

# 雄コイのビテロジェニン量について

森 真朗 若林 明子

## 要 旨

雄コイにおける雌特異タンパク質ビテロジェニンの誘導について研究した。下水処理水流入地点と高度処理水通水地点でコイ成魚を採捕し雄コイのビテロジェニン量を調べたところ、下水処理水流入地点で採捕した雄コイでビテロジェニン誘導個体の出現割合が高かった。丸子自動水質測定室で河川水を汲み上げ、雄コイを6週間河川水に曝露した。2週間毎にビテロジェニン量を測定したがビテロジェニンの上昇は認められなかった。飼料がコイのビテロジェニン誘導に及ぼす影響を調べるため、内分泌かく乱化学物質の影響の少ない飼育環境で6週間、市販飼料を給飼して雄コイを飼育したところ、6週間後に5尾中2尾でビテロジェニン量が若干上昇した。

キーワード：ビテロジェニン、コイ、内分泌かく乱化学物質、ELISA

## 1 はじめに

魚類血液中の卵黄蛋白前駆物質であるビテロジェニンは、環境水中の内分泌かく乱化学物質の影響を評価するための良いバイオマーカーと考えられている<sup>1)</sup>。雄コイにおけるビテロジェニンの誘導に関しても、これまでいくつかの研究が行われてきているが<sup>2,3)</sup>、誘導条件等については不明の点が数多く存在する。そこで、本研究ではまず、雄コイにおけるビテロジェニンの誘導に関する手掛かりを得るため、東京都内において下水処理排水が流入する1地点と高度下水処理水のみが通水されている水路の1地点、計2地点でコイ成魚を採捕し、雄コイの血清中のビテロジェニン量を比較した。また、多摩川の河川水を汲み上げている水質自動測定室内に曝露用水槽を設置し、そこで雄コイを飼育し、血液中のビテロジェニンの変化を経時的に調べ、多摩川の河川水に曝露された雄コイでビテロジェニンが誘導されるか否か検討した。さらに、雄コイのビテロジェニン誘導に餌料が関係しているかどうか明らかにするため、雄コイのみを供試し、内分泌かく乱化学物質の影響の少ない飼育環境下で給餌区と無給餌区を設定し、飼育試験を行った。

## 2 材料と方法

- (1) 下水処理水流入地点と高度下水処理水通水地点で採捕したコイ成魚のビテロジェニン誘導状況の比較



写真1 下水処理水流入地点 A地点



写真2 高度下水処理水通水地点 B地点

下水処理水流入地点(A地点、写真1)と高度下水処理水通水地点(B地点、写真2)において、コイ成魚を投網または手網を用いて採捕した。A地点については1回、B地点については時期を変え2回採捕を行った。採捕後直ちに尾部血管から冷却したシリンジにより採血した。血液をスピッツ管に移し、研究室に運搬後、一夜、冷蔵庫内に静置した。翌日、3,000rpm、10分間冷却遠心分離し、血清を分離した。得られた血清は小分けし、定量に供するまで、-80°Cで保存した。ピテロジェニンの定量は、コイ・ピテロジェニンELISAキット(株トランスジェニック)を用いて行った。このキットによるピテロジェニン検出下限は39ng/mLである。

(2) 多摩川河川水曝露が雄コイのピテロジェニン誘導に及ぼす影響

ア 供試魚：養魚場で繁殖期に腹部を圧迫し、精液の放出により雄魚と判定した雄コイ(平均全長38cm)を供試した。養魚場から購入後、研究所内の水槽で2週間飼育し、異常のないことを確認したのち試験に用いた。

イ 曝露装置及び曝露方法：多摩川中流部の丸子水質自動測定室内に270L容量のFRP製水槽を2基設置した(写真3)。一方の水槽にはポンプアップした河川水を、もう一方の水槽には対照として脱塩素水道水を注水した。河川水注水水槽には雄コイ5尾を、脱塩素水



