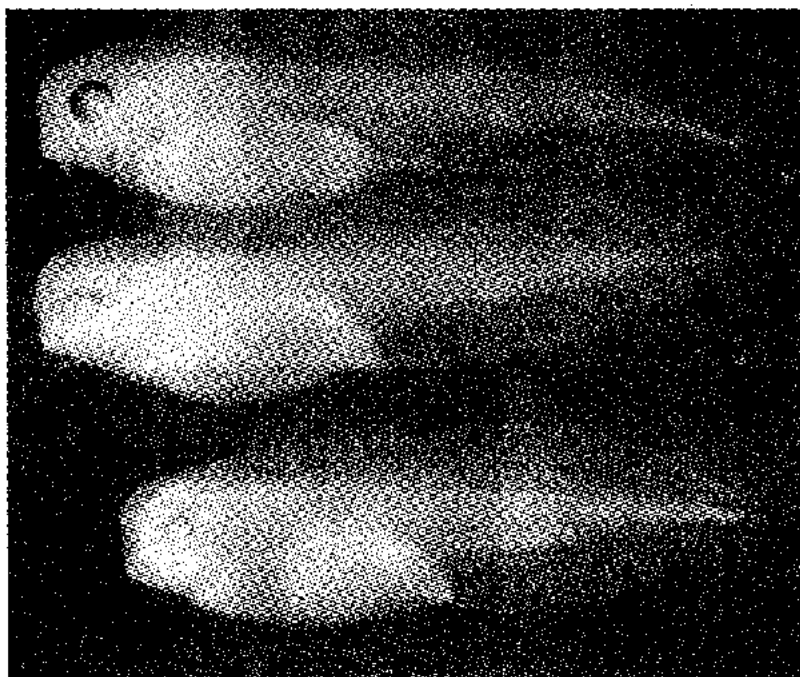
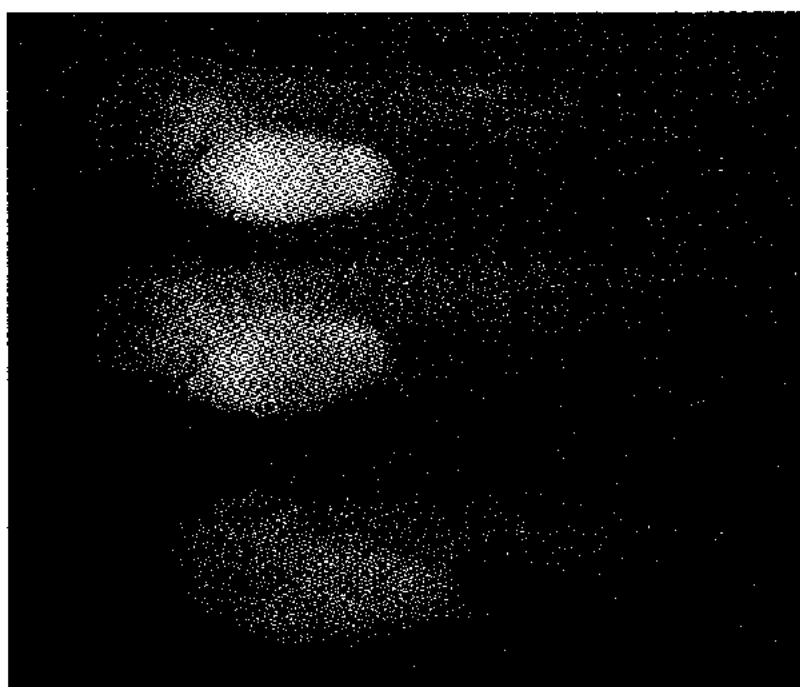




Tadpoles: 光学顕微鏡



Tadpoles: 蛍光顕微鏡

図 6

12. 内分泌攪乱化学物質等の試験に用いるメダカ系統の（d-rR 改良型および透明メダカの）開発に関する研究

研究者 若松 佑子（名古屋大学生物分子応答研究センター助教授）

研究要旨

内分泌攪乱化学物質の生殖への影響を評価する試験動物として従来から用いられてきた d-rR 系統を改良し、性の判別が発生の初期に、確実にできる系統を作製した。また初期胚から成魚に至る成長の過程で外部から内臓が透視できる透明メダカを作製した。これらの系統が内分泌攪乱化学物質の試験に有用であるかどうかを検討している。

