

水圏生態系の化学物質汚染

岩田久人,* 金 恩英, 山内正信, 井上 英, 阿草哲郎, 田辺信介

Chemical Contamination in Aquatic Ecosystems

Hisato IWATA,* Eun-Young KIM, Masanobu YAMAUCHI, Suguru INOUE,
Tetsuro AGUSA, and Shinsuke TANABE
Center for Marine Environmental Studies, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho,
Matsuyama City 790-8577, Japan

(Received October 24, 2006)

The 21st Century's Center of Excellence (COE) Program "Coastal Marine Environmental Research" in Ehime University, funded by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Government of Japan, started its activities in October 2002. One of the core projects of the COE Program in Ehime University is "studies on environmental behavior of hazardous chemicals and their toxic effects on wildlife". This core project deals with studies of the local and global distribution of environmental contaminants in aquatic ecosystems, retrospective analysis of such chemicals, their toxicokinetics in humans and wildlife, molecular mechanisms to determine species-specific reactions, and sensitivity of chemically induced effects, and with the development of methodology for risk assessment for the conservation of ecological and species diversity. This presentation describes our recent achievements of this project, including research on contamination by arsenic and organohalogen pollutants in the Mekong River basin and molecular mechanisms of morphologic deformities in dioxin-exposed red seabream (*Pagrus major*) embryos. We established the Environmental Specimen Bank (es-BANK) in Ehime University in 2004, archiving approximately 100000 cryogenic samples containing tissues of wildlife and humans that have been collected for the past 40 years. The CMES homepage offers details of samples through online database retrieval. The es-BANK facility was in operation by the end of 2005.

Key words—hazardous chemicals; toxic effects; risk assessment; Environmental Specimen Bank

1. はじめに

愛媛大学の21世紀COEプログラム「沿岸環境科学研究拠点」は、沿岸環境科学研究センターを中核に平成14年10月から活動を開始した。そのコアプロジェクトの1つが「内分泌かく乱物質等有害化学物質の環境動態と生態影響の解明」である。このプロジェクトでは、水圏生態系の化学汚染の実態を地域的・地球的視点で理解する、過去の汚染を復元し将来を予測する、ヒト・野生動物を対象に化学物質の体内動態を解析する、化学汚染に対する動物種特異的な反応・感受性の分子機構を解明する、さらには生態系・生物多様性保全のためのリスク評価の基準を確立する、などの研究課題に挑戦している。

本稿では特に、東南アジアにおける地下水のヒ素汚染やそれを飲用する住民のリスクの評価に関する調査研究、ダイオキシン暴露した魚類胚における形態異常発生の分子メカニズムの解明など、このコアプロジェクトを通じて得られた最新の成果について紹介する。

またわれわれは過去40年間に世界各地から収集した10万点にも及ぶ生物・環境試料を凍結保存し、その情報をデータベース化した「生物環境試料バンク(通称es-BANK)」を昨年度設立した。さらに2005年にはその施設・設備が完成した。ここではその活動内容についても紹介する。

2. 東南アジアにおける地下水の微量元素汚染

2-1. 微量元素汚染の分布 安全な飲料水の確保は人間の生活に不可欠であるが、世界各地で飲料水のヒ素汚染が環境問題となっている。バングラデッシュでは3000万人以上がWorld Health Organization (WHO)の定めた飲料水のガイドライ

愛媛大学沿岸環境科学研究センター (〒790-8577 松山市文京町2-5)

e-mail: iwatah@agr.ehime-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS3で発表したものを中心に記述したものである。

ン ($10 \mu\text{g/l}$) を超えるヒ素を含む井戸水を飲用している。このため皮膚障害を示す患者は 6000—7000 人にも達し、ヒ素の長期暴露による発癌リスクの増加が懸念されている。¹⁾ バングラディッシュ以外でもアジアでは中国・台湾・タイ・ベトナムで飲料水のヒ素汚染が顕在化している。ベトナムでは北部の紅河流域の井戸から高濃度のヒ素が検出されている。²⁾ またカンボジアでは WHO により井戸水のヒ素汚染の予備調査が実施されてきた。しかしながら、ベトナム・カンボジア両国におけるヒ素汚染の実態は限定された地域で明らかにされたのみで、その情報はわずかである。

そこでわれわれはベトナム・カンボジアにおける地下水の汚染実態を明らかにするために、これまでほとんど調査されてこなかったメコン川流域の地下水の微量元素を測定した。

ベトナムでは An Giang ($n=24$)・Can Tho ($n=42$)・Soc Trang ($n=2$)・Dong Thap ($n=12$)・Long An ($n=6$)・Tien Giang ($n=10$)・Vinh Long ($n=10$)・Ben Tre ($n=2$)・Hochiminh City ($n=10$) の 8 州・1 都市における計 118 地点で地下水を採集した。カンボジアでは Siem Reap ($n=20$)・Kratie ($n=35$)・Kandal ($n=24$) の 3 州における計 79 地点で地下水を採集した。

ベトナム及びカンボジアで採取した地下水試料中総ヒ素の濃度は、それぞれ <0.1 — $411 \mu\text{g/l}$ ・ <0.1 — $1930 \mu\text{g/l}$ であった (Fig. 1(a))。本研究で測定したメコン川 (ハウ川) 流域のヒ素濃度は、これまでにヒ素汚染地帯として知られているベトナム北部や

バングラディッシュ・インドの汚染レベル³⁾とほぼ同程度であった。本研究で分析したベトナム・カンボジア両国の地下水のそれぞれ 20%・57% が WHO の飲料水ガイドライン ($10 \mu\text{g/l}$) を超えていた。特に Dong Thap・Kratie・Kandal の地下水で高濃度のヒ素が検出された。概してメコン河口域よりも上流域でヒ素濃度が高くなる傾向が認められた (Fig. 2)。特に Kandal では $1000 \mu\text{g/l}$ を超えた試料が 67% ($n=16/24$) にも達した。

他の元素については、Mn (ベトナム： 0.92 — $15400 \mu\text{g/l}$ 、カンボジア： 0.36 — $3420 \mu\text{g/l}$)・Ba (ベトナム： 0.73 — $3600 \mu\text{g/l}$ 、カンボジア： <0.1 — $2800 \mu\text{g/l}$)・Sr (ベトナム： 6.36 — $1870 \mu\text{g/l}$ 、カンボジア： 3.10 — $2950 \mu\text{g/l}$) 等の濃度が高かった。特に WHO で飲料水ガイドラインが設定されている Mn・Ba に着目すると、ベトナムではそれぞれ 40% ($n=47/118$)・4.2% ($n=5/118$) の地下水がガイドライン (Mn： $400 \mu\text{g/l}$ 、Ba： $700 \mu\text{g/l}$)⁴⁾ を超えていた (Figs. 1(b) 及び 1(c))。またカンボジアでは Mn の場合 38% ($n=30/79$) の試料で、Ba の場合 10% ($n=8/79$) の試料でガイドラインを超えていた (Figs. 1(b) 及び 1(c))。これら元素の地域差に着目すると、ヒ素の場合と同様に、特に Kandal で高濃度の汚染が認められた (Figs. 3, 4)。

