

特集 魚類ビテロジェニン

現場調査への適用と留意事項
— 魚類雄血清ビテロジェニンを指標とした
内分泌かく乱物質影響評価の現場適用 —

中村幸雄^{*1§}・堀田公明^{*2}・渡辺剛幸^{*1}

Application for Field Study and Its Notes
- Site Applications of Estrogenic Activity Evaluated by Measuring Male
Serum Vitellogenin in Fish -

Yukio Nakamura^{*1§}, Komei Hotta^{*2} and Takayuki Watanabe^{*1}

1. はじめに

我が国においては1990年以降, 各省庁はじめ大学や民間機関などの産官学の共同体制のもと, 各地の水域環境や水生生物における内分泌かく乱物質影響の現場調査が本格的に行われてきた。これまでに知られている内分泌かく乱物質の多くがエストロゲン作用を有する。魚類はエストロゲン(雌性ホルモン)の作用により肝臓で卵黄前駆物質のビテロジェニンを産生する。この生理反応を利用して専ら特定魚種の雄の血中ビテロジェニン(Vg)濃度を指標として, 当該水域のエストロゲンあるいはエストロゲン作用を有する化学物質(以下, 両者を併せてエストロゲンと表記する)の影響, すなわち, 内分泌かく乱物質影響を評価する手法が採用された。現在, 雄のVg濃度を指標として影響を評価する手法は, 現場調査だけでなく, 内分泌かく乱物質の作用機構の解明やスクリーニングを行うための実験的研究にも活用され, 影響評価の極めて有効な手法として定着しつつある(環境省, 2005)。

魚類を対象とした現場調査の結果を概観すると, 雄Vg濃度の分析と同時並行で実施した当該魚種の精巣や卵巣の外部形態および組織像の検査では,

水質の汚染度と関連するような奇形および精巣卵の形成など雄生殖腺への影響は明確ではなかったが, 水質測定結果により汚染度が高いと判断された場所で採集した雄の血中Vg濃度が, 汚染度が低い場所で採集した雄のそれよりも高い値を示す傾向があった(征矢野ら, 2003; Ohkubo *et al.*, 2003; 中村, 2004)。また, 実験的研究においても17 β -エストラジオールなどの内因性のエストロゲンを曝露した場合と同様に, 特定の人工化学物質の曝露が雄に対して精巣卵の発現や魚体中あるいは血液中のVg濃度を上昇させることが明らかとなった(角埜ら, 2001; 環境省, 2005)。以上のことは, 雄のVg濃度が, 環境中の女性ホルモン活性, いわゆるエストロゲン活性を示す指標として有効であることを示している。

これまで実施された現場調査のうち, 著者らは1999年から4カ年にわたって, 水産庁の委託を受け, 複数の海域と水産的に有用な海産魚類を対象として, 内分泌かく乱物質影響の実態を明らかにするため, 生殖腺組織像や雄の血中Vg濃度等を指標とした全国規模の現場調査を行った(堀田ら, 2002; 中村, 2004)。

本論文では, 魚類雄の血中Vg濃度を指標とし

(2008年12月15日受付, 2009年1月30日受理)

*1 財団法人海洋生物環境研究所事務局(〒101-0051 東京都千代田区神田神保町3丁目29番地 帝国書院ビル5階)
§ E-mail: nakamura@kaiseiken.or.jp.

*2 財団法人 海洋生物環境研究所 実証試験場(〒945-0017 新潟県柏崎市荒浜4-7-17)

た現場調査において重要な、魚種の選定方法、採集回数、採集時期、採集数、採集方法、測定項目などの設定方法に関する留意事項の概要をとりまとめるとともに、採用した具体的な調査方法とそこで得られた一部成果を紹介する。

ここに記述した内容が、今後の本問題解決のための現場調査をより円滑に、合理的に実施する際の一助となれば幸いである。

2. 現場適用の概要

まず、本項では、魚類雄の血中Vg濃度を指標とした現場調査の計画立案を行う際の留意事項について概要をまとめた。

1) 調査魚種

一般的に、対象とする調査海域があらかじめ設定されている場合、そこに生息する魚種の選定には以下の条件が必要である。

- Vg分析法が確立している魚種
- 当該海域において通年、多く採集できる魚種
- 当該海域における繁殖生態などの生態的特性が明らかな魚種、あるいは実態調査と同時並行で繁殖生態に係わる調査が実施可能な魚種
- 新鮮な血液、肝臓などの試料が採取できる魚種

現在、我が国において血中、肝臓中あるいは魚体中などの試料を対象としたVg分析法が確立している海産魚種としては、エゾメバル（原ら，1986）、マダイ（原ら，1987；藤井，2000）、オヒョウ（松原・澤野，1992）、マイワシ（Matsubara *et al.*, 1994）、マツカワ（Matsubara and Sawano, 1995）、ナガガジ（古屋ら，1997）、ハリセンボン（Fujita *et al.*, 1998）、マコガレイ（Hashimoto *et al.*, 2000）、ゴマアイゴ（Rahman *et al.*, 2000）、トビハゼ（征矢野，2003）、ボラ（征矢野ら，2003）、マハゼ、シロギス、イシガレイ、マガレイ、メイタガレイ（大久保ら，2006）などがある。

Table 1及びTable 2に海産魚雄におけるVgを指標とした調査事例を示した。日本全体もしくは大都市周辺とバックグラウンド水域で調査した魚種別の事例としては、マハゼ *Acanthogobius flavimanus*（Ohkubo *et al.*, 2003）、マコガレイ *Pleuronectes yokohamae*（Hashimoto *et al.*, 2000）、シロギス（後述の「3. シロギスに関する調査例」参照）があり、いずれの魚種でも大都市沿岸で高い血中Vgが確認された。

同一水域内または近い水域間で調査した事例と

しては、ボラ *Mugil cephalus*（和波ら，2005）、マコガレイ（飯島ら，2001）があり、ボラでは東京湾で下水処理場近傍の運河部と同湾の沖合域とを比較しており、運河部で非常に高いVgが検出された。

また、魚種の違いによって雄魚の血中Vg濃度のレベルが大きく異なり、魚種間の比較は注意を要する。例えば海域のマコガレイ、マハゼ、シロギスで測定される血中Vg濃度の最大値は、数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～十数 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のレベルであるが、トビハゼ *Periophthalmus modestus* では数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ボラでは1 mg/mL 以上を示す。ボラが高いVgを示す原因について、底泥や浮泥とともに有機物を摂取するボラの食性との関係が指摘されている（原，2004）。

これらの調査においては、当初、この問題に対する取組が緒に着いたばかりであったこともあって、調査方法には若干の相違があるが、いずれも内分泌かく乱物質影響の評価指標として雄の血中Vgを採用し、エストロゲン活性の検出を試みている。

