

# 化学物質がメダカの繁殖能力に及ぼす影響

塩田 勉 若林 明子

## 要 旨

内分泌攪乱作用を疑われる化学物質が魚類の繁殖に及ぼす影響を明らかにするため、メダカ成魚の雌と雄を別々に化学物質に2週間暴露したのちに暴露しない雌又は雄と交配させ、産卵数および孵化数を対照群のそれらと比較した。その結果、 $17\beta$ エストラジオール (E2) 及びいくつかのアルキルフェノール類に雄を暴露したペアと、E2、ノニルフェノール (NP) に雌を暴露したペアにおいて繁殖能力の低下が見られた。繁殖能力の低下は、雄を暴露した場合は孵化数、雌を暴露した場合は産卵数の減少に著しく現れ、その無影響濃度 (NOEC) は雄より雌の方が低濃度であった。雄暴露試験におけるE2のNOECは急性毒性値 (LC50) の数千分の一以下と非常に低かったが、NPのNOECはLC50の数分の一程度であった。また、暴露の影響からの回復について検討したところ、暴露後2週間経過した後も雌雄いずれも繁殖能力は十分に回復していなかった。本研究においてエストロゲン様物質がメダカの繁殖能力に及ぼす影響が明らかになったことから、本研究で用いた試験材料や方法は短期繁殖試験法として有効であると考えた。

キーワード: 内分泌攪乱化学物質、 $17\beta$ エストラジオール、メダカ、繁殖試験、産卵数、孵化数

## 1 はじめに

内分泌攪乱作用を持つと疑われる化学物質が魚類に及ぼす影響については、これまでいくつかの研究が行われてきた。それらの研究において化学物質に暴露された魚では、①雄魚における精卵巣の形成<sup>1),2)</sup>、②精巣重量 (GSI) の減少<sup>3)</sup>、③雌特異タンパク質であるビテロゲニンの雄魚血中濃度の増加<sup>3)</sup>、④遺伝的雄魚の形態的な雌化<sup>4)</sup>、などが報告されている。

これら既往の研究においては、暴露により生じる生理学的・病理学的変化は比較的よく検討されているものの、暴露による繁殖能力の減少を定量的に検討した事例や、病理学的・生理学的変化を繁殖能力と関連づけた研究は少ない。ホルモン濃度やGSIの変化が必ずしも繁殖能力の低下に結びつくとは限らないとする報告<sup>5)</sup>もあり、暴露と繁殖能力の関係を定量的に把握することが必要である。

そこで本研究では、内分泌攪乱作用を持つとされる化学物質がメダカの繁殖に及ぼす影響を調べた。雌雄それぞれに対する影響を明らかにするため、暴露は雌雄の一方のみに対して行い、正常魚と交配させて産卵

数と孵化数に及ぼす影響を調べた。また、繁殖に影響の見られた濃度を急性毒性値と比較し、その差異について物質・雌雄による違いを検討した。さらに、暴露の影響がどの程度続くかについても検討した。

## 2 実験方法

### (1) 試験魚

試験には都内の養魚場から購入したヒメダカ成魚を用いた。購入後2~6ヶ月程度、活性炭濾過した水道水中で粉末飼料 (オリエンタル酵母工業製、蛋白質45%、脂質4%、繊維3%含有) とTetraMin (ドイツtetraBerke製) を用いて飼育したのち、体長 $3.5 \pm 0.5$ cmかつ魚体重 $0.35 \pm 0.05$ g程度のものを試験に供した。試験時のヒメダカは10~15ヶ月齢であった。

### (2) 化学物質

陽性対照物質として天然の女性ホルモンである $17\beta$ -エストラジオール (E2) (SIGMA) を用いた。雄に対する暴露試験には

-ノニルフェノール (NP) (東京化成工業、10% *o*-ノニルフェノール含有)、ビスフェノール-A (BPA) (Aldrich Chemical Company)、フタル

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) (GL Science)、4-*t*-ブチルフェノール (BP)、ベンゾフェノン (以上、和光純薬工業) を用い、雌に対する暴露試験には塩化トリブチルスズ (TBT) (関東化学) およびNPを用いた。暴露溶液は各化学物質を溶解したアセトン溶液を希釈水 (活性炭濾過した水道水) に添加して作成した。暴露溶液中のアセトン濃度は100 $\mu$  l/l以下とした。

