

コイの血漿ビテロジェニンを指標とした内分泌攪乱化学物質の影響評価

環境システム工学専攻 環境生物化学講座 塚田 雄二

指導教官 山田 良平

解良 芳夫

高橋 祥司

はじめに

内分泌攪乱物質問題が提起されて数年が経とうとしている。この問題は生物の正常な内分泌系に影響を及ぼし、その結果色々な内分泌系を有するすべての生物種に有害作用を示すと極めて強く考えられている。

現在、多くの河川、湖沼から内分泌攪乱化学物質として疑われている又は認知されている物質が調べられている。しかし、それらの検出された化学物質の個々の濃度だけで生物に影響を及ぼすかを調べるのは困難である。そのため様々な化学物質の影響を、総合的にかつ直接的に評価するバイオマーカーの利点を利用しての生物への影響を評価することが必要と考えられる。

ビテロジェニン (以下、Vtg) は、卵生動物の性的に特異的な血中タンパク質で、特に卵黄形成期～繁殖期の成熟したメスに多量に存在し、オスや未成熟のメスには極めて微量にしか存在しない。Vtgは、成熟したメスにおいて女性ホルモン作用により肝臓で合成され、血液を通り卵巣に運ばれ、卵黄タンパク質の材料となって、卵に蓄えられる。しかし、オスや未成熟のメスであっても女性ホルモンや女性ホルモン様化学物質が体外から与えられると、簡単に Vtg 合成が誘導される。そこで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)法を用いてコイ血漿 Vtg を測定し、これをバイオマーカーとして、内分泌攪乱化学物質の河川への供給源と考えられている下水処理場放流水の女性ホルモン作用を有する化学物質の影響を調査した。下水処理場放流水口直下での飼育実験の結果、血漿 Vtg が増加した。故に何らかの女性ホルモン作用を有する化学物質が存在している可能性がある。そこで下水処理場放流水を分析した結果エストラジオール-17 とエストロンが高濃度に検出された。そこでこの両物質について、水槽内で曝露することにより、影響を確かめた。その結果、血漿 Vtg 濃度の増加が認められた。故に下水処理場放流水中に存在してコイ血漿 Vtg の誘導合成を促進させた主な物質はエストラジオール-17 とエストロンである可能性が示された。

これまでは、コイの血漿中の Vtg 濃度を測定してきたが、他の魚類の血漿 Vtg を用いて、内分泌攪乱化学物質汚染の調査を行う場合、血液が大量に採取できる魚種であれば可能であるが、小さい魚種においては、採取できる血液サンプルが少ないため血漿 Vtg を用いた調査は困難となる。そこで、Vtg は肝臓で合成されることが一般的に知られていることから、血液の採取が困難な魚種においては、肝臓中の Vtg 濃度をバイオマーカーとして用いる事を考え、まずコイにおける血漿中と肝臓中の Vtg 濃度の関係について検討した。

1. 下水処理場放流水口直下におけるコイの飼育実験

内分泌攪乱化学物質の河川への供給源の一つと考えられている下水処理場について放流水中の女性ホルモン作用を有する化学物質の血漿 Vtg 濃度に対する影響を調査した。曝露期間 15 日間、コイは養魚場から同時に購入した。

購入したコイを同じ期間それぞれ下水処理場放流水口直下(曝露群)、下水処理場放流水口上流(上流対照群)、室内の水槽(室内対照群)で飼育した。

下水処理場放流水口直下の飼育実験の結果を図 1 に示す。下水処理場放流水口直下で飼育されたコイは上流で飼育されたコイと統計的にも有意な差が認められた。また室内の水槽で飼育されたコイとも同様の結果であった。故に何らかの女性ホルモン作用を有する化学物質が下水処理場放流水中に存在している可能性が示唆された。

