

19 アルテミアの孵化及び光走性におけるビスフェノールAの影響

—第3報—

1 動機

私たちの生物部の先輩たちが1999年より、自分たちの生活の中において口をつけたり食品に触れていることが多い環境ホルモンの一種であるビスフェノールAが生物に及ぼす影響についての研究をしてきました。それを引き継いで、昨年に続いて今年も環境ホルモンの研究をさらに深めて生きたいと思い、今年も実験を行いました。昨年は $20\mu\text{g}/\text{l}$ の濃度で影響が特に顕著に現れたので実験方法の改良と共にその追試を行い、さらに環境ホルモンが他にも何か影響を及ぼしているのではないかと考え調べてみたいと思いました。そして行動的なものを選び、濃度別の光走性の比較の実験を行いました。

2 材料と方法

(1) 実験動物

アルテミア

門：節足動物

綱：甲殻類

亜綱：鰓脚類

目：無甲類

科：ハウネンエビモドキ類

属：アルテミア類

種：アルテミア *Artemia salina*

ブラインシュリンプエッグスを使用。

(2) 実験方法

ア 溶液

ビスフェノールA 1g を99.5%エチルアルコール 50ml に入れ溶かす。この溶液を原液とする($20\text{g}/\text{l}$)。次に、マリンアートハイ(富田製薬株式会社)を水道水に溶かし人工海水(塩分濃度3%)をつくる。原液を人工海水に溶かしそれを希釈し実験群の溶液を作る。実験群の濃度は、 $2\mu\text{g}/\text{l}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{l}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{l}$ 、 $2\text{mg}/\text{l}$ 、 $20\text{mg}/\text{l}$ の5種類とした。対照群は人工海水のみ、

これらば溶液をミルソーという容器に 200ml ずつ入れる。

イ 飼育方法

水温を約 25°C にするために、恒温機の中にミルソーを入れ、熱帯魚用の照明で24時間明期とした。エアレーションは行わず、えさを与えない。

ウ 実験方法

【実験Ⅰ】

- ① 実験群5種類、対照群1つ、計6個ミルソーに乾燥卵を30個ずつ入れる。
- ② 卵を入れた日を0日目として、毎日、孵化して生存しているアルテミアの個体数を数える。3人で数え、一致するまで数え直した。数える時間は放課後の午後4時前後。
- ③ ミルソー内のアルテミアが死滅するまで数える。
- ④ ①～③を繰り返す。

【実験Ⅱ】

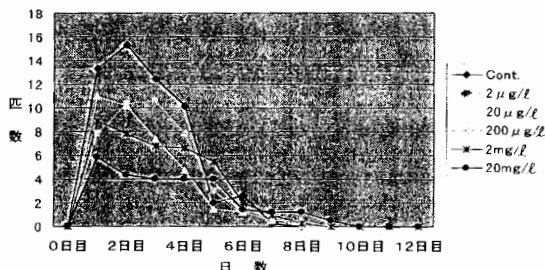
- ① 実験群5種類、対照群1つ、計6個のミルソーに乾燥卵を50個程度入れる。
- ② 卵を入れた日を0日目として、1日目から各群のアルテミアの光走性の実験を行う。
- ③ 黒いビニールのゴミ袋でミルソーを覆い、暗くしてミルソーの一方からペンライトで明かりを照らしアルテミア光の方向に 2cm 移動する時間をストップウォッチで測定する。
- ④ 6つの群を10匹ずつ測定する。
- ⑤ 1日目からミルソー内のアルテミアが死滅するまで(5日目から7日目)まで毎日測定する。
- ⑥ ①～⑤を繰り返す。

3 結果

実験Ⅰは全部で14回行った。ところが、対照群の卵の孵化率が悪く使えないデータも出てきてしまったので結局、6回の実験の結果の平均値を出した。その平均値を表1に示す。また、それをグラフ1に表す。

