

都内水域の環境ホルモンに関する研究（その5） — 下水処理水の流入による魚類生殖腺への影響 —

竹内 健 和波 一夫 川井 利雄 宮下 雄博*
(*前・非常勤研究員)

要 旨

下水処理水による魚類雄への内分泌かく乱作用を調べるため、落合水再生センターの下水処理水及び下水処理水が流入した後の神田川の河川水を用いて、メダカ及びコイの曝露試験を行った。メダカ試験では30～33日間の曝露を計3回行い、コイ試験では858日間の連続曝露を行った。メダカ試験では下水処理水で曝露した雄30尾の生殖腺を観察したところ1尾に精巣卵が認められたが、河川水で曝露した雄30尾には精巣卵が認められなかった。陽性対照として100ng/ℓの17β-エストラジオール(E2)に曝露した雄30尾のうち19尾に精巣卵が認められた。コイ試験では河川水で曝露した雄17尾の生殖腺を観察したところ、外観的な異常及び精巣卵を含めた組織的な異常は認められなかった。試験に用いた下水処理水及び河川水のE2濃度は0.9～3.4ng/ℓであり、エストロゲン作用強度(E2濃度換算)は2.1～8.2ng/ℓであった。これらの結果から、試験に用いた下水処理水及び河川水のエストロゲン濃度では、魚類雄の生殖腺に精巣卵を発現させる可能性は低いと推測された。

キーワード：内分泌かく乱物質（環境ホルモン）、下水処理水、メダカ、コイ、生殖腺、精巣卵、ビテロゲニン

Study on Endocrine Disrupters in metropolitan rivers and Tokyo Bay (5) — Influence on Fishes Gonad by Inflow of Sewage Treatment Water —

TAKEUCHI Takeshi, WANAMI Kazuo, KAWAI Toshio,
MIYASHITA Takehiro *
* Associate researcher

Summary

To examine the endocrine disrupters action on the fishes male with the sewage treatment water, we did the exposure examination of the medaka (*Oryzias latipes*) and carp (*Cyprinus carpio*). In the medaka examination, we observed gonad of 30 fish exposed by the sewage treatment water and confirmed a testis-ova from one, but could not confirmed from 30 fish exposed by river water. In the carp examination, we observed gonad of 17 fish exposed by river water, externals abnormality and histology abnormality including a testis-ova were not able to be confirmed. The intensity of estrogenic activity (17β-estradiol equivalence) of the sewage treatment water and river water used for the examination was 2.1～8.2 ng/ℓ. From

these results, in the estrogen concentration of these water, it was guessed that the possibility of making a testis-ova appear to the gonad of the fishes male was low.

Keywords : endocrine disrupters, sewage treatment water, medaka, carp, gonad, testis-ova, vitellogenin

1 はじめに

当研究所では、都内水域における環境ホルモンに関する研究を1998年度から取り組んでいる。1998年度から2001年度までは多摩川を中心とした河川域を、2002年度からは東京湾運河部を中心とした沿岸域を調査地点とし、調査地点に生息する魚類の生殖腺異常及びその原因とされる内分泌かく乱化学物質の挙動等について調査を行ってきた。その結果、内分泌かく乱化学物質のうち、魚類の生殖腺に異常を引き起こす可能性の高い物質は天然のエストロゲン（女性ホルモン）であり、そのほとんどは下水処理場から排出されていることが明らかになった^{1, 2)}。下水処理水と魚類の生殖腺異常との関係をさらに明確にするため、既報¹⁾の結果からコイの精巣異常の割合が他河川よりも高かった神田川を調査対象とし、河川水及び東京都下水道局・落合水再生センター（以下、落合処理場）の放流水で魚類を一定期間飼育した。曝露試験終了後に生殖腺等の観察を行ったが、その結果について報告する。

2 方法

(1) メダカの曝露試験

ア 試験魚及び飼育環境

都内養魚場から購入し、当研究所内で累代飼育した

メダカ (*Oryzias latipes*) 改良品種（一般にヒメダカ）で、孵化後3ヵ月以上の雄成魚を用いた。雌雄の判別は背鰭及び尻鰭等の形態を外観から観察することにより行い、形態的に雄と判断できる個体のみを選別し試験に用いた。飼育は室温24℃±1℃、光周期16時間明：8時間暗になるように制御した実験室内で、接着剤を用いない総ガラス製の角型水槽及びガラス製ビーカーを用いた。活性炭ろ過した水道水をホーロー製水槽に貯水して曝気した水を飼育水とし、試験期間以外は適宜換水した。給餌は1日2回、孵化後24時間以内のブラインシュリンプ幼生を5分程度で食べ尽くす量を与えた。

イ 試験区の設定、採水及び試水の保存

曝露試験には、次の試験区を設定した。

- ① 対照区（活性炭ろ過した水道水）
- ② 陽性対照区（活性炭ろ過した水道水に、アセトンで溶解した17β-エストラジオール（和光純薬工業 株製、生化学用）を試験水量に対して100ng/lの濃度になるように添加したもの）
- ③ 下水処理水区（塩素滅菌後で放流前の高度処理水）
- ④ 河川水区（下水処理水流入後の河川の表層水）

