九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

17 β-estradiol を暴露したヒメダカ雄における精巣の状態と精巣卵の出現頻度

鶴田, 幸成
九州大学大学院農学研究院

大嶋, 雄治
九州大学大学院農学研究院

姜, 益俊
九州大学大学院農学研究院

横田, 弘文
(財)化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所

他

https://doi.org/10.15017/4388

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 61 (1), pp.93-99, 2006-02-01. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第61巻 第1号 93-99 (2006)

17β-estradiolを暴露したヒメダカ雄における精巣の状態と精巣卵の出現頻度

鶴田幸成[1]・大嶋雄治[2]・姜 益俊[2]
横田弘文[3]・本城凡夫[2]・中園明信*
九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門海洋生物生産学講座水産増殖学研究室
(2005年10月30日受付, 2005年11月16日受理)

State of Testes and Occurrence Frequency of Testis-ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-estradiol

Yukinari TSURUDA[1], Yuji OSHIMA[2], Ik Joon KANG[2], Hirofumi YOKOTA[3], Tsuneo HONJO[2] and Akinobu NAKAZONO[1]
Laboratory of Fisheries Biology, Division of Marine Bioresources, Department of Animal and Marine Bioresource, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒 言

近年, 下水処理場及び工場の廃水中から天然エストロゲンであるE2, 合成エストロゲンであるethinylestradiol (EE2) や4-nonylphenol (NP) 及びbisphenol A (BPA) 等のエストロゲン様物質が検出され, そこに生息する生物の内分泌に影響を与えている事が報告されている (Deabrow *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Ternes *et al.*, 1999). エストロゲン及びエストロゲン様物質が, 生殖腺に与える影響は大きく, 精巣への卵細胞 (精巣卵) の誘導や生殖腺の萎縮が起こり生殖力の減退を引き起こす可能性が指摘されている (Baldwin *et al.*, 1945; Gimeno *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; Hartley *et al.*, 1998). 特にエストロゲン及びエストロゲン様物質の暴露によって精巣に誘導される精巣卵は, 内分泌撹乱様化学物質の影響評価の重要な指標であり, 評価試験において生殖巣の観察は極めて重要である. Jobling *et al.* (1998) は, イギリスの汚水処理場の処理水の流入する川に生息する雄のローチ (*Rutilus rutilus*) の精巣に精巣卵が出現している事を報告した. また, Simpson *et al.* (2000) は, イギリスのマージー河口水域に生息するヒラメ (*Platichthys flesus*) の雄の精巣に精巣卵が出現している事を報告している.

エストロゲン様物質の暴露による精巣卵の出現報告は多数なされているが, 精巣卵の出現頻度と暴露濃度の関係に関する知見はほとんどない. Jobling *et al.* は, これまでの研究 (Shibata *et al.*, 1988; Gimeno *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1997; Hartley *et al.*, 1998; Rodgers-Gray *et al.*, 2001) をもとに, イギ

[1]九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門海洋生物生産学講座水産増殖学研究室
[2]九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門海洋生命科学講座水産生物環境学研究室
[3](財) 化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所
[1]Laboratory of Fisheries Biology, Division of Marine Bioresources, Department of Animal and Marine Bioresource, Faculty of Agriculture, Kyushu University
[2]Laboratory of Marine Environmental Science, Division of Marine Biological Chemistry, Department of Bioresources and Bioenvironmental Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University
[3]Chemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
*Corresponding author (E-mail: tsuruda@agr.kyushu-u.ac.jp)

リスの汚水処理場の上流及び下流で採取した野生のローチの性転換の進行度を雄の精巣に出現した卵細胞の状態及び生殖腔の状態により分類した．しかしその研究は，暴露濃度が不明な野生のローチの雄の精巣についての観察結果であり，個々の化学物質の暴露濃度と精巣卵の出現との関連を詳細に検討した研究は殆どないのが現状である．

ヒメダカ（*Oryzias latipes*）は試験魚として広く用いられており，特に内分泌撹乱様物質の影響評価で，数多くの暴露実験がおこなわれている．ヒメダカは雌雄異体の分化種で，自然条件下で飼育する限りでは雌雄同体（hermaphrodite）は発見できないとされている（Yamamoto, 1969）．また，ヒメダカはその産卵が管理し易い上に，卵径が大きく卵膜が透明で観察しやすいので，内分泌撹乱様化学物質の影響評価，モニタリングに適した供試生物である．Kang *et al.* (2002a, b., 2003) 及び Seki *et al.* (2002) は，E2, EE2, NP, BPA 等のエストロゲン様物質の各濃度におけるビテロゲニン濃度の変化と精巣卵の観察と同時に，生殖能力を調べて各暴露物質に対する影響を評価した．Bin-Le Lin *et al.* (2003) は，実験室内でヒメダカに E2を暴露し精巣卵の出現頻度について報告したが，最高暴露濃度が64ng/L であり，より高濃度における精巣の状態及び精巣卵の出現頻度に関しては明らかでない．

