

R-03-2004

YIES Research Report

山梨県環境科学研究所研究報告書

第10号

特定研究

「魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究」

平成15年度

山梨県環境科学研究所

R-03-2004

YIES Research Report

山梨県環境科学研究所研究報告書

第10号

特定研究

「魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究」

平成15年度

山梨県環境科学研究所

はじめに

1998年の「奪われし未来」("Our Stolen Future"の日本語訳、原書は1997年出版)の出版等を機に、内分泌攪乱物質(いわゆる環境ホルモン)に関する一般の関心が高まっている。日本国内でも様々な調査研究によって、環境ホルモンによる汚染や影響の状況把握が行われている。

環境ホルモン問題認識の発端の一つが、イギリスの河川の魚の雌化であったこともあり、日本では国土交通省(旧建設省)が全国の河川のコイの雌化を指標として、汚染の影響把握のための調査を行っている。国土交通省の全国的な調査は、規模は大きいものの全ての水域をカバーするものではなく、それぞれの地域での汚染の状況と影響の有無に関して、地域住民の関心は高い。そのような状況の中、地方自治体として独自にコイの調査を行うこととして、本研究は実施された。実施にあたって県水産技術センターには全面的な協力をいただき、また、桂川の調査については桂川・相模川流域協議会、桂川・相模川流域ネットワーク、桂川をきれいにする会、並びに横浜国立大学浦野研究室と共同で調査を行った。調査結果は、これまで記者発表、桂川・相模川流域協議会総会、山梨県環境科学研究所年報等で発表してきたが、3カ年の調査研究の結果をまとめて本報告書で報告する。

本調査研究は、桂川・相模川流域協議会、桂川・相模川流域ネットワーク、桂川をきれいにする会、河口湖漁業協同組合、山中湖漁業協同組合、忍草漁業協同組合、桂川漁業協同組合、山梨中央漁業協同組合、本栖湖漁業協同組合、四尾連湖漁業協同組合、県環境活動推進課、県花き農産課、県水産技術センターの職員の方々に多大なるご協力をいただいた。この場をお借りして、深く感謝する。

平成15年12月

山梨県環境科学研究所

所長 入 来 正 躬

目次

はじめに

概要編

研究体制	1
目的	1
サブテーマ1. 山梨県内の河川・湖沼に生息するコイの雌化調査	1
サブテーマ2. 山梨県内の湖沼に生息するオオクチバス、ブルーギルの雌化調査	1
サブテーマ3. ブルーギルの血中ビテロジェニン濃度に対する女性ホルモンと ビスフェノールAの影響（水槽暴露実験）	2
サブテーマ4. 富士五湖湖水のエストロジェン様活性	2

本編

サブテーマ1. 山梨県内の河川・湖沼に生息するコイの雌化調査

目的	5
調査方法	5
結果	6
考察	7
おわりに	9
謝辞	9
文献	10

サブテーマ2. 山梨県内の湖沼に生息するオオクチバス、ブルーギルの雌化調査

目的	27
方法	27
結果と考察	28
謝辞	30
文献	30
参考資料	30

サブテーマ3. ブルーギルの血中ビテロジェニン濃度に対する女性ホルモンと ビスフェノールAの影響（水槽暴露実験）

目的	35
方法	35
結果	35
考察	36
謝辞	37
文献	37

サブテーマ4. 富士五湖湖水のエストロジェン様活性

目的	41
方法	41
結果と考察	42
文献	43

概 要 編

特定研究の概要

研究テーマ

「魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究」

研究期間

平成11～13年度（3年間）

研究体制

山梨県環境科学研究所

環境生化学研究室

主幹研究員 瀬子 義幸
研究員 長谷川達也
助手 小林 仁美

山梨県水産技術センター

研究員 岡崎 巧
研究員 加地 弘一

（株）トランスジェニック

（旧、（株）クマモト抗体研究所）

研究員 中野菜穂子

熊本県立大学

教授 有蘭 幸司

帝京大学薬学部

助教授 志村 清仁

摂南大学薬学部

教授 中室 克彦

日本バイオラッド ラボラトリーズ（株）

テクニカルスーパーバイザー
手塚 静雄

目的

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン、以下環境ホルモンという）の問題は野生生物に起きていた異常がきっかけとなって認識されるようになった。これまで、環境汚染物質による発ガン性が着目されていたが、環境ホルモン問題は人工的な環境汚染物質が内分泌をかく乱することにより野生生物や人に対して重大な影響を与える可能性を指摘している。現在様々な着眼点を持って研究が進められているが、地域に根ざした調査研究として求められているのは、我々の住んでいる地域で環境ホルモン汚染やその影響があるか否かを明らかにすることであろう。汚染の程度については、平成10年から3カ年をかけて県大気水質保全課と県衛生公害研究所が行った環境調査がある。本研究は、環境ホルモンといわれている化学物質そのものを環境試料について分析するものではなく、生き物（魚と遺伝子組み換え酵母）を使って環境ホルモン汚染の検出を試みるものである。

環境ホルモンの作用は様々で、最も注目されている環境ホルモンの一つは性ホルモン、中でも女性ホルモン様活性を持った化学物質である。そこで、本調査では、女

性ホルモン様（エストロゲン様）活性を有する化学物質で水域が汚染されている場合に予想される魚の雌化について調査することとした。魚の雌化調査には、それぞれの水域に生息しているコイが用いられることが多いが、本研究では、日本全国の湖に多く生息している外来魚オオクチバス（ブラックバス）とブルーギルを用いた調査に関しても検討した。さらに、環境ホルモンが世界的に問題となってから開発された最新の水質評価法（酵母Two-Hybrid法）を用いて、富士五湖湖水の女性ホルモン様活性についても調査を行った。

サブテーマ1. 山梨県内の河川・湖沼に生息するコイの雌化調査

山梨県内の河川と湖沼から、魚を採捕し、血液（血清）中の卵黄蛋白前駆物質ピテロジェニンの濃度を測定することにより、雄の個体の雌化の程度を調査した。延べ17ヵ所で220個体の魚を採捕し、そのうちコイ（雄50個体、雌48個体、不明7個体）、フナ類（雌2個体）、ゲンゴロウブナ（雄5個体、雌10個体）について、血清中ピテロジェニンを酵素免疫測定法（ELISA）で測定した。その結果、一部の雄個体で血清ピテロジェニンが検出されたが濃度は低く、また、ほとんどの個体は不検出であった（表1）。今回の山梨での調査結果は、国土交通省の全国調査結果と比べても、雄コイの血清中ピテロジェニン濃度が異常に高いとは考えられなかった（図1）。この結果からは、少なくとも調査した水域では、雄のコイやゲンゴロウブナが雌化しているとは考えられなかった。

サブテーマ2. 山梨県内の湖沼に生息するオオクチバス、ブルーギルの雌化調査

コイについては、血液（血清、血漿）中のピテロジェニンを特異的かつ高感度に測定する方法が確立され、測定キットも市販されているが、オオクチバスやブルーギルについてはそのようなキットは市販されていない。そこで、これらの魚種について血中ピテロジェニンを測定する方法を検討し、湖から採捕された両魚種の雌化の程度を推定した。

ピテロジェニンを測定するために、市販のコイピテロジェニンELISAキット、抗メダカピテロジェニン抗体、オオクチバスとブルーギルのピテロジェニンに対する抗体作製、高速液体クロマトグラフィー法、キャピラリー電気泳動法、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）を検討した。その結果、ピテロジェニンの特異的かつ高感度な測定法を確立することは出来なかったが、SDS-PAGEを用いることにより、血漿中に約50 $\mu\text{g/ml}$ 以上のピテロジェニンがあればそれを検出

することは出来ると考えられた。この方法を用いて、河口湖、山中湖、本栖湖、四尾連湖で採捕されたオオクチバスとブルーギルの血漿を検査したところ、約 50 μg/ml以上のピテロジェニンを含む血漿は認められず、これらの湖では少なくとも強い雌化は起きていないものと考えられた。

サブテーマ3. ブルーギルの血中ピテロジェニン濃度に対する女性ホルモンとビスフェノールAの影響（水槽暴露実験）

オオクチバスやブルーギルを用いた環境ホルモンの影響調査を行うに当たり、これらの魚種が、女性ホルモン様活性を有する化学物質に対して、どの程度の感受性を有するかを明らかにしておくことが重要である。そこで、ブルーギルを用いて、女性ホルモン（17β-エストラジオール、E2）とビスフェノールA（BPA）の影響を水槽実験で検証した。1、10 μg/LのE2に7日間暴露した雄ブルーギルの血漿中ピテロジェニン濃度は顕著に増加したが、0.1 μg/Lでは誘導は認められなかった。また、BPAについては、1、10、100 μg/Lの何れの濃度でも、血漿中ピテロジェニン濃度の増加は認められなかった。

E2とBPAの相乗効果の有無を検証するために、単独ではピテロジェニンを誘導しない 0.1 μg/L E2 と 1 μg/L BPA の両方を含む水槽で雄ブルーギルを 1 週間飼育したが、両化合物同時暴露によるピテロジェニン誘導は認められず、今回用いた実験条件下では、E2とBPAの相乗効果は認められなかった。

今回実験に用いたE2やBPA濃度は、山梨県内あるいは全国調査で河川水や湖沼水に認められる濃度よりはるかに高い濃度である。E2やBPA単独では、濃厚な汚染がなければブルーギルにピテロジェニンを誘導しないものと考えられた。

サブテーマ4. 富士五湖湖水のエストロジェン様活性

遺伝子組み換え酵母を用いて、環境水についてエストロジェン様活性（女性ホルモン様活性）を測定する方法が近年開発された。この方法は、バイオアッセイ（生物学的定量法）の一種で、環境水が何らかのエストロジェン様活性を有する化学物質で汚染されているか否かを検査する方法として有効である。富士五湖の湖水についてこの方法を適用し、湖水のエストロジェン様活性の現状を調査した。

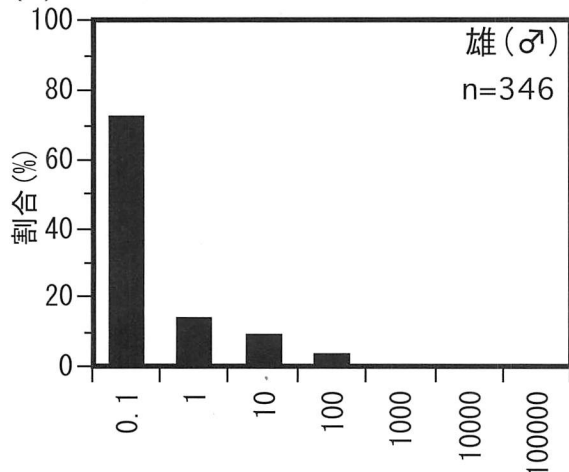
湖心から採取した水を比較すると、河口湖、山中湖、西湖の方が、精進湖、本栖湖よりエストロジェン様活性が高く、中でも河口湖の試料が最も高い値を示した。そこで、河口湖内の10地点から湖水を採取して調べた結果、生物化学的酸素要求量（BOD）、化学的酸素要求量（COD）、全有機炭素濃度（TOC）には10地点間で大きな差が認められず、一般的な水質汚濁の程度は場所による違いは少なかった。しかしながら、エストロジェン様活性は採水場所による違いが非常に大きかった。全体的な傾向としては、湖の西側で低く東側で高かった（図2）。

表1 採捕されたコイ、フナ類、ゲンゴロウブナの血清中ピテロジェニン濃度範囲

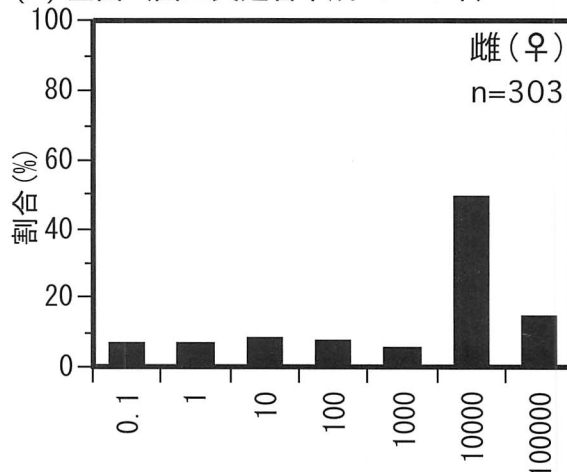
採捕地点	魚種	採捕日	オス		メス		不明（注）		合計 尾数
			尾数	ピテロジェニン濃度 （μg/ml）	尾数	ピテロジェニン濃度 （μg/ml）	尾数	ピテロジェニン濃度 （μg/ml）	
山中湖	コイ	1999. 8. 10	6	0.1未満	8	0.11～2,400	1	0.1未満	15
桂川（忍野）	コイ	1999. 10. 8	10	0.1未満、0.15	10	1,080～13,700			20
桂川（島田湖）	コイ	1999. 10. 5	8	0.1未満	6	0.26～5,700			14
桂川（島田湖）	コイ	2001. 10. 13	6	0.1未満、0.14, 1.41	8	4～7,800	6	0.1未満	20
濁川（柵橋）	コイ	1999. 11. 5	2	0.1未満					2
濁川（野間川合流地点）	コイ	1999. 11. 5	6	0.1未満	8	0.34～8,700			14
荒川（荒川橋）	コイ	2001. 3. 15	7	0.1未満	5	0.1未満～250以上			12
平等川（疾風橋）	コイ	2001. 3. 22	4	0.1未満	1	23.4			5
本栖湖	コイ	2001. 9. 28	1	0.1未満	2	0.1未満、41.1			3
濁川（柵橋）	フナ類	1999. 11. 5			1	7,500			1
本栖湖	フナ類	2001. 9. 28			1	437			1
河口湖	ゲンゴロウブナ	2000. 11. 27	2	0.1未満、0.60	1	3,250			3
河口湖	ゲンゴロウブナ	2001. 10. 19	2	0.1未満	9	1100～4500			11
本栖湖	ゲンゴロウブナ	2001. 9. 28	1	0.1未満					1
合計			55		60		7		122

注：生殖腺が採取できなかった個体。詳しくは本文参照。

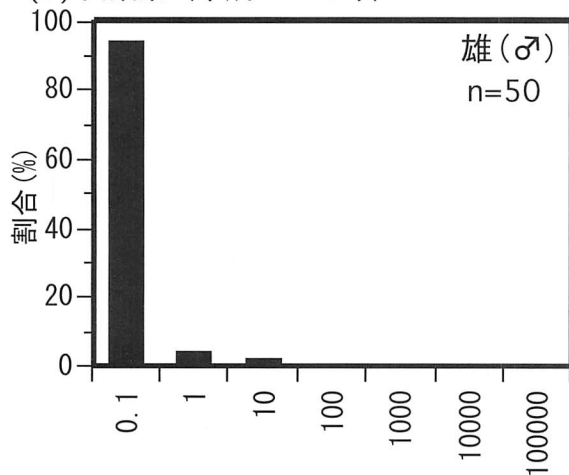
(1) 全国（国土交通省平成10-13年）



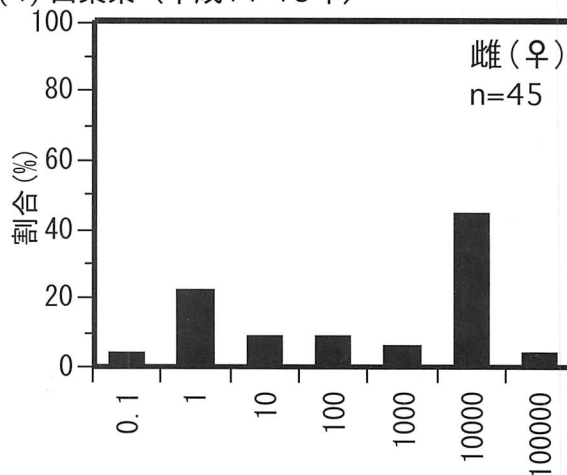
(2) 全国（国土交通省平成10-13年）



(3) 山梨県（平成11-13年）



(4) 山梨県（平成11-13年）



Vtg (µg/ml) 未満

Vtg (µg/ml) 未満

図1 コイ血清中ビテロジェニン（Vtg）濃度別の頻度：全国調査（国土交通省平成10-13年度）と山梨県（平成11-13年度）の比較

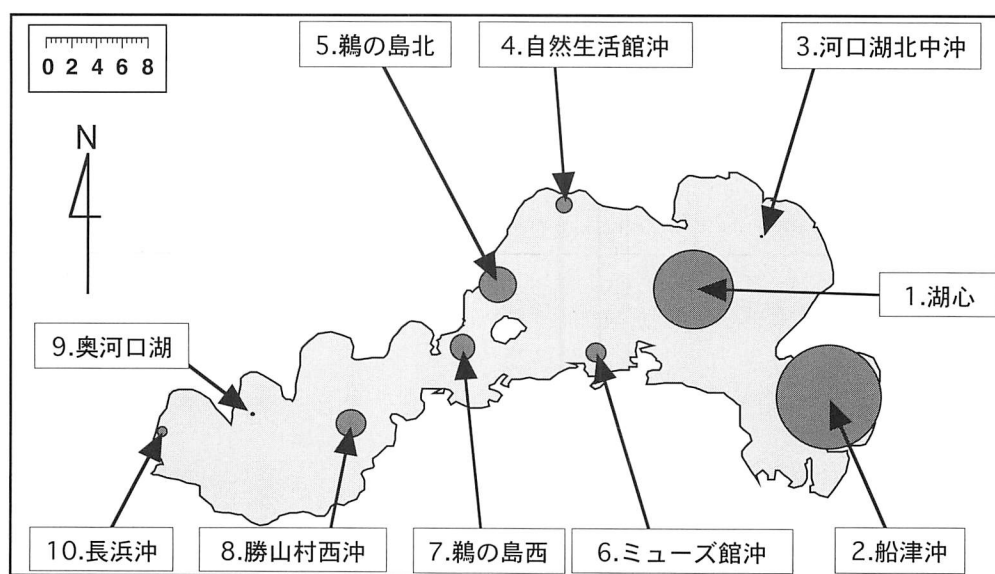


図2 河口湖湖水のエストロゲン様活性（ 17β -エストラジオール相当濃度、ng/L）

本 編

山梨県内の河川・湖沼に生息するコイの雌化調査

瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美（山梨県環境科学研究所）
岡崎巧、加地弘一（山梨県水産技術センター）

目的

野生動物で認められた異変には、雄の個体が雌化していると考えられるものが多い（井口 1999；鈴木・井口 2003）。そのため、環境ホルモンの中でも女性ホルモン様の作用を持っている化学物質が問題とされている。魚の雄が雌化していると考えられる事例も国内外で多数報告されており（中村・井口 1998；原彰彦 1998；井口 1998, 1999；和波ほか 2000；桂川・相模川流域協議会 2001）、山梨県の現状を調べることを目的として本研究を行った。

魚の雌化の指標としては、雄の魚の血液に含まれる卵黄蛋白前駆物質ビテロジェニンの測定が多く用いられているため（原 1998, 1999；有菌 1999a, b；石橋ほか 2002）、本研究でもこの方法を用いることとした。ビテロジェニンは雌の個体では女性ホルモンの作用によって肝臓で合成され、血液を介して卵巣に運ばれる。その後、卵に取り込まれて卵黄となる。雌の個体では、血液に高濃度に存在するが、雄ではほとんどないとされている。一方、雄の魚でも女性ホルモンあるいは女性ホルモン作用を有する人工化学物質に暴露されると肝臓で合成され血液中濃度が高くなることもわかっている（図1）。そのため、自然界の雄の魚の血液中に高い濃度でビテロジェニンが存在すれば、その個体は女性ホルモン作用を持った物質に暴露された可能性が考えられる。この考え方を適用して、生息している雄の魚の血中ビテロジェニン濃度を測定することによって、環境を評価することが行われている。本研究では、血中ビテロジェニンを高感度で測定できるコイを中心に山梨県内で調査を行った。本調査の一部はこれまでも報告してきたが（瀬子 2000；瀬子ほか 2000, 2001, 2002；記者発表資料 2000）、ここに調査結果の詳細を報告する。

調査方法

魚の採捕：地引き網、投網、釣り、刺し網によって魚を採捕した。採捕地点の位置を図2に示す。採捕を試みたが、コイが採捕できなかった調査地点もあった。また、コイが認められず採捕を試みなかった地点もある。

測定及び観察：採捕した魚について、採血、外観観察

（写真撮影）、年齢推定のための鱗採取、全長・体長・体重測定、生殖器外観による性別判定、生殖腺重量測定、組織学的観察のための生殖腺採取を行った。最終的な雌雄の判定は、生殖腺の顕微鏡観察によった。血液採取は、魚を採捕した現場で行った。血液を氷冷して実験室に持ち帰り、採血から24時間以内に血清を分離し、分離した血清は分注して-80℃で保存した。

血清中ビテロジェニン濃度測定：市販キット（（株）トランスジェニック、コイビテロジェニンELISAキット、KH003）を用いた酵素免疫測定法（ELISA）によって、血清中ビテロジェニン濃度を測定した。今回測定に用いたコイビテロジェニン測定ELISAキットは、フナ類、ゲンゴロウブナ（ヘラブナ）のビテロジェニンも測定できるため、採捕されたフナ類、ゲンゴロウブナについても測定を行った。測定は、測定キットのマニュアルに準じて行い、ビテロジェニン濃度に比例した発色の程度をマクロプレートリーダーで読みとり、ビテロジェニン濃度を算出した。

ELISAの検量線（図3）は、 $0.078\mu\text{g/ml}$ ～ $0.5\mu\text{g/ml}$ の範囲であるが、実際の測定では低濃度の部分では吸光度の僅かな変動が算出されるビテロジェニン濃度に大きく影響し、正確な値が得られない場合があった。そのため、5倍希釈したコイの血清をELISA法で測定する場合には、 $0.02\mu\text{g/ml}$ 以上の値をビテロジェニン検出とみなし、国土交通省と同様に血清中の濃度で $0.1\mu\text{g/ml}$ 以上をビテロジェニン検出個体とした。

測定キットの測定範囲を超える血清については、一部の試料については段階希釈を行ってELISA法で測定した。その他の高濃度試料については、高速液体クロマトグラフィー（Yamanaka et al. 1998）を用いてビテロジェニンのピーク面積から濃度を算出した。

国土交通省公開情報の利用：国土交通省は旧建設省の時期から全国の河川でコイを中心に魚を採捕し、血中ビテロジェニンの測定を行っており、その調査結果が公開されている。公開情報の中には、採捕した魚の個体別情報がある（建設省河川局河川環境課 1999, 2000；国土交通省河川局河川環境課 2001, 2002）。本研究の結果と比較するために、これらの情報を独自に解析した。

なお、平成11年度の桂川（忍野、上野原）は桂川相模川流域協議会との合同調査である。また、2001年10月

13日の桂川（上野原）での調査は、桂川・相模川流域ネットワーク、桂川をきれいにする会、及び桂川・相模川流域協議会が主催した「ダム湖の魚類調査・コイによる環境ホルモン調査」に環境科学研究所が協力して得られたデータである。魚の採捕に際しては、河口湖漁業協同組合、山中湖漁業協同組合、桂川漁業協同組合、忍草漁業協同組合、本栖湖漁業協同組合、山梨中央漁業協同組合、四尾連湖漁業協同組合ならびに県水産技術センターの方々に御協力いただいた。

結果

採捕した魚の数：平成11～13年度の3カ年に合計220尾の魚を採捕した（表1）。このうちコイは合計105尾（雄50尾、雌48尾、不明7尾）であった。コイと同じ科に属しELISAキットでピテロジェニン測定が出来る魚種としてフナ類とゲンゴロウブナも採捕された。これらの魚種以外にオオクチバス（ブラックバス）とブルーギルも採捕したが、これらに関してはサブテーマ2で調査結果を示す。国土交通省の全国調査では、一地点でのコイの採捕数を15～20尾としているが、一地点でこれだけの数のコイを採捕することは容易ではなく、この数に満たない地点もあった。

採捕した魚の大きさ：国土交通省（旧建設省）の全国調査では、全長30cm以上のコイを採捕することとしているが報告書では30cm未満の個体もデータが掲載されている。本研究でも、30cm未満の個体も試料とした。雄コイは全長が285～603mm、雌コイは293～690mmであった。今回我々が採捕したコイと国土交通省の全国調査の結果（平成10～13年度）を比較すると、図4～6のようになる。山梨で採捕したコイは全国調査の度数分布と比較すると、全長、体長、体重ともやや小さい方に分布が寄っていた。

体長、全長、体重間の関係を見ると、これらの間には良い相関が認められた（図7）。全国調査と山梨のデータは同じ直線、あるいは曲線上にあり、全国調査と山梨のデータは、全長・体長・体重の相関図で見る限り異質のものではなかった。

生殖腺重量：生殖腺重量は、雄コイでは0.8g～322.8g、雌コイでは0.9g～446gと個体差が大きかった。国土交通省の全国調査でも同様に個体差が大きかった。生殖腺重量ごとの度数分布は、全長や体重の場合と同様に、山梨のデータではやや小さい方に分布が寄っているが、大きな差は認められなかった（図8）。また、生殖腺体指数（GSI）（生殖腺の重量の体重に占める割合 [%]、 $[\text{生殖腺重量}] / [\text{体重}] \times 100$ ）も生殖腺重量と同様に個体差が大きかった。山梨の雄コイでは、全国調査と同様の分布を示したが、雌コイでは全国調査と

比べると14%以上の個体の割合が少なかった（図9）。

体長および体重と生殖腺重量およびGSIの関係：図10と図11に、体長および体重と生殖腺重量およびGSIとの関係を示す。体長の増加に伴って生殖腺重量とGSIが増加する傾向はあるが、体長、全長、体重で見られたような良好な相関関係はなく、同程度の大きさのコイでも値が大きく変動した。全国調査と山梨の間に、データの分布に違いは認められなかったが、山梨の個体で、体長や体重の割に生殖腺重量やGSI%が低い、分布の下限に位置するものも認められた。

