

## 論文の内容の要旨

氏名：馬場 康司

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：細胞分裂阻害物質コルヒチンのオオミジンコ *Daphnia magna* への繁殖毒性  
ならびに毒性発現機構

### 緒論

節足動物門枝角目ミジンコ科ミジンコ属は単為生殖で繁殖する。本研究で扱ったオオミジンコ *Daphnia magna* Straus の場合、産出された幼体は生後 7~8 日で成熟し、以降 3 日毎に遺伝的に同一な雌の産仔を繰り返す。本種の体長は 1~5 mm とミジンコ類の中では大型であり、観察および飼育が容易であること、ライフサイクルが短いこと、化学物質に対する感受性が高いことから、環境影響評価のモデル生物として世界中で利用されている。また、農薬や一般化学物質の毒性評価にあたり、本種は毒性を評価するための試験方法である OECD 試験ガイドラインの推奨種に選定されている。しかし、毒性試験の多くは半数致死濃度や無影響濃度等、生態系リスク評価に使用するための毒性値を得ることを目的としていることから、毒性症状やその発現機構に関する情報が乏しい。

細胞分裂阻害は殺菌剤あるいは除草剤の作用機序の一つであり、これまでに細胞分裂阻害物質を用いる農薬が多く開発されてきた。細胞分裂阻害剤の代表的物質であるコルヒチンは、微小管をチューブリン分子へと脱重合し、紡錘体を解消することで有糸分裂を阻害する。コルヒチンは遺伝学や微小管機能を研究するための陽性対照物質としても知られる。以上のことから、コルヒチンはオオミジンコの繁殖に負の影響を及ぼすことが懸念されるが、本種に対する毒性の知見は皆無である。コルヒチンがオオミジンコに与える繁殖毒性を明確にすることは、多くの細胞分裂阻害物質が本質的に持つ毒性リスクを理解する上で重要である。本研究では、コルヒチンのオオミジンコの繁殖に及ぼす影響を個体および組織レベルで解析し、毒性の発現機構を明らかにすることを目的とした。

### 1. オオミジンコに対する各種毒性試験

オオミジンコに対する急性および慢性毒性の強さとその毒性症状の特徴を明らかにするため、(1) 急性遊泳阻害試験、(2) 21 日間繁殖試験、(3) 抱卵成体を用いた 4 日間暴露による短期繁殖試験を行った。これらの実験における基本的な試験方法は表 1 のとおりである。国立環境研究所（つくば市）より入手し、(株)日曹分析センター小田原事業所にて 9 年以上継代したオオミジンコを供試した。飼育水には OECD テストガイドライン No. 211 で推奨されている Elendt M4 medium（以降 M4 培地とする）を用いた。コルヒチン（純度 98%, Sigma-Aldrich）は N, N-ジメチルホルムアミド（以下 DMF とする）に溶解して試験原液を調製した。暴露開始時または換水時、試験原液を M4 培地で希釈して試験液を調製した。なお、コルヒチンは M4 培地中で少なくとも 8 日間安定であることを高速液体クロマトグラフィーにより確認したため、暴露濃度は設定濃度で表記した。

#### 1-1. 急性遊泳阻害試験

遊泳阻害および異常行動が 12.5 mg/L 以上の濃度区で暴露開始 24 時間後から認められた。暴露 48 時間の EC<sub>50</sub>、LOEC（最小影響濃度）ならびに NOEC（無影響濃度）はそれぞれ 24 mg/L（95%信頼限界 21~28 mg/L）、12.5 mg/L および 6.25 mg/L であった。

