) 山崎正利 (1994) サイトカイン分子の系統発生と個体発生、271-276、免疫系の個

体発生と系統発生、野本亀久雄・和合治久編、病態生理、13 (4)

- 5) 矢野友紀 (1995) IV 魚類の生体防御、172-254、生物生産と生体防御、村上浩紀ほか編、コロナ社、東京。
- 6) Zapata, A. G., Chiba, A., and Varas, A. (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In Fish Immune System, Iwama G. and Nakanishi, T. eds., Fish Physiology vol.14. pp.1-62. Academic Press.

1.2. 無脊椎動物

1.2.1. 軟体動物 (古田恵美子)

軟体動物は、そのほとんどが海産であるが、腹足綱、有肺亜綱は主として陸産であり、鰓をもつことなく、外套膜が変化した肺で呼吸している。雌雄同体で両性管 (hermaphroditic duct) をもち、季節によって生殖腺は精巢として、あるいは卵巣として機能する。血管系は開放性でいわゆる毛細血管というものはなく、動脈の先端が直接結合組織に開口している。血色素は銅を含むヘモシアニンで、酸化されると青い色を呈する。この血液 (体液) 中には外来の異物や、自己由来の異物的成分を捕食したり、大型異物を生体内で隔離する血球が存在しているだけでなく、凝集素や溶血素など液性防御因子も含まれている。

陸棲軟体動物ナメクジ類は、体表を覆う殻をもたないが、それに代わる物として、多量の粘液細胞からの分泌物によって覆われている。この体表粘液が、物理的・科学的刺激から身を守る第一のバリエーションとなっている。

軟体動物の血球

軟体動物の血管系は開放性で、体腔 (hemocoel) 中に血液が存在し、その中に 1~数種の血球が浮遊している。ナメクジ類では以下の 3 種類の細胞が観察される。

マクロファージ様細胞

(*Incilaria fruhstorferi*) やフツウナメクジ (*Incilaria bilineata*) の体腔内に最も多く見られる大型の細胞であり、きわめて付着性の高い細胞である。体腔中では球形を停止、採

血後ガラス面上で大きなヴェール状の偽足を出して張付く。大きさは 20~30 μm で、約 5 μm の腎臓型の核をもつ。細胞内にはミトコンドリア、粗面小胞体 (rough endoplasmic reticulum)、多胞体 (multivesicular body)、遺残体 (residual body)、ゴルジ装置の他、グリコーゲン顆粒も認められる。

リンパ様細胞

球形の大きな核をもつ約 5 μm の球形細胞で、脊椎動物のリンパ球に似た形態をもつ。核・細胞質比が極めて大きく、偽足を形成することはない。大きな球形核の周囲に遊離リボゾームとミトコンドリアが認められる。

繊維芽細胞様細胞

紡錘形をした繊維芽細胞類似の細胞で、およそ 75×15 μm の大きさで、細胞 12-15nm の直径をもつマイクロフィブリル (microfibril) が認められる。その他に貪食能の存在を思わせる遺残体が観察され、かつ細胞外にはコラーゲン様の線維が認められる。

陸棲のカタツムリ (*Helix aspersa*) は 2 種類の血球をもっている。その一つは貪食能をもつアメーボサイト (amoebocyte) で、もう一つは小型の血球細胞で、貪食能をもっていない。カタツムリでは通常存在する血球数はきわめて少ないが、創傷後 15 分でその数は顕著に増加してくる。

アメーボサイトはクロマチンがブロック状に配列する腎形の核をもっているが、細胞質内に顆粒はない。きわめて付着性の高い細胞で、体外ですばやく細胞同士が凝集し、その後ガラス面に張付いてくる。

小型球形細胞は偽足を形成することはない。細胞質にはわずかな粗面小胞体と多量の遊離リボゾームが認められるにすぎない。しかしながら、貪食能をもつアメーボサイトを精査してみると、さらに二つの型の細胞があることがわかった。Type A と呼ばれる小型のアメーボサイトは 10-20 μm で、10 μm の核をもち、細胞質内に顆粒はなく、核・細胞質比が極めて高い値を示す。一方、Type B 細胞

は大型のアメーボサイトで、細胞質が豊富で、 $50\mu\text{m}$ ほどになり $10\mu\text{m}$ の核をもつ。

血球の機能

無脊椎動物は脊椎動物でなされているように、体内に侵入してくる微生物に対して対抗できる、いわゆる生体防御系を持っているが、彼らの体内には免疫グロブリンも補体もない。軟体動物特に腹足類では、体液中の血球の機能について、いくつかの報告がみられる。

食食作用

陸棲軟体動物のヤマナメクジ (*Incilaria fruhstorferi*) やフツウナメクジ (*Incilaria bilineata*) では、実験的に体腔内に注入された色々な大きさ、および性質の異なった異物を食食することがわかっている (ヒツジ赤血球、酵母、炭素粒子、ラテックスビーズ等)。この食食に関与する細胞はマクロファージのみで、リンパ球様細胞の取り込み像は認められないだけでなく、大量の異物を注入した時には、リンパ球様細胞や線維芽細胞様細胞も体液中に見られなくなる。また、同じ大きさで異なった種類の異物も同一の細胞内には取り込まれない。より小さい粒子の異物の場合にはたやすく食食される。

陸棲のカタツムリ (*Achatina achachina*, *A. fulica*, *Helix aspersa*, *H. pomatia*) ではアメーボサイトが異物や多種細胞を食食することがわかっている。これら食食細胞の異物取り込みの仕方は、偽足を伸ばして異物をその中に巻き込むやり方と原形質膜の陥入、細胞質突起による飲み込みからなるジッパー形式 (zipper model) とがある。取り込まれた異物はファゴゾームに取り入れられ、水解酵素等によって消化されていく。ナメクジ類のマクロファージは、ペルオキシダーゼをもっていないが、非特異的エステラーゼをもっている。

異物の排除

食作用による異物の取り込みは、種々の動物でよく知られた現象である。その異物の行

方についてはそれぞれ異なっている。陸棲のカタツムリ (*H. aspersa*) の足部血洞に X 線を通さない物質 (Thorium dioxide) を注入し、X 線照射法と組織学的な手法を使ってこの物質の動きを追った報告がある。二酸化トリウム注入後、4-5 日でカタツムリの全体に shadow が見られるようになり、その後次第に薄れ、10 日前後にはやっと識別できるほどの shadow になる。トリウムを取り込んだ血球は生殖器官の下方部に集まってきて、11 日ごろまでにはこの血球は陰やペニスで消失していくという。この報告に対して循環血球ではなく、異物排除に常在食細胞系が関与するとの説を唱える研究者もみられる。カタツムリ体腔内に注入された細菌は体液中から 1 時間以内に除かれるが、その時、循環血球中には注入細菌は見られず、またその血球中で消化された形跡もない。細菌は非循環細胞によって循環系から排除されるといわれている。この現象に関わる重要な器官は消化腺であるらしい。

軟体動物は脊椎動物のように IgG や T-cell、MHC、抗原リセプターなどはもっていないが、自己・非自己を識別する能力だけではなく、非自己物質の化学的な特徴の違いすら認識可能であることがわかっている。異物排除の基本的機構は食作用が存在するということであろう。

食作用を増強する液性因子

無脊椎動物は脊椎動物のもつ免疫グロブリンと対比できるような物質はもっていないが、機能的には類似する体液因子をいくつかもっていることがわかっている。その分子は種々の抗原に対して凝集活性をもち、自己・非自己認識に役立つ。無脊椎動物の凝集素はレクチンであり、それにはオプソニンが含まれているといわれる。

陸棲軟体動物腹足類のタンパク (albumin gland) には、ヒト A および B 型赤血球を凝集するレクチンが含まれている。*Helix pomatia* (カタツムリ) では A 型赤血球凝集素が含まれ、N-アセチルガラクトサミン

(GalNAc) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と結合するレクチンをもつ。オナジマイマイ (*Cepaea nemoralis*) のタンパク抽出液で処理した A 型赤血球は処理しないものに比べてより速く排除される。一方、ヤマナメクジ (*Incilaria fruhstorferi*) においても、体液および体表粘液に A 型および B 型赤血球を凝集するレクチン活性がみられる。またこの粘液中には B 型赤血球を溶血する溶血素も含まれている。この溶血素は易熱性であり、56℃で 30 分間の熱処理で失活するが、逆に凝集活性は上昇し 80℃で 10 分間の熱処理で完全に失活する。この意味は不明であるが、何らかのタンパク質によってブロックされていた部分が熱によって剥き出しにされて活性が上昇したのであろうか。さらに、体表粘液中にはオプソニンが含まれ粘液水溶液で処理したヒツジ赤血球の貪食作用を増強する。

この粘液水溶液中にはいくつかの分子量をもつタンパク質が含まれ、そのうちの 15Kd をもつレクチンは Ca イオン依存型の C 型レクチンで、この 15Kd 中にさらに 3 種類のレクチンが含まれていることが判明した。それらのアミノ酸配列が決定され、インシラリン A、B、C と名付けられた。

興味深いことにインシラリン C は、S-S 結合 2 個のうち、片方が消失していることがわかった。ごく最近、棘皮動物においても同様のレクチン活性が見出されていることから、レクチン活性には必ずしも S-S 結合が必要ではないのではないかとと思われる。

ナメクジ背側および腹側表皮には、2 種類の分泌細胞が見られ、背側部分分泌細胞は、酸性ムコ多糖を主に分泌する長い頸を持った細胞が多く、腹側部では表皮直下に球型分泌細胞が多くみられ、タンパク性物質を主に分泌している。ヒト赤血球に対するレクチン活性は、背側分泌物より腹側分泌物の方に活性が高い。

アフリカマイマイの体表粘液中にも、アカチニン 78KdC 型レクチンが含まれている。このレクチンは GalNAc を識別するが、そ

の他の N-アセチルアミノ酸もある程度識別する。

包囲化作用

1 個の食細胞で処理するには大きすぎるような異物に対しては、間葉系細胞の反応によって異物が取り囲まれ隔離される。この現象を包囲化(encapsulation)といい、寄生虫や移植片に対しても明瞭な形で現れてくる。

広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) は陸棲の腹足類を中間宿主としていることはよく知られている。本来ネズミの肺動脈に寄生する線虫であるが、中間宿主である陸棲腹足類をヒトが食することで、好酸性髄膜炎を起こす。しかし、4 週間以内に回復する場合もある。致命率は低いものの、決定的な治療法がないやっかいな寄生虫である。ネズミの便より排泄される幼虫 (1 期幼虫) を 6 週令のアフリカマイマイに感染させたところ、24 時間後に 80-90% が足部と肺に見られた。マイマイ側の生態防御系の発動は、12 時間で始まり、幼虫は多数のマイマイ血球によって包囲され、3 日後には血球の形は紡錘形となり、最外層は非薄した細胞によって取り囲まれる。中心層の細胞は核融解を起こし、その結果中心部位には「空間」が生じてくる。堀等の報告によると、関東地方の港湾周辺のチャコウラナメクジにはこの線虫の感染率が高く、またこのナメクジ内での寄生虫は、線維芽細胞によって包囲化されているという。

線虫が自然感染しているヤマナメクジに酵母を注入し、3 日後に観察すると、多数のヤマナメクジマクロファージ (血球) が動員され、線虫を取り巻いていることがわかる。この時、すでに酵母を貪食している血球も包囲化に加わり、最外層には血球が分泌したコラーゲンが十重二十重に巻きついているのが観察される。アフリカマイマイ感染時のように、中心部位には広い「空間」が生じ、線虫は死ぬことなく、体液側から栄養分を吸収して生長し、表皮から放出されるらしい。

広東住血線虫やコスタリカ住血線虫

(*Angiostongylus costaricensis*) は、中間宿主の体内から積極的に排除されることなく、14-19 日間で 1 期幼虫から 2 期幼虫を経て 3 期幼虫になる。寄生虫は感染幼虫 (3 期幼虫) になるまでに 2 回の脱皮が必要であるが、この虫では脱皮が見られず、3 期幼虫は組織学的には外皮の他に 2 層の膜構造をもっている。このことが宿主からの攻撃をかかわす戦術になっているのかも知れない。

移植片に対する包囲化の実験は、手技的にきわめて困難で、その報告もあまり数を見ない。無寄生虫性の条件下に飼育されたカタツムリ (*Helisoma durui normale*) の体腔内に、同種または異種 (*H. trivolus*) の消化腺を移植すると、同種移植片よりも異種移植片の方がすみやかに障害される。移植後 24 時間で体液細胞 (血球) が浸潤し 98 時間後には、すでに移植片の壊死・崩壊・肉芽形成が見られ、移植片外周部は蜜に増殖した線維芽細胞で覆われ、肉芽中心部は細胞崩壊物を貪食したマクロファージが観察される。しかし、同種移植では 96 時間後でも変化はなく、わずかに体液細胞の浸潤が見られるのみである。移植片の包囲化作用は 354 時間後に始まり、移植片組織の間には線維芽細胞や類上皮細胞が反応してきている。チャコウラナメクジ (*Limax marginatus*) の未成熟両性腺を外套下膜に同種移植する実験では 21 日で体液細胞の浸潤、移植組織の細胞核崩壊が顕著に見られ、2 ヶ月後では移植組織は萎縮して細胞塊となり、4 ヶ月後にはほぼ完全に移植片は消失し、その痕は結合組織に置き変わった。

淡水産のモノアラガイでの実験では、包囲化に関わる扁平化した体液細胞の間には間隙を埋めるように細かい結合組織線維が存在し、中間層と外層を分けるようになる。この細胞間物質は線維芽細胞様に変化した体液細胞が分泌していることが分かった。このことはコラーゲン合成のマーカーである 3H-プロリンを用いて蛋白合成を追跡した結果判明したものである。この包囲化にみられる筋線維芽細胞 (myofibroblast) もまた体液細胞由来であった

創傷治癒

軟体動物における外傷の最初の生体反応は平滑筋の収縮による傷口のシールで、次いで血球による血栓の形成であるが、ナメクジの場合は、通常体液中に存在する血球数がきわめて少ないために初期の生体反応は少し異なっている。まず筋の収縮、血小板様小体の凝集が起こり、ほとんど同時に体液の凝固が始まる。創傷 5 時間後には血球 (マクロファージ) が傷口の表面に伸展してくる。この一連の初期反応によって、体液の漏出、異物侵入阻止および細胞破壊片の貪食など傷の再生に向かって始動する。4 日後、上皮細胞が直接筋組織の上に乗った状態で傷口は一応ふさが

る。淡水産のモノアラガイでは、創傷後 9-24 時間以内に血球が浸潤、凝集して傷口を完全に覆う。傷口の周辺では血球が盛んに細胞の破片を貪食し、3-5 日後には扁平化した血球の間にきわめて細いコラーゲン線維が現れてくる。表皮の上皮は創傷後早い時期に扁平細胞として出現してくるが、14 日後では円柱細胞となって血栓を覆うようになる。30 日後では修復した上皮細胞の下にははっきりと基底膜が観られるようになる。

血球の起源

軟体動物は数種類の血球を持ち、そのうちの少なくとも一種類は貪食作用をもつ血球である。貪食作用は血球によってなされるが、その細胞は遊走能をもち、それが貪食を容易にしている。腹足類の体腔内に異物や線虫を注入すると、それらに対して防御反応を示す血球がきわめて速やかに増加してくる。ヒラマキミズマイマイ (*Biomphalaria glabrata*) の血液産成器官は、外套膜の後方上皮と囲心囊の間にあり、通常 20 μ m ほどの厚さしかないが、棘口吸虫類の *Echinostoma paraensei* が感染すると、細胞が増殖し好塩基性細胞塊を作り、数日後には 5 倍ほどの厚さになる。またモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) では全身の結合組織と脈管系でつくられるといわれる。カタツムリ (*Helix aspersa*) では、血球

は外套の結合組織や上皮から形成される。陸棲軟体動物ナメクジ (*Incilaria fruhstorferi*) では、異物を注入すると、およそ1時間後には通常時の5~7倍に血液中の血球数が増加してくる。ナメクジの体腔内に酵母を注入し、1時間後に電子顕微鏡で観察すると、体腔の内皮様細胞(lining cell)および動脈の内皮様細胞が突出し始め、3時間後には血液中に浮遊してくる。この細胞は単球やマクロファージのマーカ?の一つである非特異的エステラーゼに陽性であり、かつ食食能をもっている。さらにプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与して標識細胞を検索すると、体腔を構成する結合組織内、特に結合組織内に見られる血液循環の役割を果たす間隙 (hemal space) を取り巻く線維芽細胞の核内に標識 BrdU が観察された。また酵母注入後の体腔壁を *in vitro* で観察すると、培養4時間後の遊出細胞は形態学的にほとんど全てがマクロファージ様細胞で、非特異的エステラーゼは陽性となる。この結果から、異物侵入後の急速な血球増加は、生体内のいたるところに存在する線維芽細胞(間葉系細胞)が活性化されて分裂し、血管系の内腔面から突出遊離し、マクロファージ様細胞(食食細胞)に転換しているためと考えられる。この血球増加時のマクロファージは、TNF- α 、IL-1 α 陽性で、結合組織培養1時間では、細胞遊出数がTNF- α 、IL-1 α 存在下では非存在時の20倍になる。また、TNF- α 、IL-1 α の抗体を用いた時は、遊出がきわめて有意に阻害されることが分かった。軟体動物腹足類、特にナメクジ等の血液中に存在する食食細胞は、非特異的に異物を取り込み、これを処理する能力をもっている。この作用を増強する因子は体液および体表粘液中に含まれる数種のレクチンであり、また異物侵入時に分泌されるサイトカインの誘導によって食食細胞が増加するという生体防御のすばらしいネットワークは、必ずしも衛生的とはいえない環境における彼らの繁栄を可能にしている。

参考文献

- 1) Ratcliffe, N. A. and Powley, A. F. (eds): *Invertebrate Blood Cells*. Vol.1. Academic Press (1981)
- 2) 古田恵美子: 無脊椎動物の生体防御、名取金二、野本亀久雄、古田恵美子、村松繁編 学会出版センター (1992)
- 3) Ford, A. L.: Host Defense Mechanisms of Cephalopods. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 2:25-41 (1992)
- 4) Ottaviani, E., Franchini, A. and Franceschi, C.: Presence of Several Cytokine-like Molecules in Molluscan Hemocytes. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 195:984-988 (1993)
- 5) 古田恵美子: 動物免疫学入門、和合治久編著、朝倉書店、pp143-150 (1994)
- 6) Furuta, E., Yamaguchi, K., et al.: *J. Exp. Zool.*, 271:340-347 (1995)
- 7) 古田恵美子、山口恵一郎: 動物の血液細胞と生体防御、和合治久編著、菜根出版
- 8) Yuasa, H. J., Furuta, E., et al.: *Comp. Biochem. Physiol. B*119:479-484 (1998)
- 9) Yamaguchi, K., Furuta, E., et al.: *Zool. Sci.* 16:485-495 (1999)

1.2.1.2. 貝類

(吉田貴彦)

生物には外的生物(細菌、ウイルス、原虫、真菌、寄生虫など)や不要自己体成分(死細胞、感染細胞、損傷細胞、変成細胞、異化細胞など)の異物を排除する全ての生物に普遍的に存在する生体防御機構、すなわち免疫機能が備わっている。

貝類において、血リンパ液は貝体内の開放血管系内を循環しつつ栄養素や老廃物の運搬と、異物の排除による生体防御の役割を担い内部環境の恒常性を維持している。このうち後者の異物の排除は貝類における免疫機能である。高等生物においては異物抗原を認識し、それに対応する特異的なクローンの選択的増殖が生体防御機構の主役となるが、軟体動物に属する貝類などの下等生物ではこれら特異的な生体防御機構が備わっておらず免疫機構は分化が未熟な段階にとどまっている。すな

わち特異的免疫機構は発達しておらず非特異的免疫機構のみが存在する。血リンパ液は、液性成分と細胞性成分に分けることが出来る。貝類の免疫機構にもこの両者が関与している（森、1995）。

（A）液性免疫

液性免疫は体液中に溶解している蛋白質を主体とした成分が働くことによって達成される免疫機構であり、高等生物においては異物侵入の初期に働く非特異的な免疫応答である。これらは常に体内を循環するか異物進入が起こりやすい体表面に存在している。そのために異物に対して即座の対応が可能となる。したがって特異的免疫機構が存在しない貝類における生体防御機能において液性免疫機構の占める役割は大きい。液性免疫の中心的な役割を担う蛋白質は免疫担当細胞群である血リンパ球によって産生され则认为られている。

1) レクチン（凝集素）

血リンパ液の液性成分中に存在し細胞凝集活性を持つタンパク質が存在する。そのうち凝集素のある部位と特異的に結合して凝集活性を阻害する糖質が決定されている、逆に言うと糖と結合する凝集素の構造が知られているものをレクチンという。レクチンは軟体動物をはじめ多くの海棲生物において存在が確認されており原始的な免疫系を形成している。レクチンの生物活性は各種哺乳類動物の赤血球に対する凝集活性によって評価され、数種類の糖と特異的に結合する複数の構造を持つ事が知られている。貝の種により、糖結合特異性が異なる。一方、レクチンの抗原性（高等生物の免疫系に認識される構造）は一部のものを除き類似性があると報告されている。レクチンの免疫系に於ける役割は、異物表面の糖質への結合により異物塊を形成することで、外来微生物の運動能を奪い血球による食作用の効率を高めていると考えられる。異物と血球を架橋し食作用を受けやすくするオプソニン効果の有無は統一見解が無い。レクチン活性が貝の生理活性の高さ、すなわち健康

度と良く相関するとの報告がある。

2) 抗菌物質

血リンパ液の液性成分中には細菌類の増殖や生存を抑制する因子が含まれ、リゾチームと同等のものと異なるものの2種類があると報告されている。生体内に侵入した有害微生物、あるいは過剰に増殖した常在微生物の排除の役割を担っていると考えられている。

（B）細胞性免疫

貝類における細胞性免疫を担当する細胞は、血リンパ液中に浮遊する血球とそれらが体内の特定部位に浸出しとどまった細胞群に分けられる。後者の組織における免疫担当細胞の存在は高等生物においても認められる現象と同じである。高等動物と同様に免疫担当細胞が細胞性免疫を担っているが、貝類においては特異的免疫すなわち認識異物の記憶は成り立たず、非特異的免疫のみが確認されており、免疫学的に原始的な状況にある。

血リンパ液中に存在する血リンパ球数、およびそれら細胞の分画、遊走能、貪食能、H₂O₂産生量などの測定により細胞性免疫能が評価される。

1) 血リンパ球数

血リンパ液は心臓ないし閉殻筋を尖刺して採取され、その中に存在する血リンパ血球は貝類体内を循環している血球である。容積当りの数が計測されるが、貝全体の血リンパ球数と表現する場合には循環血球と組織にとどまる血球の合計となるが、現実的に測定は出来ない。これは高等動物においても同じ事である。

分担者は、心臓採血あるいは閉殻筋採血後に、血算板にて顕微鏡下に全リンパ血球を計測している。一部、幾つかの細胞が凝集塊を形成している場合があるが、正確な数が把握できないので測定対象から省いて数えている。

2) 血リンパ球分画

血リンパ球の分類については、赤血球を持

つ貝の場合には、赤血球と非赤血球を分けるが、非赤血球の分類については未だ統一見解は無い。しかし、形態学的分類においては、胞体内に顆粒を持つ細胞（顆粒球、granular cell）と顆粒を持たない細胞（無顆粒球、agranular cell または hyaline cell）に大別することが一般的である。染色性により好塩基性、好酸性細胞に分ける研究者もある。さらには、組織学的な分類だけでなく、血リンパ球の生存下での顕微鏡学的観察、比重分離法による細胞分取後の機能的検索、細胞成分の生化学的検索など、細胞の機能をも考慮した分類も報告されている。

分担者は、アコヤ貝において心臓採血あるいは閉殻筋採血後に得た血リンパ液をスライドグラスに塗抹し、ホルマリン固定乾燥後にメイギムザ染色を施し、顕微鏡下に顆粒球と無顆粒球に分類し細胞比率を測定している。

一方、貝類の循環血リンパ球は高等動物のそれに比して数が少ない。その分、組織に留まる血リンパ球が免疫機構に占める働きの部分が大きいと考えられる。消化吸收にかかわる消化盲囊細管上皮細胞のうちヘマトキシリン染色性の低い細胞（light cell）、アコヤ貝での心房上皮組織を集簇して形成するポア細胞（pore cell）、組織中に広く分布する細網細胞（reticulum cell）などは、異種あるいは変性自己蛋白の貪食・消化を行い細胞性免疫において重要な役割を担っていると考えられる。しかし、循環血リンパ球に比べて研究が進んでいない。

3) 血リンパ球遊走能

原始的な免疫機構をもつ生物にあっても、細胞性免疫が非特異的攻撃を行う場合に標的となる異物に対して接近することは初期の防御機能として大きな役割を持つ。貝類の血リンパ球においても遊走能をしめす細胞が存在する。遊走能はアメーバ状の運動を行い方向性を持たない不規則な随意運動能力と誘引物質（走化性因子）の濃度勾配の高いほうへ向かって移動する走化性の両方の総和として評価される。貝類の血リンパ球の走化性評価の

際には微生物由来の菌体成分や産生物質が用いられ、大腸菌培養濾液などが一般的である。測定条件によっては随意運動能と走化性を区別して測定ができる。アコヤ貝において、走化性は顆粒球、無顆粒球の双方に認め、随意運動能は顆粒球の方が上回るとの報告がある。

分担者はアコヤ貝において 10% 大腸菌培養濾液を走化性因子として総合的に遊走能を測定している。

4) 血リンパ球食作用

原始的な非特異的細胞性免疫では、異物への接着、貪食作用とそれに引き続き行われる細胞内消化が主な機能であり、この一連の機能を食作用という。細胞表面に接着した異物を細胞膜が取り囲み、やがてファゴソーム（食胞）という小胞体を形成する。このファゴソームは分解酵素を中に含むリソソームと融合し、その中で酵素群は異物と遭遇し分解を行う。これを細胞内消化という。異物の消化の段階で、異物が外来微生物である場合には殺菌が行われる。この殺菌過程においては、次項で述べる H_2O_2 が重要な働きをもつ。また、消化の結果として、栄養素であるグリコーゲンあるいは不要物質が形成され、グリコーゲンがエネルギー源として一部細胞内で利用されるほか不要物は細胞外に排出される。生殖活動後に不要となった生殖組織は、生体不要物質として血リンパ球の食作用によって食作用を受けグリコーゲン貯蔵組織に置き換えられていく。血リンパ球は異物である細菌など病原体をも貪食するが、その全てを処理し消化できるとは限らない。処理、消化されなかった病原体は血リンパ球を破壊し貝個体にも死をもたらすこととなる。従って、貝類において生体防御機構と栄養素の取り込み貯蔵機能に関与する食作用は、個体の健康度と密接な関係にあると考えられる。

食作用の測定法は、一般的には採取した血リンパ球を用いての *in vitro* での異物粒子の貪食を評価することが行われている。粒子としてサイモザン、墨汁滴などが用いられる。また、食作用の初期の段階と考えられる走化

性因子やレクチンなどとの接触能を評価する試みもなされている。さらに食作用の一環として細胞性免疫機構の一翼を担っている消化酵素活性の測定を行う方法もある。消化酵素としてペルオキシダーゼ、N-アセチル- β -D-グルコシダーゼ、キモトリプシン様酵素、酸性フォスファターゼ、 β -グルクロニダーゼなどが測定される。分担者はアコヤ貝において血リンパ球の食作用評価として、血リンパ球の 20℃、*in vitro* 培養系でリチウムカルミン粒子を接触させ、その取り込みを見ることにより貪食能を測定している。

5) 血リンパ球活性酸素産生量

血リンパ球は、食作用の一環として細胞内に取り込んだ外来微生物などを殺菌する。哺乳動物同様に、貝類においても細胞内殺菌においては活性酸素 (O_2^- や H_2O_2) が重要な役割を持っている。血リンパ球の活性酸素の産生能は生体防御ことに外来病原微生物に対する抵抗性と密接に関連すると考えられる。 H_2O_2 産生量の評価は、ホモバニリン酸蛍光測定法ないしニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 反応などによって測定されて行われる。

分担者はアコヤ貝において血リンパ球の 20℃、*in vitro* 培養系で NBT 試薬を作用させ、生成される不溶性青色物ホルマザンにより青色を呈する細胞を顕微鏡にて観察して評価している。

6) 血リンパ球の安定性 (被細胞毒性)・細胞活性血リンパ球の細胞膜傷害をニュートラルレッドの細胞質内貯留で見る方法がある。傷害された細胞の膜透過性が高まることによって色素の細胞内流入が増すことを指標として観察する。この方法は純粋な免疫学的方法というよりは毒性学的検索法である。また、R1 標識核酸の細胞内取り込みを測定することによって細胞の活性を評価することも試みられている。

(C) 総合的免疫能

病原性微生物あるいは常在 (共生) 微生物による感染実験がおこなわれている。用いられている微生物は、海棲細菌であるビブリオ、原虫であるパーキンサスに主に用いられている。

異物排除能力も免疫能が本来持つ重要な働きであり、閉殻筋に異物微粒子を注射しその血リンパ液からの排除を観察する検索法も工夫されている。この作用は主に血リンパ球の貪食作用によるところが大きい。サイモザンや色素であるニュートラル・レッドなどが用いられている。

移植片拒絶反応も生態防御機能の重要な働きである。この作用には、移植された外来物の異物としての認識力と排除のための細胞性免疫能が関わっている。アコヤ貝は真珠養殖に使われ、その際に核を挿入する作業が必須であるために異物排除機構に関しての研究が行われている (青木, 1965; 和田, 1987)。

参考文献

- 1) 青木駿, (1965), 挿核, 真珠養殖全書, 真珠養殖全書編集委員会, Pp. 166-204, 全国真珠養殖漁業協同組合連合会.
- 2) 森勝義, (1995), 貝類の生体防御機構, カキ・ホタテガイ・アワビ生産技術と関連研究領域- (野村正監修), Pp. 181-206, 恒星社厚生閣.
- 3) 和田浩爾, (1987), 真珠貝の体力と生体防御能力, 全貝連技術研究会報, 3, 5-13.

1.2.2. 昆虫類

(和合治久)

体表面での生体防御 (サーフェスバリアー)

昆虫は左右対称のキチン質から構成される外骨格をもち、寒さや乾燥に強く繁殖力が大きいという特徴をもっている。体表面の表皮細胞はクチクラ層を形成しているリピドや β -ポリ-アセチルグルコサミンから成るキチンと種々の蛋白質を分泌している。クチクラ層が硬化したものが外骨格であり、真皮細胞と基底膜と一緒に昆虫の皮膚を形づくっているが、この皮膚の最外層を外表皮、その内側を

原表皮と呼んでいる。一般的に、外表皮にはセメント層、ロウ層、ポリフェノール層、クチクリン層が存在し、この部位に特に生体外の異物（病原体）侵入を阻止する物理的及び化学的な生体防御のバリアーが構築されている(和合、1995、1999)。

皮膚の真皮細胞は飽和脂肪酸、カプリン酸、カプリル酸、フェノール、3、4-ジオキシ安息香酸などを含み、こうした物質によって特にカビなどの真菌類の発芽や発育を阻害することができる。さらに、真皮細胞はグラム陰性細菌やその細胞壁成分のリポ多糖体の侵入あるいは刺激によって細菌を殺す抗菌蛋白質の1種であるセクロピンを合成する能力があり、積極的に皮膚を介した細菌類の昆虫体内への侵入を食い止めている(Ashida と Brey, 1995; Brey ら 1993)。

一方、表皮や脱皮の際に分泌される脱皮液には、フェノール酸化酵素前駆体(proPO)が存在し、黒色のメラニン色素形成に関与している。特に、皮膚からカビ類や細菌類が侵入すると、これらの細胞壁の構成成分である β -1, 3-グルカンやペプチドグリカンなどによって、proPO が活性化してPOが生じ、これが真皮細胞に存在するフェノール物質を基質にして最終的にメラニンを形成させる。このプロセスは、体表の損傷によっても生じ、メラニン形成によって出血も止まるため、昆虫の重要な生体防御反応の1つである(和合、1995)。

サーフェスバリアーとして機能する体壁

皮膚—表皮(クチクラ)—外表皮—セメント層
ワックス層
蛋白性外表皮—多価フェノール
クチクリン
原表皮—外原表皮
内原表皮
真皮(飽和脂肪酸、カプリン酸、カプリル酸、
フェノールなど)
(セクロピン合成)
基底膜
*脱皮液--フェノール酸化酵素前駆体が存在

消化管での生体防御

昆虫の口から肛門に至る上皮組織の管は消化管として機能し、食物からの栄養を吸収している。この消化管は機能的に前腸、中腸、後腸の3つの部分からできているが、前腸と後腸には外胚葉由来のクチクラ層が存在するので、それは皮膚のものと同様に異物侵入を阻止する物理的バリアーとして機能している。内胚葉由来の中腸は一方で摂取した食物の消化と吸収を行っており、その内側にはキチン、ムコ多糖、蛋白質から構成される薄い開食膜が存在するため、食物と中腸上皮細胞の直接的接触が阻害されており、中腸における生体防御に役割を果たしている。

消化管に分泌される消化液の中には、細菌に対する抗菌物質や核多角体病ウイルスに対する抗ウイルス性蛍光蛋白質が存在し、微生物に抵抗している。さらに、昆虫の消化液はアルカリ性であり、pH10位の種類も知られ、強アルカリ条件で生育できない細菌などに対抗することができる(和合、1995)。

血体腔での生体防御

(A) 細胞性の防御反応

A-1) 昆虫の血球

昆虫の血体腔には背脈管の力で体液が循環している。この中に、血球が存在し、皮膚や消化管を突破して侵入する異物を攻撃する昆虫の免疫担当細胞が観察される。血球の種類や構成比は昆虫の種類によって異なっているが、どの種類にも共通して存在するのは、顆粒細胞(granular cell)とアメーバ状のプラズマ細胞(plasmatocyte)である。これらの血球は貪食という小型異物を捕食して処理する機能(食作用)と大型の異物を包囲して生体内隔離する機能(包囲化作用)をもち、細胞性防御反応に重要な役割を演じている。

チョウやガの場合、顆粒細胞とプラズマ細胞のほかに、原白血球、小球細胞、エノシトイドの3種類が存在している。細胞学的には、細胞質に小型の顆粒を数多くもち、異物に付着すると糸状突起を放射状に伸展させるのが顆粒細胞で、アメーバのように膜状突起(偽

足)と糸状突起を伸展させて付着し、運動能を示すのがプラズマ細胞であり、昆虫マクロファージとも呼ばれている。形態学的に細胞表面が滑らかで球状の血球が原白血球、細胞質に小球という大型の顆粒をもつので表面がゴツゴツしているのが小球細胞、血球の中でもっとも大型で細胞質に三日月型の構造をもっているのがエノシトイドである。これらの血球の割合と形態は個体発生の中で大きく変動し、特に脱皮や変態時には著しく変動する(和合、1995)。

さらに、特殊な血球として、シストサイト、アディポヘモサイト、ポドサイトなどの血球がある種の昆虫に観察されている。

A-2) 血球の由来

昆虫の血球は基本的には造血器官で成熟分化し、血体腔中に放出されることが知られている。鱗翅目昆虫の場合、幼虫期の前胸部にある翅芽に隣接した部位に造血器官があり、ここで顆粒細胞、プラズマ細胞、原白血球、小球細胞、エノシトイドなどの血球種が作られ、体液中に放出されることが判明している。放出された血球種の中で、顆粒細胞と原白血球は有糸分裂する能力があり、その数を調節している。

A-3) 細胞性防御反応と昆虫の免疫担当細胞

昆虫の細胞性防御反応には、前述の食食作用及び包囲化作用のほかに、細菌感染の時に見られるノジュール形成という反応も存在する。この反応は、細菌を食食した顆粒細胞がお互いに集合してノジュール(小節)を作るタイプであり、この反応によって食食された細菌は周囲に拡散することができなくなるため、昆虫の生体防御にとって重要である。これらの3つの防御反応には、顆粒細胞とプラズマ細胞が関与するので、この2種類の血球は昆虫の重要な免疫担当細胞として位置づけられるが、この他にもこうした細胞性防御反応を支援する形で間接的に防御に関与する血球も存在している。特に顆粒細胞の異物応答の中で付着反応を促進するフェノール酸化酵素前駆体活性化系を構成している因子を産

生する小球細胞とエノシトイドは新たな昆虫の免疫担当細胞である。すなわち、小球細胞は血漿中にペプチドグリカンや β -1, 3-グルカン認識する認識蛋白質を合成し、メラニン色素形成過程の上位の生化学的反応であるセリンプロテアーゼの活性化に関与する一方、エノシトイドはフェノール酸化酵素前駆体を生合成している(和合、1995)。

昆虫の血球と生体防御への関与

顆粒細胞、プラズマ細胞 — 食作用、包囲化作用、
ノジュール形成、
防御物質の産生

小球細胞 — ペプチドグリカン認識蛋白質の合成
B-1、3-グルカン認識蛋白質の合成
エノシトイド — フェノール酸化酵素前駆体の合成

A-4) 顆粒細胞の防御機能発現

顆粒細胞は糸状突起を細胞表面にもち、これを付着異物に伸展させて異物を捕まえ、最終的に細胞質内に取り込んで消化する。この食食過程は、異物への付着、糸状突起の伸展、膜状突起の伸長、取り込み、ファゴゾーム形成、消化というプロセスから成立しているが、この中で糸状突起の伸展は異物を捕まえ異物情報をキャッチする上できわめて重要である。この突起にはマイクロフィラメントが機能し、この機能発現で生じる突起伸展が次の細胞行動を進行させる上で鍵を担っている。

昆虫は生体内に侵入する物体(病原体)を非自己と認識することができるが故に、一連の細胞性防御反応を発動させることができる。一般的に、昆虫類では、非自己になるものは異種移植片であり、それが血体腔に移植された場合には血球反応を被り拒絶される。この拒絶には顆粒細胞が関与していて、特に基底膜のムコ多糖類の分子構造上変化のある部位には特に強く反応していくことが知られている。

昆虫の食食細胞は侵入異物ばかりでなく、自己体内で生じた非自己的変性細胞なども異物と認識して排除することができる。よく観察される現象は幼虫期の組織崩壊が生じ蛹の

組織が新たに再構築される変態期で、この時期の血液細胞（食食細胞）は幼虫期には存在しなかった細胞膜蛋白質を発現し、この分子によって幼虫期の組織（例えば、脂肪体の基底膜）に結合し、それを非自己と認識して、キモトリプシン様プロテアーゼを放出し、幼虫期の組織を分解することが判明している（名取、1991）。

（B）液性の防御反応

B-1）感染防御因子としての抗菌蛋白質

微生物の中でも特に昆虫に細菌感染を引き起こす細菌類に対抗する手段として、昆虫は抗菌性の蛋白質を発現して、感染から免れている。現在までに約 100 種類もの物質が分離、精製され、アミノ酸配列まで決定されている。これらの抗菌蛋白質は大きく 5 つに分類することができる。これらは、セクロピン、アタシン、ディフェンシン、高グリシン含有抗菌性蛋白質、高プロリン含有抗菌性蛋白質であり、その他に属すタイプも知られており、多くは細菌感染に関連して脂肪体あるいは血球において合成され、体液中に分泌され、細菌に対して抗菌的に作用している（Hultmark、1993；谷合と山川、1999）。

a）セクロピン類

セクロピア蚕で最初に発見された分子量約 4 kD の抗菌蛋白質で、A、B、C、D の 4 つの型が存在している。2 個のアルファヘリックス構造があり、両親媒性で短い強塩残基の N 末端と長い疎水性の C 末端が見られる。細菌のグラム陽性、陰性を問わず殺菌作用を示すが、陰性菌の方が感受性が高い。このタイプの物質は、細菌の細胞膜リン脂質に作用し表面に穴を開け、細胞膜の電気化学的ポテンシャルを破壊することにより能動輸送を停止させて障害を与えることが知られている（Ando ら、1987；Kato ら 1993；山川、1997）。

b）アタシン類

グリシンに富むドメインをもち、分子量約 20kD の物質で、主として対数増殖期にあるグラム陰性細菌に抗菌的に作用する。抗菌活

性は比較的弱く静菌的で、一般的に細菌の外膜の浸透性機能に影響し、細胞分裂の不規則性を誘導したり、細胞壁ペプチドグリカンの合成を阻害する作用が観察されている（Ando and Natori, 1988）。

c）ディフェンシン類

この抗菌物質は分子量約 4kD で構造上、システインをもち、3 個のジスルフィド結合で折り畳まれているのが特徴である。昆虫類に存在するディフェンシンは哺乳類のマクロファージが合成するディフェンシンと相同性が高く、昆虫ディフェンシンと呼ばれている。どちらも血液細胞に由来することを特徴とし、細菌の細胞質膜をターゲットに、イオンチャンネルを形成し、細菌内膜の部分的減極、ATP 減少、細胞質カリウム流出などを引き起こし、細菌を攻撃することが判明している（山川、1997）。

d）高グリシン含有抗菌性蛋白質類

分子量が 10kD 前後でアタシン類とは異なるグリシン残基を多く含有する抗菌蛋白質であり、主としてグラム陰性細菌に作用する。ディプテリシンやヒメノプタエシンが分離同定されている。

e）高プロリン含有抗菌性蛋白質類

分子量が 2-4kD のペプチドで、プロリン残基に富んでいる。主としてグラム陰性細菌に作用するが、抗菌活性の発現には糖鎖が重要である。ドロソシン、フィロホコリシン、レボシンなどが分離同定されている。

f）その他の抗菌蛋白質類

カイコのモリシン、ハマダラバエのセラトトキシンは昆虫特有の抗菌性蛋白質であり、構造上、アルファヘリックスをもっている。

B-2）感染防御因子としての抗真菌性蛋白質

昆虫類はカビなど真菌類に対抗する手段の 1 つとして、抗真菌性の蛋白質を発現している。センチニクバエには AFP という分子量約 7kD で耐熱性の物質が存在し、例えばカンジダ菌の細胞膜を標的に細胞障害することが報告されている。また、ドロソミシンという抗真菌物質がショウジョウバエから分離精製されて

いる。脂肪体で合成され体液へと分泌されるこの物質は、植物由来の 5kd 抗真菌蛋白質と相同である。さらに、ホトリシンがチョウセンクロコガネから、メチニコウインがショウジョウバエから見出されている (Fehlbaum and Bulet, 1994; Iijima ら 1993)。

B-3) リゾチーム

動植物に広く分布している生体防御蛋白質で、昆虫においてもハチミツガ、カイコ、セクロピア蚕から分離されている。リゾチームの cDNA 解析から、昆虫リゾチームがニワトリ型に相同であることが判明している。一般的に、この防御蛋白質は、ミクロコッカス・ルテウスやバチルス・メガテリウムなど一部の細菌にだけ作用し、細胞壁ペプチドグリカンのグリカン鎖を切断して抗菌性を発揮する。

昆虫類の代表的な抗菌蛋白質

主として脂肪体由来 —— セクロピン類

(細菌細胞膜チャネル形成)

アタシン類

(グラム陰性菌の外膜蛋白質合成阻害)

(ペプチドグリカン合成阻害)

主として血球由来 —— ディフェンシン類

(グラム陽性菌細胞膜)

B-4) レクチン

レクチンは動植物に広く存在する細胞凝集性の糖蛋白質である。昆虫には数多くの種類のレクチンが見出されており、異物侵入や個体発生的に脱皮や変態時、あるいは損傷時に産生されることが特徴である。昆虫レクチンの生体防御機能として、レクチンが認識する糖鎖をもつ異物細胞を凝集し、その生体内拡散を防止すると同時に、血球によって処理されやすくすること、食細胞と異物とを橋渡し、オプソニンとして機能すること、そして食細胞機能を活性化して異物殺菌能を高めること、などが考えられ、これらは実験的に証明されている。一方、昆虫レクチンは生体防御機能をもつばかりでなく、個体発生あるいは再生においても重要であり、形態形成蛋白質とし

ても機能している (和合, 1995)。

昆虫類のレクチンとしてよく研究されているものは、センチニクバエのザルコファーガレクチン、ワモンゴキブリの LPS 結合蛋白質やリジェネクチン、カイコのヘモサイチンなどである。また、血球の中で、顆粒細胞には D-ガラクトース、プラズマ細胞にはマンノースや N-アセチル-D-グルコサミンなどの糖類が存在し、自己レクチン分子が結合することも報告されており、レクチン依存性の細胞性防御反応が促進すると考えられる (Kotani ら, 1995)。

B-5) フェノール酸化酵素前駆体活性化系

昆虫のフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) は活性化するとフェノール酸化酵素 (PO) になり、この酵素によってチロシンやドーパのようなフェノール性物質が酸化され、最終的にメラニンの黒色色素が形成される。この一連の酵素反応は異物認識と関係し、特に真菌類や細菌類の侵入で引き金が引かれる。特にチロシナーゼ型の PO の前駆体は、体液のみならずクチクラ、表皮に存在し、生体防御に役割を果たしている。

proPO は血球の 1 種であるエノシトイドによって体液中に供給されており、通常はこの不活性な状態で存在するが、ペプチドグリカンをもつ細菌や β -1, 3-グルカンをもつカビなどが侵入すると、これらの成分を認識できる認識蛋白質が反応する。この結合の後にセリン型のプロテアーゼが活性化すると、proPO が PO へと部分的に活性化していく。生じた PO はフェノール性物質を酸化して、ドーパキノンやドーパクロームという中間代謝物を経て最後にメラニン色素を形成する。この活性化系によって侵入異物はメラニン色素で覆われたり、顆粒細胞による細胞性防御反応も促進する結果、より早く排除されることが判明している。

昆虫の proPO は節足動物のヘモシアニンと相同な蛋白質であることが血球由来の cDNA から推測される proPO ポリペプチド I、II の一次構造の解析から明らかにされている

し、昆虫の proPO の cDNA クローニングもカイコ、ショウジョウバエ、タバコスズメガなどで成功し、その塩基配列から推定された全アミノ酸配列もわかっている (Kawabata ら 1995; Fujimoto ら、1995; Hall ら 1995)。

フェノール酸化酵素前駆体活性化系
微生物侵入 - (エリシター) - セリンプロテアーゼ
- proPO 活性化 -メラニン

B-6) 補体因子

補体は脊椎動物の血清中に存在する生体防御蛋白質で、通常 9 つの成分 (C1-C9) が知られている。この防御蛋白質の活性化 (C1, 42356789) は、抗原抗体複合体によって生じ、最終的に抗原を溶解する。この経路が古典的経路であり、その他、C142 とは無関係に微生物成分によって C3 より C9 まで活性化される副経路あるいはレクチンが関与するレクチン経路などが存在し、細菌やカビなどの微生物の溶解に関与している。

昆虫類にも補体成分の検索が行われ、今日、C3 成分活性化因子、C3 類似成分、副経路インヒビター、C3、C4 の制御系インヒビターなどの存在が報告されている (Anderson ら、1972; Aston ら 1976)。

参考文献

- 1) Anderson, R. S., Day, N. K. B. and Good, R. A. (1972) Specific hemagglutinin and a modulator of complement in cockroach hemolymph. *Inf. Immun.*, 5, 55-59.
- 2) Ando, K. and Natori, S. (1988). Inhibitory effects of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, 103, 735-739.
- 3) Ando, K., Okada, M. and Natori (1987). Purification of sarcotoxin II, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Biochemistry* 26, 226-230.
- 4) Ashida, M. and Brey, P. (1995). Role of the integument in insect defense : Prophenol oxidase in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10698-10702.
- 5) Aspan, A. et al. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the fresh water crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 939-943.
- 6) Aston, W. P., Chadwick, J. S. and Henderson, M. J. (1976). Effects of cobra venom factor on the in vivo immune response in *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Insect Physiol.*, 27, 171-178.
- 7) Brey, P. T., et al. (1993). Role of the integument in insect immunity: Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 6275-6279.
- 8) Fehlbaum, P., Bulet, P. (1994) Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* 69, 33159-33163.
- 9) Fujimoto, K. et al. (1995) Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7769-7773.
- 10) Hall, M. et al. (1995) Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7764-7768.
- 11) Hultmark, D. (1993) Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a mode for innate immunity. *Trends Genet.*, 9, 178-183.
- 12) Iijima, R. et al. (1993) Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *J. Biol. Chem.*, 268, 12055-12061.
- 13) Kato, Y. et al. (1993) Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm,

- Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23, 285-290.
- 14) Kawabata, T. et al. (1995) Molecular cloning of insect prophenol oxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7774-7778.
 - 15) Kotani, E. et al. (1995) Cloning and expression of the gene of hemocyanin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochem. Biophys. Acta*, 1260, 245-258.
 - 16) 名取俊二(1991) 変態と異物認識, 生体防御 8, 125-130.
 - 17) 谷合幹代子, 山川稔 (1999) 環境昆虫学 (日高敏隆, 松本義明編), 234-249.
 - 18) 山川稔 (1997) 昆虫機能利用学, pp101-129, 朝倉書店.
 - 19) 和合治久 (1995) 昆虫の生体防御反応. 日本応用動物昆虫学会誌, 39, 1-13.
 - 20) 和合治久 (1999) 環境昆虫学 (日高敏隆, 松本義明編), 220-233.

