

I-22 バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究機関：平13～平17

担当チーム：水質チーム

研究担当者：鈴木 稔、宮島 潔

【要旨】

下水処理水やその放流先河川において、雌性ホルモン（エストロゲン）様物質による魚類の雌性化が起きていると疑われている。本研究では、全国規模の河川および下水処理場における実態調査、処理場内の詳細調査を行った。また、エストロゲン様の作用を誘導している物質の検索を行うとともに、特定された物質による、魚類への曝露試験（*in vivo* バイオアッセイ）を実施した。本研究では、高感度機器による微量分析、遺伝子組換え酵母によるエストロゲン様活性の直接測定（*in vitro* バイオアッセイ）により調査、検討を実施した。得られた情報とバイオアッセイの結果より、河川水や下水処理水の魚類雌性化に対する簡便な評価指標へと確立させることを目指している。

キーワード：

1. はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質による人や生態系への影響が懸念されており、下水道においても多くの内分泌攪乱化学物質について実態調査¹⁾が行われてきた。下水や環境水中ではこれらの実態調査の対象物質に加えて、分解生成物などの非意図生成物の存在についても考慮する必要があり、我々の研究チームではこれらエストロゲン様の作用を示す物質（以後、エストロゲン様物質）の包括的な試験法として遺伝子組み換え酵母法を導入し、多くの下水中にエストロゲン様活性が存在していることを明らかにしてきた²⁾。しかしこれらのエストロゲン様活性の由来についてはいまだ不明な点も多く、下水中のエストロゲン様活性が、これまで測定してきた物質によって表現できているのかという事については、まだ十分な情報は得られていない。

2. 研究の方向性

本研究では、まず、エストロゲン様物質と活性について全国規模の河川および下水処理場調査、下水処理場内での詳細調査を実施し、その実態を明らかにする。また、分画手法を用い下水処理水や河川水中のエストロゲン様活性へ寄与する化学物質を明らかにし、その物質による魚類への影響を、曝露試験により明らかにすることを目的としている。これらの目的のために、高感度な微量分析、遺伝子組換え酵母を用いたバイオアッセイ、魚類の生体反応の指標となるピテロジェニン（VTG）の測定を行った。

3. 分析方法

3.1 遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定

下水試料 1L を GF/B（保持粒径 1 μ m）フィルターによってろ過して得たる液を、Sep-Pak C18 カートリッジ（Waters 社製、充填量：360mg）に上向流で通水（10ml/min）した。このカートリッジを窒素気流下で乾燥させた後、メタノール 10ml で溶出し、抽出液を得た。一方、ろ紙上の残渣はメタノールに浸し超音波抽出（10分）を 2 回行った後、ろ液の濃縮に使用した前述のカートリッジに通水し、ろ液のメタノール抽出液と合わせた。この抽出液をロータリーエバポレーターによって濃縮し、約 1 mL に調整した後、この試料を窒素気流下で乾固し、ジメチルスルホキシド（DMSO）100 μ L に転溶した。そして遺伝子組み換え酵母法の測定前に滅菌蒸留水によって 5 倍に希釈し、最終的な試料濃縮倍率を 2000 倍とした。

遺伝子組み換え酵母は、イギリス Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いた。遺伝子組み換え酵母はエストロゲンやエストロゲン様物質がエストロゲンレセプター（ER）に結合すると β -ガラクトシダーゼが発現するように組み込まれている³⁾。

遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定法については Routledge らの方法を改良した矢古宇らの方法に従った⁴⁾。

3.2 化学分析

エストロゲン様物質の分析項目は、エストロン（E1）、

17β-エストラジオール (E2), ノニルフェノール (NP) を対象とした。またノニルフェノールエトキシレート (NPnEO), ノニルフェノールフェノキシ酢酸 (NPnEC) (以後、ノニルフェノール関連物質) についても測定を行った。

E1 及び E2 については、小森らの方法に従い LC-MS/MS を用いて測定を行った⁵⁾。また、NP、NPnEO については、下水試験法追補暫定版に従い HPLC を用いて測定を行った⁶⁾。NPnEC については八十島らの方法に従い LC-MS/MS を用いて測定を行った⁷⁾。

4. エストロゲン様活性をもたらす要因の解明

4.1 分画手法

4.1.1 順相分画方法

試料は組み換え酵母法の濃縮方法に従って固相抽出を行なった試料を、窒素気流下で乾固した後ヘキサン:ジクロロメタン=1:1 溶液 1000 μL に転溶した。極性分画操作については図-1 に示すようにアセトン 10ml/min、ヘキサン(Hex):ジクロロメタン(DCM)=1:1 溶液 10ml/min でコンディショニングを行なったシリカゲル固相カートリッジ (Sep-pack-silica) に、濃縮試料を保持させた。これをヘキサン、ジクロロメタン、アセトン(Ace)、メタノール(MeOH) の混和液各 10ml によって順次溶出させ、溶出液 9 分画を得た (各 F1~F9)。これらの試料を窒素気流下で乾固した後、MeOH に転溶し酵母法の試料とした。同手法により、NP は F2、E1 と E2 は F4 に溶出が確認された。

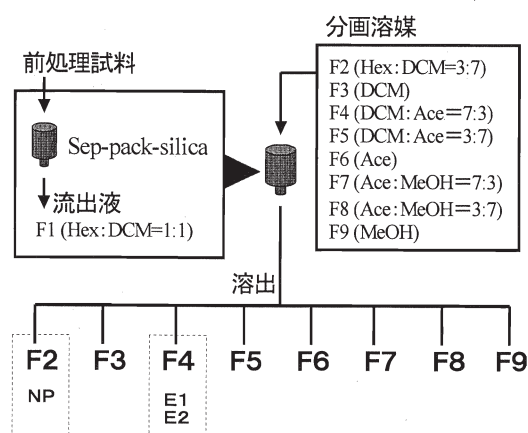


図-1 固相カラムを用いた分画フロー

4.1.2 順相分画によるエストロゲン様活性の性状把握

確立した分画手法を用い、全国 23 箇所の下水処理場から流入下水および放流水を採取し、前述の分画操作に供し、ついで遺伝子組換え酵母によるエストロゲン様活性の測定を行った。その結果、ほぼすべての試料について F4 画分に高い活性が確認された (図-2)。エストロゲン様活性と E1, E2, NP の理論活性値について比較を行なった結果、最も高い活性が確認された F4 画分は、流入下水については E2、処理水については E1 の寄与が大きいことが示唆された。しかし、NP が分画されている F2 画分については、NP の理論活性値ではほとんど説明できなかった。

4.1.3 HPLC を用いた逆相分画方法の検討

前項までに、下水処理水中のエストロゲン様活性に対し、エストロゲンの寄与が高いことが示唆された。そこで、より詳細な寄与の割合を明らかにするため、高分離能を有する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用のカラムを用いた環境試料の分画、次いで遺伝子組換え酵母によるエストロゲン様活性の測定手法について検討を行った。まず、標準物質を用いた HPLC 分画条件の最適化を行った。今回の検討では逆相系での分離を検討したため、カラムに導入された化学物質は極性の高いものから溶出し、極性の低い化学物質ほど溶出位置が遅くなる。HPLC の条件を表-1 に示した。検討の結果、ほぼすべての成分について分離を行うことができた (図-3)。E1 と EE2 については保持時間が近く、完全に分離することはできなかったが、各物質の寄与は機器分析の結果と比較することにより明らかになるとと思われる。

上記の条件を用い、下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分を YES に供した。その結果、いずれの試料においても E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン活性が検出され、さらに E1 の寄与が高いことが実測された (図-4)

表-1 HPLC 分析条件

HPLC	GILSON社製Model321H1						
カラム	Hypersil Green ENV (4.6mm x 250mm)						
流量	1.0mL/min						
検出器	UV (210nm、254nm)						
移動相	A溶液:0.1%ギ酸水溶液 B溶液:0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液						
移動相組成	時間(分)	0	5	100	110	110.1	125
	B溶液(%)	5	5	95	95	5	5
分画条件	試料注入10分後より100分まで1.5分毎(=1.5mL)に採取						

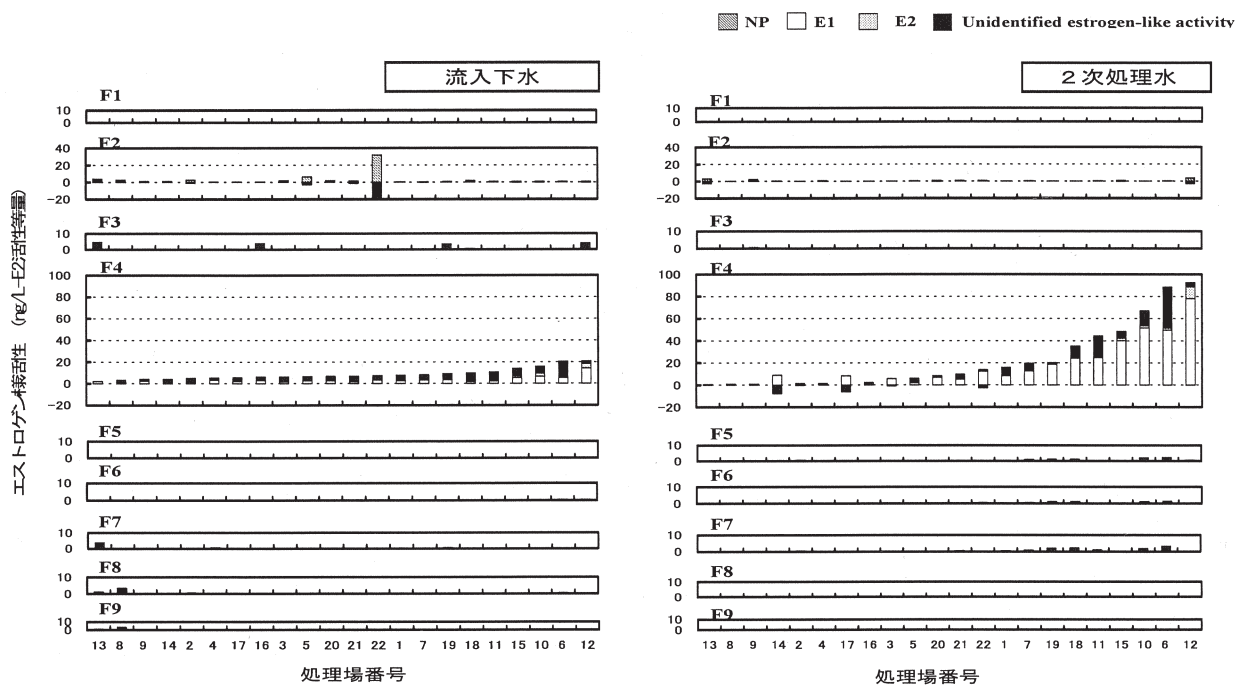


図-2 下水中のエストロゲン様活性の極性分画結果と各物質の寄与

4.2 共存物質による影響

4.2.1 分画試料間における相互作用

上記実験により、下水中の主要3物質の間では、これらの相互作用は相加的であることを示した。しかし、これは下水中の全ての物質間で行なった結果ではないため、実際の試料においては、必ずしも相加的な関係であるという確証にはならない。今回、実際に下水中に存在する主要3物質以外の物質の影響も考慮するため、極性分画を行なった分画試料間での相互作用の有無を確認することで、複数の物質間での相互作用・複合作用について検証を行った。

4.1.2で示した分画方法によって分画した試料F1~F9の試料を等量ずつ混合し、全ての組み合わせ(36通り)の試料を調整した。この試料を組み換え酵母法で分析し、相加期待値(各分画試料のエストロゲン様活性値の合計値)と比較した(図-5)。F7を加えたケースでは組み換え酵母法で測定した値の方が高くなる傾向が見られ、F6を加えた系についても若干高くなる傾向が確認された。その他の組み合わせにおいては、概ね理論活性値と測定値の間に有意な差は確認できなかった。以上の結果より、F7に溶出する成分により、環境試料を分画せずにアッセイを行った場合、エストロゲン様活性が過大評価されることが明らかとなった。

4.2.2 界面活性剤の影響

F7分画は酵母に対して強い毒性を示しており、エスト

ロゲン様物質以外に、酵母に対して毒性を与える物質の影響が考えられた。またこのF7分画は発泡性も確認されたことから、F7分画に含まれる物質として界面活性剤に焦点を絞って検討を行なった。界面活性剤は国内生産量を考慮し、陰イオン界面活性剤の代表物質としてLASを、非イオン界面活性剤の代表物質としてノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)を選び、これらの標準物質について極性分画を行なった。その結果、LAS及びNPnEO(n≥5)がF6~F7の分画に含まれることが確認された。そこでこれらの両物質による影響を確認するため、標準物質(E2)20ng/Lに界面活性剤(LAS, NPnEO)を濃度別に添加し、エストロゲン様活性への影響を調べた。その結果(図-6)、NPnEOについては、エストロゲン様活性に変化がなく、酵母測定系への影響は殆ど確認されなかったが、LASについては添加量の増加に伴いエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。LASは流入下水ではN.D~9.8mg/L程度含まれている報告⁹⁾があり、この報告を合わせて考えるとLASの共存下ではエストロゲン様活性は最大2.5倍程度高く見積られる可能性が示唆された。

5. メダカを用いた曝露試験

5.1 エストロゲンの作用濃度

本研究では、雄メダカを用いた環境水での曝露試験結果の評価のための基礎的知見を蓄積することを目的として、E2およびE1を被験物質として、雄ヒメダカの成魚を用いた実験室内での曝露試験(VTG・アッセイ)を行い、

肝臓中の VTG 濃度から両物質の最小作用濃度、最大無作用濃度、曝露期間と肝臓中の VTG 濃度の関係について検討を行った。

5.1.1 被験物質および曝露濃度

被験物質は E2 および E1 (ともに和光純薬) とし、試験濃度は以下の 5 濃度とした。また、試験液の調製に用いた溶解助剤のみを添加した助剤区を設けた。

設定濃度 : 5.0、12.6、31.6、79.5、200ng/L

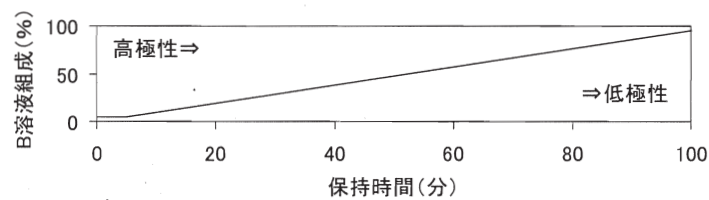
5.1.2 供試魚

試験施設において 3 世代以上継代飼育されている群か

ら採卵、飼育した月齢約 5 か月のヒメダカ成魚の雄を試験に用いた。供試個体数は、試験区あたり 60 個体とした。供試時の体重は、 333 ± 57 mg (平均 \pm 標準偏差) であった。

供試ヒメダカの飼育は、受精卵は脱塩素水道水による半止水式、ふ化後から成熟期 (親魚期) までは脱塩素水道水を飼育水とした流水式水槽 (5 換水/day) で行った。飼育水温は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明条件は 16 時間明/8 時間暗とした。餌料は、ふ化直後はシオミズツボムシ、約 2 週齢以降はアルテミアのふ化幼生を 1~3 回/day の頻度で与えた。また、成熟期に達した月齢 4 か月において、二次

a) 溶離液組成



b) クロマトグラム

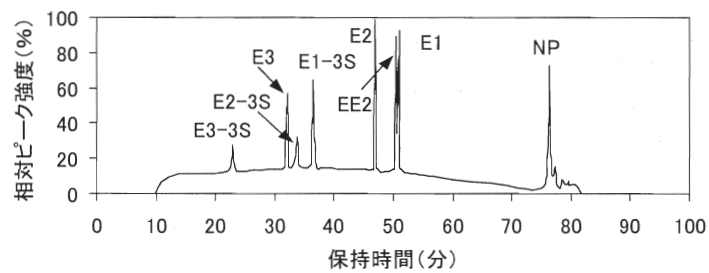


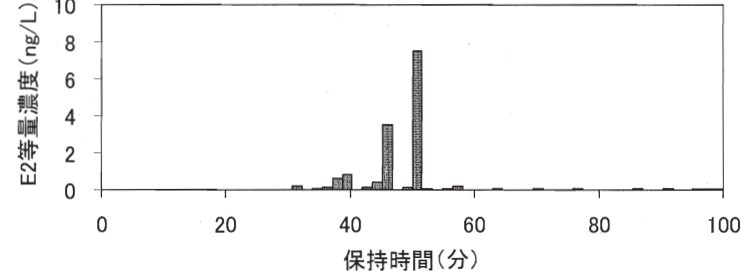
図-3 HPLC を利用した極性分画手法 (順相)

溶離液組成: A液 (0.1%ギ酸水溶液)

B液 (0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液)

