

ウニ卵を用いる水質の生物試験法に関する研究(第2報) - 環境ホルモンによるウニ卵への影響調査 -

Research on Biological Examination of Water Quality Using Spawns of Sea Urchin(2) Effect of Endocrine Disruptors on Spawns of Sea Urchin

白井康子 岡市友利
Yasuko SHIRAI Tomotoshi OKAICHI

要 旨

内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質としてリストアップされた65物質¹⁾の中から、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル, 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン(DBCP), アミトロール, ペンタクロロフェノール(PCP), カルバリル(NAC)の5物質を選び、ムラサキウニ *Anthocidaris crassispina* 及びバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* の初期発生に対する影響を調査した。

この結果、2種のウニで感受性にやや差が認められるものの影響濃度及び影響の態様について、ほぼ同様の傾向を示した。2細胞期には、PCPが10mg/ℓで受精を著しく阻害し、1mg/ℓでも受精はするものの卵割が阻害された。他の4物質は2細胞期における影響は少なかった。しかしながら、ブルテウス期には、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル及びNAC10mg/ℓでバフンウニが100%、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル1mg/ℓ, PCP及びNAC10mg/ℓでムラサキウニがほぼ100%の異常を示した。

これらの5物質についてNOEC(無影響濃度)を推定し、その値はアジピン酸ジ 2 エチルヘキシル0.01mg/ℓ, 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン(DBCP)1mg/ℓ, アミトロール0.1mg/ℓ, ペンタクロロフェノール(PCP)0.01mg/ℓ, カルバリル(NAC)1mg/ℓであった。

キーワード：環境ホルモン, ウニ, 生物検定, NOEC(無影響濃度)

I 緒言(はじめに)

ウニ卵発生法は、1個体のウニから同じ条件にある卵または精子が大量に得られ、人工授精も容易で短時間で発生結果を観察できること、また、比較的感受性が高いことなど²⁾から、生物検定にしばしば用いられる方法である。

本法を用いた生態系調査が、豊島周辺海域環境モニタリングの一部として平成11年より開始された。平成12年度より小林直正同志社大学名誉教授の指導のもと香川県環境保健研究センターが調査を継続することとなった。当センターでは、この調査を通じて得られた技術を用い、環境中の化学物質が生態系に与える影響を評価するための調査研究を平成13年度より開始し、平成13年度には、シマジン、フタル酸ジブチル、ビスフェノールA、トリブチルスズ(TBTO)、2,4 ジクロロフェノキシ酢酸の

5物質について調査を実施し、これらの物質がウニの初期発生に影響を及ぼすことを明らかにした。³⁾これらの物質はいずれも内分泌攪乱化学物質問題についての環境省の基本的な考え等をまとめた「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」¹⁾で内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質としてリストアップされた物質である。

平成14, 15年度には、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル, 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン(DBCP), アミトロール, ペンタクロロフェノール(PCP), カルバリル(NAC)の5物質を選び、ムラサキウニ及びバフンウニの初期発生に対する影響を調査した。

本調査により、これら5物質によるウニの初期発生への影響が明らかになり、これら5物質及び溶媒として使用したジメチルスルホキシド(DMSO)についてNOEC(無影響濃度)を推定したので報告する。

II 方法

1 調査時期及び使用種

調査は平成15年3月及び8月の2回実施した。

ウニは生殖時期にあるものを使用するため、夏期（平成15年8月）はムラサキウニ *Anthocidaris crassispina*，冬期（平成15年3月）はバフンウニ *Hemicentrotus pulcherrimus* を使った。いずれも香川県庵治町沿岸で採取されたものである。

参考までに、ウニの生活環（ライフサイクル）⁴⁾を図1に示す。

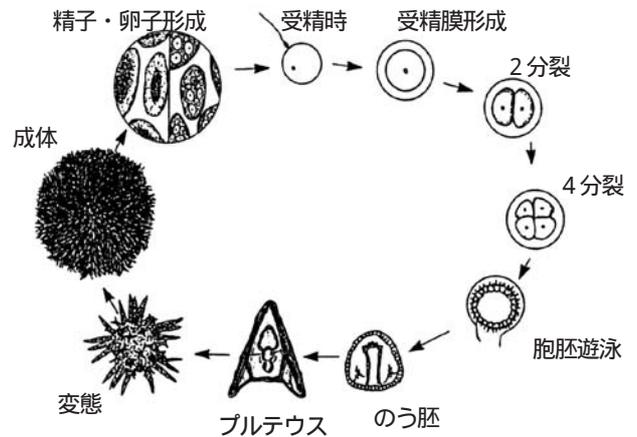


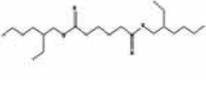
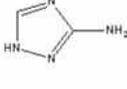
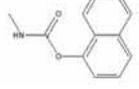
図1 ウニの生活環（ライフサイクル）

小林の論文より許可を得て転載

2 調査物質

内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質としてリストアップされた65物質¹⁾の中から、環境ホルモナー

表1 物理化学的性状等

	アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル (diethylhexyl adipate)	1,2 ジブromo 3 クロロプロパン (1,2 dibromo 3 chloropropane)	アミトロール (amitrole)	ペンタクロロフェノール (pentachlorophenol)	カルバリル (carbaryl-NAC)
CAS No	103 23 1	96 12 8	61 82 5	87 86 5	63 25 2
構造式及び分子量	 370.57	 236.33	 84.08	 266.34	 201.22
オクタノール水分配係数	log Pow 6.11	log Pow 2.96	log Kow -0.65	log Pow 5.01	log Pow 2.34
水溶解度	< 200mg/l (20degC)	1000mg/l (room temp.)	280g/l	14mg/l (20degC)	120mg/l (30degC)
DMSO 溶解度	10mg/ml (28degC)	100mg/ml (20degC)	100mg/ml (17.5degC)	Most organic solvents : Soluble	400-450g/kg (25degC)
Yeast two hybrid assay による NOEC	1.0 × 10 ⁻³ M (0.37mg/l)	1.0 × 10 ⁻³ M (0.24mg/l)	1.0 × 10 ⁻³ M (0.084mg/l)	1.0 × 10 ⁻⁵ M (0.0027mg/l)	1.0 × 10 ⁻⁴ M (0.020mg/l)
WHO 飲料水ガイドライン	0.08mg/l	0.001mg/l	-	0.009mg/l	-
主用途	プラスチック可塑剤	土壌用殺虫剤	除草剤, 分散染料, 写真薬品, 樹脂の硬化剤	除草剤(水田雑草), 防腐剤, 殺菌剤など	カーバメート系殺虫剤, 植物成長作用剤
その他	PRTR 法: 第一種	1958年農薬登録 1980年農薬失効 PRTR 法: 非該当	1962年農薬登録 1975年農薬失効 PRTR 法: 第一種	1955年農薬登録 1990年農薬失効 1971年水質汚濁性農薬 PRTR 法: 第一種 化審法: 第一種	1971年農薬登録 PRTR 法: 第一種