2) 調査海域

魚類雄の血中Vg濃度を指標として、影響評価の対象水域の実態調査を行う際、清浄地点と汚染が進んでいる地点など水質の汚染度に応じた複数の調査地点を設定し、分析結果を比較することは、当該水域における影響の評価に必須の作業である。過去の多くの実態調査でも内湾域と外海域、河川の上流域と下流域、下水処理場の上流側と下流側、河川河口域と沖合域などのように、予想される内分泌かく乱物質影響の多寡に応じた複数の地点が設定されている。

著者らが実施した4カ年の調査では、我が国周辺の内湾あるいは閉鎖性海域など、河川流入量が多いなど、陸域との関わりが強く、かつ水質汚染が進んでいると予想される水域、および河川が少なく、陸水起源物質の直接的な影響が少ないと予測される水域であって、特に外海に接する水域、さらにその中間的な水域など、水質汚染度に応じた複数の調査対象水域を選定している。

3) 魚の採集方法と血液処理

新鮮血が必要であることから、船上あるいは陸上からの漁網捕獲あるいは釣獲による採集を行い、生きたままの魚から採血処理を行う必要がある。

Table 1 Research example of serum vitellogenin (Vg) in male marine fishes

Species	Research site	Period of the research	Range of Vg concentration	No. Vg-positive fish/total samples	Reference
<i>Pleuronectes yokohamae</i>					
	The Strait of Tsugaru off Shiriuchi	Jan.-Dec.	approximately 50ng/mL	no data	Hashimoto <i>et al.</i> (2000)
	Tokyo Bay	Jan.-Dec.	25-2,200ng/mL	no data	
	Suou Nada	Sep.-Dec.	AverageND-0.4μg/mL	1/23 (1.2-1.8μg/mL)	Iijima <i>et al.</i> (2001)
	Hiroshima Bay	Apr.-Jan.	AverageND-0.4μg/mL	3/47 (1.2-1.8μg/mL)	
<i>Periophthalmus modestus</i>					
	Hama-gawa in Kashima City, Saga Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	Yurimoto <i>et al.</i> (2005)
	Honjoe in Saga city, Saga Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	
	Kusuda-gawa in Takada town, Fukuoka Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	
	Doumen-gawa in Omuta city, Fukuoka Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 30-40μg/mL	no data no data	
	Ohruta-gawa in Omuta city, Fukuoka Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	
	Tojin-gawa in Yukoshima town, Kumamoto Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	
	Mizunoura in Takaki town, Nagasaki Pref.	Apr.-Aug. Sep.-Nov.	10-20μg/mL 10-25μg/mL	no data no data	
<i>Mugil cephalus</i>					
	Tokyo Bay canal region	Jul.-Dec.	ND-over 500,000ng/mL	15/19	Wanami <i>et al.</i> (2005)
	Tokyo Bay offshore region	Sep.-Nov.	ND-86ng/mL	14/37	

船上での採血処理が難しい場合には、魚捕獲後、船内水槽や陸揚げ地あるいは近郊の蓄養水槽等に收容し、遅くとも1～2日以内で血液採取や生殖腺組織摘出などの処理を行うことが望ましい。

簡単な採血法としては尾柄部を切断して尾動脈より流出する血液を採取することができるが、最も多く用いられるのは、尾柄部血管から注射針で採血する方法である（長谷川，1991）。血中Vg分析用のサンプルに供するためには、遠心分離して血清または血漿にする。血清は4℃前後の低温で数時間、ないしは室温（20～25℃）で30分～1時間放置し、十分に凝固させてから、1,500～2,000gで10～15分間遠心し上清（血清）を採取する。血漿の場合は採血注射器の中にあらかじめヘパリンやEDTA等の抗凝固剤をいれておいて採血し、採血後直ちに遠心し、上清（血漿）を分離する（明渡，1985）。さらに血中のVgの分解を考慮しアプ

ロチニンなどの蛋白分解酵素阻害剤を併せて用いる場合もある。大久保によれば、免疫学的手法によりVgを測定する場合は、蛋白分解酵素阻害剤を使用しない場合でも、遠心分離後に採取した血清を直ちに凍結し、分析前に凍結融解を繰り返さないようにすれば分析値に大きな影響は見られないという（大久保，私信）。遠心分離後の血清を-20℃で凍結保存することにより、数か月間はビテロジェニンの抗原性を失わないことが報告されている（Hara，1987）。しかし、これまでに報告されている魚類血中のVg分析に関する文献では、サンプルとして血清と血漿のいずれも用いられており、またタンパク分解酵素阻害剤の添加の有無も文献により異なることから、統一された血液処理方法は今のところないようである。

Table 2 Research example of serum vitellogenin (Vg) in male Japanese common goby

Species	Research site	Period of the research	No. Vg-positive fish/total samples	Vg-530 concentration*1 ng/mL Mean±SD	Range of Vg-530 concentration ng/mL	Vg-320 concentration*1,*2 ng/mL
<i>Acanthogobius flavimanus</i>						
	Otaru	Sep. 2000	1/29	310±1,725	0-9,602	2,356
		Sep. 2001	2/44	209±997	0-5,721	974
	Kamiiso	Sep. 1997	0/10	0	0	no data
		Sep. 1999	2/40	6±26	0-126	86
		Sep. 2000	2/33	18±80	0-434	164
	Hakodate	Sep. 1999	0/22	0	0	no data
	Matsushima	Aug. 1998	2/31	19±76	0-376	82
	Shiogama	Aug. 1998	0/41	0	0	no data
	Sado	Nov. 2000	0/34	0	0	no data
	Kashiwazaki	Oct. 1999	0/23	0	0	no data
	Tokyo Bay (Sumida-gawa)	Sep. 2000	0/30	0	0	no data
	Tokyo Bay (Ara-kawa)	Sep. 2000	1/29	3±18	0-100	0
	Tokyo Bay (Tama-gawa 1)	Nov. 1998	0/22	0	0	no data
	Tokyo Bay (Tama-gawa 2)	Dec. 1998	2/29	123±535	0-2,780	no data
	Tokyo Bay (Tama-gawa 3)	Sep. 2000	2/12	79±208	0-706	1,375
	Nagoya	Oct. 1998	2/11	54±121	0-350	87
		Oct. 1999	10/63	142±500	0-2,541	1,339±3,469
	Mikawa	Aug. 1998	9/11	134±98	0-356	49±22
	Nagashima	Oct. 2001	0/44	0	0	no data
	Yokkaichi	Aug. 1998	10/24	140±186	0-570	46±41
	Osaka Bay (Yodo-gawa 1)	Oct. 2000	0/45	0	0	no data
	Osaka Bay (Yodo-gawa 2)	Oct. 2000	0/42	0	0	no data
	Osaka Bay (Yamato-gawa)	Oct. 2000	5/42	200±950	0-6,035	15,057±25,087
	Osaka Bay (Muko-gawa)	Sep. 1999	5/16	47±70	0-159	54±17
	Osaka Bay (Muko-gawa)	Sep. 2000	0/54	0	0	no data
	Hakata	Nov. 1999	0/36	0	0	no data
	Nagasaki	Nov. 1999	6/49	23±65	0-256	65±7
	Taira	Nov. 1999	0/38	0	0	no data

All data from Ohkubo *et al.* (2003).

