

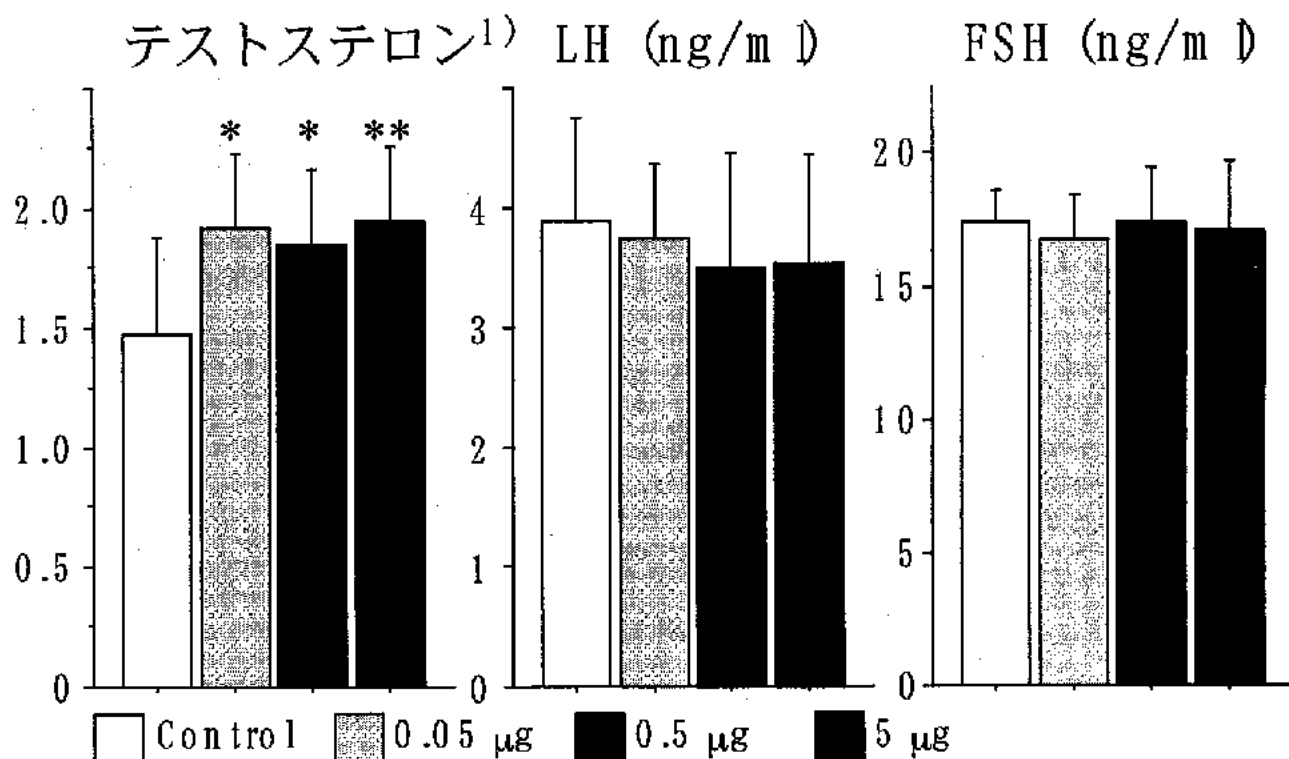


図1 生殺時（生後62日目）のオスラットの血清テストステロンおよびゴナドトロピン濃度
動物数は1,2,3,4,6,7-HxCN 5 µg 投与群は16、他の群は8。統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSDで検定。* p<0.05, ** p<0.01。D テストステロン濃度 (ng/dl) は対数変換値で表示。

表4 メスラットの体重増加、摂餌量、膣開口完了時期・完了時体重

		Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
			0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	生後 21 日目	55.0 $\pm$ 6.4	51.8 $\pm$ 6.1	53.9 $\pm$ 4.0	52.3 $\pm$ 3.4
	35 日目	124.5 $\pm$ 12.5	125.1 $\pm$ 9.8	128.3 $\pm$ 9.2	124.1 $\pm$ 9.2
	56 日目	202.7 $\pm$ 16.0	201.8 $\pm$ 17.8	210.2 $\pm$ 18.0	203.9 $\pm$ 15.2
	77 日目	241.6 $\pm$ 20.5	242.0 $\pm$ 15.1	251.8 $\pm$ 18.9	244.6 $\pm$ 26.0
摂餌量 (g/kg 体重)	生後 35 日目	25.9 $\pm$ 1.7	26.5 $\pm$ 2.3	26.1 $\pm$ 1.8	29.0 $\pm$ 3.1
	56 日目	30.7 $\pm$ 3.4	32.1 $\pm$ 2.9	33.4 $\pm$ 4.2	35.6 $\pm$ 3.7
	77 日目	33.6 $\pm$ 1.8	33.2 $\pm$ 6.1	36.0 $\pm$ 0.6	35.1 $\pm$ 2.2
膣開口	完了時期 (生後日数)	32.4 $\pm$ 1.8	31.6 $\pm$ 1.8	31.8 $\pm$ 2.0	32.1 $\pm$ 2.4
	完了時体重 (g)	109.8 $\pm$ 15.0	104.9 $\pm$ 12.0	107.8 $\pm$ 11.3	108.7 $\pm$ 18.5

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSDで検定。

表5 メスラットの性周期の長さおよび規則性

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
一周期の長さ (日)	4.4 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 2.1
規則的な性周期の割合 (%)	91.7 $\pm$ 15.4	84.4 $\pm$ 35.2	78.3 $\pm$ 31.0	75.0 $\pm$ 35.4

