

第6章 各種バイオマーカーを指標とした河川環境中の内分泌かく乱化学物質 評価

6.1 研究目的

ポリ塩化ビフェニル (PCBs)、ヘキサクロロシクロヘキサン異性体 (HCHs)、DDT 化合物 (DDTs) 及びヘキサクロロベンゼン (HCB) 等の有機塩素系化合物は、イルカやクジラなど海棲哺乳類の脂肪や皮膚などに高濃度で蓄積し悪影響を及ぼすことが報告されている¹⁾。これら環境化学物質は河川環境中にも存在することから、ヒトを含めた野生生物に深刻な影響を及ぼす可能性が危惧される。また、近年、内分泌かく乱化学物質が野生生物に与える影響も指摘されており^{2,4)}、下水処理場などから排出された処理水中に生息する魚類においては、血中ホルモン量の変化や生殖腺の異常等が報告されている^{5,6)}。

これまで、水環境中に存在する化学物質の評価は、排水基準等の既知物質毎に行われてきた。しかし、一般に機器分析による化学物質測定は費用がかかり、また、特別な環境変動を河川や海水中に存在する微量の化学物質の計測値のみから評価することは困難と考えられる。したがって、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て、生物の生体反応を用いその応答性から水環境を評価する方法と化学物質の計測値を併用することは有用と考えられる。これらの観点から、化学物質の総量としての複合影響を評価する必要があり、水環境中の汚染物質の影響を総合的に評価できるバイオアッセイ手法の確立が求められている。

ビテロゲニン⁷⁾は卵黄タンパク前駆物質で、通常、卵黄形成期の卵生脊椎動物

においてエストラジオール-17 β (E2) の作用により肝臓中で合成される。肝臓中で合成されたビテログゲニン⁷⁾は血中を介して卵巣に取り込まれ卵黄に蓄積される。ビテログゲニンは雌特異タンパク質であるため、雄魚ではほとんど検出されない。しかしながら、外因性のエストロゲン様物質を曝露することによって誘導されることから、雄魚におけるビテログゲニン産生の誘導はエストロゲン様物質曝露の指標となる⁷⁾。本論文の第2～5章においても、それらの有用性を明らかにした。一方、環境汚染物質の評価において、魚類のチトクローム P450 (CYPs) の発現変動を解析することは、生物学的影響評価手法として有用であることが知られている^{8,9)}。CYPs 依存性モノオキシゲナーゼは、薬物、抗生物質またはステロイド、脂肪酸、ビタミン及びプロスタグランジンなどの内因性物質も含めた広範囲の環境汚染物質の代謝(生体内変化)に重要な役割を果たしている。CYP 1A アイソフォームは、生体異物の活性化に最も重要なサブファミリーとして広く研究が行われており、ハロゲン化有機塩素系もしくはそれに関連した化合物の核内アリルヒドロカーボン受容体(AhR)に対する結合は肝臓中の CYP 1A 遺伝子の発現を誘導する¹⁰⁾。これらのことから、CYP 1A 依存性エトキシレゾルフィン O-脱エチル化(EROD)及びメトキシレゾルフィン O-脱エチル化(MROD)活性の評価は毒性学研究において重要であると考えられている。これら CYPs の解析に加え、メタロチオネインは重金属曝露のバイオマーカーとして有用であることが知られている。メタロチオネインは分子量が約 6500~10000 であり、構成アミノ酸の約 60 残基の約 1/3 をシステインが占め、ヒスチジン、チロシン等の芳香族アミノ酸を欠いた低分子量の金属結合蛋白質である¹¹⁾。その生理的機能は多岐に渡っており、第一に、システイ

ンのチオール基を介して通常は亜鉛、銅などの生体に必須な微量金属と結合してそれらの吸収、輸送、貯蔵、金属酵素などへの供給、排泄、恒常性の維持などに関与している。これらの機能以外に、カドミウム、水銀など有害重金属やスズ化合物の生体内侵入に際してはそれらの解毒、耐性に関して重要な役割を果たすことが魚類において報告されている¹²⁻¹⁴⁾。また、デキサメソザン曝露およびエアープンピングストレスによってコイ *Carassius cuvieri* の肝臓並びに腎臓中にメタロチオネインが誘導されることから、様々な環境ストレスに対するバイオマーカーとしても有用である可能性が示唆されている¹⁵⁾。

本研究では、キンギョ *Carassius auratus* の血中ビテログニン、肝臓中薬物代謝酵素活性、肝臓中メタロチオネインをバイオマーカーとし、河川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影響評価を試みた。

6. 2 実験方法

6. 2. 1 一般河川環境中の環境化学物質モニタリング

6. 2. 1. 1 供試魚及びモニタリング地点 (1)

性成熟した2年魚の雄及び雌キンギョ *Carassius auratus* を実験に供した。2000年11月から12月までの期間中、雄7個体を収容したケージと、雄4個体及び雌3個体を収容したケージ、合計2つのステンレスケージ (縦40 cm×横40 cm×高さ30 cm) を熊本県水俣市水俣川の調査水域3地点に35日間曝露した (Fig. 1)。対照地点として下水処理場などの処理水が流入していない河川最上流 (対照地点) を選定し、またその地点の下流にあたる河川中流地点 (A 地点) 及び河川下流地点 (B 地点) を調査対象区とした。実験魚のケージを用いた河川中への曝露は、石製ブロックを各ケージに取り付けケージが動くのを防止し、さらにそのブロックを鉄棒で川底に固定した。ケージは水面から少なくとも1 m以上の深さに沈むようにし、曝露期間中定期的に観察を行った。

6. 2. 1. 2 供試魚及びモニタリング地点 (2)

性成熟した2年魚の雄及び雌キンギョを実験に供した。1999年11月の期間中に、雌雄キンギョをそれぞれ7個体ずつ収容した合計2つのステンレスケージ (縦35 cm×横40 cm×高さ25 cm) を熊本県熊本市内の河川10地点を調査水域として28日間曝露した (Fig. 2)。対照地点として河川最上流を選定した。対照地点は、下水処理場からの放流水などによる汚染がなく、その他の地点は、環境測定地点として水質等の調査が行われていることから調査対象区に選定した。

6. 2. 2 試料採取

血液は魚の尾部動静脈より 25 G の注射針を用いて採取した。血液は直ちに 0.1 容量の aprotinin (10,000 KIU/ml)、0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride 及び heparin (14.0 U/ml) を含む生理食塩水溶液と混合した。混合液は 4°C で 20 分間 (1,800 ×g) 遠心して血漿に分離した。血漿は、1.5 ml 容チューブに分注し、速やかに凍結し使用するまで -30°C で保存した。全ての操作は 4°C で行った。血液採取後、標準体長及び標準体重を測定した。生殖腺及び肝臓は摘出後、重量を測定し、肝臓は 4 倍量の 0.25 M スクロース中でホモジナイズし、ミクロソーム及びサイトゾール画分は Arizono ら¹⁶⁾、Ariyoshi ら¹⁷⁾の方法に従って調製し、薬物代謝酵素活性及びメタロチオネイン量の測定まで -80°C で保存した。ミクロソームタンパク含量は Lowry らの方法¹⁸⁾に従って牛血清アルブミンを標準物質として測定した。生殖腺体指数及び肝臓体指数はそれぞれ GSI (生殖腺重量 × 100/体重、%) 及び HSI (肝臓重量 × 100/体重、%) として算出した。

6. 2. 3 試薬

E2、レゾルフィン、エトキシレゾルフィン、メトキシレゾルフィン、ペントキシレゾルフィン及びベンジルオキシレゾルフィンはシグマ (東京) から購入した。NADPH はオリエンタル酵母 (東京) から購入した。他の全ての試薬は市販の特級を用いた。

6. 2. 4 標準物質

レゾルフィンのストック溶液 (20 µM) は、メタノール 500 ml にレゾルフィ

ン 2.35 mg を溶解して作製した。メタノールで 20 μ M のストック溶液を希釈して標準直線用に 1 μ M の溶液を作製した。この溶液は 4°C の遮光下で少なくとも 1 ヶ月は使用できた。標準直線は、25 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.7) でストック溶液を希釈することによって測定毎に作製した。