*1: There are two types of Vg in the Japanese common goby, molecular masses of 530 kDa (Vg-530) and 320 kDa (Vg-320).

Sensitivity range of the ELISA for Vg-530 and -320 is from 100ng/mL, respectively and under 100ng/mL is assigned 0.

*2: Mean concentration of the Vg-530-positive fish.

4) 調査時期

魚類雄の血中Vg濃度を評価指標とする際、当該海域における同魚種雌雄の成熟・産卵に関して、生殖腺の発達状況、生殖関連ホルモン、周期的なVg濃度の変化をあらかじめ把握しておくことが重要である(伊藤・板野, 2006)。

血中Vg濃度は、雌はもとより雄でも季節や成熟時期に応じて変化することから、それらの季節変化の情報をあらかじめ収集し、Vgの変化の要因を的確に区別できることが必要である。トビハゼでは大牟田川河口域において、冬季の冬眠前に

有明海の他の水域の2～3倍のVg濃度が確認されている(坂本ら, 2005)。カレイ科のflounder (Kleinkauf *et al.*, 2004)、タイ科のヨーロッパマダイ (Kokokiris *et al.*, 2001)、後述のシロギスにおいては成熟期に雄の血中Vgが上昇することが観察されている。

また、シロギスを人工的な飼育環境のもとで雌雄混合飼育した場合、雌の存在が雄の血中Vg濃度を上昇させることが報告されており(堀田ら, 2008)、特に雌雄の接触頻度が増大する繁殖時期の調査では、雌と雄の値を同時並行的に精査する

必要があろう。

さらにまた、シロギスの血中Vg濃度が水温の違いによって変化することも知られており（堀田ら、2004）、血中Vg濃度を指標とした飼育実験においては水温条件に十分考慮する必要がある。

5) 採集回数や尾数の設定にかかわる考え方

血中Vg濃度は、個体ごとのばらつきが大きいこともあり、統計処理を行うことを前提とするならば、採集尾数や採集回数はできるだけ多いことが望ましい。

採集回数については、当該魚種の生殖年周期に応じた季節的な調査回数を設定することが理想的である。この際、成熟期に相当する時期には、血中Vg濃度も大きく変化し、前述のように水温や雌雄の接触頻度の増減などによっても変化することが示唆されており、水質や試料採集の調査回数を密に設定するとともに、雌魚の血中Vg濃度も同時並行的に精査する必要がある。

6) その他の調査項目

魚類の血中Vg濃度は、雌では特に生殖周期に応じて変化することは前述した。従って、実際の調査にあたっては血中Vg濃度とともに、体重や体長などの魚の大きさ、生殖腺重量、肝臓重量を測定しておく必要がある。また、それら測定値から体重に対する生殖腺重量の比（GSI；生殖腺重量×100/体重）が相対的な成熟指標として、さらに体重に対する肝臓重量の比（HSI；肝臓重量×100/体重）が内分泌かく乱物質の肝臓への影響指標としてしばしば計算され、内分泌かく乱物質の魚類に対する影響評価のために使用される。

さらに、影響の評価のためには生殖腺の奇形等の外部形態の異常の有無を観察するとともに、生殖腺組織を固定し、後にプレパラートを作成して精巣卵等の組織像の異常の有無を精査する必要がある。また、雄魚の場合には生殖腺の発達段階とVg濃度の関係についても評価する必要がある。

3. シロギスに関する調査例

著者らは、水産庁の委託を受けて平成11年度より日本沿岸域に生息する水産有用魚類を調査対象とした内分泌かく乱物質の実態把握調査の解明を進めてきた（中村、2004）。本稿は、水産庁委託事業内分泌かく乱物質魚介類影響実態把握等調査

（平成11～14年度）の中で実施されたシロギス雄の血中Vgを指標とした内分泌かく乱物質の海域実態調査の成果の一部をまとめたものである。

本調査の対象種として注目したシロギスは、九州から北海道南部にかけて沿岸あるいは汽水域に広く分布する魚種であり、水域間の影響の比較が可能である。また、日本の海産魚類の中では生態的・生理的な知見が豊富な魚種である。さらに、シロギスは比較的小型であり種苗生産や飼育技術も確立していることから、実験魚としてもしばしば用いられており飼育実験から実態調査のデータを検証することも可能な魚である。

Vgを測定するためのサンプルは、調査対象種や目的によって異なる。メダカでは、血液（田端ら、2003）、魚全体のホモジネート（Brion *et al.*, 2002）、肝臓のホモジネート（Seki *et al.*, 2003）など、同じ魚種でありながら異なる部位が用いられている。小型の魚種では腹水（角埜ら、2001）や表皮粘液（Moncaunt *et al.*, 2003）をサンプルとする場合もみられる。一般に、血液は測定するまでの試料調製や保存が容易であり、測定感度や血中濃度にもよるが本調査で用いた免疫吸着測定法（ELISA法）であれば100 μ L程度の血液（全血）で測定が可能なことから、少量でも採血できる魚類ならば血液を用いる場合が多いようである。シロギスでは10cm程度の体長になると必要量を採血することができることから、シロギス成魚を対象とした本調査では血液を用いた。

1) 調査方法

(1) 対象水域

モデル水域として次の4つの水域を選定した。すなわち、内湾性が強く化学物質による汚染が進んでいると考えられる大都市周辺沿岸水域（A1およびA2水域）、外洋に面しているが、大都市圏にも比較的近く中程度の汚染が考えられる中小都市周辺沿岸水域（B水域）、大都市圏から遠く、汚染の程度が最も低いと考えられるバックグラウンド沿岸水域（C水域）の4水域とした。

(2) シロギス採集時期

シロギス採集時期や回数は水域や年度ごとに異なるが、1999年から2002年の概ね産卵期の6～8月を中心として魚の採集を行った。ただし、A2およびC水域は1999年と2000年の2カ年に限り実施した。血中Vg測定に供した尾数の合計は、A1、A2、B、Cの各水域で、それぞれ452尾、204尾、

360尾, 298尾であった。各年各月の供試尾数の内訳をFig. 1に示した(括弧付数字; 1999年を黒色, 2000年を赤色, 2001年を青色, 2002年を緑色で示す)。