1.2.3. 環形動物 (小宮山一雄)

ミミズの免疫機能の概略

ミミズは陸生の無脊椎動物で、その生態は土壌とかかわりが深く、みみずが土を耕すことにより土壌環境が保たれているといっても過言ではない。事実、この機能を積極的に利用して、耕地の土壌改良や、コンポストにおける廃棄物処理に利用がなされてきた歴史がある。

野生種は日本では約 300 種いるといわれているが、分類についても今だ十分にミミズ解明されているとはいえない。一方で、市街化が進み、地表がアスファルトやコンクリートで覆われてしまい、彼らの生活の場は極端に減少しつつある。ミミズの減少は単に彼らの種の保存といった問題だけではなく、ミミズは野生生物の食物連鎖の原点でもあり、他の生物の生存にも少なからず影響があると考えられる。

ミミズは雌雄同体で、であるが一般に他家

受精で繁殖する。ミミズの生活環境は様々であるが、周囲には生存を脅かす多くの病原微生物がいる環境のなかで生活している。

ミミズの体表は粘液で覆われており、クチクラを有する固い上皮細胞で保護されている。粘液や上皮細胞は病原微生物の侵入を妨げている。このような物理的防御にくわえて、ミミズの生体が刺激を受けると、体の表面に開口している体孔から、強力な hemolysin、aggritinin をなどを含む coelomic fluid や多くの抗菌蛋白を持つ coelomocyte が排出され病原微生物の侵入を防いでいる。ミミズの免疫防御は脊椎動物のような、侵入する抗原に対する特異的な抗体産生が起こる液性免疫機構は存在しないが、細胞傷害活性を持った液性因子によるものと、マクロファージ、顆粒球、chorolagon cell といった細胞性免疫機構の 2 つの機構に大別される。

1) ミミズの免疫担当細胞

ミミズの閉鎖血管系であるが、血管内と体腔内ではほぼ同様の細胞が認められ、血液細胞は体腔へ出入りしているため、血球細胞と体腔細胞の両者は、ほぼ同義と考えられる。Coelomocyte の起源は、coelomic cavity を覆う上皮、もしくはその近傍にある lymphatic gland に由来すると考えられている。

ミミズは血球細胞 (coelomocytes) は、Cooper & Stein (1981)、Dales & Dixon (1981) らにより、義足をもち異物を貪食する能力有する Phagocytes (Amebocytes) と大型で球形の脂肪滴を胞体内に有する, chloragogen cell (eleocytes) の 2 種に分類されるが両者の区別が難しいことがあり、同じ細胞の分化度の違いあるいは、成熟過程の差であるとする考えもある。

Amebocytes についても、細胞の大きさ (10-30 μm) や顆粒の有無で、パリエーションが見られる。顆粒は好酸性のものと、好塩基性のものがある。Chloragogen cell は大きさが 17-70 μm で、細胞内に lipid や carotenoid pigment や glycogen を含んでおり (Dales 1961, Eckelbarger 1976)、時として顆粒を細胞質内

に認めるが、granular meocyte とは明らかに形態がことなる。

Cooper and Stein (1981)、Stein (1977)、Stein and Cooper(1978)は、ミミズの血球細胞を、さらに顆粒や細胞質の性状により、basophils, neutrophils, acidophils, granulocytes and chloragogen cell の5つのサブタイプに分類している。

しかし、Dales and Dixon(1981)は、eleocytes はいくつかの種において、phagocytic amebocyte から分化する可能性を指摘している。さらに amebocyte のいくつかは、一つの cell lineage の細胞が分化の段階で様々な大きさや性状を示していると考えられる (Dales and Dixon, 1981)。

組織化学的な方法により、細胞内に酸性ホスファターゼ、(グルクロニダーゼがすべての coelomocytes に認められるが、特に basophils and neutrophils に強く発現している。Peroxidase は、eleocyte にのみ弱く発現している。好中球では中性ムコ多糖を認める。

ミミズの免疫防御システム

1) 生体防御因子 (液性免疫因子)

溶血反応

ミミズにおいて見られる、無生物 (abiotic materials)、非自己の細胞や微生物に対する液性因子の多様性は無脊椎動物における液性因子のレパトアの一部として認められる。これらの液性因子の多くは、生理的に存在する非特異的な防御システムとして存在している。しかしながら、新しいタイプの分子が外来の異物に対しての反応として誘導されることが明らかとなり、無脊椎動物にも獲得性免疫機構の存在が示唆されている。(Boman&Hulmark1987)。例として、無脊椎動物で、リソゾームとは異なった抗菌活性が体液中に見られる。In insects, Phylum においては、多くの抗菌活性を示す物質が知られている。Defensins, ceropins などは昆虫において良く知られるが、ヒトでも認められる抗菌物質である (Eisenhauer, 1989, Lee1989)。

ほとんど、すべての無脊椎動物 (phyla) は脊椎動物の赤血球を溶血することが知られ、この物質を hemolysins と呼ぶ。Acelomates においては、組織の抽出液に溶血活性が報告されている (Kamiya1989)。同様な活性は celomate においても認められる。

[Du Pasquier&Duprat (1986), Weinheimer (1969, Day (1972), Bretting&Renwarantz (1973), Parrinello (1979), Roch (1979), Anderson (1980), Cenini (1983), Tuckova (1986), Canicatti (1987))。

ミミズは体腔液中に、脊椎動物の赤血球やある種の腫瘍細胞に障害活性を示す物質が認められており、赤血球を溶解する因子を hemolysins と呼び、無脊椎動物では組織の抽出液や体液中にこの物質が存在することが一般に知られている。この物質は無脊椎動物における補体活性に類似していると考えられている。また hemolysis は脊椎動物の pore-forming protein に類似している Canicatti (1990)、Canicatti and Roch (1993)。しかし、分子レベルでの証明はなく、明らかではない。

1968 年、ミミズにおいて初めて脊椎動物の赤血球に対する溶血活性が、Du Pasquier and Duprat により報告されて以来多くの報告がある。ミミズの溶血活性は、coelomocyte, Chloragocyte から放出されるばかりでなく、および体表を覆っている粘液中にも存在する Valembois et al (1984)。

無脊椎動物の溶血活性

1968 年に環形動物のミミズ (アイゼニア) に溶血活性があることが初めて報告された (DuPasquier & Duprat 1986)。この溶血活性は数種類のミミズにみられる。またこの活性は、体腔液、体腔細胞、chloragocyte 体表の粘液中に存在する。(Valembois1988)。Cocoon albumin のアルブミンにも溶血活性があるが、celomic fluid とは異なっている epithelial glands に含まれている。(Valembois1984)。Polychaetes, Naineteis laevigata and petalo-proctus terricola のヘモリシンは single protein からなる (Roch, 1990)。280kDa からなる

蛋白は 4 つの 70 kDa のサブユニットに別れる。

また *Spirographis spallanzani* の精液からは 16、22、40kDa の 3 種の主要タンパクと 29、34kDa のマイナーなタンパクが認められる。(Canicatti1992)。 *Eisenia fetida andrei*、では 40、45kDa の 2 つのタンパクが赤血球の溶血に関与している (Roch1992)。

これら hemolysin には溶血活性以外にも多機能性が報告されている。多くの hemolysin は、食能を活性化させる (Stein & Cooper 1981)。また、hemolysin は、ロゼット形成の際の最初の細胞認識に関与していると考えられる (Toupin 1976)。これらの結果から、環形動物においては、hemolysin、anti-bacterial activity、agglutinating activity は同じ分子によって行われるが、アッセイ方法により異なってみえるのかもしれない。(Roch 1987)。

Anthropods においては、上記の機能は、刺激を加えない限り、認められない。

hemolysin の活性は、coelomic fluids、coelomocyte lysate、external secretions などがあるが、どの細胞が産生しているのかは明らかではない。

無脊椎動物においては、非タンパク性の溶血が存在することが報告されている。それは、サポニンによるもので、熱に安定なグリコシド、燐酸グリセロールなど知られている。(Roch, 1990)

Proteolytic Enzymes in Annelides

ミミズ(*Sabellaria alveolata*)の消化液から、塩基性の pH で活性を示す serine proteinase が数種類見つかった。これらの酵素の origin は明らかでないが、broAd specificities がみられる (Peucellier, 1983) ミミズ (*E. foetida*) の coelomocytes 培養液から、異種蛋白を消化できる proteinase が確認される (Valembois et al, 1973)。また、脊椎動物の血清タンパク (pig IgG, Hu serum albumin-HAS) を分解するが自身の、体腔液や同種の他個体のタンパクは分解しない。(Tuckova et al) これらのタンパク分解酵素の分子量いずれも約 40kda

で、inhibitor による検索で、hemolytic activity とは異なる酵素である (Roch 1979)。Hemolysis は simple sugar で阻害されるが、proteolysis は阻害されない。Proteolysis は、1 mM PMSF で阻害されるが、hemolysis は阻害しない (Tuckova, 1986a)

Proteolysis は pH-dependent で、pH7 and pH10 にピークがあり、dose-dependent、Ionic strength や熱に対して耐性があり、100℃で 15 分加熱しても、完全に失活することはない。この酵素は、serine proteinase で分子量 45kDa で、trypsin-like and chymotrypsin-like な酵素である (Roch, 1991b)。

最近の研究では、異なったいくつかのタンパク分解能をもつ酵素が分離されている。(Bilej 1993, 1992b)

Antigen binding protein

ミミズには、抗原刺激に対して脊椎動物にみられるような抗体の産生はないが、体内に注入された抗原物質に対して抗体の様に特異的に結合する蛋白があることが報告された。この物質の機能は、まだ十分に解明されていないが、抗体と同じように、抗原物質の排除に働くとしたら、液性免疫機構は無脊椎動物でその原形がすでに認められることとなり、大変注目されている。(Tuckova,1988) (Tuckova, 1991)

細胞性免疫

Phagocytosis

ミミズにおける phagocytosis を始めに観察したのは Metchnikoff(1981)である。ミミズの coelomocytes は、進入してくる異物や細菌などに対しての、本質的な防御因子として働く、なぜなら体腔は外界と、体孔を通じて直接に接しているからである。Phagocytosis は、非特異的かつ生理的な作用であるとも考えられる。しかし、最近のデータでは、ヒツジ赤血球を、脊椎動物の IgG、IgM、C3b、C3bi、C3d など前処理を行うと phagocytosis が増強された。これらの結果は、脊椎動物に見られると同様なレセプターの存在を示唆する。部

分的に共通である可能性がある。

我々は、蛍光ビーズの貪食能および貪食後蛍光を発する色素を用いて、FACS で解析している。環境化学汚染物質を作用させたミミズでは貪食能の低下を、汚染度の指標あるいは、免疫能への影響として観察できる可能性がある。

Chemotaxis

他の生物の組織抗原やバクテリアなどに対して、走化性を示すことが観察され、この機能を有するのは、好中球 (type I granulocyte) が 92-94% を占めていた。

Cell chamber を使って可能かどうか?、Amebocytes が多いので、自走するものが多いと考えられる。環境化学汚染物質の投与方法が問題となる。

Encapsulation

体内に進入してきた異物を Coelomocytes が貪食できないときには、異物を包囲化して、固定する反応が脊椎動物と同様に認められる。Metchnikoff の観察では、結節は 2 層からなり、外側はキチン質からなり、多分パラサイトが分泌したと考えた。内側は coelomocytes の層状の集団からなる。E. foetida においては、最初に出来た結節は速やかに、coelomocytes の集簇により大きさを増す。その大きさは直 1-2mm で、brown body と呼ばれる。この結節は最後には、糞と一緒に排泄される。この結節には、水解酵素や酸化酵素が認められるが、後期に至るまでは酵素活性は見られない。免疫学的防御の一環と考えられる。

Natural Cytotoxicity (cell mediated)

細胞障害活性は無脊椎動物においても、脊椎動物に見られるのと同様な種のバリエーションがみられる。この二つの種において、生存のための戦略は似ているが、外来の遺物やタンパクに対する中和の過程や異物の除去の過程は異なっている。

Natural Cytotoxicity は今日免疫防御システム

としては古典的であり、抗体産生による液性免疫システムや、T細胞の分化より早い時期に確立した免疫システムであると考えられている。しかし、その起源は今だ明らかではない。近年、脊椎動物における Natural Cytotoxicity の測定と同様な方法で、細胞障害活性を測定し、coelomocytes による Natural Cytotoxicity が報告されてきている。無脊椎動物による赤血球やある種の腫瘍細胞を障害する能力はさまざまであり、種によって異なっている。環形動物はこれらのなかで最も強い傷害活性を持つと考えらる (Roch1981a) 4000units。

もちろん無脊椎動物にとって、脊椎動物の赤血球は本質的な標的ではないが、溶血現象の際の、膜に起こる現象の解析モデルとして有意である。また、病原微生物に対する傷害活性も同様に観察できる (bacteria, protozoa, parasites etc.) Insect は natural lytic component は補体様活性を示すことから、celomate のそれとは異なっていると考えられる。

この複雑なシステムは進化のなかでは、fish, amphibians からみとめられる。

無脊椎動物における hemolysis と脊椎動物における pore forming proteins に類似性がみられる。(Canicatti1990)。しかし系統発生的には異なったシステムであり更なる遺伝子レベルでの検討が必要である。(Canicatti & Roch1, 993)

最近、我々はミミズの coelomocytes の顆粒中に、perforin 様蛋白を見だし、ヒトマウスの perforin 抗体と反応する、約 70Kda の蛋白を確認した。遺伝子解析の結果、ヒト、マウスの遺伝子とは、相同性が低い、シスチンの配列が一部類似しており、更なる解析を続けている。(Komiyama, Moro, Cooper, 1998)。

Mitogen 刺激による coelomocytes の反応脊椎動物で、リンパ球の mitogen 反応の測定に利用されている、Concanavalin A (Con A)、phytohemagglutinin (PHA)、Lipopolysaccharides (LPS) を用いて検索されている。

ConA

ConA は刺激後 4 日に thymidine の取り込みがピークとなる。ConA に反応する細胞は、coelomocytes の約 10% 程度でさほど多くはない。細胞の種類は、non-adherent cell である。しかし、蛍光色素を用いて検索すると、ConA は adherent cell にも結合していることが解る。結合後、30 分で細胞に adherent cell では capping を認めた。2 時間後には capping は消失し、細胞質全体に蛍光が拡がった。

Small cell では、capping は 1 時間後に約 20%、90 分後には 30% 認められた。その後、細胞質に取り込まれ、細胞質全体が均一に蛍光を発した。

ConA の coelomocytes への結合は Methyl- α -D-mannose が最も強く抑制した。

PHA

L. Terrestris の coelomocytes が PHA 刺激で non adherent cell にのみ DNA 合成が認められた。Thymidine の取り込みは 4 日めにピークとなった。

LPS

LPS は、少数の non adherent cell にのみ DNA 合成が認められた。

Chemotaxis

他の生物の組織抗原やバクテリアなどに対して、走化性を示すことが観察され、この機能を有するのは、好中球 (type I granulocyte) が 92-94% を占めていた。

Allogenic in vitro stimulation (MLR)

ミミズにおける MLR は、脊椎動物におけるそれとは異なっている。通常 MLR は認められないが、同種動物の細胞で、数ヶ月の間を明けて行くと反応が認められる。

F1 における反応様式は、genetic control を受けているのか、あるいは生理学的反応の結果かは明らかでないが、少なくとも、無脊椎動物のリンパ球に似た反応が見られる。

移植片拒絶反応 (graft rejection)

移植組織片に対する coelomocytes の反応は、他家移植片では、同種移植片より速やかに、かつ強い移植片の拒絶がおこるが、自己の組織に対しては拒絶がおこらず生着する。移植片の拒絶や、heal の程度および速度は、移植片と宿主の遺伝的距離による。Allografts や xenografts の拒絶反応を利用して、免疫学的な memory の検索がおこなわれている。始めの grafts が拒絶されてから、短期間の内に、2 回目の移植を行うと、前より速やかに拒絶が起こる。しかし、治癒後時間を置いて移植を行うとこの反応本能は見られない。これにより短期間の memory が存在している。これらの研究の結果から、ミミズのメモリーは約 10 日以内で、20-90 日後に再移植すると、拒絶は起こらなくなってしまう。

参考文献

- 1) Bang, F. B.. (1973) A survey of phagocytosis as a protective mechanism against disease among invertebrates. In: Braum W, Unger J (eds) Non-specific factors influencing host resistance. Katger, baselm, 2-10.
- 2) Bilej, M., Tuckova, L., Rejnek, J., ervicka, V. (1990) In vitor antigen-binding propaties of coelomocytes of Eisenia foetida (annelida). Immunol. lett.. 26, 183-188.
- 3) Bilej, M., Tuckova, L., Rossmann, P. (1994) A new approch to in vitro studies of antigenic response in earthworms.. Dev. Comp. Immunol.. 18, 363-367.
- 4) Boman, H. G., Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. Annu Rev. Microbiol. 41, 103-126.
- 5) Burch, S. W., Fitzpatrick, L. C., Goven, A. J., Venables, B. J., Giggelman, M. A. (1999) In vitro earthworm Lumbricus terrestris coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation.. Bull Environ Contam Toxicol. 62(5), 547-54#
- 6) Canicatti, C. (1987) Evolution of the lytic system inechinoderms. 1. Naturally occuring

- hemolytic activity in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) coelomic fluid.. *Boll Zool.* 54, 325-329.
- 7) Canicatti, C. (1990) Hemolysin: pore-forming proteins in invertebrates. *Experientia.* 46, 239-244.
 - 8) Canicatti, C., Roch, P. (1993) Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of coelomic fluid hemolysis.. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 401-407.
 - 9) Canicatti C. (1990) Hemolysins: pore-forming proteins in invertebrates.. *Experientia.* 46(3), 239-44.
 - 10) Canicatti C, Roch P. (1993) Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of *Spirograhis spallanzani* coelomic fluid hemolysin.. *Comp Biochem Physiol C.* 105(3), 401-7.
 - 11) Cooper EL. (1986) Leukocyte activity during earthworm inflammatory reactions.. *Int J Tissue React.* 8(3), 175-84.
 - 12) Cooper EL, Cossarizza A, Kauschke E, Franceschi C. (1999) Cell adhesion and the immune system: a case study using earthworms.. *Microsc Res Tech.* 44 (4), 237-53.
 - 13) Cooper EL, Cossarizza A, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Quaglino D, Franceschi C. (1995) Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cell Immunol.* 166 (1), 113-122.
 - 14) Cooper EL, Cossarizza A, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Quaglino D, Franceschi C. (1995) Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562. *Cell Immunol.* 166(1), 113-22
 - 15) Cooper EL Stein EA Oligochetes.. (1981) In: Ratcliffe NA Rpwley AF(eds) *Invertebrate blood cells.* vol 1. Academic Press London. 75-140.
 - 16) Cossarizza A, Cooper EL, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Gri G, Quaglino D, Franceschi C (1996) Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines.. *Exp Cell Res.* 224(1), 174-82.
 - 17) Dales RP. (1961) The coelomic and peritoneal cells systems of some sabellid polychaetes. *Q. J. Microsc. Sci.* 102, 327-346.
 - 18) Dales RP, Dixon LRJ. (1981) Polychaetes. In: Ratcliffe NA Rpwley AF(eds) *Invertebrate blood cells.* vol. 2 Academic Press London. 35-74.
 - 19) Day, N. , Geiger, H., Finstad, J., Good, R. A. (1972) A starfish hemolymph factor which activates vertebrate complement in the presence of cobra venom factor.. *J. Immunol.* 109, 164-167.
 - 20) Du pasquier L, Dupart P. (1986) Aspects humoraux et cellulaires d'une immunité naturelle non spécifique chez l'oligochète *Eisenia foetida* (Lumbricidae). *CR Acad Sci Paris.* 266, 638-546.
 - 21) Eckelbarger KJ. (1976) Origin and development of the amoebocytes of *Nicolaus zoostericola* (Polychaeta Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis.. *Mar Biol.* 136, 169-182.
 - 22) Eisenhauer P. B, Harwig S. S. L, Szklarczyk D, Ganz T, Selsted M. E, Lehrer I. (1989) Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils. *Infect. Immun.* 57, 2021-2027.
 - 23) Folia Biol (Krakow). () Earthworm immune responses. *Folia Biol.* 45(1-2), 1-9
 - 24) Hanusova, R., Bilej, M., Brys, L., De-Baetselier, P., Beschin, A. (1999) Identification of a coelomic mitogenic factor in *Eisenia foetida* earthworm.. *Immunol Lett.* 65(3), 203-11.
 - 25) Herberman, R. B. (1982) Natural killer cells and their possible relevance to transplantation biology. *Transplantation.*

- 34(1), 1-7.
- 26) Jacques, T., Gilles, L. (1977) Coelomocytes of earthworms: phytohemagglutinin (PHA) responsiveness. Phylogeny of thymus and bone marrow - bursa cells. 19-25.
 - 27) Kamiya, H., Muratomo, K., Goto, R., Yamazaki M. (1988) Characterization of the antibacterial and antineoplastic glycoproteins in a sea hare *Aplysia juliana*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 54, 773-777.
 - 28) Lee J, Y., Boman, A., Chuanxin, S., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, N., Boman, H. G. (1989) Antibacterial peptides from pig intestine; Isolation of a mammalian cecropin.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9159-9162.
 - 29) Marks DH, Stein EA, Cooper EL. (1979) Chemotactic attraction of *Lumbricus terrestris* coelomocytes to foreign tissue.. *Dev Comp Immunol.* 3(2), 277-85.
 - 30) Metnikoff, E. E. (1981) Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Ann Inst Pasteur*. 1, 97-103.
 - 31) Nusetti, O., Parejo, E., Esclapes, M. M., Rodriguez-Grau, J., Marciano, L. (1999) Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 63(3), 350-6.
 - 32) Nusetti, O., Parejo, E., Esclapes, M. M., Rodriguez-Grau, J., Marciano, L. (1999) Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus*. *Bull Environ Contam Toxicol.* 63(3), 350-6.
 - 33) Oupin J, Lamoureux G, (1976) Coelomocytes of earthworms: the T-cell-like rosette. *Cell Immunol.* 26, 127-132.
 - 34) Peucellier, G. (1983) Purification and characterization of proteinases from the polychaete annelid *Sabellaria alveolata*. *Eur. J. Biochem.* 136, 435-445.
 - 35) Poch P. (1979) Protein analysis of earthworm coelomic fluid: I-polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia foetida andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 599-608.
 - 36) Roch, P. (1977) Reactivity in vitro of the leukocytes of the earthworm *Eisenia foetida* Sav. to several mitogenic substances. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci.* 284(8), 705-8.
 - 37) Roch, P. (1979) Protein analysis of earthworm coelomic fluids. I. Polymorphic system of the natural hemolysins of *Eisenia foetida andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 599-608.
 - 38) Roch, P., Stabili, L., Pagliara, P. (1991) Purification of three serine proteinases from the coelomic cells of earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B, 597-602.
 - 39) Roch, P., Valembois, P., Du Pasquier L. (1975) Response of earthworm leukocytes to concanavalin A and transplantation antigens. *Adv Exp Med Biol.* 64, 45-54.
 - 40) Roch, Ph., Valembois, P., Lassegues, M. (1987) Genetic and biochemical polymorphism of earthworm humoral defence. In Cooper EL, Langlet C, Bierné J. (eds) Progression on clinical and biological research. vol 233. Developmental and comparative immunology. Alan R. Liss, New York. 91-102.
 - 41) Stein, E. A., Cooper, E. L. (1978) Cytochemical observations of coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* 10, 657-678.
 - 42) Stein E. A., Cooper, E. L. (1978) Cytochemical observations of coelomocytes from the earthworm. *Lumbricus terrestris*. *Histochem. J.* #657-678.
 - 43) Stein E. A., Cooper, E. L. (1981) The role of opsonin in phagocytosis by coelomocytes of *andrei*. the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cev. Comp. Immunol.* 5, 415-425.
 - 44) Stein, E., Avtalion, R. R., Cooper, E. L.

- (1977) The Coelomocytes of the Earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *J. of morphology*. 153(3), 467-477.
- 45) Stein, E., Avtalion, R. R., Cooper, E. L. (1977) The Coelomocytes of the Earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. *Journal of morphology*. 153(3), 467-477.
- 46) Suzuki, M. M., Cooper, E. L. (1995) Allogeneic killing by earthworm effector cells. *Nat Immun.* 14(1), 11-19.
- 47) Tuckova, L., Bilej, M. (1994) Antigen processing in earthworm. *Immunol. Lett.* 41, 273-277.
- 48) Tuckova, L., Rejnek J., Sima, P. (1986) Lytic activities in coelomic fluids of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* 10, 181-189.
- 49) Valembois, P., Lassegues, M., Roch, Ph. (1992) Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia foetida* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev Comp Immunol.* 16, 95-101.
- 50) Valembois, P., Roch, Ph., Lassegues, M. (1984) Simultaneous existence of hemolysis and detoxification. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A, 141-145.
- 51) Valembois, P., Roch, Ph., Lassegues, M. (1988) Evidence of plasma clotting system in earthworms. *J. Invertebr. Pathol.* 51, 221-228.
- 52) Ville, P., Roch, P., Cooper, E. L., Narbonne, J. (1997) Immuno-Modulator Effects of Carbaryl and 2, 4 D in the Earthworm *Eisenia foetida*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 32(2), 291-7.
- 53) Weinheimer, P. F., Evans, E. F., Stround, R. M., Acton, R. T., Painter, B. (1969) Comparative immunology natural hemolytic system of spiny lobster *Palinurus argus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130, 322-326.

2. 環境生物の免疫機能におよぼす有害化学物質の影響 (文献調査)

2.1 脊椎動物

2.1.1 哺乳類

野生動物

(小林隆弘)

野生動物のなかではアザラシとイルカの免疫機能におよぼす影響に関する研究と汚染物質として考えられる TCDD、PCB や DDT 等をラットあるいはマウスに投与し免疫機能におよぼす影響に関する研究が報告されている。1988 年およそ 2 万頭のアザラシ (*Phoca vitula*) と数百頭の灰色アザラシがヨーロッパにおいて死亡した (Dietz ら、1989)。ヨーロッパにおける大量死亡の原因がこれまで確認されていない morbillivirus であること (Osterhaus ら、1988) が明らかとなり phocid distemper virus (PDV-1) と命名された。この大量死を説明する仮説として 免疫毒性のある環境有害化学物質やアザラシの頭数の問題が挙げられた。有害化学物質可能性があるかについてまず餌となるニシンについての汚染状況が検討されている。大西洋とバルト海のニシンではバルト海の方が TEQ にして 10 倍高いことが報告されている。大西洋とバルト海のアザラシではバルト海のアザラシの脂肪 (286ngTEQ) の方が大西洋 (90TEQ) のものより TEQ にして 3 倍高いことが明らかにされた。これらのことからバルト海のニシンが TCDD や PCB で汚染されておりそれを餌にしているバルト海のアザラシでは TCDD や PCB 濃度が上昇していることが確認された。また、メキシコ湾での bottlenose dolphin (1987- 1988) (Lipscomb ら、1994)、地中海での striped dolphin (1990-1991) (Aguilar ら、1994)においても汚染されていることが報告されている。

そこで、免疫毒性のある環境有害化学物質が免疫機能にどのような影響があるかについて検討された。アザラシを 2 群に分け、一方には汚染の少ない大西洋のニシンを、もう一方にはバルト海のニシンを与え、その免疫機能について検討した。感染との関係で重要な防御の役割を果たすナチュラルキラー活性は

汚染されたバルト海のニシンを餌にした群で低下することが見いだされた (Ross ら、1994)。また、コンカナバリン A (ConA)、フィトヘマグルチニン (PHA)、ポークウィドウマイトジェン (PWM) といったマイトジェンによる T リンパ球の増殖反応は 6 から 10 ヶ月後に低下した (De Swart ら、1994、1995a、1995b)。このマイトジェンに対する反応の低下は広範囲に分布するバンドウイルカにおいても観察されている。1991 年 6 月にフロリダ西岸に生息するバンドウイルカから採取した血液から ConA とフィトヘマグルチニン (PHA) に対するリンパ球の応答と垂集団から全血の汚染濃度を比較した。バンドウイルカにおける免疫応答反応の減少と全血の汚染濃度の増加に相関が報告されている (Lahvis ら、1995)。また、アザラシにおいて、混合リンパ球反応や外来抗原に対する特異的な反応も破傷風毒素や狂犬病の抗原 (De Swart ら、1995b)、卵白アルブミンを使用した *in vitro* の実験において低下することがあきらかにされている。また、遅発型過敏症も低下することが報告されている (Ross ら、1995)。

バルト海の汚染されたニシンを餌にすると免疫機能が低下することは汚染されたニシンをラットに与え、免疫機能におよぼす影響を検討することでも確認されている (Ross ら、1996)。ラットサイトメガロウィルスに特異的な T リンパ球の反応性、ナチュラルキラー活性、マイトジェンに対する反応のいずれもが低下することが報告されている。

これらのことから、有害汚染物質により宿主の免疫機能が低下し、感染が起きたりその病態が増悪することが野生生物においてあり得ることが示唆された。

参考文献

- 1) Aguilar, A., and Borrell, A. (1994) Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci. Total. Environ.* 154, 237

- 2) De Swart, R. L., Ross, P. S., Vedder, L. J., Timmerman, H. H., Heisterkamp, S. H., Van Loveren, H., Vos, J. G., Reijnders, P. J. H., and Osterhaus, A. D. M. E. (1994), Impairment of immune function in harbor seals (*Phoca vitulina*) feeding on fish from polluted waters. *Ambio* 23, 155.
- 3) De Swart, R. L., Ross, P. S., Timmerman, H. H., Hijman, W. C., De Ruiter, E., Liem, A. K. D., Brouwer, A., Van Loveren, H., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., and Osterhaus, A. D. M. E. (1995a), Short-term fasting does not aggravate immunosuppression in harbor seals (*Phoca vitulina*) with high body burdens of organochlorines. *Chemosphere* 31, 4289.
- 4) De Swart, R. L., Ross, P. S., Timmerman, H. H., Vos, H. W., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., and Osterhaus, A. D. M. E. (1995b), Impaired cellular immune response in harbour seals (*Phoca vitulina*) feeding on environmentally contaminated herring. *Clin. Exp. Immunol.*, 101, 480.
- 5) Dietz, R., Heide-Jrgensen, M.-P. and Hankonen, T. (1989), Mass deaths of harbor seals (*Phoca vitulina*) in Europe. *Ambio*, 18, 258.
- 6) Lahvis, G. P., Wells, R. S., Kuehl, D. W., Stewart, J. L., Rhinehart, H. L., and Via, C. S. (1995), Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environ. Health perspect.*, 103, 67.
- 7) Lipscomb, T. P., Schulman, F. Y., Moffett, D., and Kennedy, S. (1994), Morbilliviral disease in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the 1987-1988 epizootic. *J. Wildl. Dis.*, 30, 567.
- 8) Osterhaus, A. D. M. E., and Vedder, E. J., (1988), Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, 335, 20.
- 9) Ross, P. S., De Swart, R. L., Timmerman, H. H., Reijnders, P. J. H., Vos, J. G., Van

Loveren, H., and Osterhaus, A. D. M. E. (1996), Suppression of natural killer cell activity in harbour seals (*Phoca vitulina*) fed Baltic Sea herring. *Aquat. Toxicol.*, 34, 71.

- 10) Ross, P. S., De Swart, R. L., Reijnders, P. J. H., Van Loveren, H., Vos, J. G., and Osterhaus, A. D. M. E. (1995), Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environ. Health Perspect.*, 103, 162-7.
- 11) Ross, P. S., Van Loveren, H., De Swart, R. L., Van der Vliet, H., De Klerk, A., Timmerman, H. H., Van Binnendijk, R. S., Brouwer, A., Vos, J. G., and Osterhaus, A. D. M. E. (1996), Host resistance to rat cytomegalovirus (RCMV) in adult PVG rats fed herring from the contaminated Baltic Sea. *Arch. Toxicol.*, 70, 661-71

実験動物 (平野靖史郎)

一口に免疫系に及ぼす影響といっても、免疫機能を抑制 (immunosuppression) する場合と免疫機能を賦活 (immunostimulation) する場合がある。げっ歯類とヒトにおいて免疫毒性が知られている化学物質を表 2-1-1-1 にまとめた。

ある種の薬物により免疫抑制が起こることは、癌の化学療法を受けている患者が一般集団に比べ 5-100 倍の白血病の罹患率であることや、臓器移植した人や自己免疫疾患患者で免疫抑制剤使用のため癌が多発するため良く知られた事実である。一方、環境中の化学物質により免疫抑制が起こり発癌するか否かは明らかではない。しかし、免疫抑制剤を用いた人に良く見られる非ホジキンスリンパ腫の発症率が、農薬やベンゼンを曝露した場合に上昇しているなど、その可能性は否定できない。

免疫機能の低下により細菌、ウイルス、真菌類や寄生虫感染にかかり易くなることも知られている。免疫不全患者で良くみられるものは、細菌では *Staphylococcus aureus*、

表 2-1-1-1 げっ歯類とヒトにおいて免疫毒性が知られている化学物質

化学物質	げっ歯類	ヒト
2,3,7,8-テトラクロロダイオキシン		
	+	+
PCB	+	+
ポリ臭化ビフェニール	+	+
ヘキサクロロベンゼン	+	N.D.
鉛	+	N.D.
カドミウム	+	N.D.
有機水銀	+	N.D.
7,12-ジメチルベンズアントラセン		
	+	N.D.
ベンツピレン	+	N.D.
ジオクチル錳	+	N.D.
ジブチル錳	+	N.D.
ベンジジン	+	+
NO ₂ , O ₃	+	+
ベンゼン, トルエン, キシレン		
	+	+
アスベスト	+	+
ジメチルニトロソアミン	+	N.D.
ジエチルスチルベスチロール	+	+

J. Vos, et al., *TIPS*, 10: 289-292 (1989) より改変

Streptococci, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Atypicalmycobacteria*, ウイルスでは *Herpes virus*, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, *Human papillomavirus*, 真菌類では *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* などである。

免疫機能を賦活する環境化学物質は、ヘキサクロロベンゼンやセレンなどに限られている。IL-1, -2, -6, TNF, IFN γ などのサイトカインによりインフルエンザ様の症状がでたり、既往の湿疹、喘息、鼻炎などの症状が増悪することが知られているので、これらサイトカインの産生を介して化学物質が免疫賦活に働くことは予想される。興味深いことに、BCG や INF の投与により P450 などの肝薬物代謝系の活性が低下することが知られているが、これはマクロファージの活性化が起こり IL-1 や IL-6 の産生が昂進したための二次的効果と考えられている。

ハロゲン化炭化水素の免疫毒性

PCDD

2、3、7、8-TCDD を曝露したモルモット、ラット、マウスにおいて胸腺の萎縮がみられる。これは CD4⁺ CD8⁺細胞の減少に起因するが、CD4⁺ CD8⁺細胞の分化阻害ではなく胸腺ストローマ細胞を介した変化と考えられている。また胸腺リンパ球に TCDD を *in vitro* で曝露するとアポトーシスが観察される。また TCDD に曝露したマウスやラットではインフルエンザウイルスによる致死率の増加、寄生虫卵排除機能の低下、SRBC に対する抗体産生能の低下あるいは上昇が報告されている。TCDD を投与したマウスにおいて CD4⁺細胞や CD20⁺細胞の減少と CD8⁺細胞の増加が報告されている。しかしヒトにおいては、母乳の TCDD 濃度の上昇に伴い乳児の CD8⁺細胞はむしろ減少しており、動物実験とは対照的な結果が得られている。

PCB/PCDF

カミネ油症では当初 PCB が原因物質と考えられていたが、その後の分析により PCDF の方が PCB より大きな影響を及ぼしていたものと推測されている。

油症患者に慢性甲状腺炎や Graves 病などの自己免疫疾患が高率にみられるが、これは PCB/PCDF による慢性中毒の結果と考えられている。油症発症 28 年後においても血中 PCB 濃度の高い人に、高率で高い値の抗サイログロブリン抗体価が認められた。

PCB を投与したラット、マウス、モルモット、ウサギにおいて抗体産生能の低下が認められる。ツペリクリンに対する遅延型反応は、PCB を投与したモルモットには見られるが、ウサギではみられない。

PCB を投与した動物において、マクロファージの貪食能、肝臓や脾臓における病原菌の除去能力、NK 細胞の活性の低下が認められる。PCB を曝露したサルにおいて CD8⁺細胞の上昇と CD4⁺細胞の減少が認められる。

HCB

HCB を投与したラットでは免疫能が昂進し、脾臓や胸腺重量の増加、血清 IgM 濃度の上昇、リンパ節におけるろ胞、胚中心、高内皮細胞数が増加していた。

一方、マウスでは HCB 投与により細胞性免疫や抗体を介した免疫能が低下し、リーシュマニアなどの原虫や腫瘍細胞に対する抵抗力も減少することが報告されている。HCB に対する感受性はラットよりマウスの方が高いという結果が得られており、ラットとマウスにおける免疫反応の違いを反映している。ラットにおける免疫機能の増強は、自己免疫と関連があるものと考えられている。

農薬

DDT/クロルデン/リンデン

有機塩素系農薬の免疫毒性作用について結論は得られていない。DDT を投与したラットにおいて血清の抗 BSA 抗体価が上昇したという報告がある一方で、血清 IgG や IgM 濃度に変化はなかったという報告もある。10mg/kg 体重の DDT を投与したラットにおいて胸腺や脾臓重量の減少が認められる。リンデンを投与した動物においては免疫方法の違いにより、抗体産生が昂進する場合と低下する場合が報告されている。

有機リン農薬

パラチオンやマラチオンにより PFC が低下するという報告があるが、この現象はコリンエステラーゼ活性阻害による二次的効果である可能性がある。また、O、O、S-TMP はマクロファージの抗原提示能をはじめとする機能を低下させることが報告されている。

金属

一般的に金属の曝露はB細胞とT細胞の両細胞の機能に影響を及ぼし、高濃度では免疫抑制を低濃度では免疫増強を起こす可能性がある。

カドミウムを曝露したB6C3F1 マウスにおいて貪食作用や NK 細胞活性が低下し、ウイ

ルスに対する抵抗性が低下することが報告されているが、液性免疫に及ぼす影響については不明な点が多い。

鉛を曝露した動物において感染抵抗性が低下することが知られているが、酢酸鉛、塩化鉛を経口投与したマウスの遅延型反応が抑制されているのに対し、酸化鉛、硝酸鉛、炭酸鉛では変化がみられないなど不明な点が多い。無機水銀や有機水銀の曝露も胸腺や脾臓の萎縮や免疫能を低下させることが報告されている。

有機錫も、胸腺、脾臓やリンパ節の萎縮を起こすことが知られている。また、トリブチル錫オキシドは、液性免疫と細胞性免疫とともに強く抑制する。

ガリウムヒ素を気管内投与したマウスにおいて、SRBC に対する IgM や IgG 産生能の低下や MLR も減少することが知られている。一方 C3 レベルや LPS に対する増殖反応、NK 活性は上昇すると報告されている。

ベリリウム作業者に肺や皮膚の内芽腫が発症することが知られている。これはヘルパー T 細胞(CD4+)が IL-2 依存的にベリリウムに対して反応するためであると考えられている。最近の知見では HLA の遺伝多型において HLA-DpB1 型の人にベリリウム肺が多発することが知られている。これは、HLA-DpB1 ではアスパラギン酸がコードされていてベリリウムが抗原として提示されやすくなっているためであると推測されている。

大気汚染物質

オゾン、NO₂、SO₂、VOC や金属塩の吸入によりグラム陽性菌の肺からのクリアランスが低下することが報告されている。オゾンの吸入により気管支肺胞洗浄液中のマクロファージ、好中球、リンパ球数の上昇とともに胸腺や脾臓重量の減少が見られる。

アスベストの曝露によりリンパ球増殖、遅延型反応、一次抗体産生の低下が見られる。アスベストを曝露したマクロファージや肺胞型上皮細胞からサイトカインやケモカインが産生されており、これらの因子が肺の炎症と深く関わっているものと考えられている。

シリカに曝露したモルモットにおいても、LPS 依存性 B 細胞の増殖や PFC が低下することが知られている。しかしコンカナバリン A 刺激下の T 細胞の増殖は、脾臓のリンパ球ではシリカの曝露により上昇するが、腸間リンパ節由来の細胞では低下するなど不明な点も多い。またシリカ作業者にみられる線維症や自己抗体の出現の機序についても不明である。

概ねらは、珪肺患者の末梢血単核球において可溶性 Fas の mRNA レベルが上昇しており、このことは珪肺患者では自己反応性クロールンがアポトーシスにより排除されにくくなっていることを示していると報告しており注目される。

・免疫毒性学的手法

実験動物を用いた免疫毒性学的研究には様々な手法が用いられている。表 2-1-1-2 に、これまで行われてきている実験材料と手法に関してまとめた。最近では遺伝子多型など個々の感受性の違いによる免疫応答についても研究がすすめられている。

表 2-1-1-2 環境免疫毒性学におけるアッセイ法

リンパ球	— 抗原特異的増殖反応 (チミジンの取り込み量)
	— 非特異的増殖反応 (コンカナバリン A, フィトヘマグルチニン, リボポリサッカライド)
	— 抗原 (アルブミン, ツベリクリン) に対する感作性と遅延反応
マクロファージ / 顆粒球	— 粒子の貪食能 (オプソニン化, 非オプソニン化)
	— 活性酸素産生能
	— 酸化窒素産生能
NK 細胞	— YAC-1 や K562 を標的細胞とした細胞傷害性
液性免疫	— 抗体産生能
	— 補体活性
生体防御	— 寄生虫, カビ, 細菌, ウイルスに対する易感染性
自己免疫	— 抗核抗体, 抗チューブリン抗体, 抗サイログロブリン抗体
その他	— リンパ組織の病理, 胸腺や脾臓重量変化, 免疫細胞数の変化など

参考文献

- 1) WHO Immunotoxicology, IPCS Environmental Health Criteria 180
- 2) Otsuki, T., Sakaguchi, H., Tomokuni, A., Aikoh, T., Matsuki, T., Kawakami, Y., Kusaka, M., Ueki, H., Kita, S., and Ueki, A. (1998) Soluble Fas mRNA is dominantly expressed in cases with silicosis. *Immunology*, 92, 258-262.
- 3) Vos, J., Van Loveren, H., Wester, P., and Vethaak, D. (1989) Toxic effects of environmental Chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 289-292
- 4) Richeldi, L., Sorrentino, R., and Saltini, C. (1993) HLA-DPB1 Glutamate 69:A genetic marker of beryllium disease. *Science*, 62, 242-244.
- 5) 環境庁 ダイオキシンリスク評価研究会、(1997) ダイオキシンのリスク評価.
- 6) 辻 博 (1999) 内分泌攪乱物質と免疫. 感染・炎症・免疫 29, 58-61.

2.1.2 鳥類 (高橋慎司)

鳥類は有害化学物質に対する感受性が高いことが知られており、カーソン女史の「沈黙の春」では鳥類が環境汚染指標動物として有用であることを詳述している。

現在、OECD では鳥類の生態影響評価試験のガイドライン作成を行っており、世界統一化を目指している。

鳥類の免疫機能に及ぼす有害化学物質の影響については、これまでに幾つかの文献が報告されてきた。大きく分類すると、1) 野鳥での症例調査と 2) 実験鳥類での免疫毒性試験とに大別される。

文献調査

- ① Organo Chlorine-associated Immuno Suppression in Prefledgling Caspian Terns and Herring Gulls from the Great Lakes: An Ecoepidemiological Study
K. A. Grasman, G. A. Fox, P. F. Scanlon and J. P. Ludwig (Environ Health Perspect, 104 (suppl4): 829-842, 1996)

環境汚染物質(有機塩素系)が散布された五大湖で、環境疫学的研究が1992年から94年まで行われた。野生鳥類としてセグロカモメに注目し、有機塩素系汚染物質を散布されたヒナの免疫応答を測定した。PHA Skin testの結果、細胞性免疫が有機塩素系汚染物質で強く抑制されていることがわかった。また、有機塩素系の濃度に依存してビタミンEが減少する関係が認められた。

② Lead Disrupts Eicosanoid Metabolism, Macrophage Function, and Disease Resistance in Birds

S. O. Knowles and W. E. Donaldson (Biological Trace Element Research, 60:13-26, 1977)

七面鳥で鉛アセテート(100ppm)の食餌毒性試験を行い、免疫の恒常性に及ぼす影響を検討した。

マクロファージ(Mφ)では、アラキドン酸濃度が対照群の2倍に上昇した。そこで、in vitro で Mφ を LPL で刺激した結果、プロスタグランジン Fα2 が 11 倍、トロンボキサン B2 が 3 倍そしてプロスタグランジン E2 が 1.5 倍まで増加した。また、貧食能の活性(羊赤血球)を比較すると、対照群の半分であった。

次に、サルモネラ菌の感染実験を七面鳥のヒナで行った結果、ヒナの致死率に明確な差異は認められなかった。しかし、死亡するまでの時間は、暴露群で明らかに短かった。

以上、鉛汚染が七面鳥の Mφ でのアラキドン酸代謝、エイコサノイド産生、貧食能を低下させることがわかった。

③ Effects of the TCDD Congeners 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl and 3, 3', 4, 4'-Tetrachloroazoxybenzene on Lymphoid Development in the Bursa of Fabricius of the Chick Embryo

E. Nikolaidis, B. Brunstrom and L. Dencker (Toxicol. Ppl. Pharma., 92:315-323, 1988)

ニワトリ雛の発生段階で、TCDD 類(3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニールと 3, 3', 4, 4'-テトラクロロアゾキシベンゼン)を投与し、ファブリキウスのう(BF)での T 細胞の分化に

与える影響を検討した。

ニワトリ胚の 13 日令に TCDD 類を投与した結果、19 日令までに以下の影響が認められた。

(1) BF のリンパ球細胞数は投与量依存的に減少し、高濃度群 (TCB:300mg/kg、TCAOB:30mg/kg) では、リンパ球が殆ど認められなかった。

(2) BF の組織学的所見の結果、投与群では小胞中にリンパ球が殆ど認められなかった。

(3) BF の Aryl hydrocarbon hydroxylase 活性は、高濃度群 (TCB:200~300mg/kg、TCAOB:4mg/kg) が対照群より 30~50 倍も高かった。以上、BF におけるリンパ球の分化は TCDD 類投与によって著しく阻害されることが示唆された。

④ Effects of Environmentally Relevant Concentrations of 2,3,7,8-TCDD on Domestic Chicken Immune Function and CYP450 Activity: Function and Egg Injection Studies M.P. Adams, K. Alonso, C. Godard, S. Skipper, W. Mashburn, J. Hoover, C. Charbonneau, D. Henshel and R. Dickerson

(Chemosphere, vol. 37, Nos 9-12:1023-1939, 1998) ニワトリを用いて、環境中の 2,3,7,8-TCDD 暴露によるリスク調査を行った。

ニワトリに筋肉注射 (i. M.) で 30 週時に投与するとともに、発生 14 日胚の卵黄嚢に直接投与し、TCDD の影響を検討した。

その結果、

(1) 発生胚では、リンパ球の増加、IgM 抗体の変動が認められた。

(2) 生体では、CYP450 誘導について濃度依存的上昇が認められた。

(3) 発生胚では、CYP450 誘導について濃度依存的制御が認められた。

(4) F1 の生体では、B 細胞の制御傾向が見られた。

以上、TCDD はニワトリの免疫応答力に対して制御的に働くことが示唆された。

⑤ Effects of Chronic Exposure to Sublethal Concentration of Lead Acetate on Heme Synthesis and Immune Function in Red-Tailed

Hawks

P. T. Redig, E. M. Lawler, S. Schwartz, J. L. Dunnette, B. Stephenson and G. E. Duke

(Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21:72-77, 1991)

アカオノスリに鉛アセテート (致死濃度 0.82mg/kg・日) を 3~11 週間暴露し、赤血球 (ヘム) 合成及び免疫機能への影響を検討した。

その結果、

(1) ヘムの生合成経路に変化が見られ、赤血球ポルフィリノーゲン活性が有意抑制された (暴露終 35 週間で正常に回復)。

(2) 赤血球の遊離プロトポルフィリン活性が比較的短時間で増加した (亜鉛複合体暴露では 3 週間に亘って増加)。

(3) 高濃度長期間暴露により、ヘマトクリット値やヘモグロビン量が大きく減少した。

(4) 低濃度短期間暴露では、異種赤血球に対する抗体産生や T リンパ球の Mitogen 活性が抑制されたが、抗体産生に影響はなかった。

(5) 暴露濃度の上昇により、T リンパ球の Mitogen 活性が抑制されたが、抗体産生による影響はなかった。

以上、

アカオノスリでの鉛暴露実験では、致死濃度の長期間暴露によりヘム合成が阻害され、T リンパ球の Mitogen 活性が抑制された。

⑥ Effects of Aroclor 1254 on the Thyroid Gland, Immune Function and Hepatic Cytochrome P450 Activity in Mallsrds

J. R. Fowles, A. Fairbrother, K. A. Trust and N. I. Kerkvliet

(Environ. Res. 75:119-129, 1997)

マガモ (♂) に PCB (Aroclor 1254) を 4、20、100、250、500mg/kg で 5 週間 (週 2 回投与) 暴露した。その結果、

(1) PCB 暴露後の免疫毒性として、羊赤血球に対する抗体産生能、NK 細胞活性、PHA に対する Mitogen 活性を測定したが、特に変化は認められなかった。

(2) PCB 暴露濃度の 20mg/kg より、肝チト

クロム P450 の EROD と PROD の活性が有意に上昇し、100mg/kg で誘導がみられ、250mg/kg でピークに達した。

(3) PCB 暴露濃度の 100mg/kg より、肝重量と甲状腺重量は濃度依存的に増加した。しかし、甲状腺組織には変化が認められなかった（但し、高濃度群を除く）。

(4) 甲状腺ホルモン T3 は投与量依存的に減少し、T3 減少の NOAEL は 4mg/kg であった。

以上、

PCB 暴露によって、甲状腺ホルモン量と P450 活性が影響を受けるが、しかしながら、免疫毒性はマガモでは特に認められなかった。

⑦ Effects of Acute head Ingestion and Diet on Antibody and T-Cell-Mediated Immunity in Japanese Quail

K.A.Grasman and P.F.Scanlon

(Arch.Environ.Contam.Toxicol.28:161-167,1995)

ニホンウズラに鉛を急性暴露し、抗体産生と細胞性免疫に及ぼす影響を検討した。

成ウズラ (♂) を 1 群 9 羽とし、急性暴露 4 区と食餌投与 2 区とに誤鉛を与えた。

その結果、

(1) コーン油対照群は 13~14% の体重減少に対して、実験群では 23~24% の体重減少となった。

(2) コーン油対照群に比較し、PHA に対する Mitogen 活性が減少した。

(3) 実験群では、イワシャコ赤血球に対する抗体産性能に変化が認められた。コーン油と鉛の食餌投与区では 1 次応答が抑制され、鉛だけの投与区では 2 次応答が抑制された。

以上、

ウズラに鉛を摂取させると、液性及び細胞性免疫が抑制されることが示唆された。

⑧ Cyclophosphamide Metabolism in the Primary Immune Organs of the Chick: Assays of Drug Activation, p450 Expression and Aldehyde Dehydrogenase

R.R.Misra, N.A.Lorr and S.E.Bloom

(Arch.Toxicol, 65:32-38, 1991)

ニワトリの B 細胞の分化に際して、シク

ロフォスミド(CP)の解毒作用または臓器特異的酵素活性のどちらの影響が大きいのかを決定する。また、T 細胞に対しても同様に比較した。

その結果、

(1) 4P-ニトロベンジルピリジンのアルキル化分析(NBP)では、ヒナの肝臓ミクロソームにフェノバルビタール(PB)誘導性活性が認められた。

(2) 免疫担当器官のミクロソーム由来 CP 解毒作用は、PB・TCB 誘導性活性と関連していなかった。

(3) 対照群では PB 誘導性と Aldrin Epoxidase(AE)活性との関連性のあることが胸腺で認められたが、BF ではなかった（対照群の肝臓 AE 活性の 1%以下）。

(4) Etoxy resorufin-o-deethylase(EROD)活性は、TCB 誘導性個体の胸腺と BF の両方から検出され、特に胸腺で高い活性が認められた。

(5) CP 解毒作用を持つ酵素に含まれる Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性は、胸腺と BF の細胞質液性分画に認められた。

以上、

ニワトリ B 細胞の分化には、CP の解毒作用は大きな影響を及ぼさないことがわかった。

⑨ Effects of Sewage on The Immune Defenses of Mallards

D.R.Goldberg and T.M.Yuill

(Environ.Res., 51:209-217, 1990)

野鳥（マガモ）を用いて、下水汚泥に残留する化学物質に対する免疫機構、特に感染防御への影響を検討した。ミシガン州のミルウォーキーとウィスコンシン州のマディソンから採取した下水汚泥を乾燥させ、食餌に 0.5・20% 含ませて 28 または 57 日間摂取させた。

その結果、

(1) コレラ菌を感染させたところ、摂餌群が対照群よりも死亡率は低かった。(2) 摂餌群の 2 区では肝臓に取り込まれたカドミウムの量が 2~3 倍高かった。

以上、

汚泥に含まれる化学汚染物質によって、感染に対する抵抗性が低下し、死亡率が上昇す

ることは確認できなかった。

このように、野生及び生捕りされた鳥類での研究からは、PHAHs(PCBE ダイオキシンなどの有機塩素化合物)が T 細胞依存性免疫を抑制する関係が認められている。しかしながら、疾病抵抗性との具体的関連は明確にされておらず、今後の検討が必要と考えられる。

一方、実験鳥類での免疫毒性試験では、ニワトリ・ウズラ・マガモなどを用いて詳細な研究がなされてきており、PCB・ダイオキシン・DDE・TCDD・クロロフェニルなどの環境汚染化学物質の免疫毒性影響が解明されつつある。主な免疫毒性作用としては、抗体産生能(1次応答と2次応答)の抑制、すなわち B 細胞の活性低下があり、羊赤血球(SRBC)抗体産生・鳥類赤血球抗体産生などの抗体価を指標としている。また、T 細胞依存性免疫の抑制も実験的に証明されつつあり、例えば、Mitogen(PHA、ConA などの T 細胞刺激物質)を用いて有機塩素化合物暴露後の SI(Stimulation Index)の低下が明らかにされた。以上、

鳥類の免疫機能に及ぼす有害化学物質の影響についての文献調査では、有機塩素化合物が免疫機能を抑制することが明確となった。全体の文献数において免疫毒性の占める割合は少ないため、今後は野鳥での症例調査と実験鳥類での投与試験を併行させて、有害化学物質の免疫毒性を検証する必要がある。

2.1.3. 両生類 (菊池慎一)

両生類の免疫一般の研究は数多くの総説がある。しかし化学汚染物質のカエル、あるいはイモリなど、両生類への影響に関する研究報告は、2 種のカエルの発生に対する PCBs の影響についての研究、Gutleb et al (1999) の 1 篇があるだけで、さらに免疫機能への影響に関する文献は全く見あたらない。

参考文献

Gutleb, A.C., J.Appelman, M.C.bronkhorst, J.H.J.van den Berg, A.Spenkelink, A.Brouwer

and A.J.Murk., 1999. Delayed effects of pre-and early-life time exposure to poly-chlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*), *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8(1), 1-14.

2.1.4. 魚類 (菊池慎一)

重金属の影響について

工業化などに伴い、水質汚染やヘドロの蓄積が進み、それらによる魚類の健康に対する悪影響が大きな問題となっている。水界の環境中に存在する金属による魚の免疫機能の低下について、いろいろな角度からの免疫学的検査がなされている。銅イオンが養殖魚の死亡をもたらす原因になることは、古くから魚の養殖業者間で知られていた。低濃度の銅に魚を暴露すると、ウイルス(Hematopoietic necrosis virus)に対する抵抗力が下がる(Hetrick ら、1979)。単離されたニジマスの B リンパ球では、添加した銅イオンが抗体産生を直接抑制することが報告されている(Anderson ら、1989)。アルミニウム、カドミウム、水銀、マグネシウム、砒素、鉛、セレンウムも魚類の健康に影響を及ぼす金属として重要である。鉛あるいはカドミウムを注射されたブラントラウトにおいて、血清中の循環抗体の量が減少することが報告されている(O'Neill, 1981)。水銀はバルブ[コイ科魚類]のリンパ球数を減少させる(Gill & Pant, 1985)。しかし、一方ではカドミウムによる血清抗体の上昇も報告されており(Thuvander, 1989)、物質の環境水中での濃度による影響の違いも指摘されている。

多環型芳香族炭化水素の影響について

PCB は、液体の絶縁体として、長年にわたり使用されてきたもので、環境中の食物連鎖に入ると長期間持続的に存在しつづける傾向を示す。自然界でのこれらの物質が魚類の免疫系に及ぼす直接の影響を確かめることは、実験室内での調査と異なりしばしば困難を伴うものである。

PCB 添加の餌で 12 ヶ月飼育されたニジマ

スでは、抗体産生細胞には何の変化も観察されなかった (Cleland ら、1979)。アメリカナマズに Aroclor1232 を注射した実験では、抗体産生価には変化が見られないものの、食作用の減少は起こる (Jones ら、1979)。また、アメリカナマズに PCB 126 に暴露し、その血液学的、免疫学のおよび酵素を生物指標として調査した報告によると (Rice & Schlenk、1995)、非特異的細胞障害性活性は低下するが、抗体産生については、低濃度の暴露では、むしろ活性が高くなるとしている。魚とネズミ (哺乳類) では、多環型芳香族炭化水素化合物に対する感受性が異なるものと考察されている。

殺虫剤の影響について

魚類の免疫機能に及ぼす、環境中の殺虫剤およびその分解産物については、多くの実験から、その危険性が指摘されている。

DDT は散布された後も、環境に長く存在するので、魚類に及ぼす影響も大きい。キンギョにおいて、投与された DDT は、抗体産生細胞や血中の循環抗体の量の減少を引き起こす (Sharma & Zeeman、1980)。Edrin は、ニジマスにおいて食作用、抗体産生を減少させる (Bennett & Wolke、1987)。有機スズも免疫能の抑制に働き、Toadfish では、食作用の機能低下がみられる (Rice & Weeks、1990)。

その他の物質の影響について

魚類の種苗生産において、しばしば多用される抗生物質が免疫系に及ぼす影響も問題になっている。養殖において用いられる Oxytetracycline が、ニジマスの抗体産生を低下させることが報じられている (van Muiswinkel ら、1985)。Aflatoxin B-1 も、ニジマスの B 細胞の記憶喪失をもたらす (Arkoosh & Kaattari、1987)。その他、ホルモン (ヒドロコルチゾン、コルチゾル) による免疫抑制効果も報告されている (Anderson、1982; Slave & Roberson、1985)。

以上、魚類の健康における環境因子についての免疫学的視点からの考察は、Anderson

(1996) の総説に詳しい。

参考文献

- Anderson, D.P., Roberson, B.S., and Dixon, O. W. (1982). Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. *Dev. Comp. Immunol. Suppl.* 2, 197-204.
- Anderson, D.P., Dixon, O.W., Bodammer, J.E., and Lizzo, E.F. (1989). Suppression of antibody-producing cells in rainbow trout spleen sections exposed to copper in vitro. *J. Aquat. Anim. Health* 1, 57-61.
- Anderson, D.P. (1996). Environmental factors in fish health: immunological aspects. In *Fish Immune System*, eds. by Iwama G. and Nakanishi, T., *Fish Physiology* vol. 14. pp. 289-310. Academic Press.
- Arkoosh, M.R. and Kaattari, S.L. (1987). Effect of early aflatoxin B-2 exposure on in vivo and in vitro antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol. Suppl. A* 31, 19-22.
- Bennett, R.O., and Wolke, R.E. (1987). The effect of sublethal edrin exposure on rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). I. Evaluation of serum cortisol concentration and immune responsiveness. *J. Fish Biol.* 31, 375-385.
- Cleland, G. B., McElroy, P. J., and Sonstegard, R.A. (1988). The effect of dietary exposure to Aroclor 1254 and/or Mirex on humoral immune expression of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat. Toxicol.* 12, 141-146.
- Gill, T.S., and Pant, J.C. (1985). Mercury-induced blood anomalies in the fresh water teleost *Barbus conchionius*. *Water Air Soil Pollut.* 24, 165-171.
- Hetrick, F.M., Knittel, M.D., and Fryer, J.L. (1979). Increased susceptibility of rainbow trout to infected hematopoietic necrosis virus after exposure to copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 198-201.
- Jones, D.H., Lewis, D.H., Eurell, T.W., and Cannon, M.S. (1979). Alteration of the immune

response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by polychlorinated biphenyls. Animals as monitors of environmental pollutions. Symposium on pathobiology of environmental pollutants; Animal models and wildlife as monitors. National Academy of Sciences, Washington, DC (Abstract). Pp.385-386.

O'Neill, J.G. (1981). Effects of intraperitoneal lead and cadmium on the humoral immune response of *Salmo trutta*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 42-48.

Rice, C.D., and Schlenk, D. (1995). Immune function of cytochrome P4501A activity after acute exposure to 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB 126). *J. Aquat. Anim. Health* 7, 195-204.

Rice, C.D., and Weeks, B.A. (1990). The influence of in vitro exposure to tributyltin on reactive oxygen formation in oyster toadfish macrophages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 854-857.

Sharma, R.P., and Zeeman, M.G. (1980). Immunologic alteration by environmental chemicals: Relevance of studying mechanisms versus effects. *J. Immunopharmacol.* 2, 285-307.

Stave, J.W., and Robertson, B.S. (1985). Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 9, 77-84.

Thurvander, A. (1989) Cadmium exposure of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson): Effects on immune functions *J. Fish Biol.* 35, 31:197-208.

van Muiswinkel, W. B., Anderson, D. P., Lamers, C.H.J., Ebberts, E., van Loon, J.J.A., and Ijssel, J.P. (1985) Fish immunology and fish health. In "Fish Immunology" (M. J. Manning and M. F. Tatner, eds), pp.1-8. Academic Press, London.

