

ビスフェノール A が次世代の性比に及ぼす影響について

酒井 秀嗣^{1,2} 佐藤 恵^{1,2} 村田 浩一³ 塩谷 正勝³ 杉森 文夫⁴

The influence of Bisphenol A on the sex ratio of the following generation of Japanese quail

Hidetsugu Sakai^{1,2}, Megumi Sato^{1,2}, Koichi Murata³, Masakatsu Shioya³ and Fumio Sugimori⁴

Abstract

The research at the wild-duck netting place of the Imperial Household Agency conducted since 1971 revealed the significant and continuous decrease in the ratio of male pintails. The present author hypothesized that this might be caused by the pollution with endocrine disrupting chemicals the pintail's breeding area in Syberia. He administered Bisphenol A (BPA) to female Japanese quail and examined the sex ratio of their offsprings, and found that the administration of BPA does not influence the ratio. Another observation among the BPA administered quail was that their egg-laying activities and fertilization rates showed a significant decrease together with the increase of ricket-like cases. The first two facts are ascribable to the reaction to BPA similar to that to estrogen; the last is yet to be ascertained if it is directly associated with BPA administration.

Key words : Bisphenol A, egg-laying activity, fertilization rate, pintail, ricket

緒 言

埼玉県越谷市と千葉県市川市にある宮内庁鴨場では、捕獲した個体の足環の番号を記録するとともに、足環のない個体には標識調査用の金属製足環を装着して放鳥している。足環を装着する際には性別と幼鳥か成鳥かの区別を記録しており、山階鳥類研究所ではこれらの記録をデータベース化して動向を解析している。鴨場で一番多く捕獲されたのはオナガガモ (*Anas acuta*) で、1971年11月から2002年2月までに

131,931 個体が記載された。これらのデータによると、1970年代には放鳥個体に占めるオスの割合が50%程度であったものが1980年代には40%代に低下し、1990年代には30%代まで低下した。回帰分析の結果、この現象は有意であることが判明している^{1,2)}。

オスの比率が減少し続けている原因の1つとして、オナガガモの主な繁殖地であるシベリアが外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の汚染地域であることが挙げられた³⁻⁶⁾。そこで、環境ホルモンの1つであるビスフェノール A

¹ 日本大学歯学部生物学教室

² 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

³ 日本大学生物資源科学部動物資源科学教室
〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866

⁴ 山階鳥類研究所
〒270-1145 千葉県我孫子市高野山115
(受理：2004年9月28日)

¹ Department of Biology, Nihon University School of Dentistry

² Division of Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
1-8-13 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310, Japan

³ Department of Animal Resource Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University
1866 Kameino, Fujisawa City, Kanagawa 252-8510, Japan

⁴ Yamashina Institute for Ornithology
115 Takanoyama, Abiko City, Chiba 270-1145, Japan

(2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン; BPA) をニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) に投与して, 出生個体に性比の偏りが生じるか否かを調べることにした。

材料と方法

1. 動物

ブラウン系のニホンウズラを6週齢で購入し(東海有機, 豊橋), オス1個体, メス4個体を同一ケージ(14.2×68×32 cm)に収容し, 温度22±2°C, 湿度40±5%, 照明時間14 L/10 Dで飼育した。餌はウズラマッシュ(埼玉実験動物供給所, 杉戸)を1日, 1個体あたり20 g与え, 水とともに自由摂取させた。購入後, 毎日の産卵数を記録し, どのケージでも一定の産卵が記録されるようになった8週目から実験を開始した。

2. BPA 投与

飼育ケージ3つを1群とし, 対照群(C群), 高用量群(H群), 低容量群(L群)の3群を構成した。H群にはBPA(和光純薬, 大阪)をオリーブ油に0.5 mg/mlに溶かした溶液, L群には0.05 mg/mlのBPA溶液, C群にはオリーブ油のみをそれぞれ投与した。投与はメスのみ隔日に8週から12週までの4週間に渡って行い, 腹部の皮下に0.1 mlずつ注射した。

