

# 内分泌攪乱物質が魚類の成熟・再生産に及ぼす影響 —農林水産省における取り組みを中心として—

藤井 一則

独立行政法人水産総合研究センター 瀬戸内海区水産研究所

瀬戸内海区水産研究所の藤井でございます。井口先生には、この場にお招きいただきましたことを心から御礼申し上げます。私の表題と所属、バックボーンに関しては、もうすでにご紹介いただきましたので、最初のスライドは省略いたします。

諸外国では、魚への様々な影響を示唆する報告がなされております。我が国においても、井口先生あるいは帝京大学の中村先生、北海道大学の原先生たちの研究グループによって、多摩川におけるコイの異常が報告されております。その報告に端を発し、東京湾のマコガレイ、あるいは大阪湾のボラ等で異常が見られております。これらの異常というのは、いずれも雄の雌化といった現象です。しかしその原因となる物質、あるいはその他の水域における影響はどうか、あるいはそのほかの魚でどういった影響が出ているのかという点については、まだまだ解明すべき点が残されております。

そこで農林水産省において、農業、林業、および水産業に関するこれら内分泌攪乱化学物質の影響がどうかあるのか、あるいはそのメカニズムに関しても明らかにしていこうというプロジェクト研究が、一昨年の1999年より4年計画で開始されました。その中は6つのチームに分かれております。家畜・家禽、水域、耕地・森林、食品およびその包装容器、また影響防止、さらにはダイオキシン類の動態に関する研究を進めております。これら6つのチームの下には、それぞれサブチームと呼ばれる研究グループで構成されております。私の属する水域チームは、影響実態サブチーム、環境動態サブチーム、ならびに作用機構サブチームで構成されております。

本日のお話は、この水域チームの研究成果、過去2年間ではありますが、中間報告的で、かつ断片的かとは思いますが、魚の成熟および再生産に関するトピックスに絞ってご紹介していきたいと考えております。

今日、お話しする具体的な中身は、昨日来散々出てきておりますビテロジェニン、あるいはコリオジェニン、これらのバイオマーカーに関する話題、また、内分泌攪乱化学物質が魚の性行動あるいは配偶子形成、さらには性分化にどのような影響を及ぼすかという点、最後に、我が国の水域に、実際にどのような影響が出ているのかという点について、まだまだ断片的ではありますが、これまでに得られている知見をご紹介したいと思います。

まず、ビテロジェニンに関してお話を進めていきます。ビテロジェニンに関しては、これもさんざん話がされておりますので細かい点は省略しますが、本来は内因性のエストロジオール-17 $\beta$ （以下E2）の女性ホルモン作用によって肝臓で産生される卵黄蛋白質の前駆物質です。しかし、環境水中にエストロゲン活性を有する化学物質が存在した場合には、その成熟度に関わらず、また雄あるいは雌の性比に関わらず、肝臓におけるビテロジェニンの産生を誘導することから、この蛋白質がこれらエストロゲン様化学物質のバイオマーカーとして注目されているわけです。

これからは具体的なデータになりますが、右下にこの研究を担当した主たる研究者の名前と所属を示しております。マハゼの場合には、血清中に530 kDa（キログルトン）と320 kDaの2種類のビテロジェニンが存在します。それぞれ卵黄形成期の卵母細胞に取り込まれた後、リポビテリンとホスピチンの複合体、あるいはベータ・プライム・コンポーネント、あるいはこちらのビテロジェニンはそのままの形で、リポビテリンといった形態で存在します。

各々のビテロジェニンを血清より精製し、そのアミノ酸配列を調べましたところ、これまでに報告のあるいろいろな魚の配列と、いずれも大体40%台のホモロジーを示しました。この精製した蛋白質を抗原として抗体を作成し、ELISAによる定量法を開発しました。しかし、マハゼで作った抗体は、その他の魚にはほとんど交差しませんので、日本各地、あるいは様々な魚のビテロジェニンを調べるためには、各々の抗体を作成し、各々のアッセイ系を確立する必要があります。現在までのところ、このプロジェクトでここにお示した8魚種以外にも、マダイやアカシタビラメ等々、10種類以上のビテロジェニンのアッセイ系を確立しております。

