

こり、長期的には種の減少につながると危惧されるのである。

生物に対する内分泌攪乱化学物質の影響あるいは作用機構を調べる上で重要なことは、個体発生との関連を重要視する必要があることである。生殖腺の構築や配偶子形成は、遺伝子が発生プログラムに沿って正しく発現し、翻訳され、タンパク質がつくられる結果として起こるのである。内分泌攪乱化学物質がこのような遺伝子カスケードのどの段階で作用するのかを一つずつ詳細に調べる必要がある。このためには器官、細胞培養系の解析が不可欠である。また、分子生物学的手法が強力なツールとなることは言うまでもない。トランスジェニック作成技術もすでにティラピア、メダカ、ゼブラフィッシュを含む数種の魚類で確立され、頻繁に利用されている。遺伝子ノックアウトの技術もメダカを用いて日本で精力的に開発が進められている。したがって、魚類は内分泌攪乱化学物質の実験モデルとしてきわめて有益である。特に、前述したティラピアは当該研究を推進するにあたって多くの利点があり、内分泌攪乱化学物質の作用機構を研究するための非常に優れた脊椎動物を代表する実験モデルとなると確信する。これまでに魚類で蓄積されてきた生殖のホルモン制御機構に関する細胞、分子レベルの基礎的知見が、今後の内分泌攪乱化学物質の研究に大きく貢献することが期待される。

7. 内分泌攪乱化学物質等の環境因子の試験動物モデルとしてのメダカ

名古屋大学生物分子応答研究センター

尾里 建二郎

要約

内分泌攪乱化学物質などの環境因子の試験モデルとして用いられている、メダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの3種を対象に、その有用性について調査を行った。調査は文献、動物学的特性、研究基盤の整備を中心としておこなった。メダカは化学物質だけでなく放射線や発がん物質など、さまざまな環境因子の研究に有効であると評価される。とくに生殖関連の試験には高いポテンシャルをもつ。ただ、これらの研究の多くが国外で行われていることおよび試験法の開発では遅れていることを指摘しておきたい。研究基盤においても今後の整備が必要である。

ファットヘッド・ミノーでは化学物質の標準試験法の開発が最も進んでいる。さまざまな試験法に有効であるが、世代時間が長いことから継代を必要とする実験には難点がある。

ゼブラフィッシュはさまざまな試験法に有効であるが、前二者と比べると環境因子の研究では実績が少ない。熱帯性であることから低温下での試験は不可能である。また成長の過程で性転換が起こることから生殖に関連した試験には向いていない。ただ、ゼブラフィッシュは基礎生物学の分野で突出した実績と強固な研究基盤を有する。

これらの調査結果を踏まえて、メダカにおける試験法の開発、そのための基盤整備および総合的な環境科学の創生について提言を行った。

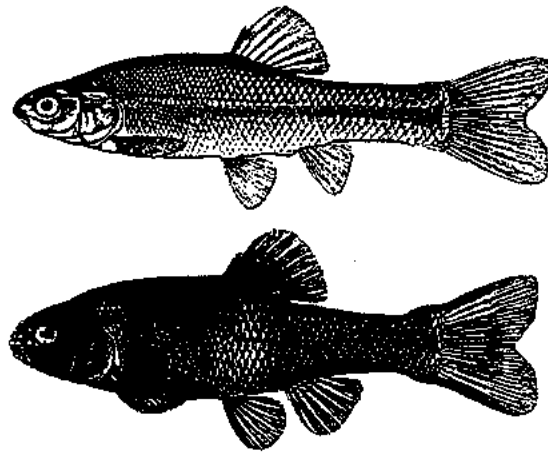
1.はじめに

内分泌攪乱化学物質問題において魚類を用いた研究の必要性が1998年環境庁「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について一環境ホルモン戦略計画 SPEED '98一」、1998年10月「魚類における試験法に関する OECD 専門家会議」等において述べられている。特に「OECD 専門家会議」は、いくつかの試験法をニジマス、ゼブラフィッシュ、ファットヘッド・ミノー、グッピーなどを用いて確立することを提案している。

