

PCBが雌メダカの性成熟に及ぼす影響

誌名	九州大学農学部学藝雑誌 = Science bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University
ISSN	03686264
巻/号	362/3
掲載ページ	p. 79-82
発行年月	1982年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



PCB が雌メダカの性成熟に及ぼす影響

安東博子・矢野友紀

九州大学農学部水産化学第一教室

(1982年1月7日 受理)

Effects of PCB on Sexual Maturation in Female Medaka (*Oryzias latipes*)

HIROKO ANDO and TOMOKI YANO

Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, 46-04, Fukuoka 812

緒 言

我国で PCB の製造が禁止されて、やがて10年になるが、これまでに環境中に放出され、回収不能となった PCB は2~3万トンに上ると推定されており、今日でもなお、重要な環境汚染物質と考えられている。

環境水中に残留している PCB は、鰓や皮膚を介して直接的に、或いは食物連鎖により間接的に魚体内に取り込まれ、体内の脂肪組織に高濃度に蓄積されることが多くの研究者により明らかにされている。しかしながら PCB が魚体に与える生理・生化学的影響についての研究は少なく、Yap *et al.* (1971) が blue gill fish の ATPase 活性阻害について、伊東 (1973) がコイの血液性状と血漿酵素の変化について報告しているに過ぎない。著者らは、PCB が雌メダカの性成熟に与える影響を調べ、二、三の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 供試魚

業者から購入した体重 0.3~0.4 g のヒメダカ (*Oryzias latipes*) を実験水槽 (28.5×60×40 cm) に入れ、水温 22~23°C、1日9時間照射 (照度約 4,000 lx) の条件下で1か月以上予備飼育したものを実験に供した。

2. PCB の投与方法

PCB (東京化成工業 K. K., PCB-48) 50 mg を corn oil 1 ml に溶かし、ヒメダカの雌 40 尾にその

1 μl ずつをマイクロシリンジで腹腔内投与した。すなわち、1尾当りの PCB 投与量を 50 μg とした。一方、別のヒメダカ 40 尾に corn oil のみを 1 μl ずつ腹腔内投与し、対照区とした。

3. 飼育条件

PCB 投与区と対照区のヒメダカを別々の水槽 (28.5×60×40 cm) に移し、水温 28°C、1日16時間照射 (照度約 4,000 lx) の条件下で22日間飼育した。なお、魚にはイトミミズを飽食するまで与え、飼育水は5日おきに半量ずつ換水した。

4. 生殖腺指数 (GSI) の測定

飼育期間中、2~3日おきに各々の水槽から2尾ずつ魚を取り出し、MS 222 で麻酔した後、体重と卵巣重量を測定し、GSI (gonado-somatic index) を求めた。

5. 水中排泄エストロゲンの定量

魚類の場合、エストロゲン代謝産物は鰓と腎臓から排泄されると考えられるが、本実験では両者をあわせて総排泄量を測定した。

PCB 投与区と対照区からヒメダカ各10尾ずつを取り出し、体重測定後、1 mM 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 500 ml を入れたビーカー中に2時間放置した。ついで魚を取り出し、残液を東洋濾紙 No. 2 で濾過後、Amberlite XAD-2 カラム (5 cm×1 cm φ) 中を流速約 5 ml/min で通過させ、吸着物をメタノール 25 ml で溶出した。減圧下でメタノールを留去後、残渣に 15% HCl 2 ml を加えて、100°C で1時間加水分解した。ついでエーテル 2 ml で2回抽出し、エーテル層を Brown (1955) の方法に準拠してアルカリ洗

浄・溶剤分別した。すなわち、エーテル層を濃炭酸塩溶液 (pH 10.5) 0.8 ml で洗浄後、8% NaOH 0.2 ml で2~3分間振とう、更に8% NaHCO₃ 0.8 ml を追加し振とう後水層を除き、エーテル層を濃炭酸塩溶液 (pH 10.5) と蒸留水 0.5 ml で洗い、窒素ガス気流中で乾燥した。残渣を0.1 mlのエタノールに溶かし、ベンゼン:石油エーテル (1:1) 混合液 2 ml と0.4 N NaOH 1 ml を加えて振とう後、有機溶媒層を除き、アルカリ層に1 N HCl 1 ml を加えて酸性とした後、エーテル 2 ml で抽出、エーテル層を水洗乾燥した。

