

水環境のエストロゲン様作用が魚類雌性化に及ぼす影響 ーコイをモデルとしてー

宮島 潔 *, 東谷 忠 **, 中田典秀 *, 小森行也 *, 田中宏明 ***, 鈴木 穰 *

Effect of Estrogenic Activity of Water Environment on Fish Feminization - Carp as Model Fish -

Kiyoshi Miyajima, Tadashi Higashitani, Norihide Nakada, Koya Komori,
Hiroaki Tanaka and Yutaka Suzuki

要旨

全国河川における魚類実態調査結果において、雄コイ血液中のビテロゲニン（卵黄タンパクの前駆物質）生成を雌性化の指標とした場合、河川水のエストロゲン（女性ホルモン）様活性が 1ng-E2/L まではビテロゲニンを生成していた雄コイの割合が増加し、1ng-E2/L以上の地点ではビテロゲニンを生成していた雄コイの割合が 30～50%であった。

魚類雌性化に対する下水処理水の影響を調べるために、コイを下水処理水(エストロゲン様活性 3.1～8.7ng-E2/L)に直接曝露したところ、早春に雄と雌を同時に曝露した場合にのみ、雄コイにビテロゲニン生成が見られ、飼育環境によりビテロゲニン生成が異なることがわかった。この2つの調査・実験結果の相違が生じた原因として、飼育環境違いが原因であると考えられる。

キーワード：コイ，雌性化，エストロゲン様活性，エストロゲン様物質，ビテロゲニン

Synopsis

In the nationwide field surveys targeting carp, relationship was observed between the estrogenic activity of river water and the vitellogenin production in male carp, which was selected as the biomarker of feminization syndrome in male fish. In the rivers where the estrogenic activity was higher than 1ng-E2/L, the ratio of male carp producing vitellogenin was as high as 30～50%.

In the experiments of direct exposure of carp to treated wastewater, which was aimed at investigating the effect of treated wastewater on feminization of fish, only the case of co-existence of male and female carp in early spring brought the result of vitellogenin production in male carp.

The ratio of male carp producing vitellogenin was lower in the wastewater exposure tests than in the field surveys.

Keywords : Carp; Feminization; Estrogenic activity; Estrogen-like substances; Vitellogenin

* 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 水質チーム

** 元 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 水質チーム

*** 元 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 水質チーム（現 京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター）

1. はじめに

1.1 英国での調査事例

魚類に発生している内分泌攪乱作用の影響として、雄の体内に取り込まれた化学物質がエストロゲン（女性ホルモン）のように作用し、雄を雌化させることが指摘されている¹⁾。英国では、1980年代前半に実施された環境庁の生物調査において、Lea川の野生ローチ（*Rutilus rutilus*）に雌雄同体（精巣に卵母細胞をもつ個体）が発見された²⁾。その場所は下水処理場の下流部であったため、下水処理水に雌化の原因となるエストロゲン様の物質が含まれているとの仮説がたてられ、これを解明するために以下のような詳細な研究が実施された²⁻¹⁰⁾。

①下水処理水放流先河川でのニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）曝露試験法（ケージ試験法）を確立する^{2,3)}。

②ニジマス曝露試験によって、下水処理水による魚類影響の有無を確認する^{3,5)}。

③雌化を引き起こした水試料を分画し、それぞれの画分についてエストロゲン様活性を調べ、疑わしい物質を探索する^{7,8)}。

④疑わしい物質を用いた曝露試験によって、当該物質のニジマスへの最小作用濃度を調べ、原因物質を特定する^{6,9)}。

⑤野生ローチを対象とした実態調査により魚類影響を確認する¹⁰⁾。

下水処理水の魚類への影響を調べるため、まずフィールドでのケージ試験法が確立された。この方法³⁾は、鉄製ケージに養殖ニジマスを入れて、処理場放流口や放流先河川に設置するものであり、雌化の影響は、雄の血中ビテログニン（VTG）生成量を指標として判定される。

VTGはエストロゲンのはたらきによって肝臓で生成される雌特異的な卵黄タンパク前駆物質である。これは、産卵に備えて体内に卵を持っている雌の血液中にはごく普通に存在する物質であるが、通常、雄の魚の血液中にはほとんど存在しないと考えられている。一方、実験的に女性ホルモンを投与すると雄でも血液中にVTGが誘導されることが知られており、外因性の女性ホルモン様物質による影響を受けているかどうかの目安となる物質である。

曝露試験に用いたケージの大きさは、1.24×0.5×0.5mであり、これに入れるニジマス個体数は、未成熟魚の場合8～20匹³⁾、雄成熟魚の場合10匹^{4,5)}とされた。養殖ニジマスを用いたのは、年齢の均一な個体を多数確保できること、さらに、ニジマス

VTGの測定法がすでに確立されていたことによる。曝露期間は、予備調査結果をもとに、VTGの上昇を確実に把握できる3週間と設定された。

下水処理場の放流口や放流先河川を対象としたフィールド調査は、予備調査の後、1988年夏期³⁾、冬期³⁾、1989年春期³⁾、夏期³⁾、1992年夏期⁴⁾、冬期⁴⁾、1994年春期～夏期⁵⁾に実施された。これらの調査の結果、成熟した雄ニジマスの血中VTG生成量は通常0.05～1.80μg/mL³⁾であるのに対し、放流水にエストロゲン様物質が含まれる場合には最大10万倍（147,000μg/mL）³⁾ほどに増加することが判明した。また、ニジマスVTGの生成は処理水や河川水のエストロゲン様活性の強度に関連しているらしく、放流口のみで影響のみられる場合⁵⁾や、Aire川のように放流口から下流5km地点までVTGがmg/mLレベルで影響を確認される場合⁵⁾があった。さらに、その影響は下流最大15km⁴⁾まで続くことも明らかとなったが、降雨により増水した河川では、処理水が希釈されて魚類への影響が軽減される可能性も示唆された⁴⁾。

一方、フィールド調査と並行して、魚類に影響を及ぼすと考えられるエストロゲン様物質を用いた室内曝露試験も実施された。その結果、経口避妊薬であるエチニルエストラジオール（EE2）についてVTGの生成によるニジマスへの最小作用濃度は0.1～0.5ng/Lの範囲にあり³⁾、非イオン界面活性剤（工業用洗剤の一つ）の分解産物であるノニルフェノール（NP）とオクチルフェノール（OP）の最小作用濃度はそれぞれ20.3μg/Lおよび4.8μg/Lという結果が得られた⁶⁾。

また、河川水質調査⁷⁾の結果、フィールド調査でニジマスの顕著なVTG生成を示したAire川では、羊毛洗浄工場の排水を受け入れているMarley処理場の放流水のNPは330μg/Lであり、その下流では180μg/Lの高濃度であった。なお、その他の河川や処理場でのNPの濃度は0.2未満～12μg/Lであり、OPの濃度はMarley処理場で0.5μg/Lであったほか、河川の全地点で1μg/L未満であった。

以上のように、Aire川でニジマスに影響を及ぼした主なエストロゲン様物質は、フィールド調査、室内曝露試験そして水質調査の結果から判断してNPであると考えられた^{5,7)}。

その他の地点で確認されたニジマスへの影響については、処理水のエストロゲン様活性の本質を見極める新たな試みがなされた。これは、水サンプルを極性の異なる複数の溶媒を用いて分画し、それぞれ

の画分についてエストロゲン様活性を調べ、さらに、活性をもつ画分においてエストロゲン様物質を同定するものである⁸⁾。この方法を処理水に適用した結果、エストロゲン様活性をもつ物質として、天然エストロゲンであるエストロン (E1)、17 β エストラジオール(E2)、さらに合成エストロゲンであるEE2が同定された。処理水中のこれらの濃度は、E1 が1～80ng/L、E2 が1～50ng/Lであり、EE2は検出されない処理場が多いものの、3 処理場では0.2～7.0ng/Lであった⁸⁾。そこで、ニジマスおよびローチを用いてE1 およびE2の室内曝露試験が実施された⁹⁾。この結果、E2のVTG生成の最小作用濃度はニジマスでは1～10ng/Lの範囲にあり、ローチでは10～100ng/Lの範囲にあると考えられた。また、ニジマスに対するE1のVTG生成の最小作用濃度は25～50ng/Lと考えられた。

次に、養殖ニジマスを用いて確認された影響は自然状態ではどの程度生じているのかを調べるため、1995～1996年に野生ローチを対象とした調査が実施された¹⁰⁾。8河川18地点および対照5地点から60～100匹の野生ローチが採集され、生殖腺の観察とVTGの測定が実施された。その結果、対照地点では10%、処理場上流では25%、処理場下流では60%のローチに雌雄同体が確認された。また、VTGの濃度は雌雄同体魚の出現状況と同じく対照、上流、下流の順に高くなったことから、野生魚におけるVTGの上昇は、雌雄同体魚の出現状況の目安となることが示された。その結果、河川において魚類の雌化を引き起こす原因物質は、下水処理水に由来する17 β -エストラジオール(E2)⁹⁾、エストロン(E1)⁹⁾、エチニルエストラジオール(EE2)³⁾、ノニルフェノール(NP)^{5,7)}の4物質であると報告された。

1.2 日本における調査の位置付け

わが国では、下水処理水のエストロゲン様活性による魚類影響について、多摩川のコイ (*Cyprinus carpio*) を対象とした調査^{11,12)}が中村、原らによって行われ、精巣の異常および雄コイのVTG生成が確認され、英国と同様の問題が提起された。そこで、魚類に生じている雌化について調査するため、国土交通省(旧建設省)は1998年度からコイを対象とした一級河川での魚類実態調査に着手した。土木研究所は、この魚類実態調査に対して技術的支援を行うとともに、独自の水質調査を行い、本実態調査と併せて調査結果をここにまとめた。

実態調査を始めた時点では、調査対象物質として

ノニルフェノール等の内分泌かく乱作用の疑いがある化学物質に重点がおかれていた。そのため、天然の女性ホルモンについては、17 β -エストラジオールを女性ホルモンなかの代表的な物質として選び、化学物質と併行して測定を実施した。

平成12～13年度の調査では、英国の調査結果を受け下水処理水に由来する天然エストロゲンを対象物質に追加し、エストロン、および機器分析による17 β -エストラジオールの測定を実施した。

2. 国土交通省(旧建設省)による一級河川における実態調査

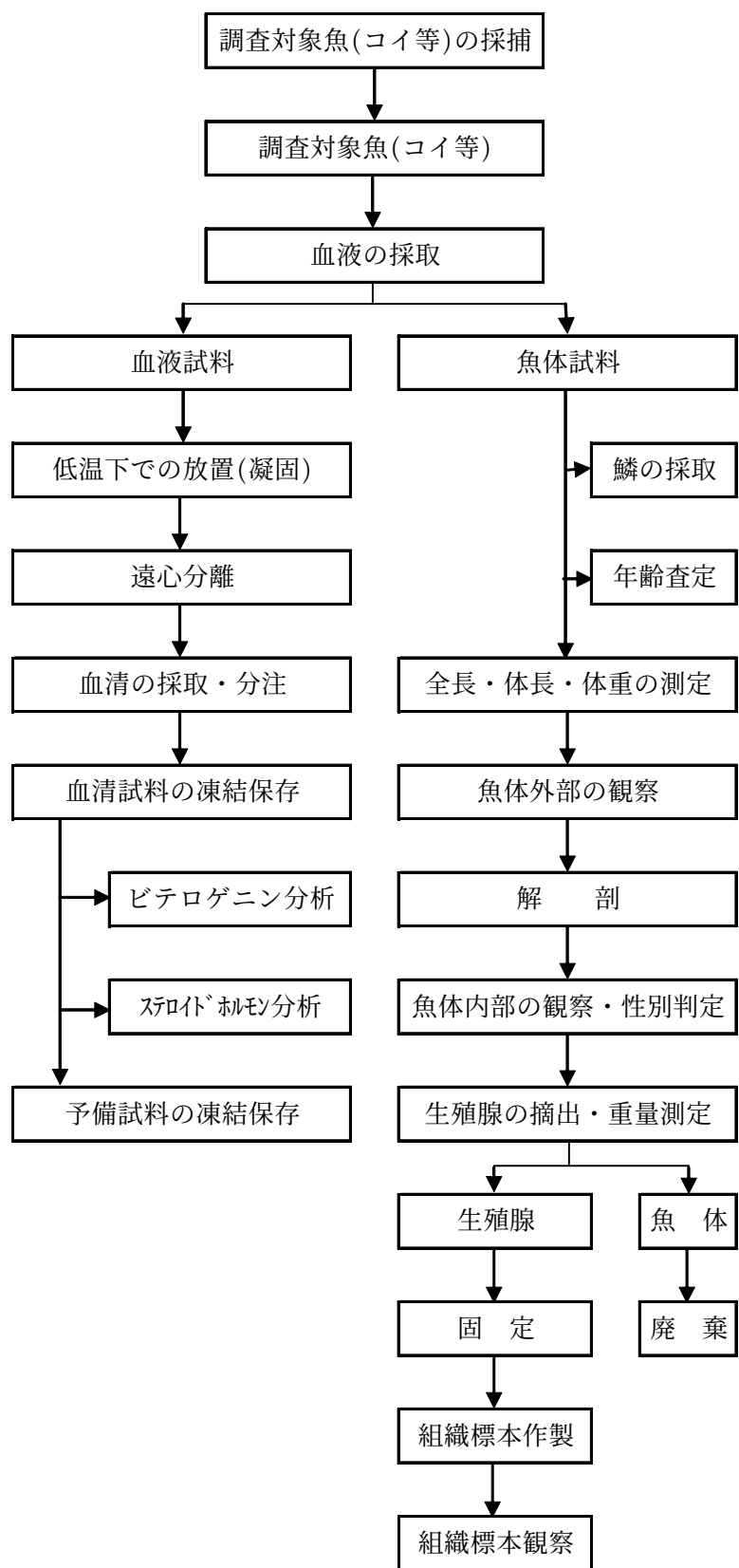
国土交通省(旧建設省)は1998年度からコイを対象とした魚類実態調査¹³⁻¹⁷⁾に着手した。コイは、北海道を除き全国的に分布しており、成長の段階で雌雄の転換が起こりやすく、また、1章で述べた既往の研究例³⁻⁵⁾があるようにVTGの測定が可能であるため、調査対象魚に選定された。

