

内分泌攪乱物質による多摩川流域の土壤動物汚染の解明

— 環形動物貧毛綱「ミミズ」を指標に用いた解析 —

2002年

蒲 生 忍
松 本 誠 治

杏林大学保健学部環境生命科学教室

目 次

はじめに

環境ホルモン	1
環境汚染とミミズ	3
ミミズについて	5

土壌環境評価動物としてのミミズの野外生態調査

1. 調査地点と調査方法	12
2. ミミズの世代周期	17
3. フトミミズ生殖器の検討	22

ミミズの実験動物化

1. シマミミズ	29
2. ヤマトヒメミミズ	35

ミミズの遺伝子解析

1. ミミズの遺伝子情報	39
2. ミミズの遺伝子情報解析	39
3. シマミミズの遺伝子解析	47

結 語	48
-----------	----

成果の公表について	50
-----------------	----

謝 辞	51
-----------	----

引用文献	52
------------	----

はじめに

環境ホルモン

近年、生態系での様々な生殖異常が報告され、環境汚染物質、特に女性ホルモン様の活性を持つ内分泌かく乱化学物質（以下 環境ホルモン）が、その原因である可能性が指摘された（1,2）。メス同士で営巣するカモメ、ワニの雄性生殖器の異常、カメや魚のメス化など世界各地で野生動物における奇妙な現象が報告された。まさに女性ホルモン様物質による汚染でオスがメス化し、有性生殖による種の維持が困難になる有様が、絶滅危惧種の話も重なり注目を集めた。さらにヒトにおいても精子数の減少（3）も報告されて、メス化現象がヒトにも及んでいる可能性が指摘されている。この原因が総て環境ホルモンと呼ばれる物質なのか、議論の余地はある。しかし、環境ホルモンはその作用機構が、従来の環境汚染物質とは異なるカテゴリーのものと考えられる。

従来の環境汚染物質はそれ自体が非常に強い毒性を持つことが明らかな（または後に明らかになった）物質である。非意図的に環境中に放出された重金属、有機水銀やダイオキシン類、また意図的に特定の生物を殺すことを目的に放出された農薬類がこの範疇に入る。それに曝露され摂取することが生物の機能不全、さらに個体死へと直結する。また放射性物質に代表される突然変異原性を持つ物質の場合、その物質に曝露された生物の遺伝子を変異させることで発がんを誘導する。または生殖細胞を変異させることで次世代に影響を与える可能性がある。現在では、このようなカテゴリーの物質は厳密な検査のもとに使用が禁止（または制限）され、環境中に放出される危険性は格段に低いといえる。

一方、現代の生活は化石燃料に由来する各種の合成化学物質により支えられている。この多くは極めて安定で安全、かつ天然物よりも環境に対する負荷が少なく安価と考えられ、産業的に利用されてきた。しかし、ヒトには毒性を示さないとされていた化学物質の一部が女性ホルモンのエストラジオールに類似の構造をとる。この物質には従来の試験法では、毒性も変異原性も見出されない。しかし、女性ホルモン様の活性を示す。女性ホルモンはそのレセプターを介して各種の遺伝子の転写を調節するため、発生初期等にこのような物質に予期せず曝露されると、形態形成の微妙なずれを生じる。

その結果が生殖器や生殖行動の異常として検出されると考えられる。環境ホルモン問題を複雑にしているのは、環境ホルモンがゲノム・遺伝子には一切傷を残さず、その精妙に調節されている働きをわずかに狂わせていること、そのため、因果関係の特定が非常に困難なことといえる。

環境ホルモンの影響は今まで主に水圏または地上性の脊椎動物で報告されている。日本では愛媛大学農学部 田辺信介らが、熱帯地方で今も使用されるヘキサクロロヘキサン (HCH) 等の有機塩素系農薬が海棲哺乳類のイルカやアザラシに異常に蓄積し、その行動異常や免疫機能低下の原因となる可能性を指摘した (4)。

また国立環境研究所の堀口敏宏らは全国で腹足類イボニシを調査し、本来雌の個体に雄性生殖器が重複して形成され、生殖不能に陥るインボセックスと呼ばれる生殖器異常を見出した (5)。この原因は船底塗料として使用されるトリブチルスズ (TBT) やトリフェニルスズ (TPT) 等の有機スズ化合物とされている。しかし、上記のメス化の場合とはことなり、その作用機構についての解析は進んでいない。

環境ホルモンの土壌環境への影響についての報告は未だにない。そこで我々は土壌動物に対する環境ホルモンの影響について調査を計画した。本計画では、最終的には分子生物学的手法を用いた環境ホルモンの分析法を開発し、土壌汚染の実態、さらには生態系汚染の解明を目指している。これを行なうためには対象となる土壌動物は以下のことができる限り満たされることが必要である。

- 1) 広い地域に生息し採集・取り扱いが容易であること
- 2) 生活史や発育段階などが明らかであること
- 3) 野外のみならず、実験室内での飼育が可能であること
- 4) 分子生物学的な解析が可能であること

これらの条件総てを満たすことは困難で、次善の対象としてミミズを選択した。

ミミズは、土壌表層及び土壌中に棲息し土壌環境の変化を直接的に受ける。鳥類や哺乳類などの捕食者への生物濃縮過程を検討するうえで、中間指標としても適している。また雌雄同体という性質は生殖器官の発達を検討するうえでも興味深い材料である。

ミミズは各地に適応した種が棲息し、生殖も含め幅のある生活形態をとる (6)。そのため、個々の種についての正確な発育・生活史については不明な点が多い。さらに分子生物学的な情報の蓄積は皆無といえる。近年のヒトから線虫 *Caenorhabditis elegans* にまでいたる各種生物のゲノム解析、特に線虫ではほぼゲノム全域を解読する段階に達しており、そのゲノム情報はインターネットを介して公開・入手可能である (7)。また、生物にとり必須の要素は多くの動物で共通で、進化の過程でも比較的よく保存されている。従って、既に知られている他の動物のゲノム情報を利用し解析する事で、現時点でのミミズのゲノム情報の不足はある程度補填できると考える。ミミズを環境指標とするには、ミミズについてよく知ることと遺伝子情報の充実させることが必要である。

環境汚染とミミズ

環境汚染の指標としてミミズを取り上げた記載はいくつか知られている。最も著名な例はレイチェル・カーソンで、農薬や殺虫剤等の人が生活改善のために作製し使用・撒布した化学物質が生態系に予期せぬ影響を与える危険性について最初に警鐘を鳴らした(8)。1962年の著書『Silent Spring-沈黙の春』は世界的に高く評価されている。その中、「第8章 そして鳥は鳴かず」で、ミミズによる「食物連鎖と生体濃縮」を示唆する次のような記載がある。

「鳥がまた帰ってくると、ああ春がきたな、と思う。でも、朝早く起きても、鳥の鳴き声がしない。それでいて、春だけがやってくる一合衆国では、こんなことが珍しくなくなってきた。いままではいろんな鳥が鳴いていたのに、急に鳴き声が消え、目を楽しませた色とりどりの鳥も姿を消した。突然のことだった。—— オランダニレ病防除のスプレーは1954年、大学の構内からはじまった。最初に小規模なスプレーがあった1954年は、べつに変わったこともなく過ぎた。そのあくる春も、渡り鳥のコマドリは大学に帰ってきた。でもやがて何かが狂っていることがわかりだした。大学の構内には、死んだコマドリ、死にそうなコマドリの姿が見られだしたのだ。いつものように元気に餌をあさったり、いつものねぐらに集まるのはごくわずか。あくる年も、またその次の春も同じことがものうくりかえされていく。薬品を撒布した個所は毒の落とし穴で、そこに落ちたコマドリは一週間とたたないうちに死んで行く。だが、なぜ？ その理由は？スプレーは『鳥には無害』だという。いろんなことから推測してみると、コマドリはじかに殺虫剤にあたって中毒するよりも、むしろ間接的に、ミミズを食べて中毒するらしい。大学構内のミミズをうっかり実験用のザリガニに与えたことがあったが、そのときには、あつというまにザリガニ全部が死んでしまった。秋になると葉が落ちる。落葉は幾重にも重なり合い、やがて少しずつ土壌になってゆく緩慢な過程がはじまる。このとき、落葉をあさりまわるのはミミズでニレの葉は大好物なのだ。葉と一緒に殺虫剤もミミズの体内に入り蓄積され、濃縮されてゆく。解剖してみると、ミミズの消化管、血管、神経、体壁にDDTが残留していたという(ペーカー博士)。もちろん毒に当って死んだミミズもいる。が、あるものは生きのび毒の生物増幅器となる。そして春になると、コマドリがやってきて、楡の木ーキクイムシー殺虫剤ーミミズという連鎖の輪がつながるのだ。」

(青樹築一訳・新潮文庫版より一部省略して引用)

カーソンは土壤動物、特に殺虫剤に汚染されたミミズがコマドリの餌となることで、コマドリの死の原因となることを示唆している。すなわち、生物の死を、食物連鎖と生体濃縮による生態系の破壊という概念を導入することで示したといえる。同時にそれは将来人間の生命をも脅かすことを警告した。カーソンの『沈黙の春』は、非常に強く我々に訴えるものを含んでいる。

あいにく、『沈黙の春』に引用されたベーカー博士の原著論文(9)は入手不能であった。しかし、カーソンの記述を裏付ける別の文献がある。1966年、Davisらは、有機塩素系殺虫剤DDTが散布された果物・野菜畑のツリミミズ、ヒメミミズ、甲虫、鳥について調査した(10)。最も高い値を示したのは甲虫、ついで甲虫を好むヒバリで、ヒメミミズはヒバリと同じレベル、ツリミミズはそれらに比べ低い値を示した。この結果は食物連鎖による濃縮を示している。甲虫の高い値は鳥にとって致死量で、死の直接の原因は急性毒性が示唆される。ミミズがヒバリの死に関与した可能性は低いと考える。カーソンは本筋において正しいが、ミミズにとってはコマドリの死は濡れ衣かもしれない*。

我々はミミズを用いた環境評価系を確立するにあたり、中央大学経済学部中村方子教授に指導をお願いした。1971年、PCBにより田子の浦港底土が汚染されていることが明らかに成った。その汚染底土へドロを浚渫により富士川河川敷にプラスチックシートを敷いて移し、運動場等が造成された。中村教授は1980年から1983年にかけて、この造成地の土壤動物調査を行い、ミミズ及び捕食者のPCB含量について調査した(11)。それによると造成地にはムラサキツリミズ *Dendrobaena octaedra* とヒトツモンミミズ *Amyntas hilgendorfi* が棲息し、順調に生態系を構成しはじめていること、これらのミミズにはPCBの蓄積が顕著でないことが示されている。

また中村教授はその著書『ミミズのいる地球』(12)のなかで、有吉佐和子著『複合汚染』(13)の中に次のような記載があることを指摘している。孫引きする。

「たとえばよ、分かりやすく言えば、ミミズのいねえ土のことだな。硫酸かければよ、ミミズは即死すっから。ミミズがいねえとよ、土が堅くなって、どうにもなんねえす。土が死ぬことは、早くいえばミミズが死んだっちことだな」

これはミミズが肥沃な土壤を形成するのに果たす役割と薬剤感受性を肌で感じさせる言葉である。しかし、ミミズは本当に死んでしまったのか、それとも移動してしまったのか？ 死ぬと

* 脚注：アメリカでコマドリ Robin と呼ばれているのはコマツグミと思われる。
(佐藤理子氏 私信)

すればどのような化学物質にどの程度の感受性があるのか。昨年11月、ミミズの農学的利用に関し世界的権威であるオハイオ州立大学昆虫・土壌生態学Clive Arthur Edwards教授を杏林大学が招聘し、親しくお話を伺う機会を得た。教授はツリミミズLumbricidae科のシマミミズ*Eisenia fetida*を用いて農薬や化学肥料による土壌汚染の評価を行なう試みを続け、OECDまたISOでの標準的評価法の確立に貢献してきた。また各種の農薬のミミズを含めた土壌生態系に与える影響について継続的に生態学的解析を進めている(14)。

Edwards教授が主に研究に用いているシマミミズは中型種で飼育は容易、繁殖力が強く気候条件により通年繁殖する。幼体から成体まで通常1-2ヶ月と生育も早い。体長約10cm以下で土壌の表層、または直下に棲息する。北米及びヨーロッパではツリミミズ科のミミズが主であるが、日本で通常、ミミズとして認識しているのはフトミミズMegascolecidae科のミミズである。上記の『複合汚染』のミミズも畑に住むこのフトミミズの仲間と推測される。これは体長10cm前後の中型から大型、表層から地中10-20cmほどを好み、飼育は困難、生育に時間がかかる。概ね一年性と考えられるが、時として見出される大型のものは越冬多年性の可能性もある。はたして、この生態のまったく異なる二種が、化学物質に対して同じような応答を示すのだろうか？ また、ミミズは他の生物と比べて汚染に強いのか？ 同じような解毒機構を持つのだろうか？

我々はこの問に対する答えを持っていない。唯一、ミミズと環境汚染物質の関係について、分子レベルで解明が進んでいるのは重金属の例である。ミミズはカドミウムやクロム、また鉛などの重金属に対して比較的高い抵抗性を示す。ミミズが重金属を結合するタンパクを豊富に含み、体内に摂取した重金属を結晶化し無毒化すると考えられている(15)。この金属結合タンパクは、哺乳類のメタロチオネインと呼ばれるタンパクと相同性を示す。哺乳類では微量金属元素と結合し、転写調節に重要な働きをすると考えられている。イギリスの草木が育たない重金属汚染土壌にシマミミズを導入することで、ミミズへ重金属が移動し、驚異的な土壌の改善が見られたと報告されている(16)。しかし、シマミミズは土壌生態系では比較的上位に位置する捕食者で、ヒメミミズ以下の生態系無しには生存できないこと、また小型のヒメミミズも同様のタンパクを持つことから考えると、この浄化作用も単純にシマミミズへの蓄積のみとは考えにくい。

ミミズについて

我々は研究材料としてミミズを取り上げることにしたが、ミミズについてどこまで知っているのだろうか。ミミズに関する生態学的研究は「進化論」の著者であるチャールズ・

ダーウィンに始まる。ダーウィンは、彼の隠棲地の庭に自生する *Lumbricus terrestris* (和名：オウシュウツリミミズ。但し日本にはいない) の徹底的な観察を基に最後の著書『ミミズと土 The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observation on their habits』(17) を著した。その中で、ミミズが土壌を摂取し糞塊として表層土を形成していくこと、その表層土の形成が遺跡の保存に貢献したこと、ミミズが土壌を混和することで植物の生育を助けることを指摘し、さらに知覚や習性をも記載している。

また、レイチェル・カーソンも『沈黙の春』の「第5章 土壌の世界」でダーウィンとミミズについて次のように記載している。

「土壌の世界—真っ暗な土のなかにうようよしている生物については、ほとんど研究されていない。でも、探ってみればみるほど、こんな素晴らしい世界がまたあるかと思う。——土壌のなかにはたくさんの生物がうごめいているが、なかでも大切なのはミミズだろう。いまから八十年まえほど、チャールズ・ダーウィンは『ミミズの活動による栽培土壌の形成—ならびにミミズの習性の観察』という本を出した。ミミズが土壌の形成に基本的な役割を果たすという考えはここにはじめて述べられたといっている。」
(青樹築一訳・新潮文庫版より一部省略して引用)

日本では1920年代に東北帝国大学理学部教授を務めた畑井新喜司博士を中心として研究が進められ、数々の新種記載や日本産のミミズの生態や特徴についての基本的な記載が行なわれている。この研究の原著論文の多くは散逸し現在では入手困難であるが、博士の講演をもとに書き下ろした『みみず』(18) と題する昭和6年出版の書籍に集約されている。詳細なデータはないものの、そこに示された研究の成果は今でも十分に通用するものである。この『みみず』も長く絶版となっていたが、京都大学農学部渡辺弘之教授のご尽力で復刻され入手可能となっている。

