

都内水域の環境ホルモン問題に関する研究（その1）

東京都内湾の魚類調査 -

和波 一夫 嶋津 暉之 宮下 雄博* 大原 拓也**
(*非常勤研究員 ** 埼玉工業大学)

要 旨

東京都内湾に生息する魚類の生殖異常の実態を把握するため、羽田沖などの浅場を対象として調査を実施したところ、次のことが明らかになった。

- (1) 合計19種類、861尾の魚類を採捕して、生殖腺等の観察を行った結果、次の4魚種の雄に精巣卵がみられた。ボラ(精巣卵が出現したもの1尾)、コノシロ(同2尾)、サッパ(同1尾)、ヒイラギ(同1尾)。
- (2) 雄ボラの血中ビテロゲニン濃度を測定したところ、一部の雄ボラから10,000ng/ml を超える高濃度のビテロゲニンが検出された。
- (3) ボラは底泥を食性とするので、東京湾の底泥に含まれるエストロゲン様物質の影響が考えられる。

キーワード：内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）、エストロゲン、精巣卵、ビテロゲニン

Study on Endocrine Disrupters in metropolitan rivers and Tokyo Bay (1)

- Gonad abnormalities and Plasma Vitellogenin in wild fish from Tokyo Bay -

Kazuo Wanami, Teruyuki Shimazu, Takehiro Miyashita* and Takuya Ohara **

*Associate researcher, ** Saitama Institute of Technology

Summary

Fish were collected at 3 sampling stations in Tokyo Bay (19species, n=861) to investigate gonad abnormalities and to measure plasma vitellogenin(VTG) concentration in male Grey Mullet (*Mugil cephalus*). Testis-ova were found in male fish of four species (*Mugil cephalus* , *Konosirus punctatus* , *Sardinella zunasi* , *Leognathus nuchalis*). The VTG concentration in some male Grey Mullet were higher than 10,000ng/ml. These results suggest that Grey Mullet captured in Tokyo Bay could be influenced estrogen or estrogen-like substances in Tokyo Bay.

Keywords: estrogen, estrogen-like substances, testis-ova , vitellogenin(VTG)

類、血液試料は実験室に搬入するまで氷を入れたアイスボックス内で保冷した。血液試料については、遠心分離器を用いて血漿を分離した(4、3000rpm × 20 min.)、この血漿を0.5ml 容量マイクロチューブに分注後、直ちにマイナス40 の冷凍庫に収納してピテロゲニン濃度の測定に供するまで凍結保存した。また、実験室に搬入した魚類は、解剖作業まで氷づけにして鮮度を保持させた。

(5) ピテロゲニンの測定

ピテロゲニンは、片山化学工業㈱製のボラ用 SRID 測定プレート (ND 25 µg/ml) で高濃度の検体をスクリーニングしたのち、同法で不検出のものについて検出感度の高い ELISA 法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay、ND 4 ng/ml) を用い測定した。ELISA 法は、ボラのピテロゲニンに特異的な 2 つの抗体を用いた免疫反応による高感度分析法である。

(6) 雌雄および生殖腺組織異常の判定

魚類の解剖を行い、生殖腺の外観観察により精巢、卵巣の状態を記録した。外観観察から雌雄の区別が明確でない生殖腺については、組織学的な観察から雌雄を判定した。生殖腺全体を摘出後、付着している脂肪組織などを取り除き、生殖腺の重量を測定した。また、生殖腺の外観を写真撮影して記録した。

摘出した生殖腺が小さいものは、全組織を組織標本用試料として採取し、生殖腺が大きなものは厚さ 5 mm から 10mm 程度に横断した組織片を複数採取した。これらの組織標本用試料をブアン氏固定液につけこんだ後、70% エタノール液に入れ替えて保存した。組織標本用試料は、常法に従い脱水しパラフィン包埋した。これを 7 µm に薄切りし、スライドガラスに貼付けした後ヘマトキシリンとエオシンの二重染色を施した。生殖腺の生殖細胞の発達状況、構造、組織の変性及び精巢卵の有無等を顕微鏡で観察して、その状態を記録した。

