

第1章 緒言

1. 1 本研究の目的

現在、ケミカルアブストラクトに登録されている化学物質は約 1800 万種を超えており、これらのうち 6~8 万種類に達する化学物質は産業的に生産されている¹⁾。このことは現在の私達の生活に化学物質が必要不可欠となっていることを示している。我々の生活環境は天然由来の化学物質に加え、環境汚染物質、医薬品、農薬、産業用化学物質、食品添加物など多くの化学物質に取り囲まれて生活している。これらの化学物質を一方では有効利用し、恩恵にも浴しているものの、一方では、過去にヒトの健康や生態系に重大な影響を及ぼした化学物質も多数知られており、化学物質の安全性や危険性に関して多くの未知の部分が残されている。

近年、これら化学物質のうち、ヒトや野生生物などの生体内に微量取り込まれ、ホルモン疑似作用やホルモン攪乱を引き起こす外因性内分泌かく乱化学物質 (Endocrine-disrupting chemicals) が問題となっている。これらの多くは、内因性ホルモンであるエストロゲンやアンドロゲンなどと化学構造が類似しているため、生体内においてそれらの受容体に誤って結合し、受容体を介し遺伝子発現やタンパク質合成へ影響を及ぼす。例えば、脊椎動物では、体内のホルモン活性が異常に高められ、生殖機能の攪乱、薬物代謝酵素の誘導や酵素活性の阻害による物質代謝の攪乱、免疫系の阻害、発ガン作用等が引き起こされ、ヒトにおいては、女性における乳ガンの発生率の上昇や男性の精子数の減少など

生殖機能障害の原因となっていると考えられている²⁴⁾。内分泌かく乱化学物質の多くは、産業排水や生活排水にも含まれ河川を通じて湖沼や海洋に広がり、水圏に棲む野生生物に顕著な影響を及ぼす可能性が考えられる。生物の生息数減少や分布の変化など生態系への影響や漁業資源の減少等をもたらす恐れがあり、水産物への依存度が高い日本において、安全な食糧の確保という問題としてもとらえる必要もある。

これまで、水環境中に存在する化学物質の評価は、一般に排水基準など既知の毒性物質のみを機器分析で測定することによって行われてきた。しかしながら、河川や海水中に存在する微量の化学物質の計測値のみで、水生生物に与える影響など水域環境中の評価を行うことは難しい。一方、未知あるいは未確認な化学物質に起因する環境変動も含め、生物の生体内反応を用いてその応答性から水環境中の評価を行う方法が注目されている。化学物質の総量としての複合影響をこれまでの物理化学的機器分析方法によって評価することに加え、化学物質によって引き起こされる生物の異常をバイオマーカーと呼ばれる生体内反応¹⁾を利用し総合的に評価する指標を用いることは有用と考えられる。

雌特異タンパク質、ビテロゲニン¹⁾は、鳥類、両生類、及び魚類などの卵性脊椎動物の繁殖に重要な役割を担っているリンタンパク質の前駆体である。脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモンはエストロゲンを合成し、血中のステロイド結合タンパク質によって肝臓へ運ばれ、受容体を介して肝臓中でビテロゲニンを生合成する。合成されたビテロゲニンは血中に分泌され、ポリペプチド鎖2本からなる2量体と考えられており、個々のポリペプチド鎖には脂質とリン酸が結合しており、魚類ではリン脂質とトリグリセロイドを主体とする脂質

の総量は全体の約 20%と報告されている。ビテロゲニンは卵に取り込まれると脂質タンパクであるリポビテリンと、リン酸化セリンを多数含むフォスビチンの 2 種類の卵黄タンパクに分解される⁵⁾。卵黄タンパク前駆物質としてのビテロゲニンの一般的な性質としては、

- 1) 卵黄形成期の雌に特異的に発現している
- 2) 卵濾胞により産生されるエストロゲンにより肝臓で産生される
- 3) 卵黄形成期の卵母細胞に特異的に取り込まれ、卵母細胞内で分子開裂し卵黄タンパク質となる
- 4) 卵発生から孵化仔稚魚が餌を捕り始めるまでの主要な栄養源であり、他の物質と結合して卵母細胞内への輸送を行う
- 5) カルシウム、鉄、亜鉛などを結合する糖、脂質、リンを含む高分子（分子量 45-60 万）の複合タンパクである