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

表6 生殺時 (生後91日目以降の発情期) のメスラットの体重および卵巣・子宮重量

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
体重 (g)	255.4 $\pm$ 24.9	254.8 $\pm$ 14.8	267.5 $\pm$ 25.6	262.2 $\pm$ 30.6
卵巣 (g/100 g 体重)	0.045 $\pm$ 0.012	0.038 $\pm$ 0.007	0.040 $\pm$ 0.007	0.036 $\pm$ 0.005
精巣上体 (g/100 g 体重)	0.206 $\pm$ 0.042	0.214 $\pm$ 0.030	0.176 $\pm$ 0.038	0.188 $\pm$ 0.066

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

表7 生殺時 (生後91日目以降の発情期) のメスラットの血清17 β -エストラジオール、LH、FSH濃度

	Control	1,2,3,4,6,7-HxCN (/100g 体重)		
		0.05 μ g	0.5 μ g	5 μ g
17 β -エストラジオール (pg/ml)	12.1 $\pm$ 9.5	8.4 $\pm$ 1.8	7.2 $\pm$ 1.6	15.1 $\pm$ 18.0
LH (ng/ml)	5.7 $\pm$ 2.5	4.9 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 1.4	5.0 $\pm$ 1.7
FSH (ng/ml)	16.5 $\pm$ 5.1	14.4 $\pm$ 4.7	15.7 $\pm$ 3.7	16.4 $\pm$ 4.9

動物数は全群で8。

統計学的有意差はANOVA+Fisher's PLSD で検定。

12. メダカに対する内分泌攪乱化学物質の短期暴露に関する研究

研究者 若林明子（東京都環境科学研究所基盤研究部長）

研究要旨

人畜由来ホルモンや内分泌攪乱化学物質による魚類への影響が懸念されている。そのため、これらの物質による魚類への影響を調べる試験方法を早急に確立する必要がある。そこで、メダカを用いてこれらの物質の短期暴露の影響を血液や肝臓中のビテロジェニン濃度の上昇によって調べることを目的に研究を実施した。

まず、メダカの血液や肝臓中のビテロジェニン濃度を精度よく測定する方法を開発した。次に、その方法を用いて性ホルモンや内分泌攪乱作用が疑われている化学物質のメダカの短期暴露によるビテロジェニンの誘導について検討し、これらの物質の暴露濃度とビテロジェニンの誘導の程度を比較した。

また、今回用いた手法は内分泌攪乱化学物質の魚類に与える影響を調べるスクリーニング手法として有効であることが示唆された。

研究協力者

森 真朗 東京都環境科学研究所主任研究員

A. 研究目的

水生生物、特に魚類に対する性ホルモンや内分泌攪乱化学物質の影響が懸念されている。例えば、人畜由来ホルモンや一部の女性ホルモン様物質の暴露によってオスのコイやファットヘッドミノーの血液中にビテロジェニンが誘導されることが報告され、魚の繁殖との関連についての検討が急がれている。そこで、本研究では、メダカ（*Oryzias latipes*）の血液及び肝臓中のビテロジェニン濃度の測定法の確立を第一の目的とした。次いで、開発した測定法を用いて水環境中での検出レベルの高い人畜由来女性ホルモンや数種の化学物質にメダカを短期暴露し、ビテロジェニンの誘導と繁殖率との関係やこれらの物質の暴露濃度と血液や肝臓中のビテロジェニン濃度との関係について検討することを第二の目的とした。

B. 試験方法

ビテロジェニンの測定法の検討

抗メダカビテロジェニンモノクローナル抗体とピオオン標識抗メダカポリクローナル抗体を作製した後、精製メダカビテロジェニンはメダカ腹水

から調製した。これらを用いてビテロジェニンの測定法を検討した。

メダカへの物質の暴露

メダカ成魚に17βエストラジオール（E2）、エストロン、エストリオール、4-ノニルフェノール（NP）及びビスフェノールA（BPA）を4日、1週間又は2週間暴露した。暴露時の希釈水は活性炭処理した水道水を用い、物質はアセトンに溶解後希釈水に溶解した。その際のアセトン溶液の濃度は100mg/l以下とし、対照水にもアセトンを加えた。暴露は半止水式で行い、暴露水は原則として毎日交換したが、1回目の2週間暴露では2日に1回交換した。水温は24±1℃、光周期は16時間明、8時間暗条件とし、餌は水交換の1～2時間前にテトラミンを与えた。暴露後メダカを氷を用いて麻酔状態に保って、尾の付根付近の動／静脈血と肝臓を採取し、今回開発した手法でそれぞれのビテロジェニン濃度を測定した。

（倫理面での配慮）

試験に用いるメダカは必要最小限の数とした。暴露終了後、麻酔状態に保って採血及び解剖を行い、薬剤で安楽死させた後に土中に埋葬した。

C. 結果と考察

ビテロジェニンの測定

血液及び肝臓中のピテロジェニン濃度の測定は下記の方法で測定可能であった。まず、抗メダカピテロジェニンモノクローナル抗体を固相化ブロッキングした ELISA プレートに、各濃度に希釈した精製メダカピテロジェニン及び測定検体の血清又は肝臓に PBS-Tween-BSA を加えてホモジネートした上清を添加し、2 時間固相化抗体と反応させた。その後、ビオチン標識抗メダカ抗体を添加し 1 時間反応させた。洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジンと 1 時間反応させた。最後に、オルトフェニレンジアミン溶液と 5 分間反応させ、硫酸溶液で反応を停止し、490nm の吸光度を測定し、標準曲線からメダカ血清中のピテロジェニン濃度を算出した。任意に希釈したピテロジェニン陰性血清に精製ピテロジェニンを添加して回収率を求める方法で求めた検出下限は血清では $20 \mu\text{g/ml}$ 、肝臓抽出液では $0.04 \mu\text{g/ml}$ (肝重量が 4mg とすると $0.002 \mu\text{g/mg}$) であった。

