

雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法の評価と内分泌攪乱化学物質の組み合わせの影響

埼玉県立深谷第一高等学校 生物部 熊谷 光敏 波多野 崇 熊谷 翠

要約

雄メダカ (*Oryzias latipes*) の再生させた尻鰭の乳頭状突起(二次性徴として雄だけに出現する)を利用し、内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様作用を調べる試験法を開発し、その評価を行った。この試験法は、尻鰭を切り取った成魚の雄メダカを内分泌攪乱化学物質を加えてある水で3週間飼育し、その後再生してきた尻鰭の乳頭状突起数で影響を調べる方法である。内分泌攪乱化学物質にエストロゲン様作用があれば、乳頭状突起の形成は抑制される。そして、その数は、影響の強さに応じて減少する。この点に着目し、指標とした。

この試験法で、17 β -エストラジオール(E2)とエストロン(E)は1ppb以上で、ビスフェノールA(BPA)、ノニルフェノール(NP)及び4-オクチルフェノール(OP)は10ppb以上に有意な差があり、また内分泌攪乱化学物質の濃度に依存して影響が大きくなることを明らかにした。この有意差が確認できた閾濃度は、メダカを用いた他の試験法とほぼオーダーで一致したので、この試験法は有効性があることが判った。また、この試験法は、簡便である、高度な設備がいらない、費用がかからないなどの特徴があるので、高校生や水環境に関心がある一般の人々にも実施できる。また、メダカは、ニジマスのように冷水性の魚類ではないので、野外実験(籠に入れた状態で河川に置くなど)をする場合でも多くの場所に適用できると思われる。したがって、この試験法が広く活用されれば、水環境における生態系の影響を調べる上で、より多くのデータを集めることができると考える。

また、この試験法を用いて、内分泌攪乱化学物質の相乗効果を調べる実験も行った。この実験では、内分泌攪乱化学物質の濃度をE2 0.5ppb、またBPA、NPおよびOPIは5ppbとし、それぞれの単独の実験区分と4種類すべての物質を含んだ実験区分

をつくった。その結果、“4種類”の実験区分はすべての単独実験区分に対して有意差があった。この“4種類”の影響は、乳頭状突起の形成をほぼ完全に抑制するほど強いもので、単独E2の10ppbの濃度に相当する。したがって、他の内分泌攪乱化学物質が組み合わせることによってその効果が20倍(0.5ppb \times 20 = 10ppb)となり、相乗効果が現れたといえる。したがって、このような相乗効果が複合的に汚染されている実際の河川で現れるとしたら、単独の内分泌攪乱化学物質の影響を調べる実験結果だけから法的規制濃度等を決めることは危険かもしれない。

はじめに

魚類に対する内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様作用の影響を定量的に調べる方法として、ピテロゲニンによる方法が知られている。しかし、設備・費用の面から高校生が簡単に取り組める方法ではない。そこで、生物部の先輩が、雌メダカの切り取った尻鰭を再生させ、性ホルモンの影響を調べた方法^{1,2)}を参考にし、“成魚の雄メダカの再生させた乳頭状突起を指標にすれば、内分泌攪乱化学物質のエストロゲン作用が数量的に比較できる”という仮説(1)を実験1で検証した。

また、河川の汚染状況の実態が環境省等の調査³⁾により明らかになったが、日本の河川は複合的に汚染されているので、いくつかの内分泌攪乱化学物質が組み合わせれば、生態系に影響がでる可能性があるかもしれない。相乗効果がある例として、大島ら⁴⁾が、メダカを用いた実験でトリブチルスズとPCBを同時に与えると産卵数が減少したことを報告している。このように、単独では影響がないレベルの濃度であっても、内分泌攪乱化学物質が組み合わせると影響がでる場合があるので、“いくつかの内分泌攪乱化学物質が組み合わせると影響

雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法の評価と内分泌攪乱化学物質の組み合わせの影響

埼玉県立深谷第一高等学校 生物部 熊谷 光敏 波多野 崇 熊谷 翠

が大きくなる”という仮説(2)を設定し、その検証を実験2で行った。

実験方法

1. 化学物質と濃度

(1) 実験1で用いた化学物質とその濃度

実験1として、それぞれの内分泌攪乱化学物質が乳頭状突起の再生に及ぼす影響を調べた。17-エストラジオール(E2)、エストロン(E)、ビスフェノールA(BPA)、ノニルフェノール(NP)、4-オクチルフェノール(OP)、フタル酸ジブチル(DBP)をエタノールに溶かし、それぞれの物質が規定の濃度となるような原液を作った。次にこの原液を希釈し、全ての実験区分でエタノールが等しくなるように調整した溶液0.4mlを水4Lに加え、以下の濃度になるようにした。なお、使用した試薬は、ノニルフェノール、4-オクチルフェノールがAldrich Chem.Co.で、それ以外は、和光純薬(株)製品である。