6. 2. 5 装置及び HPLC 測定条件

CYP 1A の活性測定は、エトキシレゾルフィン (EROD) 及びメトキシレゾルフィン (MROD) の脱アルカリ化によるレゾルフィン生成を蛍光検出器が接続された高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量することによって行った^{19,20)}。CYP 2B 活性も同様に、ペントキシレゾルフィン O-脱アルキル化 (PROD) 及びベンジルオキシレゾルフィン O-脱アルキル化 (BROD) 活性として上記の方法によって測定した。62.5 mM リン酸バッファー、6.25 mM MgCl₂、0.625 mM NADP⁺、G-6-P DHase 及び 2.5 μ M の各種基質を含む反応液 320 μ l にミクロソーム懸濁液 40 μ l、5 nM G-6-P 40 μ l を添加して 22°C の水浴中で反応を 20 分間行った。反応後、90°C で反応を停止した。反応停止液に 400 μ l の精製水を入れて 0.45 μ M ポアサイズの PTFT フィルター (ミリポア、ベッドフォード、アメリカ) を通したものを測定用試料とした。測定には蛍光検出器が接続された HPLC を使い、Waters SYMMETRY C 18 カラムに 0.001 M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) /メタノールを 60/40 (1 ml/min) で流し蛍光検出器 (Ex 550 nm, Em 585 nm) によって得られるレゾルフィンのピークを定量した。検量線作製には各濃度に希釈したレゾルフィンを用いた。

HPLC は、PU-980 インテリジェントポンプ、冷却器付き 851-AS インテリジ

メントオートインジェクター、RF-535 蛍光検出器（島津、東京）、CTO-6A カラムオープン（島津）、ERC-3522（エルマ、東京）、及びクロマトパックインテグレーター（東洋ソーダ、東京）がそれぞれ接続された日本分光 802-SC システムコントローラー（東京）を用いた。

6. 2. 6 血中ビテロゲニン測定

血中ビテロゲニン濃度の測定は、第2章の方法に従ってキンギョビテロゲニンに交差反応性を示す抗コイリポビテリンモノクローナルマウス抗体（トランスジェニック、熊本）を用いた酵素免疫測定法（ELISA）で行った²¹⁾。本測定系では96穴マイクロプレートを用いた。キンギョビテロゲニンは100 µg/lのE2に28日間曝露した雄キンギョ血漿から、陰イオン交換カラムを用いた液体高速クロマトグラフィー（HPLC）により精製した²²⁾。精製したビテロゲニンのタンパク量は牛血清アルブミンを標準物質としてBradford²³⁾の方法により測定した。標準曲線は、標準物質として1穴あたり0.78 ngから50 ngの精製キンギョビテロゲニンを用い、希釈した測定試料のビテロゲニンは二重測定で行った。測定試料の血漿中ビテロゲニン濃度は、精製ビテロゲニン標準物質の検量線から算出した。本測定系における血中ビテロゲニンの検出限界は39 ng/mlであった。

6. 2. 7 肝中メタロチオネイン量測定

肝臓中メタロチオネイン量は、カドミウム-ヘモグロビン法によって測定した²⁴⁾。サイトゾール画分上清100 µlにCdCl₂溶液100 µlを加えた。攪拌後、10分間室温で保持し、2.0% bovine hemoglobinを50 µl加え、再度攪拌した。攪拌

試料は、1 分間沸騰水浴中でヘモグロビンを変性させた後、すぐに氷上におき、室温で 3 分間 10,000×g 遠心分離した。遠心分離後、上清を新しいチューブにデカントした。これらの操作を 3～4 回繰り返し、プールした全ての上清中の Cd 量を原子吸光 (SAS 7500, Seiko Instruments Inc., Japan) で測定し、肝臓 1 g あたりのメタロチオネイン量として算出した。

6. 2. 8 統計解析

全ての統計処理は、Stat View 5.0 for Macintosh を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。標準体長、標準体重、GSI、HSI、血中ビテロゲニン濃度、肝ミクロソーム中薬物代謝酵素活性 (EROD, MROD, BROD 及び PROD 活性) 及び肝臓中メタロチオネイン量は、等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は一元配置分散分析 (one way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定 (Scheffe's F post-hoc 検定) により有意差を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjustment をもって Mann Whitney の U 検定を行った。また血中ビテロゲニン濃度において、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半数値を用いた。

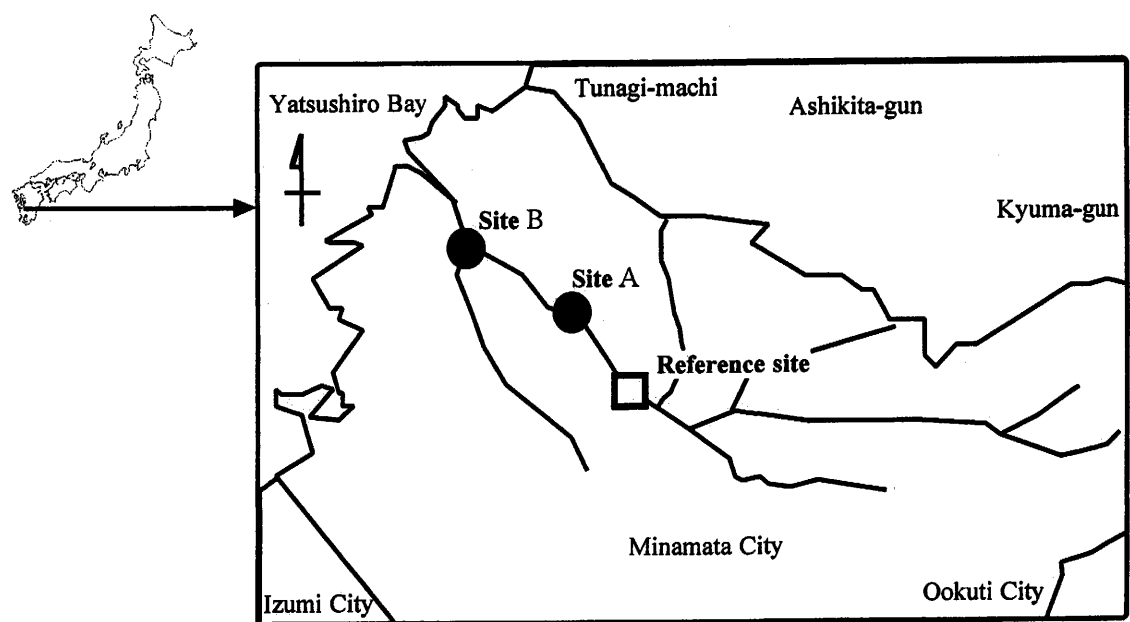


Fig. 1. Research sites for the exposure of caged goldfish to Minamata river water for 35 days. Reference site (located upstream: □), site A (located midstream: ●) and site B (located downstream: ●) were investigated in this study. These sites were located in Minamata city, Kumamoto Prefecture, Japan.

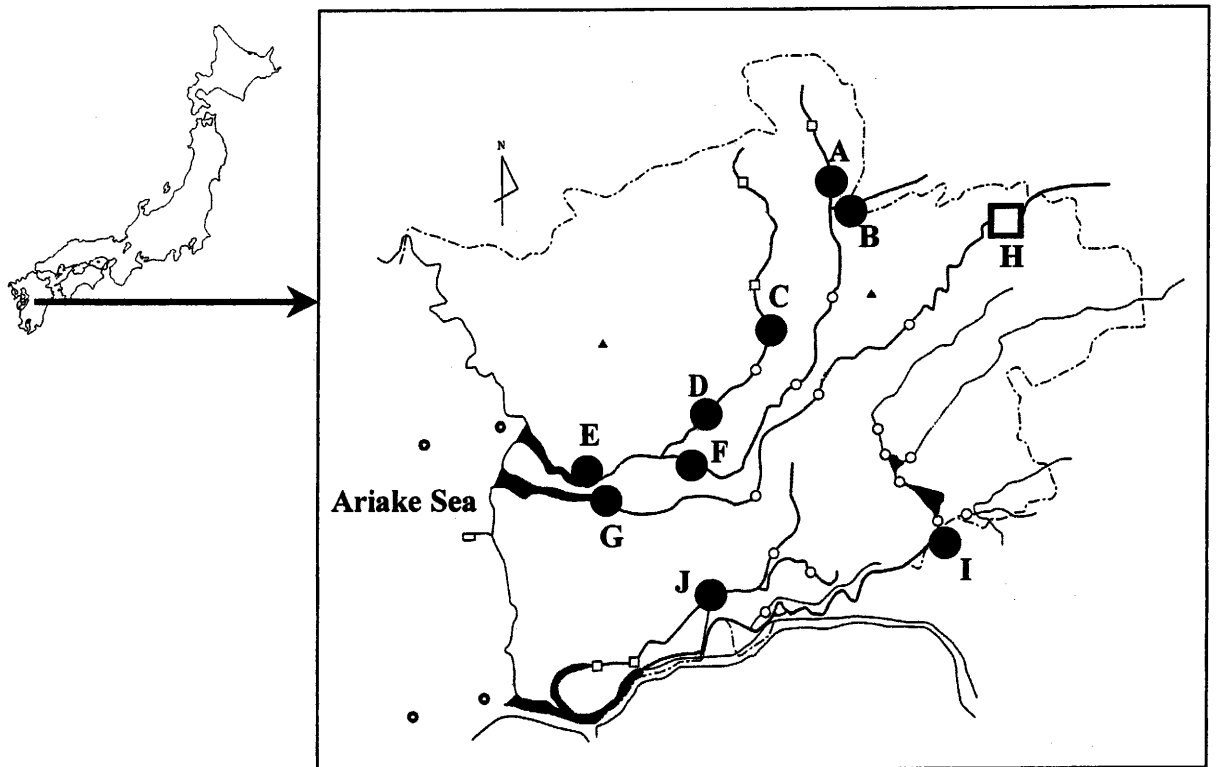


Fig. 2. Research sites for the exposure of caged goldfish to river water for 28 days. Sites A to I (marked ●) were test sites, and site H (marked □) was a reference. These sites were located in Kumamoto city, Kumamoto Prefecture, Japan.