これらの結果より、ベトナム・ハウ川流域の地下水はヒ素ばかりではなく、複数の元素によって高濃度に汚染されており、地下水を飲用する住民に複合暴露の影響が懸念された。

2-2. ヒト尿中ヒ素濃度とその組成 一般にヒ

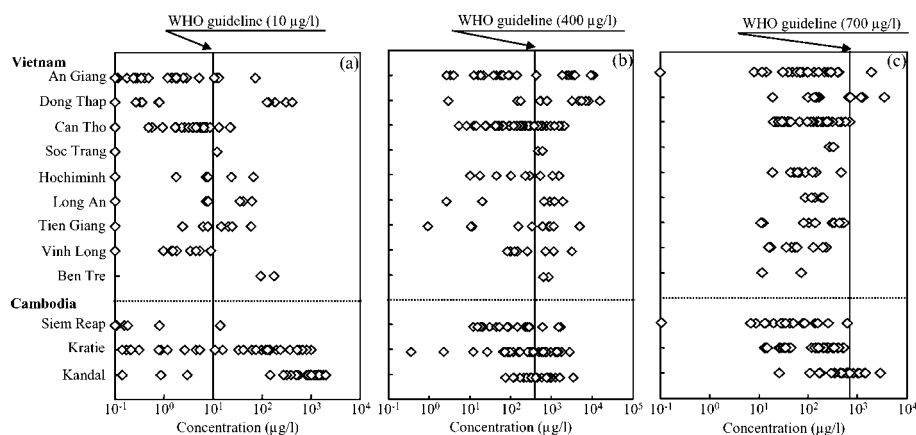


Fig. 1. Concentrations of As, Mn and Ba in Groundwater from the Mekong River Basin
a: As, b: Mn, c: Ba.

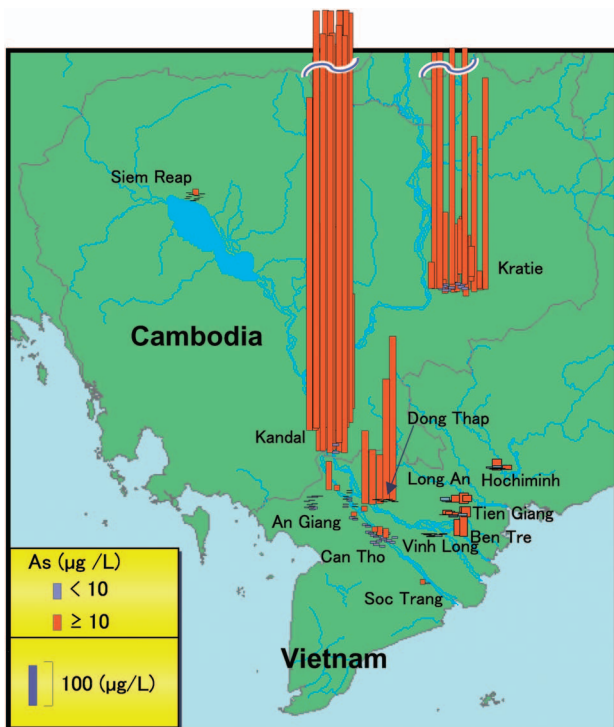


Fig. 2. Geographical Distribution of As in Groundwater from the Mekong River Basin
 Red and blue bars mean that the concentration is higher and lower than the WHO guideline, respectively.

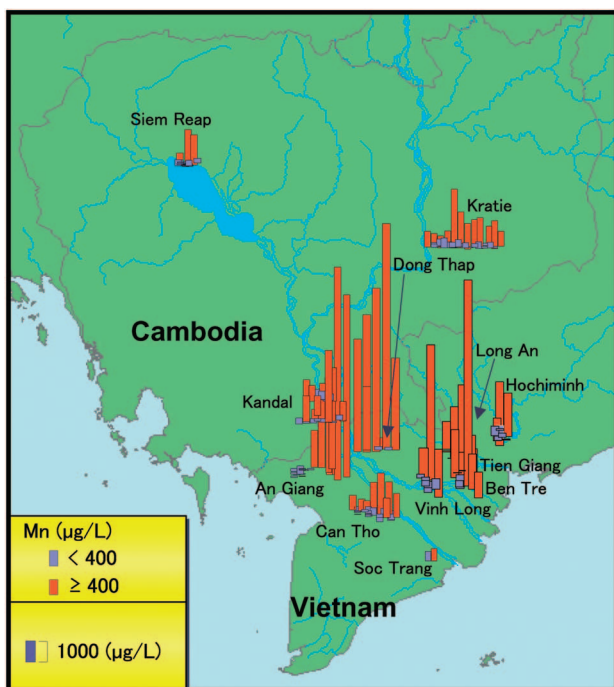


Fig. 3. Geographical Distribution of Mn in Groundwater from the Mekong River Basin
 Red and blue bars mean that the concentration is higher and lower than the WHO guideline, respectively.

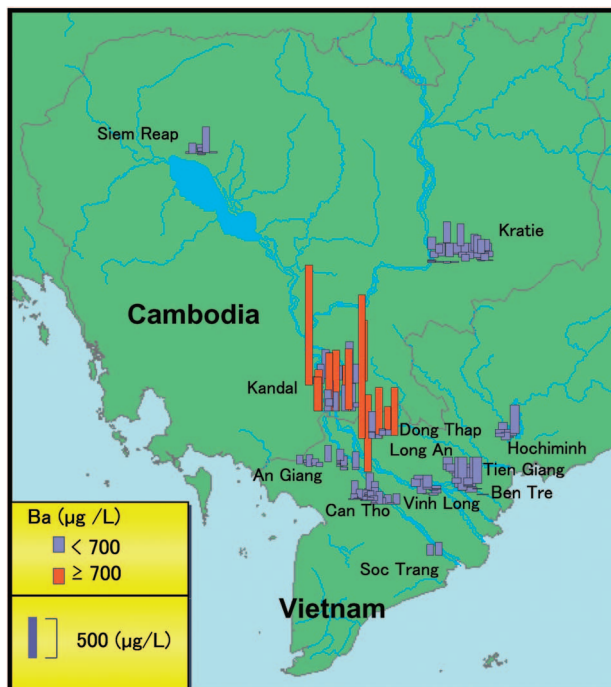


Fig. 4. Geographical Distribution of Ba in Groundwater from the Mekong River Basin
 Red and blue bars mean that the concentration is higher and lower than the WHO guideline, respectively.