E1: エストロン、E2: 17β -エストラジオール、E3: エストリオール、E1-3S: E1 硫酸抱合体化物、E2-3S: E2 硫酸抱合体化物、E3-3S: E3 硫酸抱合体化物、NP: ノニルフェノール

a) 流入水



b) 二次処理水

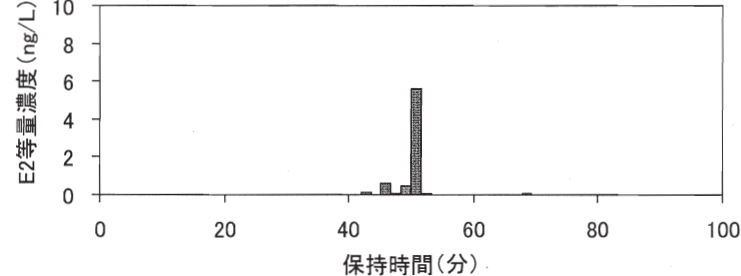


図-4 HPLC を利用した下水試料の極性分画

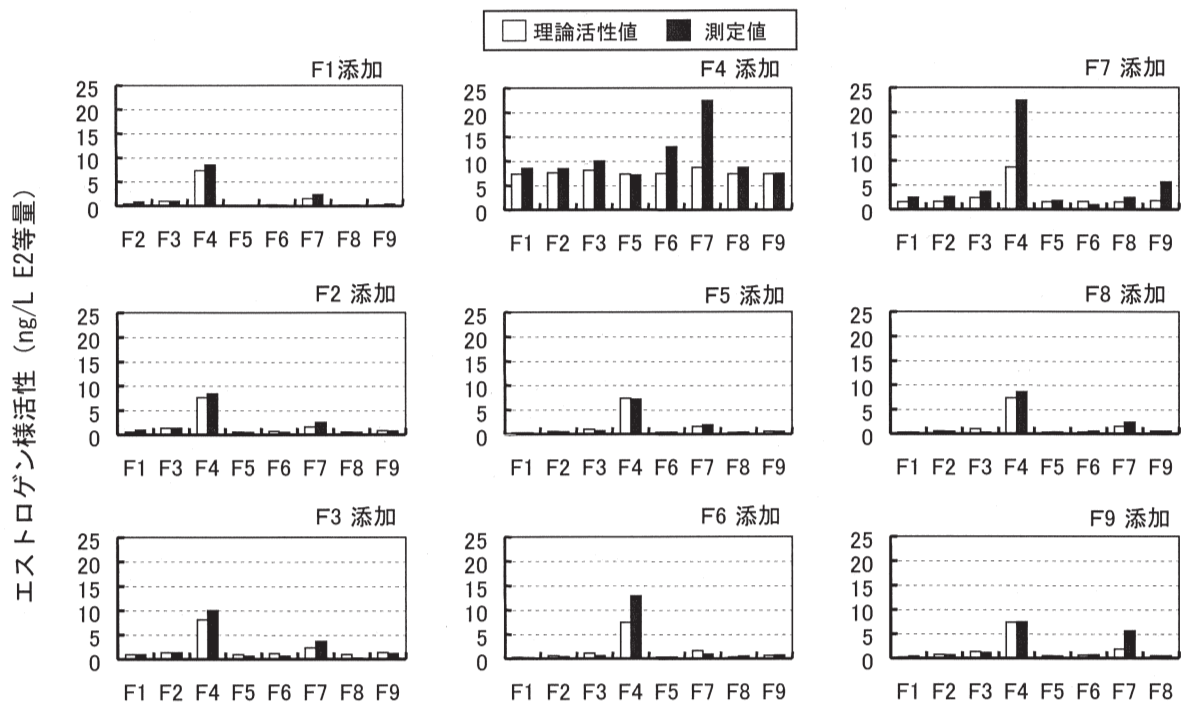


図-5 各画面の組み合わせによるエストロゲン様活性の予想活性値と測定値

性徴（臀鰭の形状）により雌雄を選別し、以降は供試まで雄個体のみで飼育した。

5.1.3 曝露方法および装置

曝露には、内装ステンレス張りの恒温室に設置したミニダイリユーター式の流水式曝露装置を用いた。試験水槽は硬質ガラス製水槽（有効量 10L）とした。なお、曝露装置および試験水槽において、試験液との接する箇所において用いられている材料は、ガラス、テフロン、ステンレスのみである。

曝露実験に用いたミニダイリユーター式の流水式曝露装置では、装置上部の希釈水槽（ガラス製）からガラス製キャピラリー管を通して、一定流量で希釈水が混合槽（ガラス製）に供給される。一方、混合槽には、定量が

ンプによって被験物質の原液が一定流量で供給される。混合槽内で原液と希釈水と混合されることにより、設定濃度の試験液が調製される。調製された各濃度の試験液は、ガラス管を通して各試験水槽に連続的に供給される。

5.1.4 曝露試験条件

曝露条件を以下に示した：

- 曝露方式：流水式
- 試験区数：被験物質 5 濃度区および助剤区
- 連数：1 連/試験区
- 供試生物：雄ヒメダカ（成魚）
- 供試生物数：60 個体/試験区
- 曝露期間：最長 14 日間
- 試験液量：10L
- 換水率：約 10 換水/日
- 試験水温：24±1℃
- 照明：16 時間明/8 時間暗
- 曝気：なし
- 給餌：ブラインシュリンプふ化幼生を 1 回/日、飽食量を給餌

5.1.5 試験液の調整

(1) 希釈水

希釈水には、水道水を活性炭濾過機に通水して残留塩素および化学物質等を除去した脱塩素水道水を用いた。希釈水は、流水曝露装置の希釈水タンク（ガラス製水槽）に貯め、十分に通気した。また、水温調整装置により試験水温に温度調整するとともに、常時、活性炭フィルタ

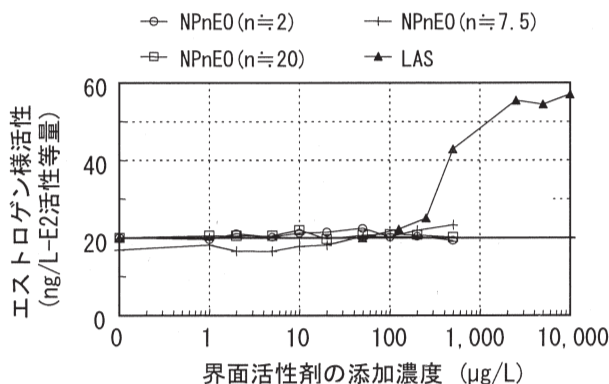


図-6 界面活性剤の添加に伴うエストロゲン様活性の変化

一に通水しながら循環濾過した。希釈水については、一般項目および重金属類、農薬類などを測定し試験用水として問題が無いことを確認した。

(2) 試験原液の調製

試験原液は、溶解助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製した。試験原液として E2 および E1 の最高設定濃度 (200ng/L) の 1000 倍濃度 (200 μ g/L) の被験物質溶液を調製した。試験原液の DMSO 濃度は 100mL/L (10% v/v) とした。

試験原液は、曝露期間中に 2 回/週の頻度で新調した。

(3) 試験液の調製

試験液は、試験原液と希釈水を一定流量で混合することにより調製し、連続的に試験水槽に供給した。試験原液はダブルプランジャー型ポンプ (日本精密株式会社) を用いて、毎分 100 μ L の流量で曝露装置の混合槽に供給、同じく混合槽に希釈水を毎分 100mL の流量で供給することにより 1/1000 に希釈した。すなわち、試験原液を希釈水で連続的に 1/1000 倍に希釈して 200ng/L の試験液を調製した。また 79.5ng/L の試験液は、200ng/L の試験液を希釈水で 1/2.5 倍に希釈することにより調製した。同様に順次、各試験液を希釈水で 1/2.5 倍に希釈することにより 31.6~5.0ng/L の各試験液を調製した。

助剤区の試験液は、希釈水に被験物質の最高濃度区と同じ濃度 (100 μ L/L) になるように DMSO を添加することにより調製した。

なお、17 β -エストラジオール曝露試験の 31.6ng/L 区および 200ng/L 区については、曝露 14 日後に試験原液の供給を止めて、希釈水でさらに 14 日間飼育を継続した。助剤区も同様に曝露 14 日後に DMSO の添加を止めて希釈水でさらに 14 日間飼育を継続した。

5.1.6 試験液中の被験物質濃度

各試験区 (助剤区を含む) の試験液中の被験物質濃度は、曝露開始日 (曝露 0 日目)、曝露 7 日目および 14 日目の計 3 回測定した (表-2)。

設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均 17 β -エストラジオール濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は <0.5ng/L であった。各試験区の平均実測濃度は設定濃度の 96~111% であったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。

また、試験液中の E1 濃度の測定結果を表-3 に示した。

設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均エストロン濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は <0.2ng/L であった。各試験区の平均実測濃度は設定濃度の 97~109% で

あったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。

5.1.7 曝露

曝露装置は曝露開始日の 3 日前から稼働させ、各試験区の被験物質濃度が設定濃度になっていることを確認した。また、供試魚の投入前に試験液の水温、溶存酸素濃度および pH を測定し、試験環境に問題がないことを確認した。

曝露開始日に曝露試験用の雄ヒメダカ群 (約 500 個体) から無作為に 60 個体ずつ 6 試験区の供試魚を取り上げ各試験水槽に投入して曝露試験を開始した。曝露期間は 14 日間とした。曝露期間中は、1 日 1 回、アルテミアふ化幼生を飽食量を目安に給餌した。また、給餌時に死亡の有無、一般症状 (外見、行動、摂餌活動の異常) を観察した。死亡がみられた場合は、直ちに除去した。水槽内に残餌や糞がみられた場合は、適宜、サイフォンを用いて除去した。

曝露開始時、曝露期間中および曝露終了時に各濃度区からヒメダカを取り上げて体長および体重、肝臓重量、肝臓中の VTG 濃度を測定した。

また E2 曝露試験では、14 日間の曝露後、31.6ng/L 区、200ng/L 区および助剤区について、残った個体をそれぞれ清浄な試験水槽に移し、希釈水 (流水式) で 14 日間飼育を継続した。この飼育期間中も曝露期間と同様に 1 日 1 回、アルテミアふ化幼生を給餌した。そして清浄な試験水槽に移行後の飼育 7 日後および 14 日後に各試験区からヒメダカを取り上げ、曝露期間と同様に体長および体重、肝臓重量、肝臓中の VTG 濃度を測定した。

5.1.8 肝臓中 VTG 濃度の分析

(1) 肝臓の採取

助剤区、被験物質の最低濃度区から最高濃度区の順に、各試験水槽から清浄なタモ網で雄ヒメダカを取り上げた。取り上げたヒメダカは氷水で麻酔した。氷冷麻酔により動きが停止したヒメダカを 1 個体ずつピンセットで取り上げ、ペーパータオルで体表面の水分を除去してから、デジタルノギスで体長、電子天秤で体重を測定した。

体長および体重測定後、解剖バサミで腹面の胸鰭基部を切開し、さらに腹面正中線を肛門の直前まで切り開いた。実態顕微鏡下でピンセットを用いて腹腔壁を押し広げて肝臓を露出させた状態にして、消化管や胆嚢を破損しないように注意して肝臓を摘出した。肝臓に付着した脂肪組織等は完全に除去した。摘出した肝臓はマイクロチューブ (容量 1.5mL) を風袋として、電子天秤で重量を測定した。

採取後の肝臓は、直ちに冷却して前処理に供するまで -80 $^{\circ}$ C 以下で凍結保存した。

また、各個体の肝臓重量および体重から、下記の式により肝指数 (HSI) を算出した。

$$\text{肝指数 (\%)} = \text{肝臓重量} / \text{体重} \times 100$$

(2) 肝臓の前処理

肝臓が入ったマイクロチューブに氷冷した Buffer (VTG 濃度の測定に用いる ELISA キットの検体希釈液) を肝臓 1 mg あたり 50 μ L 添加し、清浄なマイクロホモジナイザーでホモジネートした。ホモジネート後、冷却遠心機で遠心処理 (4 $^{\circ}$ C、13,000 g、10 分間) して、肝臓の抽出液、脂肪および肝臓組織を分離した。ELISA 測定の試料として、試料の中層に分離された肝臓抽出液をマイクロチューブ (容量 0.5 mL) に分取 (1 個体あたり 3 本) した。前処理操作はすべて氷冷下で行った。

マイクロチューブに分注した肝臓抽出液は、ELISA での測定に供するまで -80 $^{\circ}$ C 以下で凍結保存した。

(3) ELISA による VTG 濃度測定

肝臓抽出液中の VTG 濃度は、市販のメダカ・VTG 測定用の ELISA キット (株式会社トランスジェニック) を用いて定量した。肝臓抽出液は、キットの検体希釈液でさらに 10 倍以上に希釈して ELISA に供した。ELISA の手順および条件等は、キットの説明書に従った。測定はすべて二重測定で行った。

試料 (希釈した肝臓抽出液) 中の VTG 濃度は、二重測定した吸光度の平均値を基に標準曲線から算出した。これに肝臓抽出液の希釈倍率を乗じて、肝臓抽出液中の VTG 濃度を算出した。ELISA における定量範囲 (Working range) は 2~64 ng/mL とした。すなわち、肝臓中の VTG 濃度の定量下限は、すべての曝露実験において 1 ng/mg-liver weight とした。

5.1.9 統計処理

曝露試験における各曝露濃度区と助剤区の肝指数、肝臓中の VTG 濃度について、スティーアの多重比較検定 (ノンパラメトリック検定) により有意差検定した。検定における有意水準は 0.05 とした。

なお、肝臓中の VTG 濃度が定量下限未満であった個体については、上記の検定および平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

5.1.10 E2 での曝露期間中の VTG 濃度

E2 での曝露期間における肝臓中の VTG 濃度 (VTG) を図-7 に、各濃度区における VTG 濃度の経時変化を図-8 に示した。

対照系である助剤区の VTG は、曝露期間を通してすべての個体が 1 ng/mg 未満であった。E2 曝露では、各曝露期間において、E2 濃度に依存して肝臓中 VTG が高くなる傾

表-2 試験液中の 17 β -エストラジオール濃度

設定濃度 (ng/L)	実測濃度 (ng/L)			平均
	0 日目	7 日目	14 日目	
助剤区	<0.5	<0.5	<0.5	
5.0	5.6	5.1	4.4	5.0
12.6	15.5	13.4	11.9	13.6
31.6	37.7	32.1	33.6	34.5
79.5	95.0	80.8	n.a	87.9
200	212	180	182	191

* 14 日目の 79.5 ng/L 区は、ELISA 測定において吸光度が検量線の定量範囲外になったため欠測とした。

表-3 試験液中のエストロン濃度

設定濃度 (ng/L)	実測濃度 (ng/L)			平均
	0 日目	7 日目	14 日目	
助剤区	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
5.0	4.5	5.8	5.6	5.3
12.6	12.0	14.0	14.1	13.4
31.6	25.0	33.1	34.4	30.8
79.5	83.3	87.2	90.0	86.9
200	180	201	234	205

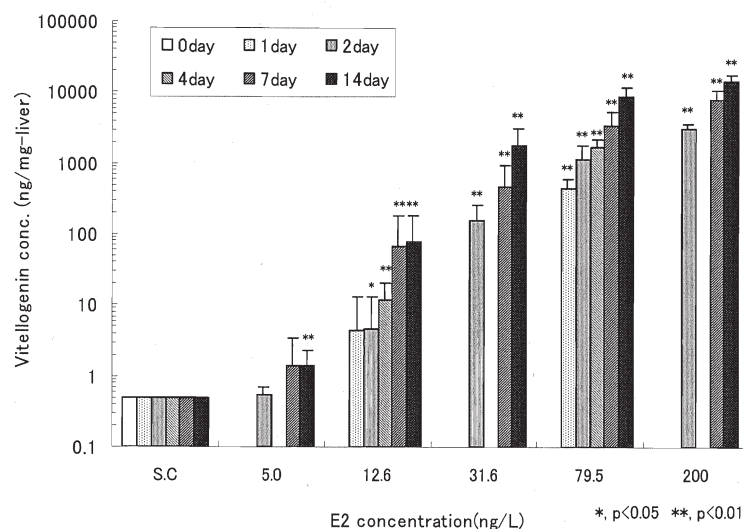


図-7 E2 曝露による肝臓中 VTG 濃度

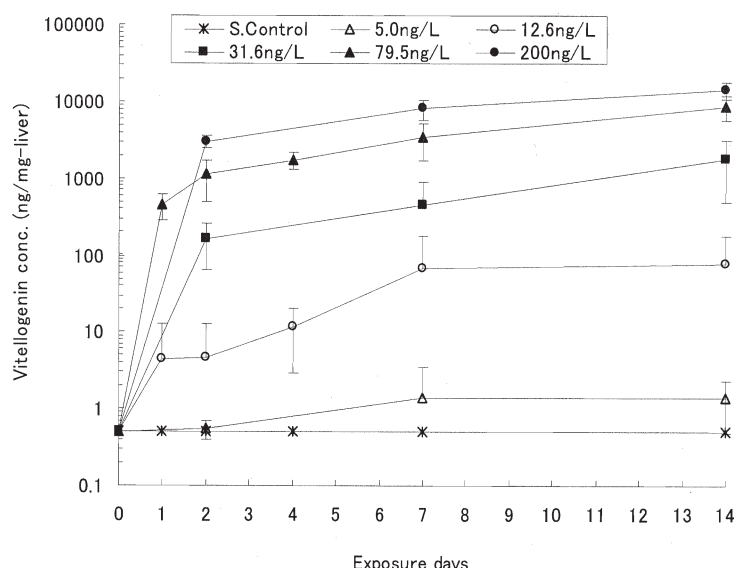


図-8 E2 曝露による肝臓中 VTG 濃度の経時変化

向がみられた。また各 E2 濃度区でも曝露期間に依存して VTG が高くなる傾向がみられた。E2 濃度が最も低い 5.0ng/L では、各曝露期間において VTG が定量下限 (1ng/mg) 未満の個体もみられたが、VTG が 1ng/mg 以上の個体数は、曝露 2 日後が 1 個体、7 日後が 3 個体、14 日後が 8 個体と曝露期間に依存して増加する傾向にあった。

