

14. メダカに対する内分泌攪乱物質の短期暴露に関する研究

研究者 若林 明子（東京都環境科学研究所基盤研究部長）

研究要旨

魚類に対する人畜由来ホルモンや内分泌攪乱化学物質の繁殖への影響を明らかにする目的で、メダカ（*Oryzias latipes*）のオスを17 β -エストラジオールや内分泌攪乱作用が疑われている数種の化学物質に暴露し、メスと合わせた後の産卵数と孵化数、及び暴露終了時のオス血液中のビテロジェニン濃度を調べた。その結果、17 β -エストラジオールではnmol/lオーダーで、いくつかの化学物質では μ mol/lオーダーで産卵数や孵化数が対照と比較して減少した。また、これらの群のオスメダカでは血漿中のビテロジェニン濃度も同時に上昇した。

研究者協力者

東京都環境科学研究所

森 真朗 主任研究員

塩田 勉 研究員

A. 研究目的

アルキルフェノールなどの化学物質が野生の魚に対して雌雄同体などを引き起こしている可能性が指摘されて以来、これら内分泌攪乱作用の疑われている化学物質の水生生物、特に魚類に対する影響に関する研究が行われてきた。そして、その結果、いくつかの化学物質は魚に対して生理学的あるいは組織学的変化を生じることが明らかになってきたが、実際にこれらの物質が魚の繁殖に影響を与えるかについての研究はほとんどない。そこで、本研究ではオスのメダカへのホルモンや他の内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の暴露が、オスの繁殖能力へ与える影響を明らかにすると同時に、オスの魚のメス化の高感度の生理学的指標である血清中のビテロジェニン濃度と繁殖能力の関係を調べる。

化学物質としては、人畜由来女性ホルモンの17 β -エストラジオール（E2）、女性ホルモン様作用が疑われているビスフェノール A（BPA）、p-ノニルフェノール（NP）、4-t-ブチルフェノール（BP）、ジエチルヘキシルフタル酸（DEHP）及びベンゾフェノンを用いた。

試験魚としてはメダカを用いた。メダカは孵化時にすでに性が分化していること、適正な飼育条件下では毎日産卵すること、及び小型で飼育管理が容易であることから繁殖試験生物として適当であり、最近、ビテロジェニンの測定も可能になっている。

B. 研究方法

繁殖試験

試験魚：地下水で産卵・孵化及び飼育を行っている都内の養魚場から購入したメダカ（*Oryzias latipes*）の成魚を20～180日馴化後試験に用いた。その間、魚には市販の粉末試料あるいはテトラミンを毎日与えた。

化学物質：E2はシグマアルドリッチ、BPとベンゾフェノンは和光純薬、NPは東京化成（90%パラ置換体、10%オルト置換体）、TBTはアルドリッチ、DEHPはGL化学製のものをそれぞれ用いた。全ての化学物質は最初アセトンに溶解後、活性炭ろ過水に溶解して暴露溶液を調製した。アセトンの濃度は、100 μ l/l以下とした。

方法：オス1尾とメス2尾を1グループとして、活性炭ろ過水に緑藻類を添加した溶液中で予備飼育し、産卵数と孵化率を調べた。飼育時の照度は、約6000ルクスで、16時間明、8時間暗条件とした。餌は毎日与え、

飼育水は2日に1回半量を交換した。飼育水には、卵を産み付けさせる目的で水生植物を入れた。その間、2週間にわたり毎日産卵数及びその後の孵化率を計測し、安定して受精卵を産むグループを試験に用いた。

オスへの影響を見る試験では、オスのみを暴露溶液に移し、各化学物質に2週間暴露した。対照についても、同様にオスのみ化学物質を含まない活性炭ろ過水中で2週間飼育した。明暗サイクルは飼育時と同様であるが、照度は酸素消費をおさえるため500ルクスとした。暴露水は2日に1回交換し、水交換の4時間前に飽食量の餌を与えた。その後、オスを元の組合わせのメスと一緒にして緑藻類を添加した溶液中で1週間採卵し、産卵数と孵化数を計測した。