E2	0.001、0.01、0.1、1、10、100ppb
E	1、10、100 ppb
BPA	0.1、1、10、100、1000、(1500)ppb
NP	10、100、(500)、1000ppb
OP	10、100、(500)、1000ppb
DBP	100、1000、10000ppb

内分泌攪乱化学物質の略号(以下、本文や表・グラフではこの略号を用いる。)

E2 = 17-エストラジオール

E = エストロン

BPA = ビスフェノールA

NP = ノニルフェノール

OP = 4-オクチルフェノール

DBP = フタル酸ジブチル

()の物質については、最初の結果が出た後から追加した濃度である。また、対照として、水4Lにエタノール0.4ml(内分泌攪乱化学物質が何も含まれていないもの)を加えたものも用意した。

(2) 実験2の濃度設定

内分泌攪乱化学物質の相乗効果を調べるため、実験2を行った。内分泌攪乱化学物質の濃度設定は、実験1で有意差が確認できた濃度と、できなかった濃度の中間の濃度にした。すなわち、E2は0.5ppb、BPA、NP、OPは5ppbの濃度で単独と4種類の内分泌攪乱化学物質をすべて含むの組み合わせ(表1)を作り、実験を行った。それぞれの実験区分濃度の調整方法は実験1と同様であるが、全ての実験区分で水4Lにエタノール1.6mlが含まれている点異なる。

表1 内分泌攪乱化学物質の組み合わせと濃度

cont. (コントロールには、内分泌攪乱化学物質は含まれず、エタノール1.6mlが含まれる。)
BPA(5ppb)
OP(5ppb)
NP(5ppb)
E2(0.5ppb)
E2(0.5ppb)+BPA(5ppb)+OP(5ppb)+NP(5ppb)
4種類の組み合わせ

2. 使用したメダカ

メダカは、孵化から3~6ヶ月で成魚となり、体長も最大で30mmくらいである。したがって、多くの検体を必要とする実験に適しており、日本だけでなく海外の研究機関でも利用している。また、メダカは、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュなどとともにOECD(経済開発機構)の魚類試験法で用いる魚種として検討が進められている。

10年前にペットショップで購入したヒメダカ(*Oryzias latipes*)5個体の子孫をもとに室内の水槽で毎年交配し、他集団と遺伝的交流がない状態で繁殖させている。

この室内で継代繁殖しているヒメダカの稚魚を野外においた水槽(1.0×1.4×0.3m)に移し、成魚になるまで飼育している。そして、雄の二次性徴と

して尻鰭に乳頭状突起が形成される体長約20mm以上の個体を実験室に持ち込み、使用した。

3. 乳頭状突起の再生と飼育条件

野外の水槽から実験室に持ち込んだメダカは、田辺製薬(株)の魚類・甲殻類用麻酔剤FA100を1/2,000に希釈したもので麻酔した。次に40倍で検鏡し、乳頭状突起の有無で雌雄の判定をした。この後、二次性徴が発現し乳頭状突起のある雄だけを選び出し、尻鰭以外の部分を傷つけないように充分注意して、ゴムマットの上で尻鰭をカミソリですばやく切り取った。なお、この処理でメダカが死ぬことは殆どなく、麻酔が覚めると泳ぎだす。

また、実験に用いるメダカは体長(20~26mm)とし、それぞれの体長を記録した。そして、それぞれの実験区分で雄メダカ14個体の平均体長が、ほぼ同じになるようにした。これらの雄メダカ14個体は、水槽(38×80×27cm)に入れ、止水水中で飼育した。餌は、テトラミン(ドイツテトラベルケ社)で1日2回食べ残しが無い程度に与え、3日に1回水換えをした。水換えのたびに規定の濃度になるように内分泌攪乱化学物質を加えた。飼育温度は26~30で、飼育期間は3週間である。3週間後に麻酔をかけて、再生してきた尻鰭の乳頭状突起数を調べた。ただし、尻鰭を腹部近くまで切り過ぎたりすると尻鰭の再生が異常になる個体(図1、2)があるので、その場合には対象からはずした。