本研究ではヒメダカを用い，E2を暴露したヒメダカ雄の精巣の状態及び精巣卵の出現頻度を調べて，精子形成と暴露濃度との関連を比較検討した．

材料及び方法

供試生物

（財）化学物質評価研究機構久留米事業所（福岡県久留米市）において3年以上系統維持されたヒメダカ *Oryzias latipes*（孵化後4ヶ月齢）の成熟した個体（体重約300mg，全長約32mm）を用いた．雌雄各59尾の成熟した魚を選び，24±1℃の脱塩素水道水で満たした1Lのガラス水槽にペアで入れた．供試魚は連続した16：8h（明：暗）の光周期下で飼育し，暴露3週間前まで，ノープリス幼生（孵化後24時間以内）を1日に2回与えた．水槽の水温，DO，pH レベルは一週間に一回測定した．馴致期間の最後の週にメスの産んだ卵をカウントし，産卵を活発にしている48ペアを選んだ．

試薬

暴露物質として，E2（>99.9% purity, Nacalai Tesque）を用いた．精巣の包埋にはテクノビット液（Heraeva Kuizer GmbH, Wehrheim Germany）を用いた．切片の染色にはヘマトキシリン（Sigma-Aldrich Chemie Gmbh），エオシン（Katayama Chemical）を用いた．

暴露方法

E2暴露濃度を決めるために，OECD のテストガイドライン（1992）に従い成魚のメダカを用いた毒性試験をおこなった結果，E2の96h LC50は2.0mg/l であった．選抜したヒメダカ6ペアに E2を設定濃度31.3, 62.5, 125, 250, 500ng/L で流水式（Benoit. *et al.*, 1982）で3週間暴露した．供試魚は16：8h（明：暗）の光周期下で飼育し，1日に2回十分な量のノープリス幼生（孵化後24時間以内）を与えた．試験装置と試験水槽は一週間に一度掃除し，試験水槽の餌の残りと排泄物は毎日取り除いた．DO，pH は，一週間に一度測定した．暴露期間の DO 濃度（mean±S.D）は8.1±0.16，pH は7.6±0.04であった．また，全ての試験水槽の水温は，23.1±0.03℃であった．

組織切片の作製と観察

E2の各濃度に暴露終了後，精巣を摘出し，ブアン氏液で固定した．1個体の精巣を前部，中央部，後部と三等分し，70, 80, 90, 95%アルコールで漸次脱水し，テクノビット液で包埋した．包埋した組織を3 μm のクロス切片とし，ヘマトキシリン・エオシン二重染色を施した．三等分した各々の組織片中心から3 μm～6 μm の間隔で12切片を作製し，各個体合計36切片の精巣の組織像を光学顕微鏡下で観察した．精巣組織切片における卵細胞や異常組織の発生の有無及び雄性生殖細胞の発達が正常であるか否かを調べた．また，卵細胞が観察された場合は，各切片当たりの個数を計数して，精巣卵の出現頻度とした．

結　　果

E2暴露時の各濃度におけるヒメダカ雄の精巣の状態

コントロール区において，雄8個体全ての精巣に精巣卵及び異常な結合組織等は見られず，精母細胞，精細胞及び精子の各発達ステージが存在し活発な精子形成が観察された（Fig. 1A）．しかし，E2全暴露濃度区でヒメダカ雄の精巣に精巣卵が出現した．

