

ヒドラを用いた淡水系における内分泌攪乱物質汚染の評価

課題番号（１３６８０６２３）

平成１３年度～平成１４年度科学研究費補助金  
基盤（Ｃ）研究成果報告書

平成１５年５月

研究代表者 木村 博  
(滋賀医科大学医学部教授)

- (1) 研究課題 ヒドラを用いた淡水系における内分泌攪乱物質汚染の評価  
課題番号 1 3 6 8 0 6 2 3
- (2) 標題 平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤 C）  
研究結果報告書 （平成15年5月作成・提出）
- (3) 研究代表者 木村博（滋賀医科大学医学部教授）
- (4) 研究分担者 福堀順敏（滋賀医科大学 RI 研究センター教務職員）

- (5) 交付決定額（配分額） (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1, 8 0 0	0	1, 8 0 0
平成14年度	1, 3 0 0	0	1, 3 0 0
総計	3, 1 0 0	0	3, 1 0 0

- (6) 研究発表

- (1) 学会誌等

Takada T, Suzuki Y, Kondo Y, Kadota N, Kobayashi K, Nito S, Kimura H, Torii R. Monkey Embryonic Stem Cell Lines Expressing Green Fluorescent Protein. **Cell Transplant** 11: 631 - 635, 2002

Kumar A, Rao AR, Kimura H. Radiosensitizing effects of Neem (Azadirachta indica) oil. **Phytother Res**: 16, 74-77, 2002

Terado T, Nonaka MI, Nonaka M, Kimura H. Conservation of the modular structure of complement factor I through vertebrate evolution. **Dev Comp Immunol**: 26, 403-413, 2002

Matsuo MY, Asakawa S, Shimizu N, Kimura H, Nonaka M. Nucleotide sequence of the MHC class I genomic region of a teleost, the Medaka. **Immunogenetics**: 53, 930 - 940, 2002

滋賀医科大学附属図書館



2002018598

Terado T, Smith SL, Nakanishi T, Nonaka MI, Kimura H, Nonaka M.  
Occurrence of structural specialization of the serine protease domain of  
complement factor B at the emergence of jawed vertebrates and adaptive  
immunity. **Immunogenetics**: 53, 250-254, 2001

(2) 口頭発表

福堀順敏、木村博 ビスフェノール A(BPA)のヒドラ雄性化への影響 日本  
内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会 2002年11月

Takada, T., Iida K., Akasaka K., Yasue, H., Torii R., Tsujimoto, G., Taira, M.,  
and Kimura, H. Evaluation of heterologous insulator function with regard to  
chromosomal position effect in the mouse blastocyst and fetus  
Insights Into Signal Transduction: A Symposium in Honor of Martha Vaughan,  
Bethesda, MD, U.S.A., 2001

Suzuki, Y., Kondo, Y., Kadota, N., Kobayashi, K., Nito, S., Kimura, H.,  
Takada, T., and Torii, R. Establishment of cynomolgus monkey embryonic stem  
cell lines expressing green fluorescent protein.  
Keystone Symposium, CO, U.S.A., 2002

Takagi, Y., Yamaguchi, A., Kawakubo, M., Nakayama, J., Sugano, S., Takada, T.,  
and Kimura, H. Enrichment of spermatogonia of the EGFP-transgenic mouse  
using fluorescence-activated cell sorting analysis.  
35th annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore,  
MD, U.S.A., 2002

Narita, J., Takada, T., Kimura, H., Sakuragawa, N. and Torii, R.  
Cynomolgus monkey blastocysts produced by nuclear transfer using amniotic  
epithelial cell International Embryo Transfer Society Conference 2003,  
Auckland, New Zealand, 2003

Tadashi TAKEMOTO, Sylvia SMITH, Tokio TERADO, Hiroshi KIMURA, Masaru NONAKA. Molecular cloning of complement B/C2 and C3/C4 of a Japanese shark *Triakis scyllia*, 8<sup>th</sup> Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology 2000.07