研究者協力者

尾里健二郎（名古屋大学生物分子応答研究センター教授）

A. 研究目的

メダカは内分泌攪乱化学物質など多様な化学物質の研究および試験において世界中の研究機関で広く用いられている魚類の試験動物である。またメダカは、OECD 魚類専門家会議の提案になるほとんど全ての試験法（稚魚成長試験、繁殖試験、性転換試験、初期生活段階毒性試験、全生涯試験）において有効である、とりわけ生殖に関わる試験法については最適な試験モデルであると評価されている。しかし、試験の効率化を図るためには、それぞれの試験法に適した系統が必要である。本研究はより有効性の高い試験用メダカ系統を開発し、内外の研究機関に供給することを目的として計画されたものである。

本研究では a) 生殖関連試験のために有効な系統、b) 外部から内臓が透視できる透明メダカの系統の二つを開発する。a) 生殖関連の試験では、試験動物の遺伝的性が化学物質に暴露する前に判別できれば、試験の効率や結果の確実性は格段に向上する。これまでの d-rR 系統では遺伝的性の判別は孵化後 2 週間にならないと出来なかったが、本研究では受精後 2 日の胚で判別が可能で、DNA マーカーによっても性を確認できる系統を開発する。b) 内臓を外部から透視することが出来れば、

化学物質の影響を時間を迫いながら観察することが可能になる。また試験動物を殺さなくてもすむ点でも利便性が大きい。本研究ではいくつかの色素細胞欠損突然変異の交配によって、体表および腹膜に色素細胞のない透明性の高いメダカの系統を作出する。

B. 研究方法

a) d-rR 型の改良

現在、性転換試験で広く用いられているのは d-rR 系統である。この系統の長所は体色（雄は黄色素細胞をもつ、雌はもたない）によって遺伝的な性の判別が出来ることである。しかし、この体色は孵化後 10 日頃からしか発現しないので、雌雄の判別が遅れることになる。

最近、われわれが開発した FLF 系統では受精後の 2 日胚で雄に白色素細胞が発現する（雌には発現しない）ことで、この時期に遺伝的な性の判定が可能である。これらの黄および白色素細胞は Y 染色体上にあるが、X と Y 染色体の交差によって雌雄の判別にはいくらかの誤差が生じる。この誤差は d-rR 系統で 0.3%、FLF 系統で 4% であって、FLF 系統の短所はこの誤差の大きいことである。そこで本研究ではこの二つの系統を用いて雌雄判別が胚期に可能な d-rR 系統の改良型を開発することにした。この二つの系統を 6 世代交配することによって樹立する。

b) 透明メダカの開発

メダカやゼブラフィッシュの胚は透明性が

高いので体の内部を顕微鏡などで容易に観察できる。これらの小型魚類が脊椎動物の発生の研究に好んで用いられている理由である。しかし、胚発生の後期になると、皮膚や腹膜に各種の色素をもった色素細胞が現れ、内部臓器の観察は不可能になる。そこで本研究では、これらの色素（主にメラニンとグアニン）がごく少ない系統を開発する。このような系統ができれば稚魚期、成魚期を通して内部臓器の観察が外部から可能になる。各種の色素欠質突然変異の交配を繰り返し行う方法によって、目的の系統を確立する。

（倫理面への配慮：魚類に関しては特別な規制はないので動物実験において常識とされる配慮を行っている。）

C. 研究結果

a) d-rR の改良型の作製

この改良型系統は二つの色素細胞マーカーにより性判別が可能である。受精後2日胚で雄では白色素細胞が分化するが、雌では分化が見られない。孵化後2週間で雄では黄色素細胞が体表に分化してくる。このように性判別を胚と孵化期の二つの発生段階で行うことが出来る。胚期の判別は白色素細胞に関してX染色体とY染色体の交叉が4%程度あるために、その分だけ誤差がでる。しかし、この誤差は孵化後の判別によって修正することができる。黄色素細胞に関する交叉は0.3%と、ごく少ないからである。

b) 透明メダカの作製

この系統では黒色素細胞、黄色素細胞、白色素細胞、虹色素細胞の多くが分化してこない。特に腹膜にメラニン、グアニンなどの色素が無いために、内臓が透視できる。脳、脊髄、鰓、心臓、血管、肝臓、腸、浮き袋、精巣、卵巣、脾臓などの諸器官がが外側から観察できる。