ことが知られている。血中ビテロゲニンは一般に雌魚の成熟時に mg/ml レベルまで達することが知られているが、雄魚や未成熟魚ではほとんど検出されない。そのため魚類の生殖生理機構を解明することを目的に、ビテロゲニン遺伝子の発現機構、ビテロゲニンの卵黄タンパクへの特異的分解過程、卵成長及び生殖周期に伴うビテロゲニンの変化などに関する研究が行われ、実用面でも雌に特異的に出現する性質を利用して早期雌雄判別法の指標タンパク、卵黄形成のモニタリングなどの分野で利用されていた。しかしながら近年、雄魚や未成熟魚でもエストロゲン様作用を示す化学物質に曝露された場合、ビテロゲニンが誘導されることが事象として報告されており、環境水中の内分泌かく乱作用（特にエストロゲン様作用）を有する物質の影響を把握する手段として、雄ニジマ

ス *Oncorhynchus mykiss* を調査水域中に曝露後、血中のビテロゲニンを検出する方法がイギリスにおいて開発され、以来、このタンパク質をバイオマーカーに用いることは、信頼度の高い評価手段として欧米で定着してきている⁶⁾。

本研究では、コイ科の一種で生殖内分泌の研究に広く利用されているキンギョ (*Carassius auratus*) をモデル生物とし、内分泌かく乱化学物質の影響評価法の確立及び応用を目的とした。成熟したキンギョは小型で扱いやすく飼育が容易で、各臓器が十分に確保でき、様々なバイオマーカーの分析が可能であることから、内分泌かく乱化学物質を評価するのに最適な実験魚であると考えられる。また、環境適応能力が優れ、1年間を通して大きさが同程度の個体を多数供給できることから通年において研究室内実験および野外調査に適用可能と思われる。これらの利点から、まず、キンギョの血中ビテロゲニンを測定可能な酵素免疫測定法を開発し、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様活性について血中ビテロゲニン合成を指標とし評価した。次に、血中ビテロゲニン合成の変動に関与すると考えられた飼料など飼育環境要因が与える影響を検討し、特異性の高い評価系を精査した。また、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質が、血中ビテロゲニン産生、薬物代謝酵素系、ステロイドホルモン合成系に及ぼす影響についても調査した。さらに、これら確立された手法に加え、環境汚染物質の評価研究において有用と考えられる薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYPs)⁷⁻⁹⁾、重金属の解毒やストレス研究に用いられているメタロチオネイン¹⁰⁾など、いくつかのバイオマーカーを指標とし、一般河川環境中における内分泌かく乱化学物質の影響評価を試みた。

1. 2 本研究に関する従来の研究

これまで、一般環境中に棲息する多くの魚類において、内分泌かく乱化学物質が原因と考えられる生殖異常が報告されている。イギリスでは 1980 年代に汚水処理施設下流に生息するローチ (*Rutilus rutilus*) に雌雄同体魚が確認され、下水処理放流水にエストロゲン様物質が含有しているのではないかとの仮説がたてられ、Purdom ら⁶⁾は、雄ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を下水処理施設の下流に 1-3 週間ケージに入れて置き、血漿ビテロゲニン量を RIA 法により定期的に測定した。1986 年から 4 年間の調査の結果、15 地点の下水処理施設下流に設置したケージから得られた雄ニジマス血中のビテロゲニン量は対照地点の魚と比較して約 500-100,000 倍の増加が確認された。下水処理放流水中のエストロゲン様物質は特定できなかつたが、経口避妊薬のエチニルエストラジオールと、界面活性剤であるノニルフェノールエトキシレート分解産物のノニルフェノールが影響した可能性が示唆された。さらに室内実験において、1-10 ng/l のエチニルエストラジオールを含む水で飼育した雄ニジマスの血中にフィールド調査と同様にビテロゲニンが産生されたことが確認されている¹¹⁾。Jobling ら¹²⁾は、下水処理水または河川中において検出されるアルキルフェノールポリエトキシレートが、雄ニジマスの血中ビテロゲニン合成に及ぼす影響を詳細に調べた。室内実験において、ノニルフェノール、ノニルフェノキシ酢酸、オクチルフェノール及びノニルフェノールジエトキシレートをそれぞれ飼育水中に 30 µg/l になるように調製し継続的に 3 週間曝露した。これらの化学物質は血中ビテロゲニン産生を誘導し、さらに生殖腺体指数 (GSI) が減少したことから、