オスメダカでのピテロジェニンの誘導と繁殖能力との関係

血清中のピテロジェニン濃度は対照のメスでは $1100 \sim 83000 \mu\text{g/ml}$ であったのに対して、オスでは全て $20 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

E 2 に 2 週間暴露したオスでは、 0.01nmol/l 群では $20 \mu\text{g/ml}$ 以下、 0.03nmol/l 群では $<20 \sim 400 \mu\text{g/ml}$ 、 0.1 nmol/l 群では $<20 \sim 16000 \mu\text{g/ml}$ 、 1 nmol/l 群で $16000 \sim 500000 \mu\text{g/ml}$ 、 10nmol/l 群で $100000 \sim 240000 \mu\text{g/ml}$ 、 100nmol/l 群で $60000 \sim 88000 \mu\text{g/ml}$ であった (図 1～5)。

また、BPA $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では、1 例を除いて $26000 \sim 110000 \mu\text{g/ml}$ 、NP $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群では $327 \sim 31600 \mu\text{g/ml}$ であった (図 6)。

我々が行った成熟メダカへの性ホルモンや内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の繁殖に及ぼす影響を調べる試験では、オスのみを 2 週間 E2 に暴露し、その後メスと一緒にして産卵数や孵化率を調べた。その試験での影響濃度を今回の結果と比較すると、他の魚種での試験と同様に、ピテロジェニンは繁殖に影響の出る濃度に比較して非常に低い濃度で誘導が見られ、感度の高い指標であることが実証できた。対照に比較して繁殖に有意の差が見られた 3 nmol/l 暴露群でのピテロジェニン濃度は平均で $10000 \mu\text{g/ml}$ 以上であり、メスでのレベルに近いピテロジェニン濃度であっ

た。また、繁殖に有意の差が見られた BPA $10 \mu\text{mol/l}$ 暴露群でもメスと同様のレベルのピテロジェニンが血液に見られた。しかし、孵化率が対照に比較して減少したものの、有意の差は見られなかった NP 暴露群のメダカのピテロジェニン濃度は平均で $1000 \mu\text{g/ml}$ 程度であった。

このように、我々が前回行った繁殖試験で影響の現われた濃度レベルで暴露されたオスのメダカの血清中のピテロジェニン濃度は対照に比較して著しい上昇が見られた。

女性ホルモンの暴露濃度とオスでのピテロジェニンの誘導

E 2 では、繁殖に影響の見られなかった 0.03nmol/l に 2 週間暴露したメダカの血液中でピテロジェニンは有意に誘導され、 1nmol/l まで暴露濃度に従って上昇した。1 週間暴露でピテロジェニンの誘導が見られた最低暴露濃度は、 0.1nmol/l であった。また、4 日暴露では 0.1 nmol/l 暴露群でピテロジェニンの上昇が見られた。2 週間暴露で有意のピテロジェニン上昇の見られた濃度は E 2 約 10ng/l に相当し、わが国の汚染された水域で測定される濃度レベルであり、下水処理水のみではなく、環境水の評価に本試験が適用できることが示唆された。

なお、予備試験的に行った都内の下水処理場の処理水に同様の条件で 1 週間暴露したオスメダカで 6 尾中 2 尾に検出限界上のピテロジェニンが検出された。

また、エストロンでは 0.3nmol/l 、エストリオールでは 2.5nmol/l から、これらの女性ホルモンに 1 週間暴露したメダカの血液中で、対照に比べてピテロジェニンの有意な誘導が見られた (図 5)。

このように、E 2 に比較してエストロンは約 10 倍、エストリオールでは約 100 倍の濃度でピテロジェニンが誘導された (図 6)。

化学物質の暴露とメスメダカ血液中ピテロジェニン濃度の関係

NP では $0.3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群で、BPA では $3 \mu\text{mol/l}$ 暴露群でピテロジェニンの有意な誘導が見られた (図 6)。これらの濃度は E 2 に比較してそれぞれ約 10000 倍、100000 倍濃度が高かった。すなわち、これらの化学物質は、内分泌を攪乱する可能性が強いものの、その作用は天然のホルモ

ンに比較して非常に弱いものであることが分かった。

肝臓中のピテロジェニン濃度も血液中の濃度とほぼ同じような傾向が見られた。

女性ホルモンの暴露濃度と血液及び肝臓中のピテロジェニン濃度の関係

肝臓中のピテロジェニン濃度と血液中のピテロジェニン濃度の間にはある程度の相関があり、相関係数は約0.45であった(図7)。そのため、血液あるいは肝臓の一方の試料についてピテロジェニンを測定することにより、メダカへの女性ホルモンの影響を評価できる。

暴露期間毎の相関係数を比較して見ると、2週間暴露より1週間暴露で相関係数は高く、4日暴露で最も相関係数は高かった。

男性ホルモンの暴露とメスメダカ血液中ピテロジェニン濃度の関係

男性ホルモンであるテストステロンを暴露したメスメダカでは、ピテロジェニンの誘導の抑制が期待された。しかし、予想に反してテストステロン濃度の上昇に従って、上昇の度合いは、女性ホルモンの暴露されたオスメダカに比較して小さい