(3) 実験方法

ア 繁殖試験

雄1尾・雌2尾のペアを24組作成し、産卵状態をチェックする目的で暴露開始前2週間にわたり20ビーカー中で予備飼育した。飼育条件は水温24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、照度6000lux、16時間明8時間暗条件とした。ビーカー中には活性炭濾過した水道水に緑藻 (*Chlorella regularis*) を約105cell/lとなるように添加した飼育水 (以下グリーンウォーターと呼ぶ) を約20入れ、2日に1回半量を交換した。餌として粉末飼料またはTetraMinを毎日与えた。ビーカー中には卵回収のための藻 (*Taxiphyllum* sp.) を入れ、毎日産卵数および受精卵数を計数した。24組の中から安定的に受精卵が得られた12組を選び、2週間の平均受精卵数が均等になるよう、3組づつ4グループに分けた。1グループは対照群とし、残りの3グループは3濃度の暴露群とした。

暴露は雌雄の一方に対してのみ2週間行った。暴露条件は基本的に予備産卵期間と同条件とし、DO濃度の低下を防ぐため照度のみ500luxに変更した。暴露溶液は2日に1回、全量を交換した。換水の4時間前に粉末飼料を給餌し、残餌は換水時に除去した。対照群には希釈水のみを用いた。暴露期間中、暴露しない性のメダカは引き続きグリーンウォーター中で予備飼育と同条件で飼育した。暴露終了後、雌雄を元のペアに戻して1週間産卵させ、産卵数及び孵化数を計数した。

繁殖能力の回復を調べる試験では、14日間の採卵期間を暴露終了後1~2、3~4、5~7、8~10、11~14日目の5つの期間に分け、各期間内における産卵数と孵化数を一日当たりの値に換算して、繁殖能力の回復を検討した。

イ 急性毒性試験

OECDテストガイドライン「魚類急性毒性試験」に準拠して行った。希釈水として活性炭ろ過した水道水を用いた。濃度公比2で一濃度区当たり7尾のメダカ成魚をE2、NPに雌雄別に96時間暴露し、半数致死濃度

(96hrLC50)を算出した。

(4) 対照群との有意差の検定

各暴露群と対照群との有意差については、分散比のF検定を行った後に、等分散である場合はt検定、等分散でない場合はwelchの検定を用いて両群の平均の差を有意水準0.1で検定した。

3 結果

(1) 雄に対する暴露試験

雄をE2に暴露した繁殖試験における産卵数・孵化数の変化を図1に示す。3nM以上の暴露群では、産卵数・

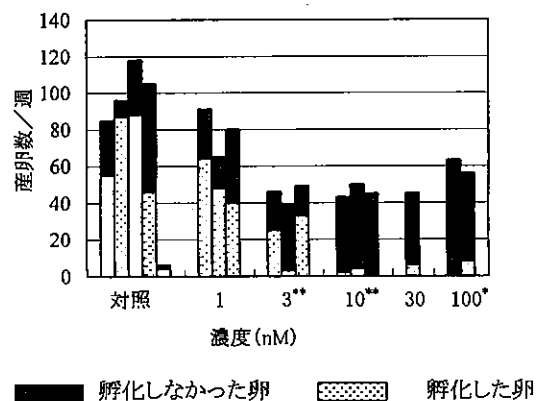


図1 E2に2週間暴露した雄と正常な雌との交配試験における産卵数および孵化数\*対照と比較して孵化数に有意差有り。\*\*対照と比較して孵化数と産卵数に有意差有り。(p=0.1)

孵化数共に対照群に比べ有意に低下し、特に孵化数は10nM以上の暴露群ではほぼ0であった。それらの濃度区においても一週間に50個程度の産卵が観察されたが、そのほとんどは未受精卵であった。他の化学物質では、BPA10 $\mu$ Mにおいて産卵数・孵化数が、BP1 $\mu$ Mにおいて孵化数が、それぞれ対照群に比べて有意に低下した(表1)。NP0.3 $\mu$ Mにおいても孵化数の低下傾向がうかがえたが、暴露群内のばらつきが大きいため統計的な有意差は認められなかった。DEHP、ベンゾフェノンに対する暴露は繁殖能力に影響を与えなかった。