	対照群	2μg/l	20μg/l	200μg/l	2mg/l	20mg/l
0日目	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1日目	13.3	7.8	11.0	9.7	8.8	5.8
2日目	15.3	10.3	10.2	8.0	7.8	4.3
3日目	12.4	10.6	7.4	9.0	6.8	4.0
4日目	10.2	7.8	4.8	8.2	6.6	4.0
5日目	2.0	3.0	1.5	4.0	5.5	4.0
6日目	2.6	1.4	1.2	1.6	2.0	1.4
7日目	0.3	0.8	0.5	1.5	1.0	1.3
8日目	0.0	0.0	0.5	1.5	0.3	1.3
9日目	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.5
10日目	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
11日目	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12日目	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表1：5種類のBPA濃度の実験群と対照群の生存数



グラフ1：BPA濃度別および対照群(Cont.)の生存数

以上の結果から、3つの点がわかった。

1つ目は、対照群に比べ、ビスフェノールAを含む実験群では、孵化したアルテミアの数が少なくなっている。1日目の数を比べると対照群は13.3匹だが、実験群は5.8匹から11.0匹で平均は8.6匹で対照群の64.8%になっている。表2に対照群の生存数と比較した実験群および実験群の平均の生存数の比率を示す。表にあるとおり、4日目までは、どの濃度においても孵化率は対照群より少なくなっていることがわかる。

	2μg/l	20μg/l	200μg/l	2mg/l	20mg/l	実験群の平均
1日目	58.8	82.5	72.5	66.3	43.8	64.8
2日目	67.4	66.3	52.2	51.1	28.3	53.0
3日目	85.5	59.7	72.6	54.8	32.3	61.0
4日目	76.5	47.1	80.4	64.7	39.2	61.6

表2：対照群の生存数と比較した時の各濃度および実験群の平均の生存数の比率(%)

2つ目は、20mg/lの高濃度で特に孵化した数が少なくなっている。対照群と比べると3日目までは半分以下になっていて、2日目では28.3%と特に少なくなっている。他の濃度と比べても20mg/lは著しく少ない数字となっている。表3に対照群および各濃度の生存数と比較した時の20mg/lの生存数の比率を示す。

	対照群	2μg/l	20μg/l	200μg/l	2mg/l
1日目	43.8	74.5	53.0	60.3	66.0
2日目	28.3	41.9	42.6	54.2	55.3
3日目	32.3	37.7	54.1	44.4	58.8
4日目	39.2	51.3	83.3	48.8	60.6

表3：対照群および各濃度の生存数と比較した時の20mg/lの生存数の比率(%)

3つ目は、20μg/lで2日目以降のアルテミアの生存数の減少が著しく、1日目から4日目までの3日間で生存数は11.0匹から4.8匹に減りその減少率は56.4%であった。2μg/lの減少率は0.0%、200μg/lの減少率は15.5%、2mg/lの減少率は25.0%、20mg/lの減少率は31.0%でありこれらと比べると20μg/lの減少率は2倍前後あり、1日目から4日目までの3日間でより多く死んでいるのが分かる。

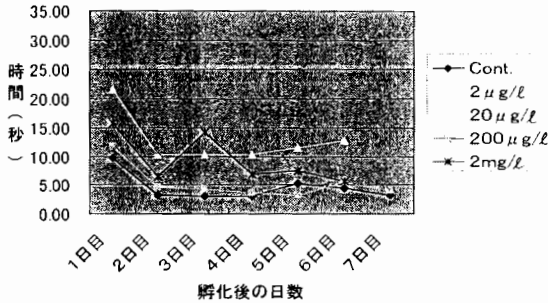
実に実験Ⅱの結果を下に示す。実験Ⅱは3回行った。20mg/lはアルテミアの孵化が少なく、実験ができなかった。

アルテミアがペンライトの光に向かって2cm移動するのに要する時間(秒)の平均値を各濃度別に7日間のデータを表4に示した。また、それをグラフに表したのがグラフ2である。

	対照群	2μg/l	20μg/l	200μg/l	2mg/l
1日目	9.77	11.83	21.65	28.62	15.78
2日目	3.28	4.75	10.35	10.79	6.48
3日目	3.13	4.35	10.29	5.39	14.07
4日目	2.97	3.61	10.31		6.98
5日目	5.25	3.16	11.57	3.73	7.54
6日目	4.41	5.49	12.77	5.63	5.67
7日目	3.32	4.12			4.15

