

# オオミジンコを用いたオス化物質評価法の開発

阿部 達雄, 佐藤 大気

## Development of chemicals-induced male assay: using *Daphnia magna*

Tatsuo Abe and Taiki Sato

### Abstract

Cladoceran crustacean *Daphnia magna* play an important role in environmental ecosystems. Daphnids reproduce female neonate by parthenogenesis under normal condition. *D. magna* juvenile acute immobilization test (OECD TG 202) and reproduction test (TG 211) are widely used to evaluate the chemical safety in aquatic ecosystems. It was reported that exposure to parent by fenoxycarb or pyriproxyfen (JHAs; Juvenile Hormone Analogues) induced male neonates. In this study, parent *D. magna* were used for chemicals-induced male assay. During the tests, no resting-egg was observed in controls, solvent controls. Both of JHAs induced male neonates on all exposure concentrations (250, 500, and 1000 ng / L). However, after a while, the parent reproduced female neonate lower level exposure (250 and 500 ng / L). These results indicate JHA is useful as positive control for detection of the endocrine disrupting chemicals and to obtain male neonates with confidential.

キーワード： オオミジンコ, オス化, 幼若ホルモン様物質, 急性遊泳阻害試験

### 1. 緒言

近年、地球上での人口増加や新興国の生活レベルの向上に伴い、大気や水域での環境汚染が深刻化するケースが増加している。生命の維持には、新鮮な空気と清涼な水は必要不可欠である。このような状況で、環境保全や環境生態系の維持は、よりいっそう重要視されている。先進国・新興国の生活レベルの向上は、工業化学物質の生産も増加させている。このため、化学物質の有害性評価は、ヒトをはじめとしたほ乳類だけではなく、魚、鳥、節足動物、植物、ミミズといった生態系を構成する代表的な生物に対しても行う必要がある。OECD（経済協力開発機構）では、化学物質の有害性を評価する基準となる試験法が示されており、OECD テストガイドラインとしてまとめられている。OECD テストガイドラインには、これらののうち、環境生物としては、水生生物ではメダカ、ミジンコ、藻類に対する評価方法がある<sup>1)</sup>。2003年の化審法（化学物質の審査及

び製造等の規制に関する法律）改正により、新規化学物質については、事業者等により一定の基準により影響が調査されている。しかし、これ以前の物質については、国が調査を主体として行ってきた<sup>2)</sup>。Japan チャレンジプログラムでは、2005年より情報収集が行われ、優先情報収集対象物質 645 物質の内 608 物質について関連事業者により収集済および収集予定である。しかし、化審法等により得られる情報は、毒性に関するものが主であり、性分化に関わる影響（内分泌かく乱）を調べるものではない。近年、この内分泌かく乱化学物質の試験標準化に関する検討が、OECD 専門家会議でおこなわれている<sup>3)</sup>。日本では、SPEED 98, Extend 2005, Extend 2010 によりこれらの検証がなされている。

本研究では、ミジンコを研究対象として選んだ。ミジンコは、単為生殖および有性生殖を行う生物である<sup>4)</sup>。有性生殖のみを行うヒトやメダカとは、異なる内分泌系をもっていると考えられている。ミジンコは、ほとんどの場合で雌のみを産生する単為生

殖を行い、遺伝的な交配のないクローンで繁殖している。しかし、単為生殖の繰り返しは、遺伝的な欠陥による絶滅を引き起こす可能性があり、ミジンコ類もカメムシなどと同様にある時期において有性生殖を行っている。単為生殖は、環境条件が良好（日照時間、温度、餌、個体密度）であるとき、有性生殖は、環境が悪化したときに雄や休眠卵により行うという説明が多い。また、休眠卵には受精卵だけではなく未受精卵（休眠卵の単為発生も可能）もあり、【クローン雌・雄・休眠卵（未受精卵）・休眠卵（受精卵）】の産生は、同時進行している可能性もある<sup>2)</sup>。

