

# 下水処理場放流水のコイ血漿ビテロジェニン濃度に及ぼす影響

環境システム工学専攻 環境生物化学講座 早川 幸恵

指導教官 山田 良平

解良 芳夫

高橋 祥司

## はじめに

河川・湖沼には多種多様な生物が生息し、食物連鎖などを通じて複雑な生態系を作り上げている。様々な合成化学物質は、環境中の濃度が現在の法的規制では何ら問題にされない極微量であっても、食物連鎖を介した生物濃縮により、食物連鎖の比較的上位に位置する魚類や鳥類、爬虫類、哺乳類などの体内に高濃度に蓄積され、致命的な悪影響を及ぼす可能性がある。特に最近では、これらの合成化学物質が急性・慢性毒性を示す濃度よりもはるかに低い濃度で動物の内分泌系の働きをかく乱し、魚類や鳥類をはじめとする様々な野生動物の生存や生殖機能に影響を及ぼしている可能性が極めて強いと考えられている。また、人間への影響も懸念されている。これがいわゆる環境ホルモン(内分泌かく乱化学物質)汚染問題である。現在、この作用を示す可能性のある合成化学物質のうち十数種類について、環境中の濃度が調べられている。しかし、測定された個々の化学物質の濃度だけで野生動物や人間への影響を評価することは難しい。従って、様々な化学物質の影響を、相加性・相乗性を含めて総合的にかつ直接評価できるバイオマーカーの利点を利用する調査が不可欠であると考えられる。

ビテロジェニン(以下、Vtg)は、魚類や鳥類など、卵生脊椎動物の血液タンパク質の一つであり、卵黄タンパク質の材料となるリン及び脂質を含む糖タンパク質である。このタンパク質は、女性ホルモンの作用により肝臓で誘導合成され、血液により卵巣へ運ばれ、卵に蓄えられるため、卵黄形成期から繁殖期の性的に成熟したメスに多量に存在する。対して、オスや未成熟のメスには極めて微量にしか存在しない。しかし、女性ホルモンや、女性ホルモン作用を示す化学物質を投与すると、オスや未成熟のメスでも容易に、かつ多量に Vtg が誘導合成されることから、Vtg はこれらの化学物質による汚染のバイオマーカーになると考えられている。

本研究では、マゴイの Vtg 精製標品とそれに対する抗体を用いた単純放射状免疫拡散法と ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いてコイの血漿 Vtg 濃度を測定し、これをバイオマーカーとして、内分泌かく乱物質の河川への供給源の一つと考えられる下水処理場放流水中の女性ホルモン作用を有する化学物質の生物への総合的な影響を調査した。マゴイを下水処理場放流水口直下流で飼育することで放流水に連続的に曝露し、血漿 Vtg 濃度への影響を調べた結果、曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度が増加したことから、下水処理場放流水中には女性ホルモン作用を示す化学物質が含まれていることが示唆された。また、河川水を分析すると放流水には女性ホルモンであるエストロン(以下、 $E_1$ )及びエストラジオール 17 $\beta$  (以下、 $E_2$ )が高濃度に存在した。さらに、室内の水槽において、 $E_1$  および  $E_2$  を含む水で飼育すると、 $E_1$  及び  $E_2$  の曝露濃度に依存した血漿 Vtg 濃度の増加が認められた。以上のことより、下水処理場放流水中に存在してコイ血漿 Vtg の誘導合成を促進した主な物質は、人畜に由来すると考えられるエストロン及びエストラジオール 17 $\beta$  である可能性が示された。

## 研究内容

### 1. コイ Vtg と Vtg 様タンパク質の精製

コイの血漿 Vtg 濃度を測定するには、標準品として用いるコイの Vtg 標品が必要である。このため、Kera *et al.* (2000) に従い、エストラジオール - 17 を投与して Vtg 合成を誘導した未成熟のコイの血漿から、陰イオン交換体とゲルろ過担体を用いたカラムクロマトグラフィーで Vtg 精製標品を得た。