表は環境ホルモナーデータベース⁵⁾を参考に作成した。オクタノール水分配係数, 水溶解度, DMSO 溶解度は複数データが記載されている場合もあったが, そのうち代表的と思われるデータをデータベース記載の単位のまま引用した。

; () 内は換算値。

タベース(独立行政法人国立環境研究所HP)⁵⁾で、水溶解度、ジメチルスルホキシド(DMSO)溶解度について記載のあったもののうち比較的水溶性が高い物質として、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル, 1, 2 ジプロモ 3 クロロプロパン(DBCP), アミトロール, ペンタクロロフェノール(PCP), カルバリル(NAC)の5物質を選定した。

これら5物質をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し1000mg/l標準液を作成した。なお、溶媒に使用したジメチルスルホキシドは100倍希釈でウニ卵の初期発生に影響がない³⁾とされていた。

表1に調査対象物質の物理化学的性状等を示す。

3 調査方法

2%塩化アセチルコリン溶液のウニ体内注射により放卵させたウニ卵(ムラサキウニ:夏期, パフンウニ:冬期)を検水3mlを入れたミニシャーレ中で精子を加えて受精させた。2細胞期(受精約1時間後)及びプルテウス期(ムラサキウニ:32時間後, パフンウニ:48時間後)に10%ホルマリン水で固定し、正常な卵胚, 異常な卵胚を合計200個計数した。卵胚は媒精から第1回の固定まで室温で、それ以後は初期発生の適温²⁾に設定した恒温槽内(ムラサキウニ28℃, パフンウニ15℃)に置いた。

検水は、Control及び希釈水として香川県水産試験場のろ過海水(25µmメッシュによるろ過)を使用した。ろ過海水3.3mlに1000mg/l標準液(ジメチルスルホキシド溶液)33.5µlを添加して10mg/lとなるよう100倍に希釈した。ここから0.33mlをとり、ろ過海水3.0mlに加え10倍希釈とした。これを繰り返し10, 1, 0.1, 0.01mg/lの4段階の検水を作成した。

表2 有害度判定基準

影響度	段階	2細胞期		プルテウス形成 (異常胚) %
		1細胞 %	多細胞(多精) %	
強影響海水	3	50 100	15 100	50 100
中影響海水	2	30 49	9 14	30 49
弱影響海水	1	10 29	3 8	5 29
無影響海水	0	0 9	0 2	0 4

1回の試験では原則的に雌3個体より採った卵を用い、3検体のうち異常発生数の多いものにより小林の有害度判定基準²⁾に従い判定を行った。判定基準を表2に示す。また、ウニの発生段階及び各部の名称は「動物発生段階図譜」⁶⁾を参考とした。

III 結果

2種のウニで感受性にやや差が認められるものの影響濃度及び影響の態様について、ほぼ同様の傾向を示した。ただし、ムラサキウニでは、試験に適した卵が得られなかったため、2個体より得た卵を用いた結果について取りまとめを行った。

パフンウニによる調査結果を表3-1, ムラサキウニによる調査結果を表3-2に示した。

1 ブランク試験

ろ過海水では、パフンウニ, ムラサキウニともに無影響であった。DMSO 1/1000vol (0.1v/v%)では、パフンウニ, ムラサキウニそれぞれ弱影響, 無影響であった。

DMSO 1/100vol (1v/v%)では、プルテウス期に骨格異常が多く発生し弱影響と判定されており、DMSOの影響が疑われた。しかし、通常の海水であっても弱影響と判定されることはしばしば起こるので、今回の実験では特段の配慮は行わなかった。なお、この濃度は、1000mg/l標準DMSO溶液を10mg/lに希釈したときの濃度に相当する。

ブランク試験における異常発生率を図2, パフンウニ, ムラサキウニの正常な2細胞及びプルテウスを図3, 多精の例(ムラサキウニ)及びDMSO 1/100vol (1v/v%)で観察された骨格異常を図4にそれぞれ示している。