全国調査の雄のデータを調査時期に分けて見たところ、同じ体重でも5～7月に採捕したコイの方が10～12月に採捕したコイより生殖腺重量、GSIともに小さくなる傾向が認められた（図12）。このデータをさらに採捕河川ごとに示したのが図13、14である。5～7月採捕の個体の方が生殖腺重量、GSIともに小さい傾向は認められるものの、採捕地点の違いもあった。山梨の雄コイにつて採捕地点別に、体長と生殖腺重量およびGSIの関係をまとめて示したのが図15である。図中の曲線あるいは直線は、全国調査のデータ全部を用いて計算した回帰曲線あるいは回帰直線である。桂川（忍野、1999年10月）のデータは曲線あるいは直線の上側に分布し、荒川（荒川橋、2001年3月）のデータは下側に分布する傾向も見られたが、季節差であるかあるいは場所の違いであるかはわからない。10月と11月に採捕した中に、体長が400mm前後あるにもかかわらず生殖腺重量が4g以下のものが3個体（濁川、桂川、荒川）が認められた。

血清中ピテロジェニン濃度：コイ、フナ類、ゲンゴロウブナのピテロジェニン濃度を採捕地点ごとに示したのが表2、3である。雄コイの場合、ほとんどの個体が0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以下で、50個体中3個体が0.1 $\mu\text{g/ml}$ を越えた（0.14、0.15、1.41 $\mu\text{g/ml}$ ）。雌コイの場合は、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 未満～13,700 $\mu\text{g/ml}$ と広範囲であったが、雄よりはるかに高い値を示した。ピテロジェニン濃度別の頻度分布を国土交通省の全国調査の結果と比較すると、雄では山梨の方が全国調査のデータより0.1 $\mu\text{g/ml}$ 未満の割合が少し高かったが、ほぼ同様のパターンが得られた（図16）。全国調査のデータでは、雄の最高値が120 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対し、山梨では1.41 $\mu\text{g/ml}$ であった。雌の場合は、山梨で1 $\mu\text{g/ml}$ の割合がやや高く、10,000 $\mu\text{g/ml}$ ～100,000 $\mu\text{g/ml}$ 未満の割合が低かったが、全国調査とほぼ同様のパターンを示した（図16）。

雌雄不明の個体：山中湖で1個体、2001年10月調査の桂川（島田湖）で6個体あった。山中湖の個体は、採捕した現地で採血を行い、その場では解剖を行わず、生かしたまま県水産技術センター（敷島）に持ち帰って、飼育していたものである。飼育中に死亡し、腐敗していたため雌雄の判別が出来なかった。桂川（島田湖）の6個

体は、生殖腺と思って採取した組織を顕微鏡観察したところ、腎臓や脂肪組織と思われる組織像だったもので、雌雄の判別が出来なかった。また、中間報告（瀬子ら2002）では、平等川No.5の組織像が生殖腺でなかったため性別不明として処理していたが、その後、採取した生殖腺に付着していた腎臓の部分を顕微鏡用切片としていたことが判明した。生殖腺の外観と組織の実体顕微鏡像から、この個体は雌と判定した。

雌コイの血清中ビテロジェニン濃度と全長、体長、体重、生殖腺重量、GSIとの関係：雌コイのビテロジェニン濃度は広範囲にわたっていたため、ビテロジェニン濃度と関連する要因を探るため、コイの大きさや生殖腺の大きさ等とビテロジェニン濃度の関係を図にした（図17）。この図の場合、生殖腺重量、GSIの場合は横軸が対数となっている。縦軸のビテロジェニン濃度は範囲が広いので全て対数となっている。全長、体長、体重、生殖腺重量、GSIの何れも値が大きいくほどビテロジェニン濃度が高くなる傾向はあるが、個体差が大きかった。山梨のデータで図中に※a、※bで示した2点はやや右下にずれているが、GSIがそれぞれ0.9%、0.8%と体の大きさの割に生殖腺（卵巣）が小さい個体である。

雄コイの血清中ビテロジェニン濃度と体長、生殖腺重量との関係：国土交通省の雄コイのデータでは、血清中ビテロジェニン濃度とコイの大きさ（体長）や生殖腺重量との間に相関は認められなかった（図18、縦軸は対数ではないことに注意）。むしろ、雌コイとは対照的に、体長や生殖腺重量の小さい個体でも、雄の中では比較的高い血清中ビテロジェニン濃度が認められた。

雄のゲンゴロウブナは5個体が採捕され、ビテロジェニン濃度は4個体が $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満、1個体が $0.60 \mu\text{g/ml}$ であった。国土交通省の全国調査では、阿武隈川、利根川、荒川、多摩川、信濃川、庄内川、淀川、筑後川で合計34個体の雄のゲンゴロウブナが採捕されているが、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満は17個体（50%）であり、50%の個体からビテロジェニンが検出されている。コイの結果（ $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満は72%）と比べるとビテロジェニンが検出される個体の割合が高い。国土交通省のデータでは、阿武隈川、多摩川でビテロジェニン濃度が比較的高い個体が採捕されている。国土交通省のデータと比べると山梨でのデータは、ビテロジェニンが検出される割合が低い。また、山梨でビテロジェニンが検出された個体は $0.6 \mu\text{g/ml}$ と全国調査より低い値であった（全国調査では、最高で $3,300 \mu\text{g/ml}$ が認められたのをはじめ、 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上の個体が5個体（14.7%）あった）。

雌のゲンゴロウブナは山梨の調査で10個体が採捕されたが、ビテロジェニン濃度は $1,100 \sim 4,500 \mu\text{g/ml}$ と雄より明らかに高い値であった（表2、3）。国土交通省の全国調査では、99個体が報告されそのうち29個体について

ビテロジェニン濃度が測定されている。濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満から $39,000 \mu\text{g/ml}$ の広範囲にわたっているが、20個体（69%）が $1,000 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。

鱗の年輪数と全長、体長、体重、生殖腺重量、GSI、ビテロジェニン濃度の関係（図19）：鯉の鱗には成長に伴って年輪が刻まれるため、コイの年齢推定に用いられる。年輪の数と全長、体長、体重、生殖腺重量、GSIの関係を見たところ、鱗年輪数が多くなるに従って、全長、体長、体重、生殖腺重量、GSIは増加する傾向が認められたが、ビテロジェニン濃度とは相関しなかった。

考察

本研究の主要目的は、雄の魚の雌化が山梨県内で起きているか否かを明らかにすることであり、雄の魚の血清中ビテロジェニン濃度を雌化の指標として測定を行った。また、雌雄合計105個体のコイを採捕し、血清中ビテロジェニン濃度以外に体長、体重、生殖腺重量、鱗の年輪数等のデータが得られたため、国土交通省の公開データと比較しながら、これらのデータ間の関係を解析した。

雄コイの血清中ビテロジェニン濃度：本調査で採捕された雄コイの血清中ビテロジェニンは、94%（47/50）の個体で検出されず（ $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満）、検出された個体でも、濃度は低かった（図16、表2、3）。東京都が都内の河川で行った同様の調査（和波ほか2000）では、5つの調査地点（合計約300個体の雄コイ）でビテロジェニン濃度が $1 \mu\text{g/ml}$ 以上の雄の個体が5~46%見ついている。また、下水処理場の放流水口付近では、 $1,000 \mu\text{g/ml}$ 以上のビテロジェニン濃度を持つ雄の個体がいることなどが報告されている。これらの報告を考えあわせると、本県の今回の雄のデータでは、ビテロジェニンの検出された個体も認められたものの、全体的に高い値とは考えられない。また、国土交通省が平成10~13年度に行った全国調査（図16）では、ほとんどの雄の個体の血清中ビテロジェニン濃度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満で、数%の個体で $1 \mu\text{g/ml}$ 以上のビテロジェニンが認められているが、本研究の雄のコイのビテロジェニンのデータは、全国調査と比較しても高いとは考えられなかった。血清中ビテロジェニンで見る限りでは、山梨県では雌化した雄コイは認められなかったと判断した。

また、雄のゲンゴロウブナが河口湖で5個体採捕されたが、4個体は血清中ビテロジェニンが $0.1 \mu\text{g/ml}$ 未満で、ビテロジェニンが検出された1個体でも $0.6 \mu\text{g/ml}$ と低値であった（表2、3）。これらの結果から、河口湖のゲンゴロウブナの雄が雌化しているとは考えられなかった。

雌コイの血清中ビテロジェニン濃度：産卵を行う雌コ

イの血清中ピテロジェニン濃度は雄とは逆に高いことが正常と考えられるが、国土交通省の調査データ（図17）でも体長が20cm以下のコイからはピテロジェニンは検出されておらず、コイの大きさ等を考慮して評価する必要がある。

雌コイの場合、大きくなるに従って、血清中ピテロジェニン濃度は高くなる傾向があり、本研究ならびに国土交通省のデータでは、体長が400mm以上、あるいは体重2000g以上の場合、ほとんどの個体で血清中ピテロジェニン濃度が1000 $\mu\text{g/ml}$ を越える高い値を示した（図17）。しかし、中には体長400mm以上で体重も2000g以上あるにもかかわらず、ピテロジェニン濃度が100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の個体も認められた（図17）。山梨のデータでは、桂川〔島田湖〕2001年No.10および平等川〔疾風橋〕No.5が、体長・体重が大きいかかわらずピテロジェニン濃度が低い個体であった。

一方、生殖腺（卵巣）重量と血清中ピテロジェニン濃度の関係を見ると、30g以下の個体はほとんどの場合、ピテロジェニンが100 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、卵巣重量が血清中ピテロジェニン濃度と強く関連することが明かとなった（図17）。桂川〔島田湖〕2001年No.10および平等川No.5の個体は、生殖腺重量がそれぞれ25.6（GSI 0.8%）、26.1g（GSI 0.9%）と、体の大きさと比較して生殖腺の発達程度が低い個体であったことがピテロジェニン濃度の低いことに関係していたと考えられる。生殖腺の発達程度が低かった原因は不明である。

コイの産卵期は4～7月とされているが、本研究と国土交通省の調査データともに10～12月に採捕された雌コイで、血清中ピテロジェニン濃度が1,000 $\mu\text{g/ml}$ を越える個体が多数得られたことから、産卵期でなくとも雌コイの血清中ピテロジェニン濃度は高いことがわかった。

雄コイの生殖腺（精巣）重量：多摩川で採捕された雄コイの中には、精巣が萎縮していると考えられるものが報告されている（中村・井口 1998）。雄コイが成長過程でエストロゲン活性を有する化学物質に暴露されることにより、精巣の発育が阻害される可能性もあるため、精巣重量も重要な調査情報となる。精巣重量が低い個体は、採捕した時点で血清中ピテロジェニンが検出されなくても、環境ホルモンの影響を受けていた可能性を考える必要もある。しかしながら今のところ、精巣重量から雄コイの雌化を判定する基準はない。また、本研究と国土交通省のデータを見ると、魚の体長や体重が大きくなるに従って精巣重量は大きくなる傾向はあるものの（図11）、個体差も大きい。体長400mm程度のコイで見ると、精巣重量は数グラム程度から200g前後まで大きくばらついている。これらのデータを見ると、個々の個体の正常・異常の判断は難しいが、少なくともデータの分布からはずれる個体は注目しておく必要があると思われる。

山梨のデータで見ると、濁川No.9（体長427mm）、荒川No.12（体長370mm）、桂川（島田湖2001年）No.19（体長380mm）は、生殖腺重量がそれぞれ1.1、6.5、3.9gと低く、図11の分布の下限に位置している。

以上のように雌雄とも、生殖腺重量が全体の分布から見るとはずれていたり、分布の下限に位置する個体が散見された。生殖腺の発達にはホルモンが強く関係する可能性があるため、魚の成長過程で何らかのホルモン作用の攪乱が起きた可能性も疑われるが、環境要因が関係するか否かも含めて原因は不明である。また、調査水域にはコイの放流が行われているため、原因が放流前のものであるか放流後のものであるかも明らかに出来ない。今後頻繁にこのような個体が認められることがあれば、原因を追及する調査研究も必要であろう。

鱗年輪数の計測：本研究では、魚の年齢を推定することがデータの解析に有用であろうと予測して鱗年輪数の計測を行い、年輪数の増加に伴って、全長、体長、体重、生殖腺重量、GSIが増加する傾向を認めたが、それほど明確な相関関係ではなかった（図19）。また、血清中ピテロジェニン濃度とは雌雄とも相関しなかった。今後、同様の調査を行う場合は、鱗の年輪数計測は必要ないものと考えられる。

雌雄不明の個体について：桂川（上野原）2001年10月13日の雌雄不明6個体は、誤って生殖腺以外の組織（腎臓、脂肪組織等）を採取したため、顕微鏡観察による雌雄の判定が出来なかった個体である。これらの個体の体長は、330mm～417mmであった。国土交通省のデータ（図10）では、この範囲の大きさの個体では、雌雄とも生殖腺重量が1g以下から300g前後まで大きくばらついており、個体差が大きい。数10g以上の生殖腺重量があれば、生殖腺採取を誤る可能性は少ないため、雌雄不明の6個体は、雌雄いずれにしても生殖腺が未発達の個体であったため、生殖腺の採取を誤ったものと思われる。これらが雄の個体であったとすると、血清中ピテロジェニン濃度は0.1 $\mu\text{g/ml}$ 未満であるため、ピテロジェニン濃度から判断すると雌化は起きていなかったと判断される。

水質との関係：県大気水質保全課と県衛生公害研究所が中心となって平成10～12年度に「外因性内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）実態調査」を行っている（山梨県2002）（この調査は継続モニタリング調査として現在も行われている（山梨県2003））。この調査では、県内の公共用水域（主要河川、湖沼）の水、底質、魚類、ならびに地下水、土壌、大気について、環境ホルモンとして疑いのもたれている65物質（92種類）の測定を行っている。調査水域には、桂川、濁川、平等川、荒川、富士五湖が含まれている。膨大な数の測定を行った結果、

公共用水域の水質では、4-*t*-ブチルフェノール、ノニルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-*n*-ブチルが河川で検出されたことが報告されている（湖沼では不検出）。また、底質では、ポリ塩化ビフェニール（PCB）、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-*n*-ブチル、ベンゾ(a)ピレン、カドミウム、鉛、水銀が検出されている（湖沼では全て不検出）。これらの化学物質の中には、弱いながら女性ホルモン様活性を有するものもあるが、検出濃度は低いためそれぞれ単独で魚の雌化を引き起こすとは考えられない。今回の魚の雌化調査でも、雌化している雄の魚は認められなかったことと矛盾しない結果である。

山梨県内では、血清中ビテロジェニン濃度の高い雄の個体は認められなかったが、東京都の多摩川や神田川（原彰彦 1998；和波ほか、2000）、あるいはその他の地域（桂川・相模川流域協議会 2001）で血清中ビテロジェニン濃度の高いコイが認められている。それらの調査では、下水処理場の放流水に含まれている女性ホルモンの影響を受けている可能性も指摘されている。しかし一方で、国土交通省の報告書（国土交通省河川局河川環境課 2002）では、各種女性ホルモン様作用を示す化学物質（ノニルフェノール、ビスフェノールAなど）の濃度および女性ホルモンそのもの（17 β エストラジオール）の調査水域での濃度とビテロジェニン検出雄個体の割合が、有意な相関を示さなかったとしており、原因は特定されていない。

今後の調査研究：本研究は、雄コイの雌化の指標となる血清中ビテロジェニン濃度を中心的な調査項目としたため、ビテロジェニンの高感度測定が市販の検査試薬で可能なコイを調査対象とした。合計50個体の雄コイを採捕することができ、少なくともビテロジェニンを指標とする限りでは、調査した水域での雄コイの雌化は起きていないと考えられる結果が得られた。しかしながら、コイが採捕出来なかった地点や、事前調査でコイが認められなかったために採捕を試みていない水域も多い。また、コイの採捕には多大な労力も必要である。今後も魚の雌化を指標とした環境調査を行う場合は、調査方法や魚種を変更することも考える必要がある。また、コイのように性染色体が分化している魚種を使う場合は、生殖腺の組織学的な検査だけではなく、遺伝子解析等により遺伝的な雌雄判別を行うことにより、成長過程での性転換の有無も検出することが出来るかもしれない。

現在は、メダカのビテロジェニンを測定する検査試薬が市販されるようになっている。また、メダカは実験動物として販売されているため、コイの代わりにメダカを使った環境調査が可能となっている（石橋ら 2002）。採取した河川水や湖水で飼育したり、メダカを入れた籠

を河川や湖沼に設置して、メダカを環境水に暴露することも可能である。また、メダカを使えば水槽内での繁殖実験も可能であるため、河川水や湖水を用いて繁殖させることによって、発生（成長）過程での環境水の影響を検査することも可能である。

おわりに

環境ホルモンは女性ホルモン様作用を有するもののみを指すのではなく、動物体内で営まれているホルモンの働きを攪乱するものをいい、女性ホルモン作用を抑制するもの、男性ホルモン作用を有するもの、甲状腺ホルモンの働きを攪乱するものなど様々なものがある。今回の魚の雌化調査は、女性ホルモン様作用を有する環境ホルモンの影響を中心に組み立てられており、その他のホルモン攪乱の有無は不明である。野生生物の異変が報告されている地域では、PCBやDDTなどの有機塩素系化学物質汚染が認められる場合がある。県大気水質保全課と県衛生公害研究所が行った調査結果から考えると、山梨の水域での環境ホルモンとして疑われている化学物質の汚染程度は比較的低いため、直ちに生息動物にホルモン攪乱の異変を引き起こすとは考えにくい。しかしながら、化学物質同士の相乗作用（作用を強めあうこと）の有無、局所的な汚染の有無等については未知の部分も多く、ホルモンの攪乱が野生生物に起きていないとは誰も断言できない。今後も注意深く様々な方法で環境を見つめていくことが必要だと考えられる。そのための方法として、今回の調査で用いた生き物を使う環境評価法は、化学物質を特定することは出来ないものの、異変の有無をいち早く検出する方法として有効である。また、研究者や行政の行う環境調査には予算的にも労力的も限界があり、十分な調査が行えないことも多い。イギリスで魚の雌化が発見された時は、釣り人からの情報が重要な役割を果たしていたことを考えると、一般市民からの情報提供も重要だと考えられる。その意味で、本研究に多くの市民が参加した意義は大きい。

謝辞

河口湖漁業協同組合、山中湖漁業協同組合、忍草漁業協同組合、桂川漁業協同組合、山梨中央漁業協同組合、本栖湖漁業協同組合、四尾連湖漁業協同組合の方々には、魚の採捕等にあたって多大なご協力をいただきました。御礼申し上げます。県農政部花き農産課には、魚の特別採捕許可や魚の放流情報入手にあたってお世話になりました。県水産技術センターの多くの職員の方々のご協力を頂きました。あらためて感謝いたします。

文献

- 有菌幸司 (1999a) 魚類の血中タンパク質から環境ホルモン汚染を調べる. 現代化学5月号、16-21.
- 有菌幸司 (1999b) 環境ホルモンの測定法の開発. 環境ホルモンの最新動向 (株式会社シーエムシー)、p.87-93.
- 原彰彦(1998)魚の血液で環境ホルモン汚染をみる. 科学 68(7)、591-596.
- 原彰彦 (1999) 水環境における汚染影響評価のバイオマーカーとしてのビテロジェニン. 環境毒性学会誌 2(1)、35-42.
- 井口泰泉 (1998) 環境ホルモンの魚類への影響 -海外の報告. 科学 68(7)、597.
- 井口泰泉 (1999) 環境ホルモンの生態系への影響と世界の対応. 環境ホルモンの最新動向 (株式会社シーエムシー)、p.3-31.
- 石橋弘志、鎌迫典久、有菌幸司 (2002) メダカを利用したモニタリング. エンパイオ02、38(12)、39-44.
- 桂川・相模川流域協議会 (2001) 桂川・相模川におけるコイを指標とした環境ホルモン調査報告書.
- 建設省河川局河川環境課 (1999) 平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果について (平成11年3月30日).
(http://www.mlit.go.jp/river/press/9901_06/990330.html)
- 建設省河川局河川環境課 (2000) 平成11年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果について(平成12年7月21日).
(http://www.mlit.go.jp/river/press/200007_12/000721bindex.html).
- 記者発表資料(平成12年5月).
(<http://www.yies.pref.yamanashi.jp/kishahap/horumon.htm>)
- 国土交通省河川局河川環境課 (2001) 平成12年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について(平成13年7月24日).
(http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha01/05/050724_2_.html)
- 国土交通省河川局河川環境課 (2002) 平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について(平成14年12月12日).
(http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha02/05/051212_.html)
- 中村將、井口泰泉 (1998) 多摩川にみる魚類の変異. 科学 68(7)、515-517.
- 瀬子義幸 (2000) 桂川・相模川でのコイを用いた環境ホルモンの影響調査結果ならびに富士山の湧水に関する話題. 平成12年度桂川・相模川流域協議会定期総会 (平成12年5月20日相模湖交流センター) 講演要旨.
- 瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美、岡崎巧、加地弘一 (2000) 魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究. 山梨県環境科学研究所年報1999年、p.36.
- 瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美、岡崎巧、加地弘一 (2001) 魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究. 山梨県環境科学研究所年報2000年、p.37-38.
- 瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美、岡崎巧、加地弘一 (2002) 魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する調査研究. 山梨県環境科学研究所年報2001年、p.69-71.
- 鈴木敦子、井口泰泉 (2003) 野生生物への影響. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発 (井口泰泉監修、シーエムシー出版)、p.79-112.
- 和波一夫、嶋津暉之、加地弘一、高橋憲一 (2000) 多摩川の環境ホルモン問題に関する研究 (その2) -都内河川におけるコイの精巣等の調査-. 東京都環境科学研究所年報2000、p.153-164.
- Yamanaka, S., Arizono, K., Matsuda, Y., Urushitani, H. Iguchi, T. and Sakakibara, R (1998) Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(6), 1196-1200.
- 山梨県 (2002) 環境ホルモン問題への対応. 平成13年度版やまなしの環境2001、p.156-160.
(<http://www.pref.yamanashi.jp/rinkan/shinrinkan-so/shuto/shuto1/hakusho13/index.htm>)
- 山梨県 (2003) 環境ホルモン問題への対応. 平成14年度版やまなしの環境2002、p.154-157.
(<http://www.pref.yamanashi.jp/rinkan/taiki/horumon/horumon-top.htm>)

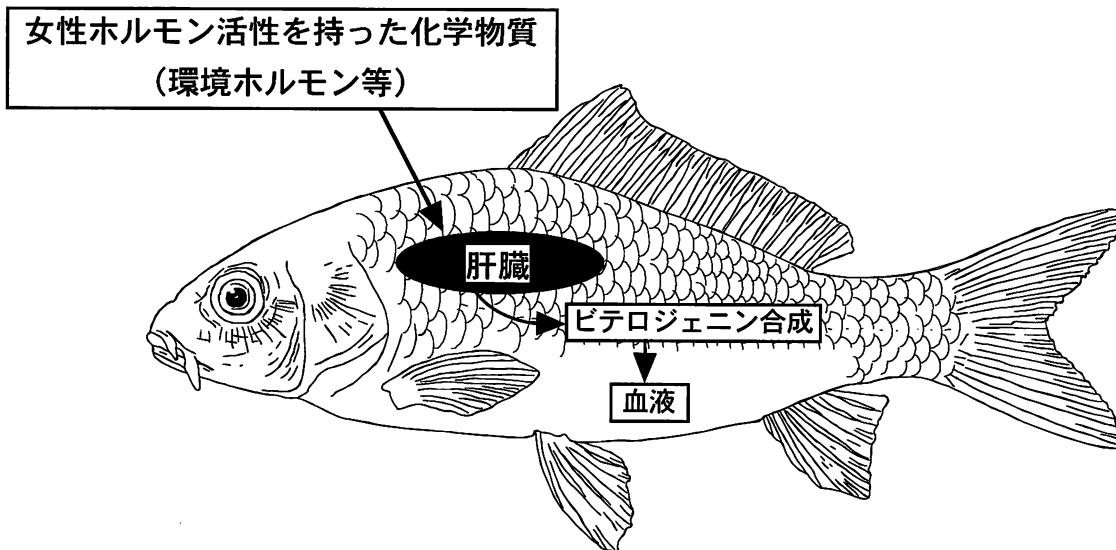


図1 環境ホルモン等による雄の魚の血中ビテロジェニン増加

雄の魚が女性ホルモン活性を持った化学物質（環境ホルモン等）に暴露されると、卵黄蛋白前駆物質ビテロジェニンが肝臓で合成され、血液（血清）中の濃度が増加する。通常、雄の魚の血清中にはビテロジェニンはほとんどないとされている。