このグラフは、マハゼをE 2に2週間曝露した結果、血中のビテロジェニン濃度がどう変化するかを見たものです。横軸は、それぞれ水中におけるE 2の設定濃度、ng/l で示しております。いわゆる ppt というオーダーです。赤い棒は530 kDaのビテロジェニン、青い棒は320 kDaのビテロジェニン濃度を示しております。

このグラフから明らかなように、エストロゲンの濃度で言いますと、大体10 ng/lあたりに、これら両蛋白質の有意な発現を誘導する閾値が存在するということがわかります。

また、誘導が見られた最低濃度10 ng/lにおける530 kDaのビテロジェニンの濃度は、数百ng/mlのオーダーであることもわかります。この数字は、あとから少しまた出てまいりますのでご記憶ください。

これから様々な魚が登場しますが、これはトビハゼで、有明海等でよく見られる魚です。このグラフは、トビハゼの血清中のビテロジェニン濃度の周年変化を調べた結果です。上の赤が雌の周年変化、下の黒いグラフが雄の周年変化です。雌に関しては、これまで様々な魚で報告されておりますように、やはりビテロジェニンは産卵期に非常に高くなります。場合によっては10 mg/mlを超えるような高濃度の個体が出てくることになりました。また、未熟な時期には非常に低濃度で推移することがわかります。

一方、雄に関してですが、トビハゼの場合、マハゼよりもはるかに高い濃度、 $\mu\text{g/ml}$ のオーダーで周年検出されます。また、最も高い濃度は、やはり雌と同様に産卵期にあることがわかりました。このような雄の血中ビテロジェニン濃度の周年変化は、そのほかのいくつかの魚種でも確認されており、何を意味するかはわかりませんが、少なくともビテロジェニンをバイオマーカーとして影響実態を調べる場合には、魚種ごとの、あるいは季節ごとの正常値を押さえる必要があることが、このグラフからわかると思います。

次に、コリオジェニンのアッセイについてお話しします。コリオジェニンに関しては、冒頭で出てきたマコガレイを対象として、実験が進められております。コリオジェニンというのは、ビテロジェニンと違って卵を取り巻く膜、ビテリン・エンベロープの構成蛋白質の前駆物質です。ビテロジェニンと同様に、本来はやはり内因性のE 2により、肝臓で産生が誘導されることから、やはり環境中のエストロゲン様物質のバイオマーカーとして注目されている蛋白質です。

これは、マコガレイのコリオジェニンをSDS-PAGE及びウェスタンブロッティングに供した図です。マコガレイの卵膜は、ここでE gと示していますが、約61 kDaと37 kDaの二つが主たる構成蛋白質であるということがわかります。

血清中にもやはり雄にE 2を投与することによって、各々に近い分子量の蛋白質が誘導されることがわかりました。そこで、血清からこれらの蛋白質を精製して、それに対する抗体を作成し、ここでは「時間分解蛍光免疫測定法」によるアッセイ系を確立しました。現在のところ、大体数十pg/mlから数十ng/mlの範囲で定量が可能となっております。

これは、マコガレイを2週間エチニルエストラジオールに曝露し、血中の37 kDaのコリオジェニン、61 kDaのコリオジェニン、およびビテロジェニンの血中濃度の変化を見たものです。下に示しました数字は、それぞれ設定した水中のエチニルエストラジオールの濃度を、ng/lでお示しております。

いずれの蛋白質も、濃度依存的に血中の濃度が上昇するということがわかりました。また、低分子の方のコリオジェニンやビテロジェニンに関しては、設定した最低濃度、0.3 ng/lでさえ、すでに有意に血中に検出されることがわかります。