今回得られたコイの Vtg 精製標品は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、分子質量 150 kDa の単一のタンパク質バンドを示した (図 1)。従って、得られたコイの Vtg 精製標品は、コイの血漿 Vtg 濃度を測定する際に用いる標準品として十分な純度であると考えられた。

また、メスの血漿やエストラジオール-17 を投与して Vtg 合成を誘導した未成熟のコイの血漿を抗コイ Vtg ウサギ抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析すると、Vtg (150 kDa) と共に検出される Vtg 様タンパク質 (180 kDa) の精製も試みた。しかし、この Vtg 様タンパク質は、陰イオン交換体とゲルろ過担体を用いたカラムクロマトグラフィーで Vtg と類似の挙動を示したため、単一のタンパク質にまで精製することはできなかった。

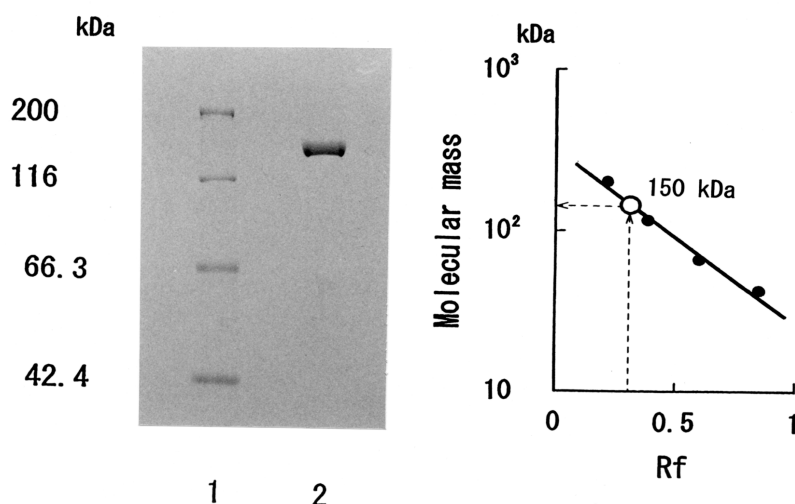


図 1 . 精製 Vtg 標品の SDS-PAGE 像

レーン 1、分子量マーカータンパク質：ミオシン (200 kDa)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116 kDa)、ウシ血清アルブミン (66.3 kDa)、アルドラーゼ (42.4 kDa)、レーン 2、精製 Vtg 標品

### 2. 下水処理場放流口直下におけるコイの飼育実験

下水処理場放流水中の女性ホルモン作用を有する化学物質の生物への影響を調べるため、放流水口直下流でコイを飼育することで、コイを放流水に連続的に曝露し、血漿 Vtg 濃度への影響を調べた。

飼育実験は 1999 年 9 月と 11 月、2000 年 10 月の計 3 回行った。養魚場から購入したコイを、1 回目及び 2 回目の実験では 10 日間、3 回目の実験では 15 日間曝露した。それぞれの実験の際には、養魚場から同時に購入したコイを、同じ期間室内で飼育し室内対照群とした。また、3 回目の実験では放流口から約 20 m 上流でも同様に飼育し、上流対照群とした。飼育実験におけるオスのコイの血漿 Vtg 濃度分布を図 2 に示す。いずれの実験においても放流口直下で飼育した個体に血漿 Vtg 濃度の増加が認めら