2.1 調査時期及び地点

第1回調査は、阿武隈川、利根川、荒川(関東)多摩川、千曲川、信濃川、庄内川、淀川、筑後川の9河川25地点で平成10年(1998年)11月～12月に実施された。第2回調査は、綾瀬川および荒川(北陸)を追加して、11河川27地点を対象に平成11年(1999年)5月～8月に実施された。荒川(北陸)には都市排水がほとんど流入しておらず、化学物質の影響が表れにくいと想定して追加された地点であった。第3回調査は、過去2回の調査から継続して実施すべき地点を選定し、阿武隈川、綾瀬川、多摩川、荒川(北陸)、筑後川の5河川10地点で平成12年(2000年)10月～11月に、また、第4回調査も同様の観点から地点を選定し、荒川(北陸)を除いた4河川9地点(ただし、拝島橋1地点ではコイの採捕を試みたものの採捕できなかった)で、平成13年(2001年)10月～11月に実施された。

2.2 調査方法

魚類採捕調査のフローを図2.1に示す。調査対象魚のコイは、原則として調査日の3日前から当日までに採捕し、いけすや活魚タンクなどを利用して、調査当日の血液採取まで調査地点の河川中または近傍で蓄養しておいた。採捕するコイの大きさは、生殖腺の肉眼観察により雌雄判別が可能な全長30cm以上を原則とした。



採捕したコイは、外観から雌雄の判定がおこなわれ、体重と全長を測定した。また、生きた状態にある調査対象魚から注射器を用いて約5mLの血液を採取した。採取した血液は容量15mLの試験管に移し、直ちに氷冷した。試験管内の試料は、実験室に持ち帰り1000Gで10分間遠心分離した後、血清をVTG測定までの間-80℃で保存した。血液中のVTGは、コイVTG-ELISAキットを用いて測定を行った。

ELISA法（酵素免疫測定法）は、測定対象物質の抗体を用いて、その物質との結合反応を利用する濃度測定法である。コイVTG-ELISAキットには、抗コイVTG抗体をコーティングした96穴マイクロプレート、検体希釈液、HRP（Horse radish peroxidase）標識抗コイVTG抗体、発色液、1μg/mLコイVTG標準品などが含まれている。5倍およびそれ以上の倍率で希釈した血清をマイクロプレートのウェルに滴下し、2時間の反応させた後、HRP標識抗コイVTG抗体を1時間反応させた。この操作によって、抗コイVTG抗体-コイVTGHRP標識抗コイVTG抗体のサンドイッチ型複合体が形成される。反応しなかったHRP標識抗コイVTG抗体を洗い流し、続いて発色基質（OPD）を含む発色液を滴下すると、酵素HRPの触媒作用によってOPDが発色する。プレートリーダーで波長490nmの吸光度を測定し、検量線をもとにコイVTG濃度を算出した。

検量線は、1μg/mLコイVTG標準品を用いて作成した。この標準品を段階的に希釈することによって0.5μg/mLから0.0078μg/mLまで7段階の溶液を調製した。これらを血清と同様に結合反応させた後、吸光度を測定して検量線を作成した。このとき、つねに0.0078μg/mLの吸光度を基点として検量線を作成することによって、例えば5倍希釈された血清の定量下限値は、0.0078μg/mLの5倍である0.039μg/mLと決定した。また、血清試料の吸光度がブランク（検体希釈液；0μg/mL）以下の場合、不検出とした。

なお、水質試料の採取にあたっては、十分洗浄を行った容器を使用するとともに、採水器具には合成樹脂製を避けステンレス製のものを用了。また、試料ビンに直接採取するなど試料の汚染防止に細心の注意を払った。調査対象物質の分析方法は、環境省「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（平成10年10月）」等に定める方法を原則とした。おもな調査対象物質の分析方法を、表2.1～2.2に示す。ここでは、コイへの影響を検討する物質として、内分泌かく乱作用が疑われている代表的な化学物質

である4-tert-オクチルフェノール、ノニルフェノール、ビスフェノールAについて、記載した。また、女性ホルモンの作用のあることは明らかであるものの河川環境中の実態を把握することを目的として調査項目とした、天然エストロゲンである17β-エストラジオールについても示した。

なお、英国の調査結果で原因物質とされたノニルフェノール、17β-エストラジオール、エチニルエストラジオール、エストロンのなかで、合成エストロゲンのエチニルエストラジオールについては、平成11年度から測定をおこなったものの、ほとんどの地点で検出下限未満であったことから、本報告においては、魚類影響を検討する対象物質に含めていない。

同様に、天然エストロゲンのエストロンについては、次の理由により魚類影響を検討する対象物質に含めなかった。エストロンは、当初、分析項目に含まれておらず、4年間の調査期間のうち平成12年度、及び13年度の2年間のみ測定を行った。そのため、データ数が他の分析項目と比べると少なく、魚類影響との関係性を評価しにくい。また、すべての調査で実施したELISA法による17β-エストラジオールの測定は、17β-エストラジオール類似物質を含んで検出していることから、エストロンの評価も含むと考えられるためである。

また、土木研究所独自の測定として、河川水中のエストロゲン様活性を測定した。エストロゲン様活性とは、エストロゲン受容体遺伝子をもつ遺伝子組み換え酵母によって、エストロゲン様物質の総量を17βエストラジオールの濃度に換算して表現するものである。本調査におけるエストロゲン様活性は、Brunel大学 Sumpter 教授から譲渡された遺伝子組み換え酵母を用いて矢古宇らの方法¹⁸⁾に従い測定した結果を示している。この酵母にはエストロゲン受容体遺伝子、エストロゲン受容体応答部位、およびレポーター遺伝子が組み込まれている。酵母の細胞壁を透過したエストロゲンはエストロゲン受容体と結合し、さらに応答部位に結合する。その結果、レポーター遺伝子が転写活性化されてβ-ガラクトシダーゼが合成される。したがって、β-ガラクトシダーゼの活性として表わされるエストロゲン様活性を測定することが可能となる。組換え酵母の反応では、試料に含まれるエストロゲン様物質もエストロゲン受容体と結合するため、エストロゲンおよびエストロゲン様物質による総合的なエストロゲン様活性を表わすことができる。

表 2.1 主な水質対象物質の分析方法

物質名			試験方法	検出下限値 (μg/L)
4-t-オクチルフェノール			固相抽出後、酢酸メチル溶出・濃縮後ヘキサンに転溶、脱水乾固後、KOH 存在下でエチル化してGC/MS-SIM で測定	0.01
ノニルフェノール				0.1
ビスフェノールA				0.01
エストロゲン	17β-エストラジオール	ELISA 法	固相抽出後抱合体分解処理は行わず、ジメチルスルホキシドに転溶後ELISA 法で測定	0.0002

表 2.2 主な底質対象物質の分析方法

物質名			試験方法	検出下限値 ($\mu\text{g/kg}$)
4-t-オクチルフェノール			メタノール抽出後、NaCl溶液転溶、ジクロロメタン抽出し乾固後、KOH下でエチル化、ケン化後カラムクロマトグラフで精製しGC/MS-SIMで測定	1.0
ノニルフェノール				3.0
ビスフェノールA				0.2
エストロゲン	17 β -エストラジオール	ELISA法	メタノール抽出後精製水を加え固相抽出、酢酸エチル・メタノールで溶出後乾固、酸分解後乾固、溶出させELISA法で測定	0.3

2.3 雄コイの VTG 測定結果

平成10～13 年度に調査を行った河川数は、合計10、調査地点数は27であった。本調査により採捕した雄コイは、合計551匹であった。採捕状況、及び雄コイのVTG濃度の測定結果を表2.3、及び図2.2、表2.4に示す。

平成10～13 年度の各調査において、採捕した雄コイの17.2～30.6%にあたる個体から0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上のVTGが検出され、河川に生息する雄コイの一部が体内でVTGを生成していることが確認された。

表 2.3 コイの採捕状況

調査時期		平成10年度 11～12月	平成11年度 5～8月	平成12年度 10～11月	平成13年度 10～11月	合計
河川数		8	10	5	4	10
地点数		25	26	10	9	27
採捕数 (尾)	雄	111	252	93	95	551
	雌	103	177	95	105	480

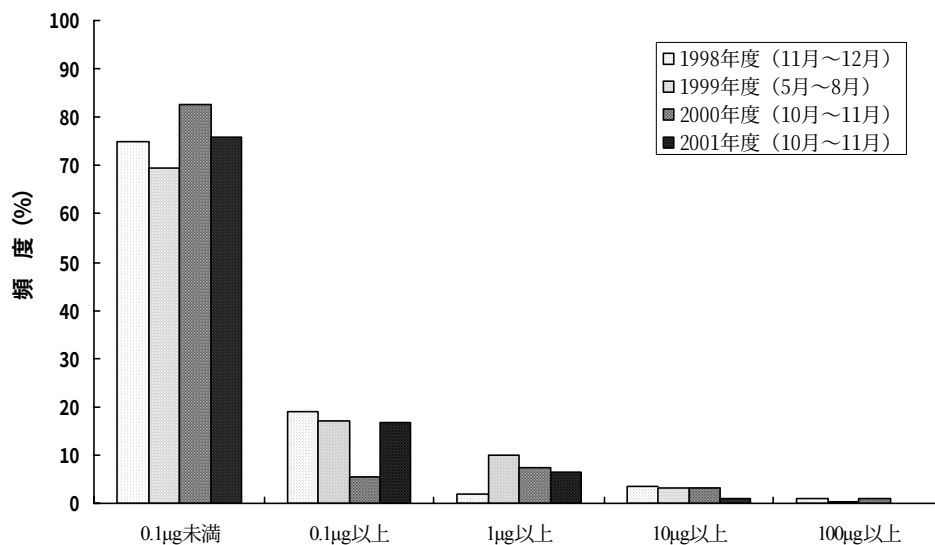


表 2.4 雄コイの血清中のVTG測定結果

調査年度 (調査時期)	VTG濃度範囲 (血清 1 mL あたり)		合計
	0.1 µg 未満	0.1 以上	
平成10年度 (11～12月)	83(74.8%) 39(72.2%)	28(25.2%) 15(27.8%)	111 54
平成11年度 (5～7月)	175(69.4%) 66(61.7%)	77(30.6%) 41(38.3%)	252 107
平成12年度 (10～11月)	77(82.8%) 74(82.2%)	16(17.2%) 16(17.8%)	93 90
平成13年度 (10～11月)	72(75.8%)	23(24.2%)	95

注1) 平成10～12年度は上段に全地点(平成10年度;25地点、平成11年度;27地点、平成12年度;10地点)の合計、下段に平成13年度と同じ9調査地点の集計値を示した。

注2) 括弧内に各年度の合計に対する各VTG濃度範囲にあった尾数の比率(%)を示した。

VTGが0.1µg/mL以上検出された雄コイの比率は、平成10～13年度の各調査のうち、同時期の10～12月に実施した平成10、12及び13年度については、17.2%(平成12年度)から25.2%(平成10年度)の範囲であり、大きな変動は認められなかった。

次に、雄コイのVTG生成と関連性の高い分析項目を選定するために、調査を3回以上実施し、データ数の多い9地点について検討した。

水質、底質分析結果を表2.5(1)～(2)に示す。エ

ストロゲン様活性については、分析の前処理方法を確立している水質のみを分析項目とした。魚類への影響は、一定期間の水質、底質環境によって現れると推測されるため、水質、底質の平均値を用いてVTGとの関係を検討した。水質、底質分析結果を表2.5(1)～(2)に示す。

水質、底質分析結果とVTG0.1µg/mL以上の検出率との関係を図2.3(1)～(2)に示す。ここでは、おおまかな関連を探るために各分析値を対数軸でプロットし、直線回帰により相関係数を比較した。

表2.5(1) 各調査地点の河川水中内分泌攪乱物質の検出率及び濃度範囲
(平成10～13年度実態調査結果)

河川	調査地点	ノニルフェノール	4- <i>t</i> -オクチルフェノール	ビスフェノール	17β-エストラジオール (ELISA法)	エストロゲン様活性
阿武隈川	須賀川	0/3 (ND～ND)	1/3 (ND～0.01)	0/3 (ND～ND)	3/3 (0.0003～0.0006)	2/3 (ND～0.00012)
	阿武隈橋	1/3 (ND～0.1)	1/3 (ND～0.01)	3/3 (0.01～0.03)	3/3 (0.0003～0.0011)	3/3 (0.00009～0.00028)
	岩沼	3/6 (ND～0.1)	2/6 (ND～0.02)	5/6 (ND～0.02)	6/6 (0.0002～0.0009)	3/3 (0.00007～0.00051)
綾瀬川	内匠橋	6/6 (1.0～3.3)	6/6 (0.10～0.48)	6/6 (0.24～1.2)	6/6 (0.0033～0.011)	3/3 (0.002～0.0027)
多摩川	拝島橋	0/3 (ND～ND)	0/3 (ND～ND)	1/3 (ND～0.02)	1/3 (ND～0.0004)	3/3 (0.00011～0.00019)
	多摩川原橋	1/3 (ND～0.4)	3/3 (0.01～0.03)	3/3 (0.02～0.05)	3/3 (0.0035～0.0070)	3/3 (0.00165～0.00444)
	田園調布堰	2/6 (ND～0.25)	3/6 (ND～0.01)	6/6 (0.02～0.05)	5/6 (ND～0.0030)	3/3 (0.00072～0.00114)
筑後川	三隅大橋	0/3 (ND～ND)	0/3 (ND～ND)	1/3 (ND～0.02)	0/3 (ND～ND)	3/3 (0.00003～0.00094)
	背の下	0/36 (ND～ND)	0/6 (ND～ND)	0/6 (ND～ND)	6/6 (0.0006～0.0010)	3/3 (0.00007～0.00032)

注) 上段に平成10～13年度の実態調査で検出された頻度(検出下限以上の調査数/全調査数)を示した。

下段に平成10～13年度の実態調査での検出濃度の範囲(μg/L)を示した。ただし、エストロゲン様活性の単位は、E2活性等量である。

表 2.5 (2) 各調査地点の底質中内分泌攪乱物質の検出率及び濃度範囲

(平成 10～13 年度実態調査結果)