6. 3 結果及び考察

6. 3. 1 一般河川環境中の環境化学物質モニタリング (1)

6. 3. 1. 1 生存率、GSI 及び HSI

魚類において、血中ピテロゲニン及び CYP 1A 依存性酵素活性は、環境汚染物質モニタリングの有用な指標として知られている。本研究では、これら各種バイオマーカーを用い、熊本県水俣市水俣川における淡水環境の内分泌かく乱化学物質を含めた環境化学物質のモニタリングを試みた。

2000 年 11 月から 12 月まで、性成熟した雄及び雌キンギョを対照地点として選定した河川上流と、河川中流 (A 地点) 及び下流 (B 地点) に 35 日間曝露した。曝露後の対照地点、A 地点及び B 地点におけるキンギョの生存率は 97 % 以上であった (Table 1)。今回行ったケージを用いた曝露手法において、試験魚が高い生存率を示したことは、今後、これらが新しい野外調査手法として有用であり、一般河川環境中の評価に適用できる可能性を示唆するものである。また、本手法は、順化された履歴の明確な試験魚を河川や湖沼などにケージすることにより影響評価を行なう野外調査であり、従来から行われている魚類を捕獲して評価を行なう野外調査や室内曝露実験との相補的な役割を担っていると考えられる。

各曝露群の標準体長、標準体重、生殖腺重量及び肝重量において有意差は認められなかった (ANOVA)。35 日間曝露後における雌及び雄キンギョの HSI 及び GSI を Fig. 3 に示す。対照地点、A 地点及び B 地点に 35 日間曝露した雌キンギョの HSI 値は、それぞれ平均 1.45、1.08 及び 1.55 % であり、GSI 値はそれぞれ平均 1.68、2.04 及び 2.07 % であった。一方、対照地点、A 地点及び B 地点

に曝露した雄キンギョの HSI 値は、それぞれ平均 0.75、0.86 及び 0.83 %であり、GSI 値はそれぞれ平均 0.70、0.76 及び 0.69 %であった。対照地点、A 地点、及び B 地点に曝露した雌及び雄キンギョの HSI 及び GSI 値において有意差は認められなかった (ANOVA)。

以上のことから、各調査地点において、雌雄キンギョの標準体長、標準体重、HSI、GSI に有意差は認められず、成長や生殖腺及び肝臓の発達に河川環境要因は影響しないことが示唆された。

Table 1. Characteristics of female and male goldfish exposed to Minamata river water for 35 days.

Sites	Sex	Treatment (Number)	Body length (cm)	Body weight (g)	Gonad weight (g)	Liver weight (g)
Control	Male	Day 0 (10)	10.57±0.16	35.81±2.42	—	—
		Day 35 (9)	10.38±0.20	34.00±2.30	0.697±0.26	0.748±0.23
	Female	Day 0 (4)	10.88±0.27	49.05±3.90	—	—
		Day 35 (4)	10.75±0.25	46.43±3.44	1.684±1.10	1.452±0.31
A	Male	Day 0 (11)	10.05±0.24	33.17±3.40	—	—
		Day 35 (11)	10.16±0.24	32.34±3.24	0.764±0.21	0.860±0.16
	Female	Day 0 (3)	10.63±0.18	41.87±5.70	—	—
		Day 35 (3)	10.83±0.18	41.00±5.31	2.039±0.83	1.077±0.22
B	Male	Day 0 (11)	9.97±0.23	33.50±2.87	—	—
		Day 35 (11)	10.02±0.22	31.77±2.64	0.692±0.70	0.830±0.21
	Female	Day 0 (3)	10.97±0.47	46.87±6.85	—	—
		Day 35 (3)	11.10±0.46	45.83±6.07	2.071±0.33	1.551±0.30

All data represent standard deviation of the mean.

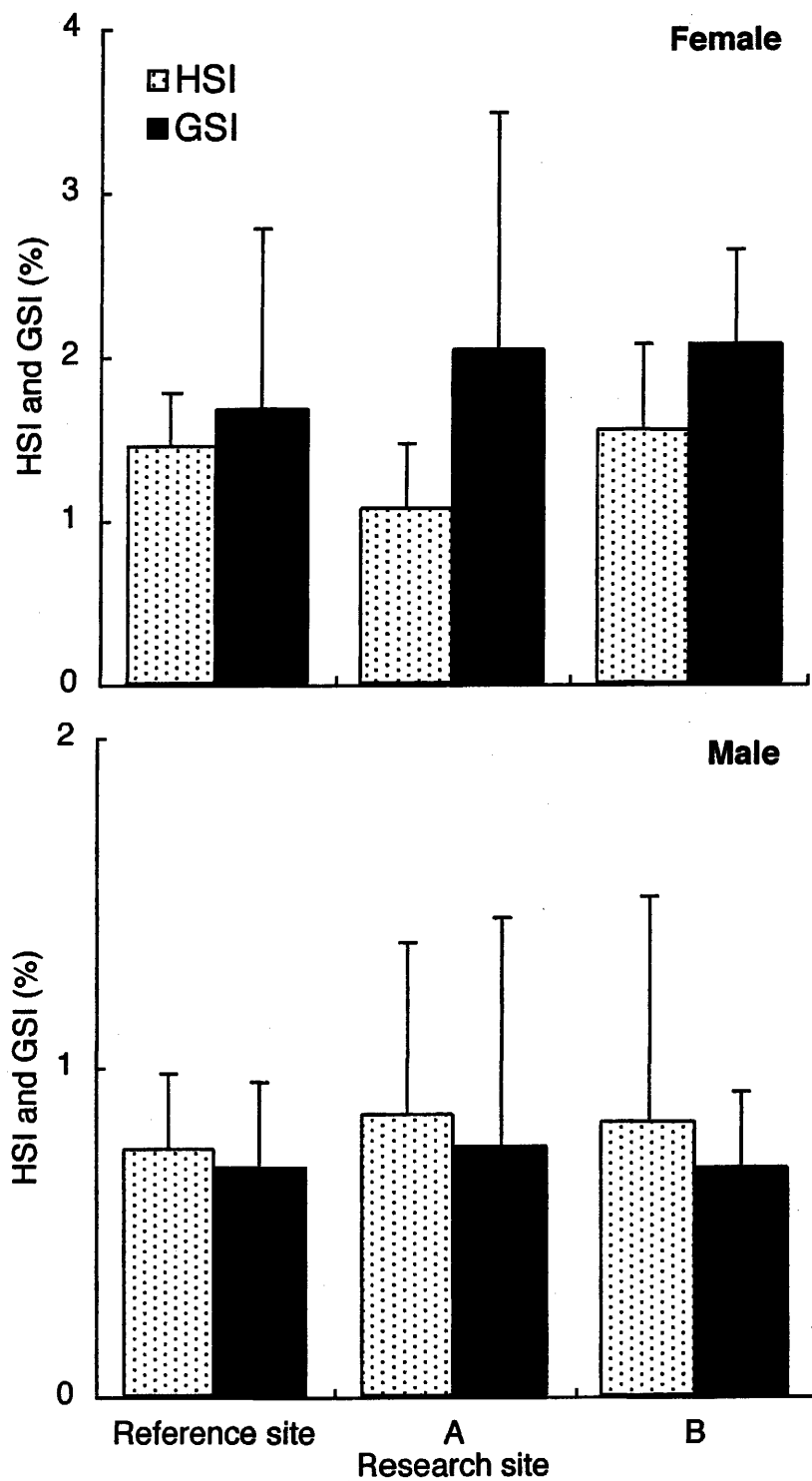


Fig. 3. HSI and GSI in female and male goldfish exposed to Minamata river water for 35 days. Error bars indicate the standard deviation of mean.