また、同様の実験を海域中でも、たまに検出されるエストロンに曝露した結果、やはり低分子のコリオジェニンは、設定した最低濃度の10 ng/lですでに有意に誘導が起こることがわかります。また、ビテロジェニンや高分子のコリオジェニンに関しても濃度依存的な上昇は見られるわけですが、有意差検定を行いますと、一つ上の濃い濃度でようやく差が見られることがわかります。

このことから、少なくともこの低分子、約37 kDaのコリオジェニンは、ビテロジェニンと同程度か、あるいはそれ以上の感度を持つバイオマーカーとなりえると期待して、現在これをもとにした影響実態調査を進めているところです。

次に、魚の性行動に及ぼす影響についてお話しします。これは、サクラマス雄の性行動に与える影響を示したグラフです。縦軸にはアテンディング、これは雄が雌に寄り添う行動です。およびクイパリングは赤い棒グラフですが、これはやはり雄が雌の産卵を促す行動のことで、その頻度を示しています。精巣を除去することによって去勢した場合、これらの性行動は急激に減少することがわかりました。また、去勢した雄にテスト

ステロンやE2、あるいは11-ケトテストステロン、DHP等のステロイドホルモンを投与した場合は、少なくともテストステロンや11-ケト等のアンドロゲンの投与によって、去勢により減少したこれらの性行動の頻度が、やや回復するという傾向が認められました。

これは、去勢していない雄にE2あるいはノニルフェノール、あるいはビスフェノールAを投与した場合、これらの行動がどうなるかを見た結果です。E2を投与した場合は、これらの行動が減少するどころか、高濃度ではやや増加するという傾向も見られますが、ノニルフェノールやビスフェノールAの投与によって、これらの性行動が抑制的に働いているという傾向が示唆されております。このことは、これらの化学物質がアンドロゲンにアンタゴニスティックに働いているのではないかということを示唆する結果です。

次に、配偶子形成についてお話いたします。これは、今度はマダイを使った実験結果です。マダイの産卵期は、大体春先の4月から5月にかけてです。それよりもかなり前の時期、すなわち11~12月にかけて、ステロイドホルモンを投与した場合にどうなるかを見た結果で、縦軸には生殖腺の重量が体重に占める割合(GSI)を示しております。

コントロールに関しては、1か月の間に有意に生殖腺の重量が重くなるのがここでわかります。一方、11-ケトテストステロンを投与した場合も、コントロールと同様の増量が認められます。しかし、エストラジオールやテストステロンを投与した場合は、本来ここまで増加すべき生殖腺の重量が、抑制されているというデータが得られております。

現在、この原因として考えられる脳内のGTHあるいはGnRHの発現量を調べておりますが、どうもそれらの発現量に関しては、これらのステロイドによる影響は認められておりません。また、先程省略しましたが、精子形成を活発に行っている時期にこれらのステロイドを投与しても、GSIの有意な変化は認められません。現在、この作用メカニズムについて調べるとともに、その他の化学物質投与によってどういった影響が出るかという点に関して調査・研究中です。

次に、性分化に及ぼす影響についてお話します。今度はティラピアを使った実験例で、ティラピアの性分化期におけるステロイド代謝酵素の発現を見た結果です。下に示した数字は、ふ化後の日数を示しております。魚としては、遺伝的に全雌のティラピア、および遺伝的に全雄のティラピアを使っております。

雌の場合、組織学的に明らかとなる性分化、すなわち卵巣腔(ovarian cavity)の形成期以前に、エストロゲンを合成するための、これら1セットの代謝酵素群の発現が見られております。しかし雄の場合には性分化後、すなわち輸精管(sperm duct)等の形成、精巣(testis)の形成後に、アンドロゲンを産生するための酵素群の発現がようやく見られることがわかってきました。