河川	調査地点	ノルフェノール	4-t-オクチルフェノール	ビスフェノール A	17β-エストラジオール (ELISA 法)
阿武隈川	須賀川	2/3 (ND～6.5)	0/3 (ND～ND)	2/3 (ND～2.6)	0/3 (ND～ND)
	阿武隈橋	2/3 (ND～40)	1/3 (ND～1.5)	2/3 (ND～1.5)	0/3 (ND～ND)
	岩沼	6/6 (46～83)	6/6 (1.5～2.9)	6/6 (2.1～8.5)	2/6 (ND～0.5)
綾瀬川	内匠橋	6/6 (390～2700)	6/6 (21～92)	6/6 (5.5～89)	5/6 (ND～1.0)
多摩川	拝島橋	1/3 (ND～150)	0/2 (ND～ND)	2/3 (ND～15)	0/3 (ND～ND)
	多摩川原橋	2/3 (ND～7.0)	0/2 (ND～ND)	3/3 (0.5～0.8)	0/3 (ND～ND)
	田園調布堰	5/6 (ND～33)	0/5 (ND～ND)	5/6 (ND～7.5)	2/6 (ND～1.3)
筑後川	三隈大橋	1/3 (ND～17)	0/2 (ND～ND)	2/3 (ND～0.9)	1/3 (ND～1.8)
	背の下	2/6 (ND～13)	0/5 (ND～ND)	4/6 (ND～0.5)	0/6 (ND～ND)

注) 上段に平成 10～13 年度の実態調査で検出された頻度 (検出下限以上の調査数/全調査数) を示した。

下段に平成 10～13 年度の実態調査での検出濃度の範囲 (μg/kg) を示した。

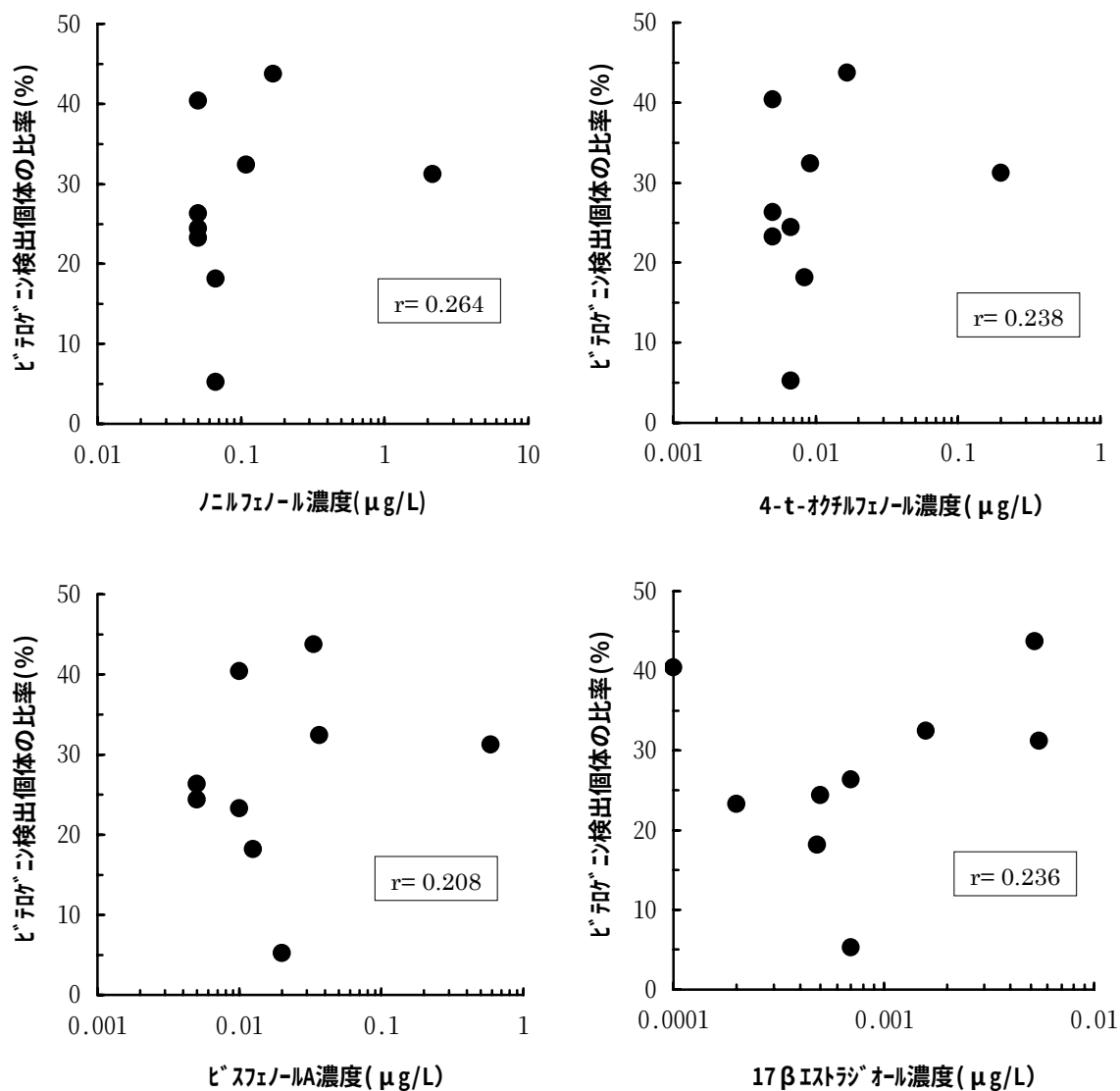


図 2.3(1) 河川水中の内分泌攪乱物質濃度とビテロゲニンが検出された雄コイの比率の関係
 (内分泌攪乱物質濃度は平成 10-13 年度調査結果の平均(検出下限未満の場合は検出下限の 1/2)、ビテロゲニンの検出比率は平成 10-13 年度調査全体の比率を用いた。図中の数値(r)は相関係数を示す。)

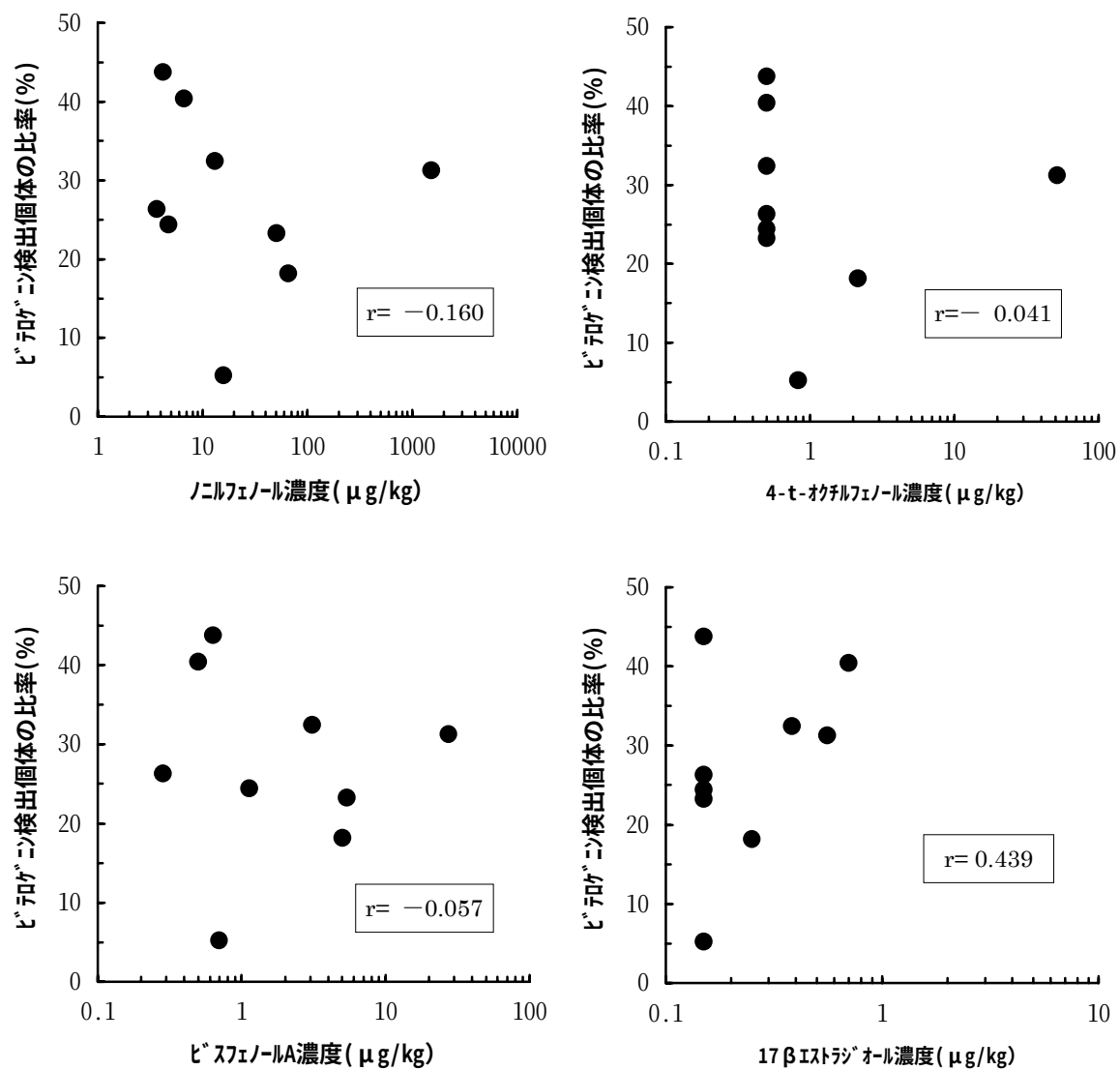


図 2.3(2) 底質中の内分泌攪乱物質濃度とビテロゲニンが検出された雄コイの比率の関係
 (内分泌攪乱物質濃度は平成 10-13 年度調査結果の平均 (検出下限未満の場合は検出下限
 の 1/2)、ビテロゲニンの検出比率は平成 10-13 年度調査全体の比率を用いた。図中の数値
 (r)は相関係数を示す。)

河川水中のノニルフェノール、4-t-オクチルフェノール、ビスフェノールA、17β-エストラジオールの各物質の濃度と VTG 検出率との関係は、水質項目による顕著な差は見られなかった。また、底質では、17β-エストラジオールだけが正の相関係数となった。水質だけの測定となったエストロゲン様活性については、相関係数が他の物質に比べて大きい値となった。そこで、分析項目としてエストロゲン様活性を選定し、測定回数の少ない

地点を含めた全調査地点について、VTG 検出率との関係を整理した。

全地点におけるエストロゲン様活性の平均値と VTG 検出率との関係を図 2.5 に示す。その結果、エストロゲン様活性が 1ng /L-E2 の値までは VTG 検出率が増加しているものの、1ng /L-E2 を超えると VTG 検出率が 30～50% の範囲で一定になる傾向を示すことがわかった。

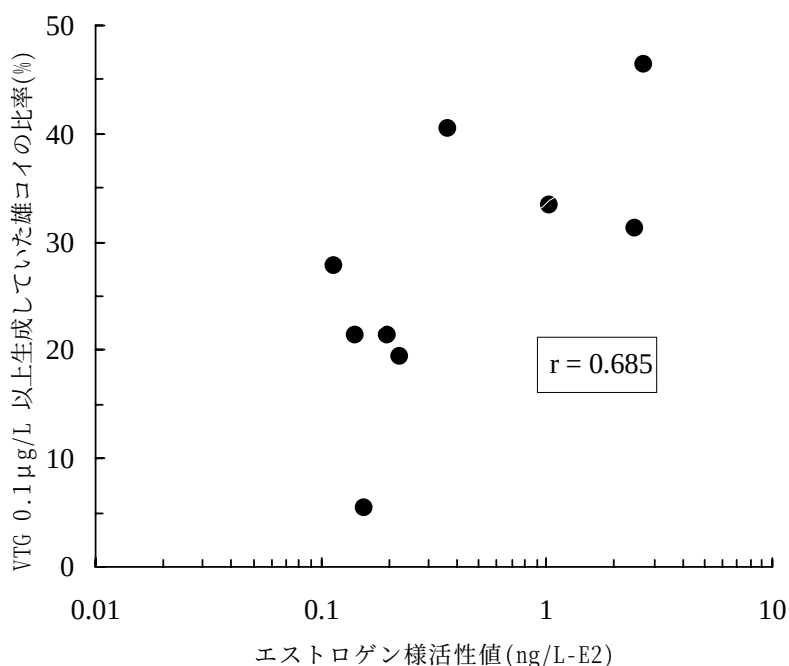


図 2.4 河川水中のエストロゲン様活性と VTG 検出率との関係
(調査3回以上で 30 尾以上が採捕された 9 地点)

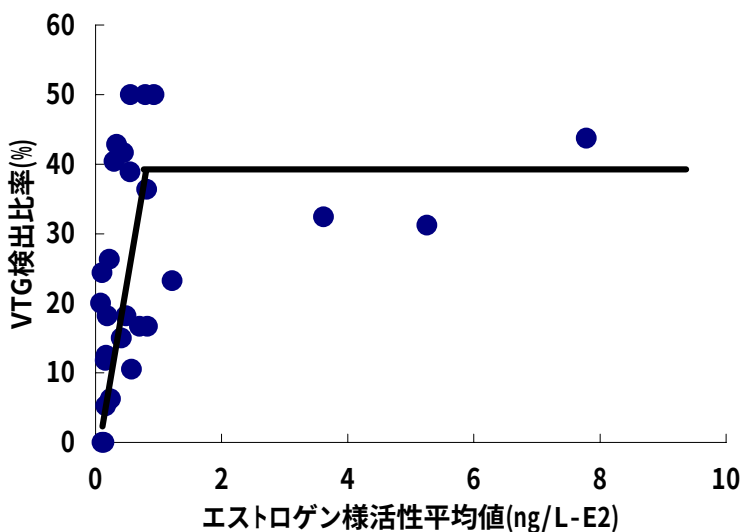


図 2.5 河川水中のエストロゲン様活性と VTG 検出率との関係
(全 27 地点)

