

ウニ卵を用いる水質の生物試験法に関する研究

—環境ホルモンによるウニ卵への影響調査—

The Research on Biological Examination of the Water Quality Using Spawns of Sea Urchin

—The Effect of Endocrine Disruptors for Spawns of Sea Urchin—

多田 千鶴子 赤井 紀子 土取 みゆき 砂古口 博文
Chizuko TADA Noriko AKAI Miyuki TUCHITORI Hirofumi SAKOGUCHI

要 旨

地球温暖化やオゾン層破壊などとともに大きな注目を集めてきた環境問題に環境ホルモンがあります。この環境ホルモンが種々の代謝機能をかく乱し、さまざまな症状を引き起こして生態への悪影響を与えています¹⁾。そこで農薬、殺虫剤、可塑剤、防腐剤、除草剤、プラスチックモノマーなど多く使用されている環境ホルモン物質（5物質）の生体への影響をウニ卵を用いてそれぞれの影響度を調べた。

エストロゲン暴露により形態異常、骨形成異常、性分化率の異常がみられと井口泰泉教授の研究結果と同じように環境ホルモン物質（5物質）がウニ卵への発生影響として多細胞の出現や形態異常としてアポロ宇宙船型囊胚の出現や骨形成異常として骨の突出や、歪みなどがみられた。しかし性分化までの調査はできなかった。また、環境ホルモン物質（5物質）を溶かす溶媒について検討した。溶媒によるウニ卵の影響を少なくするためにバフンウニを用いて調べた。3溶媒について調べたが、3溶媒ともウニ発生の段階において影響がそれぞれ異なるが、0.1g/mL含まれている濃度ではエタノールは影響がないがジメチルスルホキシドは影響度に変動があった。

キーワード：環境ホルモン ウニ卵 生物検定 細胞分裂 異常胚

I はじめに

野生生物の生殖異常やヒト精子数の減少が報告されて以来、内分泌攪乱物質である環境ホルモンが世界的な社会問題としてクローズアップされて以来、物質等による環境汚染化学物質の環境中の濃度分布やそれらの物質が生体へのホルモン様作用により代謝機能を乱し環境に及ぼす影響などについて、様々な方面において研究が進められている。国においては、環境庁が平成10年5月に「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画SPEED喉98」を策定して、環境汚染の状況、及び野生生物等への影響にかかる実態調査の推進、試験研究及び技術開発の推進を、図っているところである。

そこで、環境ホルモンが生物の生態系に与える影

響を最近OECDで検定生物候補に挙っているウニ卵を用いて影響調査をした。ウニ卵は同じ条件の卵と精子が多量に得られ人口受精も容易で、比較的短時間で発生経過を顕微鏡下で観察することができること^{1)~5)}他の水生生物の繁殖、生存形態の影響を早く推定できる。環境ホルモンがウニ卵へ与える影響調査を水質の汚染評価資料とするためと、調査物質がホルモ様作用のみならず毒性としての影響を及ぼす濃度の調査をおこなった。

II 調査方法

1 調査期間

(1) 平成13年6月13日～平成13年9月6日

ムラサキウニ（中型）

(2) 平成14年1月～平成14年3月21日

バフンウニ (小型)

2 調査材料及び環境ホルモン調査物質

(1) ウニ

夏期にはムラサキウニで、冬期にはバフンウニを用いて生物試験を行った。

香川県東部の大島、小田湾で採取したウニを香川県水産試験場の大型飼育水槽に入れ、新鮮海水を流入循環しエアレーションを行い自然状態同様で保管したのを使用した。

(2) 海水

香川県水産試験場の新鮮海水をコントロールまたは、希釈水として利用した。水温は夏期は23℃～28℃冬期は12℃～17℃で調査した。

(3) 環境ホルモン物質の溶媒物質

環境ホルモン物質の原液の調整に海水に溶けない物質をジメチルスルホキシド (以下DMSO) で溶した。

(4) 環境ホルモン物質 (5物質)

- ① シマジン (CAT) 1000ppm
- ② フタル酸ジブチル (DBP) 1000ppm
- ③ ビスフェノールA (BPA) 10000ppm
- ④ トリブチルスズ (TBTO) 1000ppm
- ⑤ 2,4ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4D) 100ppm