トの体内では、無機ヒ素として取り込まれたヒ素は MMA、さらには DMA へとメチル化され、尿に排出されることが知られている。⁹⁾ そのため尿中ヒ素の化学形態に関する情報は、ヒ素の暴露形態や代謝の影響を考えるために重要である。そこで地下水のヒ素汚染地帯であることが知られているベトナム北部の Ha Nam 及び Ha Tay の住民から採集した尿を化学分析に供した。その結果、主として DMA が検出されたものの、3 価や 5 価の無機ヒ素 (iA [III]・iA [V]) も存在していたことから、住民は井戸水を介して無機ヒ素に暴露されていると推察された。

尿中総ヒ素化合物濃度と井戸水中総ヒ素化合物濃度の間には有意な正の相関関係が認められた。また各化合物別に解析しても、尿中 DMA や iA [III]・iA [V] の濃度と井戸水中総ヒ素化合物濃度の間には有意な正の相関関係を確認した (Fig. 5)。一方、魚介類の摂取に由来すると考えられるアルセノベタイン (AB) 濃度と井戸水の総ヒ素化合物濃度の間には有意な相関関係は認められなかった。こうした結果も、Ha Nam 及び Ha Tay の住民が井戸水を介して無機ヒ素に暴露されている可能性を支持した。

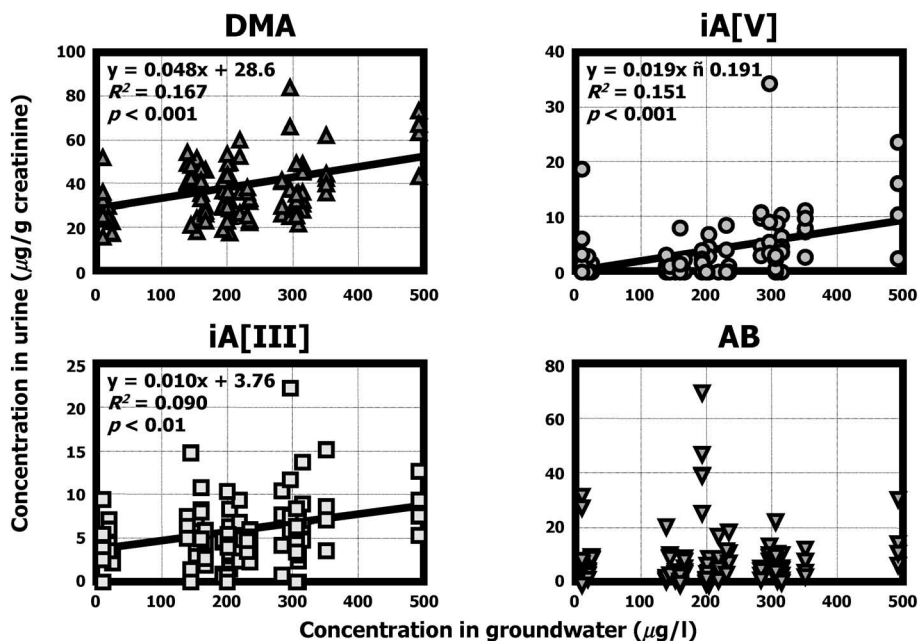


Fig. 5. Relationships between Concentrations of Total As in Groundwater and Concentrations of Each Arsenic Compound in Human Urine

3. ダイオキシン暴露した魚類胚の形態異常発生の分子メカニズム

3-1. ダイオキシン類とアリアルハイドロカーボンレセプター ダイオキシン類は難分解性であることから環境中に長期間残留し、生態系で食物連鎖を介して栄養段階高次の生物へ高濃縮される。さらに高等動物に対しては極微量であっても、催奇形性・神経毒性・免疫毒性・内分泌かく乱作用など多様な毒性を及ぼす。このためダイオキシン類の環境汚染に伴う野生生物への影響が懸念されている。これまでもダイオキシン類の生物モニタリング調査は地域的・地球的規模で行われ、その汚染実態は明らかにされつつあるが、⁶⁻⁸⁾ 毒性影響とその発現機序はまだ十分に解明されている訳ではなく、リスク評価の手法も依然として十分に確立されている訳ではない。

ダイオキシン類の主要な毒性は、アリアルハイドロカーボンレセプター (AHR) を介することが知られている。すなわちダイオキシン類は生体内に取り込まれると AHR と結合し、薬物代謝酵素の一種であるシトクロム P450 1A (CYP1A) や細胞増殖・分化の制御に関係する遺伝子群の発現を変化させ、様々な毒性影響を惹起する。⁹⁾ このダイオキシン類による AHR 活性化とそれに続く標的遺伝子の発現を通じたシグナル伝達経路に関する研究成果は、齧

歯類などモデル動物由来のものがほとんどであるが、その知見の多くは多様な動物種に適用できると考えられている。一方、既に数種のモデル動物で明らかのように、ダイオキシン類に対する毒性の症状及び感受性は、モデル動物種・系統間で大きく異なり、¹⁰⁾ このことは野生動物種にも該当すると予想される。この症状・感受性の種差を説明する一要因として、各生物固有の AHR の構造的・機能的な差が考えられている。したがって、ダイオキシン類の生物種特異的な毒性影響・感受性、さらには生態系でのリスクについて評価するためには、AHR の遺伝情報や機能を系統的・生態学的に重要な生物種間で比較検討することが不可欠である。しかしながら、それらを比較生物学的に解析した研究例は、現在でも極めて少ない。

魚類はダイオキシン類に対して極めて高感受性であることが知られており、¹⁰⁾ 胚発生段階で 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の暴露を受けると、卵黄嚢浮腫・血流低下・頭骨奇形などの形態異常を呈する。¹¹⁻¹³⁾ 最近 AHR に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた研究から、魚類でも TCDD 毒性を媒介するのは AHR シグナル伝達経路であることが明らかになった。¹⁴⁾ ところが魚類 AHR の機能に関する研究は、マミチヨグ (killifish; *Fundulus heteroclitus*) やゼブラフィッシュ

ユ (zebrafish; *Danio rerio*) などの実験魚に限定されており、哺乳類 AHR に比べると数少ない。特に水産資源として重要な魚種に関する知見はほとんどないのが現状である。また魚類は哺乳類と異なり、2 種以上の AHR 異性体を保持することが知られているが、¹⁵⁻¹⁸⁾ それらの機能特性や生理学的・毒性的役割についても十分に理解されている訳ではない。魚類におけるこのような複数の AHR 異性体の存在は、哺乳類では確認されておらず、ラットやマウスのダイオキシン類投与試験では予測できない、多様な毒性発現機序の存在を暗示している。

マダイ (red seabream: *Pagrus major*) はスズキ目に属しており、わが国で最も重要な水産資源の一種である。スズキ目はアジ・サバなど水産重要資源種が多く含まれ、その種数は真骨魚類の 50% 以上を占める。マダイは水圏生態系で栄養段階高次に位置しており、かつ長寿命であることから、長期間ダイオキシン類に暴露される危険性が高い種である。しかしながら、スズキ目を対象としたダイオキシン類の影響や感受性に関する報告例はない。そこでわれわれはマダイのダイオキシン類に対する毒性影響

や感受性、さらにそれらを規定する分子メカニズムの解明を目的とし、マダイ AHR 異性体の分子的特徴と胚発生への毒性影響の関係について解析した。

3-2. マダイ AHR 異性体の同定と分子的特徴

マダイ AHR cDNA の全長塩基配列は、肝臓若しくは心臓から全 RNA を抽出し、mRNA 精製後、RT-PCR 及び RACE 法により決定した。結果として、マダイから 2 種類の AHR 異性体を同定することに成功した。系統学的解析の結果、一方は魚類 AHR1 clade に、他方は魚類 AHR2 clade に属することが明らかになった (Fig. 6)。マダイ AHR1 cDNA は、846 アミノ酸をコードしており、予想分子サイズは 93.2 kDa であった。マダイ AHR2 については、990 アミノ酸、予想分子サイズ 108.9 kDa であった。

マダイ AHR 異性体のアミノ酸配列を種間比較した結果、マダイ AHR1 のアミノ酸配列はメダカ (medaka: *Oryzias latipes*) AHR1 α と最も高い相同性 (69%) を示した。マダイ AHR2 の場合は、マミチヨグ AHR2 との相同性 (57%) が高かった。マダイ AHR1 と AHR2 のアミノ酸相同性は、わず

