

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2016

課題番号：23580430

研究課題名(和文) 飼育動物および野生動物を用いた環境および健康モニタリング法の検討

研究課題名(英文) Biological monitoring using animals

## 研究代表者

小林 真理子(望月真理子)(Mochizuki -Kobayashi, Mariko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：50409257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：野生動物と飼育動物由来試料を用いて、動物の汚染と健康を把握するための指標を作成した。野生動物の腎臓と肝臓中の鉛(Pb)濃度、ウマ血清中サイロキシンとヨウ素(I)、ネコ尿中ケイ素(S)とカルシウム(Ca)濃度などの2変量間の相関や等確率楕円(EPE)を作成した。対照動物の成績は、EPE内に入ったが、Pb汚染があるものは逸脱した。Iが多く含まれるサプリメントを給与されたウマの成績は、他と異なる場所に位置していた。尿石症のネコの尿でのみ、SとCa間に有意な相関( $r=0.8020$ 、 $P<0.01$ )が観察された。2変量から成る相関やEPEは、動物の汚染と健康状態を把握に有用な指標となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To know the environment contamination and health condition of animals, the indexes were established using wildlife and rearing animals. The correlation or equal probability ellipse (EPE) were created using the bivariate relation such as lead (Pb) contents in the kidney and liver of wildlife, thyroxine and iodine (I) in serum of horses, silicon (Si) and calcium (Ca) in urine of cats. In investigation of Pb, the data contaminated by Pb divided from EPE, although the non-contaminated data was observed in EPE. The data obtained from horses fed by supplement including I was divided from the data of other horses. There was a significant correlation ( $r=0.8020$ ,  $P<0.01$ ) between concentration of Si and that of Ca in the urine of cats with urolithiasis, although the similar significant correlation was not observed in the urine of healthy cats. The correlation and EPE created by bivariate relation was thought to be the useful indexes to know the contamination and health condition of animals.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：生物モニタリング 環境衛生

### 1. 研究開始当初の背景

疫学情報が欠損していても、対象とした生物の汚染状況を把握することを可能とした新しい指標を Cd 汚染に関して確立した (Mochizuki et al., Environ Monit Assess, 2008)。この指標は、対象とした生物の腎臓と肝臓中の Cd 含量の成績を、特別な汚染が報告されていない地域で捕獲された 101 例の動物で作成された指標に挿入し、指標上のどこに位置するかを確認することで汚染状況を把握するものである。また、ネコの尿の研究では、尿中の複数元素の相関が尿石症のネコと健康なネコで違うことを報告している (Mochizuki et al., Biol Trace Elem Res, 2011)。元素間の相関が動物の汚染状況や健康状況を反映することが示唆されていることから、以下の目的で研究をおこなった。

### 2. 研究の目的

研究申請時の第一の目的として、Cd 以外の汚染指標の確立を目指した。第二に、野生動物に比べて年齢、餌の状態が把握しやすい飼育動物を用いて、その健康状態を把握するための指標作成を検討した。この検討では、元素分析と、一般臨床検査や必要に応じて病理組織検査と組み合わせることで、疾病と元素動態の関連性を調べることを目的とした。第三の目的として、野生動物と飼育動物で得られた成績を統合し、動物種を超えた普遍的な指標作成をめざした。

### 3. 研究の方法

(1) 試料採取および処理方法：ウマおよびウシの血清、ウマおよび野生ニホンザルの被毛、野鳥の腎臓と肝臓、ウマの蹄を試料として収集した。上記試料中、臓器と被毛、蹄には、パイレックスの試験管に入れ硝酸と過塩素酸の混合溶液を加え 180 で処理した。結晶化した試料に、0.1N の硝酸を加え元素分析を行った。血清試料は、0.1N の硝酸で 10 倍に希釈し分析を行った。

