

ウミガメ類における微量元素蓄積とその種特異性

界 温 設

1996

①

ECD-16(96)

学位論文

ウミガメ類における微量元素蓄積と その種特異性

指導教官 脇本忠明

平成 5 年度入学

愛媛大学大学院連合農学研究科
生物環境保全学専攻 環境化学講座

堺 温哉

第1章. 緒論	1
1-1. 海生動物の重金属蓄積に関する研究史	1
1-2. なぜウミガメを研究対象としたか	4
第2章. 実験方法とその検討	9
2-1. 原子吸光光度計による生体試料中の重金属類の測定	9
2-1-1. はじめに	(9)
2-1-2. 試料の前処理および原子吸光光度計による元素の定量	(9)
2-2. 誘導結合プラズマ質量分析計による生体試料中の微量元素の定量	10
2-2-1. はじめに	(10)
2-2-2. 試料の前処理および誘導結合プラズマ質量分析計による元素の定量	(11)
2-3. 細胞内の金属結合タンパクの分子量分画法	13
2-3-1. はじめに	(13)
2-3-2. 組織試料の採集と保存	(15)
2-3-3. 細胞質画分の調整	(15)
2-3-4. ゲル濾過分画	(15)
2-3-5. Zn, Cu, Cdの定量	(16)
2-4. Metallothionein 濃度の測定方法	17
2-4-1. はじめに	(17)
2-4-2. 実験方法の概要	(18)
2-4-3. 試薬の調整	(18)
2-4-3-1. Chelex (Chelating resin) によるCd除去能の検討	(19)
2-4-4. 試料とその調整	(23)
2-4-4-1. 市販MT標準試薬の調整	(23)
2-4-4-2. <i>in vitro</i> でのCu-MTの作成	(23)

2-4-5. 実験方法	(24)
2-4-5-1. ATTM-Cd-Chelex法 (Klein <i>et al.</i> , 1990)	(26)
2-4-5-2. Cd-Chelex法 (Bartsch <i>et al.</i> , 1990)	(26)
2-4-6. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法による分析値の比較	(27)
2-4-7. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法による分析値の直線性	(27)
2-4-8. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法によるCu-MTの測定	(28)
2-4-9. 考察	(32)

第3章. ウミガメ類における重金属類の体内分布・・・33

3-1. はじめに	33
3-2. 試料と方法	34
3-3. 濃度分布と負荷量分布	37
3-3-1. CdとHgの蓄積と分布	(37)
3-3-2. Znの蓄積と分布	(38)
3-3-3. Fe, Mn, Cu, Pb, Ni, Coの蓄積と分布	(41)
3-4. 産卵にともなう重金属蓄積の変動	49

第4章.

アオウミガメの筋肉、肝臓、腎臓における重金属の蓄積変動・・・・・・・・・・・・・52

4-1. はじめに	52
4-2. 試料と方法	53
4-3. 濃度レベルと他の海生動物との比較	56
4-4. アオウミガメの肝臓と腎臓における重金属間の相互関係	65
4-5. 成長にともなう変動	68
4-6. 食性の変化と重金属の蓄積変動	75

第5章.

卵および甲羅を用いた非捕殺的な微量元素

モニタリング・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83

5-1. 卵を用いた非捕殺的な重金属モニタリング 83

5-1-1. はじめに (83)

5-1-2. 試料と方法 (84)

5-1-3. 産卵順位による重量変動 (86)

5-1-4. 卵中の重金属蓄積 (87)

5-1-5. 産卵順位による卵中の重金属蓄積変動 (94)

5-1-6. 産卵回数による卵中の重金属蓄積変動 (94)

5-1-7. 卵黄と親体内の濃度との関係 (96)

5-1-8. 指標部位としての卵 (101)

5-2. 甲羅を用いた非捕殺的な微量元素モニタリング

- タイマイを例に - 102

5-2-1. はじめに (102)

5-2-2. 試料と方法 (104)

5-2-2-1. 試料 (104)

5-2-2-2. 試料の調整 (107)

5-2-2-3. 化学分析 (107)

5-2-2-4. 統計解析 (108)

5-2-3. 甲羅中の微量元素分布 (108)

5-2-3-1. 黒色部と白色部の微量元素濃度 (108)

5-2-3-2. 微量元素の濃度順位 (109)

5-2-4. 加齢による微量元素蓄積の変動 (109)

5-2-5. 養殖個体と野生個体における甲羅中微量元素蓄積の差異
(115)

5-2-6. 生息海域の違いによる甲羅中微量元素蓄積の差異
(116)

第6章.

海生動物の肝臓におけるZn、Cu、Cd蓄積と
Metallothionein —特に、ウミガメ類のCu高濃度蓄積につ
いて・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・125

6-1. はじめに 125

6-2. 試料と方法 128

6-3. 肝細胞内におけるZn、Cu、Cdの分布 134

6-3-1. 細胞質への蓄積 (134)

6-3-2. 細胞質中におけるZn、Cu、Cdの分布 (138)

6-3-3. Metallothioneinの金属構成 (140)

6-4.

肝細胞内におけるZn、Cu、CdおよびMetallothioneinの相互
関係 160

6-4-1. 海生哺乳類 (160)

6-4-2. アオウミガメ (162)

6-5. Cuの高濃度蓄積がもたらす毒性影響とその要因

178

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・182

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・186

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・187

1. 緒論

1-1. 海生動物の重金属蓄積に関する研究史

人間活動の結果、重金属類が多量に環境に放出され、生態系の構成生物に多大な被害を出した事例として、アルキルHg系種子消毒剤の使用による鳥類のHg中毒死 (Berg *et al.*, 1966)、工場廃液中に含まれていたメチルHgにより発症した水俣病 (喜多村, 1976)、鉱山廃液由来のCdの慢性暴露が主な原因と考えられるイタイイタイ病 (Kjellstrom, 1986) などがあげられる。このような環境問題が顕在化していく中、海生哺乳類に対する重金属汚染の影響も懸念されはじめ、1960年代後半から、HgやCdなどの毒性元素を中心に、体内蓄積のモニタリング研究が報告なされるようになった (Nordisk *et al.*, 1969; Koeman *et al.*, 1972)。重金属類などの法的規制により、高濃度かつ大規模汚染の発生は、一部発展途上国等を除いて、減少しつつある。しかし、海洋の汚染と生態系への影響は、依然として大きな社会的関心を集めている。公共技術の進展にともない、使用され、環境に流出する化学物質は多様化し、海洋の汚染と生態系への蓄積や影響は、広域化・複雑化している。例えば、近年報告されはじめた、鰐脚類や鯨類の大量死の間接的な原因の一つとして、重金属類を含む毒性化学物質の影響が示唆されており (Sarokin and Schulkin, 1992)、海生動物体内に蓄積する微量元素の調査・研究は、社会的・学術的に重要視されている。

海生動物 (鯨類、鰐脚類、海鳥類) の微量元素蓄積に関する研究は、これまでに多数報告され、総書・総説的なものも発表されている (Denton *et al.*, 1980; Wagemann and Muir, 1984; Honda, *et al.*, 1990; Law, *et al.*, 1991; Lock, *et al.*, 1992)。しかし、その多くは測定値の報告が中心で、取り込

みと排泄、体内における分布・挙動や影響など、海生動物における微量元素の蓄積や動態を、体系的に明らかにした研究は少ない。鯨類、鰭脚類、海鳥類などの高等動物はいずれも長い寿命を持ち、その一生の間に、性成熟、繁殖（産卵）、回遊（渡り）、絶食など個有な生物過程や生理過程がある。微量元素は体内の組織・器官で営まれる様々な生理作用に、直接もしくは間接的に関与することが知られている（Mertz, 1986）。海生動物に対する微量元素の蓄積と影響の評価を正しく行うには、様々な生理過程にともなう、微量元素の蓄積変動を究明する必要がある。また、微量元素の蓄積や影響をヒトに普遍化する上でも、海生動物を用いた研究は有用な部分がある。

愛媛大学農学部環境化学研究室では、以上のような研究課題に関して、太平洋に生息する鯨類、鰭脚類、海鳥類を主な対象にして、組織・器官分布、加齢（成長）・繁殖活動・換毛（換羽）など、生理的变化にともなう重金属類（Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hg）の蓄積変動を明らかにしてきた（本田，1986；藤瀬，1987；山本，1988；李，1989；野田，1995）。この過程で、海生動物における微量元素の蓄積は、生息海域の海水濃度、餌生物中の濃度、生理的な諸条件、を反映することが明らかにされている。このような重金属の海生動物に対する蓄積の特徴とメカニズムを利用して、藤瀬（1987）、本田（1988）と野田（1995）は、イシイルカとキタオットセイ体内の重金属をパラメーターとして、これら動物の生息域・食性・個体群の判別や個体群の動態を解析した。近年、このような、重金属などの化学物質をケミカルトレーサーとして、野生動物の生態を明らかにする研究が報告されているが（Subramanian *et al.*, 1986; Tanabe *et al.*, 1986; Minami *et al.*, 1991; Cabana & Rasmussen, 1994）、重金属類は、比較的簡便・迅速に数種類の元素を測定することが可能なため、その適用が期待される。

上述した海洋汚染のモニタリングと生態解明の研究は、野生動物を捕殺して分析試料を入手する方法が一般的である。しかし、このような手法は野生動物の保護上好ましくなく、社会的な問題も生じる。このような背景から、生体を殺さずに試料を採集し、体内に蓄積している化学物質の蓄積量をモニタリングする、非捕殺的な手法の開発が望まれる。海生動物をあつかった事例は少ないが、鳥類の羽根 (Furness *et al.*, 1986; Honda *et al.*, 1986c; 李, 1989; Walsh, 1990) や鰭脚類の毛 (Wenzel *et al.*, 1993; Yediler *et al.*, 1993; 野田, 1995) を用いた非捕殺的なモニタリング手法がこれまでに提示されている。

さて、野生動物の組織・器官中に蓄積している微量元素濃度から、その動物に対する毒性影響を判断するのは容易ではない。毒性重金属であるCd、Hg、Pbなどを含む全ての微量元素は、天然に賦存しており、体内に存在すれば、即、人為影響の結果と言うわけではない。非汚染域に生息する鰭脚類、鯨類、海鳥類の体内から、高濃度のHgやCdが報告されているが (Koeman *et al.*, 1973; Wagemann and Muir, 1984; Muirhead and Furness, 1988; Thompson and Furness, 1989; Honda, *et al.*, 1990; Law, *et al.*, 1991; Lock, *et al.*, 1992)、不思議なことに、これらの動物は、なんら重金属の毒性症状を示していない。これらの研究および実験動物を用いた研究では、体内に重金属が取り込まれても、これらの毒性を軽減しようとする、生体防御機構が働くことが明らかにされている (Durnam & Palmiter, 1980; 木村, 1980; 小島, 1984; Webb, 1986; Elinder and Nordberg, 1987; 田中, 1987; 須田, 1995)。また、これらの防御機構が有効に働く濃度閾値は、種間で差があることが、示唆されている (本田, 1985; Muirhead and Furness, 1988; Thompson and Furness, 1989; Honda, *et al.*, 1990)。イタイイタイ病の原因元素であるCdの、主な標的器官は腎臓である。これまでの研究で、一部の鯨類では腎障害の発症が示唆されており、この閾値がヒトより低く、また海生哺乳類種間で異なることが指摘

されている（本田，1985；山本，1988；鹿島，1991）。通常、海生動物の組織に蓄積されているCdは、そのほとんどがMetallothionein（MT）と結合した状態で存在する（Olafson & Thompson, 1974; Lee *et al.*, 1977; Wagemann, *et al.*, 1984, 1986; Mochizuki, *et al.*, 1985; Kwohn, *et al.*, 1986; 山本，1988）。CdはMTと結合している状態では、その毒性は活性化されない（田中，1987）。このようなことから、動物種間におけるCdの毒性発現の閾値の違いには、MTが深く関与していると考えられる。さらに、MTはZnやCuとも結合することから、Cd・Zn・CuおよびMTの相互関係の種間差もまた、毒性影響の種間差につながると思われる。しかし、現在に至るまで、このような観点で比較生理学的、比較毒性学的な研究を行った例は皆無と思われる。

1-2. なぜウミガメを研究対象としたか

本研究ではウミガメ類を研究対象として選び、種特異的な重金属の蓄積特性と、重金属蓄積の種間差におけるメタロチオネインの関与について究明した。

世界の海洋には、2科6属7種のウミガメが生息しており（Limpus *et al.*, 1988）、主として熱帯から温帯の海域に広く分布している（図1-2-1；内田，1982b）。このうち、日本の沿岸および諸島部には、成体雌のアカウミガメ（*Caretta caretta*）、アオウミガメ（*Chelonia mydas*）、タイマイ（*Eretmochelys imbricata*）が、夏期に産卵回帰してくる（Uchida and Nishiwaki, 1982；Kamezaki, 1989；亀崎，1991）。オサガメを除くほとんど全てのウミガメ類は、幼体期と未成体期の一時期を除く生涯の大部分の時間を、大陸棚深度（200m）より浅い沿岸ですぐすと考えられている

(内田, 1983b)。なかでも、草食性のアオウミガメの生活環境は、より沿岸に依存していると考えられている(内田, 1983b)。現在、ウミガメ類は乱(混)獲や産卵海岸の環境悪化などにより、その個体数の減少が懸念されている(Shoop and Ruckdeschel, 1982; 内田, 1986a; Nishimura and Nakahigashi, 1990; 西村・中東, 1992; 菅沼, 1994; Heng, 1994; Bjorndal *et al.*, 1994)。さらに産卵の場となる沿岸海域は、陸上で使用された多種多様な化学物質が河川から流入するため、人為的な影響を受けやすい環境でもある。最近の報告では、マリンデブリやタールボールに加えカドミウムや水銀などの汚染物質による、影響も懸念されている(Carr, 1987; Gramentz, 1988; Hutchinson and Simonnds, 1991; Bjorndal *et al.*, 1994)。しかしながら、これまでにウミガメ類の化学汚染に関する研究は、卵中の蓄積レベルや、死骸から採取した骨中の蓄積レベルを報告したものがあるだけで(Thompson *et al.*, 1974; Stoneburner *et al.*, 1980; Clark Jr and Krynitsky, 1980, 1985; Witkowski and Frazier, 1982)、組織、部位別の分析例はわずかしかない(Davenport *et al.*, 1990a, 1990b; Aguirre *et al.*, 1994)。このような現状の中、ウミガメ類の保護・管理を目的とした、環境汚染物質の詳細なモニタリング研究が望まれる。

ウミガメ類は、緑褐色の脂肪組織や甲羅など、固有な組織・器官を有しており、これらの部位に、どの程度重金属類が蓄積されているのか、比較生理学的な興味もたれる。また、ウミガメ類の成熟雌は、産卵シーズン中に500個前後の卵を産卵することが知られており(Hirth, 1980)、この過程で、体内の重金属がどのように組織・器官に移行し、また体外へ排泄されるのか興味を持たれる。さらに、ウミガメ類には特有な生活史がある。例えば、孵化後の幼体期からある期間、外洋で浮遊生活をし、その後は沿岸岩礁域および産卵場付近の沿岸などに分布する(内田, 1982a)。このことは、食性の変化を招くことが予測できる。特に、

沿岸域で極端な草食性を示すアオウミガメは (Hirth, 1971; 内田, 1983b)、外洋域では動物プランクトンや流れ藻に付着している小動物を食する肉食傾向を示し、成長にともない生涯の間に極端な食性の変化 (dietary shift; Hirth, 1971) を経験する。このような成長にともなう食性の変化は、体内への重金属の蓄積、代謝に大きな変動をもたらすものと考えられる。

ところで、現存するウミガメ類7種の全てに、絶滅の危機にあると報告されている (Marquenz, 1990; Hutchinson and Simonnds, 1991)。それゆえ、先に述べたような研究目的であっても、生きているウミガメを多量に捕殺することは望ましくなく、非捕殺的手法の開発が望まれている。オサガメを除く全てのウミガメ類は硬い甲羅を持ち (内田, 1982a)、また成熟メスは多量の卵を産卵する。甲羅の一部は、生体の健康にほとんど影響を与えずに採取でき、また、少量 (3個未満) の卵の採取は、おそらくウミガメ類の個体群に与える影響も少ないと考えられる。したがって、ウミガメ類の場合、甲羅や卵は化学物質の非捕殺的モニタリングに適した分析部位であり、その手法の開発が期待される。

先に述べたように、微量元素の蓄積については、ウミガメ類を対象とした研究は少ない。固有な生物過程や生理機能を持つウミガメ類は、重金属類、特にZn、Cu、Cd蓄積に関して、大型の海生動物と異なる蓄積様式や代謝様式が期待される。ウミガメ類におけるZn、Cu、Cdの特異な蓄積を詳細に研究することは、微量元素代謝の種多様性を解明する糸口になると思われる。この場合、組織中の濃度情報だけではなく、細胞内における分布や存在形態などを比較生物・生理学的に検討することは、重金属の蓄積変動や毒性影響の種間差への理解の深化につながるが、この程の研究は少なく (Lee *et al.*, 1977; Wagemann *et al.*, 1984a, 1986; Mochizuki *et al.*, 1985; Kwohn *et al.*, 1986)、特に、細胞内での分布の変動に関しては

断片的な理解しか得られていない（山本，1988；鹿島，1990）。

本研究では、アオウミガメ、アカウミガメ、タイマイの3種のウミガメを対象動物とし、体内の組織・器官における蓄積特性と、成長にともなう濃度変動を調査することで、ウミガメ類における重金属蓄積の基礎情報を得るとともに、固有な生理生態が重金属蓄積に及ぼす影響を明らかにした。また、甲羅や卵を試料として用いた、非捕殺的なモニタリング手法の開発も試みた。さらに、アオウミガメ、キタオットセイ、ミンククジラの肝臓試料を用い、Metallothionein濃度を測定するとともに、組織中Zn、Cu、Cdの細胞内分布とその変動を調べ、これら重金属の代謝と影響の種多様性に加え、ウミガメ類の特異性について考察した。



Fig. 1-2-1. Distribution of sea turtles in the Pacific Ocean.



Fig. 1-2-1 Hatching beach of sea turtles in the world (Uchida, 1982b)

- | | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| ● <i>Caretta caretta</i> | ○ <i>Chelonia mydas</i> |
| + <i>Eretmochelys imbricata</i> | ▲ <i>Lepidochelys olivacea</i> |
| □ <i>Dermochelys coriacea</i> | ■ <i>Lepidochelys kempii</i> |
| ※ <i>Chelonia depressa</i> | |

2. 実験方法とその検討

2-1. 原子吸光光度計による生体試料中の重金属類の測定

2-1-1. はじめに

生体中に蓄積されている元素の測定例は、Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hg濃度に関するものが多い（Wagemann and Muir, 1984; Honda *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1991; Lock *et al.*, 1992）。この内、Pb、Cd、Hgに関しては野生動物に対する毒性学的な視点から、Fe、Mn、Znなどの必須重金属に関しては、生理・生態学的な観点から研究が行われている。生体試料中のこれらの重金属類の分析は、一般に、混酸を用いた加熱分解によって試料中から重金属を抽出し、抽出液中の濃度を原子吸光光度計（Atomic Absorption Spectrophotometry, AAS）によって測定する方法が用いられている。

2-1-2. 試料の前処理および原子吸光光度計による元素の定量

Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Coの測定は、1~10gの試料を、200mLケルダールフラスコ中で、硝酸・硫酸・過塩素酸の混酸により加熱分解した。この分解溶液を、イオン交換水で50mLに定容し、酸洗浄したサンプル管中に測定時まで保存した。なお、骨、甲羅、卵の殻などCa濃度が高いと思われた組織については、硫酸カルシウムの沈殿をさけるために、硝酸と過塩素酸のみで分解した。

Fe、Mn、Znの測定は、分解溶液を直接、AASに供した。Cu、Pb、Ni、

Cd、Coは、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (DDTC) - 4-メチル-2-ペンタノン (MIBK) で濃縮・抽出した後、AASで測定した。また、一部組織のCuおよびCd濃度の測定は、分解溶液を調整後、直接AASで測定した (Honda *et al.*, 1986a)。使用したAASは、Shimadzu AA-670フレーム原子吸光光度計、Shimadzu AA-680フレーム原子吸光光度計、およびPerkin-Elmer 5100PC フレーム原子吸光光度計を用いた。

Hgの測定は、試料約1gを50mL首長フラスコ中で、硝酸・硫酸・過塩素酸とともに加熱分解し、50mLに定容した後、還元気化-UV吸光法で測定した (Akagi & Nishimura, 1991)。測定には、Sansou Automatic Mercury Analyser Model HG-3000を用いた。

重金属分析の精度は、小型鯨類 (スジイルカ) と鰭脚類 (オットセイ) の乾燥筋肉標準試料を用い、繰り返し試験によって確認した。

2-2.

誘導結合プラズマ質量分析計による生体試料中の微量元素の定量

2-2-1. はじめに

各種の微量元素もしくは超微量元素が、新素材として工業的に使われている。これらの元素のいくつかは、生体内における毒性、あるいは必須性などについて、ほとんど明らかにされていない。本研究では、超微量元素の生理作用や生体影響に注目するのではなく、これらをトレーサーとして、ウミガメ類の生態学や生物学の未解決課題に挑戦した。すなわち、同じ生活様式を持つ個体群ならば、体内に蓄積する微量元素の濃度および構成比は類似することが予想され、個体群間の行動域が異なれば、蓄積パターンに違いが生じるであろう。このような観点の研究で

は、多種類のパラメーターを用いることが有用と考え、誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) による、多元素同時超微量測定を試みた。

2-2-2.

試料の前処理および誘導結合プラズマ質量分析計による元素の定量

前処理した試料0.15 gを、テフロンPFAバイアル (7 mL) に秤取し、硝酸 2 mLを添加後密閉した。このバイアルをテフロンTPFEの外容器に1N NaOH 2 mLとともに密封した。この状態で電子レンジに供し、200Wの高周波で6分間加熱分解した。冷却後、少量のmilli-Q水とHNO₃を0.5mL添加し、外容器なしで再び電子レンジに供し、200Wで40秒間再加熱した。分解液をmilli-Q水で定容し試料溶液とした。

試料溶液中の微量元素測定は Perkin Elmer 社の誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS) ELAN 5000によった。定量した元素は、Li、Be、V、Cr、Mn、Co、Cu、Zn、Ga、Se、Rb、Sr、Ag、Cd、In、Cs、Ba、Tl、Pb、Bi、Th、Uの22元素で (図2-2-1)、いずれもあらかじめ分析精度を確認した。また、ICP-MSで検出可能なMg、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Ni、Cu、Zn、Ge、As、Se、Br、Sr、Mo、Rh、Cd、Sb、Te、Ba、La、Ce、Tb、W、Re、Pb、Th、Uなどの27元素は、半定量分析 (トータルクオント) で測定した。トータルクオントによる濃度計算方法とは、ELAN 5000のトータルクオントアプリケーション中に記憶されている、各元素の相対濃度と質量分析計によるインテンシティーがマッチする内部レスポンスデータを用いた処理方法である。内部レスポンスデータは相対的なものなので、わずかな数の元素を標準として分析するだけで、全部の元素の内部レスポンスデータを更新するこ

	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	0		
1	H															He		
2	Li	Be									B	C	N	O	F	Ne		
3	Na	Mg									Al	Si	P	S	Cl	Ar		
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
6	Cs	Ba	△	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	▽															

△ Lanthanoid	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
▽ Actinoid	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Mb	No	Lr

Fig. 2-2-1

Periodic table showing twenty two trace elements analyzed in this study

とが出来る。トータルクオントの長所は、定量分析よりも短時間に多数の元素を測定することが出来ることであり、逆に短所としては、分析精度は定量分析よりも悪いことが挙げられる。

2-3. 細胞内の金属結合タンパクの分子量分画法

2-3-1. はじめに

これまでに述べてきた方法は、対象とする組織全体に蓄積されている元素を測定する方法である。したがって、測定された元素の組織内での分布様式は明らかに出来ない。また、元素の存在形態についても、推測することは不可能である。毒性影響、体内動態、微量元素間の相互作用、など重金属の生理作用を明らかにするには、その細胞内分布と、存在形態を明らかにする必要がある。

一般に、金属の細胞内分布と存在形態を明らかにするには、組織をホモジネートして遠心分離する方法と、遠心分離で得られた上清をゲルカラムに導入する方法が使われている。本研究では、Cd、Zn、Cuの毒性影響、体内動態、金属間の相互作用を明らかにするため、これら金属を結合するMetallothionein (MT) に注目し、MT画分を分離・回収する方法を用いた (Kwohn *et al.*, 1986; 山本, 1988)。実験の概要を図2-3-1に示す。

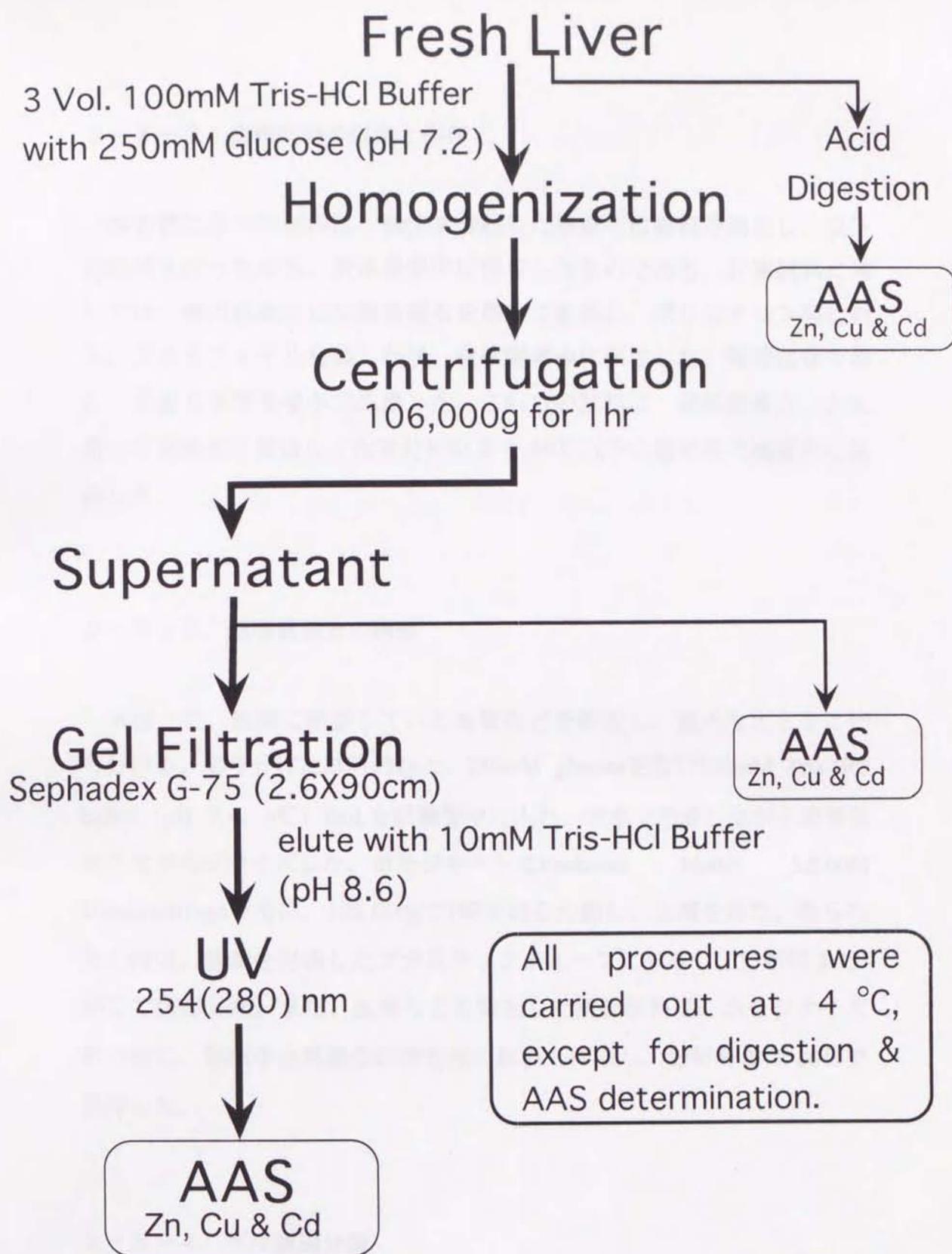


Fig. 2-3-1.

Analytical procedure of gel filtration to estimate the metal distribution in liver

2-3-2. 組織試料の採集と保存

本方法に用いた試料は、検体を捕殺した後直ちに組織を摘出し、以下の処理を行ったのち、液体窒素中に保存したものである。肝臓試料に関しては、摘出後直ちに生理食塩水を用いて脱血し、ポリエチレン袋に封入、アルミフویل包装した後、液体窒素中に保存した。腎臓は保存前に、表面を生理食塩水で洗浄した。これらの試料は、液体窒素タンクを用いて実験室に輸送し、化学分析時まで -80°C 以下の超低温冷凍庫中に保存した。

2-3-3. 細胞質画分の調整

氷板上で、組織に結合している血管などを除去し、適当な大きさに切り分ける。切り分けた試料約2gと、250mM glucoseを含む100mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 4°C) 8mLを試験管中に入れ、氷水で冷却しながら窒素気流下でホモジナイズした。ホモジネートはBeckman Model L8-60M Ultracentrifugeを用い、106,000gで1時間遠心分離し、上清を得た。得られた上清は、窒素を充填したプラスチックチューブに分取し、分析時まで -80°C で保存した。また、血管などを除去した組織試料は、ホモジナイズ用の他に、組織中金属濃度の測定用の試料も作成し、分析時まで -80°C で保存した。

2-3-4. ゲル濾過分画

得られた上清5mLを Sephadex G-75 を充填したカラム (2.6X90cm) に添加し、溶出速度を 40mL/hrに調節して、10mM Tris-HCl buffer (pH 8.6, 4

℃) で溶出した。溶出液は6mLごとに分取した。以上の操作は全て4℃以下の恒温室で行った。いくつかの試料に関しては、得られたフラクションそれぞれにUV254nmとUV280nmの吸収を測定した。

2-3-5. Zn, Cu, Cdの定量

上清の一部をイオン交換水で希釈したもの、およびゲル濾過分画によって得られたそれぞれのフラクションについて、Zn, Cu, Cd濃度を測定した。金属分析はPerkin-Elmer 5100PCを用い、原子吸光光度法で測定した。

2-4. Metallothionein濃度の測定方法

2-4-1. はじめに

MTのタンパク量を測定するには、いくつかの方法が提示されているが（佐藤と長井, 1987）、簡便・迅速な一般的な方法は「金属飽和法」である。金属飽和法は、MTに対し親和力の強いCd、Hg、Agなどで、MTと結合している他の金属を置換させ、これら金属の結合量からMT量を間接的に測定するものである（Piotrowski *et al.*, 1973; 小野坂, 1978; Onosaka 1981, 1982; Bartsch *et al.*, 1990; Eaton and Cherian, 1991; Scheuhammer and Cherian, 1991; Dutton *et al.*, 1993）。このうちHgとAgに関しては、MT1分子に対する結合量が不確定であることから、正確なタンパク量を測定するには不向きである（佐藤と長井, 1987; Scheuhammer and Cherian, 1991）。これらに対し、CdはMT1分子に対し7グラム原子結合することから、正確に見積もることが出来る。しかし、MTに対する結合力はCdよりもCuで強いことから、Cu含量の多いMTを測定するには、一般的なCd飽和法（小野坂, 1978; Onosaka 1981, 1982; Bartsch *et al.*, 1990; Scheuhammer and Cherian, 1991）では不可能である。最近、Klein *et al.* (1990) は、MTに多量に結合しているCuを、ammonium tetrathio-molybdate (ATTM) を用いてMTから除去し、apo-MTとした後に¹⁰⁹Cdを飽和させる方法を報告した。そこで本研究では、Klein *et al.* (1990) が開発した方法を若干改変し、放射性同位元素を用いずAASでCdを検出する方法を考案した。さらに、本法が野生動物から得た試料に適応できるか否か、*in vitro* で調整した海生哺乳類の肝臓由来のCu-MTを用いて検討をした。

2-4-2. 実験方法の概要

Klein *et al.* (1990) の方法を改変した、MT濃度の定量方法を図2-4-1に示す。本方法は、以下の基本操作から構成される。また、図2-4-2には、Bartsch *et al.* (1990) が開発したCd-Chelex法を示す。

- 1) 高分子タンパク質の変性・除去
- 2) ATTMによるMTからのCu除去
- 3) Cu-ATTMなどCu結合高分子タンパク質をDEAE-Sephacelで除去
- 4) Cd飽和
- 5) 余剰のCdをChelexで除去
- 6) Cd結合体の高分子タンパク質を変性・除去
- 7) AASによるCdの測定

Cu含量の多いMTは容易に酸化されること、ATTMが酸化されやすいこと、などの理由から、本法はCdを飽和させるまで、窒素気流下で操作を行う必要がある。

2-4-3. 試薬の調整

本法に用いたbufferは次の通りである。これらのbufferは、使用する直前に、30分以上窒素で曝気した。

buffer A ; 10mM Tris-HCl, 85mM NaCl (4°CでpH 7.4)

buffer B ; 10mM Tris-HCl, 1M NaCl (4°CでpH 7.4)

牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA) 、 ammonium

tetrathiomolybdate (ATTM) は使用する直前にbuffer Aで調整した。CM Sephadex、DEAE-Sephacel、Chelex (後述) は10倍溶のbuffer Bで3回洗浄後、10倍溶のbuffer Aでさらに3回洗浄したものを使用した。これらのイオン交換樹脂は、あらかじめbuffer Aで68% (V/V) に調整したものをを用いた。Klein *et al.* (1990) はBio-Rad社のChelex 100を用いているが、本研究では、Chelex 100と同等品の、SIGMA社で発売しているChelating resinをChelexとして用いた。以下に、Chelating resinのCd除去能について検討した結果を示す。

2-4-3-1. Chelex (Chelating resin) によるCd除去能の検討

本研究では、SIGMA社のChelating resinを、Bio-Rad社のChelex 100の同等品として用いたこと、ATTM-Cd-Chelex法のCd添加量は、Klein *et al.*, (1990) のCd添加量よりも多いことから、まずChelating resin (以後Chelex) によるCd除去能を検討した。

検討は、1200 μ LのBuffer Aと40 μ LのCdCl₂ (0.85mM) の混合溶液に、50, 100, 200, 400, 600 μ Lの68% (V/V) Chelex溶液を添加し、15分間振とう、遠心分離した後の上清中Cd濃度をAASで測定することで行った。

結果を図2-4-3に示す。100 μ LのChelex溶液では、1.6%のCdが除去されなかったが、200 μ LのChelex溶液で完全にCdを除去できた。したがって、実際の分析は安全を見込んで、400 μ LのChelex溶液を添加することとした。

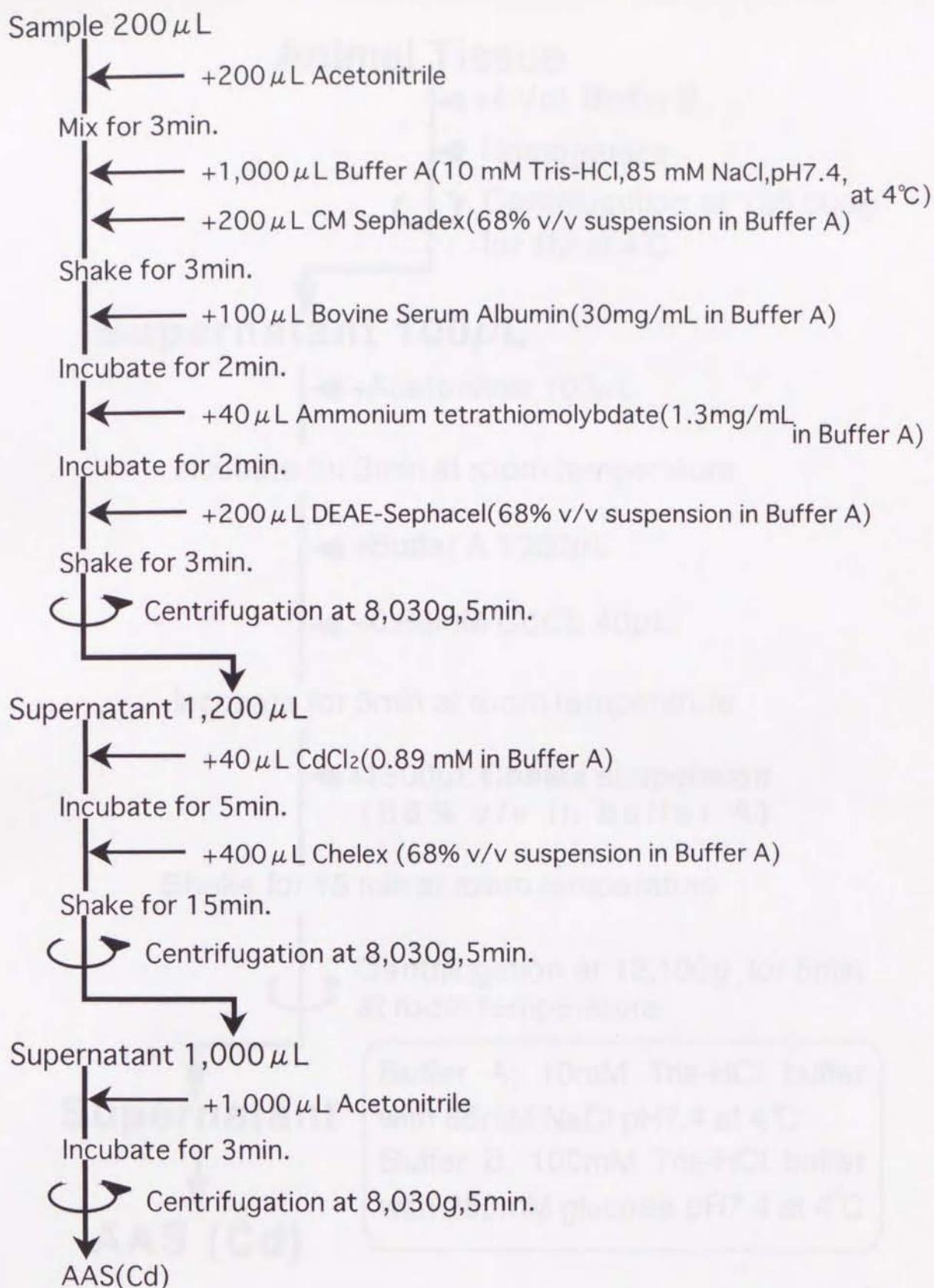


Fig. 2-4-1.

Analytical procedure of ammonium tetrathiomolybdate - Cd - Chelex method (Klein *et al.*, 1990)

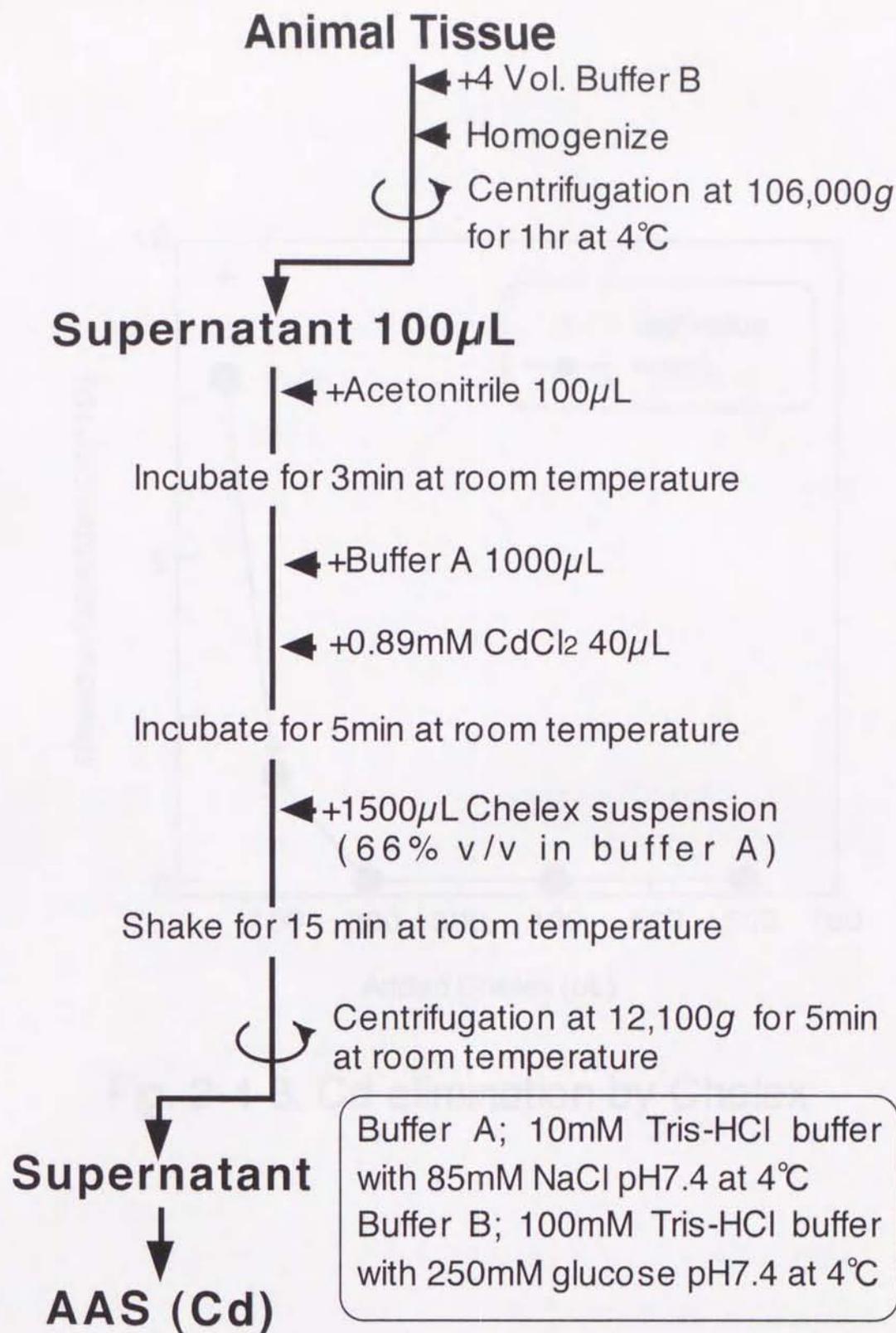


Fig. 2-4-2.
 Analytical procedure of Cd - Chelex (Bartsch *et al.*, 1990)

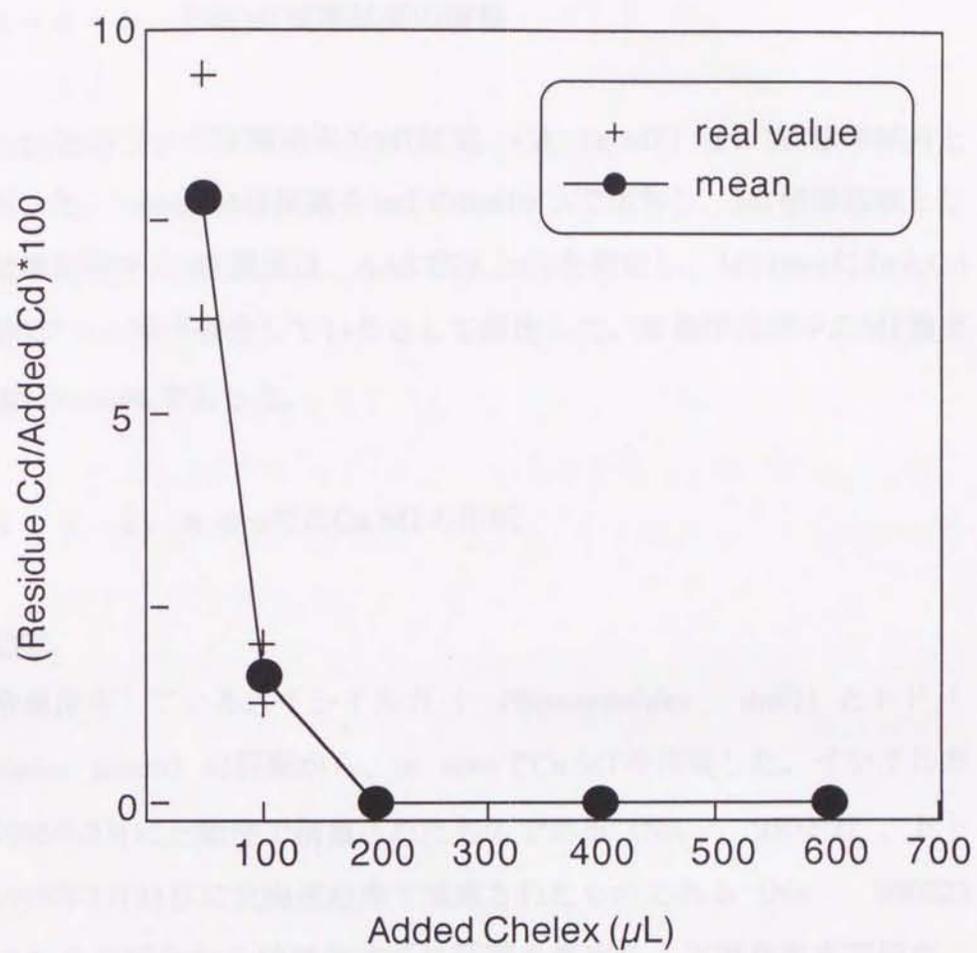


Fig. 2-4-3. Cd elimination by Chelex

2-4-4. 試料とその調整

2-4-4-1. 市販MT標準試薬の調整

SIGMA社のウサギ肝臓由来のMT試薬 (Cd, Zn-MT) を、MT標準試料として用いた。2.6mgのMT試薬を1mLのBuffer Aで溶解し、MT標準溶液とした。標準溶液中のMT濃度は、AASでZnとCdを測定し、MT1molにZnとCdが合計7グラム原子結合しているとして算出した。本標準溶液中のMT濃度は、107 nmol/mLであった。

2-4-4-2. *in vitro*でのCu-MTの作成

試料動物

超冷凍保存している、イシイルカ (*Phocoenoides dalli*) とトド (*Eumetopias jubata*) の肝臓から、*in vitro*でCu-MTを作成した。イシイルカは、1995年2月に三陸沖で捕獲されたものである (No. 9502-2)。トドは、1995年2月23日に北海道沿岸で捕獲されたものである (No. 950223)。これらの個体から捕獲後すぐに肝臓を摘出し、生理食塩水で脱血、ポリエチレン袋・アルミフォイル包装した後、液体窒素に浸漬し、研究室まで輸送した。

肝上清の調整

氷板上で、肝臓試料から血管など結合組織を除去し、適当な大きさに切り分けた。切り分けた試料約2gと、250mM glucoseを含む100mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 4°C) 8mLを試験管に入れ、氷水で冷却しながら窒素気流下でホモジナイズした。ホモジネーターはBeckman Model L8-60M Ultracentrifugeを用い、106,000gで1時間遠心分離し、上清を得た。得られ

た上清は、窒素を充填したプラスチックチューブに分取し、分析時まで-80℃で保存した。

Cu-MTの作成

Bartsch *et al.* (1990) によるCd-Chelex法の変法を用いて、Cu-MTを作成した。すなわち、調整した肝上清試料900 μ Lと同量のacetonitrileを加え、遠心分離(8030g、5分間)により上清を得た。この上清150 μ Lに、10mM Tris-HCl (85 mM NaCl, pH 7.4, 4℃) で調整した157, 115, 94, 63 nmol/mLのCuCl₂を加え3分間振とうした。さらに、1500 μ Lの68% (V/V) Chelex溶液を加え15分間振とうした。この溶液を遠心分離(8030g5分間)し、得られた上清をCu-MT溶液とした。Cu-MTの確認は、この溶液中のCu濃度を求めることで行った。

図2-4-4にCu添加量と最終溶液中のCu濃度を示す。Cu濃度は、Cu添加量にしたがい増加していた。これは、Zn,Cd-MT中のZnとCdが、*in vitro*でCuと置換反応を起こし、Cuが飽和したMTが生成していることを示している。イシイルカとトドを比較すると、イシイルカのほうが若干良好な直線性を示したため、以後の実験には、本種の肝上清を用いた。

2-4-5. 実験方法

本研究の実験方法は、Klein *et al.* (1990) およびBartsch *et al.* (1990) の方法に準じたが、最終的な測定をAASで行うために、試料容量を増加した。また、CM-Sephadex、DEAE-Sephacel、Chelex、Cd溶液の濃度と添加量も増大した。MTの酸化を防ぐために、試料および試薬の添加と分取は、窒素気流下で、氷冷して行った。MT1分子にCdは7グラム原子結合することから、MT濃度は、得られたCd濃度を7で除して求めた。

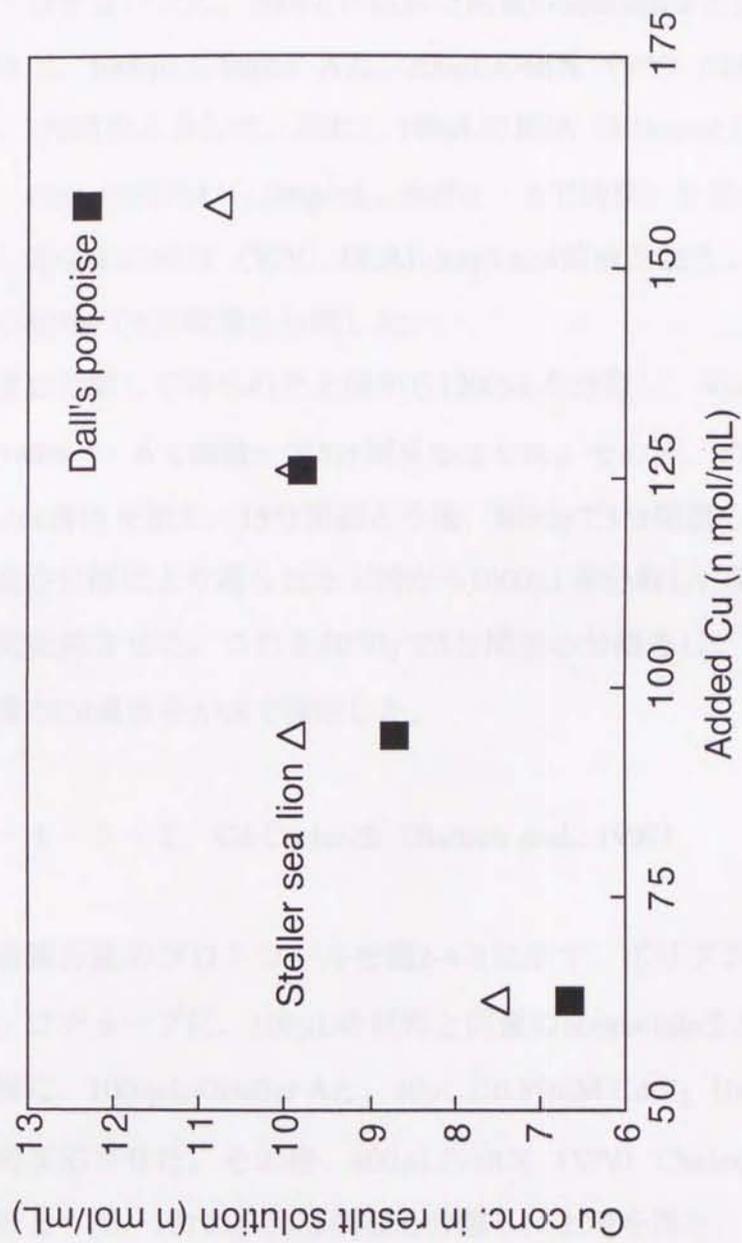


Fig. 2-4-4.
In vitro Cu saturation treatment for hepatic metallothionein from
 Dall's porpoise and steller sea lion

2-4-5-1. ATTM-Cd-Chelex法 (Klein *et al.*, 1990)

実験方法のプロトコールを図2-4-1に示す。ポリプロピレン製の2mLマイクロチューブに、200 μ Lの試料と同量のacetonitrileを加えて混合した。3分後に、1000 μ Lのbuffer Aと、200 μ Lの68% (V/V) CM-Sephadex溶液を加え、3分間振とうした。次に、100 μ LのBSA (30mg/mL) を添加し、2分後に、40 μ LのATTM (1.3mg/mL、buffer Aで調整) を加えた。さらに2分後に、200 μ Lの68% (V/V) DEAE-Sephacel溶液を加え、3分間振とうした後、8030gで5分間遠心分離した。

遠心分離して得られた上清から1200 μ Lを分取し、40 μ Lの0.89mM CdCl₂ (Buffer Aで調整) で5分間反応させた。その後、400 μ Lの68% (V/V) Chelex溶液を加え、15分間振とう後、8030gで5分間遠心分離した。

遠心分離により得られた上清から1000 μ Lを分取し、同量のacetonitrileと3分間反応させた。これを8030gで5分間遠心分離をし、上清を得た。この上清のCd濃度をAASで測定した。

2-4-5-2. Cd-Chelex法 (Bartsch *et al.*, 1990)

実験方法のプロトコールを図2-4-2に示す。ポリプロピレン製の2mLマイクロチューブに、100 μ Lの試料と同量のacetonitrileを加えて混合した。3分後に、1000 μ Lのbuffer Aと、40 μ Lの0.89mM CdCl₂ (buffer Aで調整) を5分間反応させた。その後、400 μ Lの68% (V/V) Chelex溶液を加え、15分間振とう後、12100gで5分間遠心分離し、上清を得た。この上清のCd濃度をAASで測定した。

2-4-6. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法による分析値の比較

調整したMT標準溶液を希釈して、2.16 nmol/mLに調節した試料溶液を、ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法で測定した。なお、標準溶液の分析であることから、acetonitrileは加えずに行った。操作は3連で2回行った。結果を表2-4-1に示す。本研究の結果は、ATTM-Cd-Chelex法で求めたMT濃度が、Cd-Chelex法で求めた成績よりも、より実際の値に近いことを示している。しかし、ATTM-Cd-Chelex法においても回収率は83%と期待値を下回った。この原因として、実験を行った際、ATTMが完全に溶解していなかったためと考えられた。ATTMは非常に反応性（酸化反応）が高いため、出来るだけ穏やかな条件で混合溶解させた。したがって、若干溶解していないATTMが存在していたと考えられる。その後の検討により、ATTMがある程度酸化されても実験に支障がないことが分かり、ミキサーなどを用いて完全にATTMを溶かして使用することで、満足な回収率が得られるようになった（後述）。いずれにしても、Cd-Chelex法よりも、ATTM-Cd-Chelex法で求めたMT濃度の方が、実際の値に近似していた。

2-4-7. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法による分析値の直線性

上記の検討で、Cd-Chelex法の回収率が低値であったのは、Cd-Chelex法の測定範囲を超えていた可能性がある。また、ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法ともに、MT濃度の測定可能範囲を明らかにする必要がある。そこで、両方法の分析値の直線性を検討した。

調整したMT標準溶液をbuffer Aで1/100, 1/50, 1/20, 1/10, 1/5に希釈したものを試料溶液とし、それぞれATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法で分析した。分析は2連で行った。

結果を図2-4-5に示す。ATTM-Cd-Chelex法、Cd-Chelex法ともに、良好な直線性が得られた（それぞれ $r^2=0.999$ 、 $r^2=0.998$ ）。特に、ATTM-Cd-Chelex法は、MT濃度が 4.30 n mol/mL 以上ではほぼ100%の回収率を示し、良好な結果が得られた。一方、Cd-Chelex法は直線性は良いものの、回収率は全区間にわたり低値で、最高でも83%程度であった。Klein *et al.* (1990) は、ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法で求めたMT濃度の差から、MTを構成する金属の中でCuが占める割合を推測している。しかし、本研究の検討結果から考えると、このような推測方法は用いるべきではないと言える。また、Cd-Chelex法の回収率が低かったのは、明らかな証拠はないものの、試料の量が少ないことと、実験過程での希釈率が高いことが原因の一つと考えられた。

2-4-8. ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法によるCu-MTの測定

これまでの検討は全てMT標準品のZn, Cd-MT を用いて行った。そこで次に、イシイルカ肝臓上清から*in vitro*で調整したCu-MTを用いて、ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法の両法でCu-MTを測定し、その回収率を比較した。

結果を図2-4-6に示す。ATTM-Cd-Chelex法による回収率は、Cuの飽和率が65%以上（Cu添加量の高いもの）で若干低くなるものの、最低でも85%と良好であった。Cuの飽和率が50%以下では、回収率はほぼ100%であった。逆に、Cd-Chelex法による回収率は、Cu飽和率が上昇するにつれて顕著に減少した。

Table 2-4-1. Recovery tests of ATTM-Cd-Chelex method and Cd-Chelex method

	MT concentration (n mol/ml)	
	ATTM-Cd-Chelex	Cd-Chelex
1st	1.82	0.330
	1.72	0.435
	1.82	0.382
2nd	1.79	0.452
	1.80	0.435
	1.85	0.330
Mean	1.80	0.394
S.D.	0.044	0.055
CV%	2.46	13.9

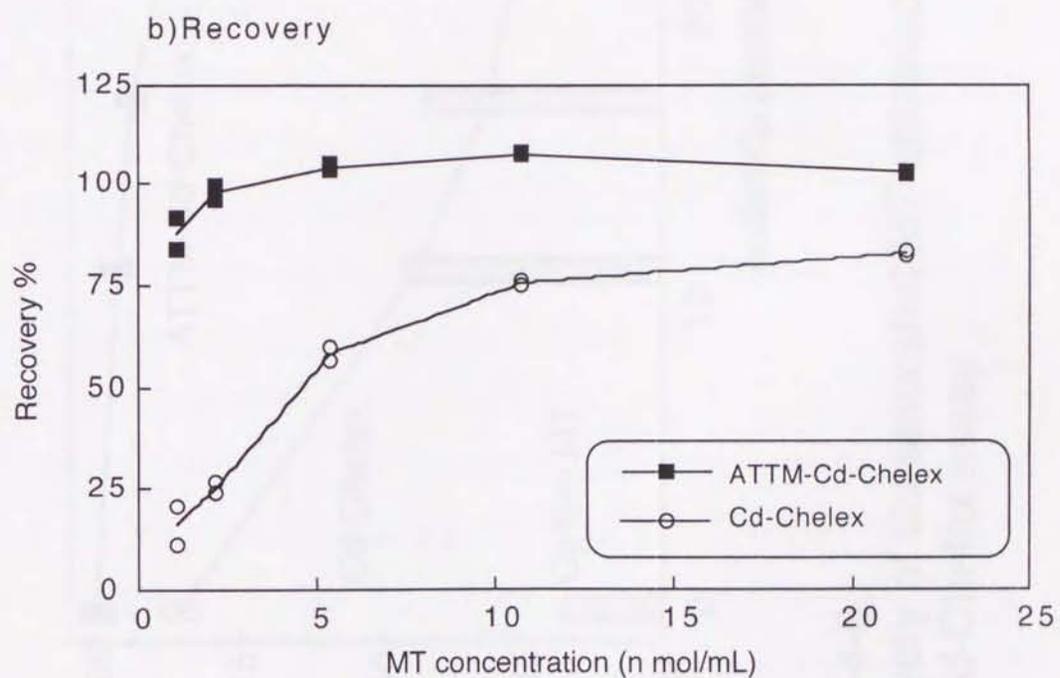
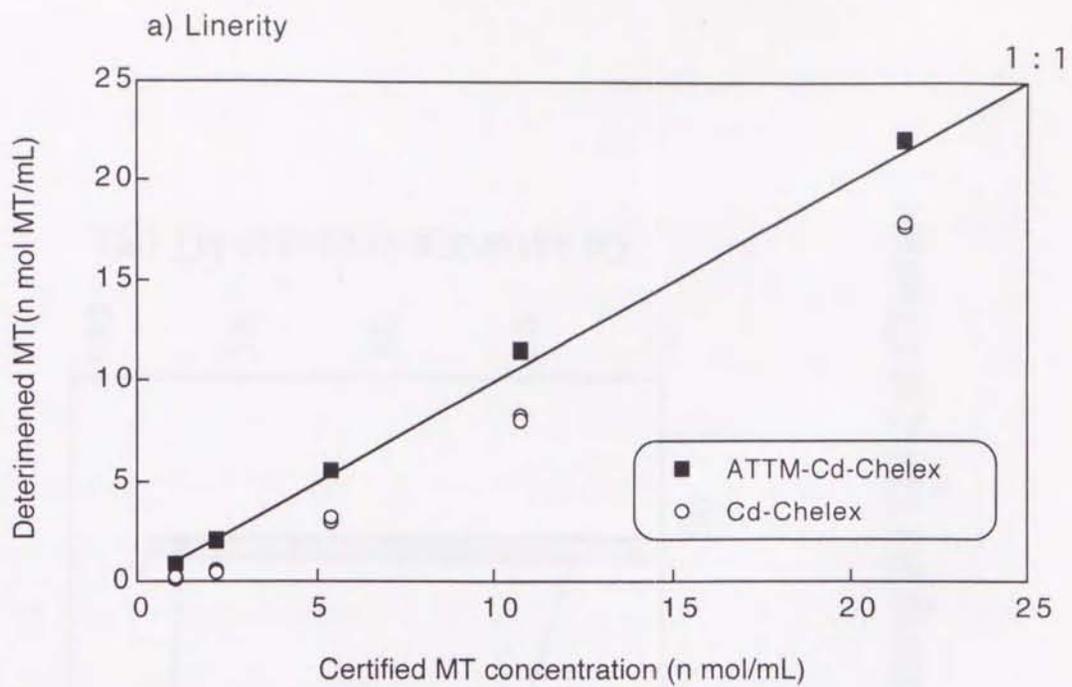


Fig. 2-4-5. Linearity and recovery of MT concentration obtained by using ATTM-Cd-Chelex and Cd-Chelex assay on different diluted MT standard

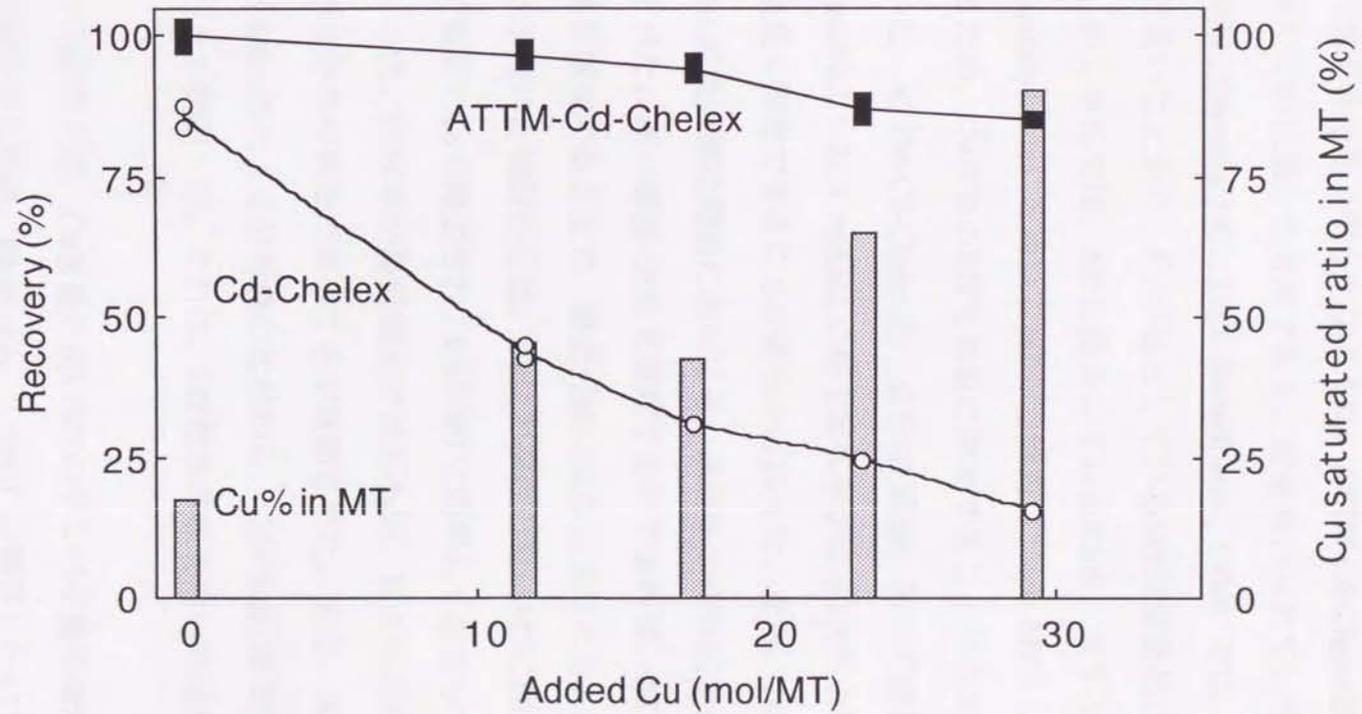


Fig. 2-4-6.
Recovery of Cu saturated MT obtained by using ATTM-Cd-Chelex
and Cd-Chelex assay

2-4-9. 考察

これまでの結果で明らかなように、ATTM-Cd-Chelex法はMTタンパク量を測定するのに適した方法である。従来用いられていたCd飽和法（小野坂, 1978 ; Onosaka 1981, 1982; Bartsch *et al.*, 1990）では、CdよりもCuの親和力が高いことから、Cuが結合しているMTは定量的に測定できなかった。しかし本法では、MTに結合しているCuを、まずATTM（ammonium tetrathiomolybdate）を用いてMTから除去し、apo-MTとした後にCdを飽和させるため、Cu含有のMTも容易に測定することが出来る。MT標準溶液を用いた、ATTM-Cd-Chelex法によるMT濃度の測定可能範囲の検討では、4.30 nmol/mL～21.4 mol/mLの間で回収率がほぼ100%となり、この範囲では精度良く測定できることが明らかとなった。また、1.08 nmol/mL～4.30 nmol/mLの低い濃度範囲においても、回収率は80%以上と比較的良好な値が得られた。高い濃度のMTを測定するのであれば、ATTMとCdの濃度と添加量を増加することで、測定可能になると思われる。*in vitro*で調整したCu-MTを用いた検討からは、Cu飽和割合の高いMTに関しても、ATTMによって容易にCuが除去され、CdがMTに効率よく結合していることが明らかとなった。回収率が最低85%ではあるが、ほとんどの場合において本方法が有効な分析法であることが証明された。また、ATTM-Cd-Chelex法とCd-Chelex法による分析値の比較から、Cd-Chelex法で測定される低値となることも判明した。これは、MT標準溶液を用いた検討でも明らかである。

以上本研究では、Cu含量の高いMTのタンパク量を精度良く、簡便に、AASで測定するため、Klein *et al.*（1990）の開発したATTM-Cd-Chelex法を改良した。本方法は測定範囲も広く、回収率も良好であったことから、以降のMTタンパク量測定にはATTM-Cd-Chelex法を用いることにした。

3. ウミガメ類における重金属類の体内分布

3-1. はじめに

プランクトンなどの小型の生物に関しては、体内に蓄積している重金属類の存在量をモニタリングする場合、検体を丸ごと分析に供する事で、体内の蓄積を知る事が出来る。しかし、ウミガメ類などの大型動物の場合、このような分析手法は不可能である。一般に、大型動物のモニタリングは、特定の組織を切り出し、その濃度のみを測定することが多い。しかしながら、体内の重金属の蓄積や動態を正確に理解するには、個々の組織や器官への分布特性を知り、研究目的に即した組織・器官を選ぶ必要がある。また、ウミガメ類には、緑褐色の脂肪組織や甲羅など、特有の組織・器官がある。これらの部位に、どの程度、重金属類が蓄積されているのか、比較生理学的な興味も持たれる。さらに、体内における重金属類の挙動について明らかにするには、組織中の濃度だけでなく、存在量についても検討する必要がある。とくに、雌のウミガメは、産卵シーズン中に500個前後の卵を産卵することが知られており（Hirth, 1971, 1980; Dodd Jr., 1988）、この過程で、体内の重金属分布や存在量に変化するものと予想される。

本章では、ウミガメ類における重金属蓄積の基礎研究として、成体雌雄のアカウミガメ（♀6検体、♂1検体）およびアオウミガメ（♀1検体、♂1検体）の各組織・器官における重金属の濃度と存在量を測定し、高濃度蓄積部位を明らかにするとともに、重金属分布の組織学的特徴を考察した。また、産卵による重金属の体内分布、および存在量の変動についても検討した。

3-2. 試料と方法

本研究に供したアカウミガメは、1990年5月に高知県沿岸で混獲された雌6検体、雄1検体の合計7検体と用いた。アオウミガメは、1990年5月4日に東京都小笠原村母島列島の向島の東方で捕獲された雌1検体、雄1検体の合計2検体を供試した。なお、アオウミガメに関しては、捕獲後6月4日まで、父島の小笠原海洋センター内の、海水プール内で飼育した。飼育中は餌を与えていない。

アカウミガメ雌の4検体および雄の1検体は、現地で体重計測を行った後に、直ちに研究室に輸送した。残りの雌2検体は、現地で体重測定を行った後に、冷凍保存し、その後研究室に輸送した。研究室では、標準直甲長 (SCL)、腹甲長 (PL)、甲幅 (CWL) を測定した。アオウミガメは、輸送直前に体重測定と、外部計測を行った。これら外部計測の後に、研究室において全ての検体に対し詳細な解剖を行い、体内の23部位を分離・採取した。これらの部位は全て、重量を計測した後、ポリエチレン袋に封入し、重金属分析時まで-20℃で冷凍保存した。骨や甲羅は、付着している筋肉や脂肪などを可能な限り取り除いて重量を測定した。外部計測、および組織重量の測定結果を表3-2-1と表3-2-2に示す。なおウミガメ類の背骨は背甲に癒着しているため、背甲は背骨込みの値を、骨の総重量値は背骨を除いた値を表示した。雌の検体は、全て発達した卵巣を有していたことから、いずれも成熟個体と判断した。また、雄に関しても、尾長およびペニスが発達していたことから、成熟個体と判断した。

重金属分析に供した部位は、左右対象にある組織の場合は基本的に左側を、筋肉は左胸筋を、皮膚は左前肢を、骨は左大腿骨を、甲羅は背甲の臀甲板切れ込みのわきの部分を供した。

分離した23部位全てについて、Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、

Table 3-2-1.

