S-rR系メダカ(*Oryzias latipes*)を用いた三世代フルライフサイクルに及ぼす4-ノニルフェノールの影響試験

林 彬 勒* 萩 野 哲† 籠 島 通 夫† 芦 田 昭 二† 原 匠†
 岩 松 鷹 司† 東 海 明 宏* 吉 田 喜久雄* 米 澤 義 堯* 富 永 衛*

中 西 準 子*

Three-Generation Full-Life-Cycle Study on 4-Nonylphenol Using S-rR Strain Medaka (*Oryzias latipes*)

Bin-Le LIN*, Satoshi HAGINO†, Michio KAGOSHIMA†, Shouji ASHIDA†, Takumi HARA†,
 Takashi IWAMATSU†, Akihiro TOKAI*, Kikuo YOSHIDA*, Yoshitaka YONEZAWA*, Mamoru TOMINAGA*
 and Junko NAKANISHI*

* Research Center for Chemical Risk Management, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 16-1 Onogawa, Tsukuba 305-8569

† Sumika Technoservice Corporation, 2-1 Takatsukasa, 4-chome, Takarazuka 665-0051

‡ Aichi University of Education, 16 Terayamashita, Igaya-cho, Kariya 448-0001

Abstract

Methodology development for the population-level ecological risk assessment of chemicals with potential endocrine disruption has become a research focus in recent years. A multigeneration full-life-cycle experiment on 4-nonylphenol (4-NP) using S-rR strain medaka was designed and conducted with this focus. This paper provides an overview of the experiment and presents some of the important results of the experiment. The experiment was designed for three generations (approximately 70 days per generation) to determine 1) the effectiveness and biological significance of each of the orthodox endpoints for endocrine disruption from the standpoint of population-level impact, 2) the correlations between the respective endpoints, 3) the possibility of intergenerational sensitivity, and 4) the incidence between the males and females. S-rR strain medaka was employed due to its biological merit of hereditary difference in body color for male and female, which is useful for the detection of a slight endocrine disruption effect on secondary sexual characteristics and reproduction. Seventeen β -estradiol (E2) compounds were used as a positive control. Fertility, the frequency of testis-ovum appearance in the male gonad, and the secondary sexual characteristics were found to have good dose-effect relationship. None of strengthened effect expressed in most of the measure endpoints for 4-NP and E2 were observed to cross from one generation to another. Males were more sensitive than females.

Key words: 4-nonylphenol, multigeneration full-life-cycle experiment, endocrine disruption, medaka, population-level impact

1. はじめに

化学物質による生態系への影響を「生態リスク」として定量的に捉えることにより、持続可能な生態系を目指した化学物質の共存利用に関する環境政策を提案することができる。近年、化学物質の影響から生態系を守りその機能と構造を保全するためには、生物の個体群存続という観点からのリスク評価が必要であることが、科学的知見をベースに導いたものとして世界的な共通認識となりつつある^{1,2)}。環境毒性化学会 (SETAC) は、個体群レ

ベルでの生態リスク評価を促進するために、2003年8月に科学的及び行政管理的な視点から、初めての国際ワークショップ (SETAC Pellston Workshop: Population-Level Ecological Risk Assessment, Roskilde Denmark, 22-28 August 2003) を開催した^{2,3)}。化学物質による生態系への影響は生物個体レベルではなく個体群レベルからの評価が合理的であることが1980年代中期に指摘された。それ以来、個体群生態学の知見を基礎にした評価の手法開発について、生態学者による理論的な研究が幾つか行われてきた⁴⁾

* 独立行政法人産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センター 〒305-8569 つくば市小野川16-1