統計学的な検定の結果、5 濃度区すべてで VTG を測定した曝露 2、7 および 14 日後のうち、曝露 2 および 7 日後には最低濃度である 5.0ng/L 区で助剤区と統計学的に有意差は認められなかった。しかし、曝露 14 日後には、5.0ng/L 区でも有意差 ($p < 0.01$) が認められた。12.6ng/L 以上の濃度区は曝露 2 日後から有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また、曝露 1 日後には、12.6ng/L は有意差が認

められなかった。

5. 1. 11 曝露後の清水飼育期間中の VTG 濃度

E2 の 31.6ng/L および 200ng/L での曝露 14 日後の希釈水での飼育期間における肝臓中の VTG 濃度の経時変化 (E2 での曝露 2 日後から曝露後の飼育 14 日後まで) を図-9 に示す。

前述のように E2 での曝露により曝露期間に VTG は上昇し、曝露 14 日後 (曝露後の飼育 0 日目) の VTG は 31.6ng/L 曝露群で平均 1810ng/mg、200ng/L 曝露群で 14400ng/mg となった。この E2 での曝露後に E2 を含まない希釈水 (脱塩素水道水) に移行したことにより、31.6ng/L 曝露群では VTG が飼育 7 日後には 378ng/mg、14 日後には 167ng/mg と E2 での曝露 2 日後と同程度まで低下した。200ng/L 曝露群でも、E2 曝露後の飼育 7 日後には 6170ng/mg、14

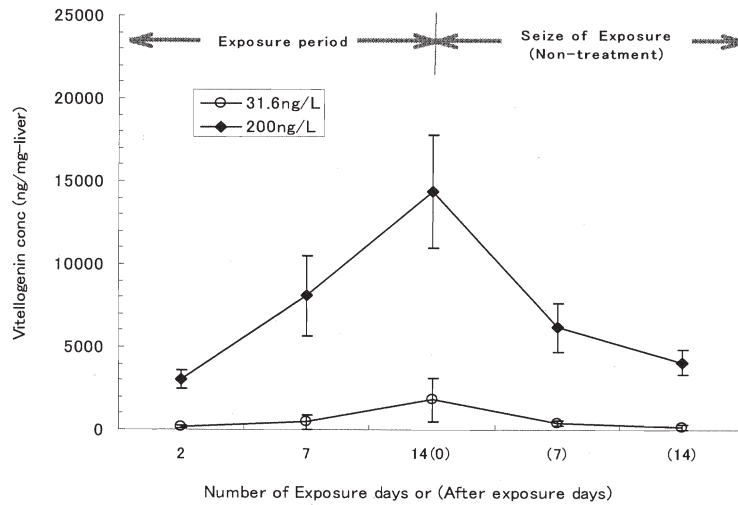


図-9 E2での曝露期間およびその後の希釈水での飼育期間のVTG濃度

日後は4080ng/mgとなり、31.6 ng/L曝露群と同様に肝臓中のVTGは、E2での曝露2日後と同程度まで低下した。ただし、飼育14日後のVTGは、E2での曝露2日後と同程度であり、曝露開始時（助剤区の0day）よりも高いレベルにあった。

5.1.12 E1での曝露期間中のVTG濃度

E1での各曝露濃度における肝臓中のVTG濃度（VTG）を図-10に示す。また各濃度区におけるVTG濃度の経時変化を図-11に示す。

助剤区のVTGは、曝露期間を通してすべての個体が定量下限（1ng/mg）未満であった。また、5.0ng/L区および12.6ng/L区も、5.0ng/L区の曝露3日後で1個体が1.0ng/mgであった以外は、すべての個体が曝露期間を通

して肝臓中のVTGは定量下限未満であった。31.6ng/L区では、曝露3日後は10個体がすべて定量下限未満であったが、曝露7日後および14日後は10個体のうち各4個体が1.0ng/mg以上のVTGを示し、平均値で見ると曝露14日後がやや高かった。79.5ng/L区および200ng/L区では曝露期間に依存して肝臓中VTGが高くなる傾向がみられた。経時的にみると、31.6ng/L以上の濃度区では、曝露時間に依存して肝臓中のVTGも増加する傾向がみられた。

統計学的な検定の結果、31.6ng/L以下の濃度区では各曝露期間とも助剤区と $p < 0.05$ の水準で有意差は認められなかった。79.5ng/L区および200ng/L区では、曝露3、7および14日後とも助剤区と有意差（ $p < 0.01$ ）が認められた。

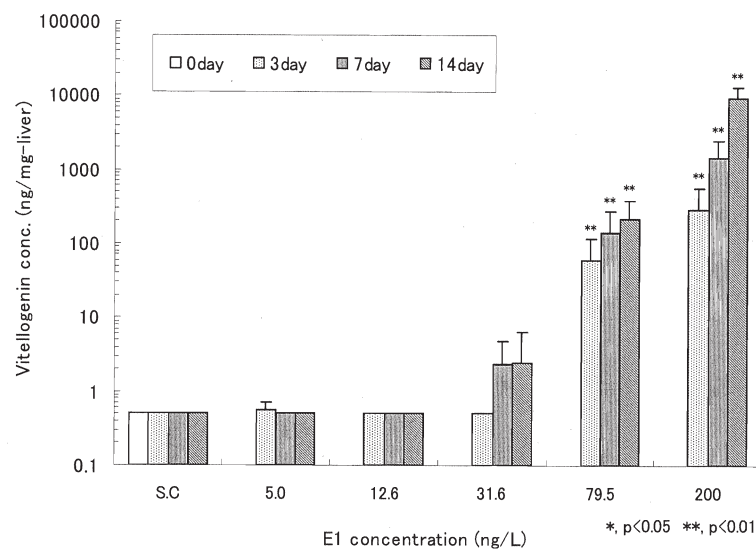
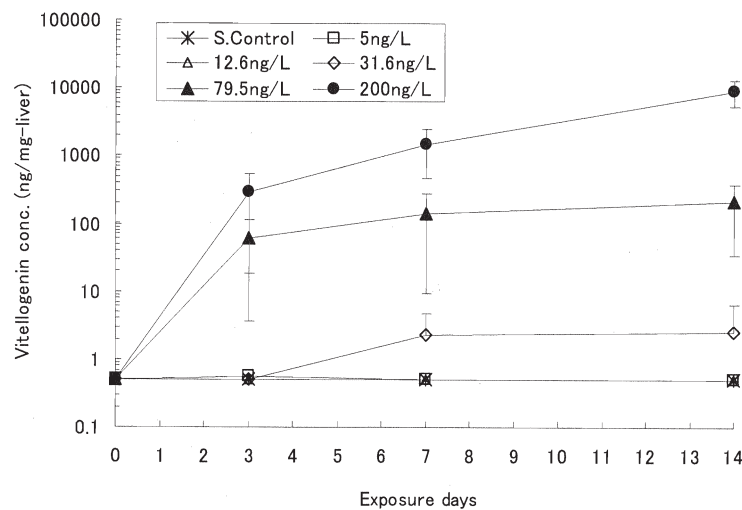


図-10 E1曝露による肝臓中VTG濃度



5.1.13 E2 および E1 の作用濃度

室内曝露試験から得られた 17β -エストラジオール (E2) およびエストロン (E1) における雄ヒメダカ成魚での VTG 誘導の最小作用濃度および最大無作用濃度を表-3 に示す。ここでは、曝露期間ごとに肝臓中の VTG 濃度 (VTG) に助剤区と有意差 ($p < 0.05$) が認められた最も低い濃度 (設定濃度) を最小作用濃度、有意差が認められなかった最も高い濃度を最大無作用濃度とした。

雄ヒメダカの肝臓中の VTG を上昇させる E2 の最小作用濃度は、2 および 7 日間の曝露期間で 12.6ng/L、14 日間で 5.0ng/L であった。最大無作用濃度は、それぞれ 5.0ng/L、 < 5.0 ng/L であった。一方、E1 の最小作用濃度は、3、7 および 14 日間の曝露期間とも 79.5ng/L、最大無作用濃度は 31.6ng/L であった。

E2 の最大無作用濃度から、実際の河川水や下水処理場を対象とした曝露試験 (現地での曝露試験) で雄ヒメダカの肝臓中 VTG をバイオマーカーとした場合、環境水の E2 濃度が 5ng/L 以下のレベルであっても、曝露期間を 14

日間またはそれ以上とすれば、メダカ (魚類) の肝臓中 VTG は上昇するが、E1 では 30ng/L 程度では 14 日間の曝露では肝臓中の VTG の有意な上昇がみられないことが分かった。

5.1.14 肝臓中 VTG の環境水での曝露試験への適用性

表-4 に示した E2 の最小作用濃度は、人為的に濃度設定された曝露試験における一定の段階的な設定濃度から推定されたものである。現地での曝露試験においても、一定期間 (例えば 14 日間) の曝露後に供試した雄ヒメダカの VTG を測定して、コントロール群 (ネガティブ・コントロール又はイニシャル・コントロール) と有意差検定することによって、試験対象とした環境水中の E2 濃度 (E2 当量換算したエストロゲン濃度) が VTG を上昇させたか否かを推定できる。しかしながら、環境水のエストロゲン様物質濃度は未知であり、また時間的に変動すると考えられる。

環境水の E2 濃度と肝臓中 VTG 濃度の関係を定量的に比較することをおこなった。E2 曝露における E2 濃度と曝露 14 日後における肝臓中 VTG を図-12 に示す。肝臓中の VTG

表 3 17β -エストラジオール及びエストロンの作用濃度

被験物質	曝露期間 (day)	最大無作用濃度 (ng/L)	最小作用濃度 (ng/L)
17β -エストラジオール	2	5.0	12.6
	7	5.0	12.6
	14	< 5.0	5.0
エストロン	3	31.6	79.5
	7	31.6	79.5
	14	31.6	79.5

と環境水中のE2濃度の関係を推定するためには両者の関 得られた近似式 ($y = 0.000827x^{3.26}$) から曝露 14 日後
 表-4 VTG を誘導する E1 および E2 濃度

ビテロジェニン濃度 (ng/mg-liver)	VTG を誘導する E1 濃度 (ng/L)		
	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
10	71.7	52.0	49.0
50	117	80.8	68.6
100	145	97.6	79.2

ビテロジェニン濃度 (ng/mg-liver)	VTG を誘導する E2 濃度 (ng/L)		
	曝露 3 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
10	16.3	11.5	8.8
50	28.2	20.0	14.5
100	35.7	25.3	17.9

係を線形化する必要がある。ここではE2濃度(x)とVTG(y)の対数変換値を一次回帰直線に当てはめることによって両者の関係式を求めた。すなわち、肝臓中のVTG(y)とE2の曝露濃度(x)の関係は次式により近似した。なお、肝臓中のVTGは漸近線を持つと考えられることから、最高濃度である200ng/LのVTGは、近似式の算出データから除外した。

$$\text{Log}(y) = a \cdot \text{Log}(x) + b$$

すなわち、

$$y = B \cdot x^a \quad (\text{ただし、} B=10^b)$$

に雄ヒメダカにある濃度のVTGを誘導させるE2濃度を推定できる。例えば、雄ヒメダカの肝臓中に5ng/mg、10ng/mg、100ng/mgのVTGを誘導させるE2濃度は、それぞれ7.1ng/L、8.8ng/L、17.9ng/Lと見積もられた。ただし、図-12のように、個体のVTGのバラツキが12.6ng/LのE2では大きい。

E2のヒメダカに対する影響濃度に関する既往知見は少ないが、フルライフサイクル試験(受精卵から2世代に渡る曝露試験)の結果、受精卵から連続的に曝露したF0世代において、ふ化後60日齢で雄の生殖腺(精巢)に精

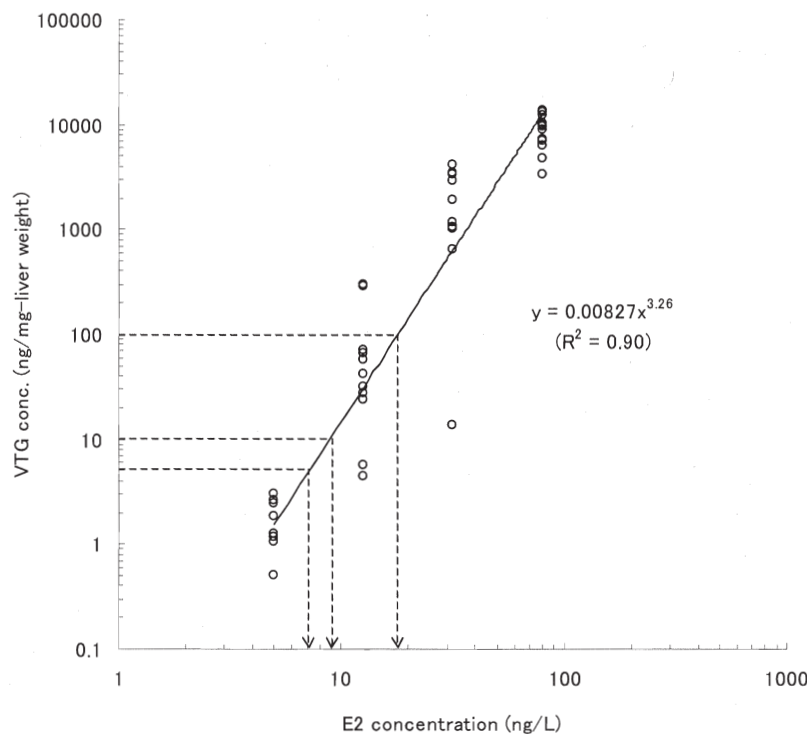


図-12 曝露 14 日後の肝臓中 VTG と E2 濃度の関係

巢卵を生じさせた E2 の最小作用濃度は 27.9ng/L (最大無作用濃度は 8.66ng/L) 、また統計学的に有意とは言えないが 8.66ng/L でも 1 個体で精巢卵がみられたとの報告⁹⁾がある。

E2 曝露試験の結果から推定した曝露 14 日後に 5ng/L または 10ng/mg の VTG を誘導させる E2 濃度は、フルライフサイクル試験において雄ヒメダカの生殖腺に精巢卵を生じさせた濃度¹¹⁾と同程度であった。このことは、現地での曝露試験において曝露 14 日後の肝臓中 VTG が 5ng/mg を超えたか否かを指標とすることによって、間接的かつ平均的な曝露状況の評価になるものの、試験対象とした環境水中のエストロゲン様物質が魚類 (メダカ) の生殖腺に影響を与えるレベルであったか否かも評価可能であることを示唆している。

ただし、曝露後の VTG から魚類影響の程度を評価する場合は、試験に曝露前の肝臓中 VTG が十分に低い雄ヒメダカ (例えば定量下限未満) を用いる必要がある。また、ヒメダカの系統、供試前の飼育環境、月齢などによっても、E2 に対する感受性や反応性が異なることも考えられるため、曝露試験に用いる雄ヒメダカの統一、あるいは供試する雄ヒメダカを用いた E2 での曝露試験結果 (E2-VTG の作用曲線) による評価基準の補正などが必要

になると考えられる。

5.1.15 E1 のエストロゲン作用強度

E1 について、曝露試験の結果から曝露 3、7 および 14 日後における曝露濃度 (VTG が定量下限以上であった 31.6 ~ 200ng/L) と肝臓中 VTG の関係を前項と同様の手順で一次回帰することによって、近似式 ($y = b \cdot x^a$) を求めた (図-13)。同様に E2 について、曝露試験の結果から曝露 2、7 および 14 日後における曝露濃度 (5 ~ 72.9ng/L) と VTG の関係の近似式を求めた (図-14)。ここで得られた E1 濃度と VTG の近似式 (図-13)、E2 濃度と VTG の近似式 (図-14) により、各直線の中央付近にある 10、50 および 100ng/mg の VTG を誘導する E1 および E2 濃度 (表-4) をそれぞれ算出した。

各曝露期間において各 VTG を誘導する E2 濃度に対する E1 濃度の比 (E2 濃度/E1 濃度) を表 5 に示す。E2 濃度に対する E1 濃度の比は、E2 に対する E1 の VTG 誘導に関する相対的な強度を示していると考えられる。したがって、雄ヒメダカにおける肝臓での VTG 誘導を指標にした場合、E1 の持つエストロゲン様作用は E2 の 0.18 ~ 0.26 倍の強さと推定された。

