

透明・光るメダカ (*olvas-GFP/STII-YI* 系統) を用いた内分泌かく乱化学物質の影響評価に関する研究

羽野健志 (瀬戸内海区水産研究所)

化学物質は現代社会にとって極めて重要であるが、それらの中には生物の内分泌系に作用して発生や生殖等に影響を与える物質 (内分泌かく乱化学物質) が存在することが明らかにされており、その影響評価が急務となっている。一般的に内分泌かく乱化学物質による性分化・再生産への影響を評価する場合、多数の実験動物を用いて長期間の曝露・飼育を実施した後、生殖腺組織を観察する等、多大な労力と時間を必要とするため、これらの影響を迅速かつ少ないコストと犠牲で検出できる試験系の開発が求められている。

本研究では、体表に色素が殆ど存在しない透明なメダカ (STII 系統) に、生殖細胞で常時発現する *vasa* 遺伝子の調節領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) を結合したトランスジーン (*olvas-GFP*) を導入した生殖腺が光るトランスジェニックメダカ (*olvas-GFP/STII-YI* 系統) を用い、内分泌かく乱化学物質の影響評価系への適用を検討した。

最初に、無処理のふ化後 1, 5, 10, 15 日令 *olvas-GFP/STII-YI* 系統仔魚を用い、蛍光顕微鏡および画像解析装置により生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定するとともに、生殖腺部位を取り出して *GFP* 蛍光を持つ生殖細胞数を調べた。その結果、ふ化後 1 日令から遺伝的メスの *GFP* 蛍光面積および生殖細胞数は遺伝的オスに比べ有意に増加し、10 日令では約 10 倍となっていた。よって、性分化の過程で生じる雌雄の差異を、10 日令仔魚の生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定することにより生きた状態で観察可能であると結論した。

次に、女性ホルモン様作用を持ち自然界の河川において検出例が多数報告されているエチニルエストラジオール (EE_2) を、ナノインジェクション法により受精直後の胚に微量注入 (0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 ng/egg) し、性分化への影響を生殖細胞の観察により調べた。その結果、0.5 ng/egg 以上の処理区で 10 日令仔魚の遺伝的オスの中に生殖細胞数、蛍光面積ともに対照区遺伝的オスの 6-10 倍と遺伝的メスと同等にまで増加した個体が観察された。さらに、仔魚を 100 日令成魚まで飼育して生殖腺組織を調べたところ、0.5 ng/egg 以上の処理区の遺伝的オスが卵巣を持ち、表現型がメスとなる現象、つまり、オスからメスへの性転換が観察された。よって、 EE_2 が性分化異常を引き起こす作用は、10 日令仔魚生殖腺の *GFP* 蛍光面積を測定することにより迅速かつ簡便に検出可能であることが示唆された。また、ふ化直後の

olvas-GFP/STII-YI 系統仔魚に EE_2 を 35 日間飼育水から曝露 (0, 25.2, 45.1, 80.1, 158, 447, 880, 1710 ng/L) し生殖腺組織を観察した結果、158 ng/L の 10 日令オスで蛍光面積が有意に増加した。さらに、35 日令では、45.1 ng/L 以上の処理区の遺伝的オスで卵巣を持つ個体が見られ、メスへの性転換が起こっていた。

同様に女性ホルモン様作用を持ち汚染が報告されているノニルフェノール (NP) を受精直後の胚に注入 (0, 2.0, 10, 50, 125, 250 ng/egg) した結果、全ての処理区で 10 日令仔魚の蛍光面積、100 日令成魚ともに遺伝子型の性と表現型の性は一致しており、性分化異常は観察されなかった。これは、NP の女性ホルモン様作用が弱い、もしくは NP がメダカ体内で代謝、排泄されたためと考察した。

さらに EE_2 による *olvas-GFP/STII-YI* 系統の成熟した生殖腺への影響を調べるため、60 日令成魚を EE_2 (0, 47.8, 94.8, 216, 522 ng/L) に 4 週間飼育水から曝露後、生殖腺 *GFP* 蛍光面積の測定を行った結果、遺伝的オスでは 216 ng/L 以上の処理区で蛍光面積が開始時の約 30% にまで減少していた。その生殖腺組織を観察した結果、精巣は萎縮して結合組織が大部分を占めており、再生産に大きな障害が予想される状態であった。また EE_2 濃度依存的に精巣に卵母細胞が見られた。遺伝的メスでも、卵巣の蛍光面積は 522 ng/L 区で曝露開始時の約 50% にまで減少していた。次に、60 日令オス成魚を EE_2 (0, 43.7, 85.8, 215, 473 ng/L) に 3 週間曝露した後、清水下で 6 週間飼育して同一個体における生殖腺蛍光面積の変化を経時的に観察した。その結果、曝露 3 週目には 215 ng/L 区以上で精巣の蛍光面積は 25% にまで減少したが、清水飼育終了時の精巣の蛍光面積は曝露開始時の値にまで回復した。組織観察の結果では、結合組織は殆どなく正常な精子形成が観察され精巣の回復が確認された。

以上の研究の結果、*olvas-GFP/STII-YI* 系統を用いてその生殖腺の *GFP* 蛍光画像を解析することにより、化学物質の生殖腺の発達と分化に及ぼす害作用を生きた状態で検出可能であることが明らかとなった。また成熟した生殖腺への影響および清水飼育による回復過程の観察も同一個体で可能となった。*olvas-GFP/STII-YI* 系統は、内分泌かく乱化学物質の影響評価やそのメカニズムを解明する上で有用なモデルになるものと期待される。

