

学 位 論 文 題 名

Cell Biological Studies on the Tributyltin-induced
Cellular Damage and Its Restoration
with Physiologically Functionalized Aqueous Solution
in *Euglena gracilis* as Model Organism

（ユーグレナ・グラシリスをモデル生物に用いた
トリブチルスズ惹起細胞障害発現と生理的機能化水溶液による
機能回復に関する細胞生物学的研究）

学位論文内容の要旨

地球環境の悪化は食物連鎖により広く生物に被害をもたらす。また、環境汚染化学物質は生体の恒常性や生理機能に作用し、健康障害、疾病を顕在化させる恐れがある。環境汚染問題が深刻化するなか、近年、低濃度でも生体障害を惹起する化学物質、なかでも有機スズ化合物、tributyltin chloride (TBTCI) による影響が高濃度域のみならず極低濃度域においても指摘され、その実態解明を含め早急な対応が望まれている。TBTCI はかつて生物付着防止の目的で船底塗料や漁網に使用され、現在も内湾に蓄積された本化合物による汚染や水圏生物に対する被害が指摘され、ppb レベルの曝露で巻貝の生殖機能障害が堀口ら (1998) によって報告されている。比較的高等な生物への影響について詳細な検討が始められている一方、水圏の一次生産者に対する細胞機能障害に関する研究は殆ど行われていない。高等動物のみならず、食物連鎖の低位に位置する生物に対してもその毒性発現メカニズムを明らかにし、双方から問題の解決に取り組む事が有効である。環境汚染物質による障害を解析するとき、高等動物では様々な過程を経るため症状が複雑化し解析が困難になるため、基本的に類似した細胞機能を持つ真核単細胞生物を用いる方がより単純かつ高感度

に評価できる。

本研究は、水圏環境汚染物質有機スズ化合物の水圏微小生物に対する障害発現と生理的機能化水溶液による機能回復の細胞生物学レベルでの解明を目的とした。モデル生物としてストレスに対して特徴的な細胞応答を示すユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) を選んだ。単細胞真核生物ユーグレナは生物の進化で系統樹の根幹に位置し、自身が藻類と鞭毛虫、植物と動物の双方に分類されている。ユーグレナは原核生物に比べ代謝や異化作用、細胞機能に高等生物との多くの共通項を有し、外部ストレスに対しても鋭敏に反応する。

先ず、顕微鏡画像解析システムを用いて TBTCI 曝露濃度、接触時間と遊泳能、細胞形態との関係を調べた。ユーグレナは通常的环境下では紡錘型をしており、細胞を回転させながら直進あるいは蛇行、後退運動をする。TBTCI 曝露ストレスにより瞬時に鞭毛を切離し、涙滴型をへて球形となり運動能を喪失し休止状態へ移行する。その形態変化は一定レベルまで TBTCI 曝露濃度に依存して惹起し、ユーグレナの細胞障害発現評価モデルとしての有効性が示唆された。続いて、TBTCI ストレス負荷による細胞内カルシウム濃度変化について Neomycin 等シグナル伝達系作用物質を用いて比較検討し、TBTCI 曝露ユーグレナ細胞形態変化における inositol-1,4,5-trisphosphate が介在するシグナル伝達系の関与、TBTCI 曝露による Ca^{2+} -ATPase 活性阻害を明らかにした。

TBTCI のユーグレナ細胞内への取り込みと細胞内小器官における分布を調べた結果、TBTCI はユーグレナ細胞に対し μM レベルで障害を発現し、その発現メカニズムが高等動物のそれと多くの共通点を有することを明らかにし、単に水圏微小真核生物のみならず他の水圏生物に対しても同様の影響をもたらす可能性が示唆された。さらに、哺乳動物や植物においても何らかの機能障害が予想され、その障害の予防、治療対策が急がれる。

そこで、生命機能の発現、維持に重要な役割を果たす水に種々のミネラル添加や

セラミック浸漬処理による解毒，疾病治癒効果など機能性が宣伝されている生理的機能化水溶液（機能水）に着目した．各種機能水とそれを調製する素材中で TBTCI を曝露することにより遊泳機能障害を発現したユーグレナに対する遊泳能回復効果の有無と効果発現メカニズムの細胞レベルでの解明を試みた．ユーグレナ細胞と TBTCI を用いて設定した評価系により，各種機能水の TBTCI 障害惹起ユーグレナの遊泳能回復効果について比較評価し，脱塩深層海水とセラミック浸漬処理水に高い回復効果を認め，その効果はキレート剤処理により著しく低下することがわかった．また，回復効果を示した機能水に含まれる元素成分の ICP 分析により，共通元素としてカルシウム，マグネシウム，ケイ素及び鉄を検出したが，各種ミネラルの添加による十分な回復効果は認められなかった．セラミック樹脂の組成について X 線回折法により結晶構造の解析を行った結果，主成分は SiO_2 や Al_2O_3 からなるアルミノケイ酸塩であった．