5.2 エストロゲンの作用におよぼす水温の影響

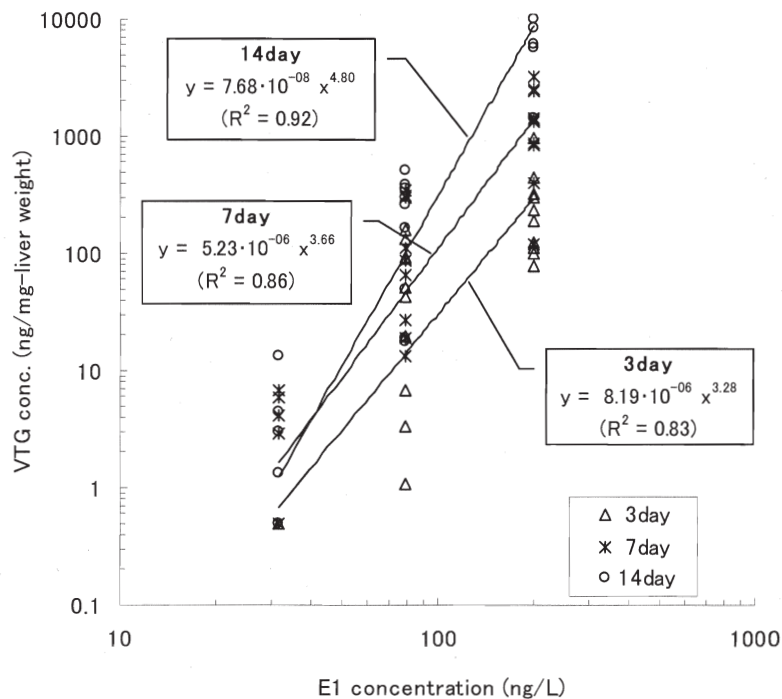


図-13 各曝露期間における肝臓中 VTG と E1 濃度の関係

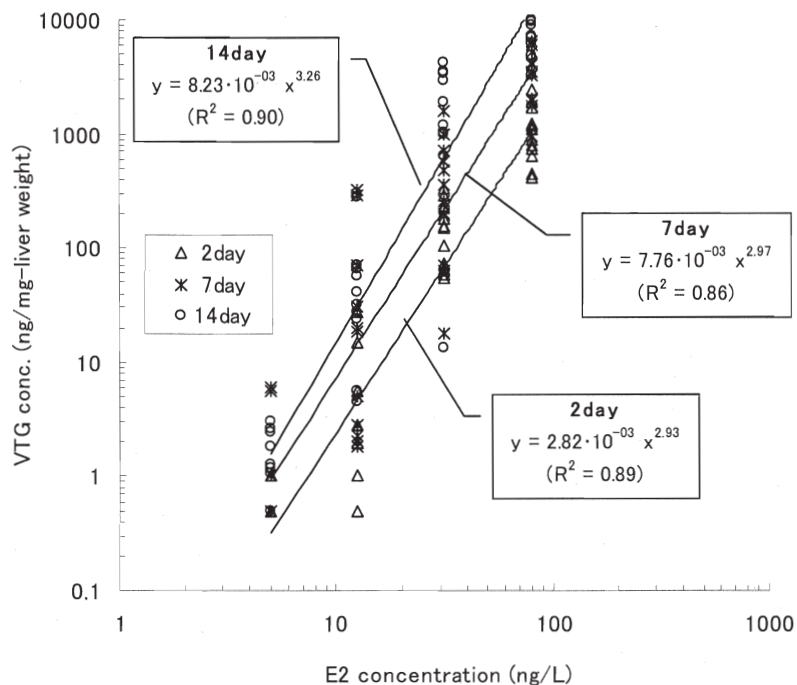


図-14 各曝露期間における肝臓中 VTG と E2 濃度の関係

E1 を添加した飼育水 (設定濃度 50ng/L) により、月齢 5 カ月の雄メダカを水温 16°C、20°C、24°C および 28°C の各条件下、月齢 2 カ月の雄メダカを水温 24°C 下で曝露した (最長 14 日間)。曝露前 (曝露 0 日) および曝露開始から 2、7 および 14 日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中の VTG 濃度を測定した。

各水温条件での肝臓中 VTG 濃度から E1 曝露における雄メダカの VTG 生成について、経時変化および水温の影響を検討した。また、5 カ月齢と 2 カ月齢の雄メダカでの肝臓中 VTG 濃度から雄メダカの成長段階と VTG 生成の関係について検討した。

5.2.1 供試前の飼育方法および条件

試験に供した雄メダカのみ化後から各曝露試験に供するまでの飼育方法および条件は以下のとおりであった。

1) ふ化直後からふ化後 2 週齢まで

ふ化直後から 2 週齢までは、脱塩素水道水 (水道水を活性炭に通して脱塩素処理したもの) を飼育水とした半止水方式 (飼育水の換水: 2~3 日ごとに約半量を換水) により飼育した。飼育水温は 24±2°C、照明は蛍光灯による明期 16 時間/暗期 8 時間周期とした。餌料は、シオミズツボワムシおよびアルテミアふ化幼生を混合で 3~4 回/日の頻度で給餌した。

2) ふ化後 2 週齢から供試まで

ふ化後 2 週齢以降は、脱塩素水道水を飼育水とした流

表-5 水温影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	: E1 を添加した試験液による流水式曝露
試験液の換水率	: 5 換水/日以上
設定曝露濃度	: E150ng/L (設定濃度)
水温	: 各水温条件 (16、20、24 および 28°C) ±2°C
曝露期間	: 2、7 および 14 日間
供試生物	: 雄メダカ (ヒメダカ系)
供試生物の月齢	: 5 カ月齢および 2 カ月齢
供試生物数	: 5 カ月齢の雄メダカ; 86 個体/曝露区 2 カ月齢の雄メダカ; 50 個体/曝露区
照明	: 昼光用蛍光灯、明期 16 時間/暗期 8 時間
給餌	: アルテミアふ化幼生を 1 回/日

水方式（換水率；5～6 換水/日）により飼育した。飼育水温は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明は蛍光灯による明期 16 時間/暗期 8 時間周期とした。餌料は、アルテミアふ化幼生を 1～2 回/日の頻度で給餌した。

5.2.2 雄メダカの選別

水温影響調査および餌の影響調査の曝露試験に供した 5 カ月齢の雄メダカは、約 3 カ月齢の時点で二次性徴（臀鰭の形状等）により雌雄を選別し、以降、雌個体の排泄するエストロゲンの影響を受けないように、飼育水槽に雄個体のみを収容し前項に示す条件下で飼育した。水温

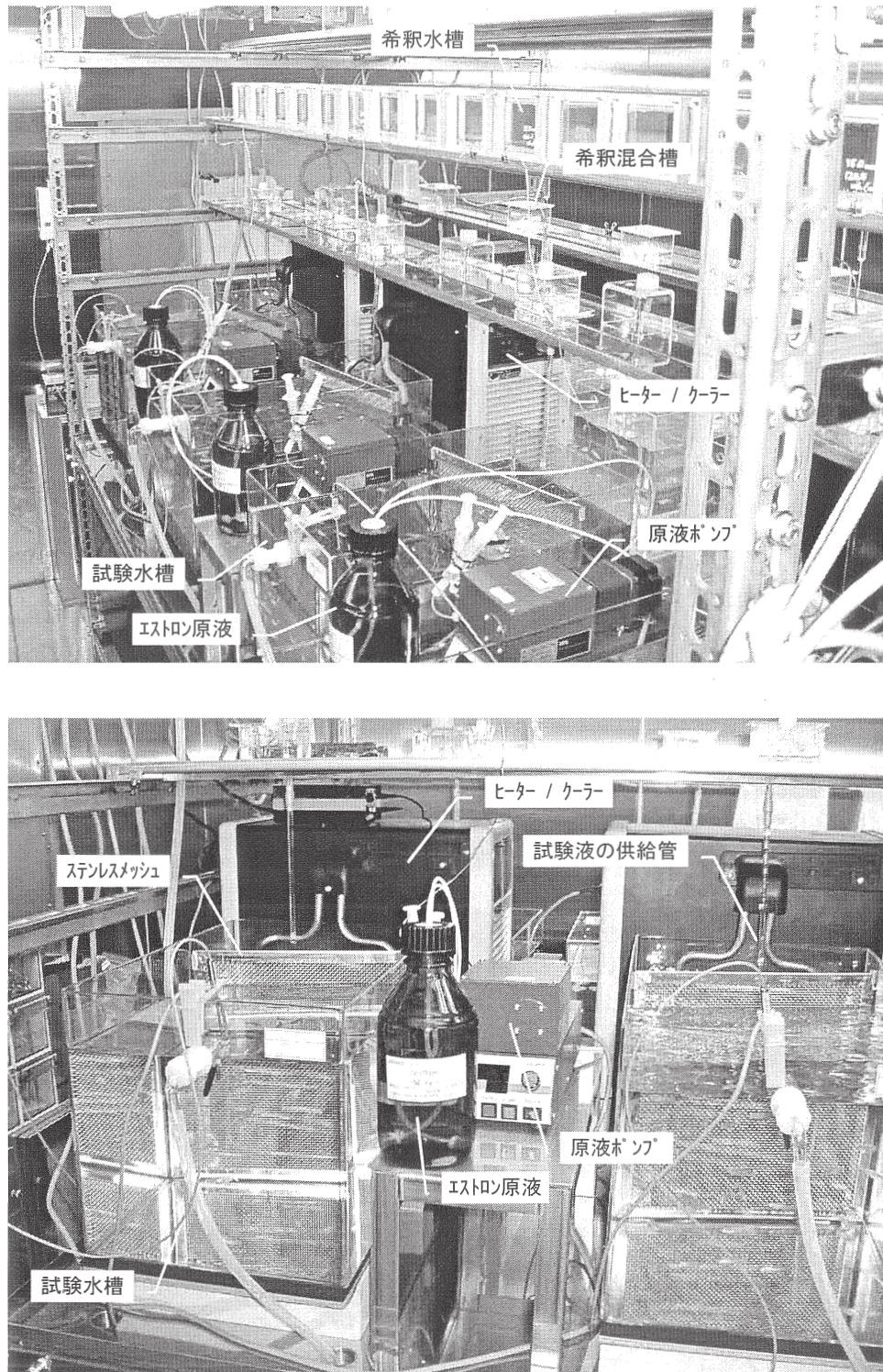


図-15 水温影響調査の曝露試験に用いた流水式曝露装置

影響調査の曝露試験に供した 2 カ月齢の雄メダカは、試験に供する約 5~7 日前に雌雄を選別し、以降は雄個体のみで飼育した。

5.2.3 水温影響調査の曝露試験

5 カ月齢および 2 カ月齢の雄メダカを 50ng/L (設定濃度) の E1 を含む試験液で曝露した。曝露における水温条件は、5 カ月齢の雄メダカで 16、20、24 および 28°C の 4 条件、2 カ月の雄メダカで 24°C の 1 条件とした。5 カ月齢の雄メダカにおける 16、20、24 および 28°C での曝露をそれぞれ 16°C 区、20°C 区、24°C 区および 28°C 区、2 カ月齢の雄メダカの 24°C での曝露を 24°C_2 カ月齢区と表記する。曝露条件を表-5 に示す。

1) 試験に用いた曝露装置の仕様

本試験に用いた曝露装置は、ステンレス鋼製の希釈水タンク (装置の下部と上部に 2 つ設置)、希釈水の水温調整器 (東京理化株式会社、クーリングサーモポンプ CTP-102)、被験物質原液用の送液ポンプ (日本精密株式会社、ケミカルポンプ NP-KX-110)、硬質ガラス製の希釈水槽 (ガラス接着にシリコンを使用)、硬質ガラス製の希釈混合および試験水槽で構成される。本装置は、希釈水、被験物質原液および試験液との接液部に内分泌かく乱作用を持つ化学物質を溶出しない素材 (ガラス、ステンレス鋼、PTFE および PFE のテフロン、シリコン) のみで使用されている (図 15)。

2) 曝露装置における試験液の調製および供給方法

本試験では、以下に示すように各曝露区の試験液を調製、各試験水槽に一定の流量で供給した。試験液の調製に用いる希釈水 (脱塩素水道水) は、装置下部の希釈水タンクに貯留および補給される。希釈水の水温は、装置の下部と上部の希釈水タンク間を循環しながら水温調整器により調整および維持されている (本試験では、希釈水の水温を 24°C 設定とした)。

試験液調製のために、希釈水は上部の希釈水タンクからテフロン管を通して希釈水槽に供給、さらに希釈水槽下面のガラス製キャピラリー管を通して希釈混合槽内に一定の流量で供給される。希釈混合槽には、原液ポンプにより被験物質原液 (本試験では E1 原液、詳細は後述) が一定の流量で添加され、希釈水と混合し一定濃度の被験物質を含む試験液が調製される。試験液は、ガラス管を通して試験水槽に供給される。

3) 試験水槽

本試験では、5 カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が 30L となる位置に排水口 (テフロン製) を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。2 カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が 10L となる位置に排水口を付けた硬質ガラス製水槽を

用いた。各試験水槽の排水口には、供試魚が逸脱しないようにステンレス鋼製メッシュを設置した。

4) 試験水槽内の水温調整

本試験では、水温 24°C の希釈水で調製した試験液を各試験水槽に供給したため、16°C 区、20°C 区および 28°C 区各曝露区については、水槽内の試験液が供給される箇所に設置した投げ込み式クーラー/ヒーター (REI SEA、RZ-150Y) により水槽内の試験液水温を調整および維持した。また、水槽内の水温を均一にするため水槽壁面にスターラーを設置し、試験液を緩やかに攪拌した。クーラー/ヒーターおよびスターラーは、ステンレス鋼製メッシュで仕切られた一画に設置した。16°C 区、20°C 区、24°C 区および 28°C 区の試験水槽には、磁気記録式温度計 (T AND D、Thermo Recorder TR-81) を設置し、水温を 10 分間ごとに測定、記録した。

5.2.4 供試雄メダカの馴化

16°C 区、20°C 区、24°C 区および 28°C 区での曝露に供する雄メダカは、曝露開始の 14 日前に各曝露区の試験水槽に収容し、水温 24°C 下で馴化を開始した。その後、16°C 区、20°C 区および 28°C 区については、水槽内に設置したクーラー/ヒーターにより飼育水温を 1 日あたり 0.5~1°C 低下 (16°C 区および 20°C 区) または上昇 (28°C 区) していき、曝露開始の 3 日前までに各曝露区の水温条件に馴化させた。馴化期間中の水温以外の環境は、前項 3.1 に示す試験における曝露条件と同じにした。24°C_2 カ月齢区については、曝露開始前の 17 日前から試験と同じ環境下で飼育して試験環境に馴化させた。

5.2.5 試験液の調製

1) 希釈水

試験液の調製に用いる希釈水は、活性炭濾過器に通水して残留塩素等を除去した水道水 (脱塩素水道水) とした。希釈水は、前述のとおり流水式曝露装置の希釈水タンク内で水温を 24°C に調整するとともに、エアレーションにより十分に通気した。

2) E1 原液

正確に秤量した 50mg の E1 をアセトン (残留農薬・PCB 試験用、和光純薬工業株式会社) に溶解、100mL に定容した (E1 濃度 500mg/L-アセトン)。さらにこの溶液 10mL をアセトンで 100mL に希釈、定容して E1 濃度 50mg/L のアセトン溶液を調製した (以下、この溶液を E1 の一次原液とする)。

E1 の一次原液 1mL を 1L デュラン瓶に分取、窒素ガスを穏やかに吹き付けアセトンを完全に留去した。ここにイオン交換水 1L を加え、翌日までスターラーで緩やかに攪拌して E1 を完全に溶解させ、E1 濃度 50μg/L の水溶液を調

製した。これを流水式曝露装置上での試験液調製に用いるE1原液とした。E1原液は、曝露区ごとに調製した。

曝露期間中、各曝露区のE1原液は、3日ごとに新調して交換した。

3) 試験液の調製濃度および流量

各曝露区の試験水槽に供給する試験液のE1濃度は、水槽内での吸着や分解、供試魚への移行等による濃度低下を考慮して、曝露条件である50ng/Lの110%に相当する55ng/Lとなるように調製した。

16°C区、20°C区、24°C区および28°C区（5カ月齢の雄メダカの曝露区）の各曝露区では、曝露装置の希釈混合槽への希釈水の流量（設定流量）を120mL/min、E1原液の流量を132μL/minとした（試験液の換水率：約6換水/日）。24°C_2カ月齢区については、希釈水の流量を70mL/min、E1原液の流量を78μL/minとした（試験液の換水率：約10換水/日）。

5.2.6 曝露操作および曝露中の管理

1) 曝露開始時の操作

E1での曝露（試験液へのE1添加）を開始する直前に、曝露0日（曝露前）におけるVTG濃度分析および遺伝子解析用の肝臓採取に供するため、各曝露区の試験水槽内の雄メダカ（86個体/曝露区）から19個体ずつを取り上げた。その後、各試験水槽への希釈水の供給を止め、水槽内の飼育水にE1濃度が50ng/LとなるようにE1原液を添加した。また、この時点から前項3.5に示す方法による流水式によるE1が添加された試験液の供給を開始した。