れた。従って、下水処理場の放流水中には、コイ血漿 Vtg の誘導合成を促進する何らかの物質が存在することが示唆された。

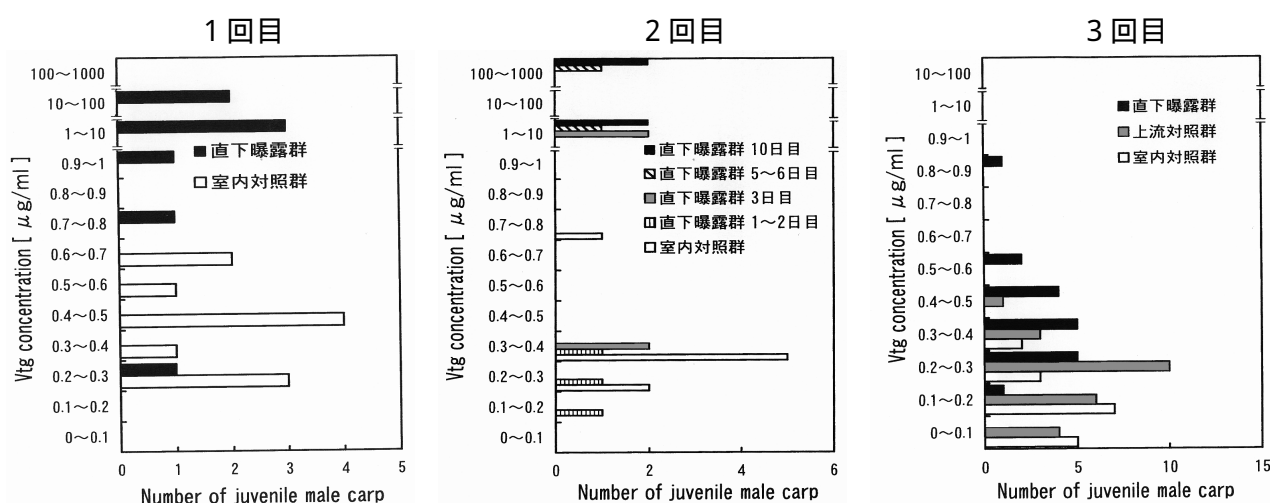


図2 . 下水処理場放流口直下流での飼育実験におけるオスのコイの血漿 Vtg 濃度分布

コイ血漿 Vtg の誘導合成を促進した物質をさぐるため、曝露地点および上流の河川水を採取し Alkylphenol 類と Bisphenol A の濃度を分析した。検出された Alkylphenol 類と Bisphenol A の濃度は、他の魚類を用いた実験において単独で Vtg の誘導合成を促進すると報告されている濃度の 100 分の 1 ~ 1000 分の 1 と非常に低濃度であった。一方、3 回目の実験では代表的な天然の女性ホルモンであるエストラジオール-17 ( $E_2$ ) の分析を行った。その結果を表 1 に示す。曝露地点の  $E_2$  濃度は 50 ~ 70 ng/L であり、上流では 0.4 ng/L 前後であった。他の魚類を用いた実験では、 $E_2$  単独で Vtg 誘導合成を促進する濃度は 10 ~ 100 ng/L と報告されていることから、曝露地点で検出された  $E_2$  濃度は、コイの血漿 Vtg 誘導合成を促進するのに十分な濃度であると考えられた。

また、2001 年 5 月に飼育実験を行った放流口直下流の同じ地点で、河川水を採取し、 $E_2$  及び、同じ天然の女性ホルモンであるエストロン ( $E_1$ ) の分析を行った。その結果、曝露地点から  $E_2$  濃度の約 4 倍の  $E_1$  が検出された (表 1)。このことから、 $E_1$  についてもコイ血漿 Vtg の誘導合成を促進する可能性が考えられた。

表 1 . 曝露地点および上流の河川水中のエストラジオール-17 ( $E_2$ ) とエストロン ( $E_1$ ) の濃度

単位 : ng/L

分析項目	分析方法	河川水採取日					
		2000/10/2 <sup>2</sup>		2000/10/5 <sup>2</sup>		2001/5/8	
		上流	放流口直下	上流	放流口直下	上流	放流口直下
$E_1$	GC/MS	-	-	-	-	1.46	75.0
$E_2$	GC/MS	0.40	71.0	0.40	69.5	-	-
	ELISA <sup>1</sup>	0.54	65.0	0.34	52.0	0.66	19.2

1 17- Estradiol Enzyme Immuno assay Kit (Assay Designs. Inc. )を用いて測定した。

2 3 回目飼育実験の期間中に採水した。

### 3. 室内におけるコイの曝露実験

下水処理場放流口直下流での飼育実験の際、採水した放流水中から検出された  $E_2$  (約 60 ng/L) 濃度が単独曝露で Vtg 濃度に影響を及ぼすか確かめるため、また  $E_2$  と同様に、下水処理場放流水中に存在した  $E_1$  の影響も検討するため室内において曝露実験を行い、血漿 Vtg 濃度への影響を調べた。