D. 考察

研究は計画通りに進行し目標を達成することが出来た。作製された試験動物はすでにい

くつかの研究機関で使用されている。透明メダカは実験動物の世界で画期的な成果となった。今後、これらの系統の形質が長期にわたって安定的に維持されるかどうか、今後の問題である。

E. 結論

a) 二つの系統は作製されたばかりで、成長や繁殖などの動物学的特性については未だ明らかになっていない。安定した試験動物として系統化できるかどうかについて研究が必要である。

b) 内分泌攪乱化学物質に対する感受性がどの程度あるか、高いか、低い、についてのテストが必要である。

c) 性判別の誤差を完全に無くするために、性染色体特異的 DNA マーカーの導入を考慮する。

d) 透明メダカの特性を生かして、GFP 遺伝子を導入したトランスジェニック系統を作製する展望が開けた。例えば、生殖組織だけが光る系統を作るなどである。

これらの課題は次年度に行う予定である。

F. 研究発表

論文発表 なし

学会発表

1. 尾里建二郎 内分泌攪乱化学物質の試験動物としてのメダカ内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム 1999 年 12 月 9-11 日、神戸国際会議場
2. 若松佑子、松山誠、酒泉満、尾里建二郎 内分泌攪乱化学物質の試験のための新しいメダカ系統の開発：d-rR 系統の改良型とシースルー系統、日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会 1999 年 12 月 9-10 日、神戸国際会議場
3. Wakamatsu, Y. New medaka strains for endocrine-disrupting substance testing. International Symposium on Endocrine-Disrupting Substance Testing in Medaka. 2000 年 3 月 17-20 日、名古屋国際会議場

13. 魚類を用いた内分泌攪乱化学物質評価法に関する研究

研究者 有園 幸司（熊本県立大学環境共生学部教授）

研究要旨

これまでお互いに情報交換を行い、それぞれ多摩川や東京湾に生息する魚類においても、不妊の雄、雌雄同体魚、産卵行動の異常魚等の生理現象が起きている可能性を示唆してきた。今回、これまでの研究をもとに河川やそれらの河川流入沿岸域の主に魚類を中心とした野生生物の個体群に生殖異常の現象が起きているか評価手法確立を中心とした基礎研究を行った。

研究者協力者

原 彰彦（北海道大学水産学部教授）

中村 将（帝京大学医学部助教授）

井口 泰泉（横浜市立大学理学部教授）

ールド調査を行い、野生生物への環境リスク
手法の確立を目指す。

（倫理面への配慮）

魚類を用いた研究のため倫理面での問題は
ないと判断した。

A. 研究目的

環境保護の促進とその強化の必要性から、
河川やそれらの河川流入沿岸域に生息する主
に魚類を中心とした野生生物の個体群に生殖
異常現象評価手法確立に関する以下調査研究
を行う。

- a) 内分泌攪乱評価に対するバイオマーカー
の検索
- b) 現有するビテログニン抗体を用いたフィ
ールド調査への応用
- c) 現有するビテログニン抗体類の関連魚種
への交差性と新種酵素免疫測定法への応
用
- d) 無脊椎動物及び両生類等への内分泌攪乱
メカニズム解明
- e) 魚や水環境関連生物を用いた内分泌攪乱
評価について、本グループと同様に取り
組んでいる英国グループとの情報交換を
行う。

B. 研究方法

多くの化学物質の海洋及び淡水生物への内
分泌攪乱作用評価のための生殖腺や臓器の発
生に関する基礎研究及び生態系におけるフィ

C. 研究結果

- 1) 内分泌攪乱評価に対するバイオマーカー
の検索：有効抗体の作成

コイ、メダカ、マダイ、マミチヨグのビテ
ログニンにそれぞれ特異的に反応する4種類
のモノクローナル抗体の作成のため、まず各
種魚類ビテログニンに特異的に反応するモノ
クローナル抗体の開発から着手した。この結
果、コイ、メダカ、タイ、マミチヨグのビテ
ログニンにそれぞれ特異的に反応する4種類
のモノクローナル抗体の開発に成功し、さら
にコイ、メダカ、マダイ、マミチヨグのすべ
てに関するビテログニン測定系（ELISA）の
確立に成功した。コイビテログニンキットは
環境庁及び建設省の全国調査に利用され日本
の河川の内分泌攪乱作用状態把握に大いに貢
献することとなった。一方、メダカビテログ
ニンキットは、OECDの魚を用いた化学物質
毒性評価法改定に伴う内分泌攪乱作用評価法
の一部としてメダカを用いた検定法に使用さ
れることが期待されている。さらに水系環境
におけるエストロゲンの影響を調べるため、
海産メダカであるマミチヨグを用い、受精卵