ピテロジェニン濃度の測定

材料及び方法

各種抗体及び試薬

抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体とビオチン標識抗メダカポリクローナル抗体はクマモト抗体研究所で作製した。HRP標識ストレプトアビジンはザイメット製のものを用いた。精製メダカピテロジェニンはクマモト抗体研究所で作製したメダカ腹水から調製した。洗浄には0.9%塩化ナトリウムと0.05%のTweenを含有した10mMリン酸緩衝液(pH 7.4) (T-PBS)を用いた。T-PBSに1mg/ml及び5mg/mlの濃度の牛血清アルブミンを含ませた溶液を希釈液及びブロッキング液に用いた(1mg/mL BSA-T-PBS及び5mg/mL BSA-T-PBS)。

方法

抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体2.5µg/mLを50µL/ウエルずつ96ウエルプレートに添加し、4℃一夜静置して固相化した(抗体の固相化)。抗体溶液を除去後、T-PBSを300µL/ウエル加え、ウエルを洗浄した。この洗浄操作をさらに2回行った(洗浄)。次に、5mg/mL BSA-T-PBSを200µL/ウエル加え、室温1時間静置しブロッキング

した。溶液を除去し、先の洗浄操作を3回行った(ブロッキング)。

1mg/mL BSA-T-PBSで各濃度に希釈した精製メダカピテロジェニン(0、0.488、1.95、7.81、31.3、125、500 ng/mL)及び測定検体を50µL/ウエル加え室温2時間静置し、固相化抗体と反応させた(抗原反応)。溶液を除去し、先に述べた洗浄操作を3回行った(洗浄)。1mg/mL BSA-T-PBSで希釈したビオチン標識抗メダカ抗体2µg/mLを50µL/ウエル添加し、室温1時間静置し反応させた(ビオチン標識抗体との反応)。溶液を除去し、洗浄操作を3回行った(洗浄)。次いで、1mg/mL BSA-T-PBSで希釈したHRP標識ストレプトアビジンを50µL/ウエル添加し、室温1時間静置し反応させた(酵素標識抗体との反応)。溶液を除去し、洗浄後、オルトフェニレンジアミン溶液を100µL/ウエル加え、室温5分反応させた後、2N硫酸を50µL/ウエル加え反応を停止した(酵素反応)。

最後に、490nmの吸光度を測定し標準曲線からメダカ血清中ピテロジェニン濃度を算出した(吸光度の測定)。

C. 試験結果

繁殖試験

メダカの産卵数と孵化率を表1から表6に示した。

E2暴露では、1nmol/l群で対照と比較して産卵数及び孵化数ともに有意な差は見られなかったが、3nmol/l以上の暴露群から産卵数及び孵化数は共に、有意に低下しはじめ、10nmol/l以上ではほとんど孵化しなかった。しかし、100nmol/l暴露群でも50程度の産卵が見られた。

BPA暴露では、3µmol/l以下の暴露群で産卵数・孵化数ともに対照群に比較して有意な差は見られなかった。しかし、10µmol/l暴露群では産卵数・孵化数ともに対照群に比較して有意な低下が見られ、この暴露群における平均孵化数は対照群の約半分であった。

NPでは、各暴露群でのバラツキが大きいいため、対照群と比較して孵化数に統計的な有

意差は見られなかった。しかし、 $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群において平均孵化数の低下が見られた。

BP 暴露では、 $1 \mu\text{mol/l}$ 群で対照に比べて著しい孵化数の減少が見られた。また、3 及び $10 \mu\text{mol/l}$ 群でも孵化数の減少が見られた。しかし、バラツキが大きいため統計的に有意の差はなかった。

DEHP 及びベンゾフェノン暴露では産卵数・孵化数ともに対照とほとんど差は見られなかった。

血清中のビテロジェニン濃度

表 7 から表 11 にビテロジェニンの測定結果を示した。

標準添加した試料の測定から求めた検出下限は $20 \mu\text{g/ml}$ であった。

血清中のビテロジェニン濃度は試験開始前のメスでは $1100 \sim 83000 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、オスでは試験開始前及び対照試験で全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

