

## 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>注1</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 10、11、12 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 12 年度調査結果は $7.1 \mu\text{g/L}$ で平成 10 年度より増加傾向)、比較的中濃度水域として日光川(愛知県、平成 12 年度調査結果は $2.4 \mu\text{g/L}$ で平成 10 年度より減少傾向)及び印旛放水路(千葉県、平成 12 年度調査結果は $0.9 \mu\text{g/L}$ 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 12 年度調査結果は検出限界値 $\text{ND}=0.1 \mu\text{g/L}$ 未満で平成 10 年度より減少傾向)を選定した(図 1 参照)<sup>注</sup>。

事前にコイの生育状況について目視及び聞き取り調査を行い、石津川、印

---

注1 「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。

旆放水路及び手賀沼において捕獲調査を行った。

コイの生息密度が比較的低い日光川においては、養殖されたコイを用いた飼育試験を行った。

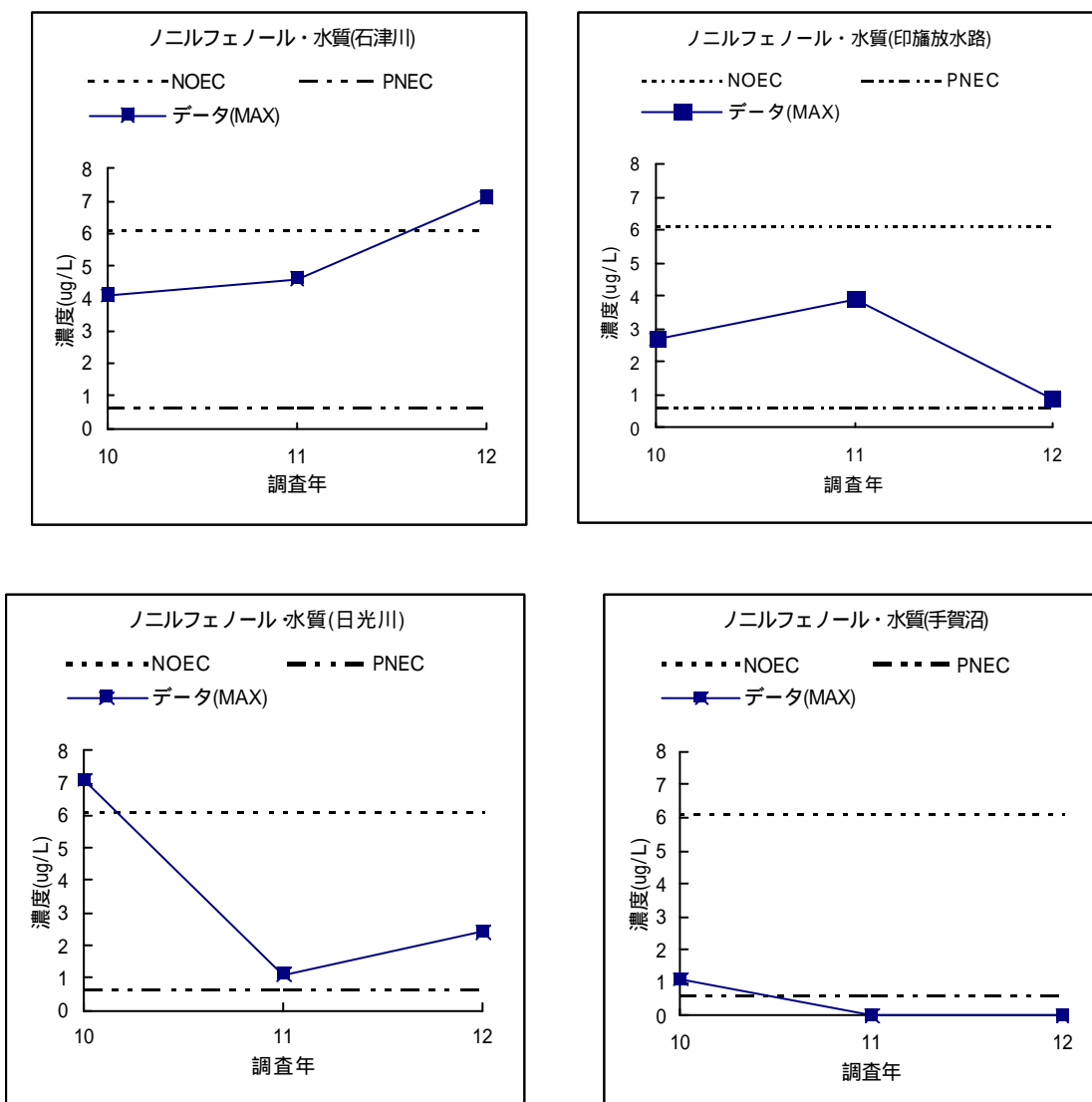


図 1 調査対象水域の環境実態調査水質調査結果の推移

## (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(外観、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-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-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) 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 - 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>19,20)</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。

