

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20580344

研究課題名（和文）野生動物（野鳥）を用いた環境モニタリング法の検討。（重金属の生体影響）

研究課題名（英文）Study on the environmental monitoring method using wildlife (wild birds). (Biological effects by heavy metals)

研究代表者：植田 富貴子 (UEDA FUKIKO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：00168634

研究成果の概要（和文）：Cd に汚染された動物と非汚染の動物の比較から Cd 標準回帰直線（CSRL）の有効性が示された。CSRL と類似した Pb 標準回帰直線が得られ、Tl を含む有害元素の幾つかがこの 2 つの線上にあった。Ti は細胞内 Cd 含量を減少させ、Ti と Cd の同時処置により肝臓と腎臓の Cd 比が CSRL の等確率楕円内に戻ることが示された。Cd による染色体 DNA の変異は *Listeria monocytogens* の血清型と関連することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The utility of Cd standard regression line (CSRL) was shown from the comparison between polluted animals and non-polluted ones. Pb standard regression line similar to CSRL was obtained, and there were some of toxic elements including the Tl on these two lines. Ti decreased the Cd content in cell, and Cd ratio of the contents in liver and kidney was shown to recover within the equal probability ellipse of CSRL. It was suggested that the mutation of chromosome DNA by the Cd was related to the serotype of *Listeria monocytogens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：獣医公衆生成、重金属汚染

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、1980年以來行ってきた種々の抽出組織中での金属元素の動態の検討に併せて、1993年以降は日本の環境をモニタリングする観点から野鳥における各種重金属元素の汚染

調査を行なってきた。この過程で、カドミウム (Cd)、バナジウム (V)、モリブデン (Mo)、タリウム (Tl) の4元素を含む各種の有害元素による野鳥の汚染が進んでいることを見いだした。これらの汚染は、鳥の種類、繁殖地域、

渡りの習性、食性などと密接に関連していること、汚染している元素間で非常に強い相関関係が認められることが明らかとなった。しかし、生態系に影響を与えるほど環境中の特定物質が高濃度か否かを判定することは、確実な非汚染対照が得られない野生動物では困難であった。そこで先ずCdについて、腎臓と肝臓でのCd代謝比（含量比）に着目し、非汚染対照としてのCd標準回帰直線（CSRL）を作成した。

(2) V、MoおよびTlについても同様の汚染が見られているので、非汚染対照が必要である。

(3) 多用されているTiが特定のネコ飼育用缶詰中に多量に含有されていたことから、その毒性を疑い動物組織を用いたin vitroでの実験を行った結果、TiがCdの組織内取り込みを減少させることを見いだした。

(4) Cdは変異原性を有し予備試験により、大腸菌（K12株）がCdとVを積極的に取り込み、制限酵素切断解析では変異点が存在する可能性があることを見いだした。

2. 研究の目的

(1) これまで行ってきたCd汚染の調査研究をさらに進めると共にCd非汚染対照であるCd標準回帰直線（CSRL）の有効性を検証する。

(2) 生態系に影響する可能性があるV、Mo、Tlでも汚染判定の非汚染指標を作成する。

(3) 動物実験によりTiがCd、VおよびMo毒性を軽減するか否かを検討する。

(4) 細菌である*L. monocytogenes* (L. m.) に対して、CdとVがどのように影響するかを増殖性と変異原性の両面から検討する。

3. 研究の方法

(1) 野鳥材料：野鳥から採取して凍結保存してある肝臓と腎臓および本研究期間中に新たな野鳥を入手し材料を使用した。標本は、酸（過塩素酸+硝酸）処理後、180℃で灰化処理して測定まで密封保存した。

(2) 臓器中の元素分析法と解析法：標本中のCd、V、Mo、Tlを発光プラズマ分光分析法（ICP法）を用いて測定し、臓器別元素含量を計算した。データの統計解析にはコンピュータソフト（Excel 2003、Excelアドイン多変量解析）を用いた。

(3) 動物実験法：マウスにTiとCdを3ヶ月間

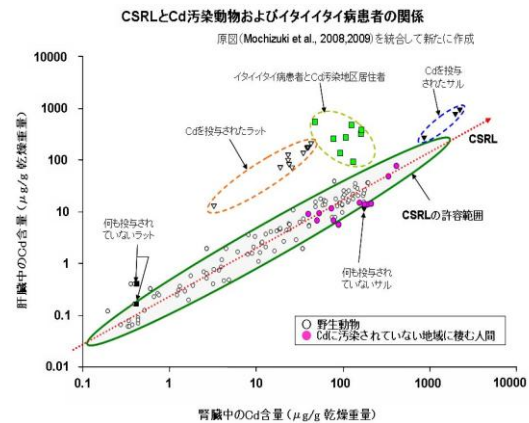
飲水で投与し、in vivoでTiがCdの毒性を軽減するか否かを検討した。また、マウスとモルモットの摘出肝臓標本（in vitro）で、V、MoおよびTlの組織内への取り込みをTiが抑制するかを検討した。

