

学位論文題名

Ecotoxicological study on the growth and reproduction  
in *Daphnia magna* as influenced by various chemicals

（オオミジンコの成長および繁殖に及ぼす化学物質の影響に関する  
生態毒性学的研究）

学位論文内容の要旨

オオミジンコは水圏生態系において重要な位置を占める小型甲殻類である。本種は農薬、化学物質の生態影響リスク評価のために実施される毒性試験においても代表種として広く用いられている。オオミジンコの繁殖は無性生殖および有性生殖によって行われるが、通常毒性試験においては主に無性生殖によって産まれた雌を用いた急性毒性試験および無性生殖繁殖試験が行われている。新規化合物のリスク評価のためには、雌雄両性に対する毒性および有性生殖による繁殖への影響を総合的に把握することが重要である。

近年、化学物質の野生生物に対するホルモン様作用、特に女性ホルモン様作用が精力的に研究されてきている。しかしながら、貝類以外の無脊椎動物に対する影響に関する知見は未だ不十分である。甲殻類は生態学的にも産業的にも重要な生物群であり、ホルモン様作用物質によりどのような影響を受けるかは重要な課題である。オオミジンコ繁殖試験は化学物質の甲殻類への影響を評価するためのバイオアッセイ系として用いられており、この系を有効に活用して各種の化学物質の反応を集積することは、今後の化学物質のリスク評価に極めて有用な知見を提供するものと考えられる。

本研究では、化学物質（無機・有機金属、脊椎動物型ステロイド、テルペノイド、催奇形物質）のオオミジンコの成長と繁殖に及ぼす影響について、

1) 急性および長期毒性における性差、2) 無性生殖と有性生殖過程における影響の違い、3) 各化学物質の影響、特に雄仔虫の誘導（雄化）について検討した。また、これらの試験に先立ち、効率よく雄の仔虫を得る方法についても検討し、確立した。

実験用の雄を得るために、環境条件の変化（明暗周期の変更と給餌量の減少）の効果を検討した。その結果、成体になった雌個体の脱皮終了後、16時間明/8時間暗周期を逆転（16時間明/8時間暗）するとともに給餌を3-4日間停止することにより、平均してほぼ1:1の比率で雌雄の仔虫が得られた。この方法は得られる仔虫の時期と数を正確に予測できる点できわめて有効であった。

性差をみるために、無機・有機金属を被験物質として、急性毒性試験および無性生殖繁殖試験を行った。その結果、生後24時間以内の個体には性差はみられなかったが、8日齢の個体では雄の半数影響濃度は雌に比べて約1/2であった。硫酸銅を用いた無性生殖繁殖試験では性差は認められなかった。

有性生殖と無性生殖における毒性を比較するために、有機スズを用いて有性生殖および無性生殖繁殖試験を行った。その結果、無性生殖繁殖試験における雌の最小影響濃度は1 µg/Lであり、有性生殖繁殖試験では、雌雄それぞれ1および0.2 µg/Lであった。雌では両試験で影響濃度に差はなかったが、有性生殖繁殖試験では雌雄の生存率に明瞭な性差が認められ、雌の休眠卵の産生に影響したと考えられた。この影響濃度の差(1/0.2=5倍)は現行の生態影響リスク評価における安全係数を超えるものではなかった。

脊椎動物型ステロイドは、オオミジンコの有性生殖、無性生殖いずれに対しても大きな影響を与えなかったが、昆虫の幼若ホルモンであるテルペノイド（メトプレンおよび幼若ホルモンⅢ〔JH-Ⅲ〕）では、体色の変化、成長の抑制、産仔数の減少、仔虫の雄化および休眠卵の誘導がみられた。また、親

ミジンコ体内での暴露が産まれた仔虫の成長にも大きな影響を与えており、発生初期における化学物質に対する暴露は孵化後のミジンコの生存にとって極めて重要と考えられる。JH-IIIを用いた短期暴露（4日間：卵巣の成長期から仔虫の放出までの期間）と長期（21日間：孵化後24時間以内の仔虫から）暴露による無性生殖繁殖試験の結果、短期暴露では親ミジンコへの毒性が軽減されるため、卵発生、仔虫の性と外部形態、孵化後の成長への影響を明瞭に検出できることが判明した。

