

ISSN 1348-4656

金沢大学自然計測応用研究センター

臨海実験施設
研究概要・年次報告 第2号
2003.4 ~ 2004.3



臨海実験施設全景

Annual Report of Noto Marine Laboratory

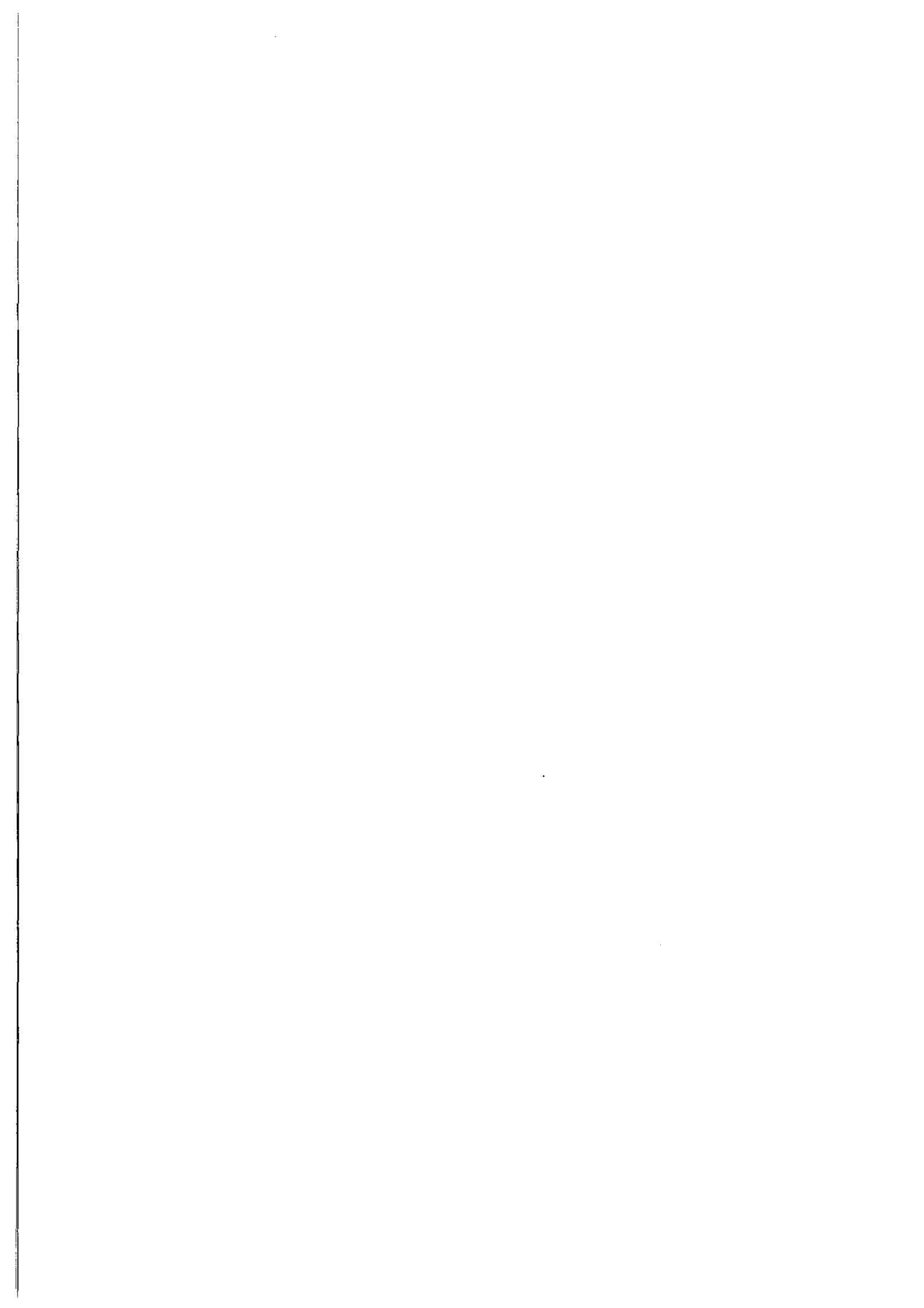
Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University

臨海実験施設
研究概要・年次報告 第2号
2003.4~2004.3



デザイン：エコテクノロジー研究部門 小林史尚 助手

兼六園のこじ灯籠は「金沢（大学）」，背景の白山は「自然」，兼六園の日本最古といわれる噴水は「計測」を表している。



活 動 報 告

* 研究概要	2
* 研究業績	4
* 研究発表及び研究活動	5
* 研究交流	7
* 研究費	8
* 利用状況	9

【研究概要】

能登半島九十九湾にのみ生息するマシコヒゲムシについて研究を進めてきたが、本年は以下の成果を得た。これらの内容は比較生理生化学 21 巻 1 号に掲載されているが、順次、英文の論文として発表する予定である。

ヒゲムシはこれまで棲管からヒゲをだしているかいないか不明であった。我々は周年をとおして海底にビデオカメラを下ろして調べた結果、通常はだしていないと結論された。しかしながら、本種を実験室において水槽に飼い、共生細菌のいわゆる”餌”として硫化水素を与えるとヒゲを出すことが明らかになった。この現象は共生細菌にとって硫化水素はなくてはならないものであるが、ヒゲムシ本体は酸素不足になるためヒゲでガス交換を促進するためと考えられたが、現在、その理由を精査している（福田貢君の卒業論文研究）。

これまでそのヒゲを電顕でみた報告があり、それによるとヒゲは表皮と血管を含む細胞群の二重構造をとり、血管を含む細胞は筋細胞と呼ばれている。そこで細胞内の筋原繊維を認識する抗体を用いてその細胞を検出するとヒゲの基部では数が多く、先端では少ないことが明らかになった。このことはヒゲの屈伸に理屈にあっている（東野翔子君の卒業論文研究）。

共生細菌は栄養体と呼ばれる部分に存在するが、そこは電顕で部分的にしか調べられていない。そこでクリオスタットを用いてオイルレッド染色による組織化学的研究を行った。その結果、バクテリオサイトの周囲には多量の中性脂肪があり、しかも脂肪酸組成は不飽和脂肪酸を多く含むものであった。この事とヒゲムシは元来が冷たい海の動物であることを考えあわせると生理的意味のあることと思われる（出口真理子君の卒業論文研究）。

さらに臨海実験施設では、ミサキギボシムシの生殖生態を調べ、ほぼそれを解明した。組織学的に生殖巣を調べると6月下旬から8月上旬にかけて放卵放精していることが分かった。またそれは一斉におこるが、潮の干満に同期して起こることを突き止めた。これは英文として発表予定である（小木曾正造君の修士論文研究）。

鈴木は生理作用の多様性を研究している。内分泌攪乱化学物質はエストロゲンの受容体に結合し、女性ホルモンとして作用することが知られている。エストロゲンは骨代謝にも関与することから、骨のモデルとして使用できるウロコのアッセイ系を用いて、内分泌攪乱化学物質の骨細胞に対する作用を調べた。その結果、内分泌攪乱化学物質の1種であるビスフェノールAはウロコの骨細胞に作用し、