† 住化テクノサービス株式会社 〒665-0051 宝塚市高司4-2-1

‡ 愛知教育大学 〒448-0001 刈谷市井ヶ谷町寺山下16

〜⁷⁾。しかし、実際の環境政策に導入するためには、何を評価エンドポイントにするか、どのように評価すべきかが重要であるにもかかわらず、それらについての議論も少なくその実用的な評価手法の確立には至っていない¹⁾。筆者らは環境庁（現在の環境省）が発表したヒメダカの4-ノニルフェノール（4-NP）のフルライフサイクル試験データ^{8,9)}を活用して、メダカ個体群存続への影響という観点から解析を行い、化学物質の管理政策の策定に資することのできる実用的な個体群レベル生態リスク評価手法を提案した¹⁰⁾。しかし、環境庁のフルライフサイクル試験はそもそも個体群レベルの影響評価のために設計したものではないし、またヒメダカを用いたため外見的な二次性徴に頼った性の判別による繁殖フェーズ時のペアリングの限界等より、提案した個体群レベル評価手法による解析結果を使うには観察項目が不足である等、幾つかの留意点が指摘された¹⁰⁾。また、提案した個体群レベル評価手法のフレームワークでは、1世代目のフルライフサイクル試験における生存率と出生数のみを考慮したもので、4-NPのような内分泌攪乱作用の疑いが持たれる化学物質の評価には、このフレームワークが適当であるのかという疑問が残る。内分泌攪乱化学物質による生殖影響は世代間で累積継代的に作用すると多くの研究に指摘されている⁸⁾ことから、1世代目のみの毒性試験結果を基にした評価にはまだ検討課題が残されている。このように、内分泌攪乱作用は、生殖巣分化の異常、精巣卵形成、ビデロジェニン誘導、第二性徴の異常及び繁殖期の乱れなどを引き起こすが、これらは生死に直接関わっていないため、提案した個体群影響評価手法のフレームワークに直接取り込んでいない。これらの内分泌攪乱測定エンドポイントをそのフレームワークに取り込む必要があると思われるが、どう取り込むのかについては、早急に取り上げるべき研究課題と言える。

一方、潜在的に外因性の内分泌攪乱作用を有している可能性が懸念されている多数の化学物質を見極めるため、経済協力開発機構（OECD）等でそれを検出するための試験法が提案され、魚類についても検証作業が進んでいる¹¹⁾。その中で、様々なエンドポイントが選択され¹²⁾、観察調査されている。しかし、現状ではそれらの個々のエンドポイントについて影響の有無を報告するにとどまり、それらの内最も感受性の高いものを基準に無影響濃度を求め評価を行っているのが殆どである。提案されてきた魚類に関する試験法では、これらのエンドポイントの関連性やその生物学的意味などについては十分に言及されないままであった。また、多世代フルライフサイクル試験の提案についてもなぜそれが必要か十分な説明がなかった。更に、4-NPのような内分泌攪乱作用を有する可能性のある物質については、従来雄への影響しか検討されておらず、雌への影響及び影響の雌雄差についてもほとんど言及されていない。

筆者らは、内分泌攪乱化学物質についての①個体群レベル生態リスク評価手法の開発及びそのための②毒性試験法の提案を最終目的として、内分泌攪乱化学物質にまつわる様々な疑問、様々な内分泌攪乱測定エンドポイントの持つ生物学的意味、及びOECDで提案された試験法

の限界などを解明するため、4-NPを被験物質とした三世代フルライフサイクル試験を実施した。ここでは、陽性対照物質として17 β -エストラジオール（E2）の試験も並行して実施した。4-NPとE2の試験を並行実施することによって、4-NPのような内分泌攪乱作用を有する可能性のある物質がもたらす影響を水系に遍在しているE2による影響と同時に比較し評価できるように配慮した。また、2.4項に記載した各種の測定エンドポイントについては個体毎にデータを取ることで、これらの相互関係を明確に分析できるように計画し、個体群存続への影響の観点から各内分泌攪乱測定エンドポイントの生物学的意義の解明や重要性についてのランク付けにも資するよう設計した。供試生物には、遺伝的雌雄が体色によって識別できるS-r系メダカを用い、暴露個体同士のみならず、暴露個体と非暴露個体とのペアを形成して雌雄への影響比較を試みた。本論文では、上記に関する一連検討の皮切りとして、まず三世代フルライフサイクル試験の全体像を示した上、得られた重要な結果の一部を報告する。

2. 実験方法

2.1 供試生物

S-r系メダカ（*Oryzias latipes*）を用いた¹³⁻¹⁶⁾。S-r系メダカは、住化テクノサービス(株)で育種され累代飼育しているもので、本試験には19世代以上を経過した系統の卵を用いた。S-r系メダカを用いることにより、その体色と第二性徴による遺伝的な性と機能的な性を容易に判断することができるため、軽微な内分泌攪乱影響を正確に評価できるとともに、ペアリングの成功率を確保できる。

2.2 被験物質、試薬および分析方法

被験物質として、4-ノニルフェノール（4-NP、関東化学(株)、生化学用、純度96.7%）を用い、その溶解助剤としてジメチルホルムアミド（DMF、ナカライテスク(株)、試薬特級、純度99.5%）を用いた。また、陽性対照物質として、17 β -エストラジオール（E2、和光純薬工業(株)、生化学用、純度97.3%）を用いた。試験原液の濃度は試験液の設定濃度（暴露濃度）の1万倍とし、シリンジポンプを用いて混合槽に導いた。ここで希釈水と試験原液とを混合した後、試験水槽に送液した。4-NP、E2ともにGC-MS（SIM）を用いて10日間に1度の頻度で濃度を測定した。半止水式としたP世代の繁殖フェーズでは溶液交換前後の濃度を2回ずつ測定した。なお、NPおよびE2の定量限界は各々1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 、1 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ とした。

