

平成 14 年度

実環境における水生生物への影響調査結果について

平成 15 年 11 月

環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課

## 平成 14 年度 実環境における水生生物への影響調査結果について

実環境において、内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質が生物に与える影響を検討するために、今回は、ノニルフェノールの水中濃度が比較的高濃度、中濃度及び低濃度<sup>i</sup>で検出された 3 水域において捕獲されたコイ (*Cyprinus carpio*) の組織学的検査、血液学的検査及び化学的検査を行った。合わせて、アルキルフェノール類及びビスフェノール A 等の女性ホルモン様作用が疑われている化学物質類及び女性ホルモン類の水中濃度並びに女性ホルモン様活性を測定した。

### 1. 調査方法

#### (1) 調査対象水域の選定

平成 13 年度の冬季に水生生物の影響調査を実施したが、同一水域において夏季における生物への影響を見るために 3 水域において調査を実施することとした。平成 10、11、12、13 年度の環境実態調査水質調査結果より、ノニルフェノールの比較的高濃度水域として石津川(大阪府、平成 13 年度調査結果は  $5.9 \mu\text{g/L}$  で平成 10 年度より増加傾向の後減少)、比較的中濃度水域として印旛放水路(千葉県、平成 13 年度調査結果は  $0.3 \mu\text{g/L}$  で平成 10 年度より減少傾向)、比較的低濃度水域として手賀沼(千葉県、平成 13 年度調査結果は  $0.2 \mu\text{g/L}$  で平成 10 年度より減少傾向の後増加)において調査を実施した(図 1)。

なお、飼育試験については、平成 13 年度の日光川において飼育の影響が

---

<sup>i</sup> 「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(案)」(平成 13 年 8 月、環境省)において、メダカに精巣卵が確認された最小曝露濃度( $8.2 \mu\text{g/L}$ )に近い水中濃度を比較的高濃度、最大無作用濃度 NOEC( $6.08 \mu\text{g/L}$ )未満で予想無影響濃度 PNEC( $0.608 \mu\text{g/L}$ )を上回る濃度を比較的中濃度、予想無影響量を下回る濃度を比較的低濃度とした。

ほとんど認められなかったことから、本年度では平成 13 年度にコイへの影響が示唆された石津川において、実施した。

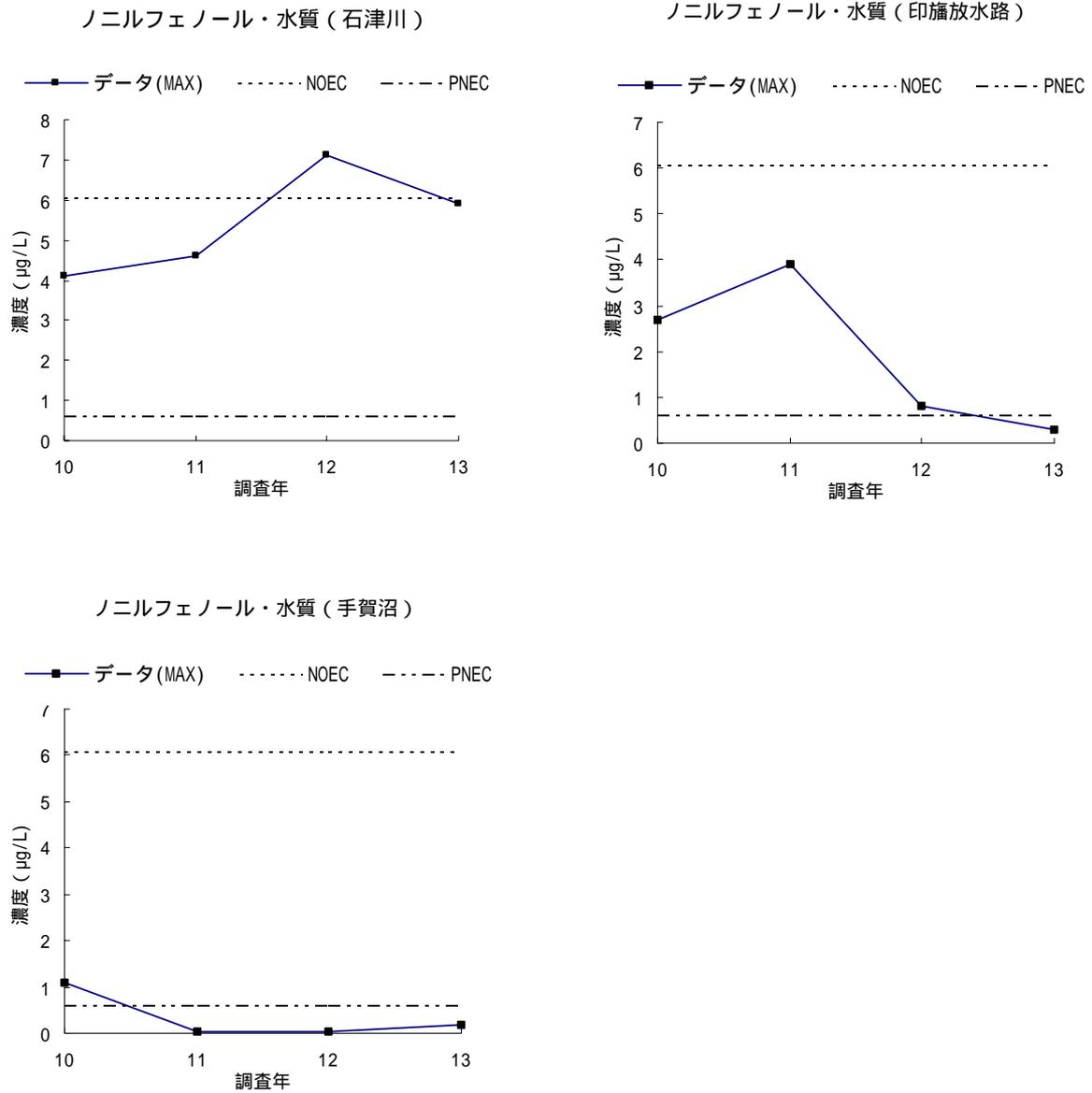


図 1 調査対象水域の環境実態調査水質調査結果の推移

## (2) 調査項目

### ア コイの検査項目

コイの検査項目を表 1に示した。検査は全て平成 13 年度と同一の機関が実施した。

表 1 コイの検査項目

検査項目	分析・測定項目
組織学的検査	外貌検査(外觀、全長、体長、体重) 解剖学的検査(肉眼的解剖所見、生殖腺重量) 病理検査(生殖腺組織病理所見)
血液学的検査	ビテロジェニン濃度 17 $\beta$ -エストラジオール濃度 テストステロン濃度
化学的検査	ノニルフェノール濃度(筋肉中) 粗脂肪(筋肉中)

#### (ア) 組織学的検査

捕獲あるいは飼育試験において回収されたコイは、直ちに外貌検査を経て採血を行った後、解剖し、解剖所見及び生殖腺重量を得た。採取した血液は遠心分離によって血清を分離した後、速やかに凍結保存し、血液学的検査に供した。また、生殖腺はホルマリン固定して病理検査に、筋肉は凍結保存して化学的検査に供した。

#### (イ) 血液学的検査

ビテロジェニン濃度の測定には市販のコイビテロジェニン測定キット(トランスジェニック社製)を用いた。

17 $\beta$ -エストラジオール濃度の測定は、HRP 標識抗原として 6-oxo-E2-6-CMO-HRP(COSMO BIO 社製)及び抗体として anti-6-oxo-E2-6-CMO-BSA(COSMO BIO 社製)を用いた ELISA 法によって行った。

テストステロン濃度の測定は、HRP 標識抗原として Testosterone-3-

CMO-HRP(COSMO BIO 社製)及び抗体として anti-Testosterone-3-CMO-BSA(COSMO BIO 社製)を用いた ELISA 法によって行った。

(ウ) 化学的検査

コイ筋肉中のノニルフェノール濃度の測定は「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)」(環境庁、平成 10 年)に準じて行った。

脂質濃度の測定はジエチルエーテル法によって行った。

イ 水質調査

水質調査の項目を表 2 に示した。

表 2 水質調査項目

調査項目	分析・測定項目
化学物質の水中濃度	アルキルフェノール類 ・ノニルフェノール ・4-t-オクチルフェノール ビスフェノール A 女性ホルモン類 ・エストロン ・17 -エストラジオール ・17 -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
女性ホルモン様活性	・アゴニスト ・アンタゴニスト

(ア) 化学物質の水中濃度

アルキルフェノール類及びビスフェノール A の水中濃度の測定は「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物)」(環境庁、平成 10 年)に準じて行った。

女性ホルモン類の水中濃度の測定は「要調査項目等調査マニュアル

(水質、底質、水生生物)」(環境庁、平成 11 年)に準じて行った。

#### (イ) 女性ホルモン様活性

女性ホルモン様活性(アゴニスト)の測定には、C18 固相抽出 - 酵母 two-hybrid 法(酵母 Y190 株(Clontech 社)にヒトのエストロゲンレセプター遺伝子、コアクチベーター発現プラスミド及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現系レポータープラスミドを導入した酵母を使用<sup>1,2)</sup>)を用い、女性ホルモン様活性を相対化学発光強度として測定した。

エストロゲン・アンタゴニスト活性は、試料と 17 $\beta$ -エストラジオールを女性ホルモン様活性の測定系に同時に添加することによって、本来の 17 $\beta$ -エストラジオールによる相対化学発光強度の低下として測定した<sup>3)</sup>。なお、試料が、試験に用いた添加量においてアンタゴニスト作用以外の作用で相対化学発光強度の低下が現れないことを確認するため、GAL4DBD とマウス p53 の融合遺伝子 pVA3、及び GAL4AD と SV40large T-antigen の融合遺伝子 pTD1 を導入した酵母 Y190 株を用いて、試料の毒性による  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の低下がないことを確認した<sup>3)</sup>。

なお、女性ホルモン様活性に寄与する物質を推定するために、C18 固相抽出 - メタノール抽出画分を、ヘキサン：ジクロロメタン(1：1)に溶媒転換し、Sep - Pak Silica 固相カートリッジに保持させ、下表の順に分画した。各画分に含まれると考えられた物質<sup>1)</sup>を表 3 に示した。