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

石津川における調査を平成 13 年 11 月 28、29 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、環境実態調査の観測点である毛穴大橋が構造上橋上からの採水が困難で夜間作業に危険が伴うため、捕獲範囲内である平岡橋で 24 時間内に 4 回の採水を行った。

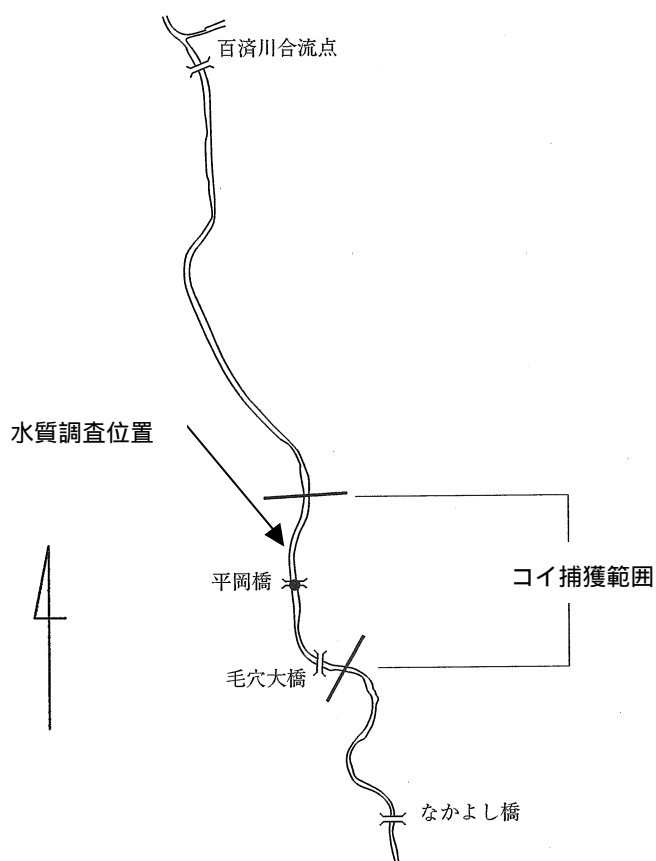


図 2 石津川調査位置図

## (2) 印旛放水路

印旛放水路における調査を平成 14 年 2 月 24～28 日に行った。

コイの捕獲範囲と水質調査位置を図 3 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(写真 1)。

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。

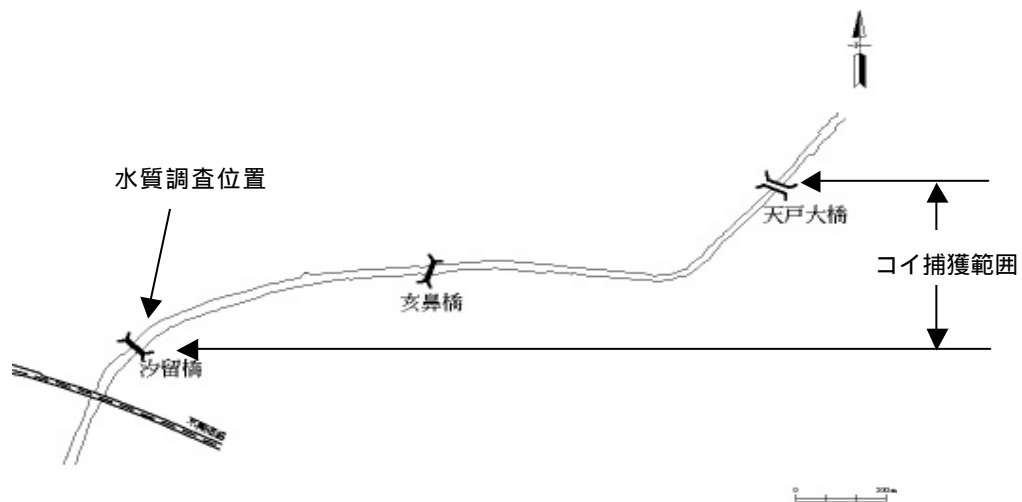


図 3 印旛放水路調査位置図



写真 1 捕獲したコイ(オス、印旛放水路)

### (3) 手賀沼

手賀沼における調査を平成 13 年 12 月 11 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(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。