2.2. 無脊椎動物

2.2.1.1. 軟体動物 (古田恵美子)

環境有害化学物質が軟体動物に与える影響について、Medline と ScienceDirect によって文献調査を行った。魚類以上の脊椎動物に比べて、軟体動物についての報告はかなり少

ないものの、食用とされる動物を主にいくつかの例が報告されている。

a-1) ダイオキシン類

1981 年に Anderson 等はヘキサクロロベンゼン(HCB)とペンタクロロフェノール(PCP)がハマグリ(1種(*Mercenaria mercenaria*))の細菌除去力を低下させることをすでに報告している(*Aquat. Toxicol.*, 1:187-195, 1981)。また、Williamson 等は汽水性カタツムリの1種(*Tegula funebris*)を水溶性 14C-PNP (p-nitrophenol)で 24 時間ラベルし、ラベル後 24 時間の放射活性を測定して、液の 89%の 14C-PNP が浄化され、残液の 96%が 14C-PNP のままであったという結果を得ている(*Aquat. Toxicol.*, 33:113-123, 1995)。

海産の貝類について polyaromatic hydrocarbon (PAH)が食能を低下させるという報告がいくつかある。アメリカ産カキの血球の異物認識能が PAH により低下する(Fisher & Tramplin, *Aquat. Sci.*, 45:1309-1315, 1988; Sami, et al., *Marine Biol.*, 113:247-252, 1992)。ムラサキガイでは血球の食能の低下と共に、ライソゾーム活性も低下する(Graundy, et al., *Aquat. Toxicol.*, 34:273-290, 1996; McCabe, et al., *Marine Environ. Res.*, 46:361, 1998)。さらに、Cajaraville 等はムラサキガイ血球の食能活性が環境汚染のマーカーとなり得ると述べている(*Ecotoxi. Environ. Safety*, 35:253-260, 1996)。一方、PCB はウバガイの胚発生において阻害的に働くことが観察されている(Smith, et al., *Toxicol. Sci.*, 50: 54-63, 1999)。

a-2) 重金属

重金属汚染が海産貝類に及ぼす影響についてみると、水銀がカキのラテックス粒子食能阻害効果を示すという(Cheng & Sullivan, *Marine. Environ. Res.*, 14:305-315, 1984)。有機スズについてもカキとアサリ(*Tapes philippinarum*)で同様の結果が得られている(Fisher, et al., *Arch. Environ. Cont. Toxi.*, 19:354-360, 1990; Cima, et al., *Marine Pollu. Bull.*, 39:112-115, 1999)。

有機スズ化合物が巻貝類に“インボセックス”を引き起こす現象は“環境ホルモン”という言葉に世に広めた。多くの重金属や化合物の汚染が報告されている中で、トリブチルスズとトリフェニルスズのみが雌貝の雄化を引き起こすことが知られている。本邦ではイボニシとバイガイ等 38 種で“インボセックス”が報告されている（日本化学会編、ダイオキシンと環境ホルモン、東京化学同人、1998）。

b) 無脊椎動物

PAH のリセプターは、DNA 転写制御蛋白であり、発生、サーカディアンリズム、ホメオスタシスにおいて重要な役割を果たし、系統学的には脊椎動物に占くから存在していたことが知られている（Hohn, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13743-13748, 1997）。しかしながら、125I-TCDD ラベル実験において、魚類以上の動物ではこのリセプターの存在が立証できたものの、尾索類と 9 種の無脊椎動物では、特異的な部位が見出されず、PAH リセプターを欠いているのではないかという（Hohn, et al., Arch. Biochem. Bioph., 310:218-228, 1994）。さらに、水棲動物について dioxin の危険度を測定したところ、無脊椎動物（4 種）は脊椎動物に比して dioxin に対する感受性が低いと述べている報告もある（Loonen, et al., Sci. Total Environ., 182:93-103, 1996）。

c) まとめ

以上の文献調査からみると、ほとんどの報告が軟体動物の中でも、海産の食用となる腹足類、それも二枚貝類に偏っており、これらの文献から、軟体動物全般について、環境有害化学物質がどのようにして免疫系を攪乱するかということ把握することはできない。頭足類や堀足類についての報告はきわめて少ない。また、陸棲軟体動物についてはほとんど報告が見られない。陸棲軟体動物は地表面を棲息場所とするだけに、環境有害化学物質に常に晒され続けていると考えられる。

現在我々は陸棲軟体動物の PAH レセプターの存在を検索中である。PAH や HCB による食生活の低下が報告されていることから、レセプターとの関連性を考慮して、免疫攪乱系を明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Anderson, R.S., Giam, C.S., Ray, L.E. and Tripp, M.R.: Aquat. Toxicol., 1:187-195, 1981.
- 2) Williamson, K.C., Shofer, S. L. : Aquat. Toxicol., 33:113-123, 1995.
- 3) Fisher, W.S. and Trampin, M.: Canad. J. Fish Aquat. Sci., 45:1309-1315, 1988.
- 4) Sami, S., Faisal, M. and Hugggett, R.J.: Marine Biol., 113:247-252, 1992.
- 5) Grundy, M.M., Moore, M.N. Howell, S.M. and Ratcliffe, N.A.: Aquat. Toxicol., 34:273-290, 1996.
- 6) McCabe, R.H., Moore, M.N. and Ratcliffe, N.A.: Marine Environ. Res., 46, 361, 1998.
- 7) Cajaville, M.P., Olabarrieta, I. And Marigomez, I: Ecotoxicol. Environ. Safety, 35:253-260, 1996.
- 8) Smith, C.R., Barker, L.E., Jensen-Eller, K. and Reinisch, C.L.: Toxicol. Sci., 50:54-63, 1999.
- 9) Cheng, T.C. and Sullivan, J.T.: Marine Environ. Res., 14:305-315, 1984.
- 10) Fisher, W.S., Wishkovsky, A. and Chua, F.L.E.: Arch. Environ. Cont. Toxicol., 19:354-360, 1990.
- 11) Cima, F., Marin, M.G., Matozzo, V., Ros, L.D. and Ballarin, L.: Marine Poll. Bull., 39:112-115, 1999.
- 12) 日本化学会編「ダイオキシンと環境ホルモン」東京化学同人出版
- 13) Hohn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A. and Perera, S.A.: Proc. Natl. Acad. Sci., 94:13743-13748, 1997.
- 14) Hohn, M.E., Poland A. Glover E. and Stegeman J.: Arch. Biochem. Bioph., 310:218-228, 1994.
- 15) Loonen, H., van de Guchte, C. Parsons J.R.

de Voogt P. and Govers H.A.: Sci. Total Environ., 182:93-103, 1996.

2.2.1.2. 貝類

(吉田貴彦)

貝類の免疫機構に対する環境有害物質の影響を研究した報告は多くはない。その研究報告には、複合汚染された現場海域における調査報告、汚染海域へ貝を移送しての曝露実験、汚染海域で採取された汚染物質の実験室での曝露実験なども含まれており、研究室において行われた特定の有害因子の免疫機構に対する影響を調べた研究はさらに少ない。貝類の免疫学的検索法が十分に確立された状況に無いため研究者によって用いられた免疫学的手法も異なる。また用いる貝の種も様々である (Fisher, 1988 ; Pipe ら, 1995c ; Livingstone ら, 1992)。以下に、環境有害化学物質による貝類の免疫機構への影響を報告した文献をまとめる。

a) 金属類

カドミウム曝露によってムラサキイガイに血リンパ球の増加が見られ (Coles ら, 1995)、また、カキへのカドミウム曝露によって血リンパ球の増加 (Cheng, 1988a ; Auffret, 1994)、さらに小無顆粒球の増加と大きな細胞の減少 (Auffret, 1994)、無顆粒球の減少 (Cheng, 1988a) が報告されている。低濃度カドミウム短期曝露でムラサキイガイに血リンパ球食能の増強の報告 (Cole ら, 1995) がある。他、カキやムラサキイガイ活性酸素量には影響しないとの報告 (Anderson ら, 1992 ; Coles ら, 1995) や、ムラサキイガイにおこる血リンパ球膜傷害性の報告 (Coles ら, 1995) などがある。ハマグリを用いた感染実験では、7日間の 0.4ppm のカドミウム (塩化カドミウム) 曝露後のビブリオ感染により循環血リンパ球数の増加と、好塩基性染色細胞の細胞比率の増大が見られている (Pipe ら, 1995c)。

銅曝露によってカキに無顆粒球比率の低下 (Cheng, 1988a)、ムラサキイガイに塩基性に染色する血リンパ球の比率の上昇 (Coles ら, 1995) がおこる。高濃度銅曝露によって

血リンパ球の減少 (Suresh ら, 1990)、カキに活性酸素量の減少 (Anderson ら, 1994) がみられる。ハマグリに7日および7週間の 0.2ppm、0.5ppm の銅 (硫酸銅) 曝露後、通常病原性を示さないビブリオ (*Vibrio tubiashii*) 感染によって循環血リンパ球数に変化は無かったものの、好塩基性染色細胞の細胞比率の減少が見られた (Pipe ら, 1995c)、0.2ppm の銅 7 週間曝露によってビブリオ感染によって亢進する血リンパ球細胞内の活性酸素量が減少し供試貝の死亡率が高まった (Pipe ら, 1995c)。

カキへのトリブチル錫によって活性酸素量が高濃度では減少し、低濃度では増加した (Fisher ら, 1989 ; Fisher ら, 1990)。

低濃度短期の重金属類曝露により血リンパ球食能の増強がみられた (Cheng ら, 1984 ; Cheng, 1988b)。高度金属汚染海域でのムラサキイガイの調査により血リンパ球食能の減弱 (Pipe ら, 1995a) が観察されている。

b) 有機物質

ムラサキイガイへのフルオランセン (Fluoranthene) の曝露によって血リンパ球は増加するが血リンパ球分画に変化無く、血リンパ球からの活性酸素放出量は増加し (Coles ら, 1994)、フェノール曝露によって血リンパ球が増加すると (Renwants, 1990) 報告されている。

多環芳香族炭化水素汚染海域でのカキの調査により血リンパ球分画の変化や血リンパ球食能の減弱が観察され (Sami ら, 1992)、実験室でのカキへの多環芳香族炭化水素曝露によってコンカナヴァリン結合部位の減少 (Sami ら, 1993) や、細胞活性の低下 (Faisal ら, 1994) が報告されている。

ハマグリの血リンパ球に6塩化ベンゼン、5塩化ベンゼンを曝露するとフラボバクテリウム属の殺菌能力が低下する (Anderson, 1990)。

Elizabeth 川の南の支流で採取した汚染沈殿物質 (クレオソート汚染) を 56 日間、カキに対して曝露したところパーキンサス属原

虫への感染を助長した (Chu ら, 1994)。
有機汚染物質曝露によって血リンパ球に変化無し (Anderson, 1981)

農薬である、DDT、トキサフェン、パラチオンの慢性曝露はカキに真菌感染 (Lowe ら, 1971) を起こした。

n-ニトロソジエチルアミン曝露はカキにパーキンサス属原虫の持続感染を起こさせた (Winstead ら, 1988)。

分担者はアコヤ貝に 1 ppm および 10 ppm のフォルムアルデヒドを 4 週間、連続あるいは間歇曝露し、NBT 還元能を有する無顆粒球の減少、血リンパ球の遊走能の減弱などを観察している (吉田, 未発表)。

3) 複合汚染

環境有害化学物質曝露によって活性酸素産生量が高濃度では抑制され、低濃度では亢進することをカキで確認した (Larson ら, 1989)。非汚染海域から汚染海域に移動したカキやムラサキイガイなどの貝類に血リンパ球分画の変化が見られた (Ruddell ら, 1975; Coles ら, 1995)

低濃度短期の汚染物質曝露により血リンパ球食能の増強がみられる (Anderson, 1981)。

参考文献

- Anderson, R.S. (1981). Effects of carcinogenic and non-carcinogenic environmental pollutants on immunological functions in marine invertebrates. In *Phylogenetic Approach to Cancer* (C.J. Dawe, J.C. Harshbarger, S. Kondo, T. Sagimura and S. Takayama, eds) pp.319-331. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press.
- Anderson, R.S. (1990). Effects of pollutant-exposure on hemocyte-mediated immune function. *J. Shellfish Res.* 8(2), 435-436.
- Anderson, R.S., Oliver, L.M., and Jacobs, D. (1992). Immunotoxicity of cadmium for the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*, Gmelin, 1791): effects on haemocyte chemiluminescence. *J. Shellfish Res.* 11, 31-35.
- Anderson, R.S., Mora, L.M., and Thomson, S.A. (1994). Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte immune function by copper, as measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 108C, 215-220.
- Auffret, M and Oubella, R. (1994). Cytometric parameters of bivalve mollusks: effects of environmental factors. In *Modulators of Fish Immune Responses*, Vol. 1 (J.S.Stolen and T.C.Fletcher, eds) pp.23-32. Fair Haven:SOS Publications.
- Cheng, T.C. (1988a). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: total and differential haemocyte counts. *J. Invertebrate Pathology.* 51, 207-214.
- Cheng, T.C. (1988b). In vivo effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: phagocytic and endocytotic indices. *J. Invertebrate Pathology.* 51, 215-220.
- Cheng, T.C., and Sullivan, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environ. Res.* 14, 305-315.
- Chu, F.-L., and Hale, R.C. (1994). Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Marine Environ. Res.* 38, 243-256.
- Coles, J.A., Farley, S.R., and Pipe, R.K. (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology.* 30, 367-379.
- Coles, J.A., Farley, S.R., and Pipe, R.K. (1995). Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. *Disease of Aquatic Organisms.* 22, 59-65.
- Faisal, M. and Demmerle-Sami, S. (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons modulate the macromolecular synthesis in hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). In *Modulators of Fish Immune Responses*, Vol. 1 (J.S.Stolen and T.C.Fletcher, eds) pp.235-246.

Fair Haven:SOS Publications.

Fisher, W.S. (1988). Environmental influence on host response: Environmental influence on bivalve hemocyte function. American Fisheries Society Special Publication. 18. 225-237.

Fisher, W.S. Chu, F.-L.E., and Wishkovsky, A. (1989). Immunosuppression of oysters by tributyltin. J. Shellfish Research. 8. 437.

Fisher, S.W., Wishkovsky, A., and Chu, F.-L.E. (1990). Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. Archives of Environ. Contamination and Toxicology. 19, 354-360.

Larson, K.G., Roberson, B.S., and Hetrick, F.M. (1989). Effect of environmental pollutants on the chemiluminescence of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica*. Disease of Aquatic Organisms. 6. 131-136.

Livingstone, D.R., and Pipe, R.K. (1992). Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 25; The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture (E. Gosling, ed.) pp. 425-456. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Lowe, J.I., Wilson, P.D., Rick, A.J., and Wilson, A.J. (1971). Chronic exposure of oysters to DDT, Toxaphene and parathion. Proceedings of the National Shellfisheries Association. 61, 71-79.

Pipe, R.K. Coles, J.A., Tomas, M.E., Fossato, V.U., and Pulsford, A.L. (1995a). Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. Aquatic Toxicology. 32, 59-73.

Renwanz, L. (1990). Internal defence system of *Mytilus edulis*. In Studies in Neuroscience, Neurobiology of *Mytilus edulis* (G.B. Stefano, ed.) pp. 256-275. Manchester: Manchester University Press.

Ruddell, C.L., and Rains, D.W. (1975). The relationship between zinc, copper and the basophils of two crassostreid oysters, *C. gigas*

and *C. virginica*. Comparative Biochemistry and Physiology. 51A, 585-591.

Sami, S., Faisal, M., and Huggett, R.J. (1992). Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated environment. Marine Biology. 113, 247-252.

Sami, S., Faisal, M., and Huggett, R.J. (1993). Effects of laboratory exposure to sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons on the hemocytes of the American oyster *Crassostrea virginica*. Marine Environmental Research. 35, 131-135.

Suresh, K., and Mohandas, A. (1990). Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. J. Invertebrate Pathology. 55, 118-125.

Winstead, J.T., and Couch, J.A. (1988). Enhancement of protozoan pathogen *Perkinsus marinus* infections in American oysters *Crassostrea virginica* exposed to the chemical carcinogen *n*-nitrosodiethylamine (DNA). Disease of Aquatic Organisms. 5, 205-213.

2.2.2 昆虫類

(和合治久)

殺虫剤の影響について

昆虫の体液が種々の化学物質の解毒において重要な役割を果たしていることは以前から指摘されていた。実際に、Joseph はゴミムシ *Dermestes* の 1 種に 5%DDT を湿らせた濾紙上を 2 分間歩かせると、3 日後の血液中の蛋白性窒素は変化しないのに、非蛋白性窒素は 50% 増加することを観察している (Joseph, 1958)。また、Jones は DDT に対する防御反応には血球は役割を果たしてはいないことを報告した (Jones, 1957)。しかし、Patton はパラチオンをコオロギに処理すると、血球数が減少することを観察した (Patton, 1961)。さらに、Rakitin は昆虫の血球がかなりの割合で投与された放射性の殺虫剤を吸収することも見出している (Rakitin, 1974)。

一方、Saxena らはワモンゴキブリにマラ

チオンを処理し、その後の血球の細胞病理学的変化と数を研究した結果、マラチオン処理後の全血球数は雌雄において減少すること、顆粒細胞が縮小化すること、プラズマ細胞の細胞質空胞が増加すること、そして原白血球の有糸分裂が増加すること、などを明らかにしている(Saxena ら、1985)。Gupta らもクロルダン処理後のワモンゴキブリにおいて血球の減少を観察しており (Gupta ら、1968)、これらの結果から、血球が何らかのメラチオンの解毒に関与していることが示唆されている。血球の形態変化については、Yeager らも塩化第2水銀を処理した蛾の1種において血球の球状化と血球凝集並びに細胞分裂の増加を観察しており(Yeager ら、1942)、こうした反応は有毒物質に対する血球応答と考えられる。

さらに、Shukla と Bahadur は別の殺虫剤であるディコルボスの昆虫血球に及ぼす影響を知るため、特にバッタの1種の雌雄成虫を用いて、ディコルボスを0.001%でオスに、0.004%でメスに処理し、処理後1日目から7日目まで血球の変化を観察した(Shukla と Bahadur、1989)。その結果、原白血球は処理1日目で小型化した、3日目ではサイズは大きくなり、5日目からほとんど正常な形態にもどること、プラズマ細胞はサイズと細胞質が増加し、外見上3極性になること、顆粒細胞はサイズが小さくなり、細胞質と核内には多くの顆粒が出現するが、メスの顆粒細胞は特に空胞が多く見られること、コアギュロサイトは核が偏心的になり形態が異常になること、小球細胞はほとんど影響を受けないこと、エノシトイドには細胞質にわずかな小滴が現れること、アディポヘモサイトは脂肪粒が消えること、などが明らかになった。

一方、Azambuja と Gracia は、サシガメの1種 *Rhodnius prolixus* を用いて、アザディラクチン *azadirachtin* (tetranortriterpenoid のこと、昆虫や線虫の摂食阻害剤とか成長阻害剤)の免疫能及びトリパノゾーマ感染に対する影響を研究した。その結果、この物質の投与でサシガメ血球数の減少が引き起こされる

こと、またクロアカ菌 (*Enterobacter cloacae*) 接種で生じるノジュール形成も減少すること、この細菌接種で誘導される抗菌蛋白質が減少すること、などが明らかになっている (Azambuja と Gracia、1992)。加えて、彼らはこの物質を餌に混ぜて与えることで、感染させたトリパノゾーマの発育が阻害されることも見出している。

除草剤の影響について

Jones らは、除草剤の2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸 (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) がオオモンシロチョウの体液中の抗菌蛋白質の活性並びにリゾチーム活性に及ぼす影響について調べた。この除草剤を20ppmの濃度で餌に混ぜて、オオモンシロチョウの幼虫に与え、体液中のセレウス菌 (*Bacillus cereus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、ルテウス菌 (*Micrococcus luteus*) に対する抗菌活性とリゾチーム活性の影響を調べてみると、対照群に比べて、除草剤処理の幼虫では特に大腸菌とルテウス菌に対する抗菌活性が低下し、リゾチーム活性も同様に減少することが判明した (Jones ら、1989)。

その他の物質の影響について (昆虫類以外)

昆虫類以外の無脊椎動物免疫系に環境の汚染物質が及ぼす影響を与えるか、については詳細な研究報告は未だにほとんどない。しかし、Cheng と Sullivan は水銀とかコバルトが二枚貝のカキ *Crassostrea virginica* の食作用に与える影響について研究し、特に水銀は食細胞のラテックス粒子の取り込みを阻害することを見出している (Cheng と Sullivan、1984)。さらに、Anderson らは汚染物質のヘキサクロロベンゼンとペンタクロロフェノールがハマグリ (1種 *Mercenaria mercenaria*) の細菌除去力を低下させることを報告した (Anderson ら、1981)。一方、殺虫剤であるディチオカーバメイト *dithiocarbamate* がクサエビ (1種 *Palaemonetes pugio*) のエラの状態に与える影響を調べた Doughtie と Rao は、殺虫剤で傷ついたエラの部位に血球が集合し、

その結果血球の崩壊によってメラニン色素形成が誘導されることを明らかにした (Doughtie と Rao, 1983)。

2.2.3. 環形動物 (小宮山一雄)

ミミズの生態は土壌と深く関わっており、古くから土の性質を知るための指標として利用されてきた。また20年以上前から農薬の環境毒性リスクの指標に取り入れられている。1984年に Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline #207 により、ミミズの急性毒性試験の様式が示されたことから、環境アセスメントの指標動物としての重要性が認識されている。OECD Guideline は今日、慢性毒性試験の様式も規定され利用されている。しかし、これらの数値はいずれもミミズの生死を判定材料としているもので、長期慢性毒性や、ミミズの生理機能や生態防御機能に与える影響については、報告は少なく今まさに研究が始まったばかりである。Polycarbonate biphenyl (PCB) の免疫毒性について Ville (1995) らはミミズ (*L. terrestris*) の coelomocyte のロゼット形成を傷害する PCB 濃度は、5 g/cm² であるが、実際の組織内濃度は 76 g/g dry mass が障害の濃度であると報告している。彼らの実験では最も強く影響が出るのは5日目であり、この時に coelomocytes の PCB レベルが最も高くなる。ロゼット形成は coelomocytes が異物抗原や細菌に接触して、凝集素を分泌する能力を測定ものと考えられる。この凝集素はまた食食の為のオプソニンとして働いている。実験の結果、PCB の投与はリゾチーム活性、抗菌活性、溶血活性、蛋白分解酵素活性を上昇させる一方食食能および創傷治癒力を低下させた。また重金属 (塩化水銀、メチル水銀、塩化カドミウム、塩化亜鉛、塩化鉛、アセチル鉛) などを、in vitro で作用させ、coelomocytes の生細胞率および食食能を測定したところ Hg、Cd、Zn は高毒性を示し、生細胞率および食食能を著しく低下させたが、これらと比べ、Pb では影響が少なかった (Fugere et al.1996)。重金属類に汚染された土

壌や産業破棄物の無毒化にミミズに応用しようとする試みがあるが、ミミズの生体内ではどこに蓄積するのであろうか？電顕観察により亜鉛、鉄、鉛が chloragosome 内に認められたことから、これらの金属は chloragosome 内に蓄積されるミミズの腸管には重金属のカドミウムとする結合するタンパク質が認められる (Ramseir et al., 1990)。鉛、亜鉛は隣と結合して、chloragosome 内に蓄積されることによって、毒性が低下する (Morgan, 1989)。他毒性試験に関する報告が 30 報ある。

参考文献

- Fugere, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M. (1996) Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* .109, 157-66.
- Morgan-JE; Morgan-AJ (1989) The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granules. *Histochemistry*. 1989; 92 (3): 237-41
- Ramseier, S., Deshusses, J., Haerdi, W., (1990) Cadmium speciation studies in the intestine of *Lumbricus terrestris* by electrophoresis of metal proteins complexes. *Mol-Cell-Biochem*. 97(2): 137-44
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Masson, P., Narbonne, J.F. (1995) PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J Invertebr Pathol*. 65-3, 217-24.

(8) 考察

いくつかの指標生物を中心とした生物の免疫機能および免疫機能におよぼす有害化学汚染物質が免疫機能におよぼす影響について文献的に調査した。生物の免疫機能は共通するものと各生物に特異的なものがあるため化学物質の影響の受け方も異なってくるものと考えられる。

実験動物

マウスやラットを用いた免疫機能への影響に関する実験は種々の環境生物を用いた影響研究の結果を踏まえ、条件がよくコントロールされたマウスやラットを用いた実験においても確認されるかどうか検討し、起こればその機序についても研究をすすめる視点での研究が重要と考えられる。細胞性免疫に関しては、マクロファージや好中球、あるいはNK細胞を用いて、貧食能や活性酸素あるいは活性窒素種の産生能、NKの細胞障害性について調べる。液性免疫においては、補体やCRPの定量値が環境汚染を反映するものなのか否かについて研究を行っていくことが必要である。また、他の脊椎動物に見られるリンパ球等が関わる獲得性免疫にお及ぼす影響においても種差を踏まえた上で検討し補完することが重要と考えられる。

海棲哺乳動物

汚染が顕著な海に棲息するイルカあるいはアザラシといった海棲哺乳動物の感染抵抗性に関わる免疫機能についてさらに検討することが必要と考えられる。特にカスピ海など汚染が深刻化している海域での調査が必要となると考えられる。また、捕獲、血液採取、野外でのNK活性、リンパ球の増殖能の測定など手法の開発も重要であることが明らかになってきた。しかし、日本近辺あるいは汚染がひどいとされる地域における海棲哺乳類の有害化学物質の体内の濃度と感染に関わる免疫機能との関連が明らかにされる。北海等でおきた大量死が日本近辺あるいは汚染がひどいとされる地域で起きる可能性について知見が得られれば予防措置をとることなどが可能となると考えられる。

鳥類

カモメなど汚染した魚を餌とする鳥類への影響も検討することが必要と考えられる。鳥類のなかでウズラは実験動物として、性成熟に達するまで約6週間と短いこと、体質が強健で繁殖も容易であること、鳥類特有の液性

免疫中枢器官(B.F.)があること、また、均一な性状の種卵(コピー卵)を大量に使用することが可能なことも、免疫毒性研究において有利な点である。重金属(Pb, Cd)、残留化合物(農業、多環式芳香族、有機塩素系化合物)の食餌投与や海面活性剤の飲水投与による免疫担当細胞(T・B細胞、Mφ、NK細胞)への傷害作用および病原体暴露による感染抵抗性と免疫担当細胞機能との関係を明らかにしていくことにより、カモメなどで報告のある免疫機能の低下の要因が実験的な研究においても明らかにされるものと考えられる。

両生類の免疫機能に関わる環境有害化学物質の影響についての報告は、ほとんどない状態であるが、水生生活をする幼生(オタマジャクシ)が水質汚染の影響を直接受けることが推察される。カエルが減少しているという報告があることから、その要因のなかに免疫機能の低下があるかどうか実験および調査研究が必要となるであろう。ツメガエルの近交系の確立により、免疫毒性研究への使用が可能になってきている。環境汚染につながると思われる環境有害化学物質を飼育水に加え曝露を行い、水生種あるいは幼生について影響の検討や陸生肺呼吸をするカエルについては経口あるいは経皮的に曝露を行い影響の検討をすることが可能である。また、自然界に自生するカエルについて、山間の渓流の清浄な地域と市街地域に自生しているカエルとの血液学的(血球種別血球数など)、血液生化学的、免疫生化学的(抗体価など)測定の比較を行うことも重要と考えられる。

魚類

硬骨魚類は、脊椎動物の中でも最も多くの種に分化し、海洋から河川・湖沼など地球を覆う水域に広く分布・繁栄している。その中で、人間の生活廃水などの影響を強く受ける可能性の高い、河川中流域から下流域・沿岸域に生息する魚類(コイ科、メダカ科、ハゼ科など)に注目して、各種汚染物質が魚類の免疫機能に及ぼす影響を与えるかを研究す

る必要がある。環境有害化学物質は、大気中、水中、土壤中などに、さまざまなかたちで存在するが、水中に含まれる汚染物質について、自然界で魚が暴露する可能性の高いものを具体的に選別し、それらを実験的に曝露したときにあらわれる、免疫系の変化を形態的および機能的側面から検討することが可能である。さらに、汚染物質の取り込まれる経路（食物から、皮膚から、鰓から、）や、魚体内での処理過程（蓄積部位、排除経路など）を探ることにより、栽培漁業の改善あるいは食品としての魚の安全性という分野への寄与も期待される。有害環境有害化学物質が免疫機能にどのような影響を与えているかについて、液性（サイトカイン、補体系、抗体産生）および細胞性免疫機能（食細胞の貪食能）や外界とのバリアー機能を持つ体表（皮膚）、粘液による防御などを指標に検討することが必要である。具体的には、魚に環境有害化学物質を飼育水に混入、あるいは餌から経口的に投与して、マクロな視覚による健康状態の診断による評価（呼吸数、鰓、皮膚、鱗など）、病理組織学的評価、免疫関連器官の光学・電子顕微鏡的診断、血液学的・免疫学的評価、感染実験魚病実験でつかわれる病原体に感染させたときの感染抵抗性に及ぼす影響、末梢血あるいは腹腔のマクロファージ好中球などの食細胞の貪食能、移植片拒絶反応への影響などの指標による評価が可能である。魚類は系統進化の上で脊椎動物の基にあり、免疫系も哺乳類にみられる機能をほぼ備えている一方、無脊椎動物とをつなぐ位置にある。魚類を対象材料とすることは、環境有害化学物質が動物の免疫システムに及ぼす影響を広い視野から展望できることが期待できる。また、水棲生物であるので、環境水の汚染が生物の生体防御システムに及ぼす影響を判定する基礎を得られると考えられる。魚類は、河川、湖沼などの陸水から海洋の沿岸域から遠洋にわたり、広く分布し、その種類も多様である。その中には、コイのように寿命の長い種もあればアユやハゼ、メダカのように短寿命の種もある。環境有害化学物質はそれぞれの種の

卵発生期から老年期にわたり影響を及ぼすと考えられるので、多様性のある魚種の存在は、実験・調査の材料として大きな利点となる。

金属、芳香族炭素化合物などの環境有害化学物質は、これまでの毒性物質の安全基準からかけ離れたきわめて微量で、内分泌機能を攪乱させることが確認されている。自己以外の物質を異物として排除する免疫システムは、生体内で複雑な分子生理的メカニズムで制御されている。そこにさまざまな環境有害化学物質が侵入すると、それらの化学的情報伝達が誤作動して、システムが攪乱、破壊され、生存の危機に陥ることは十分考えられる。

我々人類は、さまざまな魚類を食用として用いているので、環境物質による魚類の汚染は、食品衛生上の問題や我々の健康管理の問題とも直接関係が深い。有害環境有害化学物質の免疫学的評価法が魚類を用いて確立され、汚染物質の魚体内での代謝経路の詳細が明らかになれば、その成果は、魚病研究や水産養殖の分野さらには食品管理の面においても、大きく貢献できると思われる。

ナメクジ

陸棲軟体動物ナメクジの主たる免疫担当細胞はマクロファージであることが明らかにされてきた。マクロファージはどの種の動物にも存在し、生体防御に深く関わる細胞であり動物の生死に直接結びつくことから、環境有害化学物質のこの細胞に対する影響を調べることは、重要な意味をもつ。環境有害化学物質が無脊椎動物のマクロファージに与える影響についての詳細はほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで、調査研究と実験的研究のいずれもが必要となると考えられる。

調査研究としては、汚染度の異なると思われる地域においてナメクジを採集し臓器、器官内の汚染物質の蓄積量はどれほどかについて、a)消化管、腎、中腸腺、生殖腺、結合組織、皮膚等に分けて汚染物質の含有量を分析する、b)ゴミ焼却炉近辺、農薬散布地、山林等の採集地における汚染度の差はあるか、c)

蓄積量に季節的な変動があるか、d)解剖組織学的に蓄積部位に変化が見られるか、の観点からどのような環境有害化学物質を指標にするかを含め検討していくことが重要と考えられる。汚染の度合いと免疫機能との関係を a) ナメクジ体液中のマクロファージの数を計測し、採集地による差を調べることで、b) ヒツジ赤血球、イーストをナメクジ体腔内に注射して、一定時間後マクロファージを取り出して貪食能を調べることで、c) その貪食能に季節的な変動はあるか、d) 汚染物質の種類によりその貪食能に差があるか、などを指標に検討していくことにより影響を評価することが可能になる。

実験的研究としては、a) 環境有害化学物質(溶媒の検討)を混入した飼育土でナメクジを飼育し、どの濃度から影響が現れるかを検索すること、b) ナメクジに有害物質を経口接種および経皮接種を行い、細胞性防御(マクロファージ活性)への影響を明らかにすること、c) 同接種法を用いて生体内のどの臓器、器官から蓄積されて行くかを明らかにすること、d) 発生過程での曝露の影響など感受性の違いをあきらかにすること、などの検討が重要な点であり新奇性も高い。ナメクジの生体影響を検討する際に哺乳動物と大きく異なることから a) polyaromatic hydrocarbon (PAH) receptor があるか、b) CRP の存在、その変化はどうか(無脊椎動物では acute phase な protein ではなく、常時高濃度で存在するといわれているが、果たしてそうか)、など考慮しておく必要がある。これらの研究を通して、これまで空白だった陸棲軟体動物の免疫機能に対する環境有害化学物質の影響と汚染物質の侵入経路が明白になる。また、最も汚染が高いとされる地上に棲み這い回る陸棲軟体動物は、環境汚染度を知る上で重要な生物マーカーとして挙げることができるようになるのみならず、有害な環境有害化学物質の免疫学的評価法が確立され、地球環境保全のための情報の提供が可能となる。

貝類

貝類は地球上全ての汚染物質の終着のある水域に生息する。特に海棲貝類は全世界で使用されて環境に附加された汚染物質に遭遇する可能性を持つ。また、高等哺乳類と異なり、貝類では免疫機構が原始的な発達段階にあり、特異的な免疫機構が存在しない単純な機構から成り立っている。すなわち、外来異物の生体内への侵入直後に働く非特異的な液性免疫と既存の免疫担当細胞群による食作用を中心とする非特異的な免疫応答である。これらは高等哺乳類においても外来異物の排除における早期段階で機能する免疫機構と相同のものであるため、貝類での免疫学的研究によって高等動物での免疫学的研究にも有用な情報が得られる。これまで行われてきた研究等から、試験対象物質、試験物質の曝露方法、試験供試貝、飼育条件、曝露期間などの概略をまとめた。

A. 試験対象物質

貝類は魚類と同様に水棲生物であり水質の影響を多く受けると考えられる。また大気圏から降り注ぐ降雨は大気中に存在する物質を溶解して含んで水圏に入る。また地圏から水圏に流入する表層あるいは地下水脈もまた地圏に存在する化学物質を運び込む。すなわち水圏には大気圏および地圏に存在する全ての化学物質が付加されることとなる。従って、貝類に対する環境汚染物質の影響を評価するにあたっては、水圏のみならず大気圏、地圏における全ての汚染物質が対象となり得る。

B. 試験物質の曝露方法

貝類の免疫学的な検索など毒性学的な研究手法としては、汚染海域現場での飼育という曝露法と、研究室での実験的な曝露方法が行われている。前者では複合汚染である場合が多く、この場合は得られた結果を単一の結果に帰結できない、一方、曝露物質の調整などが不要で自然な形で曝露が行える。しかし、他生物の共存など個体差を生じさせる因子が極めて多くなる。研究室での実験的曝露について以下にまとめる。

貝類への化学物質の曝露は、対象物質を水

質に溶解あるいは固形成分の場合には浮遊させその中で貝を棲息飼育させて行う方法が一般的と考えられる。個体ごとへの注射投与などは閉殻筋（二枚貝で言う貝柱）などへの注射が可能ではあるものの適切でないと考える。なぜならば貝類は殻と身からなり、体重あたりの投与の場合、身重量あたりに計算して投与すべきと考えるが、生きたままで身重量のみを計測することは困難だからである。以下には、飼育水質に試験物質を添加しての曝露法について検討する。

水に溶解しやすく、かつ安定性の良い物質の場合は問題が少ないが、水に難溶性、疎水性、高揮発性、有機物質などとの反応性が高い物質の場合、曝露濃度の制御が困難となる。頻回の飼育水の交換と飼育水容量と化学物質添加量とから計算した推測濃度での曝露実験、あるいは曝露中の濃度測定を行いつつの実験となることは止むを得ないであろう。

C. 試験供試貝

二枚貝の研究では殆ど海産貝が用いられているようである。カキ(oyster, *Crassostrea*)、ムラサキイガイ(mussel, *Mytilus*)、ハマグリ(clam, *Mercenaria*)などが用いられている(Pipeら、1995c)。分担者は、アコヤ貝を用いた経験がある。

以下には海産貝について考える。実験に用いる貝は、哺乳動物 SPF(specific pathogen free)に相当する貝が望ましい。しかし、試験貝の供給を考えると幼生から稚貝までは漁協稚貝供給研究所などでの濾過海水を用いての飼育が行われている貝種もあるが、一般的な貝種や、成長貝の場合には、天然海にて飼育されている場合が殆どである。このような飼育環境にあつては、各種プランクトン（餌そのものもプランクトンであるが、ここでいうのは餌としないプランクトン）、貝殻表面のホヤ、カサネカンザシ、フジツボ、カイメン、海藻類など付着生物、さらにはオキアミや寄生虫、細菌・真菌類やウイルスなどが存在する。これらの共存する生物を排除するためには、受精の段階から実験に供するまでの成長貝の段階まで人工海水を用いての飼育が必要となるが、現実的にそのような条件で

飼育した貝の供給を求めることは困難である。それに替わるものとして、通常の天然海にて飼育された貝の提供を受けた後、人工海水中にて物理的に貝殻表面の付着生物を除去し、殻内部を人工海水にて洗浄し、かつ数日間ないし1週間程度を人工海水にて毎日殻表面の生物を除去する操作を繰り返しながら順化飼育を行うことによってある程度の外部生物を排除した貝が得られる。こうした貝を実験に供することが現実的かつ無難なところであろう。事実、濾過天然海水を用い他生物の存在を無視した実験系よりは、人工海水を用いかつ他生物を極力排除した実験系の方が、各種免疫能の指標において個体差が小さい結果が得られ、より感度の良い毒性学的な検索が可能となる結果を得ている。欧米では一般的に、野生の貝類を採取し、数日間ないし3ヶ月ほど濾過天然海水でタンクにて飼育して実験に供している。

免疫学的な検索を行うにあたって用いる検体である血リンパ液を採取するには、採血操作を容易とするために大きな閉殻筋を持つ二枚貝が適切であろう。閉殻筋の殻からの切離後の採血では血リンパ液の閉殻筋からの出血により得られる血液量の損失や体外海水などの混入を避けることが難しい。しかし、止むを得ない場合には閉殻筋の切離、開殻後に心臓からの採血を行うこととなる。真の心腔の外側に囲心腔が有る場合には心臓からの採血は注意を要する。すなわち囲心腔中の体液は血リンパと大きく異なり、血球成分が殆ど無いからである。

D. 飼育条件

飼育条件としては、哺乳動物 SPF(specific pathogen free)に相当する環境での飼育が望ましいと考えられる。自然海水を一般的海棲動物飼育用の濾過だけでは外部生物を完全に除去できない上に、自然海水は季節や天候によって成分組成の変動が考えられるので、成分が一定である人工海水などでの飼育が必須である。

飼育温度をコントロールすることは重要である。なぜならば季節変動に伴う温度変化によって血リンパ球数の変動があることが知ら

れている（船越、1977；Pipe ら、1995b）。船水によると、一般海域で飼育観察されたアコヤ貝の血リンパ球数は冬季に増加し夏季に減少する。温度幅 9℃から 28℃の範囲で 4 倍の開きがあり、血リンパ球分画の構成比もやや変動する。したがって、曝露実験中の温度変化は免疫学的な観察の際に大きな交絡因子となるので、特殊な目的をもつての実験以外は、一定の温度での飼育が望ましいと考える。一般に 20℃前後で行われた実験が多い。飼育容器は毒性試験を行う以上、有害物質の溶出が無いものを使うことが必須と考えられる。飼育が水中で行われる都合上、水圧、重量に耐えうる容器を準備しなければならない。溶出物質の少なさを考慮すると総ガラス製ないし総テフロン製が最も適切と考えられるが、高価であり、特に後者は高価である。また、前者は重い上に割れやすく扱いが難しい。水産関係の飼育には、ポリカーボネート製、FRP 樹脂製、アクリル樹脂製が一般的とのことである。また、ポリプロピレン製タンクを用いる研究者もある。いずれの材質にしろ製造過程で使用される原料、添加物などの溶出の可能性は完全には否定しえないであろう。

給餌を考慮する場合、貝類の場合には水質に浮遊させたプランクトンを与えねばならないが、これらプランクトンと当該化学物質の反応や相互作用も考慮せねばならないなど実験系の構築に際して懸案事項が少なくない。あこや貝などの真珠核珠入れ時の抑制に相当する無給餌状態での実験条件を採用するならば、餌と化学物質の相互作用を無視した実験ができるが、無給餌という別の条件が加わるることとなる。また、化学物質への曝露前に時間を区切って給餌する条件の下に実験をおこなった研究もある（Pipe ら、1995c）。

E. 曝露期間

無給餌での飼育を前提とした場合、分担者はあこや貝を用いての 1 ヶ月以上にわたる飼育経験があり、かつホルムアルデヒドの間歇曝露実験においても 4 週間の無給餌飼育の経験がある。他の研究者の採用している曝露期間は給餌の上で 7 日から 11 週間である。感

染実験では、曝露期間に加えて感染をさせる期間が加わるために一般的に長期の曝露期間となっている。

参考文献

- Pipe, R.K., Coles, J.A., and Farley, S.R. (1995). Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. In *Techniques in Fish Immunology-4. Immunology and Pathology of Pathology of Aquatic Invertebrates* (J.S. Stolen, T.C. Fletcher, S.A. Smith, J.T. Zelikoff, S.L. Kaattari, R.S. Anderson, K. Sørderhll and B.A. Weeks-Perkins, eds) pp. 93-100. Fair Haven: SOS Publications.
- Pipe, R.K., and Coles, J.A. (1995). Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mussels, *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 581-595.
- 船越将二. (1977). アコヤガイの血球数、血球組成および血球の大きさの季節変化。国立真珠研究所報告。21、2229-2308。

カイコ

無脊椎動物の中で約 80%以上占める昆虫の生体防御機能に着目し、環境有害化学物質がこの異物排除を基盤とする免疫機能に及ぼす影響を与えるかを、具体的な汚染物質（例えば、殺虫剤、除草剤、重金属など）を選別し、加えて昆虫の具体的な個々の生体防御因子の発現を指標に、研究することは、空气中並びに水中、あるいは土壌中の環境有害化学物質の免疫学的評価が可能になり、生物の免疫学的保護の技術の開発も将来模索できるようになると期待される。

昆虫は顆粒細胞とアメーバ状のプラズマ細胞による細胞性防御反応と、抗菌蛋白質やレクチン分子並びにフェノール酸化酵素前駆体活性化系などに依存した液性防御反応によって、侵入する異物の排除を行っている。この生体防御反応が正常に機能することが昆虫の健康維持と生存にとってきわめて重要である。昆虫は進化の流れの中で最も種分化を果たし、最も繁栄している生物であるため、人間の生

活空間に常に存在している。その観点で、人間活動によって生じる悪環境や自然界に放出される有害汚染物質には常にさらされる運命にあり、多くの影響を被っている。しかし、その影響についての具体的な実態は不明である。昆虫（特にカイコ）を用い、環境有害化学物質がの血球機能、特に顆粒細胞による食作用、抗菌蛋白質やレクチン、あるいはフェノール酸化酵素前駆体活性化系などの防御蛋白質の発現・誘導に及ぼす影響を生体内及び生体外のバイオアッセイによって解明することが重要である。具体的にはカイコを用いて有害物質の経口接種並びに経皮接種を行い、a)細胞性防御反応への影響を食作用と包圍化作用の観点で追求すること、b)細胞性防御反応に関与する顆粒細胞とプラズマ細胞の微細構造並びに細胞行動に及ぼす影響を電子顕微鏡で調べること、c)脱皮変態時に誘導されるレクチン分子並びに抗菌蛋白質誘導に及ぼす影響を追求すること、d)フェノール酸化酵素前駆体活性化系によるメラニン色素形成に及ぼす影響を調べること、また、*in vitro*において、e)上述の血球機能並びに防御分子の発現に及ぼす影響を調べること、などを検討することにより免疫機能への影響を観察することができる。

これまで、環境有害化学物質が昆虫類の生体防御機能にいかなる影響を与えるか、についてはほとんど知られていないのが現状である。カイコの免疫機能に着目し、人間活動が生み出す有害物質の影響を検討することにより、自然界の環境有害因子の昆虫の免疫攪乱の実態が明確になると考えられる。

ミミズ

ミミズは陸生動物としては、我々の身近に生息しており、生物生存環境の変化の補足に適している。ミミズは我々の生活と密接に結びついており、過去に畑の作物を荒らした害虫としてとらえられたものもあるが、畑にミミズがいますと、土壌改良効果があることが知られ、作物の育成に有益であることが知られている。またヘドロおよび生ゴミの処理にミミ

ズが有効であることが報告されている。さらにミミズはモグラや鳥など多くの野生生物のエサとなっているので、生物学的には誠に大きな役割をになっていると考えられる。日本の国上が、作物の生産を上げるために大量の農薬を土壌へ散布し続けている。陸生生物の住環境は著しく悪化しつつある。これらの環境を汚染する物質は降雨とともに川へは入り、河川およびさらに近海の生物の住環境に影響を与えている。当然、この結果のエンドポイントは、食物連鎖の頂点にあるヒトへとつながっている。我々の生活の利便性の追及から、自然界では存在しなかった様々な化学物質を生産し利用してきた。今、これらの物質が生物の生存を脅かしている現況であるが、これらの化学物質の生物の免疫機能へ与える影響を調べ、評価することは重要な意義があると考えられる。さらに、ミミズは環境汚染化学物質のモニター動物として使われてきたが、その判定基準は短期での大量被曝による生か死かであり、致死量以下での影響や長期毒性の影響について検討はほとんど行われてこなかった。ミミズの免疫機能については、極めて基本的な現象を観察してきた歴史があるが未だ充分に解明されてはいない。各免疫担当細胞の由来、分類および機能などを、分子レベルで明らかにすることが、必要であると考ええる。

ミミズは、実験動物としては比較的扱いやすく、大量飼育してもあまり、スペースをとらず、再現性のある実験を行うことが可能である。有害化学物質のミミズに与える影響について、基本的な液性免疫機能、および細胞性免疫能の測定を行うことが可能である。特にミミズの免疫担当細胞を分離する技術は確立されており利用できる。また実験対象となるミミズについては、純粋種に近いものを安定的に供給するシステムが確立されており、さらに汚染土壌から採取して検討することも比較的容易に出来る。そこで、環境有害化学物質がミミズの基本的な免疫能への影響を、a) 異物食能およびリゾチームを始めとする酵素活性、b) 溶血活性、c) 赤血球凝集活

性、d) 抗原結合性蛋白の測定（抗原をミミズに免疫）、e) Natural killing activity、を指標に検討することが可能である。これらの基本的免疫機能の測定は、技術的に他の生物で行ってきた方法を応用でき、評価基準を確立することが可能である。1) -5) の機能の評価を行う手法として、免疫組織化学、免疫化学（ウエスタンブロット、ザイモグラフ、ELISA による定量）、蛍光免疫染色（顕微鏡およびフローサイトメトリー解析）などがある。

さらに、環境有害物質の免疫機能へ与える影響を分子レベルで検討することも可能である。汚染物質のレセプターと考えられる arylhydrocarbon receptor(AhR), estrogen receptor (ER) heat shock protein(HSP,60,70,90), cytochrome oxidase subunit, cathepsin などレセプターの標的遺伝子について、分子生物学的手法と蛋白解析を合わせて行い、総合的に評価する。ミミズ免疫能を担う分子として Thy-1, (2-microglobuline, pore forming protein、ケモカインなどの発現も検討することが可能である。

ミミズにおける環境汚染有害物質の評価は現在行われている行われている短期毒性試験の他、世界的に統一された評価方法は未だ確立されていない。これらの研究の結果得られる知見は、環境汚染有害物質の評価の確立に寄与するにとどまらず、生物における免疫系の進化を明らかにするなど派生する利点は大きい。ともすると地球環境の保全を計るという問題は、人類の生存を前提条件として述べられるが、この地球上の動物王国の中では、ヒト占める割合は数的に微々たるもので、我々はこの地球環境を守る義務があると考え、その戦略を確立する上で、この成果が生かされると思われる。

(9) 結論

多くの野生生物が生物学的に影響を持つ可能性のある濃度の PCB やダイオキシンなどの有機塩素系化合物、有機スズなどの重金属、アルキルフェノールなどの可塑剤、農薬とい

った有害化学物質に曝されていると考えられる。マウスを用いたダイオキシンの実験に見られるように環境中に現実にあるような濃度においても有害化学物質による免疫機能の攪乱が起きる可能性があると考えられる。今回の調査により、実験室レベルにおいても生態系においても、有害化学物質が環境生物の免疫機能におよぼす影響に関わる知見がきわめて少ないことが明らかになった。特に、哺乳類以外の生物において未知の部分が多く実験手法の開発を含め今後の研究の進展が望まれるが、現存の手法を用いることでも多くの知見が得られることが明らかになってきた。一方、種々の野生生物における免疫機能の異常が生態系におよぼす影響については多くの因子が含まれていることから複雑な因果関係で影響にいたることが推察される。この点についても地道な基礎研究による解析が必要になると考えられる。この観点からも解析の基盤となる環境有害化学物質による免疫機能への影響の研究を推進する必要がある。国際的にも米国、EU 諸国は連携を謀りながらこれらの点についての検討を推進している。有害化学物質の生態系におよぼす影響の研究は我が国のみならず人類全体の問題であることから、我が国においても早急に正式なプロジェクト研究として立ち上げ、基礎データを得つつこれらの諸国との連携を強化する必要がある。

(10) 研究発表

なし

(11) 英文アブストラクト

Living things lead their lives with excluding invasion of microorganisms by developing their immune functions. Decline of the immune functions allows invasion of latently invasive microorganisms. There is a possibility that this invasion causes fatal effect on creatures. The cause of mass death of marine mammals in polluted waters such as the Baltic Sea is presumed to be infectious disease by suppression of immune system due to hazardous chemicals. It

is not too much to say that most studies on the effects of chemicals on immune functions have been done with using experimental animals such as mice and rats not with other diverse species. Differences are expected in the effects of chemicals on immune functions of different species because of their diversity of immune functions. Therefore, in order to elucidate the effects of hazardous chemicals in the environment on various animals, we surveyed using literatures 1) immune functions of various

representative animals, 2) effects of hazardous chemicals on the immune functions of various animals, and considered 3) future studies. Regarding 1) and 2), we surveyed vertebrates such as mammals, birds, amphibians and fish, and invertebrates such as mollusk, arthropod and annelid. Based on these surveys, we considered direction of future studies and made clear that it is necessary to push forward with a project to elucidate the effects of hazardous chemicals on immune functions of environmental animals.

小林隆弘	国立環境研究所
菊池慎一	千葉大学海洋バイオシステムセンター
小宮山一雄	日本大学歯学部
高橋慎司	国立環境研究所
平野靖史郎	国立環境研究所
古田恵美子	獨協医科大学
吉田貴彦	旭川医科大学
和合治久	埼玉医科大学短期大学
遠藤直紀	筑波大学医科学
瀬尾直美	東京医科大学
高木 尚	東北大学
中村弘明	東京歯科大学
山口恵一郎	獨協医科大学

Fig.1 環境生物の免疫影響に関する研究



Fig.2 アザラシの大量死

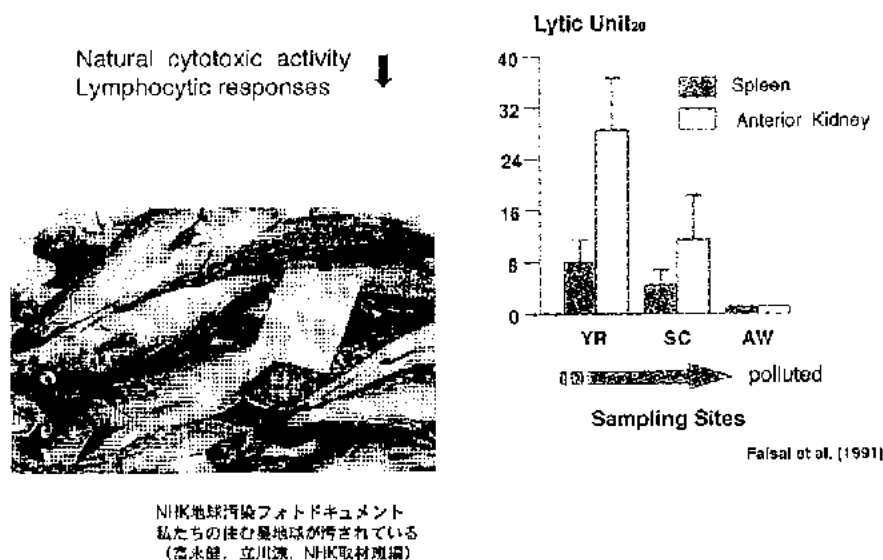


Fig.3 汚染された水域の魚類の免疫機能の低下

環境汚染有害化学物質が各種生物の免疫機能に及ぼす影響の解明研究
のための文献調査

1. 指標生物を中心とした生物の免疫機能についての文献調査
2. 有害化学物質が各種生物の免疫機能に及ぼす影響についての文献調査
3. 今後の研究の方向性

Fig.4 目的

脊椎動物

哺乳類（マウス、ラット）
鳥類
両生類（カエル）
魚類

無脊椎動物

軟体動物（ナメクジ、貝）
節足動物（昆虫）
環形動物（ミミズ）

Fig.5 環境生物の免疫機能

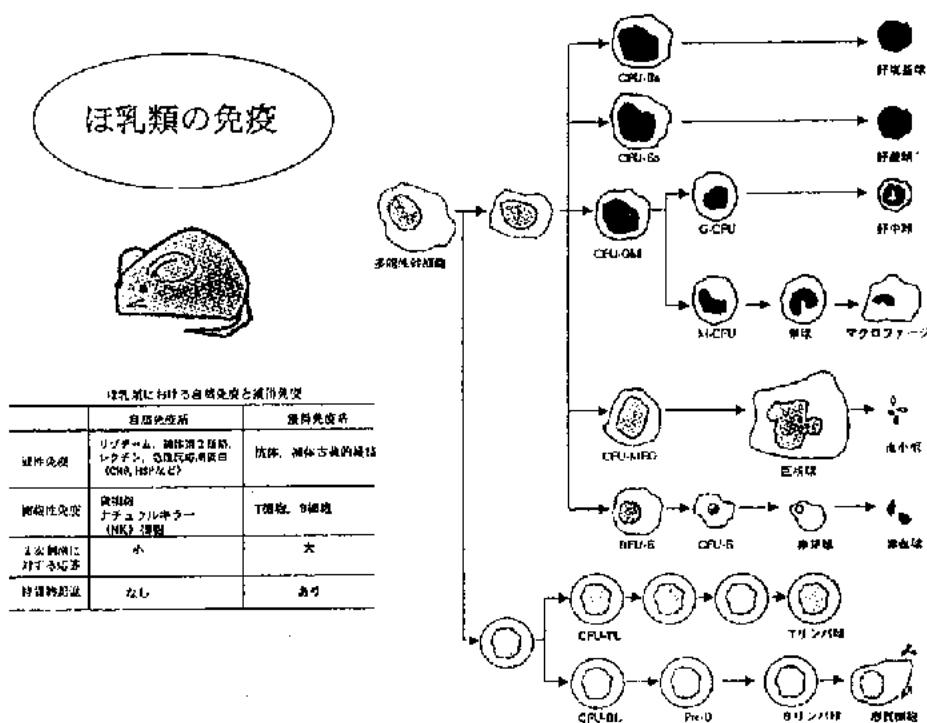


Fig.6 ほ乳類の免疫

・液性防御因子

非特異的因子

リゾチーム
トランスフェリン
C反応性タンパク質
補体 など

特異的因子

抗体 (IgM)

・細胞性防御因子

非特異的因子

顆粒白血球
マクロファージ

特異的因子

Bリンパ球
Tリンパ球

・免疫器官

脾臓、腎臓、胸腺

Fig.7 硬骨魚類の免疫系

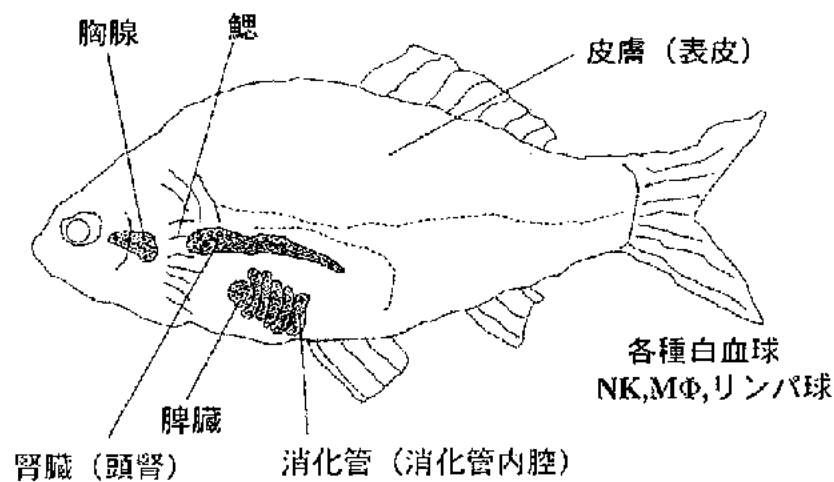


Fig.8 魚類の免疫機能

・液性防御因子

非特異的因子

リゾチーム
トランスフェリン
C反応性タンパク質
補体 など

特異的因子

抗体 (IgM, IgY)

・細胞性防御因子

非特異的因子

顆粒白血球
マクロファージ

特異的因子

Bリンパ球
Tリンパ球

・免疫器官

脾臓、腎臓、胸腺、
骨髓/リンパ節 (カエル)

Fig.9 両生類免疫系

特徴： 非特異的免疫（免疫学的記憶は存在しない）

液性免疫

機能： 異物の凝集、殺菌・失活化

レクチン（凝集素）、抗菌物質（リゾチームなど）が担う

細胞性免疫

機能： 異物への遊走、接着、貪食、殺菌（消化）、など

循環血中の無顆粒球、顆粒球が主役となる

（一部、組織定着細胞も一定の役割を担う）

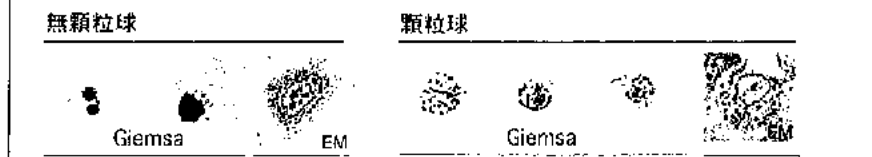


Fig.10 貝類の免疫機構

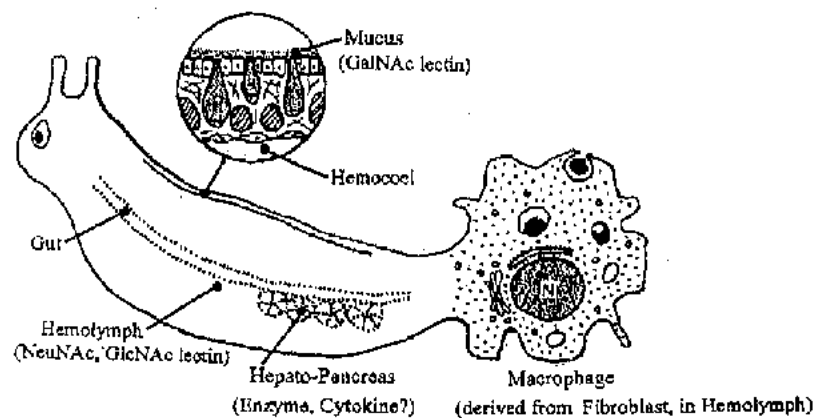


Fig.11 DO YOU HAVE MACROPHAGES?

