

# 水環境中における植物プランクトン（藻類）のエストロゲン様作用—野外定期調査から—\*

肥田 嘉文

## 1. はじめに

1990年代に新しいタイプのリスク<sup>1)</sup>として懸念された内分泌かく乱化学物質においては、その後“リスクとしての小ささ”や、内分泌かく乱という問題（現象）自体の捉え方等への指摘がなされてきた<sup>2,3)</sup>。ここでは、そういった指摘への一つの取り組みとして、藻類が過剰繁茂する環境水での水質の特徴に着目して、迷いを吐露しつつ<sup>4)</sup>も始めた野外定期調査の内容を述べたいと思う。

## 2. 複数のニゴロブナ種苗生産池の水質、魚類調査

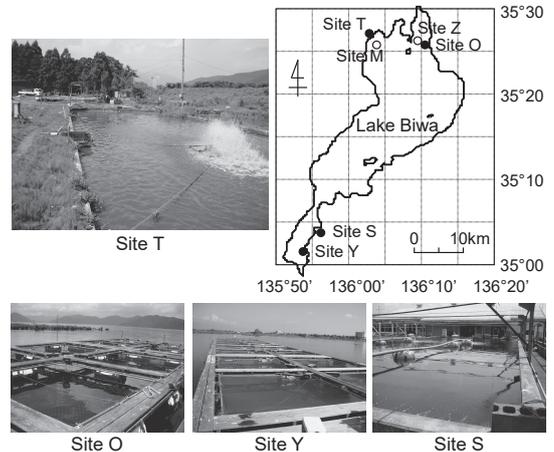
### 2.1 調査地の背景

当初、内分泌かく乱物質の発生源とされていた下水道排水が流入する休耕田での調査を手がけ、その対照調査地としたニゴロブナ種苗生産（飼育）池が、のちの本調査地となった。ニゴロブナの資源回復のため、1990年代から種苗生産放流事業（春先にふ化した仔魚を10~11月頃まで種苗生産池で育成して、琵琶湖へ放流する事業）が毎年実施されている。このうち、藻類（植物プランクトン）が過剰繁茂する調査地Tを主調査地として、他の3地点と比較する形で、2005年度に水質定期調査と放流時魚類調査を行った（図1、表1）。

調査地Tは河川水が流入する水の入れ替えの少ない土壌池、調査地O、Yは琵琶湖北湖、南湖の湖上網生簀、調査地Sはコンクリートで囲まれた池で、琵琶湖湖水をポンプアップして利用している。配合飼料は、ふ化から2週間後から給餌するが、植物性（大豆）油かすを10~20%程度含み、天然のエストロゲン（女性ホルモン）様物質であるイソフラボン類の供給源となる。

### 2.2 放流魚の飼育期間中のエストロゲン暴露の状況

水環境中のエストロゲン様物質による暴露状況の指標として用いられる血中ビテロゲニン（VTG）濃度は、個体密度が最も高い調査地Sの栽培魚の雌雄で高かった（図2A）。これは、魚の排泄物由来と考えられる飼育水中の高い体内エストロゲン（エストラジオール（E2）、エスト



\* Site MとSite Z (○)にて、2005年秋放流魚の琵琶湖での追跡調査、および琵琶湖成熟魚(≥1+)の調査を行った。なお魚齢(数え年)は、生後1ヵ年未満を0+, 1ヵ年以上2ヵ年未満を1+と表す。

図1 ニゴロブナ種苗(0+)生産池の外観(2005年度)

表1 ニゴロブナ種苗生産池の概要と水質(2005年度)