(4) 細菌を用いた実験法：CdとVを含むBHI培地中で10代継代培養した*L. monocytogenes*（EGD1/2a株、L98-74C3株、L98-82B1株）の増殖曲線がどのように変化するかを、誘導期・増殖期の変化（時間変化・菌数変化）の両面から検討した。

4. 研究の成果

(1) CSRLの有効性の検証（主要データ：論文4, 8, 11, 12&図書1-4）

CSRLをより普遍的にするために、本研究では文献数を増やして27文献とし、陸・淡水鳥類、海

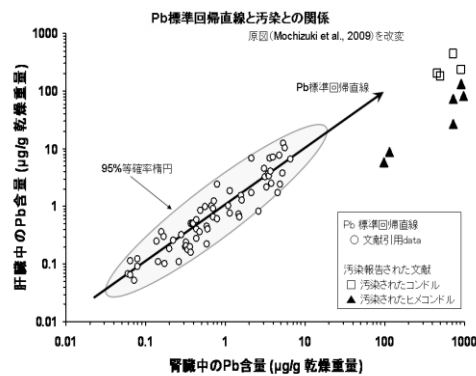


棲鳥類、海棲哺乳類および陸棲哺乳類の総計62種の腎臓と肝臓中のCd含量（101データ；平均値：個体数総計では2800頭羽を超える）から、CSRLおよびその許容範囲である等確率楕円を再計算した。Cd投与後のアカゲザルやラットおよびCd汚染地区居住者とイタイタイ病患者は、CSRLから明らかにはずれたが、Cd非汚染地区居住者で正常な人はCSRLの等確率楕円内に存在しており、これらの成績からCSRLの有効性が示された。同様に検討した野鳥標本では、野鳥採集地域により差が認められ特定地域の標本はCSRLから明らかに外れた位置に存在した。

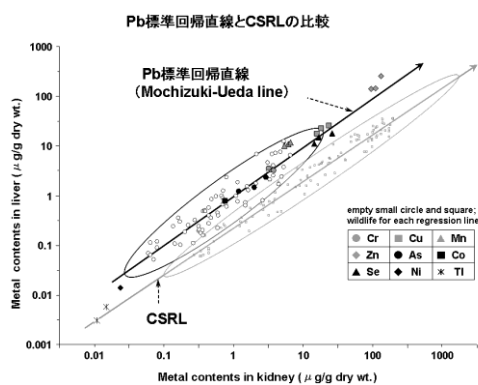
(2) V、Mo、Tlについての汚染判定の指標を作成（主要データ：論文1, 9&図書1）

これら3元素については文献が少なかった

ので、本研究では文献が多い鉛(Pb)についての非汚染指標を先ず作成した。この結果、PbでもCSRLと同様の直線(Pb標準回帰直線; Mochizuki-Ueda line)が得られた。汚染されたコンドル、ヒメコンドルおよび本研究で行ったPb投与マウスでは



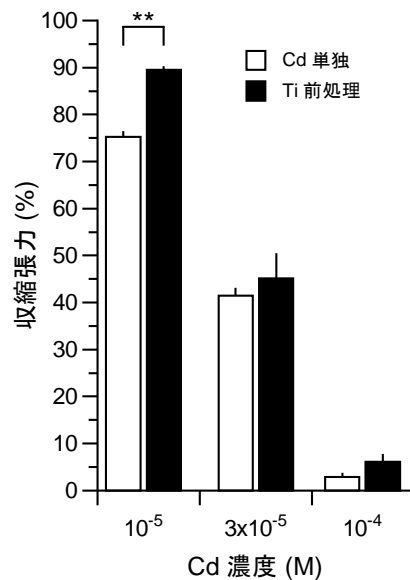
明らかに、正常と考えられる群(Pb標準回帰直線の等確率楕円)からはずれていた。また、このPb標準回帰直線とCSRLの傾きはほぼ同じで、正常で病気になっていない動物を調査した文献から引用したT1のデータは、Pb標準回帰直線上に存在していた。VとMoについては非汚染のデータがあまり多くなかったため非汚染対照作成完了には至らなかったが、クロム(Cr)、銅(Cu)、マンガン(Mn)、亜鉛(Zn)、砒素(As)、コバルト(Co)、セレン(Se)、ニッケル(Ni)、タリウム(Tl)など非常に多くの有害元素のデータが、これら2つの線上にあることが判明した。



