

ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の生殖能および  
精子運動能に及ぼす低濃度エストロゲン暴露の影響

Effects of environmental relevant estrogen on reproduction  
and sperm motility of Java medaka (*Oryzias javanicus*)

今井 祥子

2008

## 要旨

近年、内分泌攪乱物質によるヒトや野生生物への影響、とくに水棲生物への影響が懸念されている。内分泌攪乱作用を引き起こすのは人工化学物質だけではなく、人畜由来である天然エストロゲンも含まれる。エストロゲンのなかでも、 $17\beta$ -estradiol (E2) および estrone (E1) はエストロゲン活性が高く、多くの環境水中から検出されている。これらのエストロゲンは、河川を經由して沿岸域に流入しているが、魚類の内分泌攪乱に関する報告のほとんどが淡水魚に対する影響であり、海産魚に対する影響の報告はほとんどない。これらのことから、本研究では東南アジアの汽水域に生息するジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) を用いて E2 および E1 の暴露を行い、成長、生残、ビテロゲニン (VTG) 誘導、産卵などに対する影響を明らかにすることを目的とした。

ジャワメダカを用いて E2 のフルライフサイクル試験（胚期から産卵期）を行った結果、成長阻害、産卵数低下、受精率低下、雄の VTG 誘導および精巢中に卵細胞を有する精巢卵の出現などが引き起こされた。受精率に対する E2 の最小影響濃度 (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC) は 16 ng/L、無影響濃度 (No Observed Effect Concentration, NOEC) は 9 ng/L であった。また、E1 のフルライフサイクル試験の結果も同様に、産卵数低下、受精率低下、孵化日数遅延および雄の VTG 誘導などが引き起こされた。受精率に対する E1 の LOEC は 1190 ng/L、NOEC は 484 ng/L であった。E1 の LOEC は環境中では検出されないような濃度であったが、E2 の LOEC は環境中で検出されている濃度であった。E2 濃度 16 ng/L 以上で受精率低下が引き起こされた一方で、68 ng/L では産卵数が

有意に増加していた。68 ng/L 以下の E2 低濃度では雄に対してのみ E2 が影響したことから、E2 低濃度で受精率低下が引き起こされた要因は雄にあると考えられた。そこで、E2 暴露による精子運動能（精子運動率および運動距離）を測定し、受精率低下を引き起こした要因を明らかにすることとした。

成魚に対して E2 暴露を行った結果、34 ng/L で 4 週間暴露すると、その精子運動率が対照区と比較して有意に低下し、さらには運動距離も有意に低下した。これらのことから、E2 暴露によって精子の運動能が低下し、これにより受精率が低下したことが示唆された。また、E2 およびエストロゲン様物質が 11-ketotestosterone の生成に重要な P450 11 $\beta$ -hydroxylase の mRNA 発現を抑制することが既に知られており、この 11-ketotestosterone は精子形成に関与するステロイドホルモンであることも知られている。これらのことから、E2 暴露によって P450 11 $\beta$ -hydroxylase の mRNA 発現が抑制され、11-ketotestosterone の生合成を阻害し、それによって精子形成の阻害、精子運動能低下が生じて、最終的には受精率の低下を引き起こしたものと考えられる。

## ABSTRACT

Estrogenic chemicals and natural hormones, including 17 $\beta$ -estradiol (E2) and estrone (E1), are known to disrupt functions of the endocrine system of aquatic organisms. E2 and E1 have been detected in sewage treatment works effluent and estuarine waters. Moreover, there is little information on the effects of E2 and E1 on reproduction of marine fish. This study investigated the effects of E2 and E1 on reproduction of the estuarine fish, Java medaka (*Oryzias javanicus*).

Starting from the embryonic stages, Java medaka were exposed to 9.5, 16, 68, 159 and 243 ng/L of E2. Accordingly, E2 exposure induced vitellogenin in male, the appearance of testis-ova and inhibition of fertility. Similarly, Java medaka were exposed to 39, 198, 484, 1188 and 3701 ng/L of E1. E1 exposure also induced vitellogenin in male and inhibition of fertility. The fertility of Java medaka exposed to 16 and 68 ng/L of E2 was significantly lower than that of control. However, fecundity of the fish exposed to 68 ng/L was stimulated. Some male fish exposed to less than 68 ng/L of E2 seemed to exhibit androgen-inhibition effects. Suggesting that spermatogenesis of male fish can be inhibited by E2. Therefore, sperm motility in Java medaka, as determinant by the ratio of motile sperm and swimming velocity, was investigated to clarify the cause of the inhibition of fertility. Results show that the ratio of motile sperm of fish exposed to more than 34 ng/L of E2 for 4 weeks or more was significantly lower than that of the control. Additionally, the swimming velocity of their sperms was also significantly lower than that of the control. These results suggest that E2 may have inhibitory effects on the sperm motility. As reported by other researchers, 4-*tert*-pentylphenol inhibited P450 11 $\beta$ -hydroxylase mRNA expression in medaka (*O. latipes*) and suggested that 4-*tert*-pentylphenol may have inhibitory effects on the

synthesis of testicular 11-oxygenated androgens through downregulation of P450 11 $\beta$ -hydroxylase expression, a key steroidogenic enzyme in production of 11-ketotestosterone. Consequently, exposure of Java medaka to E2 could have inhibited the synthesis of 11-ketotestosterone thus affecting sperm motility that leads to inhibition of fertility by exposure of E2 and estrogenic chemicals.

## TABLE LIST

Table 1: HPLC conditions for 17 $\beta$ -estradiol analysis by UV detection

Table 2: Composition of protein splitting enzyme's inhibitor

Table 3: Composition of phosphate buffered saline (PBS)

Table 4: Composition of tris bufferd saline (TBS)

Table 5: Composition of Gill's hematoxylin solution

Table 6: Composition of eosin solution

Table 7: Concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (E2) in test waters (n=5)

Table 8: Hatching rate and time to hatching of embryos in the control and 17 $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups

Table 9: Total length and body weight of Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups at 187 days after hatching

Table 10: Concentrations of estrone (E1) in test waters (n=5)

Table 11: Hatching rate and time to hatching of embryos in the control and estrone (E1) treatment groups

Table 12: Total length and body weight of Java medaka in the control and estrone (E1) treatment groups at 243 days after hatching

Table 13: Composition of solution for sperm motility of Japanese medaka (*O. latipes*)

Table 14: Composition of solution for sperm motility of Java medaka (*O. javanicus*)

Table 15: HPLC conditions for 17 $\beta$ -estradiol analysis by fluorescence detection

Table 16: Concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (E2) in test waters

Table 17: Mean total length and body weight of Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups

## FIGURE LIST

Fig. 1: Java medaka (*Oryzias javanicus*)

Fig. 2: Secondary characteristics of male and female Java medaka (*O. javanicus*). This illustration is reprinted by the integrated book for the biology of the Medaka (Iwamatsu, 1993).

Fig. 3: 96-well multi plate for ELISA.

Fig. 4: Selection of approximated curve for vitellogenin (VTG) analysis. Low VTG concentration and high VTG concentration were selected linear curve and exponential curve, respectively.

Fig.5: Principle of ELISA for VTG analysis

Fig. 6: Vitellogenin analysis for ELISA

Fig. 7: Preparing of Tissue specimen using Technovit 7100

Fig. 8: Survival rate of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol at 13, 43 and 89 days after hatching.

Fig. 9: Hepatosomatic index (HSI) of male Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 10: Hepatosomatic index (HSI) of female Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 11: Gonadosomatic index (GSI) of male Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 12: Gonadosomatic index (GSI) of female Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 13: The number of eggs for Java medaka in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 14: The number of matured eggs for Java medaka in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 15: The number of fertilized eggs for Java medaka in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.

Fig. 16: The fertility of Java medaka in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.

- Fig. 17: The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per protein weight of Java medaka in control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.
- Fig. 18: The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight of Java medaka in control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.
- Fig. 19: Sex ratio of Java medaka at 89 days after hatching (a) and 183 days after hatching by secondary sexual characteristics (b) and at 183 days after hatching by histological observation (c).
- Fig. 20: Histological observation of gonads in the control (a) and 243 ng/L treatment groups (b and c). Arrows indicate oocytes.
- Fig. 21: Survival rate of Java medaka in control and estrone exposure groups at 33 days after hatching.
- Fig. 22: Hepatosomatic index (HSI) of male Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 23: Hepatosomatic index (HSI) of female Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 24: Gonadosomatic index (GSI) of male Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 25: Gonadosomatic index (GSI) of female Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 26: The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 27: The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.
- Fig. 28: The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups.

(\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 29: The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups.

(\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 30: Fig. 30 The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per protein weight of Java medaka in control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.

Fig. 31: The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight of Java medaka in control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.

Fig. 32: Sex ratio of Java medaka at 243 days after hatching in control and estrone exposure groups.

Fig. 33: Histological observation of gonads in the control (a) and 1190 ng/L treatment groups (b).

Fig. 34: The observed chamber of paraffin block for sperm motility.

Fig. 35: Observed chamber of ink print's slide glass for sperm motility provided Prof. Kagawa.

Fig. 36: Histogram of swimming velocity in different time zone, 10:00 (a), 13:00 (b) and 16:00 (c).

Fig. 37: Hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight in control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups for sperm motility. (\*)Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard.

Fig. 38: The ratio of motile sperm of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol for 1, 4 and 8 weeks. (\*) Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 39: The swimming velocity of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol for 1, 4 and 8 weeks. (\*) Significantly different from control ( $p<0.05$ ). Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Fig. 40: Relationship between VTG concentration per liver weight of Java medaka and swimming velocity of their sperms in control and E2 exposure groups.



## ABBREVIATION LIST

- ANOVA: one-way analysis of variance, 一元配置分散分析
- BPA: Bisphenol A
- BSA : bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
- DDT: Dichloro-diphenyl-trichloroethane
- DES: Diethylstilbestrol
- DO: dissolved oxygen, 溶存酸素
- E1: Estrone
- E2: 17 $\beta$ -estradiol
- E3: Estriol
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酵素免疫測定法
- GSI: Gonadosomatic index, 生殖腺指数
- HE: Hematoxylin and eosin stain, HE (ヘマトキシリンエオジン) 染色
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography, 高速液体クロマトグラフィー
- HRP: Horse radish peroxidase
- HSI: Hepato somatic index, 肝量指数
- LOEC: Lowest observed Effect Concentration (最小影響濃度)
- NOEC: No Observed Effect Concentration (無影響濃度)
- NP: Nonylphenol
- OECD: 経済協力開発機構
- OP: Octylphenol
- PBS: phosphate buffered saline
- ppb: parts per billion
- ppt: parts per million
- SPEED'98: 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 - 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 -
- SPSS: statistical Package for Social Science
- TBS: tris-buffered saline
- VTG: Vitellogenin, ビテロゲニン



第1章	総合緒言	1
第2章	ジャワメダカ ( <i>Oryzias javanicus</i> ) の生殖能に及ぼす 17 $\beta$ -estradiol フルライフサイクル暴露の影響	
2-1	緒言	5
2-2	材料と方法	
2-2-1	試験魚	7
2-2-2	試験物質	10
2-2-3	17 $\beta$ -estradiol フルライフサイクル暴露の方法	11
2-2-4	試験水中の 17 $\beta$ -estradiol 濃度分析および水質測定	12
2-2-5	肝臓および生殖腺の採取方法	13
2-2-6	肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定	14
2-2-7	肝臓抽出液中のタンパクの定量	19
2-2-8	生殖腺組織標本の作製方法	20
2-2-9	17 $\beta$ -estradiol 暴露における影響評価項目および評価方法	24
2-2-9-1	成長および生残に対する影響評価方法	24
2-2-9-2	再生産に対する影響評価方法	26
<b>2-2-9-3</b>	<b>ビテロゲニン誘導に対する影響評価方法</b>	<b>27</b>
2-2-9-4	生殖腺組織および二次性徴に対する影響評価方法	27
2-2-10	統計学的解析	28
2-3	結果	

2-3-1	飼育水の水質および 17β-estradiol 実測濃度	29
2-3-2	成長および生残に対する影響	30
2-3-3	再生産に対する影響	36
2-3-4	ビテロゲニン誘導に対する影響	39
2-3-5	生殖腺組織および二次性徴に対する影響	40
2-4	考察	44

### 第3章 ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の生殖能に及ぼす estrone フルライ フサイクル暴露の影響

3-1	緒言	47
3-2	材料と方法	
3-2-1	試験魚	48
3-2-2	試験物質	48
3-2-3	Estrone フルライフサイクル暴露方法	49
3-2-4	試験水中の estrone 濃度分析および水質測定	50
3-2-5	肝臓および生殖腺の採取方法	51
3-2-6	肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定	52
3-2-7	肝臓抽出液中のタンパクの定量	52
3-2-8	生殖腺組織標本の作製方法	53
3-2-9	Estrone 暴露における影響評価項目および評価方法	54
3-2-9-1	成長および生残に対する影響評価方法	54

3-2-9-2	再生産に対する影響評価方法	55
3-2-9-3	ビテロゲニン誘導に対する影響評価方法	56
3-2-9-4	生殖腺組織および二次性徴に対する影響評価方法	56
3-2-10	統計学的解析	57
3-3	結果	
3-3-1	飼育水の水質および estrone 実測濃度	58
3-3-2	成長および生残に対する影響	59
3-3-3	再生産に対する影響	64
3-3-4	ビテロゲニン誘導に対する影響	67
3-3-5	生殖腺組織および二次性徴に対する影響	69
3-4	考察	71

#### 第4章 ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の精子運動能に及ぼす 17 $\beta$ -estradiol パーシャルライフサイクル暴露の影響

4-1	緒言	73
4-2	精子運動能測定方法の検討	75
4-2-1	精子採取方法の検討	76
4-2-2	精子運動能測定方法の検討	78
4-2-3	精子運動能測定用スライドガラスの検討	80
4-2-4	精子運動能測定用希釈液の検討	83
4-2-5	精子採取時刻の検討	85

#### 4-3 材料と方法

4-3-1	試験魚	87
4-3-2	試験物質	87
4-3-3	17 $\beta$ -estradiol パーシャルライフサイクル暴露の方法	87
4-3-4	17 $\beta$ -estradiol 暴露における精子運動能測定方法	88
4-3-5	肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定	89
4-3-6	飼育水中の 17 $\beta$ -estradiol 濃度分析および水質測定	90
4-3-7	17 $\beta$ -estradiol パーシャルライフサイクル暴露における影響評価項目および評価方法	91
4-3-7-1	体重および全長に対する影響評価方法	91
4-3-7-2	ビテロゲニン誘導に対する影響評価方法	91
4-3-7-3	精子運動能に対する影響評価方法	91
4-3-8	統計学的解析	92

#### 4-4 結果

4-4-1	飼育水中の水質および 17 $\beta$ -estradiol 実測濃度	93
4-4-2	体重および全長に対する影響	94
4-4-3	ビテロゲニン誘導に対する影響	95
4-4-4	精子運動能への影響	96
4-5	考察	98

第5章	総合考察	102
-----	------	-----

第6章 謝辞 ····· 106

第7章 参考文献 ····· 107

## 第1章 総合緒言

1962 年に出版されたレイチェルカーソンの「沈黙の春」において、野生生物の繁殖力が低下したのは、Dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) などを含む農薬が大量散布された影響であると指摘された。その後、1960-1970 年代に使用された合成女性ホルモンである Diethylstilbestrol (DES) を胎児期に暴露された場合、生殖器障害などが発生すると報告された (Newbold et al., 1984; Colborn et al., 1993)。近年になって、このような化学物質による生物への様々な影響が報告されるようになり、環境中に放出されている化学物質の中には生体内でホルモン類似の作用を有して内分泌系を攪乱するものがあるとして、生物への影響が懸念されるようになった。

日本においては、環境省（当時の環境庁）によって平成 10 年（1998 年）5 月に「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 - 環境ホルモン戦略計画 SPEED'98 -」（以下 SPEED'98）がとりまとめられ、「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」のリストには当時 67 物質がリストアップされた。以降、環境汚染の状況や生物への影響などの調査が行われてきた。平成 15 年（2003 年）5 月には、内分泌攪乱化学物質について、「内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質」との政府見解が示されている。

魚類においても、様々な内分泌攪乱が報告されている。英国では、魚を収容したケージを河川に設置し一定期間飼育した結果、雌に特異的なタンパク質であるビテロゲニン (VTG) が雄の血中에서도誘導されたと報告されている (Harries

et al., 1997)。VTG は、卵黄タンパクの前駆物質であり、雌の血中では高濃度で認められる物質である。雄でもごく低濃度の VTG を有することは知られているが、これらの河川で飼育された魚は、実験室レベルで飼育された魚と比べて有意な VTG 濃度が誘導されていた。また、これらの河川には下水処理場からの排水が流入しており、排水中に含まれる女性ホルモン（エストロゲン）様物質による影響ではないかと言われている。原因物質は断定されていないが、ノニルフェノール（NP）などのアルキルフェノール類がこれらの河川および排水中から検出されていることから、これらの物質による影響ではないかと疑われている。NP は魚類に対してエストロゲン様の作用を示し、内分泌攪乱を引き起こすことがすでに研究で明らかになっている（Gray and Metcalfe, 1997; Hemmer et al., 2001; Hemmer et al., 2002; Nakamura et al., 2002; 田畑ら, 2003; Kawana et al., 2003; Miura et al., 2005; Yokota et al., 2005）。

NP は人工化学物質であるが、処理場からの排水中には人畜由来の天然エストロゲンも含まれている。天然エストロゲンには、 $17\beta$ -estradiol (E2)、estrone (E1) および estriol (E3) などが含まれる。E2 はエストロゲン活性の強い物質のひとつである。E1 は E2 よりもエストロゲン活性は低いが、環境中から検出される濃度は E2 よりも高い。E3 はエストロゲン 3 種の中でエストロゲン活性が最も低く、環境中濃度は検出下限値未満であることが多いため、生物に対する影響は E1 や E2 よりも低いと考えられている。平成 13 年度の東京都下水道局の調査では、放流水中 E2 の最大検出値（LC/MS/MS 測定）は 7 ng/L（流域処理場北多摩 1 号）、E1 の最大検出値（LC/MS/MS 測定）は 120 ng/L（流域処理場北多摩 1

号)であったと報告されている。VTGは、10 ng/L以下のE2濃度でも誘導されるとの報告(田畑ら, 2003)もあり、これらの調査において検出された値は、内分泌攪乱作用を引き起こす可能性の高い値であると言える。また、下水処理場からの放流は河川のみならず、海域への放流も多い。平成14年度の東京都環境科学研究所の調査では、東京湾海域におけるE2の最大検出値(ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, 酵素免疫測定法)は、23.7 ng/L、E1の最大検出値(ELISA測定)は61.2 ng/Lであったと報告されている(和波ら, 2003)。河川などの淡水域だけではなく、海域におけるエストロゲン物質による海産生物への影響が懸念されており、影響を明らかにする必要があると考えられる。

魚類における内分泌攪乱作用の報告は、淡水魚に関するものがほとんどである。日本では、飼育が容易であるヒメダカ(*Oryzias latipes*)が昔から観賞魚として親しまれており、科学的研究にも多く用いられてきた。ヒメダカは経済協力開発機構(OECD)の毒物試験魚にも指定されており(OECD, 1992)、ヒメダカに対する内分泌攪乱の影響報告は多い(Hartley et al., 1998; 畠山ら, 2001; Kang et al., 2002; Oshima et al., 2003; 林ら, 2004)。しかしながら、海産魚に対する内分泌攪乱の知見はほとんどないのが現状である。内分泌攪乱作用を評価するには、性決定に重要である卵あるいは孵化仔魚などの初期生活段階(early life stage)から、全生活環(full life cycle)における暴露試験を行うことが重要である。そのため、比較的全生活環の短い魚種が試験魚として適している。さらには、エストロゲン様物質暴露の指標(biomarker)であるVTGが測定できる魚種が望ましい。VTG測定系が確立されている海産魚の中で、成熟までに要する期間が最

も短いものでも、約 1 年は必要であり、全生活環における暴露試験を行うにはかなりの労力と時間を要することとなる。ヒメダカと同じ *Oryzias* 属であり、東南アジアの汽水域に生息するジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) を海水飼育して海産試験魚として確立しており、これを用いて天然エストロゲン、特に E2 および E1 に対する内分泌攪乱作用のリスク評価を行うこととした。

## 第2章 ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の生殖能に及ぼす

### 17 $\beta$ -estradiol フルライフサイクル暴露の影響

#### 2-1 緒言

SPEED'98 でリストアップされた 67 物質 (発表当時) は、すべて化学物質である。その中でも、特に「優先して取り組むべき物質」として NP やビスフェノール A (BPA) などを含む 8 物質が選定された。NP や BPA などの化学物質は、雄血中にビテロゲニンを誘導すると言われている濃度が ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) オーダーである。これに対して、天然物質である E2 は ppt ( $\text{ng/L}$ ) オーダーでビテロゲニンを誘導すると報告されている (田畑ら, 2003)。環境中から検出されている濃度と、ビテロゲニンを誘導する濃度の双方を合わせて内分泌攪乱作用のリスクを想定した場合、NP や BPA よりも E2 の方が生物に対するリスクが高い可能性が考えられる。そこで、環境中で検出されているエストロゲン (E2 および E1) 濃度が、海産魚に対してどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを本実験の目的とした。

エストロゲン (E2 および E1) の内分泌攪乱作用を評価するにあたり、まずは各々の影響評価項目における最小影響濃度 (LOEC: Lowest observed Effect Concentration) および無影響濃度 (NOEC: No Observed Effect Concentration) を明らかにすることが必要である。従来、魚類を用いた影響試験は、致死性の評価を行う急性毒性などが行われてきた。しかし近年では、内分泌攪乱物質は死に至らないような低濃度で内分泌系に影響を与え、生殖能に影響を及ぼすと報告されていることから、生死だけではなく

それ以外の項目で評価することが必要である。これらのことから、エストロゲン暴露の指標であるビテロゲニン濃度の測定、成長や生残に対する影響、産卵や受精に対する影響、生殖腺組織への影響などを評価項目とした。

また、実験室における暴露実験影響濃度と、環境中から検出されている物質濃度とを比較することで、それらの海域に生息する海産魚への内分泌攪乱作用のリスク評価を行った。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 試験魚

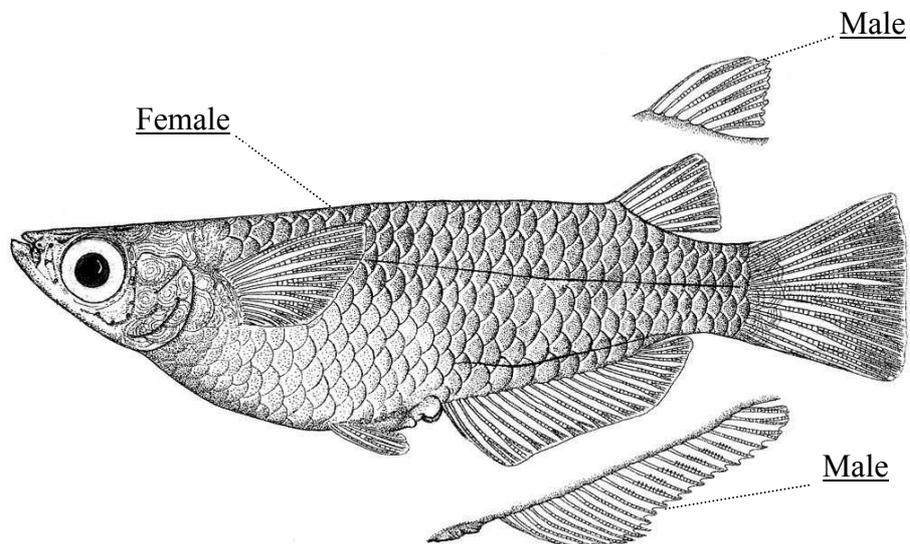
本実験では、東南アジアの汽水域に生息するジャワメダカ (*O. javanicus*) を試験魚として用いた。独立行政法人 瀬戸内海区水産研究所から分与され、鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センターで継代飼育したものである。このジャワメダカは、生殖腺組織を観察することにより孵化後2-3週間で雌雄判別が可能であり（角埜ら，2001）、約3ヶ月という短い期間で成熟する。*Oryzias* 属の中では海水への適応能は最も高い種であると報告されている（Inoue and Takei, 2002）。飼育が容易であり、塩分濃度を除けばヒメダカ (*O. latipes*) の飼育条件とほぼ同じである。



**Fig. 1** Java medaka (*Oryzias javanicus*)

雌雄の判別は、以下に記した二次性徴の違いによって行った (Fig. 2)。

- (1) 雌の背鰭の形状は滑らかであるが、雄の場合は端がギザギザである。
- (2) 雌の臀鰭の鰭条はすべて先端が分岐しているが、雄の場合は尾側の三つの鰭条のみが分岐していて残りの鰭条は分岐していない。
- (3) 雌の鰭条には乳頭突起が見られないが、雄の場合は観察できる。



**Fig. 2** Secondary characteristics of male and female Java medaka (*O. javanicus*). This illustration is reprinted by the integrated book for the biology of the Medaka (Iwamatsu, 1993).

