

簡易メダカ・ビテロジェニンアッセイによる 環境水のエストロジェン作用評価の検討

津田泰三・佐貫典子・青木佳代¹⁾・
内藤幹滋・青木茂・原良平

要 約

メダカ・ビテロジェニンアッセイを利用したエストロジェン作用物質のスクリーニング試験法について、簡便化の検討を行うとともに、環境水への適用およびエストロジェン作用評価について検討した。本研究で検討した曝露条件を環境水（琵琶湖水および琵琶湖流入河川水）および合併浄化槽排水に適用した結果、メダカ血中ビテロジェニン濃度は環境水において対照群と比較して統計的に有意な差は認められなかったが、合併浄化槽排水においては上昇傾向がわずかに認められた。また、併行測定した環境水および合併浄化槽排水中の女性ホルモン濃度も本結果と対応するものであった。

1. はじめに

魚類ビテロジェニンはエストロジェン作用物質に対する有用なバイオマーカーとして注目され、OECD (2002) やU. S. EPA (2002) でエストロジェン作用物質のスクリーニング試験法として検討されている。一方、日本においても環境省がプロジェクトSPEED'98によりメダカを用いた試験法の確立を進めている。しかしながら、これらのスクリーニング試験法により環境水のモニタリングを実施することは、大容量の試料水の確保と長期間の流水式曝露実験を行う必要があり、かなりの困難を伴うことになる。

このような状況下、羽田野ら (2003) は半止水式を採用することにより、試験水の少量化および曝露期間の短期化を検討し、簡易メダカ・ビテロジェニンアッセイ手法の確立を行った。

本研究では、羽田野ら (2003) により確立された簡易メダカ・ビテロジェニンアッセイ手法の簡便化をさらに進めるとともに、環境水への適用およびエストロジェン作用評価について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 供試魚

市販のヒメダカを購入し、尻ビレと背ビレの形状により雌雄を分け、雄メダカ30尾前後（体長2.2～2.5cm、体重0.18～0.27g）を10ℓガラス水槽内で脱塩素水道水（3日間エアレーションしたもの）により7日間馴化させた後に試験を実施した。

2.2 実験条件

実験条件は OECD guideline for testing of chemicals No.203 : Fish, acute toxicity test (OECD, 1992) を基準とし、羽田野ら (2003) による簡易メダカビテロジェニンアッセイを参考として設定した。馴化期間中については1日1回給餌したが、試験期間中は給餌しなかった。曝露実験では1ℓのビーカーを用い、試験水1ℓにヒメダカ3尾を投入し、室温21℃、明期16時間で半止水式試験（2日後換水）を4日間実施した。1水槽あたりのメダカの個体数および曝露期間については下記の検討結果により設定した。

1) 県衛生科学センター

曝露実験におけるメダカ個体数の検討

1 水槽 (1 l) あたりのメダカの個体数については統計処理可能な最小数である 3 個体を設定した。代表的なエストロゲン作用物質である 17 β -エストラジオールについて、曝露期間中の試験水濃度の減少を明らかにするために、曝露開始前 1 日後および 2 日後の濃度測定を行った。また、溶存酸素についても曝露開始前および 2 日後に測定し、60%以上になっているかどうかを確認した。

曝露期間の検討

17 β -エストラジオール

- (1) 関東化学(株)製 17 β -エストラジオール標準品をアセトンで溶解して調製した標準原液 100 μ g/ml を蒸留水で希釈し、標準液 0.01 μ g/ml を用時調製した。曝露期間を設定するための実験として、本液を脱塩素水道水 (3 日間エアレーションしたもの) で希釈することにより 17 β -エストラジオール 0.05 μ g/l の試験水を 6 連調製し、それぞれについて 1、2、3、4、6 および 8 日間の曝露実験を行った。
- (2) 17 β -エストラジオールの曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を明らかにするための実験として、17 β -エストラジオールの標準液 0.01 μ g/ml を脱塩素水道水で希釈することにより試験水 0、0.005、0.01、0.02、0.05 および 0.1 μ g/l を調製し、曝露実験を 4 日間行った。