(2) 雌に対する暴露試験

雌をE2に暴露した繁殖試験における産卵数・孵化数を図2に示す。各E2暴露群の雌全6尾のうち、1nMで1尾、10nMで1尾、100nMで1尾の雌が暴露期間中に死亡し、さらに暴露終了後の産卵期間中に、10nMで4尾の雌が死亡した。対照群と比較し、0.1nMでは孵化数が、1nM以上の暴露群では産卵数と孵化数がそれぞれ有意に低下し、10nM以上では全く産卵が行われなかった。一方、

表1 雄を化学物質に暴露したペアにおける産卵数と孵化数 (\*対照と比較して有意差有り)

a) NP

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	76 (±40)	51 (±31)
30	86 (±60)	54 (±53)
100	127 (±21)	94 (±27)
300	83 (±37)	39 (±35)

b) BPA

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	88 (±26)	58 (±23)
300	133 (±46)	102 (±45)
1000	89 (±42)	64 (±23)
3000	81 (±36)	60 (±31)
10000	47* (±15)	32* (±5)

c) BP

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	179 (±72)	115 (±48)
1000	130 (±20)	50* (±9)
3000	162 (±98)	65 (±69)
10000	129 (±71)	71 (±57)

d) DEHP

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	207 (±30)	115 (±21)
100	186 (±31)	76 (±41)
300	226 (±28)	108 (±44)
1000	276 (±48)	151 (±14)

e) ベンゾフェノン

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	179 (±72)	115 (±48)
100	119 (±18)	75 (±23)
300	232 (±77)	90 (±83)
1000	244 (±32)	128 (±28)

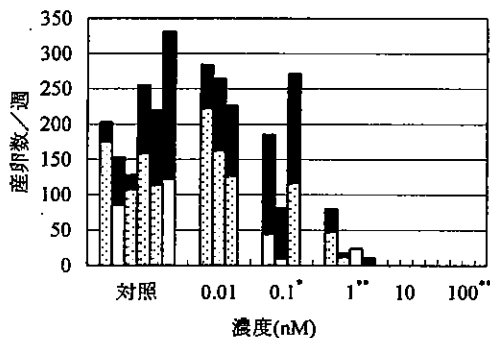


図2 E2に2週間暴露した雄と正常な雌との交配試験における産卵数および孵化数\*対照と比較して孵化数に有意差有り。\*\*対照と比較して孵化数と産卵数に有意差有り。(p=0.1)

全てのNP暴露群では対照群に比べて産卵数が有意に低下したが、孵化数については統計的な有意差は認められなかった(表2)。TBT暴露群では、繁殖に対する影響は見られなかった。

(3)繁殖能力の回復

雄および雌をE2に暴露した群における2週間の産卵数

表2 雌を化学物質に暴露したペアにおける産卵数と孵化数 (\*対照と比較して有意差有り)

a) NP

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	236 (±67)	134 (±83)
30	127 (±38)	75* (±21)
100	148 (±18)	90* (±24)
300	126 (±40)	69* (±19)

b) TBT

濃度 (nM)	平均産卵数 (標準偏差)	平均孵化数 (標準偏差)
対照	161 (±38)	122 (±47)
30	238 (±17)	198 (±15)
100	230 (±96)	182 (±121)
300	165 (±127)	143 (±127)

表3 急性毒性値(96hrLC50)と繁殖に対するNOECの比較(単位:nM)

	96hr LC50	NOEC(繁殖)	96hrLC50/NOEC
E2(♂暴露)	>8000	1	>8000
E2(♀暴露)	>8000	0.01	>800000
NP(♂暴露)	2800	>300	<9.3
NP(♀暴露)	1900	<30	>63
BPA(♂暴露)	39000 <sup>18)</sup>	3000	13

孵化数(一日当たり)を図3に示す。雄暴露群では3nMの一組を除き、すべての暴露群において産卵数・孵化数ともに対照群のそれより少なく、日数の経過による回復もみられなかった。雌暴露群では、暴露濃度が高いほど産卵の再開に日数を要した。しかし、3nM暴露群においても10日目以降には産卵が開始され、繁殖能力は回復しつつあると思われた。

(4)急性毒性値

E2の急性毒性値は低く、雌雄共に8000nMにおいても半数の致死は見られなかった(表3)。NPの急性毒性値は、雄の方が雌よりやや高濃度であったが、ほとんど雌雄差がないといえるレベルであった。