ものの、血液中ピテロジェニンは上昇した(図8)。

D. 結論

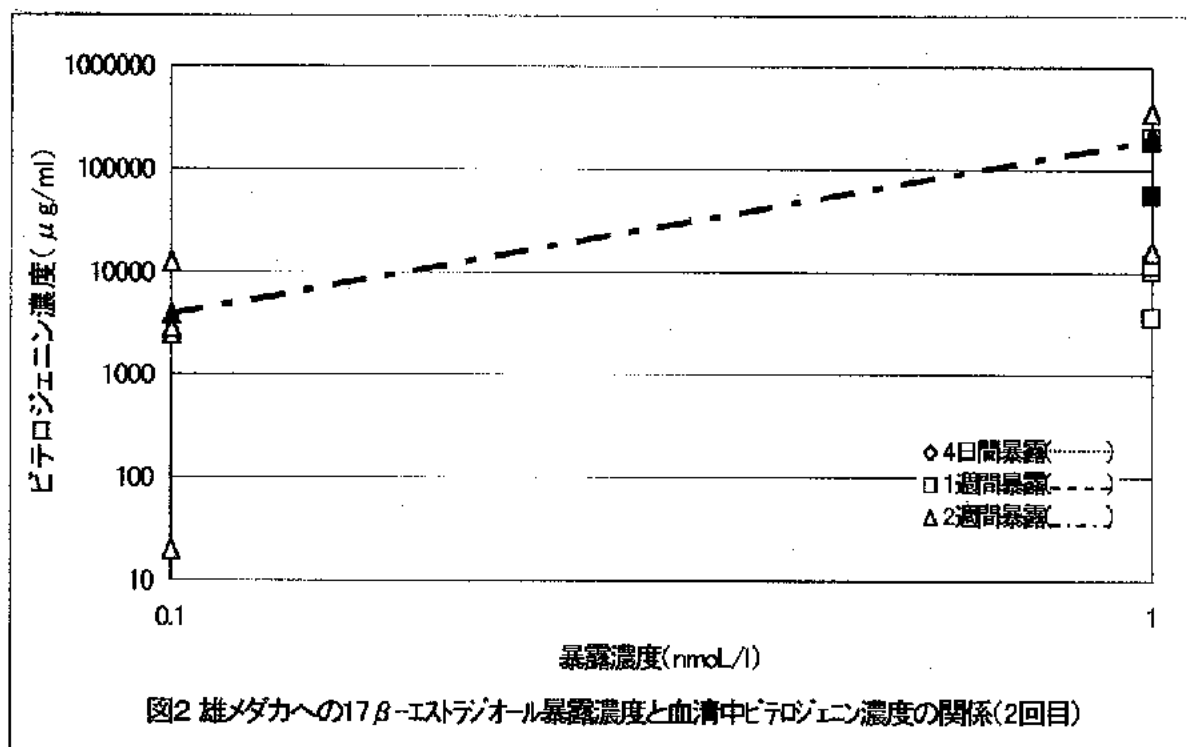
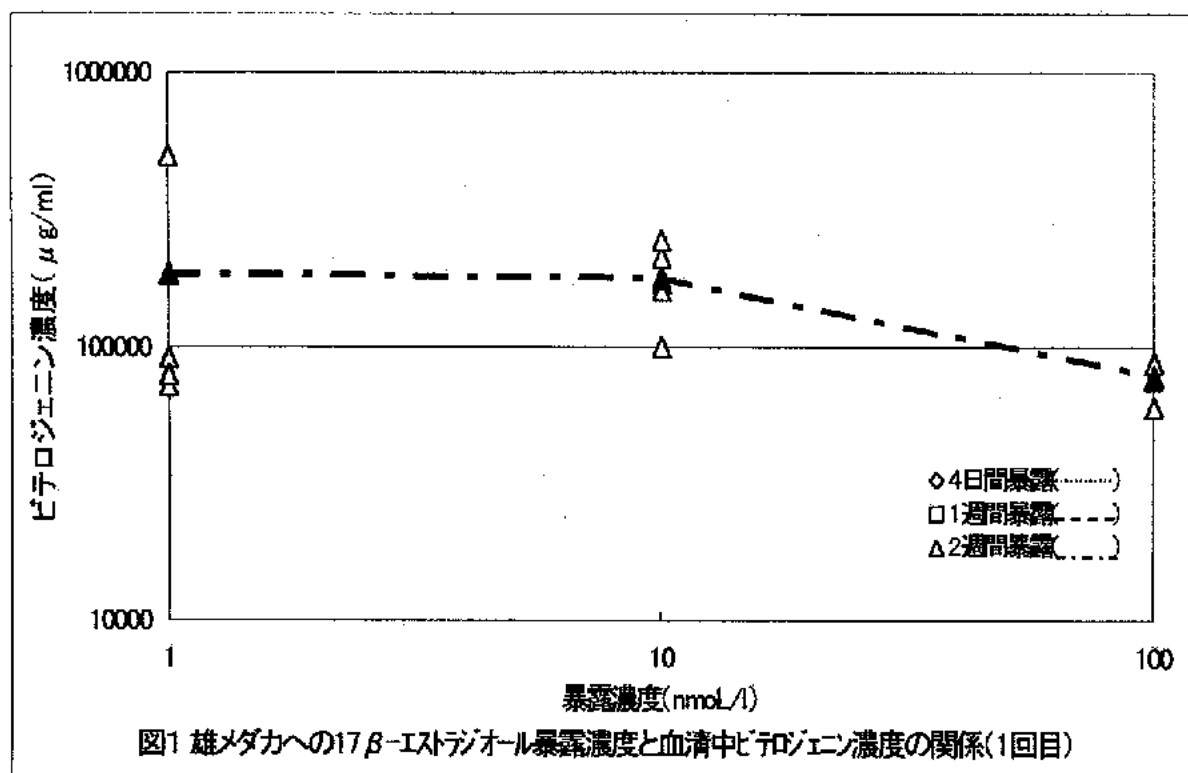
メダカの血液及び肝臓中ピテロジェニンの濃度測定法を開発し、その方法を用いて性ホルモンなどに暴露してメダカ中のピテロジェニン濃度を測定し、ホルモンなどの暴露とピテロジェニンの誘導の関係を明らかにした。