採水地点は図1に示す。下水処理水は落合処理場の急速ろ過池から、河川水は旧・東京都神田川水質汚濁



図1 調査地点

常時監視室（以下、神田川測定室）の前から神田川の表層水を採水した。採水はステンレス製バケツで行い、ポリエチレン製 20 ℓ タンクを用いて実験室に運搬した。運搬後は速やかに容量 5 ℓ のガラス製ビーカーに分注し、曝露試験に用いるまで 3℃ の冷蔵庫内で保存した。なお、下水処理水及び河川水の採水は原則的に週 1 回行い、9 日以上保存した試験水は曝露に用いなかった。

ウ 曝露試験

試験は 2004 年 6 月～7 月（夏季 1 回目、33 日間）及び 8 月～9 月（夏季 2 回目、30 日間）、2005 年 1 月～2 月（冬季、30 日間）の計 3 回行った。前述した環境に制御した実験室内で、各試験区ともに容量 5 ℓ 強のガラス製角型水槽に試験水 5 ℓ と試験魚 10 尾を入れた（写真 1）。

試験は半止水式で 24 時間毎に試験水を全量換水し、換水の前後に pH 及び DO の測定を行った。給餌は換水の約 2 時間前と約 6 時間後の 1 日 2 回、孵化後 24 時間以内のブラインシュリンプ幼生を 5 分程度で食べ尽くす量を与えた。

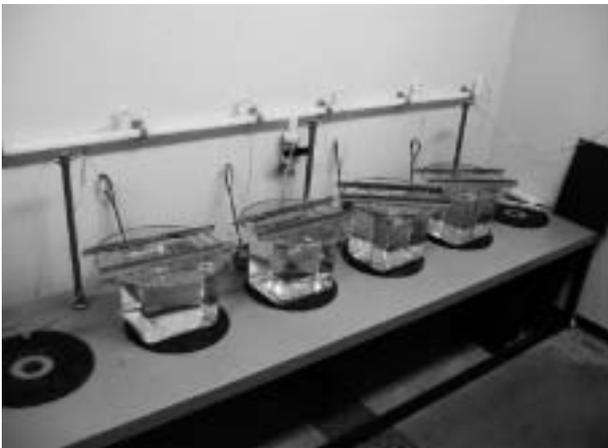


写真 1 メダカ曝露試験水槽

エ 計測及び生殖腺組織の観察

曝露試験終了後、全ての試験魚はブアン氏固定液に漬け込み、その後 70 % エタノールに入れ替えて保存した。次いで試験魚の全長及び体重を測定し、常法に従って脱水しパラフィンで包埋した。これを厚さ 7 μm に薄切りにし、スライドガラスに貼り付けて乾燥した後にヘマトキシリンとエオシンの二重染色を施した。顕微鏡で精巣組織を観察し、生殖細胞の発達状況及び構造、組織の変性、精巣卵の有無等を記録した。

(2) コイの曝露試験

ア 試験魚及び飼育環境

神田川測定室内に容量 1 m³ (90 × 180 × 70 cm) と容量 0.26 m³ (60 × 90 × 50 cm) の 2 つの水槽を設置し（写真 2）、容量 1 m³ の水槽（以下、A 水槽）には水中ポンプで汲み上げた神田川の表層水を、容量 0.26 m³ の水槽（以下、C 水槽）には脱塩素した水道水をそれぞれ注水した。室内は空調及び照明の制御は特に行わず、外部環境の影響を受けるままに飼育した。また、当研究所屋外に容量 1 m³ (90 × 180 × 70 cm) の水槽を設置して（以下、環研水槽）、脱塩素した水道水を注水した。酸素欠乏及び水質悪化を防止するため、各水槽ともに簡易的な水中ろ過器とエアレーションを施した。試験魚は茨城県北浦で養殖されたコイ (*Cyprinus carpio*) の稚魚で、A 水槽に 35 尾、C 水槽に 15 尾、環研水槽に 15 尾をそれぞれ収容した。



写真 2 コイ曝露試験水槽

イ 曝露試験

試験は 2002 年 11 月 8 日から開始し、環研水槽では 2005 年 2 月 21 日までの 837 日間、A 水槽及び C 水槽では 2005 年 3 月 14 日までの 858 日間行った。A 水槽では神田川内に設置した水中ポンプ（最大吐出量 80 ℓ/分）2 台で 1 日 4 回の注水換水を行い、C 水槽では水量の 2/3 程度の換水を 3～10 日おきに行った。また、環研水槽でも水量の 2/3 程度の換水を 7～14 日おきに行った。なお、C 水槽及び環研水槽の換水には、脱塩素した水道水を使用した。

飼料は茨城県北浦の養魚場で使用されているものと同じコイ育成用の配合飼料（中部飼料株式会社製しらは 2 号、成分：粗タンパク質 34.0 % 以上、粗脂肪 3.0 % 以上、粗繊維 4.0 % 以下、粗灰分 15.0 % 以下）で、A 水槽及

びC水槽では自動給餌器により1日2回、環研水槽では試験魚の摂餌行動を観察しながら1日0～2回、それぞれ適量を与えた。また、試験魚と同じ養魚場（茨城県北浦）で同じ時期に孵化したコイの稚魚22尾（以下、北浦産）及び大阪府の養魚場で養殖されたコイの稚魚26尾（以下、大阪府産）を入手し、比較対照群として測定及び分析に用いた。