竹本 忠司、野中勝、柳 茂、島田敦子、嶋 昭紘、木村 博    メダカ  
DHP/DRP/CRAM ファミリー分子のクローニングと発現解析、第 6 回小型魚類研究会 2000.08

寺戸勅男、竹本忠司、Sylvia L. Smith、木村博、野中勝    サメ補体 B/C2 と C3/C4  
の cDNA クローニング、第 23 回日本分子生物学会年会 2000.12

Tadashi TAKEMOTO, Masaru NONAKA, Shigeru YANAGI, Atsuko SHIMADA,  
Akihiro SHIMA, Hiroshi KIMURA    Cloning and expression analysis of  
DHP/DRP/CRAM family of the teleost fish, *Oryzias latipes*, 14<sup>th</sup> International  
Congress of Developmental Biology 2001.07

### 研究目的

最近、内分泌かく乱物質が環境系に混入することで正常な性機能に影響をおよぼすという報告が相次いでいる。特に淡水系の水環境の悪化は重大である。つまり、多くのヒトが湖や河川の水を、浄水場をとおして飲む結果、ヒトの正常な生殖機能が乱され、子孫を残すという種の存続にとって不可欠な機能が損なわれる可能性がでてきたのである。

飲食物用の容器として使われている各種プラスチック類からビスフェノール A が検出されている。つまり食事や飲料水を摂取するたびにビスフェノールが直接口を通して体に取り込まれるのである。また、歯の治療などの際にもビスフェノールは体内に取り込まれると考えられている。これらの危険性を確認すべく数多くのビスフェノール影響の研究がマウスやラットを用いてなされてきた。それらの結果をまとめると①ビスフェノール A はエストロゲン様の活性を持っているが、その強さはエストロゲンや合成エストロゲンの強さの1万分の1以下と極端に少ないこと、②ヒトの血中などに見出される濃度のビスフェノール A を用いた場合の影響評価は実験系や実験室の違いによって結果がまちまちであり、特に影響があるとした実験では扱った数が少ないなどの問題点が指摘されており、必ずしも、しっかりしたデータとは言えないこと、③げっ歯類とヒトとの違いを考え合わせるとマウスのデータをヒトに当てはめると過剰評価の可能性があることなどである。つまり、現状では飲食や歯の治療によるビスフェノール摂取による性かく乱が、すぐにヒト集団全体にとって緊急を要するものでは決してないことが結論できるのである。

一方、水環境をみてみよう。近年、下水処理施設の下流域の河川数キロにわたって、特に魚類においてオスのメス化や精子形成過程に問題をもった場合が報告されつつある。これらの結果はメスに特異的なタンパク質を測定するなど生化学的な調査によっても裏打ちされてきている。これらの汚水を調べてみるとそこには数種類のエストロゲン活性をもった物質が検出される。中でも自然のエストロゲンや人工のエストロゲンの濃度はメス化を十分に説明できる量が含まれていることがわかってきた。一方、ビスフェノール A のようにエストロゲン活性を示す物質については、濃度は数倍から数十倍が報告されているが、先に述べたように活性は1万分の1以下と小さく、現時点で直接、水環境に影響を及ぼしているという証拠はない。しかし、多くの報告で指摘されているように、エストロゲンや人工エストロゲンなどと共に存在すると相乗的な影響が懸念されるし、また、将来にわたって、こ

これらの物質の濃度が現状より大きくなならないという保障はない。

以上、ビスフェノール A の内分泌かく乱物質としての環境汚染は特に水環境において最も危惧される。少なくとも污水处理施設周辺では、自然、人工エストロジェンを含めてエストロジェン活性をもつ物質による汚染が魚のホルモン系を乱していることは明らかである。そこで、魚、特に食用となる魚類の研究を通してこれらの物質による汚染を評価していくことは大変重要なことである。しかし、淡水系環境を全体として考えるには魚類を調べるだけでは不十分である。食用にならない水棲無脊椎動物、プランクトン類やバクテリアなど淡水系を構成しているすべての生物が安定した生態系や水環境を作り出すのかにかかわっていると考える必要がある。これらの点をふまえて、われわれは最も単純な無脊椎動物のひとつであるヒドラに注目し、ビスフェノール A が彼らの生存や生殖系にどのように影響をもつかを調べるため本研究を計画した。

