特集1・微量汚染物質のバイオ技術による測定法

水環境におけるエストロゲン作用評価手法としての
ビテロゲニン

石橋 弘志*・鑑迫 典久**・有菌 幸司***

1. はじめに

近年、環境中に放出あるいは存在している環境化学物質が、ヒトや野生生物などの生体内に取り込まれホルモン疑似作用やホルモン攪乱を引き起こす内分泌攪乱物質（環境ホルモン）問題が注目されている¹⁻³⁾。これらの化学物質は最終的に水域環境に放出される可能性が高く、魚類などの水生生物に顕著な影響を与えることが懸念される。そこで、魚類における内分泌攪乱物質の影響を評価するためには、それら水域環境中の機器分析による化学物質濃度に加え、バイオマーカーと呼ばれる生物の生体内反応を用いた評価が有用であると考えられる。ここでは、特にエストロゲン様作用を示す物質によって特異的に誘導される雌特異タンパク質、ビテロゲニン（VTG）を指標とした評価の現状について概説する。

2. ビテロゲニン

VTGは、卵黄に含まれるリンタンパク質の前駆体で、エストロゲンの刺激により鳥類、両生類または魚類の肝臓中で生合成され、血中に分泌される雌特異的タンパク質である。VTGは、血中で分子量380～500KDaの2量体として存在し、リン酸の他に、糖、脂肪、カルシウムを含むタンパク質で、成熟中の卵に取り込まれ卵内で成長する胚の栄養源となる。正常な雄ではほとんど検出されないが、大量のエストロゲン処理によって雄血中にVTGが検出されることから、内分泌攪乱作用（特にエストロゲン様作用）のバイオマーカーとして雄魚の血中のVTGを調査することで、水環境中にエストロゲン

様物質が存在するかどうかについて評価する試みが行われている⁴⁾。一般的な血中VTGの測定方法としては、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた方法⁵⁾や、より高感度な酵素免疫測定法（ELISA）が知られている⁶⁾。また近年、半定量的な測定法として、数滴の血液のみを用い、数十分で簡便に測定可能なイムノクロマト等も開発されている⁷⁾。

3. フィールド調査におけるビテロゲニン合成を指標としたエストロゲン様作用の評価

欧米では河川や汽水域に生息あるいはケージングしたニジマス、コイ及びカレイなど成熟した雄魚について、血中に産生されたVTGを測定することでエストロゲン様作用を示す化学物質の影響評価を行っている⁸⁻¹⁰⁾。日本でも多摩川（コイ）¹¹⁾や東京近海（マコガレイ）の調査¹²⁾が行われており、環境省や国土交通省はコイを指標魚として、全国の河川の一斉調査を行っている。この調査において、採捕した一部の雄コイの血清中にVTGが検出され、そのVTG濃度範囲は平成10～12年度調査ではほぼ同様であった（図-1）。しかしながら河川など自然環境下では、水温など季節的に変動する生息場所の環境要件、生理的活性や成熟度の個体差などもVTG生成量を変動させる要因になっていると考えられる。そのため、雄コイの血清中VTG濃度の測定結果のみから調査地点におけるエストロゲン様物質の存在を評価することは困難と考えられるため、今後、生殖腺の組織像（精巣卵）の確認、調査地点の水質や底質からのエストロゲン様物質の測定を併用し総合的な評価を行う必要がある。

*長崎大学大学院生産科学研究科 Hiroshi ISHIBASHI

**独立行政法人国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシン研究プロジェクト Norihisa TATARAZAKO

***熊本県立大学環境共生学部 Koji ARIZONO

図-1 雄コイの血清中VTG濃度測定結果

調査地点数は、平成10年度25地点、平成11年度27地点、平成12年度10地点で行った。

図-2 日本沿岸海域で捕獲したボラ血清中VTG量
Oは長崎県大瀬戸町沿岸、Nは沖縄県今帰仁村川下流、NBは長崎港内、Hは博多港内、Yは熊本県八代海沖合を示す。

また近年、征矢野らは長崎県大瀬戸町沿岸・熊本県八代海沖合・沖縄県今帰仁村川下流・長崎市長崎港内・福岡市博多港内・大阪湾西部・東京湾において採捕したボラ (*Mugil cephalus*) を用いて、血中VTG濃度の測定および生殖腺の組織観察を行い、ボラにおける生殖異常調査を報告している¹³⁾。それによると血中VTG量は、大阪湾西部・東京湾では10~1000 μg/mL程度検出されるのに対し、博多港内を除くその他の海域では10 μg/mL以下で(図-2)、大都市部周辺海域に生息するボラは非常に高濃度のVTGを産生していることが明らかとなった。また、生殖腺組織の形態異常が博多湾、大阪湾及び東京湾の個体で観察され、精巣組織中に周辺期の卵母細胞が点在する精巣卵を持つ個体も確