(3) 試料採取および分析

シロギスは釣獲あるいは魚網により捕獲された。前述(2.-3))したとおり, シロギスは試料採取時まで生かした。初めに体長と体重を測定した後, 直ちに採血を行った。剃刀で尾柄部を切断して1.5mLのマイクロチューブに直接, 血液を受けて採取した。採血後に生殖腺を摘出して生殖腺重量を測定し, 後にGSIを算出した。血液を入れたマイクロチューブは氷温で数時間以上静置した後に遠心分離して血清を分取し, Vg測定まで-80°Cで凍結保存した。また, 摘出した生殖腺の一部は

ブアン氏液で固定し, 常法によりパラフィン切片を作製し光学顕微鏡により組織観察を行った。VgはシロギスVg抗体を用いたELISA法により血清中濃度を測定した(Hotta *et al.*, 2003)。

2) 調査結果

(1) GSI

周年調査を行った1999年および2000年の調査において, 各水域で採集されたシロギス雄のGSIは6月から7月にかけて漸増し, 7月から8月にピークを迎え, 以後, 漸減傾向を示した(Fig. 1)。この傾向は後年度調査でも確認され, 2001年にはA1およびB水域で産卵期前の5月にGSIは1%以下の低値であったが, 2002年の7月のA1およびB水域の値はいずれも1.8%に増加していた。GSIの

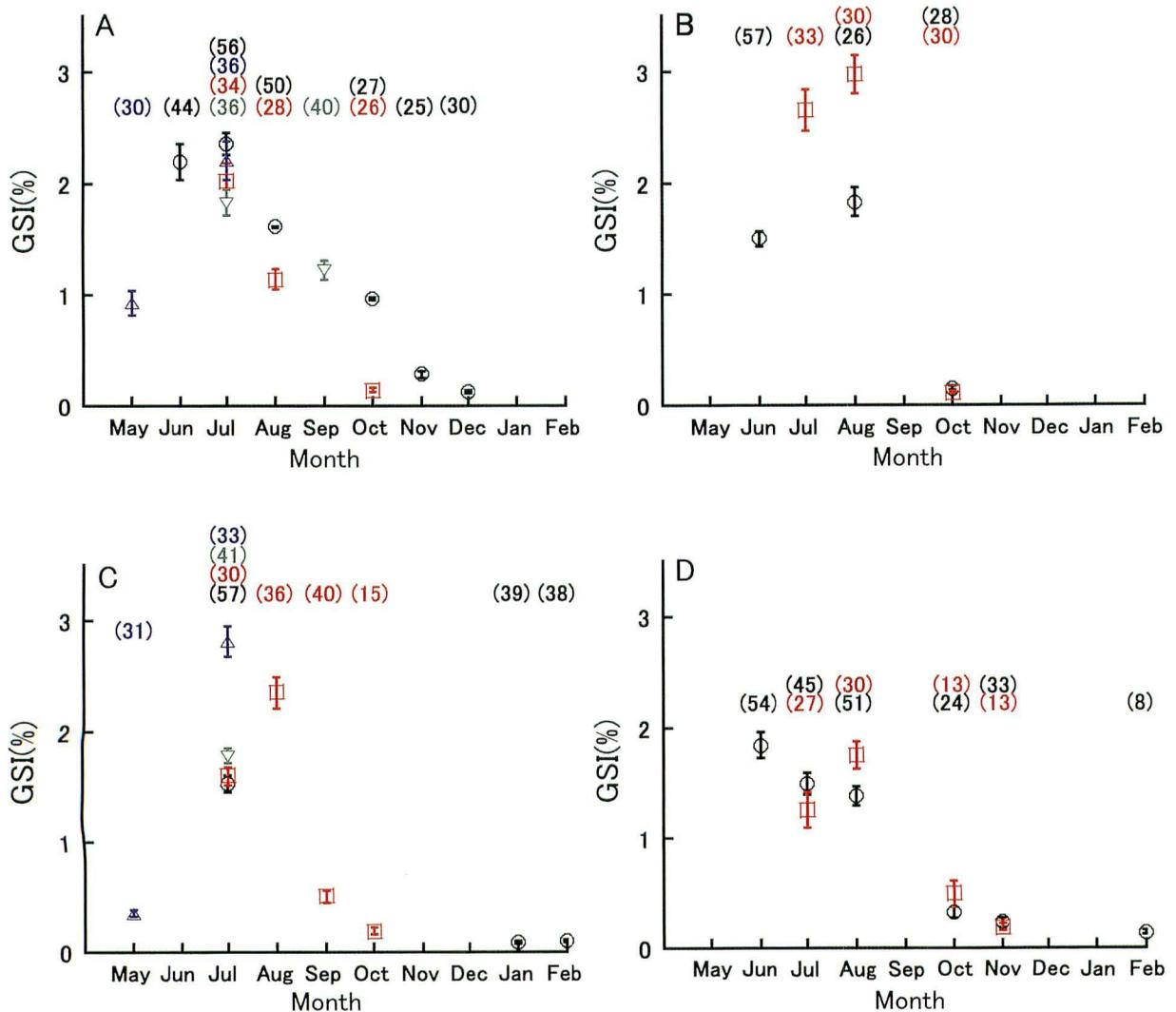


Fig. 1 Gonadosomatic index (GSI) in male Japanese whiting in coastal waters of the metropolitan city (A: Site A1, B: Site A2), the regional city (C: Site B), and the local city as reference site (D: Site C). Each symbol represents the mean \pm SEM from males in each month/each year. Numbers in parentheses show the numbers of specimens.

変化をみる限り4水域とも成熟期に大きな違いはなく、6月から8月に成熟し産卵するとみられた。

(2) 血中Vg

B水域を除くA1, A2, C水域では, GSIが最大を示す6~8月の成熟期において血中Vg値が高い個体が出現する傾向がみられた。特にA1およびA2の水域ではこの傾向が顕著で, 6~8月における雄の血中Vgの検出率および濃度がそれぞれ24~44%およびND (0.05 μ g/mL未満)~3 μ g/mL, 13~77%およびND~1.7 μ g/mLであった (Fig.2)。また, B水域で同時期に採集した雄の検出率および濃度は0~10%およびND~0.3 μ g/mL (1尾: 4.9 μ g/mL) で他水域に比べ低く, 同様に, バックグラウンドのC水域では3~36%およびND~0.4 μ g/mL (1尾: 2.5 μ g/mL) であった。このように, BおよびC水域では, 2000年にそれぞれ各1尾の雄で血中Vg濃度が高い値を示したが, 1999~

2001年の調査で, 他の雄の血中Vg濃度は0.5 μ g/mL以下の低いレベルであった。一方, A1およびA2水域では, いずれの年も血中Vg濃度が0.5 μ g/mL以上の値を示す雄の検出率が比較的高かった。4水域とも成熟期を除く時期には血中からはほとんど検出されなかった。また, 2002年の調査においてもA1水域で検出率が高く, B水域で低いという傾向が再確認された。

