

メダカFLF系統雄の雌化に及ぼす17βエストラジオールの 暴露時期及び期間の影響

塩田 勉 若林 明子

要 旨

遺伝的な雌雄が体表の白色素胞の有無により判別できるメダカFLF系統を用い、17βエストラジオール(E2)が遺伝的雄の機能的な雌への転換に及ぼす影響を検討した。試験には遺伝的雄のみを用い、成長段階及び暴露期間の影響について検討した。孵化直後から15日間、0.1及び1μg/Lで暴露した群では、性転換した魚の割合は少なかったが、孵化直後から30日間及び90日間、0.1及び1μg/Lで暴露した群では、成熟した個体は全て機能的雌であった。一方、孵化後16-30日、及び孵化後31-60日、0.1μg/Lで暴露した群では、性転換した魚の割合は少なかった。以上から、孵化直後から30日間、E2 0.1μg/Lに暴露することにより、ほぼ完全に遺伝的雄を機能的雌に転換することができると推察された。

また、数種の女性ホルモン物質について、雌化を誘導する濃度を比較したところ、エチニルエストラジオールはE2と同程度であったが、エストロンはE2より数倍、エストリオールは数百倍高かった。

キーワード：メダカFLF系統、性転換、遺伝的雄、エストラジオール

1 はじめに

多くの魚では、ある時期に雄を女性ホルモン物質に暴露すると、容易に機能的な雌に転換することが知られている。メダカに関しては、孵化後数週間以内からエストロン等の天然女性ホルモンを数ヶ月間経口投与すると、遺伝的雄が機能的な雌に転換することがこれまでの研究から明らかにされている¹⁻³⁾。しかし、暴露期間及び時期の違いが雌化に及ぼす影響については十分に検討されていない。

そこで本研究では、遺伝的な雌雄が体表の白色素胞の有無により判別できるメダカFLF系統を用い、17βエストラジオール(E2)への暴露時期及び期間の違いが、遺伝的雄の機能的雌化に及ぼす影響について検討した。また、近年、E2を含む天然及び合成の女性ホルモンによる水環境の汚染が懸念されていることから、雌化を指標として、これらの物質の女性ホルモン活性を比較した。

2 実験方法

(1) 試験魚

試験にはメダカFLF系統を用いた。本系統は名古屋大

学において新たに開発されたもので、遺伝的雄の体表に存在する白色素胞により、受精後3日目の卵段階において顕微鏡下で遺伝的雌雄の判別が可能である^{4,5)}。ただし、交差率が3~4%ある。本研究では、白色素胞の有無により遺伝的な性を、また鰭の二次性徴(背鰭の切れ込みの有無)から機能的な性を判別し、遺伝的な性と機能的な性が一致しているものをペアとして産卵させ、受精後5~6日目に顕微鏡下で雌雄を判別した後に、遺伝的雄のみを試験に用いた。

(2) 実験方法

ア 暴露時期及び期間の検討

試験物質として天然の女性ホルモンである17βエストラジオール(E2)(SIGMA Aldrich Chemical製)を用いた。はじめにE2をアセトンに溶解し、それを脱塩素水道水(活性炭濾過した水道水)で希釈して所定濃度の暴露溶液を得た。暴露溶液中のアセトン濃度は100μg/L以下とした。対照区には、アセトンのみを100μL/L添加した。孵化後24時間以内の仔魚を1濃度区当たり20尾用い、水温24°C±1、16時間明8時間暗条件にて実験を行った。暴露期間を図1に示す。暴露は、孵化

直後（0日）から15、30、90日間暴露する群と、孵化後16-30日、及び孵化後31-60日暴露する群を設定した。孵化直後から暴露する群は0.01、0.1、1 μg/Lの3濃度、孵化後16-30日及び31-60日暴露する群は0.1 μg/Lとした。ただし、0-30日暴露群のみ0.03 μg/Lも設定した。暴露は半止水式で行い、孵化後30日までは暴露溶液2Lを毎日全量交換した。31日目から90日までは、暴露溶液5Lを連続曝気し、2日に1回全量交換した。餌は孵化後30日までは稚魚用テトラミン(Tetraberke社)とブラインシュリンプ幼生を併用し、31日目からブラインシュリンプ幼生のみを与えた。暴露終了後は脱塩素水道水中で飼育し、孵化後90日目に背鰭の切れ込みの有無から機能的な雌雄を判定した。