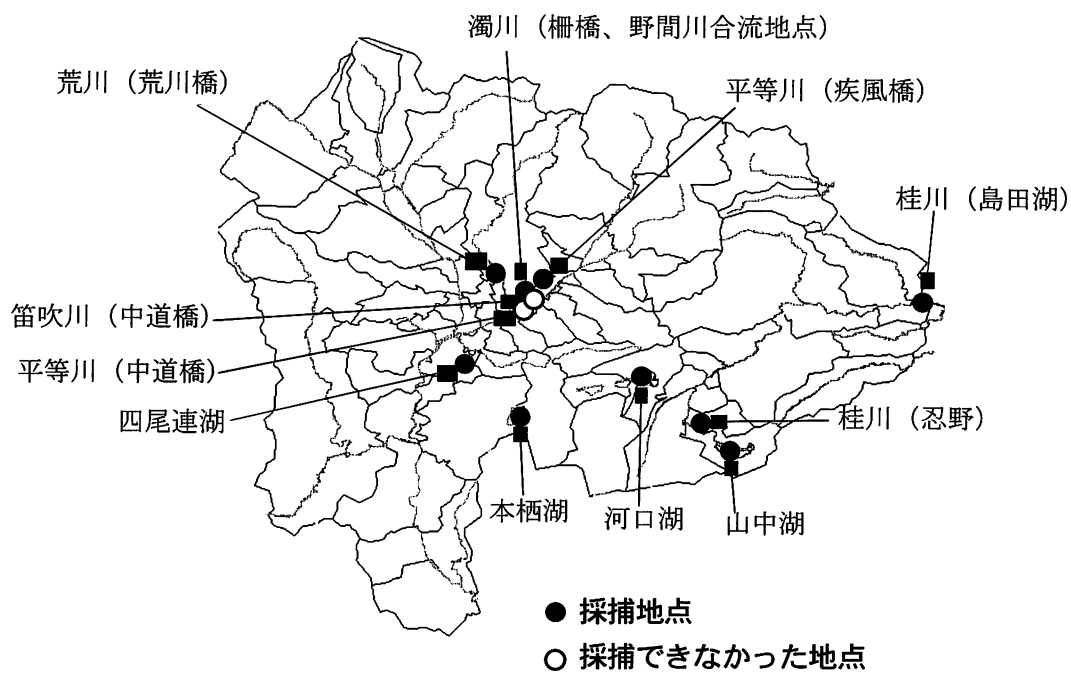


図2 魚の採捕地点

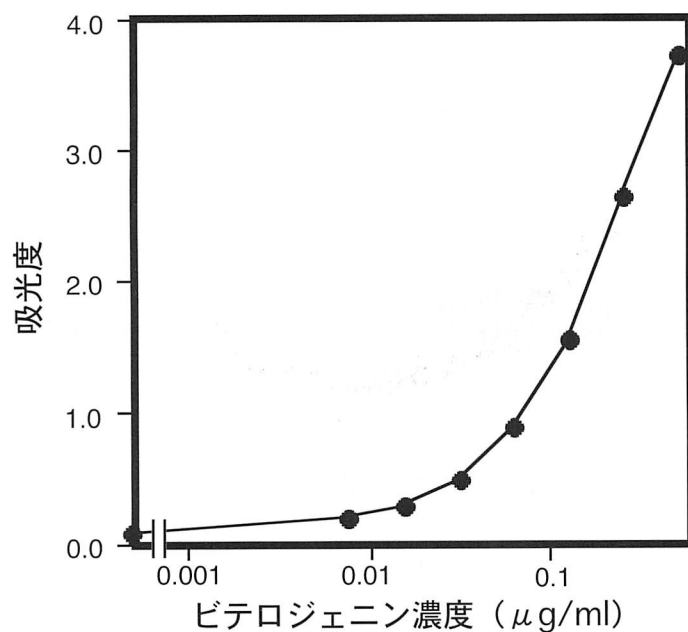
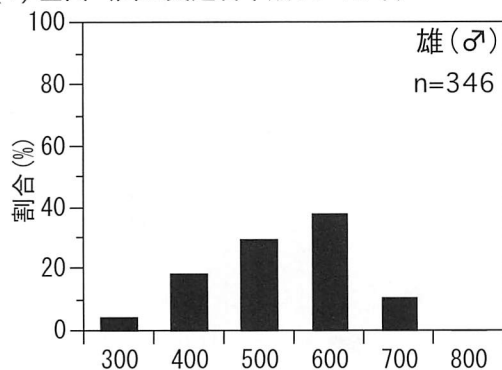


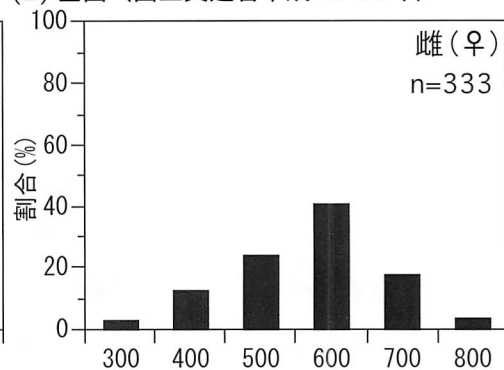
図3 酵素免疫測定法（ELISA）によるビテロジェニン測定の見量線の一列

コイの血清は、5倍以上に希釈して測定する。5倍希釈で測定値が0.1 μg/mlの場合、血清中では0.5 μg/mlになる。

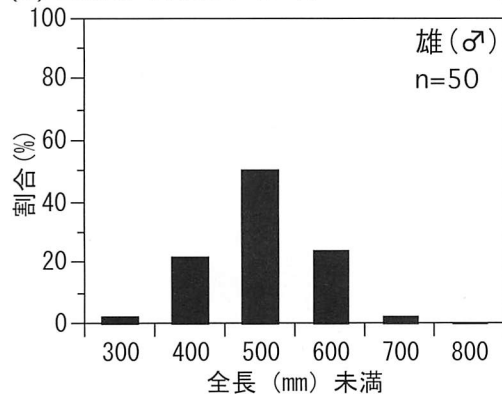
(1) 全国（国土交通省平成10-13年）



(2) 全国（国土交通省平成10-13年）



(3) 山梨県（平成11-13年）



(4) 山梨県（平成11-13年）

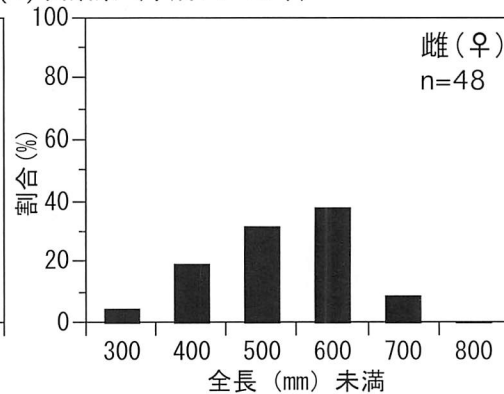
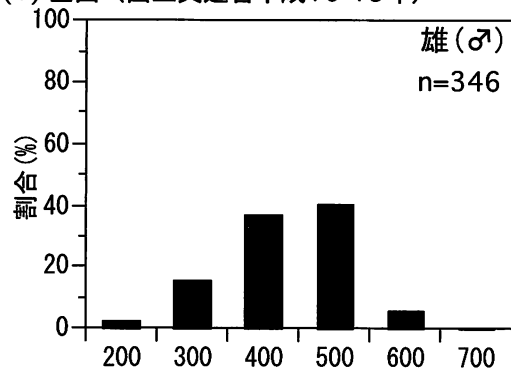
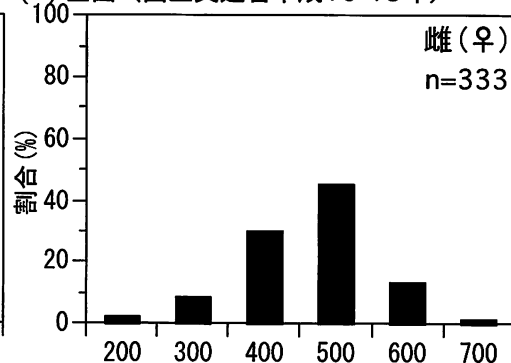


図4 コイ全長別の頻度：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11-13年度）の比較

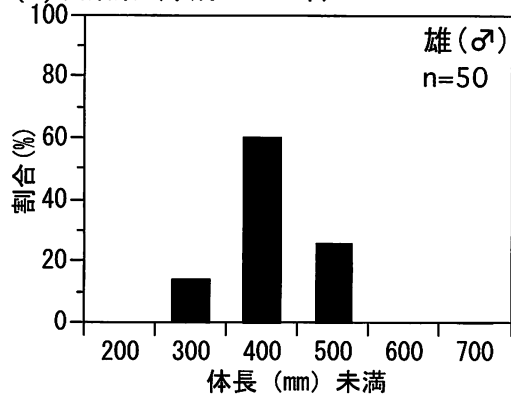
(1) 全国（国土交通省平成10-13年）



(2) 全国（国土交通省平成10-13年）



(3) 山梨県（平成11-13年）



(4) 山梨県（平成11-13年）

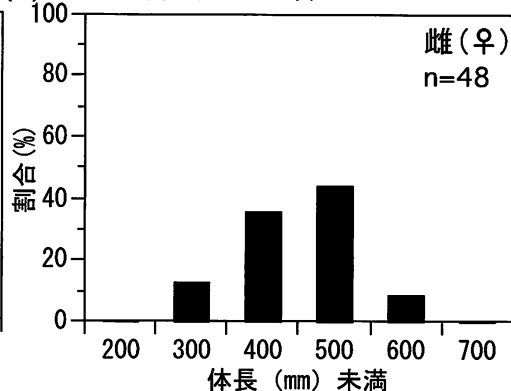
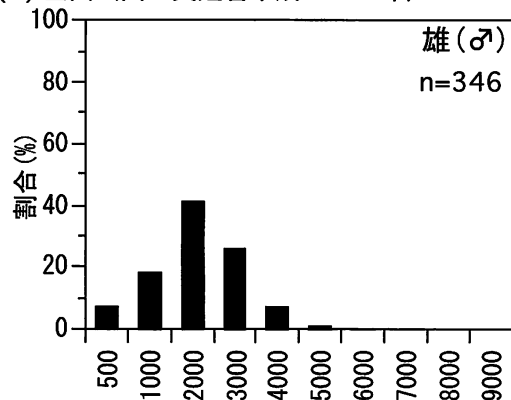
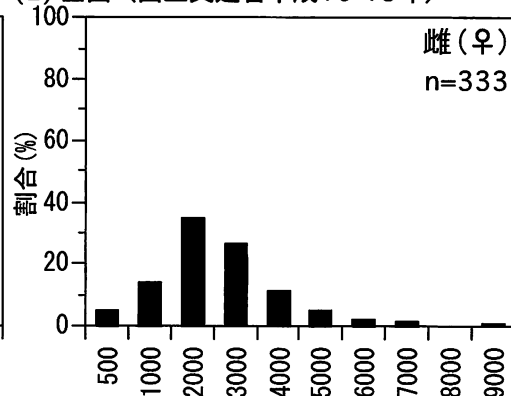


図5 コイ体長別の頻度：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11-13年度）の比較

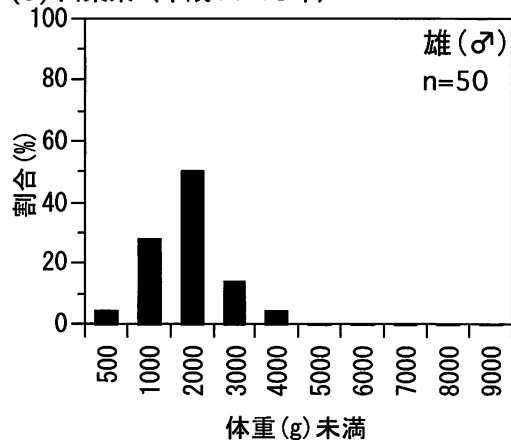
(1) 全国（国土交通省平成10-13年）



(2) 全国（国土交通省平成10-13年）



(3) 山梨県（平成11-13年）



(4) 山梨県（平成11-13年）

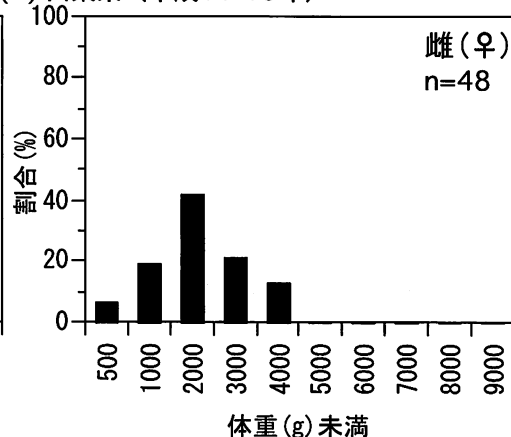


図6 コイ体重別の頻度：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11-13年度）の比較

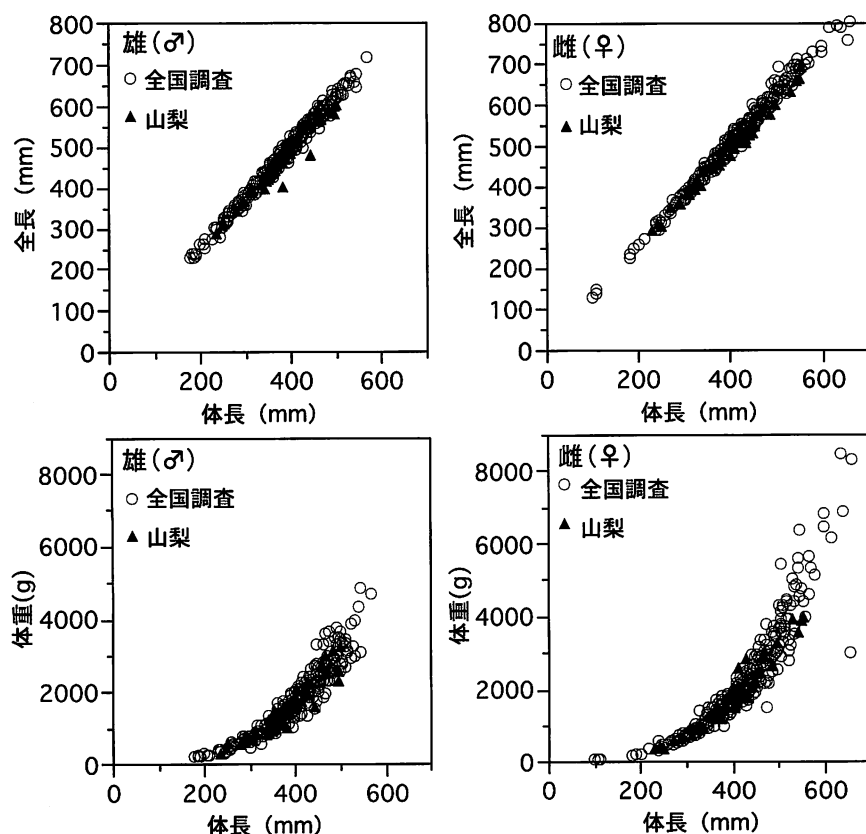


図7 コイの体長、全長、体重の関係：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11～13年度）の比較

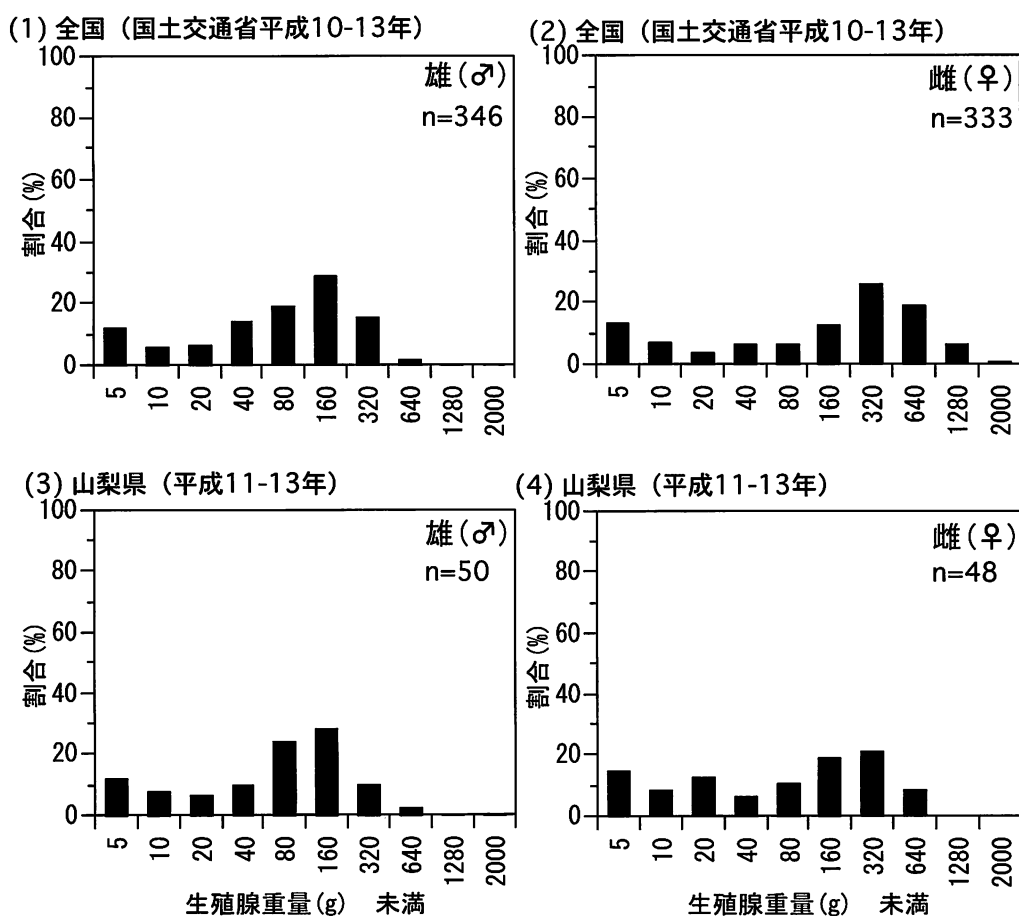


図8 コイ生殖腺重量別の頻度：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11～13年度）の比較

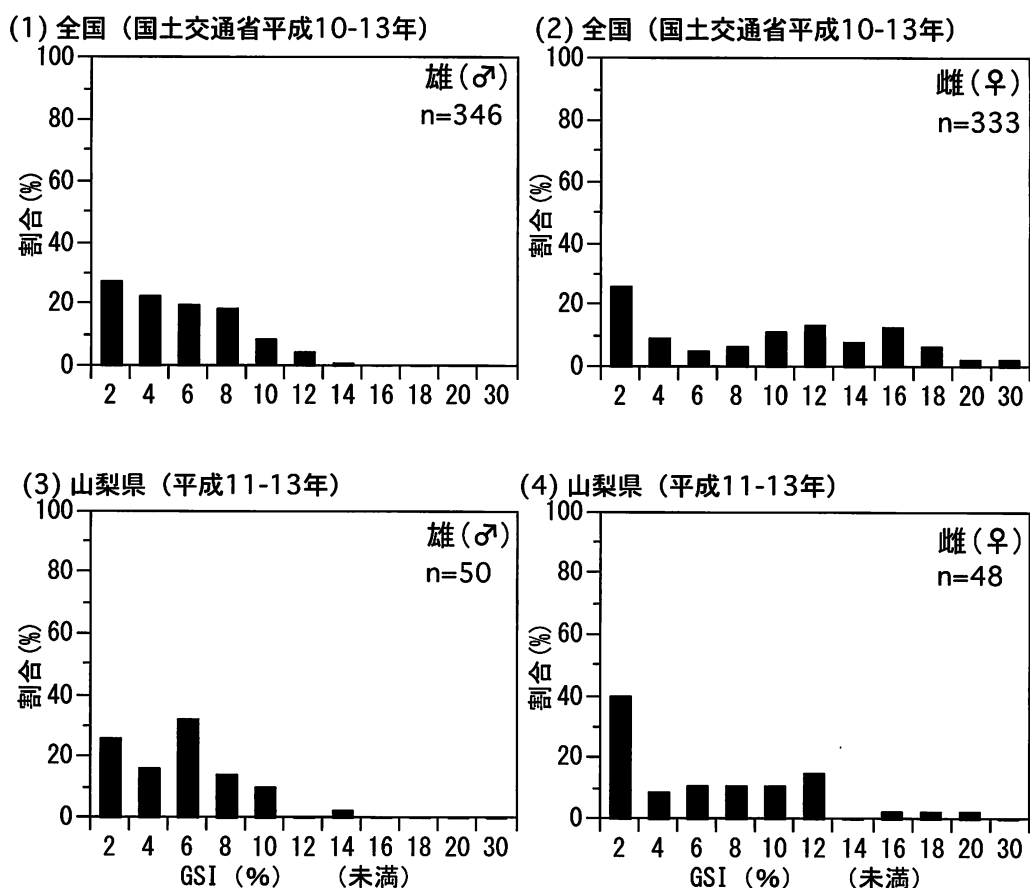


図9 コイGSI (%)の頻度：全国調査（国土交通省平成10～13年度）と山梨県（平成11年度-13年度）の比較

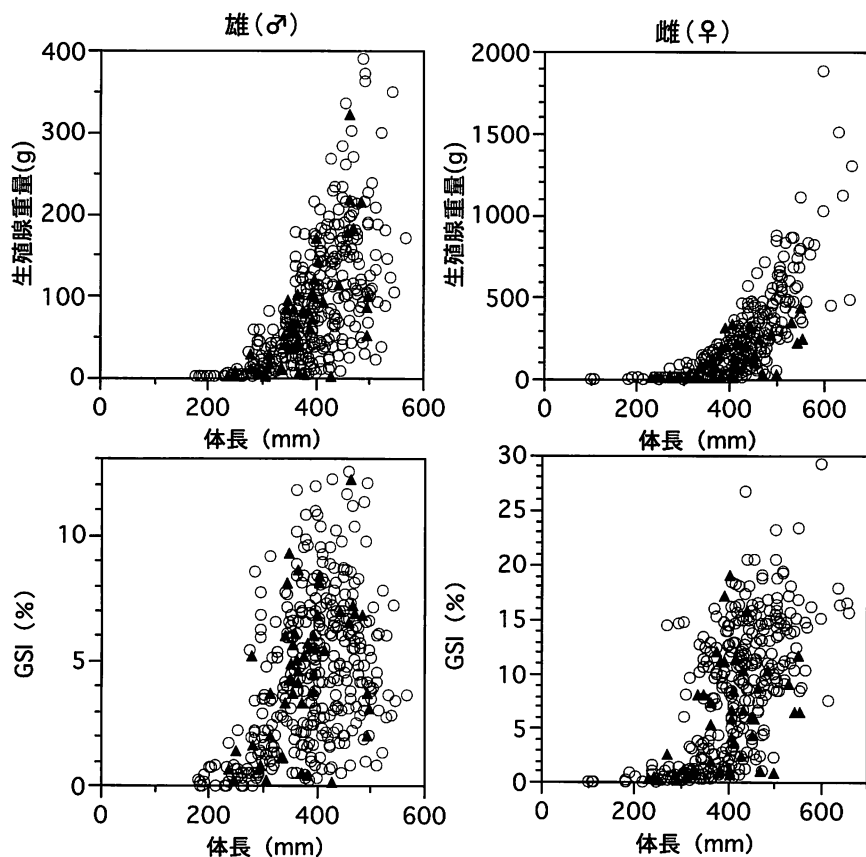


図10 コイの体長と生殖腺重量およびGSIの関係：全国調査（○、国土交通省平成10～13年度）と山梨県（▲、平成11～13年度）の比較
※雌雄で縦軸と横軸のスケールが異なることに注意。

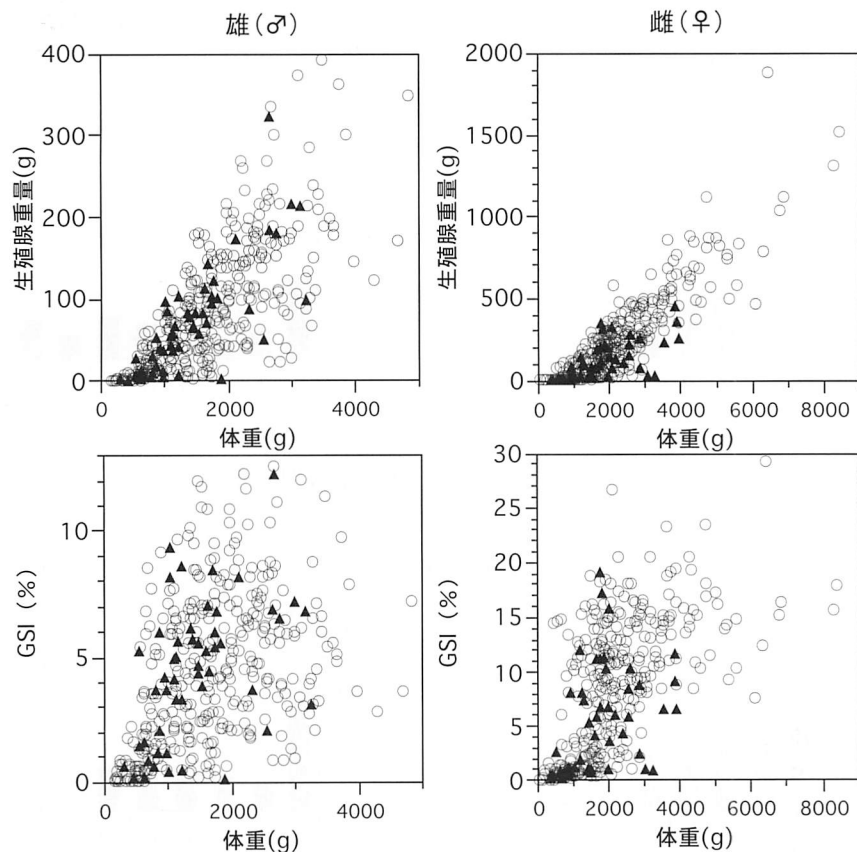


図11 コイの体重と生殖腺重量およびGSIの関係：全国調査（○、国土交通省平成10～13年度）と山梨県（▲、平成11～13年度）の比較
※雌雄で縦軸と横軸のスケールが異なることに注意。

