

(10) 下水処理水に曝露した雄コイのビテロジェニン誘導に関する研究

Study of Vitellogenin Induction on Male Carp (*Cyprinus carpio*)
Exposed to Sewage Treatment Plant Effluents

東谷 忠*, 玉本博之*

Tadashi HIGASHITANI*, Hiroyuki TAMAMOTO*

宮本宣博*, 八十島誠*, 田中宏明*

Norihiro MIYAMOTO*, Makoto YASOJIMA*, Hiroaki TANAKA*

ABSTRACT: To investigate whether male fish are really feminized by estrogen-like substances exist in effluent of sewage treatment plants, eight-week exposure tests were performed using carp in water tanks received effluent from a sewage treatment plant. Serum vitellogenin (VTG) was selected as a biomarker of feminization. When the first run of the tests launched in the early spring of 2000, male and female carp were exposed in the same tank receiving treated sewage, VTG concentrations of male carp exposed to the effluent increased with time, while it reduced after the cease of exposure to the effluents. In the control experiment using dechlorinated tap water, increase in VTG was not recognized in male carp. Two more runs of the test were performed in the summer of 2000 and early spring 2001. However, significant increase in VTG could not be observed in male carp. The estrogenic activities in the effluents were almost in the same level throughout all the tests; therefore, the seasonal timing of exposure might be important for understanding this inconsistent phenomenon.

KEYWORD: Endocrine disrupting chemicals, estrogenic effects, *Cyprinus carpio*, vitellogenin, sewage treatment plant effluents

1. はじめに

化学物質の内分泌攪乱作用による魚類への影響として、雄魚の体内に取り込まれた化学物質がエストロゲン（雌性ホルモン）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、精巢の中に卵母細胞をもつ雌雄同体の野生ローチ *Rutilus rutilus* が発見された²⁾。その場所は下水処理場の放流先であったため、下水処理水にはエストロゲン作用をもつ雌化原因物質が含まれていると考えられた。そこで、この疑問を解明するため養殖ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を用いた詳細な研究^{2,9)}が実施された。この研究では、魚類影響の判定は精巢異常およびビテロジェニン (VTG) を指標として、下記1)~4)のとおり進められた。

- 1) 下水処理水放流先河川でのニジマス曝露試験法（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

*独立行政法人 土木研究所 水循環研究グループ

Water Environment Research Group, Public Works Research Institute, Independent Administrative Institution

特定する^{6,9)}。

この結果、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17β-エストラジオール(E2)⁹⁾、エストロン(E1)⁹⁾、17α-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。現在では、自然環境における影響を把握するため、野生魚を対象とした調査が進められている^{10,11)}。

一方わが国では、多摩川のコイ *Cyprinus carpio* を対象とした調査^{12,13)}において、雄コイの精巢異常およびピテロジェニン生成が確認され、英国と同様の問題が提起された。そこで、日本の河川における魚類の雌化について現状を明らかにするため、国土交通省（旧建設省）では1998年度からコイを対象とした魚類実態調査¹⁴⁻¹⁷⁾が開始された。また、この調査に並行して全国的な河川実態調査¹⁴⁻¹⁷⁾や下水道実態調査¹⁸⁻²⁰⁾が実施され、エストロゲン様物質の現況が調べられた。魚類実態調査の結果、季節に関わらず雄コイの一部にピテロジェニン生成が確認され、雌化が引き起こされている可能性が示された。しかし、エストロゲン様物質の水質データとの明確な関係は認められず、その他の影響要因として、雌が排出するエストロゲンや餌に含まれる植物性エストロゲンが影響を及ぼしている可能性があげられた。さらに、生殖周期や成熟状況など、コイの生理的活性が異なることによってピテロジェニン生成に差が生じる可能性があげられた。

わが国の調査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。しかし、直接的な魚類曝露試験は実施されていないため、下水処理水による魚類影響の有無は不明なまま残されている。一方、下水処理水のエストロゲン作用については、英国と同様に、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作用を表わすエストロゲン様活性によって評価する手法が導入され、わが国の下水処理水はエストロゲン作用を有している²¹⁾ことが明らかにされている。