(7) 水質分析の方法

内分泌かく乱化学物質については既報⁵⁾の図 1 のフローで試料の濃縮を行ったうえで、エストロゲンの主要成分であるエストラジオール、エストロンを ELISA 法で分析した。また、エストロゲン総合作用強度を Brunel 大学の遺伝子組み換え酵母法で測定した。一部の検体については外部委託により LC-MS/MS 法でも分析を行った。その他に、COD、窒素、りん等の一般項目を JIS-K0102 にしたがって分析した。

3 結果及び考察

(1) 採捕魚種

表 1 に魚種別の採捕尾数を示す。ボラ、コノシロ、サッパ等の 19 種、861 尾を採捕した。なお、マアナゴの検体の大半は、都水産試験場がマアナゴの解剖を行い、外観観察により雌雄を判定したもののの中から、雄を多く選んで供与されたものである。

魚類の性別は、生殖腺の外観と組織学的観察により判定を行ったが、雌雄不明のものも多く、ボラでは 135 尾のうち 37 尾が雌雄不明であった。また、マハゼなどでは、摘出することが困難な未発達な生殖腺もあった。

表 1 魚種別採捕数 単位：尾

	雄	雌	雌雄不明	摘出不能	合計数	精巢卵
ボラ	2	94	37	2	135	1
コノシロ	7	49	7	2	65	2
サッパ	5	36	2	0	43	1
ヒイラギ	9	37	0	1	47	1
マルタ	29	44	7	0	80	
スズキ	7	59	19	3	88	
マハゼ	24	74	0	18	116	
シロギス	30	71	0	5	106	
クサフグ	24	15	0	0	39	
マアナゴ	78	20	0	2	100	
マコガレイ	0	5	1	2	8	
イシガレイ	0	1	0	1	2	
シタビラメ	0	1	0	0	1	
クロナシタ	0	1	0	0	1	
シログチ	0	9	0	0	9	
メバル	1	1	1	0	3	
カサゴ	6	0	0	0	6	
アイナメ	0	1	0	0	1	
クロダイ	0	10	1*	0	11	
総合計					861	

*：雌雄同体

(2) 生殖腺異常

魚類の生殖腺異常については、組織学的観察にもとづく知見が少ないことから、現時点では、精巢および卵巣内の細胞や組織に顕著な変性等が認められる場合を異常ありと判定した。

雄の生殖腺を観察した結果、すべての魚種で生殖腺の外観異常は認められなかった。しかし、精巢の組織学的観察からは、ボラ(雄 2 尾のうち 1 尾)、コノシロ(雄 7 尾のうち 2 尾)、サッパ(雄 5 尾のうち 1 尾)、ヒイラギ(雄 9 尾のうち 1 尾)の精巢組織中に卵母細胞(精巢卵)が認められた(写真 1 ~ 6)。

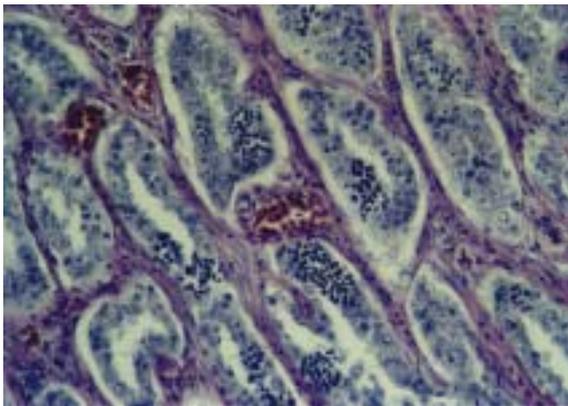


写真1 ボラ 正常な精巣組織(400倍)
2003年3月13日 東京湾・京浜島(体長371mm; 体重822g)

