

平成22年 5月26日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20710052  
 研究課題名 (和文) ヒラメにおける水酸化PCBsの体内挙動と生体影響に関する研究  
 研究課題名 (英文) Biological effects of hydroxylated PCBs on Japanese flounder  
 研究代表者  
 仲山 慶 (NAKAYAMA KEI)  
 愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師  
 研究者番号：80380286

研究成果の概要 (和文)：本研究では、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) の代謝物である水酸化PCBs (OH-PCBs) が、ヒラメの初期胚に対して及ぼす影響を解析した。その結果、OH-PCBs の一部の異性体 (4-hydroxy-2',3,5,5'-tetrachlorobiphenyl) は0.1 ppb以上の濃度で発生異常、特に頭部末梢神経の形態的異常を引き起こすことが明らかとなった。本研究結果より、OH-PCBs が *in vivo* においても甲状腺ホルモンの機能をかく乱する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, we investigated the early life stage toxicity of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs), metabolites of PCBs, using Japanese flounder embryos. The exposure test revealed that more than 1 ppb of an isomer of OH-PCBs, 4-hydroxy-2',3,5,5'-tetrachlorobiphenyl, caused malformation of peripheral nervous system in head part of flounders. The present study suggests that OH-PCBs could disrupt thyroid hormone functions *in vivo* as well as *in vitro*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学，放射線・化学物質影響科学

キーワード：マイクロアレイ，環境，農林水産物，有害化学物質，トキシコゲノミクス

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル (PCBs) による環境汚染は、その使用および製造が禁止された現在でもなお継続しており、環境中に広く分布・蓄積している。PCBs の生物試料中の蓄積濃度は、過去数十年の間に減少傾向にはあるものの依然として高く、残留性有機汚染物質 (POPs) の中でも最も高濃度に残留している化合物のひとつとして PCBs が挙げられる。近年、PCBs の代謝物である水酸化 PCBs (OH-PCBs) が生物の体内から、例えば、海棲ほ乳類の血液および脳から検出されることが報告されている。親化合物である PCBs が現在でも生物体内に高濃度で蓄積していることから、その代謝物である OH-PCBs による汚染が将来にわたり継続することは自明の理であり、生物への影響が懸念される。

OH-PCBs の生体影響に関する知見は限られているが、その中でも良く知られているのは甲状腺ホルモン機能のかく乱である。OH-PCBs は甲状腺ホルモンの輸送タンパク質である Transthyretin (TTR) に結合することが知られており、甲状腺ホルモンの輸送を阻害すると言われている。また甲状腺ホルモン受容体を介してその標的遺伝子の発現を誘導することも報告されている。しかしながら、OH-PCBs による甲状腺ホルモンへの影響は *in vitro* で確認されているにすぎず、*in vivo* で OH-PCBs が同様の影響を及ぼすかは不明である。

魚類を対象とした OH-PCBs に関する研究は、魚類を指標とした環境モニタリング研究を除けば、ニジマスにおける PCBs の代謝実験が報告されているのみであり、体内動態や生体影響に関しては不明な点が多い。沿岸域には依然として高濃度の PCBs が残留していることから、PCBs のみならず OH-PCBs の魚類に対する影響を詳細に検証する必要がある。

## 2. 研究の目的

PCBs の代謝物である OH-PCBs は PCBs と同様に環境中に偏在している。OH-PCBs の毒性影響として甲状腺ホルモンに対する拮抗作用が知られているが、同影響は *in vitro* で確認されているのみであり、*in vivo* での生体影響はほとんど明らかにされていない。OH-PCBs は母体より次世代へと移行すること

が知られており、移行した OH-PCBs が化学物質暴露に対して最も敏感な初期胚に対して何らかの影響を及ぼすことが推測される。特に、甲状腺ホルモンは発生期における脳神経系の形成に重要な役割を担っていることから、OH-PCBs による神経形成への影響が懸念される。したがって、本研究ではヒラメ胚を対象として OH-PCBs が初期発生、特に神経形成に及ぼす影響を明らかにし、その影響メカニズムについて調査した。

## 3. 研究の方法

対象物質として 4-hydroxy-2', 3, 5, 5'-tetrachlorobiphenyl (4OH-TCB) を使用した。受精後 24 時間のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 胚を用いて、3 種類の暴露実験を行なった。実験 1 では、4OH-TCB 濃度が 10, 100, 1000 ppb となるように試験水を調製した。同試験水に 200 個の胚を 6 時間暴露した後、500 ml の通常海水に移し、ふ化するまで観察した。実験 2 は、1 L グラスビーカーに人工海水を 300 ml 入れ、ヒラメ胚を 200~300 個投入し、4OH-TCB を 1, 10, 100 ppb になるように添加した。溶剤対照区には DMSO を使用した。その後、15°C で発生させた。サンプルは受精後 90 時間 (暴露 66 時間) の仔魚を 4%PFA で固定した。実験 3 は、ガラス製シャーレに人工海水を 10 ml 入れ、そこにヒラメ胚を 50 個前後投入し、4OH-TCB を 0.01, 0.1, 1, 10 ppb になるように添加した。溶剤対照区には DMSO を使用し、その後、15°C、震盪条件で発生させた。サンプルは受精後 118 時間 (暴露 94 時間) の仔魚を 4%PFA で固定した。