2.3 供試生物の暴露方法

試験期間を、受精卵から3世代、各世代約70日間（胚フェーズ8〜9日、成長フェーズ30日、繁殖フェーズ30日）とした。試験液の設定濃度は、過去に実施された試験結果^{8,9,17)}を基に4-NPを8, 16, 32, 64 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ の4つの暴露濃度区を設けた。対照区として、E2を16, 32, 64 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ とした3つの陽性対照区、DMFを100 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ 含む助剤対照区および清水のみの清水対照区を設けた。4-NPの暴露濃度区およびE2の暴露濃度区のDMF濃度は全て100 $\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ とした。

雌雄いずれに対する影響かを調査する目的で、繁殖フェーズでは暴露個体同士のペアの他、暴露個体と非暴露

Fig. 1 Schematic time schedule of the present 3-generation full life-cycle study.

個体とのペアリングも行った。非暴露個体を確保するため、清水対照区と飼育条件を同一にした予備区を別途設けた。3世代を通じて連続流水式を採用したが、第1世代（P世代）の繁殖フェーズのみ毎日溶液交換の半止水式とした。メダカは受精卵から孵化後20日までは20個体/5Lガラス製水槽、孵化後20日から30日までは20個体/20Lガラス製水槽、その後は雌雄1ペア毎にステンレスメッシュ製1Lビーカーに導入した。ただし、第1世代についてはペアはガラス製1Lビーカーに導入した。暴露時の水温は25℃、照明は16時間明/8時間暗の日周期に設定した。孵化直後からアルテミアを毎日2~3回適量給餌した。全体のスケジュールはFig. 1に示す通りであった。E2の32および64 ng・l⁻¹区は得られた子孫の数が不十分であったため、各々のF2世代、64 ng・l⁻¹のF1世代の暴露を行わなかった。

2.4 観察項目

測定エンドポイントとして、各世代の孵化率、孵化日数、生残率、成長（全長・体重）、孵化後の産卵開始日数（days post-hatching, dhp）、産卵個体数、産卵数、第二性徴（臀鰭の①後から2番目の軟条の節数、②乳頭状突起が発現した軟条数、③1軟条に発現した最大乳頭状突起数）¹⁸⁾、生殖腺指数（GSI）、精巣中の精巣卵の有無およびその個数と発育ステージを観察した¹⁹⁾。また、P世代には肝臓ビテロジェニン濃度（VTG）も測定した。測定エンドポイント間の比較を実施するため、観察は個体毎に実施した。

孵化率は受精7日後より全個体について孵化または死亡するまで毎日観察し、孵化終了時に算出した。孵化日数は各濃度毎に平均日数を算出した。全体の孵化日数は清水対照区の平均日数を基準とした。全長、体重は孵化後30日および60日に各濃度20ペアずつ測定した。産卵開始日（dhp）、産卵個体数および産卵数は個体毎に孵化後30日から60日まで毎日観察した。観察ペア数は原則として6~12ペアとした。受精率は繁殖フェーズの受精卵数の合計を総産卵数で除して算出した。雌雄いずれに影響が発現しているか判定するため、暴露魚と非暴露魚のペアによる産卵数、受精率も確認した。

VTG誘導量はP世代の繁殖フェーズ終了時に肝臓試料より測定した。氷冷水で麻酔した魚より個体毎に肝臓を注意深く切り出して重量測定後ドライアイスで直ちに冷凍し、使用まで-20℃で保存した。肝臓ホモジネートは氷冷緩衝液（PBSに40 mM EDTAおよび5 μg・ml⁻¹アプロチニ

ン添加）を加えてマイクロホモジナイザーで調製した。VTG濃度は市販の抗メダカVTG抗体（エンバイオテックラボラトリーズ、東京）を用いて測定した²⁰⁾。96穴マイクロタイプレート中で試料をインキュベートし、酵素反応後、プレートリーダー（ARVO SX 1420; PerkinElmer Life Science）で490 nmおよび650 nmの吸光度を測定した。VTG濃度を以下の式により算出した：

$$\text{VTG濃度 (}\mu\text{g}\cdot\text{mg liver}^{-1}\text{)}$$

$$= \text{VTG測定値} \times \text{希釈率} \times \text{上澄容量} / \text{肝臓重量}$$

第二性徴のうち、①については分節計数法を採用した¹⁸⁾。供試魚の精巣、卵巣はホルマリン標本から注意深く切り出し、重量を測定した。GSIは以下の式により算出した：

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

雄個体の約半数について精巣全体を解剖針で分解し、小片化法¹⁹⁾で精巣卵の有無を観察した。精巣卵が見出された場合は、その数（1~9, 10~99, 100以上にランク分け）と最大の精巣卵の発育ステージを記録した。