(2) 分析方法 元素分析の方法：試料の特性や選択した元素種に依存し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (FTP-08, SPECTRO A.I.) あるいは、原子吸光度計 (Z-8200, 日立製作所) のいずれかの装置で試料中の元素を分析した。ヨウ素 (I) の分析は、誘導結合プラズマ質量分析計 (Agilent) を用いた (日本食品分析センター)。血液生化学性状検査方法：ウマの血清に関しては、外部検査機関 (富士フィルムモノリス) に依頼した。ウシ血清に関しては、生化学自動分析装置 (NX500iV, 富士フィルム) を用いて分析した。

(3) 統計処理方法 得られた成績を、統計ソフト Excel (Microsoft) あるいは Lotus (IBM) を用いてまとめ、SPSS Statistics 19 (IBM), JMP12 (SAS Institute Inc) を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物を用いた環境汚染の検討

環境汚染指標の作成とその有用性の確認：Cd で確立されていると同様の指標を鉛 (Pb) で作成した。報告されている陸・海・淡水に生息している魚、鳥類および哺乳類の腎臓と肝臓中 Pb 含量の成績 98 例を用いた。腎臓と肝臓中 Pb 含量の相関は、 $\log Y = 0.9256 \log X - 0.0578$  ( $R^2 = 0.808$ ,  $P < 0.01$ ) であった。この 98 例の成績より、等確率楕円を作成した。有用性の確認のため、汚染地域で捕獲された動物の成績を挿入したところ、汚染している動物の成績は、等確率楕円の中に入らないことが確認できた (図 1)。さらに、Pb を異なる濃度と期間で投与されたマウスの成績を挿入したところ、その投与量と投与期間に依存して、等確率楕円より異なって位置した。以上、本指標の利用により対象とした動物の Pb 汚染の状況を把握することができ、さらに急性および慢性の汚染を判断できる可能性が示唆されたことから、環境モニタリングの新技术として有用な一手法となりえると考えられた。以上の研究成果を、発表論文の と において報告した。また、Cd および Pb の指標を含めて、生物モニタリングに関してまとめたものを、研究成果報告 で発表した。

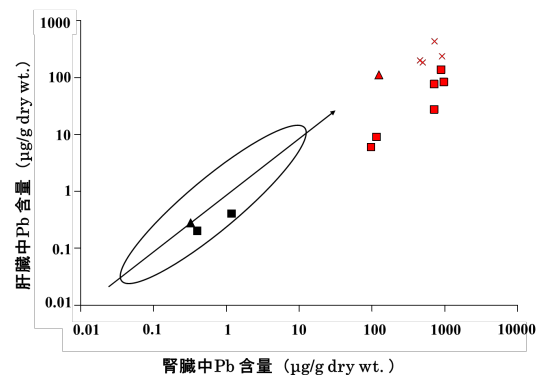


図 1: Pb の指標と Pb を投与された鳥の成績の比較。黒と赤のシンボルはそれぞれ対照と Pb を汚染された鳥を示している。

と : ヒメコンドル (Carpenter et al., J Wildlife Dis., 39,96-104,2003), と : マガモ (Heinz et al., Arch Environ Contam Toxicol, 36,323-333,1999), × : コンドル (Pattee et al., J Wildlife Dis, 42: 772-779,2006). Mochizuki ら (Rev Agri Sci, 1: 65-75,2013) の成績を日本語に改変。

その他の環境汚染に関する研究成果：下北半島に生息する 45 例のサル (Macaca fuscata) の被毛中 Cd の分析を行った。野生のサルの被毛中 Cd 含量は、ヒトの毛髪中 Cd 含量よりも有意 ( $P < 0.01$ ) に低かったが、半野生のサルの被毛中 Cd 含量とヒトの毛髪中 Cd 含量間に有意差は観察されなかった。被毛は、非侵襲的に動物より

採取が可能であることから有用な試料と考えられ、野生と半野生のサルでの Cd 含量に差が得られたことから、動物の被毛をモニタリングに使用できることが示唆された。以上の研究成果を、発表論文にまとめた。

