

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

( / )

研究題目	農薬アトラジンがカエルの発声回路に及ぼす影響	報告書作成者	山口文子
研究従事者	山口文子		
研究目的	<p>アトラジンは日本や米国で幅広く使われている除草剤であるが、欧州諸国では地下水を汚染するとして2004年にその使用が禁止されている。最近、このアトラジンが低濃度(0.1ppb、100億分の一)でもカエルの脱雄化を促す作用があることが報告された。この濃度は米国環境保護庁の定める規制値の300分の1である。この脱雄化現象は、アトラジンが雄性ホルモンの分泌を抑制することに起因すると考えられている。本研究では、アトラジンがカエルの発する音声にどのような影響を与えるかを調べた。アフリカツメガエルの雄は繁殖期にアドバタイズメントコールという雄特有の音声を使ってメスに求愛をする。この求愛音声行動を制御する脳内神経回路は雄性ホルモンの作用によって発達することが知られている。アトラジンが雄性ホルモンの分泌を抑制するのであれば、この雄特有の脳内神経回路も脱雄化をとげ、結果として不完全なアドバタイズメントコール(以下、コール)を発するのではないか、という仮説の元にこの研究が進められた。</p>		

研究内容	<p>本研究では低濃度のアトラジンを含む水中で7年間成育されたオスのアフリカツメガエルをカリフォルニア大学バークレー校のタイロン・ヘイズ教授の研究室から入手し、以下の3つの実験を行った。</p> <p>第一に、これらのカエルのコールを録音し、アトラジンの有無により、音声構造に系統的な違いがあるかどうかを調べた。オスのアフリカツメガエルは繁殖期になるとアドバタイズメントコールと呼ばれる音声を発してメスに求愛する。このコールはクリック音の繰り返しから構成されている。このクリック音の繰り返し頻度はオスの血中雄性ホルモンの濃度と相関することが知られている。ツメガエルのオスを去勢して血中の雄性ホルモン濃度を下げると、クリック音の繰り返し頻度が次第に低下し、しまいにはコールを発しなくなることが私の研究室の以前の研究からわかっている。ここでは、録音したアドバタイズメントコールの音声解析を行い、クリック音の頻度がアトラジンの有無によって異なるかを調べた。</p> <p>第二に、カエルの発声器官である喉頭の筋肉の収縮性を調べた。雄と雌では喉頭筋の収縮性が大きく異なることが知られている。オスの喉頭筋は収縮、緩和にかかる時間が10ミリ秒なのに対し、メスの喉頭筋は、収縮、緩和を完了するのに50ミリ秒かかる。よって、雌雄の喉頭筋を継続的に60 Hz で刺激した場合（刺激と刺激の間のインターバルは16.6ミリ秒）、オスの喉頭筋は収縮、緩和を繰り返すが、メスの喉頭筋は収縮したまま硬直してしまう。ここでは、アトラジンが喉頭筋を脱オス化に導き、収縮、緩和にかかる時間が増加するかどうかを調べた。</p> <p>第三に、喉頭筋に入力シグナルを与えている脳内音声神経回路の機能特性を調べた。我が研究室では、アフリカツメガエルの脳を摘出し、体外で脳内音声神経回路を作動させることに成功している。ペトリディッシュに摘出した脳を神経伝達物質で刺激すると、オスがメスに向けてアドバタイズメントコールを歌っている際に記録できるものと全く同じ神経活動が喉頭運動神経から再現されるのである。私の研究室では、以前に脳内神経回路から出力される神経信号の発火頻度が血中雄性ホルモンの濃度に相関していることを示した。この手法を使って、脳からの神経活動がアトラジンの有無によって左右されるかを調べた。</p>
------	--