表 3 分画方法

画分	溶出溶媒	溶出が確認されている物質
	非吸着画分	BP、BAP
	ヘキサン：ジクロロメタン(1：2)	NP
	ジクロロメタン	NP、NP1EO
	ジクロロメタン：アセトン(2：1)	E1、E2、E3、NP1EO、NP2EO、BPA
	ジクロロメタン：アセトン(1：2)	NP2EO
	アセトン	
	アセトン：メタノール(2：1)	
	アセトン：メタノール(1：2)	
	メタノール	

BP：ベンゾフェノン、BAP：ベンツ(a)ピレン、NP：ノニルフェノール

NPnEO：ノニルフェノールエトキシレート類、E1：エストロン、

E2：17 $\beta$ -エストラジオール、E3：エストリオール、BPA：ビスフェノールA

## 2. 調査の概要

### (1) 石津川調査

石津川における捕獲調査を平成 14 年 7 月 23 日に、飼育調査を平成 14 年 7 月 25 日～8 月 22 日に行った。

コイの捕獲範囲と水質調査位置を図 2 に示した。環境実態調査の観測点が毛穴大橋であるため、その周辺で投網を用いてコイを捕獲した。

水質調査は、平成 13 年度の水質調査点である平岡橋において、捕獲調査の期間中に 1 回及び飼育調査の期間中に 3 回の計 4 回の採水を行った。

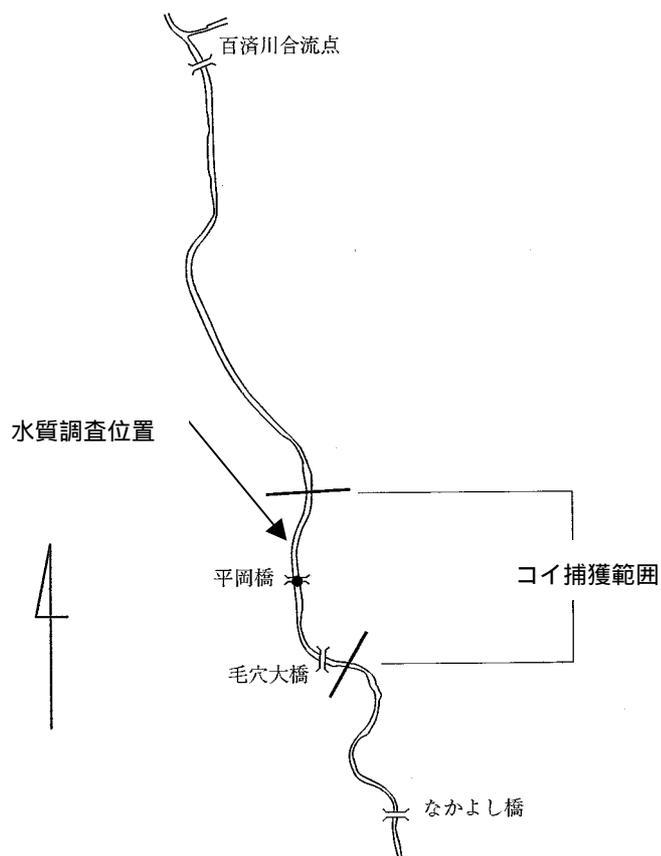


図 2 石津川調査位置図

図 3に示した 1 箇所ステンレス金網製の飼育ケージ(77×52×83cm)4 個を水中に川底に接して設置し、それぞれ 5 個体、計 20 個体を投入した。飼育試験に用いたコイは、コイの筋肉中からノニルフェノール及びピテロジェニンが検出されないことを事前に確認した養殖場(安部養鯉場、茨城県)から、オスを選別して使用した。

4 週間の飼育期間の後、20 個体全てを回収し、10 個体を無作為に抽出し、検査を行った。

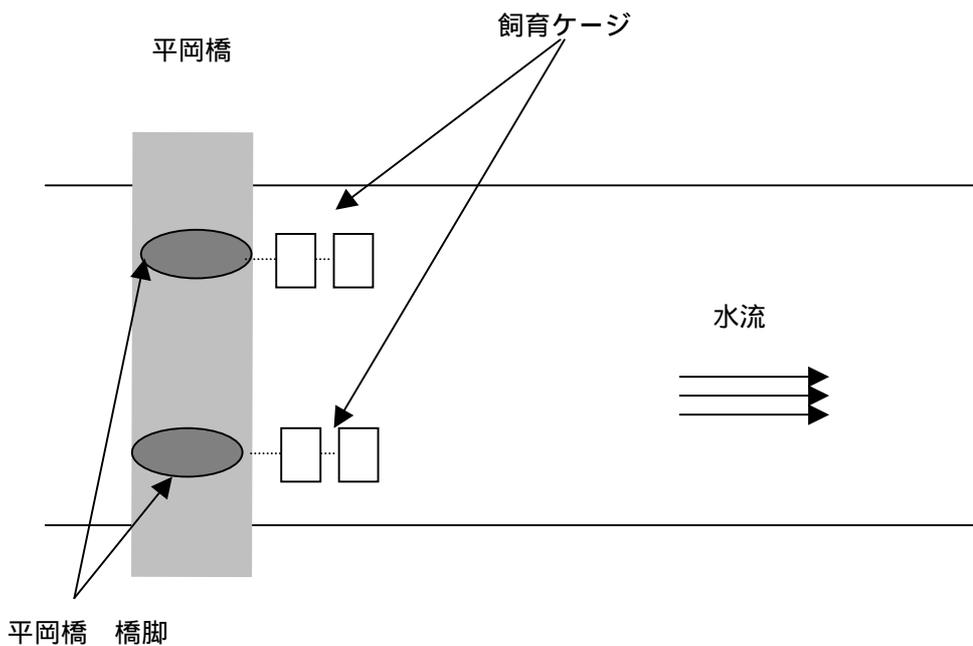


図 3 飼育ケージ配置図

## (2) 印旛放水路

印旛放水路における調査を平成 14 年 7 月 8 日に行った。

コイの捕獲範囲と水質調査位置を図 4 に示した。

環境実態調査の観測点が汐留橋であること、汐留橋に堰がありそれより下流ではコイが少ないことから、汐留橋を基点としたその上流で投網及び刺し網を用いてコイを捕獲した。

水質調査は、環境実態調査の観測点である汐留橋で、24 時間内に 4 回の採水を行った。

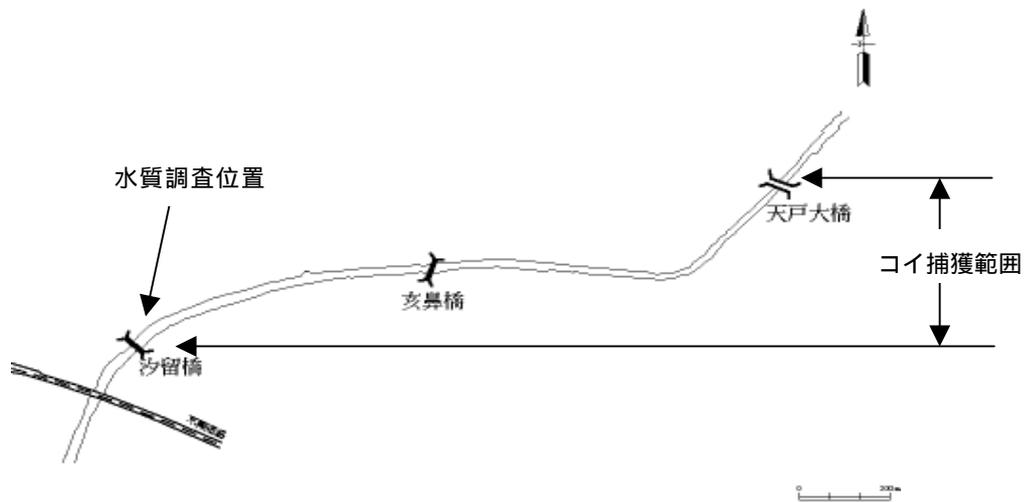


図 4 印旛放水路調査位置図

### (3) 手賀沼

手賀沼における調査を平成 14 年 7 月 5 日に行った。

コイの捕獲範囲と水質調査位置を図 5 に示した。

環境実態調査の観測点(T-B-1)近傍の水域の建網に入網したコイを漁業者より購入した。

水質調査は、手賀沼内に夜間作業可能な傭船がないことから、日中に環境実態調査の観測点(T-B-1)から最も岸に近い建網付近(T-B-4)の間の 4 箇所で行った。

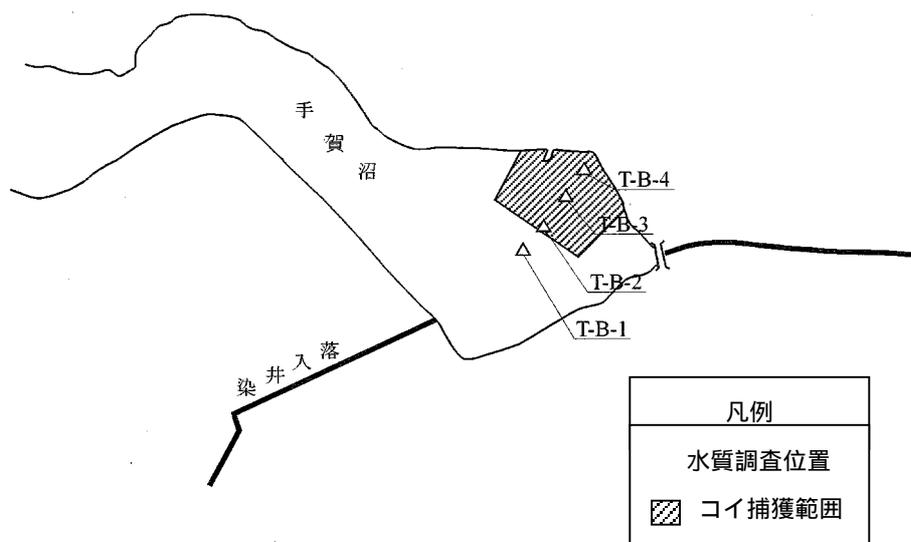


図 5 手賀沼調査位置図

### 3. 捕獲調査結果

#### (1) 石津川

##### ア コイの検査

コイの検査結果を表 4に示した。

オス 10 個体の検査を実施した。検査を行ったオスの平均体重は 1,500 g (1,000 ~ 1,700 g)、平均標準体長は 38 cm (34 ~ 44 cm)であった。