(3) TiによるCd毒性の軽減作用 (主要データ: 論文2&学会7)

モルモット摘出臓器標本(血管、盲腸紐、肝臓)を用いて、各種濃度の硫酸TiとCdを投与した場合の影響を検討すると共に総計30匹のICR♂マウスにCdとTiを飲水で投与して肝臓

と腎臓中のCd含量を検討した。この結果、摘出臓器では低濃度Tiによる細胞内Cd含量の有意な変化は得られなかったが、高濃度Tiでは細胞内Cd含量の減少が認められた。また、盲腸紐でCdによる高濃度カリウム収縮の抑制がTiにより軽減される成績が得られた(下図)。また、マウスで行ったin



vivoの実験では、Tiによる肝臓と腎臓組織中Cdに有意な変化は得られなかったが、両臓器のCd含量をCSRLに当てはめて検討したところ、Tiが存在する場合にはCSRLの等確率楕円内の、より正常値に戻ることが示された。

(4) 細菌に対するCdとVの影響 (主要データ: 学会17)

CdがL.m. (L98-82B1株)で染色体DNAに影響を与えている成績を得たために、血清型と影響との関係を検討するためにCdとVを含む培養液中で培養したL.mから抽出した染色体DNAを用いて、どのような変異が起こっているのかを電気泳動法を用いて解析した。この結果、血清型4bと変異との関連性が示唆された。また、CdはL.mの増殖性に影響を与えている成績を得た。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (13件全て査読有/総計18件)

1) MOCHIZUKI M, OKUTOMI Y, Takano T, Hondo R, YUMOTO N, KAJIGAYA H, UEDA F. A Modified index for lead in biological monitoring. Rev Agr Sci 2013 (accepted)

- 2) TAKANO T, KANEDA T, KANESHIGE M, TSUTSUMI T, OCHIAI Y, SHIMIZU K, HONDO R, MOCHIZUKI M, UEDA F. Interaction between titanium and cadmium in various guinea pig organs. *Biol Trace Elem Res* 151(2):209-216, 2013. DOI: 10.1007/s12011-012-9562-y
- 3) MOCHIZUKI M, SHIOZAWA M, MORI M, KAJIGAYA H, HAYAMA S-I, OCHIAI Y, HONDO R, UEDA F. The biological monitoring of wild birds -Part1: The cadmium content of organs from migratory birds. *Int J Energ Environ Econ* 19 (6), 525-534, 2011.
- 4) MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R, UEDA F. The biological monitoring of wild birds -Part 2: The possibility of a new index for biological monitoring. *Int J Energ Environ Econ* 19 (6), 535-545, 2011.
- 5) MOCHIZUKI M, KUDO E, KIKUCHI M, TAKANO T, TANIUCHI Y, KITAMURA T, HONDO R, UEDA F. A basic study on the biological monitoring for Vanadium - effects of vanadium on Vero cells and the evaluation of intracellular vanadium contents. *Biol Trace Elem Res* 142(1), 117-126, 2011. DOI: 10.1007/s12011-010 -8741-y
- 6) OCHIAI Y, YAMADA F, BATMUNKH O, MOCHIZUKI M, TAKANO T, HONDO R, UEDA F. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. *J Food Prot* 73(9), 1688-1693, 2010.
- 7) MOCHIZUKI M, MORI M, MIURA M, HONDO R, OGAWA T, UEDA F. A New technique for biological monitoring using wildlife. *Int J Energy, Environ Economics* 18, 85-93, 2010.
- 8) UEDA F., MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R. A new technique for biological monitoring. 'Energy and Environmental Engineering Series - A series of Reference Books and Textbooks; Energy, Environment, Ecosystems, Development and Land scope Architecture " The proceedings of the 5th international conference on energy, environment, ecosystem and sustainable development, pp176-184, World Scientific and Engineering Academy and Society (WSEAS) Press, (ISSN: 1790-5095, ISBN:978-960-474-125-0), 2009.
- 9) MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R, UEDA F. A new index for heavy metals in biological monitoring. *id*, pp185-191, 2009.
- 10) MORI M, RAHMAN MD. S, MOCHIZUK M, HONDO R, UEDA F. Acute effect of cadmium on female reproduction in birds. *id*, pp192-196, 2009.
- 11) UEDA F., MORI M, TAKANO T, OCHIAI Y, HONDO R , MOCHIZUKI M. Basic investigation for an epidemiological study on cadmium contamination of wildlife - Cadmium distribution in the rat body after intravenous cadmium exposure. *id*, pp57-63, 2009.
- 12) MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R, UEDA F. A new index for evaluation of cadmium pollution in birds and mammals. *Environ Monit Assess* 137, 35-49, 2008. DOI : 10.1007/s10661-007 -9727-x
- 13) OCHIAI Y, BATMUNKH O, OGASAWARA K, MOCHIZUKI M, HONDO R, UEDA F. Genetic variation of *Listeria monocytogenes* isolates from domestic and imported foods in Japan. *Int J Food Microbiol* 127, 12-17, 2008. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro .2008.05.038
- [学会発表] (28件/総計44件)
- 1) 落合由嗣、藤田修、Batmunkh O、望月眞理子、高野貴士、山田文也、棚林清、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* の遺伝子型法の比較検討。第155回 獣医学学会学術集会 2013.3.28 駒場東大。
- 2) 神澤聖也、落合由嗣、高野貴士、望月眞理子、本藤良、植田富貴子。食肉由来 *Listeria monocytogenes* 持続汚染株のバイオフィルム形成能と温度条件の解析。 *id*。
- 3) 林達也、落合由嗣、高野貴士、望月眞理子、本藤良、植田富貴子。食肉由来 *Listeria monocytogenes* 分離株のバイオフィルム形成能と運動能の検討。第153回日本獣医学