暴露実験に用いる受精卵（胚）を得るために、10 L の砂濾過海水を入れた 30 cm 水槽（23 cm × 44 cm × 30 cm, 水容量 10 L）に成熟したジャワメダカの雄 3 尾および雌 6 尾を収容した。設定水温は 26°C、光周期は 14 時間明条件、10 時間暗条件、塩分濃度は 32-34 ‰とした。エサとしてアクアランプラス（BASF JAPAN Ltd.）で栄養強化した *Artemia nauplii*（孵化後 24 時間以内の幼生；株式会社マリンテック）と海産魚用テトラミン（テトラジャパン株式会社）を細かく粉砕したものを一日に 3-4 回適量投与した。これらの飼育条件で 2 週間馴致飼育し、得られた受精卵を暴露試験に用いた。卵は粘着糸を取り除いた後に、実体顕微鏡下で受精卵を選別しガラスシャーレー（直径 45 mm, 深さ 15 mm）に収容した。暴露試験を行う前に、受精卵を 3 %過酸化水素水（和光純薬工業株式会社）に浸けて 1 分間滅菌処理を施した。

## 2-2-2 試験物質

試験物質には、E2（純度>98.0 %，ナカライテスク株式会社）を用いた。

E2 の溶解方法（Kang et al., 2002）は以下の通りである。

- (1) 高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography, 以下 HPLC）用アセトン（和光純薬工業株式会社）を溶媒とし、100 mg/L の E2 溶液を作製した。
- (2) 100 mg/L アセトン溶液から三角フラスコに適量とり、エアレーション下でアセトンを揮発させた。
- (3) アセトン揮発後、適量の超純水を添加してスターラーで一晩溶解させ、1 mg/L の E2 水溶液を作製した。なお、1 mg/L の E2 中間原液作製ごとに HPLC（Table 1）で測定し、測定した実測濃度を中間原液の濃度として、設定濃度になるように各濃度区の海水に添加した。

**Table 1.** HPLC conditions for 17 $\beta$ -estradiol analysis by UV detection

Column	Inertsil ODS-3V, 5 mm, 4.6 $\times$ 50 mm
Eluent	Acetonitrile : 50mM phosphate buffer = 45 : 55 (pH2.3)
Flow Rate	1.0 mL/min
Detector (wave length)	UV (210 nm)
Column Temperature	40 $^{\circ}$ C
Column Oven	HITACHI L-7300
UV Detector	HITACHI L-7400
Pump	HITACHI L-7100
Degasser	HITACHI L-7160
Integrator	HITACHI L-7500

### 2-2-3 17 $\beta$ -estradiol フルライフサイクル暴露の方法

東京湾において E2 は ND (<1 ng/L) から 19 ng/L の範囲で検出されたと報告されている (和波ら, 2003)。このことから、暴露に用いる E2 低濃度区を 10 ng/L および 30 ng/L に設定した。また、ポジティブコントロールとして 200 ng/L および 500 ng/L を設定した。複数の親魚から採卵し、その受精卵をひとまとめにプールした後、ランダムに各濃度区のシャーレーに収容した。E2 濃度 10, 30, 80, 200 および 500 ng/L 区を設定し、8 つのガラスシャーレー (直径 45 mm, 深さ 15 mm) に各 20 個前後の卵 (合計 150 個) を収容して暴露試験を行った。対照区 (E2 を含まない清浄海水) は、6 つのガラスシャーレーに各 20 個前後の卵 (合計 108 個) を収容して試験を行った。すべてのガラスシャーレーは 26 °C に設定したインキュベーター内に収容し、暴露海水は毎日調製して全量換水を行った。暴露開始後、孵化数を計測し孵化率を算出した。また、孵化に要した日数 (以下、孵化日数) も計測し、濃度区ごとに平均孵化日数を算出した。

暴露開始後、魚体サイズが大きくなるにつれて、100 mL, 300 mL および 2.5 L のガラスビーカーに替えて暴露飼育を継続し、最終的にはガラス水槽 (23 cm  $\times$  44 cm  $\times$  30 cm, 水容量 10 L) で成熟するまで飼育を行った。成熟後、対照区の産卵が安定した後、産卵に関するデータ (産卵数、成熟卵数、受精卵数および受精率) を求めるために、2.5 L ガラスビーカー (水容量 2 L) に雄 2 尾および雌 4 尾を収容し、暴露を継続した。

#### 2-2-4 試験水中の 17 $\beta$ -estradiol 濃度分析および水質測定

E2 濃度の測定を行うため、エムポアディスクを用いて試験水中の E2 を固相抽出した。抽出手順は以下の通り行った。

- (1) 直径 47 mm のエムポアディスク（住友 3M, SDB-XC）を吸引濾過装置に装着し、メタノール 10 mL および超純水 10 mL をディスクに通水してコンディショニングを行った。
  - (2) その後、飼育水 300-500 mL を通水して E2 を固相抽出し、10 mL の超純水でディスクを洗浄した。
  - (3) 洗浄後、10 分間吸引を続けてディスクを乾燥させ、メタノール 10 mL で E2 を溶出させた。
  - (4) 溶出させたメタノールは試験管で採取し、E2 ELISA キット（日本エンバイロケミカルズ株式会社）を用いて E2 濃度の測定を行った。
- なお、測定手順は付属マニュアルに従った。

また、暴露期間中の水温、溶存酸素濃度（DO）、pH および塩分濃度を濃度区ごとに測定した。水温はデジタル水温計（アズワン株式会社）、溶存酸素濃度は DO メーター（Model58, YSI）、pH は pH メーター（D-24, HORIBA）、塩分濃度は屈折塩分計を用いて測定した。

## 2-2-5 肝臓および生殖腺の採取方法

暴露終了後、魚のサイズに合わせて 200-500  $\mu\text{L/L}$  のフェノキシエタノール（和光純薬工業株式会社）で麻酔した。体重および全長を測定後、開腹して肝臓を摘出し肝臓重量を測定した。タンパク分解酵素阻害剤（Table 2）0.5mL を添加し、マイクロホモジナイザー（アズワン株式会社）を用いて細かく粉砕した。粉砕後、遠心分離（10000  $\times$  g, 10 分間, 4  $^{\circ}\text{C}$ , KUBOTA, 5922）して得られた上清を VTG 測定試料とし、測定まで-80  $^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。肝臓摘出後の魚体は 10 %ホルマリンで固定し、後に生殖腺を摘出して生殖腺重量を測定した。また、肝量指数（Hepato somatic index; 以下、HSI）および生殖腺指数（Gonadosomatic index; 以下、GSI）を算出した。

**Table 2. Composition of protein splitting enzyme's inhibitor**

1M Tris-HCl (pH8.0)	2 mL
3M NaCl	5 mL
NaN <sub>3</sub>	50.0 mg
Aprotinin	3.3 mg
p-APMSF	25.2 mg
0.5M EDTA	10 mL
DW	
Total	100 mL

## 2-2-6 肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定

VTG とは雌に特異的なタンパクであり、卵黄タンパクの前駆物質である。環境中にエストロゲン様物質が存在すると、雄であっても VTG が誘導される。このことから、エストロゲン様物質の暴露試験において、雄の VTG 誘導はエストロゲン様物質暴露の指標のひとつとなっている。

肝臓抽出液中の VTG 濃度は、酵素免疫測定法 (ELISA) により測定し、肝臓重量あたりおよび肝臓抽出液中のタンパク重量あたりの濃度として表した。測定に用いた抗ジャワメダカ VTG 抗体は、(独) 水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所の藤井一則博士から分譲されたものを用いて行った。ELISA (Okumura et al., 1995) は以下の手順で行った。

- (1) 一次抗体の固相化：マイクロプレートの各穴に 10  $\mu\text{g/mL}$  の抗 VTG-IgG を含む phosphate buffered saline (以下 PBS, Table 3 参照) 100 $\mu\text{L}$  を添加し、4  $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベーションした。
- (2) ブロッキング：1%BSA (ウシ血清アルブミン) を含む tris-buffered saline (TBS, Table 4 参照; 以下 TBS-BSA) を各穴に 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、4  $^{\circ}\text{C}$ で4時間以上インキュベーションした。
- (3) 洗浄：0.1%Tween20 を含む TBS (以下 TBS-T) で3回洗浄した。
- (4) サンプルおよびスタンダードの添加：サンプル

およびスタンダードを 1%BSA および 0.1% Tween20 を含む TBS (以下 TBS-BSA-T) で希釈し、各穴に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 4 時間インキュベーションした。

- (5) 洗浄 : TBS-T で 3 回洗浄した。
- (6) 二次抗体の添加 : 0.625  $\mu$ g/mL のビオチン標識 F(ab')<sub>2</sub> を含む TBS-BSA-T を各穴に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。
- (7) 洗浄 : TBS-T で 3 回洗浄した。
- (8) Horse radish peroxidase (以下 HRP) 標識アビジンの添加 : HRP 標識アビジンを TBS-BSA-T で 5000 倍に希釈した後に各穴に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温で 1-2 時間放置した。
- (9) 洗浄 : TBS-BSA-T で 3 回洗浄した。
- (10) 発色 : 終濃度 0.02% 過酸化水素を含む 3 mg/mL のフェニレンジアミン (0.1M クエン酸バッファ) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ添加し、室温、暗所で 30 分インキュベーションした。
- (11) 発色停止 : 1N 硫酸を各穴に 100  $\mu$ L ずつ添加した。
- (12) 測定 : マイクロプレートリーダーを用いて、492

nm の吸光度で測定した。

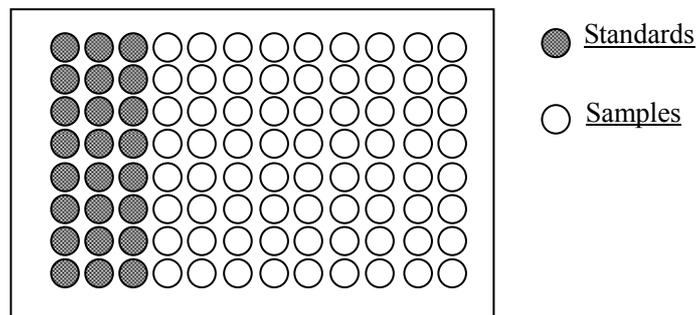
**Table 3.** Composition of Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	8.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.9 g
KCl	0.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
DW	
Total	1000 mL

**Table 4.** Composition of Tris buffered saline (TBS)

1M Tris-HCl (pH8.0)	20 mL
3M NaCl	50 mL
DW	
Total	1000 mL

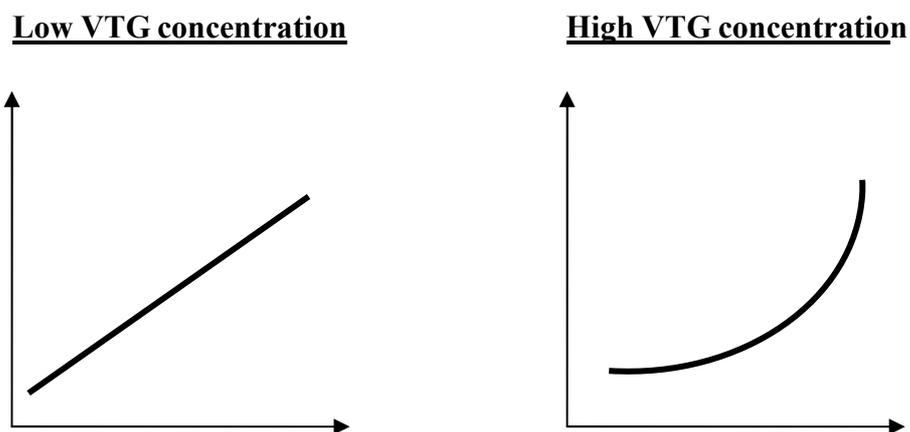
測定を行う際には、それぞれのプレートについてスタンダードウェルを設けた (Fig. 3 参照)。1 サンプルにつき 2 連 (2 ウェル) 以上測定を行い、ウェル間のばらつきをチェックした。



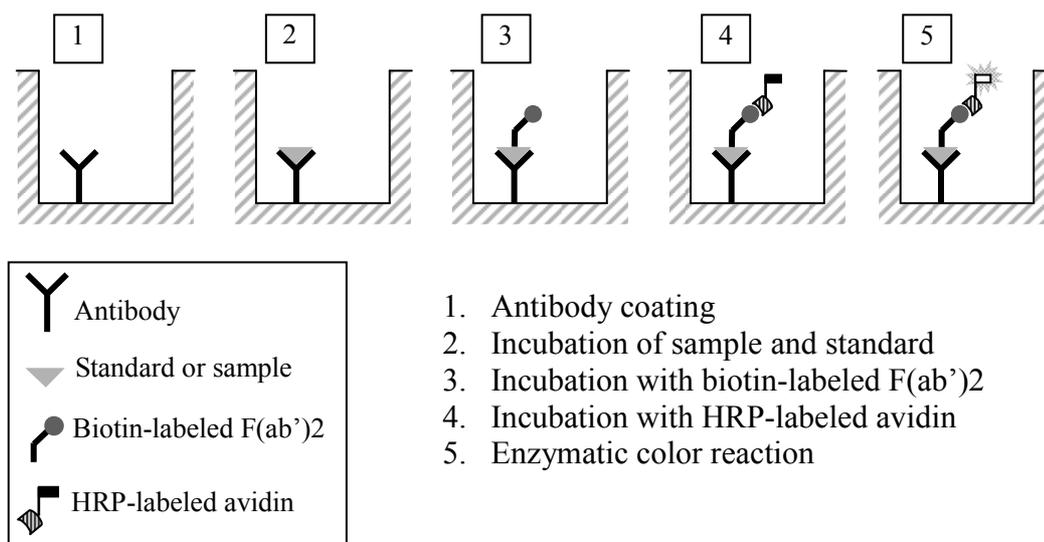
**Fig. 3** 96-well multi plate for ELISA.

スタンダードの標準曲線を求める際、VTG 低濃度は直線式、VTG 高濃度は指数式で求めた (Fig. 4 参照)。

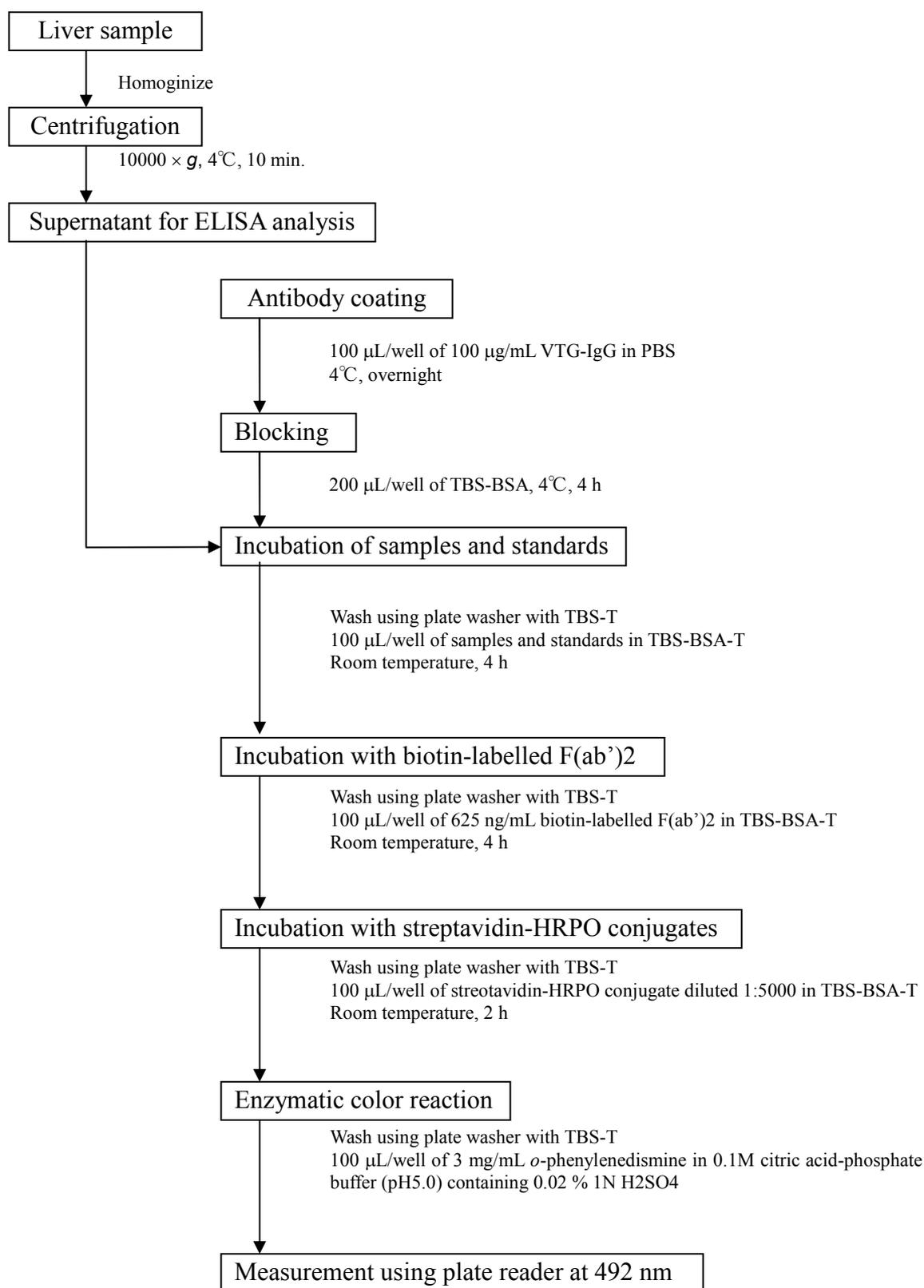
ELISA の原理およびフローチャートは Fig. 4 および Fig. 5 を参照。



**Fig. 4** Selection of approximated curve for vitellogenin (VTG) analysis. Low VTG concentration and high VTG concentration were selected linear curve and exponential curve, respectively.



**Fig. 5** Principle of ELISA for VTG analysis



**Fig. 6** Vitellogenin analysis for ELISA

### 2-2-7 肝臓抽出液中のタンパクの定量

DC Protein Assay (Bio-Rad) を用いてタンパクの定量を行った。タンパクの定量を行う際のスタンダードには BSA を使い、段階的に希釈を行って標準曲線を求めた。また、VTG 測定時のサンプルは TBS-BSA-T で希釈を行ったものを用いたが、これらにはタンパク質 (BSA) が含まれているため、タンパクの定量を行う際のサンプルには希釈を行う前の肝臓抽出液を用いた。なお、タンパク定量の手順は、付属のマニュアルに従って行った。

## 2-2-8 生殖腺組織標本の作製方法

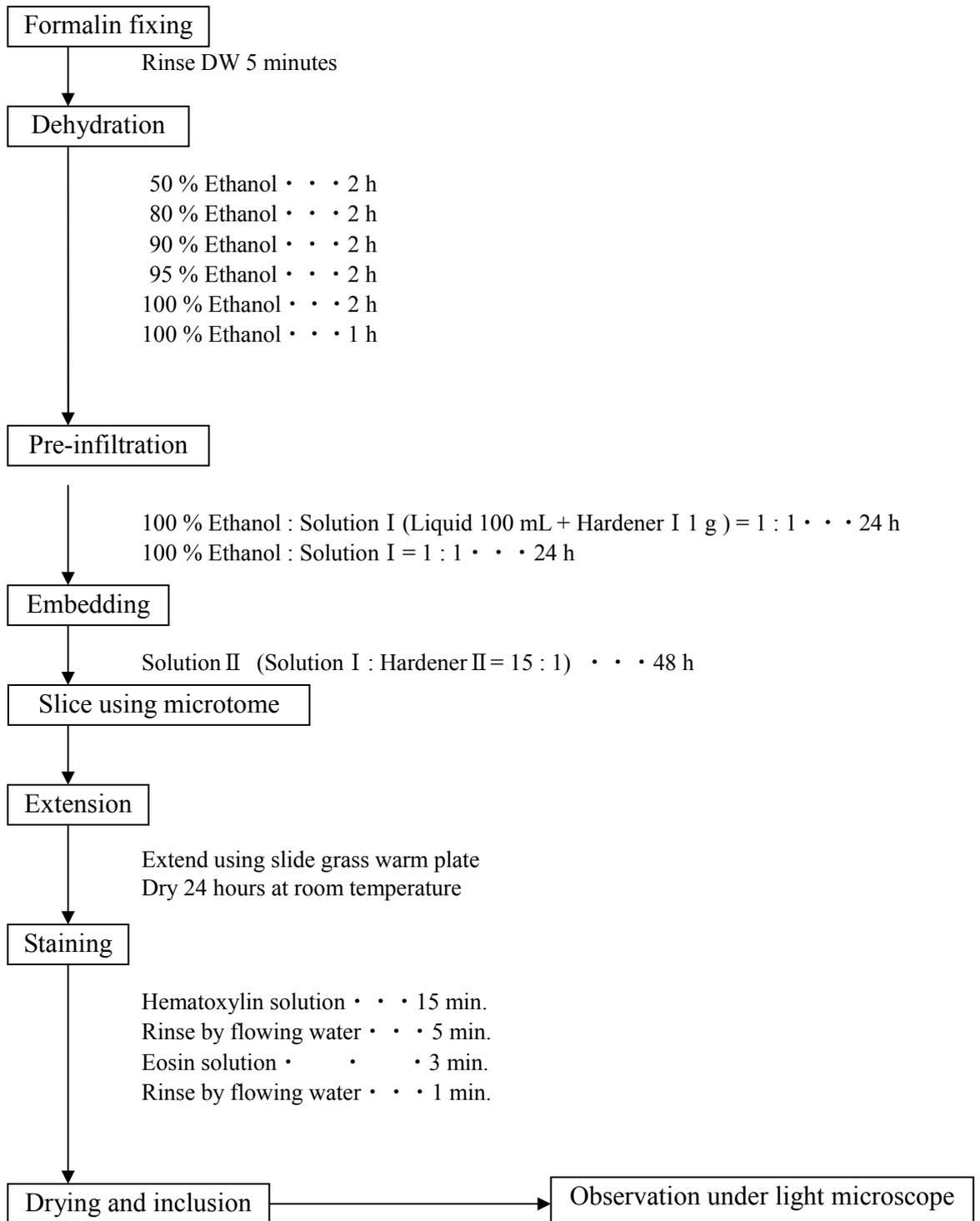
暴露終了後にホルマリン固定した魚体から生殖腺を摘出した。生殖腺重量を測定した後に生殖腺を脱水し、Technovit 7100 (Kulzer) を用いて包埋した (Fig. 7)。包埋後、ミクロトームを用いて試料を薄切し、hematoxylin および eosin 染色 (以下 HE 染色, Table 5) を施して光学顕微鏡下で観察を行った。Technovit 7100 による包埋の手順を以下に示した。