曝露実験は 2000 年 12 月、2001 年 6 月の計 2 回行った。養魚場から購入した未成熟のコイを、それぞれ 14 日間曝露した。1 回目の曝露実験では  $E_2$  の濃度を 50 ng/L、100 ng/L、200 ng/L で、2 回目の曝露実験では  $E_2$  の濃度を 100 ng/L、200 ng/L、400 ng/L、 $E_1$  の濃度を 1000 ng/L、2000 ng/L、4000 ng/L で曝露した。また、2 回目の曝露実験ではコイに個体標識をつけ、曝露前と後の Vtg 濃度を個体別に比較した。

1 回目の室内曝露実験における  $E_2$  濃度 200、100、50 ng/L に曝露されたコイと Blank のコイの血漿 Vtg 濃度の分布を図 3 に示す。メスでは、 $E_2$  200、100、50 ng/L の各濃度に曝露されたコイが Blank のコイと比べて血漿 Vtg 濃度分布に統計的に有意な違いが見られた ( $F$ -test,  $p < 0.05$ )。さらに、 $E_2$  200 ng/L の濃度では Blank と比べて血漿 Vtg 濃度の平均値も統計的に有意に高い値を示した ( $t$ -test,  $p < 0.05$ )。一方、オスでは  $E_2$  へ曝露されたコイは Blank のコイと比べての血漿 Vtg 濃度分布が統計的に有意に異なった ( $F$ -test,  $p < 0.05$ )。Vtg 濃度の平均値には統計的に有意な差は認められなかった ( $t$ -test,  $p > 0.05$ )。

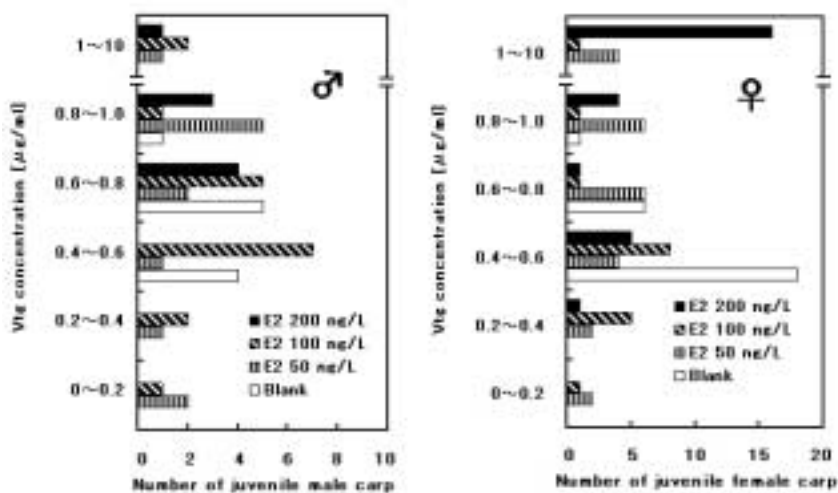


図 3 . 1 回目室内曝露実験における未成熟のコイの血漿 Vtg 濃度分布 (左 オス、右 メス)

2 回目の室内曝露実験において  $E_2$  に曝露された未成熟のコイの曝露前と曝露後の血漿 Vtg 濃度の変化を図 4 に示す。メスでは、 $E_2$  100 及び 200 ng/L に曝露されたコイは曝露前と曝露後を比べ、血漿 Vtg 濃度の分布や平均値に統計的に有意な差は認められなかった ( $F$ -test,  $p > 0.05$   $t$ -test,  $p > 0.05$ )。しかし、200 ng/L に曝露されたコイは、Blank のコイと比べ、曝露後の血漿 Vtg 濃度分布が統計的に有意に異なった ( $F$ -test,  $p < 0.05$ )。400 ng/L に曝露されたコイは曝露前と曝露後を比べ、血漿 Vtg 濃度の分布が統計的に有意に異なった ( $F$ -test,  $p < 0.005$ )。