ついで残渣を0.2~1.6 mlのベンゼン:メタノール (85:15) に溶かし、その0.2 mlを牧野 (1973) の方法に従って Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにかけ、エストロン、エストラジオール、エストリオールを分画、各々のフラクションについて Radioimmunoassay (RIA) を行なった。

RIA に用いた標品エストロン、エストラジオール、エストリオールは東京化成工業 K. K. から、エストロン-6,7-³H (58.3 Ci/mmole)、エストラジオール-6,7-³H (53.0 Ci/mmole)、エストリオール-6,7-³H (57.1 Ci/mmole) は New England Nuclear 社から、また、抗血清エストロン-6-オキシム-BSA、エストラジオール-6-オキシム-BSA、エストリオール-6-オキシム-BSA は帝國臓器製薬 K. K. から購入した。エーテルは残留農薬分析用の試薬をそのまま使い、メタノール、ベンゼン、石油エーテルは、市販の特級品を再蒸留して使用した。

実験結果

水温 28°C, 1日16時間光照射 (照度約 4,000 lx) の条件下では、対照区ヒメダカ 30尾のうち2尾が10日目に放卵した。その後、実験終了までの間、対照区ではほぼ毎日数尾の放卵がみられた。これに対して PCB 投与区では、16日目に初めて放卵を観察、その後、20日目に2尾の放卵をみとめたのみであった。

1. 生殖腺指数 (GSI)

実験開始時の1尾あたりの平均体重は、対照区が 0.33 g, PCB 投与区が 0.32 g であつたが、22日後の実験終了時にはそれぞれ 0.52 g (1.6倍), 0.45 g (1.4倍) に増加した (Fig. 1)。また、GSI (gonado-somatic index = 性巣重量 × 100 / 体重) を求めた結果、実験開始時に両区とも約 0.7% であつたものが、対照区では6日目に 3.9%, 8日目に 6.3%, 12日目に 10.2% と急激に増加し、22日目には 13.8%

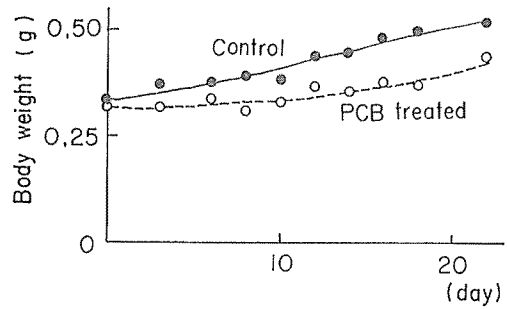


Fig. 1. Changes in body weights of control and PCB treated medaka, *Olyzias latipes*. The fish were bred under the condition of 28°C and 16 hours of light per day.

に達した。一方 PCB 投与区では、6日目に 0.8%, 8日目に 1.9%, 12日目に 3.4%, 22日目に 9.5% と対照区に比べ、増加が緩慢であり、卵巣成熟の遅れが認められた (Fig. 2)。

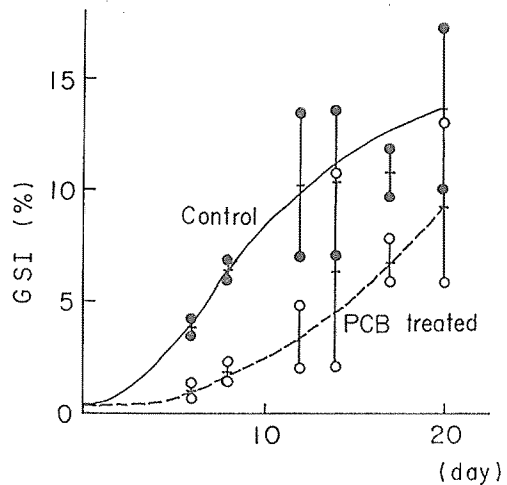


Fig. 2. Effect of PCB administration on gonadal maturation in medaka.