各試験水槽の試験液のpH、溶存酸素濃度（D.O.）、水温を原則10日間毎に測定した。

2.5 統計解析

基本的にカイ2乗検定もしくはグループ間の差の検定を行い、2グループの比較にはt検定、3グループ以上の比較には一元配置分散分析を用いた。あらかじめデータの正規性の検定（Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk統計量）、Leveneの等分散性の検定を実行し、正規性・等分散性の仮定が満たされれば、BonferroniまたはSidakの多重比較検定による分散分析を、正規性はあるが等分散仮定が適用できない場合は、Brown-Forsythe, Welchでグループ平均値の等質性を検定し、その後の検定でTamhaneのT2, Dunnett, またはGames-Howellを、正規性の仮定が満たされない場合にはノンパラメトリック検定（Kruskal-Wallis検定, Mann-Whitney検定）をそれぞれ適用した。有意差基準は原則としてp<0.05とした。なお、統計解析はSPSS for Windows 11.5.1Jを用いた²¹⁾。

3. 結果

実験期間における試験溶液中の被験物質濃度の測定結果をFig. 2に示す。4-NP濃度はP世代の繁殖フェーズ（半止水式）以外では設定濃度の66~119%を維持した。半止水式の場合、調製当日はほぼ設定濃度を維持したものの、

1日後にはその9~31%に低下した。このため、F1、F2世代の繁殖フェーズでは連続流水式を採用した。試験期間中、試験液のpHは7.5~8.1、D.O.は飽和量(8.11 mg・l⁻¹, 25℃)の60%以上、水温は24.8~25.8℃で、いずれの試験区でも問題はなかった。

孵化はいずれの試験区でもP、F1、F2世代ともほぼ8~12日で起こり、濃度間の差は認められなかった。孵化率はF2世代の16 ng E2・l⁻¹区で36%と低かった以外は対照区と同様に90%以上を示した。一方、孵化後64 μg 4-NP・l⁻¹区では仔稚魚の生残率がP、F1、F2世代ともに低く、他の濃度区でも一部生残率が対照区に比べて有意に低下した

(Table 1)。孵化後30日のP、F1およびF2世代の仔稚魚の成長には試験区により多少の変動が認められたが、16 μg 4-NP・l⁻¹の雌雄の全長の例に見られるように、F1世代で有意に低かったものの、濃度依存性が見られないこと、またF2世代にその傾向が伝わっていないことから、成長に対する化合物の影響はなかったものと判断された (Fig. 3)。

Fig. 2 Measured concentrations for 4-NP and E2 during the 3-generation full life-cycle study.

Table 1 Survival rates of hatching fish exposed to NP or E2.

Concentration	Survival rate (%)		
	P	F1	F2
Control	95.8	94.2	82.5
Solvent control	86.7	90.8	85.0
4-NP 8 μg·l ⁻¹	87.5	86.7	82.5
4-NP 16 μg·l ⁻¹	76.7	97.5	49.2
4-NP 32 μg·l ⁻¹	76.7	87.1	45.4*
4-NP 64 μg·l ⁻¹	57.5*	36.7*	65.8
E2 16 ng·l ⁻¹	90.0	78.3	46.4
E2 32 ng·l ⁻¹	84.2	87.5	-
E2 64 ng·l ⁻¹	80.8	-	-

- means no data; * p<0.05

Fig. 3 Mean total length of test fish (30 dph) in each generation
Generation : ■ =P, □ =F1, ▤ =F2, * p<0.05

Fig.4 Percentage of egg producing females in each generation

◆ Control, ■ Solvent, ▲ NP=8 μg·l⁻¹, × NP=16 μg·l⁻¹, ◇ NP=32 μg·l⁻¹, ● NP=64 μg·l⁻¹, × E2=16 ng·l⁻¹, ◇ E2=32 ng·l⁻¹, ● E2=64 ng·l⁻¹

Table 2 Secondary sexual characteristics of fish exposed to 4-NP or E2 in three generations (mean $\pm$ SD).