①, ②, ③, ④はDMSOで溶解して原液とした。

⑤は、水産試験場新鮮海水に溶かして原液とした。

(5) 環境ホルモン物質の溶媒の検討 (バフンウニ)

- ① ジメチルスルホキシド
- ② エタノール
- ③ メタノール

3 検定方法

(1) 0.1M塩化アセチルコリンをウニの囲口部へ0.2mL注射し海水に満たした各々ビーカーの上へ載て自然に放卵、放精させる。

(2) 卵と精子の溶液を作成する。

普通海水で各ウニ卵の受精膜の上昇率が90

%以上であることを確認する。受精膜の上昇率が悪いと生物検定には使えない。

(3) 3mLの普通海水をミニシャーレに入れ卵溶液3滴と精子溶液3滴をくわえて良く混合する。これを対照とする。

(4) 環境ホルモン調査物質も(3)と同様におこなった。

(5) 環境ホルモン調査物質はDMSOの影響が及ばない濃度 (原液の100倍希釈) よりはじめ以後10倍希釈を繰り返してそれぞれの影響濃度を求めた。

(6) 生物検定は、2細胞分裂とプルテウス形成の2回におこなう。

一定時間後ホルマリンで固定して顕微鏡下で200個計数して細胞分裂の状態等を対照と比較しておこなう。

(7) ムラサキウニは第1回分裂60分後プルテウス形成は32時間後の判定、バフンウニは第1回分裂100分後プルテウス形成は49時間後に評価した。

(8) 有害度基準は表1の小林直正著の「環境を調べる」ウニ卵を用いた海水汚染の影響度基準IV (小林 1988) を用いた。普通海水を0とし、生物一般に使われている50%致死量に相当する場合を3と表し0から3の4段階で評価をおこなった。

表1 ウニ卵を用いた海水汚染の影響度基準IV

段階	細胞分裂 (第1回)		プルテウス形成
	1細胞 %	多細胞 %	異常胚 %
3	50～100	15～100	50～100
2	30～49	9～14	30～49
1	10～29	3～8	5～29
0	0～9	0～4	0～4

0 (無影響度海水) 1 (弱影響度海水)
2 (中影響度海水) 3 (強影響度海水)

Ⅲ 結果

受精して発生が進み胞胚となり胞胚は受精膜を破り泳ぐようになる。さらに正常な囊胚はその中に二ヶ所で骨ができ、胚の真ん中に腸ができ始める。囊胚は骨を中心に伸びて初期プルテウスとなる。次第に成長して正常なプルテウスとなる。(写6)

しかし環境ホルモン(5物質)の影響により未受精が見られたり正常にプルテウス形成まで发育しないなど発生阻害がみられた。環境ホルモンの種類により図1, 表2, 表3に示すようにウニの発生に対する影響が異なった。

環境ホルモン物質(5物質)の各々の同濃度においてでも、発生の影響度に差がみられた。なかでもトリブチルスズが強く発生を阻害し³⁾, 10ppt (10^{-11})までも影響がでた。5物質の中でも2,4ジクロロフェノキシ酢酸は10ppm (10^{-5})から1ppb (10^{-9})まで影響が少なく中から弱の影響度であった。

ウニ卵の細胞分裂後の発生段階においては、表2に示すように二細胞期の10ppm (10^{-5})濃度においてトリブチルスズとビスフェノールAが未受精卵と一細胞(写1)が多く、フタル酸ジブチルは、一細胞が多くみられる。また、プルテウス期ではシマジンに異常胚の奇形が多くみられた。表3, 写2の示すようにシマジンとフタル酸ジブチルは、後期囊胚期に亜鉛の影響による異常胚で特に見られるアポロ宇宙船型囊胚(Lallier 1955, Timourian 1968, Kobayashi 1990)の変形囊胚が見られた^{1~4)}。