ウ 計測及び採血方法

曝露試験終了後（北浦産及び大阪府産は入手後）、試験魚の全長及び体長、体重を測定し、外観異常の有無を記録した。また、尾部血管から注射器を用いて採血し、10 ml容量の血漿分離用スピッツ管に入れ、ビテロゲニン濃度測定用の試料とした。採血後の魚類及び血液試料は、保冷しながら実験室に搬入した。血液試料は採血後8時間以内に遠心分離（4℃、3,000rpm×20分）し、血漿を分離した。血漿は0.5 ml容量のマイクロチューブに分注後、直ちに-35℃の冷凍庫に収納し、ビテロゲニン濃度の測定に供するまで凍結保存した。

エ ビテロゲニンの測定

ビテロゲニン濃度の測定は、コスモ・バイオ製の「ビテロジェニンSRIDプレートキット（コイ科）」及び株トランスジェニック製の「コイ ビテロジェニンELISAキット」を用いた。試料はSRIDキット（検出下限9.8 µg/ml）で高濃度のスクリーニングを行い、同キットで検出されなかった試料については検出感度の高いELISAキット（検出下限39ng/ml）を用いて再度測定した。

オ 雌雄の判定及び生殖腺の観察

試験魚の解剖を行い、生殖腺の外観観察により雌雄の判定及び生殖腺の状態を記録した。外観観察から雌雄の判定が明確でない個体については、顕微鏡を用いた組織学的な観察から雌雄を判定した。生殖腺は全体を摘出後、付着している脂肪組織等を取り除き、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場合は全組織を採取し、大きい場合には厚さ5～10 mm程度に横断した組織片を複数個採取した。これらの組織標本用試料をブアン氏固定液に漬け込み、その後70%エタノールに入れ替えて保存した。組織標本用試料は、常法に従って脱水しパラフィンで包埋した。これを厚さ7 µmに薄切り

にし、スライドガラスに貼り付けて乾燥した後にヘマトキシリンとエオシンの二重染色を施した。顕微鏡で生殖腺組織を観察し、生殖細胞の発達状況及び構造、組織の変性、精巣卵の有無等を記録した。

(3) 水質分析

A水槽及びC水槽、神田川の表層水、落合処理場の放流水及び塩素滅菌前の処理水を採水し、エストロゲン及びBOD、COD、窒素、リン等の一般項目についての分析を行った。採水は原則的に月1回行い、曝露試験期間中は試験水を採水することを行った。落合処理場の放流水の採水については、試験期間中では場内で行ったが、試験期間外は場外の放流口（暗渠出口）から行った。採水はステンレス製バケツで行い、ポリエチレン製1ℓびんを用いて保冷しながら運搬した。エストロゲンの分析については、既報³⁾の図1で示したフローに従って試料の濃縮を行った。その後、日本エンバイロケミカルズ株製のELISAキットを用いて、エストロン及び17β-エストラジオールの分析を行った。一部の試料については、外部委託によりLC-MS/MS法でエストロン及び17β-エストラジオール、エストリオール、エチニルエストラジオールの分析を行った。また、一般項目については工場排水試験方法JIS-K0102に従って分析し、窒素及びリンの分析にはオートアナライザー（BRAN LUEBBE製TRAACS800）を用いた。

3 結果

(1) メダカの曝露試験

2004年6月17日から7月20日までの33日間曝露した結果を表1の上段に、2004年8月25日から9月24日までの30日間曝露した結果を中段に、2005年1月19日から2月18日までの30日間曝露した結果を下段に示す。

対照区のpHは6.8～8.2（平均7.4）、陽性対照区は6.9～8.3（平均7.5）、下水処理水区は6.1～7.8（平均7.1）、河川水区は7.0～8.7（平均7.3）であった。また、対照区のDOは2.3～8.6 mg/ℓ（平均7.0 mg/ℓ）、陽性対照区は1.8～8.5 mg/ℓ（平均6.5 mg/ℓ）、下水処理水区は2.2～11.0 mg/ℓ（平均7.2 mg/ℓ）、河川水区は2.0～10.8 mg/ℓ（平均7.3 mg/ℓ）であった。換水直前のDOが4 mg/ℓ以下になることが対照区で1日、陽性対照区で22日、下水処理水区

表 1 メダカ曝露試験の結果

		対照区	陽性対照区	下水処理水区	河川水区
夏季 1 回目 曝露試験 (2004/6月~7月)	全長 (mm)	31 (最大) 34 (最小) 30	30 (最大) 33 (最小) 28	32 (最大) 39 (最小) 29	30 (最大) 37 (最小) 26
	体重 (g)	0.29 (最大) 0.33 (最小) 0.25	0.27 (最大) 0.34 (最小) 0.22	0.31 (最大) 0.48 (最小) 0.22	0.27 (最大) 0.49 (最小) 0.20
	精巣卵 出現個体(尾)	0/10	6/10	0/10	0/10
夏季 2 回目 曝露試験 (2004/8月~9月)	全長 (mm)	31 (最大) 33 (最小) 28	29 (最大) 33 (最小) 27	30 (最大) 33 (最小) 25	30 (最大) 32 (最小) 28
	体重 (g)	0.27 (最大) 0.37 (最小) 0.21	0.24 (最大) 0.32 (最小) 0.19	0.23 (最大) 0.30 (最小) 0.14	0.24 (最大) 0.27 (最小) 0.20
	精巣卵 出現個体(尾)	0/10	10/10	1/10	0/10
冬季 曝露試験 (2005/1月~2月)	全長 (mm)	30 (最大) 32 (最小) 28	30 (最大) 33 (最小) 29	30 (最大) 32 (最小) 28	30 (最大) 32 (最小) 28
	体重 (g)	0.26 (最大) 0.30 (最小) 0.22	0.28 (最大) 0.32 (最小) 0.23	0.25 (最大) 0.28 (最小) 0.21	0.26 (最大) 0.29 (最小) 0.22
	精巣卵 出現個体(尾)	0/10	3/10	0/10	0/10