1) NON-SELF RECOGNITION

2) PHAGOCYTOSIS

3) ENCAPSULATION

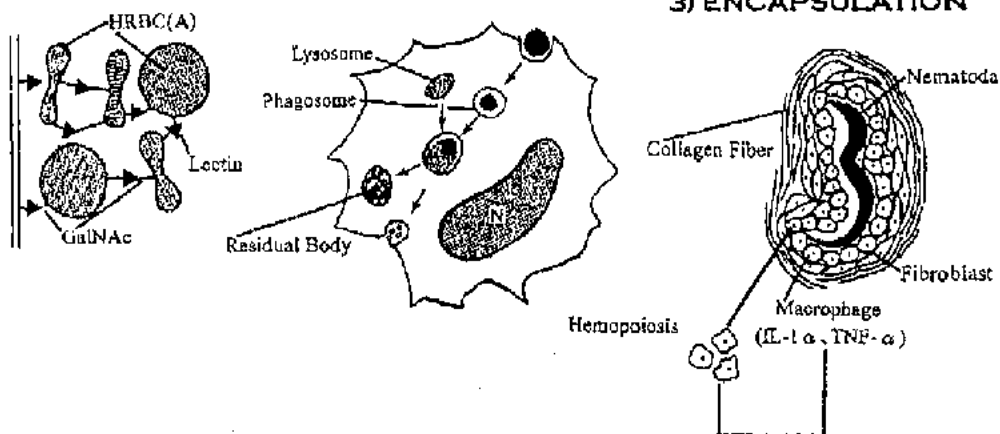


Fig.12 FUNCTIONS

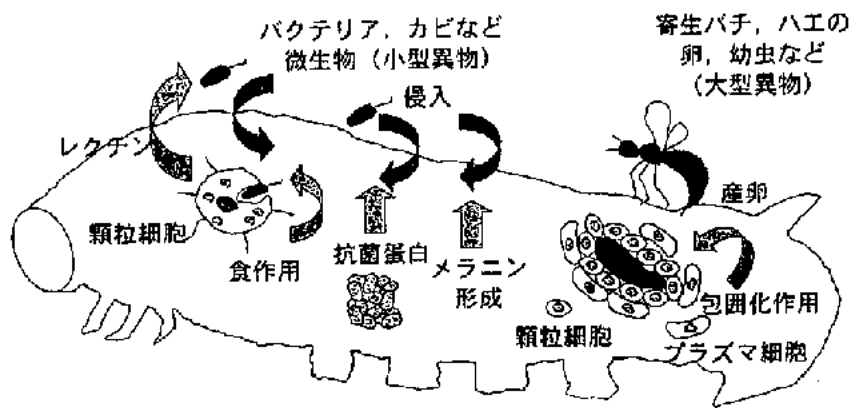


Fig.13 昆虫の免疫機能

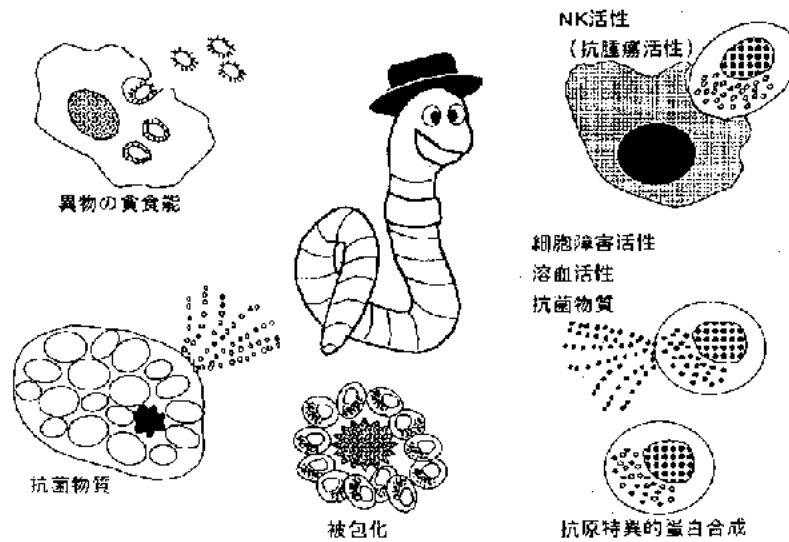


Fig.14 ミミズの免疫機能

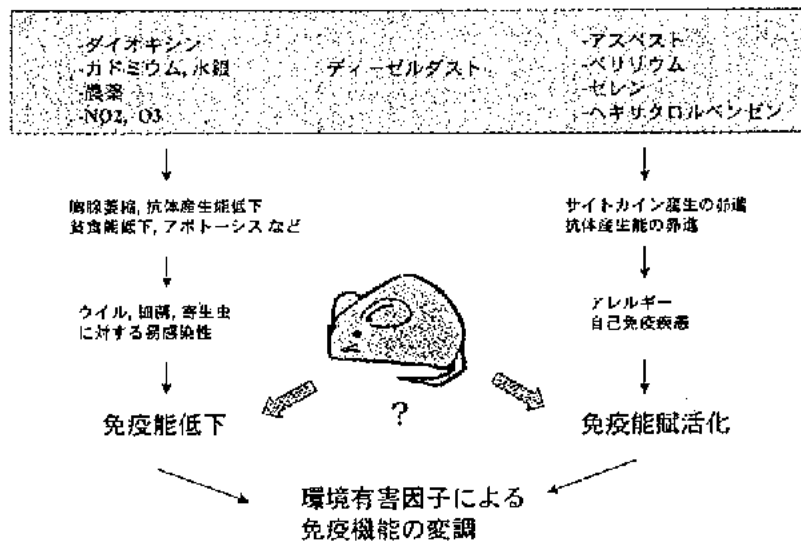


Fig.15 環境有害物質がほ乳類の免疫機構に及ぼす影響

重金属 水銀：リンパ球の減少（コイ） 銅：抗体産生の抑制（ニジマス） カドミウム&鉛：循環抗体の減少 （ブラウントラウト）	芳香族炭化水素 PCB：影響無し（ニジマス） 食作用の減少（アメリカナマス） 血清抗体の減少（ナツヒラメ）
殺虫剤 DDT：抗体産生細胞および 循環抗体の減少（キンギョ） Edrin：食作用・抗体産生の減少 （ニジマス） 有機スズ：食作用の機能低下（Toadfish）	抗生物質 テトラサイクリン：抗体産生低下 （ニジマス） アフラトキシン：B細胞の記憶喪失 （ニジマス）

Fig.16 環境汚染物質の魚類免疫機能への影響

金属類

カドミウム、銅、有機スズ、複合金属汚染

一般に、短期・低濃度で応答亢進、長期・高濃度で抑制影響

有機物質

カトラレン、フェノール、多環芳香族炭化水素化合物、6塩化ベンゼン、5塩化ベンゼン、汚染沈殿物質（タレオソート汚染）、農薬（DDT、トキサフェン、パラチオン）、n-ニトロソジエチル アミン、ホルムアルデヒド

一般に免疫抑制、感染抵抗性の減弱

複合汚染物質

一般に、短期・低濃度で応答亢進、長期・高濃度で抑制影響

Fig.17 貝類で報告されている免疫影響

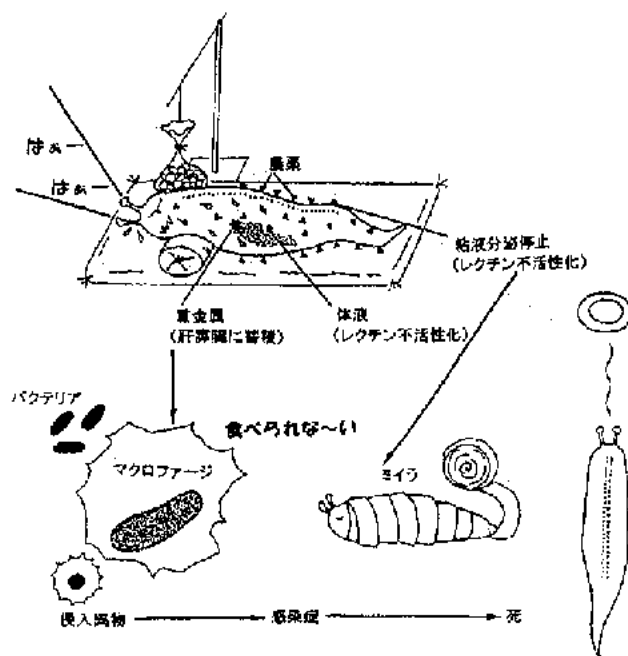


Fig.18 複合汚染物質

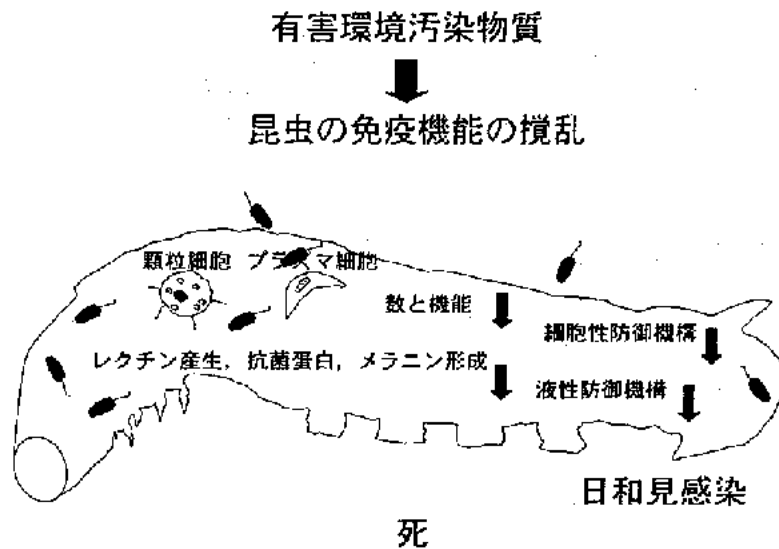


Fig.19 有害環境汚染物質

実験的研究：

種々の環境生物を用いた影響研究の結果を踏まえ、条件がよくコントロールされたマウスやラットを用いた実験においても確認されるかどうか検討し、起こればその機序についても研究をすすめる。

- a) 細胞性免疫：マクロファージや好中球、あるいはNK細胞を用いて、貪食能や活性酸素あるいは活性窒素種の産生能、NKの細胞障害性について調べる。
- b) 液性免疫：補体やCRP、HSPの定量値が環境汚染を反映するものなのか否かについて研究

調査研究：

- a) 汚染が顕著な海に棲息するイルカあるいはアザラシといった海棲哺乳動物の感染抵抗性に関わる免疫機能についてさらに検討することが必要。特にカスピ海など汚染が深刻化している海域での調査が必要と
- b) 捕獲、血液採取、野外でのNK活性、リンパ球の増殖能の測定など手法の開発も重要。

Fig.20 哺乳類

- a) 重金属 (Pb, Cd), 残留化合物 (農業, 多環式芳香族, 有機塩素系化合物) の食餌投与や海面活性剤の飲水投与による免疫担当細胞 (T・B細胞, Mφ, NK細胞) への傷害作用
- b) 病原体暴露による感染抵抗性と免疫担当細胞機能との関係の検討
- c) 汚染が顕著な水域の鳥類の免疫機能の調査

Fig.21 鳥類

カエルが減少しているという報告があることから、その要因のなかに免疫機能の低下があるかどうか実験および調査研究が必要となる。ツメガエルの近交系の確立により、免疫毒性研究への使用が可能になった。

- a) 環境有害化学物質を飼育水に加え曝露し、水生種あるいは幼生について影響の検討
- b) 陸生肺呼吸をするカエルについては経口あるいは経皮的に曝露を行い影響の検討
- c) 自然界に自生するカエルについて、血液学的（血球種別血球数など）、血液生化学的、免疫生化学的（抗体価など）検討を行い、汚染との比較を行う。

Fig.22 両生類

有害環境有害化学物質が

液性（サイトカイン、補体系、抗体産生）および細胞性免疫機能（食細胞の貪食能）や外界とのバリアー機能を持つ体表（皮膚）、粘液による防御などを指標に検討することが必要である。

魚に環境有害化学物質を飼育水に混入、あるいは餌から経口的に投与して、

- a) マクロな視覚による健康状態の診断による評価（呼吸数、鰓、皮膚、鱗など）、
- b) 病理組織学的評価（免疫関連器官の光学・電子顕微鏡的診断）
- c) 血液学的・免疫学的評価、
- d) 感染実験 魚病実験でつかわれる病原体に感染させたときの感染抵抗性に及ぼす影響、
- e) 末梢血あるいは腹腔のマクロファージ好中球などの食細胞の貪食能、
- f) 移植片拒絶反応への影響などの指標による評価も必要である

Fig.23 魚類

貝類の免疫機能について調査と実験的研究のいずれもが必要となる。

- a) 汚染度の異なると思われる地域において貝類を採集し汚染の度合いと免疫機能との関係を貝類体液中の貪食細胞の数や貪食能などを指標に非特異的免疫への影響を検討
- b) 汚染海域現場あるいは研究室での実験的な曝露と飼育を行い免疫機能への影響を検討する。
- c) 貝類への化学物質の曝露（対象物質を水質に溶解あるいは固形成分の場合には浮遊させその中で貝を棲息飼育させて行う）し免疫機能への影響を検討する。

免疫学的な検索を行うにあたって用いる検体である血リンパ液を採取するには、採血操作を容易とするために大きな開殻筋を持つ二枚貝が適切である。開殻筋の殻からの切離後の採血では血リンパ液の開殻筋からの出血により得られる血液量の損失や体外海水などの混入を避けることが難しい。止むを得ない場合には開殻筋の切離、開殻後に心臓からの採血を行う。真の心腔の外側に囲心腔がある場合には心臓からの採血は注意を要する。すなわち囲心腔中の体液は血リンパと大きく異なり、血球成分が殆ど無いからである。

Fig.24 貝類

ナメクジの免疫機能について調査と実験的研究のいずれもが必要となる。

調査研究

汚染度の異なると思われる地域においてナメクジを採集し

- a) 汚染の度合いと免疫機能との関係をナメクジ体液中のマクロファージの数や貪食能などを指標に検討比較する。

実験的研究

- a) ナメクジに有害物質を経口接種および経皮接種を行い、細胞性防御（マクロファージ活性）への影響を明らかにすること、
 - b) 環境有害化学物質（溶媒の検討）を混入した飼育土でナメクジを飼育し、量-反応関係を検討すること、
 - c) 同接種法を用いて生体内のどの臓器、器官から蓄積されて行くかを明らかにすること、
 - d) 発生過程での曝露の影響など感受性の違いを明らかにすること、
- などが重要な点であり新奇性も高い

Fig.25 ナメクジ

昆虫の生体防御機能に着目し、環境有害化学物質が異物排除を基盤とする免疫機能にいかなる影響を与えるかを、殺虫剤、除草剤、重金属などを用いて研究することは、空气中、水中、あるいは土壌中の環境有害化学物質の免疫学的影響評価が可能になり、生物の免疫学的保護の技術の開発も将来模索できるようになると期待される。

有害物質の経口接種並びに経皮接種を行い、

- a) 細胞性防御反応への影響を食作用と包囲化作用
- b) 細胞性防御反応に関与する顆粒細胞とプラズマ細胞の微細構造並びに細胞行動に及ぼす影響（電子顕微鏡を用いた検討）
- c) 脱皮変態時に誘導されるレクチン分子並びに抗菌蛋白質誘導に及ぼす影響
- d) フェノール酸化酵素前駆体活性化系によるメラニン色素形成に及ぼす影響 in vitroにおいて、
- e) 上述の血球機能並びに防御分子の発現に及ぼす影響

を検討することにより免疫機能への影響を観察することができる。

Fig.26 カイコ

ミミズは、実験動物としては比較的扱いやすく、大量飼育してもあまり、スペースをとらず、再現性のある実験を行うことが可能である。有害化学物質のミミズに与える影響について、基本的な液性免疫機能、および細胞性免疫能の測定を行うことが可能である。特にミミズの免疫担当細胞を分離する技術は確立されており利用できる。また実験対象となるミミズについては、純粋種に近いものを安定的に供給するシステムが確立されており、さらに汚染土壌から採取して検討することも比較的容易に出来る。

- a) 異物貪食能およびリゾチームを始めとする酵素活性
- b) 溶血活性
- c) 赤血球凝集活性
- d) 抗原結合性蛋白の測定
- e) Natural killing activity,

を指標に検討することが可能。

1) - 5) の機能を評価を行う手法として、免疫組織化学、免疫化学（ウエスタンブロット、ザイモグラフ、ELISAによる定量）、蛍光免疫染色（顕微鏡およびフローサイトメトリー解析）などがある。

環境有害物質の免疫機能へ与える影響を分子レベルで検討することも可能である。汚染物質のレセプターと考えられるarylhydrocarbon receptor(AhR), estrogen receptor(ER) heat shock protein(HSP,60,70,90), cytochrome oxidase subunit, cathepsinなどレセプターの標的遺伝子について、分子生物学的手法と蛋白解析を合わせて行い、総合的に評価する。

Fig.27 ミミズ

1. 多くの野生生物が生物学的に影響を持つ可能性のある濃度の有害化学物質に曝されていると免疫機能の攪乱が起きる可能性があることが推察される。
2. 実験室レベルにおいても生態系においても、有害化学物質が環境生物の免疫機能におよぼす影響に関わる知見が（特に、哺乳類以外の生物において）きわめて少ないことが明らかになった。
3. 未知の部分が多く実験手法の開発を含め今後の研究の進展が望まれるが、現存の手法を用いることでも多くの知見が得られることが明らかになった。
4. 種々の野生生物における免疫機能の異常が生態系におよぼす影響については多くの因子が含まれていることから複雑な因果関係で影響にいたることが推察されるが、この点においても解析の基礎となる環境有害化学物質による免疫機能への影響の研究を推進する必要がある。
5. 国際的にも米国、EU諸国は連携を謀りながらこれらの点についての検討を推進しており、我が国においても早急にプロジェクトを立ち上げ基礎データを得つつこれらの諸国との連携を強化する必要がある。

Fig.28 結論

8. 鳥類の内分泌攪乱化学物質影響調査

研究者 和田 勝（東京医科歯科大学教養部教授）

研究要旨

鳥類を用いた内分泌攪乱化学物質の研究をわが国において推進するために、有力な鳥類内分泌学者を糾合し、強力な研究グループを組織した。今後、研究を進められる体制を整える必要がある。一方、鳥類における内分泌攪乱化学物質の評価法を確立するために、ビテロゲニンのかわりに血中 VLDL 量を機器分析し、エストロゲンの肝臓に対する作用を推定する方法を試した。血中 VLDL 量は、雌では高く雄では低かった。雄にエストラジオールを投与すると、雄は雌と同じように血中 VLDL 濃度が著しく上昇した。この方法は評価法のひとつとして有効であると考えられる。

研究者協力者

服部 淳彦（東京医科歯科大学教養部教授）

岡崎 三代（東京医科歯科大学教養部教授）

園田 豊（日本大学生物資源科学部講師）

A. 研究目的

ヒトが作った化学合成物質が、環境に排出された後に生体にとりこまれて内分泌攪乱化学物質としてはたらき、野生動物に深刻な影響を与え、ヒトへの影響も見過ごされない状況に立ち至っている。多くの内分泌攪乱物質はエストロジェニックな作用を持ち、生体の内分泌系、特に生殖にかかわる内分泌系を攪乱していると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。野生生物への影響についても、散発的な報告が見られるだけである。食物連鎖の頂点にいるヒトへの影響を考えたとき、同じような地位にいる鳥類に関する情報が重要である。

現在、OECD において鳥類内分泌毒性試験ガイドラインの改訂がおこなわれ、さらに二世世代試験を含む内分泌攪乱化学物質試験法の策定が進められている。環境行政上、これらに対応するためにも、鳥類の研究が

不可欠となってきた。

そこで、この研究では鳥類への内分泌攪乱物質の影響を調査し、今後の OECD の動向に対応するため「鳥類における内分泌攪乱物質の影響と評価法の確立」のための研究グループを組織することを目的とした。また、魚類では、卵黄タンパク前駆物質であるビテロゲニンをバイオマーカーとして、内分泌攪乱物質の影響を評価しようとしているが、鳥類では現在までのところ、よい評価方法がない。そこで、実験動物である、ウズラ、ヒメウズラを使い、ビテロゲニンあるいはその関連物質をバイオマーカーに使うためにはどのような方法があるかを検討し、評価方法を確立するための予備的な実験をおこなった。

B. 研究方法

1) 鳥類を使った研究の必要性和研究グループの立ち上げ

1999 年 5 月 23 日（日）～24 日（月）にドイツ国ライプチヒ大学で開かれた Meeting of the Avian Reproduction Expert Group on OECD Test Guideline for Avian

Reproduction Toxicity Testing に参加して、鳥類に対する化学科学物質の生殖毒性検査のガイドライン策定に関与するようになった。参加者はアメリカ、カナダ、ドイツ、英国、オランダ、日本であった。現在までのところ、生殖毒性の最終ガイドラインの策定を行っており、これが終わったら内分泌攪乱物質の評価と検査のガイドライン策定に向かうことになった。内分泌攪乱物質に関しても若干討議したが、二世代テストを行うという点では参加者の一致を見たが、エンドポイントをどうするかという議論では、議論の入り口に立ったところである。このように、鳥類において内分泌攪乱化学物質が本当にどのように影響を与えているかに関する研究はまだ少ないのが現状である。今後、このガイドラインを策定するに当たって、どのようなエンドポイントを設定するか、どのくらいの検査期間を置くかという点が重要なポイントになってくるだろう。そこでまず、鳥類における内分泌攪乱物質による影響を文献調査し、国内外の研究者と情報交換を行い、十分な情報を収集し、OECD Test Guideline for Avian Reproduction Toxicity Testing に対応するためにわが国の研究者を集めて研究グループを組織することを試みた。

今後、この研究グループが十分な成果をあげられるような環境を整える必要がある。

2) 評価法確立のための予備的実験

鳥類における内分泌攪乱物質の影響を評価するバイオマーカーを探索した。魚類ですでおこなわれているように、ビテロゲニンはエストロゲンの効果を調べる有効なバイオマーカーである。鳥類でもエストロゲンの作用により、ビテロゲニンが肝臓で生成され、卵巣に送り込まれるが、ビテロゲニンの有効な測定系はまだ開発されていない。血清中のリポタンパク質である超低

密度リポタンパク質 (VLDL) はビテロゲニンと関連があり、肝臓でつくられた多量の中性脂肪を卵巣に運搬する。そのため、ビテロゲニンと同様に、産卵に連動して増加する。VLDL を指標とすれば各種内分泌攪乱物質の鳥類に対するエストロジェニック作用を簡便に測定することができると考えた。そこで、以下のような実験をおこなった。

- (1) 雌雄で VLDL の血中濃度に差があるかどうかを確認するために、ヒメウズラ (*Coturnix chinensis*) の雌 4 羽雄 4 羽の血中 VLDL 量を、東ソーリポタンパク質測定システムで測定した。この装置は、カラム 2 本を備えた HPLC を通して粒子の大きさで分けたフラクションのコレステロールとトリグリセリド量を抗体法によって検出して、これらを運ぶ HDL、LDL、VLDL 量を測定する装置である。

雌 4 羽のうち 2 羽は産卵を続けている個体であったが、2 羽は長日下であったにもかかわらず産卵していない個体であった。

翼静脈 (尺骨静脈) を注射針によって破り出血させ、これをヘマトクリット毛細管で吸引して採血した。採血した血液を遠心し、血漿を分離してサンプルとした。

- (2) 次に、短日下で飼育して性的に成熟していない、雌 8 羽雄 8 羽のヒメウズラを長日 (16L8D) に移して視床下部-脳下垂体-生殖腺を刺激し、雄の精子形成、雄の卵成熟ならびに産卵を誘導した。短日から長日に移した日を Day0 とし、これ以降、Day5、Day10、Day14、Day20、Day25、Day30 に採血した。血中エストラジオールの濃度をラジオイムノアッ

セイ法で測定した。同じサンプル中の VLDL 量を上記の方法で測定した。

- (3) エストラジオールをごま油に溶かし、1羽あたり 1mg/100g BW の用量で雄 8羽に腹腔内投与をおこなった。投与前に採血をおこない、この日を Day0 とし、これ以降、毎日投与した。投与後、Day2、Day4、Day7、Day10、Day14 にも注射をおこない、投与前に採血した。これらのサンプルの VLDL 量を測定し、タイムコースを確定した。

- (4) 各群 3羽の雄に、エストラジオールの用量を変えて 7日間、投与した。7日目に断頭で殺し、採血をおこない、開腹して精巣、肝臓重量を摘出し、重さを測定した。投与開始前にも採血をおこなった。用量は、0.064、0.32、1.6、8、40、200、1000 μ g/100gBW とした。

得られた Day0 と Day7 のサンプルから血中エストラジオール濃度と VLDL 量を測定した。

- (5) ウズラ (*Coturnix japonica*) を使って雄と雌の血中 VLDL 量の違い、用量反応性を調べた。

雄ウズラ各群 3羽に、エストラジオールと dienestrol (DES の誘導体) をそれぞれ投与した。投与法は胸筋への筋注で、用量はいずれも 1、10、100 μ g/個体とした。

対照群として雄 3羽にごま油のみを投与し、比較のために雌 1羽から採血した。

C. 研究結果

- 1) 鳥類を使った研究の必要性和研究グループの立ち上げ
ライプチヒ大学での会議の後、この分

野での研究の必要性を痛感し、鳥類内分泌学研究者に呼びかけ、研究グループを立ち上げることとした。神戸でおこなわれた第 2 回国際内分泌攪乱化学物質シンポジウムなどで、内外の研究者と話し合い、どのような研究グループをつくるかを議論した。2000 年 1 月に各研究単位の責任者が環境庁で最終的な話し合いをおこない、次のような組織を作った。

○総括責任者

和田 勝

○鳥類における内分泌攪乱物質の影響評価および指標に関する研究

和田 勝、服部 淳彦、園田 豊、岡崎 三代

○鳥類の性分化および生殖腺発達に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

島田清司、森 誠、齋藤 昇、赤染 康久

○鳥類の受精機能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

吉村幸則、前田照夫、仲田 正、古沢修一、藤田正範、小櫃剛人

○鳥類の発生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

小野珠乙、鏡味 裕、小林哲也、服部淳彦

○鳥類の中枢神経機能および行動に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

竹内浩昭、山内清志、松島俊也、大村百合、後藤麻木、筒井和義

○オブザーバー

井口泰泉、原 彰彦

今後この組織が十分な成果をあげられるような研究環境を整える必要がある。これらの研究グループが所期の成果をあげれば、OECD に十分対応でき、わが国の環境行政に資することになると考える。

2) 評価法確立のための予備実験

(1) ヒメウズラ血中 VLDL 量は、雄では低く雌では高かったという。特に産卵している雌では高く、産卵雌では低かった (図 1)。コレステロールを運ぶ高密度リポタンパク質は雌雄で血中濃度に差がないこともわかった。そこでこれ以降は、血中 VLDL 量にのみ注目することとした。

(2) そこで、冬季、屋外で飼育され生殖腺が完全に退化している雌雄のヒメウズラを実験室の 16L8D 下に移し、時間を追って採血した。その結果、雄では成熟して calling が始まったが、まったく血中 VLDL 量の変化が見られなかった。一方、雌では長日刺激によってエストラジオールが上昇して産卵が始まり、これに対応して、血中 VLDL 量が増加した (図 2、3)。

(3) 雄にエストラジオール 1mg/100 g BW を投与したところ、2 日目にすでに雌の血中濃度を越え、14 日には雌の血中濃度の 12 倍を超えた (図 4)。

体重もエスとロジェン投与によって増加し、Day0 の体重 (51.41 ± 1.14 g) から Day14 の体重 (60.20 ± 1.09 g) は有意な増加だった。

(4) エストラジオールの用量を変えて 7 日間投与したときの、体重増加率と肝臓重量を図 5 と図 6 に示した。各群 3 羽ずつなので、バラツキが大きいですが、 $8 \mu\text{g}/100\text{gBW}$ までの低い用量では増加が見られないが、この濃度以降では用量と反応の間に関係があるように見える。

Day0 と Day7 の血中エストラジオールの濃度を図 7 に示した。図 7 から明らかなように、投与前にはおよそ $0.5\text{ng}/\text{ml}$

だったエストラジオールの血中濃度は、高濃度用量群 ($8 \sim 1000 \mu\text{g}/100\text{gBW}$) では増加している。投与量と血中濃度の間には両対数表示で直線関係がある (図 8)。

これを反映して、血中 VLDL 濃度においても投与前の $0.5\text{mg}/\text{ml}$ の値が、7 日間のエストラジオールの投与で高濃度群では増加している (図 9)。投与量と VLDL 血中濃度の間には両対数表示で直線関係がある (図 10)。

(5) ウズラでも $1 \mu\text{g}/\text{個体}$ では血中 VLDL 量を増加させなかったが、10 および $100 \mu\text{g}/\text{個体}$ の投与で VLDL 濃度は増加した。また dinestrol (DES の誘導体) ではエストラジオールよりも効果は顕著ではなかったが増加が見られた (図 11)。

D. 考察

環境行政上、OECD への対応は必要であるためにはそれなりの研究の蓄積が必要であろう。これまで、鳥類における研究は哺乳類、魚類に比べて遅れていた。今回、この研究組織を動かして所期の成果をあげられれば、これまでの遅れを一挙に取り戻すことができると考える。実際に動き出せるよう、各方面のご支援をお願いする次第である。

文献調査をした結果、鳥類のビテログゲニンを測定した論文は見つからなかった。両生類のビテログゲニンを測定するラジオイムノアッセイ系が、ニワトリのビテログゲニンと交差をするという論文があったが、その抗体の所在は不明であった。そこで、ビテログゲニンの代わりに、VLDL を測定する事を考えた。VLDL は肝臓で作られた中性脂肪を卵黄に運搬するリポタンパク質であり、エストロゲンによってその血中量が支配されている。リポタンパク質の定量は、これ

まで煩雑であったが、東ソーのシステムを使うと、比較的簡単に多量の試料を測定することができる。このシステムでは VLDL 量は粒子の大きさで分けて中性脂肪量を測定して推定している。

この測定方法を用いてヒメウズラの雌雄の血中 VLDL 量を測定したところ、生理的状态とよく一致していた。また、長日条件にして脳下垂体-生殖腺系を刺激したところ、雌でのみ血中 VLDL 量が増加した。雄にエストラジオールを投与した場合には、本来ほとんどないはずの VLDL が著しく増加した。これらの結果は、この方法が感度のよいエストロゲン様物質の評価法として有望であることを示している。今後、この方法がビスフェノール A などの内分泌攪乱物質として疑われる物質を評価するために使えるかどうかを調べて行く必要がある。

今回の一連の実験ではヒメウズラを使った。これはこの鳥が体重 50 から 60 g でウズラの 100 g から 120 g に比べて小型であること、さらに自然条件下で繁殖期が長く、屋外のフライングケージで雌雄を同居させて自由に交配させ有性卵が長期にわたって得やすいこと、孵卵設備が小規模ですむこと、などの理由である。二世世代試験法を開発するときには適していると考えたが、OECD での議論や外国での実験などを考えると、ウズラが主な試験動物となっていくと思われる。

ウズラでも雄にエストラジオールを投与すると血中 VLDL 濃度は増加し、その反応性はヒメウズラと本質的な差はない。また、ウズラでは dienesol に反応して血中 VLDL が増加することが示されている。今後は、ヒメウズラをウズラに変えて、さらに評価法を検討し、内分泌攪乱化学物質の評価をおこなう方向でこの研究を進めたい。

E. 研究発表

この研究に関する研究発表は現在までのところない。

F. 参考文献

- 1) Barron, L. G., Walzem, R. L. and Hansen, R. J. Plasma lipoprotein changes in hen (*Gallus domesticus*) during an induced molt. *Comp. Biochem. Biophys. Part B.* **123**, 9-16 (1999).
- 2) Korach, K. S., Metzler, M. and McLachlan, J. A. Estrogenic activity in vivo and in vitro of some diethylstilbestrol metabolites and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1) : 468-471 (1978).
- 3) 岡崎三代。「リポ蛋白」 臨床検査 **40** (12) : 1281-1292. 1996).
- 4) Walzem, R. L. Lipoproteins and the laying hen: Form follows function. *Poultry Avian Biol. Rev.* **7**(1), 31-64 (1996).

Organization of a Japanese Research Group on Endocrine Disruption in Birds and a Preliminary Study on Testing of Estrogenic Substances by Measuring Circulating Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

Masaru Wada (College of Liberal Arts and Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Professor)

Keywords: Endocrine disruption in birds, Research group, VLDL, Assay method

Abstract:

After attending the Meeting of the Avian Reproduction Expert Group on OECD Test Guideline for Avian Reproduction Toxicity Testing held in Leipzig during May 23 through 24, 1999, the author took an attempt to organize a research group gathering Japanese avian endocrinologists to promote studies of endocrine disruption in birds to meet the demand of OECD EDTF guideline scheme decision. Fortunately, many researchers agreed to have such a research group after a meeting held in January, 2000 and 23 members were included in the group. We have made a proposal which waits for approval from authority.

Vitellogenin is established as a good endpoint to assess estrogenic substances in fish. However, in avian species, vitellogenin assay system has not established so far. To get a good testing method to assess estrogenic substance, we took notice of Very Low Density Lipoprotein (VLDL). VLDL is a carrier of neutral lipids from the liver to the ovary. In egg-laying hens, circulating VLDL increases. Amount of circulating VLDL is estimated by Tosoh Lipoprotein Assay System with relatively simple procedures. With this assay system we measured circulating VLDL in male and female Asia blue quails. The level of VLDL in females was very high compared with those in male; especially laying females had high values. Photostimulation induced increase in circulating VLDL only in female birds. Furthermore, injection of estradiol (1 mg/100g BW) into males induced tremendous increase in circulating VLDL. These results indicate that this assay method is valid to assess estrogenic substances in male birds. Further validation is required using actual endocrine disruptors.

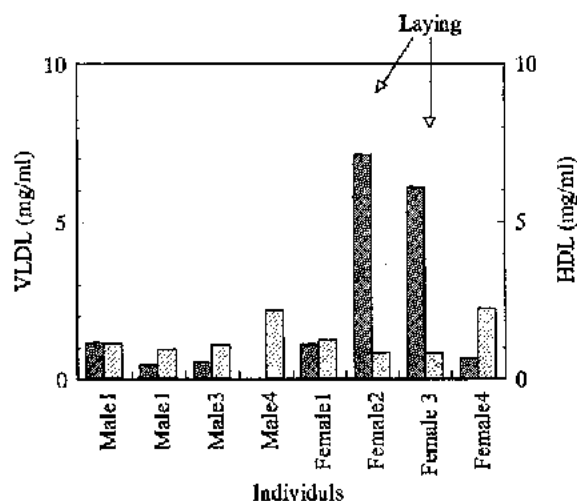


図1 成熟ヒメウスラ雄4個体と雌4個体の血中 VLDL 濃度。雌では個体番号2と3が産卵中で1と4は産卵していなかった。

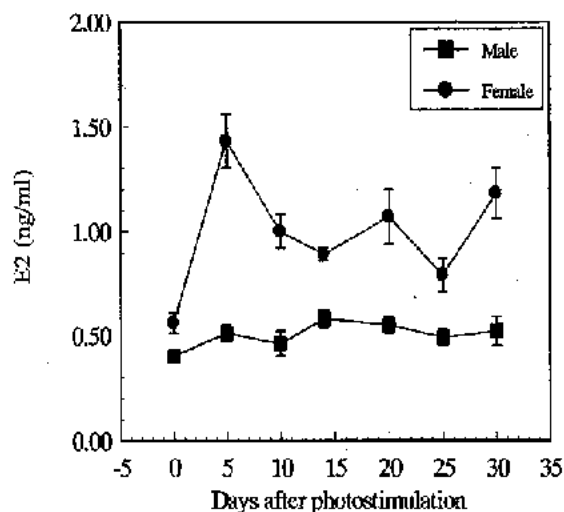


図2 成熟ヒメウスラ雄8個体と雌8個体を短日から長日に移した後の血中エストラジオール濃度の変動

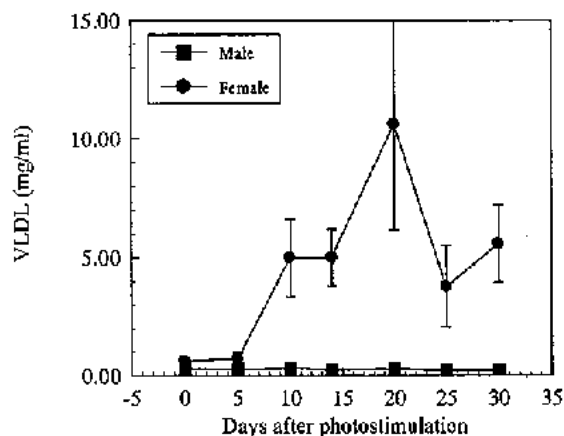


図3 成熟ヒメウスラ雄8個体と雌8個体を短日から長日に移した後の血中 VLDL 濃度の変動

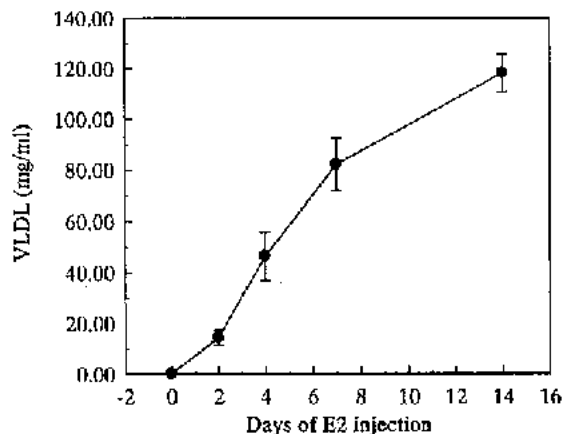


図4 成熟ヒメウスラ雄にエストラジオールを 1mg/100gBW 投与したときの血中 VLDL 濃度の増加 (n=8)。2 日目以降、Day0 に比べて有意の増加である。

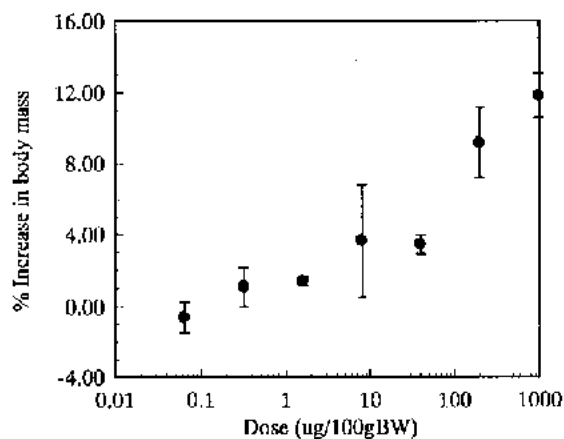


図5 投与したエストラジオールの用量に対する体重増加の割合

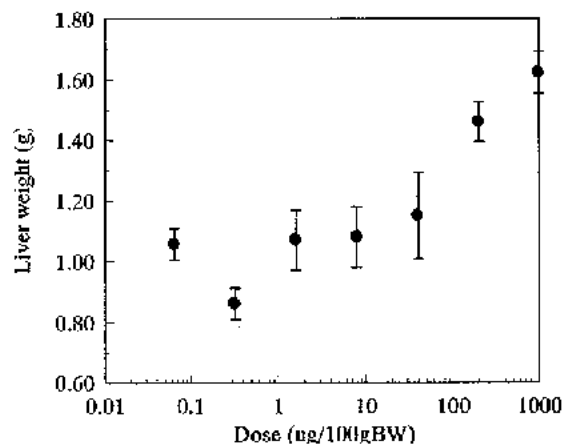


図6 投与したエストラジオールの用量に対する Day7 の肝臓重量

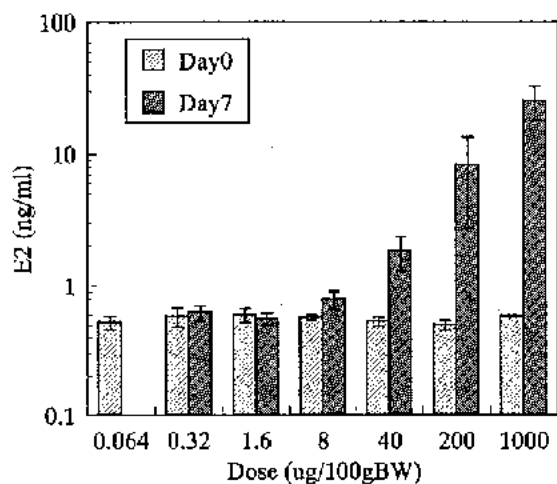


図 7 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中エストラジオール濃度の関係

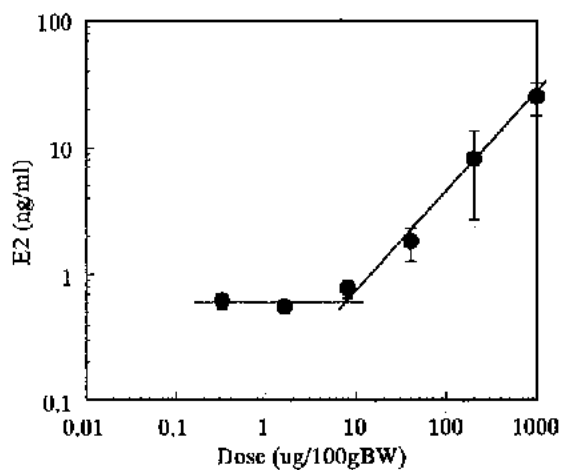


図 8 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中エストラジオール濃度の関係

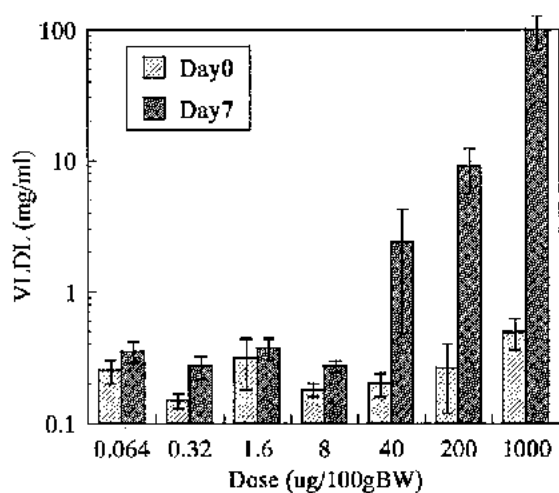


図 9 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中 VLDL 濃度の関係

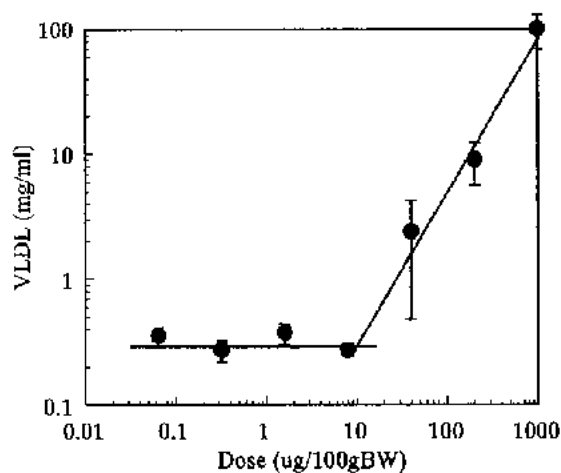


図 10 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中 VLDL 濃度の用量反応関係

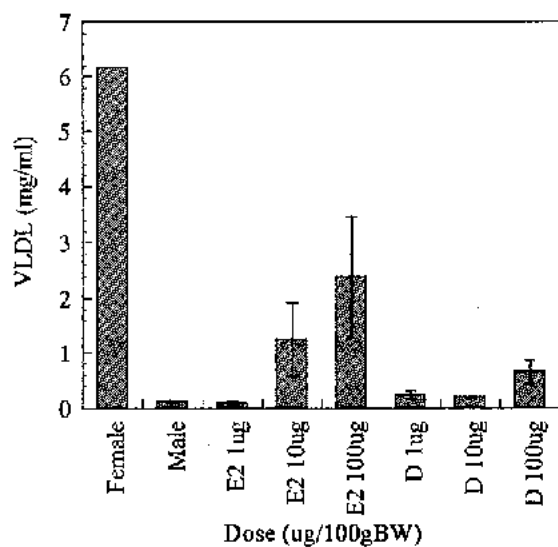


図 11 ウズラ雌雄の血中 VLDL 濃度、および雄にエストラジオールあるいは dienestrol (D) を投与したときの血中 VLDL 濃度

9. レポーター遺伝子を導入した細胞培養系の確立

研究者 加藤 茂明 (東京大学分子細胞生物学研究所 教授)

研究要旨

各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムを構築することを目的に、性ステロイドホルモンレセプター [ヒトエストロゲンレセプター α 、 β (hER α 、hER β) 及びヒトアンドロゲンレセプター (hAR)] の安定した発現細胞株を外来遺伝子導入によって樹立することを試みた。

研究者協力者

柳澤 純 (東京大学分子細胞生物学研究所 助手)
武山 健一 (東京大学分子細胞生物学研究所 助手)

【はじめに】

内分泌攪乱物質による環境汚染によって引き起こされるヒトを含めた生物への害は、様々な形で、研究調査されている。

1) は、ダイオキシンを始めとした内分泌攪乱物質と目される化合物群の汚染源を調べる調査である。これによって大気中、地中、そして生物体中の存在量が調べられている。しかし前にも述べたように、内分泌攪乱物質群の作用点は複数であること、また化学的測定法に限界があって類似の化合物群や代謝体などを同時に測定できない。従って、このような調査においては、あくまでも代表的な内分泌攪乱物質を指標とした汚染の“目安”を示すにすぎない。全く内分泌攪乱作用点の異なる化合物群についての測定は、場合によっては完全に欠落してしまう可能性が考えられる。

2) としては、性転換生物個体数の調査である。内分泌攪乱物質の影響によると考えられる性転換が、様々な生物で報告されている。しかし、性決定は決して1つの段階で成り立つものではなく、複数の複雑なステップを経ていて、内分泌攪乱物質作用点は複数と予想される。従ってこのような方法は 1) の陥る

全く同じ欠点であり、これも異なった種類の化合物が異なった作用点に作用し性転換を引き起こしている可能性が否めない。従って性転換生物個体数もあくまでも汚染の1つの“目安”に過ぎないように思う。

この報告者は決して 1)、2) の有用性を否定するものではない。このようなアプローチがあつてこそ、内分泌攪乱物質汚染の実態が浮き彫りにされ、世間にも強い関心と認識を喚起することができたことは言を待たない。しかし次の最も重要な布石は、1)、2) の結果をふまえた内分泌攪乱物質作用点の解明であろう。このような作用点を決める研究は、1)、2) とは全く異質な方法論の開発が必要であり、さしあたっては、分子生物学的手法に基づいた基礎研究の展開が大いに期待できる。

そこで我々は、性ステロイドホルモンの分子作用メカニズムに着目した。核内ステロイドホルモンレセプター群が挙げられる。核内ステロイドホルモンレセプターは核内レセプタースーパーファミリーに属し、核内に局在するリガンド誘導性転写制御因子である。従って、後に詳細に述べるように、核内レセプターはリガンドのもつシグナルを遺伝情報へと伝達する変換器として働く(図)。このファミリーに属するレセプターは、リガンド未知のオーファンレセプターを含めると、ヒトではおよそ100種近くも存在すると考えられている。内分泌攪乱物質が、直接性ステロイドホルモンレセプターのリガンドとして働き、

内因性の性ステロイドホルモン作用を攪乱する可能性は最もわかりやすく、説得力のある可能性である。しかし、性ステロイドホルモン作用に完全拮抗するような、いわゆる合成ホルモンアンタゴニストには、性転換能がないことが知られている。従って、性ステロイドホルモンレセプターに作用するとしても、性ステロイドホルモンに対して完全に拮抗するものではなく、性決定という限られた時期にレセプター機能を調節するような効果が想像される。そのような調節作用は、後に詳しく述べるように、レセプターそのものへの効果よりむしろレセプター機能に必要な転写共役因子の機能への影響が考えられる。

同様に、内分泌攪乱物質がこのファミリーに属するオーファンレセプターのリガンドとして作用する可能性を検証することは、最も興味深い対象の1つである。特に最近同定されたPXRはステロイドホルモン代謝体をリガンドとするため、内分泌攪乱物質との関係は目を離せない。

A. 研究目的

低分子量の脂溶性生理活性物質をリガンドとする核内ステロイドレセプター群（核内レセプタースーパーファミリー）は、最も内分泌攪乱物質の作用する標的分子としての可能性が高い。そこで、性ステロイドホルモンレセプターの安定した発現細胞株を外来遺伝子導入によって樹立する。この細胞株を用いることで、各種化合物の性ステロイドホルモン様活性を検索するシステムを構築することを目的とする。

同時にレセプターと相互作用する転写共役因子群の同定及び解析を行なう。核内レセプターに作用する転写共役因子はすべてが同定されたわけではなく、その一部のみが同定されている。これら核内レセプター転写共役因子は、薬物レセプターや性決定因子群の転写制御に対しても共通の転写共役因子として働く可能性が推察されているからである。

B. 研究方法

I. ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、ヒト男性ホルモンレセプター (hAR) 高発現細胞株を樹立する。更に、これらの株にレポーター遺伝子を導入することで、恒常的に発現するレポーター遺伝子-レセプターシステムを構築する。この細胞株は高感度に性ホルモンに応答するので、化合物のホルモン様活性をレセプターの転写促進能として検出できる。

実験手法は以下の通りである。

- 1) ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、及びヒト男性ホルモンレセプター (hAR) の転写促進能をエンハンサー応答配列を含むレポーター遺伝子を用いた transient expression assay により検討する。
- 2) ヒト女性ホルモンレセプター (hERα)、及びヒト男性ホルモンレセプター (hAR)、次に hERα, hAR cDNA を transfect させた後、薬剤耐性クローンを選択することで、これら cDNA が染色体 DNA に組み込まれた stable transformant を取得する。これらクローンのうち、レセプタータンパクを十分に発現し、リガンド応答能を有するものを選ぶ。
- 3) 2) で得られた有望クローンのいくつかに、同様の手法により、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) が染色体 DNA に組み込まれた 2 重の stable transformant を作成する。

II.

- 1) 核内性ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれら

の転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター (ER α 、ER β) をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子 (SRC-1/TIF2/AIB1、p300/CBP) と女性ホルモンレセプター (TRAP/DRIP220) の相互作用を中心に調べ p300/CBP はN末側転写促進能に関与することを明らかにした。

2) ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進する co-activator と転写を抑制する co-repressor の存在が知られている。しかしながらこれら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミン D レセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ER の N 末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合する P68 を細胞核抽出液より精製・クローニングした。P68 は cDNA クローニングの結果、RNA ヘリケースの 1 種であることが判明し、AR、MR、VDR への効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

C. 研究成果

I. hER α 、hER β AhAR の転写促進能について transient expression assay によって調べたところ、いずれも当該ホルモンによく応答した。このことから、本系で用いた cDNA から、本来の機能を有する hER α 、hER β AhAR タンパクが産生されることが確認できた。現在、hER α 、hER β AhAR cDNA を取り込んだ stable transformant が数クローン取得され、

更に、高発現するクローンを選択しているところである。

D. 考察

I. hER α 、hER β AhAR を高発現する細胞種が樹立できれば、同一クローン由来の細胞を用いることで、数多くの化学物質のホルモン活性を一度に評価することが可能である。一方、一般に核内レセプター高発現細胞においては、本来の細胞機能が損なわれるため、本課題の目的に合致する細胞系樹立は高度な技術と多くの労力を必要とすることがわかった。

II. 現在、同様の手法により P72RNA ヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急いでいる。以上のアプローチから、組織特異的なホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。

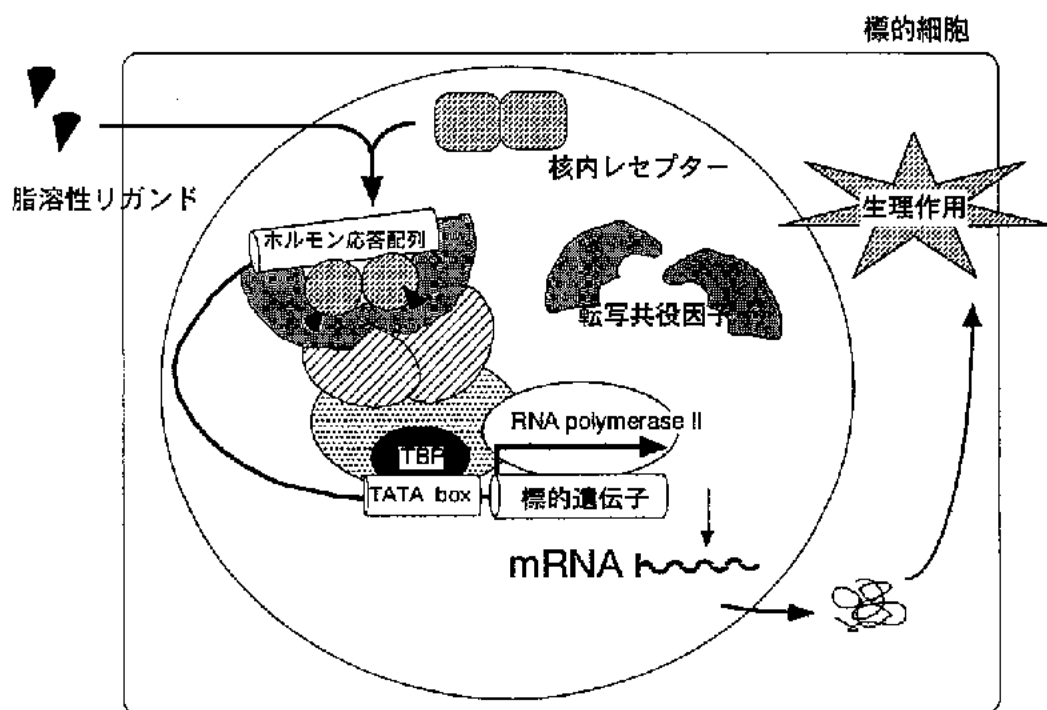
今後は同定した転写共役因子群が内分泌かく乱物質の標的分子か否かを検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000.
- 2) Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N., Yamada, G.: Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development*, **127**, 2471-2479, 2000.
- 3) Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor α and β by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651, 2000.