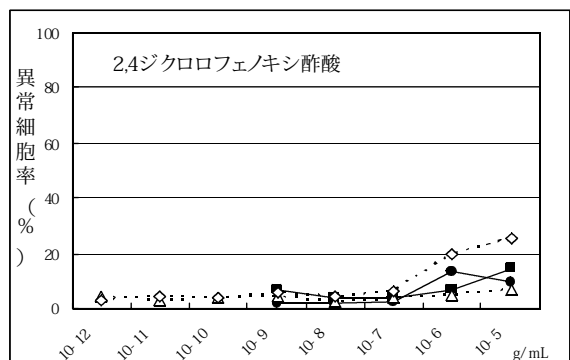
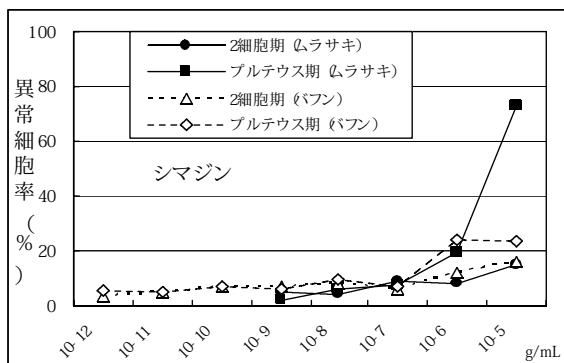
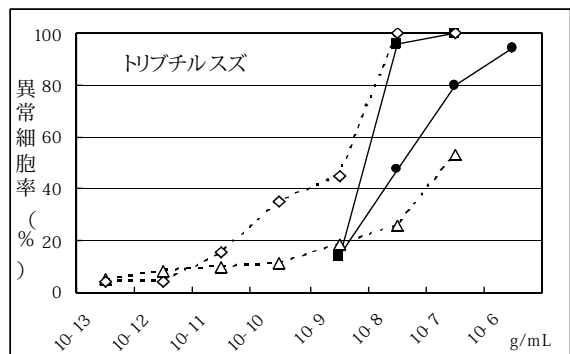
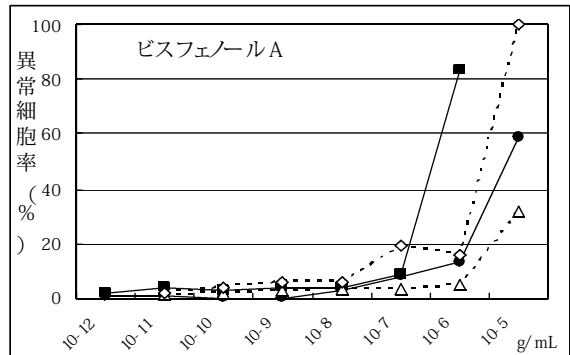
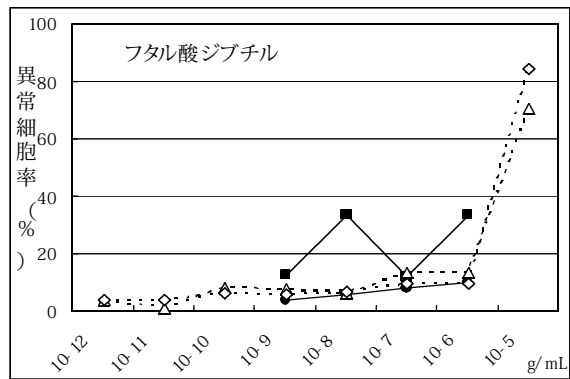


図1 発生段階における異常細胞数

シマジン、フタル酸ジブチル、2,4ジクロロフェノキシ酢酸の物質等の影響で変形プルテウスの骨格先端不融合の骨の異常がみられた。(写5)トリブチルスズは、10ppt (10^{-11})の低濃度において変形囊胚、遅滞プルテウスが見られた。(写3, 4)

ビスフェノールAと2,4ジクロロフェノキシ酢酸は100ppt (10^{-10})シマジンとフタル酸ジブチルは10ppt (10^{-11})トリブチルスズは1ppt (10^{-12})の濃度においてはウニ卵に対する影響がないことが見られた。(表3)

調査環境ホルモン(5物質)において初期発生段階の二細胞期の早くから影響がでることがわかった。特にトリブチルスズの影響がウニの発生の初期の早くから見られた。(表2)

図1に示すように調査環境ホルモン(5物質)においてそれぞれの物質の影響により発生形態が多少異なる。また、ウニの種類により多少異なりムラサキウニ卵とバフンウニ卵へのそれぞれの影響濃度の結果に多少の差がみられた。