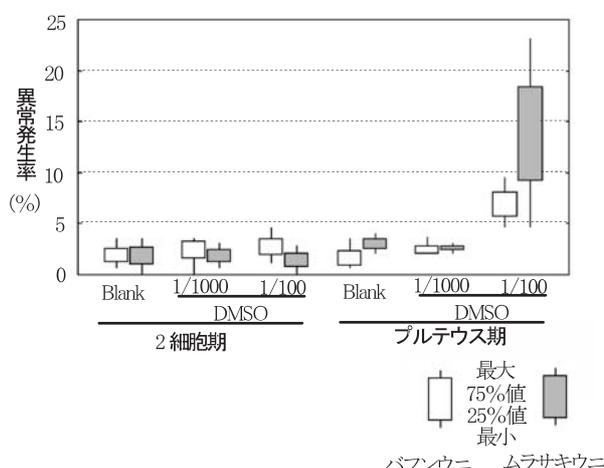


図2 ブランク試験における異常発生率

表3-1 バフンウニによる調査結果

平成15年3月3日 媒精時水温17, 第1回固定後15

試水	2細胞期 (90m)					ブルテウス期 (49h)					有害度 段階	異常の形態		
	正常 (%)	異常 (%)			平均	正常 (%)	異常胚 (%)			平均				
		1細胞	多精	計			遅滞	奇形	のう胚以前				計	
BL	96.5	1.5	2.0	3.5	1.9	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	0	無影響	
	98.3	0.6	1.1	1.7		97.0	0.0	0.0	3.0	3.0				
	99.5	0.0	0.5	0.5		96.5	1.0	1.5	1.0	3.5				
BL DMSO	1/100 vol	98.0	0.5	1.5	2.0	2.5	93.5	0.0	5.0	1.5	6.5	6.8	1	BL, BL(DMSO)1/1000vol と比べ骨格異常が認められたが、弱影響と判定された。
		98.0	1.0	1.0	2.0		90.5	2.5	7.0	0.0	9.5			
	1/1000 vol	96.4	1.5	2.1	3.6	2.7	95.5	1.0	2.5	1.0	4.5	1.7	1	弱影響
		99.0	0.5	0.5	1.0		96.5	1.0	0.5	2.0	3.5			
		97.5	2.0	0.5	2.5		99.0	0.5	0.0	0.5	1.0			
		95.5	0.0	4.5	4.5		99.5	0.5	0.0	0.0	0.5			
アジピル ヘキシ 2ル	10	97.0	2.0	1.0	3.0	3.8	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	3	2細胞期には無影響と判定されたが不均等な卵割が認められた。ブルテウス期にはのう胚以前で発生が停止し、強影響と判定された。
		97.5	1.0	1.5	2.5		0.0	0.0	0.0	100.0	100.0			
		94.0	3.0	3.0	6.0		0.0	0.5	0.0	99.5	100.0			
	1	99.4	0.0	0.6	0.6	2.9	88.0	8.5	2.5	1.0	12.0	48.5	3	2細胞期には無影響と判定された。ブルテウス期には発生が著しく遅滞した他、のう胚以前で発生停止が認められ、強影響と判定された。
		93.8	2.5	3.7	6.2		56.5	34.0	0.5	9.0	43.5			
		98.0	0.5	1.5	2.0		10.0	66.5	0.5	23.0	90.0			
	0.1	98.5	1.0	0.5	1.5	1.9	94.5	0.0	3.5	2.0	5.5	5.3	1	弱影響
		96.9	2.6	0.5	3.1		96.0	1.5	1.0	1.5	4.0			
	0.01	99.0	1.0	0.0	1.0	2.7	93.5	3.0	2.0	1.5	6.5	5.2	1	弱影響
		97.0	0.5	2.5	3.0		93.5	2.0	2.5	2.0	6.5			
		96.9	3.1	0.0	3.1		96.5	0.5	0.5	2.5	3.5			
	1、2、クロ プロベン 3	10	100.0	0.0	0.0	0.0	4.0	92.0	5.5	1.5	1.0	8.0	47.3	3
93.5			2.4	4.1	6.5	43.0		48.5	1.0	7.5	57.0			
94.5			2.5	3.0	5.5	23.0		68.0	2.0	7.0	77.0			
1		94.0	0.7	5.4	6.0	4.0	92.5	1.0	1.5	5.0	7.5	4.8	1	弱影響
		96.3	3.7	0.0	3.7		97.5	0.0	1.5	1.0	2.5			
		97.7	0.8	1.5	2.3		95.5	1.5	1.0	2.0	4.5			
0.1		96.1	0.0	3.9	3.9	2.8	95.0	0.5	3.0	1.5	5.0	3.5	1	弱影響
		97.5	2.0	0.5	2.5		98.0	0.5	1.0	0.5	2.0			
		98.0	1.0	1.0	2.0		96.5	2.0	0.0	1.5	3.5			
0.01		99.0	1.0	0.0	1.0	1.3	99.0	0.0	0.5	0.5	1.0	1.4	0	無影響
		98.5	1.0	0.5	1.5		97.3	1.3	0.0	1.3	2.7			
		98.5	1.0	0.5	1.5		99.5	0.0	0.5	0.0	0.5			
アミト ロール	10	98.5	0.5	1.0	1.5	1.7	91.5	6.0	1.5	1.0	8.5	21.2	1	ブルテウス期でやや発生が遅れ気味で、骨格異常が認められたが、弱影響と判定された。
		96.5	2.5	1.0	3.5		73.0	19.5	6.0	1.5	27.0			
		100.0	0.0	0.0	0.0		72.0	19.5	8.0	0.5	28.0			
	1	97.4	1.9	0.6	2.6	1.9	95.0	2.0	0.5	2.5	5.0	4.7	1	弱影響
		99.0	1.0	0.0	1.0		95.0	0.5	0.5	4.0	5.0			
		98.0	1.0	1.0	2.0		96.0	1.0	1.5	1.5	4.0			
	0.1	99.0	0.5	0.5	1.0	2.2	96.0	2.0	0.5	1.5	4.0	3.7	1	弱影響
		95.5	3.5	1.0	4.5		99.0	0.0	0.0	1.0	1.0			
		99.0	0.5	0.5	1.0		94.0	4.0	0.0	2.0	6.0			
	0.01	98.0	1.5	0.5	2.0	2.8	95.0	3.5	1.5	0.0	5.0	3.5	1	弱影響
		97.0	1.0	2.0	3.0		96.5	1.5	0.0	2.0	3.5			
		96.5	1.0	2.5	3.5		97.9	1.5	0.5	0.0	2.1			
ペンタ クロ フェ ノール	10	0.0	100.0	0.0	100.0	100.0							3	受精が強く阻害され、ほとんど未受精で、強影響と判定された。
		0.0	100.0	0.0	100.0									
		0.0	100.0	0.0	100.0									
	1	0.0	100.0	0.0	100.0	100.0							3	受精し、受精膜が確認されたが、卵割が起こらず、1細胞のまま発生が停止し、強影響と判定された。
		0.0	100.0	0.0	100.0									
		0.0	100.0	0.0	100.0									
	0.1	98.5	1.0	0.5	1.5	2.2	92.0	4.0	1.5	2.5	8.0	6.3	1	PCP1mg/l に比べ、正常にブルテウス期まで至っており、弱影響と判定された。
		97.5	2.0	0.5	2.5		93.5	1.0	0.5	5.0	6.5			
		97.5	1.0	1.5	2.5		95.5	1.0	0.5	3.0	4.5			
		99.0	1.0	0.0	1.0		94.5	1.5	2.0	2.0	5.5			
		96.2	1.0	2.9	3.8		96.5	1.5	0.0	2.0	3.5			
	0.01	98.0	0.0	2.0	2.0	2.3	92.5	2.5	1.5	3.5	7.5	5.5	1	弱影響
カル バリ ル	10	98.0	0.0	2.0	2.0	2.4	0.0	99.0	0.0	1.0	100.0	100.0	3	2細胞期には無影響と判定されたが、ブルテウス期にはほぼ100%遅滞またはのう胚以前で発生が停止し、強影響と判定された。
		97.7	2.3	0.0	2.3		0.0	0.0	0.0	100.0	100.0			
		97.1	2.3	0.6	2.9		0.0	0.0	0.0	100.0	100.0			
	1	96.0	4.0	0.0	4.0	2.5	94.5	1.0	3.0	1.5	5.5	7.3	1	2細胞期には無影響と判定された。ブルテウス期にはやや遅滞が認められたが弱影響と判定された。
		99.5	0.5	0.0	0.5		90.5	1.5	4.5	3.5	9.5			
		97.0	1.0	2.0	3.0		93.0	6.0	0.5	0.5	7.0			
	0.1	98.5	1.0	0.5	1.5	1.0	91.0	0.5	5.0	3.5	9.0	5.7	1	弱影響
		100.0	0.0	0.0	0.0		94.5	1.5	2.5	1.5	5.5			
		98.5	0.5	1.0	1.5		97.5	2.5	0.0	0.0	2.5			
	0.01	98.0	1.0	1.0	2.0	2.7	90.0	5.0	3.5	1.5	10.0	15.0	1	弱影響
		96.5	3.5	0.0	3.5		71.5	26.5	0.0	2.0	28.5			
		97.5	1.5	1.0	2.5		93.5	4.0	1.5	1.0	6.5			