そこで本研究は、下水処理水による魚類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おこない、今後、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。

2. 方法

2.1 対象処理場および試験水

英国では、多数の地点で魚類の雌化を引き起こす物質として、天然エストロゲンである17β-エストラジオールおよびエストロンが報告されている⁹⁾。そこで、本研究を実施する下水処理場として、天然エストロゲンを含む家庭系排水を処理しており、処理および消毒方式としてわが国で一般的な標準活性汚泥処理および塩素消毒を採用している下水処理場を選定した。また、魚類曝露試験には、当該処理場の場内用水として用いられている砂ろ過処理放流水を用いた。

2.2 魚類曝露試験法

(1) 試験魚および影響指標

下水処理水を対象とする本研究の試験魚としてコイ *Cyprinus carpio* を選定し、影響指標として雄コイの血中ピテロジェニンを採用した。

コイは、わが国で初めて雌化が示された魚種^{12,13)}であり、全国的に生息することから魚類実態調査¹⁴⁻¹⁷⁾の対象となった魚種である。実態調査によって今後比較すべきピテロジェニン測定結果が蓄積されると期待でき、何よりも、わが国で最初に示されたコイの問題に対し、その影響の有無や要因を探る必要があると考えられた。

卵黄タンパク前駆物質であるビテロジェニンは、雌の卵巣ろ胞で合成されたエストロゲンが血流を介して肝臓に運ばれ、エストロゲン受容体に結合してビテロジェニン遺伝子を活性化することによって合成される。合成されたビテロジェニンは再び血流を介して卵巣に運ばれ、卵黄に蓄積される。本来、ビテロジェニンは雄には必要ないものと考えられるが、雄もビテロジェニン遺伝子を有しており、エストロゲン作用によってこれを合成するため、雌化を検出する有効な指標¹³⁾とされている。さらに、ビテロジェニンは少量の血液試料を用いて測定できるため、比較的簡便に魚類影響を検出することが可能である。とくに、コイは定期的な採血が可能と考えられ、個体ごとにビテロジェニンの経時的变化を追跡できるものと期待された。

そこで本研究では、体重約1,000gの養殖コイを曝露試験のたびに同一業者から購入し、試験に用いた。

(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。試験水槽を図1に示す。

試験水槽は、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、曝露槽には鳥のいたずら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。よって、6.7L/minとなった。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、濁度および残留塩素濃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²²⁾、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ビテロジェニン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¹³⁾を含んでいない市販の餌(日清飼料株式会社)を週に1回適量与えた。

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。

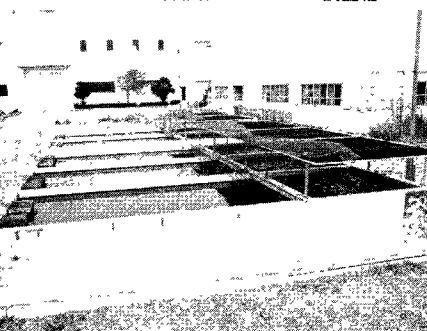
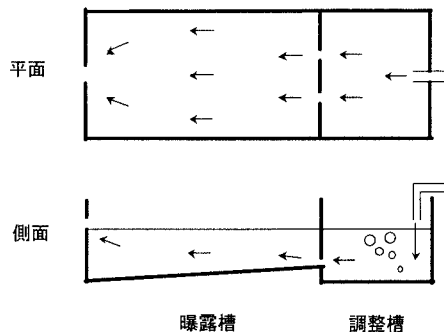


図1 コイ曝露水槽

上; 模式図, 下; 現地設置状況

(4) コイ・ピテロジェニンの測定

コイの血中ピテロジェニン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。

ピテロジェニンの測定は、魚類実態調査と同じくコイピテロジェニン ELISA キット（株式会社トランスジェニック）を用い、添付のプロトコールに従い測定した。

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。コイピテロジェニン ELISA キットには、抗コイピテロジェニン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 標識抗コイピテロジェニン抗体、発色液、1 μ g/mL コイピテロジェニン標準品などがキット化されている。結合反応は、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時間の反応の後、HRP 標識抗コイピテロジェニン抗体を1時間反応させた。この操作によって、抗コイピテロジェニン抗体-コイピテロジェニン-HRP 標識抗コイピテロジェニン抗体のサンドイッチ型複合体が形成される。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濃度依存的に 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ピテロジェニン濃度を算出した。