2.4 雄コイ精巢の観察結果

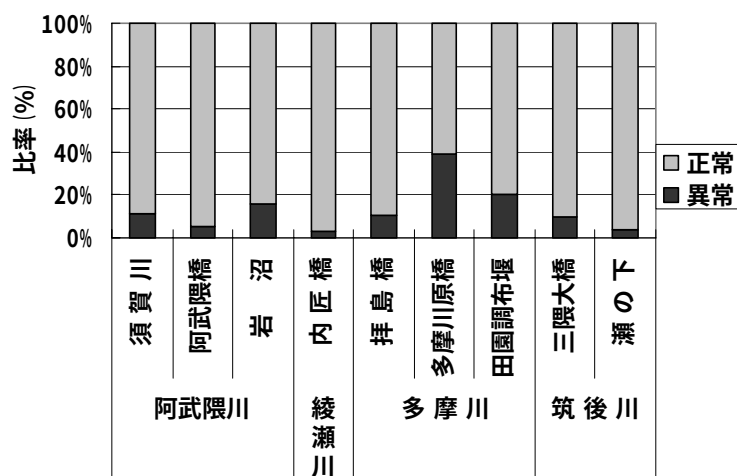
平成 10 年度から 13 年度の各調査で採捕した雄コイの精巢の観察結果を表 2.6、各調査地点の観察結果を図 2.6 に示す。また、各調査地点の水質及び底質中の内分泌攪乱物質濃度と精巢に異常がみられた雄コイの比率（精巢異常の出現率）の関係を図 2.7(1)～図 2.7(3)に示す。

VTG 測定の場合と同様に、調査回数が 3 回以上、かつ 1 地点での雄コイの採捕数合計が 30 匹以上の 9 地点について、採捕した雄コイの観察を行った。346 尾の精巢を肉眼及び組織学的に観察した結果、一部に正常な精巢とは形態的、組織学的に異なる精巢を持つ雄コイがみられた。正常でない精巢とは、1)外見的に萎縮した部位がみられ、組織学的に機能不明の細胞の増殖が認められる、2) 外見的に異常は認められないが、組織学的に卵母細胞（精巢卵）が認められる、3) 外見的に萎縮した部位がみられ、組織学的に機能不明の体細胞の増殖及び卵母細胞（精巢卵）が認められる、4)外見的に硬い瘤状の部位がみられ、組織学的に繊維芽細胞の増殖が認められる、等である。

精巢に異常がみられた雄コイの比率は、平成 10 ～ 13 年度の各調査でほぼ同様であった。しかし、雄コイの精巢異常の出現率は、調査地点により差がみられた。自然環境下に生息する魚類では、精巢に異常を生じさせる要因として、内分泌攪乱物質の影響以外にも、水温、水質、餌条件などの生息環境や加齢に伴う老化などが考えられる。しかしながら、河川に生息する魚類の精巢異常に関する知見は少なく、組織学的な観察でも一部の雄コイに認められた各精巢異常がどのような要因で生じたかを区別することは困難である。

各調査地点の水質の内分泌攪乱物質の測定結果と精巢異常の出現率の関係をみると、水質の濃度が高いにも関わらず、精巢異常の出現率が非常に低い地点があるため、一定の傾向をとらえることはできなかった。

	精巢の観察結果		合計
	正常	異常	
平成10年度	50(92.6%)	4(7.4%)	54
平成11年度	94(87.9%)	13(12.1%)	107
平成12年度	76(84.4%)	14(15.6%)	90
平成13年度	85(89.5%)	10(10.5%)	95



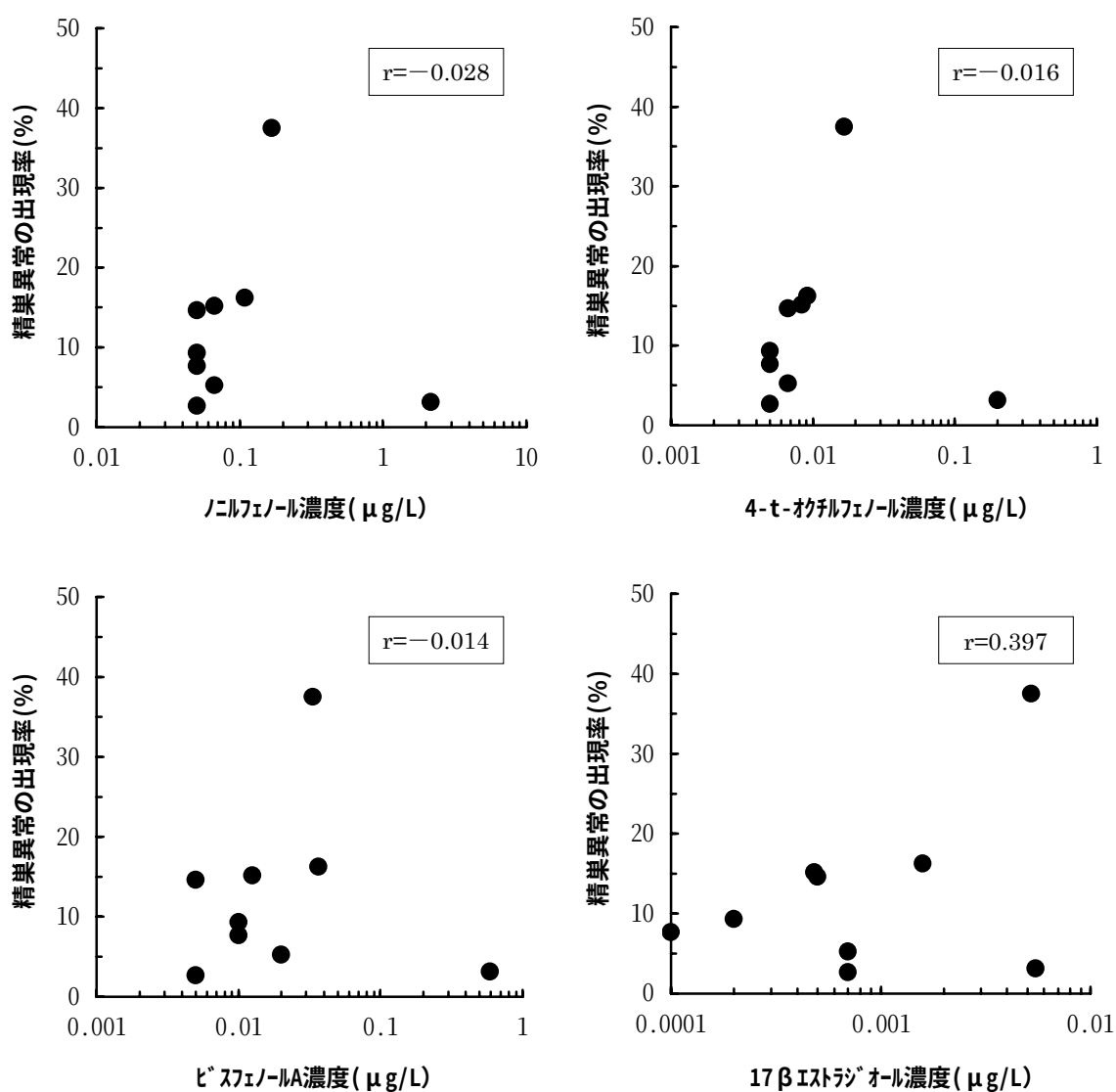


図 2.7(1) 水質中の内分泌攪乱物質濃度と雄コイの精巢異常出現率の関係（内分泌攪乱物質濃度は平成 10-13 年度調査結果の平均（検出下限未満の場合は検出下限の 1/2）、精巢異常の出現率は平成 10-13 年度調査全体の比率を用いた。図中の数値(r)は相関係数を示す。）

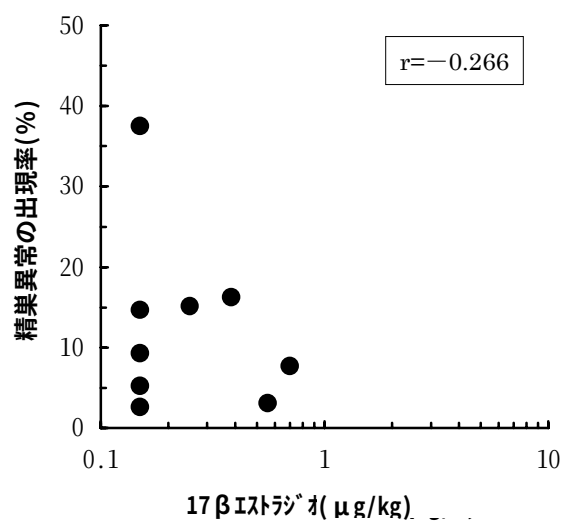
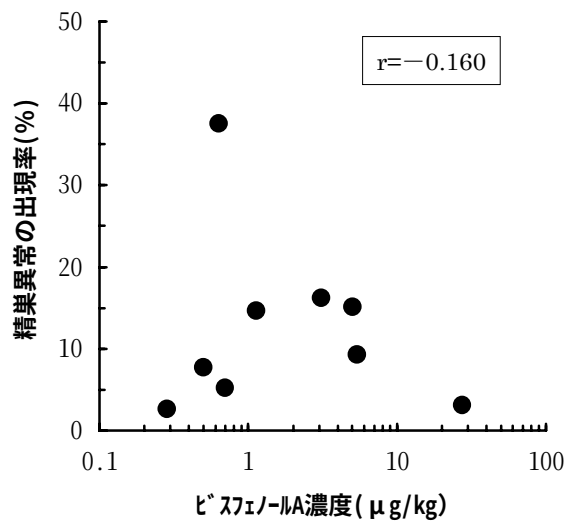
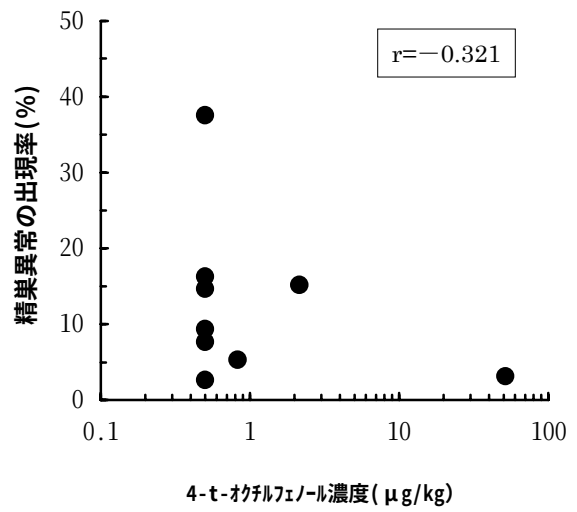
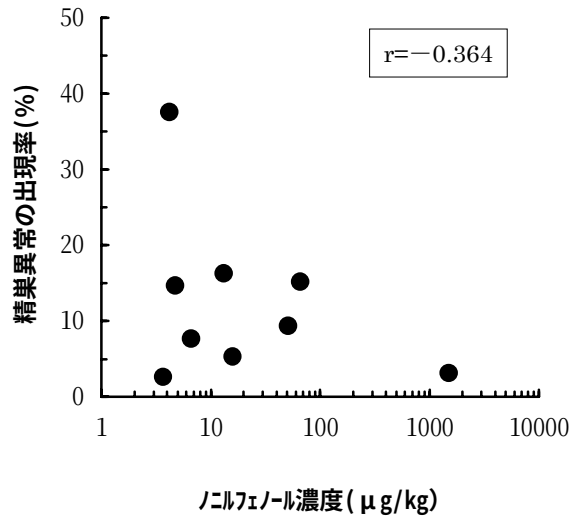


図 2.7(2) 底質中の内分泌攪乱物質濃度と雄コイの精巣異常出現率の関係（内分泌攪乱物質濃度は平成 10-13 年度調査結果の平均（検出下限未満の場合は検出下限の 1/2）、精巣異常の出現率は平成 10-13 年度調査全体の比率を用いた。図中の数値(r)は相関係数を示す。）

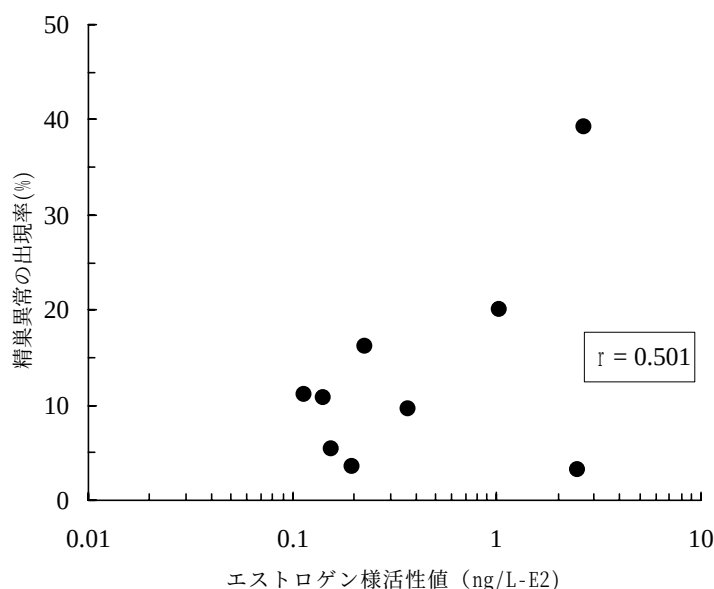


図 2.7(3) 河川水中のエストロゲン様活性と精巣異常の出現率

2.5 実態調査結果のまとめ

河川における魚類実態調査の結果、季節に関わらずVTGを生成している雄コイが確認された。

自然環境下に生息する魚類を対象とした調査の場合、得られたデータに様々な環境要因が反映されているために解釈が非常に難しいと考えられる。しかしながら、調査回数3回以上、及び採捕数30匹以上の条件を満足する9地点について検討した結果、河川水のエストロゲン様活性は、雄コイのVTG検出比率との間に関連性があると推測された。本調査の全データでは、エストロゲン様活性が1ng/L-E2程度まではVTG検出率が増加し、1ng/L-E2以上ではVTG検出率が30～50%の範囲で一定になる傾向を示していた。

ただし、わが国のフィールド調査の結果を英国の例と比較すると魚類の雌化が顕著に示されるデータは取得されていない。フィールド調査においては、様々な因子が魚類に影響するため、内分泌攪乱物質の魚類影響を評価するためには、実験的な研究等に基づいた検討も必要と考えられる。