溶媒物質DMSOによるムラサキウニ卵とバフンウニ卵への影響濃度が0.1g/mL (10^{-3})結果が多少異なった結果が見られた。そこでバフンウニ卵における溶媒の影響を、DMSO・メタノール・エタノールの3溶媒で検討した結果ではエタノールの影響が1g/mL (10^{-2})で中影響濃度であるが0.1g/mL (10^{-3})では、無影響度の安定した結果である。

DMSOは1g/mL (10^{-2})ではエタノールより影響が少ないが0.1g/mL (10^{-3})で多少の影響がある時もあり変動があった。メタノールはウニ卵への影響が強すぎた。(図2)

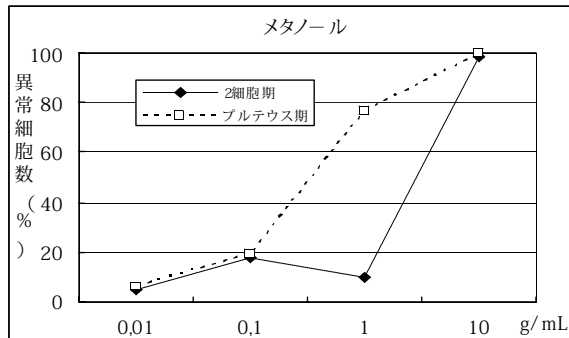
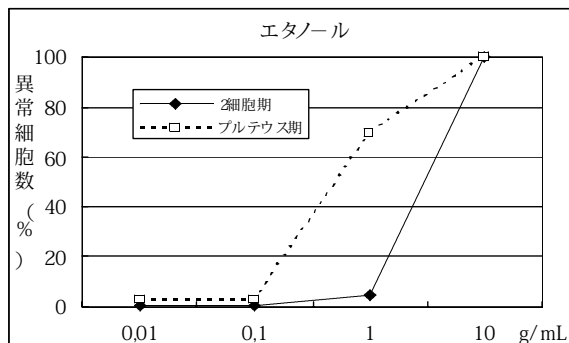
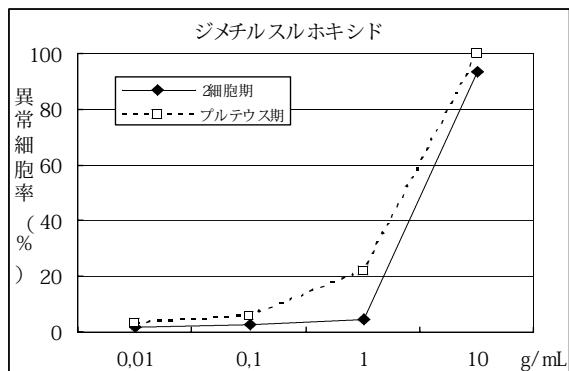