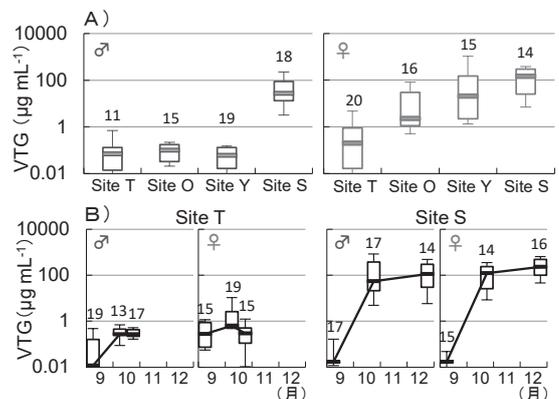
調査地	調査地 T	調査地 O	調査地 Y	調査地 S
飼育環境	土壌	網生簀	網生簀	コンクリート
流入水	河川水	琵琶湖水	琵琶湖水	琵琶湖水
換水率(回 日 <sup>-1</sup> )	0.2	-*1	-*1	5
個体密度(尾 m <sup>-2</sup> )*2	62	130	260	310
SS(mg L <sup>-1</sup> )*3	110±92	1.2±1.3	1.6±1.2	11±7.7
Chl.a(μg L <sup>-1</sup> )	360±370	2.2±0.6	5.4±1.6	5.0±2.6
E2(ng L <sup>-1</sup> )	4.5±2.0	0.7±0.1	1.0±0.2	1.7±0.2
E1(ng L <sup>-1</sup> )	16±6.7	1.8±0.4	2.5±0.8	6.3±2.1
放流日	10月27日	10月20日	10月24日	11月30日
放流尾数 (% of 1,657,000)	438,000 26%	79,000 5%	560,000 34%	580,000 35%

\*1 周囲の湖水に対して開放系。\*2 放流時。\*3 平均値±SD。



Yoshifumi Hida  
農学博士

平成4年 東北大学大学院農学研究科博士前期課程修了  
同年 大塚製薬(株)大津研究所  
8年 京都大学大学院農学研究科博士後期課程  
11年 同大学大学院退学  
同年 滋賀県立大学環境科学部助手  
31年 同学部講師



\*データは10%・90%タイル値、中央値、第1・第3四分位数を、数字はn数を示す。

図2 ニゴロブナ放流魚(0+)の血中ビテロゲニン(VTG)濃度(2005年)(A)と飼育期間中の経時変動(2008年)(B)

\* Estrogen-Like Effects of Phytoplankton (Algae) in Water Environment: A Study Based on Periodic Field Research

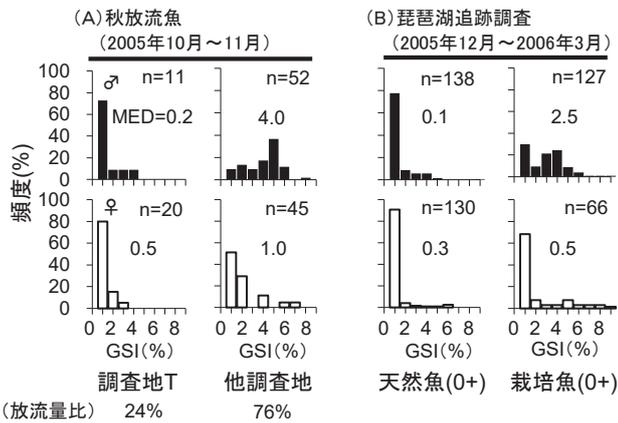


図3 2005年生まれ秋放流魚(0+)のGSI頻度分布(A),および琵琶湖へ放流後に追跡,採捕した2005年生まれ天然魚(0+)と秋放流魚(0+)のGSI頻度分布(B)

ロン(E1):ELISA法で測定)濃度(表1)が原因と考えられた。つまり,飼育水中の排泄物を魚が再摂取することによる影響と考えられた。一方,同様に飼育水中の体内エストロゲン濃度が高かった調査地Tでは低値となり,調査地O,Yの雌は調査地T,Sの間の値となった。

また飼育期間の血中VTG濃度( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )の経時変動を2008年度に調査地T,Sにて調査した(図2B)<sup>5)</sup>。その結果,調査地Tでは9月から10月において中央値1以下の低値で推移した一方,調査地Sでは9月には調査地Tと同レベルだった濃度が10月以降,雌雄ともに上昇し,中央値で100のオーダーに達し,両地点の相違が2005年度と同様に見られた。