また、英国の研究例から、魚類に影響を及ぼすと考えられる下水処理水が実際に魚類の雌化を引き起こしているのか否かを明らかにすることが必要と考えられる。

3. 下水処理水を用いた雄コイの曝露試験

3.1 研究の目的

わが国での河川における魚類実態調査の結果では、河川水のエストロゲン様活性が雄コイのVTG検出率に関係すると推測された。わが国の調

査結果を英国の研究過程と比較すると、河川における影響要因を探るため、最大の要因と考えられる下水処理水に魚類を曝露して、その影響を明らかにすることが必要と考えられる。

そこで、下水処理水によるコイへの影響の有無およびその程度を明らかにするため、処理水への直接的な魚類曝露試験法について検討し、曝露試験を繰り返し実施した。さらに、エストロゲン作用による魚類影響について、魚類生理学の観点から検討を行い、魚類影響を評価する上で必要となる生理学的作用について検討した。

3.2 方法

3.2.1 対象処理場および試験水

調査を実施した下水処理場は、天然エストロゲンを含む家庭系排水を処理しており、処理方式としては、わが国で一般的な方法である標準活性汚泥処理を採用している。また、魚類曝露試験には、活性汚泥処理後に砂ろ過処理を行った放流水を用いた。

3.2.2 魚類曝露試験法

(1) 試験魚および影響指標

下水処理水を曝露試験水として用いた本試験では、試験魚に実態調査と同様のコイを選定した。また、影響指標としては、雄コイの血中VTGを採用した。VTGは少量の血液試料で測定できるため、定期的な採血により個体ごとのVTG経時的变化を追跡することとした。

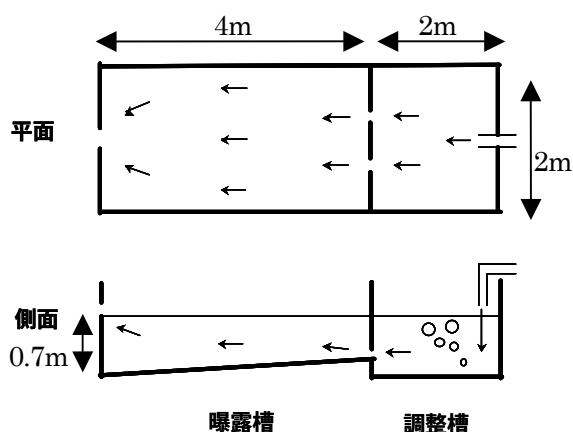
各試験開始時に養殖コイを購入し、体重約1,000gの大きさの魚を試験に供した。

(2) 試験水槽

コイの曝露試験をおこなうため、処理場敷地内に流水式の野外試験水槽を5つ並べて設置した。

試験水槽は、図3.1に示すように、コンクリートブロックを積み上げ、表面をモルタルで仕上げたもので、コイ曝露槽と調整槽から成り立っている。コイ曝露槽の大きさは、長さ4m、幅2mであり、水深は水流にともない0.5mから0.7mへと深くなる。コイ曝露槽の容積は4,800Lである。

調整槽（2×2×0.7m）では、それぞれにエアポンプを取り付け、毎分60Lのエアレーションによって酸素の供給、および処理水、水道水（対照試験区）の脱塩素処理をおこなった。なお、曝露槽には鳥による採魚を防止するネットを張り、調整槽上部には藻類の発生を抑制する日除けを設けた。



(3) コイ曝露試験の基本的条件

5つの野外試験水槽では、水質を除いてその他の曝露条件がすべて均一になるよう設定した。

流量は、4,800Lのコイ曝露槽で2回転/日となるよう設定した。日長条件や水温は、野外であることを活用し、日射による変化をそのまま採用した。この条件

下での試験水の性状について、水温、溶存酸素濃度、pH、電気伝導度、濁度を定期的に監視した。なお、曝露槽への流入水温は、各調整槽での滞留中にすべての水槽でほぼ等しくなった。

コイの試験個体数は、水槽あたり10匹あるいは15匹と設定した。この場合、個体密度はそれぞれ2.1匹/m³および3.1匹/m³となる。コイの飼育最適密度は、エアレーションが実施されている場合に最大3匹/m³とされており¹⁹⁾、ほぼこれに合致して過密にはなっていないと考えられた。また、個体ごとの経時的な VTG 生成を追跡するため、すべてのコイに識別タグを取り付けた。タグは、衣料品などに用いるループ状のタグファスナーに、識別番号を記載した薄いプレートが付けたもので、これを背びれ前端の基部（鰭骨の下）に通して固定した。エサは、植物性エストロゲンとしてコイに影響を及ぼす可能性のある大豆を含んでいない市販の餌を選定した。給餌は、週に1回食べ残しのない量を与えた。

曝露試験の開始時にコイの全長、体長、体重を測定し、試験終了後、生殖腺を観察して雌雄を決定した。また、その重量をもとに生殖腺体指数（GSI；体重あたりの生殖腺重量比率）を求めて成熟状況を観察した。

(4) コイ-VTG の測定

コイの血中 VTG を定期的に測定するため、各個体からの採血量は、コイの活動に支障をきたさないこと、さらに、測定に必要な血清量を確保することを考慮して0.5mLとした。血液は、コイの尾柄部から注射器を刺し、脊椎に沿っている血管から採取した。採取した血液は保冷して持ち帰り、その翌日冷却遠心によって血清に分離した。

VTG の測定は、魚類実態調査と同じくコイビテログニン ELISA キットを用い、添付のプロトコールに従い測定した。

なお、血清試料および VTG 標準試料はすべて二重測定をおこない、変動係数が10%以内であるデータをもとに濃度を算出した。

(5) エストロゲン様活性およびエストロゲン様物質の水質分析

試験水のエストロゲン作用を明らかにするため、組換え酵母法によるエストロゲン様活性のほか、17β-エストラジオール、ノニルフェノールおよびその前駆物質であるノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)について2週間ごとに測定した。

天然エストロゲンである17β-エストラジオールの測定は、ELISA 法に従い実施した。この測定ではコイ

VTG と同じく市販品を用いて測定した。また、ノニルフェノールおよびノニルフェノールエトキシレートの測定は、HPLC による分析法²⁰⁾に従った。

なお、ELISA 法による17β-エストラジオールの測定では、17β-エストラジオールとその抗体の結合反応を利用するため、形態のよく似た物質を同時に測定している可能性¹¹⁾が指摘されている。そこで、本調査で実施した5回（RUN1～RUN5）のうち、第4回試験（RUN4）では、LC/MS/MS による17β-エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールの分析を試みた。分析方法は、土木研究所が開発した方法²¹⁾に従い実施した。

水試料は、コイ曝露槽からガラス瓶に採取し、保冷した状態で実験室に持ち帰った。その後、すみやかに測定項目ごとの前処理操作をおこない分析用濃縮試料を作製した。なお、水試料の分析ではすべて二重測定をおこなうとともに、変動の大きいデータが得られた場合には再測定を実施した。

3.3 コイ曝露試験および試験結果

コイ曝露試験の実施状況を表3.1に示す。

第1回試験は、処理水試験区および対照試験区の2つの試験区で曝露試験を実施した。また、この結果をもとに、第2回～第4回試験の内容を計画した。

3.3.1 第1回曝露試験(Run1) 2000年2月～4月

第1回曝露試験（Run1）では、下水処理水による魚類影響の有無を明らかにするため、下水処理水試験区および対照試験区の2つの試験区にて曝露試験を実施

した。さらに、処理水の影響によって VTG 生成が誘導される場合、時間経過によるその上昇の様子や到達濃度を把握するとともに、対照区において雄の血中 VTG の正常値を明らかにすることをめざした。試験は、経時の変化を詳しく調べるため、試験期間を8週間と設定し、1週間ごとの VTG 値を追跡することとして、2000年2月に着手した。コイは、各試験区に9匹を曝露した。試験終了後に雌雄を判定した結果、処理水試験区では雄5匹、雌4匹、対照区では雄7匹、雌2匹であった。なお、対照区の雌2匹は試験途中で死亡したため、途中から雄のみの試験となった。処理水試験区の VTG 測定結果を図3.2に示す。

下水処理水に曝露した雄のうち4個体では、時間の経過にともない VTG が上昇し、4週目には1,000μg/mL ほどに達する個体が現れた。その後、変動はあるものの曝露期間中は1μg/mL を超えるレベルが維持された。さらに、8週経過した時点で脱塩素水道水に戻したところ、その3週間には VTG の低下する様子がみられた。曝露中のコイ VTG 最高値は1,400μg/mL であった。また、雄1個体では VTG 生成は認められなかった。曝露後に精巣を確認した結果、VTG を生成した雄4個体の GSI（生殖腺体指数：体重あたりの生殖腺重量比率）は4.5～12.0%、生成しなかった雄の GSI は8.3%であり、ともに成熟途中であると考えられた。

一方、対照区では雄7個体すべての VTG は定量下限値0.039μg/mL 未満のまま経過し、その誘導は確認されなかった。これらの GSI は1.7～7.1%であった。

表3.1 コイ曝露試験一覧

曝露試験	試験区	コイ			曝露期間
		試験個体数 (雄 / 雌)	体長 (mm)	体重 (g)	
Run1	100%処理水	5 / 4	351.3 ± 16.3	1129.0 ± 98.7	8 週間 2000年 2月 - 4月
	対照	7 / 2	335.5 ± 18.0	1151.0 ± 93.2	
Run2	100%処理水	7 / 5	338.9 ± 13.9	798.3 ± 53.2	8 週間 2000年 7月 - 9月
	10%処理水	7 / 6	326.3 ± 16.8	753.1 ± 65.8	
	1%処理水	4 / 9	327.5 ± 15.8	758.5 ± 84.7	
	O ₃ 10mg/L処理水	6 / 6	331.1 ± 15.4	776.7 ± 68.2	
	対照	6 / 7	338.1 ± 15.1	816.9 ± 51.4	
Run3	混合飼育①	5 / 10	352.2 ± 11.5	1170.0 ± 122.9	6 週間 2000年 12月 - 2001年 2月
	混合飼育②	5 / 10	343.4 ± 15.9	1025.3 ± 126.4	
	対照 (雄単独飼育)	15 / -	332.1 ± 15.9	920.0 ± 113.0	
Run4	100%処理水	10 / -	349.1 ± 14.6	1163.0 ± 129.2	8 週間 2001年 2月 - 4月
	10%処理水	10 / -	343.3 ± 19.6	1087.5 ± 140.0	
	O ₃ 10mg/L処理水	11 / -	330.6 ± 12.2	984.6 ± 73.7	
	O ₃ 2mg/L処理水	10 / -	345.5 ± 14.0	1181.3 ± 139.8	
	対照	10 / -	343.8 ± 12.9	1037.8 ± 104.8	

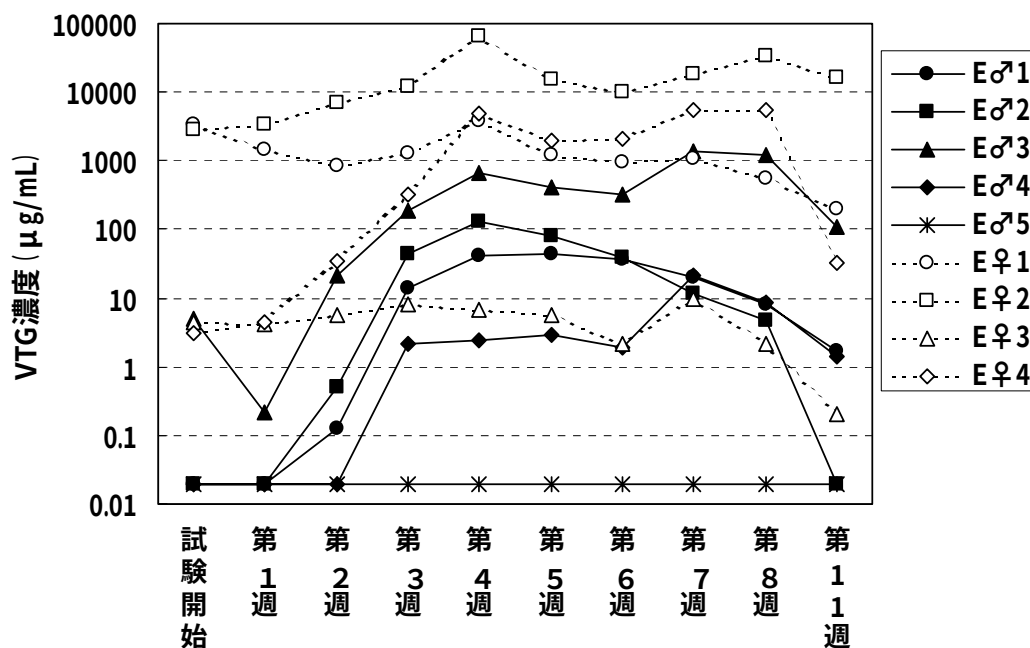


図3.2 下水処理水に曝露したコイのVTG経時変化 (Run1)

3.3.2 第2回曝露試験(Run2) 2000年7月～9月

Run1において下水処理水による雄コイの VTG 誘導が認められた。そこで、Run2では、これを抑制する対策を探るため、処理水のエストロゲン作用を弱めるオゾン添加試験区および希釈試験区を設定した。下水処理におけるオゾン消毒では、放流水の大腸菌群数が3,000個/cm³以下になるよう定められており、オゾン注入率は5mg/Lが目安とされている²²⁾。ここではエストロゲン様物質が確実に酸化分解されることを期待して、オゾン注入率10mg/L、接触時間10分と設定した。導入したオゾン発生装置の能力は、発生量20g-O₃/時、オゾン反応塔有効容量18L (直径100mm×高さ2,500mm) であり、最大185mg/L のオゾン注入が可能であった。また、希釈試験区は、エストロゲン様物質の濃度を低下させることによってコイへの影響を低減させることをめざした。ここでの希釈率は、100%処理水試験区との相違を明確にするため10%および1%と設定した。

Run2は、試験期間8週間、VTG 測定間隔2週間と設定して、2000年7月～9月に実施した。Run2の結果を表3.2に示す。10%処理水に曝露した1個体、及びオゾン処理水の2個体については、試験開始時から VTG が検出されており、試験水とは別の要因によるものである。これらの個体を除くと、いずれの試験区においても雄の VTG は誘導されなかった。