## 研究成果

まず、オスのヒドラ 60 匹を用いて、ビスフェノール A がヒドラのオス化に影響をおよぼすかどうかを調べた。ヒドラは通常えさとしてアルテミアを与えた条件で、 $20^{\circ}\text{C}$  で飼育していると、自分の体からヒドラの形をした小さい別の個体を無性生殖で作り出す（出芽）。ところが、えさを与えずに  $10^{\circ}\text{C}$  で飼育を開始すると、15 日ほどで精巣を形成する個体が現れる（図 1）。つまり、えさを制限した状態で冷たい環境により出芽をやめオスであれば精巣、メスであれば卵を形成するようになるのである。この条件下で 0.5–4ppm の濃度のビスフェノール A 中で飼育し、オス化にビスフェノール A がどう影響するかを調べたのが図 1 である。0.5ppm の濃度では影響はほとんどみられないが、濃度を 1–3ppm とすると、用量依存性にオス化が抑えられることがわかってきた。因みに 4ppm の濃度ではオス化は完全に抑えられているが、顕微鏡下でヒドラを観察すると胴体は縮まり、触手はのびないなど、かろうじて生きている状態であることがわかった。すなわち、4ppm では個体の生存にも影響を与えていると考えられた。一方、3ppm 以下の濃度ではヒドラの形や動きを見る限り正常であった。