近年では、Edwards教授が、長年にわたり、農業とミミズの関係、農業廃棄物のミミズによる処理、ミミズの糞塊の肥料としての有用性などの農学的な応用の研究を進めてきた。その成果を集約し改訂を重ねている著書『Biology and Ecology of Earthworm』が唯一の体系的な解説書といわれている (19)。

ミミズは地球上で4億年以上の歴史を持ち、極地を除き人の生活する所、ほぼ全域に分布する。ミミズの住めない所は耕作に不適であり、人の住環境として不適といっても過言

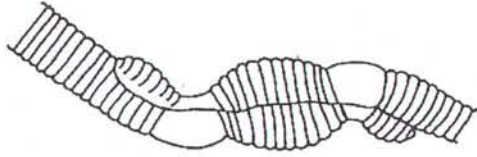
ではない。ミミズは生態学的には土壤中の捕食者に位置づけられる。落葉や枯葉などの植物枯死体と共に土壤中の線虫や原生動物等を餌とし摂食する。摂取量の約85%を未消化のまま糞塊として排出し、土壌形成に多大な貢献をする。現在までに主に形態学的な分類により約3,000種が記載されている。大きさは1メートルを超えるものから数ミリのものまでである。その形態は筒状で単純であるため、内部形態と外部形態、特に生殖器の外部への開口部を主な指標に分類される。棲息場所は海水適応したものから陸棲まで、土壌表層棲から地中棲と幅広い。日本には主に温暖な気候を好む大型から中型フトミミズ科 *Megascolecidae* のミミズが数十種、寒冷な気候を好むツリミミズ科 *Lumbricidae* のミミズが十種ほど、その他の科のミミズが十種ほど自生する。ツリミミズを含め相当数が移入種と考えられている。

ミミズは雌雄同体の生物である。フトミミズでは10-11の体節に精巣があり輸精管が18体節にまでのび雄性孔を開口する(図1)。13体節には卵巣があり、14体節に雌性孔が開口する。卵包を形成する生殖隆起(環帯)は14-16体節にある。受精嚢は8-10体節にある。環帯を中心に頭と尾を相反する方向にして、雄性孔と受精嚢孔を合せて接合し相手の精子を受精嚢に受け取る。十分に発達すると卵包となる分泌物が環帯から分泌され頭の方角に移動する。移動の過程で卵が卵包の中に、続いて受精嚢中の相手精子が卵包の中に放出される。従って、接合は精子の交換であり、受精は卵包の中で起こる。卵包の中で初期発生と形態形成を行い、成体と基本的に同形だが生殖器未発達の幼体になる。卵包から出る時は成体と基本的に同じ体制を持つ。ツリミミズの場合、雄性孔は15体節に開口し、環帯は32体節以降にある。受精嚢は未発達で、接合時に、相手の精子を袋状の精嚢として体表に付着させる。

人と共に生態系を形成している身近な、そして高頻度に棲息する動物でありながら、ミミズに関する近代生物学的な研究は乏しく、上記の生殖過程についても疑問の余地が残る。現在、米国オハイオ州立大学Edwards教授のグループが農学的利用(14)、英国Cardiff大学A.J.Morgan博士のグループがミミズの金属結合タンパク(メタロチオネイン)の研究(20)を進める以外では、種の記載のみを目的とし、新しい技術を用いその生態や生理に踏み込んだ研究はほとんど類を見ない。

今回は我々は、東京都下を中心に多摩川及びその支流流域数ヶ所でのミミズの生態調査、本学敷地内と奥多摩町峰畑で、ほぼ2年間にわたり継続的な生態調査を行なった(図2)。

その採取標本中、ヒトツモンモンミミズ *Amyntas hilgendorfi* を中心に生殖器を検討した。また世界共通種のシマミミズ（ツリミミズ科 *Eisenia fetida*）の実験動物化を目指した室内飼育系の確立と、日本で発見され特異な増殖様式をとるヤマトヒメミミズ *Enchytraeus japonensis* について検討した。さらに分子生物学的解析の基盤となるDNA抽出法、PCRによる遺伝子増幅法を確立した。

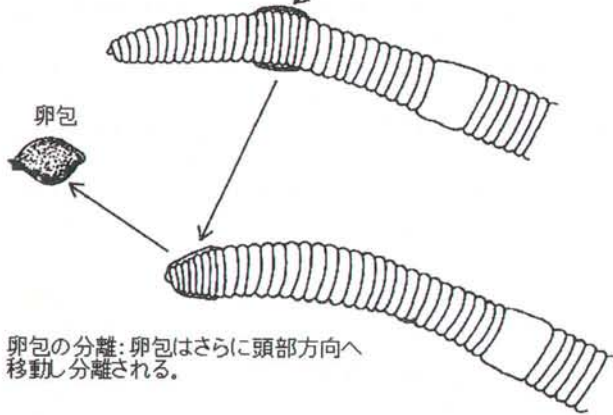


交接: 雄性孔と受精嚢孔を合せて、精子を交換する。

卵包形成: 環帯分泌物から卵包を形成する。卵包の頭部方向へ移動する過程で、環帯近くの雌性孔から卵が放出される。



受精: 卵包はさらに頭部方向へ移動し受精嚢性孔から精子が卵包内に放出される。



卵包の分離: 卵包はさらに頭部方向へ移動し分離される。

文献14 p53より一部改変して引用



シマミミズの交接

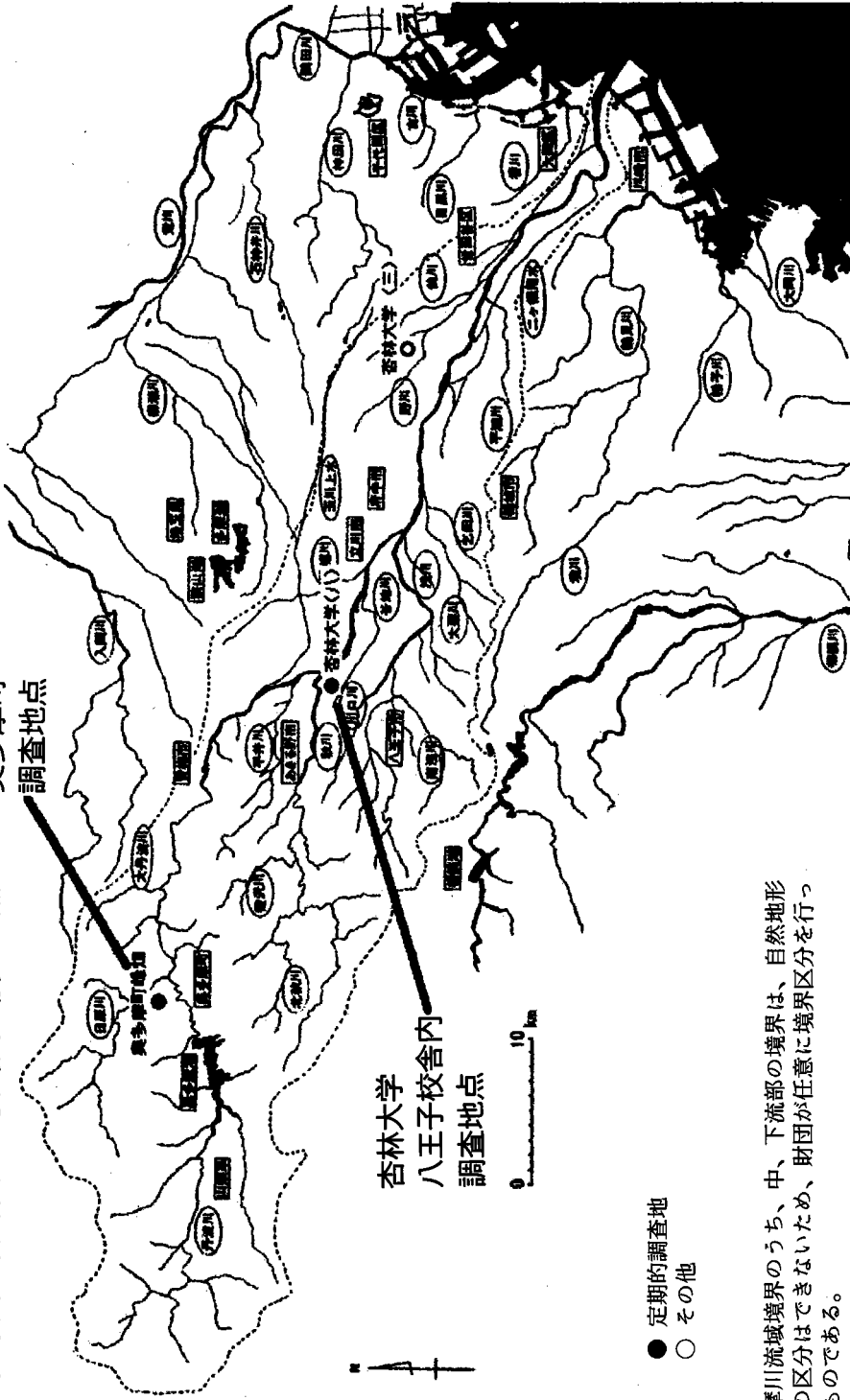


左を環帯を中心として拡大。相互の環帯部分で強く交接している。

図1 ミミズの交接と卵包形成

●多摩川の首都圏の主要河川と調査地点

奥多摩町
調査地点



杏林大学
八王子校舎内
調査地点

- 定期的調査地
- その他

※ 多摩川流域境界のうち、中、下流部の境界は、自然地形上の区分はできないため、財団が任意に境界区分を行ったものである。

(「とうきゅう環境浄化財団調査および試験研究助成に関する規定」 p12より抜粋し加筆)

図2 多摩川流域と調査地点

奥多摩調査地点：奥多摩町峰畑の久田雅夫氏の撮影拠点

杏林大学八王子校舎調査地点：八王子市宮下町（加住丘陵・秋川隣接）

土壤環境評価動物としてのミミズの野外生態調査

1. 調査地点と調査方法

平成12-13年度、ミミズの継続的生態学調査を多摩川上流部の奥多摩及び多摩川支流秋川に隣接する本学校地内の雑木林でハンドソーティングおよびシフティングにより行なった。採集は毎回、約50cm角の範囲を基準としたが傾斜地や道路脇等では適宜、ほぼ同面積の区画を設定した。また採集は主に表層と表層直下5~10cm程度とした。採集したミミズは水中におき、二本のガラス棒ではさみ、徐々にエタノールを加えて麻酔した。最終100%エタノールで固定し、体長、体幅、体節数を計測した。体幅の計測は環帯、または環帯を形成する領域とした。固定後、標本は解剖し、生殖器の発達について検討した。

奥多摩の調査地点は奥多摩町氷川峰畑周辺、標高700m（図2、図3）に位置する。動物写真家久田雅夫氏が、住民が放置していた旧家を借り受け撮影拠点としている場所で、家の持ち主及び久田氏の許可を得て、周辺での標本採集を行なった。

久田氏撮影拠点は奥多摩町から北へ東京農業大学の演習林につながる林道を車で15分、徒歩では1時間以上の距離にあり、奥多摩町から標高差が400mある。林道から約10mのぼった山の斜面をわずかに切り開き平地を作り二軒の家があり、その一軒を久田氏が撮影拠点としている。奥多摩町との夜間気温、また冬季気温の差は数度と推定される。家北側（山側）は整然と植林された杉林、その奥の峰からは東京農業大学の演習林に接する。北西はかつての住民が耕作をしていたわずかな段々畑の名残である。南側は林道をはさんで急な斜面で深い谷になり北側と同様、整然と杉が植林されている。南北とも杉は樹齢十数年程度で直径20cm前後、手入れが行き届いているとは言えないが完全に放置された山林ではない。休日にごく限られた数のハイカーが林道を通過するのみで非常に閑静で、久田氏の写真集『奥多摩に生きる動物たち：山小屋の撮影日誌』（21）で紹介されているごとく、鹿、テン、アナグマ、ハクビシン等多数の野生動物が棲息し、夜には頻りに山小屋周辺を徘徊する。

本学校地内では、本学から加住北丘陵をこえ秋川に達する小道に沿う雑木林内の窪地を調査地点（図2、図4）とした。小道は送電線補修を目的とし、本学学生がたまに散策する程度で人通りはほとんど無い。標高約150mで、コナラが主体の落葉広葉樹林、アズマネザサが主体の草本層よりなり、特別な手入れはされていない。

加住北丘陵自体は多くの二次林が保存されている。しかし、近隣の人家での番犬、大学食堂の残飯をあさる半野生化した猫等の存在、また本学西1 km及び2 kmで加住北丘陵を横断する交通量の多い道路等を考慮すると、秋川上流部の森林地帯との中大型野生動物の往来は遮断されていると考えるのが妥当であろう。

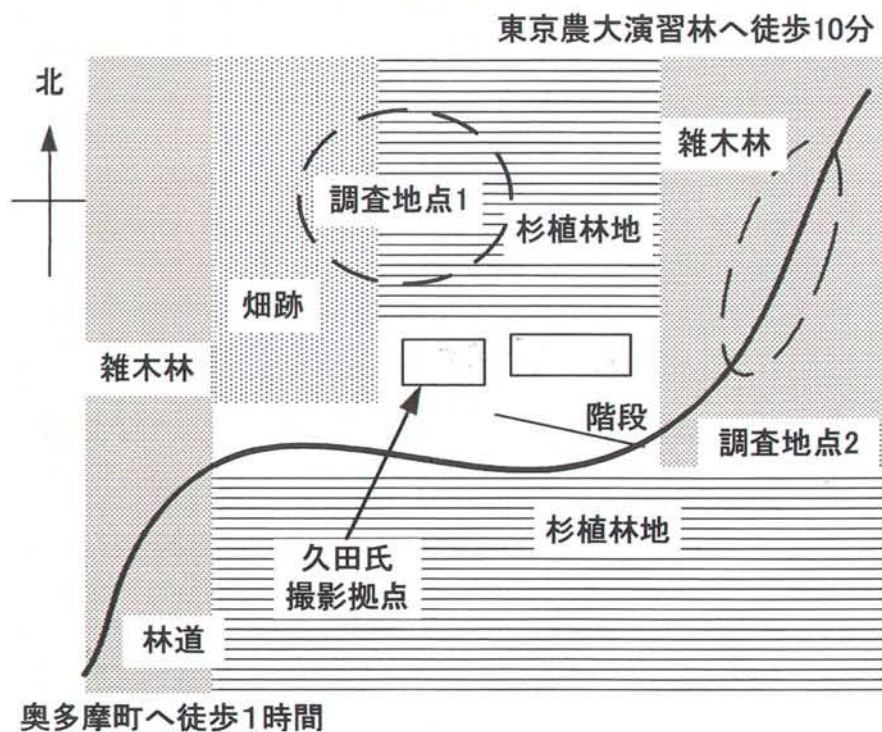
久田氏撮影拠点の家の裏側杉林一畑地跡と林道沿いの二箇所ですら2年間、継続的に採集した。

日本国内には概ね80種のミミズが自生する。主に温暖な気候を好む大型から中型フトミミズ科Megascolecidaeのミミズが約60種、寒冷な気候を好むツリミミズ科Lumbricidaeのミミズが十種ほどといわれる(22,23)。一般に観察されるフトミミズは成熟個体で概ね10~15cm、数種ほどである。ツリミミズは概ね5 cm以下、フトミミズは各体節の全周に1列の剛毛、ツリミミズは体節腹側に2本ずつ4組計8本の剛毛を持つことで区別できる(図5)。また成熟個体の環帯は、フトミミズでは背腹側の区別無く帯状であるのに対し、ツリミミズでは背から側壁部までの鞍状を示す。

奥多摩調査地で採集したミミズで体長10cm-15cm(但し、固定時に元気に生存していた個体の固定後の体長)の種は大多数をヒトツモンミミズ*Amyntas hilgendorfi*、少数が*Amyntas corticis*と同定した。本学調査地でも大多数をヒトツモンミミズ*Amyntas hilgendorfi*と同定した。本研究では従来のEastonの基準(22,23)に従い、オーストラリア連邦科学産業研究機構のRobert John BLAKEMORE博士の助力を得た。