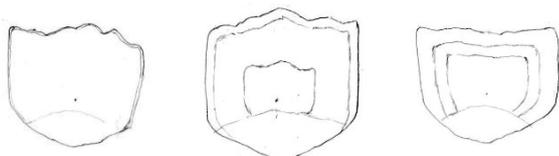
なお,生殖腺重量の体重に対する割合で成熟度をあらわす生殖腺体指数(GSI)で見ても,調査地Tでは雌雄ともに低値側への分布が見られ(図3A),他の調査地の放流魚とは異なった。ただ後述する琵琶湖へ放流後の追跡調査において,調査地Tの放流魚の特徴はむしろ同じ2005年生まれの天然魚と類似していた(図3B)<sup>6)</sup>。

### 3. 秋放流魚のその後—放流後の追跡調査

#### 3.1 琵琶湖での定期採捕調査の概要

2005年は秋放流魚(表1)の全個体に耳石標識<sup>7)</sup>が施された年で(通常は一部の年),2005年生まれの魚は標識がなければ天然魚であると判定できることから,放流魚の放流後の経過を天然魚と比較する形で追跡調査

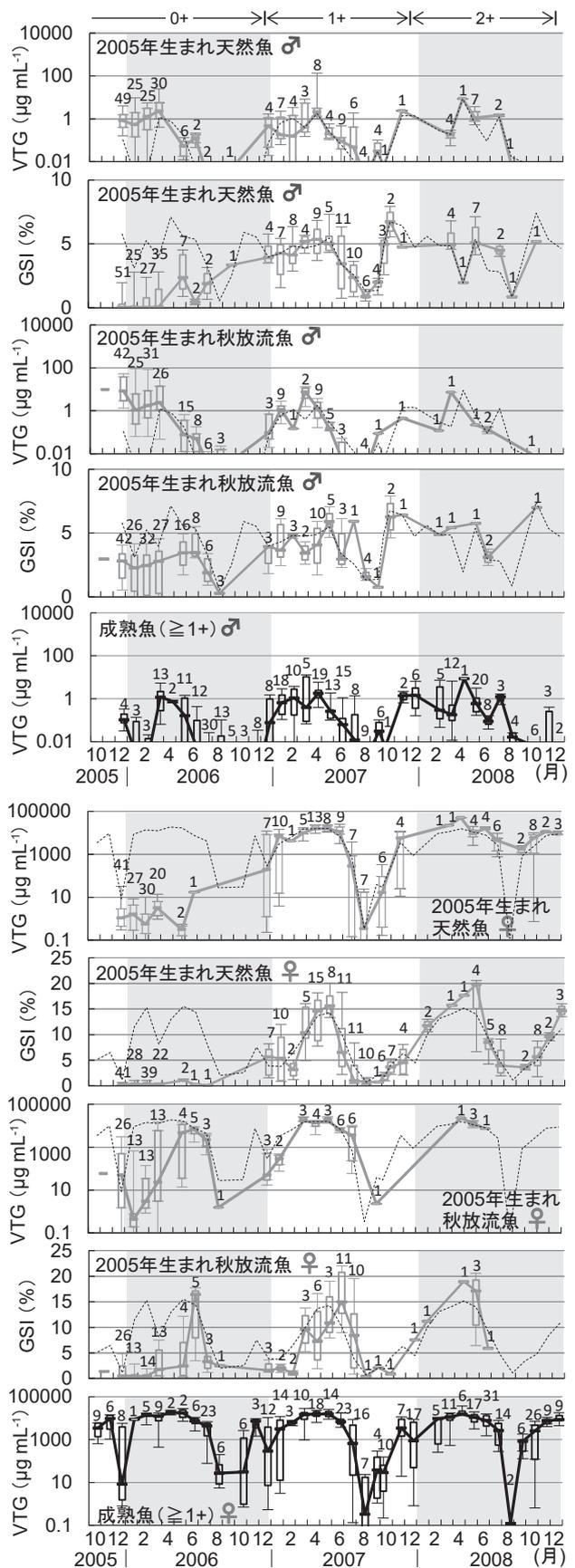
- ① 3月末~12月中旬:[10]の位置をカウントしない(A)。
- ② 9月末~12月中旬:[9]の位置をカウントしない(B)。
- ③ 11月末~12月中旬:[8]の位置は,体重を考慮して限定的にのみカウントしない。つまり,通常はカウントする(C)。
- ④ ~12月中旬:[7]の位置より内側は必ず数える(C)。



