

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻
平成 12 年度博士課程 入学
氏 名 松本 建
指導教官 渡部終五

論文題目： 魚類用飼料のエストロゲン活性に関する生化学的研究

近年、環境中に放出された微量の化学物質が、動物体内でホルモンとしての作用を示すことが示唆されている。このような物質は内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)と呼ばれ、ヒトおよび動物に生殖障害などの影響を与えることが懸念されている。工場や下水処理場などから排出された環境ホルモンは、最終的には河川や海洋などの水圏に達することから、魚類に対しても何らかの影響を与える可能性が考えられる。実際、これまでに魚類の雄において、精巣内に卵細胞をもつ個体あるいは雌特有の血漿タンパク質であるビテロゲニン(VTG)を血漿中に高濃度にもつなどの異常個体が捕獲されている。これらは雌性ホルモン(エストロゲン)作用をもつ環境ホルモンによって生じた現象と考えられている。

VTG は魚類の雌において卵巣で産生される 17β -エストラジオール(E2)などのエストロゲンの作用により、肝臓で合成される卵黄タンパク質前駆物質である。VTG は本来雌特有のタンパク質であるが、雄においても外部からのエストロゲン投与により、肝臓において雌と同様に合成される。したがって雄における VTG は、その魚がエストロゲン作用をもつ物質にどれだけ暴露されたかというマーカータンパク質として、環境ホルモンの影響調査に活用されている。しかし環境ホルモン以外の物質によっても VTG 産生が誘起されるかという検証はあまりなされておらず、雄の魚における VTG 産生と環境ホルモンとの関係は必ずしも明確ではない。

本研究はこのような背景のもと、はじめに日本における環境ホルモン汚染の現状調査の端緒として、漁業および養殖業が盛んである霞ヶ浦において、コイおよびゲンゴロウブナの血漿中 VTG 濃度の測定および精巣組織像の観察を行った。次に雄における VTG の産生が、環境ホルモンだけではなく内因性ステロイドや飼料に含まれる植物エストロゲンなどの物質により誘導される可能性を検証するため、種々のステロイド、植物エストロゲンおよび魚類用飼料について、エストロゲン活性の測定を行った。さらに魚類用飼料による魚類の VTG 産生を明らかにするため、コイに市販の飼料を与え、VTG 遺伝子の発現および VTG 産生について調べた。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. 霞ヶ浦産コイおよびゲンゴロウブナにおける内分泌攪乱化学物質による影響調査

1998 年 6 月から 1999 年 8 月までに 10 回、茨城県桜川村の小野川河口付近の定置網によって霞ヶ浦産天然コイおよび天然ゲンゴロウブナを捕獲し、これらの魚から血液および精巣を採取した。また霞ヶ浦町で養殖された霞ヶ浦産養殖コイから 6 回、茨城県内水面水産試験場の養殖コイから 1 回、天然コイと同様に血液および精巣を採取した。血漿中 VTG 濃度は化学発光免疫測定法 (CLIA) により測定し、精巣は組織観察に供した。また血漿中の性ステロイドは、ラジオイムノアッセイ法により測定した。その結果、天然コイ、養殖コイおよび天然ゲンゴロウブナの雄において、少量の VTG が検出されたものがみられたが、ほとんどの個体において VTG は検出限界(40 ng/ml)以下であった。また、これらの雄では、生殖腺体重比は産卵期に高く、精巣においては産卵期には活発な精子形成が観察され、生殖腺に異常のある個体はみられなかった。さらに雄における血漿中アンドロゲン(テストステロン、T および 11-ケトテストステロン、11KT)、雌における E2 および T は、いずれも正常な範囲内の濃度が検出され、産卵期に上昇する傾向がみられた。また雄の魚における血漿中 E2 は、これまであまり注目されてこなかったが、今回の測定より雄においても雌と同等かそれ以下の濃度で検出された。この結果は、雄自身が産生する E2 により VTG 産生が誘導される可能性を示している。

今回の調査の結果から、霞ヶ浦のコイおよびゲンゴロウブナの雄において少量の VTG が検出されたものの、環境ホルモンによる著しい影響は受けていないことが示唆された。

2. YES assay による種々のステロイド、植物エストロゲンおよび魚類用飼料のエストロゲン活性の測定

霞ヶ浦産コイおよびゲンゴロウブナの雄において少量の VTG 産生を行う個体のみられたが、これらの VTG 産生の原因として、環境ホルモン以外に、魚類自身が産生する内因性ステロイド、飼料中の植物エストロゲンや種々のステロイドなどの可能性が考えられた。そこで本研究では、種々のステロイド(アンドロゲン、プロゲステロンなど)、植物エストロゲンおよびその関連物質、さらに魚類用飼料とその原料についてエストロゲン活性の測定を行った。測定には、ヒトエストロゲン受容体遺伝子を含む組換え酵母を用いた *in vitro* のエストロゲン活性測定法、YES (yeast estrogen-screen) assay を用いた。その結果、アンドロゲン