からエストロゲン暴露を行うと、形態異常、骨形成異常、性分化率の変化及び生殖腺の異常を引き起こすことが確認された。そのため、エストロゲンが初期発生段階のどの時期から影響を及ぼすのかエストロゲン受容体のクローニング及び、発生段階と、初期発生でのエストロゲン処理によるエストロゲン受容体 mRNA の発現変化の解析を血漿中ピテロゲニン濃度とともに評価を行った。その結果、発生初期におけるエストロゲンの影響が、エストロゲン受容体を介して起こることが示唆されたことから、室内水槽実験においてピテロゲニン抗体を用いた評価方法に加え、エストロゲン受容体の発現を使用する評価系の基礎を確立できた。

2) 現有するピテロゲニン抗体を用いたフィールド調査への応用

a) コイ、キンギョを用いた淡水フィールド調査への応用

中村・井口・原らは、東京都府中市の北多摩下水処理場から多摩川本流に流れ込むまでの流域に生息するコイを調査した。調査したコイは全長 45-66cm、雌 101 尾、雄 53 尾雌雄同体 1 尾計 155 尾で、雄の半数以上からピテロゲニンが検出された ($10 \mu\text{g/ml}$ 以上で最高 12mg/ml と雌と同じレベル)。さらに精子をほとんど形成していない雄が約 30% 存在した。養殖雄コイピテロゲニンを測定した結果、 $1 \mu\text{g/ml}$ 前後の値を示し、餌の影響を受けている可能性が示唆されたが、直接的な原因物質は現在のところ明確になっていない。

キンギョは、養殖された無処理の 2 年魚を地下水で 1 週間生育させ、ピテロゲニン産生のない雄を対照群とした。これら対照群及び 0.01, 0.1, 1, 100 ppb の 17β -エストラジオール (E2) に 1 ヶ月間曝露したキンギョの血漿中ピテロゲニンを ELISA により測定し、E2 に対するキンギョピテロゲニンの感受性を確認した。(図 1) キンギョの E2 曝露 1 ppb 濃度区において、1 週間曝露でピテロゲニンは誘導されず、1 ヶ月間曝露で最大数 mg/ml 程度誘導された。100 ppb 濃度区においては、1 週

間曝露で数百 mg/ml レベルまで誘導された。さらにキンギョ 14 匹をケージ (D.30cm×W.40cm×H.25cm) に入れ、熊本市内の河川 10 ヶ所に 1 ヶ月間曝露した。曝露後、ELISA による血漿中ピテロゲニン濃度の測定及び Cd-Hem 法による肝臓中メタロチオネイン (MT) 量の測定を行った。(図 2) キンギョを熊本市内の河川 10 ヶ所に 1 ヶ月間曝露したところ、河口域 2 ヶ所ではすべての個体が死亡した。一方、その他 8 ヶ所において雄魚では 2 ヶ所の地点においてピテロゲニンを発現する個体が存在した。雌魚では 8 ヶ所すべての河川においてピテロゲニンを発現する個体が存在した。また、肝臓中 MT 量は河口域近郊の曝露群が高い値を示した。今回測定したキンギョ血漿中ピテロゲニン濃度と、生殖腺指数 (GSI) の間には正の相関関係が認められた。(図 3) 以上のことより、キンギョ血漿中ピテロゲニン濃度及び肝臓 MT 量の分析が水環境中の内分泌攪乱作用及び重金属等の影響を評価する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。今後他のバイオマーカーや機器分析の併用により、内分泌攪乱作用等も含めた水環境の評価系を確立していく予定である。

b) カレイ、ハゼ、マダイを用いた海洋フィールド調査への応用

橋本・原らは、マコガレイの雄から高濃度の雌特異タンパクであるピテロゲニンを検出し、松原らの研究グループもマハゼの調査から大都市周辺の閉鎖的な水域で雄にピテロゲニンが検出される確率が高いことを確認した。