で7日、河川水区で4日あったが、試験魚の行動その他に異常は認められなかった。DO低下の原因として給餌過多が考えられたため、給餌量を減らして対処した。

夏季1回目の曝露試験中、下水処理水区の試験魚1尾が死亡した。死亡した個体は曝露開始18日目から尾鰭の損傷が進行し、22日目で死亡した。異常が認められた時期の水温、pH、DOはそれぞれ良好であり、他の試験魚の行動その他に異常は認められなかったことから、下水処理水による曝露が死亡の直接的な原因である可能性は極めて低いと思われる。また、夏季2回目及び冬季の曝露試験では死亡は見られず、試験開始から終了まで全個体が生存した。

試験魚の生殖腺を顕微鏡で観察した結果、陽性対照区の夏季1回目で10尾中6尾、夏季2回目で10尾

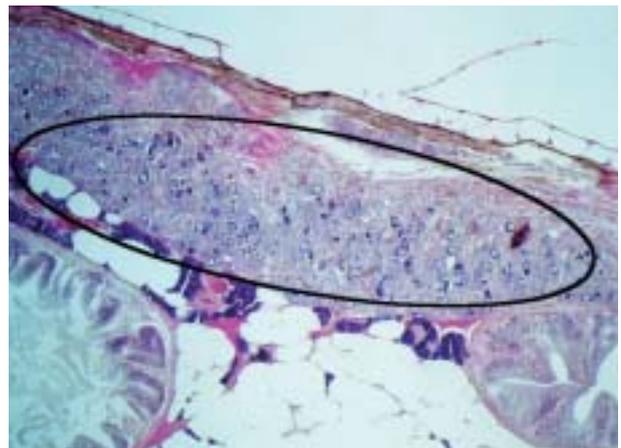


写真4 精巣卵 (顕微鏡倍率 100 倍)
陽性対照区 体長 28 mm、体重 0.22 g
発達途中の精巣卵 (円内の紫色に縁取られた細胞) が多数見られる

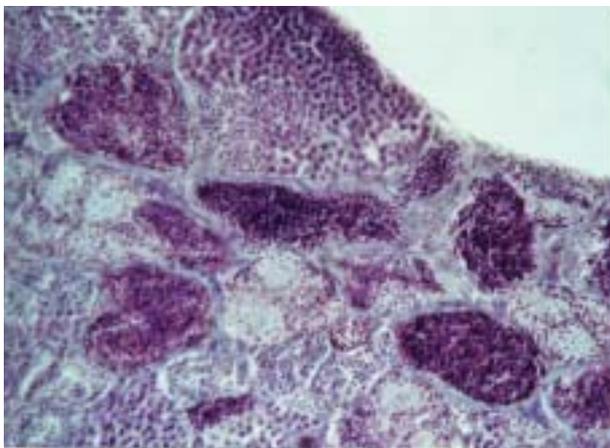


写真3 正常な精巣組織 (顕微鏡倍率 400 倍)
対照区 体長 33 mm、体重 0.37 g
精巣組織全体にわたって、活発な精子形成が見られる

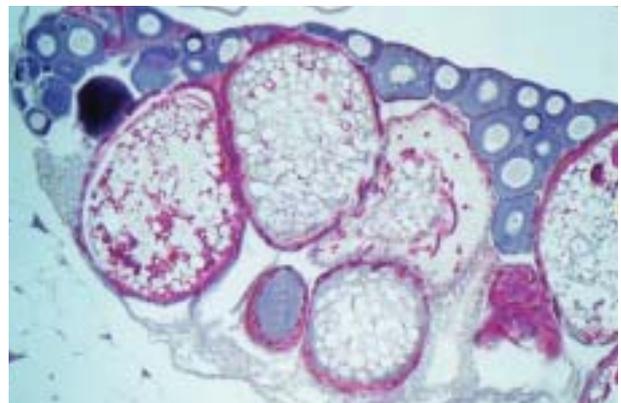


写真5 精巣卵 (顕微鏡倍率 400 倍)
下水処理水区 体長 29 mm、体重 0.25 g
大きく発達した精巣卵

中 10 尾、冬季で 10 尾中 3 尾に精巣卵が認められた。
 また、夏季 2 回目の下水処理水区では、10 尾中 1 尾
 に精巣卵が認められた。精巣卵が確認された 20 尾以
 外の試験魚については、生殖腺組織の異常は認められ
 なかった（写真 3～5）。

(2) コイの曝露試験

ア 試験魚の計測

試験魚の全長及び体重、生殖腺重量等の測定結果を
 表 2 及び表 3 に示す。魚体の外観観察では環研水槽の
 雌 1 尾に尾部が湾曲する変形が見られたが、その他の
 個体に異常は認められなかった。試験魚の雄と雌との