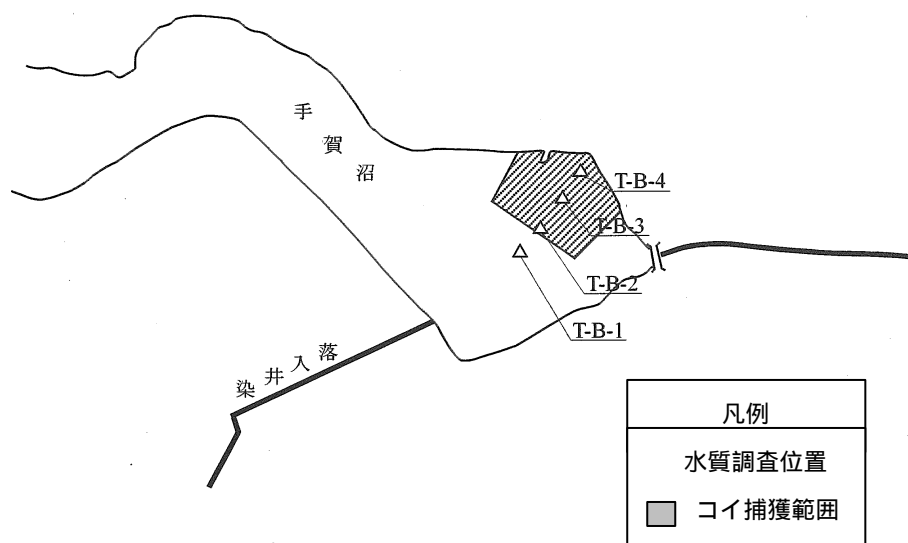


図 4 手賀沼調査位置図



(4) 日光川

日光川における飼育試験を平成 14 年 2 月 10 日～ 3 月 9 日に実施した。

コイの飼育位置と水質調査位置を図 5 及び図 6 に示した。

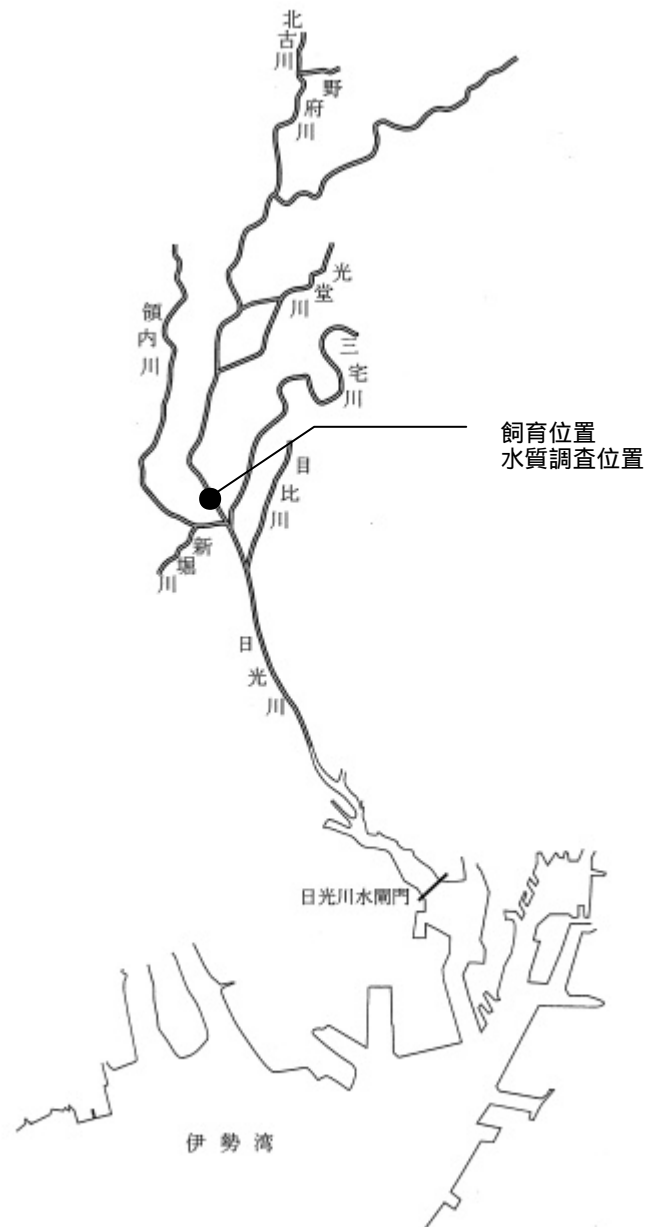


図 5 日光川調査位置図

図 6 に示した 2 箇所にてステンレス金網製の飼育ゲージ(80×50×30cm) 8 個を水中に川底から離して設置し、それぞれ 4 個体を投入した。飼育試験には、コイの筋肉中からノニルフェノールが検出されていない養殖場(杉島養魚場、熊本県)から、オスを選別して使用した。