写真3 丸子水質自動測定室内に設置したFRP製水槽



写真4 魚類等曝露試験施設内に設置した円形水槽

道水注水水槽には雄コイ3尾を、個体別に標識タグを取り付けたのち収容した。

ウ ピテロジェニンの測定：購入直後、曝露開始時、開始2週間後、4週間後、6週間後に全尾から血液を採取した。血液採取は尾部血管から冷却したシリンジを用いて行い、1尾1回3~5mLを採血した。採血した血液は水冷して運搬後、冷蔵庫内に一夜静置した。翌日、3,000 rpm、10分間冷却遠心分離し、血清を採取した。血清は、定量に供するまで-80°Cに小分けして保存した。ピテロジェニンの定量は、コイ・ピテロジェニンELISAキット(株トランスジェニック)を用いて行った。

(3) コイのピテロジェニン誘導に及ぼす給飼の影響

ア 供試魚：(2)に用いたものと同じ、養魚場から購入した雄コイを用いた。

イ 飼育装置及び飼育方法：魚類等曝露試験施設内に90L容量のホーロー製円形水槽を2基設置した(写真4)。両水槽に雄コイ5尾づつを個体別に標識タグを取り付けたのち収容した。飼育水は脱塩素水道水を活性炭で処理したものをを用いた。一方の水槽には市販の成鯉用配合飼料(粗タンパク質 37.0%以上、粗脂肪 2.5%以上、粗繊維 3.0%以下、粗灰分 11.0%以下、水分 11.0%以下)を50g/日給飼し、他方は無給飼とした。

ウ ピテロジェニンの測定：購入直後、飼育開始時、開始2週間後、4週間後、6週間後に全尾から血液を採取した。採血方法、血清分離、保存、ピテロジェニンの測定は(2)の多摩川河川水曝露が雄コイのピテロジェニン誘導に及ぼす影響の項に記載したのと同じである。なお、(2)と(3)の実験は同時に開始した。

表1 下水処理排水流入地点(A地点)及び高度下水処理水通水地点(B地点)で採捕した雄コイのピテロジェニン量

| 魚体番号 | 体長(cm) | 体重(g) | 生殖腺重量(g) | GSI(%) | ピテロジェニン量(μg/mL) |
|------|--------|-------|----------|--------|-----------------|
| A1   | 41.0   | 1950  | 47.5     | 2.4    | 1.2             |
| A2   | 40.0   | 1570  | 17.8     | 1.1    | 4.8             |
| A3   | 47.0   | 2550  | 65.4     | 2.5    | 39.2            |
| A4   | 41.0   | 2100  | 105.3    | 5.0    | 0.5             |
| A5   | 42.5   | 1950  | 39.2     | 2.0    | 1.2             |
| A6   | 41.0   | 2000  | 76.9     | 3.8    | ND              |
| B1   | 38.0   | 1680  | 81.3     | 4.8    | ND              |
| B2   | 38.0   | 1360  | 123.1    | 9.0    | ND              |
| B3   | 40.5   | 1850  | 123.6    | 6.6    | ND              |
| B4   | 33.0   | 1050  | 91.1     | 8.6    | ND              |
| B5   | 33.0   | 920   | 14.9     | 1.6    | ND              |
| B6   | 36.0   | 1220  | 34.0     | 2.7    | ND              |
| B7   | 36.5   | 1380  | 51.1     | 3.7    | ND              |
| B8   | 30.0   |       |          |        | 128.4           |
| B9   | 30.5   | 730   | 42.4     | 5.8    | ND              |
| B10  | 33.0   | 940   | 12.6     | 1.3    | ND              |

(ND:<39ng/mL)

