

## 下水処理水へ曝露したメダカ雄のビテロジェニン誘導

森 真朗 塩田 勉

### 要 旨

下水処理水の魚類雄への内分泌かく乱作用を調べるため、都内A下水処理場で処理水をくみ上げ、曝露試験施設に運搬し、メダカ雄成魚へ5Lガラスビーカーを用いて曝露した。曝露期間は14日間とし、毎日換水した。季節変化を調べるため、試験は夏、秋、冬、春季の年4回行った。14日間の曝露終了後、採血し、血液中の雌特異タンパク質・ビテロジェニン濃度をELISAアッセイで調べた。曝露期間の影響を調べるため、冬、春季の試験では、7日目と14日目に採血し、ビテロジェニン濃度を測定した。結果は次のとおりであった。①下水処理水へメダカ雄を14日間曝露することにより、秋、冬、春季には血液中にビテロジェニンが誘導された。②ビテロジェニンの誘導は夏季には認められなかった(1ug/mL以下)。③下水処理水へ7日以内の期間曝露することで、メダカ雄にビテロジェニンが誘導された。今後、エストロゲン曝露量とビテロジェニン誘導量との比較やビテロジェニンの誘導が雄魚の生殖生理に及ぼす影響等について検討する必要がある。

キーワード：下水処理水、メダカ、ビテロジェニン、内分泌かく乱化学物質

### 1 はじめに

魚類雄における雌特異タンパク質ビテロジェニンの誘導は、内分泌かく乱化学物質の魚類への影響を調べる良いバイオマーカーと考えられている<sup>1,2)</sup>。これまでに、魚類雄のビテロジェニン誘導状況を調べるために、いくつかの野外調査が行われ、その結果、下水処理場排水の流入する地点付近で採捕した魚類雄に、高い割合でビテロジェニンの誘導が認められることが明らかになってきた<sup>1,3,4,5,6,7,8)</sup>。しかし、雄魚のビテロジェニン誘導の要因については同じ場所に生息する雌魚が排出する女性ホルモン、餌等により摂食する植物性のホルモン様物質、河川水中の人畜由来の女性ホルモンや内分泌かく乱化学物質など、様々な要因が考えられていて、明確になっていない<sup>3)</sup>。雄魚のビテロジェニンは、何時、どのようなときに、どのくらい誘導されるのか。そして、雄魚のビテロジェニン誘導は、どのくらいのレベルになると魚類の生殖へ影響を与えるのか。これらは、健全な水域生態系を保全するため、

明らかにしなければならない課題である。

本研究の目的は、人口の密集した都市の下水処理場処理水へ魚類雄を曝露し、①雌特異たんぱく質のビテロジェニンが誘導されるか否か、②誘導に季節による差があるか否か、③どの程度の期間曝露されるとビテロジェニンが誘導されるのか、を明らかにすることである。

メダカは、性決定がXY型であること、性染色体が分化していること、生殖研究に便利な系統が確立されていること、ステロイドホルモンによる性転換が証明された初めての脊椎動物であることなどから、内分泌かく乱化学物質の試験動物として有効性を発揮すると考えられている<sup>9)</sup>。さらに、メダカは内分泌かく乱化学物質に係る試験魚として、OECD(経済協力開発機構)においても推奨されている。我が国における野外調査の多くは、コイを対象に行われてきたが、こうしたメダカの特徴や飼育施設、取り扱いの容易さなどから、本研究ではメダカを試験魚に用いた。

## 2 材料及び方法

(1) 供試魚：都内養魚場から購入し、当研究所魚類等曝露試験施設で飼育、少なくとも2～3世代継代したヒメダカ (*Oryzias latipes*) で、孵化後6ヶ月以上の成魚雄を用いた。背鰭の切れ込みや尻鰭の形態等の外観観察で雌雄の判別を行った。飼育は原則として、室温 $24 \pm 1$  °C、光周期16時間明：8時間暗に環境制御したステンレス製試験室内で行った。供試魚の飼育には、内分泌かく乱化学物質による汚染を極力排除するため、脱塩素水道水を活性炭処理し、ポリビニデリンフルオライド製の配管を通し、ホーロー製水槽に貯留した飼育水を用いた。飼育容器には、接着剤等を用いない、全ガラス製の水槽を用いた。餌料は、孵化後24時間以内のアルテミア (ブラインシュリンプ) を1日2回、飽食量与えた。