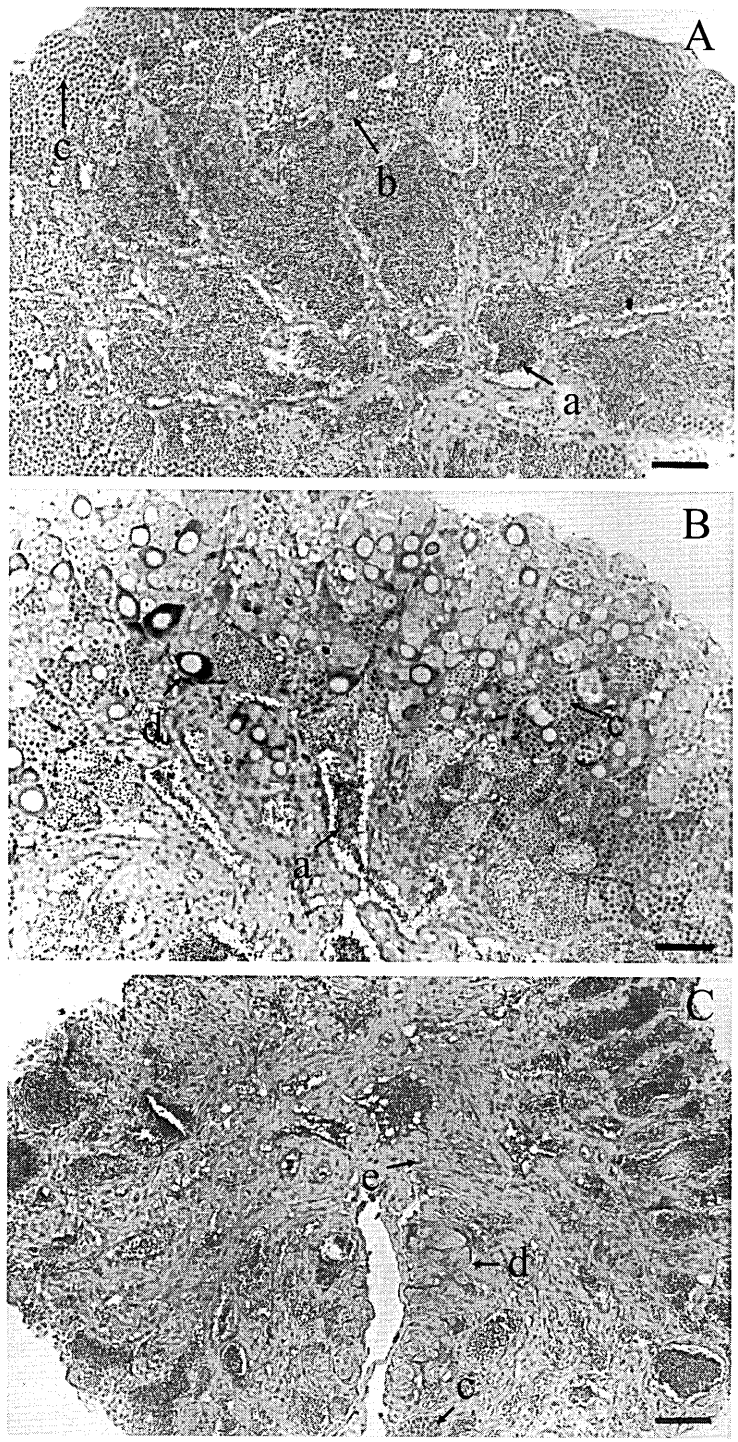

Fig. 1. Nomal testicular condition without 17β-estradiol (E2) treatment and abnomal testicular conditions after treatment of male medaka. (A) Normal testicle of male medaka (control). (B) Development of testis-ova within the gonads of medaka exposed to 125 ng/L E2. (C) Development of connective tissue in the testis of a medaka exposed to 500 ng/L E2. The arrow indicates (a) supermatozoon, (b) spermatid, (c) primary spermatocyte, (d) testis-ova and (e) connective tissue. Scale bars, 50 μm.

31.3ng/L 区において，8 個体中 5 個体に精巣卵が出現したが，精母細胞，精細胞，精子の各発達ステージの雄性生殖細胞が見られ，精子形成が観察された．62.5ng/L 区，125ng/L 区及び250ng/L 区では供試した全ての個体で精巣卵が出現し，同時に正常な精母細胞，精細胞及び精子の各発達ステージの雄性生殖細胞が存在し，精子形成が確認された（Fig. 1B）．これに対し500ng/L 区においては精巣に精巣卵及び不明細胞が出現し，かつ精巣全体に著しい結合組織の発達が見られた．精巣卵と精子は発達した結合組織の隙間に僅かに存在し，精母細胞はコントロール区及び他の全ての暴露濃度区と比較して極端に少なく，精細胞も僅かに存在しただけであった（Fig. 1C）．また 1 個体は精巣全体が結合組織で覆われ精巣卵は観察されなかった．