なお、フトミミズの分類については当該分野の専門家の中で意見が分かれている。和名ヒトツモンミミズは*Amyntas hilgendorfi*または*Pheretima hilgendorfi*と表記される。すなわち属名のレベルで不一致がある。また、*Amyntas corticis*については、新旧の文献間の不一致のため和名を確定することができない。

最近多摩地区から多数のフトミミズの新種が報告されている(24)。この新種については、報告が必ずしも完全でないこと、新種タイプ標本の閲覧が困難であること、また新種の判定基準が従来の学説と必ずしも一致するものでないことなどから、議論がある。種ごとの形態的な変異の幅及び原因が明確に示されていない現状では、むしろDNA配列の解析等の新しい手段により明らかにすべきであると考えられる。また、報告が新種として認知しうるものであれば、多摩地区に特有の種か否か等、今後の広範な調査が必要であろう。現在、BLAKEMORE博士を日本学術振興会外国人研究員として改めて本年5月より招聘し文献的及び形態的な照合を進めている(25,26)。



奥多摩調査地点の見取り図

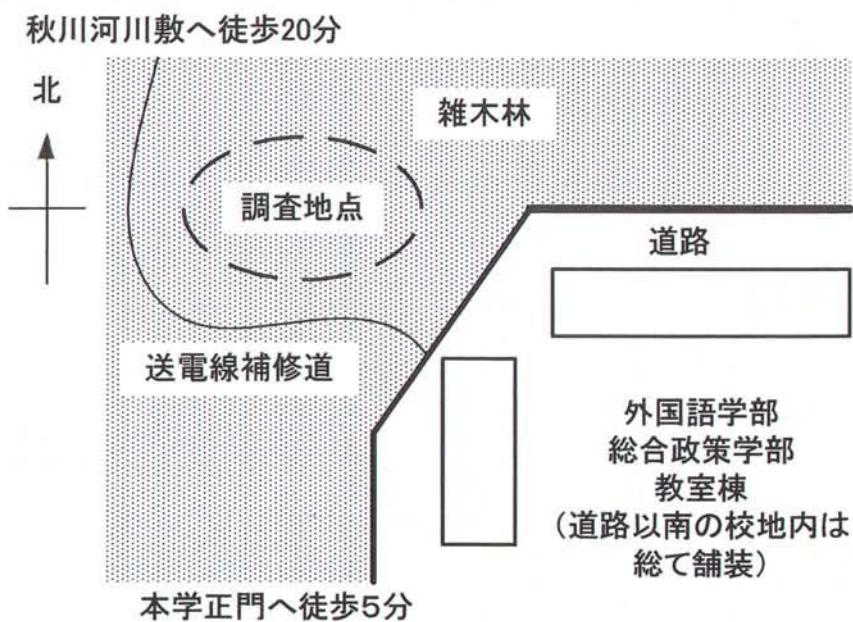


調査地点1：南側へ強く傾斜した杉の植林地である



調査地点2：東京農大演習林へ向かう林道のごく一部で山側ノリ面がコンクリート補強され、側溝が整備されている。この場所は調査地点周辺の路では例外的に広く、よく整備されている。

図3 奥多摩調査地点の概略



本学内調査地点の見取り図

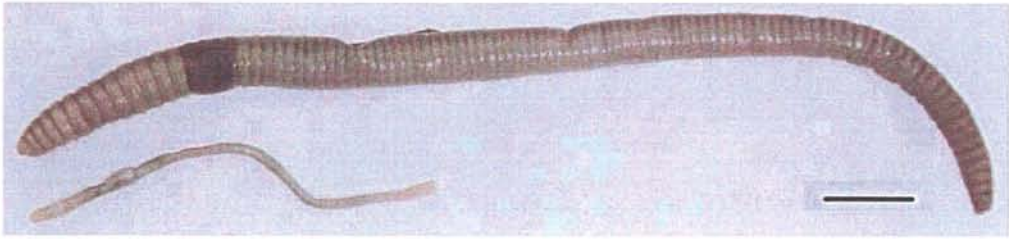


調査地点：北側へ向かってゆるく傾斜し窪地で、コナラ等の広葉樹の雑木林である。

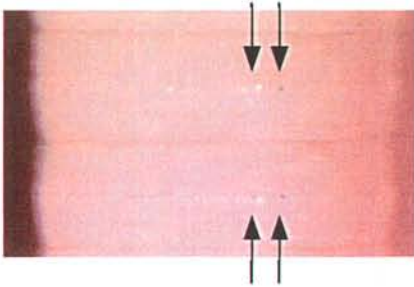


調査地点内での採集：約50cm区画の表層土をビニールシート上にとり、篩によりミミズを選別する。

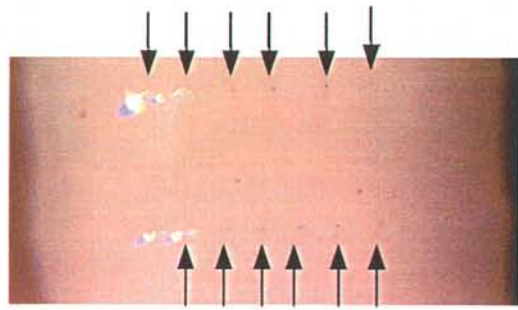
図4 本学内調査地点の概略



A. hilgendorfi (上) と *E. japonica* (下) (スケールバー 1 cm)



E. japonica は各体節の腹側に二本ずつの剛毛 (矢印) を 4ヶ所に持つ。



A. hilgendorfi では各体節に一行の剛毛 (矢印) を持つ。



E. japonica の鞍型環帯 側面から見ると背側にのみ環帯がある。腹面から見ると体節構造が明瞭で環帯が形成されていないことがわかる。



A. hilgendorfi の環状の環帯 背腹の区別のない環帯を持つ。

図 5 ツリミミズとフトミミズの相違点

2. ミミズの世代周期

採取したフトミミズ標本は主にヒトツモンミミズ *Amyntas hilgendorfi* と同定した。ヒトツモンミミズは体長10cm~15cm、主に落葉層などの表層に生活する。畑井の『みみず』の中で

「最も普通な種類で日本国中何処のごみ溜を掘っても此のみみずの居ない所はないと思ひます。普通人々の云ふ庭の隅やごみ溜にをる巨大な蚯蚓とは大抵の場合此のみみずを指して居ります。頗る特徴のある種類で腹面の第八節の中央に円形の凹みがあって其の凹みの色が周囲よりも黒黄色になって居るので一寸メタルを頸に掛けた様で肉眼でも容易に識別されます。ヒルゲンドルフみみずは呼び悪いので一つ紋みみずと和名を附しました。」(原文の旧仮名使いを一部修正)

と紹介されている。

奥多摩では、4月末~5月から小型の未成熟のフトミミズが確認可能となる(図6)。

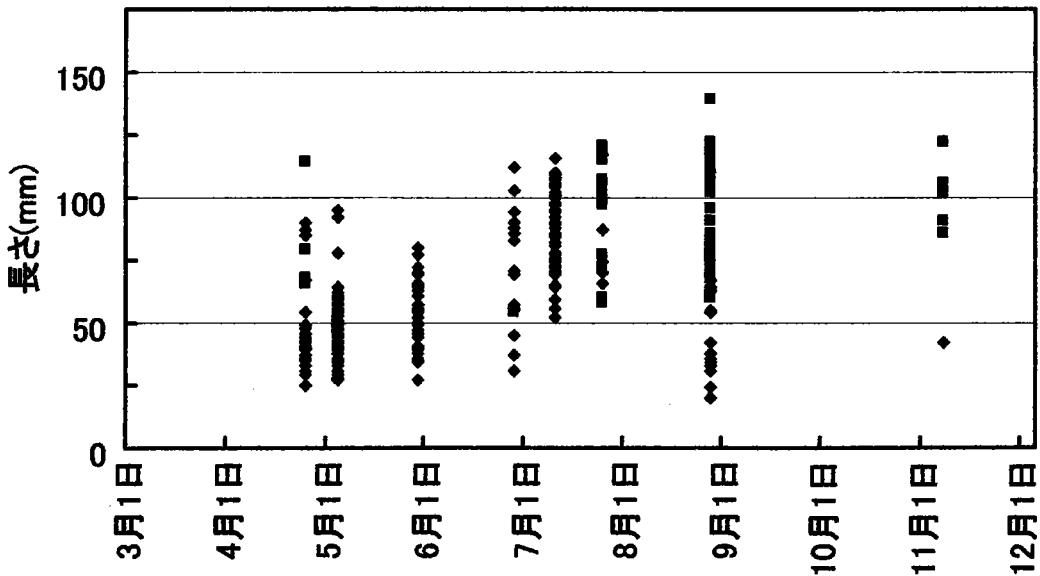


図6 奥多摩調査地点のフトミミズ

二年分のフトミミズの試料を採集日ごとに集計した。(■)は環帯のある個体、(◆)は環帯のない個体を示す。長さは固定後に計測した。環帯を持つ個体は8月以降に出現し多数を占める。主にヒトツモンミミズ *A. hilgendorfi* である。

6月梅雨時期に急速に成長し、梅雨明け頃最大長に達する。7月から8月に、過半数の個体が成熟し卵包形成が可能であることを示す明瞭な環帯を持つ。その後、急速に個体数が減少する。

奥多摩の二箇所の採集地点で採取した標本には、基本的な差異は認められない。奥多摩の調査地点1は杉林と放置された耕作地の境界で、杉枯葉10cmほどの堆積の中に、多数が密集して棲息する個所が点在する。また調査地点2は林道山側のコンクリート側壁沿い側溝上に土砂・落葉が5-10cmほど堆積した地点で、山側の雑木林から土砂・落葉と共に流出落下した集団と考えられる。地点2では11月中旬まで環帯を持つ成熟個体の生存が確認できた。

本学敷地内でも、フトミミズは5月出現、梅雨期に成長・成熟し繁殖期を迎えるパターンを示した(図7)。奥多摩との相違は、11月末まで成熟個体が比較的多数、表層に確認できる点である。

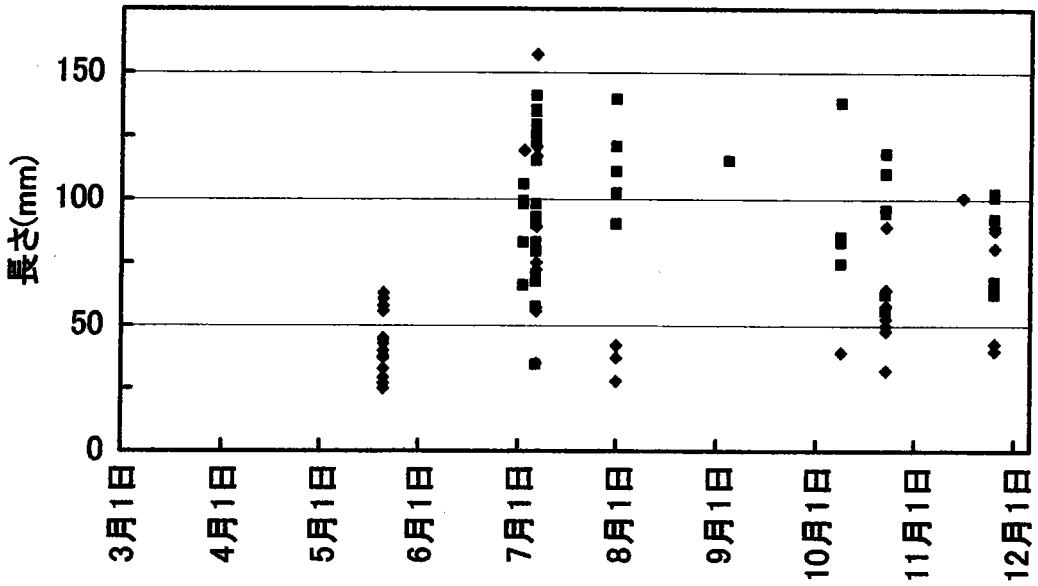
これらを総合すると、ヒトツモンミミズに代表される普通のフトミミズは春に未成熟個体が地表に出現、梅雨時期に急速に成熟し繁殖可能になる。梅雨明けから夏に産卵をはじめ、秋以降に捕食圧で個体数が減少、幼体(または卵包)で越冬する一年一世代周期の増殖をすると推定できる。冬期でも環帯明瞭な個体が観察できることから、気温が低下しても産卵機能は維持されていると考える。

秋以降の個体数減少は気候と捕食圧の二つの要因が考えられる。気候、特に温度に関しては11月でも産卵能を示す成熟個体が奥多摩・調査地点2及び本学内調査地点で観察されることから可能性は低い。地中での越冬は、5月に大型個体が少ないことから少数と推測できる。

ミミズを捕食する生物としては、モグラに加え、イノシシ、アナグマ、タヌキ、テンなどの肉食・雑食の哺乳類と野鳥が考えられる。奥多摩の調査地点1近辺には鹿の排泄物が非常に多く、また久田氏の写真集(21)に示されるごとく多くの野生哺乳類の存在、強い捕食圧が示唆される。奥多摩では、各種の野鳥も豊富だが、野鳥がアクセスを嫌う木立の中の調査地点1では急速な個体数減少が見られ、野鳥がアクセス容易で哺乳類がアクセスを嫌う道路沿いの調査地点2(動物の糞はない)に長く成熟個体が見られることから、野鳥による捕食圧はむしろ低いと考えられる。

一方、本学内調査地点ではイノシシ、アナグマの存在報告は無い。タヌキの存在は示唆されているが、これはヒトの残飯食と推定される。従って捕食者はモグラと野鳥のみであるため、奥多摩に比べ捕食圧が低く、冬近くまで成熟個体を観察できると推測する。

フトミミズ



ツリミミズ

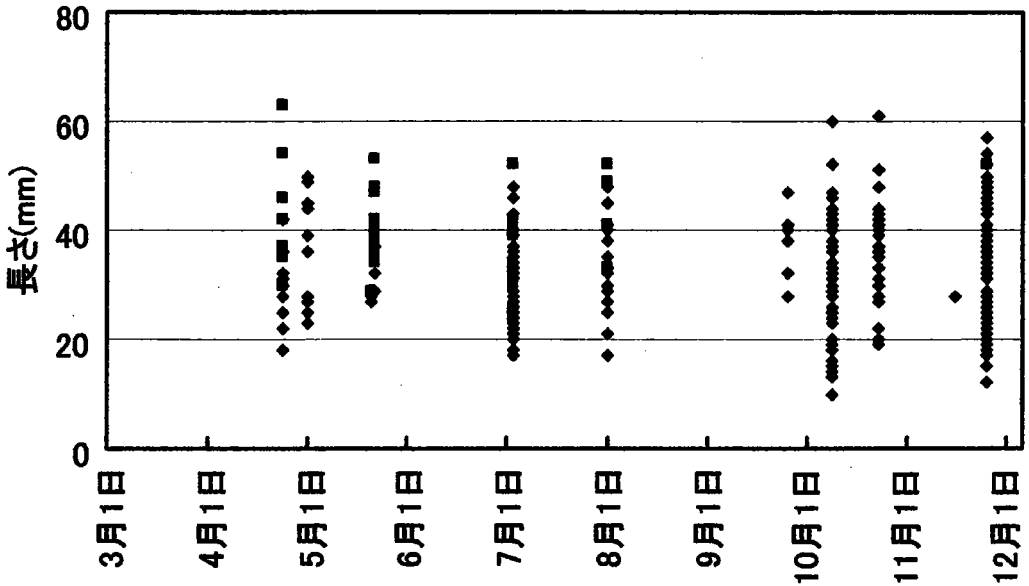


図7 本学内調査地点のミミズ

上：フトミミズ 下：ツリミミズ

二年分の試料を採集日ごとに集計した。(■)は環帯のある個体、(◆)は環帯のない個体を示す。長さは固定後に計測した。環帯を持つフトミミズは7月より出現する。環帯を持つツリミミズは5月から7月に多数観察されるが、それ以降は少ない。フトミミズは主にヒトツモンミミズ *A. hilgendorfi*で、ツリミミズは主にサクラミミズ *E. japonica*である。

