

学位論文題名

Studies of the impacts of environmental estrogens
on marine fish: measurement of serum vitellogenins
in the male Japanese common goby
(*Acanthogobius flavimanus*)

(マハゼビテロジェニンを指標とした環境エストロジェンの
海産魚への影響評価に関する研究)

学位論文内容の要旨

環境水中には人間活動に由来する様々な化学物質が流入している。それらの中には雌性ホルモン（エストロジェン）活性を持つものが存在し、環境エストロジェンと呼ばれている。環境エストロジェンの中には人畜由来のエストラジオール-17 β （E2）やエストロン（E1）等のエストロジェン類及び植物エストロジェン、医薬品のエチニルエストラジオール（EE2）や界面活性剤由来のノニルフェノール（NP）等が含まれる。水域におけるこうした環境エストロジェンの存在は、水棲生物の生殖や発生に悪影響を及ぼす可能性が懸念される。実際に英国の河川ではコイ科魚類で卵精巣が高頻度で見つかり、下水処理水に含まれる高濃度の環境エストロジェンが原因であることが明らかにされた。環境エストロジェンの影響を調査する手段として、魚類雄の血中に誘導されるビテロジェニン（Vg）の検出の有効性が示されている。Vgは卵黄タンパク前駆物質であり、本来、成熟期の雌で内因性E2によって合成されるが、環境エストロジェンの影響を受けた雄においても血中への誘導が見られる。河川においてはニジマス雄血中のVgを指標とした調査が英国で実施され、NP、E1、E2、EE2が原因物質として特定された。一方、海域では英国の河口域のカレイ調査において河川に匹敵する環境エストロジェンの影響が報告されている他、東京湾でもマコガレイ雄血中にVgが検出されている。魚食習慣のあるわが国ではこの問題への

感心が高く、各地の沿岸での早急な影響調査が求められている。こうした背景に基づき、本研究では環境エストロジェンの海産魚への影響調査のため、都市部を含む全国の沿岸域に分布し、化学物質の影響を評価するのに適したマハゼ(*Acanthogobius flavimanus*)を対象種として、雄血中に誘導されたVgを指標とした評価法の開発と、それを用いた全国的調査を行った。

マハゼVgの免疫測定系の確立に先立ち、マハゼには免疫生化学的に性質の異なる2型のVgが存在することを明らかにした。3段階の液体クロマトグラフィー(ハイドロキシアパタイト、Superose 6、Mono Q)により、各Vgを精製したところ一方は分子量53万のVg(Vg-530)であり、その分子量、脂質含量、リン含量から他魚種で報告されている一般的なVgと考えられた。もう一つのVgは分子量が32万(Vg-320)と比較的小さく、リン含量が低いことから、テラピアやゼブラフィッシュで報告された別タイプのVgであることが予想された。これら2型のVgに対する特異抗体を作製し、アビジン・ビオチン結合に基づいたサンドイッチ法による酵素免疫測定系(ELISA)を確立した。測定範囲はVg-530が1.3~160ng/ml、Vg-320が0.3~66ng/mlであり、正常なマハゼ雄血清との反応性が無いことから、微量Vgの検出に有効であることが示された。2型Vgのエストロジェン応答性を知るため、マハゼ雄にE2を注射(0、0.1、1、10、25、100、1000 μ g/kg)、あるいは暴露(0、10、1、10、100、1000ng/L)し、各Vg血中濃度をELISAにより測定した。両Vgは共に筋肉中投与では25 μ g/kgを3回、暴露では10ng/Lを3週間行うことで誘導が認められ、以降E2濃度依存的に血中濃度は増加した。また両Vgの血中濃度比は、Vg濃度が低い場合には差は少ないが、濃度が上がるにつれVg-530濃度がVg-320に比べ10倍程度高くなった。

天然マハゼ雌の生殖腺の発達に伴う血中E2濃度と2型Vg濃度の変化について調べた結果、E2濃度の上昇に伴い2型Vg共に濃度が上昇し、卵巣の組織学的な観察結果とよく一致した。卵黄形成初期の雌血中E2濃度は約2ng/mlであり、暴露時の飼育水の最低有効濃度10ng/L(10pg/ml)と著しい隔たりを見せた。暴露を受けた雄の血中E2濃度を測定したところ、100ng/L暴露で1.95ng/ml、1,000ng/L暴露で1.72ng/mlと約2~20倍の濃度で血中に蓄積し、この濃縮作用により低濃度の暴露においてもVg合成が誘導されることが示唆された。