4 考察

(1)雄の繁殖能力に与える影響

雄への暴露による繁殖能力の低下は、産卵数以上に孵化数の減少に著しく現れた。すなわち、E2暴露群ではほとんど孵化しなかった10nMにおいても週に50個程度の産卵が行われ、BPの1μMでは孵化数に統計的な有意差は見られたが産卵数に有意差は見られなかった。このように、これらの暴露群では産卵数に占める未受精卵の割合が高かったことから、女性ホルモン様作用を持つとされるこれらの化学物質への暴露により雄の排精能力が低下もしくは消失したが、雌の産卵を促す性行動は行なっていたと思われる。この点については今後更に検討が必要であるが、E2を投与した金魚の雄

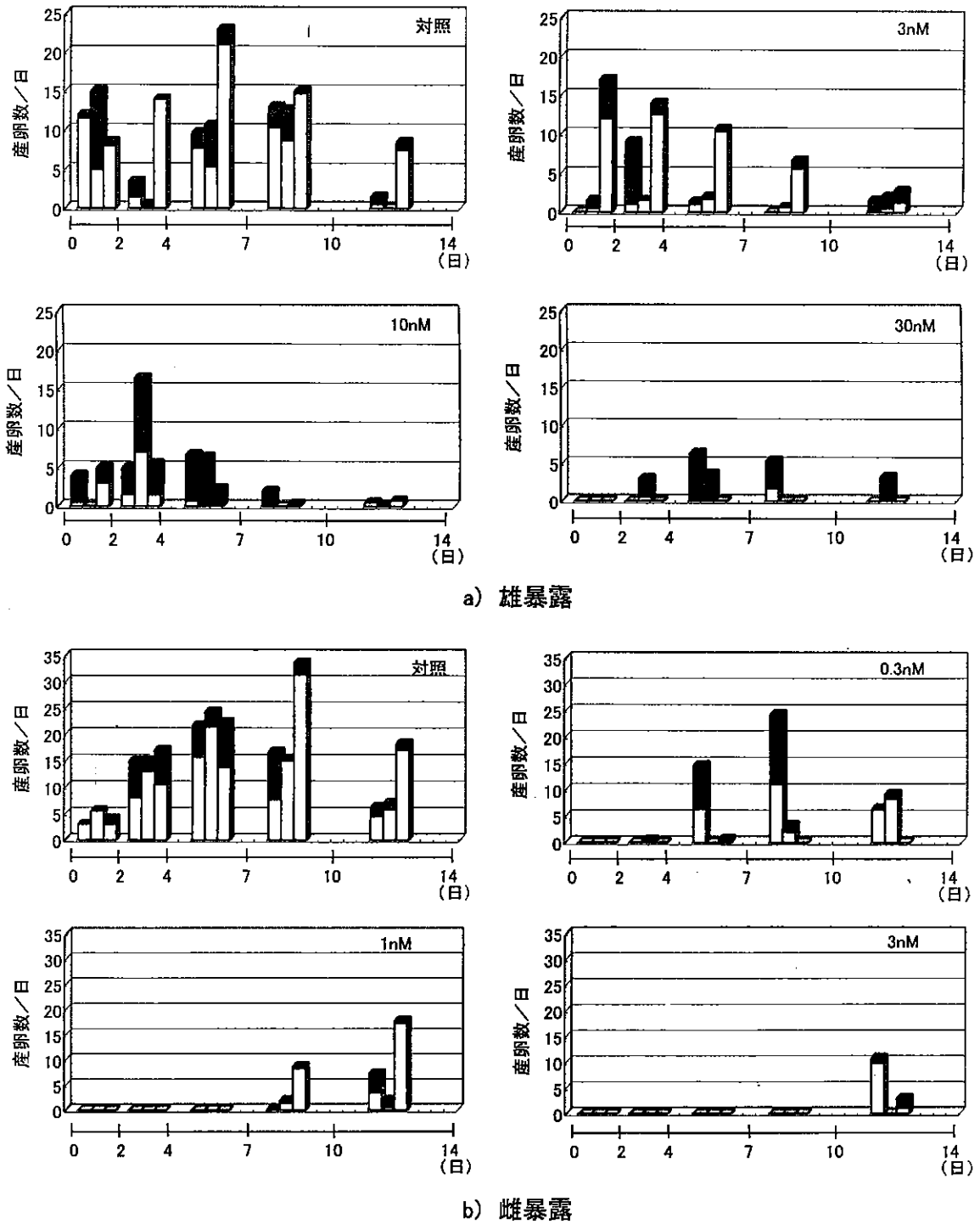


図3 E2に2週間a)雄またはb)雌を暴露したペアにおける暴露後2週間の産卵数と孵化数の推移

においては、排精と性行動が低下すること、排精の抑制が性行動の抑制より早く起きることが報告されている<sup>6)</sup>。以上から、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重要であることが明らかとなった。