Body weight, standard carapace length (SCL), carapace wide length (CWL),
 plastron length (PL) of loggerhead turtle and green turtle

	Loggerhead turtle		Green turtle	
	Female (n=6, mean±S.D)	Male	Female (n=1)	Male (n=1)
Weight(Kg)	93 ± 14	83	124	117
SCL(cm)	83 ± 6	85	93.3	97.0
CWL(cm)	66 ± 4	67	71.8	73.3
PL(cm)	64 ± 4	63	N.M.	N.M.

N.M.; Not measured

Table 3-2-2.

Tissue and organ weight of loggerhead turtles and green turtles

	Loggerhead turtle		Green turtle	
	Female (n=6)	Male (n=1)	Female (n=1)	Male (n=1)
Internal Organ (g)				
Liver	3250 ± 613	2220	3240	2260
Gullet	516 ± 88	440	723	559
Stomach	426 ± 80	431	749	789
Intestine	2480 ± 450	3420	3530	3180
Pancreas	65 ± 26	135	28	66
Heart	622 ± 450	383	457	473
Trachea	118 ± 40	89	109	102
Lung	1290 ± 187	1500	1690	1483
Bladder	43 ± 18	49	42	27
Spleen	83 ± 24	37	169	79
Kidney	730 ± 197	634	541	546
Salt gland	90 ± 14	78	48	47
brain	8 ± 1	6	10	6
Reproductive Organ (g)				
Spermary		183		111
Penis		190		117
Oviduct	2080 ± 317		3080	
Ovary	6600 ± 1840		9315	
Egg	2920 ± 1460		1530	
Integument Tissue (g)				
Scale	4460 ± 593	4970	6241	5051
Fat	11600 ± 3520	6640	13000	22700
Mesentery	346 ± 98	228	725	601
Muscle (g)	22300 ± 2000	22600	30300	35900
Bone (g)	5841 ± 1018	5920	6860	7670
Carapace (g)	16400 ± 2000	14700	19400	18400

Hgの定量を行った。実験方法は、2章1節で述べた方法に従った。

3-3. 濃度分布と負荷量分布

測定した組織・器官中の重金属濃度を表3-3-1, 3-3-2に示す。濃度にか
なりな個体差が認められたが、重金属分布の様式には個体差や、雌雄差
はほとんど認められなかった。さらに、アカウミガメとアオウミガメの
間に種間差も小さかった。表3-3-3, 3-3-4に、重金属の組織・器官におけ
る負荷量分布、すなわち、部位における濃度とその重量をかけた存在量
の分布を、体内全存在量に対する、組織・器官中の存在量の割合 (%)
で示した。負荷量分布の個体差は、濃度分布のそれに比べ少ないもので
あった。また、濃度分布の時と同様に、種間による差も認められなかつ
た。以下に、それぞれの重金属についてその分布特性を記す。

3-3-1. CdとHgの蓄積と分布

Cdは腎臓と脾臓、および肝臓で高濃度に蓄積し、Hgは肝臓で高値を示
した。また、CdとHgともに、体内蓄積量の大半は肝臓と腎臓に蓄積して
いた。このようなCdとHgの濃度分布、存在量分布は、海生哺乳類や海鳥
類で報告されているものと、基本的に類似していた (Osborn, *et al.*, 1979;
Honda, and Tatsukawa, 1983; Honda, *et al.*, 1986a, 1986b, 1987, Yamamoto, *et al.*, 1987;
山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; André, *et al.*, 1990a, 1990b; Noda, *et al.*,
投稿中)。一般に有害金属として考えられているCd、Hgについて、
アカウミガメとアオウミガメの体内平均濃度と、両種それぞれが食して
いると考えられている餌中 (内田, 1983) の濃度を比較すると (細貝
他, 1978; Denton, *et al.*, 1980; 藤瀬, 1987; 森田, 1987; Hamilton, 1990;

Rainbow, 1990; Thompson, *et al.*, 1990; Kureishy, 1991)、この種の元素がアカウミガメおよびアオウミガメの体内に高濃縮している傾向は認められなかった。また、アカウミガメとアオウミガメ体内組織のCdとHg濃度は、ヒトや実験動物で毒性を発症する値より低く (Kjellström, 1986; Clarkson, 1987)、また、これまで報告されている海生動物の値とほぼ同程度、もしくは低かった (Wagemann and Muir, 1984; Honda *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1991; Lock *et al.*, 1992)。

3-3-2. Znの蓄積と分布

Znは、甲羅や骨など硬組織に高濃度で蓄積し、膵臓と脂肪組織の濃度も高かった。哺乳動物の結果から考えて、Znは硬組織ではこれら組織の形成に、膵臓ではインシュリン合成に関与していると考えられる (Hambidge *et al.*, 1986)。この分布様式を、これまでに報告されている海生哺乳類や海鳥類と比較すると、アカウミガメの場合、脂肪組織で高濃度蓄積が認められたという点で、他の動物種と大きく異なる (Honda, *et al.*, 1983, 1986a, 1987; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Noda, *et al.*, 投稿中)。

一般に、重金属は脂肪組織中に高濃度に蓄積しないため、この部位は最も濃度の低い組織の一つとして知られている (Honda, *et al.*, 1983, 1986a, 1987; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Noda, *et al.*, 投稿中)。しかしながら脂肪中のZn濃度は、アカウミガメで $96.1 \pm 18.8 \mu\text{g/g}$ (n=7)、アオウミガメで $56.4 \mu\text{g/g}$ (雌)と $46.2 \mu\text{g/g}$ (雄)であり、両種ともに脂肪中にZnを蓄積する傾向がある。これらの濃度レベルは肝臓を上回っている。また、Znの体内全蓄積量に対する、脂肪組織への蓄積割合は、10%以上の高値を示した。さらに、甲羅や骨を除いた軟

組織だけでは、Znの大半が脂肪組織に蓄積されている。ウミガメ類の脂肪中のZn濃度を、これまでに報告された海鳥類のアデリーペンギン (*Phygoscelis adeliae*, $11.3 \pm 6.4 \mu\text{g/g}$, $n=3$; Honda, *et al.*, 1986a)、海生哺乳類のキタオットセイ (*Callorhinus ursinus*, $1.95 \mu\text{g/g}$, $2.63 \mu\text{g/g}$; Noda, *et al.*, 投稿中)、ウェッデルアザラシ (*Lyptonychotes weddellii*, $0.8 \mu\text{g/g}$, $0.6 \mu\text{g/g}$; Yamamoto, *et al.*, 1987)、スジイルカ (*Stenella coeruleoalba*, $5.66 \pm 5.90 \mu\text{g/g}$, $n=16$; Honda, *et al.*, 1983)、イシイルカ (*Phocoenoides dalli*, $6.44 \mu\text{g/g}$, $1.32 \mu\text{g/g}$; Fujise, *et al.*, 1988)、ミンククジラ (*Balaenoptera acutorostrata*, $1.34 \mu\text{g/g}$, $0.94 \mu\text{g/g}$; 山本, 1988) などと比較すると、アカウミガメとアオウミガメの濃度が約10倍高値である (図3-3-1)。しかし、ウミガメ類の脂肪組織で高濃度蓄積が認められたのはZnだけで、Fe、Mn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hgの濃度は、海鳥類や海生哺乳類の値と大きく異なることはなかった。また、肝臓、腎臓、脾臓、骨中の濃度などを種間で比較しても、明瞭な種間差は認められなかった (Honda, *et al.*, 1983, 1986a, 1987, 1990; Wagemann, and Muir, 1984; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Law, *et al.*, 1991; Lock, *et al.*, 1992; Noda, *et al.*, 投稿中)。脂肪組織中Zn濃度の種間差の原因について、餌の影響を考えた場合、アカウミガメが摂餌するとされる底生動物 (内田, 1983b; Dodd Jr, 1988) の組織中総Zn濃度、アオウミガメ胃内容物の海草中総Zn濃度と (後述、表4-6-1)、海鳥類や海生哺乳類が摂餌する魚類、イカ類、動物プランクトンの組織中総Zn濃度は、これらの生物種間で大きな違いはない (細貝 他, 1978; Hamanaka, *et al.*, 1981; Honda, *et al.*, 1987; 藤瀬, 1987; Rainbow, 1990; Thompson, *et al.*, 1990)。したがって食性の違いだけでは、脂肪組織中濃度の種間差は説明できない。しかも、アカウミガメは肉食性、アオウミガメは海草 (藻) 食性と食餌の種類が異なっているにも関わらず (Hirth, 1971; 内田, 1983B; Dodd Jr., 1988)、脂肪中のZn濃度はいずれも高い。これまでのところ、アカウミガメおよ

びアオウミガメの脂肪に、Znのみが高濃度で蓄積する原因は明らかではない。また、高濃度のZnの生理的な役割も明らかにはされていない。しかし、脂肪中に体内の全蓄積量の10%以上が蓄積していたことから、この部位が体内Znの貯蔵場所として働いていると考えることが出来る。

アカウミガメ脂肪組織中の脂質含量を求めたところ、 $71.5 \pm 9.26\%$ と高く、一般の海生哺乳類に相当する値が得られた。ウミガメ類の脂肪中には、脂溶性の形態のZnが濃縮している可能性もある。そこで、Blight-Dyerによる脂質抽出法の変法*（図3-3-2）を行い、脂肪組織中のZnの存在形態を検討した。試料とした検体は、脂肪中のZn濃度が最も高かった、900519-6の雌を供した。検討の結果、Znは脂質画分には存在せず、そのほとんどは残査に蓄積していることが明らかとなった。残査中の存在形態については明らかに出来なかったが、アカウミガメとアオウミガメの脂肪組織は緑褐色を呈しており、他の海生動物とは全く異なることから推測すると、脂肪組織中のZnは、脂肪細胞に含まれる何らかの色素タンパクと結合している可能性がある。

* ; 本研究で行った、Blight-Dyer法の変法

前もって血管や膜を除去した約3gの脂肪組織に、クロロフォルム・メタノール・イオン交換水をそれぞれ20・40・12mL加え、コニカルビーカー中で、ディスパーザーを用いてホモジナイズし、上澄み（メタノール・水）を分取した。クロロフォルムと残査の入ったコニカルビーカーに、先と同量の混合溶液を加え、再度ホモジナイズし、脂質をクロロフォルムに抽出した。得られた全ての溶液をろ紙で濾過し、残査を集めた。この残査を、4フッ化エチレン樹脂フィルター上で、80°C1時間乾燥させた後、酸分解を行い、Zn分析に供した。得られたそれぞれの溶液は、ロータリーエバポレーターで濃縮した後、酸分解を行い、Zn分析に供した。

3-3-3. Fe、Mn、Cu、Pb、Ni、Coの蓄積と分布

Znが脂肪組織中に高濃度で蓄積していたことを除けば、アカウミガメとアオウミガメ体内各組織の重金属の濃度分布、および存在量分布は、海生哺乳類や海鳥類で報告されているものと類似していた (Osborn, *et al.*, 1979; Stoneburner, *et al.*, 1980; Honda, *et al.*, 1983, 1986a, 1986b, 1987; Ohlendorf, *et al.*, 1986; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Wagemann, *et al.*, 1988; André, *et al.*, 1990a, 1990b; Noda, *et al.*, 投稿中)。また、濃度にかなりな個体が認められたが、濃度分布および存在割合の分布には、個体による違い、雌雄による違い、さらに種による違いはほとんど認められなかった。一般に、Fe、Mn、Cu、Pb、Ni、Co濃度は肝臓、腎臓、脾臓、骨、甲羅で高く、反対に、脳や脂肪で低い値が観察された。Coは、腎臓 (アカウミガメ $0.201 \pm 0.053 \mu\text{g/g}$ 、アオウミガメ雌 $0.57 \mu\text{g/g}$) 以外では検出されなかった。しかし、いくつかの重金属で例外が認められた。Feは肝臓の他、循環器系の器官や赤血球の破壊と貯蔵の場である脾臓で高かった。また、Cuは他の重金属とは異なり、脳や塩類腺で比較的高い値が認められた。腎臓中のNiは、アカウミガメよりもアオウミガメで高濃度蓄積する傾向が見られた。

存在量の分布では、Mnは甲羅と骨に全蓄積量の80%以上が蓄積していた。一方、FeとCuは、濃度の高かった肝臓と、重量割合の多い筋肉に多く蓄積しており、Hgの分布様式と類似のパターンを示した。

Table 3-3-1(1). Heavy metal concentrations (mean±SD) in organs and tissues of Loggerhead turtles

Internal Organ	Fe ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Mn ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Zn ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Cu ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Liver	604 ± 401	917	2.18 ± 0.40	1.44	28.1 ± 4.73	26.6	17.7 ± 8.93	19.4
Gullet	8.48 ± 4.67	4.31	0.12 ± 0.06	0.24	12.5 ± 7.06	10.5	0.406 ± 0.064	0.279
Stomach	15.2 ± 9.39	3.96	0.43 ± 0.26	0.42	13.0 ± 3.22	14.8	0.624 ± 0.149	0.493
Intestine	9.72 ± 5.40	3.16	0.51 ± 0.29	0.83	30.4 ± 23.0	20.1	0.712 ± 0.233	0.688
Pancreas	34.1 ± 9.01	14.6	26.4 ± 20.2	2.89	117 ± 35.6	86.5	1.02 ± 0.186	0.951
Heart	153 ± 225	47.4	0.32 ± 0.20	0.57	36.2 ± 9.51	32.5	1.23 ± 0.377	1.06
Trachea	16.5 ± 16.4	10.1	0.13 ± 0.08	0.24	4.56 ± 0.564	2.93	0.322 ± 0.195	0.258
Lung	134 ± 114	50.6	0.12 ± 0.08	0.25	16.7 ± 7.20	12.1	0.545 ± 0.105	0.508
Bladder	16.8 ± 5.25	7.15	0.16 ± 0.06	0.32	14.4 ± 1.95	12.6	0.669 ± 0.125	0.641
Spleen	65.1 ± 33.3	44.8	0.37 ± 0.38	0.37	21.9 ± 2.42	20.3	0.696 ± 0.073	0.744
Kidney	30.0 ± 36.6	11.4	1.50 ± 0.51	1.97	25.4 ± 4.39	28.4	1.30 ± 0.216	1.29
Salt gland	47.0 ± 15.2	31.8	0.75 ± 0.23	0.80	14.5 ± 1.71	11.1	2.83 ± 0.721	2.04
Brain	21.2 ± 12.9	12.1	0.35 ± 0.14	0.63	8.78 ± 1.72	5.64	2.05 ± 1.11	2.00
Reproductive Organ								
Spermary		24.1		0.46		26.0		0.867
Oviduct	17.4 ± 9.19		0.54 ± 0.30		7.48 ± 1.66		1.73 ± 1.02	
Ovary	33.0 ± 3.62		0.70 ± 0.32		37.7 ± 3.67		1.60 ± 0.201	
Egg	11.5 ± 1.29		0.52 ± 0.26		14.7 ± 1.44		1.05 ± 0.199	
Shell	10.6 ± 2.20		0.68 ± 0.48		2.17 ± 0.590		5.57 ± 0.767	
Yolk	25.1 ± 2.18		0.91 ± 0.42		34.4 ± 3.18		1.57 ± 0.073	
Albumen	0.870 ± 0.377		0.17 ± 0.30		0.594 ± 0.584		0.129 ± 0.083	
Integument Tissue								
Scale	16.7 ± 9.14	8.31	0.14 ± 0.10	0.27	12.6 ± 6.00	7.05	0.398 ± 0.114	0.372
Mesentery	45.0 ± 38.0	15.2	0.14 ± 0.08	0.19	7.92 ± 4.02	5.65	0.395 ± 0.150	0.278
Fat	9.92 ± 5.61	18.9	0.12 ± 0.09	0.18	96.1 ± 18.8	85.6	0.109 ± 0.029	0.237
Muscle	19.8 ± 8.71	22.2	0.28 ± 0.11	0.43	25.0 ± 3.49	19.5	0.810 ± 0.277	0.948
Bone	6.70 ± 1.12	8.49	10.8 ± 4.96	18.4	197 ± 26.5	139	0.200 ± 0.056	0.384
Carapace	26.2 ± 19.1	9.77	7.01 ± 3.49	8.94	198 ± 37.2	142	0.251 ± 0.077	0.298
Whole body	62.2 ± 10.2	58.4	2.31 ± 1.05	3.44	73.8 ± 10.6	56.7	1.21 ± 0.360	1.13

Concentration*

a; n=2, b; n=1, na=not analysis, nc=not calculation

Whole body concentrations were calculated from the body burden

Table 3-3-1(2). Heavy metal concentrations (mean±SD) in organs and tissues of Loggerhead turtles

	Pb ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Ni ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Cd ($\mu\text{g}/\text{wet g}$)		Hg($\text{ng}/\text{wet g}$)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Internal Organ								
Liver	0.08±0.03	0.21	<0.03	<0.03	9.74 ± 3.37	6.60	400 ±155	8150
Gullet	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.183± 0.130	0.827	49.1 ± 21.0	193
Stomach	<0.03	<0.03	<0.03	0.086	0.451± 0.174	0.149	36.2 ± 13.9	na
Intestine	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	1.10 ± 1.41	2.56	49.1 ± 27.6	102
Pancreas	<0.03	<0.03	0.084±0.041	0.045	39.2 ±16.1	20.9	102(a) 217(a)	1990
Heart	<0.03	<0.03	<0.03	0.117	0.454± 0.339	0.257	92.2 ± 12.6	na
Trachea	<0.03	<0.03	0.041±0.064	0.115	0.035± 0.085	0.154	10.3 ± 2.85	33.7
Lung	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.371± 0.143	0.254	39.7 ± 16.0	127
Bladder	<0.03	<0.03	<0.03	0.030	0.291± 0.085	0.139	37.0 ± 15.5	82.1
Spleen	<0.03	<0.03	0.022±0.039	0.037	1.19 ± 0.875	0.516	55.7 ± 20.3	289
Kidney	0.16±0.05	<0.03	0.217±0.093	0.053	38.3 ±17.5	45.5	237 ±140	304
Salt gland	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	1.52 ± 0.329	0.831	53.3 ± 24.4	216
Brain	<0.03	<0.03	<0.03	0.050	0.269± 0.067	0.253	38.7(b)	na
Reproductive Organ								
Spermary		<0.03		<0.03		0.775		na
Oviduct	<0.03		<0.03		0.061± 0.033		22.0 ± 8.83	
Ovary	<0.03		<0.03		0.037± 0.019		17.5 ± 5.67	
Egg	<0.03		<0.03		0.013± 0.004		5.54± 1.57	
Shell	<0.03		<0.03		<0.01		4.05± 1.31	
Yolk	<0.03		<0.03		0.026± 0.007		12.1 ± 3.41	
Albumen	<0.03		<0.03		<0.01		0.49± 0.24	
Integument Tissue								
Scale	0.08±0.03	0.07	0.081±0.037	0.048	0.085± 0.026	0.028	35.2 ± 18.8	279
Mesentery	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.413± 0.620	0.211	43.0 ± 73.2	34.2
Fat	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.066± 0.036	0.093	5.59± 3.46	37.2
Muscle	0.02±0.03	<0.03	0.083±0.026	0.056	0.064± 0.028	0.048	94.4 ± 36.1	189
Bone	3.53±1.62	1.82	0.140±0.049	0.086	0.134± 0.033	0.086	7.27± 2.02	14.0
Carapace	2.42±0.52	1.56	0.094±0.022	0.063	0.129± 0.034	0.072	43.2 ± 29.9	159
Whole body Concentration	nc	nc	nc	nc	0.81 ± 0.16	0.80	55.5 ± 10.9	359

a; n=2, b; n=1, na=not analysis, nc=not calculation

Whole body concentrations were calculated from the body burden

Table3-3-2. Heavy metal concentrations in tissues and organs of green turtle

	Fe#		Mn#		Zn#		Cu#		Pb#		Ni#		Cd#		Co#		Hg*	
	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male	Female	male
Internal Organ																		
Liver	126	145	1.86	1.91	59.5	57.1	8.73	13.5	0.12	<0.03	0.059	0.071	3.90	12.1	<0.03	<0.03	301	76.70
Gullet	4.00	3.89	0.21	0.20	40.8	15.9	1.55	0.337	1.20	<0.03	<0.03	0.219	0.389	0.164	<0.03	<0.03	49.1	5.77
Stomach	2.93	3.94	0.27	0.34	11.9	15.9	0.327	0.412	<0.03	<0.03	<0.03	0.068	0.089	0.196	<0.03	<0.03	n.a.	n.a.
Intestine	8.57	2.87	0.36	0.38	31.6	24.0	0.463	0.519	<0.03	<0.03	0.043	<0.03	2.85	5.91	<0.03	<0.03	7.54	7.39
Pancreas	13.2	12.8	2.66	7.31	1120	347	1.04	0.970	0.03	0.04	0.075	0.158	7.16	12.6	<0.03	<0.03	n.a.	25.6
Heart	43.2	34.5	0.28	0.36	24.4	31.5	0.945	0.950	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	0.066	0.234	<0.03	<0.03	n.a.	n.a.
Trachea	14.3	9.59	0.21	0.26	7.03	9.82	0.271	0.243	<0.03	<0.03	<0.03	0.331	0.084	0.182	<0.03	<0.03	2.45	1.82
Lung	38.2	57.6	0.25	0.25	11.9	14.9	0.299	0.356	<0.03	<0.03	<0.03	0.187	0.132	0.224	<0.03	<0.03	2.71	2.25
Bladder	6.52	6.12	0.35	0.32	16.7	13.3	0.454	0.462	<0.03	<0.03	<0.03	0.034	0.091	0.161	<0.03	<0.03	4.16	3.77
Spleen	44.1	48.2	0.30	0.35	20.6	18.4	0.519	0.455	0.06	0.05	0.072	0.077	0.994	0.414	<0.03	<0.03	6.89	5.85
Kidney	12.9	14.9	1.09	1.55	32.8	35.2	1.71	1.33	<0.03	0.14	0.561	0.463	37.0	45.5	0.571	<0.03	42.2	47.8
Salt gland	33.2	19.9	1.09	0.94	17.9	11.5	3.26	2.61	<0.03	<0.03	<0.03	0.049	0.581	0.903	<0.03	<0.03	6.71	6.38
Brain	10.9	13.2	0.40	0.55	8.19	9.38	0.652	1.07	<0.03	<0.03	<0.03	0.118	0.103	0.164	<0.03	<0.03	n.a.	n.a.
Reproductive Organ																		
Spermary		27.3		0.38		11.0		0.502		<0.03		0.072		1.19		<0.03		9.50
Oviduct	6.69		0.33		7.63		2.17		<0.03		<0.03		0.026		<0.03		4.61	
Ovary	28.0		0.81		50.5		0.546		<0.03		<0.03		<0.03		<0.03		4.72	
Egg	10.9		0.38		20.3		0.781		<0.03		<0.03		<0.03		<0.03		1.35	
Shell	1.98		1.33		0.555		4.74		<0.03		<0.03		<0.03		<0.03		1.20	
Yolk	24.4		0.57		47.2		0.634		<0.03		<0.03		<0.03		<0.03		2.51	
Albumen	1.07		<0.03		1.29		0.157		<0.03		<0.03		<0.03		<0.03		0.05	
Integument Tissue																		
Scale	7.23	8.64	0.29	0.34	26.7	13.4	0.133	0.182	0.09	0.14	<0.03	0.888	0.024	0.036	<0.03	<0.03	5.11	2.81
Mesentery	19.8	11.9	0.14	0.12	5.87	6.52	0.349	0.253	<0.03	<0.03	<0.03	0.111	0.053	0.258	<0.03	<0.03	2.65	1.49
Fat	23.0	14.8	0.20	0.19	56.4	46.2	0.216	0.407	<0.03	<0.03	<0.03	0.059	0.063	0.060	<0.03	<0.03	2.42	2.81
Muscle																		
Muscle	9.07	13.7	0.24	0.29	10.5	8.84	0.270	0.240	<0.03	<0.03	0.059	<0.03	0.011	0.034	<0.03	<0.03	6.94	2.13
Bone	7.78	4.20	5.67	7.46	247	106	0.187	0.320	2.4	2.3	0.058	<0.03	0.025	0.042	<0.03	<0.03	2.01	2.15
Carapace	13.0	6.48	3.92	5.04	347	292	0.350	0.240	2.3	3.1	0.191	<0.03	0.054	0.033	<0.03	<0.03	2.79	2.03
Whole body concentration																		
Whole body concentration	26.4	23.1	1.22	1.62	91.2	74.0	1.52	0.590	0.55	0.7	0.06	0.06	0.390	0.710	n.c.	n.c.	12.4	4.02

#; $\mu\text{g/g}$ wet wt., *; ng/g wet wt., n.c.; not calculation

n.a.; not analyzed

Whole body concentrations were calculated from the body burden

Table3-3-3. Percentage composition of heavy metals in the organs of loggerhead turtles

	Fe (%)		Mn (%)		Zn (%)		Cu (%)		Cd (%)		Hg (%)	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Muscle	12.4 ± 5.03	16.6	3.37±1.54	3.69	8.78±1.17	10.6	17.5 ±3.08	26.9	2.17±1.09	1.82	42.2 ±9.92	15.5
Liver	48.7 ±16.0	67.2	3.89±1.48	1.22	1.44±0.33	1.41	51.8 ±8.68	53.9	44.4 ± 8.64	24.5	26.9 ±9.26	65.6
Kidney	1.01± 1.20	0.24	0.58±0.24	0.48	0.28±0.05	0.43	0.98±0.40	1.03	37.0 ± 7.30	48.4	3.12±1.26	0.70
Ovary	6.28± 2.14		2.35±1.00		3.91±1.14		10.7 ±3.36		0.33± 0.14		2.40±0.91	
Egg	0.93± 0.58		0.70±0.06		0.62±0.31		2.96±1.75		0.05± 0.03		0.29±0.16	
Fat	2.35± 1.53	4.15	0.63±0.69	0.46	13.2 ±7.27	13.6	1.02±0.76	1.97	0.86± 0.63	1.03	0.93±1.12	0.90
Bone	1.17± 0.46	1.66	31.1 ±3.50	41.6	18.3 ±4.29	19.7	1.15±0.21	2.85	1.13± 0.25	0.86	0.87±0.18	0.30
Carapace	14.4 ±13.0	4.75	55.4 ±6.73	50.3	50.7 ±7.02	50.2	4.18±1.45	5.50	3.28± 1.59	1.76	13.7 ±7.38	8.47

Table 3-3-4. Percentage composition of heavy metals in the organs of green turtles

	Fe		Mn		Zn		Cu		Cd		Hg	
	Female	Male										
Muscle	15.3	33.0	5.10	6.04	3.00	4.00	14.3	12.3	0.73	1.57	14.3	17.6
Liver	22.8	21.9	4.14	2.47	1.81	1.63	50.4	42.5	27.2	35.6	66.3	39.7
Kidney	0.39	0.55	0.41	0.49	0.17	0.24	1.20	1.39	43.2	32.5	1.56	5.99
Ovary	14.6		5.18			4.43		7.65	n.c.		3.00	
Egg	0.88		0.38			0.28		1.70	n.c.		0.11	
Fat	16.6	22.5	1.77	2.45	6.89	13.3	15.3	4.21	1.75	1.77	2.14	14.67
Bone	2.97	2.16	26.9	32.9	16.0	10.2	4.06	1.93	0.36	0.42	0.94	3.78
Carapace	14.1	7.99	52.5	53.1	63.5	67.7	7.28	10.2	2.25	0.79	3.69	8.54

n.c.; not calculation

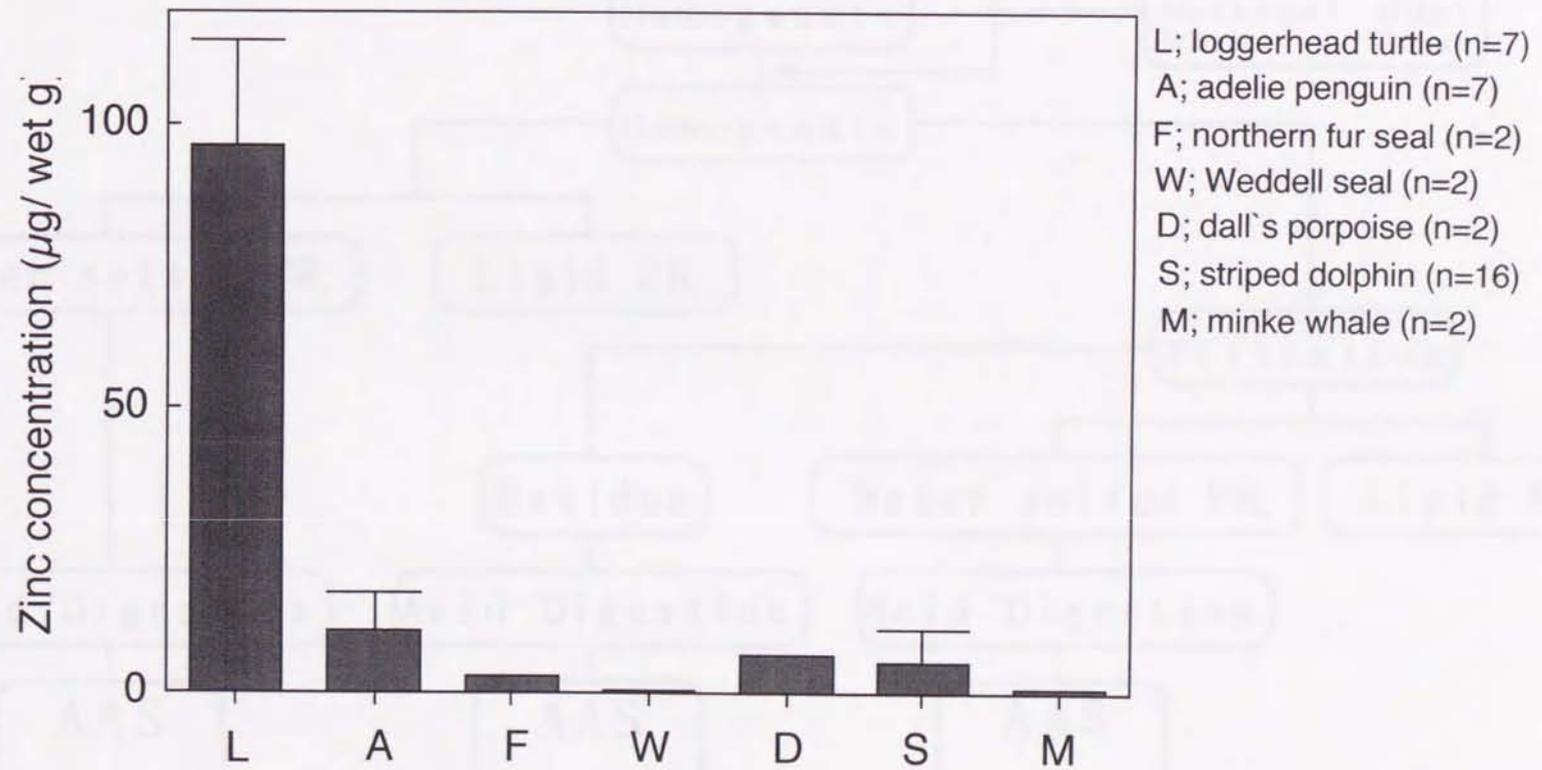


Fig. 3-3-1
Comparison of zinc concentrations in fat tissues of several marine animals

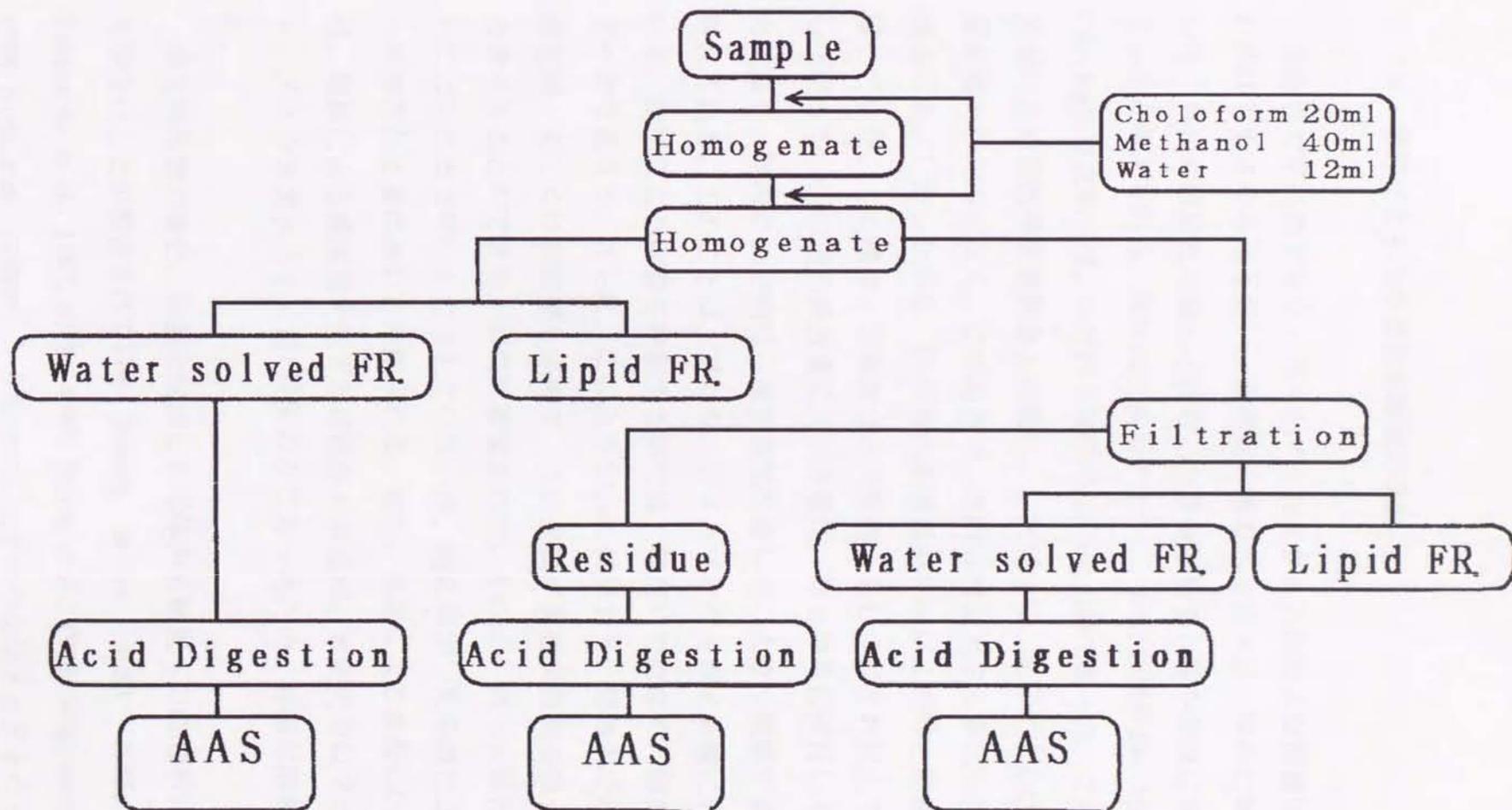


Fig. 3-3-2. Analytical procedure of fat extraction

3-4. 産卵にともなう重金属蓄積の変動

本研究で用いたアカウミガメとアオウミガメの卵および卵巣は、体重の約10%を占めるほど重い。産卵期の雌のウミガメは、体内に蓄積していた、もしくは新たに餌から吸収した重金属類を、卵や卵巣に移行させていると考えられる。表3-3-2で示したように、卵と卵巣中Fe、Mn、Zn、Cd、Hgの存在割合は、いずれもほぼ5%以下と低値であった。この値は、体重に占める組織重量割合より低い。したがって、産卵によるCu以外の重金属の移行は少なく、この過程で、体内分布は大きく変化しないと推測される。しかしながら、Cuは体内蓄積量の10%以上が卵と卵巣中に蓄積していた。この値は、重量割合と同程度、もしくはそれ以上である。したがって、Cuは他の重金属に比べ多量に、卵と卵巣に移行していることになり、体内のCu分布は、産卵期間を通して、大きく変動するものと考えられる。このことは、アカウミガメとアオウミガメ両種に共通している。産卵による影響を検討する際には、卵だけではなく、卵巣も考慮すべきであろう。さらに、このようなCuの結果から、母体内での卵の形成過程、もしくは胚の発生過程で、この金属が重要な役割を担っているとも考えることもできる。卵巣に蓄積されているCuの、卵への移行率についてはこれまで明らかにされていないが、他の測定した金属に比べ体外へ排泄される量は多いと推察される。また、産卵による多量のCuの移動は、雌雄による濃度差を生ずる可能性があるが、本研究ではアカウミガメ、アオウミガメともに雄1検体のみであったため、詳細な議論は避けた。

海生哺乳類の場合、胎盤を経由した母体から胎児へのCd移行はきわめて少ないことが報告されている (Honda, *et al.*, 1983, 1986a, 1987; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Wagemann, *et al.*, 1988; Noda, *et al.*, 投稿中)。今回分析したアカウミガメとアオウミガメで

は、卵および卵巢中Cdの存在割合は、測定した他の重金属に比べ極端に低値であった。また、海鳥類に関しても、卵中のCd蓄積は低いという報告がある (Stoneburner, *et al.*, 1980; Honda, *et al.*, 1986a; Ohlendorf, *et al.*, 1986)。このようなことから、卵生の海鳥類やウミガメ類に関しても、母体から卵にCdを移行させない、何らかの機構が働いているものと推察される。

同じ毒性重金属でありながら、HgはCdよりも生殖器官への分布割合が多い。同様なことは、これまでに鳥類でも認められており (Stoneburner *et al.*, 1980a; Honda *et al.*, 1986a; Ohlendorf & Harrison, 1986)、例えば、Lewis *et al.* (1993) が報告したherring gullは、体内のHg蓄積量の20%以上が産卵によって排泄されている。このようなHgとCdの違いは、体内における存在形態の違いによるものと思われる。一般に、体内に蓄積しているHgの存在形態の内、メチルHgは各組織に移行しやすい (井村, 1980)。ウミガメ類においても、このようなCdとHgの存在形態の差が、生殖器官における分布割合の違いに影響をもたらしているものと考えられる。また、アカウミガメの場合、生殖器官重量の割合の変化にともない、腎臓のHg濃度が変動した (図3-4-1)。ここで、重量割合が少ないほど過去の産卵回数が多く、重量割合が多いほど産卵回数が少ないと仮定すると、腎臓のHg濃度は産卵を行うごとに低減することになる。また、腎臓ほど明瞭ではないが、肝臓でも類似した傾向が得られた。このような現象には、おそらく産卵にともなう何らかの生理的機能の変化が関与しているものと思われる。いずれにしても、Hgの生殖器官の存在割合は5%以下で、重量割合よりも低いことから、産卵による体内の蓄積変動は少ないと考えられる。

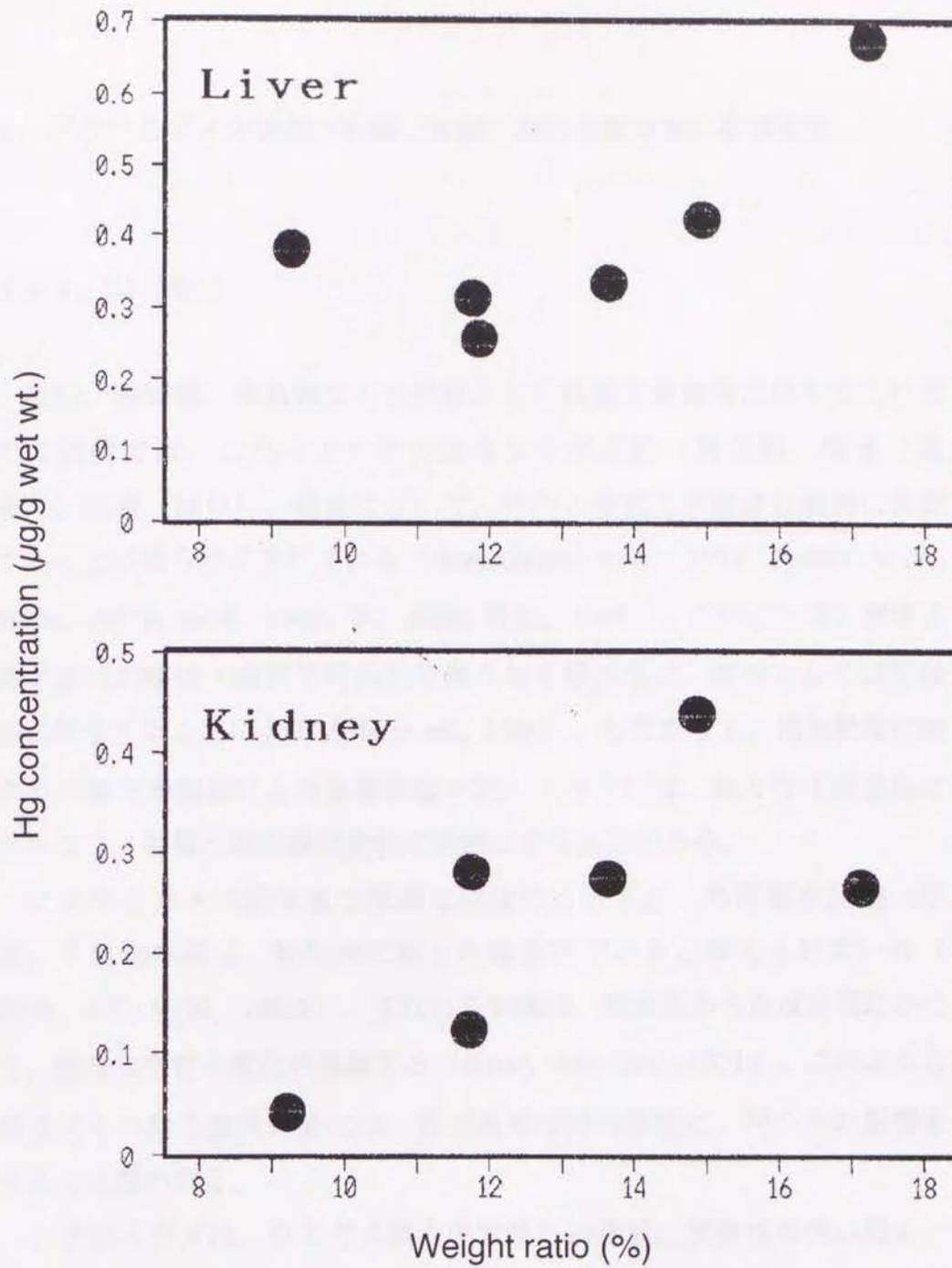


Fig. 3-4-1.
 Relationship between weight ratio (%) of female reproductive organs and Hg concentration in liver and kidney

4. アオウミガメの筋肉、肝臓、腎臓における重金属の蓄積変動

4-1. はじめに

鯨類、鰭脚類、海鳥類などを対象とした微量元素蓄積に関するこれまでの研究では、これらの生物の固有な生理過程（性成熟、繁殖（産卵）、回遊（渡り）、絶食など）で、体内の微量元素濃度は劇的に変動することが明らかにされている（Haarakangas *et al.*, 1974; Honda *et al.*, 1986a, 1987b; 山本, 1988; 李, 1989; 野田, 1995）。このことは、微量元素が体内の組織・器官で行われる様々な生理作用に、直接もしくは間接的に関与することによる（Mertz *ed.*, 1986）。したがって、海生動物に対する微量元素蓄積による影響評価を正しく行うには、様々な生理過程にともなう、微量元素の蓄積変動を明確にする必要がある。

アオウミガメは沿岸域で極端な草食性を示すが、外洋域を回遊（浮遊）する幼体期は、動物食に偏った雑食性であると考えられている（Hirth, 1971; 内田, 1983b）。すなわち本種は、幼体期から亜成体期にかけて、極端な食性の変化を経験する（dietary shift; Hirth, 1971）。このような成長にともなう食性の変化は、重金属類の体内蓄積に、何らかの影響を与えらると思われる。

アオウミガメは、ウミガメ類の中で最も沿岸域に摂餌性の強い種の一つであるため、人間活動由来の化学物質の影響が、最も懸念される。最近、ハワイ諸島沿岸に生息するアオウミガメ個体群で、線維乳頭腫（fibropapilloma）の多発が報告されるようになっている（Hutchinson and Simonnds, 1991; Aguire *et al.*, 1994）。化学汚染が直接の原因とした報告はないが、その影響が疑われている。アオウミガメを含むウミガメ類全てについては、重金属蓄積のデータが大幅に欠落しているため、影響評価のためのモニタリング基礎研究が求められている。

ここでは、八重山列島近海で捕獲されたアオウミガメの筋肉、肝臓、腎臓中のFe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hg濃度を測定し、その蓄積の状況を明らかにするとともに、成長にともなう変動、特に食性の変化にともなう変動について考察した。

4-2. 試料と方法

本研究に供したアオウミガメ50検体は、1992年3月から5月にかけて、南西諸島八重山列島付近にて捕獲したも(図4-2-1)。その内、3月に捕獲された2検体は、愛媛大学農学部へ輸送後、体重計測および外部計測を行ない、新鮮な状態で詳細な解剖を行った。摘出した各組織・器官は重量を測定した後に、ポリエチレン袋に封入し、 -20°C 以下で分析時まで冷凍保存した。他の48検体は石垣市内の剥製製造場で解体をし、そのうち23検体(サンプル番号920428-1~22, 920428-G1)は筋肉、肝臓、大腿骨を分析試料として採取した。他の25検体は、筋肉と肝臓、大腿骨の他に、腎臓、脂肪、胃内容物などを採取した。これら試料はポリエチレン袋に封入し、現地で凍結した後、新鮮な状態で愛媛大学農学部環境化学研究室まで輸送し、分析時まで -20°C 以下で冷凍保存した。これら試料の詳細を表4-2-1に示す。

重金属分析は2章1節で述べた方法にしたがい、筋肉、肝臓、腎臓についてFe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hgの定量を行った

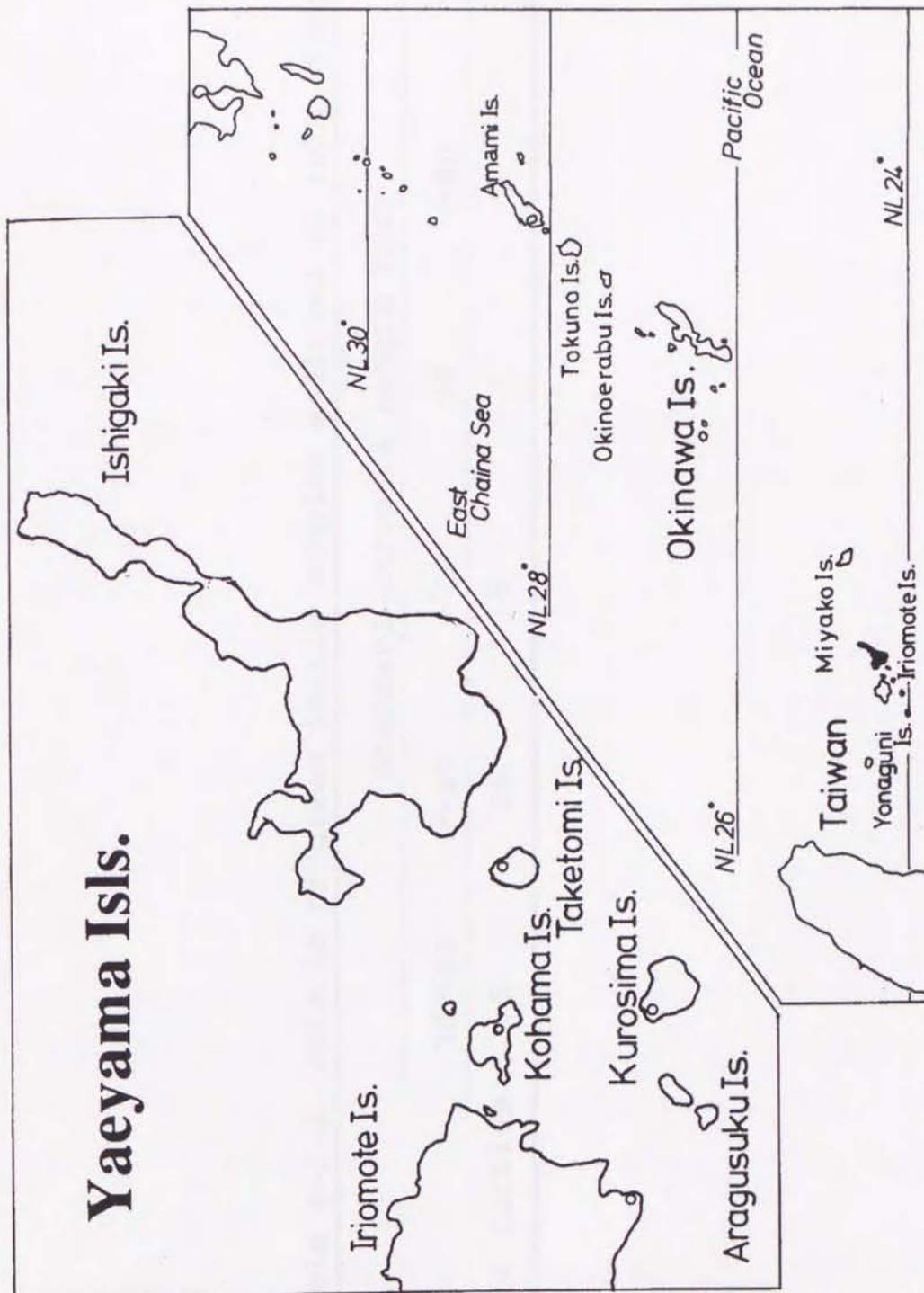


Fig. 4-2-1. Sampling point of green turtles

Table 4-2-1. Details of green turtle samples analyzed in this study

	Standard carapace length (cm)					
	30~40	~50	~60	70	~80	~90
Number of turtles	5	26	8	7	2	2

4-3. 濃度レベルと他の海生動物との比較

アオウミガメの筋肉、肝臓、腎臓中から検出されたFe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hg濃度を表4-3-1に示す。測定した重金属は一般に、肝臓の濃度が最も高く、筋肉は低値であった。ただし、Pb、Ni、Cd、Coは、肝臓よりもむしろ腎臓で濃度が高かった。

アオウミガメの重金属濃度を、これまでに報告されている海生哺乳類や海鳥類のデータと比較すると (Wagemann and Muir, 1984; Honda *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1991; Lock *et al.*, 1992)、肝臓中のCuで極めて高い値が見られた (図4-3-1)。しかし、高濃度のCuが検出されたのは肝臓だけで、腎臓 (図4-3-2) や筋肉では認められず、他の海生動物と同程度もしくは低いものであった。図4-3-1と図4-3-2には、アオウミガメと共にアカウミガメとタイマイの値も示した。これら2種のウミガメの肝臓中Cu濃度も、アオウミガメよりも低いが、他の海生動物と比べると高値であった。また、ウミガメ類3種の肝臓中Cu濃度は、高値であるばかりでなく変動も大きいことに特徴がある。これまでに、ヒツジやカモなどの肝臓に高濃度のCuが蓄積することが報告されているが (和田, 1985; Davis and Mertz, 1986)、ウミガメ類がCuの高濃度蓄積種であるという知見はなく、本研究が初めての報告である。なぜウミガメ類が肝臓中にCuを高濃度に蓄積するのか、その理由は今のところ明らかではない。しかし、金属毒性を考えた場合、CuはCdに匹敵するほど毒性が強く (和田, 1985)、毒性発症のメカニズムも似ていることから (鈴木, 1996)、ウミガメ類、特にアオウミガメにおいてCuの影響が懸念される。

Cuを除く他の測定した重金属は、海生哺乳類や海鳥類で報告された範囲内の濃度であった (Wagemann and Muir, 1984; Honda *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1991; Lock *et al.*, 1992)。毒性重金属であるHgの肝臓中濃度は、これまで報告されている海生動物の中でも特に低いレベルを示した (図4-3-3

)。腸管からのHg吸収率は、餌の中のHgの存在形態に大きく依存する。メチルHgなど有機体のHgの吸収率は高く、無機の形態のものは低いことが知られている(和田, 1985)。また、Hgは海洋生態系において、食物連鎖にしたがい生物濃縮されることが知られている(本田, 1986; 藤瀬, 1987; 山本, 1988)。アオウミガメは主に海草(藻)を食し、アカウミガメやタイマイも甲殻類や海綿など、食物連鎖上の低次生物を餌としている(Hirth, 1971; 内田, 1983b; Dodd Jr, 1988)。したがって、アオウミガメおよび他の2種のウミガメ類でHg濃度が低い原因として、食物連鎖上の低次生物を好んで食すことと、餌中のHgの存在形態の違いが考えられる

腎障害を発症させることが知られるCdの腎臓中濃度は、一般にCd濃度の高いことで知られる海生哺乳類の平均的な値とほぼ同程度、もしくは高い値を示した(図4-3-4)。本田(1986)は海生哺乳類において、腎臓中Cd濃度が40ppm(湿重当たり)を越すと、肝臓中Cd濃度と腎臓中Cd濃度の正の相関関係がなくなり、腎臓中濃度が減少することを報告している。この原因として本田(1986)は、Cd慢性暴露により腎障害が発症し、腎臓におけるCdの再吸収能が阻害されたためと指摘している。本研究で用いたアオウミガメに関しては、肝臓中Cd濃度の増加にともない、腎臓中の濃度も増加していたことから(図4-3-5)、Cdの高濃度蓄積による腎障害は発症していないと考えられる。ところで、アオウミガメ腎臓中のCd濃度は、海生動物の中で比較的高い値を示したが、肝臓中のCd濃度は他の海生動物と比較すると低いグループに属する(図4-3-6)。このことから、Cdの体内移動のメカニズムは、海生動物の種によって違いがあるものと推測される。このことについては、6章で詳しく述べる。

Table 4-3-1.

Heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ wet wt.) in muscle, liver and kidney of green turtle

Muscle									
	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd	Co	Hg*
mean	5.28	0.11	8.80	0.35			0.05		18.8
s.d.	4.60	0.06	5.50	0.41			0.08		30.0
min	0.97	0.05	3.30	0.08	n.d.	n.d.	0.01	n.d.	0.95
max	29.6	0.36	33.0	2.65			0.54		119
Liver									
	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd	Co	Hg*
mean	461	1.86	30.3	50.2			5.58		287
s.d.	260	0.84	7.13	31.6			4.05		156
min	32.7	0.70	17.5	4.27	n.d.	n.d.	0.30	n.d.	53.0
max	1270	5.40	47.1	113			18.6		644
Kidney									
	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Ni	Cd	Co	Hg*
mean	22.8	1.21	29.6	2.15	0.18	0.62	38.5	0.81	132
s.d.	14.6	0.32	7.39	0.86	0.07	0.37	21.3	0.79	76.9
min	11.4	0.72	17.5	0.95	0.05	0.12	7.31	0.06	29.0
max	59.2	2.30	44.7	3.94	0.28	1.33	80.7	2.50	248

*; ng/g wet wt.