精子形成の抑制も引き起こすことが明らかとなった。これらの結果はアルキルフェノールポリエトキシレートが雄魚に対して初めてエストロゲン様作用を示す報告となった。米国の Folmar ら¹³⁾は、ミネソタ州のミネアポリス及びセントポール近郊の河川 5 地点で雄コイ *Cyprinus carpio* 血清中のビテロゲニン、エストラジオール-17 β 及びテストステロン量を測定した。セントポール市の下水処理施設下流で捕獲したコイは、対照と比較してビテロゲニンの上昇及びテストステロンの低減が確認され、この河川においてもエストロゲン様作用を有する化学物質が流入していることが示唆され、北米でもイギリスと同様な現象があることが示された。Goodbred ら¹⁴⁾も同様に、1994 年 8 月から 12 月にかけて全米 25 か所の河川に生息する成熟コイのエストラジオール-17 β 、11-ケトテストステロン、ビテロゲニン及び生殖腺の組織学的観察、さらには各調査地点における化学物質濃度について調査している。雌雄魚ともにステロイドホルモン量は各調査地点で 100 倍近くの変動があり、単純に各地域を比較できないことや、各種バイオマーカーに加えエストラジオール-17 β と 11-ケトテストステロンの比もよい指標となる可能性を示唆した。

一方、日本では、多摩川に放出している下水処理場下に生息するコイの血清中ビテロゲニン量が 1997~1998 年にわたり測定されている¹⁵⁾。それによると、雄コイでは最高値 12 mg/ml まで上昇している個体が観察され、採取した雄コイ 48 個体中半数が 10 μ g/ml 以上であり、EIA 法で測定した結果では 95%以上の個体にビテロゲニンが検出されたという。また、これらの雄魚中には生殖巣の異常が組織学的に観察された個体も見つかっている¹⁶⁾。海産魚においては、1997 年に東京湾から採取した雄マコガレイ *Pleuronectes yokohamae* の血清中ビ

テロゲニンが、蛍光検出による EIA 法により測定されている¹⁷⁾。北海道沿岸の雄カレイ（対照群）と比較して、東京湾で採取された雄カレイは、ビテロゲニンの陽性反応を示す個体が多く存在し、最高値は 670 ng/ml であった。この値は卵黄形成期の雌魚のビテロゲニン量と比較すると 500 分の 1 程度で、産卵後の雌魚ビテロゲニン濃度とほぼ同程度であった。これらのことより、都市近郊の河川に生息するコイや、半閉鎖系水域に生息するカレイにもエストロゲン様物質の影響があることが示され、我が国においてもイギリスやアメリカと同様の生殖異常が少なからず起きている可能性が示唆された。これらの背景をうけ、日本の環境省と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た。この調査において、採捕した一部の雄コイの血清中にビテロゲニンが検出され、その濃度範囲は平成 10~12 年度調査でほぼ同様であった。

野生生物において、内分泌かく乱化学物質が原因と考えられる生殖異常が数多く報告されているが、これらの事象をより詳細に調べるために *in vitro* や *in vivo* 試験も試みられている。Loomis と Thomas¹⁸⁾は、4-ノニルフェノールに曝露した Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) の精巣及び肝由来のエストロゲン受容体を用いた結合親和性試験を行い、精巣由来のエストロゲン受容体は $EC_{50}=1.3 \times 10^{-6}$ M で 4-ノニルフェノールと結合し、その親和性はエストラジオール-17 β の約 1/3,000 で、肝由来のエストロゲン受容体は $EC_{50}=1.5 \times 10^{-5}$ M で 4-ノニルフェノールと結合し、親和性はエストラジオール-17 β の約 1/2,000 であったと報告している。ニジマス初代培養肝細胞や、大西洋サケ *Salmo salar* 初代肝細胞を用いた *in vitro* 試験によっても、4-ノニルフェノールのエストロゲン様活性が明らかにされている¹⁹⁻²³⁾。また、魚類以外にも哺乳類などのエストロゲ

ン受容体を組み込んだ酵母 two-hybrid 試験²⁴⁾、ラット子宮細胞質由来エストロゲン受容体結合試験²⁵⁾、ヒト乳癌がん細胞 T47D 由来のエストロゲン受容体を介したレポーター遺伝子試験²⁶⁾、エストロゲン受容体を介したレポーター遺伝子を導入したヒト乳がん細胞由来の MCF-7 細胞並びに HeLa 細胞試験²⁷⁾など様々な *in vitro* 試験によって、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様活性が評価されている。