破骨及び骨芽細胞の活性を低下させることを初めて明らかにした (Life Sci. 73: 2237-2247, 2003) 。さらに血液中のカルシウム濃度も低下し、血液中のカルシウム濃度を調節するホルモンであるカルシトニン濃度も低下させることを見出した (Zool. Sci. 20: 745-748, 2003) 。魚類においてエストロゲンは、破骨及び骨芽細胞を活性化させ、さらにカルシトニン濃度も上昇させることが知られている。しかしビスフェノールAはエストロゲンと異なり、骨細胞の活性や血中カルシウム及びカルシトニン濃度も低下させ、魚類のカルシウム代謝に悪影響を及ぼしていた。したがって、生殖（女性ホルモン様の作用）以外にも骨代謝との関係を詳細に調べる必要がある。

またウロコのアッセイ系を用いて、水銀が骨代謝にも影響を及ぼすことも明らかにした。今まで水銀は神経細胞に作用し、骨に蓄積しないことから、骨代謝には影響を及ぼさないと考えられていた。しかしウロコのアッセイ系で調べると、カドミウムと同様に破骨及び骨芽細胞の活性を低下させることがわかった。さらにキンギョの血中カルシウム濃度及びカルシトニン濃度にも影響がみられ、カルシウム代謝を攪乱することが判明した。水銀の骨細胞及びカルシウム代謝に関する報告は、本研究が最初である (J. Bone Miner. Metab., in press) 。

昨年度は、ウロコを用いた*in vitro*のアッセイ系により、カドミウムが骨に直接作用することを証明した（昨年度研究報告参照）。そこで今年度は、キンギョを用いて*in vivo*における実験を行い、*in vitro*の結果の再現性を調べた。その結果、*in vivo*でも再現され、ウロコの破骨及び骨芽細胞の活性が低下した。さらに骨細胞の活性が低下することで、血液中のカルシウム濃度も低下することも明らかになった。

これら内分泌攪乱化学物質及び重金属の骨代謝に関する知見を、鈴木は2003年6月に大阪で開催された国際シンポジウム (Comparative Endocrinology of Calcium Regulation) 及び2003年9月に函館で開催された日本動物学会で報告した。さらに水銀のデータについても、本年4月に鹿児島大学で開催される日本水産学会で報告する予定である。

鈴木は、骨細胞に影響を及ぼす物理的な刺激についても調べている。本年度、学内の重点化経費の助成を受け、電磁界の骨細胞に対する影響を調べた。その結果、ウロコには骨細胞以外にもコラーゲンやオステオネクチン等の骨基質が備わっているため、電磁界の物理的な刺激にも反応し、電磁界の骨形成促進作用の機構解明につながる基礎的なデータを得た。来年度はこの磁界に対する作用を調べると共に、重力との関係についても調べ、骨細胞の多様な応答機構を追及して行く予定である。

【研究業績】

1) 学術論文

- (1) Sasayama, Y. and Takeuchi, A.: Reproductive strategy of the tiny abyssal scallop (*Delectopecten vitreus macrocheiricolus*) collected on the bottom of the Japan Sea, surmised from histological observations of the gonads. *Zool. Sci.*, 20, 759-763 (2003)
- (2) Kimura, H., Sato, M., Sasayama, Y. and Naganuma, T.: Molecular characterization and *in situ* localization of endosymbiotic 16S rRNA and RuBisCO genes in the pogonophoran tissue. *Marine Biotech.*, 5, 261-269 (2003)
- (3) Kaida, N. and Sasayama, Y.: Dynamics of plasma Ca and calcitonin levels in stonefish (*Inimicus japonicus*) administered a high-Ca solution into the stomach. *Zool. Sci.*, 20, 353-356 (2003)
- (4) Sasayama, Y., Matada, M., Fukumori, Y., Umabayashi, M., Matsuno, A., Nakagawa, T. and Imajima, M.: External morphology of the posterior end, the “opisthosoma”, of the beard worm *Oligobrachia mashikoi* (Pogonophora). *Zool. Sci.*, 20, 1411-1416 (2003)
- (5) Yaoi, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Kurabuchi, S., Sasayama, Y. and Tanaka, S.: Expression and localization of prohormone convertase PC1 in the calcitonin-producing cells of the bullfrog ultimobranchial gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 1459-1466 (2003)
- (6) Yaoi, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Sasayama, Y., Kikuyama, S. and Tanaka, S.: Molecular cloning of otoconin-22 complementary deoxyribonucleic acid in the bullfrog endolymphatic sac: Effect of calcitonin on otoconin-22 messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*, 144, 3287-3296 (2003)
- (7) Suzuki, N., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. *Zool. Sci.*, 20, 745-748 (2003)
- (8) Suzuki, N. and Hattori, A.: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.*, 73, 2237-2247 (2003)
- (9) Suzuki, N., Yamamoto, M., Watanabe, K., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: The scale is a good model for the evaluation of heavy metals on bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.*, in press

- (10) Suzuki, N.: Physiological role of calcitonin in fish: With special reference to reproductive and feeding periods. In: Proceedings of IBMS-JSBMR Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation (Eds. C. Gay, C.G. Dacke and J.A. Danks), in press
- (11) Suzuki, N., Yamamoto, K., Sasayama, Y., Suzuki, T., Kurokawa, T., Kambegawa, A., Srivastav, A.K., Hayashi, S. and Kikuyama, S.: Possible direct induction by estrogen of calcitonin secretion from ultimobranchial cells in the goldfish. Gen. Comp. Endocrinol., in press

2) 総説

- (1) 笹山雄一, 又多政博, 福森義宏, 松野あきら, 三田雅敏, 今島実: 有鬚動物マシコヒゲムシ (*Oligobranchia mashikoi*) 終体部の外部形態と共生細菌. うみうし通信, 40, 8-9 (2003)
- (2) 笹山雄一: カルシウム代謝調節機構の進化—PTH と PTHrP—. The Bone, 18, メディカルレビュー社, 大阪, 17-22 (2004)
- (3) 笹山雄一: 有鬚動物門マシコヒゲムシはどのように生きているか: その形態学的, 生理学的特徴. 比較生理生化学, 21, 30-36 (2004)

3) 著書

- (1) 笹山雄一, 鈴木信雄: カルシトニン, カルシトニン関連ペプチド, 副甲状腺ホルモン, 副甲状腺ホルモン関連蛋白及びそれらの受容体, 新ホルモンハンドブック, 南江堂, 東京, 印刷中

【研究発表及び研究活動】

1) 研究発表

- (1) 鈴木信雄, 山元恵, 渡部和郎, 服部淳彦: カドミウムの骨細胞に対する作用: ウロコのアッセイ系の開発, 平成15年度日本水産学会大会, 東京 (2003, 4)
- (2) 笹山雄一, 又多政博, 福森義宏, 中川太郎, 梅林正芳, 松野あきら, 今島実: マシコヒゲムシの終体部の構造, 日本動物分類学会第39回大会, 京都 (2003, 5)