図1 正常な再生



図2 異常な再生

4. 統計的検定法

実験データの統計的検定方法は、文献^{5,6)}を参考にした。乳頭状突起数に対する影響は、JSTAT(佐藤真人氏のフリーソフト)を使用してMann-WhitneyのU検定、Scheffeの多重比較、及びSpearmanの順位相関分析を行った。

結果

1. 内分泌攪乱化学物質が乳頭状突起の再生に及ぼす影響(実験1)

(1) 乳頭状突起の形成

3週間後に、尻鰭の乳頭状突起が形成したものの(図3)としなかったもの(図4)の例を示した。



図3 ビスフェノールA 1ppbでは、乳頭状突起が形成する。

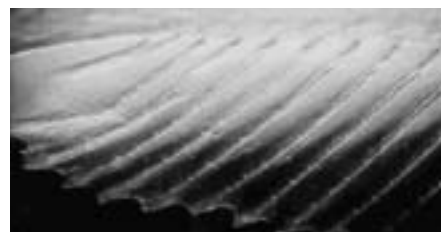


図4 ビスフェノールA 1500ppbでは、乳頭状突起が形成されない。

雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法の評価と内分泌攪乱化学物質の組み合わせの影響

埼玉県立深谷第一高等学校 生物部 熊谷 光敏 波多野 崇 熊谷 翠

(2) 内分泌攪乱化学物質の濃度とその影響

内分泌攪乱化学物質を含んだ水で3週間飼育した後、乳頭状突起の再生に及ぼす影響を調べた結果を図5に示した。

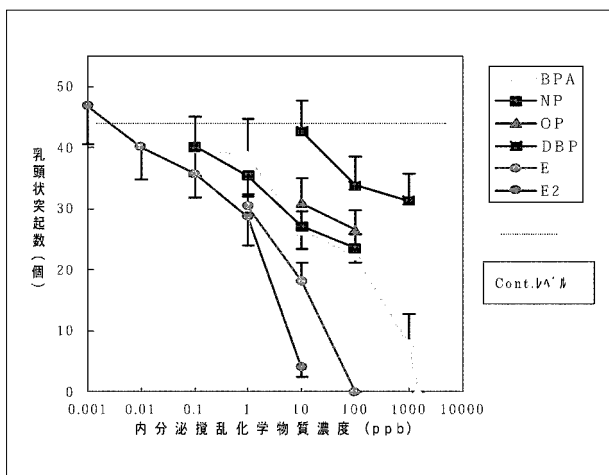


図5 乳頭状突起再生に及ぼす影響
棒線は標準誤差を表す。各点での標本数は、9 N 14。
ただし、エストロン100ppbは、N=3

コントロールの乳頭状突起数は、 42.8 ± 3.7 個 (N = 13)であった。乳頭状突起数について、コントロールとそれぞれの濃度区分でMann-WhitneyのU検定 ($P < 0.05$)を行ったところ、E2とEは1ppb以上で、BPA、NP、OPは10ppb以上で有意差があった。

これらの物質の濃度と乳頭状突起数との関係を調べるためにSpearmanの順位相関分析を行った。その結果を以下に示した。

- E2 $r_s = -0.75$ (N = 67, $P < 0.01$)
- BPA $r_s = -0.69$ (N = 88, $P < 0.01$)
- E $r_s = -0.65$ (N = 43, $P < 0.01$)
- NP $r_s = -0.42$ (N = 64, $P < 0.01$)
- OP $r_s = -0.41$ (N = 40, $P < 0.05$)
- DBP $r_s = -0.29$ (N = 48, $P < 0.05$)

以上の結果から、E2、E及びBPAでは、

$$0.6 \quad r_s < 0.8$$

なので濃度と乳頭状突起数に負の相関があり、NP

とOPでは、

$$0.4 \quad r_s < 0.6$$

なので弱い負の相関があると言える。

2. 内分泌攪乱化学物質の毒性(実験1)

途中でメダカが全滅する実験区分が出てきたので、コントロールに対して生存率が低かった内分泌攪乱化学物質の毒性の強さも調べることにした。その結果を図6に生存曲線として示した。