しかし、内分泌攪乱化学物質が問題化してから日が浅いこともあって、これら試験法について比較して検討することはほとんど行われていない。

本調査は、これらの魚類のなかで小型実験魚類であるメダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの内分泌攪乱化学物質などの環境因子の研究における位置づけを 1) 文献、 2) 実験動物としての特性、 3) 研究基盤の整備、なについて行ったものである。さらにわが国では、メダカは自然ばかりでなく社会や文化的な観点から特別の存在であることから、とくに詳しい記載を行った。最後に今回の調査を踏まえていくつかの提言を試みた。

最後に、ファットヘッド・ミノーについてはわが国ではほとんど知られていないので次頁に写真を載せておいた。



Female (top) and male (bottom) fathead minnow, *Pimephales promelas*.
The male is illustrated in breeding condition with rostral tubercles.
Illustrations by Joseph Tomelleri (with permission).

ファットヘッド・ミノー

2. 文献調査

三種の小型魚類を用いた環境因子の影響に関する研究について過去30年間に発表された論文数について調査を行った。用いたデータベースは次の通りである。

メダカ：インターネット Medakafish Homepage

ファットヘッド・ミノー：文献データベース Medline

ゼブラフィッシュ：文献データベース Medline

ここで用いたデータベースについて述べておくと、Medakafish Homepage には100%近い文献が収録されていると思われる。これに対し Medline の文献収録数は70%程度だと思われるので、ファットヘッド・ミノーとゼブラフィッシュの調査に関してはやや少な目の値が出ていることを注意しておきたい。またメダカについては国内と国外にわけて考察した。

1) 総論文数

これは生物学、医学、環境科学などのすべての分野についての論文数である（表1、図1-グラフ1）。

i) メダカ（表1-1）

70年代と80年代は120程度であるが90年代は400に増加している。

ii) ファットヘッド・ミノー (表1-2)

70年代が20、80～90年代が各50～60程度である。

iii) ゼブラフィッシュ (表1-3)

70年代～80年代は30～120程度であるが90年代になって1、200と爆発的に増加していることが注目されている。このゼブラフィッシュの増加は発生学、神経生物学、ゲノム生物学の分野での進展による。

2) 環境因子研究論文数

次に化学物質、発がん物質、放射線などの環境因子についての論文数を調べた (表1、図1-グラフ2)。

i) メダカ (表1-1)

過去30年間の環境因子についての総論文数は180 (全体の28.6%) である。メダカは環境因子の研究に比較的良く用いられてきたことがわかる。70年代～80年代は放射線や発がん物質の研究が多い。90年代は101編で80年代の約2倍に増加しているが、大部分は化学物質の影響に関するものである。

表 1-1 過去 30 年間に於けるメダカを用いた環境因子研究

		環境因子総論文数			化学物質		発がん		放射線	
年代	総論文数	総数	国内	国外	国内	国外	国内	国外	国内	国外
1991-1999	397	101	24	77	16	65	2	12	6	0
1981-1990	117	53	33	20	11	3	10	12	15	2
1971-1980	115	26	22	4	2	4	6	0	14	0
合計	629	180	79	101	29	72	18	24	35	2