表 1.3 種類の毒性試験における試験方法の概要

試験	供試ステージ	暴露期間 (日)	設定濃度	試験区あたりの 供試個体数
1 急性遊泳阻害	幼体 (生後 24 時間齢未満)	2	5 濃度区 (100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg/L), 無処理対照区 (M4 培地), 溶媒対照区 (1 mL/L DMF 溶液)	35
2 21 日間繁殖	幼体 (生後 24 時間齢未満)	21	5 濃度区 (5, 2, 1, 0.5, 0.2 mg/L), 溶媒対照区 (0.1 mL/L DMF 溶液)	19~40
3 短期繁殖	抱卵成体 (11 日齢)	4	5 濃度区 (5, 2, 1, 0.5, 0.2 mg/L), 溶媒対照区 (0.1 mL/L DMF 溶液)	31~52

### 1-2. 21 日間繁殖試験

暴露方法は半止水式とし、試験液を週に 2~3 回、全量を換水した。試験期間中、親ミジンコ (以下、F0) の遊泳行動、脱皮殻の有無、産出幼体 (以下、F1) の数、随胎卵数を毎日肉眼観察するとともに、F1 の性別および形態異常の有無を実体顕微鏡下で観察した。暴露終了日、F0 生存個体について外観異常の観察および体長測定 (個体頂部から殻刺の付け根) を実体顕微鏡下で行った。

F0 個体について、致死や形態異常 (第 2 触角の遊泳剛毛の欠損) が 1 mg/L 以上の濃度区でそれぞれ 7.5~100% および 100% 観察された。最高濃度区 (5 mg/L) では F0 は産仔できず暴露開始 5 日以内に全個体死亡した。体長は 0.5 mg/L 以上の濃度区で暴露終了時に有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した。脱皮および産仔回数は 2 mg/L 以上の濃度区で有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した。F0 1 個体による産仔 1 回あたりの平均生存産仔数は 0.5 mg/L 以上の濃度区で有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した。また、0.5 mg/L 以上の濃度区で脱皮時に随胎卵 (未発達の初期胚) の放出が観察された。随胎卵から細胞分化や器官形成が認められず、油滴と思われる顆粒状構造物が胚内部に認められた。F0 の抱卵は、5 mg/L を除く全濃度区で暴露期間を通じて約 3 日毎に観察されたが、0.5 mg/L 区のみ産卵後 48~72 時間経過した時点で育房内の初期胚が崩壊した。繁殖試験において、最も感受性が高い毒性指標は、体長の減少および雌 1 個体の産仔 1 回あたりの平均生存産仔数の減少であった。繁殖試験における F0 個体に対する LC<sub>50</sub> 値は 2 mg/L (95%信頼限界 1.5~2.4 mg/L)、NOEC および LOEC はそれぞれ 0.2 mg/L および 0.5 mg/L であった。

### 1-3. 短期繁殖試験

成体に対する暴露の影響を排除した繁殖毒性を明らかにするため、抱卵成体を用いた短期間暴露による繁殖試験を行った。産仔 6 回目まで M4 培地中で飼育し、F1 の数および随胎卵数を毎日肉眼観察するとともに、性別および形態異常の有無を実体顕微鏡下で観察した。

一連の発生過程において、暴露するタイミングにより毒性は異なった。産仔 3 回目はほぼ無影響であり、産卵後 1 日程度経過した胚には毒性を示さなかった。産仔 4 回目は随胎卵 (未発達の卵) のみがみられ、卵巣内で暴露された胚は全て発生が阻害された。産仔 5 および 6 回目では、産仔回数が増えるとともに生存幼体数が増加する一方で未発達卵の数が減少し、暴露による負の影響からの回復が認められた。