6. 3. 1. 2 血中ビテロゲニンと肝ミクロソーム中薬物代謝酵素活性

対照地点、A 地点及び B 地点に 35 日間曝露した雌及び雄キンギョの血中ビテロゲニン濃度は、曝露前と比較して減少した (Fig. 4)。曝露前の対照地点、A 地点及び B 地点における雄キンギョの血中ビテロゲニン濃度は、それぞれ平均 0.42、0.33 及び 0.23 $\mu\text{g/ml}$ 検出され、曝露後はそれぞれ平均 0.12、0.18 及び 0.017 $\mu\text{g/ml}$ 検出された。一方、曝露前の対照地点、A 地点及び B 地点における雌キンギョの血中ビテロゲニン濃度は、それぞれ平均 250.9、112.1 及び 233.5 $\mu\text{g/ml}$ 検出され、曝露後はそれぞれ平均 111.7、43.4 及び 111.9 $\mu\text{g/ml}$ 検出された。各調査地点における雄及び雌キンギョの血中ビテロゲニン濃度に有意差は認められず、(ANOVA) 曝露後の顕著な誘導も確認されなかった。これらのことより、水俣川水域の淡水環境において、キンギョエストロゲン受容体に対してアゴニスト作用を示すエストロゲン様物質は存在しないことが示唆された。

Panter ら²⁸⁾はファットヘッドミノール *Pimephales promelas* に抗エストロゲン様物質 ZM 189, 154 を曝露し、ビテロゲニン産生が抑制されたと報告している。*In vivo* 試験系においてビテロゲニン産生の誘導は、エストロゲン受容体に対してアゴニスト作用を示す物質曝露の指標として有用であるが、アンタゴニスト作用を示す物質の評価も、E2 共存によるビテロゲニン産生抑制等により推測できるかもしれない。今回、全曝露地点において雌雄ともに血中ビテロゲニンの顕著な増加は認められなかったものの、B 地点において雄キンギョの血中ビテロゲニンは他の調査地点と比較して若干高い抑制を示した。これらがエストロゲン様物質と抗エストロゲン様物質の存在によるものかどうかは今回の結果のみからは不明である。今後、水俣川水域のキンギョエストロゲン受容体に対する

エストロゲン・アゴニスト及びアンタゴニスト作用を示す化学物質のさらなる検索が必要である。

全ての調査地点において、河川曝露前の雄キンギョ血中にビテロゲニンが検出された。ビテロゲニンは雌特異タンパク質の一つとして考えられているが、エストロゲン様物質曝露なしでもいくつかの種の雄魚において低濃度で検出される^{29,30)}。河川曝露前における血中ビテロゲニンの産生は、養殖場の飼育水や他の養殖環境要因など、何らかのエストロゲン様物質が存在したことを示唆している。今回、養殖場飼育水中にエストロゲン様物質が存在した可能性については不明だが、市販の魚類用飼料中に含まれているエストロゲン様物質が雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生した可能性を憂慮する必要がある。本論文の第3, 5章において、市販の魚類用飼料に含まれる植物エストロゲンがエストロゲン様作用を示し、雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生することを明らかにした。今回、全ての調査地点の曝露前における雄キンギョの血中ビテロゲニンは非常に低濃度であったがほとんどの個体で検出された。これらのことから、魚類を用いた内分泌かく乱化学物質の評価において、魚類用飼料の標準化が必要であり、さらに植物エストロゲンや他のエストロゲン様物質を含む市販飼料で飼育した場合の、雄及び雌魚における通常の生理状態のビテロゲニン産生レベルを把握し試験に供する必要がある。

CYP 1A の誘導は AhR に対する生体異物の結合の最も高感度な指標として知られている。今回、環境汚染物質曝露の指標として、ケージングした雌雄キンギョの肝ミクロソーム中 CYP 1A 及び 2B 依存性薬物代謝酵素活性を測定した (Fig. 5)。水俣川水域の最上流に位置する対照地点のキンギョ肝ミクロソーム

中 EROD 及び PROD 活性は、それぞれ平均 1.73 及び 3.36 pmol/mg/min で、A 地点及び B 地点と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$, Scheffe's F post-hoc 検定)。一方、対照地点、A 地点及び B 地点における MROD 及び BROD 活性の有意差は認められなかった (ANOVA)。マウスなど哺乳類では、多くの多環式芳香族炭化水素 (PAHs) とそれら混合物は、AhR に結合性を示し、AhR 依存的な *Cyp1a1* 及び *Cyp1a2* を発現誘導し、AhR に依存した抗エストロゲン活性を示すことが知られている³¹⁾。Stagg ら³²⁾は、CYP 1A mRNA、CYP 1A タンパク及び EROD 活性を評価し、大西洋サケ *Salmo salar* の肝 CYP 1A 誘導は PAHs の構造選択性に依存していると報告している。それらの誘導は 4 つの環を持つクリセンで観察されたが、ピレンでは観察されず、また 5 つの環を持つベンゾ[a]ピレン及び 3-MC で観察されたが、ベンゼン及びフェナンスレンでは影響されなかったとしている。今回、対照地点におけるキンギョ肝ミクロソーム中の MROD 及び BROD 活性は、A 及び B 地点のそれらと比較して有意な増加は認められなかった。しかしながら、対照地点において、特異的な EROD 活性の増加が認められたことから、AhR に対してアゴニスト作用を示す何らかの物質が本水域中に存在した可能性が示唆された。

対照地点における PROD 活性もまた A 及び B 地点と比較して有意に高い値を示した。哺乳類において、フェノバルビタール (PB) は CYP 2B ファミリーの *in vivo* における誘導剤として知られているが、硬骨魚類において、PB による CYP 2B の誘導はこれまで報告されていない。Sadar ら³³⁾は、初代培養ニジマス肝細胞への PB 曝露によって、CYP 2K1 タンパク及び PROD 活性は誘導されず、PB 曝露によって CYP 1A mRNA、CYP1A タンパク及び EROD 活性の増

加を観察し、特に CYP 1A1 遺伝子の発現が顕著であったと報告している。今回、対照地点において、低い活性であるものの PROD 活性の誘導が認められたが、これらの原因については不明である。また、硬骨魚類と哺乳類における CYP 2B 誘導の生物学的種間も不明であり、今回の対照地点における特異的な誘導は、CYP 2B ファミリーアイソザイムによって代謝されたというよりむしろ、ペントキシレゾルフィンが CYP 1A1 の基質となり活性が生じた可能性も考えられる。今後、河川中の機器分析による化学物質測定を行うとともに、室内実験において、PB あるいは PAHs などの様々な化学物質曝露による CYPs 誘導あるいは抑制について調べる必要がある。

Fielden ら³⁴⁾は、コールタール・クレオソートは *in vitro* で AhR に対して濃度依存的な活性を示すが、そのダイオキシン様作用は *in vivo* ではエストロゲン様作用を抑制するかもしれないと報告している。今回、調査を行った 3 地点において、雄キンギョの血中ビテロゲニン産生の増加は認められなかったが、対照地点の肝ミクロソーム中 EROD 及び PROD 活性は、A 及び B 地点と比較して有意に高かった。これらの結果は、河川中に含まれる何らかの化学物質が、キンギョの血中ビテロゲニン合成を抑制した可能性を示唆しているかもしれないが、河川中に存在する血中ビテロゲニン、肝ミクロソーム中 CYP 1A 及び CYP 2B 活性を誘導及び抑制する可能性のある化学物質を機器分析によって検索し、それらの結果と併せて慎重に評価を行う必要がある。