2. 水中排泄エストロゲン量の変化

メダカの血中エストロゲン濃度の変化を推測するために、メダカが腎臓、或いは鰓を通して一定時間内に水中に排泄するエストロゲン量の経日変化を調べたところ、Fig. 3 に示す結果が得られた。エストロンは、対照区、PCB 投与区ともに実験開始後14日目まではゆるやかな増加がみられ、ほとんど差がみられなかったが、16日目以降に対照区のエストロン排泄量が急増し、相対的に PCB 投与区の方が低い値を示すようになった。エストラジオールは、6~8日目に対照区

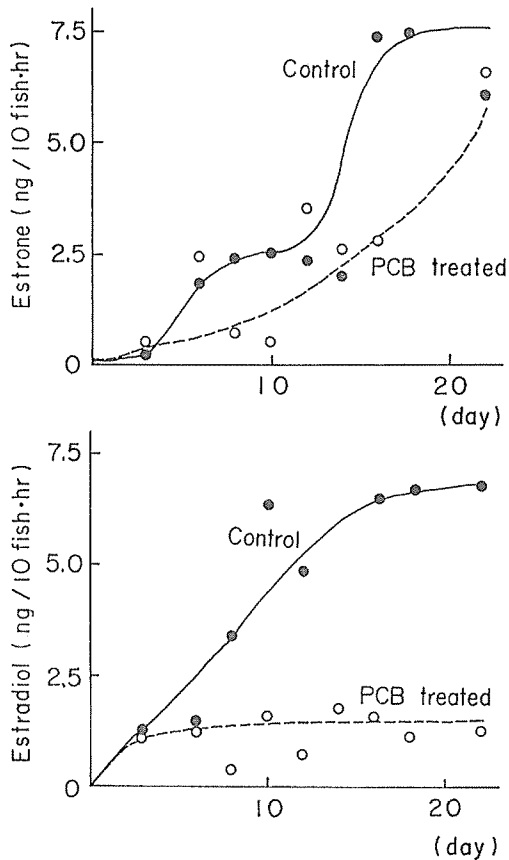


Fig. 3. Time course of effect of PCB administration on estrone and estradiol excretion in medaka. The estrogens were determined using radioimmunoassay method.

の測定値が急激に上昇し、18日目頃にピーク (8 ng / 10 fish·hr) に達したのに対し、PCB 投与区では実験期間中僅かな増加しかみられず、10日目以降対照区との差が顕著になった。また、エストリオールは両区ともに成熟に伴う変化がみられず、測定値は常に低い値 (0.05 ng / 10 fish·hr 以下) を示した。

今回の全実験操作を通しての各エストロゲンの回収率は、エストロン 53.5%，エストラジオール 60.1%，エストリオール 37.6% であった。また、water blank 値は、エストロン 32 pg，エストラジオール 18 pg，エストリオール 3 pg であった。

考 察

魚の卵巣の成熟にエストラジオールが重要な役割を果たしていることはよく知られている。本実験において PCB 投与区のメダカの卵巣成熟が遅れた (Fig.

2) のは、PCB 投与によつてヒメダカのエストラジオール合成過程ないし代謝過程に何らかの障害が生じ、エストラジオールの血中濃度が低下したことが一因と考えられる。

鳥類では、DDT, DDE, PCB 等の有機塩素系環境汚染物質によつて肝臓の薬物代謝酵素が誘導されること、この誘導酵素の基質特異性が低いために生体成分であるエストラジオールまでが分解され、その血中濃度が低下し、カルシウム代謝異常、卵殻重量の減少等の障害が起きることが報告されている (Risebrough *et al.*, 1968; Lincer and Peakall, 1970; Peakall 1970 a, b; Ratcliffe, 1971)。

魚類の場合も、摂取された PCB は鳥類や哺乳類と同じく脂肪組織中に高濃度に蓄積され、排泄には長期間を要すると言われており (Hansen *et al.*, 1971; Yoshida *et al.*, 1973; Guinery *et al.*, 1977), また PCB によつて肝臓の各種薬物代謝酵素が誘導されることも最近明らかにされている (Hill *et al.*, 1976; Lidman *et al.*, 1976; Elcombe and Lech, 1978; 伊東・村田, 1980)。従つて、本実験において PCB 投与区のメダカのエストラジオール測定値が著しく低かつたのは、PCB による薬物代謝酵素誘導の結果ではないかと推論される。しかしながら魚類のエストラジオール—ヒドロキシラーゼ活性は哺乳類や両生類にくらべて著しく低いという報告 (Ozon und Breuer, 1963) もあるので、今後これらの点について更に詳しく調べたい。