- (1) 固定：魚体を 10% 海水ホルマリンで固定し、十分固定された後生殖腺を摘出した。
- (2) 洗浄：蒸留水に 5 分ほど浸漬し、時々ゆっくり振とうさせた。
- (3) 脱水 50% エタノールから 100% エタノールまで段階的にアルコール濃度をあげたものに浸漬し、生殖腺の脱水を行った。
- (4) 予備浸透：100% エタノールおよび包埋液 I (Technovit 7100 主液を 100 mL, Technovit 7100 硬化剤 I を 1 g 混合し溶解させたもの) を等量混合し、これに脱水した生殖腺サンプルを一晩浸漬した。その後、これらを包埋液 I に 2 日浸漬した。ただし、包埋液 I に浸漬してから一日経った後に、新しい包埋液 I に換液した。
- (5) 包埋：包埋液 II (包埋液 I と Technovit 7100 硬化剤 II を 15 : 1 で混合したもの) を包埋板に注いで生殖腺組織を入れ、生殖腺サンプルを 2 日間浸漬した。
- (6) 薄切：試料をボンドアロンアルファ (東亜合成株式会社) で木片に接着し、ミクロトームで 5-7  $\mu\text{m}$  に薄切した。

(7) 伸展：薄切した切片をプレパラート上の水塊に置き、ホットプレートを用いて伸展させた。伸展後、常温で1時間以上乾燥させた。

(8) 染色：プレパラート上に伸展させた後、HE染色を施した。

染色後乾燥させ、封入剤を用いて封入した。



**Fig. 7** Preparing of Tissue specimen using Technovit 7100

**Table 5 Composition of Gill's hematoxylin solution**

DW	365 mL
Ethylene glycol	125 mL
Hematoxylin	1.0 g
Sodium iodate	0.1 g
Aluminum sulphate	8.8 g
Glacial acetic acid	10 mL

**Table 6 Composition of eosin solution**

Eosin Y	1.0 g
DW	100 mL

## 2-2-9 17β-estradiol 暴露における影響評価項目および評価方法

内分泌攪乱作用を評価するにあたって、各々の影響評価項目の評価方法について以下の通りに行った。

### 2-2-9-1 成長および生残に対する影響評価方法

成長および生残に対する影響評価項目として、孵化率、孵化日数、全長、体重、HSI および GSI を算出した。

- (1) 孵化率：暴露を開始後、孵化数を計測し各々のシャーレーごとに孵化率を算出した。孵化率の算出方法は、次式の通りである。

$$\text{孵化率 (\%)} = \frac{\text{孵化数}}{\text{暴露開始時の卵数}} \times 100$$

- (2) 孵化日数：暴露開始から孵化に要するまでの日数を計測し、各々のシャーレーごとに平均孵化日数を算出した。

- (3) 全長および体重：暴露終了後、全長および体重を測定し、各々濃度区ごとに平均全長および平均体重を算出した。

- (4) 肝量指数 (Hepato somatic index; HSI) および生殖腺指数 (Gonadosomatic index; GSI)：暴露終了後、肝臓重量および生殖腺重量を計測し、HSI および GSI を算出した。HSI および GSI の算出方法は、以

下の通りである。

$$\text{HSI (\%)} = \frac{\text{肝臓重量 (mg)}}{\text{体重 (mg)}} \times 100$$

$$\text{GSI (\%)} = \frac{\text{生殖腺重量 (mg)}}{\text{体重 (mg)}} \times 100$$

## 2-2-9-2 再生産に対する影響評価方法

産卵によって得られた卵は、受精卵、未受精卵および未成熟卵の3つに分けて各々の数を計測し、再生産に対する影響評価項目として、産卵数、成熟卵数、受精卵数および受精率を算出した。

(1) 産卵数：受精卵、未受精卵および未成熟卵の総計とし、雌1尾あたりの産卵数を算出した。

(2) 成熟卵数：受精卵と未受精卵の総計とし、雌1尾あたりの成熟卵数を算出した。

(3) 受精卵数：雌1尾あたりの受精卵数を算出した。

(4) 受精率：産卵数と受精卵数から受精率を算出した。算出方法は、次式の通りである。

$$\text{受精率 (\%)} = \frac{\text{受精卵数}}{\text{産卵数 (受精卵数 + 未受精卵数 + 未成熟卵数)}} \times 100$$

### 2-2-9-3 ビテロゲニン (VTG) 誘導に対する影響評価方法

暴露終了後に魚体から肝臓を摘出し、肝臓ホモジネートの上清を用いて VTG 濃度を測定した。

(1) 肝臓重量あたりの VTG 量：肝臓摘出時に肝臓重量を測定し、肝臓重量あたりの VTG 量を算出した。

(2) タンパク量あたりの VTG 量：肝臓ホモジネートの上清を用いてタンパク濃度の測定を行い、タンパク量あたりの VTG 量を算出した。

### 2-2-9-4 生殖腺組織および二次性徴に対する影響評価方法

暴露終了後に魚体から生殖腺を摘出し、生殖腺組織標本を作製して顕微鏡下で観察した。また、二次性徴から雌雄の判別を行い、生殖腺組織から判別した雌雄との相違を比較した。

(1) 生殖腺組織の観察：生殖腺組織標本を顕微鏡下で観察し、精巣卵の有無を調べた。

(2) 二次性徴による性判別：前述（第2章，2-2-1 試験魚，p7）の二次性徴により、雌雄の判別を行った。生殖腺組織から判別した雌雄との比較を行い、二次性徴の発現に対する影響について検討した。

## 2-2-10 統計学的解析

得られたデータはすべて平均値±標準偏差で示した。対照区および暴露区の等分散性を検定し、一元配置分散分析（one-way analysis of variance, 以下 ANOVA）で解析を行った。等分散の場合は Dunnett t 検定、等分散でない場合は Dunnett T3 および Dunnett C 検定により、対照区と暴露区で平均値の有意差検定を行なった。すべての検定において、有意水準は 0.05 とした。これらの統計学的解析は、統計ソフト（statistical Package for Social Science 10.0J, 以下 SPSS®）を用いて行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 飼育水の水質および 17 $\beta$ -estradiol 実測濃度

E2 暴露期間における飼育水の平均水温は  $25.9 \pm 0.6^\circ\text{C}$ 、DO は  $6.32 \pm 1.21$  mg/L、塩分濃度は  $33.8 \pm 0.9\%$ 、pH は  $7.24 \pm 0.55$  であった。

E2 濃度を E2 ELISA キットで測定した結果、24 時間の平均 E2 実測濃度は対照区が ND (<5 ng/L)、10 ng/L 区が  $9.5 \pm 3.8$  ng/L (以下 9.5 ng/L 区)、30 ng/L 区が  $15.5 \pm 3.8$  ng/L (以下 16ng/L 区)、80 ng/L 区が  $68.4 \pm 25.1$  ng/L (以下 68 ng/L 区)、200 ng/L 区が  $159 \pm 41$  ng/L (以下 159 ng/L 区)、500 ng/L 区が  $243 \pm 73$  ng/L (243 ng/L 区) であった (Table 7)。以下、結果を述べるときには、設定濃度ではなく実測濃度で示した。

**Table 7. Concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (E2) in test waters (n=5)**

Nominal E2 Concentrations (ng/L)	Measured E2 Concentrations <sup>1</sup>		
	0 h	24 h	0-24 h <sup>2</sup>
control	ND <sup>3</sup>	ND	ND
10	$11 \pm 3$	$8 \pm 4$	$9 \pm 3$
30	$17 \pm 2$	$13 \pm 4$	$15 \pm 3$
80	$88 \pm 9$	$48 \pm 18$	$68 \pm 25$
200	$186 \pm 42$	$132 \pm 18$	$159 \pm 41$
500	$249 \pm 106$	$236 \pm 26$	$243 \pm 73$

<sup>1</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

<sup>2</sup>The mean concentrations at 0 and 24 h after preparation.

<sup>3</sup>Not detectable (ND) for ELISA < 5 ng/L

### 2-3-2 成長および生残に対する影響

孵化率は対照区が  $85.4 \pm 14.3\%$ 、暴露区が  $62.8-90.2\%$  の範囲であった。対照区と比較して、暴露区の孵化率に統計学的有意差は認められなかった (Table 8)。また、孵化日数は対照区が  $16.3 \pm 1.5$  日、暴露区が  $15.8-17.3$  日の範囲であった。孵化日数も孵化率同様に、対照区と比較して有意な差は認められなかった (Table 8)。なお、孵化率はシャーレー毎に平均値を算出し、孵化日数は孵化した稚魚 1 個体毎に算出した。

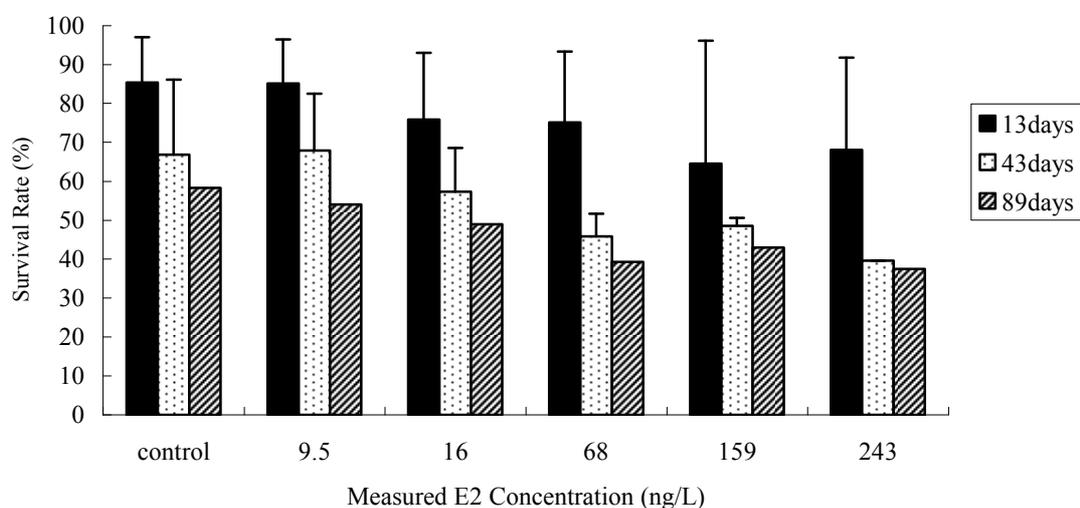
**Table 8. Hatching rate and time to hatching of embryos in the control and 17 $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups**

E2 Concentrations <sup>1</sup> (ng/L)	Hatching Rate <sup>2</sup>		Time to Hatching <sup>2</sup>	
	(%)	<i>n</i>	(days)	<i>n</i>
control	$85.4 \pm 14.3$	6	$16.3 \pm 1.6$	90
9.5	$77.8 \pm 28.9$	8	$17.2 \pm 2.2$	120
16	$90.2 \pm 12.3$	8	$17.0 \pm 1.5$	142
68	$80.9 \pm 26.8$	8	$16.7 \pm 1.3$	117
159	$62.8 \pm 29.7$	8	$15.8 \pm 1.1$	97
243	$77.3 \pm 27.2$	8	$16.1 \pm 2.5$	120

<sup>1</sup>The mean concentration at 0 and 24 hours after preparation.

<sup>2</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

孵化後 13 日令の生残率にも影響は認められなかった。また、孵化後 43 日令および 89 日令の生残率も同様に、対照区と比較して有意な差は認められなかったが、E2 濃度依存的に生残率は低下傾向を示していた。(Fig. 8)。



**Fig. 8** Survival rate of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol at 13, 43 and 89 days after hatching. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation. The bars are not indicated at 43 days after hatching of 243 ng/L and 89 days after hatching of all groups, because these groups were no repetition.

孵化後 187 日令における体重は対照区が  $0.390 \pm 0.038$  g、暴露区が  $0.258-0.325$  g の範囲であった。対照区と比較して、すべての暴露区の体重に有意な低下が認められた (Table 9)。

また、孵化後 187 日令における全長は対照区が  $36.4 \pm 1.2$  mm、暴露区が  $30.5-34.7$  mm の範囲であった。対照区と比較して、16 ng/L 区以上の暴露区的全長に有意な低下が認められた (Table 9)。

**Table 9. Total length and body weight of Java medaka in the control and 17  $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups at 187 days after hatching**

E2 Concentrations <sup>1</sup> (ng/L)	<i>n</i>	Total Length <sup>2</sup> (mm)	Body Weight <sup>2</sup> (mg)
control	14	$36.4 \pm 1.2$	$390 \pm 39$
9.5	17	$34.7 \pm 1.5$	$325 \pm 44$ *
16	18	$34.0 \pm 1.3$ *	$306 \pm 50$ *
68	23	$32.6 \pm 2.1$ *	$260 \pm 74$ *
159	12	$32.0 \pm 1.5$ *	$264 \pm 48$ *
243	17	$30.5 \pm 3.2$ *	$258 \pm 79$ *

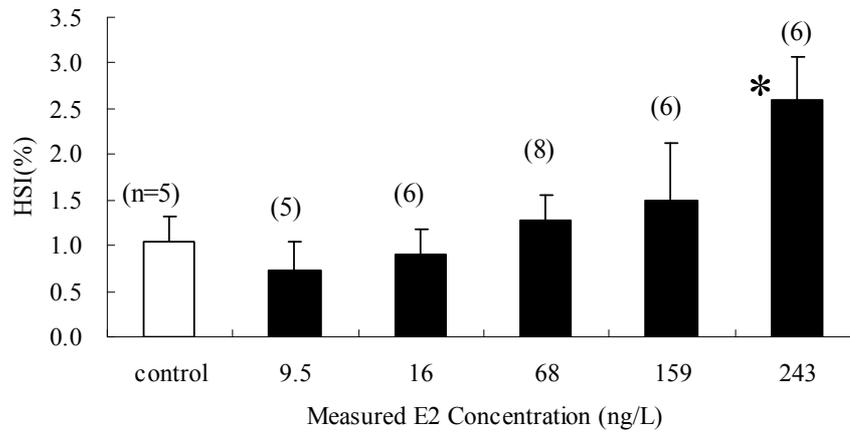
<sup>1</sup>The mean concentration at 0 and 24 h after preparation.

<sup>2</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

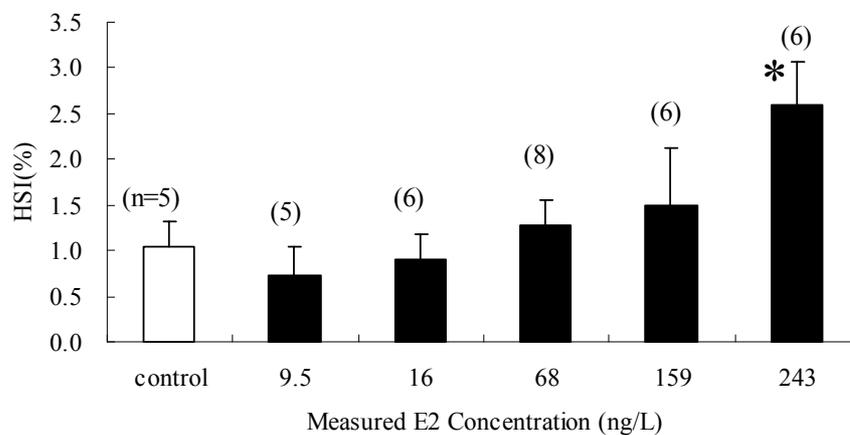
\*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

孵化後 187 日令における雄の HSI は対照区が  $1.0 \pm 0.3\%$  であり、暴露区が 0.7-2.6% の範囲であった (Fig. 9)。孵化後 187 日令における雌の HSI は対照区が  $1.1 \pm 0.4\%$  であり、暴露区が 1.3-2.3% の範囲であった (Fig. 10)。対照区と比較して雌雄ともに、243 ng/L 区の HSI に有意な増加が認められた。

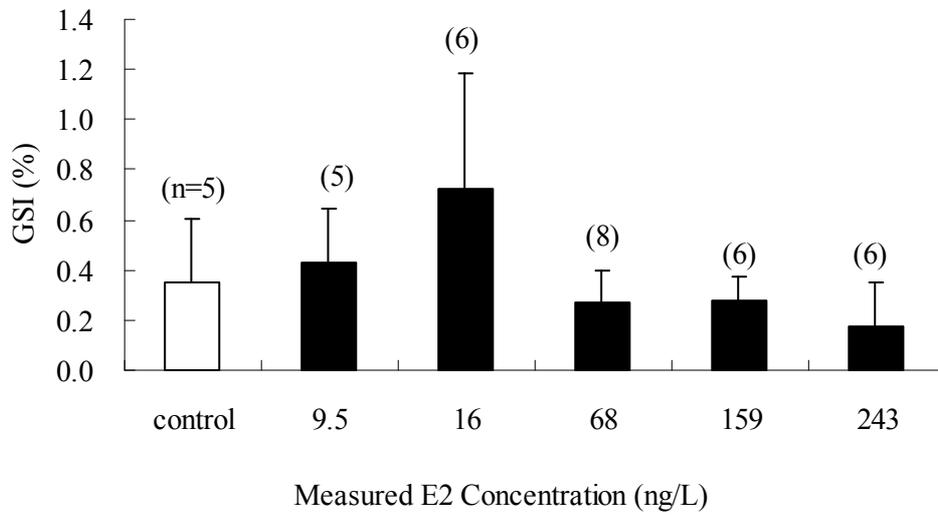
孵化後 187 日令における雄の GSI は対照区が  $0.4 \pm 0.3\%$  であり、暴露区が 0.2-0.7% の範囲であった (Fig. 11)。また、孵化後 187 日令における雌の GSI は対照区が  $1.5 \pm 0.5\%$  であり、暴露区が 1.0-1.8% の範囲であった (Fig. 12)。対照区と比較して雌雄ともに、すべての暴露区の GSI に有意な差は認められなかった。



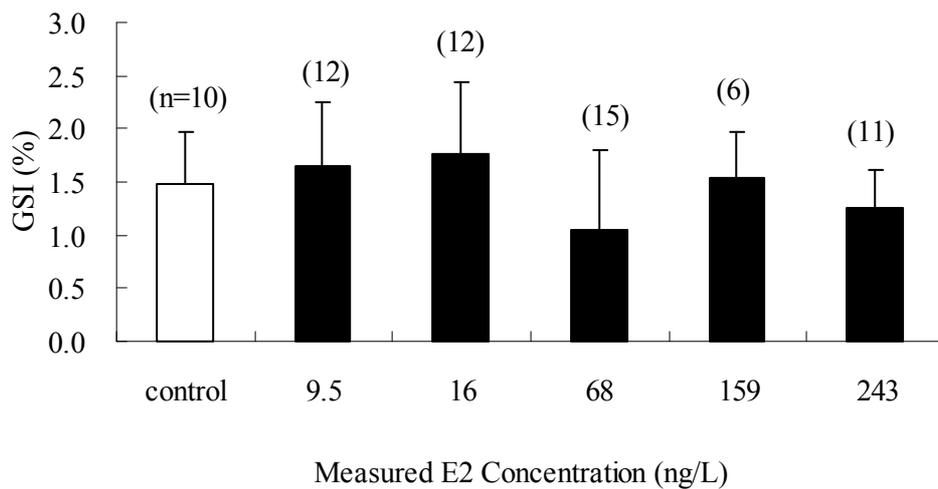
**Fig. 9** Hepatosomatic index (HSI) of male Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 10** Hepatosomatic index (HSI) of female Java medaka at 187 days after hatching in the control and  $17\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



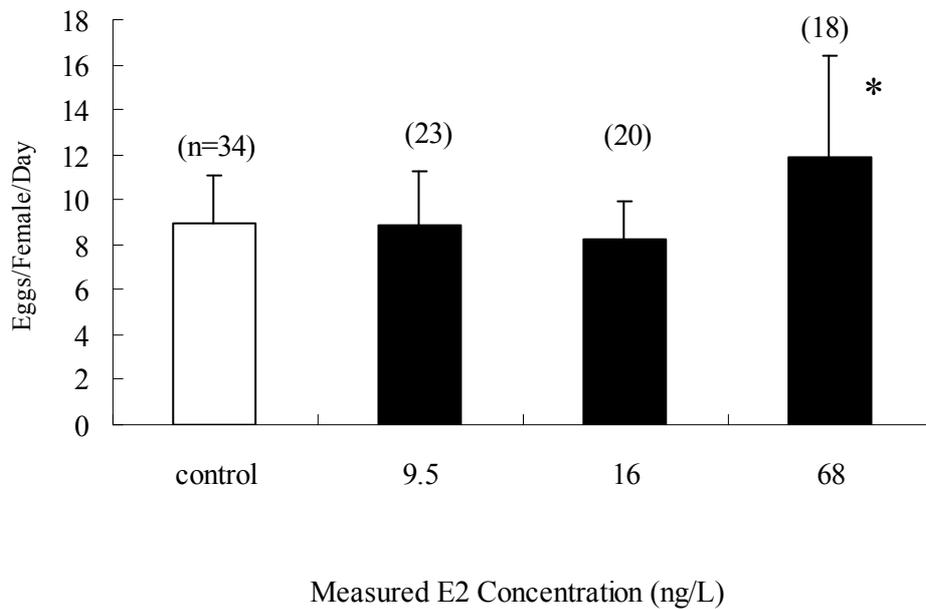
**Fig. 11** Gonadosomatic index (GSI) of male Java medaka at 187 days after hatching in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



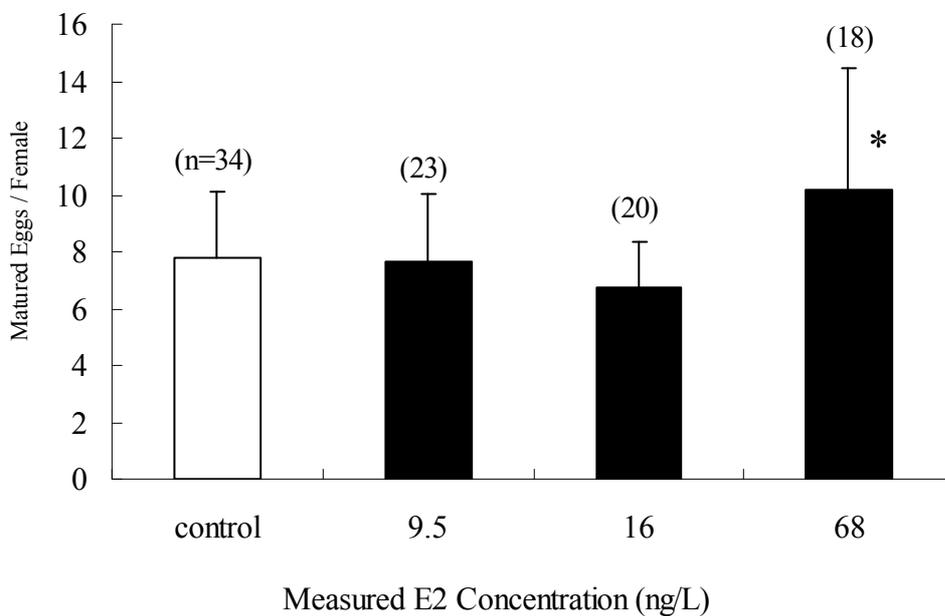
**Fig. 12** Gonadosomatic index (GSI) of female Java medaka at 187 days after hatching in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