認された。このことより、大都市部周辺海域に生息するボラに生殖異常が起きている可能性が示唆された。ボラは日本ばかりでなく世界各地に同種が生息し、捕獲が極めて容易で、河川下流部、内湾河口域及び沿岸域に生息し、清浄海域から環境汚染が進んでいると考えられる地域にまで広く分布する。また雑食性であるため水質・底質の影響を受けやすく、さらに性転換魚ではないため雌雄の分化は明瞭で、精巣卵の出現頻度は非常に少ないとされている。これらの理由からボラは一般水環境中における内分泌攪乱物質の影響を評価するのに最適な魚類として注目され、今後世界的規模での研究に発展することが期待される。また、ハゼなどを用いた全国的な環境調査も松原ら¹⁴⁾によって行われており、今後様々な魚種を用いた調査が行われるであろう。

4. 研究室レベルにおけるビテロゲニン合成を指標としたエストロゲン様物質の評価

近年、海外では国際経済協力機構(OECD)や米国環境保護局(EPA)を中心に、ゼブラフィッシュ、ファットヘッドミノー及びメダカを用いた内分泌攪乱物質のスクリーニング及び試験法の開発が行われている¹⁵⁾。

Panterら¹⁶⁾は幼若ファットヘッドミノーを用い、ジエチルスチルベストロール(DES)、17 α -エチニルエストラジオール(EE₂)、メトキシクロール(MXC)、4-*tert*-ペンチルフェノール(TPP)、ゲニステイン及びZM 189,154についてエストロゲン活性評価を行った。それによると、最小曝露実測濃度2.9 μg/LのDES及び0.002 μg/LのEE₂に4日間曝露した幼若ファットヘッドミノーのVTG濃度は対照群と比較してそれぞれ増加が認められ、またそれ以上の曝露区(DES: 9.5, 22.1 μg/L, EE₂: 0.005, 0.02 μg/L)においても曝露14, 21日後に増加が認められた。MXC曝露(0.16, 0.43, 1.8 μg/L)においてもVTG濃度の増加が認められたが、濃度依存性は確認されず、TPP(10, 29.6, 56.0 μg/L)及びゲニステイン(70, 263, 760 μg/L)曝露14, 21日後のVTG濃度は対照群と比較して増加が認められた。これらのことより、MXC以外は14日間の曝露によりVTG産生を指標としたエストロゲン様物質の評価が可能であることが示唆された。さらに、抗エストロゲンであるZM 189,154(5, 24.4, 76.6 μg/L)は曝露14日後にVTG産生を抑

図-3 ZM189,154に4, 7, 14及び21日間曝露した幼若ファットヘッドミノーのVTG濃度
データは平均±標準誤差として示した。*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。エストロゲン陽性対照物質としては17 α -エチニルエストラジオール (EE₂, 10ng/L)を用いた。

制するものの、濃度依存性は確認されていない(図-3)。しかし、VTG産生の抑制を指標としたZM 189,154など抗エストロゲン様作用を持つ化学物質の検出も可能であることが示唆された。メダカにおいても同様に、肝臓中VTG産生が抗エストロゲン物質として知られている4ヒドロキシタモキシフェンにより、濃度依存的に抑制されることが明らかにされた¹⁷⁾。この手法を用いて抗エストロゲン作用を持つ他の化学物質についてのスクリーニングが試みられている。今後、エストロゲン様作用だけではなく、抗エストロゲン様作用等の評価も必要であろう。