一方、様々な魚種を用いた *in vivo* 試験においても、内分泌かく乱化学物質が性分化、生殖腺発達及び繁殖など、特に内分泌系や生殖系に及ぼす影響に関して多くの報告がなされている。Yokota ら²⁸⁾は、初期生活段階におけるメダカ *Oryzias latipes* を用いビスフェノール A の影響を検討した。2.28-1,820 $\mu\text{g/l}$ の曝露濃度において、孵化率、孵化までの時間、孵化後の死亡率に影響は認められなかったが、孵化後 60 日齢のメダカの全長及び体重は、曝露濃度の増加に従って減少し、対照群と比較して有意に減少した。また、71.2 $\mu\text{g/l}$ 以下のビスフェノール A 曝露群の性比は 1 : 1 を示し、355 $\mu\text{g/l}$ 曝露群では雄より雌が多く、1,820 $\mu\text{g/l}$ 曝露群では全て雌で、対照群の性比は、雄 : 雌が 2 : 1 であった。さらに、1,820 $\mu\text{g/l}$ 曝露群にのみ精巣卵が観察され、32%の個体が精巣卵を持つ雌雄同体魚であったと報告している。Gray と Metcalfe²⁹⁾は、4-ノニルフェノール 10, 50 及び 100 $\mu\text{g/l}$ に 3 ヶ月間曝露した雄メダカへの影響を検討し、50 $\mu\text{g/l}$ 以上の曝露群において精巣内に卵細胞の形成を認めている。Miles-Richardson ら³⁰⁾は、4-*p*-ノニルフェノールとノニルフェノールエトキシレートにそれぞれ 42 日間曝露した雌雄ファットヘッドミノー *Pimephales promelas* の二次性徴と生殖腺構造に及ぼす影響を比較、検討した。1.6 及び 3.4 $\mu\text{g/l}$ の 4-*p*-ノニルフェノ

ールに曝露した雄魚において精巣組織に異常が認められ、5.5 $\mu\text{g/l}$ のノニルフェノールエトキシレート曝露によって、二次性徴と生殖腺は影響を受けず、両物質の曝露濃度 3.4 及び 5.5 $\mu\text{g/l}$ は二次性徴に影響しないと報告している。

Gimeno ら³¹⁾は、4-*t*-ペンチルフェノールが精子形成時期の雄コイ *Cyprinus carpio* に及ぼす影響を検討し、1000 $\mu\text{g/l}$ の 4-*t*-ペンチルフェノールは有意に血中ビテロゲニンの増加及び精子形成を阻害し、32, 100 及び 1000 $\mu\text{g/l}$ の 1 ヶ月間曝露によって生殖腺体指数が有意に減少したと報告している。また、孵化後 50 日齢の性分化時期の雄コイにおける生殖器の形成、始原生殖細胞の成熟や配偶子形成に及ぼす影響も検討し、4-*t*-ペンチルフェノールは曝露濃度に依存して始原生殖細胞が減少し精子形成が抑制されたと報告している³²⁾。

Shioda と Wakabayashi³³⁾は、エストラジオール-17 β 、ビスフェノール A、ノニルフェノール及びフタル酸ジエチルヘキシルがメダカの繁殖に及ぼす影響を検討し、フタル酸ジエチルヘキシル以外の物質は、産卵数、受精率及び次世代胚の孵化成功率を減少させる事実を報告している。Gronen ら³⁴⁾は、成熟した雄メダカに 20 ~230 $\mu\text{g/l}$ の 4-*t*-オクチルフェノールを 21 日間曝露し、ビテロゲニン産生能と生殖能阻害の関係を検討し、4-*t*-オクチルフェノール曝露濃度の増加に伴って雄メダカの血中ビテロゲニン量の増加、受精卵の減少、胚生存率減少を認めている。また、生殖腺の組織学的観察において、41 $\mu\text{g/l}$ 以上で精巣の精原細胞形成阻害が認められ、74 $\mu\text{g/l}$ 曝露群の 1 個体、230 $\mu\text{g/l}$ 曝露群の 1 個体において精巣卵が確認されたと報告している。Check ら³⁵⁾も同様にメダカを用い、*o,p'*-DDT に曝露したメダカのビテロゲニン産生と繁殖影響の関連性について検討し、孵化後 2 週間 (DDT 濃度 : 0.23, 0.50, 1.37 及び 4.32 $\mu\text{g/l}$) あるいは 8 週間 (DDT