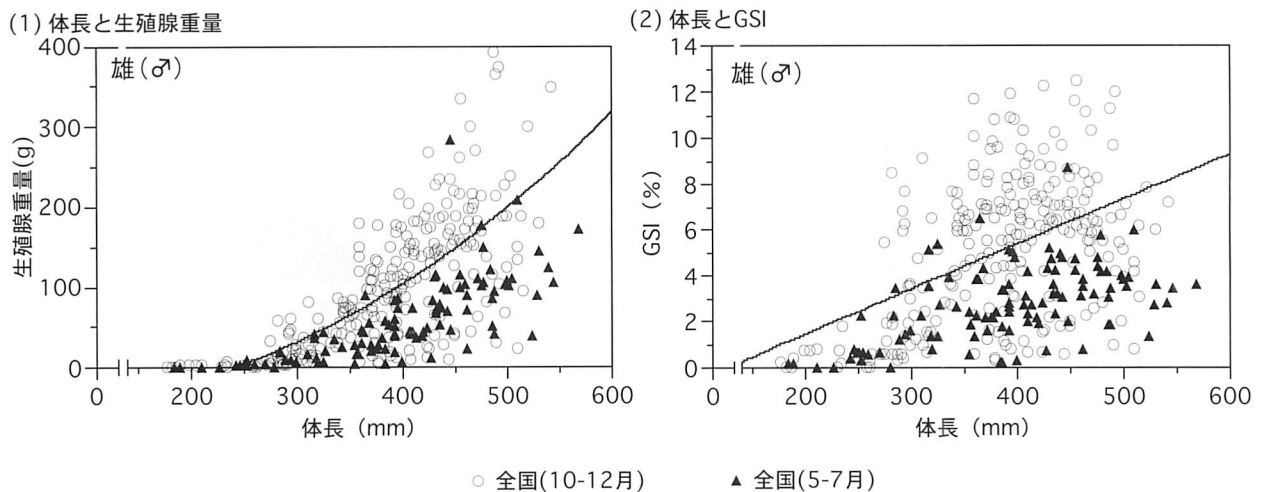


図12 雄コイの体長と生殖腺重量およびGSIの関係：鯉の採捕時期の比較（全国調査：国土交通省平成10～13年度）

回帰曲線、又は回帰直線は全てのデータを用いて計算

(1)：二次回帰曲線 $y = 0.00118x^2 - 0.107x - 42.4$

(2)：回帰直線 $f(x) = 0.0198x - 2.51$ （二次曲線の場合は、上に凸のグラフとなる）

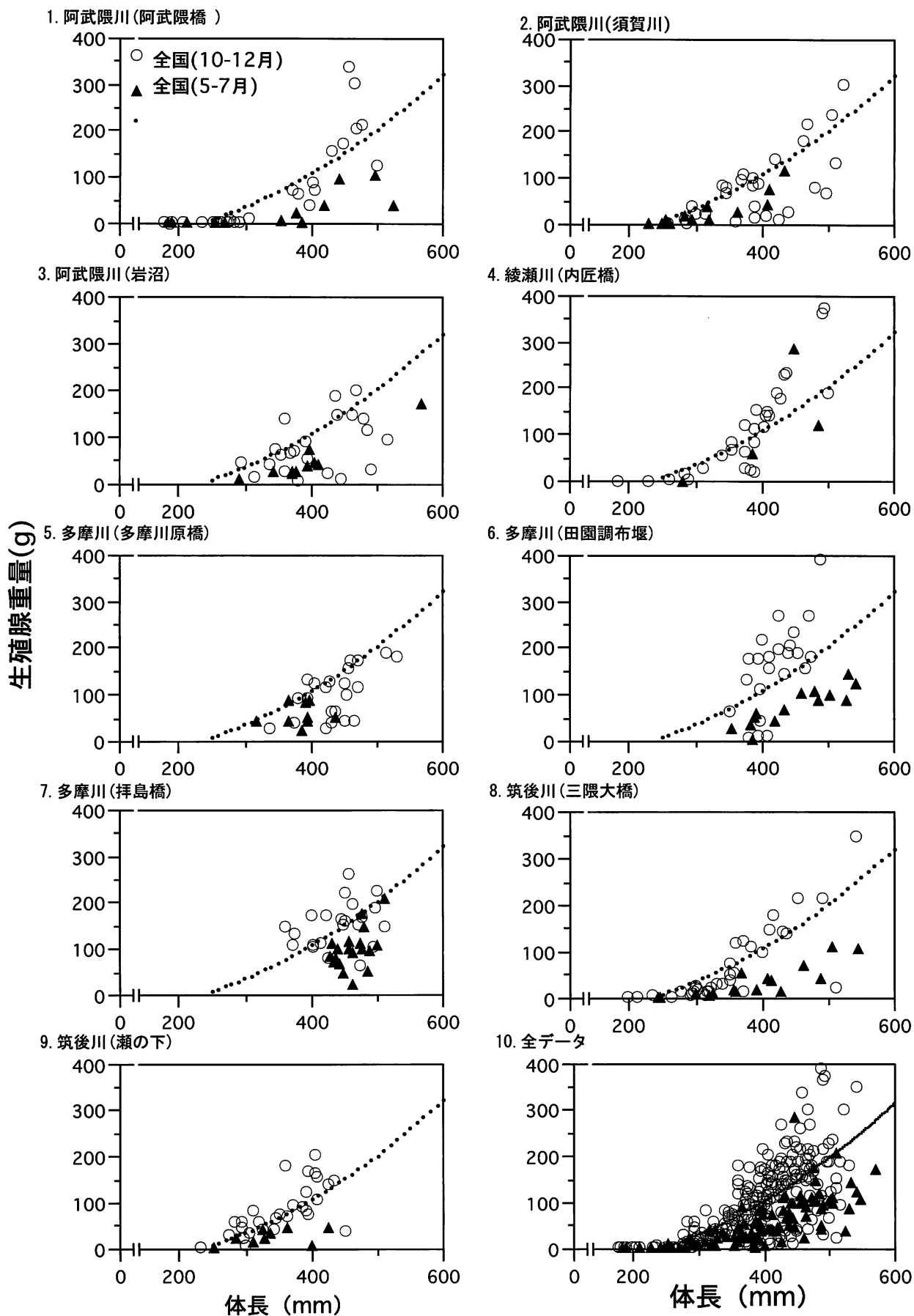


図13 雄コイの体長と生殖腺重量の関係：採捕場所ごとの時期の比較（全国調査：国土交通省平成10～13年度）

1～9の図中の点線は全データを用いたときの回帰二次曲線

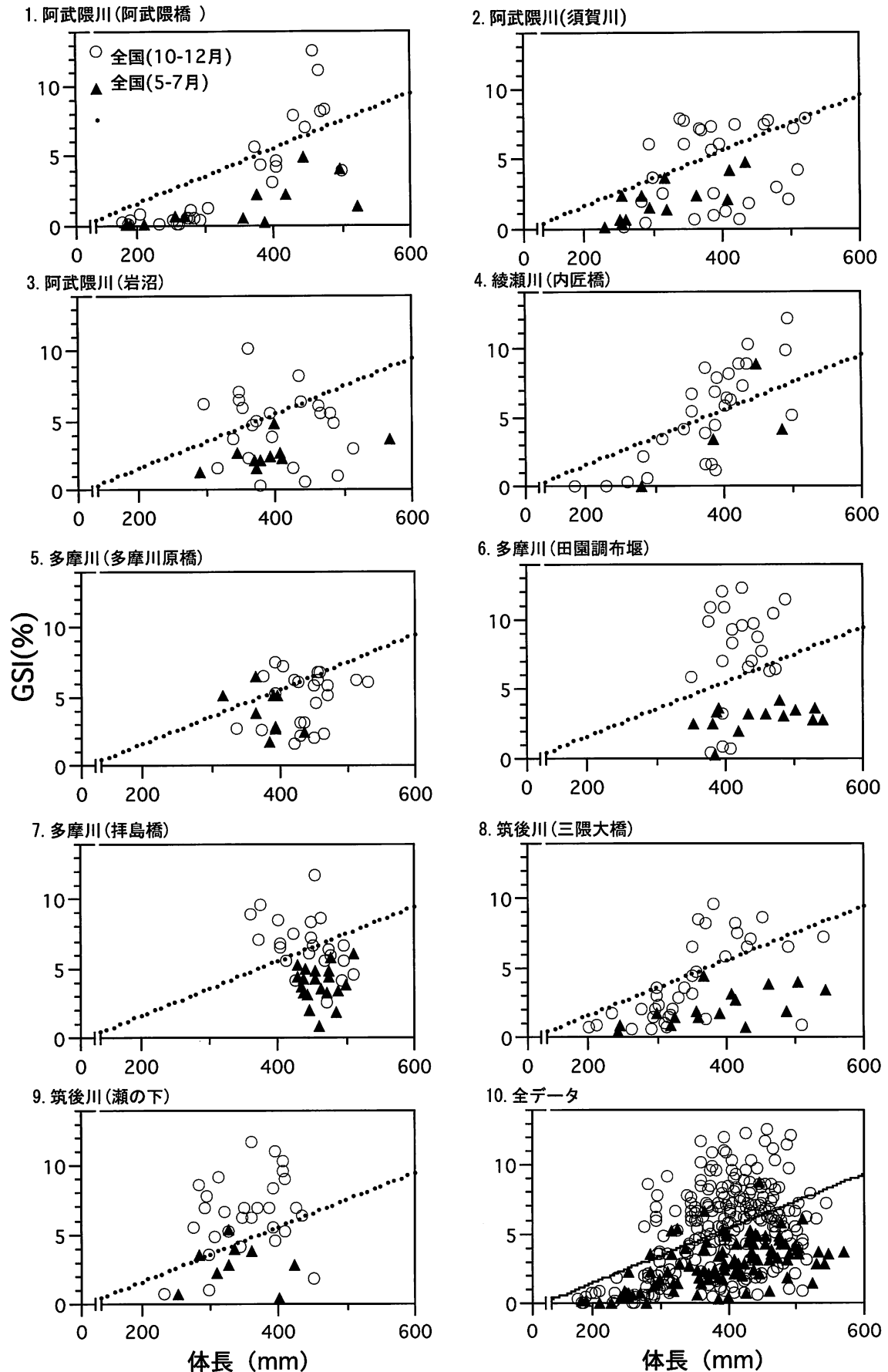


図14 雄コイの体長とGSIの関係：採捕場所ごとの時期の比較（全国調査：国土交通省平成10～13年度）
1～9の図中の点線は全データを用いたときの回帰直線

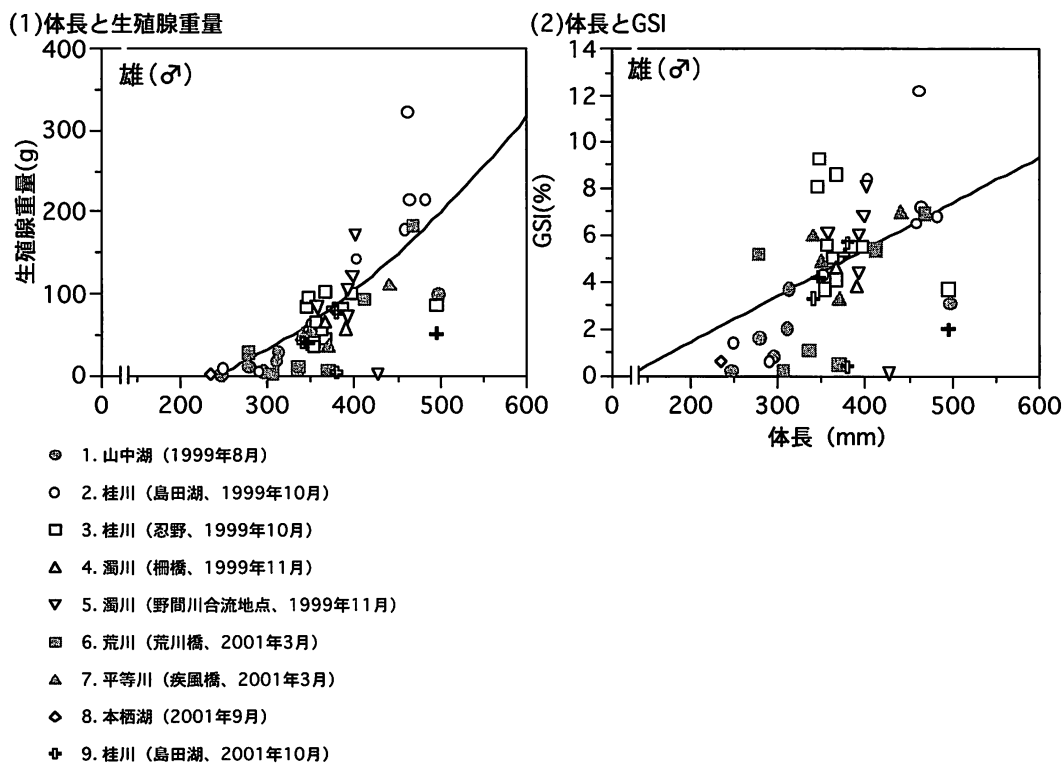


図15 雄コイの体長と生殖腺重量および生殖腺体指数(GSI)の関係：コイの採捕場所の比較(山梨データ)
(1)の曲線と(2)の直線は、全国のデータから計算した回帰曲線と回帰直線

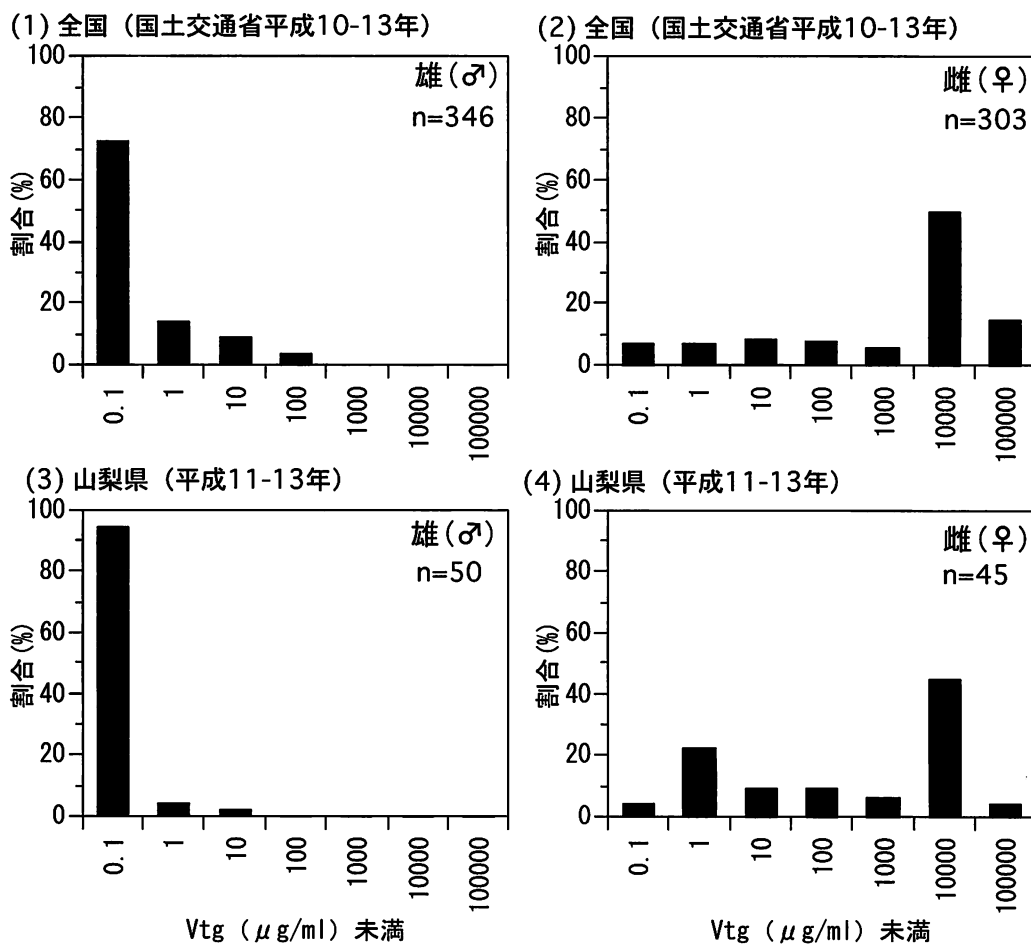


図16 コイ血清中ビテロジェニン (Vtg) 濃度別の頻度：全国調査 (国土交通省平成10-13年度) と山梨県 (平成11-13年度) の比較

血清中ビテロジェニン濃度が250 µg/mlを越える雌3個体 (「250<」、表3-1) のデータは含まれていない。

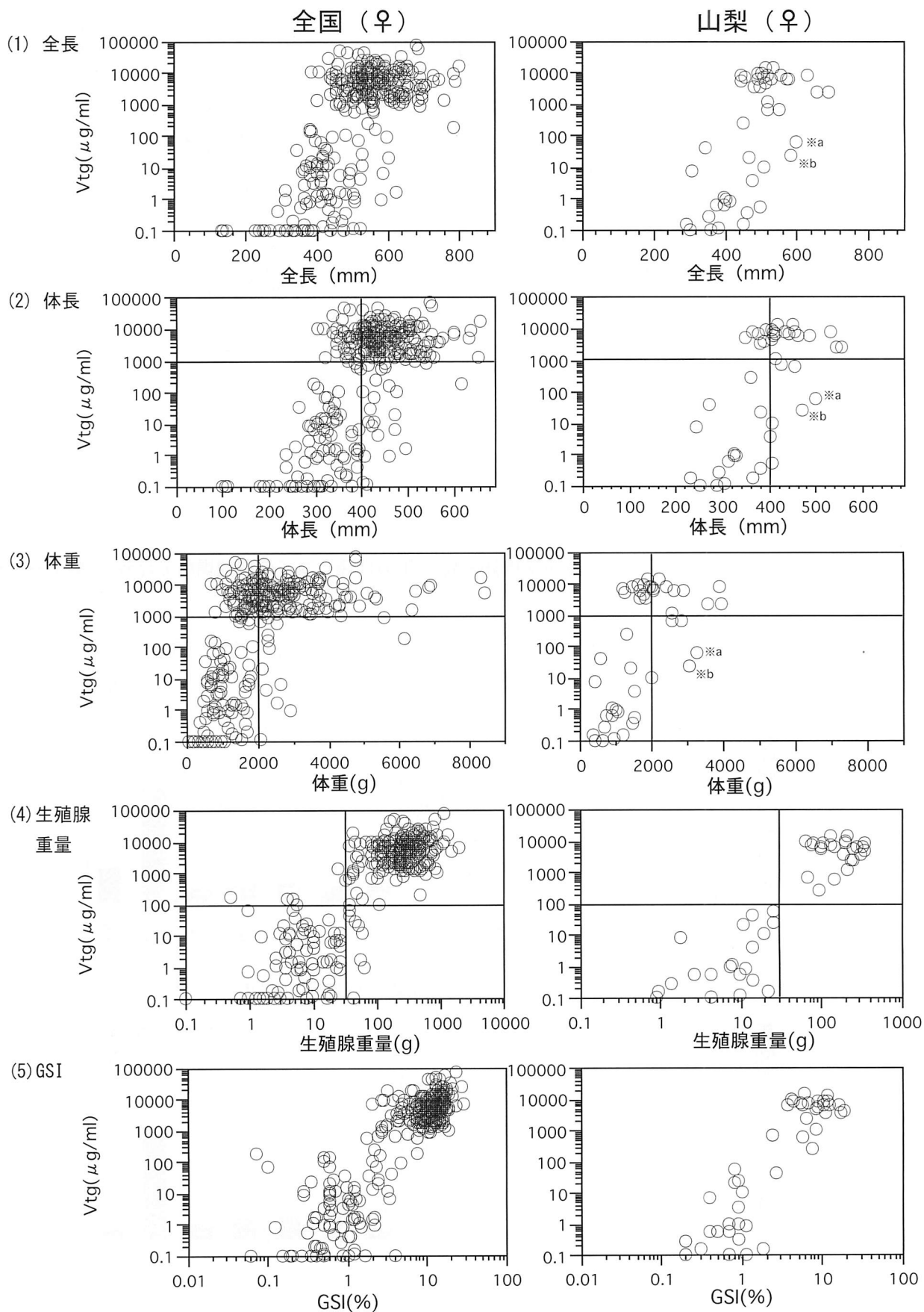


図17 雌コイの全長、体長、体重、生殖腺重量、生殖腺重量、GSIとビテロジェニン (Vtg) の関係 (全国調査および山梨データ)

※a: 桂川 [島田湖]、2001年No.10) ; ※b: 平等川No.5

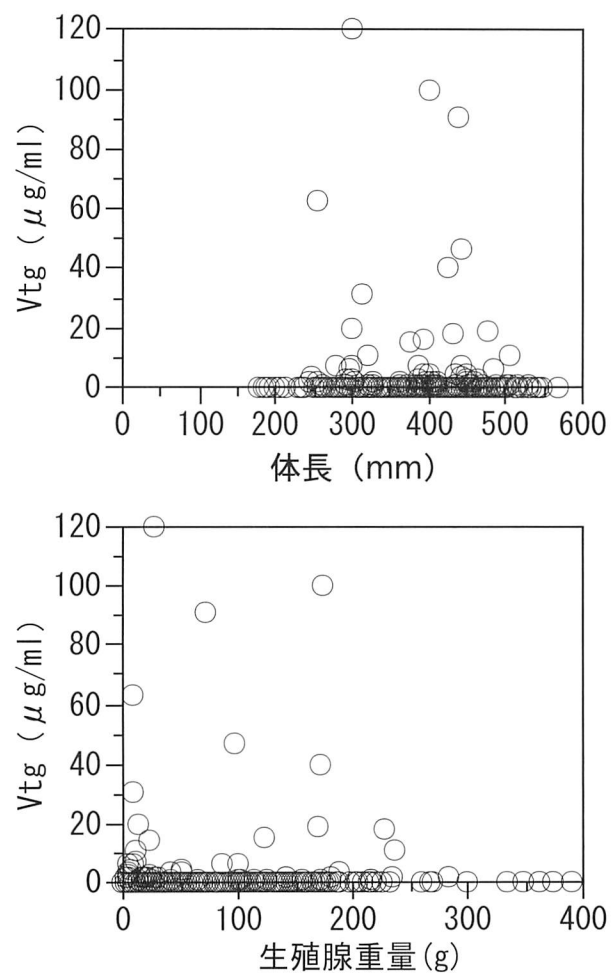


図18 雄コイの体長および生殖腺重量と血清中ビテロジェニン（Vtg）濃度の関係
（国土交通省平成10-13年度調査）

図19 鱗の年齢数と全長、体長、体重、生殖腺重量、GSI、血清中ピロロジエニン濃度 (Vtg) の関係 (山梨データ)

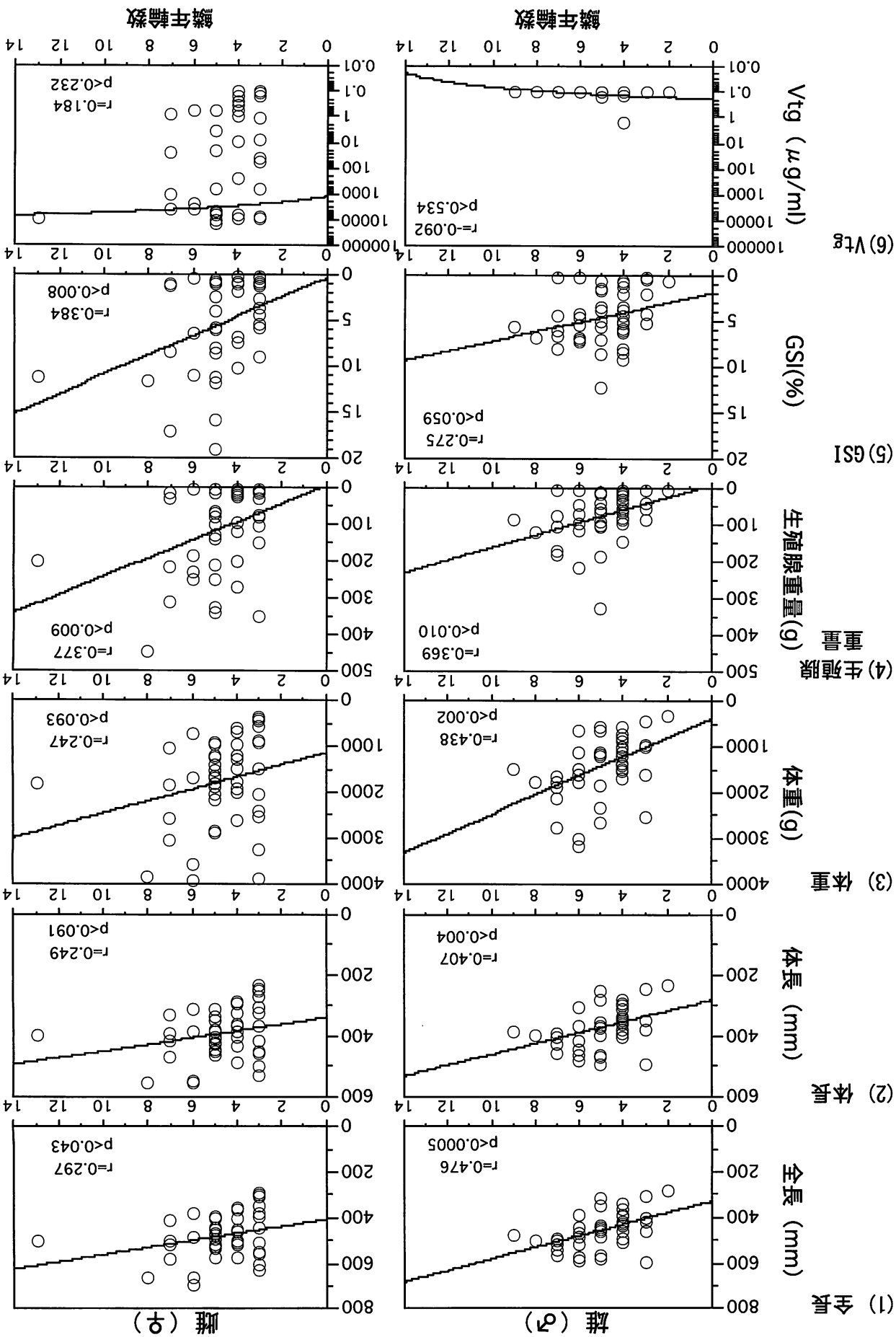


表1 調査日・調査地点・採捕魚種・採捕尾数

年月日	調査地点	調査方法	採捕魚種	採捕尾数
1999. 8. 3	河口湖	地引き網	オオクチバス	20
			ブルーギル	20
1999. 8. 10	山中湖	地引き網	コイ	15
			オオクチバス	15
1999. 10. 5	桂川（島田湖）	刺し網、釣り	コイ	14
1999. 10. 8	桂川（忍野）	釣り	コイ	20
1999. 11. 5	濁川（さくはし）	投網	コイ	2
			フナ類	1
	濁川（野間川合流地点）	投網	コイ	14
2000. 1. 22	河口湖	地引き網	オオクチバス	15
2000. 8. 10	山中湖	地引き網	オオクチバス	7
2000. 11. 27	河口湖	地引き網	ゲンゴロウブナ（ヘラブナ）	3
2001. 3. 15	荒川（荒川橋）	投網	コイ	12
2001. 3. 22	平等川（疾風橋）	投網	コイ	5
2001. 3. 22	平等川（中道橋上流）	刺し網		0
2001. 3. 22	笛吹川（中道橋）	刺し網		0
2001. 9. 28	本栖湖	刺し網	コイ	3
			ゲンゴロウブナ（ヘラブナ）	1
			フナ類	1
			オオクチバス	4
2001. 10. 13	桂川（島田湖）	投網	コイ	20
2001. 10. 17	四尾連湖	釣り	オオクチバス	10
2001. 10. 19	河口湖	地引き網	ゲンゴロウブナ（ヘラブナ）	11
			ブルーギル	7
合計				220