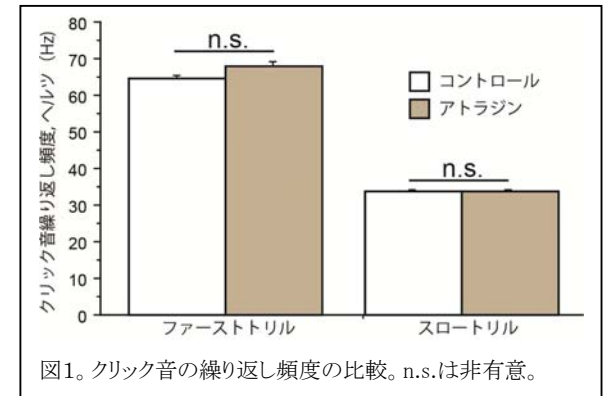
研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

( / )

<p>研究のポイント</p>	<p>低濃度のアトラジンが雄性ホルモンの分泌を抑制するのであれば、アフリカツメガエルの発声回路が脱雄性化し、コールの音声構造が退化することが予想される。本研究では、アトラジンがカエルの発声回路に及ぼす影響を行動学的、及びに生理学的見地から詳しく調べた。もし、低濃度のアトラジンが生体に及ぼす影響が明らかになった場合、このような内分泌障害が、単に両生類だけでなく、人を含む脊椎動物にも同様な悪影響があることが示唆される。本研究の結果は、アトラジンの農業使用を見直す必要性とつながると考えられる。</p>
<p>研究結果</p>	<p>本研究の対象動物は、アトラジンの生物学的研究者の第一人者である、カリフォルニア大学バークレー校のタイロン＝ヘイズ教授の研究室から入手した。これらのカエルは7年間低濃度のアトラジンが含まれる水環境で育てられた。まず第一に、これらのカエルのアドバタイズメントコールを解析した結果、クリック音の頻度にはアトラジンの影響が見られないことが解った。次に、発声器官である喉頭筋の収縮活動を調べた結果、筋肉にもアトラジンは影響を及ぼしていないことが解った。最後に、脳内発生回路から出力される神経信号を解析したところ、アトラジン漬けのツメガエルは、アトラジン無しの環境で育ったカエルと全く変わらない信号を出力していることがわかった。アトラジンは血中雄性ホルモンの濃度を低下させ、脱オス化を誘導することが明らかにされているが、雄性ホルモンの濃度低下は微量だと考えらる。よって、微量の雄性ホルモンの低下は発生回路に影響は及ぼさないと結論される。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>ヘイズ教授によると、アトラジンのカエルに及ぼす影響は、個体群により相当差異があるそうである。今回ヘイズ教授の研究室から入手したカエルはアトラジンの影響が少ない個体群から採取されたもので、他の個体群から採取された動物を使って実験をしたら異なる結果になる可能性がある。また、ヘイズ教授がカエルの飼育に使っているアトラジンの濃度は、米国環境保護庁の定める規定値の300分の1であり、アトラジンの影響が生体で確認しにくい状況であることが考えられる。次回の実験では、アトラジンの濃度を EPA の安全値に設定し、アトラジンの影響が確認されている個体群を使うことを検討している。</p>