一方、E2 に 2 週間暴露したオスでは、 0.01nmol/l 暴露群では全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。 0.1nmol/l 暴露群では $20 \mu\text{g/ml}$ 以下から $13000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $4000 \mu\text{g/ml}$)、 1nmol/l 暴露群で $72000 \sim 500000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $190000 \mu\text{g/ml}$) と暴露濃度が 10 倍上昇した結果ビテロジェニン濃度は約 5 倍上昇した。更に 10 倍濃度の高い 10nmol/l 暴露群でのビテロジェニン濃度は $100000 \sim 240000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $180000 \mu\text{g/ml}$) と 10nmol/l 暴露群とほぼ同程度であり、 100nmol/l 暴露群では $60000 \sim 88000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $78000 \mu\text{g/ml}$) と逆に減少した。また、1 週間 1nmol/l に暴露した群でのビテロジェニン濃度は $3700 \sim 200000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $57000 \mu\text{g/ml}$) と 2 週間暴露群の半分以下であったが、高濃度のビテロジェニンが検出された。

また、BPA 暴露では、 $1 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。しかし、 $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、1 例を除いて $26000 \sim 110000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $57000 \mu\text{g/ml}$) であった。

NP $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では $330 \sim 32000 \mu\text{g/ml}$ (平均 $11000 \mu\text{g/ml}$) であった。

D. 考察

ホルモンや他の化学物質のメダカオスへの暴露は繁殖能力に影響を与えた。しかし、影響濃度は致死レベルに比較してかなり低かった。このような現象が、内分泌攪乱作用によるものであるかは本試験からは明らかでないが、急性毒性作用によるものではないだろう。

また、E2 や他の化学物質に暴露したメダカでは、産卵数に比較して孵化数の低下が著しく、特に高濃度の暴露群において多くの未受精卵が見られた。このように、未受精卵が多く生まれた理由としては、化学物質への暴露によりオスの排精能力が低下あるいは消失したにもかかわらず、メスの産卵を促す性行動を行なったか、オスの性行動の有無に関わらずメスが産卵を行なったためのいずれかと思われる。

今回の試験結果から、繁殖能力を適切に評価するためには産卵数だけでなく孵化数も合わせて評価することが必要であることが分かった。

また、繁殖に影響の出た濃度レベルでは、オスのメダカの血清中ビテロジェニン濃度は対照に比較して著しい上昇が見られた。しかし、E2 暴露群で暴露濃度とビテロジェニン濃度の関係を見ると、 1nmol/l 暴露群までは、濃度の上昇によりビテロジェニン濃度は上昇したが、 10nmol/l 暴露群ではほぼ同レベルで、 100nmol/l 暴露群ではビテロジェニン濃度は逆に低下した。この濃度では、暴露したオスの半数が死亡したため、E2 の急性毒性による衰弱など他の要因によってこのような現象が見られたと思われる。また、 1nmol/l 暴露群で、7 日暴露で血清中のビテロジェニン濃度の著しい上昇が見られたことから、短期間の暴露でもビテロジェニンが上昇することが分かった。更に、短時間の暴露を行い、スクリーニング試験を行なう場合には、何日程度の暴露が適当であるか検討が必要である。

一方、ビスフェノール A の暴露でも繁殖能力に影響の出た濃度ではビテロジェニンの上昇が見られたが、影響の出なかった濃度では上昇が見られなかった。従来、ビテロジェニ

ンは感度のよい測定法であることが報告されているが、今回の結果では産卵数や孵化率と同レベルの感度であり、後者も比較的高感度のよい試験法であることが明らかになった。この点については、更に検討が必要であろう。

現在、肝臓中のピテロジェニン濃度の測定を行い血清中との相関を求めている。

E. 結論

メダカを用いて繁殖試験を行なったところ、ホルモン他の化学物質でもオスの繁殖能力に影響を与えることが判明した。しかし、化学物質の影響濃度はホルモンに比較して数百倍高かった。また、同時にこの条件下で血清中のピテロジェニン濃度の上昇も見られることが判明した。

F. 研究発表

論文発表

1. T.Shioda and M.Wakabayashi; Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 40, 239-243 (2000)
2. T.Shioda and M.Wakabayashi; Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using 2-week reproduction test, *Water Sci. Technol.* in press