検量線は、1 μ g/mL コイピテロジェニン標準品を用いて作成した。この2倍希釈によって0.5 μ g/mL から0.0078 μ g/mL まで7段階の標準品を調製した。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0.0078 μ g/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、5倍希釈された血清の定量下限値は、0.0078 μ g/mL の5倍である0.039 μ g/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；0 μ g/mL）以下の場合、不検出（ND）とした。

なお、血清試料およびピテロジェニン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、17 β -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。

組換え酵母法によるエストロゲン様活性は、大阪大学大学院西原教授および Brunel 大学 Sumpter 教授から譲渡された遺伝子組換え酵母を用いてそれぞれ Nishikawa et al.²³⁾および矢古宇らの方法²¹⁾に従い測定した。ここではこれら2株をそれぞれ Two-hybrid 株および Sumpter 株と呼ぶ。これら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。よって、 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。なお、Two-hybrid 株にはこれらに加えて哺乳類細胞に存在するコアクチベーター発現遺伝子（エストロゲン受容体応答部位の反応を促進してレポーター遺伝子に伝えるタンパク質群を生成する遺伝子）が組み込まれている。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。なお、この活性は17 β -エストラジオールによる活性に換算した値〔単位；ng/L(E2)〕として表現する。

天然エストロゲンである17 β -エストラジオールの測定は、調査マニュアル²⁴⁾に従い実施した。この測定はコイピテロジェニンと同じく ELISA 法であり、市販キット（Assay Designs, Inc.）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²⁵⁾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²⁶⁾が指摘されている。そこで、第4回試験では LC/MS/MS による17β-エストラジオール、エストロン、17α-エチニルエストラジオールの分析を試みた。分析方法は、土木研究所水質チームにおいて検討中の方法^{26,27)}に従い実施した。

水試料は、コイ曝露槽からガラス瓶に採水し、保冷した状態で実験室に持ち帰った後、すみやかに測定項目ごとの前処理操作をおこなう分析用濃縮試料とした。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. 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。第2回試験では雄コイのビテロジェニン誘導を抑制する対策を探るため、オゾン酸化および希釈を採用した。また、第1回試験の結果から雌の排泄するエストロゲンが雄に影響を及ぼすことが考えられたため、第3回試験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。さらに、第4回試験では、第1回および第2回の試験結果から季節によって影響が異なると考えられたため、第1回試験と同じ季節に雄のみを用いて試験を実施した。コイの性別は、試験終了後に生殖腺を観察して決定したが、第3回および第4回試験ではあらかじめ雌雄を決定しておく必要が生じたため、精液を放出する個体を雄と決定し、さらに購入時のビテロジェニン値を参考に雌雄を仮定して試験に着手した。

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ビテロジェニン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ビテロジェニンの正常値を明らかにすることをめざした。試験は、経時的変化を詳しく調べるため、

表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	

試験期間を8週間と設定し、1週間ごとのビテロジェニン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匹は試験途中に死亡したため、途中から雄のみの試験となった。処理水試験区のビテロジェニン測定結果を図2に示す。

下水処理水に曝露した雄のうち4個体では、時間の経過とともにビテロジェニンが上昇し、4週目には1,000 $\mu\text{g/mL}$ ほどに達する個体が現れた。その後、変動はあるもの曝露期間中は1 $\mu\text{g/mL}$ 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週後にはビテロジェニンの低下する様子がみられた。曝露中のコイビテロジェニン最高値は1,400 $\mu\text{g/mL}$ であった。また、雄1個体ではビテロジェニン生成は認められなかった。曝露後に精巢を確認した結果、ビテロジェニンを生成した雄4個体の GSI 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個体すべてのビテロジェニンは定量下限値0.039 $\mu\text{g/mL}$ 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。