- (3) Suzuki, N.: Physiological role of calcitonin in fish: With special reference to reproductive and feeding periods. IBMS-JSBMR Satellite Symposium on the Comparative Endocrinology of Calcium Regulation, 招待講演, 大阪 (2003, 6)
- (4) 矢追雄一, 矢島信弥, 鈴木雅一, 戸村秀明, 笹山雄一, 菊山栄, 田中滋康: ウシガエル内リンパ囊における炭酸カルシウム結晶の形成と分解, 第28回日本比較内分泌学会, 富山 (2003, 8), Proc. Japan Soc. Comp. Endocrinol., 18, 39 (2003)
- (5) 鈴木信雄, 服部淳彦: ビスフェノールA及びカドミウムの骨細胞に対する作用: キンギョのウロコによる解析, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1600 (2003)
- (6) 鈴木信雄: 魚類におけるカルシトニンの生理作用: ウロコを用いたアッセイ系による解析と他の物質への応用, 第74回日本動物学会, 関連集会 (ホメオスタシス研究会), 函館 (2003, 9)
- (7) 笹山雄一, 福森義弘, 松野あきら, 又多政博, 梅林正芳, 今島実: 有鬚動物門マシコヒゲムシの形態学的・生理学的・生態学的研究, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1529 (2003)
- (8) 福田貢, 笹山雄一, 又多政博, 福森義弘, 小木曾正造, 峯岸孝彰, 今島実: 有鬚動物門マシコヒゲムシの自然界における生態, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1532 (2003)
- (9) 篠崎裕利, 笹山雄一, 三田雅敏: 有鬚動物門マシコヒゲムシの脂質組成の分析, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1532 (2003)
- (10) 出口真理子, 笹山雄一, 松野あきら, 福森義弘: 有鬚動物門マシコヒゲムシの栄養体部分の組織学的研究, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1532 (2003)
- (11) 東野翔子, 笹山雄一, 又多政博, 福森義弘, 松野あきら, 今島実: 有鬚動物門マシコヒゲムシのヒゲの変異について, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1532 (2003)
- (12) 矢追雄一, 矢島信弥, 鈴木雅一, 戸村秀明, 笹山雄一, 菊山栄, 田中滋康: ウシガエル内リンパ囊の液胞型プロトンATPase AおよびEサブユニットの発現, 第74回日本動物学会, 函館 (2003, 9), Zool. Sci., 20, 1607 (2003)

(13)鈴木信雄，服部淳彦：ウロコを用いたカルセミックホルモンの骨細胞に対する作用，第3回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会，東京（2003，12），「第3回カルシトニン/副甲状腺ホルモン研究会」記録集，株式会社メド・ウイズ，東京，p 35

2) 受賞

(1) 矢追雄一，矢島信弥，鈴木雅一，戸村秀明，笹山雄一，菊山栄，田中滋康：ウシガエル内リンパ囊における炭酸カルシウム結晶の形成と分解，日本比較内分泌学会第28回大会ベストポスター賞，(2003，8)

【研究交流】

1) 共同研究

- (1) 笹山雄一：タイ・バンコク郊外におけるメダカの雌雄性を指標にした環境汚染の研究，国立スリナカリンウイロット大学（タイ）Dr. Wichian Magtoon
- (2) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体のバクテリオサイト微細構造の研究，島根大学生物資源科学部教授 松野あきら氏
- (3) 笹山雄一：マシコヒゲムシ栄養体の脂肪酸組成の研究，帝京大学理工学部助教授 三田雅敏氏
- (4) 笹山雄一：特殊な生理機能を有する海産無脊椎動物のデータベースの構築，広島大学理学部教授 道端齊氏
- (5) 鈴木信雄：フグの骨代謝に関する研究，メルボルン大学（オーストラリア）Dr. Janine A. Danks
- (6) 鈴木信雄：魚類のカルセミックホルモン（カルシトニン、ビタミン D、スタニオカルシン）に関する研究，ゴラクプール大学（インド）Dr. Ajai K. Srivastav
- (7) 鈴木信雄：メラトニンの骨代謝に関する研究，東京医科歯科大学教授 服部淳彦氏
- (8) 鈴木信雄：重金属の骨細胞に及ぼす影響：ウロコのアッセイ系による解析，国立水俣病研究センター主任研究員 山元恵氏
- (9) 鈴木信雄：ニワトリのカルシトニンレセプターのクローニングとその発現に関する研究，新潟大学農学部教授 楠原征治氏，同助手 杉山稔恵氏

2) 来学した外国人研究者

(1) Dr. Wichian Magtoon, Associate Professor, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok,

2003.8/16-23

3) 各種活動

社会活動

(1) 笹山雄一, 石川県環境影響評価委員会委員, 2003-現在

(2) 笹山雄一, 石川県原子力発電温排水検討委員会委員, 2000-現在

(3) 笹山雄一, 石川県農林水産技術審議会委員, 2000-現在

(4) 笹山雄一, 内浦町海洋深層水利用検討会委員, 2000-現在

(5) 笹山雄一, のと海洋ふれあいセンター研究報告編集委員会委員, 1994-現在

【研究費】

1) 科学研究費

(1) 鈴木信雄 (代表), 若手研究B, 重金属及び内分泌攪乱物質の骨代謝に及ぼす作用:

骨硬化ホルモンとのクロストーク, 700千円

2) その他

(1) 鈴木信雄 (代表), 平成15年度重点化経費 (若手教官の萌芽的研究), 電磁界による骨形成促進

機構の解明, 893千円

【利用状況】

1) 利用者及び研究目的

- 4 / 21 ~ 4 / 22 金沢大学理学部
福森義宏 教授 他4名
「マシコヒゲムシの採集」
- 4 / 21 ~ 4 / 22 金沢大学低レベル放射能実験施設
小村和久 教授 他11名
「海洋フィールド実験」
- 4 / 28 ~ 5 / 2 日本大学法学部
峯岸秀雄 講師
「海産小型渦虫類の分類及び間隙動物群の調査」
- 5 / 28 ~ 5 / 29 金沢大学理学部
福森義宏 教授
「ヒゲムシに関する共同研究」
- 5 / 28 ~ 5 / 30 京都大学農学研究科
甲斐嘉晃 他1名
「メバル属、魚類の採集」
- 6 / 6 ~ 6 / 7 金沢大学理学部
福森義宏 教授
「ヒゲムシに関する共同研究」
- 6 / 18 ~ 6 / 19 金沢大学工学部
塚脇真二 助教授 他6名
「九十九湾内ならびに周辺海域での採泥」
- 7 / 12 ~ 7 / 13 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他5名
「生物採集及び固定のため」
- 7 / 18 ~ 7 / 30 京都大学総合博物館
伊勢戸徹
「内肛動物の採集」