対馬沖で油汚染により死亡した 29 例のアピ類の腎臓と肝臓中 8 元素の含量を、検討した。死亡して発見された鳥の肝臓の中のバナジウムとタリウムおよび腎臓中のチタン (Ti) 含量は、救助された後死亡した鳥の元素含量に較べ有意 ( $P < 0.05$ ) に高い結果となった。重油をはじめとする各種工業用の油には、高濃度に元素が含まれていることから、死亡して回収されたアピ類は、それらにより高濃度に汚染されていた可能性が考えられた。以上の研究成果を、発表論文にまとめた。

野生動物由来の試料を用いた解析が難しい要因として、実験動物と異なり系統を統一することができない点があげられる。近年、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の D-Loop の解析により集団を分類することが行われている。分類された集団ごとの汚染の違いを把握することが可能であるか、当初の予定では詳細な説明をしていなかった DNA 解析と元素分析の成績を組み合わせる試みを行った。静岡で採取したカワウ (15 例) の mtDNA の D-Loop を解析し、集団を分類し、Cd を含む多元素の分析を行った。現在、分類された集団ごとの汚染状況の差に関して解析を行っている。

(2) 飼育動物を用いた環境汚染および健康指標の作成：当初の予定では、被毛、蹄などの分析を行うことで非侵襲的な研究を進める予定であった。しかし、被毛、蹄より得られた成績が、対象動物の状況を正確に反映しているかを調べる必要があると判断された。被毛、蹄で得られた成績を、血液などで得られた成績と比較する必要があると考えられる。また、飼育動物の場合は、血液生化学性状などにより、ある程度の健康状態の把握は可能であり、健康指標作成の前に、健康状態の把握も必要と考えられた。そこで、申請時に、記載した一般臨床検査の中から血液生化学性状検査を選択し分析、飼育動物の健康状態を把握してから、研究を進めた。

ウマ血清におけるサイロキシン (T4) と I による健康指標：世界的に見ると、I は、ビタミン A および鉄と並ぶ世界の三大欠乏微量栄養素であるが、本邦では、むしろ過剰摂取が懸念される。海藻や海産物などを利用する食文化があるからである。血清中 I と T4 濃度に関して、A 地区で飼育され、海藻のサプリメントを多給されたウマ (A1, 15 例) 同じ A 地区で飼育されているが海藻のサプリメントは与えられていないウマ (A2: 12 例, A3: 5 例) および他の地域で飼育されていたウマ (B: 15 例, C: 25 例) を用いて比較した。I と T4 濃度の相関を調べたところ、それぞれの群

で有意な相関 ( $P < 0.01$ ) が観察された。また、それぞれの群の成績を等確率楕円で検討したところ、両者はあきらかに異なる位置にあった (図 2)。これは、汚染の解明の目的で、Cd および Pb で作成した指標で得られた理論と類似していると考えられ、分布域の違いによる健康指標の作成が可能であると考えられた。A1 で飼育されていたウマ 15 例中 14 例では、獣医師の触診により甲状腺の腫れが観察されている。この地域においてヒトでの同様の健康被害は、現在のところ報告されていないことから、ウマでの臨床症状は、過剰な I 摂取によるものと考えられた。また、このような指標は、ヒトの成績でも応用可能と考えられる。この成果を、研究報告で報告した。また、研究報告で発表し、学会奨励賞を受賞した。

同時に分析した I の同族元素である臭素 (Br) に関して、I と拮抗する成績を得ている。Br の必須性に関しては、様々な報告において可かあるいは否で報告されているが、2014 年に必須性が確認された。しかし、動物での Br に関する研究例は少ない。従って本研究において、新たな知見が得られたと考えられる。Br に関しては、投稿準備中である。

