

# 琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro*精子分化系による化学物質 定量的影響解析方法の確立



立命館大学 薬学部  
細胞工学研究室  
高田 達之

2017

## ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*)

コイ科の淡水魚

体長 9~14 cm

琵琶湖固有種

絶滅危惧 I A類に指定



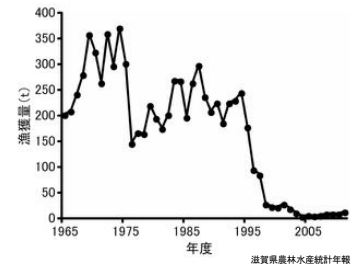
<http://www.ibm.go.jp/emuseum/zukan/gyorui/honmoroko.html>

ホンモロコ以外にも、  
琵琶湖固有16種中

絶滅危惧種 : 5種

絶滅危機増大種 : 2種

希少種 : 5種



## 外因性内分泌攪乱物質(EDC)による琵琶湖の汚染



河川からノニルフェノール(NP)などのEDCsが  
琵琶湖へ流入

南湖: 0.5 nM NP

北湖: 0.3 nM NP

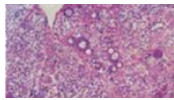
魚類へのNPの影響

・メダカ

NPが精巣卵形成、精子数減少

・ニジマス

卵巣の発達障害



ホンモロコなど固有魚種の生殖機能への  
影響が懸念される

上: 正常な精巣 (メダカ) 下: 精巣卵を形成した精巣

環境省 環境白書 (2002)

## 生体内におけるNPとBPAの影響

メダカ精巣内での卵子形成

NP: >227 nM Gray & Metcalfe, Environ. Toxicol. Chem. (1997) 16: 1082-1086

NP: >52.7 nM Seki et al., Environ. Toxicol. Chem. (2003) 22: 1507-1516

BPA: >1.6 μM Gray & Metcalfe, Environ. Toxicol. Chem. (2000) 19: 1925-1930

ファットヘッドミノーの精細胞の壊死、精子分化阻害

NP: >7.27 nM Miles-Richardson et al., Environ. Res. Section A (1999) 80: S122-S137

BPA: >70 nM Sohoni et al., Environ. Sci. Technol. (2001) 35: 2917-2925

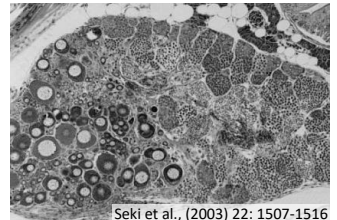
NP: 最高 3.08 ng/ml (14 nM)

0.3-0.5 nM

BPA: 最高 0.03 ng/ml (130 pM)

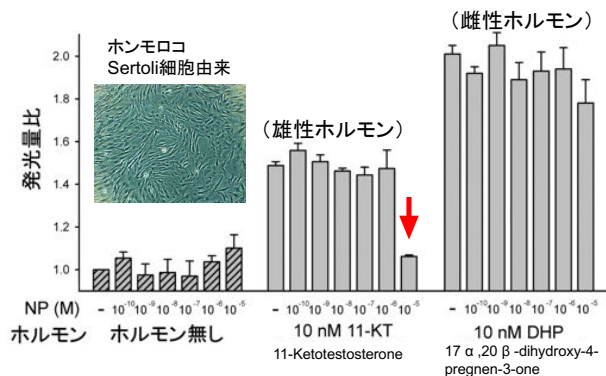
詳細な作用メカニズムは  
解明されていない

固有種への影響解析



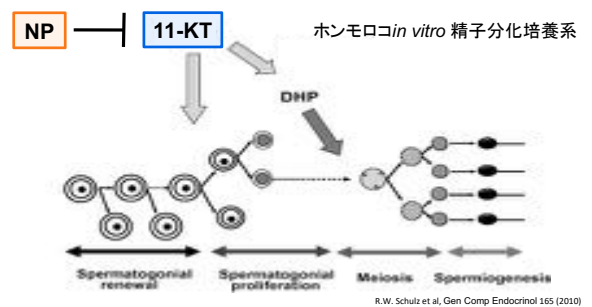
Seki et al., (2003) 22: 1507-1516

## 固有魚種細胞を用いたNPの影響解析



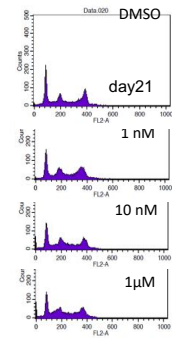
NPは雄性ホルモン(11-KT)の働きを抑制する

## これまでの研究



当研究室で確立したホンモロコ *in vitro* 精子分化培養系を用いて、NPがホンモロコの精子形成に影響することを明らかにした

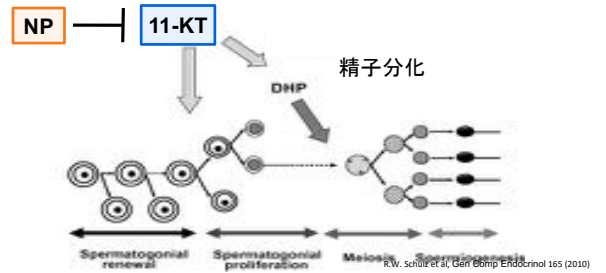
NPが*in vitro* 精子形成に及ぼす影響  
非繁殖期(9月)ガラス化精巣(接着培養)