- 7 / 19 ~ 7 / 20 金沢大学理学部
神谷隆宏 助教授 他 24名
「地質調査」
- 7 / 22 ~ 7 / 23 金沢大学低レベル放射能実験施設
井上睦夫 助手 他 2名
「海水試料のサンプリング」
- 8 / 4 ~ 8 / 5 富山大学理学部
黒田英世 教授 他 5名
「観察及び採集」
- 8 / 7 ~ 8 / 8 富山大学理学部
小松美英子 教授 他 1名
「ニホンクモヒトデの放卵・放精の人為的誘導と発生の研究」
- 9 / 1 ~ 9 / 7 金沢大学自然科学研究科 博士前期課程 2年
舟本冴子 他 3名
「キクメイシモドキの生態調査」
- 9 / 28 ~ 9 / 29 金沢大学自然科学研究科 博士前期課程 1年
會田将人
「九十九湾内の底泥の採取」
- 11 / 18 ~ 11 / 19 金沢大学低レベル放射能実験施設
井上睦夫 助手 他 2名
「海水試料のサンプリング」
- 11 / 25 のと海洋ふれあいセンター
坂井恵一 普及課長
「研究打ち合わせ」
- 12 / 4 のと海洋ふれあいセンター
達克幸 普及課主任技師
「海洋生物の調査」
- 12 / 12 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他 1名
「海洋生物の採集」

- 12/25 のと海洋ふれあいセンター
坂井恵一 普及課長
「研究打ち合わせ」
- 1/15 のと海洋ふれあいセンター
達克幸 普及課主任技師 他1名
「海洋生物の調査」
- 2/12 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他1名
「海洋生物の採集」
- 3/23～3/25 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター
鈴木範男 教授
「研究打ち合わせ」
- 2) 臨海実習等
- 7/8～7/10 富山県立砺波高校
松原禎弘 教諭
他43名
「ウニの初期発生の研究・磯の生物調査」
- 8/11～8/13 金沢大学医学部
長井雅子 教授
他33名
「生命科学実験」
- 8/17～8/23 公開臨海実習
甲南大学
長井光太郎 他11名
- 8/25～8/30 富山大学理学部
小松美英子 教授
他18名
「臨海実験の実施」
- 9/1～9/3 金沢大学理学部
矢島孝昭 教授
他21名
「生物学実習」

3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成15年度臨海実験施設利用者数（延べ人数 2,490人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	10	3	139	0
5	2	4	155	6
6	10	0	156	0
7	10	24	201	134
8	8	18	377	196
9	3	0	243	0
10	2	0	165	0
11	4	0	152	0
12	0	0	165	0
1	0	0	155	0
2	0	0	115	0
3	0	3	30	0
合計	49	52	2,053	336

平成15年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ
4	7	3
5	9	1
6	8	3
7	6	3
8	6	3
9	5	2
10	5	2
11	6	2
12	6	3
1	3	5
2	3	1
3	4	0
合計	68	28

研 究 報 告

* キンギョの血漿Ca及びカルシトニン濃度に及ぼすビスフェノールAの影響
(p 14-15)

Effects of bisphenol A on the plasma calcium and calcitonin concentrations in goldfish

* キンギョの破骨細胞、骨芽細胞及び血漿Ca濃度に及ぼすカドミウムの影響
(p 16-17)

Effects of cadmium on the osteoclastic and osteoblastic activities and plasma calcium concentrations in goldfish

* ミサキギボシムシの生殖周期および放卵・放精に関わる要因 (p 18)

Reproductive cycle and factors relating to spawning in the acorn worm
(*Balanoglossus misakiensis*)

* マシコヒゲムシの生態学的、行動学的観察 (p 19)

Ecological and behavioral observation of the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

* マシコヒゲムシの栄養体における脂肪貯蔵細胞の存在とバクテリオサイトにおける共生細菌の分布について (p 20)

Existance of fat storage cells in trophosome and distribution of symbiotic bacteria in bacteriocytes in the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

* マシコヒゲムシの“ヒゲ”の形態学的、組織学的研究 (p 21)

Morphological and histological studies of tentacles in the beard worm
(*Oligobrachia mashikoi*)

キンギョの血漿Ca及びカルシトニン濃度に及ぼすビスフェノールAの影響

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Effects of bisphenol A on the plasma calcium and calcitonin concentrations in goldfish

魚類においてエストロゲンは、生殖時に肝臓に作用し、卵黄タンパク質であるビテロゲニンの合成を促進する。またエストロゲンは、ウロコの破骨細胞を活性化させ、ウロコからのカルシウムの溶出を促進し、血液中のカルシウム濃度を上昇させることも知られている。さらにエストロゲンを未成熟なキンギョやサケ科魚類に投与すると、血液中のカルシウム濃度を調節するホルモンであるカルシトニンの分泌が促進されることも報告されている。最近我々は、ウロコの培養系により、エストロゲンにより活性化された破骨細胞がカルシトニンにより抑制されることを証明した。したがって、魚類の生殖時には、エストロゲンとカルシトニンの相互作用により、血液中のカルシウム濃度が調節されていると考えられる。

ビスフェノールAは、主としてポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として使用され、食品の包装等に広く用いられている。最近、この物質は女性ホルモンであるエストロゲンの受容体と結合し、エストロゲン様の作用が現れるために、生殖を攪乱することがわかってきた。エストロゲンは脊椎動物のカルシウム代謝にも作用するため、ビスフェノールAも何らかの影響を及ぼす可能性が考えられるが、ビスフェノールAのカルシウム代謝に及ぼす影響は調べられていない。

そこで本研究においては、ビスフェノールAのカルシウム代謝に及ぼす影響を調べるため、ビスフェノールAで処理したキンギョの血液中カルシウム及びカルシトニン濃度を調べた。

内因性のエストロゲンの影響を除くため、未成熟のキンギョ（体重5g前後）を実験に用いた。まずキンギョ8匹をMS222（Aldrich）で麻酔し、エラからペパリン処理したガラス毛细管を用いて血液を採取した。その後、遠心機で血漿を分離し、分析まで-20°Cで保存した。次に、48匹を2群に分けた。実験群は、ビスフェノールA（和光）（ 10^{-6} M）を含む水で飼育し、対照群は水道水で飼育した。これらのキンギョは、2、4及び8日後にそれぞれ8匹ずつ、前述の方法で麻酔し、血液を採取した。血漿Ca濃度は、カルシウム-Cテストワコー（WAKO）を用いて測定し、カルシトニン濃度はサケカルシトニン抗体（コスモバイオ）を用いたエライサ法により測定した。さらに、血液中に卵黄タンパク質の1種であるビテロゲニンを検出するため、Laemmliの方法によりSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。なお、サンプルは8日後の血漿を用い、分離ゲルは7.5%アクリルアミドを使用した。電気泳動後、クマジーブリアントブルーR250（Research Organics Inc.）によりゲルを染色し、ビテロゲニンを検出した。

血液中のカルシウム濃度の変化をFig.1に示し、カルシトニン濃度の変化をFig.2に示す。血液中のカルシウム濃度は、ビスフェノールAを含む水で4日間飼育した時、コントロール（ 7.34 ± 0.11 mg/100ml）よりも有意に上昇した（ $P < 0.001$, 8.94 ± 0.25 mg/100ml）。しかしながら、8日後には、コントロール（ 7.28 ± 0.39 mg/100ml）よりも有意に低下し（ $P < 0.05$, 5.96 ± 0.42 mg/100ml）、ビスフェノールAは血液中のカルシウム濃度に影響を及ぼすことがわかった。

