

中川 (N) と続いた。M はオス、F はメス個体を示している (Figure 8)。

(2) テストステロン

テストステロン代謝は、ラットにおいては各部位の水酸化反応を表に示した P450 分子種が担っていることが報告されている (Table 6)。エゾヤチネズミに存在する P450 分子種はクローニング及び精製されていないが、これまでの我々の抗体を用いた研究から、CYP1 ファミリー、CYP2 ファミリーに関してはラットと同様の基質特異性を持っていることが分かっている。

2000 年度に捕獲したエゾヤチネズミのテストステロン代謝活性をグラフに示した (Figure 9)。蘭越由来の個体はいずれの部位の代謝に関しても最も低い値を示し、札幌、石狩由来のサンプルでは高活性を示した。特に、石狩由来のサンプルでは、農薬曝露で誘導されることが分かっている、テストステロン 16 α 水酸化や 16 β 水酸化活性について、高い値を示した。

D. 考察

(a) アザラシ

PCB170、PCB180 は 7 塩素化 PCB であり、これらの異性体は PCB 類の中でも難代謝性の異性体である。そのため、これらの物質の蓄積量は、その個体がそれまでに受けた PCB 類の総曝露量の指標となる化学物質である。

PCB77 などの異性体が甲状腺ホルモン分泌抑制を持っているという報告があるが、今回の結果はそれを支持するものとなった。今回の結果では、もっとも PCB 影響を受けている個体で T3 量が、70% 程度まで減少していると考えられ、成長や繁殖などの面で影響が出ている可能性が考えられた。甲状腺ホルモンは加齢に伴い減少するが、年齢との相関よりも PCB 蓄積量との相関の方が顕著であった。

(b) オオワシ、オジロワシ

これまで、年齢過程を考慮して環境汚染物質の蓄積パターンの分析を行った報告は、野生生物に関してはあまりない。今回の分析から、発達過程により、生体に蓄積する PCB 異性体は、成長するに従って塩素数の多い PCB 異性体の蓄積濃度が高くなっていることが分かる。極東アジアを飛来するこれら猛禽類の、PCB の汚染源と考えられる Sovol の PCB 塩素数の組成は図に示す通りである。幼鳥から成鳥になるに従って、蓄積組成は Sovol の組成よりも、高塩素側の PCB 類の割合が増加していくことが明らかとなった。従って、成長過程の中で、難分解性の多塩素化 PCB 類が P450 を始めとする異物代謝酵素によって代謝されることなく蓄積されてしまっていることが考えられる。

また、PCB 類と、DDT 類・クロルダン類の蓄積レベルにそれぞれ相関が見られたことから、

① 同一地域内で曝露されている

② 曝露されている地域は異なるが、

それらの汚染化学物質の比率が同じとの可能性が考えられた。

さらに、TEQ 値に占める non-ortho PCB が関与する割合と、総 TEQ 値との間には負の相関が見られた。従って、コプラナー PCB によって P450、特に Ah 受容体を介して発現誘導を受ける CYP1 ファミリーが誘導され、生体に残存する環境汚染物質の排泄に関与している可能性が示唆された。

(c) コイ

今回の分析結果から、ダイオキシンの汚染が考えられる引地川に棲息するコイでは、ダイオキシン曝露によって肝臓の異物代謝能が増加している可能性が考えられる。一方、HE 染色によって生殖腺を調べたところ、生殖腺の発達は、雌では、EROD 値や CYP1A サブファミリーの発現量と負の相関を示すことが今回の結果から明らかとなった。

た。雌の血中のエストロゲン濃度に関して、CYP1A サブファミリーの発現量とは同じく負の相関を示した。汚染個体群で卵母細胞の発育が十分でなかったことから、調査することができなかったものの、ダイオキシン類の曝露が産卵数や繁殖率などへ影響を及ぼしている可能性は考えられる。また、雌個体の体内で、エストロゲンが CYP1A によって代謝排出されている、もしくは、エストロゲンレセプターと Ah レセプターの相互作用の可能性が考えられた。しかし、その一方で、雄では、CYP1A 発現量や EROD と、生殖腺の発達には相関が見られなかった。従って、これらの結果から、ダイオキシン曝露によって CYP1A の増加と、性ステロイドホルモンの中でもエストロゲン量及びその作用の抑制が認められることを示唆する結果となった。