Concentration & Sex		No. of fish tested	GSI ¹⁾	Anal fin		
				Node ²⁾	Max app ³⁾	Ray / app ³⁾
Control	♂	32	1.1±0.3	20.0±2.1	19.4±2.3	7.8±1.4
	♀	33	13.1±2.8	10.8±1.2	0.0±0.0	0.0±0.0
Solvent control	♂	32	1.1±0.3	20.0±2.0	19.2±2.4	7.5±1.4
	♀	31	13.9±4.5	10.0±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0
4-NP 8 µg·l ⁻¹	♂	36	1.7±4.4	19.6±2.9	17.5±3.8	7.5±1.7
	♀	31	12.4±4.1	10.1±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
4-NP 16 µg·l ⁻¹	♂	35	1.8±3.4	18.8±3.5	16.5±5.1	6.9±2.2
	♀	35	14.2±4.6	9.6±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
4-NP 32 µg·l ⁻¹	♂	61	4.7±6.6*	15.1±4.1	9.4±7.7	4.4±3.6
	♀	72	17.4±9.6	9.8±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
4-NP 64 µg·l ⁻¹	♂	55	13.0±7.9*	10.7±1.9	1.0±3.2	0.6±2.0
	♀	44	17.7±8.0	9.6±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0
E2 16 ng·l ⁻¹	♂	30	1.8±2.5	14.9±3.2	9.6±6.4	5.3±3.1
	♀	28	14.3±6.6	10.1±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
E2 32 ng·l ⁻¹	♂	21	5.7±6.2	12.3±2.0	1.0±3.2	0.7±2.2
	♀	20	14.1±5.1	10.0±1.1	0.0±0.0	0.0±0.0
E2 64 ng·l ⁻¹	♂	10	14.6±10.2*	10.8±0.9	0.0±0.0	0.0±0.0
	♀	6	13.9±10.5	8.7±1.5	0.0±0.0	0.0±0.0

1) Gonado-Somatic Index = gonad weight / body weight $\times$ 100 (%); 2) Number of nodes in the second ray from the last one in the anal fin; 3) Maximum number of the small papillary processes on a ray in the anal fin; 4) Number of the rays with the small papillary processes in the anal fin; * p<0.05

Table 3 Appearance of testis-ova in genotypical males exposed to 4-NP or E2 in three generations.

Concentration	No. of fish tested	Testis-ova				Stage ²⁾	Sperm ³⁾
		Number of testis-ova (%) ¹⁾					
		0	1-9	10-99	>100		
Control	32	96.9	0.0	3.1	0.0	0.0	100
Solvent control	32	96.9	0.0	3.1	0.0	0.0	100
4-NP 8 µg·l ⁻¹	36	88.9	8.3	0.0	2.8	0.0	100
4-NP 16 µg·l ⁻¹	35	57.1*	22.9	8.6	11.4	0.0	100
4-NP 32 µg·l ⁻¹	63	6.6*	9.8	13.1	70.5	0.0	100
4-NP 64 µg·l ⁻¹	55	0.0*	0.0	5.5	94.5	0.0	100
E2 16 ng·l ⁻¹	30	23.3*	43.3	13.3	20.0	0.0	100
E2 32 ng·l ⁻¹	21	4.8*	0.0	0.0	95.2	0.0	100
E2 64 ng·l ⁻¹	10	0.0*	0.0	0.0	100.0	80.0	20.0

1) Number of testis-ova / individual (%); 2) Appearance of Testis-ova at vitellogenic phases (>150 μm) in the test fish (%); 3) Appearance of spermatozoa in the testis of the test fish (%); * p<0.05

産卵は孵化後34～40日に開始され、最終的にはほぼ90%以上の個体が産卵するに至った (Fig. 4)。4-NP, E2とも高濃度区では産卵開始の遅延傾向が認められた。特に4-NPの高濃度区では初期の受精率が低く、受精卵の生産が遅れた。産卵個体の占める割合はいずれの試験区でも加齢とともに増加した (Fig. 4)。4-NPおよびE2暴露区では対照区と比較して産卵数が少ない傾向が認められた。F1, F2世代ではP世代と比較して全体的に産卵数が少なかった。しかしながら、受精卵に着目すると総産卵数よりも明確に影響の傾向が示され (Fig. 5), 32 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上の4-NP暴露区および全てのE2暴露区で濃度依存的な減少が観察さ

れた。F1およびF2世代では、受精率はこれらの濃度区において暴露♂ $\times$ 暴露♀ペア同様、暴露♂ $\times$ 非暴露♀ペアでも低下が認められた。一方、非暴露♂ $\times$ 暴露♀ペアでは低下が認められなかった。また、高い暴露濃度区での暴露♂ (すなわち♀化した♂) $\times$ 非暴露♂ペアでも非常に低い受精率でありながら受精卵が得られ、♀化した♂が形態のみならず実際に♀として機能することが確かめられた。