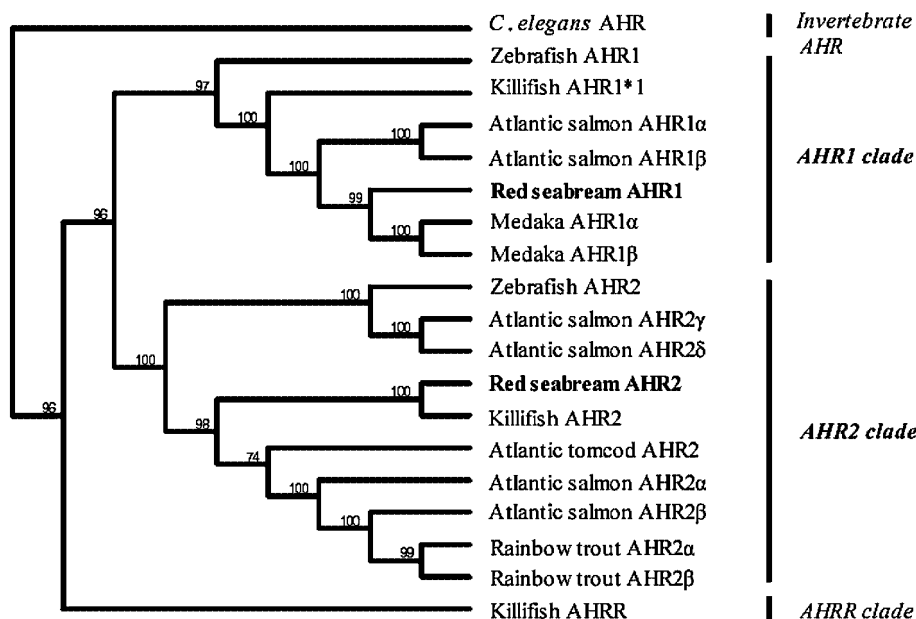


Fig. 6. Phylogenetic Analysis of AHR Amino Acid Sequences

The amino acid sequences of AHR were aligned using Clustal W analysis. Phylogenetic tree of AHR genes was constructed by the neighbor-joining method using Mac Vector 7.1 program. Bootstrap values based on 1000 sampling are shown above each branch. Positions with gaps are excluded and corrections were made for multiple substitutions. Accession numbers used were: *C. elegans* AHR (AF039570), zebrafish AHR1 (AF258854), killifish AHR1*1 (AF024591), Atlantic salmon AHR1 α (AY456090), Atlantic salmon AHR1 β (AY456091), medaka AHR1 α (AB065092), medaka AHR1 β (AB065093), zebrafish AHR2 (AF063446), Atlantic salmon AHR2 γ (AY052499), Atlantic salmon AHR2 δ (AF495590), killifish AHR2 (U29679), Atlantic tomcod AHR2 (AF050489), Atlantic salmon AHR2 α (AY219864), Atlantic salmon AHR2 β (AY219865), rainbow trout AHR2 α (AF065137), rainbow trout AHR2 β (AF065138) and killifish AHRR (AF443441).

かに 32%であった。

AHR アミノ酸配列をドメイン別に比較すると、マダイ各 AHR 異性体の N 末端側にある bHLH 及び PAS ドメインは相対的によく保存されており、両異性体ともにレセプター型転写因子としての機能を保持していると推察された。

リガンド結合ドメインに関する知見として、マウス AHR のリガンド結合能は特定のアミノ酸の変異に影響されることが知られている。TCDD に対して高感受性である C57/BL6J マウスと低感受性である DBA2 マウスの AHR は、TCDD との結合親和性が大きく異なり (C57/BL6J > DBA2)、この違いはリガンド結合ドメイン内にある 375 番目のアミノ酸の変異 (C57/BL6J: アラニン, DBA2: バリン) に依存している。¹⁹⁾ マダイの AHR 異性体はともに相当部位が C57/BL6J マウス AHR と同じアラニンであったことから、両異性体のリガンド親和性は高いと考えられた。

3-3. 卵への TCDD 暴露 マダイの AHR 遺伝的タイプと TCDD 感受性の関係を明らかにするため、発生卵に対する TCDD 暴露試験を行い、半数致死濃度 (LC₅₀) を求めた。また形態学的な毒性影響についても観察した。暴露試験は受精後 10 時間の卵を 3.1—100 ppb の TCDD 含有海水で 90 分間暴露させたのち、TCDD 非含有海水に移して所定の時間まで飼育した。なお、TCDD の暴露については実際に卵へ移行した量 (濃度) で評価した。

TCDD 処理による孵化時間への影響を調査した結果、対照群と TCDD 処理群の間に明確な差は認められなかった。孵化はすべての処理群で受精後 42 時間 (42 hpf) から 47 hpf までに終了した。

3-4. 孵化後致死率と半数致死濃度 TCDD 処理した受精卵の 90% 以上が孵化に成功したことから、次に孵化後の致死率について時間経過を観察した。各濃度群の孵化仔魚 100 個体について、48・66・78・90 及び 96 hpf の死亡数を計数した結果、高濃度投与群では 66 hpf (孵化後 18 時間) から濃度依存的な致死が観察され、1577 pg/g 群では 96 hpf でほぼ 100% の死亡が確認された (Fig. 7)。96 hpf (孵化後 3 日) は仔魚の卵黄の吸収が進んで自発的な遊泳が始まる時期であり、Sac fry 後期—Swim-up fry 初期に相当する。一般に TCDD 暴露を受けた魚類発生卵は、孵化後死亡し始め、swim-

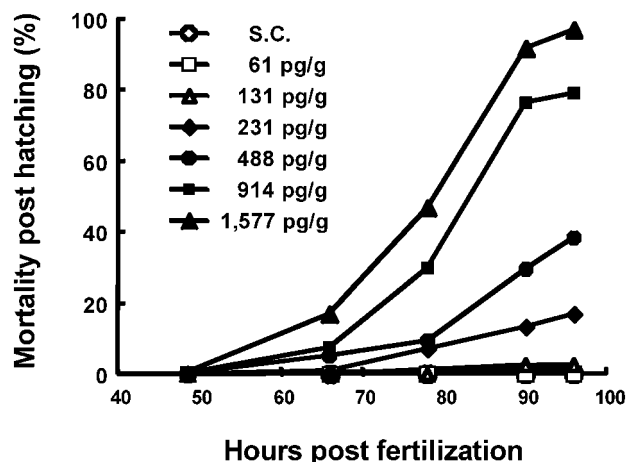


Fig. 7. Time Course of Post-hatching Mortality in Embryo Exposed to TCDD
Values are mean of $n=2$. SC: solvent control.