このように, 天然シロギス雄の血中Vg濃度は, ND~数 μ g/mLの範囲にあること, 生息水域による差があること, 成熟期に高値を示すという季節性があることがわかった。

(3) 血中VgとGSIの関係

シロギス雄の血中Vgの濃度が成熟期に高い傾向がみられたことから, 個体毎の血中Vgの濃度とGSIを水域別にFig. 3に示した。各水域で採集されたシロギス雄の血中Vgの濃度とGSIの間に相

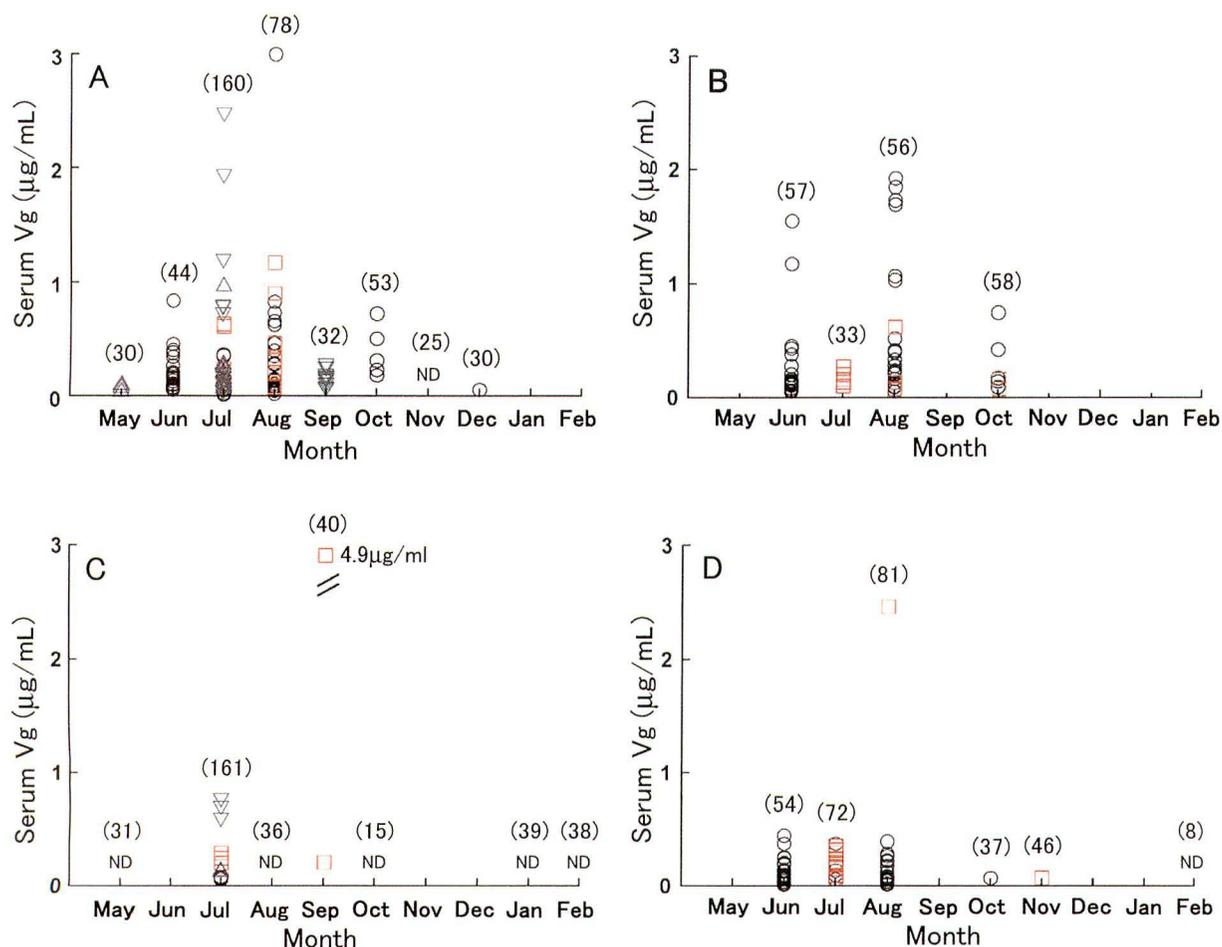


Fig. 2 Serum levels of vitellogenin of male Japanese whiting in coastal waters of the metropolitan city (A: Site A1, B: Site A2), the regional city (C: Site B), and the local city as reference site (D: Site C). Each symbol represents the value from one individual. Numbers in parentheses show the numbers of specimens. Vg concentrations less than the detection limit (<0.05 μ g/mL) are denoted by ND.

関はなかったが、GSIが1～2%の時期に血中Vg濃度が高値を示す傾向があった。

(4) 精巣組織像

生殖腺組織像の明らかな異常を示す個体は、2000年7月のA1水域における調査時に235尾の雄の中から1尾確認された (Fig. 4)。この魚は血中Vg濃度が0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、外見的所見は正常な精巣を有していたが、組織観察の結果、精巣組織中に卵母細胞が混在する精巣卵であった。他の年度および水域で採取された雄からは精巣卵は確認されなかった。

3) 考察

(1) シロギス雄の血中Vg濃度の生息水域による差

Fig. 2で示した各個体のシロギス雄の血中Vg濃度から、1999年から2002年のA1, A2, B, Cの各

水域のシロギス雄魚の血中Vg濃度の平均値を算出すると、それぞれ0.12, 0.15, 0.07, 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる (NDは検出下限値の0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として計算)。大都市周辺沿岸水域A1, A2水域の値はB, C水域に比べ2倍近いレベルにあり、大都市周辺沿岸水域のシロギス雄の血中Vg濃度が他の水域に比べ高値であることを示している。大都市周辺の海域の化学物質を調べた報告は多くあるが、例えば東京湾の海水および底泥にはエストロジェンが広く分布することが確認されている (中田・高田, 2006)。本調査が示したVgの水域差は大都市周辺沿岸水域においてエストロジェンによる環境汚染の程度が大きいことを反映した結果と考えられる。