## 2. 胚発生に対する毒性とその発現時期

### 2-1. 抱卵成体育房内卵の胚発生阻害

産卵直後から 10 時間経過した抱卵成体をコルヒチン 1 mg/L に暴露し、産仔が終了するまで 3~4 日

間暴露した。暴露終了時、産仔数および外部形態の異常（胚発生）の有無を観察した。暴露期間中、育房内の胚の状態も毎日観察した。

胚に対する毒性は、産仔数の減少および胚発生の阻害（未発達卵）として現れた。胚の発生過程により毒性発現が異なり、産卵後 6 時間経過した時点が境界であった。産卵直後～5 時間経過時点までに暴露を開始した場合、胚は幼体として産仔されず未発達卵のみがみられた。産卵後 3～5 時間経過した胚へ暴露した場合、卵も未成熟胚もほとんど観察されず、産卵から 48～72 時間経過した時点で胚は育房内で崩壊した。産卵後 7 時間以降に暴露した場合、胚発生は阻害されなかったことから、原腸陥入以降には胚発生・器官形成は阻害されないことが明らかとなった。これらのことから、(1) チューブリン重合阻害の作用は認められるが、阻害時期が限定されること、(2) チューブリン重合阻害ならびにそれ以外の作用も存在する可能性が伺われた。

## 2-2. 卵割阻害作用および有糸分裂阻害作用の検証

7 日齢以降の抱卵成体をコルヒチン 1 mg/L に 4 日以上暴露し、卵巣内で暴露された胚を育房より継時的に採取した。胚を固定（固定液①: 50 mM EGTA, 9.25%ホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) または固定液②: 99%冷エタノール）、脱水したのち、卵膜を物理的に除去するかコラゲナーゼ Type 1 で処理した。免疫染色後（1 次抗体: 抗  $\alpha$ -Tubulin マウス IgG, 2 次抗体: Cy3 標識抗マウス IgG ウサギ抗体）、RNase A 処理および YOYO<sup>®</sup>-1 による核染色を行い、共焦点顕微鏡下で胚を観察した。

核染色の結果、発生初期（産卵後 4 時間経過まで）は卵割の阻害が認められないものの、産卵後 10～24 時間経過した段階では卵割が阻害されることが明らかとなった。チューブリン免疫染色の結果、微小管は発生初期では検出されたが、産卵後 24 時間経過した段階では検出されなかった。このことから、コルヒチンはオオミジンコのチューブリン重合を阻害するが、その時期は産卵後 10 時間以降に限定される可能性が考えられた。

## 2-3. 胚の組織断面の構造解析

7 日齢以降の抱卵成体をコルヒチン 1 mg/L に 4 日以上暴露し、卵巣内で暴露された胚を育房より継時的に採取した。胚を上記の固定液①中で固定後、パラフィン包埋、薄切したものをヘマトキシリン・エオジン（以降 HE とする）染色し、光学顕微鏡下で観察した。

HE 染色の結果、産卵後 10 時間以上経過した胚で発生の阻害が顕著に認められたことから、組織学的にも胚発生の阻害が証明された。

## 3. コルヒチンによる胚の崩壊作用

### 3-1. 卵膜に対する影響

オオミジンコに対するチューブリン重合阻害以外の作用の可能性として、卵膜に及ぼす影響が考えられたため、(1) 産卵前暴露および (2) 産卵後暴露により得られた胚について、電子顕微鏡（透過型 TEM, 走査型 SEM）による卵膜の構造解析を行った。各実験方法の概要を表 2 に示す。

SEM 用試料として胚を固定（50 mM EGTA, 9.25%ホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH 7.4)）、脱水後、臨界点乾燥および導電処理を行い、TEM 用試料として胚を固定（2.5%グルタルアルデヒド）、樹脂包埋、超薄切片を作成したのち、卵膜の断面を観察した。

実験 1 の産卵前暴露において、卵膜の厚さは暴露区の方がやや厚かったもの ( $p < 0.01$ )、卵膜の表面構造には特別な変化は認められなかった。実験 2 の産卵後暴露において、2 層から成る卵膜のうち外膜の表面構造および厚さに明瞭な変化は認められなかった。

表 2. 卵膜構造の解析方法の概要

実験	暴露開始時	暴露時の成長段階	暴露期間（終了時）
1 卵膜構造解析-1 (SEM, TEM)	産卵前	抱卵成体／ 卵巣	産卵後 6 時間まで
2 卵膜構造解析-2 (SEM, TEM)	産卵後	抱卵成体／ 産卵後 3 時間経過した胚	産卵後 30 時間まで (胚が崩壊する直前)