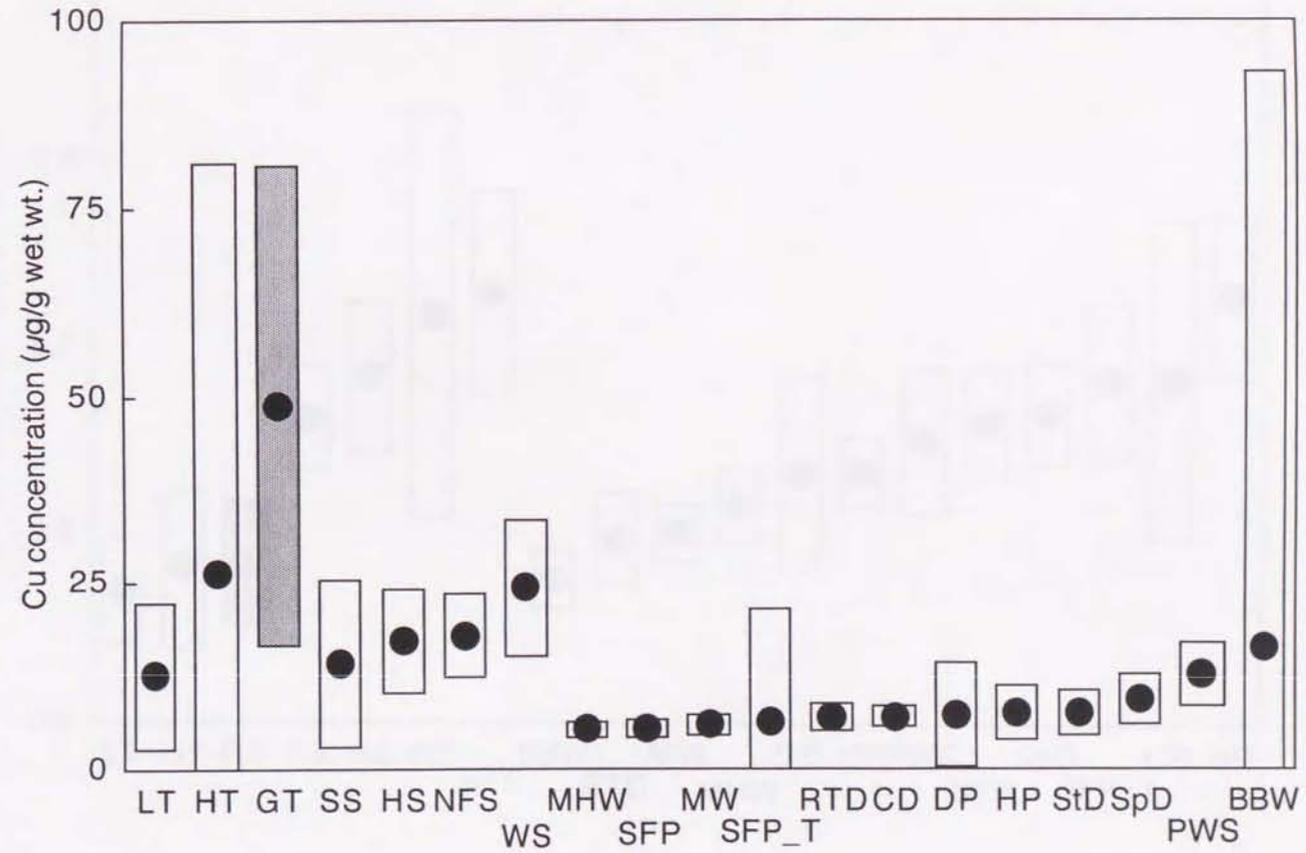


Fig.4-3-1. Comparison of Cu concentration in liver of sea turtles, pinnepeds and cetaceans

HT; hawksbill turtle, GT; green turtle, LT; loggerhead turtle, SS; spotted seal, WS; Weddel seal, HS; Harbor seal, NFS; northern fur seal, HP; harbor porpoise, BD; bottlenose dolphin, CD; common dolphin, StD; striped dolphin, PWS; Pacific white-sided dolphin, DP; Dall's porpoise, RTD; Rough-toothed dolphin, SFP_T; short-fined pilot whale (T), MW; minke whale, MHW; melon-headed whale, BBW; Baird's beaked whale, SpD; Spinner dolphin, SFP; short-fined pilot whale

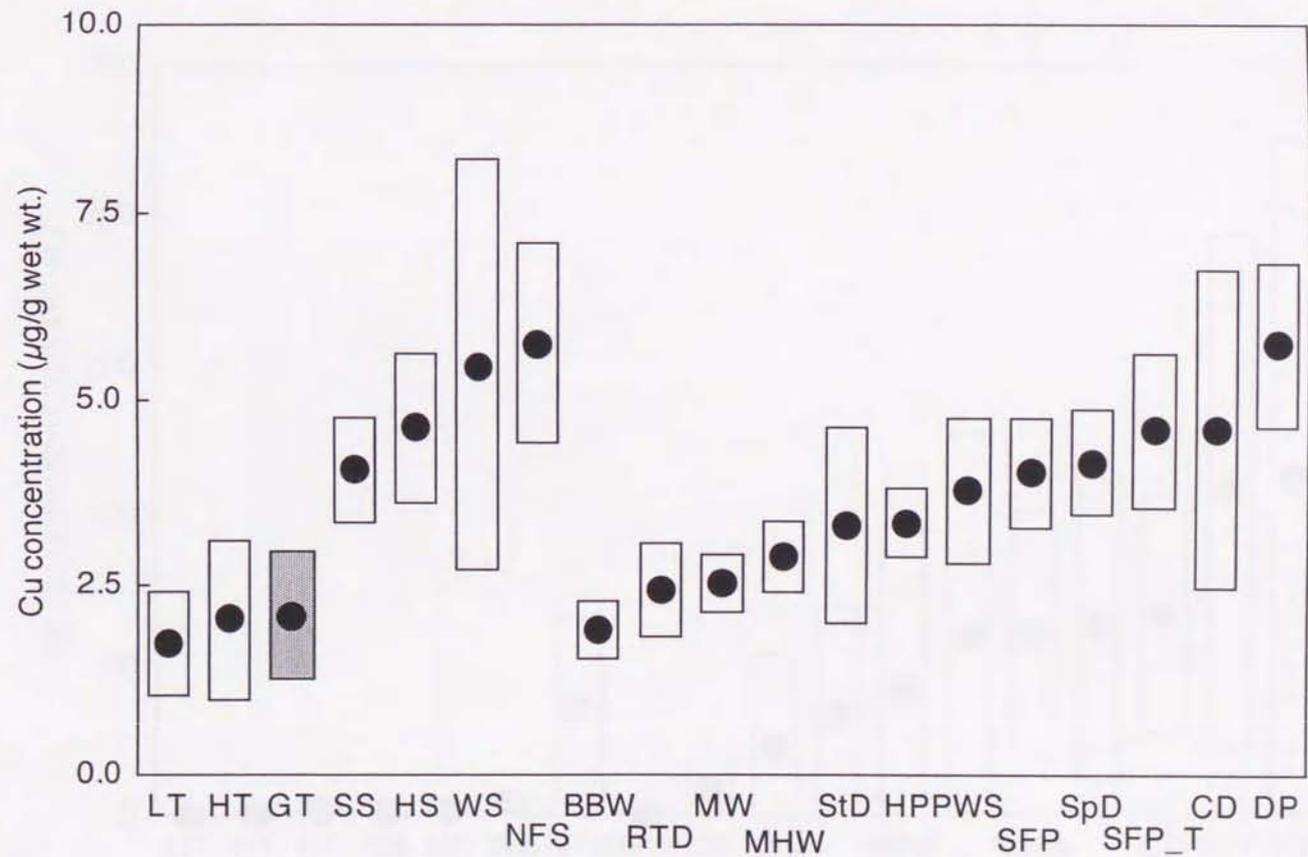


Fig.4-3-2. Comparison of Cu concentration in kidney of sea turtles, pinnepeds and cetaceans

HT; hawksbill turtle, GT; green turtle, LT; loggerhead turtle, SS; spotted seal, WS; Weddel seal, HS; Harbor seal, NFS; northern fur seal, HP; harbor porpoise, BD; bottlenose dolphin, CD; common dolphin, StD; striped dolphin, PWS; Pacific white-sided dolphin, DP; Dall's porpoise, RTD; Rough-toothed dolphin, SFP_T; short-fined pilot whale (T), MW; minke whale, MHW; melon-headed whale, BBW; Baird's beaked whale, SpD; Spinner dolphin, SFP; short-fined pilot whale

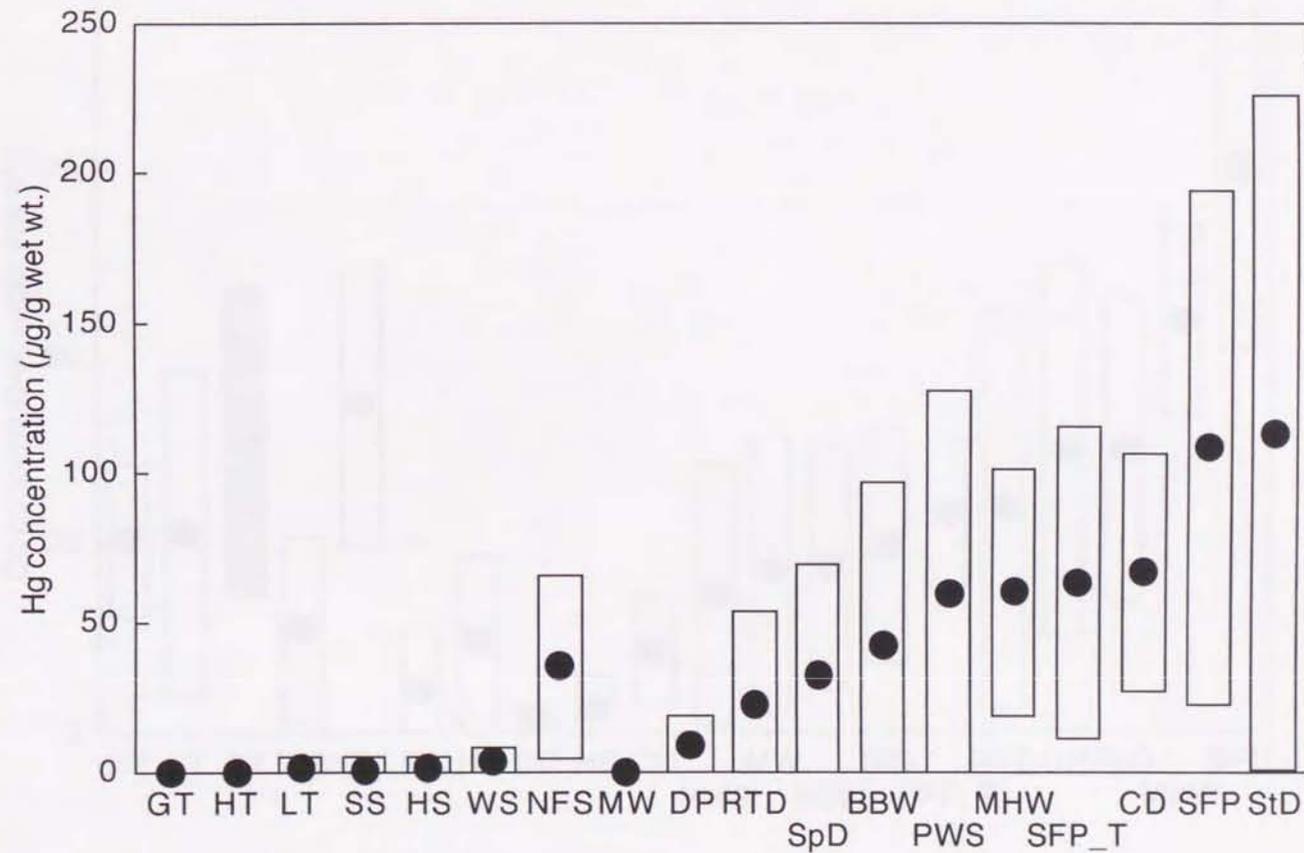


Fig.4-3-3. Comparison of Hg concentration in liver of sea turtles, pinnipeds and cetaceans

HT; hawksbill turtle, GT; green turtle, LT; loggerhead turtle, SS; spotted seal, WS; Weddel seal, HS; Harbor seal, NFS; northern fur seal, HP; harbor porpoise, BD; bottlenose dolphin, CD; common dolphin, StD; striped dolphin, PWS; Pacific white-sided dolphin, DP; Dall's porpoise, RTD; Rough-toothed dolphin, SFP_T; short-fined pilot whale (T), MW; minke whale, MHW; melon-headed whale, BBW; Baird's beaked whale, SpD; Spinner dolphin, SFP; short-fined pilot whale

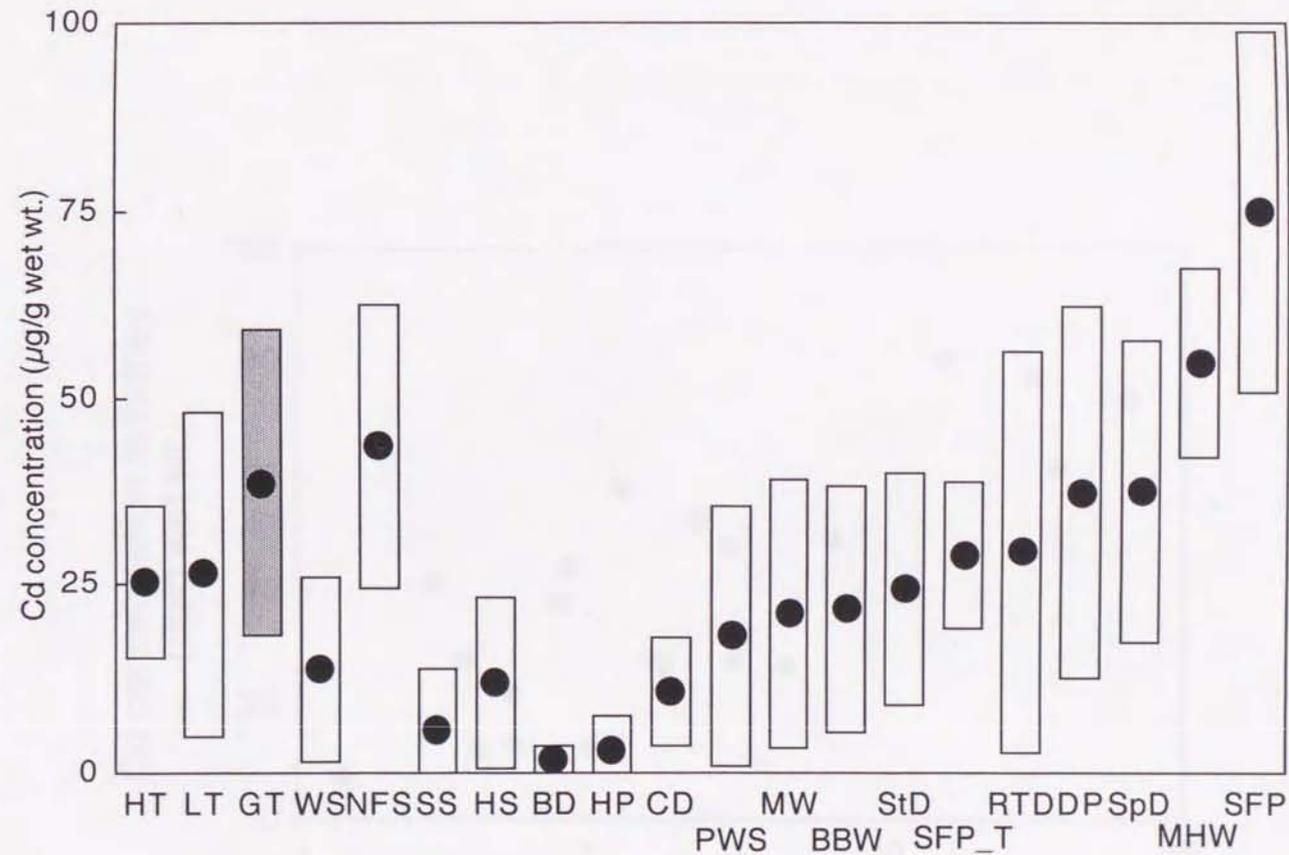


Fig.4-3-4. Comparison of Cd concentration in kidney of sea turtles, pinnipeds and cetaceans

HT; hawksbill turtle, GT; green turtle, LT; loggerhead turtle, SS; spotted seal, WS; Weddel seal, HS; Harbor seal, NFS; northern fur seal, HP; harbor porpoise, BD; bottlenose dolphin, CD; common dolphin, StD; striped dolphin, PWS; Pacific white-sided dolphin, DP; Dall's porpoise, RTD; Rough-toothed dolphin, SFP_T; short-fined pilot whale (T), MW; minke whale, MHW; melon-headed whale, BBW; Baird's beaked whale, SpD; Spinner dolphin, SFP; short-fined pilot whale

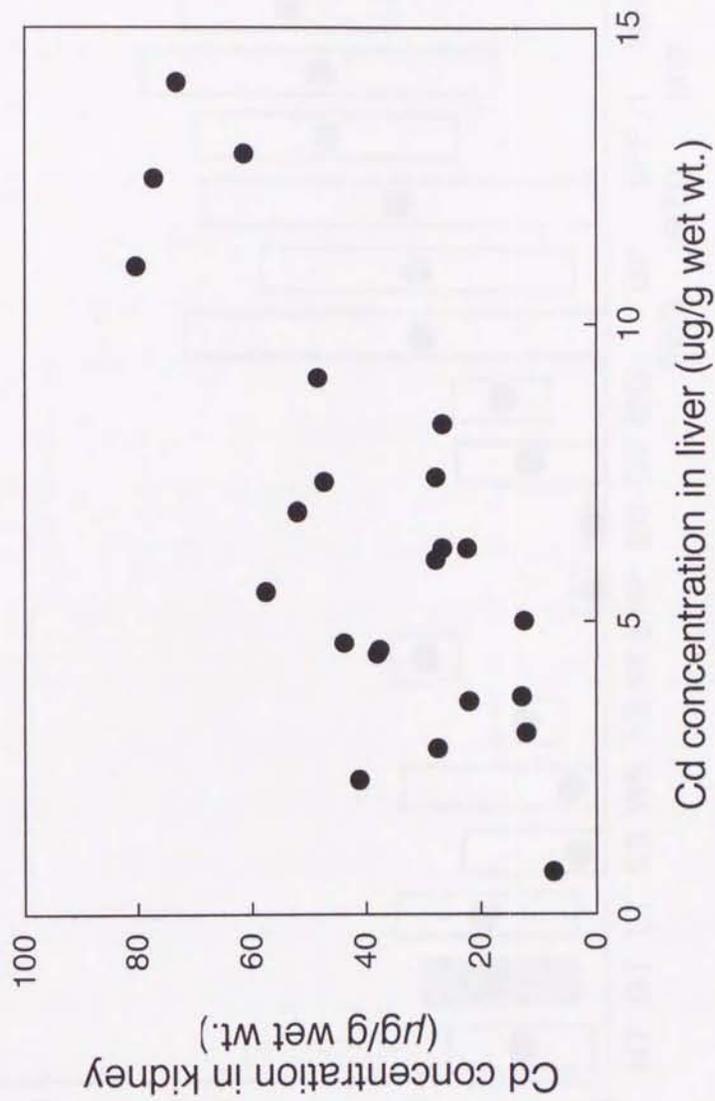


Fig. 4-3-5
 Relationship of cadmium concentration between liver and kidney
 of green turtle

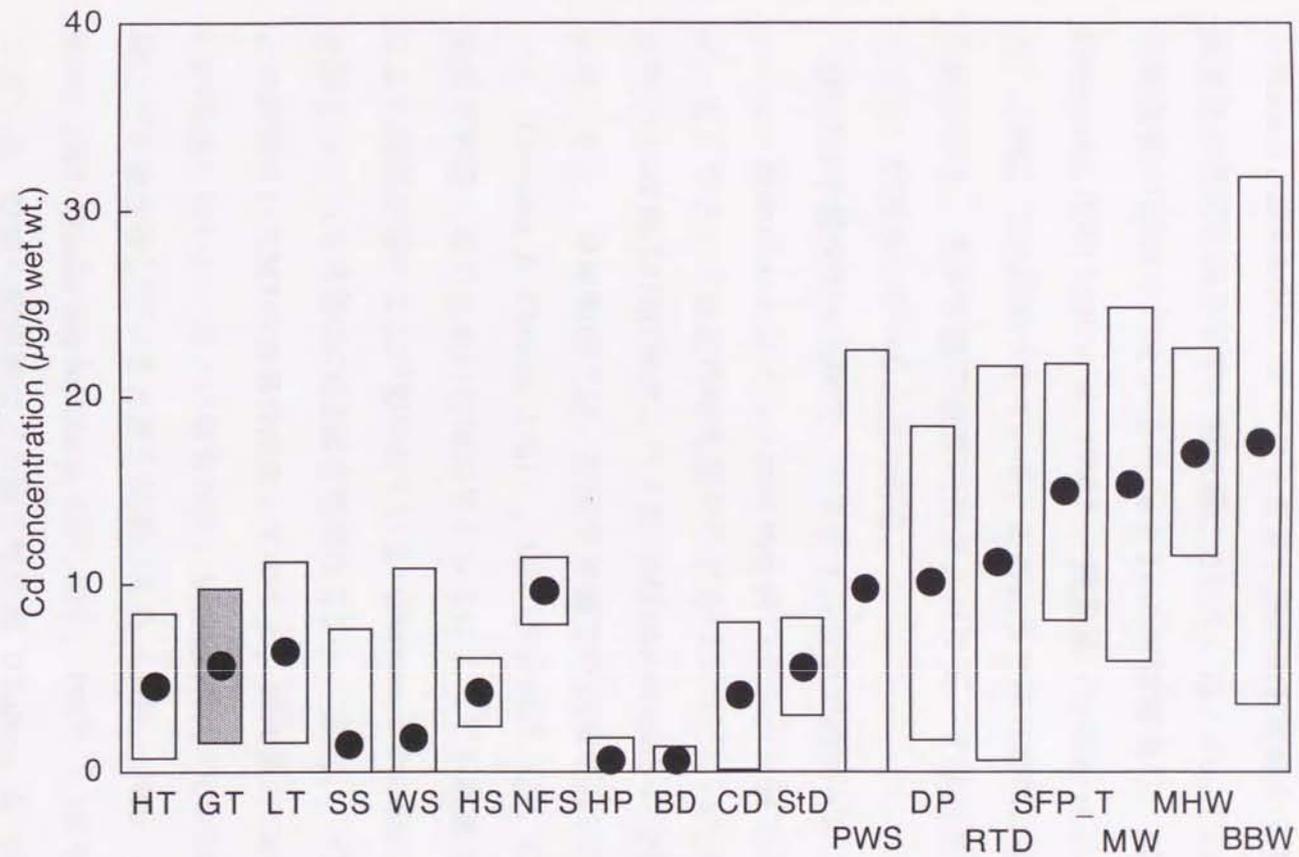


Fig.4-3-6. Comparison of Cd concentration in liver of sea turtles, pinnipeds and cetaceans

HT; hawksbill turtle, GT; green turtle, LT; loggerhead turtle, SS; spotted seal, WS; Weddel seal, HS; Harbor seal, NFS; northern fur seal, HP; harbor porpoise, BD; bottlenose dolphin, CD; common dolphin, StD; striped dolphin, PWS; Pacific white-sided dolphin, DP; Dall's porpoise, RTD; Rough-toothed dolphin, SFP_T; short-finned pilot whale (T), MW; minke whale, MHW; melon-headed whale, BBW; Baird's beaked whale, SpD; Spinner dolphin, SFP; short-finned pilot whale

4-4. アオウミガメの肝臓と腎臓における重金属間の相互関係

表4-4-1と表4-4-2に、アオウミガメ肝臓および腎臓から検出された重金属濃度の相関関係を示す。両組織において、Zn、Cu、Cdの間に強い正の相関関係が認められた。このCdとZnの相関関係は、鯨類や鰭脚類（Thompson, 1990; Law, *et al.*, 1991）、海鳥類（Honda, *et al.*, 1990; Lock, *et al.*, 1992）でも認められている。このような相互関係には、Zn、Cu、Cdを結合する、低分子量の金属結合タンパク質、すなわちMetallothionein (MT) が関与していると思われる。

MTは分子量6000~7000で、システイン含量が約30%以上と多く、特有のアミノ酸構成およびアミノ酸配列を持つタンパク質である。これまでに、ヒトやラットなどの哺乳類からアカパンカビにいたるまで、多くの生物からMTおよびMT様タンパク質 (MT like protein) が分離・精製されている。また、脊椎動物では、肝臓や腎臓で存在量が多いことが知られている (Onosaka & Cherian, 1981)。MTの生合成は、Zn、Cu、Cdなどの重金属が細胞へ取り込まれた時のストレスによっても誘導され、特に、Cdによる誘導が強いことが知られている (Durnam & Palmiter, 1980)。「MTと結合している状態のCdは毒性を持たない」、また、「CdもしくはZnなどを前投与してMTの誘導合成をしておく、致死量のCdを投与しても毒性が発現しない」、などの報告から、MTは生体内でCdの毒性を軽減・無毒化する働きをしているという見解がある (木村, 1980; 小島, 1984; Webb, 1986; Elinder and Nordberg, 1987; 田中, 1987)。MTもしくはMT様タンパク質は、鯨類や鰭脚類などの海生哺乳類 (Olafson & Thompson, 1974; Lee, *et al.*, 1977; Wagemann, *et al.*, 1984, 1986; Mochizuki, *et al.*, 1985; Kwohn, *et al.*, 1986; 山本, 1988)、数種の鳥類 (Elliot *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1996) などの野生動物の体内で、その存在が認められている。したがって、野生動物で認められたCdとZnの相互関係は、組織に取り込まれたCdの刺

激によりMTが誘導合成され、新たに合成されたMTにZnが結合するために、MTを介してCdとZnが正の相関関係を示したと考えられる。アオウミガメの肝臓と腎臓で認められた、CdとZnの相互関係も、基本的には、これまで報告されている野生動物と同じであると推察される。

肝臓もしくは腎臓中のCdとZnの正の相関関係については、多くの海生動物で報告されているが、CdとCuの関係については少なく、ほとんどの動物の場合、有意な相関関係は認められていない。しかし、アオウミガメに関しては肝臓と腎臓の両組織で、CdとCuの間には有意な正の相関関係が認められた。特に、肝臓における相関係数 (r) は、CdとZnの関係よりも ($r=0.5025$)、わずかではあるがCdとCuの関係の方が高い ($r=0.5117$)。さらに、肝臓においてZnは、Cdとの関係よりもむしろ、Cuとの関係がより強い ($r=0.6840$)。このようなCuをとまなう相互関係は、野生動物ではこれまで報告例がない。本研究の結果は、アオウミガメ特有のCu蓄積機構、もしくは代謝機構の存在を示唆するものである。また、MTを介してZn、Cu、Cdが相互に関係していることから、アオウミガメは、Cdの蓄積もしくは代謝機構に関しても、海生哺乳類や海鳥類とは異なった様式を持つかも知れない。海生動物の肝臓におけるZn、Cu、Cdの蓄積と種特異性に関しては、第6章で詳しく述べる。

Table 4-4-1 Inter-metal and growth-dependent correlation matrix of heavy metal concentrations in liver of green turtle

	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg
SCL	0.106	-0.287	-0.014	-0.040	-0.140	0.056
Fe		*-0.360	0.192	0.186	**0.536	-0.085
Mn			*0.363	-0.240	-0.073	0.192
Zn				**0.684	**0.503	0.081
Cu					**0.512	-0.059
Cd						-0.326

Significant correlation coefficients are asterisked (*; <0.1, **; <0.01)

Table 4-4-2 Inter-metal and growth-dependent correlation matrix of heavy metal concentrations in kidney of green turtle

	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg
SCL	-0.076	0.026	** -0.707	** -0.729	** -0.646	-0.438
Fe		-0.262	0.202	-0.090	0.032	0.252
Mn			0.088	-0.240	0.080	* -0.549
Zn				*0.584	**0.772	0.278
Cu					**0.728	0.393
Cd						0.239

Significant correlation coefficients are asterisked (*; <0.1, **; <0.01)

4-5. 成長にともなう変動

肝臓および腎臓中のZn, Cu, Cd濃度は、甲長40cm付近の幼体期で濃度が高く、また変動も大きい(図4-5-3、図4-5-4、図4-5-5)。この高い値は、成長にともなって減少した。

図4-5-1から図4-5-6に成長にともなう、肝臓、腎臓、筋肉中の重金属濃度の変動を示す。これら3組織のPb, Ni, Co濃度は、ほとんどの個体が検出限界以下の値を示したので、考察の対象外とした。ウミガメ類の年齢査定法はまだ確立していないため、成長を示す指標として、直甲長(SCL; standard carapace length)を用いた。

一般に、海生哺乳動物の場合、CdやHgなどホメオスタシスのきかない毒性金属は、成長にともなって体内に蓄積されることが知られている(本田, 1985; Wagemann, and Muir, 1984; Yamamoto, *et al.*, 1987; 山本, 1988; Fujise, *et al.*, 1988; Law, *et al.*, 1991; 野田, 1995)。しかしながら、本研究で用いたアオウミガメの肝臓、腎臓、筋肉中のCdとHgは、甲長40cm前後の幼体期で濃度が高く、また個体変動も大きい。逆に、甲長サイズの大きな個体(甲長60~80cm)に関しては、それらの濃度は低い。特に、腎臓中のCd、筋肉中のHg濃度と甲長の間には、強い負の相関関係が認められた(図4-5-5、図4-5-6)。また、MTを介してCdと相互に関係しているZnとCuも、Cdと類似した傾向を示した(図4-5-3、図4-5-4)。特に、腎臓中のZnとCu濃度は、甲長との間に強い負の相関関係が認められた。後の6章で詳しく述べるが、肝臓中のCuに関しては、平均48.7 μ g/g、いくつかの検体は100 μ g/gを越すなど、海生哺乳類や海鳥類のデータと比較すると明らかに高濃度であり(Wagemann & Muir, 1984; Honda, *et al.*, 1990; Thompson, 1990; Law, *et al.*, 1991; Lock, *et al.*, 1992)、しかも濃度変動も著しい。海生哺乳類の場合一般に、必須元素であるZnとCuは、胎児期または新生児期においてはその変動が大きいものの、その後の成長にともな

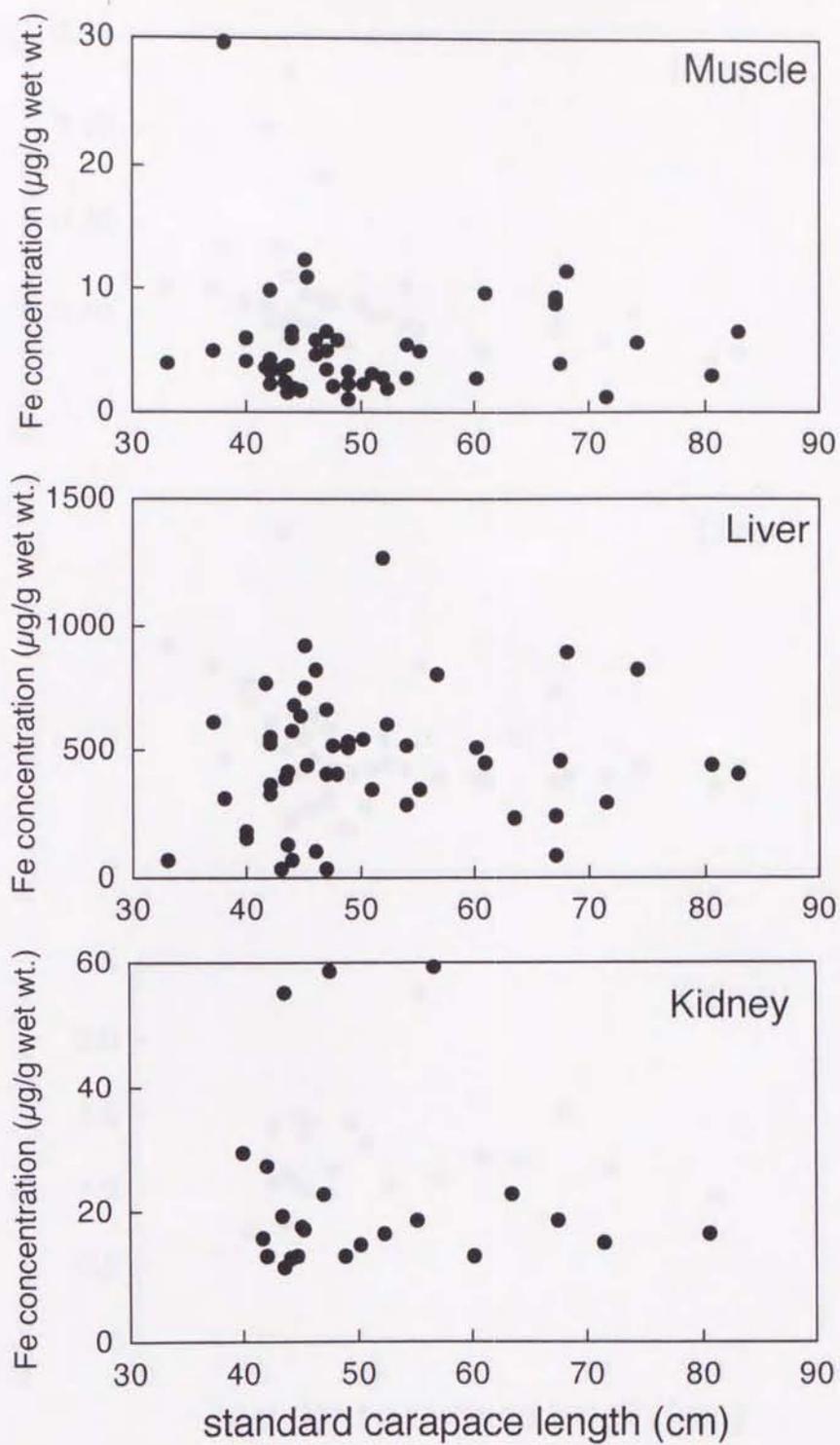


Fig. 4-5-1

Growth-related change of Fe concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

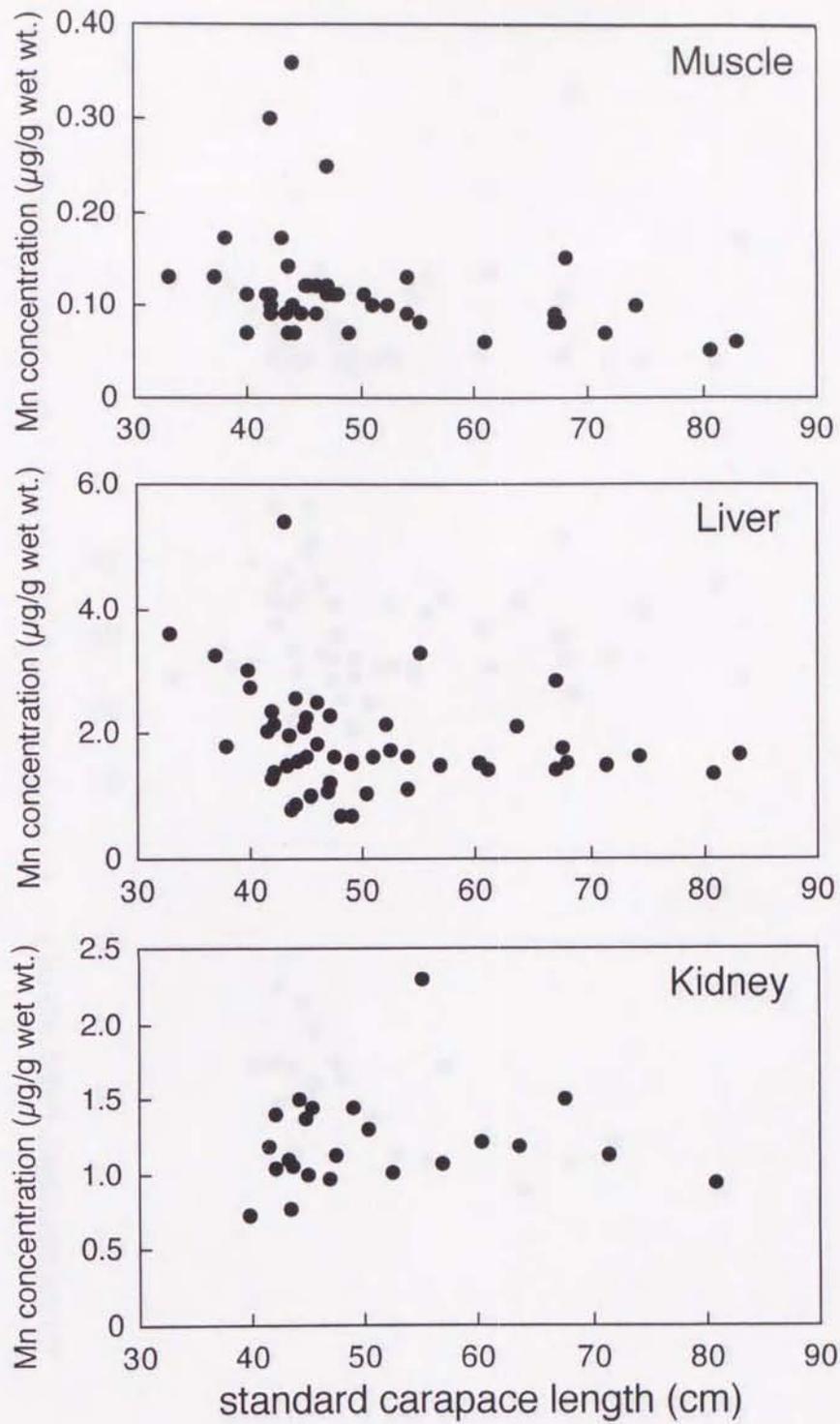


Fig. 4-5-2
Growth-related change of Mn concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

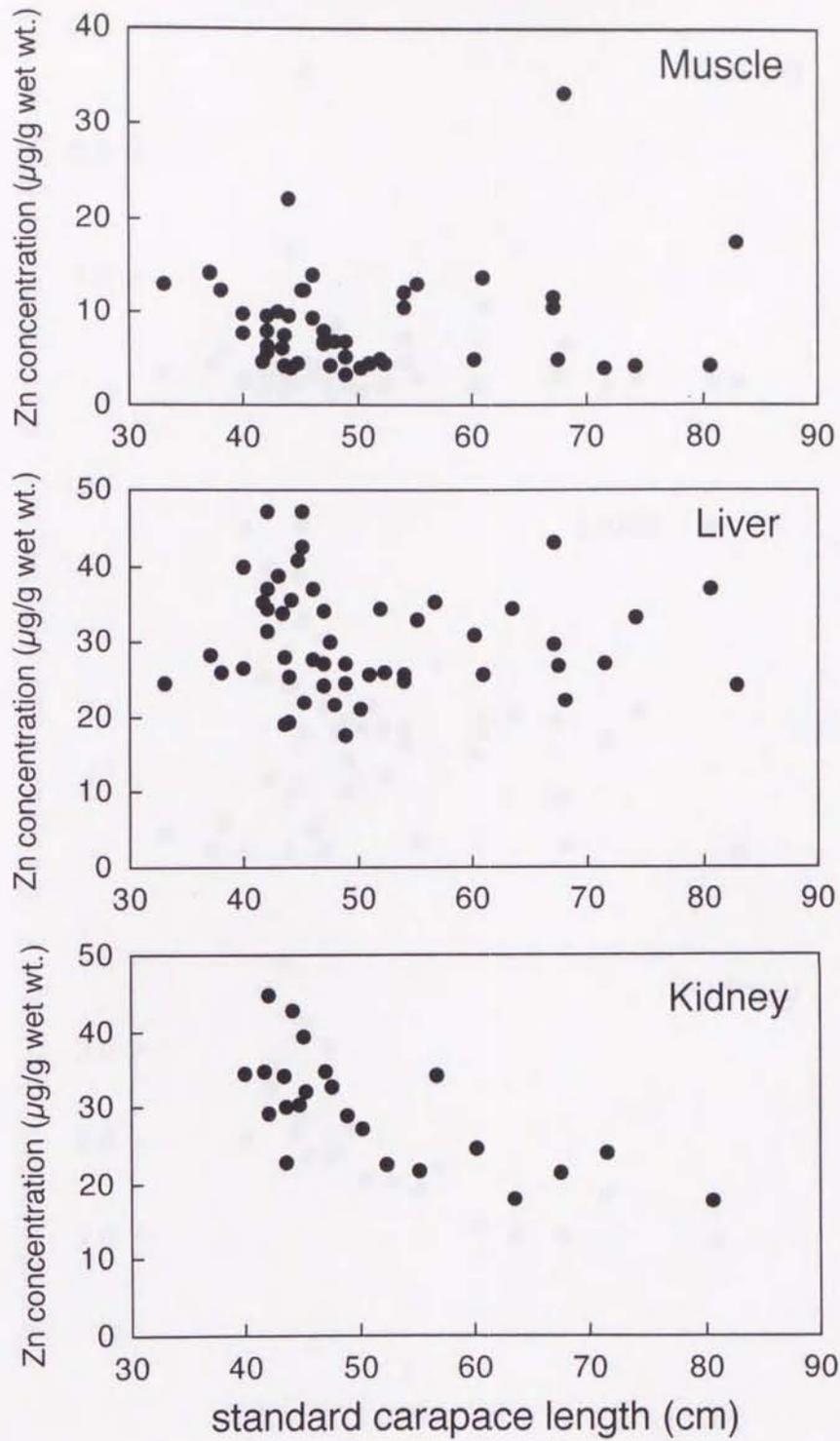


Fig. 4-5-3

Growth-related change of Zn concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

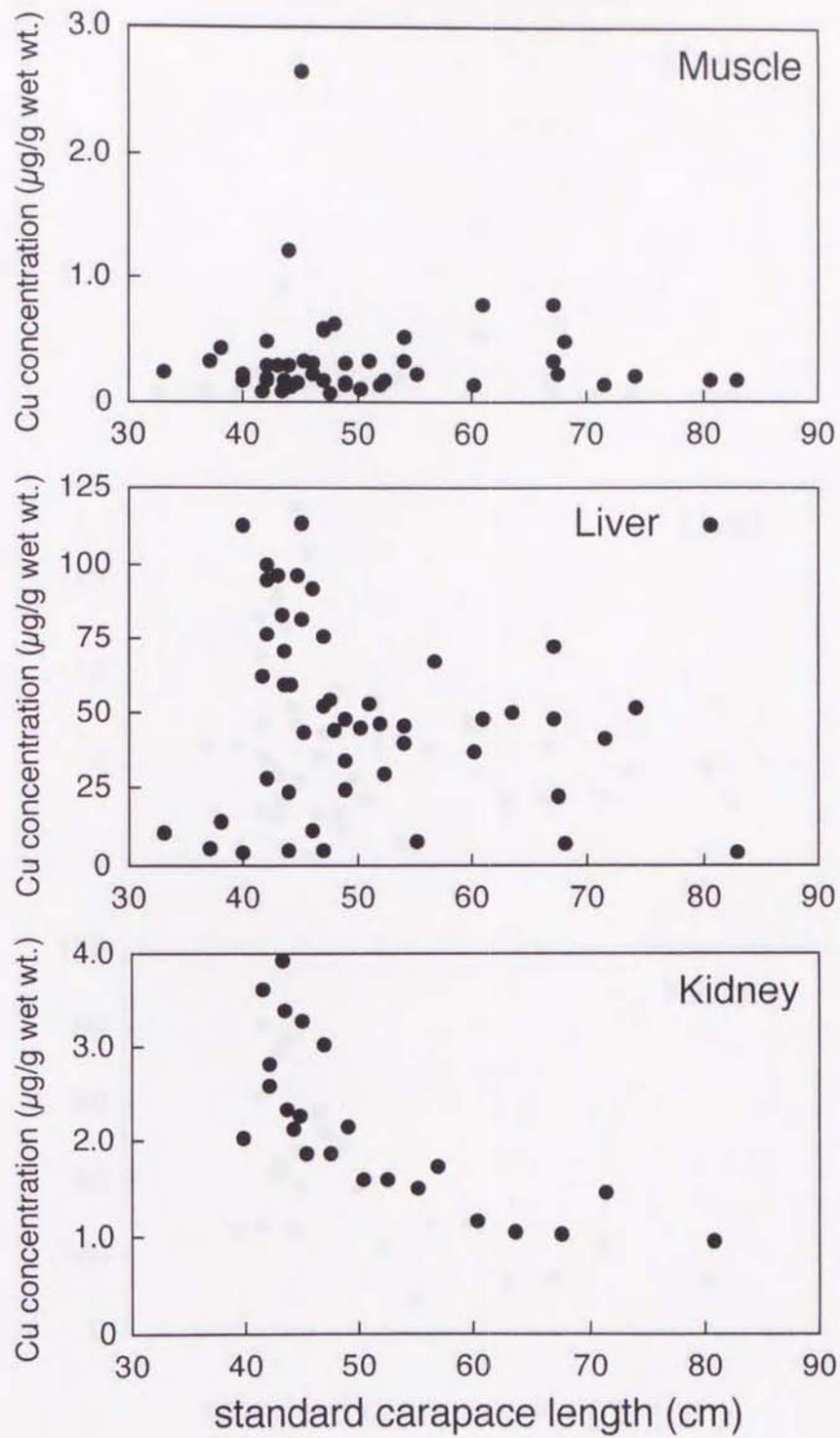


Fig. 4-5-4

Growth-related change of Cu concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

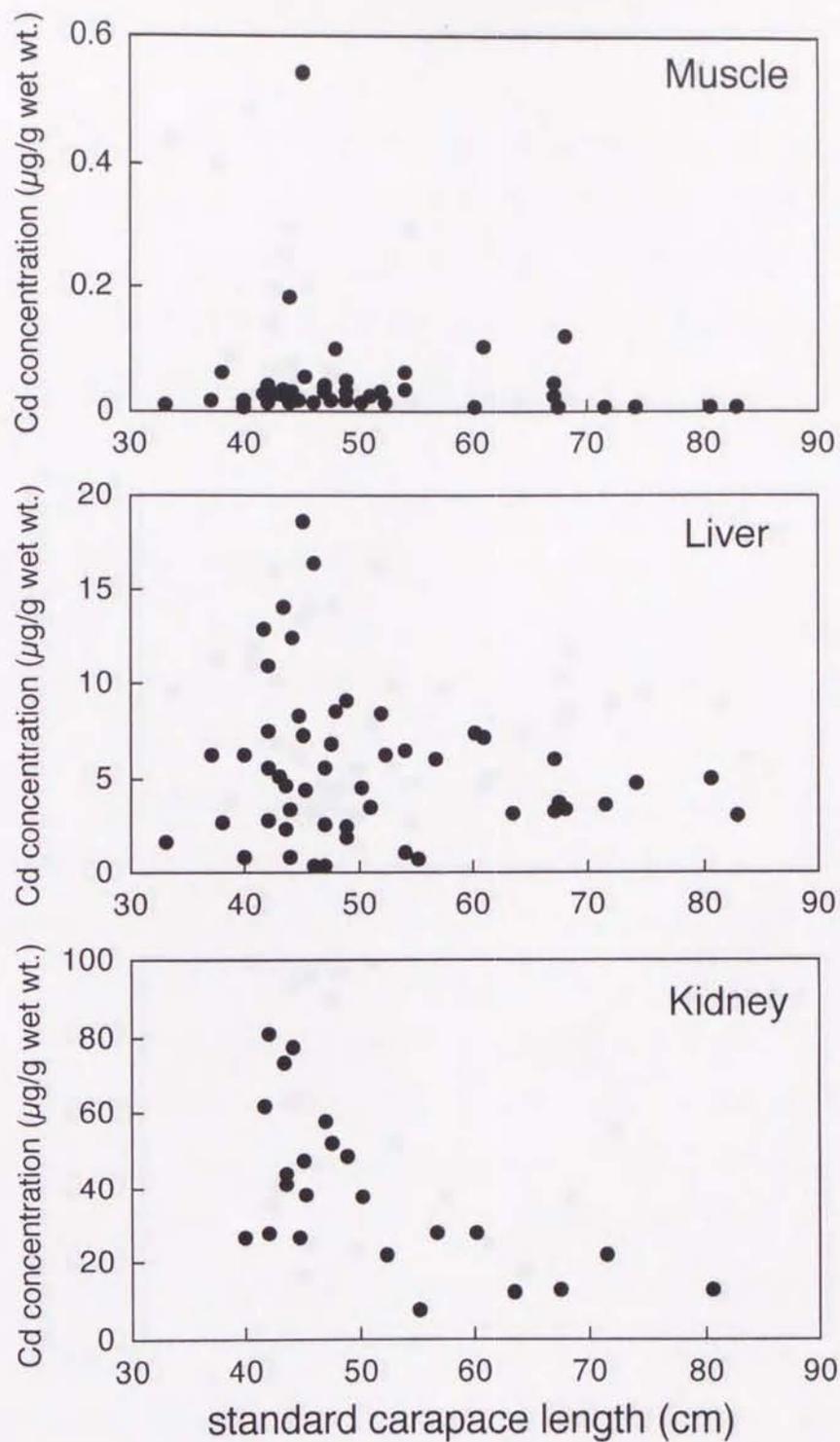


Fig. 4-5-5

Growth-related change of Cd concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

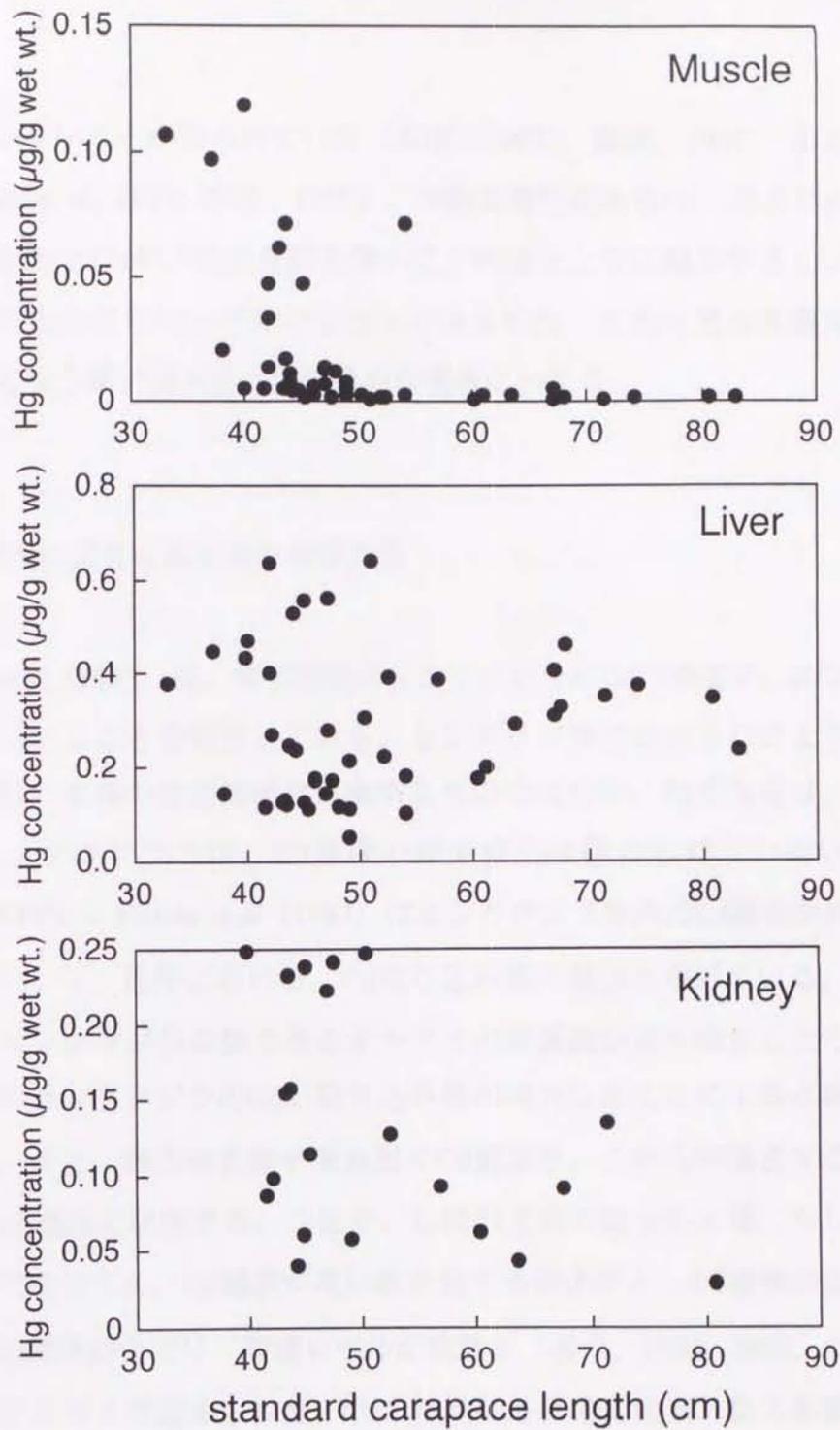


Fig. 4-5-6

Growth-related change of Hg concentrations in muscle, liver and kidney of green turtle

う変動は小さいことが知られている（本田，1985； 藤瀬，1987； 山本，1988； Law, *et al.*, 1991； 野田，1995）。年齢蓄積性のあるCd、および必須元素であるZnとCuが、新生児期を除いて、成長とともに減少するといった報告はほとんどない。アオウミガメでみられた、これら重金属濃度の成長にともなう減少傾向は、種特異的な現象といえる。

4-6. 食性の変化と重金属の蓄積変動

Honda *et al.* (1987) は、南半球産のミンククジラのCdの濃度が、20才以降減少していることを報告している。ミンククジラにおけるこのような減少傾向は、本種の生理機能に由来するものではない。なぜならば、北半球のミンククジラでは、Cd濃度の減少傾向は認められていない（Hansen, 1990）。Honda *et al.* (1987) はミンククジラ体内のCd濃度が減少する理由として、近年における、Cd取り込み量の増加を挙げている。すなわち、ミンククジラの餌であるオキアミの資源量が近年増加したために、若齢のミンククジラのCdの取り込み量が増大したことによると報告している。また、海生哺乳類や海鳥類のCd濃度は、これらが捕食する生物体内のCd濃度に依存する。つまり、比較的生態の似ている種、もしくは同一種であっても、Cd濃度が高い餌を食する個体群と、Cd濃度の低い餌を食する個体群とでは、蓄積レベルが異なる（浜中，1984； 藤瀬，1987）。アオウミガメで認められた、Cdの特異的な蓄積変動も、餌の影響が推察される。Cdが成長にともなって減少した理由は、本種の成長にともなう食性の変化が関与していることを示唆している。

アオウミガメは、成長過程にしたがってその生活域を変えることが、指摘されている（Hirth, 1971； 内田，1982b, 1983a, 1983b； Carr, 1986,

1987)。またその生活域の変化にしたがって、食性も変化していると考えられている (Hirth, 1971)。アオウミガメの生活環と、食性変化の模式図を図4-6-1に示す。孵化後間もないウミガメ類は、その種の如何を問わず、外洋フロント海域の表層で流れ藻などとともに浮遊生活を営むと考えられている (Carr, 1986, 1987; 平手と木村, 1996)。これは、ウミガメ類の幼体が、あまり潜水能力を持たないことから支持される (内田, 1967)。この時期の食性は、生活形態に合わせ、流れ藻などに付着している小動物や、動物プランクトンなどを食す肉食主体の雑食性であろうと考えられている (Hirth, 1971)。アオウミガメの場合、甲長が約30cmに達すると、外洋から戻って沿岸の岩礁域に姿を現す。そして、沿岸で生息を開始したアオウミガメは、強い草食性を示す。本研究に用いたアオウミガメ試料の胃内容物は、全て、海草類であった。このようにアオウミガメは、肉食中心の雑食性から草食性へと、成長にともなって摂餌の内容を変化させている。

表4-6-1に、アオウミガメの胃から採集した海藻中のCd濃度を示す。この値はこれまでに報告されている海藻中のCd濃度とよく一致する (Denton, *et al.*, 1980; Kureishy, 1991)。図4-6-2に、これら海藻のCd濃度と、アオウミガメ幼体が外洋で摂餌していると考えられている動物プランクトンのCd濃度、および他の海生生物のCd濃度を示す (Denton, *et al.*, 1980; 藤瀬, 1987; 森田, 1987; Hamilton, 1990; Kureishy, 1991)。これら生物のうちCd濃度が最も低いのは、海草類と魚類である。逆に、濃度が高いのは、アオウミガメの幼体が食していると考えられている動物プランクトン、およびイカ類である。この比較から、アオウミガメで見られたCdの特異的な蓄積パターンは、次の理由によるものと推測された。孵化したばかりのアオウミガメの幼体は、外洋で動物プランクトンなどを食すことにより、急激にCdを蓄積する。これは、アオウミガメ卵中のCd濃

度が検出限界以下であることから支持される（第3章、第5章）。また、未成熟期の急激なCd蓄積は、スジイルカ（Honda *et al.*, 1983a, 1983b）、イシイルカ（藤瀬, 1987）、ミンククジラ（山本, 1988）でも認められている。一定期間外洋で過ごした、甲長30cm前後のアオウミガメは、Cdを高濃度に蓄積し、沿岸域へと生活の場を変える。そして、Cd濃度の低い海藻を食すことになる。この時、アオウミガメ体内のCd収支は、排泄されるCd量のほうが、取り込まれるCd量よりも多くなっていると考えられる。したがって、体内組織中のCd濃度は徐々に減少する。このようなアオウミガメにおけるCdの蓄積様式を模式図として図4-6-3に示す。本種で認められた体内Cd濃度の減少は、Cd濃度の高い餌種から低濃度の餌種へ、成長にともなって食性を変化させる、生態が主として影響していると考えられた。

Cuの蓄積変動に関しても、Cdと同様の説明ができる。すなわち、動物プランクトン中のCu濃度は、海草中のCu濃度よりも高い（表4-6-1、Denton, *et al.*, 1980; 藤瀬, 1987; 森田, 1987; Hamilton, 1990; Kureishy, 1991）。しかし、これまで報告されている海生動物では、体内のCuレベルは、恒常性機能によって制御され、生涯の一時期を除いて大きな変動はないと報告されている（本田, 1986）。アオウミガメにCuが高濃度蓄積し、その変動が大きいのは、本種に固有なCu代謝機構が存在するためと推測される（第6章）。Znについては、MTを介して、CuもしくはCdの蓄積変動に同調しているものと思われる。すなわち、CuもしくはCdの取り込みによって誘導合成されたMTに、Znも同時に結合しており、CuとCdの取り込みが減少すると同時にMTも減少する。この結果Znも減少したものと考えられる。Hgに関しては、海草中のHg濃度が他の餌生物と比較して低濃度ではないため、餌濃度の違いだけでは濃度の変動を説明できない（Denton, *et al.*, 1980; 藤瀬, 1987; 森田, 1987; Hamilton, 1990; Kureishy, 1991）。一般に、Hgの吸収率は餌中のHgの化学形態で大幅に異なること

が知られ、メチルHgなど有機態のHgの吸収率は高い(和田, 1985)。海草(藻)中に蓄積しているHgの化学形態を報告した論文は、これまで皆無と思われる。しかし、陸水環境に生息する水草類では、総Hg蓄積量に対する有機態Hgの蓄積量は低い(藤井, 1976)。また、植物体内中のHgの構成比は、その環境水中の構成比に依存し、海水の場合メチルHg存在量は全体の10分の1以下とされている(Akagi and Nishimura, 1991)。このようなことから推測すると、海草中に蓄積されているHgのほとんどは、アオウミガメの腸管から吸収されにくい無機Hgの形態で存在しているものと予想される。したがって、Hg濃度の変動には、海草と他の海生生物のHg濃度レベルの違いだけではなく、Hgの化学形態が種間で異なることも関与していると考えられる。このことを支持する例として、陸水魚で草食性のアユや、草食性の強いソウギョは、他の魚種と比較してHg濃度が低いという報告がある(藤井, 1976)

Table 4-6-1.

Heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ dry wt.) in sea plants collected from stomach of green turtles

	Cu	Ni	Cd	Hg*
MEAN \pm SD	1.44 \pm 0.49	1.67 \pm 1.16	0.581 \pm 0.385	4.10 \pm 2.39
N	10	10	10	10
MIN-MAX	0.806-2.14	0.484-3.72	0.099-1.14	N.D.-7.71

mean and standard deviation of water contents were 82.67.64

*; ng/g dry wt.

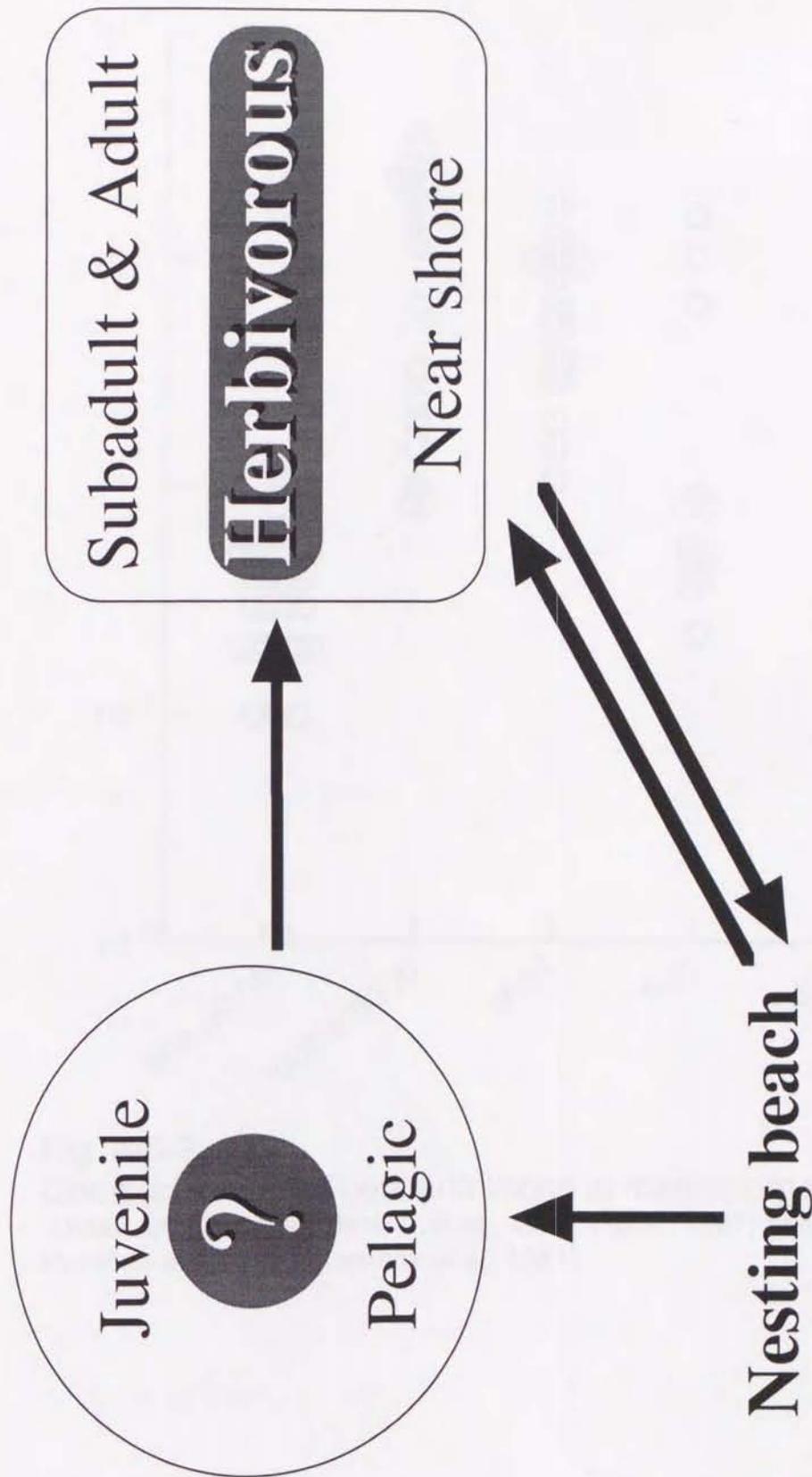


Fig. 4-6-1. Life cycle and growth-related dietary shift of green turtle

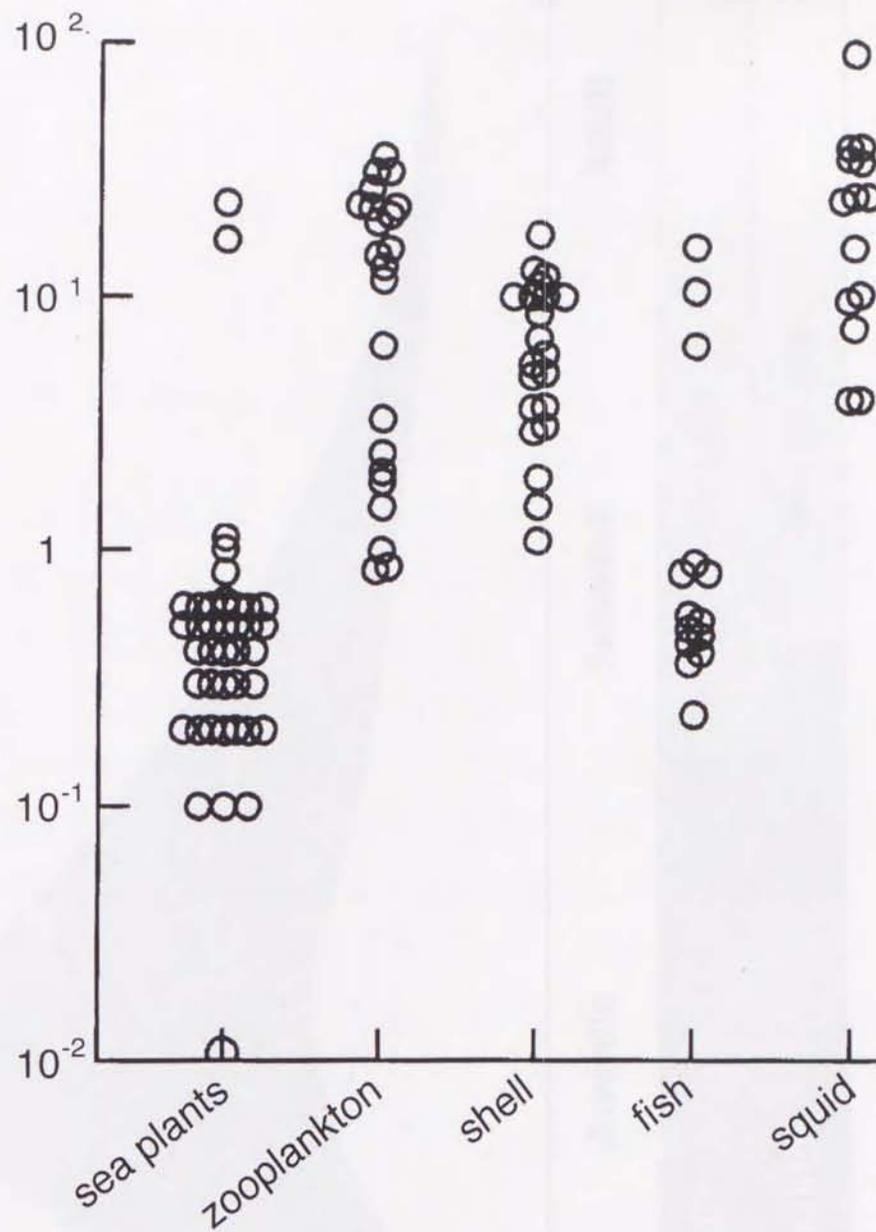


Fig. 4-6-2.
 Comparison of Cd concentrations in marine organisms.
 (Data are cited from Denton *et al.*, 1980; Fujise, 1987; Morita, 1987;
 Hamilton *et al.*, 1980; Kureishy *et al.*, 1981)

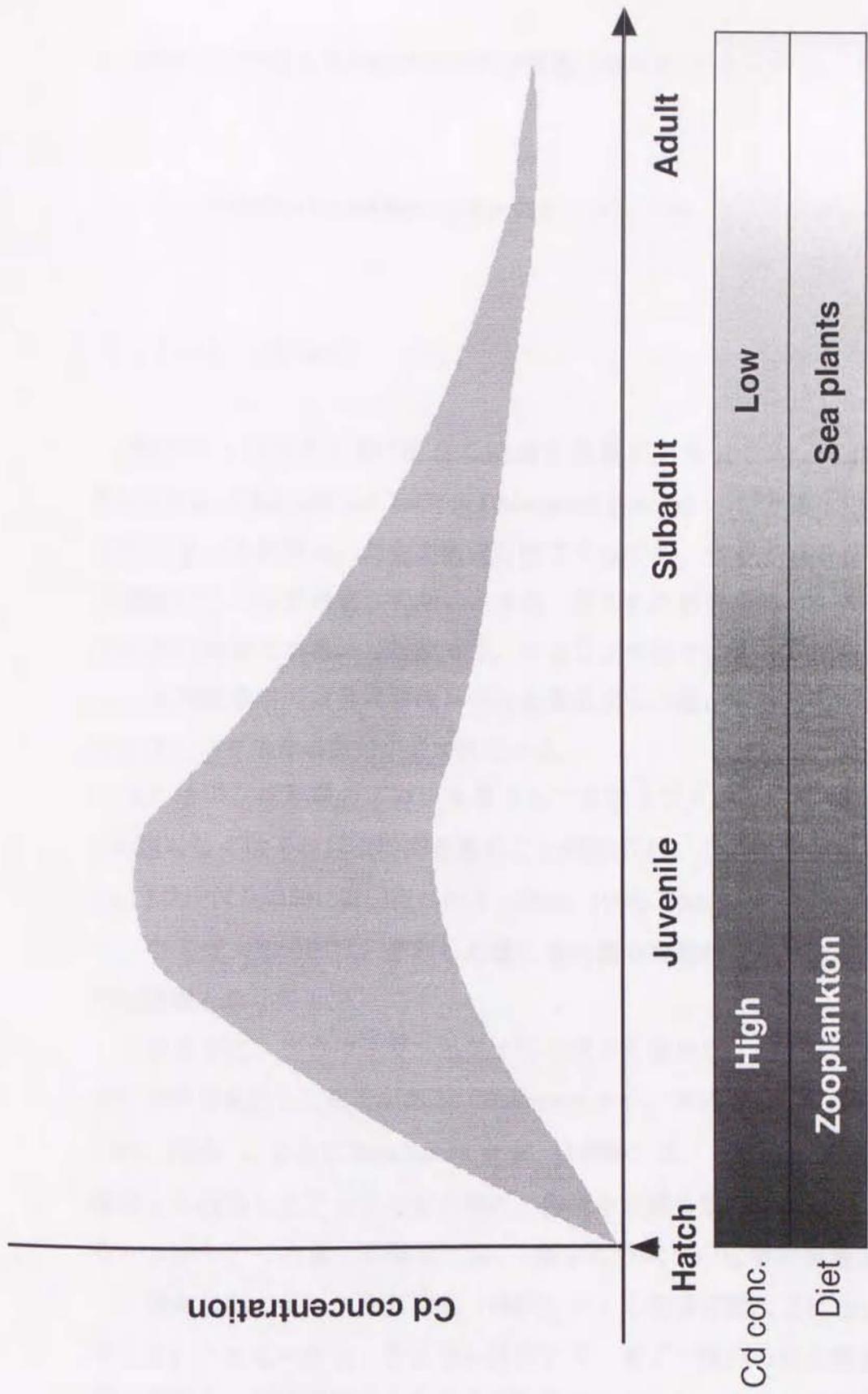


Fig. 4-6-3. Cd accumulation and process in green turtle

5. 卵および甲羅を用いた非捕殺的な微量元素モニタリング

5-1. 卵を用いた非捕殺的な重金属モニタリング

5-1-1. はじめに

現存するウミガメ類7種全て絶滅の危機があるとされ、CITES (Convention of International Trade in Endangered Species) の付属書Iに挙げられている。それゆえ、たとえ研究目的であっても、生きているウミガメを捕殺することは望ましくないとされ、限られた数の試料しか入手できないのが現状である。したがって、ウミガメを殺すことなく試料を採取し、体内組織中の重金属蓄積レベルを推定する方法、すなわち非捕殺的モニタリング手法の開発が望まれている。

ところで、成熟雌のアカウミガメとアオウミガメは、1回の産卵で約100個もしくはそれ以上の卵を産むことが知られ、このような産卵行動が、1シーズンの中に数回行われる (Hirth, 1980; Dodd, 1988)。したがって、ウミガメ類の卵は、産卵した雌の体内重金属蓄積量を推定する、有用な指標となり得る。

これまでに、アカウミガメとアオウミガメの卵から、残留性の有機塩素化合物を検出した報告がある (Thompson *et al.*, 1974; Clark & Krynitsky, 1980, 1985)。さらにStoneburner *et al.* (1980b) は、アメリカ合衆国の東海岸から採取したアカウミガメ卵の、卵黄中の重金属濃度を報告している。しかし、これまでの報告では、1巢中の卵間での化学物質濃度の差 (一腹中の卵の差) や産卵回数 (周期) による蓄積変動などについては明らかにされていない。そこで本研究では、まず一腹内の卵の重金属蓄積の変動と、産卵回数によるその変動を明らかにし、これらの結果を踏

まえて、卵中と産卵雌の体内の重金属濃度との相互関係について考察した。

5-1-2. 試料と方法

産卵順位と左右輸卵管での重量変動、および重金属の蓄積変動を調べるために、1990年5月に高知県の足摺岬沿岸で混獲された雌アカウミガメ5検体を用いた。これらは、第3章で用いた検体と同一のものである。解剖時に、これら検体の左右の輸卵管から卵を順番に取り出し、総排泄口に最も近いものを1番として、個々に番号をつけた。採取後は、個々にポリエチレン袋に封入し、計測時まで冷凍保存した。ただし、アカウミガメの1検体(900519-6)は、解剖時に、左輸卵管中の最後の20個の卵の順番が不明となったため、これらは計測から除外した。また卵白、卵黄、卵殻の重量の変化を見るために、1検体のアカウミガメ(900519-3)を用い、左側輸卵管から5個毎に、さらに右側輸卵管からも10個毎に卵を採集した。これらの卵は恒温室(室温4℃)内で、ほぼ凍結させたまま卵白、卵黄、卵殻に分離し、重量を測定するとともに重金属の分析を行った。なお、Hg分析に関しては、総排泄口より2番目のものから、左側輸卵管では5個毎に、右側輸卵管では10個毎に卵を選択して分析に供した。

産卵周期による重金属蓄積の変動を見るために、1991年に父島で複数回の産卵が確認できた雌アオウミガメ3検体の卵を用いた。これら3検体(W397, W412, W413)は、1991年の産卵シーズンの前に、小笠原諸島近海で捕獲されたものである。捕獲した後、父島の小笠原海洋センターの養殖場で飼育された。これらの検体は、1991年の6月~8月の産卵シーズンの中に、4回から6回の産卵を行った(表5-1-2-1)。卵は各産卵巣ごとに採取し、計測まで冷凍保存した。これら卵はアカウミガメの卵と同

Table 5-1-2-1.