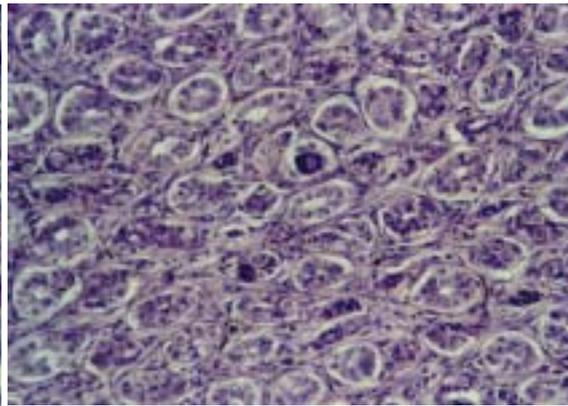


写真2 ボラ 精巣卵(400倍)
2002年12月17日 東京湾・京浜島(体長285mm; 体重400g)

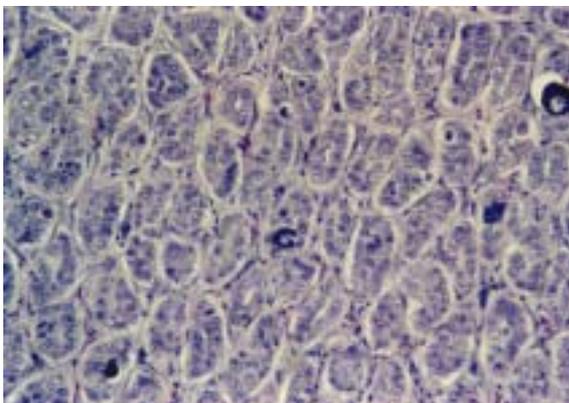


写真3 ボラ 精巣卵?(精巣卵の疑いのある生殖腺)(400倍)
2003年3月10日 東京湾・京浜運河(体長421mm; 体重1320g)

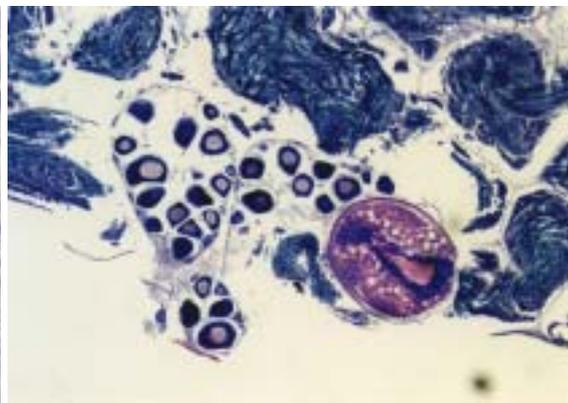


写真4 コノシロ 精巣卵(100倍)
2002年7月1日 東京湾・京浜運河(体長230mm; 体重210g)

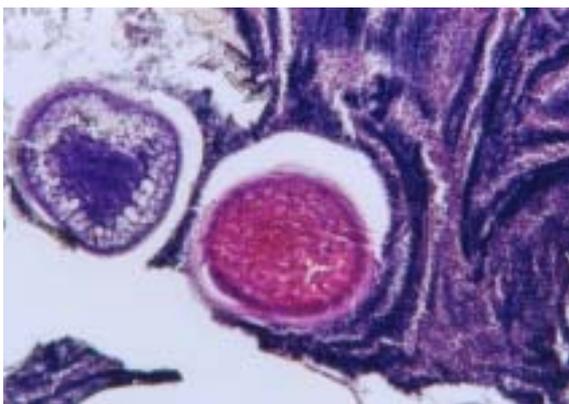


写真5 サツバ 精巣卵(400倍)
2002年6月24日 東京湾・羽田沖(体長93mm; 体重12.7g)