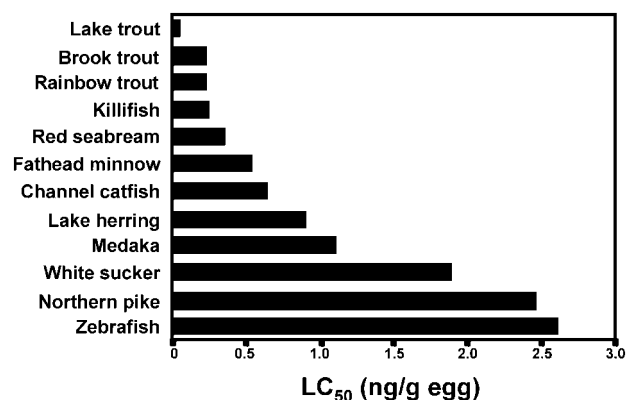


Fig. 8. Interspecies Comparison of LC₅₀ in Embryos Exposed to TCDD

up 前後に死亡率は顕著に上昇する。²⁰⁻²²⁾ 同様の傾向はマダイでも認められた。

過去の報告では多くの場合、発生卵の LC₅₀ は仔魚の自発的な遊泳が始まる時期に算出されているので、マダイでは 96 hpf で LC₅₀ を決定した。マダイの 96 hpf LC₅₀ は 0.36 ng TCDD/g (0.32—0.40 : 95% 信頼限界) となった (Fig. 8)。この値はマミチヨグの LC₅₀ と類似しており、マダイはこれまでに知られている魚種のなかでも高感受性種に属することが明らかとなった。

魚類は 2 種以上の AHR 異性体を有している。マダイのほか、マミチヨグ・ゼブラフィッシュからは AHR1 及び AHR2, ニジマス (rainbow trout: *Oncorhynchus mykiss*) からは 2 種の AHR2 (AHR2 α ・AHR2 β)、メダカからは 2 種の AHR1 (AHR1 α ・

AHR1 β) がこれまでに同定されてきた。^{13,15-18)}

魚類と哺乳類 AHR の N 末端側機能ドメインは保存性が高いことから、哺乳類 AHR でリガンド結合に関与するアミノ酸残基は、魚類 AHR でも同様の役割を果たしていると考えられる。そこで、マウスで認められた「375 番目のアミノ酸残基と TCDD 感受性の関係」を魚類 AHR に適用し、TCDD 感受性の種差について考察した。

先述したように、高感受性 C57/BL6J マウス AHR の 375 番目アミノ酸残基はアラニンである。一方、低感受性のゼブラフィッシュでは、AHR2 のアミノ酸はアラニンではあるものの、AHR1 の場合はトレオニンである。興味深いことに、ゼブラフィッシュ AHR1 は TCDD 結合能を消失していることが最近報告された。¹⁸⁾ このリガンド結合ドメインのアミノ酸変異がゼブラフィッシュ AHR1 のリガンド結合能の欠如にどのように関係するかは依然として不明であるが、ゼブラフィッシュ AHR1 の機能が TCDD に対する低感受性に寄与しているかもしれない。対照的に、マダイ AHR1・AHR2 のアミノ酸残基は、高感受性マミチヨグの AHR1・AHR2、及びニジマスの AHR2 α ・AHR2 β の場合と同様に、アラニンである。こうした結果は、マウス AHR の 375 番目アミノ酸残基に相当する部位が TCDD 感受性の指標になることを示唆している。

3-5. 孵化仔魚への形態学的影響 TCDD 暴露

の結果、孵化仔魚の成長が遅延した。各処理群の体長及び体幅を測定した結果、孵化直後は対照群と TCDD 処理群の間に有意差はなかったが、54 hpf から 231 pg/g 以上の処理群で体長・体幅は有意に減少した (Fig. 9)。また体長・体幅に対する TCDD の影響は濃度依存的であった。

TCDD 暴露による成長遅延は多くの魚種で報告されている。²³⁾ その原因として、卵黄からの栄養分の輸送阻害が考えられている。^{12,24)} そこで、卵黄サイズの経時変化を調査した。すべての処理群で発生に伴い卵黄サイズが減少し、卵黄吸収の遅延が観察された (Fig. 10)。したがって成長遅延が生じたのは、TCDD の影響により卵黄から各組織に栄養が十分に輸送されなかったためであろう。

卵黄からの栄養分輸送に重要な役割を果たしているのは卵黄静脈であるが、この血管に対する TCDD の影響は、これまでも調査されてきた。メダカを用いた研究では、TCDD 暴露によって卵黄静脈にアポトーシスが発生した。²⁴⁾ またニジマスでは TCDD 処理による卵黄静脈の血流低下とともに、卵黄吸収の遅延が確認されている。¹²⁾

魚類の初期発生における TCDD 毒性の中でも、浮腫はよく知られた症状である。マダイでも孵化前後の個体の卵黄嚢に浮腫を確認した (Fig. 11)。孵

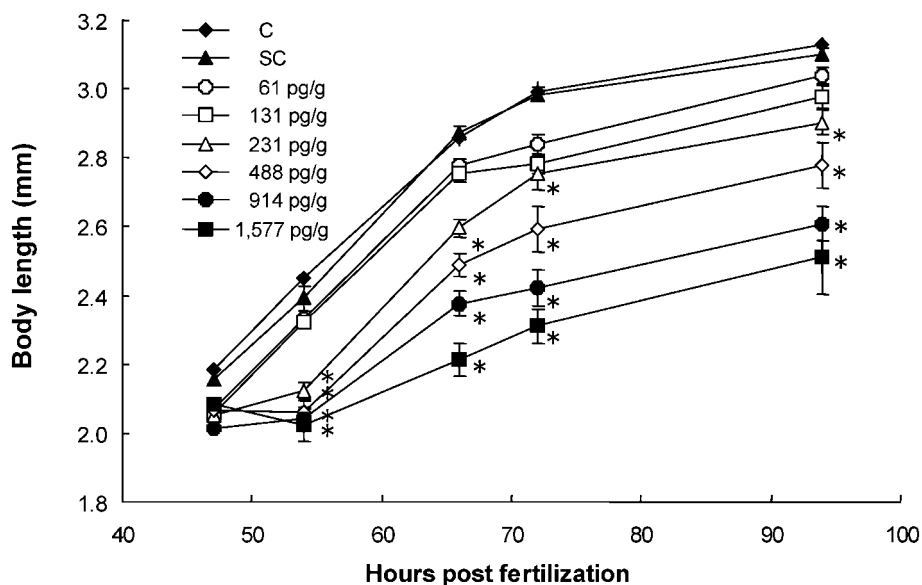


Fig. 9. Time Course of Early Life Stage Development (Body Length) in Embryo Exposed to TCDD

Values are mean \pm S.E. of $n=15$. C: control, SC: solvent control. *: Significant difference ($p<0.05$) between TCDD-treatment and its respective solvent control at each hour post fertilization.