Standard carapace length (SCL), day of nesting and number of eggs in one nest (n) of each of the three green turtles identified to nest 4 to 6 times during summer 1991 in Chichi-Jima Island

Sample code	SCL (cm)	Day of nesting						Total Eggs
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	
W397	94 n=	9 May 78	28 May 55	15 Jun 112	2 Jul 107			352
W412	102 n=	6 May 124	24 May 129	7 Jun 154	*	5 Jul 167	9 Jul 68	642+
W413	98 n=	7 May 69	26 May 92	15 Jun 39	3 Jul 12			212

*; 4th nesting of W412 was identified, however no egg was collected

様の方法にしたがい、ほぼ凍結させたまま卵を卵白、卵黄、卵殻の3部位に分離し、重金属分析に供した。

分析法は2章1節にしたがい、Fe、Mn、Zn、Cu、Pb、Ni、Cd、Co、Hgの定量を行った。

5-1-3. 産卵順位による重量変動

アカウミガメ各個体の卵重量の測定結果を表5-1-3-1に示した。一腹に存在する卵の重量は、表5-1-3-1に示したようにほとんど変化がなくほぼ一定した重量を示した。しかし、わずかな変動ではあるが、産卵順位にしたがい、卵重量が増加もしくは減少する傾向がみられた(図5-1-3-1)。この傾向は、個体ごとに異なっていた。また、アカウミガメのほとんどの個体で、総排泄口から10個目付近までは重量減少の傾向がみられた。また、卵重量が増加するにしたがい、卵白、卵黄、卵殻重量も増加していた(図5-1-3-2)。また、産卵順位の変動にともなう卵構成物の重量割合の変動は、ほとんど見られなかった(図5-1-3-3)。

以上のように、卵重量は産卵順位によってわずかながら変動することがありらかとなった。しかし、この変動は非常に小さいため、重金属蓄積の面からみれば、一腹に存在している卵の重量変動は、無視できる範囲と考えられた。

ところで、900519-3の右輸卵管中の最後の2卵は、重量が1g程度と小さく形状も変形していた。この卵には卵黄が存在せず、卵白の周りに卵殻がついているだけのものであった。また、第3章で用いたアオウミガメについても、産卵順位と卵重量の関係について検討を行ったが、卵重量の変動はアカウミガメよりも大きかった。この理由ははっきりしないが、

今回用いたアオウミガメは父島において1カ月間絶食状態で飼育したことの影響とも考えられる。

5-1-4. 卵中の重金属蓄積

5検体のアカウミガメ体内から得られた卵の、卵白、卵黄、卵殻中重金属濃度を表5-1-4-1に示す。Fe、Mn、Zn、Cd、Hg濃度は卵黄で最も高く、Cdは卵黄以外の部位では検出できなかった。Cu濃度は卵殻で最高値が得られた。卵白、卵黄、卵殻中のPb、Ni、Co濃度は、いずれも検出限界以下であった。Fe、Zn、Cuのような必須重金属の濃度は、CdやHgなどの毒性重金属と比較して変動は少なかった。このパターンは、Stoneburner *et al.* (1980b) の報告と一致している。彼らは、アメリカ合衆国東海岸で採取した、アカウミガメの卵黄中必須重金属元素は、4カ所の産卵場間で有意な違いが認められなかったと報告している。その理由として、これらの重金属の蓄積レベルは、胚発生の過程で必要な量であると示唆している。

測定した卵白、卵黄、卵殻中の濃度とその重量から算出したアカウミガメ卵1個当たりのHg濃度は、これまで報告されている海鳥類の卵の値よりも低く (Fimreite *et al.*, 1974; Hakkinen & Hasanen 1980; Maedgen *et al.*, 1982; Honda *et al.*, 1986; Ohlendorf & Harrison, 1986)、逆に、アカウミガメ卵中のCd濃度は、これら海鳥類の値とほぼ同程度であった。

卵中の重金属のほとんどは、卵黄に存在していた (図5-1-4-1)。しかし、Cuは全体の約40%が卵殻に存在していた。

Table 5-1-3-1. Weight (g) of egg collected from loggerhead turtles

	1F	2F	3F	4F	5F
Left					
n	62	51	59	37	55
mean±SD	28.76± 1.20	30.61± 1.22	24.20± 0.69	35.05± 0.970	22.59± 0.91
CV%	4.17	3.97	2.87	2.76	4.05
Min-Max	25.53-32.67	28.14-34.02	22.35-25.55	32.86-36.88	20.81-26.00
Right					
n	72	54	58	56	67
mean±SD	28.67± 1.07	30.90± 1.19	25.10± 0.85	35.36± 1.00	22.19± 1.10
CV%	3.73	3.84	3.38	2.83	4.97
Min-Max	26.19-30.88	28.21-33.19	22.69-26.59	32.57-37.30	20.44-26.40

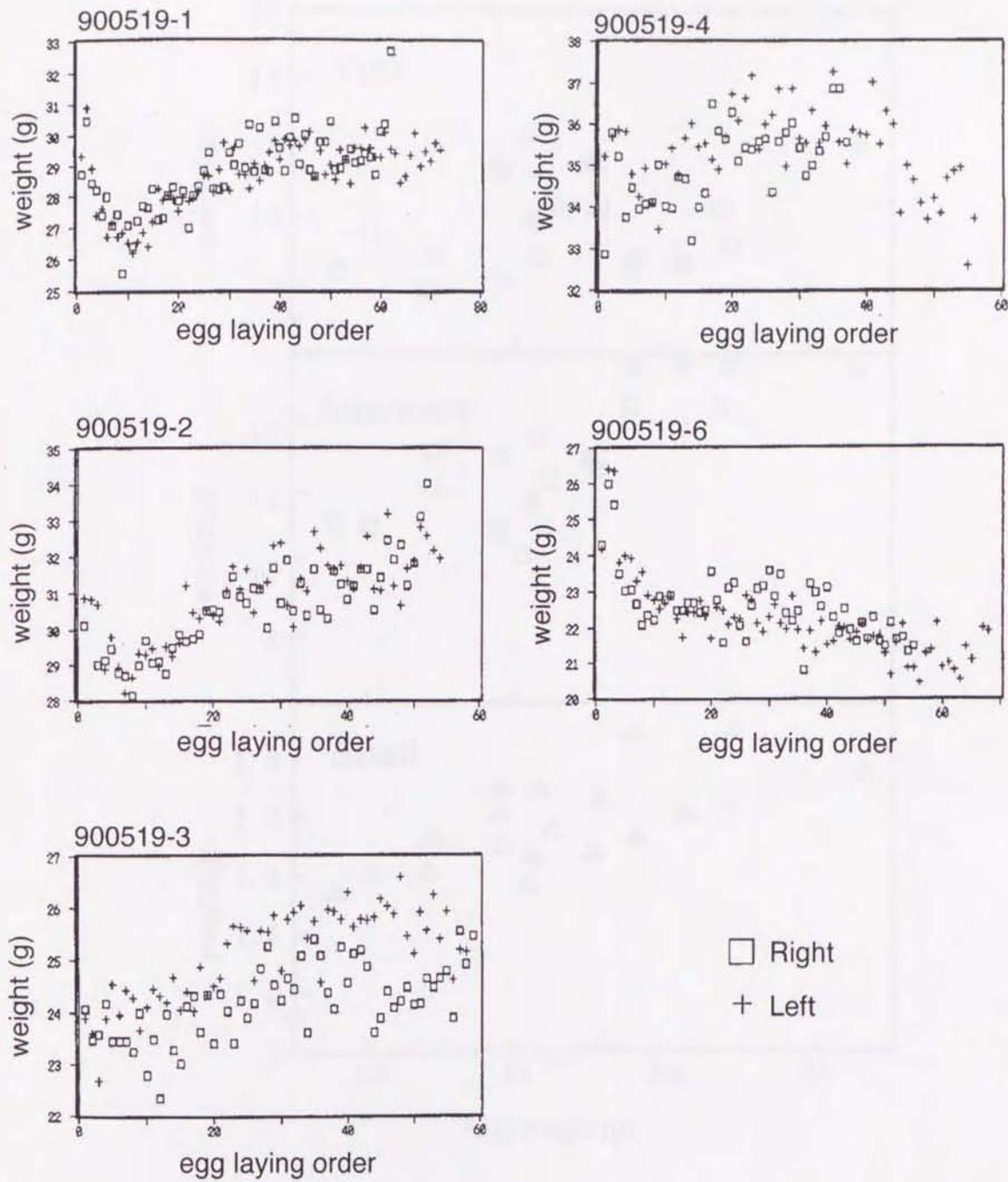


Fig. 5-1-3-1
 Relationship between egg laying order and egg weight of
 loggerhead turtles

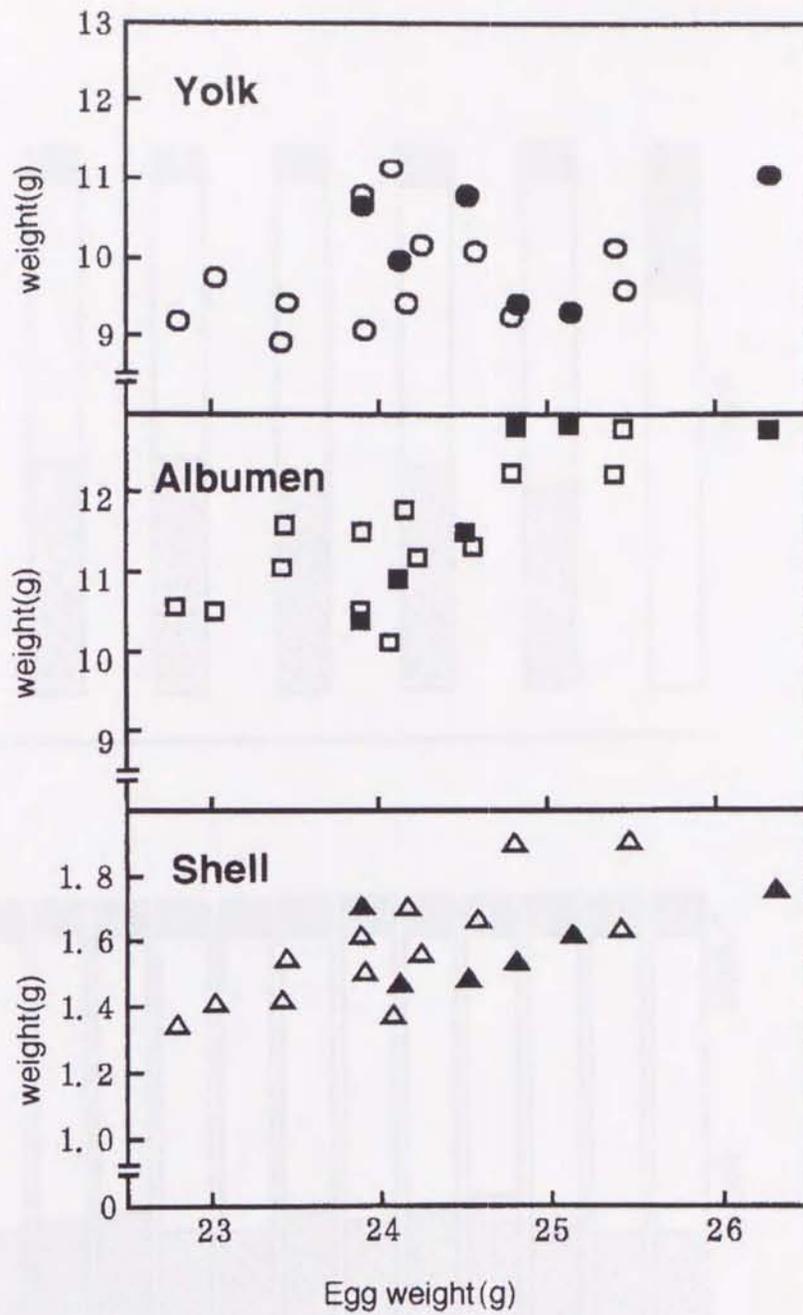


Fig. 5-1-3-2
 Relationship between whole egg weight and
 each part weight

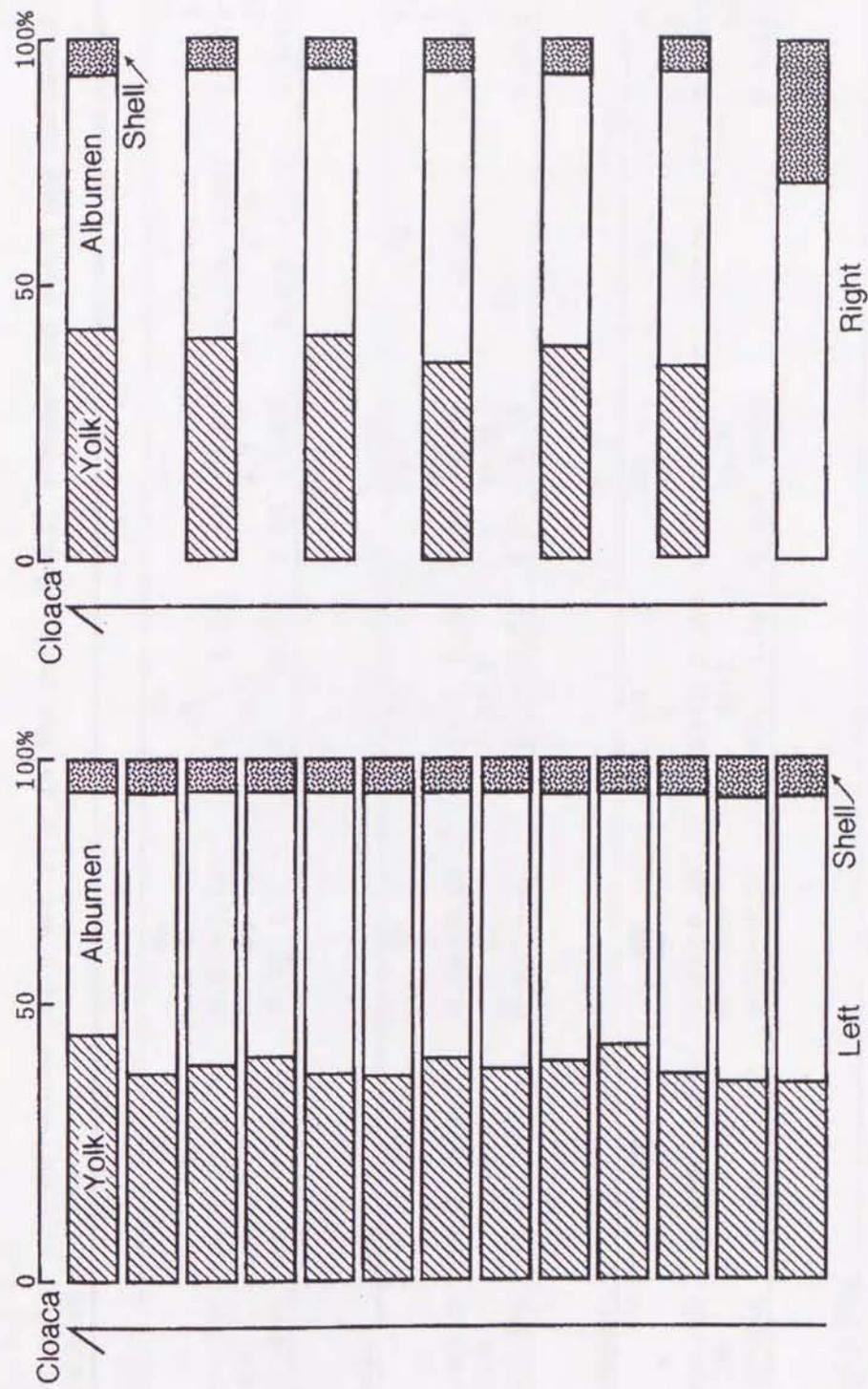


Fig. 5-1-3-3
Weight ratio of yolk, albumen and shell of loggerhead turtle with egg laying order

Table 5-1-4-1.

Heavy metal concentrations ($\mu\text{g/g}$ wet wt.) in the yolk, shell, albumen and whole egg collected from five loggerhead turtles.

Yolk							
	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg	
n	5	5	5	5	5	5	5
Mean \pm SD	25.1 \pm 2.18	0.91 \pm 0.42	34.4 \pm 3.18	1.57 \pm 0.07	0.026 \pm 0.007	0.0121 \pm 0.0034	
CV%	8.7	46	9.3	4.7	27.9	28.1	
Min-Max	22.9 -28.3	0.52-1.4	30.5 -38.0	1.48 -1.68	0.019-0.035	0.0080-0.0158	
Shell							
	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg	
n	5	5	5	5	5	5	5
Mean \pm SD	10.6 \pm 2.2	0.68 \pm 0.48	2.17 \pm 0.59	5.57 \pm 0.77	<0.01	0.0040 \pm 0.0013	
CV%	20.9	71	27.2	13.8		32.3	
Min-Max	7.23 -13.3	N.D.-1.2	1.66 - 2.87	4.25 -6.18		0.0020-0.0054	
Albumen							
	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg	
n	5	5	5	5	5	5	5
Mean \pm SD	0.870 \pm 0.377	0.17 \pm 0.30	0.594 \pm 0.584	0.129 \pm 0.083	<0.01	0.0005 \pm 0.0002	
CV%	43.4	178	98.3	64.3		48.1	
Min-Max	0.499- 1.30	N.D.-0.71	0.058- 1.54	0.034-0.235		0.0001-0.0008	
Whole Egg							
	Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg	
n	5	5	5	5	5	5	5
Mean \pm SD	11.5 \pm 1.29	0.52 \pm 0.26	14.7 \pm 1.44	1.05 \pm 0.199	0.013 \pm 0.004	0.0055 \pm 0.0016	
CV%	11.2	51	9.8	18.9	34.8	28.3	
Min-Max	10.5 -13.7	0.30-0.90	13.2 -16.5	0.772-1.31	0.008-0.015	0.0038-0.0074	

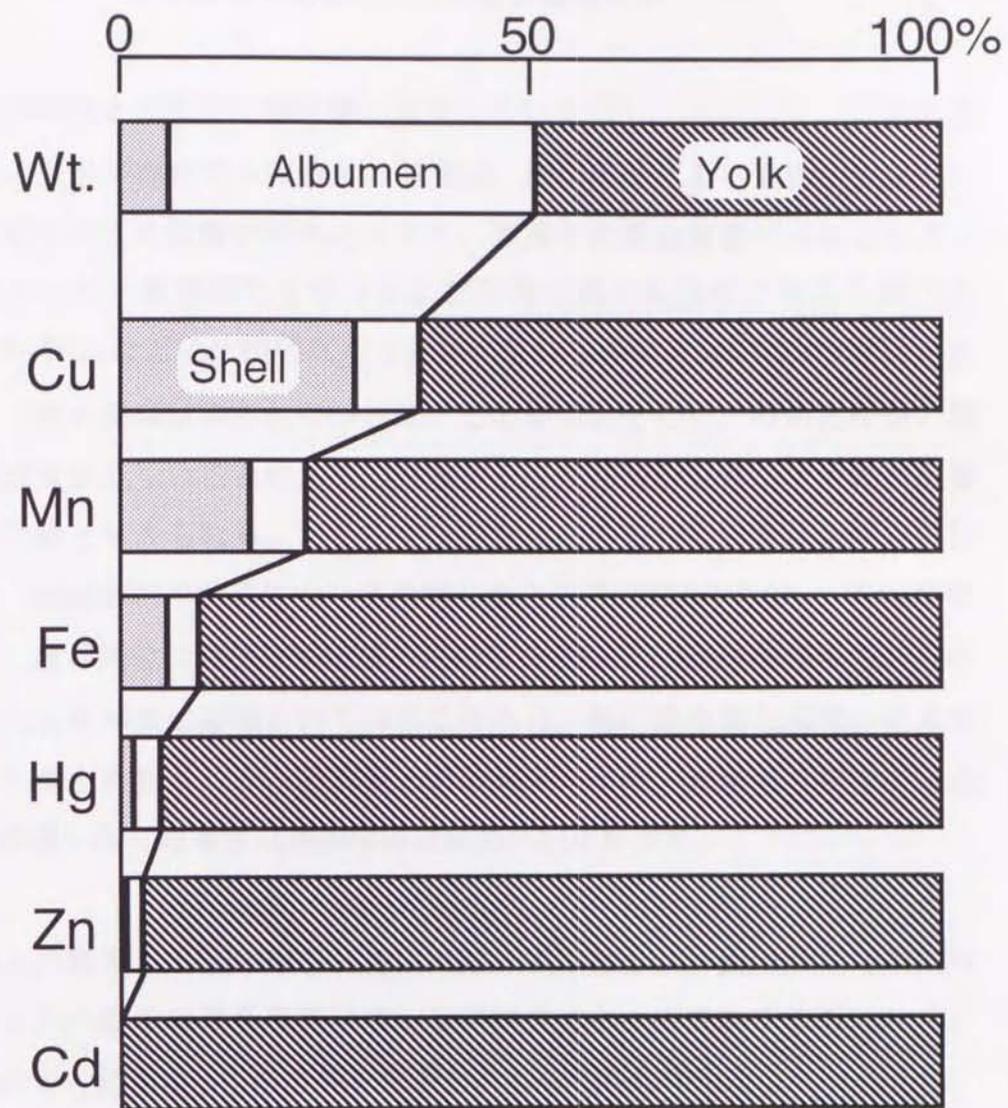


Fig. 5-1-4-1
 Percentage composition of heavy metals in shell, albumen and yolk of egg of a loggerhead turtle

5-1-5. 産卵順位による卵中の重金属蓄積変動

産卵順位と卵黄中の重金属の関係について図5-1-5-1に示す。卵中の重金属の大半が存在する卵黄中の濃度は、産卵順位による変動が少なく、輸卵管中のどの位置の卵をとっても、卵黄中の重金属濃度はほとんど一定であった。産卵順位と卵白および卵殻の重金属濃度の関係も調べたが、FeやCuなどは比較的ばらつきが小さいものの、MnやZnなどは大きく、一定の傾向はみられなかった。この事はおそらく、卵白と卵殻の重金属濃度が低いことに加え、分離する際に卵黄からの二次汚染が影響したためと考えられる。ところで、卵全体に含まれている重金属の負荷量と、産卵順位の関係について検討したところ（図5-1-5-2）、その負荷量は、産卵順位に関係なくほぼ一定の値を示した。Hgはの場合も、そのほとんどが卵黄に蓄積されていることから、他の重金属と同様の結果を示すものと推察される。卵重量と卵の濃度、また、卵重量と卵中の重金属負荷量の間には有意な相関関係は認められなかった。

以上の結果、一腹に存在していた卵、すなわち、一回の産卵で体外へ排出される卵中の重金属蓄積は、産卵順位によって変動する事はなく、体内のどの卵をとっても全体を代表しうることがわかった。

5-1-6. 産卵回数による卵中の重金属蓄積変動

図5-1-6-1に、産卵回数によるアオウミガメの卵黄中重金属濃度の変動を示す。Hgを除く測定したほとんどの重金属で、1シーズン中に産卵した卵の卵黄中の重金属濃度に大きな変動は認められなかった。必須金属が濃度変動を示さなかったのは、先にも述べたように、卵の胚発生過程で必要とされるためと考えられる。Cdはこれらの卵から検出されなかつ

た。シーズン中最初の産卵巣から得られた卵黄中のHg濃度は、2回目の産卵時のものよりも低値であった。しかし、2回目以降、濃度は徐々に減少した。Hgだけが、産卵回数によって大きく変動する理由は不明である。いずれにしても、HgとCd以外の元素は、産卵回数によって卵中の重金属濃度は変動しないことが明らかになった。

1シーズン中に産卵によって排泄される重金属量を計算すると、Feが最も多く、つづいてZn、Cu、Mn、Hg、Cdの順であった。HgがCdより排泄されやすいという傾向は、アカウミガメで得られた結果（第3章）と一致する。

ウミガメ類における卵形成のメカニズムが基本的にあまり変わりがないと考えると、これまでの結果から、1シーズンにウミガメ類が産む卵中の重金属濃度と存在量は、産卵順位や産卵回数による影響を受けないため、同一のウミガメが産む卵は、どれをサンプリングしてもほぼ一定である事が明かとなった。この結果は、生物モニタリングの際に懸念される、個体内での重金属蓄積の変動がウミガメ類の卵にはない事を示しており、ウミガメ類の卵が非捕殺的な生物モニタリングに適した材料である事を確認できた。

5-1-7. 卵黄と親体内の濃度との関係

雌アカウミガメ4検体 (900519-1, 900519-2, 900519-3, 900519-4) の筋肉、肝臓、腎臓および個体平均濃度と、卵黄中濃度との比を表5-1-7-1に示した。ここで、Fe、Mn、Zn、Cuなどの必須金属に関しては、親体内と卵黄中濃度の比が低いことから、比較的容易に親の体内から卵へ重金属が移行していると言える。逆に、CdやHgなどの毒性金属では、濃度比が高かったことから、親体内から卵への移行に何らかの制御機構が働いているものと推察された。また、CdとHgの移行率を比較すると、Hgの方が卵に移行しやすいことがわかった。このようなCdとHgの移行率の差は、Adelie penguin (Honda *et al.*, 1986a)、osprey、wedgetailed shearwater、red-footed booby (Ohlendorf & Harrison, 1986)、sooty tern (Stoneburner *et al.*, 1980a) などの海鳥類で報告されている結果と一致した。必須重金属と毒性重金属の移行率の差異に関しては、ラット、マウスなどの哺乳類実験動物や、海生哺乳類で類似の結果が報告されている。哺乳類の場合、親と胎児の間では胎盤を介して物質交換が行われており、毒性重金属の胎児への移行の制御は、胎盤で行われていると考えられている (Tsuchiya *et al.*, 1984; 本田, 1986; Wagemann *et al.*, 1988)。産卵を行うウミガメ類や海鳥類が、哺乳類と同様の傾向を示すことは、胎盤に変わる何らかの器官に、物質交換の制御機構があると考えられる。また、CdとHgの移行率の差異は、Hgが体内循環しやすいメチルHgの形態で存在するためと推測される。

表5-1-7-1に示した濃度比のCV%に注目すると、卵黄中Zn濃度と親体内組織中のZn濃度の比、卵黄中CuおよびCd濃度と親の腎臓中濃度の比、卵黄中Hg濃度と筋肉中濃度の比のCV%値は低い。したがって、卵黄中の濃度で親体内組織中の濃度を推測できる。また、Znに関しては、親の個体平均濃度も推測できる。

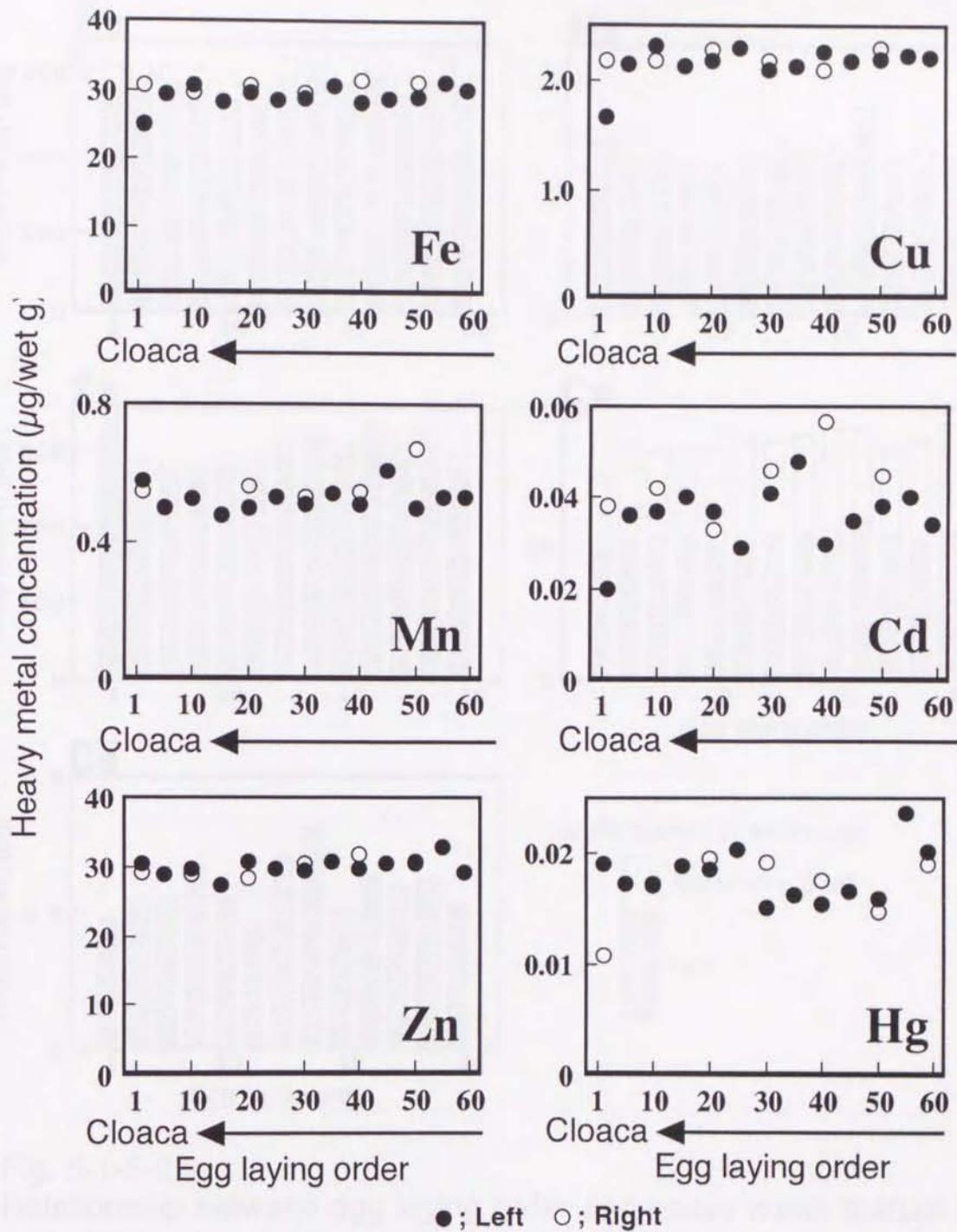


Fig.5-1-5-1.
Relationship between egg laying order and heavy metal concentrations in the yolk of a loggerhead turtle

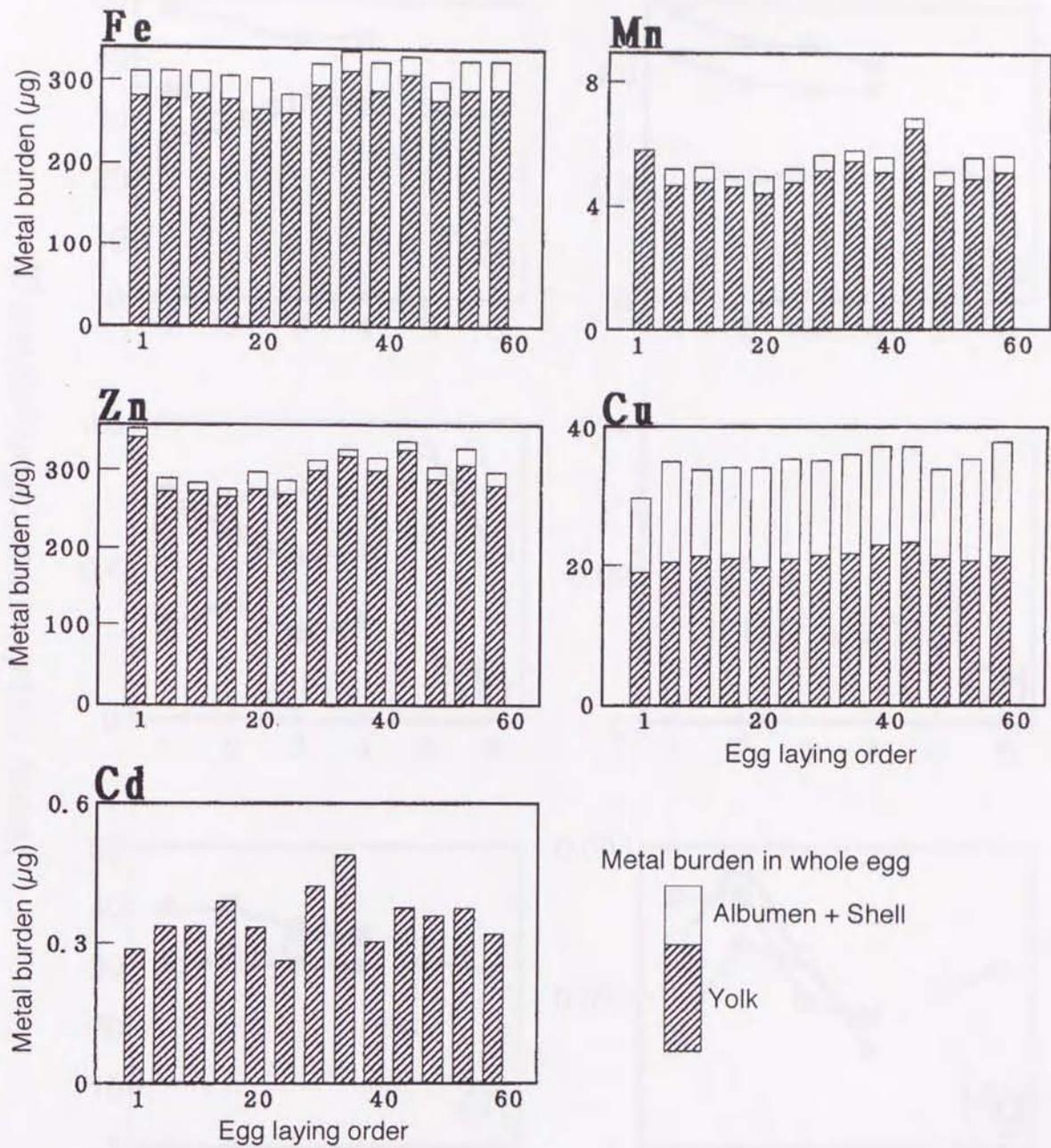


Fig. 5-1-5-2
Relationship between egg laying order and heavy metal burden in egg of loggerhead turtle

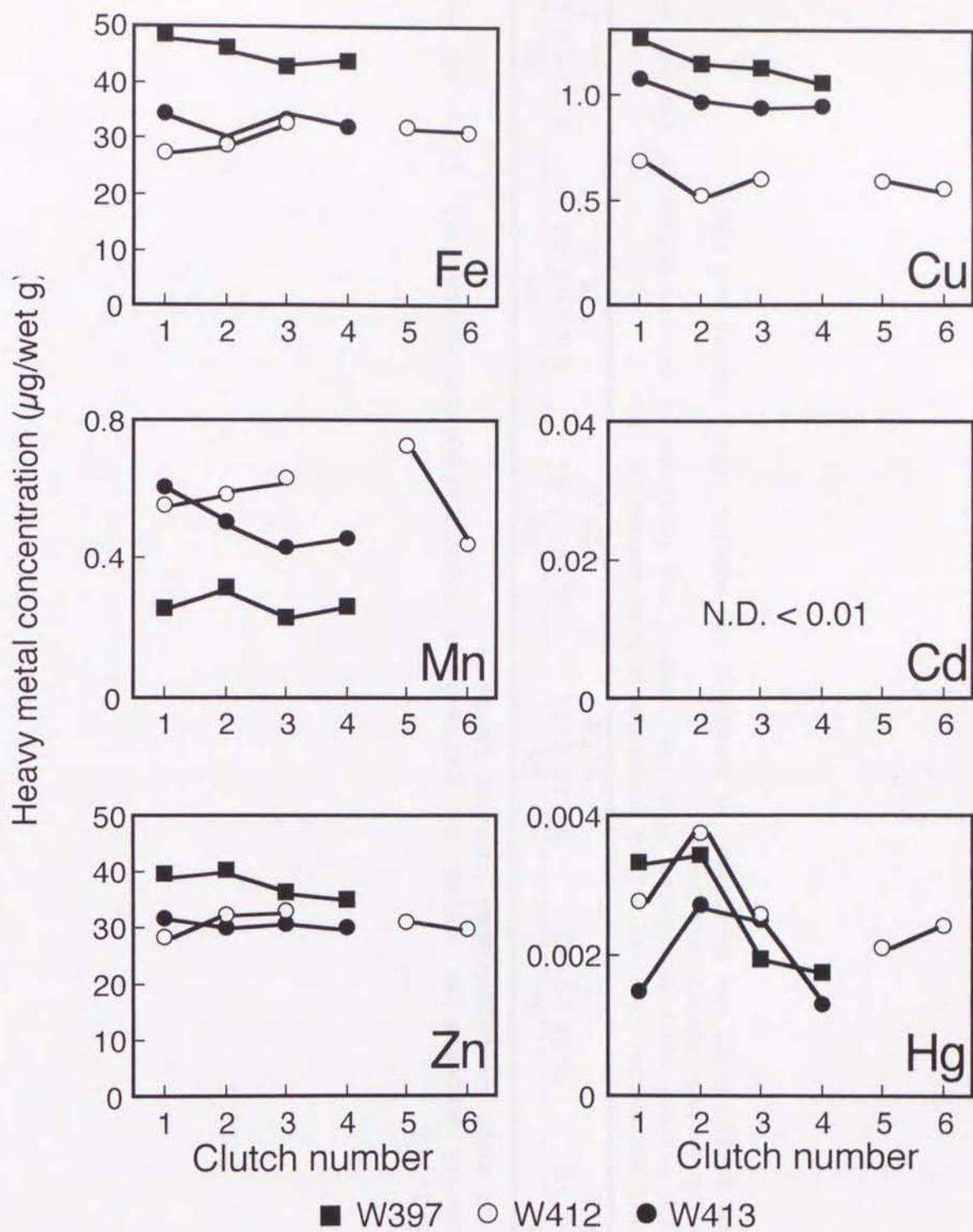


Fig. 5-1-6-1

Relationship between nesting time and heavy metal concentrations in the yolk of three green turtles

Table 5-1-7-1

Heavy metal excretion rates in percentage (mean±standard deviation, CV%) of one clutch of eggs in loggerhead turtles (N=4)

Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Hg
0.65±0.18	0.86±0.55	0.64±0.06	2.78±0.81	0.05±0.01	0.47±0.10
28.2	63.6	9.54	29.0	19.9	21.4

Heavy metal excretion rate (%) = (egg burden/whole body burden) × 100

Whole body burdens were calculated from the weights and heavy metal concentrations of tissues and organs which include twenty four parts.

Whole body of Hg burden was calculated as summation for muscle, liver, kidney and egg.

5-1-8. 指標部位としての卵

以上述べた研究により、ウミガメ類の卵中の重金属蓄積には、以下のような特徴が見られた。

- ・卵中の重金属のほとんどが卵黄に存在している
- ・1巢中の卵の重金属濃度および負荷量は、ほぼ一定している
- ・卵黄中Fe、Mn、Zn、Cu濃度は、産卵回数によってほとんど変動しない
- ・Zn、Cu、Cd、Hgについて、卵黄中濃度と親体内組織中濃度の比に、大きな変動はない

以上の事実は、ウミガメ類の卵が非捕殺的な重金属モニタリングの指標部位として活用できることを示している。すなわち、Hg (Cd) を除く重金属の卵黄中濃度は、1個体の雌ウミガメが1産卵シーズン中に産卵する卵であれば変動が小さい。また、Zn、Cu、Cd、Hgについては、卵黄中の濃度から親体内組織中の蓄積濃度を推定することができる。

ところで、真の「非捕殺的モニタリング」を考えた場合、卵を使うことも制約される可能性がある。多くの場合、産卵した全ての卵が孵化するわけではなく、孵化に失敗する卵も少なからずある。一般にウミガメの卵は腐敗しにくいと言われている。実際、一度も掘り返していなかったり、海水に浸かっているものでは、孵化失敗卵と平常卵のと区別が難しい。このような、保存状態の良い卵では、容易に卵黄が区別できる。卵を用いた重金属のモニタリングでは、このような孵化失敗卵を用いることが望ましい。

5-2.

甲羅を用いた非捕殺的な微量元素モニタリング — タイマイを例に —

5-2-1. はじめに

タイマイ (Hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*) は世界の熱帯・亜熱帯海域に生息する、一属一種のウミガメである (Limpus *et al.*, 1988; Marquez, 1990)。日本では、南西諸島の一部でのみ産卵が確認されている (Kamezaki, 1989; 亀崎, 1991)。本種の甲羅加工品 (べっ甲) もしくは剥製は、日本を含めたアジア地域、および、一部ヨーロッパ地域の各国で古くから愛用されている。正確な統計資料はないが、日本におけるタイマイ漁獲量は少ないと思われる。かつて熱帯各国で捕獲されたタイマイの加工、もしくは未加工の甲羅の内、約90%が日本に輸入されていたという報告もある (Marquez, 1990)。現在タイマイは絶滅が危惧され、ワシントン条約の付属書I (CITES I) に挙げられている。したがって、国際間のべっ甲の輸出入は、厳しく制限されている。しかし、日本におけるべっ甲細工は、伝統工芸品としての価値も高く、今なお少数の職人によって技術が伝承されている。捕鯨と同様に様々な問題を含むが、タイマイ資源の持続可能な利用が望まれている。

このような現状の中、べっ甲原材料を安定して日本に供給するため、養殖のタイマイから甲羅を採取すること、漁獲制限の管理が適切に行われた (ワシントン条約締結国が認めた) 海域のタイマイの甲羅を利用することなどが提案されている。しかしながらいづれも、現在までのところ、条約国会議では認められていない。その理由の一つとして、甲羅が一旦市場に流出すると、その由来が明らかにできない、つまり密輸の摘発の困難なことがあげられている。そこで現在、べっ甲原材料、あるいは、べっ甲の由来を化学的に判別する方法の開発が求められている。

Costa Rica近海のタイマイの胃内容物調査によると、海綿動物の*Geodia gibberosa*と海鞘類の*Styela sp.*が最も多く、全般的に、タイマイは底性の無脊椎動物を無分別に摂餌する傾向がある（内田，1983）。また、Andresが行ったキューバ海域のタイマイの胃内容物調査によると（日本エヌ・ユー・エス株式会社，1993）、タイマイの主食は2種の海綿動物（*Chondrilla nucula*と*Geodia sp.*）で、その他に、貝類や海藻もわずかに摂餌している。さらに、タイマイの食性には地域性も見られ、その地域の環境に影響されているという。これらの報告から、タイマイは海綿を主として食し、その摂餌行動には地域性のあることがわかる。

動物体内に蓄積している微量元素の濃度は、餌中の微量元素濃度を反映している。ここで、餌中の濃度は基本的に次の二つの要因によって決まる。一つは海水中の濃度であり、もう一つはその餌生物までの食物連鎖段階で（本田，1985，1988；Honda *et al.*，1987a；藤瀬，1987）、これらの要因は海域によって異なる。また、ある種の生物は特定の微量元素を特異的に高蓄積することが知られている（例えば、ホヤで見られるバナジウムの蓄積（和田，1985））。したがって、同一種で、年齢や性構成が均一な個体群の場合、体内に蓄積している微量元素濃度が個体群間で異なれば、これら個体群の採餌海域はそれぞれ異なる、もしくは餌構成が異なると考えることが出来る。一般に、筋肉や肝臓などの軟組織に蓄積している微量元素の濃度、もしくは濃度比は、比較的短期間の暴露あるいは、絶食や産卵（出産）など、様々な生物過程の影響を受けやすい（Haarakangas, *et al.*，1974；Honda, *et al.*，1986a, 1986b）。しかしながら、甲羅など硬組織に蓄積している元素は、比較的長い期間の暴露を反映すると考えられ、甲羅中の微量元素濃度を測定し解析する手法は、タイマイの個体群判別に有効であると考えられる。

本研究では、微量元素を化学指標としたタイマイの個体群判別法を確

立するため、甲羅の微量元素の測定を行い、本判別法の有効性について検討した。

5-2-2. 試料と方法

5-2-2-1. 試料

試料は1995年にキューバ共和国で採取したものと（以下、試料A）、日本べっ甲協会から提供されたもの（以下、試料B）、を用いた。試料Aは、生物学的情報が整っているため、「加齢による微量元素蓄積の変動」および「養殖個体と野生個体の甲羅中微量元素蓄積の差異」の検討に用いた。試料Bは主として「生息海域の違いによる甲羅中微量元素蓄積の差異」の検討に活用した。

試料Aにおける甲長（SCL）のヒストグラムを図5-2-2-1に示す。甲羅の部位は、全て右側のC1（内田，1982a）を用いた。これらの試料は、1995年10月にキューバ周辺海域で捕獲した野生のタイマイ8検体と、同国のIsland of Pineのタイマイ養殖場で飼育された14検体から得た。養殖産の甲羅試料のうち5試料は、健全個体を解剖して得た。他は、病死個体の保存試料から背甲部を得た。

試料Bの内訳を表5-2-2-1に示す。これらの試料は、インド洋東アフリカ近海が原産地と推定された1破片，メキシコ海域が原産地と推定された2破片，フィリピン海域が原産地と推定された2破片，ソロモン海域が原産地と推定された4破片，フィジー海域が原産地と推定された2破片，キューバ海域が原産地と推定された4破片，モルジブ近海海域が原産地と推定された4破片の合計17試料で、日本べっ甲協会から提供されたものである。これらの内、アフリカの試料に関しては、黒色部と白色

Table 5-2-2-1.

Details of samples of carapace plates of
hawksbill turtle

Region	Number of BEKKOUs
Phillipines	2
Solomon	4
Fiji	2
Cuba	4
Mexico	1
Maldives	4

Fig 5-2-2-1

Frequency distribution of the standard carapace length (SCL) of hawksbill and
solomon turtles

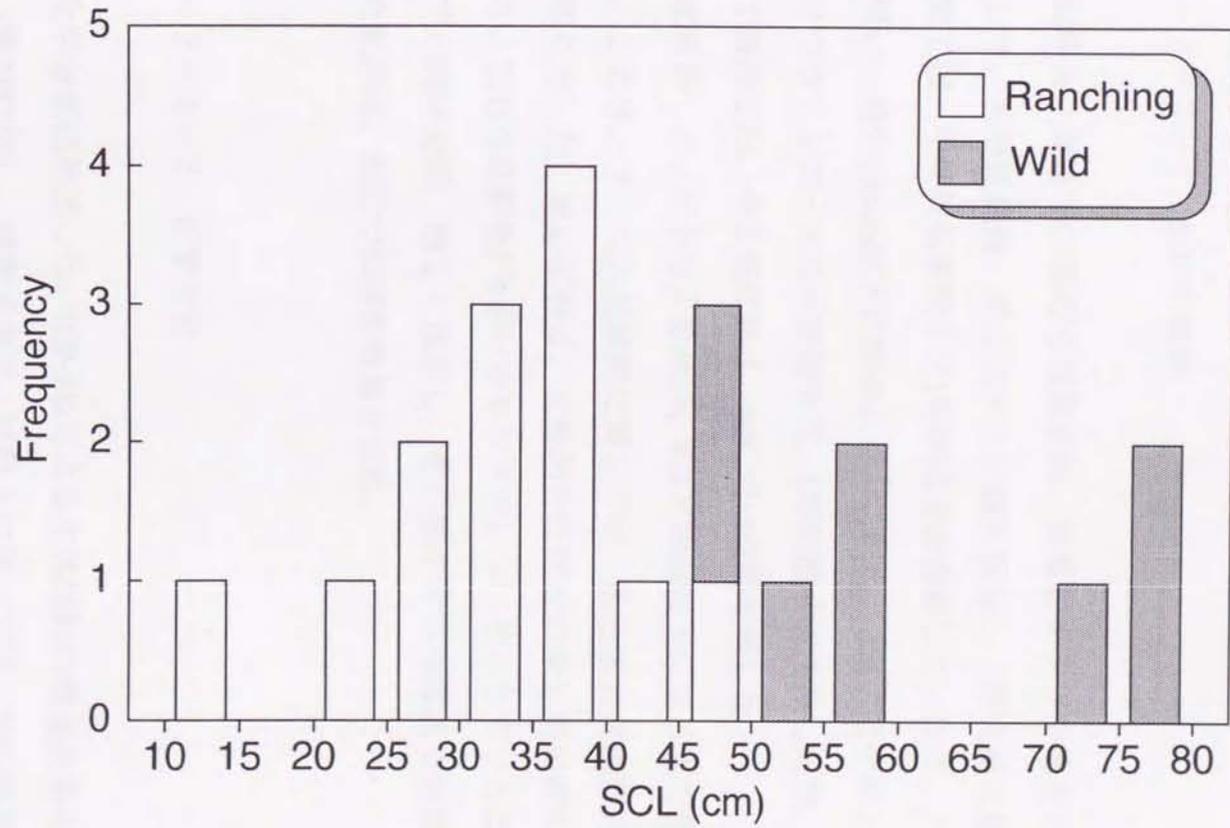


Fig.5-2-2-1

Frequency distribution of the standard carapace length (SCL) of ranching and wild hawksbill turtles

部の濃度差の検討に用いた。

5-2-2-2. 試料の調整

試料A ; 現地でC1部位を収集直後、付着物をタワシ等を用いて水洗除去した。自然乾燥後、ポリエチレン袋に保存し、研究室に輸送した。研究室では、中性洗剤溶液中で1時間超音波洗浄した。次に、ハンドドリルを用い、約5×5mm以下に細切した。これを、3%ポリオキシエチレン・モノラウリルエーテル水溶液中で、1時間超音波洗浄した後、イオン交換水で洗浄した。その後試料は、80℃で12時間乾燥した。

試料B ; ハンドドリルを用い、約3×3mm以下になるまで細かく切断した。この時、アフリカ産試料に関しては、黒色部と白色部の両方を別々に切り出した。他の試料は、比較的存在割合の多い黒色部のみを切り出した。これら試料を3%ポリオキシエチレン・モノラウリルエーテル水溶液で3回各5分間、激しく洗浄し、その後イオン交換水で洗浄した。洗浄した試料は、80℃で12時間乾燥させた。

5-2-2-3. 化学分析

化学分析は前述した、ICP-MSによる生体試料の微量元素定量法に従った(第2章2節)。測定元素は、試料Aに関しては、分析精度を確認した22の元素(Li, Be, V, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Ga, Se, Rb, Sr, Ag, Cd, In, Cs, Ba, Tl, Pb, Bi, Th, U)について、定量分析を行った。また、試料Bに関しては、ICP-MSの半定量分析法(トータルクオント、第2章2節)で測定し、検出可能な27元素(Mg, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Ni,

Cu、Zn、Ge、As、Se、Br、Sr、Mo、Rh、Cd、Sb、Te、Ba、La、Ce、Tb、W、Re、Pb、Th、U) を対象とした。

なお分析は基本的に、1甲羅試料に対し3連で行った。値は、特に断りのない限り、3連の分析結果の平均値で示した。

5-2-2-4. 統計解析

相関関係の有無の検定は、Supermanの順位相関検定によった。養殖個体と野生個体の甲羅中微量元素濃度の比較は、Mann-WhitneyのU検定で行った。有意水準5%未満で有意とした。また、養殖個体と野生個体の比較、および生息海域間の比較に関しては、Mann-WhitneyのU検定に加え、判別分析も行った。統計解析は、SPSS 6.1J (Macintosh 版) もしくはSPSS/PC+を用いた。

5-2-3. 甲羅中の微量元素分布

5-2-3-1. 黒色部と白色部の微量元素濃度

同一試料から得た黒色部と白色部中の微量元素濃度を図5-2-3-1に示す。黒色部と白色部に存在する微量元素の構成には大きな違いは認められなかったが、白色部で若干高い濃度が認められた。白色部で相対的に高い濃度が認められた元素は、Rh、Sc、Thなどで、黒色部ではGe、As、Srなどが高値を示した。しかしながら、検討したほとんどの元素は濃度比1:1の直線上に集中しており、半定量法の性質から考えても、黒色部お

よび白色部中の微量元素濃度には大きな差がないと言える。また、べっ甲中微量元素の構成比に関しても黒色部と白色部で違いはないといえる。これらのことから、微量元素測定のためのべっ甲試料は、部位の色調に関わりなく選択できることが分かった。

5-2-3-2. 微量元素の濃度順位

べっ甲中の微量元素濃度は、軽い元素でやや高い傾向が見られた。図5-2-3-1で示したように、べっ甲では濃度の高い元素と低い元素の間で大きな差が認められる。黒色部における微量元素濃度、および濃度順位と原子量の関係を見ると（図5-2-3-2、図5-2-3-3）、明瞭な相関関係は得られないものの、比較的軽い元素で濃度が高く、逆に重い元素は低濃度傾向にあった。しかしながら、ウミガメ類の硬組織で特異的な蓄積を示すPbは、他の元素と比べると濃度が高かった。

海域別の表層水中元素濃度のデータがないことから、適切な比較は行えないが、野崎（1992）の総説に記されている海水中微量元素濃度を用いて、べっ甲中濃度と海水中濃度の比較を行った。その結果Mg、Mo、Srのみが海水中濃度よりもべっ甲中濃度が低かった。逆に、海水からの濃縮率が高かったのは、Ti、Zn、Te、Pbであった。

5-2-4. 加齢による微量元素蓄積の変動

養殖個体の甲羅を用い、加齢による微量元素濃度の変動について検討した。供試した検体数が14と少なく、年齢範囲も狭いことから、健全個体と病死個体の区別はせずに統計解析を行った。また、同じ理由から、雌雄の区別もしなかった。

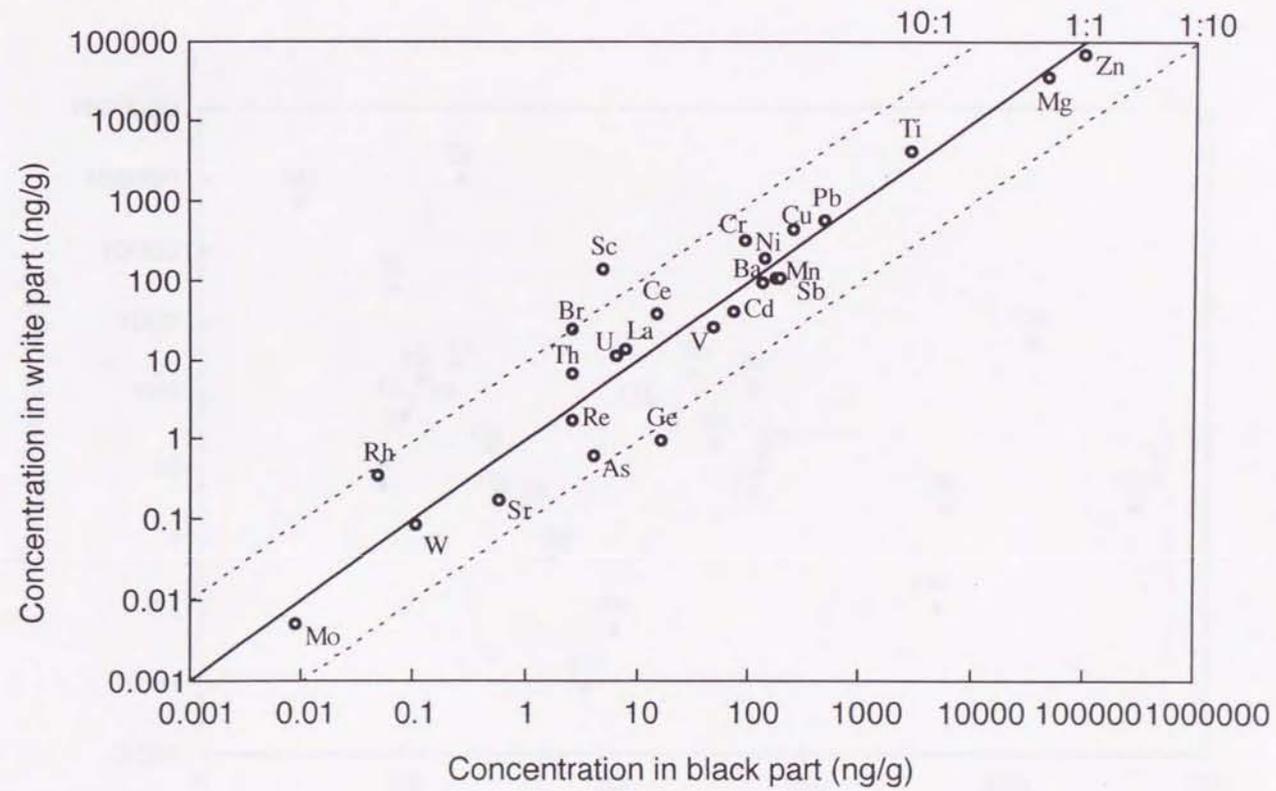


Fig. 5-2-3-1

Comparison of element concentrations in white part of African BEKKOU with in black part of those

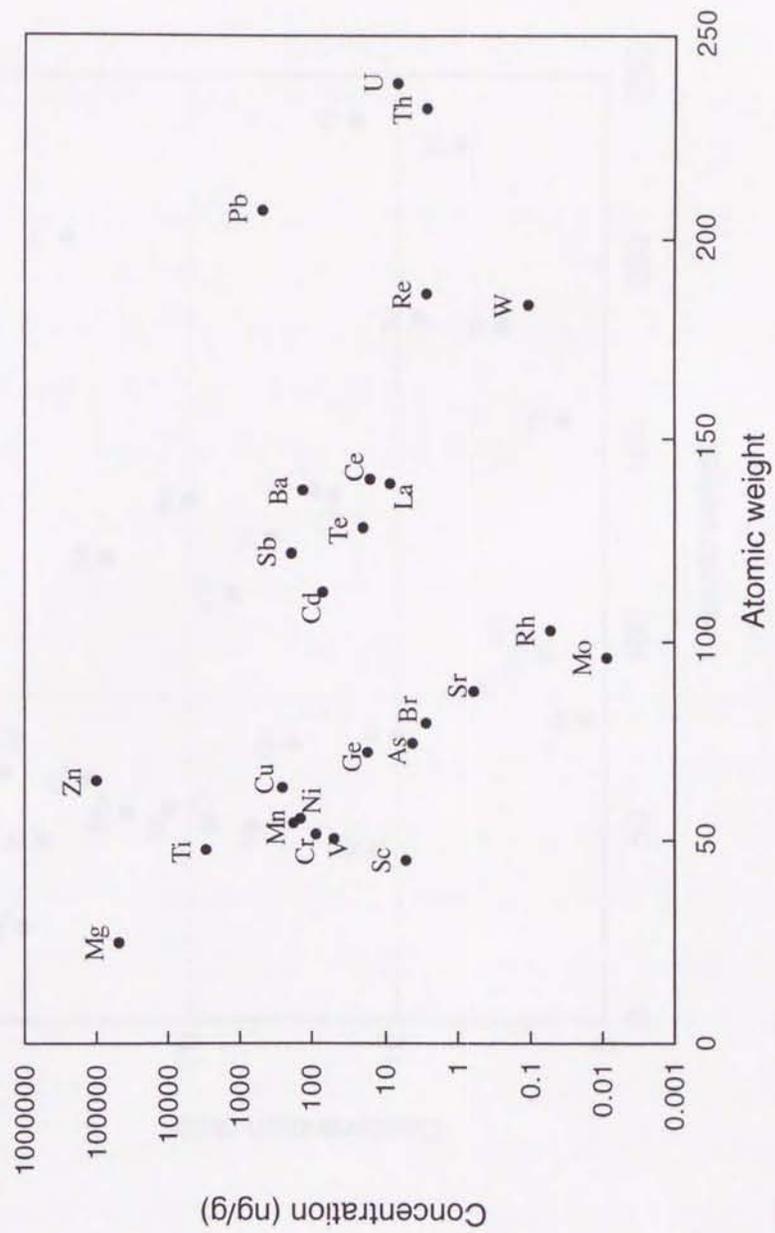


Fig. 5-2-3-2
Plots of atomic weight vs element concentrations in black part of African BEKKOU