奥多摩ではツリミミズはほとんど観察されなかったが、本学内調査地点では観察可能であった。観察できたのは主にツリミミズ科に属するサクラミミズ *Eisenia japonica* (*Allolobophora japonica*と異名同種)と確認された。

サクラミミズはツリミミズと全く異なる世代周期を示す。3月頃より地表で観察可能で4月には環帯が明瞭な成熟した個体が出現する(図7)。5月から7月まで成熟個体が観察可能である。この間、体長の増加は観察できない。8月を境に個体数と体長は維持されるが環帯を持つ個体は消失する。10月から11月末まで春と同じ大きさの個体を多数観察できるが、環帯を持つものは稀である。

ツリミミズ科は元来、ヨーロッパを中心に分布する。寒冷な気候を好むとされている。本学内調査地点のサクラミミズは6月頃より気温の上昇に伴い、丸まって夏眠状態にあるものが観察された。我々の観察と従来の報告を併せ、サクラミミズは春に接合産卵し、卵包または夏眠状態で夏を過ごし、秋に次世代が地表に出現する。ヨーロッパでは、秋に再び産卵し卵包で越冬するとされているが(19)、我々の観察では、秋の成体には産卵能を示す環帯が見出せない。従って、産卵能を持たない成体で越冬し、次の春に接合産卵の一年一世代周期の増殖の可能性、但し、フトミミズとずれた周期が推定できる。より寒冷な気候を好むツリミミズが、より気温の高い中下流域に発見されることは興味深い。樹木・草本相等の気温以外の棲息環境がより重要な因子と推測できる。

サクラミミズを含め、日本へのツリミミズの移入は、比較的新しいとされているが、移入期の詳細は明らかでない。サクラミミズと近縁思われるシマミミズ *Eisenia fetida*との分類上の距離についても明らかでなく、今後、分子生物学的検討を予定している。

上記の二調査地点に加え、新川に隣接する本学三鷹校舎とその周辺など、多摩川中下流域で数ヶ所での調査を行なったが、ほぼ本学校地と同様の種分布を示した。調査を行なった地点のリストを本学及び奥多摩と併せて表1に示す。

表1 ミミズの野外調査地点

調査日		調査地
2000	4/30	杉並区塚山公園・和泉梅林邸・済美山
2000	5/2	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	5/5	茨城県笠間
2000	5/22	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	6/29	小平市一橋大学南側
2000	7/5	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	7/11	武蔵野市小金井公園
2000	7/13	奥多摩町峰畑
2000	7/16	成蹊大学周辺
2000	7/23	東京都多磨霊園
2000	8/3	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	8/4	杏林大学三鷹校舎・都立武蔵野公園・神大植物公園
2000	8/6	杉並区自然観察の森
2000	8/31	奥多摩町峰畑
2000	9/28	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	10/27	杏林大学八王子校舎・周辺
2000	11/11	奥多摩町峰畑
2000	11/28	杏林大学八王子校舎・周辺
2001	3/15	川崎市等々力緑地他
2001	3/23	奥多摩町峰畑
2001	4/7	杏林大学八王子校舎・周辺
2001	4/21	杏林大学八王子校舎・周辺
2001	5/12	杏林大学八王子校舎・周辺
2001	6/9	奥多摩町峰畑
2001	6/30	奥多摩町峰畑
2001	9/1	奥多摩町峰畑
2001	11/24	奥多摩町峰畑
2001	12/22	奥多摩町峰畑
2002	1/26	奥多摩町峰畑

3. フトミミズ生殖器の検討

奥多摩及び本学内調査地点からのフトミミズ固定標本各25個を用い、卵を放出する雌性孔及び精子を放出する雄性孔、性斑紋の有無を検討した(図8)。その後、解剖し、接合した相手の精子を受取り貯蔵する受精嚢、自身の精子成熟の場である貯精嚢等の生殖器官について検討した。

50個体中、ヒトツモンミミズは38個体、10個体が *Amyntas corticis*、*Amyntas fravescens* と *Amyntas fuscatus* が各1個体ずつであった。ヒトツモンミミズではすべての個体に雌性孔が明らかなのに対し、雄性孔を持つ個体が3個体、雄性孔を持つ場合も左右のどちらか一方に留まる。受精嚢は完全欠損から、一部欠損を含め不完全な個体が多数確認された。

それに対し *Amyntas corticis* 他の12個体では総ての個体で雌性孔、雄性孔が認められる。受精嚢も欠損は認められない。性斑紋には変異が認められる。

畑井は『みみず』の中で、

「——然し種類によりては頗る変異性に富み、単に数匹位を見ただけでは同種でありながら異種ではないかと思われる程変わって居るのもある位です。——此の種の蚯蚓は頗る多いので一々名称を挙げるのは容易ではありませんが、先ず代表的なものとしては、ふとすじみみず、一つ紋みみず、ごみみみずなどであります。

それから普通雄性門の開孔を有せぬもので、時々開孔を有するものの頭はるる事があります。その割合は一プロセント以内の少数であるが、みみずの本来として開孔を有するのが正常と見るべきに却って正常の数が少なく、正常でない方が九十九プロセント、即ち殆んど全部に近くなって居る奇異なる現象は、日本産ふとみみず類の或る種が退化を来しつつある事を示すのであるか、それとも雌雄両性から雌雄の異なる高等な状態に遷る道程を示すのであるかは今の所何等説明を与へる根拠がありません。——

普通雄性門を欠如し稀に有する個体を見出さるる種類は せなくろみみず、一つ紋みみず、ふとすじみみず、畠みみず、ごみみみず等であります。」

(原文の旧仮名使いを一部修正)

と紹介している。

ヒトツモンミミズの雄性生殖器形成不全原因は種の特長であると記載されている。我々の観察と大筋において一致する。畑井の観察以来、この原因についての説明は行なわれていない。

貯精囊 Seminal Vesicle 砂嚢 Gizzard そ嚢 Crop 受精囊Spermatheca (副嚢Diverticulum) (主嚢Ampulla)

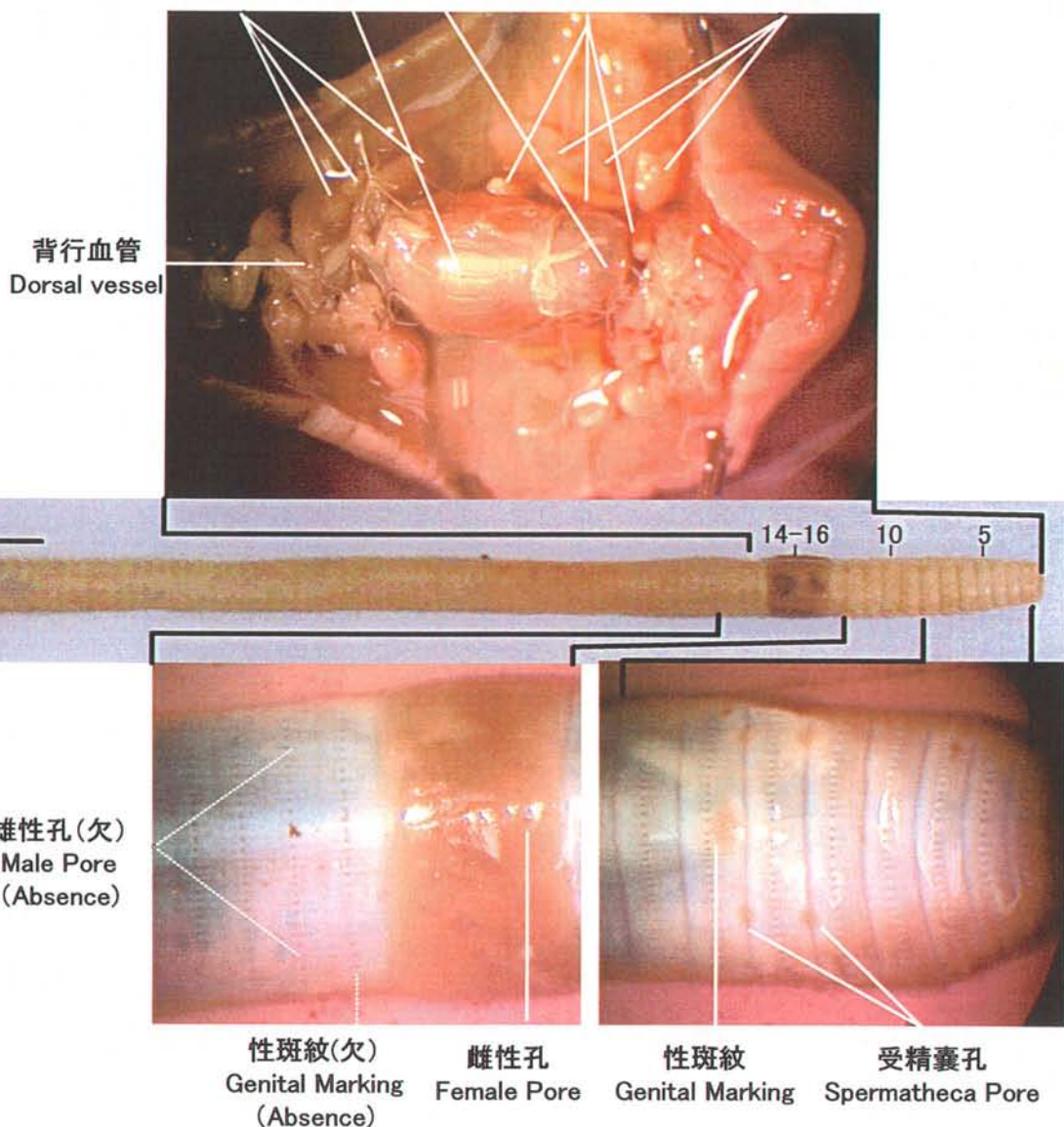


図8 ヒトツモンミミズ *Amyntas hilgendorfi* の生殖器官

- 上：背側から解剖。この個体では左右対称に主な雄性生殖器が存在する。
- 中：14-16体節に環帯がある。環帯以降の体節は概ね単純な構造の繰り返しである。
- 下右：5-7体節腹側左右に受精嚢孔が開口し、7体節腹中央に性斑紋がある。
- 下左：環帯腹側14体節の位置に雌性孔がある。18体節腹側左右に雄性孔を持つ個体が少数存在する（この個体では欠損している）。17-19体節腹側に性斑紋を持つ個体が存在するが多くで欠損する。

畑井が『みみず』を著した昭和初期は、前述の有吉佐和子『複合汚染』にある硫安等の化学合成肥料が導入される時期で、現在のような防虫剤や除草剤は未だに開発されていない。「公害」や「環境汚染」という概念は無かったものの、各地での近代産業の勃興にともなう環境汚染・破壊は頻発している(27)。足尾銅山鉍毒事件にはじまり昭和初期に既に発病例があったとされるイタイタイ病の例の如く、どの程度に環境が清浄に維持されていたのか、どの程度に環境汚染が広がっていたのか定かではない。従って、ミミズの変異性への環境汚染の影響も否定しきれず、今後引き続いて定量的な検討が必要である。

関東地区の環境汚染、特にダイオキシン類・ジベンゾフラン類については横浜国立大学中西準子教授グループの研究に詳しい(28)。それによると多摩地区ではかつて除草剤の大量使用があり、その残渣が今も検出されるとのことである。また、本学も周辺5 km以内に複数のゴミ焼却施設を持つ。本研究の調査地点のいずれも従来の履歴に関する情報、また土壌汚染を正確に数値化する情報はないものの、非汚染とは云い難い。

ミミズは一般的に雌雄同体であるとされている。実験室内で飼育するシマミミズでは典型的な交配と産卵が見られ、この明らかな例といえる(図1)。一方、ヒトツモンミミズは野外で大多数を占め強い増殖能が示唆されるにもかかわらず、生殖器形成不全、特に雄性孔を持たない個体が大半を占める。雄性生殖器が不完全であることが種の特性であるとすると、雌雄同体の有性生殖による種の維持は困難である。雄性生殖器形成不全はフトミミズ科では比較的高頻度に見られる形質であり、特異な生殖機構を想定せざるをえない。単為発生による種の維持を推論している研究者もいる(29、30)。しかし、雄性生殖器が不完全なフトミミズの総ての種を単為発生とする必然はなく、畑井が指摘しているように雌雄異体による有性生殖(雌雄異体化の端緒)一代雑種、生殖能を持つのは一部で他は生殖環境の維持のみに働く可能性等も十分に考慮に値する。

フトミミズは実験室内での維持は可能だが増殖させることは極めて困難である。比較的広い棲息域と多数の共生生物を必要とすること、一年一世代であること等から、単為発生を実験的に証明するには少なくとも数年(数世代)の厳密に管理された飼育系の確立が要求される。1937年にKobayashiがヒトツモンミミズに関する実験的な検討を報告している(30)。その中に単為発生を積極的に指示する信頼しうる実験的な根拠は見出せない。今後単為発生を証明するにはカブラハバチやミツバチで用いられている分子生物学的な証明法の導入を考慮に入れ、さらに検討を加える必要がある。

現在のミミズの分類では形態、特に生殖器及び付属器の形態が最も主要な判定基準であ

表2 フトミミズ生殖器の変異

調査地点	動物名	雌性孔	雄性孔	受精囊	性斑紋
1	奥多摩 1 (杉林) <i>A. fravescens</i>	14	-	6/7/8/9	18-19
2	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
3	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
4	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
5	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
6	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
7	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
8	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
9	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	13	-	5/6/7/8	-
10	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
11	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
12	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
13	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
14	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
15	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
16	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
17	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
18	奥多摩 1 (杉林) <i>A. hilgendorffi</i>	14	18L	6/7	-
19	奥多摩 2 (道路側) <i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	-
20	奥多摩 2 (道路側) <i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	-
21	奥多摩 2 (道路側) <i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	17-20
22	奥多摩 2 (道路側) <i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	7-9, 16-18
23	奥多摩 2 (道路側) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
24	奥多摩 2 (道路側) <i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	7
25	奥多摩 2 (道路側) <i>A. hilgendorffi</i>	14	18R	-	18

26	杏林大学	襄山	<i>A. corticis</i>	13R/14L	17	5/6/7/8/9	7-9, 17-18
27	杏林大学	襄山	<i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	7-8, 17
28	杏林大学	大学坂下	<i>A. fuscatu</i>	14	18	5/6/7/8/9	9
29	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
30	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
31	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
32	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	-
33	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	7
34	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	7
35	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	-	6
36	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	7/8	-
37	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	6/7/8	-
38	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	6/7/8	-
39	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	6/7/8	8
40	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
41	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
42	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	18
43	杏林大学	襄山	<i>A. hilgendorffi</i>	14	18R	7/8	R
44	杏林大学	温室	<i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	7-8
45	杏林大学	温室	<i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	18
46	杏林大学	弓道場	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	6/7/8	8
47	杏林大学	弓道場	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	6/7/8	7-8
48	杏林大学	弓道場	<i>A. hilgendorffi</i>	14	-	5/6/7/8	-
49	杏林大学	体育館	<i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	9
50	杏林大学	体育館	<i>A. corticis</i>	14	18	5/6/7/8/9	-

る。しかしながら、本研究で明らかのように形態的な変異の幅が広いとの観点にたつと、従来の形態学的な基準のみでは不十分で、それに加え、分子レベルでの解析も必須と考えられる。

フトミミズにおいて雄性生殖器に変異が集中することは生物学的に非常に興味深い。ヒトをはじめ、ほぼすべての有性生殖をする動物においては、基本の性は卵（大型で運動性のない配偶子）を産生するメスであるとされている。雌性生殖器の形成の過程に介入し変形を加えることで雄性生殖器が形成される（31）。最近、ショウジョウバエの雄性生殖器の形成と維持にかかわる遺伝子 *doublesex* がエレガンス線虫で同様の働きをする遺伝子 *mab* (male-abnormal) と共通の構造を持つことが示された（32）。この共通構造はDMドメインと呼ばれる。哺乳類、鳥類、魚類、両生類等の広い範囲の脊椎動物にもこの構造を持つ転写因子遺伝子DMRT (doublesex-mab related transcription factor) が見出され、やはり雄性生殖器の形成と維持に関与することが報告された（33）。温度により性の転換が起こる魚類では、この遺伝子の発現も温度により変化が見られる（34）。ミミズにおける雄性生殖器の維持にもこの遺伝子の相同遺伝子に関与する可能性がある。現在、シマミミズよりこの遺伝子の分離を進めている。