一般に雄魚の血中Vgはエストロジェンに曝露されてから、1週間以内に血中濃度が上昇し、上昇した値がもとのレベルに戻るには1カ月から

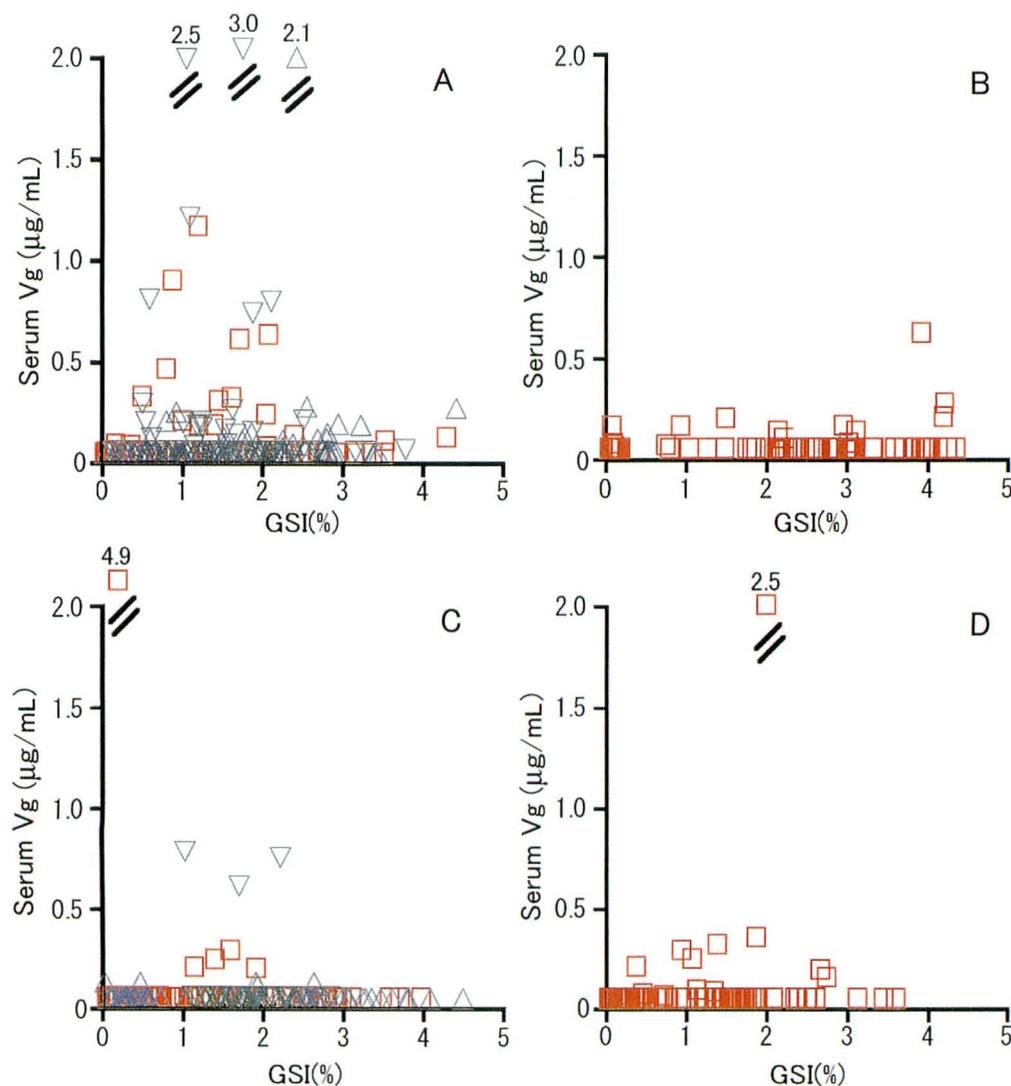


Fig. 3 The relationship between serum levels of vitellogenin and gonadosomatic index (GSI) from 1999 to 2002. Each symbol represents the value from one individual.

(Van den Belt *et al.*, 2002) 数カ月に及ぶと推定されている (Hemmer *et al.*, 2002; Pait and Nelson, 2003)。すなわち、雄魚の血中Vgは、生息環境中のリアルタイムのエストロジェン濃度を反映するものではなく、ある期間の汚染の平均的な状況を示していると考えられ、これはVgの指標としての精度の限界であり、また特質でもありとされる。

(2) シロギス雄の血中Vg濃度の季節性

魚類は成熟期になるとステロイドホルモンの産生が活発となり、雄では雄性ホルモンである11-ケトテストステロン (11KT) の血中値が上昇する。ウナギでは11KTが血中Vgの産生能を増加させることが報告されている (Asanuma *et al.*, 2003)。シロギスでは血中11KT濃度が高い時期は、成熟が完了して精巣に精子が充満している時期ではなく、比較的精子形成が初期の時期である (堀

田ら, 2009)。GSIが1～2%の時期に血中Vg濃度の上昇がみられた (Fig. 3) との本調査結果もこれを裏付けている。また、サクラマスでは雄の肝臓のエストロジェンレセプターの結合能は成熟にもなって増加することから (東藤, 1992)、雄の肝臓のVg産生能は成熟にもない増加すると考えられる。シロギス雄においても成熟にもない雄性ホルモンの上昇や肝臓のVg産生能の増加等により、エストロジェンに反応してVgを産生しやすい生理状態になるとみられる。環境中のエストロジェンが少ない水域であれば、例えVg産生能が増加した成熟期であってもVg産生は行われず血中Vgは上昇しないだろう (例えば本調査のB, C水域)。しかし、エストロジェンが通年、ある程度の濃度で存在する水域であれば、未熟時にはVg産生はみられなくとも成熟期には少量のエストロジェンであっても刺激となってVg産生が促され血中Vg値が上昇すると考えられる (本調査のA1, A2水域)。シロギス雄の血中Vg濃度の季節性はこのような仕組みで形成されたと推察される。

(3) 精巣卵

Fig. 4に示すように、本調査のシロギス雄の精巣組織に精巣卵が観察されたが、シロギスの精巣卵に関しては、これまでに海域のシロギスで精巣卵の報告例がないことから、海域のシロギスが自然発生的に精巣卵を有する可能性があるのか、あるいはその可能性はないのかは判断できない。著者らがシロギス雄を用いて、发育段階のうち最も精巣卵が誘導されやすい時期を調べた実験的研究では、精巣卵形成が誘導される時期は稚魚期のごく限られた期間であることが明らかとなった (堀田ら, 2007)。また、シロギス成魚を用いたエストロジェン曝露の実験も多く行われているが、これまでに精巣卵が観察された例はない。これらの実験例を参考にすると、本調査で観察された精巣卵形成の原因として、海域のシロギス雄の一部 (235尾中1尾：約0.4%) は自然発生的に精巣卵を有する、という可能性と、稚魚期の雄のある時期にエストロジェンに曝露された、という2つの可能性が考えられる。

雄魚の血中Vg値と精巣卵とともにエストロジェン曝露の指標とされることから、しばしば精巣卵を有した雄の血中Vg値が問題となる。本調査においても精巣卵を有した雄の血中Vg値は0.1µg/mLのオーダーの低い値であったにもかかわらず