2) 曝露期間中の管理

曝露期間中は、毎日、各曝露区について死亡個体の有無、行動および外観異常の有無を肉眼的に観察した。死亡個体が見られた場合は、直ちにタモ網で掬い取り水槽内から除去した。餌料は、アルテミアふ化幼生を1回/日の頻度で給餌した（曝露終了日の曝露14日後は無給餌）。給餌量は15分間程度で食べきる量を目安とした。また、給餌から数時間後にサイフォンを用いて水槽内の糞および残餌等を除去した。

3) 曝露期間中の環境測定

各曝露区について、試験液の水温を毎日、pHおよび溶存酸素濃度を週3回の頻度で測定した。水温は検定済みの水銀棒状温度計、pHはガラス電極式水素イオン濃度計（METTLER TOLEDO、MP125）、溶存酸素濃度はポーラログラフ式溶存酸素濃度計（METTLER TOLEDO、MO128）を用いて、それぞれ試験水槽の中央部で測定した。希釈水およびE1原液の流量は毎日測定し、設定流量から少なくとも±1%以上の変動がみられた場合には、流量が設定値になるように再調整した。

4) E1濃度分析試料の採取

曝露0日目（曝露開始日）、曝露2、7および14日後に各曝露区の試験水槽からE1濃度分析に供するための試料（試験液）を採取した。曝露0日目の試料は、前述の曝露開始時における試験水槽へのE1原液の添加および試験水槽への試験液の供給を開始した時点から約4時間後に各試験水槽から採取した。曝露2、7および14日後の試料は、当日の給餌前に採取した。

試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器（500mL容）に採取した。採取量は約1000mLとし、約500mLを直ちに前処理（抽出）に供し、残りは予備としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

5) 遺伝子解析およびVTG分析用肝臓採取に供する個体の取り上げ

曝露0日（曝露前）、曝露2、7および14日後に、各曝露区から表-6に示す個体数の雄メダカを取り上げ、遺伝子解析用およびVTG分析用の肝臓採取に供した。曝露0日目は試験水槽にE1を添加する直前（E1での曝露開始の直前）に、曝露2、7および14日後は当日の給餌前に取り上げた。

供試個体は、小型のネットを用いて試験水槽内の雄メダカから無作為に掬いあげ、曝露区ごとに試験水槽から分取した試験液（約1.5L）を入れた手付きビーカーに収容して解剖作業を行う実験室に搬入した。

5.2.7 E1濃度分析

表-6 水温影響調査の曝露試験における遺伝子解析およびVTG分析用雄メダカの供試個体数

曝露区		曝露期間			
		0日	2日	7日	14日
16°C区	VTG分析用	10	10	10	10
20°C区	VTG分析用	10	10	10	10
24°C区	VTG分析用	10	10	10	10
28°C区	VTG分析用	10	10	10	10
24°C_2カ月齢区	VTG分析用	10	10	10	10

水温影響調査および餌の影響調査の曝露試験で採取した各曝露区の試験液および飼育水中の E1 濃度は、「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS で測定した。

5.2.8 肝臓中の VTG 濃度分析

VTG 濃度分析に供するための肝臓を採取した。肝臓の採取は、試験区ごとに行い、1 個体ずつ氷冷水中で麻酔してから、全長、体長および体重を測定した後、肝臓を摘出し秤量した。

その後、以下の手順で VTG の濃度を測定した。

- ① 肝臓の入った 1.5mL マイクロチューブに氷冷した ELISA キット付属の Assay buffer を肝臓重量 1mg あたり 25 μ L 添加する。
- ② 1.5mL マイクロチューブ用のマイクロホモジナイザーを用いて Assay buffer 中で肝臓をホモジナイズする。
- ③ 冷却遠心機で遠心分離する (4 $^{\circ}$ C、13,000 g \times 10 分間)。
- ④ マイクロピペットを用いて、上層に分離した脂肪を混入させないように中層から上清（肝臓抽出液）を 0.5mL マイクロチューブ 3 本に分取する。

マイクロチューブに採取した肝臓抽出液は、直ちに超低温冷凍庫に入れ、ELISA による VTG 濃度測定に供するまで -70 $^{\circ}$ C 下で凍結保存した。

肝臓抽出液中の VTG 濃度は、メダカの VTG 測定用 ELISA キット (Enbio Madaka vitellogenin ELISA system、株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ) を用いた。ELISA 測定における条件および手順、濃度算出方法は、同キットの説明書に従った。ただし、標準曲線の作成に用いる VTG 標準溶液の濃度は 100、50、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56ng/mL の 7 濃度系列にした（説明書記載の調製濃度は、100、50、20 および 10ng/mL の 4 濃度系列）。

ELISA 測定における定量下限は、標準曲線の作成に用いた VTG 標準溶液の最低濃度である 3.16ng/mL とした。したがって、肝臓中 VTG 濃度の定量下限は、3.16ng/mL に肝臓抽出液の最低希釈倍率 (20 倍) および肝臓のホモジナ

イズに用いた Assay buffer 量 0.025mL/mg-liver を乗じて算出される 1.56ng/mg-liver とした。

5.2.9 試験液中の E1 濃度

曝露 0 日目および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から採取した試験液中の E1 濃度の測定結果を表-7 に示す。

16 $^{\circ}$ C区、20 $^{\circ}$ C区および 24 $^{\circ}$ C_2 カ月齢区の試験液中の E1 濃度は、曝露期間を通して 50~56ng/L の範囲にあり、設定濃度 (50ng/L) の 100~111%、試験液調製における E1 添加濃度 (55ng/L) の 91~101%を維持していた。また、各測定日間のばらつきも小さかった。24 $^{\circ}$ C区は、曝露 7 日後まで 50ng/L 以上を維持していたが、14 日後の濃度は 48.7ng/L とやや低かった。一方、28 $^{\circ}$ C区の E1 濃度には経時的な漸減傾向がみられ、曝露 7 日後および 14 日後の濃度 (42.8 および 29.7ng/L) は、他の曝露区の 80%および 55%程度と低かった。28 $^{\circ}$ C区の曝露 7 日後および 14 日後については、予備試料（採水直後にアスコルビン酸を添加、冷蔵保存したもの）として保存した試験液を用いた再測定を行ったが、再測定値も 43.0ng/L および 30.9ng/L とほぼ同じ濃度であった。

曝露期間中に測定した 28 $^{\circ}$ C区における希釈水および E1 原液の実測流量は、曝露期間を通して設定流量の \pm 3%以内の変動で維持されていたことから、E1 原液添加量の低下が、試験水での濃度低下の原因ではないと考えられる。

前述のように 24 $^{\circ}$ C区においても曝露 7 日後から 14 日後にかけて若干の濃度低下がみられたことから、試験水の水温に依存的に試験水槽内でのバクテリア等による E1 の分解が促進され、結果として最も水温が高い 28 $^{\circ}$ C区で顕著な濃度低下が生じた可能性が考えられる。なお、24 $^{\circ}$ C区と同じ水温条件の 24 $^{\circ}$ C_2 カ月齢区では、試験液の換水率が 10 換水/日と 24 $^{\circ}$ C区 (6 換水/日) よりも大きかったため、濃度低下がみられなかったと推察される。

各曝露区における曝露 0 日目から曝露 2、7 または 14 日後までの試験液中の平均 E1 濃度、すなわち曝露 2、7 または 14 日後に各曝露区から取り上げた雄メダカの曝露

表-7 水温影響調査の曝露試験における試験液中の E1 濃度

曝露区	E1 濃度 (ng/L)			
	曝露 0 日目	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
16 $^{\circ}$ C区	54.0	55.5	52.5	54.6
20 $^{\circ}$ C区	54.6	54.0	50.2	51.1
24 $^{\circ}$ C区	52.9	55.3	51.0	48.7
28 $^{\circ}$ C区	52.3	50.8	42.8	29.7
24 $^{\circ}$ C_2 カ月齢区	53.8	53.6	55.1	54.7

開始から取り上げ日までの試験液中のE1による平均曝露 24℃_2カ月齢区が23.6~23.8℃と、いずれの曝露区にお

表-8 各曝露期間における試験液の平均E1濃度

曝露区	平均E1濃度 (ng/L)		
	0日目~2日後	0日目~7日後	0日目~14日後
16℃区	54.8	54.0	54.2
20℃区	54.3	52.9	52.5
24℃区	54.1	53.1	52.0
28℃区	51.6	48.6	43.9
24℃_2カ月齢区	53.7	54.2	54.3

表-9 水温影響調査の曝露試験における曝露期間中の水温

曝露区	曝露期間中の最低~最高水温および平均水温 (°C)	
	水銀温度計での測定	磁気記録式水温計での測定
16℃区	15.1 ~ 16.3 (15.8)	15.0 ~ 16.4 (15.8)
20℃区	19.3 ~ 20.8 (20.2)	19.1 ~ 21.0 (20.4)
24℃区	24.3 ~ 24.8 (24.5)	23.6 ~ 24.8 (24.2)
28℃区	27.8 ~ 28.4 (28.1)	27.7 ~ 28.6 (28.1)
24℃_2カ月齢区	23.6 ~ 23.8 (23.7)	—

表-10 水温影響調査の曝露試験における曝露期間中のpHおよび溶存酸素濃度

曝露区	最低~最高		
	pH	DO (mg/L)	DO飽和度 (%)
16℃区	7.1 ~ 7.6	6.8 ~ 7.9	70 ~ 82
20℃区	7.3 ~ 7.7	6.5 ~ 7.9	73 ~ 87
24℃区	7.3 ~ 7.9	6.4 ~ 7.4	78 ~ 87
28℃区	7.3 ~ 7.9	5.8 ~ 7.0	75 ~ 86
24℃_2カ月齢区	7.4 ~ 7.7	6.2 ~ 7.1	75 ~ 86

注) 括弧内の数値は平均水温を示す。24℃_2カ月齢区は、磁気記録式水温計による測定を行わなかった。

濃度を表-8に示す。曝露0日目~2日後の平均E1濃度は、28℃区でやや低かったものの、曝露区間の差は最大で3.2ng/Lと比較的小さかった。曝露0日目~7日後および14日後の平均濃度は、28℃区を除く曝露区間では最大差は1.3ng/Lおよび2.3ng/Lと小さかった。28℃区の曝露0日目~7日後および14日後の平均濃度は48.6および43.9ng/Lと、他の曝露区より10~20%程度低い濃度であった。

5.2.10 曝露期間中の生育環境の変化

曝露期間中の各曝露区における水温の範囲(最低~最高)および平均を表-9に示す。曝露期間中の平均水温は、各曝露区とも水温条件の±0.5℃以内であった。曝露期間中の変動範囲も、16℃区が15.0~16.4℃、20℃区が19.1~21.0℃、24℃区が23.6~24.8℃、28℃区が27.7~28.6℃、

いても水温条件の±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区におけるpH、溶存酸素濃度(DO)および溶存酸素飽和度の曝露期間中の範囲(最低~最高)を表-10に示す。各曝露区のpHおよび溶存酸素濃度は、曝露0、1、6、9、12および14日目に測定した。各曝露区のpHは7.1~7.9の範囲にあった。溶存酸素濃度は、5.8mg/L以上(飽和度として70%以上)であった。pHおよび溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通してOECD化学品テストガイドラインTG203(6)(魚類の急性毒性試験)で試験環境として推奨される範囲(pH;6.0~8.5、溶存酸素飽和度;60%以上)を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pHおよび溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件ま

たは一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

曝露期間中、28℃区で曝露 6 日後に 1 個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

5.2.11 供試個体の全長および体重

曝露 0 日（曝露前）および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中 VTG 濃度分析に供した 10 個体の平均全長および体重を表-11 に示す。

5 カ月齢の雄メダカを曝露に供した 16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区の平均体重には、相対的に水温の低い条件区が大きく、水温の高い条件区ほど小さい傾向がみられた。

5.2.12 肝指数

曝露 0 日および曝露 2、7 および 14 日後に各試験水槽から取り上げ、肝臓中 VTG 濃度分析に供した雄メダカの肝指数（10 個体／曝露区の平均）を図-16 に示す。

各曝露区の肝指数は、曝露 0 日（曝露前）から曝露 14 日後にかけて低下する傾向がみられた。また、曝露 0 日および曝露 2、7 および 14 日後とも、水温が低い条件区で肝指数が大きく、水温が高い条件区ほど肝指数が小さい傾向がみられた。肝臓採取の観察では、水温が低い条件区において色調がクリーム色の脂肪を多く蓄積した肝臓

を持つ個体が多くみられた。これはより低い水温条件下で飼育された個体ほど、基礎代謝量が小さく餌料から吸収した脂肪の肝臓への蓄積量が多かったためと考えられる。

5.2.13 肝臓中の VTG 濃度

曝露 0 日（曝露前）、曝露 2、7 および 14 日後に取り上げた雄メダカ（10 個体／曝露区）の肝臓中 VTG 濃度（各曝露区 10 個体の平均濃度）を図-17、10 個体のうち VTG 濃度が定量下限以上であった個体数を図-18 に示す。

5 カ月齢の雄メダカ（16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区）では、曝露前の VTG 濃度（VTG）は、16℃区および 20℃区は全個体、24℃区は 8 個体、28℃区は 4 個体が定量下限未満（<1.56ng/mg）であった。また、定量下限以上の個体（24℃区の 2 個体および 28℃区の 6 個体）の VTG も 1.6~1.7ng/mg と低い濃度であった。曝露 2 日後も、16℃区は全個体が定量下限未満であった。20℃区、24℃区および 28℃区では、VTG が定量下限以上の個体が 2、2 および 7 個体みられ、このうち VTG 2ng/mg 以上の個体は、1、2 および 3 個体と僅かではあるが水温に依存して増加する傾向にあった。曝露 7 日後には、16℃区を除く各曝露区の全個体で VTG は定量下限以上となり、16℃区、20℃区および 24℃区の平均 VTG は 2.3±1.5ng/mg、5.7±7.6ng/mg および 10.4±7.7ng/mg と水温に依存した漸増傾向がみられた。しかし、28℃区については、全個体の VTG が定量下限以上であったが、平均 VTG は 3.5±2.0ng/mg と 24℃区および 20℃区よりも低かった。

表-11 水温影響調査の曝露試験で VTG 濃度分析に供した雄メダカの全長および体重

曝露区	平均全長 (mm)			
	曝露 0 日	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
16℃区	32.9 ± 1.5	33.5 ± 1.6	33.7 ± 2.1	35.5 ± 1.1
20℃区	35.0 ± 1.0	33.6 ± 1.9	35.1 ± 1.0	34.7 ± 1.3
24℃区	32.3 ± 1.1	34.4 ± 1.6	34.1 ± 2.0	33.7 ± 1.8
28℃区	33.9 ± 2.0	32.5 ± 2.0	31.7 ± 1.4	33.7 ± 1.4
24℃_2 カ月齢区	27.6 ± 1.3	28.4 ± 1.0	28.4 ± 0.9	29.7 ± 1.1
曝露区	平均体重 (mg)			
	曝露 0 日	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
16℃区	474 ± 95	453 ± 94	505 ± 91	502 ± 64
20℃区	515 ± 48	439 ± 67	503 ± 61	481 ± 54
24℃区	413 ± 48	437 ± 77	470 ± 80	428 ± 63
28℃区	432 ± 84	348 ± 60	361 ± 34	412 ± 64
24℃_2 カ月齢区	263 ± 27	249 ± 37	263 ± 30	280 ± 34

注) データは、10 個体の平均±標準偏差を示す。

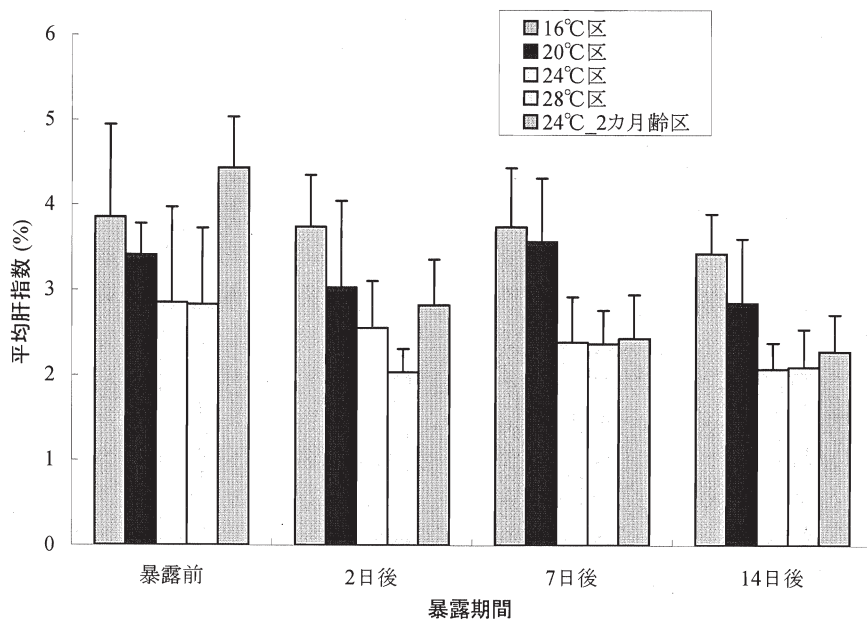


図-16 水温影響調査の曝露試験における雄メダカの肝指数
(グラフに付したバーは標準偏差を示す。)