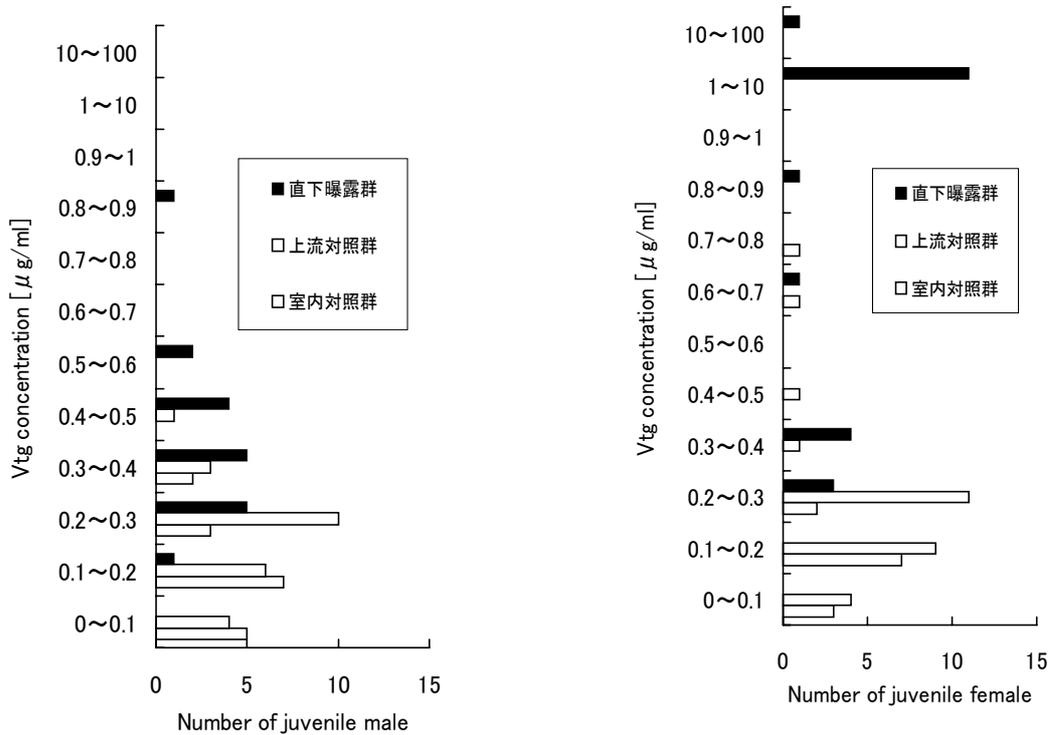


図 1 . 下水処理場放流水口直下流での飼育実験におけるコイの血漿 Vtg 濃度分布

コイの血漿 Vtg 濃度の誘導合成を促進した物質を探るため、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、他の魚種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、代表的な女性ホルモンであるエストラジオール-17 (E_2)とエストロン(E_1)の分析を行ったところ、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。他の魚種を用いた実験では、 E_2 単独で Vtg の誘導合成を促進するのに十分な濃度であると報告されている。このことから下水処理場放流水口直下で曝露されたコイの Vtg 誘導合成を促進した原因物質の一つと考えられた。また E_1 における分析結果は E_2 に比べ約 4 倍の濃度である 75 ng/L 検出された。このことから E_1 もまたコイの Vtg 誘導合成を促進した原因物質と考えられた。 E_2 および E_1 の分析結果を表 1 に示す。

表 1 . 曝露地点および上流の河川水中のエストロン (E₁) とエストラジオール-17 (E₂) の濃度

単位 : ng/L

分析項目	分析方法	河川水採取日					
		2000/10/2 ²		2000/10/5 ²		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 ¹	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。

2 . 室内曝露実験による E₂ および E₁ の影響評価

下水処理場放流水口直下流での飼育実験の結果、曝露群は対照とした上流対照群および室内対照群と比べ高い Vtg の濃度分布を示した。また統計的にも有意な差が認められた。そこで放流水中を分析した結果、E₂ と E₁ が Vtg 誘導合成を促進した原因物質と考えられた。よってこの両物質に関して室内で単独曝露することにより、その影響を確かめてみることにした。

室内曝露実験は 2001 年 6 月に行った。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。曝露濃度は E₂ において 100、200、400 ng/L で行った。E₁ においては 1000、2000、4000 ng/L で行った。また曝露前と曝露後を比較するためにコイを個体標識(図 2)し個体別に比較した。室内曝露実験の結果を図 3、図 4 に示す。

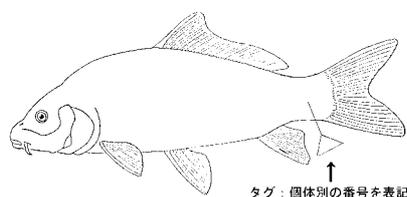


図 2 . タグ付けによるコイの個体標識

図 3 . 室内曝露実験において E₂ に曝露される前と後のコイの血漿 Vtg 濃度の変化 (左 メス、右 オス) E₂ 0 ng/L は Blank のコイの血漿 Vtg 濃度