濃度：0.30, 0.69, 1.94 及び 5.19 $\mu\text{g/l}$) DDT に曝露したメダカの成熟後におけるビテロゲニン量は、DDT の濃度依存性はないものの産生を認めている。また、4.32 $\mu\text{g/l}$ と 1.94 $\mu\text{g/l}$ 及び 5.19 $\mu\text{g/l}$ 曝露群の生殖腺に精巣卵が確認され、成熟後の産卵数、受精率及び次世代胚の孵化成功率がそれらより低濃度において低下し、指標として孵化成功率>受精率>>生殖腺分化>>VTG 産生の順に影響が顕著に認められたと報告している。Jobling ら³⁶⁾は、4-ノニルフェノール0.24, 1.06, 1.85, 5.02, 20.3 及び 54.3 $\mu\text{g/l}$ に3週間曝露した成熟雄ニジマスへの影響を検討し、20.3 $\mu\text{g/l}$ 以上の曝露群において、血中にビテロゲニンの誘導が認められ、ビテロゲニン誘導の閾値は 10 $\mu\text{g/l}$ であったと報告している。Pedersen ら³⁷⁾は、4-ノニルフェノール 76 $\mu\text{g/l}$ に 9 日間曝露した未成熟ニジマスへの影響を検討し、血中のビテロゲニン濃度の増加を認めている。また、4-ノニルフェノールまたは 4-n-ノニルフェノール 50 mg/kg を 2 回腹腔内投与した未成熟ニジマスへの影響も検討し、4-ノニルフェノール投与群では有意に血中にビテロゲニンの誘導が認められたが、4-n-ノニルフェノールでは認められなかったと報告している。Christiansen らは^{38,39)}、ニジマス血中のビテロゲニン産生を指標として、エストラジオール-17 β 、ジエチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール及びビスフェノール A がエストロゲン様作用を示すことを明らかにした。また、ビスフェノール A 以外に、ジメタクリルビスフェノール A もエストロゲン様作用を示すことを明らかにし、テトラプロモビスフェノール A はニジマスに対してエストロゲン様作用を示さないことを示唆している。Korsgaard と Pedersen⁴⁰⁾は、4-*t*-ノニルフェノール (試験濃度：10, 50, 100, 250, 500 及び 1,000 $\mu\text{g/l}$) に 3 週間曝露したゲンゲ類 *Zoarces viviparus* への影響を検討し、100 $\mu\text{g/l}$

以上の曝露群において、血中のビテロゲニン濃度の増加が認められたと報告している。Ashfieldら⁴¹⁾は、4-t-ノニルフェノール 1, 10 及び 30 µg/l を 431 日間曝露した雌ニジマスへの影響について検討し、30 µg/kg 投与群において体重に対する相対生殖腺重量の増加が認められたと報告している。Nimrod と Benson⁴²⁾は、ノニルフェノールを腹腔内投与したナマズ類 *Ictalurus punctatus* への影響評価を行い、237 mg/kg 投与群において血ビテロゲニンの有意な増加が認められ、活性はエストラジオール-17βの 1/5,000 であったと報告している。Lindholstら⁴³⁾は、ニジマスの血中ビテロゲニン産生を指標にビスフェノール A のエストロゲン様作用と、肝臓ならびに筋肉への蓄積量を検討した。曝露 6 及び 12 日後に 500 µg/l 曝露群のみで有意に血中ビテロゲニン量が増加し、70 及び 100 µg/l 曝露群でも 6 日後には、ビテロゲニン合成の誘導が認められる個体が多数観察されたことから、低濃度における作用点は 40~70 µg/l の間にあることを示唆した。一方、肝臓中に蓄積されるビスフェノール A 含量は 10~500 µg/l 曝露群で平均 0.22~4.36 µg/g で対照群に比べ有意に高い値を示し、胸部筋肉中では 70~500 µg/l 曝露群で 0.22~0.83 µg/g の間で検出され、肝臓中に蓄積されたビスフェノール A 含量と血中ビテロゲニン量の間には正の相関性が認められたと報告している。Ren 及び Lechら^{44,45)}は、10, 20, 50, 100, 150 µg/l のノニルフェノールに 72 時間曝露した未成熟ニジマスへの影響を検討した。肝臓中ビテロゲニン mRNA は、ノニルフェノール 50 µg/l の曝露 1 日で誘導され、50 µg/l で 72 時間曝露後、浄水に戻すと 48 時間後には肝臓中ビテロゲニン mRNA のレベルは減少することや、10-150 µg/l の 72 時間曝露によって肝臓中ビテロゲニン mRNA は濃度依存的に上昇することを報告している。

以上のように、様々な *in vitro* 及び *in vivo* 試験系において、内分泌かく乱化学物質の魚類に与える影響が評価されている。しかしながら、*in vivo* 試験系において魚類を飼育するために用いられる市販飼料に含まれるエストロゲン様物質、特に植物エストロゲンと試験化学物質の複合作用についてはほとんど知見がない。大豆成分やそれらに含まれるゲニステイン、ダイゼイン、クメステロール及びイクオールなどエストロゲン様作用を示す植物エストロゲンは、哺乳類において生殖機能を攪乱することが示されている^{46,47)}。多くの植物エストロゲンは標的組織においてエストロゲン受容体に結合し、RNA 合成においてエストロゲン・アゴニスト作用として働き^{48,49)}、あるいは多くの RNA 応答を阻害しエストロゲン・アンタゴニスト作用を示す⁵⁰⁾。植物エストロゲンと試験化学物質の複合影響について基礎的知見を得る必要性から、それらの影響を考慮した特異性の高い内分泌かく乱化学物質の評価系を標準化することを目指した。