摘要：判定は、2細胞期には1細胞、多精それぞれの発生率で行われる。ブルテウス期には遅滞、奇形、のう胚以前の異常胚の合計で判定される。各個体ごとの判定の結果を参考までに以下の網掛けで区分して表示しており、その中で最も影響の大きいものにより有害度段階が判定される。また、ブルテウス期の異常胚の発生率で遅滞、奇形、のう胚以前それぞれについて、5%を越えたものについて太ゴシックで表してある。

凡例：無影響海水 弱影響海水 中影響海水 強影響海水

表3-2 ムラサキウニによる調査結果

平成15年8月6日 媒精時水温28 , 第1回固定後28

試水	2細胞期(60m)					ブルテウス期(32h)					有害度 段階	異常の形態		
	正常 (%)	異常(%)			平均	正常 (%)	異常胚(%)			平均				
		1細胞	多精	計			遅滞	奇形	のう胚以前				計	
BL	100.0	0.0	0.0	0.0	1.8	99.5	0.5	0.0	0.0	0.5	1.8	0	無影響	
BL DMSO	1/100vol	96.5	2.0	1.5	3.5	97.0	1.5	1.0	0.5	3.0	13.8	1	BL, BL(DMSO) 1/1000と比べ、骨格異常の奇形が認められたが、弱影響と判定された。	
		98.0	0.0	2.0	2.0	77.0	1.5	21.0	0.5	23.0				
	1/1000vol	97.0	1.0	2.0	3.0	95.5	2.0	2.0	0.5	4.5	3.0	0	無影響	
		100.0	0.0	0.0	0.0	98.0	0.5	1.5	0.0	2.0				
アジエチル ピニル 酸ヘキシ ル、 2、 1	10	92.5	7.5	0.0	7.5	92.5	7.5	0.0	0.0	7.5	100.0	3	2細胞期には無影響と判定されていたが、その後、壊死し卵が崩壊しており、強影響と判定された。	
		98.3	0.0	1.7	1.7	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0				
	1	98.0	0.0	2.0	2.0	8.7	78.0	5.8	7.5	91.3	94.2	3	2細胞期には無影響と判定されていたが、ブルテウス期には著しく発生が遅滞し、強影響と判定された。	
		99.5	0.0	0.5	0.5	3.0	92.0	0.5	4.5	97.0				
	0.1	97.0	1.0	2.0	3.0	96.5	3.0	0.0	0.5	3.5	4.0	0	無影響	
		98.0	1.5	0.5	2.0	95.5	2.0	2.0	0.5	4.5				
	0.01	99.0	0.0	1.0	1.0	92.5	5.5	2.0	0.0	7.5	4.8	1	弱影響	
		96.5	3.0	0.5	3.5	98.0	1.0	0.5	0.5	2.0				
1、3、 2、 ジクロロ プロモ、 1	10	99.0	0.5	0.5	1.0	89.5	1.0	9.0	0.5	10.5	6.3	1	ブルテウス期に骨格異常が認められたが、弱影響と判定された。	
		98.0	0.0	2.0	2.0	98.0	0.5	1.0	0.5	2.0				
	1	99.0	0.0	1.0	1.0	99.5	0.5	0.0	0.0	0.5	2.3	0	無影響	
		98.5	0.5	1.0	1.5	96.0	2.5	1.0	0.5	4.0				
	0.1	98.0	0.0	2.0	2.0	94.5	5.0	0.5	0.0	5.5	6.3	1	弱影響	
		99.0	0.5	0.5	1.0	93.0	5.5	1.5	0.0	7.0				
	0.01	99.5	0.0	0.5	0.5	99.5	0.5	0.0	0.0	0.5	1.8	0	無影響	
		97.0	1.5	1.5	3.0	97.0	2.5	0.0	0.5	3.0				
アミト ロール	10	99.5	0.0	0.5	0.5	89.0	1.5	9.0	0.5	11.0	10.5	1	ブルテウス期に骨格異常が認められたが、弱影響と判定された。	
		96.0	0.0	4.0	4.0	90.0	3.0	4.5	2.5	10.0				
	1	98.5	0.0	1.5	1.5	96.0	2.0	0.5	1.5	4.0	3.0	0	無影響	
						98.0	1.0	0.5	0.5	2.0				
	0.1	99.5	0.0	0.5	0.5	99.5	0.5	0.0	0.0	0.5	1.5	0	無影響	
		97.5	2.0	0.5	2.5	97.5	1.0	1.5	0.0	2.5				
	0.01	100.0	0.0	0.0	0.0	97.5	1.5	1.0	0.0	2.5	3.3	0	無影響	
		97.5	1.0	1.5	2.5	96.0	0.5	2.5	1.0	4.0				
ベンタ クロー ロフェ ノ	10	0.0	100.0	0.0	100.0	/	/	/	/	/	100.0	3	2細胞期に未受精が多く、強影響と判定された。	
		0.0	100.0	0.0	100.0	/	/	/	/	/				
	1	2.0	98.0	0.0	98.0	99.0	/	/	/	/	99.0	3	受精しており受精膜は確認されたが、卵割が行われず1細胞のまま発生が停止したものが多く、強影響と判定された。	
		0.0	100.0	0.0	100.0	/	/	/	/	/				
	0.1	99.0	0.0	1.0	1.0	98.5	0.0	1.0	0.5	1.5	0.8	1.5	0	無影響
		99.5	0.5	0.0	0.5	98.5	0.5	0.5	0.5	1.5				
	0.01	97.5	0.5	2.0	2.5	99.0	0.5	0.5	0.0	1.0	2.8	2.3	0	無影響
		97.0	2.0	1.0	3.0	96.5	2.5	0.0	1.0	3.5				
カル バリ ル	10	97.5	0.0	2.5	2.5	0.0	28.2	10.3	61.5	100.0	3.0	100.0	3	2細胞期にやや不均整な卵割が認められたが無影響と判定された。ブルテウス期にはのう胚以前で発生が停止した卵が多く、強影響と判定された。
		96.5	0.5	3.0	3.5	0.0	0.0	0.6	99.4	100.0				
	1	97.0	0.0	3.0	3.0	98.0	0.0	2.0	0.0	2.0	3.1	1.5	1	弱影響
		96.9	0.6	2.5	3.1	99.0	0.0	1.0	0.0	1.0				
	0.1	99.5	0.0	0.5	0.5	98.0	1.0	0.5	0.5	2.0	0.5	3.5	1	弱影響
		99.5	0.5	0.0	0.5	95.0	3.5	1.0	0.5	5.0				
	0.01	99.0	0.0	1.0	1.0	96.5	1.0	2.5	0.0	3.5	1.8	4.0	0	無影響
		97.5	1.0	1.5	2.5	95.5	2.5	1.0	1.0	4.5				