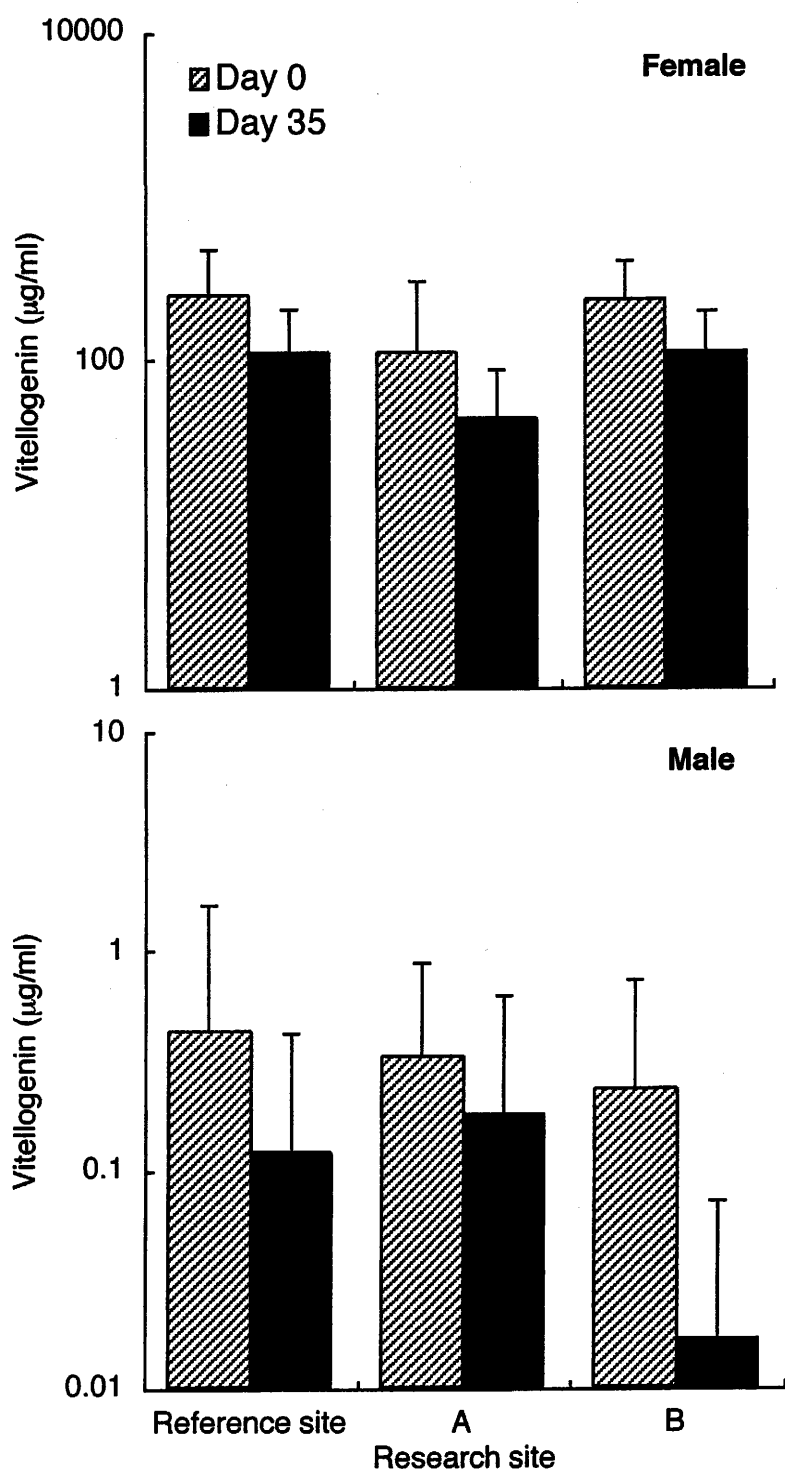


Fig. 4. Means of plasma vitellogenin concentration in female and male goldfish exposed to Minamata river water for 35 days. Error bars indicate the standard deviation of mean.

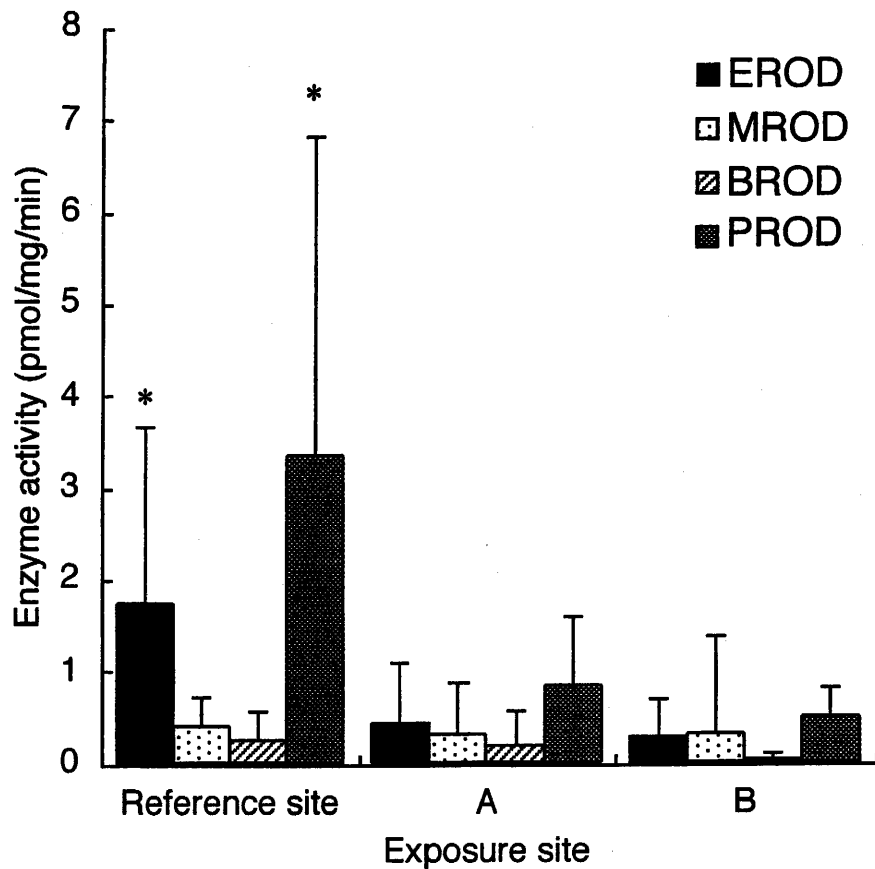


Fig. 5. Means of EROD, MROD, BROD, and PROD activity in goldfish exposed to Minamata river water for 35 days. *Significant difference from sites A and B by Scheffe's F Post-hoc test ($p < 0.05$). Error bars indicate the standard deviation of mean.

6. 3. 2 一般河川環境中の環境化学物質モニタリング (2)

6. 3. 2. 1 生存率、GSI 及び HSI

魚類において、血中ビテロゲニン及び CYP 1A 依存性酵素活性は、環境汚染物質モニタリングの有用な指標として知られている。本研究では、これら各種バイオマーカーに加え、肝臓中メタロチオネイン合成も指標とし、熊本県熊本市内の河川 10 地点における内分泌かく乱化学物質を含めた環境化学物質のモニタリングを試みた。

1999 年の 11 月に 14 個体の雌及び雄キンギョを、熊本市内の河川 10 地点に 28 日間曝露した。キンギョの生存率は、A, B, C, D, F, H, I 及び J 地点において平均 80 % 以上であった (Table 2)。河川下流の E 及び G 地点においては、全ての個体の死亡が確認された。E 及び G 地点は河口付近に位置していたことから、これら調査地点への海水の流入による塩濃度の影響が考えられた。

平均 GSI 及び HSI 値を Fig. 6 に示す。B 地点における雄キンギョの GSI 値は、平均 3.1 % であり、H 地点の 1.6 % と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。B 及び C 地点における雄キンギョの HSI 値は、それぞれ平均 3.4 % 及び 3.8 % で、H 地点の HSI 値 (1.9 %) と比較して有意に増加した ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)。B 地点における雌キンギョの GSI 値は平均 4.0 % で、H 地点の 1.5 % と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。A, B, C 及び J 地点における雌キンギョの HSI 値は、それぞれ 2.8, 3.2, 3.0 及び 2.5 % で H 地点 (0.98 %) と比較して有意に増加した ($p < 0.01$ あるいは $p < 0.001$)。他の調査地点における GSI 及び HSI 値は、H 地点と比較して有意差は認められなかった。

Table 2. Characteristics of female and male goldfish exposed to river water for 28 days.

Sites	Number (F/M)	Body length (mm)	Body weight (g)	Gonad weight (g)	Liver weight (g)
A	3/10	62±14	9.3±4.4	0.367±0.19	0.264±0.13
		60±9	8.6±2.8	0.182±0.14	0.234±0.08
B	7/6	60±8	10.2±3.2	0.377±0.17	0.309±0.05
		62±7	11.2±3.8	0.329±0.08	0.381±0.13
C	5/7	58±10	8.1±3.2	0.241±0.10	0.223±0.04
		53±9	7.0±3.1	0.191±0.07	0.249±0.14
D	5/7	62±6	7.9±1.4	0.188±0.07	0.128±0.04
		64±7	9.5±2.0	0.093±0.06	0.180±0.07
E*	0/0	—	—	—	—
		—	—	—	—
F	5/7	68±6	11.4±2.4	0.520±0.46	0.174±0.04
		61±10	8.8±3.0	0.091±0.04	0.126±0.06
G*	0/0	—	—	—	—
		—	—	—	—
H	3/5	71±3	11.3±1.5	0.174±0.04	0.110±0.01
		63±11	8.2±3.3	0.100±0.12	0.145±0.07
I	3/7	71±3	13.1±1.4	0.288±0.09	0.208±0.05
		70±2	11.0±0.9	0.054±0.04	0.109±0.06
J	5/5	59±8	8.5±2.7	0.275±0.06	0.189±0.05
		68±7	10.6±2.3	0.096±0.06	0.186±0.02

Sites E and G were near an estuary; all individuals died during exposure.