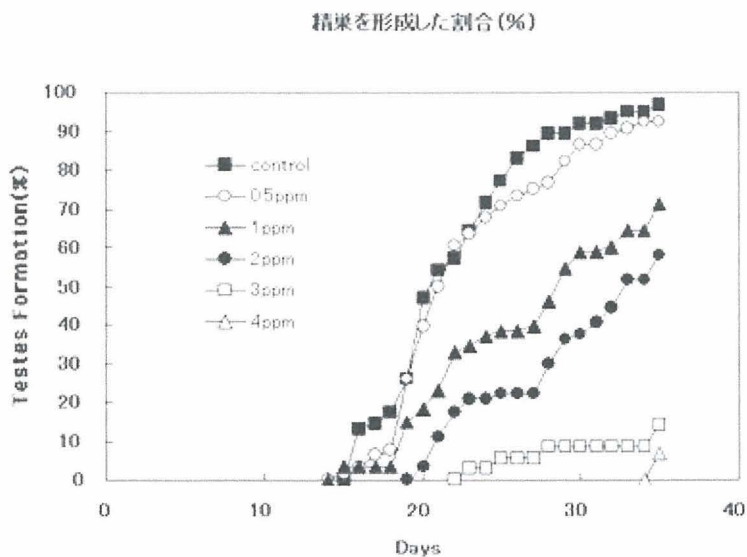


図1 ビスフェノールAの精子形成に対する影響

次に、精子を形成した個体に注目し、個体当たりいくつの精巣を作るかを数え、ビスフェノールAの影響について検討した（図2）。

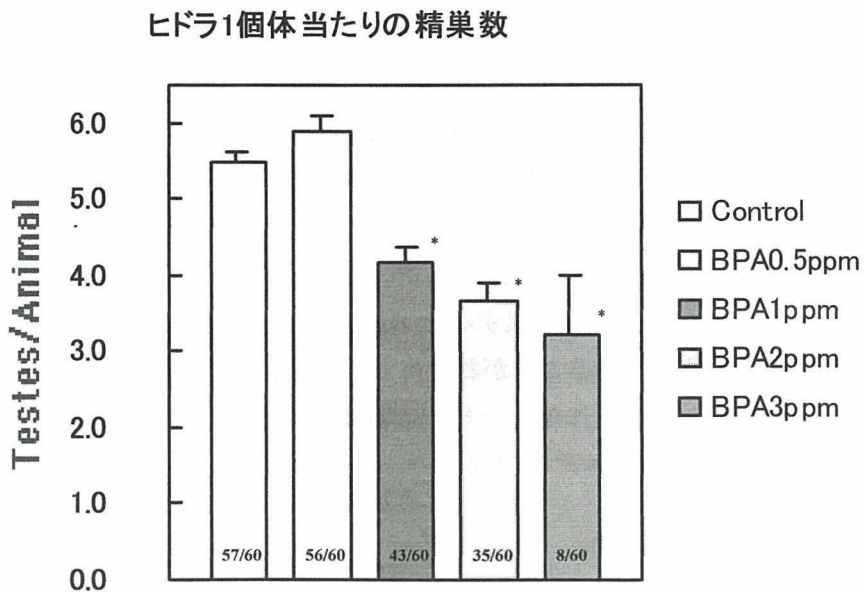


図2 ビスフェノールAが個体あたりの精巣数に与える影響

図2にみられるように、ビスフェノールAの濃度依存性に個体あたりの精巣数が減っていくのがわかる。1-3ppmの濃度では精巣数の減少はスチューデントのtテストによれば5%の信頼限界で有意であった。0.5ppmでは、何も処理しない対照群と比べると有意差はないものの精巣数が増えていた。

次に、ビスフェノールAの無性生殖に対する効果を調べてみた(図3)。

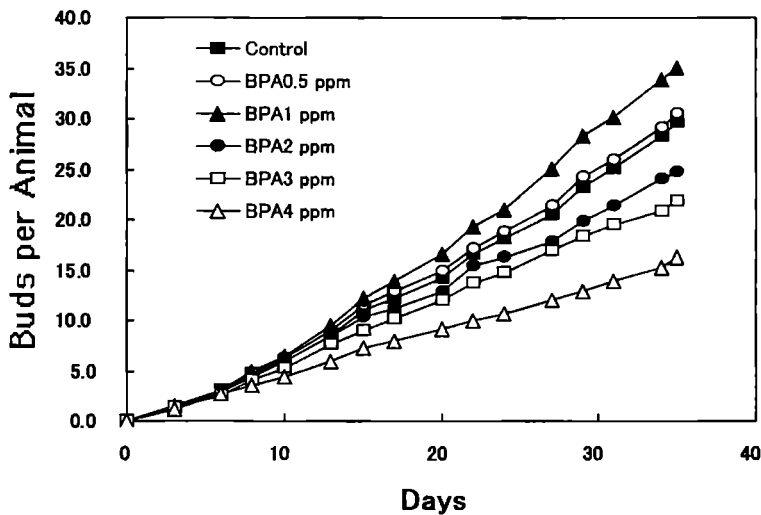


図3 20°CにおけるビスフェノールAのヒドラ出芽数に対する影響

図3にみられるように、ビスフェノールAは2-4ppmで、オス化を抑えるのと同様、ヒドラの出芽産生(無性生殖)に対しても抑制的な効果があることがわかった。ただし、1ppmではむしろ出芽産生が増えていた。この増加が有意であるかどうかはわからないが、図4のように、10°Cにおいても(この場合、えさは毎日与える。えさを与えないと図1の結果で示したように、10°Cでは精巣形成だけが起こる)ビスフェノールAの濃度の小さいところで出芽産生が増えることが観察されていることから、たぶん増加は本物らしい。ただし、この場合は0.5ppmと1ppmの両方の濃度で出芽数の増加が観察された。2-4ppmでの抑制は20°Cの場合と比べて、明らかに大きい。これらのことから、おそらくビスフェノールAは低濃度で出芽を促進する作用があり、高濃度になると抑制がかかるのだと推測される。例えば、1



