

# S-rR 系メダカ(*Oryzias latipes*)を用いた外因性内分泌攪乱化学物質試験法の開発に関する研究

長崎大学大学院生産科学研究科

萩野 哲

野外で雄の魚が雌化する等の内分泌攪乱作用が顕在化する中で、多様な外因性のホルモン様作用を有することが懸念される物質がリストアップされ、これらの影響を評価する手法が求められた。本研究では、雄が橙色、雌が白色と、遺伝的な性が体色で判別できるメダカの系統に着目し、これを用いた性転換試験法を開発し、実際にこれが化学物質の内分泌攪乱作用を評価できることを証明した。

[第1章] 遺伝的雌雄を判別できるメダカの系統(S-rR 系)を育種・確立した。この系統は基本的に名古屋大学が育種したd-rR系と同等であり、遺伝的な性を示す不変の体色と、化学物質の作用で変化する機能的な性(背鰭、臀鰭の形態や生殖巣が精巣、卵巣いずれに誘導されるか)を比較することにより、性転換が誘導されたか否かが明確に判定できることが期待された。ここでは名古屋大学のFLF II系と感受性差がないことも確認した。

[第2章] S-rR 系の育種と並行して、機能的性転換の指標として有効に使用できる形質をメダカの発育を踏まえながら比較選択した。その後、S-rR 系メダカ用い、内分泌攪乱化学作用(ED)の有無が容易に判定できる試験法を、暴露期間の検討結果に基づき応用開発した。試験法の概要は、メダカをその性転換に関する感受期を包含する孵化から4週間暴露した後清水に移し、更に2~4週間飼育した後、背鰭と臀鰭に発現した第二次性徴と生殖巣の状態を観察し、性転換の有無を判定するものである。

[第3章] 本手法を用いて、経済開発協力機構(OECD)が内分泌攪乱物質試験の陽性対照として選択した強エストロゲンのエチニルエストラジオール(EE2)、ジェチルスチルベストール(DES)、弱エストロゲンの4-t-ペンチルフェノール(4tPP)、強アンドロゲンのメチルテストステロン(MT)、抗アンドロゲンのフルタミド(Flu)の性転換能を評価した。更に、内分泌攪乱作用が疑われていた化学物質の中からp-ニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、酢酸トリブチルスズ(TBT)を選択して同様の性転換試験を実施した。また、環境省のSPEED'98に優先して調査研究を進めて行く必要性の高い物質としてリストアップされた農薬数種(マラソン、ベノミル、シペルメトリン、ペルメトリン、エスフェンバレレート、フェンバレレート)についても性転換能の有無を確認した。これらの試験に先立って96時間の急性毒性試験を実施して半数致死濃度(LC50)を算出し、性転換試験の最大無影響濃度(NOEC)および最小影響濃度(LOEC)と比較した。

その結果、選択した機能的性転換の指標(背鰭と臀鰭の第二次性徴と生殖巣の状態)はいずれも同様の被験物質濃度で発現し、化学物質の影響を有効に評価可能と判断された。化学物質群と並行して実施した清水および助剤対照群では遺伝的性(=体色)と機能的性(=第二次性徴)とは90%以上の一致が認められた。

強エストロゲンであるE2、EE2、DESの雄から雌への性転換NOECおよびLOECは各々0.01および0.032μg/Lであった。一方、それらの96hr-LC50は各々3900、1500、1400μg/Lであった。弱エストロゲンである4tPPのNOECおよびLOECは10および100μg/Lであり、LC50は2600μg/Lであった。強アンドロゲンのMTの雌から雄へのNOECおよびLOECは0.01および0.032μg/Lであり、LC50は>10000μg/Lであった。抗アンドロゲンのFluの場合は単独暴露の場合、雌雄いずれにも性転換誘導は観察されなかった。しかしながら、アンドロゲンのMTとの共存下

では、Flu が MT の作用を阻害することにより、Flu の抗アンドロゲン作用が検出できた。

内分泌攪乱作用が疑われていた NP、BPA、DEHP、TBT の内、NP、BPA、TBT では雄から雌への性転換が認められ、その NOEC および LOEC は各々 10 および 100、100 および 1000、0.1 および 1 $\mu$ g/L であったが、DEHP および上記農薬類の場合は性転換誘導が観察されなかった。また、NP、BPA、DEHP、TBT の LC50 は各々 680、10000、>1000000、17 $\mu$ g/L であった。

これらの化学物質の性転換 NOEC と急性 LC50 とを比較すると、強いエストロゲンやアンドロゲンの場合は 10 万倍以上、弱エストロゲンの場合でも 2600 倍の差が認められた一方、内分泌攪乱作用が疑われていた化学物質では 100 倍前後の差であることが確認された。従って、全ての内分泌攪乱作用を発現する物質が極めて低い濃度でその作用を発現するのではなく、性ホルモン様物質以外では急性毒性値に比較的近い濃度でのみ作用を示すことが推察される。

第二次性徴の評価基準として選択した鰭の各測定値および生殖腺における性転換の発現レベルが良く一致し、ばらつきが少ないため、得られた結果を精度の高い信頼度の高いものとみなすことができる。E2、MT については数回の反復試験を実施しており、いずれの結果も非常に再現性が良いことを確認した。著者らの報告後に環境省等で得られたデータとも影響レベルは一致した。NP、BPA、E2 の場合はメダカに性転換を誘導する濃度と酵母を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が認められた濃度との間には高い相関が認められた。以上から、本試験は内分泌攪乱作用の有無を検出するための有効な 1 手法として利用できることが確認された。本手法は OECD でも内分泌攪乱作用スクリーニング試験の候補として挙げられた。

以上の結果より、本手法は内分泌攪乱作用の有無を検出するための有効な 1 手法として利用できることが確認された。本手法の利点は以下のようにまとめることができる。

- 1) S-rR 系メダカでは本来の遺伝的雌雄が体色によって識別できるため、第二次性徴に発現した性転換を明白に検出することができる。
- 2) 性転換に最も感受性が高い期間である仔稚魚期のみの暴露により、エストロゲン様、アンドロゲン様、抗エストロゲン様(未確認)および抗アンドロゲン様物質いずれの影響も検出できる。
- 3) S-rR 系メダカでは比較的短期間(=1.5 か月)で性成熟に達するため、第二次性徴が容易に観察できる。
- 4) メダカは小型の魚であり、また単純な試験系であるため、特別な機器や広いスペースを必要としない。