

8 アルテミアにおけるビスフェノールAの影響

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。環境ホルモンという言葉は私たちが小学生の時から耳にしていた言葉でしたが、その内容は全くといっていいほど無知で分かったことといえば人体に悪い影響があるといった程度でした。そして高校のサイエンス部生物班に入り、先輩方の環境ホルモンの研究のことを聞いた時に非常に興味を持ち、自分たちでも研究をしたいと思い研究を始めました。先輩方はアフリカツメガエルの初期発生に及ぼす影響、プラナリアの再生に及ぼす影響という内容について研究していました。その結果は、どちらの生物でも $20\mu\text{g}/\ell$ の濃度で発生速度・再生速度が遅くなり、アフリカツメガエルの初期発生では、死亡率が増加し、プラナリアの再生では、奇形が生じるなどの影響が見られたというものでした。そこで私たちは同じ水の中で生活する生物だが両生類でも扁形動物でもない節足動物のアルテミアを材料に昨年から研究してきました。脊椎動物で影響が現れたので、節足動物でも何か影響があるのではないかと思い、また、自然の水中にはプランクトン等の多くの節足動物が生息しているので環境ホルモンの影響を受けやすい環境にいるのではないかと思い、節足動物を実験動物として選びました。そして、実験生物として入手しやすいアルテミアを使用しました。しかし、昨年は調べた濃度の数が少なかったりなど、かなり不十分な点が多かったので、今年はさまざまな工夫をして、再度実験を行うことにしました。

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：ホ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 1 g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($20\text{ g}/\ell$)。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、 $2\mu\text{g}/\ell$ 、 $20\mu\text{g}/\ell$ 、 $200\mu\text{g}/\ell$ 、 $2\text{ mg}/\ell$ 、 $20\text{ mg}/\ell$ の5種類とした。対照群は人工海水のみ。これらの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 28°C にするために、置く場所を生物室の直射日光の当たらない場所にし、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、えさは与えない。

ウ 実験方法

- 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30個ずつ入れる。

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4時前後。

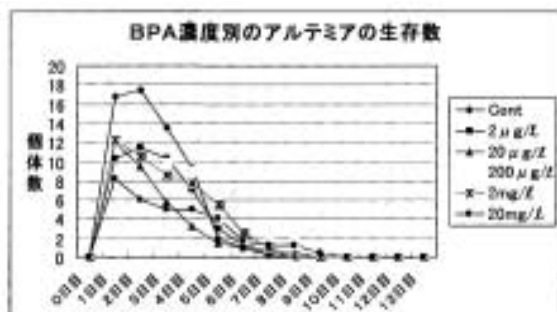
- ② ミルソー内のアルテミアが死滅するまで数える。

3 結果

実験は全部で10回行った。ところが、対照群の卵の孵化率が悪かったり、水温が低くなったりと、使えないデータも出てきてしまったので結局、4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。実験の1回目はデータが得られたが、2回目ではどの群でもほとんど孵化しなかった。乾燥卵が古かったので新しい卵と買い換えた。よって、1回目と2回目の結果は使えなくなった。新しい卵の3回目から5回目の実験では対照群で孵化した数が非常に少なかった（卵30個中7匹以下）。また、他の群も孵化した数が少なかったために使わなかった。孵化しなかった理由として温度が低かったことが考えられる。10回目の実験では10月の遅い時期だったので、温度が低くなり、全体的に孵化した数が少なかったために使えなかった。その結果、対照群の孵化数が30個中15匹以上で50%以上であった4回目から7回目までの4回分の実験のデータを使った。

	対照群	2 μ g/L	20 μ g/L	200 μ g/L	2mg/L	20mg/L
0日目	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1日目	16.8	10.3	12.0	12.0	12.3	8.3
2日目	17.5	11.5	9.5	10.5	10.5	6.0
3日目	13.5	10.3	5.8	10.0	8.5	5.0
4日目	9.3	7.0	3.3	9.0	7.8	5.0
5日目	2.0	3.0	1.5	4.0	5.5	4.0
6日目	1.0	1.5	1.0	2.0	2.5	1.8
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：B濃度の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(Control)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16.8匹だが、実験群は8.3匹から13.0匹で平均は11.2匹で対照群の3分の2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。