- 会学術集会 2012. 3. 9 大宮。
- 4) UEDA F, MORI M, MOCHIZUKI M, HONDO R. The analysis using new index for cadmium contamination in poultry. 9th Pacific poultry conference. 2011. 3. 20-23 Taiwan Taipei.
 - 5) OCHIAI Y, TAKANO T, MOCHIZUKI M, HONDO R, UEDA F. Biofilm formation and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* strain suspected of persistence. International union of microbiological societies 2011 congress, VIII, inter-national congress of bacteriology and applied microbiology. 2011. 9. 7. Sapporo.
 - 6) 奥富幸、森誠、本藤良、植田富貴子、梶ヶ谷博、望月真理子。野鳥の重金属元素汚染に関する疫学調査-10) 新たな指標を用いた野鳥におけるカドミウム汚染の検討。第 149 回獣医学会学術集会 2010. 3. 27 日獣大。
 - 7) 小沢美紀、高野貴士、望月真理子、落合由嗣、植田富貴子。マウスの臓器中のカドミウム蓄積に対するチタンの影響。id.
 - 8) 森吉美樹、落合由嗣、Batmunkh O、高野貴士、小林真理子、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* の市販食肉における持続汚染の動態解析。id.
 - 9) 進藤彰、落合由嗣、Batmunkh O、高野貴士、望月真理子、本藤良、植田富貴子。土壌に分布する *Listeria monocytogenes* の分離方法の基礎的検討。id.
 - 10) 小峯朋美、森誠、貝塚千博、落合由嗣、本藤良、植田富貴子、望月真理子。生物モニタリングの新技术-水銀汚染を把握するための新たな指標とその有用性の検証。第 26 回日獣大研究交流会 2010. 11. 13 日獣大。
 - 11) 奥富幸、高野貴士、山本昌美、竹本麻里子、梶ヶ谷博、湯本典夫、植田富貴子、望月真理子。生物モニタリングの新技术-鉛汚染を把握するための新たな指標とその有用性の検証。id.
 - 12) 竹本麻里子、森誠、奥富幸、羽山伸一、梶ヶ谷博、本藤良、植田富貴子、望月真理子。野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 5) 新たな指標による野鳥の鉛汚染の解析。第 35 回鳥類内分泌研究会 2010. 11. 25-26 岡山。
 - 13) 藤田圭佑、Batmunkh O、高野貴士、望月真理子、落合由嗣、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* の actA 領域による系統樹解析; Phylogenetic Analysis of actA region of *Listeria monocytogenes*。第 20 回日本医大外国人留学者研究会 2009. 1. 2 日医大。
 - 14) 奥富幸、森誠、梶ヶ谷博、落合由嗣、本藤良、小河孝、植田富貴子、望月真理子。野鳥の重金属汚染に関する疫学調査 (9) カドミウム汚染の性差による違い。第 147 回日本獣医学会学術集会 2009. 04. 02 宇都宮。
 - 15) 門井健、望月真理子、落合由嗣、高野貴士、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* のゲノム DNA に対するカドミウムの影響。id.
 - 16) 藤田圭祐、Batmunkh O、高野貴士、望月真理子、落合由嗣、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* の分子疫学に関する基礎的研究 (13) *Listeria monocytogenes* の actA 領域における分子進化学的解析。id.
 - 17) 中村純子、落合由嗣、Batmunkh O、高野貴士、本藤良、植田富貴子。培養開始時菌数・前培養期間・培地での継代が *Listeria monocytogenes* の増殖に及ぼす影響。id.
 - 18) 落合由嗣、山田文也、Batmunkh O、望月真理子、高野貴士、本藤良、植田富貴子。市販食肉における *Listeria monocytogenes* 血清型 1/2a、1/2b、1/2c 及び 4b の偏在汚染。第 148 回日本獣医学会学術集会 2009. 04. 02 鳥取。
 - 19) UEDA F, MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R. A new technique for biological monitoring. WSEAS, world conference 5th international conference on energy, environment, eco-system and sustainable development, 2009. Sept 28-30th Greece Aten.
 - 20) MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R, UEDA F. A new index for heavy metals in biological monitoring. id.