3.3.3 第3回曝露試験(Run3) 2000年12月～2001年2月

Run1の処理水試験区では雄と雌が混在していたため、雌の排出するエストロゲンが雄に影響を及ぼした可能性が考えられた。そこで、Run3では脱塩素水道水を用いて雌から雄への作用を確認する試験を実施した。

雌10匹と雄5匹の混合試験区を2水槽、雄15匹の対照試験区を1水槽とし、コイの性別は、購入時および試験開始時に、腹部を圧迫して精液を放出する個体を雄と選別した。さらに、あらかじめ VTG を測定し、これを高濃度に生成している個体を雌と仮定して試験に用いた。

Run3は2000年12月に着手し、3週間ごとに VTG を測定した。Run3の結果を表3.3に示す。この結果、6週後までいずれの試験区においても雄コイの VTG 誘導は確認されず、雌の排泄するエストロゲンの影響はみられなかった。

3.3.4 第4回試験(Run4) 2001年2月～4月

Run1および Run2の結果、Run1では処理水による影響により雄の VTG が誘導されたと考えられるが、Run2ではそのような影響は再現できなかった。

この理由として、季節によりコイの反応が異なることが考えられた。そこで、Run1と同じ季節に雄のみを用いて Run4を実施した。なお、オゾン添加試験区として、10mg/L と2mg/L (ともに接触時間10分) の2

つを設け、希釈試験区は10%とした。

Run1と同様に、2月から4月にかけて8週間の曝露試験を実施し、2週間ごとに VTG を測定した。Run4の結果を表3.4に示す。この結果、Run2と同じくいずれの試験区においても雄の VTG は誘導されなかった。

3.3.5 試験水のエストロゲン様活性およびエストロゲン様物質濃度

Run1、Run2および Run4のエストロゲン様活性および17β-エストラジオール測定結果を表3.5に示す。

下水処理水（100%処理水）のエストロゲン様活性は、雄に VTG 誘導がみられた Run1では3.6～5.9ng/L(E2)であり、Run2および Run4ではそれぞれ3.1～3.8ng/L(E2)および6.2～8.7ng/L(E2)であった。一方、17β-エストラジオール(ELISA 法)は、Run1では44.0～58.0μg/L であり、Run2および Run4ではそれぞれ28.8～45.8ng/L および24.3～45.3ng/L であった。エストロゲン様活性および17β-エストラジオール(ELISA 法)のデータでは、3回の試験を通じて大きな変動は認められなかった。

また、Run4において ELISA および LC/MS/MS を用いた2つの方法によって17β-エストラジオールを測

定したところ、これらの測定結果に差が認められた(表3.6参照)。ELISA 法では、17β-エストラジオールに形態の似た物質を合せて測定している¹²⁾と考えられ、17β-エストラジオール濃度が実際よりも高く表されたものと考えられた。LC/MS/MS による分析結果では、17β-エストラジオールよりもエストロンが高濃度に存在していることが示されたため、これがその要因の一つと考えられる。

ノニルフェノール、ノニルフェノールエトキシレートおよび水温の測定結果を表3.7に示す。Run1および Run4ではノニルフェノールはほとんど検出されなかったが、Run2では試験開始時に検出され、試験終了まで徐々に低下していく様子が認められた。また、いずれの試験においても下水処理水（100%処理水）にノニルフェノールエトキシレートが検出された。また、オゾン添加による酸化分解で期待されるエストロゲン様物質の濃度低減は、測定した物質すべてで確認された。処理場の施設点検にともなう停電のため、その効果は一定しなかったが、Run4のノニルフェノールエトキシレートをみると、オゾン添加の効果は10mg/L 添加の場合に大きく、2mg/L 添加ではあまり分解されないものと考えられた。

表 3.2 コイの VTG 経時変化 (Run2)

試験区	個体	VTG濃度 (μg/mL)					GSI (%)
		試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週	
100% 処理水	2-♂1	ND	Tr	ND	ND	ND	4.2
	2-♂2	0.3	Tr	Tr	ND	ND	1.6
	2-♂3	ND	Tr	Tr	ND	ND	0.6
	2-♂4	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	0.7
	2-♂5	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	0.9
	2-♂6	ND	Tr	Tr	ND	ND	3.2
	2-♂7	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	1.5
	♀ 平均値	3579.7 ± 6128.4	6035.9 ± 8585.6	2855.0 ± 3959.3	3082.3 ± 4158.9	1294.8 ± 2261.2	3.2 ± 1.5
10% 処理水	2-♂8	2.0	7.1	14.8	51.5	43.0	2.8
	2-♂9	Tr	ND	ND	Tr	ND	0.9
	2-♂10	ND	Tr	ND	0.1	ND	2.1
	2-♂11	ND	Tr	Tr	ND	ND	2.6
	2-♂12	ND	Tr	Tr	0.4	ND	1.8
	2-♂13	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	3.0
	2-♂14	ND	Tr	ND	Tr	ND	1.3
	♀ 平均値	1705.3 ± 3601.7	2683.6 ± 5857.9	1190.1 ± 2557.8	1730.6 ± 3723.7	1716.2 ± 3729.6	3.2 ± 2.3
1% 処理水	2-♂15	ND	ND	ND	ND	ND	1.3
	2-♂16	ND	ND	ND	ND	ND	0.5
	2-♂17	ND	Tr	ND	Tr	ND	1.0
	2-♂18	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	2.1
	♀ 平均値	21.2 ± 29.8	12.6 ± 9.5	80.7 ± 93.3	148.8 ± 170.6	215.4 ± 252.1	2.7 ± 0.8
O ₃ 10mg/L 処理水	2-♂19	ND	Tr	ND	Tr	Tr	0.9
	2-♂20	ND	ND	ND	ND	ND	4.6
	2-♂21	23.7	8.3	27.3	ND	ND	3.4
	2-♂22	ND	Tr	Tr	Tr	ND	4.9
	2-♂23	7.8	14.0	28.3	53.8	14.7	1.0
	2-♂24	ND	ND	Tr	Tr	ND	0.6
		± 60.1	± 277.4	± 3236.7	± 2213.9	± 975.5	± 1.1
	♀ 平均値	10.4 ± 12.3	23.4 ± 37.8	15.8 ± 15.3	32.4 ± 33.1	32.7 ± 38.8	2.6 ± 1.2
対照	2-♂25	ND	ND	ND	ND	ND	2.2
	2-♂26	ND	ND	ND	ND	ND	0.3
	2-♂27	ND	Tr	Tr	ND	ND	1.6
	2-♂28	ND	Tr	ND	ND	ND	2.8
	2-♂29	ND	Tr	ND	ND	ND	1.2
	2-♂30	ND	0.4	Tr	Tr	ND	2.3
	♀ 平均値	10.4 ± 12.3	23.4 ± 37.8	15.8 ± 15.3	32.4 ± 33.1	32.7 ± 38.8	2.6 ± 1.2

ND：不検出，Tr：定量下限値 0.039 μg

表 3.3 コイの VTG 経時変化 (Run3)

試験区	個体	VTG濃度 (μg/mL)		
		試験開始	第3週	第6週
混合 飼育 ①	3-♂1	ND	Tr	Tr
	3-♂2	ND	Tr	Tr
	3-♂3	ND	Tr	Tr
	3-♂4	ND	Tr	Tr
	3-♂5	ND	ND	Tr
	♀ 平均値	1598.7 ± 1496.9	741.6 ± 837.6	1112.9 ± 1243.7
混合 飼育 ②	3-♂6	ND	Tr	Tr
	3-♂7	ND	Tr	Tr
	3-♂8	ND	ND	ND
	3-♂9	ND	ND	ND
	3-♂10	ND	Tr	ND
	♀ 平均値	218.5 ± 345.5	605.7 ± 1162.8	570.2 ± 1142.6
雄 単独 飼育	3-♂11	ND	ND	Tr
	3-♂12	Tr	ND	Tr
	3-♂13	Tr	ND	ND
	3-♂14	ND	Tr	ND
	3-♂15	Tr	Tr	Tr
	3-♂16	Tr	Tr	Tr
	3-♂17	Tr	Tr	ND
	3-♂18	ND	ND	ND
	3-♂19	ND	ND	Tr
	3-♂20	ND	ND	Tr
	3-♂21	Tr	ND	Tr
	3-♂22	0.155	0.124	0.048
	3-♂23	ND	ND	Tr
	3-♂24	Tr	ND	Tr
	3-♂25	Tr	Tr	Tr

ND：不検出，Tr：定量下限値 0.039 μg/mL 未満

表3.4 コイのVTG経時変化 (Run4)

試験区	個体	VTG濃度 (μg/mL)					GSI (%)
		試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週	
100% 処理水	4-♂1	ND	Tr	Tr	ND	ND	-
	4-♂2	ND	Tr	Tr	ND	ND	1.8
	4-♂3	ND	Tr	Tr	ND	ND	-
	4-♂4	ND	ND	Tr	ND	ND	10.3
	4-♂5	ND	Tr	Tr	ND	ND	7.8
	4-♂6	ND	ND	Tr	ND	ND	-
	4-♂7	ND	ND	Tr	ND	ND	13.6
	4-♂8	Tr	Tr	Tr	ND	ND	5.1
	4-♂9	ND	ND	Tr	ND	ND	4.6
	4-♂10	1.03	0.65	0.29	Tr	Tr	8.3
10% 処理水	4-♂11	ND	Tr	Tr	0.04	ND	6.2
	4-♂12	Tr	ND	Tr	Tr	Tr	4.3
	4-♂13	0.08	0.08	0.07	Tr	0.05	7.8
	4-♂14	ND	ND	Tr	ND	ND	-
	4-♂15	0.09	0.07	0.04	ND	Tr	3.7
	4-♂16	Tr	Tr	Tr	-	-	-
	4-♂17	Tr	Tr	Tr	ND	0.05	3.3
	4-♂18	ND	ND	ND	ND	ND	-
	4-♂19	-	Tr	Tr	ND	Tr	6.6
	4-♂20	-	-	Tr	ND	Tr	3.0

試験区	個体	VTG濃度 (μg/mL)					GSI (%)
		試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週	
O ₃ 10mg/L 処理水	4-♂21	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	4.9
	4-♂22	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	6.0
	4-♂23	ND	ND	Tr	ND	ND	7.8
	4-♂24	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	6.6
	4-♂25	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	2.0
	4-♂26	ND	ND	Tr	ND	Tr	5.3
	4-♂27	ND	ND	Tr	Tr	ND	2.2
	4-♂28	ND	Tr	0.07	Tr	ND	6.6
	4-♂29	ND	ND	Tr	ND	ND	7.5
	4-♂30	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	6.8
	4-♂31	ND	ND	Tr	Tr	ND	7.2
O ₃ 2mg/L 処理水	4-♂32	ND	Tr	Tr	ND	ND	3.9
	4-♂33	ND	ND	Tr	ND	ND	8.6
	4-♂34	ND	Tr	Tr	ND	-	-
	4-♂35	ND	ND	ND	ND	ND	7.1
	4-♂36	ND	ND	ND	ND	ND	-
	4-♂37	ND	ND	Tr	Tr	ND	-
	4-♂38	ND	Tr	Tr	ND	Tr	-
	4-♂39	2.52	1.89	1.02	-	-	-
	4-♂40	ND	ND	Tr	-	-	-
	4-♂41	0.06	Tr	0.05	ND	Tr	-
	4-♂42	Tr	ND	-	-	-	-
対照	4-♂43	ND	ND	Tr	ND	ND	6.2
	4-♂44	ND	Tr	ND	ND	ND	0.7
	4-♂45	ND	Tr	Tr	ND	ND	0.8
	4-♂46	ND	2.07	Tr	ND	Tr	2.2
	4-♂47	-	-	Tr	ND	ND	7.3
	4-♂48	-	-	Tr	ND	ND	0.7

ND：不検出， Tr：定量下限値 0.039 μg/mL 未満

表 3.5 エストロゲン様活性および 17β-エストラジオール測定結果

項目	試験区	Run1					Run2					Run4				
		開始	第2週	第4週	第6週	第8週	開始	第2週	第4週	第6週	第8週	開始	第2週	第4週	第6週	第8週
エストロゲン様活性 0.02≤Tr<0.07 ND<0.02 (ng/L)	100%処理水	—	5.2	3.6	5.9	4.8	3.7	3.1	3.7	3.8	4.4	8.7	8.1	6.2	7.4	4.7
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	0.9	1.9	0.3	1.0	0.7	0.1	ND	ND	Tr(0.07)	0.3
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.5	8.6	0.8	0.3	5.5
	対照	1.5	ND	ND	ND	ND	1.0	0.7	0.7	2.0	0.6	Tr(0.07)	ND	0.1	ND	ND
		Two-hybrid株					Sumpter株					Sumpter株				
E2 (ELISA法) 0.1≤Tr<0.3 ND<0.1 (ng/L)	100%処理水	—	58.0	52.7	57.5	44.0	34.8	38.6	28.8	45.8	32.0	45.3	38.9	24.3	32.6	32.0
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	9.9	0.5	ND	ND	ND	ND	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.8	41.4	7.7	4.3	31.2
	対照	ND	ND	ND	ND	2.9	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND：検出下限値未満， Tr：検出下限値以上， 定量下限値未満

表3.6 下水処理水試験区におけるエストロゲン濃度比較

項目	測定法	開始	第2週	第4週	第6週	第8週
		(単位: ng/L)				
エストロゲン様活性	Sumpter株	8.7	8.1	6.2	7.4	4.7
17β-エストラジオール	ELISA法	45.3	38.9	24.3	32.6	32.0
	LC/MS/MS法	—	8.6	—	3.0	1.2
エストロン	LC/MS/MS法	—	11.0	—	12.1	8.6