1. 3 本研究の概要

これまで一般環境中に生息する魚類などの野生生物において、内分泌かく乱化学物質が原因と考えられる数多くの生殖異常が報告されている。これらの化学物質は、エストロゲンと類似の化学構造を持つため、生体内のエストロゲン受容体に誤って結合することができる。その結果、内因性エストロゲンと競合し生体内のホルモンバランスを攪乱することによって様々な悪影響を及ぼすと考えられている。しかし、これら内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用を *in vivo* 試験系において検出する評価法はほとんど確立されていない。

本研究では、エストロゲン様物質によって特異的に誘導されるビテロゲニン（雌特異タンパク質）を指標としたエストロゲン様物質の評価法確立を目指した。また、それらビテロゲニン合成に関与する環境要因についても検討を行い、特異性の高い内分泌かく乱化学物質評価系の精査、さらにこれら確立した手法といくつかのバイオマーカーを指標とし、一般河川環境中における内分泌かく乱化学物質評価への応用を試みた。

第 2 章では、内分泌かく乱化学物質の評価に有用と考えられるキンギョ *Carassius auratus* を用い、酵素免疫測定法（ELISA）による血中ビテロゲニンの高感度測定法の確立を行った。エストロゲン処理した雄キンギョ血中から陰イオン交換カラムによりビテロゲニンの精製を行い、抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体とのサンドイッチ ELISA を構築した。キンギョ血中において 39-2,500 ng/ml のビテロゲニンが定量可能となった。また、雄キンギョ血中ビテロゲニン産生を指標とし、ビスフェノール A のエストロゲン様作用を

明らかにした。

第3章では、雄キンギョの血中ビテロゲニン合成が飼料成分、主に植物エストロゲンにより変動するか明らかにするため、異なる飼料で飼育した雄及び卵巣摘出キンギョの血中ビテロゲニン産生に及ぼす影響を検討し、それら飼料に含まれる植物エストロゲン含量を測定した。試作した開発飼料 No. 2(FD)を与えた雄キンギョはほとんど血中ビテロゲニンを産生しなかったが、市販のマス(TD)及びコイ用飼料(CD)を与えた雄キンギョは、FD 給餌群と比較して有意に高い血中ビテロゲニンの産生を引き起こした。また、卵巣摘出キンギョにおいても同様の結果を得た。植物エストロゲン含量は、CD>TD>FD の順に高い値を示した。以上のことより、飼育飼料の違いにより血中ビテロゲニン合成レベルや植物エストロゲン含量が異なることが示唆された。

第4章では、*in vitro* 試験によるエストロゲン活性測定系の確立を行い、代表的な植物エストロゲン（ゲニステイン、ダイゼイン、イクオール、クメステロール、ゲニスチン及びダイジン）のエストロゲン活性を明らかにした。次にそれら基礎的知見及び *in vitro* エストロゲン活性試験によって、魚類、両生類、及び爬虫類など市販の実験動物用飼育飼料の総エストロゲン活性と植物エストロゲン含量の関連について調べた。ほとんどの実験動物用飼育飼料はエストロゲン受容体アルファ及びベータに対しアゴニスト作用を示し、エストロゲン活性を有することが明らかになった。また、それらエストロゲン活性と植物エストロゲン含量には正の相関性が認められ、エストロゲン活性には植物エストロゲンが寄与していることが示唆された。

第5章では、内分泌かく乱作用が疑われている合成化学物質ノニルフェノー

ル(NP)が、植物エストロゲン低含有飼料(FD2)を与えた雄キンギョの血中ビテロゲニン産生、ステロイドホルモン合成、チトクローム P450(CYP)及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)活性に及ぼす影響を調べた。また、植物エストロゲン高含有飼料(CD2)を与え NP に曝露した雄キンギョのそれらバイオマーカーも調べ、NP と植物エストロゲンの複合影響について FD2+NP 群と比較、検討した。NP-100 µg/l は、FD2 及び CD2 給餌群それぞれにおいて、雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生しエストロゲン様作用を示すことが示唆されたが、FD2 給餌群は全体的に血中ビテロゲニン量が低く、結果的に NP のエストロゲン様作用を短期間に検出した。CD2 給餌群は FD2 給餌群と比較して、有意に高い血中ビテロゲニン産生の増加及びアンドロゲン合成低下を引き起こし、精巣の発達を抑制した。FD2 及び CD2 給餌群ともに、肝ミクロソーム中 CYP1A 依存性酵素活性及び GST 活性に大きな変化は認められず、NP の代謝機構には別の酵素が関与していることが示唆された。以上のことより、NP は雄キンギョに対してエストロゲン様作用を持つことが示され、血中ビテロゲニン合成を指標としたエストロゲン様物質評価系における FD2 の有用性が示唆された。また、CD2 中に含まれる植物エストロゲンは雄キンギョの内分泌系を攪乱し、精巣発達の抑制を引き起こしたことから、飼育飼料の標準化及び植物エストロゲンが魚類に及ぼす影響評価を行う必要性が示唆された。