(2) 下水処理水：東京都内のA下水処理場から放流前かつ消毒用塩素注入前の処理水を必要量、ステンレス製バケツでくみ取り、容量20Lのポリエチレン製容器を用いて研究所に運搬した。搬入後直ちに、容量5Lのガラス製ビーカーへ下水処理水を分注し、冷蔵保存した。

(3) 曝露試験：容量5Lのガラス製ビーカーへ前述の飼育水を入れ、供試魚のヒメダカ雄7尾を収容し予備飼育した。冷蔵保存した下水処理水を試験温度に戻し、そこへ予備飼育により異常のないことを確認したヒメダカを、手網を用いて移し入れた。

次の試験区を設定した。

- ① 陰性対照区 (アセトン (和光純薬工業、大阪) 150  $\mu$  L / 5 L 添加)
- ② 陽性対照区 (0.3nM/L 17 $\beta$  エストラジオール (和光純薬工業、大阪) へ曝露)
- ③ 下水処理水曝露区 - 1 週間
- ④ 下水処理水曝露区 - 2 週間

なお、陽性対照区の17 $\beta$  エストラジオールは、アセトンに溶解して用いた。

試験は半止水式で行った。各試験区とも、5Lガラス製ビーカーへ供試魚7尾を収容し、24時間毎に全量を換水した。曝露は14日間行い、換水前にpH、DOを測定した。なお、下水処理水は1週間に1度くみ取り、運搬し冷蔵保存した。

試験は季節毎の変化を調べるため、夏、秋、冬、春

季の年4回行った。夏、秋季の試験では、「下水処理曝露区 - 1 週間」は設定しなかった。

(4) 取り上げ、採血、凍結保存：曝露終了後、陰性対照区、下水処理水曝露区、陽性対照区の順に供試魚を取り上げた。供試魚は1尾ずつ、水を用いて麻酔状態にした後、体表の水分をふき取り、眼科用ステンレス製鉗を用いて尾部を切断し、血液をガラス製キャピラリーヘマトクリット管 (Drummond Scientific Co. PA, USA) に毛細管現象で吸い込ませた。次いで、血液が凝固する前に、あらかじめ氷冷しておいた容量0.5mLのポリエチレン製マイクロチューブにヘマトクリット管内の血液を吹き入れ、氷冷保存した。採血終了後、マイクロチューブを冷却遠心分離機 (HITACHI himac CR 5B2) に架け、4 °C、4500rpm、10分間、冷却遠心分離した。その後、ピテロジェニンの定量に供するまで、-80°Cの超低温槽 (SANYO ULTRA LOW MDF-192AT) で冷凍保存した。

(5) ピテロジェニンの測定：メダカ・ピテロジェニン濃度の測定は、「エンバイオ メダカ ピテロジェニン E L I S A システム」(アマシャムファルマシアバイオテック株式会社、東京) を用いて行った。冷凍保存した血液試料を解凍し、冷却遠心機に架け、4 °C、4500rpm、10分間、遠心分離した。遠心分離後、血清部分をマイクロピペットで1  $\mu$  L吸い上げ、サンプル希釈液に移した。以下のアッセイは製品添付のマニュアルに基づいて行った。

## 3 結果

夏季、7月下旬から8月上旬にかけて行った曝露試験結果を図1にとりまとめて示した。14日間の曝露試験期間中、陰性対照区で1尾、陽性対照区で1尾が死亡した。陰性対照区のメダカのピテロジェニン濃度は6尾すべて1  $\mu$  g/mL以下であった。pHは7.1～7.4、試験開始時のDOは6.8mg/Lであった。下水処理水曝露区では、1試験区の7尾についてのみ測定したが、ピテロジェニン濃度はすべて1  $\mu$  g/mL以下であった。pHは7.1～7.8、試験期間中のDOは5.9mg/L以上であった。陽性対照区のピテロジェニン濃度は、6尾すべて100  $\mu$  g/mL以上であった。予想濃度を超え、希釈段数が足りなかったため、こうした表示とした。試験期間中のpHは7.0～7.5であった。なお、夏季曝露試