表2 採捕されたコイ、フナ類、ゲンゴロウブナの血清中ビテロジェニン濃度範囲

採捕地点	魚種	採捕日	オス		メス		不明（注）		合計 尾数
			尾 数	ビテロジェニン濃度 （μg/ml）	尾 数	ビテロジェニン濃度 （μg/ml）	尾 数	ビテロジェニン濃度 （μg/ml）	
山中湖	コイ	1999. 8. 10	6	0.1未満	8	0.11～2,400	1	0.1未満	15
桂川（忍野）	コイ	1999. 10. 8	10	0.1未満、0.15	10	1,080～13,700			20
桂川（島田湖）	コイ	1999. 10. 5	8	0.1未満	6	0.26～5,700			14
桂川（島田湖）	コイ	2001. 10. 13	6	0.1未満、0.14, 1.41	8	4～7,800	6	0.1未満	20
濁川（柵橋）	コイ	1999. 11. 5	2	0.1未満					2
濁川（野間川合流地点）	コイ	1999. 11. 5	6	0.1未満	8	0.34～8,700			14
荒川（荒川橋）	コイ	2001. 3. 15	7	0.1未満	5	0.1未満～250以上			12
平等川（疾風橋）	コイ	2001. 3. 22	4	0.1未満	1	23.4			5
本栖湖	コイ	2001. 9. 28	1	0.1未満	2	0.1未満、41.1			3
濁川（柵橋）	フナ類	1999. 11. 5			1	7,500			1
本栖湖	フナ類	2001. 9. 28			1	437			1
河口湖	ゲンゴロウブナ	2000. 11. 27	2	0.1未満、0.60	1	3,250			3
河口湖	ゲンゴロウブナ	2001. 10. 19	2	0.1未満	9	1100～4500			11
本栖湖	ゲンゴロウブナ	2001. 9. 28	1	0.1未満					1
合計			55		60		7		122

注：生殖腺が採取できなかった個体。詳しくは本文参照。

表3-1 コイ、フナ類、ゲンゴロウブナのデータ一覧

通し No.	元表 No.	調査地点	採捕年月日	魚種	性別	鱗 年輪	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (g)	生殖腺 重 (g)	GSI値 (%)	Vtg濃度 (μg/ml)	備考
1	16	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	4	365	296	687	5.37	0.8	<0.1	
2	22	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	-	603	497	3230	98.71	3.1	<0.1	
3	24	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	4	389	311	864	16.99	2.0	<0.1	
4	25	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	4	395	313	802	29.31	3.7	<0.1	
5	29	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	5	342	279	625	10.31	1.6	<0.1	
6	30	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♂	3	303	247	438	0.8	0.2	<0.1	穴あき病
7	2	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	4	359	290	774	4.7	0.6	<0.1	
8	4	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	5	311	249	540	7.7	1.4	<0.1	
9	7	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	4	425	352	1457	62.8	4.3	<0.1	
10	8	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	4	492	402	1692	142.3	8.4	<0.1	脾臓分節
11	10	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	6	585	482	3147	213.9	6.8	<0.1	
12	11	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	5	561	462	2651	322.8	12.2	<0.1	
13	13	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	6	569	464	2985	215.2	7.2	<0.1	
14	14	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♂	7	564	458	2753	178.1	6.5	<0.1	
15	2	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	5	581	495	2305	86.3	3.7	<0.1	
16	4	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	5	442	366	1200	102.6	8.6	<0.1	
17	6	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	4	416	345	1047	84.3	8.1	<0.1	左眼欠損
18	8	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	4	418	347	1020	94.9	9.3	<0.1	
19	11	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	9	475	385	1473	81.3	5.5	<0.1	
20	13	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	5	485	396	1823	100.3	5.5	0.15	
21	14	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	6	444	366	1092	44.3	4.1	<0.1	
22	16	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	4	432	362	1113	55.9	5.0	<0.1	
23	17	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	5	436	355	1157	65.2	5.6	<0.1	
24	20	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♂	4	432	354	983	35.9	3.7	<0.1	
25	1	濁川(榑橋)	1999. 11. 5	コイ	♂	6	469	366	1458	66.39	4.6	<0.1	
26	2	濁川(榑橋)	1999. 11. 5	コイ	♂	4	505	391	1519	57.59	3.8	<0.1	左鰓蓋欠損
27	6	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	8	501	398	1768	120.29	6.8	<0.1	
28	7	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	7	492	392	1640	71.52	4.4	<0.1	
29	9	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	7	538	427	1877	1.08	0.1	<0.1	腫瘍状組織14.0g
30	10	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	7	518	401	2121	171.32	8.1	<0.1	
31	11	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	7	497	392	1746	103.93	6.0	<0.1	
32	14	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♂	4	455	357	1353	82.7	6.1	<0.1	
33	1	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	4	416	337	990	10.7	1.1	<0.1	右精巣が小さい
34	5	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	6	387	306	640	1.3	0.2	<0.1	
35	6	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	-	408	334	820	9.3	1.1	<0.1	
36	7	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	5	565	468	2630	182.3	6.9	<0.1	
37	9	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	6	512	412	1740	93.1	5.4	<0.1	
38	11	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	4	341	278	540	28.1	5.2	<0.1	
39	12	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♂	5	462	370	1200	6.5	0.5	<0.1	穴あき病、左側ひも状精巣
40	1	平等川(疾風橋)	2001. 3. 22	コイ	♂	6	480	441	1610	112.1	7.0	<0.1	
41	2	平等川(疾風橋)	2001. 3. 22	コイ	♂	5	443	350	1100	54.16	4.9	<0.1	
42	3	平等川(疾風橋)	2001. 3. 22	コイ	♂	5	450	370	1120	36.9	3.3	<0.1	
43	4	平等川(疾風橋)	2001. 3. 22	コイ	♂	4	395	340	860	51.3	6.0	<0.1	
44	5	本栖湖	2001. 9. 28	コイ	♂	2	285	235	320	1.9	0.6	<0.1	
45	3	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	3	462	376	1580	82.2	5.2	<0.1	
46	14	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	3	420	346	935	39.1	4.2	<0.1	
47	15	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	4	462	380	1380	78.4	5.7	1.41	
48	17	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	3	597	495	2540	51.0	2.0	<0.1	
49	18	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	4	415	341	1210	40.1	3.3	0.14	
50	19	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♂	3	400	380	995	3.9	0.4	<0.1	
1	17	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	7	414	326	1023	11.41	1.1	0.83	
2	18	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	3	379	305	900	9.74	1.1	0.11	
3	19	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	4	452	364	1200	21.17	1.8	0.16	
4	20	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	6	690	555	3940	251.93	6.4	2,411.00	
5	21	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	5	475	402	1528	14.07	0.9	3.62	
6	23	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	6	658	544	3560	228.52	6.4	2,410.00	穴あき病
7	26	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	6	377	312	718	2.65	0.4	0.58	
8	27	山中湖	1999. 8. 10	コイ	♀	3	293	230	359	0.93	0.3	0.16	
9	1	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	4	355	291	655	1.4	0.2	0.26	
10	3	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	4	400	325	962	7.2	0.7	0.92	
11	5	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	5	465	381	1388	10.9	0.8	20.40	
12	6	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	3	305	243	420	1.8	0.4	7.20	イカリムシ
13	9	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	5	520	427	2853	68.6	2.4	662.00	
14	12	桂川(島田湖)	1999. 10. 5	コイ	♀	5	570	463	2864	250.5	8.7	5,654.00	
15	1	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	4	500	404	1491	9.8	0.7	0.53	
16	3	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	4	518	434	1921	197.2	10.3	7,998.00	
17	5	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	512	418	1859	210.3	11.3	13,480.00	
18	7	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	532	448	2175	128	5.9	13,685.00	
19	9	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	7	517	414	2551	215	8.4	1,080.00	脊椎湾曲
20	10	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	4	575	487	2610	270.1	10.3	5,958.00	
21	12	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	528	441	2056	324.7	15.8	6,263.00	
22	15	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	494	410	1680	97.3	5.8	5,899.00	左体側に穴あき、頭部に凹み
23	18	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	453	375	1184	140.4	11.9	6,435.00	
24	19	桂川(忍野)	1999. 10. 8	コイ	♀	5	493	407	1624	64.5	4.0	9,057.00	左卵巣未発達
25	4	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	4	460	382	1477	13.98	0.9	0.34	口部発赤、脾臓肥大27.83g
26	5	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	-	517	410	2004	132.39	6.6	7,481.00	
27	8	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	7	498	390	1823	311.23	17.1	3,641.00	
28	12	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	5	398	310	896	4.38	0.5	0.58	
29	13	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	6	484	382	1672	186.16	11.1	3,482.00	
30	15	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	5	512	405	1778	340.46	19.1	4,416.00	
31	16	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	5	442	347	1239	99.9	8.1	5,005.00	
32	17	濁川(野間川合流地点)	1999. 11. 5	コイ	♀	13	502	393	1782	199.11	11.2	8,713.00	口曲がり、脊椎湾曲
33	2	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♀	4	452	362	1290	95.7	7.4	250.00	尾びれ損傷、尾柄部びらん
34	3	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♀	4	358	286	600	4.3	0.7	<0.1	
35	4	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♀	5	403	334	940	76.4	8.1	250<	
36	8	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♀	8	662	550	3860	446	11.6	250<	
37	10	荒川(荒川橋)	2001. 3. 15	コイ	♀	4	506	432	1760	118.7	6.7	250<	
38	5	平等川(疾風橋)	2001. 3. 22	コイ	♀	7	580	470	3050	26.1	0.9	23.40	
39	7	本栖湖	2001. 9. 28	コイ	♀	3	300	250	380	0.9	0.2	<0.1	
40	9	本栖湖	2001. 9. 28	コイ	♀	3	345	270	540	13.9	2.6	40.75	
41	7	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♀	3	553	452	2395	102.8	4.3	7,784.00	
42	8	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♀	3	395	325	875	7.7	0.9	1.03	
43	9	桂川(島田湖)	2001. 10. 13	コイ	♀	3	550	455	2540	147.7	5.8	613.00	

表3-2 コイ、フナ類、ゲンゴロウブナのデータ一覧（続き）

44	10	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	♀	3	600	498	3250	25.6	0.8	57.31	卵巣：卵は認められず、表面に水泡状の粒々あり。
45	12	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	♀	3	508	412	2055	73.9	3.6	6,651.00	
46	13	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	♀	4	510	403	1985	19.5	1.0	9.76	腹が異常に膨れている。藤肝臓肥大。腸間膜リンパの腫瘍？大きな水泡あり。
47	16	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	♀	3	630	530	3890	350.3	9.0	7,990.00	
48	20	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	♀	3	445	365	1475	78.0	5.3	7,749.00	
1	1	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	5	330	262	575	4.0	0.7	<0.1	
2	2	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	6	360	292	680	0.8	0.1	0.12	
3	4	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	5	352	382	635	2.6	0.4	<0.1	
4	5	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	3	373	310	875	11.0	1.3	<0.1	
5	6	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	4	417	335	1010	4.6	0.5	<0.1	
6	11	桂川（島田湖）	2001.10.13	コイ	不明	4	382	314	845	4.0	0.5	<0.1	全部保存
7	28	山中湖	1999.8.10	コイ	不明	4	263	211	272	-	-	<0.1	畜養中に死亡。腐敗で生殖腺未測定
1	3	濁川（榑橋）	1999.11.5	フナ sp	♀	-	264	204	279	10.15	3.6	7,510.00	
2	2	本栖湖	2001.9.28	フナ sp	♀	11	320	260	460	8.8	1.9	437.00	
1	1	河口湖	2000.11.27	ゲンゴロウブナ	♂	4	305	264	680	11.9	1.8	<0.1	
2	2	河口湖	2000.11.27	ゲンゴロウブナ	♂	5	295	244	700	16.3	2.3	0.60	
3	8	本栖湖	2001.9.28	ゲンゴロウブナ	♂	2	300	245	440	12.2	2.8	<0.1	
4	15	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♂	3	390	310	1180	60.2	5.1	<0.1	
5	17	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♂	10	390	295	960	38.3	4.0	<0.1	尾が上に曲がっている
1	3	河口湖	2000.11.27	ゲンゴロウブナ	♀	7	352	280	830	70.8	8.5	3,250.00	
2	7	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	4	410	330	1560	73.8	4.7	2,521.00	
3	8	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	5	400	320	1560	113.2	7.3	1,086.00	
4	9	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	5	410	330	1880	141.7	7.5	2,206.00	
5	10	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	5	430	350	1920	130.0	6.8	4,505.00	
6	11	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	5	400	330	1300	144.8	11.1	3,975.00	
7	12	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	2	390	305	1300	65.5	5.0	2,802.00	
8	13	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	2	375	295	1080	43.5	4.0	2,925.00	
9	14	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	2	380	310	1280	58.3	4.6	2,815.00	
10	16	河口湖	2001.10.19	ゲンゴロウブナ	♀	2	360	290	1080	80.3	7.4	3,659.00	

雄コイ

平均値	4.9	454	371	1,431	72.3	4.4	
標準偏差	1.4	78	65	727	66.8	2.8	
最大値	9.0	603	497	3,230	322.8	12.2	1.41
最小値	2.0	285	235	320	0.8	0.1	0.14

雌コイ

平均値	4.7	481	392	1,772	112.8	5.4	
標準偏差	1.8	93	79	952	116.9	5.0	
最大値	13.0	690	555	3,940	446.0	19.1	13,685.00
最小値	3.0	293	230	359	0.9	0.2	0.11

山梨県内の湖沼に生息するオオクチバス、ブルーギルの雌化調査

瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美（山梨県環境科学研究所）
岡崎巧、加地弘一（山梨県水産技術センター）
志村清仁（帝京大学薬学部）、有蘭幸司（熊本県立大学）
中野菜穂子（株式会社トランスジェニック）
手塚静雄（日本バイオラッド ラボラトリーズ（株））

目的

野生生物に対する外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の野生生物に対する影響の有無を調査する一環として、コイを用いた魚の雌化調査は全国的に行われている。我々も、山梨県内の河川や湖沼からコイを採取して、雄コイの雌化の有無を調査してきた（本報告書サブテーマ1）。しかしながら、我々の調査のみならず、全国調査や他の自治体等の調査でも、調べようとする水域でコイが採捕出来ない場合があり、コイ以外の魚種を用いた調査手法も必要とされている。一方、外来魚であるオオクチバスやブルーギルは、本県の湖のみならず、現在日本全国に分布し、日本の本来の生態系を攪乱している水域もあり問題となっている。そのため両魚種の駆除も行われているが、完全駆除は数例あるもののきわめて困難な状況にある。これらの魚種は湖の中で小魚を食べたり、他の魚の卵を食べるため、食物連鎖の上位に位置すると考えられる。そのため、脂溶性で蓄積性の高い環境ホルモンの場合はその影響が現れやすいと予想される。よって、コイと同様にオオクチバスやブルーギルは、環境調査のための有用な対象魚種となりうると考えられる。本研究はオオクチバスとブルーギルの血液中ピテロジェニン測定法を検討し、さらに山梨県内の湖から採捕されたオオクチバスとブルーギルの雌化状況を調査することを目的としている。

方法

魚の採捕：地引き網、刺し網、釣りによってコイの採捕を試みた際に得られたオオクチバスとブルーギルを試料とした。採捕尾数は表1に示すとおりである。

採捕後の処理：採捕した魚をフェノキシエタノール添加（約400ppm）水槽で麻酔した後に、尾部から採血を行った（一部の調査・実験では、抗凝固剤ヘパリン粉末入りの注射針を用いて採血し、血漿を得た）。外観をデ

ジタルカメラで撮影し、体重、体長、全長を測定した後、解剖し、生殖腺を摘出した。生殖腺の外観もデジタルカメラで撮影した。生殖腺はブアン氏液で固定し、顕微鏡観察用の組織切片を作成した。雌雄判定は、生殖腺の外観から行ったが、最終的には生殖腺の顕微鏡観察でチェックした。

採血した血液は氷冷し、実験室に持ち帰り、採血から24時間以内に血清（血漿）を分離し、分注して-80℃で凍結保存した。

高ピテロジェニン血清の調製：オオクチバスとブルーギルにフェノキシエタノール麻酔下で、プロピレングリコールに溶解した17 β -エストラジオール（1 mg/kg）を3回筋肉内投与し（0、3、6日目）、9日目に採血を行った。

ピテロジェニン測定法の検討

(1)ウェスタンブロット法

抗原と抗体の調製：Yamanaka et al. (1998)に従い、陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により、17 β -エストラジオール投与後9日目のオオクチバスならびにブルーギル血清からピテロジェニン画分を分離し抗原とした。この抗原でウサギを免疫し、抗ピテロジェニン-ウサギ血清を得た。このウサギ血清をDEAEイオン交換クロマトグラフィーで分画し、IgG画分を抗ピテロジェニン-ウサギIgG抗体として実験に用いた。

(2)高速液体クロマトグラフィー法：Yamanaka et al. (1998)に従い、陰イオン交換カラムとUV検出器を用いて測定を行った。

(3)キャピラリー電気泳動法：キャピラリー電気泳動装置を用いて、等電点キャピラリー電気泳動法、キャピラリーゾーン電気泳動法、SDSキャピラリー電気泳動法を検討した（いずれもUV検出）。

(4)SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE法）：SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）とCBB染色による蛋白質検出を用い

た。リン酸緩衝生理食塩水と泳動サンプル緩衝液で血清を希釈し、その5 μ lを5-20%の濃度勾配ゲル（ミニゲル）に添加後、1 プレートあたり10mA 50分+20mA 60分の泳動を行った。泳動後、CBB染色を行いタンパク質の検出を行った。

結果と考察

分析法の検討

高ピテロジェニン血漿の調製：17 β -エストラジオール投与前と投与後のオオクチバスとブルーギルの血清を、HPLC法で分析した結果を図1に示す。17 β -エストラジオール投与前には見られなかった280nmのUVの吸収ピークが3回の投与後に認められ、高濃度のピテロジェニンが誘導されていた。ELISAでピテロジェニン濃度を測定したコイの血清を同様にHPLCで分析した時に得られたピーク面積からブルーギルとオオクチバスのピーク面積を計算した結果では、ブルーギル、オオクチバスの血清中ピテロジェニン濃度は10mg/ml前後であった。

コイピテロジェニンELISAキットによるオオクチバスおよびブルーギルの高ピテロジェニン血清の測定：市販のコイピテロジェニンELISAキットを用いて、オオクチバスとブルーギルの高ピテロジェニン血清中のピテロジェニン濃度測定を試みたが、測定値は最大でも101 ng/mlであった（表2）。この結果は、ELISAキットに使われている抗体がオオクチバスとブルーギルのピテロジェニンとはほとんど反応しないことを示しており、市販のキットは使えないことが明らかとなった。また、抗メダカピテロジェニン抗体もオオクチバス、ブルーギルのピテロジェニンとは反応しなかった。

ウエスタンブロット法：得られた抗ピテロジェニン-ウサギIgG抗体は、オオクチバスならびにブルーギルのピテロジェニンと反応したものの（図2）、ウエスタンブロット分析では、ピテロジェニン以外のタンパク質とも反応してしまった（図3）。清浄な環境で数ヶ月飼育した雄のブルーギルの血清で吸収処理を行って、抗ピテロジェニン抗体以外のIgGを取り除くことを試みたが、依然としてピテロジェニン以外の蛋白質とも反応した（図4）。これらの結果から、得られた抗体は特異性が低いことが明らかになり、ELISA等を用いたピテロジェニンの特異的かつ高感度な定量には使えなかった。

HPLC法：図1に示されるように、HPLC法はUV検出であるため検出感度は高くないが、ピテロジェニンが高濃度に存在する試料については有用な方法であった。

キャピラリー電気泳動法：等電点キャピラリー電気泳動法では、17 β -エストラジオールでピテロジェニンを誘導した血清でのみ現れるピークを得ることは出来な

かった。キャピラリーゾーン電気泳動法（図5）およびSDSキャピラリー電気泳動法（図6）では、17 β -エストラジオールを投与された個体でのみ認められるピークが得られ、このピークがピテロジェニンであると考えられた。しかし、UV検出であるため高感度分析は出来なかった。キャピラリー電気泳動法はHPLC法と同様に、ピテロジェニンが高濃度に含まれる試料の分析には適していると考えられた。特に、メダカ等の小さな魚を用いた調査研究では、得られる血清が少ないため、ELISAによる測定前に血清中に高濃度のピテロジェニンが含まれているか否かを検査するためには、測定に必要な試料量が微量（数 μ L程度）であるキャピラリー電気泳動は特に適していると考えられる。

SDS-PAGE：17 β -エストラジオール投与によりピテロジェニンを誘導させたブルーギル血清を段階的に希釈して、SDS-PAGEとCBB染色でのピテロジェニン検出限界を検討した。17 β -エストラジオール投与ブルーギルの血清（ピテロジェニン濃度は、HPLCでの分析結果から約10mg/mlと推定）を2,000倍に希釈しても、SDS-PAGEで分子量17万～21.2万の間にピテロジェニンと考えられるバンドが検出されたことから（図7）、SDS-PAGEのピテロジェニン検出限界は、もとの血漿中ピテロジェニン濃度で約5 μ g/ml以下と推定された。しかし、清浄な水で数ヶ月飼育しピテロジェニンが殆どないと考えられる雄のブルーギル血漿のSDS-PAGEでも、分子量17万～21.2万の間に薄いバンドが検出された。CBB染色はピテロジェニン特異的ではないため、このバンドがピテロジェニンであるのかピテロジェニン以外の蛋白質であるのかは現在のところ不明である。

図8はピテロジェニンがほとんどないと考えられる雄のオオクチバス血清（レーン1）に、高ピテロジェニン血清を希釈して添加し、SDS-PAGEを行ったものである。このとき用いた高ピテロジェニン血清も約10mg/mlのピテロジェニンを含むため、200倍希釈した血清（レーン番号3）で認められる濃いバンドは血清中濃度で約50 μ g/mlに相当する。レーン3と同量の高ピテロジェニン血清をレーン1のサンプルに添加して電気泳動したものがレーン2である。約50 μ g/mlのピテロジェニンを含む血清はレーン2と同様の電気泳動像となると考えられ、このような泳動像が得られたときにピテロジェニンが検出されたとみなすこととした。コイのピテロジェニンをELISAで測定する場合、血清中濃度で0.1 μ g/ml以下の検出限界が得られるので、ELISAと比較するとSDS-PAGEは検出限界は劣るが、化学物質等によって高濃度のピテロジェニンが誘導された場合には充分SDS-PAGEで検出可能であると考えられた。

湖で採捕されたオオクチバスとブルーギルの血清中ピテロジェニン

河口湖、山中湖、本栖湖、四尾連湖で採捕したオオクチバスとブルーギル（表1）の血清をSDS-PAGEを用いて分析した。分析例を図9に示す。両魚種とも分子量17万～21.2万の間に薄いバンドが検出されたが、200倍希釈した高ピテロジェニン血清で認められるような濃いバンドは、両魚種の雌雄何れの個体でも認められなかった。山中湖で採捕した雌のオオクチバスの中に、胃から数個の疑似餌が出てきた個体があったが、この個体でも高濃度のピテロジェニンは検出されなかった。また、ピテロジェニン以外の蛋白質のバンドも他の個体と同様のパターンを示した。分子量17万～21.2万の間に認められる蛋白質のバンドは、ピテロジェニンの可能性もあるが、その濃さに雌雄の明確な差は認められなかった。コイの場合は、血清中ピテロジェニン濃度が雌雄で大きく異なっていたが（本報告書サブテーマ1）、我々が採捕したオオクチバスとブルーギルではピテロジェニン濃度の雌雄差は大きくないものと考えられる。

現在のところ、分子量17万～21.2万の間に認められる薄いバンドがピテロジェニンであるか否かは不明であるが、200倍希釈した高ピテロジェニン血漿を添加した試料では、無添加試料にあったバンドが認められなくなっている。SDS-PAGEでは、タンパク量が多くなるとバンドの位置が低くなることがあるため（図8）、この結果は分子量17万～21.2万の間に認められる薄いバンドがピテロジェニンである可能性も示唆している。もしこのバンドがピテロジェニンであるとする、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度のピテロジェニンが雄雌とも血清中にあると思われる。この点に関しては、今後ピテロジェニン検出法を改良して検討する必要がある。