マハゼで見いだされた2型のVgの卵黄タンパクドメイン構造を明らかに

し、各分子の同定を行うため、それぞれのcDNA配列解析を行った。マハゼ肝臓cDNAライブラリーからクローニングしたVg cDNAは、Vg-530ではシグナルペプチドを含む1,664のアミノ酸を、Vg-320は1,238のアミノ酸をコードしていた。演繹されたVg-530のアミノ酸配列はN-末端からリポビテリン重鎖 (LvH)、ホスピチン (Pv)、リポビテリン軽鎖 (LvL)、ベータ成分 (β '-c) という一般的な構造を持ち、他魚種のVgと40~45%の相同性を持っていた。一方、Vg-320のアミノ酸配列は、セリンの連続配列に特徴付けられるPv部分が無いことに加え、LvL以降の配列が短い特異な配列であり、ゼブラフィッシュで報告されたPvが欠損したVg (Pvless Vg) に類似した。また、卵黄タンパクの生化学的分析から、Vg-530は卵母細胞に取りこまれた後、分子量47万のLvH-Pv-LvL複合体と3.3万の β '-cとに分裂し、Vg-320は変化しないことが明らかになった。

環境水中で主に検出される環境エストロジェンのE2、E1、NP、ビスフェノールA (BPA) について暴露実験を行い、海水中の濃度とマハゼ雄に誘導される2型Vg濃度との関係を明らかにした。その結果、E2は10ng/Lから、E1は27ng/Lから、NPは19 μ g/LからVg濃度の上昇が見られたが、BPAでは134 μ g/LでもVgは誘導されなかった。暴露した物質の血中濃度は、E2とE1は最大で環境水の約20倍、BPAは約50倍、NPは約450倍にまで高まっていた。このように、先のE2以外の環境エストロジェンについても血中への濃縮が起ることによってVg合成を誘導すると考えられた。暴露実験の結果を基に全国調査結果をとりまとめたところ、大都市沿岸の調査地点の一部で10ng/LのE2暴露と同程度のVgが検出され、環境エストロジェンの影響が示唆されたが、精巣の異常は認められなかった。一方、水中のE2とNPは、それぞれ単独でVgを誘導する濃度には到っておらず、検出されたエストロジェン活性はE2、E1、NP等の複合作用によるものと考えられた。

以上、本研究ではマハゼにおいて、2型のVgの存在をタンパク及びcDNA両面から初めて明らかにし、この2型Vgに対する測定系を作製して、2つのエストロジェン誘導タンパクを測定することで確実性の高い調査手法を確立した。暴露実験を通じて主要な環境エストロジェン4種の水中濃度と雄血中Vg濃度の相関を明らかにし、野外調査におけるエストロジェン強度の尺度を提示した。加えて、水中の環境エストロジェンが血中に濃縮、蓄積されることを示し、環境エストロジェンによる魚類Vgの誘導機構の一端を

明らかにした。野外調査では、大都市沿岸で環境エストロジェンの影響が見られたが、その強度は10ng/LのE2程度であり、生殖腺の異常は観察されなかった。今後の社会情勢の変化等により変動することが予想され、将来にわたり継続的な影響調査を行うことが重要である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原 彰彦
副査	教授	山内 皓平
副査	助教授	足立 伸次
副査	助教授	東藤 孝
副査	北海道区水産 研究所室長	松原 孝博

学位論文題名

Studies of the impacts of environmental estrogens on marine fish: measurement of serum vitellogenins in the male Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*)

(マハゼビテロジェニンを指標とした環境エストロジェンの
海産魚への影響評価に関する研究)

水域に存在する雌性ホルモン作用を持つ物質（環境エストロジェン）が水棲生物の生殖に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。実際に英国の河川では下水処理水に含まれる高濃度の環境エストロジェンの影響で、コイ科魚類において卵精巣が高頻度で見ついている。環境エストロジェンの影響を調査する手段として、魚類雄血中に誘導されるビテロジェニン (Vg) の検出の有効性が示されている。Vg は卵黄蛋白前駆体であり、本来、成熟期の雌で内因性エストラジオール-17 β (E2) によって合成されるが、環境エストロジェンの影響を受けた雄においても血中への誘導が見られる。この手法を用いた環境エストロジェン調査が英国の河川で実施され、ノニルフェノール (NP)、エストロン (E1)、E2、エチニルエストラジオールが原因物質として特定された。一方、海域でもカレイを用いた英国での調査において河川に匹敵する環境エストロジェンの影響が報告され、また我が国でも東京湾のマユガレイの雄血中に Vg が検出されている。これらの結果を受け、全国の沿岸海域での早