0° CにおけるビスフェノールAの取り込みが20° Cの場合に大きいと仮定すると図3、図4の違いが説明できる。つまり、図3では、促進効果は1ppmでしか観察されないが、図4ではビスフェノールの取り込みが大きくなるので、0.5ppmでもその効果がみられるようになったのではないかと考えられるのである。これは抑制効果についても同様で、図3における抑制が図4の場合と比べて小さいことは10° Cでの取り込みが20° Cでの取り込みより多いと考えれば説明がつく。しかし、これを証明するには実際の取り込み量を調べる必要がある。われわれの予備的な実験において、このことが証明されている（今回、データは示していない）。

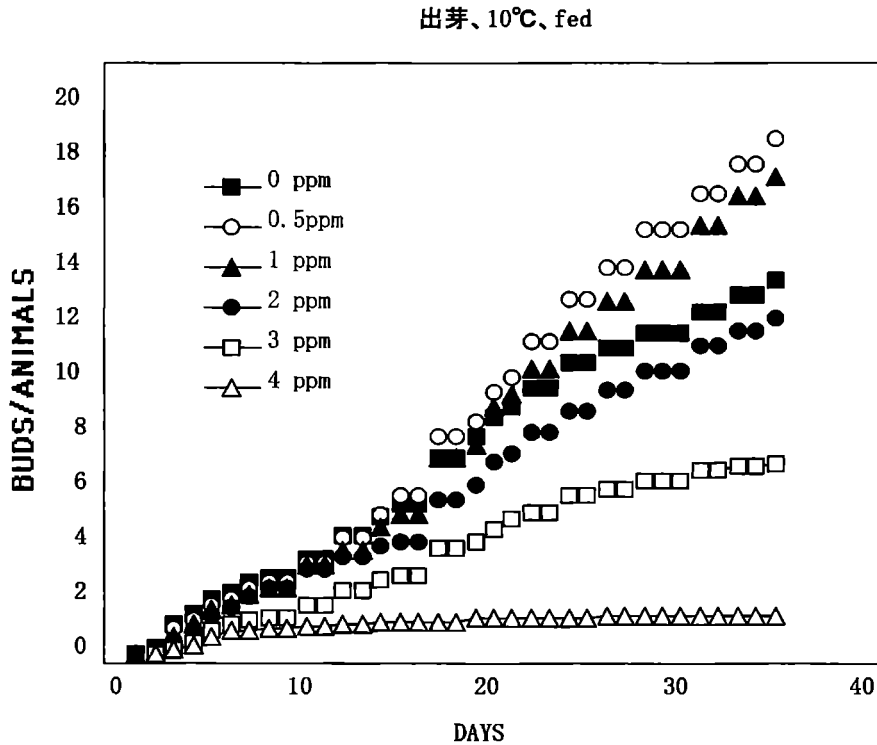


図4 10° CにおけるビスフェノールAの出芽数に対する影響

さて、10° Cでえさを与えた場合、出芽が起こることは図4に示した。一方、この条件下では同時に精巣形成も起こることが観察された（図5）。奇妙なことに、この場合、精巣形成は0.5-1ppmのビスフェノールAで抑制されるのに2-3ppmではむしろ抑制効果が減少していた。図1と図5に示した実験における条件の違いはえさを与えるか与えないかであり、その結果、出芽が起こるか起こらないかが異なる。つまり、図5では出芽が同時に起こるのでこのような結果が生じたと考えられるのである。われわれは現時点では、おそらく、0.5-1ppmでは出芽が促進される結果、

精巣形成が抑制されるのではないかと考えている（つまり出芽と精巣形成はどちらかが促進されればどちらかが抑制される関係にある）。4ppm で精巣形成がないのは、以上の推測とは関係なく、えさを与えても 4ppm ではヒドラは形態的にも運動的にも弱っていて、えさをとることすらできない状態であるからであることを顕微鏡下で確認している。

