

令和3年度 化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー  
2022年3月2日

# 野生生物の個体群でみられる 生殖影響と内分泌かく乱

小林 亨

静岡県立大学

食品栄養環境科学研究所・環境科学

1

このような発表の機会を頂き、どうもありがとうございます。静岡県立大学の小林です。

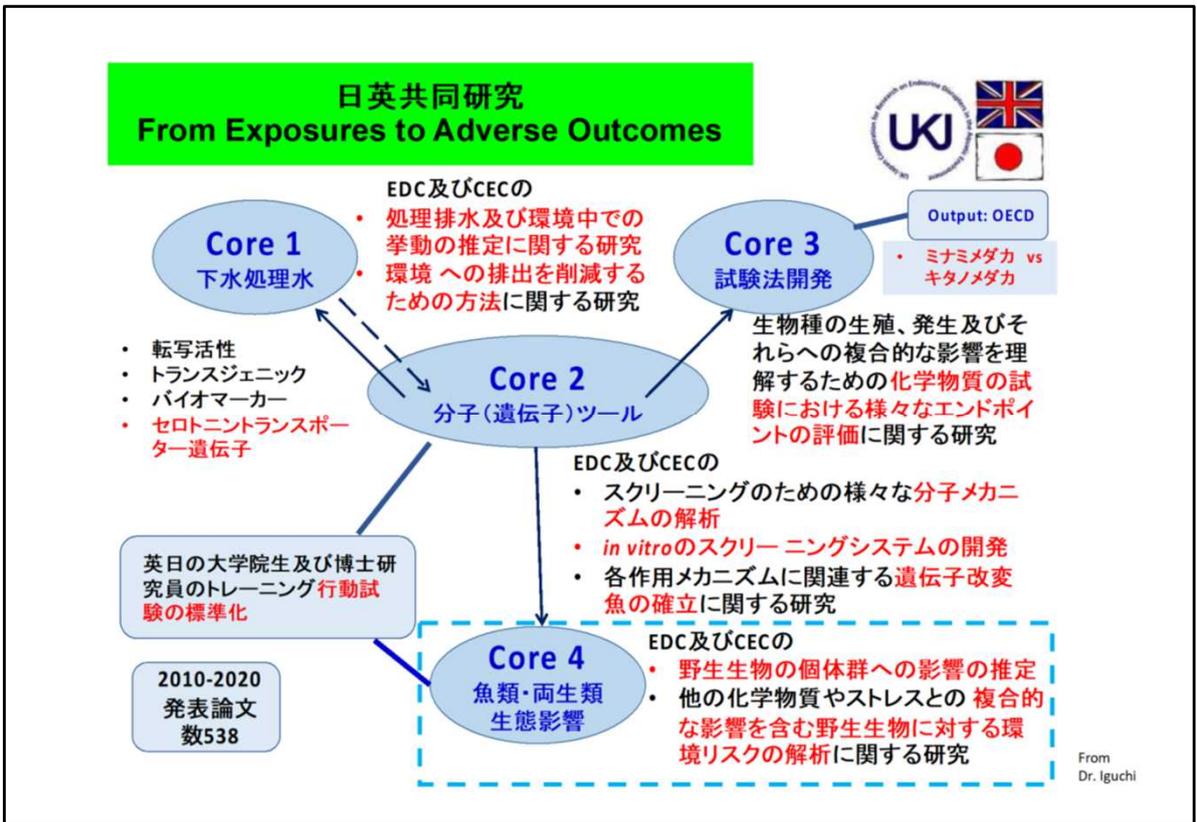
今日の私の話は「野生生物の個体群でみられる生殖影響と内分泌かく乱」というテーマでお話しさせていただきます。

# 化学物質の内分泌かく乱作用に関する 日英共同研究

Core 4. 内分泌かく乱作用が疑われる  
物質の集団レベルへの影響  
—日英両国での環境リスクの解析に向けて—

2

先ほど御紹介にありましたように、今日の話は、環境省が主催しています化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究の一環として行われています。