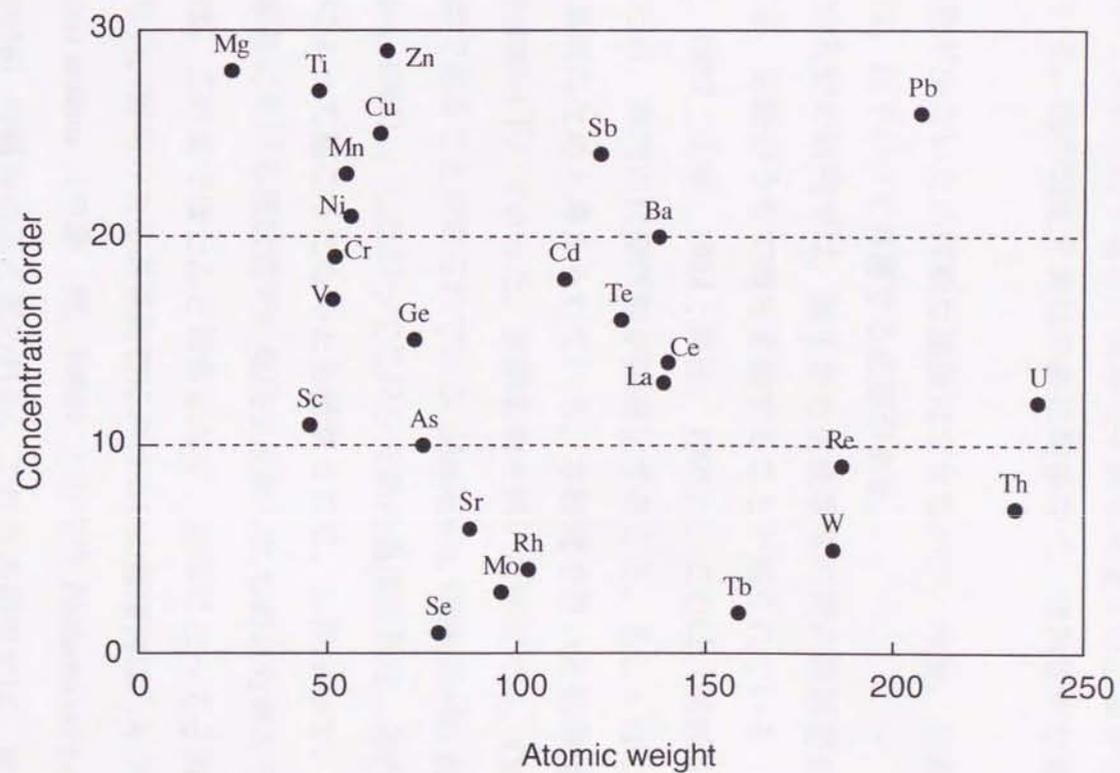


Fig. 5-2-3-3
Relationship between atomic weight and element concentration order in
black part of African BEKKOU

分析を行った22元素のうち、有意な変動を示したのはCr、Mn、Se、Uの4元素のみで、このうちCrとMnは加齢とともに濃度が増加、逆にSeとUは加齢とともに濃度が減少した（図5-2-4-1）。この結果は、これら4元素を用いて解析を行う場合、個体の年齢も考慮する必要があることを示唆している。他の測定元素は年齢に関係なく、個体固有な濃度変動を示した。

試料数が少ないため詳細な議論はできないが、今後、年齢変動を考える際には、以下の点を考慮する必要がある。

海生哺乳類の研究では、誕生から生後数年の間の組織器官中の微量元素濃度は、生涯のうちで最も変動することが知られている（本田、1985；藤瀬、1987；山本、1988；野田、1995）。これは、若齢期の成長速度が早いため、体内の代謝活動が活発化すること、もしくはこの時期の代謝が特異的なためと考えられている。本研究で用いた検体は、いずれも若齢（4歳齢以下）であった。実験動物を用いた研究では、Cr、Mn、Seは必須元素であることが知られている（Anderson, 1986; Hurley & Keen, 1986; Leavander, 1986）。したがってこれら元素の濃度変動は、体内での恒常的な代謝によって起こったものとも推察される。したがって、上記の結果は、若齢期における極短期間の傾向を反映したものとも考えられる。Uに関しては、これまでほとんど報告がなく、生体にとって必須か否かは明らかでない。野生の大型高等動物におけるUの蓄積例は、キタオットセイ *Callorhinus ursinus*（中島 他、1996）とカワウ *Phalacrocorax carbo*（佐伯 他、1996）の報告のみと思われる。これらの研究では、組織器官におけるUの分布は、毛や羽などの体外硬組織に蓄積する傾向が認められている。

体内に蓄積している微量元素濃度の増減は、取り込み量と排泄量によって決まる。養殖個体の餌は主に魚類であり、野生個体の餌は海綿が主体とされている（内田、1983；日本エヌ・ユー・エス株式会社、1993

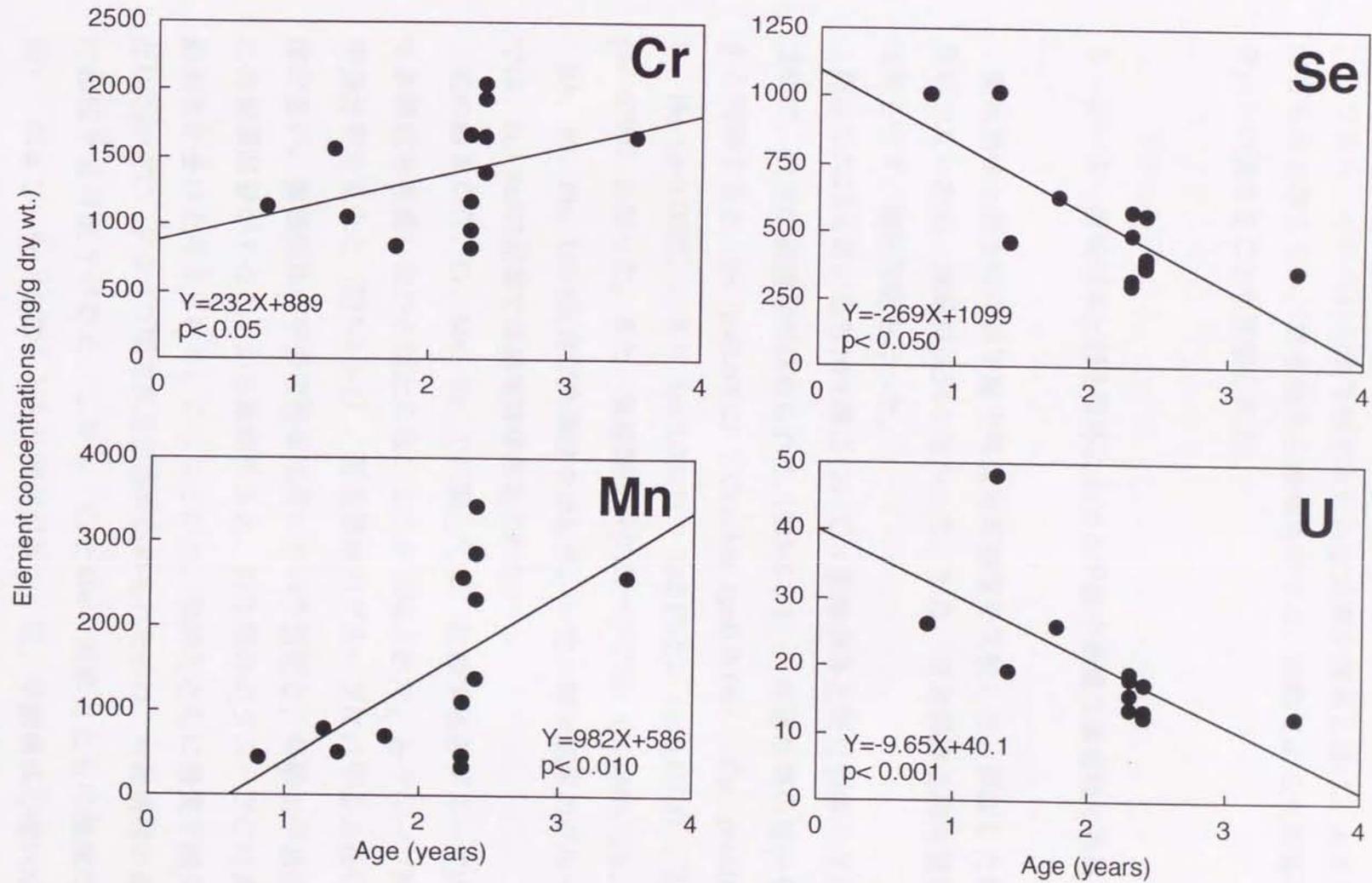


Fig. 5-2-4-1
Age-dependent concentrations of four trace elements in the carapace of ranching hawksbill turtle

）。つまり、それぞれの個体群が取り込む元素の種類と量は、大きく異なるものと考えられ、野生個体と養殖個体では、加齢による元素蓄積パターンが異なることも予想される。

5-2-5. 養殖個体と野生個体における甲羅中微量元素蓄積の差異

養殖個体と野生個体の甲羅中微量元素濃度を比較した。供試した検体数が少ないため、雌雄は区別しなかった。また、健全個体と病死個体の区別もせず、統計解析を行った。

測定した22元素のうち10元素について、養殖個体と野生個体のグループ間で、有意な濃度差が認められた(図5-2-5-1)。有意水準の低いものから列挙すると、Se ($p=0.0002$)、CrとMn ($p=0.0006$)、Cu ($p=0.0021$)、Ba ($p=0.0027$)、Rb ($p=0.0041$)、LiとPbとU ($p=0.0078$)、Zn ($p=0.0290$)となった。また、養殖個体のグループでは、Cr、Mn、Cu、Zn、Rb、Ba、Pb、Uの8元素が高濃度を示した。一方、野生個体のグループでは、Li、Seの2元素で高濃度蓄積が見られた。

先の結果から、Cr、Mn、Se、Uに関しては、比較する各グループ内の年齢構成を考慮しなければならないことが示唆された。各グループ間の甲長分布を見ると(図5-2-2-1)、野生個体のグループには甲長の長い個体が多い。養殖個体の甲長成長率は高いという仮定と、年齢と甲長の間には相関関係があることから推察すると、野生個体のグループには高年齢個体が多いと考えられる。このことから、加齢とともに濃度が減少したUにおいて、グループ間で有意な差が認められたのは、年齢構成の違いに起因する可能性がある。しかし、CrとMn(加齢とともに濃度が増加)、および、Se(加齢とともに濃度が減少)は、年齢構成の違いから生ずる濃度差とは逆の結果を示している(図5-2-4-1、図5-2-5-2)。した

がって、これら3元素(Cr、Mn、Se)で見られたグループ間の濃度差は、年齢構成に起因するものではないと考えられた。このような差が認められたのは、基本的に周辺環境の元素分布の違い、とくに、餌中の元素分布の違いが関与していると考えられる。ところで、養殖個体の元素濃度の変動が予想以上に大きい。これは、健康状態の差、与えている餌の濃度変動、などが考えられる。この点について、今後さらに解明する必要がある。

以上の結果より、養殖個体から得られたべっ甲と野生個体から得られたべっ甲の判別には、Cr、Mn、Seを用いることが適切と考えられた。そこで、養殖個体のグループで相対的に高い濃度を示したCrとMn、野生個体のグループで高い濃度が認められたSeを、それぞれグラフ上にプロットした(図5-2-5-3)。その結果、CrとSeの関係でも、MnとSeの関係でも、養殖個体と野生個体はそれぞれ異なったグループを形成することが明らかとなった。さらに、Cr、Mn、Se濃度を用いて判別分析を行ったところ、ほぼ完全に、養殖個体と野生個体の甲羅を判別することができた(図5-2-5-4)。今回の結果は、養殖個体と野生個体の甲羅の識別に、微量元素濃度を用いる方法が有望であることを示唆している。

5-2-6. 生息海域の違いによる甲羅中微量元素蓄積の差異

べっ甲中の微量元素濃度を変数として用い、判別分析を試みたところ、高い確率で原産地を判別することが出来た。

5海域16試料のべっ甲中に存在する27元素を測定し、得られた元素濃度全てを判別分析で処理した。試料数が少なかったため、三連の測定値の平均ではなく実測値全てを活用した。その結果5個の判別関数を用いることで、原産地を非常に高い確率で区別することが出来た(図5-2-6-1、

判別関数 1 と判別関数 2 の結果のみを図示)。判別分析から得られた、元素ごとの標準化判別係数を表5-2-6-1に示す。次に、表5-2-6-1で示した判別係数の絶対値が大きいものから11元素を変数として選び、三連の測定値の平均値を用いて判別分析を行った。その結果平均値のみを用いた場合においても、5個の判別関数を用いることでこれらの原産地を高い確率で判別することが出来た(図5-2-6-2、判別関数 1 と判別関数 2 の結果のみを図示)。以上の結果より、化学分析によりベッ甲の原産地判別を推定する場合、多種類の微量元素濃度を変数にして、多変量解析を行う方法は有効であろう。

ところで、表5-2-6-1に示したように、La、Ce、W、Uなどの重い元素は、高い判別係数の絶対値を示した。先に述べたように、これら重い元素の濃度は他の元素に比べ低い。また海洋環境での分布や生物体内での挙動についてはほとんど報告がない。なぜこれらの元素が原産地判別の際の化学指標として有用なのか、その要因を究明するのは今後の課題である。

さらに、ベッ甲中の微量元素濃度の測定のみでは、タイマイの海域間移動を検証できない。この手法をより実際的な生態学の分野に応用するには、餌生物や海水中の微量元素濃度、および肝臓などの軟組織の微量元素濃度もあわせて測定し、解析を行う必要がある。

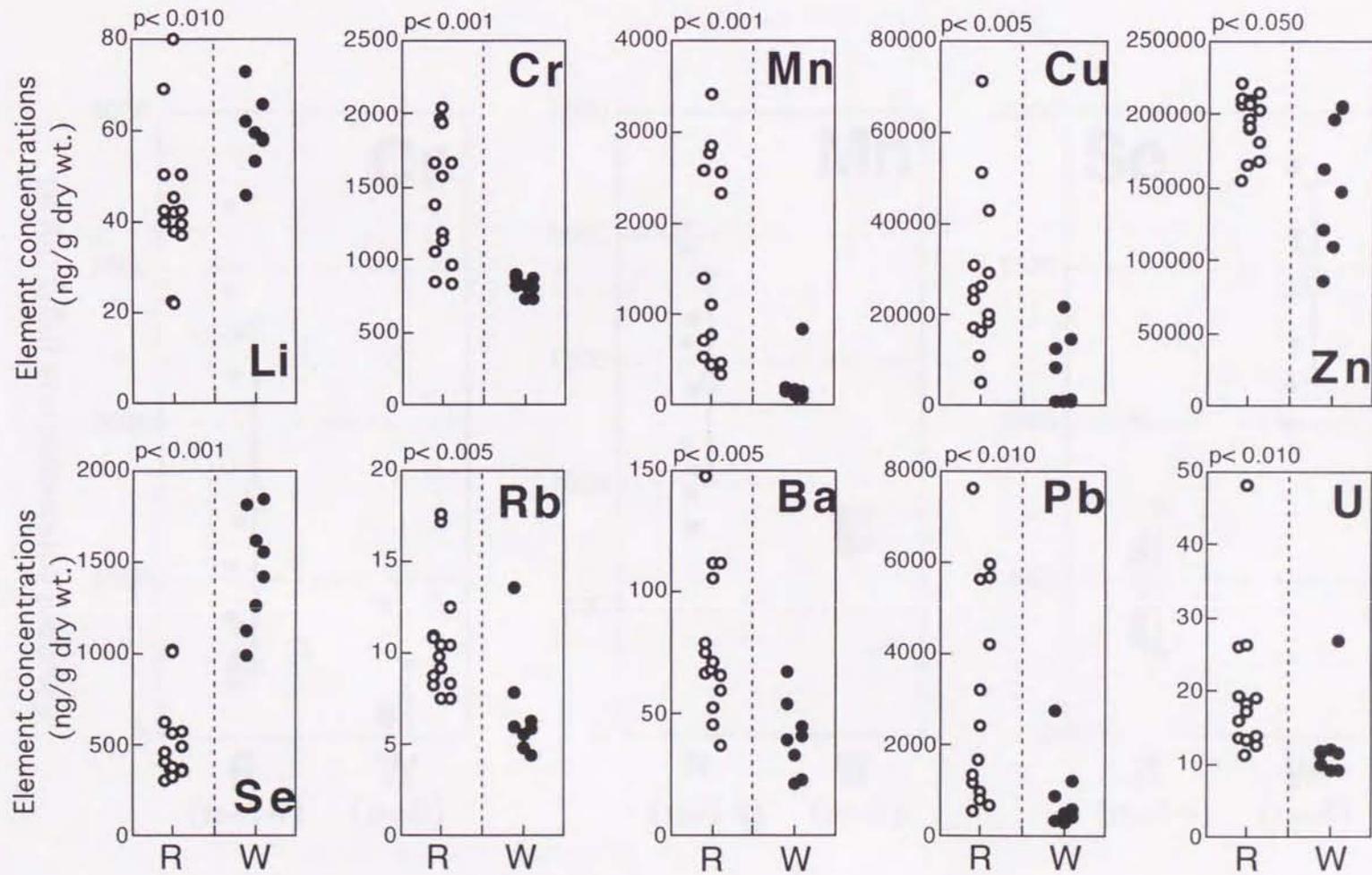


Fig. 5-2-5-1
Significant differences of element concentrations in carapaces between the ranching (n=14) and the wild hawksbill turtle (n=8)

R; Ranching hawksbill turtles W: Wild hawksbill turtles

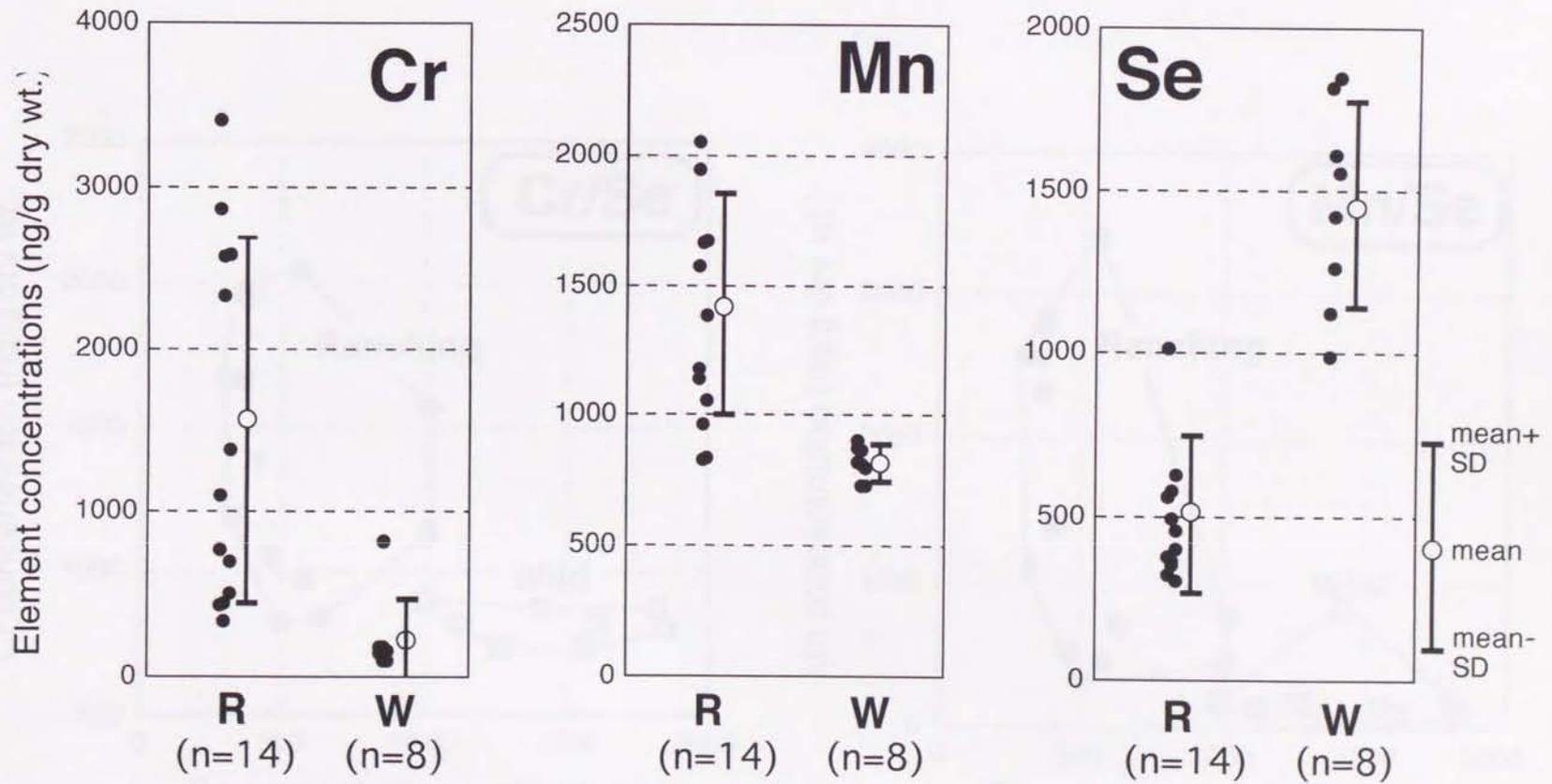


Fig. 5-2-5-2
Concentrations of Cr, Mn and Se in carapace plates of ranching and wild hawksbill turtles.

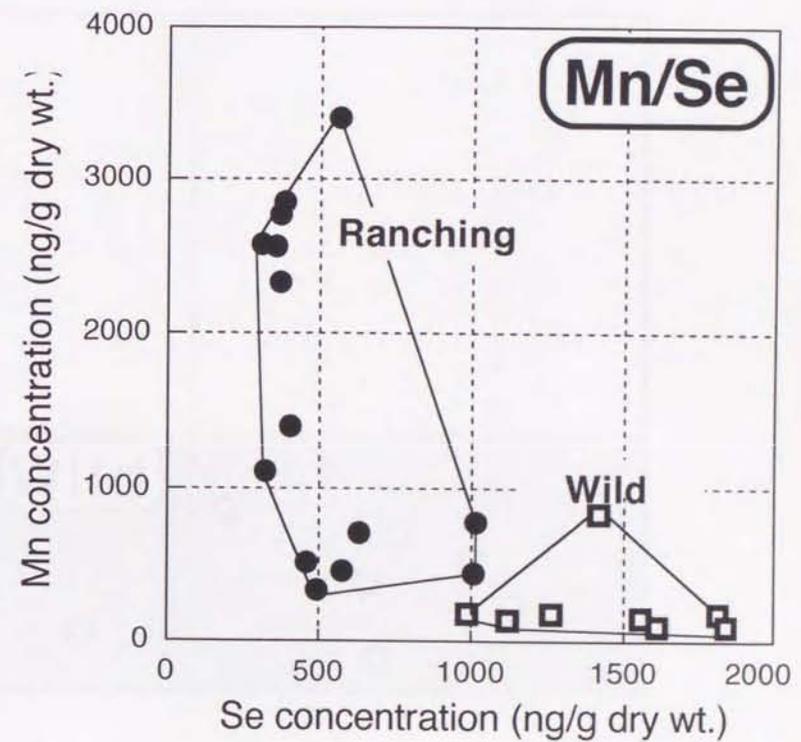
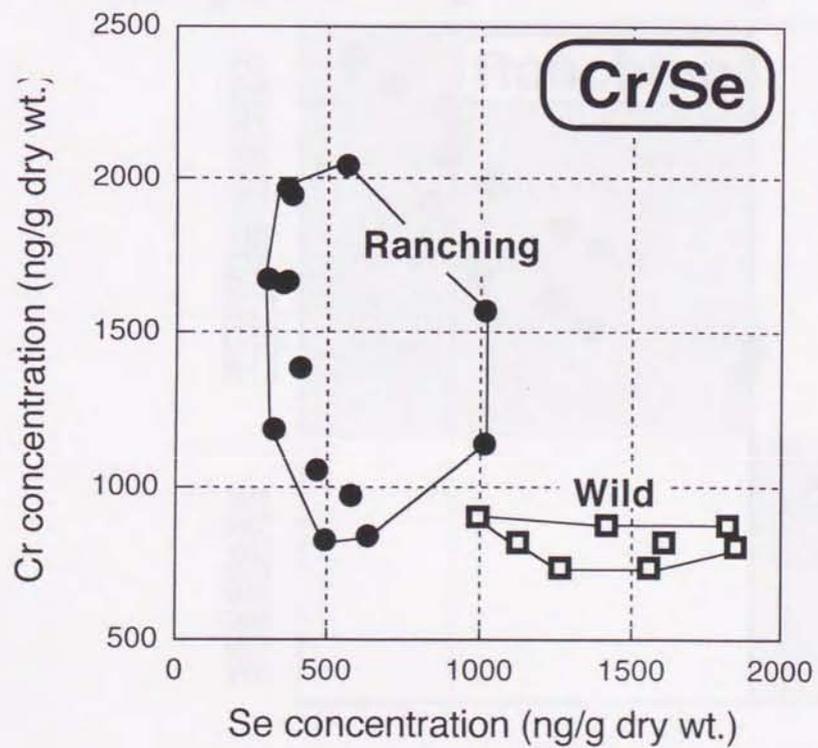


Fig. 5-2-5-3

Relationship between Cr, Mn and Se concentrations in carapace of ranching and wild hawksbill turtle

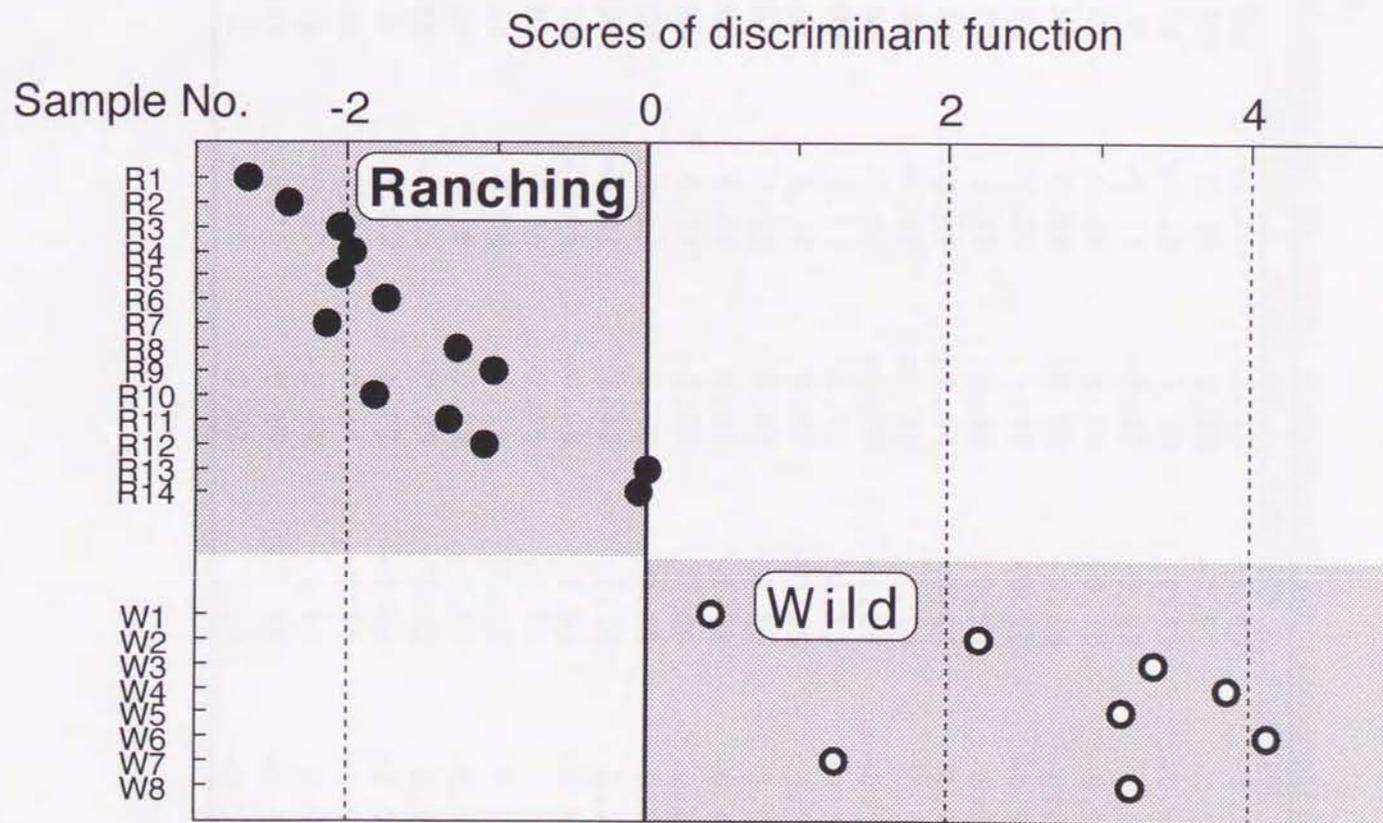


Fig. 5-2-5-4.

Scores calculated by discriminant analysis based on the concentrations of Mn, Cr, and Se in carapace from two habitats.

Table 5-2-6-1

Standardized canonical discriminant function coefficients

	FUNCTION 1	FUNCTION 2	FUNCTION 3	FUNCTION 4	FUNCTION 5
Mg	-2.21	1.45	-1.44	-3.11	-2.45
Sc	0.44	0.48	-0.97	-0.57	-0.63
Ti	-0.18	1.30	0.39	-0.81	-0.75
V	-0.30	-3.27	3.08	1.48	0.91
Cr	0.58	1.02	0.10	-0.50	0.20
Mn	-0.88	-0.57	-0.68	-0.29	2.02
Ni	1.03	1.77	-0.10	-0.95	-0.53
Cu	1.76	-0.33	0.94	1.31	1.04
Zn	0.67	-1.64	0.46	1.45	1.23
Ge	-0.39	-0.54	0.13	0.70	0.26
As	-1.72	-1.22	-1.25	-0.12	-1.63
Se	0.86	0.53	0.25	-0.52	0.49
Br	0.19	0.38	-0.18	1.31	1.07
Sr	1.15	0.94	0.55	1.94	1.61
Mo	0.49	0.21	1.18	-0.47	0.00
Rh	0.34	-0.42	0.08	0.14	0.33
Cd	-1.13	-0.77	0.69	-0.09	-0.53
Sb	-3.01	1.12	0.64	1.26	0.38
Te	-1.06	-0.08	0.02	-0.04	-0.24
Ba	0.38	-2.65	-0.11	1.36	1.15
La	0.54	-16.15	6.53	7.56	6.14
Ce	0.19	19.28	-7.10	-6.49	-7.88
Tb	-0.15	-0.29	0.40	0.83	-0.27
W	5.02	0.82	-0.68	-2.09	1.31
Re	0.76	-0.24	-2.15	-3.67	0.82
Pb	0.10	-2.44	-1.17	1.99	0.77
Th	-0.20	-0.29	0.18	-0.43	-0.85
U	-2.05	3.23	1.02	-0.53	-1.85

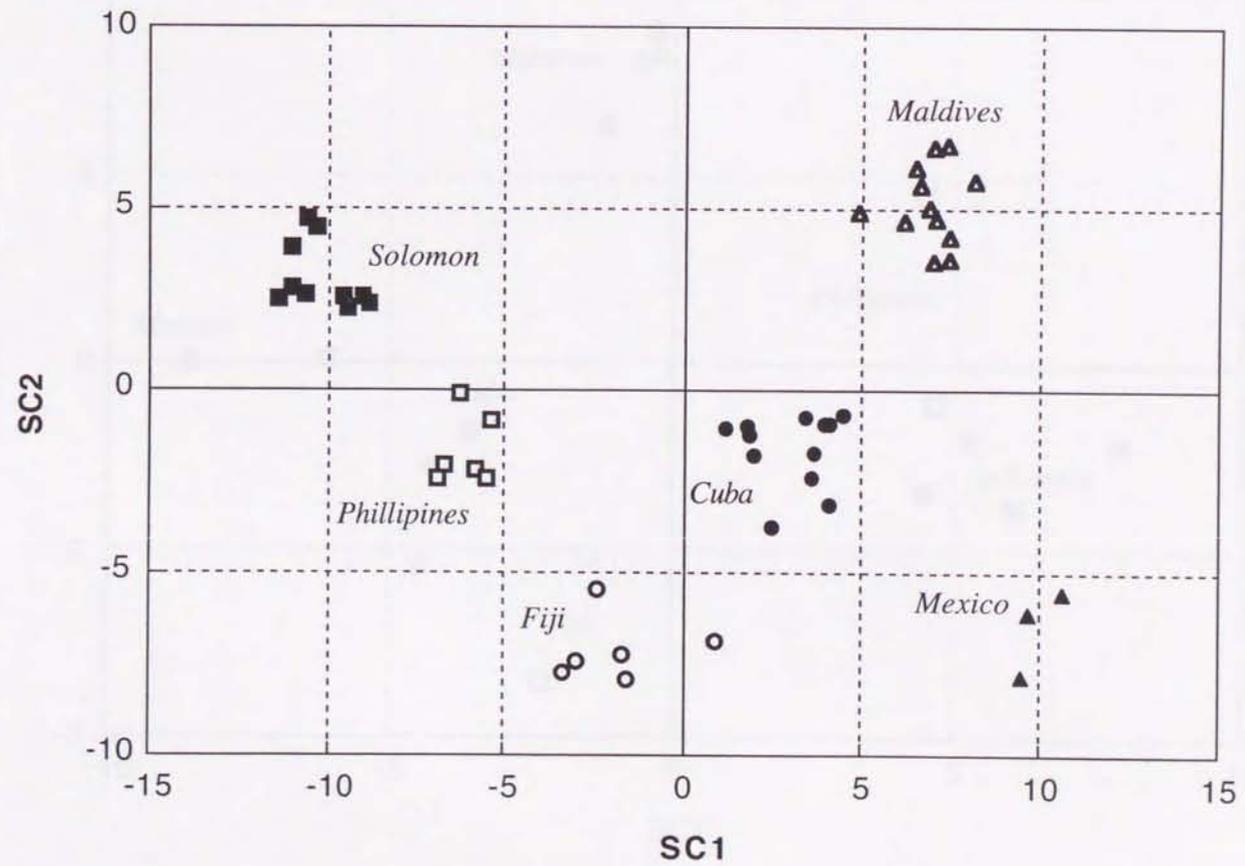


Fig. 5-2-6-1
Scores calculated by discriminant analysis based on the concentrations of 27 elements in 46 carapaces from 5 habitats.

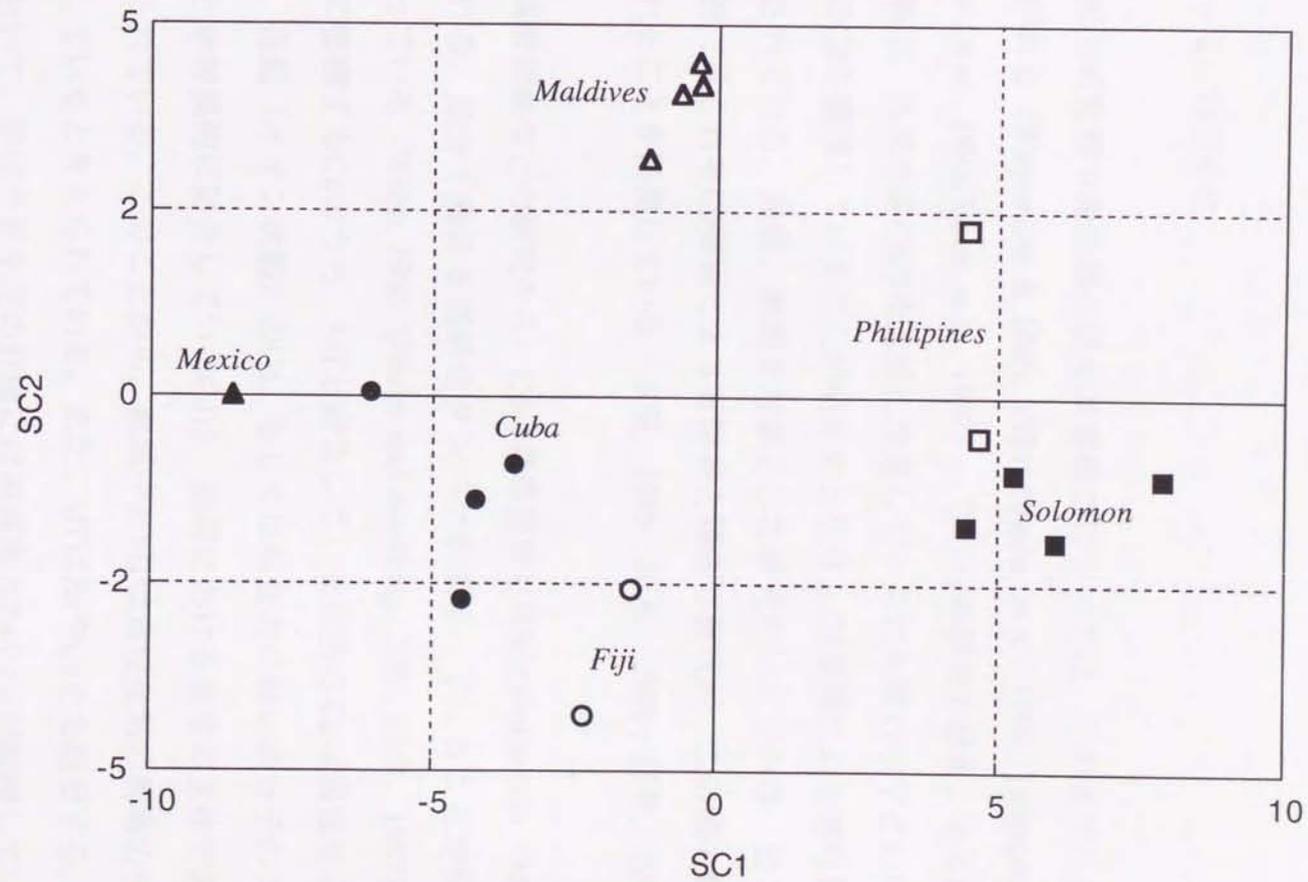


Fig. 5-2-6-2
Scores calculated by discriminant analysis based on the mean concentrations of 11 elements in 16 carapace samples from 5 habitats.

6. 海生動物の肝臓におけるZn、Cu、Cd蓄積とMetallothionein

—特に、ウミガメ類のCu高濃度蓄積について—

6-1. はじめに

海生哺乳類や海鳥類の重金属蓄積については、これまでに多くの報告がある (Wagemann & Muir, 1984; Honda, *et al.*, 1990; Thompson, 1990; Law, *et al.*, 1991; Lock, *et al.*, 1992)。これらの研究の結果、ある種の海生生物は、外洋の非Cd汚染海域に生息しているにも関わらずきわめて高濃度のCdを蓄積していることが明らかとなり、Cd蓄積による毒性影響が懸念されている。実際、鯨類を対象とした研究のいくつかは、ヒトや実験動物で見られるCd蓄積による腎障害と類似の症状が、この種の動物で見られることを指摘している (本田, 1986; 山本, 1988; 鹿島, 1991)。

実験動物などの研究から、Cdの毒性発現にはMetallothionein (MT) と呼ばれる、低分子量の金属結合タンパクが関与していることが明らかとなっている (Webb, 1986; Elinder and Nordberg, 1987; 田中, 1987)。組織中に蓄積するCdのうち、MTと結合している形態のCdは毒性を示さないが、遊離 (イオン状態) のCd、もしくは結合力の弱い高分子のタンパク質と非特異的に結合しているCdは、組織における毒性の主体であると考えられている。このことから、組織中のMTは毒性金属の解毒の役割を果たしていると考えられている。また、MTはZnやCuとも結合する。哺乳類において、胎児や新生児の肝臓には高濃度のZnやCuが蓄積しているが、この大半はMTと結合している (Bakka and Webb, 1981; Suzuki *et al.*, 1983; Richards, 1989; Bremner and Beattie, 1990)。また、Cdの暴露がないときでも、肝臓などではZnやCuが結合したMTが認められている (Onosaka and

Cherian, 1981a, 1981b)。したがって、MTはCdなどの毒性金属を解毒する役割ばかりでなく、必須金属のホメオスタシスにも関与していると考えられている。これまでに数種の海生動物の肝臓、もしくは腎臓から、MTを分離・検出した報告がなされている (Olafson and Thompson, 1974; Lee, *et al.* 1977; Wagemann, *et al.*, 1984, 1986; Mochizuki, *et al.*, 1985; Kwohn, *et al.*, 1986; 山本, 1988)。また、重金属蓄積とMT濃度の関係についての報告例もある (Thoyama *et al.*, 1986; Elliot *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1996)。これらの研究では、CdもしくはHgといった毒性重金属が組織に蓄積するにしたがい、そのMT濃度も増加する傾向を示し、CdもしくはHg毒性を緩和するためにMTが誘導合成されていることを指摘している。ところで、野生動物に対するCdの毒性影響を評価する場合、Cd濃度とMT濃度の相関関係の検討だけでは不十分である。Cd毒性の要因が、MTと結合していない状態のCdであることから、MT結合体のCdと合わせて、細胞内のCdの分布を併せて調査する必要がある。しかしながら、Cd蓄積に伴う、細胞内のCd分布変動を研究した例は山本 (1988) と鹿島 (1991, 未発表) 以外みあたらず、Cdの毒性影響を定量的に評価した報告はない。

Cuは必須性元素とされているが、高濃度で蓄積すると毒性を程し、Cdと同程度、もしくはそれ以上の毒性を示すことが知られている (和田, 1985)。ヒトおよびラットでは、先天的にCu代謝に異常をきたす遺伝疾病がある (和田, 1985; Li *et al.*, 1991a, 1991b; Sugawara *et al.*, 1991a, 1991b; 青木, 1996)。このうち、ヒトでおこるWilson病は、肝臓中にCuが異常蓄積するため、肝炎および肝硬変などの肝障害が発症する。また、Long-Evans Cinnamon (LEC) ラットはWilson病のモデル動物で、肝臓へのCuの異常蓄積があり、Cu毒性による肝障害が認められている (鈴木, 1993; 鈴木, 1996)。LECラットは非近交系のLong Evans系のラットから、体毛の色の違いに分離樹立された近交系ラット2系のうちの1系で

ある (Yoshida, *et al.*, 1987; Takeichi *et al.*, 1988)。Wilson病患者とLECラットにおける肝臓へのCu異常蓄積は、細胞内でCu輸送をしていると考えられるP-type ATPaseの遺伝子異常により、肝細胞からCuが除去されないためであると考えられている (Yamaguchi *et al.*, 1994; 青木, 1996)。肝臓に過剰に蓄積されているCuの多くはMTと結合しており、肝細胞内でCuがMTに保持されているうちは、その毒性が軽減されている (Li *et al.*, 1991a, 1991b; Sugawara *et al.*, 1991a, 1991b; Suzuki *et al.*, 1993a; 青木, 1996)。すなわちMTは、過剰に存在するCuの毒性を、Cdの場合と同様に、MT結合体として組織中に保持することで毒性を軽減していると考えられる (Bremner, 1987)。

4章3節で述べたように、ウミガメ類、とくにアオウミガメの肝臓中Cu濃度は、鯨類、鰐脚類、海鳥類と比較して明らかに高い (Wagemann and Muir, 1984; Honda *et al.*, 1990; Law *et al.*, 1991; Lock *et al.*, 1992)。また、ウミガメ類肝臓中のCuは、必須元素であるにも関わらず、個体による濃度変動が著しい。一方、鯨類、鰐脚類、海鳥類肝臓中のCuは、恒常性維持機構が働き、その濃度はほぼ一定に保たれ、大きな変動はないとされている (本田, 1986)。このような重金属蓄積の種間差の原因は、餌だけでは説明できない。なぜならば、餌中のCu濃度の種間差は、海生動物の肝臓中Cu濃度の種間差を説明できるほど大きな差はない。ウミガメ類に見られるCu蓄積の種特異性は、ウミガメ類特有なCu代謝の存在を示唆している。

ところでCuは、ZnやCdと同様にMTと結合する。したがってZn、Cu、CdはMTを介して相互に影響し、それぞれの生体内動態に密接に関係していると考えられる。図6-1-1にウミガメ類、海生哺乳類 (鰐脚類と鯨類) の肝臓中Cd濃度とCu濃度の関係を示す。Cuを高濃度で蓄積しているウミ

ガメ類は、Cd蓄積に関しては逆の傾向を示し、海生哺乳類、とくに鯨類のCd濃度比べると低い。また、海生哺乳類の中でも鰭脚類は、濃度の差はあるもののウミガメ類と類似の傾向を示した。このようなCdとCu蓄積の種間差には、MTが深く関与していると考えられ、海生動物におけるCd蓄積の毒性影響、およびCu蓄積による影響を正しく評価するためには、CdおよびCu蓄積の種間差を理解する必要がある。

本章では、肝臓中で特徴的なCdとCu蓄積を示したアオウミガメ、キタオットセイ、北半球産ミンククジラの肝臓を用い、組織中のZn、Cu、Cdの分布と、MTの関係を検討した結果について述べる、また、これら重金属蓄積の種間差の原因についても考察した。

6-2. 試料と方法

本章で用いた試料は、以下に示すとおりである。

アオウミガメ (*Chelonia mydas*)

1995年4月から5月にかけて、南西諸島八重山列島近海(図4-2-1)で捕獲されたアオウミガメ(*Chelonia mydas*) 11検体を用いた。試料の詳細を表6-2-1に示す。アオウミガメの捕獲海域は、第4章で用いた検体と同じであるが、捕獲年は異なる。これら検体から肝臓を摘出し、直ちに(解剖開始後1時間以内)生理食塩水で脱血した。その後、試料をポリエチレン袋に入れ、その上をアルミホイルで包装した後に、液体窒素中に保存して研究室まで輸送した。研究室では、分析時まで-80℃以下で保存した。

キタオットセイ (*Callorhinus ursinus*)

キタオットセイは、1992年と1993年の4月から6月に、オホーツク海お

よび三陸沖で捕獲された17検体を供試した。試料の詳細を表6-2-2に示す。肝臓試料は、捕獲後20分以内に検体から摘出し、生理食塩水を用いて脱血後、アルミホイルで包装した後、液体窒素中に保存し研究室に輸送した。これらの試料は分析時まで-80℃以下で保存した。

ミンククジラ (*Baraenoptera acutorostrata*)

1995年6月から8月、北東部北太平洋において、調査捕鯨により捕獲された100検体の中の10検体を選択して分析に供した(表6-2-3)。個体の解剖は、調査捕鯨母船、日新丸の船上で行った。肝臓試料は解剖後直ちに摘出し生理食塩水を用いて脱血、アルミホイルで包装した後、-80℃以下で保存した。分析に供した検体は、あらかじめ全検体の肝臓組織中Zn、Cu、Cd濃度を測定し、その濃度範囲が分散するよう選択した。肝臓中の重金属濃度の測定は、-20℃以下で保存した試料を、先に(2章1節)述べた方法で処理し、AASで測定した。

-80℃以下で保存した、以上の動物種の肝臓試料を、前述(2章3節)した方法で処理し、細胞質画分を得た。細胞質画分を、Sephadex G-75ゲルカラム(2.6×90cm)を用いて分子量分画を行い、得られたそれぞれのフラクション中のZn、Cu、Cd濃度を測定し、これら金属の細胞質内の分布を調べた(2章3節)。また、細胞質画分中のMT濃度は、Klein *et al.* (1990)のATTM-Cd-Chelex法で定量した(2章4節)。

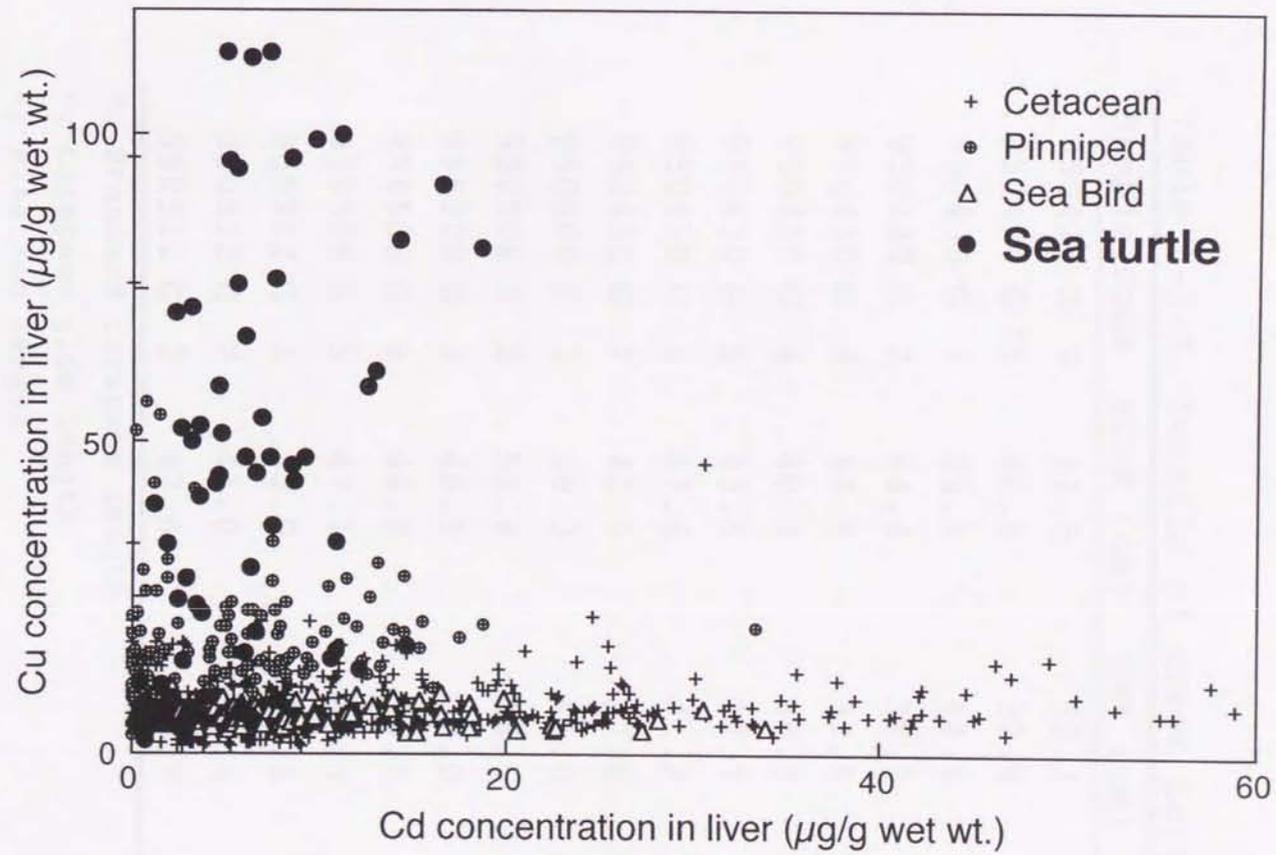


Fig. 6-1-1
Relationship between Cd and Cu concentration in liver of sea turtles, cetaceans, pinnipeds and sea birds.

Table 6-2-1. Details of green turtle samples

Sample Code	SCL# (cm)	CW* (cm)	PL~ (cm)
950424 G 9	41.5	35.1	
950424 G 11	44.5	37.4	
950430 G 1	52.1	44.6	42.9
950430 G 2	44.4	38.5	36.0
950430 G 3	44.8	37.9	35.5
950430 G 4	40.3	35.7	31.7
950430 G 5	43.5	37.7	34.8
950430 G 6	47.6	41.2	39.5
950430 G 7	42.0	37.0	33.4
950808 G 1	58.3	46.0	48.0
950508 G 2	55.8	46.8	45.3
950508 G 3	46.5	40.0	37.5
950508 G 4	44.8	39.4	36.7
950508 G 5	47.1	41.0	38.3
950512 G 1	53.0	45.5	43.1
950512 G 2	41.0	34.4	31.3
950512 G 3	42.4	35.7	34.5

#; Standard carapace length

*; Carapace wide length

~; Plastron length

Table 6-2-2. Details of northern fur seal samples

Sample No.	Sex	Sampling Date	Sampling Point		Body weight	Body length
					kg	cm
71	F/P	1992/04/16	36° 21.0' N	141° 54.0' E	40.0	125.5
72	F/P	1992/04/18	36° 16.7' N	141° 44.1' E	21.5	108.0
73	F/P	1992/04/18	36° 17.6' N	141° 44.2' E	39.0	132.0
74	F/P	1992/04/18	36° 18.3' N	141° 43.9' E	31.5	123.5
75	F	1992/04/18	36° 18.9' N	141° 43.9' E	37.0	134.0
76	F/P	1992/04/18	36° 19.6' N	141° 43.9' E	37.5	126.5
77	F/P	1992/04/18	36° 19.3' N	141° 43.9' E	37.0	128.0
78	F/P	1992/04/19	36° 54.2' N	141° 33.1' E	33.5	114.0
79	F/P	1992/04/19	36° 54.2' N	141° 33.1' E	39.0	126.5
80	F	1992/04/19	36° 54.2' N	141° 33.1' E	35.0	126.5
81	F/P	1992/04/19	36° 53.3' N	141° 32.5' E	34.0	123.0
82	F/P	1992/04/19	36° 51.4' N	141° 32.3' E	39.0	121.5
83	F/P	1992/04/19	36° 51.4' N	141° 32.0' E	30.0	122.5
84	F/P	1992/04/19	36° 51.4' N	141° 31.9' E	29.0	123.0
85	F/P	1992/04/19	36° 51.6' N	141° 31.7' E	35.0	124.0
86	F/P	1992/04/19	36° 47.6' N	141° 32.0' E	29.5	109.0
87	F/P	1992/04/19	36° 47.6' N	141° 32.0' E	34.5	122.0
88	M	1992/04/20	36° 35.2' N	141° 23.6' E	23.0	98.5
89	M	1992/04/20	36° 38.0' N	141° 24.8' E	25.0	103.0
90	F/P	1992/04/20	36° 38.0' N	141° 24.8' E	39.0	129.5
91	F/P	1992/04/20	36° 38.0' N	141° 24.8' E	38.0	132.0
92	F/P	1992/04/20	36° 37.2' N	141° 23.8' E	38.0	132.0
101	M	1993/06/11	45° 40.3' N	141° 58.8' E	160.0	185.0
102	M	1993/06/20	41° 03.0' N	141° 54.7' E	29.0	116.0
103	F	1993/06/20	41° 03.0' N	141° 54.7' E	29.5	119.0
104	F	1993/06/20	40° 53.9' N	142° 00.4' E	27.0	114.0
105	F	1993/06/20	40° 46.7' N	142° 05.1' E	21.6	114.0
106	M	1993/06/20	40° 42.8' N	142° 04.8' E	31.0	124.0
107	M	1993/06/22	39° 18.1' N	142° 11.9' E	20.2	103.5

M; Male

F; Female

F/P; Pregnant female

Table 6-2-3. Details of Minke whale samples

Sample Code	Sampling Date	Sex	Sampling Point	Body Length (m)	Body Weight (t)	Bulluber Thickness (cm)
95NP/007	1996.6.29	M	40° 37' N 157° 31' E	7.55	4.35	2.9
95NP/022	1996.7.7	M	40° 49' N 160° 15' E	7.33	5.20	3.1
95NP/027	1996.7.8	M	40° 57' N 159° 04' E	7.26	4.55	2.7
95NP/043	1996.7.21	M	45° 58' N 160° 34' E	7.36	4.55	3.3
95NP/071	1996.7.25	F/P	45° 01' N 161° 32' E	7.95	6.11	3.0
95NP/072	1996.7.25	M	45° 01' N 161° 30' E	7.45	3.80	3.0
95NP/082	1996.8.7	M	42° 34' N 166° 44' E	7.29	4.01	2.4
95NP/090	1996.8.10	M	44° 49' N 165° 30' E	7.43	4.10	3.0
95NP/091	1996.8.12	M	44° 56' N 168° 13' E	7.53	5.54	3.9
95NP/095	1996.8.15	M	46° 56' N 165° 17' E	7.41	4.55	3.2

M; Male

F/P; Pregnant Female

6-3. 肝細胞内におけるZn、Cu、Cdの分布

6-3-1. 細胞質への蓄積

Zn、Cu、Cdについて、アオウミガメ、キタオットセイ、ミンククジラの肝臓の総組織濃度と肝ホモジネート10,000g上清中（以後、細胞質とする）の濃度をそれぞれ図6-3-1、図6-3-2、図6-3-3に示す。肝臓中のZn、Cu、Cdは、いずれの動物種においても、その大半が細胞質に存在していた。CuおよびCdの組織総濃度には、明らかな種間差が認められたが、細胞質と組織中の濃度の比に顕著な種間差はみられなかった。このことから、CuおよびCd蓄積の種間差は細胞質画分で生じていることが判明したため、以降は細胞質画分に注目して検討した。

ところで、本研究で求めたアオウミガメ、キタオットセイ、ミンククジラの肝臓中Zn、Cu、Cdの細胞質における存在割合は、これまでに報告されているイッカク（Wagemann *et al.*, 1984a）、およびイシイルカ、コビレゴンドウ、ミンククジラ（鹿島、未発表）の値より高い割合を示した。分析試料の保存状態が悪いと（保存温度や冷解凍の繰り返し、など）細胞内で金属の再分配が起こることが指摘されている（山崎, 1986；鹿島、未発表）。本研究で用いた試料は、いずれの動物種においても、採取・脱血後直ちに-80℃以下で保存したが、これまでの報告で用いられている試料は、保存方法状態が必ずしもよいとは言えない。本研究と既存の研究で、細胞質における元素の分布割合が異なるのは、このようなことが原因と推察される。

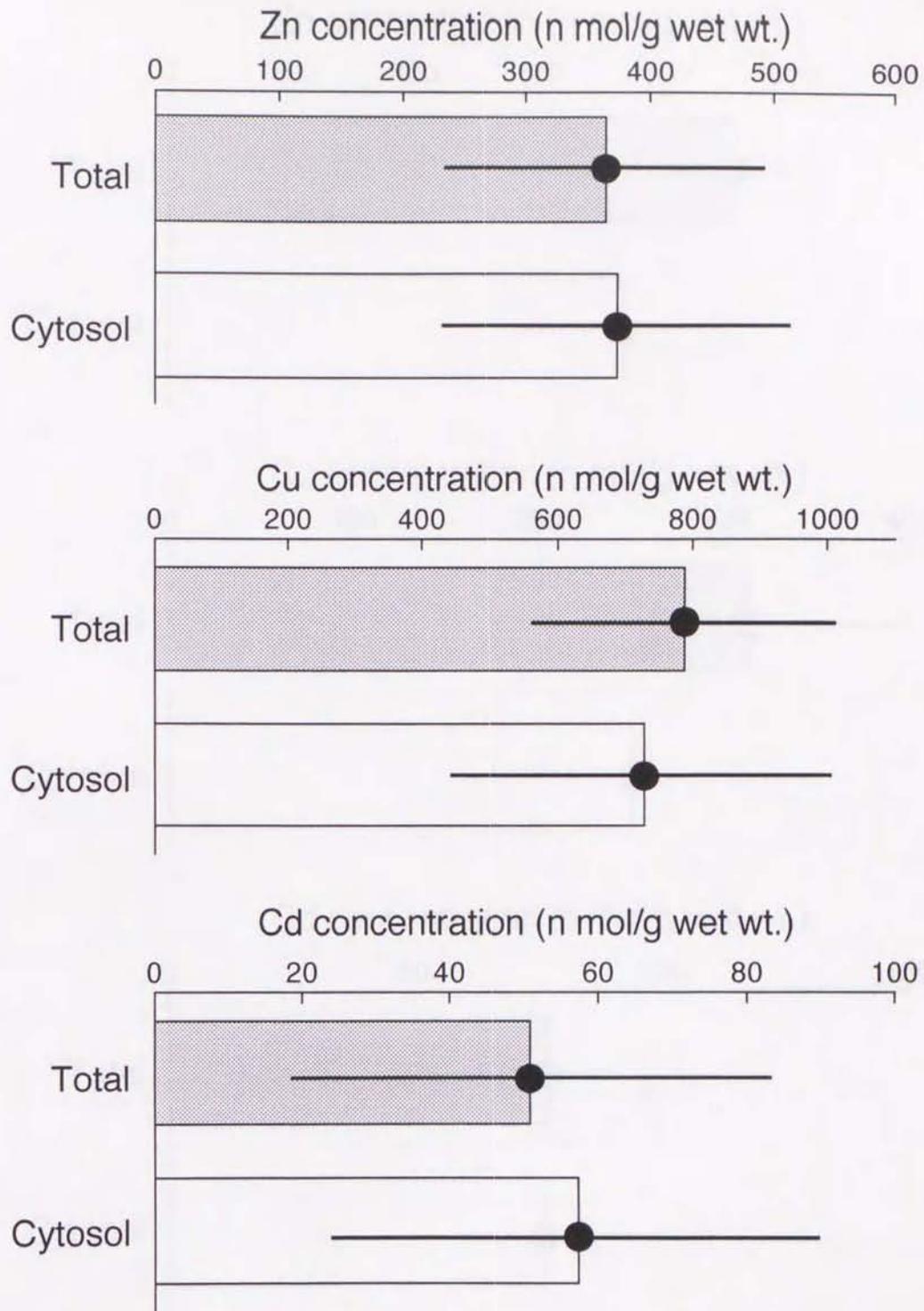


Fig. 6-3-1
Zinc, copper and cadmium concentration in total and cytosol of liver from green turtle