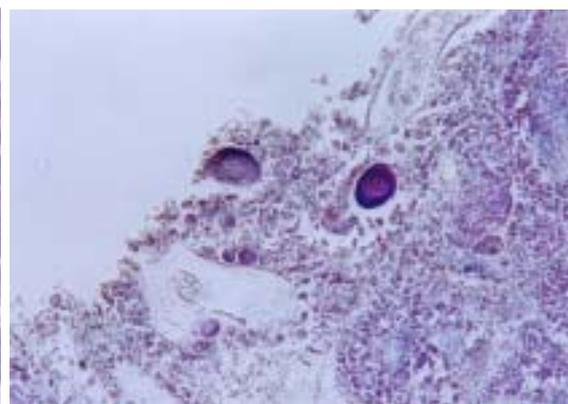


写真6 ヒイラギ 精巣卵(400倍)
2002年7月1日 東京湾・京浜島(体長66mm; 体重7.9g)

精巣卵の出現状態はボラとその他の3種では異なっていた。ボラでは、精巣卵は精巣組織の内部に散在してみられた。これらの精巣卵は精小嚢内部にあり、雄性生殖細胞と混在した状態で観察された(写真1、2)。なお、生殖腺が未発達であるため雌雄不明と判定したボラ37尾のうち、12尾については雄性生殖細胞のシストと思われる細胞集塊があり、雄である可能性が高いと考えられる。この12尾のうち3尾には生殖腺に卵母細胞が認められた(写真3)。これらが雄であるとするならば、雄ボラの合計数は14尾となり、うち精巣卵が認められるものは4尾(精巣卵の出現率は約30%)となる。

コノシロ、サッパ、ヒイラギでは、精巣卵は精巣組織の周縁部にのみあり、精小嚢内には観察されなかった(写真4、5、6)。また、これらの精巣卵を取り巻く組織は、精巣部分の組織とは異なり、退行した状態であった。

魚類の精巣中に卵母細胞がみられる原因としては、魚類の性分化の様式により、種によっては正常な生殖周期においてみられる場合と、外因性のエストロゲン様物質などの影響による場合とが考えられる。

魚類の性分化の様式は多様で、ベラ科やタイ科などでは性転換や雌雄同体現象がみられる⁶⁾。例えば、本調査で採捕されたクロダイは雄性先熟で、雄から雌へと性転換が起こる。そのため、クロダイにみられた精巣と卵巣の両方の組織が混在した状態は、正常な生殖周期で通常にみられる現象と考えられる。しかし、今回、精巣卵が確認されたボラ、コノシロ、サッパ、ヒイラギについては、性転換や雌雄同体の報告はない。

これら4種のうち、ボラは内湾や河川の汽水域を生活の場としており、ケイ藻やデトリタス等の底泥中の有機物を泥とともに食べている。特に河口部や下水処理場放流口付近には多数のボラが通年生息しているのが観察されている。近年では、隅田川・両国橋(台東区)や柳瀬川・清柳橋(清瀬市)などの都市部河川でも採捕されている⁴⁾。既報⁷⁾で示したように下水処理場放流水には天然エストロゲンが含まれていること、また、東京湾の泥底には、エストロゲン活性をもつ物質が蓄積されていることが明らかにされている⁸⁾。これらのことから、ボラは他の魚種に比べて都市部から流入する外因性のエストロゲン様物質の影響を強く受けられていると考えられ、それが精巣卵の原因となっている可能性が示唆される。

コノシロ、サッパ、ヒイラギの3種も内湾や河口域を生活の場にしている。ヒイラギは主に内湾、河口汽水域で生活し、底生性の甲殻類や貝類を餌としている。また、コノシロとサッパは、沿岸域から内湾にかけて生息し、プランクトンを餌としている。本調査で解剖したコノシロには、泥を食べている個体もみられた。そのため、これら3種の精巣卵の出現も、外因性のエストロゲン様物質による影響を受けている可能性がある。