- 4) Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
- 5) Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 410-414, 2000.
- 6) Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen- dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 311-316, 2000.
- 7) Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1049-1055, 1999.
- 8) Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5363-5372, 1999.
- 9) Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, **283**, 1317-1321, 1999.
- 10) Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12971-12974, 1999.
- 11) Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 248-255, 1999.



10. 内分泌攪乱化学物質をはじめとする環境汚染物質の 野生動物に対する影響と環境評価

ーバイオマーカーを用いた新環境リスク評価システム確立に向けてー

研究者 藤田 正一（北海道大学大学院獣医学研究科・環境獣医科学講座・教授）

研究要旨

肝臓の異物代謝酵素 Cytochrome P450 をバイオマーカーとして、環境汚染の野生生物に対する影響を評価できる可能性を検討することとした。まず、先の我々の研究で、シベリアから飛来するオオワシがPCBやDDTに高度に汚染されていることが明らかになったことから、同じ海域で魚を食べているアザラシに同様の汚染を疑った。そこで、PCBによって誘導される Cytochrome P450 分子種 CYP1A1 について、その含量と活性の両面から検討したところ、それらには大きな個体差があり、アザラシの脂肪に蓄積したコプラナーPCBの濃度と正の相関があった。従って、肝臓の酵素 P450 は汚染の指標として有望なバイオマーカーとなり得る可能性が示された。ついで、アザラシおよびクジライルカ類の Cytochrome P450 のクローニングを行い、一次配列から導かれる系統樹と分類学上の系統樹の対応を考察した。海棲哺乳類間での類縁関係は顕著では無く、鯨類と鯨類はそれぞれが独立した群を構成し、鯨類は肉食獣であるイヌのそれと近縁の関係であることが示され、従来の系統樹と一致した。発現系で得られた Cytochrome P450 の活性を比較し、種差についても考察した。

研究者協力者

数坂 昭夫（北海道大学大学院獣医学研究科
助教授）
岩田 久人（北海道大学大学院獣医学研究科助手）
升田真木彦（元北海道大学大学院獣医学研究科
助教授）
千葉 一成（北海道大学大学院獣医学研究科大学
院生）

A. 研究目的

環境汚染の指標となるバイオマーカーの開発が急務とされている。我々は、異物が生物体内に侵入すると、生体防御反応として誘導されてくる肝臓の異物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) をバイオマーカーとして、環境汚染の野生生物に対する影響を評価できる可能性を検討することとした。今回は、調査対象の動物種として、アザラシ等の海棲哺乳動物を対象とすることとした。

海棲哺乳動物は、海洋生態系食物連鎖の最上位に位置し、生物濃縮による環境汚染物質

の体内蓄積が知られている。1970年代後半より発生した海棲哺乳類の生殖障害と大量死は、環境汚染物質が直接的あるいは間接的原因と考えられてきた(1-5)。PCB、DDT等の有機塩素系化合物が、原因物質として挙げられてきたが未知の汚染物質の寄与も無視出来ない。我が国近海の海洋環境を考える上で、海棲哺乳動物の汚染とその生体影響は重要な指標となることは間違い無い。現在の状況では、我が国近海では、海棲哺乳類の大量死等の目に見える影響はまだ報告されていないが、近海の海棲哺乳類にPCB等の汚染の報告や、イボニシのインボセックスの報告があることから、汚染の影響として、目に見える変化ではなくても、生体に何らかの変化が起きている可能性はある。汚染による生物への影響が不可逆的なものになってしまう以前に、汚染の生物に対する負荷を検知し、対応策を検討しなければならない。

実験動物においては、Cytochrome P450

(CYP)を含む異物代謝酵素が有機塩素化合物をはじめ、様々な汚染物質の曝露により誘導されることが知られている(6)。従って、海棲哺乳類の異物代謝酵素の変動は、未知の汚染物質を含めた複合的な海洋汚染物質への曝露を反映する可能性がある。また、それらの海棲動物種間の種差は、海洋汚染物質に対する感受性の違いをも反映していると考えられる。さらに、異物代謝酵素、特にCYPは、性ステロイド等生理活性物質の合成・代謝に関わる重要な酵素群であり、内分泌攪乱による影響を反映している可能性もある。

従来の海棲哺乳類における異物代謝酵素に関する報告例は断片的であり、体系的な研究はまだなされていない(7)。これまで、分子種の欠落あるいは低酵素活性といった海棲哺乳類に特異的であると思われる性質が示されてきたのみである。また、従来の研究はCYP酵素活性を中心とした蛋白レベルに留まるもので、遺伝子レベルにおける検討もなされてこなかった。

これらの事を考慮し、本研究では、海棲哺乳類がもつ異物代謝酵素の変動を複合的な海洋汚染のモニターのバイオマーカーとして用いることの有用性を検討した。また、環境汚染物質による内分泌攪乱の可能性について、異物代謝酵素によって代謝される生理活性物質の動態から注目した。さらに、海棲哺乳類CYP遺伝子のクローニングを行い、予想されるアミノ酸配列を用いた系統解析と *in vitro* 系での発現実験によるCYP蛋白の機能解析を行った。

B. 研究方法

1997年冬に北海道沿岸で駆除されたミンククジラ、イシイルカ、トド、ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシの成獣を試料として用いた。ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシから、酵素測定用の新鮮肝臓と血清を、また、化学分析用の皮下脂肪を入手した。一方、各種動物の肝臓から常法によりcDNA Libraryを得た。

皮下脂肪中の環境汚染物質濃度はGC/ECD

とGC/MSにより定量した。また、汚染物質のダイオキシン毒性換算等量(TEQ)は、van den Bergら(8)の毒性換算係数(TEF)を用いて算出した。CYP各分子種の活性はmethoxy-, ethoxy-, pentoxy-, bezylloxy-resorfinおよびtestosteroneを基質とする脱アルキル化酵素活性(MROD, EROD, PROD, BROD,)および水酸化酵素活性の測定から、また各分子種の含量はWestern blotting法(Anti-Rat CYP1A, 2B, 3A antiserumを使用)の測定から定量した。新規遺伝子の増幅は、Degenerate PCR法を用いた。予想されるアミノ酸配列を用いた系統解析、RACE法によるCYPのcDNA全長のクローニング、および発現CYP蛋白の機能解析等を行った。蛋白機能解析は、クローニングした各海棲哺乳類CYPをヒト胎児腎臓細胞293Tに過剰発現させ、その細胞から抽出したミクロソーム画分を用いてEROD代謝活性を測定することにより行った。

C. 研究結果、D. 考察

皮下脂肪に蓄積された環境汚染物質質量ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシとも、それらの皮下脂肪に代表的な環境汚染物質であるPCB、DDTのほか各種農薬が検出された(Fig. 1)。そしてDDT、PCB濃度は最高値で海洋表面濃度の各々10億倍、1億倍に濃縮されていた。しかし、それらの値でもアザラシの大量死があった北海、バイカル湖等汚染地域でのそれらよりは低かった。

(a) CYPをバイオマーカーとした環境汚染の評価

複合的な環境汚染の生体に対する影響の強度を評価するために、CYPをバイオマーカーとして使用することの適否を判断するためには、まず、CYPの濃度および活性が汚染物質の生体内あるいは環境中濃度と相関することを確認する必要がある。

実験動物では四つの主要なCYP familyからなる酵素分子種が環境汚染物等により誘導を受けることが明らかになっている。これらはしかし、高濃度で数日間の短期投与の実験

結果である。低濃度の化学物質による長期暴露の影響についての情報は少ない。はたして、海棲哺乳動物のアザラシで、誘導の現象が見られるであろうか。また、見られるとすれば、どの CYP 分子種が誘導されるのであろうか。

本研究では CYP1A1, 1A2, 2B1 および 3A2 の各分子酵素群について注目した。

Table 1 には、ゴマフアザラシおよびクラカケアザラシで得られたアルコキシマリン脱アルキル化 (AROD) およびテストステロン水酸化酵素活性の測定結果を示した。両アザラシとも、活性に大きなばらつきがあり、平均値を出すことに意味は無いと思われたので、活性の幅で示した。ゴマフアザラシでは特に CYP1A1 依存の EROD 活性が大きな個体間のばらつきを示した。これらの値を個体ごとに汚染物質の濃度と対応させて相関をとると、Table 2 and 3 に示すように有意な相関を示すものが認められた。

特にアルコキシマリン脱アルキル化活性と TEQ および、コプラナー PCB 濃度には有意な相関があり (Fig. 2)、蓄積された汚染物質が汚染濃度に対応する P450 の誘導を起こしていることが強く示唆された。

(b) アザラシ肝臓における CYP2B 分子種

Western blotting 法による CYP 蛋白の染色強度の比較から、アザラシ肝には他動物種と比較して非常に微量の CYP2B 分子種しか存在しないと云う興味ある事実が見出された。しかし、アザラシ肝ミクロソームにもラットなら CYP2B によって触媒されているはずの PROD 活性は検出される。ところが、アザラシ肝ミクロソームでは PROD 活性と CYP2B 含量には相関が無く、むしろ、PROD 活性と CYP1A1 の含量に有為な相関が認められた。アザラシ肝ミクロソームの酵素反応においては CYP1A 分子種が CYP2B 分子種様に作用することが考えられた。このことは、Anti-Rat CYP1A, 2B antisera を用いた阻害実験からも明らかになった (not shown)。

(c) CYP 遺伝子のクローニングと系統解析

CYP1A および CYP3A の P450 分子種についてクローニングを行い、cDNA フラグメントを得た。P450 命名委員会の定義に基づいて、各フラグメントについて得られた塩基配列と翻訳したアミノ酸配列をもとに、CYP3A フラグメントはそれぞれミンククジラ、イシイルカ、トド、ゴマフアザラシ、クラカケアザラシの順に、CYP3A32 から 3A36 と命名をうけた。また、CYP1A フラグメントは CYP1A1 もしくは CYP1A2 のいずれかに分類された。

アミノ酸配列をもとに作製した CYP3A サブファミリーの系統樹を分類学上の系統樹と比較すると、動物種の分類を反映したグルーピングによく一致することが分かった。ここで、ラット、マウス、ハムスターからなる齧歯類グループ、ヒトとサルの霊長類グループ、および独立したモルモットグループ等が見られる。さらに、新しく同サブファミリーに加わった鯨類 CYP はウシ、ヒツジおよびブタからなる偶蹄類とひとつのまとまりを形成していることがわかる。また、鰭脚類 CYP は、イヌからクローニングされた CYP3A12 と近縁の関係にあって食肉類グループを形成している。

一方、CYP1A サブファミリーについて作製した系統樹では、魚類グループ、鳥類グループ、さらに、哺乳類グループ等がクラスターを形成していることがわかる。哺乳類グループは、更に CYP1A1 および 1A2 に大別されている。海棲哺乳類では、鯨類と鰭脚類はそれぞれが独立した群を構成し、鰭脚類は肉食獣であるイヌのそれと近縁の関係であることが示されている。

また、RACE 法によってイシイルカおよびクラカケアザラシの CYP1A1 分子種の全長 cDNA クローニングを行ったところ、CYPcDNA の塩基配列から予想されるこれら二つのアミノ酸配列は 85.7% の相同性を示すことが明らかになった。

(d) 発現 CYP 蛋白の機能解析

各 CYP1A1 cDNA をヒト胎児腎臓細胞 293 T

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びかれた。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	
			PCB97	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.

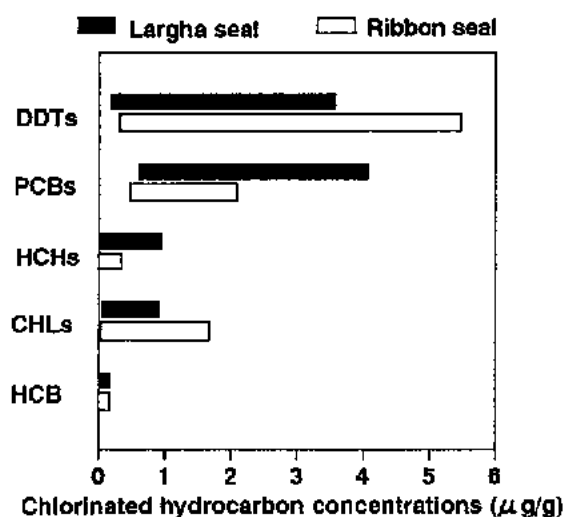


Fig. 1 Chlorinated hydrocarbon concentrations (lipid weight basis) in blubber of two seal species.

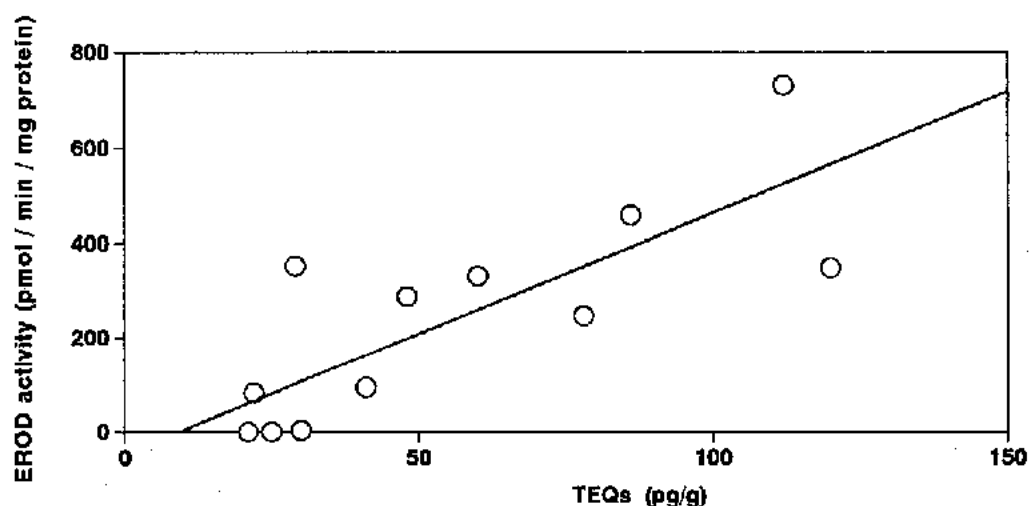


Fig. 2 Relationship between hepatic EROD activity and blubber TEQ (lipid weight basis). TEQs were calculated using polychlorinated biphenyl isomer concentrations and TEF values (van den Berg et al, 1998). Statistical analyses were examined by Spearman rank correlation.

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)

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

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。

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

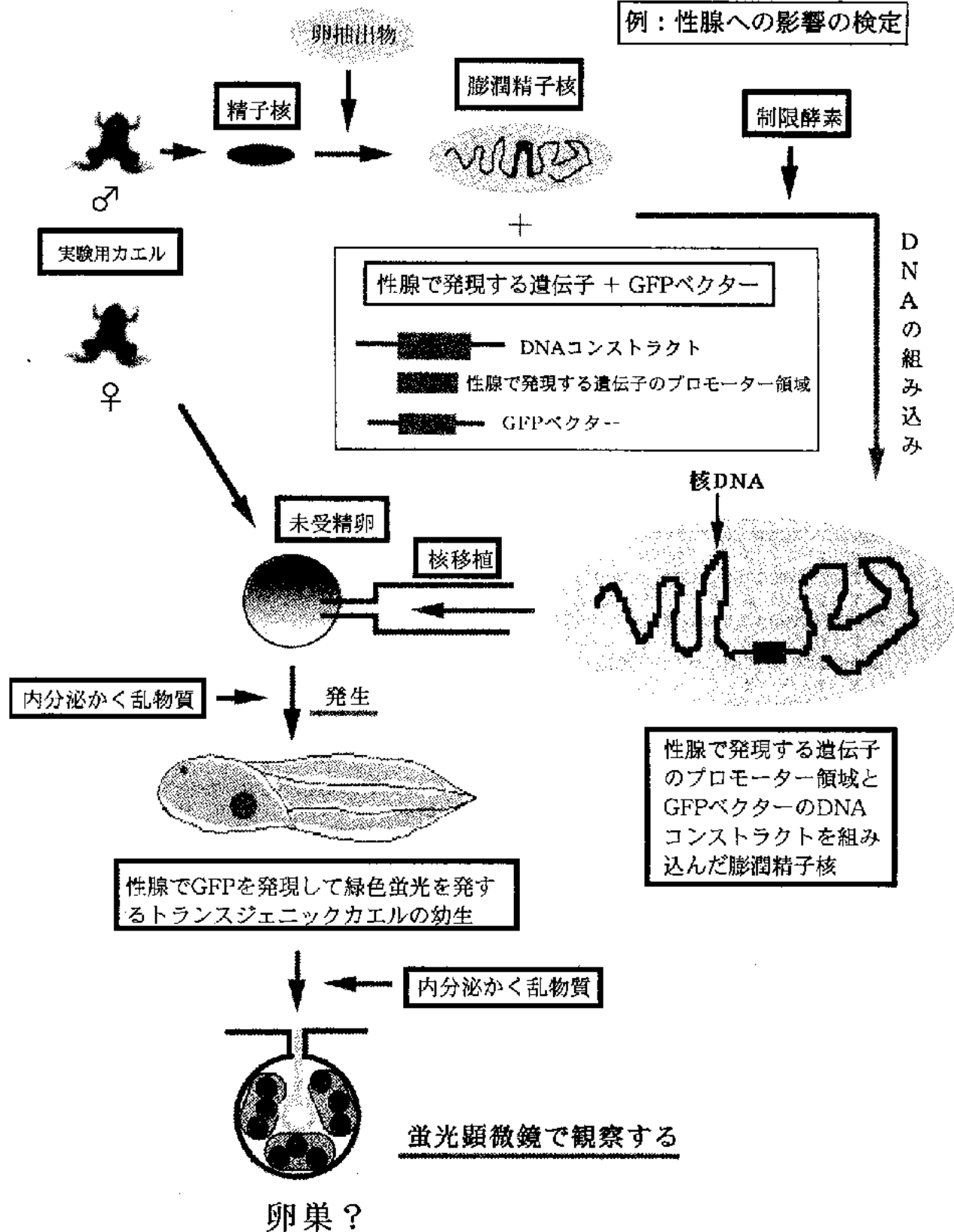


図1

AGAGCTCAGCCTGGCCGGCTGATCACACAGAGCTTGGGAGGGGAGCCAGGAGGTACGGGC	60
TGTCCATTCTTTCTTCTACACACTTGTGAGCCACACACACCTATATACTACTACTGAG	120
TACTTGTGTACAGGACAAGTCCAGCCCTCCCCCAACACCACAGGAGCCAATGCCCCCG	180
TCCACTGACACCACCTAAGCCCGGCGAGGCGGCACTTAGTCACTCACCTCTCCTGACATCCC	240
TGTCTCTGGGCGCCCCCTGTCCCGGCATGCTGCCCAAGGTGGAGTCCGAAGCTTTAGGAC	300
M L P K V E S E A L G L	(12)
TGTCCCGGTACACAGGGGAGCACGGACAGATGCCGACACATGCAAGTGTACAGTTTA	360
S R S H G E H G Q M P D N M Q V S Q F K	(32)
AAATGATGGGCTACTCCTATGATGATGACCTGGAGGAGATGTGTCCAGTCTGCGGGGACA	420
M M G Y S Y D D D L E E M C P V C G D K	(52)
AAGTATCTGGATATCATTATGGACTGCTGACCTGCGAGAGTTGCAAGGGCTTTTTTAAAC	480
V S G Y H Y G L L T C E S C K G F F K R	(72)
GCACAGTTTCAGAACAAATAAAGATATACTTGCATTGAAAAACCAGACCTGTCTCAGATTGATA	540
T V Q N N K R Y T C I E N Q T C Q I D K	(92)
AGACTCAGAGGAAGAGGTGTCTTATTGCGCTTCCAGAAGTGTCTCAGTGTGGGGATGA	600
T Q R K R C P Y C R F Q K C L S V G M K	(112)
AGTTAGAAGCTGTGAGAGCAGACCGGATGCGAGGAGGAAGAAACAAATTTGGGCCAATGT	660
L E A V R A D R M R G G R N K F G P M Y	(132)
ATAAAGGGGACCGAGCTCTTAACAACAGAAAAAGCTTTAATTCGAGCAAATGGACTCA	720
K R D R A L K Q Q K K A L I R A N G L K	(152)
AACTAGAAGCAATGAGTCAGGTTCATCCAAGCCATTCCCACCGATCTCACTATTTTCATCAG	780
L E A M S Q V I Q A I P T D L T I S S A	(172)
CTATCCAAAATATCCATTCTGCATCCAAGGCTCTACCTCTAAACCATACTGCCCTTCCCC	840
I Q N I H S A S K G L P L N H T A L P P	(192)
CAACAGACTATGACAGAAGCCCCCTTTGTAACCTCACCCATTAGCATGGCTATGCCACCTC	900
T D Y D R S P F V T S P I S M A M P P H	(212)
ATGGCAGCCTGCAGAGTTATCAAGCCTATGGTCACTTCCCAAGTCGAGCTATCAAATCGG	960
G S L Q S Y Q A Y G H F P S R A I K S E	(232)
AGTACCCGGATCCCTACACCAGTTCTCCAGAATCTCTCATGGGATACTCTTATATGGACA	1020
Y P D P Y T S S P E S L M G Y S Y M D S	(252)
GTTATCAGTCCAGTTCCCCCTCAAACATCCCGCACCTTATAGTGGAACCTTTGAAATGTG	1080
Y Q S S S P S N I P H L I V E L L K C E	(272)
AGCCAGATGAACCTCAAGTCCAAAGCAAGATGTCTATATTGCGAGCAGGAACAGGCCA	1140
P D E P Q V Q S K I M S Y L Q Q E Q A N	(292)
ACAGGAGCAAACATGATAAACTCAACACCTTTGGACTAATGTGCAAAATGGCCGACCAGA	1200
R S K H D K L N T F G L M C K M A D Q T	(312)
CATTGTTTTCCATTGTTGAATGGGCAAGGAGTAGCATATTCTTCAGAGAACTAAAGGTAG	1260
L F S I V E W A R S S I F F R E L K V D	(332)
ATGATCAAATGAAGCTTTTACAGAATTGTTGGAGTGAGCTACTAATTCTGGATCACATAT	1320
D Q M K L L Q N C W S E L L I L D H I F	(352)
TCCGACAAGTTCTACATGGGAAGGAAGGCTCAATACTTCTAGTTACGGGACAGCAGGTGG	1380
R Q V L H G K E G S I L L V T G Q Q V D	(372)
ATTTTTCTGTATCGTGTCTCAGGCTGGTACCACGCTAAACAACCTCATGAGCCATGCAC	1440
F S V I V S Q A G T T L N N L M S H A Q	(392)
AGGAATTGGTGGCCAAGCTACGATCGCTACAGTTTCGATATGAGAGAGTTTGTGTGTCTAA	1500
E L V A K L R S L Q F D M R E F V C L K	(412)
AATTCTTGGTGTCTCTCAGTCTGGACGTTAAGAAGTTGGAGAAGTTCCAGCTGGTAGAAG	1560
F L V L D V K N L E N F Q L V E G	(432)
GAGTTCAGGAACAAATAAACGCTGCTCTTCTGGACTACACCCTATGTTACTACCCCCAGC	1620
V Q E Q I N A A L L D Y T L C Y Y P Q Q	(452)
AAACAGACAAATTTGGGCGAGTTGTTACTACGGCTTCCAGAAATTCGGGCTATTAGTTTGC	1680
T D K F G Q L L L R L P E I R A I S L Q	(472)
AGGCAGAAGAAATATCTATATTACAAACATCTCAATGGTGATGTGCCATGTAACAATCTCC	1740
A E E Y L Y Y K H L N G D V P C N N L L	(492)
TAATCGAAATGCTTACGCAAAGAGGGCTGACCTTTTTTTTCTCGTCAGCGGAAGTGT	1800
I E M L H A *	(501)
GCACAGTCAAAGACTATTTAAGCTTAAAAACATTTGAAGTCCAAAACTATAATAATCAC	1860
AAAATTCTTAATAGTCAATTTGTGATGCATCAGGGTATTTGTATTTCAAAGTGTGAATGA	1920
CATTATAATGTCCACGAAGGATTCTACACAGGACATTCTGCCTGAATTCAGCATAGTC	1980
ACGTGGTCTGCTCTTGTGTATCCTGAAGTGGGCTCATCTCTATTGGGAAGAAGACTG	2040
GGATGCTCATTAAAACTCATTAAAGAGAACAGAAAATAATTCATCGTTGAAGAATCTTA	2100
ATTCCTTACAAAACCGTATGAGCTTCATCCAGAGCAATCTATGTTTGTCTCTGTGGCCT	2160
G	2161

図2 ツチガエル *FTZ-F1* 遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

GAATTCTCATCGCAATCGGAGCAACCTTGCACAGGACCCTTTTTCCTCGCAGCACCGGAAT	60
CGGATGGCATGGTGGTTTACACCATGCGGTCCGATTCCTGTGCGAGTTTGCAGTTCGCAG	120
TGCAATATGCAAACCTGATTTGGGGTGTCTTTAACTTTGTGCTGACACTCCCTGCAGTTCCG	180
CATATCGCAGTGTGAACTGCCGCAGGAAGACATGCCTGCACCACAGCAGTGTGAACCGGC	240
CCTAATAGAAGGTACTGTTTAATGTTAAAAATGCTAACTTGAATAGAACCTTGTACAGAG	300
.....	
ATGGTACATGGCAGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGGATG	2760
ATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGT	2860
CAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTAC	2880
ATGGCAGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGGATGATGGCAG	2940
GGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGG	3000
ATGAGGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCA	3060
GGGTCAGGGGATGATGGCAGGGATGGTACATGGCAGGGTCAGAGGAGAGTAATGTCAATTA	3120
GAAGTGGTGATTTCTGCTTGTGTCTACCAATCTACATAATGTGTAAAGAGAGAGCAGCAG	3180
CAATGTAAGTGCTGATCCTCCATCAGGACACCTCCACATACATGAGGATGGATGATATGA	3240
CCTGAAGAGGAGCGCTCCCCAGGCTCCCCCTGCTCTATACTGGCGATCTCCTCTCTGGA	3300
TGGACGGAGAGAAGCACCAACTTCACAGGAGACACAACAGAGCGAGGGAGGCGTGGCTAC	3360
AGAAGAGGCCTCCTGATTGGAGGAGACGCGGCGGAGGCGATCCAGCCCCCAGCGCTTGA	3420
CAGAGTGACAGAGATGAGAGGAGACAGAGCTCAGCCTGGCCGGCTGATCACACAGAGCTT	3480
GGGAGGGGAGCCAGGAGGTACGGGCTGTCCATTCCTTTCTTCTACACACTTGTACAGCCA	3540
CACACACCTATATACTACTACTGAGTACTTGTGTACAGGACAAGTCCAGCCCTCCCCCA	3600
ACACCACAGGAGCCAATGCCCCCGTCCACTGACACCACTAAGCCCGGCAGGCGGCACTT	3660
AGTCACTCACCTCTCCTGACATCCCTGTCTCTGGGCGCCCCCTGTCCCGGCATGCTGCC	3720
..... M L P	(3)
AAGGTGGAGTCCGAAGCTTTAGGACTGTCCCGGTCACACGGGGAGCACGGACAGATGCCG	3780
K V E S E A L G L S R S H G E H G O M P	(23)
GACAACATGCAAGGTAAGTGGCCCTCCGATCTCTGCACAGGGGCCCAACAATGCACAGG	3840
D N M Q V	(28)
GGCCCCAACTCTGCACAGGGACCCCAACTCTGCACAGAGGGCAGGCAGTCCCATCAGGAG	3900
CTGGGAACTCTGCTAATGTATCCGATCACTCAGGCTTTGTATGGGCTATAGGGAGAAAA	3960
.....	
TTCTATTCTAATTTAGTTGCGATTATTTGGCACACAAAGAATTTTAAATCTCAGATTTT	5760
CTTTCTATTTTCAATTTTTTGGTAAAATCATAAAAACAGATATTTTATTTTATTTGTTTGAAT	5820
TC	5822

図3 FTZ-F1 遺伝子転写調節領域の塩基配列
赤枠は第一エクソン青色文字は第一エクソン内のアミノ酸配列を示す。

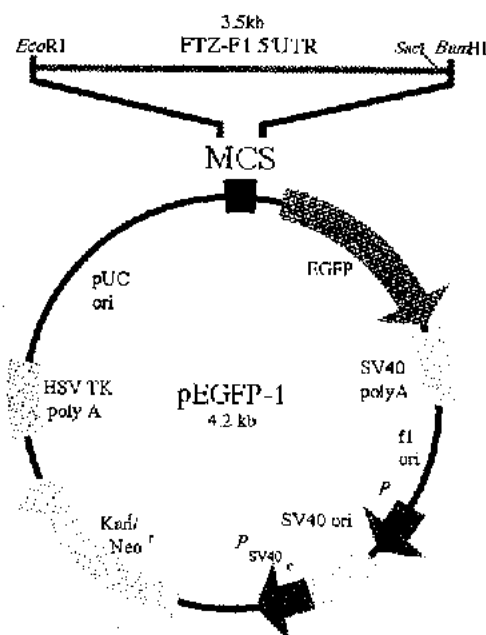


図4 トランスジェニック用 DNA コンストラクト

ンターネットを利用して全国からの情報が得られる体制を整えた。開設がカエルの冬眠している時期であったこと、また冬眠があげてからまだ日数があまり経っていないこと、更に奇形カエルの出現頻度が多くないことが予想されることもあって、寄せられた情報はまだ少ない。しかし、このホームページが全国に浸透すれば各地から貴重な情報が寄せられることが期待される。このホームページはアドレス (<http://www.ipc.hiroshima-u.ac.jp/~nakamra/>) にアクセスすれば見ることができる。画面を開くと、「カエルの情報室」のページが現れ、教えて頂ける方はここをクリック、全国のカエル紹介、リンク、をクリックすることによって、情報を提供するための記入欄、日本全国のカエルの種類と特徴及び写真、環境庁が出している関連情報のページが現れる。これらのページを印刷して添付した（資料参考）。今後は寄せられた情報を整理した後、公開する予定である。このホームページアドレスは共同通信社を経て日本経済新聞や広島 RCC 放送等のメディアで紹介された。

○インターネットで得られた情報例

(1) ヤマアカガエル（長野県飯田市在住、熊谷聖秀氏）（図 1）

採集年月日：1999 年 6 月

採集場所：長野県売木小中学校のプール

異常部：背の屈曲

※奇形オタマジャクシの発生要因としてプールの塗料が考えられるので現在、水質検査中である。この奇形カエルについては平成 11 年度長野県総合教育センター自主研修報告書に記載されている（参考資料 2）。

(2) アフリカツメガエル（長野県飯田市在住、熊谷聖秀氏）（図 2-1、図 2-2）

採集年月日：1999 年 6 月

採集場所：長野県塩尻市総合教育センタ

—

異常部：後多肢

※教育センター内のプラスチック容器で飼育。水質検査の必要がある。

(B) 分布実態調査

少数の研究員でカエルの動態に関する実態調査を多くの地区で行うことは困難である。そこで、地区を限定して実態調査を行い、それを基礎データにして、将来、多くの地区の実態調査を行う目的で下記の地域の実態調査を行った。

(1) 地域：北陸地方、新潟県・佐渡島及び新潟市（ツチガエル）

新潟県佐渡島に生息するカエルは、これまで数種が記載されており、その一つにツチガエルが含まれる。1996 年、新潟大学の関谷國男氏は、この島でツチガエルの生息を確認したが、年々その数が減る傾向にあり、対岸の新潟市に生息する個体とは、形態や鳴き声はかなり異なることから、佐渡島のツチガエルは独自に分化を遂げたのではないかと考えていた。そこで、同氏の協力を得て佐渡島におけるツチガエルの生息状況を調査するとともに、遺伝学的解析を行った。

① 生息状況

1999 年 8 月に 3 地点でツチガエルの生息を確認した（図 1 a）。島は中央部が平地であるが、西端と東端は山地になっている。3 地点のうち 2 地点は中央部平地の秋津と古岡で、もう 1 地点は西岸の達者である。3 年前、秋津では水田地帯に多数のツチガエルが観察されたが（図 1 b）、今回の調査では田圃には確認できず、水田近くの洗い場と思われる水たまりに数個体を確認したにすぎなかった（図 1 c）。鳴き声は明らかに本土のものとは異なったが、詳細な分析は未だ行っていない。

② 形態

佐渡島と新潟市のツチガエルで形態学的に大きく異なる点は、腹部の色彩と吻の形であった。新潟市の場合、腹は白色が普通であるが、地域によっては薄黄色である（図 1 f）。

カエルの情報室

elcome!

「内分泌攪乱化学物質等の調査」研究班
代表：中村正久（早稲田大学教育学部）

nakamura@ma.waseda.ac.jp

奇形カエルについての情報を集めています



過剰肢カエル

近年、森林の伐採や気候の変動などによる著しい自然環境の変化が生物に悪い影響を及ぼし、その結果、数多くの貴重な動物が絶滅するのではないかと心配されています。カエルも例外ではなく、世界各地でいくつもの種が絶滅したり様々な奇形が発生しています。オーストラリアやチリでは調査した種類の約3割が絶滅の危機にあり、北アメリカやカナダでは多くの奇形カエルが発見されています。北アメリカにおける奇形カエルの発生状況は次のアドレスにアクセスすると知ることが

できます <http://www.npwrc.usgs.gov/news/>。日本でも前肢過剰の奇形カエルが北九州市で発見され、新聞やテレビで報道されました。しかし、奇形カエルの発生が報告される場合は限られており、実際の発生頻度はもっと高いと考えられます。カエルの種や生息地の急減、及び奇形の発生は、人間による自然破壊だけでなく、オゾン層の破壊による紫外線の増加、酸性雨、病気、寄生虫なども要因として挙げられており、これらの要因が複合的に作用している可能性があります。

カエルは水陸両方の生活史を持つため、環境汚染に敏感に反応することから、最適な環境汚染指標動物と考えられています。この動物は食物連鎖の重要な位置を占めていて、世界的に生息数が減少したり奇形が多発することが必然的に生態系全体に大きな影響を与えることが予想されます。カエルに代表される種の絶滅の危機は自然環境の破壊や環境汚染物質が人間に悪い影響を及ぼしている危険信号に思われ、この問題を早期に解決する必要があります。このような状況にあって、国内各地のカエルの絶滅に関する組織的な実地調査や情報の収集はほとんど行われていないのが現状です。

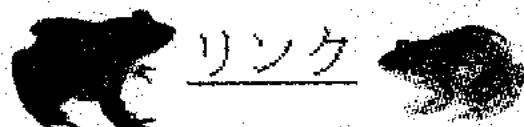
環境庁「内分泌攪乱化学物質等の調査」研究班は、インターネットを通じて国内における奇形カエルに関する情報を集め、環境汚染との因果関係を明らかにすることによって野生種の絶滅や生息数の減少を防止したいと考えております。研究員によって集められる情報だけでは不十分です。皆さんが情報を提供して下さい、広い範囲の情報が集まることになり、より確実な実態が把握できます。そうすることによって近い将来、絶滅や生息数の減少がどのようにして起きるのか、その原因を説明することができると思われます。自然に親しむという意味をも込めて、ぜひ周りの生物に目を向けてみて下さい。そして変わったカエルを見つけたらそのカエルについての情報を送って下さい。皆様の協力が感謝いたします。

教えて頂ける方はここをクリック

全国のカエル紹介

教えて頂ける方はここをクリック

全国のカエル紹介



2000.1.20作成

「内分泌攪乱化学物質等の調査」研究班
代表：中村正久（早稲田大学教育学部）

nakamura@ma.waseda.ac.jp



Copyright(c) M. Nakamura. All rights reserved.

日本のカエル

日本には次の種類のカエルが生息しています。

これらのカエルは次のような特徴があります。

アオガエル科	
アイワインガーカエル	体長3cm前後 石垣島・西表島に分布
アマミオガエル	体長5～7.5cm 奄美大島・徳之島に分布
オキナワアオガエル	体長4～8cm 沖縄島に分布
カジカガエル	体長4～7cm 本州・四国・九州に分布 特に山口県美川町錦川と岡山県瀬原町旭川が有名
シロアゴガエル	体長6～7cm 沖縄島に分布 中国南部・台湾・東南アジアが原産
シクレーダルフアガエル	体長♂3.5～4cm ♀5～6cm 本州・四国・九州に分布
リュウキュウカジカガエル （ニホンカジカガエル）	体長♂2.5～3cm ♀3～3.5cm 口之島以南のトカラ列島・沖縄諸島・先島諸島・台湾に分布
モリアオガエル	体長♂5～7cm ♀6～9cm 本州・佐渡島に分布
ヤエヤマアオガエル	体長♂4～5cm ♀5～6cm 石垣島・西表島に分布

チカガエル科（アマガエルの仲間）	
エゾアカガエル	体長4～5.5cm 北海道及び周辺の島々に分布
テヨウセンヤクアマガエル	体長5～7cm 対馬にのみ分布
ツシマアマガエル	体長♂3～5cm ♀4～5cm 対馬の固有種
ニホンアマガエル	体長♂4～5cm ♀5～7cm 本州・四国・九州・伊豆七島・隠岐・室戸・大隅諸島に分布
ヤブアマガエル	体長♂6cm以下 ♀約6cm 本州・四国・九州・佐渡島・大隅諸島に分布
リュウキュウアマガエル	体長3.5～4.5cm 奄美大島・徳之島・沖縄島に分布

アカガエル科 (タゴガエルの仲間)	
オキタゴガエル	体長約5cm 隠岐諸島に分布
タゴガエル	体長♂3.5~4.5cm ♀4.5~5cm 本州・四国・九州に分布 日本本土の固有種
ヤクシマタゴガエル	体長♂4~4.8cm ♀4.4~5.4cm 屋久島に分布

アカガエル科 (トノサマガエルの仲間)	
ウシガエル	体長10~20cm 北海道・本州・四国・九州・徳之島・沖縄島・石垣島などに分布 原産地はアメリカ東部・南部
ダルマガエル	体長5~6cm 本州の山陽地方・近畿地方の中南部・東海地方及び香川県の瀬戸内側に分布
シデガエル	体長♂3.5~4cm ♀約3cm 本州・四国・九州・佐渡島・隠岐・嵯峨・屋久島・種子島に分布
トウキョウドルマガエル	体長♂5~7cm ♀5~7cm 関東地方・仙台平野・新潟県の中南部・長野県の北中部に分布
トノサマガエル	体長5~8cm 本州(関東平野・仙台平野・新潟県の中南部を除く)・四国・九州・大隅諸島に分布
ヌマガエル	体長3.5~6.8cm 東海地方以西の本州・四国・九州・南西諸島に分布

アカガエル科 (奄美・沖縄諸島のアカガエル)	
イシカワガエル	体長10~13cm 奄美大島・徳之島・沖縄島(本部半島北部)に分布
オットンガエル	体長10~14cm 奄美大島・徳之島(?)の固有種
ナミエガエル	体長10~12cm 沖縄島の固有種 名護市辺以北の本部半島から国頭山地に分布
ハナサキガエル	体長7~8cm 奄美大島・徳之島・沖縄島・石垣島・西表島に分布
ホルストガエル	体長10~13cm 沖縄島の固有種。本部半島から北の山地帯に分布
ハラブチガエル	体長3.5~5cm 石垣島・西表島に分布

アマガエル科	
ニホンアマガエル	体長3~4cm 北海道・本州・四国・九州・対馬・屋久島などに分布
クロウエルアマガエル	体長2.5~3.5cm 奄美大島・徳之島・宮界島・与論島・沖縄島・西表島に分布

ジムグリガエル科	
ヒメアマガエル	体長2.5~3cm 奄美大島以南の奄美・沖縄諸島に分布

アマガエル科	
アズマヒキガエル	体長5~15cm 本州(山陰・近畿地方以東)・北海道函館付近に分布
オオヒキガエル	体長15~25cm 小笠原諸島・南・北大東島に分布
ナガレヒキガエル	体長8~13cm 本州(石川・岐阜・福井・滋賀・京都・奈良・三重・和歌山)な山地に分布
ニホンヒキガエル	体長7~15cm 本州(鈴鹿山脈以西)・四国・九州・嵯峨・五島列島・屋久島・種子島に分布
ミヤコヒキガエル	体長7~10cm 先島諸島の宮古島に隣接する伊良部島・下地島に分布

詳細は次の本を参考にして下さい。

環境庁編	「日本の重要な両生類・爬虫類の分布」大蔵省印刷局
千石正一監修	「爬虫類・両生類800種図鑑」ピーシーズ
種村ひろし	「カエル」講談社
松井冬爾	「日本の両生類・爬虫類」小学館
松井正文、前田憲男	「日本カエル図鑑」分一総合出版

トップへ戻る

アイフィンガーガエル



photo by Chigira

カエルリストへ戻る



図1 尾部が屈曲したヤマアカガエル (矢印)



図 2-1 後多肢のアフリカツメガエル (矢印)



図 2-2 後肢が屈曲したアフリカツメガエル (矢印)

参考資料 2

平成 11 年度 長野県総合教育センター自主研修報告書

両生類と環境

売木中学校 熊谷 聖秀
担当専門主事 小池 良彦

1 はじめに

昨年度、売木中学校の 3 年生とともに、田んぼや池など野外に生息しているオタマジャクシの異常（奇形や腫瘍等）の出現率について調べた結果、異常出現率の最も高かったのは、売木小中学校のプールであった（17.1 %）。

そこで、今年度は、同じく売木中学校の 3 年生とともに、プールの水でオタマジャクシを飼育し、池の水で飼育したものと比較するなどして、奇形等の原因を探ってみた。

2 研究の方法

(1) オタマジャクシの飼育は、前年より溜まり水となっているプールの水を用いて、卵から前肢の出る頃まで飼育し、調査時点における生存数に対する生存している異常オタマジャクシの割合を調べた。池の水や水替えの有無でも比較を行った。

(2) プールの水の水質検査は、比色法で水素イオン濃度（PH）を、バックテストで化学的酸素消費量（COD）・りん酸イオン濃度（ PO_4^{3-} ）・アンモニウムイオン濃度（ NH_4^+ ）・硝酸イオン濃度（ NO_3^- ）を調べた。また、長野県総合教育センターの産業技術研修講座「自然環境の計測技術」において、イオンクロマトグラフィによる陰イオン全般の分析もしていただいた。

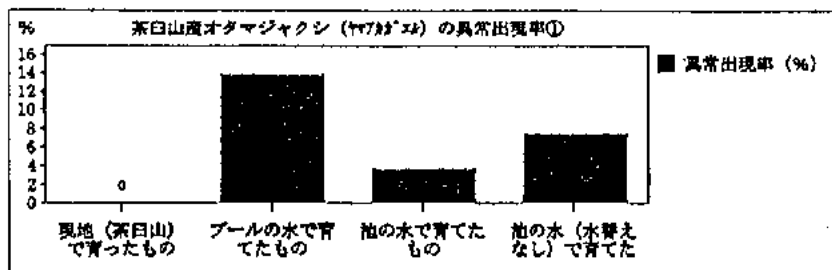
3 研究の結果と考察

(1) アズマヒキガエルのオタマジャクシの飼育実験

学校近くの水たまりから採取したアズマヒキガエルの卵を 300 個ずつプールの水と池の水で飼育した結果、プールの水は、お腹に空気がたまる症状で死んでいくものが目立ち、前肢が出るころまでの生存数（206 匹）は、池の水（223 匹）より少なくなった。異常出現率では顕著な差は生じなかった。

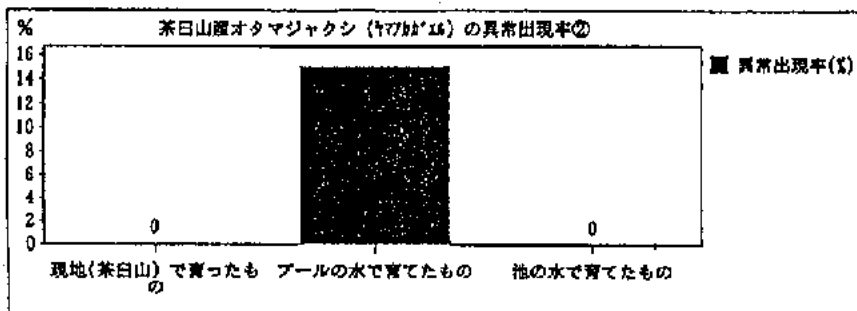
(2) ヤマアカガエルのオタマジャクシの飼育実験①

茶臼山高原に産卵されたヤマアカガエルの卵（各 160 個）を飼育した場合、プールの水の死亡数（75 匹）は、池の水（81 匹）よりやや少ない結果が出たが、背曲がりの異常出現率（14.1 %）は、池の水（3.8 %）よりも高い割合を示した。



(3) ヤマアカガエルのオタマジャクシの飼育実験②

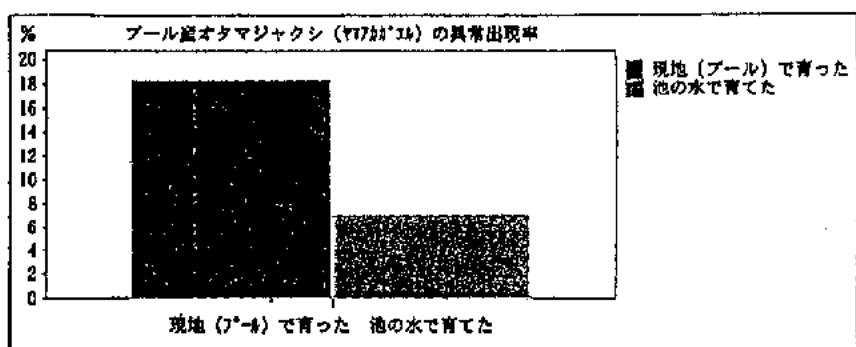
茶臼山高原から採取したヤマアカガエルの 2 例めの飼育では、プールの水は死亡数（37 匹）でも異常出現率（15.1 %）でも池の水よりも明らかに高い割合を示した（池の水は 18 匹と 0 %）。



(4) ヤマアカガエルのオタマジャクシの飼育実験③

プールに産卵されたヤマアカガエルの卵 261 個を理科室で飼育した結果、異常出現率は 6.9 % で、プールでそのまま生育したヤマアカガエルのオタマジャクシの異常出現率 18.3 % より低い数値が出た。このようにプールの水のなかには、オタマジャクシに奇形を生じさせる何かがあるようである。

参考資料 2



(5) プールの水の水質検査結果

プールの水の水質検査結果では、特に異常は認められなかった。当初、塩素の影響を疑ってみたが、分析結果では通常の河川よりも低い濃度であった。

NO.	検査対象	PH	COD	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
1	プールの水	6.2	10	0.2	2	0.3
2	池の水	6.6	5	0.3	4	0.5

バックテストによる水質検査結果 (1999.6.9)

101		CL		Cano. Level: 1		Calc. Method: (CEni. Std.)		Part: 00000		PB: 1.00000							
BR				NO.		NAME		RT		AREA		MARK		CONC		HEIGHT	
NO2				1		PO4		1.813		28654		V		0.1331		1975	
				2		F		1.301		14513		V		0.0186		160	
SO4				3		CL		0.689		15541500		V		11.9574		1173439	
				4		NO2											
				5		BR		5.357		81767				0.1398		6173	
				6		NO3		1.182		881320				1.5159		52616	
				7		SO4		1.074		184474				0.0117		14518	
				TOTAL						17167831				17.9787		1310237	

プールの水の陰イオン検査データ (1999.10.22)

(6) 原因の推定

プールの中の水の中にオタマジャクシに奇形を起させる何か有害な物が含まれていると言えそうである。それが塩素でないならプールに使用してある塗装剤や接着剤ではないだろうか。プールを使用しない9か月間にどれだけのものが溶けだしているのかいないのか、技術的にも予算的にも限界を感じる。

水替えを行わない水槽の異常出現率が毎週水替えを行った水槽の2倍ほどの値が出たことから停滞水ゆえに自分たちの糞尿による水質汚濁が直接影響するのか、あるいは水質汚濁に関係して細菌類や寄生生物の繁殖が関与しているのかもしれない。

アメリカ西海岸で多発しているカエルの奇形の真犯人は、異種生物の感染や寄生に求められている (石川, 1999)。また、北アメリカのカエル減少の原因の一つにオゾン層の破壊による紫外線の増加があげられ、実験的にも確かめられている (小田・桜井, 1996) とのことから、木陰のないプールのように、太陽光線にもさらされる所では、産卵初期の胚が発生する段階で紫外線の悪影響もあるのかもしれない。

長野県総合教育センター生物科のアフリカツメガエルにも、後肢を余分に持つものや前肢が機能しないものが見つかったが、餌を含めて複合的要因によるものだろうと推定している。

4 おわりに

本年度の飼育実験により、プールの水が益々怪しいことはわかってきたが、それはいったい何であるのかはわからない。昨年度までは、塗装剤や接着剤に含まれているであろう有害物質以外には考えられないと思っていたが、今年度新たに異種生物の感染や寄生が浮上してきており、プールの水を煮沸して飼育実験に用いたり、プールにおいて奇形誘発の容疑者であるところの生物を発見することなどが今後の課題として考えられる。また、紫外線の影響についても調べてみたいと思っている。

5 参考文献

- (1) 石川 統 (1999) : カエルはなぜ減るのか, 遺伝, 1999年9月号, 57 ~ 60
- (2) 小田 英智・桜井 淳史 (1996) : カエル観察事典, 偕成社
- (3) 東亜電波工業株式会社 (1999) : イオンクロマトグラフ応用データ集

しかし、佐渡島のツチガエルは下腹部から脚の腿まで鮮やかな黄橙色を呈している（図 1 g）。吻は、佐渡島のツチガエルの方が鋭角である（図 1 d、1 e）。佐渡島のツチガエルのこれら 2 つの特徴は、朝鮮半島のツチガエルにも見られる。

③ 性連鎖遺伝子 ADP/ATP ロカーゼによる性決定様式の推定

ツチガエルでは、性染色体上にある遺伝子 ADP/ATP ロカーゼ（AAT）を制限酵素で切断すると国内の 4 つの地方種族と韓国の 1 つの地方種族の AAT の切断パターンが異なることから性決定様式、雄ヘテロ型、或いは雌ヘテロ型かが推定できる。佐渡島のツチガエルの AAT の制限酵素による切断パターンは新潟市のものと異なり、性染色体が形態的に区別できない雄ヘテロ型（XX/XY）の性決定機構を持つ関東・韓国グループと同じであることが分かった（図 2）。

④ ミトコンドリアの遺伝子配列

佐渡島のツチガエルは性連鎖遺伝子 ADP/ATP ロカーゼの制限酵素切断パターンによって関東・韓国グループと同じであることが分かった。更に、佐渡島のツチガエルが進化的に関東、或いは韓国地方種族のどちらに由来するかをミトコンドリアの 12S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列から推定した。この遺伝子の 407 塩基配列を比較したところ、佐渡島のツチガエルは関東のグループと最も相同性が高く（図 3）、新潟市のツチガエルは韓国のもので高い相同性を示した（表 1）。このことから佐渡島のツチガエルは関東の集団と近縁であることが分かった。

⑤ 考察と今後の展望

今回の調査で、佐渡島におけるツチガエルの繁殖が確認できた。しかし、生息状況や環境変化については、継続調査が必要である。また、遺伝学的解析によって、佐渡島のツチガエルは対岸の新潟市のツチガエルと異なり、関東の集団と近縁であることが分かった。こ

れは予想もしない驚くべき結果であった。これまでの日本と韓国集団の調査結果から、日本に生息するツチガエルは進化的に関東種族が最も古いと考えられていた。しかし、今回の調査は佐渡島のツチガエルは初期に日本で繁殖した子孫であり、朝鮮半島から進入し日本海側で繁殖した新潟種族と交わらず、当時の形態を維持したまま現在まで生息してきたことを示した。佐渡島には、鳥類（朱鷺）のみならず、両生類（ツチガエル）でも日本古来の種族が生息していたことになる。内分泌学的には、関東種族は性ホルモンの投与によって雌から雄への性転換を容易に引き起こすことができるが、新潟集団は性ホルモンに対する性転換に極めて強い抵抗性を示す。このことは、関東種族に近縁な佐渡島のツチガエルが環境の変化、特に性ホルモン様活性物質によって性が転換する可能性が高く、集団個体数が小さいため性比がくずれ、それが個体数の減少要因になっている可能性がある。今回、性ホルモンや内分泌攪乱物質に対する感受性については調査を行うことができなかったが、今後、さらに佐渡種族の内分泌学的及び生態学的調査を行う必要がある。

(2) 地域：四国地方、高知県・高知市

対象：ヌマガエル

平成 11 年 6 月 24 日、高知県香美郡土佐山田町で真っ白なヌマガエルのオタマジャクシ及び変態直後の子ガエルが発見され、地元の高知新聞に報道された。そこで、現地調査や個体採集を行い、持ち帰った個体については成長に伴う皮膚色の変化と色素細胞の観察を行った。

① 発見場所

白色オタマジャクシが発見された場所は水田地帯で一枚の田圃に限られていた。地主がそれまでに使用した薬剤は除草剤だけであったが散布は広範囲に及んでいた。当地で、22 匹の子ガエルと 14 匹のオタマジャクシを捕獲し飼育した。

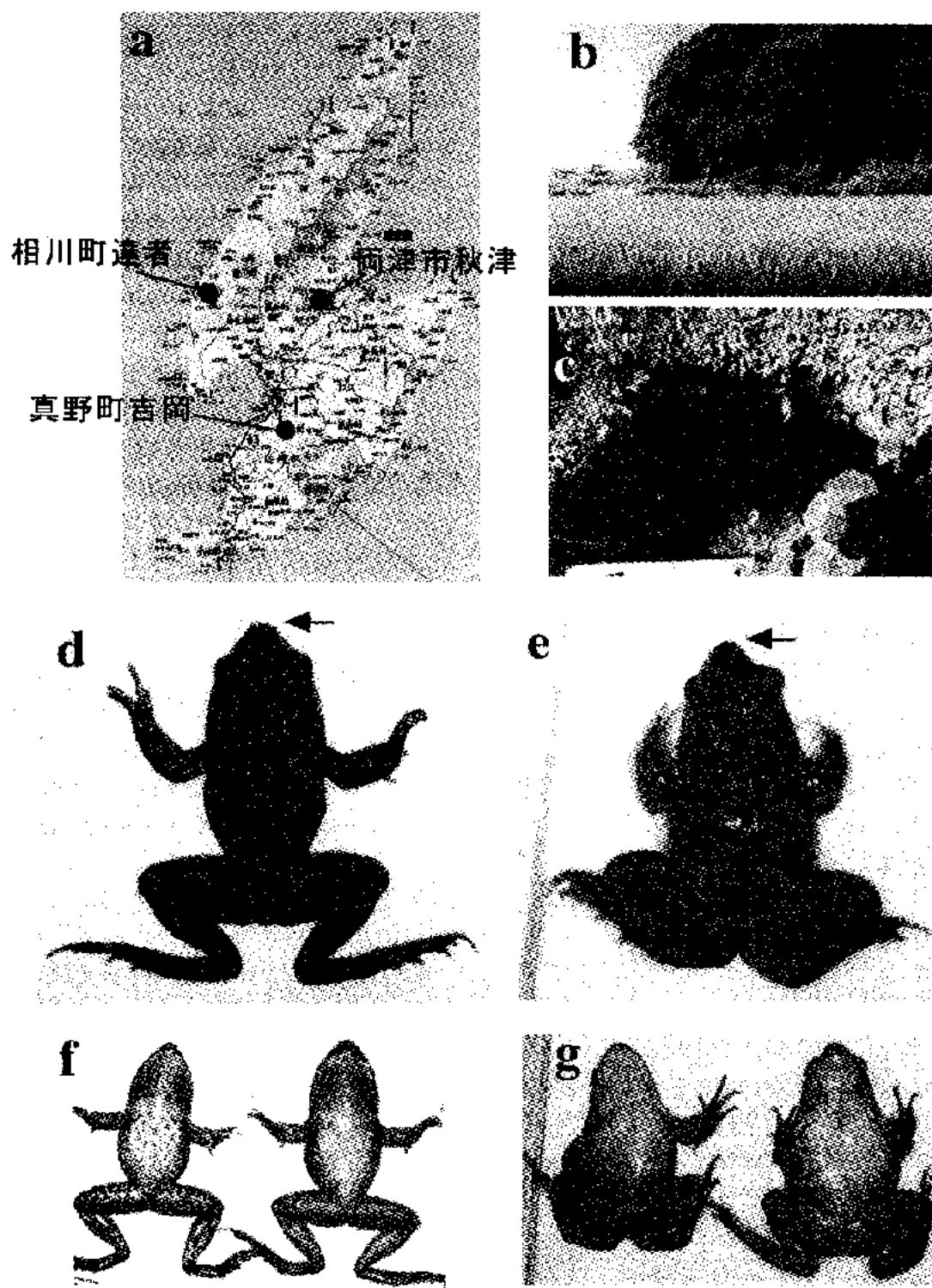


図1 佐渡島におけるツチガエルの生息地と形態

aは佐渡の地図。Bは水田。Cは今回生息地を確認した水たまり。dとfは新潟市のツチガエル。
eとgは佐渡島のツチガエル。矢印は吻を指す。

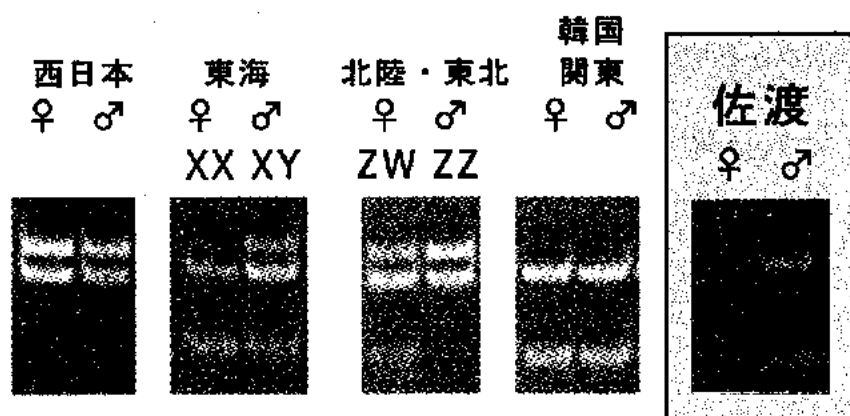


図2 ADP/ATP トランスロカーゼ遺伝子から推定した性決定機構

AAT500 塩基断片を制限酵素 *Mbo*I で切断すると、X と W 染色体由来の AAT は 2 カ所で切断されるが (3 本のバンド：一番小さいバンドは 2 本が重なっている)、Y と Z 染色体由来の AAT は一カ所でしか切断されない (2 本のバンド)。これをもとに性染色体の組成を知ることができる。又、西日本は 1 カ所切断、関東・韓国は 2 カ所切断で性染色体の形態に雌雄差はない。佐渡の AAT は関東・韓国と同じ 2 カ所切断で、雌雄同型であることがわかる。