哺乳類に対する催奇形物質であるエチレンチオウレア、バルプロ酸(VPA)、GABA関連化合物の無性生殖繁殖試験の結果、VPAのみが仔虫の雄化を誘導した。したがって、VPAの雄化誘導はGABAトランスアミナーゼの阻害によるものではないと考えられた。また、GABAおよびAminoxyacetic acidでは仔虫の死亡、繁殖の停止という特徴的な現象がみられた。

VPAを親ミジンコに暴露（無性生殖、短期暴露）すると20 mg/L以上の濃度で、仔虫にほぼ100%雄化が誘導された。その雄をVPAを含まない飼育水で飼育すると雄の形質（第1触角、腹縁前面部の突起、第1付属肢の刺毛、後腹部の生殖突起）は完全には発達せず、雌の形質（腹突および卵巣の発達、抱卵）も発現し、繁殖する（仔虫を放出する）個体も観察された。これらの個体から産まれた仔虫はすべて雌であり、正常に成長、繁殖した。

VPAの短期暴露により産まれた仔虫にその後もVPAまたはJH-IIIを暴露しても雄の形質の不完全な発達、雌の形質の発現を抑制することはできず、それぞれ化合物の影響（雄の仔虫と休眠卵の誘導）がみられたのみであった。したがって、テルペノイド(JH-III)は、雄化を誘導するとともに雌の形質発現を抑制し、それぞれ分子構造上の極性部分と非極性部分が関係していると推定された。

親ミジンコに対する環境条件の変化（明暗周期の変化と給餌制限）、JH-III

および VPA の暴露期間の違いが仔虫の性決定にどのように影響するかを調べた結果、オオミジンコの性決定は、卵細胞が卵として育嚢に移動する直前（卵母細胞が成長する時期）に行われていること、また、その時期は環境条件の変化および化学物質による誘導においてもほぼ一致していることが示された。この時期は仔虫の性決定のみならず、孵化後の生存にも影響を与える重要な発生段階であると考えられた。

以上本研究では、化学物質のオオミジンコ有性生殖と無性生殖への影響の違いを初めて示すとともに、影響の性差についても知見を得た。脊椎動物型のステロイドはオオミジンコの成長と繁殖にほとんど影響を与えないが、テルペノイドは多種の影響を与えることを示した。さらにテルペノイドによる仔虫の雄化誘導は雄の形質発現のみならず、雌の形質発現を抑制していることを示した。これらの結果は、オオミジンコの化学物質による雄化の誘導に関して、重要な新知見を提供したものである。また、上記の性決定時期を暴露する短期暴露無性生殖試験は、親ミジンコへの影響を軽減することにより、化学物質の仔虫への影響をより鮮明に検出できる有効な試験方法であることが示唆された。これら知見は今後のオオミジンコを用いた化学物質の毒性試験およびリスク評価に大きく役立つものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 彰 彦  
副 査 教 授 池 田 勉  
副 査 教 授 都 木 靖 彰  
副 査 助 教 授 東 藤 孝

学 位 論 文 題 名

## Ecotoxicological study on the growth and reproduction in *Daphnia magna* as influenced by various chemicals

(オオミジンコの成長および繁殖に及ぼす化学物質の影響に関する  
生態毒性学的研究)

オオミジンコは水圏生態系において重要な位置を占める小型甲殻類である。本種は農薬、化学物質の生態影響リスク評価のために実施される毒性試験においても代表種として広く用いられている。オオミジンコの繁殖は無性生殖および有性生殖によって行われるが、通常毒性試験においては主に無性生殖によって産まれた雌を用いた急性毒性試験および無性生殖繁殖試験が行われている。新規化合物のリスク評価のためには、雌雄両性に対する毒性および有性生殖による繁殖への影響を総合的に把握することが重要である。

近年、化学物質の野生生物に対するホルモン様作用、特に女性ホルモン様作用が精力的に研究されてきている。しかしながら、貝類以外の無脊椎動物への影響に関する知見は未だ不十分である。甲殻類は生態学的にも産業的にも重要な生物群であり、ホルモン様作用物質によりどのような影響を受けるかは重要な課題である。オオミジンコ繁殖試験は化学物質の甲殻類への影響を評価するためのバイオアッセイ系として用いられており、この系を有効に活用して各種の化学物質の反応を集積することは、今後の化学物質のリスク評価に極めて有用な知見を提供するものと考えられる。