オスの発生については、有名な初期の研究で個体密度の変化によりオスが生まれやすいことが知られている<sup>5)</sup>。また、単為生殖で飼育管理を行っているため、一定の条件下で雌を産む系統となっているが、何らかのきっかけによりオスが発生する事も考えられるが、オスの発生に関する遺伝学的な作用機序については解明されていない点も多い。明らかになっていることとしては、幼若ホルモン様物質（Juvenile Hormone Analogs; JHA）の曝露がミジンコをオス化させることが報告されている<sup>6~8)</sup>。天然化合物では、メチルファルネシン酸（MF）があるが、試薬の価格が高く、物質の安定性も悪い（冷凍保存が必要）など、取り扱いが難しい。

今回は、JHA としてフェノキシカルブ（FC）およびピリプロキシフェン（PX）を用いた。いずれの物質も低濃度でオスの産仔を誘導することが既に報告されている。これらは、農薬として開発された物質であり、価格も比較的安価で、物質の保管も比較的容易（冷蔵保存）である。

本研究の目的は、JHA のミジンコのオス化における内分泌かく乱作用の陽性対照物質としての有効性を確認するとともにミジンコを用いたオス化物質評価法を開発し、その有効性を検証した。また、遺伝子レベルでの作用機序の解明を目指し、オスの産生が確実となる条件を見出すことを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 オオミジンコの飼育

オオミジンコ(*Daphnia magna*)は、(株)三菱化学安全研究所=現在 (株)三菱化学メディエンス=および国立環境研究所より供与を受けたものを2009年8月から継代飼育して使用した。飼育は、OECD テストガイドライン TG202<sup>9)</sup> に準拠して、飼育水は Elendt

M4 培地（以下 M4 培地）、飼育密度は 20 頭/L、水温は 20 ± 2°Cで行った。培地の調製には超純水（ミリポア製 Academic-Q10、東京）を使用した。容器には、ふたをした 1L ビーカーを用い、常時エアレーションを行った。定温とするため、流し台に栓をして、ヒーター（ニッソー製 New IC オート 100）、クールユニット（GEX 製 GXC-200）、ポンプ（コトブキ製 POWER BOX 55）を用いた。光周期は、16 時間明/8 時間暗として、鑑賞魚用の照明器具を用いて行った。餌は、クロレラ (*Chlorella vulgaris*) を培地中濃度が 1×10<sup>9</sup> cells / mL となるようにクロレラ給餌溶液を 1 mL / L を毎日加えた。オオミジンコの個体数、水温は毎日記録し、1 日おきに換水を行った。

クロレラには、クロレラ V12（クロレラ工業製、福岡）を用い、原液の細胞数をカウンティングチャンバー（ビルケルチュルク血球計数板）により顕微鏡を用いて観察し、細胞数を計算した。M4 培地を用いて遠心分離により 2 回洗浄した後、再び培地で 1×10<sup>6</sup> cells / mL となるように調整し、クロレラ給餌溶液とした。

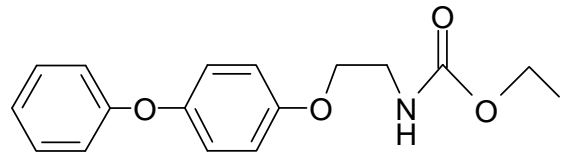


Fig. 1a Fenoxycarb

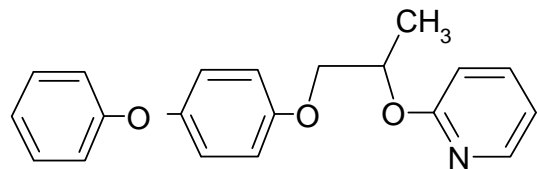


Fig. 1b Pyriproxyfen

### 2.2 幼若ホルモン様物質

化学物質として、フェノキシカルブ(Fenoxycarb) 標準品 (99.4%、和光純薬工業株式会社、CAS No. 79127-80-3 M.W. = 301.34、Fig. 1a)、ピリプロキシフェン(Pyriproxyfen) 標準品 (96.78%、フナコシ株式会社、CAS No. 9573-68-1 M.W. = 321.34、Fig. 1b)を用いた。化学物質は、DMF に試験物質を溶解させ、各濃度用に添加液を用意した。曝露時には M4 培地 100 mL に対して 100 mg / L 以下の添加量となるようにした。対照区および溶剤対象 (DMF 濃度が 100 mg / L のもの) を準備して同時に試験を行った。これら