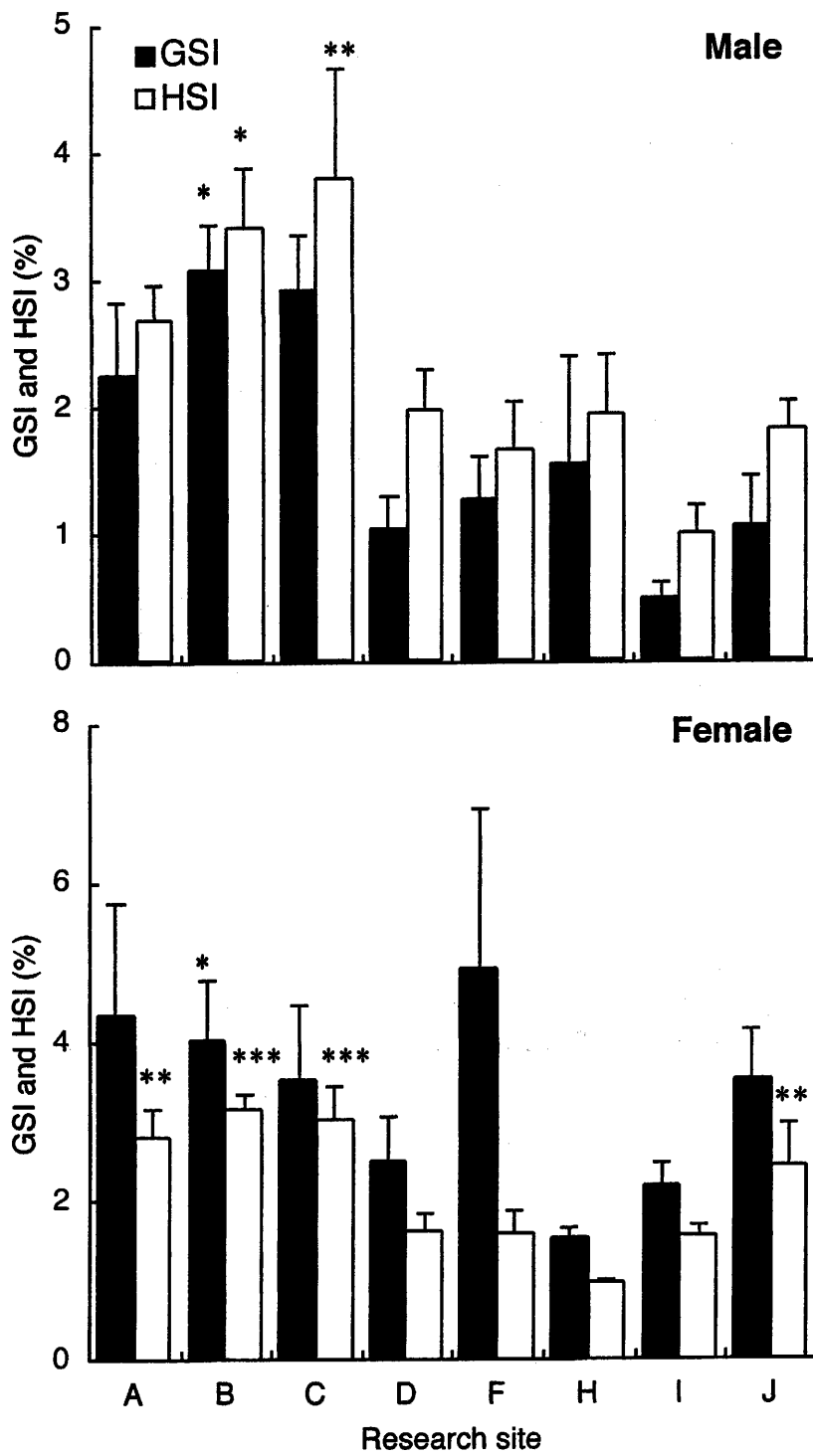


Fig. 6. Means of GSI (black bar) and HSI (white bar) in male and female goldfish exposed to river water for 28 days. Error bar indicates the standard error of mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ are results compared with the value of reference site H.

6. 3. 2. 2 血中ビテロゲニン、肝ミクロソーム中薬物代謝酵素活性及び メタロチオネイン

各調査地点曝露後における雄及び雌キンギョの血中ビテロゲニン濃度を Fig. 7に示す。A, B, C, D, H 及び I 地点における雄キンギョの血中ビテロゲニン産生は認められず、全ての個体において検出限界以下であった。しかしながら、河川最下流の F 及び J 地点における雄キンギョの血中ビテロゲニンは、それぞれ平均 0.061 及び 0.044 $\mu\text{g/ml}$ 検出された。一方、雌キンギョの血中ビテロゲニン産生は全ての調査地点において認められ、B 地点の平均 744 $\mu\text{g/ml}$ が最も高く、次いで J 地点の平均 410 $\mu\text{g/ml}$ 、F 地点の平均 52 $\mu\text{g/ml}$ の順であった。B 地点における雌キンギョの血中ビテロゲニン濃度は、H 地点の平均 1.6 $\mu\text{g/ml}$ と比較して有意差は認められなかったものの 500 倍程度高い値を示した。河川下流の F 及び J 地点に曝露した雄キンギョにおいて、低濃度ではあるものの血中にビテロゲニンが検出され、また、雌キンギョの血中ビテロゲニンも H 地点と比較して高い値を示したことから、本調査地点におけるエストロゲン様物質の存在が示唆された。日本の環境省³⁵⁾は、1998 年の河川調査において 12 ng/l の E2 を F 地点で検出している。しかしながら、この調査は E2 の測定を ELISA で行っているため、E2 標準曲線の対数プロットによる誤差、E2 特異抗体の他の物質に対する交差反応性等、測定技術に問題があるとの指摘がある。このことから、今回調査を行った F 地点中にどの程度の E2 が含まれていたかは不明である。また、今回、J 地点において雄キンギョの血中ビテロゲニンが産生された原因

も確認できなかったことより、今後、さらなる調査や機器分析等によるエストロゲン様物質の検索が必要である。一方、雌キンギョの中で最も高いビテロゲニン濃度を示した B 地点は下水処理場の直下に位置していた。Sumpter ら³⁶⁾は、下水処理場からの処理水が放流されている河川にニジマス *Oncorhynchus mykiss* を曝露し、血中ビテロゲニンが mg/ml のレベルで出現した報告している。また、B 地点に曝露した雌雄キンギョの GSI 及び HSI は、H 地点と比較して有意な増加が認められた。これらのことから、B 地点におけるエストロゲン様物質の存在が示唆されたが、雄キンギョにおいて顕著な血中ビテロゲニン産生は認められなかったことより、さらなる調査を行う必要がある。

魚類において CYP 1A 依存性 EROD 活性の誘導は、AhR に結合しうる生体異物の評価に重要であることが知られている。今回、環境汚染物質曝露の指標として、ケージングした雌雄キンギョの肝ミクロソーム中 CYP 1A 依存性薬物代謝酵素活性を測定した。各調査地点曝露後におけるキンギョ肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を Fig. 8 に示す。H 地点の EROD 活性は平均 2.0 pmol/mg/min であった。雌キンギョの血中ビテロゲニンが最も高かった B 地点と雄キンギョの血中ビテロゲニンが検出された F 地点の EROD 活性は、それぞれ平均 5.4 及び 7.5 pmol/mg/min であった。F 地点の EROD 活性は、H 地点と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。B 及び F 地点の MROD 活性もまた、それぞれ平均 3.2 及び 3.4 pmol/mg/min で、H 地点と比較して有意に増加した ($p < 0.05$ 及び $p < 0.01$)。前述したとおり、B 地点の上流には下水処理場が存在しており、

F 地点は比較的河川下流に位置し生活排水等の流入も考えられることより、本調査地点における AhR に対するアゴニスト作用物質の存在が示唆された。

Kharat と Saatcioglu は³⁷⁾、E2 はマウス Hepa 1c1c7 hepatoma 細胞において Ah の反応性を抑制すると報告している。また、Arukwe ら³⁸⁾は、4-ノニルフェノール 1, 5, 25 及び 125 mg/kg を腹腔内投与した太平洋サケ *Salmo salar* の肝顆粒体の反応について検討し、顆粒体中の 6 β -水酸化酵素活性は 1 mg/kg 投与群で増加し、25 mg/kg 以上の投与群で減少するとしている。また、16 α -及び 17 β -水酸化酵素活性と EROD 活性は 125 mg/kg 投与群で減少し、さらに CYP 1A タンパク量は 1 mg/kg 以上の投与群で用量依存的に減少し、CYP 2K 様タンパク量及び CYP 3A 様タンパク量は 125 mg/kg 投与群で減少したと報告している。Arukwe らは、4-ノニルフェノールは低濃度においてステロイド代謝酵素を増加させ、高濃度では低下させることを示唆した。今回、B 及び F 地点において雌あるいは雄キンギョの血中ビテログニン産生は高く、肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性も高かったことから、キンギョ肝ミクロソーム中 CYP 1A 依存性酵素活性の誘導を抑制する可能性のある E2 や 4-ノニルフェノールなどの物質が本調査地点に存在した可能性は低く、他のエストロゲン様物質が存在した可能性が高いことが示唆された。