全ての暴露濃度区で，出現した精巣卵の最も発達したステージは，周辺仁期の卵細胞だった．

E2暴露時の各濃度におけるヒメダカ雄の精巣卵の出現頻度

各暴露区において精巣に出現した精巣卵の 1 切片あたりの個数を計数した頻度を Fig. 2 に示す．精巣卵の出現頻度は31.3ng/L 区で2.1±3.3であったが，62.5ng/L 区で185.7±150.4と最も高くなった．しかし，125ng/L 区で148.3±166.7，250ng/L 区で96.2±61.4，500ng/L 区で2.9±4.4と低下し，E2の濃度が増加しても精巣卵の出現頻度は逆に低下した．

考　　察

E2 31.3，62.5，125，250ng/L に暴露したメダカ雄の精巣に精巣卵が出現した．一方，それらの精巣には精母細胞，精細胞及び成熟した精子が同時に存在して正常な精子形成がおこなわれており，受精に問題が起こる可能性は低いと予想された．また，雄性生殖細胞の各発達ステージが存在する事から，放精後も正常な精子の再生産が可能であると考えられる．Kang *et al.*（2002a）は同じ濃度に暴露したヒメダカを用いて繁殖試験をおこなった結果，受精率に異常が無かった事を報告しており本実験の結果を支持している．Bin-Le Lin *et al.*（2003）はヒメダカに E2濃度16，32，64ng/L で暴露した結果，精巣に精子を鮮明に観察し，全て雄としての生殖機能があると推察している．Jobling *et al.*（1998）は，イギリスの河川域に生息する雄のローチの精巣に現れる雌性化の状態をスコア化しているが，スコアは低く正常な雄性生殖細胞と精巣卵が同時に存在している．

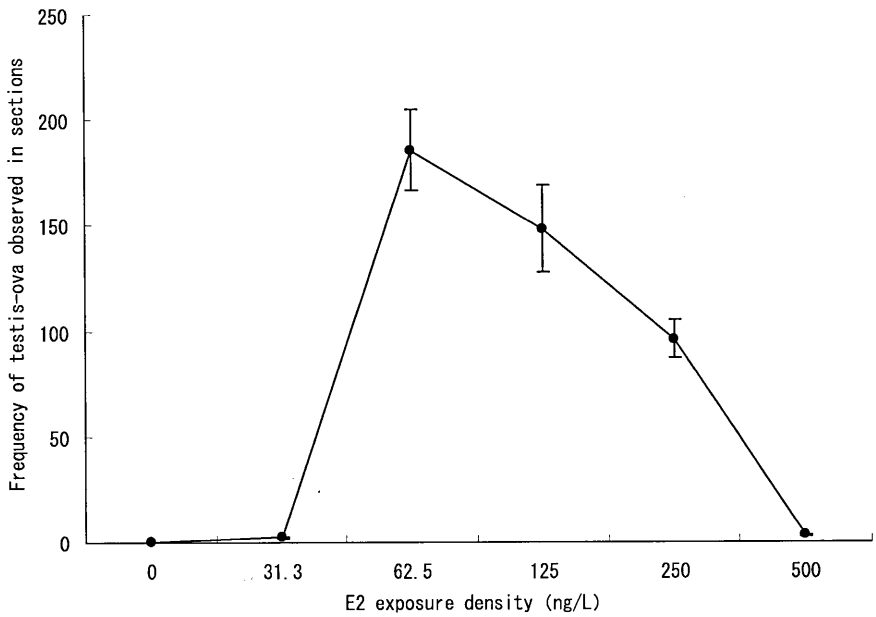

Fig. 2. Frequency of testis-ova in gonad sections of medaka expose to 31.3, 62.5, 125, 250, 500 ng/L 17β-estradiol (E2). See test for details for method.

これに対し E2 500ng/L を暴露したヒメダカ雄の精巣において，結合組織が著しく発達し全体が覆われていた．精子は結合組織の間隙に僅かに存在し，精母細胞と精細胞は極端に少ないので，精子の正常な再生産は不可能と考えられた．また，結合組織の発達が著しい為，存在する精子の放出が困難であり，生殖不可能に近い状態にあると予想された．Egami *et al.* (1955) によって先に E2濃度の高濃度暴露による精細胞，精子の減少及び結合組織の発達は報告されている．Seki *et al.* (2002) による EE2の高濃度暴露及び Gray *et al.* (1999) による4-*tert*-octylphenol (OP) 高濃度暴露でも精巣における結合組織の発達が報告されている．一方，Kang *et al.* は弱エストロゲンである NP，BPA の高濃度暴露区において結合組織の発達はなかった事を報告している (2002b., 2003)．高濃度暴露で結合組織の発達を誘導する物質は，強いエストロゲン活性を持つと考えられる．E2や EE2等による精巣での精細胞，精子の減少及び結合組織の発達は，強いエストロゲン活性により内分泌が強く攪乱されたために引き起こされたと考えられる．また，高濃度暴露区での精巣卵の減少は，高濃度による細胞毒性によって引き起こされた可能性も考えられる．