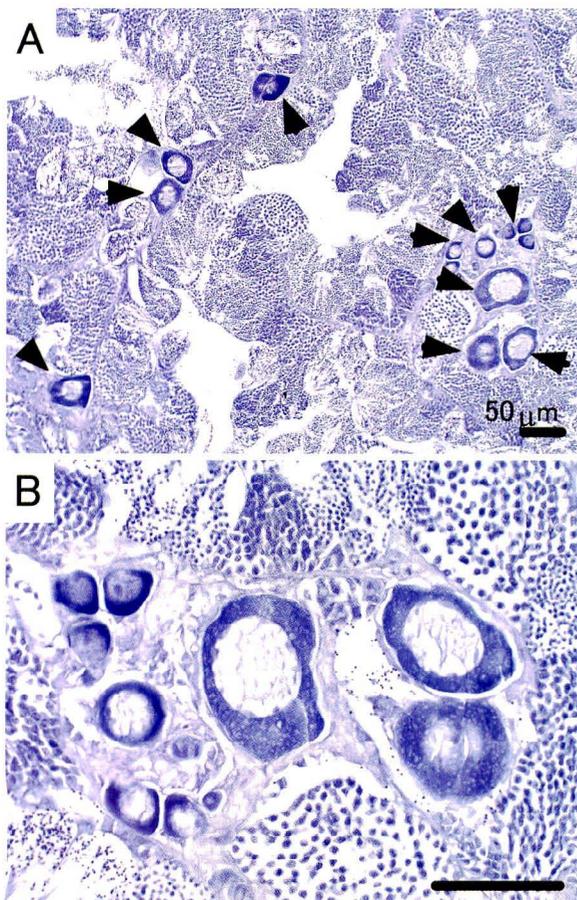


Fig. 4 Testis-ova of male Japanese whiting. It was observed in one of 235 males in coastal waters of the metropolitan city (Site A1) in 2000. A: Arrowheads indicate testis-ova scattered through the testicular tissue. B: Magnified images show that they are primary oocytes. Scale bars represent 50µm.

精巣卵が確認された。しかし、これも前述の実験例を参考にするならば、シロギスにおいてその両者に関係を見出そうとすることは適当ではないことがわかる。精巣卵が自然発生したのならば環境中のエストロジェンや血中Vgは関与しなかったのであるし、精巣卵形成に環境中エストロジェンが関与したとしても、それは過去の稚魚期に遭遇したエストロジェンであり、成魚の血中にVgを誘導したエストロジェンとは時間的にも地理的にも異なったものである可能性が高い。したがって、精巣卵形成が自然発生由来であってもエストロジェン曝露由来であっても、その個体の血中Vg濃度とは関係がないと考えられる。シロギスの精巣卵は海域のシロギスにも自然発生的に発生するものなのか、あるいは稚魚期のエストロジェン曝露のような人為的な影響によるものなのかは今後の検討課題として残されている。

4. おわりに

水域における内分泌かく乱物質影響を評価する場合に、水環境中のエストロジェン活性、すなわち内分泌かく乱物質影響を評価する際に、雄血中Vgは環境中エストロジェン曝露の指標として非常に鋭敏かつ特異的に反応することからすぐれた指標であり（原，1999），本調査によって明らかとなった水域間の差もエストロジェン曝露の指標の有効性を示したものと言える。

しかし、環境中の化学物質測定における機器分析値が採集時のリアルタイムの値であるのに比べ、血中Vgの測定値は過去数か月の間に曝露され体内に取り込まれたエストロジェンにより産生されたVgの血中の蓄積量と血中からの排泄量の差である。その値は雄魚の生理状態や水温等の外部環境の影響を受け変動する。海域調査において雄魚の血中Vg測定の生物学的な意味は、血液検査により魚の内分泌学的な異変を捉えるという、いわゆる、「魚の健康診断」的要素が大きい。機器分析による環境調査により連続的な海域のモニタリングを実施するには多大な労力と費用が必要となる。特にエストロジェン様化学物質を含む影響調査においては、雄魚の血中Vgを指標とした調査を事前に適用し、始めに魚の健康診断を行い（血中Vg測定を行う・組織異常の有無を調べる）その結果次第で、その生息環境を入念に調べる（機器分析による精緻な物質測定を実施する）という段階を踏んだ調査を実施することにより、コスト

の削減、また、モニタリング手法の簡易化が期待できるのではないだろうか。

謝 辞

本論文のとりまとめに際し、終始、懇切丁寧なご指導およびご助言を賜りました財団法人海洋生物環境研究所研究参与山田 久博士に謹んで深謝の意を表します。また、本稿のご校閲を賜った東京大学名誉教授平野禮次郎博士、東京大学名誉教授沖山宗雄博士並びに財団法人海洋生物環境研究所理事城戸勝利博士に謹んで感謝の意を表します。また、この論文は、水産庁から委託された内分泌かく乱物質魚介類影響実態把握等調査の報告のうち一部を公表するものであり、関係各位に謝意を表します。

引用文献

- 明渡 均 (1985). 3章 血液成分の分離法, 「生物化学実験のてびき 1 生物試料調整法」(泉 美納, 中川八郎, 三輪谷俊夫協編), 化学同人, 京都, pp.29.
- Asanuma, H., Ohashi, H., Matsubara, H., Ijiri, S., Matsubara, T., Todo, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). 11-ketotestosterone potentiates estrogen-induced vitellogenin production in liver of Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 383-384.
- Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A. and Porcher, J.M. (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 1699-1708.
- 藤井一則 (2000). マダイおよびベステルのビテロジェニンに関する研究. 瀬戸内水研報, **2**, 1-48.
- Fujita, T., Takemura, A. and Takano, K. (1998). Immunochemical detection of precursor proteins of yolk and vitelline envelope, and their annual changes in the blood of *Diodon holocanthus*. *J. Fish Biol.*, **52**, 1229-1240.
- 原 彰彦・竹村明洋・松原孝博・高野和則 (1986). エゾメバル雌特異血清タンパクの免疫学的検索. 北大水産彙報, **37**, 101-110.