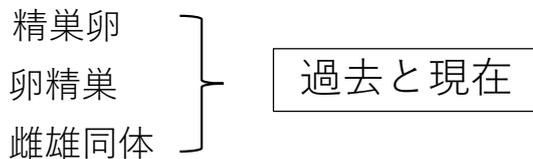


これが日英共同研究の枠組みになりますが、今日の話はこのCore 4の中のお話になります。

# 野生生物の個体群でみられる生殖影響と内分泌かく乱

## 1. 野生生物種の個体群における生殖影響

- ・野生トノサマガエル集団でみられる雌雄同体现象



- ・メダカ地域個体群による性ホルモンへの感受性の違い:  
性転換誘導率の差異

## 2. 個体群への影響：どのように評価する？

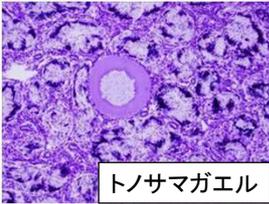
侵襲的、非侵襲的評価

4

今日の話は大きく分けて2つです。

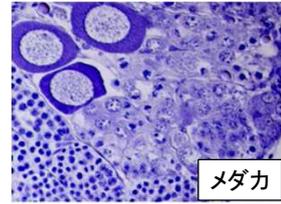
1つは野生生物種の個体群における生殖影響です。私は博士号取得まではカエルの生殖に関する研究を行っていて、その後、基生研に移ってからは魚の生殖に関する研究を行ってきました。静岡県立大学に着任するに当たって、またカエルでの研究をやってみたくなり、このプロジェクトに参加させていただいてます。現在、環境がらみで行なっている研究としては、野生トノサマガエル集団で見られる雌雄同体现象、今日のメインの話になります精巢卵ですとか卵精巢、雌雄同体のお話、もう1つは、メダカの地域個体群でみられる性ホルモンによって誘導される性転換の感受性の違いの原因遺伝子解明のための研究も行っています。この話は、今日はしません。

2つ目は、これら野生生物種の個体群における環境影響の評価方法です。これに関して、この数年、侵襲的な方法に加えて非侵襲的な方法による評価について検討しておりますので、これについても御紹介させていただきます。



トノサマガエル

## 精巣卵とは？



メダカ

- ・ 精巣卵：精巣組織中にみられる卵母細胞様細胞  
(卵精巣：卵巣に部分的に精巣要素を持つモザイク生殖腺)
- ・ 古くから知られている  
無脊椎動物：アナジャコ (1891), ヒメトンボ, フトミミズ  
脊椎動物：魚類 (イワナ, エゾトミヨ etc.) 両生類 (アカガエル etc.),  
爬虫類 (スッポン、ヤモリ), 鳥類 (コアジサシ)  
内田, 1935
- ・ 実験的発生：エゾアカガエル, メダカ etc.

5

これはトノサマガエル、こちらはメダカで見られる精巣です。

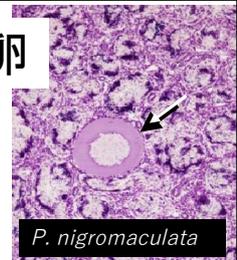
精巣卵は、精巣組織中に見られる卵母細胞様細胞のことをいいます。よく卵精巣と混同されるのですが、卵精巣というのは卵巣中に部分的に精巣要素を持つモザイク生殖腺ですので精巣卵とは違うものです。

精巣卵は文献的にはかなり古くから脊椎動物・無脊椎動物関係なく知られています。例えばここにお示ししてありますように、1891年にはアナジャコで既に記載されてます。1935年の日本動物学会誌における報告では、ヒメトンボ、フトミミズ、ここに示してあります魚類、両生類、爬虫類、鳥類で既に精巣卵が見られるという記載があります。また、実験的な発生に関しての検討も古くからされてます。

## 両生類の野生集団で見られる精巣卵

### 調査研究を始める前(~2010)

- ・ 精巣卵が容易に観察される種：  
トノサマガエル、ツチガエル、ヌマガエル  
(Iwasawa & Asai, 59; 64; Min. Environ. Jpn., 99~04)
- ・ 精巣卵を持つカエルの頻度は、集団間で異なる (Min. Environ. Jpn., 05)
- ・ 両生類の精巣卵の発生が、エストロゲンで誘導されるかは不明  
(メダカでは、実験的にエストロゲン曝露で容易に誘導できる)



両生類の精巣卵の発生は、  
環境要因 and/or 遺伝的要因によるのかは？

6

今日の最初の話題のカエルの野生集団で見られる精巣卵ですが、私がこのプロジェクトで仕事を始める前、2010年より前はどうかをまず簡単に紹介させてください。先ほどお話ししましたように、カエルの精巣卵は古くから記載されています。国内種でいうと、精巣卵が容易に観察される種としましては、今日お話しするトノサマガエルや、ツチガエル、ヌマガエルで高頻度に観察されるということが報告されております。