3. 卵の採取と孵卵

採卵はBPA投与開始の8週から始め, 投与終了後4週まで8週間に渡って行った。卵は日付とケージ番号を記録して14°Cで保存し, 1週間分をまとめて孵卵器に入卵した。孵卵温度は38°Cに保ち, 1日に20回の転卵を自動的に行い, 入卵5日目に検卵を行って, 胚の発生が確認できたものを受精卵, 認められないものを未受精卵とした。また, 軟卵, 破卵等は異常卵として, 受精卵で孵化しなかった卵も死籠もりとしてそれぞれ記録した。

4. 性判別

BPAの投与期間中に産卵された卵については, 孵化後の雛の雌雄判定を行った。雛は孵化日またその翌日に雛は屠殺後解剖し, 生殖腺の目視によって性別を判定した。また, 解剖時に心臓から採血してDNAを抽出し, PCR法によって性染色体上の遺伝子を増幅させて性判別を行った。採取した血液0.1 mlをFTAマイクロカード(Whatman)に滴下し, 乾燥させていったん保存した。この濾紙の血液部分をハリスマイクロパンチで打ち抜き, FTA精製試薬を用いて抽出を行った。PCRはItoh *et al.*の方法^{7,8)}に準じ, Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, USA) とプライマー-2550 F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') およびプライマー-2718 R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3')を用いて行った。

結果

1. 産卵

採卵した8週間で, C群では367, H群では215個, L群では303個の卵が得られた。週ごとの産卵数を分散分析で検定すると群間に有意な差(p<0.001)が認められ, C群に対してH群

表1 各実験群での産卵数, 異常卵数, 受精卵数, 孵化個体数および異常個体数(括弧内は頻度:%)

	C 群	H 群	L 群
産卵数	367	215***	303
異常卵数 ^a	14(3.8)	13(6.0)	22(7.3)
受精卵数 ^b	339(96.0)	171(87.7)*	248(88.3)*
孵化個体数 ^b	124(35.1)	104(51.5)	121(43.1)
異常個体数 ^c	7(5.6)	28(26.9)***	13(10.7)*

a: 括弧内は産卵数に対する頻度

b: 括弧内は異常卵を除いた産卵数に対する頻度

c: 括弧内は孵化個体数に対する頻度

*: p<0.05, ***: p<0.001

($p < 0.001$) は有意に低いことが判明した。一方、L 群の産卵数は減少傾向にあったが、有意差は認められなかった。また、軟卵や破卵などの異常卵の発生率は、C 群 3.8%、H 群 6.0%、L 群 7.3% で投与群が高くなる傾向が見られたが、統計的な差は認められなかった (表 1)。

孵卵 5 日目における検卵の結果、受精率は群間で差が認められた ($p < 0.05$)。毎週の受精率の平均は C 群 96.0% に対し、H 群は 84.7%、C 群は 88.3% と両者とも有意 ($p < 0.05$) に低下した。一方孵化率の平均は、C 群 35.1%、H 群 51.5%、L 43.1% と投与群の方が高い傾向が見られたが、検定では差は認められなかった。(表

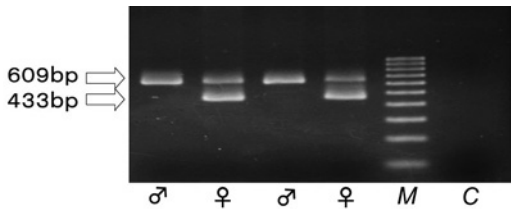


図 1 DNA による性別別

オス (♂) とメス (♀) の血液から抽出し、増幅した DNA の電気泳動結果。609 bp に Z 染色体、433 bp に W 染色体由来のバンドが見られる。M はマーカー、C は蒸留水を用いたネガティブコントロール。

1)。

2. 性別判別

孵化した個体の性別判別を、剖検と PCR 法による DNA 判定の 2 つで試みた (図 1)。その結果、両者で判断の異なった個体が、各群で 7 ~ 8 個体生じた。しかし、いずれの結果においても、C 群と H 群または L 群との間に違いは認められなかった (表 2)。また、発生が途中で停止した死籠もりについて、血液を採取して DNA 判定を試みた。この結果、各群とも 80% 以上の個体で性別判別を行うことができた (表 2)。これらの値を孵化個体の測定値に合算した場合も、群間における性比の違いは認められなかった。