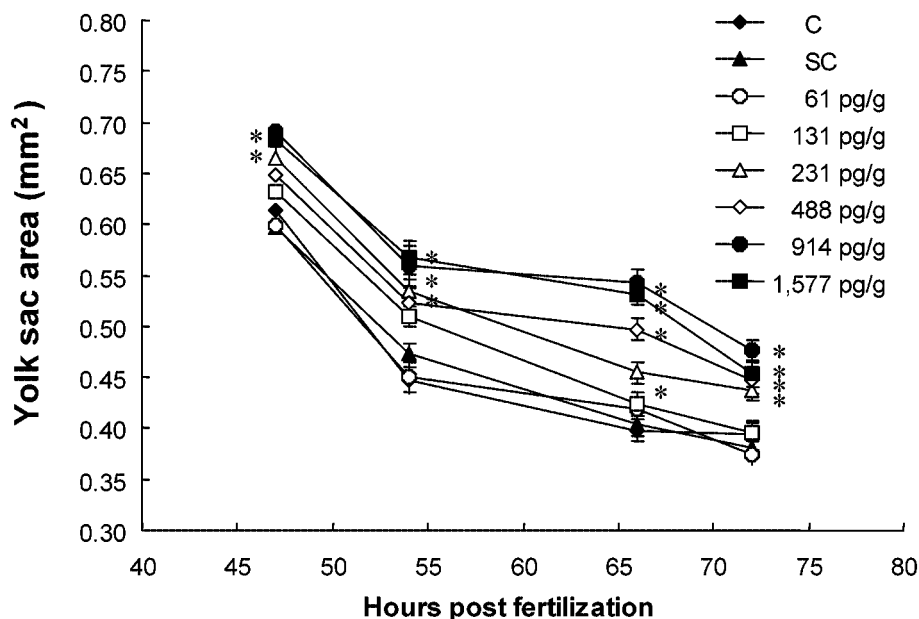


Fig. 10. Time Course of Yolk Sac Area in Embryo Exposed to TCDD

Values are mean \pm S.E. of $n=15$. C: control, SC: solvent control. *: Significant difference ($p<0.05$) between TCDD-treatment and its respective solvent control at each hour post fertilization.

化後の個体について、卵黄囊周囲の体液貯留部位の投射面積を測定したところ、61及び131 pg/g TCDD 処理群では対照群と有意差はなかったが、231 pg/g 以上の処理群では体液貯留量は暴露濃度依存的に増加する傾向がみられた (Fig. 12).

孵化仔魚の鰭原基の面積を鰭サイズとし、これを測定した結果、TCDD 処理群で孵化直後から有意な鰭の低形成が認められた (Fig. 11)。このことは、TCDD が孵化仔魚の遊泳能力低下へ導くことを意味する。実際に 488 pg/g 以上の TCDD 処理群では、背骨の変形も認められ、正常に遊泳できない個体が多くみられた。

下顎や鼻の低形成も TCDD の毒性影響として孵化仔魚ではよく観察される症状である。¹¹⁾ マダイでは通常孵化後 5 日目以降に顕著な下顎の発達がみられるので、本研究では 190 hpf (孵化後 7 日目) にて下顎発達の評価を行った。下顎発達の指標として、下顎の長さを体長に対する割合で表示した。その結果、暴露濃度依存的な下顎の低形成が認められた (Figs. 11, 13)。特に 231 pg/g 群では、下顎がほとんど形成されていない個体が多かった。

3-6. AHR・CYP1A mRNA 発現への影響 形態学的観察について、TCDD が AHR1・AHR2 及び CYP1A の mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。

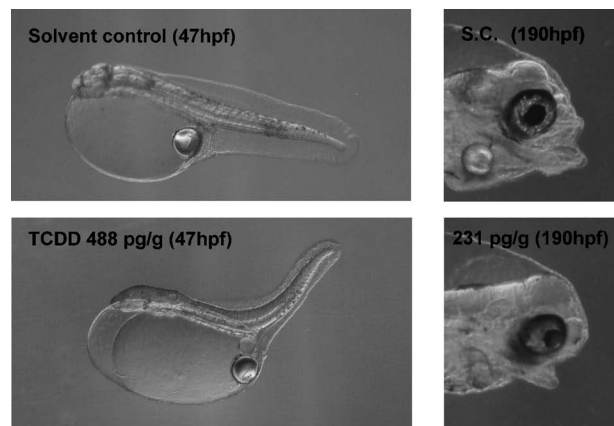


Fig. 11. Development of Yolk Sac Edema, Retarded Fin Growth, Spinal and Craniofacial Deformities in TCDD-treated Red Seabream Embryos

各 mRNA の経時的な発現量を、対照群に対する TCDD 処理群の比で示したのが Fig. 14 である。結果として、AHR1 mRNA の発現量比は経時的にすべての処理群で 1 前後を示し、AHR1 の発現量は TCDD によって影響されないことが分かった。対照的に、AHR2 mRNA 発現量は TCDD により濃度依存的に増加した。AHR2 mRNA 発現量比は 42 hpf では 60 pg/g 群で 2.2 倍、231 pg/g 群で 3.9 倍、1577 pg/g 群で 5.5 倍であった。さらに CYP1A

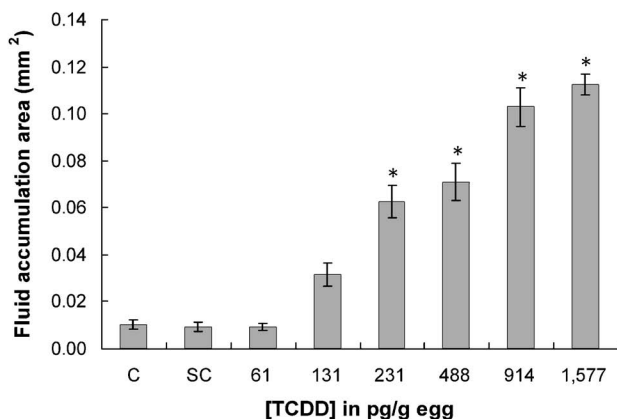


Fig. 12. Effect of TCDD Exposure on Fluid Accumulation in Yolk Sac of Embryo at 54 hpf

Values are mean \pm S.E. of $n=20$. C: control, SC: solvent control. *: Significant difference ($p<0.05$) between TCDD-treatment and solvent control.

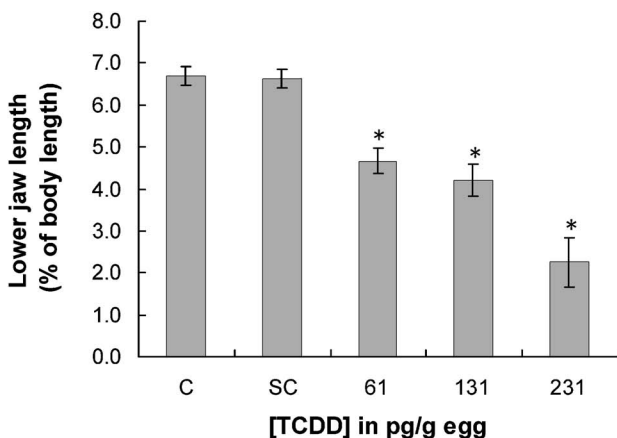


Fig. 13. Effect of TCDD Exposure on Low Jaw Development of Embryo at 190 hpf

Values are mean \pm S.E. of $n=15$. C: control, SC: solvent control. *: Significant difference ($p<0.05$) between TCDD-treatment and solvent control.

mRNA も濃度依存的に上昇し、36 hpf では 60 pg/g 群で 18 倍、231 pg/g 群で 80 倍、1577 pg/g 群で 120 倍であった。以上の結果、AHR1・AHR2 の経時的発現パターンが異なっていたことから、AHR は異性体特異的な転写制御を受けていると考えられた。また、AHR2 は CYP1A と同様に、リガンド (TCDD) 依存的に転写制御されていることも推察された。CYP1A mRNA の場合は、他の魚種と同様に TCDD により劇的な誘導がみられた。

3-7. 形態学的異常と AHR・CYP1A mRNA 発現との関係 TCDD 暴露による毒性影響と AHR1・AHR2 及び CYP1A mRNA 発現量 (対対照群比)、及び発生に伴う各現象の経時変化につい