第6章では、2~5章で得られた知見を応用し、熊本県内の一般河川に曝露した雌雄キンギョの血中ビテロゲニン合成、CYPs 依存性酵素活性及び肝臓中メタロチオネイン合成を指標とし、水環境中における内分泌かく乱化学物質など環境化学物質のスクリーニングを試みた。環境化学物質の複合的な汚染が憂慮

される調査地点において各バイオマーカーが誘導あるいは抑制された。これらバイオマーカーの変動を指標とすることによって、一般河川環境の環境化学物質をスクリーニングできる可能性が示された。

以上のことから、内分泌かく乱化学物質など環境化学物質の評価において、キンギョ及び各種バイオマーカーの有用性が示され、今後、それらがスクリーニング試験やフィールド試験に応用できることが示唆された。

1. 4 参考文献

- 1) 鈴木基之, 内海英雄編, バイオアッセイ水環境のリスク管理, 講談社 (1998).
- 2) T. Colborn, F.S. vom Saal, A.M. Soto: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 101, 378-384 (1993).
- 3) T. Colborn, D. Dumanoshi, J.P. Myers: Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996).
- 4) L.J. Guillette Jr, T.S. Gross, G.R. Masson, J.M. Matter, H.F. Percival, A.R. Woodward: Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 102, 680-688 (1994).
- 5) J.R. Markert, W.E. Vanstone: Egg proteins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma. *J. Fish. Res. Board. Can.*, Vol. 28, 1853-1856 (1971).
- 6) C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter: Estrogenic effects of effluent from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, Vol. 8, 275-285 (1994).
- 7) T.D. Bucheli, K. Fent: Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, Vol. 25, 201-268 (1995).
- 8) J.J. Whyte, R.E. Jung, C.J. Schmitt, D.E. Tillitt: Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol.

30, 347-570 (2000).

- 9) M.E. Hahn, J.J. Stegeman: Regulation of cytochrome P4501A1 in teleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 127, 187-198 (1994).
- 10) C. Hogstrand, C. Haux: Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol. C*, Vol. 100, 137-141 (1991).
- 11) E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, and J.P. Sumpter: Identification of estrogenic chemicals in STW Effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 32, 1559-1565 (1998).
- 12) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 15, 194-202 (1996).
- 13) L.C. Folmar, N.D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino and L.J. Guillette Jr: Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 104, 1096-1101 (1996).
- 14) S.L. Goodbred, R.J. Gillion, T.S. Gross, N.P. Denslow, W.L. Bryant and T.R. Schoeb: Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United State streams: Potential for

- contaminant-induced endocrine disruption. U. S. Geological Survey, Open File Report 96-627, Sacramento, California, 1-47 (1997).
- 15) 平野香織, 深田陽久, 平松尚志, 原彰彦: コイのビテロジェニン酵素免役測定法 (ELISA) の確立. 平成 11 年度日本水産学会春期大会講演要旨集, 210 (1999).
 - 16) 中村將, 井口泰泉: 多摩川にみる魚類の異変, 科学, Vol. 68, 515-517 (1998).
 - 17) S. Hashimoto, H. Bessho, K. Sato, A. Hara and K. Fujita: Vitellogenin in wild male flounder, *Pleuronectes yokohamae*, in Tokyo Bay, Japan. *Jpn. J. Environ. Toxicol.*, Vol. 1, 75-85 (1998).
 - 18) A.K. Loomis, P. Thomas: Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biol. Reprod.*, Vol. 61, 51-60 (1999).
 - 19) R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter, M.G. Parker: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, Vol. 135, 175-182 (1994).
 - 20) S.R. Milligan, O. Khan, M. Nash: Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 112, 89-95 (1998).
 - 21) G. Flouriot, F. Pakdel, B. Ducouret, Y. Valotaire: Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.*, Vol. 15, 143-151 (1995).
 - 22) M. Islinger, S. Pawlowski, H. Hollert, A. Volkl, T. Braunbeck: Measurement of

- vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay. *Sci. Total Environ.*, Vol. 233, 109-122 (1999).
- 23) T. Celius, T.B. Haugen, T. Grotmol, B.T. Walther: A sensitive zonal genetic assay for rapid *in vitro* assessment for estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 107, 63-68 (1999).
- 24) T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, H. Utsumi: Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, Vol. 46, 282-298 (2000).
- 25) R.M. Blair, H. Fang, W.S. Branham, B.S. Hass, S.L. Dial, C.L. Moland, W. Tong, L. Shi, R. Perkins, D.M. Sheehan: The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, Vol. 54, 138-153 (2000).
- 26) J. Legler, C.E. van der Brink, A. Brouwer, A.J. Murk, P.T. van der Saag, A.D. Vethaak, B. van der Burg: Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.*, Vol. 48, 55-66 (1999).
- 27) P. Balaguer, F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A.-M. Boussioux, M. Pons, J.-C. Nicolas, C. Casellas: Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens *Sci. Total Environ.*, Vol. 233, 47-56 (1999).
- 28) H. Yokota, Y. Tsuruda, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, A. Nakazono, T. Honjo, K. Kobayashi: Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka.

- Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 1925-1930 (2000).
- 29) M.A. Gray, C.D. Metcalfe: Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, 1082-1086 (1996).
- 30) S.R. Miles-Richardson, S.L. Pierens, K.M. Nichols, V.J. Kramer, E.M. Snyder, S.A. Snyder, J.A. Render, S.D. Fitzgerald, J.P. Giesy: Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Research Section A*, Vol. 80, S122-S137 (1999).
- 31) S. Gimeno, H. Komen, S. Jobling, J.P. Sumpter, T. Bowmer: Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.*, Vol. 43, 93-109 (1998).
- 32) S. Gimeno, H. Komen, A.G.M. Gerritsen, T. Bowmer: Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.*, Vol. 43, 77-92 (1998).
- 33) T. Shioda, M. Wakabayashi: Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, Vol. 40, 239-243 (2000).
- 34) S. Gronen, N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes, M. Brouwer: Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-*tert*-octylphenol. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 107 (1999).
- 35) A.O. Cheek, T.H. Brouwer, S. Carroll, S. Manning, J.A. McLachlan, M. Brouwer: Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive

- disruption. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 109, 681-690 (2001).
- 36) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 15, 194-202 (1996).
- 37) S.N. Pedersen, L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard: *In vivo* estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.*, Vol. 233, 89-96 (1999).
- 38) L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard: Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar. Environ. Res.*, Vol 46, 137-140 (1998).
- 39) L.B. Christiansen, K.L. Pedersen, S.N. Pedersen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard: *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 1867-1874 (2000).
- 40) B. Korsgaard, K.L. Pedersen: Vitellogenin in *Zoarces viviparus*: purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 β and 4-nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, Vol. 120, 159-166(1998).
- 41) L.A. Ashfield, T.G. Pottinger, J.P. Sumpter: Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenolic compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 17, 679-686 (1998).
- 42) A.C. Nimrod, W.H. Benson: Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar. Environ. Res.*, Vol. 42, 155-160 (1996).
- 43) C. Lindholst, K. L. Pedersen, S. N. Pedersen: Estrogenic response of bisphenol A in

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat. Toxicol.*, Vol. 48, 87-94 (2000).
- 44) L. Ren, S.K. Lewis, J.J. Lech: Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. *Chem. Biol. Interact.*, Vol. 100, 67-76 (1996).
- 45) J.J. Lech, S.K. Lewis, L. Ren: In vivo estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Vol. 30, 229-232 (1996).
- 46) N.R. Adams, M.R. Sanders: Persistent infertility in ewes after prolonged exposure to oestradiol-17 β . *J. Reprod. Fertil.*, Vol. 84, 373-378 (1988).
- 47) J.M. Obst, R.F. Seamark: Plasma hormone levels during pregnancy and parturition in ewes grazing Yarloop clover pastures. *J. Reprod. Fertil.*, Vol. 29, 146-147 (1972).
- 48) D.A. Shutt, R.I. Cox: Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *J. Endocrinol.*, Vol. 52, 299-310 (1972).
- 49) M.A. Thompson, B.L. Lasley, B.A. Rideout, L.H. Kasman: Characterization of the estrogenic properties of a nonsteroidal estrogen, equol, extracted from urine of pregnant macaques. *Biol. Reprod.*, Vol. 31, 705-713 (1984).
- 50) H. Adlercreutz, K. Hockerstedt, C. Bannwart, S. Bloigu, E. Hamalainen, T. Fotsis, A. Ollus: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J. Steroid Biochem.*, Vol. 27, 1135-1144 (1987).