組織学的検査において、生殖腺指数の平均値は 1.7% (0.8 ~ 3.6%)、であった。解剖所見では、1 個体で生殖腺が小さかったが、他の臓器に異常は認められなかった。病理所見では、2 個体 (全 10 個体) において、退縮<sup>ii,4,5)</sup>の異常が認められた (写真 1、写真 2)。

血液学的検査において、ピテロジェニン<sup>ii</sup>はオスの 50% (10 個体中 5 個体)で検出され、0.055 ~ 1.8  $\mu\text{g/mL}$  範囲にあった。テストステロンは全ての個体で検出され、670 ~ 1,400  $\text{pg/mL}$  の範囲にあった。17 $\beta$ -エストラジオールは全ての個体で検出され、680 ~ 1,500  $\text{pg/mL}$  の範囲にあった。

化学的検査において、ノニルフェノールは全ての個体で検出され、40 ~ 290  $\mu\text{g/kg}$  (平均 137  $\mu\text{g/kg}$ )の範囲にあった。

##### イ 水質調査

水質調査結果を表 5に示した。採水時の水温は 25.4 ~ 33.5 °C であった。

ノニルフェノールの測定値は、3.4 ~ 4.8  $\mu\text{g/L}$  (平均 4.3  $\mu\text{g/L}$ )、4-t-オクチルフェノールの測定値は、0.25 ~ 0.83  $\mu\text{g/L}$  (平均 0.52  $\mu\text{g/L}$ )、ビスフェノール A の測定値は、0.11 ~ 0.18  $\mu\text{g/L}$  (平均 0.15  $\mu\text{g/L}$ )、エストロンの測定値は、1.5 ~ 2.0  $\text{ng/L}$  (平均 1.7  $\text{ng/L}$ )、17 $\beta$ -エストラジオールの測定値は、

---

<sup>ii</sup> 退縮：小葉構造が不明瞭になった状態や構成細胞が欠落した状態。

0.2~0.6 ng/L (平均 0.5 ng/L)、17 $\beta$ -エストラジオールの測定値は、1.0~2.3 ng/L (平均 1.8 ng/L)、エストリオールの測定値は、ND:<0.1~1 ng/L (平均 0.1 ng/L)、エチニルエストラジオールの測定値は、ND:<0.1~0.2 ng/L (平均 0.1 ng/L)であった。なお、平均値の算出に当たっては、測定結果が ND であった場合、濃度を ND 値の 1/2 と仮定し、計算した。

今回の測定結果の平均値を平成 13 年度環境実態調査水質調査結果と比較すると、4-t-オクチルフェノール、17 $\beta$ -エストラジオール、17 $\beta$ -エストラジオール及びエチニルエストラジオールの平均値は平成 13 年度調査結果を上回り、ノニルフェノール及びビスフェノール A は下回っていた。

酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性測定結果を表 6に示した。全ての試料に女性ホルモン様活性が認められ、17 $\beta$ -エストラジオール換算値は 1~4.5 ng/L (平均 2.5 ng/L)であった。各画分においては、 $\alpha$ 画分及び $\beta$ 画分に活性が認められ、17 $\beta$ -エストラジオール換算値が得られた。

酵母 two-hybrid 法を用いた 17 $\beta$ -エストラジオール競合試験法によるエストロゲン・アンタゴニスト活性測定結果を表 7に示した。全ての試料にエストロゲン・アンタゴニスト活性が認められ、17 $\beta$ -エストラジオール阻害率は 52~70% (平均 62%)であった。各画分においては、 $\alpha$ 及び $\beta$ 画分に活性が認められ、阻害率が求められた。エストロゲン・アンタゴニスト活性の認められた $\alpha$ 画分を、女性ホルモン様活性が認められた $\beta$ 画分または $\alpha$ 画分と混合して、試験水(全)の活性が再現できるかどうかを確認した。その結果、4.4~8.6ng/L (17 $\beta$ -エストラジオール換算値)であった $\beta$ 画分の女性ホルモン様活性は、 $\alpha$ 画分との混合によって 0.8~4.96ng/L (17 $\beta$ -エストラジオール換算値)と全ての試料で活性

の低下が認められ、エストロゲン・アンタゴニスト活性が確認された(表 8)。試験水(全)の活性を下回る女性ホルモン様作用が示されたのは、  
または 画分以外に含まれる女性ホルモン様活性を示す画分の寄与などによるものと考えられた。

なお、確認試験は試験系の都合で試料添加量が少なく 17 エストラジオール換算値を得るために十分な発光強度が得られなかったため、求めた計算値は参考値として取り扱い、検出限界値未満であっても計算値を示した。

表 4 石津川におけるコイの検査結果

検査項目						組織学的検査					血液学的検査			化学的検査		
No.	性別	捕獲日	全長	標準体長	体重	生殖腺重量			生殖腺指数	解剖所見	病理所見	ビテロジェニン	テストステロン	17-エストラジオール	ノニルフェノール	粗脂肪
						右	左	合計								
			cm	cm	g	g	%	μg/mL	pg/mL			pg/mL	μg/kg	g/100g		
1		2002/7/23	40	34	1099	12.0	7.5	19.5	1.8	異常なし	異常なし	ND	1,100	1,200	280	1.8
2		2002/7/23	51	42	1731	7.3	7.2	14.5	0.8	異常なし	退縮	0.076	1,100	900	290	1.6
3		2002/7/23	53	44	1656	13.0	10.0	23.0	1.4	異常なし	異常なし	ND	1,100	1,200	92	1.1
4		2002/7/23	47	38	1428	8.8	8.6	17.4	1.2	異常なし	異常なし	ND	950	1,400	44	0.9
5		2002/7/23	44	36	1019	12.2	2.5	14.7	1.4	左生殖腺小さい	異常なし	0.055	1,400	680	40	1.2
6		2002/7/23	45	36	1338	11.0	6.2	17.2	1.3	異常なし	退縮	ND	970	1,100	130	2.3
7		2002/7/23	47	38	1492	12.5	11.2	23.7	1.6	異常なし	異常なし	ND	1,100	1,500	140	1.0
8		2002/7/23	52	40	1669	32.4	28.0	60.4	3.6	異常なし	異常なし	1.4	670	900	190	1.4
9		2002/7/23	49	39	1664	17.3	11.1	28.4	1.7	異常なし	異常なし	1.4	870	1,300	98	0.8
10		2002/7/23	48	38	1476	19.4	9.7	29.1	2.0	異常なし	異常なし	1.8	960	1,100	69	0.8
平均	-	-	48	38	1457	14.6	10.2	24.8	1.7	-	-	0.48	1,000	1,100	140	1.3

ビテロジェニンの平均値算出にあたって、検出限界値未満 (ND) は検出限界値 (0.039μg/mL) の 1/2 を用いた。

表 5 石津川における水質調査結果

分析項目		4-tert-オクチルフェノール	ノニルフェノール	ビスフェノールA	17-エストラジオール	17-エストラジオール	エストリオール	エストロン	エチニルエストラジオール
単 位		μg/L	μg/L	μg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L
検出限界値		0.01	0.1	0.01	0.1	0.1	1	0.2	0.1
採水日時	7/23 9時 (水温29.9 )	0.25	4.5	0.17	1.9	0.4	ND	2.0	ND
	7/30 14時 (水温33.5 )	0.67	4.3	0.18	2.3	0.6	ND	1.8	ND
	8/6 11時 (水温31.7 )	0.83	4.8	0.14	2.1	0.6	ND	1.6	0.1
	8/22 8時 (水温25.4 )	0.33	3.4	0.11	1.0	0.2	1	1.5	ND
平均値		0.52	4.3	0.15	1.8	0.5	1	1.7	0.1
(参考)平成13年度 環境実態調査結果		0.24	5.9	0.17	ND	ND	-	-	ND

表 6 石津川における酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性

〔単位：ng/L (17-エストラジオール換算値)〕

画分		全	BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明			
採水日時	7/23 9時	4.5	ND	ND	ND	6.7	ND	ND	ND	ND	ND
	7/30 14時	weak	ND	4.2	ND	weak	ND	ND	ND	ND	ND
	8/6 11時	weak	ND	3.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	8/22 8時	weak	ND	weak	ND	3.2	ND	ND	ND	ND	ND
平均		2.5	ND	2.5	ND	3.1	ND	ND	ND	ND	ND

検出限界値 ND：1 ng/L (平均値計算にあたっては、NDは0.5 ng/Lとして計算した。)  
 Weak：対照に対する発光強度が10倍未満であった場合で17-エストラジオール換算値は1~2.7 ng/L (平均値計算にあたっては、weakは1.85 ng/Lとして計算した。)

表 7 石津川におけるエストロゲン・アンタゴニスト活性

〔単位：% (17 $\beta$ -エストラジオール阻害率)〕

画分		全	BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明			
含まれる物質											
採水日時	7/23 9時	52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	51	weak	ND
	7/30 14時	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	54	51	ND
	8/6 11時	70	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	weak	ND
	8/22 8時	60	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56	52	ND
平均		62	ND	ND	ND	ND	ND	ND	57	46	ND

終濃度 10 倍濃縮試料を添加したときの 300pM の 17 $\beta$ -エストラジオール活性の阻害率として表示。

検出限界値 ND：30% (平均値計算にあたっては 15%として計算した)

weak：30～50% (平均値計算にあたっては 40%として計算した)

表 8 エストロゲン・アンタゴニスト活性の確認試験結果

〔単位：ng/L (17 $\beta$ -エストラジオール換算値)〕

画分		全	BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	または を と混合して 活性を測定
含まれる物質								
採水日時	7/23 9時	6.8	-	-	-	8.6	-	4.9
	7/30 14時	2.9	-	4.4	-	-	-	0.8
	8/6 11時	3.0	-	5.4	-	-	-	1.3
	8/22 8時	3.6	-	-	-	5.2	-	1.0

試料混合のために試料添加量が少ない試験系となり、濃度算出のために必要な発光強度が得られなかった。そのため、ここで示した 17 $\beta$ -エストラジオール換算値は参考値であり、検出限界値未満であっても計算値を示している。本表では活性強度の目安として利用する。このため、表 6 で示した結果とは計算値が一致しない。

\*1：画分と画分を均等に混合して女性ホルモン様活性を測定した。

\*2：画分と画分を均等に混合して女性ホルモン様活性を測定した。

## (2) 印旛放水路

### ア コイの検査

コイの検査結果を表 9に示した。

オス 10 個体の検査を実施した。検査を行ったオスの平均体重は 1,500 g (880 ~ 2,500 g)、平均標準体長は 39 cm (33 ~ 46 cm)であった。