験に供試したメダカの平均体重は、 $0.32 \pm 0.05$  gであった。

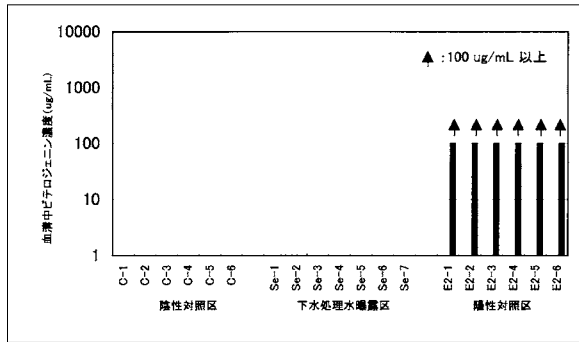


図1 下水処理水へ曝露したメダカ雄におけるビテロジェニンの誘導 夏季

秋季、10月下旬から11月上旬にかけて行った曝露試験結果を図2にとりまとめて示した。曝露試験期間中、死亡は認められなかった。陰性対照区のメダカのビテロジェニン濃度は7尾すべて  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。pHは7.1~7.6、試験開始時のDOは8.0mg/Lであった。下水処理水曝露区では、1試験区の7尾についてのみ測定したが、ビテロジェニン濃度は7尾すべて  $1 \mu\text{g/mL}$ 以上で、 $3.4 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 以上であった。pHは6.8~7.9、試験期間中のDOは6.7mg/L以上であった。陽性対照区のビテロジェニン濃度は、7尾すべて  $1,000 \mu\text{g/mL}$ 以上であった。下水処理水曝露区の一部及び陽性対照区の検体が予想濃度を超え、希釈段数が足りなかったため、 $100 \mu\text{g/mL}$ 以上あるいは  $1,000 \mu\text{g/mL}$ 以上という表示とした。試験期間中のpHは7.2~7.6であった。なお、秋季曝露試験に供試したメダカの平均体重は、 $0.27 \pm 0.05$  gであった。

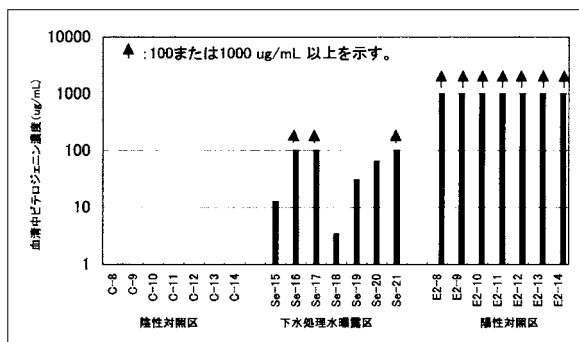


図2 下水処理水へ曝露したメダカ雄におけるビテロジェニンの誘導 秋季

冬季、1月下旬に行った曝露試験結果を図3にと

りまとめて示した。曝露試験期間中、死亡は認められなかった。陰性対照区のメダカのビテロジェニン濃度は7尾すべて  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。pHは7.0~7.5、試験開始時のDOは9.2mg/Lであった。下水処理水曝露区では、曝露1週間後に7尾、2週間後に7尾を取り上げ、採血し、ビテロジェニン濃度を測定した。曝露1週間後の7尾のうち1尾からは採血できなかった。測定に供した6尾のうち2尾のビテロジェニン濃度は  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。残り4尾のビテロジェニン濃度は  $4 \sim 64 \mu\text{g/mL}$ であった。曝露2週間後の7尾のうち1尾は  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。残り6尾のビテロジェニン濃度は  $9 \sim 567 \mu\text{g/mL}$ であった。pHは7.2~7.9、試験期間中のDOは7.1mg/L以上であった。陽性対照区のビテロジェニン濃度は、 $3,460 \sim 6,430 \mu\text{g/mL}$ であった。試験期間中のpHは7.0~7.5であった。なお、冬季曝露試験に供試したメダカの平均体重は、 $0.40 \pm 0.08$  gであった。