また、2005年の環境省の報告書では、精巣卵を持つカエルの頻度は地域集団間で異なる傾向がありそうだ、ということが既に指摘されておりました。ただし、例えばメダカでは実験的にエストロゲン曝露で精巣卵の発生が容易に誘導できるのですが、カエルの精巣卵の発生がエストロゲン曝露で本当に誘導できるか、は明らかではありませんでした。

そうすると、野生のカエルで見られる精巣卵というのは環境要因によるのか、あるいは遺伝的要因、この両者によるのかということに関してはよく分からなかったというのがこの研究を始める前の状況となります。

トノサマガエル *Pelophylax nigromaculatus* (XY/XX)



生活史

- ・ 性決定: 分化型 (未分化生殖線から精巣、卵巣に分化する)
- ・ 性成熟: 生後、雄は2年; 雌は3年要する
- ・ 精子・卵形成の動態、2次性徴の発達、性ホルモン動態は明らかとなっている

Ref. Iwasawa & Asai, 59; Satoh, 71; Kobayashi & Iwasawa, 76; Kera & Iwasawa, 82; Iwasawa & Kobayashi, 85; Kobayashi & Iwasawa, 88,89; Kobayashi et al., 93

これは今日の最初の話題の材料のトノサマガエルですが、以前はアカガエル属に分類されていたのですが、近年トノサマガエル属というものが新設されて、現在ではトノサマガエル属のカエル、学名も*Pelophylax nigromaculatus*となっております。

このカエルは生活史が結構よく分かっています、性染色体だとか性決定遺伝子というのはまだ分かっていないのですが、プロジェクトからはXY/XX型、我々ヒトと同じような性決定様式を取るということ、そして未分化の生殖腺から精巣と卵巣に直接的に分化する分化型であるということが分かっています。また、受精卵は大体2か月ほどで変態したカエルになるのですが、その後、雄が2年後、雌は3年後に、生殖に初めて参加するということが分かっています。

それに加えて、配偶子形成の時系列の動態、第2次性徴の発達、それを引き起こす性ホルモンの動態というのも既に記載されています。

# 成熟トノサマガエルでみられる精巣卵

表1 精巣卵を有するカエルの頻度 (%)

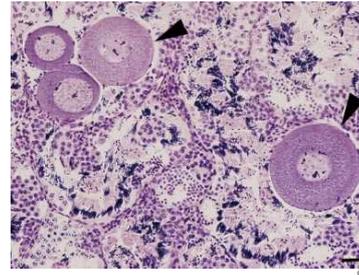
|         | May or June | Aug          | Oct | Total        | Area |
|---------|-------------|--------------|-----|--------------|------|
| 1958*   | 50(23/46)   | 62.5 (10/16) | -   | 53.2(33/62)  | 新潟   |
| 1970**  | 50<         | 50<          | 50< | 49.7(96/193) | 新潟   |
| 1944*** | 75          | -            | -   | 75(9/12)     | 福岡   |

\* Iwasawa and Asai, 1959; \*\* Satoh, 1971; \*\*\* Goto, 1944

2 集団で、高頻度に精巣卵を有するカエルがみられた

しかし、

- ・ 肥大卵母細胞期以外の精巣卵の情報がない  
→ 精巣卵の発生がどの様になっているかは？
- ・ エストロゲン様物質の関与？



トノサマガエルの成熟個体で見られる精巣卵に関しては古くから記載があります。例えば福岡集団では1944年の報告では、個体数は少し少ないのですが、7割程度のカエルで精巣卵の発生が見られる。新潟集団では、これは結構数があって信頼できるのですが、5割程度のカエルが精巣卵を持つということが報告されています。

このようにトノサマガエルを含めて精巣卵を有するカエルの頻度は数多く報告されているのですが、実は肥大卵母細胞以外の精巣卵の情報がありませんでした。つまり精巣卵の発生がどのようになっているかはカエルでは不明だったわけです。また、先にお話ししたように、エストロゲン様物質がこの発生に関与しているかどうかということもよく分かっていませんでした。