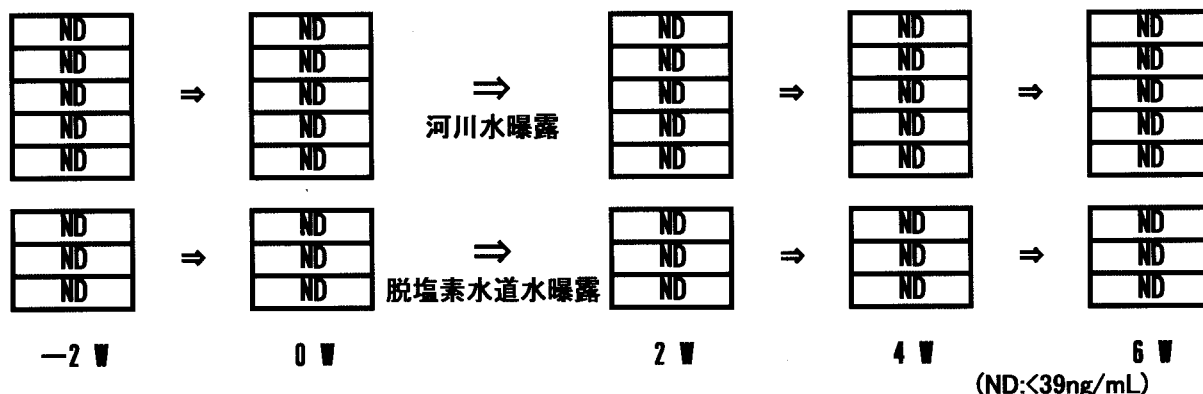


図1 多摩川河川水に曝露した雄コイのビテロジェニン量測定結果

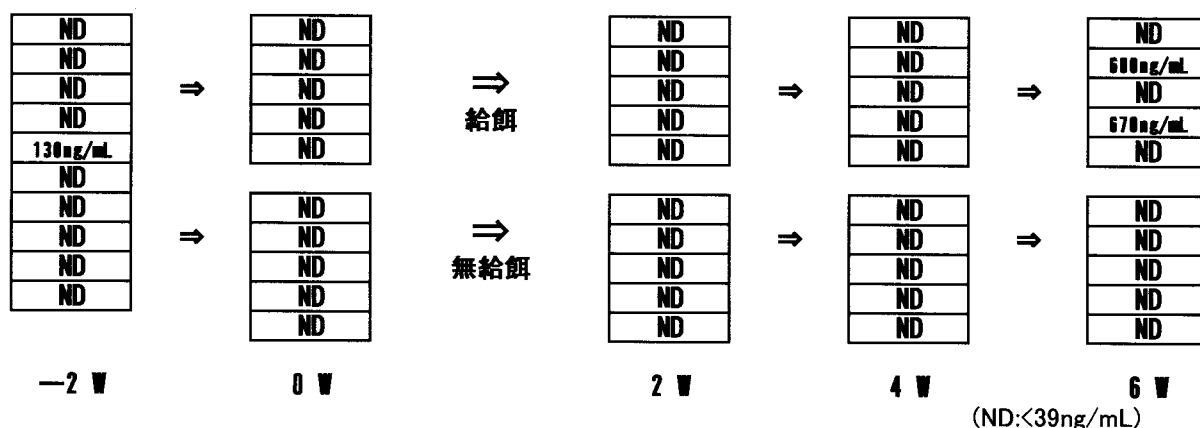


図2 市販配合飼料で飼育した雄コイのビテロジェニン量測定結果

### 3 結果

(1) 下水処理水流入地点と高度下水処理水通水地点で採捕したコイ成魚のビテロジェニン誘導状況の比較

A及びB地点で採捕したコイ雄魚のビテロジェニン測定結果を表1に一覧として示した。A地点で採捕した6尾の雄コイのうち5尾からは0.5~39.2 μg/mLのビテロジェニンが検出された。B地点では時期を変え2回採捕したが、計10尾のうちビテロジェニンが検出されたのは1尾のみであった。B地点は清流復活水路で下水処理水を砂ろ過、オゾン注入処理した高度浄化用水のみが通水されている地点である。

(2) 多摩川河川水曝露が雄コイのビテロジェニン誘導に及ぼす影響

購入直後から曝露開始6週間後まで2週間毎に測定したビテロジェニン濃度を一括して図1に示した。購入直後(-2W)の雄コイのビテロジェニン量は8尾すべて検出限界(39ng/mL)以下であった。試験開始時(0W)、2週間後(2W)、4週間後(4W)及び6

週間後(6W)においても、河川水注水水槽で飼育した雄コイのビテロジェニン量は、いずれも検出限界以下であった。対照として設定した脱塩素水道水注水水槽で飼育した雄コイにおいても、ビテロジェニン量はいずれも検出限界以下であった。