表 2 雄魚の魚体計測とビテロゲニンの測定

	検体 番号	魚体計測							ビテロゲニン	
		性別	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	肥満度	生殖腺 重量(g)	GSI (%)	SRID測定値 (μ g/ml)	ELISA測定値 (ng/ml)
A水槽 (17尾)	A-1	♂	365	291	568.3	116.9	29.0	5.1	ND	ND
	A-2	♂	262	209	235.9	131.2	5.3	2.2	ND	76
	A-5	♂	262	214	258.2	143.6	20.2	7.8	ND	3300
	A-12	♂	292	231	303.8	122.0	6.5	2.1	79	
	A-13	♂	299	231	336.4	125.8	3.6	1.1	ND	ND
	A-15	♂	317	251	481.6	151.2	16.9	3.5	ND	ND
	A-16	♂	327	256	424.3	121.3	18.2	4.3	ND	2400
	A-18	♂	337	272	509.0	133.0	19.2	3.8	14	
	A-24	♂	288	227	299.3	125.3	13.4	4.5	ND	2
	A-26	♂	299	238	358.6	134.2	9.7	2.7	ND	6700
	A-27	♂	343	270	460.2	114.0	25.4	5.5	ND	14
	A-28	♂	321	252	479.3	144.9	18.8	3.9	ND	ND
	A-30	♂	305	245	360.0	126.9	13.5	3.8	26	
	A-32	♂	300	239	319.0	118.1	7.8	2.4	ND	22000
	A-33	♂	285	225	284.9	123.1	19.5	6.8	ND	340
A-34	♂	312	246	419.6	138.2	15.2	3.6	ND	6500	
A-35	♂	321	260	440.8	133.3	34.3	7.8	ND	ND	
	平均		308	245	384.7	129.6	16.3	4.2		
C水槽 (6尾)	C-1	♂	205	160	108.0	125.4	3.7	3.4	1432	
	C-2	♂	221	182	157.4	145.8	7.2	4.6	414	
	C-3	♂	204	164	113.7	133.9	3.5	3.1	518	
	C-12	♂	210	161	103.7	112.0	3.1	3.0	54	
	C-14	♂	190	148	85.5	124.7	2.2	2.6	30	
	C-15	♂	178	140	69.0	122.3	2.8	4.1	132	
	平均		201	159	106.2	127.3	3.8	3.4		
環研水槽 (7尾)	カ-1	♂	298	239	362.8	137.1	14.3	3.9	207	
	カ-2	♂	264	204	253.6	137.8	1.9	0.7	723	
	カ-3	♂	206	162	113.2	129.5	1.8	1.6	691	
	カ-4	♂	232	182	161.0	128.9	5.1	3.2	102	
	カ-7	♂	242	192	204.4	144.2	3.2	1.6	96	
	カ-9	♂	260	206	261.8	149.0	4.9	1.9	562	
	平均		250	197	222.6	137.0	5.1	2.2		
北浦産 (12尾)	北-1	♂	344	277	559.0	137.3	18.2	3.3	ND	524
	北-3	♂	363	297	780.0	163.1	19.1	2.4	ND	225
	北-4	♂	366	297	618.0	126.1	15.7	2.5	ND	25
	北-6	♂	344	280	676.0	166.1	38.4	5.7	ND	307
	北-8	♂	361	296	748.0	159.0	25.5	3.4	ND	25
	北-11	♂	372	304	795.0	154.4	35.9	4.5	ND	121
	北-12	♂	364	293	658.0	136.4	18.3	2.8	ND	415
	北-13	♂	368	296	666.0	133.6	14.9	2.2	ND	27
	北-14	♂	354	285	628.0	141.6	15.1	2.4	ND	35
	北-15	♂	359	290	733.0	158.4	33.7	4.6	ND	91
	北-17	♂	351	287	631.0	145.9	16.4	2.6	ND	67
	北-21	♂	346	274	635.0	153.3	31.7	5.0	ND	60
	平均		358	290	677.3	147.9	23.6	3.5		
大阪府産 (7尾)	サ-8	♂	245	191	187.1	127.2	2.0	1.1	ND	ND
	サ-12	♂	241	189	160.5	114.7	4.5	2.8	ND	ND
	サ-17	♂	219	175	154.4	147.0	1.5	1.0	ND	
	サ-19	♂	257	198	169.4	99.8	3.8	2.2	ND	ND
	サ-21	♂	267	209	215.2	113.1	5.2	2.4	ND	ND
	サ-23	♂	255	203	181.7	109.6	2.8	1.5	ND	ND
	サ-26	♂	239	189	173.6	127.2	1.2	0.7	ND	ND
	平均		246	193	177.4	119.8	3.0	1.7		

肥満度: $\text{体重}/(\text{全長})^3 \times 10^7$
 GSI(生殖腺指数): $\text{生殖腺重量} \times 100/\text{体重}$

表3 雌魚の魚体計測

		全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	肥満度	生殖腺 重量(g)	GSI (%)
A水槽 (18尾)	最大	392	316	854	159.8	98.9	15.1
	最小	231	178	176.5	106.8	1.2	0.6
	平均	305	241	401.1	135.3	27.5	6.1
C水槽 (9尾)	最大	226	179	148.7	143.5	17.2	11.6
	最小	198	155	95.5	114	0.2	0.2
	平均	215	167	125.6	125.1	4.6	3.4
環研水槽 (8尾)	最大	292	232	335.8	144.4	16.2	8.3
	最小	210	165	111	115.6	0.9	0.6
	平均	254	199	223.3	132.6	7.7	3.3
北浦産 (10尾)	最大	398	317	874	154.5	8.7	0.2
	最小	316	269	460	128.6	1.3	1.0
	平均	368	300	709	141.4	4.4	0.6
大阪府産 (19尾)	最大	274	223	258.6	165.1	2.6	1.5
	最小	232	181	154.2	111.5	0.6	0.4
	平均	248	197	194.5	128.1	1.4	0.7