飼育期間は当初 4 週間を予定したが、飼育 3 週間目に 5 個体の死亡が確認されたため、その時点で死亡した 5 個体と生存していた 14 個体を回収し、生存個体から 7 個体を無作為に選抜し、検査を行った。残りの 8 個体については飼育を継続し、4 週間後に回収し、検査を実施した。

水質調査は、新平和橋の 1 箇所にて、飼育期間中に 4 回の調査を行った。

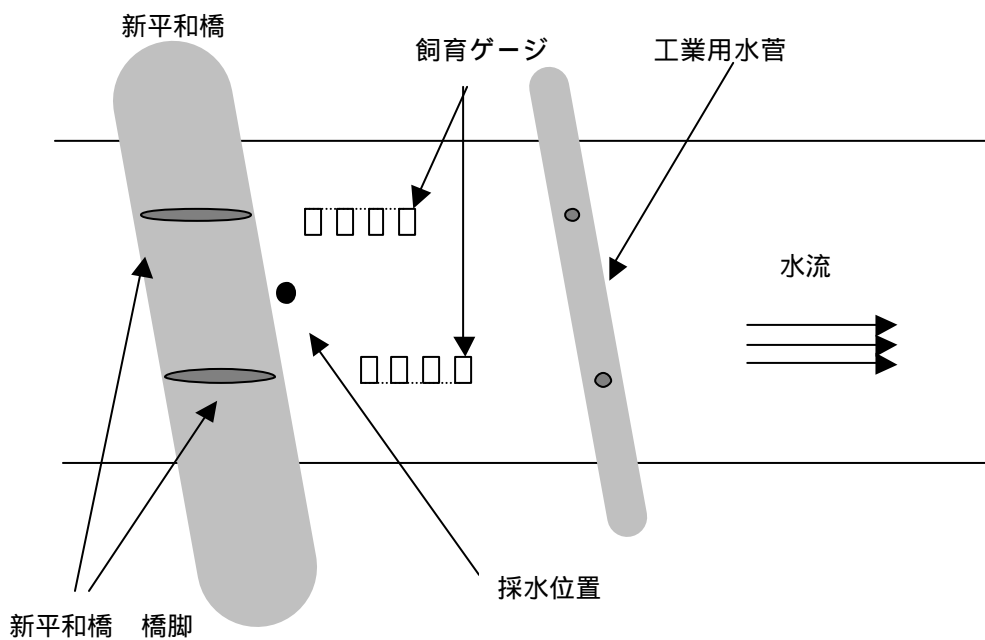


図 6 飼育ゲージ配置図

### 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 15 個体、メス 5 個体の検査を実施した。検査を行ったオスの平均体重は 1,013 g (500 ~ 2,200 g)、平均標準体長は 33 cm (27 ~ 42 cm)、メスの平均体重は 942 g (610 ~ 1,400 g)、平均標準体長は 32 cm (28 ~ 37 cm)であった。

組織学的検査において、生殖腺指数は、オスの平均値は 3.9% (0.5 ~ 8.1%)、メスの平均値は 2.6% (0.2 ~ 8.3%)であった。解剖所見では、全ての雌雄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、オスに異常は認められなかったが、メスの 2 個体に退行変性卵<sup>注ii)</sup>が認められた(写真 2)。

血液学的検査において、ピテロジェニン<sup>17</sup>はオスの 40% (15 個体中 6 個体)、メスの 80% (5 個体中 4 個体)で検出され、オスで 0.071 ~ 2.0  $\mu$ g/mL、メスで 0.17 ~ 5,300  $\mu$ g/mL の範囲にあった。テストステロンは全ての雌雄で検出され、オスで 360 ~ 4,000 pg/mL、メスで 360 ~ 1,300 pg/mL の範囲にあった。17 $\beta$ -エストラジオールは全ての雌雄で検出され、オスで 200 ~ 1,900 pg/mL、メスで 250 ~ 760 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雌雄で検出され、オスで 210 ~ 1,300  $\mu$ g/kg (平均 594  $\mu$ g/kg)、メスで 290 ~ 700  $\mu$ g/kg (平均 462  $\mu$ g/kg)の範囲にあった。

---

<sup>注ii</sup> 退行変性卵：卵黄蓄積した卵母細胞が退行、崩壊し、周辺の体細胞に吸収される過程の卵<sup>2,15)</sup>