未発表データにつき、文章のみでの調査結果の概要です。

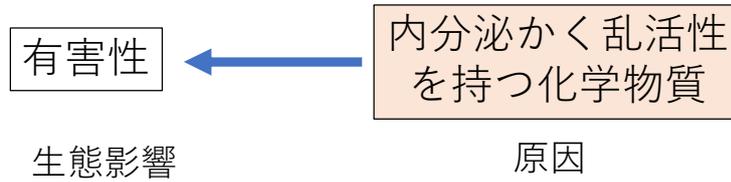
- ・新潟では、1970年代の調査では、成熟♂の約50% に大きな精巣卵が観察されていた。この10年では、成熟♂の20～40%に精巣卵がみられているが、精巣卵の大きさは小さい。
- ・富山でも精巣卵は地点Aと同様の割合で観察されている。最近の調査では、地点Aの70年代と同様に精巣卵を持つ個体の頻度が高いことが明らかとなった。精巣卵のサイズは1970年代の地点Aのカエルよりも小さかったが、1970年代と同様に、1つの精巣で、10個以上の精巣卵が観察される個体が見られた。
- ・精巣卵は、幼若体で見られる精子形成開始に伴い、発生し、正成熟期と生殖周期の間に成長し続け、退化する。
- ・幼生への低用量のエストロゲン曝露は精巣卵様分化を誘導できる。
- ・新潟で見られた卵精巣、雌雄同体カエルは、雄として成長し、偽雄（XX雄）として集団に存在する可能性がある。

9

私がこの研究を始めたときにまず行ったのは、地域集団で精巣卵を持っているカエルの頻度がどうなっているかの調査を始めました。

結果の概要は記載の通りです。

野生集団の生殖への影響と  
生息地域（水環境）の内分泌かく乱活性

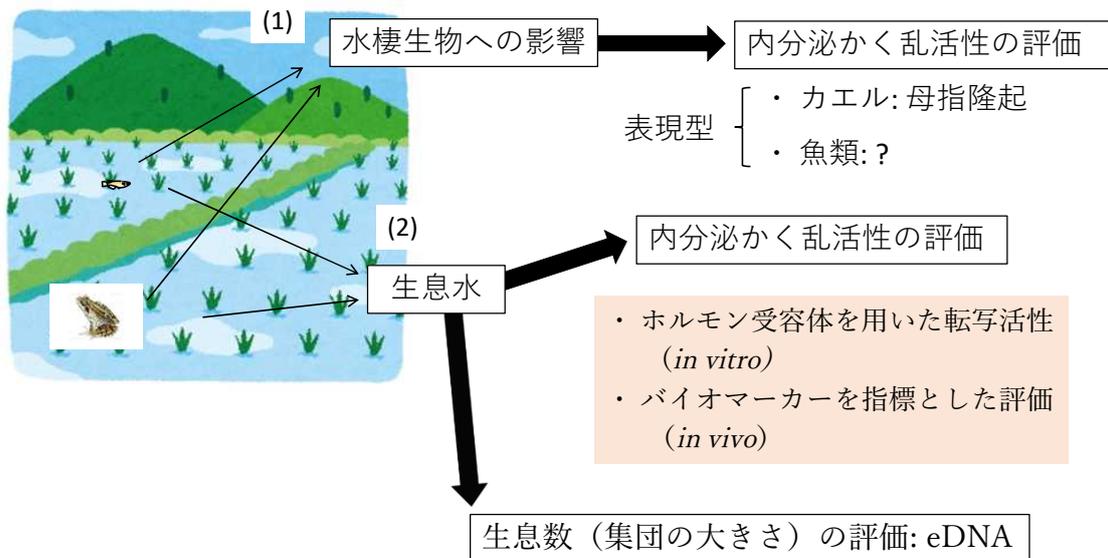


—どのように評価する？—

- ・ 生息水中の化学物質の濃度を測定：どれを測定する？
- ・ 生息水中の活性を測定する：どの活性を測定する？

生態影響には原因が当然あるはずだということで、これをどのようにして見いだすかということが問題になります。そうすると、方法論としては生息水中の化学物質の濃度を根こそぎ測定するというのは有効ですが非常にパワーが必要となります。私たちは、生息水中の内分泌かく乱活性があるかどうかを判断し、その後、物質の単離同定をするという戦略を取ることにし、まずは、どのようにしてこれらの活性を検出するかを検討しています。

## 非侵襲的方法: *in vitro* and *in vivo*



11

この生息水の内分泌かく乱活性を見るということと並行して、水棲生物への影響、今までは例えば精巣卵だとか卵精巣を確認するのは組織医学的な解析をしないと確認できないのでどうしても侵襲的な方法になったのですが、それを非侵襲的な方法にできないかということも並行して考えています。