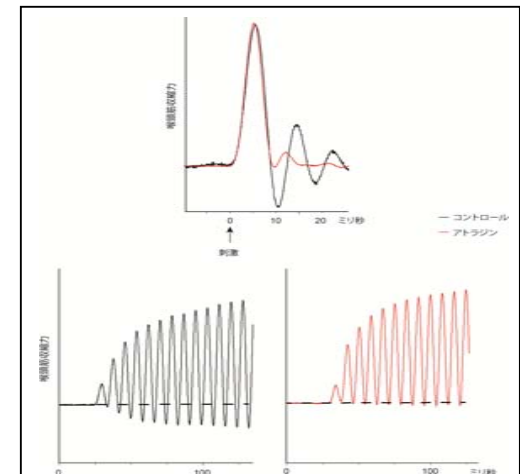
### アトラジンがカエルの音声に与える影響

オスのアフリカツメガエルのアドバタイズメントコールは、はクリック音の繰り返しから構成されている。このクリック音の繰り返し頻度はオスの血中雄性ホルモンの濃度と相関することが知られている。ツメガエルのオスを去勢して血中の雄性ホルモン濃度を下げると、クリック音の繰り返し頻度が次第に低下し、しまいにはコールを発。ここでは、録音したアドバタイズメントコールの音声解析を行い、クリック音の頻度がアトラジンの有無によって異なるかを調べた。アドバタイズメントコールはファーストリルとスロートリルからなり、ファーストリルはクリック音が60ヘルツで繰り返され、スロートリルではクリック音が30ヘルツで繰り返される。アトラジン漬けとコントロールのカエルのクリック音の繰り返し頻度を比べたところ、統計的有意差は見られなかった(図1)。よって、低濃度のアトラジンはカエルのオスの音声に影響はないと考えられる。



### アトラジンがカエルの喉頭筋肉に与える影響

オスのアフリカツメガエルの喉頭筋は10ミリ秒で収縮、緩和を完了するが、メスの喉頭筋は、収縮、緩和に50ミリ秒かかる。よって、雌雄の喉頭筋を継続的に60 Hz で刺激した場合(刺激と刺激の間のインターバルは16.6ミリ秒)、オスの喉頭筋は収縮、緩和を繰り返すが、メスの喉頭筋は収縮したまま硬直してしまう。コントロールとアトラジン漬けのオスの喉頭筋の収縮、緩和に要する時間を調べたところ、両グループとも10ミリ秒程度で収縮、緩和を完了し(図2、上)、統計的有意差はみられなかった。また、両グループの筋肉を60 Hz の電気信号で刺激したところ、両方とも完全な収縮、緩和を繰り返し(図2、下)、メスの筋肉のような硬直は見られなかった。したがって、低濃度のアトラジンは喉頭筋を生理学的にメス化することはないと結論される。