♂の肝臓VTG誘導量は対照区ではほぼ検出下限未満であった (Fig. 6)。4-NP暴露区のVTG量は8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 区では調査した全ての個体で検出下限未満であったが、16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上

Fig. 5 The total mean values for fecundity (left) and fertility (right) in each condition (* $p < 0.05$)

E: exposure, N: not exposure, □ Control, ▤ Solvent, ▨ 4-NP=8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ▩ 4-NP=16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ▪ 4-NP=32 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ▫ 4-NP=64 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ▬ E2=16 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, ▮ E2=32 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, ▯ E2=64 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$

の区で濃度依存的に増加した。E2暴露区でも濃度依存的な増加が観察された。個体毎に観察すると、同一濃度区でも誘導VTG量にかなりのばらつきが観察され、誘導量の多い個体では精巣卵を有する傾向が認められた。♀においては、VTG量は $0.7\sim 2.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mg liver}^{-1}$ であった (Fig. 6)。E2暴露区では濃度依存的にVTGが増加する傾向が見られた。ただし、16 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ におけるVTG量は対照区よりも顕著に低かった。

対照区および助剤対照区のGSIは、3世代を通じて、♂で1.0前後、♀で11~15程度であり、世代を経た増加傾向は観察されなかった (Table 2)。

孵化後63~76日目に第二性徴として観察した腎臓軟条最大節数、乳頭状突起 (app) を有する軟条数および軟条が有するapp数は、対照区の♂では各々およそ20, 20, 8,

♀では10, 0, 0であった。暴露区の♂では3世代を通じて、4-NP暴露区では16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 以上、E2暴露区では全ての区で濃度依存的に減少が認められたが、♀ではこれらの形質に変化はなかった (Table 2)。♂の精巣内に誘導された精巣卵を持つ個体の割合は3世代を通じ、対照区、助剤対照区、4-NPの8, 16, 32, 64 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ 区、E2の16, 32, 64 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ 区で各々3.1, 3.1, 11.1, 42.9, 93.4, 100, 76.7, 95.2および100%であり、濃度依存性が認められた (Table 3)。ただし、各個体の有する精巣卵の状態は同一濃度内でも大きく異なり、卵母細胞の数やその発育ステージによりGSIの値が大きく変動した。また、対照区でも若干の精巣卵の存在が確認された一方、相当数の精巣卵が認められた暴露区の個体でも精子像が観察され、影響評価の際にその存在の有無よりも各々の性の機能を重視すべきことが示唆された。

4. 考察

OECDのTier 3試験で言及され¹¹⁾、環境省が環境ホルモン戦略計画SPEED'98²²⁾で確定試験として採用したフルライフサイクル試験の試験期間は、P世代の受精卵から繁殖フェーズに加えて、F1世代の受精卵から孵化後60日までとなっている。2世代にわたるのは、次世代への影響の強化の有無を決定する目的があるものと容易に推察できるが、その試験期間の採用理由については明言されていない。今回の試験で調査した測定エンドポイントの中にはかなりばらつきが大きいものも認められたが、特に世代を経るに従って影響が強くなる傾向のあるものはなかった。例えば産卵数は暴露濃度や世代で著しく変動したが、その理由は化合物の暴露濃度によって産卵開始時期に影響があるか否か

Fig. 6 Hepatic vitellogenin induction in P-generation

調べる目的で、産卵開始時より観察したため、個体間の産卵遅速が影響したためと考えられる。従来行われていた試験のように、十分に成熟して安定産卵を行っている個体を使用した場合は、もっと安定した産卵データが得られたものと推察できる。しかしながら、従来の試験で軽視されてきた産卵開始時期の遅れが個体群存続への影響をもたらす可能性のある測定エンドポイントとして重要視されるべきと考える。F1, F2世代ではP世代と比較して全体的に産卵数が少なく、流水式の影響も考えられた。産卵数に関しては、化合物の影響とともに環境諸要因の影響もあると思われる。Yokota らは環境省が示した確定試験法に従い、ヒメダカを用いた4-NPのフルライフサイクル試験⁸⁾と、併せてこの前段階のパーシャルライフサイクル試験およびビテロジェニンアッセイを実施した⁹⁾。これらの試験結果においても、試験期間のより短いパーシャルライフサイクル試験でより低い濃度でVTG誘導および精巣卵の発現が認められている。E2に関する今回のデータでも、世代間の各測定エンドポイントに対する影響の強化は認めらず、過去に得られたデータ²³⁾とも近似している。以上のことから、4-NPやE2のような蓄積性の低い化学物質においては世代が進むに従って累積的に影響が強化することではなく、内分泌攪乱影響を確定するために多世代フルライフサイクル試験を実施する必然性はないことが推察される。