摘要は表3-1と同様である。

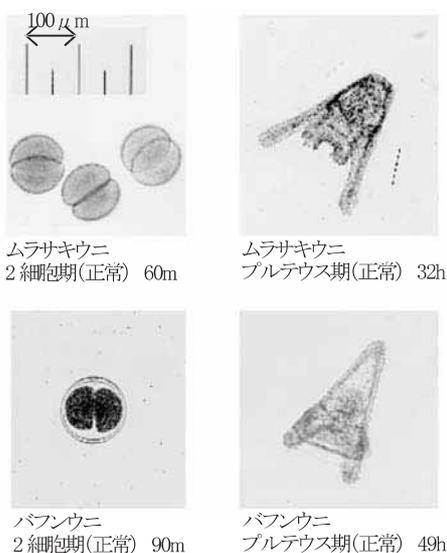


図3 正常な2細胞及びブルテウス

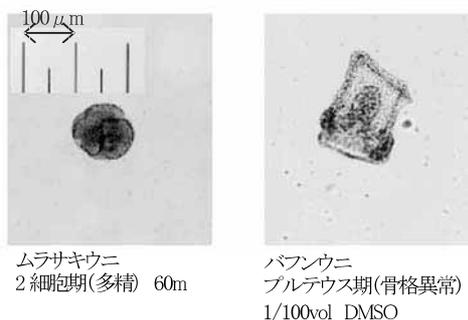


図4 2細胞期(多精)及びブルテウス(骨格異常)

多精は、ほとんどすべての検体において数%の割合で発生しているが、中影響海水と判定される9%を超えた検体はなかった。

DMSO 1/100vol で観察された骨格異常では、体桿が過剰形成され奇形となっている。ムラサキウニでも同様

に体桿が過剰形成されたためか腕が平行に変形した個体がみられた。

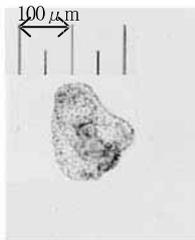
2 アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル

10mg/ℓでは、2細胞期にバフンウニでやや不均等な卵割が生じていたが、バフンウニ、ムラサキウニそれぞれ弱影響、無影響と判定されるレベルであった。その後、のう胚期以前で発生が停止(バフンウニ99.5~100%)し、ムラサキウニでは卵が壊死・崩壊し強影響と判定された。

1mg/ℓでは、2細胞期にバフンウニ、ムラサキウニとも異常は認められなかったが、プルテウス期には発生が著しく遅滞(バフンウニ8.5~66.5%、ムラサキウニ78.0~92.0%)し、バフンウニではのう胚期以前で発生が停止(1.0~23.0%)した卵も認められ、強影響と判定された。また、このときバフンウニの異常発生率のバラツキが大きかった。

0.1, 0.01mg/ℓでは、バフンウニ、ムラサキウニとも無影響または弱影響と判定された。

アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル 1mg/ℓで発生が遅滞した幼生を図5に示す。49時間経過後も腕の形成が認められない。



バフンウニ
プルテウス期(遅滞) 49h
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(1mg/l)

図5 アジピン酸ジ 2 エチルヘキシルによる遅滞

3 1,2 ジブromo 3 クロロプロパン (DBCP)

10mg/ℓでは、2細胞期にバフンウニでやや不均等な卵割が生じていたが、バフンウニ、ムラサキウニそれぞれ弱影響、無影響と判定されるレベルであった。プルテウス期には、バフンウニで発生が遅滞(5.5~68.0%)し、のう胚以前で発生が停止(1.0~7.5%)した卵もあり、強影響と判定されたが、ムラサキウニでは骨格異常(1.0~9.0%)が認められたものの弱影響と判定され、バフンウニとムラサキウニで異なる判定結果となった。