表4：4種類のBPA濃度の実験群と対照群の光方向に2cm移動するのに要する時間(秒)

濃度別光走性の差



グラフ2：4種類のBPA濃度の実験群と対照群の光方向に2cm移動するのに要する時間(秒)

対照群が、4日目までは1番短時間で2cmを移動している。実験群では時間が多くかかっていることがわかる。その中で特に20 $\mu\text{g}/\ell$ が多く時間がかかっている。3日目以降は対照群も他の濃度も差はなくなってきたが、20 $\mu\text{g}/\ell$ だけは3日目以降も6日目まで一定して時間が対照群の2倍以上かかっている。

4 考察

ビスフェノールAがアフリカツメガエルの初期発生やプラナリアの再生に影響を及ぼしたようにアルテミアにも昨年に続いて今年も影響を及ぼしたという結果が得られたことは意味深いものであると考えられる。さらに、光走性という行動においても影響が現れたことが大きな発見であった。

まず、実験IでビスフェノールA溶液では実験したどの濃度でも孵化数を減少させているという結果が得られた。1日目の孵化数が対照群と比べて43.8%から82.5%となっている。アフリカツメガエルの発生実験でも死亡率が増加したし、プラナリアの再生でもその速度を遅らせたという過去の本校生物部の実験結果と合わせてもこのビスフェノールAが卵の発生や再生という未分化の細胞が分化していく過程のどこかで何らかの作用を及ぼしているのではないかとということが考えられる。また、実験IIより光走性においてもビスフェノールAは影響を及ぼすことがわかった。光に対する反応が遅れたのか泳ぐ速度が遅くなったのかは今回の実験ではわからないが何らかの影響を与えたと考えられる。アルテミアは5日目までにはほぼ複眼が形成されるが、それ以前はノープリウス眼があり、それにより光を感知している。そのノー

プリウス眼および複眼の形成に影響を与えたことも考えられる。ビスフェノールAの濃度による複眼の形成時期と光走性の関係について発展させて実験を行うとその関係がわかってくるかもしれない。このビスフェノールAにはエストロゲン様作用があるので、ビスフェノールAによりその生物が本来もつホルモンバランスが崩れ、細胞生成に何らかの影響をもたらす可能性が高いと考えられる。そしてこの作用が脊椎動物、扁形動物、節足動物という異なるのいずれの生物においても現れたということが重要で、このことからこれ以外の生物にも影響があるのではないかとすることも考えられる。アルテミアによく似たホウネンエビは農薬の影響を受けてその年により孵化する数が異なってくるという。同様にビスフェノールAでもその様な影響を受けるかもしれない。また、ビスフェノールAのエストロゲン様作用により行動の活発性を抑制して泳ぐ速度を遅らせるという影響も考えられる。このように様々な生物に影響があるとすると人間を含めて危険な状態にさらされている可能性があるということになる。

次に、20 $\mu\text{g}/\ell$ という濃度が3つのすべての生物に影響を及ぼしているという共通点があげられる。今回の実験ではこの20 $\mu\text{g}/\ell$ で孵化後の生存を抑制する傾向が見られ、かつ、光走性においても行動の抑制をする傾向が見られた。孵化においては、孵化そのものにも抑制はするがそれ以上に特徴的な結果として2日目以降の生存数の激減が目立った。光走性においては、6日目まで常に行動を抑制し続けるという他の濃度にはない結果が見られた。このことから20 $\mu\text{g}/\ell$ の濃度は何らかの異常を実験動物に引き起こしやすいものと思われる。アルテミアの幼生が約0.4mm、アフリカツメガエルの卵は約2.0mm、プラナリアは体長20~25mmであり、このことから、その生物の大きさ如何にかかわらず、20 $\mu\text{g}/\ell$ の濃度で何らかの影響が現れることがわかる。よって、生物の大きさによる差ではなくこの濃度そのものが生物にとって影響を受けやすい濃度ではないかということが予想される。