であるT、ジヒドロテストステロンおよび11KTにおいてエストロゲン活性がみられ、E2に対する相対活性はそれぞれ 3.7×10^{-6} 、 1.2×10^{-4} および 3.0×10^{-6} であった。しかし、霞ヶ浦産コイにおいて検出された血漿中アンドロゲンの濃度から考えると、これらのアンドロゲンがVTG産生を誘導する可能性は低いと考えられた。また、植物エストロゲンについては、ゲニステイン、クメステロール、フォルムオノネチンおよびエクオールにおいてエストロゲン活性がみられ、それらのE2に対する相対活性は $8.6 \times 10^{-6} \sim 1.1 \times 10^{-4}$ であった。これら植物エストロゲンは、魚類が飼料とともに大量に摂取した場合、魚類に対してもエストロゲン活性を示す可能性が考えられた。

魚類用飼料については、17種類の市販の飼料(養殖魚用および鑑賞魚用)およびネガティブコントロールとしてカゼインベースで調製された低エストロゲン飼料(NC)1種類について、それぞれのメタノール抽出物のエストロゲン活性を測定した。その結果、すべての市販の飼料においてエストロゲン活性がみられ、その活性はE2相当量で $<0.1 \sim 6.2 \text{ ng/g}$ (相対活性: $<0.4 \times 10^{-9} \sim 6.6 \times 10^{-9}$)であった。またNCにおいては、エストロゲン活性はみられなかった。したがって、これら市販の飼料を魚類に給餌した場合、そのエストロゲン活性によりVTG産生が起こる可能性が示唆された。また魚類用飼料の原料については、大豆油粕が最も高いエストロゲン活性を示し、これが飼料のエストロゲン活性の主な原因となっていると考えられた。以上の結果から、雄におけるVTG産生の原因として、エストロゲン活性をもつ飼料による可能性も示された。

3. コイにおける魚類用飼料によるビテロゲニン合成

魚類用飼料においてエストロゲン活性がみられたことから、実際にコイにコイ用飼料を与えてVTG産生が誘導されるかどうか調べた。未成熟な当歳魚のコイを 20°C で飼育し、2週間絶食後、14日間、飼料を1日1回体重の2%量給餌した。飼料給餌前、給餌開始後1、3、7および14日目の個体(各5~7個体)について血漿中VTG濃度および肝臓におけるVTG遺伝子の発現を調べた。実験には、市販の飼料であるエクストルーダーペレット(EP)、スチームドライペレット(DP)、浮き餌(FF)および錦鯉用飼料(SW)を用いた。また、ネガティブコントロールとしてNC、ポジティブコントロールとしてNCにE2を 1 mg/g 添加した飼料(PC)を用いた。血漿中VTG濃度はCLIAおよび1次元放射免疫拡散法にて測定した。その結果、NC給餌群において25個体中6個体でVTGが検出された。またPC給餌群においては、1日目にすべての個体(5個体)においてVTGが検出され、以降14日目まですべての個体(20個体)において高い値で検出された。また、市販の飼料を与えたグループにおいては、EP給餌群で1~14日目までに25個体中5個体、DP給餌群では25個体中10個体、FF給餌群では25個体中9個体、SW給餌群では25個体中16個体でVTGが検出された。

次にVTGプローブを用いたノザンプロット解析により、各飼料を与えたコイの肝臓におけるVTG遺伝子の発現を調べた。NC給餌群においてVTG遺伝子の発現を示す個体はみられず、PC給餌群では

1日目(5個体)からシグナルが検出され、以降14日目まですべての個体(20個体)で強いシグナルが検出された。また、EP給餌群においては1～14日目までに25個体中1個体、DP給餌群においては25個体中2個体、FF給餌群においては25個体中5個体、SW給餌群においては25個体中1個体でVTG遺伝子の発現がみられた。血漿中VTGが検出された個体において、遺伝子の発現がみられなかったものがあったが、これは実験開始以前に与えられていた飼料により産生されたVTGが残っていたか、あるいはノザンブロット解析で検出できない程度の遺伝子の発現があった可能性が考えられた。しかしVTG遺伝子の発現がみられた個体ではすべて血漿中VTGが検出されたことから、個体差はあるもののコイ用飼料によってVTGが産生されることが示された。

以上本研究により、正常な魚類の雄においても血漿中に少量のVTGが検出されることが示された。また、このVTGの産生の原因としては、環境ホルモン以外にも、魚自身がつくるエストロゲンあるいは植物性エストロゲンを含む魚類用飼料による可能性があることが示された。これらの成果は、これまで環境ホルモンの指標として用いられていた魚類のVTGが、環境ホルモン以外の物質によっても産生されている可能性を示すものであり、環境ホルモンの影響評価の基準を決定する上で重要な知見となると思われる。