表 3.7 ノニルフェノール、ノニルフェノールエトキシレート測定結果

項目	試験区	Run1					Run2					Run4				
		開始	第2週	第4週	第6週	第8週	開始	第2週	第4週	第6週	第8週	開始	第2週	第4週	第6週	第8週
NP 0.1 ≤ Tr < 0.3 ND < 0.1 (μg/L)	100%処理水	ND	ND	ND	ND	ND	0.94	0.52	0.40	0.40	Tr(0.28)	ND	ND	Tr(0.11)	ND	ND
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	0.55	0.31	Tr(0.19)	Tr(0.20)	Tr(0.16)	ND	ND	ND	ND	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND
	対照	ND	ND	ND	ND	ND	0.56	0.30	Tr(0.16)	Tr(0.15)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	(μg/L)															
NPnEO (1 ≤ n ≤ 4) 0.1 ≤ Tr < 0.3 ND < 0.1 (μg/L)	100%処理水	Tr(0.14)	0.36	1.01	0.83	0.96	1.92	0.71	0.85	0.97	0.63	1.52	2.11	1.80	1.07	1.03
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	Tr(0.24)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.72	2.05	1.27	ND	ND
	対照	ND	ND	Tr(0.13)	Tr(0.13)	ND	Tr(0.28)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	(μg/L)															
NPnEO (5 ≤ n) 0.4 ≤ Tr < 1.0 ND < 0.4 (μg/L)	100%処理水	ND	ND	ND	ND	ND	0.45	2.38	ND	1.09	ND	0.51	6.21	1.84	ND	ND
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.73	ND	ND	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.42	4.45	ND	ND	ND
	対照	ND	ND	ND	ND	ND	Tr(0.28)	ND	ND	ND	ND	ND	1.17	ND	ND	ND
	(μg/L)															
水温 (°C)	100%処理水	14.9	9.8	11.0	16.0	18.4	—	30.5	30.4	32.1	29.6	12.1	13.8	15.1	15.6	—
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	30.4	30.7	32.1	29.7	12.0	12.4	12.0	15.0	—
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.9	14.2	15.6	16.0	—
	対照	14.8	10.0	10.8	16.0	18.2	—	30.2	30.3	31.9	29.4	10.0	11.0	12.7	13.3	—
	(°C)															

ND：検出下限値未満，Tr：検出下限値以上，定量下限値未満

3.4 2002年度追加曝露試験(Run5)

下水処理水へのコイ曝露試験の結果、早春に雌雄のコイを同所的に曝露した場合に限り、雄コイの VTG 合成が認められた。この現象は、下水処理水のエストロゲン作用が直接 VTG 生成に関わった可能性のほか、この時期に生殖活動にともなって雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲンをもとに、アロマターゼの働きによってエストロゲンが合成され、その結果として VTG 生成が誘導された可能性が考えられた。

そこで、この仮説を検証するため、春期に雌雄を同所的に曝露する試験を実施することとした。さらに、薬物代謝酵素の働きを明らかにするため、その活性のひとつとなっている EROD (Ethoxy resorufin-o-deethylase) 活性について測定を試みた。

3.4.1 方法

(1) 曝露試験の概要

本研究では、下水処理水および脱塩素水道水を対象に、それぞれ雄単独曝露試験区および雌雄混合曝露試験区を設けた。曝露期間は4月からの8週間とし、その間2週間ごとに血液を採取して VTG を測定することとした。

(2) EROD 測定

EROD は、薬物代謝酵素 P4501A1依存性のエトキシレゾルフィン O-脱エチル化活性であり、化学物質によって引き起こされる肝臓での P4501A1遺伝子の発現の指標となり、アロマターゼの作用の指標ともなる。

この測定は、肝臓サンプルから調製されたミクロゾームに蛍光物質を添加することによって、蛍光分光と HPLC を組み合わせて測定検出感度を

上げた Tatarazako らの方法²³⁾にしたがい実施した。

3.4.2 結果および考察

2002年春期に実施した試験結果を図3.3に示す。この試験では、下水処理水に曝露した雄コイは、雄単独試験区、雌雄混合試験区いずれにおいても VTG の生成は認められなかった。また、脱塩素水道水を用いた対照試験区においても同様に、雄コイの VTG 生成はみられなかった。なお、曝露開始時に全水槽で複数のコイが死亡したため、第2週から試験個体を追加した。また、図では試験途中に死亡した個体のデータは掲載していないが、死亡した雄でも VTG の生成はみられなかった。

EROD 活性について、8週経過個体からサンプルを抽出して測定を試みた。この結果、図 3.4 に示すように対照区（水道水♂♀混合試験区）3個体に比べ、下水処理水に曝露した試験区では、EROD 活性が上昇している傾向がうかがえた。

3.5 考察

下水処理水にコイを直接曝露する試験を実施した結果、2000年2月～4月に実施した Run1において、雄コイ4個体に VTG 誘導が確認され、時間の経過とともに上昇する様子が確認された。これらの雄を脱塩素水道水に戻したところ VTG の低下がみられ、また対照区では雄の VTG はつねに定量下限値0.039μg/mL 未満であったことから、下水処理水のエストロゲン作用によって雄コイの雌化が引き起こされたものと考えられた。さらに、魚類実態調査で確認された雄コイの VTG 最高値は870μg/mL¹³⁻¹⁷⁾であったのに対し、処理水に曝露した場合には1,400μg/mL まで達すること

試験区	個体番号	性別	第0週	第2週	第4週	第6週	第8週
下水処理水 ♂単独試験区	E♂01	♂					
	E♂02	♂					
	E♂03	♂					
	E♂04	♂					
下水処理水 ♂♀混合試験区	E♂♀01	♂					
	E♂♀02	♂					
	E♂♀03	♂					
	E♂♀04	♂					
	E♂♀05	♂					
	E♂♀06	♂					
	E♂♀07	♀					
	E♂♀08	♀					
	E♂♀09	♀					
	E♂♀10	♀					
	E♂♀11	♀					
	E♂♀12	♀					
水道水 ♂単独試験区	C♂01	♂					
	C♂02	♂					
	C♂03	♂					
	C♂04	♂					
	C♂05	♂					
	C♂06	♂					
	C♂07	♂					
水道水 ♂♀混合試験区	C♂♀01	♂					
	C♂♀02	♂					
	C♂♀03	♂					
	C♂♀04	♀					
	C♂♀05	♀					
	C♂♀06	♀					
	C♂♀07	♀					
	C♂♀08	♀					

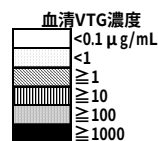


図 3.3 コイ VTG 測定結果 (2002 年度)

が確認された。しかし、Run2以後の試験では雄の VTG 誘導は再現されず、下水処理水に曝露した雄コイに VTG 誘導が確認されたのは、Run1において早春に雄と雌が混在していた場合に限られた。

Run1とその後の曝露試験において、エストロゲン様活性をはじめ、17β-エストラジオール (ELISA)、ノニルフェノールおよびノニルフェノールエトキシレートの濃度に大きな変動は認められなかった。下水処理水のエストロゲン作用に変動が認められないにもかかわらず、雄コイの VTG 誘導に差がみられたことは、VTG 誘導に関わる要因が下水処理水のエストロゲン作用だけではないためと考えられる。

国土交通省が2000年度までに魚類実態調査を実施した5河川10地点について、地点別および季節別に整理した VTG 測定結果¹³⁻¹⁷⁾を見ると、阿武隈川の3地点および北陸の荒川では春期調査でのみ雄 VTG の生成がみられており、本研究結果と同様の傾向を示していると考えられる。荒川は、都市排水の影響を受けていない地点として1999年度から調査対象に選定された河川であるが、春には雄コイの VTG 生成が確認された。また、多摩川における調査でも、早春に雄コイの VTG が上昇する傾向が示されている。

早春に雄コイの VTG が誘導される原因について、コイの内分泌²⁴⁾や生殖周期²⁵⁾などの生理学的知見をもとに考えてみることにする。コイ科魚類の生殖サイクル模式図を図3.5に示す。春の産卵期

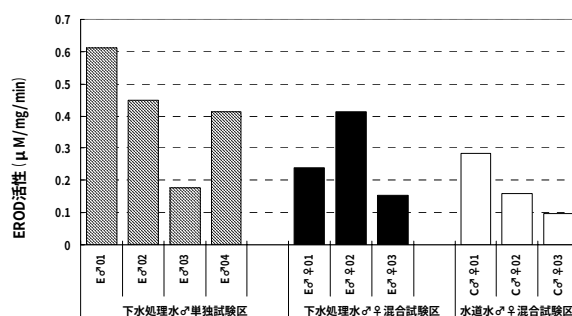


図 3.4 雄コイの EROD 活性測定結果 (2002 年度)

を迎えるため、コイの体内では秋から性ホルモンの分泌が始まっている。この生殖腺形成第1フェーズは、産卵活動によって退行した生殖腺の再熟過程と位置付けられ、卵径の増大や精母細胞の出現が起こり、GSI が緩やかに上昇する。早春に、長日条件への変化および水温上昇というシグナルを受けると第2フェーズが始まる。雌の体内ではエストロゲンが、また雄ではアンドロゲン (男性ホルモン) が多量に分泌されて、卵黄蓄積や精子形成が活発化され、GSI が急増する。産卵期は季節に応じた十分な長日条件によって維持され、その後、盛夏に水温が25℃を超えるようになると、性ホルモンの分泌は抑制され、生殖腺は急激に退行する。

また、エストロゲンはアンドロゲンにアロマターゼ (薬物代謝酵素の一つ) が作用して合成される^{24,26)}ことが知られている。

コイの生理学的観点からみると、早春に実施した Run1では、下水処理水に含まれるエストロゲン様物質が直接 VTG の誘導に関与した可能性のほか、この時期に雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲンをもとに、アロマターゼの作用によってエストロゲンが合成され、その結果 VTG が誘導された可能性も考えられる。この場合、Run1と同じ季節にもかかわらず Run4で雄の VTG 誘導がみられなかった理由は、同じ水槽に雌が存在していなかったため生殖活動が活発化されず、アンドロゲンが活性化されなかったため、エストロゲンへの合成も進まなかったことが考えられる。

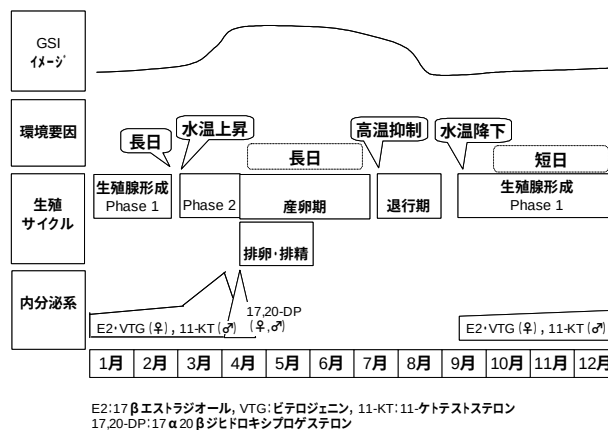


図3.5 コイ科魚類の生殖サイクル模式図
(文献24, 25をもとに作成)

Run1の対照試験区では雄の VTG 誘導がみられなかった理由は、雌が死亡したため雄のみの試験であったことも考えられる。

また、夏期に実施した Run2では、水温が30℃前後の高水温であったためコイの生殖腺は退行を始めており、アンドロゲンは冬から春先よりも低濃度であったと考えられる。

アロマターゼの作用および雌の同所性による VTG 誘導の仮説を確かめるため、2002年度は春季に雄単独試験区および雌雄同所試験区を設けて調査を行ったが、雄単独試験区、雌雄混合試験区いずれにおいても VTG の生成は認められなかった。2002年度に実施した曝露試験水の水質測定結果は、過年度に実施した実験に比べ大きな差異は認められなかった。このため、雄コイの VTG 生成が認められた過年度調査の Run1に比べ、雄の VTG 誘導がみられなかった理由は、試験開始が4月であったことから、生理的活動が活発になる早春を過ぎていたためと考えられた。

アロマターゼの作用については、EROD (Ethoxylresorufin o-deethylase) の活性を指標として測定することが可能²⁷⁾であるため、VTG とともに影響指標の一つとして測定する必要があると考え、2002年度に調べたところ、下水処理水に曝露した試験区で EROD 活性が上昇している傾向であったことから、下水処理水によって薬物代謝酵素が誘導されている可能性を示すものと考えられた。

英国の研究では、コイ科魚類のローチに対する 17β-エストラジオール(GC/MS 法)の最小作用濃度は、10~100ng/L の範囲にある⁹⁾と報告されている。コイに対する下水処理水に含まれるエストロゲン様物質の影響を確認するためには、前述し

た内因性の原因の検証とともに、17β-エストラジオールなどの標準物質による曝露試験を実施して最小作用濃度を明らかにして、現象の再現をおこなう必要がある。

なお、試験のスタート時から一定レベルの VTG を生成している雄が確認された。この原因として、成長途中における餌や化学物質による影響が考えられるが、原因は不明である。本研究の目的はエストロゲン様物質による雄コイの雌性化、つまり VTG 誘導を明らかにすることであったため、これらのコイについては検討対象から除外した。

4 処理場曝露試験と河川実態調査との比較

曝露試験結果を河川実態調査結果と比較すると、河川の実態調査において野生の雄コイに VTG を生成している割合が高いという傾向を示していた。これについて、考察を行った。

いくつかの文献で、VTG を生成するエストロゲンあるいはエストロゲン様物質の濃度レベルが報告されている。雄のニジマス中の VTG 誘導についての議論では、Routledge らは、雄のニジマスに VTG 誘導を起こすのは、E2 が 1~10ng / L の範囲にあり、ローチでは 10~100 ng / L の範囲⁹⁾にあるとしている。Matsumoto²⁸⁾らによって、霞ヶ浦の養殖コイを対象として、VTG の調査が行われている。この事例をもとに雄コイの VTG の正常値は、1 または 2 才の未成熟な雄コイでは 0.1μg/mL (血しょう) であると考えられる。

このため、血清中の VTG が 0.1μg/mL を超える雄コイを VTG が検出された個体として扱うこととした。野生の雄コイ中の VTG 誘導は、ニジマスやローチ中のそれと比較して、より低い濃度で起こる傾向がみられた。図 2.5 で示されるように、