物質は、メチルファルネシン酸と同様に非常に溶けにくく、通常の希釈操作は行わず、スターラーで攪拌しながら、マイクロピペットで DMF 溶液を徐々に加えながら、5~15 分程度かけて溶解させた。

### 2.3 オオミジンコ急性遊泳阻害試験

オオミジンコ急性遊泳阻害試験は、OECD ガイドライン TG202 に準拠して行った<sup>9)</sup>。M4 培地を入れた 100 mL ビーカーに試験原液を設定した濃度になるように加えて、5 濃度区と対照区を作成した。作成した各濃度区と対照区の水温、pH、溶存酸素量(DO)は、試験開始時と試験終了時(48 時間後)に測定した。水質測定には、水温計 (SATO 製 SK-250WP11-K)、pH 計 (HORIBA 製 D-53T) および溶存酸素計(YSI 製 Model 55 )を用いた。試験には、24 時間以内に産まれたオオミジンコの仔を使用した (20 頭/濃度区)。このとき、初産個体の使用は避けた。24 時間後および 48 時間後にミジンコの状態および個体数を実体顕微鏡により観察して記録した。ビーカーを軽くゆすっても動かない個体と死亡個体を影響されたとみなした。影響の強さは、半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)で評価した。試験は、クールインキュベーター(IWAKI 製 ICB-151LN)内で行った。

### 2.4 オス化物質評価法

オス化物質評価法は、オオミジンコ繁殖試験 (OECD ガイドライン TG211) をもとに試験期間や曝露方法などを適宜変更して行った<sup>1)</sup>。M4 培地を入れた 100 mL ビーカーに試験原液を前述 (2.2) の方法で設定した濃度になるように加えた濃度区と対照区を作成した。作成した各濃度区と対照区の水温、pH、溶存酸素量(DO)は、試験液調製時に測定した。水質測定には、水温計 (SATO 製 SK-250WP11-K)、pH 計 (HORIBA 製 D-53T) および溶存酸素計(YSI 製 Model 55 )を用いた。試験には、24 時間以内に産まれたオオミジンコの仔を使用した (1~2 頭/100 mL 容器)。試験は、クールインキュベーター(IWAKI 製 ICB-151LN)内で 20°C に設定して行った。曝露は、半止水式で 2 連及び 3 連、16h 明/8h 暗の光周期、試験中の給餌は 100 µL / day (クロレラ)、9 及び 16 日間曝露した。試験培地は、M4 培地でビーカーを用いて 100 mL 及び 200 mL、1 頭/100 mL の飼育密度とした。添加液を曝露区のビーカーに入れて攪拌した後に、親ミジンコを入れ曝露開始とした。曝露開始日を 0 日目とし、飼育と観察を続けた。産仔を確認したら仔ミジンコのみを取り出しその数を記録し

た。ミジンコは、実体顕微鏡(Digital Series Microscopes XTX-6S-W)により観察して記録した。第一触角の形質を観察し、雌雄の判別を行った (Fig. 2)。また、雄の産仔を確認した後から、試験終了までの総産仔数を数えた。

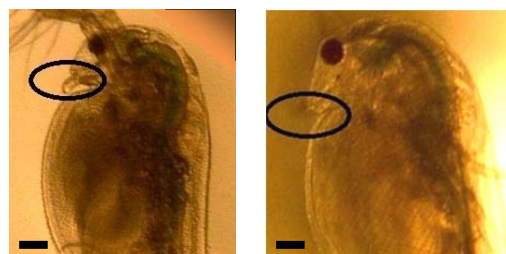


Fig. 2 Male (left) and female (right) of *Daphnia magna* within 24 hours old. Male have long first antenna (in circle). Bar indicate 100 µ meters.

## 3. 結果および考察

### 3.1 オオミジンコ急性遊泳阻害試験

幼若ホルモン様物質 (JHA) の試験結果を Table 1 および Fig. 3 に示した。

Table 1 *Daphnia magna* acute immobilization assay

	24 h	48 h	72 h
Control	1	1	2
DMF	0	0	0
<hr/>			
Fenoxycarb (µg/L)	24 h	48 h	72 h
25	1	3	3
50	1	2	3
100	0	3	4
200	0	11	14
400	0	20	20
800	12	20	20
<hr/>			
Pyriproxyfen (µg/L)	24 h	48 h	72 h
25	0	0	2
50	0	0	8
100	0	0	17
200	6	18	20
400	20	20	20
800	20	20	20

\*The number indicate inhibition (initial neonate is 20).