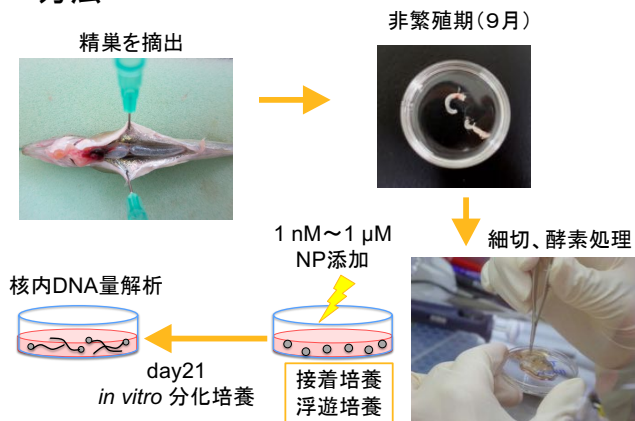
9月精巣: NP 濃度依存的に1倍体が減少する傾向が認められた

## 目的

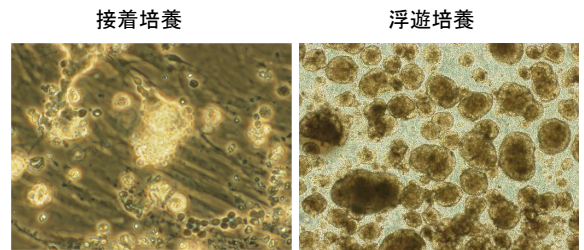
1. ホンモロコの*in vitro*精子分化系による化学物質の定量解析系を確立する
2. NPの総細胞数への影響を明らかにする
3. NPが分化段階の生殖細胞数に与える影響を明らかにする



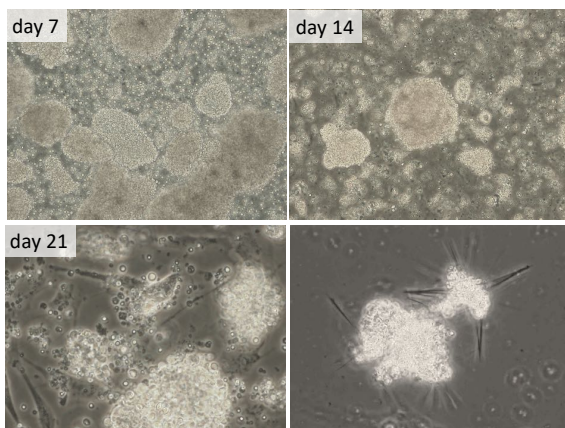
## 方法



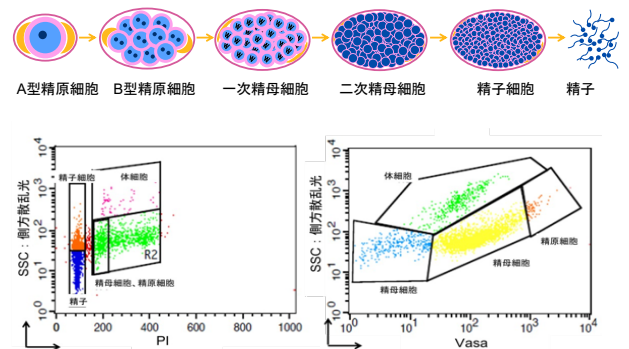
## ホンモロコ *in vitro* 精子分化培養



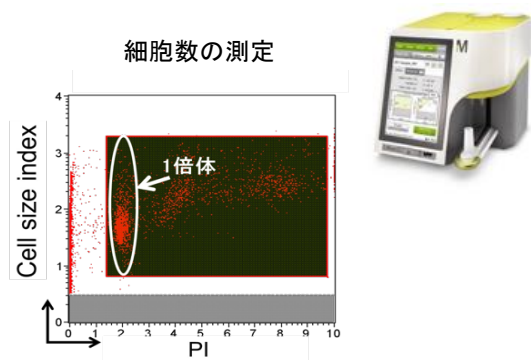
## 浮遊培養による *in vitro* 精子分化



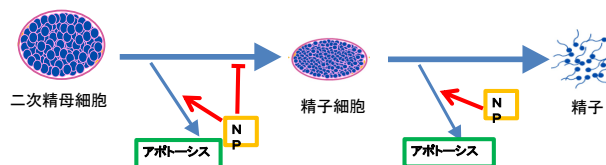
## フローサイトメーターによるDNA量解析



## セルアナライザーによるDNA量解析の簡便化



## NPが精子形成にあたる影響の推定



NPは二次精母細胞から精子形成の過程に影響する

## 総括

- 琵琶湖固有種ホンモロコのin vitro精子分化系を用いて化学物質の定量分化系を確立した。
- 化学物質が固有種の精子分化に与える影響を直接定量的に解析することが可能となった。
- NPは1 nM の低濃度においてホンモロコの精子数を減少させた。



|                   | 北湖     | 南湖     |
|-------------------|--------|--------|
| 琵琶湖のNP濃度          | 0.3 nM | 0.5 nM |
| 生物濃縮係数: 15~22     |        |        |
| 予測されるホンモロコの体内NP濃度 | 6.6 nM | 11 nM  |

環境中に存在するNPは野生のホンモロコの精子数を減少させる可能性が示唆された

## 謝辞

琵琶湖博物館 藤岡康弘 博士  
滋賀県水産試験場  
国立遺伝学研究所 酒井則良 准教授  
山本養魚場 山本太右衛門 氏  
草津ホンモロコ生産組合 下村修一 氏  
(株)山匠 山本哲夫 氏

公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構

感謝申し上げます。

ご清聴ありがとうございました