コイを用いた我々の山梨県内でのこれまでの調査（本報告書サブテーマ1）では、最もピテロジェニン濃度が高かった雄コイで $1.41\mu\text{g}/\text{ml}$ であったことから考えると、約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ をピテロジェニン検出の目安とした本研究は、雄の魚の雌化調査としては不十分な面があることは否めない。しかしながら、山梨県以外で行われたコイの調査報告では、雄コイで数 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ から $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ を越えるピテロジェニンが検出されることがあり、そのような場合に何らかの内分泌攪乱が起きていると疑われている。オオクチバスやブルーギルが環境ホルモンにどの程度の感受性を有するかは不明であるが、少なくとも 17β -エストラジオール（女性ホルモン）を投与したときには雌雄とも血清中ピテロジェニン濃度が $10\text{mg}/\text{ml}$ （ $10,000\mu\text{g}/\text{ml}$ ）前後の高濃度に達する（図1）。このことから考えると、オオクチバスもブルーギルも共に女性ホルモン様活性を有する環境ホルモンの強い影響を受ければ、血漿中ピテロジェニン濃度が数 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ から $1,000\mu\text{g}/\text{ml}$ を越える高濃度になりうるものと考えられる。これらのことを考えあわせると、今回調

査したオオクチバスとブルーギルの血漿からはピテロジェニンと考えられるSDS-PAGEでの濃いバンドが認められなかったことは、河口湖、山中湖、本栖湖、四尾連湖のブルーギルやオオクチバスでは、少なくとも雄の個体の強い雌化は起きていないと考えられた。

魚の雌化を指標とした環境調査では、現在は雄の魚の血清中のピテロジェニン濃度が雌化の主要な指標として使われている。血清中にはピテロジェニン以外にも多種類の蛋白質が存在するため、ピテロジェニンを測定するためには、ピテロジェニンと他の蛋白質を区別する必要がある。抗体を用いる方法は、ピテロジェニンのみと反応する抗体が得られれば、特異性と感度の高いELISA法を確立出来る点で優れている。しかしながら、魚種が異なると抗体が反応しない場合があり、その場合は対象魚種のピテロジェニンに対する抗体を新たに作製しなければならない。本研究でも、市販のコイピテロジェニンELISAキットが使えず、また、抗メダカピテロジェニン抗体も使えなかったため、オオクチバスとブルーギルのピテロジェニンに対する抗体作製を試みた。残念ながら今回は、特異性の高い抗体を得ることが出来なかったため、他の方法を用いてピテロジェニンを検出することとした。

本研究では、HPLC法、キャピラリー電気泳動法、SDS-PAGEを検討した結果、最終的にはSDS-PAGEが適していると考え、山梨県内の湖から採捕された個体についてピテロジェニンの検出を行った。今回用いたSDS-PAGEでは、血清中に $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の濃度があればピテロジェニンを検出できると考えられたが、より低濃度のピテロジェニンを検出するには方法を改善する必要がある。SDS-PAGEは、分子量（大きさ）の違いで血清中蛋白質を分画する方法であり、ピテロジェニンと同程度の分子量を持つ蛋白質が試料中に混在する場合はピテロジェニンと区別出来ないため、高感度検出が出来ない。しかし、イオン交換クロマトグラフィー等の蛋白分画原理の異なる方法で血清を前処理をした後にSDS-PAGEを行い、さらに銀染色のようなCBB染色より高感度な蛋白質検出法を併用すれば、抗体を用いずとも比較的高感度にピテロジェニンを検出できる可能性があり、また、魚種が異なっても適用できる可能性が高い。このような方法は抗体を用いないので、蛋白質検出の特異性の問題は最後まで残るが、魚の雌化が起きたときには比較的高い濃度のピテロジェニンが血清中に認められると考えられるので、実際の環境調査では十分活用できる可能性がある。今後、多くの魚種のピテロジェニンと反応する抗体の作製や、魚種ごとに特異性の高い抗体を作製すると共に、SDS-PAGEを用いたピテロジェニン検出法を改良することもあるであろう。

謝辞

本研究は、平成11年度日本生命財団研究助成「人間活動と環境保全の調和に関する研究」の補助を受けました（研究代表者瀬子義幸。研究課題「淡水域の食物連鎖の上位に位置するブラックバス及びブルーギルを用いた環境ホルモンの影響評価に関する研究」）。助成下さいました日本生命財団に深謝いたします。また、河口湖漁業協同組合、山中湖漁業協同組合、本栖湖漁業協同組合、四尾連湖漁業協同組合には、魚の採捕にご協力いただきました。御礼申し上げます。県水産技術センターの多くの職員の方々にご協力いただきました。あらためて感謝いたします。

文献

Yamanaka, S., Arizono, K., Matsuda, Y.,

Urushitani, H. Iguchi, T. and Sakakibara, R (1998) Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(6), 1196-1200.

参考資料

西岡久壽彌監修、真崎知生編（1994）役にたつ免疫実験法 第2版。講談社。
西方敬人（1997）バイオ実験イラストレイテッド5.タンパクなんて恐くない。細胞工学別冊。秀潤社。
日本電気泳動学会編集（1999）最新電気泳動実験法。医歯薬出版株式会社。
大野茂男、西村善文監修（1997）タンパク実験プロトコール 細胞工学別冊。秀潤社。

表1 調査日・調査地点・採捕魚種・採捕尾数

年月日	調査地点	調査方法	採捕魚種	雄(♂)	雌(♀)	不明	採捕尾数
1999. 8. 3	河口湖	地引き網	オオクチバス	20			20
			ブルーギル	8	12		20
1999. 8. 10	山中湖	地引き網	オオクチバス	9	5	1	15
2000. 1. 22	河口湖	地引き網	オオクチバス	7	7	1	15
2000. 8. 10	山中湖	地引き網	オオクチバス	2	5		7
2001. 9. 28	本栖湖	刺し網	オオクチバス	3	1		4
2001. 10. 17	四尾連湖	釣り	オオクチバス			10	10
2001. 10. 19	河口湖	地引き網	ブルーギル	4	3		7
			合計	53	33	12	98

表2 コイビテロジェニン測定キットを用いたオオクチバス及びブルーギル血清中ビテロジェニン測定結果

魚種	検体番号	ビテロジェニン濃度 (ng/ml)
ブルーギル	1	44
	2	N. D
	3	N. D
	4	101
	5	54
	6	N. D
	7	N. D
	8	43
	9	N. D
	10	N. D
	11	N. D
	12	68
オオクチバス	13	N. D
	14	N. D
	15	N. D
	16	N. D
	17	N. D
	18	N. D
	19	N. D

N. D : Not Detected (不検出)
用いた血清は、全てエストラジオールを投与された魚のもので
ビテロジェニンが数mg/ml含まれている。

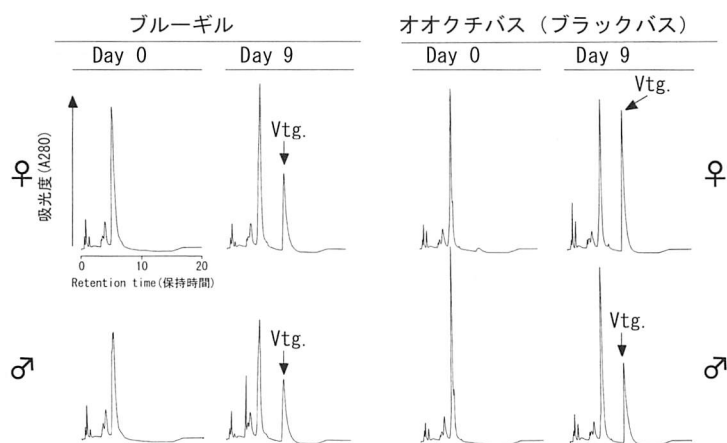


図1 17 β -エストラジオール（女性ホルモン）投与によるビテロジェニ(Vtg)の誘導：血清を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果
17 β -エストラジオール投与：投与：Day 0, 3, 6 (1 mg/kg \times 3回) .
採血：Day 0, 9.

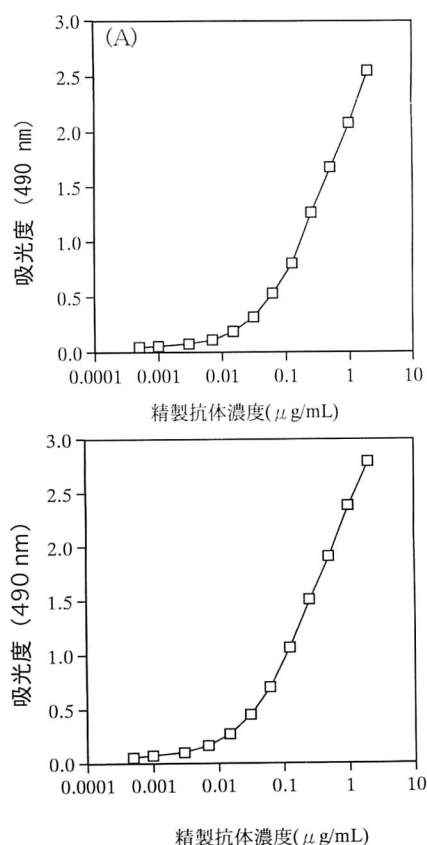


図2 ブルーギルおよびオオクチバスの精製ビテロジェニン (Vtg) と抗VtgウサギIgGの反応

固相化抗原：(A) 精製ブルーギルVtg (1 μ g/ml)、(B) 精製ブラックバスVtg (1 μ g/ml).

1次抗体：抗VtgウサギIgG.

2次抗体：HRP標識抗ウサギIgGヒツジ抗体.

精製抗体濃度が増加するに従って吸光度（発色程度）が増加することが、抗体とビテロジェニンが反応していることを示す。

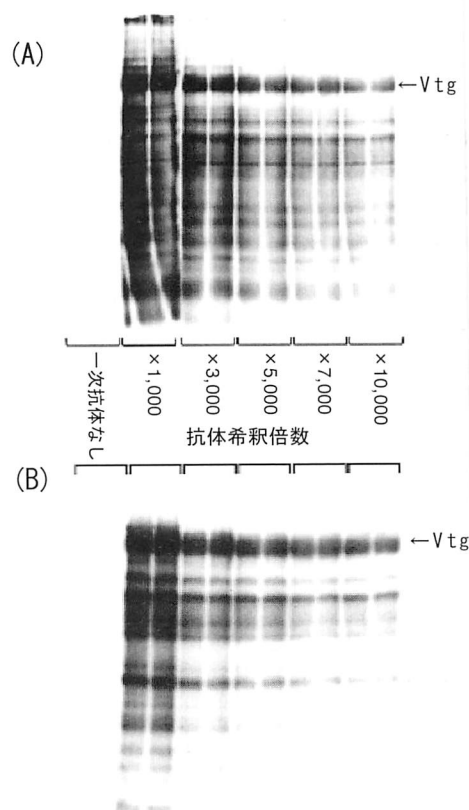


図3 17 β -エストラジオール（女性ホルモン）注射でビテロジェニン (Vtg) を誘導したブルーギル(A)およびオオクチバス(B)の血漿のウエスタンブロット分析

一次抗体：(A)抗ブルーギルVtgウサギIgG、(B)抗オオクチバスVtgウサギIgG。

二次抗体：HRP標識抗ウサギIgGヒツジ抗体（二次抗体濃度は、3000倍希釈（一定））

※一次抗体の特異性が高くビテロジェニンのみと反応すれば、Vtgの位置だけにバンドが検出されるが、この場合は抗体の特異性が低くビテロジェニン以外の蛋白質とも反応しているため、Vtg以外のバンドが多数認められる。

※「一次抗体なし」の場合にバンドがみとめられないことは、抗体がなければバンドの検出が出来ないことを示している。

※抗体の希釈倍数が大きくなると、蛋白質と反応する抗体量が少なくなるためバンドの濃さが薄くなる。

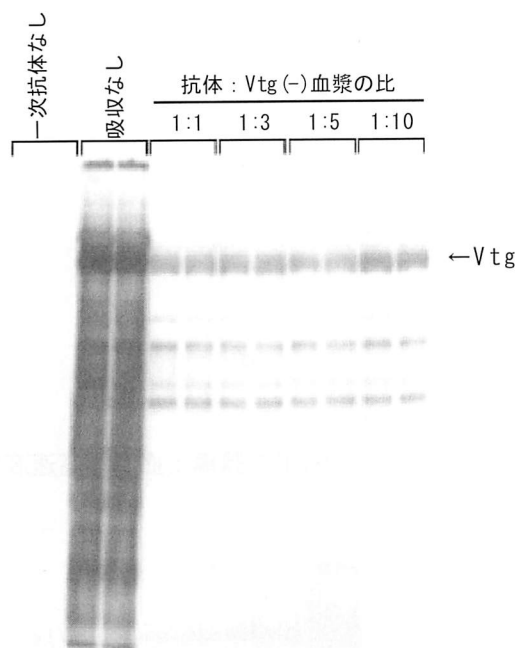


図4 非特異抗体吸収後の抗ブルーギルビテロジェニン(Vtg)ウサギIgGを用いたウエスタンブロット分析

- ・非特異抗体を取り除くために、 17β -エストラジオール投与前のVtgをほとんど含まない雄ブルーギル血清で抗体を処理した後、ウエスタンブロット分析に用いた。
- ・非特異抗体を吸収することにより、Vtg以外のバンドは減少したが、依然としてVtg以外のバンドも認められる。また、Vtgのバンドが薄くなった。
- ・抗体の吸収処理に用いる血清の量を1:1~1:10まで変化させたが、影響は認められなかった。

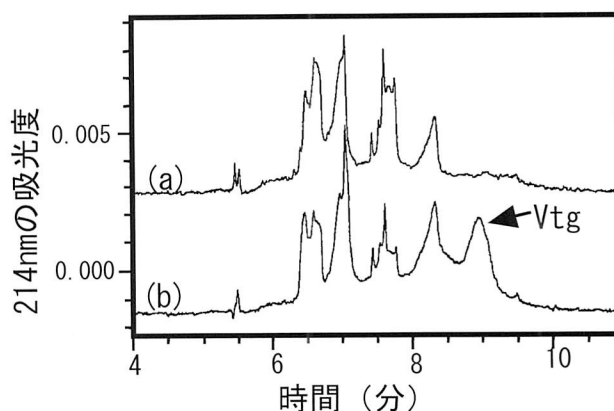


図5 ゾーンキャピラリー電気泳動によるブルーギル血清の分析

(a) : 17β -エストラジオール投与前の血清
(b) : 17β -エストラジオール3回投与後の血清
Vtg : 17β -エストラジオールを投与したことにより出現したビテロジェニンと思われるピーク。

キャピラリー : スクシニルポリリジンでコートした溶融シリカキャピラリー。

(内径 $50\mu\text{m}$ 、長さ 57cm)

泳動緩衝液 : 0.1M Tris-酢酸緩衝液 (pH7.9)、

0.1% Tween20および 0.2% NaN_3 を含む。

試料調製 : 血清 $5\mu\text{l}$ を 1% Tween20を含む泳動緩衝液 $10\mu\text{l}$ で3倍希釈。

電気泳動装置 : ベックマンP/ACE2210。

試料注入 : 試料注入モードで陽極端より1秒間。

電気泳動 : 28.5kV ($500\text{V}/\text{cm}$)。

検出 : 214nm 。

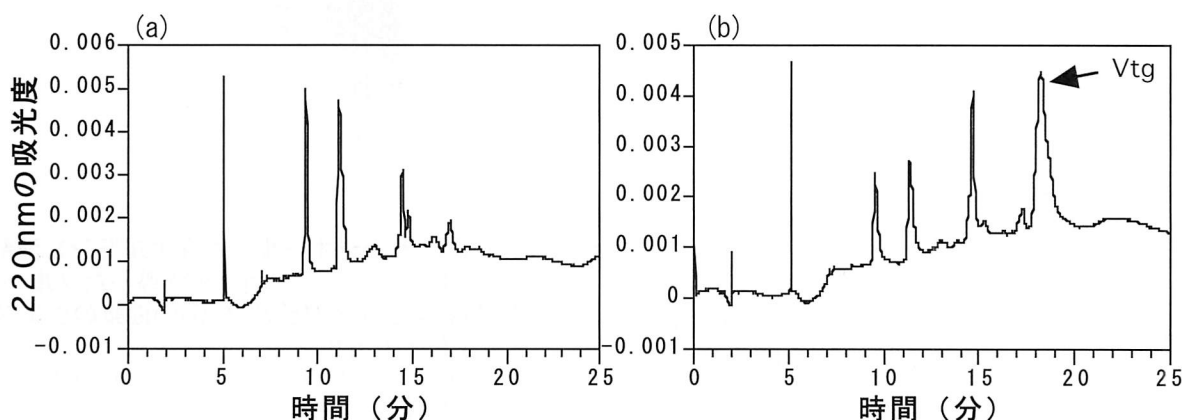


図6 SDS-キャピラリー電気泳動によるコイ血清の分析

(a) : ビテロジェニン濃度 $0.04\mu\text{g}/\text{ml}$ の雄コイの血清。

(b) : ビテロジェニン濃度 $13700\mu\text{g}/\text{ml}$ の雌コイの血清。

キャピラリー : $32\text{cm} \times 50\mu\text{m}$ 、シリカキャピラリー (コーティングなし)。

泳動緩衝液 : CE-SDSプロテイン泳動バッファー (バイオラッド社製)

試料調製 : 泳動緩衝液で5倍希釈

電気泳動装置 : バイオラッド社製Biofocus2000。

試料注入 : 10kV 、7秒。

電気泳動 : 20kV 、 20°C 。

検出 : 220nm 。

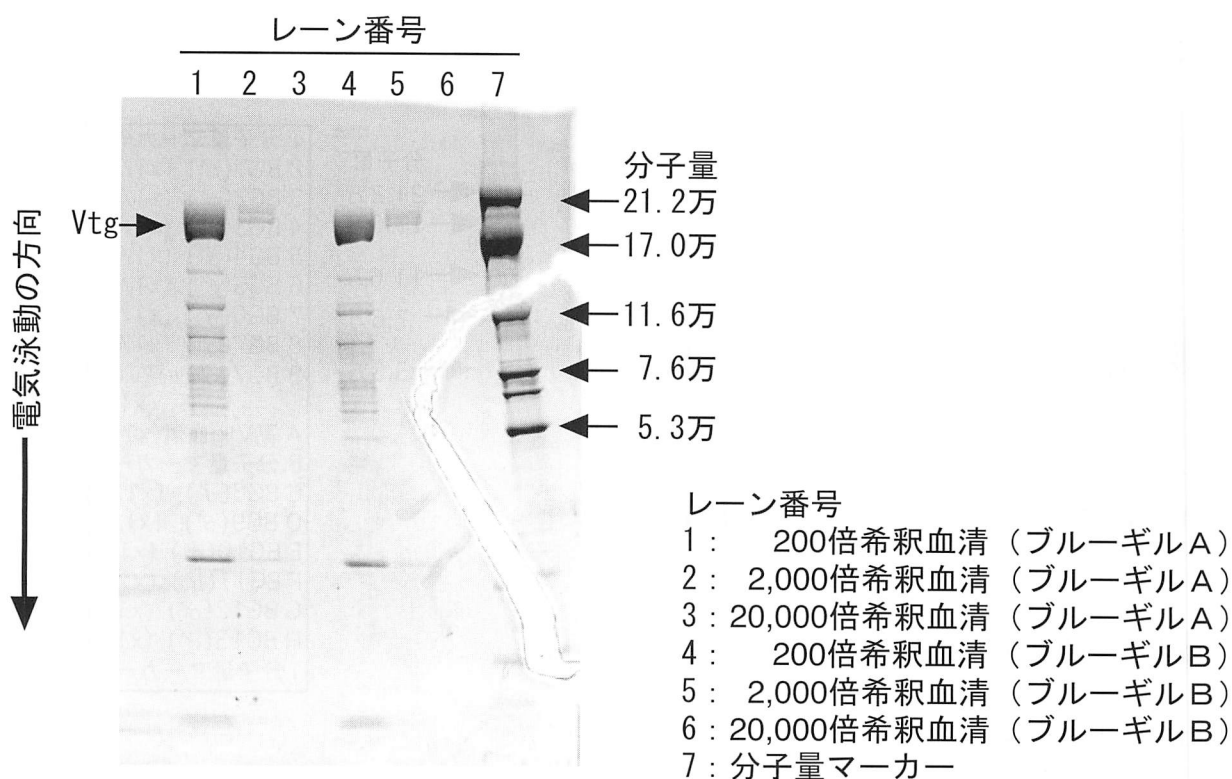


図7 17 β -エストラジオール（女性ホルモン）でピテロジェニン（Vtg）が誘導されたブルーギル血清のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

- 分子量17.0万～21.2万の間に認められるバンドがVtgと考えられる。
- 17 β -エストラジオールによってVtgが誘導されているため、2000倍に希釈した血清でもVtgと考えられるバンドが認められる。
- Vtg量が多いとバンドの位置が下にずれる。
- Vtgのバンドが2本になる理由は不明。

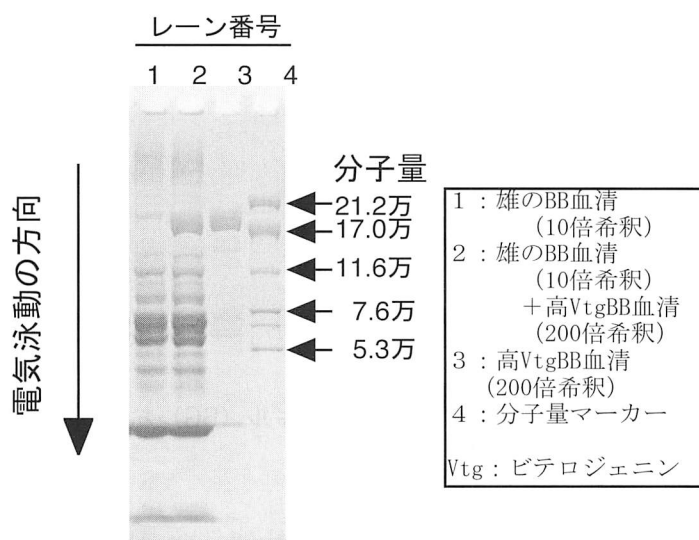
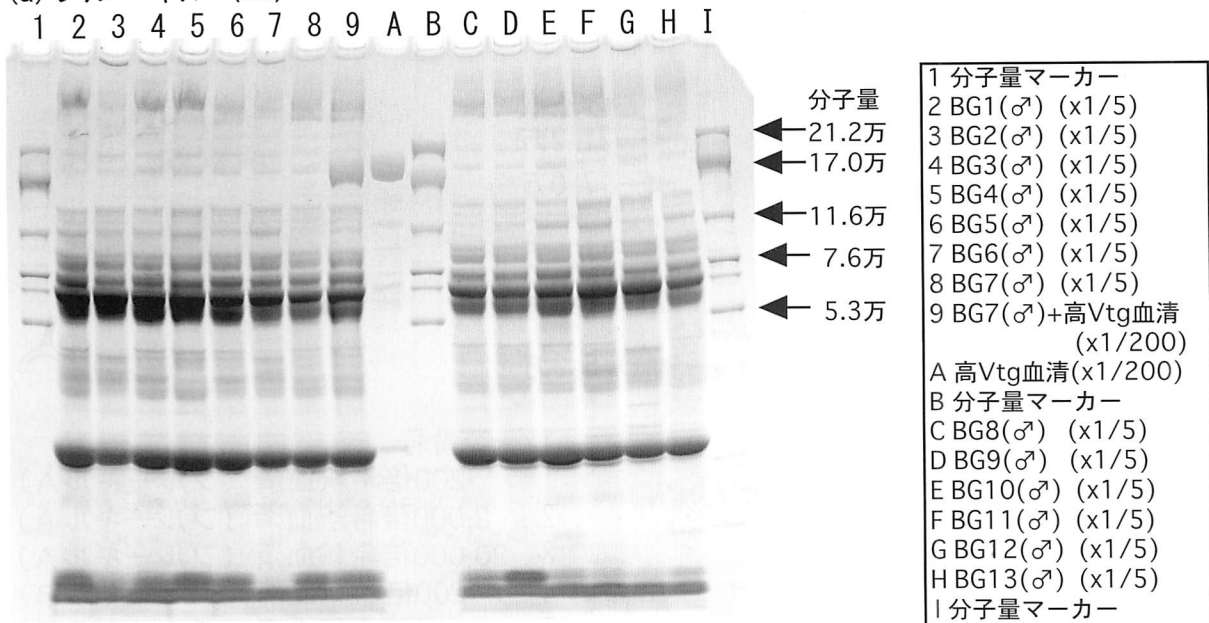


図8 SDSポリアクリルアミド電気泳動によるオオクチバス(BB)血清の分析（CBB染色）

(a) ブルーギル (BG)



(b) オオクチバス (ブラックバス、BB)

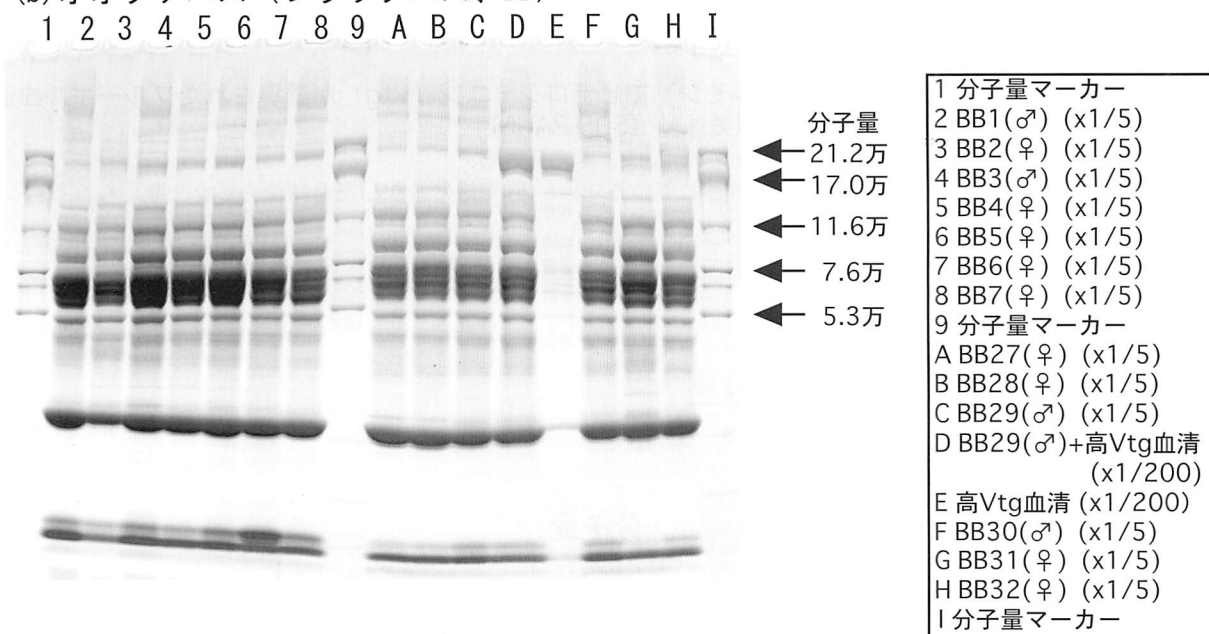


図9 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるブルーギル (BG) およびオオクチバス (ブラックバス、BB) 血清の分析

ブルーギル (No.1~13) : 1999年8月3日、河口湖.