一方、血液中のカルシトニン濃度は、ビスフェノールAを含む飼育水で飼育すると、その濃度は徐々に低下し、8日後には、コントロール（ 209.11 ± 37.99 pg/ml）との間に有意差が認められた（ $P < 0.05$, 117.50 ± 10.86 pg/ml）。なお、電気泳動により、実験群の血漿中にビテロゲニンは検出されたが、コントロール群にはそのバンドはみられなかった。

以上のことから、ビスフェノールAは、エストロゲン受容体と結合し、ビテログニンの合成を促す作用はある。しかしながら、カルシウム代謝における作用は、エストロゲンとは異なっており、血液中のカルシウム及びカルシトニン濃度を逆に低下させていることがわかった。さらに我々は、ウロコの骨細胞における作用をエストロゲンと比較してみると、エストロゲンは破骨及び骨芽細胞を活性化させたが、ビスフェノールAは逆にこれら両方の細胞活性を阻害したという結果を報告している。したがって、ビスフェノールAはエストロゲンと異なり、魚類のカルシウム代謝に悪影響を及ぼしていることがわかった。今後、他のカルシウム代謝に関与するホルモンに及ぼす影響について調べると共に、ビスフェノールA以外の内分泌攪乱化学物質についても調べていく予定である。

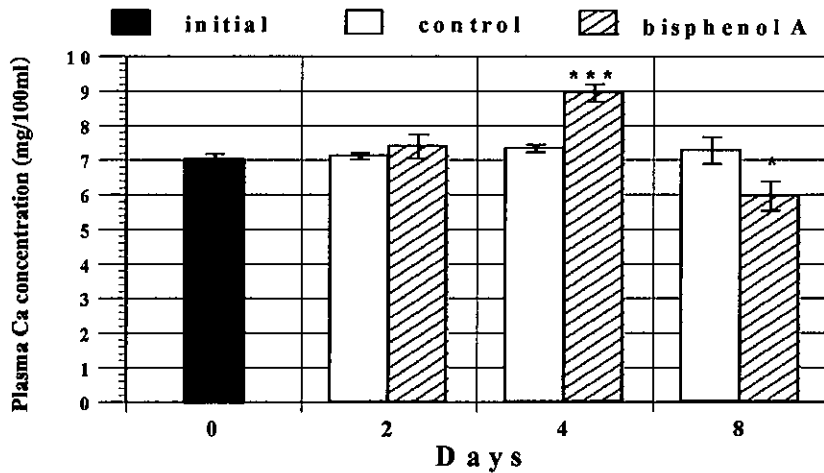


Fig. 1 Plasma calcium (Ca) levels in the bisphenol A-treated goldfish and control goldfish. Values are means \pm SEM. *,*** indicate statistically significant differences at $P<0.05$ and $P<0.001$, respectively, compared with the values in the control.

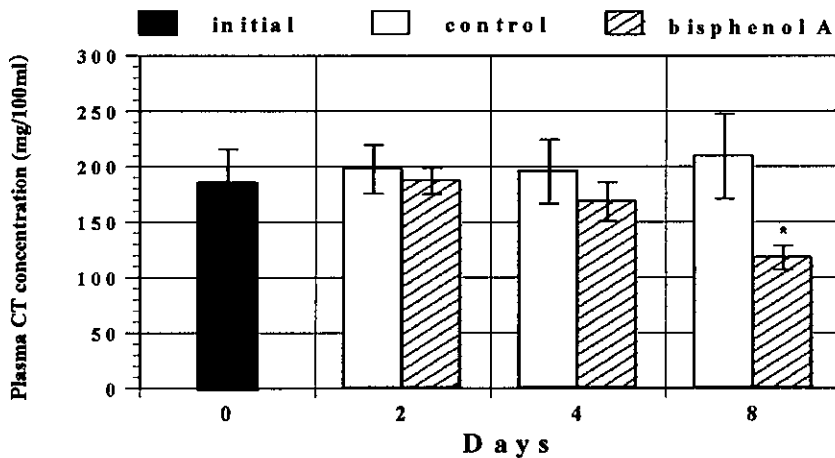


Fig. 2 Plasma calcitonin (CT) levels in the bisphenol A-treated goldfish and control goldfish. Values are means \pm SEM. * indicates a statistically significant difference at $P<0.05$, compared with the values in the control.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B（14740455）の援助により行われた。

キンギョの破骨細胞、骨芽細胞及び血漿Ca濃度に及ぼすカドミウムの影響

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Effects of cadmium on the osteoclastic and osteoblastic activities and plasma calcium concentrations in goldfish

魚のウロコには、破骨細胞と骨芽細胞とが共存し、I型コラーゲンも存在している。その中のカルシウムは、ハイドロキシアパタイトの形状をしている。すなわちウロコは、ヒトの脊椎骨を薄く輪切りにしたような構造である。このような構造を持つウロコを用いて培養系を開発した（昨年度研究報告参照）。

一方カドミウムは、イタイタイ病（骨軟化症）を引き起こす重金属である。その作用機構は、腎障害を経る経路が有力だが、骨に対する直接的な影響に関しては不明な点が多い。そこで昨年度は、ウロコの培養系を用いて、カドミウムの骨細胞に対する直接的な作用を調べ、ウロコで発現している遺伝子も解析した。その結果、破骨細胞の活性を低下させ、カドミウムが骨に直接的に作用していることを明らかにした。さらにウロコの骨細胞で発現している遺伝子を解析すると、カドミウムの解毒に関係するタンパク質であるメタロチオネインの発現が上昇し、短時間の培養（18及び36時間）では、骨芽細胞の活性は低下しなかった。しかしながら、骨芽細胞の増殖や分化に関係するエストロゲン受容体及びインシュリン様成長因子-1の発現が減少していたので、長期間の培養（64及び96時間）では、その活性が低下した。以上の結果が、生体内でも起こっているかを明らかにするため、本研究ではカドミウムを含む水でキンギョを飼育し、ウロコの破骨及び骨芽細胞の活性と血液中のカルシウム濃度を調べた。

未成熟のキンギョ（体重5g前後、16匹）を実験に用いた。これらを2群に分けた。実験群は、カドミウム（和光）（ 10^{-7} M）を含む水で飼育し、対照群は水道水で飼育した。4日間飼育後、これらのキンギョをMS222（Aldrich）で麻酔し、ウロコ及び血液を採取した。ウロコは、10%ホルマリンを含む0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）で固定し、破骨細胞の活性（酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性）及び骨芽細胞の活性（アルカリフォスファターゼ活性）を測定した。血液は、エラからペパリン処理したガラス毛細管を用いて血液を採取した。その後、遠心機で血漿を分離し、分析まで -20°C で保存した。血漿Ca濃度は、カルシウム-Cテストワコー（WAKO）を用いて測定した。

ウロコの破骨細胞（A）及び骨芽細胞（B）の結果をFig. 1に示す。破骨細胞の活性は、コントロール（ 1.23 ± 0.07 nmol pNP produced \times (mg scale \times h) $^{-1}$ ）よりも有意に（ $P < 0.05$ ）低下した（ 1.09 ± 0.04 nmol pNP produced \times (mg scale \times h) $^{-1}$ ）。また、骨芽細胞もコントロールとカドミウム処理群において、有意差（ $P < 0.01$ ）が認められ、その活性が低下していた（コントロール： 2.05 ± 0.07 nmol pNP produced \times (mg scale \times h) $^{-1}$ ；実験群： 1.83 ± 0.12 nmol pNP produced \times (mg scale \times h) $^{-1}$ ）。これらの結果は、前述の*in vitro*のウロコの培養系で、64-96時間培養により、両方の細胞の活性が低下したという結果と一致していた。したがって、*in vivo*においても*in vitro*の結果が再現されたことを示している。