Kang *et al.* (2002a) は E2 31.3, 62.5, 125, 250ng/L 区において，ヒメダカの産卵数及び受精率等の生殖能力に影響を与えなかったが，500ng/L 暴露区において著しく生殖能力が低下した事を報告している．また NP 暴露区25, 50, 100, 200μg/L, BPA 暴露区1,000, 2,000, 4,000μg/L において精巣卵が出現したがほとんど生殖能力に変化はないとしている (2002b., 2003)．Seki *et al.* (2002) は EE2暴露区 31.3, 62.5, 125, 250 ng/L においては生殖能力に影響はなかったが，高濃度暴露区 (500ng/L) での雄性生殖細胞の減少，結合組織の発達及び生殖能力の大幅な減少を報告している．このことは，生殖腺の組織学的観察による精巣の状態と生殖能力の観察結果の一致を示すものであった．よって，E2を暴露したヒメダカ雄の精巣に精巣卵が出現しても，精子が形成され，より高濃度暴露で結合組織等に覆われ精子形成が阻害を受けない限り，生殖能力に影響を与えないと考えられた．

本研究においては，Fig. 2 に示すように E2の暴露濃度に従い精巣卵の出現頻度は増加し，62.5ng/L で最高となった．しかし，暴露濃度が125, 250, 500ng/L と高くなるに従い精巣卵の出現頻度は逆に減少した．E2暴露において精巣卵の形成は E2の暴露濃度に比例するのではなく出現しやすい濃度の存在が示唆される．Bin-Le Lin *et al.* (2003) は，E2濃度 16, 32, 64ng/L に暴露したヒメダカ雄の精巣に出現した精巣卵をカウントした．その結果，暴露濃度が高くなるに従い精巣卵の出現頻度は増加した事を報告した．よって本研究の結果と良く一致する．本研究における E2 125, 250, 500ng/L 暴露での濃度の増加に伴う精巣卵の出現頻度の減少，特に高濃度暴露区での大幅な減少は，E2による急性毒性及び雄性生殖細胞の壊死，精巣内の結合組織の肥大化による異常な結合組織の発達に関係すると考えられる．

本実験の結果において，低濃度 (E2；31.3ng/L) でも精巣卵は出現したことから，河川等野外でのエストロゲン暴露のバイオマーカーとして利用できることが検証された．しかし，精巣卵の出現する場所は一定しておらず，また個体によっては数個（1～2個）のみの出現であり，切片を作製する部位によっては精巣卵が観察されないことなどから精巣全体の切片観察が必要であると考えられる．また E2を繁殖期のヒメダカ雄に暴露した時，低濃度 (31.3ng/L) から精巣卵は出現し，62.5ng/L でその頻度は最も高くなるが，逆に高濃度 (500ng/L) では，精巣卵の出現頻度の減少及び雄性生殖細胞の減少の他に，結合組織の発達等も明らかになり，生殖能力の減少との関連が認められた．

要　　約

内分泌攪乱様化学物質の影響を明らかにする研究の一環として，本研究ではヒメダカに17β-estradiol (E2) を31.3ng/L, 62.5ng/L, 125ng/L, 250ng/L, 500ng/L の濃度で暴露し，各暴露濃度における精巣の状態，精巣卵の出現頻度を調べ生殖能力との関係を検討した．その結果，全ての暴露区において雄の精巣に精巣卵が出現し，62.5ng/L 区においてその出現頻度は最高であった．しかし，31.3ng/L, 62.5ng/L, 125ng/L, 250ng/L 区においては，雄性生殖細胞の各発達ステージが観察され精子が活発に生産されており，E2による生殖能力への影響は低いと考えられた．また高濃度区500ng/L においては，精巣卵及び雄性生殖細胞ともに減少し，精巣のほとんどを結合組織が占めており，生殖能の低下が示唆された．以上のことから，250ng/L E2濃度以下の暴露では，精巣卵が出現してもそれは生殖能力の低下とは直結しないと予想された．