	2 μ g/L	20 μ g/L	200 μ g/L	2mg/L	20mg/L	実験群の平均
1日目	61.3	71.4	77.4	73.2	49.4	66.7
2日目	65.7	64.3	60.0	60.0	34.3	64.9
3日目	76.3	43.0	74.1	63.0	37.0	58.5
4日目	75.3	35.6	96.8	83.9	53.8	68.8

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、20 mg / 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34.3%と特に少なくなっている。他の濃度と比べても3日目までは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	2 μ g/L	20 μ g/L	200 μ g/L	2mg/L
1日目	49.4	80.6	69.2	63.8	67.5
2日目	34.3	52.2	63.2	57.1	67.1
3日目	37.0	48.5	86.3	50.0	58.8
4日目	53.8	71.4	151.6	55.6	64.1

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、20 μ g/ 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12.0匹から3.3匹に減りその減少率は72.5%であった。2 μ g/ ℓ の減少率は32.0%、200 μ g/ ℓ の減少率は30.8%、2 mg / ℓ の減少率は36.6%、20 mg / ℓ の減少率は39.8%でありこれらと比べると20 μ g/ ℓ の減少率は2倍前後あり、より多く死んでいるのが分かる。

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。

まず、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49.4%から77.4%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考えられる。このビスフェノールAは生物濃縮がおこる濃縮係数100を大幅に下回る5.1~61であり、なおかつ生分解性についても馴化活性汚泥では4日間で30分の1に分解されるということが判明しており、さらにエストロゲン様作用の他に、目立った生物に対する悪影響も発見もない。よって、エストロゲン様作用によって孵化率が低下したと言うものである。エストロゲンは卵胞ホルモンという女性ホルモンの一つで生物の細胞を活性化させる働きをもっている。そして、その作用により、アルテミアやアフリカツメガエルの孵化やプラナリアの再生において、それらの細胞に関して何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えられる。その理由としては、エストロゲン様作用があるということは、その生物の細胞の活性不活性に深くかわるためである。人間の細胞は性ホルモンが枯渇すると急激に新陳代謝が低下する。これは、人間の性ホルモンが細胞の生成や再生に必要な物質であるためであり、これは、当然、同じ動物であるアルテミアやプラナリア、カエルにも当てはまることがらである。つまり、エストロゲン様作用があるということは、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いうことになるからである。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。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た。孵化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。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、今回は実験濃度を増やしたためにビスフェノール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20 mg/ℓ で、この濃度では孵化を大きく抑制することが見られる。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そうだ。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なく適量がいいように、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を抑制するということ。2つ目は、20 mg/ℓ が特に抑制の作用が大きかったということ。3つ目は、20 $\mu\text{g}/\ell$ が孵化後の生存を抑制するということ。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。

5 感想

私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。

今年は実験の数も増やし、ビスフェノールAの実験群も5種類にし時期も温度の安定した5～7月と9月、10月に行いました。それでも、温度を十分安定させることはできなかったのも、よりよい方法を考えていきたいと思います。

初めて行う実験では耐久卵は小さいし、孵化したばかりのアルテミアは小さいうえに動くので数えるのは難しかったし、時期も限られていることから焦りを感じました。しかし、だんだん慣れていき、実験が進むにつれ去年のデータよりおもしろい結果がでるのではないかと期待が高まっていました。そして事実、昨年よりも実験回数も多くしっかりと興味深い結果を得られたと思います。

実験が一段落した後も、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、面白い結果だと再確認しました。

今回、最近話題の環境ホルモンというものに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。この問題は、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などについて調べていきたいと思っています。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1968 vo123
- ・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