口頭発表

1. 塩田勉、若林明子；ノニルフェノールなどの化学物質がメダカの繁殖に及ぼす影響、第33回日本水環境学会年会、仙台、1999、3、17
2. 森真朗、若林明子；コイのピテロジェニン量の差異について、平成11年度日本水産学会秋季大会、仙台、1999、3、27
3. 塩田勉、若林明子；内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法としてのメダカを用いた短期繁殖試験、第2回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会、神戸、1999、12、9-10。塩田勉、若林明子；17 β エストラジオール及びノニルフェノールに対するメダカ感受性の雌雄差について、第34回日本水環境学会、京都、2000、3、17

表1 17β エストラジオールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	118	112(±9)	88	67(±30)	75	60(±22)
	105		46		44	
	暴露中に♂死亡					
10	16	16	11		69	
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
30	45	45	6		13	
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
100	63	60(±5)	0	4(±6)	0	7(±10)
	56		8		14	
	暴露中に♂死亡					

2回目

対照	85	62(±49)	55	49(±42)	66	74(±14)
	96		87		91	
	6		4		67	
1	91	79(±13)	64	51(±12)	70	65(±13)
	65		48		74	
	80		40		50	
3	46	45(±5)	25	20(±16)	54	43(±31)
	39		3		8	
	49		33		67	
10	43	46(±4)	2	2(±2)	5	4(±4)
	50		4		8	
	45		0		0	

3回目

対照	60	79(±30)	49	61(±42)	82	72(±28)
	63		26		41	
	114		107		94	
1	22	43(±45)	5	31(±42)	23	61(±33)
	12		9		75	
	94		80		85	
3	38	39(±12)	6	10(±4)	16	26(±10)
	52		14		27	
	28		10		36	
10	19	12(±10)	0	1(±0.7)	0	3(±4)
	17		1		6	
	0					

表2 ビスフェノール A にオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	84	84	73	73	87	87
	暴露中に♂死亡					
	暴露中に♂死亡					
1000	73	62 (±32)	68	55 (±32)	93	84 (±13)
	26		18		69	
	86		78		91	
3000	19	55 (±51)	15	48 (±47)	79	84 (±7)
	91		81		89	
	暴露中に♂死亡					
10000	52	47 (±15)	38	32 (±5)	73	74 (±23)
	59		30		51	
	30		29		97	

2回目

対照	55	89 (±32)	24	53 (±26)	44	57 (±11)
	119		73		61	
	94		61		65	
300	87	133 (±46)	61	102 (±45)	70	75 (±8)
	178		150		84	
	135		96		70	
1000	82	117 (±35)	68	74 (±7)	83	66 (±15)
	118		72		61	
	151		82		54	
3000	95	99 (±9)	95	69 (±24)	100	71 (±28)
	92		62		67	
	109		49		45	

表3 ノニルフェノールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

1回目

濃度 (mM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	85	62 (±49)	55	49 (±42)	65	74 (±14)
	96		87		91	
	6		4		67	
30	176	124 (±49)	141	87 (±58)	80	65 (±27)
	79		26		33	
	117		95		81	
300	70	70 (±40)	26	32 (±14)	37	51 (±18)
	110		48		44	
	31		22		71	

2回目

対照	55	89 (±32)	24	53 (±26)	44	57 (±11)
	119		73		61	
	94		61		65	
30	9	47 (±45)	0	21 (±23)	0	34 (±30)
	34		19		56	
	99		45		45	
100	147	127 (±21)	114	94 (±27)	78	73 (±12)
	106		63		59	
	128		106		83	
300	58	96 (±37)	0	45 (±52)	0	37 (±39)
	132		102		77	
	98		33		34	

3回目

対照	202	288 (±75)	30	141 (±102)	15	45 (±27)
	338		229		68	
	323		165		51	
100	251	272 (±27)	20	66 (±43)	8	23 (±14)
	303		106		35	
	262		72		27	
300	282	266 (±50)	183	141 (±44)	65	53 (±11)
	210		96		46	
	306		145		47	
1000	274	274	157	157	57	57
	暴露中に死亡					
	暴露中に死亡					

表4 4-*t*-ブチルフェノールにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	96	179 (±72)	59	115 (±48)	61	64 (±3)
	230		145		63	
	210		140		67	
1000	121	130 (±20)	40	50 (±9)	33	39 (±9)
	153		53		35	
	117		58		50	
3000	68	162 (±98)	7	65 (±69)	10	31 (±22)
	153		45		30	
	264		142		54	
10000	179	129 (±71)	111	71 (±57)	62	50 (±17)
	79		30		38	
	暴露中に♂死亡					