DEHPおよびベンゾフェノン暴露群では繁殖に対する影響は認められなかった。DEHPの内分泌攪乱作用に関

しては、エストロゲンレセプターと結合するもののレポーター遺伝子の転写は活性化しないアンタゴニストであるとの報告<sup>7)</sup>があり、本試験の結果はこの報告と矛盾しない。ベンゾフェノンについては、黄体ホルモンであるプロゲステロンとその受容体タンパク質の結合を阻害するアンタゴニストであるとの報告<sup>8)</sup>がされており、雄を暴露する本試験では影響を与えなかったと考えら

れる。

## (2) 雌の繁殖能力に与える影響

E2暴露群では1nM以上で産卵数が著しく低下し、10nM以上では全く産卵が行われなかった。孵化数だけが有意に低下した0.1nMにおいても、産卵時にすでに多くの卵が変形あるいは卵殻が破れるなどしており、正常な卵が少ないため孵化数が低下した。このように、雌への暴露は孵化数より産卵数に強く影響を与えた。女性ホルモン物質を過剰に投与した雌についての毒学的な知見は少なく、産卵数減少の要因については明らかではない。NP暴露群においてもE2と同様に産卵数への影響が強く現れた。多くの研究においてNPは女性ホルモン様作用を有すると報告<sup>9)10)11)</sup>されていることから、E2と類似的作用により繁殖に影響を与えた可能性がある。本研究においてTBTは雌の繁殖能力に影響を及ぼさなかったが、TBTO（トリブチルスズオキシサイド）を経口投与したメダカにおいて産卵数・受精率の減少が見られたとの報告<sup>12)</sup>があることから、有機スズ化合物が魚類に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要であろう。

## (3) 急性毒性値との比較

本研究の結果から得られた繁殖に対する無影響濃度（NOEC）を急性毒性値（96hrLC50：96時間半数致死濃度）と比較した（表3）。E2に雄を暴露した試験のNOECはLC50の8000分の1以下と極めて低濃度であったのに対し、BPAのNOECはLC50の13分の1とかなりLC50に近い値であった。また、NPではLC50の10分の1以下という高濃度で雄を暴露したにもかかわらず、繁殖に統計的な有意差は見られなかった。以上のことから、女性ホルモンそのものであるE2に比べ、他の化学物質が雄の繁殖能力に影響を及ぼす濃度は、極めてLC50に近い濃度であると考えられた。

一方、繁殖能力が低下した濃度は雌雄で異なった。E2、NPともに急性毒性値には雌雄差が見られないにもかかわらず、繁殖に対するNOECはE2で約100倍（雄：1nM、雌：0.01nM）、NPでは10倍以上（雄：>0.3μM、雌：<0.03μM）雌の感受性が高かった。女性ホルモン様物質については、雄の繁殖能力に対する影響が特に注目されているが、本研究の結果は雌に対する影響評価の必要性を示唆しているといえる。

## (4) 短期繁殖試験としての有効性

OECDの内分泌攪乱化学物質の魚類を用いた試験法に

関する専門家会議では、第一段階のスクリーニング試験として、短期繁殖試験を提案している。そこで、本試験の短期繁殖試験としての有効性を検討した。

まず試験材料については、試験魚として用いたメダカは外見的な雌雄の区別が容易であるとともに、対照群及び影響を受けない暴露群においてはほぼ毎日産卵できたことから、繁殖試験に非常に適した魚種であることが確認できた。また、孵化後数ヶ月で成熟するため、試験魚の供給も容易であった。飼育水として用いたグリーンウォーターは、①安定的にメダカの産卵を行うことが出来る、②DO濃度の低下が少ない、といった点から、優れた飼育水であった。