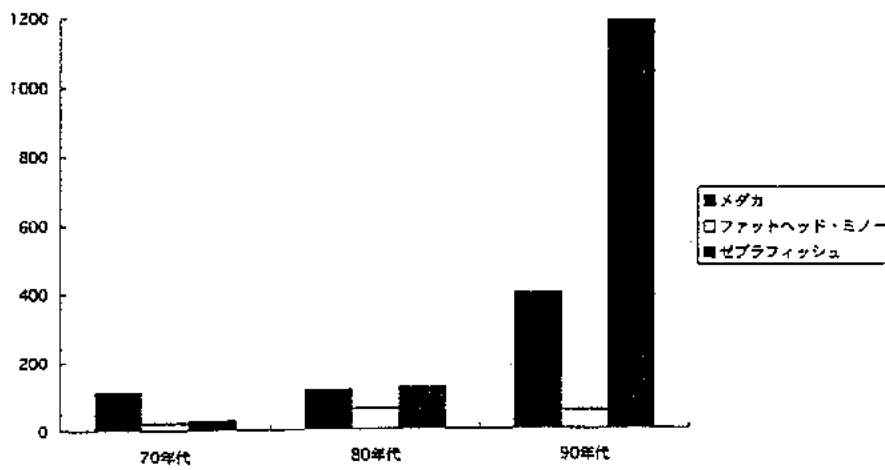
表 1-2 過去 30 年間に於けるファットヘッド・ミノーを用いた環境因子研究

年代	総論文数	環境因子総論文数	化学物質	発がん	放射線
1991-1999	54	46	46	0	0
1981-1990	61	45	41	3	1
1971-1980	22	14	14	0	1
合計	137	105	101	3	2

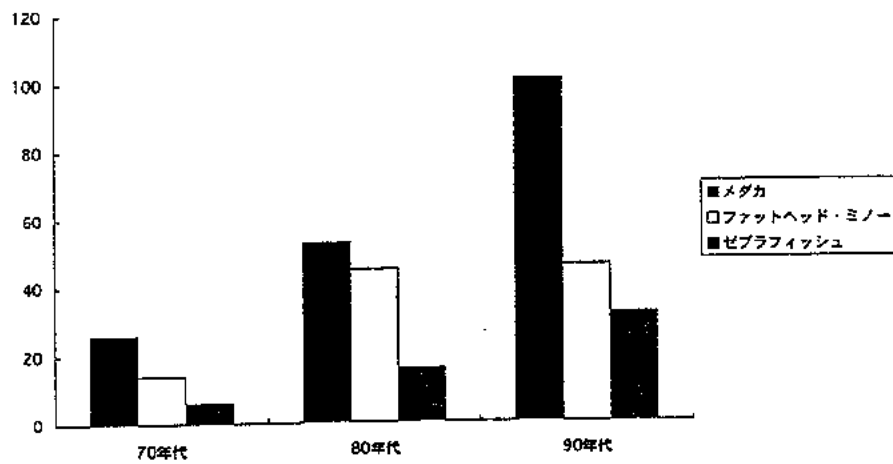
表 1-3 過去 30 年間に於けるゼブラフィッシュを用いた環境因子研究

年代	総論文数	環境因子総論文数	化学物質	発がん	放射線
1991-1999	1186	32	31	0	1
1981-1990	122	16	16	0	0
1971-1980	30	6	6	0	0
合計	1338	54	53	0	1

グラフ1 総論文数



グラフ2 環境因子総論文数



グラフ3 メダカ環境因子総論文数（国内・国外別）

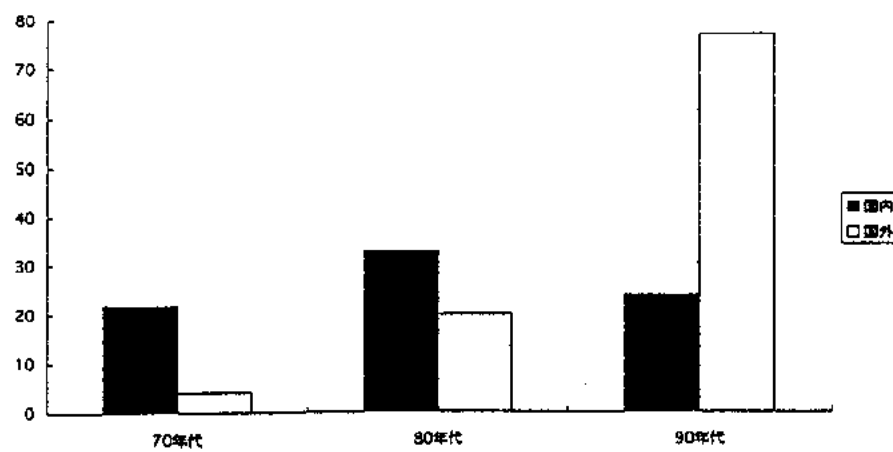


図1. 小型魚類三種についての論文数の調査

ii) ファットヘッド・ミノー (表1-2)