表5 フタル酸ジエチルヘキシルにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	195	207 (±30)	99	115 (±21)	51	55 (±4)
	242		139		57	
	185		107		58	
100	220	186 (±31)	94	78 (±41)	43	42 (±24)
	161		105		65	
	176		30		17	
300	241	226 (±28)	126	108 (±44)	52	46 (±15)
	244		140		57	
	194		57		29	
1000	331	276 (±48)	164	151 (±14)	50	55 (±6)
	254		137		54	
	244		152		62	

表6 ベンゾフェノンにオスを曝露したペアにおける産卵数と孵化数

濃度 (nM)	産卵数	平均 (±標準偏差)	孵化数	平均 (±標準偏差)	孵化率	平均 (±標準偏差)
対照	96	179(±72)	59	115(±48)	61	64(±3)
	230		145		63	
	210		140		67	
100	132	119(±18)	91	75(±23)	69	62(±9)
	106		59		56	
	暴露中に死亡					
300	144	232(±77)	95	90(±83)	66	43(±35)
	284		171		60	
	269		5		2	
1000	208	244(±32)	105	128(±28)	50	52(±6)
	255		120		47	
	269		160		59	

表7 暴露開始時のオスとメスの血清中ピテロジェニン
濃度

雌雄	番号	ピテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均(±標準偏差)
オス	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
	5	<20	
	6	<20	
	7	<20	
	8	<20	
	9	<20	
	10	<20	
	11	<20	
	12	<20	
	13	<20	
	14	<20	
	15	<20	
	16	<20	
メス	1	21000	19000(±22000)
	2	10000	
	3	83000	
	4	9000	
	5	15000	
	6	11000	
	7	22000	
	8	20000	
	9	6500	
	10	13000	
	11	1200	

表8 対照群オスの血清中ピテロ
ジェニン濃度

番号	ピテロジェニン濃度	
	$\mu\text{g/mL}$	平均(±標準偏差)
1	<20	<20
2	<20	
3	<20	
4	<20	
5	<20	
6	<20	
7	<20	
8	暴露中に死亡	
9	<20	
10	<20	
11	暴露中に死亡	
12	暴露中に死亡	

表9 17βエストラジオール暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 (nmol/L)	番号	ビテロジェニン濃度	
		μg/mL	平均(±標準偏差)
0.01	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
	5	<20	
	6	暴露中に死亡	
0.1	1	13000	4000(±4600)
	2	2700	
	3	<20	
	4	2400	
	5	2900	
	6	2800	
1	1	500000	190000(±150000)
	2	73000	
	3	92000	
	4	190000	
	5	80000	
	6	暴露中に死亡	
	7	180000	
	8	暴露中に死亡	
	9	360000	
	10	190000	
	11	16000	
	12	210000	
	13 *	11000	57000(±100000)
	14 *	12000	
	15 *	200000	
	16 *	3700	
10	1	暴露中に死亡	180000(±53000)
	2	暴露中に死亡	
	3	170000	
	4	210000	
	5	240000	
	6	暴露中に死亡	
	7	160000	
	8	100000	
100	1	60000	78000(±13000)
	2	暴露中に死亡	
	3	76000	
	4	暴露中に死亡	
	5	87000	
	6	暴露中に死亡	
	7	88000	
	8	暴露中に死亡	

*) 7日間暴露

表 10 ビスフェノール A 暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	番号	ビテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均 (±標準偏差)
1	1	<20	<20
	2	<20	
	3	<20	
	4	<20	
10	1	55000	57000 (±35000)
	2	56000	
	3	70000	
	4	28	
	5	26000	
	6	94000	
	7	110000	
	8	44000	

表 11 ノニルフェノール暴露群オスの血清中ビテロジェニン濃度

濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	番号	ビテロジェニン濃度	
		$\mu\text{g/mL}$	平均 (±標準偏差)
0.3	1	6000	11000 (±11000)
	2	370	
	3	32000	
	4	21000	
	5	18000	
	6	330	
	7	9200	
	8	3400	