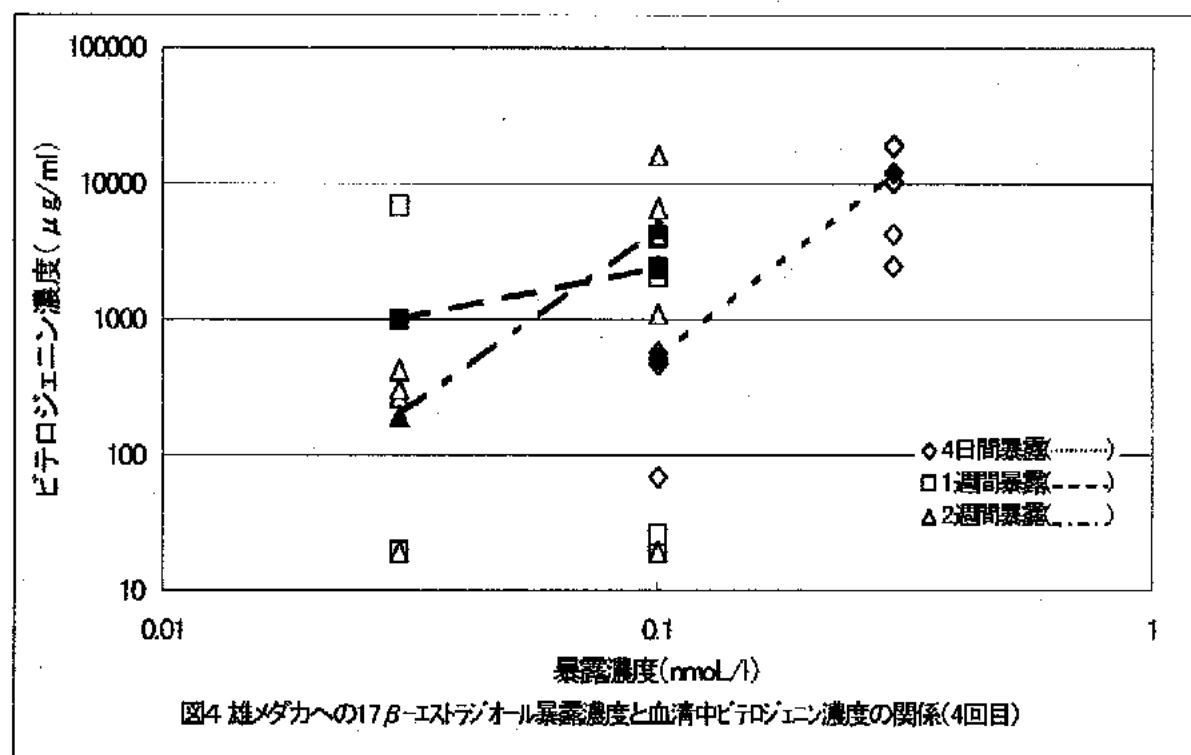
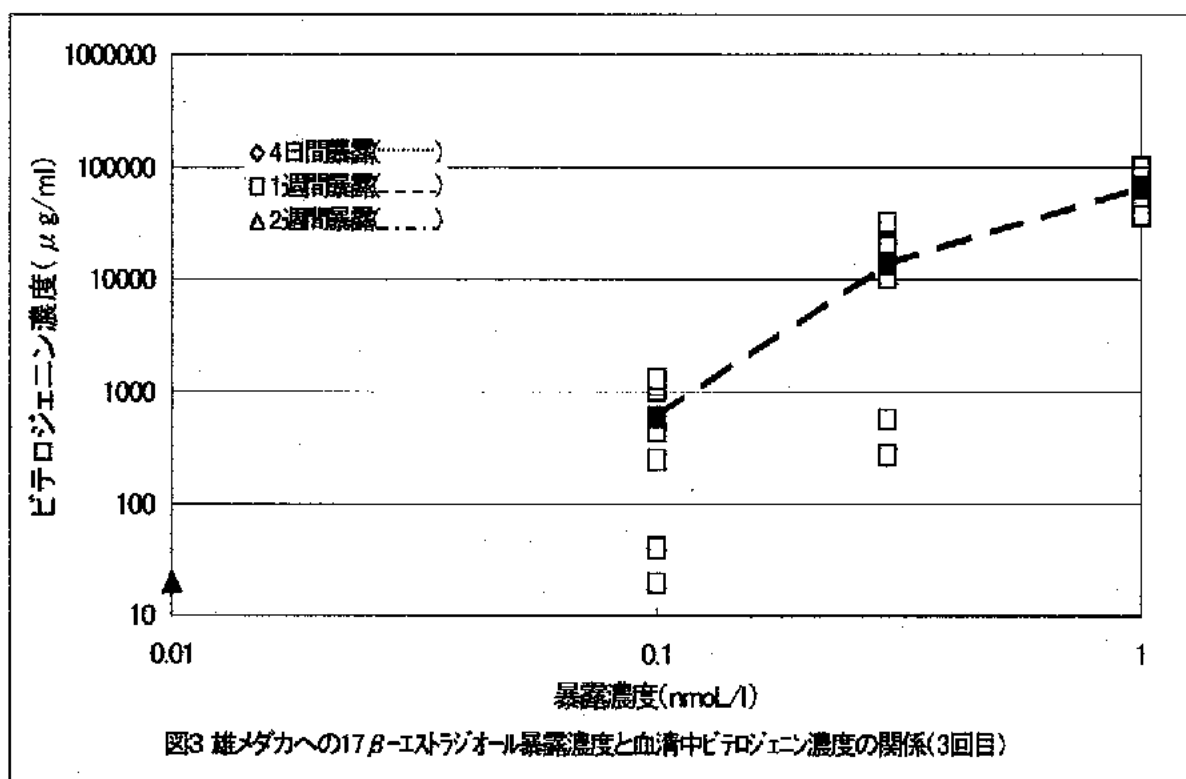
E. 研究発表