4-ノニルフェノール

関東化学(株)製 4-ノニルフェノール標準品をアセトンで溶解し、標準液 1000 μ g/ml を調製した。4-ノニルフェノールの曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を明らかにするための実験として、4-ノニルフェノールの標準液 1000 μ g/ml を脱塩素水道水で希釈することにより試験水 0、50、100、200 および 500 μ g/l について曝露実験を 4 日間行った。

エストロン

関東化学(株)製 エストロン標準品をアセトンで溶解して調製した標準原液 100 μ g/ml を蒸留水で希釈し、標準液 0.01 μ g/ml を用時調製した。エスト

ロンの曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を明らかにするための実験として、エストロンの標準液 0.01 μ g/ml を脱塩素水道水で希釈することにより試験水 0、0.02、0.05、0.1、0.2 および 0.5 μ g/l を調製し、曝露実験を 4 日間行った。

2.3 環境水のエストロゲン作用評価

2004年 1 月に採取した琵琶湖水 (南湖および北湖各 1 地点)、琵琶湖流入河川水 (2 地点) および浄化槽排水 (1 カ所) による曝露実験を 2.2

実験条件に従い 4 日間行った。なお、2 日後に用いる換水用の試料水 1 l は、森・塩田 (2002) の方法に従い採水後に冷蔵 (5 $^{\circ}$ C) 保存し、曝露実験開始の約 4 時間前に冷蔵から出し、室内温度に戻してから曝露実験を行った。

2.4 ビテロジェニン測定

曝露実験の終了した雄メダカからキャピラリー管を用いて 2 オL の血液を採取し、アマシャムバイオサイエンス(株)製 Enbio Medaka VTG kit を用いて ELISA 法により血中ビテロジェニン (Vtg) 濃度の測定を行った。血液試料の調製および ELISA 操作手順についてはキット添付プロトコル (西ら、2000) に従った。

2.5 女性ホルモン濃度測定

試験水、環境水および合併浄化槽排水中の 17 β -エストラジオール (E2) およびエストロン (E1) + 17 β -エストラジオール (E2) + エストリオール (E3) の濃度測定については「下水試験方法追補暫定版 2002 年版」(日本下水道協会、2002) に記載されている固相抽出 ELISA 法に従った。ELISA キットは武田薬品工業(株)製 17 β -エストラジオール ELISA キットおよびエストロゲン ELISA キットを用いた。

2.6 統計処理

データの統計解析はノンパラメトリック検定における独立 2 群間比較 (Mann-Whitney 検定) に

より行った。

3. 結果と考察

3.1 曝露実験におけるメダカ個体数

17β-エストラジオール0.04 μg/l に設定した試験水1 l にヒメダカ3尾を投入し、曝露前に対する曝露1日後および2日後の17β-エストラジオールの残存率は74%および57%となった。本法の止水式による環境水のエストロゲン作用評価はOECD (2002) やEPA (2002) の流水式と比較して低めの評価となることが推察された。一方、溶存酸素については曝露前100%であったものが2日後に70%となっており、60%以上を保持していた。

3.2 17β-エストラジオール、4-ノニルフェノールおよびエストロンによる曝露実験

17β-エストラジオール0.05 μg/l の試験水に曝露した雄メダカの血中誘導ビテロジェニン濃度の経時変化を図1に示す。血中ビテロジェニン濃度が4日後ではほぼ平衡状態に達することから、曝露期間として羽田野ら (2003) がスクリーニング手法において提案している7日間をさらに短縮した4日間を採用することにした。

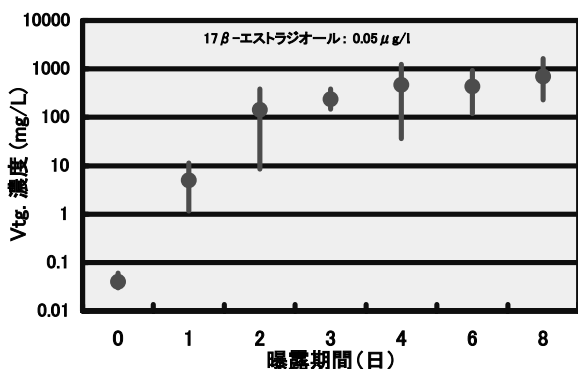


図1 17β-エストラジオール曝露雄メダカにおける血中誘導ビテロジェニン濃度の経時変化

次に、17β-エストラジオールおよび4-ノニルフェノールについて曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係 (曝露期間: 4日間) を明らかにするための実験結果を図2および