エストロゲン様活性が1ng /L-E2以上であれば、雄コイの30～50%程度がVTGを生成するという結果であった。

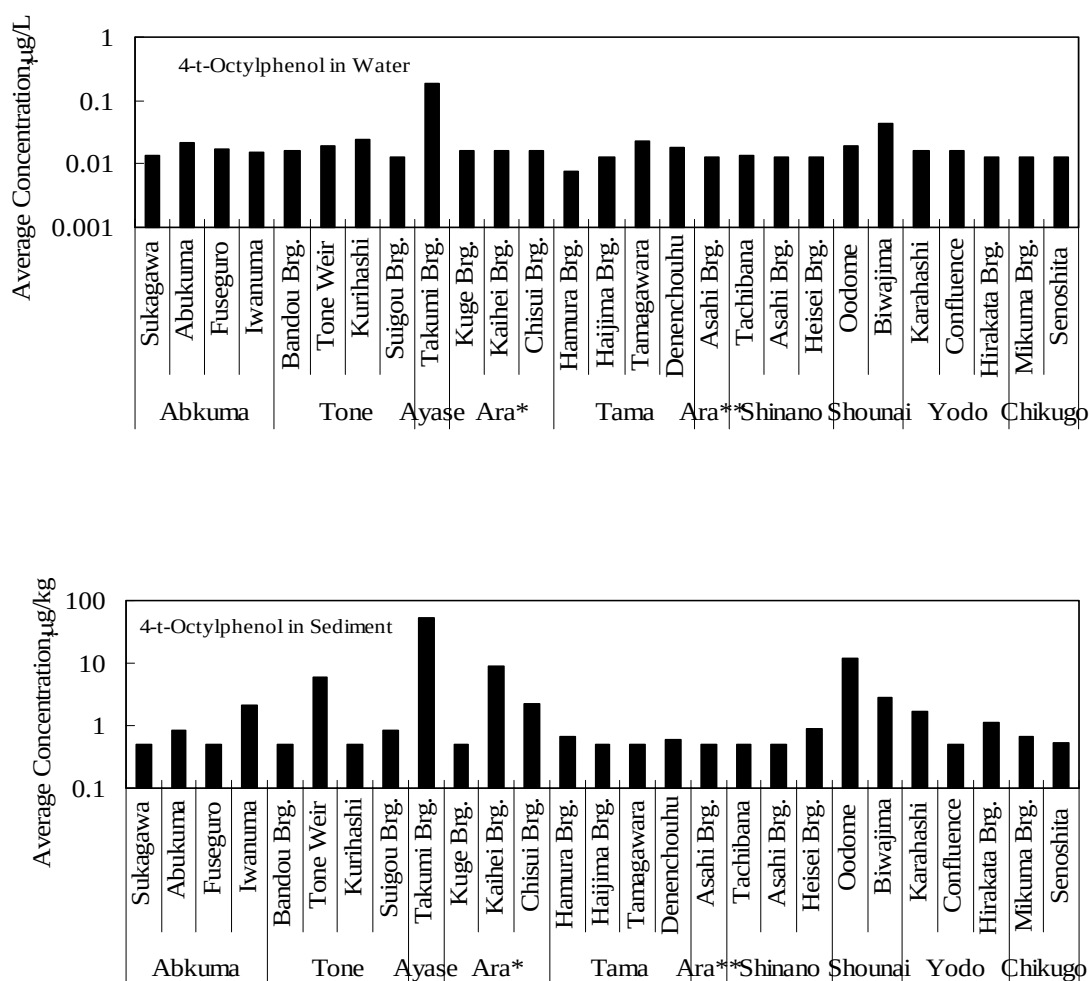
本研究で実施した雄コイの曝露実験では、RUN1～4の間にエストロゲン様活性約7～10ng-E2/L の下水処理水に曝露しており各 RUN の間で大幅な水質変化はないと思われるが、VTG の上昇を確認できたのは RUN1 だけであった。

河川実態調査における雄コイ中の VTG 誘導は、エストロゲン様活性が曝露試験に用いた下水処理水中和同程度の場合には、曝露試験よりも高い頻度で起こっていた。この原因として、食物連鎖が実河川中のコイの場合には影響している可能性が考えられる。曝露試験における VTG の誘導および水中のエストロゲン様活性は、いずれも水系の曝露だけを考慮

している。しかしながら、コイは付着藻類、底生動物など河床や底質にある有機物を餌としている。このため、水だけでなく食物連鎖の考察が必要である。

国土交通省の調査結果では、底質に存在するエストロゲン様物質濃度は、図4.1～4.3に示すように河川水中の濃度に比べて100～1000倍高くなっていた。また、付着藻類および底生動物中のエストロゲン、nonylphenol の濃度についても、10～1000倍高くなっていることが確認されている²⁹⁾。

したがって、食物連鎖は、曝露試験等の研究による結果と実河川における実態との相違について説明するために考慮することが有効であると思われる。このことについては、今後の研究により明らかにすることが必要である。



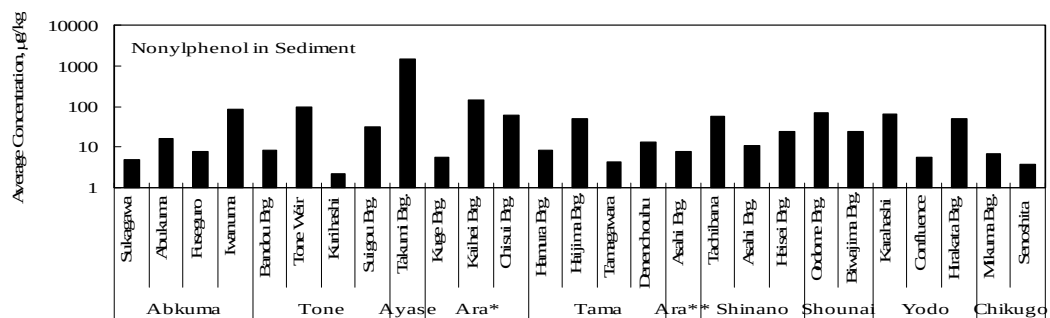
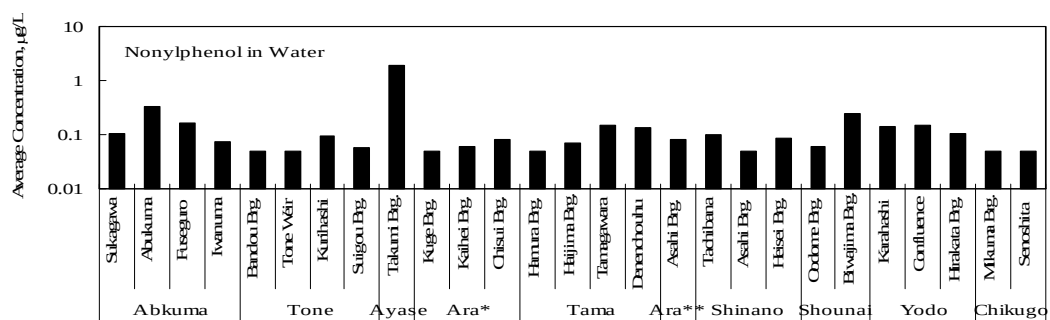


図 4.2 ノニルフェノールの河川水および底質中の濃度

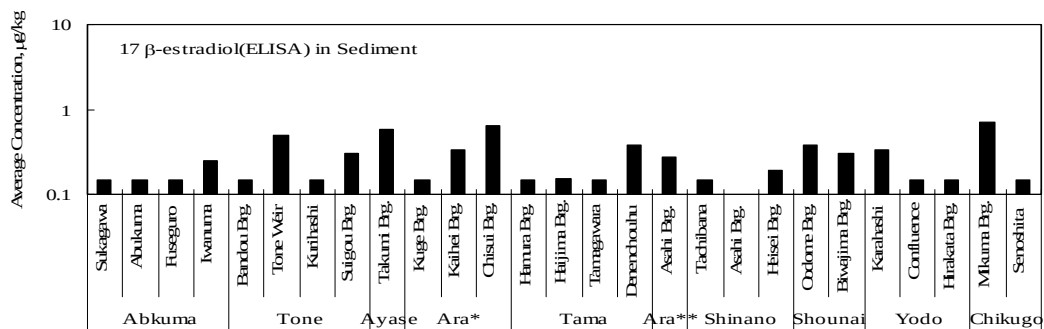
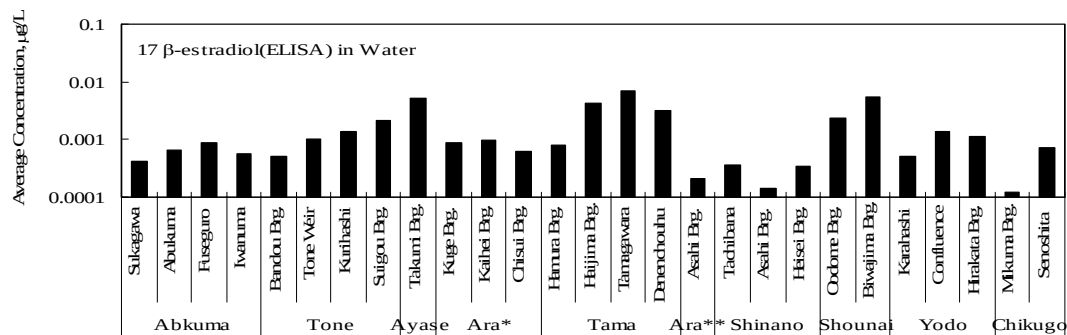


図 4.3 17βエストラジオールの河川水および底質中の濃度

5 結論

下水処理水および河川水に含まれるエストロゲン様物質によって、雄の魚類が雌化すると指摘されている。本研究では、エストロゲン様物質の影響を明らかにすることを目的として、国土交通省が実施した実態調査の結果と土木研究所独自の調査結果をとりまとめて評価するとともに、下水処理水を用いた魚類曝露試験を実施した。

その結果、以下のことが明らかになった。

- (1) 魚類実態調査の結果、河川水中のエストロゲン様活性は、1ng/L-E2程度までは濃度とともにビテロゲニン生成の比率が増加していた。エストロゲン様活性が1ng/L-E2以上になると、VTG 検出率が30～50%の範囲で一定になる傾向を示した。
- (2) 下水処理水にコイを直接曝露する試験を実施した結果、早春に雄と雌を同時に曝露した場合に雄コイのビテロゲニン誘導が確認された。また、処理水への曝露を終えると3週間後にはその低下が確認できたことから、雄コイの血中ビテロゲニンは3～4週間で曝露による影響が消失することが明らかとなった。
- (3) 曝露試験に用いた試験水のエストロゲン様活性は約7～10ng-E2/L と比較的高かったが、ビテロゲニンを誘導している雄の割合は、魚類実態調査での割合に比べると小さかった。

参考文献

- 1) デボラ・キャドバリー: メス化する自然. 集英社, 371p, 1998.
- 2) Environment Agency: The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents. 1997.
- 3) Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. and Sumpter J.P.: Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*, 8, pp.275-285, 1994.
- 4) Harries J.E., Sheahan D. A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E.J., Rycroft R., Sumpter J.P. and Tylor T.: A Survey of Estrogenic Activity in United Kingdom Inland Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(11), pp.1993-2202, 1996.
- 5) Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T. and Zaman N.: Estrogenic Activity in Five United Kingdom Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(3), pp.534-542, 1997.
- 6) Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P. and Sumpter J.P.: Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), pp.194-202, 1996.
- 7) Blackburn M.A. and Waldock M.J.: Concentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales. *Water Research*, 29(7), pp.1623-1629, 1995.
- 8) Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. and Waldock M.: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological Screening. *Environmental Science and Technology*, 32(11), pp.1549-1558, 1998.
- 9) Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M. and Sumpter J.P.: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science and Technology*, 32(11), pp.1559-1565, 1998.
- 10) Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G. and Sumpter J.P.: Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science and Technology*, 32(17), pp.2498-2506, 1998.
- 11) 中村将ほか, 科学, 68, 515-517 (1998)
- 12) 原彰彦, 廃棄物学会誌, 10, 278-287(1999)
- 13) 建設省, 「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, http://www.mlit.go.jp/river/press/9901_06/990330.html (1999)
- 14) 建設省, 平成11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(春期・夏期調査)について, http://www.mlit.go.jp/river/press/9907_12/991119part2.html (1999)
- 15) 建設省, 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, http://www.mlit.go.jp/river/press/200007_12/000721index.html (2000)
- 16) 国土交通省, 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, http://www.mlit.go.jp/river/press/200107_12/010724b/010724.html (2001)
- 17) 国土交通省, 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, http://www.mlit.go.jp/river/press/200207_12/021212 (2002)
- 18) 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, 36, 199-204, 1999
- 19) 落合明, 鈴木克美; 観賞魚解剖図鑑1, 緑書房, 1997
- 20) 小島節子, 渡辺正敏; 名古屋市内の水環境中のアルキルフェノールポリエトキシレート(APE)および分解生成物の分布, 水環境学会誌, 21(5), pp.302-309, 1998
- 21) 小森行也, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明, LC/MS/MSによる下水試料のエストロゲンの測定,

第9回世界湖沼会議，発表文集第3分科会，
pp.225-228, 2001

- 22) 社団法人日本下水道協会，下水道維持管理指針
—2003年版—後編，pp.221-222, 2003
- 23) Tatarazako N. et al., Environ. Science, 9 pp.451-462,
2002
- 24) 長浜嘉孝；生殖-配偶子形成の制御機構，魚類生理
学，恒星社厚生閣，pp.243-286, 1991
- 25) 羽生功；生殖周期，魚類生理学，恒星社厚生閣，
pp.287-325, 1991
- 26) 有蘭幸司；バイオマーカーを用いた水環境評価法，ぶん
せき，6, pp.467-474, 1999
- 27) Chen C.M. and Cooper K.R.; Development Toxicity
and EROD Induction in the Japanese Medaka(*Oryzias
latipes*) Treated with Dioxin Congeners, Bulletin of
Environment Contamination and Toxicology, 63,
pp.423-429, 1999
- 28) Takeru Matsumoto, Makito Kobayashi, Yoshiaki Nihei,
Toyoji Kaneko, Haruhisa Fukada, Kaori Hirano,
Akihiko Hara and Shugo Watabe, Plasma vitellogenin
levels in male common carp *Cyprinus carpio* and
crucian carp *Carassius cuvieri* of Lake Kasumigaura,
Fisheries Science; 68, 1055-1066, 2002
- 29) Takahashi, A., T. Higashitani, Y. Yakou, H. Tanaka,
Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine
Disrupters into Periphytons and Benthos in the Tama
River, Water Science and Technology, 47, 9, 73~76,
2003