文　献

Baldwin, FM., Li, MH 1945 Induction of ovatestis in estrogen treated adult male Teleost, Xiphophorus helleri. *American Naturalist.*, **79**: 281-286

Benoit, D. A., Mattson, V. R., Olson, D. L 1982 A continuous-flow mini- diluter system for toxicity testing. *Water Res.*, **16**: 457-464

Bin-Le, LIN., Hagino, S., Kagoshima, M., Ashida, S., Iwamatsu, T., Tokai, A., Yoshida, K., Yonezawa, Y., Tominaga, M and Nakanishi, J 2003 A new quantitative evaluation technique (Fragmented Method) for detection of testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *J. Jap. Soc. Wat. Environ.*, **26**: 725-730

Desbrow, C., Routledge, EJ., Brighty, GC., Sumpter, JP., Waldock, M 1998 Identification of estrogenic chemical in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Env.ron. Sci. Technol,*, **32**: 1549-1558

Egami, N 1955 Production of testis-ova in sdult males of *Oryzias latipes* I . Testis-ova in the fish receiving estrogens. *Jpn. J. Zool.*, **11**: 353-365

Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowmer, T., Komen.H 1996 Feminization of male carp. *Nature.*, **384**: 221-222

Gray, MA., Metcalfe, CD 1997 Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**: 1082-1086

Gray, MA., Teather , KL., Metcalfe, CD 1999 Reproductive success and behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-*tert*-octylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18**: 2587-2594

Hartley, WR., Thiyagarajah, A., Anderson, MB., Broxson, MW., Major, SE., Zell, SI 1998 Gonadal development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β estradiol. *Mar.Environ. Res.*, **46**: 145-148

Ik Joon Kang., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T 2002 Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere.*, **47**: 71-80

Ik Joon Kang., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T., Imada, N., Tadokoro, H and Honjo, T 2002 Effect of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 2394-2400.

Ik Joon Kang., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Hano, T., Maeda, M., Imada,N., Hiroshi, Tadokoro, H and Honjo, T 2003 Effect of 4-nonylphenol on reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes. Environ. Toxicol. Chem.*, **22**: 2438-2445.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, CR., Brighty, G., Sumpter, JP 1998 Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.*, **32**: 2498-2506

Lee H-B., Peart, TE 1998 Determination of 17 β estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *J Assoc OFF Anal Chem.*, **81**: 1209-1216

Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H and Kobayashi, K 2002 Effect of ethinyleestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**: 1692-1698

M. G. Simson., M. Parry., A. Kleinkauf., D. Swarbreck., P. Walker., R.T. Leah 2000 Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Mar. Environ. Re.*, **50**: 283-287

Rodgers-Gray, TP., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, MJ., Sumpter, JP., Tyler, CR 2001 Exposure of juvenile roach (Rutilus rutilus) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Envron. Sci. Technol.*, **35**: 462-470

Shibata, N.; Hamaguchi, S. 1988 Evidence for the sexual biopotentiality of spermatogenia in the fish Oryzias latipes. *J. Exp. Zool.*, **245**: 71-77.

Ternes, TA., Sumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R-D., Servos, M 1999 Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- I . Investigation in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total. Environ.*, **225**: 81-90

Yamamoto, T-O 1969 Sex differentiation. In Hoar WS, Randall DJ, eds, *FishPhysiology.*, 3. Academic, NewYoek, NY, USA

Summary

Adult medaka (*Oryzias latipes*) were exposed to 17β-estradiol (E2) of the following concentrations 31.3 ng/L, 62.5 ng/L, 125 ng/L, 250 ng/L and 500 ng/L for 21 days. The state of their testicular as well as the occurrence frequency of testis-ova were examined histologicaly in relation to their fertility. Results show that testis-ova appear in testes of males at all concentrations and their occurrence frequency was highest at 62.5 ng/L. Each developmental stage of the male germ cell was observed and the spermatozoa were produced actively at 31.3 ng/L, 62.5 ng/L, 125 ng/L and 250 ng/L. It was concluded that these concentration of E2 had no influence in the fertility of male medaka. At highest concentration (500 ng/L) it was found that the connective tissue was occupying most of the testicular tissue and decrease of the number of testis-ova was observed as well as that of male germ cells, suggesting loss of the fertility. Although testis-ova were observed, concentrations below 250 ng/L may not give effect fertility of males.