アルミノケイ酸塩の効果解明を目的に触媒能や吸着能，イオン交換能等の機能を持つ結晶性アルミノケイ酸塩であるゼオライトを用い，TBTCI 細胞障害発現ユーグレナの遊泳能回復に対するゼオライト処理水の機能性評価とそのメカニズムについて検討した．結晶格子中に鉄，マンガン，亜鉛を包含させたゼオライト処理水で高い回復効果を認め，微量の遷移金属の関与を見いだしたが，この効果はキレート剤処理により失われ，ゼオライト処理水を構成するミネラル組成に相当する再構成系においてもそれと同等の効果を認めなかったことからゼオライト処理水による細胞遊泳能回復には，単に微量元素のみならずゼオライトの立体構造が関与していることを推察した．

ユーグレナの異物代謝機能に対するゼオライト処理水の作用を明らかにするため，ゼオライト処理水中に保持した細胞内小器官におけるスズ量分布の経時的変化と TBT 代謝物について原子吸光，GLC，GC-MS 分析により検討し，さらに異物代謝酵素チトクロム P-450 (P450) の TBTCI 代謝への関与について調べた．取り込ま

れた TBTCI はゼオライト処理水中での培養により速やかに脱ブチル化され dibutyltin (DBT) となり細胞外へ排出されることが判った。ユーグレナのミクロゾーム画分を用いた *in vitro* での異物代謝酵素反応系でもゼオライト処理水は TBTCI の DBT への変換を促進させていることが明らかとなったが、ゼオライト自体には異物代謝機能は認められなかった。さらに、P450 誘導の有無を Western-blotting 法により分析した結果、ゼオライト処理水は P450 が関与する異物代謝酵素活性に間接的に関与している可能性が示唆された。微量元素は異物代謝機能やシグナル伝達系、エネルギー代謝などの生理的機能に不可欠な元素であり、鉄は P450 が関与する生体内変換 (Phase I 反応) の触媒活性を担っている重要な元素である。P450 酵素類似の触媒作用をもつと報告されている鉄包含ゼオライトはユーグレナにおける TBTCI の解毒機構に関与していると推察された。

本研究を通じて TBTCI が微小生物に対して機能障害を発現すること、またその障害がいくつかの機能水によって回復可能であることを細胞生物学的手法により明らかにした。その機能回復は細胞と Ca, Mg, Fe, Si などの元素と水分子の三次元的配向関係によると考えられる。本研究結果から、ユーグレナは細胞障害発現評価モデルとして有用な生物であり、また化学物質により障害を受けた生体に対し回復効果を持つ物質のスクリーニングへの応用が可能であることを示すものであり、今後より広範な利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木	鐵也
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	教授	原	彰彦
副査	教授	宮下	和夫
副査	教授	久万	健志
副査	助教授	工藤	勲

学位論文題名

Cell Biological Studies on the Tributyltin-induced Cellular Damage and Its Restoration with Physiologically Functionalized Aqueous Solution in *Euglena gracilis* as Model Organism

(ユーグレナ・グラシリスをモデル生物に用いた
トリブチルスズ惹起細胞障害発現と生理的機能化水溶液による
機能回復に関する細胞生物学的研究)

地球環境汚染は食物連鎖により生物の恒常性や生理機能を乱し、健康障害、疾病を顕在化させる。近年、低濃度でも障害を惹起する化学物質、有機スズ化合物、tributyltin chloride (TBTCI) の影響が高濃度域のみならず極低濃度域でも指摘され、その実態解明と早急な対応が望まれている。TBTCI は生物付着防止を目的に船底塗料や漁網に使用され、現在も内湾に蓄積された本化合物による汚染や水圏生物に対する被害が、ppb レベルで巻貝で報告されている(堀口ら 1998)。多細胞生物への影響の検討に対し、水圏の一次生産生物に対する研究は殆ど行われていない。高等動物のみならず、食物連鎖の低位に位置する生物に対しても毒性発現メカニズムを明らかにし、双方からの問題解決への取り組みが必要である。