組織学的検査において、生殖腺指数の平均値は 2.7% (1.8 ~ 4.0%)であった。解剖所見では全ての個体とも生殖腺及び他の臓器に異常は認められなかった。病理所見では異常が認められなかった。

血液学的検査において、ビテロジェニンは 70% (10 個体中 7 個体)で検出され、0.14 ~ 1.8  $\mu\text{g/mL}$  の範囲にあった。テストステロンは全ての個体で検出され、580 ~ 2,600  $\text{pg/mL}$  の範囲にあった。17 $\beta$ -エストラジオールは全ての個体で検出され、220 ~ 1,500  $\text{pg/mL}$  の範囲にあった。

化学的検査において、ノニルフェノールは 50% (10 個体中 5 個体)で検出され、16 ~ 150  $\mu\text{g/kg}$  (平均 38  $\mu\text{g/kg}$ )の範囲にあった。

### イ 水質調査

水質調査結果を表 10に示した。採水時の水温は 25.7 ~ 27.6 °C であった。

ノニルフェノールの測定値は、0.8 ~ 1.1  $\mu\text{g/L}$  (平均 0.9  $\mu\text{g/L}$ )、4-t-オクチルフェノールの測定値は、0.03 ~ 0.04  $\mu\text{g/L}$  (平均 0.04  $\mu\text{g/L}$ )、ビスフェノール A の測定値は、0.12 ~ 0.13  $\mu\text{g/L}$  (平均 0.12  $\mu\text{g/L}$ )、エストロンの測定値は、1.4 ~ 1.7  $\text{ng/L}$  (平均 1.5  $\text{ng/L}$ )、17 $\beta$ -エストラジオールの測定値は、検出限界値未満 ND=0.1  $\text{ng/L}$  未満 ~ 0.1  $\text{ng/L}$  (平均 0.1  $\text{ng/L}$ )、17 $\alpha$ -エストラジオールの測定値は、0.4 ~ 0.5  $\text{ng/L}$  (平均 0.5  $\text{ng/L}$ )であった。エス

トリオール及びエチニルエストラジオールの測定値は、それぞれ検出限界値 ND=1 ng/L 未満及び ND=0.1 ng/L 未満であった。なお、平均値の算出に当たっては、測定結果が ND であった場合、濃度を ND 値の 1/2 と仮定し、計算した。

今回の測定結果の平均値を平成 13 年度環境実態調査水質調査結果と比較すると、ノニルフェノール、ビスフェノール A、17 $\beta$ -エストラジオール及び 17 $\alpha$ -エストラジオールの平均値は平成 13 年度調査結果を上回り、4-t-オクチルフェノールの平均値は平成 13 年度調査結果を下回っていた。

酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性測定結果を表 11に示した。全ての試料で、弱い女性ホルモン様活性 ( weak : 1 ~ 2.7ng/L ) が認められた。

酵母 two-hybrid 法を用いた 17 $\beta$ -エストラジオール競合試験法によるエストロゲン・アンタゴニスト活性測定結果を表 12に示した。3 つの試料 ( 全 4 試料 ) において弱いエストロゲン・アンタゴニスト活性 ( 30 ~ 50% ) が認められた。一つの試料において 画分に弱い活性が認められた。

表 9 印旛放水路におけるコイの検査結果

検査項目						組織学的検査				血液学的検査			化学的検査			
No.	性別	捕獲日	全長	標準体長	体重	生殖腺重量			生殖腺指数	解剖所見	病理所見	ビテロジェニン	テストステロン	17-エストロジオール	ノニルフェノール	粗脂肪
						右	左	合計								
			cm	cm	g	g			%			μg/mL	pg/mL	pg/mL	μg/kg	g/100g
			0.039	50	50	15	-									
1		2002/7/8	49	40	1017	15.4	15.5	30.9	3.0	うっ血	異常なし	ND	1,900	970	ND	1.3
2		2002/7/8	40	33	973	14.8	13.3	28.1	2.9	異常なし	異常なし	0.14	1,500	800	ND	0.8
3		2002/7/8	47	38	1257	11.6	13.0	24.6	2.0	異常なし	異常なし	0.15	1,800	350	ND	0.7
4		2002/7/8	41	33	876	15.1	14.5	29.6	3.4	異常なし	異常なし	0.15	2,300	560	ND	0.7
5		2002/7/8	51	42	1616	34.3	31.1	65.4	4.0	うっ血	異常なし	0.24	580	300	ND	0.8
6		2002/7/8	55	46	2482	43.7	16.9	60.6	2.4	異常なし、脂肪多い	異常なし	ND	1,600	220	32	3.4
7		2002/7/8	48	40	1571	25.8	19.4	45.2	2.9	異常なし、脂肪多い	異常なし	1.8	1,400	660	16	0.6
8		2002/7/9	49	37	1470	17.0	9.6	26.6	1.8	ややうっ血	異常なし	1.1	1,100	620	150	1.7
9		2002/7/9	47	37	1302	16.6	20.2	36.8	2.8	異常なし	異常なし	ND	2,500	650	92	0.2
10		2002/7/9	51	41	1961	26.3	16.9	43.2	2.2	異常なし	異常なし	0.21	2,600	1,500	51	0.4
平均	-	-	48	39	1453	22.1	17.0	39.1	2.7	-	-	0.38	1,700	660	38	1.1

ビテロジェニン及びノニルフェノールの平均値算出にあたって、検出限界値未満（ND）は検出限界値（それぞれ0.039μg/mL及び15μg/kg）の1/2を用いた。

表 10 印旛放水路における水質調査結果

分析項目	4-tert-オクチルフェノール	ノニルフェノール	ビスフェノールA	17 -エストラジオール	17 -エストラジオール	エストリオール	エストロン	エチニルエストラジオール	
単 位	μg/L	μg/L	μg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	
検出限界	0.01	0.1	0.01	0.1	0.1	1	0.2	0.1	
採水日時	7/8 10時 (水温26.3 )	0.04	1.1.	0.12	0.4	0.1	ND	1.7	ND
	7/8 16時 (水温27.6 )	0.03	0.8	0.13	0.5	0.1	ND	1.5	ND
	7/8 22時 (水温26.2 )	0.03	0.8	0.12	0.5	0.1	ND	1.5	ND
	7/9 4時 (水温25.7 )	0.04	0.9	0.12	0.4	ND	ND	1.4	ND
平均	0.04	0.8	0.12	0.5	0.1	ND	1.5	ND	
(参考)平成13年度 環境実態調査結果	0.06	0.3	0.05	0.2	ND	-	-	ND	

表 11 印旛放水路における酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性

{ 単位 : ng/L ( 17 -エストラジオール換算値 ) }

画分	全	BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明				
採水日時	7/8 10時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7/8 16時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	7/8 22時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	7/9 4時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
平均	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

検出限界値 ND : 1 ng/L、Weak : 対照に対する発光強度が 10 倍未満であった場合で 17 -エストラジオール換算値は 1 ~ 2.7 ng/L

表 12 印旛放水路におけるエストロゲン・アンタゴニスト活性

〔単位：%（17 $\beta$ -エストラジオール阻害率）〕

画分		全										
含まれる物質			BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明				
採水日時	7/8 10時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7/8 16時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	7/8 22時	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	weak	ND	ND	ND
	7/9 4時	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
平均		34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

終濃度 10 倍濃縮試料を添加したときの 300pM の 17 $\beta$ -エストラジオール活性の阻害率として表示。

検出限界値 ND：30%（平均値計算にあたっては 15%として計算した）

weak：30～50%（平均値計算にあたっては 40%として計算した）

### (3) 手賀沼

#### ア コイの検査

コイの検査結果を表 13に示した。

オス 10 個体の検査を実施した。検査を行ったオスの平均体重は 1,100 g (610 ~ 2,300 g)、平均標準体長は 36 cm (31 ~ 46 cm)であった。

組織学的検査において、生殖腺指数の平均値は 2.5% (1.0 ~ 4.1%)、であった。解剖所見では、全ての個体とも生殖腺及び他の臓器に異常は認められなかった。病理所見でも、異常は認められなかった。

血液学的検査において、ビテロジェニン<sup>17</sup>は全ての個体で検出限界値 ND=0.039  $\mu$ g/mL 未満であった。テストステロンは全ての個体で検出され、380 ~ 870 pg/mL の範囲にあった。17 $\beta$ -エストラジオール<sup>17</sup>は全ての個体で検出され、120 ~ 860 pg/mL の範囲にあった。

化学的検査において、ノニルフェノール<sup>17</sup>は全ての個体で検出限界値 ND=15  $\mu$ g/kg 未満であった。

#### イ 水質調査

水質調査結果を表 14に示した。採水時の水温は 24.5 ~ 25.1 °C であった。

ノニルフェノールの測定値は、ND:<0.1 ~ 0.1  $\mu$ g/L (平均 0.1  $\mu$ g/L)、4-t-オクチルフェノールの測定値は、ND:<0.01 ~ 0.01  $\mu$ g/L (平均 0.01  $\mu$ g/L)、ビスフェノール A の測定値は、0.07  $\mu$ g/L (平均 0.07  $\mu$ g/L)、エストロンの測定値は、0.2 ~ 0.3 ng/L (平均 0.3 ng/L) であった。17 $\beta$ -エストラジオール<sup>17</sup>、17 $\alpha$ -エストラジオール<sup>17</sup>、エストリオール及びエチニルエストラジオールの測定値は、それぞれ検出限界値 ND 未満であった。なお、平均値

の算出に当たっては、測定結果が ND であった場合、濃度を ND 値の 1/2 と仮定し、計算した。

今回の測定結果の平均値を平成 13 年度環境実態調査水質調査結果と比較すると、4-t-オクチルフェノール及びビスフェノール A の平均値は平成 13 年度調査結果を上回り、ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノール及び 17 $\beta$ -エストラジオールの平均値は平成 13 年度調査結果を下回っていた。

酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性測定結果を表 15に示した。全ての試料で、女性ホルモン様活性は検出限界値 ND=1 ng/L 未満であった。

酵母 two-hybrid 法を用いた 17 $\beta$ -エストラジオール競合試験法によるエストロゲン・アンタゴニスト活性測定結果を表 16に示した。1つの試料(全4試料)において弱いエストロゲン・アンタゴニスト活性(30~50%)が認められた。