研究室実験において、雄魚の血中VTG産生をバイオマーカーとして内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様作用を評価する場合、飼育飼料に含まれる植物性エストロゲンを考慮する必要があると考えられる。我々は、雄キンギョにカゼイン主原料飼料、マス用飼料及びコイ用飼料をそれぞれ毎日体重あたり1%量与え、血漿中VTG産生に及ぼす影響を調べた(図-4)。市販のコイ用飼料を与えた雄キン

ギョにおいて、給餌7日目から約100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の血漿中VTGが検出され、またHPLCによって飼料中の植物性エストロゲン含量を測定したところ、エストロゲン様作用を持つことが知られているゲニステイン、ダイゼインなどが高濃度で検出された。これらのことから、植物性エストロゲンを含む飼料は雄魚の血漿中VTGを産生することが示唆され、今後、飼料摂取により産生されるVTG濃度を考慮しエストロゲン様物質の評価を行うとともに、低エストロゲン飼料を用いる必要があろう。

またKangら¹⁸⁾は、雌雄ペアのメダカを平均測定濃度29.3, 55.7, 116, 227及び463ng/Lのエストラジオール試験液に21日間流水条件下で曝露し、繁殖及びVTG産生に及ぼす影響を評価した。ペアあたりの21日間の総産卵数及び平均受精率は、対照区と比較して463ng/L曝露区のみ有意に低下した。一方、雄魚の肝臓中VTG濃度は、対照区と比較して55.7ng/L曝露区から濃度依存的に上昇し、雌魚では463ng/L曝露区のみ有意に上昇した。これらのことから、雌雄ペアのメダカの繁殖に影響したエスト

図-4 体重あたり1%の各種飼料をそれぞれ63日間毎日与えた場合の雄キンギョ血漿中VTG合成
データは平均±標準偏差として示した。

ラジオール濃度と、雄魚においてVTG産生を引き起こしたエストラジオール濃度は必ずしも一致せず、今後、エストロゲン様物質曝露により雄魚で産生されたVTGが生体に及ぼす影響等に関する研究も必要かもしれない。

5. メダカを用いたビテロゲニン評価と環境リスク手法への応用

日本では、古くから発生や性分化の研究材料として用いられてきたメダカ *Oryzias latipes* を内分泌攪乱物質の評価に応用する試みがなされている。また、メダカでは肝臓中VTG産生を指標としたエストロゲン様物質の評価手法も開発され、環境省はそれら手法を用いノニルフェノール (NP) 及び4-*t*-オクチルフェノール (4-*t*-OP) のエストロゲン様作用について評価を行っている¹⁹⁾。それによると、約3ヶ月令のメダカ(雌雄各8個体/濃度)をNP平均測定濃度7.40, 12.8, 22.5, 56.2及び118 $\mu\text{g/L}$ と4-*t*-OP平均測定濃度12.7, 27.8, 64.1, 129及び296 $\mu\text{g/L}$ の試験液にそれぞれ流水条件下で21日間曝露を行い、NP曝露した雄個体の肝臓中VTG濃度は曝露濃度の上昇と共に増加し、22.5 $\mu\text{g/L}$ 以上で統計学的に有意な上昇を認めている(図-5)。一方、4-*t*-OP曝露した雄個体の肝臓中VTG濃度も同様に曝露濃度の上昇と共に増加し、64.1 $\mu\text{g/L}$ 以上で統計学

的に有意な上昇が認められている。これらの事実から、NP及び4-*t*-OPはいずれもそのエストロゲン様作用により雄のメダカ肝臓においてVTGの産生を引き起こすことが明らかとなった。

NPのメダカの性分化に及ぼす内分泌攪乱作用を評価するために、メダカ(60個体/濃度)を平均測定濃度3.30, 6.08, 11.6, 23.5及び44.7 $\mu\text{g/L}$ のNP試験液に受精卵からふ化後60日令まで流水条件下で曝露を行った。メダカ受精卵のふ化及びふ化後の死亡において、上記NP濃度範囲での影響は観察されなかったが、ふ化後60日令の成長において、44.7 $\mu\text{g/L}$ 区で全長及び体重が、23.5 $\mu\text{g/L}$ 区で体重がそれぞれ有意に減少し、NPによる成長阻害が観察された。また、ふ化後60日令における生存個体の外観的二次性徴から判定した性比は、23.5 $\mu\text{g/L}$ 以上で有意に雌に偏っており、さらに、生殖腺の組織学的観察結果から、11.6 $\mu\text{g/L}$ 以上で精巣卵の個体が観察され、雄個体の肝臓中VTG濃度は、11.6 $\mu\text{g/L}$ 以上で統計学的に有意に上昇したと報告している(図-6)。これらの事実から、NPのエストロゲン様作用により雄メダカの性分化に影響を及ぼし、外観的二次性徴を雌化させる最小作用濃度は23.5 $\mu\text{g/L}$ であり、精巣卵を出現させ、VTG産生を引き起こす最小作用濃度は11.6 $\mu\text{g/L}$ であることが示唆された。