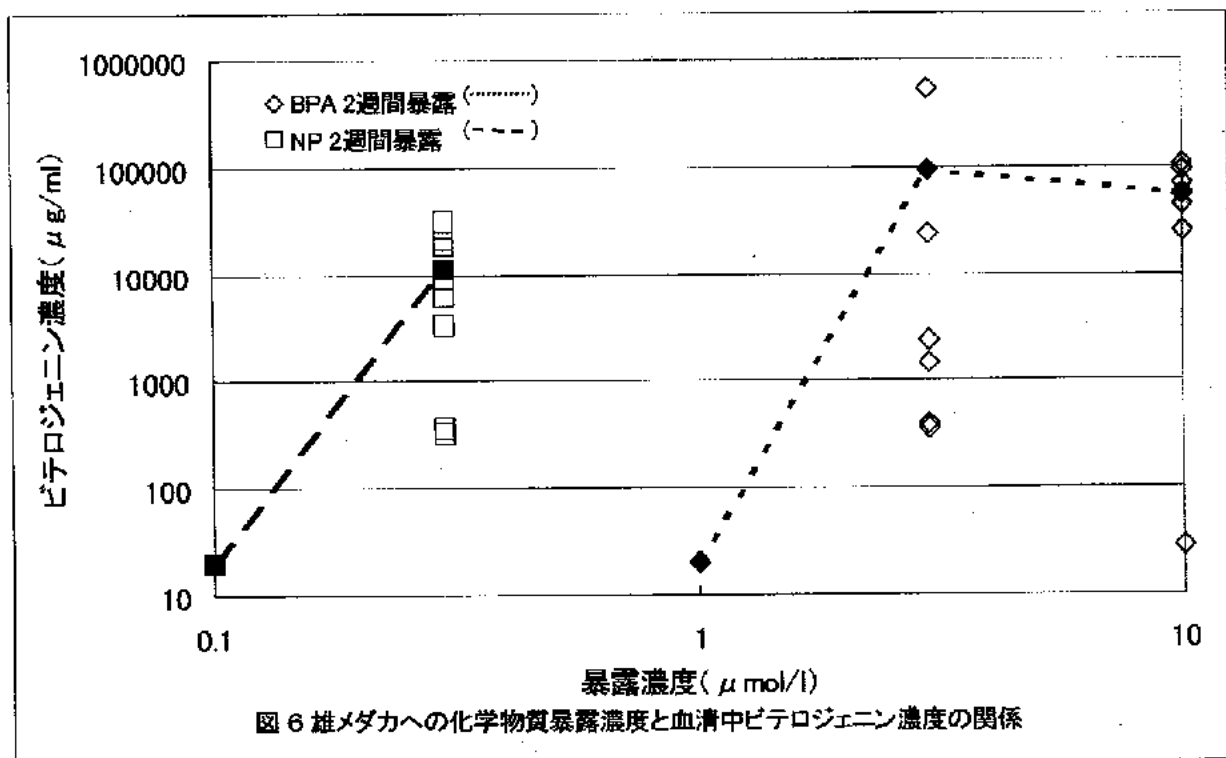
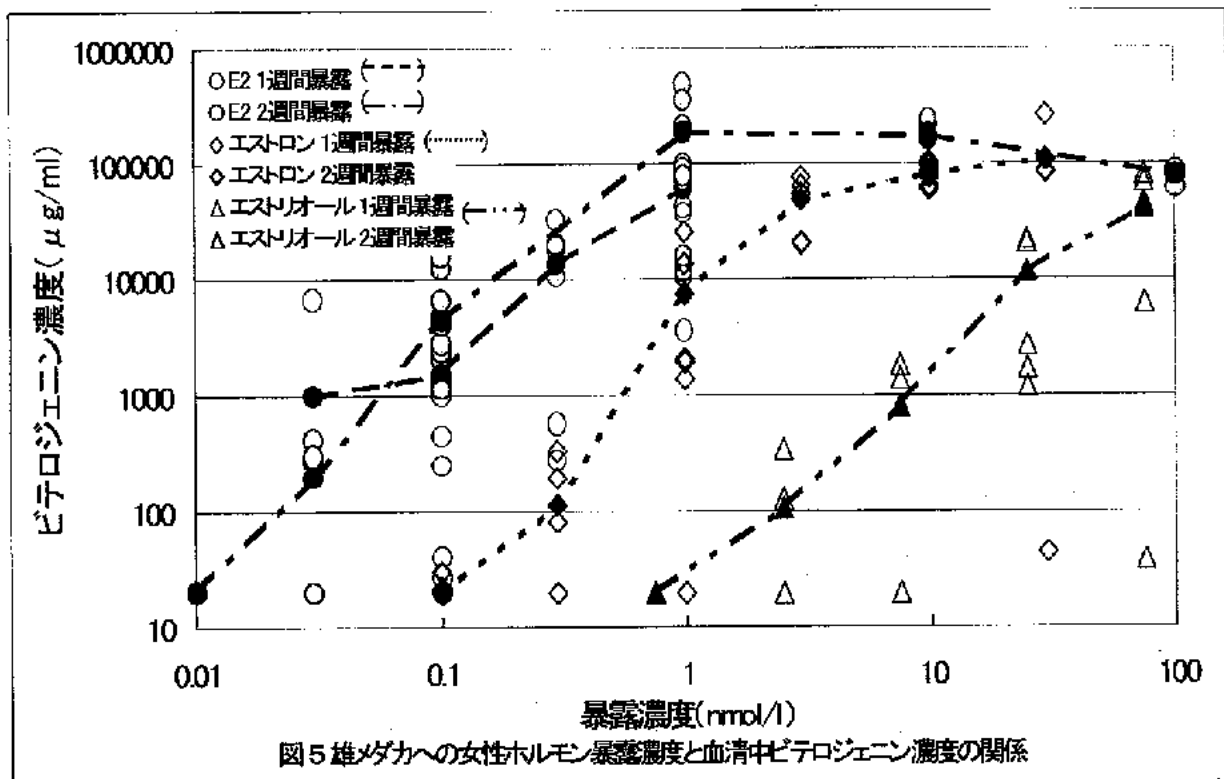
若林明子、中野菜穂子：メダカの性ホルモンの暴露によるピテロジェニンの誘導、第35回日本水環境学会年会、2001年3月、岐阜