ミミズの実験動物化

1. シマミミズ

環境汚染物質に対するミミズの感受性を調査するためには一定の種を用いて比較検討する必要がある。そのため、シマミミズ *Eisenia fetida* を可能な限り清浄環境下で飼育繁殖する系を確立した。シマミミズは国内を含め世界各地で産業廃棄物処理やツリ餌用また家庭生ゴミ処理用として養殖され、業者により流布している。我々も当初、相模浄化サービス関野てる子氏から入手し使用したが、文献的な記載と必ずしも完全には一致しないこと、また均一性にも疑問が生じた。そこでオハイオ州立大学 Edwards 教授からシマミミズの分与を受け、以降それを使用した (図9)。

シマミミズ飼育繁殖系には基材としてオガクズ (シイタケ栽培に用いた廃材で直径約10cm高さ15cmの円筒状) を用いた。この基材を粉碎しゴミを篩で十分に除去し、数日間天日乾燥し保管した。

この基材に3~4倍重量の水を加えたものを飼育基とし、Edwards教授より分与を受けたシマミミズを順次増殖させ、最終的に飼育基約6Lを20Lステンレスタンクに入れて維持した。この中で幼体からの成長及び産卵が可能である。必要に応じ食餌として米糠を添加した。

産卵に与える個体密度の影響を検討するため、200mL容量のガラス器に飼育基120g (湿重量) を入れ、1-10匹を90日間飼育し、産卵数を測定した。一匹群でも90日間継続的で、個体当たり10個以上の産卵が見られた。これはシマミミズの寿命 (6ヶ月程度) から考えると事実上、一度の交接でその寿命の間に十分な量の精子が供給されることを示唆する。また卵包産生は必ずしも個体数に比例しない。十匹群では個体当たり卵包産生は1個前後に低下する。継続的に最も多数の卵包を形成するのは四匹群で個体当たり8個、即ち飼育容器当たり30個以上の卵包が産生された。

シマミミズは飼育基のみでも、幼体からの成長が可能である。しかし、食餌として2-10%の米糠を与えると、より活発な産卵が観察される。糠を2%以上に飼育基に混入すると約30日で体長10cm体重約1g、飼育基のみの場合の約2倍の大きさに達する (図10)。しかし、その間は産卵は行なわない。その後60日目に新たな飼料中に移すと、複数の卵を含む卵包の産生を開始する。卵包産生は糠の量に概ね比例し、10%混入で最も高率に卵包を産生する (一個体・一日当たり0.5~1個)。

以上の結果から、低栄養状態下では成長より卵包産生が優先し、富栄養状態では成長しその後活発な産卵を行なう生存・種の維持戦略が示唆される。

採取した卵包を個別に水1 mlと濾紙片を入れた小試験管に移し、室温で出包までに要する日時を計測した。平均25日、最短2日、最長48日に出包し、出包時の体長は約1 cm数10mgであった。また卵包1個から最大3匹の幼体の出包が観察された。

5%寒天上に卵包を静置することで、卵包から幼体を出包させることができる。出包後、糠を添加すると幼体は飼育基表面及び飼育基中に潜りほぼ成体の体長にまで発育する。しかし、十分な糠を与えても生殖能を示す環帯は見られない。不足する因子については今後の検討を待たねばならない。

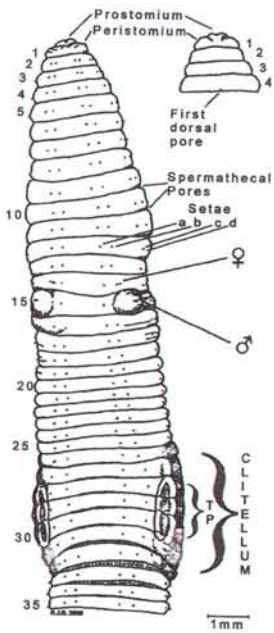
ジエチルスチベステロール (Diethylstilbestrol) は、1938年英国で合成された強力なエストロゲン作用を持つ化学物質で、一般にDESと呼ばれる。DESは流産・早産の予防薬、さらに悪阻の改善薬として臨床的に広く利用された(1,2)。しかし、母親の胎内でDESに曝露された子供たちが成人期を向かえる時期になり、DESが生殖器の異常を誘導したことが明らかになり、その使用が厳しく制限されることとなった。現在に至ってもその後遺症は続いている(35,36)。本研究では環境ホルモンに代え、強力なエストロゲン作用を持つ化学物質DESを用いて、シマミミズの成長と産卵に与える影響について検討した。

シマミミズ飼育基40g(湿重量)当りDES 0.01mgの添加では成長及び産卵には有意な影響を与えない。しかし、0.1mg以上を添加すると、成長が有意に阻害された(図11)。DESはヒトはじめ多くの動物で強い内分泌毒性を示すことが知られている。シマミミズは明瞭な内分泌腺を持たない動物ではあるが、他の多くの動物と共通の性ホルモンの影響を受けることになる。今後、ステロイドホルモンの作用機構について検討を進める必要がある。

本実験において、DESは飼育基にのみ含有させ、食餌の糠には含ませていない。現在の投与方法ではどの程度の有効な投与濃度が確保されているか正確な値は算定し得ない。一般に一個体のミミズの体重の1/3は土壌成分であり、一日当り体重相当分の土壌を摂取する。飼育条件下でも、ミミズは糠と共に飼育基を摂食する。従って、飼育基に一定濃度含ませること、さらに経皮的な吸収で、ほぼ数日のうちに飼育基に近い濃度条件に達すると推定している。Edwards教授らは、化学物質を(強制的に)経口投与した場合と飼育環境下に均一に存在させた場合で、ミミズへの蓄積量に差が見られないこと(私信)を示しており、経皮吸収も相当量あると考えられる。

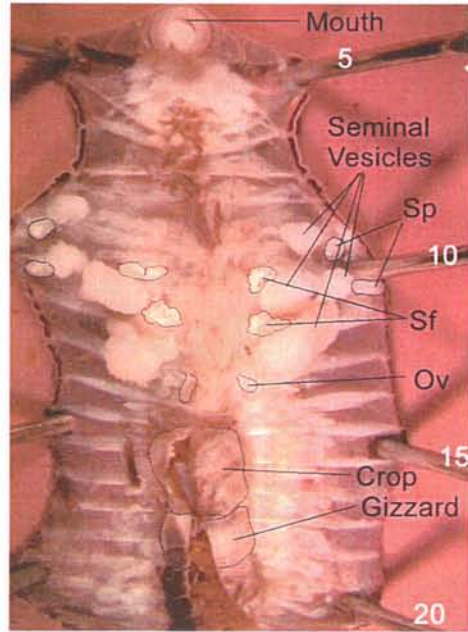


オハイオ州立大学Clive A. Edwards教授より入手したシマミミズ (スケールは1cm)。
背側のシマ模様が明瞭でタイガーワームとも呼ばれることもある。



シマミミズを腹側から見た模式図
(Blakemore博士原図)。

Prostomium 口前葉 : Peristomium 口側葉 :
First dorsal pore 第一腹孔 : Spermathecal
pore 受精嚢孔 : Setae 剛毛 : ♀ 雌性孔 :
♂ 雄性孔 : Clitellum 環帶



背側から解剖したシマミミズ。

Mouth 口 : Seminal Vesicle 貯精嚢 : Sp 受精嚢 :
Ov 卵巣 : Crop 砂嚢 : Gizzard 砂嚢

図9 シマミミズ *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

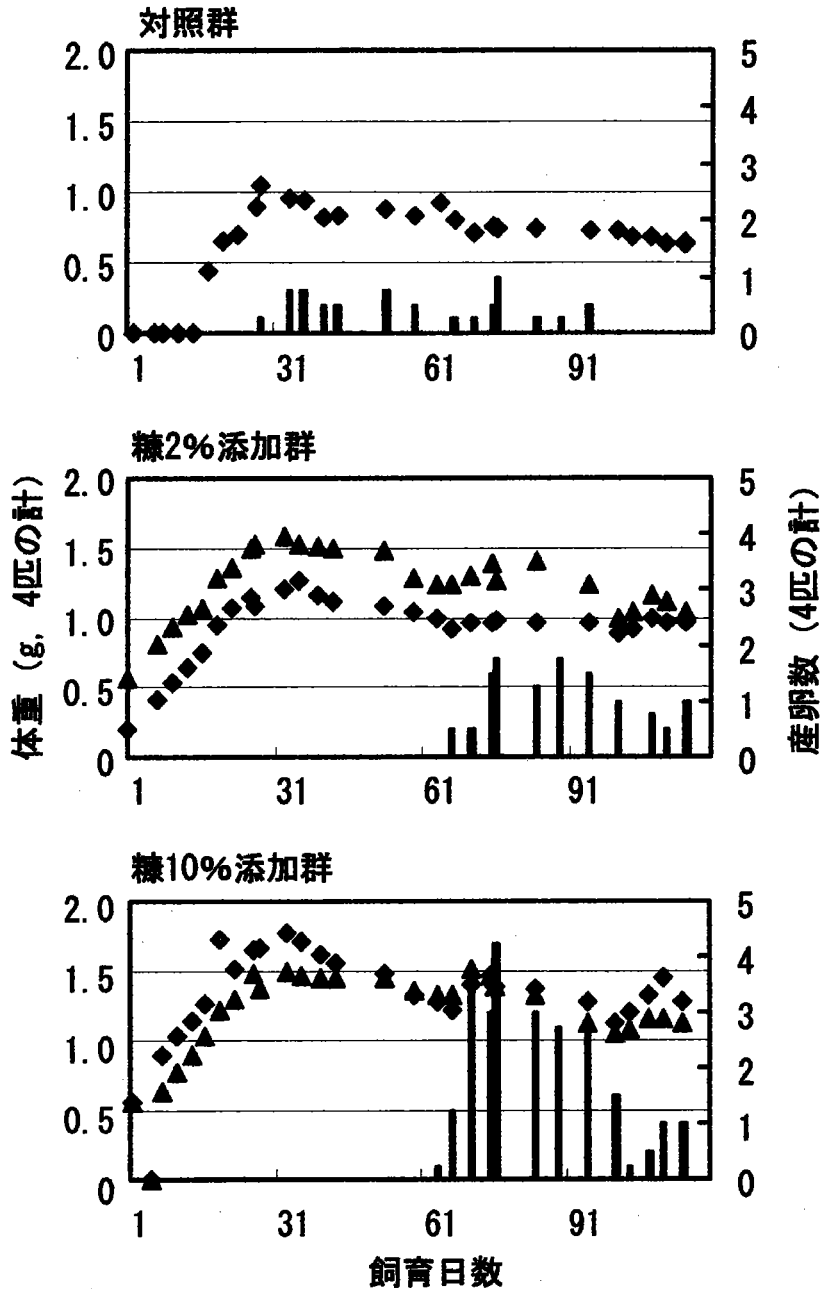


図10 シマミミズの成長と産卵

卵包からの出包後約1週間の4匹のシマミミズ幼体をガラス製容器（直径11cm・高さ8cm 乾燥飼育基30gに120mlの水）で室温飼育（25℃）する。糠を食餌として最初の湿重量比で加えた。対照群以外は二群を用い、4匹の合計体重（左軸・▲◆）および産卵数（右軸・縦棒）を測定した。60日目に新たな糠を含む飼育基に移した。糠なしでも成長し産卵するが、糠を添加するとより大きく成長し、また同調的に産卵する。

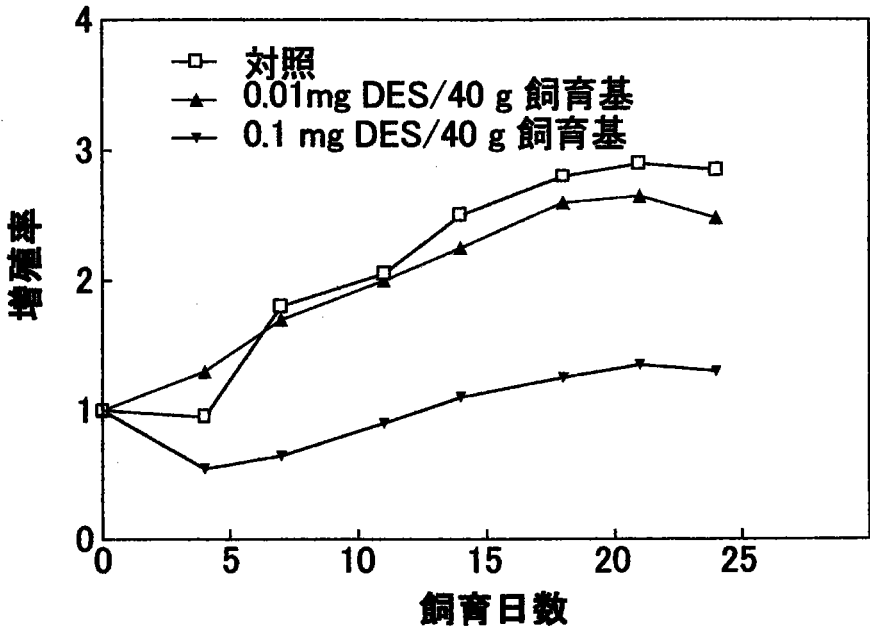


図11 DESのシママミズの成長に与える影響

エタノールに溶解希釈したDESを表記の濃度に含ませた飼育基でシママミズを飼育し、その体重を計測した。飼育開始時4匹の体重合計を1とした時の成長率で示した。食餌として追加して与える糠にはDESは添加していない。DESは一定濃度以上で強い成長阻害を示す。

飼育シママミズを用いた土壤汚染評価系の作製を試みた。対象として野外種のサクラミズ *Eisenia japonica* が自生可能な地点（奥多摩及び本学校地の継続的生態調査地点）より土壤を採取し、シママミズを飼育した。

野外土壤中では約半年間シママミズの生存は維持できたが、繁殖は観察できなかった。飼育シママミズはコンポスト用には有機質過剰な環境に適応している。そのため、有機質含量が比較的低い野外土壤のみでは成熟に十分な栄養が供給されず、飼育系のような速い世代周期を維持できない可能性が高い。今後、野外土壤への飼料添加等により成熟を促進させる等も含めて検討の余地がある。

2. ヤマトヒメミミズ

ヤマトヒメミミズ *Enchytraeus japonensis* は農水省東北農業試験場の中村好男博士（現 愛媛大学農学部）が単離した体長約1 cmの小型のミミズである（37）。イトミミズ亜目ヒメミミズ科に属する。寒天（1%）上でオートミールを食餌として成長する。成熟個体は約10片に分断し、それぞれがまた十日ほどで成体の大きさに成長する（図12）。各碎片はすべて等価で、成体の頭に由来する碎片も、胴や最後尾に由来する碎片も、等しく完全な成体へと分化する（38, 39）。従って、組織再生の格好のモデルである（40）。通常の飼育条件では稀に生殖器が発達した個体が出現し、有性生殖により卵包を形成する。卵包からは通常2-3匹の幼体が出現する。一度、この過程を経ると通常の飼育条件下では数ヶ月間有性化は見られない。

ヤマトヒメミミズを分子遺伝学的な実験動物として取り扱うためには有性生殖と無性生殖のサイクルを制御する必要がある。そのため、有性化を誘導する条件について検討した。

個体密度、温度、食餌条件を変えて有性化の頻度について検討した。個体密度を低下させ食餌であるオートミールは十分量に与える飼育条件が、最も効果的に有性化を誘導できた。飢餓は生育を制限するものの、有性化は促進しない。温度の低下、特に4℃ではヤマトヒメミミズは生育不能であったことから、野生状態では温度低下が著しい表層を避けて越冬、または卵包を形成することで越冬すると推測される。