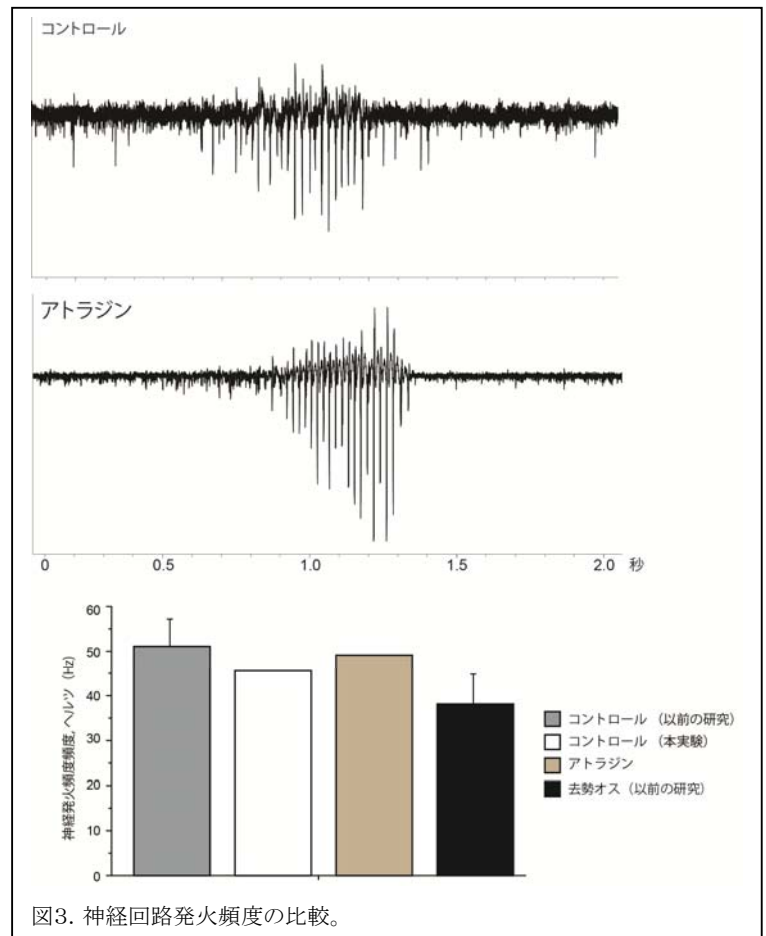
### アトラジンがカエルの発声神経回路に与える影響

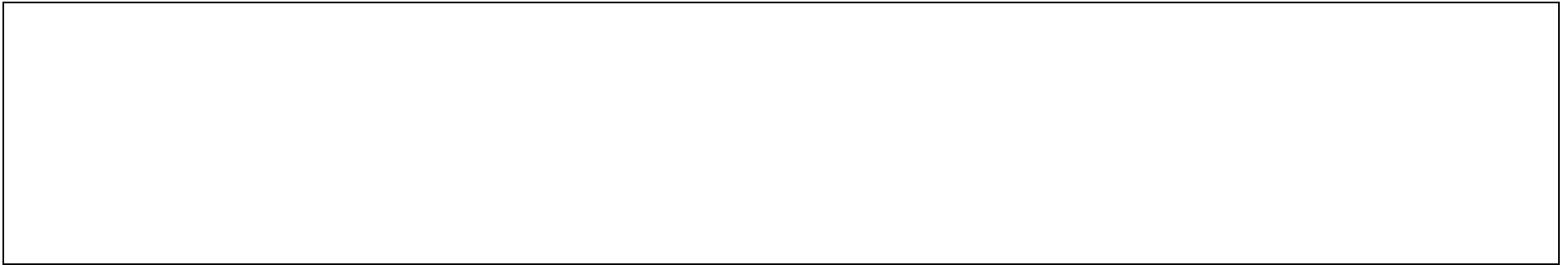
アフリカツメガエルの脳を摘出し、脳内神経物質であるセロトニンを投与すると、体外で脳内音声神経回路を作用させることができる。私の研究室では、以前に脳内神経回路から出力される神経信号の発火頻度が血中雄性ホルモンの濃度に相関していることを示した。この手法を使って、脳からの神経活動がアトラジンの有無によって左右されるかを調べた。

理由は不明だが、ヘイズ研究室から入手したカエルの脳から神経活動を誘発するのは非常に困難で、結果的にはコントロール1匹とアトラジン漬け1匹からしか神経活動の記録をとることができなかった(図3、上)。しかしながら、この記録と以前の私の研究の結果を比べることで、アトラジンは神経回路の機能にも影響を与えてないことが示唆された。以前の研究

から、コントロールオスの神経回路の発火頻度は  $51.0 \pm 6.0\text{Hz}$  であるのに対し、去勢オスの発火頻度は  $39.0 \pm 8.0\text{Hz}$  であることがわかっている(図3、下)。本実験で用いたコントロールオスの発火頻度は  $46.5\text{Hz}$ 、アトラジンオスの発火頻度は  $49.1\text{Hz}$  であった(図3、下)。アトラジンオスの発火頻度は以前の研究のコントロールオスの平均値に近く、去勢オスの値からは程遠い。よって、神経回路の発火頻度にもアトラジンの影響は見られないと結論する。

これらの結果は、今までに報告されてきたアトラジンによるカエルにおける脱オス化現象と全く異なる。この実験に使われたカエルの提供者であり、アトラジンの生体への影響を報告した第一人者であるヘイズ教授によると、アトラジンの影響は個体群毎に大きな差があるそうである。ここで使われたカエルは、長期に渡り(7年)アトラジンを含む水で飼育されていたにもかかわらず、アトラジンに感受性の低い個体群から採集されてきたため、今回の実験では発声回路への影響が見られなかったものと考えられる。また、ヘイズ研究室でカエルの飼育に使用しているアトラジン濃度は、米国環境保護庁(EPA)の定める許容濃度の300分の一であり、この低濃度のために本実験ではアトラジンの大きな影響が見られなかったということも考えられる。次回には、アトラジンに感受性の高い個体群を用いて、EPA の定めるアトラジンの許容濃度で飼育されたカエルを用いて実験を行うことを検討している。





(注:フローチャート図, ブロック図, 構成図, 写真, データ表, グラフ等 研究内容の補足説明にご使用下さい。)

様式-10