G. 参考文献

1. Shioda, T., Wakabayashi, M.: Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 239-243 (2000)
2. Shioda, T., Wakabayashi, M.: Evaluation of reproductivity of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to chemicals using 2-week reproduction test, *Water Sci. Technol.* 42, 53-60(2000)







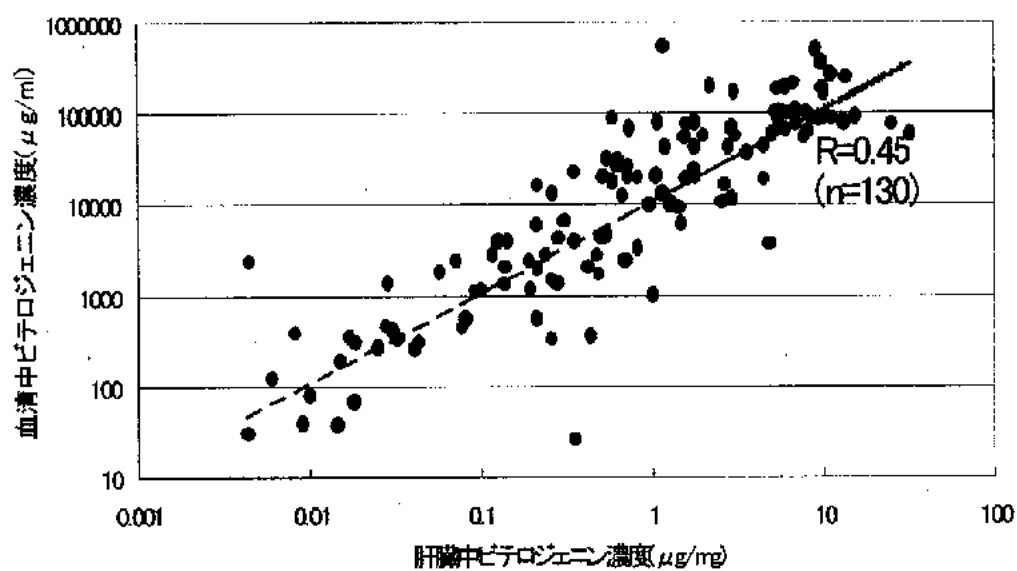


図7 血清中と肝臓中のビテロジェニン濃度の相関

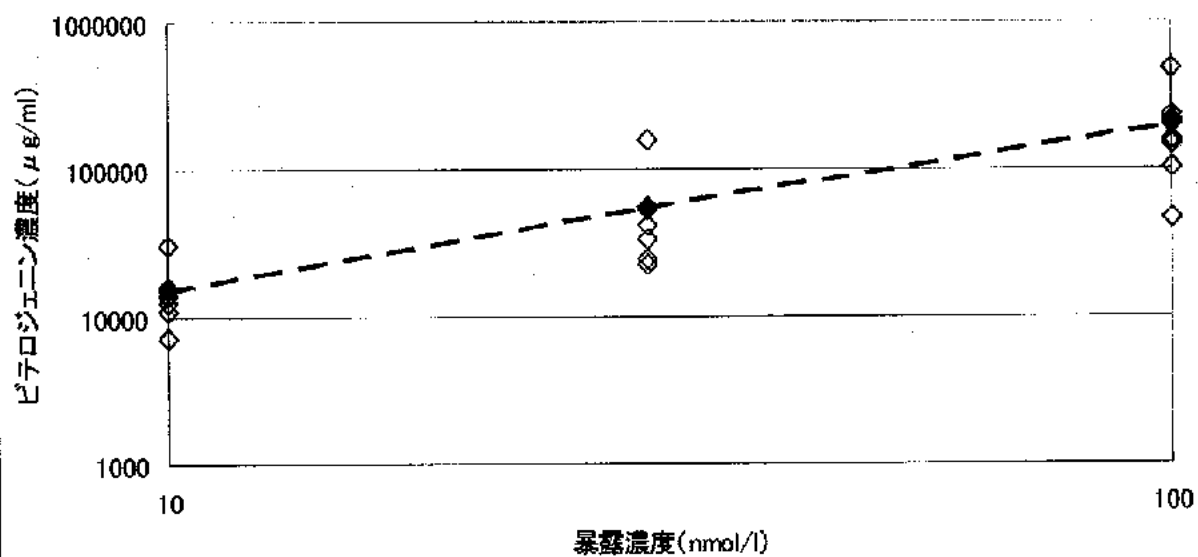


図8 雌メダカへのテストステロン暴露濃度と血清中ビテロジェニン濃度の関係

Research on short term exposure of endocrine-disrupting chemical on medaka(*Olyzias latipes*)

Meiko Wakabayashi, Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection

Abstract

Influence on fishes by natural hormones and endocrine-disrupting chemicals has been concerned. Therefore, it is necessary to establish the test method to examine the influence on fishes with these materials. In this research, medaka was exposed to these materials for a short term and influence of the exposure was examined by induction of vitellogenin in blood and liver. First, analytical method of vitellogenin in blood and liver of medaka was developed. Next, induction of vitellogenin by the short term exposure of sex-hormones or endocrine disrupting chemicals on medaka was examined by using the method developed in this study and the relationship between the induction level of vitellogenin and the exposure concentration of hormone was compared. Materials and methods used in this study is considered to be applicable for screening test methods of endocrine disrupting chemicals.