さらに、血液中のカルシウム濃度もコントロール（ 7.56 ± 0.37 mg/100ml）よりも有意に低下した（ 6.54 ± 0.38 mg/100ml, $P < 0.01$ ）（Fig. 2）。ウロコに含まれるカルシウム含量は、全体の20%に過ぎないが、生殖や絶食時には、他の硬組織よりもカルシウムの供給量が多いことが知られている。したがって、カドミウムがウロコの骨細胞の活性を低下させ、キンギョのカルシウム代謝を攪乱させた為、血液中のカルシウム濃度を調節することができなくなり、低下したと考えられる。

以上のことから、ウロコのアッセイ系で得られた結果は、生体内でも再現されることが判明した。したがって、この系により、重金属の骨細胞に対する作用を迅速に把握できる可能性がある。さらにこの系は、前述の内分泌攪乱化学物質に対しても有効であり、広く環境汚染物質の骨に対する作用を調べるのに使用できる可能性がある。今後、この系を他の環境汚染物質にも適用し、骨に対する影響を調べていく予定である。

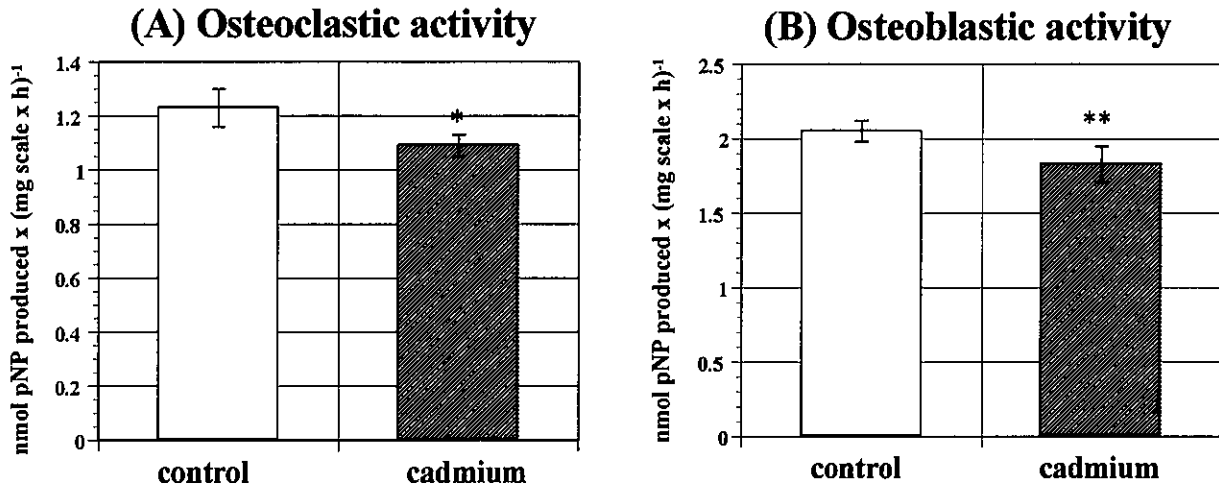


Fig. 1 Osteoclastic (A) and osteoblastic (B) activities in the cadmium-treated goldfish and control goldfish. Values are means± SEM. *,** indicate statistically significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively, compared with the values in the control.

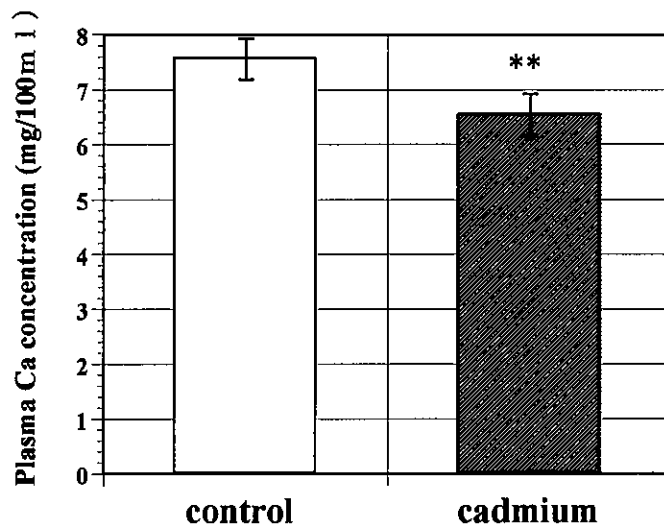


Fig. 2 Plasma calcium (Ca) concentrations in the cadmium-treated goldfish and control goldfish. Values are means± SEM. ** indicates a statistically significant difference at $P<0.01$, compared with the value in the control.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B（14740455）の援助により行われた。

ミサキギボシムシの生殖周期および放卵・放精に関わる要因

小木曾正造

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Syozo Ogiso: Reproductive cycle and factors relating to spawning in the acorn worm (*Balanoglossus misakiensis*)

ミサキギボシムシ(*Balanoglossus misakiensis* KUWANO)は半索動物門腸鰓綱ギボシムシ科オオギボシムシ属の動物で、雌雄異体で成熟すると体の前方にある生殖翼に卵あるいは精子を蓄え、体外受精をする。私は卒業論文研究において、本種の放卵あるいは放精の過程を詳しく解明した。本研究においては、能登半島における本種の生殖周期の解明と、生殖行動に関わる要因が何であるかを明らかにすることを目的とした。

本研究においては、まず一年を通して採集された本種の生殖巣について組織標本を作成し、生殖周期を調べた。その結果、4月では雌雄とも生殖巣は粘液が占めており、卵母細胞は卵黄の蓄積に至っておらず、精巣においては精原細胞を確認することができなかった。しかしながら、5月から6月にかけてメスにおいては卵母細胞に卵黄を蓄積し始め、オスでは精原細胞の出現とともに精子への変態が促進された。7月及び8月には成熟期を迎え、放卵・放精が行われた。その後、9月のメスにおいては卵原細胞しか見られなかったが、10月にそれらは卵母細胞に変わり、3月まで徐々にその数が増え、4月の卵巣の状態になると思われた。オスでは9月にはわずかに精子の残っている小葉も見えたが、10月から3月まで生殖細胞は全く見られなかった。