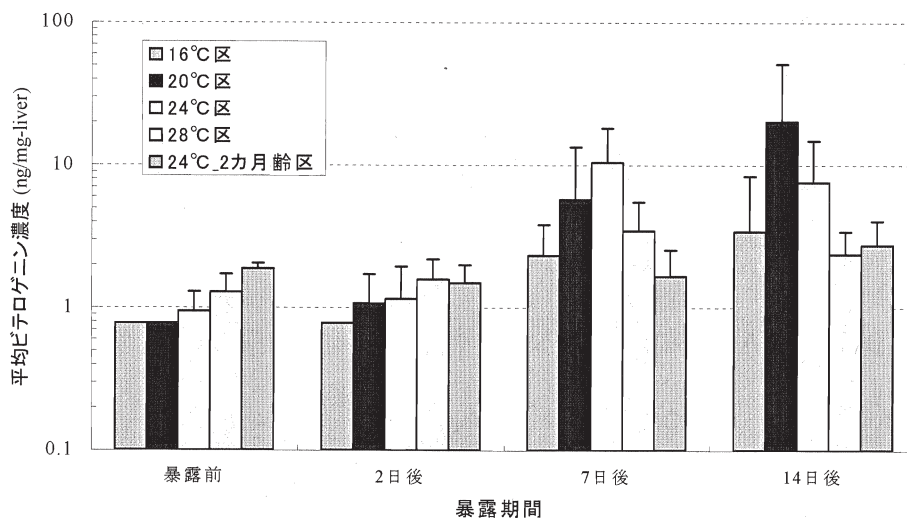


図-17 水温影響調査の曝露試験における雄メダカの肝臓中
VTG 濃度 (グラフに付したバーは標準偏差を示す。)

曝露 14 日後は、16°C 区の 4 個体、20°C 区の 2 個体、24°C 区および 28°C 区の 1 個体は、VTG が定量下限未満であった。しかし、16°C 区および 20°C 区では、平均 VTG は 7 日後よりも高かった。24°C 区および 28°C 区では、14 日後の平均 VTG は 7 日後より低くなった。以上のように、5 カ月齢の雄メダカの各曝露区では、総体的にみると、各曝露区とも曝露 7 日後から比較的明瞭な VTG 生成がみられたが、VTG が定量下限未満または定量下限付近の個体もみられるなど個体間のばらつきも大きかった。

2 カ月齢の雄メダカを曝露に供した 24°C_2 カ月齢区は、曝露前は全個体の VTG が定量下限以上であり、このうち 2 個体は VTG が 2ng/mg 以上であった。曝露 2 日後も 7 個体が定量下限以上であったが、いずれも VTG は 2ng/mg 未満であった。曝露 7 日後は 7 個体、14 日後は全個体の VTG が定量下限以上であり、ともに 6 個体の VTG は 2ng/mg 以上であった。また平均 VTG は、曝露 7 日後から 14 日後にかけて増加傾向がみられたが、14 日後でも 2.8 ± 1.3 ng/mg と低く、5 カ月齢の雄メダカを供した 24°C 区のような曝露期間に依存した明瞭な増加傾向はみられなかった。

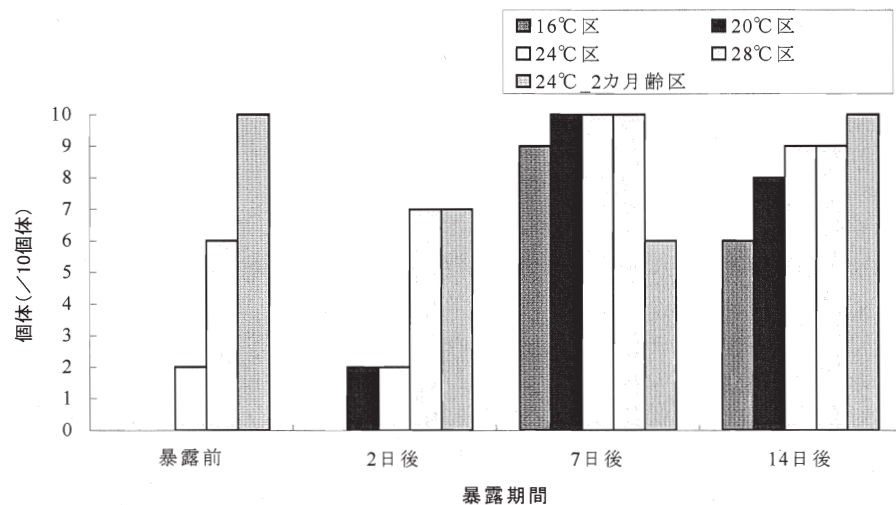


図-18 VTG 濃度が定量下限以上の個体数

各曝露区における曝露日間（曝露0日、曝露2、7および14日後）のVTG濃度について行った有意差検定の結果を表-12に示す。16°C区、20°C区、24°C区および28°C区の各曝露区とも、曝露2日後と曝露0日（曝露前）のVTGに統計学的な有意差は認められなかったが、曝露7日後および14日後のVTGは、曝露0日のVTGと比べて有意に高かった。16°C区、20°C区および24°C区については、曝露7日後および14日後のVTGは2日後と比べても有意に高かったが、28°C区では7日後および14日後のVTGと2日後のVTGに有意差は認められなかった。また、各曝露区とも、7日後と14日後のVTGに有意差は認められなかった。24°C_2カ月齢区については、すべての曝露日間についてVTGに統計学的な有意差は認められなかった。

曝露0日（曝露前）および曝露2、7および14日後における各曝露区間のVTG濃度について行った有意差検定の結果を表-13に示す。曝露前は、28°C区のVTGが16°C区および20°C区に比べて有意に高かったが、16°C区、20°C区および24°C区の各曝露区間には有意差は認められなかった。曝露2日後のVTGも、28°C区と16°C区には有意差が認められたが、他の曝露区間に有意差は認められなかった。曝露7日後のVTGは、24°C区が16°C区、20°C区および28°C区に比べて有意に高く、24°C区以外の曝露区間に有意差は認められなかった。曝露14日後は、各曝露区間のVTGに有意差は認められなかった。

同一水温条件で曝露した5カ月齢の雄メダカ（24°C区）と2カ月齢の雄メダカ（24°C_2カ月齢区）について、曝

表-12 各曝露区における曝露日数間のVTG濃度の検定結果

	16°C区	20°C区	24°C区	28°C区	24°C_2カ月齢区
0日 vs 2日後	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
0日 vs 7日後	0日<7日 (p<0.01)	0日<7日 (p<0.01)	0日<7日 (p<0.01)	0日<7日 (p<0.01)	N. S.
0日 vs 14日後	0日<14日 (p<0.05)	0日<14日 (p<0.01)	0日<14日 (p<0.01)	0日<14日 (p<0.05)	N. S.
2日後 vs 7日後	2日<7日 (p<0.01)	2日<7日 (p<0.01)	2日<7日 (p<0.01)	N. S.	N. S.
2日後 vs 14日後	2日<14日 (p<0.05)	2日<14日 (p<0.05)	2日<14日 (p<0.01)	N. S.	N. S.
7日後 vs 14日後	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.

注) N. S. は比較した曝露日間のVTGに統計学的な有意差が認められなかったことを示す。(p<0.05)および(p<0.01)は、有意水準0.05または0.01で比較した曝露日間のVTGに上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

表-13 各曝露期間における各曝露区の VTG 濃度の検定結果

	曝露前	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
16°C区 vs 20°C区	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
16°C区 vs 24°C区	N. S.	N. S.	16°C<24°C (p<0.01)	N. S.
16°C区 vs 28°C区	16°C<28°C (p<0.05)	16°C<28°C (p<0.05)	N. S.	N. S.
20°C区 vs 24°C区	N. S.	N. S.	20°C<24°C (p<0.05)	N. S.
20°C区 vs 28°C区	20°C<28°C (p<0.05)	N. S.	N. S.	N. S.
24°C区 vs 28°C区	N. S.	N. S.	24°C>28°C (p<0.05)	N. S.

注) N. S. は比較した曝露区間の VTG に統計学的な有意差が認められなかったことを示す。(p<0.05)および(p<0.01)は、有意水準 0.05 または 0.01 で比較した曝露区間の VTG に上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

露前および曝露 2、7 および 14 日後における VTG の有意差検定を行った結果、曝露 2 日後および 14 日後は両曝露区の VTG に統計学的な有意差は認められなかった。曝露前および曝露 7 日後は両曝露区の VTG に有意差 (p<0.01) が認められたが、曝露前は 24°C_2 カ月齢区の VTG が 24°C 区より高く、曝露 7 日後は、逆に、24°C 区の VTG が 24°C_2 カ月齢区よりも高かった。

5.2.14 メダカへの E1 曝露による水温および餌の影響

水温影響調査の曝露試験に供した 5 カ月齢の雄メダカでは、曝露 0 日 (曝露前) の VTG は最も高い個体でも 1.7ng/mg と各曝露区とも総体的に低かった。しかし、VTG が定量下限以上であった個体数でみると、16°C区および 20°C区が 0 個体、24°C区が 2 個体、28°C区が 6 個体と、水温に依存した増加傾向がみられた。また、統計学的にも 16°C区および 20°C区と 28°C区の VTG には有意差が認められた。これらの結果は、馴化期間中の水温条件の差が、雄メダカの VTG の差を生じさせた要因となったことを示

唆している。より高い水温での飼育 (馴化) において雄メダカの VTG 生成量が多くなった可能性も考えられるが、本試験の場合は、各曝露区間の肝指数の差が VTG に僅かな差異を生じさせたと推察される。曝露前に取り上げた雄メダカの平均肝指数は、16°C区の $3.9 \pm 1.1\%$ 、20°C区の $3.4 \pm 0.4\%$ に対して、28°C区は $2.8 \pm 0.9\%$ と相対的に小さかった。また、個体ごとにみると、28°C区の 10 個体のうち、VTG が定量下限未満であった 4 個体の平均肝指数は $3.4 \pm 1.2\%$ と 16°C区および 20°C区と同程度であったのに対して、VTG が定量下限以上であった 6 個体の平均肝指数は $2.4 \pm 0.4\%$ と相対的に小さかった。馴化期間中に飼育

水の水温を 24°C から 28°C に上昇させた 28°C 区では雄メダカの基礎代謝量が大きくなり、逆に水温を低下させた 16°C 区や 20°C 区に比べて肝指数 (肝臓重量) が小さくなったと考えられる。VTG は肝臓 1mg あたりの VTG 量として算出されるため、馴化飼育の開始から終了 (曝露前の雄メダカの取り上げ時) まで VTG の生成状況 (肝臓中の VTG 量) が変化しなくても、この間に肝臓重量が低下すると VTG は相対的に大きくなる。28°C 区では、馴化期間中に肝臓重量が比較的大きく低下した一部の個体で、結果的に曝露前の VTG が高くなったと考えられる。

これらのことから、16~28°C の範囲であれば水温条件の差異は、エストロゲン様物質を含まない飼育水 (脱塩素水道水) 中で飼育された雄メダカの VTG 生成に影響を及ぼさなかったことが示唆された。しかし一方で、馴化あるいは曝露期間中の水温変化は肝指数 (肝臓重量) を変動させる要因となり、結果として、僅かではあるものの VTG を変動させる場合があることも示唆された。下水処理水や河川水など環境水を試水とした曝露試験では、曝露に供した雄メダカの VTG の変化 (増加) は比較的小さいと考えられることから、エストロゲン様作用の有無や強さを正確に評価するためには、供試する雄メダカを曝露前に曝露期間と同じ水温条件下で飼育しておくこと、また、曝露期間中に水温が大きく変動しない条件下で試験を実施することが必要と考えられる。

また、Tatarazako et al.¹⁰⁾ は、日本国内で市販されている 2 種の ELISA キットについて、複数の試験機関で同一試料を測定する比較検証を行い、VTG 濃度が定量下限付近の試料において、測定値のばらつきやキット間の差異が大きくなることを報告している。前述のような曝露試験

から得られた結果については、とくに曝露した雄メダカの VTG の増加が定量下限を僅かに超える程度であった場合、ELISA 測定における誤差に起因する変化である可能性も念頭に置いて評価することが必要と考えられる。

5.2.15 E1 曝露における雄メダカの VTG 生成への影響

水温影響調査の曝露試験では、16°C区、20°C区、24°C区および28°C区における曝露2日後のVTGは、曝露前のVTGと統計学的に有意差は認められなかった。また、VTGが定量下限以上の個体数にも明瞭な増加傾向はみられなかった。これらの結果から、50ng/L前後のE1による2日間の曝露は、水温によらず雄メダカに有意なVTG生成を誘導しないことが示唆された。一方、曝露7日後および14日後のVTGは、各曝露区とも曝露前と統計学的な有意差が認められ、水温が16~28°Cの範囲にあれば、水温によらず少なくとも7日間の曝露で雄メダカに有意なVTG生成を誘導することが示唆された。

また、曝露7日後の平均VTGには、16°C区から24°C区まで水温に依存した漸増傾向がみられ、統計学的にも20°C区のVTGは16°C区よりも有意に高く、24°C区のVTGは16°C区および20°C区よりも有意に高くなった。各曝露区とも9個体以上のVTGが定量下限以上であったが(図18)、このうちVTGが定量下限の2倍以上であった個体に着目すると、その個体数には16°C区から24°C区まで水温に依存した明瞭な増加傾向がみられた(図19)。前述のように、曝露前における各曝露区間のVTGの差異は、肝指数に依存して生じたものと推察された。曝露7日後においても、16°C区および20°C区の平均肝指数(3.7±0.7%および3.6±0.7%)に比べて24°C区の平均

肝指数(2.4±0.5%)は小さく(図19)、VTGが16°C区あるいは20°C区よりも相対的に高い値を示した可能性も考えられる。しかし、肝指数が同程度であった16°C区と20°C区間のVTGに比較的明瞭な差異がみられることから、7日後にみられた各曝露区間のVTGの差は、水温条件の差異によって生じたものと考えられる。Ishibashi et al. (2001)は、10°Cと30°Cの各水温条件下でキングヨを17β-estradiol(100μg/L)に曝露した場合に、10°Cよりも30°Cにおいて血漿中のVTGに急激な増加がみられ、曝露1、5あるいは10日後の血漿中濃度も30°Cでの曝露で高くなったこと報告している¹¹⁾。本調査の結果もこれと一致するものであった。これらのことから、エストロゲン物質で曝露された雄メダカのVTG生成は、水温の影響を受け、16~24°Cの水温条件下では、水温の上昇に依存してVTGを生成する個体数が増加し、肝臓中の濃度も相対的に高くなることが示唆された。

一方、曝露14日後においても、VTGが定量下限の2倍以上であった個体数には、7日後と同様に16°C区から24°C区にかけて水温に依存した増加傾向がみられた。しかし、各曝露区のVTGには統計学的な有意差は認められなかった。また、24°C区については、平均VTGおよびVTGが定量下限の2倍以上であった個体数は7日後よりも少なかった。これらの結果から、比較的低い水温条件下(例えば20°C以下)では、VTGを生成する個体は曝露期間に依存して増加し、VTGを生成している個体のVTGも相対的に増加するものの、水温が相対的に高い条件では、これらが必ずしも曝露期間に依存して増加しない場合もあることが示唆された。

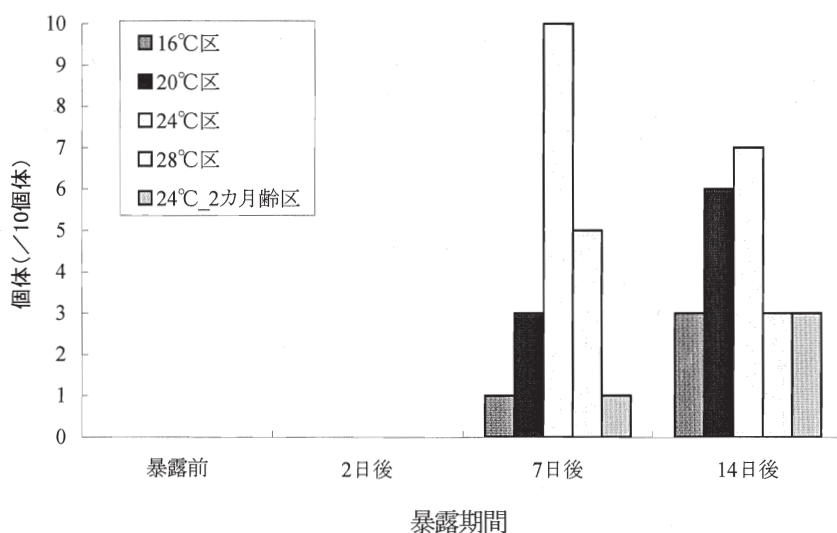


図-19 ヒドロゲン濃度が定量下限の2倍以上の個体数(水温影響調査の曝露試験)