比率は、A水槽 1 : 1.1、C水槽 1 : 1.5、環研水槽 1 : 1.1、北浦産 1 : 0.8、大阪府産 1 : 2.7であった。北浦産以外は雌の方が多く、特に大阪府産では3倍近くも雌が多かった。大阪府産は、同じ飼育群の中でも比較的大きな個体を選別して入手した。コイでは雄魚よりも雌魚の方が成長が早いことが知られており、結果的に大きな個体を選別したことにより雌魚が多くなったと考えられる。

イ ビテロゲニンの測定

雌魚の血中ビテロゲニン濃度の測定結果を表2に示す。

A水槽では17尾中12尾、C水槽では6尾中6尾、環研水槽では7尾中7尾にビテロゲニンが検出された。表中の検体番号A-24、A-27及び北-4、北-8、北-13、北-14はELISA法での検出下限(39ng/ml)以下のビテロゲニン濃度ではあったが、全く検出されなかった個体と区別するために測定値を示した。雄魚のビテロゲニン濃度はC水槽及び環研水槽で高い傾向が見られ、C水槽では54~1,432 μg/ml、環研水槽では96~723 μg/mlであった。一方、大阪府産では雌雄ともにビテロゲニンが検出されなかった。一般的に雄コイは満2年、雌コイは満3年で成熟する⁵⁾が、大阪府産は孵化後約2年であった。大阪府産は雌雄ともに成熟していないため、ビテロゲニンが検出されなかったものと思われる。

ウ 生殖腺の観察

既報¹⁾の判定基準を用いて、生殖腺の外観及び組織学的な観察を行った。外観観察では、生殖腺全体が極端に小さい個体(C水槽・雌)と片側の生殖腺が欠損している個体(大阪府産・雌)がそれぞれ1尾ずつ認められたが、既報^{1,4)}で報告されたような著しい異常は認められなかった。その他の試験魚については、外観的な異常は認められなかった。また、他の試験群と比較すると大阪府産の生殖腺は小さかった。前述したと

表4 エストロゲンと一般項目の水質分析結果

調査地点 及び調査日			エストロゲン						一般項目							
			ELISA法(ng/L)				LC/MS/MS法(ng/L)		水温 (°C)	電気 伝導度 (ms/cm)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	T-N (mg/L)	NH4-N (mg/L)	TP (mg/L)	
			エストロゲ ン(ES)	エストロン (E1)	17β-エスト ラジオール (E2)	2成分のエ ストロゲン 作用強度	エストロン	17β-エスト ラジオール								2成分のエ ストロゲン 作用強度
コイ暴露 試験	A水槽	6/23	13.2	9.2	4.0	6.5	---	---	25.7	0.40	---	11.5	9.93	0.29	1.07	
		1/26	19.3	15.6	3.7	7.9	6.87	1.24	3.1	13.6	3.23	7.3	11.1	12.55	2.35	1.18
		2/9	15.4	13.2	2.2	5.8	2.83	0.61	1.4	12.6	8.36	7.6	10.5	13.14	0.90	2.99
	C水槽	6/23	14.5	13.3	1.2	4.8	---	---	---	25.2	0.29	---	5.9	16.30	0.95	4.40
		1/26	2.8	1.9	0.9	1.4	1.81	0.36	0.8	8.3	0.34	4.8	6.9	9.14	0.26	2.04
		2/9	5.1	3.9	1.2	2.2	2.07	0.44	1.0	7.7	0.37	2.5	4.7	12.38	---	2.32
神田川 河川水	6/23	19.1	16.0	3.1	7.4	---	---	---	26.3	0.41	---	7.7	10.00	0.20	1.07	
	1/26	21.1	17.7	3.4	8.2	5.51	0.56	2.0	14.7	2.58	2.5	9.9	10.18	2.95	1.11	
	2/9	11.7	10.0	1.7	4.4	3.30	0.51	1.4	13.3	3.50	1.4	6.7	12.55	0.51	0.95	
落合 処理場	放流水	6/23	11.5	10.3	1.2	4.0	---	---	---	26.7	0.43	---	6.7	10.48	0.07	1.30
		8/24	13.2	11.0	2.2	5.2	---	---	---	27.4	0.40	1.5	8.1	9.42	0.09	1.14
		9/1	13.6	11.6	2.0	5.1	---	---	---	27.5	0.42	0.4	6.5	9.51	0.06	1.14
		9/9	11.4	9.5	1.9	4.5	---	---	---	27.4	0.41	1.7	6.3	9.59	0.06	1.26
		9/15	13.4	12.1	1.3	4.6	---	---	---	27.7	0.43	1.8	7.4	---	---	---
		1/26	15.7	13.7	2.0	5.7	2.81	0.29未満	1.0未満	14.8	0.37	2.9	8.3	10.91	0.67	1.21
		2/9	5.5	4.6	0.9	2.1	0.29未満	0.29未満	0.4未満	17.1	0.51	1.1	1.3	12.70	0.06	1.10
	滅菌前	6/23	29.6	20.9	8.7	14.3	---	---	---	26.2	0.44	---	8.7	11.38	0.15	1.39
		1/26	21.8	17.6	4.2	8.9	7.18	0.85	2.8	14.1	0.38	9.1	14.3	13.54	3.49	1.40