メタロチオネインはカドミウムや水銀など有害重金属によって誘導されることから、魚類において重金属曝露の有用なバイオマーカーとなることが知られている。各調査地点曝露後における肝臓中メタロチオネイン量を Fig. 9 に示す。

肝臓中メタロチオネインは全ての調査地点において検出された。H 地点におけるキンギョの肝臓中メタロチオネイン量は、平均 580 $\mu\text{g/g}$ liver tissue であった。肝 EROD 及び MROD 活性が高く検出された B 地点におけるキンギョの肝臓中メタロチオネイン量は最も低く、平均 201.71 $\mu\text{g/g}$ liver tissue で H 地点と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。A, C 及び J 地点におけるキンギョの肝臓中メタロチオネイン量は、それぞれ 310, 290 及び 350 $\mu\text{g/g}$ liver tissue で H 地点と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。以上のことから、今回調査を行った地点における重金属汚染はほとんどないことが示唆された。Marcela ら³⁹⁾は、肝メタロチオネインレベルは、エストロゲンによって抑制されると報告している。B 地点の雌キンギョ及び J 地点の雄キンギョにおける血中ビテロゲニン濃度は H 地点と比較して増加傾向を示し、肝臓中メタロチオネイン量は有意に減少した。また、B 地点における雌雄キンギョの GSI あるいは HSI 値は、H 地点と比較して有意な増加が認められた。これらのことから、B 及び J 地点に肝臓中メタロチオネイン合成を抑制する可能性のあるエストロゲン様物質が存在することが示唆された。

本研究において、キンギョの肝ミクロソーム中 CYP 1A 依存性酵素活性測定法を確立した。これらの手法を用いた CYP 1A 及び 2B 依存性酵素活性と、血中ビテロゲニン産生、及び肝臓中メタロチオネイン合成を指標として、河川環境中の内分泌かく乱化学物質を含めた環境化学物質のモニタリングを試みた。今回調査を行ったいくつかの河川中において、エストロゲン様物質や AhR ア

ゴニスト様物質が存在する可能性が示唆された。しかしながら、検出された雄キンギョの血中ビテロゲニン濃度は非常に低濃度であったことや、1 回のみ調査であったことを考慮し、今後、測定地点をさらに増やし継続的な調査を行う必要がある。また、生殖腺の組織像（精巣卵）の確認、調査地点の水質や底質からのエストロゲン様物質及び AhR アゴニスト様物質の測定を併用し総合的な評価を行う必要がある。これらの手法は、順化された履歴の明確な試験魚を河川や湖沼などにケージすることにより影響評価を行なう野外調査であり、従来から行われている魚類を捕獲して評価を行なう野外調査や室内曝露実験との相補的な役割を担っていると考えられる。また、環境化学物質が淡水環境中に棲息する生物に及ぼす複合影響を早期に評価できる生物学的アラームとして有用であり、今後、様々なフィールド試験に適用できると考えられる。

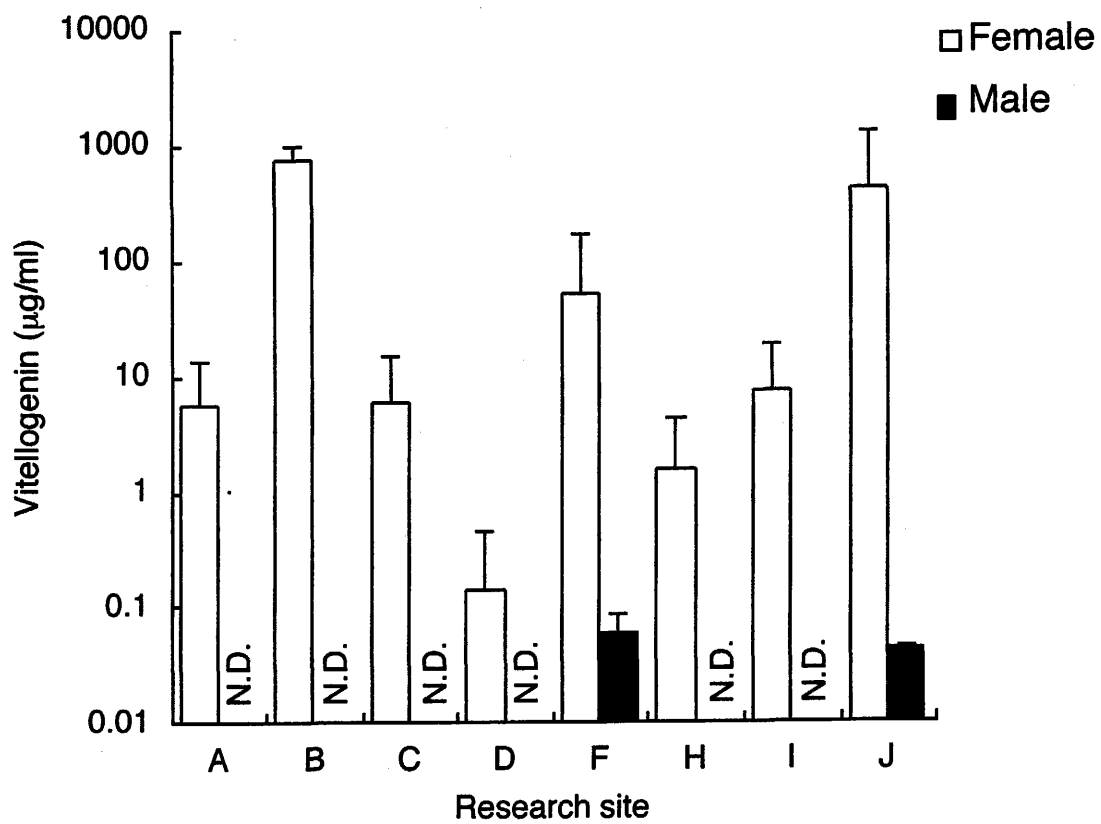


Fig. 7. Means of plasma vitellogenin induction in male and female goldfish exposed to river water for 28 days. Error bar indicates the standard deviation of mean. N.D.; not detected (<39 ng/ml).

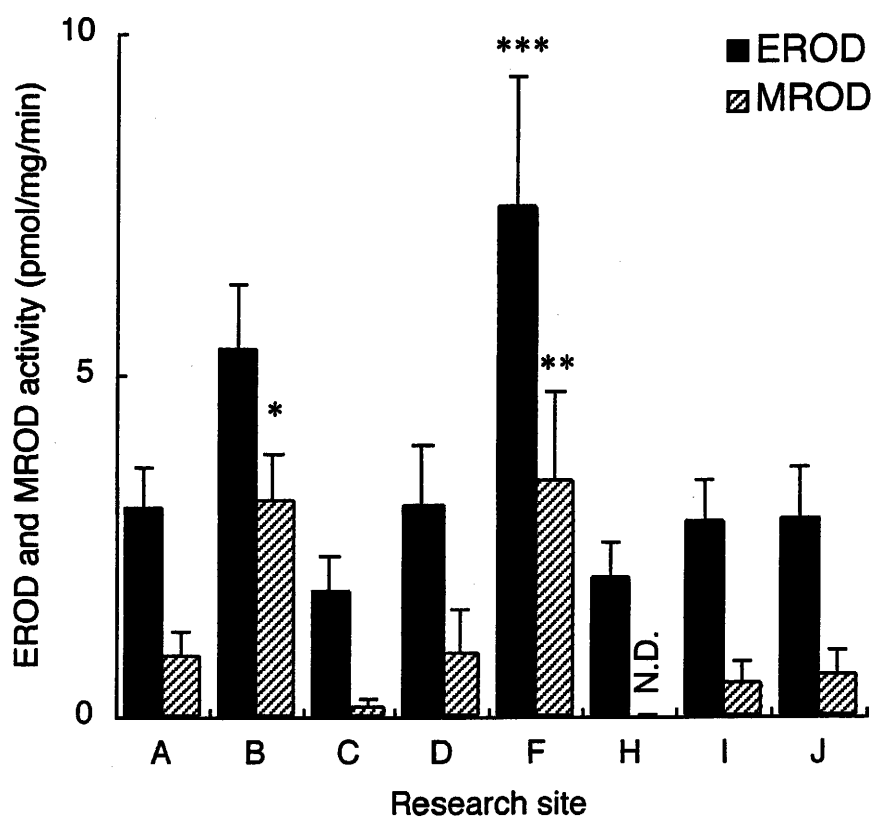


Fig. 8. Means of EROD and MROD activity in goldfish exposed to river water for 28 days. Error bar indicates the standard error of mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ are results compared with the value of site H as reference. N.D.; not detected.