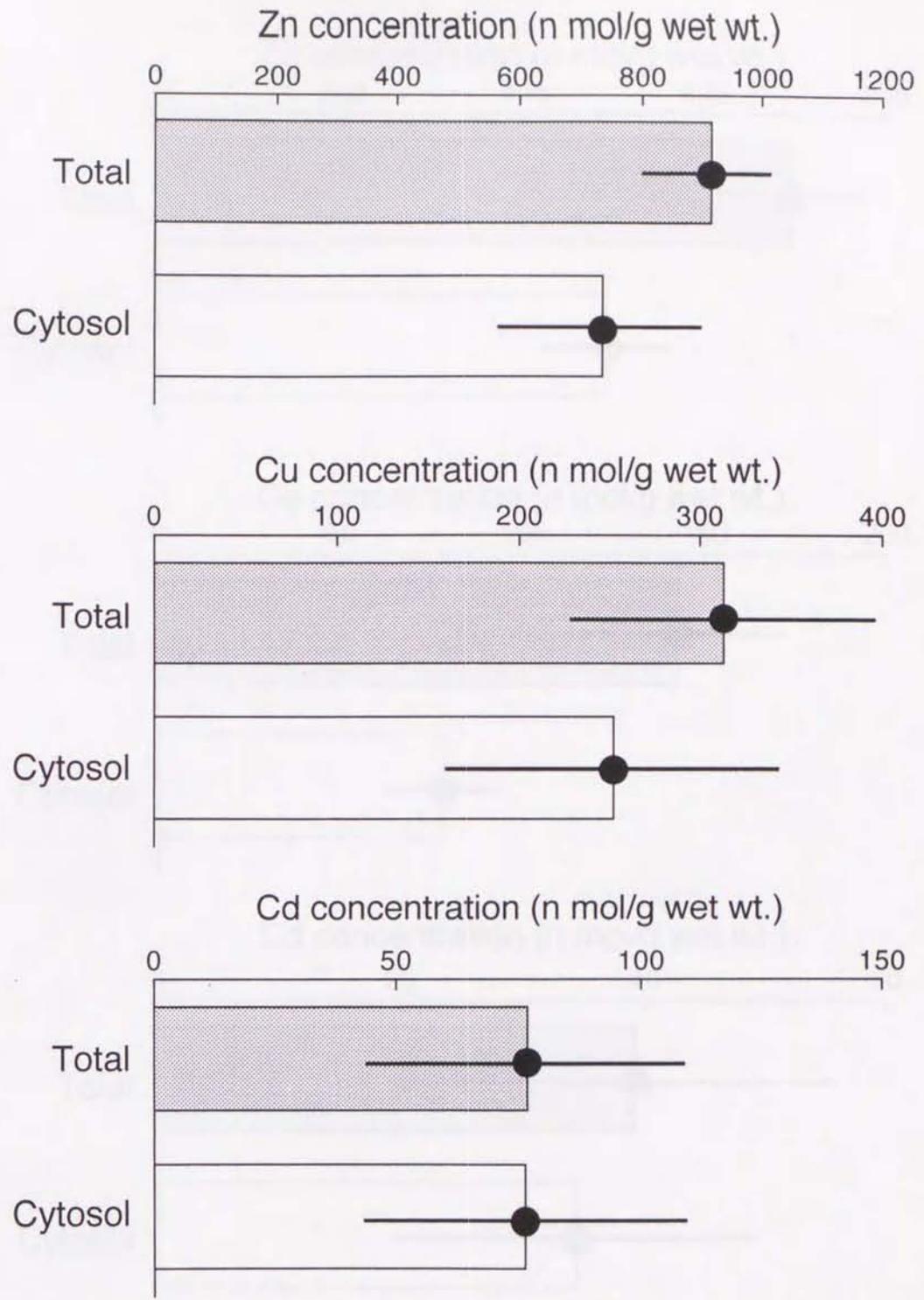


Fig. 6-3-2
 Zinc, copper and cadmium concentration in total and cytosol
 of liver from northern fur seal

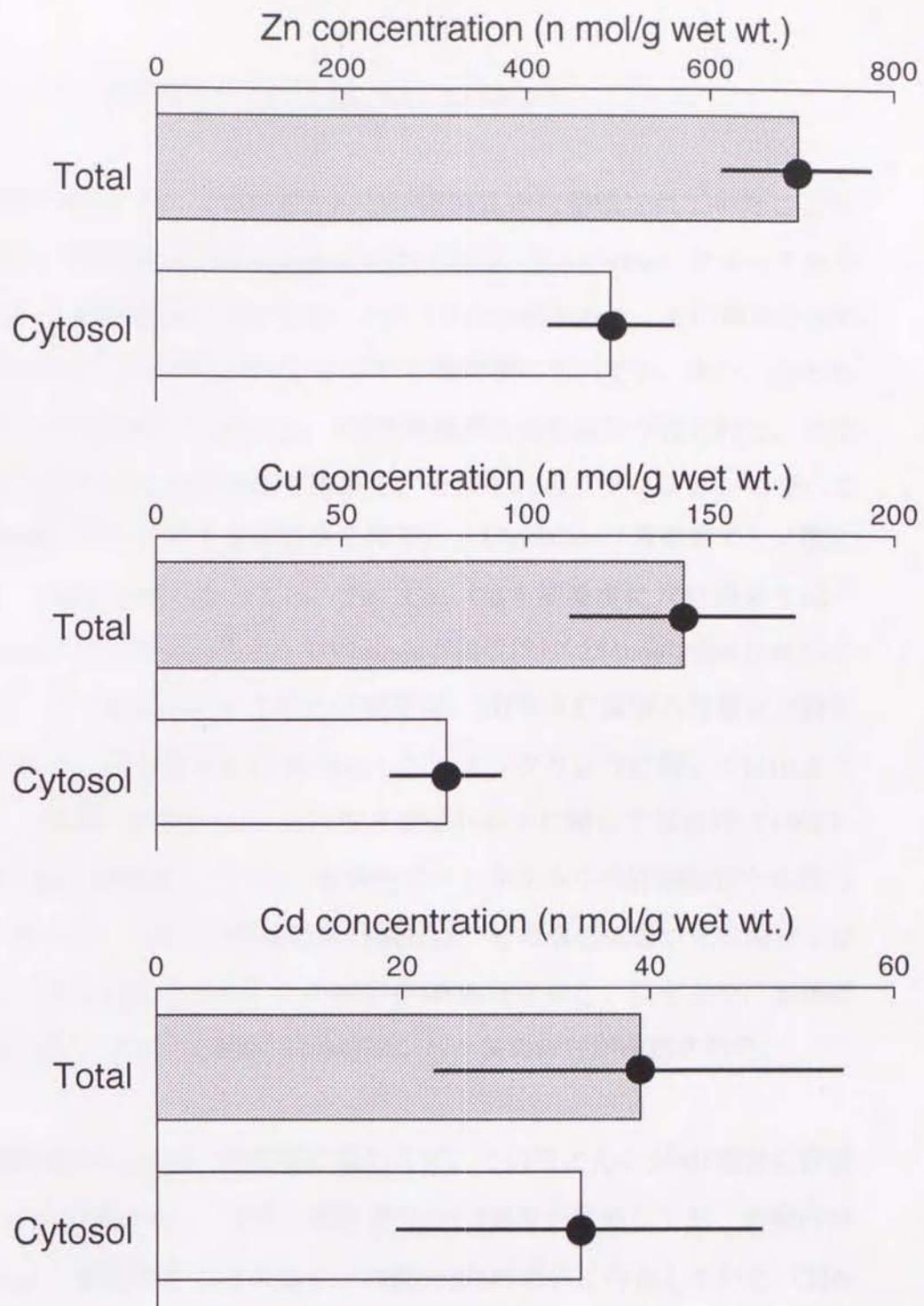


Fig. 6-3-3
Zinc, copper and cadmium concentration in total and cytosol of liver from minke whale

6-3-2. 細胞質中におけるZn、Cu、Cdの分布

肝臓中のZn、Cu、Cdのほとんどが細胞質中に蓄積されていたことから、次に、細胞質画分をSephadex G-75カラム (2.6×90cm) によって分子量分画し、細胞質内におけるZn、Cu、Cdの分布をみた。その結果を図6-3-4、図6-3-5、図6-3-6に示す。いずれの動物種においても、また、分析を行った全ての試料で、Zn、Cu、Cdを高濃度に含む画分が得られた。アオウミガメのいくつかの検体を用いて、それぞれのフラクションについてUV254nm (チオールと金属結合に特有) とUV280nm (芳香族アミノ酸に特有) の吸収を調べたところ、Zn、Cu、Cdを高濃度に含む画分では、UV254nmの吸収が認められ、UV280nmの吸収はUV254nmの吸収に比べて少なかった (図6-3-7)。これらの結果は、MTを含む溶液の特徴と一致することから、この画分をMT画分とした。ミンククジラに関しては山本 (1988) と鹿島 (1991) が、またキタオットセイに関しては西村 (1992) がMTの存在を確認している。本研究でミンククジラの肝細胞質から得られた、Zn、Cu、Cdを高濃度に含む画分は、その溶出位置が先の報告とほぼ同じであったことから、この画分をMT画分とした。以上より、本研究で検討を行った全ての検体で、MTタンパク質の存在が確認された。

肝細胞質中のCdは、動物種に関わらず、そのほとんどがMT画分に存在していた (図6-3-8)。また、細胞質中のCd濃度が変動しても、細胞内分布が大きく変動することはない、大部分がMT画分に存在していた (図6-3-9、図6-3-10、図6-3-11)。

実験動物を用いたCd暴露の研究では、細胞に取り込まれたCdはまずHMに存在することが知られている (Webb, 1986; Elinder and Nordberg, 1987)。数検体のミンククジラに関しては、高分子量画分 (HM) にも明らかな分布が見られた。ミンククジラは絶食をとまなう周期的な回遊を行

い、摂餌シーズンには多量の餌を短期間で食することが知られている。本研究で用いた検体は全て、摂餌シーズンの間に北西部北太平洋で捕獲されたものである。HM画分にCdが存在していたのは、このようなミンククジラの特異な摂餌生態によるものと推察される。

Znの細胞質内における分布は、キタオットセイとアオウミガメではHM画分とMT画分にほぼ同程度、ミンクではHM画分への分布がわずかに多かった(図6-3-12)。細胞質中のZn濃度の変動にともなう、細胞内分布の変動は、海生哺乳類(ミンククジラ、キタオットセイ)とウミガメ類でその傾向が異なった。海生哺乳類においては、細胞質中のZn濃度が増加してもHM画分中のZn濃度はほとんど変動せず、MT画分のみ濃度が増加していた(図6-3-13、図6-3-14)。また、細胞質中に存在するZnの各画分(HM、MT、LM)の存在割合は、細胞質中濃度の増加にともない、MT画分に占める割合が増加し、相対的にHM画分に存在する割合が減少した。一方アオウミガメは、海生哺乳類とは若干異なる傾向を示した。細胞質中のZn濃度が比較的低濃度の場合には、細胞質中の濃度増加にともない、HM画分および、MT画分のZn濃度はともに増加したが、細胞質中のZn濃度が500 nmol/gを越えると、HM画分における濃度増加が頭打ちし、MT画分中の濃度のみが増加した(図6-3-15)。

CuはCdやZnの場合と異なり、その細胞質内の分布が動物種間で大きく異なった(図6-3-16)。ミンククジラではHM画分に存在する割合が最も多く、ついで細胞質全体の約40%がMT画分に存在していた。アオウミガメとキタオットセイは、ミンククジラとは全く異なり、細胞質中のほとんどのCuがMT画分に存在していた。本研究の結果と、これまで報告されている鯨類の結果を比較すると、海生動物の中で肝臓中Cu濃度が低い鯨類は、MT結合体として存在している割合が少なく、逆に、比較的Cu濃度

が高いキタオットセイと、Cu濃度が明らかに高いアオウミガメは、ほとんどのCuがMT結合体として存在していた（図6-3-17）。また、細胞質のCu濃度と各画分の濃度の関係も、ミンククジラ（図6-3-18）、アオウミガメ（図6-3-19）、キタオットセイ（図6-3-20）の間では異なっていた。ミンククジラでは、細胞質中のCu濃度の増加にともなって、MT画分の濃度が有意に増加し、HM画分の濃度も有意ではなかったが増加した（ $p=0.060$ ）。しかし、アオウミガメとキタオットセイに関しては、MT画分のみが顕著な濃度増加を示した。ところで、HM画分、MT画分、LM（低分子量）画分のCu濃度を3種間で比較したところ（図6-3-21）、MT画分の濃度のみが大きな種間差を示し、HM画分とLM画分の濃度にはほとんど差が認められなかった。以上の結果より、肝臓中Cu蓄積の種間差は、細胞質中のMTと結合した状態のCuによって生じていることが明らかとなった。

6-3-3. Metallothioneinの金属構成

これまでの検討で、分析を行った全検体からMTタンパクの存在を確認出来た。そこで次に、MTに結合している金属の構成割合を調べた。図6-3-22にミンククジラ、キタオットセイ、アオウミガメのMT画分中のZn、Cu、Cdの構成割合を示す。海生哺乳類のミンククジラとキタオットセイでは、MTに結合している金属ではZnが最も多く、この傾向はミンククジラで顕著であった。CuとCdの割合は、ミンククジラではほぼ同程度で、Znに比べて非常に低い。キタオットセイではCdが最も低く、CuがZnに比べやや低い割合であった。アオウミガメは、ミンククジラやキタオットセイとは全く異なる金属構成を示した。アオウミガメ肝臓のMTは、Cuの結合割合が高い。Cuの次に多いのがZnで、最も少ないのはCdである。

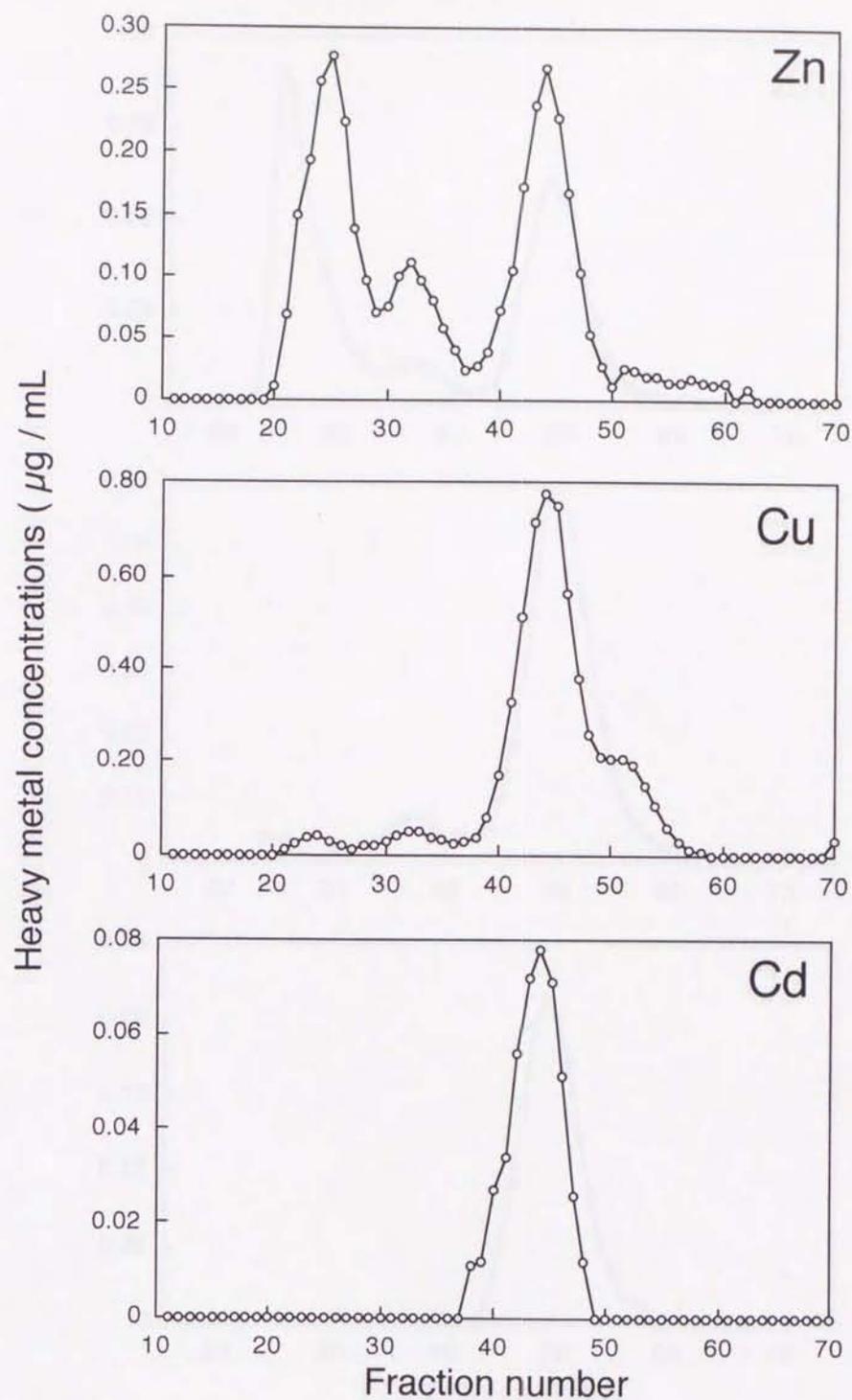


Fig. 6-3-4
 Elution profiles of Zn, Cu and Cd obtained by gel filtration on
 a Sephadex G-75 column of the green turtle hepatocytosol

950508/1G/L/10

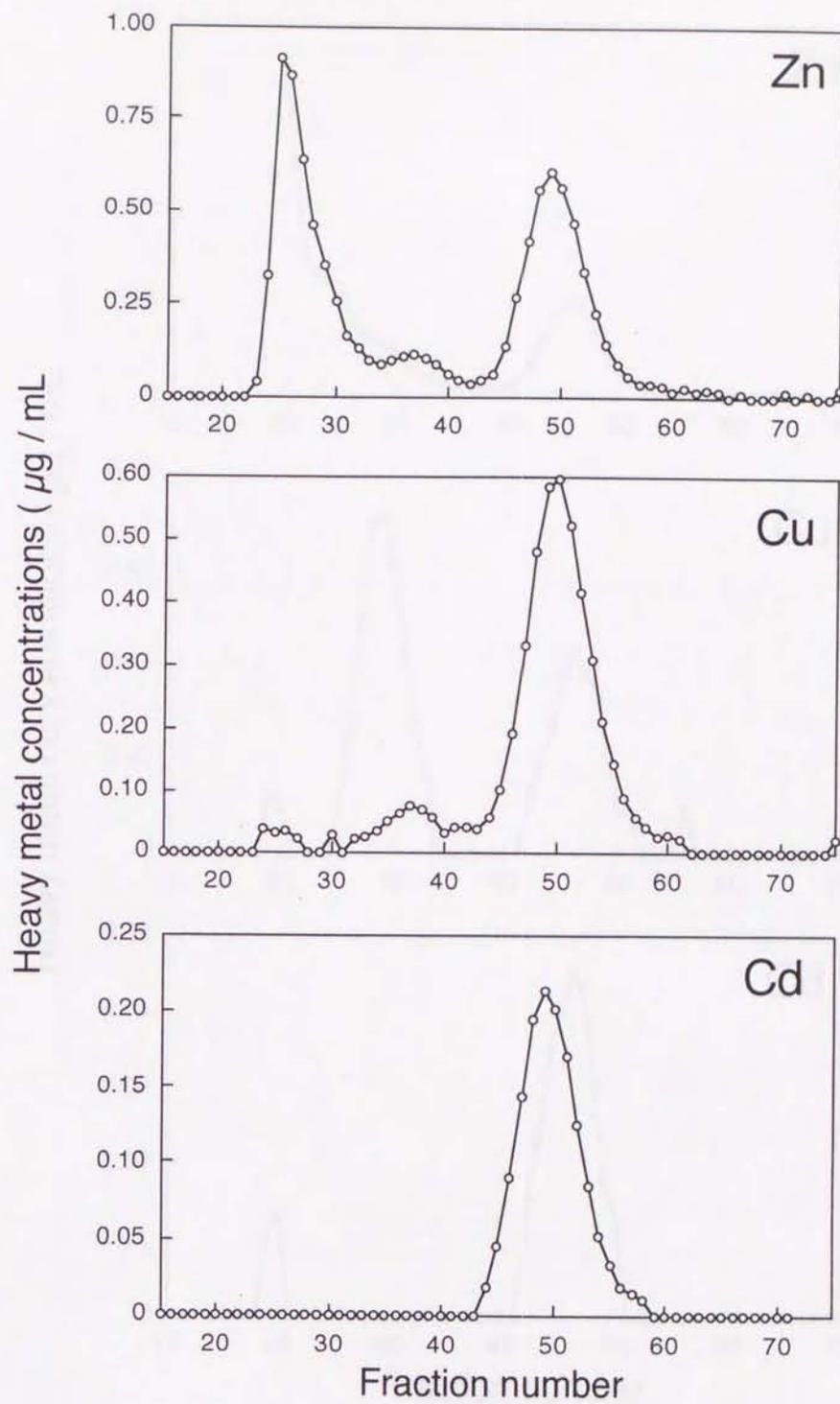


Fig. 6-3-5
 Elution profiles of Zn, Cu and Cd obtained by gel filtration on a
 Sephadex G-75 column of the northern fur seal hepatocytosol
 NFS/104L

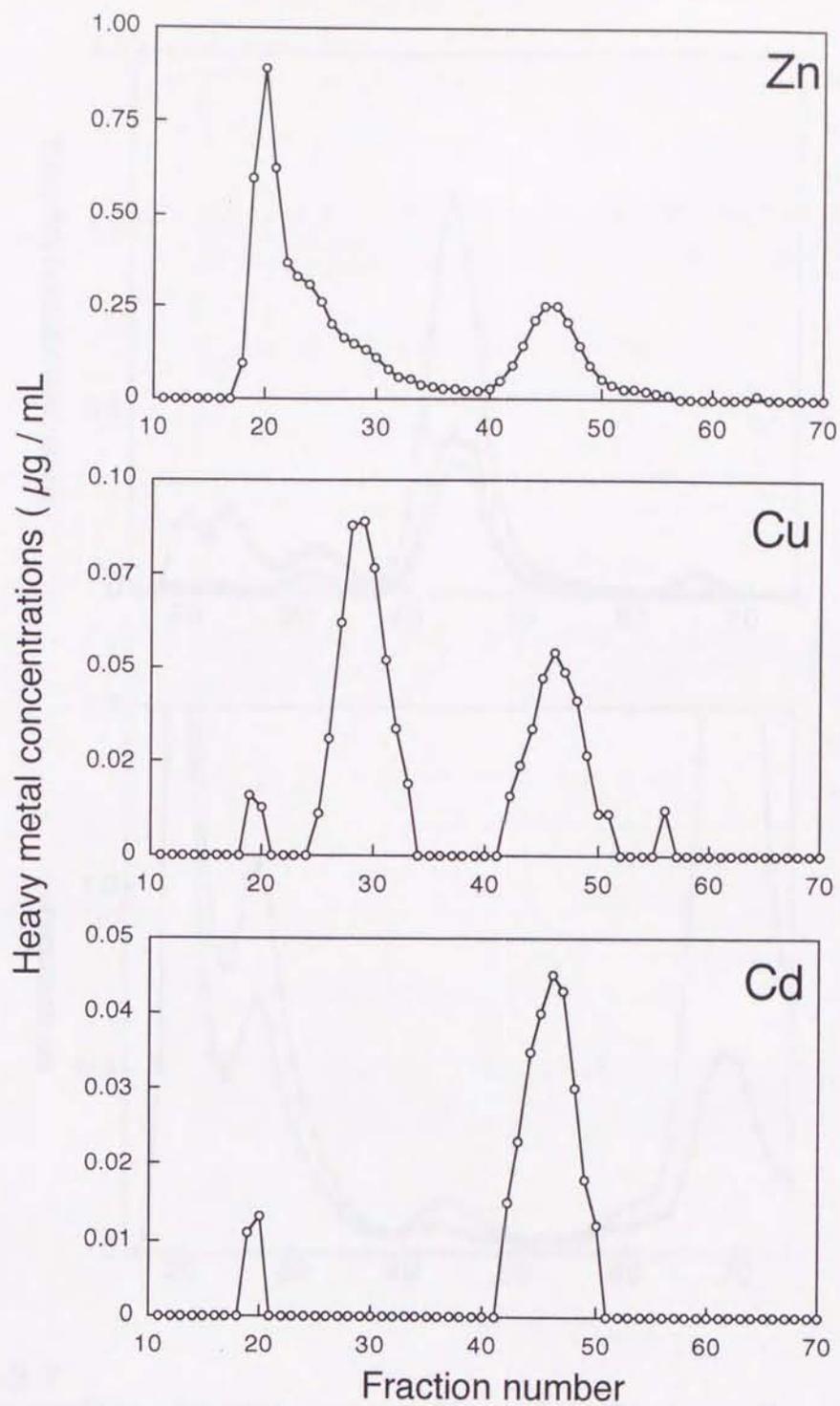


Fig. 6-3-6
 Elution profiles of Zn, Cu and Cd obtained by gel filtration on a Sephadex G-75 column of the minke whale hepatocytosol

MW/022L

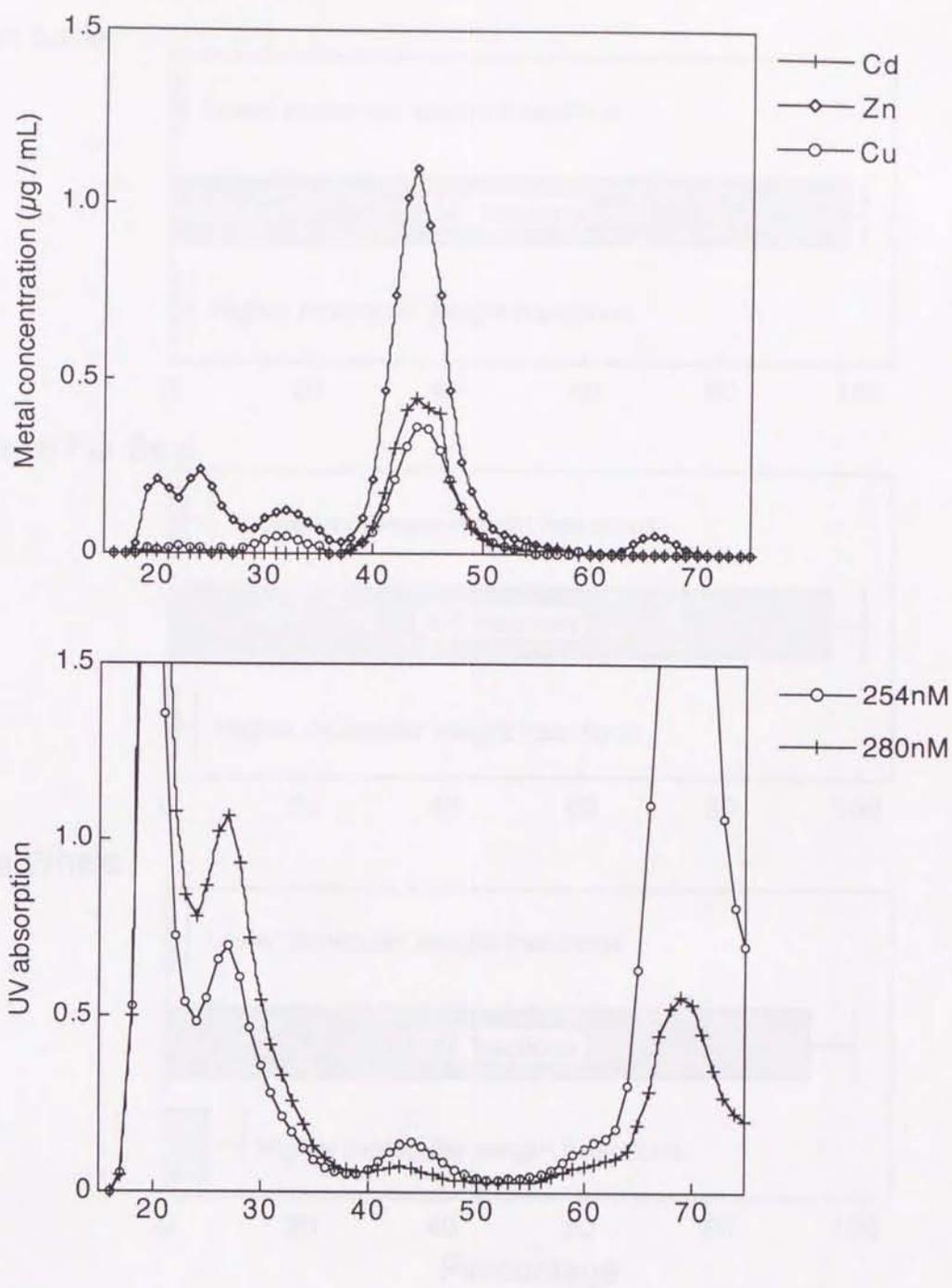
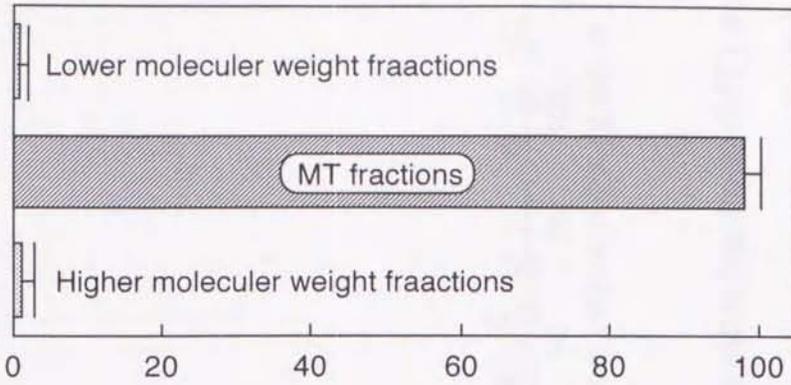
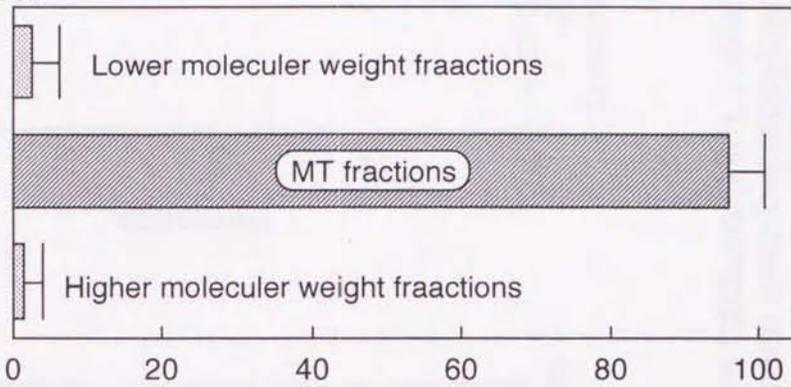


Fig. 6-3-7
 Elution profiles of metal concentration and UV absorption obtained by gel filtration on a Sephadex G-75 column of the green turtle hepatocytosol

Green turtle



Northern Fur Seal



Minke Whale

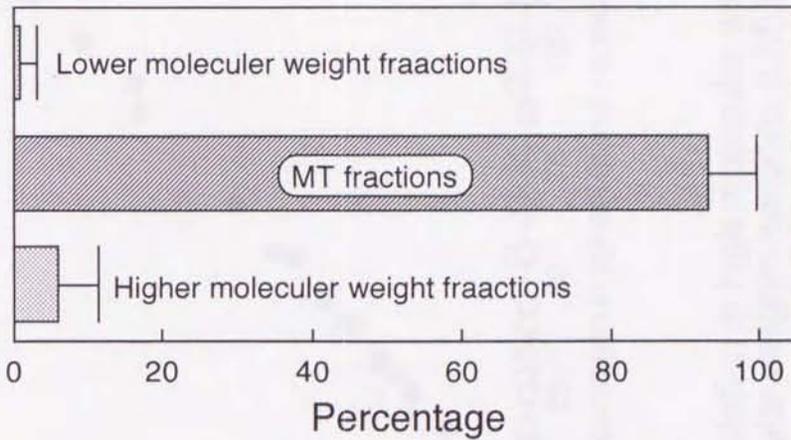


Fig. 6-3-8 Cadmium subcellular distribution in liver of green turtle, northern fur seal and minke whale

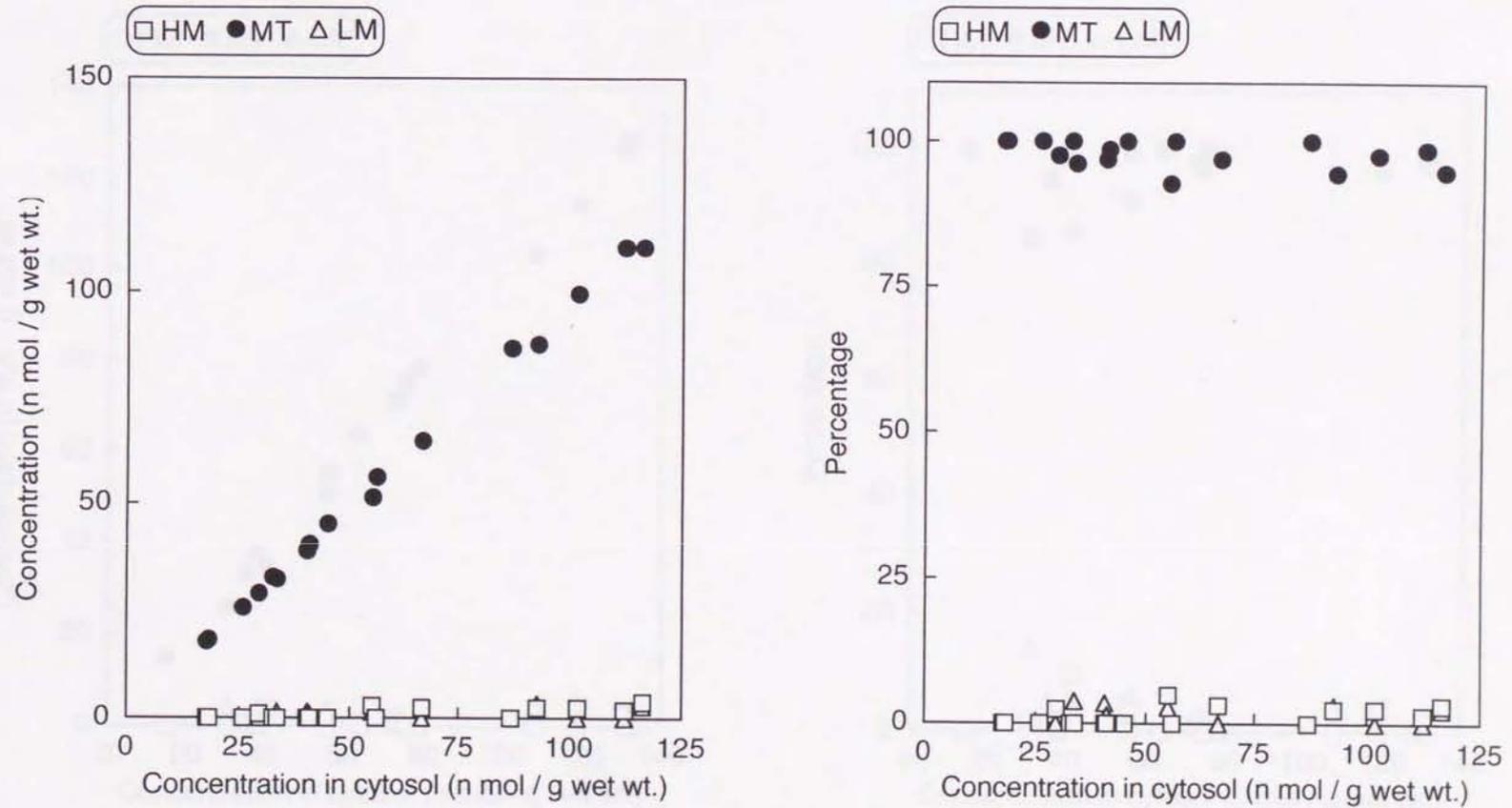


Fig. 6-3-9
Cd accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of green turtle hepatocytosol

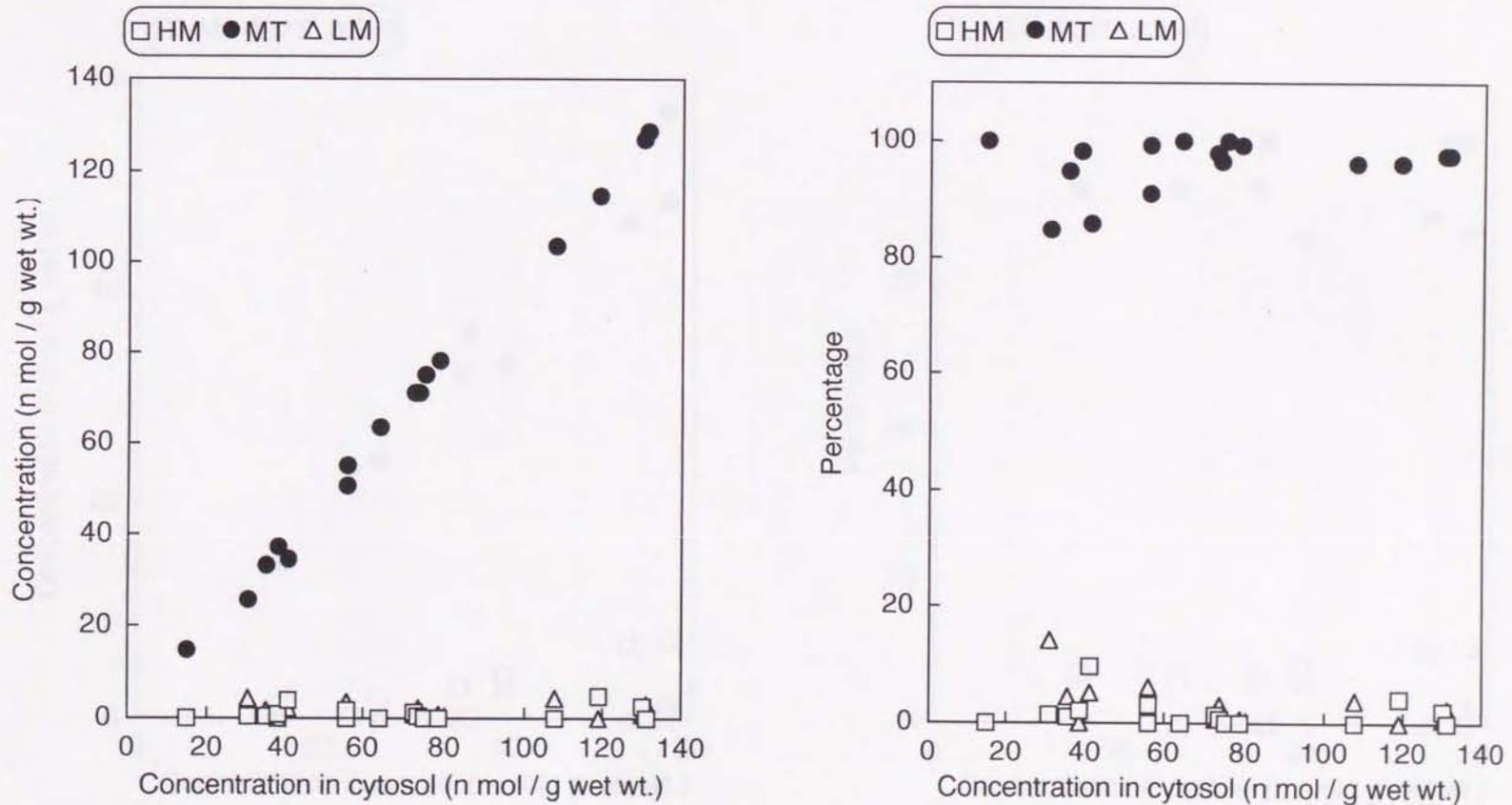


Fig. 6-3-10
Cd accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of northern fur seal hepatocytosol

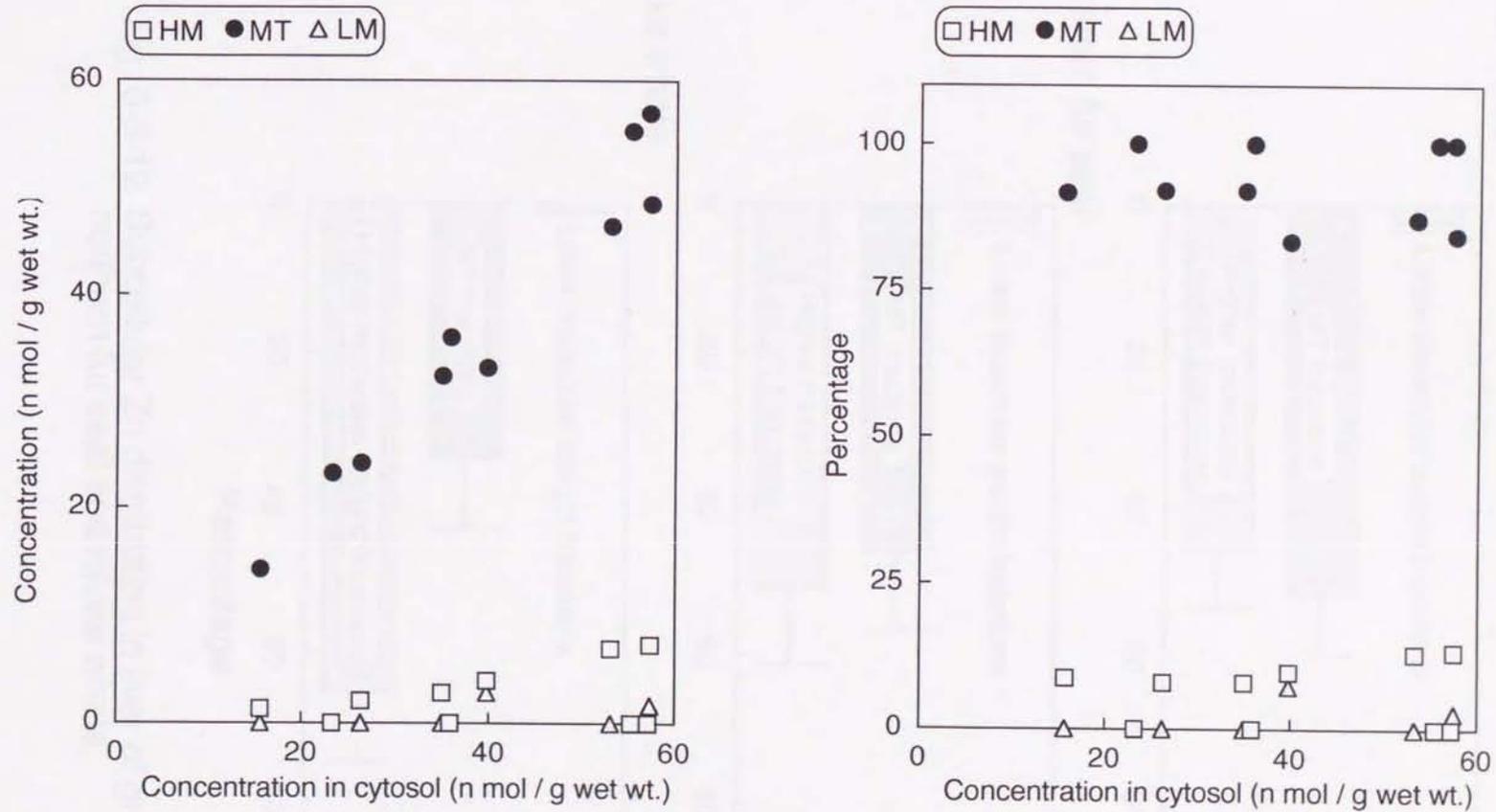
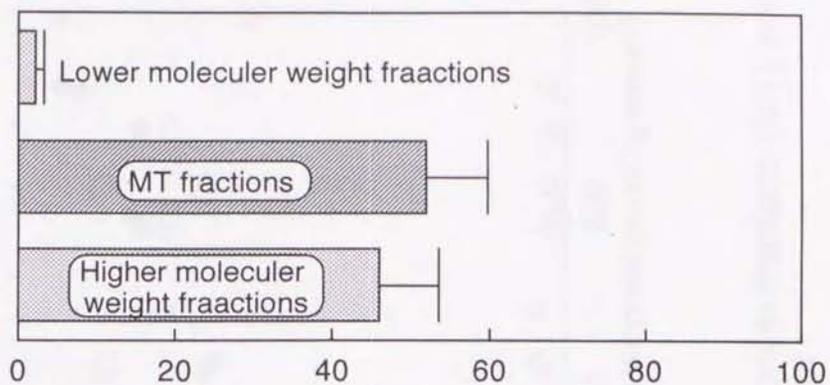


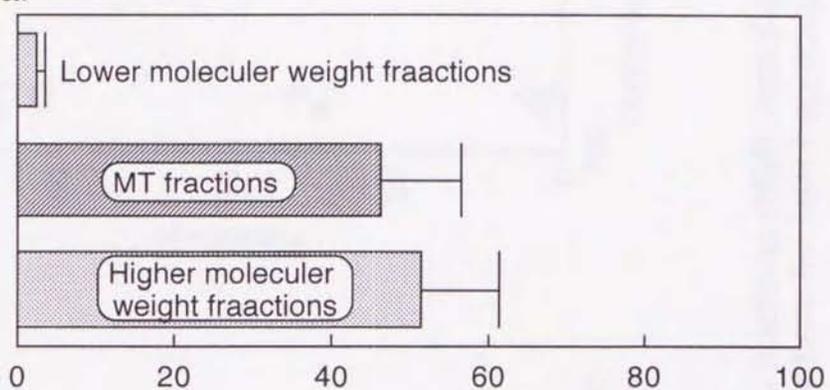
Fig. 6-3-11

Cd accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of Minke whale hepatocytosol

Green turtle



Northern fur seal



Minke whale

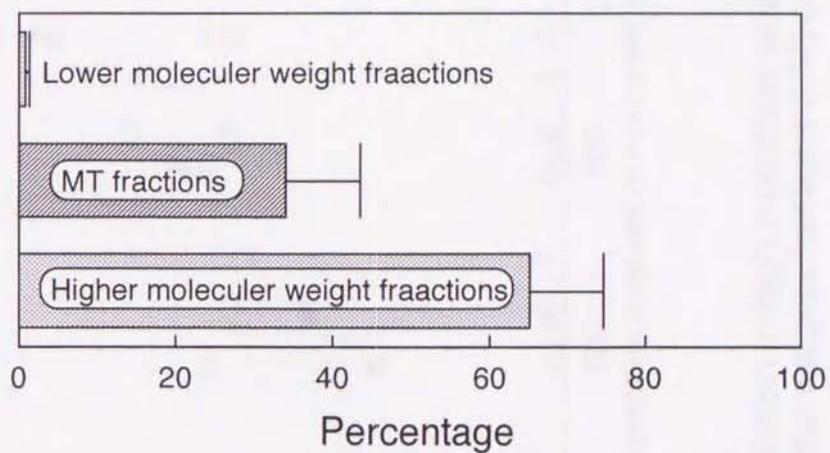


Fig. 6-3-12 Subcellular Zn distribution in liver of green turtle, northern fur seal and minke whale

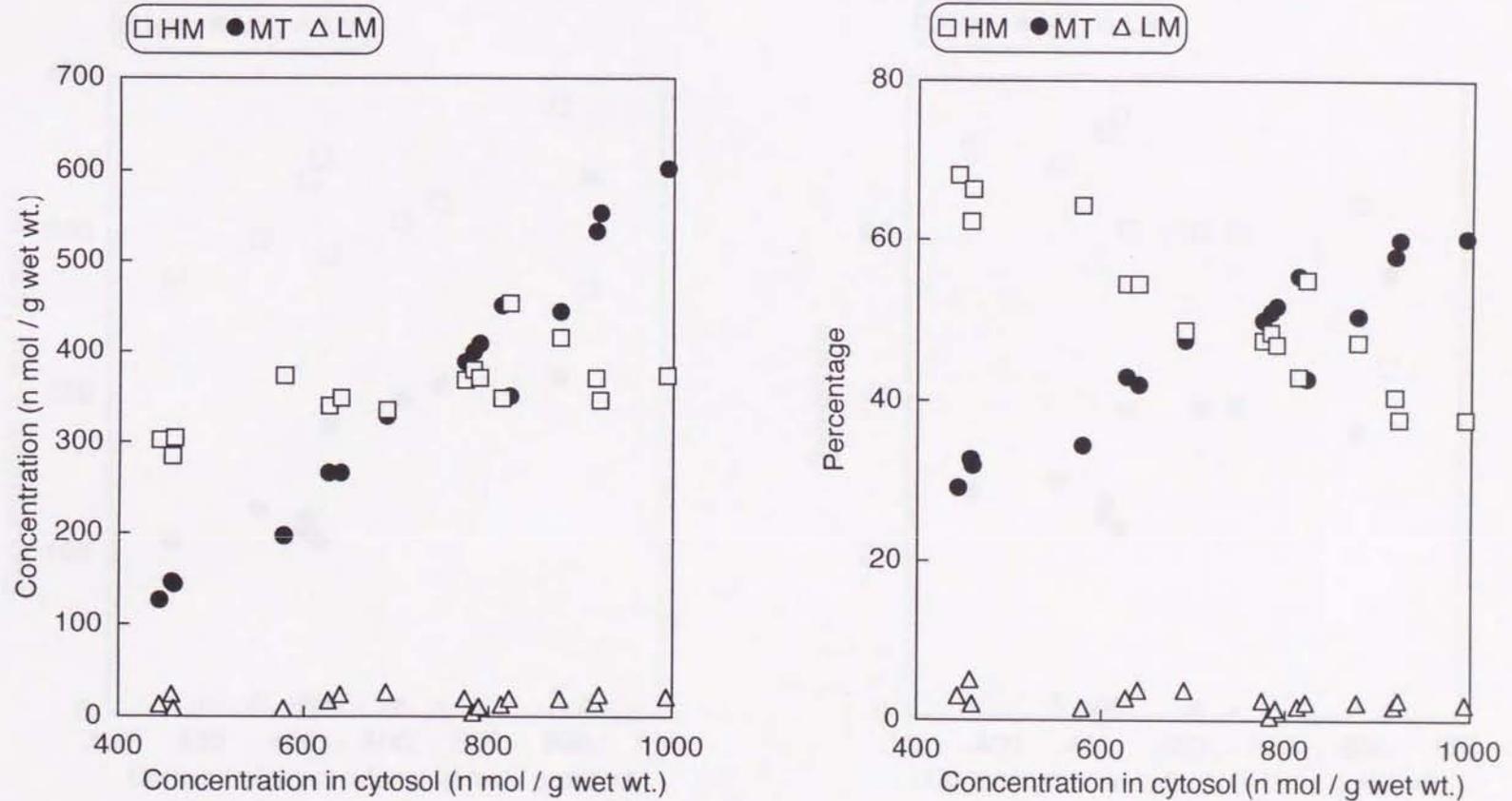


Fig. 6-3-13
Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of northern fur seal hepatocytosol

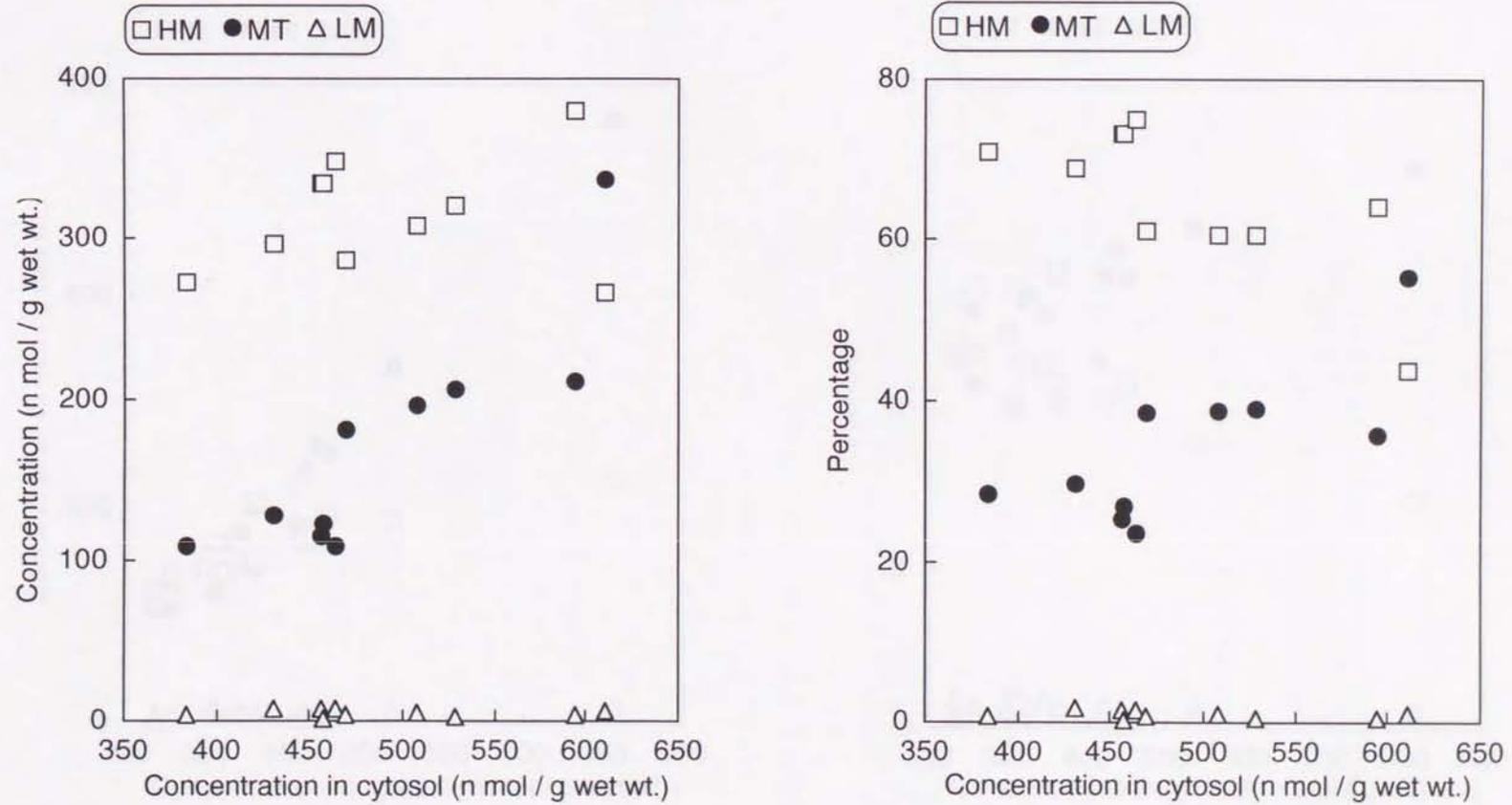


Fig. 6-3-14

Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of Minke whale hepatocytosol

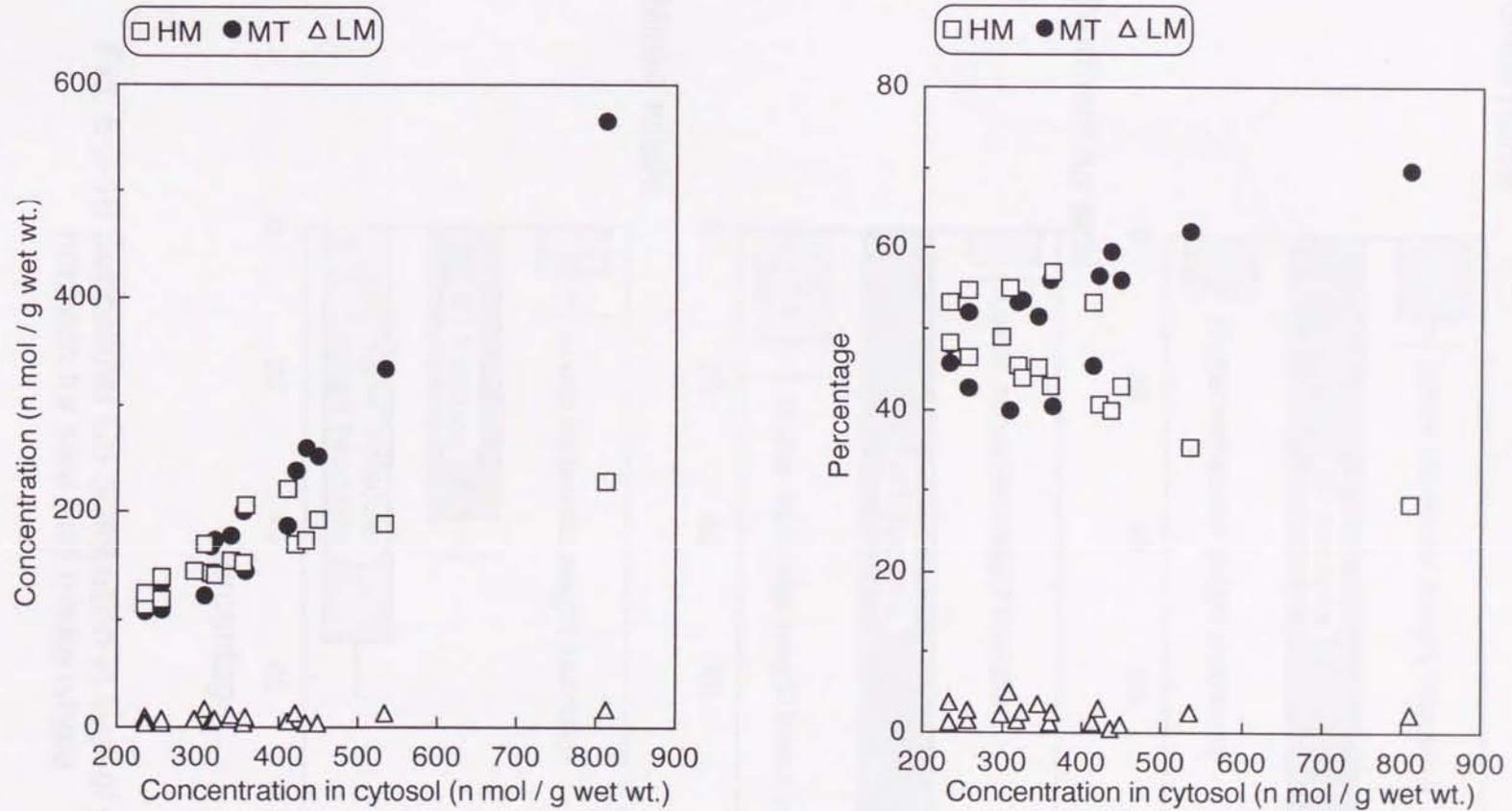
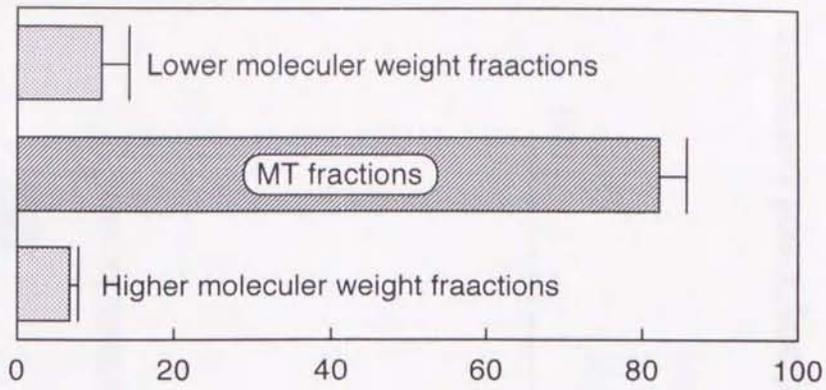
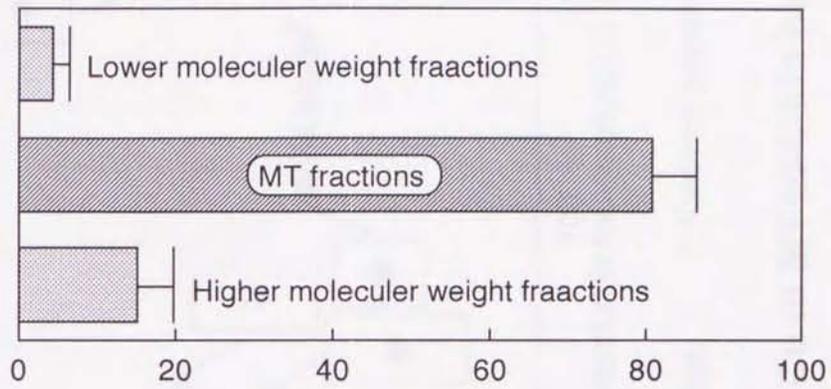


Fig. 6-3-15
Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of green turtle hepatocytosol

Green turtle



Northern fur seal



Minke whale

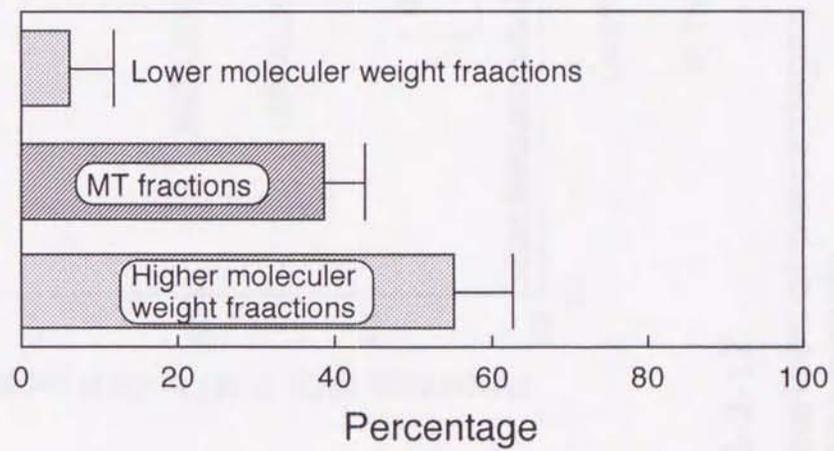
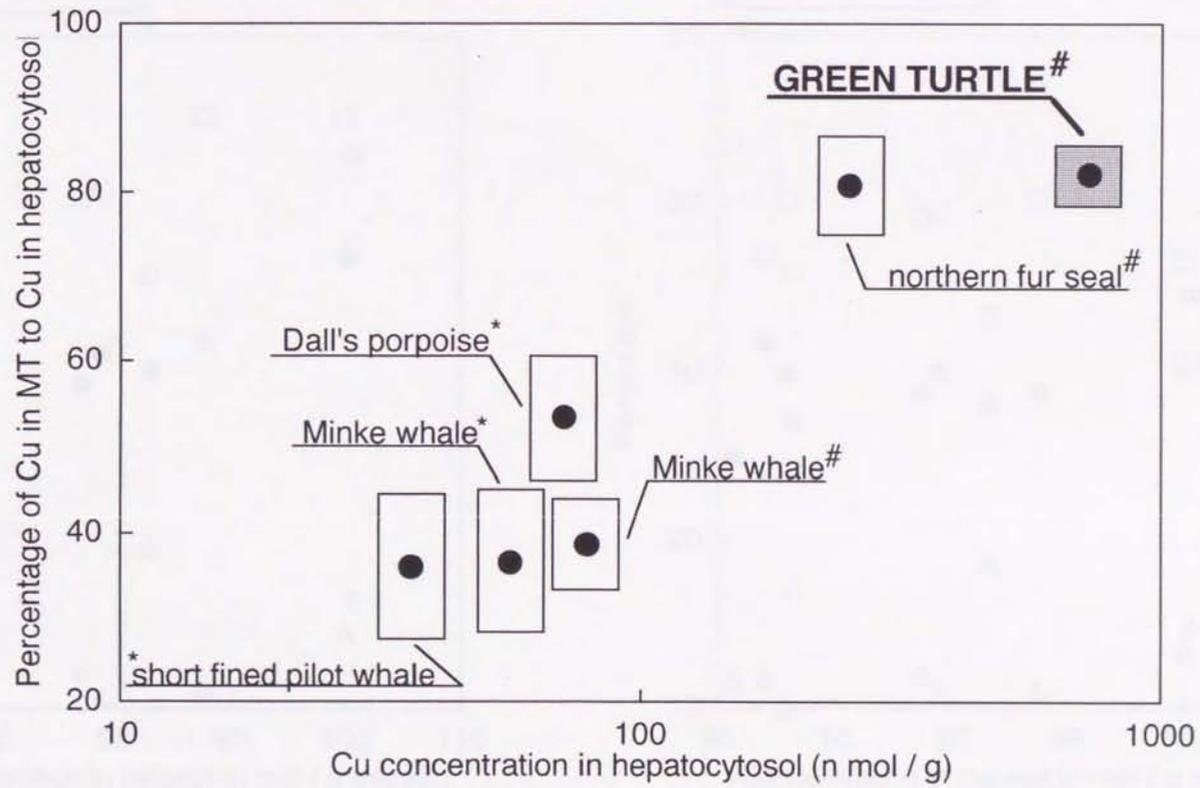


Fig. 6-3-16 Subcellular Cu distribution in liver of green turtle, northern fur seal and minke whale



#; This study *; Kashima (unpublished)

Fig. 6-3-17
Comparison of percentages of Cu in MT to Cu in hepatocytosol between marine animals