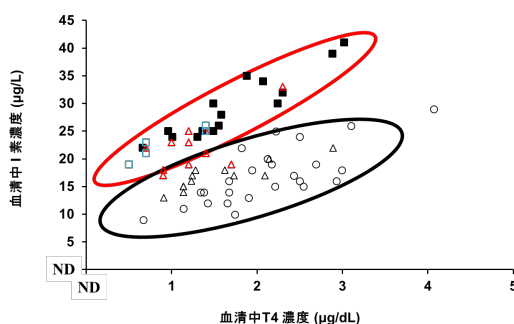


図 2. ウマ血清中 T4 と I の関係。□: A1 (海藻サプリメント給与群, 15 例), □: A2 (12 例), ○: A3 (15 例), △: B (15 例), ◇: C (25 例)。黒線: B と C の成績より得られた 95% 等確率楕円、赤線: A1 の成績より得られた 95% 等確率楕円。Mochizuki ら (Environ Monit Assess, 184(4):226, 2016) の成績を日本語に改変。

他方、一乗馬クラブのポニー (15 例) とサラブレッド (サラ, 30 例) 血液生化学性状の成績を解析し、ポニーの中性脂肪 (TG) がサラのそれに比べ有意 ( $P < 0.01$ ) に高いこと、またポニーでは年齢に伴い有意 ( $r = 0.764$ ,  $P < 0.001$ ) に TG が高くなることを示唆した (図 3)。さらに、体内の抗酸化物質の一つであるビリルビンに関しては、サラで有意に高いこと、両群で年齢に伴い有意 ( $P < 0.05$ ) に低下することなどを報告した。ウマに関して、本邦においては、競走馬の研究は進んでいるが、乗馬クラブ等の乗用馬の研究に関しての基礎的な情報が少ないとの現場獣医師の声

がある。本研究における、品種間の違いや年齢による変化に関する研究は、今後の乗用馬の臨床に役立つものと考えられた。

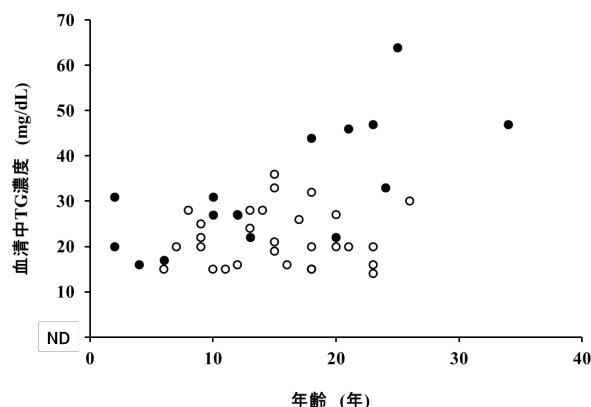


図 3. ウマの年齢と血清中中性脂肪濃度の関係。● : サラブレッド (30 例); ○ : ポニー (15 例). Mochizuki ら (J Equine Vet Sci, 42,1-6.2016) の成績を日本語に改変。

以上、指標作成のために動物の健康状態を把握することを目的とし分析した血液生化学性状の成績より、得られた成績をまとめ、発表論文の で報告した。I と T4 の関係をまとめたものから明らかのように、種々の血液生化学性状値と元素濃度は、関連することが多いので、現在その点を解析し、新たな指標作成を目指している。また、発表論文の の成績の一部を引用して、動物への意識調査に関するアンケートを作成し、成績を学会発表の で発表した。

ネコの尿中元素分布:2011年に報告(Biol Trace Elem Res)したネコの尿中元素分布の検討では、尿石症のネコの尿中複数元素濃度間の相関と、正常ネコのそれが分布する位置が異なることを報告した。今回、この論文で検討していなかったケイ素(Si)を検討した。尿石症のネコの尿中 Si 濃度は、正常なネコのそれに比べ有意 ( $P<0.001$ ) に高かった。また、Si およびイオウなどの他の元素間で得られる相関の傾きは、健康なネコと尿石症のネコで異なっていた。また、尿石症のネコの尿では、S と Ca 間に有意な相関 ( $r=0.8020$ ,  $P<0.01$ ) が観察されたが、健康なネコの尿では類似の相関 ( $r=0.0599$ ,  $P=0.8321$ ) は得られなかった。以上の成績を、研究成果 で発表した。