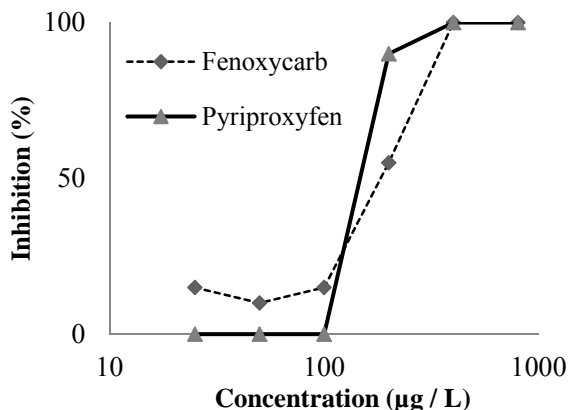


Fig. 3 *Daphnia magna* acute immobilisation assay (48 h)

2つの物質とも24, 48, 72時間後のいずれにおいても用量反応性を示した。48時間後のEC<sub>50</sub>値は、フェノキシカルブで188 µg/L、ピリプロキシフェンで156 µg/Lだった (Fig. 3)。また、これらは既報のデータに近い値であった<sup>10)</sup>。

### 3.2 オス化物質評価法

#### i) ミジンコの繁殖影響

Table 2a, 2b に示した対照区の5~14日目の産仔数の合計は、184であった (250及び500 ng/Lの対照区は同じデータである)。これに対して、フェノキシカルブの250及び500 ng/Lにおける産仔数は77および62であった。ピリプロキシフェンの250及び500 ng/Lにおける産仔数は、117および111であり、繁殖試験においてもピリプロキシフェンの毒性はフェノキシカルブよりも低減されていた。

また、Table 2c に示した対照区の4~8日目の産仔数の合計は、118であった (1000 ng/Lの対照区は、1容器中の2個体の親からの合計)。これに対して、フェノキシカルブの1000 ng/Lにおける産仔数は64であり、ピリプロキシフェンの1000 ng/Lにおける産仔数は、76であった。この濃度では、両物質ともほぼ同程度の繁殖影響であったが、250及び500 ng/Lの試験においても8~10日後の影響はほぼ同程度であったことから、このまま試験を続けることができれば、同様な結果が得られることも考えられる (1000 ng/Lでは、親ミジンコの生育にも影響が出始めるため、試験を継続しなかった)。

試験期間中の産仔数については、いずれの物質の各濃度で、オスを発生してからの産仔数が対照区と比較して減少した。また、フェノキシカルブの産仔数は、ピリプロキシフェンの産仔数よりも減少してお

り、急性影響はほぼ同様であるが、慢性影響についてはフェノキシカルブが強いことが明らかになった。

#### ii) ミジンコのオス化に及ぼす影響

250 ng/Lの曝露において、フェノキシカルブでは、6日目に雄の産仔を確認したが、10日目では雌のみの産仔しかなかった。ピリプロキシフェンでは、7日目にオスの産仔を確認したが、10日目以降はオスの産仔が少なくなった (Table 2a)。

500 ng/Lの曝露において、フェノキシカルブでは、6日目に雄の産仔を確認したが、10日目では雌のみの産仔しかなかったものと13日目以降もオスのみの産仔のもの両方があった。ピリプロキシフェンでは、5日目にオスの産仔を確認したが、8~12日目以降はオスの産仔が少なくなった (Table 2b)。

1000 ng/Lの曝露では、雄の産仔をピリプロキシフェンでは、4日目に確認して以降、全ての試験ビーカーで確認した。フェノキシカルブでは、5日目にオスを産生した以降、雄が産まれたときの産仔の性別は全て雄だった (Table 2c)。