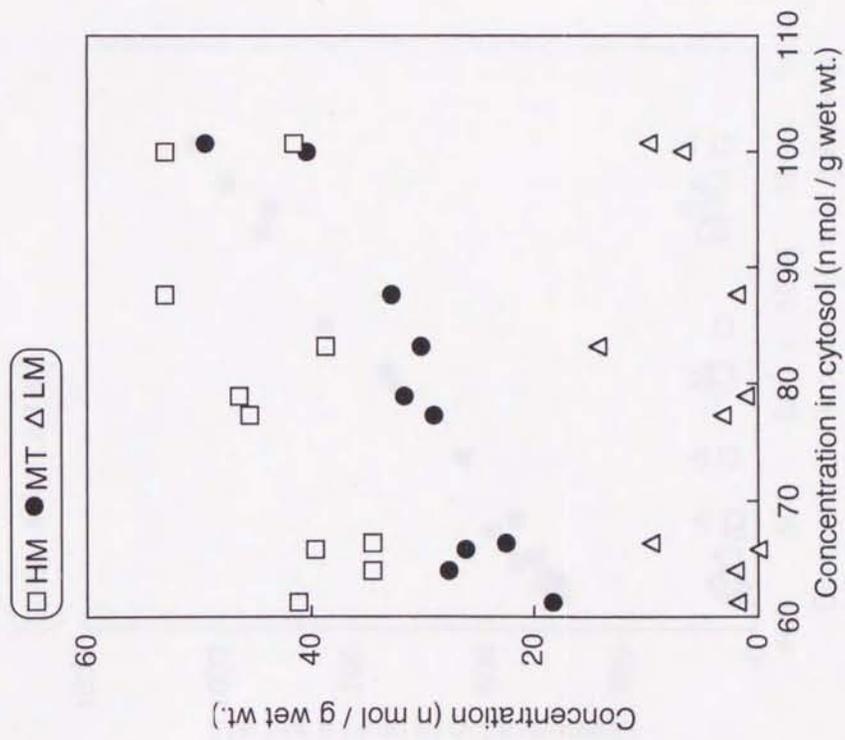
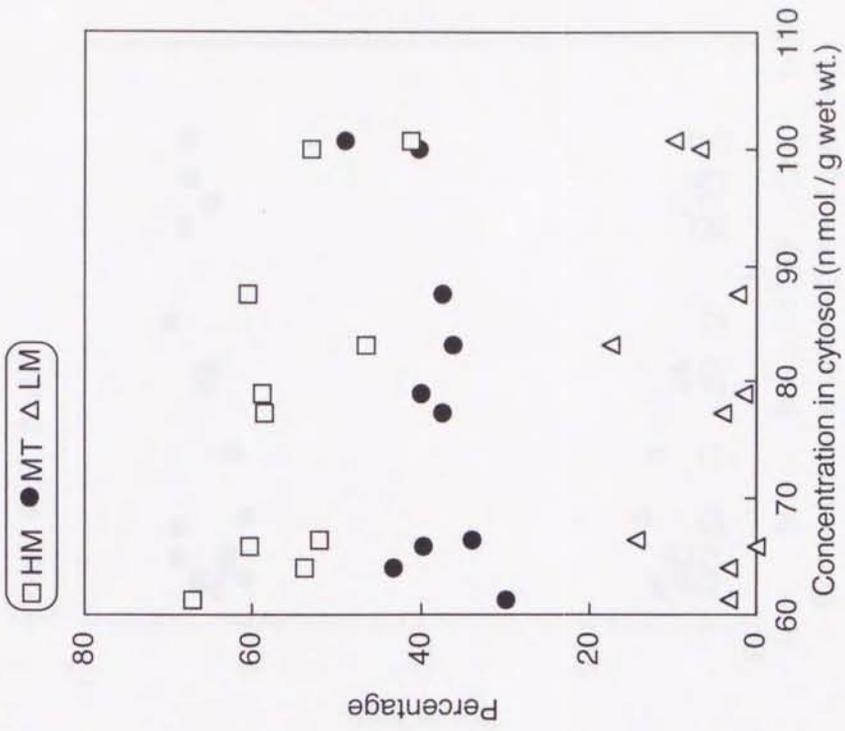


Fig. 6-3-18
 Cu accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of Minke whale hepatocytosol

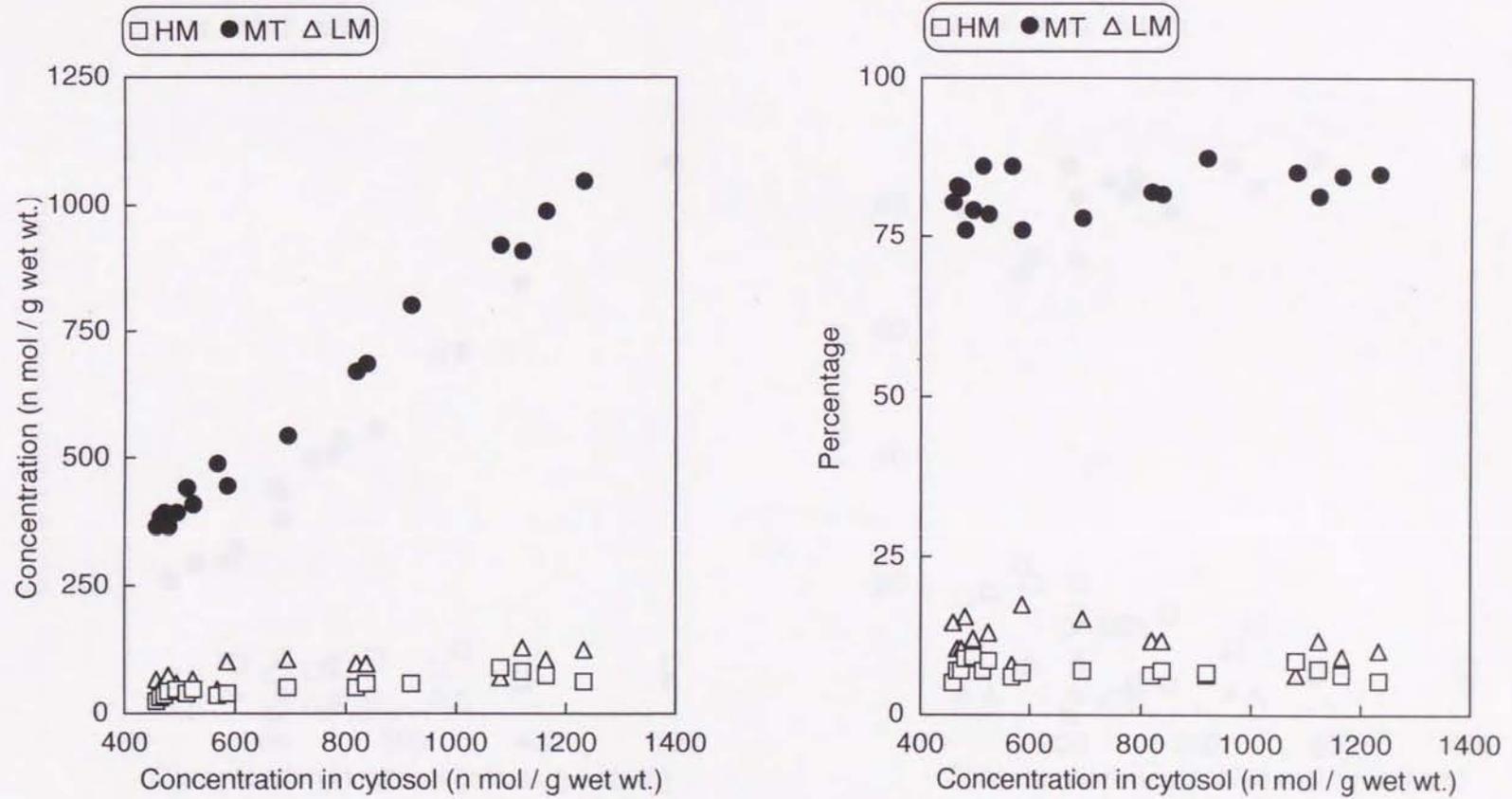


Fig. 6-3-19
Cu accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of green turtle hepatocytosol

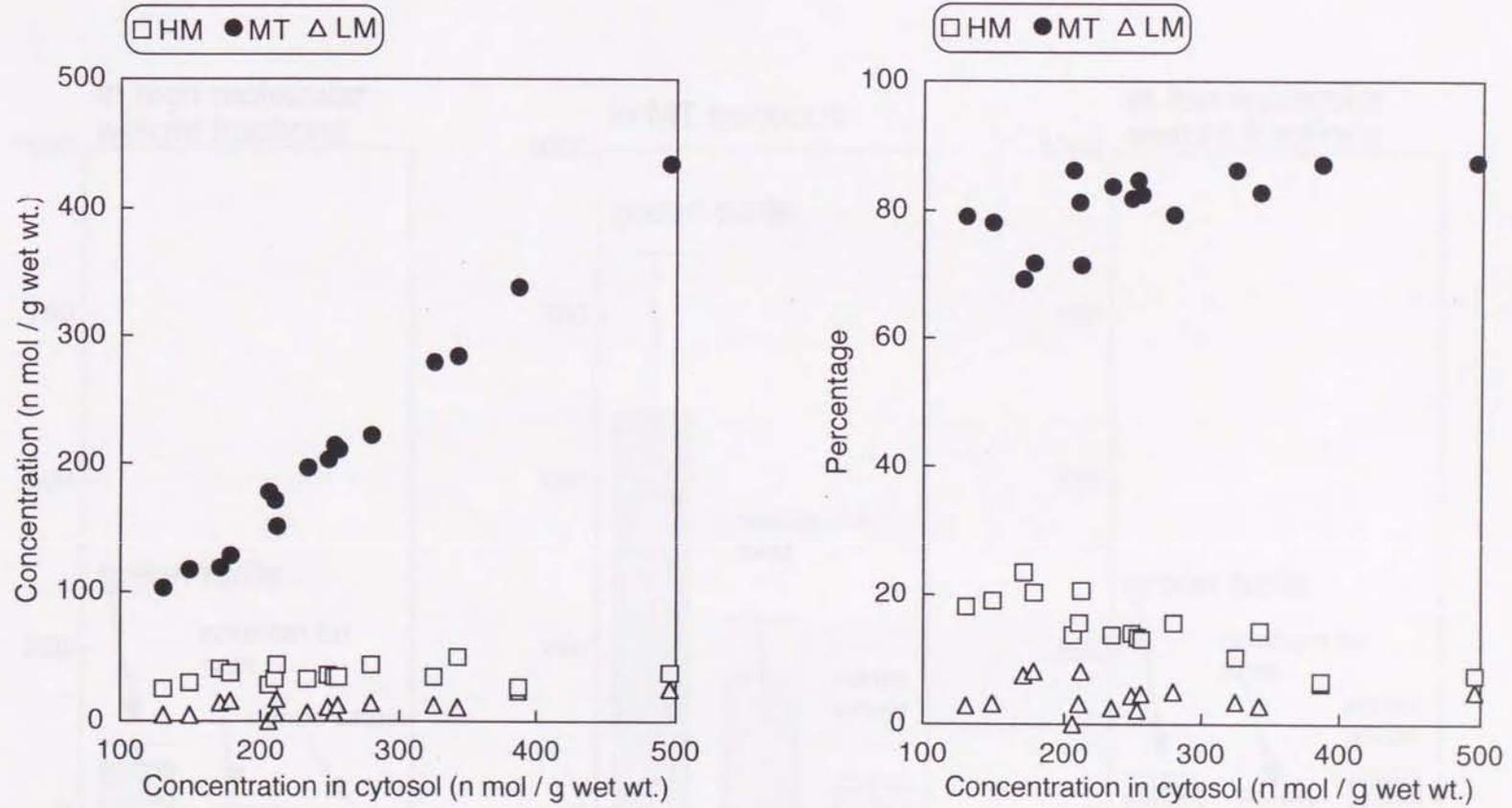


Fig. 6-3-20

Cu accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) of northern fur seal hepatocytosol

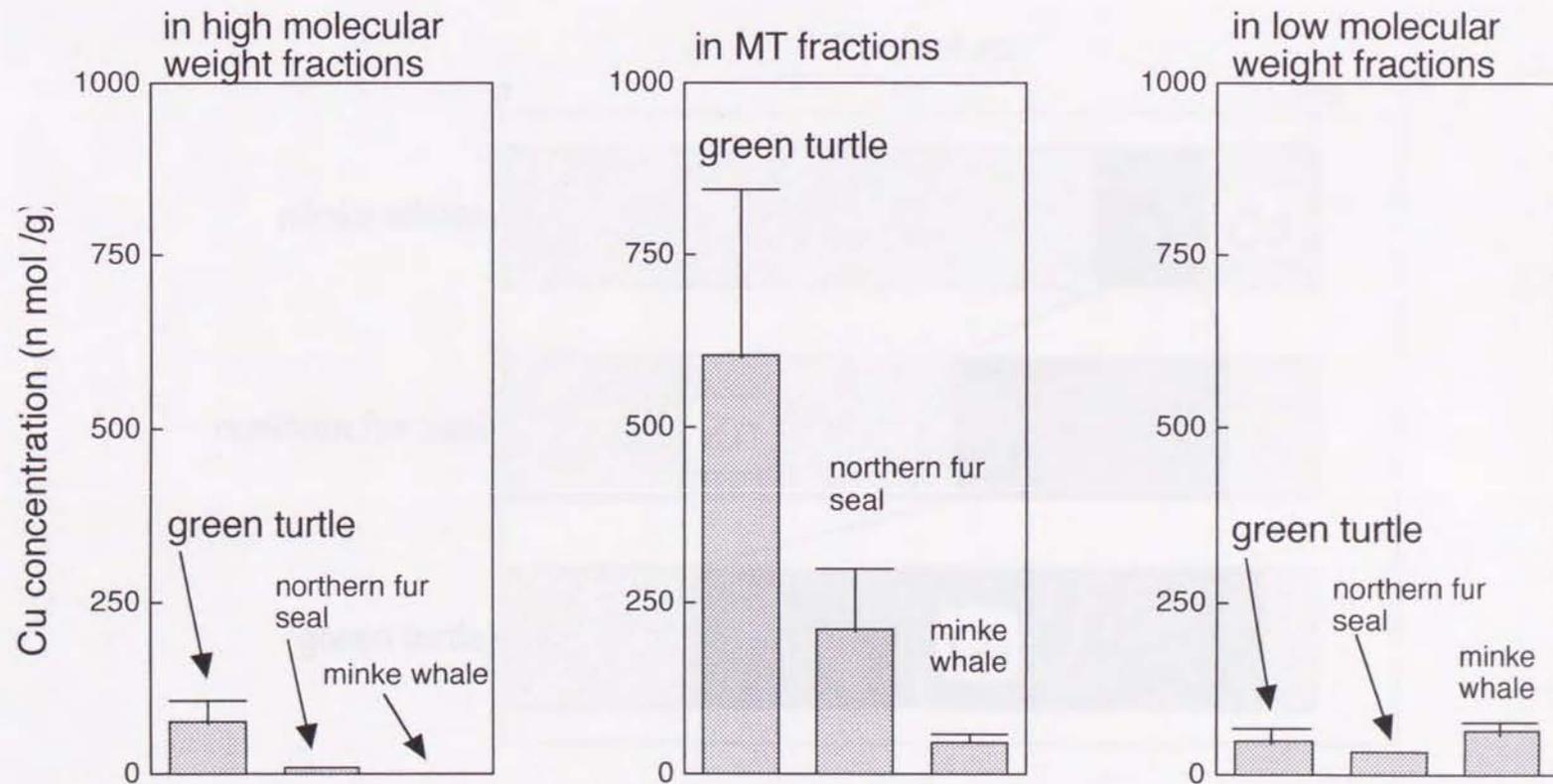


Fig. 6-3-21.

Cu concentration in high molecular weight, metallothionein and low molecular weight fractions of green turtle, northern fur seal and minke whale

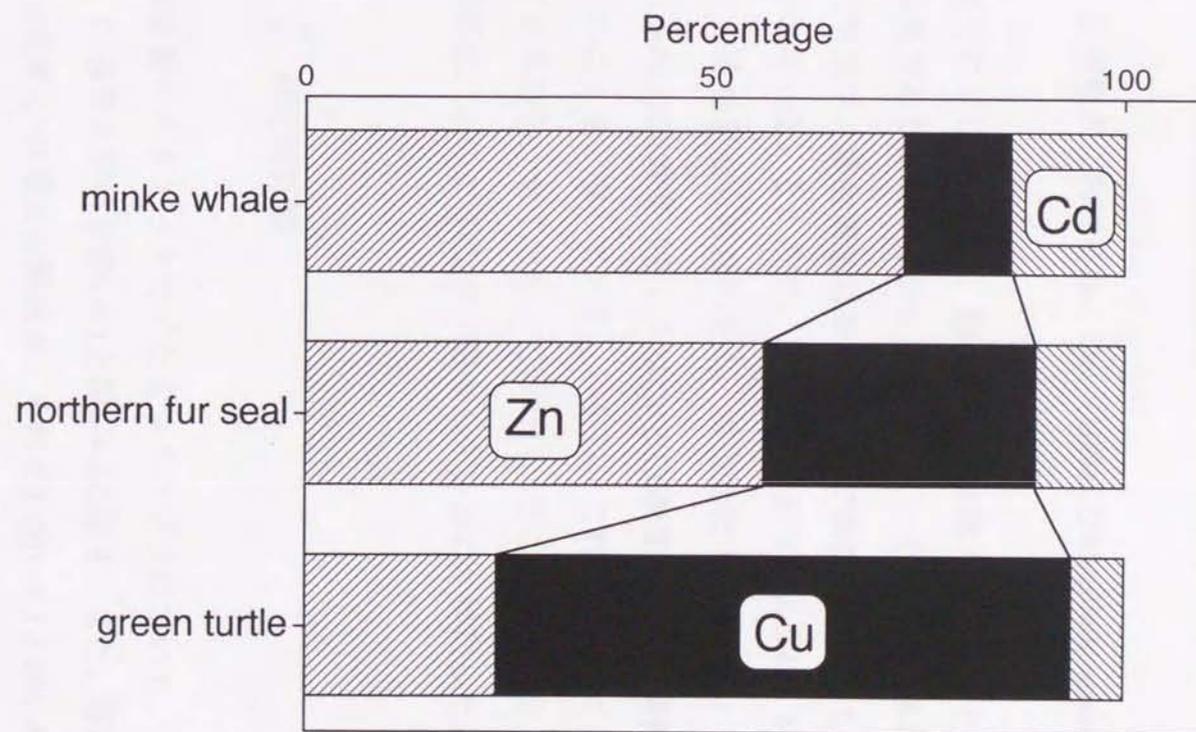


Fig. 6-3-22.

Comparison of metal composition in hepatic metallothionein fraction between minke whale, northern fur seal and green turtle

これまでの結果から、Cu濃度が高い種ほど細胞質中でMTに結合する割合が高く、また、MTの金属構成もCuの占める割合が高いことが明らかとなった。

6-4. 肝細胞内におけるZn、Cu、CdおよびMetallothioneinの相互関係

前節までに示したように、細胞内の重金属の蓄積部位として、細胞質画分が重要であることが分かった。さらに、その中に含まれているMTと結合した形態が、重金属蓄積を考える上で無視できないものであることも明らかとなった。ところで、これまでに述べたように、MTはZn、Cu、Cdいずれの重金属とも結合出来る。海生動物の研究では、肝臓や腎臓で認められるZnとCd濃度（もしくはCuとCd濃度）の相互関係に、MTが関与していることを示唆している。しかし、これらの関係にどの程度MTが関与しているのか、全く分かっていない。そこで本節では、Zn、Cu、Cdの相互関係に、どのようにMTが関与しているのか検討した。

6-4-1. 海生哺乳類

海生哺乳類のキタオットセイとミンククジラについて、肝細胞質中のZn、Cu、Cd濃度の関係を図6-4-1と図6-4-2に示す。また、肝細胞質中のZn、Cu、Cd濃度とMT濃度の関係を、それぞれ図6-4-3と図6-4-4に示す。金属間の相互関係では、キタオットセイおよびミンククジラともにZnとCdの間のみ、有意な正の相関関係が認められた（ともにSpearmanの順位相関検定で $p < 0.01$ ）。また、金属とMT濃度の関係では、ZnとMT（キタオットセイとミンククジラともに $p < 0.01$ ）、CdとMT（キタオットセイ

で $p < 0.01$ 、ミンククジラで $p < 0.05$)の間に有意な正の関係が認められた。これらの事実は、ZnとCdの相互関係に明らかにMTが関与していることを示している。そして、MTの濃度増加の主な原因は、細胞内へのCdの取り込みによることが明らかとなった。一方Cuは、Zn、Cd、MT濃度のいずれとも、有意な相関関係を示さなかった。しかし図6-3-18と図6-3-20で、いずれの種においてもCuの結合しているMTの存在が明らかで、このことは、おそらく生理的に必要とされるCuが、MTと結合していることを示している。

次に、Cdの蓄積にともなう細胞質中のZnの変動について調べた。図6-4-5にキタオットセイのCd蓄積にともなう、細胞質中のZn分布の変動を示す。ここで明らかのように、細胞質中のZn濃度は、Cdの増加にともない、MT画分のみ有意に増加し、HM画分とLM画分の変動はほとんど認められなかった。Znの細胞質における分布(%)は、濃度の変動にともない、MT画分に存在する割合が相対的に増加し、逆にHM画分の存在割合が減少した。同様の傾向は、有意ではないものの、ミンククジラでも認められた(図6-4-6)。これらのことは、Cdの蓄積が、単に細胞中のZn濃度を増加させるだけでなく、細胞内のZn分布までも変化させることを示している。

Cdの増加に対するMTの増加は、以下の一次式で近似される。

キタオットセイ；

$$MT=0.779 \times Cd+35.0 \quad (\text{ただし、単位はn mol/g})$$

ミンククジラ；

$$MT=0.664 \times Cd+10.6 \quad (\text{ただし、単位はn mol/g})$$

これらの近似式より、キタオットセイおよびミンククジラの肝細胞質では、Cdが1グラム原子取り込まれるごとに、約1mol(キタオットセイで0.8mol、ミンククジラで0.7mol)のMTが誘導合成されていると見積もられた。また、MT画分中Cd濃度とMT濃度を比較すると(図6-4-7、図6-4-8

)、ほとんどの検体でMT濃度が高い。このことは、Cdが結合していないZn-MTもしくはZn,Cu-MTが存在していることを示唆している。近似式でCdが1グラム原子取り込まれても、MTが1mol増加しなかったのは、おそらく、取り込まれたCdのうちの20%から30%程度が、細胞質中のZn-MTもしくはZnCu-MTのZnと置換しているためと思われる。

キタオットセイにおける、MT濃度の増加と、MT画分中の金属の存在割合(%)の変化を図6-4-9に示す。Zn、Cu、Cdともに有意な傾向は見られなかったが、MT濃度の増加にともない、ZnとCdの占める割合が増加し、Cuの占める割合が減少した。このことは、Cdの取り込みによりMTが誘導され、Zn含量の高いCd,Zn-MTが合成された結果、Zn,Cu-MTの割合が相対的に減少し、MT画分に占めるCuの割合が減少したためと思われる。ミンククジラに関しては、このような明瞭な結果は得られなかった。このことはおそらく、ミンククジラのMT中Zn割合が非常に高かったためと思われる。

ところで、キタオットセイとミンククジラはCu蓄積に関しては種間差を示したが、Zn、Cu、Cd代謝に関わるMTの働きには、大きな差が認められなかった。鯨類と鰭脚類で必須金属のCu蓄積に種間差が見られる原因について、本研究では明らかに出来なかったが、Zn、Cu、Cd代謝に関わるMTの働きに種間差が認められなかったことから、少なくともキタオットセイに関しては、体内における生理的なCu欲求量が鯨類に比べ高いため、肝臓中にCu,Zn-MTとして蓄積しているものと推察された。

6-4-2. アオウミガメ

以下に述べるアオウミガメの結果は、先に示した海生哺乳類(ミンク

クジラとキタオットセイ)の結果と全く異なる。アオウミガメ肝細胞質中のZn、Cu、Cd濃度の相互関係を図6-4-10に示す。また図6-4-11に、肝細胞質中のZn、Cu、Cd濃度とMT濃度との関係を示す。金属間の相互関係は、Zn/Cd、Cu/Cd、Zn/Cuのいずれも $p < 0.05$ で有意な正の相関が認められた。とくに、海生哺乳類には見られなかったZn/Cu ($p < 0.001$)の関係と、Cu/Cd ($p < 0.005$)の関係が顕著であった。金属濃度とMT濃度との関係は、Cu濃度とMT濃度との間のみ有意な正の相関関係が認められた。また、MT画分における金属相互の関係をみると、ZnとCuの間のみ有意 ($p < 0.01$)な関係が認められた(図6-4-12)。

アオウミガメ肝臓中に存在するMTの濃度は、Cu濃度と最も強い正の相関関係を示した(図6-4-11)。また、MT画分中のZn濃度は、同画分中のCu濃度と有意な正の相関関係をしてしている(図6-4-12)。このことは、Cuの刺激によりMTが誘導合成され、合成されたMTに、新たにZnが結合していることを示唆している。これまでの結果は、アオウミガメ肝臓におけるMTの多くが、Cuによって誘導合成されたMTであることを示している。他の海生動物の研究において、肝臓のMTがCuによって誘導されるという報告はなく、アオウミガメ固有な現象といえよう。

海生哺乳類や海鳥類の場合、MT合成を誘導する金属ストレスの主体はCd、もしくはHgであると考えられている(Thoyama, *et al.*, 1986; 鹿島, 1988, 1991; 山本, 1988; Elliot, *et al.*, 1992)。このことは、先に検討したミンククジラとキタオットセイの場合にも当てはまる。アオウミガメの肝臓で認められたMTの誘導様式は、一般的な海生動物で考えられているMT合成の様式とは異なる。Wlostowski (1992)は、ヨーロッパハチネズミを用いた研究で、肝臓中でCuと結合し、Cu代謝の役割を担っているMTは、まずCdによって誘導合成され、その後細胞内でCuとCdが置換したものであると報告している。アオウミガメにおいても、CdによってMTが

合成、多量にあるCuによってMT中のCdが置換され、Cu含量の高いMTが生成されるた考えることもできる。しかし、そうであるならば、MTに占めるCdの割合が相対的に高くなるはずであるが、本研究のでは1分子のMTに1原子以上のCdが結合しているという結果は得られていない（図6-3-22, 6-4-13）。また、遊離のCuを用いても、MT結合しているCdを置換することは難しく（2章4節）、この考えは棄却される。したがって、先にも述べたようにアオウミガメ肝臓においては、Cu蓄積がMTの誘導合成の主たる要因であると結論される。

ところで、CdもMT画分に含まれており、Zn濃度とCd濃度の間に正の相関関係があること、Cd濃度の増加にともないMT濃度も増加する傾向にあることから、おそらくCdでもMTが誘導合成されていると考えられる。しかし、Cuによって誘導合成されたMT量と比較すると、その存在量は少ない。

次に、Cu蓄積によるZnの細胞内分布の変動について調べた。図6-4-14に、細胞質中のCu濃度とHM、MT、LM画分中のZn濃度、および各画分の分布割合を示す。海生哺乳類でみられるZnとCdの関係ほど明瞭ではないが、アオウミガメ肝臓では、Cu濃度の増加にともないMT画分のZn濃度が有意（ $p < 0.001$ ）に増加した。また、HM画分のZn濃度も増加の傾向を示したが（ $p < 0.05$ ）、その増加率は低い。Cu蓄積にともなうMT画分のZn濃度の増加は、Znの細胞内分布を変化させ、MT画分におけるZnの存在割合を相対的に増加し（ $p < 0.005$ ）、逆に、HM画分のZnの存在割合を減少させた（ $p < 0.005$ ）。これらのことは、Cuの蓄積が、細胞中のZn濃度を増加させるだけでなく、細胞内のZn分布も変化させることを示している。このような関係は、海生哺乳類でみられたCd蓄積に対するZnの細胞内分布の変化と類似している。アオウミガメ肝臓でも、Cd濃度の増加にともない、MT画分のZn濃度およびその存在割合は増加傾向を示したが（

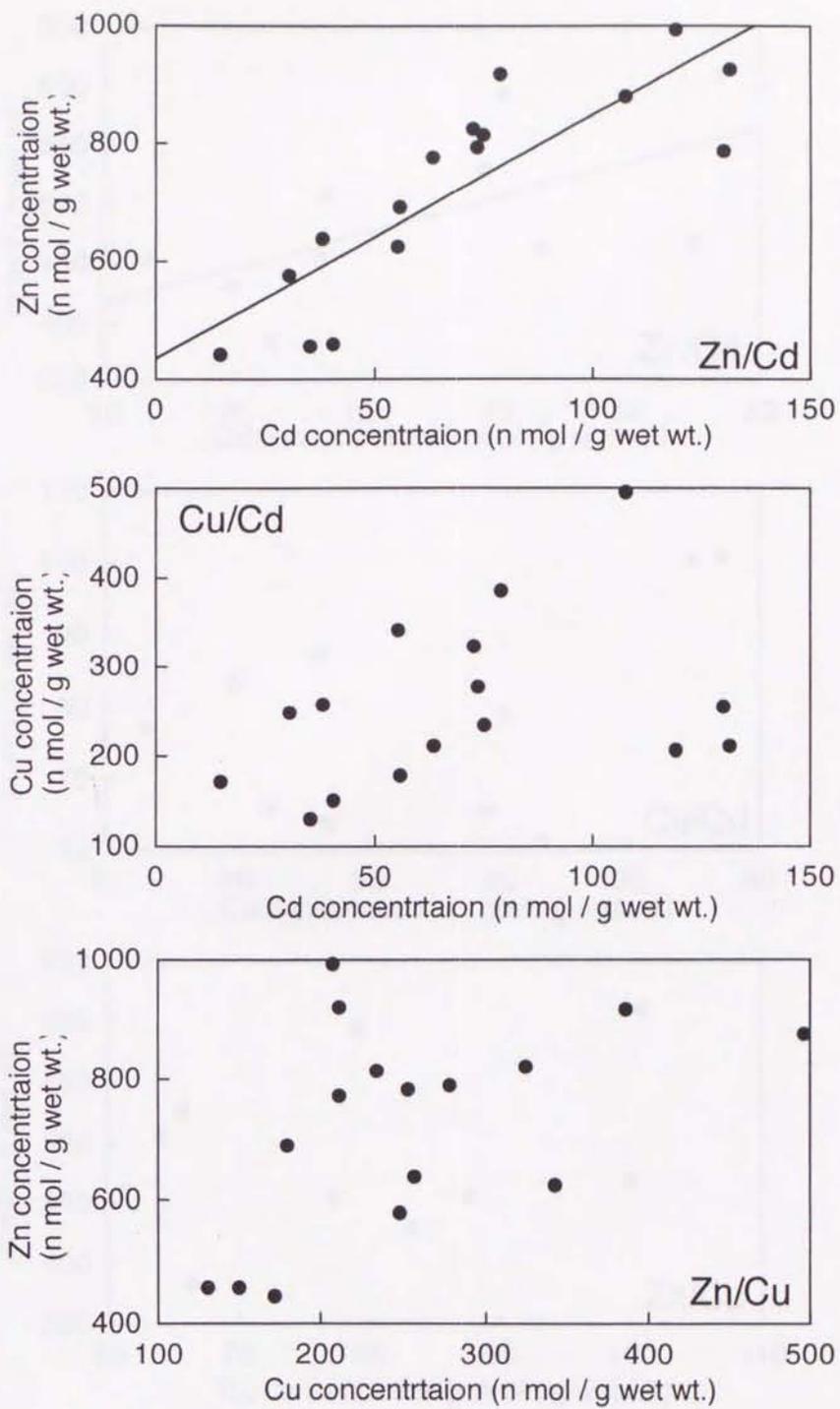


Fig. 6-4-1
 Relationship of Zn, Cu and Cd concentration in hepatocytosol
 of northern fur seal

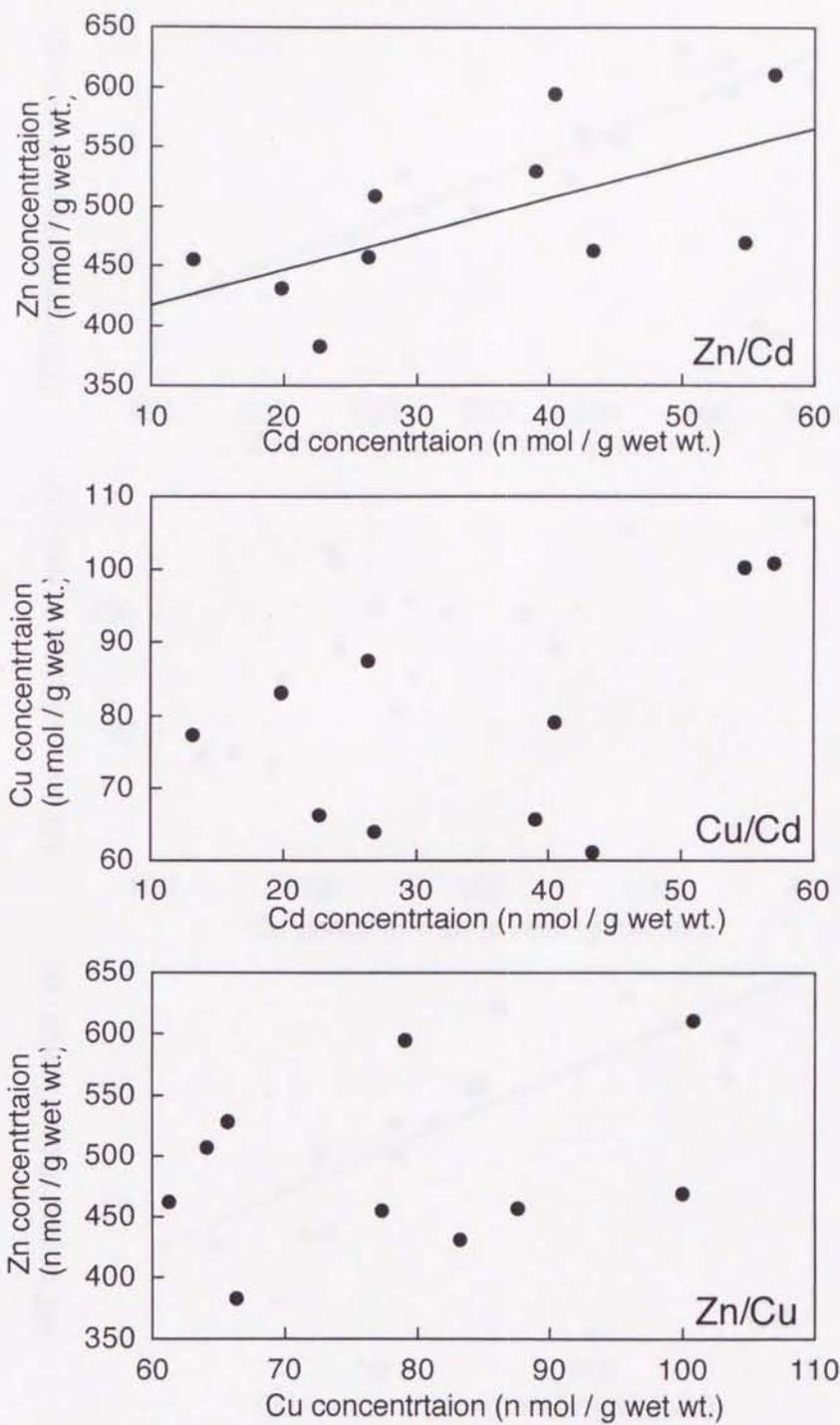


Fig. 6-4-2
 Relationship of Zn, Cu and Cd concentration in hepatocytosol
 of minke whale

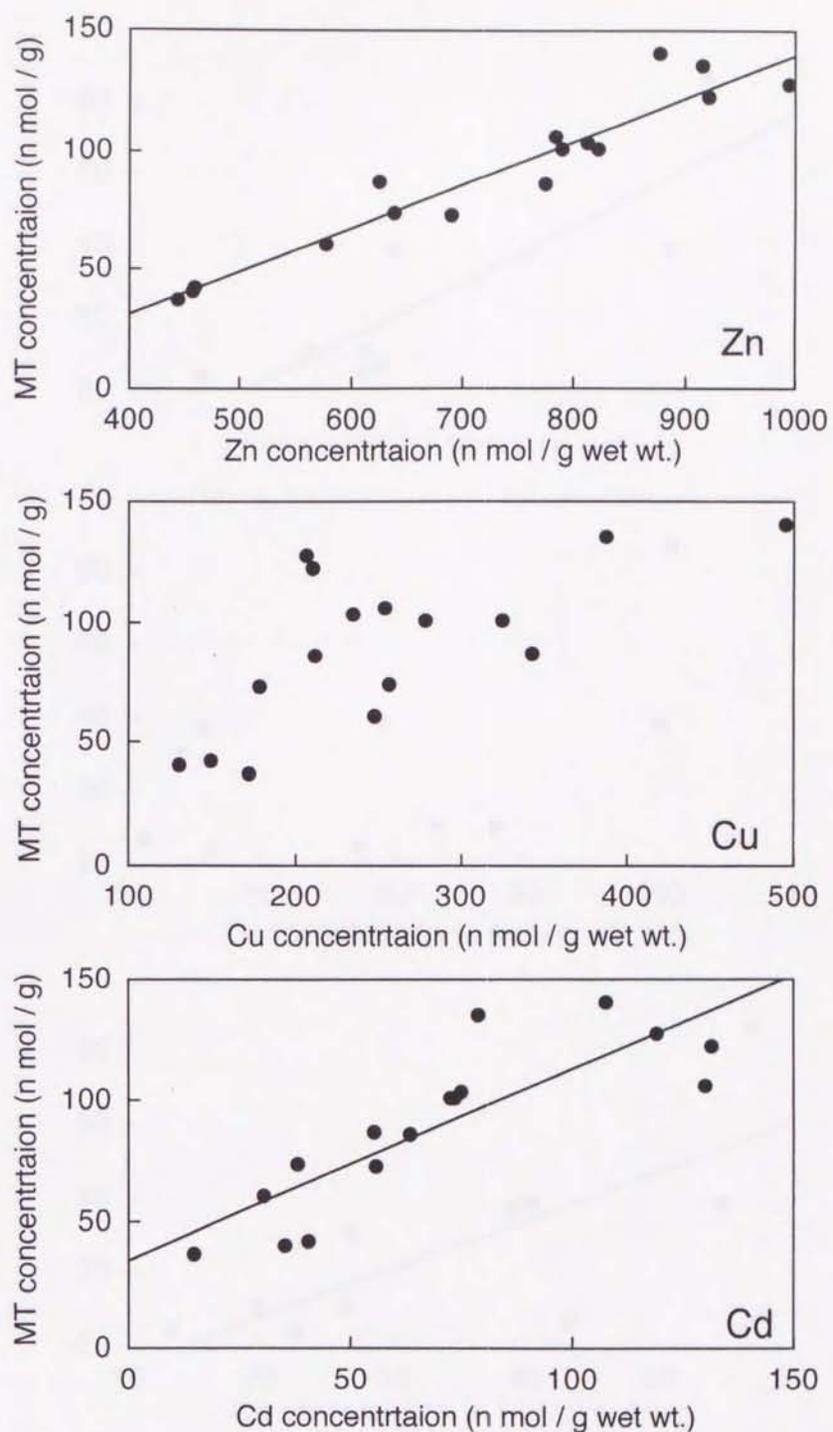


Fig. 6-4-3
 Relationship between metallothionein (MT) concentration and metal concentration in hepatocytosol of northern fur seal

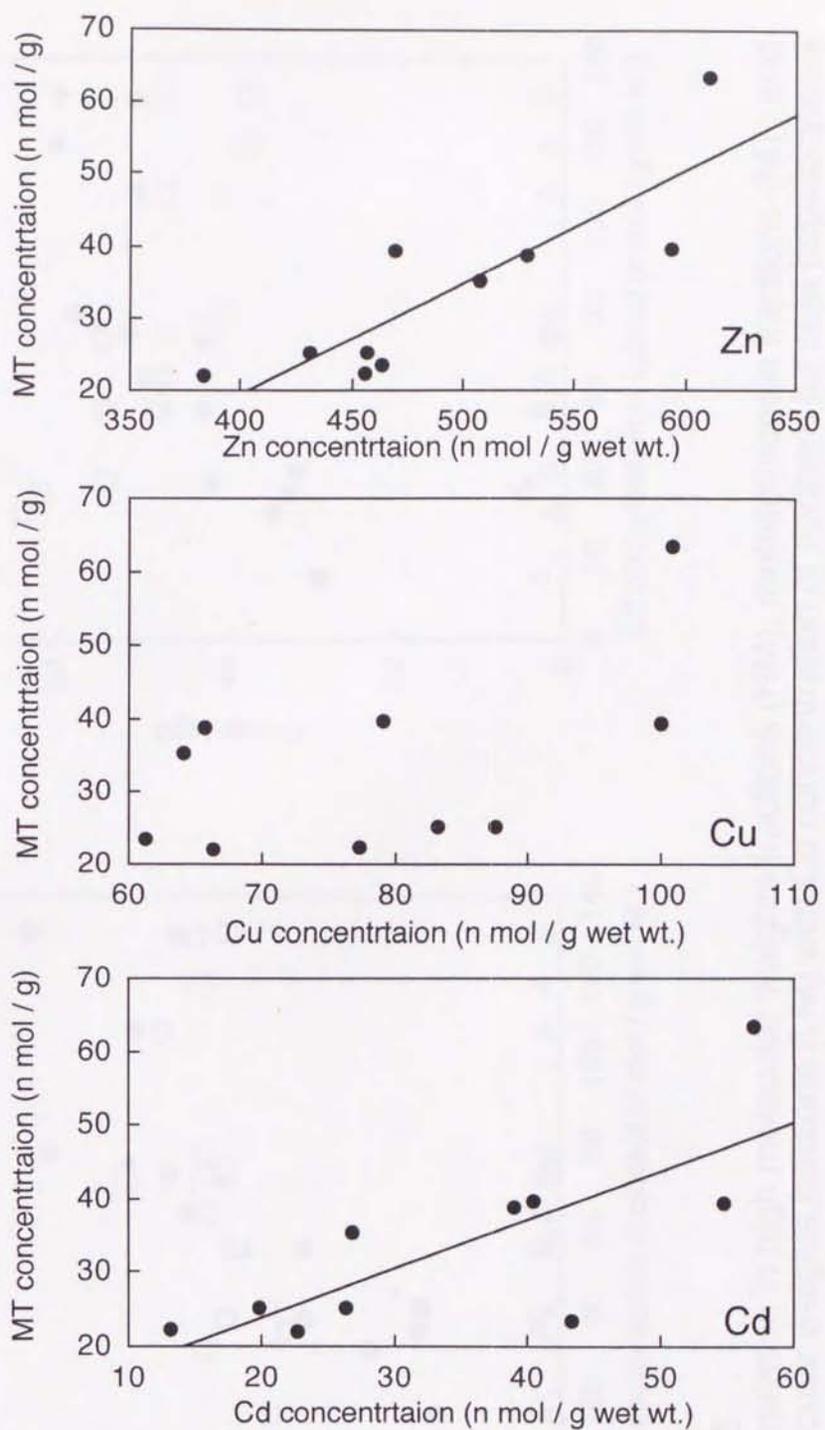


Fig. 6-4-4
 Relationship between metallothionein (MT) concentration and metal concentration in hepatocytosol of minke whale

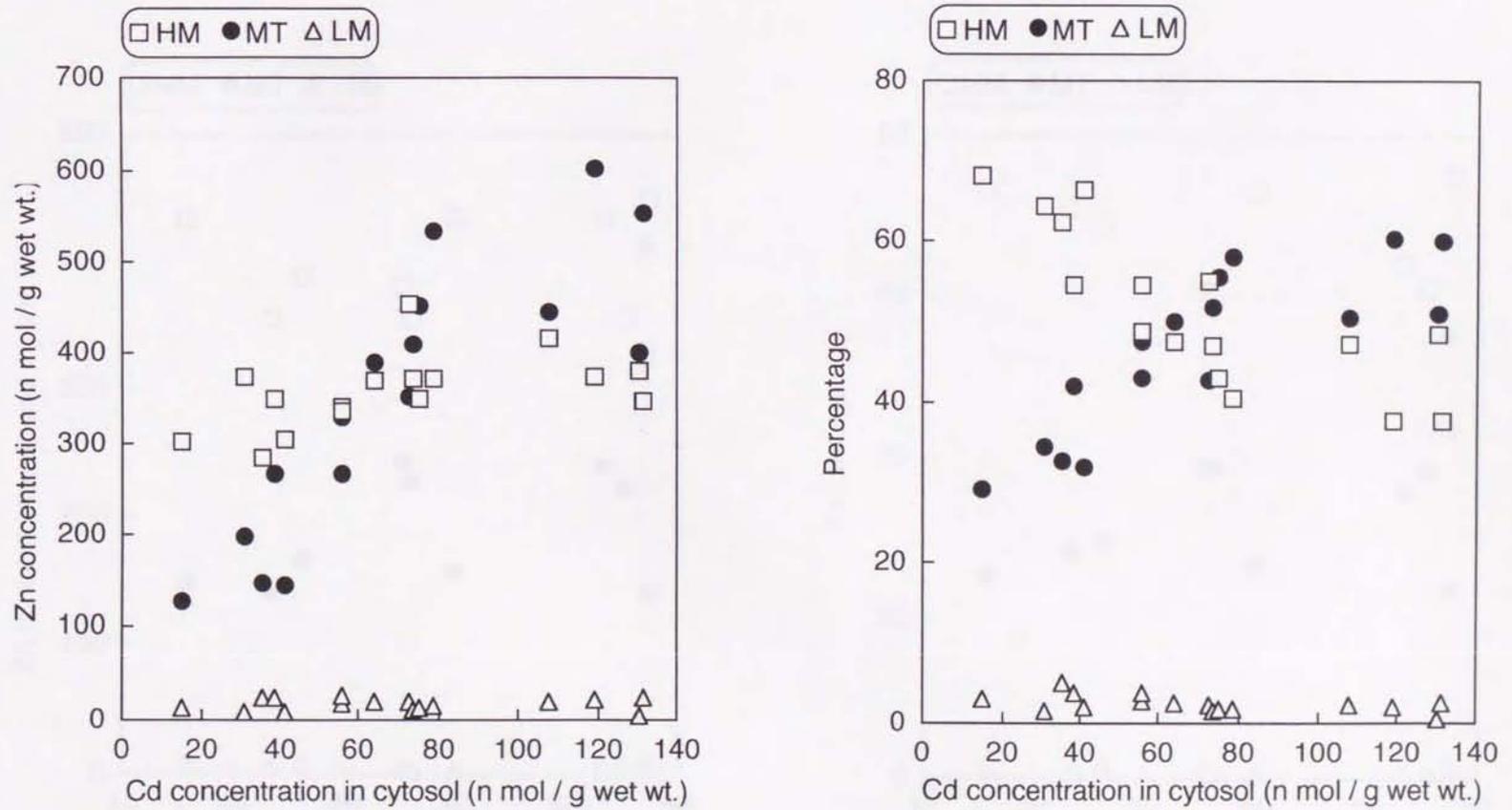


Fig. 6-4-5
 Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) with Cd concentration of northern fur seal hepatocytosol

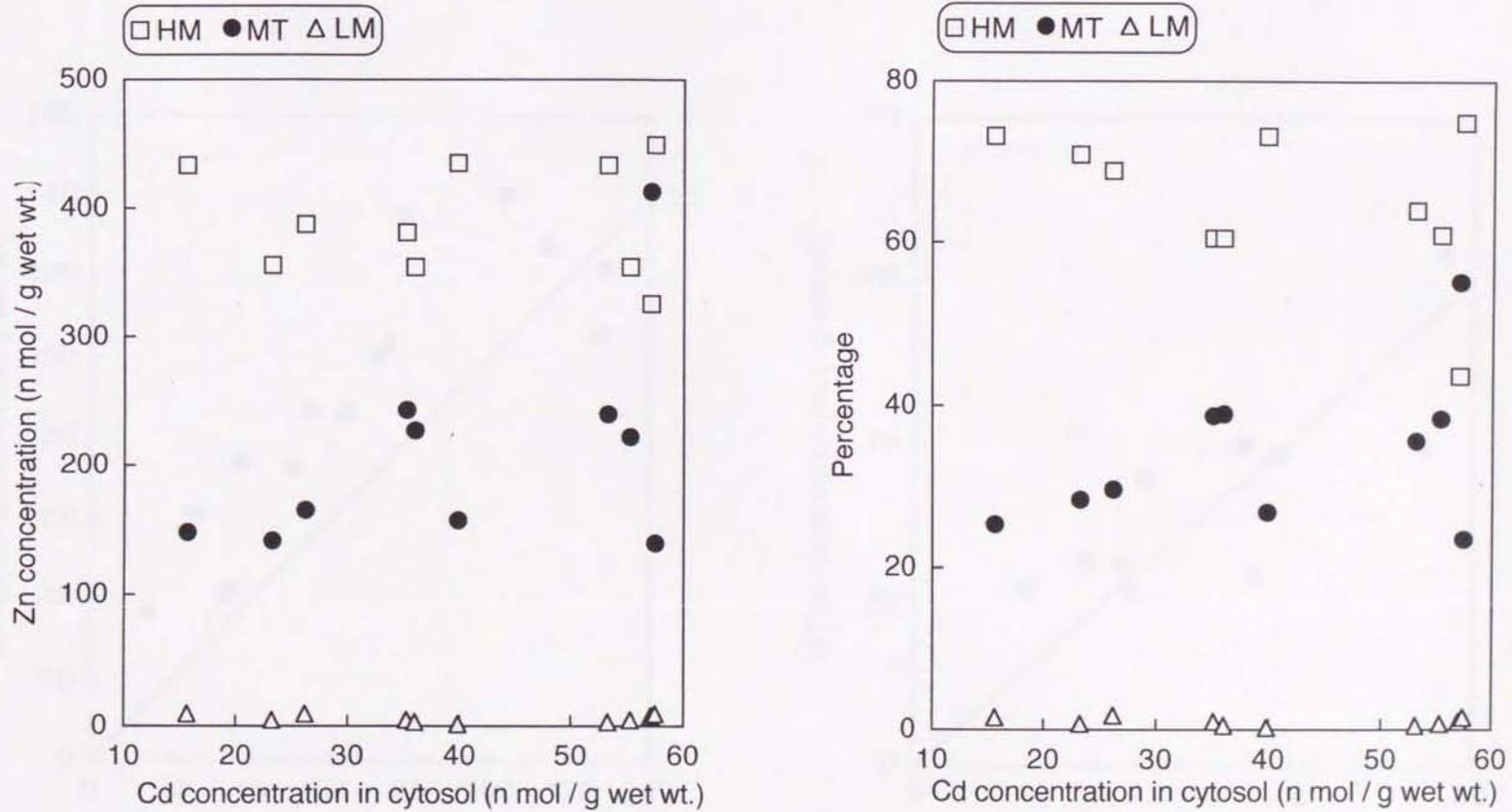


Fig. 6-4-6
Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) with Cd concentration of minke whale hepatocytosol

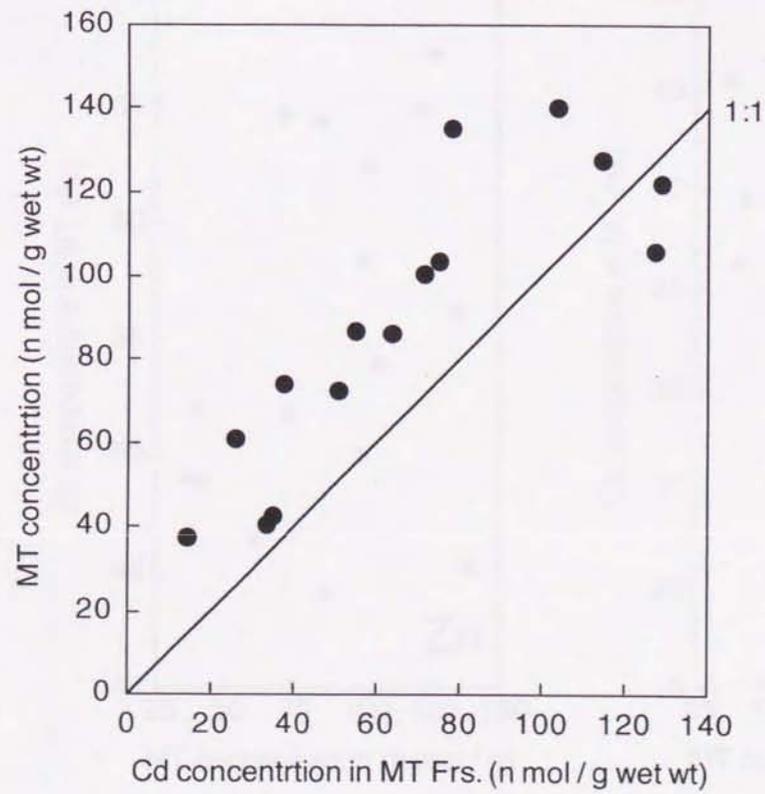


Fig.6-4-7
Relationship between metallothionein concentration and Cd concentration in MT fractions of hepatocytes of northern fur seal

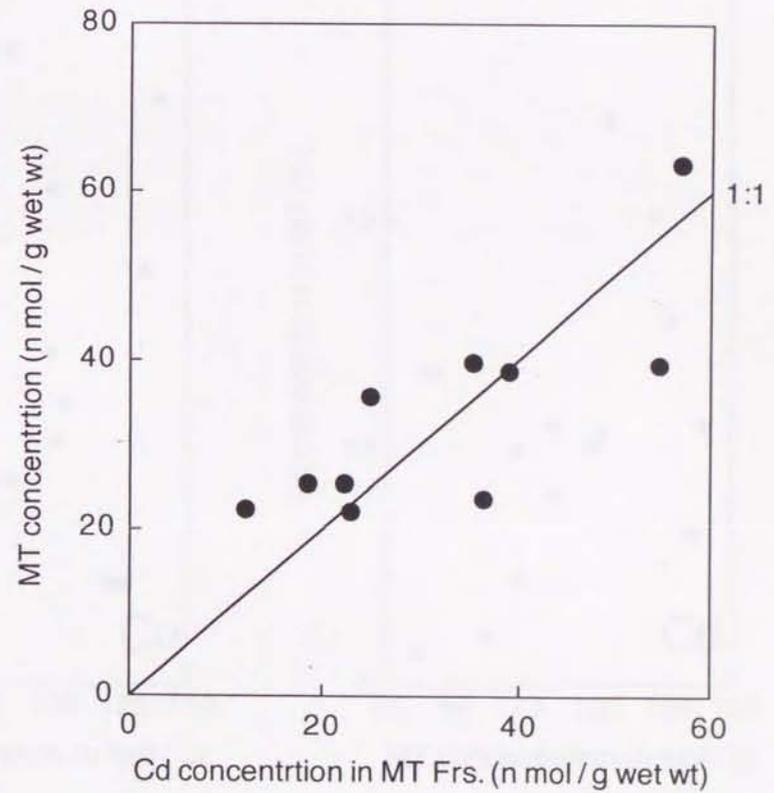


Fig.6-4-8
Relationship between metallothionein concentration and Cd concentration in MT fractions of hepatocytes of minke whale

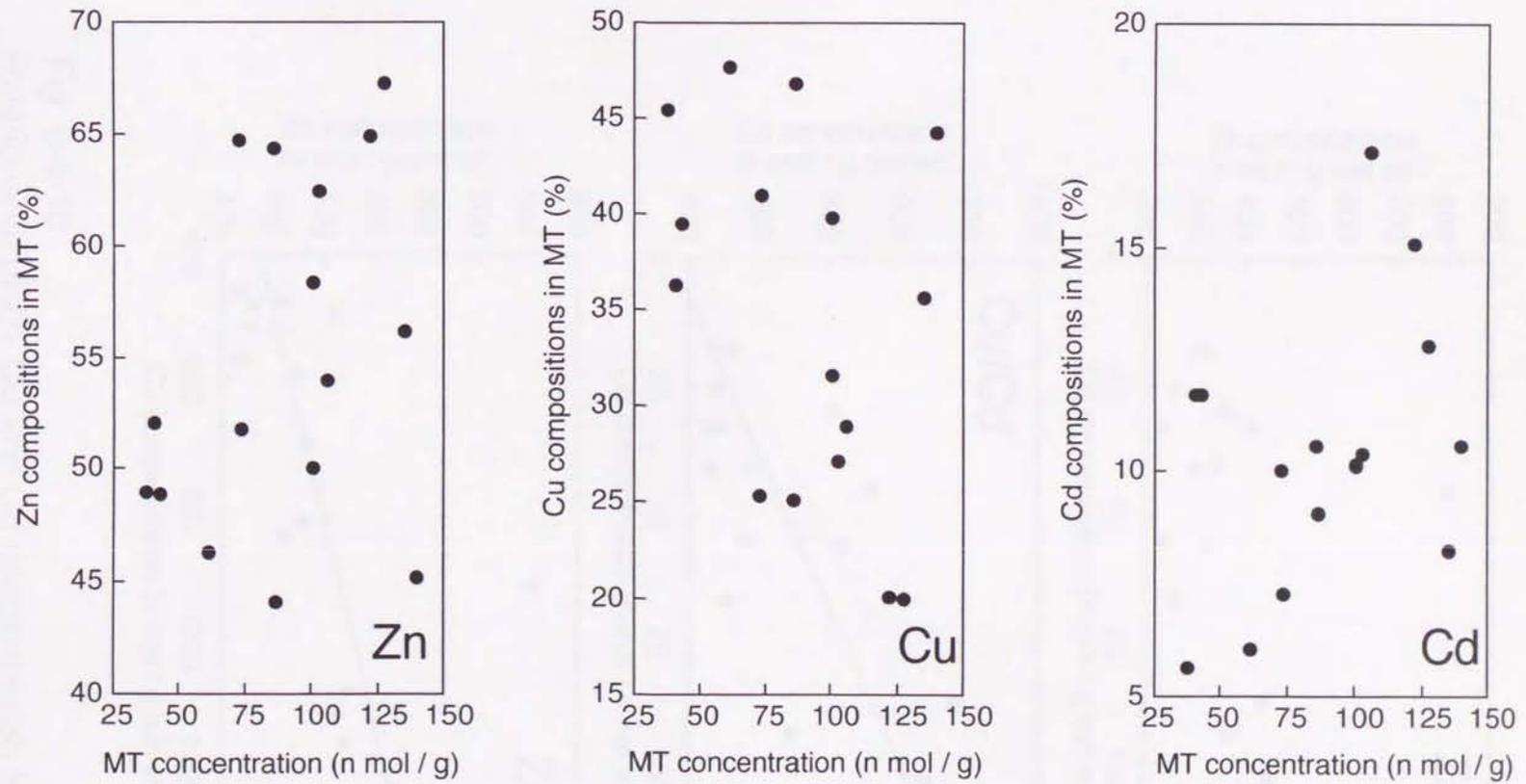


Fig. 6-4-9
Relationship between metal compositions in MT and MT concentration of northern fur seal hepatocytes

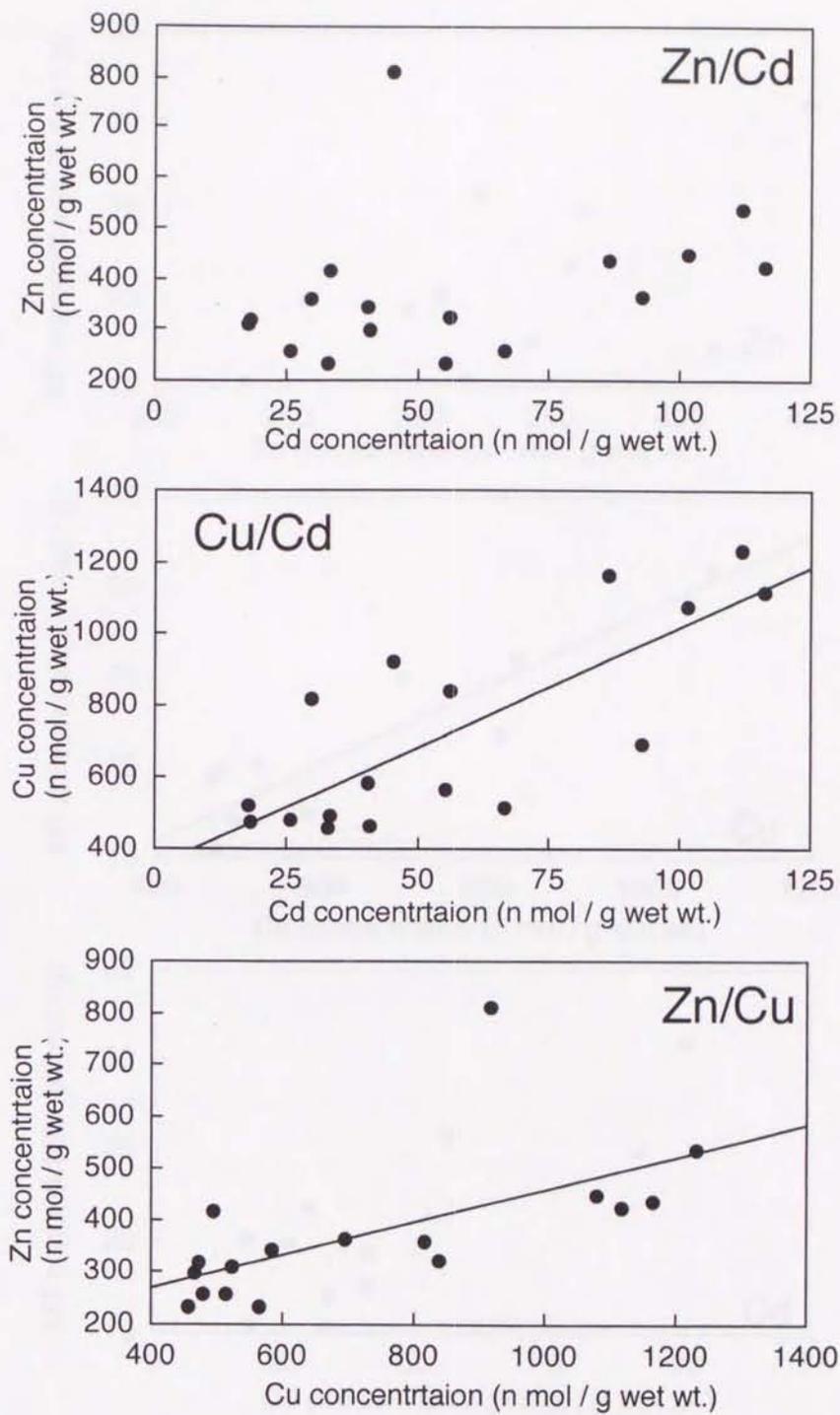


Fig. 6-4-10
 Relationship of Zn, Cu and Cd concentration in hepatocytosol
 of green turtle

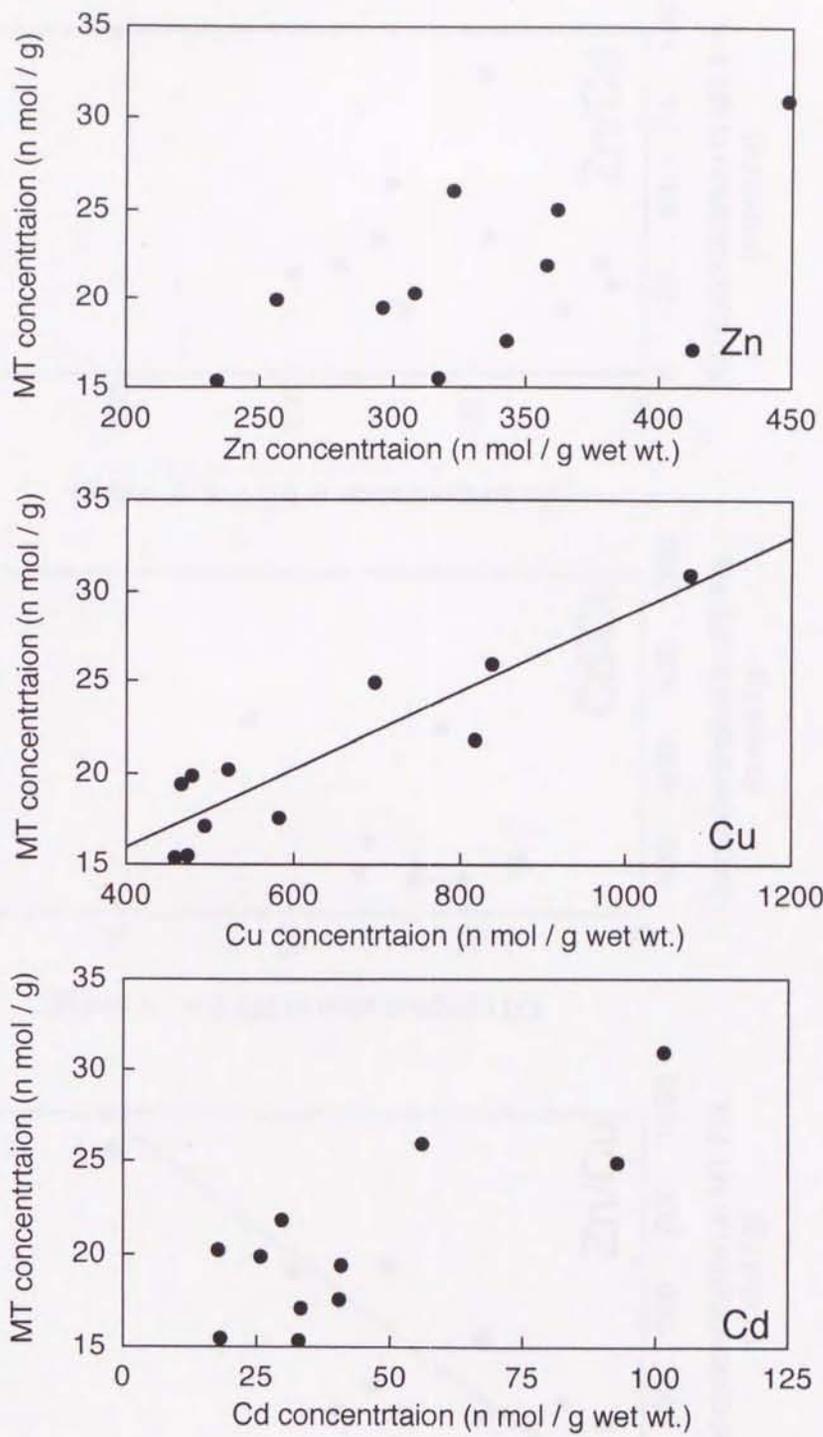


Fig. 6-4-11
 Relationship between metallothionein (MT) concentration and metal concentration in hepatocytosol of green turtle