図3にそれぞれ示す。17β-エストラジオールおよび4-ノニルフェノールのいずれについても曝露濃度の上昇に伴い雄メダカの血中ビテロジェニン濃度の上昇が認められた。血中ビテロジェニン濃度の対照群に対する上昇についてMann-Whitney検定を行った結果、17β-エストラジオールでは0.005 μg/l (p=0.1266) および0.01~0.1 μg/l (いずれの濃度についてもp=0.0495)、4-ノニルフェノールでは50~200 μg/l (いずれの濃度についてもp=0.0495) となった。曝露濃度の最低値 (17β-エストラジオール0.005 μg/l および4-ノニルフェノール50 μg/l) は雄メダカの血中ビテロジェニン濃度の上昇が認められる最低濃度として報告されている値 (Tabata, 2001; 田畑, 2003) であるが、本実験結果から17β-エストラジオール0.01 μg/l 以上および4-ノニルフェノール50 μg/l 以上で対象群と比較して有意 (p<0.05) に血中ビテロジェニン濃度の上昇が認められた。

さらに、環境水において検出される女性ホルモンの中で17β-エストラジオールより高濃度検出されるエストロン (嶋津ら, 2003; 倉林・二宮, 2004) について、曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を明らかにするために行った実験結果を図4に示す。エストロンについても同様にMann-Whitney検定を行った結果、0.02 μg/l (p=0.0463) および0.05~0.5 μg/l (いずれの濃度についてもp=0.0495) となり、0.02 μg/l 以上のすべてにおいて血中ビテロジ

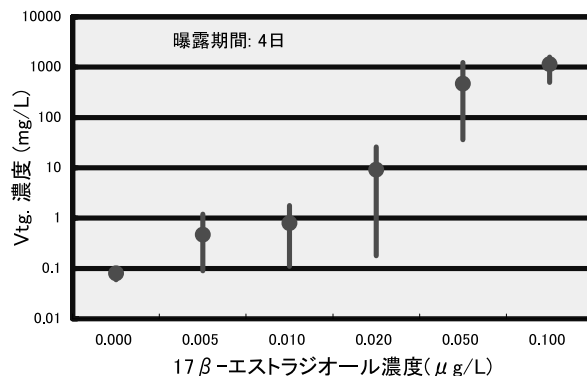


図2 雄メダカ血中ビテロジェニン誘導濃度の17β-エストラジオール曝露濃度による変化

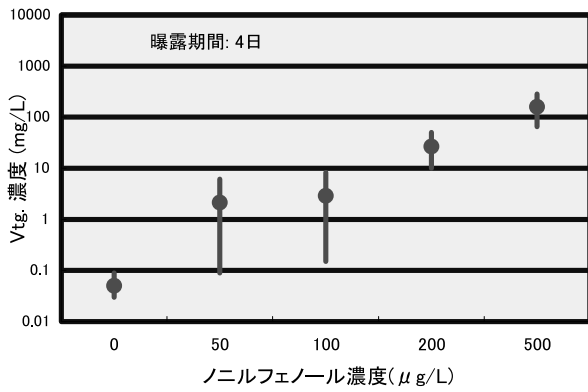


図3 雄メダカ血中誘導ビテロジェニン濃度の4-ノニルフェノール曝露濃度による変化

エニン濃度の上昇が有意 ($p < 0.05$) に認められた。図2と図4の比較により、 17β -エストラジオールおよびエストロンが同濃度の $0.02 \sim 0.1 \mu\text{g/l}$ において両ホルモンにより誘導される血中ビテロジェニン濃度比 (エストロン/ 17β -エストラジオール) が $1/100 \sim 1/1000$ と算出され、エストロンによる血中ビテロジェニン誘導強度は 17β -エストラジオールと比較してかなり低いことが明らかとなった。