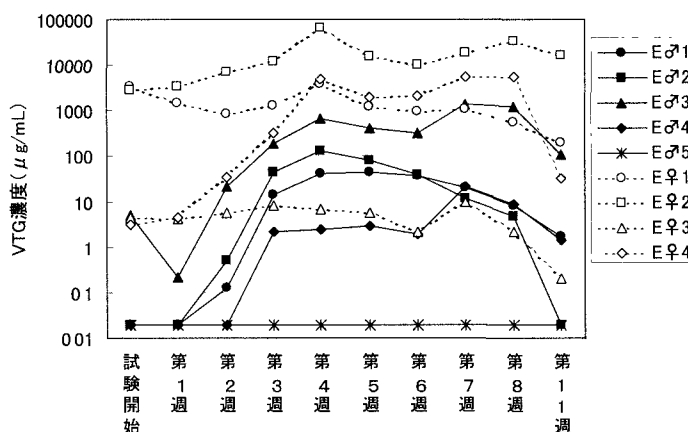


図2 下水処理水に曝露したコイの VTG 経時変化 (Run1)

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ビテロジェニン誘導が認められた。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²⁰⁾。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、ビテロジェニン測定間隔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2に示す。この結果、いずれの試験区においても雄のビテロジェニンは誘導されなかった。

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、あらかじめビテロジェニンを測

表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
10% 処理水	♀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
	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
1% 処理水	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
	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
	♀平均値	±60.1 ±277.4	±3236.7	±2213.9	±975.5	±1.1	
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

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週間ごとにピテロジェニンを測定した。Run3の結果を表3に示す。この結果、6週間後までいずれの試験区においても雄コイのピテロジェニン誘導は確認されず、雌の排泄するエストロゲンの影響はみられなかった。

3.4 第4回試験(Run4) 2001年2月～4月

Run1および Run2の結果、Run1では雄のピテロジェニンが誘導され処理水による影響が発生したと考えられたが、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週間ごとにピテロジェニンを測定した。Run4の結果を表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ピテロジェニンは誘導されなかった。

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、雄にピテロジェニン誘導がみられた 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

表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
ND 不検出, Tr 定量下限値 0.039 μg/mL 未満	3-♂23	ND	ND	Tr
	3-♂24	Tr	ND	Tr
	3-♂25	Tr	Tr	Tr

表4 コイの VTG 経時変化 (Run4)

試験区	個体	VTG濃度 (μg/mL)					GSI (%)	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				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	-	O ₃ 10mg/L 処理水	4-♂21	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	4.9
	4-♂2	ND	Tr	Tr	ND	ND	1.8		4-♂22	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	6.0
	4-♂3	ND	Tr	Tr	ND	ND	-		4-♂23	ND	ND	Tr	ND	ND	7.8
	4-♂4	ND	ND	Tr	ND	ND	10.3		4-♂24	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	6.6
	4-♂5	ND	Tr	Tr	ND	ND	7.8		4-♂25	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	2.0
	4-♂6	ND	ND	Tr	ND	ND	-		4-♂26	ND	ND	Tr	ND	Tr	5.3
	4-♂7	ND	ND	Tr	ND	ND	13.6		4-♂27	ND	ND	Tr	Tr	ND	2.2
	4-♂8	Tr	Tr	Tr	ND	ND	5.1		4-♂28	ND	Tr	0.07	Tr	ND	6.6
	4-♂9	ND	ND	Tr	ND	ND	4.6		4-♂29	ND	ND	Tr	ND	ND	7.5
	4-♂10	1.03	0.65	0.29	Tr	Tr	8.3		4-♂30	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	6.8
10% 処理水	4-♂11	ND	Tr	Tr	0.04	ND	6.2	O ₃ 2mg/L 処理水	4-♂31	ND	ND	Tr	Tr	ND	7.2
	4-♂12	Tr	ND	Tr	Tr	Tr	4.3		4-♂32	ND	Tr	Tr	ND	ND	3.9
	4-♂13	0.08	0.08	0.07	Tr	0.05	7.8		4-♂33	ND	ND	Tr	ND	ND	8.6
	4-♂14	ND	ND	Tr	ND	ND	-		4-♂34	ND	Tr	Tr	ND	-	-
	4-♂15	0.09	0.07	0.04	ND	Tr	3.7		4-♂35	ND	ND	ND	ND	ND	7.1
	4-♂16	Tr	Tr	Tr	-	-	-		4-♂36	ND	ND	ND	ND	ND	-
	4-♂17	Tr	Tr	Tr	ND	0.05	3.3		4-♂37	ND	ND	Tr	Tr	ND	-
	4-♂18	ND	ND	ND	ND	ND	-		4-♂38	ND	Tr	Tr	ND	Tr	-
	4-♂19	-	Tr	Tr	ND	Tr	6.6		4-♂39	2.52	1.89	1.02	-	-	-
	4-♂20	-	-	Tr	ND	Tr	3.0		4-♂40	ND	ND	Tr	-	-	-
ND 不検出, Tr 定量下限値 0.039 μg/mL 未満								対照	4-♂41	0.06	Tr	0.05	ND	Tr	-
									4-♂42	Tr	ND	-	-	-	-
									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