文 献

- Brown, J. B. 1955 A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. *Biochem. J.*, 60: 185-193
- Elcombe C. R. and J. J. Lech 1978 Induction of monooxygenation in rainbow trout by polybrominated biphenyls: A comparative study. *Environ. Health Perspect.*, 23: 309-314
- Guiney P. D., R. E. Peterson, M. J. Melancon, Jr. and J. J. Lech 1977 The distribution and elimination of 2, 5, 2', 5', -[¹⁴C]-tetrachlorobiphenyl in rainbow trout (*Salmogairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39: 329-338
- Hansen D. J., P. R. Parrish, J. I. Lowe, A. J. Wilson, Jr. and P. D. Wilson 1971 Chronic toxicity, uptake, and retention of Aroclor® 1258 in two estuarine fishes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6: 113-119
- Hill, D. W., E. Hejtmanick and B. J. Camp

- 1976 Induction of hepatic microsomal enzymes by Aroclor® 1258 in *Ictalurus punctatus* (cannel catfish). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 495-502
- 伊東保之 1973 水生生物におよぼす PCB の影響— II. PCB の経口投与によるコイの血液性状および血漿酵素活性の変化. *日水誌*, 39: 1135-1138
- 伊東保之・村田敏郎 1980 水生生物におよぼす polychlorinated biphenyls (PCB) の影響 (第8報). コイの薬物代謝酵素系におよぼす PCB 投与の影響. *衛生化学*, 26: 21-27
- Lidman, U., L. Förlin, O. Molander and G. Axelson 1976 Induction of the drug metabolizing system in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver by polychlorinated biphenyls (PCBs). *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 39: 262-272
- Lincer, J. L. and D. B. Peakall 1970 Metabolic effects of polychlorinated biphenyls in the american kestrel. *Nature*, 228: 783-784
- 牧野拓雄 1973 性ステロイドホルモンの radio-immunoassay. *日内分泌誌*, 49: 629-645
- Ozon R. und H. Breuer 1963 Hydroxylierung von Östradiol-(17 β) zu 6 α -Hydroxy-östradiol-(17 β) und östriol in der Leber von Amphibien. *Hoppe-Sayl. Z.*, 333: 282-285
- Peakall, D. B. 1970 a p,p'-DDT: Effect on calcium metabolism and concentration of estradiol in the blood. *Science*, 168: 592-594
- Peakall, D. B. 1970 b Pesticides and the reproduction of birds. *Sci. Am.*, 222: 72-78
- Ratcliffe, D. A. (土井隆雄・中村 譲訳) 1971 殺虫剤による野鳥の卵破損率と卵殻厚の変化 II. *科学*, 41: 392-403
- Risebrough R. W., P. Rieche, D. B. Peakall, S. G. Herman and M. N. Kirven 1968 Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature*, 220: 1098-1102
- Yap, H. H., D. Desaiyah and L. K. Cutkomp, R. B. Koch 1971 Sencitivity of fish ATP-ase to polychlorinated biphenyls. *Nature*, 233: 61-62
- Yoshida, T., F. Takashima and T. Watanabe 1973 Distribution of ¹⁴C-PCBs in carp. *Ambio*, 2: 111-113

Summary

In order to investigate the effect of PCB on sexual maturation of fish, female medaka (*Olyzias latipes*), weighing from 0.3 to 0.4 g, were injected intraperitoneally with 150 μ g/g of PCB dissolved in corn oil and bred for 22 days under the condition of 28°C, 16 hours of light per day.

The control fish which received only corn oil began to spawn on the 10th to 15th day after injection, while very few PCB treated fish began spawning by the termination of the experiment. Gonado-somatic index of the treated fish was significantly lower than that of control ones (Fig. 2). Further, in control fish, the amount of estradiol excreted in water per hour began to rise on the 8th day after injection and reached maximum on the 18th day, while PCB treated fish showed only slight increase during the experiment (Fig. 3). This suggests that the delay or cessation of sexual maturation in PCB treated medaka was caused by a dysfunction of estrogen metabolism.