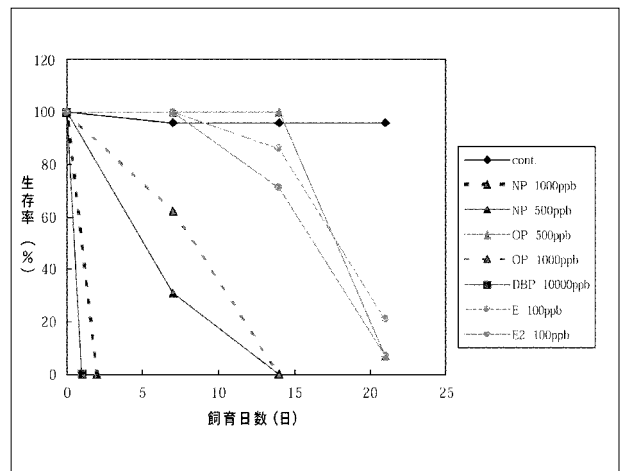


図6 内分泌攪乱物質濃度と生存曲線

この図6の結果をメダカの半数以上が死んでしまう濃度と日数をまとめると以下の通りである。

- E2 100ppb(21日) E 100ppb(21日)
- NP 500ppb(7日) NP 1000ppb(2日)
- OP 500ppb(21日) OP 1000ppb(14日)
- DBP 10000ppb(1日)

これに対して、21日後でもE2とEの10ppb以下、NPとOPの100ppb以下、DBPの1000ppb以下及びBPAの1500ppb以下の濃度では、90%以上が生きていた。

したがって、毒性の強さ(致死作用)に順番をつけると以下ようになる。

- E 100ppb E2 100ppb > NP 500ppb > OP 500ppb > DBP 1000ppb > BPA 1500ppb

3. 内分泌攪乱化学物質の相乗効果(実験2)

内分泌攪乱化学物質を含んだ水で3週間飼育した後、乳頭状突起の再生に及ぼす影響に相乗効果があるか調べた結果を図7に示した。

コントロールとそれぞれの実験区分とでMann-WhitneyのU検定 ($P < 0.05$) をした結果、“E2”と“4種類”に有意差があった。また、Scheffeの方法で多重比較 ($P < 0.05$) したところ、“4種類”はすべての実験区分とに有意差があった。

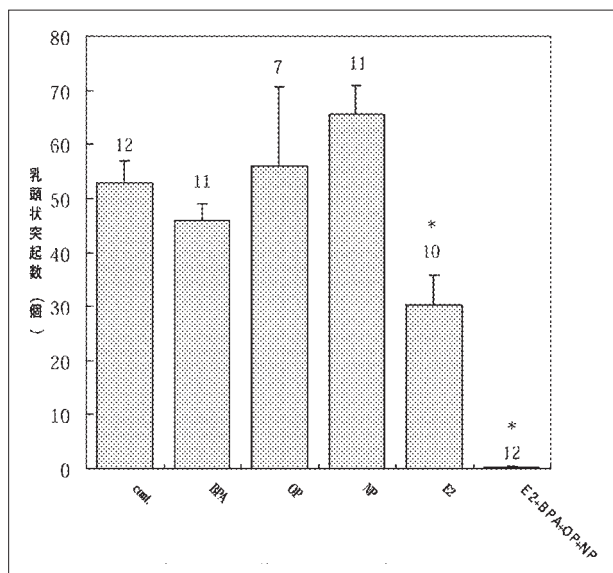


図7 内分泌攪乱化学物質の相乗効果

コントロールとそれぞれの実験区分とでMann-WhitneyのU検定をし、有意差 ($P < 0.05$) のあった実験区分の棒グラフ上に*印を示した。棒グラフ上の数字は標本数であり、棒線は標準誤差を表す。

表2 エストロゲン作用の測定方法とその閾値(濃度はppb単位)

試験方法	使用生物	発表者	E2	BPA	OP	NP
幼生の性分化	アフリカツメガエル	Kloas ⁷⁾	2.7	23	2.1	22
ピテロゲニン	ニジマス	Sumpster ⁸⁾	0.001 ~ 0.01			
ピテロゲニン	ローチ	Sumpster ⁸⁾	0.05 ~ 0.1			
ピテロゲニン	メダカ(成魚)	本城凡夫 ⁹⁾	0.0557			
ピテロゲニン	メダカ(成魚)	環境省 ¹⁰⁾	0.1		64.1	22.5
ピテロゲニン	メダカ(稚魚)	環境省 ¹⁰⁾			11.4	11.6
雌特異タンパク質	メダカ(成魚)	Magara ¹¹⁾	0.005	10		0.1
稚魚の性分化	メダカ(稚魚)	萩野哲 ¹²⁾	1			
精巢卵	メダカ(稚魚)	Potter ¹³⁾		10		
乳頭状突起数	メダカ(成魚)	深谷第一高	1	10	10	10