### 2-3-3 再生産に対する影響

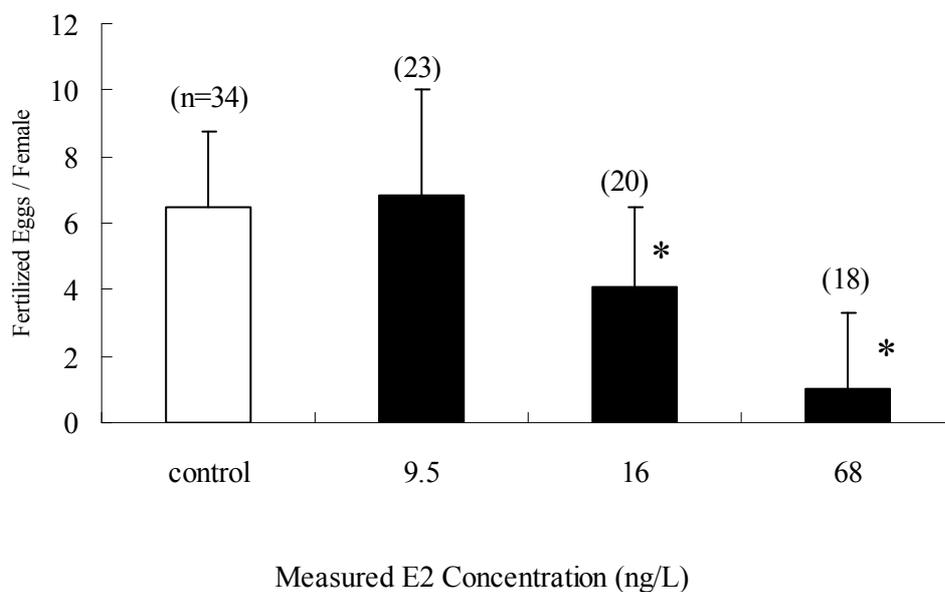
159 ng/L 区および 243 ng/L 区では、全暴露期間中に得られた産卵数は数個のみであった。さらに、得られた卵はすべてが未受精卵であり、受精卵は観察されなかった。雌 1 尾あたりの産卵数は対照区が  $9.0 \pm 2.1$  個であった。対照区と比較して、暴露区の産卵数は 68 ng/L 区で  $11.9 \pm 4.5$  個と有意な増加を示し、159 ng/L 区以上では有意な低下を示した (Fig. 13)。雌 1 尾あたりの成熟卵数は対照区が  $7.8 \pm 2.3$  であった。対照区と比較して、暴露区の成熟卵数は 68 ng/L 区で  $10.2 \pm 4.3$  個と有意な増加を示し、159 ng/L 区以上では有意な低下を示した (Fig. 14)。雌 1 尾あたりの受精卵数は対照区が  $6.5 \pm 2.3$  個であり、対照区と比較して 16 ng/L 区以上の暴露区で有意な低下を示した (Fig. 15)。受精率は対照区が  $83.2 \pm 19.0\%$  であり、対照区と比較して 16 ng/L 区以上の暴露区で有意な低下を示した (Fig. 16)。



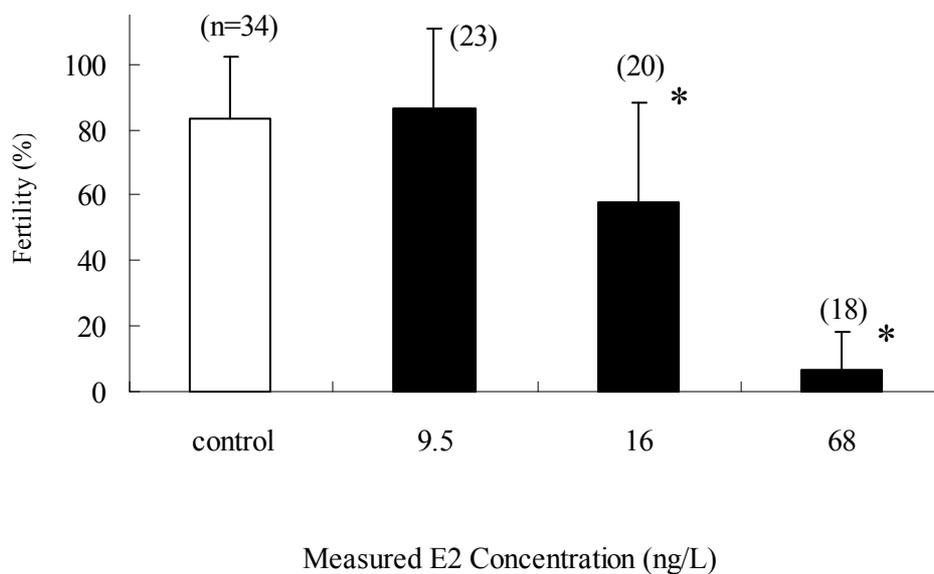
**Fig. 13** The number of eggs for Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 14** The number of matured eggs for Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



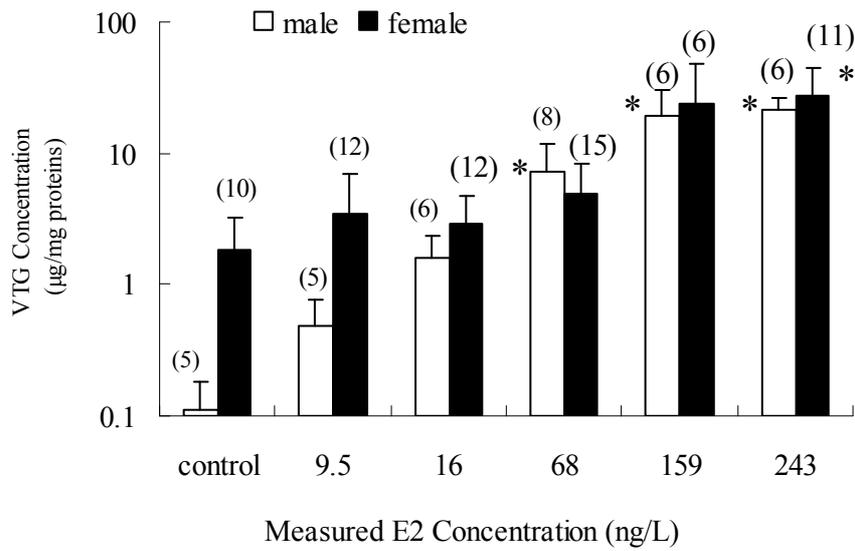
**Fig. 15** The number of fertilized eggs for Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



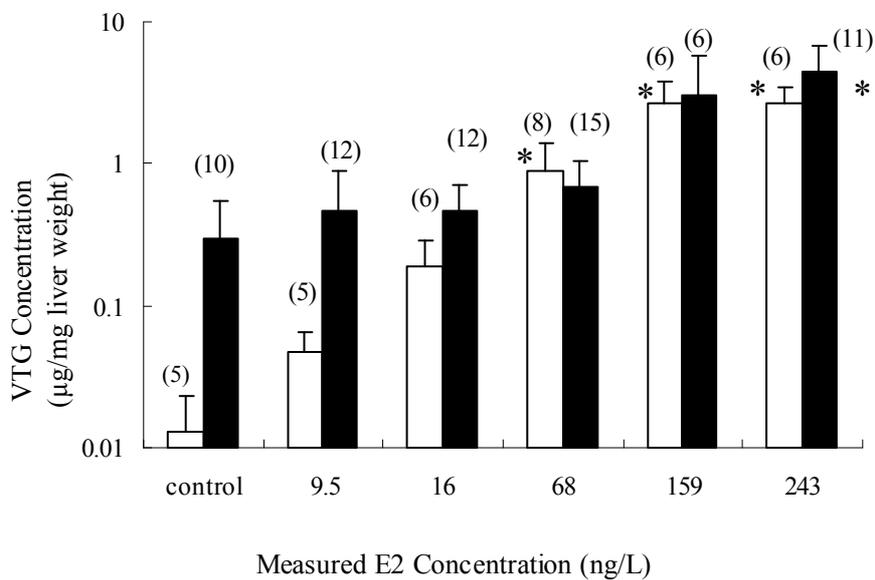
**Fig. 16** The fertility of Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

#### 2-3-4 ビテロゲニンに対する影響

肝臓抽出液中のタンパク濃度および肝臓重量を測定し、肝臓抽出液中タンパク量あたりの VTG 濃度、および肝臓重量あたりの VTG 濃度を求めた。雄の肝臓抽出液中タンパク量あたりの VTG 濃度は対照区が  $0.1 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、暴露区が  $0.5\text{-}21.3 \mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲であった。対照区と比較して、68 ng/L 区以上の暴露区のタンパク量あたりの VTG 濃度に有意な差が認められ、雄体内中で有意に誘導されている結果となった (Fig. 17)。雄の肝臓重量あたりの VTG 濃度は対照区が  $0.013 \pm 0.009 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、暴露区が  $0.026\text{-}2.7 \mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲であった。対照区と比較して、68 ng/L 区以上の暴露区の肝臓重量あたりの VTG 濃度に有意な増加が認められた (Fig. 18)。また、雌の場合も同様に測定した結果、雌のタンパク量あたりの VTG 濃度および肝臓重量あたりの VTG 濃度ともに、対照区と比較して 243 ng/L 区で有意な増加を示した。



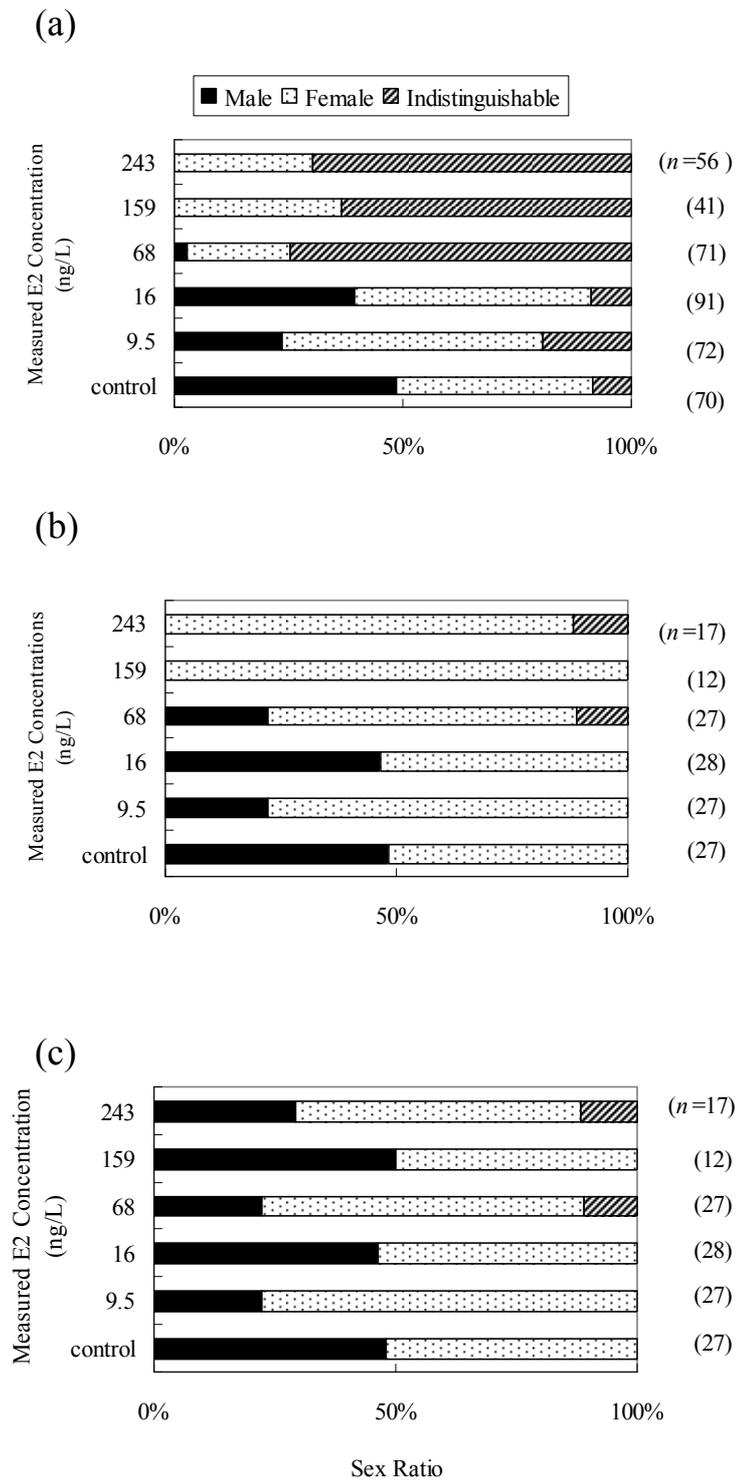
**Fig. 17** The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per protein weight of Java medaka in control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



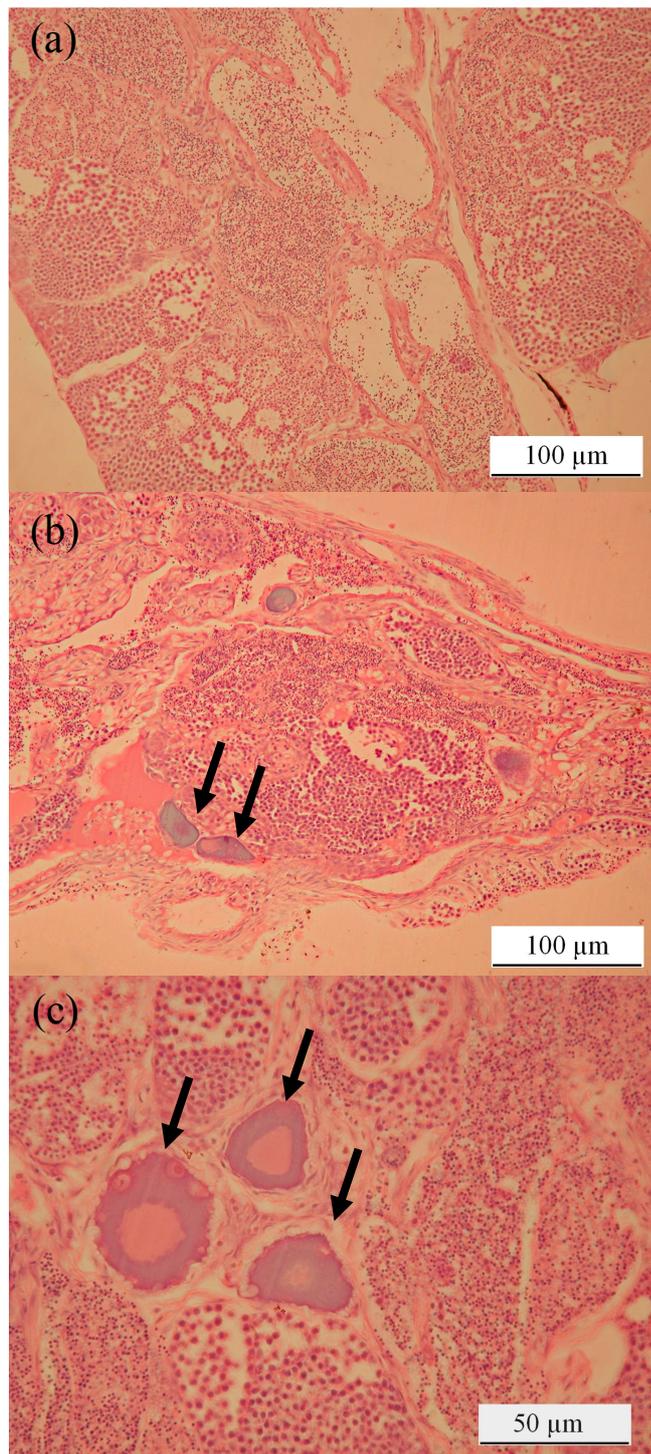
**Fig. 18** The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight of Java medaka in control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

### 2-3-5 生殖腺組織および二次性徴に対する影響

孵化後 138 日令の時点で、背鰭や臀鰭の形状、臀鰭軟条の分岐および軟条の乳頭状小突起などの外部形態から雌雄の判別を行った。これらの外部形態を観察した結果、159 ng/L 区および 243 ng/L 区には雄と判別できた個体はおらず、雌および性別不明（二次性徴のはっきりしない）個体しか認められなかった。しかし、生殖腺組織標本を作製し観察した結果、外部形態から雌と判別したが組織学的には雄である個体が 159 ng/L で 50%（12 尾中 6 尾）、243 ng/L 区で 29%（17 尾中 5 尾）認められた（Fig. 19）。また、これらの暴露区からは精巢中に卵細胞を有する精巢卵の個体が認められ、159 ng/L 区では 34%（6 尾中 2 尾）、243 ng/L 区では 60%（5 尾中 3 尾）であった（Fig. 20）。



**Fig. 19** Sex ratio of Java medaka at 89 days after hatching (a) and 183 days after hatching by secondary sexual characteristics (b) and at 183 days after hatching by histological observation (c).



**Fig. 20** Histological observation of gonads in the control (a) and 243 ng/L treatment groups (b and c). Arrows indicate oocytes.

## 2-4 考察

本実験では、E2 フルライフサイクル試験によるジャワメダカへの慢性影響を明らかにすることを目的とした。その結果、187 日令における体重は 9.5 ng/L 区以上の暴露区で、全長は 16 ng/L 区以上の暴露区で有意な低下を示した。これまで、成魚の短期暴露で成長阻害が引き起こされたという報告はほとんどない。しかし長期暴露の場合、ヒメダカを胚から成熟段階までオクチルフェノール (OP) 50 µg/L で暴露した結果、対照区と比較して体重および全長が有意に減少したという報告 (Knörr and Braunbeck, 2002) や、rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) を胚から若魚まで 1 年間 NP 1 µg/L で暴露した結果、体重が減少したという報告 (Ackermann et al., 2002) がある。本実験のように胚から成魚期までの長期暴露を行うと、短期暴露の場合と比べて、成長阻害が起こる可能性が高くなることが考えられる。

暴露区の産卵数は、対照区と比較して 68 ng/L 区で有意に増加したが、159 ng/L 区および 243 ng/L 区では顕著に低下した。メダカを 27.3 ng/L の E2 にフルライフ暴露した場合 (Seki et al., 2003)、成魚を 463 ng/L の E2 に 21 日間暴露した場合 (Kang et al., 2002)、成魚を 817 ng/L の E2 に 14 日間暴露した場合 (Shioda and Wakabayashi, 2000)、1660 ng/L の E2 に暴露した場合 (Nimrod and Benson, 1998) にも本実験同様に、産卵数が低下したと報告されている。さらには、fathead minnow の場合も、成魚を 105 ng/L の E2 に 19 日間場合、産卵数が低下したと報告されている (Kramer et al., 1998)。他の文献値よりもかなり低い Seki et al. (2002) が報告した影響濃度を除け

ば、ジャワメダカに対して産卵阻害が引き起こされた影響濃度は、メダカの場合よりも低い結果となった。本実験の結果は、比較的高い E2 濃度では魚類の産卵を阻害するというこれまでの研究と一致するものであった。

本実験における 68 ng/L 区に着目してみると、対照区と比較して受精率は有意に低下したが、産卵数は有意に増加していた。産卵数は雌に対する影響を見る項目であるが、受精率は雌雄双方に対する評価項目である。この濃度区の雌の卵巣組織を観察したところ、組織学的に異常な個体は認められなかった。しかしながら、二次性徴によって雌雄判別を行った結果、半数以上が二次性徴だけでは性別の判定ができない性別不明個体であった。Arcand-hoy and Benson (1998) は、雄の二次性徴の発達にはアンドロゲンが重要であると報告しており、本実験の 68 ng/L 以下の暴露区では、雄ジャワメダカに対してアンドロゲン阻害影響が見られたと考えられる。これらの結果から、アンドロゲンが関与する雄の精子形成にも影響した結果、受精率が低下したことが示唆される。

また、本実験において、E2 濃度の増加するにつれて HSI が増加した。243 ng/L 区の HSI は対照区と比較して有意な増加を示した。rainbow trout を人工エストロゲンである ethinylestradiol 10 ng/L に暴露した場合 (Verslycke et al., 2002)、メダカを NP 50 µg/L に暴露した場合 (田畑ら, 2003) にも本実験同様に HSI が増加したと報告されている。これらの結果から、E2 およびエストロゲン様物質暴露によって肝臓における VTG の生成が促進され、肝臓重量の増加が引き起こされたのではないかと考えられる。

メダカ成魚を 55.7 ng/L で E2 暴露した場合 (Kang et al., 2002)、fathead minnow を初期生活段階に 30 日間 50 ng/L で E2 暴露した場合 (Tyler et al., 1999) に、雄中で VTG が有意に誘導されることが報告されている。本実験においても 68 ng/L 以上の暴露区で VTG が有意に誘導されており、E2 暴露による VTG 誘導に関してこれらと同様の感受性であることが示唆される。

前述のように、東京湾海域から E2 は最大で 23.7 ng/L 検出されている。本実験の結果、受精に対する E2 の LOEC は 16 ng/L であり、NOEC は 9.5 ng/L であった。環境中で検出されるような E2 濃度で成長阻害や受精率の低下が引き起こされたことから、これらの海域に生息しているジャワメダカよりもエストロゲンに対する感受性の高い魚種に対して E2 が内分泌攪乱作用を引き起こす可能性が示唆される。

## 第3章 ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の生殖能に及ぼす

### estrone フルライフサイクル暴露の影響

#### 3-1 緒言

東京湾域からは、E1 が 0.7-105.6 ng/L の範囲で検出されており、これらの海域に生息する魚からは精巣卵が観察されたと報告されている (和波ら, 2003, 2004)。さらに、雄の grey mullet (*Mugil cephalus*) からは高い VTG 濃度も検出されている。これらの研究では、下水処理場からの排水中に含まれている E2 や E1 が東京湾の魚類に対して内分泌攪乱作用を引き起こしていると示唆している。同様に、東京湾で捕獲した雄の flounders (*Platichthys flesus*) から高い VTG 濃度が検出され、精巣卵が認められたと報告されている (Hashimoto et al., 2000)。

前章ではジャワメダカに対する E2 暴露の影響を検討した。E2 暴露の際と同様に、海産魚に対する内分泌攪乱の報告は少なく、そのなかでも特にフルライフサイクル試験の報告はほとんどない。そこで本実験では、ジャワメダカを用いて E1 のフルライフサイクル試験を行い、E1 が海産魚に対してどのような影響をおよぼすのか明らかにすることを目的とした。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 試験魚

E2 暴露同様、鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センターで継代飼育しているジャワメダカ (*O. javanicus*) を用いて試験を行った。試験魚の詳細に関しては第2章 (2-2-1 試験魚, p.7) を参照。

### 3-2-2 試験物質

試験物質には、E1 (純度>98.0%, 和光純薬工業株式会社) を用いた。E1の溶解方法は以下の通りである。

- (1) HPLC 用メタノール (和光純薬工業株式会社) を溶媒とし、100 mg/L 溶液を作製した。
- (2) 100 mg/L メタノール溶液を中間原液とし、設定濃度になるように各濃度区の海水に添加した。試験水中のメタノール濃度は、OECD ガイドラインで定められている溶解助剤濃度の許容値 100  $\mu$ L/L を越えなかった。

### 3-2-3 Estrone フルライフサイクル暴露の方法

東京湾において E1 は 0.0-153.0 ng/L の範囲で検出されたと報告されている (和波ら, 2004)。このことから、暴露に用いる E1 低濃度区を 50 ng/L および 170 ng/L に設定した。また、ポジティブコントロールとして 1700 ng/L および 5000 ng/L を設定した。複数の親魚から採卵し、その受精卵をひとまとめにプールした後、ランダムに各濃度区のシャーレーに収容した。E1 濃度 50, 170, 500, 1700 および 5000 ng/L 区を設定し、5 つのガラスシャーレー (直径 45 mm, 深さ 15 mm) にそれぞれ 25 個前後の受精卵 (計 128-132 個) を収容して暴露試験を行った。対照区 (E1 を含まない清浄海水) および溶媒対照区 (50  $\mu$ L/L メタノールを含む海水) は、それぞれ 25 個前後の受精卵 (計 132 および 128 個) を 5 つのガラスシャーレー (直径 45 mm, 深さ 15 mm) に収容して試験を行った。すべてのガラスシャーレーは 26  $^{\circ}$ C に設定したインキュベーター内に収容し、暴露海水は毎日調製して全量換水を行った。暴露開始後、孵化数を計測し孵化率を算出した。

暴露開始後、魚体サイズが大きくなるにつれて、100 mL, 300 mL および 2.5 L のガラスビーカーに替えて暴露を継続し、最終的にはガラス水槽 (23 cm  $\times$  44 cm  $\times$  30 cm, 水容量 10 L) で成熟するまで飼育を行った。成熟後、対照区の産卵が安定した後、産卵に関するデータ (産卵数、成熟卵数、受精卵数および受精率) を求めるために、2.5 L ガラスビーカー (水容量 2 L) に雄 2 尾および雌 4 尾を収容し、暴露を継続した。

### 3-2-4 試験水中の estrone 濃度分析および水質測定

E1 濃度の測定を行うため、エムポアディスクを用いて試験水中の E1 を固相抽出した。抽出手順は以下の通りに行った。

- (1) 直径 47 mm のエムポアディスク（住友 3M, SDB-XC）を吸引濾過装置に装着し、メタノール 10 mL および超純水 10 mL をディスクに通水してコンディショニングを行った。
  - (2) その後、飼育水 300-500 mL を通水して E1 を固相抽出し、10 mL の超純水でディスクを洗浄した。
  - (3) 洗浄後、10 分間吸引を続けてディスクを乾燥させ、メタノール 10 mL で E1 を溶出させた。
  - (4) 溶出させたメタノールは試験管で採取し、E1 ELISA キット（日本エンバイロケミカルズ株式会社）を用いて E1 濃度の測定を行った。
- なお、測定手順は付属マニュアルに従った。