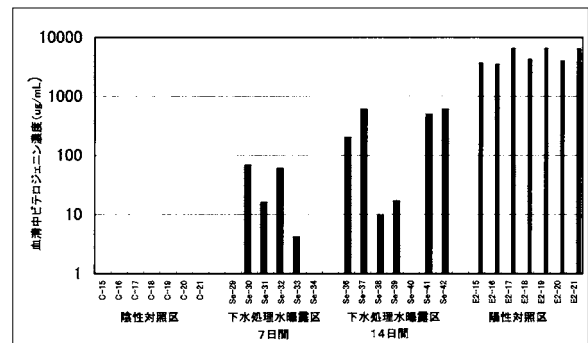


図3 下水処理水へ曝露したメダカ雄におけるビテロジェニンの誘導 冬季

春季、4月中旬に行った曝露試験結果を図4にとりまとめて示した。曝露期間中、陽性対照区で2尾が死亡した。陰性対照区の7尾のうち1尾からは採血できなかった。残り6尾のビテロジェニン濃度はすべて  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。pHは7.0~7.4、試験開始時のDOは8.0mg/Lであった。下水処理水曝露区では、冬季と同様、曝露1週間後に7尾、2週間後に7尾を取り上げ、採血し、ビテロジェニン濃度を測定した。曝露1週間後に採血した7尾のうち3尾のビテロジェニン濃度は  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。残り4尾のビテロジェニン濃度は  $2 \sim 25 \mu\text{g/mL}$ であった。曝露2週間後の7尾のうち2尾のビテロジェニン濃度は  $1 \mu\text{g/mL}$ 以下であった。残り5尾のビテロジェニン

濃度は23~68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。pHは6.3~7.9、DOは6.3mg/L以上であった。陽性対照区のビテロジェニン濃度は、1,370~11,310  $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。試験期間中のpHは7.0~7.5であった。なお、春季曝露試験に供試したメダカの平均体重は、0.30 $\pm$ 0.07gであった。

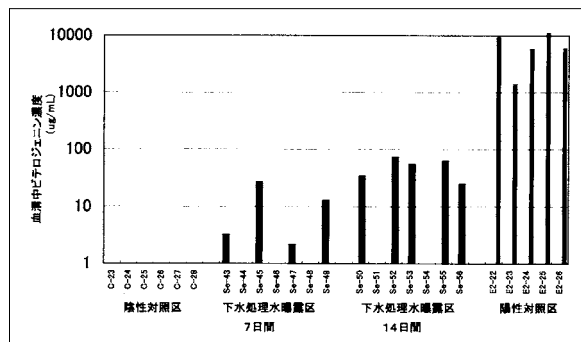


図4 下水処理水へ曝露したメダカ雄におけるビテロジェニンの誘導 春季

#### 4 考察

下水処理場処理水へメダカ雄を曝露したところ、秋、冬、春季において、雌特異たんぱく質ビテロジェニンの誘導が認められた。下水処理水の魚類雄への影響を調べた研究としては次のような報告がある。Purdomら<sup>8)</sup>は、イギリスにおいて下水処理水の放流口付近に設置したケージでニジマス雄を飼育したところ、短期間で著しいビテロジェニンの上昇（3週間で1000倍）が認められたと報告している。松原ら<sup>10)</sup>のまとめによると、イギリス北部の下水処理場付近の河口域に生息するカレイで、雄の血液中にビテロジェニンが誘導されるとともに、高い割合で精巢の異常が見つかる。Folmarら<sup>11)</sup>によると、アメリカでは下水処理場放流口の雄コイの血液中にビテロジェニンが検出され、ステロイドホルモン濃度に変化が見られている。早川ら<sup>6)</sup>は、下水放流水口直下流でコイを飼育することで放流水に連続的に曝露し、血漿ビテロジェニン濃度への影響を調べた。この曝露実験において、コイのビテロジェニン誘導合成を促進した主な物質は、下水処理場放流水に含まれる17 $\beta$ エストラジオール（E2）である可能性が強いと考えた。和波ら<sup>12)</sup>は、下水処理場放流口の直下流点や下水処理水の影響が大きい地点では、採捕したコイ雄のビテロジェニン濃度が高い、と報告している。このように、種々の魚類で、雄魚のビテロジェニン誘導と下水処理水との関係が指