考察

1. 乳頭状突起を指標にした試験法の評価(実験1)

図11より、E2とEは1ppb以上で、BPA、NP、OPは10ppb以上で、コントロールに対し有意差があり、また、濃度に依存して乳頭状突起数が減少する傾向がある。したがって、仮説(1)は立証でき、雄メダカの再生した乳頭状突起数を指標にして、内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様作用を数量的に比較できることが判った。更に、この方法の評価を判定するために、ホームページや文献⁷⁻¹³⁾で調べた他の試験法の実験結果を表2にまとめた。なお、濃度については、水溶液濃度をppb単位に統一し、エストロゲン様作用が確認できた閾濃度とした。

表2から、E2に対するNPのエストロゲン様作用の相対強度を比較した場合、環境省のメダカ(成魚)のピテロゲニン法では約1/200倍、Magaraのメダカ(成魚)の雌特異タンパク質では約1/20倍、Kloasのアフリカツメガエルと深谷第一高校のメダカ(成魚)の乳頭状突起数とでは、約1/10倍である。したがって、アフリカツメガエルやメダカ(成魚)を使用した場合、相対強度のオーダーにあまり大きな差はない。

また、試験した3つの内分泌攪乱化学物質(BPA、OP、NP)の閾値のオーダーも、他の生体内試験結

雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法の評価と内分泌攪乱化学物質の組み合わせの影響

埼玉県立深谷第一高等学校 生物部 熊谷 光敏 波多野 崇 熊谷 翠

果とほぼ一致している。ただし、乳頭状突起を指標にした試験法のE2の閾値は、ピテロゲニンや雌特異タンパク質を指標にした試験法に比べて大きい。しかし、萩野とKloasの性分化を用いた両試験法とは、オーダーで一致した。

以上のことから、成魚の雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法は、有効性があり評価できる。また、この試験法は、メダカが水棲動物であることから水環境における生態系への影響を調べる方法として適しており、高校生でもできる簡便さが優れていると言える。

2. 内分泌攪乱化学物質の毒性(実験1)

この実験で使用しているメダカの数、それぞれの実験区分で14個体であり、致死作用として毒性を議論するには数が少ないかもしれないが、コントロールや低濃度区分では、21日後の生存率が90%以上である。しかし、内分泌攪乱化学物質がある濃度以上になると、生存率が極端に低下してしまう。したがって、これは、やはり内分泌攪乱化学物質の毒性によると考えたほうが自然であろう。

エタノールも高濃度になると毒性があるが、全ての濃度区分で同じ濃度のエタノールが含まれている。それにも関わらず、内分泌攪乱化学物質がある濃度以上になると生存率が低下するので、0.01%(v/v)のエタノールは毒性の原因ではないと考えられる。ただし、より正確な毒性試験を行うには、エタノールを全く含まない区分も用意する必要がある。

この実験は致死作用としての毒性を調べる実験として計画したものではないが、コントロールや低濃度区分に対して明らかな差があった濃度の物質については、敢えて議論したい。

致死作用として的一般毒性のデータは、ホームページや文献で調べても少なく(特に、溶液の濃度と

してのデータ)、NP以外のデータは参考にならなかった。そのNPのデータがある環境省¹⁰⁾のホームページによると、欧州委員会では、ニジマスなどの魚類を試験生物として、96時間(4日)半数致死濃度はLC₅₀ = 128 ~ 310ppb、カナダ環境省及び厚生省では18種類の魚類ではLC₅₀ = 17 ~ 1400ppbでその大部分は100 ~ 300ppbであると報告している。メダカの実験結果(図12)では、500ppbで7日後に約31%が死滅し、100ppbの濃度では21日後でも生存率が93%以上だったので、致死作用を示す閾濃度は、100ppb ~ 500ppbの間にあると思われる。したがって、文献で調べたデータとあまり大差がない。NP以外の物質のデータは少ないので、今回出したメダカのデータは水環境における生態系への影響を調べる上でそれなりに意義があると思う。

3. 内分泌攪乱化学物質の相乗効果の検出(実験2)