過去30年の環境因子関係の総論文数は105である(全体の76.8%)。その中で、化学物質関係が101と大部分を占める。発がんや放射線関係の論文はほとんどない。このことからファットヘッド・ミノーは専ら化学物質の影響に関する研究に用いられてきたと言える。80年代～90年代は70年代の3倍に増加しており、ファットヘッド・ミノーが環境因子研究の分野で重要な存在になっていることを窺わせる。

iii) ゼブラフィッシュ (表1-3)

過去30年間の環境因子関係の論文数は54(全体の4%)と全体の割合からすれば少ない。ほとんど化学物質関連である。90年代にはそれでも増加が見られる。発がんや放射線に関するものはほとんどない。

iv) メダカ環境因子論文数の国内・国外別の比較

メダカが国際的にどのような位置にあるかを知るために、環境因子論文数を国内における研究によるものと国外における研究によるものとに区別して調べた(表1-3、図-1 グラフ3)。70年代～80年代までは国内のほうが多い。ところが、90年代になると国外の論文数は環境因子総論文数で国内の3倍(国内24:国外77)、化学物質関係では4倍(国内16:国外65)になっている。メダカを用いた研究は国外でのものが圧倒的に多いのである。

3) 掲載雑誌の種類

文献については数の他に掲載雑誌の種類を調べた。

i) メダカ

論文の掲載紙の論文数は次の 61 誌である。他と比べて圧倒的に多い。これはメダカを用いた研究の巾の広さを示すもので、その中には発がんや放射線関係も含まれる。

Aquat Toxicol

Arch Toxicol

Arch Environ Contam Toxicol

Biol Bull

Bull Environ Contam & Toxicol

Bull Nippon Veterinary & Zootechnical College

Cancer Res

Carcinogenesis

Chem Med

Chem Pharmacol Bull

Chemisphre

Comp Biochem Physiol C. Comp Pharmacol

Comp Pharmacol & Toxicol

Dev Comp Immunol

Dis Aquat Organ

Ecotoxicol
 Ecotoxicol Environ
 Ecotoxicol & Environ Safety
 Environ Contam Toxicol
 Environ Health Perspect
 Environ Res
 Environ Toxicol & Chem
 Environ Toxicol & Water Quality
 Eur J Cancer
 Exp Gerontol
 Exp Mal Pathol
 Exp Toxicol Pathol
 Folia Morphol
 Food Chem Toxicol
 In Vivo
 Int J Rad Biol Relat Stud Phys Chem Med
 J Appl Toxicol
 J Comp Pathol
 J Environ Sci (China)
 J. Natl Cancer Inst
 J Rad Res

J Toxicol Environ Health
J Toxicol Sci
Jpn J Cancer Res
Jpn J Exp Med
Jpn J Health & Human Ecology
Jpn J Toxicol & Environ Health
Lab Anim Sci
Laboratorye Zhirotnye
Mut Res
Neurotoxicol
Nippon Eisei Gakkaishi
Photochem Photobiol
Proc Natl Acad Sci
Rad Res
Rev Aquat Sci
Science
Sci Total Environ
Sino Zoologica
Teratology
Toxicol
Toxicol Appl Pharmacol