本研究では、化学物質（無機・有機金属、脊椎動物型ステロイド、テルペノイド、催奇形物質）のオオミジンコの成長と繁殖に及ぼす影響に関し、①急性および長期毒性における性差、②無性生殖と有性生殖過程における影響の違い、③各化学物質の影響（仔虫の性および外部形態および成長への影響）について生態毒性学的に検討し、以下の知見を得た。

- 1) 試験に先立ち、性差および有性生殖への検討するために必須である雄の仔虫を得る効率的な方法（照明時間の変更と給餌制限による方法）を確立した。この方法は得られ

る仔虫の時期と数を正確に予測できる点できわめて有効であった。

- 2) 無機・有機金属の急性および長期毒性における性差を検討した結果、生後 24 時間以内の個体には性差はみられなかったが、8 日齢の個体では雄の半数影響濃度は雌に比べて約 1/2 であった。さらに有機スズの有性生殖における最小影響濃度 (0.2 $\mu$ g/L) は、無性生殖 (1  $\mu$ g/L) に比べて明らかに小さく、その原因は雄の生存率に起因していた。オオミジンコの有性生殖への影響を解析したのは初めての報告である。
- 3) 脊椎動物型ステロイドは、オオミジンコの有性生殖、無性生殖いずれに対しても大きな影響を与えないが、昆虫の幼若ホルモンであるテルペノイドでは、体色の変化、成長の抑制、産仔数の減少、仔虫の雄化および休眠卵の誘導がみられた。また、親ミジンコ体内での暴露は産まれた仔虫の成長にも大きな影響を与えた。
- 4) 無機・有機金属の急性および長期毒性における性差を検討した結果、生後 24 時間以内の個体には性差はみられなかったが、8 日齢の個体では雄の半数影響濃度は雌に比べて約 1/2 であった。さらに有機スズの有性生殖における最小影響濃度 (0.2 $\mu$ g/L) は、無性生殖 (1  $\mu$ g/L) に比べて明らかに小さく、その原因は雄の生存率に起因していた。オオミジンコの有性生殖への影響を解析したのは初めての報告である。
- 5) 脊椎動物型ステロイドは、オオミジンコの有性生殖、無性生殖いずれに対しても大きな影響を与えないが、昆虫の幼若ホルモンであるテルペノイドでは、体色の変化、成長の抑制、産仔数の減少、仔虫の雄化および休眠卵の誘導がみられた。また、親ミジンコ体内での暴露は産まれた仔虫の成長にも大きな影響を与えた。
- 6) 哺乳類に対する催奇形物質であるバルプロ酸を親ミジンコに暴露 (無性生殖、短期暴露) すると 20 mg/L 以上の濃度で、仔虫にほぼ 100%雄化が誘導された。その雄をバルプロ酸を含まない飼育水で飼育しても雄の形質 (第 1 触角、腹縁前面部の突起、第 1 付属肢の刺毛、後腹部の生殖突起) は完全には発達せず、雌の形質 (腹突および卵巣の発達、抱卵) も発現し、繁殖する (仔虫を放出する) 個体も観察された。これらの個体から産まれた仔虫はすべて雌であり、正常に成長、繁殖した。バルプロ酸の短期暴露により産まれた仔虫にその後もバルプロ酸または幼若ホルモン-III を暴露しても雄の形質の不完全な発達、雌の形質の発現を抑制することはできず、それぞれ化合物の影響 (雄の仔虫と休眠卵の誘導) がみられたのみであった。したがって、幼若ホルモン-III は、雄化を誘導するとともに雌の形質発現を抑制し、それぞれ分子構造上の極性部分と非極性部分が関係していると推定された。
- 7) オオミジンコの性は卵細胞が成長して育嚢に移動する時期に決定され、化学物質による雄の誘導もこの時期の暴露によるものであることを明らかにした。幼若ホルモンを用いた短期暴露 (4 日間: 卵巣の成長期から仔虫の放出までの期間) と長期 (21 日間: 孵化後 24 時間以内の仔虫から) 暴露による無性生殖繁殖試験の結果、短期暴露では親ミジンコへの毒性が軽減されるため、卵発生、仔虫の性と外部形態、孵化後の成長へ

の影響を明瞭に検出できることが判明した。

本研究では、化学物質のオオミジンコ有性生殖への影響および雄誘導の特徴を初めて明らかにするとともに、毒性評価における改良繁殖試験法の有効性を示した。これらの結果は、オオミジンコの化学物質に対する反応解析に関して、重要な新知見を提供したものとして高く評価され、申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。