急な影響調査が求められていたことから、本研究では全国の沿岸域に分布するマハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) を対象魚種として、雄血中に誘導された Vg を指標とした環境エストロジェンの影響評価法の開発と、それを用いた全国的調査を行った。

マハゼ Vg の免疫測定系の確立に先立ち、マハゼには免疫生化学的に性質の異なる 2 型の Vg が存在することを明らかにした。各 Vg を精製したところ一方は分子量 53 万の Vg (Vg-530) であり、その分子量、脂質含量、リン含量から他魚種で報告されている一般的な Vg と考えられた。もう一つの Vg は分子量が 32 万 (Vg-320) と比較的小さく、リン含量が低いことから、テラピアやゼブラフィッシュで報告された別タイプの Vg であることが予想された。これら 2 型の Vg に対する特異抗体を作製し、酵素免疫測定系を確立した。測定範囲は Vg-530 が 1.3~160ng/ml、Vg-320 が 0.3~66ng/ml であり、微量 Vg の検出に有効であることが示された。

マハゼで見いだされた 2 型の Vg の卵黄蛋白ドメイン構造を明らかにし、各分子の同定を行うため、それぞれの cDNA 配列の解析を行った。マハゼ肝臓 cDNA ライブラリーからクローニングした Vg cDNA は、Vg-530 ではシグナルペプチドを含む 1,664 のアミノ酸を、Vg-320 は 1,238 のアミノ酸をコードしていた。Vg-530 のアミノ酸配列は N 末端からリポビテリン重鎖 (LvH)、ホスピチン (Pv)、リポビテリン軽鎖 (LvL)、ベータ成分 (β -c) という一般的な構造を持ち、他魚種の Vg と 40~45% の相同性を持っていた。一方、Vg-320 のアミノ酸配列は、セリンの連続配列に特徴付けられる Pv 部分が無く、また LvL 以降の配列が短い特異な配列であり、ゼブラフィッシュで報告された Pvless Vg に類似した。

日本の水域で検出される主要な環境エストロジェンの E2、E1、NP、ビスフェノール A (BPA) について 3 週間にわたり暴露実験を行い、海水中の濃度とマハゼ雄に誘導される 2 型 Vg 濃度との関係を明らかにした。その結果、E2 は 10ng/L から、E1 は 27ng/L から、NP は 19 μ g/L から Vg 濃度の上昇が見られたが、BPA では 134 μ g/L でも Vg は誘導されなかった。一方、天然マハゼ雌の卵黄形成初期の血中 E2 濃度は約 2ng/ml であり、暴露時の飼育水の最低有効濃度 10ng/L (10pg/ml) と著しい隔たりを見せた。暴露を受けた雄の血中 E2 濃度を測定したところ、100ng/L 暴露で 1.95ng/ml と約 20 倍の濃度で血中に蓄積し、この濃縮作用により低濃度の暴露においても Vg 合成が誘

導されることが示唆された。また、暴露した他の物質の血中濃度も、E1 は環境水の約 20 倍、BPA は約 50 倍、NP は約 450 倍に高まっており、E2 と同様に暴露物質の血中への濃縮が Vg 合成を誘導する原因と考えられた。暴露実験の結果を基に全国調査結果をとりまとめたところ、大都市沿岸の調査地点の一部で 10ng/L の E2 暴露と同程度の Vg が検出され、環境エストロジェンの影響が示唆されたが、精巢の異常は認められなかった。一方、水中の E2 と NP は、それぞれ単独で Vg を誘導する濃度には到っておらず、検出されたエストロジェン活性は E2、E1、NP 等の複合作用によるものと考えられた。

以上、本研究ではマハゼにおいて、2 型の Vg の存在を蛋白及び cDNA 両面から初めて明らかにし、この 2 型 Vg に対する測定系を開発して定量することで確実性の高い調査手法を確立した。暴露実験を通じて主要な環境エストロジェン 4 種の水中濃度と雄血中 Vg 濃度の相関を明らかにし、野外調査におけるエストロジェン強度の尺度を提示した。加えて、水中の環境エストロジェンが血中に濃縮、蓄積されることを示し、環境エストロジェンによる魚類 Vg の誘導機構の一端を明らかにした。野外調査では、大都市沿岸で 10ng/L の E2 程度の環境エストロジェンの影響が見られたが、生殖腺の異常は観察されなかった。これらの結果は環境エストロジェンの海産魚類の生殖機構への影響を解明する上で重要な知見を提供するものとして高く評価され、本論文が博士（水産科学）の学位請求論文に値する業績であると認定した。