1.3. 環境生物の免疫影響に関する研究

小林 隆弘 (国立環境研究所 環境健康部)
菊池 慎 (千葉大学海洋バイオシステムセンター)
小宮山 一雄 (日本人学歯学部病理)
高橋 慎司 (国立環境研究所 地域環境研究グループ)
平野 靖史郎 (国立環境研究所 地域環境研究グループ)
古田 恵美子 (獨協医科大学)
吉田 貴彦 (旭川医科大学)
和合 治久 (埼玉医科大学短期大学)

研究要旨

有害環境汚染物質であるベンゾ [a] ピレン (BaP) は多環式芳香族化合物(PAH)の一つであり、大気、水、底質、土壌のいずれにも含まれており発ガンを含めた生体影響が問題となっている。BaP が免疫機能に及ぼす影響については、主にマウスやラットを使用した実験において感染抵抗性、抗体産生、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害活性、マクロファージの $\text{TNF}\alpha$ や IL-1 の産生を低下させることなどが報告されている。これらのことは、環境中の BaP などにより生物は免疫機能を攪乱される可能性があることを示しているが、マウスやラット以外の生物の免疫機能におよぼす影響についてはほとんど検討されていないのが現状である。そこで、BaP により、マウス、ウズラ、金魚、アコヤガイ、ナメタジ、ミミズ、カイコの免疫機能に影響を及ぼす可能性があるかについて検討し以下の結果を得た。

マウス：出生直後7日間母親マウスに BaP (10 または 100mg/kg·day) を腹腔内投与し、7 日目に新生仔マウスの胸腺細胞をフローサイトメトリーを用いて解析した。100mg/kg では体重、胸腺、脾臓がそれぞれ有意な減少、減少傾向、増加傾向が見られた。胸腺細胞の胸腺重量比は有意な増加が見られた。10mg/kg BaP 投与のマウスにおいて、 CD4-CD8- T 細胞及び CD4-CD8+ T 細胞の割合は有意な減少が見られた。 CD4+CD25+ サブセットは 10mg/kg BaP 投与では影響は見られなかったが、100mg/kg BaP 投与群では CD4low の領域で有意な減少が見られた (小林隆弘、平野靖史郎、遠藤直紀)。

ウズラ：近交系ウズラに BaP を食道内投与 (10, 30, 100mg/kg) し、リンパ球の増殖能、マクロファージの食食能、羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能および病原体 (ラウス肉腫) の感染抵抗性を指標に実験をおこなった。T 細胞の ConA 刺激による増殖反応は抑制され、B 細胞の LPS 刺激に対する増殖反応は亢進する傾向が認められた。また、抗体産生能への影響は認められなかった。マクロファージの食食能は投与量に依存した抑制された。ラウス肉腫に対する感染抵抗性は、30mg/kg の投与量では影響はなかった。(高橋慎司、小山卓美、清水佐良子、三浦克洋)

金魚：BaP を金魚の腹腔内に 30, 100 mg/kg BW 注入し、7 日後の脾臓、腎臓を組織学的に観察した。また、7 日後にインディアンインクを注入し、3 日後に脾臓、腎臓のカーボンの取り込みを組織学的に観察し、BaP の食細胞の食食能への影響を評価した。

造血組織に BaP の影響と思われる目立った変性は観察されなかったが、脾臓では実験群・対照群ともにエリプソイド (莢動脈) 周囲に Indian ink の取り込みがみられたが、その取り込みは、実験群