#### iii) 幼若ホルモン様物質のミジンコへの影響

本研究では、幼若ホルモン様物質 (JHA) としてフェノキシカルブとピリプロキシフェンを用いた。いずれの物質も農薬として開発されたもので、フェノキシカルブは、農薬登録を1996年11月7日に失効している (登録1990年)<sup>11)</sup>。ピリプロキシフェンは、1995年に登録され一般的に使用されている。また、日本のみならず韓国、タイ、フランス、アメリカなどでも農薬登録されている。ピリプロキシフェンは、殺虫剤として登録されており、ラノー乳剤 (19109)、ラノーテープ (19647)、プルートMC (22092) (括弧内は登録農薬の登録番号。いずれも (株) 住友化学が申請) などの製品が流通している。これらは、脱皮ホルモンとの協調性を崩しきなぎや成虫への変態阻害作用や排卵阻害作用により、コナジラミ類、アブラムシ類、アザミウマ類などへの殺虫活性があり、野菜、豆、花きなどでの農業害虫の駆除に利用されている。国内生産量は、46.3~86.2トン/年 (2008~2010年) で、使用量は少なくない。平成24年の評価では、水質汚濁予測濃度は0.000020 mg/L (20 ng/L) と算出され、公共用水域の水中の予測濃度0.26 mg/Lを超えず、農薬登録保留基準値を超えないことが確認された<sup>12)</sup>。PECの値は、20 ng/Lであり (イヌのADIを基準とした値)、本研究のオス化評価法

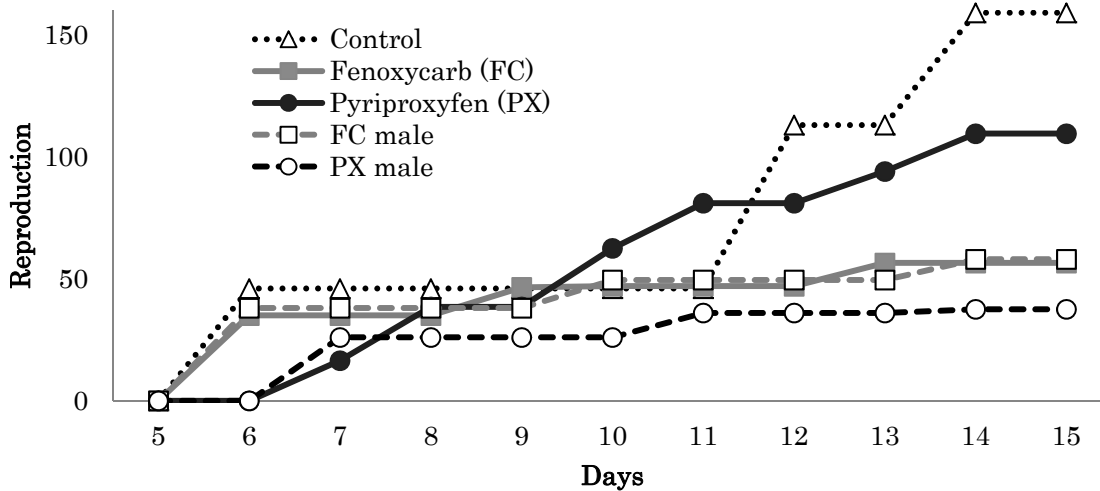


Fig. 4a *Daphnia magna* reproduction; 250 ng / L.

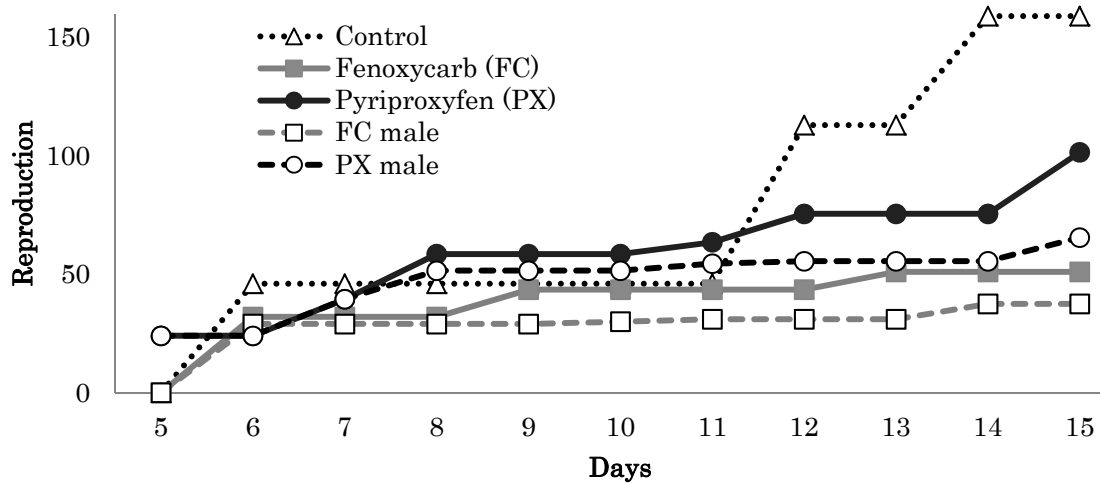


Fig. 4b *Daphnia magna* reproduction; 500 ng / L.