図－5 各濃度のNP曝露における雄個体の肝臓中VTG濃度

データは平均±標準偏差として示した。*及び**はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ で有意であることを示す。エストロゲン陽性対照物質としてはエストラジオール-17 β (E2, 100ng/L)を用いた。

図－6 各濃度のNP曝露におけるふ化後60日令の雄個体の肝臓中VTG濃度

データは平均±標準偏差として示した。カッコ内は個体数を示す。*及び**はそれぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$ で有意であることを示す。

さらにフルライフサイクル試験において、メダカの全生涯を通したNPの内分泌攪乱作用が評価された。メダカ(60個体/濃度)を平均測定濃度4.2, 8.2, 17.7, 51.5及び183 $\mu\text{g/L}$ のNP試験液に受精卵からふ化後104日令まで流水条件下で曝露した。183 $\mu\text{g/L}$ 区では F_0 メダカの受精卵の生存及びふ化後の遊泳開始が有意に低下し、遊泳開始からふ化後60日令までの累積死亡率は51.5及び17.7 $\mu\text{g/L}$ 区で有意に増加した。生殖腺の組織学的観察結果から17.7 $\mu\text{g/L}$ 以上で精巣卵の個体が観察され、17.7 $\mu\text{g/L}$ 区以下についてふ化後70日令でペアリングを行い、ふ化後103日令まで毎日産卵数及び受精率を調査した結果、総産卵数への影響は観察されず、平均受精率は統計学的に有意差は認められなかったものの、対照区と比較して76%に低下した。これらのことより、NPのメダカ全生涯を通した最小作用濃度、無作用濃度はそれぞれ17.7 $\mu\text{g/L}$ 及び8.2 $\mu\text{g/L}$ であ

ることが示唆された。次世代(F_1)のふ化、ふ化後の死亡、成長については17.7～4.2 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲で影響は観察されなかったが、ふ化後60日令個体の生殖腺における精巣卵の出現は、17.7 $\mu\text{g/L}$ だけでなく8.2 $\mu\text{g/L}$ においても観察され(表1)、NPは17.7 $\mu\text{g/L}$ より低濃度で次世代のメダカの繁殖能力に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

環境省は、メダカのパーシャルライフサイクル試験で精巣卵、VTG産生が有意にみられた水中NP濃度11.6 $\mu\text{g/L}$ を性分化に関する影響の最小作用濃度とし、この場合の最大無作用濃度(NOEC)は6.08 $\mu\text{g/L}$ 、また、予測無影響濃度(PNEC:影響がないと予測される水中濃度)については、NOECに安全係数1/10を乗じた0.608 $\mu\text{g/L}$ と試算している。NPが魚類等に与える影響のリスク評価では、PNEC(0.608 $\mu\text{g/L}$)は予測環境濃度(PEC)である0.59 $\mu\text{g/L}$ に近似しており、また、環境実態調

表1 F₁メダカのふ化後60日令個体の二次性徴及び生殖腺の組織学的観察結果から判断した性比

実測NP濃度 (μ g/L)	二次性徴		生殖腺組織学			
	尾数	性比 (♂:♀)	尾数	精巣	卵巣	精巣卵
対照区	59	28:31		7	13	0
助剤対照区		26:28		11	9	0
4.2		25:29		9	11	0
8.2		24:25		10	8	2
17.7a		9:19		4	11	5

aは生殖腺組織学の結果から得られた性比は助剤対照区と比較して $p < 0.01$ で有意であることを示す。

査で得られた国内の環境水中の濃度はND (<0.03 ~0.1) ~21 μ g/Lの範囲内であり、同調査を行った1,574地点中4.5%に当たる71地点がPNECの値を超過している。これらのことから、日本の水域環境中でみられるNPは、魚類への内分泌攪乱作用を通じ、生態系に影響を及ぼしている可能性があると呼び出している。