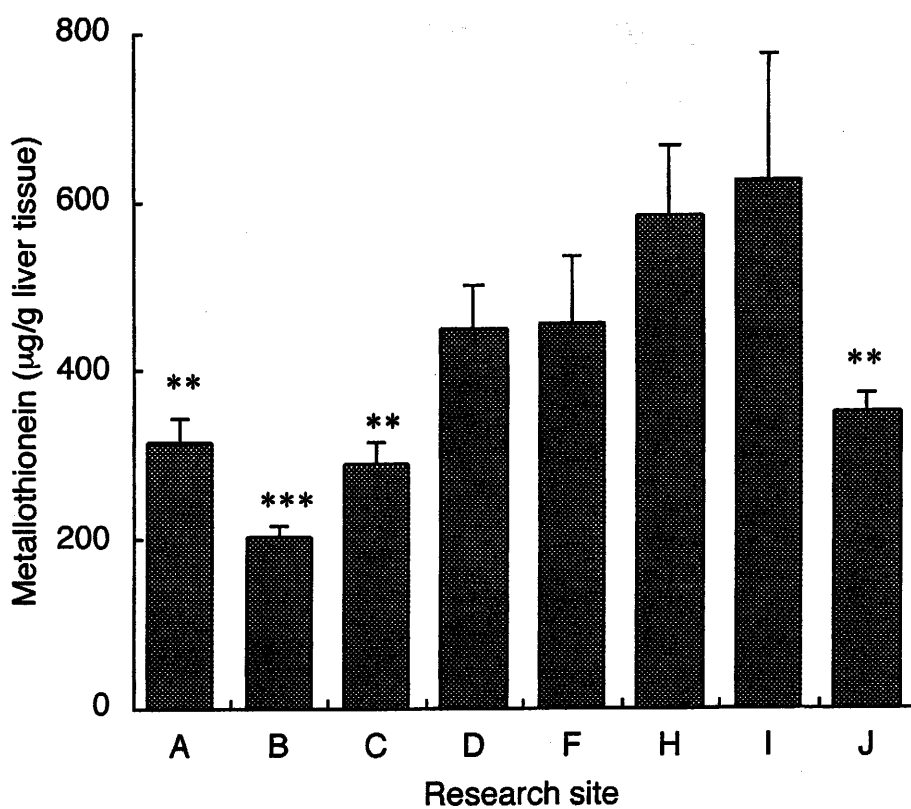


Fig. 9. Means of liver metallothionein induction in goldfish exposed to river water for 28 days. Error bar indicates the standard error of mean. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ are results in compared with the value of site H as reference.

6. 4 参考文献

- 1) A.V. Weisbrod, D. Shea, M.J. Moore, J.J. Stegeman: Species, tissue and gender-related organochlorine bioaccumulation in white-sided dolphins, pilot whales and their common prey in the northwest Atlantic. *Mar. Environ. Res.*, Vol. 51, 29-50 (2001).
- 2) T. Colborn, D. Dumanoshi, J.P. Myers: *Our Stolen Future*. Dutton, NY, USA (1996).
- 3) 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).
- 4) L.J. Guillette Jr, D.A. Crain, A.A. Rooney, D.B. Pickford: Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103, 157-164 (1995).
- 5) L.G. Steven, J.G. Robert, S.G. Timothy, P.D. Nancy, L.B. Wade, R.S. Trenton: Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams: Potential for contaminant-induced endocrine disruption. U.S. geological survey open file report, 96-627 (1997).
- 6) J.E. Harries, D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, J.P. Sumpter, T. Tylor, N. Zaman: Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, 534-542 (1997).

- 7) J.P. Sumpter, S. Jobling: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103, 173-178 (1995).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) J.H.R. Kagi: In *Metallothionein III*. K.T. Suzuki, N. Imura, and M. Kimura. eds., Birkhauser Verlag Basel (1993).
- 12) T. Ariyoshi, S. Shiiba, H. Hasegawa, K. Arizono: Profile of metal-binding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 44, 643-9 (1990).
- 13) D. Schlenk, Y.S. Zhang, J. Nix: Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral and caged fish species correlates with muscle mercury levels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 31, 282-286 (1995).

- 14) A. Kawano, T. Baba, Y. Mizukami, K. Arizono, T. Ariyoshi: Acute effect of organotin compounds to red sea bream and red carp using biological parameters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 56, 774-781 (1996).
- 15) N. Muto, H.W. Ren, G.S. Hwang, S. Tominaga, N. Itoh, K. Tanaka: Induction of two major isoforms of metallothionein in crucian carp (*Carassius cuvieri*) by air-pumping stress, dexamethasone, and metals. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, Vol. 122, 75-82 (1999).
- 16) T. Ariyoshi, E. Takabatake, H. Remmer: Drug metabolism in ethanol induced fatty liver. *Life sci.* Vol. 9, 361-369 (1970).
- 17) K. Arizono, T. Ito, M. Yamaguchi, T. Ariyoshi: Induction of zinc metallothionein in the liver of rats by lead. *Eisei Kagaku* Vo. 28, 94-98 (1982).
- 18) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, 265-275 (1951).
- 19) N. Hanioka, N. Tatarazako, H. Jinno, K. Arizono, M. Ando: Determination of cytochrome P450 1A activities in mammalian liver microsomes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, Vol. 744, 399-406 (2000).
- 20) N. Hanioka, H. Jinno, T. Tanaka-Kagawa, T. Nishimura, M. Ando: *In vitro* metabolism of chlorotriazines: characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450

- inducers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 156, 195-205 (1999).
- 21) H. Ishibashi, K. Tachibana, M. Tsuchimoto, K. Soyano, Y. Ishibashi, M. Nagae, S. Kohra, Y. Takao, N. Tominaga, K. Arizono: *In vivo* testing system for determining estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Health Sci.*, Vol. 47, 213-218 (2001).
- 22) S. Yamanaka, K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi, R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol. 62, 1196-1200 (1998).
- 23) M.M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, Vol. 72, 248-254 (1976).
- 24) D.L. Eaton, B.F. Toal: Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 66, 134-142 (1982).
- 25) T. R. Henry, D. J. Nesbit, W. Heideman, R. E. Peterson: Relative potencies of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and biphenyl congeners to induce cytochrome P4501A mRNA in a zebrafish liver cell line. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 20, 1053-1058 (2001).
- 26) A. Behrens, K. Schirmer, N.C. Bols, H. Segner: Polycyclic aromatic hydrocarbons

- as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 20, 632-643 (2001).
- 27) J.M. Navas, H. Segner: Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor. *Chem. Biol. Interact.*, Vol. 138, 285-298 (2001).
- 28) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, H. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, C.R. Tyler: Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 21, 319-326 (2002).
- 29) P.A. Copeland, P. Thomas: The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol. 91, 17-23 (1988).
- 30) A.E. Goodwin, J.M. Grizzle, J.T. Bradley, B.H. Estridge: Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, Vol. 101, 441-446 (1992).
- 31) K. Chaloupka, M. Steinberg, M. Santostefano, L.V. Rodriguez, L. Goldstein, S. Safe: Induction of *Cyp1a-1* and *Cyp1a-2* gene expression by a reconstituted mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons in B6C3F1 mice. *Chem-Biol. Interact.*, Vol. 96, 207-221 (1995).
- 32) R.M. Stagg, J. Rusin, A.D. McIntosh, C.F. Moffat: Effects of polycyclic aromatic

- hydrocarbons on expression of CYP1A in salmon (*Salmo salar*) following experimental exposure and after the *Braer* oil spill. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 2797-2805 (2000).
- 33) M.D. Sadar, R. Ash, J. Sundqvist, P.E. Olsson, T.B. Andersson: Phenobarbital induction of CYP1A1 gene expression in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, 17635-17643 (1996).
- 34) M.R. Fielden, Zhi-Fen Wu, C.J. Sinal, H.H. Jury, J.R. Bend, G.L. Hammond, T.R. Zacharewski: Estrogen receptor- and aryl hydrocarbon receptor-mediated activities of a coal-tar creosote. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 1262-1271 (2000).
- 35) 環境庁環境保健部環境安全課: 環境ホルモン緊急全国一斉調査 (1998).
- 36) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter: Inhibition of testicular growth in rainbow trout exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 15, 194-202 (1996).
- 37) I. Kharat, F. Saatcioglu: Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, 10533-10537 (1996).
- 38) A. Arukwe, L. Forlin, A. Goksoyr: Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, 2576-2583 (1997).
- 39) G. Marcela, K. Peter, H.B. Axel, O. Per-Erik: Arctic char (*Salvelinus Alpinus*)

metallothionein: cDNA sequence, expression, and tissue-specific inhibition of cadmium-mediated metallothionein induction by 17 β -estradiol, 4-OH-PCB 30, and PCB 104. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 638-645 (2000).