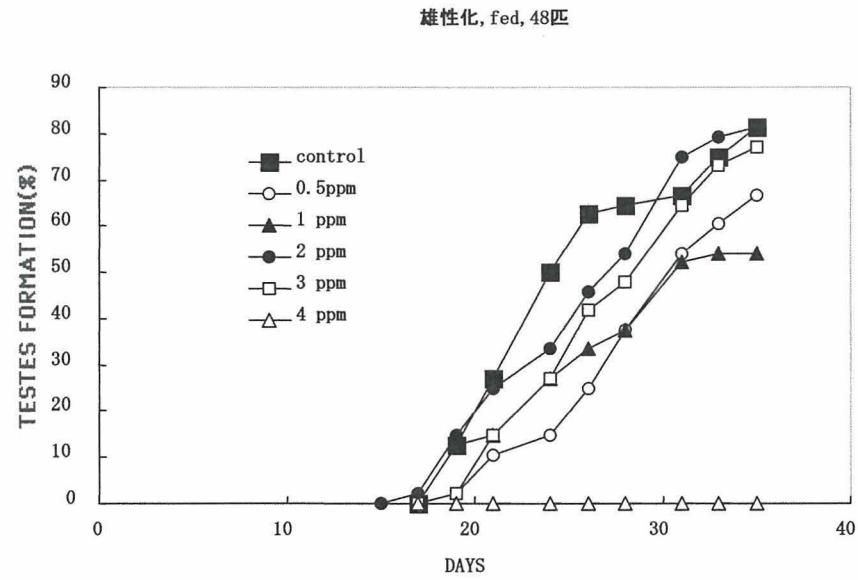


図5 10℃でヒドラにえさを与えた条件下でのビスフェノールAの精巣形成に与える影響

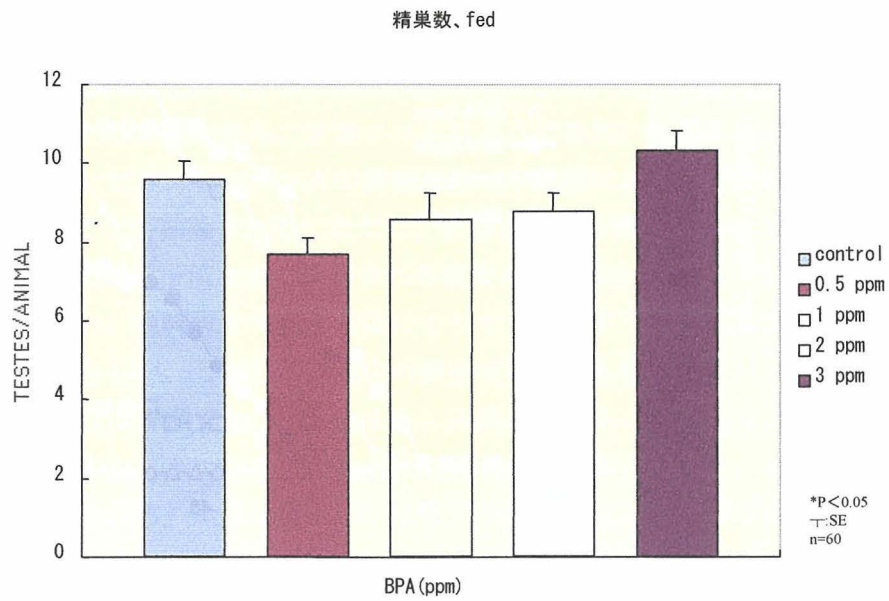


図6 10℃でヒドラにえさを与えた条件下でのビスフェノールAの個々のヒドラ当たりの精巣数へ与える影響

ヒドラを10°Cで飼育しえさを与えた場合、0.5–1 ppm のビスフェノールA処理により出芽増殖が促進され、一方で精巣形成が抑制されることは図6によってもうかがい知ることができる。図6には、ヒドラ1個体当たりの精巣数がビスフェノールAによってどう影響を受けるかを示してある。0.5–1ppmの低濃度でむしろ精巣数は大きく減り、反対に高濃度（2–3ppm）のビスフェノールの影響は少ない。このように、図5と図6の結果の間には矛盾がなく、われわれの考えていることが正しいことを強く支持しているといえる。