牛のストレス指標：健康指標作成の一環として、学生の牧場での実習前後におけるウシのストレスの変化を把握するために、血清中元素濃度の変化を観察した。現在解析が終了している元素に関しては、実習の前後で大きな変化はなかったが、同時に分析したコルチゾールは、実習の後で有意 ( $P<0.01$ ) に上昇した。これに関しては、学会発表の で発表

し、学会優秀賞を受賞し、現在、投稿準備中である。

### (3) 今後の展開

今後、蹄および毛髪中の元素分析を進めて血清中の元素との関係を観察し、指標作成に非侵襲的に得られた試料の有効性を検証していく。また、各種、血液生化学性状と元素の組み合わせにより健康指標の作成を引き続きおこなう。また、本研究期間内にヒトの尿を 100 検体ほど採取していることから、これを用いてネコで得られたような健康指標の作成が可能かを検討していく。申請当時には、必要な場合には、元素分析の成績と病理組織学的検査の組み合わせを行うとしたが、疾病に関連するような組織試料を、研究期間内に十分に得ることができなかった。現在、継続して試料を集めていることから、今後はこの点も含めて検討していきたい。

以上、本研究では、野生動物や飼育動物用いて、環境汚染あるいは健康の指標作成を行い、その内容を論文 8 件、学会発表 9 件にて発表した。

### 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 8 件)

望月真理子, 植田富貴子 (2017) 環境モニタリングの意義と問題点：新しい環境モニタリングの方法、日本獣医師会雑誌, 70, 57-61. <http://nichiju.lin.gr.jp/mag/07001/d1.pdf>. (査読有)

Mochizuki M, Minowa F, Ishimoto C, Gin A, Ishioka K, Okubo K (2016) The effect of aging on biochemical markers in equine serum. J Equine Vet Sci, 42,1-6. [http://www.j-evs.com/article/S0737-0806\(16\)30008-9/fulltext](http://www.j-evs.com/article/S0737-0806(16)30008-9/fulltext) (査読有)

Mochizuki M Hayakawa N, Minowa F, Saito A, Ishioka K, Ueda F, Okubo K, Tazaki H (2016) The concentration of iodine in horse serum and its relationship with thyroxin concentration by geological difference. Environ Monit Assess, 188(4):226.doi:10.1007/s10661-016-5221-7. (査読有)

Takano T, Okutomi Y, Mochizuki M, Ochiai Y, Yamada F, Mori M, Ueda F (2015) Biological index of environmental lead pollution: accumulation of lead in liver and kidney in mice. Environ Monit Assess. 187(12):744.doi:10.1007/s10661-015-4958-8. (査読有)

Takahashi F, Mochizuki M, Yogo T, Ishioka K, Yumoto N, Sako T, Ueda F, Tagawa M, Tazaki H (2014) The silicon concentration in cat urine and its relationship with other elements. J Vet



Med Sci, 76(4):569-572. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064144/> (査読有)

Mochizuki M, Yamamoto H, Yamamura R, Suzuki T, Ochiai Y, Kobayashi J, Kawasumi K, Arai T, Kajigaya H, Ueda F (2013) Contents of various elements in the organs of seabirds killed by an oil spill around Tsushima Island, Japan. J Vet Med Sci, 75(5):667-670. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/5/75\\_12-0386/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/5/75_12-0386/_article) (査読有)