A) 魚齢0+O[10] (10月調査)  
B) 魚齢1+O[5-9] (10月調査)  
C) 魚齢2+[7-8] (10月調査)

\*カウントしなかった休止帯がある場合,査定した年齢に「O」の表記を添えて記録した(データ上は査定した年齢で扱った)。

図4 鱗の休止帯によるニゴロブナの年齢査定のコ考え方



\*秋放流魚の2005年11月の値は,種苗生産池4地点の放流魚の放流尾数に応じた加重平均値を表す。データは10%・90%タイル値,中央値,第1・第3四分位値を,数字はn数を示す。

図5 2005年生まれニゴロブナ秋放流魚の琵琶湖における追跡調査の採捕魚と2005年生まれ天然魚,および琵琶湖成熟魚( $\geq 1+$ )の血中VTG濃度,GSIの変動(図中の破線は,成熟魚の中央値を示す)。

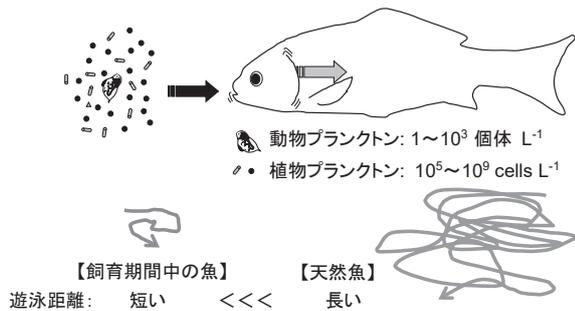


図6 摂餌過程における魚類の植物プランクトンの受動的暴露（魚は鰓耙で濾し摂る過程で、濃度として圧倒的に高い藻類を受動的に取り込み、その量は餌にたどり着くまでの遊泳距離に比例すると予想される。給餌がなされる飼育魚では遊泳距離は短くなる。）

した。琵琶湖北湖の2ヵ所（調査地 Z, M: 図1）にて月に1回の頻度で漁業者に依頼して実施し、12月末～4月末の期間は小型機船曳き網（地方名「沖曳き網」）を用い、その後は、刺し網、罎（一部は釣り）によっても採捕した。また別途調査した個体を含む成熟魚（ $\geq 1+$ ）データとの比較を行った。なお、サイズが小型の個体については、県より特別許可を受けて採捕を実施した。

### 3.2 魚体の同定に関する判断基準

調査で採捕したフナを同定して、ニゴロブナのみの結果を示した。秋放流魚以外にも複数種が放流されているが、相互に識別可能な標識を施しており、それらは以下のように扱った。(1) 天然魚：2005年生まれの無標識魚に加えて、配合飼料が給餌されない水田放流魚（耕作水田にニゴロブナのふ化仔魚を放養し、20 mm サイズにまで育成して放流する事業による）を含めた。(2) 秋放流魚：前述のとおり、仔魚を配合飼料にて10～11月頃まで飼育した標識魚のみをこの分類の対象とした。(3) 成熟魚（ $\geq 1+$ ）：1～2ヵ月の短い期間のみ配合飼料で飼育し夏季に放流する個体を含む、1+以上の全調査魚。

### 3.3 鱗による年齢査定判断基準

魚体の胸鱗に隠れる部位から鱗を複数枚採取し、鱗紋（休止帯）の本数により、外観および体重も考慮して年齢査定を行った。周年での年齢査定では、12月下旬には少なくともその年の年頭の（前年度の）冬季に形成された