イ 女性ホルモン活性の比較

女性ホルモンとして、エストロン(E1)、エストリオール(E3)、エチニルエストラジオール(EE2)（以上全て和光純薬工業製）を使用した。濃度公比3~3.3で暴露群を設定し、孵化後24時間以内の仔魚を一濃度区当たり20尾で30日間暴露した。暴露終了後は清水中で飼育し、成熟した段階で背鰭の切れ込みの有無から機能的な雌雄を判定した。その他の実験条件はアと同様である。

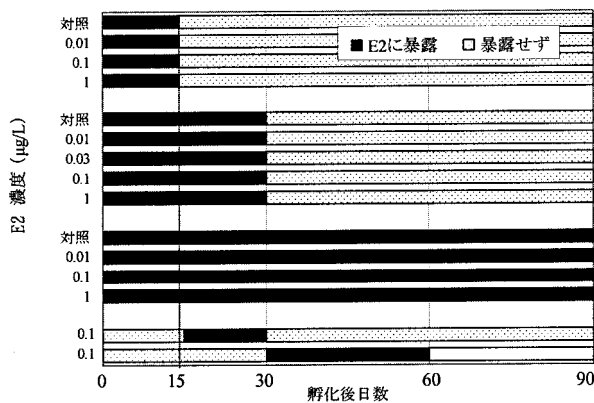


図1 暴露期間及び暴露濃度の設定

3 結果及び考察

(1) 暴露時期及び期間の検討

各暴露群における機能的雌雄の出現割合を図2に示す。なお、1 μg/Lで0-90日暴露した群では、90日目までに全ての個体が死亡した。0-15日暴露群では、0.1 μg/L区で16尾中2尾、1 μg/L区で10尾中4尾が機能的雌であったが、機能的雄も出現しており、雌化の誘導は不完全であった。対照群に見られた1尾の雌は、

本系統が持つ交差率に起因するものであると考える。一方、0-30日暴露群においては、対照区と0.01 μg/L区では全てが機能的雄であるのに対し、0.03 μg/L区から機能的雌が出現し(6尾中2尾)、さらに0.1及び1 μg/L区ではそれぞれ17尾中13尾、16尾中14尾が機能的雌で、雄の二次性徴を呈する個体が全く存在しなかった。0-90日暴露群の結果も同様であり、0.01 μg/L区では全てが機能的雄であったが、0.1 μg/L区では判別可能な個体はすべて機能的雌であった(11尾中6尾)。以上から、E2 0.1 μg/Lに孵化直後から30日間暴露することにより、ほぼ完全に雌化を誘導できることがわかった。一方、0.1 μg/Lで16-30日及び31-60日暴露した群では、いずれも機能的な雌雄が混在しており、雌化の誘導は不完全であった。以上のことから、0.1 μg/Lで雌化を完全に誘導するためには15日間の暴露では短すぎることを、孵化後0-30日間に比べ孵化後31-60日