試験方法については、メダカの精子形成には1週間程度を要するとの報告<sup>13)</sup>があり、暴露期間は少なくとも1週間以上必要であると考えられる。本研究ではE2に1週間暴露した繁殖試験も行ったが、2週間暴露の方がよりはっきりと影響が現れた。以上のことから、短期繁殖試験としては2週間の暴露が適切であると考えられる。影響は雄では孵化数に、雌では産卵数に強く現れたことから、孵化数・産卵数を合わせて評価する必要があることが、本試験法より明らかとなった。

雌雄別々に暴露する本試験法では、女性ホルモンそのもの及び女性ホルモン様物質の雄に対する影響を検出できたとともに、女性ホルモン様ではないとされる化学物質の影響は受けなかった。よってエストロゲン様物質の雄に対する影響を見るのに有効な試験法であると考えられる。一方、雌に対する暴露試験では雄に対するよりも低濃度で繁殖能力が低下し、雌雄でレスポンスが異なることが明らかとなった。このことは、雌雄別々に暴露する本試験法による繁殖能力の検討が必要であることを示している。

以上から、本試験法は短期繁殖試験として有望な試験法であると考えられる。今後さらに、個体差の解消・採卵期間の検討を行うと共に、ピテロジェニン濃度等の生理学的指標との相関についても検討する必要がある。

## 5 おわりに

本研究において雌の繁殖能力の低下が見られた濃度（E2:0.1nM=27ng/l、NP:0.03μM=6.6μg/l）に近い値は環境水中からも検出される場合があり（E2:12.6ng/l<sup>14)</sup>、NP:2.6μg/l<sup>15)</sup>、さらに毒性及び環境データを収集して精度の高いリスク評価をおこなう必要がある。

毒性データについては、生涯暴露試験等を行い長期間暴露での影響濃度を把握すると必要があるとともに、個体の繁殖能力との相関を有するバイオマーカーの開発が望まれる。環境データに関しては、ELIZA法によるE2測定値はGC/MSによる測定値の1/10～1/100であると報告されている<sup>14)</sup>ことから、より精度の高い測定法による環境濃度の把握が必要である。また、E2濃度に占める抱合体の割合等についても明らかにする必要がある。

本研究における成果の一部についてはChemosphere誌<sup>16)</sup>およびWater Science & Technology誌<sup>17)</sup>に発表した。

#### 参考文献

- 1) Gray M. A. and Metcalfe C. D. : Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5, p.1082-1086 (1997)
- 2) Gray M. A. et al. : Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8, p.1835-1842 (1999)
- 3) Ashfield L. A. et al. : Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3, p.679-686 (1998)
- 4) 荻野ら : 内分泌攪乱作用が疑われている化学物質のS-rR系メダカ性転換試験, 日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集, p.51 (1999)
- 5) Arcand-Hoy L. D. and Benson W. H. : Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1, p.49-57 (1998)
- 6) 小林ら : エストラジオールがキンギョの雄の性行動に及ぼす影響, 平成11年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.67 (1999)
- 7) Jobling S. et al. : A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, 103, p.582-587 (1995)
- 8) Saxena S. K. et al. : Specific interacion of some non-steroidal compounds with the progesterone binding site of uteroglobin. *J. Steroid Biochem.*, 3, p.303-308 (1983)
- 9) Jobling S. and Sumpter J. P. : Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout hepatocytes. *Aqua. Toxicol.*, 27, p.361-372 (1993)
- 10) Routledge E. J. and Sumpter J. P. : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3, p.241-248 (1996)
- 11) White R. et al. : Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135, p.175-182 (1994)
- 12) Nirmala K. et al. : Transgenerational toxicity of tributyltin and its combined effects with polychlorinated biphenyls on reproductive processes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 4, p.717-721 (1999)
- 13) 江上信雄 : メダカの生物学, 中央公論社, pp.107-113 (1989)
- 14) 福島実 : 内分泌攪乱物質の定量法やスクリーニング法に付随した問題点、1. 女性ホルモンの定量法, 平成12年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.292 (2000)
- 15) 小島節子ら : 水環境中の非イオン界面活性剤アルキルフェノールポリエトキシレートの分布, 第31回水環境学会講演要旨集, p.384 (1997)
- 16) Shioda T. and Wakabayashi M. : Effect of some chemicals on reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemospher*, 40, p.239-243 (2000)
- 17) Shioda T. and Wakabayashi M. : Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using 2-week reproduction test. *Water Sci. & Tech.*, in press.
- 18) 柏田ら : ヒメダカを用いた内分泌攪乱化学物質の環境リスク評価, 第5回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集, p.46-47 (1999)