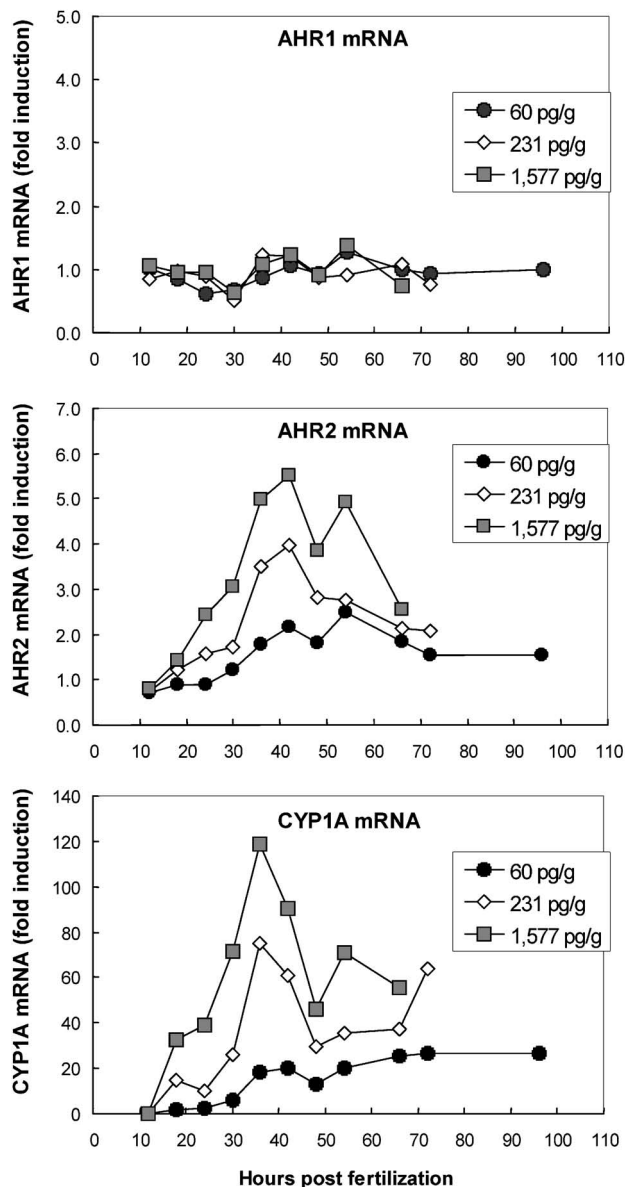


Fig. 14. Time Course of Induction of AHR1, AHR2 and CYP1A mRNAs in Embryo Exposed to TCDD

て、1577 pg/g 処理群の結果を Fig. 15 に示した。TCDD 暴露による AHR2 及び CYP1A mRNA の発現量の増加は、毒性が発現する以前に認められた。両遺伝子の発現量は心拍 (28 hpf) や血液循環 (32 hpf) が始まる時期に最大となる傾向を示したが、卵黄脳浮腫は 36 hpf 頃から認められ、孵化直後にその発生率は 100% に達した。

魚類の血液循環系は TCDD の主要なターゲットの 1 つであり、TCDD 暴露は心臓や血管内皮に CYP1A を誘導することや、アポトーシスを誘発することなどが報告されている。^{24,25)} Guiney et al.

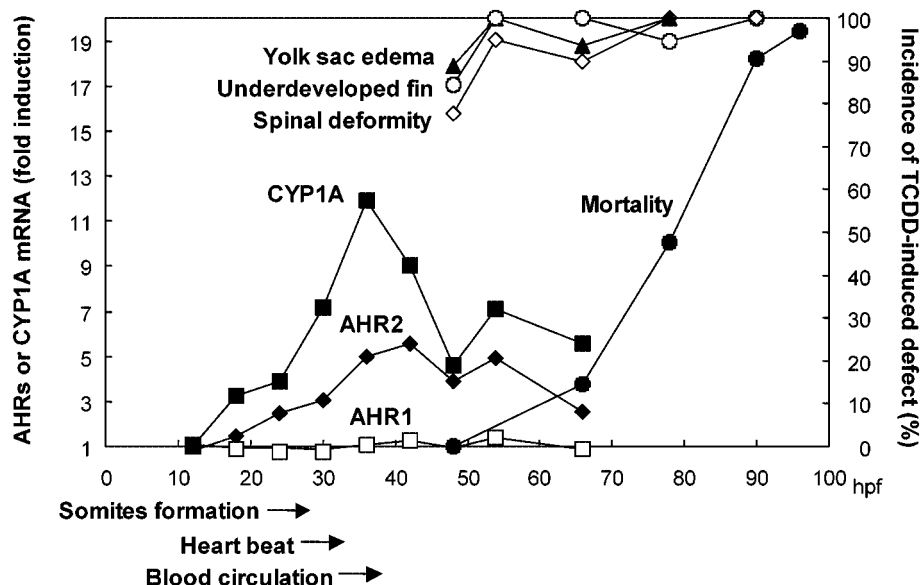


Fig. 15. Relationship of Time Courses between Induction of AHR1, AHR2 and CYP1A mRNAs and Incidence of Toxic Effects in Embryo Exposed to 1577 pg TCDD/g
Induction of CYP1A mRNA is expressed in the magnification of $\times 1/10$.

(2000) は、TCDD 暴露によりレイクトラウト (lake trout: *Salvelinus namaycush*) に生じた浮腫液は血液の過剰ろ過に由来することを指摘し、血管内皮に高発現した CYP1A によって血管の水透過性がかく乱されたことを原因として挙げている。²⁶⁾ また Hill et al. (2004) は、TCDD による浮腫は体表面の水透過性バリアのかく乱が一因であることを、マンニトール等張水を用いた実験から明らかにした。²⁷⁾ ゼブラフィッシュ仔魚の体表面には AHR2 が発現し、TCDD 暴露によって CYP1A が誘導される。²⁸⁾ さらに Teraoka et al. (2003) はゼブラフィッシュ発生卵に CYP1A-MO を注入した実験から、CYP1A 誘導が心嚢浮腫や血流低下といった TCDD 毒性に直接関与することを指摘した。²⁹⁾ 対照的に、Carney et al. (2004) は Teraoka et al. (2003) と同様の実験を行い、心嚢浮腫や血流低下に対して AHR2-MO による阻害効果は認めたものの、CYP1A-MO の効果は認められなかったと報告した。^{29,30)} これら過去の報告と AHR2 及び CYP1A 発現量の経時変化に関する本研究の結果を併せて考えれば、マダイでも TCDD によって活性化された AHR2 を介して血管・体表面で水透過性が変化し、浮腫が形成されたと推察される。マダイで誘導された CYP1A が浮腫形成に直接関与するかどうかについては、さらなる検討が必要である。

以上の結果から、AHR の機能は異性体及び種特異的であることから、ダイオキシン類の毒性は生物種毎に異なる反応・感受性によって発現することが示唆された。つまり、ダイオキシン類による野生生物個体の生態リスクを評価する場合、モデル動物の結果を適用するだけでは不十分である。今後はダイオキシン類に対する野生生物特異的な反応・感受性解明のための研究手法や、生態系保全のためのリスク評価の基準を確立することが重要である。

4. 生物環境試料バンク (es-BANK)