表 13 手賀沼におけるコイの検査結果

検査項目						組織学的検査						血液学的検査			化学的検査	
No.	性別	捕獲日	全長	標準 体長	体重	生殖腺重量			生殖腺 指数	解剖所見	病理所見	ビテロシエニン μg/mL	テストステロン pg/mL	17-エストロジオール pg/mL	ノニルフェノール μg/kg	粗脂肪 g/100g
						右	左	合計								
			cm	cm	g	g			%							
1		2002/7/5	43	36	1143	12.3	15.4	27.7	2.4	異常なし	異常なし	ND	440	480	ND	0.6
2		2002/7/5	43	36	860	11.0	9.1	20.1	2.3	異常なし	異常なし	ND	570	410	ND	0.4
3		2002/7/5	40	33	698	10.5	11.8	22.3	3.2	異常なし	異常なし	ND	380	860	ND	0.4
4		2002/7/5	38	31	663	3.6	2.8	6.4	1.0	異常なし	異常なし	ND	580	150	ND	0.5
5		2002/7/5	39	32	676	3.8	2.7	6.5	1.0	右生殖腺うっ血	異常なし	ND	520	370	ND	0.4
6		2002/7/5	47	39	1408	15.9	10.6	26.5	1.9	異常なし	異常なし	ND	870	520	ND	0.5
7		2002/7/5	48	41	1282	28.1	24.5	52.6	4.1	異常なし	異常なし	ND	460	230	ND	0.5
8		2002/7/5	56	46	2287	41.0	32.7	73.7	3.2	うっ血	異常なし	ND	610	280	ND	0.7
9		2002/7/5	46	38	1178	24.5	20.7	45.2	3.8	かすかにうっ血	異常なし	ND	520	590	ND	0.3
10		2002/7/5	39	32	613	6.8	6.7	13.5	2.2	かすかにうっ血	異常なし	ND	720	120	ND	0.3
平均	-	-	44	36	1081	15.8	13.7	29.5	2.5	-	-	ND	570	400	ND	0.5

表 14 手賀沼における水質調査結果

分析項目	4-tert-オクチルフェノール	ノニルフェノール	ビスフェノールA	17-エストラジオール	17-エストラジオール	エストリオール	エストロン	エチニルエストラジオール	
単 位	μg/L	μg/L	μg/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	
検出限界	0.01	0.1	0.01	0.1	0.1	1	0.2	0.1	
採水位置	TB-1 (水温25.1)	0.01	0.1	0.07	ND	ND	ND	0.3	ND
	TB-2 (水温24.8)	0.01	0.1	0.07	ND	ND	ND	0.3	ND
	TB-3 (水温24.8)	ND	ND	0.07	ND	ND	ND	0.2	ND
	TB-4 (水温24.5)	0.01	ND	0.07	ND	ND	ND	0.3	ND
	平均	0.01	0.1	0.07	ND	ND	ND	0.3	ND
(参考)平成12年度 環境実態調査結果	0.02	0.2	0.05	0.3	ND	-	-	ND	

表 15 手賀沼における酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性

{ 単位 : ng/L ( 17-エストラジオール換算値 ) }

画分	全	BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明				
採水位置	TB-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TB-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	TB-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	TB-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
平均	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

検出限界値 ND : 1 ng/L

Weak : 対照に対する発光強度が 10 倍未満であった場合で 17-エストラジオール換算値は 1 ~ 2.7 ng/L

表 16 手賀沼におけるエストロゲン・アンタゴニスト活性

〔単位：%（17 $\beta$ -エストラジオール阻害率）〕

画分		全									
含まれる物質			BP, BAP	NP	NP, NP1E0	E1, E2, E3, NP1E0, NP2E0, BPA	NP2E0	不明			
採水日時	TB-1	weak	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TB-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TB-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	TB-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
平均		21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

終濃度 10 倍濃縮試料を添加したときの 300pM の 17 $\beta$ -エストラジオール活性の阻害率として表示。

検出限界値 ND：30%（平均値計算にあたっては 15%として計算した）

weak：30～50%（平均値計算にあたっては 40%として計算した）

#### (4) 捕獲調査結果のまとめ

捕獲調査結果の概要を表 17に示した。

##### ア コイの検査結果

組織学的検査において、オスの生殖腺指数は、石津川で平均 1.7 % (0.8 ~ 3.6%)、印旛放水路で平均 2.7% (1.8 ~ 4.0%)、手賀沼で平均 2.5 % (1.0 ~ 4.1%)であった。これらの値を東京都環境科学研究所が平成 11 年に東京都内の河川 (多摩川、浅川、野川及び神田川) において実施した調査<sup>5)</sup>の内、同時期にあたる 6~8 月のコイの調査結果と比較すると、平均値 (2.8%) はほぼ同程度で、その変動範囲 (0.5 ~ 8.2%) に含まれていた。冬季の結果 (3 水域のオスの平均は 4.6%) と比較すると低値であった。建設省が平成 10 年 11 ~ 12 月に実施したコイの調査結果<sup>6)</sup>の平均値 (5.3%) 及び東京都環境科学研究所が平成 10 年 11 月に東京都内の河川 (浅川、野川及び神田川) において実施した調査結果<sup>7)</sup>の平均値(6.3%) をみると、夏季より秋~冬季で生殖腺指数が高値になる傾向が認められている。

オスメダカ等が女性ホルモン様作用を示す物質に曝露された際に精巣に形成される精巣卵<sup>8,9)</sup>は、冬季の調査に引き続き、夏季の調査においても、捕獲したコイには認められなかった。

オスの解剖所見及び病理所見では、石津川で捕獲された 2 個体 (全 10 個体) に精巣異常が認められ、これらの個体の精巣に退縮が認められた。冬季の調査では、印旛放水路で捕獲された 2 個体 (各水域オス各 15 個体) に精巣異常 (退縮及び不明細胞増殖) が認められた。東京都環境科学研究所の調査<sup>10)</sup>によると、多摩川水系では 11%の精巣異常 (不明細胞増殖、腫瘍形成、退縮、精巣卵形成など) が認められているが、これら

の精巣異常の発生率については、女性ホルモン様物質やビテロジェニンの濃度との正の相関は得られていない。しかし、これらの異常のうち不明細胞増殖については、女性ホルモンや女性ホルモン様物質が主に下水処理場から排出されることと、下水処理水の影響を受けていると考えられる地点で他地点と比較して発生率が高い傾向があることから、女性ホルモンや女性ホルモン様物質により引き起こされる可能性を示唆している。

血液学的検査において、オスの血清中ビテロジェニンは、石津川では捕獲された個体の 50% (冬季は 40%)、印旛放水路では捕獲された個体の 70% (同 53%) で検出され、その濃度範囲は、石津川で 0.055 ~ 1.8  $\mu\text{g/mL}$  (同 0.071 ~ 2  $\mu\text{g/mL}$ )、印旛放水路で 0.14 ~ 1.8  $\mu\text{g/mL}$  (同 0.053 ~ 1.9  $\mu\text{g/mL}$ ) であった。手賀沼で捕獲された個体は夏季及び冬季とも全て検出限界値  $\text{ND}=0.039 \mu\text{g/mL}$  未満であった (図 6)。冬季の結果と比較すると、検出率はやや高くなっていたが、濃度範囲はほとんど変化はなかった。建設省が平成 10 年 11 ~ 12 月に実施した全国調査結果(参考資料 1)では、捕獲されたオスコイの 25% で検出され、その濃度範囲は 0.1 ~ 870  $\mu\text{g/mL}$  (検出限界値  $\text{ND}=0.1 \mu\text{g/mL}$ )<sup>4)</sup> であった。霞ヶ浦で平成 9 ~ 10 年に実施された調査結果では、捕獲された野生のオスの 32% で検出され、その濃度範囲は 0.088 ~ 1.68  $\mu\text{g/mL}$  (検出限界値  $\text{ND}=0.04 \mu\text{g/mL}$ )<sup>8)</sup> であった。生活排水の流入が多いと考えられた水域で捕獲されたオスでは、0.04 ~ 1.34  $\mu\text{g/mL}$  (検出率 69%、長崎市)、0.5 ~ 39.2  $\mu\text{g/mL}$  (検出率 56%、東京都)等の測定例があった<sup>9)</sup>。下水処理排水が流入する水域で捕獲されたオスでは、0.5 ~ 39.2  $\mu\text{g/mL}$  (検出率 83%)<sup>10)</sup>、 $\text{ND}: < 0.039 \sim 120 \mu\text{g/mL}$ <sup>3)</sup>、10 ~ 12,000  $\mu\text{g/mL}$  (検出率 50%)<sup>11)</sup>等の測定例があり、

比較的下水道流入水の影響が少ないと考えられた水域で捕獲されたオスでは、ND:<0.039 ~ 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>3)</sup>であった。

これらの値と今回の測定結果を比較すると、霞ヶ浦での測定結果と同程度であり、下水処理排水が流入する水域での測定結果より低い値であった。

化学的検査において、ノニルフェノールは石津川で捕獲された全ての個体及び印旛放水路で捕獲された5個体(全10個体)の筋肉中から検出され、石津川で捕獲されたコイで平均137  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (冬季594  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、印旛放水路で捕獲されたコイで平均38  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (同101  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )であり、冬季と比較して低値となっていた。なお、夏季及び冬季とも、手賀沼で捕獲された全ての個体の筋肉中ノニルフェノール濃度は、検出限界値ND=15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 未満であった。

なお、ノニルフェノールの筋肉中濃度測定結果と水質調査結果よりコイのノニルフェノール生物濃縮係数を求めると、石津川のオスで30(冬季は89)、印旛放水路のオスで42(同53)であった。冬季と比較して低値となっていたが、コイのノニルフェノール生物濃縮係数については、琵琶湖での調査結果として15~22<sup>11,12)</sup>、室内実験結果として90~330<sup>13)</sup>、124<sup>14)</sup>、113~158<sup>15)</sup>等の値が得られており、今回の調査結果は、既存の報告値に類似する値であった。

## イ 水質調査結果

ノニルフェノールの測定値は、石津川で4.3  $\mu\text{g}/\text{L}$  (冬季は平均6.7  $\mu\text{g}/\text{L}$ )、印旛放水路で平均0.9  $\mu\text{g}/\text{L}$  (同1.9  $\mu\text{g}/\text{L}$ )、手賀沼で検出限界値ND=0.1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 未満(同検出限界値未満)であった。4-t-オクチルフェノ

