

環境ホルモンに関する魚類調査の課題

東谷 忠* 高橋明宏** 田中宏明***

1. はじめに

魚類に起きている、外因性内分泌擾乱化学物質(環境ホルモン)の問題として、オスの体内に取り込まれた化学物質が女性ホルモン(エストロゲン)のように作用し、オスをメス化させることがあげられる。1980年代からこの問題に取り組んできたイギリスでは、下水処理水に含まれているエストロン、 17β -エストラジオール(ともに天然エストロゲン)、 17α -エチニルエストラジオール(ピルの主成分である合成エストロゲン)、ノニルフェノール(工業用洗剤の分解生成物)の4物質が原因であると考えられている^{1,2)}。

自然環境における生物影響を明らかにする調査手法として、影響のレベルや範囲を把握するためのフィールド調査と、原因と考えられる物質を生物に与えて反応をみる生物影響試験(バイオアッセイ)の2つのアプローチがとられる。イギリスでは、ニジマスを用いた広範なフィールド調査と詳細なバイオアッセイによって疑わしい物質を特定した。建設省では、魚類の環境ホルモン問題が日本の河川でも起こっているのか、という疑問をきっかけとして、コイを対象としたフィールド調査に着手し、現在もこれを継続している。これまでの結果、オスに何らかの影響が表れている可能性が示されているが、その影響要因の把握には至っていない。また、都市排水のほとんど流入していない調査地点でもオスに変化が認められるなど、原因不明の現象があることも明らかとなつた。

本報では、今後実施すべきバイオアッセイに向けて、魚類生理学の観点からフィールド調査結果をみなおし、課題を抽出する。

2. 魚類影響の指標—ビテロゲニン³⁾

魚類のメス化を判断する指標として、ビテロゲニンというタンパク質が用いられている。

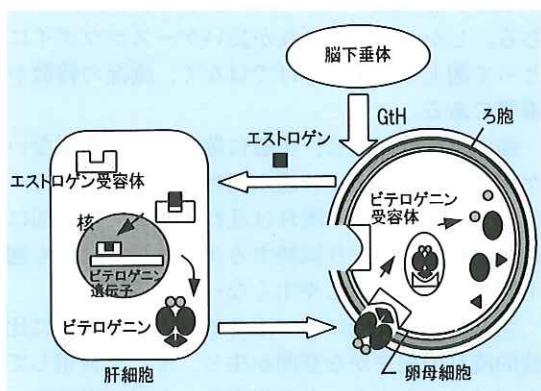


図-1 ビテロゲニンの合成模式図

この合成経路は魚類の環境ホルモン問題を考える上で重要と考えられる。

孵化した仔魚が自力でエサを摂り始めるまでの間、腹部に貯蔵された卵黄を栄養とする。この卵黄の元となるタンパク質がビテロゲニンであり、本来、メスの体内で合成され、卵に蓄えられるものである。よって、オスがビテロゲニンを作り出している場合、何らかの環境ホルモン、とくに環境エストロゲンの影響を受けていると考えられる。

ビテロゲニン合成は、まず生殖腺刺激ホルモン(GtH)が卵表面のろ胞組織に作用し、ここでエストロゲンが合成されることに始まる(図-1 参照)。エストロゲンは血中に分泌されて肝臓に運ばれ、肝細胞のエストロゲン受容体に結合する。この結合体が核内のビテロゲニン遺伝子に作用し、ビテロゲニンの合成を開始する。肝臓で合成されたビテロゲニンは血中に分泌されて卵母細胞のビテロゲニン受容体に結合し、卵内に取り込まれる。内分泌擾乱作用としては、エストロゲン様の物質がオスの肝臓に作用し、眠っていたビテロゲニン遺伝子を目覚めさせると考えられている。

3. 建設省のフィールド調査

3.1 調査内容

1998年に着手した建設省のフィールド調査「水環境における内分泌擾乱化学物質に関する実態

表-1 建設省フィールド調査の実施概要

水系	第1回 1998年11~12月		第2回 1999年5~7月	
	地点数	コイ採捕数 (オス/メス)	地点数	コイ採捕数 (オス/メス)
阿武隈川	4	9/9	4	39/23
利根川	4	20/17	4	22/20
綾瀬川	-	-	1	4/5
荒川	3	7/9	3	26/24
多摩川	4	27/28	4	43/15
荒川(北陸)	-	-	1	15/5
信濃川	3	8/9	3	36/27
庄内川	2	7/8	2	11/5
淀川	3	13/11	3	31/31
筑後川	2	20/12	2	25/22
合計	8水系 25地点	111/103	10水系 27地点	252/177