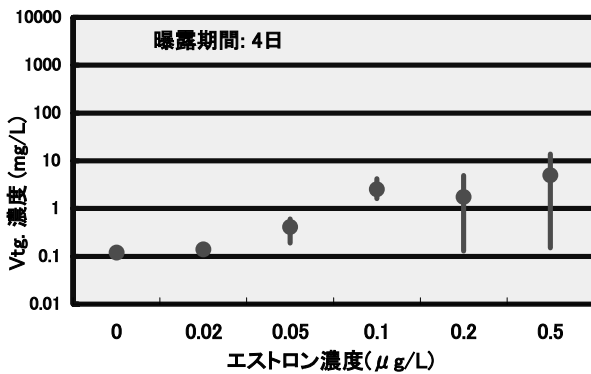


図4 雄メダカ血中誘導ビテロジェニン濃度のエストロン曝露濃度による変化

3.3 環境水および浄化槽排水による曝露実験

本研究で検討した曝露条件を環境水 (琵琶湖水および琵琶湖流入河川水) および合併浄化槽排水に適用した実験結果を図5の上部に示した。ビテロジェニン誘導濃度について Mann-Whitney 検定を行った結果、琵琶湖水 ($p=0.184$ および 0.268)、琵琶湖流入河川水 ($p=0.105$ および 0.376) および合併浄化槽排水 ($p=0.0765$) と

った。いずれの試料水についても対照群に対して統計的に有意な差 ($p < 0.05$) は認められなかったが、合併浄化槽排水においては有意確率が最も低い値 $p=0.0765$ となり、わずかに上昇傾向を示した。環境水においてエストロゲン作用は認められなかったが、合併浄化槽排水においてはエストロゲン作用が示唆された。

本実験では、併行して環境水および浄化槽排水について主要女性ホルモンの 17β -エストラジオール (E2) およびエストロン (E1) + 17β -エストラジオール (E2) + エストリオール (E3) を測定しており、測定結果を図5の下部に示した。合併浄化槽排水における女性ホルモン濃度は環境水と比較して高い傾向を示し、血中ビテロジェニン誘導濃度と対応する結果となった。なお、合併浄化槽排水における血中ビテロジェニンの上昇傾向については、 17β -エストラジオールおよびエストロンの両濃度が本研究での血中ビテロジェニン誘導下限濃度を大きく下回っていることから、他のエストロゲン作用物質を含む複合影響が示唆された。