環境汚染物質の障害解析に高等動物をモデルとする場合、複雑な要因が関与し解析が困難だが、基本的に同一の細胞機能を有す真核単細胞生物を用いることによ

り迅速・簡単に評価できる。

本研究は、水圏環境汚染物質、有機スズ化合物の水圏微小生物に対する障害発現と生理的機能化水溶液による機能回復の細胞生物学レベルでの解明とその解毒を目的としている。モデル生物としてユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) を選んだのは、本生物のストレスに対する鋭敏な形態変形能にある。単細胞真核生物ユーグレナは生物の進化で系統樹の根幹に位置し、分類学上でも藻類と鞭毛虫、つまり植物と動物の双方に属している。ユーグレナは、他の原核生物に較べ代謝や異化作用、細胞機能に高等生物との多くの共通性を示す。また、外部ストレスに対しても鋭敏に反応する。

先ず、顕微鏡画像解析システムにより TBTCI 曝露濃度、接触時間と遊泳能、細胞形態との関係を調べている。通常的环境下では紡錘型細胞を回転させ直進、蛇行、後退運動する細胞が、曝露により数分以内に鞭毛切離、涙滴型をへて運動能を喪失した球形となり休止状態へ移行する。形態変化は一定レベルまで曝露濃度に依存し、細胞障害発現評価指標としての有効性を明らかにしてい。次ぎに細胞生物学的手法によるストレス作用点の解析を行い、TBTCI ストレス負荷による細胞内カルシウム濃度変化について Neomycin 等シグナル伝達系作用物質を用いて比較検討し、曝露ユーグレナ細胞形態変化における inositol-1,4,5-trisphosphate を媒体とするシグナル伝達系の関与、曝露による Ca^{2+} -ATPase 活性阻害を明らかにしている。

TBTCI の細胞内への取り込みと細胞内小器官における分布を調べ、TBTCI が μM レベルで障害を発現し、そのメカニズムが高等動物のそれと多くの共通点を有することを明らかにし、水圏微小真核生物のみならず他の水圏生物に対しても同様の影響をもたらす可能性を示唆している。

ユーグレナ細胞への TBTCI 障害発現機構を明らかにした太田は、次ぎに解毒方法に目を向け、種々のミネラル添加やセラミック浸漬処理による解毒、疾病治癒効果など機能性が宣伝されている生理的機能化水溶液（機能水）に着目した。各種機能水とそれを調製する素材中で TBTCI を曝露することにより遊泳機能障害を発現したユーグレナに対する遊泳能回復効果の有無をユーグレナ細胞と TBTCI を用い

て設定した評価系により、各種機能水の TBTCI 障害惹起ユーグレナの遊泳能回復効果について比較評価し、脱塩深層海水とセラミック浸漬処理水に高い回復効果を認めた。その効果はキレート剤処理により著しく低下すること、回復効果を示す機能水に含まれる、共通元素としてカルシウム、マグネシウム、ケイ素及び鉄を検出した。セラミックの結晶構造の解析から、主成分は SiO_2 や Al_2O_3 からなるアルミノケイ酸塩と同定した。

結晶性アルミノケイ酸塩であるゼオライトを用い、細胞障害発現ユーグレナの遊泳能回復へのゼオライト処理水の機能性評価とそのメカニズムについて検討し、結晶格子中に鉄、マンガン、亜鉛を包含するゼオライト処理水に高い回復効果を認めている、

ゼオライト処理水中で培養し TBTCI 曝露細胞のスズ量細胞内小器官分布の経時的变化と TBT 代謝物の分析、異物代謝酵素 P450 の TBTCI 代謝への関与について調べ、細胞内 TBTCI はゼオライト処理水中での培養により速やかに脱ブチル化され dibutyltin (DBT) となり細胞外へ排出されること、ミクロゾーム画分を用いた *in vitro* での異物代謝酵素反応系でもゼオライト処理水は TBTCI の DBT への変換を促進させることを明らかにしたが、ゼオライト自体の異物代謝機能は認めなかった。P450 誘導の有無を Western-blotting 法により検討し、ゼオライト処理水は、異物代謝酵素活性に間接的に関与している可能性を示唆した。

本研究を通じて TBTCI が微小生物に対して機能障害を発現すること、またその障害がいくつかの機能水によって回復可能であることを細胞生物学的手法により明らかにした。本研究結果から、ユーグレナは細胞障害発現評価モデルとして有用な生物であることを明らかにした。また、これまで十分な科学的検証が行われてこなかった機能化水溶液にも科学のメスを入れたことは、大いに評価出来る学位論文である。