図2 溶媒における異常細胞数

ムラサキウニ卵において、環境ホルモン物質(5物質)の相互作用や拮抗作用や相加作用などを調査したが明確な結果がえられなかった。

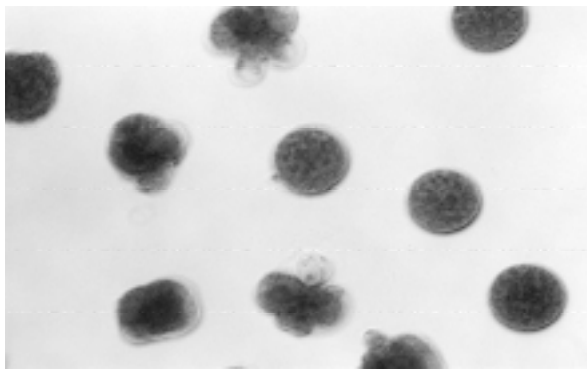
表2 環境ホルモンの影響によるウニ卵の発生状況

物質	濃度	2細胞期 (%)								プルテウス期 (%)							
		正常		異常						正常		異常胚					
				未受精		1細胞		多細胞				遅滞		奇形		囊胚以前	
		ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン	ムラサキ	バフン
シマジン	10ppm	85.3	84.1	17.0	—	1.2	14.7	2.3	1.2	27.4	76.7	16.3	8.2	67.0	7.8	34.8	7.3
	1ppm	91.9	88.3	12.3	—	4.3	11.0	0.9	0.7	80.5	75.9	6.1	2.1	11.4	13.3	2.7	8.7
	100ppb	91.1	94.0	22.7	—	3.0	5.6	0.3	0.4	92.6	93.6	3.0	1.6	2.7	3.3	1.9	1.5
	10ppb	95.9	92.0	0.7	—	3.7	7.6	—	0.4	94.1	91.0	4.1	1.7	2.0	3.8	1.7	3.5
	1ppb	95.0	93.3	—	—	5.0	6.4	—	0.3	97.7	94.2	2.3	1.9	—	1.9	—	2.0
	100ppt	—	93.6	—	—	—	6.2	—	0.1	—	93.6	—	1.7	—	2.7	—	2.0
	10ppt	—	95.0	—	—	—	4.7	—	0.3	—	95.5	—	0.1	—	3.6	—	0.8
	1ppt	—	96.6	—	—	—	3.3	—	0.1	—	94.6	—	1.6	—	3.2	—	0.6
フタル酸ジブチル	10ppm	—	29.6	—	—	—	70.2	—	0.2	—	15.9	—	5.4	—	16.2	—	62.5
	1ppm	89.7	86.6	14.7	—	4.6	12.9	0.8	0.5	66.5	90.4	16.3	2.0	2.4	3.3	14.8	4.3
	100ppb	92.1	86.6	8.5	—	4.8	12.9	0.3	0.5	88.3	90.4	7.1	2.0	1.6	3.3	3.0	4.3
	10ppb	94.2	93.7	—	—	5.8	5.8	0.0	0.5	66.3	93.0	21.0	1.2	8.1	3.3	4.6	2.5
	1ppb	96.4	92.6	—	—	3.6	7.2	0.0	0.2	87.1	94.3	6.3	1.4	2.6	2.3	4.0	2.0
	100ppt	—	91.9	—	—	—	8.0	—	0.1	—	93.4	—	1.8	—	2.0	—	2.8
	10ppt	—	98.4	—	—	—	1.2	—	0.4	—	96.4	—	1.1	—	1.7	—	0.9
	1ppt	—	95.9	—	—	—	3.8	—	0.2	—	96.1	—	1.1	—	1.8	—	0.9
ビスフェノールA	10ppm	40.9	68.1	50.0	—	9.1	31.9	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—	0.0	—	100.0
	1ppm	87.0	95.2	14.7	—	6.5	4.8	0.4	0.0	16.5	84.1	21.8	11.4	41.7	1.4	20.0	3.2