本研究においては、次に5月から7月上旬にかけて本種の急激な成熟を組織学的に精査し、成熟の数量化を試みた。メスにおける卵細胞1個の平均面積は5月7日では $0.7 \pm 0.22 \text{ cm}^2$ (mean \pm SE)であり、その後、緩やかに増加し6月18日で $2.7 \pm 0.33 \text{ cm}^2$ であったが、6月24日では $4.8 \pm 0.34 \text{ cm}^2$ と急激に増加し、7月8日で $6.3 \pm 0.71 \text{ cm}^2$ となった。オスにおける精子及び精母細胞の占める面積は5月7日では $6.1 \pm 1.36 \text{ cm}^2$ であり、その後、緩やかに増加し、6月18日で $122.7 \pm 29.98 \text{ cm}^2$ であったが、6月24日では $265.3 \pm 5.69 \text{ cm}^2$ と急激に増加しプラトーに達した。このように急激な成熟は雌雄で一致して起こり、海水温度が 21°C を越える日が続くことと関連があるように思われた。なお、これらの数値は便宜上の値で、実際はメス、オスそれぞれ1/133と1/334の値である。

本研究では、さらに本種の放卵・放精の要因を調べるために、酸素欠乏、温度上昇、1-メチルアデニン投与、最大の神経系がある“襟”抽出物の投与の刺激を与えたが、いずれも配偶子の放出を引き起こさなかった。これらの実験を遂行する過程で、放卵・放精のタイミングを逃した個体は、その後全く放卵・放精を起こさないことがわかった。しかしながら、上記の処理を行った時に水槽において放卵・放精が起こったタイミングを調べると、全て自然界において満潮から干潮へ向かう間の後半に起きていることが明らかになった。また、自然界において放卵・放精が観察された時間もこの時間に一致した。満潮から干潮へ向かう時に放卵・放精を行えば、受精卵はより沖へ運ばれ、本種の生息域を広げることができる利点があると考えられる。この現象には体内時計が関与していると考えられるが、今後の検証を必要とする。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 小木曾正造君の修士論文の一環として行われた。)

マシコヒゲムシの生態学的、行動学的観察

福田 貢

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Mitsugu Fukuda: Ecological and behavioral observation of the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

有鬚動物門ヒゲムシ綱の動物は、頭部に“ヒゲ”とよばれる触手を持つが、口も消化管も無く、体内に化学合成細菌を共生させて生きている。体型は、体幅が0.6mmで体長は数cm〜数十cmという極めて細長く、切れ易い形態をし、自ら分泌して造った数十cmの長さの棲管に入っている。

これまでヒゲムシ類は海底において、実際にどのような生態を示すかの報告はなく、想像図のみ描かれている。それによると体の中央付近のガードルと言われる部分を海底表面近くに置き、体の前半部を海底より突出させ、ヒゲは棲管の入り口付近より出るか否か微妙に描かれている。したがって私は、卒業論文研究としてまず石川県能登半島の九十九湾にのみ棲息するマシコヒゲムシの海底における生態を観察した。

本種は水深25mの海底に棲むため、その地点へ焦点距離が15cmの水中ビデオカメラと、3cmまでズーム可能なカメラを下ろし、撮影を試みた。6月に撮影した映像では、これまでの想像図とは異なり、棲管の海底より出ている部分は1cm以下であった。従って、本種は棲管のほとんどを泥の中に埋め、生活を海底下で営んでいると判断される。また、昼夜、撮影を行ったがヒゲを棲管から明らかに出している個体を発見できなかった。12月にカメラを降ろして撮影すると、冬の海底表面は夏よりも多くのデトライトが堆積し、本種を見つけるのすら困難であった。従って、本種は、通常ヒゲを棲管より出していないと考えざるを得ない。

有鬚動物門にはヒゲムシ綱の姉妹群としてハオリムシ綱がある。鹿児島水族館はサツマハオリムシに硫化水素を与えて長期間の飼育に成功しており、硫化水素を与えるとヒゲムシのヒゲに相当するエラをわずかに棲管より出すことがわかっている。従って、私の卒業研究では、次にサツマハオリムシの飼育のノウハウをマシコヒゲムシに応用し、硫化水素に対してどのような行動をとるかを調べた。硫化水素を発生させる硫化ナトリウムは、海水に溶けにくいので淡水で溶かし、それを約7ml/min程度の割合で50ℓの水槽に滴下させるとともにエアストーンを用いて海水を攪拌させた。対照実験として、硫化ナトリウムを含まない淡水を滴下する水槽も設けた。その結果、対照実験では、9個体中9個体の100%が棲管の奥深くに入ったまま動きを見せなかったのに対し、硫化水素を付加した個体は10個体中100%の10個体が棲管の入り口近くにまで体を伸ばしてきた。さらに、その中の60%にあたる6個体が、棲管入り口よりわずかにヒゲを出した。ヒゲを出さなかった個体では、血が凝固して入り口を塞いでおりヒゲを出すことができなかったことが後でわかった。従って、本種も硫化水素に反応してサツマハオリムシのようにわずかにヒゲを棲管より出す行動をとることは間違いないと考えられる。今後は、この行動と自然界における観察との接点を探す必要があると思われる。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 福田 貢君の卒業論文の一環として行われた。)

マシコヒゲムシの栄養体における脂肪貯蔵細胞の存在と バクテリオサイトにおける共生細菌の分布について

出口真理子

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Mariko Deguchi: Existence of fat storage cells in trophosome and distribution of symbiotic bacteria in bacteriocytes in the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

有鬚動物門のヒゲムシ類は冷水域や深海に棲む動物で、口も消化管もなく、体に化学合成細菌を共生させて生きている。細菌の共生部位は、個体発生の過程で退化した消化管に相当し、それは成体では栄養体と呼ばれている。栄養体は背血管と腹血管に挟まれた領域で、細胞内に細菌を共生させている、いわゆるバクテリオサイト領域が中心にある。その周囲には栄養を貯蔵する細胞が存在し、多量のグリコーゲン顆粒やおそらく脂肪や蛋白質と思われる顆粒も認められている。しかしながら、これらの記述は、主として電子顕微鏡による部分的な観察に基づいてなされたものであり、実際に組織全体を調べて栄養体が説明されているわけではない。

本研究では、まず本種の栄養体部分について通常の光学顕微鏡標本を作製し、詳細に観察した。その結果、栄養体は、大部分が白く抜けて観察され、所々に結合組織が膜状に内部に陥入している組織であることがわかった。このような所見は、白く抜けた部分が脂肪組織であることを強く示唆している。したがって、次の段階として、凍結切片を作製し、組織化学的手法によって脂肪組織の検出を試みた。すなわち、本種をメントールにより麻酔し、栄養体部分を切り出した。それをO.C.Tコンパウンドに包埋し、液体窒素により瞬時に凍らせ、クリオスタットを用いて -20°C 下で $10\sim 20\mu\text{m}$ の厚さに薄切した。それを10%海水ホルマリンで5分間固定し、オイルレッド染色を施した。その結果、脂肪は赤い多数の粒子として、栄養体の中心部を除く周囲の組織においてのみ検出された。これまで、栄養体において多量の脂肪の存在は報告されておらず、少なくとも本種の栄養体には脂肪貯蔵細胞と言ふべき細胞があることが示唆された。さらに本種の栄養体の中性脂肪の脂肪酸を分析すると、オレイン酸とパルミトレイン酸の2種類の不飽和脂肪酸が全脂肪酸の68%を占めていることが分かった。この事実は、本種は深海性で冷たい海に棲む先祖に由来し、その様な環境でも貯蔵脂肪は固形化せず、生理的にエネルギーとして転換し易い状態にあることを示唆している。