また、ヤマトヒメミミズの増殖に対する環境ホルモンの影響を、天然型の女性ホルモンの17βエストラジオールとDESを用いて検討した（図13）。この場合も、17βエストラジオールとDESは寒天飼育基に均一に含ませ、食餌として与えるオートミールには含ませていない。

17βエストラジオールは50 μM以上で濃度依存的な増殖の抑制効果を示し、500 μMで対象の約1/2となった。一方、DESは20 μMで弱い増殖抑制、200 μMでは強い毒性を示し、生存個体が観察されなかった。両薬剤ともに殺効果を示さない濃度域では、碎片化の促進、有性生殖の可能性を示す卵巣の成熟や卵包の形成の促進のいずれも観察されなかった。ヤマトヒメミミズは内分泌腺を持たないが、ステロイドホルモンの影響を受けることになる。これはシマミミズで成長阻害が見られるDES 0.1mg/飼育基40g（10 μM：但し飼育基40gを40mLと換算）に近似する濃度であり、両者のDES感受性が極めて近いことを示唆する。

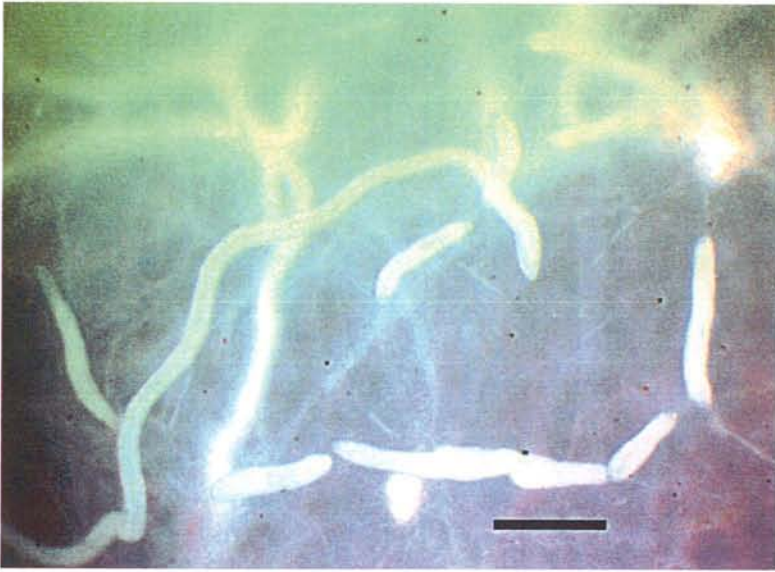
碎片分断と組織再生の際には、活発な細胞増殖が進行していると考えられる。この間の

細胞動態を検討するため、DNAに取り込まれるヌクレオチド類似体のブロモデオキシウリジン（Bromo-deoxyuridine：BrdU）を飼育基（1%寒天）中に5 mMの濃度で加え1時間飼育、ホルムアルデヒド（リン酸緩衝生理食塩水中に4%）で固定、BrdUに対するマウスモノクローナル抗体での免疫染色法で検討した。検出はFITC標識抗マウス抗体を用い倒立蛍光顕微鏡にて行なった。DNA合成が活発で細胞の増殖が見られる部位にBrdUが取り込まれ、従って抗BrdU抗体で強く染色・検出されることが期待される。ヤマトヒメミミズの成体全体を用いた解析では消化管に強い染色を認めた。消化管は一般に細胞の入れ替わりが速い場所であり、妥当な結果と思われる。

また細胞の増殖・分化を制御するのは、小分子の増殖因子や分化因子を細胞間で受け渡すいわゆる「情報伝達」が最も基本的な機構と考えられる。形態形成が活発に進行している部位では、細胞間及び細胞内の情報伝達が活発に行なわれている。情報伝達系の初期反応としては、増殖因子・分化因子の細胞膜受容体の特定のチロシン残基のリン酸化とそれに続く細胞内基質のチロシンリン酸化が最も頻繁に用いられている（41）。従って、ヤマトヒメミミズの碎片分離とその後の生殖器形成過程に関わる増殖と分化の指標として、チロシンリン酸化の有無と局在を抗リン酸化チロシン抗体（42）を用いて検討する系を確立した。

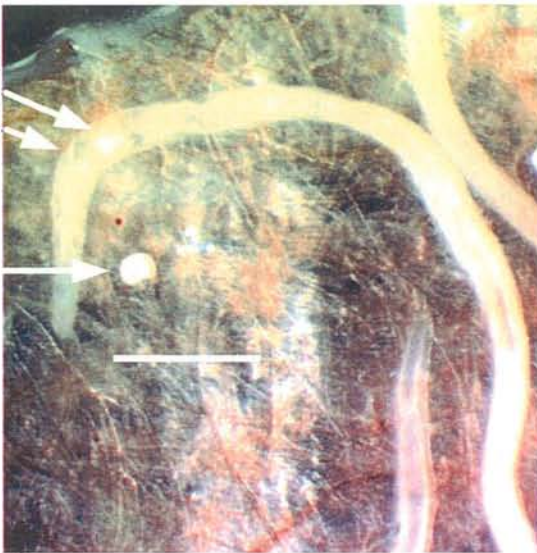
ヤマトヒメミミズをホルムアルデヒド固定し、リン酸化チロシンに対するマウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色、ビオチン標識抗マウス抗体さらにアルカリホスファターゼ標識アビジンを用いた酵素抗体法で検出した。成体では消化管及び尾部、碎片後の再生片では尾部が強く染色され（図14）、活発な増殖と組織構築・分化が行なわれる場所を示唆した。現在、薄切標本を用いた細胞レベルでの検討を進めている。

BrdU標識と抗BrdU抗体による増殖細胞の検出と抗リン酸化チロシン抗体による情報伝達活性化細胞の検出を組み合わせること、また現在は個体レベルでの解析であるが、これをさらに細胞レベルでの解析に進めることで、ヤマトヒメミミズの再生・分化の機構、また環境ホルモンが与える影響について詳細に解析可能と期待できる。



一個体が数個に碎片化したヤマトヒメミミズ。
約10日から2週間の周期で碎片化により増殖する。

有性化個体
卵細胞
精巢
卵包



ペーパータオル上で密度を下げて飼育すると、
卵細胞や精巢が明瞭な有性化個体が出現し、卵
包が観察される。(スケールは1mm)



卵包内には1個から数個の卵が含まれる。
(スケールは1mm)

図12 ヤマトヒメミミズ *Enchytraeus japonensis* の無性生殖と有性生殖

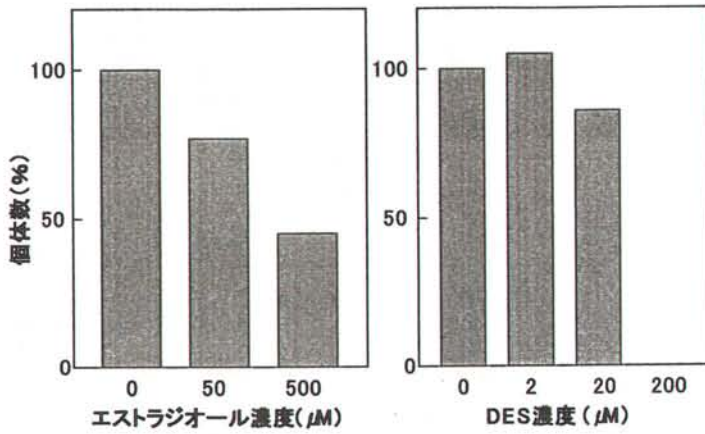


図13 DESによるヤマトヒメミミズの増殖阻害

エタノールに溶解希釈したDES (右) と対照として 17β エストラジオール (左) を表記の濃度に含ませた寒天培地上でヤマトヒメミミズを飼育し、その個体数を計測した。食餌として添加するオートミールにはDESと 17β エストラジオール共に添加していない。DESは一定濃度以上で、強い殺作用を示す。一方、天然エストロゲンの 17β エストラジオールは増殖阻害を示すが殺作用は弱い。

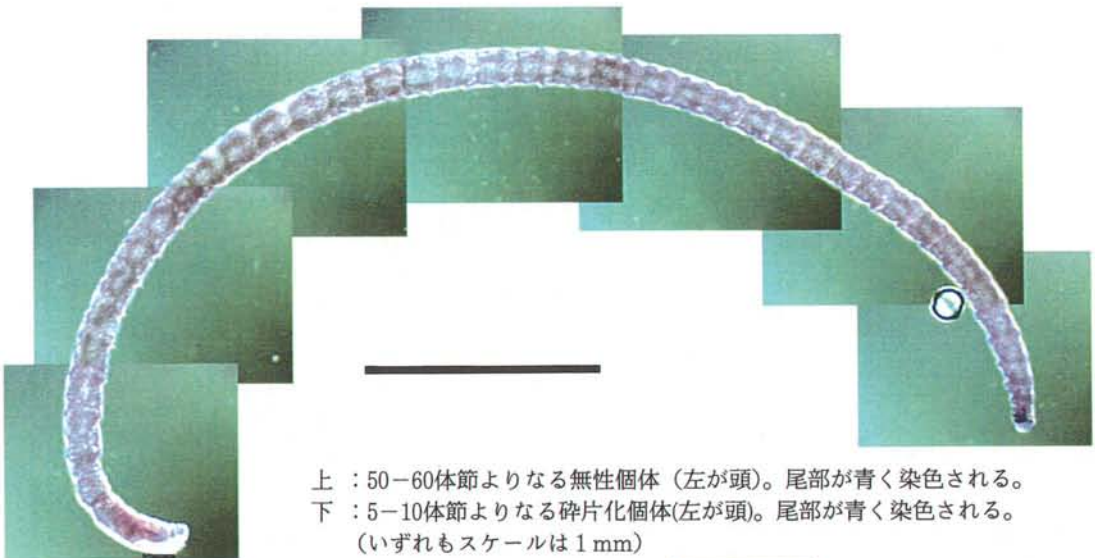


図14 ヤマトヒメミミズの抗リン酸化チロシン抗体での免疫染色

ミミズの遺伝子解析

1. ミミズの遺伝子情報

研究者が新たに遺伝子情報を得た場合、論文への発表に先立ち遺伝子データベースに登録することが義務付けられている。この遺伝子情報データベースは、ヒトはじめ哺乳類に限らず、あらゆる動物の、また遺伝子変異がある場合や部分も個別に登録されている。インターネットを介して公開されており、誰でもそれを自由に閲覧することができる (7)。

環形動物貧毛綱Oligochaetaに関する遺伝情報をデータベースで検索した結果を表3 (平成14年4月) に示す。現在までに知られている環形動物の遺伝子情報は2,000件余りで、実験動物として有名なキイロショウジョウバエ*Drosophila melanogaster*の34万1千件、エレガンス線虫*Caenorhabditis elegans*の21万8千件に比べて、ごく限られている。環形動物のうちでは、貧毛綱は比較的情報があり1,000件余りで、ツリミミズの情報が過半を占める。またツリミミズの中でもヨーロッパ産のツリミミズである*Lumbricus rubellus* (和名：アカミミズ。日本にはいない) の情報が614件、それもCardiff大学のA. J. Morgan博士の研究グループが*L. rubellus*のcDNAライブラリーを順次配列決定した情報が大半の575件である (表4)。本研究で実験動物化を目指しているシマミミズについては飼育繁殖が容易で広く利用されているにもかかわらず、情報は20件、ヤマトヒメミミズの場合は全く登録されていない (表5)。シマミミズのデータのうち、五件は分子系統分類に利用されるリボゾームRNAの遺伝子、八件が体腔液中にある生体防御タンパクと考えられているライセニン (43) とその関連遺伝子 (EEF、CCFとも呼ばれる。)、血管平滑筋を収縮させるバソプレシンと相同の作用を持つタンパクのアネトシン遺伝子が二件 (44)、金属結合タンパク (45)、Lombricine kinaseと呼ばれる酵素タンパク (46) 他が登録されている。

フトミミズ科については総数で126件、我々の野外調査で主に採取されたフトミミズ属については一件の報告のみで (表4では*Pheretima*と表記されている。)、これも分子系統分類に広く用いられる伸長因子I α の遺伝子に留まっている (47)。

2. ミミズの遺伝子解析

一般的に系統分類に当っては、生殖再生が生物の基本的な特性であり、各種は種の維持のため特異的な生殖器官を発達させ、それが最も信頼にたる分類指標であると考えられる。

表3 貧毛類の遺伝子情報

動物種	配列が報告されている遺伝子数
キイロショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i>	341,014
エレガンス線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	218,278
環形動物	2,009
多毛綱 Polychaeta	511
ヒル綱 Hirudinida	344
貧毛綱 Oligochaeta	1,106
ナガミミズ目 Haplotaxida	1,078
ツリミミズ亜目 Lumbricina (earthworms)	832
アブラミミズ科 Aeolosomatidae	4
Almidae	1
Eudrilidae	1
Glossoscolecidae	1
Hormogastridae	1
ツリミミズ科 Lumbricidae	696
フトミミズ科 Megascolecidae	126
Ocnerodrilidae	2
イトミミズ亜目 Tubificina	246
ヒメミミズ科 Enchytraeidae	17
ミズミミズ科 Naididae	26
Phreodrilidae	1
イトミミズ科 Tubificidae (sludge worms)	202
オヨギミミズ目 Lumbriculida	27
Uncinidae	1

2002年4月のNCBI PubMedから検索した遺伝子のデータベースによる。和名のあるものは示した。データベースの性格上、登録者の記載した分類がそのまま使用されている。

表4 ツリミミズとフトミミズの遺伝子情報

動物種	配列が報告されている遺伝子数
ツリミミズ科 Lumbricidae	(696)
Allolobophora	1
Aporrectodea	1
Dendrobaena	1
Eisenia	
シマミミズ <i>Eisenia fetida</i> (tiger worm)	20
ツリミミズ属 Lumbricus	
<i>Lumbricus bimastus</i>	2
<i>Lumbricus castaneus</i>	2
アカミミズ <i>Lumbricus rubellus</i> (humus earthworm)	614
from Cardiff's cDNA Library	(575)
オウシュウツリミミズ <i>Lumbricus terrestris</i> (common earthworm)	33
<i>Lumbricus</i> sp.	4
Octolasion	16
Octolasion	1
unclassified Lumbricidae	2
フトミミズ科 Megascolecidae	(126)
Achaeta	1
Begemius	3
Dichogaster	4
Didymogaster	2
Digaster	5
Diplotrema	5
Diporochaeta	3
Fletcherodrilus	11
Heteroporodrilus	2
Neodiplotrema	2
Perionychella	3
Perionyx	3
フトミミズ属 Pheretima	1
Pontodrilus	3
Propheretima	1
Rhododrilus	1
Spenceriella	6
Terrisswalkerius	70

2002年4月のNCBI PubMedから検索した遺伝子のデータベースによる。和名のあるものは示した。データベースの性格上、登録者の記載した分類がそのまま使用されている。