「調査」では、水質や底質の調査とともに魚類調査を実施している^{4~6)}。

魚類調査では、日本を代表する魚であり広範囲に分布していること(養殖放流を含めて)、また、ビテロゲニンの測定が可能であることを理由にコイ *Cyprinus carpio* を調査対象魚に選定した。調査の実施概要を表-1に示す。

第1回調査(98年度冬期)では8水系25地点にてオス111尾、メス103尾を採捕した。第2回調査(99年度春期)は2水系2地点を増やし、オス252尾、メス177尾を採捕して、これらのビテロゲニン濃度を測定した。

ビテロゲニンの測定結果を図-2に示す。

3.2 調査結果

オスのビテロゲニン濃度分布をみると、2回の調査とも、定量下限値 $0.039\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ に満たない個体が半数以上を占めていた。一方、ビテロゲニンを合成していると考えられるオスが存在する

ことも示された。オスでの最高検出値は、98年度冬期調査で $870\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ 、99年度春期調査では $200\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ であった。

建設省では、魚類研究者5名⁴⁾と協議した結果、コイを調べた先行事例^{7,8)}を参考にして、オスに影響が表れている可能性を示すレベルを $0.1\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ と設定した。このレベルから判断すると、オスの1/4に何らかの影響が表れているものと考えられる。この原因として化学物質による影響のほか、エサや、メスの放出するエストロゲンによる影響などの可能性が挙げられているが、実態は不明である。なお、環境ホルモンの水質・底質調査結果との明確な関連は認められなかった。

また、第2回の春期調査で追加した北陸の荒川は、都市排水がほとんど流入しておらず化学物質の影響が表れにくいと想定して追加した地点であるが、意外にも $0.1\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ を超えるオスが15個体中3個体($0.18, 0.25, 3.4\mu\text{g}/\text{血清 ml}$)確認された。

一方、メスのビテロゲニン濃度は高濃度側に分布しており、2回の調査とも、採捕個体の約60%が $1,000\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ 以上の値を示した。なお、ビテロゲニンを合成していない個体もあり、 $0.1\mu\text{g}/\text{血清 ml}$ に満たない個体はおよそ10%を占めていた。

3.3 調査結果にみられる疑問点

(1) 下水処理水によらない影響の可能性

フィールド調査を2回実施した結果、オスでは、冬期と春期で同様なビテロゲニン濃度分布をしていることが示された。これは、季節にかかわらず定常的に化学物質の影響を受けているが、すべての個体が影響を受けるほどのレベルではないということを示しているのであろうか。この場合、北陸の荒川でオスに影響を与えた化学物質は何であ

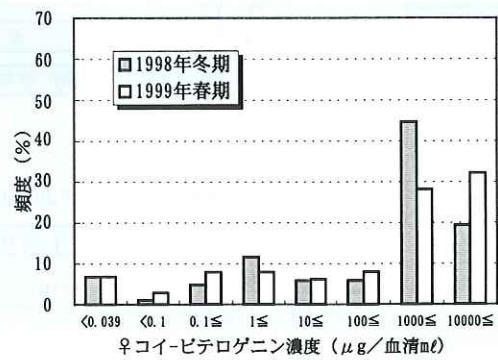
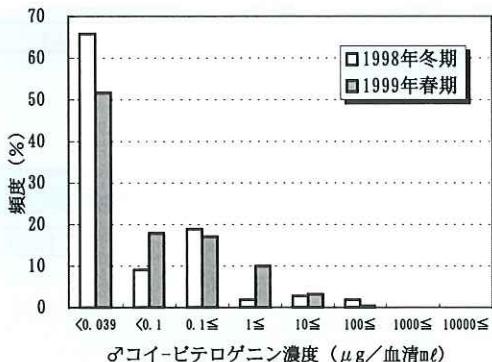


図-2 建設省フィールド調査結果(左:オス、右:メス)

ろうか。アメリカ全土の25地点で実施されたフィールド調査⁸⁾では、産卵期の後、オスのコイ275尾のうち42尾でビテロゲニン生成が確認された。しかし、特定の河川に集中していなかったので、どの地点でも検出される有機塩素系農薬との関連が疑われている。

