

学 位 論 文 要 旨

氏 名	今井 祥子
題 目	<p>ジャワメダカ (<i>Oryzias javanicus</i>) 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 (<i>Oryzias javanicus</i>))</p>
<p>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、17β-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 (<i>Oryzias javanicus</i>) 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。</p> <p>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。</p> <p>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 11β-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 11β-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。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shoko Imai
題 目	Effects of environmental relevant estrogen on reproduction and sperm motility of Java medaka (<i>Oryzias javanicus</i>) (ジャワメダカ (<i>Oryzias javanicus</i>) 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)
<p>Estrogenic chemicals and natural hormones, including 17β-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 (<i>Oryzias javanicus</i>).</p> <p>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, 1190 and 3700 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 the 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-<i>tert</i>-pentylphenol inhibited P450 11β-hydroxylase mRNA expression in medaka (<i>O. latipes</i>) and suggested that 4-<i>tert</i>-pentylphenol may have inhibitory effects on the synthesis of testicular 11-oxygenated androgens through downregulation of P450 11β-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.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	今井 祥子
審査委員	主査 鹿児島大学水産学部 磯崎 小山次朗
	副査 鹿児島大学水産学部 磯野 呂忠秀
	副査 宮崎大学農学部教授 三浦 知之
	副査 鹿児島大学水産学部 磯崎 鈴木廣志
	副査 佐賀大学農学部 講師 上野 大介
審査協力者	
題目	<p>ジャワメダカ (<i>Oryzias javanicus</i>) 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 (<i>Oryzias javanicus</i>))</p>
<p>近年、魚類をはじめとする水生生物に対する内分泌攪乱化学物質の影響が問題となっており、淡水魚を中心とした研究が広く実施されてきた。しかし沿岸域でも同様に、天然女性ホルモンを含む内分泌攪乱化学物質が海水から検出されており、海産魚に対する内分泌攪乱化学物質の影響を評価する必要がある。</p> <p>本研究では、内分泌攪乱化学物質中で最も活性の高い天然女性ホルモンである17β-estradiol (以下E2) およびestrone (以下E1) の海産魚に対する影響評価を行うことを目的として、成熟に要する期間が3ヶ月程度と短いジャワメダカ (<i>Oryzias javanicus</i>、東南アジア産汽水性メダカ) の生殖能に対するE2およびE1の有害性評価とリスク評価を行うとともに、その有害性メカニズムの解明を行った。</p> <p>最初に、ジャワメダカに対するE2およびE1フルライフサイクル暴露試験 (胚期から産卵期) を行い、暴露区で産卵数低下、受精率低下、雄ビテロゲニン (以下VTG、雌特有の卵黄前駆タンパク質) 誘導などの影響を明らかにし、受精率に対するE2およびE1の最小影響濃度 (Lowest Observed Effective Concentration, LOEC) が16 ng/Lおよび1190 ng/L</p>	

最大無影響濃度 (No Observed Effect Concentration, NOEC) が9 ng/Lおよび484 ng/Lであることを明らかにした。E1のNOECおよびLOECが環境水から検出される濃度より高く、E2のLOEC (16 ng/L) が環境水から検出されるE2の濃度範囲内にあることをから、環境水中に存在するE2が魚類生殖能に対してリスク (受精率低下) を有していることを明らかにした。

ついで女性ホルモン暴露によるジャワメダカ受精率低下のメカニズムを解明するため精子運動能に対するE2の影響試験を実施した。実験に先立ち、精子採取方法、精子希釈液、精子採取時間帯の最適条件を明らかにし、この方法により、34 ng/L以上のE2試験水に暴露したジャワメダカ成魚の精子を観察した結果、E2暴露濃度および暴露期間に依存した精子運動率および運動距離の低下の起こることを明らかにした。