また、このときバフンウニの異常発生率のバラツキが大きかった。

1, 0.1, 0.01mg/ℓでは、バフンウニ、ムラサキウニとも無影響または弱影響と判定された。

4 アミトロール

10mg/ℓでプルテウス期に遅滞(バフンウニ6.0~19.5%)や骨格異常(バフンウニ1.5~8.0%、ムラサキウニ4.5~9.0%)が多く認められているが、他の物質に比べ影響は少なく、すべての濃度段階で、バフンウニ、ムラサキウニとも無影響または弱影響と判定された。

また、10mg/ℓのときバフンウニの異常発生率のバラツキが大きかった。

5 ペンタクロロフェノール(PCP)

10mg/ℓでは、バフンウニ、ムラサキウニとも受精が強く阻害(バフンウニ、ムラサキウニともに100%)され、強影響と判定された。特にバフンウニではほとんど未受精であった。

1mg/ℓでは、バフンウニ、ムラサキウニとも受精が行われ、受精膜が確認されたが、卵割が起こらず、1細胞のまま発生が停止(バフンウニ100%、ムラサキウニ98.0~100%)し強影響と判定された。

0.1, 0.01mg/ℓでは、バフンウニ、ムラサキウニとも無影響または弱影響と判定された。

ペンタクロロフェノール10mg/ℓで未受精となった卵及び同1mg/ℓで受精した卵を図6に示す。これらの卵は49時間経過後まで発生を開始することはなかった。

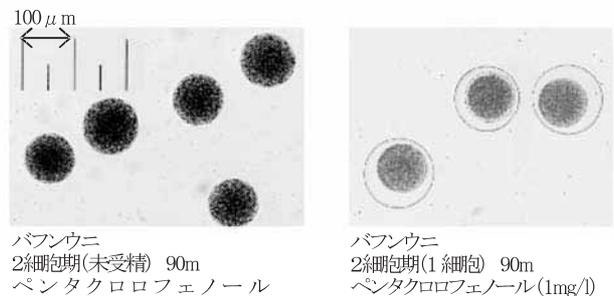


図6 ペンタクロロフェノールによる未受精及び受精卵

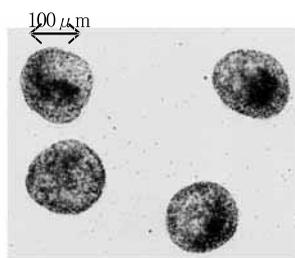
6 カルバリル(NAC)

10mg/ℓでは、ムラサキウニでやや不均等な卵割が生じていたが、バフンウニ、ムラサキウニそれぞれ無影響、

弱影響と判定されるレベルであった。しかしながら、その後、バフンウニでは、ほぼ100%のう胚期以前で発生が停止(1.0~100%)、ムラサキウニでも発生の停止(61.5~99.4%)した卵が多く、強影響と判定された。

1, 0.1, 0.01mg/l では、バフンウニ、ムラサキウニとも無影響または弱影響と判定された。バフンウニについては、低濃度においても異常発生率がやや高く、バラツキが大きかった。

カルバリル10mg/l で発生が遅滞した胚を図7に示す。49時間経過後も骨片が形成されていない。



バフンウニ
ブルテウス期(のう胚) 49h
カルバリル(10mg/l)

図7 カルバリルによる遅滞

IV 考察

1 NOEC (無影響濃度) の推定

バフンウニのブルテウス期異常発生率をもとに、NOEC (無影響濃度) の推定を試みた。ただし、ペンタクロロフェノールについては高濃度処理群で受精が著しく阻害されたため、2細胞期の異常発生率による推定である。ムラサキウニについては、良好な卵が得られず、各群2連の試験であり、以下のNOEC (無影響濃度) の推定は行っていない。

ブランクを対照として、DMSO、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル、1,2ジブromo 3 クロロプロパン、アミトロール、ペンタクロロフェノール及びカルバリルの各物質について Shirley Williams の多重比較法⁷⁾による検定を行った。結果を表4に示す。有意差の認められる最小濃度を LOEC (最小影響濃度)、その10倍希釈の濃度を NOEC (無影響濃度) とした。

この結果、DMSO については、1/100vol (1v/v%) が LOEC、1/1000vol (0.1v/v%) が NOEC と推定された。同様に、1,2ジブromo 3 クロロプロパンについては10mg/l が LOEC、1mg/l が NOEC、アミトロー

表4 Shirley Williams の多重比較及び影響濃度の推定
DMSO

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
1/100vol(1v/v%)	3	2.021	*	LOEC
1/1000vol(0.1v/v%)	2	0		NOEC

アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
10mg/l	5	3.261	*	
1mg/l	4	3.016	*	
0.1mg/l	3	2.038	*	
0.01mg/l	2	1.771	*	

1,2ジブromo 3 クロロプロパン

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
10mg/l	5	2.330	*	LOEC
1mg/l	4	1.191		NOEC

アミトロール

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
10mg/l	5	2.891	*	
1mg/l	4	1.945	*	LOEC
0.1mg/l	3	1.123		NOEC

ペンタクロロフェノール (2細胞期)

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
10mg/l	5	2.312	*	
1mg/l	4	2.361	*	LOEC
0.1mg/l	3	0.449		NOEC

カルバリル

処理濃度	用量群数 (a)	ta	有意差	影響濃度の推定
10mg/l	5	2.965	*	LOEC
1mg/l	4	1.569		NOEC

有意差; $t_a < w(a, \infty, 0.05)$ であれば、5%の危険率で有意差ありと認められ、 $t_a < w(a, \infty, 0.05)$ であれば有意差は認められない。ただし、 $w(2, \infty, 0.05) = 1.645$ 、 $w(3, \infty, 0.05) = 1.716$ 、 $w(4, \infty, 0.05) = 1.739$ 、 $w(5, \infty, 0.05) = 1.750$ である。

ルについては1mg/l が LOEC、0.1mg/l が NOEC、ペンタクロロフェノール(2細胞期)については1mg/l が LOEC、0.1mg/l が NOEC、カルバリルについては10mg/l が LOEC、1mg/l が NOEC と推定された。

アジピン酸ジ 2 エチルヘキシルについては、Shirley Williams の多重比較では全濃度群で対照と比較して有意差が認められなかったため、NOEC の推定ができなかった。