Mochizuki M, Okutomi Y, Takano T, Hondo R, Yumoto N, Kajigaya H, Ueda F (2013) Modified index for lead in biological monitoring. Rev Agri Sci, 1: 65-75, doi: 10.7831/ras.1.65 (査読有)

Mochizuki M, Anahara R, Mano T, Nakayama Y, Kobori M, Omi T, Matsuoka S, Ueda F (2012) Investigation of cadmium contamination using hair of the Japanese macaque, *Macaca fuscata*, from Shimokita Peninsula, Aomori Prefecture in Japan. Bull Environ Contam Toxicol, 89(3): 577-579. doi: 10.1007/s00128-012-0694-8. (査読有)

[学会発表](計 9 件)

望月真理子、植田富貴子、新たに開発した生物モニタリングの一手法に関して、野生動物学文科会シンポジウム「野生動物の環境汚染問題と保全医学」第 159 回本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日、日本大学 生物資源科学部 (神奈川県・藤沢市)

若林真由、銀梓、佐藤巧、藤平篤志、三浦亮太郎、水谷尚、天尾弘実、山田裕、神谷新司、吉村格、望月真理子、牧場実習におけるウシのストレスに関する研究、動物介在教育・療法学会第 9 回、2016 年 10 月 30 日、日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)

望月真理子、銀梓、佐藤稲子、美濃輪史子、石岡克己、田崎弘之、大久保公裕、ウマの血液生化学性状に対する加齢や品種差の影響、日本動物看護学会第 25 回大会、2016 年 7 月 2 日、酪農学園大学 (北海道・江別市)

銀梓、望月真理子、濱野佐代子、神谷万波、美濃輪史子、松原孝子、大久保公裕、神谷新司、望月真理子、定められた給餌以外の餌やりに関する乗馬クラブ会員の意識調査、日本動物看護学会第 25 回大会、2016 年 7 月 2 日、酪農学園大学 (北海道・江別市)

能登まどか、美濃輪史子、早川典之、石岡克己、植田富貴子、大久保公裕、田崎弘之、望月真理子、ウマ血清を用いた生物モニタリング、日本動物看護学会第 24 回大会、2015 年 7 月 4 日、日本獣医生命科学大学 (東京都・武蔵野市)

望月真理子、早川典之、美濃輪史子、齋藤明広、園田遥、石岡克己、落合由嗣、植田富貴子、湯本典夫、左向敏紀、動物を用いた

健康モニタリング法の検討:ウマ血清中 T4 濃度および各種元素濃度に関する検討、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス (東京都・目黒区)

眞野朋樹、望月真理子、穴原玲子、中山裕理、小堀睦、松岡史朗、植田富貴子、ニホンザルの体毛を用いた有害元素のモニタリング、第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 28 日、東京大学駒場キャンパス (東京都・目黒区)

山村里紗、山本英恵、鈴木友子、落合由嗣、小林淳、川角浩、新井敏郎、梶ヶ谷博、植田富貴子、望月真理子、野鳥の重金属元素汚染に関する疫学調査-11)油汚染を受けたアビ類における元素含量の検討、第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 29 日、大宮ソニックシティ (埼玉県・大宮市)

望月真理子、余戸拓也、浦野貴美代、美濃輪史子、石岡克己、小田民美、左向敏紀、植田富貴子、飼育ネコにおける尿中微量元素の分布:ケイ素濃度の分布と他元素との関係、第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 29 日、大宮ソニックシティ (埼玉県・大宮市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者 小林真理子 (望月真理子)  
(KOBAYASHI, Mariko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授  
研究者番号: 50409257

## (3)連携研究者

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

山本昌美 (YAMAMOTO, Masami)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 30530026

石岡克己 (ISHIOKA, Katumi)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授  
研究者番号: 60409258

余戸拓也 (YOGO, Takuya)  
日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師  
研究者番号: 30386297

## (4)研究協力者

美濃輪史子 (MINOWA, Fumiko)  
ミノワホースクリニック・獣医師