(3) コイのビテロジェニン誘導に及ぼす給餌の影響

購入直後から飼育開始6週間後まで2週間毎に測定したビテロジェニン量を一括して図2に示した。購入直後(-2W)の雄コイのビテロジェニン量は、1尾(130ng/mL)を除きすべて検出限界(39ng/mL)以下であった。試験開始時(0W)、2週間後(2W)、4週間後(4W)においては、給餌区、無給餌区とも雄コイのビテロジェニン量はいずれも検出限界以下であった。飼育開始6週間後(6W)において、給餌区の5尾のうち2尾にビテロジェニンの誘導が認められた。それら2尾のビテロジェニン量は600ng/mL及び670ng/mLであった。無給餌区では飼育開始6週間後においてもビテロジェニンの誘導は認められなかった。

#### 4 考察

(1) 下水処理水流入地点と高度下水処理水通水地点で採捕したコイ成魚のビテロジェニン誘導状況の比較

ビテロジェニンは正常の雄にはほとんど誘導されないものの、エストロゲン処理によって雄の血中にビテロジェニンが誘導されることが知られている。そのため、水環境中に存在する女性ホルモン様物質に対する生体応答を示すバイオマーカーとして、雄魚血中のビテロジェニンを用いる試みが始まっている<sup>4)</sup>。魚類の血中ビテロジェニンの測定により環境水中のエストロゲン作用を評価しようという試みはイギリスでニジマスを用いて最初に行われた<sup>5)</sup>。アメリカでは都市近郊の河川で雄コイ血清中のビテロジェニンが測定され、下水処理施設下流で捕獲したコイで、対照に比してビテロジェニンの上昇が認められている<sup>6)</sup>。また、全米25地点で野生のコイを調査した結果では、25地点のうち13地点で雄コイの血漿中に最高0.8mg/Lのビテロジェニンが検出されている。ビテロジェニンを発現している個体は275尾中42尾に認められたが、特定の河川に集中していることはなかった。東南アジア地域（マレーシア、フィリピン、インドネシア）に生息する野生コイの血漿中ビテロジェニンの測定では、総測定数の約53%でビテロジェニンが検出されている<sup>7)</sup>。我が国では、多摩川の下水処理場下に生息するコイのビテロジェニンを周年にわたり測定した例がある。それによると、雄コイでは最高12mg/mLで、48尾中半数が10 $\mu$ g/mL以上であった<sup>8)</sup>。長崎市内の生活排水が流れ込む河川で捕獲した野生の雄コイでは0.04~16.34 $\mu$ g/mLであったが、宮崎市内の河川で捕獲した野生の雄コイでは定量限界以下であり、東京、長崎、宮崎で採捕した野生雄コイにおいて、総測定数の約61%でビテロジェニンが検出されたという報告がある<sup>7)</sup>。

本研究では、下水処理水流入地点のA地点で採捕した雄コイのビテロジェニン誘導個体の出現率は高かった。また、B地点は、砂ろ過、オゾン処理された高度処理下水が放水されている清流復活水路である。B地点で2回目に行った調査で1尾にビテロジェニンの誘導が認められた。この原因については、水中、食餌中のエストロゲン様物質、繁殖期のため雌魚から排出されたエストロゲンの影響あるいは住民による放流等々が考えられるが、全国のコイの調査におけるのと同様、現在のところビテロジェニン誘導の原因は不明である。

高度処理によって下水処理水中のエストロゲン様物質がどの程度削減されるか、高度処理水と一般の処理水とで雄コイを飼育したとき、ビテロジェニンの誘導にどのような違いが現れるかなどは、今後検討すべき課題と考えられる。