(d) エゾヤチネズミ

以前の我々の実験から、エゾヤチネズミもラット同様、多環芳香属類による P450 の誘導機構を有していることが分かっている。従って、1996 年度捕獲個体において EROD 活性の低い森林地帯の中川では、平面構造を持つ環境汚染物質による汚染レベルが比較的低いことが考えられた。また、蘭越、石狩群は同じ農村地帯ではあるが、石狩は札幌都市近郊に位置し、付近を流れる河川について環境汚染度を調査したところ、石狩群では PCB や DDT などによる有機塩素系化合物の汚染が顕著であることが我々の分析から分かっている。これらの有機塩素系化合物もまた、農薬によって誘導される P450 と同じ分子種を誘導することが知られている。2000 年に捕獲した石狩由来のエゾヤチネズミでは、テストステロン代謝について高活性を示した。従って、石狩では蘭越に比べ、農薬など平面構造を持たない環境汚染物質による汚染が進んでいる可能性が考えられる。

E. 結論

コイに蓄積するダイオキシン類の分析はまだ検討中であるが、アザラシやオオワシ、オジロワシなどでは、高濃度の有機塩素系化合物の蓄積が認められた。アザラシでおこっている甲状腺ホルモン濃度の低下が、これらの汚染物質への曝露によるものである可能性は十分に考えられる。今後は、実際にシトクロム P450 が PCB 各異性体を代謝し、それらが生体に及ぼす影響について、アザラシまたは実験動物の肝培養細胞を用いて調べていく予定である。

エゾヤチネズミの EROD 活性は、1996 年度捕獲、2000 年捕獲のいずれの個体も、石狩由来群で最も高い値を示し、以下、札幌、中川と続いた。また、中川由来のエゾヤチネズミは、1996 年度では、エリスロマイシン、イミプラミン、アミノピリン代謝など、測定した全ての基質の代謝活性において、札幌・石狩由来の個体に比べて顕著に低い値を示した。特に、ラットにおいて CYP2C11、CYP2B の担うアミノピリンの N 脱メチル化代謝は農薬に曝露されることで活性が上昇することが報告されている。

しかし、一方で、1996 年度と異なり、2000 年度に中川で捕獲したエゾヤチネズミでは、同じく CYP2C11、CYP2B が担い、農薬曝露などで増加するテストステロン 16 α 水酸化や 16 β 水酸化活性について、札幌や石狩由来の個体と変わらない高い活性値を示した。中川演習林では、毎年、殺鼠剤散布や林道工事を行っている。従って、薬剤曝露によって P450 の発現量が増加した可能性、棲息域が変動することで食性が変わった可能性、あるいは異物代謝に関して高活性を持つ個体が、淘汰され、生き残った可能性などが考えられた。

F.研究発表

1.論文発表

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 seal from the coast of Hokkaido, Japan. (Environ Toxicol Chem. in press)

Fujita S., Chiba I., Ishizuka M., Hoshi H., Iwata H., Sakakibara A., Tanabe S., Kazusaka A., Masuda M., Masuda Y., Nakagawa H. P450 in wild animals as biomarker of environmental impact. Biomarkers 2001 6(1):13-25

Teramitsu I., Yamamoto Y., Chiba I., Iwata H., Tanabe S., Fujita S., Kazusaka A., Akahori F., Fujita S. Identification of novel cytochrome P450 1A genes from five marine mammal species. Aquat Toxicol. 2000 Dec 1;51(2):145-153.

Yamamoto H., Watanabe T., Mizuno H., Endo K., Fukushima J., Hosokawa T., Kazusaka A., Fujita S. The antioxidant effect of DL- α -lipoic acid on copper-induced acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. Free Radic Res. 2001 Jan;34(1):69-80.

Yamamoto H., Watanabe T., Mizuno H., Endo K., Hosokawa T., Kazusaka A., Gooneratne R., Fujita S. In vivo evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in liver of Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with acute hepatitis. Free Radic Biol Med. 2001 Mar 1;30(5):547-54.

Maruyama Y., Teraoka H., Iwata H., Kazusaka A., Fujita S. Inhibitory effects of endogenous dopaminergic neurotoxin, norsalsolinol on dopamine secretion in PC12 rat pheochromocytoma cells. Neurochem Int. 2001 Jun 1;38(7):567-572.

Yoon S., Kazusaka A., Fujita S. FTIR spectroscopic and HPLC chromatographic studies of carbon tetrachloride induced acute

hepatitis in rats: damage in liver phospholipid membrane. Biopolymers. 2000;57(5):267-71.

Yoon S., Maruyama Y., 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. 2000 Feb;47(3-4):151-4.

Yoon S., Maruyama Y., Kazusaka A., Fujita S. Accumulation of diacylglycerol 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. 2000 Feb;47(3-4):135-44.