図3 ミトコンドリア 12s リボソーム RNA 遺伝子の配列

407 塩基のうち、集団間で異なる塩基だけを抜粋した。佐渡と同じ塩基は反転文字で示してある。佐渡の遺伝子は新潟よりも関東と相同性が高い。

表1 ミトコンドリア 12s リボソーム RNA 遺伝子配列の一致率 (%)

	佐渡	関東	韓国
関東	93.9		
韓国	92.6	92.6	
新潟	89.9	90.4	95.3

② 形態

オタマジャクシ及び子ガエルは全体的に色が白く、透けていた(図1 e)。瞳は暗いピンクであったが、背側の皮膚を通して見えるオタマジャクシの眼球は、黒色であった(図1 b, 1 e)。腹部の皮膚は白色不透明で野生型との違いはなかった(図1 a, 1 b)。持ち帰った個体の詳細は以下のとおりである。

○オタマジャクシ

12 匹：白色透明

2 匹：白色透明の背中に黒色部分がある

○子ガエル

20 匹：白色透明

1 匹：背中に黒い斑点が1個

1 匹：頭部が黒い

その後、飼育を続けたところ、全個体が正常に成長した。また、全白色個体に黒い斑点(1~4、5個)が現れた(図1 d)。一方、頭の一部が既に黒いオタマジャクシは、子ガエルになると黒い領域が頭部全体に広がった(図1 c)。

③ 色素細胞の観察

皮膚の色は、主に真皮に存在する3種類の色素細胞によって決まる。3種類の色素細胞は黒色素(メラニン)を有する黒色素胞、黄色素(カロチン及びプテリジン)を有する黄色素胞、そして青緑色を反射する反射小板(グアニン)を有する虹色素胞である。これらの3つの色素細胞に注目して皮膚の生標本及び凍結切片標本を作製して観察した。黄色素胞はアンモニア水に浸した後、紫外線(UV)を当てると蛍光を発するのでその細胞が黄色素胞であることが分かる。また、虹色素胞は白色光の反射で青緑色を呈するので容易に識別できる。この方法によって、野生型の背中の皮膚では、黒、虹、黄色素胞が細胞突起を広げて分布していることが分かった(図2 a, a-u, d, d-u)。図2では虹色素胞の反射が強いため、黄色素胞を確認しにくい。真皮の最上層に位置している。白色個体の皮膚の部分では、メラニンを含む黒色素胞は見つからなかった(図2 b, c)。黄色素胞は色が薄く、虹

色素胞は極端に収縮していた。また、白色個体の皮膚の黒い部分では、黒色素胞が著しく発達していた(図2 c, f)。

④ 考察と今後の展望

今回、高知県で発見された白色ヌマガエルは、両親が突然変異遺伝子を持っていたために子供にその形質が現れたのか、それとも除草剤等の影響が後天的に現れたのか、現在のところ不明である。今後、白色個体同士の交配を行なうことによってその原因が遺伝子の突然変異によるものかどうかを確認できる。さらに、平成12年度もこのような個体が出現するかどうか、出現した場合には、その場所、個体数、形態等について調査する予定である。多数の白色個体が同時に出現したことは、遺伝子突然変異によることを強く示唆しているが、薬剤等の影響も無視できない。その理由として同じ田圃から見つかった別種のアマガエルのオタマジャクシにも、尻尾に異常な赤色が出現していたからである(図1 f)。細胞学的に興味深い点は、成長に伴い黒色素が復活した点である。果たして、オタマジャクシの時期に黒色素胞が形成されなかったのか、或いは黒色素胞は形成されたが黒色素を合成しなかったのか不明で、今後の電子顕微鏡による観察が待たれる。また、3種の色素胞全てに異常が認められた色彩変異体は極めて珍しい。この原因が遺伝子異常によるものであれば非常に貴重な研究材料である。また、後天的異常であれば、色素細胞に与えた影響は極めて強力に原因の追及が強く望まれる。

(3) 地域・関東地方

対象：奇形ウシガエルの分布調査

奇形カエルの出現は新聞紙等でいくつか報告されている。武石は今までの報告を「北九州市山田緑地の四肢異常ガエルに関する調査結果」(1999年)にまとめている(表1参照)。関東地方ではマスコミで報道されていないものの奇形ウシガエルがいくつか発見されていた(大内研究員、私信)。ここでは本調査研究において平成11年度後期に関東地方で発見

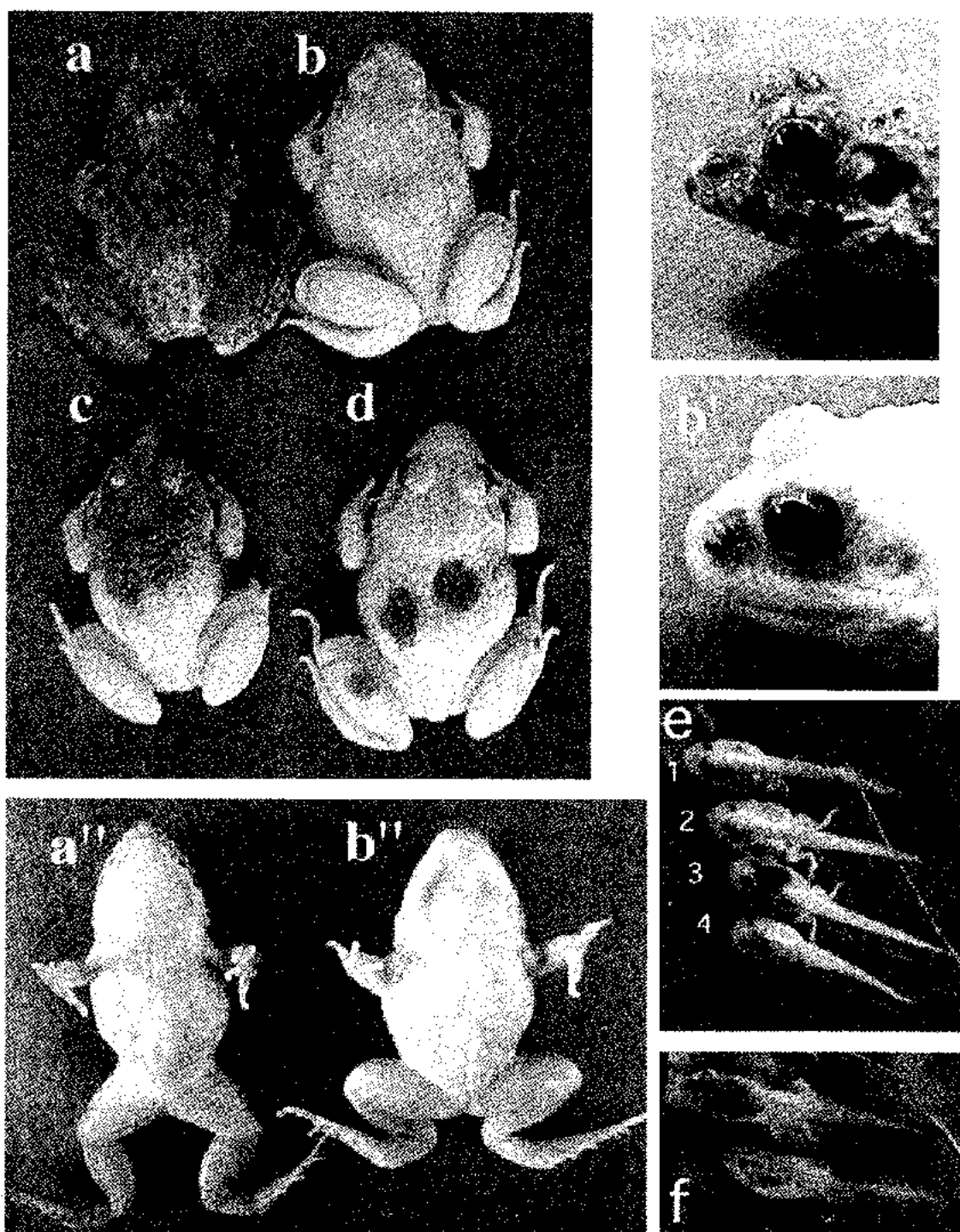


図1 高知県で発見されたヌマガエルの白色個体

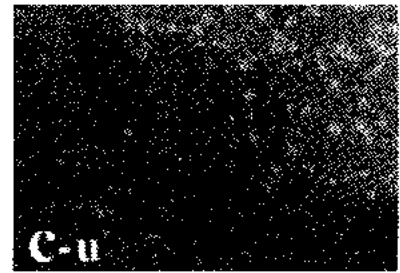
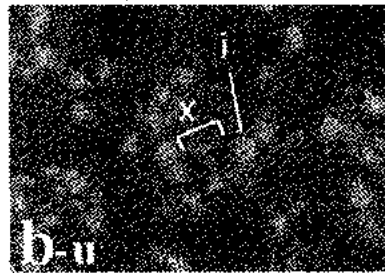
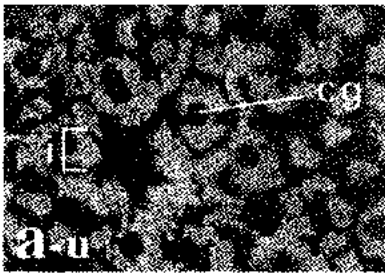
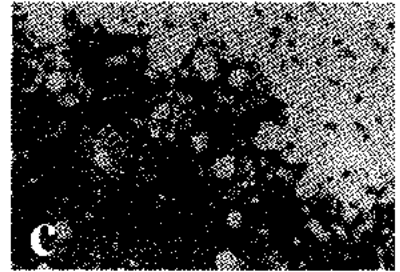
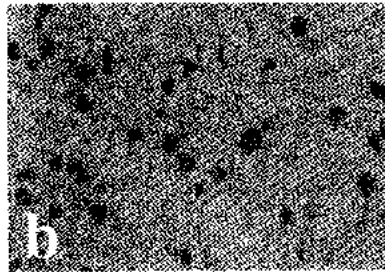
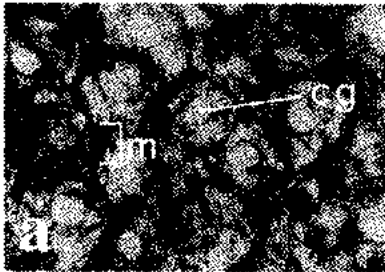
aは正常個体、b, c, dは6ヶ月飼育した白色個体。eは採集して間もない白色のオクマジャクシ。3と4は背に黒い部分が見られる。fは、同じ場所で見つかったアマガエルのオクマジャクシ。尾の一部が赤い。

野生型

白色型



背面



横断面

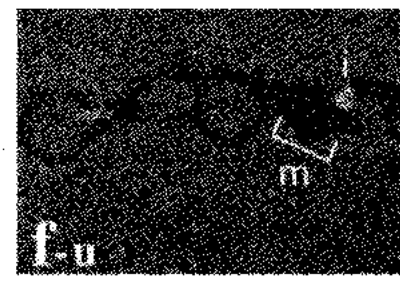
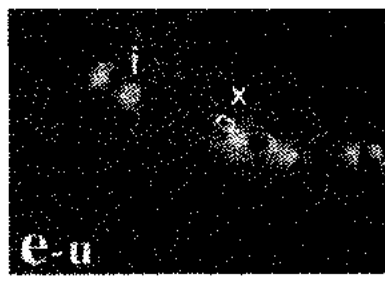
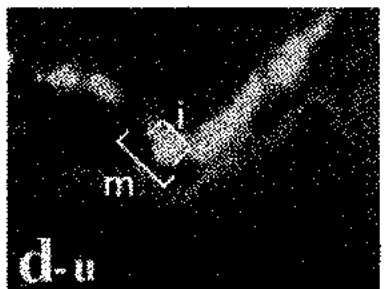
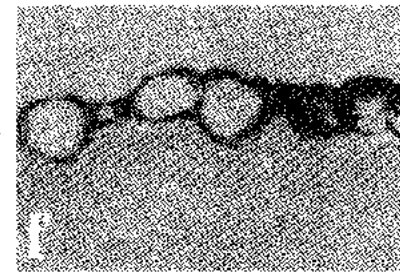
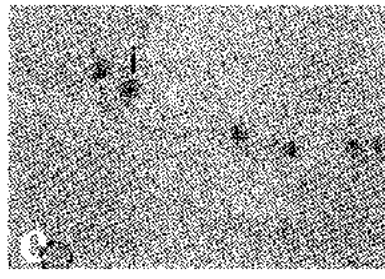


図2 ヌマガエル正常及び白色個体の色素細胞

a~b は背面から、d~f は横断面からの観察。-u は UV 反射光による観察。
m 黒色素胞、x 黄色素胞、i 虹色素胞、cg 皮膚腺

した奇形ウシガエル 6 例について報告する
(図 1、2)。

①奇形ウシガエルの発生場所と異常部

和名：ウシガエル

種名：*Rana catesbeiana*

(1)

採集年月日：1999 年 11 月 10 日

採集場所：埼玉県久喜市

異常肢の位置：左後短肢

(2)

採集年月日：1999 年 11 月 12 日

採集場所：茨城県麻生町

異常肢の位置：4 肢指異常

(3)

採集年月日：1999 年 11 月 19 日

採集場所：茨城県桜川村

異常肢の位置：右前短肢

(4)

採集年月日：1999 年 12 月 5 日

採集場所：千葉県久喜市

異常肢の位置：左右後肢指欠損

(5)

採集年月日：1999 年 1 月 30 日

採集場所：茨城県霞ヶ浦町

異常肢の位置：右前短肢

(6)

採集年月日：1999 年 2 月 2 日

採集場所：茨城県土浦市

異常肢の位置：右後 2 本肢

②今後の展望

短期間ではあるが 6 例の奇形肢ウシガエルを捕獲した。この結果から推測すると全国では無視できない数の奇形ウシガエルが出現しているものと思われ、早急に全国規模の実態調査を行う必要があると結論するに至った。

(4) 北陸・東海地方

今回の報告では、静岡地区、愛知・岐阜地区、および新潟県越後早川のイモリの生息、個体数、奇形個体の有無についての調査の中間結果をしたい。調査予定であった、群馬県沼田地区については、今後すぐに調査を実施

するつもりである。

①調査地区と結果

1) 静岡地区

本調査では、静岡県の伊豆から駿河、遠州および天竜にかけての 16 地点における、両生類の生息分布および奇形個体の有無の確認を行った。

(a) 環境庁メッシュマップ番号：5237-0731

磐田市近郊を流れる太田川水系の古川から水を引いた水路がある。この水路は魚のカワバタモロコ（コイ科も淡水魚で、静岡を東限）が生息していた場所の代替地として造成されたもので、流れもゆるやかで、保護池となっている。この池の周辺にはトノサマガエルが 80 匹、ニホンアマガエルが 100 匹確認されたが、観察時にはトノサマガエルは草刈りや工事のため古い水路にしか姿が見られなくなった。また、ニホンアマガエルのほとんどは、水路の周辺の草むら、田圃に生息していた。池の中には、多数のウシガエルのオタマジャクシがいた。成体は 4、5 匹ほどしか観察されなかったが、繁殖期にはうろさいほどに鳴き声が聞こえるので、数多く生息していると推定される。この池で採取したオタマジャクシの中に、見られるような両側の後肢の先が欠損している個体が発見された（図 1）。

(b) 環境庁メッシュマップ番号：5237-0780
- 0781

磐田市内桶谷沼での調査では、ヌマガエルとニホンアマガエルが確認できた。捕獲数は僅かであったが、鳴き声から推定するとかなりの数が生息していると思われる。

(c) 環境庁メッシュマップ番号：5237-0480

湖西市神座地区の神座神社前の水路は草が生い茂りカエルの生息に適した場所である。この地域ではダルマガエルとニホンアマガエルをそれぞれ 10 匹捕獲した。ダルマガエルは捕獲が難しく、その姿を見つけるのが容易でないが、まだ多数生息していると思われる。

表1 過剰肢を持つカエル類の日本での発見例

和名	種名	個体数	採集年月日	採集場所	過剰肢の位置と数	文献
アオガエル属(?)	<i>Rhacophorus</i> (?)	1	1928.08.07	青森県弘前市	左後肢2本、幼生	根岸(1935)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	1	1928.08.	青森県弘前市(?)	右前肢1本、雌、SVL約67mm	同上
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1928.10.05	青森県東津軽郡平舘村	左前肢1本、SVL約19mm	同上
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1931.10.	岩手県膽沢郡佐倉河村	左後肢1本、雌、SVL約28mm	同上
ニホンアカガエル	<i>Rana japonica japonica</i>	1	1938.10.	千葉県君津郡中村	右後肢2本、SVL約30mm	白井(1940)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1949.12.05	愛知県春日井市	後肢3本、変態完了直前、SVL47mm	岡島(1951)
モリアオガエル	<i>Rhacophorus arboreus</i>	1	1954(?)	新潟県新潟市	左前肢1本、雄、SVL58mm	佐々木・鈴木(1954)
アズマヒキガエル	<i>Bufo japonicus formosus</i>	1	1956(?)	新潟県北蒲原郡水原町	左前肢1本、雄、SVL112mm	佐藤(1956)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1956.10.	新潟県新潟市	右後肢1本、雄、SVL21.4mm	佐々木(1957)
トウキョウダルマガエル	<i>Rana porosa porosa</i>	1	1961.06.02	東京都江戸川区葛西	左前肢1本、SVL約90mm	青木(1962)
ヌマガエル	<i>Rana limnocharis limnocharis</i>	1	1963.06.	愛知県知多郡阿久比町	左後肢1本	新美(1965)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1964.05.	愛知県知多郡阿久比町	右前肢1本	同上
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1966.05.17	香川県	後肢2本	立石(1967)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1966.09.	愛知県半田市乙川浜側町	右前肢1本	新美(1969)
(ヌマガエルの1種?)		1	1967.05.	沖縄県具志川市具志川	後肢7本(左2本、右5本)	琉球新報(1968.08.02)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1967.08.15	愛知県刈谷市	左後肢2本	新美(1969)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	2	1967.10.08	愛知県半田市長根町	2匹とも過剰後肢左右各1本、幼生	同上
ヌマガエル	<i>Rana limnocharis limnocharis</i>	1	1971.08.	愛知県中島郡祖父江町	左前肢2本、雄、SVL44mm	新美(1971)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	2	1973.06.	千葉県市川市	後肢1本(左と右)、変態完了直前	和爾(1978)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1973.09.13	兵庫県豊岡市岩熊	右前肢1本、SVL45mm	長谷川(1974)
アズマヒキガエル	<i>Bufo japonicus formosus</i>	1	1974.05.25	千葉県市川市	右後肢2本、幼生	和爾(1978)
シュレーゲルアオガエル	<i>Rhacophorus schlegelii</i>	1	1980.05.	新潟県	右後肢1本、変態完了直前	杵淵(1981)
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1980.07.14	富山県富山市五福	右前肢1本	南部(私信)
トノサマガエル	<i>Rana nigromaculata</i>	1	1982.06.29	新潟県北蒲原郡加治川村	左前肢1本、2年目の雌、SVL45.3mm	高須(1982)
ニホンアマガエル	<i>Hyla japonica</i>	1	1992.8.23	愛媛県上浮穴郡小田町	右前肢1本、SVL27.5mm	岡山(1995)
ウシガエル	<i>Rana catesbeiana</i>	1	1993.05.22	埼玉県越谷市	後肢1本、幼体	朝日新聞(1993.05.27)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	8	1995.06.	福岡県北九州市山田緑地	前肢1~2本、幼体	武石(1996)
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	91	1996.05.	同上	前肢1~3本(90匹)、後肢1本(1匹)、幼体	武石
ニホンヒキガエル	<i>Bufo japonicus japonicus</i>	1	1996.05.17	同上	後肢1本、幼体	同上
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	2	1997.05.	同上	前肢、幼体	同上
ヤマアカガエル	<i>Rana ornativentris</i>	90	1998.05.	同上	前肢、幼体	同上



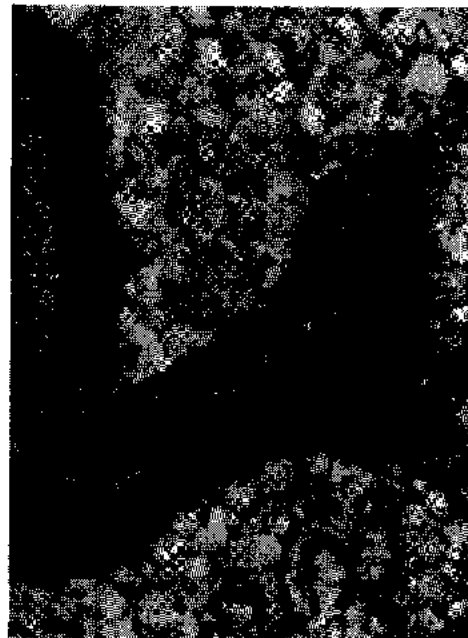
(1) 採集年月日 : 11 月 10 日
採集場所 : 埼玉県久喜市
異常肢の位置 : 左後短肢



(2) 採集年月日 : 11 月 12 日
採集場所 : 茨城県麻生町
異常肢の位置 : 4 肢指異常



(3) 採集年月日 : 11 月 19 日
採集場所 : 茨城県桜川村
異常肢の位置 : 右前短肢

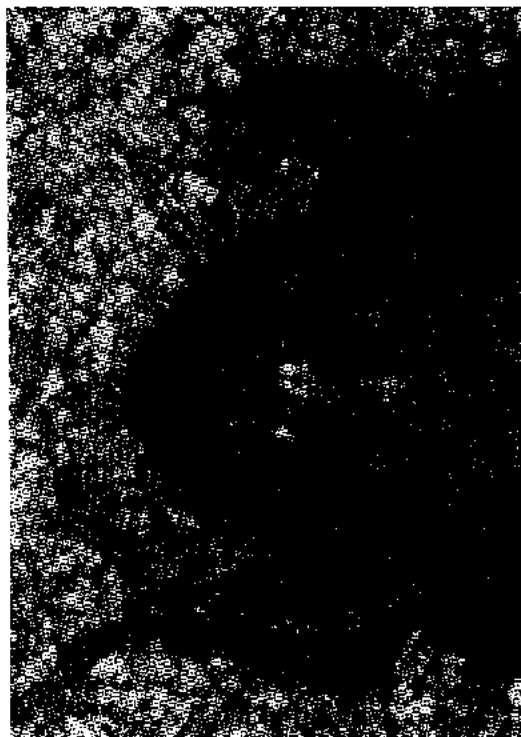


(3) の拡大図

図 1



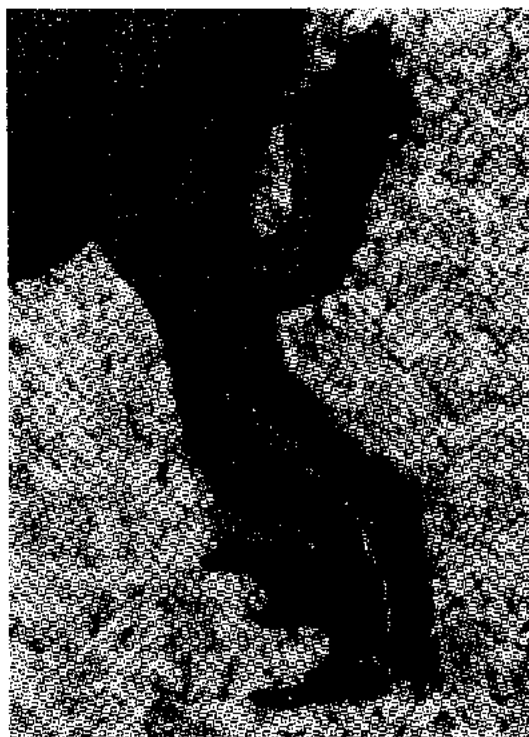
(4) 採集年月日 : 12月5日
採集場所 : 埼玉県久喜市
異常肢の位置 : 左右後肢指欠損



(5) 採集年月日 : 1月30日
採集場所 : 茨城県霞ヶ浦町
異常肢の位置 : 右前短肢



(6) 採集年月日 : 2月2日
採集場所 : 茨城県土浦市
異常肢の位置 : 右後2本肢



(6) の拡大図

図2

(d) 環境庁メッシュマップ番号: 5237-1647

磐田市近郊にある天竜川水系の一雲育川の33番池では、ウシガエルのオタマジャクシ10匹、成体1匹を捕獲した。昔はかなりの数がいたようだが、個体数が減少したのは、池の工事のため環境が激変し、さらに流入水路の流路変更で池の水がたまり、水質が悪くなったこと等の理由が考えられる。池周辺の草むらには、トノサマガエルとニホンアマガエルが確認できた。

(e) 環境庁メッシュマップ番号: 5237-2738
- 2739

掛川市森地区の山里の清流周辺の草むらには、カジカガエル、ニホンアマガエル、ツチガエル、トノサマガエルが多数生息していることを確認した。

(f) 環境庁メッシュマップ番号: 5237-1741

磐田市北部の敷地川からの農業用水路および周辺の田圃には、トノサマガエル、ヌマガエル、ニホンアマガエルが生息している。また、イモリやその幼生を確認したが、あまりりにも水が泥で濁っているため、イモリの生息には適さない環境になっている。

(g) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-1223
- 1224

大井川河口の左岸に広がる草むらには、ツチガエルの生息が確認された。

(h) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-37

修善寺地区。山田地区(5238-3792)、小室(5238-3794)には多数のアマガエルが生息している。また、中伊豆町の山間の姫之湯(5238-3719)では、ニホンアマガエルに加えて、シュレーゲルアオガエル20匹とイモリ5匹を確認した。

(i) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-4311,
4323, 4344, 4352

静岡市北部の麻機(あさはた)地区周辺に

は、数百単位でヌマガエルが生息している。

その他、ツチガエル、ニホンアマガエルも数十匹ほど確認できた。また、数は少ないがイモリの生息も確認された。より山添いの場所(4352)には、タゴガエルの卵塊、成体の抱接を観察した。鳴き声も多く聞こえたが、姿は殆ど見かけることはできなかった。

(j) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-3354,
3355, 3376

静岡大学の裏山の谷では、タゴガエルの生息が確認された。日本平の吉田川沿いの平沢観音付近にはシュレーゲルアオガエルの鳴き声や卵塊が確認された。ニホンアマガエルは多く、100匹程度数えられた。イモリも生息しているがその数は、少なく、10匹捕獲できたにすぎない。

(k) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-3264

静岡市西部の飯間地区の藁科川水系では、カジカガエルの一対が目撃されたので、この地域にはカジカガエルが多く生存していることが推測される。

(l) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-4248,
4249, 4239

静岡市郊外の足久保地区の諸川池周辺には、トノサマガエル5匹、ツチガエル6匹、イモリを1匹捕獲確認した。また、トノサマガエル5匹、ニホンアマガエル30匹確認できた。1999年10月9日の調査では、この地域の4239で、50匹のイモリを確認できたが、その中に足の指数異常イモリを1匹発見した(図2)。この川の水には沢山の洗剤が流入している。

(m) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-5380,
5370

この地域にはイモリ50匹、カジカガエル10匹を確認した。また、モリアオガエルの成体の姿は確認できなかったが、卵塊が木の枝にたくさんみられたので、かなりの数が生息していると推測される。同様にアズマヒキガエル成体は1匹しかみかけなかったが、多く

の卵塊が見られた。

(n) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-5266

静岡市北西で安部川西の奥池ヶ谷地区ではカジカガエルのカスタネットをならしたような鳴き声が辺り一面にするので、その生息数は多いと推測される。

(o) 環境庁メッシュマップ番号: 5237-3753, 3742, 5238-30, 5237-38, 5237-39

犬竜犬居地区を流れる竜電沢付近で 2000 年 4 月にヤマアカガエルが確認された。これに隣接する家山地区の身成川に沿った水辺にもヤマアカガエル 5 匹を確認した。また、犬竜森地区すなわち掛川市の北部では、カエルの種類も豊富でカジカガエル、ニホンアマガエル、ツチガエル、トノサマガエルが生息しており、その数もそれぞれ 3~20 匹ほどを捕獲できたので、かなりの数の生息していることが窺える。

(p) 環境庁メッシュマップ番号: 5238-5178 および 5238-6169

さらに山奥の千頭や井川地区にはカジカガエルの鳴き声や姿 (1 対) や数匹のヒキガエルを口撃、毎年産卵に来る池を確認した。この周辺にはヒダサンショウウオが生息しているとの情報を得た。

②今後の展望

今回の調査で静岡県には、トノサマガエル、ニホンアマガエル、ウシガエル、ヌマガエル、ダルマガエル、ツチガエル、シュレーゲルアオガエル、モリアオガエル、タゴガエル、カジカガエル、ヤマアカガエル、アズマヒキガエルなどの無尾両生類 13 種、イモリ、ヒダサンショウウオなどの有尾両生類 2 種を確認できた (表 1 参照)。

日本には無尾類が 41 種類、有尾類が 21 種類生息し、その多くは沖縄諸島の島々に生息していることを考慮すると、静岡地方は両生類の生息には適した土地であることが分かる。特に、ダルマガエルは日本で殆ど見られなく

なっているので、静岡地方でこのカエルが観察されたことは、この地方がまだ汚染されていないことを示唆しており、自然の豊かさを長く守っていくことが重要と思われる。県の南半分の地域全域には、アマガエルが生息していることがわかった。陸生で小型のアマガエルは都会の庭先でもよく見かける。それに対し、比較的水に依存しているトノサマガエルやアカガエルの数の減少は著しい。人里離れた山間部の池や川辺に、モリアオガエル、タゴガエル、カジカガエルがまだ見られるのは救いである。ウシガエルとイモリに足の奇形をもつ個体が発見されたが、これが即、内分泌攪乱物質の影響であると断定できない。今後より詳しい調査、研究が望まれる。

2) 愛知・岐阜地区

①調査結果

調査地 : 愛知県中島郡祖父江町祖父江地内

調査期間: 平成 11 年 10 月~12 年 4 月

調査方法: 実地踏査と写真撮影

祖父江町は愛知県尾張地方西部、木曽川の東岸に位置しており、対岸は岐阜県である。人口は約 2 万 3000 人で、おもな土地利用は水田、畑地、雑木林、河川敷緑地、住宅地である。調査地は町内で最も住宅が密集している地域であるが、水田や用水路も見られ、無尾類が数多く生息している。調査期間中、多数のアマガエルおよびトノサマガエルの他、少数のウシガエルを確認した。住民からはニホンアカガエル、或いはツチガエルが見られるとの情報もあったが、実地では確認できなかった。今回の調査では、調査対象にできるカエルの種類と調査地点を決定することを目標とした。その結果、アマガエルとトノサマガエルの生息数が多いため対象種として適していることが分かった。また、調査地点として地区内の数か所を選定した。

アマガエルは昨年 11 月 19 日から本年 3 月 18 日までの間、鳴き声を確認できなかった。4 月下旬からはトノサマガエルが鳴いている様子がほぼ毎日確認できた。調査期間中、奇

表 1 : 調査地で生息が観察された両生類のリスト

両生類

有尾目

サンショウウオ科

ヒダサンショウウオ *Hynobius kimurae*

イモリ科

アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

無尾目

アマガエル科

ニホンアマガエル *Hyla japonica*

ヒキガエル科

アズマヒキガエル *Bufo japonicus formosus*

アカガエル科

ヤマアカガエル *Rana ornativentris*

タゴガエル *Rana tagoi*

トノサマガエル *Rana nigromaculata*

ツチガエル *Rana rugosa*

ウシガエル *Rana catesbeiana*

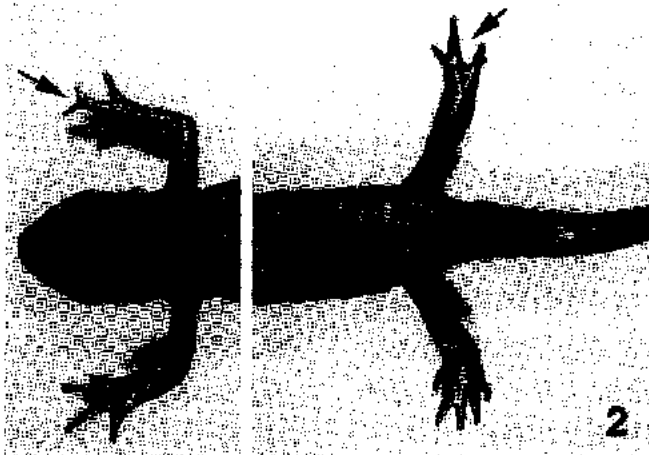
ダルマガエル *Rana brevipoda*

アオガエル科

シュレーゲルアオガエル *Rhacophorus schlegeli*

モリアオガエル *Rhacophorus arboreus*

カジカガエル *Rhacophorus buergeri*



形、或いは異常が認められる個体はなかった。

②今後の展望

愛知県、岐阜県を含む東海地域はトノサマガエル、ダルマガエル、トウキョウダルマガエルの3種とも生息しているが生息数の減少が懸念される。今後、継続した分布調査を行う必要がある。

3) 新潟県村上市周辺地域（イモリ）

①調査結果

1976年以來、過去25年間ほどイモリの生態を観察してきたが、今回の調査でその生息数が急速に減少していることが分かった。これは、1992年ごろ農業用水を引き入れるための水路をコンクリートで固めたため、水路にせりなどの水草が生えなくなり、イモリの餌となる水生昆虫やミミズなどの小動物がいなくなったこと、かつては川底は柔らかな土の中があり、冬眠さえできる環境であったのににもかかわらず、川の流れが急になり、イモリの生活にとって環境が急変したことなどが大きな原因として考えられる。水は山から流れてくる綺麗な水のためか、奇形個体は観察されなかった。

②考察と今後の展望

イモリも生息数の減少が懸念されるので、今後、継続した分布調査を行う必要がある。

(5) 地域：沖縄地方、南大東島・宮古島

（オオヒキガエル、ミヤコヒキガエル）

沖縄県南大東島や宮古島にはオオヒキガエル及びミヤコヒキガエル等、数種が生息している。沖縄諸島は土地開発が進んでおり、貴重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、沖縄地方のカエルの実態を把握するため実態調査を行った。今回の調査には沖縄在住の千木良研究員の協力を得た。調査対象のオオヒキガエルとミヤコヒキガエルは両島に棲息しており、地理的に大きく離れた地域での動態を知るには良いモデル動物と思われる。

た。また、継続した実態調査を行うには、生息数が豊富な場所を最初に選んだ方が良く判断したため、沖縄県内の2つの島を選んだ。

①調査結果

(a) 南大東島におけるオオヒキガエル及びミヤコヒキガエルの分布実態調査

南大東島は北緯25度50分47秒、東経131度14分23秒で沖縄本島や小笠原諸島と同緯度であり、沖縄本島から東に約400km、小笠原諸島から西に約1100kmの位置にある。この島には約2,000人の島民が住んでいる。北東に約11km離れた北大東島と南に約160km離れた沖大東島を含め大東諸島と呼ばれている（図1）。

気候は亜熱帯の海洋性気候で、年平均気温は23℃近くあり、年間を通して温暖である。年間降水量は1700mm程度で、沖縄本島や宮古島よりやや少ない程度である。年間の降水量は夏から秋にかけて、台風の通過状況によっても大きく変わる。島は太平洋の遠い海上にぽっかり浮かんでいるため、島の気象情報は非常に重要で南大東島地方気象台が置かれている。台風情報や気象情報で多くの人が「南大東島」の名前を聞いたことがあると思われる。

地形は面積30.74km²、南北26.54km、東西5.78km、周囲20.8kmの楕円の形をしている。島の中央部より西側に大小多数の池がある（図2）。島の周囲は口の中の歯ぐきのように盛り上がり、島の一番高いところで標高75.8mである。島はサトウキビの栽培が行われているためそのほとんどが住宅地と畑である（図3）。

この島には昔、両生類及び爬虫類は全くいなかったとされている。現在、両生類では、1940年代にサトウキビの害虫駆除を目的として導入されたオオヒキガエル、同じ目的で宮古島から導入されたミヤコヒキガエル、及び1921年に沖縄本島から持ち込まれたとされるヌマガエルがいる。従って、これらのカエルは島の固有種ではないが、精糖工場がひとつあるだけで近代産業が殆どなく、また、

外敵の蛇がいない環境で生息するカエルの実態を調査するには最も良い場所のひとつと思われたのでこの島を選び、島内の大東神社境内と全島、特に北部を調査地とした(図4)。

調査(1)

調査員：中村正久(広島大学)、千木良芳範(沖縄県教育庁)

調査日時：平成12年2月3日、午後8時～11時

調査場所：大東神社、約400m²(図5)

天候：晴、微風、19℃

観察個体数：56個体(内訳：オオヒキガエル3匹、ミヤコヒキガエル53匹)ミヤコヒキガエルの変態直後個体100匹以上及びオタマジャクシ無数

調査(2)

調査員：中村正久、千木良芳範

調査日時：平成12年2月4日、午前9時～12時

調査場所：南大東島北部(図6)

天候：晴、微風、22℃

観察個体数：7個体(内訳：オオヒキガエル2匹、ミヤコヒキガエル5匹)

(b) 宮古島におけるオオヒキガエル及びミヤコヒキガエルの分布調査

宮古島は面積が225.86km²、約北緯24度50分、東経125度24分で伊良部島と同緯度であり、沖縄本島から南西に約290kmの位置にある(図1、図8)。気候は北回帰線よりほんの少し北にある亜熱帯の海洋性気候で、年平均気温は23℃近くあり、年間を通して温暖である。年間降水量は2,247mm程度で一日の最大降水量が402mm、降水日数が148日以上で雨が多い。地形は周囲約102.9kmで島にはほとんど池がなく飲料水は自然雨と海水を淡水に代え飲み水として使用している。島全体が概ね平坦で低い台地状を呈し、山岳部は少なく、最も高い地点はナカオ嶺で標高113m、最も低いところは多良間村で34mとなっている(図9)。島は平良市と3町2村からなり、人口は約55,735人(平成7年国勢調査)でサトウキ

ビの栽培や観光が主な収入源となっている。この島には両生類及び爬虫類がいる。沖縄群島に生息している有名な爬虫類のハブは宮古島にはいない。しかし、アオカナヘビ、サキシママダラ、ヒメヘビ等の無毒のヘビが生息していてカエルの天敵となっている。ハブは西に約7km離れた伊良部島にも生息していないが、これはふたつの島が比較的新しい地層の琉球石灰岩でおおわれた平らな島であり、ハブが移動できない時期に島がつくられたことによるものと推測されている。両生類ではヒメアマガエル、ヌマガエル、それに宮古固有亜種のミヤコヒキガエルがいる。毒蛇がいない島であること、また、ミヤコヒキガエルの生息状態を南大東島と比較する必要があること、沖縄群島でも土地開発が進んでいない島であることから、カエルの実態を調査するには良い場所と考えてこの島を選んだ。

調査(1)

調査員：中村正久、高瀬稔(広島大学)

調査日時：平成12年2月5日、午前10時～16時

調査場所：宮古島全域

天候：晴、微風、23℃

観察個体数：0個体

調査(2)

調査員：中村正久、高瀬稔、千木良芳範

調査日時：平成12年2月5日、午後7時～8時

調査場所：宮古島市営熱帯植物園(図10)

天候：晴、微風、20℃

観察個体数：3個体(内訳：ミヤコヒキガエル3匹)(図11)

調査(3)

調査員：中村正久、高瀬稔、千木良芳範

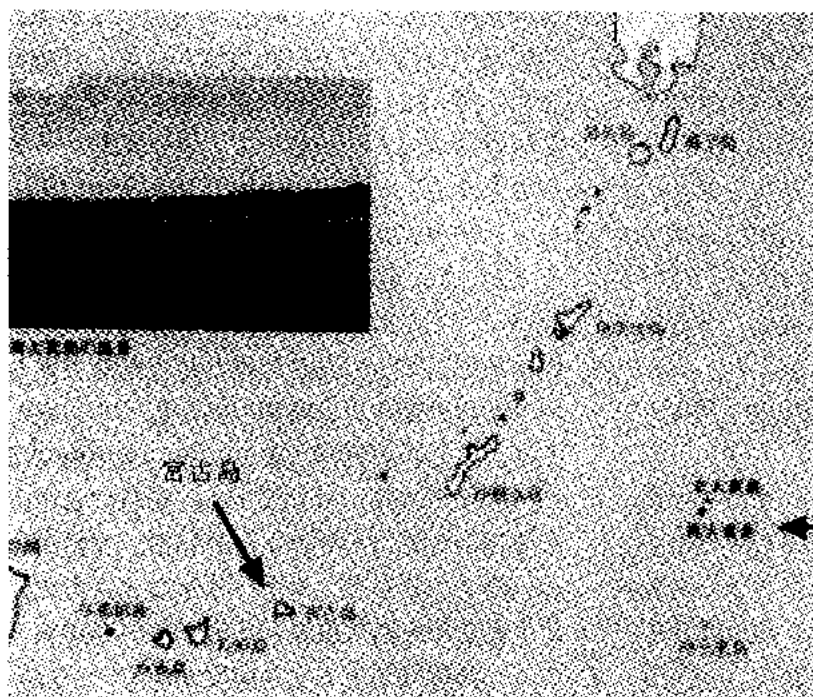
調査日時：平成12年2月5日、午後8時30分～23時

調査場所：宮古島松尾地区溜池(図12)

天候：晴、微風、20℃

観察個体数：26個体(内訳：ミヤコヒキガエル26匹)

変態直後のミヤコヒキガエル多数



南大東島

図1
沖縄諸島の位置



図2
南大東島の航空写真
中央に池が見える。



図3
南大東島の風景
開墾地はほとんどが
サトウキビ畑である。



南大東島北部

大東島神社

図4 南大東島の全景。周囲約21kmである。

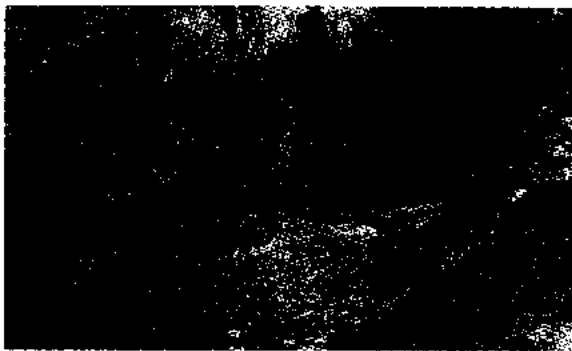


図5 大東神社内の池。周囲約40kmである。

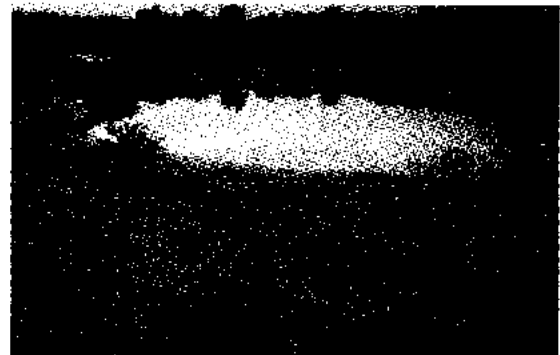


図6 南大東島の北部。ゴルフ場の人工池。

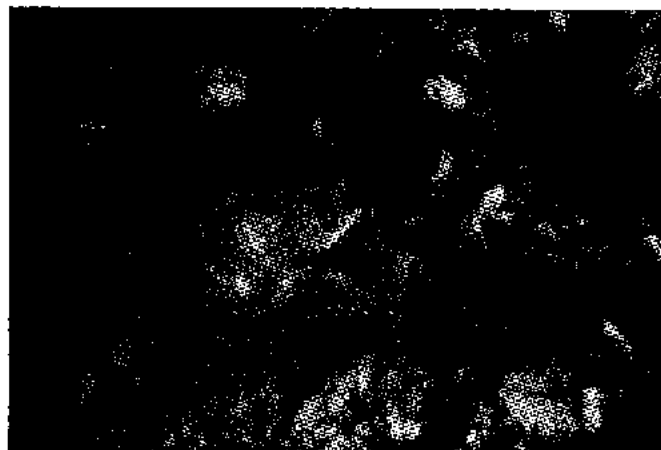


図7 大東神社境内に現れたミヤコヒキガエル。

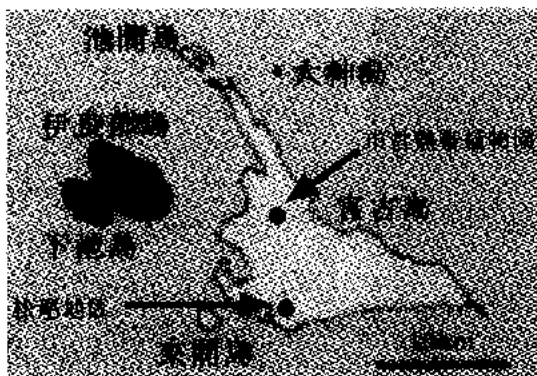


図8 宮古諸島

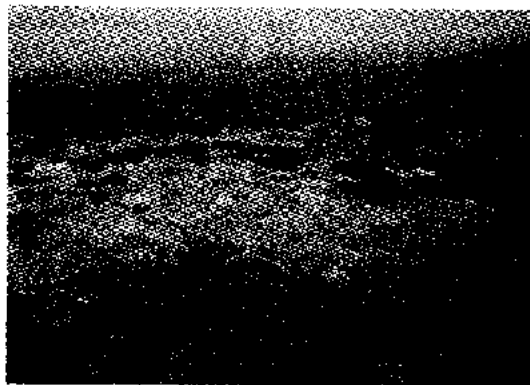


図9 宮古島の航空写真



図10 宮古島市営熱帯植物園

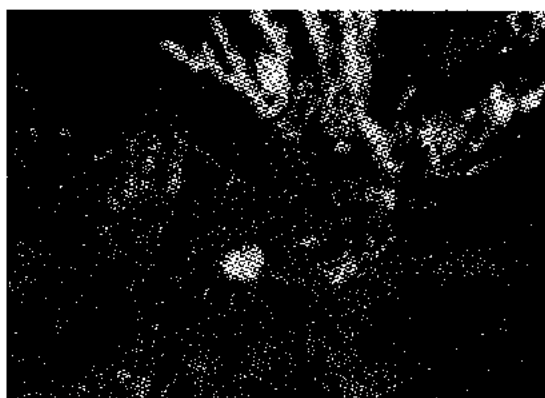


図11 宮古島市営熱帯植物園に現れた
ミヤコヒキガエル



図12 宮古島松尾地区の溜池



図13 宮古島松尾地区の溜池で見つけた
変態直後のミヤコヒキガエル

②考察と今後の展望

今回の調査は2月に行った。述べるまでもなく、この季節は本州に生息しているカエルは冬眠している。しかし、南大東島では数多くのミヤコヒキガエルが観察できた。島民の方にカエルの生息状況について尋ねたところ、夏には無数のカエルが車道に現れ、多くの個体が車に牽かれていたとのことであった。南大東島では天敵のヘビがいないこと、また、工場及び宅地のために土地を開発することも殆どないと思われるので絶滅の心配はないと思われる。今回の調査でミヤコヒキガエルの個体数がオオヒキガエルに比べかなり多く観察されたことから、オオヒキガエルが南大東島では絶滅するのではないかと予測される。ただ、オオヒキガエルの原産地は南アメリカであり、日本の固有種ではないことから、進化的にはむしろ良い傾向にあるのかもしれない。

一方、宮古島では、観察された成体の個体数が比較的少ないことから数が減少していると推測される。宮古島は雨が多いものの池がほとんどない。しかし、カエルの繁殖期に多量の雨が降ることによって窪地に小さな水がたまりができる。その水たまりにカエルが産卵し、オタマジャクシは変態するまでそこで水中生活を送ることになる。従って、もし変態前に水が干上がってしまうとオタマジャクシが死滅することは明白で、宮古島のカエルの生息数は降雨量に大きく左右されるものと思われる。宮古島の固有亜種であるミヤコヒキガエルはこの島では数が減少していると推測されるものの、南大東島では害虫駆除のために移入されたという幸運も手伝って新天地で繁殖を続けることができた。しかし、この結果は今回の実態調査で得たものであり、継続的な実態調査を行わない限り最終結論は出せない。

【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

①研究成果

(1) 有機塩素系農薬及びPCB

分析に供した卵塊の母ガエルの体内中の有機塩素系農薬及びPCB濃度を表1に示す。カエル体内からは、湿重量換算でPCBが13ng/g wet (検出頻度 1/10)、DDT類が5~97ng/g wet (検出頻度 7/10)、ディルドリンが3ng/g wet (検出頻度 1/10) 及びオキシクロルデンが4ng/g wet (検出頻度 1/10) 検出されている。特に高濃度で検出された物質はDDT類で、山田緑地では10mg/g fatを超えた個体があった(表1-2)。

次に、卵の湿重量濃度を表2に示すが、母体から検出された物質は、卵からも検出されており、さらに卵だけから検出された物質も多い。卵の検出濃度は、PCBが1~40ng/g wet (検出頻度 5/10)、DDT類が3~349ng/g wet (検出頻度 9/10)、ディルドリンが2~18ng/g wet (検出頻度 3/10) 及びクロルデン類が4~32ng/g wet (検出頻度 10/10) であり、母体の数倍である。検出物質の中では母体同様DDT類濃度が特に高く、山田緑地のニホンアカガエルの卵では6mg/g fatを超えるものもあった(表2-2)。

卵生の生物では、母体中の疎水性物質は脂肪と共に卵に移行することが知られている。調査した2種のカエルの体内及び卵の脂肪分は、それぞれ1%と5%であり、卵の脂肪分の高さが卵の高濃度の原因と考えられた。そこで、母ガエルとその卵の脂肪換算濃度を比較することとし、両者から検出されたデータを用いて、母体から卵への化学物質の移行率を計算して表3にまとめた。卵への移行率は、脂肪換算で平均0.59(幾何平均値の範囲0.30~1.10)であり、有機塩素系農薬やPCBが脂肪と共に卵へ移行していることが確認された。

次に、母体内の有機塩素系物質が、絶対量としてどの程度卵に移行しているかを検討した。その結果を表4に示す。母体内に存在する化学物質の2倍(0.14~5.6倍)の量が卵から検出されており、カエルの場合は、体内に

蓄積した有機塩素系物質の 2/3 が、1 回の産卵により卵に移行することが確認された。

(2) ダイオキシン類 (含 Co-PCB)

分析に供した卵塊の母ガエルの体内中のダイオキシン類濃度及び TCDD 毒性当量 (TEQ 値) を表 5 に示す。母体からは、湿重量換算で PCDD/DF が 18.7~207.5pg/g wet (平均 53.6pg/g wet)、コプラナー PCB が 131.1~375.2pg/g wet (平均 242.4pg/g wet)、総ダイオキシン類が、173.2~424.5pg/g wet (平均 295.9pg/g wet) 検出されている。また、それらの平均脂肪換算濃度は、PCDD/DF が 5,333pg/g fat、コプラナー PCB が 21,519pg/g fat、総ダイオキシン類が 26,852 pg/g fat である (表 5-2)。

一方、卵 (表 6) からは、湿重量換算で PCDD/DF が 37.9~540.9pg/g wet (平均 158.1pg/g wet)、コプラナー PCB が 289.2~1,958pg/g wet (平均 952.2pg/g wet)、総ダイオキシン類が、327.1~2,114pg/g wet (平均 1,110pg/g wet) 検出されている。卵の湿重量濃度は、有機塩素系農薬と同様に母体より大きく約 3.8 倍であった。また、卵の平均脂肪換算濃度は、PCDD/DF が 2,828pg/g fat、コプラナー PCB が 17,034pg/g fat、総ダイオキシン類が 19,861 pg/g fat であり、母体の約 70% であった。母体と卵の TEQ 値を比較したところ、湿重量濃度と同様に卵の TEQ 値は母体より 3.8 倍大きかった。このことから、土壌からカエルへの移行で見られた 2,3,7,8-体の選択的な生物濃縮は、母体-卵間では見られないことが確認された。

母体から卵へのダイオキシン類の絶対量の移行率を求めた。その結果を表 7 に示すが、母体中のダイオキシン類量の約 2.5 倍が卵から検出されており、有機塩素系農薬と同様ダイオキシン類も体内蓄積量の 2/3 が卵に移行することが確認された。さらに、個々のコンジェナーで移行率に差があり、OCDD など高塩素の異性体ほど卵へ移行しにくいことが分かった。PCDD/DF が土壌や水質など環境媒体から体内への移行する場合、高塩素化体ほど

取り込みにくくなることが多数報告されており、平成 10 年度に実施した土壌とカエル調査においても確認されている。しかし、高塩素化 PCDD/DF が、母体から卵へも低塩素化体と比べて移行しにくいことが明らかにされたのは、我々が知る限り初めてである。

調査 3 地域の土壌、カエル及び卵のダイオキシン類の TEQ 値 (TEF は、「WHO 1997 ほ乳類」を使用) を表 8 に示す。土壌及び卵の TEQ 値は、地域間で大きな差があったが、カエルの TEQ 値にはほとんど差がなかった。この理由として、対照 2 地域の土壌と卵塊の試料数が少ないことと、母体濃度の高い卵塊を調査対象としたことが考えられる。そこで、最も試料数の多い山田緑地の試料を用いて、土壌・カエル・卵間のダイオキシン類の動態を検討した。その結果を表 9 に示すが、土壌の TEQ 値を 1 としたときのオスガエル及び卵の TEQ 値は、それぞれ 0.36 及び 0.75 であった。なお、調査卵塊の母体の TEQ 値は、山田緑地の全メス (20 個体) の平均 TEQ 値の 1.39 倍であり、それを考慮すると全メスの卵塊の平均 TEQ 値は、土壌の 0.53 倍となる。即ち、カエル卵中のダイオキシン類の TEQ 値濃度は、生息地の土壌濃度の約半分であることが分かった。

②今後の展望

TEQ 最大値を示した卵塊は、田園地帯の小敷 (30.6 pg-TEQ 値/g wet) から採集したものであった。小敷の土壌の異性体構成比から、そのダイオキシン類の由来は水田用除草剤の CNP であることが分かっているため、高濃度は CNP の影響によると考えられる。北九州地方は、全国的に見て CNP の使用量が特に多い地域ではないため、カエルへの影響を考えるには CNP 使用量が多い地域のダイオキシン類分析調査が必要である。また、ダイオキシン類の卵への影響に関しては、五大湖に生息する魚を餌とする鳥の卵に悪影響 (孵化しない) を与える最低濃度は 10pg-TEQ/g wet と報告されている。また、この TEQ 値はラットの H4IIE 肝細胞を用いたバイオアッセイで得ら

れた値であり、GC/MS の分析値から計算で求める TEQ に比べ 2～4 倍の値であることを考慮すると、今回の調査で卵塊から検出された TEQ 値のカエルの胚に対する影響を更に調査する必要がある。また、ほぼ同程度のダイオキシン類の体内濃度で肝臓や血中のビタミン A 濃度が低下することが報告されている。ビタミン A は、胚発生時に重要な役割をするホルモンであり、その不足及び過剰により四肢形成を含む種々悪影響を生じさせる可能性が指摘されている。その為、カエルへのビタミン A 濃度の影響についても詳細な検討が求められる。

【3】環境汚染モニター動物（トランスジェニックカエル）の作製

①研究成果

結果を図 5 と図 6 に示した。図 5 で明らか

なようにカエル *FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域が GFP のプロモーターとして初期胚で機能していることがその蛍光から分かる。オタマジャクシでは部域特異的に発現している。この幼生はこの時期で死んだため、性腺で発現するかどうかを確認することができなかった。

②今後の展望

今回の実験でツチガエルの性腺で発現する遺伝子の転写調節領域がアフリカツメガエルの生体内で機能することが判った。今後は、導入個体数の増加、プロモーター活性の強化、他の候補遺伝子の導入等を行うことによってトランスジェニックカエルの作製を試みる予定である。もし成功すれば、極めて有効な環境汚染指標動物となるものと思われる。

Investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of extermination and making a Web site to gather informations of amphibian malformations in Japan, and production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution

Masahisa Nakamura, Laboratory for Amphibian Biology, Faculty of Science, Hiroshima university, Professor

Key words: actual circumstances, amphibians, Web site, malformation, EDC, dioxins, transgenesis, model animal

The research consists of 3 parts: 1) investigation of the actual circumstances of amphibians and making a Web site to gather information of amphibian malformations in Japan. 2) the investigation to clarify unbalance of sexual ratio in frogs in the Yamada-Ryokuchi area in the city of Kita-Kyushu. 3) production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution.