さらに、ビスフェノールAの影響が顕著に現れる濃度を2つ見出すことができた。1つ目の濃度は上で述べた20 $\mu\text{g}/\ell$ で、この濃度では孵化後の生存を抑制することが見られた。2つ目の濃度

は20mg/ℓで、この濃度では孵化を大きく抑制することが見られた。このように濃度の差により異なった影響を生物に及ぼすという面白い結果が得られた。環境ホルモンではこのように高濃度と低濃度で異なる影響を及ぼすことはあるようだ。体内にあるホルモンでも多すぎても少なすぎても正常に働かず適量がいいように、環境ホルモンでも高濃度と低濃度で影響が現れやすいのかもしれない。

以上、今回の実験でビスフェノールAがアルテミアの孵化に及ぼす影響として4つのことが分かった。1つ目は、ビスフェノールAはアルテミアの孵化と光走性を抑制するという。2つ目は、20mg/ℓが特に孵化の抑制の作用が大きかったということ。3つ目は、20μg/ℓが孵化後の生存を抑制し、光走性を長く抑制するという。4つ目は、ビスフェノールAは高濃度と低濃度でアルテミアに異なる影響を及ぼすということ。その中で、20μg/ℓという濃度で今までの私たち生物部で行われたアフリカツメガエル、プラナリア、アルテミアの孵化、アルテミアの光走性の実験すべてで影響が現れたことが特筆すべきことであり、発見であった。

5 感想

僕たちは先輩たちが長年続けてきた「環境ホルモン」というテーマに興味を持ち、今回は去年の方法・データも参考にし、いろいろな工夫をしながらビスフェノールAがアルテミアの孵化に及ぼす影響について調べてきました。

今年は昨年からさらに実験の数も増やして行いました。恒温機を使ってみたのが水温を安定させるのに役に立ちました。

昨年も実験を10回行いましたが、今年はさらにデータを増やすためにより多く実験を行いました。1回の実験に1週間かかるのでせっかく行った実験のデータは全部使いたかったが、今年も孵化率が悪い週があり、使えないデータも多くあり残念でした。

実験が一段落した後、今回の実験にかかわる資料をインターネットを中心に探し出し、なぜこのような結果が出たのか原因を突き止めていくのは大変でした。しかし、それはおもしろく、自分のためになったと思います。そして、アフリカツ

メガエル、プラナリアに続きアルテミアでも同じようにビスフェノールAにより影響が現れるということが、さらに濃度によってその効果が少し変わってくるのではないかとということがわかり、面白い結果だと再認識しました。そして何より、今まで行ったことがなかった行動実験でも影響が現れたという点に喜びを感じました。

今回、最近話題の環境ホルモンというものにも少しでも触れることができたことは良かったと思います。そしてこの問題は、生物の孵化や行動等様々な面に影響を及ぼしていることがわかり無視して置けないし、たくさんの人に知って欲しいと思いました。また、環境ホルモンという物質は現代社会が生んだ問題であり日常にあふれているので、便利になることへの代償は大きいと思いました。

今回はさらに孵化・行動以外に影響が現れるのか。例えばアルテミアの奇形についてや脱皮サイクルに与える影響、複眼の形成時期などについて調べていきたいと思います。そして、環境ホルモンについての道が少しでも開けていけたらいいと思いました。

6 参考文献

- ・アルテミアにおける内分泌攪乱化学物質の影響：静岡大学理学部生物地球環境科学科
4年 2003年度卒論研究 湯山育子
- ・アルテミアの飼育法：南部滋郎、田中晋、南部文子、産業医科大学産業保健学部
第一生体情報学講座
- ・室内で簡単に飼育できるアルテミア：水越虔二、遺伝1968vol123
- ・アルテミア：石原勝敏編著、動物発生段階図譜、共立出版株式会社
以下インターネットのホームページより
- ・海猿の部屋
- ・ビスフェノールAと内分泌攪乱化学物質
- ・オレと怪洋
- ・ポリカーボネート樹脂とビスフェノールAに関するQ&A
- ・イソフラボン効果・女性ホルモン相似作用
- ・あるある大辞典II