その1つとして、先ほど少しお話した雄の成熟個体で見られるカエルの母指隆起、これはアンドロゲン、男性ホルモン依存性のものなので、例えばアンドロゲン合成が阻害されるとかアンドロゲン活性を阻害する、例えば高濃度のエストロゲンがあれば阻害するとかということは実験的に分かっているのですが、これを1つ指標にして生き物そのものへの影響が分からないか、検討しています。これは今イギリス側と一緒に検討しております。

生息水の方ですが、内分泌かく乱活性の評価するために、従来の方法ではホルモン受容体を用いた*in vitro* 転写活性化試験(これは非常に感度が良いです)が使われますが、化学物質自身の活性しか見られません。これは、例えば個体にばく露された後で代謝されるとか、あるいは分解された物質についての活性評価はできません。そこで、このような生体内での代謝、分解物の活性を含めて評価できるようなバイオマーカーを指標とした*in vivo*の評価系とホルモン受容体を用いた*in vitro* 転写活性化試験、両者を併用するのがいいだろう、ということで進めております。

生息水に含まれる内分泌かく乱活性の評価  
－ *in vivo* 法と *in vitro* 法の特徴－

(1) バイオマーカーの発現を指標とした評価 (*in vivo*)

ステロイドホルモン応答遺伝子の発現変化

(RT-q-PCR、トランスジェニックレポーター魚)

化学物質及び、その生体内代謝物の持つ活性が評価できる

(2) 培養細胞におけるホルモン受容体を用いた転写活性化試験

(*in vitro*)

エストロゲン、アンドロゲン等の受容体

化学物質自身の活性を評価

12

生息水に含まれる内分泌かく乱活性の評価は、生息水域の水から抽出・濃縮したものを、1つは先ほどお話したホルモン受容体を用いた *in vitro* 転写活性化試験、もう1つはバイオマーカーの発現を指標とした *in vivo* 評価をして、この2つを合わせてこのサンプルに内分泌かく乱活性があるのかというのを見ていこうという方向で進めております。

未発表データにつき、文章のみでの結果の概要です。

- ・メダカでは、エストロゲン応答遺伝子のコリゲニンH (chgH)では、胚期で既に感受性が高いが、ビテロゲニン (vtg)は胚期では低く、孵化仔魚でその感受性が高くなる。
- ・化学物質の甲状腺ホルモン作用の内分泌かく乱活性は、自発性摂餌開始前のメダカ孵化仔魚のエストロゲン誘導のvtg遺伝子発現で検出が可能である。
- ・自発性摂餌開始前のメダカ孵化仔魚を用いたアッセイでは、他にエストロゲン、アンドロゲン作用の内分泌かく乱活性が検出できる。この方法は、Animal welfareに則った動物試験代替法になる。

13

結果の概要は記載のとおりです。

## 野生トノサマガエルの個体群における 雌雄同体现象と内分泌かく乱

1970年代と比べて、

- ・ 精巣卵をもつカエルの割合が減少。
- ・ 精巣卵の大きさは、小さい。
- ・ 低容量のエストロゲン曝露は精巣卵様の分化を誘導できる。

評価には、精巣卵を持つカエルの割合（％）に加えて、  
精巣中の精巣卵数も重要。

- ・ 調査区の生息水中の内分泌かく乱活性：  
メダカ孵化仔魚を用いた*in vivo* 試験、*in vitro* ステロイド受容体  
レポーター試験で評価する。

ご静聴ありがとうございました。

14

今日の話をもとめると、野生トノサマガエルの個体群に見られる精巣卵は1970年代と比べて精巣卵を持つカエルの頻度は減っているということ、大きさも小さくなっているということ。低用量のエストロゲンばく露は精巣卵様の分化を誘導できるということが分かりました。影響評価としては、精巣卵を持つカエルの頻度に加えて、精巣中の精巣卵数、精巣卵のサイズも重要な指標となります。

環境要因による影響は、生息水中の内分泌かく乱活性を培養細胞を用いたホルモン受容体のレポーター試験とメダカ孵化仔魚を用いたバイオマーカーを使用した*in vivo* 試験を総合して評価する方法によって、化学物質自身、分解物およびその生体内代謝物の活性を評価できることが明らかとなりました。現在、生息水中の内分泌かく乱活性をこの方法で評価しているところです。別の機会があればお話ししたいと思います。

どうもありがとうございました。