We successfully made Web site to gather information of deformed amphibians which might be caused by chemical compounds such as EDC and dioxins. Investigation was also carried out to see the actual circumstances of amphibians (frogs and newts) in selected areas in the districts of Kanto, Hokuriku, Tokai, Shikoku and Okinawa. The number of amphibians seems to be declining in all areas examined. Interestingly, six malformed frogs (*Rana catesbeiana*) were found in a few months by this investigation.

In order to elucidate a reason for induction of unbalance of sexual ratio in frogs living in the Yamada-Ryokuchi area in the Kita-Kyushu city, we analyzed the contents of environmentally disruptive compounds and dioxins in frog eggs and found that organochlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls (PCB) and dioxins which were accumulated in frog bodies were transferred to the eggs. It is, therefore, very likely that the malformed frogs might be caused during development by the chemicals that had been accumulated in the eggs.

Finally, we tried to produce transgenic frogs to monitor environmental pollution by injecting a DNA construct of the 5'-untranslated region of the frog *FTZ-F1* gene, which is expressed in the frog gonad and a pEGFP vector into the eggs of *Xenopus laevis*. The expression of green fluorescence protein (GFP) was tissue-specific in the transgenic embryos. Unfortunately embryos died before reaching the tadpole stage, so that we could not confirm the *FTZ-F1* gene was expressing in the gonad.

We successfully obtained many results, but this research was performed in a period less than one year. Thus, we cannot draw a conclusion for the relationship between the deterioration of living conditions and the change in the number of amphibians at the present time. Further investigations are required to elucidate why the number of amphibians are declining and why frogs are deformed.

表 1-1 カエルの PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (湿重量換算)

No.		山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域		山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類		YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
体長	mm	81	86	80	67	66	64	67	66	80	72
脂肪分	%	0.94	1.63	1.07	1.16	0.93	0.85	1.15	0.5	1.1	0.84
体重	g	30.9	37.1	31	17.8	19.3	15	17.6	15.8	34.9	22.5
P C B	塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	二塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	三塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	四塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	五塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	六塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	9	<2
	七塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	八塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	九塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	十塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
農 薬 類	HCB	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	α-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	β-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	γ-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	δ-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDT	<2	4	17	<4	17	6	19	6	<2	<2
	op'-DDT	<2	<2	3	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDE	5	4	7	<4	76	5	55	11	<2	<2
	op'-DDE	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDD	<2	<2	3	<4	<4	<4	<4	<4	<2	<2
	op'-DDD	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	All DDTs	5	8	24	0	37	11	74	19	0	0
	γ'-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	γ'-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	3
	trans-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	cis-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	オキシカダリン	<2	<2	<2	24	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	trans-ノカド	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	cis-ノカド	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2

表 1-2 カエルの PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (脂肪換算)

No.		山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域		山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類		YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
体長	mm	81	86	80	67	66	64	67	66	80	72
脂肪分	%	0.94	1.63	1.07	1.16	0.93	0.85	1.15	0.5	1.1	0.84
体重	g	30.9	37.1	31	17.8	19.3	15	17.6	15.8	34.9	22.5
P C B	塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	二塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	三塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	四塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	五塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	364	0
	六塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	818	0
	七塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	八塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	九塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	十塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
農 薬 類	HCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	α-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	γ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	δ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	1000	0	0
	pp'-DDT	0	245	1028	0	1828	706	1652	1600	0	0
	op'-DDT	0	0	280	0	0	0	0	0	0	0
	pp'-DDE	532	245	654	0	8172	588	4763	2200	0	0
	op'-DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	pp'-DDD	0	0	280	0	430	0	0	0	0	0
	op'-DDD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	All DDTs	532	491	2243	0	10430	1294	6433	3800	0	0
	γ'-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	γ'-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	trans-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	357
	cis-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	オキシカダリン	0	0	0	345	0	0	0	0	0	0
	trans-ノカド	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cis-ノカド	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2-1 卵の PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (湿重量換算)

(ng/g wet)										
検体番号	山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類	YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
卵黄重量(g)	17.30	17.35	16.73	8.39	10.17	8.68	11.29	10.58	19.05	15.85
脂肪分(%)	5.4	6.5	5.5	6.0	5.8	6.5	5.4	5.3	4.9	4.6
塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
二塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
三塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
四塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
五塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15	ND
六塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22	ND
七塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	ND
八塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
九塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
十塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
β-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
δ-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDT	8	ND	4	ND	65	12	37	47	ND	ND
o,p'-DDT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDE	20	3	2	6	270	23	99	92	ND	4
o,p'-DDE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDD	ND	ND	ND	ND	14	3	10	12	ND	ND
o,p'-DDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
全DDT	23	3	6	6	349	38	146	151	0	4
Δ ² -DDE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	ND	18
trans-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
cis-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	7	4	5	8	17	2	48	8	4	30
trans-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2
cis-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: 検出せず

PCB検出限界: 1 ng/g, その他の検出限界: 2 ng/g

表 2-2 卵の PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (脂肪換算)

(ng/g fat)										
検体番号	山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類	YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
卵黄重量(g)	17.30	17.35	16.73	8.39	10.17	8.68	11.29	10.58	19.05	15.85
脂肪分(%)	5.4	6.5	5.5	6.0	5.8	6.5	5.4	5.3	4.9	4.6
塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
二塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
四塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
五塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	306	0
六塩化ビフェニル	19	15	0	17	0	15	0	0	449	0
七塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	61	0
八塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
九塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
十塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
δ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDT	56	0	73	0	1121	185	685	887	0	0
op'-DDT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDE	370	46	36	100	4655	354	1833	1736	0	87
op'-DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDD	0	0	0	0	241	48	185	226	0	0
op'-DDD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
All DDTs	426	46	109	100	6017	585	2704	2849	0	87
Δ ² -DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	37	0	0	0	0	0	0	75	0	391
trans-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cis-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ ² -DDE/Δ ² -DDT	130	62	91	133	121	185	74	151	82	652
trans-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43
cis-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 カエルと卵の有機塩素系農薬及びPCB濃度の比較（まとめ）
脂肪換算での比較結果

物質名	n	平均	最大	最小	標準偏差	幾何平均
塩化ビフェニル	0		0	0		
二塩化ビフェニル	0		0	0		
三塩化ビフェニル	0		0	0		
四塩化ビフェニル	0		0	0		
五塩化ビフェニル	1	0.842	0.842	0.842		0.842
六塩化ビフェニル	1	0.549	0.549	0.549		0.549
七塩化ビフェニル	0		0	0		
八塩化ビフェニル	0		0	0		
九塩化ビフェニル	0		0	0		
十塩化ビフェニル	0		0	0		
HCB	0		0	0		
α -HCH	0		0	0		
β -HCH	0		0	0		
γ -HCH	0		0	0		
δ -HCH	0		0	0		
p,p'-DDT	5	0.383	0.613	0.071	0.221	0.304
o,p'-DDT	0		0	0		
p,p'-DDE	7	0.469	0.789	0.056	0.270	0.358
o,p'-DDE	0		0	0		
p,p'-DDD	1	0.561	0.561	0.561		0.561
o,p'-DDD	0		0	0		
全DDTs	7	0.449	0.801	0.049	0.294	0.314
α -7-クロル	0		0	0		
α -7-クロルエポキシド	0		0	0		
ディルドリン	1	1.096	1.096	1.096		1.096
trans-7-クロル	0		0	0		
cis-7-クロル	0		0	0		
オキソ7-クロル	1	0.387	0.387	0.387		0.387
trans-7-クロル	0		0	0		
cis-7-クロル	0		0	0		
平均		0.592				
幾何平均		0.554				
標準偏差		0.251				

表4 PCB及び有機塩素系農薬のカエルと卵の存在量比(卵/カエル)

物質名	n	平均	最大	最小	標準偏差	幾何平均
塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
二塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
三塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
四塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
五塩化ビフェニル	1	2.047	2.047	2.047	-	2.047
六塩化ビフェニル	1	1.334	1.334	1.334	-	1.334
七塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
八塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
九塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
十塩化ビフェニル	0	-	-	-	-	-
HCB	0	-	-	-	-	-
α-HCH	0	-	-	-	-	-
β-HCH	0	-	-	-	-	-
γ-HCH	0	-	-	-	-	-
δ-HCH	0	-	-	-	-	-
p,p'-DDT	5	1.710	3.934	0.196	1.401	1.176
o,p'-DDT	0	-	-	-	-	-
p,p'-DDE	7	2.005	5.600	0.154	1.840	1.215
o,p'-DDE	0	-	-	-	-	-
p,p'-DDD	1	1.844	1.844	1.844	-	1.844
o,p'-DDD	0	-	-	-	-	-
全DDTs	7	1.910	5.322	0.135	1.764	1.065
ヘプタクロル	0	-	-	-	-	-
ヘプタクロルエポキシド	0	-	-	-	-	-
ディルドリン	1	4.227	4.227	4.227	-	4.227
trans-クロルデン	0	-	-	-	-	-
cis-クロルデン	0	-	-	-	-	-
特種クロルデン	1	0.943	0.943	0.943	-	0.943
trans-ノタクロル	0	-	-	-	-	-
cis-ノタクロル	0	-	-	-	-	-
平均		2.002				
幾何平均		1.840				
標準偏差		0.974				

表 5-1 カエルのダイオキシン類 (コプラナー-PCB 含む) 濃度 (湿重量換算)

(pg/g wet)													
試料名	山田3	山田5	山田10	山田12	山田17	田代13	田代15	田代19	小敷1	小敷15			
地域	山田線地	山田線地	山田線地	山田線地	山田線地	田代	田代	田代	小敷	小敷			
紅は覆膜	YA	YA	YA	NA	NA	YA	YA	YA	NA	NA			
体長 mm	76	78	75	67	72	88	79	90	66	68			
体重 g	26.8	25.1	24.8	15.2	22.6	40.3	40.4	49.6	21.9	22.3			
脂肪含量 %	1.25	1.72	0.84	0.81	1.09	1.33	1.24	1.65	0.86	0.84			
2,3,7,8-T4CDD	0.2	0.2	0.21	0.1	0.1	0.19	0.16	0.18	0.1	0.1			
1,3,6,8-T4CDD	2	2.1	2.1	0.6	1.5	1.7	2.7	2.1	51	9.2			
1,3,7,9-T4CDD	0.17	0.3	0.24	0.025	0.2	0.05	0.26	0.23	5.4	0.3			
その他のT4CDDs	0.12	0.1	0.11	0.025	0.2	0.06	0.14	0.12	0.4	0.025			
1,2,3,7,8-P5CDD	0.65	0.9	0.74	0.4	0.5	0.62	0.66	0.72	1.7	0.5			
その他のP5CDDs	0.72	1	1.1	0.3	0.7	0.59	1.1	1	4.5	0.7			
1,2,3,4,7,8-H6CDD	0.5	0.8	0.5	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6	0.9	0.4			
1,2,3,6,7,8-H6CDD	0.6	1.1	0.9	0.5	0.6	0.9	0.9	0.9	1.9	0.6			
1,2,3,7,8,9-H6CDD	0.05	0.05	0.3	0.05	0.05	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2			
その他のH6CDDs	0.5	0.9	0.9	0.2	0.7	0.6	0.9	0.7	1	0.9			
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	1.3	2.2	2.4	0.9	1.4	1.9	1.5	1.4	10	1.8			
その他のH7CDD	0.3	0.3	0.6	0.05	0.6	0.3	0.6	0.2	2.6	0.4			
O8CDD	3.9	6	7.7	4.2	7.7	3.8	9.9	2.5	99	13			
2,3,7,8-T4CDF	1.3	1.9	1.6	0.6	1	1	1.1	1	0.3	0.4			
1,3,6,8-T4CDF	0.55	0.7	0.65	0.3	0.6	0.05	0.56	0.47	0.1	0.2			
その他のT4CDFs	1.5	3.4	5.4	0.6	1.2	1.6	3.3	3.6	2.3	0.7			
1,2,3,7,8-P5CDF	1.1	1.4	1.5	0.8	1	1.1	1	1	0.5	0.6			
2,3,4,7,8-P5CDF	2.1	3.1	2.7	1.2	1.7	2	1.9	2.1	1.1	1.1			
その他のP5CDFs	5.4	11	11	3.1	5.5	6.7	7.8	7.9	2.6	3.3			
1,2,3,4,7,8-H6CDF	1	1.8	1.3	0.9	1.2	1.4	1.1	1.2	8	1.5			
1,2,3,6,7,8-H6CDF	0.6	1.1	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.8	1	0.6			
1,2,3,7,8,9-H6CDF	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1			
2,3,4,6,7,8-H6CDF	0.7	1.5	1	0.5	0.8	1.2	1.1	1.1	0.8	0.6			
その他のH6CDFs	1.9	3.7	3.5	1.4	2.3	4.4	2.8	3.1	2.5	1.9			
1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	0.5	0.7	0.9	0.5	1	0.7	0.7	0.6	2.4	1			
1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1.2	0.3			
その他のH7CDFs	0.2	0.2	0.4	0.2	0.5	0.4	0.4	0.2	2.5	1.4			
O8CDF	0.1	0.1	0.4	0.1	0.6	0.3	0.5	0.1	3.2	0.9			
Co-PCBs													
3,4,4',5'-T4CB	1.5	1.8	0.2	0.8	1.7	1.6	1.5	1.7	0.9	0.6			
3,3',4,4'-T4CB	0.5	0.8	1.7	0.7	1.4	0.7	0.8	0.6	0.7	0.7			
3,3',4,4',5-P5CB	9.2	10	11	4.8	8.3	9.8	8.6	10	4.5	4			
3,3',4,4',5,5'-H6CB	8.6	4.3	5.3	2.6	3.8	3.6	3.4	4.1	2.1	1.8			
2',3,4,4',5-P5CB	5	4	8	4	6	4	3	3	3	2			
2,3',4,4',5-P5CB	130	200	180	54	110	150	130	130	68	52			
2,3,4,4',5-P5CB	2	2	3	2	3	1	2	2	2	2			
2,3,3',4,4'-P5CB	21	25	29	14	27	20	15	14	14	14			
2,3',4,4',5,5'-H6CB	33	40	46	26	38	26	24	24	18	20			
2,3,3',4,4',5-H6CB	34	36	43	24	36	24	25	30	16	19			
2,3,3',4,4',5'-H6CB	11	15	20	10	15	9	9	9	5	7			
2,3,3',4,4',5,5'-H7CB	13	16	18	12	17	10	10	13	9	8			
総PCDD	11.0	16.0	17.8	7.7	14.7	11.5	19.6	11.0	178.9	27.5			
総PCDF	12.1	30.8	31.5	11.1	18.4	21.8	23.1	23.3	28.6	14.6			
総PCDD/DF	23.1	46.7	49.3	18.7	33.0	33.3	42.7	34.3	207.5	42.1			
総Co-PCB	269.8	354.9	375.2	154.9	267.2	259.7	232.9	241.4	143.2	131.1			
総ダイオキシン類	291.9	401.6	424.5	173.6	300.2	293.0	275.0	275.7	350.7	173.2			
WHO-TEF: Toxicity Equivalency Factor (WHO,1998) の哺乳類を適用													
定量下限値未満の場合は定量下限値の 1/2 とした													
YEQ (pg-TEQ/g wet)	山田3	山田5	山田10	山田12	山田17	田代13	田代15	田代19	小敷1	小敷15	平均	最大	最小
PCDD(WHO-TEF)	0.978	1.318	1.145	0.594	0.720	0.999	1.006	1.094	2.230	0.739	1.082	2.230	0.594
PCDF(WHO-TEF)	1.481	2.268	1.925	0.926	1.301	1.513	1.418	1.527	1.631	0.913	1.490	2.268	0.913
DXN(WHO-TEF)	2.459	3.585	3.070	1.520	2.020	2.512	2.424	2.621	3.861	1.652	2.572	3.861	1.520
Co-PCB12	0.997	1.095	1.211	0.533	0.912	1.052	0.928	1.078	0.492	0.440	0.874	1.211	0.440
DXN(WHO-TEF)+Co-PCB12	3.456	4.680	4.281	2.053	2.932	3.564	3.352	3.699	4.353	2.092	3.446	4.680	2.053

表 5-2 カエルのダイオキシン類 (コプラナー-PCB 含む) 濃度 (脂肪換算)

試料名	山田3	山田5	山田10	山田12	山田17	田代13	田代15	田代19	(pg/g fat)	
									小敷1	小敷2
紅肌塩類	YA	YA	YA	NA	NA	YA	YA	YA	NA	
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	田代	田代	小敷	
紅肌塩類	YA	YA	YA	NA	NA	YA	YA	YA	NA	
体長 mm	76	78	75	67	72	83	79	90	66	
体重 g	26.8	25.1	24.6	15.2	22.6	40.3	40.4	49.6	21.9	
脂肪含量 %	1.25	1.72	0.84	0.81	1.09	1.33	1.24	1.65	0.86	
2,3,7,8-T4CDD	16	12	25	12	9	14	13	11	12	
1,3,6,8-T4CDD	160	122	250	74	138	128	218	127	5930	
1,3,7,9-T4CDD	14	17	29	3	18	4	21	14	628	
その他のT4CDDs	10	6	13	3	18	5	11	7	47	
1,2,3,7,8-P5CDD	52	52	88	49	46	47	53	44	198	
その他のP5CDDs	58	58	131	37	64	44	89	61	523	
1,2,3,4,7,8-H6CDD	40	47	60	37	37	38	40	36	105	
1,2,3,6,7,8-H6CDD	48	64	107	62	55	68	73	55	221	
1,2,3,7,8,9-H6CDD	4	3	36	6	5	23	24	18	47	
その他のH6CDDs	40	52	107	25	64	45	73	42	116	
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	104	128	286	111	128	143	121	85	1163	
その他のH7CDD	24	17	71	6	55	23	48	12	302	
O8CDD	312	349	917	519	706	286	798	152	11512	
2,3,7,8-T4CDF	104	110	214	74	92	75	89	61	85	
1,3,6,8-T4CDF	44	41	77	37	55	4	45	28	12	
その他のT4CDFs	120	198	643	74	110	120	266	218	267	
1,2,3,7,8-P5CDF	88	81	179	99	92	83	81	61	58	
2,3,4,7,8-P5CDF	168	180	321	148	156	150	153	127	128	
その他のP5CDFs	432	640	1310	383	505	504	629	479	302	
1,2,3,4,7,8-H6CDF	80	105	155	111	110	105	89	73	930	
1,2,3,6,7,8-H6CDF	48	64	83	86	73	60	56	48	116	
1,2,3,7,8,9-H6CDF	8	6	12	12	9	8	8	6	12	
2,3,4,6,7,8-H6CDF	56	87	119	62	73	90	89	67	93	
その他のH6CDFs	152	215	417	173	211	331	226	188	291	
1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	40	41	107	62	92	53	56	36	279	
1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	4	3	12	5	5	4	4	3	140	
その他のH7CDFs	16	12	48	25	46	30	32	12	291	
O8CDF	8	6	48	12	55	23	40	6	372	
Co-PCBs										
3,4,4',5'-T4CB	120	105	24	99	156	120	121	103	105	
3,3',4,4'-T4CB	40	47	202	86	128	53	65	36	81	
3,3',4,4',5'-P5CB	736	581	1310	593	761	737	694	606	523	
3,3',4,4',5,5'-H6CB	288	250	631	321	349	271	274	248	244	
2',3,4,4',5-P5CB	400	233	952	494	550	301	242	182	349	
2,3',4,4',5-P5CB	10400	11628	22619	6667	10092	11278	10484	7879	7907	
2,3,4,4',5-P5CB	160	116	357	247	275	75	161	121	233	
2,3,3',4,4'-P5CB	1680	1453	3452	1728	2477	1504	1210	848	1628	
2,3',4,4',5,5'-H6CB	2640	2326	5476	3210	3486	1955	1935	1455	2093	
2,3,3',4,4',5-H6CB	2720	2093	5119	2963	3303	1805	2016	1818	1860	
2,3,3',4,4',5'-H6CB	860	872	2381	1235	1376	677	726	545	581	
2,3,3',4,4',5,5'-H7CB	1040	930	2143	1481	1560	752	806	788	1047	平均
総PCDD	881	927	2119	944	1344	865	1582	664	20802	最大
総PCDF	1366	1788	3744	1364	1683	1639	1864	1413	3326	最小
総PCDD/F	2249	2715	5863	2309	3028	2505	3446	2077	24128	3341
総Co-PCB	21104	20634	44667	19123	24514	19526	18734	14630	16651	20802
総ダイオキシン類	23353	23349	50530	21432	27541	22031	22180	16707	40779	5664
										1993
										3744
										1364
										2077
										5333
										24128
										2077
										21519
										44667
										14630
										16707

表 6-1 卵のダイオキシン類 (コプラナー-PCB 含む) 濃度 (質量換算)

(pg/g wet)													
検体	山田3	山田5	山田10	山田12	山田17	田代13	田代15	田代19	小敷1	小敷15			
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	田代	田代	小敷	小敷			
種類	YA	YA	YA	NA	NA	YA	YA	YA	NA	NA			
卵塊重量 g	12.49	14.69	13.48	9.02	11.59	22.36	23.23	22.38	13.90	13.49			
2,3,7,8-T ₄ CDD	0.7	0.6	0.5	1.2	0.7	0.23	0.27	0.34	1.1	1.0			
1,3,6,8-T ₄ CDD	6.7	5.0	6.8	11	7.5	3.8	4.0	4.4	230	220			
1,3,7,9-T ₄ CDD	0.4	0.8	0.5	0.5	0.5	0.34	0.44	0.67	20	2.0			
その他のT ₄ CDDs	0.4	0.3	0.2	0.9	0.7	0.14	0.16	0.22	1.1	0.7			
1,2,3,7,8-P ₅ CDD	2.0	2.1	1.9	3.7	2.4	0.93	0.94	1.1	14	4.5			
その他のP ₅ CDDs	2.0	2.4	1.6	8.5	2.5	1.1	1.3	1.8	16	11			
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDD	1.0	1.3	1.1	2.2	1.7	0.7	0.7	0.8	4.1	3.4			
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDD	1.6	2.1	1.8	3.2	2.4	0.9	1.0	1.1	11	5.2			
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDD	0.5	0.7	0.4	1.0	0.7	0.3	0.3	0.4	1.6	1.8			
その他のH ₆ CDDs	1.2	1.1	0.9	2.2	1.6	0.6	0.7	1.1	1.9	2.1			
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDD	1.6	1.8	2.3	4.1	2.8	0.9	0.8	1.2	18	5.5			
その他のH ₇ CDD	0.2	0.1	0.3	0.4	0.3	0.1	0.05	0.1	1.0	0.4			
OCDD	3.0	2.7	4.3	10	3.8	1.2	0.9	1.3	78	13			
2,3,7,8-T ₄ CDF	5.1	5.3	4.5	8.9	5.2	1.6	1.7	2.1	3.6	6.2			
1,3,6,8-T ₄ CDF	2.4	2.2	1.8	5.0	3.1	0.79	1.1	1.1	1.1	2.2			
その他のT ₄ CDFs	13	17	8.5	15	12	4.9	5.5	7.2	14	15			
1,2,3,7,8-P ₅ CDF	2.9	3.0	2.5	5.7	3.8	1.1	1.3	1.5	3.8	5.3			
2,3,4,7,8-P ₅ CDF	5.8	6.6	5.2	11	7.9	2.5	2.8	3.3	8.4	11			
その他のP ₅ CDFs	22	30	15	34	25	9.1	11	13	25	42			
1,2,3,4,7,8-H ₆ CDF	2.2	3.3	1.9	5.3	4.1	1.4	1.3	1.4	41	8.6			
1,2,3,6,7,8-H ₆ CDF	1.3	1.6	1.2	3.7	2.7	0.6	0.7	0.8	5.4	3.7			
1,2,3,7,8,9-H ₆ CDF	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.025	0.025	0.025	0.2	0.3			
2,3,4,6,7,8-H ₆ CDF	1.7	2.4	1.4	3.6	2.7	0.9	1.1	1.2	3.3	4.2			
その他のH ₆ CDFs	6.0	7.7	4.1	15	9.4	3.1	3.0	4.2	15	16			
1,2,3,4,6,7,8-H ₇ CDF	0.7	0.7	0.7	2.5	1.5	0.4	0.3	0.5	5.3	2.3			
1,2,3,4,7,8,9-H ₇ CDF	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.05	0.05	0.05	4.3	0.9			
その他のH ₇ CDFs	0.1	0.1	0.2	1.2	0.6	0.1	0.1	0.1	7.5	1.5			
OCDF	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.1	0.1	0.1	5.2	1.3			
Co-PCB													
3,4,4',5'-T ₄ CB(#81)	6.4	5.4	9.4	12	8.4	2.2	2.8	2.9	7.3	10			
3,3',4,4'-T ₄ CB(#77)	2.4	3	3.6	8.1	6.6	1	1.3	1.3	2.3	3.9			
3,3',4,4',5'-P ₅ CB(#126)	25	22	30	55	34	9.1	12	13	35	51			
3,3',4,4',5,5'-H ₆ CB(#169)	7.8	6.9	9.4	19	15	2.9	4.1	4.3	13	19			
2',3,4,4',5'-P ₅ CB(#123)	17	12	24	56	24	4	4	5	22	27			
2,3',4,4',5'-P ₅ CB(#118)	490	510	560	920	500	180	180	220	630	850			
2,3,4,4',5'-P ₅ CB(#114)	9	7	13	25	14	3	3	4	14	16			
2,3,3',4,4'-P ₅ CB(#105)	110	81	99	280	150	28	25	31	150	190			
2,3',4,4',5,5'-H ₆ CB(#167)	58	53	72	170	94	16	19	23	100	160			
2,3,3',4,4',5'-H ₆ CB(#156)	87	75	95	250	130	26	27	37	140	210			
2,3,3',4,4',5'-H ₆ CB(#157)	32	25	37	90	46	9	9	11	48	55			
2,3,3',4,4',5,5'-H ₇ CB(#189)	24	20	32	73	48	8	10	12	43	61			
総PCDD	21.30	21.00	22.60	43.90	27.60	11.24	11.56	14.53	397.80	270.60	平均	最大	最小
総PCDF	63.60	80.30	47.40	111.75	78.50	26.67	30.08	36.58	143.10	120.50	73.8	397.8	11.2
総PCDD/DF	84.9	101.3	70.0	155.7	106.1	37.9	41.6	51.1	540.9	391.1	158.1	143.1	26.7
総Co-PCB	868.60	820.30	984.40	1958.10	1070.00	289.20	297.20	364.50	1204.60	1664.90	952.2	1958.1	37.9
総ダイオキシン類	953.50	921.60	1054.40	2113.75	1176.10	327.11	338.84	415.61	1745.50	2056.00	1110.2	2113.8	327.1

表 6-2 卵のダイオキシン類 (コプラナーPCB 含む) 濃度 (脂肪換算)

(pg/g fat)										
検体	山田3	山田5	山田10	山田12	山田17	田代13	田代15	田代19	小敷1	小敷15
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	田代	田代	小敷	小敷
国産	YA	YA	YA	NA	NA	YA	YA	YA	NA	NA
卵塊重量 g	12.49	14.69	13.48	9.02	11.59	22.36	23.23	22.38	13.9	13.49
2,3,7,8-T4CDD	13	11	9	21	13	4	5	6	20	18
1,3,6,8-T4CDD	120	89	122	197	134	68	72	79	4114	3936
1,3,7,9-T4CDD	7	14	9	9	9	6	8	12	358	36
その他のT4CDDs	7	5	4	16	13	3	3	4	20	13
1,2,3,7,8-P5CDD	36	38	34	66	43	17	17	20	250	81
その他のP5CDDs	36	43	29	63	45	20	23	32	286	197
1,2,3,4,7,8-H6CDD	18	23	20	39	30	13	13	14	73	61
1,2,3,6,7,8-H6CDD	29	38	32	57	43	16	18	20	197	93
1,2,3,7,8,9-H6CDD	9	13	7	16	13	5	5	7	29	32
その他のH6CDDs	21	20	16	39	29	11	13	20	34	38
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	29	32	41	73	50	16	14	21	322	98
その他のH7CDD	4	2	5	7	5	2	1	2	18	7
OCDD	54	48	77	179	68	21	16	23	1395	233
2,3,7,8-T4CDF	91	95	81	159	93	29	30	38	64	111
1,3,6,8-T4CDF	43	39	32	89	55	14	20	20	20	39
その他のT4CDFs	233	304	152	268	215	88	98	129	250	268
1,2,3,7,8-P5CDF	52	54	45	102	68	20	23	27	68	95
2,3,4,7,8-P5CDF	104	118	93	197	141	45	50	59	150	197
その他のP5CDFs	394	537	268	608	447	163	197	233	447	751
1,2,3,4,7,8-H6CDF	39	59	34	95	73	25	23	25	733	154
1,2,3,6,7,8-H6CDF	23	29	21	66	48	11	13	14	97	66
1,2,3,7,8,9-H6CDF	1	1	1	1	1	0	0	0	4	5
2,3,4,6,7,8-H6CDF	30	43	25	64	48	16	20	21	59	75
その他のH6CDFs	107	138	73	268	168	55	54	75	268	286
1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	13	13	13	45	27	7	5	9	95	41
1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	2	2	2	5	4	1	1	1	77	16
その他のH7CDFs	2	2	4	21	11	2	2	2	134	27
OCDF	4	4	4	9	4	2	2	2	93	23
Co-PCB(pg/g)										
3,4,4',5'-T4CB(#81)	114	97	168	215	150	39	50	52	131	179
3,3',4,4'-T4CB(#77)	43	54	64	145	118	18	23	23	41	70
3,3',4,4',5'-P5CB(#126)	447	394	537	984	608	163	215	233	626	912
3,3',4,4',5',5'-H6CB(#169)	140	123	168	340	268	52	73	77	233	340
2,3,3',4,4',5'-P5CB(#123)	304	215	429	1002	429	72	72	89	394	483
2,3',4,4',5'-P5CB(#118)	8766	9129	10018	16458	8945	3220	3220	3936	11270	15206
2,3,4,4',5'-P5CB(#114)	161	125	233	447	250	54	54	72	250	322
2,3,3',4,4',5'-P5CB(#105)	1968	1449	1771	5009	2683	501	447	555	2683	3399
2,3',4,4',5',5'-H6CB(#167)	1038	948	1288	3041	1682	286	340	411	1789	2862
2,3,3',4,4',5'-H6CB(#156)	1556	1342	1699	4472	2326	465	483	662	2504	3757
2,3,3',4,4',5'-H6CB(#157)	572	447	662	1610	823	161	161	197	859	1168
2,3,3',4,4',5',5'-H7CB(#169)	429	358	572	1306	859	143	179	215	769	1091
総PCDD	381	376	404	785	494	201	207	260	7116	4841
総PCDF	1138	1436	848	1999	1404	477	538	654	2560	2156
総PCDD/DF	1519	1812	1252	2784	1898	678	745	914	9676	6996
総Co-PCB	15538	14674	17610	35029	19141	5174	5317	6521	21549	29784
総ダイオキシン類	17057	16487	18862	37813	21039	5852	6061	7435	31225	36760
									19861	37813
										5852

脂肪分は、有機塩素系農薬原料の平均値5.59%を使用

定量下限値未満の場合は定量下限値の 1/2 とした

表7 ダイオキシン類（コプラナー-PCB含む）のカエルと卵の存在量比（卵／カエル）

コンジェナー	平均	最大	最小	標準偏差	幾何平均
2,3,7,8-T4CDD	3.095	7.121	0.672	2.641	2.166
1,3,6,8-T4CDD	3.856	14.466	0.852	4.766	2.320
1,3,7,9-T4CDD	2.941	11.868	0.973	3.328	2.060
その他のT4CDDs	4.895	21.363	0.657	7.596	2.159
1,2,3,7,8-P5CDD	2.519	5.489	0.689	2.041	1.863
その他のP5CDDs	2.656	9.506	0.680	3.032	1.721
1,2,3,4,7,8-H6CDD	1.985	5.142	0.602	1.631	1.499
1,2,3,6,7,8-H6CDD	1.998	5.243	0.551	1.658	1.464
1,2,3,7,8,9-H6CDD	4.246	11.868	0.555	3.950	2.402
その他のH6CDDs	1.724	6.528	0.447	2.020	1.118
1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	0.926	2.703	0.263	0.793	0.696
その他のH7CDD	0.709	4.747	0.048	1.426	0.301
O8CDD	0.416	1.413	0.052	0.384	0.304
2,3,7,8-T4CDF	3.604	9.376	0.888	3.513	2.353
1,3,6,8-T4CDF	4.254	9.890	1.056	3.432	3.065
その他のT4CDFs	4.822	14.836	0.863	5.026	2.994
1,2,3,7,8-P5CDF	2.174	5.344	0.555	1.872	1.559
2,3,4,7,8-P5CDF	2.457	6.049	0.694	2.135	1.752
その他のP5CDFs	2.921	7.699	0.742	2.739	1.937
1,2,3,4,7,8-H6CDF	1.664	3.495	0.526	1.252	1.285
1,2,3,6,7,8-H6CDF	1.628	3.730	0.416	1.306	1.199
1,2,3,7,8,9-H6CDF	0.484	1.815	0.113	0.576	0.307
2,3,4,6,7,8-H6CDF	1.719	4.273	0.416	1.491	1.230
その他のH6CDFs	2.232	6.358	0.391	2.120	1.461
1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	0.914	2.967	0.246	0.830	0.681
1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	1.395	3.561	0.451	1.017	1.102
その他のH7CDFs	0.804	3.561	0.139	1.103	0.433
O8CDF	0.883	2.967	0.115	0.870	0.564
Co-PCBs					
3,4,4',5-T4CB	5.879	25.754	0.763	7.752	3.039
3,3',4,4'-T4CB	2.307	6.867	0.793	1.803	1.857
3,3',4,4',5-P5CB	2.752	7.713	0.515	2.699	1.784
3,3',4,4',5,5'-H6CB	2.122	6.385	0.447	2.051	1.406
2',3,4,4',5-P5CB	3.026	8.308	0.555	2.979	1.987
2,3',4,4',5-P5CB	3.532	10.110	0.666	3.725	2.176
2,3,4,4',5-P5CB	2.968	7.418	0.863	2.128	2.377
2,3,3',4,4'-P5CB	3.870	11.868	0.777	3.779	2.565
2,3',4,4',5,5'-H6CB	1.721	4.839	0.341	1.682	1.120
2,3,3',4,4',5-H6CB	2.569	6.686	0.556	2.509	1.659
2,3,3',4,4',5'-H6CB	2.366	6.093	0.551	2.321	1.527
2,3,3',4,4',5,5'-H7	1.671	4.613	0.417	1.513	1.171
平均	2.468				
標準偏差	1.282				
幾何平均	2.103				

表 8 土壌、カエル及び卵のダイオキシン類の TCDD 当量濃度 (pg-TEQ/g)

土壌	山田緑地 (n=15)		田代 (n=2)	小敷 (n=2)
	平均	幾何平均		
PCDD/DF	28.38	14.84	1.15	9.70
Co-PCB	1.33	0.87	0.11	0.30
PCDD/DF+Co-PCB	29.72	16.04	1.25	10.19
ヤマアカガエル オス	山田緑地 (n=10)		田代 (n=11)	
	平均	幾何平均	平均	幾何平均
PCDD/DF	3.46	3.39	3.26	3.20
Co-PCB	2.12	2.09	1.97	1.89
PCDD/DF+Co-PCB	5.58	5.50	5.23	5.13
ヤマアカガエル メス	山田緑地 (n=10)		田代 (n=9)	
	平均	幾何平均	平均	幾何平均
PCDD/DF	2.23	1.99	1.88	1.77
Co-PCB	0.98	0.88	0.93	0.78
PCDD/DF+Co-PCB	3.21	2.88	2.80	2.59
ニホンアカガエル オス	山田緑地 (n=10)		小敷 (n=10)	
	平均	幾何平均	平均	幾何平均
PCDD/DF	4.13	4.01	3.61	3.28
Co-PCB	2.21	2.17	1.89	1.65
PCDD/DF+Co-PCB	6.35	6.19	5.50	4.99
ニホンアカガエル メス	山田緑地 (n=10)		小敷 (n=10)	
	平均	幾何平均	平均	幾何平均
PCDD/DF	1.26	1.13	1.61	1.45
Co-PCB	0.54	0.49	0.47	0.45
PCDD/DF+Co-PCB	1.79	1.62	2.08	1.91
卵	山田緑地 (n=5)	田代 (n=3)	小敷 (n=2)	
	PCDD/DF	8.51	3.46	19.84
	Co-PCB	3.42	1.21	4.60
	PCDD/DF+Co-PCB	11.96	4.67	24.89

WHO-TEF: Toxicity Equivalency Factor (WHO, 1998) の哺乳類を適用

定量下限値未満の場合は定量下限値の 1/2 とした

平均、幾何平均の記述のないものは、幾何平均値である。

表 9-1 山田緑地内でのダイオキシン類の動態

(pg-TEQ/g)

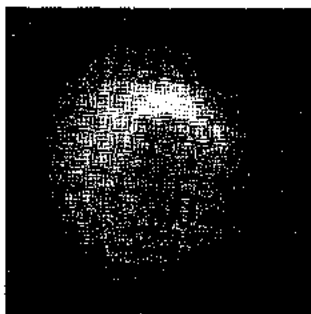
試料	PCDD/DF	Co-PCB	PCDD/DF+Co-PCB
土壌	14.84	0.87	16.04
カエル (オス)	3.70	2.13	5.85
卵	8.51	3.42	11.96

卵は、WHO-TEF: Toxicity Equivalency Factor (WHO, 1998) の哺乳類を適用

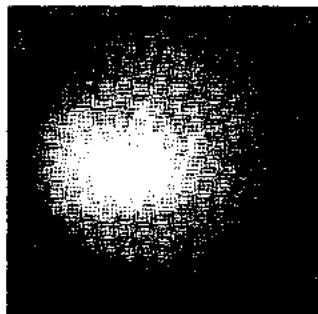
定量下限値未満の場合は定量下限値の 1/2 とした

表 9-2 山田緑地内での土壌に対するカエル及び卵の比率

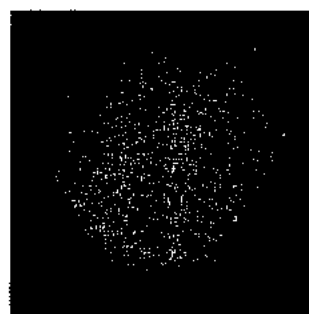
試料	PCDD/DF	Co-PCB	PCDD/DF+Co-PCB
土壌	1	1	1
カエル (オス)	0.25	2.45	0.36
卵	0.57	3.93	0.75



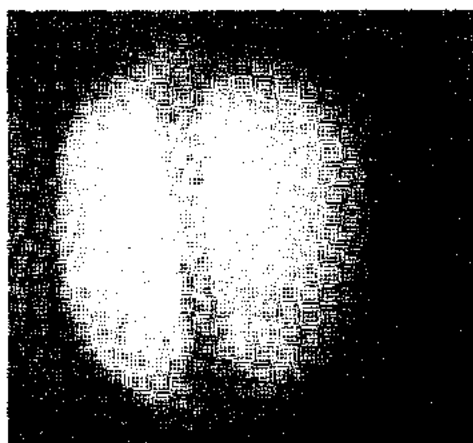
St. 10 植物極側



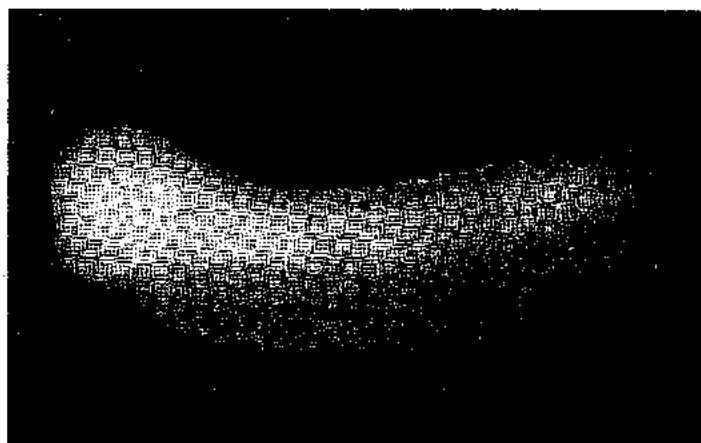
St. 12 側面



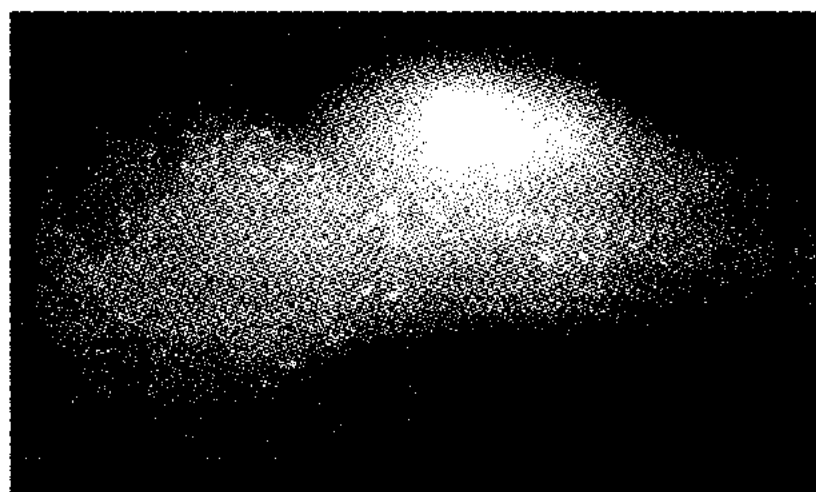
St. 12 植物極側



St. 20 側面

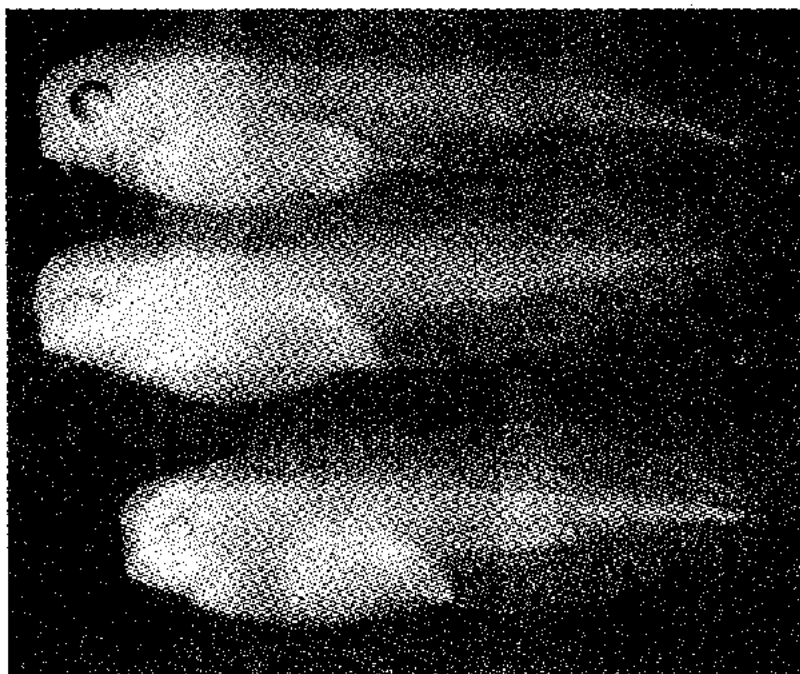


St.31 側面

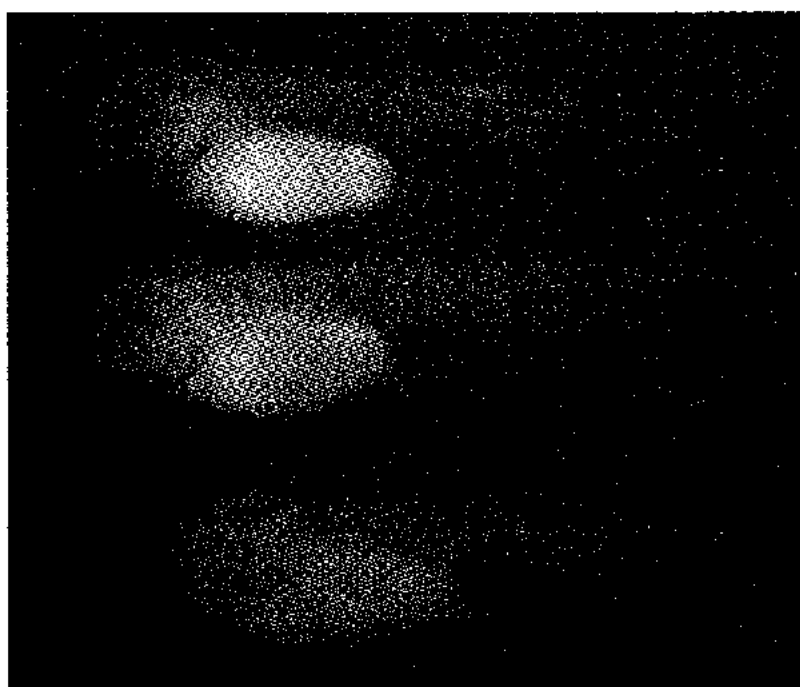


St. 41 頭部背側

図 5



Tadpoles: 光学顕微鏡



Tadpoles: 蛍光顕微鏡

図 6

12. 内分泌攪乱化学物質等の試験に用いるメダカ系統の (d-rR 改良型 および透明メダカの) 開発に関する研究

研究者 若松 佑子 (名古屋大学生物分子応答研究センター助教授)

研究要旨

内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を評価する試験動物として従来から用いられてきた d-rR 系統を改良し、性の判別が発生の初期に、確実にできる系統を作製した。また初期胚から成魚に至る成長の過程で外部から内臓が透視できる透明メダカを作製した。これらの系統が内分泌攪乱化学物質の試験に有用であるかどうかを検討している。

研究者協力者

尾里健二郎 (名古屋大学生物分子応答研究センター教授)

A. 研究目的

メダカは内分泌攪乱化学物質など多様な化学物質の研究および試験において世界中の研究機関で広く用いられている魚類の試験動物である。またメダカは、OECD 魚類専門家会議の提案になるほとんど全ての試験法 (稚魚成長試験、繁殖試験、性転換試験、初期生活段階毒性試験、全生涯試験) において有効である、とりわけ生殖に関わる試験法については最適な試験モデルであると評価されている。しかし、試験の効率化を図るためには、それぞれの試験法に適した系統が必要である。本研究はより有効性の高い試験用メダカ系統を開発し、内外の研究機関に供給することを目的として計画されたものである。

本研究では a) 生殖関連試験のために有効な系統、b) 外部から内臓が透視できる透明メダカの系統の二つを開発する。a) 生殖関連の試験では、試験動物の遺伝的性が化学物質に暴露する前に判別できれば、試験の効率や結果の確実性は格段に向上する。これまでの d-rR 系統では遺伝的性の判別は孵化後 2 週間にならないと出来なかったが、本研究では受精後 2 日の胚で判別が可能で、DNA マーカーによっても性を確認できる系統を開発する。b) 内臓を外部から透視することが出来れば、

化学物質の影響を時間を迫いながら観察することが可能になる。また試験動物を殺さなくてもすむ点でも利便性が大きい。本研究ではいくつかの色素細胞欠損突然変異の交配によって、体表および腹膜に色素細胞のない透明性の高いメダカの系統を作出する。

B. 研究方法

a) d-rR 型の改良

現在、性転換試験で広く用いられているのは d-rR 系統である。この系統の長所は体色 (雄は黄色素細胞をもつ、雌はもたない) によって遺伝的な性の判別が出来ることである。しかし、この体色は孵化後 10 日頃からしか発現しないので、雌雄の判別が遅れることになる。

最近、われわれが開発した FLF 系統では受精後の 2 日胚で雄に白色素細胞が発現する (雌には発現しない) ことで、この時期に遺伝的な性の判定が可能である。これらの黄および白色素細胞は Y 染色体上にあるが、X と Y 染色体の交差によって雌雄の判別にはいくつかの誤差が生じる。この誤差は d-rR 系統で 0.3%、FLF 系統で 4% であって、FLF 系統の短所はこの誤差の大きいことである。そこで本研究ではこの二つの系統を用いて雌雄判別が胚期に可能な d-rR 系統の改良型を開発することにした。この二つの系統を 6 世代交配することによって樹立する。

b) 透明メダカの開発

メダカやゼブラフィッシュの胚は透明性が

高いので体の内部を顕微鏡などで容易に観察できる。これらの小型魚類が脊椎動物の発生の研究に好んで用いられている理由である。しかし、胚発生の後期になると、皮膚や腹膜に各種の色素をもった色素細胞が現れ、内部臓器の観察は不可能になる。そこで本研究では、これらの色素（主にメラニンとグアニン）がごく少ない系統を開発する。このような系統ができれば稚魚期、成魚期を通して内部臓器の観察が外部から可能になる。各種の色素欠陥突然変異の交配を繰り返し行う方法によって、目的の系統を確立する。

（倫理面への配慮：魚類に関しては特別な規制はないので動物実験において常識とされる配慮を行っている。）

C. 研究結果

a) d-rR の改良型の作製

この改良型系統は二つの色素細胞マーカーにより性判別が可能である。受精後2日胚で雄では白色素細胞が分化するが、雌では分化が見られない。孵化後2週間で雄では黄色素細胞が体表に分化してくる。このように性判別を胚と孵化期の二つの発生段階で行うことが出来る。胚期の判別は白色素細胞に関してX染色体とY染色体の交叉が4%程度あるために、その分だけ誤差がでる。しかし、この誤差は孵化後の判別によって修正することができる。黄色素細胞に関する交叉は0.3%と、ごく少ないからである。

b) 透明メダカの作製

この系統では黒色素細胞、黄色素細胞、白色素細胞、虹色素細胞の多くが分化してこない。特に腹膜にメラニン、グアニンなどの色素が無いために、内臓が透視できる。脳、脊髄、鰓、心臓、血管、肝臓、腸、浮き袋、精巣、卵巣、脾臓などの諸器官が外側から観察できる。

D. 考察

研究は計画通りに進行し目標を達成することが出来た。作製された試験動物はすでにい

くつかの研究機関で使用されている。透明メダカは実験動物の世界で画期的な成果となった。今後、これらの系統の形質が長期にわたって安定的に維持されるかどうか、今後の問題である。

E. 結論

a) 二つの系統は作製されたばかりで、成長や繁殖などの動物学的特性については未だ明らかになっていない。安定した試験動物として系統化できるかどうかについて研究が必要である。

b) 内分泌攪乱化学物質に対する感受性がどの程度あるか、高いか、低いか、についてのテストが必要である。

c) 性判別の誤差を完全に無くするために、性染色体特異的 DNA マーカーの導入を考慮する。

d) 透明メダカの特性を生かして、GFP 遺伝子を導入したトランスジェニック系統を作製する展望が開けた。例えば、生殖組織だけが光る系統を作るなどである。

これらの課題は次年度に行う予定である。

F. 研究発表

論文発表 なし

学会発表

1. 尾里建二郎 内分泌攪乱化学物質の試験動物としてのメダカ内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム 1999 年 12 月 9-11 日、神戸国際会議場
2. 若松佑子、松山誠、酒泉満、尾里建二郎 内分泌攪乱化学物質の試験のための新しいメダカ系統の開発：d-rR 系統の改良型とシースルー系統、日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会 1999 年 12 月 9-10 日、神戸国際会議場
3. Wakamatsu, Y. New medaka strains for endocrine-disrupting substance testing. International Symposium on Endocrine-Disrupting Substance Testing in Medaka. 2000 年 3 月 17-20 日、名古屋国際会議場

13. 魚類を用いた内分泌攪乱化学物質評価法に関する研究

研究者 有園 幸司（熊本県立大学環境共生学部教授）

研究要旨

これまでお互いに情報交換を行い、それぞれ多摩川や東京湾に生息する魚類においても、不妊の雄、雌雄同体魚、産卵行動の異常魚等の生理現象が起きている可能性を示唆してきた。今回、これまでの研究をもとに河川やそれらの河川流入沿岸域の主に魚類を中心とした野生生物の個体群に生殖異常の現象が起きているか評価手法確立を中心とした基礎研究を行った。

研究者協力者

原 彰彦（北海道大学水産学部教授）

中村 将（帝京大学医学部助教授）

井口 泰泉（横浜市立大学理学部教授）

ールド調査を行い、野生生物への環境リスク
手法の確立を目指す。

（倫理面への配慮）

魚類を用いた研究のため倫理面での問題は
ないと判断した。

A. 研究目的

環境保護の促進とその強化の必要性から、
河川やそれらの河川流入沿岸域に生息する主
に魚類を中心とした野生生物の個体群に生殖
異常現象評価手法確立に関する以下調査研究
を行う。

- a) 内分泌攪乱評価に対するバイオマーカー
の検索
- b) 現有するビテログニン抗体を用いたフィ
ールド調査への応用
- c) 現有するビテログニン抗体類の関連魚種
への交差性と新種酵素免疫測定法への応
用
- d) 無脊椎動物及び両生類等への内分泌攪乱
メカニズム解明
- e) 魚や水環境関連生物を用いた内分泌攪乱
評価について、本グループと同様に取り
組んでいる英国グループとの情報交換を
行う。