### 3-2. 膜の浸透圧調整に及ぼす影響

コルヒチンによる胚の崩壊は、膜機能（浸透圧調整）の阻害によるものと仮説を立て、浸透圧調整に関わる作用点であるイオンチャネルおよび水チャネル（アクアポリン）の阻害の有無を検証した。

産卵後 3～4 時間経過した胚を採取し、各種チャネル阻害剤（Cl<sup>-</sup>チャネル：NFA, DIDS, 水チャネル：塩化水銀、塩化銅 2 水和物、塩化亜鉛）を暴露した。胚の崩壊の有無を指標に、コルヒチンとの異同を評価した。また、イオンを介した水の透過性が胚の崩壊に関与するかを調べるため、産卵後 3～4 時間経過した胚を Cl<sup>-</sup>フリー培地および低張液（イオン交換水、脱塩素水道水）に暴露した。

Cl<sup>-</sup>チャネル・水チャネルの阻害剤の暴露により、胚の発生停止（未発達卵）や崩壊、発生異常（奇形）が混在して認められ、両チャネル阻害剤によっても胚発生が阻害されることが明らかとなった。発生異常が一定の割合（20%以上）で認められた点で、一部のチャネル阻害剤（Cl<sup>-</sup>チャネル：NFA, 水チャネル：塩化水銀）の症状はコルヒチンと異なった。ただし、Cl<sup>-</sup>フリー培地およびイオン交換水、脱塩素水道水中のいずれにおいても胚の崩壊が認められなかったことから、Cl<sup>-</sup>チャネルの阻害やイオンを介した水の透過性の低下が胚の崩壊を引き起こすとは考え難い。水チャネル阻害剤（塩化水銀、塩化亜鉛）による胚の崩壊が一定の割合（20%以上）で認められたことから、コルヒチン暴露による胚の崩壊は、水チャネルの阻害によって引き起こされている可能性が高いと考えられた。

### 総括

コルヒチンは $\geq 0.5$  mg/L でオオミジンコの初期（産卵後 10～24 時間経過）の胚発生を阻害（発生停止、胚の崩壊）することが明らかとなった。このことは、オオミジンコにおいて初めて見出された作用である。また、胚の崩壊の有無は暴露開始時の胚発生の過程によっても異なり、産卵前と産卵後の暴露で毒性症状が異なった。産卵後の暴露開始では、胚発生の阻害は産卵から 6 時間以内に暴露を開始した場合に限定され、産卵後 7 時間以降の暴露では、原腸陥入や器官形成を阻害しないことが明らかとなった。一方、産卵前の暴露開始では、核染色およびチューブリン免疫染色の結果、卵割および微小管形成の阻害は産卵後 24 時間経過した時点で現れることも明らかとなった。

以上のことから、オオミジンコに対する毒性の発現機構として以下のようなことが推察される。すなわち、産卵前ならびに産卵後 6 時間以内の暴露開始において、卵形成は阻害されないが、チューブリン重合阻害により微小管形成（有糸分裂）と卵割が妨げられ、胚が死亡すると考えられる。また、コルヒチン暴露による胚の崩壊は、Cl<sup>-</sup>チャネルの阻害ではなく、水チャネル（アクアポリン）の阻害により胚の浸透圧調整が妨げられることで引き起こされている可能性が高い。

以上のとおり、コルヒチンの繁殖毒性およびその発現機構については多くの知見が得られたが、胚の崩壊の機序については未解明の部分も残された。しかしながら本研究の成果は、細胞分裂阻害物質が持つ本質的な毒性リスクを理解する上で重要な基礎的知見であり、生態毒性の低い新規農薬の開発に向けた応用展開に資するものである。