バフンウニ、ムラサキウニの異常発生率(平均)の変化を図8に示す。図より、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシルについても LOEC、NOEC の推定が可能と考えられたので、ブランクを対照として、低濃度側より「平均値の差の検定(t検定)」を行い、有意差の認められる最小濃度を LOEC (最小影響濃度)、その10倍希釈の濃度を NOEC (無影響濃度) と推定することとした。こ

の結果、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシルについては、0.1mg/ℓが LOEC, 0.01mg/ℓが NOEC と推定された。結果について表5に示す。

2 推定された NOEC (無影響濃度) の評価

推定された NOEC (無影響濃度) の比較を表6に示した。

今回の NOEC を推定した5物質のうちでは、アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル (0.01mg/ℓ) > アミトロール, ペンタクロロフェノール (0.1mg/ℓ) > 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン, カルバリル (1 mg/ℓ) の順で毒性が認められ、アミトロールを除き、水溶解度の低く、オクタノール水分分配係数の大きいものほど毒性が強い傾向が認められた。アミトロールは脂溶性の違いによる分配以外の機序で毒性を発現しているものと考えられた。また、ペンタクロロフェノールの NOEC は2細胞期の異常発生率より求められたもので、この物質は受精を著しく阻害し、極めて毒性が強いと思われた。

Yeast two hybrid assay による NOEC (ペンタクロロフェノール > カルバリル > アミトロール > 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン > アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル) と比較すると、ペンタクロロフェノールが最も毒性が強かったところ及び1,2 ジブロモ 3 クロロプロパンが毒性が弱いと考えられることは一致したが、他の3物質については序列が異なっていた。特にウニ卵で毒性が

タクロロフェノール, カルバリル1,2 ジブロモ 3 クロロプロパンの3物質では NOEC はバフンウニのほうが低濃度で影響を受けた。アミトロールは同程度であった。

これらの差は分析法の違い, 生物の感受性の違いによるものと思われるが, アジピン酸ジ 2 エチルヘキシルを除き, 同じ濃度レベルであること, よく似た影響の強さの序列であることから, 今回推定した NOEC は妥当な値ではないかと考える。

3 バフンウニとムラサキウニの比較

アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル 1 mg/ℓ ではブルテウス期に発生が遅滞し, バフンウニ, ムラサキウニとも強影響海水と判定されたが, ムラサキウニでは91.3~97.0% (うち遅滞78.0~92.0%) と安定していたのに対し, バフンウニでは異常発生率が12.0~90.0% (うち, 遅滞8.5~66.5%, のう胚以前1.0~23.0%) とばらついた。今回の結果では, ムラサキウニは2個体のデータであるがバラツキは小さく, バフンウニでは何点かバラツキの大きな群が認められた。バラツキが大きかったのは, アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル 1 mg/ℓ, 1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン 10mg/ℓ, アミトロール 10mg/ℓ で, いずれも異常発生率の上昇が認められる濃度である。影響を受け始める濃度付近では, 親ウニの栄養状態, 成熟度や個体差によるバラツキが無視できないものと思われた。

1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン 10mg/ℓ では, バフンウニ (強影響海水) とムラサキウニ (弱影響海水) と判定が異なっているが, この物質は揮発性が高いため, シャーレで蓋をした程度の半開放系では濃度低下が起こることが予想される。特に, ムラサキウニの試験条件下 (28℃, 32時間) では, バフンウニ (15℃, 48時間) に比べ温度が高いため濃度低下が起こりやすく, 弱影響と判定されたのではないかとと思われる。本試験方法は水溶性が高い物質であっても, 揮発性のある化合物の検定に