(2) 季節変動のみられないビテロゲニン生成

メスは、春期ではより高濃度にビテロゲニンを合成している傾向がみられるが、おおむね冬期と春期で同様なビテロゲニン濃度分布をしている。コイは1年のうち春に産卵するので、1年をサイクルとした生殖サイクルをもっていると考えられる。メスの卵黄蓄積、つまりビテロゲニンの合成・蓄積も1年を単位としたサイクルがあると考えられるが、冬と春ではビテロゲニン合成に異なる点はないのだろうか。

これらの疑問について考察するため、魚類の生理学的観点から、生殖サイクルとビテロゲニン合成について考察する。

4. コイの生殖サイクルと内分泌系

4.1 生殖サイクル⁹⁾

コイの産卵期は4~7月であり、この間に2~3回の産卵をおこなう。このような春産卵型のコイ科魚類の生殖腺(卵巣・精巢)の発達は、2つのフェーズから成り立っている。

図-3に生殖サイクルの模式図を示す。この図は文献9、10の記載内容を新たにまとめたものである。9月ごろに始まる第1フェーズは、産卵によって退行した生殖腺の再熟過程と位置づけられる。このフェーズでは、卵径の増大や精母細胞の出現が起こり、生殖腺指数(gonado-somatic index、GSI、生殖腺重量/体重×100(%))がゆるやかに上昇する。3月に始まる第2フェーズは産卵直前の蓄積期といえるものであり、卵黄蓄積と精子形成の活発化がみられ、GSIが急増する。

春産卵型の魚では、一般に春の水温上昇と日長増加の両方が成熟・産卵を促進するといわれるが、水温と日長条件をさまざまに組み合わせて生殖腺の発達・退行が調べられた結果、第2フェーズの蓄積期は水温上昇をきっかけとすることが判明した。その後の産卵期は季節に応じた十分な長日によって維持される。やがて盛夏の水温が20°C半ばを超えるようになると、高水温をきっかけとして産卵期が終結し(高温抑制)、すみやかに生殖腺の退行がおこる。その後、秋の水温低下をきっかけとして第1フェーズが始まる。GSIのゆるやかな発達は秋から冬の短日条件によって維持され、長日への移行にともなって終結する。

すなわち、メスのビテロゲニン合成は、秋から

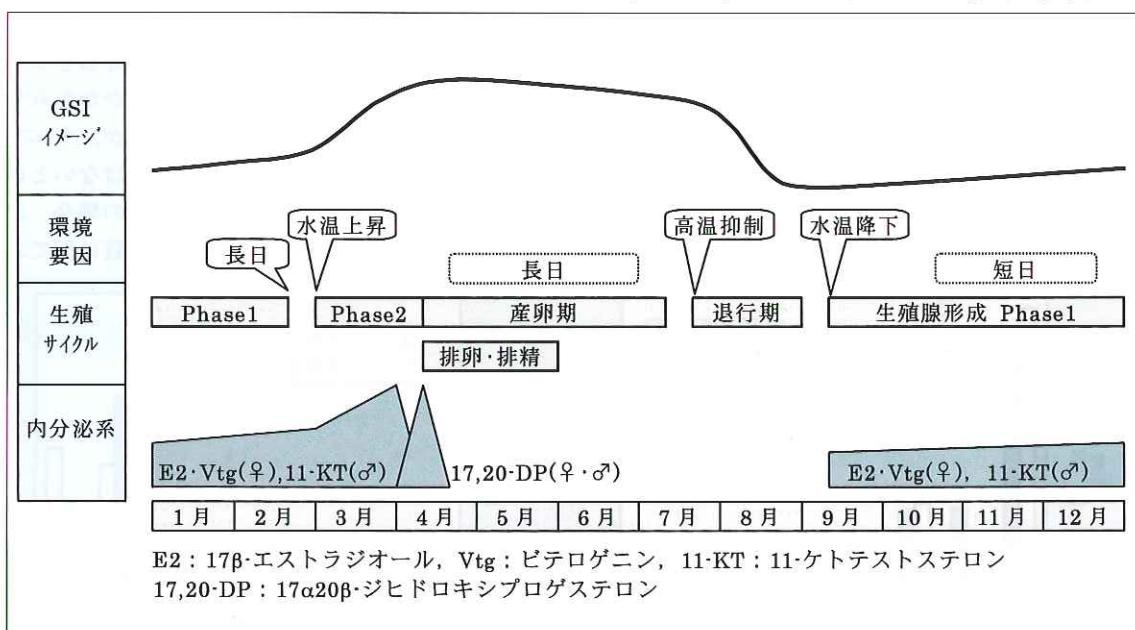


図-3 生殖サイクル模式図(コイ科魚類)(文献9,10をもとに作成)