摘されてきている。本研究では、下水処理水をくみ取り、実験施設へ運搬し、メダカへ曝露した。これまでの研究や本研究の結果から、下水処理水へ魚類雄を曝露するとビテロジェニンが誘導される場合があると考えられ、その詳細を検討するのに、本研究のような環境の制御された試験施設で行う曝露試験は役立つものと考えられる。

夏季に行った曝露試験では、ビテロジェニンの誘導は認められなかった。この理由としては、処理場に入る流入水中のエストロゲン様物質が、夏季には処理により他の季節以上に低減する可能性が考えられるが、詳細は不明である。曾根ら<sup>13)</sup>は、内分泌かく乱化学物質が下水処理場へどのような濃度で流入し、処理水中にどの程度含まれているか、また、下水処理工程においてどのような挙動を示しているか、その実態を明らかにすることを目的に、流入水と放流水の検出濃度を比較し、下水処理過程での一定の低減効果を認めた。また、生物膜ろ過やオゾン処理等の高度処理を施すことにより一層の低減が認められた、と報告している。また、生物反応槽における17 $\beta$ エストラジオールの低減は滞留時間に依存する、と述べている。高橋<sup>14)</sup>は、魚類のメス化と下水処理の関係について、一部の産業系排水の影響を強く受けている下水道ではノニルフェノールの関与が疑われているが、我が国の下水のエストロゲン活性は、ヒトに由来する可能性が最も高い。下水処理の過程でかなりのエストロゲン活性が不活化することも認められており、アンモニアを硝化することができる高度処理を行うことによって、9割以上の活性値の低下が観測されているが、通常の下水処理方式では不活化率が不安定で、5割程度の不活化しか観測されない場合もある。その要因は明らかとなっておらず、活性の測定方法を含め、検討を行っているところである、と報告している。このように、下水処理とエストロゲン活性については更に検討が必要であり、その際、季節変動についても考慮する必要がある。

なお、本研究と同時に行った「下水処理中の化学物質がメダカに及ぼす影響」において、夏季及び冬季のメダカ曝露に用いた下水処理水中の17 $\beta$ エストラジオール（E2）、エストロン（E1）+17 $\beta$ エストラジオール（E2）+エストリオール（E3）の濃度が測定用キット（武田薬品工業株式会社、大阪）を用いて測定され

ている。それによると、17βエストラジオールが夏季、5.0~5.7ng/L、冬季14~17ng/L、E1+E2+E3が夏季、21~28ng/L、冬季61~101ng/Lで、いずれも冬季の方が濃度は高かった。

冬、春季に行った曝露試験では、曝露1週間後及び2週間後に供試魚を取り上げ、ビテロジェニンの誘導を調べた。その結果、1週間曝露でもビテロジェニン誘導は認められた。しかし、1週間曝露と2週間曝露とを比較すると、ビテロジェニン濃度は1週間曝露の魚の方が総じて低かった。曝露量と誘導ビテロジェニン量の関係等については、今後、17βエストラジオールなどを基準物質として明らかにしていく必要がある。

0.3nM/Lの17βエストラジオールへ曝露した陽性対照群では、すべての魚でビテロジェニンの誘導が認められたが、冬、春季に行った曝露試験では、下水処理水へ曝露した魚の一部に、ビテロジェニン濃度が1μg/mL以下の個体が出現した。この理由については今のところ不明である。