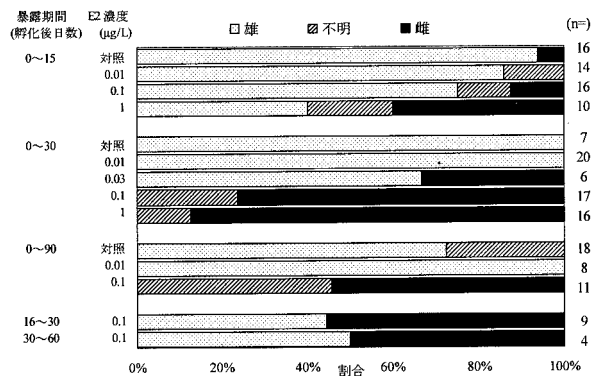


図2 各暴露群における機能的雌雄の出現割合

間は雌化に対する感受性が低下すること、等がうかがわれた。

(2) 女性ホルモン活性の比較

E1、E3、EE2に孵化後0-30日暴露した群では、暴露終了後の飼育期間中に病気等により多くの個体が死亡したため、定量的な比較は困難であった。半数以上の個体に雌化を誘導した濃度は、E1が0.3 μg/L(4尾中2尾)、E3が10 μg/L(11尾中8尾)、EE2が0.1 μg/L(7尾中6尾)であり、メス化を誘導する強さはE2 ≧ EE2 > E1 > E3の順であった。雌化を誘導する濃度は、E2、EE2を1とした場合、E1は数倍程度、E3は数百倍程度と考えられた。酵母を用いたエストロゲン活性の比較では、E2を1とした場合、EE2、E1、E3の活性は1、0.3、0.005程度と報告されており⁶⁾、

本研究の結果はほぼこれと同様である。ただし、今回は試験魚数が少ないため、今後、母集団を増やして追試験を行う。一方、下水放流水中からは、E2及びE1が数ng/L～数十ng/Lで検出される場合があることから⁷⁾、今後これらの物質が魚類に及ぼす影響について、相加作用の有無等も含めてより詳細に検討する必要がある。

(3) 試験魚としてのFLF系統の有効性

本研究で用いたメダカFLF系統は、白色素胞の有無により容易に遺伝的雌雄の判別が可能であり、その白色素胞は一生消えなかった。このことから本系統は、内分泌攪乱化学物質がメダカに及ぼす影響を調べるのに非常に適した系統であると考えられる。性転換に対する感受性を他の系統と比較したところ、ヒメダカではE2 0.1 µg/Lで100%が雌化⁸⁾、S-rR系統では0.01 µg/Lで0%、0.1 µg/Lで100%が雌化した⁹⁾と報告されており、系統間の差はほとんど無かった。しかし、本系統は病気に対する抵抗性がヒメダカより弱いようであった。半止水式で高密度に飼育した場合、ヒメダカはほとんど死亡しないが、本系統では尾腐れ病などの病気が頻発し、一部の個体に発生した病気により容器内の全ての個体が死亡する場合もあった。病気の発生抑制や飼育負担の軽減のためには、流水式での飼育が望ましいと考えられた。

謝 辞

本研究に用いたメダカFLF系統は、名古屋大学 尾里健二郎教授、若松祐子助教授のご好意により分与賜ったものである。記して深謝の意を表する。

参考文献

- 1) 岡田 要：メダカにおける性の完全転換，遺伝の総合研究，pp. 143-145 (1952)
- 2) Yamamoto T. : Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka, *J. Exp. Zool.* 123, pp. 571-594 (1953)
- 3) Yamamoto T. : A further study on induction of functional sex reversal in genotypic males of the medaka and progenies of sex reversals, *Genetics*, 44, pp. 739-757 (1959)
- 4) Ozato K. et al. : Medaka as a model for Endocrine-disrupting substance testing, *Abstract of the 2nd International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors '99*, pp. 91-92.
- 5) Wakamatsu Y. : New medaka strains for endocrine-disrupting substance testing, *Proceedings of International Symposium on Endocrine-Disrupting Substance Testing in Medaka*, p. 33 (2000)
- 6) 嶋津 暉之ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(その3)，東京都環境科学研究所年報2000，pp. 165-175
- 7) 中村 由美子ら：下水試料中のエストラジオール類の定量分析，第9回環境化学討論会講演要旨集，pp. 134-135 (2000)
- 8) Yokota et al., Development of full life-cycle test for endocrine disruptors using Japanese medaka, *Abstract of the 2nd International Symposium on Environmental Endocrine Disruptors '99*, pp. 94-95 (1999)
- 9) Hagino S. et al. : Effects of ethinylestradiol, diethylstilbestrol, 4-t-pentylphenol, 17β-estradiol, methyltestosterone and flutamide on sex reversal in S-rR strain medaka (*Oryzias latipes*), *Environmental Sciences*, 8, 1, pp. 75-87 (2001)