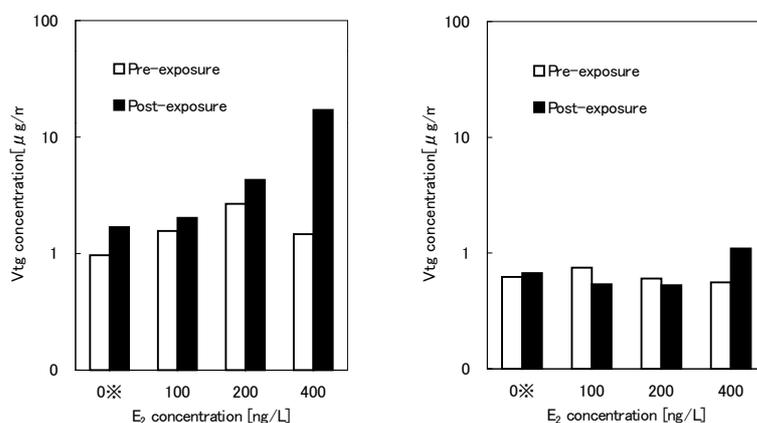
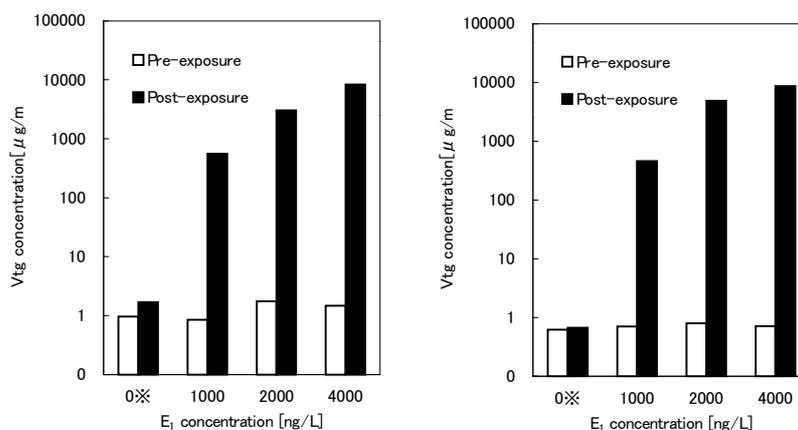


図4 . 室内曝露実験において E₁ に曝露される前と後のコイの血漿 Vtg 濃度の変化
(左 メス、右 オス) E₁ 0 ng/L は Blank のコイの血漿 Vtg 濃度



室内曝露実験において E₂ 濃度 400、200、100 ng/L に曝露されたコイの曝露前と後の Vtg 濃度の変化について、メスは Blank も含めたすべての条件で曝露後の Vtg 濃度が増加し、その中でも E₂ 濃度 400 ng/L に曝露されたコイは曝露前と比べ、曝露後の Vtg 濃度は大きく増加した。メスでは E₂ 100 及び 200 ng/L に曝露されたコイの Vtg 濃度は曝露前と後では Vtg 濃度の分布も平均値も統計的に有意な差は認められなかった。しかし、200 ng/L に曝露されたコイは、Blank のコイと比べると Vtg 濃度の分布は統計的に有意に異なった。400 ng/L に曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度は曝露前と後で Vtg 濃度の分布は統計的に有意に異なった。E₂ 100 及び 200 ng/L に曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度は曝露前と後では大きな変化はなかった。しかし、E₂ 400 ng/L に曝露されたコイでは 11 尾中 2 尾が曝露後に Vtg 濃度を大きく増加させ、その濃度は曝露前の 10 倍以上となった。

オスにおいても、E₂ 100 及び 200 ng/L に曝露されたコイの血漿 Vtg 濃度は曝露前と後では大きな変化はなかったが、E₂ 400 ng/L に曝露されたコイが、1 尾のみであったが曝露後の Vtg 濃度を曝露前の約 6 倍に増加させていた。