一方、オイルレッド染色を施した標本を詳しく観察すると、栄養体において中心部に位置するバクテリオサイトと脂肪貯蔵細胞に接しているバクテリオサイトでは細胞質における共生細菌の分布が異なっているように見えた。すなわち、中心部に位置するバクテリオサイトにおいて共生細菌は核の周囲に偏って分布していたが、栄養体の周辺部に位置するバクテリオサイトでは、脂肪貯蔵細胞側に偏って分布していた。これらの事実は、バクテリオサイトにおいて中央部に位置する細胞と脂肪貯蔵細胞に接する細胞では、宿主細胞において核の共生細菌への関与の仕方に違いがあることを暗示している。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 出口真理子君の卒業論文の一環として行われた。)

マシコヒゲムシの“ヒゲ”の形態学的、組織学的研究

東野翔子

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測応用研究センター, 臨海実験施設

Shoko Higashino: Morphological and histological studies of tentacles in the beard worm (*Oligobrachia mashikoi*)

マシコヒゲムシ (*Oligobrachia mashikoi*) は、1973年に石川県能登半島の九十九湾において、有鬚動物門ヒゲムシ綱の1新種として記載され、この和名は当時の金沢大学理学部附属臨海実験所所長の益子帰来也先生に献名された。この動物の体の前方部には“アゴヒゲ”が生えている。ヒゲという言い方は、体の背腹が逆転して理解されていた時につけられた呼び方で、現在は、発生学的知見から、以前腹側と考えられていた側は背側であり、背側と考えられていた側は、腹側であると分かっている。従って、実際にヒゲは他の無脊椎動物の触手が生えている位置に生えているので触手と相同である。しかしながら、現在においても、ヒゲは本動物門の特徴の一つであり、心臓を出た血液の一部はヒゲに運ばれ、そこでガス交換がなされているので、ヒゲは生理的にも重要な器官であると考えられている。

本種の模式標本は13本のヒゲを持つが、私はヒゲの数にどの程度の変異があるかについて興味を持ち、124個体についてヒゲの数を調べた。その結果、最少で5本、最多で20本の変異があった。13本を中心に12-14本の個体の総計は56個体であり、それ以外の本数を持った個体の総計は68個体であった。従って、模式標本の数は本種の代表的なヒゲの数を表していると言うことができるが、一方では、ヒゲの数からのみ本種であると同定する事は不可能であることも示している。また、本種においてヒゲとして生理学的に機能を果たすことができれば、本数は厳密に規定されていないのかもしれない。さらに個体によっては、ヒゲの長さや太さにも変異があり、ヒゲは再生できることが暗示された。

本種のヒゲの基部付近を横断する組織標本を作製し、ヘマトキシリンとエオシンで染めると、中心部と表層部の二重構造をとっているように見えた。中心部は一層の細胞に囲まれており、その中心にあるスペースは体腔と連続していた。そのスペースには心臓からの血液の通り道とヒゲの先端から戻ってくる血液の通り道が区別された。表皮には、粘液細胞も混在しており、内容物を放出し終わったと見なされる細胞もあった。しかしながら、これまで別種のヒゲムシでは、電子顕微鏡による観察の結果、中心部に体腔を取り囲んで筋細胞が存在することが報告されている。本種においても電子顕微鏡によってその部位に多くの平滑筋繊維を持つ細胞が認められた。本研究ではこの筋繊維を持つ細胞がヒゲの根元から先端までどの様に分布しているのかを調べるために、一次抗体としてヒト由来の α チューブリンのC末端より149-448個のアミノ酸残基を認識するウサギ抗体を用いて、筋細胞を特異的に免疫染色することを試みた。その結果、ヒゲの基部付近においては、多数の筋細胞の細胞質に強い反応を示す部分が見られた。一方、ヒゲの先端部分は基部よりやや細いが、粘液細胞を含む表皮と筋細胞があり、組織学的構成はヒゲの基部と変わらないように見えた。しかしながら、抗体に反応する細胞は明らかに少なかった。このことは、ヒゲの曲げ運動の出力は、先端部より基部や中部の筋細胞が大きく担っていることを示唆している。

(本研究は、金沢大学理学部生物学科 東野翔子君の卒業論文の一環として行われた。)

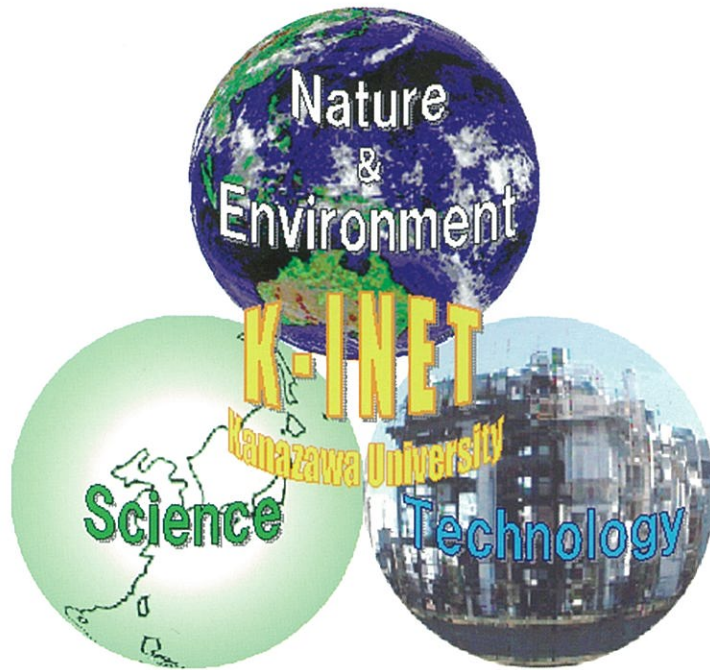
【構成員】

1) 職員

教授	笹山雄一 (sasayama@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 理学博士 専攻 生物多様性学、比較生理学 (有鬚動物門マシコヒゲムシの形態学・生理学・生態学を研究している)
助手	鈴木信雄 (nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 博士(理学) 専攻 骨学、比較内分泌学 (骨代謝に関与するホルモン、様々な環境汚染物質及び重力・磁界等の環境要因の骨細胞に対する作用を研究している)
技術専門職員	又多政博 (matada@sweet.ocn.ne.jp) 専門 海産無脊椎動物一般
事務補佐員	曾良美智子(msora@sweet.ocn.ne.jp)

2) 学生

博士前期課程2年	小木曾正造 (syozo-o@sweet.ocn.ne.jp)
博士前期課程1年	峯岸孝彰 (t-mine@sweet.ocn.ne.jp)
4年生	福田貢 (mitsugu-f@sweet.ocn.ne.jp) 出口真理子 (deguchim@sweet.ocn.ne.jp) 東野翔子 (shoko-h@sweet.ocn.ne.jp)



金沢大学
自然計測応用研究センター

自然計測応用研究センター 臨海実験施設

〒927-0553 石川県珠洲郡内浦町小木ム4-1

TEL (0768) 74 - 1151 FAX (0768) 74 - 1644

Noto Marine Laboratory, Kanazawa University, Ogi, Uchiura, Ishikawa 927-0553, JAPAN