新たな休止帯は完成していると考え、春先（3月）～12月中旬の期間に鱗外周に認められる前冬季のものと考えられる最外殻の休止帯はカウントせず、「12月下旬に一斉に年齢が繰り上がる」という考え方で査定した。具体的には、休止帯の位置を内側から [1]～[10] と区切り、図4のように行った。耳石標識のパターンが限られるため、年齢査定が分類、同定にとって重要となる。

### 3.4 秋放流魚と天然魚の血中VTG季節変動周期の比較

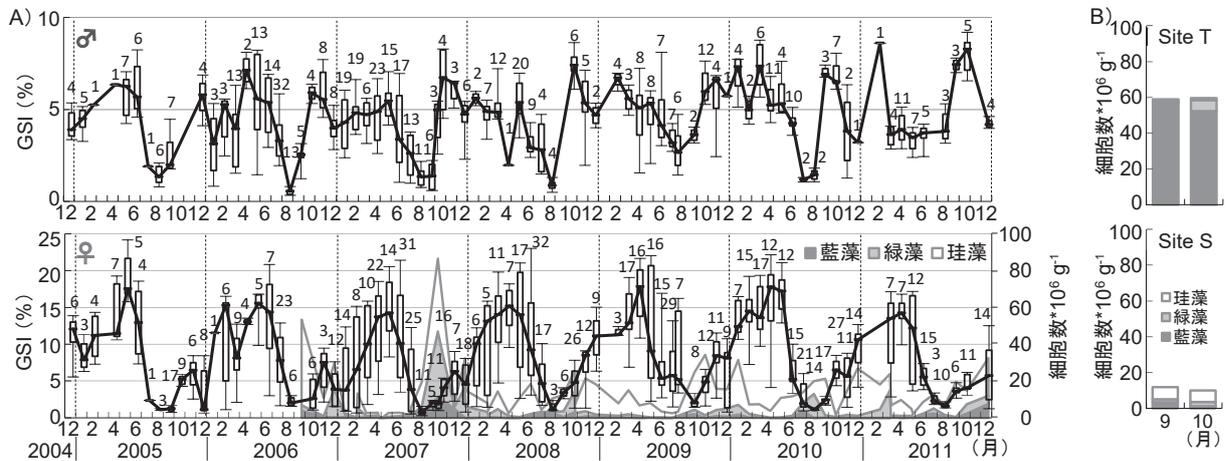
放流後から1年目（0+期）までの放流魚の経過は、雌雄ともに放流時に高濃度側に分布したVTG濃度が1月にかけてすみやかに低下して、雄では産卵期後の8月まで天然魚と同様の変動を示し、誘導されたVTG濃度の上昇は一過性と考えられた（図5）。一方、雌では、天然魚と異なり、0+期で産卵期の6～8月にかけて大きく上昇し、中央値は成熟魚（ $\geq 1+$ ）の産卵期に見られる濃度と同レベルの約20,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ にまで達した。これは、飼育期間に受けた体内由来エストロゲンの暴露影響が、魚体の早熟という形で遅発的に生じたものと推察された。

そして、放流後2年目（1+期）、3年目（2+期）までを比較すると、雄では2+期の2008年まで両者の変動パターンが維持され、放流魚の方が約1ヵ月先行する傾向にあった。一方、雌では約2ヵ月、放流魚の変動パターンが遅れる傾向にあったが、2+期の2008年ではn数が少ないながら、2ヵ月という大きなズレは認められなくなったようであった。そして、図5（および図7A）の成熟魚は、このような特徴の秋放流魚、天然魚の2種が毎年加入して形成される集団全体と見ることができる。

### 4. 植物プランクトンの暴露量と生殖腺成熟との対応

懸濁物質（SS）としての植物プランクトンによる暴露状況（図6）と見ることができる腸管内容物中の細胞数を調べ、成熟魚（ $\geq 1+$ ）（図5、図7A）および放流魚（図7B）の生殖腺成熟との対応を検討した。腸管内容物は消化の進んでいない部分のみをサンプルとして用い、植物プランクトンの種を同定し、湿重1 gあたりの細胞数を求めた。なお給餌が日中のみで夜間に摂餌していない飼育魚では、夕方の採捕調査により評価した<sup>5)</sup>。