ールの測定値は、石津川で平均  $0.52 \mu\text{g/L}$  (同  $0.77 \mu\text{g/L}$ )、印旛放水路で平均  $0.04 \mu\text{g/L}$  (同  $0.12 \mu\text{g/L}$ )、手賀沼で  $0.01 \mu\text{g/L}$  (同  $0.01 \mu\text{g/L}$ ) であった。ビスフェノール A の測定値は、石津川で平均  $0.15 \mu\text{g/L}$  (同  $0.19 \mu\text{g/L}$ )、印旛放水路で平均  $0.12 \mu\text{g/L}$  (同  $0.26 \mu\text{g/L}$ )、手賀沼で  $0.07 \mu\text{g/L}$  (同  $0.12 \mu\text{g/L}$ ) であった。アルキルフェノール類及びビスフェノール A の水中濃度は、石津川、印旛放水路、手賀沼の順で低く、アルキルフェノールについては、冬季と同じ傾向であった。

エストロンの測定値は、石津川で平均  $1.7\text{ng/L}$  (同  $21 \text{ng/L}$ )、印旛放水路で平均  $1.5\text{ng/L}$  (同  $3.9 \text{ng/L}$ )、手賀沼で  $0.3\text{ng/L}$  (同  $0.9 \text{ng/L}$ ) であった。17 $\beta$ -エストラジオールの測定値は、石津川で平均  $0.5\text{ng/L}$  (同  $1.4 \text{ng/L}$ )、印旛放水路で平均  $0.1\text{ng/L}$  (同  $0.2 \text{ng/L}$ )、手賀沼で検出限界値  $\text{ND}=0.1 \text{ng/L}$  未満 (同 検出限界値未満) であった。17 $\alpha$ -エストラジオールの測定値は、石津川で平均  $1.8\text{ng/L}$  (同  $4.4 \text{ng/L}$ )、印旛放水路で平均  $0.5\text{ng/L}$  (同  $1.0 \text{ng/L}$ )、手賀沼で検出限界値  $\text{ND}=0.1 \text{ng/L}$  未満 (同  $0.2 \text{ng/L}$ ) であった。エストリオールの測定値は、石津川で平均  $1 \text{ng/L}$  (同  $2 \text{ng/L}$ )、印旛放水路で検出限界値  $\text{ND}=1 \text{ng/L}$  未満 (同  $15 \text{ng/L}$ )、手賀沼で検出限界値  $\text{ND}=0.1 \text{ng/L}$  未満  $\text{ng/L}$  (同 検出限界値未満) であった。エチニルエストラジオールの測定値は、全ての水域で検出限界値  $\text{ND}=0.1 \text{ng/L}$  未満 (冬季は石津川のみで検出、 $0.1 \text{ng/L}$ ) であった。女性ホルモン類の水中濃度は、石津川、印旛放水路、手賀沼の順で低く、エストリオール、エチニルエストラジオールの水中濃度は 3 水域ともほぼ同程度であり、冬季と同じ傾向であった。

女性ホルモン様活性の測定値(17 $\beta$ -エストラジオール換算値)は、石津川で  $4.5\text{ng/L}$  (同  $11 \text{ng/L}$ )、印旛放水路で  $1 \sim 2.7 \text{ng/L}$  (同  $1 \sim 2.7 \text{ng/L}$ )

手賀沼で検出限界値 ND=1 ng/L 未満（同 検出限界値未満）であった。  
女性ホルモン様活性は、石津川、印旛放水路、手賀沼の順で低く、冬季と同じ傾向であった。

エストロゲン・アンタゴニスト活性は、石津川で 62%、印旛放水路で 34%、手賀沼で 21%であった。

夏季の測定結果を冬季の結果と比較すると、いずれの値も低値となっていた。東京都環境科学研究所の多摩川水系における調査<sup>16)</sup>では、水温が高い場合、水中での化学物質の減少率が高くなり、下流域では濃度が低下することが報告されており、これと同様の結果となっていた。

表 17 捕獲調査結果の概要

調査対象水域 調査期間		石津川		印旛放水路		手賀沼			
		2001年11月	2002年7月	2002年2月	2002年7月	2001年12月	2002年7月		
		オス(n=15)	オス(n=10)	オス(n=15)	オス(n=10)	オス(n=15)	オス(n=10)		
検査項目	平均体重(g)	1,013	1,457	2,536	1,453	798	1081		
	平均標準体長(cm)	33	38	45	39	33	36		
	コイの検査結果	平均生殖腺指数(%)	3.9	1.7	5.6	2.7	4.2	2.5	
		組織学的検査	解剖所見	異常なし	精巣異常 1 個体	精巣異常 2 個体	異常なし	異常なし	異常なし
		病理所見	異常なし	退縮 2 個体	退縮 1 個体、 退縮及び不明細胞 増殖 1 個体	異常なし	異常なし	異常なし	
	血液学的検査	ヒレロシエロン(μg/mL) 検出率と濃度範囲	40% 0.071 ~ 2	50% 0.055 ~ 1.8	53% 0.053 ~ 1.9	70% 0.14 ~ 1.8	0% ND<0.039	0% ND<0.039	
		テストステロン(pg/mL) 検出率と濃度範囲	100% 360 ~ 4,000	100% 670 ~ 1,400	100% 3,700 ~ 18,000	100% 580 ~ 2,600	100% 210 ~ 3,800	100% 380 ~ 870	
		17-テストステロン(pg/mL) 検出率と濃度範囲	100% 200 ~ 1,900	100% 680 ~ 1,500	100% 350 ~ 1,300	100% 220 ~ 1,500	100% 60 ~ 550	100% 120 ~ 860	
	化学的検査	ニルフェノール平均濃度(μg/kg)	594	137	101	38	ND<15	ND<15	
	水質調査結果	水温( )	15.6 ~ 16.8	25.4 ~ 33.5	10.4 ~ 12.6	25.7 ~ 27.6	5.0	24.5 ~ 25.1	
ニルフェノール平均濃度(μg/L)		6.7	4.3	1.9	0.9	ND<0.1	ND<0.1		
4-t-オキフェノール平均濃度(μg/L)		0.77	0.52	0.12	0.04	0.01	0.01		
ビスフェノール A 平均濃度(μg/L)		0.19	0.15	0.26	0.12	0.12	0.07		
エストロン平均濃度(ng/L)		21	1.7	3.9	1.5	0.9	0.3		
17-テストステロン平均濃度(ng/L)		1.4	0.5	0.2	0.1	ND<0.1	ND<0.1		
17-テストステロン平均濃度(ng/L)		4.4	1.8	1.0	0.5	0.2	ND<0.1		
エストロール平均濃度(ng/L)		2	1	15	ND<1	ND<1	ND<1		
イチルエストロン平均濃度(ng/L)		0.1	1	ND<0.1	ND<0.1	ND<0.1	ND<0.1		
女性ホルモン様活性の 17-テストステロン換算値の平均値(ng/L)		11	2.5	1 ~ 2.7	1 ~ 2.7	ND<1	ND<1		