B. 研究方法

多くの化学物質の海洋及び淡水生物への内
分泌攪乱作用評価のための生殖腺や臓器の発
生に関する基礎研究及び生態系におけるフィ

C. 研究結果

- 1) 内分泌攪乱評価に対するバイオマーカー
の検索：有効抗体の作成

コイ、メダカ、マダイ、マミチヨグのビテ
ログニンにそれぞれ特異的に反応する4種類
のモノクローナル抗体の作成のため、まず各
種魚類ビテログニンに特異的に反応するモノ
クローナル抗体の開発から着手した。この結
果、コイ、メダカ、タイ、マミチヨグのビテ
ログニンにそれぞれ特異的に反応する4種類
のモノクローナル抗体の開発に成功し、さら
にコイ、メダカ、マダイ、マミチヨグのすべ
てに関するビテログニン測定系（ELISA）の
確立に成功した。コイビテログニンキットは
環境庁及び建設省の全国調査に利用され日本
の河川の内分泌攪乱作用状態把握に大いに貢
献することとなった。一方、メダカビテログ
ニンキットは、OECDの魚を用いた化学物質
毒性評価法改定に伴う内分泌攪乱作用評価法
の一部としてメダカを用いた検定法に使用さ
れることが期待されている。さらに水系環境
におけるエストロゲンの影響を調べるため、
海産メダカであるマミチヨグを用い、受精卵

からエストロゲン暴露を行うと、形態異常、骨形成異常、性分化率の変化及び生殖腺の異常を引き起こすことが確認された。そのため、エストロゲンが初期発生段階のどの時期から影響を及ぼすのかエストロゲン受容体のクローニング及び、発生段階と、初期発生でのエストロゲン処理によるエストロゲン受容体 mRNA の発現変化の解析を血漿中ピテロゲニン濃度とともに評価を行った。その結果、発生初期におけるエストロゲンの影響が、エストロゲン受容体を介して起こることが示唆されたことから、室内水槽実験においてピテロゲニン抗体を用いた評価方法に加え、エストロゲン受容体の発現を使用する評価系の基礎を確立できた。

2) 現有するピテロゲニン抗体を用いたフィールド調査への応用

a) コイ、キンギョを用いた淡水フィールド調査への応用

中村・井口・原らは、東京都府中市の北多摩下水処理場から多摩川本流に流れ込むまでの流域に生息するコイを調査した。調査したコイは全長 45-66cm、雌 101 尾、雄 53 尾雌雄同体 1 尾計 155 尾で、雄の半数以上からピテロゲニンが検出された ($10 \mu\text{g/ml}$ 以上で最高 12mg/ml と雌と同じレベル)。さらに精子をほとんど形成していない雄が約 30% 存在した。養殖雄コイピテロゲニンを測定した結果、 $1 \mu\text{g/ml}$ 前後の値を示し、餌の影響を受けている可能性が示唆されたが、直接的な原因物質は現在のところ明確になっていない。

キンギョは、養殖された無処理の 2 年魚を地下水で 1 週間生育させ、ピテロゲニン産生のない雄を対照群とした。これら対照群及び 0.01, 0.1, 1, 100 ppb の 17β -エストラジオール (E2) に 1 ヶ月間曝露したキンギョの血漿中ピテロゲニンを ELISA により測定し、E2 に対するキンギョピテロゲニンの感受性を確認した。(図 1) キンギョの E2 曝露 1 ppb 濃度区において、1 週間曝露でピテロゲニンは誘導されず、1 ヶ月間曝露で最大数 mg/ml 程度誘導された。100 ppb 濃度区においては、1 週

間曝露で数百 mg/ml レベルまで誘導された。さらにキンギョ 14 匹をケージ (D.30cm×W.40cm×H.25cm) に入れ、熊本市内の河川 10 ヶ所に 1 ヶ月間曝露した。曝露後、ELISA による血漿中ピテロゲニン濃度の測定及び Cd-Hem 法による肝臓中メタロチオネイン (MT) 量の測定を行った。(図 2) キンギョを熊本市内の河川 10 ヶ所に 1 ヶ月間曝露したところ、河口域 2 ヶ所ではすべての個体が死亡した。一方、その他 8 ヶ所において雄魚では 2 ヶ所の地点においてピテロゲニンを発現する個体が存在した。雌魚では 8 ヶ所すべての河川においてピテロゲニンを発現する個体が存在した。また、肝臓中 MT 量は河口域近郊の曝露群が高い値を示した。今回測定したキンギョ血漿中ピテロゲニン濃度と、生殖腺指数 (GSI) の間には正の相関関係が認められた。(図 3) 以上のことより、キンギョ血漿中ピテロゲニン濃度及び肝臓 MT 量の分析が水環境中の内分泌攪乱作用及び重金属等の影響を評価する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。今後他のバイオマーカーや機器分析の併用により、内分泌攪乱作用等も含めた水環境の評価系を確立していく予定である。

b) カレイ、ハゼ、マダイを用いた海洋フィールド調査への応用

橋本・原らは、マコガレイの雄から高濃度の雌特異タンパクであるピテロゲニンを検出し、松原らの研究グループもマハゼの調査から大都市周辺の閉鎖的な水域で雄にピテロゲニンが検出される確率が高いことを確認した。

また、筆者らは天然マダイ血漿中ピテロゲニン濃度を調査した。(図 4) 天然マダイ血漿中ピテロゲニン濃度をレベル 1; $0.0097 \mu\text{g/ml}$ 未満、レベル 2; 0.0097 - $0.078 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 3; 0.078 - $0.312 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 4; 0.312 - $1.2 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 5; $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上の 5 段階にレベル分けした。産卵期の天然雌マダイでのみレベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体が多数存在した。天然雄マダイにおいてもピテロゲニンが検出された個体が数例存在し、その

中にレベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体も存在した。

養殖雌マダイにおける血漿中ピテロゲニンを測定した結果 (図 5)、産卵期の養殖雌マダイで、天然雌マダイ同様、レベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体が多数存在した。養殖雄マダイは天然雄マダイよりも高比率でピテロゲニンが検出された個体が存在した。また雌雄同体マダイにおいてもピテロゲニンが検出された個体が存在し、高濃度のピテロゲニンを示す個体も存在した。

3) 現有するピテロゲニン抗体類の関連魚種への交差性と新種酵素免疫測定法への応用

コイピテロゲニン ELISA を化学発光を利用した短時間で簡便な測定法を確立した。測定範囲は 120pg/ml - 500ng/ml でフナ・ウグイの雌血清と交叉性を示し、本測定系は他のコイ科魚種 Vg 測定に有効であることが明らかになった。

4) 無脊椎動物及び両生類等への内分泌攪乱メカニズム解明

多くの種を超えたピテロゲニン抗体を米国 Selcer 博士の協力を得て開発し、すでに無脊椎動物や両生類への応用が可能であることが判明している。さらに、ウミネコの受精卵より卵黄蛋白の主成分であるリポピテリンを精製し、抗体を作製した。(図 6,7) これを用いてマンシーニ法によるピテロゲニンの測定を確立し (図 8)、鳥類への調査に利用されることが期待される。

5) 魚を用いた内分泌攪乱評価について、本グループと同様に取り組んでいる英国のグループとの情報交換を行う

筆者のグループの高橋徹らは以下のスケジュールで英国アストロゼネカ社及び CEFAS の研究グループを訪問し情報交換を行った。

3 月 28 日 関空発 ロンドン着

3 月 30 日 CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture

Science) 訪問

3 月 30 日 Brixham に移動

3 月 31 日 BEL (Beixham Environmental Lab., Astra Zenica) 訪問

4 月 3 日 デンマークを経て帰国

D. 考察

河川の指標魚種としてコイを用い、全国主要河川の調査を環境庁、建設省とも協力して組織学的観察、血中ピテロゲニンの測定を行い、魚類を用いた評価法の基礎を確立した。結果として多摩川や東京湾に生息する魚類に不妊の雄、雌雄同体魚、産卵行動の異常魚等の生理現象が起きていることを見出した。一方、実験室内においても、マミチヨグやメダカを用いて産卵行動や卵の孵化状況を観察することにより内分泌攪乱作用の評価を行う実験系を確立した。本研究で得られた知見から、河川流入域および沿岸域での魚類調査の方向性も打ち出され、現在いくつかの調査が進行中である。今回得られた多くの化学物質の海洋及び淡水生物への内分泌攪乱作用評価のための生殖腺や臓器の発生に関するデータ及び生態系におけるフィールド調査結果は、環境保護の促進とその強化の必要性からも野生生物への環境リスク手法の確立にも大いに寄与できるものであろう。

E. 結論

a) 今後の課題

- (1) 日本の代表的な都市型河川に生息する魚類の生殖系にどのような異常型が出現しているのかを整理する。
- (2) それらの生殖異常にどの環境化学物質が関与しているのか解析する。
- (3) 環境化学物質の生体内での作用機序を実験的に解析する。
- (4) 河川中の環境化学物質を特定し、それらの生体影響の簡易測定法を開発する。

b) 社会的貢献

河川の指標魚種としてコイを用い、全国主要河川の調査を環境庁、建設省とも協力して

組織学的観察、血中ビテロジェニンの測定を行い、魚類を用いた評価法の基礎を確立した。

F. 研究発表

論文発表

1. S. Kitamura, M. Yoshida, K. Sugihara, S. Ohta and A. Hara: Effect of Fenthion on the level of vitellogenin in Goldfish, *Carassius auratus*, J. Health Science, 45 (5), 262-265 (1999) .
2. S. Hashimoto, H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi and K. Fujita: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male Flounder, *Pleuronectes yokohamae*, in Tokyo bay, Japan, Marine Environ. Res., 48 (1), 1-17 (2000) .
3. H. Bessho, S. Iwakami, N. Hiramatsu, A. Hara and S. Hashimoto: Developmental of a sensitive luminometric immunoassay for determining baseline seasonal changes in serum vitellogenin levels in male Flounder, *Pleuronectes yokohamae*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 00, 1-12 (1999) .
4. M. Kobayasi et al.: Effects of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*, Fisheries Sci., in press (1999) .
5. Sohn, Y. C., et al.: Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin in the goldfish, *Carassius auratus*, Gen. Com. Endocrinol., 113, 436-444 (1999) .
6. M. Kobayasi et al.: 11-Ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*, Gen. Com. Endocrinol., 115, 178-187 (1999) .

学会発表

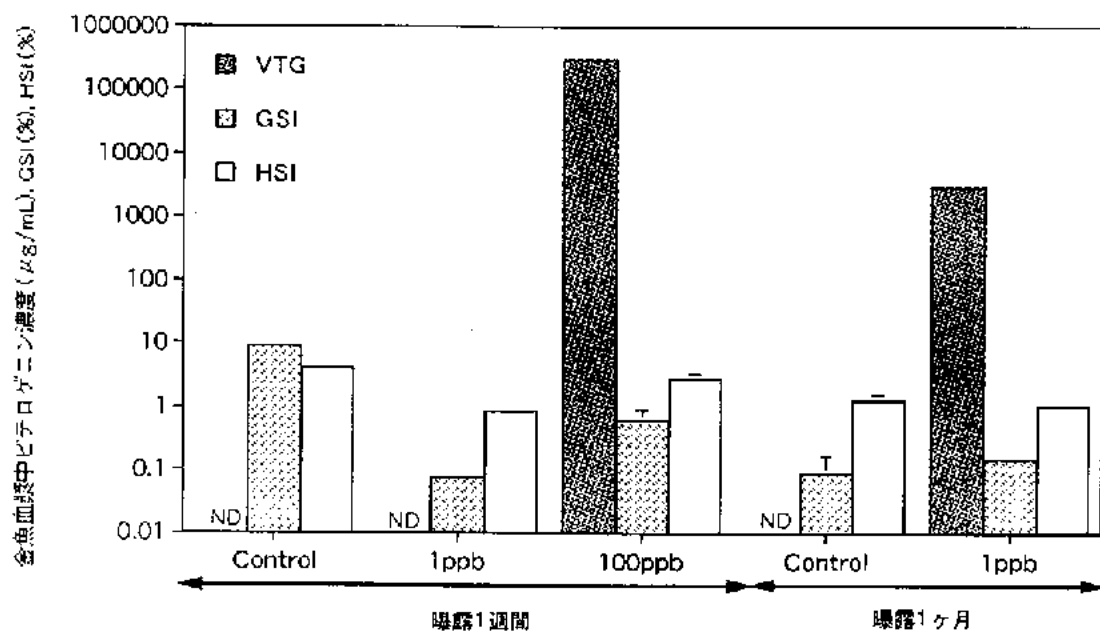
1. 北村繁幸, 吉田真由美, 杉原数美, 太田茂, 原 彰彦: 残留性農薬 DDT の代謝とエストロゲン様活性, 日本薬学会第 119 年会, H11. 3. 29-31 (1999) .
2. 小林牧人, 松本 健, 渡部終五, 平野香織,

原 彰彦: 霞ヶ浦産コイおよびゲンゴロウブナの血液中ビテロジェニンの測定, 平成 11 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p34, (1999) .

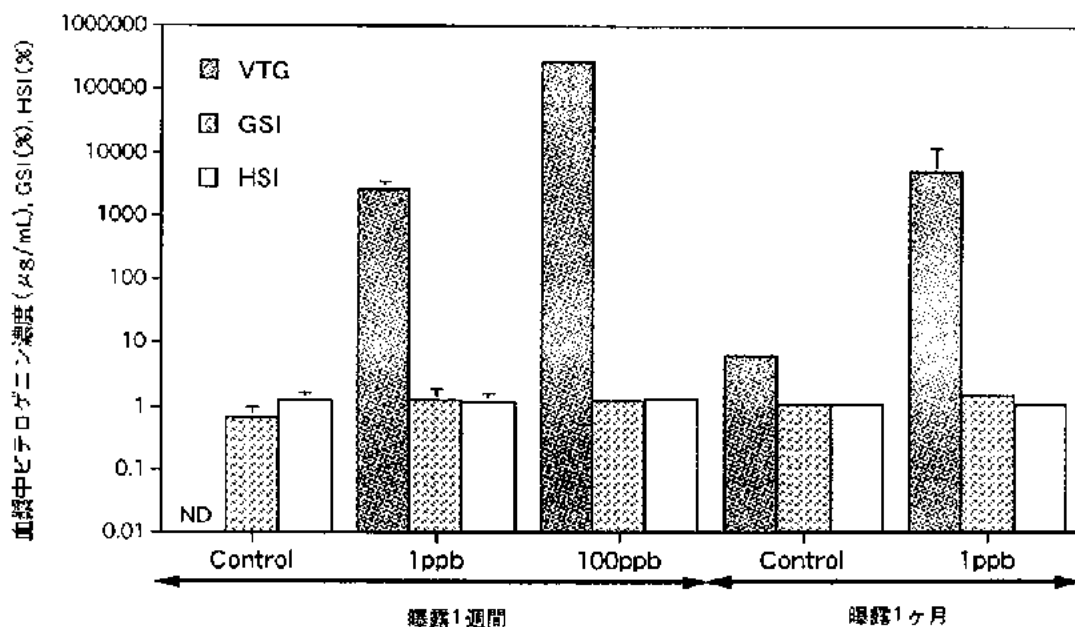
3. 平野香織, 深田陽久, 平松尚志, 原 彰彦: コイのビテロジェニン酵素免疫測定法 (ELISA) の確立, 平成 11 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p210, (1999) .
4. 井口和明, 大島章子, 星野 稔, 平松尚志, 原 彰彦: サケ科 Vitellogenin の部位特異抗体の作製と ELISA, 日本薬学会第 119 年会, H11. 3. 29-31 (1999) .
5. H. Fukada, N. Hiramatsu, M. Shimizu, C. V. Sullivan and A. Hara: Changes of serum growth hormone and vitellogenin levels in cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*) during sexual maturation, 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999, Program and Abstracts, p.107 (1999) .
6. H. Fukada, N. Hiramatsu, M. Shimizu, C. V. Sullivan and A. Hara: Changes of serum choriogenin and vitellogenin levels in masu salmon (*Oncorhynchus masou*) during sexual maturation and after estrogen treatment, 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999, Program and Abstracts, p.107 (1999) .
7. 原 彰彦, 芳賀歩, 伊藤敬三, 江本匡, 渡部 聡: 魚類ビテロジェニンの迅速検出法の開発, 第 2 回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集 (1999.12) .
8. 漆谷博志, 佐藤友美, 井口泰泉: マミチヨグのエストロゲン受容体遺伝子のクローニング及び発生段階での発現変化について, 日本動物学会第 70 回大会, 山形, Zool. Sci. 16, Suppl., 14 (1999) .
9. 河野郷通, 藤目誠, 上島孝久, 井口泰泉: ニホンアマガエルの皮膚での水分吸収量の性差と下垂体後葉ホルモン受容体発現量, 日本動物学会第 70 回大会, 山形, Zool. Sci. 16, Suppl., 8 (1999) .
10. 石橋弘志, 橋勝康, 槌本六良, 征矢野清,

- 石橋康弘, 中野菜穂子, 三井義則, 有蘭幸司: モノクローナル抗体を用いた各種魚類血漿中ピテロジェニンの分析, 第33回水環境学会年会 (1999.3) .
11. 石橋康弘, 富永伸明, 緑川隆宏, 高尾雄二, 高良真也, 有蘭幸司: HPLC法を用いたピテロジェニン分析の内分泌攪乱化学物質調査への応用, 第33回水環境学会年会 (1999.3) .
 12. H. Ishibashi, K. Tachibana, M. Tuchimoto, Y. Ishibashi, A. Yamaguchi, N. Tominaga and K. Arizono: The Improved HPLC System for Fish Plasma Vitellogenin and Its Application, *Ecohazard* 99 (1999.12) .
 13. 石橋弘志, 槌本六良, 中田晴彦, 島田秀昭, 中野菜穂子, 立花賢浩, 森下惟一, 鎌迫典久, 四位直美, 宮原真紀, 有蘭幸司: 魚類ピテロジェニンをバイオマーカーとした内分泌かく乱作用評価法, 第2回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集 (1999.12) .
 14. 石橋弘志, 槌本六良, 石橋康弘, 中野菜穂子, 立花賢浩, 有蘭幸司: 金魚を用いた水環境評価法に関する研究, 第34回水環境学会年会要旨集 (2000.3) .
 15. 中田典秀, 丹生谷博, 高田秀重, 中村将, 井口泰泉: GC/MS および遺伝子組み替え酵母を用いた下水処理放流水中の内分泌系を攪乱する化学物質の推定, 第9回環境化学討論会, 札幌 (2000.6) .
 16. 姜益俊, 大嶋雄治, 小林牧人, 仲山慶, 井上義之, 小江敏明, 今田信良, 本城凡夫: TBT と PCB の複合投与がヒメダカ雄の性行動に及ぼす影響, 平成11年度日本水産学会春期発表 (1999) .
 17. Y. Oshima, I. J. Kang, M. Kobayashi, N. Imada and T. Honjo: Suppression of sexual behavior in male Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by endocrine disruptors, 20th Society of environmental Toxicology and Chemistry (1999) .
 18. 別所宏紀, 岩上淳, 橋本伸哉, 大槻晃, 原彰彦: 化学発光法による雄マコガレイ血清中のピテロジェニンの高感度測定法の開発, 日本水産学会春季大会 (1999.4) .
 19. S. Hashimoto, H. Bessho, S. Iwakami and A. Hara: Development of luminometric Immunoassay for the monitoring of background level of serum vitellogenin in male flounder (*Pleuronectes yokohamae*), SETAC 20th Annual Meeting, Philadelphia PA, 14-18 November (1999) .
 20. 橋本伸哉: 内分泌かく乱物質の海産魚に対する影響, 第2回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム, 神戸 (1999.12) .
- 総説、解説
1. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質 (環境ホルモン) の生物への影響, *臨床環境*, 8, 62-71 (1999) .
 2. 井口泰泉: 性分化異常と環境ホルモン, *Hormone Frontier in Gynecology*, 6 (3), 65-70 (1999) .
 3. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質, *最新医学*, 54, 2490-2495 (1999) .
 4. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質問題 環境ホルモン (内分泌かく乱物質) 研究の展開, *医学のあゆみ*, 190, 721-756 (1999) .
 5. 原彰彦: 魚類ピテロジェニン研究と環境ホルモン環境ホルモン (内分泌かく乱物質) 研究の展開, *医学のあゆみ*, 190, 745-746 (1999) .
 6. A. Hara: Vitellogenin in male as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, 2 (1), 35-42 (1999) .
 7. 原 彰彦: 魚類ピテロジェニン研究と環境ホルモン, *医学のあゆみ*, 190 (7.8), 745-746 (1999) .
 8. 原 彰彦: 内分泌攪乱物質の生態影響—魚類への影響, *廃棄物学会誌*, 10 (4), 278-287 (1999) .
 9. 橋本伸哉: 環境ホルモンの海産魚類に対する影響 東京湾産マコガレイを例として, *沿岸海洋研究*, 37 (2), 3-6 (2000) .
 10. 中村 将: 性分化と環境, *月刊海洋*, 31

- (5), 304-312 (1999) .
11. 有蘭幸司: バイオマーカーを用いた水環境評価法, ぶんせき, 467-474 (1999.6) .
 12. 有蘭幸司: 環境ホルモンをさぐる (5) 魚類の血中タンパク質から環境ホルモン汚染を調べる, 現代化学, 東京化学同人, 16-21 (1999.5) .
 13. 有蘭幸司: 特集生殖と内分泌攪乱物質-魚類の性分化生殖能と内分泌攪乱物質-, 産科と婦人科, 診断と治療社, 66 (2) , 245-252 (1999.4) .
 14. 有蘭 幸司: 特集環境ホルモンの最新動向—環境ホルモンの測定法の開発—エコインダストリー, シーエムシー, 4 (2) , 27-31 (1999) .
 15. 川添禎浩, 牧野利明, 有蘭幸司: 内分泌かく乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) と植物性エストロジェン, 薬用植物研究, 薬用植物研究会, 124-35 (1999) .
 16. 有蘭幸司: 水環境に存在する重金属 (微量元素) の毒性, 水環境学会誌, 日本水環境学会, 22 (5) , 5341-345, (1999) .
- 出版物
1. 有蘭幸司: 生物モニタリング技法, IV-2 in vivo 法, 環境ホルモンのモニタリング技術, シーエムシー, 217-225 (1999.11) .
 2. 有蘭幸司: 第 14 講魚類血液を用いたピテロジェニンの分析法, 環境ホルモン汚染対策, エヌ・ティー・エス, 363-389 (1999.5) .
 3. 有蘭幸司 (分担執筆) : 第 6 章 環境ホルモンの測定法の開発, 環境ホルモンの最新動向, シーエムシー, 87-93 (1999.5) .



17β-エストラジオール濃度 (曝露期間)



17β-エストラジオール濃度 (曝露期間)

図1 17βエストラジオール曝露によるキンギョの血漿中ビテロゲニンの誘導
上; 雄魚、下; 雌魚、ND<78ng/ml

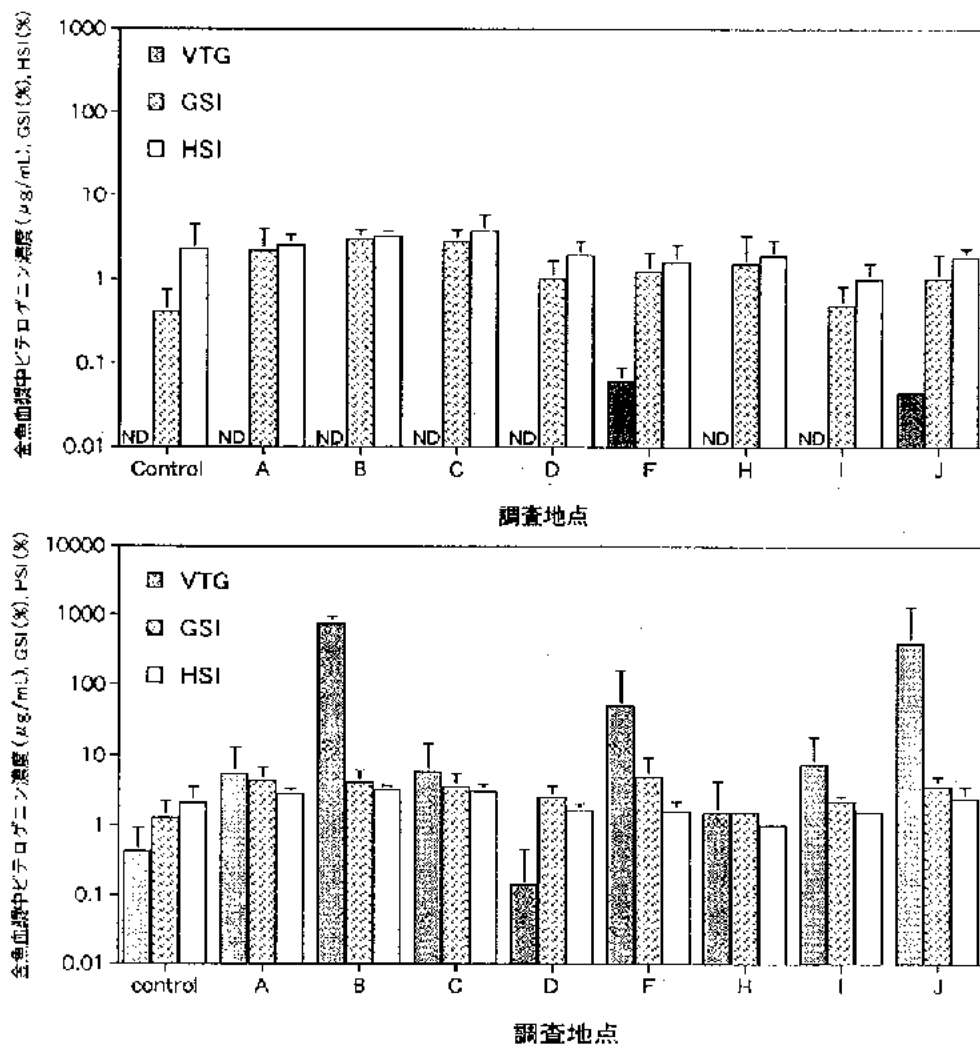


図2 一般河川に1ヶ月間曝露したキンギョの血漿中ピテロゲン濃度とGSI及びHSIの関係
上：雄魚、下：雌魚、ND<78ng/ml

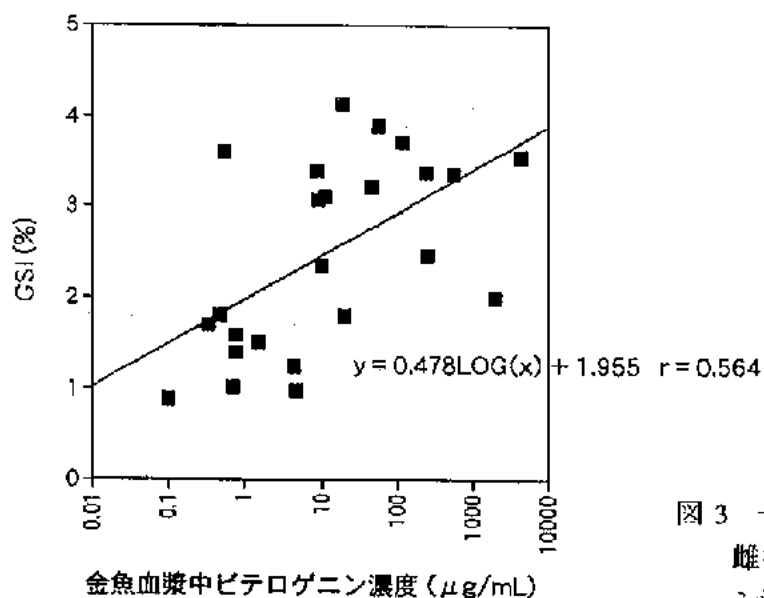


図3 一般河川に1ヶ月間曝露した雌キンギョの血漿中ピテロゲン濃度とGSIの関係

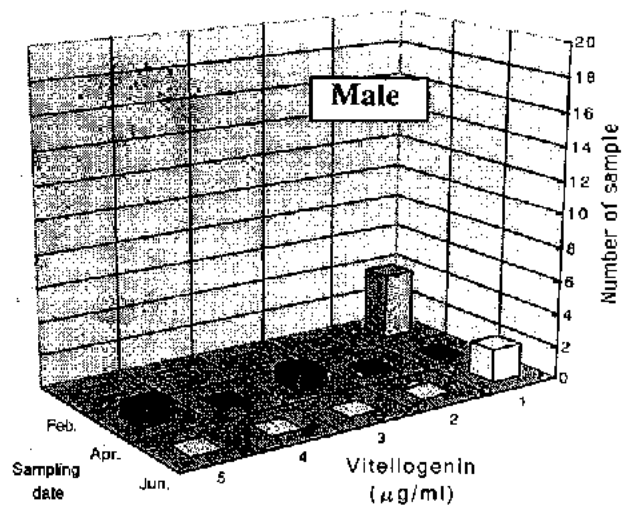
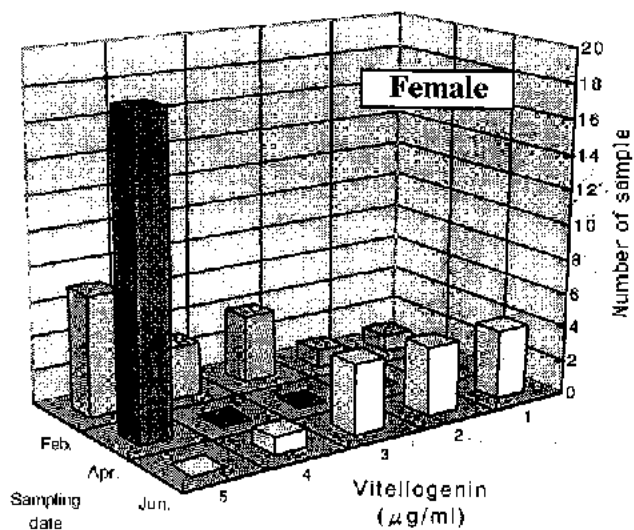


図4 天然マダイの血漿中ビテロゲン濃度

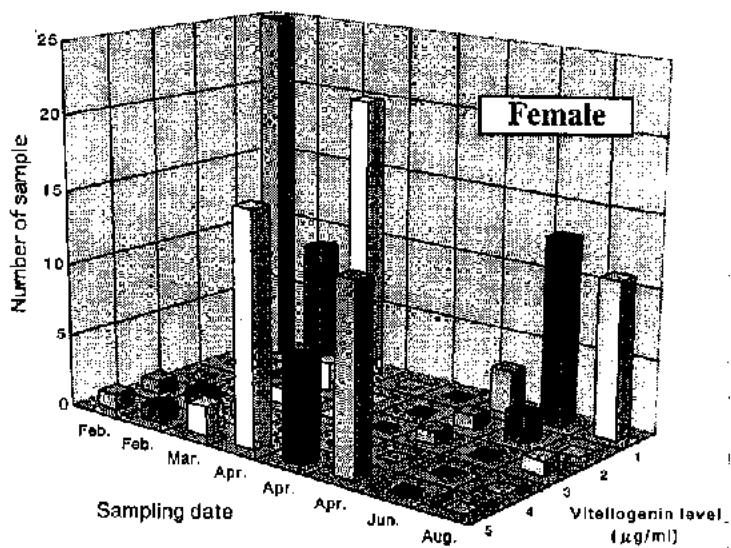
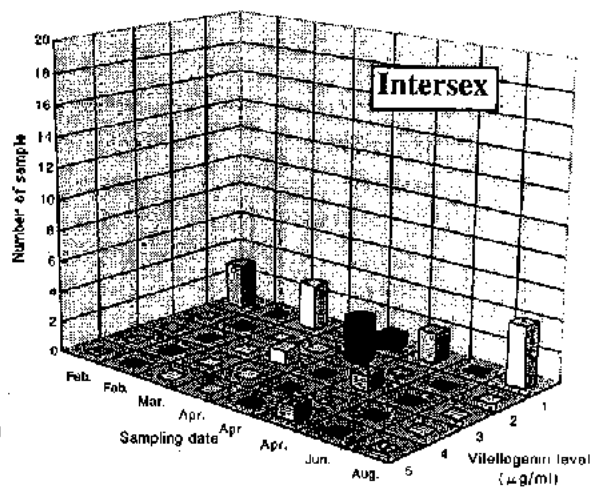
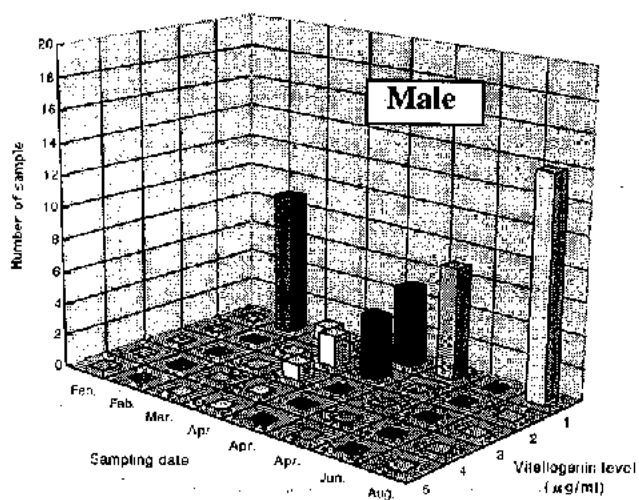


図5 養殖マダイの血漿中ビテロゲン濃度

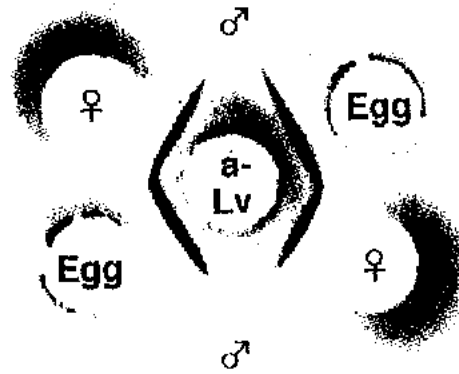


図6 ウミネコリポビテリン抗体の特異性

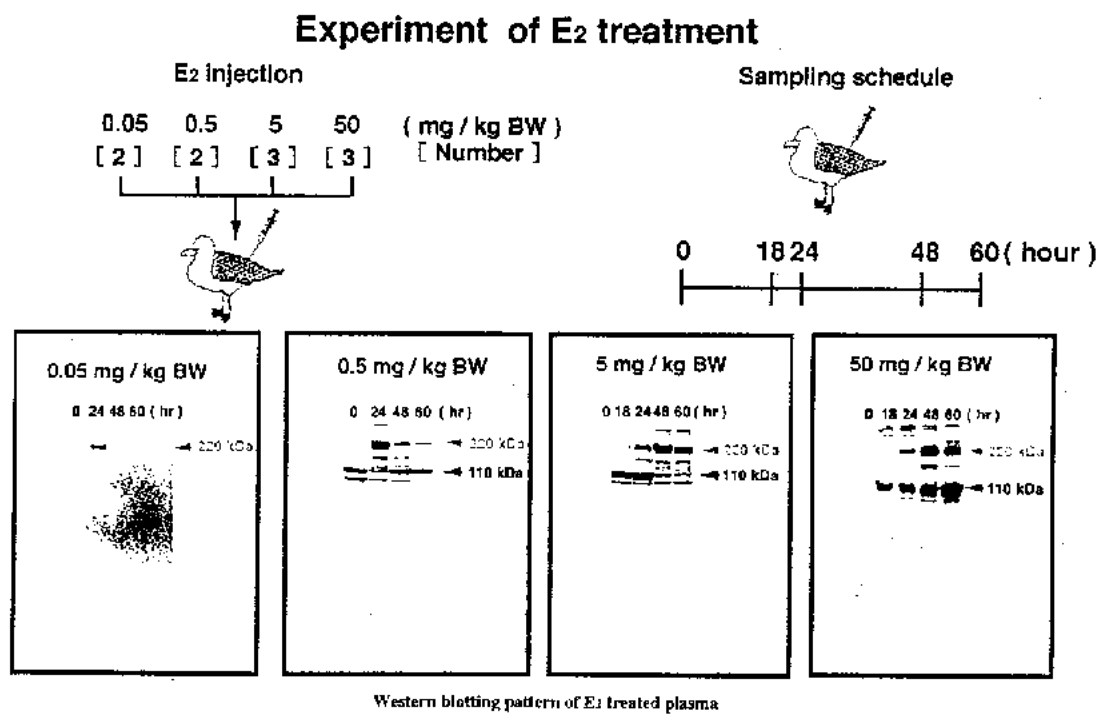


図7 各濃度の 17β-エストラジオール投与とウミネコ血漿のウエスタンブロッティングパターン

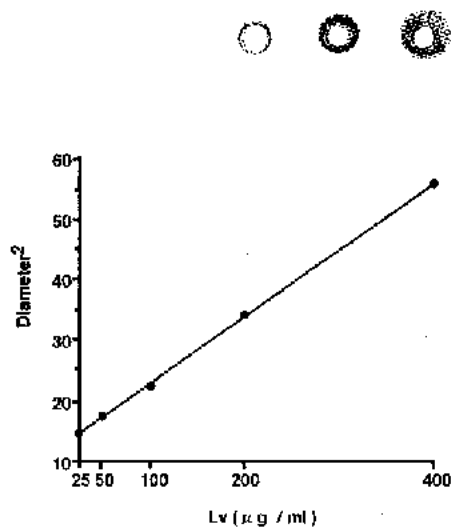


図8 Mancini 法によるウミネコリポビテリンの標準曲線

14. メダカに対する内分泌攪乱物質の短期暴露に関する研究

研究者 若林 明子（東京都環境科学研究所基盤研究部長）

研究要旨

魚類に対する人畜由来ホルモンや内分泌攪乱化学物質の繁殖への影響を明らかにする目的で、メダカ（*Oryzias latipes*）のオスを17 β -エストラジオールや内分泌攪乱作用が疑われている数種の化学物質に暴露し、メスと合わせた後の産卵数と孵化数、及び暴露終了時のオス血液中のビテロジェニン濃度を調べた。その結果、17 β -エストラジオールではnmol/lオーダーで、いくつかの化学物質では μ mol/lオーダーで産卵数や孵化数が対照と比較して減少した。また、これらの群のオスメダカでは血漿中のビテロジェニン濃度も同時に上昇した。

研究者協力者

東京都環境科学研究所

森 真朗 主任研究員

塩田 勉 研究員

A. 研究目的

アルキルフェノールなどの化学物質が野生の魚に対して雌雄同体などを引き起こしている可能性が指摘されて以来、これら内分泌攪乱作用の疑われている化学物質の水生生物、特に魚類に対する影響に関する研究が行われてきた。そして、その結果、いくつかの化学物質は魚に対して生理学的あるいは組織学的変化を生じることが明らかになってきたが、実際にこれらの物質が魚の繁殖に影響を与えるかについての研究はほとんどない。そこで、本研究ではオスのメダカへのホルモンや他の内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の暴露が、オスの繁殖能力へ与える影響を明らかにすると同時に、オスの魚のメス化の高感度の生理学的指標である血清中のビテロジェニン濃度と繁殖能力の関係を調べる。

化学物質としては、人畜由来女性ホルモンの17 β -エストラジオール（E2）、女性ホルモン様作用が疑われているビスフェノール A（BPA）、p-ニルフェノール（NP）、4-t-ブチルフェノール（BP）、ジエチルヘキシルフタル酸（DEHP）及びベンゾフェノンを用いた。

試験魚としてはメダカを用いた。メダカは孵化時にすでに性が分化していること、適正な飼育条件下では毎日産卵すること、及び小型で飼育管理が容易であることから繁殖試験生物として適当であり、最近、ビテロジェニンの測定も可能になっている。

B. 研究方法

繁殖試験

試験魚：地下水で産卵・孵化及び飼育を行っている都内の養魚場から購入したメダカ（*Oryzias latipes*）の成魚を20～180日馴化後試験に用いた。その間、魚には市販の粉末試料あるいはテトラミンを毎日与えた。

化学物質：E2はシグマアルドリッチ、BPとベンゾフェノンは和光純薬、NPは東京化成（90%パラ置換体、10%オルト置換体）、TBTはアルドリッチ、DEHPはGL化学製のものをそれぞれ用いた。全ての化学物質は最初アセトンに溶解後、活性炭ろ過水に溶解して暴露溶液を調製した。アセトンの濃度は、100 μ l/l以下とした。

方法：オス1尾とメス2尾を1グループとして、活性炭ろ過水に緑藻類を添加した溶液中で予備飼育し、産卵数と孵化率を調べた。飼育時の照度は、約6000ルクスで、16時間明、8時間暗条件とした。餌は毎日与え、

飼育水は2日に1回半量を交換した。飼育水には、卵を産み付けさせる目的で水生植物を入れた。その間、2週間にわたり毎日産卵数及びその後の孵化率を計測し、安定して受精卵を産むグループを試験に用いた。

オスへの影響を見る試験では、オスのみを暴露溶液に移し、各化学物質に2週間暴露した。対照についても、同様にオスのみ化学物質を含まない活性炭ろ過水中で2週間飼育した。明暗サイクルは飼育時と同様であるが、照度は酸素消費をおさえるため500ルクスとした。暴露水は2日に1回交換し、水交換の4時間前に飽食量の餌を与えた。その後、オスを元の組合わせのメスと一緒にして緑藻類を添加した溶液中で1週間採卵し、産卵数と孵化数を計測した。

ピテロジェニン濃度の測定

材料及び方法

各種抗体及び試薬

抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体とビオチン標識抗メダカポリクローナル抗体はクマモト抗体研究所で作製した。HRP標識ストレプトアビジンはザイメット製のものを用いた。精製メダカピテロジェニンはクマモト抗体研究所で作製したメダカ腹水から調製した。洗浄には0.9%塩化ナトリウムと0.05%のTweenを含有した10mMリン酸緩衝液(pH 7.4) (T-PBS)を用いた。T-PBSに1mg/ml及び5mg/mlの濃度の牛血清アルブミンを含ませた溶液を希釈液及びブロッキング液に用いた(1mg/mL BSA-T-PBS 及び 5mg/mL BSA-T-PBS)。

方法

抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体2.5µg/mLを50µL/ウエルずつ96ウエルプレートに添加し、4℃一夜静置して固相化した(抗体の固相化)。抗体溶液を除去後、T-PBSを300µL/ウエル加え、ウエルを洗浄した。この洗浄操作をさらに2回行った(洗浄)。次に、5mg/mL BSA-T-PBSを200µL/ウエル加え、室温1時間静置しブロッキング

した。溶液を除去し、先の洗浄操作を3回行った(ブロッキング)。

1mg/mL BSA-T-PBSで各濃度に希釈した精製メダカピテロジェニン(0、0.488、1.95、7.81、31.3、125、500 ng/mL)及び測定検体を50µL/ウエル加え室温2時間静置し、固相化抗体と反応させた(抗原反応)。溶液を除去し、先に述べた洗浄操作を3回行った(洗浄)。1mg/mL BSA-T-PBSで希釈したビオチン標識抗メダカ抗体2µg/mLを50µL/ウエル添加し、室温1時間静置し反応させた(ビオチン標識抗体との反応)。溶液を除去し、洗浄操作を3回行った(洗浄)。次いで、1mg/mL BSA-T-PBSで希釈したHRP標識ストレプトアビジンを50µL/ウエル添加し、室温1時間静置し反応させた(酵素標識抗体との反応)。溶液を除去し、洗浄後、オルトフェニレンジアミン溶液を100µL/ウエル加え、室温5分反応させた後、2N硫酸を50µL/ウエル加え反応を停止した(酵素反応)。

最後に、490nmの吸光度を測定し標準曲線からメダカ血清中ピテロジェニン濃度を算出した(吸光度の測定)。

C. 試験結果

繁殖試験

メダカの産卵数と孵化率を表1から表6に示した。

E2暴露では、1nmol/l群で対照と比較して産卵数及び孵化数ともに有意な差は見られなかったが、3nmol/l以上の暴露群から産卵数及び孵化数は共に、有意に低下しはじめ、10nmol/l以上ではほとんど孵化しなかった。しかし、100nmol/l暴露群でも50程度の産卵が見られた。

BPA暴露では、3µmol/l以下の暴露群で産卵数・孵化数ともに対照群に比較して有意な差は見られなかった。しかし、10µmol/l暴露群では産卵数・孵化数ともに対照群に比較して有意な低下が見られ、この暴露群における平均孵化数は対照群の約半分であった。

NPでは、各暴露群でのバラツキが大きいいため、対照群と比較して孵化数に統計的な有

意差は見られなかった。しかし、 $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群において平均孵化数の低下が見られた。

BP 暴露では、 $1 \mu\text{mol/l}$ 群で対照に比べて著しい孵化数の減少が見られた。また、3 及び $10 \mu\text{mol/l}$ 群でも孵化数の減少が見られた。しかし、バラツキが大きいため統計的に有意の差はなかった。

DEHP 及びベンゾフェノン暴露では産卵数・孵化数ともに対照とほとんど差は見られなかった。

血清中のビテロジェニン濃度

表 7 から表 11 にビテロジェニンの測定結果を示した。

標準添加した試料の測定から求めた検出下限は $20 \mu\text{g/ml}$ であった。

血清中のビテロジェニン濃度は試験開始前のメスでは $1100 \sim 83000 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、オスでは試験開始前及び対照試験で全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

一方、E2 に 2 週間暴露したオスでは、 0.01nmol/l 暴露群では全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。 0.1nmol/l 暴露群では $20 \mu\text{g/ml}$ 以下から $13000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $4000 \mu\text{g/ml}$)、 1nmol/l 暴露群で $72000 \sim 500000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $190000 \mu\text{g/ml}$) と暴露濃度が 10 倍上昇した結果ビテロジェニン濃度は約 5 倍上昇した。更に 10 倍濃度の高い 10nmol/l 暴露群でのビテロジェニン濃度は $100000 \sim 240000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $180000 \mu\text{g/ml}$) と 10nmol/l 暴露群とほぼ同程度であり、 100nmol/l 暴露群では $60000 \sim 88000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $78000 \mu\text{g/ml}$) と逆に減少した。また、1 週間 1nmol/l に暴露した群でのビテロジェニン濃度は $3700 \sim 200000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $57000 \mu\text{g/ml}$) と 2 週間暴露群の半分以下であったが、高濃度のビテロジェニンが検出された。

また、BPA 暴露では、 $1 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。しかし、 $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、1 例を除いて $26000 \sim 110000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $57000 \mu\text{g/ml}$) であった。

NP $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では $330 \sim 32000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $11000 \mu\text{g/ml}$) であった。

D. 考察

ホルモンや他の化学物質のメダカオスへの暴露は繁殖能力に影響を与えた。しかし、影響濃度は致死レベルに比較してかなり低かった。このような現象が、内分泌攪乱作用によるものであるかは本試験からは明らかでないが、急性毒性作用によるものではないだろう。

また、E2 や他の化学物質に暴露したメダカでは、産卵数に比較して孵化数の低下が著しく、特に高濃度の暴露群において多くの未受精卵が見られた。このように、未受精卵が多く生まれた理由としては、化学物質への暴露によりオスの排精能力が低下あるいは消失したにもかかわらず、メスの産卵を促す性行動を行なったか、オスの性行動の有無に関わらずメスが産卵を行なったためのいずれかと思われる。

今回の試験結果から、繁殖能力を適切に評価するためには産卵数だけでなく孵化数も合わせて評価することが必要であることが分かった。

また、繁殖に影響の出た濃度レベルでは、オスのメダカの血清中ビテロジェニン濃度は対照に比較して著しい上昇が見られた。しかし、E2 暴露群で暴露濃度とビテロジェニン濃度の関係を見ると、 1nmol/l 暴露群までは、濃度の上昇によりビテロジェニン濃度は上昇したが、 10nmol/l 暴露群ではほぼ同レベルで、 100nmol/l 暴露群ではビテロジェニン濃度は逆に低下した。この濃度では、暴露したオスの半数が死亡したため、E2 の急性毒性による衰弱など他の要因によってこのような現象が見られたと思われる。また、 1nmol/l 暴露群で、7 日暴露で血清中のビテロジェニン濃度の著しい上昇が見られたことから、短期間の暴露でもビテロジェニンが上昇することが分かった。更に、短時間の暴露を行い、スクリーニング試験を行なう場合には、何日程度の暴露が適当であるか検討が必要である。

一方、ビスフェノール A の暴露でも繁殖能力に影響の出た濃度ではビテロジェニンの上昇が見られたが、影響の出なかった濃度では上昇が見られなかった。従来、ビテロジェニ

ンは感度のよい測定法であることが報告されているが、今回の結果では産卵数や孵化率と同レベルの感度であり、後者も比較的高感度のよい試験法であることが明らかになった。この点については、更に検討が必要であろう。

現在、肝臓中のビテロジェニン濃度の測定を行い血清中との相関を求めている。

E. 結論

メダカを用いて繁殖試験を行なったところ、ホルモン他の化学物質でもオスの繁殖能力に影響を与えることが判明した。しかし、化学物質の影響濃度はホルモンに比較して数百倍高かった。また、同時にこの条件下で血清中のビテロジェニン濃度の上昇も見られることが判明した。

F. 研究発表

論文発表

1. T.Shioda and M.Wakabayashi; Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 40, 239-243 (2000)

2. T.Shioda and M.Wakabayashi; Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using 2-week reproduction test, *Water Sci. Technol.* in press

口頭発表

1. 塩田勉、若林明子；ノニルフェノールなどの化学物質がメダカの繁殖に及ぼす影響、第33回日本水環境学会年会、仙台、1999、3、17
2. 森真朗、若林明子；コイのビテロジェニン量の差異について、平成11年度日本水産学会秋季大会、仙台、1999、3、27
3. 塩田勉、若林明子；内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法としてのメダカを用いた短期繁殖試験、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会、神戸、1999、12、9-10。塩田勉、若林明子；17 β エストラジオール及びノニルフェノールに対するメダカ感受性の雌雄差について、第34回日本水環境学会、京都、2000、3、17

表1 17β エストラジオールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	118	112(±9)	88	67(±30)	75	60(±22)
	105		46		44	
	暴露中に♂死亡					
10	16	16	11		69	
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
30	45	45	6		13	
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
100	63	60(±5)	0	4(±6)	0	7(±10)
	56		8		14	
	暴露中に♂死亡					

2回目

対照	85	62(±49)	55	49(±42)	66	74(±14)
	96		87		91	
	6		4		67	
1	91	79(±13)	64	51(±12)	70	65(±13)
	65		48		74	
	80		40		50	
3	46	45(±5)	25	20(±16)	54	43(±31)
	39		3		8	
	49		33		67	
10	43	46(±4)	2	2(±2)	5	4(±4)
	50		4		8	
	45		0		0	

3回目

対照	60	79(±30)	49	61(±42)	82	72(±28)
	63		26		41	
	114		107		94	
1	22	43(±45)	5	31(±42)	23	61(±33)
	12		9		75	
	94		80		85	
3	38	39(±12)	6	10(±4)	16	26(±10)
	52		14		27	
	28		10		36	
10	19	12(±10)	0	1(±0.7)	0	3(±4)
	17		1		6	
	0					

表2 ビスフェノール A にオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	84	84	73	73	87	87
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
1000	73	62 (±32)	68	55 (±32)	93	84 (±13)
	26		18		69	
	86		78		91	
3000	19	55 (±51)	15	48 (±47)	79	84 (±7)
	91		81		89	
	暴露中に♂死亡					
10000	52	47 (±15)	38	32 (±5)	73	74 (±23)
	59		30		51	
	30		29		97	

2回目

対照	55	89 (±32)	24	53 (±26)	44	57 (±11)
	119		73		61	
	94		61		65	
300	87	133 (±46)	61	102 (±45)	70	75 (±8)
	178		150		84	
	135		96		70	
1000	82	117 (±35)	68	74 (±7)	83	66 (±15)
	118		72		61	
	151		82		54	
3000	95	99 (±9)	95	69 (±24)	100	71 (±28)
	92		62		67	
	109		49		45	

表3 ノニルフェノールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (mM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	85	62 (±49)	55	49 (±42)	65	74 (±14)
	96		87		91	
	6		4		67	
30	176	124 (±49)	141	87 (±58)	80	65 (±27)
	79		26		33	
	117		95		81	
300	70	70 (±40)	26	32 (±14)	37	51 (±18)
	110		48		44	
	31		22		71	

2回目

対照	55	89 (±32)	24	53 (±26)	44	57 (±11)
	119		73		61	
	94		61		65	
30	9	47 (±45)	0	21 (±23)	0	34 (±30)
	34		19		56	
	99		45		45	
100	147	127 (±21)	114	94 (±27)	78	73 (±12)
	106		63		59	
	128		106		83	
300	58	96 (±37)	0	45 (±52)	0	37 (±39)
	132		102		77	
	98		33		34	

3回目

対照	202	288 (±75)	30	141 (±102)	15	45 (±27)
	338		229		68	
	323		165		51	
100	251	272 (±27)	20	66 (±43)	8	23 (±14)
	303		106		35	
	262		72		27	
300	282	266 (±50)	183	141 (±44)	65	53 (±11)
	210		96		46	
	306		145		47	
1000	274	274	157	157	57	57
	暴露中に死亡					
	暴露中に死亡					

表4 4-*t*-ブチルフェノールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	96	179 (±72)	59	115 (±48)	61	64 (±3)
	230		145		63	
	210		140		67	
1000	121	130 (±20)	40	50 (±9)	33	39 (±9)
	153		53		35	
	117		58		50	
3000	68	162 (±98)	7	65 (±69)	10	31 (±22)
	153		45		30	
	264		142		54	
10000	179	129 (±71)	111	71 (±57)	62	50 (±17)
	79		30		38	
	暴露中に♂死亡					

表5 フタル酸ジエチルヘキシルにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	195	207 (±30)	99	115 (±21)	51	55 (±4)
	242		139		57	
	185		107		58	
100	220	186 (±31)	94	78 (±41)	43	42 (±24)
	161		105		65	
	176		30		17	
300	241	226 (±28)	126	108 (±44)	52	46 (±15)
	244		140		57	
	194		57		29	
1000	331	276 (±48)	164	151 (±14)	50	55 (±6)
	254		137		54	
	244		152		62	

表6 ベンゾフェノンにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	96	179(±72)	59	115(±48)	61	64(±3)
	230		145		63	
	210		140		67	
100	132	119(±18)	91	75(±23)	69	62(±9)
	106		59		56	
	暴露中に死亡					
300	144	232(±77)	95	90(±83)	66	43(±35)
	284		171		60	
	269		5		2	
1000	208	244(±32)	105	128(±28)	50	52(±6)
	255		120		47	
	269		160		59	

表7 暴露開始時のオスとメスの血清中ピテロジェニン
濃度

雌雄	番号	ピテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均(±標準偏差)
オス	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
	5	<20	
	6	<20	
	7	<20	
	8	<20	
	9	<20	
	10	<20	
	11	<20	
	12	<20	
	13	<20	
	14	<20	
	15	<20	
	16	<20	
メス	1	21000	19000(±22000)
	2	10000	
	3	83000	
	4	9000	
	5	15000	
	6	11000	
	7	22000	
	8	20000	
	9	6500	
	10	13000	
	11	1200	

表8 対照群オスの血清中ピテロ
ジェニン濃度

番号	ピテロジェニン濃度	
	$\mu\text{g/mL}$	平均(±標準偏差)
1	<20	<20
2	<20	
3	<20	
4	<20	
5	<20	
6	<20	
7	<20	
8	暴露中に死亡	
9	<20	
10	<20	
11	暴露中に死亡	
12	暴露中に死亡	

表9 17βエストラジオール暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 (nmol/L)	番号	ビテロジェニン濃度	
		μg/mL	平均(±標準偏差)
0.01	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
	5	<20	
	6	暴露中に死亡	
0.1	1	13000	4000(±4600)
	2	2700	
	3	<20	
	4	2400	
	5	2900	
	6	2800	
1	1	500000	190000(±150000)
	2	73000	
	3	92000	
	4	190000	
	5	80000	
	6	暴露中に死亡	
	7	180000	
	8	暴露中に死亡	
	9	360000	
	10	190000	
	11	16000	
	12	210000	
	13 *	11000	57000(±100000)
	14 *	12000	
	15 *	200000	
	16 *	3700	
10	1	暴露中に死亡	180000(±53000)
	2	暴露中に死亡	
	3	170000	
	4	210000	
	5	240000	
	6	暴露中に死亡	
	7	160000	
	8	100000	
100	1	60000	78000(±13000)
	2	暴露中に死亡	
	3	76000	
	4	暴露中に死亡	
	5	87000	
	6	暴露中に死亡	
	7	88000	
	8	暴露中に死亡	

*) 7日間暴露

表 10 ビスフェノール A 暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	番号	ビテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均 (±標準偏差)
1	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
10	1	55000	57000 (±35000)
	2	56000	
	3	70000	
	4	28	
	5	26000	
	6	94000	
	7	110000	
	8	44000	

表 11 ノニルフェノール暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	番号	ビテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均 (±標準偏差)
0.3	1	6000	11000 (±11000)
	2	370	
	3	32000	
	4	21000	
	5	18000	
	6	330	
	7	9200	
	8	3400	