6. お わ り に

以上、VTG産生を指標とした内分泌攪乱物質のエストロゲン様作用の評価について、野生生物に対する影響評価から研究室レベルでの適用について概説した。日本では、メダカを用いた各種試験法によって内分泌攪乱物質の生態影響が評価されているが、これら試験法へのメダカの適用に、近年、体色の違いから性判別可能なdr-R系統や、受精後3日胚で白色色素の有無により遺伝子型の雌雄を判別できるFLF系統、さらには透明メダカにおいて、生殖細胞で特異的に発現することが知られているメダカ *vasa* 遺伝子のプロモーター領域にクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) を組み込んだものを作製し、その蛍光により生殖細胞の分化から老化に至る時期や、卵母細胞が成熟する過程を同一の雌について継続的に観察できる系統などが開発されており²⁰⁾、実用化が検討されている。さらにメダカではVTG以外にエストロゲンで誘導される卵膜タンパク質前駆物質 (コリオゲニン: Chg) などもバイオマーカーとして有用であることが報告されており²¹⁾、エストロゲン受容体、VTG及びChg遺伝子発現を指標としたエストロゲン様物質の評価も行われている²²⁾。一方、魚類における内分泌攪乱物質のアンドロゲン様作用についての知見は乏しいが、近年、淡水性硬骨魚類のイトヨ three-spined stickleback (*Gas-*

terosteus aculeatus) のバイオマーカーを用いた評価法の確立が行われている。イトヨ類の雄は産卵期に営巣行動を示し、その際にアンドロゲン支配により腎臓で営巣関連タンパク (spiggin) を合成する²³⁾。そこで、この腎臓中spigginの合成を利用してVTG同様、内分泌攪乱物質のアンドロゲン様作用を評価しようというものである。今後、他のバイオマーカーの検索も必要であり、さらに遺伝子に関する研究も含めて行うことで、より詳細に生物に対する内分泌攪乱物質の影響評価や作用機序解明ができるであろう。

参 考 文 献

- 1) Colborn T. et al.: Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996)
- 2) Colborn T. et al.: Environ. Health Perspect., 101, 378-384 (1993)
- 3) Jobling S. et al.: Environ. Toxicol. Chem., 19, 2812-2820 (1998)
- 4) Sumper J.P. et al.: Environ. Health Perspect., 103, 173-178 (1995)
- 5) Yamanaka S. et al.: Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 1196-1200 (1998)
- 6) Tyler C.R. et al.: Environ. Toxicol. Chem., 21, 47-54 (2002)
- 7) 原彰彦他：日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集, 77 (1999)
- 8) Purdom C.E. et al.: Chem. Ecol., 8, 275-285 (1994)
- 9) Folmar L.C. et al.: Environ. Health Perspect., 104, 1096-1101 (1996)
- 10) Allen Y. et al.: Sci. Total Environ., 233, 5-20 (1999)
- 11) 中村將他：岩波書店, 68, 515-517 (1998)
- 12) Hashimoto S. et al.: Jpn J. Environ. Toxicol., 1, 75-85 (1998)
- 13) 征矢野清：第8回環境ホルモン学会講演会テキストー環境ホルモンと水生生物ー, 39-41 (2001)
- 14) 征矢野清他：日本内分泌攪乱化学物質学会第三回研究発表会要旨集, 114 (2000)
- 15) U.S. Environmental Protection Agency, Draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption (2002)
- 16) Panter G.H. et al.: Environ. Toxicol. Chem., 21, (2002)
- 17) 鎌迫典久他：日本内分泌攪乱化学物質学会第四回研究発表会要旨集, 115 (2001)
- 18) Kang I.J. et al.: Chemosphere, 47, 71-80 (2002)
- 19) 環境省：ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (2001)
- 20) Wakamatsu Y. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10046-10050 (2001)
- 21) 原彰彦：廃棄物学会誌, 10, 278-287 (1999)
- 22) 滝上英孝他：第六回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 25 (2000)
- 23) Ioanna K.: The 3rd Japan-UK joint workshop on endocrine disrupting chemicals, 6-7 (2001)