E₁ 濃度 4000、2000、1000 ng/L に曝露されたコイの曝露前と後の Vtg 濃度の変化について E₁ 1000 ng/L、2000 ng/L、4000 ng/L に曝露されたコイのオス、メスとも Vtg 濃度に著しい増加が見られた。メスにおいて、E₁ 4000、2000、1000 ng/L とすべての曝露濃度においてコイの 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、平均も統計的に有意に増加した。オスのいは E₁ 1000 ng/L に曝露されたコイの曝露前と後の Vtg 濃度の分布は統計的に有意に異なった。E₁ 4000、2000 ng/L に曝露されたコイの 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、平均も統計的に有意に増加した。

室内曝露実験における飼育水中の E₂・E₁ の濃度変化をそれぞれ表 2 に示す。室内曝露実験における飼育水中の E₂ の濃度は設定濃度 400 ng/L において E₂ を水槽に添加した直後では 519 ng/L であったのが添加した 24 時間後では 9 ng/L であった。設定濃度 200 ng/L 及び 100 ng/L において E₂ を添加した直後ではそれぞれ 178 ng/L および 58 ng/L であったのが添加した 24 時間後では 6 ng/L 及び 1 ng/L であった。また、E₁ の濃度は設定濃度 4000 ng/L において E₁ を水槽に添加した

直後では 5280 ng/L であったのが添加して 24 時間後では 386 ng/L であった。設定濃度 2000 ng/L 及び 1000 ng/L において E₁ を添加した直後ではそれぞれ 2130 ng/L および 1020 ng/L であったのが添加して 24 時間後では 197 ng/L 及び 128 ng/L であった。なお Blank の飼育水中の E₂ および E₁ 濃度は室内曝露実験において測定はしなかった。

室内曝露実験で設定した E₂ と E₁ の濃度は放流水中よりかなり高濃度である。しかし、E₂ に曝露されたコイの 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 E₂ 濃度は飼育期間中 65 ~ 52 ng/L (表 9 : ELISA による測定値) 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 E₂ 濃度は添加直後(添加後 0hr) 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 E₂ 及び E₁ 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 E₂ 及び E₁ 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。このため飼育水中の E₂ 及び E₁ はコイの体内に取り込まれるなどの理由で時間の経過とともに減少していったのではないと思われる。ゆえにコイは高濃度の E₂ 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。以前、当研究室の大高が行った室内の曝露実験でも E₂ 100 ng/L の曝露では Vtg 濃度に影響は見られず、Vtg 濃度が著しく上昇したのは E₂ 1000 ng/L であった。

一方、E₁ は E₂ 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 E₂ 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が残っていた。このことより曝露期間中、コイは高濃度の E₁ に連続的に曝露され、Vtg の誘導合成がおおいに促進されたのではないかと考えられる。

今回の結果からコイの Vtg 誘導合成を促進した主な物質の一つが E₂ に加え、放流水中に存在する E₁ である可能性も示された。しかし、下水処理場放流水中の内分泌攪乱物質の水生生物への影響の調査を続ける上で室内における曝露実験の条件は改善するべきであろう。また、他の化学物質による E₂ 及び E₁ の相乗性・相加性についても検討する必要がある。

表 2 . 室内曝露実験における飼育水中の E₂ , E₁ の濃度変化

単位 : ng/L

設定濃度	E ₂			E ₁		
	100ng/L	200ng/L	400ng/L	1000ng/L	2000ng/L	4000ng/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

4 . 血漿 Vtg 濃度と肝臓 Vtg 濃度との関係

これまででは、コイの血漿中の Vtg 濃度を測定してきたが、他の魚類の血漿 Vtg を用いて、内分泌攪乱化学物質汚染の調査を行う場合、血液が大量に採取できる魚種であれば可能であるが、小さい魚種においては、採取できる血液サンプルが少ないため血漿 Vtg を用いた調査は困難となる。

そこで、Vtg は肝臓で合成されることが一般的に知られていることから、血液の採取が困難な魚種においては、肝臓中の Vtg 濃度をバイオマーカーとして用いる事を考え、血漿中と肝臓中の Vtg

濃度の関係について検討した。

同一のコイにおける肝臓中と血漿中の Vtg 濃度を分析し、その関係について明らかにした。

同一の成熟したメスのコイにおける肝臓中と血漿中の Vtg 濃度の関係を図 5 に、同一の未成熟のオスおよびメスにおける肝臓中と血漿中の Vtg 濃度の関係を図 6 に示す。