(2) 多摩川河川水曝露が雄コイのビテロジェニン誘導に及ぼす影響

多摩川の下水処理場下で捕獲した雄コイのビテロジェニン誘導個体の出現割合は高かった<sup>8)</sup>。本研究で河川水を汲み上げた地点の上流には旧建設省の河川水質測定地点があり、その地点の観測では、魚類の雄のビテロジェニン量を上昇させる一つの要因と考えられている天然女性ホルモン17 $\beta$ -エストラジオールの濃度は3~23ng/Lと報告されている<sup>9)</sup>。本研究では、期間は6週間であったが、河川水で飼育した雄コイのビテロジェニン量は上昇しなかった。雄魚におけるビテロジェニンの上昇は、外因性のエストロゲン様物質に曝された、あるいは曝されていることを意味すると考えられているが<sup>1)</sup>、発育のどの段階で、どのような又どのくらいのエストロゲン様物質に曝露すると、どの程度ビテロジェニンが上昇するのか、あるいは清浄環境に魚が移動した場合、ビテロジェニン量は元に戻るのかなどについては、今のところ分かっていない。雄魚におけるビテロジェニンの上昇を内分泌かく乱化学物質の曝露影響を測る指標として用いようとする場合、こうした基礎的な検討は必須の事柄であり、今後更に研究する必要がある。

(3) コイのビテロジェニン誘導に及ぼす給飼の影響

養殖されている雄コイの血中ビテロジェニンは10月に上昇し、それ以降産卵期まで100 $\mu$ g/mL程度の高値を示したと報告されている<sup>10)</sup>。また、産卵期に相当しない養殖雄コイで、高濃度のビテロジェニンを示す個体が野生コイに比べ多く存在し、養殖雄コイにおいて、総測定数の約70%でビテロジェニンが検出されたという報告もある<sup>7)</sup>。これらの場合は配合飼料中の植物エストロゲンがエストロゲン様の要因として疑われる。本研究では給餌を行わなかったため、配合飼料中の植物エストロゲンの要因は排除できる。しかし、雑食性のコイは底泥中の餌料物質も食する場合があります。そうした環境は本研究では設定できていない。底泥中には一部の内分泌かく乱化学物質が高い濃度で含まれる場合もある。雄コイのビテロジェニン誘導の原因究明

には底泥の影響も今後調べていく必要があるであろう。また、植物性エストロジェンの作用に関しては今後の重要課題と考えられており<sup>3)</sup>、今後、実験室内での基礎的な研究が必要である。

## 5 まとめ

コイのビテロジェニン量について検討した。下水処理水流入地点と清流復活水路の高度下水処理水通水地点でコイ成魚を採捕し、コイ雄魚のビテロジェニン誘導状況を比較したところ、下水処理水流入地点で採捕したコイ雄魚でビテロジェニン誘導個体の出現率が高かった。丸子自動水質測定室でコイ雄魚をポンプアップした多摩川河川水で6週間曝露し、血液中のビテロジェニン量を経時的に測定したが、ビテロジェニン量の上昇は認められなかった。内分泌かく乱化学物質を極力フリーにした飼育環境下で市販配合飼料を給飼して6週間コイ雄魚を飼育し、血液中のビテロジェニン量を経時的に測定したところ、6週間後に5尾中2尾でビテロジェニン量が若干上昇した。雄魚のビテロジェニン量の上昇については、実験室内での基礎的な研究が今後必要である。

## 参考文献

- 1) 原 彰彦：魚の血液で環境ホルモン汚染をみる、科学、68(7)、pp.591~596 (1998)
- 2) 中村 将、井口泰泉：多摩川にみる魚類の異変、科学、68(7)、pp.515~517 (1998)
- 3) 原 彰彦：内分泌攪乱物質の生態影響、廃棄物学会誌、10(4)、pp.278-287 (1999)
- 4) 有菌幸司：バイオマーカーを用いた水環境評価法、ぶんせき、1999(6)、pp.37-44 (1999)
- 5) Sumpter J.P. and Jobling S. : Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment, *Environ. Health Perspect.*, Suppl. 7, 103, pp.173-178 (1995).
- 6) Folmar L.C. et al. : Vitellogenin induction and reduce serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, 104, pp.1096-1101 (1996)
- 7) 石橋弘志：バイオマーカー（ビテロジェニン）を用いた魚類生育環境評価法に関する研究、長崎大学大学院水産学研究科修士論文、2000.
- 8) 原 彰彦：水環境における汚染影響評価のバイオマーカーとしてのビテロジェニン、環境毒性学会誌、2(1)、pp.35-42 (1999)
- 9) 建設省：平成10、11年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果
- 10) 伊藤文成ら：コイの成熟に伴う血中ステロイドホルモンおよびビテロジェニンの変化、平成12年度日本水産学会秋季大会、623