表5 エストロゲン様活性および 17 β -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	開始	第2週	第4週	第6週	開始	第2週	第4週	第6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
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	0.9	1.9	0.3	1.0	0.7	0.1	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.5	8.6
	対照	1.5	ND	ND	ND	ND	1.0	0.7	0.7	2.0	0.6	Tr(0.07)	ND
Two-hybrid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
	O ₃ -10mg/L処理水	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	9.9	0.5	ND	ND
	O ₃ -2mg/L処理水	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38.8	41.4
	対照	ND	ND	ND	ND	2.9	ND	1.7	ND	ND	ND	ND	ND
Sumpter株													
Sumpter株													
Sumpter株													

ND 検出下限値未満, Tr 検出下限値以上, 定量下限値未満

表6 下水処理水試験区におけるエストロゲン濃度比較 (Run4)

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

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17 β -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17 β -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6参照)。ELISA 法では、17 β -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²⁹⁾と考えられ、17 β -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、17 β -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

表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	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
	0.1 ≤ Tr < 0.3	—	—	—	—	—	0.55	0.31	Tr(0.19)	Tr(0.20)	Tr(0.16)	ND	ND	ND	ND	ND
	ND < 0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND
	(μg/L) 対照	ND	ND	ND	ND	ND	0.56	0.30	Tr(0.16)	Tr(0.15)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	NPnEO (1 ≤ n ≤ 4)	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
NPnEO (5 ≤ n)	100%処理水	—	—	—	—	—	Tr(0.24)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0.1 ≤ Tr < 0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.72	2.05	1.27	ND	ND
	ND < 0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND
	(μg/L) 対照	ND	ND	Tr(0.13)	Tr(0.13)	ND	Tr(0.28)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	NPnEO (5 ≤ n)	ND	ND	ND	ND	ND	0.45	2.38	ND	1.09	ND	0.51	6.21	1.84	ND	ND
水温	100%処理水	—	—	—	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.73	ND	ND	ND
	0.1 ≤ Tr < 0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.42	4.45	ND	ND	ND
	ND < 0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	ND	1.17	ND	ND	ND
	(μg/L) 対照	ND	ND	ND	ND	ND	Tr(0.28)	ND	ND	ND	ND	ND	1.17	ND	ND	ND
	水温 (°C)	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	—
水温	100%処理水	—	—	—	—	—	—	30.4	30.7	32.1	29.7	12.0	12.4	12.0	15.0	—
	0.1 ≤ Tr < 0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.9	14.2	15.6	16.0	—
	ND < 0.1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.0	11.0	12.7	13.3	—
	(°C) 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	—
	水温 (°C)	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	—

ND 検出下限値未満, Tr 検出下限値以上, 定量下限値未満

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。

4. 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個体にビテロジェニン誘導が確認され、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ビテロジェニンの低下がみられ、また対照区では雄のビテロジェニン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ビテロジェニン最高値は870μg/mL¹⁴⁻¹⁷⁾であったのに対し、処理水に曝露した場合には1,400μg/mL まで達することが確認された。しかし、Run2以後の試験では雄のビテロジェニン誘導は再現されず、下水処理水に曝露した雄コイにビテロジェニン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、雄コイのビテロジェニン誘導に差がみられたことは、ビテロジェニン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ビテロジェニン測定結果¹⁴⁻¹⁷⁾を図3に示す。これを見直すと、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ビテロジェニン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、春には雄コイのビテロジェニン生成が確認された。また、多摩川における調査でも、早春に雄コイのビテロジェニンが上昇する傾向が示されている¹³⁾。