雄メダカの VTG 生成を指標として環境水のエストロゲン作用を評価する場合、試水の水温が 20°C 程度あるいはそれ以下であれば、曝露試験の期間（雄メダカの曝露期間）を相対的に長くすること（例えば、14 日間またはそれ以上）が、適正な評価のために必要と考えられる。しかし、試水の水温が 24°C 程度あるいはそれ以上であれば、曝露期間を長くすることは必ずしも適正な評価のためには必要ではなく、逆に曝露試験の結果あるいはその解釈を曖昧にする要因になることもあると考えられる。

なお、水温影響調査の曝露試験では、28°C 区の曝露 7 日後の VTG は、16°C 区および 20°C 区と統計学的な有意差はみられず、また 24°C 区よりも有意に低かった。28°C 区については、曝露 7 日後および 14 日後に測定した試験液中の E1 濃度は、16°C 区から 24°C 区の平均濃度の 84% および 58% と低く、曝露 2 日後以降、14 日後まで漸減していたと考えられる。当施設で実施した試験から得られた曝露 7 日後または 14 日後の雄メダカにおける VTG 生成に対する E1 の最小作用濃度は 79.5 ng/L、最大無作用濃度は 31.6 ng/L であった。また、17 β -estradiol で曝露した雄メダカを清浄な飼育水に戻して飼育すると、血清中の VTG は経時的に低下することが報告され¹²⁾、本試験の結果では、肝臓中 VTG (17 β -estradiol で曝露直後の濃度は約 200 ng/mg) の半減期は約 5 日と見積もられた。水温影響調査の曝露試験における曝露濃度 (50 ng/L) は最小作用濃度 (閾値) に近い濃度であり、28°C 区における曝露 14 日後の E1 濃度は、無作用濃度付近もしくはそれ以下であると考えられる。28°C 区については、試験液中の E1 濃度が無作用濃度付近まで低下したために、VTG を生成した個体も少なく、また VTG を生成した個体も代謝の増大による VTG の低下速度が相対的に大きかった結果、曝露 14 日後あるいは 7 日後における VTG が相対的に低くなったと推察される。

5.2.16 雄メダカの月齢と VTG 生成の関連性

水温影響調査の曝露試験に供した 2 カ月齢の雄メダカ (24°C_2 カ月齢区) では、曝露前の VTG は全個体が定量下限以上であり、統計学的にも同じ水温条件である 5 カ月齢の雄メダカ (24°C 区) より有意に高かった。24°C_2 カ月齢区の平均肝指数は 24°C 区よりも大きかったことから、両曝露区間の VTG の差は肝指数の差に起因したものではないことが示唆される。すなわち、試験に供した 2 カ月齢と 5 カ月齢の雄メダカでは、曝露前の VTG 生成量が異なっていたと考えられる。曝露前の VTG 生成量に差を生じさせた要因として、曝露試験に供するまでの飼育条件の違いが考えられる。5 カ月齢の雄メダカは、曝露試験に供する約 2 カ月前から雄個体のみで飼育されていた

のに対して、2 カ月齢の雄メダカは試験に供する 5~7 日前まで雌雄一緒に飼育されていた。このため 2 カ月齢の雄メダカでは、雌個体 (雌メダカ) が排泄したエストロゲンの影響で VTG が生成され、5 カ月齢の雄メダカよりも曝露前の VTG が高くなっていた可能性が考えられる。水温影響調査の曝露試験では、24°C_2 カ月齢区における VTG が定量下限以上であった個体数は曝露前から曝露 7 日後まで漸減し、5 カ月齢の雄メダカ (24°C 区) とは異なる傾向を示した。また、曝露 7 日後および 14 日後とも、24°C_2 カ月齢区で VTG が定量下限の 2 倍以上であった個体数は 24°C 区より少なく、これらの個体の VTG も 24°C 区より相対的に低かった。すなわち、水温影響調査の曝露試験に供した 2 カ月齢の雄メダカについては、E1 (エストロゲン物質) に対する感受性が 5 カ月齢の雄メダカよりも相対的に低かったことが示唆される。このようなエストロゲン物質に対する感受性の差がどのような要因で生じたか特定することはできないが、前述のような供試前の飼育環境と関連している可能性も考えられる。したがって、環境水のエストロゲン作用を評価するための曝露試験に供する雄メダカは、供試前の十分な期間 (例えば少なくとも 1 カ月以上)、雄個体のみで飼育しておくことが望ましいと考えられる。

5.3 餌を通してのエストロゲンの曝露

E1 を添加した配合飼料 (0、15、150 および 1500 ng/g-餌料の 4 条件) を月齢 5 カ月の雄メダカに 2 回/日の頻度で給餌して曝露した (最長 14 日間)。曝露前および曝露開始から 2、7 および 14 日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中の VTG 濃度を測定した。各条件での肝臓中 VTG 濃度から、餌料を通じた E1 曝露 (経口曝露) における雄メダカの VTG 生成について、餌料中 E1 濃度との関係やその経時的変化など餌料の及ぼす影響について検討した。

5.3.1 曝露濃度および曝露区の設定

餌の影響調査の曝露試験では、飼料中濃度が 0、15、150 および 1500 ng/g 程度となるように E1 を添加した配合飼料を調製し、これらを 5 カ月齢の雄メダカに与えて E1 で曝露した。E1 濃度 0、15、150 および 1500 ng/g の飼料を給餌する条件をそれぞれ 0 ng/g 区、15 ng/g 区、150 ng/g 区および 1500 ng/g 区と表記する。

曝露条件を表-14 に示す。本試験における雄メダカの曝露は、以下に示す室温を 24°C に設定した大気循環型安定性試験室 (タバイエスペック株式会社) に設置された流水式曝露装置 (図-20) を用いて実施した。本試験では、曝露装置の下部と上部の希釈水タンクを循環させ水温調

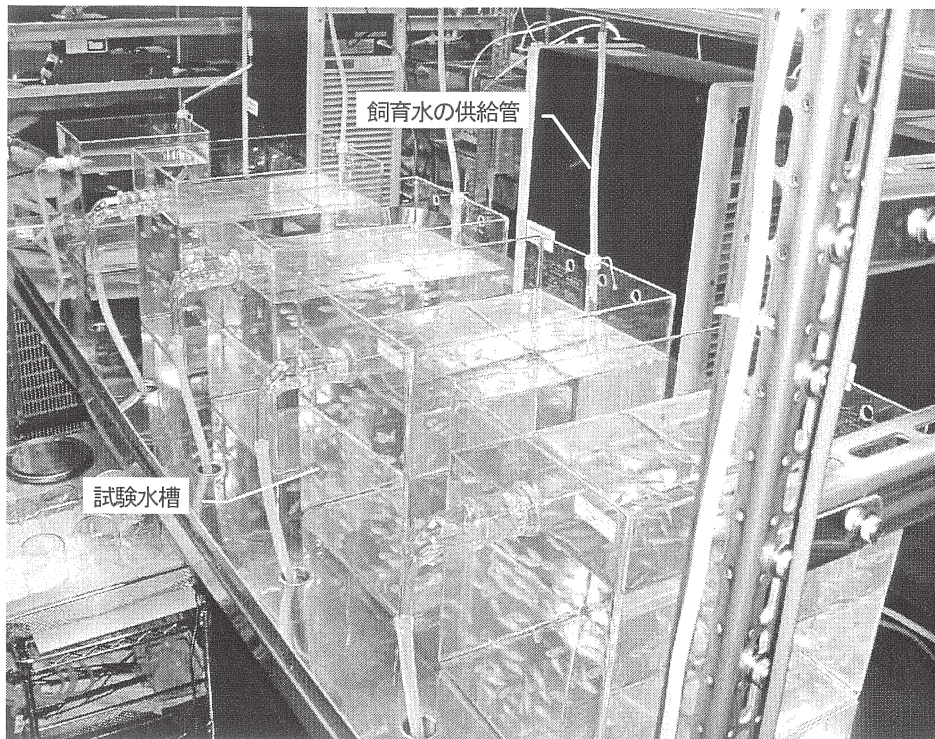


図-20 餌の影響調査の曝露試験に用いた流水式曝露装置

表 14 餌の影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	:	E1 添加飼料の給餌による曝露
設定曝露濃度	:	飼料中 E1 濃度として、0、15、150 および 1500ng/g
E1 添加飼料の給餌	:	2 回/日、飽食を目安に給餌
飼育水	:	脱塩素水道水による流水式
飼育水の換水率	:	5 換水/日以上
水温	:	24±2℃
曝露期間	:	2、7、14 日間
供試生物	:	雄メダカ (ヒメダカ系)
供試生物の月齢	:	5 カ月齢
供試生物数	:	84 個体 (0ng/g 区) 65 個体 (15ng/g 区、 150ng/g 区 および 1500ng/g 区)
照明	:	昼光用蛍光灯光、明期 16 時間/暗期 8 時間

整器 (東京理化株式会社、クーリングサーモポンプ CTP-102) で水温を 24±1℃に調節した脱塩素水道水を飼育水として試験水槽に供給した。飼育水は、装置上部の

希釈水タンクから希釈水槽の供給、さらに下面のガラス製キャピラリー管を通して各試験水槽に一定流量で供給した。試験水槽は、各曝露区とも水量が 20L となる位置に排水口 (ガラス製) を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。各試験水槽への飼育水の供給量 (流量) は 100mL/min (7.2 換水/日) とした。なお、本試験に用いた曝露装置および試験水槽は、試験水槽に供給する飼育水との接液部には内分泌かく乱作用を持つ化学物質を溶出しにくい素材 (ガラス、ステンレス鋼、PTFE および PFE のテフロン、シリコン) のみを使用されている。

本試験に供した雄メダカは、曝露開始の 14 日以上前から試験と同じ環境下で飼育した。曝露開始の 14 日前からそれまでのアルテミアふ化幼生から配合飼料 (おとひめ B-2、日清飼料) に切り替え、曝露期間中に給餌する配合飼料に馴化させた。

5.3.2 E1 添加飼料の調製

曝露期間中に各曝露区の雄メダカに給餌する E1 添加飼料は、以下に示す方法を用いて顆粒状の配合飼料に E1 を添加、吸着させて調製した。

1) 配合飼料

E1 添加飼料の調製には、海産魚類用配合飼料「おとひめ B-2 (日清飼料)」を用いた。

2) E1 の添加濃度

1500ng/g 区、150ng/g 区および 15ng/g 区用の飼料は、配合飼料に E1 をアセトンに溶解して添加し、アセトンを窒素ガスの吹き付けで留去する方法を用いて調製した。調製に際して飼料に添加する E1 量は、アセトン留去において E1 の一部が調製容器等に残留する可能性を勘案して、設定飼料中濃度 (1500、150 および 15ng/g) の 110%相当量とした。

3) 調製方法

E1 16.7mg を 100mL のアセトン (農薬分析用、和光純薬工業株式会社) に溶解して E1 濃度 167μg/mL のアセトン溶液を調製し、これをアセトンで段階的に希釈にして、1670、167 および 16.7ng/mL のアセトン溶液を調製した。1500ng/g 区の E1 添加飼料は、ガラスビーカーに分取した配合飼料 50g に E1 濃度 1670ng/mL のアセトン溶液 50mL を添加、よく混合した後、窒素ガスを穏やかに吹き付けてアセトンを留去して調製した。150ng/g 区および 15ng/g 区の E1 添加飼料も同様の手順で 167 および 16.7ng/mL のアセトン溶液を用いて各 50g を調製した。0ng/g 区の飼料は、無処理の配合飼料とした。

4) 飼料中の E1 濃度測定

調製した各 E1 添加飼料から約 5g を分取して、E1 濃度分析に供した。

5.3.3 曝露中の操作および管理

1) E1 添加飼料の給餌

表-15 に示した個体数を水槽に入れ試験を行った。曝露期間中は、1 日に 2 回 (午前 9 時頃および午後 3 時頃)、各曝露区の雄メダカに E1 添加飼料を給餌した。給餌では、食べ残しがでないように供試魚の摂餌状態をみながら 10~15 分間かけて飼料を少量ずつ与えた。給餌量は飽食量としたが、水槽内の雄メダカの概ね半数以上が飼料に対して積極的な摂餌行動を示さなくなった時点で給餌を終了した。曝露 14 日後 (曝露終了日) は無給餌とした。

表-15 餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの供試個体数

曝露区	曝露期間			
	0 日	2 日	7 日	14 日
0 ng/g 区	10	10	10	10
15 ng/g 区	-	10	10	10
150 ng/g 区	-	10	10	10
1500 ng/g 区	-	10	10	10

2) 曝露期間中の管理

曝露期間中は、毎日、各曝露区について死亡個体の有

無、行動および外観異常の有無を肉眼的に観察した。死亡個体がみられた場合は、直ちにタモ網で掬い取り水槽内から除去した。また、午後の給餌から約 3 時間後にサイフォンを用いて水槽内の糞および残餌等を除去した。

3) 曝露期間中の環境測定

各曝露区について、試験液の水温を毎日、pH および溶存酸素濃度を週 3 回の頻度で測定した。水温は検定済みの水銀棒状温度計、pH はガラス電極式水素イオン濃度計 (METTLER TOLEDO、MP125)、溶存酸素濃度はポーラログラフ式溶存酸素濃度計 (METTLER TOLEDO、MO128) を用いて、それぞれ試験水槽の中央部で測定した。飼育水の流量は、1 回/日の頻度で測定した。

4) E1 濃度分析試料の採取

曝露 2、7 および 14 日目に各曝露区の試験水槽から E1 濃度分析に供するための試料 (試験液) を採取した。曝露 2 および 7 日目の試料は、当日午前の給餌から約 4 時間後に採取した。曝露 14 日目の試料は、当日の遺伝子解析用の肝臓採取および肝臓中の VTG 濃度分析に供する雄メダカの取り上げ時 (前日午後の給餌から約 17 時間後) に採取した。試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器 (1000mL 容) に採取した。採取量は 2000mL 以上とし、うち 1000mL を直ちに前処理 (抽出) に供し、残りは予備試料としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

供試個体は、小型のネットを用いて試験水槽内の雄メダカから無作為に掬いあげ、曝露区ごとに水温 24±2℃ の脱塩素水道水 (約 1.5L) を入れた手付きビーカーに収容して解剖作業を行う実験室に搬入した。

5.3.4 飼料中の E1 濃度測定

餌の影響調査の曝露試験に用いた E1 添加飼料中の E1 濃度は、「下水試験方法 (追補暫定版) 2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS で測定した。

0ng/g 区、15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区用に調製した E1 添加飼料中の E1 濃度の測定結果を表-16 に示す。0ng/g 区用飼料 (E1 無添加) 中の E1 濃度は、定

飼料	E1 濃度 (ng/g)	
	実測濃度	添加濃度
0 ng/g 区用	ND	0
15 ng/g 区用	30.0	16.7
150 ng/g 区用	355	167
1500 ng/g 区用	2330	1670

注) ND は定量下限未満 (0.3ng/g 未満) を示す。

量下限未満であった。15ng/g 区、150ng/g 区および1500ng/g 区用に調製した各飼料中 E1 の実測濃度は、30.0、355 および 2330ng/g であった。これは添加濃度の 1.5～2.3 倍に相当する濃度であった。飼料中の E1 濃度が添加濃度以上になることは考えにくいことから、実測濃度と添加濃度の解離は、飼料中の E1 濃度が均一でなかった等によって生じた誤差の可能性が考えられる。

5.3.5 試験環境

曝露期間中の各曝露区における水温の範囲（最低～最高）および平均を表-17 に示す。曝露期間中の平均水温は、各曝露区とも 24±0.3℃以内であった。また、曝露期間中の変動範囲も、各曝露区とも 24±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区における pH、溶存酸素濃度 (DO) および溶存酸素飽和度の曝露期間中の範囲（最低～最高）を表-18 に示す。各曝露区は、曝露 0、3、6、9、12 および 14 日目に測定した。各曝露

区の pH は 7.0～8.0 の範囲にあった。溶存酸素濃度は、飼育個体数の多かった曝露開始日が 5.0～5.3mg/L（飽和度として 61～64%）とやや低かったが、曝露 3 日目以降の飽和度は 65%以上であった。pH および溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通して OECD 化学品テストガイドライン TG203 6）（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH ; 6.0～8.5、溶存酸素飽和度; 60%以上）を維持していた。

各曝露区の試験水槽への飼育水の供給量（実測流量）は、曝露期間を通して設定流量（100mL/min、換水率として 7.2 換水/日）の 99～101%の範囲を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pH および溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件または一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

5.3.6 E1 添加飼料の給餌量

曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げた雄

表-17 餌の影響調査の曝露試験における曝露期間中の水温

曝露区	曝露期間中の最低～最高水温 および平均水温 (°C)
0 ng/g 区	23.9 ~ 24.6 (24.3)
15 ng/g 区	23.9 ~ 24.4 (24.1)
150 ng/g 区	23.7 ~ 24.1 (23.9)
1500 ng/g 区	23.6 ~ 24.0 (23.9)