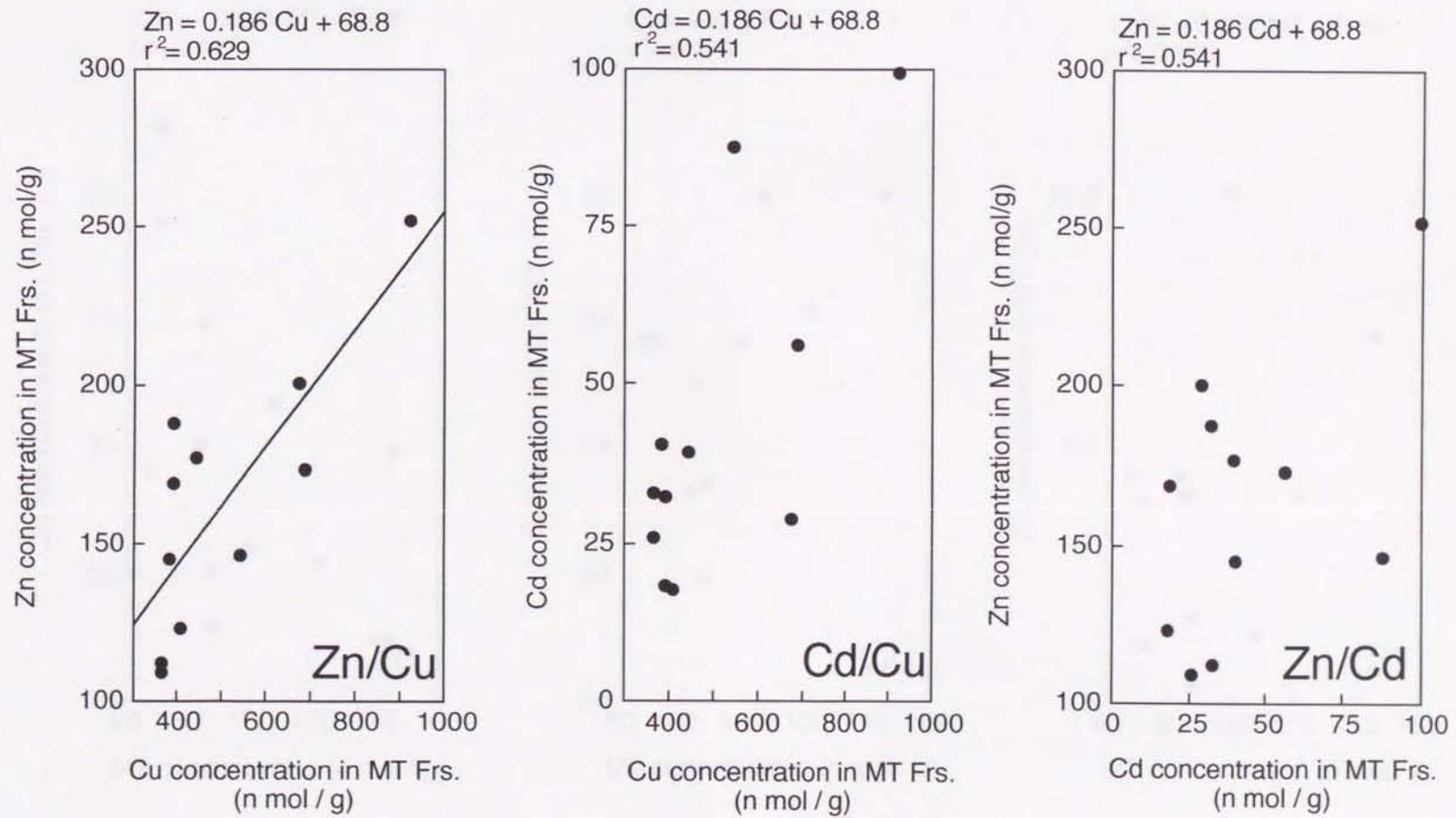


Fig. 6-4-12
Relationship between metal concentrations in MT Frs. of green turtle hepatocytes

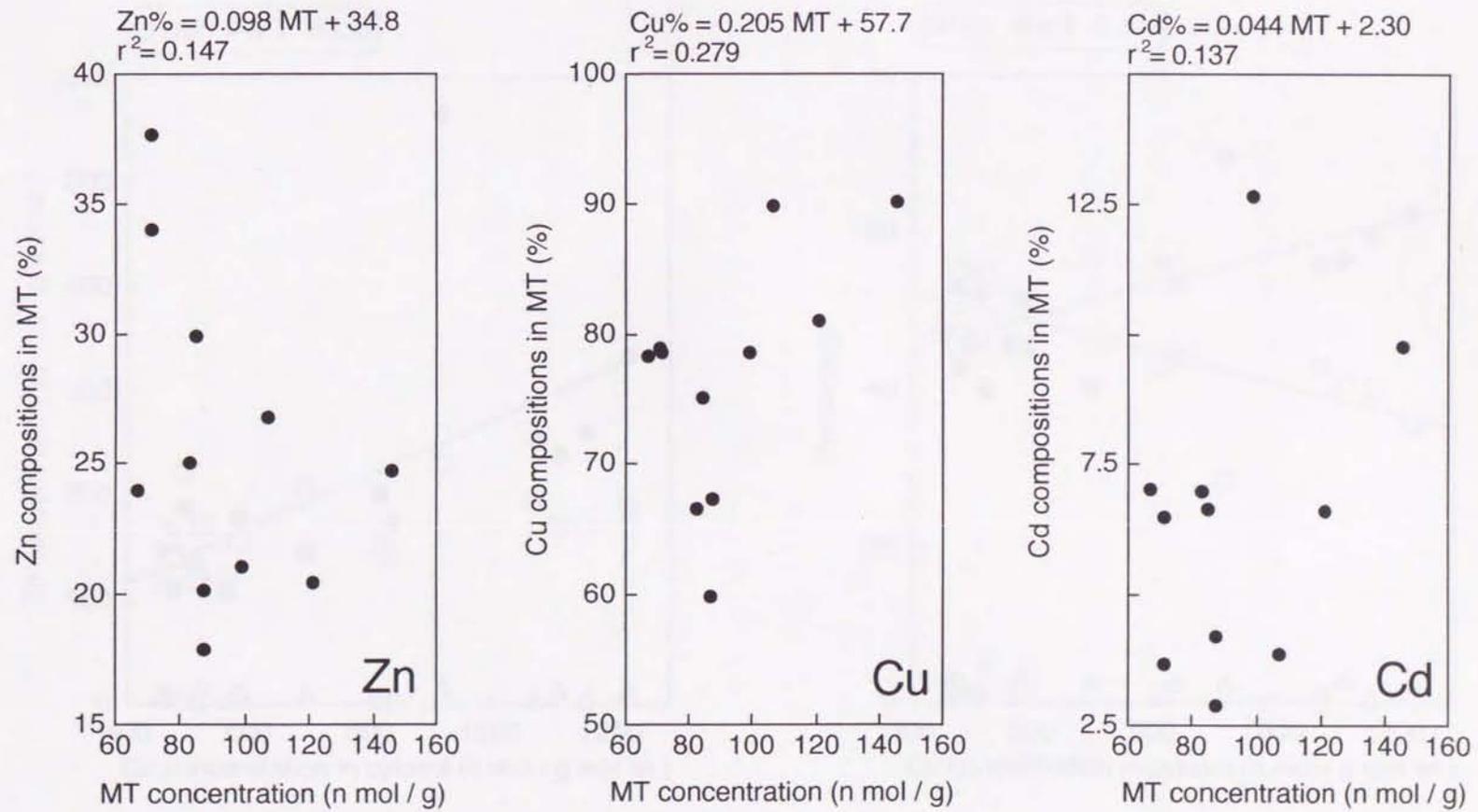


Fig. 6-4-13 Relationship between metal compositions in MT and MT concentration of green turtle hepatocytes

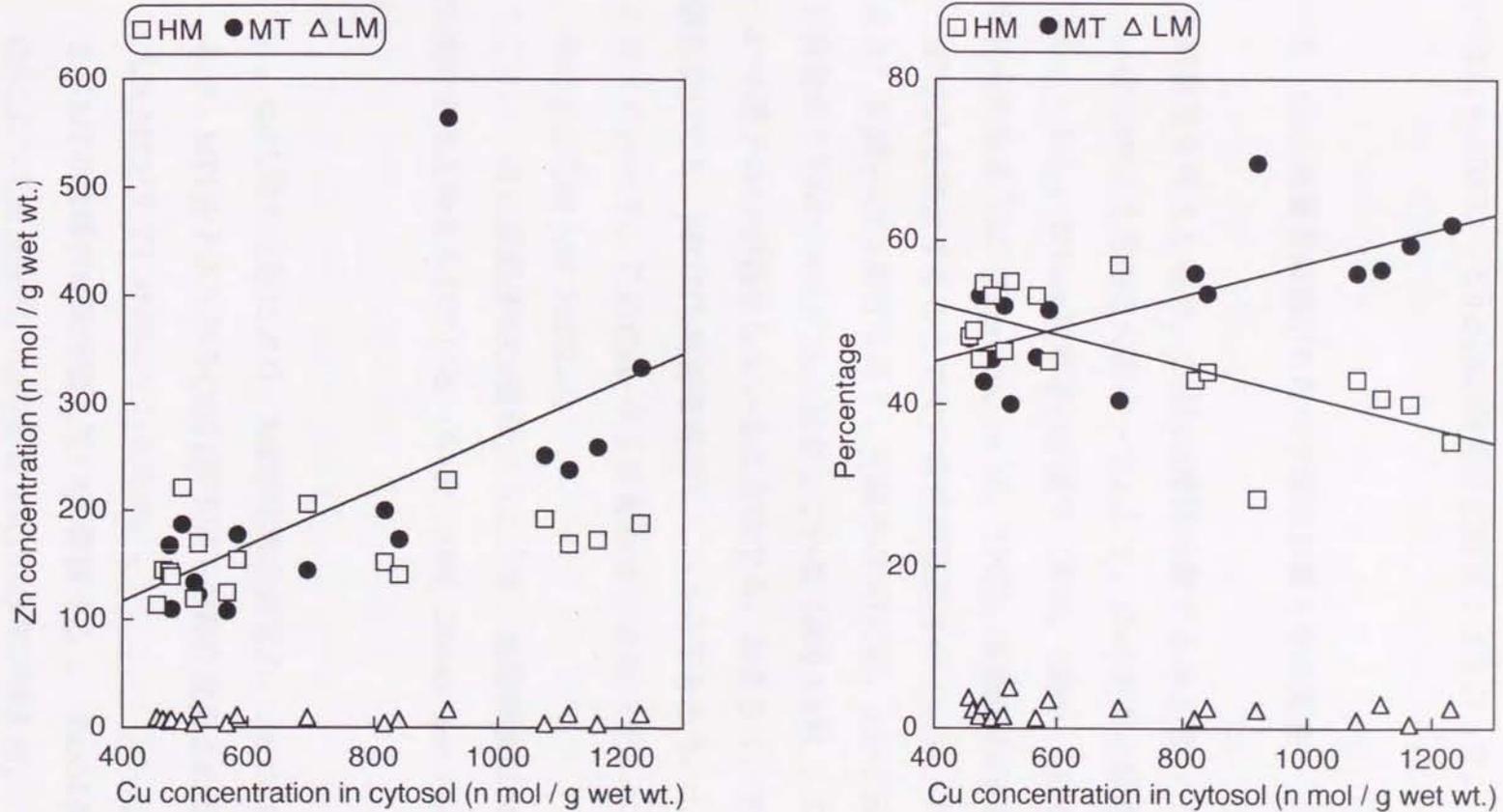


Fig. 6-4-14
Zn accumulation in high molecular weights fractions (HM), metallothionein fractions (MT) and low molecular weights fractions (LM) with Cu concentration of green turtle hepatocytosol

$p < 0.05$ 、 $p < 0.05$)、CuとZnの関係ほど顕著ではなかった。

6-5. Cuの高濃度蓄積がもたらす毒性影響とその要因

金属毒性を考えた場合、CuはCd毒性匹敵するほど強い(和田, 1985)。一般にMTの生理的な役割の一つとして、Cuの貯蔵と輸送があげられている。しかし、Willson病患者の肝臓や(青木, 1996)、LECラットの肝臓で見られるように(Sugawara, *et al.*, 1992)、高濃度のCuが蓄積する場合、MTはCuを結合することでその毒性を軽減させている。アオウミガメの場合、肝臓中のCu濃度は高く、肝臓中のMTには、1分子当たりの金属結合容量のうち60~90%がCuと結合している(図6-4-13)。これはMT1分子に4~6原子のCuが結合していることになる。おそらく、アオウミガメ肝臓においても、MTはCu毒性を軽減しているのであろう。しかし、アオウミガメにとって、このCuレベルが毒性を引き起こすレベルかどうかは、今のところ明らかではない。

ここで、一般に高濃度のCd蓄積がもたらす、組織障害は次のような順序で進行すると考えられている(Webb, 1986; Elinder and Nordberg, 1987)。

- 1) Cdの取り込みにより、MTが誘導合成され、Zn,Cd-MTが生成するが、MT1分子当たりのCdは1原子以下の存在量を占めるに過ぎない(Zn-MTがすでに存在しているため)。
- 2) MTの誘導合成能を越えてCdが蓄積すると、Zn,Cd-MT中のZnがCdによって置換され、Cdの豊富なMTの存在が増える。
- 3) さらにCdが取り込まれると、CdはMTと結合できなくなり、遊離のCdが存在するようになる。このCdが組織障害を発症させる。

ウサギを用いたCdの投与実験では、腎臓中MTのCd/Zn比が、2.5以上になると、Cdの腎障害が発症している (Elinder, *et al.*, 1987)。この例から考えると、MT中のZnの割合が2原子以下になると、MT合成能が追いつかず、またZnとの置換反応も起こりにくくなるため、遊離のCdやCuが生成されやすくなり、毒性が発症すると仮定できる。先に示したように、アオウミガメの肝MTには、4~6原子のCuが結合し、Znは約3~1原子が結合していることを明らかにできた。また、アオウミガメ肝臓のMT濃度の増加にともなう、Zn濃度の増加は、いずれの画分においても顕著ではない。このことは、Cu蓄積によるMTの誘導合成量が少なく、MT中のZnとの置換反応が限界に近づいていることを示唆している。これらのことから、アオウミガメでみられるCd、Cu、Znの関係は、遊離のCuが発生しやすい、つまり毒性生起するレベルに近いと考えられる。事実、アオウミガメでみられるCu/Zn比は、Willson病患者よりも高く (Klein, *et al.*, 1990)、肝炎発症直前のLECラットの値に匹敵する (Sugawara, *et al.*, 1992)。さらに、アオウミガメの場合、肝細胞に与える金属ストレスはCuだけではなく、Cdも考慮する必要がある。先の仮定に基づき、アオウミガメ肝臓のMTの誘導能がCuもしくはCd蓄積量に対応できないと解釈すると、これ以上のCu蓄積もしくはCd蓄積は、これら金属のリガンド (MT) 不足を招き、毒性の強い遊離の金属を生成することになる。肝機能障害の直接的な証拠はないが、アオウミガメ肝臓では脂肪肝と思えるほど脂肪が蓄積している。また、ゲル濾過分画のプロファイルでは、MT画分よりも低分子側に、Cuのブロードピークが確認されるなど、肝機能障害の可能性を示唆する現象が認められている。

肝臓における高濃度のCu蓄積は、肝機能障害の原因になるばかりでなく、Cdによる腎障害も引き起こしうる。Suganuma *et al.* (1996) によると、肝炎発症前のLECに低濃度 (5ppm) のCd (CdCl₂) を30日間にわたっ

て暴露したところ、他系統のラットに比、腎臓へのCd蓄積が増大している。その理由として、血漿中へのCd-MT排泄量が多いことを示唆している。LEC肝臓中のMT濃度は高く、そのため血漿中へのMTの排出も多くなる。Cd-MTの形態は腎臓へ取り込まれやすいため、LECでは腎臓のCd蓄積が顕著になったと考えられている (Suganuma *et al.*, 1996)。腎臓では、血流から流れてくるCd-MTの方がCdCl₂よりも強い毒性を示すことが知られている (田中, 1987)。Suganuma *et al.* (1996) は、LECラットに高濃度のCdを投与した場合、その腎毒性は他系統のラットより顕著に発症すると考えている。ここでアオウミガメとキタオットセイおよびミンククジラの肝臓中MT濃度を比較すると、アオウミガメの濃度が最も高い。また、アオウミガメは肝臓中のCd濃度が低いにも関わらず、腎臓中の濃度は他の海生動物と匹敵、もしくはそれ以上である。これらの結果は、アオウミガメにおけるCdの腎臓移行率が他の海生動物と比較して高いことを暗示している。高濃度のCuを蓄積するアオウミガメは、肝臓においてCdのリガンドも少なく、血漿へのMTの排泄も多いため、腎臓へのCdの移行と蓄積量が多くなるものと推察される。

一般にCuは、体内では必須元素として働き、その蓄積と排泄は恒常性維持機能によってコントロールされ、濃度変動が少ないと考えられている。しかし、アオウミガメの場合、高濃度である上にその濃度変動も著しい。この原因は依然不明であるが、以下のような説明が可能かも知れない。

アオウミガメの場合、高濃度にCuが蓄積している臓器は肝臓だけである。体内の老廃物が集まる腎臓中のCu濃度は、他の海生動物と比較して低い。この点から考えて、肝臓における高濃度蓄積は、肝臓からのCu排泄機構に原因があると考えられる。つまり、「Cu保持能の強いMTが存在する」、もしくは「MTから他のCu輸送タンパクへの受け渡しが円滑でな

い」などの要因が挙げられる。

ところで、肝臓にCdが蓄積する原因は、恒常性維持機能が働かないため、すなわち肝細胞からCdを除去するシステムが存在しないことによる。ここで、アオウミガメ肝臓におけるCuとCdの関係には、有意な正の相関関係が認められている。すなわちアオウミガメの肝臓では、Cdの場合と同様にCuを肝細胞から排泄するシステムが弱いため、肝臓に徐々に蓄積し、その毒性を軽減するためにMTが誘導合成されていると考えることもできる。

Cuの代謝異常のため、肝臓中にCuを異常蓄積してしまう疾病にWilson病があり、その病態モデルとしてLECラットが利用されている。最近になって、Wilson病患者およびLECラットにおけるCu異常蓄積の原因は、細胞内のCu輸送タンパク質に関連するP-type ATPase遺伝子の異常によることが明らかにされた (Yamaguchi *et al.*, 1994; 青木, 1996)。Wilson病患者およびLECラットの肝臓では、P-type ATPaseが機能しないため、取り込まれたCuが血液や胆汁にも排泄されずに蓄積され、Cuの毒性を軽減するためにMTが誘導合成されていることが明らかにされている。アオウミガメ肝臓のCu排泄系は、他の生物に比べ効率が悪いという仮説は、考えられる原因の一つであり、今後の新たな研究の展開が望まれる。

いずれにしても、アオウミガメにおける重金属毒性発症の検証は今後の課題であるが、MTが介在する特異なCu、Zn、Cd動態は本種生物に影響が現れやすいことを示しており、人間活動や産業活動のインパクトを考える際、考慮する必要がある。

要約

世界の海洋には、2科6属7種のウミガメが生息しているが、最近の報告では、CdやHgなどの汚染物質による、生体影響が懸念されている。しかし、海洋生態系における有害物質のモニタリング調査は近年精力的に行われ、かなりの情報が集積されつつあるが、海生爬虫類ウミガメの調査例はきわめて少ない。特に微量元素の蓄積と影響については断片的な情報しかなく、ウミガメ類における微量元素蓄積について体系的・包括的な研究が求められている。

現存するウミガメ類7種の全てに、絶滅の危機にあると報告されている。それゆえ、先に述べたような研究目的であっても、生きているウミガメを多量に捕殺することは望ましくなく、非捕殺的手法の開発が望まれている。また、このモニタリング手法を用いウミガメ類の生態を解明する、新たな手法の開拓も期待されている。

固有な生物過程や生理機能を持つウミガメ類は、微量元素、特にZn、Cu、Cd蓄積に関して、海生哺乳類や海鳥類と異なる蓄積様式や代謝様式が期待される。ウミガメ類におけるZn、Cu、Cdの特異な蓄積を詳細に研究することは、微量元素代謝の種多様性を解明する糸口になると思われる。この場合、組織中の濃度情報だけではなく、細胞内における分布や存在形態などを比較生物・生理学的に検討することは、重金属の蓄積変動や毒性影響の種間差への理解の深化につながる。

本研究では、ウミガメ類における微量元素の蓄積特性、特に体内での分布や挙動、成長にともなう濃度変動などについて調べ、ウミガメ類における元素蓄積の基礎情報を得るとともに、固有な生理生態が元素蓄積に及ぼす影響について検討した。また、肝臓中Zn、Cu、Cdの細胞内分布とその変動、およびメタロチオネイン (MT) の関与について調べ、ウミガメ類におけるこれら元素の代謝とその毒性影響を比較生物学的視点で

考察した。さらに、卵や甲羅を用いた非捕殺的なモニタリング手法の開発も試みた。

成体アカウミガメとアオウミガメを用いて、微量元素の体内分布を調査した。ウミガメ類における微量元素の体内分布は、各元素によって異なり、Fe、CuやHgは肝臓に、Mn、ZnやPbは硬組織に濃度、負荷量ともに高値が認められた。Cdの蓄積量は腎臓と肝臓に高く、両組織で体内の80%近くを占めていた。このような傾向は、他の海生動物と類似していたが、ウミガメ類脂肪組織のZn濃度は、他動物に比べ10倍以上の高値を示した。雌親-生殖器官間の微量元素の移行を検討したところ、生殖器官中にはCdがほとんど蓄積しておらず、Cdの移行率が最も低かった。このように微量元素移行の選択性が認められたことから、ウミガメ類は何れかの器官で元素移行の制御を行っていることが推察された。

次に、アオウミガメにおける、成長にともなう微量元素蓄積の変動について調査した。アオウミガメの肝臓と腎臓中Cd濃度は、甲長40~50cmの小型個体で最高値を示し、濃度変動も大きい。しかしこの高値は、成長とともに減少した。Cdは一般に年齢蓄積性が知られており、成長とともに濃度が減少したという報告は本種以外には皆無である。このような特異な蓄積傾向を示した原因は、本種の固有な摂餌生態にあると推察された。本種は幼体期で動物プランクトン食性が強く、その後は海草食性になる。そこでこれら餌生物のCd濃度を分析したところ、動物プランクトンで高値で、海草で低値であった。以上より、成長にともなう食性の変化が、毒性元素の蓄積に影響を及ぼすことが明らかとなった。

非捕殺的なモニタリング法を開発するために、まず卵に注目して検討を行った。ウミガメ類の卵に蓄積しているFe、Mn、Zn、Cu、Cd、Hgは、ほとんど卵黄中に存在していた。また、一腹の卵の重金属濃度は、

ほとんど一定であった。さらに、産卵回数毎に卵の濃度を調べたところ、変動は小さくほぼ一定であった。さらに、卵黄と親の組織との間の濃度比を調べたところ、卵黄中Zn濃度は親の筋肉、肝臓と腎臓、Cuは腎臓、Cdは筋肉と腎臓、Hgは筋肉中の濃度を反映していることがわかった。以上の結果から、重金属の卵黄中濃度は、1個体の雌ウミガメがシーズン中に産卵する卵であれば変動が小さく、また、Zn、Cu、Cd、Hgについては、卵黄中の濃度から親体内組織中の蓄積濃度を推定できることがわかった。すなわちウミガメ類の卵は、非捕殺的な重金属モニタリングの指標部位として活用できることを明らかにできた。

次に、甲羅に注目した。ICP-MSを用いてタイマイの甲羅中の微量元素を測定し、微量元素濃度から個体群の判別を試みたところ、摂餌生態の異なる2の個体群間で、Cr、Mn、Cu、Zn、Rb、Ba、Pb、U、Li、Se濃度において有意な濃度差が認められた。また、世界各地から収集された甲羅の微量元素濃度を判別分析に適用し、個体群判別を試みたところ、相当な確率で区別することが出来た。以上の結果より、化学分析によりべつ甲の原産地判別を推定する場合、甲羅は有効な部位であり、非捕殺的なモニタリングシステム開拓の手段として活用できることがわかった。

アオウミガメの肝臓中Cu濃度は、Cd濃度と類似の傾向を示し、蓄積レベルは海生哺乳類や海鳥類と比較して相当高く、その変動も大きい。Cuは必須元素であるが、高濃度蓄積による組織障害も知られることから、アオウミガメ肝臓におけるCu代謝に興味をもたれる。そこで、肝細胞内におけるCuの存在形態について検討を行った。その結果、肝細胞中のCuは、ほとんど細胞質に蓄積されていることが分かった。また、肝細胞質におけるCuは、主にメタロチオネイン (MT) 画分に存在していた。細胞質中のCu濃度の増加は、MT濃度を有意に増加させ、またMT画分中のZn

濃度も有意に上昇させていた。さらに、本種の肝MTは、金属結合許容量の70%までCuが結合する、海生動物の中でも特殊な形態である。以上の結果より、アオウミガメの肝臓では、Cuの高濃度蓄積がMT合成を誘導し、新たに合成されたMTを介してZnの蓄積が変化する、これまで報告例のないCu代謝様式であることが明らかとなった。また、本種肝臓ではMTがCuで飽和されているために、活性型Cuが生じやすく、その影響が生じやすい状態であると推察された。

本研究は、ウミガメの微量元素蓄積の状況を、はじめて体系的に明らかにしたばかりでなく、その保護・管理のための新しい手法、および毒性影響検知のための重要な知見を提示できた。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ウミガメ類の試料採取・収集にご協力いただいた、小笠原海洋センター副館長・菅沼弘行氏、日本ウミガメ協議会会長・亀崎直樹氏、沖縄県石垣市・山城親介氏、八重山海中公園研究センター・佐藤文彦氏と森 美枝女史、キューバ共和国水産局局長・C. C. Elvira女史、北海道大学獣医学部・小林万里女史、ならびに日本ベッコウ甲協会、高知県以布利漁協と窪津漁業のみなさまに厚くお礼を申し上げます。また、キタオットセイの採集に関しては、遠洋水産研究所・馬場徳寿氏と清田雅史氏に、ミンククジラの採集に関しては、日本鯨類研究所研究員・藤瀬良弘博士ならびに愛媛大学農学部・青野さや香嬢に心から感謝いたします。

本研究は、愛媛大学農学部・立川 涼教授（現、高知大学学長）ならびに愛媛大学農学部・脇本忠明教授のもとに行われたものであり、お二人の教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究を行うにあたり、始終懇親なる御指導を賜った横浜市立大学医学部・鹿島勇治助手、大分大学教育学部・佐伯和利講師、農業環境研究所・市橋秀樹博士に心から感謝いたします。

さらに、本論文の副査をして頂いた、高知大学農学部・堀川幸也教授、香川大学農学部・門谷 茂教授、愛媛大学農学部・田辺信介助教授、同・河野公栄助教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、様々な面で御協力・御助力を賜った、愛媛大学農学部環境化学研究室の院生、学生、研究生のみなさまに心からお礼を申し上げます。とくに、新居田真美嬢の御協力には心から感謝いたします。Zn、Cu、Cdの細胞内分の研究は、彼女の協力と助言に負うところが大きい。

参考文献

Aguirre, A. A., Balazs, G., Zimmerman, B., & Galey, F. D. (1994) Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) affected with fibropapillomas in the Hawaiian Islands., *Mar. Pollut. Bull.*, 28, 109-114.

Akagi, H., & Nishimura, H. (1991) Speciation of mercury in the environment. In *Advances in Mercury Toxicology* (Suzuki, T., Imura, N., & Clarkson, T. W. eds), pp53-76, Plenum Press, New York.

青木継稔 (1996) 銅の代謝とその異常症. 「最新内科学体系第10巻 核酸・蛋白・ポルフィリン代謝異常」 (井村, 尾形, 高久, 垂井 共編), pp315-334. 中山書店, 東京.

Anderson, R. A. (1986) Chromium. In *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth edition., Vol. 1.* (Mertz, W. ed), pp225-244. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA.

André, J. M., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Boudou, A., & Ribeyre, F. (1990a) Cadmium contamination of tissues and organs of Delphinids species (*Stenella attenuata*)-Influence of biological and ecological factors., *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 20, 290-306.

André, J. M., Ribeyre, F., & Boudou, A. (1990b) Mercury contamination levels and distribution in tissues and organs of Delphinids (*Stenella attenuata*) from the eastern tropical Pacific, in relation to biological and ecological., *Mar. Environ. Res.*, 30, 43-72.

有吉敏彦 (1996) 化学物質に対する生体の適応と防御. 薬学雑誌, 116, 3, 192-208.

Bakka, A. & Webb, M. (1981) Metabolism of zinc and copper in the neonate: Changes in the concentrations and contents of thionein-bound Zn and Cu with age in the livers of the newborn of various mammalian species. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 7, 721-725.

Bartsch, R., Klein, D., & Summer, K. H. (1990) The Cd-Chelex assay: a new sensitive method to determine metallothionein containing zinc and cadmium., *Arch. Toxicol.*, 64, 177-180.

Berg, W., Johnels, A. G., Sjostrand, B., Westermarck, T. (1966) Mercury content in feathers of Swedish birds from the past 100 years. *Oikos*, 17, 71-83.

Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. & Lagueux, C. (1994) Ingestion of marine debris by juvenile sea turtles in coastal Florida habitat. *Mar. Pollut. Bull.*, 28, 3, 154-158.

Bremner, I. (1987) Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J. Nutr.*, 117, 19-29.

Bremner, I., & Beattie, J. H. (1990) Metallothionein and the trace minerals. *Annu. Rev. Nutr.*, 10, 63-83.

Cabana, G. & Rasmussen, J. B. (1994) Modelling food chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotope., *Nature*, 372, 17, 255-257

Carr, A. (1986) New perspectives on pelagic stage of sea turtle development., In *NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-190*.

Carr, A., (1987) Impact of nondegradable marine debris on the ecology and survival outlook of sea turtles., *Mar. Pollut. Bull.*, 18, 352-356.

Clark Jr, D. R. & Krynitsky, A. J. (1980) Organochlorine residues in eggs of loggerhead and green sea turtles nesting at Merritt Island, Florida-July and August 1976., *Pestic. Monit. J.*, 14, 7-10.

Clark Jr, D. R. & Krynitsky, A. J. (1985) DDE residues and artificial incubation of loggerhead sea turtle eggs., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 121-125.

Clark Jr, D. R. & Krynitsky, A. J. (1980) Organochlorine residues in eggs of loggerhead and green sea turtles nesting at Merritt Island, Florida-July and August 1976., *Pestic. Monit. J.*, 14, 7-10.

Clarkson, T. W. (1987) Mercury., In *Trace Elements in Human and Animal Nutrition-Fifth Edition* (Mertz, W., ed), pp417-428, Academic Press, San Diego, California, USA.

Courtney, A. J., Die, D. J. & Holmes, M. J. (1994) Discriminating populations of the eastern king prawn, *Penaeus plebejus*, from different estuaries using ICP-MS trace element analysis., *Atomic Spectroscopy.*, 15, 1-6.

Davenport, J., & Wrench, J. (1990) Metal levels in a leatherback turtle., *Mar. Pollut. Bull.*, 21, 40-41.

Davenport, J., Wrench, J., McEvoy, J. & Camacho-Ibra, V. (1990) Metal and PCB concentrations in the "Harlench" leatherback., *Mar. Turtle Newslet.*, 48, 1-6.

Davis, G. K. & Mertz, W. (1986) Copper. In *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth edition.*, Vol. 1. (Mertz, W. ed), pp301-364. Academic Press,

Inc., Orlando, FL, USA.

Denton, G. R. W., Marsh, H., Heinsohn, G. E., & Burdon-Jones, C. (1980) The unusual metal status of the dugong *Dugong dugon*., *Mar. Biol.*, 57, 201-219.

Dodd Jr, C. K. (1988) Synopsis of the biological data on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* (Linnaeus 1758), FAO Synopsis NMFS-149., *Biological Report*, 88, p110

Durnam, D. M., & Palmiter, R. D. (1980) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.*, 256, 11, 5712-5716.

Dutton, M. D., Stephenson, M., & Klaverkamp, J. F. (1993) A mercury saturation assay for measuring metallothionein in fish., *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1193-1202.

Eaton, D. L. & Cherian, M. G. (1991) Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay. *Methods in enzymology*, 205, 83-88.

Elinder, C. G., Nordberg, M., Palm, B., Bjork, L. & Jonsson, L. (1987) Cadmium, zinc, and copper in rabbit kidney metallothionein. -relation to kidney toxicity., *Environ. Res.*, 42, 553-562.

Elinder, C. G. & Nordberg, M. (1987) Metallothionein. In *Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal.*, Vol. I (Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellström, T., & Nordberg, G. F. eds.), pp.65-80., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA.

Elliott, J. E., Scheuhammer, A. M., Leighton, F. A. & Pearce, P. A. (1992) Heavy metal and metallothionein concentrations in Atlantic Canadian seabirds., *Arch. Contam. Toxicol.*, 22, 63-73.

Fimreite, N., Brun, E., Frøslie, A., Frederichsen, P. & Gundersen, N., (1974) Mercury in eggs of Norwegian seabirds. *Astarte*, 1, 71-75.

藤井正美 (1976) 生物圏における水銀の分布. 「水銀」 (喜多村, 近藤, 瀧澤, 藤井, 藤木, 共編), pp312-381, 講談社サイエンティフィク, 東京.

藤瀬良弘 (1987) 北部北太平洋産イシイルカの重金属蓄積に関する研究. 博士論文, 北海道大学. p109.

Fujise, Y., Honda, K., Tatsukawa, R., & Mishima, S. (1988) Tissue distribution of heavy metals in Dall's porpoise in the northwestern Pacific., *Mar. Pollut. Bull.*, 19, 226-230.

Furness, R. W., Muirhead, S. J. & Woodburn, M. (1986) Using bird feathers to measure mercury in the environment; relationships between mercury content and moult. *Mar. Pollut. Bull.*, 17, 27, 27-30.

Furness, R. W., Lewis, S. A. & Mills, J. A. (1990) Mercury levels in plumage of red-billed gulls *Larus novaehollandiae scopulinus* of known sex and age. *Environ. Pollut.*, 63, 33-39.

Gramentz, D. (1988) Involvement of loggerhead turtle with the plastic, metal and hydrocarbon pollution in the central Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.*, 19, 11-13.

Haarakangas, H., Hyvarinen, H. & Ojanen, M. (1974) Seasonal variations and the effects of nestling and moulting on liver mineral content in the house sparrow (*Passer domesticus* L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 47A, 153-163.

Häkkinen, I., & Häsänen, E. (1980) Mercury in eggs and nestings of the osprey (*Pandion haliaetus*) in Finland and its bioaccumulation from fish., *Ann. Zool. Fennici.*, 17, 131-139.

Hamanaka, T., & Mishima, S. (1981) Cadmium and zinc concentrations in marine organisms in the northern North Pacific Ocean. *Res. Inst. N. Pac. Fish., Hokkaido Univ., Spe. Vol.*, 191-206.

浜中恒寧 (1983) 鰭脚類の重金属濃度. 哺乳類科学, 45, 131-141.

浜中恒寧 (1984) 海鳥類における重金属蓄積. , 海洋科学, 16, 245-251

Hambidge, K. M., Casey, C. E. & Krebs, N. F. (1986) Zinc. In *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth edition.*, Vol. II. (Mertz, W. ed), pp1-138. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA.

Hamilton, E. I. (1990) As, Cd, Pb and Hg in benthic animals from the Kverner-Rijeka bay region, Yugoslavia., *Mar. Pollut. Bull.*, 21, 12, 595-598.

Hansen, C. T., Nilsen, C. O., Dietz, R., & Hansen, M. M. (1990) Zinc, cadmium, mercury and selenium in minke whales, belugas and narwhales from west Greenland., *Polar. Biol.*, 10, 529-539.

Heng, C. E. (1994) マレーシアのオサガメの減少. 「ウミガメは減っているか その保護と未来」(紀伊半島ウミガメ情報交換会・日本ウミガメ協議会 共編), pp34.

Henriksson, K., Karppanen, E. & Helminen, M. (1969) Mercury in inland and

marine seals. *Nordisk Hyg Tidsskr*, 50, 54-59.

平手康一, 木村基文 (1996) ロストエイジ期のアオウミガメの琉球列島海域での発見 (速報). *うみがめニュースレター*, 29, 10-11.

Hirth, H. F. (1971) Synopsis of biological data on the green turtle *Chelonia mydas* (Linnaeus) 1758., In *FAO Fisheries Synopsis*, No. 85.

Hirth, H. F. (1980) Some aspects of nesting behavior and reproductive biology of sea turtles., *Amer. Zool. Fennici*, 20, 131-139.

Honda, K., & Tatsukawa, R. (1983a) Distribution of cadmium and zinc in tissues and organs, and their age-related changes in striped dolphins, *Stenella coeruleoalba*., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 12, 543-550.

Honda, K., Tatsukawa, R., Itano, K., Miyazaki, N., & Fujiyama, T. (1983b) Heavy metal concentrations in muscle, liver and kidney tissue of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, and their various with body length, weight, age and sex. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1219-1228.

本田克久 (1985) 海産哺乳類の重金属類の生物濃縮に関する研究. 博士論文, 東京大学, p101.

Honda, K., Yamamoto, Y., Hidaka, H., & Tatsukawa, R. (1986a) Heavy metal accumulations in Adélie penguin, *Pygoscelis adeliae*, their variations with the reproductive processes., *Mem. Nat. Inst. Polar Res.*, 40, 443-453.

Honda, K., Min, B. Y., & Ryo Tatsukawa. (1986b) Distribution of heavy metals and their age-related changes in the eastern great white egret, *Egretta alba modesta*, in Korea., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 185-197.

Honda, K., Nasu, T. & Tatsukawa, R. (1986c) Seasonal changes in mercury accumulation in the black-eared kite, *Milvus migrans lineatus*. *Environ. Pollut.*, Ser. A., 42, 325-334.

Honda, K., Yamamoto, Y., & Tatsukawa, R. (1987a) Distribution of heavy metals in Antarctic marine ecosystem., *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, 1, 184-197.

Hoda, K., Yamamoto, Y., Kato, H., & Tatsukawa, R. (1987b) Heavy metal accumulations and their recent changes in southern minke whales *Balaenoptera acutorostrata*., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 704-711.

Honda, K., Ichihashi, H., & Tatsukawa, R. (1987c) Tissue distribution of heavy metals and their variations with age, sex, and habitat in Japanese serows (*Capricornis crispus*)., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 551-561.

本田克久 (1988) 重金属をトレーサーとしたイシイルカの系統群判別の試み. 月刊海洋, 20, 9, 541-545.

Honda, K., Marcovecchio, J. E., Kan, S., Tatsukawa, R., & Ogi, H. (1990) Metal concentration in peragic seabirds from the north Pacific Ocean., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19, 704-711.

細貝祐太郎, 直井家壽太, 岡田太郎 (1978) 含有量表, pp41-388, 「有害元素マニュアル」, 中央法規社, 東京.

Hurley, L. S., & Keen, C. L. (1986) Manganese. In *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth edition., Vol. 1.* (Mertz, W. ed), pp185-223. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA.

Hutchinson, J., & Simonnds, M. (1991) A Review of the Effects of Pollution on Marine Turtles. In *A Greenpeace Ecotoxicology Project.*, Greenpeace Int., London, p20.

井村伸正 (1980) 水銀—河川等底質中水銀の挙動と生物濃縮—. 化学の領域, 増刊126号, 71-81.

伊藤真次 (1974) 適応の仕組み. p247, 北海道大学図書刊行会.

岩本俊孝, 石井正敏, 中島義人, 竹下 完 (1986) アカウミガメの産卵周期と回遊, 遺伝, 40, 10, 82-87.

Kamezaki, N. (1989) The nesting sites of sea turtles in the Ryukyu archipelago and Taiwan. In *Current herpetology in east Asia.*, (Matsui, M., Hikida, T., & Goris, R. C., eds), pp342-348, Herpetological Society of Japan, Kyoto, Japan.

亀崎直樹 (1991) 琉球列島におけるウミガメ類の産卵場の分布とその評価 (予報). *Biol. Mag. Okinawa.*, 29, 29-35.

鹿島勇治, 西村光代, 本田克久, 山本義志, 立川涼 (1991) 鯨類の腎メタロチオネインとその種間差. , 平成3年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 57.

木村正己 (1980) メタロチオネイン. 蛋白質・核酸・酵素, 25, 8, 738-753.

喜多村正次, 瀧澤行雄 (1976) 水銀と水俣病. 「水銀」 (喜多村, 近藤, 瀧澤, 藤井, 藤木 共著), 講談社, pp312-380.

Kjellström, T. (1986) Renal effects., In *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal Volume II* (Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellström, T., & Nordberg, G. F., eds), pp21-109, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Kjellström, T. (1986) ITAI-ITAI disease., In *Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal Volume II* (Friberg, L., Elinder, C. G., Kjellström, T., & Nordberg, G. F., eds), pp257-290, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Klein, D., Bartsch, R. & Summer, K. H. (1990) Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturtaion method., *Anal. Biochem.*, 189, 35-39.

Koeman, J. H., Peters, W. H. M., Smit, C. J., Tjioe, P. S., Goeij, J. J. M. de (1972) Persistent chemicals in marine mammals. *TNO-nieuws*, 27, 570-578.

Koeman, J. H., Peters, W. H. M., Smit, C. J., Tjioe, P. S., Goeij, J. J. M. de (1973) Mercury-selenium correlations in marine mammals., *Nature*, 245, 385-386.

小池祐子 (1994) アイソトープ等によるべっ甲の原産地判別調査報告書. 日本べっ甲協会.

小泉信滋 (1987) メタロチオネイン遺伝子とその発現調整. トキシコロジフォーラム, 10, 4, 368-387.

小島 豊 (1984) メタロチオネインと重金属代謝. 小児科MOOK, 33, 177-187.

Kotsonis, F. N., & Klaassen, C. D. (1977) Comparison of methods for estimating hepatic metallothionein in rats., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42, 583-588.

Kureishy, T. W. (1991) Heavy metals in algae around the coast of Oatar., *Mar. Pollut. Bull.*, 22, 8, 414-416.

Kwohn, Y.T., Yamazaki, S., Okubo, A., Yoshimura, E., Tatsukawa, R. & Toda, S. (1986) Isolation and characterization of metallothionein from kidney of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba.*, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 11, 2881-2885.

Law, R. J., Fileman, C. F., Hopkins, A. D., Baker, J. R., Harwood, J., Jackson, D. B., Kennedy, S., Martin, A. R., & Morris, R. J. (1991) Concentrations of trace metals in the livers of marine mammals (seals, porpoises and dolphins) from waters around the British Isles. *Mar. Pollut. Bull.*, 22, 183-191.

Leavander, O. A. (1986) Selenium. In *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth edition.*, Vol. 2. (Mertz, W. ed), pp209-279. Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA.

Lee, S. S., Mate, B. R., Von Der Trenck, K. T., Rimerman, R. A., & Buhler, D. R., (1977) Metallothionein and the subcellular localization of mercury and cadmium in the California sea lion., *Comp. Biochem. Physiol.*, 57C, 45-53.

李 斗杓 (1989) 鳥類の重金属モニタリングの羽による非捕殺的モニタリング. p122, 博士論文, 愛媛大学.

Lewis, S. A., Becker, P. H. and Furness, R. W. (1993) Mercury levels in eggs, tissues, and feathers of herring gulls *Larus argentatus* from the German Wadden sea coast. *Environ. Pollut.*, 80, 293-299.

Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J. H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. & Uchino, J. (1991a) Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. *J. Clin. Invest.*, 87, 1858-1861.

Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J. H., Takeichi, N., Kobayashi, H., Kojima, Y., Une, Y. & Uchino, J. (1991a) Abnormal copper accumulation in non-cancerous and cancerous liver tissues of LEC rats developing hereditary hepatitis and spontaneous hepatoma. *Jpn. Cancer Res.*, 82, 490-492.

Limpus, C. J., Gyuris, E. & Miller, J. D. (1988) Reassessment of the taxonomic status of the sea turtle genus *Natator* McCulloch, 1908, with a redescription of the genus and species., *Trans. Royal Soc. S. Aus.*, 112, 1-9.

Lock, J. W., Thompson, D. R., Furness, R. W., & Bartle, J. A. (1992) Metal concentrations in seabirds of New Zealand region., *Environ. Pollut.*, 75, 289-300.

Louis St, V. L., Breebaart, L., Barlow, J. C., & Klaverkamp, J. F. (1993) Metal accumulation and metallothionein concentrations in tree swallow nestlings near acidified lakes., *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1203-1207.

Maedgen, J. L., Hacker, C. S., Schroder, G.D., & Weir, F. W. (1982) Bioaccumulation of lead and cadmium in the loyal tern and sandwich tern., *Aech. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 99-102.

Marquenz M, R. (1990) 世界のウミガメ類, FAO生物種カタログ, 11, FAO, ローマ (内田 至監訳 1994), p136

Mehra, R. K., & Bremner, I. (1984) Species differences in the occurrence of copper-metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper-loaded animals., *Biochem. J.*, 219, 539-546.

Mertz, W., ed. (1986) *Trace elements in human and animal nutrition - Fifth*

edition., Vol. 1, p480., Vol. 2, p499., Academic Press, Inc., Orlando, FL, USA.

Minami, H., Minagawa, M. & Ogi, H. (1991) The relationship between stable isotopes and ecology of sooty (*Puffius griseus*) and Short-tailed (*P. tenuirostris*) shearwaters in the North Pacific., In *Abstracts of the 14th Symp. on Pol. Biol.*, Natl. Inst. Pol. Res., 69.

Mochizuki, Y., Suzuki, K. T., Sunaga, H., Kobayashi, T., & Doi, R. (1985) Separation and characterization of metallothionein in two species of seals by high performance liquid chromatography-atomic absorption spectrophotometry., *Comp. Biochem. Physiol.*, 82C, 2, 249-254.

Muirhead, S. J. & Furness, R. W. (1988) Heavy metal concentrations in the tissues of seabirds from Gough Island, south Atlantic Ocean. *Mar. Pollut. Bull.*, 19, 6, 278-283.

永井 章, 井村伸正 (1987) メタロチオネインの医療への応用. トキシコロジーフォーラム, 10, 4, 383-390.

中島正登, 佐伯和利, 馬場徳寿, 清田雅史, 立川 涼 (1995) キタオットセイの組織・器官中微量元素の分布. 環境化学, 5 (2) ,

中東 覚, 西村和一郎 (1989) 官公庁に所属する漁業海洋調査船を対象としたウミガメについてのアンケート調査. うみがめニュースレター, 4, 3-7.

Nishimura, W., & Nakahigashi, S., (1990) Incidental capture of sea turtles by Japanese research and training vessels: results of a questionnaire., *Marine Turtle Newsletter*, 51, 1-4.

西村和一郎, 中東 覚 (1992) 東シナ海におけるアカウミガメ (*Caretta caretta*) の分布. うみがめニュースレター, 12, 3-7.

西村光代 (1992) 海生生物における重金属蓄積とメタロチオネインの関係. 修士論文, p170, 愛媛大学.

野田香織 (1995) キタオットセイの重金属蓄積と毛を用いたその非捕殺的モニタリング. 博士論文, p95, 愛媛大学.

Noda, K., Ichihashi, H., Loughlin, T. R., Baba, N., Kiyota, M. & Tatsukawa, R. (in press) Distribution of heavy metals in muscle, liver, and kidney of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) caught off Sanriku, Japan and from the Pribilof Islands, Alaska., *Environ. Pollut.*

Noda, K., Ichihashi, H., Baba, N., Kiyota, M., & Tatsukawa, R. (投稿中)

Distribution of heavy metals in organs and tissues of northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) collected off Sanriku, Japan., *Mar. Pollut. Bull.*

野見山一生, 野見山紘子 (1994) カドミウムの標的器官と毒性発現メカニズム. 水環境学雑誌, 17, 4, 227-226.

野崎義行 (1992) 海水中の微量元素: 平均濃度と北太平洋における鉛直分布. 地球科学, 26, 25-40.

Ohlendorf, H. M., & Harrison, C. S. (1986) Mercury, selenium, cadmium and organochlorines in eggs of three Hawaiian seabird species., *Environ. Pollut.*, 11B, 169-191.

太田久吉 (1996) メタロチオネイン遺伝子の発現調整に関わる必須微量元素の役割. 日本臨床, 54, 1, 40-45.

Okamoto, K., Yamamoto, Y., & Fuwa, K. (1978) Pepperbush powder, a new standard reference material., *Anal. Chem.*, 50, 1950-1951.

Olafson, R. W. & Thompson, J. A. J. (1974) Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates., *Mar. Biol.*, 28, 83-86.

小野坂敏美, 田中慶一, 土井雅子, 岡原國男 (1978) 動物臓器中のMetallothioneinの簡易定量法. 衛生化学, 24, 3, 128-131.

Onosaka, S., & Cherian, G. (1981a) The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts., *Toxicol.*, 22, 91-101

Onosaka, S., & Cherian, G. (1981b) The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. II. Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein., *Toxicol.*, 23, 11-20.

Osborn, D., Harris, M. P., & Nicholson, J. K. (1979) Comparative tissue distribution of mercury, cadmium and zinc in three species of pelagic seabirds., *Comp. Biochem. Physiol.*, 64C, 61-67.

Pitrowski, J. K., Bolanowska, W. & Sapota, A. (1973) Evaluation of metallothionein content in animal tissues., *Acta Biochimica Polonica*, 20, 3, 207-215.

Rainbow, P. S. (1990) Heavy metal levels in marine invertebrates. In *Heavy metals in the Marine Environment* (Furness, R. W., & Rainbow, P. S., eds), pp67-80, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

Richards, M. P. (1989) Recent developments in trace element metabolism and function: Role of metallothionein in copper and zinc metabolism. *J. Nutr.*, 119, 1062-1070.

Ridlington, J. W., Chapman, D. C., Goeger, D. E., & Whanger, P. D. (1981) Metallothionein and Cu-chelation: Characterization of metal-binding proteins from tissues of four marine animals., *Comp. Biochem. Physiol.*, 70B, 93-104.

佐伯和利, 岡部祐子, 井関直政, 山岸 哲, 立川 涼 (1995) カワウ体内中の微量元素 (第1報) -ICP-MSを用いた定量とその分布-. 1995年度日本鳥学会, 1995年9月, 東京.

Sarokin, D. & Schulkin, J. (1992) The role of pollution in large-scale pollution disturbances. *Environ. Sci. Tech.*, 26, 8, 1476-1484.

佐藤政夫, 長井靖 (1987) メタロチオネインの測定法とその利用. トキシコロジーフォーラム, 10, 4, 348-357.

Scheuhammer, A. M. & Cherian, M. G. (1991) Quantification of metallothionein by silver saturation. *Methods in enzymology*, 205, 78-83.

Shoop, C. R., & Ruckdeschel, C. (1982) Increasing turtle strandings in the southeast United States: A complicating factor. *Biol. Conserv.*, 23, 213-215.

Stewart, F. M., Furness, R. W., & Monteiro, L. R. (1996) Relationship between heavy metal and metallothionein concentrations in lesser black-backed gulls, *Larus fuscus*, and Cory's shearwater, *Calonectris diomedea*., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30, 299-305.

Stoneburner, D. L., Patty, P. C., & Robertson Jr, W. B. (1980a) Evidence of heavy metal accumulations in sooty terns., *Sci. Total Environ.*, 14, 147-152.

Stoneburner, D. L., Nicola, M. N., & Blood, E. R. (1980b) Heavy metals in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): Evidence to support the hypothesis that demes exist in the western Atlantic Population., *J. Herpetol.*, 14, 171-175.

Subramanian, A. N., Tanabe, S., Fujise, Y., & Tatsukawa, R. (1986) Organochlorine residues in Dall's and Truei's porpoises collected from northwestern Pacific and adjacent waters., *Mem. Natl. Inst. Polar Res. Spec. Issue.*, 44, 167-173.

須田郁夫 (1995) メチル水銀の体内無機化における活性酸素青酸系の関与とその意義. 衛生化学, 41, 1, 1-13.

菅沼弘行 (1994) ウミガメは減っているか. 「ウミガメは減っているか

その保護と未来」(紀伊半島ウミガメ情報交換会・日本ウミガメ協議会共編), pp33.

Sugawara, N., Sugawara, C., Katakura, H., Takahashi, H. & Mori, M. (1991a) Copper metabolism in the LEC rat: Involvement of induction of metallothionein and disposition of zinc and iron. *Experientia*, 47, 1060-1063.

Sugawara, N., Sugawara, C., Sato, M., Katakura, H., Takahashi, H. & Mori, M. (1991a) Copper metabolism in the LEC rat: aged 30 and 80 days old: Induction of Cu-metallothionein and status of zinc and iron. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 72, 353-362.

Sugawara, N., Sugawara, C., Sato, M., Takahashi, H. & Mori, M. (1992) Excessive Accumulation of hepatic copper in LEC rats aged 80days without hepatitis and 130 days with hepatitis., *Pharmacol.Toxicol.*, 71, 321-324.

Suganuma, N., Lai, Y. R. & Sugawara, C. (1996) Accumulation of orally given cadmium in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with an inherently abnormal copper metabolism., *Toxicology*, 108, 1-7.

鈴木和夫 (1982) メタロチオネインの分析法の開発とその応用. 薬学雑誌, 102, 9, 801-815

鈴木和夫 (1982) メタロチオネインの構造的特徴と生化学. 化学増刊, 95, 91-197.

Suzuki, K. T., Ebihara, Y., Akitomi, H., Nishikawa, M., & Kawamura, R. (1983) Change in ratio of the two hepatic isometallothioneins with development from prenatal to neonatal rats., *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C, 33-38.

鈴木和夫 (1987) 金属結合タンパク質の検索と生物学的役割. トキシコロジーフォーラム, 10, 4, 338-347.

Suzuki, K. T., Kanno, S., Misawa, S., & Sumi, Y. (1993) Changes in hepatic copper distribution leading to hepatitis in LEC rats., *Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol.*, 82, 2, 217-224.

Suzuki, K. T., Kanno, S., Misawa, S., & Sumi, Y. (1993) Changes in copper distribution in the plasma and kidneys of LEC rats following acute hepatitis., *Res. Comm. in Chem. Pathol. and Pharmacol.*, 82, 2, 225-232.

鈴木和夫 (1993) LECラット研究の最近の進歩. ファルマシア, 29, 12, 1382-1386.

Suzuki, K. T. (1995) Disordered copper metabolism in LEC rat, an animal model

of wilson disease: Role of metallothionein. *Res. Commun. Moluc. Pathol. Pharmacol.*, 89, 2, 221-240.

鈴木和夫 (1996) メタロチオネインの構造と機能. *日本臨床*, 54, 1, 33-39.

Takeichi, N., Kobayashi, H., Yoshida, M. C., Sasaki, M., Dempo, K. & Mori, M. (1988) Spontaneous hepatitis in Long-Evans rats. *Acta. Pathol. Jpn.*, 38, 11, 1369-1375.

Tanabe, S., Miura, S., & Tatsukawa, R. (1986) Variations of organochlorine residues with age and sex in Antarctic minke whale., *Mem. Natl. Inst. Polar Res. Spec. Issue.*, 44, 174-181.

田辺信介, Subramanian, An., 立川 涼 (1987) 残留性有機塩素化合物をトレーサーとして用いた化学接近法によるイシイルカの生物過程解明の試み. 昭和61年度水産庁委託研究「基地式さけ・ます漁業混獲動物対策調査委託事業報告書」, 74-114

田中慶一 (1987) メタロチオネインの体内動態と腎毒性. *トキシコロジフォーラム*, 10, 4, 358-367.

田中之雄, 田中涼一, 樫本 隆 (1983) ラットにおけるカドミウムの生体内挙動に及ぼすシステインの影響 -カドミウム投与停止後の生体内推移-. *食品衛生誌*, 25, 2, 142-148.

Thompson, D. R. & Furness, R. W. (1989) The chemical form of mercury stored in south Atlantic seabirds. *Environ. Pollut.*, 60, 305-317.

Thompson, D. R. (1990) Metal levels in marine vertebrates. In *Heavy metals in the Marine Environment* (Furness, R. W., & Rainbow, P. S., eds), pp143-182, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

Thompson, N. P., Rankin, P. W., & Johnston, D. W. (1974) Polychlorinated biphenyls and p,p' DDE in green turtle eggs from Ascension Island, south Atlantic Ocean., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11, 399-406.

Tohyama, C., Himeno, S., Watanabe, C., Suzuki, T. & Morita, M. (1986) The relationship of the increased level of metallothionein with heavy metal levels in the tissue of harbor seal (*Phoca vitulina*)., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 12, 85-94.

Tsuchiya, H., Mitani, K., Kodama, K. & Nakata, T. (1984) Placental transfer of heavy metals in normal pregnant Japanese women. *Arch. Environ. Health*, 39, 1, 11-17.

Uchida, I., & Nishiwaki, M. (1982) Sea turtles in the waters adjacent to Japan. In *Biology and Conservation of sea turtles* (Bjordal, K., ed), pp317-319, Smithsonian Institution Press, Washington, DC USA.

内田 至 (1967) アカウミガメの成長について. 日本水産学会誌, 33, 6, 497-507.

内田 至 (1981) わが国沿岸のウミガメ類の現状と話題. 海中公園情報, 52, 3-4.

内田 至 (1981) アカウミガメ日本沿岸で産卵するウミガメの産卵生態. 採取と飼育, 9, 472-476.

内田 至 (1982a) ウミガメ学入門 (I) 現生ウミガメ類の形態と分類. 海洋と生物, 4, 5, 333-339.

内田 至 (1982b) ウミガメ学入門 (II) 繁殖の生態. 海洋と生物, 4, 6, 402-410.

内田 至 (1982c) アカウミガメ—その生態と現状—. 動物と自然, 12, 3, 2-6.

内田 至 (1983a) ウミガメ学入門 (III) 成長. 海洋と生物, 5, 1, 36-42.

内田 至 (1983b) ウミガメ学入門 (IV) 食性. 海洋と生物, 5, 3, 198-204.

内田 至 (1983c) ウミガメ学入門 (V) 卵の孵化をめぐる問題点. 海洋と生物, 5, 6, 416-421.

内田 至 (1984) ウミガメ学入門 (VI) 利用と保護. 海洋と生物, 6, 2, 82-88.

内田 至 (1985a) ウミガメ学ノート①吹上町海浜保護条例. 海洋と生物, 7, 4, 270-271.

内田 至 (1985b) ビニールを食べたウミガメ. 自然保護, 5, 12-15.

内田 至 (1986a) ウミガメ学ノート③離岸堤の構築とウミガメの産卵上陸生態の変化. 海洋と生物, 8, 3, 217-219.

内田 至 (1986b) ウミガメ学ノート④アカウミガメの生物学的最小型. 海洋と生物, 8, 4, 292-294.

内田 至 (1987) ウミガメ学ノート⑥測定部位と測定誤差. 海洋と生物, 9, 2, 120-121.

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. & Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7, 337-347.

和田 攻 (1985) 金属とヒト-エコトキシコロジーと臨床-. p320, 朝倉書店, 東京.

Wagemann, R., Hunt, R. & Klaverkamp (1984a) Subcellular distribution of heavy metals in liver and kidney of a narwhal whale (*Monodon monoceros*): An evaluation for the presence of metallothionein., *Comp. Biochem. Physiol.*, 78C(2), 301-307.

Wagemann, R., & Muir, D. C. G. (1984b) Concentrations of heavy metals and organochlorines in marine mammals of northern waters: Overview and evaluation., *Canadian Technical Rep. Fisheries Aquatic Sci.*, 1279, p97.

Wagemann, R., & Hobden, B. (1986) Low-molecular weight metalloproteins in tissues of the narwhal (*Monodon monoceros*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C(2), 325-344.

Wagemann, R., Stewart, R. E. A., Lockhart, W. L., Stewart, B. E., & Povoledo, M. (1988) Trace metals and methyl mercury: Associations and transfer in harp seal (*Phoca groenlandica*) mothers and their pups., *Mar. Mammal Sci.*, 4(4), 339-355.

Walsh, P. M. (1990) The use of seabirds as monitors of heavy metals in marine environment., In *Heavy Metals in the Marine Environment* (Furness, R. W., & Rainbow, P. S., eds), pp.183-204. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA.

Webb, M (1986) Role of metallothionein in cadmium metabolism. In *Cadmium* (Foulkes, E. C. ed.), pp.281-338. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Wenzel, C., Adelung, D., Kruse, H. & Wassermann, O. (1993) Trace metal accumulation in hair and skin of the harbour seal, *Phoca vitulina*. *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 3, 152-155.

Witkowski, S. A., & Frazier, J. G. (1982) Heavy metals in sea turtles., *Mar. Pollut. Bull.*, 13, 254-255.

Wlostowski, T. (1992) Postnatal changes in subcellular distribution of copper, zinc and metallothionein in the liver of bank vole (*Clethrionomys glareolus*): A possible involvement of metallothionein and copper in cell proliferation. *Comp. Biochem.*

Physiol., 103C, 285-290.

Yamada, T., Agui, T., Suzuki, Y., Sato, M. & Matsumoto, K. (1993) Inhibition of the copper incorporation into ceruloplasmin leads to the deficiency in serum ceruloplasmin activity in Long-Evans Cinamon mutant rat., *J. Biol. Chem.*, 268, 12., 8965-8971.

Yamaguchi, Y., Heiny, M. E., Shimizu, N., Aoki, T. & Gitlin, J. D. (1994) Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans Cinamon rat. *Biochem. J.*, 301, 1-4.

Yamamoto, Y., Honda, K., Hidaka, H., & Tatsukawa, R. (1987) Tissue distribution of heavy metals in Weddell seals (*Leptonychotes weddellii*), *Mar. Pollut. Bull.*, 18, 164-169.

山本義志 (1988) 「南半球産ミンククジラの重金属蓄積と生体影響」. p127, 博士論文, 愛媛大学.

Yamamura, M. & Suzuki, K. T. (1984) Isolation and characterization of metallothionein from the tortoise *Clemmys mutica*.. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C, 1, 63-69.

山村 充, 鈴木和夫 (1986) は虫類におけるメタロチオネインの誘導と生化学的性質. 国立公害研究所研究報告, 99.

山内 清, 竹下 完, 出口智久, 韓 志郎, 芳賀聖一, 大橋登美男 (1984) アカウミガメ (*Caretta caretta*) の卵の化学的組成について. 宮大農報, 31, 155-159.

山崎素直 (1986) イルカ腎中のカドミウムの存在形態., 立川涼 (代表) 環境指標としての長寿命生物, [環境科学] 研究報告集 B-288-R12-3., 文部省 [環境科学] 特別研究, 105-120.

山崎素直 (1988) 重金属の生化学. 「重金属と生物」 (茅野充男, 斎藤寛, 編) pp245-332. 博友社, 東京.

Yediler, A., Panou, A. & Schramel, P. (1993) Heavy metals in hair samples of the Mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). *Mar. Pollut. Bull.*, 26, 3, 156-159.

Yoshida, M. C., Masuda, R., Sasaki, M., Takeichi, N., Kobayashi, H., Dempo, K. & Mori, M. (1987) New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. *J. Heredity.*, 78, 361-365.