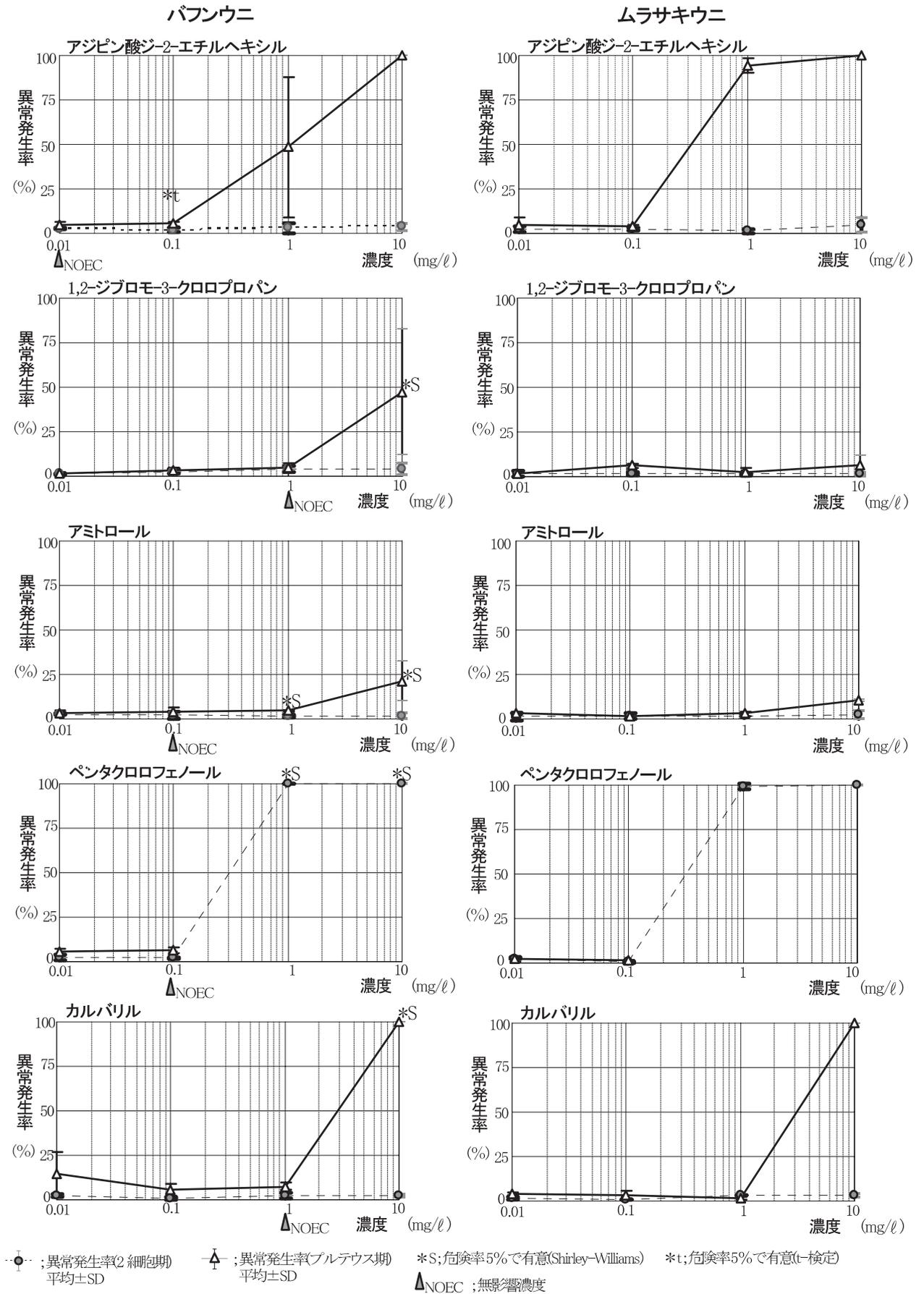
表5 t 検定及び影響濃度の推定

処理濃度	t	P (T t) 片側	有意差	影響濃度の推定
0.1mg/ℓ	-2.136	0.037	*	LOEC
0.01mg/ℓ	-2.413	0.05		NOEC

強かったアジピン酸ジ 2 エチルヘキシルが Yeast two hybrid assay で5物質の中で最も毒性が低く, NOEC はバフンウニの約 1/40倍の濃度であった。また, ペン

表6 推定された NOEC (無影響濃度) の比較

物質名	推定した NOEC	オクタノール水分分配係数	1 ; 表1よりの再掲, 2 ; 2細胞期 Yeast two hybrid assay による NOEC (換算値)
ジメチルスルホキシド (DMSO)	0.1 v/v%	-	-
アジピン酸ジ 2 エチルヘキシル	0.01mg/ℓ	logPow 6.11	0.37 mg/ℓ
1,2 ジブロモ 3 クロロプロパン	1 mg/ℓ	logPow 2.96	0.24 mg/ℓ
アミトロール	0.1 mg/ℓ	logKow -0.65	0.084 mg/ℓ
ペンタクロロフェノール (PCP)	0.1 mg/ℓ 2	logPow 5.01	0.0027mg/ℓ
カルバリル (NAC)	1 mg/ℓ	logPow 2.34	0.020 mg/ℓ



なお、ムラサキウニについては検定を実施していないため、*S、*t、NOECの表示がない。

図8 パフンウニ、ムラサキウニの異常発生率(平均)の変化

はその点を考慮した検定法が必要と思われる。

バフンウニとムラサキウニで感受性にやや差が認められるものの影響濃度及び影響の態様について、ほぼ同様の傾向を示した。バフンウニ、ムラサキウニの異常発生率の変化を図8に示しているが、1,2ジブプロモ 3クロロプロパン10mg/lを除き、よく一致しており、バフンウニで推定したNOELはムラサキウニについても同レベルであると推定できる。

V まとめ

環境中の化学物質による生態系への影響については、知見が少なく様々なデータの蓄積が望まれているところであり、本調査研究によるバフンウニ及びムラサキウニの初期発生への化学物質の影響試験結果は、有用なデータを提供することができたものとする。

しかしながら、本県ではもともとウニの生息地が限られ、潜水による採捕が必要となり、また、概して生育不良で未成熟⁸⁾で、試験実施にあたり良好な卵及び精子を得ることが極めて難しかった。これが試験結果のバラツキの原因ではないかと考えられる。このようなことから本県においてはウニ卵を用いた生物検定を用い、継続して調査を実施することは困難と思われた。

環境省は「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」の改訂作業を平成15,16年度の2カ年で行っており、この中でこれまでの取組みを整理したうえで、「内分泌攪乱作用」の定義の確認、取り組むべき課題、対象とすべき範囲を概観する⁹⁾としており、改訂版にはリスクコミュニケーションの考え方が盛り込まれる。いわゆる環境ホルモン問題はあまりにもセンセーショナルな取り上げ方をされたため、定義やリスクについて十分な吟味が欠けたまま様々な議論が展開され、研究の現場及び一般社会が大いに混乱した。改訂版により、この問題の共通認識が確立され、また、対応方針が示されるものと期待される。

環境ホルモンに限らず、環境中に放出される恐れのある化学物質についてのリスク管理が適切に行われるためには、作用メカニズムの解明などの研究、環境中濃度の測定のほか、化学物質の評価手法の標準化が必要である。ウニ卵を用いた生物検定は、この評価手法のひとつとして有益の情報を提供できることは明らかで、本法によるデータが更に蓄積されることが望まれる。

謝 辞

実験に使用したウニは、香川県水産試験場のご好意で提供いただいた。

同志社大学名誉教授小林直正先生には、試験の実施及び取りまとめの各段階において貴重な助言をいただいたほか、本稿での図版の使用を認めていただいた。

併せて、御礼申し上げます。

文 献

- 1) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 (2000年11月版),(2000)
- 2) 小林直正：環境汚染を調べる ウニ卵による海水の生物検定 ,サイエンティスト社,(1997)
- 3) 多田千鶴子ほか：ウニ卵を用いる水質の生物試験法に関する研究 環境ホルモンによるウニ卵への影響調査 ,香川県環境保健研究センター所報,創刊号 41-48,(2002)
- 4) 小林直正：ウニ卵を用いた海水汚染の生物検定 重金属汚染の推定 ,用水と排水,44(12),1053-1059,(2002)
- 5) 環境ホルモンデータベース：(独)国立環境研究所 HP <http://w.edcdb.nies.go.jp/>
- 6) 石原勝敏編著：動物発生段階図譜,共立出版株式会社,191-220,(1996)
- 7) 吉村功・大橋靖雄責任編集：毒性試験データの統計解析,地人書館,95-112,(1996)
- 8) 山賀賢一ほか：ムラサキウニの駆除および飼育試験,香川県水産試験場事業報告,76-77,(1997)
- 9) 環境省：平成16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料18-1「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」の改訂状況等について,(2004)