オオクチバス (No.1~7) : 2000年8月10日、河口湖.

オオクチバス (No.27~32) : 1999年8月3日、河口湖.

ブルーギルの血中ビテロジェニン濃度に対する 女性ホルモンとビスフェノールAの影響(水槽暴露実験)

瀬子義幸、長谷川達也(山梨県環境科学研究所)
岡崎巧、加地弘一(山梨県水産技術センター)

目的

魚の雌化を指標とした環境ホルモンの影響に関する野外調査結果を評価するには、用いる魚が女性ホルモン様作用を有する化学物質に対して、どの程度の感受性を有するかを確認しておくことも重要である。我々は、オオクチバスとブルーギルを山梨県内の湖から採捕して血清中ビテロジェニン濃度の測定を行ったが、これらの魚種が女性ホルモン様作用を有する化学物質（環境ホルモン）にどの程度の感受性を有するかは不明である。また、環境ホルモンは環境中には単独で存在するわけではなく、他の化学物質と混在している。多くの化学物質が混在する場合、野生生物等に対する化学物質の影響は、単独の場合とは異なった様相を示す可能性もある。化学物質同士がお互いの作用を強め合ったり、逆に弱め合ったりすることもある。このように化学物質がお互いの作用に影響を及ぼし合うことは、化学物質の相互作用と呼ばれる。そのため、本研究では、環境中から検出されることが比較的多いビスフェノールAと女性ホルモン（17β-エストラジオール）について、ブルーギルの感受性を水槽暴露実験で確認するとともに、両化学物質に相乗効果があるか否かを検討した。

方法

17β-エストラジオール（E2）とビスフェノールA（BPA）への暴露方法

山梨県中巨摩郡敷島町にある山梨県水産技術センターで実験を行った。図1に示す40cm（高さ）× 30 cm（幅）×60 cm（奥行き）のガラス製水槽を用い、センター内でくみ上げた地下水を、連続的に500ml/分の速度で注入する流水条件下で実験を行った。水槽内にはヒーターを入れ、エアレーションをしながら水温を約20℃に保った。注入する地下水は、水槽内に垂直に沈めたメスシリンダーに注入し、そこに50%ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した17β-エストラジオール（Merck社）とビスフェノールA（p,p'-Isopropylidenediphenol、ビスフェノールA標準品、和光純薬株式会社）をペリスタポンプで注入し（2 ml/時

間）混合した。E2とBisAが混合された地下水は、メスシリンダーからオーバーフローし、水槽内に流れ込むようにした。水槽内の水は、メスシリンダーとは反対側の水槽の端に設置されたパイプからあふれ出し、ネット濾過、砂・砂利濾過、活性炭濾過を経た後、実験室の排水溝に流れ込むようにした。

実験に用いたブルーギルは、河口湖、あるいは水産技術センター近くの牛沼で採捕されたものを、センター内の清浄な生け簀で数ヶ月飼育した後用いた。実験前に外観から雌雄を判別し、雄と判定された個体を用いた。実験終了時の解剖で、生殖腺の外観から雌雄の最終確認を行った。水槽内には、体重100～220 gの雄のブルーギル3尾を入れた。暴露実験直前に、フェノキシエタノール麻酔下に尾部から部分採血し、暴露前の血清を得た。一部の採血には、抗凝固剤ヘパリン入り注射針を用い、血清の代わりに血漿を分離した。E2とBPAへの暴露期間は7日間とした。暴露7日後に部分採血し、さらにその後E2やBPAを含まない地下水で7日間飼育し、採血と解剖を行った。実験の間の給餌は自動給餌器で行い、1つの水槽に1日約3 gの粉末飼料を加えた。

血清（血漿）中ビテロジェニンの検出：血清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）法とCBB染色を用いて分析し、分子量17万～20万付近のビテロジェニンと考えられるバンドの濃さを肉眼で判定した。

結果

体重変化：図2にE2及びBPA暴露実験時の体重変化の一例を示す。14日間の実験中、ブルーギルの体重はほとんど変化せず、最大でも実験開始時の体重の10%程度の増減であった。

E2暴露実験：E2の水槽内での濃度が0、0.1、1、10 μg/Lとなるように50%DMSOにE2を溶解して用いた。1週間の暴露で、1および10μg/L群の血清中ビテロジェニンの顕著な増加が認められた（図3-d,e,f）。清浄な水でさらに1週間飼育しても、血清中ビテロジェニン濃度の減少は認められず、むしろ暴露終了時より増加する傾向があった。0および0.1μg/L群では、血清中ビテロ

ジェニンの経時的变化は認められなかった(図3-c, d, e, f, 表1)。なお、ビテロジェニンの強いバンドが認められるレーンの隣のレーンでは、分子量17万付近に比較的濃いバンドが認められることがあるが、これはビテロジェニン濃度の高いサンプルを注入したときに一部が混入したことによると思われる。

BPA暴露実験：E2暴露実験と同様の手順で、雄のブルーギルを0、1、10、100 µg/LのBPAに1週間暴露したが、いずれの群でも血清中ビテロジェニンの増加は認められなかった。

E2+BPA暴露実験：雄のブルーギルを、E2 (0.1 µg/L) とBPA (1 µg/L) それぞれ単独、並びにE2 (0.1 µg/L) +BPA (1 µg/L) の併用条件下で1週間飼育したが、いずれの群でも暴露による血清中ビテロジェニンの増加は認められず、今回の実験条件下ではE2とBPAの相乗効果は認められなかった(図3-a, b, c, 表2)。

考察

環境ホルモンの疑いがある化学物質に各種の魚を暴露し、その影響を調べる研究が行われているが(Tabata et al. 2000, 2003; Christiansen et al. 2000; Ishibashi et al. 2001, 2002; Kashiwada et al. 2002; Hemmer et al. 2002)、メダカなどの小型の魚を用いる傾向があり、ブルーギルを用いた研究は認められない。また、用いる魚種、化学物質の濃度、暴露方法、暴露時間、暴露温度等の違いにより、血液や肝臓中に誘導されてくるビテロジェニンの濃度は異なるため、実験データの厳密な比較は難しい場合が多い。メダカをBPAに暴露した実験では、1720 µg/Lの濃度に21日間暴露した場合に肝臓中のビテロジェニンが増加するが、837 µg/Lではビテロジェニン増加は認められないとするもの(Kang et al. 2002)や、772 µg/L 14日間で肝臓中ビテロジェニンが僅かながら増加するが334 µg/Lでは有意な増加は認められないとするもの(環境省 2003)、1000 µg/Lで誘導が認められたとするもの(Tabata et al. 2003)などがある。キンギョを用いた実験(Ishibashi et al. 2001)では、1000 µg/L 7日間で血漿中ビテロジェニンが有意に増加するが、100 µg/Lでは有意な増加は認められなかったとするものなどがある。我々のブルーギルを用いた実験では、1、10、100 µg/LのBPAに水温20℃で1週間暴露したが、何れの群でもSDS-PAGEで検出する限りでは、ビテロジェニンの増加は認められなかった。流水で飼育する実験であるため、砂濾過や活性炭濾過を行ってから排水するとはいえ、これ以上の濃度を設定することはより大量のBPA廃液を排出する可能性もある。また、実際に環境中で認められるBPAの濃度とますますかけ離れてしまうため、100 µg/Lを超

える濃度は設定しなかった。ブルーギルでBPAによってビテロジェニンの誘導がかかる濃度を求めることが出来なかったため、BPAの女性ホルモン様作用に対するブルーギルの感受性が、キンギョやメダカとどの程度異なるかは不明であるが、少なくともキンギョやメダカより感受性が高いことはないものと考えられる。

我々の実験では、1 µg/LのE2に7日間暴露することにより、ブルーギルの血清中ビテロジェニン濃度は顕著な増加を示したが、0.1 µg/Lでは誘導は認められなかった。一方、メダカの実験では、0.05 µg/LのE2暴露でビテロジェニンが誘導される(Tabata et al. 2003)。sheepshead minnowでは、0.089 µg/LのE2でビテロジェニンが誘導されている(Hemmer et al. 2002)。これらの報告と我々の実験は、暴露期間やビテロジェニンの検出法が異なるため、厳密な比較は出来ないが、血清中のビテロジェニンを指標とすると、E2に対する反応性はブルーギルの方がメダカやsheepshead minnowより低いと思われる。

河川や湖沼の水質を平成10～12年度に調査した国土交通省河川局(2002)の報告では、BPAは不検出(0.01 µg/L未満)～1.7 µg/Lであるが、ほとんどの場合不検出か0.1 µg/L以下であり、1 µg/Lを超えることはほとんどない。また、E2に関しては不検出(0.0002 µg/L未満)～0.027 µg/Lとなっている(国土交通省 2002)。山梨県の行った調査では(山梨県 2002)、BPAは湖沼では検出されておらず、河川で不検出あるいは最高0.03 µg/Lが検出されている。山梨県の調査では、E2の測定は行っていない。

今回の実験で用いたBPA 1～100 µg/L、E2 0.1～10 µg/Lは、実際に環境中で認められる濃度と比べると高い濃度であるが、BPAへの1週間の暴露では100 µg/Lでもビテロジェニンの誘導が認められず、また、E2の場合は0.1 µg/Lで誘導が認められなかった。これらの結果は、BPAとE2の場合、現状で認められるこれらの化学物質の環境水中の濃度と比べるとより高い濃度の汚染がなければ、少なくともそれぞれ単独ではブルーギルにビテロジェニンを誘導しないものと思われる。

環境中には様々な化学物質が存在し、それぞれの化学物質の毒性や生体影響は単独で作用する場合とは異なる可能性も想定しておく必要がある。化学物質同士が作用を打ち消し合うことや、逆に作用を強め合うことなどが想定される。これら化学物質の相互作用の有無まで考慮して環境中の化学物質の影響評価を行うことも重要であるが、研究報告はほとんどない。本研究では、環境中で検出されることが多いE2とBPAについて、それぞれ単独ではビテロジェニンを誘導しない濃度を用いて、試験的にブルーギルを両化合物に暴露した。両化合物に暴露してもブルーギルの血漿中ビテロジェニン濃度増加はな

く、少なくともここで用いた実験条件下では、E2とBPAの間に相互作用（相乗効果）は認められなかった。

謝辞

本研究は、平成11年度日本生命財団研究助成「人間活動と環境保全の調和に関する研究」の補助を受けました（研究代表者 瀬子義幸。研究課題「淡水域の食物連鎖の上位に位置するブラックバス及びブルーギルを用いた環境ホルモンの影響評価に関する研究」）。助成下さいました日本生命財団に深謝いたします。

文献

- Christiansen, L.B, Pedersen K.L, Pedersen S.N., Korsgaard, B., and Bjerregaard, P. (2000) *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1867-1874.
- Hemmer, M.J., Bowman, C.J., Hemmer, B.L., Friedman, S.D., Marcovich, D., Kroll, K.J., and Denslow, N.D. (2002) Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 beta-estradiol and p-nonylphenol. *Aquat. Toxicol.* 58, 99-112.
- Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Ishibashi, Y., Nagae, M., Kohra, S., Takao, Y., Tominaga, N., and Arizono, K. (2001) *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Health Sci.* 47, 213-218.
- Ishibashi, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T., Imada, N., Tadokoro, H. and Honjo, T. (2002) Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese Medaka. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2394-2400.
- Kashiwada, S., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., and Magara, Y. (2002) Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Res.* 36, 2161-2166.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, Y., Imada, N., Tadokoro, H. and Honjo, T. (2002) Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2394-2400.
- 環境省 (2003) 魚類を用いた生態系への内分泌攪乱作用に関する試験結果について（案）. 平成15年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会 資料5-2 (<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1501/mat/mat05-2.pdf>).
- 国土交通省河川局 (2002) 平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果. (http://www.mlit.go.jp/river/press/200207_12/021212/siry01.pdf)
- Tabata, A., Kashiwada, S., Miyamoto, N., Ishikawa, H., Ohnishi, Y., Itoh, M., and Magara, Y. (2000) Polyclonal antibody against egg yolk extracts of medaka, *Oryzias latipes* (teleostei), for investigating the influences of xeno-estrogens. *Jpn. J. Environ. Toxicol.* 3, 15-21.
- Tabata, A., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., Itoh, M., Yamada, Y., Kamei, Y., and Magara, Y. (2003) The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Water Sci. Technol.* 47, 51-57.
- 山梨県 (2002) 環境ホルモン問題への対応. 平成13年度版山梨の環境2001, 156-160.

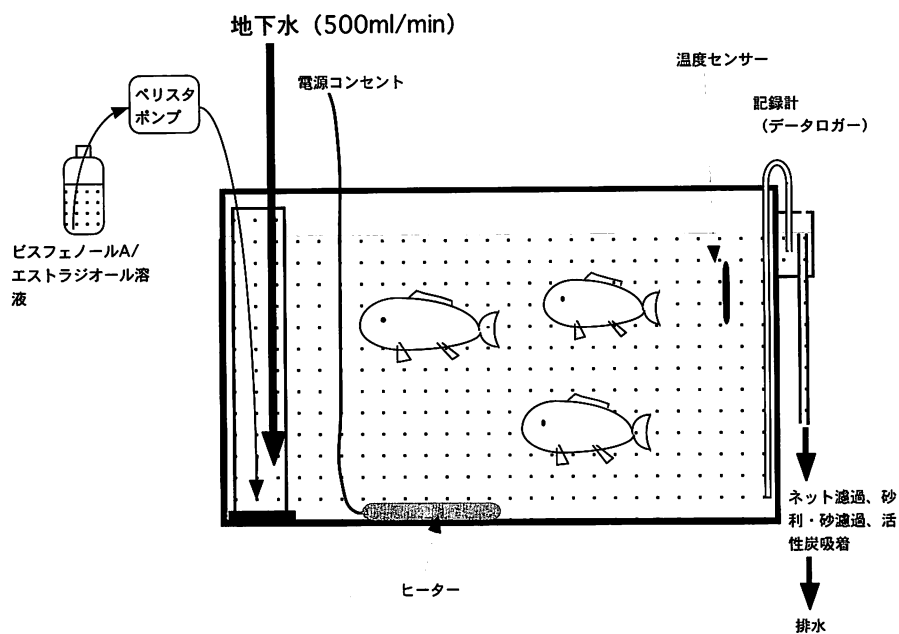


図1 ブルーギルの暴露実験装置

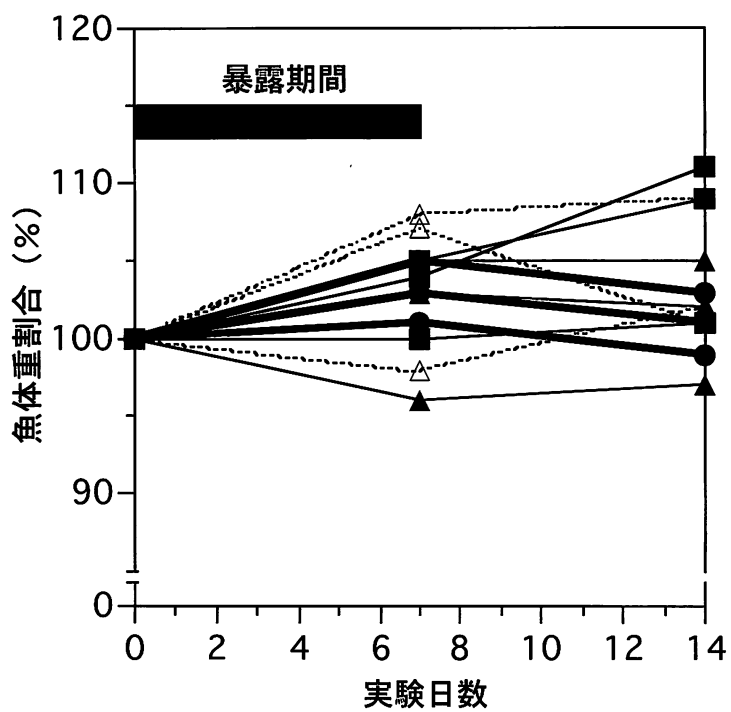


図2 暴露実験におけるブルーギルの体重変化

- △---- 対照
- ▲— エストラジオール (0.1 μg/L)
- BisA (1 μg/L)
- エストラジオール (0.1 μg/L) + BisA (1 μg/L)

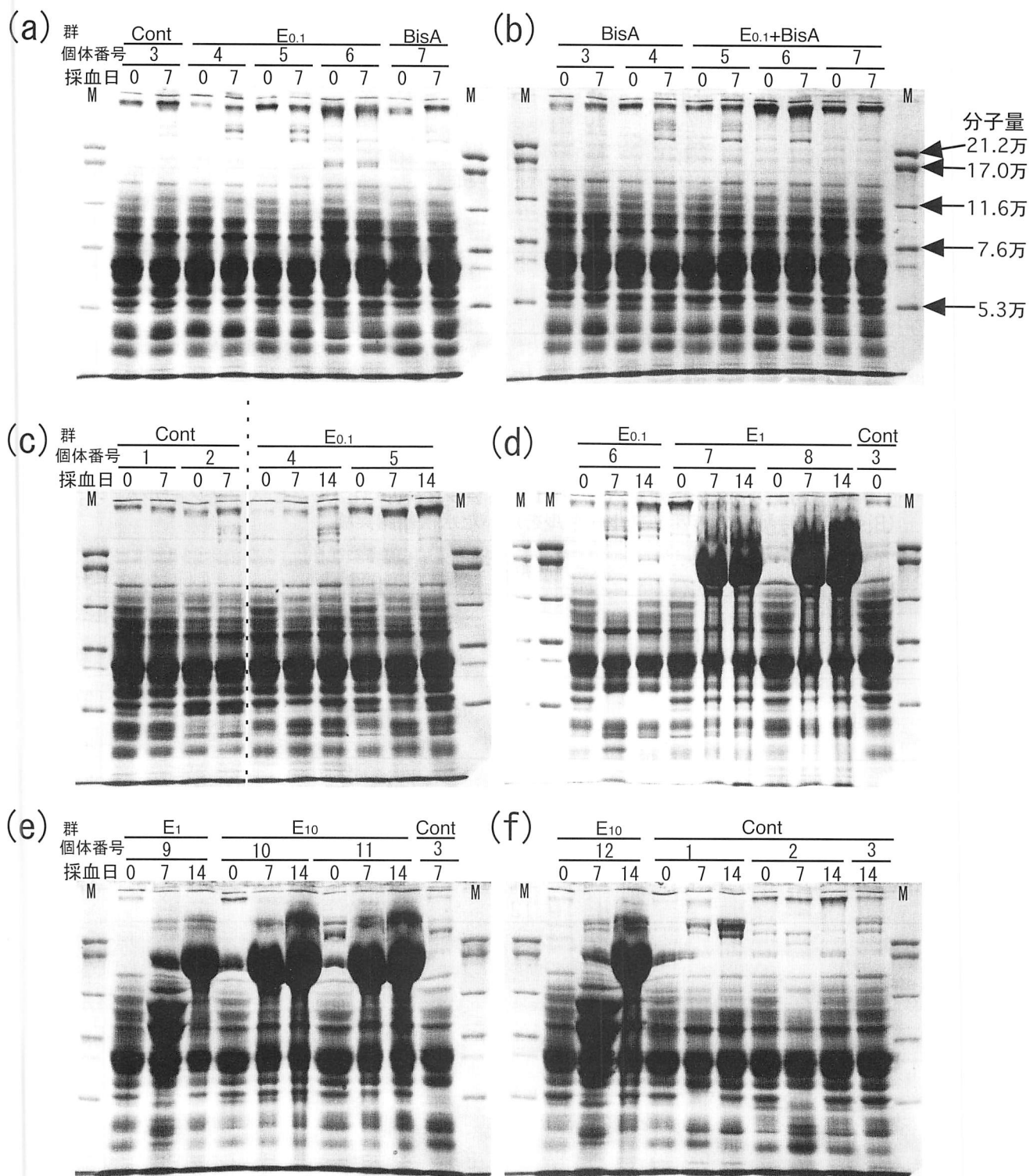


図3 17 β -エストラジオール(E)およびビスフェノールA(BisA) に7日間暴露されたブルーギル血漿蛋白質のSDS-PAGEによる分析

- ・0日目～7日目まで水槽で暴露。清浄な水で14日目まで飼育。
- ・17 β -エストラジオール濃度：0(Cont), 0.1(E_{0.1}), 1(E₁), 10 μ g/L(E₁₀).
- ・ビスフェノールA濃度：0(Cont), 1 μ g/L(BisA)
- ・M：分子量マーカー

表1 17β-エストラジオール（E2）によるピテロジェニンの誘導：ブルーギルを用いた水槽暴露実験

E2 (μg/L)	魚番号	暴露直前 0日目	暴露直後 7日目	暴露中止後 14日目
0	1	±	±	±
	2	±	±	±
	3	±	±	±
0.1	4	±	±	±
	5	-	±	±
	6	±	±	+
1	7	±	++++++	++++++
	8	±	++++++	++++++
	9	-	+++	++++++
10	10	±	+++++	++++++
	11	±	+++++	++++++
	12	±	++	++++++

表2 血清中ピテロジェニンに対する17β-エストラジオール（E2）とビスフェノールA（BisA）同時暴露の影響：ブルーギルを用いた水槽暴露実験

E2 (μg/L)	BisA (μg/L)	魚番号	暴露直前 0日目	暴露直後 7日目
0	0	1	±	±
		2	±	±
		3	±	±
0.1	0	4	±	±
		5	-	-
		6	±	±
0	1	7	±	±
		8	±	±
		9	±	±
0.1	1	10	±	±
		11	±	±
		12	±	±

富士五湖湖水のエストロジェン様活性

瀬子義幸、長谷川達也、小林仁美（山梨県環境科学研究所）
中室克彦（摂南大学薬学部）

目的

魚の雌化を指標として女性ホルモン（エストロジェン）様活性を有する化学物質汚染や魚への影響が調査される一方、水そのもののもつエストロジェン様活性を分析する新しい手法が開発され（Nishikawa et al. 1999）、環境調査に応用されるようになってきている（中室ほか2000；鶴川ほか2001）。遺伝子組み替え酵母を用いた酵母Two-hybrid法と呼ばれる方法で、化学物質のエストロジェン様活性のスクリーニングにも用いられている（Nishihara et al. 2000）。女性ホルモンそのものあるいは女性ホルモンと同様の作用を有する化学物質をこの酵母に加えると、活性の強さに応じて発色が認められるため、化学物質や環境水のエストロジェン様活性を定量的に調査することが出来る。環境水に応用した場合この方法では、エストロジェン様活性を有する化学物質を特定することは出来ないが、水質を評価する方法として有用である。富士五湖湖水のエストロジェン様活性の現状を把握するために、この酵母Two-hybrid法を用いて平成11、12年度に富士五湖の湖水を検査したので、その結果を報告する。

方法

採水：(1)1999年（平成11年）5月20日午前10時から午後2時にかけて、山中湖、河口湖、西湖、精進湖、本栖湖の湖心の表層の水を1地点につき20リットル採取した。採水には、ブリキ製バケツを用い、褐色ガラス瓶に保存した。山中湖、河口湖については湖心以外の地点でも採水を行った。採水した水は、採水当日に冷蔵宅配便で摂南大学薬学部・中室研究室に送付し、エストロジェン様活性の測定を行った。(2)平成2000年（平成12年）5月15日午前10時から12時にかけて、河口湖の10地点（河口湖湖心、船津沖、河口湖北中沖、自然生活館沖、ミューズ館沖、鶴の島北、鶴の島西、勝山村西沖、奥河口湖、長浜沖）で採水した。採水は、1999年5月と同様に行った。そのほか、生物化学的酸素要求量（BOD）測定用に採水地で孵卵瓶に採水を行うとともに、ポリタンクで水を持ち帰り、化学的酸素要求量（COD）、全有機炭素量（TOC）を測定した。採取から測定までの手順の

概略を図1に示す。

エストロジェン様活性測定

試料の濃縮：Sayato et al. 1991 の方法に従い、XAD1180カラムによる濃縮法を用いた。すなわち、試料20リットルにアスコルビン酸を加えて、pHを約4.5に調整した後、洗浄済みXAD1180樹脂に通水し、試料水中の可溶性有機物質を樹脂に吸着させた。通水後、水を除き、酢酸エチルおよびメタノール各500mlを用いて順次抽出した。得られた抽出液は、ロータリーエバポレーターを用いて30℃で減圧濃縮・乾固し、残留物をジメチルスルホキシド(DMSO)1mlに溶解させ、それぞれ酢酸エチル濃縮画分およびエタノール濃縮画分とした（図2）。