また、この時期にアロマターゼのインヒビターを投与した場合には、遺伝的な雌が雄に変わることも見られております。このことは何を意味するかというと、雌の性分化にはどうもエストロゲンが効いている、必須であろうということです。また雄の分化は、メカニズムとしてはまだ未解明な点が多々あるわけですが、少なくともアンドロゲンが必須であるとはどうやら考えにくいというデータを示しております。

こういった背景を受けて、より感受性が高いと思われるサケ科の魚アマゴを用いて、やはりこれも遺伝的にすべて雄のアマゴを用いて、性分化期に各種化学物質に曝露した場合にどうなるかを見た結果です。当然、対象群はすべて雄になります。しかしE2に曝露した場合、これはふ化後の日数を示しておりますが、50 ng/l以上の濃度で雄は全く出現せず、80%以上の個体が雌になりました。その他はインターセックス、間性個体となりました。設定した最低濃度の20 ng/lでさえ、インターセックスが約3割出現するということがわかりました。

エチルエストラジオールに曝露した場合はさらに強烈で、設定した最低濃度の10 ng/lの曝露でさえ、雄は全く出現せず、8割以上が雌となり、その他がインターセックスであったという結果です。濃度はかなり高くなりますが、ノニルフェノールやビスフェノールAの曝露によっても、やはり雌が出現したり、間性個体が出現するという結果が得られております。

さらに、今後これ以下の濃度でどうなるかも検証すべき点でありましょうし、雌の雄化というアンドロジェニックな作用についても、今後、検討する必要があると考えております。

最後に、日本の水環境中の影響実態がどうなのかについて、これもまだまだデータが出そろっていませんが、これまでに得られた結果をお示しします。これは冒頭に出てきたマハゼを使った結果です。汚染が低いと考

られる水域の、雄の血中ビテロジェニン量、ここでは 530 kDa のビテロジェニンをお示します。先程のエストロゲンの曝露実験等のデータから、ここでは便宜的に 100 ng/ml という血中濃度で線を引いて、それを超える個体が各水域でどの程度あるか、分母はサンプリングしたトータルの数を示していますが、日本の各水域で調べた結果です。

この数字を見てわかりますように、日本海沿岸では、ほとんどこの数値を超える個体は出現していませんが、太平洋側、特に大都市周辺で、ぼつぼつと高い比率でこの値を超える雄が出現していることがわかります。しかし、例えばサンプリングした年によって、この値が必ずしも一定ではないことがわかり、このような調査は、ほかの水域、あるいは経年的にやはり続けていく必要があるのではないかと考えております。現在、ほかの魚種に関しても、いろいろな水域でこういった影響実態調査を進めている最中です。

省略した点が多くて申し訳ありませんが、これは環境省が昨年実施した水環境中の各種化学物質の濃度です。上の3つが河川のデータ、下の3つが海域のデータで、それぞれ調査ポイントの数がかっこ内に示してあります。化学物質の名前は、各グラフの真ん中に示しております。エチニルエストラジオール、ノニルフェノール、オクチルフェノールです。白い数字は、検出限界未満の水域の比率、例えば海域におけるエチニルエストラジオールは、調査した 17 ポイントすべてで検出限界未満であったことを示しております。

これはフタル酸ジエチルヘキシル、ビスフェノールA、および女性ホルモンそのもののエストラジオール(E2)、先程の性分化あるいはビテロジェニンの曝露実験のデータからも明らかなように、それらが発現する閾値以上の濃度のポイントが、特に河川を中心に見られることがわかりました。したがって、こういった水域では、もしかしたら実際に、先程お示したような影響が出ている可能性が示唆されるわけです。

また、海域におきましては、河川に比べて非常に低い濃度ではありますが、すでにいくつかのエストロゲン様の化学物質が検出されております。低い濃度ではありますが、それぞれの化学物質の複合汚染等々も考えて、やはり海域においても、今後とも調査を継続する必要性を感じております。