前述したように、精巣卵が確認されたボラ、コノシロ、サッパ、ヒイラギについては、性転換や雌雄同体の報告はない。一方、マダイなどの幼時雌雄同体種では、幼時期には生殖腺に卵巣組織がはじめに形成される。雄となる個体は、その後、卵巣と精巣の両方の組織をもつ生殖腺を経て、精巣組織が発達する。このため、雄への性分化の過程で、精巣には卵母細胞が認められる⁹⁾。また、イトヨリダイの雄では、卵巣組織と精巣組織の両方をもつ時期を経て成熟した後も、精巣には卵母細胞とみられる細胞が痕跡的に残存することが知られている(痕跡的雌雄同体)¹⁰⁾。本調査では、ボラなどの4種に精巣卵がみられたが、その原因として幼時雌雄同体現象による可能性も否定できない。この点については、今後、検討していく必要がある。

雌の生殖腺については、スズキ(59尾のうち3尾)とクサフグ(15尾のうち1尾)に退行変性卵がみられ、卵巣の一部が硬変していた。退行変性卵は、卵が成熟する過程で、水温、光周期などの環境条件の変動により引き起こされるため、正常な生殖周期においてもみられる現象と考えられる。

(3) 血液中のビテロゲン濃度

ビテロゲンは、体内の天然エストロゲン(天然女性ホルモン)によって誘導、産生される雌特有の卵黄タンパク前駆物質である。通常、ビテロゲンの産生は雌に限られ、雄にはほとんどビテロゲンが検出されないが、雄にエストロゲンを投与するとビテロゲンが産生される。また、環境中に存在するエストロゲン様物質(女性ホルモン様物質)によっても産生される。すなわち、雄魚にビテロゲンが検出された場合、天然エストロゲンやエストロゲン様物質に暴露された可能性が高い¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。現在、エストロゲン様物質の魚類への影響が懸念されていることから、研究機関等でビテロゲンを指標とした調査が行われている。

表2 ボラのピテロゲン濃度測定結果

魚種	調査地点	調査月	識別番号	性別	体重	生殖腺	SRID 測定値	ELISA 測定値
					(g)	重量(g)	($\mu\text{g/ml}$)	(ng/ml)
ボラ	京 浜 島	3月	3-い-14	雄	822	0.38	890	
ボラ	京浜運河	12月	12-ウ-1	雄	400	0.09	ND	120
ボラ	京浜運河	3月	3-う-17	雄?	459	0.03	360	
ボラ	京浜運河	3月	3-ウ-10	雄?	1320	0.48	ND	11,000
ボラ	京 浜 島	3月	3-い-11	雄?	1400	5.38	ND	6,200
ボラ	京 浜 島	12月	12-イ-10	雄?	680	0.25	ND	5,200
ボラ	京浜運河	3月	3-う-18	雄?	467	0.11	ND	1,000
ボラ	京浜運河	7月	7-ウ-32	雄?	292	0.03	ND	16
ボラ	京浜運河	3月	3-ウ-18	雄?	740	0.36	ND	13
ボラ	羽 田 沖	6月	6-ア-20	雄?	187	0.10	ND	8
ボラ	羽 田 沖	6月	6-ア-2	雄?	399	0.18	ND	6
ボラ	羽 田 沖	6月	6-ア-10	雄?	201	0.10	ND	6

雄? : 雄性生殖細胞のシストと思われる細胞集塊がみられた個体

検出限界 : SRID ND 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下 ELISA ND 4 ng/ml 以下