	100ppb	92.0	96.6	8.5	—	3.0	3.4	0.7	0.0	91.4	81.0	5.8	3.9	0.6	0.6	2.3	14.5
	10ppb	97.3	96.9	—	—	1.2	3.1	1.6	0.0	96.2	93.8	2.7	4.5	1.2	0.4	0.0	1.4
	1ppb	100.0	97.2	—	—	0.0	2.8	0.0	0.0	96.2	93.8	2.2	4.3	1.5	0.5	0.2	1.5
	100ppt	99.8	97.8	—	—	0.0	1.8	0.2	0.3	97.5	96.2	2.0	3.0	0.3	0.5	0.2	0.3
	10ppt	99.0	98.8	—	—	0.0	1.0	1.0	0.2	96.2	98.2	2.8	0.8	0.3	0.5	0.7	0.5
	1ppt	99.1	—	—	—	0.6	—	0.4	—	98.0	—	1.3	—	0.5	—	0.2	—
トリブチルスズ	1ppm	5.5	—	71.0	—	23.5	—	0.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	100ppb	19.7	46.8	60.3	—	50.2	53.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0
	10ppb	52.7	74.3	55.8	—	19.1	25.7	0.3	0.0	4.4	0.0	29.7	0.0	36.5	0.0	29.4	100.0
	1ppb	85.4	81.6	—	—	14.0	18.4	0.6	0.0	86.1	55.3	9.3	1.8	2.2	0.6	2.5	42.4
	100ppt	—	89.1	—	—	—	10.6	—	0.3	—	64.9	—	6.0	—	4.2	—	25.0
	10ppt	—	90.4	—	—	—	9.5	—	0.1	—	84.9	—	2.7	—	1.3	—	11.1
	1ppt	—	91.6	—	—	—	8.2	—	0.2	—	95.9	—	1.3	—	0.7	—	2.1
	0.1ppt	—	95.0	—	—	—	5.0	—	0.0	—	96.2	—	2.3	—	0.3	—	1.2
2,4,6-トリクロロ安息香酸	10ppm	90.2	92.8	2.1	—	19.8	4.6	0.3	2.6	85.3	74.7	10.3	13.8	2.1	10.3	2.3	1.3
	1ppm	86.4	95.1	2.1	—	20.5	2.8	0.1	2.1	93.1	80.4	3.3	13.8	0.9	4.6	2.8	1.3
	100ppb	97.3	96.3	2.3	—	—	3.1	0.4	0.6	96.2	93.7	3.0	2.3	0.3	3.3	0.5	0.7
	10ppb	98.0	97.4	1.8	—	—	1.7	0.2	0.9	96.3	95.7	3.0	1.8	0.3	1.5	0.4	1.1
	1ppb	98.0	95.5	1.7	—	—	3.5	0.2	1.0	92.7	94.6	4.9	1.8	0.9	2.8	0.8	0.9
	100ppt	—	96.2	—	—	—	3.3	—	0.5	—	95.9	—	1.3	—	1.9	—	0.8
	10ppt	—	96.9	—	—	—	2.0	—	1.1	—	95.6	—	1.0	—	2.5	—	0.9
	1ppt	—	95.8	—	—	—	3.9	—	0.3	—	97.1	—	0.4	—	1.8	—	0.8