固定したサンプルをメタノールで脱水後、抗アセチル化チューブリン抗体を用いた FITC 蛍光抗体染色によって発生過程の神経系を可視化した。可視化した神経は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行なった。また、末梢神経伸長のガイダンス因子である *Sema3a* の mRNA 発現部位を *in situ hybridization* により明らかにした。実験 3 においては、ふ化率および奇形率も算出した。

## 4. 研究成果

実験 1 の結果、ヒラメ胚における半数ふ化

阻害濃度は 100 ppb であることが明らかとなった。

実験 2 での末梢神経の形態的な観察の結果、4OH-TCB の暴露により仔魚頭部の眼の背側に走行している神経系が神経束を形成しない現象が観察された。通常の神経はいくつかの神経繊維が束になり目的部位まで伸長する (図(A))。しかし、4OH-TCB に曝露された仔魚ではこの神経の束が束性を失い、神経繊維が編み目状になり無秩序に走行することが観察された (図(B))。

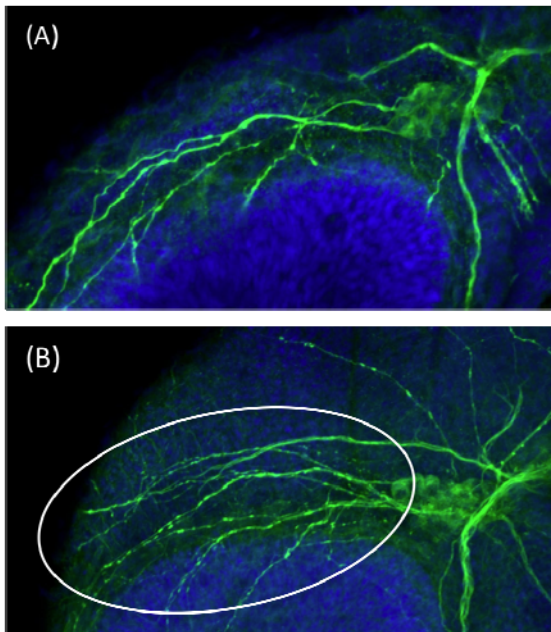


図. 水酸化PCBを暴露したヒラメ仔魚における頭部末梢神経。(A)対照区、(B) 1 ppb 4OH-TCB暴露区。円で囲んだ部分で最も顕著に三叉神経の束性が失われている。

一方で、眼の腹側を走行している三叉神経系及び側線神経系の神経には曝露の影響はほとんど観察されなかった。神経軸索の伸長に関わるガイダンス因子である *Sema3a* は通常特定の部位のみで発現し、発生中の神経線維はそれを避けるように伸長することによりまとまった神経束を形成する。しかしながら、4OH-TCB の暴露により *Sema3a* の発現・非発現部位の境界が不明瞭となっており、このことが神経線維の脱束性および無秩序な走行の一因である可能性が示唆された。

実験 3 の結果より、4OH-TCB は 0.01~10 ppb の濃度範囲において、ふ化率や奇形率に影響及ぼさなかった (表)。しかしながら、0.1 ppb 以上の濃度区において実験 1 と同様に神

表. ふ化率, 奇形率および神経が束性を起こした胚の割合

項目	対照区	濃度対照区	4OH-TCB (ppb)			
			0.01	0.1	1	10
ふ化率 (%)	72.4	63.1	68.6	64.8	64.3	67.3
奇形率 (%)	9.8	12.7	12.4	7.3	11.0	11.0
脱束性	1/14	0/5	1/11	4/12	9/12	8/12

経繊維が束性を形成しない脱束性が観察された。このことから、4OH-TCB は外部形態には影響を及ぼさない濃度であっても神経形成には影響を与えることが明らかとなった。なお、最小作用濃度は 0.1 ppb, 最大無作用濃度は 0.01 ppb であった。

水酸化 PCB は、ふ化阻害や奇形の発生など外部形態には影響しない濃度レベルでも、ヒラメの神経発生過程において明らかな毒性を示した。これは、末梢神経系の異常が外部形態の変化による二次的なものでなく、水酸化 PCB が神経系に対して直接的に影響することを示唆している。末梢神経系の形態異常に起因する機能的な異常が懸念される。また、本実験で用いた手法は、操作や形態観察の容易さから化学物質が末梢神経形成に及ぼす影響の評価に有用であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 入江浩大, 仲山 慶, 川口将史, 野見山桂, 北村真一, 村上安則. 水酸化 PCB 暴露による硬骨魚類の初期発生への影響-水酸化 PCB 暴露におけるヒラメ仔魚の形態解析結果から-. 第 15 回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会, 2009 年 10 月 3-4 日, 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲山 慶 (NAKAYAMA KEI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師

研究者番号：80380286

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし