

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

**Effects of the cell division inhibitor colchicine on reproduction in the
Cladoceran *Daphnia magna* and its toxic mechanism**

馬場 康司

2016

目次

	ページ
目次.....	2
図表目次.....	4
Abstract.....	5
第 I 章 緒言.....	8
I-1 オオミジンコの生態毒性評価における位置づけ.....	9
I-2 細胞分裂阻害剤の作用ならびにコルヒチンを選択する理由.....	10
I-3 コルヒチンの作用.....	11
I-4 本論文での諸知見の将来的な新農薬開発に向けた応用.....	12
I-5 本論文の目的ならびに論文構成.....	13
第 II 章 オオミジンコの正常な卵発生と胚発達.....	15
II-1 序論.....	16
II-2 材料および方法.....	16
II-2-1 供試生物.....	16
II-2-2 胚の採取と観察.....	16
II-3 結果および考察.....	17
第 III 章 コルヒチンを用いたオオミジンコ毒性試験.....	19
III-1 序論.....	20
III-2 材料および方法.....	20
III-2-1 供試生物.....	20
III-2-2 コルヒチンおよび試験液の調製.....	20
III-2-3 試験水中におけるコルヒチン濃度および安定性の確認.....	20
III-2-3-1 HPLC 分析の諸条件.....	21
III-2-3-2 コルヒチン標準溶液の調製および検量線の作成.....	21
III-2-3-3 分析試料の前処理および HPLC 分析.....	21
III-2-4 急性遊泳阻害試験.....	22
III-2-5 21 日間繁殖試験.....	22
III-2-6 短期繁殖試験.....	23
III-2-7 統計処理.....	23
III-3 結果.....	24
III-3-1 試験水中におけるコルヒチン濃度および安定性の確認.....	24
III-3-2 急性遊泳阻害試験.....	24
III-3-3 21 日間繁殖試験.....	24
III-3-4 短期繁殖試験.....	33
III-4 考察.....	37
III-4-1 コルヒチン暴露による毒性の量的特徴.....	37
III-4-2 毒性の質的特徴.....	37
第 IV 章 胚発生に対する毒性とその発現時期.....	39
IV-1 序論.....	40
IV-2 材料および方法.....	40

IV-2-1 抱卵成体を用いた育房内卵の胚発生阻害.....	40
IV-2-2 卵割阻害作用.....	41
IV-2-3 有糸分裂阻害作用.....	41
IV-2-4 胚の組織断面の観察.....	42
IV-3 結果.....	42
IV-3-1 抱卵成体を用いた育房内卵の胚発生阻害.....	42
IV-3-2 卵割阻害作用.....	43
IV-3-3 有糸分裂阻害作用.....	46
IV-3-4 胚の組織断面の観察.....	46
IV-4 考察.....	49
第V章 コルヒチンによる胚の崩壊:卵膜の構造的脆弱化.....	51
V-1 序論.....	52
V-2 材料および方法.....	52
V-2-1 電子顕微鏡による卵膜の構造解析:産卵前暴露胚.....	52
V-2-2 電子顕微鏡による卵膜の構造解析:産卵後暴露胚.....	53
V-3 結果.....	53
V-3-1 電子顕微鏡による卵膜の構造解析:産卵前暴露胚.....	53
V-3-2 電子顕微鏡による卵膜の構造解析:産卵後暴露胚.....	53
V-4 考察.....	57
第VI章 コルヒチンによる胚の崩壊:浸透圧調節の阻害作用.....	58
VI-1 序論.....	59
VI-2 材料および方法.....	60
VI-2-1 コルヒチン濃度と胚毒性の関係.....	60
VI-2-2 Cl ⁻ チャンネル阻害剤の影響.....	60
VI-2-3 水チャンネル(AQP)阻害剤の影響.....	60
VI-2-4 コルヒチンと各種チャンネル阻害剤の同時処理効果.....	61
VI-2-5 イオンを介した水透過性および浸透圧の影響.....	62
VI-3 結果.....	62
VI-3-1 コルヒチン濃度と胚毒性の関係.....	62
VI-3-2 Cl ⁻ チャンネル阻害剤の影響.....	65
VI-3-3 水チャンネル(AQP)阻害剤の影響.....	65
VI-3-4 コルヒチンと各種チャンネル阻害剤の同時処理効果.....	71
VI-3-5 イオンを介した水透過性および浸透圧の影響.....	71
VI-4 考察.....	76
第VII章 総括.....	79
謝辞.....	82
引用文献.....	85

図表目次

ページ

Table 1.	Effects of colchicine on the reproduction and growth of <i>D. magna</i> for 21 days.....	28
Table 2.	EC ₅₀ , LOEC and NOEC of colchicine in <i>D. magna</i>	32
Table 3.	Effects of colchicine on reproduction and growth of daphnids in short-term reproduction test (4 days exposure).....	35
Fig. 1.	Time-course of embryogenesis in female of <i>D. magna</i> at 20°C.	18
Fig. 2.	The cumulative immobilization (%) of <i>D. magna</i> neonates exposed to colchicine for 24 and 48 hours.	25
Fig. 3.	The cumulative mortality of <i>D. magna</i> neonates exposed to colchicine for 21 days.....	26
Fig. 4.	The morphological abnormality of adult female caused by the exposure of colchicine.....	27
Fig. 5.	Mean number of offspring per brood and mortality of adult females for 21 days.....	30
Fig. 6.	Typical abnormality on embryogenesis caused by colchicine exposure.	31
Fig. 7.	The cumulative mortality of <i>Daphnia magna</i> adult females exposed to colchicine for 4 days. ..	34
Fig. 8.	Mean number of offspring per brood in parent females during the test period in short-term reproduction test.	36
Fig. 9.	Mean number of offspring produced by female at each exposure timing in the embryo developmental inhibition test.	44
Fig. 10.	Effect of colchicine on early embryogenesis of <i>Daphnia magna</i> in the nuclear staining.....	45
Fig. 11.	Effect of colchicine on early embryogenesis of <i>Daphnia magna</i> in the nuclear staining and immunostaining for tubulin.	47
Fig. 12.	Effect of colchicine on early embryogenesis of <i>Daphnia magna</i> in the HE staining.	48
Fig. 13.	Surface structure of embryos of <i>Daphnia magna</i>	54
Fig. 14.	Box-and-whisker plots of the thickness of egg membrane of <i>Daphnia magna</i>	55
Fig. 15.	The surface structure of embryos of <i>Daphnia magna</i>	56
Fig. 16.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of colchicine.	63
Fig. 17.	The typical morphological abnormalities of embryos caused by the exposure of chemicals.....	64
Fig. 18.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of NFA.66	66
Fig. 19.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of DIDS.67	67
Fig. 20.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of HgCl ₂ .68	68
Fig. 21.	The typical morphological abnormalities of embryos caused by the exposure of chemicals.	69
Fig. 22.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of ZnCl ₂ .70	70
Fig. 23.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of CuCl ₂ .72	72
Fig. 24.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of NFA and colchicine.....	73
Fig. 25.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of HgCl ₂ and colchicine.....	74
Fig. 26.	The developmental abnormalities of <i>Daphnia magna</i> embryos caused by the exposure of colchicine in M4 medium or Cl ⁻ free medium.	75
Fig. 27.	The temporal variations in the proportion (%) of abnormalities in low-osmotic medium.	77

Abstract

The freshwater cladoceran *Daphnia magna* is one of the recommended test organisms for acute and chronic toxicity tests of chemical substances in the OECD test guidelines. Many studies on the toxic effects of chemicals to aquatic organisms have been performed to examine several indexes such as the lethal concentration to 50% of test organisms (LC₅₀) and the highest NOLC (no observed lethal concentration) in acute toxicity tests, the highest NOEC (no observed effect concentration), LOEC (lowest observed effect concentration) and EC₅₀ (median effect concentration) in chronic toxicity tests, and the acute-chronic ratio.

The inhibition of cell division is one of the mechanisms of toxicity for fungicides and/or herbicides, and many products of pesticides derived from some cell division inhibitors have been developed. The knowledge on the toxic symptoms and mechanism of cell division inhibitors to aquatic animals (crustaceans) has been still scarce, although cell division inhibitors can reduce the reproduction of animals. This study aimed (1) to evaluate the effects of colchicine, a typical chemical substance of cell division inhibitors on the reproduction of *D. magna*, (2) to examine its mechanism of toxicity, and (3) to propose the short-term and simple methods for evaluating the toxic effects of colchicine on *D. magna*.

The results obtained in this study are as follows:

1. In the 21-day reproduction test, the values of LC₅₀ for adults, the highest NOEC and LOEC on reproduction were 2, 0.2 and 0.5 mg L⁻¹, respectively. These were equivalent to about 1/10 to 1/30 of the values obtained in the acute (48-hr) immobilization test.
2. In the short-time reproduction test by the exposure of colchicine to adult females containing eggs/embryos in their brood chamber, the embryogenesis/growth of the early stage (i.e. eggs in ovary) <6 hrs was inhibited, whereas that of embryos >7 hrs was not inhibited. After stopping the exposure, offspring in next (the second) ovary grew normally.

3. In the embryo developmental inhibition test by the exposure of 1 mg L⁻¹ colchicine to adult females containing in their brood chamber, the embryogenesis/growth was inhibited when the exposure to the early stage (i.e. ovary to 6 hrs after oviposition) had been begun, and then almost of embryos burst within 48–72 hrs after oviposition. This phenomenon found in this study is the new toxic symptom of colchicine for animals.
4. In the nuclear staining and immunostaining for tubulin, the early stage (i.e. eggs in ovary) exposed continuously to 1 mg L⁻¹ colchicine showed a normal cleavage until at least 4 hrs after oviposition, but then it was inhibited at 10– 24 hrs after oviposition.
5. On the basis of the SEM (Scanning Electron Microscope) and TEM (Transmission Electron Microscope) observation, there was no notable change in the surface structure of embryos, although the egg membrane of embryos exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine in the ovary was slightly thicker than that of normal (non-exposed) embryos (p<0.01). This fact was not due to the fragility of its physical structure.
6. In the inhibition effect test of principal ion channels and aquaporins (AQP) on the osmoregulation of embryos, all of Cl⁻-channel inhibitors tested in this study could cause both the inhibition of embryogenesis/growth and the burst of embryos. Additional toxic symptom (i.e. malformed embryos) was observed for Cl⁻-channel, which was different from that of colchicine.
7. These results obtained in this study indicate that (a) the tubulin polymerization was inhibited, which resulted in the restrain of mitosis and cleavage, and finally embryos would die, although oogenesis in ovaries was not inhibited by the exposure of colchicine to the early stage (i.e. ovary to 6 hrs after oviposition), and (b) the osmoregulation of embryos was disturbed by the imperfection of aquaporin (AQP) function, which would result in burst of embryos based on the results mentioned in #6.

In summary, in this study several data on the toxic symptom and mechanism of colchicine to *D. magna* were obtained, which is essential for evaluating the toxic effects of such cell division inhibitors to aquatic animals (crustaceans). In addition, both the short-term reproduction test by the exposure for

4 days and the embryo developmental inhibition test obtained results that were consistent with those in the 21-day reproduction test. These short-term and simple methods are available and proposed to evaluate the toxic effects of the cell division inhibitors on embryos and oogenesis. The results obtained in this study are expected for improving development efficiency of new agricultural chemicals (i.e. pesticides) with low toxicity to aquatic organisms.

第 I 章 緒言

I-1 オオミジンコの生態毒性評価における位置づけ

動物プランクトンの1分類群である枝角類のミジンコは、水圏生態系の第1次消費者(第2次生産者)に位置し、生態系において第1次生産者と第2次消費者(第3次生産者)をつなぐという重要な役割を担っている(若林 2003)。節足動物門鰓脚綱枝角目ミジンコ科ミジンコ属は、水温や十分な飼料など生育環境に問題のない条件下、雌のみによる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、潤沢な給餌下、水温 20°C で産出された幼体は生後 7~8 日で成熟する。雌成体は育房内で生育した全ての幼体を放出(これを産仔と呼ぶ)した後、脱皮する。未抱卵の雌は、脱皮後 20 分以内に卵巣から育房内へ産卵を開始し、抱卵する。抱卵以降、雌成体は 3 日毎に遺伝的に同一な雌の産仔を繰り返す(Zaffagnini 1987)。オオミジンコの卵は、外膜のコリオンおよび内膜のビテリン膜の二つの卵膜を有している(Seidman & Larsen 1979; Sobral et al. 2001; Mittmann et al. 2014)。産出された卵(初期胚)は、育房内で胚発生が進み、卵膜を破って孵化後 3 日で育房外へと放出され、1 齢幼生となる。産出幼体数は、産仔回数が増えるとともに増加し、産仔 2 回目以降毎回 20~50 個体程度を産仔する。本種の体長が 1~5 mm とミジンコ類の中で大型であり、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、生態毒性評価のモデル生物として世界中で利用されてきた。また、本種は、農薬や一般化学物質の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(OECD 2004, 2012)。しかし、水生生物に対する毒性試験は、半数阻害濃度(供試生物の半数が遊泳や成長等を阻害される濃度)や無影響濃度(供試生物に対して成長阻害等の影響を全く示さない濃度)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主な目的としていることから、毒性の詳細な諸症状やそれらの発現機構に関する情報が乏しい。

I-2 細胞分裂阻害剤の作用ならびにコルヒチンを選択する理由

世界中で開発されてきた農薬は、その用途により殺菌剤や殺虫剤、除草剤などに分類される。農薬の有効成分が多様であるため、病害虫の農薬耐性の発達を対策するための国際委員会である Fungicide Resistance Action Committee (FRAC 2015), Insecticide Resistance Action Committee (IRAC 2015), Herbicide Resistance Action Committee (HRAC 2005) は、世界の主要な殺菌剤・殺虫剤・除草剤を網羅した作用機構別のコードリストをそれぞれ作成、公表している。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、これまでに多くの細胞分裂阻害物質が農薬として開発されてきた。細胞分裂阻害作用は、標的生物に対する効力が優れることから、新しい農薬の作用機序として現在でも有望視されている。微小管をターゲットとする細胞分裂阻害剤は、作用機序に基づき微小管の不安定化、ならびにその逆の安定化を生じるという2グループに大別される(Tian et al. 2010)。その一方で、細胞分裂阻害剤は、その作用特性から特に繁殖影響が懸念されるものの(Ebert et al. 1992; Nakai et al. 1992)、甲殻類に対する影響に関する知見が少ない(Dunham & Banta 1940; Morrow et al. 2001; Ribeiro et al. 2011)点が課題として残されている。

そこで、本研究では細胞分裂阻害剤の代表としてコルヒチンを供試することとした。コルヒチンの作用については、I-3にて後述するが、本研究での被験物質として選択した理由は、(1)幅広い生物種で微小管機能研究の陽性対照に広く使用されている、(2)オオミジンコと他生物間で試験結果の比較・考察が可能、(3)農薬やその有効成分は、化学構造や物理化学的性質の改変・最適化によって標的以外の生物に対する毒性を低減していることが多く、細胞分裂阻害物質が本質的に持つ毒性とその発現機構の解明を目的とする本研究には適さない、(4)天然物であり、前述の農薬のように毒性低減を目的とした化学構造の改変がされていないことから、オオミジンコに様々な毒性を示す可能性がある、などの点が挙げられるからである。

I-3 コルヒチンの作用

コルヒチンは、ユリ科に属するイヌサフラン *Colchicum autumnale* の種子に含まれるアルカロイドであり、リウマチや痛風治療薬の有効成分としても知られる。Havas は、ネギの根端細胞を用いた実験により、コルヒチンが植物細胞の有糸分裂パターンに影響を与えることを 1937 年に初めて明らかにした(小林 1991)。同年、Gavaudan はコルヒチン処理した根端細胞の中に染色体数が増加したものがあつたことを示した(小林 1991)。この発見を契機として、コルヒチンは倍数体や複二倍体などの作製のための主要な物質として農業分野で利用され、現在でも種なしスイカの作出に用いられている。しかしながら、淡水環境中での検出濃度については報告事例がなく、実環境中でオオミジンコがコルヒチンにどれだけ暴露されているかは不明である。

コルヒチンの作用機序は、放射能ラベルをしたコルヒチンを用いて調べられ、ウニの微小管タンパク質(チューブリン)と特異的に結合することが見出された。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とされる。微小管は真核細胞に普遍的に存在し、有糸分裂の際に形成される紡錘体の主成分としてよく知られているが、その他にも、微小管は繊毛・鞭毛運動、細胞形態形成、神経機能、分泌機能、生体膜機能等に関与している(小林 1991)。微小管を構成する主な蛋白質はチューブリンであり、 α -チューブリンと β -チューブリン各 1 分子が結合したヘテロ 2 量体 (分子量約 $50,000 \times 2$) を基本単位として規則正しく重合して 13 本のプロトフィラメントから成る管状構造をもつ微小管を形成する。その形成には、チューブリンのほかに微小管結合蛋白 (MAPs) やタウ蛋白も関与し、細胞の中で調節を受け、集合・解離している。チューブリンの *in vitro* での重合には GTP や Mg^{2+} が必要であり、また Ca^{2+} により解重合されるが、細胞内の調節機構については未だ明らかにされていない(岩崎 1994)。

コルヒチンはウニ胚に対しても $5 \times 10^{-5} M$ 程度で活性を示し、第 1 分裂が完了する時期にミニチュアサイズの紡錘体のままか、あるいはほとんど紡錘体が形成されないままで停止した胚が観察される。*in vivo* でのウシの脳由来のチューブリン重合阻止濃度 IC_{50} は $2.3 \times 10^{-7} M$ と極めて低い。コルヒチン

は α , β ヘテロダイマーあたり 1 個結合することが明らかにされ、チューブリン分子にはコルヒチン結合に適した疎水性ポケットが存在していることが示されている(小林 1985).

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、その研究対象としてブタ脳や各種培養細胞、ウニ胚など多数挙げられる(小林 1985). コルヒチンは、微小管重合の阻害により成長や活発な細胞分裂が行われている胚発生を阻害することが懸念されるが、ミジンコ類に対する知見は *Daphnia longispina* O.F. Müller を用いた遺伝研究(Dunham & Banta 1940) ならびに *Daphnia pulex* Leydig に対する 24 時間暴露での急性毒性(Morrow et al. 2001)のみであり、オオミジンコに対する生態毒性の知見は皆無である. コルヒチンがオオミジンコにどのような毒性を示すか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必要不可欠である.

I-4 本論文での諸知見の将来的な新農薬開発に向けた応用

農薬登録に必要な試験項目の一つにオオミジンコ繁殖試験がある. この試験のデメリットは、暴露期間が 21 日間と長いことから、被験物質の使用量が増える点、産仔数の計数や顕微鏡観察等に時間と労力のコストが必要な点である. オオミジンコ繁殖に及ぼす毒性の有無をより簡便かつ短期間で評価できる手法を新規に確立することは、複数の候補の中からより低毒性な化合物を早期選抜することを目的とする探索研究において非常に重要である. また、コルヒチンのオオミジンコ繁殖に及ぼす影響、すなわち、いつ、どこで、どのような毒性症状が発現するのか、というような毒性の発現機構に関する知見を得ることは、細胞分裂阻害物質が本質的に持つ毒性リスクの理解に繋がる. 新農薬の探索研究を行う段階では、標的外生物に対する毒性の発現機構は不明であることが多い. よって、毒性試験では僅かな作用兆候も見逃さない高い観察力が研究者に求められる. ここで、細胞分裂阻害物質が示す特徴的な毒性症状について事前に把握できていれば、毒性評価中の化合物が細胞分裂阻害作用を有するか否かの類推ができる. また、その特徴的な毒性症状を指標に、オオミジ

ンコに対する細胞分裂阻害作用が弱い、あるいは持たない化合物を選抜するための探索研究が可能となる。以上のように、新規の農薬候補化合物が甲殻類に対し問題となる毒性を有していないかを早期に見極め、必要に応じて毒性回避研究を進めるためにも、コルヒチンの知見は非常に重要である。コルヒチンの知見を応用することで、開発着手後の毒性問題の発覚、開発中止といったリスクを低減することができ、なおかつ、より環境負荷の少ない農薬の効率的な開発が可能となる。

I-5 本論文の目的ならびに論文構成

以上のような背景から、本研究は(1)コルヒチンのオオミジンコの繁殖に及ぼす毒性発現機構の解明、および(2)オオミジンコ繁殖に及ぼす暴露影響を簡便かつ短期間に評価できる手法の確立を目的とし、コルヒチン暴露による影響について個体～組織レベルでの解析を試みた。

第II章では、オオミジンコの繁殖に関する基礎的知見を得ることを目的に、試験条件下でのオオミジンコの正常胚の発生を継時的に観察した。第III章では、コルヒチンのオオミジンコに対する繁殖毒性を明らかにするため、24時間齢未満の幼体を用いた急性遊泳阻害試験、ならびに標準的な毒性評価方法である幼体を用いた21日間繁殖試験を行った。さらに、抱卵成体の4日間暴露試験を行い、21日間暴露による結果と比較した。第IV章では、育房中の胚に対する毒性の諸症状を明らかにすることを目的とした。まず、コルヒチン暴露が正常胚の発生に及ぼす影響とその時期を調べるため、抱卵成体を用いた胚発生阻害試験を行った。次いで、コルヒチンを暴露した成体の育房より採取した初期胚を用いて、核染色およびチューブリン免疫染色により卵割阻害作用と有糸分裂阻害作用を検証した。また、HE染色により胚組織の観察を行った。第V章では、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、卵膜に対する影響を明らかにするため電子顕微鏡による卵膜の構造解析を行った。第VI章では、コルヒチンによるオオミジンコ胚の膜機能(浸透圧調節)に対する影響を明らかにするため、浸透圧調節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, コルヒチンのオオミジンコに対する毒性の発現機構の推定を試みた.

第Ⅱ章 オオミジンコの正常な卵発生と胚発達

II-1 序論

コルヒチンがオオミジンコの繁殖に及ぼす影響を調べるうえで、基礎的な知見として正常胚の発生過程を予め把握しておく必要がある。ミジンコ類の減数分裂や胚発生を調べた知見は幾つかあるが（例えば、Zaffagnini 1987; Hiruta & Tochinai 2012; Mittmann et al. 2014; Toyota et al. 2016）、オオミジンコの飼育系統の違いの他、温度や飼育水の組成等の環境条件の違いによって胚発生の進行は異なると思われる。そこで、本研究で供試するオオミジンコについて、試験条件下における正常胚の発生過程を継時的かつ定量的に観察した。

II-2 材料および方法

II-2-1 供試生物

オオミジンコは、国立研究開発法人国立環境研究所より入手されたもので、(株)日曹分析センター小田原事業所にて9年以上継代飼育されたものを供試した。飼育水にはOECDテストガイドライン No. 211(OECD 2012)で推奨されている Elendt M4 medium（以降 M4 培地とする）を用いた（Elendt & Bias 1990）。オオミジンコは、水温 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、照度 $500\sim 900\text{ lux}$ ($50\sim 90\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ に相当、液面付近で測定)、明暗周期は16時間明期、8時間暗期の条件下で集団または個別飼育した。給餌量はOECDテストガイドライン No. 211(OECD 2012)に従い、緑藻 *Chlorella* sp.（生クロレラ V12、クロレラ工業）を1個体あたり1日約 $0.1\sim 0.2\text{ mg C}$ となるよう毎日1回与えた。

II-2-2 胚の採取と観察

オオミジンコの胚は Palma et al. (2009a)の方法に従って採取した。雌成体は、2~6回目の産仔を終えた後、集団飼育容器から個別飼育容器へと単離した。成体の脱皮および産卵(卵巣から育房内への卵の移動)の有無を経時的に観察し、産卵を開始した時刻を記録した。抱卵した雌成体は、産卵4~70時間後に時計皿へ移した。成体の外殻の腹側を細針で固定しつつ育房内に注射針を

刺し込み, M4培地をゆるやかに注入して胚を押し出した. 採取した胚は, 室温で20分間固定(固定液: 50 mM EGTA, 9.25%ホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4))した後, PBS-T(0.1% Tween-20 含有 PBS)中のメタノール濃度を段階的に上げて脱水し, -20°C で少なくとも1週間100%メタノール中に保管した. 胚の観察は, 胚の保管液を段階的にPBS-Tに置換した後, 実体顕微鏡下で行った.

II-3 結果および考察

成体の育房内より採取した正常胚は, 産卵から10時間経過するまでの間は球状であり, 外観上の変化はなかった(Fig. 1). 産卵から24時間経過すると, 胚は非対称形となり, 30~40時間経過した時点で卵膜(コリオン)が胚から離脱した. 産卵後40時間以降, 胚の発生の進む様子は肉眼でも明瞭に分かるようになり, 48時間後には触角等の器官形成が認められた. 試験条件下での正常胚の発生は, Kast-Hutcheson ら(2001)の報告にある6つの発生段階に分けることができ, その時間帯にも, 大きなずれはなかった.

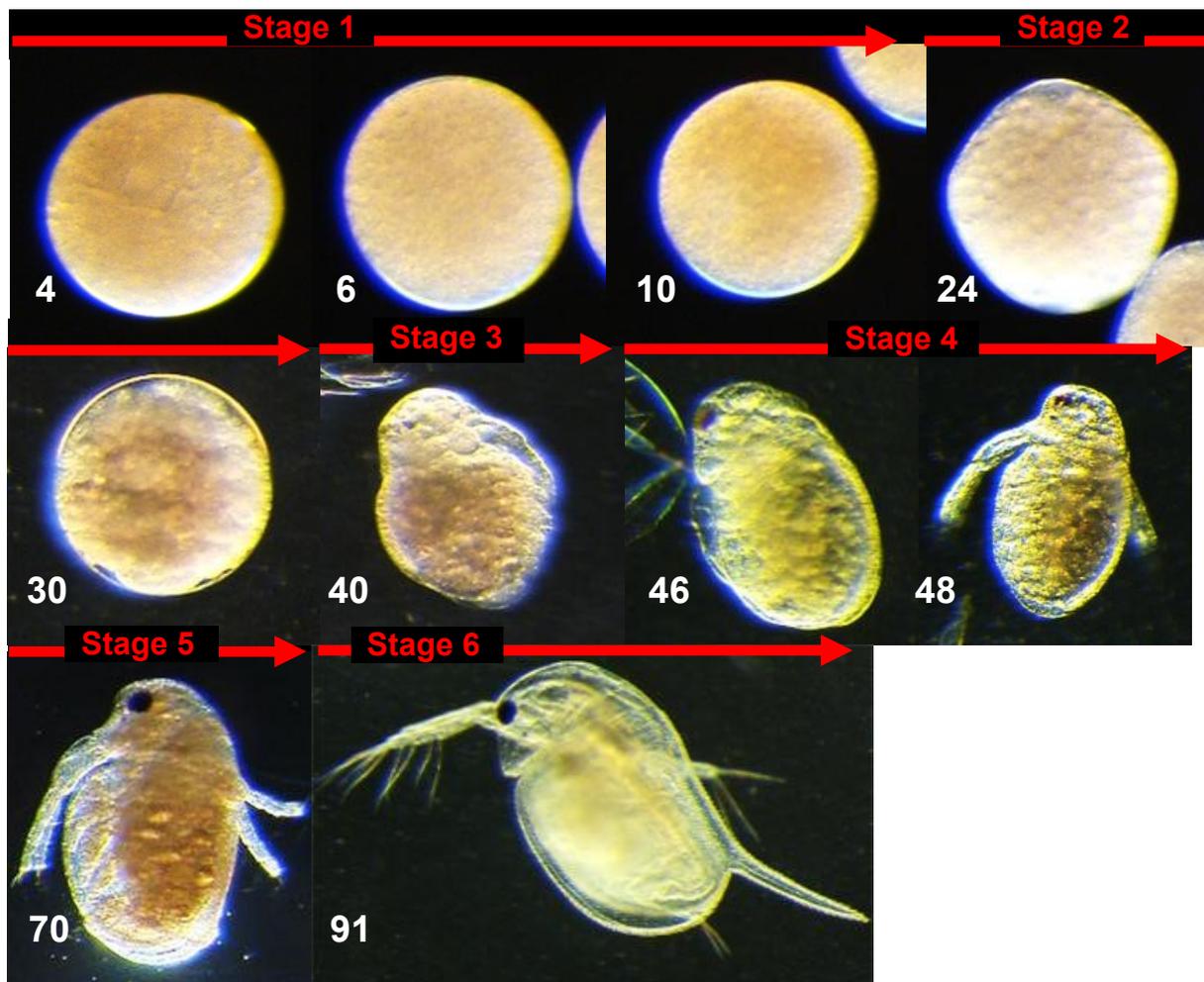


Fig. 1. Time-course of embryogenesis in female of *D. magna* at 20°C.

Based on the previous report (Kast-Hutcheson et al. 2001), six stages of daphnid embryonic development were distinguished. The numbers at the left below of pictures indicate time (hours) after oviposition. Stage 1: Cleavage. Embryo was spherical, with no difference among cells. Stage 2: Gastrulation. Cellular organization and differentiation were occurred. The first embryonic membrane was shed after entry into Stage 2. The embryo became asymmetrical. Stage 3: Early embryonic maturation. The head capsule and second antennae have differentiated. Stage 4: Mid embryonic maturation. The pigmented eye appeared, and antennae developed. Stage 5: Late embryonic maturation. The second embryonic membrane has ruptured, and second antennae were partially extended. Antennal setae poorly developed, and the shell spine folded against the carapace. Stage 6: Fully developed neonate. Second antennae setae developed, and the shell spine extended from the carapace. The organism is free-swimming.

第Ⅲ章 コルヒチンを用いたオオミジンコ毒性試験

Ⅲ-1 序論

オオミジンコに対する急性および慢性毒性とそ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)抱卵成体に4日間暴露させる短期繁殖試験を行った。毒性試験の実施に先立ち、試験水中のコルヒチン濃度の分析方法を開発し、試験水中でのコルヒチンの安定性を確認した。

Ⅲ-2 材料および方法

Ⅲ-2-1 供試生物

本実験には第Ⅱ章と同じ条件で飼育したオオミジンコを供試した。急性遊泳阻害試験および21日間繁殖試験では、成体の育房外へと放出されてから24時間未満の幼体を使用した。胚発生阻害試験では、11日齢以上の未抱卵(脱皮後20分以内)、あるいは抱卵した雌成体を使用した。

Ⅲ-2-2 コルヒチンおよび試験液の調製

コルヒチン(純度98%, Sigma-Aldrich)を*N, N*-ジメチルホルムアミド(DMF, 和光純薬工業)に溶解し、2,000~100,000 mg L⁻¹の試験原液を作成した。試験液は、暴露開始時または換水時(暴露開始後3~4日毎に実施)に、各濃度の試験原液をM4培地で希釈して調製した。試験液中のDMF濃度は各試験区で一定とした。

Ⅲ-2-3 試験水中におけるコルヒチン濃度および安定性の確認

高速液体クロマトグラフ(HPLC)を用いたコルヒチン濃度の測定法は、佐藤ら(2003)の報告を参考に開発した。開発された分析方法をⅢ-2-3-1~3に示す。試験水中におけるコルヒチンの安定性は、繁殖試験の予備実験において、0.2 mg L⁻¹試験液中のコルヒチン濃度を経時的にHPLCで分析することで評価した。

Ⅲ-2-3-1 HPLC 分析の諸条件

本分析法では、HPLC 装置として Prominence(島津製作所)を使用した。ポンプは LC-20AD, 恒温槽は CTO-20AC, 検出器は SPD-20AV, オートインジェクターは SIL-20AC, システムコントローラーは CBM-20A を使用し、データ処理装置として LCsolution を使用した。カラムは CAPCELL PAK C18 MG II (4.6 mm I.D.×250 mm, 5 μm, 資生堂)を用いた。移動相は HPLC 用アセトニトリル+蒸留水=30+70(v/v)とし、流速は 1.0 mL min⁻¹とした。カラム温度は 40℃, 検出波長を 243 または 351 nm とし、試料注入量は 50 または 100 μL とした。分析時間は 1 試料につき 25 min とした。本分析法における定量下限は 5 または 20 μg L⁻¹とした。

Ⅲ-2-3-2 コルヒチン標準溶液の調製および検量線の作成

コルヒチンをアセトニトリルに溶解し、100 mg L⁻¹の標準原液を作成した。この 100 mg L⁻¹の標準原液を蒸留水で希釈して 1~100 μg L⁻¹ または 20~2000 μg L⁻¹ の溶液を調製し、コルヒチンの標準溶液とした。これらの標準溶液は前項の HPLC 条件で分析し、コルヒチン濃度を横軸に、ピーク面積を縦軸にとり、最小二乗法により検量線を作成した。

Ⅲ-2-3-3 分析試料の前処理および HPLC 分析

分析試料として、21 日間繁殖試験の予備試験において 0.2 mg L⁻¹ 試験液を経時的に採取した。試験液をシリンジフィルター (GL クロマトディスク 13P 0.45 μm) でろ過し、得られたろ液をⅢ-2-3-1 項の HPLC 条件にて 1 回分析し、検量線からコルヒチン濃度を算出した。また、試験水中におけるコルヒチンの安定性は、調製直後の濃度と比較することにより評価した。

III-2-4 急性遊泳阻害試験

急性遊泳阻害試験は OECD テストガイドライン No. 202 (OECD 2004) に準じて実施した。試験濃度は 5 濃度区 (100, 50, 25, 12.5 および 6.25 mg L⁻¹) とし、無処理対照区 (M4 培地) および溶媒対照区 (1.0 mL L⁻¹ DMF 溶液) を設けた。試験容器にはガラス容器 (直径 5.0 cm, 高さ 5.5 cm) を用い、試験液量は 50 mL とした。供試個体の成長段階は 24 時間齢未満の幼体とし、止水式で 48 時間暴露を行った。供試個体数は、試験容器あたり各 5 個体、各試験区につき 7 容器の合計 35 個体とした。試験期間中の環境条件は、水温 20±1°C, 照度 500~900 lux (16 時間明期, 8 時間暗期) とし、給餌や通気は行わなかった。ミジンコの観察は、暴露開始 24 および 48 時間後に行い、遊泳阻害の有無、行動や外見の異常を記録した。ここで、遊泳阻害の定義は、死亡ないし観察中に 15 秒間全く水中を遊泳しないものとした (OECD 2004)。

III-2-5 21 日間繁殖試験

繁殖試験は OECD テストガイドライン No. 211 (OECD 2012) に準じて実施した。試験濃度は 5 濃度区 (5, 2, 1, 0.5 および 0.2 mg L⁻¹) とし、溶媒対照区 (0.1 mL L⁻¹ DMF 溶液) を設けた。試験容器にはガラス容器 (直径 5.0 cm, 高さ 5.5 cm) を用い、試験液量は 60 mL とした。これに 24 時間齢未満の幼体を 1 個体入れ、暴露区は 1 濃度区につき 30 個体以上、溶媒対照区は 19 個体で 21 日間暴露を行った。暴露方法は半止水式とし、試験液を週に 2~3 回換水した。給餌条件として、オオミジンコに緑藻 *Chlorella* sp. を 1 個体あたり 1 日約 0.1~0.2 mg C となるよう毎日行った。試験期間中の環境条件は、水温 20±1°C, 照度 500~900 lux (16 時間明期, 8 時間暗期) とした。ミジンコの観察は、試験期間中、成体ミジンコ (以下, F0) の遊泳行動、脱皮殻の有無、産出幼体 (以下, F1) の数、および随胎卵の数について毎日肉眼で行うとともに、F1 の性別および形態異常の有無について実体顕微鏡下で行った。暴露終了日は、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(M165 C, Leica Microsystems)下で行った。F0の死亡判定は目視で行い、基準は第1,2触角および心臓の停止とした。

III-2-6 短期繁殖試験

抱卵成体を用いた短期間暴露による繁殖試験は、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に実施した。生後11日齢の抱卵成体とし、暴露期間は2回目産仔以降の4日間のみとした。暴露終了後、供試生物はM4培地の入ったガラス製容器(直径5.0 cm, 高さ5.5 cm)に1個体ずつ移し、6回目の産仔を終えるまで飼育を継続した。供試個体数は、暴露区は1濃度区につき51~52個体、溶媒対照区は31個体とした。その他の試験条件(試験濃度, 容器, 試験液量, 水温, 照度, 給餌)は21日間繁殖試験と同条件とした。

III-2-7 統計処理

半数遊泳阻害濃度(EC₅₀), 半数死亡濃度(LC₅₀)の算出および無影響濃度(No Observed Effect Concentration, NOEC)の決定には、市販ソフトウェア Statlight(Yukms Corp.)を用いた。EC₅₀およびLC₅₀値はProbit法で算出した(Finney 1952)。繁殖試験の結果の統計処理は、各試験区の繁殖状況(初産仔日, 産仔回数, 産仔1回あたりの平均生存産仔数)および成長(脱皮回数, 暴露終了時におけるF0の体長)について、等分散検定(Bartlett test, $\alpha=0.01$)を行った後、パラメトリックの多重比較検定(Dunnett, $\alpha=0.05$, 両側)またはノンパラメトリックの多重比較検定(Steel, $\alpha=0.05$, 片側)を実施した。NOECならびに最低影響濃度(Lowest Observed Effect Concentration, LOEC)は、溶媒対照区と比較した結果から、それぞれ有意差が認められない最高濃度ならびに有意差が認められる最低濃度とした。

III-3 結果

III-3-1 試験水中におけるコルヒチン濃度および安定性の確認

繁殖試験の予備実験において、 0.2 mg L^{-1} 試験液中のコルヒチン濃度を HPLC で測定した結果、調製 8 日後の測定濃度は設定濃度に対して 83%であった。このことから、コルヒチンは試験条件下 (M4 培地, 20°C) で少なくとも 8 日間は安定であると判断した。したがって、以降の全ての毒性試験において試験液中のコルヒチン濃度の実測は行わず、暴露濃度は設定濃度で表記した。

III-3-2 急性遊泳阻害試験

オオミジンコの遊泳阻害と行動異常 (対照区よりも不自然に活発な遊泳, 着底, 水面への捕捉) は、コルヒチン 12.5 mg L^{-1} 以上の濃度区で、暴露開始 24 時間後から認められた (Fig.2)。幼体に対する暴露 48 時間の EC_{50} , LOEC および NOEC は、それぞれ 24 mg L^{-1} (95%信頼限界 $21 \sim 28 \text{ mg L}^{-1}$), 12.5 mg L^{-1} および 6.25 mg L^{-1} であった。

III-3-3 21 日間繁殖試験

最高濃度区 (5 mg L^{-1}) の親ミジンコ (F0 個体) は、初産日を迎えることなく暴露開始 5 日以内に全個体死亡した (Fig. 3)。 2 mg L^{-1} での F0 の死亡率は 40%であり、死亡率は暴露開始 16 日以降に急増した。溶媒対照区および 1 mg L^{-1} 以下の濃度区での F0 の死亡率は、10%未満と低く、試験ガイドラインの規定範囲以内であった。また、 1 mg L^{-1} 以上の濃度区では、生存していたすべての個体が暴露終了時に第 2 触角の遊泳剛毛を欠損しており (Fig. 4)、水中を正常に遊泳できず暴露容器への着底が観察された。第 2 触角以外の部分、例えば殻や殻刺、第一触角、複眼では形態異常を認めなかった。体長は、 0.5 mg L^{-1} 以上の濃度区で暴露終了時に有意 ($p < 0.05$) に減少し (Table 1)、成長の阻害が認められた。脱皮および産仔回数は 2 mg L^{-1} 以上の濃度区で有意 ($p < 0.05$) に減少した。一方、初産仔日の遅延は、いずれの濃度区でも認められなかった。

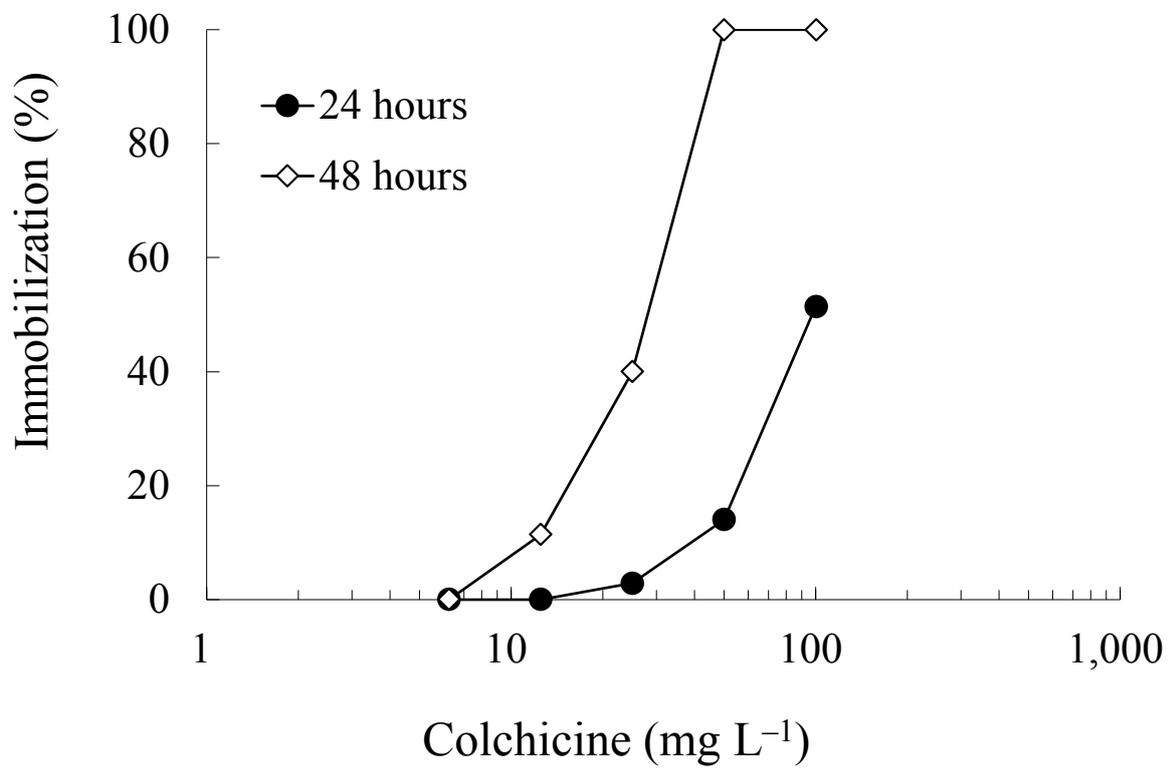


Fig. 2. The cumulative immobilization (%) of *D. magna* neonates exposed to colchicine for 24 and 48 hours.

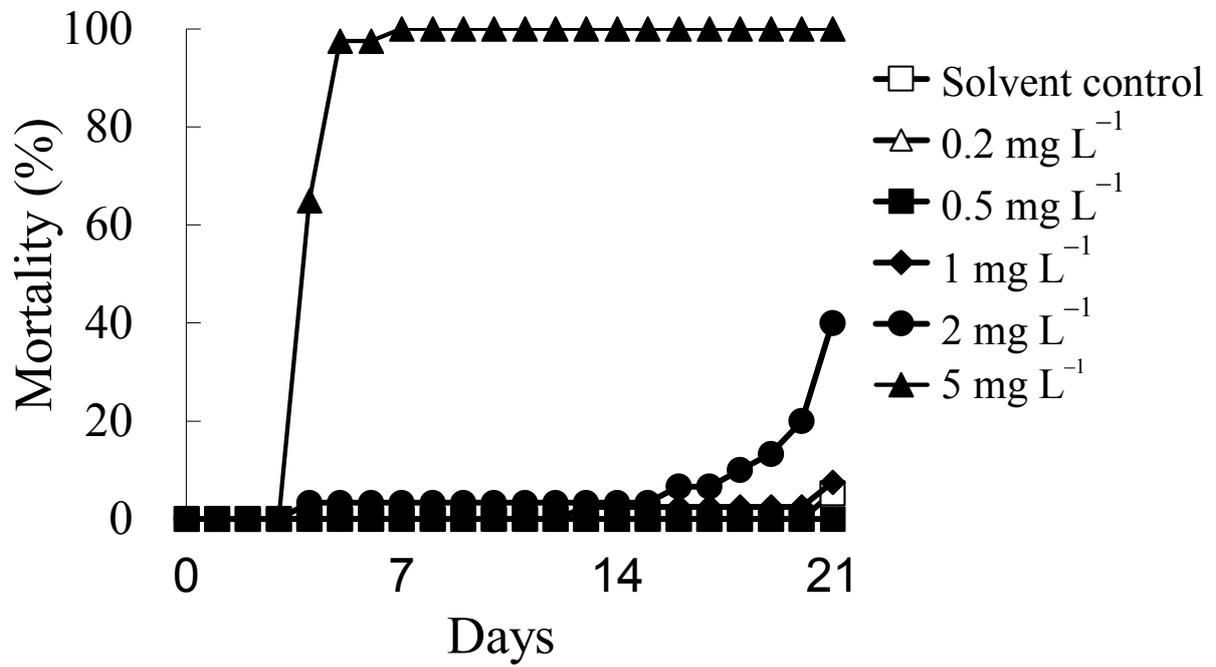


Fig. 3. The cumulative mortality of *D. magna* neonates exposed to colchicine for 21 days.

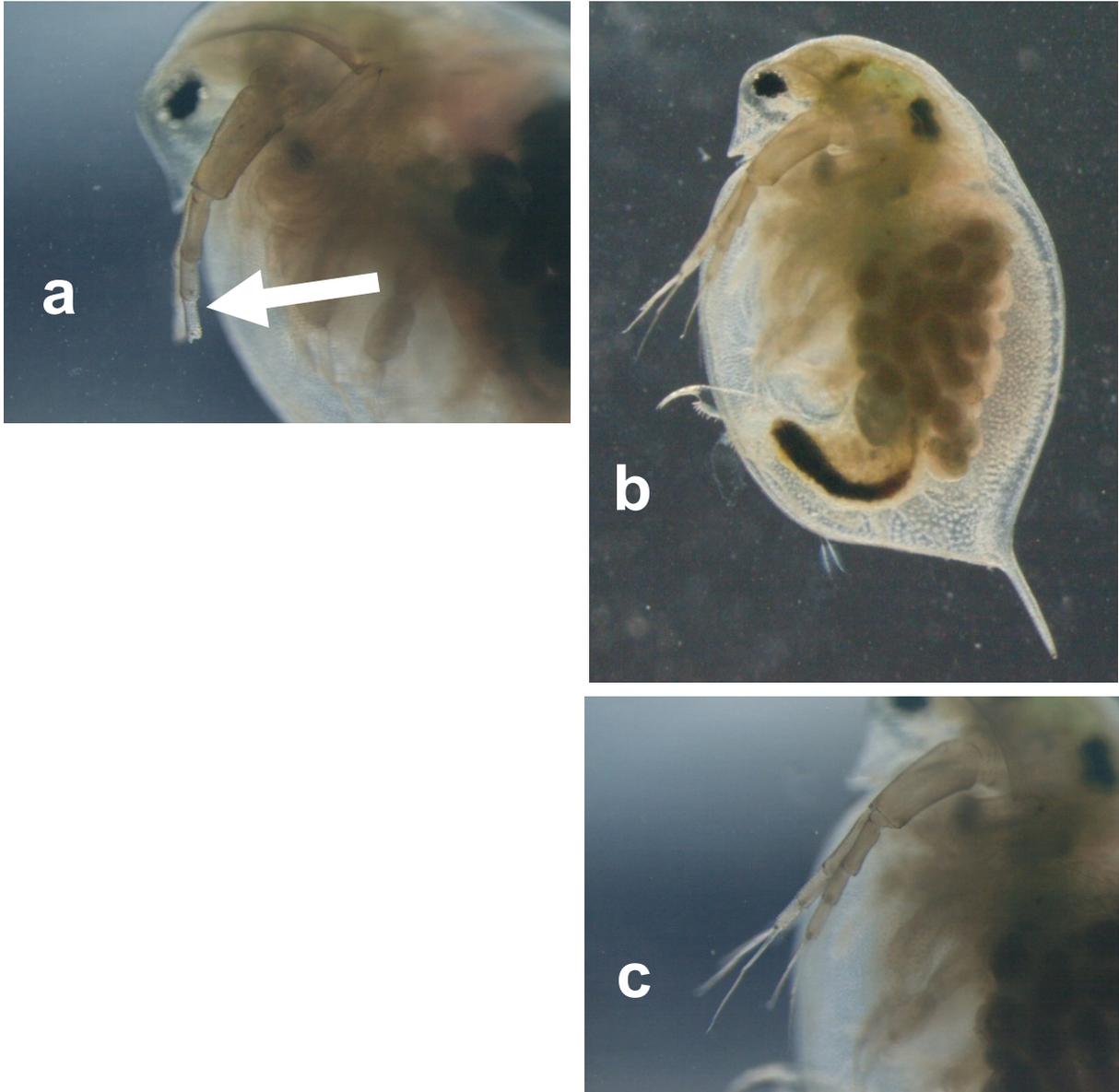


Fig. 4. The morphological abnormality of adult female caused by the exposure of colchicine. Dark field images under a stereoscopic microscope. (a): Abnormal adult female caused by the exposure of colchicine. White arrow indicates the second antennae without setae (hairs). (b), (c): Normal adult female cultured in the Elendt M4 medium.

Table 1. Effects of colchicine on the reproduction and growth of *D. magna* for 21 days.

Conc. (mg L ⁻¹)	N	Mortality (%)	Body Length ^{a)} (mm)	Days of first brood	Mean number				Burst of embryos ^{e)}
					Molts ^{b)}	Broods ^{b)}	Offspring ^{c)}	Aborted eggs ^{d)}	
Solvent control	19	5.3	4.38	8.4	9.0	4.8	35.9	0.2	-
0.2	40	0.0	4.46	8.0*	9.0	4.9	34.2	0.2	-
0.5	30	0.0	3.91*	8.1	9.0	4.9	0.0*	1.2*	+
1	40	7.5	3.81*	8.2	8.9	4.8	0.0*	30.3*	-
2	30	40.0	3.53*	8.1	6.8*	3.8*	0.0*	24.7*	-
5	40	100	N.A.	N.A.	2.0*	0.0*	0.0*	N.A.	N.A.

^{a)} Mean body length (mm) at the end of the exposure ($n=10$ [solvent control], 30 [exposure groups]).

Body length (from top of the head to base of the tail spine) was measured on all surviving daphnids.

^{b)} Mean number per female for 21 days

^{c)} Mean number of living offspring brood⁻¹ female⁻¹

^{d)} Mean number of aborted eggs (developmentally arrested) brood⁻¹ female⁻¹

^{e)} Burst of embryos in the brood chamber. +: observed, -: not observed.

* Significantly different from the solvent control ($p < 0.05$)

N.A., Not available

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^{-1} 以上の濃度区で有意 ($p < 0.05$) に減少した (Table 1). 雄は、溶媒対照区を含む全ての試験区で出現しなかった. 生存幼体は、溶媒対照区および 0.2 mg L^{-1} 区のみで産仔された. これらの幼体の外観と行動は全て正常であり、 $\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$ の濃度区 of F0 個体で認めた形態異常 (第 2 触角の遊泳剛毛の欠損) は、幼体で認められなかった. F0 個体の産仔の異常は、 0.5 mg L^{-1} 以上の濃度区で認められ、脱皮時に墮胎卵 (球状、未発達初期胚) の放出が観察された (Fig. 5). このような現象は、暴露期間中 5 回全ての産仔において繰り返し認められた. 実体顕微鏡による観察で墮胎卵から細胞分化や器官形成は認められず、油滴と思われる顆粒状構造物が胚内部に認められた (Fig. 6). また、暴露胚では卵膜が離脱せず残存していた. F0 の抱卵は、溶媒対照区および $0.2 \sim 2 \text{ mg L}^{-1}$ 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^{-1} 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. この現象は、産仔のたびに認められた.

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 個体による産仔 1 回あたりの平均生存産仔数の減少であった (Table 1). 繁殖試験における F0 個体に対する LC_{50} 値は 2.0 mg L^{-1} (95%信頼限界 $1.5 \sim 2.4 \text{ mg L}^{-1}$), NOEC および LOEC はそれぞれ 0.2 mg L^{-1} および 0.5 mg L^{-1} であり、各毒性値は急性毒性試験の結果に比べ約 $1/10 \sim 1/30$ に低下した (Table 2).

溶媒対照区における繁殖状況 (初産仔日, 産仔回数, 産仔 1 回あたりの平均生存産仔数) や成長 (脱皮回数, 暴露終了時における F0 の体長【個体頂部から殻刺の付け根】) は、施設内で過去に実施した無処理対照区 (M4 培地) の結果とほぼ一致し、溶媒による毒性影響は認められなかった.

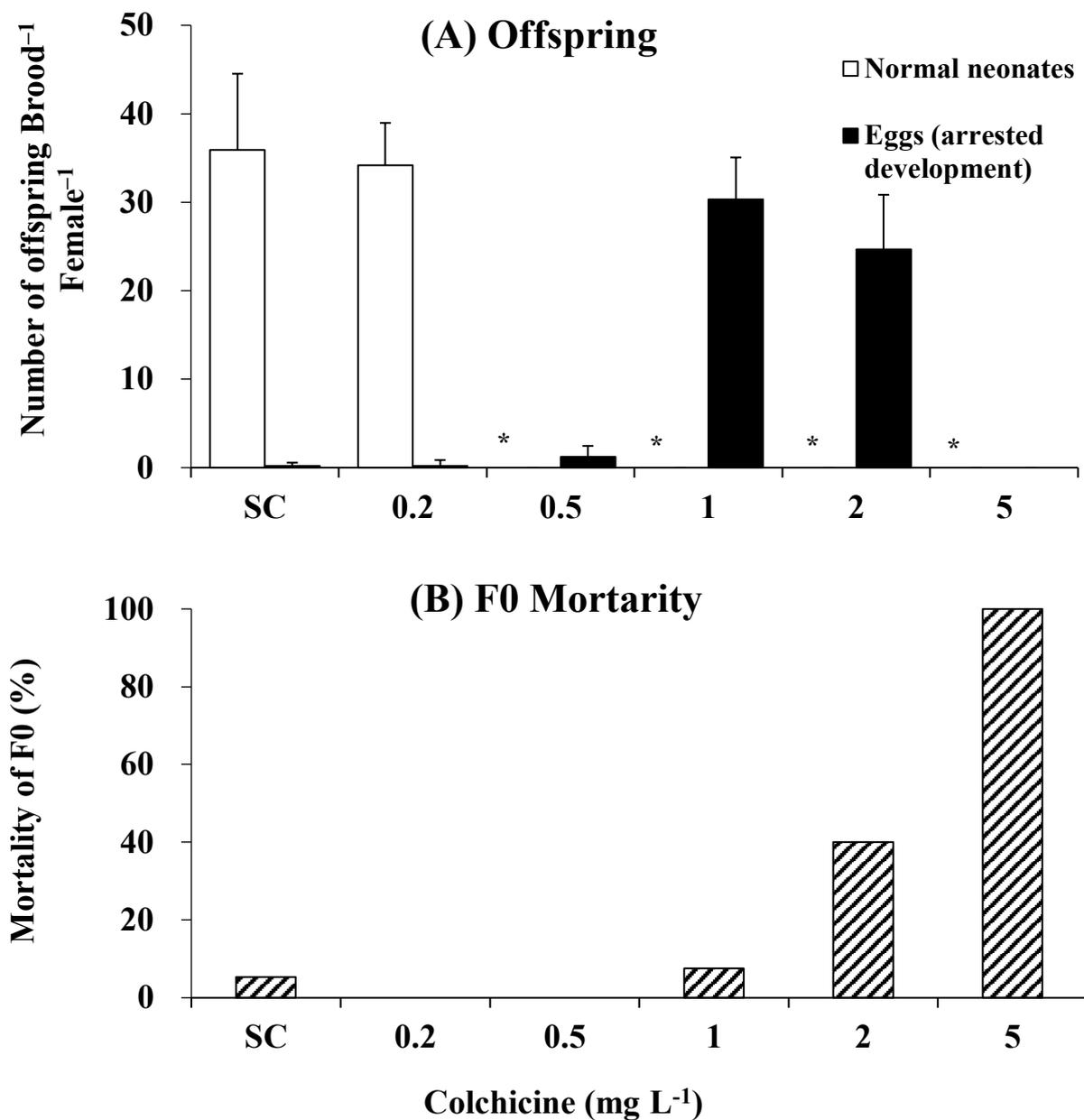
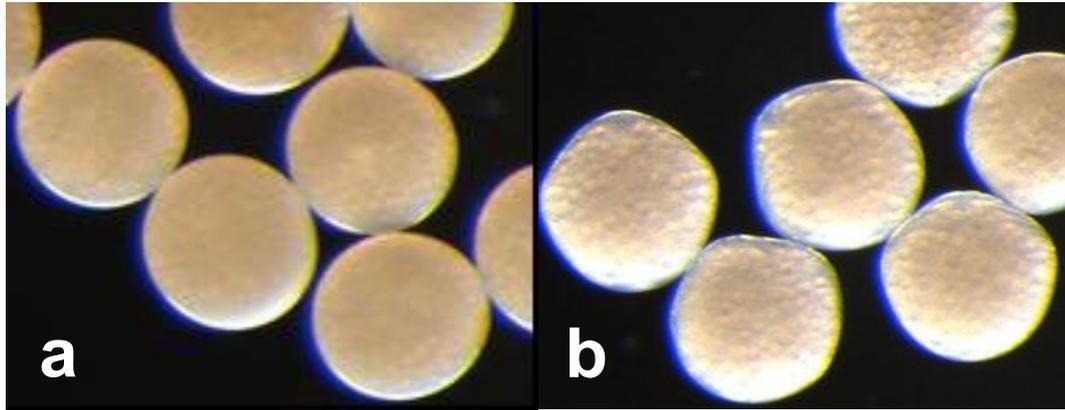


Fig. 5. Mean number of offspring per brood and mortality of adult females for 21 days.

(A): Mean number of offspring per brood per female. Data are presented as the mean value plus standard deviation. In the highest concentration of colchicine (5 mg L⁻¹), all daphnids died within 5 days after the start of exposure and the first brood was not occurred. * Significant at $p < 0.05$, Steel's multiple comparison. (B): The cumulative mortality of adult females (F0) for 21 days. $n=19$ in SC (solvent control) and 30-40 in exposure groups.

(A)

Control



(B)

Treated

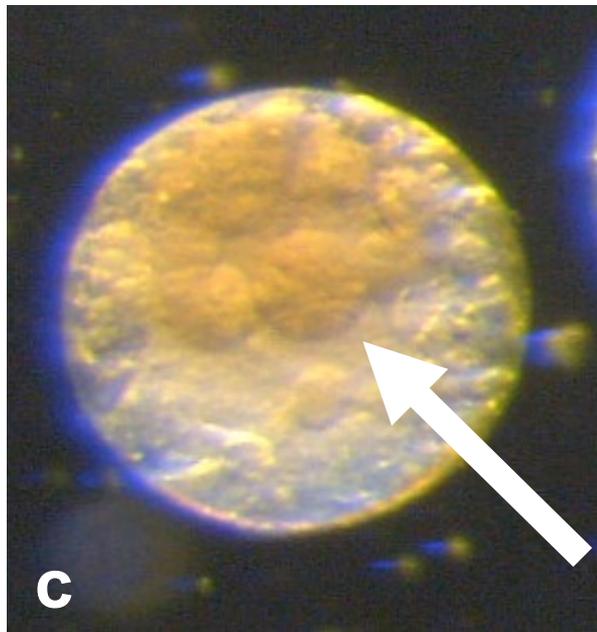


Fig. 6. Typical abnormality on embryogenesis caused by colchicine exposure.

Dark field images by stereomicroscopy. (A): Normal embryos isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium. (a): Ten hours after oviposition. (b): 24 hours after oviposition. (B): Abnormal embryos. (c): Developmentally arrested egg (early embryo) observed in 21-day standard reproduction test. Egg was released from brood chamber of adult daphnia which was exposed to 1 mg L^{-1} colchicine for more than 72 hours. White arrow indicates oil drops observed in the egg. Egg is spherical with no evidence of cellular differentiation.

Table 2. EC₅₀, LOEC and NOEC of colchicine in *D. magna*

Test type	Exposure period	Test period	EC ₅₀ , LC ₅₀ * (mg L ⁻¹)	LOEC (mg L ⁻¹)	NOEC (mg L ⁻¹)
Acute toxicity	48 hours	48 hours	EC ₅₀ ; 24 (21-28)	12.5	6.25
Standard reproduction	21 days	21 days	LC ₅₀ ; 2.0 (1.5-2.4)	0.5	0.2
Short-term reproduction	4 days	22-26 days	LC ₅₀ ; 2.7 (2.4-3.1)	0.5	0.2

*: The value in the parenthesis indicates 95% confidence interval.

*: LC₅₀ was determined with mortality of test daphnids (F0) in the reproduction test.

III-3-4 短期繁殖試験

最高濃度区(5 mg L⁻¹)の F0 個体は暴露終了日から死亡が認められ、生後 24 日後までに全個体死亡した(Fig. 7). 溶媒対照区および 2 mg L⁻¹ 以下の濃度区での F0 の死亡率は 5%未満と低かった. 1 mg L⁻¹ 以上の濃度区では致死の他に F0 個体の形態異常も観察され、暴露終了時に第 2 触角の遊泳剛毛が欠損していた.

F0 1 個体による産仔 1 回あたりの平均生存産仔数は、産仔 4 回目において 0.5 mg L⁻¹ 以上の濃度区で有意($p < 0.05$)に減少した(Table 3). 溶媒対照区を含む全ての試験区で雄は出現しなかった. 一連の発生過程において、暴露するタイミングによりコルヒチンの毒性は異なった(Fig. 8). 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対する暴露では毒性を示さなかった. 産仔 4 回目は墮胎卵(未発達卵)のみがみられ、卵巣～産卵後 24 時間程度経過した胚に対する暴露では、胚は全て発生が阻害された. 産仔 5 回目(卵巣への暴露)や産仔 6 回目(卵巣や胚への暴露なし)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.

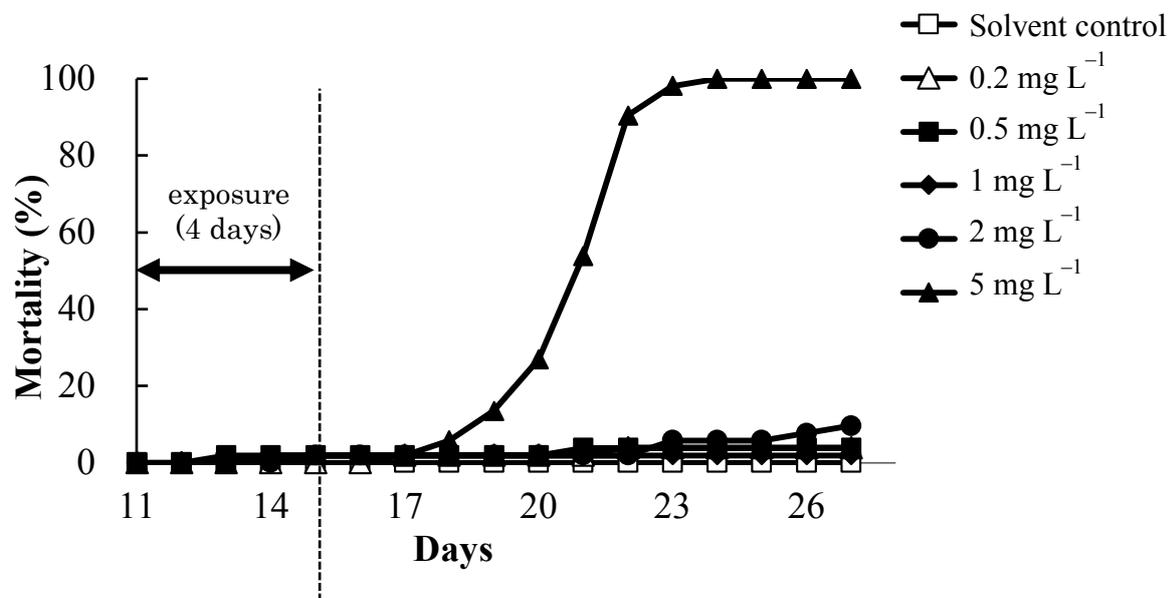


Fig. 7. The cumulative mortality of *Daphnia magna* adult females exposed to colchicine for 4 days.

In the short-time reproduction test by the exposure of colchicine to adult females containing eggs/embryos in their brood chamber. After stopping the exposure, offspring in next (the second) ovary grew normally to adults. In the highest concentration of colchicine (5 mg L⁻¹), all daphnids died within 5 days after the start of exposure and the first brood was not occurred.

The embryogenesis/growth was inhibited when the exposure to the early stage (i.e. ovary to 6 hours after oviposition) had been begun, and then almost of embryos burst within 48–72 hours after oviposition.

On day after the second brood, adult females containing eggs/embryos in their brood chamber was exposed to various concentrations of colchicine for 4 days under static conditions. At the end of exposure, test solutions were renewed to M4 medium. Thereafter daphnids were cultured in medium under semi-static conditions until the sixth brood was finished.

Table 3. Effects of colchicine on reproduction and growth of daphnids in short-term reproduction test (4 days exposure)

Concentration (mg L ⁻¹)	<i>N</i>	Mortality (%)	Number of offspring brood ⁻¹ a)			
			3rd	4th	5th	6th
Solvent control	31	0.0	39.7	40.6	49.5	46.0
0.2	51	3.9	41.4	43.8	52.0	45.2
0.5	52	3.8	41.0	0.0*	50.4	50.0*
1	52	1.9	42.1	0.2*	36.7*	49.8*
2	52	9.6	40.3	0.0*	4.4*	44.8
5	52	100	42.3	0.0*	N.A.	N.A.

a) Mean number of living offspring brood⁻¹ female⁻¹

* Significantly different from the solvent control ($p < 0.05$)

N.A., Not Available

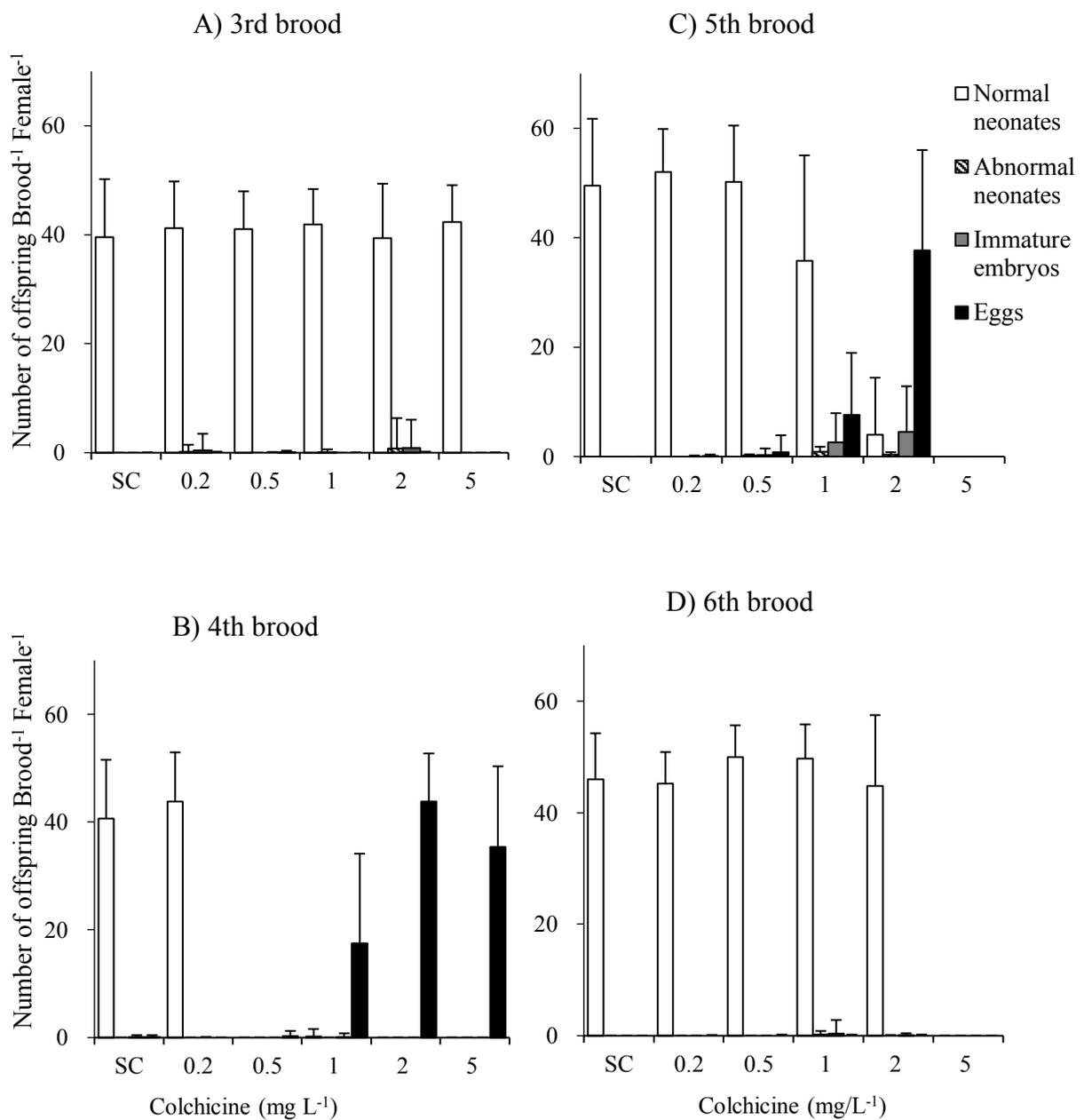


Fig. 8. Mean number of offspring per brood in parent females during the test period in short-term reproduction test.

Data are presented as mean value with standard deviation. $n=31$ in SC (solvent control) and 51-52 in exposure groups.

III-4 考察

III-4-1 コルヒチン暴露による毒性の量的特徴

急性遊泳阻害試験の結果、オオミジンコの幼体に対するコルヒチンの毒性は mg L^{-1} レベルと低く、24h-EC₅₀値は48h-EC₅₀値より約4倍大きい99 mg L^{-1} (95%信頼限界79~140 mg L^{-1})であった。Morrow et al. (2001)はオオミジンコよりも小型の*D. pulex*の幼体に対するコルヒチンの毒性を24h-EC₅₀値 > 1000 mg L^{-1} としたことから、*D. pulex*よりもオオミジンコに対する毒性が10倍以上強いことになり、同じミジンコ属内においてもコルヒチンに対する感受性が大きく異なることが分かる。一方、21日間繁殖試験の結果では、LC₅₀、NOECおよびLOECの値は急性遊泳阻害試験のEC₅₀値に比べ約1/10~1/30に低下し (Table 2)、コルヒチンのオオミジンコに対する急性-慢性毒性比ACR (acute-chronic ratio, 急性遊泳阻害試験EC₅₀/繁殖試験NOEC)は120であった。また、短期繁殖試験におけるNOECおよびLOECは21日間繁殖試験と同じであった (Table 2)。百数十種の農薬のミジンコ類に対するACRの分布は10以下が52%、10~100が32%と100以下が84%を占めており (若林2003)、コルヒチンのACRは農薬に比べ比較的大きい。すなわち、コルヒチンは殺虫剤の一分類である昆虫成長制御剤のように、短期暴露よりも長期暴露により毒性が強く発現することを示す。ACRが大きい理由として、毒性発現が遅効的で短時間の暴露では症状が現れにくい可能性も考えられるが、コルヒチンの毒性が発生段階で大きく異なるため、生後24時間の幼体を用いる急性遊泳阻害試験では毒性が弱く、胚に対する暴露期間を含む繁殖試験では毒性が強く現れることが大きな要因として挙げられる。

III-4-2 毒性の質的特徴

21日間繁殖試験の結果、コルヒチンはオオミジンコの卵形成を阻害しないが胚の初期発生を阻害することが明らかとなった。また、短期繁殖試験の結果から、抱卵成体への暴露が生まれた幼体の胚発生にも影響を及ぼすが、暴露期間中の発生段階 (卵巣あるいは産卵後の経過時間の異なる胚)

の違いによってコルヒチンの影響が異なることが判明した。さらに、暴露を中止することで正常な産仔が回復することから、F0 個体に対する繁殖(胚発生)阻害は一過的なものと考えられた。暴露した F0 個体は、第 2 触角の遊泳剛毛(setae)が欠損しており、水中を正常に遊泳できず暴露容器へ着底した。このような個体は、自然環境下で摂餌効率の低下や魚等による捕食リスクが高いと考えられ、生存の可能性が大きく低下した”Ecological death”と呼ばれる状態と見做され(Scott & Sloman 2004)、死亡率だけの評価では実環境中での影響を過少評価してしまう一例と言えよう。なお、短期繁殖試験の 5 回目産仔(暴露終了後の産仔)で、F1 の発達異常や遊泳異常が一部認められたが、これは卵巣内での暴露の影響が現れたものである。第2触角先端の遊泳剛毛のみを欠損した F1 個体は認められないことから、形態異常は F1 に遺伝しないと考えられた。

胚発生に対する影響については、3,4-ジクロロアニリン(Sobral et al. 2001)、4-ノニルフェノールおよびテストステロン(LeBlanc et al. 2000)、殺虫剤(Palma et al. 2009a, b; Toumi et al. 2013)や殺菌剤(Kast-Hutcheson et al. 2001)等の化学物質について調べられており、オオミジンコの F1 世代の異常症状、例えば第 2 触角の未発達、殻刺湾曲、および胚発生の停止等が報告されている。しかし、コルヒチンも含め細胞分裂阻害作用を示す物質で同様の報告はない。胚発生に及ぼす影響に関して、発生が停止した胚はその後死亡すると考えられるが、正常な産卵がみられるにも関わらず育房内の胚全ての発生停止や崩壊が起こることを報告した例はこれまでにない。本論文で見出された、コルヒチン暴露で見出した胚発生に対する毒性影響がコルヒチンに特有なものか、あるいは細胞分裂阻害物質に一般化できるものかを明らかにするため、今後他の細胞分裂阻害剤を用いた実験で検証する必要がある。

第IV章 胚発生に対する毒性とその発現時期

IV-1 序論

第Ⅲ章にて実施した各種毒性試験の結果、コルヒチンはオオミジンコの卵形成を阻害せず、胚発生を阻害することが明らかとなった。そこで本章では、コルヒチンの育房中の胚に対する毒性とその発現時期を明らかにするため、(1)抱卵成体を用いた胚発生阻害試験、(2)核染色による卵割阻害作用の検証、(3)チューブリン免疫染色による有糸分裂阻害作用の検証、および(4)ヘマトキシリン・エオジン(以降HEとする)染色による胚の組織断面の観察を行い、組織学的に検証することも併せて行った。

IV-2 材料および方法

IV-2-1 抱卵成体を用いた育房内卵の胚発生阻害

胚への毒性を評価するため、11日齢以降の未抱卵あるいは抱卵の雌成体を供試した。21日間繁殖試験の結果より、試験濃度は暴露影響が確実に認められる 1 mg L^{-1} の1濃度のみとした。予備実験では、産卵10時間以降の胚(産卵24~76時間後、 $n=1\sim5$)へコルヒチンを暴露してもオオミジンコの胚発生に影響を及ぼさなかったことから、本試験はさらに早い段階の発生段階で行った。2~6回目の産仔を終えた飼育中の成体をM4培地の入ったガラス製容器に1個体ずつ移し、産卵させた。産卵直後から10時間経過するまでの、産卵後の経過時間が1時間ずつ異なる卵/胚を抱卵した成体をそれぞれコルヒチンが入った試験液に移し、次の産仔が終了するまで止水条件で3~4日間暴露した(ただし産卵9時間後は除く)。卵/胚の発生段階(産卵後の経過時間)ごとに50~59個体の成体を供試した。試験条件(容器、試験液量、水温、照度、給餌)は繁殖試験と同条件とした。暴露終了時、産仔数および外部形態異常(胚発生)の有無を目視で観察した。暴露期間中、育房内の胚の外部形態も毎日目視で観察した。

IV-2-2 卵割阻害作用

卵割に及ぼす影響を明らかにするため、既報(Palma et al. 2009a)の方法に従い卵巣内で暴露された胚を育房より継時的に採取した。2~6 回目の産仔を終えた雌成体を、1 mg L⁻¹のホルヒチンに48 時間以上暴露した後に単離し、脱皮と産卵(卵巣から育房内への卵の移動)が終わるまで観察した。産卵 4~24 時間後、抱卵した雌ミジンコを時計皿に移した。外殻の腹側を細針で固定しつつ育房内に注射針を刺し込み、M4 培地をゆるやかに注入して胚を押し出した。

YOYO-1 による核染色のため、室温で胚を 20 分間固定(固定液: 50 mM EGTA, 9.25%ホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4))した。PBS-T(0.1% Tween-20 含有 PBS)中のメタノール濃度を段階的に上げて胚を脱水し、-20°C で少なくとも 1 週間 100%メタノール中に保管した。その後、PBS-T 中のメタノール濃度を段階的に下げて胚を洗浄し、さらに PBS-T で 2 回洗浄した。実体顕微鏡下で胚を撮影後、産卵後 4~6 時間経過した胚は卵膜処理のためコラゲナーゼ Type 1 (1 mg mL⁻¹; 和光純薬工業)を含む Ca²⁺ free SOS buffer(100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1mM MgCl₂, 5 mM HEPES)中で 37°C, 180 分間処理した。産卵 10 時間後の胚は、コラゲナーゼによる卵膜処理の効果が認められなかったため、細針を用いて卵膜を物理的に除去した。PBS-T で胚を 3 回洗浄後、試料中の RNA を分解するため、RNase A (1 mg mL⁻¹; ニッポンジーン)を含む PBS-T 中で 23°C, 60 分間胚を処理した。PBS-T で胚を 3 回洗浄後、0.05 μM YOYO[®]-1 Iodide (1 mM DMSO 溶液; Life Technologies Corp.)を含む PBS-T で 23°C, 30 分間胚を染色した。PBS-T で 6 回洗浄後、共焦点顕微鏡(FV1000, オリンパス工業)下で胚の核酸(DNA)を観察した。

IV-2-3 有糸分裂阻害作用

有糸分裂に及ぼす影響を明らかにするため、IV-2-2 項と同様、卵巣内で暴露された胚を育房より継時的に採取し、YOYO-1 による核染色およびチューブリン抗体を用いた免疫染色の 2 重染色を実施した。

抱卵成体の育房より採取した胚を 99%冷エタノール中に入れ、 -20°C で少なくとも 1 週間固定・脱水した。PBS-T 中のエタノール濃度を段階的に下げて胚を洗浄し、さらに PBS-T で 2 回洗浄した。実体顕微鏡下で胚を撮影後、卵膜の残っている産卵 4 時間後の暴露胚は、コラゲナーゼ Type 1 (1 mg mL^{-1}) を含む Ca^{2+} free SOS buffer 中で 37°C , 180 分間処理した後、PBS-T で胚を 3 回洗浄した。卵膜の残っていない胚(産卵 4 時間後の正常胚, ならびに産卵 24 時間後の正常および暴露胚)は、コラゲナーゼ処理を行わなかった。1.5%BSA を含む PBS-T (ただし Tween-20 濃度は 0.5%) で 40 倍希釈した一次抗体(抗 α -Tubulin マウス IgG)を胚に処理し、 4°C で一晩静置した。PBS-T で胚を 3 回洗浄後、PBS-T で 500 倍希釈した二次抗体(Cy3 標識抗マウス IgG ウサギ抗体)を胚に処理し、 4°C で一晩静置した。PBS-T で胚を 3 回洗浄後、試料中の RNA 分解のため RNase A (1 mg mL^{-1}) を含む PBS-T 中で 23°C , 60 分間胚を処理した。PBS-T で胚を 3 回洗浄後、 $0.05\ \mu\text{M}$ YOYO[®]-1 Iodide を含む PBS-T で 23°C , 30 分間胚を染色した。PBS-T で 6 回洗浄後、Vectashield(H-1000)で封入し、共焦点顕微鏡(FV1000, オリンパス工業)下で胚の核酸およびチューブリンを観察した。

IV-2-4 胚の組織断面の観察

IV-2-2 項と同様に、7 日齢以降の抱卵成体をコルヒチン 1 mg L^{-1} 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 IV-2-2 項に示した固定液中で固定、パラフィン包埋、薄切した後、HE 染色を行い、光学顕微鏡下で胚の全体像を観察した。

IV-3 結果

IV-3-1 抱卵成体を用いた育房内卵の胚発生阻害

育房内に発生段階の異なる胚を抱卵したミジンコ成体に対しコルヒチンを暴露すると、胚の発生過程により産卵への影響が異なった。産卵から 5 時間以内にコルヒチンを暴露した場合、正常に胚発生した幼体は 1 個体も産仔されなかった (Fig. 9)。産卵後 10 時間経過した胚へ暴露した時に比べ、

遊泳異常(着底, 断続的な遊泳など)を示す幼体や未成熟胚, 未発達卵を含めた産仔数は雌 1 個体あたり 10 未満と顕著に減少した. また, 産卵から 3 時間以内にコルヒチンを暴露すると未発達卵のみが放出され, その数は雌 1 個体あたり 10 個未満であった. 産仔数の減少は, 産卵後 3~5 時間経過した胚へ暴露した時に顕著で, 卵も未成熟胚もほとんど観察されなかった. 暴露中に育房内の胚の状態を観察すると, 産卵後 5 時間までに暴露した場合, 産卵から 48~72 時間経過すると胚が崩壊した. 産卵後 6~10 時間経過した胚に暴露した場合, 産まれた幼体はほぼ正常であったが, 産卵後 6~7 時間経過した胚へ暴露した場合, 遊泳異常(着底, 断続的な遊泳など)を示す幼体, 未成熟胚ならびに未発達卵が僅かに観察され, その数は雌 1 個体あたり 5 未満であった.

IV-3-2 卵割阻害作用

卵巣内でコルヒチンを暴露された胚(以降, 暴露胚とする)と正常胚を実体顕微鏡下で比較すると, 産卵から 4~10 時間経過した段階では胚発生の違いは観察されなかった(Fig. 10A). しかし産卵から 24 時間経過すると, 正常胚は非対称形であったが暴露胚は依然として完全な球状であり, 多数の油滴が認められた(Fig. 10A, d および h). また, 産卵後 24 時間経過した暴露胚では卵膜が離脱せず残存していた. 核染色をすると, 産卵後 4 時間経過した時点で正常な卵割が対照区と同様に暴露胚でも観察された(Fig. 10B, a および e, 32~64 細胞期). また, 産卵後 6 時間経過した時点で, コルヒチン暴露の影響は不明瞭であった(Fig. 10B, b および f, 64~256 細胞期). しかし, 産卵後 10 時間経過すると, 暴露胚の形状は歪み, 対照区に比べ蛍光染色された核酸の数が減少した(Fig. 10B, c および g). さらに産卵後 24 時間経過すると, 正常胚では胚が順調に発達したが, 暴露胚では核酸に特異的な蛍光がほとんど消失していた(Fig. 10B, d および h). 対照区の胚では, 観察期間を通じて正常な卵割と初期胚発生が観察された.

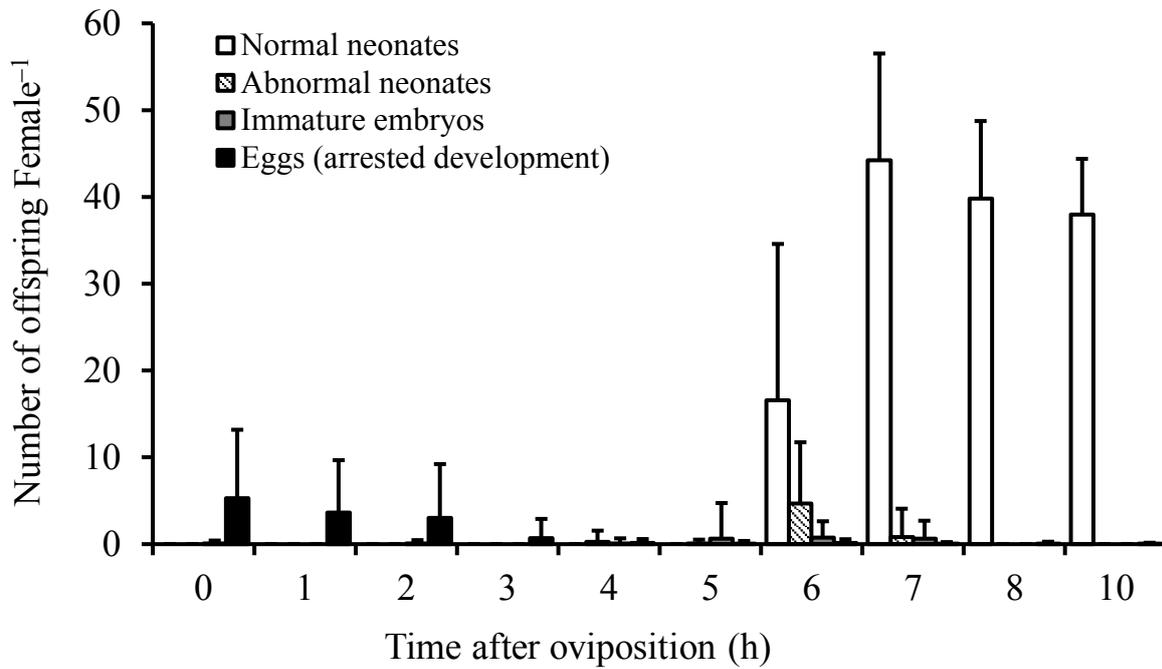


Fig. 9. Mean number of offspring produced by female at each exposure timing in the embryo developmental inhibition test.

Data are presented as mean value with standard deviation. White bars and diagonal bars indicate normal and abnormal neonates, respectively. Light gray bars indicate the immature embryos. Black bars indicate developmentally arrested eggs. $n=50-59$.

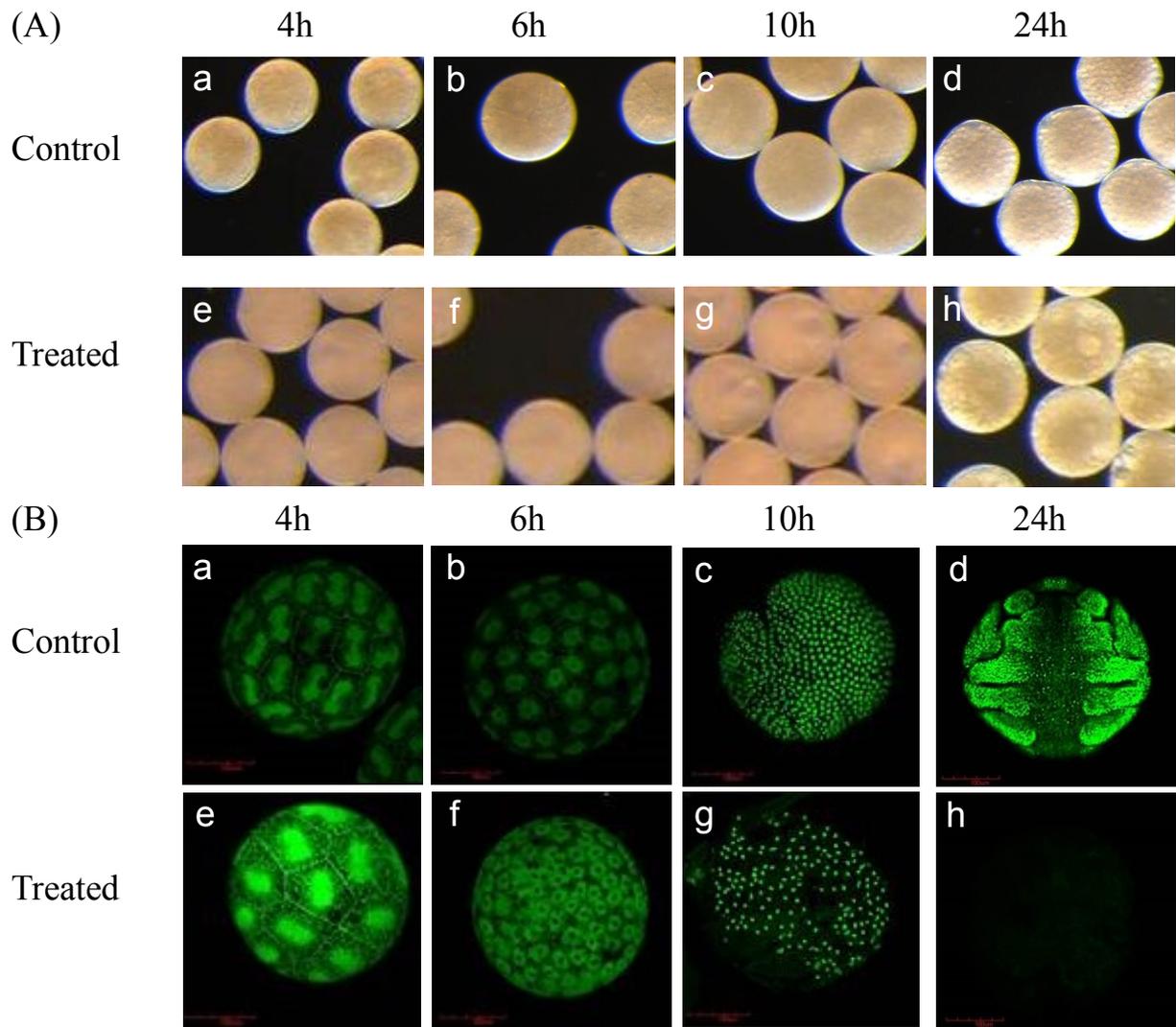


Fig. 10. Effect of colchicine on early embryogenesis of *Daphnia magna* in the nuclear staining.

(A): Dark field images by stereomicroscopy. (B): Fluorescent nuclear staining images with YOYO-1 by confocal laser-scanning microscopy. Embryos were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (a-d) or exposed to 1 mg L^{-1} colchicine (e-h). (a, e): Four hours after oviposition. (b, f): Six hours after oviposition. (c, g): Ten hours after oviposition. Egg envelope was removed from embryo by using fine needles. (d, h): Twenty-four hours after oviposition.

IV-3-3 有糸分裂阻害作用

産卵から 4 時間経過した時点では、正常な卵割が対照区と同様に暴露胚でも観察された (Fig. 11, a および e). 産卵後 24 時間経過すると、正常胚では胚が順調に発達したが、暴露胚では核酸に特異的な蛍光がほとんど消失していた (Fig. 11, c および g).

チューブリン免疫染色の結果、対照区 (Fig. 11, b および d)と同様に暴露胚でも発生初期(少なくとも産卵後 4 時間経過した時点まで)は微小管を検出した (Fig. 11, f)が、産卵から 24 時間経過した段階では微小管を検出しなかった (Fig. 11, h). 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と考えられた。また、コルヒチンがオオミジンコの胚のチューブリン重合を阻害する時期は、産卵後 10 時間以降に限定される可能性が考えられた。

IV-3-4 胚の組織断面の観察

HE 染色の結果、対照区の胚では時間の経過とともに胚が発達する様子が観察された (Fig. 12, 上段). 一方、暴露胚では産卵から 10 時間以上経過した時点で発生の阻害が顕著に認められ (Fig. 12), コルヒチンによって胚発生が阻害されることが組織学的に証明された。

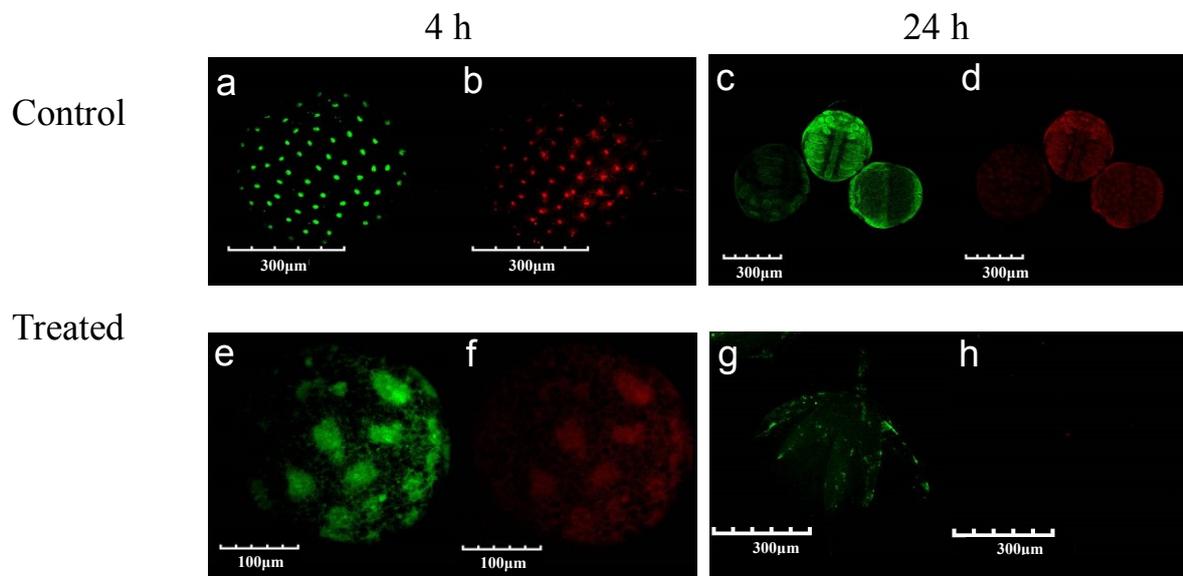


Fig. 11. Effect of colchicine on early embryogenesis of *Daphnia magna* in the nuclear staining and immunostaining for tubulin.

Fluorescent nuclear staining images with YOYO-1 (green) and immunostaining images for tubulin (red) with anti- α tubulin 1st antibody and Cy3-conjugated 2nd antibody by confocal laser-scanning microscopy. Embryos were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (a-d) or exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine (e-h). (a, b, e, f): Four hours after oviposition. (c, d, g, h): Twenty-four hours after oviposition. Egg envelope was removed or treated with collagenase Type 1 (1 mg mL⁻¹) in Ca²⁺ free SOS buffer.

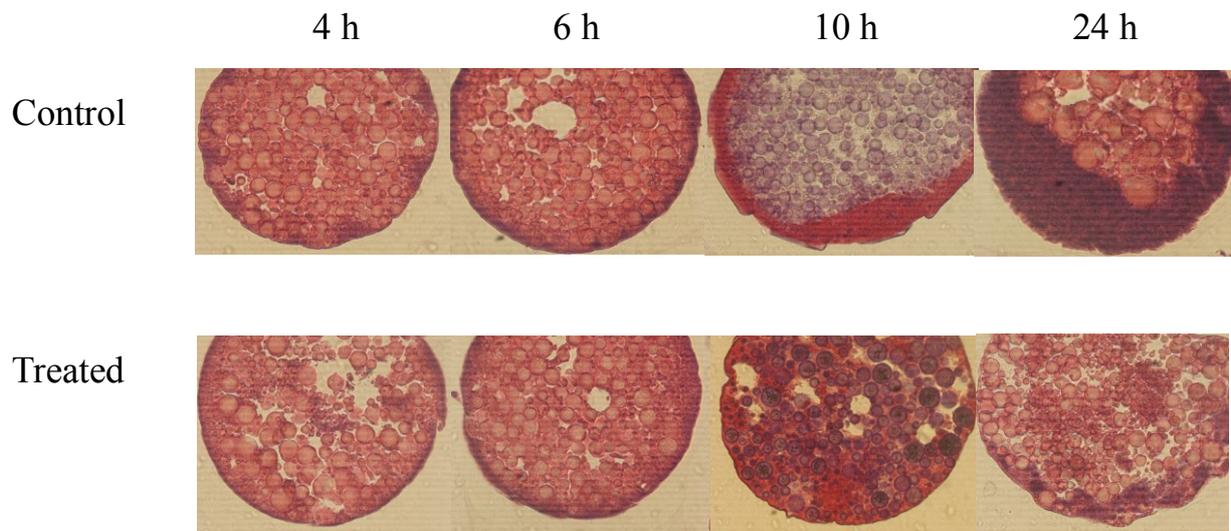


Fig. 12. Effect of colchicine on early embryogenesis of *Daphnia magna* in the HE staining.

Embryos were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (upper) or exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine (lower).

IV-4 考察

オオミジンコの産卵以降の胚発生の過程に焦点を絞り、毒性の発現時期と症状を明らかにすることを目的に胚発生阻害試験を実施した結果、コルヒチン暴露に対する胚の感受性が高かったのは産卵後3～5時間のものであった。この時間における胚の発生段階は、Kast-Hutcheson et al. (2001) に準拠すればステージ1(卵割;産卵後0～15時間、胚は完全に球状で細胞分化の徴候がない)に該当する。産卵後7時間以上経過した胚へ暴露すると、ほぼ全て正常な幼体が産まれたことから、コルヒチンは胚発生の初期に影響を及ぼすものの、原腸陥入期(ステージ2;産卵後15～25時間)および正常な器官形成期(ステージ3～6)の発生を阻害し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作用は認められるが、阻害時期が限定されること、さらには(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考えられる。

胚の崩壊の有無は暴露開始時の胚の発生段階によって異なり、産卵後と産卵前の暴露では影響が異なった。産卵後の暴露である胚発生阻害試験(1 mg L^{-1})では、産卵から5時間以内にコルヒチンを暴露した胚が産卵後48～72時間経過した時点で崩壊した。一方、産卵前の暴露である繁殖試験では、 0.5 mg L^{-1} のみ胚が崩壊し、 $1\sim 2 \text{ mg L}^{-1}$ では時間が経過しても胚は崩壊せず、卵膜も残存した。繁殖試験では、(1)卵巣内での暴露による影響が遅効的にあらわれ、胚の崩壊が阻害された可能性、あるいは(2)試験期間を通じて長時間暴露されることにより、コルヒチンに対する耐性の高い胚が産卵され、胚の崩壊が起こらなかった可能性も考えられる。なお、胚の崩壊は一瞬の出来事と考えられ、崩壊する瞬間を確認することはできなかった。

一部の農薬が示すオオミジンコに対する胚毒性について、母体への影響が胚発生に影響を及ぼす可能性が指摘されている(Kast-Hutcheson et al. 2001; Palma et al. 2009a, b)。母体に対する毒性影響を除外した胚毒性を確認するためには、育房内より採取した初期胚への直接暴露試験(Abe et al. 2001; Kast-Hutcheson et al. 2001; Palma et al. 2009a, b)が必要かもしれない。ただし、Abe et al. (2001)が報告したように、産卵から2時間以内の胚は物理的な刺激に弱く、この時間における初期

胚の採取と直接暴露試験の実施は困難である。産卵直前までの胚発生の阻害や、コルヒチンが卵膜から胚に到達するまでのタイムラグを考慮する必要はあるが、(1)短期間の暴露によって母体への毒性を最小化することで、産卵直後の胚に対する毒性を把握できること、(2)暴露時期を早めることで卵巣中での暴露の影響も把握できる点が、抱卵成体を用いた胚発生阻害試験の特徴と言える。

本論文で見出されたコルヒチンによる卵割の阻害を報じたものとして、コルヒチンおよびコルヒチンの誘導体デメコルシン(demecolcine)をウニ卵に暴露した実験がある(小林 1958)。デメコルシン処理により、ウニ卵の分裂装置である紡錘体と星状体は核分裂のどの時期の処理でも完全に消失する。卵割は核分裂の中期以前に処理した場合に阻害されるのに対し、後期以後の処理では卵割は必ず起こるが1回目だけで、2回目は阻害される。卵割が阻害される発生段階はウニとオオミジンコで異なり、オオミジンコでの阻害はウニよりも遅効的だが、最終的に卵割が阻害されるという点ではオオミジンコとウニは同じであった。21日間繁殖試験において、オオミジンコの胚は、第一卵割の時期、すなわち卵形成後、胚が卵巣内から育房内へと移動し産卵される前までにコルヒチンに暴露されているため、胚内部に到達する時間等の薬物動態の差や、オオミジンコの抱卵成体あるいは採取したウニの受精卵への暴露という暴露形態の違いが、毒性発現の早さの差をもたらしているかもしれない。

コルヒチンは多くの生物でチューブリンの重合を阻害することが知られており、卵割や胚発生の阻害が報告されているが(小林 1985)、本研究で観察された胚崩壊を報告した例はない。一方で、高度に保存された普遍的なタンパク質であるチューブリンの阻害物質に対する感受性は、生物種により異なることも知られている(Hess & Bayer 1974, 1977; Morejohn & Fosket 1984; 小林 1985; Dostál & Libusová 2014)。今後、(1)オオミジンコ胚由来のチューブリンタンパクを用いた重合阻害試験、(2)チューブリンタンパク/遺伝子の発現解析等を行うことにより、微小管形成の阻害時期がウニよりも遅効的である理由や、胚の崩壊現象との関連性の解明が期待される。

第V章 コルヒチンによる胚の崩壊:

卵膜の構造的脆弱化

V-1 序論

第Ⅲ章およびⅣ章にて実施した各種毒性試験および胚発生の阻害試験の結果、チューブリン重合阻害による毒性としては想定外の胚の崩壊作用が認められた。すなわち、胚の崩壊の有無は胚の発生過程のどのタイミングで暴露させるかによって異なった。また、胚が崩壊する際には卵膜も破裂し、卵黄顆粒や油滴などが漏出した。コルヒチンにはチューブリン重合阻害以外にも、(1)卵膜の肥厚化による胚発生の阻害あるいは卵膜の脆弱化による胚の崩壊、あるいは(2)膜機能(浸透圧調節)の阻害を持ち合わせる可能性が考えられる。そこで本章では、上記の二つの可能性のうち(1)の卵膜の構造に及ぼす影響を明らかにするため、産卵前暴露および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。

V-2 材料および方法

V-2-1 電子顕微鏡による卵膜の構造解析：産卵前暴露胚

Ⅳ-2-2項と同様に、7日齢以降の抱卵成体をコルヒチン 1 mg L^{-1} に4日以上暴露した。産卵から6時間経過した時点で、卵巣内で暴露された胚を育房より採取した。

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うことでSEM用試料を作成し、SEM(JSM-7001F, 観察/測定モード; 二次電子観察, 加速電圧: 2.00 kV)にて卵膜の表面を観察した。

TEM用試料については、胚を固定(2.5%グルタルアルデヒド含有M4培地), 樹脂包埋, 超薄切片を作成した後、TEM(JEM-1400plus, 加速電圧: 100 kV)にて卵膜の断面を観察した。さらに、試験区毎に10個の胚について、胚当たり3か所の合計30か所で卵膜断面の厚さを測長した。対照区と暴露区の測定値について、Studentのt検定(両側)による有意差検定を実施した。

なお、組織標本の固定以降の操作(前処理, 試料作製, 観察および測長)は日本電子株式会社に委託した。

V-2-2 電子顕微鏡による卵膜の構造解析：産卵後暴露胚

IV-2-1項と同様に、産卵から3時間経過した抱卵成体をコルヒチン 1 mg L^{-1} に暴露した。産卵から30時間後、胚を育房より採取した。その後、V-2-1項と同様にSEMおよびTEM用の試料を調製し、観察を行った。なお、胚を採取するタイミングは暴露の影響によって胚の崩壊が始まる直前としたが、実際の採取時間は予備検討の結果に基づいて決定した。組織標本の固定以降の操作(前処理、試料作製、観察および測長)は日本電子株式会社に委託した。

V-3 結果

V-3-1 電子顕微鏡による卵膜の構造解析：産卵前暴露胚

SEM観察の結果、二つの層から成るオオミジンコの卵膜のうち、外膜の表面は対照区および暴露区ともに平滑で起伏が少なく(Fig. 13a, c)、両区ともに外膜の表面構造には暴露の影響と考えられる変化は認められなかった。

TEM観察の結果、オオミジンコの卵膜の断面構造に暴露の影響と考えられる変化は認められなかったが(Fig. 13b, d)、外膜の厚さは正常胚よりも暴露区の方が有意に厚かった($p < 0.01$) (Fig. 14)。

V-3-2 電子顕微鏡による卵膜の構造解析：産卵後暴露胚

SEM観察の結果、対照区の胚は産卵から30時間経過した時点で発生が進んでおり、多くは外膜が胚から離脱しかけた状態であった(Fig. 15a)。暴露区の胚は、全ての試料でメタノール固定あるいは前処理中に外膜が破れていたものの、外膜の表面構造は平滑で起伏が少なく(Fig. 15c)、産卵後6時間経過した正常胚(Fig. 13a)と同様であった。また、胚の外膜の下には内膜と推定される微細な網状構造が胚全体を覆う様子が観察された(Fig. 15c)

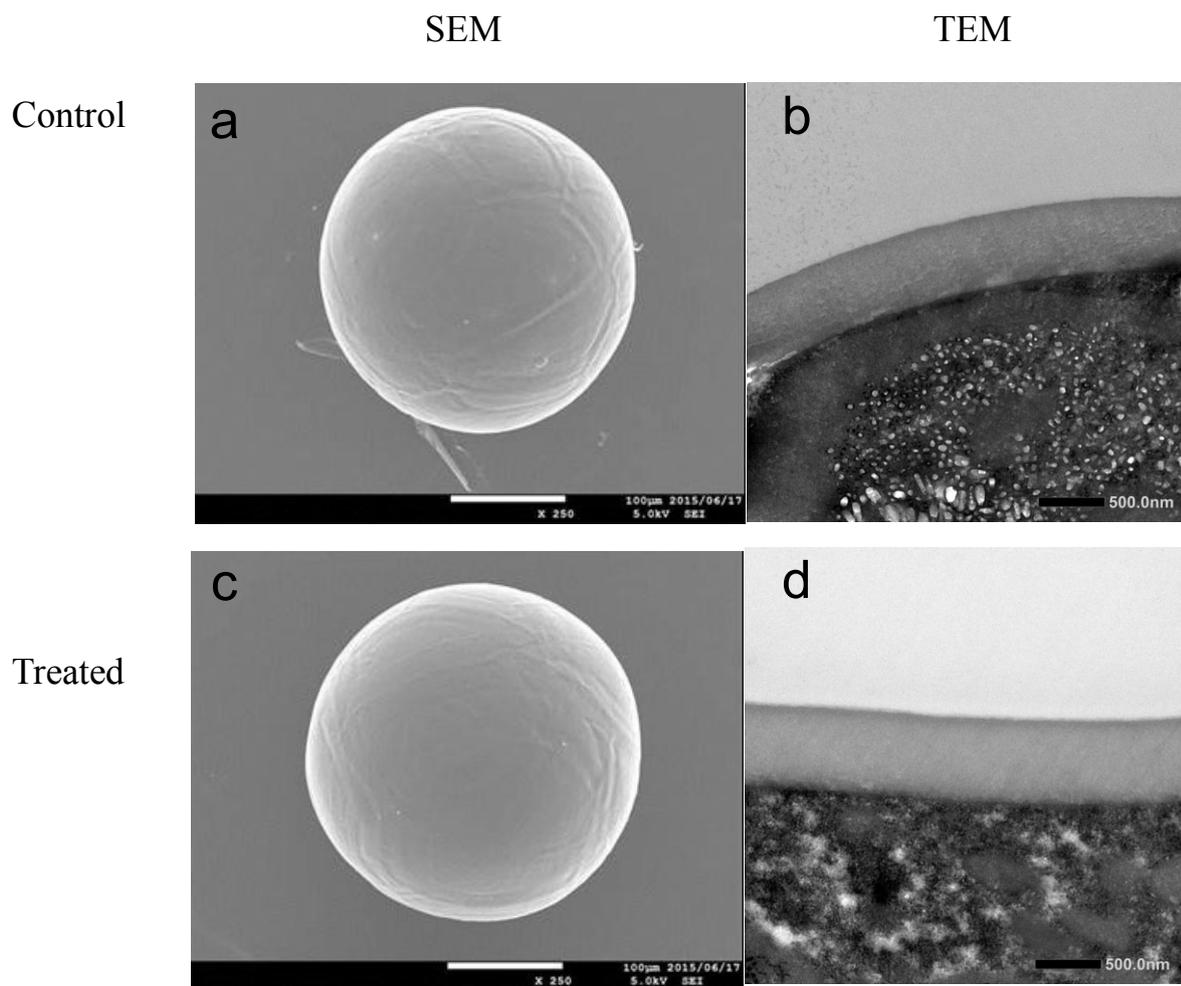


Fig. 13. Surface structure of embryos of *Daphnia magna*.

Embryos 6 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (a, b) and exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine for more than 48 hours in brood chamber (c, d). (a, c): SEM. (b, d): TEM. Scale bar = 100 µm (white for SEM), 500 nm (black for TEM).

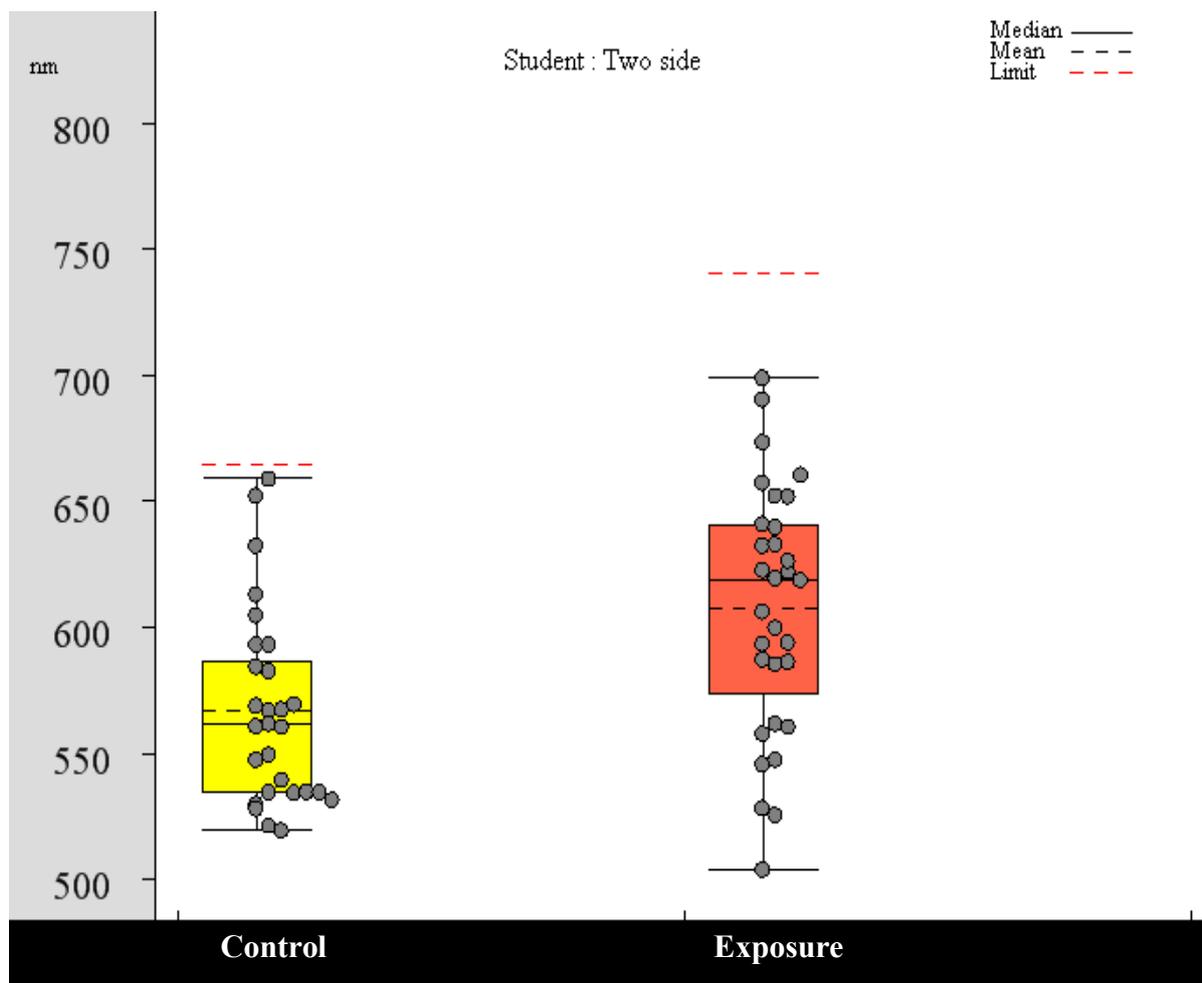


Fig. 14. Box-and-whisker plots of the thickness of egg membrane of *Daphnia magna*.

Embryos of 6 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (control) and exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine for more than 48 hours in brood chamber (exposure). The exposure group shows a significantly difference from the control ($p < 0.01$).

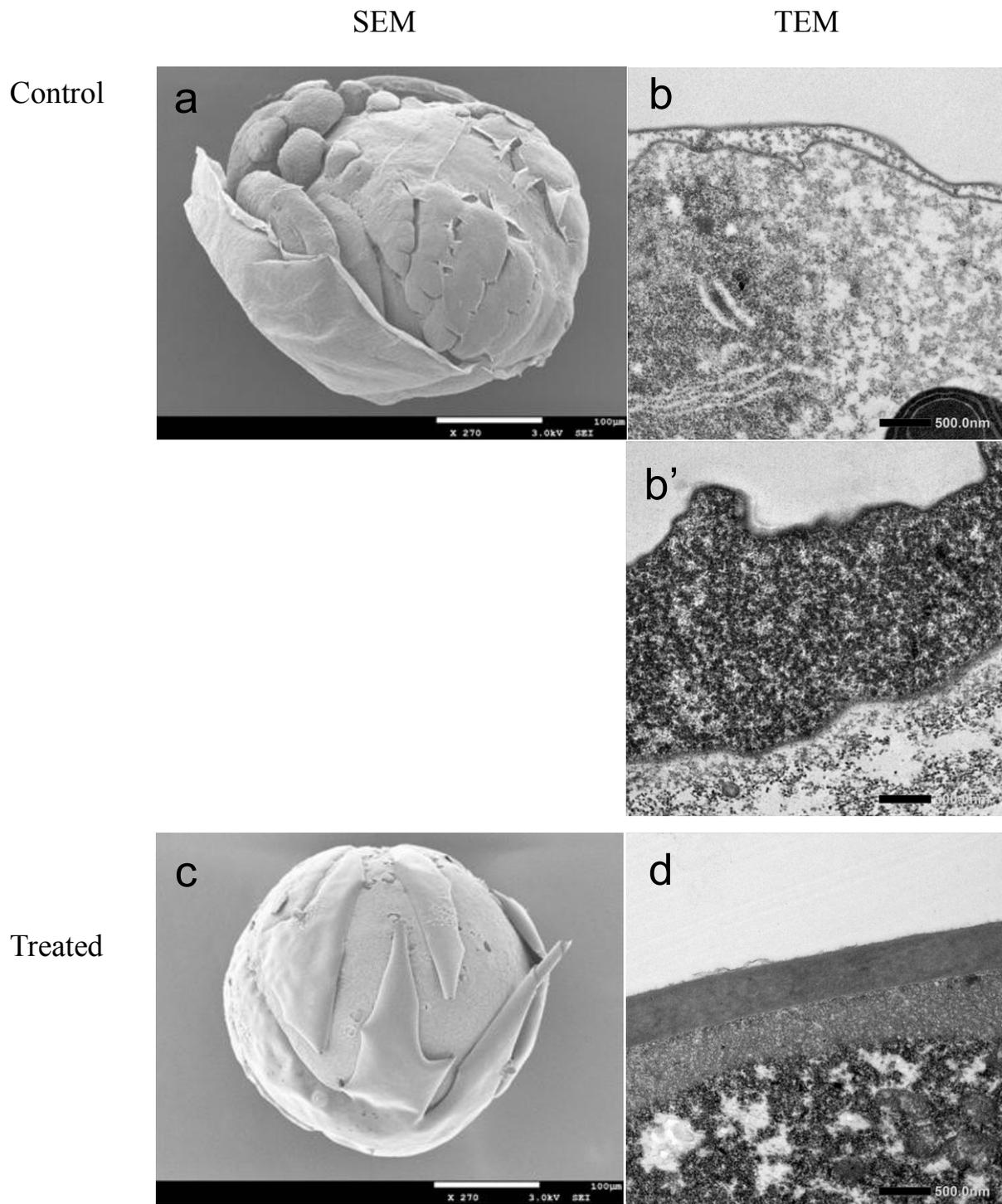


Fig. 15. The surface structure of embryos of *Daphnia magna*.

Embryos of 30 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium (a, b, b') and exposed to 1 mg L⁻¹ colchicine from 3 hours after oviposition in brood chamber (c, d). (a, c): SEM. (b, b', d): TEM. Scale bar = 100 μm (white for SEM), 500 nm (black for TEM).

TEM観察の結果、対照区の胚は外膜が離脱したものが多く、その断面構造(Fig. 15b)については産卵後6時間経過した正常胚あるいは暴露胚(Fig. 13b, d)とも大きく異なった。一部で認められた外膜の肥大した胚(Fig. 15b')は、第一または第二触角の先端等の部位であった可能性が考えられる。外膜の表面構造と厚さについて、産卵後暴露と産卵前暴露の胚を比べた結果、明瞭な違いは認められなかった(Figs. 13d, 15d)。

V-4 考察

オオミジンコの二つの卵膜の内コリオンからなる外膜は卵を堅く覆い、内膜のビテリン膜はコリオン近傍で胚を覆っているとされる(Seidman & Larsen 1979; Sobral et al. 2001; Mittmann et al. 2014)。繁殖試験でコルヒチンによる胚発生の阻害作用が認められ、 $\geq 1 \text{ mg L}^{-1}$ の暴露では胚が崩壊しないことから、オオミジンコの卵膜は、卵巣内でコルヒチンに暴露された場合に厚さとともに物理的強度が増し、あるいは正常な発生でおこるべき時期に卵膜が離脱しないものと予想していた。しかしながら、産卵前から卵巣内で暴露された胚の外膜は、対照区に比べ有意に厚かったが暴露影響と考えられるほどの顕著な差ではなく、表面構造上の変化も見いだせなかった。次に、産卵後のコルヒチン暴露によって胚が崩壊する作用に着目し、崩壊直前の胚について調べたところ、内外膜ともに表面および断面に暴露の影響と考えられる明確な構造的変化は見いだせなかった。このことことから、胚の崩壊は膜の物理的構造面での脆弱によるものでないことが窺える。以上のように、電子顕微鏡による観察ではコルヒチンが卵膜に及ぼす形態的な影響を認めなかったが、薬剤を暴露したオオミジンコの卵膜を電子顕微鏡で詳細に観察した報告はこれまでに無い。少なくとも崩壊直前の胚の外膜についても、厚さや表面構造の大きな変化を伴わないことが本研究で明らかとなった。

コルヒチンの影響部位が外膜のコリオンでなく内膜のビテリン膜である可能性や、膜の物理的強度や柔軟性を変化させる可能性も考えられる。V-1で述べたとおり、コルヒチンが有するであろうもう一つの阻害作用として、膜機能(浸透圧調節)を阻害する可能性を今後検証する余地が残された。

第VI章 コルヒチンによる胚の崩壊:

浸透圧調節の阻害作用

VI-1 序論

浸透圧調節に関わる作用には受動輸送と能動輸送の二つがあり、前者の作用点として Cl^- チャンネルと水チャンネル(アクアポリン, 以降AQP)が挙げられる。 Cl^- チャンネルは, 細胞膜に組み込まれたイオンチャンネルの一種であり, 主に塩化物イオン(Cl^-)を受動的に透過させる。 Cl^- チャンネルは, 神経系を含むあらゆる種類の細胞に発現し, 膜電位や細胞容積の調節, 細胞の移動, 増殖や細胞死(アポトーシス), 分泌などの細胞の基本機能に広く関与しており, チャンネルとの関連疾患も数多く知られている(秋田ら 2015)。一方のAQPは, Cl^- チャンネルと同様にほぼ全ての生命体に発現し, 細胞内外の浸透圧勾配によって水を特異的に移動させる他, 尿細管での再吸収や唾液腺での水分分泌等の体内外のあらゆるダイナミックな水移動に関わるとともに, 近年は麻酔薬や様々な薬剤の作用機序に関わる可能性が示唆されるなど, 多くの生命維持に不可欠なタンパク質であることが明らかにされている(鈴木・田中 2014; 三須・青木 2015)。また, AQPは基本的に四量体を形成して細胞膜に発現しているが(Engel et al. 2000), 新しい機能としてAQPが細胞接着に関与する可能性なども示唆されている(Hiroaki et al. 2006)。しかしながら, Cl^- チャンネルや水チャンネルの阻害剤をオオミジンコに暴露した報告はなく, これらのチャンネルの働きを阻害することによってどのような毒性が現れるのかは不明である。

そこで本章では, コルヒチンによる胚の崩壊作用が膜機能(浸透圧調節)の阻害によるものと仮説を立て, 浸透圧調節に関わる作用点である Cl^- チャンネルおよび水チャンネル(AQP)の阻害の有無を検証した。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, Cl^- フリー培地中でのコルヒチン暴露試験を行った。さらに, 浸透圧が胚発生に及ぼす影響を明らかにするため低張液中(脱塩素水道水, イオン交換水)での胚発生を調べた。

VI-2 材料および方法

VI-2-1 コルヒチン濃度と胚毒性の関係

オオミジンコの胚に対するコルヒチンの毒性を明らかにするため、既報(Kikuchi et al. 2014)の方法を参考にして試験を実施した。試験濃度は繁殖試験と同じ5濃度区(5, 2, 1, 0.5および0.2 mg L⁻¹)とし、無処理対照区(M4培地)および溶媒対照区(0.1 mL L⁻¹ DMF溶液)を設けた。試験容器にはポリスチレン製96穴マイクロプレートを用い、試験液量は250 μLとした。産卵後3~4時間経過した抱卵成体の育房内より胚を採取し、ピペットで試験容器に1個 well⁻¹ となるように入れ、発生が完了するまで止水条件で4日間暴露した。暴露区は1濃度区につき42~44個、無処理対照区は30個、溶媒対照区は9個の胚を供試した。水温、照度および明暗周期は繁殖試験と同条件とした。暴露期間中、胚の発生の状態と形態異常の有無は実体顕微鏡下で観察した。

VI-2-2 Cl⁻チャンネル阻害剤の影響

阻害剤として、哺乳類の神経系に発現していることが知られるカルシウム依存性Cl⁻チャンネルおよび細胞容積感受性Cl⁻チャンネルの阻害剤であるNFAおよびDIDS(秋田ら 2015)を用いた。VI-2-1項と同様に、産卵後3~4時間経過した胚を両Cl⁻チャンネル阻害剤に暴露した。NFA(純度99.2%, 東京化成)およびDIDS(純度97.1%, 東京化成)は、DMFに溶解した後、それぞれM4培地に添加、希釈し試験液を調製した。試験濃度は4濃度区(10, 5, 2 および1 mg L⁻¹)とし、溶媒対照区(0.1 mL L⁻¹ DMF溶液)を設けた。試験容器にはポリスチレン製96穴または6穴マイクロプレートを用い、試験液量は200 μLまたは6 mLとした。暴露区は1濃度区につき29~54個、溶媒対照区は10個の胚を供試した。

VI-2-3 水チャンネル(AQP)阻害剤の影響

哺乳動物のAQPには13種類のサブファミリー(AQP0~12)が存在することが知られており、水分子

を選択的に通すもの、ならびにグリセロールを通すなど選択性が緩いアクアグリセロポリンに大別される(三須・青木 2015)が、オオミジンコのAQPに関する知見はない。そこで、本研究ではAQPの非特異的阻害剤として塩化水銀(Ⅱ)を選択するとともに、AQP4を阻害する塩化亜鉛ならびに塩化銅(Ⅱ)を用いた(Yukutake et al. 2009)。VI-2-1項と同様に、産卵後3～4時間経過した胚を各種水チャネル阻害剤に暴露した。各阻害剤(純度99.9%以上, 和光純薬工業)はそれぞれM4培地で溶解, 希釈し, 試験液を調製した。試験濃度は5濃度区(塩化水銀(Ⅱ):0.1, 0.05, 0.02, 0.01 および0.005 mg L⁻¹, 塩化銅(Ⅱ)二水和物:無水和物として3.9, 1.6, 0.8, 0.4 および0.2 mg L⁻¹, 塩化亜鉛:5, 2, 1, 0.5 および0.2 mg L⁻¹)とし, 無処理対照区を設けた。試験容器にはポリスチレン製24穴または6穴マイクロプレートを用い, 試験液量は2 mLまたは6 mLとした。暴露区は1濃度区につき29～54個, 無処理対照区は14～61個の胚を供試した。

VI-2-4 コルヒチンと各種チャネル阻害剤の同時処理効果

コルヒチンの胚崩壊作用について、イオンを介した水の透過性あるいはイオンを介さない水の透過性の阻害が関与する可能性が考えられる。そこで、イオン透過性あるいは水透過性をブロックした状態でコルヒチンの効果を調べることで、胚崩壊作用との関連性を把握できるのではないかと考え、コルヒチンと各種チャネル阻害剤との同時暴露を行った。

VI-2-1項と同様に、産卵後3～4時間経過した胚をコルヒチンならびにチャネル阻害剤(Cl⁻チャネル阻害剤:NFA, 水チャネル阻害剤:塩化水銀(Ⅱ))に同時暴露した。試験濃度はコルヒチンを0.5 mg L⁻¹の1濃度のみとし, 混合するチャネル阻害剤NFAは10, 5および1 mg L⁻¹の3濃度, 塩化水銀(Ⅱ)は1, 0.01および0.001 mg L⁻¹の3濃度とし, 無処理対照区を設けた。試験容器にはポリスチレン製6穴マイクロプレートを用い, 試験液量は5 mLとした。暴露区は1濃度区につき81～93個(コルヒチン+NFA)または73～80個(コルヒチン+塩化水銀(Ⅱ)), 無処理対照区は14～15個の胚を供試した。胚の崩壊性の変化について(1)崩壊しなくなる(キャンセル), または(2)より早く崩壊する(相乗

効果)という指標を設けることによりコルヒチンの作用の推定を試みた。

VI-2-5 イオンを介した水透過性および浸透圧の影響

コルヒチンの胚崩壊作用について、イオンを介した水の透過性の関与の有無を調べるため、Cl⁻フリー培地を用いた実験を行った。VI-2-1項と同様に、産卵後3～4時間経過した胚をCl⁻フリー培地および同培地で調製した0.5 mg L⁻¹のコルヒチン溶液に暴露した。対照として、M4培地および同培地で調製した0.5 mg L⁻¹のコルヒチン溶液に胚を暴露した。Cl⁻フリー培地の試験区は51～52個、M4培地の試験区は23～25個の胚を供試した。暴露期間中、胚の発生の状態と形態異常の有無を実体顕微鏡下で観察し、M4培地での胚発生の結果と比較した。なお、M4培地中の塩化物を全て硫酸塩あるいは硝酸塩へ変更した改変培地(ただし、塩酸チアミンを除く)をCl⁻フリー培地として使用した。

浸透圧が胚発生に及ぼす影響を明らかにするため、低張液(脱塩素水道水およびイオン交換水)中での胚発生を調べた。脱塩素水道水は、小田原市水道水(上水)を10 μmフィルターおよび活性炭フィルターでろ過することで得た。試験容器にはポリスチレン製6穴マイクロプレートを用い、試験液量は3～4 mLとした。VI-2-1項と同様に、産卵後3時間経過した胚をイオン交換水および脱塩素水道水中に暴露した。それぞれの試験区に58および57個の胚を供試した。暴露期間中、胚の発生の状態と形態異常の有無は実体顕微鏡下で継時的に観察した。

VI-3 結果

VI-3-1 コルヒチン濃度と胚毒性の関係

産卵3時間後の胚にコルヒチンを暴露した結果、産卵から72時間経過した時点での胚発生は0.2 mg L⁻¹ではほぼ正常であったが、 ≥ 0.5 mg L⁻¹で全て異常であり(Fig. 16)、発生停止(球状、未発達の卵)または胚の崩壊が認められた(Fig. 17a)。胚はコルヒチン濃度が低いほど崩壊する割合が高く、

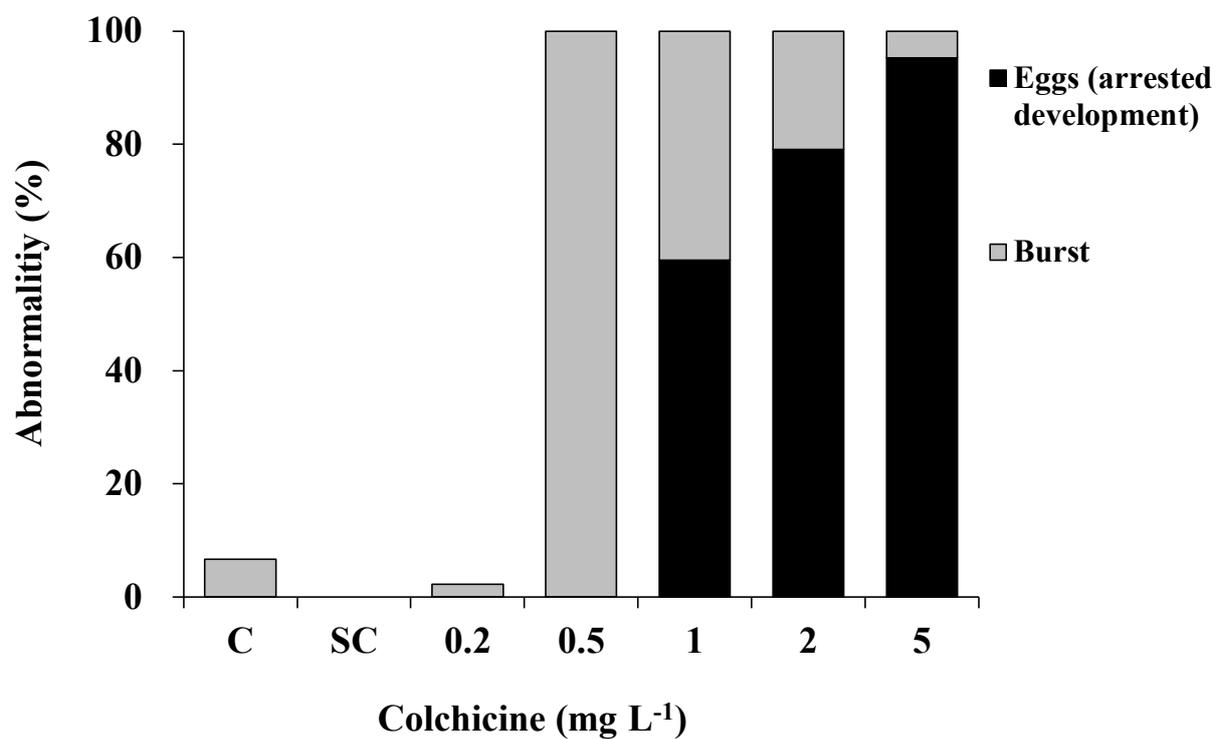
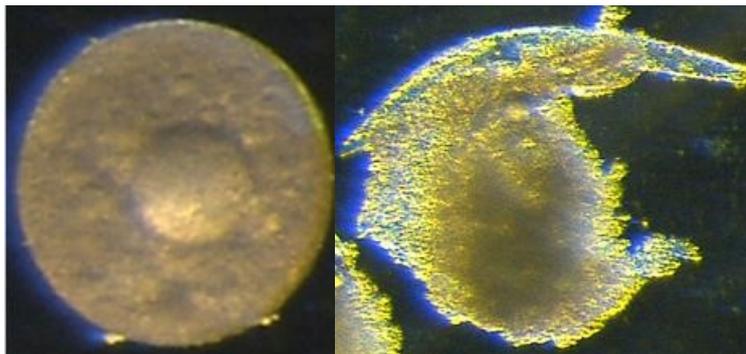


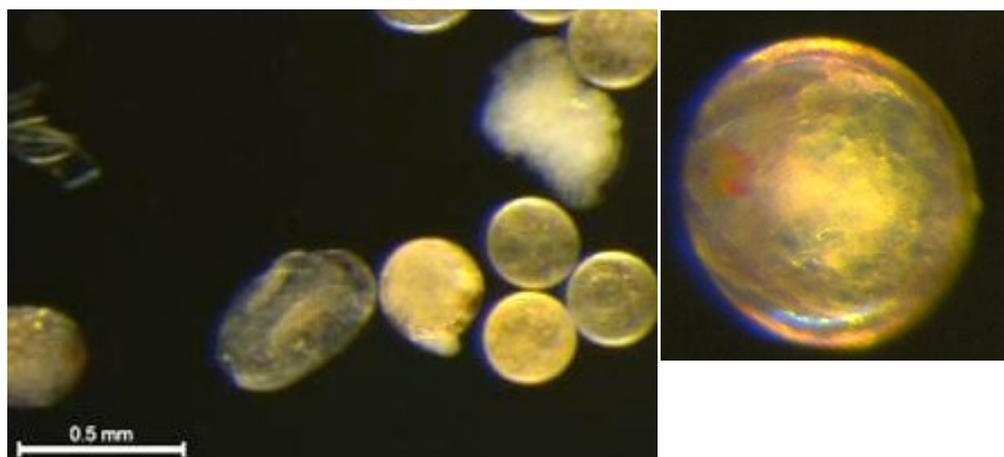
Fig. 16. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of colchicine.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to colchicine. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. $n=30$ in control (C), 9 in solvent control (SC) and 42-44 in exposure groups.

(A)



(B)



(C)

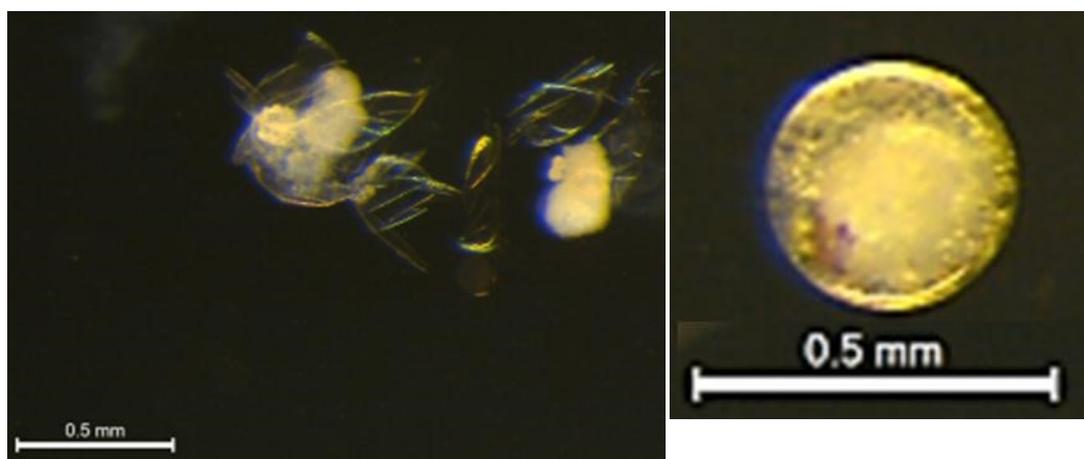


Fig. 17. The typical morphological abnormalities of embryos caused by the exposure of chemicals.

Dark field images under a stereomicroscopy. (A): Embryo exposed to colchicine; (B): Embryos exposed to NFA; (C): Embryo exposed to DIDS.

0.5 mg L⁻¹で全て崩壊した。0.5 mg L⁻¹の暴露によって全ての胚が崩壊するという現象は、21日間繁殖試験の結果と同様であった。一方、1～5 mg L⁻¹での胚の異常は発生停止が全体の50%以上を占め、コルヒチン濃度が高いほど発生停止の割合も高かった。

VI-3-2 Cl⁻チャネル阻害剤の影響

NFAを ≥ 2 mg L⁻¹で暴露した胚には発生停止(未発達卵)や崩壊、発生異常(奇形)が認められ、 ≥ 5 mg L⁻¹では全ての胚に発生異常が認められた(Fig. 18)。NFAを暴露した胚は、コルヒチンと同様、高濃度ほど発生停止の割合が高く、10 mg L⁻¹で全て発生停止した。胚の発生異常として、幼体に近い形態まで発生が進んだ発達途中のもの、正常胚よりも大きく、複眼の原形と推察される赤い着色物を胚内部に含む未発達卵などが認められた(Fig. 17b)。

DIDSを暴露した胚では、最高濃度の10 mg L⁻¹の暴露で8割以上が正常に孵化し、DIDSの毒性は低かった(Fig. 19)。異常症状としては胚の崩壊が大半を占め、僅かに胚の発生停止(未発達卵)も認められた。NFAと同様に、複眼の原形と推察される着色物が胚内部に観察される未発達卵が認められたが(Fig. 17c)、その発生頻度は少なく、色調もNFAとは異なる赤紫色であった。

VI-3-3 水チャネル(AQP)阻害剤の影響

塩化水銀(II)を ≥ 0.005 mg L⁻¹で暴露した胚には、発生停止(未発達卵)や崩壊、発生異常(奇形)が認められた(Figs. 20, 21A)。コルヒチンと同様、塩化水銀(II)の暴露では高濃度ほど発生停止の割合が高かった。ただし、コルヒチンとは異なり、発生異常が0.005～0.05 mg L⁻¹で各濃度区の胚の2割程度で認められた。

塩化亜鉛を暴露した胚では、 ≥ 0.2 mg L⁻¹で発生が阻害された。塩化亜鉛の主な毒性症状は発生停止(未発達卵)と崩壊であり、発生異常(奇形)は1 mg L⁻¹で僅かに認められるのみであった(Figs. 21B, 22)。コルヒチンと同様、塩化亜鉛では高濃度ほど発生停止の割合が高く、低濃度ほど

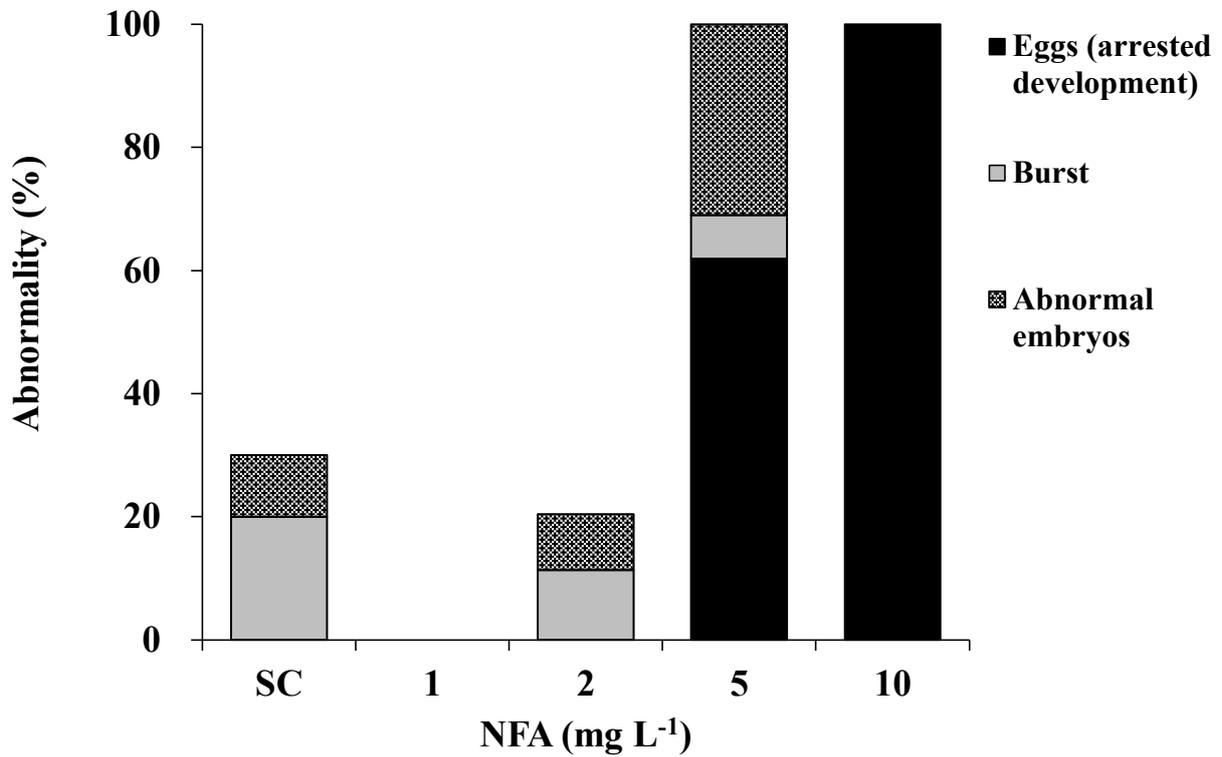


Fig. 18. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of NFA.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to NFA. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. $n=10$ in solvent control (SC) and 42-54 in exposure groups.

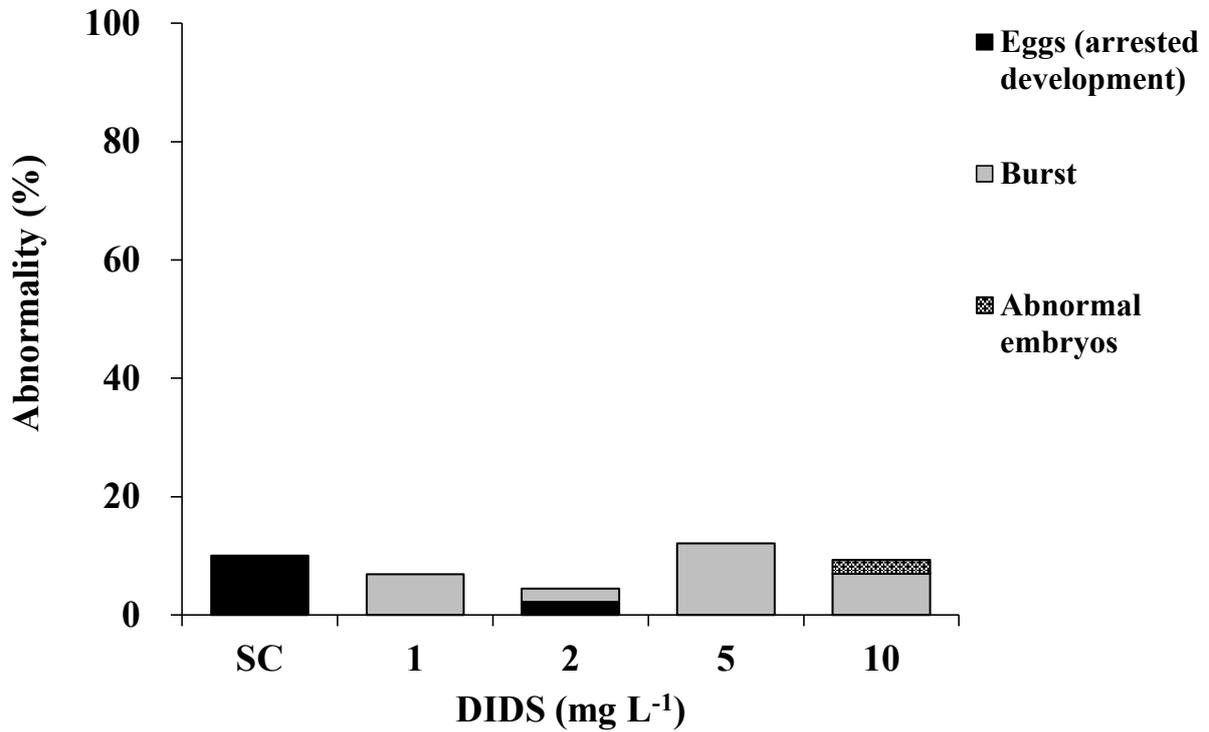


Fig. 19. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of DIDS.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to DIDS. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. $n=10$ in solvent control (SC) and 29-45 in exposure groups.

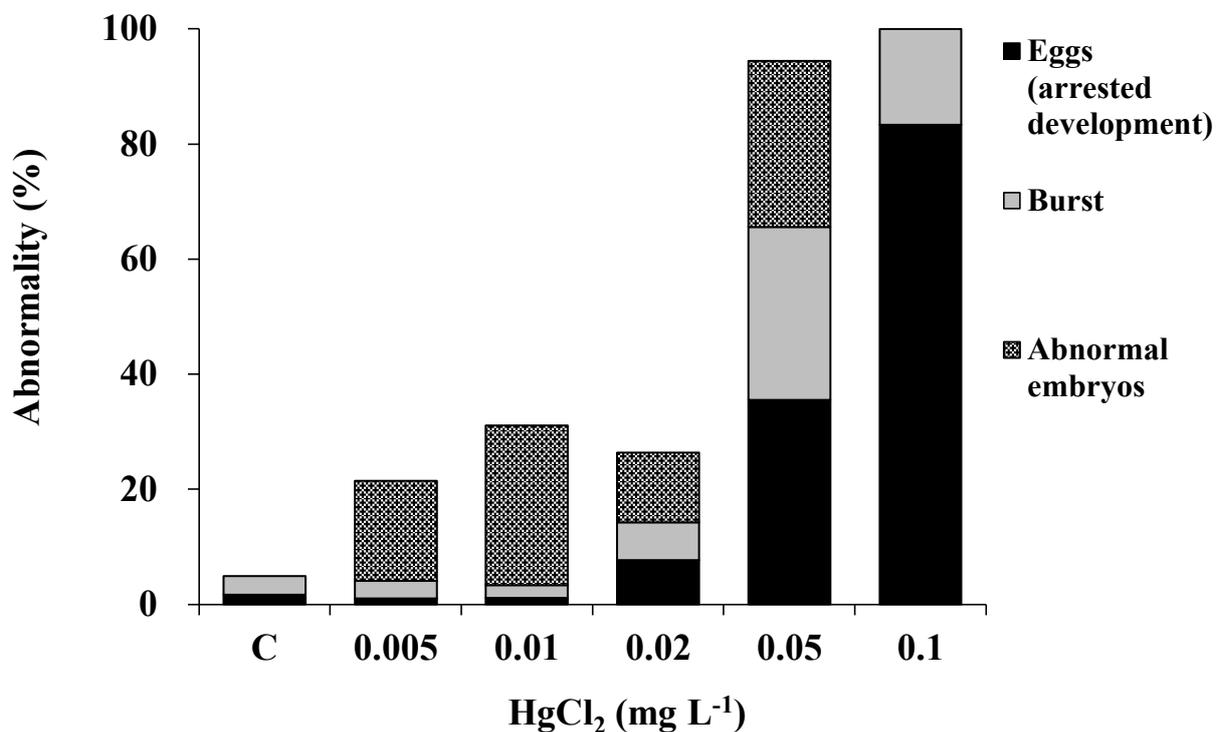


Fig. 20. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of HgCl₂.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to HgCl₂. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. $n=61$ in control (C) and 90-98 in exposure groups.

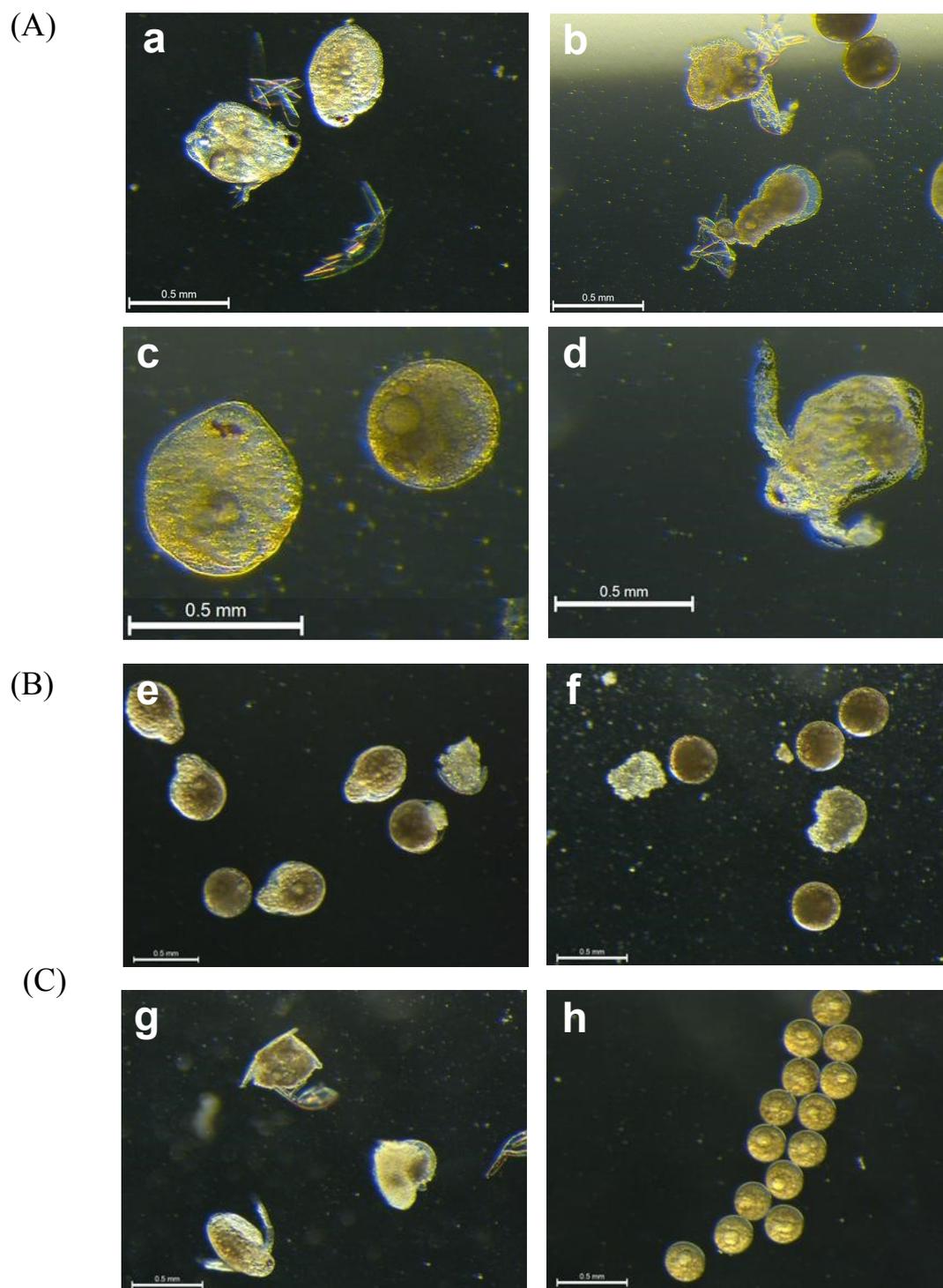


Fig. 21. The typical morphological abnormalities of embryos caused by the exposure of chemicals.

Dark field images under a stereomicroscopy. (A): Embryos exposed to HgCl_2 ; (a): Embryos exposed to 0.01 mg L^{-1} at 72 hours after oviposition; (b, c, d): Embryos exposed to 0.05 mg L^{-1} at 72 hours after oviposition. **(B):** Embryos exposed to ZnCl_2 ; (e, f): Embryos exposed to 1 and 2 mg L^{-1} at 48 hours after oviposition, respectively. **(C):** Embryos exposed to CuCl_2 ; (g, h): Embryos exposed to 0.5 and 2 mg L^{-1} at 48 hours after oviposition, respectively.

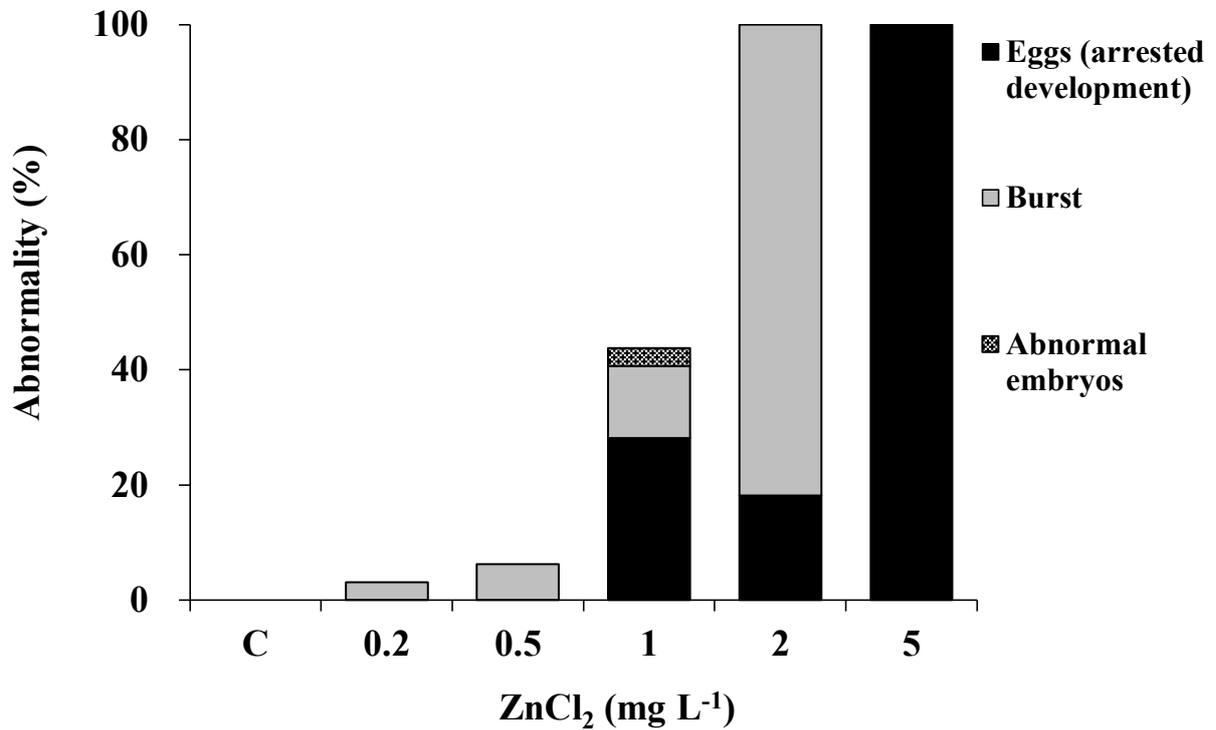


Fig. 22. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of ZnCl₂.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to ZnCl₂. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. $n=14$ in control (C) and 32-33 in exposure groups.

胚が崩壊した。

塩化銅(Ⅱ)を暴露した胚は、0.2および0.4 mg L⁻¹でごく僅かに発生阻害を呈した(Figs. 21C, 23)。胚は、 ≥ 0.8 mg L⁻¹で全て発生異常を呈し、その症状は全て発生停止(未発達卵)であった。

VI-3-4 コルヒチンと各種チャネル阻害剤の同時処理効果

NFA 1~10 mg L⁻¹とコルヒチン0.5 mg L⁻¹を同時に暴露した結果、全ての濃度区で胚は発生異常を呈した(Fig. 24A)。NFA 1 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹の同時暴露で90%以上の胚が崩壊し、NFA 5~10 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹の同時暴露で全ての胚の発生が停止した。胚毒性の強さとして、胚の崩壊>発生停止>発生異常の順であるとした場合、NFAの単独暴露(Fig. 18)に比べ、崩壊作用の緩和や遅延は認められず、NFA 5 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹との同時暴露では毒性が増強した。

塩化水銀(Ⅱ) 0.001~1 mg L⁻¹とコルヒチン0.5 mg L⁻¹を同時に暴露した結果、全ての濃度区で胚は発生異常を呈した(Fig. 25A)。塩化水銀(Ⅱ) 0.001~0.01 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹の同時暴露で全ての胚が崩壊し、塩化水銀(Ⅱ) 1 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹の同時暴露で全ての胚発生が停止した。胚毒性の強さとして、胚の崩壊>発生停止>発生異常の順であるとした場合、塩化水銀(Ⅱ)の単独暴露(Fig. 20)に比べ、塩化水銀(Ⅱ) 1 mg L⁻¹ とコルヒチン0.5 mg L⁻¹の同時暴露で崩壊作用の緩和や遅延は認められなかった。

VI-3-5 イオンを介した水透過性および浸透圧の影響

胚の崩壊に対するイオンを介した水の透過性の関わりを明らかにするため、産卵後3~4時間経過した胚をCl⁻フリー培地に暴露したところ、胚発生はほぼ正常に進んだ(Fig. 26)。また、Cl⁻フリー培地で調製した0.5 mg L⁻¹のコルヒチン溶液に暴露した胚は、発生停止を僅かに呈したものの、90%以上が崩壊し、M4培地で調製した0.5 mg L⁻¹のコルヒチン溶液に暴露した場合とほぼ同じ結果が得ら

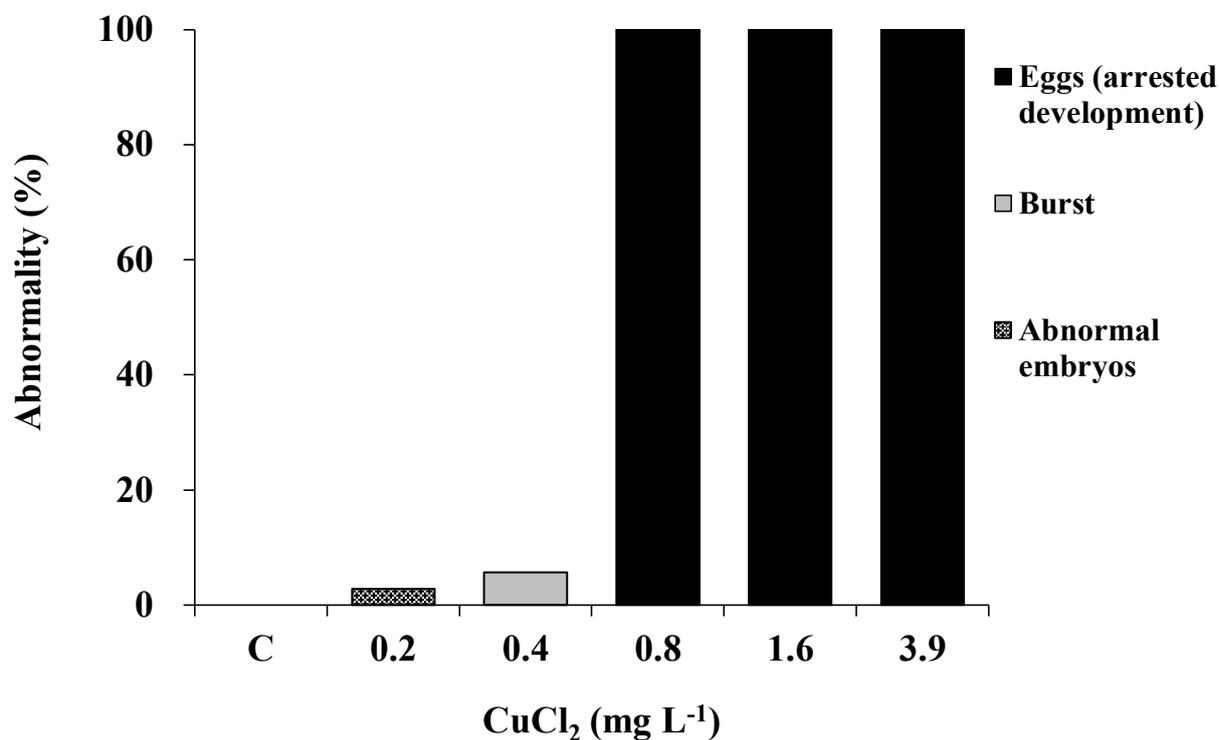


Fig. 23. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of CuCl₂.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to CuCl₂·2H₂O. Test concentrations are indicated as anhydrous CuCl₂. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. *n*=14 in control (C) and 34-36 in exposure groups.

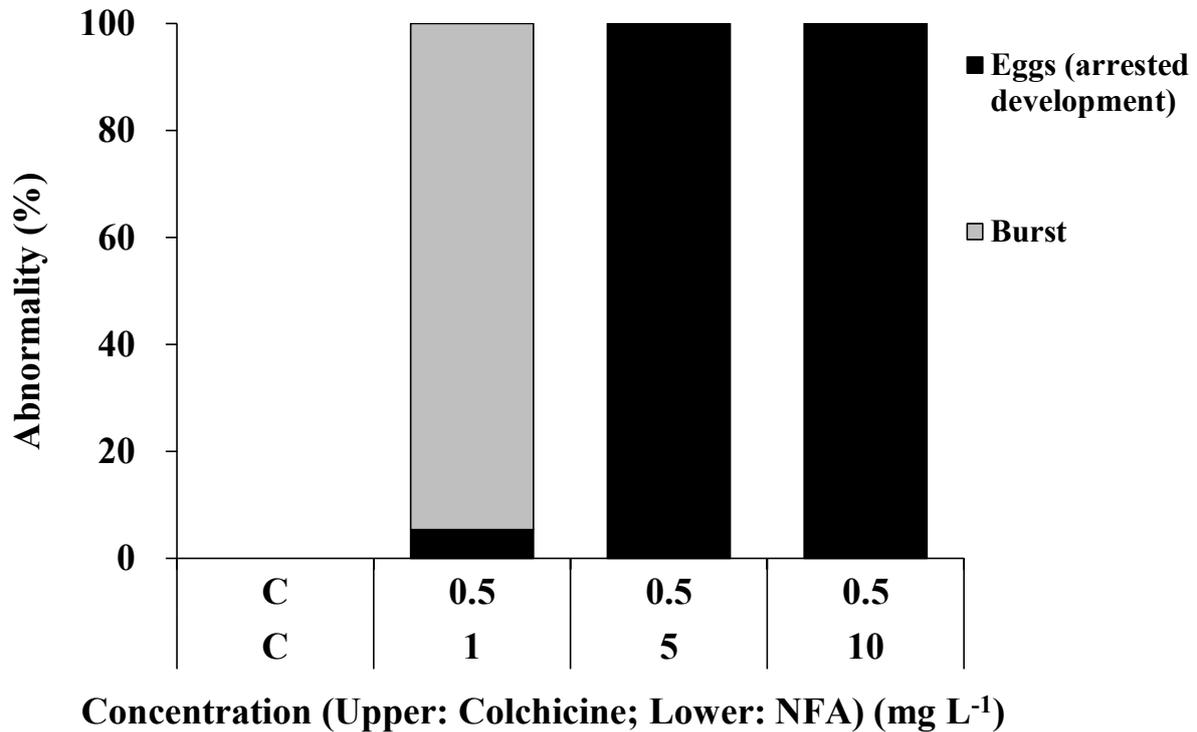


Fig. 24. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of NFA and colchicine.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then treated with or without (C) 1-10 mg L⁻¹ NFA and 0.5 mg L⁻¹ colchicine simultaneously. $n=15$ in without (C) and 81-93 in the treated groups. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition.

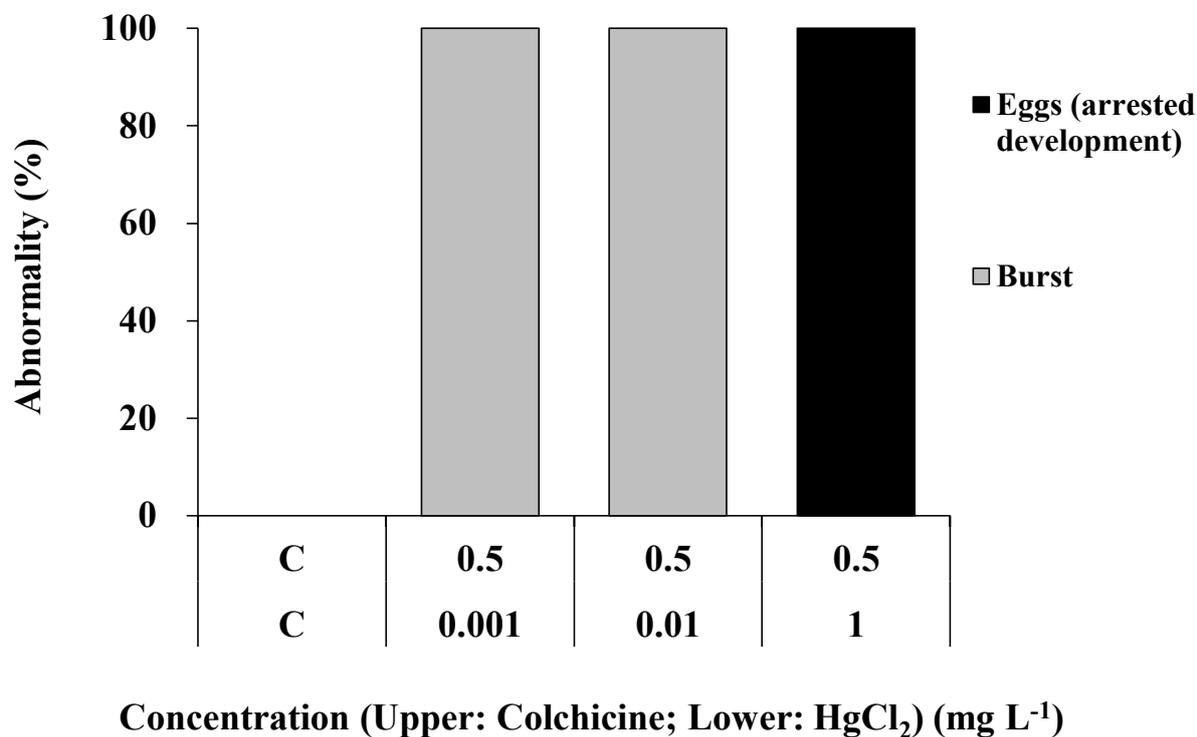


Fig. 25. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of HgCl₂ and colchicine.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then treated with or without (C) 0.001-1 mg L⁻¹ HgCl₂ and 0.5 mg L⁻¹ colchicine simultaneously. *n*=14 in without (C) and 73-80 in the treated groups. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition.

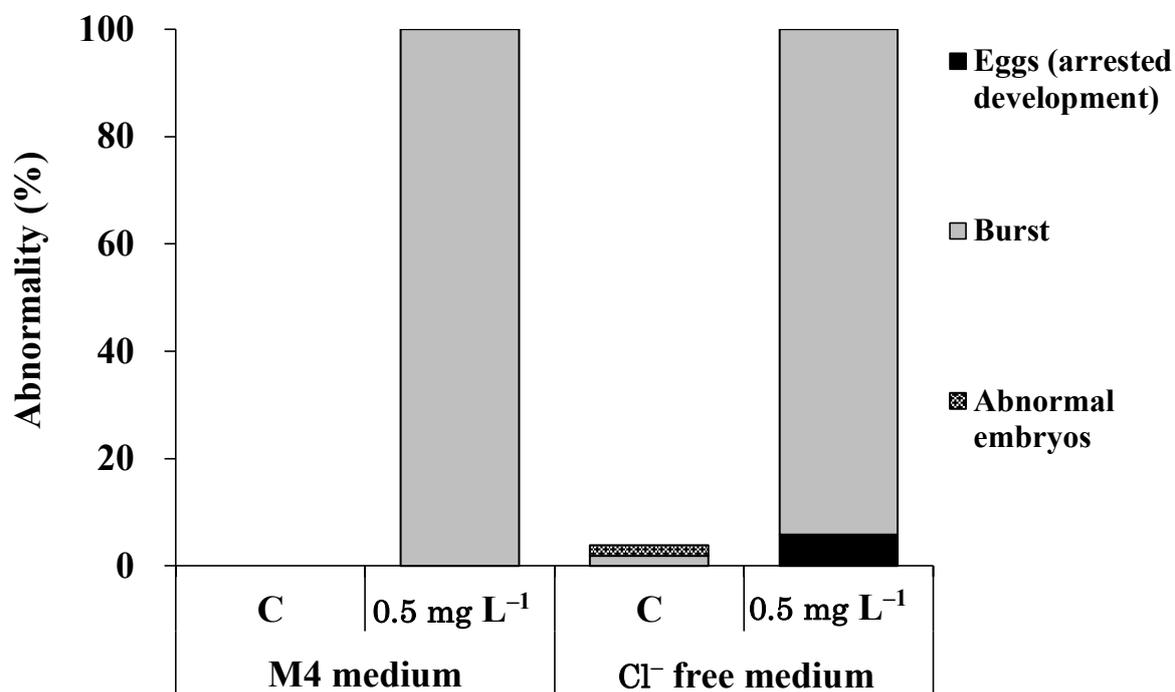


Fig. 26. The developmental abnormalities of *Daphnia magna* embryos caused by the exposure of colchicine in M4 medium or Cl⁻ free medium.