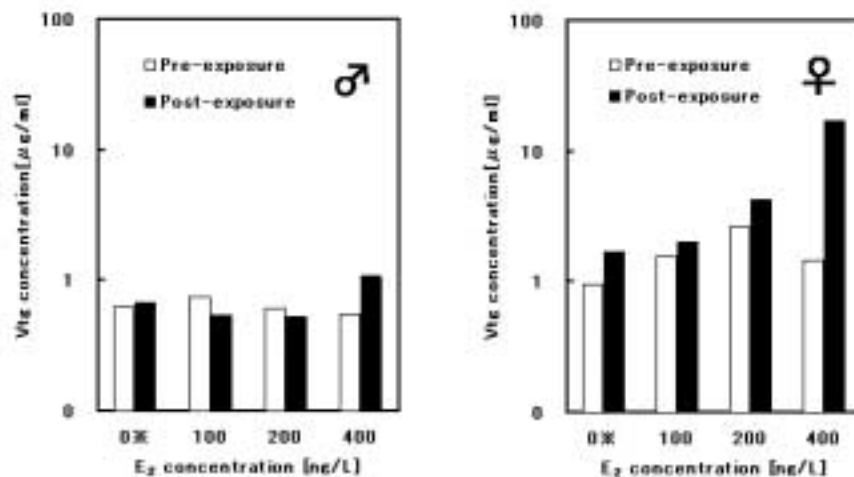


図4 . 2回目室内曝露実験において E<sub>2</sub> に曝露された未成熟のコイの曝露前と後の Vtg 濃度変化  
E<sub>2</sub> 0 ng/L は Blank のコイの血漿 Vtg 濃度 (左オス、右メス)

2回目の室内曝露実験において E<sub>1</sub> に曝露された未成熟のコイの曝露前と曝露後の血漿 Vtg 濃度の変化を図5に示す。E<sub>1</sub> 1000 ng/L、2000 ng/L、4000 ng/L に曝露されたコイはオス、メスとも血漿 Vtg 濃度に著しい増加が見られた。メスでは、E<sub>1</sub> 4000、2000、1000 ng/L とすべての曝露濃度でコイの血漿 Vtg 濃度は曝露前に比べ曝露後の分布が統計的に有意に異なり、平均値も統計的に有意に増加した ( *F* - test, *p* < 0.005 *t* - test, *p* < 0.05 )。オスでは E<sub>1</sub> 1000 ng/L に曝露されたコイの曝露前と曝露後の血漿 Vtg 濃度の分布は統計的に有意に異なった ( *F* - test, *p* < 0.005 )。E<sub>1</sub> 4000、2000 ng/L に曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度は曝露前に比べ曝露後の分布が統計的に有意に異なり、平均値も統計的に有意に増加した ( *F* - test, *p* < 0.005 *t* - test, *p* < 0.005 )。Blank のコイには変化はなかった。

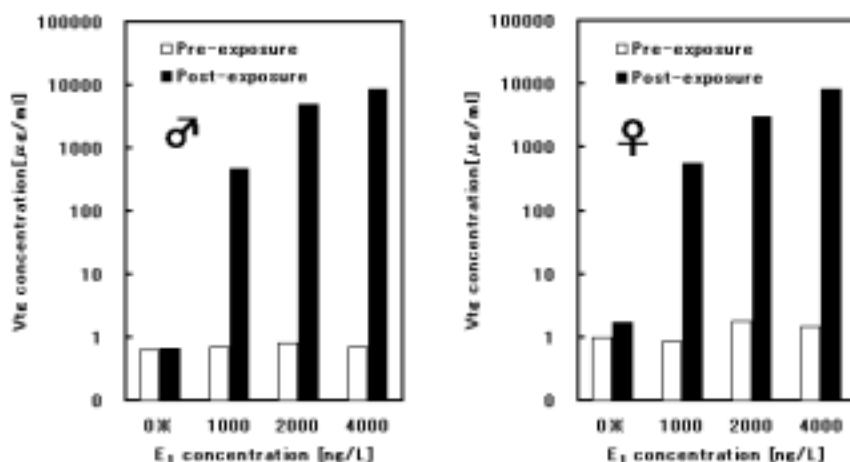


図5 . 2回目室内曝露実験において E<sub>1</sub> 曝露された未成熟のコイの曝露前と後の Vtg 濃度変化  
E<sub>1</sub> 0 ng/L は Blank のコイの血漿 Vtg 濃度 (左オス、右メス)