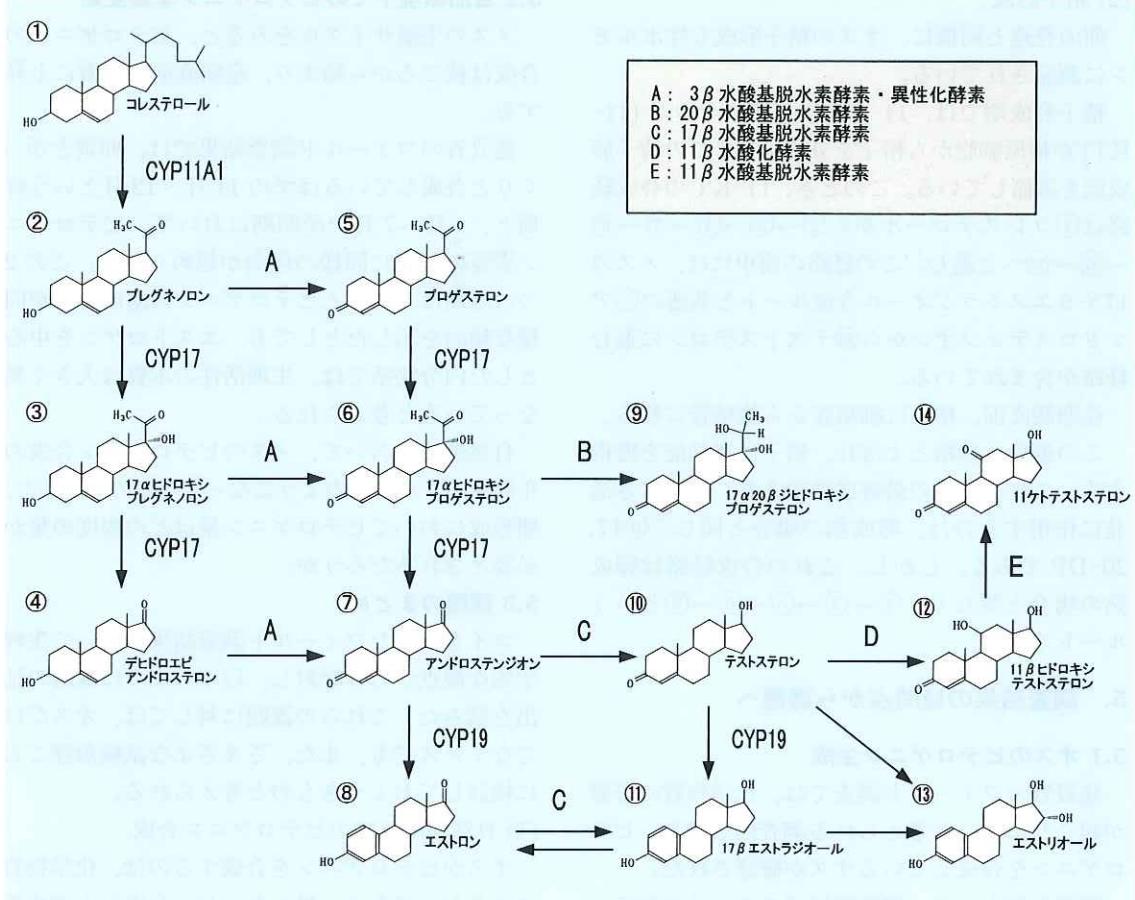


図-4 性ホルモン合成経路 (文献 10,11 をもとに作成)

始まる第1フェーズではゆるやかに進んでいるが、産卵直前の3月には活発になると考えられる。なお、上記の水温や日長条件の臨界点は、魚種によって異なる。また、コイを25°Cを超えない水温に保てば成熟状態を維持できることが確かめられている。

4.2 生殖内分泌系¹⁰⁾

水温や日長などの環境要因に強く依存している生殖サイクルは、化学物質のレベルでは生殖内分泌系に調節されている。

生殖内分泌系の性ホルモン合成経路を図-4に示す。魚類のエストロゲンは図中の番号⑧、⑪、⑬であり、男性ホルモン(アンドロゲン)は⑦、⑩、⑫、⑭である。エストロゲンはアンドロゲンから合成されることが重要な点である。