成熟魚（ $\geq 1+$ ）の雌では産卵期後の8～9月にVTG濃度の低下が認められたが、それに加えて植物プランクト



\*データは10%・90%タイル値、中央値、第1・第3四分位数を、数字はn数を示す。

図7 琵琶湖の成熟ニゴロブナ（ $\geq 1+$ ）の生殖腺体指数（GSI）と腸管内容物中植物プランクトン細胞数の季節変動（A）、および調査地 T, S の2008年秋放流魚（0+）の飼育期間中の腸管内容物中植物プランクトン細胞数（9, 10月）（B）

ン細胞数の増加が見られる時期（2006年10月、12月、2007年10月、12月、2008年10月など）に濃度の低値側への分布が認められる傾向にあった。一方2008年では、12月から1月にかけてのVTG濃度の明瞭な減少が認められず、このことと秋以降、過去2年に比べ植物プランクトン細胞数が低値で推移したこととの関連が推察された。

## 5. 観察結果から考えられること

ニゴロブナ種苗生産池で、飼育水中の体内エストロゲンが高濃度であるにもかかわらず、調査地Tにおいては魚体がその影響を受けていないことから、過剰繁茂する藻類由来のエストロゲン様物質が、それを摂取する飼育魚（図7B）の血中VTG生成に対して抑制的に働く可能性が推察された。一方で、2005年放流魚で多くを占めたその他の調査地の飼育魚では、摂餌過程での遊泳距離が短くなる（図6）ことで藻類暴露量が少なく（図7B）、魚の排泄物由来の飼育水中の体内エストロゲンによる暴露影響を受ける結果として、放流魚の生殖腺成熟の季節変動周期が天然魚とはズレを生じることが考えられた。

また、飼育環境下において未成熟である放流魚（0+）の雄のGSIが高値傾向（図3A）となる現象は、藻類の暴露量が少ないことに加え、大豆イソフラボンを含む配合飼料を代わりに主として摂取することで、自然環境下で受ける藻類によるエストロゲン様作用の影響が減弱されることをあらかず結果ではないかと考えられる。つまり、いずれも体内エストロゲンよりも弱い活性をもつ藻類と配合飼料（植物エストロゲン）のうち、より低い活性をもつ配合飼料が摂取源として優占することで、自然下での生殖腺成熟に対する抑制側への作用が一部解除された現象と解釈できる。この拮抗現象は、同じホルモン体系をもつ人において大豆製品の摂取と乳がん発生率の減少とが関連する<sup>8)</sup>とする見方と共通する現象と考えられる。

以上、体内ホルモンにより制御される魚類の生殖腺発達の周年サイクルに、藻類が相互作用している可能性を示すことは、内分泌かく乱とされてきた現象を自然現象と同等のものとして捉えることにつながると考えられる。

## 6. おわりに

室内の毒性評価でこぼれる部分をカバーする野外調査をと考え取り組んできた。結果として、大量の懸濁物質（SS）を含む環境水のろ過量に応じて増える、ろ紙の使用枚数に比例した（ろ紙の不純物：結合剤）エストロゲン様活性<sup>9)</sup>を藻類由来の活性と誤解して始めた研究が今日までつながっており、不思議な因縁を感じる。バイオアッセイによるエストロゲン活性の総量評価<sup>10)</sup>により、藻類がもつ活性の真の評価に今も格闘している。

バックグラウンドを一つの安全レベル<sup>11)</sup>と見て評価する、明日とるべき行動を考え出す結論を、といった内山充先生の言葉<sup>12)</sup>は、何度も読み返しこれまで研究を続ける上での励みとしてきた。その門下の畝山智香子氏が世界の研究動向やその雰囲気伝えてくださる情報<sup>13, 14)</sup>にもずい分、助けられた。そして何を置いても中西準子先生のリスク論の考え方<sup>2)</sup>に対する自分の理解として、比較することを重ねてきたのが本研究だった。