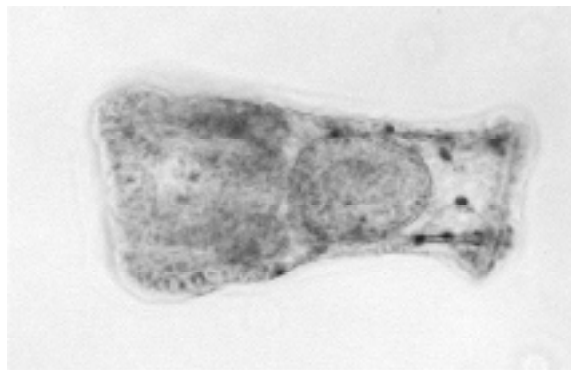
* ムラサキウニは1回判定60分後と2回判定32時間後バフンウニは1回判定100分後と2回判定49時間後

表3 ウニ卵の発生に対する環境ホルモン物質の影響度

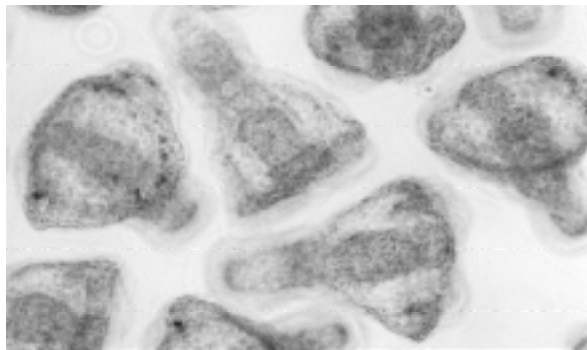
物質	濃度	細胞分裂(第1回)				プルテウス期		発生の状態 (特徴)
		1細胞		多細胞		異常胚		
		ムラサキウニ	バフンウニ	ムラサキウニ	バフンウニ	ムラサキウニ	バフンウニ	
シマジン	10ppm	1	1	1	0	3	1	アポロ宇宙船型
	1ppm	0	1	0	0	1	1	骨の異常
	100ppb	0	0	0	0	1	1	異常胚
	10ppb	0	0	—	0	1	1	異常胚
	1ppb	0	0	—	0	0	1	異常胚
	100ppt	—	0	—	0	—	1	異常胚
	10ppt	—	0	—	0	—	0	正常
1ppt	—	0	—	0	—	1	やや正常	
フタル酸ジブチル	10ppm	—	3	—	0	—	3	アポロ宇宙船型
	1ppm	0	1	0	0	2	1	骨の異常
	100ppb	0	1	0	0	1	1	未受精
	10ppb	0	0	0	0	2	1	遅滞
	1ppb	0	0	0	0	1	1	異常胚
	100ppt	—	0	—	0	—	1	異常胚
	10ppt	—	0	—	0	—	0	正常
1ppt	—	0	—	0	—	0	正常	
ビスフェノールA	10ppm	3	2	—	0	—	3	一細胞
	1ppm	0	0	0	0	3	1	異常胚
	100ppb	0	0	0	0	1	1	未受精
	10ppb	0	0	0	0	0	1	遅滞
	1ppb	0	0	0	0	0	1	遅滞
	100ppt	0	0	0	0	0	0	正常
	10ppt	0	0	0	0	0	0	正常
1ppt	0	—	0	—	0	—	正常	
トリブチルスズ	1ppm	3	—	0	—	—	—	一細胞
	100ppb	3	3	0	0	3	3	未受精卵
	10ppb	1	1	0	0	3	3	遅滞
	1ppb	1	1	0	0	1	2	一細胞
	100ppt	—	1	—	0	—	2	異常胚
	10ppt	—	0	—	0	—	1	異常胚
	1ppt	—	0	—	0	—	0	正常
0.1ppt	—	0	—	0	—	0	正常	
2,4-ジクロキシ酢酸	10ppm	1	1	0	0	1	1	骨の異常
	1ppm	2	0	0	0	1	1	一細胞
	100ppb	—	0	0	0	0	1	異常胚
	10ppb	—	0	0	0	0	0	正常
	1ppb	—	0	0	0	1	1	遅滞
	100ppt	—	0	—	0	—	0	正常
	10ppt	—	0	—	0	—	0	正常
1ppt	—	0	—	0	—	0	正常	



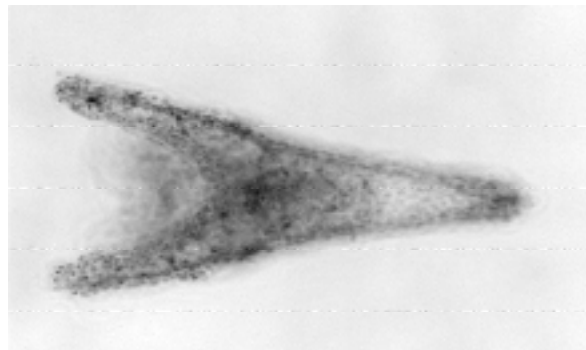
写1 未受精



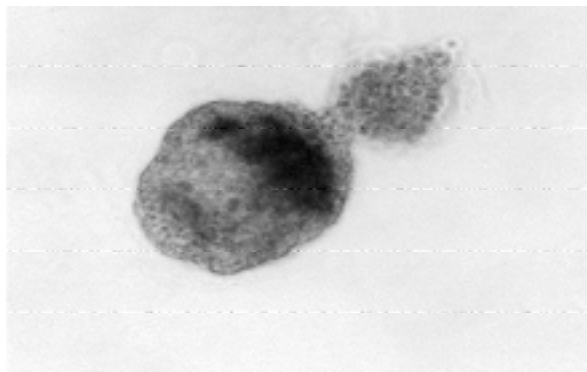
写5 プルテウス期 骨異常



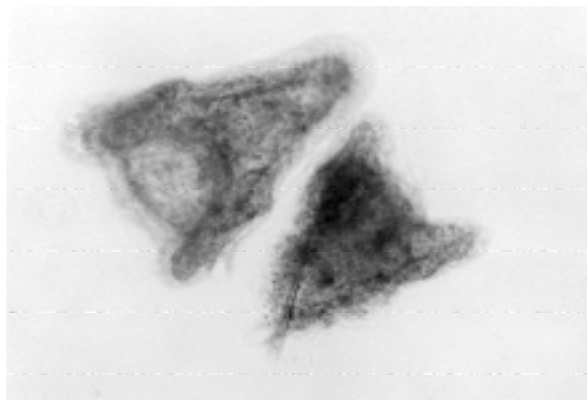
写2 変形囊胚 アポロ宇宙船型囊胚



写6 プルテウス期 正常



写3 変形囊胚 外腸胚



写4 プルテウス期
遅滞プルテウス (左上) 変形プルテウス (右下)