酵母Two-hybrid法によるエストロジェン様活性測定：プラスミドpGBT9およびプラスミドpGAD424が導入された遺伝子組み換え酵母Y190株を用いた。合成培地200 μ lにDMSO濃縮溶液2.5 μ lを添加した後、酵母懸濁液50 μ lを加えた。30℃で4時間培養した後、培養液150 μ lを96穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで630nmの吸光度を測定した。残りの培養液を15,000rpmで5分間遠心した後上清を捨て、沈殿に1.0 mg/ml Zymolyase-Z buffer 200 μ lを加えて懸濁した後、37℃で15分間静置した状態で酵素反応を行った。これに4 mg/ml o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 40 μ lを加えて攪拌した後、30℃で18時間反応させた。その後、1 M Na₂CO₃ 100 μ lを加えて反応を停止させ、15,000rpmで5分間遠心した後、上清150 μ lについてマイクロプレートリーダーを用いて405nmと560nmの吸光度を測定した。エストロジェン様活性の指標となる β -galactosidase活性(U)は以下の計算式に従って算出した。

$$U = [(OD_{405}) - (1.75 \times OD_{560})] / [(V) \times (OD_{630})]$$

但し、V = Volume of preculture used in assay (ml)

また、S9mixを用いた場合は、ラット肝ホモジネートの9,000 \times g上清(S9：(株)オリエンタル酵母製)100 μ lを、冷却下で濾過滅菌したコファクター（ β -NADPH 3.54 mg、 β -NADH 2.66 mg、グルコース-6-リン酸 1.88 mg、0.4 mol/L MgCl₂ 2.0 μ l、1.65 mol/L KCl

2.0 μl 、0.2 mol/L リン酸緩衝液 500 μl 、蒸留水400 μl)に加え、S9mixを調製した。ついでマイクロチューブにSD (-Trp, -Leu) 合成培地を 30 μl ずつ分注し、環境水濃縮画分 2.5 μl およびS 9mix 5.0 μl を添加した後、37℃で20分間プレインキュベートした。その後、SD (-Trp, -Leu) 合成培地を加えて200 μl とし、酵母懸濁液を加え、S9mixを用いない場合と同様に操作した。

結果と考察

富士五湖湖水のエストロジェン様活性 (1999年5月の調査)

水のエストロジェン様活性は、17 β -エストラジオール (女性ホルモン) 換算している。たとえば、湖水のエストロジェン様活性が 1 ng /L との結果を得たとすると、その水は 1 ng/Lの 17 β -エストラジオールを含む水と同じエストロジェン様活性を有していることを示す。濃縮過程で酢酸エチル濃縮画分とメタノール濃縮画分に分けて、それぞれのエストロジェン活性を測定したが、この分画法は、従来から環境中の変異原物質の濃縮・分画に用いられていた方法 (Sayato et al. 1991) をそのまま応用しており、エストロジェン様活性が同じ水でも、活性の認められる画分が異なるときは、原因物質が異なると推定される。17 β -エストラジオールのような疎水性の強い化学物質は、酢酸エチル画分に分画される傾向がある。

1999年5月に富士五湖の湖水を検査した結果を図3に示す。酢酸エチル画分では、河口湖の長浜沖と湖心の試料で 1 ng/Lを越える値となった。河口湖船津沖、山中湖 (湖心、寺屋敷沖)、西湖でそれぞれ0.2ng/L前後あるいはそれ以下の低値を示した。精進湖と本栖湖の酢酸エチル画分からは、女性ホルモン様活性は認められなかった。メタノール画分の活性は0.1ng/L前後であったが、湖間の大きな違いは認められなかった。

河口湖の試料が他の湖より高い値を示したことから、2000年5月には、河口湖について採水ポイントを増やして調査を行うこととした。

河口湖湖水のエストロジェン様活性 (2000年5月の調査)

河口湖の10地点 (河口湖湖心、船津沖、河口湖北中沖、自然生活館沖、ミュージアム館沖、鵜の島北、鵜の島西、勝山村西沖、奥河口湖、長浜沖) で採水した。湖水のエストロジェン様活性、生物化学的酸素要求量 (BOD)、化学的酸素要求量 (COD)、全有機炭素量 (TOC) を測定した結果を表1と図4に示す。

BOD、COD、TOC (表1) : 10カ所の最大値と最小値の比はそれぞれ2.2、1.3、1.4であった。BODの採水地

点間の差がやや大きかったが、CODとTOCの採水地点間の差は小さかった。

エストロジェン様活性 : 1つの湖水試料につき、酢酸エチル濃縮画分S9mix(-)[A]、酢酸エチル濃縮画分S9mix(+)[A']、メタノール濃縮画分S9mix(-)[B]、メタノール濃縮画分S9mix(+)[B']の4通りの測定用試料を調製し、エストロジェン様活性を測定した。酢酸エチル画分とメタノール画分は、分画される物質の疎水性の違いを反映している (疎水性の強い物質は、酢酸エチル画分に分画される)。また、S9mixとは薬物代謝酵素を含有するラットの肝臓抽出液のことで、代謝活性化¹⁾される化学物質を検出するために用いている。湖心の場合、酢酸エチル画分とメタノール画分のエストロジェン様活性は、それぞれ0.50ng/Lと5.8ng/Lであり、疎水性の強い物質に由来するエストロジェン様活性は低かった (表1)。しかし、S9mixの添加で酢酸エチル画分の活性は4.00ng/Lと8倍に増加している。この結果は、湖心の酢酸エチル画分には代謝活性化を受ける何らかの物質が含まれていることを示唆しており、S9mixの添加が潜在的エストロジェン様活性物質を検出することに役立つことを示唆している。

一方、長浜沖の湖水の場合には、酢酸エチル画分とメタノール画分の何れも、S9mixの添加でエストロジェン様活性はほとんど変化せず、比較的低値のままであった。長浜沖の湖水には、代謝を受けて活性を発揮する潜在的エストロジェン様物質もほとんどないものと考えられた。

S9mixは代謝活性化を想定して添加しているが、活性を阻害する物質が試料に含まれている場合、それが代謝されて阻害作用がなくなれば試料の活性が上昇することもあり得る。そのため、S9mixの添加で活性が増加した場合に、代謝活性化を受ける物質が存在していたと即断することは出来ない。また、S9mix添加で活性が減少する場合もあり、この場合は、代謝によってエストロジェン様活性が失われる場合や活性阻害物質が新に生成されることなどが想定され、結果の解釈には注意を要する。しかしながら、S9mix添加は試料中のエストロジェン様物質の性状に関する重要な情報を提供し、何より潜在的エストロジェン様物質を検出できる意義は大きい。

10地点の測定値の最大値と最小値の比は、酢酸エチル濃縮画分S9mix(-) [A]、酢酸エチル濃縮画分S9mix(+)[A']、メタノール濃縮画分S9mix(-) [B]、メタノール濃縮画分S9mix(+)[B']についてそれぞれ、40、8、620、150であった (表1)。BOD、COD、TOCと比べると地点間の差が非常に大きく、BOD、COD、TOCといった

¹⁾ 代謝活性化 : 活性のなかった化学物質が代謝を受けて構造が変化して活性を有するようになることや、活性の低い物質が代謝を受けて活性が増加することなどを代謝活性化という。

水質汚濁の一般的な指標では検出できない水質の違いがエストロゲン様活性の測定で明らかになった。

S9mix添加試料の活性の強さ及び性質から採水地点を以下の3つのグループに分けることができる（図4-9）。

グループ1：エストロゲン様活性が比較的高く、活性が疎水性物質と疎水性が高くない物質の両方による地点（船津沖、河口湖湖心、河口湖北中沖、自然生活館沖、鵜の島北）。

グループ2：エストロゲン様活性が比較的高く、活性が主に17 β -エストラジオールに代表される疎水性物質による地点（ミュージアム沖、勝山村西沖、鵜の島西）。

グループ3：エストロゲン様活性が比較的低い地点（奥河口湖、長浜沖）。

グループ1は河口湖東部、グループ2は河口湖中部、グループ3は河口湖西部にそれぞれ位置し、活性の高低及び特徴が水域ごとに違っていた（図4）。これらの違いは、採水地点沿岸地域の環境の違いを反映している可能性も考えられるが、原因物質の特定や水域による違いが認められた原因を解明するには、より詳細な調査が必要である。但し、河口湖で行った魚の調査では、コイ、ゲンゴロウブナ、オオクチバス、ブルーギルに今のところ雌化は認められていないため、湖水のエストロゲン様物質の特定と水域の違いの原因を究明することは緊急の課題ではないと考えている。

文献

- 中室克彦、上野 仁、奥野智史、井川 仁（2000）酵母 Two-Hybrid Systemを用いた環境水中内分泌攪乱化学物質の評価。日本臨床、58（12）、2477-2481。
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, S., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S. and Utsumi, H. (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. J. Health Sci. 46(4), 282-298.
- Nishikawa, J., Saitou, K., Gotou, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154, 76-83.
- Sayato, Y., Nakamuro, K., Ueno, H., Johtatsu, Y., Goto, R., and Hasegawa, T. (1991) Comparative studies on preconcentration methods for detecting the organic mutagens in water. Eisei Kagaku 37, 197-204.
- 鵜川昌弘、宮野啓一、土井均、小泉義彦、中室克彦（2001）水道水源におけるエストロゲン様活性物質の実態と処理性に関する研究。大阪府立公衛研所報 39号、65-73。

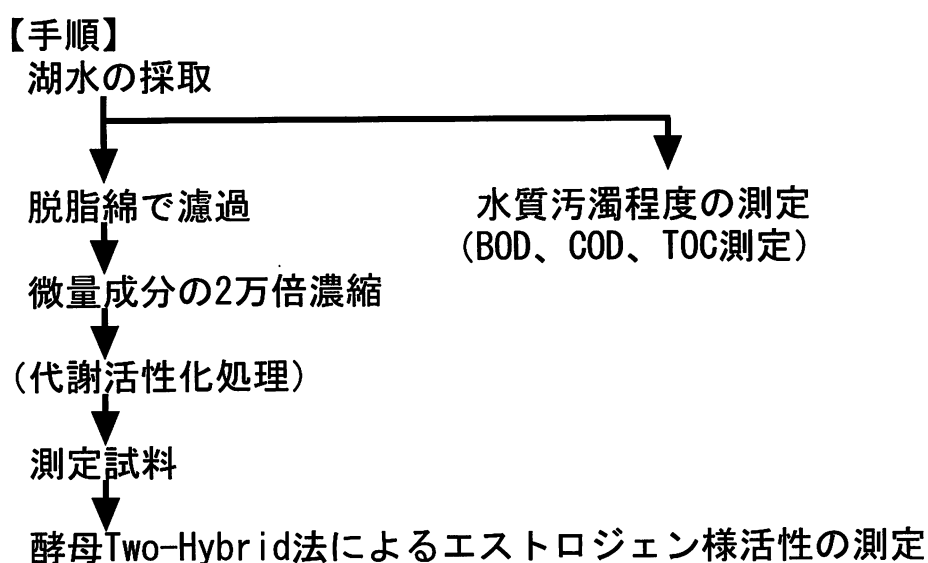


図1 湖水の処理手順と測定項目

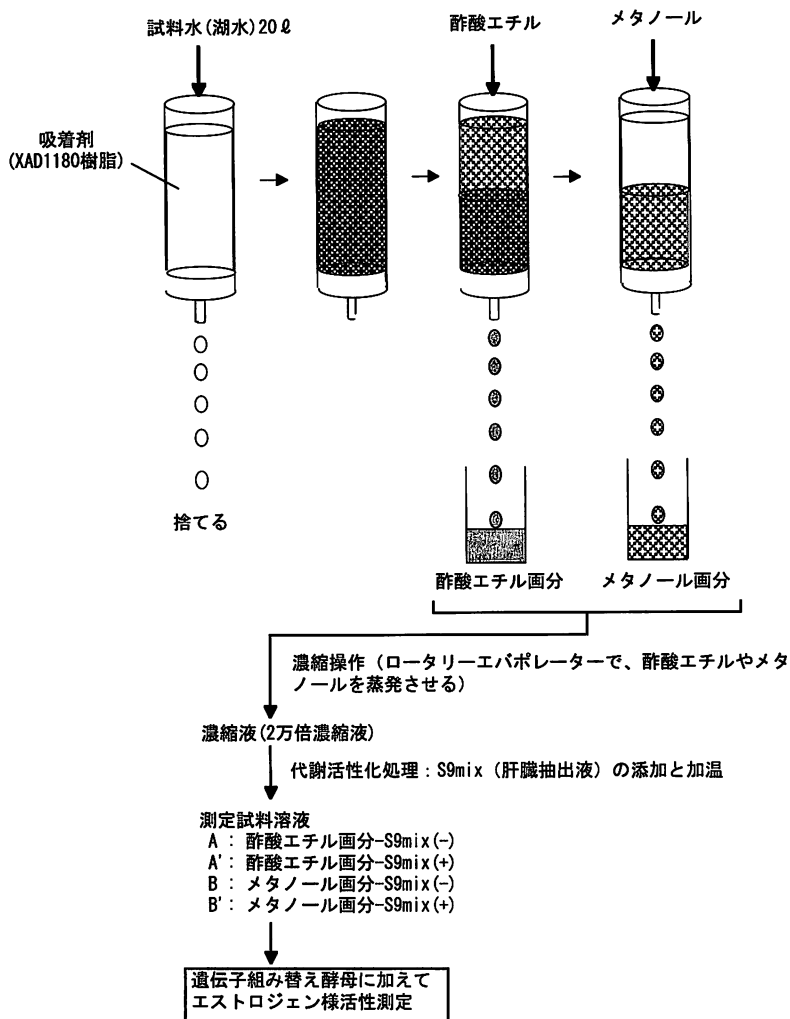


図2 湖水のエストロゲン様活性測定手順：含有微量成分の濃縮、前処理（代謝活性化）、測定

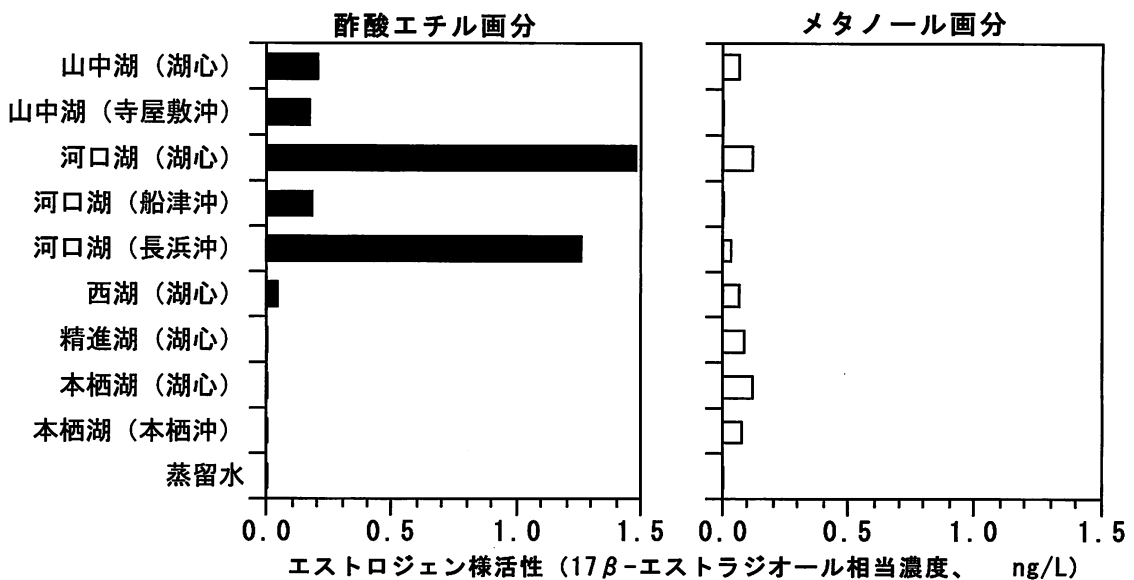
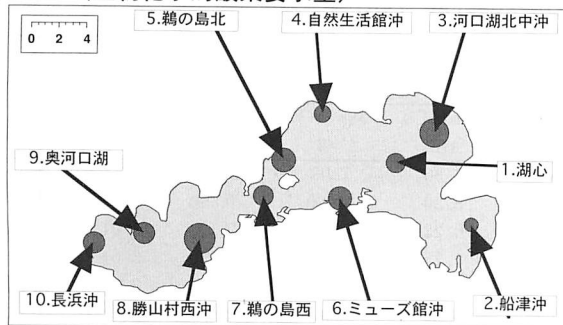
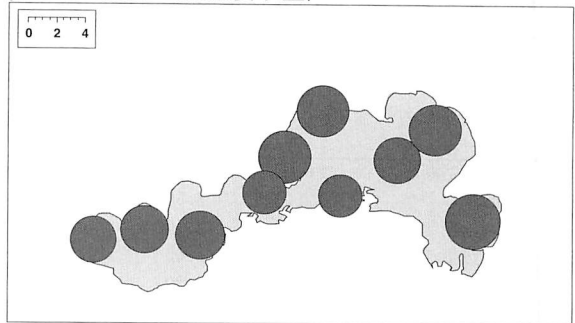


図3 酵母Two-Hybrid法によって測定した富士五湖湖水のエストロゲン様活性 (1999年5月14日採水)

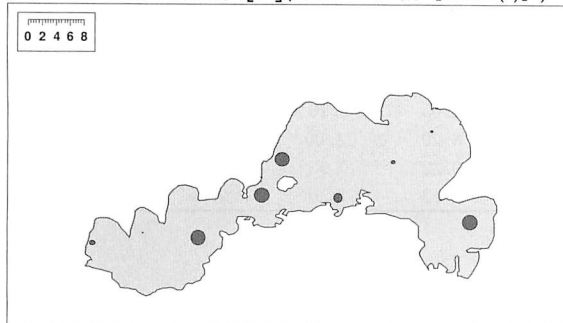
(1) BOD (生物化学的酸素要求量)



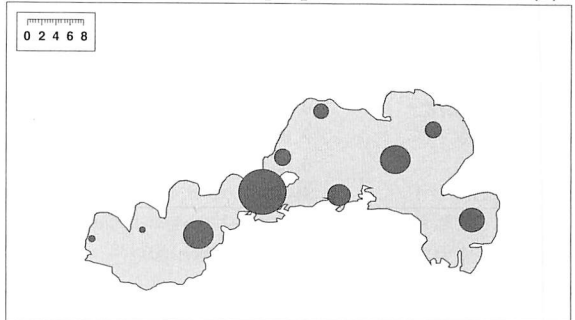
(2) COD (化学的酸素要求量)



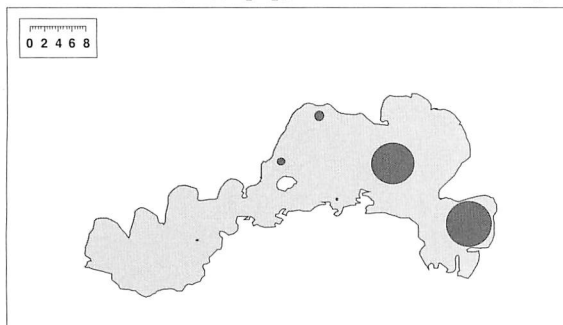
(3) エストロジェン様活性[A] (酢酸エチル画分 [S9mix(-)])



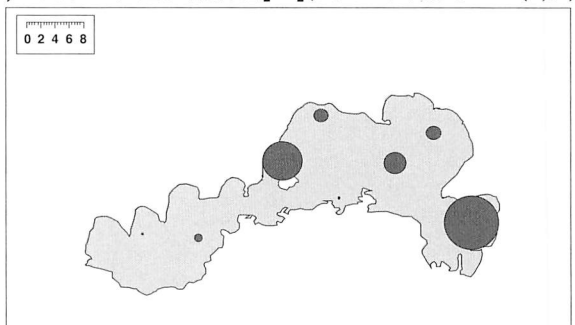
(4) エストロジェン様活性[A'] (酢酸エチル画分 [S9mix(+)])



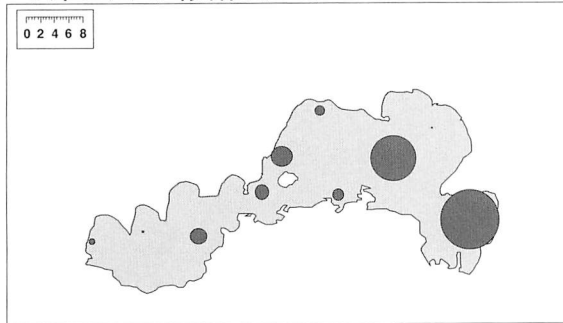
(5) エストロジェン様活性[B] (メタノール画分 [S9mix(-)])



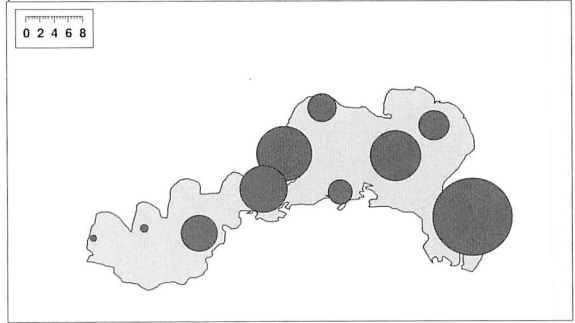
(6) エストロジェン様活性[B'] (メタノール画分 [S9mix(+)])



(7) エストロジェン様活性 [A+B]



(8) エストロジェン様活性 [A'+B']



(9) エストロジェン様活性 [A'+B'] : 棒グラフによる比較

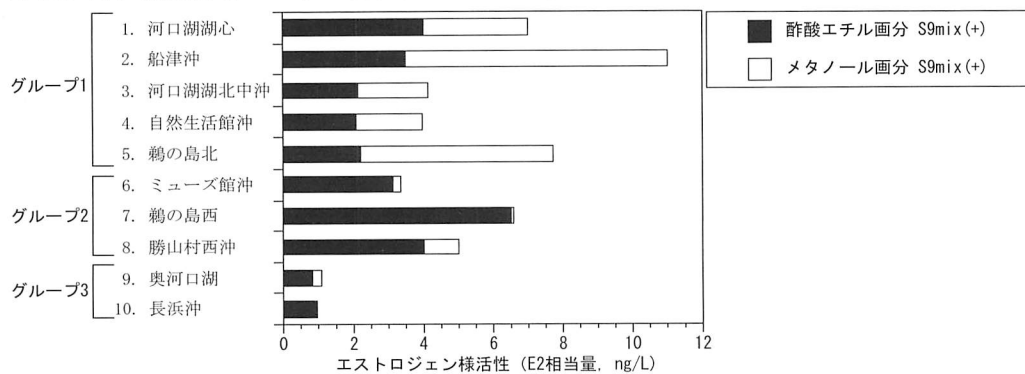


図4 河口湖湖水のBOD、CODおよびエストロジェン様活性

表1 河口湖湖水のエストロジェン様活性、BOD、COD、ならびにTOC

地点番号	地点名	エストロジェン様活性 (17β-エストラジオール相当量、ng/L)						BOD (mg/L)	COD (mg/L)	TOC (mg/L)
		酢酸エチル濃縮画分		メタノール濃縮画分		合計				
		S9mix (-)	S9mix (+)	S9mix (-)	S9mix (+)	S9mix (-)	S9mix (+)			
		A	A'	B	B'	A+B	A' +B'			
1	河口湖湖心	0.50	4.00	5.80	3.00	6.30	7.00	1.39	3.21	2.14
2	船津沖	2.00	3.50	6.20	7.50	8.20	11.00	0.99	3.82	2.15
3	河口湖北中沖	0.20	2.10	0.02	2.00	0.22	4.10	2.05	3.61	2.22
4	自然生活館沖	0.05	2.05	1.20	1.90	1.25	3.95	1.23	3.61	2.85
5	鵜の島北	1.90	2.20	1.00	5.50	2.90	7.70	1.73	3.61	2.01
6	ミューズ館沖	1.20	3.10	0.30	0.20	1.50	3.30	1.65	3.01	2.28
7	鵜の島西	2.00	6.50	0.01	0.05	2.01	6.55	1.44	3.01	2.04
8	勝山村西沖	2.00	4.00	0.20	1.00	2.20	5.00	2.17	3.41	2.54
9	奥河口湖	0.20	0.80	0.05	0.25	0.25	1.05	1.52	3.31	2.17
10	長浜沖	0.70	0.90	0.05	0.05	0.75	0.95	1.53	3.21	2.18
	平均	1.08	2.92	1.48	2.15	2.56	5.06	1.57	3.38	2.26
	標準偏差	0.84	1.70	2.42	2.54	2.65	3.10	0.35	0.28	0.25
	最大	2.00	6.50	6.20	7.50	8.20	11.00	2.17	3.82	2.85
	最小	0.05	0.80	0.01	0.05	0.22	0.95	0.99	3.01	2.01
	最大/最小	40.0	8.1	620.0	150.0	37.3	11.6	2.2	1.3	1.4

BOD：生物化学的酸素要求量 (Biochemical Oxygen Demand)

COD：化学的酸素要求量 (Chemical Oxygen Demand)

TOC：全有機炭素濃度 (Total Organic Carbon)

R-03-2004

平成15年度
山梨県環境科学研究所研究報告書
第10号

YIES Research Report

2004年3月発行

編集・発行
山梨県環境科学研究所

〒403-0005 山梨県富士吉田市上吉田字剣丸尾5597-1

電話：0555-72-6211

FAX：0555-72-6204

<http://www.yies.pref.yamanashi.jp/>

印刷 株式会社サンニチ印刷