3. 剖検

実験終了後、卵巣、輸卵管、甲状腺、副腎、脾臓の重量を測定した。輸卵管中に卵がある場合はそれを除いた重量を測定した。分散分析の結果、いずれの器官も群間の違いは認められなかった (表 3)。また、実験期間中に 2 週間毎に採血を行い、RIA によってエストラジオール-17 β の濃度を測定したが、排卵に関係すると思われる高い値が多数混じったため、検定を行わなかった。

4. 異常個体

孵化した個体の中に、骨盤のところで脚が開

表 2 各群の孵化個体および死籠もり個体の、剖検と DNA による雌雄の個体数。括弧内は百分率

		剖 検		D N A			合 計
		オ ス	メ ス	オ ス	メ ス	不 明	
C 群	孵化個体	43 (64.2)	24 (35.8)	35 (52.2)	32 (47.8)		67
	死籠もり			40 (39.8)	42 (43.0)	8 (17.2)	90
	合 計			75 (47.8)	74 (47.1)	8 (5.1)	157
H 群	孵化個体	31 (57.4)	23 (42.6)	24 (44.4)	30 (55.6)		54
	死籠もり			9 (37.0)	15 (46.3)	4 (16.7)	33
	合 計			33 (40.2)	45 (54.9)	4 (4.9)	87
L 群	孵化個体	37 (59.7)	25 (40.3)	30 (48.4)	32 (51.6)		62
	死籠もり			23 (36.8)	24 (44.3)	13 (18.9)	60
	合 計			53 (43.4)	56 (45.9)	13 (10.7)	122

表3 実験個体の解剖結果

	C 群	H 群	L 群
体重(g)	137.1 (6.1)	130.4 (4.5)	142.0 (3.7)
卵巣重量(g)	5.64(0.83)	5.78(1.11)	5.12(0.85)
輸卵管長(cm)	20.2 (2.2)	22.9 (1.2)	23.7 (2.43)
輸卵管重量(g)	8.04(0.69)	7.45(0.47)	8.22(0.52)
脾臓重量(mg)	93.38(9.14)	76.11(11.81)	67.60(7.94)
甲状腺重量(mg)	12.22(1.75)	9.90(0.77)	11.66(1.28)
副腎重量(mg)	10.66(1.58)	11.32(1.80)	13.18(0.72)

平均値 (標準誤差)



図2 くる病様の異常個体

いた状態になり、立てない個体が出現した(図2)。出現率は、C群5.6%、H群26.9%、L群10.7%で、C群に対してH群($p < 0.001$) L群($p < 0.05$)とも有意に高いことが判明した(表1)。

考 察

いわゆる環境ホルモンの作用によってオナガガモ個体群に占めるオスの比率が低下した、という仮説を実験的に証明するため、メスに環境ホルモンの1つであるBPAを4週間投与した。これは、鳥類がZWの性染色体を持ち、性別が卵細胞によって決定されるからである。卵母細胞から減数分裂によって卵細胞ができる際、1つの卵細胞を除いて他の細胞は退化して極体化する。この極体化が特異的に起きれば、特定の性染色体だけを持つ卵だけが排卵されることになる。

BPA投与の結果、産卵率および受精率の低下が認められた。また、統計的に有意ではなかったが、軟卵や破卵等の異常卵は投与量の増加に従って増加する傾向が認められた。これらの現象は、すでにBPAによってもたらされる作用として知られているもので⁹⁾、それらの結果と矛盾しない。また、投与開始後1週間のH群およびL群の受精率がC群よりも高く、2週目以後に低下していることは、BPAとの関連を強く示唆するものである。

問題の性比は、剖検とDNAとの間で結果が異なったものの、BPA投与の影響が認められないことでは両者一致した。この2つの方法で性別の判定を行ったのは、いわゆる環境ホルモンによってオスがメス化する現象を懸念したためである^{10,11)}。この場合、性染色体はオスを示すZZの構成になるが、生殖器はメス型になる。しかし、判定が一致しなかった個体はいずれも、DNAではZWのメス型を示しながら、生殖器官の目視ではオス型と判断されたものである。また、この不一致は、性分化の発生が期待されないC群で最も多く生じた。これらの事実から、両者の不一致は性分化の異常ではなく、非常に未発達な精巣の見落としによる判定の間違いではないかと推察される。よって、特定の性染色体を持つ卵細胞に偏って排卵されるという可能性も否定された。また、死籠もりのDNA判別の結果から、特定の性の胚だけが発生を停止