表5 シマミミズ *E. fetida* とヒメミミズ *Enchytraeus* sp. の遺伝子情報

GenBank Access #	動物種 Species	内容 Description
シマミミズ <i>Eisenia fetida</i>:		
1. AY048508	<i>Eisenia fetida</i>	28S ribosomal RNA gene, partial sequence
2. AB076887	<i>Eisenia fetida</i>	gene for 18S rRNA, partial sequence
3. AJ426271	<i>Eisenia fetida</i>	mRNA for annetocin precursor (ann gene)
4. AF432224	<i>Eisenia fetida</i>	fibrinolytic enzyme mRNA, partial cds
5. AF212166	<i>Eisenia fetida</i>	28S ribosomal RNA gene, partial sequence
6. X 79872	<i>Eisenia fetida</i>	18S rRNA gene
7. AJ236886	<i>Eisenia foetida</i>	mRNA for metallothionein, partial
8. D50859	<i>Eisenia foetida</i>	EEP-2 precursor and mature peptide mRNA, complete cds
9. A94985	Sequence 2 from Patent	W09931229
10. AB014478	<i>Eisenia fetida</i>	ann mRNA for Annetocin precursor, complete cds
11. AF030028	<i>Eisenia fetida</i>	coelomic cytolytic factor 1 (CCF1) mRNA, complete cds
12. AB008013	<i>Eisenia fetida</i>	mRNA for lombricine kinase, complete cds
13. U82405	<i>Eisenia fetida</i>	28S ribosomal RNA gene, D6 region, partial sequence
14. U02710	<i>Eisenia fetida andrei</i>	hemolysin gene, complete cds
15. D85848	<i>Eisenia fetida</i>	mRNA for lysenin-related protein, complete cds
16. D85847	<i>Eisenia fetida</i>	mRNA for lysenin-related protein, complete cds
17. D85846	<i>Eisenia fetida</i>	mRNA for lysenin, complete cds
18. D50862	<i>Eisenia foetida</i>	mRNA for precursor protein of EEP-2, complete cds
19. D50861	<i>Eisenia foetida</i>	EEP-2 precursor mRNA, complete cds
20. D50860	<i>Eisenia foetida</i>	EEP-2 precursor mRNA, complete cds
ヒメミミズ <i>Enchytraeus</i> sp.		
1. U55841	<i>Enchytraeus</i> sp.	16S ribosomal RNA gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial rRNA, partial sequence
2. AF406597	<i>Enchytraeus albidus</i>	28S ribosomal RNA gene, partial sequence
3. AY040683	<i>Enchytraeus</i> cf. <i>albidus</i>	18S ribosomal RNA gene, partial sequence
4. AF063418	<i>Enchytraeus</i> sp. 'Enc'	elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds
5. U95948	<i>Enchytraeus</i> sp. 'Aguinaldo, 1997'	18S ribosomal RNA gene, complete sequence
6. Z83750	<i>Enchytraeus</i> sp.	18S rRNA gene
7. U67325	<i>Enchytraeus</i> sp.	18S ribosomal RNA gene, partial sequence
8. X95396	<i>E. buchholzi</i>	mRNA for aldehyde dehydrogenase
9. X79344	<i>E. buchholzi</i>	crp mRNA
10. X03911	<i>Enchytraeus albidus</i>	5S rRNA

2002年4月のNCBI PubMedから検索した遺伝子のデータベースによる。データベースの性格上、登録者の記載した種名や遺伝子名等がそのまま使用されている。

しかし、フトミミズ、特に日本各地で最も高頻度に観察採取されるヒトツモンミミズは生殖器多様性を持ち、多様性が種の特性ともなっている。従って、ヒトツモンミミズにおいては形態的多様性と遺伝的多様性との対応を明らかにすること、すなわち、遺伝的には均一な集団であるにも関わらず形態的な多様性を持つのか、それとも多様な形態は遺伝的多様性によるのかを明らかにする必要がある。ヒトツモンミミズが属するフトミミズ属 *Amyntas* (*Pheretima*) の遺伝子情報は伸長因子I α のみに留まっている。そのため、これに加える分類指標となる遺伝子として18S リボゾームRNA遺伝子 (48) とミトコンドリア・チトクローム酸化酵素I (COI) 遺伝子 (49) の解析を目指した。

前項「生態調査」で形態的解析を行なったフトミミズ標本から、DNAを抽出した。フトミミズは概ね90-110体節からなり、環帯と雄性孔・性斑紋等は20体節までに位置する。摂護腺(前立腺)が雄性孔周辺、盲囊(消化管付属器)が27体節にある。従って、30体節以降は消化管と腎管以外に特別の器官が存在しない。通常、頭から50-60体節周辺より以降(但し尾部側10体節は保存)から約5mm長の部位を切り取り、消化管を除去し筋層のみを取り出した。ハサミ及びマイクログラインダーで破碎、タンパク分解酵素Kで60°C 3時間処理、クロロホルムでの除タンパク、イソプロパノールでの核酸沈殿、水への再溶解、RNaseによるRNA分解、HiBondカラムによるDNA分画、DNAのエタノール沈殿による濃縮の各ステップを経て、DNAを抽出した。抽出後、1%アガロースゲルで電気泳動により分子量で分画、エチジウムブロマイドで染色し紫外線照明下で観察記録した。

また、実験室内で飼育しているオハイオ州立大学Edwards教授より分与されたシマミミズ *E. fetida* 及び *E. andrei*、相模浄化サービス関野氏より分与されたシマミミズの3種類の新鮮材料をエタノール麻醉・固定し、直ちに解剖し消化管を除去、同様の部位を用いて同様の手技でDNA抽出を行なった。

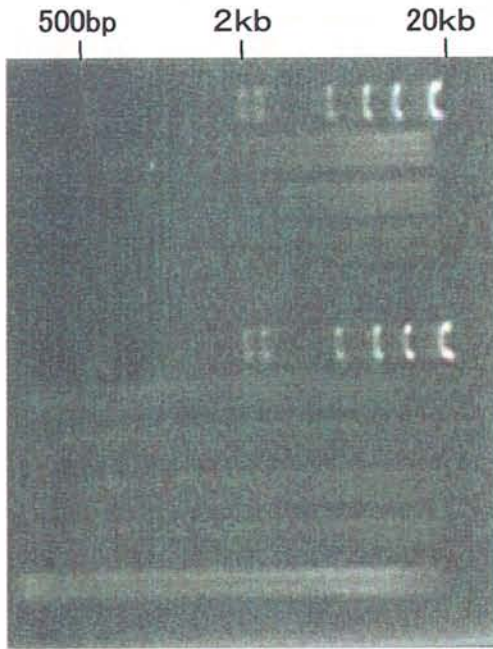
上記の方法でシマミミズからは十分な量のDNAが抽出可能である。一方、初期に採取しフトミミズのホルマリン固定標本では、DNAはわずかにしか回収できなかつた。しかし、エタノール固定した標本からは高分子DNAがPCR分析を十分な回数可能な量を抽出できた。現在、同定が完了している *A. hylgendorfi* (奥多摩・本学内)、*A. corticis*、*A. fravescens*、*A. fuscatus* の4種5標本からDNAを抽出した(図15)。

抽出したDNAを鋳型に18SリボゾームRNA遺伝子とチトクローム酸化酵素I遺伝子を耐熱DNA複製酵素Taqを用いたポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction: PCR)により増幅した。上記のDNAを鋳型に用いてDNA変性94°C 3分の後、変性94°C 30秒・ブ

プライマー結合48°C30秒・延長70°C30秒を35回繰返す増幅反応を行なった。反応生成物を2%アガロースゲルで電気泳動・エチジウムブロマイド染色後に観察記録した。

配列が既にデータベース上に登録されているオウシュウツリミミズ *L. terrestris* の18SリボソームRNA遺伝子の異なる部位を増幅する二組のプライマー、及びCOI遺伝子の一部を増幅する一組のプライマーを設定した。18SリボソームRNA遺伝子ではそれぞれ590塩基対と170塩基対、COI遺伝子では680塩基対が予想される (図16)。

用いたツリミミズのDNA 3試料、フトミミズ4種 5試料共に、それぞれの遺伝子で予想される大きさのDNA増幅断片が観察できた (図17)。現在、増幅断片を制限酵素で切断しその切断部位多型の検出、DNA塩基配列の直接法での決定を進めている。これらの解析により、種内の変異、または種間の系統的距離について明らかにできると期待できる。また任意に設定したプライマーを用いて塩基配列多型を検出するRAPD法 (50) により、より簡便に個体間の系譜を明らかにする手法を検討している。



分子量マーカー(λ HindIII)

E. fetida (Ohio)

E. fetida ? (相模浄化サービス)

E. fetida andrei (Ohio)

分子量マーカー(λ HindIII)

A. hilgendorfi (奥多摩)

A. hilgendorfi (本学)

A. corticis (奥多摩)

A. fravescens (本学)

A. fuscatus (本学)

図15 各種のミミズから抽出したDNA

実験室内で飼育しているツリミミズ3種と、奥多摩調査地点・本学内から採集したフトミミズ4種5試料からDNAを抽出し、その一部をアガロースゲル電気泳動で分析した。20kb近辺から小分子量領域にかけてDNAを検出できる。

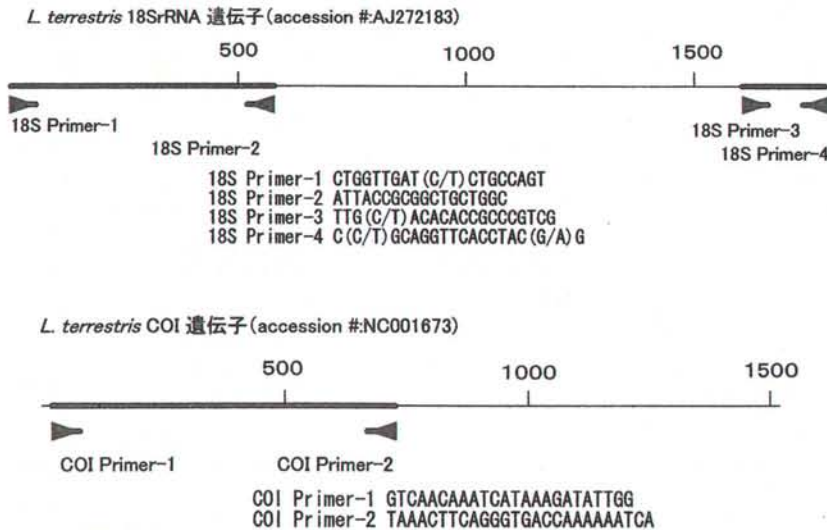


図16 18S rRNA遺伝子とCOI遺伝子のPCRプライマー

データベースより得たオウシュウツリミミズ *L. terrestris* の18S rRNA及びCOI遺伝子の配列上にポリメラーゼ連鎖反応PCRによる増幅断片を示した。18S rRNA遺伝子ではプライマー1と2によりはさまれた約580塩基対の5'側断片、プライマー3と4でははさまれた約180塩基対の3'側断片の増幅が期待される。COI遺伝子では約680塩基対の5'側断片の増幅が期待される。

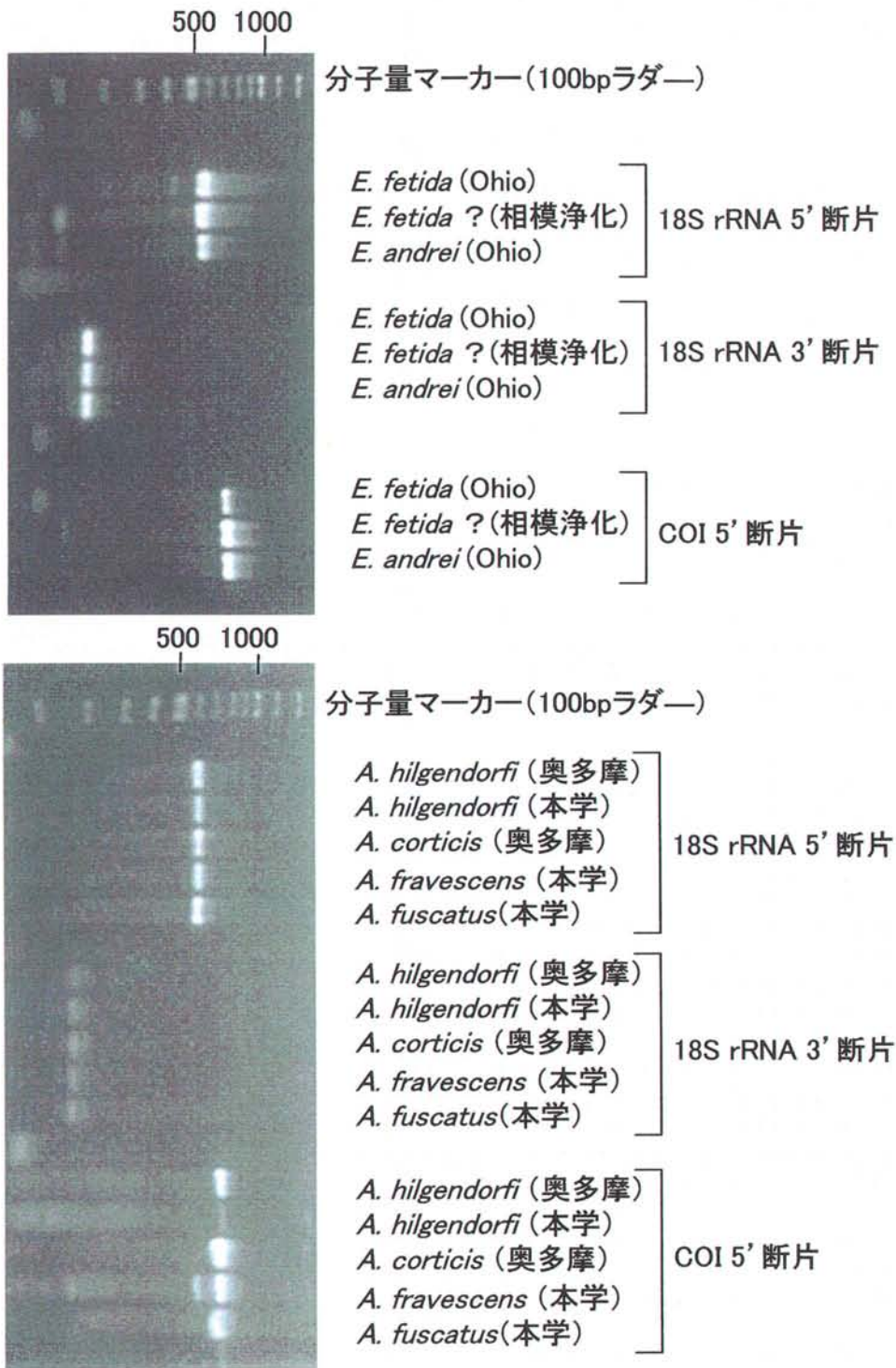


図17 PCR増幅断片の電気泳動解析

図15に示した3種類のツリミミズ、及び4種5試料のフトミミズDNAと図16に示した各プライマーを用いて、PCR法で遺伝子断片を増幅し、アガロース電気泳動により解析した。いずれのDNA試料からも期待された大きさの断片の増幅が確認できた。

3. シマミミズの遺伝子解析

シマミミズの遺伝子解析を進めるに当り、生殖機能に関連する遺伝子の単離、さらに発現パターン網羅的解析を目的に、cDNAライブラリーの作製を行なった。

このため、シマミミズの各成長段階の個体を数匹ずつを、液体窒素で瞬間凍結した後、総RNAを抽出、オリゴdTカラムを用いてmRNAを分離、逆転写した後にラムダZAPベクターに組み込んだ。数回の条件検討を行なった結果、一般的に発現しているmRNAをほぼ網羅できる 10^6 個以上の独立クローンからなるcDNAライブラリを作製できた。

現在、このライブラリーからエレガンス線虫の生殖器形態形成に関与する遺伝子をプローブにミミズの相同遺伝子の検索を進めている。特にDMRT遺伝子は各種の動物で雄性生殖器の維持に重要な働きをすることが示されているので、フトミミズ属の生殖器変異に関する昭和6年の畑井の提示した設問に何らかの解答を出せるものと期待できる。

また、本研究で確立した技術を応用し、シマミミズから特性の異なるcDNAライブラリーの作製、ヤマトヒメミミズでも同様の複数の異なる特性を持つcDNAライブラリーの作製を予定している。特性の異なるライブラリーを用いたDifferential Display法で分化や形態形成・再生に関わる遺伝子等(51)を網羅的に把握できる可能性がある。

結 語

ミミズ自体は近代生物学の代表者ダーウィンがその重要性を力説しても、またどうも眞面目に見ても、我々にとってありふれた路傍の生き物であろう。日本にはシーボルトミミズと呼ばれる青く輝く美しいミミズもいるがほぼ絶滅危惧種で、普通のミミズは美しくもないし魅力的な動物でもない。