表3 2002年度調査地点のエストロゲン等の水質分析調査結果

エストロゲン : ng/l

一般項目 : mg/l

調査月日、地点	ELISA 法				酵母法	LC-MS/MS 法			一般項目			
	エストロゲン	17- β -エストラジオール	エストロン*	2成分のエストロゲン作用強度	エストロゲン総作用強度	17- β -エストラジオール	エストロン	2成分のエストロゲン作用強度	COD	T-N	$\text{NH}_4\text{-N}$	T-P
7/1 羽田沖	4.8	4.1	0.7	4.3	0.4				6.6	2.02	0.19	0.10
7/1 京浜島	7.2	2.0	5.2	3.4	5.1				6.4	6.66	2.81	0.16
7/1 京浜運河	80.9	19.7	61.2	36.2	52.0				7.1	7.21	5.11	0.27
9/17 羽田沖	18.8	3.4	15.4	7.6	6.7				4.0	4.70	0.01	0.09
9/17 京浜島	32.0	1.8	30.2	10.0	10.1				5.4	6.64	0.33	0.15
9/17 京浜運河	11.8	0.9	10.9	3.8	5.8				5.1	6.58	0.01	0.10
12/17 羽田沖	6.2	0.7	5.5	2.2	0.3				1.7	1.06	0.61	0.03
12/17 京浜島	27.1	7.5	19.6	12.8	13.5				3.9	5.57	0.25	0.09
12/17 京浜運河	11.5	3.2	8.3	5.4	3.4				2.7	3.27	2.16	0.05
12/17 S t .25	6.6	0.8	5.8	2.4	0.5				1.3	1.15	0.63	0.01
12/17 森ヶ崎処理場	66.9	23.7	43.2	35.4	27.5				11.8	15.0	10.6	0.60
3/10 羽田沖	8.0	1.1	6.9	3.0	2.6	0.0	3.0	0.8	2.5	5.14	0.17	0.34
3/10 京浜島	36.4	4.3	32.1	13.0	17.0	2.0	24.0	8.5	6.2	1.61	0.96	0.03
3/10 京浜運河	8.3	1.2	7.1	3.1	2.2	0.0	2.5	0.7	3.0	9.35	7.33	0.15

* : ELISA 法のエストロンの値は、エストロゲンの値から 17- β -エストラジオールの値を差引いたものである。

本調査で血液採取した魚類のうち、ボラの血液中ピテロゲン分析結果を表2に示す。SRID法では京浜島（3月調査）で採捕された雄1尾から890 µg/mlの高濃度ピテロゲンが検出された。また、雌雄不明としたものの、雄である可能性が高いボラの1尾に360 µg/mlの高濃度ピテロゲンが検出された。ELISA法では、雌雄不明のボラの4尾に1000ng/ml以上のピテロゲンが検出された。

米山ら¹⁴⁾によるボラのピテロゲン全国調査では、沖縄0.2 µg/ml、八代海0.8 µg/ml、長崎大瀬戸0.008 µg/ml、長崎港2.3 ~ 4.1 µg/ml、博多港11.0 ~ 29.4 µg/ml、大阪湾1755 µg/ml、東京湾994 µg/mlの値が報告されており、大阪湾、東京湾のボラが他の地域にくらべると極めて高い値を示している。なお、この東京湾のボラのピテロゲン994 µg/mlは、本調査で採捕したボラの890 µg/mlとほぼ同レベルの値である。

征矢野ら¹⁵⁾による有明海干潟域に生息するトビハゼのピテロゲンを指標にした調査では、大牟田川河口の泥を用いてトビハゼを飼育すると、対照群の約200倍(2927 µg/ml ± 369.61)ものピテロゲンが血液中から検出され、トビハゼは大牟田川河口の底泥中エストロゲン様物質の影響を受けている可能性が高いことが明らかにされている。トビハゼと種類は異なるが、ボラも底泥の有機物を食性に行っていることを考えると、ボラの高濃度ピテロゲン検出には底泥中エストロゲン様物質の影響が示唆される。

(4) 調査地点の水質分析結果

表3に調査地点のエストロゲン等の濃度を示す。エストロゲン2成分作用強度は、既報⁵⁾の比活性値を用いて求めたものである。各地点のエストロゲン作用強度やアンモニア性窒素は、羽田沖にくらべると、京浜島や京浜運河が高い値を示した。この原因としては、下水処理場放流水の影響が考えられる。京浜島の近傍の昭和島には都内で最大の処理能力を持つ森ヶ崎水処理センター（1日放流量約120万m³）があり、京浜運河の北端奥部にも規模の大きい芝浦水処理センター（1日放流量約65万m³）がある。12月の調査では、魚類調査地点に加えて沖合の内湾St.25と森ヶ崎水処理センター放流口付近の水質調査を行った。このSt.25は、各水質項目とも羽田沖地点と同程度の値を示したが、森ヶ崎水処理センター放流口付近はエストロゲン作用強度とアンモニア性窒素が他の地点にくらべて高い値を示した。これらのことから、