図13から、E2にBPA、NP、OPを加えた“4種類”では、単独の“E2”以上の影響があり、乳頭状突起の形成をほぼ完全に抑制するほど強い影響あるといえる。この“4種類”の影響の強さは、図11で示したE2の10ppbの濃度に相当するが、単独のBPA、NP、OPでは、高濃度の100ppbにしても乳頭状突起の形成をほぼ完全に抑制することはできない。“4種類”に加えてあるE2濃度は0.5ppbなので、他の内分泌攪乱化学物質が組み合わせることによって、その効果が20倍(0.5ppb × 20 = 10ppb)となり、相乗効果が現れたといえる。

したがって、“いくつかの内分泌攪乱化学物質が組み合わせると相乗効果が現れる”という仮説(2)は、この実験条件において立証できた。また、河川の汚染が、このような濃度の組み合わせであるとしたら、雄メダカの乳頭状突起を指標にした試験法で検出できる可能性がある。ただし、日本の河川におけるこれらの物質の濃度は、この実験で

設定した濃度に比べてかなり低い値である。建設省¹⁴⁾のデータを基に、これら4つの物質の汚染状況実態を表3にまとめた。

表3 日本の河川における内分泌攪乱化学物質の汚染状況実態 (1998年建設省データ)

内分泌攪乱化学物質	実験設定濃度 (ppb)	河川の最高濃度 (ppb)	調査で検出した地点の割合 (%)
BPA	5	1.4	57.4
NP	5	3.0	51.7
OP	5	0.7	3.1
E2	0.5	0.027	86.7

表3より、実験で設定した濃度は、日本の河川の最高濃度より約2～19倍高い。したがって、実際の河川で複合的な汚染による相乗効果があったとしても、乳頭状突起を指標にした試験法でその影響を検出することは難しいかもしれない。しかし、Sumpter⁸⁾らの報告では、イギリスのRiver Aire流域では、24～53ppbのNPが検出されているので、この場合では単独のNPの影響をこの試験法で検出できる。今後の課題として、日本の河川の最高濃度レベルでの組み合わせで実験を計画し、相乗効果が現れるか調べたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、生物部顧問の服部明正先生にインターネットによる文献の検索方法・翻訳方法及びコンピュータによる統計的検定法・グラフ作成をご指導いただき、感謝いたします。また、この論文をみていただき、アドバイスをいただいた高知大学の種田耕二、岩崎望両先生にも厚く御礼申し上げます。なお、英文を翻訳するのに農林水産省農業生物資源研究所DNA管理情報科のホームページにあるzip-translator(<http://zip-translator.dna.affrc.go.jp/indexJ.html>)を利用しました。また、統計的検定法は、佐藤真人氏のフリーソフトJSTAT(<http://www.vector.co.jp/>

vpack/filearea/win95/business/calc/index.html)を使用しました。以上の関係団体・諸氏に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. 深谷第一高校生物部(1995) 雌メダカに対するメチルテストステロンの影響について
2. 深谷第一高校生物部(1998) 雄メダカに対する内分泌攪乱化学物質の影響について
3. 環境省(1998)水環境中の内分泌攪乱化学物質の実態概況調査(夏季)結果について
<http://www.env.go.jp/press/press.php3?Serial=687>
4. Oshima Yほか(1998)Transgenerational toxicity of tributyltin and its combined effects with polychlorinated biphenyls on reproductive processes in Japanese medaka(*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem.*18(4):717-721
5. 内田滋(1996)すぐわかるEXCELによる実験データの解析. 東京書籍
6. クリス・バーナードほか(1995)生物学の考える技術. 講談社
7. Kloas Wほか(1999)Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci Total Environ.*225(1-2):59-68
8. IUPAC編 宮本純之 監訳(1999)エンドクリン白書.pp147-261.化学工業日報社
9. 本城凡夫ほか(2000)17 エストラジオールに暴露されたメダカの繁殖とビテロジェニン誘導の関連. 日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会要旨集. p.214
10. 環境省(2001)ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告(案)
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1301/index.html>
11. Magara Yほか(2001)Estrogenic influences of estradiol-17 beta, p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese medaka(*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. *Water Sci Technol.*43(2):109-16
12. 萩野哲(2000)メダカを用いる試験法. 今井清・長村義之・加藤正信・菅野純 編『内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法』pp.127-132.シュプリンガー・フェアラーク東京.
13. Potter T(2001)Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20(2):297-308
14. 建設省(1998)平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査について