また、暴露期間中の水温、DO、pH および塩分濃度を測定した。測定に使用した機器類は第 2 章（2-2-4 試験水中の 17 $\beta$ -estradiol 濃度分析および水質測定, p12）を参照。

### 3-2-5 肝臓および生殖腺の採取方法

暴露終了後、500  $\mu\text{L/L}$  のフェノキシエタノール（和光純薬工業株式会社）で麻酔した。体重および全長を測定後、開腹して肝臓を摘出し肝臓重量を測定した。摘出した肝臓にタンパク分解酵素阻害剤（Table 2）0.5 mL を添加し、ハンドホモジナイザーを用いて細かく粉砕した。粉砕後、遠心分離（10000  $\times$  g, 10 分間, 4  $^{\circ}\text{C}$ ）して得られた上清を VTG 測定試料とし、測定まで -80  $^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。肝臓摘出後の魚体は 10 %ホルマリンで固定し、後に生殖腺を測定して生殖腺重量を測定した。また、HSI および GSI を算出した。HSI および GSI の算出方法は第 2 章（2-2-5 肝臓および生殖腺の採取方法, p.13）を参照。

### 3-2-6 肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定

肝臓抽出液中の VTG 濃度は、酵素免疫測定法（ELISA）により測定し、肝臓重量あたりおよび肝臓抽出液中のタンパク重量あたりの濃度として表した。ELISA の手順は第 2 章（2-2-6 肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定， p.14）を参照。

### 3-2-7 肝臓抽出液中のタンパクの定量

DC Protein Assay（Bio-Rad）を用いてタンパクの定量を行った。タンパクの定量を行う際のスタンダードには BSA を用い、段階的に希釈を行って標準曲線を求めた。また、ビテロゲニン測定時のサンプルは TBS-BSA-T で希釈を行ったものを用いたが、これらにはタンパク質（BSA）が含まれているため、タンパクの定量を行う際のサンプルには希釈を行う前の肝臓抽出液を用いた。なお、タンパク定量の手順は、付属のマニュアルに従って行った。

### 3-2-8 生殖腺組織標本の作製方法

暴露終了後にホルマリン固定した魚体から生殖腺を摘出した。生殖腺重量を測定した後に生殖腺を脱水し、Technovit 7100 を用いて包埋した。包埋後、ミクロトームを用いて試料を薄切し、HE 染色を施して光学顕微鏡下で観察を行った。Technovit 7100 による包埋の手順は第 2 章（2-2-8 生殖腺組織標本の作製方法， p.20）を参照。

### 3-2-9 Estrone 暴露における影響評価項目および評価方法

内分泌攪乱作用を評価するにあたって、各々の影響評価項目の評価方法について以下の通りに行った。

#### 3-2-9-1 成長および生残に対する影響評価方法

成長および生残に対する影響評価項目として、孵化率、孵化日数、全長、体重、HSI および GSI を算出した。

(1) 孵化率：暴露を開始後、孵化数を計測し各々のシャーレーごとに孵化率を算出した。孵化率の算出方法は、第2章(2-2-9-1 成長および生残に対する影響評価方法, p24)を参照。

(2) 孵化日数：暴露開始から孵化に要するまでの日数を計測し、各々のシャーレーごとに平均孵化日数を算出した。

(3) 全長および体重：暴露終了後、全長および体重を測定し、各々濃度区ごとに平均全長および平均体重を算出した。

(4) 肝量指数 (Hepato somatic index; HSI) および生殖腺指数 (Gonadosomatic index; GSI)：暴露終了後、肝臓重量および生殖腺重量を計測し、HSI および GSI を算出した。HSI および GSI の算出方法は、第2章(2-2-9-1 成長および生残に対する影響評価方法, p24)を参照。

### 3-2-9-2 再生産に対する影響評価方法

産卵によって得られた卵は、受精卵、未受精卵および未成熟卵の3つに分けて各々の数を計測し、再生産に対する影響評価項目として、産卵数、成熟卵数、受精卵数および受精率を算出した。

(1) 産卵数：受精卵、未受精卵および未成熟卵の総計とし、雌1尾あたりの産卵数を算出した。

(2) 成熟卵数：受精卵と未受精卵の総計とし、雌1尾あたりの成熟卵数を算出した。

(3) 受精卵数：雌1尾あたりの受精卵数を算出した。

(4) 受精率：産卵数と受精卵数から受精率を算出した。算出方法は、第2章(2-2-9-2 再生産に対する影響評価方法, p26)を参照。

### 3-2-9-3 ビテロゲニン (VTG) 誘導に対する影響評価方法

暴露終了後に魚体から肝臓を摘出し、肝臓ホモジネートの上清を用いて VTG 濃度を測定した。

(1) 肝臓重量あたりの VTG 量：肝臓摘出時に肝臓重量を測定し、肝臓重量あたりの VTG 量を算出した。

(2) タンパク量あたりの VTG 量：肝臓ホモジネートの上清を用いてタンパク濃度の測定を行い、タンパク量あたりの VTG 量を算出した。

### 2-2-9-4 生殖腺組織および二次性徴に対する影響評価方法

暴露終了後に魚体から生殖腺を摘出し、生殖腺組織標本を作製して顕微鏡下で観察した。また、二次性徴から雌雄の判別を行い、生殖腺組織から判別した雌雄との相違を比較した。

(1) 生殖腺組織の観察：生殖腺組織標本を顕微鏡下で観察し、精巣卵の有無を調べた。

(2) 二次性徴による性判別：前述（第2章，2-2-1 試験魚，p7）の二次性徴により、雌雄の判別を行った。生殖腺組織から判別した雌雄との比較を行い、二次性徴の発現に対する影響について検討した。

### 3-2-10 統計学的解析

得られたデータはすべて平均値±標準偏差で示した。対照区および暴露区の等分散性を検定し、ANOVA で解析を行った。等分散の場合は Dunnett t 検定、等分散でない場合は Dunnett T3 および Dunnett C 検定により、対照区と暴露区とで平均値の有意差検定を行った。すべての検定において、有意水準は 0.05 とした。統計学的解析は統計ソフト (SPSS) を用いて行った。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 飼育水の水質および estrone 実測濃度

E1 暴露期間における飼育水の平均水温は  $26.2 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 、DO は  $7.08 \pm 0.71$  mg/L、塩分濃度は  $33.9 \pm 0.3\text{‰}$ 、pH は  $7.32 \pm 0.50$  であった。

E1 濃度を E1 ELISA キットで測定した結果、対照区は ND (<5 ng/L)、溶剤対照区は ND、50 ng/L 区は  $38.6 \pm 14.1$  (以下 39 ng/L 区)、170 ng/L 区は  $198 \pm 26$  (以下 198 ng/L 区)、500 ng/L 区は  $484 \pm 112$  ng/L (以下 484 ng/L 区)、1700 ng/L 区は  $1188 \pm 424$  ng/L (以下 1190 ng/L 区)、5000 ng/L 区は  $3701 \pm 1262$  ng/L (以下 3700 ng/L 区) であった (Table 10)。以下、結果を述べるときには、設定濃度ではなく実測濃度で示した。

**Table 10. Concentrations of estrone (E1) in test waters (n=5)**

Nominal E1 Concentrations (ng/L)	Measured E1 Concentrations <sup>1</sup>		
	0 h	24 h	0-24 h <sup>2</sup>
control	ND <sup>3</sup>	ND	ND
solvent	ND	ND	ND
50	$49 \pm 7$	$27 \pm 10$	$39 \pm 14$
170	$218 \pm 14$	$174 \pm 16$	$198 \pm 26$
500	$578 \pm 42$	$372 \pm 20$	$484 \pm 112$
1700	$1588 \pm 43$	$787 \pm 39$	$1188 \pm 424$
5000	$4969 \pm 183$	$2534 \pm 377$	$3701 \pm 1261$

<sup>1</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

<sup>2</sup>The mean concentration at 0 and 24 h after preparation.

<sup>3</sup>Not detectable (ND) for ELISA < 5 ng/L.

### 3-3-2 成長および生残に対する影響

孵化率は対照区が  $93.4 \pm 5.0\%$ 、暴露区が  $72.7-87.6\%$  の範囲であった。対照区と比較して、暴露区の孵化率に統計学的有意差は認められなかった (Table 11)。また、孵化日数は対照区が  $15.6 \pm 2.2$  日、暴露区が  $14.9-17.6$  日であった。対照区と比較して、 $484 \text{ ng/L}$  区以上の暴露区の孵化日数に有意な遅延が認められた (Table 11)。なお、孵化率はシャーレー毎に平均値を算出し、孵化日数は孵化した稚魚 1 個体毎に算出した。

**Table 11. Hatching rate and time to hatching of embryos in the control and estrone (E1) exposure groups**

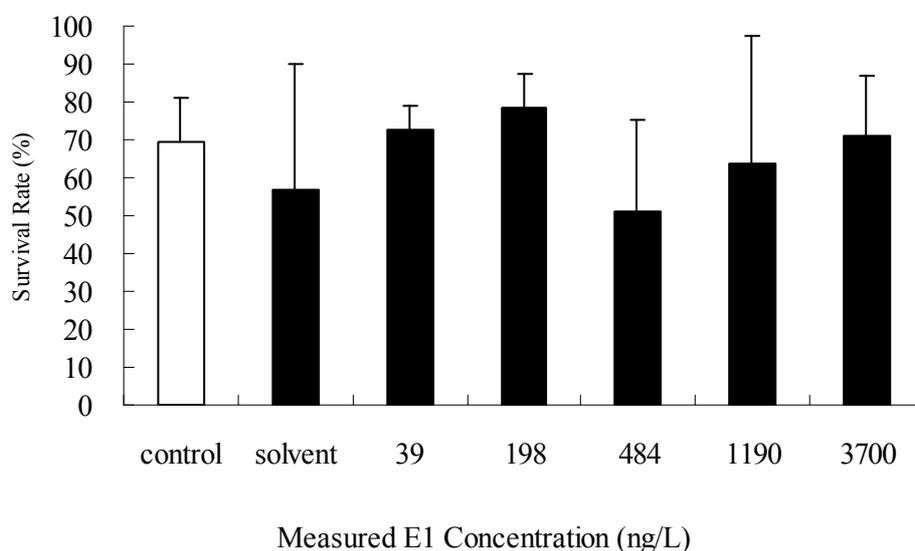
E1 Concentrations <sup>1</sup> (ng/L)	Hatching Rate <sup>2</sup>		Time to Hatching <sup>2</sup>	
	(%)	<i>n</i>	(days)	<i>n</i>
control	$93.4 \pm 5.0$	5	$15.6 \pm 2.2$	121
solvent	$75.9 \pm 17.0$	5	$14.9 \pm 2.9$	104
39	$81.1 \pm 26.1$	5	$15.6 \pm 1.9$	95
198	$77.5 \pm 10.9$	5	$15.9 \pm 2.6$	100
484	$87.6 \pm 9.3$	5	$17.0 \pm 2.5^*$	110
1190	$82.1 \pm 5.1$	5	$17.4 \pm 2.3^*$	108
3700	$72.7 \pm 23.8$	5	$17.6 \pm 3.0^*$	96

<sup>1</sup>The mean concentration at 0 and 24 hours after preparation.

<sup>2</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

\*Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

孵化後 33 日令の生残率は、対照区と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 21)。



**Fig. 21** Survival rate of Java medaka in control and estrone exposure groups at 33 days after hatching. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

孵化後 243 日令における体重は対照区が  $0.274 \pm 0.051$  g、暴露区が  $0.217-0.282$  g であった。対照区と比較して、すべての暴露区の体重に有意な差は認められなかった (Table 12)。また、孵化後 243 日令における全長は対照区が  $32.3 \pm 3.2$  mm であり、暴露区が  $31.0-33.6$  mm の範囲であった。対照区と比較して、すべての暴露区的全長に有意な差は認められなかった (Table 12)。

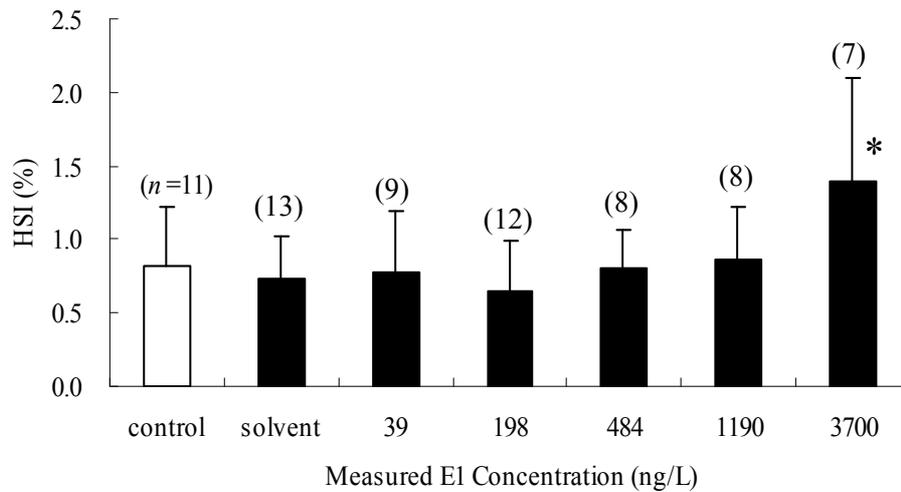
**Table 12. Total length and body weight of Java medaka in the control and estrone (E1) treatment groups at 243 days after hatching**

E1 Concentration <sup>1</sup> (ng/L)	<i>n</i>	Total Length <sup>2</sup> (mm)	Body Weight <sup>2</sup> (mg)
control	20	32.3 ± 3.2	274 ± 51
solvent	18	32.3 ± 2.3	256 ± 69
39	18	32.3 ± 1.7	254 ± 41
198	21	31.0 ± 2.1	217 ± 55
484	16	32.1 ± 1.8	255 ± 46
1190	16	33.6 ± 1.0	282 ± 38
3700	18	32.1 ± 1.7	246 ± 42

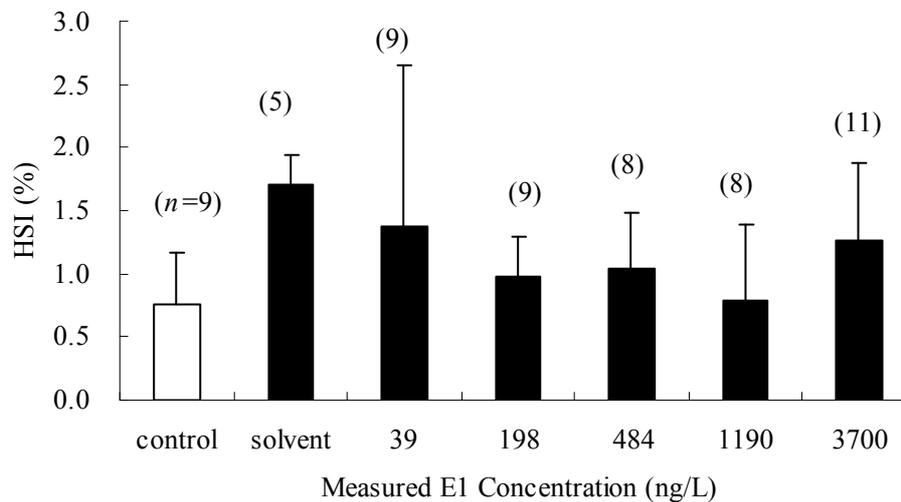
<sup>1</sup>The mean concentration at 0 and 24 h after preparation.

<sup>2</sup>Data are shown as mean ± standard deviation.

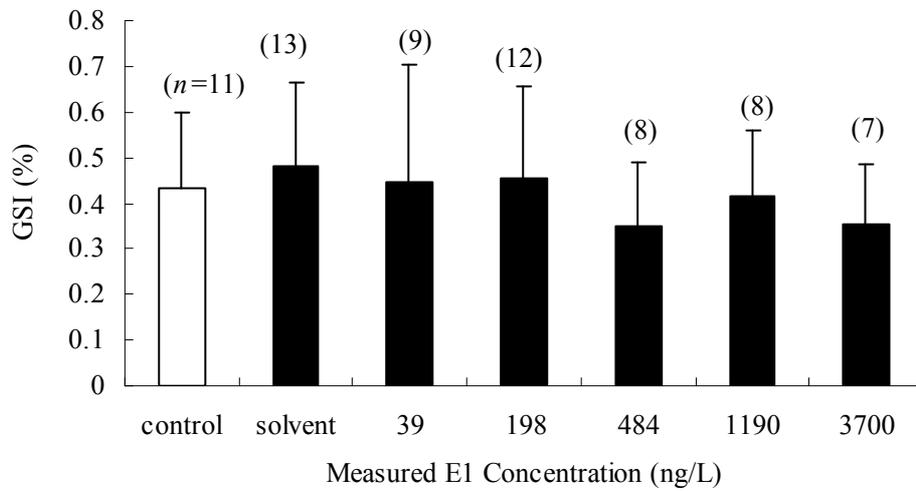
孵化後 243 日令における雄の HSI は対照区が  $0.8 \pm 0.4\%$  であり、暴露区が  $0.6-1.4\%$  の範囲であった。対照区と比較して、3700 ng/L 区の雄の HSI に有意な増加が認められた (Fig. 22)。孵化後 243 日令における雌の HSI は対照区が  $0.8 \pm 0.1\%$  であり、暴露区が  $0.8-1.7\%$  の範囲であった。対照区と比較して、すべての暴露区の雌の HSI に有意な差は認められなかった (Fig. 23)。また、孵化後 243 日令における雄の GSI は対照区が  $0.4 \pm 0.2\%$  であり、暴露区が  $0.3-0.5\%$  の範囲であった (Fig. 24)。孵化後 243 日令における雌の GSI は対照区が  $2.8 \pm 0.9\%$  であり、暴露区が  $2.5-3.9\%$  の範囲であった (Fig. 25)。多対照区と比較して雌雄ともに、すべての暴露区の GSI に有意な差は認められなかった。



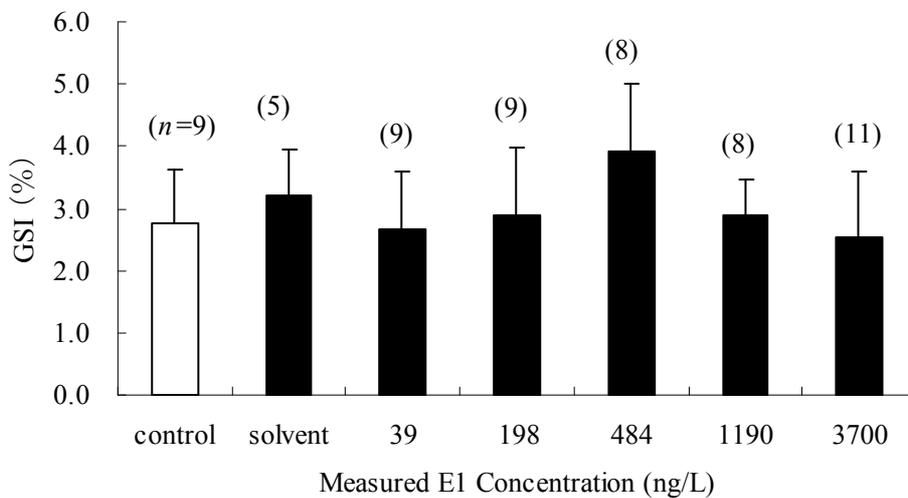
**Fig. 22** Hepatosomatic index (HSI) of male Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 23** Hepatosomatic index (HSI) of female Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



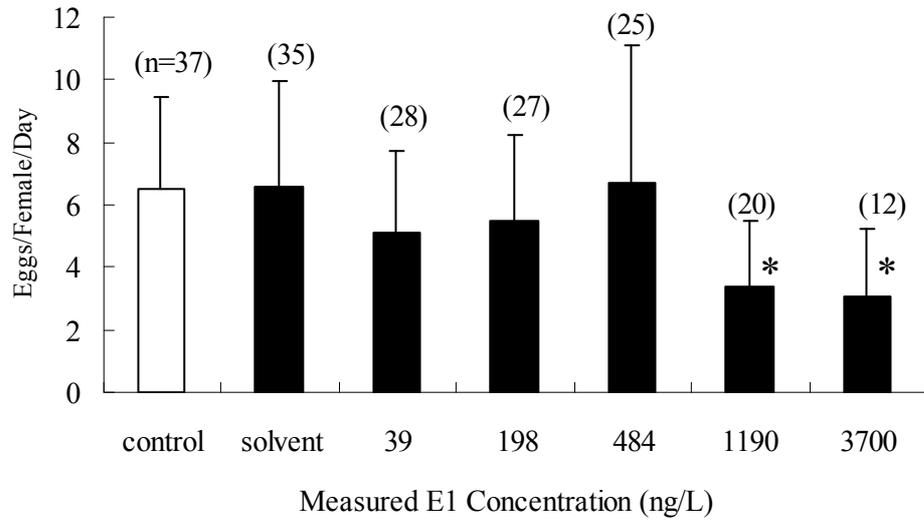
**Fig. 24** Gonadosomatic index (GSI) of male Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



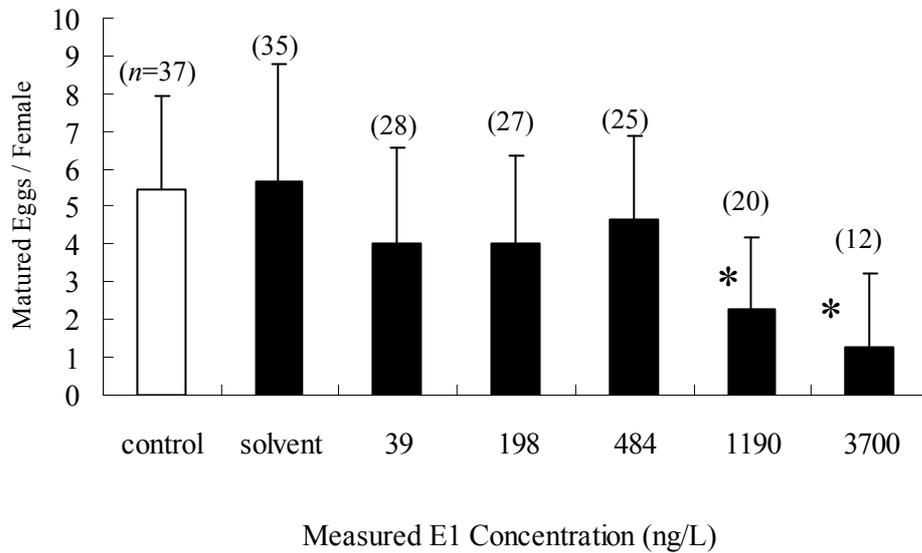
**Fig. 25** Gonadosomatic index (GSI) of female Java medaka at 243 days after hatching in the control and estrone exposure groups. The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