Yokota らの試験⁸⁾結果の内、最も低濃度で影響が示されたパーシャルライフサイクル試験におけるVTG誘導および精巣卵の発現を基に、環境省は4-NPの最小影響濃度を11.6 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ とした⁹⁾。今回の試験でも4-NPでは、VTGの顕著な誘導は16 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上で濃度依存的に増加した。また、精巣卵の場合も対照区、助剤対照区での発現を考慮した上で16 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ が閾値近辺であり、VTG同様に濃度依存的な発現が認められ、Yokota らの試験とほぼ近似した結果が得られた。しかしながら、個体群存続への影響の観点からVTGや精巣卵の誘導生成のような血液・組織レベルの測定エンドポイントがわずかながら発現した場合に及ぼす生物学的意義については今後更に研究知見を蓄積する必要がある。例えば精巣卵の発現は、今回の試験では小片化法¹⁹⁾を用いて精巣まるごとを調査することにより暴露区に限らず清水対照区や助剤対照区でも観察され、精巣卵が化学物質の影響に関わらず一定の頻度で出現することが示唆された。今までよく用いられた組織切片法では見落としも多く、対照区では常識的には精巣卵が出現しないとみなされており、少数でも精巣卵が見出された濃度が影響濃度と判定された可能性が高いと思われる。実際に16 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 4-NP暴露区で相当数の精巣卵が見出された個体でも精子が観察されており、繁殖に影響が認められなかったことから、多少の精巣卵の存在は個体群存続への影響に問題ないものと言えそうである。個体毎の精巣卵出現と産卵及び受精との関係は今回得られたデータの解析によって、今後更に明確にする予定である。

今回の試験で安定して濃度依存的に観察された測定エンドポイントは受精率、第二性徴であった。精巣卵出現も感度の高い測定エンドポイントであるが、対照区にも出現することから、軽度な影響発現の生物学的重要性の

取扱いを考慮する必要がある。そのためにはまず、小片化法¹⁹⁾のような量的な試験法の導入が必須と考えられる。GSIはOECDの必須エンドポイントの1つに挙げられている¹²⁾が、今回の試験結果からもその有効性はかなり重症の影響にのみ当てはまると考えられた¹⁹⁾。暴露区の♂のGSIはほぼ濃度依存的に大きくなり、64 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 4-NPおよび64 ng E2 $\cdot \text{l}^{-1}$ では♀と同様の値を示し、これらの濃度で完全な性転換が誘導されていることが示唆された (Table 2)。♀の場合も高濃度区でGSIが高くなる場合が多く、その原因は、ペアの♂に性転換が誘導された結果、繁殖行動が起これず、排卵状態の卵が多数体内に残存したためと推察される。今回の生殖巣の観察結果より、低レベルの精巣卵出現は大きな繁殖影響にはなり得ないと推察される。VTGに関しては、その誘導にどの程度の生物学的意義があるのか、現在でも十分なデータが提出されておらず、議論が不十分である。以上、OECDで選択された3つの必須エンドポイント、①全体的な形態観察 (GSIと第二性徴の消長を含む)、②VTG量測定および③生殖巣の組織観察に関して多少の考察を加えたが、今後更に得られたデータを基に個体群存続の観点から解析し、各測定エンドポイント間の比較を行うことにより、それらの有効性や生物学的意義についてより深い考察を加える予定である。

今回の試験では、繁殖フェーズにおいて暴露個体同士のみならず、暴露個体と非暴露個体とのペアを用いて、雌雄いずれへの影響が大きい比較を試みた。このような比較は既にShioda & Wakabayashi (2000) によって試みられており、メダカ♂成魚を2週間暴露後非暴露の♀とペアにした場合、E2で3 nmol $\cdot \text{l}^{-1}$ 以上の濃度で産卵数および受精率が低下することを確認している²⁴⁾。今回我々もF1およびF2世代において受精率が暴露♂×暴露♀ペアおよび暴露♂×非暴露♀ペアで低下した一方、非暴露♂×暴露♀ペアでは低下が認められなかったことから、これらの化合物の影響が♂に大きいことを観察し、暴露個体と非暴露個体とのペアリングが雌雄別影響判定の有効な手段であることを示唆することができた。なお、P世代で明確なデータが得られなかったのは、最初に暴露個体同士のペアをつくり、その後片方を非暴露個体に換えたことに原因があると考えられる。♀が正常であっても初産時に異常な♂とペアリングした場合、卵膜の硬化した過熟卵が生殖口を塞ぐため、その後の産卵が困難になるようである¹⁵⁾。今回は更に、完全に♀に性転換した♂と非暴露の正常な♀とのペアも作成し、遺伝的な♀でも♀として機能することを証明した。今後、性転換が一部誘導された遺伝的♂個体において、雌雄いずれとして機能するのか個体群存続の観点からの評価を解析するに当たり、S-rR系メダカが有効な供試生物として活用できるものと考えられる。