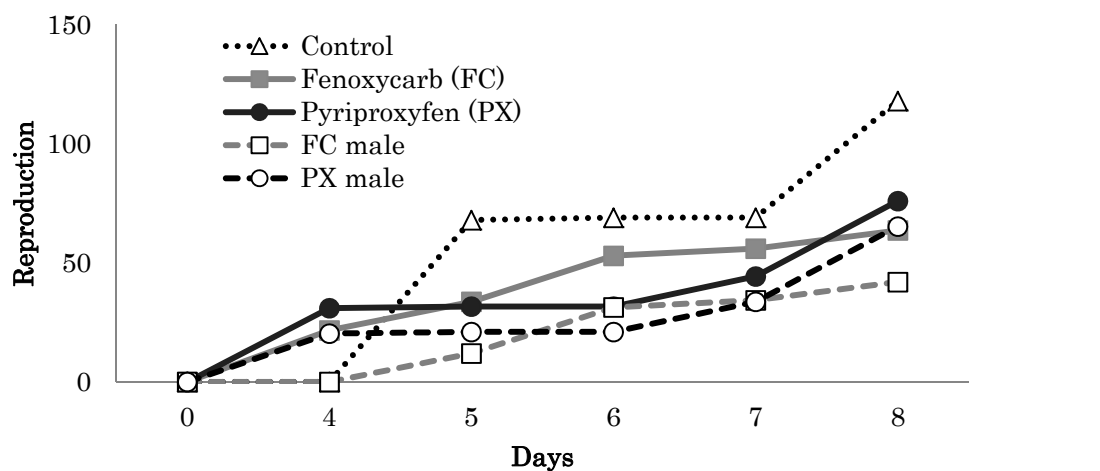


Fig. 4c *Daphnia magna* reproduction; 1000 ng / L.

Table 2a The number of neonates in *Daphnia magna* reproduction test; 250 ng / L

Day	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	0	46	0	0	67	0	0	67	0	0	-
	0	45	4	0	65	0	0	2	76	0	-
Fenoxycarb	0	32 (26)	0	0	23 (15)	1 (0)	0	0	19 (5)	0	-
	0	38 (38)	0	0	0	23 (0)	0	0	0	17 (0)	-
Pyriproxyfen	0	0	0	44 (0)	0	0	37 (20)	0	0	31 (3)	0
	0	0	33 (26)	0	0	48 (0)	0	0	26 (0)	0	0

One daphnia / beaker. The number in parentheses indicates male neonate.

Table 2b The number of neonates in *Daphnia magna* reproduction test; 500 ng / L

Day	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Control	0	46	0	0	67	0	0	67	0	0	-
	0	45	4	0	65	0	0	2	76	0	-
Fenoxycarb	0	35 (35)	0	0	23 (23)	0	0	0	15 (15)	0	-
	0	29 (29)	0	0	0	2 (0)	2 (0)	0	0	13 (0)	-
Pyriproxyfen	48 (48)	0	0	38 (24)	0	0	0	24 (2)	0	0	31 (0)
	0	0	31 (31)	0	0	0	10 (6)	0	0	0	21 (20)

One daphnia / beaker. The number in parentheses indicates male neonate.

Table 2c The number of neonates in *Daphnia magna* reproduction test; 1000 ng / L

Day	4	5	6	7	8
Control	0	68 (0)	1 (0)	0	49 (0)
	65 (0)	0	23 (23)	0	23 (23)
Fenoxycarb	0	36 (36)	21 (21)	0	0
	0	0	14 (14)	9 (9)	0
Pyriproxyfen	32 (0)	0	0	17 (17)	24 (24)
	61 (61)	2 (2)	0	0	52 (52)
	0	0	0	21 (21)	19 (19)

Two daphnia / beaker. The number in parentheses indicates male neonate.