IV 考 察

ウニの種類により影響濃度の若干の差が見られたのは、ムラサキウニ卵（夏期）とバフンウニ卵（冬期）は発生時間の違いにより判定時間に差があるためにシャーレ内の海水の汚れが要因となり影響度の差が現れると推察される。

また、ウニ卵の個体差と水温、室温、海水等により影響濃度の変動が多少あると思われる。しかし、良い状態のウニ卵を用い室温、水温を一定にすることと、ろ過海水を用いて大きいシャーレで試水を多くした状態にして汚れを防ぐなど条件を一定にすることで良好な結果が得られると思われる。

受精してから受精卵に2細胞期の初期の発生段階で早くも異常細胞が見られたことは、環境ホルモンの影響が初期発生段階から関係すると思われる。またウニ卵発生 of プルテウス期に、形態異常としてアポロ宇宙船型囊胚が現れたり骨形成異常が見られたのは、環境ホルモンがホルモン様作用の影響によりエストロゲンとして働いた可能性があると思われる。

環境ホルモン物質（5物質）のなかでもトリブチルスズの影響がウニ卵に大きく及ぼすことは²⁾、他の生物に対しても大きな影響を与えることが推測される。また生物の発生の初期からホルモン様作用として影響を及ぼすと考えられる。

環境ホルモン物質の相互作用や拮抗作用や相加作用もあると思われるが、今後数多くの調査が必要になる。

今回は、バフンウニのみでしか検討できていないが溶媒によりウニ卵への影響がある。メタノールは影響が強くて溶媒には適してない。エタノールは0.1g/mLで影響がないがDMSOは影響がある時があるので常に海水と溶媒の影響度を確認しながら検査することが重要である。溶媒の影響を少なくすることにより、より信頼性のある結果が得られると考えられる。

以上のことからウニ卵を用いた生物検定は、早く結果がわかるとともに顕微鏡下で発生を目で確認できるので環境ホルモン等による汚染の影響を早く把握することが可能である。また、他の生物への影響を推測することができると思われる。

V まとめ

- 1 環境ホルモン物質（5物質）がウニ卵への発生影響として多細胞、形態異常、骨形成異常などが現れた。性分化までは調査できていないが環境ホルモン様作用のひとつであると考えられる。
- 2 受精して二細胞期の早い時期から環境ホルモン物質が作用し影響を及ぼすことがわかった。
- 3 環境ホルモン（5物質）によるウニ卵への発生影響が強いのは、トリブチルスズであった。また影響が弱いのは2・4ジクロロフェノキシ酢酸であった。
- 4 環境ホルモンによるムラサキウニ卵とバフンウニ卵への影響度の違いは室温、水温、を一定の条件にして受精膜の上昇が良好なウニ卵で海水の汚れを防ぐことで安定な結果をえることができる。と考える。
- 5 溶媒による影響を少なくすることで、より信頼性のある結果が得られる。

6 生物検定としてウニ卵を用いて環境ホルモン等による水質汚染を評価する資料となる。また影響を早く把握できる。

謝 辞

研究に際しご指導賜りました小林直正先生（同志社大学名誉教授）、ウニの採取等にご協力いただいた山賀賢一主席研究員、藤原宗弘主任研究員（香川県水産試験場）の方々に心から謝意を表します。

参考文献

- 1) 大石正道：生態系と地球環境のしくみ 日本実業出版社，p. 152～159（1999）
- 2) 小林直正：環境汚染を調べる－ウニ卵による海水の生物検定 サンエンテイス社（1997）
- 3) 小林直正：水汚染の生物検定 サンエンテイス社（1985）
- 4) 小林直正：海水汚染の海産無脊椎動物卵などによる生物検定1・基礎実験を中心に 生化学，Vol. 3，No. 1，p. 13～20（1980）
- 5) 環境庁水質保全局・瀬戸内海環境保全協会：海産動物の卵発生過程等による海水の検定法－環境海水の評価法－，p. 13～29（1980）
- 6) 香西俣行，岡崎秀信，別称元茂：水質汚濁の生物学的判定法の研究－ウニ卵発生期を利用する生物試験－香川県衛生研究所報，p. 32～42（1977）