(1) 卵黄形成と卵成熟のホルモン調節

生殖サイクルの第1フェーズにおいて、新しい卵に卵黄が蓄積され始める。すなわち、エストロ

ゲンの作用によってビテロゲニンの生成が始まることを示している。この時期、エストロゲンの合成は、図-4に示した①コレステロールを基質として、①→②→⑤→⑥→⑦→⑩テストステロンという経路を進み、⑪17 β -エストラジオールが合成される。テストステロンから17 β -エストラジオールへの代謝にはたらくのは芳香化酵素(CYP19, アロマターゼ)である。生殖サイクルの第2フェーズに相当する卵黄形成期後期では芳香化酵素の活性は最大となり、卵黄の蓄積が進む。

卵黄蓄積を終えた卵はやがて卵成熟期に至る。

卵成熟は短期間に起こる現象で、短い魚種で数時間、サケ科など長いものでも1~2日で完了する。この時期には17 β -エストラジオールはほとんど合成されず、⑥から⑨17 α , 20 β -ジヒドロキシプロゲステロン(17, 20-DP)が合成される。なお、この物質は卵成熟誘起ホルモンと呼ばれている。

(2) 精子形成

卵の発達と同様に、オスの精子形成も性ホルモンに調節されている。

精子形成期では、11-ケトテストステロン(11-KT)が精原細胞から精子を分化するまでの精子形成能を調節している。このとき、11-KTの合成経路は①コレステロールから②→③→④→⑦→⑩→⑫→⑭へと進む。この経路の途中には、メスの 17β -9エストラジオール合成ルートと共に⑦アンドロステンジオンから⑩テストステロンに進む経路が含まれている。

産卵期直前、精子は細精管から輸精管に移る。

この過程は排精とよばれ、精子は運動能を獲得する。これは精子の最終成熟であり、このとき活性に作用するのは、卵成熟の場合と同じく⑨17,20-DPである。しかし、これの合成経路は卵成熟の場合と異なり、①→②→③→⑥→⑨というルートである。

5. 調査結果の疑問点から課題へ

5.1 オスのビテロゲニン生成

建設省のフィールド調査では、化学物質の影響が起りにくくと考えられる調査地点でも、ビテロゲニンを合成しているオスが確認された。

同様な例として、飼育環境下でのコイのビテロゲニン合成を明らかにするため、未成熟の段階から経時的にビテロゲニンの合成状況を追跡した結果が発表されている¹²⁾。この試験ではオス未成熟魚のビテロゲニン合成が確認されたが、水質やエサに化学物質の影響はないものと考えられた。そして、この原因として、オスとして成長する段階でアンドロゲンを合成してゆく際に、副次的に 17β -エストラジオールが合成されてしまい、結果としてビテロゲニンが生成してきたものと考えられている¹²⁾。

さらに、オスが本来の活動として精子形成をおこなっているとき、中間代謝物としてテストステロンを合成するが、このとき、芳香化酵素(CYP19)が存在していれば、 17β -エストラジオールを合成してしまう可能性がある。芳香化酵素は薬物代謝酵素の一つであるため、外因性の化学物質が体内に入り込むことによって、これを代謝・分解するために増加している場合もあると考えられる。

5.2 自然環境下でのビテロゲニン季節変動

メスの生殖サイクルをみると、ビテロゲニンの合成は秋ごろから始まり、産卵直前に急激に上昇する。

建設省のフィールド調査結果では、卵黄をゆっくりと合成しているはずの11月～12月という時期と、4月～7月の産卵期において、ビテロゲニン濃度の分布に同様の傾向が認められた。この2つの時期は、たとえビテロゲニンの濃度分布が同様な傾向を示したとしても、エストロゲンを中心とした内分泌系では、生理活性の本質は大きく異なると考えられる。

自然環境において、メスのビテロゲニン合成の年周サイクルはどのようになっているのか。また、卵形成においてビテロゲニン量はどの程度の量が必要とされるだろうか。

5.3 課題のまとめ

コイを用いたフィールド調査結果について生理学的な観点からみなおし、以下のように課題の抽出を試みた。これらの課題に対しては、オスだけでなくメスでも、また、さまざまな試験魚種ごとに検討しておくべきものと考えられる。

(1) 自然環境下でのビテロゲニン合成

オスがビテロゲニンを合成するのは、化学物質によるだけでなく、アンドロゲン合成から副次的に作り出してしまう可能性が考えられる。生物影響を判断するためには、成長段階や季節変動に応じたビテロゲニン合成のベースラインを明らかにしておく必要がある。