注) 括弧内の数値は平均水温を示す。

表-18 曝露期間中の pH および溶存酸素濃度

曝露区	最低～最高		
	pH	DO (mg/L)	DO 飽和度 (%)
0 ng/g 区	7.0～7.7	5.0～7.6	61～77
15 ng/g 区	7.0～7.7	5.3～7.6	64～79
150 ng/g 区	7.0～7.8	5.3～8.0	64～77
1500 ng/g 区	7.1～8.0	5.2～8.2	63～78

表-19 曝露試験における E1 添加飼料の給餌量

曝露区	給餌量 (mg/個体)		
	曝露期間		
	0～1 日目	0～7 日目	0～14 日目
0 ng/g 区	16.4	59.3	117.4
15 ng/g 区	16.5	51.8	110.1
150 ng/g 区	18.8	60.4	122.2
1500 ng/g 区	17.0	57.3	121.6

注) 給餌量は、各曝露期間中における雄メダカ 1 個体あたりの給餌量を示す。

メダカの曝露開始日（曝露 0 日目）から取り上げ日までの総給餌量を表-19 に示す。各曝露日における 1 個体あたりの給餌量は、各曝露区の総給餌量を飼育個体数で除して算出した。曝露期間中に雄メダカ 1 個体に給餌した 1 日あたりの給餌量は 7.9~8.7mg/day/ind であった。曝露期間中に各曝露区から取り上げた雄メダカの平均体重（約 580mg）であり、1 日あたりの給餌量は体重の 1.4% 前後であった。

5.3.7 飼育水中の E1 濃度

曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区の試験水槽から採取した飼育水中の E1 濃度の測定結果を表-20 に示す。1500ng/g 区を除く各曝露区では、曝露期間を通して採取した飼育水中の E1 濃度は 0.4ng/L 以下であった。1500ng/g 区では、曝露 14 日目（曝露終了時）に採取した飼育水の E1 濃度は 0.2ng/L と他の曝露区と同様に低かったが、曝露 2 および 7 日目に採取した飼育水の E1 濃度（1.7 および 1.1ng/L）は、他の曝露区や 14 日目の飼育水に比べて 1ng/L 程度高かった。曝露 2 および 7 日目は、飼育水を午前と午後の給餌の間（午前の給餌から約 4 時間後）に採取したことから、給餌した飼料から飼育水に溶出した E1 の影響等により相対的に濃度が高くなったと考えられる。一方、14 日目の E1 濃度は、前日の給餌から約 17 時間後に採取した飼育水で測定しており（14 日目は曝露終了日で無給餌のため）、前日午後の給餌以降、飼育水が換水されたことにより E1 濃度が低くなったと考えられる。なお、1500ng/g 区における曝露期間中の飼育水中 E1 の平均濃度は、最も高濃度になると思われる午前と午後の給餌間における濃度（曝露 2 および 7 日後の算術平均濃度；1.4ng/L）と最も低濃度になると思われる前日午後の給餌から 18 時間後の濃度（曝露 14 日後の濃度；0.2ng/L）の幾何平均として算出される 0.5ng/L 程度であったと見積

もられる。

以上の結果から、各曝露区における曝露期間中の飼育水中の E1 濃度は低く、雄メダカの VTG 生成に影響を与えないレベルにあったと推察される。

5.3.8 曝露期間中の死亡

曝露 1 日後に 150ng/g 区、8 日後に 1500ng/g 区でそれぞれ 1 個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

5.3.9 供試個体の全長および体重

曝露 0 日（曝露前）および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中 VTG 濃度分析に供した 10 個体の平均全長および平均体重を表-21 に示すとおりであった。

5.3.10 肝指数

曝露 0 日および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中 VTG 濃度分析に供した個体の肝指数（10 個体/曝露区の平均）を図-21 に示す。各曝露区の平均肝指数は 2.1~3.0% の範囲にあった。曝露 2、7 および 14 日後とも各曝露区の肝指数に明確な差異や傾向等はみられなかった。

5.3.11 肝臓中の VTG 濃度

曝露 0 日（曝露前）、曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げた雄メダカ（10 個体/曝露区）の肝臓中 VTG 濃度（10 個体の平均）を表-22、VTG 濃度が定量下限

表-20 餌の影響調査の曝露試験における飼育水中の E1 濃度

曝露区	E1 濃度 (ng/L)		
	曝露 2 日目	曝露 7 日目	曝露 14 日目
0 ng/g 区	0.3	0.3	0.3
15 ng/g 区	0.2	0.1	0.1
150 ng/g 区	0.4	0.3	0.2
1500 ng/g 区	1.7	1.1	0.2

表-21 餌の影響調査の曝露試験で
VTG濃度分析に供した雄メダカの全長および体重

曝露区	平均全長 (mm)			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	36.5 ± 3.3	36.0 ± 1.3	36.1 ± 1.6	37.0 ± 1.4
15ng/g区	-	35.7 ± 1.9	36.7 ± 1.6	37.0 ± 1.2
150ng/g区	-	35.6 ± 1.3	37.1 ± 1.5	36.5 ± 1.5
1500ng/g区	-	35.0 ± 1.4	37.2 ± 1.8	37.4 ± 1.3

曝露区	平均体重 (mg)			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	536 ± 102	599 ± 63	561 ± 90	585 ± 86
15ng/g区	-	560 ± 73	563 ± 65	611 ± 73
150ng/g区	-	557 ± 71	611 ± 97	577 ± 79
1500ng/g区	-	513 ± 60	601 ± 99	666 ± 82

注) データは、10個体の平均±標準偏差を示す。

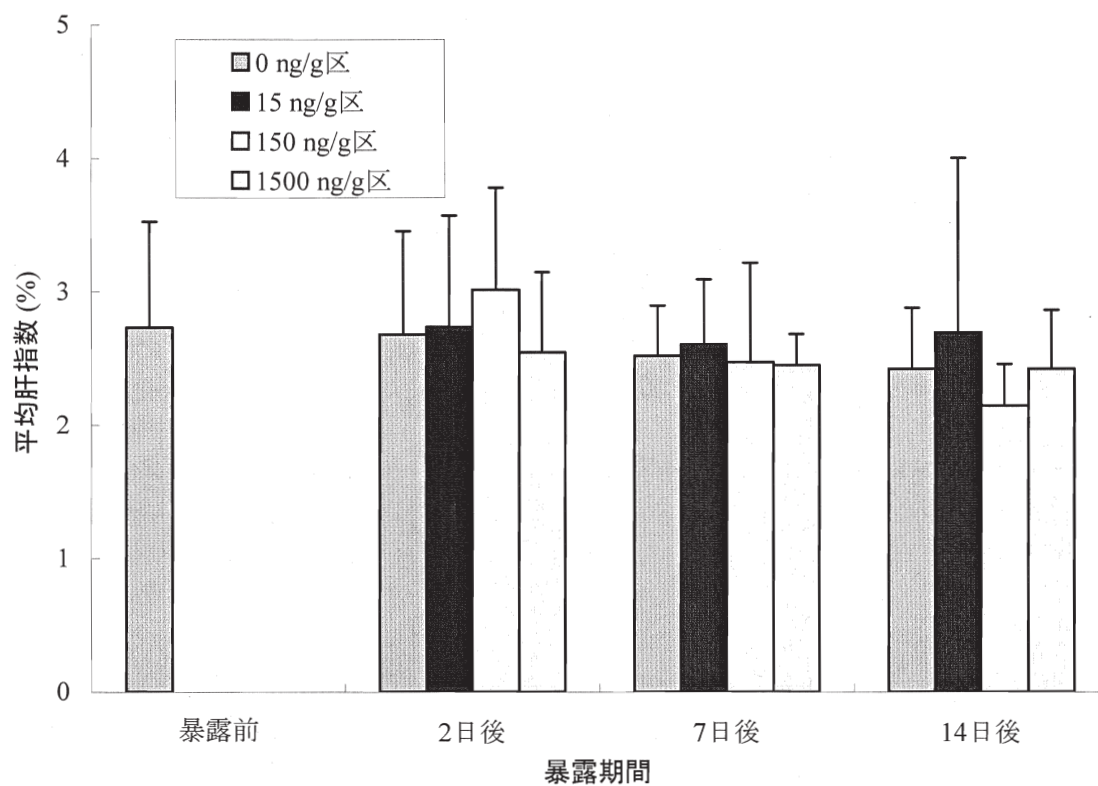


図-21 餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの肝指数
(グラフに付したバーは標準偏差を示す。)

以上であった個体数を表-23 に示す。曝露前に 0ng/g 区から取り上げた 10 個体の VTG 濃度 (VTG) は、8 個体が定量下限未満 (<1.56ng/mg) であり、他の 2 個体も 1.7

および 1.9ng/mg と低かった。曝露 2、7 および 14 日後の VTG は、0ng/g 区、15ng/g 区および 150ng/g 区各曝露区では、全個体が定量下限未満であった。1500ng/g 区では、

表-22 餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの肝臓中 VTG 濃度

曝露区	VTG 濃度 (ng/mg)			
	曝露前	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
0ng/g 区	1.0±0.4	ND	ND	ND
15ng/g 区	—	ND	ND	ND
150ng/g 区	—	ND	ND	ND
1500ng/g 区	—	1.6±2.7	2.1±4.0	2.3±1.9

注) データは、10 個体の平均±標準偏差を示す。ND は全個体の VTG 濃度が定量下限未満 (1.56ng/mg 未満) であったことを示す。VTG 濃度が定量下限未満については、平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

表-23 肝臓中 VTG 濃度が定量下限以上の個体数

曝露区	曝露前	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
0ng/g 区	2	0	0	0
15ng/g 区	—	0	0	0
150ng/g 区	—	0	0	0
1500ng/g 区	—	1	1	6

曝露 2 日後および 7 日後は定量下限以上の個体が 1 個体ずつ (VTG は 9.4 および 13.5ng/mg) であったが、14 日後は 6 個体 (VTG は 1.6~6.4ng/mg) と増加した。しかし、平均 VTG には明瞭な増加傾向はみられなかった。

各曝露区における曝露日間 (曝露 0 日、曝露 2、7 および 14 日後) の VTG 濃度について有意差検定を行った結果、

各曝露区ともすべての曝露日間の VTG に統計学的な有意差は認められなかった。

曝露 2、7 および 14 日後における各曝露区間の VTG 濃度について行った有意差検定の結果を表-24 に示す。

曝露前および曝露 2 日後は、各曝露区間の VTG に統計学的な有意差は認められなかった。曝露 14 日後も、0ng/g 区、15ng/g 区および 150ng/g 区の各曝露区間の VTG に有意差は認められなかったが、1500ng/g 区の VTG は、これら 3 曝露区の VTG よりも有意に高かった。

5.3.12 雄メダカの VTG 生成に及ぼす餌の影響

餌の影響調査の曝露試験では、0 ng/g 区、15 ng/g 区および 150 ng/g 区は曝露 2 日後から 14 日後まですべて個体の VTG が定量下限未満であり、VTG を生成した個体はみ

表-24 各曝露期間における各曝露区の VTG 濃度の検定結果

	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
0ng/g区 vs 15ng/g区	N. S.	N. S.	N. S.
0ng/g区 vs 150ng/g区	N. S.	N. S.	N. S.
0ng/g区 vs 1500ng/g区	N. S.	N. S.	0ng/g<1500ng/g (p<0.05)
15ng/g区 vs 150ng/g区	N. S.	N. S.	N. S.
15ng/g区 vs 1500ng/g区	N. S.	N. S.	0ng/g<1500ng/g (p<0.05)
150ng/g区 vs 1500ng/g区	N. S.	N. S.	0ng/g<1500ng/g (p<0.05)

注) N. S. は比較した曝露区間の VTG に統計学的な有意差が認められなかったことを示す。(p<0.05) は、有意水準 0.05 で比較した曝露区間の VTG に上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

られなかった。1500 ng/g 区については、曝露 2 日後および 7 日後は VTG が定量下限以上であった個体は 1 個体のみであったが、14 日後には 6 個体に増加した。14 日後の VTG は、曝露前あるいは他の曝露区と統計学的に有意差が認められた。しかし、14 日後の平均 VTG は 2.3 ± 1.9 ng/mg とかなり低いものであった。

1500 ng/g 区の雄メダカには、曝露開始から 14 日後まで 1 日に 1 個体あたり平均 8.7mg の E1 添加飼料を給餌した。したがって、調製時の添加濃度 (1670ng/g) を飼料中の E1 濃度とすると、雄メダカ 1 個体が飼料とともに体内に取り込んだ E1 量は、1 日あたり 14.5ng と見積もられる。これらの結果から、雄メダカの VTG 生成を誘導する飼料中の E1 濃度は 1500ng/g 以上であり、1 日あたり 15ng 程度の E1 が体内に取り込まれた場合に VTG 生成が誘導されることが示唆された。

6. 本研究のまとめ

6.1 下水処理水等で検出された環境ホルモン化学物質の濃度と魚類の雌性化との関係把握

E2 および E1 を被験物質として、雄ヒメダカの成魚を用いた実験室内での曝露試験を行い、肝臓中の VTG 濃度から両物質の最小作用濃度、最大無作用濃度、曝露期間と肝臓中の VTG 濃度の関係について検討した。その結果、雄ヒメダカの肝臓中の VTG を上昇させる E2 の最小作用濃度は、2 および 7 日間の曝露期間で 12.6ng/L、14 日間で 5.0ng/L であった。最大無作用濃度は、それぞれ 5.0ng/L、<5.0ng/L であった。一方、E1 の最小作用濃度は、3、7 および 14 日間の曝露期間とも 79.5ng/L、最大無作用濃度は 31.6ng/L であった。

6.2 魚類を用いた試験系の確立と評価手法の開発

水温影響調査の曝露試験では、16°C、20°C、24°C および 28°C の各水温条件とも曝露 7 日後および 14 日後に雄メダカの肝臓中 VTG 濃度に統計学的に有意な増加がみられ、VTG 生成がみられた個体数や VTG に水温に依存した増加傾向がみられた。これらの結果から、E1 に曝露された雄メダカの VTG 生成は、水温の影響を受け、16~24°C の水温条件下では、水温の上昇に依存して VTG を生成する個体数が増加し、肝臓中の濃度も相対的に高くなることが示唆された。

餌の影響調査の曝露試験では、E1 濃度が最も高い 1500 ng/g の飼料を給餌した雄メダカの曝露 14 日後のみ VTG の有意な増加がみられた。この結果から、雄メダカの VTG 生成を誘導する飼料中の E1 濃度は 1500ng/g 以上であり、1 日あたり 15ng 程度の E1 が餌を通して体内に取り込まれ

た場合に雄メダカの VTG 生成が誘導されることが示唆された。

6.3 魚類の試験系と遺伝子組み換え酵母を用いた試験系で得られた結果の比較解析

河川水や下水処理水のエストロゲン様活性がどのような成分に起因するかを明らかにするため、環境試料の分画手法を検討した。確立した方法を河川水や下水処理水に適用した結果、いずれの試料についても E1 の寄与が高い事が明らかとなった。

魚類の試験系と、分画手法と遺伝子組み換え酵母を用いた試験系の比較の結果 (6.1) と、室内実験におけるメダカへの標準物質の曝露試験の結果 (6.2)、人畜由来のエストロゲン、特にエストロンがメダカの雄性化に強く寄与していることが示唆された。しかし、河川水や下水処理水の中に含まれ、洗剤成分である LAS は、それ自体にエストロゲン様活性は無いが、YES アッセイにおいて活性を増長させる作用があることが明らかとなった。

<参考文献>

- 1) 国土交通省、下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査結果 (2001) .
- 2) H. Tanaka, Y. Yakou, A. Takahashi, T. Higashitani and K. Komori; Comparison Between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, Water Science & Technology, Vol. 43 (2), pp125-132 (2001).
- 3) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. ; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15 (3), pp241-248 (1996) .
- 4) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol. 36, pp199-204, (1999).
- 5) 小森行也, 八十島誠, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明; 下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析, 土木技術資料, Vol. 43 (11), pp44-49 (2001) .
- 6) 社団法人日本下水道協会編: 下水試験方法 追補暫定版 (内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編), (2002).
- 7) 八十島誠, 小森行也, 田中宏明; LC/MS によるノニ

- ルフェノキシ酢酸類の分析, 第4回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会要旨集, pp171(2001).
- 8) 小森行也, 八十島誠, 田中宏明他: 「LC/MS/MS によるエストロゲンの分析」, 第36回日本水環境学会年会講演要旨集, p.431, 2002
 - 9) 田中宏明、水環境における環境ホルモンの汚染状況と魚類の雌性化調査の現状, 日本内分泌攪乱化学物質学会第8回講演会テキスト, pp. 27-38. (2001)
 - 10) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., and Iguchi, T.; Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka., *Journal of health science*, 50(3), p. 301-308, 2004.
 - 11) Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Ishibashi, T., Nagae, M., Kohra, S., Takao, Y., Tominaga, N. and Arizono, K.; *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in Goldfish (*Carassius auratus*)., *Journal of health science*, 47(2), p. 213-218, 2001.
 - 12) 田畑彰久, 亀井翼, 眞柄泰基, 渡辺哲理, 宮本信一, 大西悠太, 伊藤光明; 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., *日本水環境学会誌*, 26, 10, p. 59-64, 2003.