Embryos of 3-4 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to colchicine in Cl⁻ free medium. Data are presented as the mean value at 72 hours after oviposition. M4 medium: $n=23-25$ in with or without (C) colchicine exposure group; Cl⁻ free medium: $n=51-52$ in with or without (C) colchicine exposure group.

れた。

浸透圧が胚発生に及ぼす影響を明らかにするため、低張液(脱塩素水道水およびイオン交換水)中での胚発生を調べた結果、胚は脱塩素水道水中で90%以上が正常に発生したが(Fig. 27A)、イオン交換水中で70%以上が発生停止し、球状を呈したままであった(Fig. 27B)。

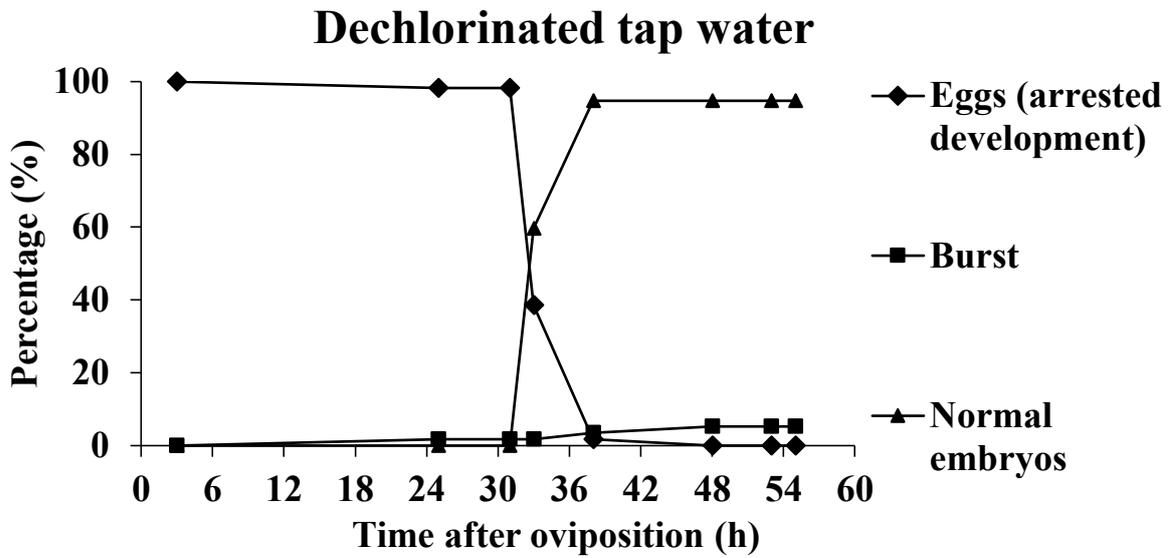
VI-4 考察

水の受動輸送に関わる Cl^- チャネルと水チャネルは生物、特に胚や卵、細胞にとって重要であり、これらの機能の阻害は胚の崩壊を引き起こしうるものと考えられる。本研究では、コルヒチンによる胚の崩壊作用について、チャネルでの水の透過/排出が阻害されることで浸透圧調節が妨げられ、胚発生の停止や胚の崩壊が引き起こされる、と仮説を立て、検証実験を行った。

複数の両チャネルに対する阻害剤を暴露した結果、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、両チャネルの阻害剤暴露によっても胚発生が阻害されることが本研究で明らかとなった(Figs. 17~23)。しかしながら、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^- チャネル:NFA, 水チャネル:塩化水銀(II))の症状はコルヒチンと異なった(Figs. 16, 18, 20)。DIDSを含むスチルベン誘導体は、クロライド・トランスポーター阻害作用を有するばかりでなく、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} チャネルなど種々のイオンチャネルに対する抑制作用も持つ(頼・西 2003)。クロライド・トランスポーターには様々な種類があるだけでなく、それに対する阻害薬の作用にも様々な非特異的薬理的側面があるとされることから(頼・西 2003)、NFAも Cl^- チャネル阻害以外の作用によって胚の崩壊を引き起こした可能性もある。塩化水銀(II)の暴露では、発生異常が一定の割合(20%以上)で認められたが(Fig. 20)、塩化水銀(II)はヒト赤血球やニジマス鰓における Ca^{2+} -ATPaseの阻害等も知られることから(Hogstrand et al. 1996, 1999)、AQP以外の阻害作用によって胚発生の異常を生じた可能性が考えられる。

イオンを介した水透過性(Cl^- チャネル)あるいはイオンを介さない水透過性(AQP)が胚の崩壊

(A)



(B)

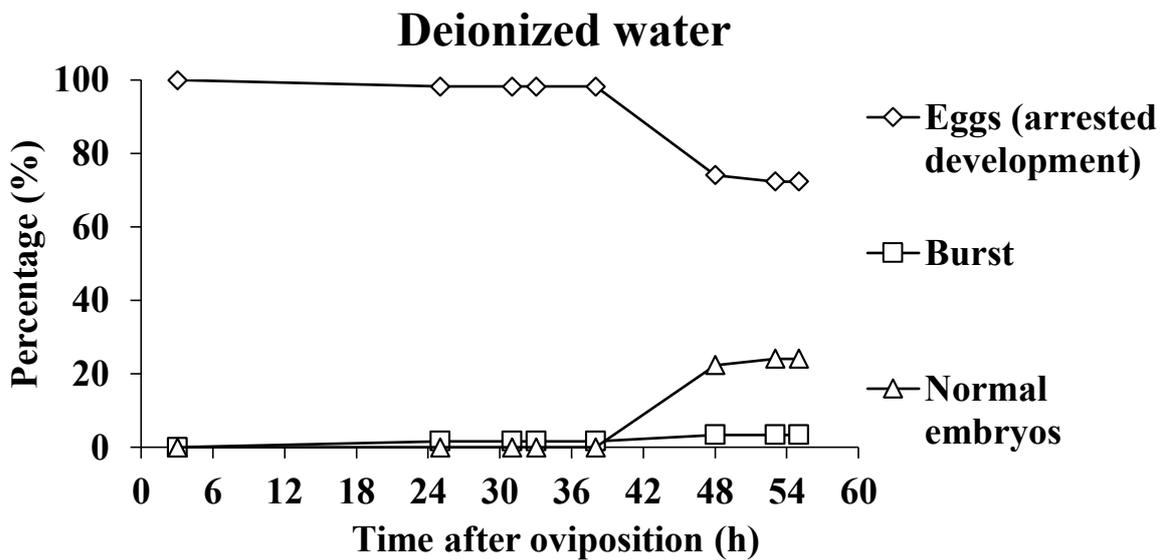


Fig. 27. The temporal variations in the proportion (%) of abnormalities in low-osmotic medium.

Embryos of 3 hours after oviposition were isolated from brood chamber of adult female cultured in the Elendt M4 medium, and then exposed to dechlorinated tap water (A) or deionized water (B). Data are presented as the mean value during the test period. $n=57-58$.

に關与するかを調べるため、コルヒチンとCl⁻チャネルまたは水チャネル阻害剤を同時にオオミジンコ胚に暴露したが、胚の崩壊作用はNFAや塩化水銀(Ⅱ)を単独暴露した場合に比べ緩和されなかった(Figs. 24, 25). 胚の崩壊性に変化がみられなかった理由として、(1)暴露濃度やタイミングが適していなかったために、イオンを介した水透過性あるいはイオンを介さない水透過性がブロックされなかった可能性、(2)胚崩壊には、イオンを介した水透過性あるいはイオンを介さない水透過性のどちらも關与しない可能性、が考えられる。(1)について、チャネル阻害剤を前処理することにより(頼・西2003)、コルヒチンの暴露影響(胚の崩壊)に変化が生じるかを調べるのが、今後の検討課題である。(2)について、Cl⁻フリー培地中および低張液中(脱塩素水道水、イオン交換水)のいずれにおいても胚の崩壊が認められなかったこと(Figs. 26, 27)、コルヒチン暴露による胚発生の阻害作用は培地中のCl⁻濃度に影響されなかったことから(Fig. 26)、Cl⁻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。一方、水チャネル阻害剤(塩化水銀(Ⅱ)、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(Figs. 20, 22)、さらにAQP4を阻害する塩化亜鉛や塩化銅(Ⅱ)二水和物では発生異常(奇形)がほとんど生じなかった(Figs. 22, 23)。これらのことから、コルヒチン暴露による胚の崩壊は、水チャネルを特異的に阻害することで引き起こされている可能性が高いと考えられる。

第Ⅶ章 総括

第Ⅶ章 総括

コルヒチンは $\geq 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ の濃度でオオミジンコの繁殖を阻害し、その毒性は胚発生初期(産卵後10~24時間経過した段階)における阻害であることが明らかとなった(馬場ら 2016)。胚発生の阻害は他の物質(例えばテストステロンや殺虫剤クロルピリフォス等)でも報告されているが、コルヒチンによる胚全ての発生停止、および胚の崩壊という現象は、本研究で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、暴露開始時の胚の発生段階によって異なり、産卵前と産卵後の暴露で影響が異なった。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4時間経過した時点で観察されず、産卵後24時間経過した時点で阻害が認められた。

以上のことから、オオミジンコに対するコルヒチンの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^- 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節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ものの、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ると評価される。さらに本研究は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と考えられる。その理由は以下に述べるとおりである。

新規農薬の開発には、医薬品の開発と同じように膨大な費用と期間が必要であり、農薬となりうる

候補化合物が発見されてから製品として市場に出るまでに10年以上、また、探索研究や安全性試験等に要する費用として100～150億円あるいはそれ以上にのぼるといわれている(農薬工業会HP)。

農薬のヒトや環境生物に対する安全性担保や環境負荷の軽減に対する法規制は、世界的に年々厳しくなっており、これまで使用された農薬が使用できなくなったものも多い。低薬量で効力を示しながら安全性も優れる性質が求められるため新規農薬の開発は年々困難になってきており、農薬になる確率は5万分の1以下ともいわれる(農薬工業会HP)。膨大な数の有機合成化合物の中からより毒性の低い化合物を早期選抜することを目的とする探索研究において、より多くの化合物の毒性試験を効率的に実施すること、見出した毒性低減の糸口を化合物の合成展開に早くフィードバックさせることが必須である。本研究により、コルヒチンが示す特徴的な胚の発生停止や崩壊作用について把握できたため、毒性評価中の化合物が細胞分裂阻害作用を有するか否かの類推が可能となった。また、これらの毒性症状を指標として、オオミジンコに対する細胞分裂阻害作用が弱い、あるいは持たない化合物を選抜するための探索研究も可能となる。本研究における抱卵成体を用いた4日間暴露による短期繁殖試験ならびに胚発生阻害試験の手法では、農薬登録に必要な試験項目の一つであるオオミジンコ繁殖試験(21日間暴露)とほぼ同じ結果が得られた。これらの手法は、(1)暴露期間が短い、(2)被験物質の使用量が少ない、(3)産仔数の計数や顕微鏡観察等の所要時間と労力を削減できる、というメリットがあり、オオミジンコに対するコルヒチンの繁殖毒性を短期間かつ簡便に評価できる手法を確立したと言える。抱卵成体を用いた4日間暴露による短期繁殖試験ならびに胚発生阻害試験の手法は、21日間繁殖試験よりも効率的な毒性の評価が可能であり、期間の短縮に加え、胚に対する毒性や卵形成への影響も把握できることから、生態毒性の低い新規農薬の開発に貢献するものである。

謝辭

謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、多くの方々からご指導およびご協力を賜りました。本論文の主査として日本大学大学院生物資源科学研究科 廣海十朗教授、副査として同研究科専攻主任 上田眞吾教授、同研究科 荒功一准教授、獣医学研究科 杉谷博士教授に詳細な校閲を戴くとともに有益なご助言を頂きましたことを心から感謝申し上げます。

2013年より社会人博士課程の3年間および研究生として約1年間在籍させて頂いた生物環境科学専攻海洋環境学研究室では、廣海十朗教授、荒功一准教授、同生物資源科学部 小糸智子助教に研究の進め方とまとめ方、論文作成と終始懇切丁寧なご指導を賜りました。また、オオミジンコ胚のチューブリン免疫染色および胚の崩壊作用に及ぼす浸透圧調節の影響に関する実験では、同生物資源科学部獣医学科 杉谷博士教授に研究計画の立案、実験手法の問題点指摘、結果の解釈の仕方と多大なご指導を賜りましたことを深く御礼申し上げます。また、福山哲司博士をはじめとする同海洋環境学研究室の大学院生、学部生、卒業生の方々には、社会人の私を温かく迎え入れて下さったことを感謝致します。

東京薬科大学生命科学部応用生命科学科 時下進一博士には、同研究室卒業生であり現職場の同僚である大貫晋平氏を通じ、オオミジンコ胚の核染色手法について有益なご助言を頂戴しましたことに対して感謝致します。

日本曹達株式会社小田原研究所創薬解析研究部 平田晃一氏には、オオミジンコ胚の核染色と共焦点顕微鏡観察における実験手法について有益なご助言を頂戴しましたことに対して感謝致します。同 創薬生物研究部植物研究Gの皆様には、共焦点顕微鏡の使用許可を頂き感謝致します。また、同 農業化学品事業部登録部の皆様には、本研究遂行と他業務との兼務についてご理解と支援をいただきましたことを深く感謝いたします。

オオミジンコ胚の組織標本作成と観察について、株式会社新組織科学研究所の一色祐介氏、山本裕樹氏および関係者の皆様にご協力戴きました。オオミジンコ胚の電子顕微鏡観察では、日本電

子株式会社の高木孝志氏，服部隆氏にご協力戴くとともに，有益なご助言を頂戴しました．ここに感謝申し上げます．

本研究は，私が所属する株式会社日曹分析センター小田原事業所内にて業務の一環として実施しました．親会社である日本曹達株式会社の関係各位，ならびに株式会社日曹分析センター 佐野 慎亮社長，吉本哲夫前社長，中島信一専務，齋藤秀行所長のほか小田原事業所の関係各位には研究遂行上の理解と支援をいただきました．ここに深く感謝いたします．同第二研究部 藤掛登博士，松本建博士には，研究を遂行するうえで数々のご助言と励ましを賜りました．同 浦部千晶氏には，本研究全般の実験を共に遂行して頂き，多大なご協力を賜りましたことを感謝致します．同 大貫晋平氏には，オオミジンコ胚の核染色の実施ならびにチューブリン免疫染色法を検討して頂きました．同 新旧部員の伊東義兼博士，今村美雪氏，植田広之氏，岡本暁氏，鈴木喜和子氏，竹内彩乃氏，中村千穂氏および吉村智子氏には，オオミジンコの飼育，繁殖試験，顕微鏡観察用の胚採取の実施に協力頂きました．また，元上司であるフリーコンサルタントの雑賀修博士には，社会人博士課程に入学する前から研究の立案，遂行，まとめと論文作成まで終始懇切丁寧なご指導と叱咤激励を戴きましたことを深く感謝致します．

最後に，自分を理解し，これまで支えてくれた妻と子供達，親戚に心から感謝致します．

引用文献

引用文献

- Abe, T., H. Saito, Y. Niikura, T. Shigeoka & Y. Nakano 2001. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere* **45**: 487–495.
- 秋田天平・熊田竜郎・福田敦夫 2015. 塩素チャネル. 脳科学辞典 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/塩素チャネル>.
- 馬場康司・大貫晋平・松本 建・藤掛 登・浦部千晶・小糸智子・荒 功一・雑賀 修・広海十朗 2016. 細胞分裂阻害剤コルヒチンのオオミジンコ*Daphnia magna*の繁殖に及ぼす影響. 日本プランクトン学会報 **63**: 45–54.
- Dostál, V. & L. Libusová 2014. Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma* **251**: 991–1005.
- Dunham, H. H. & A. M. Banta 1940. Some effects of colchicine on heredity in *Daphnia longispina*. *Genetics* **25**: 310–325.
- Ebert, E., K. H. Leist, R. Hack & G. Ehling 1992. Toxicology and hazard potential of trifluralin. *Food Chem Toxicol.* **30**:1031–1044.
- Elendt, B.P. & W.R. Bias 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Wat. Res.* **24**: 1157–1167.
- Engel, A., Y. Fujiyoshi & P. Agre 2000. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.* **19**: 800–806.
- FRAC 2015.
<http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2016.pdf?sfvrsn=2>
- Finney, D. J. 1952. *Probit analysis* (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 318 pp.
- Hess, D. & D. Bayer 1974. The effect of trifluralin on the ultrastructure of dividing cells of the root meristem of cotton (*Gossypium hirsutum* L. "Acala 4-42"). *J. Cell Sci.* **15**: 429–441.

- Hess, F. D. & D. E. Bayer 1977. Binding of the herbicide trifluralin to *Chlamydomonas flagellar* tubulin. *J. Cell Sci.* **24**: 351–360.
- Hiroaki, Y., K. Tani, A. Kamegawa, N. Gyobu, K. Nishikawa, H. Suzuki, T. Walz, S. Sasaki, K. Mitsuoka, K. Kimura, A. Mizoguchi & Y. Fujiyoshi 2006. Implications of the auaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J. Mol. Biol.* **355**: 628–639.
- Hiruta, C & S. Tochinai 2012. Spindle assembly and spatial distribution of γ -tubulin during abortive meiosis and cleavage division in the parthenogenetic water flea *Daphnia pulex*. *Zool. Sci.* **29**: 733–737.
- Hogstrand, C., P.M. Verbost, S. E. Bonga & C. M. Wood 1996. Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **270**: 1141–1147.
- Hogstrand, C., P. M. Verbost & S. E. Bonga 1999. Inhibition of human erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by Zn^{2+} . *Toxicology*. **133**: 139–145.
- HRAC 2005. <http://www.hracglobal.com/>
- IRAC 2015. <http://www.irc-online.org/documents/moa-classification/?ext=pdf>
- 岩崎成夫 1994. 微小管系に作用する天然生理活性物質. *化学と生物* **32**: 153–159.
- Kast-Hutcheson, K., C. V. Rider & G. A. LeBlanc 2001. The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 502–509.
- Kikuchi, M., H. Onodera, A. Sato, K. Goto, K. Kato & J. Sawai 2014. Toxic effects of several heavy metal ions and their pyridithione complexes on *Daphnia magna* embryos. *Jpn. J. Environ. Toxicol.* **17**: 33–40.
- 小林昭雄 1985. 天然有糸分裂阻害物質. *化学と生物* **23**: 162–175.
- 小林昭雄 1991. 有糸分裂阻害剤の作用メカニズム. *日本農芸化学会誌* **65**: 1003–1007.
- 小林直正 1958. ウニ卵の分裂装置に対するデメコルチンの影響. *遺伝学雑誌* **33**: 286–295.
- LeBlanc, G. A., X. Mu & C. V. Rider 2000. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product

- 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environ. Health Perspect.* **108**: 1133–1138.
- 三須建郎・青木正志 2015. アクアポリン. 脳科学辞典 <http://bsd.neuroinf.jp/wiki/アクアポリン>.
- Mittmann, B., P. Ungerer, M. Klann, A. Stollewerk & C. Wolff 2014. Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo.* 5: 12. <http://www.evodevojournal.com/content/5/1/12>
- Morejohn, L. C. & D. E. Fosket 1984. Taxol-induced rose microtubule polymerization *in vitro* and its inhibition by colchicine. *J. Cell Biol.* **99**: 141–147.
- Morrow, D., D. Corrigan & S. Waldren 2001. Development of a bioassay for phytochemicals using *Daphnia pulex*. *Planta Med.* **67**: 843–846.
- Nakai, M., R. A. Hess, B. J. Moore, R. F. Guttroff, L. F. Strader & R. E. Linder 1992. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat. *J. Androl.* **13**: 507–518.
- 農薬工業会ホームページ <http://www.jcpa.or.jp/index.html>
- OECD 2004. *Daphnia sp., Acute Immobilization Test*. Test No. 202, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, 12 pp.
- OECD 2012. *Daphnia magna Reproduction Test*. Test No. 211, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, 25 pp.
- Palma, P., V. L. Palma, R. M. Fernandes, A. M. Soares & I. R. Barbosa 2009a. Endosulfan sulphate interferes with reproduction, embryonic development and sex differentiation in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**: 344–350.
- Palma, P., V. L. Palma, R. M. Fernandes, A. Bohn, A. M. Soares & I. R. Barbosa 2009b. Embryo-toxic effects of environmental concentrations of chlorpyrifos on the crustacean *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**: 1714–1748.
- Ribeiro, F., N. C. G. Ferreira, A. Ferreira, A. M. Soares & S. Loureiro 2011. Is ultraviolet radiation a synergistic stressor in combined exposures? The case study of *Daphnia magna* exposure to UV and carbendazim. *Aquat Toxicol.* **102**: 114–22.

- 佐藤正幸・姉帯正樹・南 収 2003. イヌサフラン(コルカチム)誤食による中毒事例. 北海道立衛生研究所報 **53**: 82–83.
- Scott, G.R. & K.A. Sloman 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* **68**: 369–392.
- Seidman, L. A. & J. H. Larsen 1979. Ultrastructure of the envelopes of resistant and nonresistant *Daphnia* eggs. *Can. J. Zool.* **57**: 1773–1777.
- Sobral, O., C. Chastinet, A. Nogueira, A. M. Soares, F. Goncalves & R. Ribeir 2001. *In vitro* development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **50**: 174–179.
- 鈴木雅一・田中滋康 2014. アクアポリンの構造, 機能, およびその多様性—脊椎動物を中心として. 生化学 **86**: 41–53.
- Tian, W., L. Qin, Q. Song, L. He, M. Ai, Y. Jin, Z. Zhou, S. You, Y. Long & Q. Yu 2010. A novel synthetic analog of 5, 8-disubstituted quinazolines blocks mitosis and induces apoptosis of tumor cells by inhibiting microtubule polymerization. *PLoS One* **5**(5):e10499.
- Toumi, H., M. Boumaiza, M. Millet, C. M. Radetskiv, Felten, C. Fouque & J. F. Férard 2013. Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Sci. Total Environ.* **458–460**: 47–53.
- Toyota, K., C. Hiruta, Y. Ogino, S. Miyagawa, T. Okamura, Y. Onishi, N. Tatarazako & T. Iguchi 2016. Comparative developmental staging of female and male water fleas *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* during embryogenesis. *Zool. Sci.* **33**: 31–37.
- 若林明子 2003. 化学物質と生態毒性(改訂版). 丸善, 東京, 457 pp.
- 頼 仲方・西 勝英 2003. クロライド・トランスポーター阻害薬の薬理作用の多様性. 心電図 **23**: 301–312.
- Yukutake, Y., Y. Hirano, M. Suematsu & M. Yasui 2009. Rapid and reversible inhibition of

aquaporin-4 by zinc. *Biochemistry*. **48**: 12059–12061.

Zaffagnini, F. 1987. Reproduction in *Daphnia*. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.* **45**: 245–284.