我々は当たり前とその辺りにいて誰もが知っている動物だから、敢えてミミズを材料に用いた分子生物学的汚染評価系の確立を目指した。しかし、予期せず多くの難問に直面し、紆余曲折した。現在の科学の花形の材料であれば問題に直面した時、文献を検索すると大概、どこかで類似の発想を持った幾つかの研究に行き当たり、それを検討し取捨選択するというプロセスをとる。我々もそれを当然のことと考えている。しかし、この研究では検討すべき文献がほとんど存在しなかった。これは、確かに研究を発想した段階からある程度は予想できたことであり、いい言葉で云えば「他に類を見ない独創的研究」である。本研究を進めるに当り、多くの方の助言を賜った。多くは私の従来の研究テーマからの飛躍に驚き絶句。次になぜミミズなのかを説明すると『面白いテーマ』と一応は評価いただく。お世辞半分としても勇気付けられた。

今、先達である畑井新喜司博士の『みみず』を読み返してみると、その中で提示されている多くの問題に未だに解答が出されていないことに気が付く。我々の観察の多くが博士の発見の確認の域を出ていない。つまり、『みみず』以降、日本でのミミズ研究の進歩は限られたものだった。これから新しい手法を使って、畑井博士の提示した問題に答えを出して行きたいと思う。

以下に要約した研究成果は未だに中途半端で、生態学的調査、実験動物化、分子生物学的解析等の基盤を固めた段階に留まった。今後、この基盤の上に進展させるべき研究の方向性が見えてきた。ミミズを用いて、分子レベル解析することは、環境評価に加え、今、視野の中に入りつつある発生・分化・再生のみならず、さらに種の維持や種概念など生物学的にも興味深く、また奥も深いテーマへと発展することを期待させる。

この基盤整備は、とうきゅう環境浄化財団の助成の賜物である。

1. 多摩川上流域奥多摩町と中流域八王子市宮下町で継続的なミミズの生態調査を行なった。採集されたフトミミズは主にヒトツモンミミズ *Amyntas hilgendorfi*、ツリミミズは主にサクラミミズ *Eisenia japonica* であった。

2. ヒトツモンミミズでは雄性孔欠損をはじめ受精囊孔欠損など生殖器が不完全な個体が大半をしめた。種の維持に特異な機構を仮定せざるを得ない。
3. 環境評価系に用いるため、オハイオ州立大学Clive Edwards教授よりシマミミズ *Eisenia fetida*の供与を受け実験動物化に取り組んだ。キノコ廃菌床を利用した飼育基と糠を用いて、清潔であり、また安定して産卵と成長を通年に維持できる飼育系を確立した。
4. 東北農業試験場中村好男博士より無性的な碎片分離による増殖と有性生殖を行うヤマトヒメミミズ *Encytraeus japonensis*の供与を受け、細胞の増殖と情報伝達を指標として再生と分化を解析する方法を確立した。
5. 野外より採取したミミズ標本の生殖器多様性と種が多様性を対比検討するため、遺伝子DNA抽出法を確立した。また遺伝子データベースを詳細に検討し、解析すべき遺伝子の絞込みを行ないPCRによる遺伝子断片を増幅する方法を確立した。
6. シマミミズより 10^6 個以上の独立クローンよりなるcDNAライブラリーを作製し、性決定、特に雄性生殖器の維持に関わる遺伝子の単離を進めた。
7. 今後、上記で基盤整備した技術をさらに拡張して用いることが期待される。本研究は多摩川流域の土壌環境の評価のみならず、生物学的に興味深いテーマへと発展可能と期待される。

成果の公表について

本研究の成果の一部を平成14年9月に連合王国（イギリス）Cardiffで開催される国際学会“The 7th International Symposium on Earthworm Ecology”において、次の三演題として発表した。

Review of Japanese Earthworms in Relation to the Asian Fauna
Blakemore, R., Matsumoto, S., Gamou, S.

Molecular Cloning of Gonad-Determining Gene (s) from *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta: Lumbricidae)

Suzuki, T., Honda, M., Matsumoto, S., Gamou, S.

Immunological Analysis of Fragmental Reproduction and Regeneration of *Enchytraeus japonensis* (Oligochata: Enchytraeidae)

Honda, M., Suzuki, T., Matsumoto, S., Gamou, S.

日本産フトミミズの分類についてはR.J. Blakemore博士と共同で英文専門誌へ原著論文として発表を予定している（印刷中）。

蒲生を中心としてミミズの分類に関する問題点について、動物学関係の英文学術専門誌への総説の投稿を準備中である。

遺伝子クローニング等については、英文学術専門誌への原著論文の投稿を予定している。

謝 辞

とうきゅう環境浄化財団の助成により土壌動物ミミズの生態学的、分子生物学的な研究に必須の数々の基盤を整備することができました。とうきゅう環境浄化財団に深く感謝します。

本研究を進めるの当り、多くの方々の協力を得ました。共同研究者としてご助力いただいた下記の諸先生に感謝します。

中央大学経済学部 教授 中村 方子 先生 (現 名誉教授)
慶応義塾大学医学部 教授 清水 信義 先生
摂南大学薬学部 教授 宮田 秀明 先生

本研究を進めるに当り、試料の提供や助言を賜った、下記の諸先生方に感謝します。

オハイオ州立大学 教授 Clive Arthur Edwards 先生
オーストラリア連邦科学産業研究機構 非常勤研究員
Robert John Blakemore 先生
(2002年5月より日本学術振興会外国人研究員として杏
林大学にて10ヶ月間、研究に従事)

東北農業試験場 上席研究員 中村 好男 先生 (現 愛媛大学農学部教授)
農業生物資源研究所 主任研究員 茗原眞路子 先生
成蹊高校 教諭 石塚小太郎 先生
動物写真家 久田 雅夫 様
東京の野生動物事務局 佐藤 理子 様
相模浄化サービス 関野てる子 様

本研究を進めるの当り、野外採集や試料整理に協力いただいた杏林大学保健学部の下記の方々に感謝します。

野田 治久 鈴木 知晴 本田 誠 皆川(平山)智美 菊池 沙知
足立 理恵 土屋 貴代 岡田 晋也 松島 信介 奥田美奈子
高橋 麻美 前泊 美紀 若月 良子

引用文献

- 1 T. Colborn, D. Dumanoski & J. Peterson Myers. 『Our Stolen Future』
(邦題：奪われし未来 長尾 力 訳 翔泳社 1997)
- 2 D. Cadbury. 『The Feminization of Nature』
(邦題：メス化する自然 井口泰泉 監修・古草秀子 訳 集英社 1998)
- 3 A.G. Andersen, T.K. Jensen, E. Carlsen, N. Jorgensen, A.M. Andersson, T. Krarup, N. Keiding & N.E. Skakkebak. High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Hum. Reprod.* 15 (2) : 366-72, 2000
- 4 T. B. Minh, H. Nakata, M. Watanabe, S. Tanabe, N. Miyazaki, T. A. Jefferson, M. Prudente & A. Subramanian. Isomer-specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls, including coplanar congeners, in cetaceans from the north Pacific and Asian coastal waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39:398-410, 2000
- 5 T. Horiguchi, C. Hyeon-Seo, H. Shiraishi, Y. Shibata, M. Soma, M. Morita & M. Shimizu. Field studies on imposex and organotin accumulation in the rock shell, *Thais clavigera*, from the Seto Inland Sea and the Sanriku region, Japan. *Sci. Total Environ.* 214:65-70, 1998
- 6 中村方子『ヒトとミズの生活誌』吉川弘文館 歴史文化ライブラリーVol.31 1998
- 7 代表的なデータベースへの入り口のサイトとして次の3つがある。但し、データそのものは共通である。DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html)
- 8 Rachel Carson. 『Silent Spring』
(邦題：沈黙の春 一生と死の妙薬 青柳梁一 訳 新潮社)
- 9 R. J. Baker. Notes on some ecological effects of DDT sprayed on elms. *J. Wildlife Manag.* 22 (3) : 269-274, 1958
- 10 B.N.K. Davis. Soil animals as vectors of organochlorine insecticide for ground-feeding birds. *J. Appl. Ecol.* 3. suppl. pp133-139, 1966

- 11 M. Nakamura. Soil animal colonizing in reclamation sites of bottom oil polluted by polychlorinated biphenyls on flood plain of Fujikawa, Shizuoka Prefecture. 中央大学論集10:45-54, 1989
- 12 中村方子『ミミズのいる地球：大陸移動の生き証人』中公新書 1996
- 13 有吉佐和子『複合汚染』新潮社 1974
- 14 S.-K. Chen, C.A. Edwards & S. Subler. A microcosm approach for evaluating the effects of the fungicides benomyl and captan on soil ecological processes and plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 18:69-82, 2001
- 15 S.R. Sturzenbaum, C. Winters, M. Galay, A. J. Morgan & P. Kille. Metal ion trafficking in earthworms. Identification of a cadmium-specific metallothionein. *J. Biol. Chem.* 276 (36) : 34013-8, 2001
- 16 Sixth International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, 1998
(<http://www.fzk.de/consoil98/consoil.pdf>)
- 17 Charles Darwin 『The formation of vegetable mould, through the action of worms, with observation on their habits (邦題：ミミズと土 渡辺弘之 訳 平凡社)
- 18 畑井新喜司『みみず』改造社 1931 (復刻版 サイエнтиスト社 1980)
- 19 C.A. Edwards & P.J. Bohlen. 『Biology and Ecology of Earthworm, Third Edition』Chapman & Hall, 1996
- 20 A.J. Morgan, M.P. Turner & J.E. Morgan. Morphological plasticity in metal-sequestering earthworm chloragocytes: morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (3) : 610-8, 2002
- 21 久田雅夫『奥多摩に生きる動物たち：山小屋の撮影日記より』けやき出版 2000
- 22 E. G. Easton. A revision of the acaecate earthworm of the *Pheretima* group (Megascolecidae:Oligochaeta) : *Archiphertima*, *Metapheretima*, *Planapheretima*, *Pleionogaster* and *Polypheretima*. *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.* 35 (1) : 1-128, 1979
- 23 E. G. Easton. Japanese earthworms : a synopsis of the Medadrile species (Oligochaeta) . *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool.* 40 (2) : 33-65, 1981
- 24 石塚小太郎 『日本産フトミミズ属 (Genis *Pheretima* s. lat.) の分類学的研究』成蹊大学一般研究報告 33 (3), 2001
- 25 R.J. Blakemore. Japanese Earthworms. 印刷中

- 26 S. Gamou, R.J. Blakemore & S. Matsumoto. 投稿準備中
- 27 宇井純 『公害原論』 亜紀書房1988
- 28 T. Sakurai, J.G. Kim, N. Suzuki, T. Matsuo, D.Q. Li, Y. Yao, S. Masunaga & J. Nakanishi. Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Sediment, Soil, Fish, Shellfish, and Crab Samples from Tokyo Bay Area, Japan. *Chemosphere* 40 (6) : 627-640, 2000
- 29 G.E. Gates. Burmese earthworms: An introduction to the systematics and biology of Megadrile Oligochaetes with special references to Southeast Asia. *Trans. Am. Phil. Soc.* 62 (7) : 1-326, 1972
- 30 S. Kobayashi. On the breeding habit of the earthworm without male pores. I. Isolation experiments in *Pheretima hilgendorfi* (Michaelson). *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ.* 11 (4) : 473-485, 1937
- 31 P.S. Western & A.H. Sinclair. Sex, genes and heat: triggers of diversity. *J. Exp. Zool.* 290 (6) : 624-31, 2001
- 32 C.S. Raymond, C.E. Shamu, M.M. Shen, K.J. Seifert, B. Hirsch, J. Hodgkin & D. Zarkower. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391 (6668) : 691-5, 1998
- 33 C.S. Raymond, M.W. Murphy, M.G. O'Sullivan, V.J. Bardwell & D. Zarkower. Dmrt 1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.* 15;14 (20) : 2587-95, 2000
- 34 J.R. Kettlewell, C.S. Raymond & D. Zarkower. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt 1 prior to sexual differentiation. *Genesis* 26 (3) : 174-8, 2000
- 35 R.H. Kaufman & E. Adam. Findings in female offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Obstet. Gynecol.* 99 (2) : 197-200, 2002
- 36 W.C. Strohsnitter, K.L. Noller, R.N. Hoover, S.J. Robboy, J.R. Palmer, L. Titus-Ernstoff, R.H. Kaufman, E. Adam, A.L. Herbst & E.E. Hatch. Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J. Natl. Cancer Inst.* 4;93 (7) : 545-51, 2001
- 37 Y. Nakamura. A new fragmenting enchytraeid species, *Enchytraeus japonensis* from a cropped Kuroboku soil in Fukushima, Northern Japan (Enchytraeids in Japan 5) . *Edaphologia* 50:37-39, 1993

- 38 M. Myohara, C. Yoshida-Noro, F. Kobari & S. Tochinai. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. *Dev. Growth Differ.* 41 (5) : 549-55, 1999
- 39 C. Yoshida-Noro, M. Myohara, F. Kobari & S. Tochinai. Nervous system dynamics during fragmentation and regeneration in *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Dev. Genes Evol.* 210 (6) : 311-9, 2000
- 40 茗原眞路子 再生研究の新しいモデル実験動物：ヤマトヒメミミズの生物学 遺伝53 (11) : 47-52, 1999
- 41 蒲生 忍・清水信義 「EGF/TGF- α 系」(『最新医学からのアプローチ13 細胞増殖因子と疾患』黒木 登志夫 編) メジカルビュー社 p.14-29, 1995
- 42 M. Ohtsubo, S. Gamou & N. Shimizu. Antisense oligonucleotide of WAF 1 gene prevents EGF-induced cell-cycle arrest in A431 cells. *Oncogene* 16 (6) : 797-802, 1998
- 43 Y. Sekizawa, T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima & S. Natori. Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* 20;191 (1) : 97-102, 1997
- 44 H. Satake, K. Takuwa, H. Minakata & O. Matsushima. Evidence for conservation of the vasopressin/oxytocin superfamily in Annelida. *J. Biol. Chem.* 274 (9) : 5605-11, 1999
- 45 C. Gruber, S. Sturzenbaum, P. Gehrig, R. Sack, P. Hunziker, B. Berger & R. Dallinger. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. (Cd) -metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* 267 (2) : 573-582, 2000
- 46 T. Suzuki, Y. Kawasaki, T. Furukohri & R.W. Ellington. Evolution of phosphagen kinase VI. Isolation, characterization and cDNA-derived amino acid sequence of lombricine kinase from the earthworm *Eisenia foetida*, and identification of a possible candidate for the guanidine substrate recognition site. *Biochim. Biophys. Acta* 1343 (2) : 152-9, 1997
- 47 S. Kojima, T. Hashimoto, M. Hasegawa, S. Murata, S. Ohta, H. Seki & N. Okada. Close phylogenetic relationship between Vestimentifera (tube worms) and Annelida revealed by the amino acid sequence of elongation factor-1 alpha.

- J. Mol. Evol.* 37 (1) : 66-70, 1993
- 48 C. Erseus, M. Kallersjo, M. Ekman & R. Hovmoller. 18S rDNA phylogeny of the Tubificidae (Clitellata) and its constituent taxa: dismissal of the Naididae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 22 (3) : 414-22, 2002
- 49 P. Martin, I. Kaygorodova, D.Y. Sherbakov & E. Verheyen. Rapidly evolving lineages impede the resolution of phylogenetic relationships among Clitellata (Annelida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 15 (3) : 355-68, 2000
- 50 T. Richardson, S. Cato, J. Ramser, G. Kahl & K. Weising. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Res.* 23 (18) : 3798-9, 1995
- 51 D. Shah, D. Aurora, R. Lance & G.W. Stuart. POU genes in metazoans : homologs in sea anemones, snails, and earthworms. *DNA Seq.* 11 (5) : 457-61, 2000

ないぶん び かくらんぶつしつ た まがわりゅういき どじょうどうぶつお せん かいめい
「内分泌攪乱物質による多摩川流域の土壤動物汚染の解明」

かんけいどうぶつひんもうこう しひょう もち かいせき
— 環形動物貧毛綱「ミミズ」を指標に用いた解析 —

(研究助成・学術研究VOL. 31—No.229)

著 者 がもう しのお まつもと せいじ
蒲生 忍・松本 誠治
発行日 2003年3月31日
発 行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団

〒150-0002

渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03)3400-9142

FAX (03)3400-9141