* E1=ES-E2

* 2成分のエストロゲン作用強度 = E1 × 0.27 + E2

おり、大阪府産は雌雄ともに成熟していないため、生殖腺も小さかったのだと思われる。

組織学的な観察では、雌雄ともに既報^{1,4)}で報告されたような生殖腺の組織異常は認められなかった。

(3) 水質分析

エストロゲン及び一般項目の測定結果を表4に示す。また、一般項目については、2004年4月から2005年3月までの平均値を表5に示す。表中の2成分のエストロゲン作用強度は、既報³⁾の比活性値を用いて17β-エストラジオール（以下、E2）で換算した。

ELISA法による2成分のエストロゲン作用強度は、A水槽で5.8～7.9ng/l、C水槽で1.4～4.8ng/l、河川水で4.4～8.2ng/l、落合処理場の放流水で2.1～5.7ng/lであった。LC-MS/MS法による同作用強度は、A水槽で1.4～3.1ng/l、C水槽で0.8～1.0ng/l、河川水で1.4～2.0ng/l、落合処理場の放流水で0.4～1.0ng/l未満であった。また、LC-MS/MS法によるエストジオール及びエチニルエストラジオール濃度は、全ての試料で検出限界（0.31ng/l）以下であった。

表5 一般項目の水質分析結果（平均値）

調査地点		水温(°C)	電気伝導度 (ms/cm)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	T-N (mg/L)	NH4-N (mg/L)	TP (mg/L)
神田川	A水槽	20	2.251	6.7	12.5	11.09	0.78	1.36
	C水槽	18.1	0.331	3.1	7.2	14.39	0.71	3.71
	河川水	20.2	1.471	2.8	8.7	9.78	0.67	0.89
落合処理場	放流水	22.8	0.433	2.6	7.9	10.26	0.27	1.07
	減菌前	23.6	0.442	4.0	10.8	11.64	0.68	1.26

4 考察

(1) 精巣卵の出現

ある時期の遺伝的な雄にエストロゲンを曝露すると、機能的な雌に容易に転換することが多くの魚類で知られている。塩田ら⁶⁾は、孵化直後のメダカを100ng/lのE2に30日間曝露することにより、遺伝的な雄を機能的な雌にほぼ完全に転換できることを明らかにした。林ら⁷⁾は、16ng/lのE2に受精卵から連続して曝露することで、メダカ雄魚に精巣卵が発現することを明らかにした。精巣卵とは精巣の中に卵母細胞が発現する現象で、エストロゲン作用を示すパラメーター

として考えられている⁸⁾。

今回のメダカ曝露試験では稚魚よりも感受性の低いと思われる成魚を使用した。陽性対照区では30尾中19尾で精巣卵が認められた。しかし、下水処理水区では30尾中1尾、河川水区では30尾中0尾という結果であった。コイ曝露試験では、河川水に曝露したA水槽の雄魚17尾全てに精巣卵等の生殖腺異常は認められなかった。曝露に用いた試験水のE2濃度（ELISA法）は、下水処理水0.9～2.2ng/l、河川水1.7～3.4ng/l、A水槽2.2～4.0ng/lであった。萩野⁹⁾はE2によるメダカの性転換試験を実施したところ、32ng/lでは30%の個体に精巣卵が確認されたが、10ng/lでは精巣卵が確認できなかったと報告している。これらのエストロゲン濃度と精巣卵発現の関係から推測すると、現時点での落合処理場の放流水に含まれるエストロゲン濃度では、雄魚の生殖腺に精巣卵を発現させる可能性は低いと思われる。

(2) 雄魚のビテロゲニン

ビテロゲニンとは、エストロゲンの作用により肝臓で産生される雌特有の卵黄タンパク前駆物質である。通常、ビテロゲニンの産生は雌に限られるが、雄にエストロゲンを投与するとビテロゲニンが産生される。また、環境中に存在するエストロゲン様物質によっても産生される。つまり、雄魚にビテロゲニンが検出された場合、エストロゲンやエストロゲン様物質に曝露された可能性が高いと考えられる¹⁰⁻¹²⁾。今回の試験に用いた雄コイからもビテロゲニンが検出されており、特に脱塩素水で飼育した対照群（C水槽及び環研水槽）では全ての雄魚から30～1,432 μg/mlという高濃度のビテロゲニンが検出された。

エストロゲン濃度が低い脱塩素水で飼育した対照群にビテロゲニンが検出された理由として、次の二つのことが考えられる。一つは、同居する雌魚の影響である。外観からの観察でコイの雌雄を判別することは極めて難しいため、本研究では雌雄を区別することなく同居させて試験を行った。比較的狭い水槽内で雌雄を同居させた場合、雌魚から排泄された直後の高濃度のエストロゲンに雄魚が至近距離で曝露することが推測される。エストロゲン濃度が低い対照群の雄魚でビテロゲニンが検出された理由として、同居する雌魚の影響を受けた可能性が考えられる。もう一つは、飼料に含まれる植物エストロゲンの存在である。試験魚に給