- 21) MORI M, RAHMAN MD-S, MOCHIZUK M, HONDO R, UEDA F. Acute effect of cadmium on female reproduction in birds. *id.*
- 22) UEDA F., MORI M, TAKANO T, OCHIAI Y, HONDO R, MOCHIZUKI M. Basic investigation for an epidemiological study on cadmium contamination of wildlife - Cadmium distribution in the rat body after intravenous cadmium exposure. *id.*
- 23) UEDA F. A new technique for biological monitoring. *id.*
- 24) Batmunkh O, Maeda K, Takano T, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R, Ueda F. The study on molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination (11) Phylogenetic analysis of sigB region of *Listeria monocytogenes*. 第 146 回日本獣医学会学術集会 2008. 09. 24 宮崎。
- 25) 落合由嗣、前田和弘、Batmunkh O、望月眞理子、高野貴士、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* の分子疫学に関する基礎的研究 (12) 市販食肉の Epidemic clone による汚染状況。 *id.*
- 26) 三浦睦、森誠、小河孝、本藤良、植田富貴子、望月眞理子、野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 4) カドミウム標準回帰直線を用いた解析の実例。第 33 回鳥類内分泌研究会 2008. 11. 13 群馬県草津市栲比呂。 *id.*
- 27) 高梨ありこ、森誠、小河孝、本藤良、植田富貴子、望月眞理子。野鳥の重金属汚染に関する疫学的研究 3) 新たな指標であるカドミウム標準回帰直線を用いた生物モニタリングの可能性。 *id.*
- 28) Batmunkh O, Maeda Kazuhiro, Takano T, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R, Ueda F. The Study on Molecular Epidemiology of *Listeria monocytogenes* Contamination (11) Phylogenetic Analysis of sigB region of *Listeria monocytogenes*. 第 19 回日本医大外国人留学者研究会 2008. 11. 29 日医大。

[図書] (4 件/Cross publication を含む)

総計 23 件)

- 1) 植田富貴子、望月眞理子 地球環境汚染と動物、松木洋一監修、人間動物関係論、養賢堂、pp11-20, 2012.
- 2) MOCHIZUKI M, KITAMURA T, OKUTOMI Y, YAMAMOTO H, SUZUKI T, MORI M, HONDO R, YUMOTO N, KAJIGAYA H, UEDA F. Biological monitoring using new cadmium indexes: cadmium contamination in seabirds. In: Advances in medicine and biology, volume 33, pp173-186, Nova Science Publisher, NY, USA, 2012.
- 3) MOCHIZUKI M, MORI M, HONDO R, UEDA F. "A Cadmium standard regression line" : A possible new index for biological monitoring. In: Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution, pp331-338, ISBN 978-1-60876-487-7, Nova Science Publishers, Inc. NY. 2011.
- 4) MOCHIZUKI M, Mori M, HONDO R, UEDA F. Biological monitoring using a new technique. In: Wildlife; Destruction, Conservation and Biodiversity, pp293-300, ISBN#978-1-60692 -974-2, Nova Science Publishers, Inc. NY., 2009.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者：植田富貴子 (UEDA FUKIKO)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：00168634
- (2) 連携研究者
- 落合由嗣 (OCHIAI YOSHITSUGU)
日本獣医生命科学大学・獣医学科・准教授
研究者番号：40350178
- 高野貴士 (TAKANO TAKASHI)
日本獣医生命科学大学・獣医学科・助教
研究者番号：20462781
- 望月 (小林) 眞理子 (MOCHIZUKI-KOBAYASHI MARIKO)
日本獣医生命科学大学・獣医保健看護学科・准教授
研究者番号：50409257
- 本藤良 (HONDO RYO)
日本獣医生命科学大学・獣医学科・名誉教授
研究者番号：20114639