松原<sup>10)</sup>は、内分泌かく乱化学物質の影響評価における今後の留意点として、測定されたビテロジェニン濃度が、その魚種に一定期間雌性ホルモン(エストラジオール17β)を投与した場合のどの程度のホルモン濃度に相当するのかがわかれば、応答性の異なる魚種間での比較が可能になるとともに、環境水の雌性ホルモン作用の強度が数値化できる、と述べている。本研究でメダカ雄を下水処理水へ曝露することにより得られた各数値は、今後、他の魚種を用いて得られる数値と比較することにより、魚種間の比較にも用いることができるであろう。

#### 謝 辞

下水処理水採水に当たり、お世話になった関係各位に深く感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり、ご助言いただいた 前基盤研究部長 若林明子博士(現 淑徳大学教授)に厚くお礼申し上げます。

#### 引用文献

1) 有園幸司：環境ホルモン(内分泌攪乱物質)の魚類への影響—ビテロジェニンをバイオマーカーとして—環境技術、29(6)、pp.27~32 (2000)

2) 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)

3) 建設省河川部、都市局下水道部：平成10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2、月刊「水」、1999(10)、pp.72~79 (1999)

4) 森 真朗・若林明子：雄コイのビテロジェニン濃度について、第35回日本水環境学会年会講演集、pp.451 (2001)

5) 中村 将：性分化と環境、月刊海洋、31、pp.304~312 (1998)

6) 早川幸恵ら：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、第35回日本水環境学会年会講演集、pp.450 (2001)

7) Hashimoto S. et al. : Vitellogenin in wild male flounder, *Pleuronectes yokohamae*, in Tokyo Bay, Jpn. J. Environ. Toxicol., 1, pp.75-85 (1998)

8) Purdom C.E. et al. : Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, Chemistry and Ecology, 8, pp.275-285 (1994)

9) 尾里健二郎：内分泌攪乱化学物質の試験動物モデルとしてのメダカ、International symposium on environmental endocrine disruptors '99、Abstracts, pp.89 (1999)

10) 松原孝博：魚の性の攪乱の現状、第1回日本環境ホルモン学会(仮称)講演会テキスト、pp.10 (1998)

11) Folmar L.C. et al. : Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant, Environ. Health Perspect., 104 (10) , pp.1096-1101 (1996)

12) 和波一夫ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(その4)—都内河川におけるコイの精巣等の調査—、東京都環境科学研究所年報2001、pp.53~63 (2001)

13) 曾根啓一、上野孝司：下水処理場における内分泌かく乱化学物質の実態調査結果、東京都環境行政交流会誌、24、pp.50~53 (2001)

14) 高橋正宏：研究最前線 魚類のメス化—下水道か

## Vitellogenin Induction of Male Medaka Exposed to Sewage Treatment Water

Masaaki Mori and Tsutomu Shioda

### Summary

Adult male medaka (*Oryzias latipes*) were exposed to the sewage treatment water taken from A sewage treatment work in Tokyo. The water was carried from the treatment work to our laboratory, and the exposure experiment was conducted with the 5L glass beaker in the experimental room regulated the condition of light and temperature. The exposure period was 14 days. The treatment water for the exposure was changed everyday. To know the seasonal variation, the exposure experiment was carried out 4 times in a year, in summer, autumn, winter and spring season. The blood was obtained from the medaka after the 14-day exposure. The concentration of serum vitellogenin of the medaka was determined by ELISA assay. At the exposure experiment conducted in winter and spring, the concentration of serum vitellogenin was determined after the 7 and 14-day exposure to know the effect of exposure period. The results are as follows. ①Vitellogenin induction was observed in the serum of male medaka after the 14-day exposure to the sewage treatment water in autumn, winter and spring season. ②The exposure conducted in summer didn't induct vitellogenin in the serum of medaka ( $< 1\mu\text{g}/\text{mL}$ ). ③Within the period of 7-day exposure to the sewage treatment water, vitellogenin was inducted in the serum of male medaka. Farther studies focused on comparison between estrogen levels in sewage treatment water and vitellogenin induction levels of male medaka, and on the effect of vitellogenin induction on the reproductive physiology of male medaka are necessary.

**Keywords:** sewage treatment water, medaka, vitellogenin, endocrine disrupter chemicals