人間活動や産業活動によって生産・利用された化学物質がヒトや生態系に有害な影響を及ぼした事例は枚挙にいとまがない。化学物質による環境と生態系の汚染は、今日の環境問題の中でも極めて重要なテーマである。しかしながら、化学汚染を取り巻く情勢は変化し、かつての水俣病のような重篤な急性毒性の事例は影を潜め、これに代わって環境ホルモンや遺伝毒性・発癌物質などの化学汚染に代表されるように、影響が発現するまで長時間を要し、発覚したときには既に深刻化・広域化している例が多数みられるようになった。PCB やダイオキシン等の残留性有機汚染物質 (POPs) による環境と生物の汚染が地球規模で進行したことに対処するため、2004 年にその排出と汚染を防止する国際条約 (ストックホルム条約, 別名 POPs 条約) が発効され

たのは、その典型例である。

一方、人類が意図的に作り出し、日常的に利用されている化学物質だけでも数万種類が存在する。さらにダイオキシン類に代表されるように、意図的物質の生産や処理過程あるいは廃棄の過程で副次的に生産される物質も増大している。したがって、現在の環境監視システムでは捕捉できない化学物質が環境に流出し、ヒトや生物の生命を脅かす事態は起こり得ることであり、その対処策として時空間を越えて環境を監視できる新しいシステムの構築が国内外で求められている。すなわち、汚染の過去を復元して将来予測に役立てたり、汚染の空間的広がりを解析したりするには、長期的かつ広域的に収集した環境試料を適切に保管しながら有効活用できるシステムとしてスペシメンバンクを整備する必要がある。総合科学技術会議が策定した第2期科学技術基本計画のなかでも、環境研究の知的基盤としてスペシメンバンクの必要性が明記されている。

愛媛大学では過去40年以上に渡り、世界各地から野生生物個体や臓器試料、大気・海水・土壌などの環境試料を収集し、これらを活用した有害化学物質の研究を展開してきた。これら試料は冷凍保存されているが、その総数は現在10万点にも及び、世界でも有数のコレクションになっている。これら試料の収集を今後も進めるとともに、試料を体系的に整理してデータベース化し、その有効利用を図るための施設が「生物環境試料バンク」である(英名は、Environmental Specimen Bank for Global Monitoring: es-BANK)。試料のデータベースは愛媛大学沿岸環境科学研究センターホームページ (<http://www.ehime-u.ac.jp/~cmes/mokuji/mokuji.htm>) より閲覧することができる。

生物環境試料バンク(es-BANK)棟は2005年12月に完成した。この棟の完成により、これまで民間企業の冷凍倉庫に保管してあった試料を愛媛大構内で管理することができるようになった。施設は鉄筋三階建て延べ800平方メートルで、 -30°C の冷凍試料保管室のほか、液体窒素による凍結試料保管室・解剖室・試料処理室・実験室・居室を備えている。施設は2006年度さらに解剖室・試料処理室・実験室等が整備され、本格的な運用が始まったところである。

REFERENCES

- 1) Karim M. M., *Water Res.*, **34**, 304–310 (2000).
- 2) Berg M., Tran H. C., Nguyen T. C., Pham H. V., Schertenleib R., Giger W., *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 2621–2626 (2001).
- 3) Nordstrom D. K., *Science*, **296**, 2143–2145 (2002).
- 4) “WHO Guidelines for Drinking-water Quality,” 3rd ed., World Health Organization, Geneva, 2004.
- 5) Styblo M., Drobna Z., Jaspers I., Lin S., Thomas D. J., *Environ. Health Perspect.*, **110 Suppl 5**, 767–771 (2002).
- 6) Iwata H., Watanabe M., Okajima Y., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E. A., *Environ. Sci. Technol.*, **38**(13), 3505–3513 (2004).
- 7) Kubota A., Iwata H., Tanabe S., Yoneda K., Tobata S., *Environ. Sci. Technol.*, **38**(14), 3853–3859 (2004).
- 8) Watanabe M. X., Iwata H., Watanabe M., Tanabe S., Subramanian A. N., *Environ. Sci. Technol.*, **39**(12), 4421–4430 (2005).
- 9) Mimura J., Fujii-Kuriyama Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 263–268 (2003).
- 10) Hahn M. E., *Mar. Biotechnol.*, **3**, 224–238 (2001).
- 11) Henry T. R., Spitsbergen J. M., Hornung M. W., Abnet C. C., Peterson, R. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 56–68 (1997).
- 12) Hornung M. W., Spitsbergen J. M., Peterson R. E., *Toxicol. Sci.*, **47**, 40–51 (1999).
- 13) Kawamura T., Yamashita I., *Zoolog. Sci.*, **19**, 309–319 (2002).
- 14) Prash M. L., Teraoka H., Carney S. A., Dong W., Hiraga T., Stegeman J. J., Heideman W., Peterson R. E., *Toxicol. Sci.*, **76**, 138–150 (2003).
- 15) Abnet C. C., Tanguay R. L., Hahn M. E., Heideman W., Peterson R. E., *J. Biol. Chem.*, **271**, 15159–15166 (1999).
- 16) Karchner S. I., Powell W. H., Hahn M. E., *J. Biol. Chem.*, **274**, 33814–33824 (1999).
- 17) Tanguay R. L., Abnet C. C., Heideman W., Peterson R. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1444**, 35–48 (1999).

- 18) Andreasen E. A., Hahn M. E., Heideman W., Peterson R. E., Tanguay R. L., *Mol. Pharmacol.*, **62**, 234–249 (2002).
- 19) Ema M., Ohe N., Suzuki M., Mimura J., Sogawa K., Ikawa S., Fujii-Kuriyama Y., *J. Biol. Chem.*, **269**, 27337–27343 (1994).
- 20) Elonen G. E., Spehar R. L., Holcombe G. W., Johnson R. D., Fernandez J. D., Erickson R. J., Tietge J. E., Cook P. M., *Environ. Toxicol. Chem.*, **17**, 472–483 (1998).
- 21) Walker M. K., Spitsbergen J. M., Olson J. R., Peterson R. E., *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **48**, 875–883 (1991).
- 22) Walker M. K., Peterson R. E., *Environ. Toxicol. Chem.*, **5**, 817–820 (1994).
- 23) Peterson R. E., Theobald H. M., Kimmel G. L., *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 283–335 (1993).
- 24) Cantrell S. M., Joy-Schlezinger J., Stegeman J. J., Tillitt D. E., Hannink M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**, 24–34 (1998).
- 25) Guiney P. D., Smolowitz R. M., Peterson R. E., Stegeman J. J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 256–273 (1997).
- 26) Guiney P. D., Walker M. K., Spitsbergen J. M., Peterson R. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **168**, 1–14 (2000).
- 27) Hill A. J., Bello S. M., Prash A. L., Peterson R. E., Heideman W., *Toxicol. Sci.*, **78**(1), 78–87 (2004).
- 28) Andreasen E. A., Spitsbergen J. M., Tanguay R. L., Stegeman J. J., Heideman W., Peterson R. E., *Toxicol. Sci.*, **68**, 403–419 (2002).
- 29) Teraoka H., Dong W., Tsujimoto Y., Iwasa H., Endoh D., Ueno N., Stegeman J. J., Peterson R. E., Hiraga T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 223–228 (2003).
- 30) Carney S. A., Peterson R. E., Heideman W., *Mol. Pharmacol.*, **66**, 512–521 (2004).