(2) 芳香化酵素の発現様式

オスがアンドロゲンから副次的にエストロゲンを合成する経路にはたらくのは芳香化酵素である。芳香化酵素は、薬物代謝酵素の一つであり、環境ホルモンを含む広い範疇の化学物質によって増加あるいは活性化されることが考えられる。ビテロゲニン合成に関し、芳香化酵素の発現様式を明らかにしておく必要があると考えられる。

(3) ビテロゲニンの作用濃度

オスの体内で合成されたビテロゲニンが、不妊や雌雄同体などの悪影響を及ぼすのであれば、その作用濃度や負荷量を明らかにすることが望ましい。

一方、メスは卵形成にどの程度のビテロゲニン量を必要とするのであろうか。エストロゲンのは

たらきを阻害する物質がある場合、ビテロゲニン合成が妨げられる可能性も考えられる。

6. おわりに

魚類の生理学的観点から、環境ホルモンに関する魚類調査について課題を抽出した。化学物質の影響試験を実施する際には、これら基礎生理学的な課題に十分注意しながら取り組むべきである。コイは 25 °C に満たないある程度の高水温に保てば成熟状態を維持できるので、年間を通じてほぼ一定の水温で放流される下水処理場の放流口付近では、化学物質ではなく水温による生理的変化が表れているのかもしれない。この課題に対し、基礎生理学的な知見を適用することができれば、影響要因を明確にすることが期待できる。なお、もし水温が影響要因であれば、放流水温という新たな検討課題を提示することが可能となる。

参考文献

- 1) C.Desbrow, E.J.Routledge, G.C.Brighty, J.P.Sumpter and M.Waldock : Identification of Estrogenic Chemicals in Stw Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening, Environmental Science and Technology, 32(11), pp.1549-1558, 1998.
- 2) J.E.Harries, D.A.Sheahan, S.Jobling, P.Matthiessen, P.Neall, J.P.Sumpter, T.Taylor and N.Zaman : Estrogenic Activity in Five United Kingdom Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout, Environmental Toxicology and Chemistry, 16(3), pp.534-542, 1997.
- 3) 原彰彦：魚の血液で環境ホルモン汚染をみる－バイオマーカーとしての血清タンパク, ビテロゲニン, 科学, 68(7), pp.591-596, 1998.
- 4) 建設省河川局河川環境課：「平成 10 年度水環境における内分泌擾乱化学物質に関する実態調査結果」について, 1999., <http://www.moc.go.jp/river/press/990330.html>
- 5) 建設省河川局・都市局下水道部：平成 11 年度水環境における内分泌擾乱化学物質に関する実態調査結果(春期・夏期調査)について, 1999., <http://www.moc.go.jp/river/press/991119part2.html>
- 6) 建設省河川局・都市局下水道部：平成 11 年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果について, 2000., <http://www.moc.go.jp/river/press/000721bindex.html>
- 7) L.C.Folmar, N.D.Denslow, V.Rao, M.Chow, D.A.Crain, J.Enblom, J.Marcino and L.J.Guillette Jr. : Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant, Environment Health Perspectives, 104, pp.1096-1101, 1996.
- 8) S.L.Goodbred, R.J.Gilliom, T.S.Gross, N.P.Denslow, W.L.Bryant and T.R.Schoeb : Reconnaissance of 17 β -Estradiol, 11-Ketotestosterone, Vitellogenin, and Gonad Histopathology in Common Carp of United States Streams: Potential for Contaminant-Induced Endocrine Disruption, U.S.Geological Survey Open-File Report, pp.6-627, 1996., <http://water.wr.usgs.gov/pnsp/rep/carp2>
- 9) 羽生功：生殖周期, 魚類生理学, 恒星社厚生閣, pp.287-325, 1991 年 6 月
- 10) 長浜嘉孝：生殖-配偶子形成の制御機構, 魚類生理学, 恒星社厚生閣, pp.243-286, 1991 年 6 月
- 11) 有薗幸司：人体は化学物質にどう反応するか, 科学, 68(7), pp.576-581, 1998.
- 12) 伊藤文成：野生生物における内分泌擾乱現象の現状と想定される原因物質 1. 魚類 1) 淡水魚, 平成 12 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p.294, 2000 年 4 月

東谷 忠*



建設省土木研究所下水道部
水質研究室重点研究支援協力員
Tadashi HIGASHITANI

高橋明宏**



水質研究室研究員
Akihiro TAKAHASHI

田中宏明***



水質研究室長
Hiroaki TANAKA