Toxicol Lett

Toxicol Pathol

Toxicol Sci

Water Res

ii) ファットヘッド・ミノー

論文の掲載誌の数は23誌である。しかし、大多数は3～4誌（*印）に集中している。

*Arch Environ Contam Toxicol

Biomed Environ Sci

Bull Environ Contam & Toxicol

Chem Res Toxicol

*Chemosphere

Comp Biochem Physiol A

Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol

*Ecotoxicol & Environ Safety

*Environ Health Perspect

Environ Res

Fund Appl Toxicol

J Appl Toxicol

J Toxicol Environ Health

J Water Pollut Control Fed

Mut Res

Natl Cancer inst Monogr

Neurotoxicol

Neurotoxicol Teratol

Rad Res

Regul Toxicol Pharmacol

Sci Total Environ

Toxicol Appl Pharmacol

Xenobiotica

iii) ゼブラフィッシュ

論文の掲載誌の数は12誌である。メダカ、ファットヘッド・ミノーと比べると少ないのが目立っている。

Arch Environ Contam Toxicol

Bull Environ Contam & Toxicol

Chemosphre

Ecotoxicol & Environ Safety

Environ Health Perspect

Environ Res

Fundam Appl Toxicol

J Exp Zool

Pharmacol Toxicol

Sci Total Environ

Toxicol Appl Pharmacol

Xenobiotica

4) まとめ

i) 生物学、医学、環境科学などを含む分野での論文の数はゼブラフィッシュが圧倒的である。環境因子関係ではメダカとファットヘッド・ミノーが多い。

ii) メダカは70年代の放射線、80年代の発がん、90年代の化学物質と、その時代の要請に合わせて、広い範囲の環境因子研究に用いられてきた。このことは論文掲載誌の種類の高さからもいえる。この意味でメダカは環境因子研究の実験動物としてはオール・ラウンダーといえる。1990年代のメダカを用いた化学物質環境因子の研究はその8割が国外で行われている。これはわが国における今後の環境因子研究のあり方を考える上で重要となろう。

iii) ファットヘッド・ミノーは専ら化学物質の影響の研究に集中的に用いられてきた。このことは論文の掲載数が3～4誌に集中していることから裏付けられるはずである。ファットヘッド・ミノーは化学物質の環境因子研究の専

用種の鯉がある。米国にはファットヘッド・ミノーについての豊富な研究の蓄積がある。

iv) ゼブラフィッシュは発生、脳神経などの基礎生物学分野で群を抜いている。環境因子についての研究は現在多くはないが、この研究の蓄積は環境因子の研究にも将来大きな力となるはずである。環境因子関連の分野での革新的な手法がゼブラフィッシュから生まれることも充分あり得ると考えられる。

3. 動物学的特性

表2-1はメダカ、ファットヘッド・ミノー、ゼブラフィッシュの動物学的特性についてまとめたものである。ただ、ファットヘッド・ミノーについてはわが国ではほとんど研究されておらず、短期間の調査で資料も充分に入手でなかったもので、いくつかの項目が空欄となっていることを断っておきたい。

1) 成長

体長についてはメダカとゼブラフィッシュは3～4 cmであるので、多数個体を必要とする実験では便利である。ファットヘッド・ミノーは5 cmとやや大きく、動物の維持管理にスペース等の問題があるかも知れない。しかし、この体長の大きさは組織を取り出して分析するなどの研究では有利であろう。

世代時間は遺伝学的研究には短いほうが便利である。メダカとゼブラフィッシュは2～3ヶ月と短く、ファットヘッド・ミノーは4～6ヶ月と長い。環境因子の影響を何世代にも渡って、観察するような実験にはファットヘッド・ミノーはやや不向きである。

寿命は室内の飼育条件下でいずれの魚種も2年程度である。実験のための飼育や系統の保存では、この寿命を考慮して次世代を育成しなければならない。

2) 発生

i) 産卵周期、産卵数、卵の大きさ、卵の透明度、孵化日数などは発生学的研究に適しているかどうかの示標になる。これらの点でメダカ、ファットヘッド・

表 2 - 1 動物学的特性

	メダカ	ゼブラフィッシュ	ファットフェッドミノー
学名	<i>Oryzias latipes</i>	<i>Brachydanio rerio</i>	<i>Pimephales promelas</i>
成長			
体長	3 c m	4 c m	5 c m
世代時間 (性成熟)	2 ～ 3 ヶ月	2 ～ 3 ヶ月	4 ～ 6 ヶ月
寿命	2 年	2 年	2 年
発生			
産卵周期	毎日	週 2 回	週 1 回
産卵数	20 ～ 30 / 回	200 ～ 300 / 回	200 ～ 1,000 / 回
卵の大きさ	1 m m	1 m m	1 m m
卵の透明度	高い	高い	
卵膜の固さ	硬い	柔らかい	
胚操作の容易さ	やや難しい	容易	
孵化日数	7 ～ 1 0 日	2 ～ 3 日	5 日
性決定			
雌雄性	雌雄異体	雌性先熟	
性染色体	XY	不明	不明
室内飼育温度	2 6 C	2 6 C	2 5 C
野外生息温度	0 ～ 4 0 C	2 0 ～ 3 0 C	0 ～ 4 0 C
染色体			
染色体数	4 8	5 0	
ゲノムサイズ	8 0 0 Mb	1600 Mb	
地域集団	あり		