### 3-3-3 再生産に対する影響

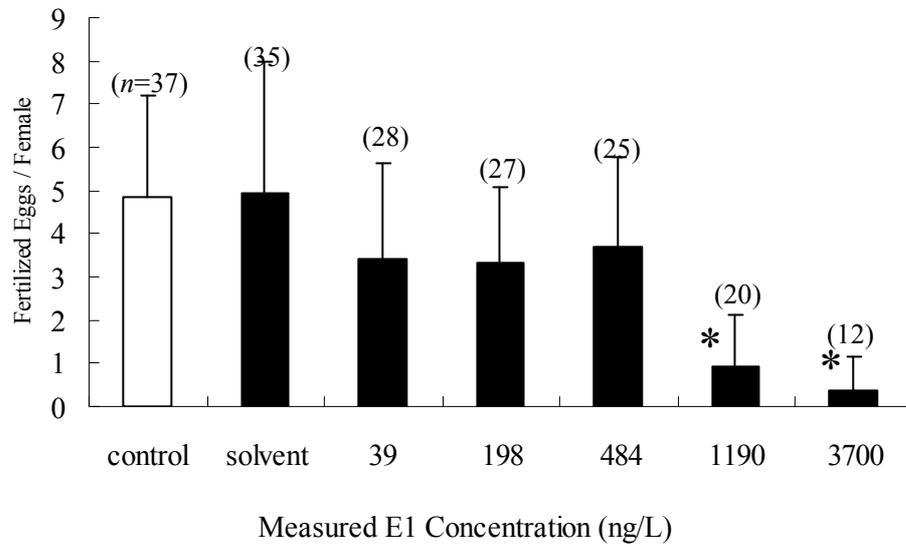
雌 1 尾あたりの産卵数は対照区が  $6.5 \pm 2.9$  個であった。対照区と比較して、暴露区の産卵数は 1190 ng/L 区で  $3.4 \pm 2.1$  個、3700 ng/L 区で  $3.1 \pm 2.2$  個と有意な低下を示した (Fig. 26)。雌 1 尾あたりの成熟卵数は対照区が  $5.5 \pm 2.5$  個であった。対照区と比較して暴露区の成熟卵数は 1190 ng/L 区で  $2.3 \pm 1.9$  個、3700 ng/L 区で  $1.3 \pm 2.0$  個と有意な低下を示した (Fig. 27)。雌 1 尾あたりの受精卵数は対照区が  $4.8 \pm 2.4$  個であった。対照区と比較して暴露区の受精卵数は 1190 ng/L 区で  $0.9 \pm 1.2$  個、3701 ng/L 区で  $0.4 \pm 0.8$  個と有意な低下を示した (Fig. 28)。受精率は対照区が  $74.8 \pm 19.4\%$  であり、対照区と比較して 1190 ng/L 区以上の暴露区で有意な低下を示した (Fig. 29)。



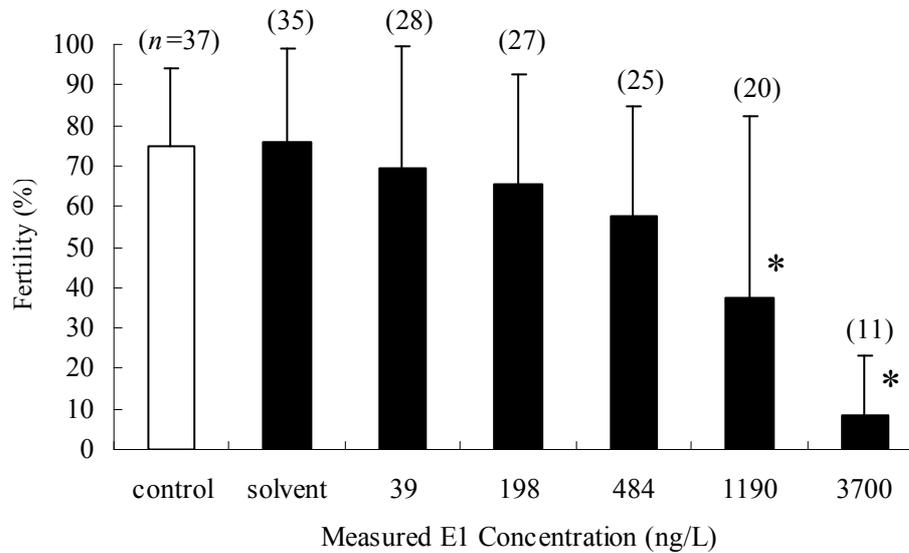
**Fig. 26** The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



**Fig. 27** The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



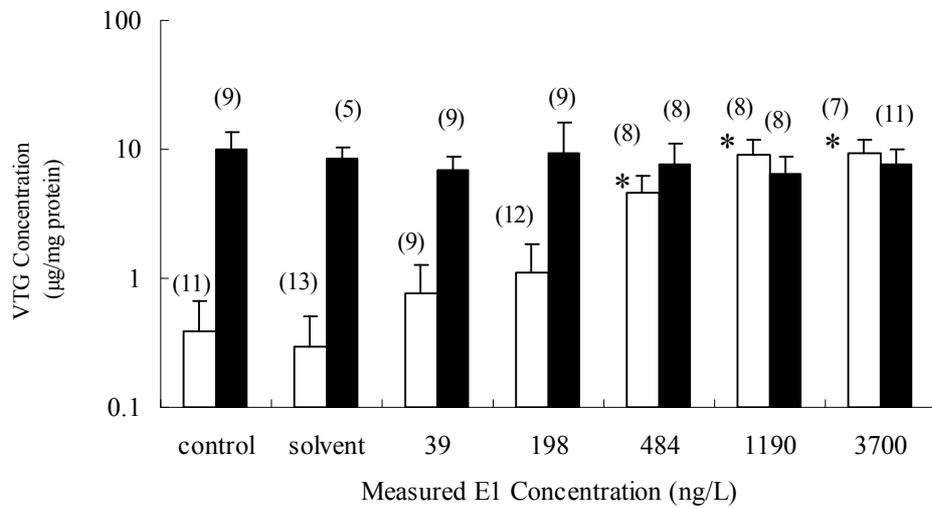
**Fig. 28** The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



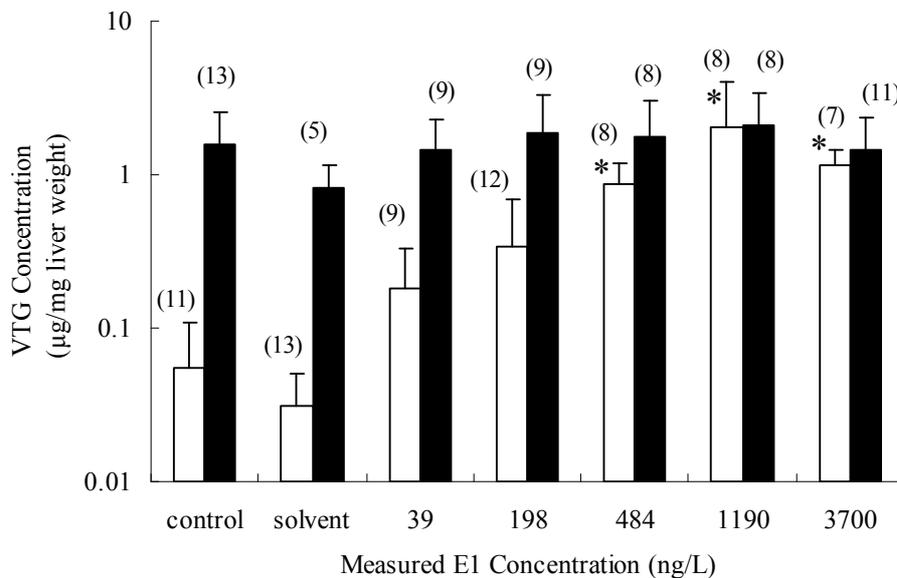
**Fig. 29** The number of eggs for Java medaka in the control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

### 3-3-4 ビテロゲニン誘導に対する影響

肝臓抽出液中のタンパク濃度および肝臓重量を測定し、肝臓抽出液中タンパク量あたりの VTG 濃度、および肝臓重量あたりの VTG 濃度を求めた。雄の肝臓抽出液中タンパク量あたりの VTG 濃度は対照区が  $0.4 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、暴露区が  $0.3\text{-}9.3 \mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲であった。対照区と比較して、484 ng/L 区以上の暴露区のタンパク量あたりの VTG 濃度に有意な増加が認められ、雄体内中で有意に誘導されている結果となった (Fig. 30)。雄の肝臓重量あたりの VTG 濃度は対照区が  $0.054 \pm 0.052 \mu\text{g}/\text{mg}$  であり、暴露区が  $0.031\text{-}2.06 \mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲であった。対照区と比較して 484 ng/L 区以上の暴露区の肝臓重量あたりの VTG 濃度に有意な増加が認められた (Fig. 31)。また、雌の場合も同様に測定した結果、雌のタンパク量あたりの VTG 濃度および肝臓重量あたりの VTG 濃度ともに、対照区と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 30 and 31)。



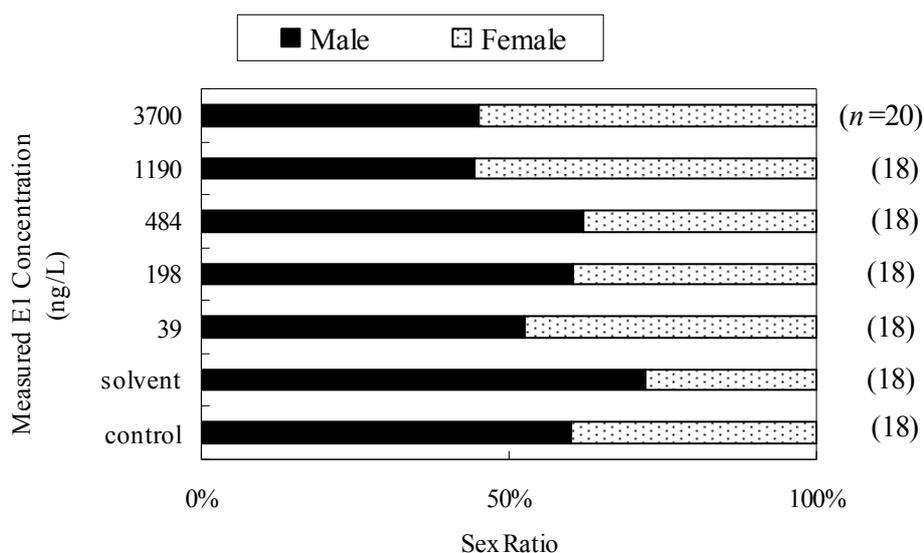
**Fig. 30** The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per protein weight of Java medaka in control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.



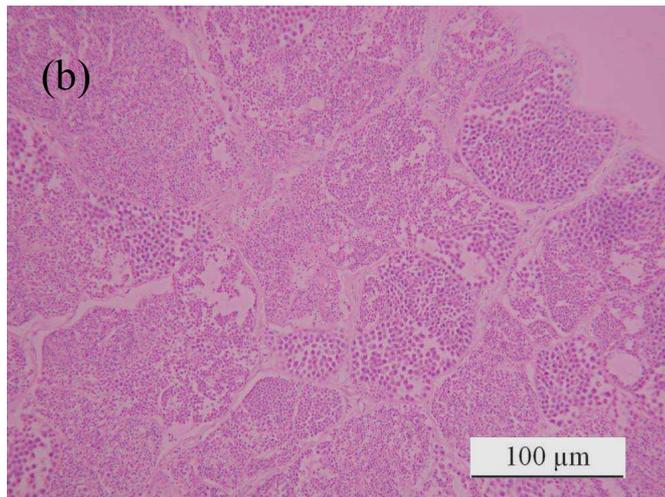
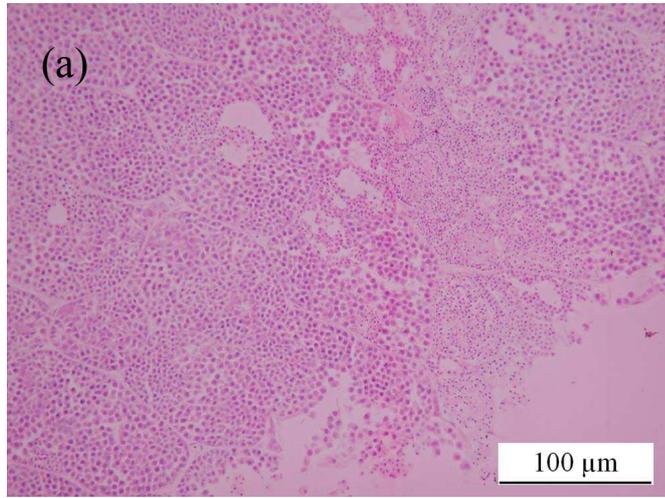
**Fig. 31** The hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight of Java medaka in control and estrone exposure groups. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard deviation.

### 3-3-5 生殖腺組織および二次性徴に対する影響

暴露終了時である孵化後 243 日令の時点で、二次性徴などの外部形態から雌雄の判別を行った。これらの外部形態を観察した結果、雄もしくは雌と判別ができ、性別不明（二次性徴のはっきりしない）個体は認められなかった (Fig. 32)。 また、生殖腺組織標本を作製し観察した結果、外部形態で判別した雌雄と組織学的な雌雄は、すべての個体で合致していた。さらに、精巣中に卵細胞を有する精巣卵の雄個体は、今 E1 暴露実験認められなかった (Fig. 33)。



**Fig. 32** Sex ratio of Java medaka at 243 days after hatching in control and estrone exposure groups.



**Fig. 33** Histological observation of gonads in the control (a) and 1190 ng/L treatment groups (b).

### 3-4 考察

ジャワメダカを用いて E1 フルライフサイクル試験を行った結果、対照区と比較して 1190 ng/L 区および 3700 ng/L 区では、トータルの受精卵数が少なかった。3700 ng/L 区においては、産卵数の顕著な低下が引き起こされており、再生産の低下が認められた。前述の E2 フルライフサイクル試験においても、159 ng/L 区以上で顕著な産卵数の低下が認められており、E2 同様に、E1 暴露が産卵を阻害することにより、メスに対して悪影響を及ぼしていることが示唆される。

3700 ng/L 区の雄の HSI は、対照区と比較して有意な増加を示しており、E2 暴露と同様に、E1 暴露により VTG が生成され肝臓重量が増加したと考えられる。

また、E2 暴露では暴露区で精巣卵が観察されたが、本実験の E1 暴露では最高濃度区の 3700 ng/L 区でも観察されなかった。

本実験では、484 ng/L 区で肝臓重量あたり 862 ng/mg の VTG が誘導された。E2 暴露でほぼ同量の VTG が誘導されたのは 68 ng/L 区であり、897 ng/mg であった。Panter et al. (1998) は 992.7 ng/L の E1 試験水と 100 ng/L の E2 試験水に暴露した fathead minnow の VTG 濃度がほぼ同等であったと報告している。VTG 誘導に対するエストロゲン活性は、ジャワメダカの場合 E2 は E1 の 7.1 倍 (484/68) 高く、fathead minnow の場合 E2 は E1 の 9.9 倍 (992.7/100) 高いということになる。酵母を用いてエストロゲン活性を測定した結果、E2 は E1 の 7.1 倍高いと報告されており (Metcalfé et al., 2001)、

本実験の結果とほぼ同等のエストロゲン活性を示している。これらの結果から、E2はE1の約8倍程度のエストロゲン活性を有していることが示唆される。

東京湾からは、E1が最大105.6 ng/L 検出されている。E1 暴露の VTG 誘導に対する LOEC は 484 ng/L であることから、環境中の E1 では海産魚に対して影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。しかしながら、同海域から E2 は最大で 21.2 ng/L 検出されており、これらは E2 フルライフサイクル試験で受精率低下を引き起こした濃度よりも高い濃度である。環境中で検出されるような E1 濃度のみでは海産魚に対して影響を及ぼす可能性は低いかもしれないが、環境中では E1 が単独で検出されているわけではなく、同時に E2 や他のエストロゲン様物質も検出されている。このことから、E1 および E2 あるいはその他のエストロゲン様物質が共存している環境中では、様々な物質の複合影響を評価する必要があると考えられる。また、これらの物質に複合的に暴露されるとき、相加的あるいは相乗的に影響するのかどうか検討することも重要であると考えられる。

## 第4章 ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の精子運動能に及ぼす

### 17 $\beta$ -estradiol パーシャルライフサイクル暴露の影響

#### 4-1 緒言

本研究の E2 フルライフサイクル試験において、産卵数は 68 ng/L 区で有意に増加、159 ng/L 区以上の暴露区で有意に低下し、受精率は 16 ng/L 区以上の暴露区で有意に低下した。68 ng/L 区に関して産卵数と受精率の結果を合わせてみると、産卵数は増加しているのにも関わらず、受精率は低下していた。産卵数は雌に及ぼす影響を評価する項目であり、受精率は雌雄双方に及ぼす影響を評価する項目である。E2 暴露の結果から、68 ng/L 区では雌に対して E2 が悪影響を及ぼさず、むしろ産卵を促進させていたということが言える。68 ng/L 区以上の 159 ng/L 区および 243 ng/L 区では産卵数が低下したため、E2 が高濃度になれば雌に対して悪影響を及ぼすのではないかと考えられる。68 ng/L 区では E2 が雌に対して悪影響を及ぼしていないとすると、この濃度区あるいはそれ以下の濃度区で受精率が低下した要因は雄の方にあると考えられる。

合成エストロゲンである DES は流産抑制目的で、1960-1970 年代にヒトに対して使用された結果、胎児に影響を及ぼしたと報告されている (Newbold et al., 1984; Colborn et al., 1993)。その DES を新生仔期のマウスに 5 日間皮下投与し、3 ヶ月後測定をした結果、DES 投与群において精子数、精子運動能、精巣相対重量が対照区と比較して有意に低下したと報告

されている（足立ら，2001）。また、BPA 投与群においても精子数、精子運動能が有意に低下した。哺乳類において、精巣が化学物質の影響を受けやすい器官のひとつであることが知られている。特に胎生期あるいは新生期に化学物質暴露が起こると、精巣成熟の遅延や精子形成の阻害を引き起こすことが認められてきた。またヒトの場合、精巣や精子に対する内分泌攪乱物質を含めた毒性を判定する方法として、精巣重量、精巣組織像、精子数、精子運動率および奇形率などが評価の基準となっている。

近年では、化学物質が魚類の精子形成に影響を及ぼすことが指摘されており（Gimeno et al., 1998; McAllister and Kime, 2003; Kinnberg and Toft, 2003; Christensen et al., 2004 ; Miura et al., 2005）、E2 フルライフサイクル試験で受精率が低下した要因として、E2 暴露による精巣および精子への影響が考えられる。魚類も哺乳類の報告と同様に、E2 あるいはエストロゲン様物質によって精巣および精子に影響を受け、結果的に受精率低下を引き起こしたのではないかと考えられた。これらのことから、E2 が魚類の精巣へ影響を及ぼしたと仮定して、E2 暴露が精子運動能に及ぼす影響を明らかにし、精子運動能が受精率低下の要因のひとつであるか明らかにすることを本実験の目的とした。

## 4-2 精子運動能測定方法の予備検討

これまで魚類の種苗生産に関わる研究として、精子の冷凍保存技術や運動開始要因、運動に及ぼす環境要因などが報告されてきた（野村, 1964; 高野ら, 1973; 広井ら, 1973; 辻ら, 2000; 井塚, 2003; 藤浪ら, 2003）。それらはサケ (*Oncorhynchus keta*)、マス (*Salmo gairdneri*)、アユ (*Plecoglossus altiveris altiveris*)、ワカサギ (*Hypomesus nipponensis*) およびメダカ (*O. latipes*) などの淡水魚に関する知見がほとんどである。海産魚に関する知見としては、クロダイ (*Acanthopagrus schlegeli*) 精液の液状保存や (栩野, 1988) 若狭湾で漁獲されたアカアマダイ (*Branchiostegus japonicus*) の精子の運動活性 (藤浪ら, 2003a,b) などが報告されている。また、魚類の精子運動能を測定した研究がわずかに報告されているが、ほとんどが淡水魚に関するものである (Schoenfuss et al., 2002; Kawana et al., 2003; Hara et al., 2007)。E2 暴露によるジャワメダカ (*O. javanicus*) の精子運動能への影響を評価するに際して、まずは精子運動能の測定方法を検討する必要がある。そこで、他魚種の測定方法をもとにジャワメダカの精子運動能の測定方法を検討した。

#### 4-2-1 精子採取方法の検討

ヒメダカの場合 (Kawana et al., 2003; Hara et al., 2007)、麻酔後にメダカの腹部を圧迫して精子を得る搾出法が用いられている。ジャワメダカもメダカ同様に搾出法による精子の採取ができるかどうかを検討した。継代飼育している雄のジャワメダカを 500  $\mu\text{L/L}$  のフェノキシエタノールで麻酔し、腹部を圧迫して精子が採取できるかどうか試みた。

また、アカアマダイの報告 (藤浪ら, 2003) で用いられているように、精巣を切断して精子を採取する方法も検討した。搾出法の場合と同様に、継代飼育している雄のジャワメダカを 500  $\mu\text{L/L}$  のフェノキシエタノールで麻酔し、開腹後精巣を摘出した。摘出後、精巣を解剖用ハサミで切断し、切断面から滲出した精子をスライドグラス上にのせた。ヒメダカと同様の測定用精子希釈液 (Table 10) をスライドグラス上の精子に添加し、光学顕微鏡下で精子の運動を観察した。

検討の結果、ジャワメダカの腹部を圧迫し、搾出法による精子の採取を試みたが、精子を得ることはできなかった。過度な圧迫による長時間の採取行為は魚自体や精子へのダメージにもつながるため、搾出法以外の精子採取法を行う方が良いと考えられる。

また、精巣を摘出して解剖用ハサミで切断した結果、切断面から白色の液体が滲出した。スライドグラス上でこの滲出した液体とヒメダカ測定用精子希釈液を混合し、光学顕微鏡下で観察したところ、運動する精子を確認することができた。

これらの結果から、精巣を切断してその切断面から精子を採取する方法を用いることとした。

#### 4-2-2 精子運動能測定方法の検討

継代飼育している雄のジャワメダカを 500  $\mu\text{L/L}$  フェノキシエタノールで麻酔し、体重および全長の測定を行った。開腹して精巣を摘出し、生殖腺重量を測定した。摘出した精巣を解剖用ハサミで切断し、切断面から滲出した精液を前述のヒメダカ測定用精子希釈液とスライドグラス上で混合した。光学顕微鏡に接続しているデジタルカメラを経由して、ビデオカメラ (DCR-PC300, SONY) で運動能解析用にテープ録画を行った。ジャワメダカを開腹した時点から時間を計測し、それぞれの作業を行った際の経過時間を記録した。

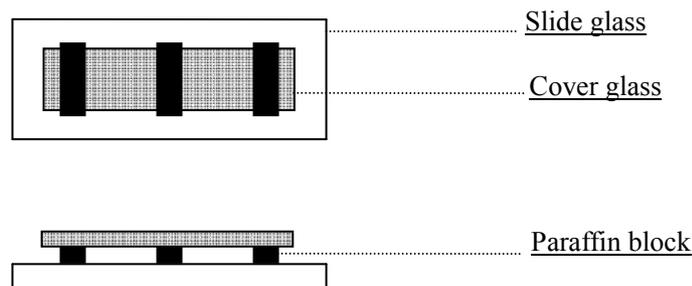
光学顕微鏡下で観察した結果、運動している精子を確認することができた。精子が遊泳している層が厚かったため、対物レンズに対して上下左右の運動だけではなく、手前から奥への運動が生じてしまった。そのため、対物レンズの倍率が 4 倍あるいは 10 倍の場合、運動している精子を認識してピントを合わせるまでかなりの時間を要し、動いている状態があまり観察できなかった。観察時間が経過するとともに精子の運動量はだんだん減少し、最終的には運動しなくなった。しかしながら、スライドグラス上にのせた時点から 5 分が経過しても、ほとんどの精子は運動量ゼロにはなっておらず、わずかながら運動していた。10 分以上が経過しても観察開始時のように運動している精子がいたが、ほとんどの精子はごくわずかの運動をしているもの、または運動をしていないものであった。これらのことから、解剖して生殖腺を摘出してからの経過時間を記録し、ビデオカメラ

で記録するまでの時間を統一させる必要があると考えられた。

#### 4-2-3 精子運動能測定用スライドガラスの検討

スライドガラスに精子と測定用希釈液の混合溶液をのせて検鏡すると、遊泳層が厚くなってしまうため、上下左右の運動に加えて手前から奥への運動が生じてしまった。このことから、測定を行うスライドガラスを改良して遊泳層を小さく抑えることが必要である。

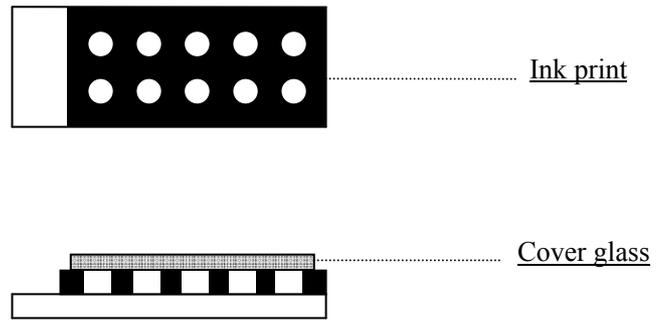
そこで、薄切したパラフィンを用いてスライドガラスを作製し、観察を行って検討した。マイクロームを用いて幅 1 cm のパラフィンを 10, 15, 20, 25  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切し、スライドガラス上にのせた (Fig. 34)。その上にカバーガラスをかぶせ、ホットプレートに 1 分ほどのせて接着させた。作製後、前述のように精子を採取し、希釈液と混合したものをカバーガラスとスライドガラスの隙間に注入して、光学顕微鏡下で観察した。



**Fig. 34** The observed chamber of paraffin block for sperm motility.

また、宮崎大学の香川博士から分与されたインクパターンの印刷によってウェルが形成されているスライドガラス（インク印刷の厚さは不明, Fig.