1 回目及び 2 回目室内曝露実験における飼育水中の  $E_2$ ,  $E_1$  の濃度変化をそれぞれ表 2 及び 3 に示す。室内曝露実験で設定した  $E_2$  と  $E_1$  の濃度は放流水中よりかなり高濃度である。しかし、 $E_2$  に曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度に曝露の影響は見られなかった。これは、下水処理場放流口での飼育実験において放流水中の  $E_2$  濃度は飼育期間中 65 ~ 52 ng/L (表 1) とほぼ一定であると考えられるのに対し、室内曝露実験における飼育水中の  $E_2$  濃度は添加直後 (添加後 0 hr) がほぼ設定濃度であったのに 24 時間後には大きく減少していたためではないかと考えられる。この違いは、下水処理場放流口直下の河川水は放流水から常に  $E_2$  及び  $E_1$  の供給があるのに対し、室内曝露実験において飼育水への  $E_2$  及び  $E_1$  の供給は飼育水を交換した時のみであったことが原因と考えられる。従って、コイは高濃度の  $E_2$  に連続的に曝露されることはなく Vtg の誘導合成があまり促進されなかったものと思われる。

一方、 $E_1$  は  $E_2$  と同様に 24 時間後には飼育水中の濃度は大きく減少するが、1000 ng/L 以上と  $E_2$  よりさらに 10 倍濃い濃度に設定していたため、減少後も 100 ng/L 以上と放流水より検出された濃度に近い濃度で残っていた。このことより曝露期間中、コイは血漿 Vtg の誘導合成を促進するに十分な濃度の  $E_1$  に連続的に曝露されたためではないかと考えられる。

以上、下水処理場放流口直下流での飼育実験の結果、及び室内曝露実験の結果から、下水処理場放流水中に存在し、コイの血漿 Vtg 誘導合成を促進した主な物質の一つが  $E_2$  及び  $E_1$  であったと考えられた。

表 2 . 1 回目室内曝露実験における飼育水中の  $E_2$  の濃度変化

単位 : ng/L

設定濃度	50 ng/L	100 ng/L	200 ng/L
実測濃度			
添加後 0 hr	32	48	85
添加後 24 hr	4	10	9

表 3 . 2 回目室内曝露実験における飼育水中の  $E_1$ ,  $E_2$  の濃度変化

単位 : ng/L

設定濃度	$E_2$			$E_1$		
	100 ng/L	200 ng/L	400 ng/L	1000 ng/L	2000 ng/L	4000 ng/L
実測濃度						
添加後 0 hr	58	178	519	1023	2129	5281
添加後 24 hr	1	6	9	128	197	386

## 参考文献

Kera, Y., Kato, T., Koshiba, K. and Yamada, R. (2000) *Jpn. J. Environ. Toxcol.* 3, 47-62.

## 研究成果の公表

1. 小柴和彦、加藤智樹、大高敦士、早川幸恵、解良芳夫、山田良平 (2000) 第 6 回日本環境毒性学会研究発表会講演要旨集、p. 66-67
2. 小柴和彦、早川幸恵、加藤智樹、解良芳夫、山田良平 (2001) 第 35 回日本水環境学会年会講演集、p. 500
3. 早川幸恵、小柴和彦、加藤智樹、解良芳夫、山田良平、石川英律、柏田祥策、茨木剛 (2001) 第 35 回日本水環境学会年会講演集、p. 450.
4. 解良芳夫、早川幸恵、小柴和彦、加藤智樹、高橋祥司、山田良平、石川英律、茨木剛 (2001) 第 7 回日本水環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会講演要旨集、p. 36-37.
5. Kera, Y., Koshiba, K., Kato, T., Hayakawa, S., Takahashi, S. and Yamada, R. (2001) *Jpn. J. Environ. Toxcol.* 4, 35-43.