最後に、この研究分野の傍流である自分にこの場を与えていただいたことに、心から感謝したい。

## 謝辞

ニゴロブナ魚体の耳石標識の分析、亜種および魚齢の同定にご指導、ご協力をいただいた滋賀県水産試験場の根本守仁氏、ニゴロブナVTGの測定系の確立にご指導、ご協力をいただいた水産総合研究センター北海道区水産研究所（当時）の松原孝博氏、種苗生産池調査および放流魚、天然魚の琵琶湖での採捕調査にご協力いただいた滋賀県漁業協同組合連合会高島事業場（当時）の小林眞氏、財団法人（当時）滋賀県水産振興協会の各氏、朝日漁業協同組合の松岡正富氏ほかの各氏、百瀬漁業協同組合の戸田猛氏ほかの各氏、酵母ツーハイブリッド試験系によるエストロゲンアッセイ法の酵母株の譲渡およびご指導をいただいた独立行政法人国立環境研究所（当時）の白石不二雄氏、鎌迫典久氏ほかの各氏、貴重な時間を割いて助力をいただいた学部の同僚に深く感謝申し上げます。また、本調査データは研究室の歴代の指導学生の存在なくしては取り得なかったものであり、苦勞をかけたお詫びと、心からの感謝を記したい。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金（2004年～2006年度、課題番号：16710035）により行われた。

## 参考文献

- 1) 蒲生昌志, 2010. 意思決定の社会ニーズに応えるリスク評価へ。日本リスク研究学会 第23回シンポジウム講演予稿集, pp.5-8.
- 2) 中西準子, 2004. 環境リスク学-不安の海の羅針盤-. 日本評論社, 東京.
- 3) 安井至, 小出重幸, 2006. 環境ホルモン問題からなにを学ぶのか? チビコト: ロハスの環境ホルモン学 (ソトコト1月号別冊), 20-27.
- 4) 肥田嘉文, 2005. 琵琶湖と環境「環境ホルモン研究」①~⑩. 中日新聞広域滋賀版 (3月7日~5月23日).
- 5) Hida, Y., Yamada, Y., OOkura, H., Shibata, T., Nakamura, M., Kitao, K., Kurata, T., 2009. Interpretation of the "endocrine disruption" phenomenon based on the interaction of algal estrogens with gonadal maturation in fish. SETAC North America 30th Annual Meeting Abstract book, p.247.
- 6) 大倉英也, 山田祐輝, 肥田嘉文, 2007. 植物プランクトンが関わる自然起源エストロゲン暴露シナリオの評価. 第41回日本水環境学会年会講演集, p.209.
- 7) 藤原公一, 白杵崇広, 根本守仁, 北田修一, 2010. アリザリン・コンプレクソンを用いたニゴロブナ *Carassius auratus grandoculis* の耳石への多重標識装着条件と放流サイズの推定方法. 日本水産学会誌 76(4), 637-645.
- 8) Yamamoto, S., Sobue, T., Kobayashi, M., Sasaki, S., Tsugane, S., 2003. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. Journal of the National Cancer Institute 95(12), 906-913.
- 9) 戸田珠実, 肥田嘉文, 竹原宗範, 2019. 培養藻類からのエストロゲン様活性物質の分離と構造解析-浮遊珪藻を対象として-. 第53回日本水環境学会年会講演集, p.195.
- 10) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏, 2000. 酵母 Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発. 環境化学 10(1), 57-64.
- 11) Ames, B.N., Profet, M., Gold, L.S., 1990. Dietary pesticides (99.99% all natural). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(19), 7777-7781.
- 12) 厚生労働省, 2001. 第11回 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会議事録. URL: <https://www.mhlw.go.jp/shingi/0107/s0731-3.html> (2024年2月時点).
- 13) WHO/UNEP, Bergman, Å., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., Zoeller, R.T., 2013. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. WHO, UNEP, Geneva, Switzerland.
- 14) 畝山智香子, 2007-2018. 食品安全情報blog (過去記事). URL: <https://uneyama.hatenadiary.jp/> (2024年2月時点).