35) による観察も同様に行った。



**Fig. 35** Observed chamber of ink print's slide glass for sperm motility provided Prof. Kagawa.

パラフィンで作製したスライドグラスで観察した結果、運動している精子を確認することができた。パラフィンの厚さ（遊泳層の厚さ）が 20  $\mu\text{m}$  および 25  $\mu\text{m}$  のスライドグラスで検鏡すると、精子の遊泳層が 2-5 層程度観察できた。パラフィンの厚さが 10  $\mu\text{m}$  および 15  $\mu\text{m}$  のスライドグラスの場合、この遊泳層が 2-3 層と減少した。このことから、15  $\mu\text{m}$  あるいは 10  $\mu\text{m}$  以下のより薄い厚さで検鏡する方が、遊泳層を小さくすることができ、観察しやすくなることが分かった。また、宮崎大学の香川先生から分与されたスライドグラスによる観察の結果、遊泳層が 1-2 層であり、ほとんどの精子が観察可能であった。10  $\mu\text{m}$  の厚さのパラフィンで作製したスライドグラスよりも、層の厚さが小さかったのではないかと思われる。これらの結果から、このインク印刷のあるスライドグラスを用いて運動能の観察を行うこととした。

#### 4-2-4 精子運動能測定用希釈液の検討

精子は精巣内または、雄の生殖管内では運動をせず、体外あるいは雌の生殖管内に放精されると運動を開始する（毛利秀雄, 1997）。ウニは海水中に放精されると活発な運動を示し、キングョのような淡水魚は体内の浸透圧よりも低い溶液中で、多くの海産魚の場合は体内の浸透圧より高い溶液中で運動が開始される。また、アユに関しては運動開始を制御するイオン環境について報告されており、K イオンが 10 mM 以上含まれていること、Ca イオンが低濃度に維持されていること、115 mM の Na イオンを含む電解質の濃度が高いこと、精漿の pH が弱アルカリに保たれていることなどが、精子の運動開始を抑制している要因であるとしている（辻ら, 2000）。シシャモの場合、K イオン濃度が減少すると運動開始が引き起こされることが明らかになっている（太田ら, 1995）。

これらのことから、メダカで用いられている測定用希釈液と、その他の魚類で用いられている測定用希釈液を参考にし、濃度組成の異なる二種類の希釈液を用いて検討を行った。濃度組成は Table 13 および Table 14 を参照。

濃度組成の異なる二種類の希釈液を用いて検討を行った結果、ヒメダカで用いられている測定用希釈液では運動距離が  $53.8 \pm 23.6 \mu\text{m/s}$  であったのに対し、メダカの 100 倍濃度の希釈液では  $67.1 \pm 27.9 \mu\text{m/s}$  であった。最適な条件を見つけることが本実験でも目的ではないが、E2 暴露により精子運動能が低下する仮定していることから、通常の清浄海水飼育のメダカ（つ

まりは対照区) の精子がより活発に運動していた方の希釈液を用いるのが適していると考え、メダカの 100 倍濃度の希釈液を精子運動能測定時に用いることとした。

**Table 13. Comoposition of solution for sperm motility of Japanese medaka (*O. latipes*)**

NaCl	74.8 mg
KCl	2.0 mg
CaCl <sub>2</sub>	2.2 mg
NaHCO <sub>3</sub>	2.0 mg
DW	1000 mL

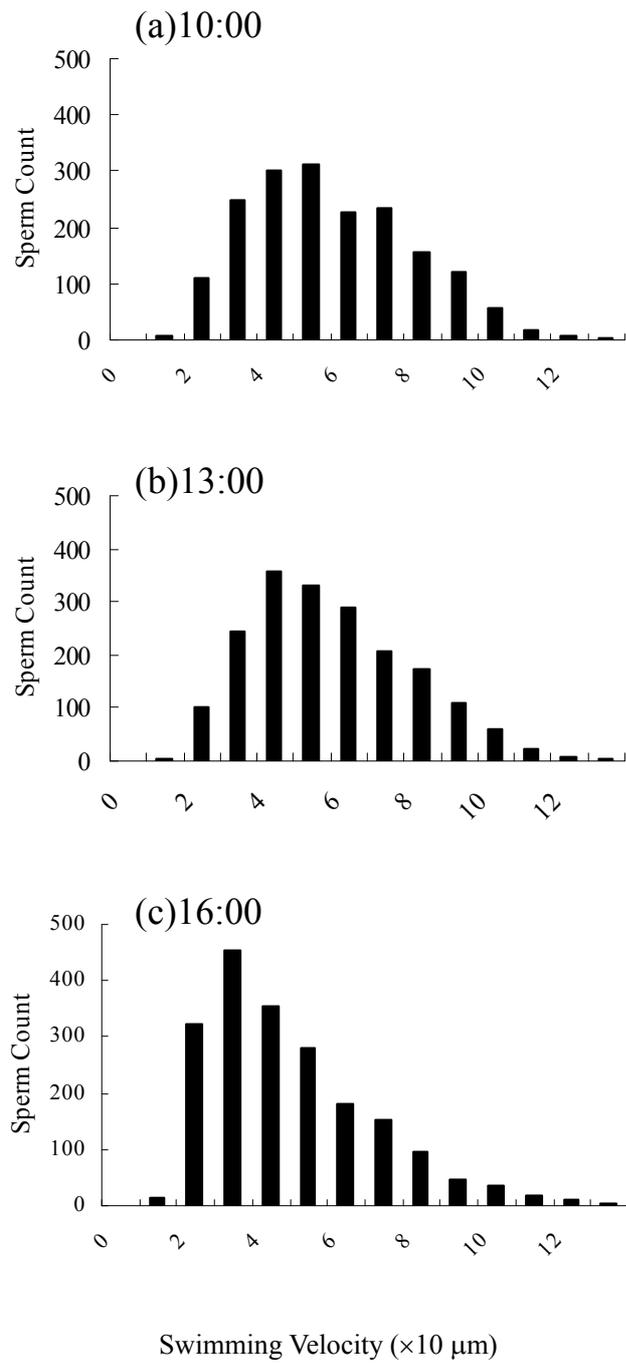
**Table 14. Comoposition of solution for sperm motility of Java medaka (*O. javanicus*)**

NaCl	7.48 g
KCl	0.20 g
CaCl <sub>2</sub>	0.22 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.20 g
DW	1000 mL

#### 4-2-5 精子採取時刻の検討

ジャワメダカは光周期と水温をコントロールすれば、通年で産卵する。季節によって産卵期を有するような魚種の場合、各季節によって生殖腺の発達具合が異なることが考えられる。しかしながら、ジャワメダカやヒメダカのような通年で産卵可能な魚種の場合、一日の時間帯によって運動能に差が生じる可能性が考えられる。そこで、精子運動能の日変動を観察するため、8時から17時までの間運動能を測定して、測定時間の検討を行った。測定方法および測定用希釈液は前述の検討4章（4-2-3 運動能測定用スライドガラスの検討、4-2-4 精子運動能測定用希釈液の検討, p.80-83）により決定したものをを用いた。

8時から17時までの間精子運動能の観察を行い、8時20分から10時42分までを10時帯、11時22分から14時05分までを13時帯、16時02分から16時33分までを16時帯として、それぞれの時間帯における精子の運動距離をヒストグラムで示した（Fig. 36）。精子運動距離は10時帯が $50.1 \pm 21.9 \mu\text{m}$  (n=1794)、13時帯が $50.2 \pm 21.5 \mu\text{m}$  (n=1909)、16時帯が $4.01 \pm 21.9 \mu\text{m}$  (n=1967)であった。10時帯と13時帯に比べて、16時帯は全体的に分布の頂点（山）が低値側に移動していた。それぞれの時間帯をt検定で検定した結果、10時帯と16時帯で、13時帯と16時帯で有意な差が認められた。また、10時帯と13時帯では差は認められなかった。これらのことから、精子運動能測定時間を10時の前後一時間（9時から11時）とし、時間を統一して測定を行った。



**Fig. 36** Histogram of swimming velocity in different time zone, 10:00 (a), 13:00 (b) and 16:00 (c).

## 4-3 材料と方法

### 4-3-1 試験魚

E2 フルライフサイクル暴露、E1 フルライフサイクル暴露と同様に、鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センターで継代飼育しているジャワメダカ (*O. javanicus*) を試験魚として行った 2 章 (2-2-1 試験魚, p.7) を参照。

### 4-3-2 試験物質

試験物質には、E2 (純度>98.0 %, ナカライテスク株式会社) を用いた。E2 の溶解方法は 2 章 (2-2-2 試験物質, p.10) を参照。

### 4-3-3 17 $\beta$ -estradiol パーシャルライフサイクル暴露の方法

成熟した雄 3 尾を 2.5 L ビーカー (水容量 2.0 L) に収容し、設定濃度 50, 500 および 5000 ng/L の E2 で暴露を行った。すべての濃度区を 2 連で行い、1, 4 および 8 週間暴露を行った。また、E2 を含まない海水で暴露した対照区を設定し、暴露区と同様の条件で 8 週間飼育を行った。和波ら (2004) の報告によれば、東京湾では E2 が 0.1 から 21.9 ng/L の範囲で検出されている。さらに、既述の E2 フルライフサイクル試験 (Imai et al., 2005) では、E2 濃度 16 ng/L で受精率の阻害が観察された。これらのことから、最低 E2 濃度区に 50 ng/L を設定した。また、最高 E2 濃度区である 5000 ng/L を positive effect として設定した。海水はこれまでの暴露試験と同様に、鹿児

島湾で採水し砂濾過したものを用いた。暴露期間中、すべての飼育水は毎日換水する半止水式暴露で行った。

暴露終了後、9時から11時の間にサンプリングをし、体重および全長を測定した。また、開腹して肝臓を摘出し、肝臓重量を測定した。また、肝臓重量から HSI を算出した (2-2-5 肝臓および生殖腺の採取方法, p.13)。0.5 mL タンパク分解酵素阻害剤 (Table 2) を添加し、VTG 測定までの-80°C で冷凍保存した。肝臓摘出後、実体顕微鏡下で精巣を摘出し、運動能の測定に用いた。

#### 4-3-4 17 $\beta$ -estradiol 暴露における精子運動能測定方法

暴露終了後、魚体から精巣を摘出し生殖腺重量を測定した。また、生殖腺重量から GSI を算出した (2-2-5 肝臓および生殖腺の採取方法, p.13)。重量測定後、精巣を解剖用ハサミで切断した。精巣の切断面から滲出した精子をスライドグラス上へのせ、精子用希釈溶液 (128mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.0mM CaCl<sub>2</sub> and 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>; Table 14) を適量加えた。スライドグラスは、マイクロウォームプレート (MP10DM, Kitazato supply CO. Ltd., Shizuoka, Japan) を用いて 26°C に保持した。精子の運動は、光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ等を経由して、ビデオカメラ (DCR-PC300, SONY) で録画した。運動している精子の割合および運動距離は以下の方法で測定した。ビデオカメラで動画を撮影し、1秒あたり30コマの静止画としてコンピューターに取り込んだ。精子の運動は、各魚体あたり3回 (1回の測定につ

き 3 秒間) の測定を行い、1 個体に対して 9 秒分の静止画を用いて解析を行った。運動している精子の割合は、1 個体に対して 450 の精子を用いて測定を行った。また、精子の運動距離に関しては、1 個体に対して 296 から 1265 の精子を用いて測定を行った。これらの解析には、画像解析ソフトである Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, USA) を用いた。

#### 4-3-5 肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定

-80℃で保存していた肝臓を解凍し、ハンドホモジナイザーを用いて細かく粉砕した。粉砕後、遠心分離 (10000 × g, 10 分間, 4 °C, KUBOTA, 5922) して得られた上清を VTG 測定試料とした。肝臓抽出液中の VTG 濃度は、ELISA により測定した。測定の手順は先述 (2-2-6 肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度の測定, p.14) の通りである。

#### 4-3-6 飼育水中の 17β-estradiol 濃度分析および水質測定

E2 濃度の測定は、換水直後（0 時間後）と換水直前（24 時間後）の飼育水を採水して行った。先述（2-2-4 試験水中の 17β-estradiol 濃度分析および水質測定，p.12）の通り、エムポアディスクを用いて固相抽出を行った。10 mL のメタノールで溶出させた後、窒素下で乾固させ適量の移動相（50mM リン酸：アセトニトリル=55：45）を加えた。HPLC の蛍光検出（励起波長 275 nm，蛍光波長 300 nm）で測定を行った。詳しい HPLC 設定条件は Table 15 を参照。

**Table 15. HPLC conditions for 17β-estradiol analysis by fluorescence detection**

Column	Inertsil ODS-3V, 5 mm, 4.6 × 150 mm
Eluent	Acetonitrile : 50mM phosphate buffer = 45 : 55 (pH2.3)
Flow Rate	1.0 mL/min
Detector (wave length)	UV (210 nm) Fluorescence ( Ex 275 nm, Em 300 nm)
Column Temperature	40 °C
Column Oven	HITACHI L-7300
UV Detector	HITACHI L-7400
Pump	HITACHI L-7100
Autosampler	HITACHI L-7200
Degasser	HITACHI L-7160
Integrator	HITACHI L-7500

#### 4-3-7 17β-estradiol パーシャルライフサイクル暴露における影響評価項目

##### および評価方法

内分泌攪乱作用を評価するにあたって、各々の影響評価項目の評価方法について以下の通りに行った。

##### 4-3-7-1 体重および全長に対する影響

全長および体重：暴露終了後、全長および体重を測定し、各々濃度区ごとに平均全長および平均体重を算出した。

##### 4-3-7-2 ビテロゲニン誘導に対する影響評価方法

暴露終了後に魚体から肝臓を摘出し、肝臓ホモジネートの上清を用いて VTG 濃度を測定した。また、肝臓摘出時に肝臓重量を測定し、肝臓重量あたりの VTG 量を算出した。

##### 4-3-7-3 精子運動能に対する影響評価方法

精子運動能に対する影響評価項目として、精子運動率および精子運動距離を測定した。

(1) 精子運動率：ビデオカメラで記録した動画上から、1 個体あたり 450 の精子をランダムに選択し、運動していた精子の割合を算出した。算出方法は、以下の通りである。

$$\text{精子運動率} = \frac{\text{運動精子数}}{\text{ランダムに選択した精子数 450}} \times 100$$

(2) 精子運動距離：ビデオカメラで記録した動画上から、運動している精子をランダムに選択し、平均運動距離を算出した。1 個体あたり 296-1265 の運動精子に対して、運動距離を測定した。

#### 4-3-8 統計学的解析

得られたデータはすべて平均値±標準偏差で示した。対照区および暴露区の等分散性を検定し、すべてのデータは ANOVA により解析を行った。等分散の場合は、Dunnett t 検定、等分散でない場合は Dunnett T3 および Dunnett C 検定により、対照区と暴露区で平均値の有意差検定を行った。また、すべての検定において有意水準を 0.05 とし、SPSS® 14.0J を用いて行った。

## 4-3 結果

### 4-3-1 飼育水中の水質および 17 $\beta$ -estradiol 実測濃度

E2 暴露期間における飼育水の平均水温は  $26.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ 、DO は  $6.75 \pm 0.50$  mg/L、塩分濃度は  $33.5 \pm 0.5\text{‰}$ 、pH は  $7.83 \pm 0.18$  であった。

E2 濃度を HPLC で測定した結果、24 時間の平均 E2 実測濃度は対照区が ND (<5 ng/L)、50 ng/L 区が  $34 \pm 17$  ng/L (以下 34 ng/L 区)、500 ng/L 区が  $195 \pm 110$  ng/L (以下 195 ng/L 区)、5000 ng/L 区が  $3900 \pm 1480$  ng/L (以下 3900ng/L 区) であった (Table 16)。以下、結果を述べる時には、設定濃度ではなく実測濃度で示した。

**Table 16. Concentrations of 17 $\beta$ -estradiol (E2) in test waters**

Nominal E2 Con (ng/L)	<i>n</i>	Measured E2 Concn. <sup>a</sup>		
		0h	24h	0-24h <sup>b</sup>
control	4	ND <sup>c</sup>	ND	ND
50	4	$50 \pm 2$	$18 \pm 1$	$34 \pm 17$
500	4	$296 \pm 27$	$94 \pm 11$	$195 \pm 110$
5000	4	$5266 \pm 199$	$2548 \pm 369$	$3907 \pm 1479$

<sup>a</sup>Data are shown as mean $\pm$ standard deviation.

<sup>b</sup>The mean concentration at 0 and 24 h after preparation.

<sup>c</sup>not detectable (ND) for ELISA < 5 ng/L.

#### 4-3-2 体重および全長に対する影響

3900 ng/L 区の 1 週間暴露、4 週間暴露および 8 週間暴露において、暴露期間中に各 1 尾ずつが死亡した。平均体重は対照区が  $432 \pm 143$  mg であり、暴露区は  $470 \pm 150$  mg であった。平均全長は対照区が  $37.1 \pm 3.4$  mm であり、暴露区は  $38.5 \pm 2.9$  mm であった。対照区と暴露区の体重および全長には、統計学的に有意な差は認められなかった (Table 14)。

**Table 17. Mean total length and body weight of Java medaka in the control and 17 $\beta$ -estradiol (E2) treatment groups**

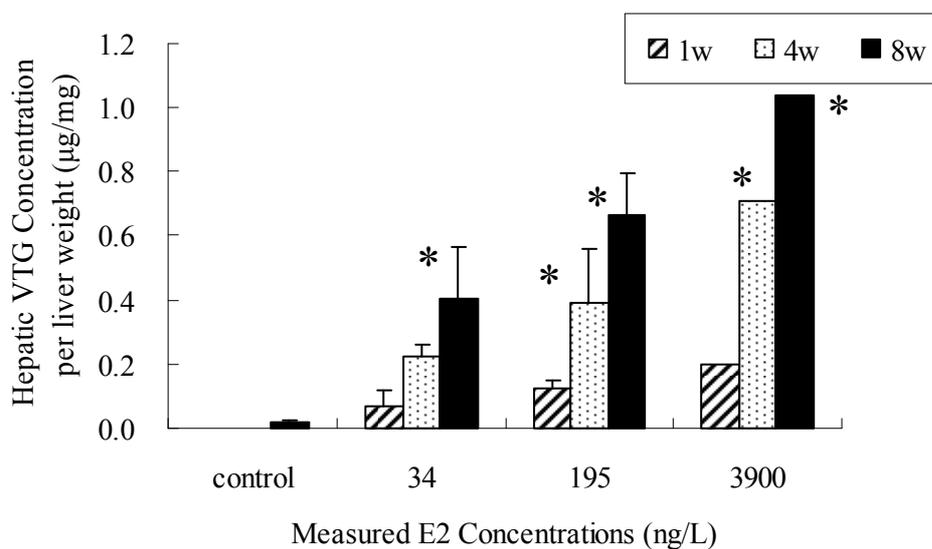
E2 Concentrations <sup>1</sup> (ng/L)	<i>n</i>	Total Length <sup>2</sup> (mm)	Body Weight <sup>2</sup> (mg)
control	3	$37 \pm 3$	$432 \pm 144$
34	9	$39 \pm 3$	$505 \pm 144$
195	9	$38 \pm 3$	$404 \pm 142$
390	6	$39 \pm 2$	$518 \pm 160$

<sup>1</sup>The mean concentration at 0 and 24 h after preparation.

<sup>2</sup>Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

### 4-3-3 ビテロゲニン誘導に対する影響

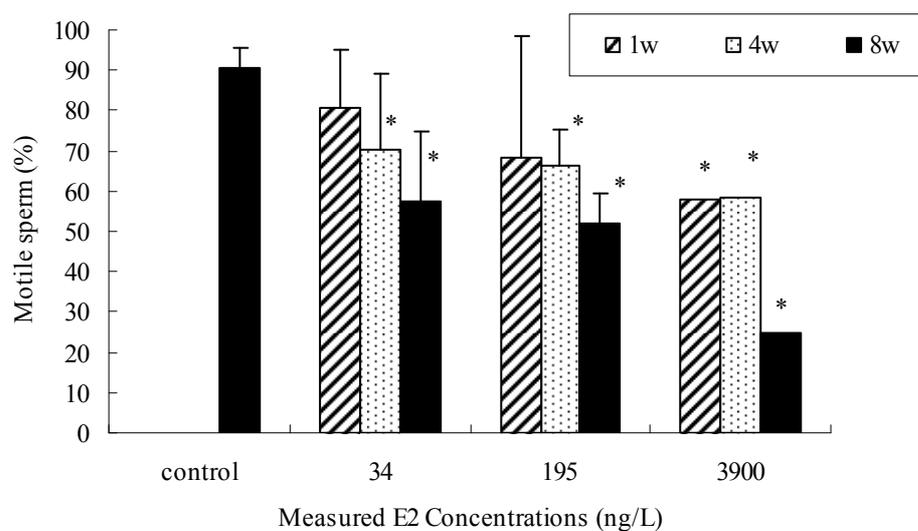
肝臓重量を測定し、肝臓重量あたりの VTG 濃度を求めた。肝臓重量あたりの VTG 濃度は対照区が 9-23  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、暴露区が 31-1087  $\mu\text{g}/\text{mg}$  の範囲であった。34 ng/L 区の 8 週間暴露、195 ng/L 区の 4 週間および 8 週間暴露、3900 ng/L 区の 4 週間および 8 週間暴露の VTG 濃度が、対照区と比較して有意な増加が認められた (Fig. 37)。



**Fig. 37** Hepatic vitellogenin (VTG) concentration per liver weight in control and 17 $\beta$ -estradiol exposure groups for sperm motility. (\*)Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard.

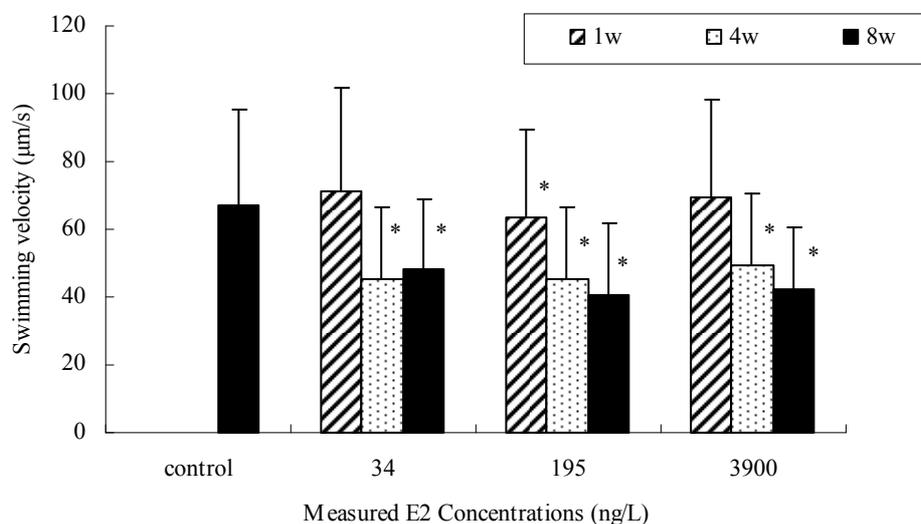
#### 4-3-4 精子運動能への影響

各暴露期間の終了後に、精巢を摘出して精子運動能（精子運動率および精子運動距離）を観察した。運動精子率は対照区が  $90.5 \pm 5.3\%$  であり、暴露区では 24.6-82.1% の範囲であった (Fig. 38)。精子運動率は、E2 濃度および暴露期間依存的に低下傾向を示した。34 ng/L 区の 1 週間暴露および 195 ng/L 区の 1 週間暴露を除く暴露区の精子運動率は、対照区と比較して有意な低下を示した。



**Fig. 38** The ratio of motile sperm of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol for 1, 4 and 8 weeks. (\*) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard.