Chiba I., Sakakibara A., Goto Y., Isono T., Iwata H., Tanabe S., Shimazaki K., Akahori F., Kazusaka A., Fujita S. Correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in Steller seallions from the coast of Hokkaido, Japan. (Mar Pollut Bull. submitted)

Chiba I., Sakakibara T., Iwata H., Tanabe S., Kazusaka A., Fujita S. Hepatic microsomal P450s and chlorinated hydrocarbons in Larga and Ribbon seals from Hokkaido, Japan. (Environ Toxicol Chem. submitted)

Shen, Y.B., Kazusaka, A., Fujita, S., Sasaki I., The effect of the water-miscible solvent acetone on the cytochrome P450 system in rat liver microsomes and its mediated reaction. (Journal of molecular catalysis. submitted)

2.国際会議予稿その他

Sakamoto, K., Nakai, K., Aoto, T., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S., Comparison of contents and activities of carp cytochrome P450 upstream and downstream to the site of accidental dioxin release at the Hikijiri River, Fujisawa--Risk assessment for environmental pollution caused by the Hikijiri River dioxin accident~. Environmental Sciences (in press)

Tateishi, Y., Kim, E.Y., Iwata, H., Shimamoto, Y., , Seok-Joo, Y., Maruyama, Y., Chiba, I., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. Alterations in the differentiations and the developments of the central nervous system and reproductive organs of neonatal male rats following prenatal and lactational exposure to bisphenol A. Environmental Sciences (in press)

organs of neonatal male rats following prenatal and lactational exposure to bisphenol A. 第 3 回環境ホルモン学会

Shen, Y.B., Terasawa, M., Kazusaka, A., Fujita, S.: Preventive properties of birch sap against oxidative stress in rats. Proceedings of the 2 nd International Symposium on Sap Utilization in Bifuka'2000, pp.149 - 1153 (2000)

3.学会発表

坂本健太郎、数坂昭夫、藤田正一、国末達也、渡部真文、岩田久人、田辺信介、増田泰、北海道産オオワシおよびオジロワシにおける残留性有機塩素化合物の蓄積特性とその毒性影響、第 6 回バイオアッセイ研究会、日本環境毒性学会合同研究発表会

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明、第 129 回獣医学会学術集会

鈴木裕子、丸山 豊、数坂昭夫、藤田正一、Ah レセプターを介した薬物代謝酵素誘導に対するエストロゲンレセプターの関与、第 130 回獣医学会学術集会

坂本健太郎、中井清貴、青戸隆博、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、横山愛子、牛越亮子、広瀬一美、引地川水系におけるコイの異物代謝酵素 P450 活性の比較、第 3 回環境ホルモン学会

立石陽子、Eun-Young Kim,岩田久人、嶋本義則、Yoon Seok-Joo 丸山豊、千葉一成、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一、Alterations in the differentiations and the developments of the central nervous system and reproductive

Effect of environmental endocrine disruptors and other environmental pollutants on wild animals and its evaluation

Shoichi FUJITA^{1*}, Akio KAZUSAKA¹, Mayumi ISHIZUKA¹, Hisato IWATA²

¹Graduate school of veterinary medicine, Hokkaido University, ² Ehime University

*Corresponding Author: (Professor)

Chlorinated hydrocarbon (CHCs) levels in the blubber of Larga seals and Ribbon seals collected from the coastal waters of Hokkaido, Japan were determined in order to assess the hormonal effects of CHC exposure in free-ranging pinnipeds. Plasma thyroid hormone levels, including total thyroxine (T4), free T4, total triiodothyronine (T3), and free T3 were also measured. Spearman rank correlation analyses showed that in Larga seals, plasma total T3 and free T3 levels negatively correlated with levels of all the CHCs analyzed, although there was no such correlation between total or free T4 levels and CHC concentrations. In Ribbon seals, total T3 levels significantly decreased with an increase of di-ortho PCB (PCB170 and 180) residues. These findings indicated that the plasma T3 deficiency could be associated with some CHC exposure in Larga and Ribbon seals, and that the responses of plasma thyroid hormones may be useful biomarkers for CHC exposure in Ribbon seals.

Stellar's sea eagle and White-tailed sea eagles are suspected to be endangered. We aim to determine the levels of CHCs in the breast muscle of these eagles migrating to Hokkaido, Japan, and to evaluate the ecotoxicological risk base on the obtained data. PCBs and DDTs were the most commonly found compounds, with concentrations 1-2 orders of magnitude higher than the other compounds; i.e., from 0.12 to 38 and from 0.068 to 15 mg / g wet wt., respectively. The residual PCBs were found to change their

compositions with growth stage. It is striking that relatively higher levels of lower chlorinated PCBs were observed in the juvenile than in mature specimens.