クルマエビのホワイトスポット病 WSD (white spot disease) の防除対策に関する研究

佐藤 純 (増養殖研究所 上浦庁舎)

WSD は、クルマエビ種苗生産過程あるいは養殖生産過程において被害をもたらすウイルス感染症である。元来抗体を持たない無脊椎動物のワクチン開発は無意味であると考えられて来たが、感染耐過クルマエビが WSD 原因ウイルスである WSSV (white spot syndrome virus) の再感染に対しある程度の特異性を有する抵抗性を獲得することが解明された (免疫様現象)。本研究では、これらの免疫様現象を利用したより積極的な水平伝染除技術の開発を目的の一つとした。第 1 章では、種苗生産過程における WSSV の感染経路を検討し、種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は垂直感染の可能性が高いと判断した。第 2 章では種苗生産過程において実施される受精卵のヨード剤による消毒の安全性と効果について検討し、クルマエビの受精卵は 128 細胞期においてハンドリングの影響を受けやすいことを確認した。また、ヨウ素濃度 5 mg/L で 5 分の処理が安全であり、安全な処理条件で卵表面の生菌数を 90% 以上減させた。第 3、4 章では大腸菌発現の WSSV の rVP26 と rVP28 の経口投与ワクチンの有効性を検討した。その結果、経口攻撃、浸漬攻撃および注射攻撃の何れにおいても防御効果が確認できた。特に、経口攻撃試験で高い防御効果が得られたことは、共食いによる水平的な感染の拡大を特徴とする WSD の実用的な防除対策の一つになると考えた。

以上、現時点で考えられる最も有効な防除対策技術を取りまとめると、1. 親エビの選抜、2. 卵消毒、3. 飼育水の管理、飼育水の殺菌管理が難しくなる天然海面を利用した養殖生産過程での対策としては、生体防御能を利用した水平感染対策が考えられ、rVPs の経口投与とブースターの必要性について検討したところ、WSSV に対する防御効果が誘導できること、さらに誘導される防御反応の発現時期および持続期間も明らかにした。

飼育条件下におけるタイマイの繁殖に関する生態、行動および生理学的研究

小林真人

(西海区水産研究所亜熱帯研究センター八重山庁舎)

本研究の対象種であるタイマイ *Eretmochelys imbricata* は、ウミガメ科に属するウミガメ類の 1 種で、主に熱帯から亜熱帯のサンゴ礁海域に生息してい

る。日本における本種の分布は伊豆半島以南であるが、産卵の北限は南西諸島であり、その産卵個体数は非常に少ない。本種は、古くからタンパク源の一つとして肉や卵が食用に供されてきただけでなく、剥製や甲羅を用いた工芸品 (日本ではべっ甲細工) の原料としても世界各地で利用されてきた。しかし、乱獲などによって生息数は減少し、本種は国際自然保護連合のレッドリストの絶滅危惧 I A 類に記載されている。また、本種をはじめとしたウミガメ類の保護対策の一環として、ワシントン条約によって国際的な商取引が禁止されている。そして、このことによって日本のべっ甲産業は原料の調達が可能となり、存亡の危機に直面している。このようなことを背景として、1999 年から独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所石垣支所は人工飼育した仔ガメの放流 (Head-Starting) による本種資源の回復を目指し、本種の増殖技術の研究開発を開始した。Head-Starting を行うためには、安定的な採卵と仔ガメの確保が不可欠であり、そのためには親ガメの繁殖機構を解明することが重要である。そこで、本研究は飼育条件下における本種の繁殖生理や繁殖生態を解明することを目的とした。

第 1 章では、雄の血漿テストステロン濃度の変動と交尾行動を調べ、性成熟とテストステロン濃度との関係を明らかにし、雄の繁殖周期は毎年であることがわかった。また、直甲長、尻尾の長さ、TE (直甲長に対する尻尾の長さの比率) などの外部形態を指標として雄の性成熟の状態を調べたところ、TE を指標とすることで簡便に雄の性成熟を判定できることがわかった。

第 2 章では、雌の血漿エストロジオール-17 β 濃度の変動と卵巣の発達状態を調べ、エストロジオール-17 β 濃度と卵巣の発達の関係を明らかにした。また、雌の繁殖周期は野生個体と同様に 2~3 年であること、飼育条件によっては毎年成熟できる可能性があることが示唆された。

第 3 章では、2006 年から 2009 年にかけて雌の繁殖生態を調べ、産卵数、産卵回数、産卵間隔、ふ化仔ガメの大きさは、野生タイマイの既存の報告例と大きな違いは認められなかったが、ふ化率は野生個体の事例よりも著しく低いことが明らかになった。

第 4 章では、第 1 章から第 3 章までの結果をもとに総合考察を行った。飼育条件下のタイマイの性ホルモンの動態は、野生個体のものと同様の変動パターンを示し、飼育条件下であっても正常に性ホルモンが分泌されていることがわかった。交尾期は 4 月下旬から 5 月であったが、雌が雄の交尾を受け入れる期間は短いことが示唆された。このことから、確実に交尾をさせ

るためにはこの期間を逃さずに雌雄を同居させて交尾させる必要がある。交尾からふ化までの繁殖生態は、野生個体の報告事例と大きな差はなかったものの、飼

育条件下ではふ化率が非常に低いことが明らかとなった。今後タイマイの増養殖をさらに推進するためには、ふ化率を向上させる研究が急務である。