次に、ビスフェノールAの卵形成に対する影響をみてみよう。メスのヒドラを用い、10°Cで飼育しえさを与えないと図7に示すようにヒドラは卵を形成するようになる。このとき、図1と同様、出芽は起こらない。精巣形成の場合より卵が形成されるまでの時間は長くなる（日程度）が、ビスフェノールの影響は基本的に精巣形成の場合と同様である。また、図8にはヒドラ個体当たりに形成される卵の数に対するビスフェノールの影響を示したものである。図8の結果も基本的に図2の場合と同様である。つまり、ビスフェノールは卵形成に対しても、精巣形成に対する影響と同様の影響をもっていることが示された。これは、ビスフェノールの影響が精巣に特異的ではないことを示すもので、魚などでみられるオス化に特異的に抑制がかかる場合とは作用機序が異なると考えるべきであることを示している。

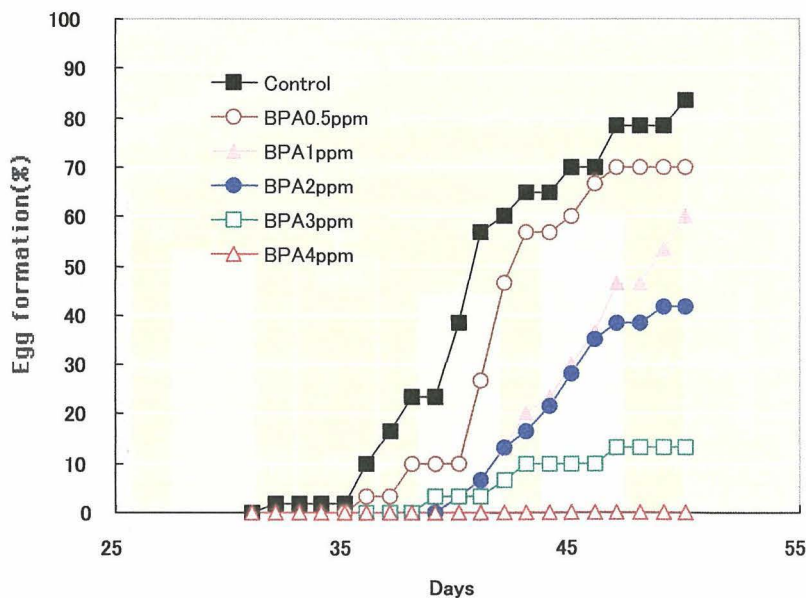


図7 ビスフェノールAの卵形成に対する影響

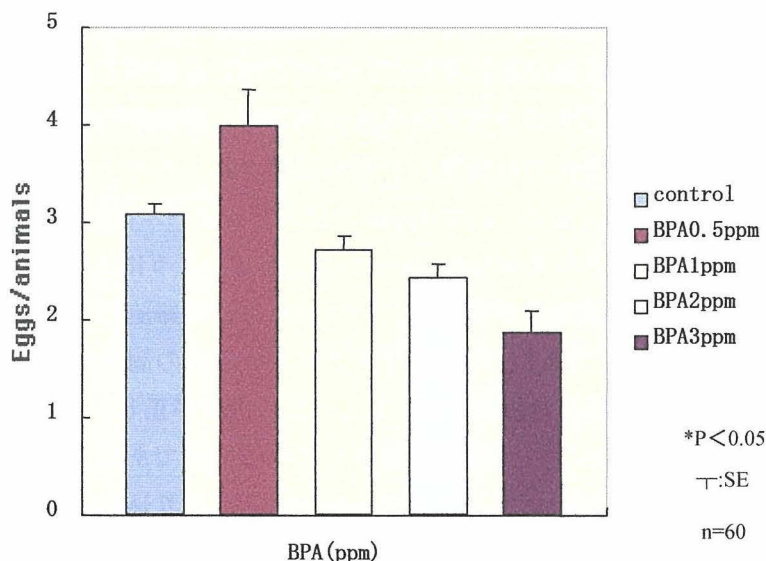


図8 ビスフェノールAが個体当たりの卵数に与える影響

## 考察

以上、われわれはビスフェノールAがヒドラの無性生殖（出芽）、有性生殖（精巢形成、卵形成）のいずれに対しても影響をもっていることを示した。これは、魚類などで見られるオス化に対する特異的な抑制効果とはメカニズム的に異なることを示唆している。しかしながら、メカニズムはどうであれ、生殖系に大きな影響を与えることから、ビスフェノールAの環境汚染、水環境における汚染は極力抑えることが望ましいことが結論される。ただし、影響を与える濃度は ppm オーダーであり、実際の污水处理場下流などで観察される濃度と比べると少なくとも 100 倍は大きい。言い換えると、現時点で実際の汚染によりすぐにヒドラの生態系が乱れるというものではないらしい。しかし、環境中の濃度であっても世代を重ねれば何らかの影響が出る可能性は否定できないし、また、天然のエストロジェンや人工のエストロジェンが汚水中からみつかることから、これらの物質同士の相互作用による相乗効果などが危惧される。エストロジェン活性は天然、人工エストロジェンの 1 万分の 1 程度である一方で、汚染濃度はこれらのエストロジェンの数倍から数 10 倍であることを念頭に置かなければならない。

上記のように、ビスフェノールAの影響は比較的高濃度でしか観察されないが、メ