Dioxin-containing waste had been released into the Hikiji River from EBARA Co. in Fujisawa for seven and one-half years from November 1992 to March 2000. The released dioxins during this period amounted to 3.0 g-TEQ. We investigated alterations in cytochrome P450 enzymatic activities in the hepatopancreas of carp caught upstream and downstream from the site of dioxin release in the Hikiji River. The significantly high levels of P450 contents, dependent activity and CYP1A isozyme contents were observed in the female carp caught at polluted site. Furthermore, plasma estrogen levels negatively correlated with levels of CYP1A contents and dependent activity. These results indicate that the Hikiji River dioxin accident affected xenobiotic-metabolizing activities in common carp with apparent sign of alteration in reproductive systems.

We have also determined the metabolism of xenobiotics and steroid hormones in the liver of *Clethrionomys rufocanus*, which is one of the wild voles. We corrected *Clethrionomys rufocanus* from sites as follows; Nakagawa, where is a rural area, mountain villages; Rankoshi, where is an agricultural area; Ishikari, where is a suburban agricultural area; and Sapporo, where is an industrial, agricultural, domestic, urban areas. We examined the P450-dependent enzyme activities in liver microsomes of wild voles, corrected in 1996 and 2001, using aminopyrine, imipramine, ethoxyresorufin and testosterone as substrates. The P450 dependent enzyme activities of wild voles corrected from Sapporo and Ishikari in 1996 were higher than those of Nakagawa vole. However, in animals corrected in 2000, the vole from Nakagawa has a high ability of testosterone metabolism. Although both of Rankoshi and Ishikari were agricultural area, the activities of testosterone hydroxylation in Ishikari vole were higher than those of vole from Rankoshi area. We have examined and reported that organochlorinated pesticides polluted the Ishikari area. From the results of present study, it has been suggested that the P450 enzyme activities in wild voles are altered depend on the levels of pollution in habitat environment.

Table1. エゾヤチネズミ採集場所及び数

採集地	棲息環境	1996 年 捕獲個体数		2000 年 捕獲個体数	
		オス	メス	オス	メス
蘭越	農作地帯	0	0	11	7
石狩群	都市近郊、農作地帯	13	15	6	14
中川演習林	北海道大学農学部付属演習林・山林	6	10	3	1
札幌市	都市	6	10	3	1

Table 2. Age, body length, blubber chlorinated hydrocarbon levels (ng/g wet weight) and plasma thyroid hormone levels in Larga and ribbon seals. n.a.: data not available, Figures represent mean±SD.

Species Sex	Larga seal		Ribbon seal	
	Male	Female	Male	Female
<i>n</i>	0	0	3	9
Age (yr)	n.a.	n.a.	3.7±0.58	6.7±3.5
<i>n</i>	2	2	3	9
Body length (cm)	96, 145	100, 147	127±7.5	139±15
<i>n</i>	2	2	1	6
PCB77	0.11, 0.50	0.066, 0.11	0.15	0.11±0.027
PCB126	0.20, 0.55	0.15, 0.18	0.25	0.12±0.073
	<0.021,	<0.021,		
PCB169	<0.021	<0.021	<0.021	<0.021
PCB105	25, 58	8.8, 19	8.2	10±5.3
PCB118	52, 140	23, 45	34	42±21
PCB156	13, 18	3.1, 6.2	3.3	5.9±3.2
PCB170	18, 24	4.9, 9.1	5.9	13±5.7
PCB180	43, 83	19, 29	17	40±20
Total PCB	2400, 2600	500, 1100	650	885±435
TEQ	0.034, 0.084	0.020, 0.028	0.031	0.021±0.011
HCB	28, 37	14, 15	19	19±4.8
alpha-HCH	67, 190	3.2, 81	22	43±15
beta-HCH	160, 420	25, 130	2.1	53±9.3
gamma-HCH	3.9, 8.8	0.65, 4.5	<0.10	2.5±1.8
oxychlordane	250, 370	38, 170	9.6	55±23
trans-chlordane	<1.0, 7.1	<1.0, 2.1	<1.0	22±23
cis-chlordane	7.0, 11	4.6, 4.8	<1.0	23±5.3
trans-nonachlor	210, 460	76, 100	140	225±56
cis-nonachlor	13, 34	4.9, 7.3	2.5	34±3.4
<i>p,p'</i> -DDE	960, 2300	270, 690	460	580±133
<i>p,p'</i> -DDD	15, 72	11, 21	43	31±7.1
<i>p,p'</i> -DDT	160, 200	60, 130	92	122±22
Fat (%)	75, 87	92, 93	88	92±1.4
<i>n</i>	2	2	3	10
Total T3 (ng/ml)	0.59, 0.64	0.83, 0.87	0.31±0.060	0.24±0.099
Free T3 (pg/ml)	1.5, 1.6	1.7, 1.8	n.a.	n.a.
Total T4 (ng/ml)	6.3, 7.3	4.8, 10	19±17	16±7.7
Free T4 (pg/ml)	2.9, 4.3	3.0, 5.1	n.a.	n.a.