平均精子運動距離を測定した結果、対照区は  $67.1 \pm 27.9 \mu\text{m/s}$  であり、暴露区は  $40.5\text{-}71.4 \mu\text{m/s}$  の範囲であった (Fig. 39)。平均精子運動距離は、 $34 \text{ ng/L}$  区の 1 週間暴露および  $3900 \text{ ng/L}$  の 1 週間暴露を除く暴露区で、対照区と比較して有意な低下が認められた。



**Fig. 39** The swimming velocity of Java medaka exposed to  $17\beta$ -estradiol for 1, 4 and 8 weeks. (\*) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ). The bars are indicated as mean  $\pm$  standard.

#### 4-4 考察

ジャワメダカの E2 フルライフサイクル試験では、受精率は 16 ng/L 区ですでに阻害影響が見られたが、産卵数は 159 ng/L 区にならないと阻害影響は見られず、しかも 68 ng/L 区で促進影響が認められた。Imai et al. (2005) では 16 ng/L のような E2 低濃度では、雄に対してのみ抑制影響を示しており、E2 暴露によって雄魚の精子形成に重要であるアンドロゲン抑制影響が生じたのではないかと示唆している。これらのことから、本実験では、ジャワメダカの精子運動能に対する E2 暴露の影響を評価した。その結果、本実験では暴露区の精子運動率が対照区と比較して有意に低下した。Graying (*Thymallus thymallus*) を 1.0 ng/L の E2 で暴露した場合や (Lahnsteiner et al., 2006)、金魚 (*Carassius auratus*) を 50 ng/L の E2 で暴露した場合 (Schoefuss et al., 2002) にも同様の結果が報告されている。さらに、ヒメダカを NP で暴露した場合にも同様に精子運動率が低下すると報告されている (Kawana et al., 2003; Hara et al., 2007)。また、本実験では暴露区の精子運動距離が対照区と比較して有意に低下した。Graying を 1 ng/L の E2 で暴露した結果、本実験と同様に、精子運動距離が有意に低下したと報告されている (Lahnsteiner et al., 2006)。これらのことから、E2 およびエストロゲン様物質は、淡水魚の場合と同様に、ジャワメダカの精子運動率および精子運動距離に対して阻害影響をおよぼすと考えられる。

Yokota et al. (2005) は、メダカを 4-*tert*-pentylphenol で暴露すると、11-ketotestosterone を生成するのに重要なステロイド酵素である P450

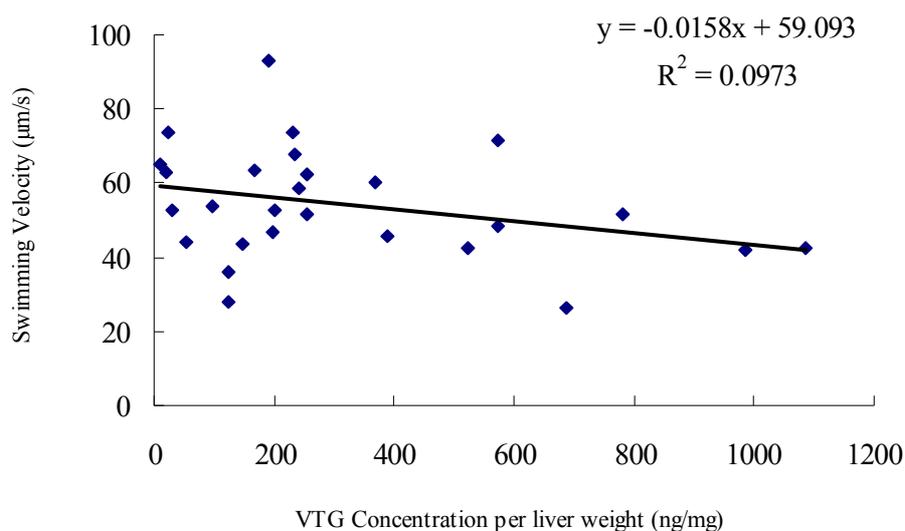
11 $\beta$ -hydroxylase の mRNA 発現が阻害されると報告している。これらは、4-*tert*-pentylphenol が雄魚において、P450 11 $\beta$ -hydroxylase の mRNA 発現を抑制することで、精巢 11-oxygenated androgen の合成を阻害したのではないかと示唆している。11-ketotestosterone は精子形成に関わるステロイドホルモンであることから、E2 で暴露したジャワメダカの場合も同様に、E2 暴露によって 11-ketotestosterone の生成が阻害され、その結果精子運動能が影響を受けたのではないかと考えられる。

環境中で検出されるような低濃度の E2 で受精率低下が引き起こされた (Imai et al., 2005) のは、E2 暴露による精子運動能の阻害が要因で引き起こされた可能性が考えられる。さらには、本実験での精子運動能の阻害は Yokota et al. (2005) の報告のように、11-ketotestosterone の生合成の阻害によって引き起こされたのではないかと考えられる。

東京湾域からは 0.1-21.9 ng/L の E2 濃度が検出されている (和波ら, 2004)。E2 フルライフサイクル試験では 16 ng/L で受精率が低下し (Imai et al., 2005)、本実験の成魚 4 週間暴露試験では精子運動能は 34 ng/L で阻害された。これらの結果から、環境中で検出されている濃度に近い比較的低濃度の E2 で海産魚の精子運動能が阻害され、その結果受精率が阻害されたと考えられる。

これまで、内分泌攪乱作用を評価する際には、VTG の誘導、精巢卵の有無、産卵数や受精率の低下、成長および生残に対する影響などが観察されてきた。本実験の結果から、今までの評価項目と同様に、精子数や精子運

動能なども新たに評価項目として用いることが可能であると示唆される。また、VTG は測定が容易でバイオマーカーとしては有用であるが、実際に VTG が高濃度で誘導されている魚の生殖能が低いかどうかは明らかになっていない。VTG の場合と比較して精子運動能は、受精などの生殖能と直接関わる項目であることから、内分泌攪乱物質に対する評価項目として有用であると考えられる。本実験で測定した精子運動距離と VTG 濃度の相関をみたところ、 $r = 0.312$  となり、VTG 濃度が増加するにつれて精子運動距離も低下するという傾向が見られた (Fig. 40)。



**Fig. 40** Relationship between VTG concentration per liver weight of Java medaka and swimming velocity of their sperms in control and E2 exposure groups.

また、本実験の結果から、E2 の暴露によって 11-ketotestosterone などのステロイドホルモンの合成阻害が引き起こされていると示唆された。このことから、魚体中あるいは血中、生殖腺中のステロイドホルモン濃度を測定し、mRNA 発現の抑制が実際に、その下流であるステロイドホルモン合成

を阻害して濃度が低下しているか確かめる必要があると考える。

## 第5章 総合考察

環境中で検出されるような低濃度のエストロゲン（E2 および E1）が、ジャワメダカに対してどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、エストロゲンのフルライフサイクル暴露を行った。

E2 フルライフサイクル暴露において、ジャワメダカに対する E2 の慢性毒性を明らかにした。暴露の結果、成長阻害、雄中の VTG 誘導、産卵数の低下、受精率の低下、二次性徴発現の抑制および精巣卵の出現が引き起こされた。これらの結果は、報告されていたメダカを含む淡水魚の現象と同様のものではあった。受精率に対する E2 の LOEC は 16 ng/L であり、NOEC は 9 ng/L であった。前述のように、東京湾沿岸域から E2 は最大で 23.7 ng/L 検出されている（和波ら，2003）。本研究 E2 フルライフサイクル暴露における LOEC（16 ng/L）は環境中で検出されている濃度の範囲内であり、このような比較的低濃度の E2 で受精率の低下が引き起こされた。これらのことから、E2 濃度が他の地点と比べて比較的高く検出されている東京湾のような沿岸海域では、これらの海域に生息しているエストロゲンに対する感受性の高い魚種に対して E2 が内分泌攪乱作用を引き起こす可能性が示唆された。

また、E1 フルライフサイクル暴露において、E2 フルライフサイクル暴露と同様にジャワメダカに対する E1 の慢性毒性について明らかにした。暴露の結果、E2 暴露と同様に、雄中の VTG 誘導、産卵数の低下および受精率の低下が引き起こされた。受精率に対する E1 の LOEC は 1200 ng/L であり、NOEC は 484 ng/L であった。前述のように、東京湾沿岸域から E1 は最大で 61.2 ng/L 検出されて

いる（和波ら，2003）。本研究 E1 フルライフサイクル暴露における NOEC（484 ng/L）も環境中で検出されている濃度よりも高濃度であり、環境中の E1 濃度だけでは魚類に対して内分泌攪乱作用を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

しかしながら、E1 が検出されている海域からは E2 も検出されている。和波ら（2004）によれば、浜路橋付近（東京都）の水中から E2 が 10.6 ng/L、E1 が 59.9 ng/L 検出されたと報告されている。E2 および E1 濃度ともに、本研究の LOEC を下回っているため、E2 および E1 単独では内分泌攪乱作用を引き起こす可能性は低いことが考えられる。しかしフルライフサイクル暴露の結果、VTG 誘導に対するエストロゲン活性の強さは E2 が E1 より 7.1 倍高いと示唆された。浜路橋付近から検出された E1 濃度を E2 濃度に換算すると、8.4 ng/L（59.9/7.1）であり、E2 濃度 10.6 ng/L に加算すると合計が 19 ng/L ということになる。E2 および E1 濃度を合わせてリスク評価すると、E2 フルライフサイクル暴露の LOEC は 16 ng/L であったため、この浜路橋付近のエストロゲン（E2 および E1）濃度は内分泌攪乱作用を引き起こす可能性の高い濃度であることが示唆された。このように、実海域からは単一の内分泌攪乱物質が検出されているわけではなく、E2 および E1 あるいはそれ以外の多くのエストロゲン様物質が検出されている。これらのことから、今後は単独物質のリスク評価だけではなく、複数物質の複合的なリスク評価を行う必要があると考えられる。また、複数物質で暴露した際に、相加的あるいは相乗的な作用を示すのかどうか検討することも重要であると考えられる。

E2 フルライフサイクル暴露を行った結果、68 ng/L で産卵の促進影響と受精の阻害影響が認められた。産卵は雌に対する影響を評価する項目であり、受精は雌雄双方に対する影響を評価する項目であることから、68 ng/L の時点で E2 が雄に対してのみ阻害影響を及ぼしたのではないかと示唆された。これらのことから、E2 パーシャルライフサイクル暴露を行い、ジャワメダカの精子運動能に対する影響を評価した。その結果、精子運動能に対する E2 の LOEC は 34 ng/L であり、NOEC は 34 ng/L 未満であった。E2 低濃度区で精子運動能が低下したことから、運動能の阻害が受精率低下の要因のひとつであることが示唆された。

メダカを E2 で暴露した場合、ステロイド代謝に関与する 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ HSD) および 11 $\beta$ -hydroxylase (P450 11 $\beta$ ) の mRNA 発現が抑制されると報告されている (Govoroun et al., 2001)。また、4-PP で暴露した場合も同様に P450 11 $\beta$  の mRNA 発現が抑制されると報告されている (Yokota et al., 2005)。これらは、雄魚において 11-ketotestosterone を生成するのに重要な P450 11 $\beta$  の mRNA 発現が抑制されることで、アンドロゲンの合成が阻害されるのではないかと示唆している。11-ketotestosterone は精子形成に関わるステロイドホルモンであることから、E2 などのエストロゲン様物質によって精子形成に関わるステロイドホルモンの生合成が阻害され、その結果精子運動能が低下し、最終的に受精率の低下が引き起こされたのではないかと考えられた。今後、精子形成および精子成熟に関与するステロイドホルモンの魚体中濃度を測定し、E2 暴露による mRNA 発現の抑制が実際にその下流であるステロイドホルモンの合成を阻害しているのかどうか確かめる必要があると考えられる。

本研究の結果、エストロゲン（E2 および E1）がジャワメダカの生殖能および精子運動能に対してどのような影響を及ぼすのか明らかになった。また、野外で検出されるような低濃度で受精率が低下したということは、エストロゲンに対する感受性の高い魚では、本研究のジャワメダカと同様の現象が起こる可能性があるのではないかと考えられる。さらには、環境中のエストロゲンあるいはエストロゲン様物質によって、受精率の低下が引き起こされた場合、局所的な個体群の減少にもつながる可能性があるのではないかと考えられる。

## 第 6 章 謝辞

本研究の遂行にあたり、鹿児島大学大学院博士課程において終始暖かいご指導とご教示を頂いた、鹿児島大学水産学部附属海洋資源環境教育研究センターの小山次朗教授に心より感謝致します。また、ジャワメダカのビテログゲニンを測定するにあたり、ビテログゲニン抗体およびビテログゲニンスタンダードを作製して頂いた、瀬戸内海区水産研究所化学環境部生物影響研究室の藤井一則室長に心より感謝致します。研究を進めるにあたって、多くのご助言を頂いた鹿児島大学水産学部同センターの野呂忠秀教授、山本智子准教授、宇野誠一助教に深く感謝致します。

博士課程の指導教員として多くのご助言を頂いた宮崎大学農学部生物環境科学科水産科学講座の三浦知之教授、鹿児島大学水産学部資源育成科学講座の鈴木廣志教授、佐賀大学農学部生物環境科学科生物環境保全学講座の上野大介講師にも深く感謝致します。

修士課程からの 6 年間ジャワメダカを飼育するにあたり、多大なるご協力を頂いた鹿児島大学水産学部の長野章一技官に深く感謝致します。また、飼育実験を円滑に行うために実験装置を作製して頂いた鹿児島大学水産学部の児玉正二技官、実験の準備等をサポートして頂いた並松実技官にも心より感謝致します。

## 第7章 参考文献

- 足立哲也, 櫻井健一, 深田秀樹, 小宮山政敏, 芝山孝子, 井口泰泉, 森千里 (2001).  
植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の精子形成への影響評価に対する  
DNA マイクロアレイを用いた判定法の開発. 千葉医学, 77 号, 151-158.
- 井塚隆 (2003). 冷凍保存したワカサギ精巣精子の運動能と受精能の検討. 神奈  
川県水産総合研究所研究報告, 第 8 号, 13-16.
- 岩松鷹司 (1993). メダカ学全書 (The Integrated Book for the Biology of the  
Meedaka), 大学教育出版, 岡山
- 太田博巳, 楠田聡, 工藤智 (1995). シンチャモ精巣精子の運動活性. 日本水産学  
会誌, 61 号, 7-12.
- 角埜彰, 藤井一則, 小山次朗 (2001). ジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) におけ  
る生殖腺の発達と雌雄判定. 水産総合研究センター研究報告, 第 1 号, 35-37.
- 棚野元秀 (1988). クロダイ精液の液状保存. 昭和 62 年度香川県水産試験場事  
業報告, 120-122.
- 高野和則, 広井修, 安川雅夫, 末武敏夫 (1973). サケ・マス類の卵および精子  
の保存に関する研究—1 サケ (*Oncorhynchus keta*) 未受精卵の保存について.  
北海道さけ・ますふ化場研究報告, 第 27 号, 31-37
- 田畑彰久, 亀井翼, 眞柄泰基, 渡辺哲理, 宮本信一, 大西悠太, 伊藤光明 (2003).

ヒメダカビテロジェニンを指標としたノニルフェノール、ビスフェノール A、  
17 $\beta$ -エストラジオールおよびこれらの混合曝露の影響。水環境学会誌, 26  
号, 671-676.

辻将治, 池田和夫, 太田博巳 (2000). アユ精子の運動開始を導くイオン環境の  
変化. 日本水産学会誌, 66 号, 55-61

東京都下水道局. 数字で見る東京の下水道—平成 13 年度の下水处理の状況—  
平成 13 年度内分泌かく乱化学物質調査結果 (水处理関連).

<http://www.gesui.metro.tokyo.jp/gijyutou/fukyu/m1data/13ehoru2.htm>

野村稔 (1964). ニジマス的人工採卵に関する基礎研究—VI. 淡水・等調液・体  
腔液・尿の稀釈による精子の活動性と精液の貯蔵について. 日本水産学会  
誌, 30 号, 723-733.

畠山成久, 菅谷芳雄, 高木博夫, 石川英律, 尾里建二郎, 若松佑子 (2001).  
17 $\beta$ -estradiol (E2) によるメダカの性転換とそれに伴う繁殖影響. 環境毒性  
学会誌, 4 号, 99-111.

広井修, 安川雅夫, 末武敏夫 (1973). サケ・マス魚類の卵および精子の保存に  
関する研究—2 サケ (*Oncorhynchus keta*) 精子の保存について. 北海道さ  
け・ますふ化場研究報告, 27 号, 39-44.

藤波祐一郎, 竹内宏行, 津崎龍雄, 太田博巳 (2003). アカアマダイ漁獲鮮魚か

- ら採取した精巢精子の運動活性と冷凍保存. 日本水産学会誌, 69 号, 162-169.
- 藤波祐一郎, 竹内宏行, 津崎龍雄, 太田博巳 (2003). 若狭湾西部海域で漁獲されたアカアマダイの精巢重量と精巢精子の運動活性. 日本水産学会誌, 69 号, 197-200.
- 毛利秀雄 (1997). 精子の生物学, 東京大学出版会, 東京
- 林彬勸, 荻野哲, 籠島通夫, 芦田昭二, 岩松鷹司, 東海明宏, 吉田喜久雄, 米沢義堯, 富永衛, 中西準子 (2004). メダカ (*Oryzias latipes*) 第二次性徴による量的内分泌攪乱影響評価のための有効な手法 (分節計数法). 水環境学会誌, 27 号, 47-51.
- 和波一夫, 嶋津暉之, 宮下雄博, 大原拓也 (2003). 都内水域の環境ホルモン問題に関する研究 (その 1) —東京都内湾の魚類調査—. 東京都環境科学研究所年報, 55-62.
- 和波一夫, 嶋津暉之, 宮下雄博, 山本俊光, 塚田和秀, 吉岡大輝 (2004). 都内水域の環境ホルモンに関する研究 (その 3) —東京都内湾の魚類の生殖異変とエストロゲンの流入負荷量—. 東京都環境科学研究所年報, 101-109.

- Ackermann GE, Schwaiger J, Negele RD, Fent K. 2002. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 60: 203-221.
- Arcand-hoy LD, Benson WH. 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 49-57.
- Calborn T, Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101: 378-384.
- Christensen JR, Bishop CA, Richardson JS, Pauli B, Elliott J. 2004. Validation of an amphibian sperm inhibition toxicological test method using zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 2950-2955.
- Gimeno S, Komen H, Jobling S, Sumpter J, Bowmer T. 1998. Demasculinisation of sexually mature male common carp *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*ter*-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology* 43: 93-109.
- Gray MA, Metcalfe CD. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1082-1086.

- Hara Y, Strüssmann CA, Hashimoto S. 2007. Assessment of short-term exposure to nonylphenol in Japanese medaka using sperm velocity and frequency of motile sperm. *Archives of environmental contamination and toxicology* 53: 406-410.
- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Mattheiessen P, neall P, Sumpter Jp, Tylor T, Zaman N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis incaged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 534-542.
- Hartley WR, Thiyagarajah A, Anderson MB, Broxson MW, Major SE, Zell SI. 1998. Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed tp 17 $\beta$ -estradiol. *Marine Environmental Research* 46: 145-148.
- Hashimoto S, Bessho H, Hara A, Nakamura M, Iguchi T, Fujita K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49: 37-53.
- Hemmer MJ, Hemmer BL, Bowman CJ, Kroll KJ, Folmar LG, Marcovich D, Hoglund MD, Denslow ND. 2001. Effects of *p*-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegates*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 336-343.

- Hemmer MJ, Bowman CJ, Hemmer BL, Friedman SD, Marcovich D, Kroll KJ, Denslow ND. 2002. Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegates*) after cessation of exposure to 17 $\beta$ -estradiol and *p*-nonylphenol. *Aquatic Toxicology* 58: 99-112.
- Imai S, Koyama J, Fujii K. 2005. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on reproduction of Java medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish. *Marine Pollution Bulletin* 51: 708-714.
- Imai S, Koyama J, Fujii K. 2007. Effects of estrone on full life cycle of Java medaka (*Oryzias javanicus*), a new marine test fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 726-731.
- Inoue K, Takei Y. 2002. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. *Zoological Science* 19: 727-734.
- Kinnberg K, Toft G. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 16-24.
- Kang IK, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2002. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47:71-80.

- Kawana R, Strüssmann CA, Hashimoto S. 2003. Effects of *p*-Nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 213-214.
- Kramer VJ, Miles-Richardson S, Pierens SL, Giesy JP. 1998. Reproduction impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. *Aquatic Toxicology* 40: 335-360.
- Lahnsteiner F, Berger B, Kletzl M, Weismann T. 2005. Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology* 75: 213-224.
- Lahnsteiner F, Berger B, Kletzl M, Weismann T. 2006. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquatic Toxicology* 79: 124-131.
- McAllister BG, Kime DE. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 65: 309-316.
- Metcalfé CD, Metcalde TL, Brenda YK, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage

- treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 297-308.
- Miura C, Takahashi N, Michino F, Miura T. 2005. The effects of para-nonylphenol on Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatogenesis in vitro. *Aquatic Toxicology* 71: 133-141.
- Moreels D, Cauwenberghe KV, Debaere B, Rurangwa E, Vromant N, Bastiaens L, Diels L, Springael D, Merckx R, Ollevier F. 2006. Long-term exposure to environmentally relevant doses of methyl-*tert*-butyl ether causes significant reproductive dysfunction in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 2388-2393.
- Nakamura M, Nagoya H, Hirai T. 2002. Nonylphenol induces complete feminization of the gonad in genetically controlled all-male amago salmon. *Fisheries Science* 68: 1387-1389.
- Newbold RR, Suzuki Y, McLachlan JA. 1984. Müllenrian duct maintenance in heterotypic organ culture after in vivo exposure to diethylstilbestrol. *Endocrinology* 115: 1863-1868.
- Nimrod AC, Benson WH. 1998. Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquatic Toxicology* 44:

141-156.

OECD, 1992. Fish, acute toxicity and fish early-life stage toxicity test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203 and No. 210, OECD, Paris.

Okumura H, Hara A, Saeki F, Todo T, Adachi S, Yamauchi K. 1995. Development of sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for vitellogenin in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fisheries Science 61: 283-289.

Oshima Y, Kang IJ, Kobayashi M, Nakayama K, Imada N, Honjo T. 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\beta$ -estradiol. Chemosphere 50: 429-436.

Panter GH, Thompson RS, Sumpter JP. 1998. Adverse reproductive effects in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquatic Toxicology 42: 243-253.

Patyna PJ, Davi RA, Parlerton TF, Brown RP, Cooper KR. 1999. A proposed multigeneration protocol for Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to evaluate effects of endocrine disruptors. The Science of the Environment 233: 211-220.

Schoenfuss HL, Levitt JT, Kraak GVD, Sorensen PW. 2002. Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive

- behavior and sperm production in goldfish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2185-2190.
- Seki M, Yokota H, Matubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2002. Effects of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
- Seki M, Yokota H, Maeda M, Kobayashi K. 2003. Toxicity assessment of 17 $\beta$ -estradiol on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by full life cycle toxicity test. Abstracts of 9<sup>th</sup> meeting of Japanese Society of Environmental Toxicology pp.49.
- Shioda T, Wakabayashi M. 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40: 239-243.
- Tyler CR, Aerle RV, Hutchinson TH, Maddix S, Trip H. 1999. An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337-347.
- Verslycke T, Vandenbergh GF, Versonnen B, Arijs K, Janssen CR. 2002. Induction of vitellogenesis in 17 $\alpha$ -ethinylestradiol-exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a method comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132: 483-492.

Yokota H, Abe T, Nakai M, Murakami H, Eto C, Yakabe Y. 2005. Effects of 4-*tert*-pentylphenol on the gene expression of P450 11 $\beta$ -hydroxylase in the gonad of medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 71: 121-132.