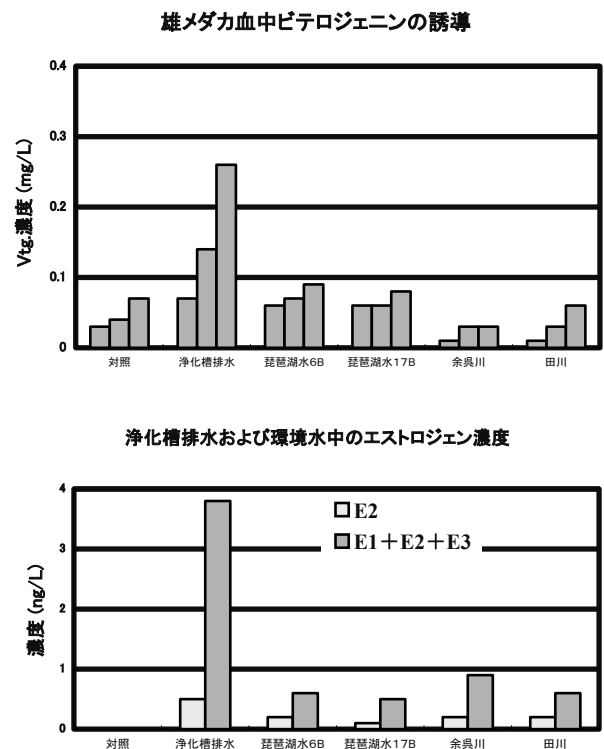


図5 環境水および浄化槽排水曝露による雄メダカ血中ビテロジェニンの誘導

4. まとめ

メダカ・ビテロジェニンアッセイを利用したエストロゲン作用物質のスクリーニング試験法について、簡便化の検討を行うとともに、環境水への適用およびエストロゲン作用評価について検討した。17 β -エストラジオールの曝露実験から雄メダカの血中誘導ビテロジェニン濃度が4日後ではほぼ平衡状態に達することが明らかとなり、曝露期間として4日間を設定した。17 β -エストラジオールおよび4-ノニルフェノールの曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を4日間の曝露実験で調べた結果、17 β -エストラジオール0.01 $\mu\text{g}/\ell$ 以上および4-ノニルフェノール50 $\mu\text{g}/\ell$ 以上で対象群と比較して有意 ($p < 0.05$) に血中ビテロジェニン濃度の上昇が認められた。環境水において検出される女性ホルモンの中17 β -エストラジオールより高濃度検出されるエストロンについても、曝露濃度と雄メダカの血中ビテロジェニン誘導濃度との関係を調べた結果、エストロン0.02 $\mu\text{g}/\ell$ 以上で対象群と比較して有意 ($p < 0.05$) に血中ビテロジェニン濃度の上昇が認められた。本研究で検討した曝露条件を環境水(琵琶湖水および琵琶湖流入河川水)および合併浄化槽排水に適用した結果、メダカ血中ビテロジェニン濃度は環境水において対照群と比較して統計的に有意な差は認められなかったが、合併浄化槽排水においては上昇傾向がわずかに認められた。また、併行測定した環境水および合併浄化槽排水中の女性ホルモン濃度も本結果と対応するものであった。

謝 辞

簡易メダカ・ビテロジェニンアッセイに関する資料をご提供頂いた(株)エンバイオテック・ラボラトリーつくば研究所の羽田野泰彦氏に深く感謝致します。

また、メダカ・ビテロジェニンアッセイを実施するにあたり、旧滋賀県立衛生環境センター微生物担当に測定機器のマイクロプレートリーダーを使用させて頂くとともに、吉田智子主任主査から

ELISA法の技術指導を受けられたことを深く感謝致します。

引用文献

- OECD (2002) : Draft test guideline on fish two-generation: Fish life-cycle test guide line 1-18.
- U.S. EPA (2002) : Draft detailed review paper on fish screening assays for endocrine disruption. EPA contract number 68-W-01-023 Work assignment 2-12.
- 羽田野泰彦, 近江みゆき, 西和人, 鎌迫典久, 水上春樹, 山下倫明, 民谷栄一, 榊原隆三 (2003) : 簡易メダカ・ビテロジェニンアッセイによる外因性エストロゲンの影響評価研究. 水環境学会誌, 26, 779-785.
- OECD (1992) : OECD guideline for testing of chemicals No.203. Fish, acute toxicity test.
- 森真朗, 塩田勉 (2002) : 下水処理水へ曝露したメダカ雄のビテロジェニン誘導, 東京都環境科学研究所年報, 84-89.
- 西和人, 水上春樹, 筒井道雄, 白石寛明, 山下倫明, 榊原隆三, 民谷栄一, (2000) : メダカを利用した環境ホルモン・バイオアッセイの開発. 実験医学, 18, 2701-2705.
- 日本下水道協会 (2002) : 下水道試験法 (追補暫定版) - 内分泌攪乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編 2002年版 -.
- Tabata, A., Kashiwada, S., Ohnishi, Y., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Itoh, M. and Magara, Y. (2001): Estrogenic influences of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations. Wat. Sci. Technol., 43: 109-116.
- 田畑彰久, 亀井翼, 真柄泰基, 渡辺哲理, 宮本信一, 大西悠太, 伊藤光明 (2003) : ヒメダカビテロジェニンを指標としたノニルフェノール、ビスフェノールA、17 β -エストラジオールおよびこれらの混合曝露の影響. 水環境学会誌, 26, 671-676.
- 嶋津暉之, 和波一夫, 関善行, 大原拓也 (2003) : 都内水域の環境ホルモン問題に関する研究 (その2) 河川におけるエストロゲンの消失の機構. 東京都環境科学研究所年報, 63-71.
- 倉林輝世, 二宮勝幸 (2004) : 横浜市内河川における環境ホルモン物質のモニタリング調査-女性ホルモン様作用に関する解析-. 横浜市環境科学研究所年報, 28, 39-45.