Table 3. Spearman rank correlation analyses between plasma thyroid hormone levels and blubber chlorinated hydrocarbon levels (on a fat-weight basis) or age in Larga and ribbon seals.

Sample		Total T3		Free T3		Total T4		Free T4	
		r_s	p -value	r_s	p -value	r_s	p -value	r_s	p -value
Larga seal	PCB77	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB126	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB105	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB118	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB156	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	PCB170	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	PCB180	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	TEQ	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	HCB	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	beta-HCH	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	oxychlordane	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	trans-nonachlor	-1.0	0.08	-0.60	0.30	0.20	0.73	-0.40	0.49
	p,p'-DDE	-0.80	0.17	-0.80	0.17	0.40	0.49	<0.01	>0.99
	Age	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribbon seal	PCB77	-0.29	0.51	-	-	-0.46	0.30	-	-
	PCB126	-0.09	0.84	-	-	-0.12	0.80	-	-
	PCB105	-0.74	0.10	-	-	0.06	0.90	-	-
	PCB118	-0.65	0.15	-	-	0.12	0.80	-	-
	PCB156	-0.85	0.06	-	-	0.06	0.90	-	-
	PCB170	<u>-0.88*</u>	0.04	-	-	<0.01	>0.99	-	-
	PCB180	<u>-0.88*</u>	0.04	-	-	<0.01	>0.99	-	-
	TEQ	-0.21	0.65	-	-	-0.23	0.60	-	-
	HCB	-0.21	0.61	-	-	-0.31	0.45	-	-
	beta-HCH	0.06	0.89	-	-	0.67	0.10	-	-
	oxychlordane	-0.77	0.06	-	-	-0.02	0.96	-	-
	trans-nonachlor	-0.23	0.58	-	-	0.11	0.79	-	-
	p,p'-DDE	0.23	0.58	-	-	-0.09	0.82	-	-
	Age	-0.46	0.13	-	-	0.05	0.87	-	-

Figures represent Spearman coefficient (r_s). * r_s significant at $p < 0.05$.

Table 4. Concentration (ng/g wet wt.) and 2,3,7,8-TCDD toxic equivalents (TEQs) of coplanar PCBs (pg/g wet wt.) in breast muscles

Sample	PCBs	<non-orth coplaner>			<mono-orth coplaner>			TEQ(WHO)
		77	126	169	105	118	156	
HP1	120	0.090	0.042	0.040	2.7	7.7	0.67	9.2
HP2	30000	1.6	3.3	1.4	800	2400	360	550
HP3	39000	1.7	4.7	1	1100	3300	390	740
HP4	11000	1.6	2.6	0.71	280	780	90	390
HA1	23000	2.0	2.6	1.4	500	1900	330	460
HA2	1900	0.57	0.38	0.17	47	140	11	74

Table 5. Concentrations of organochlorine pesticides in breast muscles of steller's sea eagles and White-tailed sea eagles (ng/g wet wt.)

Sample	Fat (%)	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	DDTs	<i>a</i>	<i>b</i>	HCHs	<i>t</i> -ch	<i>c</i> -ch	<i>t</i> -nona	<i>c</i> -nona	oxy	CHLs	HCB
HP1	4.3	1.2	10	57	68	ND	2.5	2.5	0.9	3.5	8.6	1.7	1.6	16	6.1
HP2	1.1	23	440	14000	15000	1.6	640	640	19	68	2800	270	910	4100	400
HP3	2.7	23	350	15000	15000	1.3	530	540	17	63	3000	240	920	4200	95
HP4	0.81	29	310	5200	5500	0.6	310	310	40	40	750	89	400	1300	47
HA1	7.6	40.0	560	10000	11000	ND	320	320	4.6	28	560	110	350	1000	170
HA2	2.3	8.6	110	1200	1300	0.1	33	33	4.2	36	200	32	47	320	56

Table6.ラット肝臓においてテストステロン代謝するP450分子種	
水酸化部位	P450分子種
7 α	CYP2A1
6 β	CYP3A2
16 α	CYP2C11,CYP2B
16 β	CYP2B
2 α	CYP2C11
2 β	CYP3A2