早春に雄コイのビテロジェニンが誘導される原因について、コイの内分泌²⁹⁾や生殖周期³⁰⁾などの生理学的知見をもとに考えてみたい。コイ科魚類の生殖サイクル模式図を図4に示す。

春の産卵期を迎えるため、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

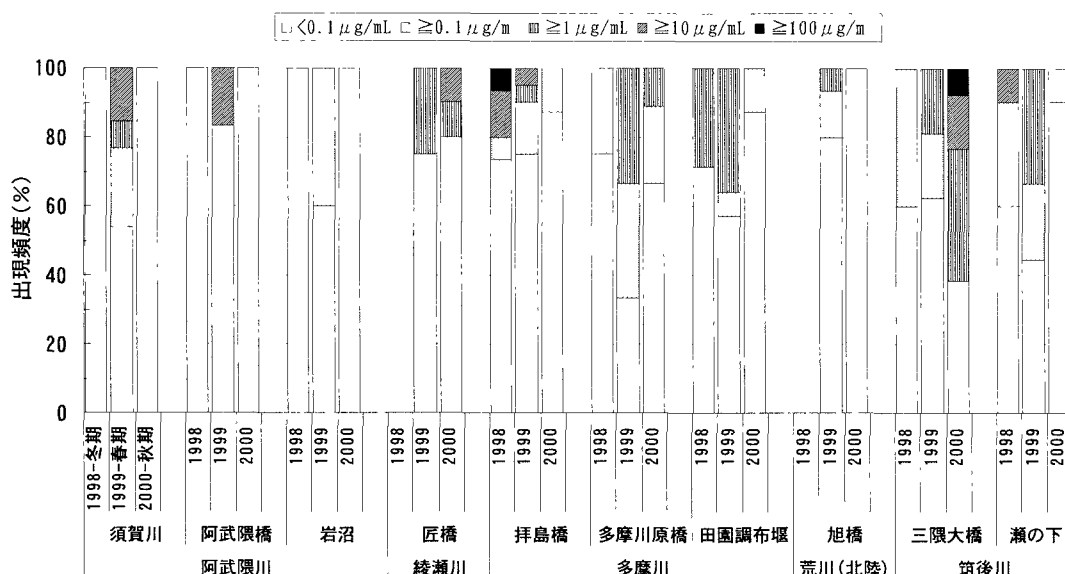
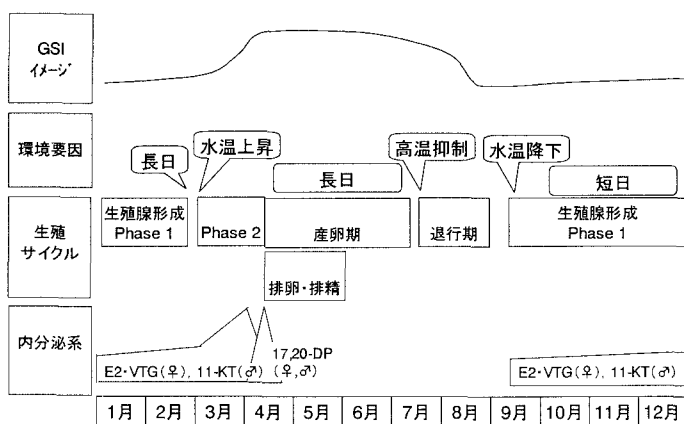


図3 コイ VTG 地点別調査結果 (国土交通省魚類実態調査結果 1998-2000 年)

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^{29,31)}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ピテロジェニン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、その結果ピテロジェニン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で雄のピテロジェニン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が進まなかったことが考えられる。Run1の対照試験区では雄のピテロジェニン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