(原稿受付 2004年06月11日)

(原稿受理 2004年10月4日)

参考文献

- 1) Pastorok, R.A., Bartell, S.M., Ferson, S. and Ginzburg, L.R. (eds.) (2001) Ecological modeling in risk assessment: Chemical Effects on population, ecosystem, and landscapes. Lewis Publisher, Boca Raton, FL: CRC Press.

- 2) SETAC Pellston Workshop on Population-Level Ecological Risk Assessment, 23-28 August 2003 in Roskilde Denmark. http://www.setac.org/eraag/era_pop_index.htm.
- 3) 林 彬勸 (2003) 特集：魚類個体群レベルにおける生態リスク評価, CRM ニュースレター, No. 5. <http://unit.aist.go.jp/crm/mainmenu/6-1.html#5>.
- 4) Feldman, M.W. and Roughgarden, J. (1975) A population's stationary distribution and chance of extinction in a stochastic environment with remarks on the theory of species packing. *Theoretical Population Biology*, 7, 197-207.
- 5) Leigh, E.G. (1981) The average lifetime of a population in a varying environment. *Journal of Theoretical Biology*, 90, 213-239.
- 6) Lande, R. (1993) Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Amer. Natur.*, 142, 911-927.
- 7) Foley, P. (1994) Predicting extinction times from environmental stochasticity and carrying capacity. *Conservation Biology*, 8, 124-137.
- 8) Yokota, H., Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T. and Kobayashi, K. (2001) Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2552-2560.
- 9) 環境省総合環境政策局環境保健部 (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), 平成13年8月, 平成13年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料2.
- 10) 林 彬勸, 東海明宏, 吉田喜久雄, 富永 衛, 中西準子 (2003) 魚類個体群レベルにおける生態リスク評価手法の提案—4-ノニルフェノールによるメダカ個体群評価のケーススタディー. 水環境学会誌, 26, 575-582.
- 11) OECD Test Guidelines Programme (1999) Report from the OECD Expert Consultation on Testing in Fish. London, 28th-29th October 1998. OECD.
- 12) OECD Test Guidelines Programme (2000) Record from the 2nd OECD Expert Consultation on Endocrine Disrupters Testing in Fish. Tokyo, 15th-16th March 2000. OECD.
- 13) Aida, T. (1921) On the inheritance of color in a freshwater fish, *Aplocheilichthys latipes* Temmick and Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6, 554-573.
- 14) Yamamoto, T. (1953) Artificially induced sex-reversal of genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* 123, 571-594.
- 15) 岩松鷹司 (1997) メダカ学全書. 360pp., 大学教育出版, 岡山.
- 16) 萩野哲 (2000) メダカを用いる試験法, 「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」(井上達監修), 127-132, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京.
- 17) Gray, M.A. and Metcalfe, C.D. (1997) Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1082-1086.
- 18) 林彬勸, 萩野哲, 籠島通夫, 芦田昭二, 岩松鷹司, 東海明宏, 吉田喜久雄, 米澤義堯, 富永衛, 中西準子 (2004) メダカ (*Oryzias latipes*) 第二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, 47-51.
- 19) 林彬勸, 萩野哲, 籠島通夫, 芦田昭二, 岩松鷹司, 東海明宏, 吉田喜久雄, 米澤義堯, 富永衛, 中西準子 (2003) メダカ (*Oryzias latipes*) 精巣卵の定量的検出のための新手法 (小片化法). 水環境学会誌, 26, 725-730.
- 20) Hara, T., Hagino, S. and Hosokawa, S. (2004) Quantification of vitellogenin in several developmental stages of medaka (*Oryzias latipes*) S-rR strain. *Environ. Sci.*, 11, 221-230.
- 21) SPSS (2002). *SPSS® Base 11.5.1 J for Windows User's Guide*. Tokyo, Japan.
- 22) 環境庁 (1998) 外因性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, 環境庁.
- 23) Hagino, S., Kagoshima, M. and Ashida, S. (2001) Effects of ethinylestradiol, diethylstilbestrol, 4-*t*-pentylphenol, 17 β -estradiol, methyltestosterone and flutamide on sex reversal in S-rR strain medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Sci.* 8, 75-87.
- 24) Shioda, T. and Wakabayashi, M. (2000) Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 40, 239-243.