するという事実も認められなかった。

本研究では脚に異常のある雛が, BPA 投与群に有意に多く出現した。この症状は, ビタミン D の欠乏によって引き起こされるくる病によく似ている¹²⁾。カルシウム代謝が関係すると推察されることから, BPA の卵殻形成を阻害する作用との関連が考えられる。H 群の 6 個体が BPA 投与終了後 2 週目で産卵されたのを除くと, 他は全て BPA を投与した 4 週間の間に産卵されている。BPA は体内に蓄積されにくく, 比較的速く排出されるといわれていることと良く一致している。投与終了から 4 週間後に, 投与個体の器官重量を比較しても差が認められなかった。BPS のエストロゲン様作用によって生殖器官等に差が見られることを期待したが, 実際に差が生じたとしても同じ理由によって投与終了後に解消したものと思われる。

以上のように, BPA 投与に関しては性比への影響は認められず, 産卵率, 受精率, 異常卵等の既に知られている現象が認められた。しかし, 本研究における産卵率は 50%程度で, ニホンウズラの標準的な産卵率¹³⁾の 70%に比べるかなり低い。また, 孵化率も 50%未満であったことから, 飼育環境や孵卵条件の再確認が必要である。これら, 産卵率, 孵化率の改善がなされた場合においても本研究の結果が再現されるのか, 特にくる病様個体の発生が BPA 投与と因果関係のある事象なのかについて十分な検証が必要と考える。

謝 辞

本研究は文部科学省平成 14 年度科学研究費補助金 (特定奨励費), 平成 14 年度日本大学学術研究助成金奨励研究, 平成 14 年および平成 15 年日本大学歯学部佐藤研究費の助成を受けた。瀬戸香織, 八木美千代両氏の協力に感謝する。

文 献

- 1) 山階鳥類研究所 (1998) 渡り鳥アトラス: 鳥類回収記録解析報告書 (非スズメ目編 1961-1995 年), 山階鳥研, 我孫子
- 2) 杉森文夫, 尾崎清明, 米田重玄, 馬場孝雄, 吉安京子, 三田村あまね, 川原田史治, 前田琢, 宮内庁埼玉鴨場, 宮内庁新浜鴨場 (2000) 宮内庁鴨場で放鳥されたオナガガモの雌雄変動. 日本鳥学会 2000 年度大会講演要旨, p 42
- 3) Eroschenko Vp, Palmiter RD (1980) Estrogenicity of Kepone In Birds and Mammals, In Estrogens In the Environment (ed. McLachlan J) Elsevier North Holland, Inc. New York, pp305-326.
- 4) Fry DM, Toone CK, Speich SM, Peard RJ (1987) Sex ratio skew and breeding patterns of gulls. Demographic and toxicological considerations. Stud Avian Biol 10, 26-43
- 5) Kubiak TJ, Harris HJ, Smith LM, Schwartz TR, Starling DL, Trick JA, Sileo L, Docherty DE, Erdman TC (1989) Microcontaminants and reproductive impairment of the Forster's tern on Green Bay, Lake Michigan-1983. Arch Environ Contam Toxicol 18, 706-727
- 6) Sonnenschein C, Soto AM (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J Steroid Biochem Mol Biol 65, 143-150
- 7) Anna-Karin F, Hans E (1999) A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. J Avian Biol 30, 116-121
- 8) Itoh Y, Suzuki A, Ogawa I, Munechika K, Mizuno S (2001) Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. J Hered 92, 315-321
- 9) Ewins PJ, Postupalsky S, Hughes KD, Weseloh DV (1999) Organochlorine contaminant residues and shell thickness of eggs from known-age female ospreys (*Pan-*

- dion haliaetus*) in Michigan during the 1980s. Environ Pollut 104, 295-304
- 10) Elbrecht A, Smith RC (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. Science 255, 467-470
- 11) Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. J Endocrinol 158, 327-339
- 12) 田先威和夫(監訳)(1983)家禽栄養学, 養賢堂, 東京
- 13) 田鳴嘉雄(編)(1971)実験動物学各論, 朝倉書店, 東京