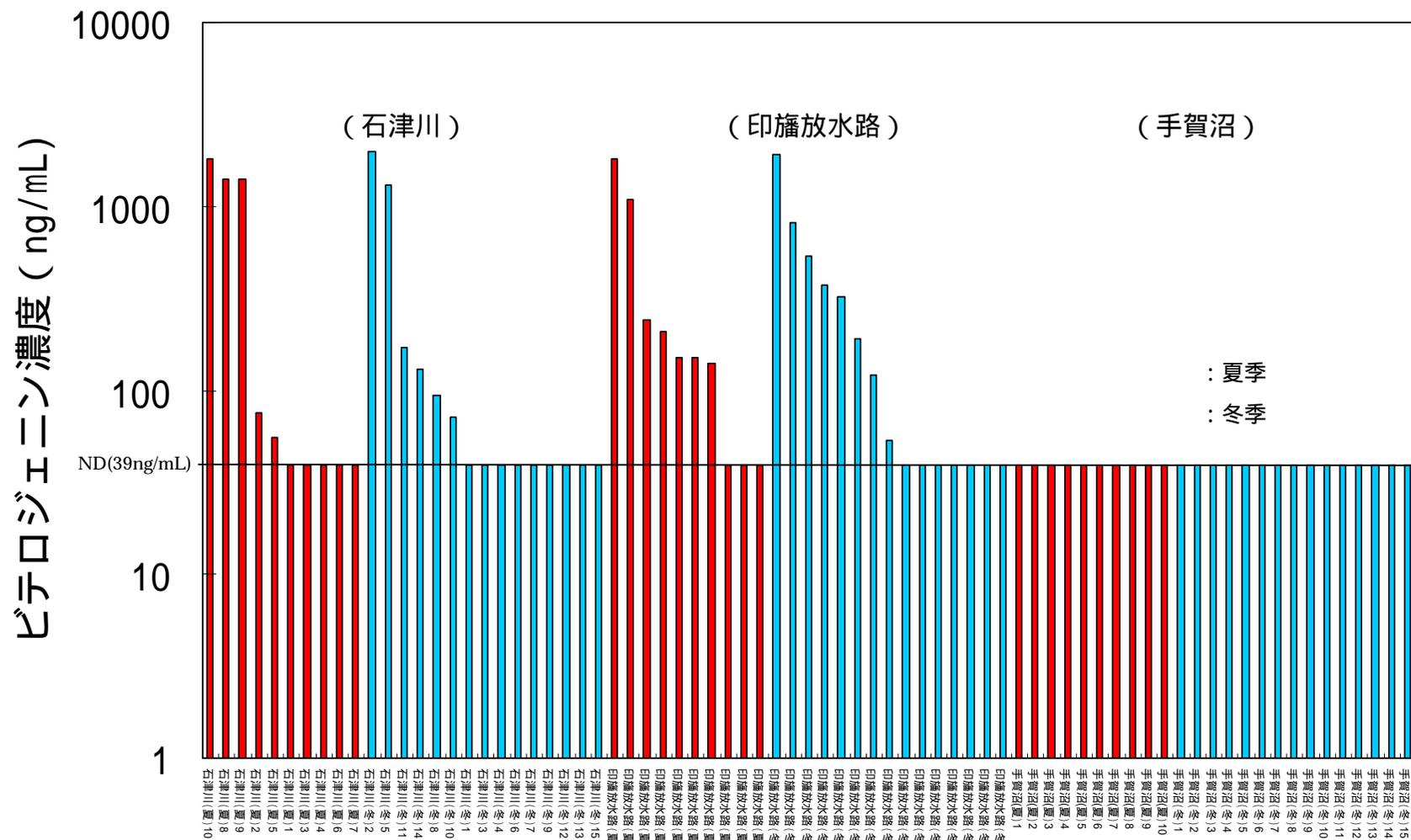


図 6 捕獲されたコイの血清中ビテロジェニン濃度

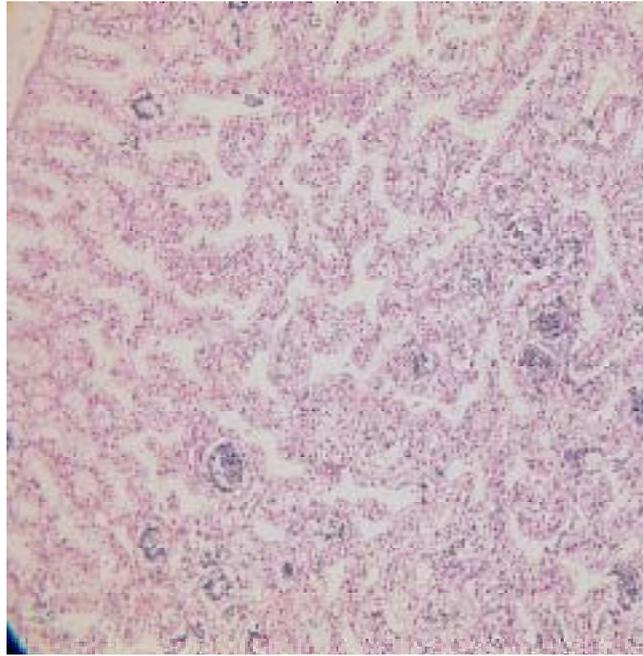


写真 1 退縮した精巣（石津川、オス）

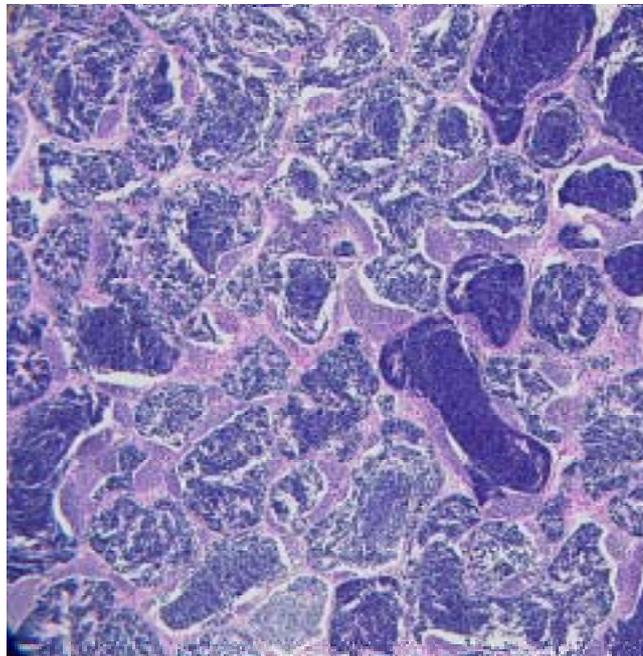


写真 2 正常な精巣（手賀沼）

#### 4 . 飼育調査結果(石津川)

##### ア コイの検査

コイの検査結果を表 18に示した。

飼育開始時に 10 個体、飼育 4 週間後に 10 個体の検査を実施した。飼育開始時の平均体重は 790g (710 ~ 940 g)、平均標準体長は 33 cm (31 ~ 35 cm)、飼育 4 週間後の平均体重は 760g (560 ~ 890 g) 、平均標準体長は 32 cm (29 ~ 34 cm)であった。

組織学的検査において、生殖腺指数は、飼育開始時の平均値は 3.9% (0.8 ~ 8.0%)、飼育 4 週間後の平均値は 2.0% (1.1 ~ 3.9%)であった。解剖所見では、飼育開始時に 2 個体に生殖腺の小さいものが認められた。病理所見では、飼育 4 週間後の 1 個体に退縮が認められた。

血液学的検査において、ピテロジェニンは飼育開始時には全個体で検出されなかった。飼育 4 週間後には 30% (10 個体中 3 個体)で検出され、0.054 ~ 0.64  $\mu$  g/L の範囲にあった。テストステロンは飼育開始時には全個体で検出され、320 ~ 1,400 pg/mL の範囲にあった。飼育 4 週間後に全個体で検出され、820 ~ 2,500 pg/mL の範囲にあった。17 $\beta$ -エストラジオールは飼育開始時には 40%( 10 個体中 4 個体 )で検出され、79 ~ 670 pg/mL の範囲にあった。飼育 4 週間後には全個体で検出され、430 ~ 1,400 pg/mL の範囲にあった。

化学的検査において、ノニルフェノールは飼育開始時には 10% ( 10 個体中 1 個体、21  $\mu$  g/kg ) に検出されたが、飼育 4 週間後には 100% (全 10 個体)検出され、70 ~ 250  $\mu$  g/kg (平均 161  $\mu$  g/kg)の範囲にあった。

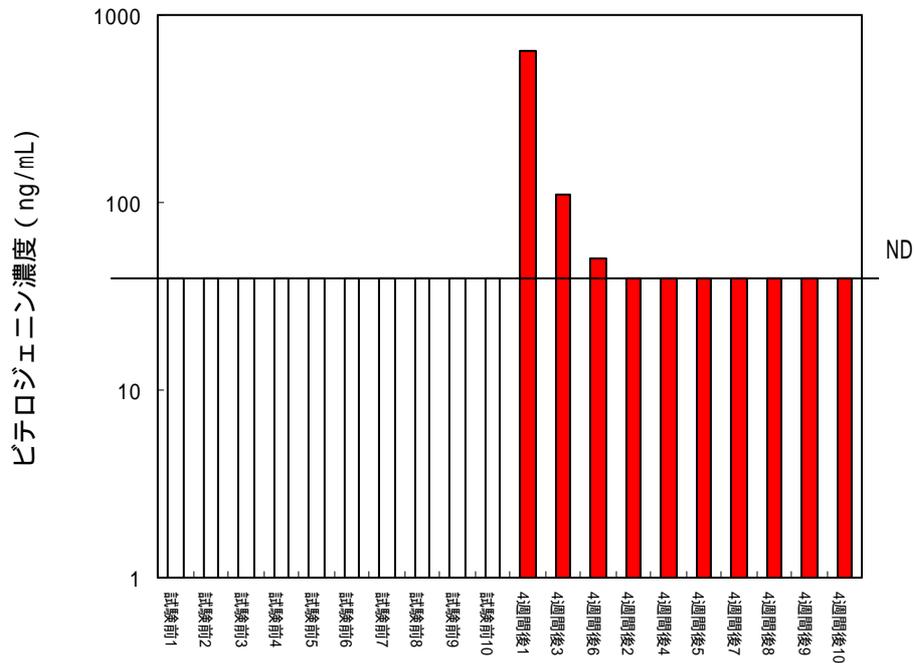


図 7 飼育試験でのコイの血清中ピテロジェニン濃度

#### ウ 水質調査

「3. 捕獲調査結果(1)石津川 イ水質調査」参照の

#### エ まとめ

今回の調査において、飼育試験開始時に、筋肉中にノニルフェノールが1個体(21 μg/kg)から検出された以外は、筋肉中のノニルフェノール及び血液中のピテロジェニンは検出限界値未満であった。

ノニルフェノールの平均水中濃度が4.3 μg/L及び女性ホルモン様活性の17 エストラジオール平均換算値が2.5ng/Lの石津川で4週間飼育さ

れたコイの筋肉中ノニルフェノール濃度は、検出限界値 ND=15  $\mu$ g/kg 未満から平均 161  $\mu$ g/kg に増加した。血清中ビテロジェニンは、検出率が 0% から 30% へ、平均濃度が検出限界値未満 ND = 0.039  $\mu$ g/mL から 0.09  $\mu$ g/mL に上昇した。

0.1ng/L の 17 $\beta$ -エストラジオール濃度（2 ヶ月間飼育試験）で、コイにおけるビテロジェニンが誘導されることが報告されており、ノニルフェノールではニジマスで 10 ~ 20.3ng/L<sup>17,18)</sup>、メダカで 22.5ng/L<sup>8)</sup>の濃度でビテロジェニンが誘導されている。また、(独)土木研究所の報告<sup>19)</sup>では、オスコイのビテロジェニン誘導は、早春の 2 ~ 4 月に誘導され、夏季の 7 ~ 9 月には誘導されなかったことを報告しており、夏季の高水温（25 以上）時に性ホルモンの分泌が抑制され、産卵期から退行期へ移行するためと推察している。本試験は、退行期へ移行した後と考えられ、早春の成熟期（3 ~ 5 月）に調査を実施すると、本試験結果より高いビテロジェニン誘導が認められる可能性が示唆された。