以上のように本研究では、沿岸域の海水から検出される低濃度のE2でも魚類生殖能に対するリスクを有しており、その影響メカニズムが精子運動能阻害によることを明らかにした。このような成果は世界的にみても価値在る研究であり、今後の内分泌攪乱化学物質の環境汚染とその生態影響に関する研究に大きく貢献するものと考えられる。審査委員会では、本研究論文が学位論文として十分な内容であると判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	今井 祥子
審査委員	主査 鹿児島大学水産学部教授 小山次朗
	副査 鹿児島大学水産学部教授 野呂忠秀
	副査 宮崎大学農学部教授 三浦知之
	副査 鹿児島大学水産学部教授 鈴木廣志
	副査 佐賀大学農学部講師 上野大介
審査協力者	
実施年月日	平成19年12月27日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) ○口答・筆答	
<p>主査及び副査の5名は、平成19年12月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者	
氏名	今井 祥子

[質問 1] フルライフサイクル試験を行った時、雌雄一緒に行ったのか。暴露期間はどのくらいで、その間、試験水中エストロゲン測定はどうしたのか。

[回答 1] 卵の段階から暴露しているので、暴露開始時点では雌雄の判別はできず、成熟するまで雌雄一緒に、6～8ヶ月暴露試験した。エストロゲン濃度測定は、試験水調製直後の0時間と換水直前の24時間後に測定し、これを毎月1回のペースで実施した。

[質問 2] ジャワメダカ 1尾あたりの産卵数は少ないが、1個体が産卵した卵をひとつのシャーレーに收容しているのではないのか。

[回答 2] ジャワメダカを継代飼育しており、毎日採卵している。数ペアが産卵した卵を一度すべてひとつにプールし、受精卵のみ選んだ後に、各濃度区にランダムに收容している。同じ親からの卵のみを使用しているというわけではない。

[質問 3] 精子運動能測定のための暴露実験の濃度に関して、最低設定濃度を 50 ng/L から開始したが、環境中の濃度を考えたらもっと低い濃度から暴露を行った方がよかったのではないのか。

[回答 3] 従来経験から、設定濃度に対する実測濃度の割合が半分程度であったため、環境水中濃度の最高レベルである 25 ng/L を実現させるため、最低設定濃度を 50 ng/L とした。無影響濃度を求めるためにはさらに低い濃度を設定する必要があるかもしれない。今後の課題としたい。

[質問 4] エストラジオールおよびエストロンの複合影響が考えられると言っているが、複合暴露試験は行わないのか。この実験からそう結論づけるのは厳しいのではないのか。

[回答 4] 他の学生がエストラジオールおよびエストロンの複合暴露試験を行っており、どのような複合影響があるのか明らかにした。評価項目によるが、エストラジオールとエストロンによる相乗影響が見られたものもあった。

[質問 5] 精子運動能が時刻によって変動するかもしれないと考えた根拠が何かあるのか

[回答 5] 他の魚類において、精子運動能が時刻によって変動するかどうか検討した報告はない。ジャワメダカの場合、2-3日に一回産卵をし、朝に生殖行動を行っていると考えられる。その前後などでは、精巢中の精子のステージが変わって、精子運動能にも変動が見られるのかもしれないと考え、精子採取に適した時刻の検討を行った。

[質問 6] 精子運動能の測定時に注意した点はなにか。精子の運動は短時間で落ちるのではないか。

[回答 6] 最長で 30 分間観察を行ったことがあるが、たしかに時間が経過するに従って運動は低下していく。しかし、短時間で劇的に落ちるという感じではなかった。また、生殖腺を摘出してから測定するまでの時間を計測し、すべてのサンプルについて測定の経過時間を同じになるように注意した。

[質問 7] インクプリントの施されたスライドガラスを使用することで、インクプリント中の化学物質が運動能に影響を及ぼすということはないのだろうか。

[回答 7] 供与されたスライドガラスなので、厳密にどのような物質でインクプリントを施してあるのかは不明であるが、あくまでも対照区との比較を行っているので、対照区も同様のスライドガラスを用いていればその影響は考慮しなくても問題ないと思われます。

[質問 8] 運動能測定に用いる希釈液の浸透圧がかなり低いように感じるが、一般的にこのようなものを用いるのか。

[回答 8] 精子運動能を測定したという報告自体少なく、メダカにおける報告はあったのでその希釈液を参考にした。また、他の魚種の報告と比較して、メダカで用いられていた希釈液の濃度が著しく低かったため、それよりも 100 倍濃い濃度組成の希釈液について検討を行った。この希釈液は、他の魚種で報告されているものとほぼ同等の濃度組成をとった。