成熟したメスにおける肝臓中と血漿中の Vtg 濃度の関係について、肝臓中の Vtg 濃度は血漿中濃度の約 1/10 量であった。また統計的にも強い相関関係が認められた。

一方、未成熟のオスおよびメスにおいては統計的にも相関関係が認められなかった。

成熟したメスと未成熟のオスおよびメスに関して対照的な違いがあった。成熟したメスは肝臓中の Vtg 濃度が血漿中の Vtg 濃度の約 1/10 量に対し、未成熟のオスおよびメスは肝臓中の Vtg 濃度は血漿中の Vtg 濃度の約 10 ~ 100 倍であった。このことは性成熟度に起因すると考えられる。成熟した個体の肝臓中に蓄えられる最大の Vtg 量に限界があるのではないかと考えられる。そのため未成熟の個体は血漿中の Vtg 濃度と比べて肝臓中 Vtg 濃度が高い値を示し、成熟した個体においては肝臓中に蓄えられる Vtg 量が限界に達し血漿中に放出され、結果として肝臓中の濃度より血漿中の Vtg 濃度が高い値を示したのではないかと考えられる。メスにおいて Vtg は生殖腺重量の体重比(GSI)が 5% 前後までは GSI の増加に伴い血漿 Vtg 濃度も有意に相関して増加し、それ以上では GSI の増加に関わらず数 $\mu\text{g/L}$ ~ 数 mg/L と一定の値を示すようになる。このことから GSI が 5% 以上の成熟したメスの肝臓中において、蓄えられる Vtg 量が限界に達していることで血漿 Vtg 濃度は一定の値を示すのではないかと考えられる。

故に今回の成熟したメスの血漿中 Vtg 濃度は肝臓中 Vtg 濃度に比べ 10 倍と高い値を示したと同時に高い相関性を示したのではないかと考えられた。

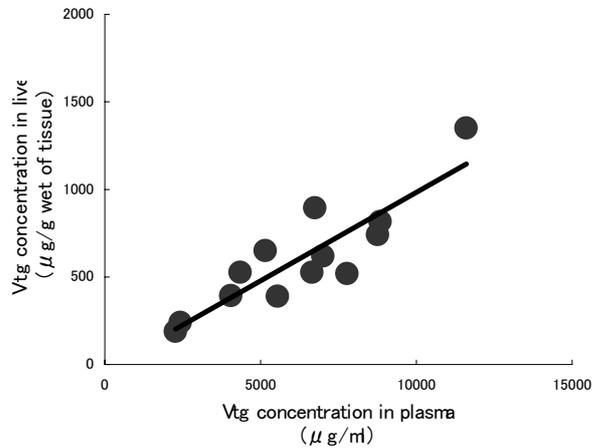
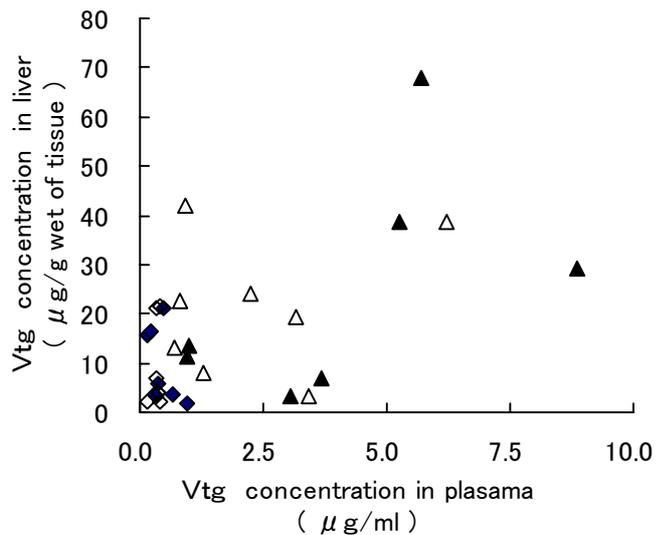


図 5 . 成熟したメスにおける肝臓中と血漿中の Vtg 濃度関係



- ◆ 300 g前後のメス ◇ 300 g前後のオス
- ▲ 1000 g前後のメス △ 1000 g前後のオス

図 6 . 未成熟のメスおよびオスの肝臓中と血漿中の Vtg 濃度関係