E2 17β エストラジオール、VTG ピテロジェニン、11-KT 11-ケトテストステロン
17,20-DP 17α,20β ヒドロキシプロゲステロン

図4 コイ科魚類の生殖サイクル模式図
(文献 28, 29 をもとに作成)

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。

アロマトーゼの作用および雌の同所性によるピテロジェニン誘導の仮説を確かめるには、早春に雄単独試験区および雌雄同所試験区を設けてこれを調べる必要がある。この際、アロマト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³²⁾であるため、ピテロジェニン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られる。さらに、体内のエストロゲンおよびアンドロゲンを測定することによって、コイの生理的な状況とともにピテロジェニン誘導に関連する要因を明らかにできると考えられる。

また、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ピテロジェニン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、つまりピテロジェニン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。

5. まとめ

- 1) 下水処理水にコイを直接曝露する試験方法を検討し、曝露試験を実施した。この結果、早春に雄と雌を同時に曝露した場合に雄コイのピテロジェニン誘導が確認された。
- 2) 雄コイのピテロジェニンは、曝露開始から4週間上昇を続けた。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。このことから、雄コイの血中ピテロジェニンは3～4週間で曝露による影響が表れることが明らかとなった。
- 3) 雌の排出するエストロゲンが雄に影響を及ぼす可能性が指摘されていたので、秋季に水道水を用いて雌雄を同所的に飼育する試験をおこなったが、そのような影響は観察されなかった。
- 4) 雄、雌を分けて下水処理水で飼育する実験を夏季および早春におこなったが、雄のコイからはピテロジェニンの誘導は認められなかった。
- 5) 下水処理水による曝露試験では、処理水のエストロゲン作用に大きな変動は認められなかったため、雄コイのピテロジェニンの上昇が認められた原因として、処理水のエストロゲン作用のほかに雄のピテロジェニン生成にかかわる内因性の生理学的な要因がある可能性がある。
- 6) 今後の魚類曝露試験では、生理的観点に基づき、ピテロジェニンだけでなくエストロゲン、アンドロゲンおよび EROD など他の指標を組み合わせることが必要と考えられた。

謝辞

本研究の計画および実施にあたりご指導いただいた、有蘭幸司熊本県立大学教授、原彰彦北海道大学教授に厚く御礼申し上げます。また、試験実施にご協力いただいた下水処理場関係者の方々に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) デボラ・キヤドバリー; 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) Harnes 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) Sumpter J.P.: Research in the Fresh Environment, UK-Japan Joint Workshop on Endocrine Disrupting Chemicals Report, Environment Agency, Government of Japan, pp.113-118, 1999
- 12) 中村将, 井口泰泉; 多摩川にみる魚類の異変, *科学*, 68(7), pp.515-517, 1998
- 13) 原彰彦; 内分泌攪乱物質の生態影響-魚類への影響-, *廃棄物学会誌*, 10(4), pp.278-287, 1999
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 建設省; 下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査・中間報告について, <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewage/information/naibunp990823.html>, 1999
- 19) 建設省; 平成11年度下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告について, <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewage/information/naibunpi000419.html>, 2000
- 20) 国土交通省; 平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査の結果について, <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewage/kisha/naibun010509.html>, 2001
- 21) 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, pp.199-208, 1999
- 22) 落合明, 鈴木克美; 観賞魚解剖図鑑I, 緑書房, 1997
- 23) Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M. and Nishihara T.: New Screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154, pp.76-83, 1999
- 24) 社団法人日本下水道協会; 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル, 1999
- 25) 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
- 26) 高橋明宏, 小森行也, 矢古宇靖子, 岡安祐司, 斎藤正義, 東谷忠, 田中宏明; 下水試料中の女性ホルモン測定法の課題—LC/MS/MSとELISAの比較から—, 第3回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.175-176, 2000
- 27) 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
- 28) 社団法人日本下水道協会; 下水道施設計画・設計指針と解説2001年版, 平成13年5月
- 29) 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
- 30) 羽生功; 生殖周期, *魚類生理学*, 恒星社厚生閣, pp.287-325, 1991
- 31) 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
- 32) 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