また、筆者らは天然マダイ血漿中ピテロゲニン濃度を調査した。(図 4) 天然マダイ血漿中ピテロゲニン濃度をレベル 1; $0.0097 \mu\text{g/ml}$ 未満、レベル 2; 0.0097 - $0.078 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 3; 0.078 - $0.312 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 4; 0.312 - $1.2 \mu\text{g/ml}$ 、レベル 5; $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上の 5 段階にレベル分けした。産卵期の天然雌マダイでのみレベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体が多数存在した。天然雄マダイにおいてもピテロゲニンが検出された個体が数例存在し、その

中にレベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体も存在した。

養殖雌マダイにおける血漿中ピテロゲニンを測定した結果 (図 5)、産卵期の養殖雌マダイで、天然雌マダイ同様、レベル 5 の $1.2 \mu\text{g/ml}$ 以上を示す個体が多数存在した。養殖雄マダイは天然雄マダイよりも高比率でピテロゲニンが検出された個体が存在した。また雌雄同体マダイにおいてもピテロゲニンが検出された個体が存在し、高濃度のピテロゲニンを示す個体も存在した。

3) 現有するピテロゲニン抗体類の関連魚種への交差性と新種酵素免疫測定法への応用

コイピテロゲニン ELISA を化学発光を利用した短時間で簡便な測定法を確立した。測定範囲は 120pg/ml - 500ng/ml でフナ・ウグイの雌血清と交叉性を示し、本測定系は他のコイ科魚種 Vg 測定に有効であることが明らかになった。

4) 無脊椎動物及び両生類等への内分泌攪乱メカニズム解明

多くの種を超えたピテロゲニン抗体を米国 Selcer 博士の協力を得て開発し、すでに無脊椎動物や両生類への応用が可能であることが判明している。さらに、ウミネコの受精卵より卵黄蛋白の主成分であるリポピテリンを精製し、抗体を作製した。(図 6,7) これを用いてマンシーニ法によるピテロゲニンの測定を確立し (図 8)、鳥類への調査に利用されることが期待される。

5) 魚を用いた内分泌攪乱評価について、本グループと同様に取り組んでいる英国のグループとの情報交換を行う

筆者のグループの高橋徹らは以下のスケジュールで英国アストロゼネカ社及び CEFAS の研究グループを訪問し情報交換を行った。

3 月 28 日 関空発 ロンドン着

3 月 30 日 CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture

Science) 訪問

3 月 30 日 Brixham に移動

3 月 31 日 BEL (Beixham Environmental Lab., Astra Zenica) 訪問

4 月 3 日 デンマークを経て帰国

D. 考察

河川の指標魚種としてコイを用い、全国主要河川の調査を環境庁、建設省とも協力して組織学的観察、血中ピテロゲニンの測定を行い、魚類を用いた評価法の基礎を確立した。結果として多摩川や東京湾に生息する魚類に不妊の雄、雌雄同体魚、産卵行動の異常魚等の生理現象が起きていることを見出した。一方、実験室内においても、マミチヨグやメダカを用いて産卵行動や卵の孵化状況を観察することにより内分泌攪乱作用の評価を行う実験系を確立した。本研究で得られた知見から、河川流入域および沿岸域での魚類調査の方向性も打ち出され、現在いくつかの調査が進行中である。今回得られた多くの化学物質の海洋及び淡水生物への内分泌攪乱作用評価のための生殖腺や臓器の発生に関するデータ及び生態系におけるフィールド調査結果は、環境保護の促進とその強化の必要性からも野生生物への環境リスク手法の確立にも大いに寄与できるものであろう。

E. 結論

a) 今後の課題

- (1) 日本の代表的な都市型河川に生息する魚類の生殖系にどのような異常型が出現しているのかを整理する。
- (2) それらの生殖異常にどの環境化学物質が関与しているのか解析する。
- (3) 環境化学物質の生体内での作用機序を実験的に解析する。
- (4) 河川中の環境化学物質を特定し、それらの生体影響の簡易測定法を開発する。

b) 社会的貢献

河川の指標魚種としてコイを用い、全国主要河川の調査を環境庁、建設省とも協力して