カニズム的には興味深いものがある。まず、0.5–1ppm の濃度では無性生殖が促進することがあげられる。この促進はわずかではあるが有性生殖でも存在することが図2と図8から想像される。おそらく、無性生殖では一番未分化の幹細胞の細胞分裂が促進され、有性生殖では、それぞれ精子と卵に分化する前の少し分化した幹細胞の分裂が促進されるものと考えられる。そして、結果から判断すると、ビスフェノールAによって未分化の幹細胞の分裂が促進されるので上記の現象が現れるのであろう。図3のように、20°Cで1ppmのビスフェノールは出芽を促進するが、0.5ppmではその効果はほとんどみられない。一方、図4のように10°Cで0.5ppmと1ppmの両方で出芽の促進効果が現れる。われわれは、幹細胞の分裂促進を通して出芽が促進されるものの、促進のためのビスフェノールAの個体内濃度は20°Cでも10°Cでも同じであると推測した。もし、この推測が正しいならば、ヒドラのビスフェノールAの取り込みには温度が関与しているはずである。これを証明すべく、アイソトープでラベルしたビスフェノールを購入し取り込みの実験を行った結果、10°Cで20°Cの場合より多くのビスフェノールAの取り込みが観察された（データは示していない）。面白いことに、10°Cでえさを与えた場合、出芽以外にも有性生殖が起こる（ここではオスを用いているので精巢形成）。出芽が促進される0.5ppmと1ppmで精巢形成は、より高濃度のものと比べて強く抑えられていることが図5、図6からわかる。おそらく、10°Cでは出芽と精巢形成の両方が起こり、出芽が促進される（体内環境として出芽が優位である）結果、精巢形成が抑制されるものと推察された。

以上、われわれはヒドラを用いてビスフェノールAの影響を調べた。ビスフェノールAのほ乳類や魚類に対する影響を調べた研究は多いが、無脊椎動物に対する影響を調べたものは数が少ない。しかしながら、環境への影響を考える上ではほ乳類や魚類に対する影響を調べることも重要であるが、食物連鎖や他の点においても無脊椎動物と脊椎動物の共存によって自然環境が保たれていることを考えれば、内分泌かく乱物質の無脊椎動物に対する影響研究がもっと行われる必要があると考えられる。ビスフェノールAがヒドラ以外の無脊椎動物においても増殖の促進や抑制を起こすとするれば、これらの動物での基本的なデータの蓄積が望まれる。最後に、本研究はこの後、遺伝子発現についても実験をおこなう予定であった。DNAのライブラリー作りには手を染めたが、その後の解析には至らなかった。思った以上に予想と異なる結果がでたので、それらの確認に手間がかかったというのが実情である。今後の課題にしたい。