京浜島、京浜運河の地点は、下水処理場放流水の影響が強いと推定された。なお、同一地点であっても各調査月によってエストロゲン作用強度の値が大きく異なったのは、運河部には潮汐流による複雑な水の流れがあり、下水処理場放流水の流入影響が変化したためと考えられる。

東京湾に面する下水処理場の放流口付近や運河部奥部にはボラが数多く生息している。前述のとおり、ボラは底泥を食性とするので、同表に示した水中のエストロゲン等のほかに、底質中のエストロゲン様物質の影響を受けている可能性が高いと考えられる。今後、東京湾の底質に含まれるエストロゲン様物質の濃度、成分、由来についても調査を進める必要がある。

4 おわりに

都内水域で19種類の魚類を採捕して、生殖腺観察を行った。このうち、ボラ、コノシロ、サツパ、ヒイラギから精巣卵が認められた。また、雄ボラの血液中から高濃度のピテロゲンが検出され、エストロゲン様物質との関連が考えられた。今後、これらの魚種を中心に調査を進め、精巣卵やピテロゲン産生の原因を明らかにすることが必要である。さらに都内水域の魚類調査を進めていくとともに、調査水域の水質・底質調査を行い、都内水域における魚類生殖異常の実態を明らかにしていきたい。

5 謝辞

本研究における魚類採捕作業は、新日本環境調査株式会社へ委託した。羽田沖周辺の魚類採捕については財団法人東京都内湾漁業環境整備協会の協力を得た。マアナゴの生殖腺摘出については、東京都水産試験場の協力を得て実施した。生殖腺の組織学的観察については、大西悠太氏（国土環境株式会社環境創造研究所）からご教示をいただいた。ボラのピテロゲンの分析は片山化学工業株式会社の協力で行った。ここに、ご協力をいただいた関係各位に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 橋本伸哉: Induction of serum vitellogenin and histological abnormalities in the gonads of wild male fish coastal areas of Japan, 環境ホルモン学会第4回研究発表回要旨集, pp.68, (2001).

- 2) 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8），東京都環境科学研究所年報，pp.45-55，(2002).
- 3) 宮下雄博ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その9），東京都環境科学研究所年報，pp.56-65，(2002).
- 4) 平成12年度 水生生物調査結果報告書：東京都環境局環境評価部，pp.547，(2002).
- 5) 嶋津暉之ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その3），東京都環境科学研究所年報，pp.165-175，(2000).
- 6) 中園明信：機能的雌雄同体現象，魚類生理学 板沢靖男・羽生 功編 恒星社厚生閣，pp.327-361，(1991)
- 7) 嶋津暉之ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その11），東京都環境科学研究所年報，pp.75-82，(2002).
- 8) 山下信義ら：柱状底質中の内分泌活性物質，化学総説，50，pp.206-212
- 9) Matsuyama, M. et al. : Juvenile bisexuality in the red sea bream, *Pagrus major*, Env. Biol. Fish., 21 (1), pp.27-36 ,(1988)
- 10) Takahashi, H. et al. : Gonadal Morphology of threadfin Breems, *Nemipterus bathybius* and *N. virgatus*: Evidence of Rudimentary Hermaphroditism, Japan. J. Ichthyol., 36(1), pp.82 - 89 (1989)
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 有菌幸司：河川海域などにおける内分泌攪乱化学物質の検出，資源環境対策 34，pp.844-848，(1998).
- 14) 米山健太ら：ボラを対象生物とした環境ホルモンの影響調査，環境ホルモン学会第4回研究発表回要旨集，pp.287，(2001).
- 15) 征矢野清ら：有明海泥干潟域における環境エストロゲン汚染，海洋と生物144，25(1)，pp.15-20，(2003).