の曝露最低濃度は250 ng/L であるため、確定的な考察はできないが、その差は約10倍程度しかない。オスの発生する割合については、その傾向がほとんど変化していない。本研究でも確認したようにオオミジンコに対する急性影響 ( $EC_{50}=188 \mu\text{g/L}$ ) や繁殖影響はあまりなかったが、オス化の影響について安全係数を100から1000と安全側に設定すれば、このPECの値では今後注意する必要がある可能性もある。

今回の研究では、確認することはできなかったが、2つある第一触覚の半分はオス、半分はメスのミジンコもあるとされている<sup>13)</sup>。今後の研究ではこれらを検証する必要があるかもしれない。また、フェノキシカルブは、カブトムシのオスの角を巨大化させてしている。本研究では、ミジンコのオス化の指標に第一触覚を用いている。今回の研究では、ミジンコの第一触覚が巨大化している事実は確認していないが、何らかの関係性も考えられる<sup>14)</sup>。

#### 4. 結論

今回の実験結果から、既報の通り幼若ホルモン様物質はオオミジンコのオス発生に影響していた。また、オオミジンコをオス化する濃度でもしばらくするとメスを産み始める場合があることから、オス化についても馴化反応があることが示された。また、急性遊泳試験や繁殖性試験では、既報とほぼ同等の濃度で影響し、可逆的な反応は無かった。オス化した胚や幼生を確実に得るには、曝露した後なるべく早い段階で馴化する前であることが明らかになった。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、この研究のきっかけとなる機会をいただき、メチルファルネシン酸の溶解法 (JHA の溶解に応用) をはじめ、多くの助言を頂いた米国インディアナ大学 Center for Genomics and Bioinformatics (CGB) 主任研究員 John Colbourne 博士 (現在、英国バーミンガム大学教授) に感謝いたします。また、この研究のパイロット実験を行わせていただいたインディアナ大学公衆衛生環境学領域 (SPEA) 准教授 Joseph Shaw 博士、研究員 Stephen Glaholt 氏に感謝します。また、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を分譲して頂いた (株) 三菱化学メディエンスおよび (独) 国立環境研究所に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 若林明子, 化学物質と環境毒性, 丸善, (2000)
- 2) 日本環境毒性学会編, 生態影響試験ハンドブック, 朝倉書店, (2003)
- 3) Weltje, L., Schulte-Oehlmann, U., The seven year itch—progress in research on endocrine disruption in aquatic invertebrates since 1999, *Ecotoxicology* **16**, 1–3, (2007)
- 4) 花里孝之, ミジンコ —その生態と湖沼環境問題—, 名古屋大学出版会, (2000)
- 5) Hoback, A., Larsson, P., Sex determination in *Daphnia magna*, *Ecology* **71**, 2255–2268, (1990)
- 6) Matsumoto, T., Ikuno, M., Itoi, S., Sugita, H., *Chemosphere* **72**, 451–456, (2008)
- 7) Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T., Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs., *Chemosphere* **61**, 1168–1174, (2005)
- 8) Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M., Iguchi, T., Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere* **53**, 827–833, (2003)
- 9) OECD, *Daphnia* sp. acute immobilization test. Test guideline 202., Paris, France, (1981)
- 10) 米国環境保護庁 ECOTOX Database [http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick\\_query.html](http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.html)
- 11) 農林水産消費安全技術センター (FAMIC) 登録・失効農薬情報 <http://www.acis.famic.go.jp/toroku/index.htm>
- 12) 環境省, 水質汚濁に係る農薬登録保留基準—評価書—平成24年9月7日中央環境審議会土壌農薬部会農薬小委員会 (第31回) 資料, (2013)
- 13) LeBlanc, G. A., Crustacean endocrine toxicology: a review, *Ecotoxicology* **16**, 61–81, (2007)
- 14) Gotoh, H., Cornette, R., Koshikawa, S., Okada, Y., Lavine, L. C., Juvenile Hormone Regulates Extreme Mandible Growth in Male Stag Beetles. *PLoS ONE* **6**(6): e21139. doi:10.1371/journal.pone.0021139, (2011)