ここでは、あえて結論はお示ししません。今後研究期間があと2か年残っておりますので、結論はすべてを終えた時点でお示ししたいと思います。

これが今回のデータをご提供いただいた共同研究者の方々です。これらの共同研究者ならびにご協力いただいた魚にも感謝して、私のプレゼンテーションを終わりたいと思います。どうもありがとうございました。

## 質疑応答

井口：どうもありがとうございました。いろいろな魚種でいろいろな角度からのご研究を、中間報告ということでお話しいただきました。何かご質問がありましたらどうぞ。マイクのところに来ていただければと思います。何かございませんでしょうか。どうぞ。

ジレット：フロリダ大学のジレットです。ちょっと質問させてください。コリオジェニンとビテロジェニンの反応に関し、影響を及ぼす混合物を観察されましたか？我々はアンドロゲンやプロゲステンが魚の卵黄形成を遮断することが分かっています。私が抱えている疑問の一つは、複雑な混合物が存在する環境では、陽性の場合には何かがあるということですが、陰性ではあっても、複雑な混合物が存在する故に、偽陰性である可能性があるのではないかということです。

藤井：複合的な影響というのは非常に重大なテーマだと思います。ただし、今までのところ少なくとも陽性の反応を示すもの、陰性の反応を示すもの、それらが合わさってどうなるか。あるいは陽性どうしで相乗効果、あるいは相加的な効果が出るのかについては、非常に関心の高いテーマではありますが、まだそれについてこれといったデータはとっておりません。今後、できればそういった影響、複合汚染、複合的なメカニズムについても、調べていきたいとは考えております。

井口：どうぞ。山東さん。

山東：東和化学の山東と申します。2つありまして、1つはトビハゼの雄のビテロジェニンの血中濃度の周年変化です。あれはフィールドのトビハゼのデータなのか、飼育下のデータなのか、あるいはその両方で違いがあるのかどうか、おわかりでしたら教えてください。

もう一つは、最後の方のマハゼの血中のビテロジェニン濃度が、閾値を超えた個体数の全国分布の図ですが、例えば長崎と大阪が同じぐらいの比率だったと思うのです。大都市あるいは中小都市といった比較の物差しに代わる物差しとして、どういう物差

しをアイディアとして今お考えかを、お教えいただければ教えていただきたいと思います。

藤井：1点目のトビハゼの件ですが、私の記憶によりますと、フィールドでサンプリングしたデータだと思います。誤解があれば訂正したいと思うのですが、少なくともあの数値が、今後ベースとなる正常な値とは考えておりません。あそこでお示ししたのは、何が言いたかったかということ、今までコイやウグイでも観察されているわけですが、雄にも、どうやら血中のビテロジェニンの濃度の周年変化がありそうだということで、こういったものをバイオマーカーとして影響を見るには、周年変化やサンプリングする季節に関しても、注意を払う必要があるということをお願いしてお示しました。

それと2点目ですが、今言えるのは、こういった原因はまだわかりません。比較的都市部あるいは都市に近いところで、高い濃度の検出個体の割合が多いことは事実です。しかし、先程も申し上げましたように、例えばあまり具体的には言いたくないのですが、兵庫県のここを見ますと、ある年ではある割合で出ており、99年に調査では70分の13個体出ているわけです。しかし、翌年は全く出なかったというポイントもあり、ここで結論めいたことはなかなか言いにくいということがあります。

1つだけ加えますと、こういったどうやら影響が出ていそうなポイントに関しては、その中の原因物質を現在、調べている最中です。フラクショナルネーションをして、*in vivo*、*in vitro*の両面から、どのフラクションにこういった活性があるのか、特にエストロゲン活性をメインに置いています。そういった手法によって、現在その原因物質の究明にもあたっております。そういったデータと、あるいは環境中の水中の分析データについて、環境省なり我々も独自でやっているのですが、そういったもの等を考えあわせて各水域の評価をしていきたいと考えております。

答になっていましたでしょうか。

井口：どうもありがとうございました。