表 18 飼育調査（石津川）におけるコイの検査結果

検査項目						組織学的検査					血液学的検査			化学的検査		
No.	飼育期間	回収日	全長	標準体長	体重	生殖腺重量			生殖腺指数	解剖所見	病理所見	ビテロシヒニン μg/mL	テストステロン pg/mL	17-エストロジオール pg/mL	ノニルフェノール μg/kg	粗脂肪 g/100g
						右	左	合計								
			cm	cm	g	g			%							
1	開始時	2002/7/23	38	33	768	25.9	17.3	43.2	5.6	異常なし	異常なし	ND	1,100	390	ND	1.0
2	開始時	2002/7/23	40	34	850	12.2	10.4	22.6	2.7	異常なし	異常なし	ND	520	99	ND	2.1
3	開始時	2002/7/23	41	35	816	13.4	12.5	25.9	3.2	異常なし	異常なし	ND	320	79	ND	1.1
4	開始時	2002/7/23	39	34	799	3.9	2.5	6.4	0.8	生殖腺小さい	異常なし	ND	400	ND	ND	1.6
5	開始時	2002/7/23	37	33	733	4.7	4.0	8.7	1.2	生殖腺小さい	異常なし	ND	450	ND	ND	1.2
6	開始時	2002/7/23	37	31	705	27.8	28.8	56.6	8.0	異常なし	異常なし	ND	580	ND	ND	1.3
7	開始時	2002/7/23	38	33	752	11.2	10.4	21.6	2.9	異常なし	異常なし	ND	440	ND	ND	1.1
8	開始時	2002/7/23	39	33	761	20.7	24.4	45.1	5.9	異常なし	異常なし	ND	1,400	670	ND	1.0
9	開始時	2002/7/23	41	35	942	10.4	11.6	22.0	2.3	異常なし	異常なし	ND	550	ND	ND	4.6
10	開始時	2002/7/23	42	35	813	25.1	25.0	50.1	6.2	異常なし	異常なし	ND	800	ND	21	1.9
11	4週間	2002/8/22	38	32	746	5.8	5.8	11.6	1.6	異常なし	異常なし	0.640	820	1,300	200	2.4
12	4週間	2002/8/22	40	34	800	4.2	4.4	8.6	1.1	異常なし	異常なし	ND	1,200	570	130	1.8
13	4週間	2002/8/22	39	33	805	10.8	11.3	22.1	2.7	異常なし	異常なし	0.110	1,900	1,100	70	0.5
14	4週間	2002/8/22	34	29	556	4.2	3.9	8.1	1.5	異常なし	異常なし	ND	1,600	570	180	1.2
15	4週間	2002/8/22	39	32	803	9.7	12.8	22.5	2.8	異常なし	異常なし	ND	2,200	860	170	1.0
16	4週間	2002/8/22	39	32	687	8.3	6.6	14.9	2.2	異常なし	異常なし	0.054	1,700	1,000	140	1.1
17	4週間	2002/8/22	43	34	894	6.9	3.8	10.7	1.2	うっ血	組織退縮	ND	1,200	780	250	1.2
18	4週間	2002/8/22	39	33	693	10.7	16.0	26.7	3.9	異常なし	異常なし	ND	970	570	150	1.5
19	4週間	2002/8/22	38	32	730	10.7	4.4	15.1	2.1	異常なし	異常なし	ND	1,500	430	140	1.0
20	4週間	2002/8/22	37	32	760	4.9	4.8	9.7	1.3	軽いうっ血	異常なし	ND	2,500	1,400	180	1.5

## 5 考察

(1) 冬季の調査において、石津川で認められた女性ホルモン様活性における化学物質の寄与を検討すると、ノニルフェノールが含まれる画分の女性ホルモン様活性とエストラジオール等の女性ホルモンが含まれる画分の女性ホルモン様活性の合計値が、水質が示した女性ホルモン様活性を4試料の内3試料で上回っていた。夏季の調査においても、石津川でノニルフェノールが含まれる画分の女性ホルモン様活性とエストラジオール等の女性ホルモンが含まれる画分の女性ホルモン様活性の合計値が、水質が示した女性ホルモン様活性を全ての試料で上回り、女性ホルモン様活性に拮抗する作用を示す物質(アンタゴニスト)の溶存の可能性が示唆された。夏季の試料についてエストロゲン・アンタゴニスト活性を測定したところ、石津川の画分、画分及び水質に活性が認められた他、印旛放水路及び手賀沼の試料にも弱い活性が認められた。環境水中では、女性ホルモン様活性を示す物質が存在していても、それに拮抗する成分も存在して、一部の活性を打ち消しているものと考えられた。

(2) 環境省が実施したメダカを用いた試験<sup>8)</sup>において、 $8.2\ \mu\text{g/L}$ (フルライフサイクル試験 F1:60 日齢)、 $11.6\ \mu\text{g/L}$ (パーシャルライフサイクル試験 60 日齢)及び  $17.7\ \mu\text{g/L}$ (フルライフサイクル試験 F0:60 日齢)以上のノニルフェノール濃度に曝露された際に精巣卵の形成が認められている。本調査結果では、石津川のノニルフェノール水中濃度は冬季で平均  $6.7\ \mu\text{g/L}$ 、夏季で  $4.3\ \mu\text{g/L}$  であり、このいずれの精巣卵形成濃度を下回っていた。一方、酵母 two-hybrid 法による女性ホルモン様活性の測定結果から水質が示した女性ホルモン様活性値、冬季の  $11\ \text{ng/L}$  及び夏季の  $2.5\ \text{ng/L}$  は水中のノニルフェノール濃度に換算すると、それぞれ  $17.5\ \mu\text{g/L}$  及び  $4.0\ \mu\text{g/L}$  に相当すると考えられ、冬季ではメダカでの精巣卵形成濃度を上回る。今回の調査結果では、夏季及び冬季とも精巣卵は全ての個体で認められなかった

こと及びエストロゲン 受容体競合結合試験<sup>8)</sup>において、コイはメダカの約 1/100 の相対結合強度であったことからメダカと比較して化学物質の女性ホルモン作用に対する感受性がコイでは低いことが考えられた。また、環境中においてエストロゲン・アンタゴニストの存在も確認されたことから、実環境における生物への影響についてはこれらの存在についても考慮する必要があるものと考えられる。

夏季の調査では、石津川で捕獲されたオス 2 個体に精巣組織の退縮が認められた。冬季の調査では印旛放水路で捕獲されたオス 2 個体に精巣組織の退縮及び不明細胞増殖が認められていた。夏季・冬季とも、オスコイの血清中にビテロジェニン誘導が認められた水域において精巣組織の異常が認められ、その出現率は東京都の調査<sup>10)</sup>とほぼ同様（東京都 11%、石津川 8%、印旛放水路 8%）であったが、内分泌攪乱作用を示す化学物質の水中濃度との因果関係は不明であった。

(3) オスコイの血清中ビテロジェニンについては、石津川及び印旛放水路でほぼ同様の検出率及び濃度範囲であったが、ノニルフェノールの筋肉中濃度、水中のアルキルフェノール類濃度、女性ホルモン濃度(冬季ではエストリオール濃度を除く)及び女性ホルモン様活性は、印旛放水路における測定値が石津川における測定値を下回っていた。オスコイの血清中ビテロジェニンが石津川及び印旛放水路でほぼ同様の検出率及び濃度範囲であった原因として、測定例数が少ないことを考慮する必要があるが、底質中のアルキルフェノール類濃度、ビスフェノール A 濃度及び女性ホルモン濃度の平成 12 年度<sup>20)</sup>及び平成 13 年度<sup>21)</sup>の測定値が、石津川における値を印旛放水路における値が上回っていたことも考えられる。コイは水底の有機物も摂食する<sup>22)</sup>こと、餌に含まれるエストロゲンの影響で血清中ビテロジェニン濃度が上昇する<sup>23)</sup>ことが報告されていることから、餌に含まれるエストロゲンの影響によるものと推察された。また、コイの生殖サイクルによってビテロジェニン誘導性が変化することも報告されている<sup>19)</sup>ため、今後の試験において

は調査時期についても考慮する必要があるものと考えられた。

## 6 . 参考文献

- <sup>1</sup> Nishikawa, J., K.Saito,J.Goto,F.Dakeyama,M.Matsuo and T.Nishihara(1999): New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 76-83.
- <sup>2</sup> 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、西原 力、森田昌敏(2000)酵母 Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発、*環境化学*、10、57-64.
- <sup>3</sup> 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、曾家義博、佐野友春、彼谷邦光、西原 力、森田昌敏(2001)酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用、*環境化学*、11、65-73
- <sup>4</sup> 和波一夫、嶋津暉之、宮下雄博、大月正人(2001)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巢等の調査-、*東京都環境科学研究所年報* 2001、53-63
- <sup>5</sup> 和波一夫、嶋津暉之、加地弘一、高橋憲一(2000)多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(その2)-都内河川におけるコイの精巢等の調査-、*東京都環境科学研究所年報* 2000、153-164
- <sup>6</sup> 建設省河川局(1999)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
- <sup>7</sup> 和波一夫、嶋津暉之(1999)多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(1)-都内河川におけるコイの精巢等の調査-、*東京都環境科学研究所年報* 1999、212-217
- <sup>8</sup> 環境省総合環境政策局環境保健部(2001)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(案)
- <sup>9</sup> Gray,M.A. and C.D.Metcalf(1997)Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.16, 1082-1086
- <sup>10</sup> 宮下雄博、和波一夫、嶋津暉之、田村基(2002)多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(9)-都内河川のコイ等にみられた卵巣異常の実態と雌雄の生殖腺異常の比較-、*東京都環境科学研究所年報* 2002、56-65
- <sup>11</sup> Tsuda,T.,A.Takino,M.Kojima,H.Harada,K.Muraki and M.Tsuji(2000)4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere*,41,757-762.
- <sup>12</sup> Tsuda,T.,A.Takino,K.Muraki,H.Harada and M.Kojima(2001)Evaluation of 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. *Wat.,Res.*,35,7,1786-1792.
- <sup>13</sup> 財団法人 化学品検査協会(1992)化審法の既存化学物質安全性点検データ集
- <sup>14</sup> Gray,M.A. and C.D.Metcalf(1997)Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.16, 1082-1086
- <sup>15</sup> Fukumaki,T., A.Suzuki, Y.Kawashima, M.Sumi and M.Shimizu: Bioaccumulation Factor of Nonylphenol in carp (*Cyprinus carpio*), 投稿中
- <sup>16</sup> 和波一夫、嶋津暉之、田村基(2002)多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(10)-内分泌かく乱化学物質の多摩川縦断変化-、*東京都環境科学研究所年報* 2002、66-74
- <sup>17</sup> Ren,L.,Lewis,S.K. and Lech,J.J.(1996)Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chemico-Biological Interactions*,100,67-76.
- <sup>18</sup> Jobling,S.,Sheahan,D.,Osborne,J.A.,Matthiessen,P. and Sumpter,J.(1996)Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and*

---

Chemistry,15,2,194-202.

- <sup>19</sup> 東谷忠、玉本博之、宮本宣博、八十島誠、田中宏明(2002)下水処理水に曝露した雄コイのビテロジェニン誘導に関する研究、環境工学研究論文集、39、97-108
- <sup>20</sup> 環境省環境管理局水環境部水環境管理課(2001)平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果
- <sup>21</sup> 環境省環境管理局水環境部企画課(2002)平成13年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果の概要
- <sup>22</sup> 阿部 宗明、本間 昭郎(1997)現代おさかな事典、(株)エヌ・ティー・エス
- <sup>23</sup> Ishibashi H, Tachibana K, Tsuchimoto M, Kobayashi M, Koshiishi T, Moriwaki T, Iguchi T, MORI C and Arizono K(2002) Induction of Plasma Vitellogenin Synthesis by the Commercial Fish Diets in Male Goldfish (*Carassius auratus*) and Dietary Phytoestrogens., J. Health Sci. 48, 427-434