餌した飼料には大豆が使われているが、その大豆には植物エストロゲンが多量に含まれている。植物エストロゲンを含む飼料により血中のビテロゲニン濃度が高い値を示すことが予測される¹²⁾が、原ら¹¹⁾の実験でも対照群とした雄コイにビテロゲニンが検出され、飼料中の植物エストロゲンの影響と結論付けている。これらと同様に、今回の試験でも飼料中の植物エストロゲンが関与している可能性が考えられる。しかし、C水槽等と共通の飼料を給餌した北浦産・雄コイのビテロゲニン濃度は0.025～0.524 $\mu\text{g/ml}$ で、C水槽等と比較すると極めて低い濃度であった。共通の飼料を給餌したにもかかわらずビテロゲニン濃度に大きな差異が現れたのは、植物エストロゲンの関与よりも飼育環境の影響の方が大きいことを示唆している。植物エストロゲンの関与がないとは言えないが、北浦産との比較から判断するとその影響はさほど大きいとは言えない。すなわち、脱塩素水で飼育した対照群（C水槽及び環研水槽）で高濃度のビテロゲニンが検出されたのは、同居する雌魚からの影響を受けたことが最大の要因だと推定される。なお、最近の研究結果では、成熟して繁殖期を迎えた雄コイのビテロゲニン濃度が上昇することが知られており、あるレベルまでの上昇は異常ではないのかもしれないとの報告¹²⁾もある。エストロゲン様物質の曝露指標としてビテロゲニン濃度を用いる場合には、以上のことを考慮する必要がある。植物エストロゲンの関与や雌魚の影響等と同様に、魚類の生理機構を再検証することは今後の検討課題でもある。

(3) 雄魚の生殖腺異常

1998年度から99年度に神田川で採捕したコイの精巢を観察したところ、調査した雄魚（70尾）の17%（12尾）に異常が認められた¹⁾。しかし、今回の試験では精巢異常のある個体は認められなかった。国土交通省¹³⁾の調査では、1998年から2001年の4年間に全国で採捕した346尾の雄コイを観察したところ、精巢に異常がある個体は12%（41尾）という結果であった。水中の内分泌かく乱化学物質の測定結果とこれらの結果を検討したところ、精巢に異常を生じさせた原因は不明としながらも、内分泌かく乱化学物質の影響以外にも生息環境や加齢に伴う老化等も原因として考えられると指摘している。一般的に生物は加齢に伴って病気等が発症する可能性が増大するが、今回の試

験では生後2年10ヵ月程度の比較的若いコイを用いているため、そのリスクは小さいと考えられる。また、自然下でのコイは、餌料となる底生動物等を砂泥とともに摂餌している。砂泥中に蓄積された化学物質を餌料とともに取り込むことで、病気等を発症する可能性があることも考えられる。今回の試験で雄魚の生殖腺に異常が生じなかったのは、年齢及び生息環境、飼料等の条件が良好であったことが考えられる。これらの生殖腺異常の原因を明らかにするためには、今後さらなる調査研究が必要である。

5 おわりに

魚類における内分泌かく乱作用を評価する場合、OECDのガイドラインでは①全体的な形態観察（生殖腺指数と第二次性徴の消長を含む）及び②ビテロゲニン濃度の測定、③生殖腺の組織観察の3点を必須の評価基準として位置付けている⁷⁾。そして、生殖腺の組織観察の中でも、特に精巣での卵母細胞（精巣卵）の発現が重要である¹⁴⁾と考えられている。

内分泌かく乱化学物質と魚類の生殖腺異常との関係は、未だ解明されていない部分も多い。魚類における内分泌かく乱作用を正しく評価するためには魚類の生理機構に関する研究や野外での実態調査等を今後も継続して行い、さらなる知見の集積を進めていく必要があると思われる。

引用文献

- 1) 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、45-55、（2002）
- 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10）、東京都環境科学研究所年報、66-74、（2002）
- 3) 嶋津暉ら：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、165-175、（2000）
- 4) 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、56-65、（2000）
- 5) 細谷和海：コイ、日本の淡水魚、334-338、山と溪谷社、（1998）
- 6) 塩田勉ら：メダカFLF系統の雌化に及ぼす17 β

- エストラジオールの暴露時期及び期間の影響、東京都環境科学研究所年報、108-111、(2001)
- 7) 林彬勲ら：メダカ (*Oryzias latipes*) 精巣卵の定量的検出のための新手法 (小片化法)、水環境学会誌,26 (11)、725-730、(2003)
 - 8) 環境省：魚類を用いた生態系への内分泌攪乱作用に関する試験結果について (案)、(2002)
 - 9) 萩野哲：メダカ性転換試験法、生態影響試験ハンドブック、221-227、朝倉書店、(2003)
 - 10) 原彰彦：魚の血液で環境ホルモン汚染をみる、科学、68(7)、591-597、(1998)
 - 11) 原彰彦：内分泌攪乱物質の生態影響,廃棄物学会誌,10(4)、278-287 (1999)
 - 12) 川合真一郎：内分泌活性物質の生態影響,季刊化学総説、(50)、32-54、学会出版センター、(2001)
 - 13) 国土交通省・河川局：平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果、(2002)
 - 14) 大嶋雄治ら：内分泌攪乱試験法、生態影響試験ハンドブック、207-220、朝倉書店、(2003)