- Hara, A. (1987). Studies on female-specific serum proteins (vitellogenin) and egg yolk proteins in teleosts : immunochemical, physicochemical and structural studies. *Mem. Fac. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **34**, 1-59.
- 原 彰彦 (1987). マダイ血清中の雌特異蛋白 (ビテロゲニン) および関連の卵黄蛋白の検索. 養殖研報, **12**, 25-35.
- 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. 日本環境毒性学会誌, **2**, 35-42.
- 長谷川早苗 (1991). VI 魚類, 4. 採血, 「ホルモン実験ハンドブック I 飼育と手法」(日本比較内分泌学会編), 学会出版センター, 東京, pp.160-163.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K. (2000). Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar. Environ. Res.*, **49**, 37-53.
- 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 β -estradiol and *p*-nonylphenol. *Aquat. Toxicol.*, **58**, 99-112.
- 堀田公明・岸田智穂・眞道幸司・佐藤裕介・瀬戸熊卓見・中村幸雄・大久保信幸・足立伸次・山内皓平 (2004). シロギス雄のビテロジェニン産生能に及ぼす成熟度と水温の影響. 平成16年度日本水産学会大会講演要旨集, 87.
- 堀田公明・岸田智穂・瀬戸熊卓見・佐藤裕介・道津光生・足立伸次 (2007). 性分化中および後のシロギス生殖腺に及ぼすエストロジェン曝露の影響. 平成19年度日本水産学会秋季大会要旨集, 95.
- 堀田公明・岸田智穂・佐藤裕介・瀬戸熊卓見・中村幸雄・足立伸次・山内皓平 (2009). シロギス雄のビテロゲニン産生能に及ぼす成熟度の影響. 海生研研報, **12**, 1-8.
- 堀田公明・渡辺剛幸・岸田智穂・眞道幸司・三浦正治・中村幸雄・足立伸次・大久保信幸・松原孝博 (2002). 複数海域におけるシロギス雄の血中Vg濃度と生殖腺の季節変化. 平成14年度日本水産学会大会講演要旨集, 173.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting, *Sillago japonica*, reared under natural temperature and photoperiod. *Fish. Sci.*, **69**, 555-562.
- 堀田公明・渡辺剛幸・岸田智穂・中村幸雄・井尻成保・足立伸次・山内皓平 (2008). シロギス雄の血中ビテロゲニン量に及ぼす雌魚の影響. 日水誌, **74**, 20-25.
- 飯島憲章・植松一眞・下川真理子・石井裕子・大嶋雄治・藤井一則・橋本伸哉・原 彰彦・山田 久 (2001). 瀬戸内海周防灘及び広島湾のマコガレイに対するエストロジェン様内分泌攪乱物質の影響実態. 環境毒性学会誌, **4**, 45-53.
- 伊藤文成・坂野博之 (2006). III. 水産生物に対する影響実態と評価, 4. Vgによる影響評価, §2内水面における影響実態. 「環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構—」(「環境ホルモン—水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.75-81.
- 角埜 彰・藤井一則・小山次朗 (2001). ノニルフェノールのマミチヨグ仔稚魚への影響. 環境毒性学会誌, **4**, 55-66.
- 環境省 (2005). 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について. <http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2005/01.pdf>.
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G. and Leah, R.T. (2004). Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **58**, 356-364.
- Kokokiris, L., Le Menn, F., Kentouri, M., Kagara, M. and Fostier, A. (2001). Seasonal cycle of gonadal development and serum levels of vitellogenin of the red porgy, *Pagrus pagrus* (Teleostei : Sparidae). *Mar. Biol.*, **139**, 549-559.
- Koya, Y., Matsubara, T., Ikeuchi, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1997). Annual changes in serum vitellogenin concentrations in viviparous

- eelpout, *Zoarces elongatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118A**, 1217-1223.
- 松原孝博・澤野敬一 (1992). ビテロジェニンを指標としたドットブロッキングによるオヒョウ (*Hippoglossus stenolepis* Schmidt) の雌雄判別法. 北水研報, **56**, 17-26.
- Matsubara, T., Wada, T. and Hara, A. (1994). Purification and establishment of ELISA for vitellogenin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 545-555.
- Matsubara, T. and Sawano, K. (1995). Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.*, **272**, 34-45.
- Moncaut, N., Lo Nostro, F. and Maggese, M.C. (2003). Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17 β . Effects on liver and gonads. *Aquat. Toxicol.*, **63**, 127-137.
- 中村幸雄 (2004). 話題－水産動物における内分泌かく乱物質影響の実態把握. 日水誌, **70**, 972-976.
- 中田典秀・高田秀重 (2006). II. 水域汚染の実態と水域環境における動態, 2. エストロゲン様内分泌かく乱物質の分布・動態－東京湾, 「環境ホルモン－水産生物に対する影響実態と作用機構－」(「環境ホルモン－水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.19-39.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, Y. and Matsubara, T. (2003). Estrogenic activity in coastal areas around Japan evaluated by measuring male serum vitellogenins in Japanese common goby *Acanthogobius flavimanus*. *Fish. Sci.*, **69**, 1135-1145.
- 大久保信幸・持田和彦・松原孝博 (2006). III. 水産生物に対する影響実態と評価, 4. ビテロジェニンによる影響評価, §1沿岸域の影響評価, 内水面における影響実態「環境ホルモン－水産生物に対する影響実態と作用機構－」(「環境ホルモン－水産生物に対する影響実態と作用機構」編集委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.65-75.
- Pait, A.S. and Nelson, J.O. (2003). Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquat. Toxicol.*, **64**, 331-342.
- Rahman, M.S., Takemura, A. and Takano, K. (2000). Lunar synchronization of testicular development and plasma steroid hormone profiles in the golden rabbitfish. *J. fish Biol.*, **57**, 1065-1074.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M., Tadokoro, H. and Kobayashi, K. (2003). Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 1507-1516.
- 征矢野 清 (2003). 有明海泥干潟域における環境エストロゲン汚染－トビハゼを対象生物とした調査研究－. 海洋と生物, **144**, 15-20.
- 征矢野 清・岡松一樹・米山健太・原 彰彦・松原孝博・大久保信幸・塚本達也・渡辺康憲 (2003). 有明海の環境ホルモン汚染. 月刊海洋, **35**, 276-281.
- 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 (2003). ヒメダカビテロジェニンを指標としたノニルフェノール, ビスフェノールA, 17 β -エストラジオールおよびこれらの混合曝露の影響. 水環境学会誌, **26**, 671-676.
- 東藤 孝 (1992). サクラマス肝臓のエストロゲンおよび甲状腺ホルモンレセプターに関する研究. 修士論文, 北海道大学, 函館, 37-38.
- Van Den Belt, K., Wester, P.W., Van Der Ven, L.T.M., Verheyen, R. and Witters, H. (2002). Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 767-775.
- 和波一夫・竹内 健・宮下雄博 (2005). 都内水域の環境ホルモンに関する研究 (その4)－東京湾に生息する魚類の精巣卵とボラのビテロジェニン－, 東京都環境科学研究所年報, 158-165.
- 米山健太・原 彰彦・松原孝博・石橋弘志・有菌幸司・大嶋雄治・福留清秀・久保 消・中村将・征矢野 清 (2001). ボラ (*Mugil*

cephalus) を対象生物とした環境ホルモンの影響調査. 環境ホルモン学会第4回研究発表会要旨集, 287.

坂本達也・征矢野清・北條智之・岡松一樹・渡辺康憲 (2005). 第2章水域生態系における内分泌かく乱物質の影響実態と作用機構の解明,

1. 影響実態の解明, (6) 内分泌かく乱物質が内湾干潟域に生息する底生魚類の再生産に与える影響実態の把握. 農林水産業における内分泌かく乱物質の動態解明と作用機構に関する総合研究 (研究成果433), 農林水産省農林水産技術会議事務局, pp.157-162.