ミノー、ゼブラフィッシュは非常に優れた実験動物であることは明らかである。

メダカでは卵膜が硬いこと、卵黄の流動性が大きいことなどから胚操作にやや困難な点がある。しかし、いずれの魚種も環境因子の胚の発生や成長に対する影響を研究する好適な材料として用いられている。

3) 性決定

i) 雌雄性

魚類の性は雌雄同体から雌雄異体まで多様性に富んでいる。雌雄同体の中には卵巢と精巣が同一個体にあるものや、成長の早い時期に卵巢（雌性先熟）または精巣（雄性先熟）が形成され、後に反対の性に転換するものがある。雌性先熟と雄性先熟の魚種では成長の過程で性転換が自然に起こるのである。雌雄異体では最初に決定された性が変わることは生涯を通じて起こらない。メダカは雌雄異体である。ゼブラフィッシュは雌性先熟と言われている。このようにゼブラフィッシュでは全ての個体で先に卵巢ができて、やがて半数の個体で卵巢が精巣に転換して雄になる。ファットヘッド・ミノーの性決定については資料がないので不明である。内分泌攪乱化学物質の生殖機能への影響の研究では雌雄異体のメダカが適していることは明らかである。ゼブラフィッシュでは自然の条件でも性の動揺が起こるからである。ドイツのある研究者はメダカを実験に用いる理由にこの点をあげている。

ii) 性染色体

メダカでは XY 染色体によって性決定が行われる。この点でメダカはヒトを含む哺乳動物と同じである。これを基礎にしてメダカでは性の決定や分化について豊富な研究が蓄積されてきた。内分泌攪乱化学物質の影響が生殖機能障害として現れるケースでは、メダカが好適な研究材料と考えられている理由の一つはここにある。最近、メダカでは DNA マーカーを用いて Y 染色体が同定できるようになった。ファットヘッド・ミノーやゼブラフィッシュでは性染色体は明らかにされていない。

4) 野外生息温度と室内飼育温度

メダカは日本、ファットヘッド・ミノーは北米が原産地であって、温帯性である。ゼブラフィッシュはインド原産で熱帯性である。メダカとファットヘッド・ミノーは野外では 0℃～40℃の広い温度域で生息している。ゼブラフィッシュは 20℃以下の温度域では生存できない。室内の実験条件下ではいずれも 25～26℃で飼育されている。いずれの魚種でも実験室での環境因子の研究はこの温度条件で行われているが、実験室での結果が野外で生息する動物にどの程度あてはめることができるかの検討が必要であろう。魚類のような変温動物での環境因子の研究には、この点でマウスなどの恒温動物にはない問題が生じる。

5) 染色体

i) 染色体数

メダカは48、ゼブラフィッシュは50である。ファットヘッド・ミノーについての文献が得られなかった。

ii) ゲノムサイズ

メダカは約800Mbで、これはゼブラフィッシュの1/2、ヒトやマウスなど哺乳動物の1/5である。メダカがゲノムプロジェクトには有利であると言われている理由である。個々の遺伝子について見てもメダカの遺伝子はサイズが小さくなっている。

6) 地域集団

メダカでは北日本集団、南日本集団、東韓集団、中国・西韓集団など少なくとも4つの遺伝的に異なる地域集団が知られている。これらは環境因子の影響と地理的変異の関係を研究するのに良い材料である。環境因子に対する感受性は地域集団ごとに異なるかも知れないからである。ゼブラフィッシュ、ファットヘッド・ミノーにこのような地域集団があるかどうかは確かではない。

7) まとめ

i) メダカは発生や成長などにおいて実験動物として優れた特性をもっている。

また、雌雄異体であること、性染色体が明らかであることから、生殖機能の研