

6. 都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究

国土交通省

(委託先) 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

鈴木 穰

小森 行也

宮島 潔

東谷 忠

中田 典秀

八十島 誠

研究期間

平成 14 年度～ 17 年度

平成 16 年度当初予算額

35,661 千円

Effects of Estrogen-Like Substances in Urban Wastewater on Fish and Their Indication
(FY2002 ~ 2005)

Yutaka Suzuki, Koya Komori, Kiyoshi Miyajima,
Tadashi Higashitani, Norihide Nakada, Makoto Yasojima

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

Estrogen-like substances have been suspected to cause the feminization of wild fish in some rivers in Japan. To elucidate the influence of estrogen-like substances on fish in the rivers, we have developed an on-site fish exposure system using medaka *Oryzias latipes*. Then, we placed three sets of the systems in three Water Quality Monitoring Stations (WQMSs) along the River Tama that is a representative urbanized river in Japan and whose water has been suspected to cause endocrine disruption in fish. Adult male medaka were exposed to the river water in a glass exposure tank. Flow rate and temperature of the water were controlled at 30L/hour and 26°C, respectively, and a light: dark cycle was maintained 16:8 hours in the system. A commercial diet free from phyto-estrogens was fed 4 times in a day using an automatic feeder. After 2-week exposure, hepatic vitellogenin concentration of each male medaka was measured. The exposure tests were repeatedly performed at both the upstream and the downstream locations of discharge from sewage treatment plants (STPs) along the river. At the reference site, Haijimabashi WQMS where no STP discharge is received, vitellogenin was not detected in any male medaka. On the other hand, at Ishihara WQMS that is located the most downstream in this study field and where eight STP discharges are received, all the male medaka were found to produce vitellogenin. Estrogenic activity derived from the STP discharge was thought to cause the feminization of the male medaka, which is supported by the following facts: the induction of vitellogenin of the male medaka coincided with the occurrence of the estrogenic activity of the river waters; the increase in estrogenic activity coincided with the increase in electric conductivity of the river water, which suggests the increase in the ratio of STP discharge to the river water.

1. はじめに

下水処理水やその放流先河川において、エストロゲン様物質による魚類の雌性化が起こっていると疑われている。わが国においては、下水処理水や河川水にエストロゲン様物質が存在することが明らかにされてきたが、これらが魚類の雌性化を起しているのかは依然として明らかになっていない。下水道の急速な普及によって下水処理水等の都市排水が都市河川に占める割合は急速に大きくなりつつある。よって、下水処理水の比率が高い都市河川に存在するエストロゲン様物質が、魚類にどの程度影響を及ぼしているのか明確にする必要があり、状況によって下水道や都市排水の対策をとる必要がある。

本研究は、下水処理水やその放流先の都市河川において魚類を曝露飼育することによって、エストロゲン様物質が魚類の雌性化に及ぼす影響を評価する。さらに、水試料の分画法と遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン活性を組み合わせることによって、水試料のエストロゲン作用について評価し、このエストロゲン活性を魚類の雌性化を表すことのできる簡便な評価指標へと完成させることをめざすものである。加えて、下水処理水と放流先河川に存在するエストロゲン様物質の由来を推定し、雌性化を抑制するために必要な都市排水由来の要因を明らかにすることをめざすものである。

平成 14 年度は、河川における魚類曝露試験について既往事例を整理して課題を抽出し、現地魚類曝露試験法の開発およびその予備試験を実施した。さらに、下水処理水を分画抽出することによって、これに含まれるエストロゲン様物質の性状を把握する手法について検討した。

平成 15 年度は、河川での魚類曝露試験を継続するとともに、その基礎情報を得るため、エストロゲンをを用いた室内曝露試験を実施して、個々の化学物質による魚類影響を明らかにすることとした。また、水試料の分画抽出について、より分解能の高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による手法の検討を行った。

平成 16 年度は、下水処理水流入の有無によって生じる魚類影響について、より詳細に観察しその影響の程度を把握するため、河川および下水処理場での魚類曝露試験を実施し、水試料に含まれる影響要因を分画抽出によって探索した。

2. 方法

2.1 現地魚類曝露試験装置

水質に起因する魚類への影響を検出するためには、影響要因である水質を除いて、その他の試験条件を一定に保つ曝露試験装置が必要である。さらに、用いる試験水は新鮮であることが望ましい。そこで、河川での試験では、国土交通省が河川水質をモニタリングしている水質自動監視所にて流水式魚類曝露試験を実施することとした。また、下水処理場での試験では、放流水および二次処理水を対象として同じく流水式魚類曝露試験を実施することとした。

水質自動監視所では、河川から水をポンプアップして、一時間ごとに水温、pH、溶存酸素、電気伝導度、濁度を自動測定している。この測定では、河川水は 30 分間大量にポンプアップされ、ヘッドタンクを経て自動測定機へと導水されており、余剰水はヘッドタンクの上部から直接排水される仕組みとなっている。そこで、この余剰水を魚類曝露試験に適用することとした。

魚類試験装置への導水は、監視所のヘッドタンクにフロートセンサーを取り付け、水がタンクに流入してきたら魚類試験装置へ吸引する自吸式ポンプが作動する仕組みとした。この仕組みによって、監視所ヘッドタンクが空の時間帯には自吸式ポンプは停止している。自吸式ポンプで導水した河川水は、曝露試験装置の最上部に設けたステンレス製第 1 槽に送られる。

下水処理場での試験では、処理工程の配管から分岐することによって、魚類試験装置の第 1 槽へ定期的に導水される仕組みとした。

魚類試験装置の第1槽は、貯水およびごみや砂泥の除去を目的とするとともに、第2槽へ滴下させるキャピラリーの内径と水位を調整することによって、システム全体の単位時間当たりの流量を制御することとした。

ステンレス製第2槽は水温調節機に接続しており、河川水はこれらを循環して温度が保たれる仕組みとした。このようにして水温を一定にした河川水は、サイフォンによって魚類曝露水槽へと滴下させる。サイフォンを用いたのは、ガラス製の魚類曝露水槽で生じる排泄物や食べ残された餌が、第2槽から勢いよく流れ落ちてくる河川水で巻き上げられ、排水口から押し流されることを期待した構造である。

なお、第1槽および第2槽の余剰水、および曝露水槽の排水は、排水管にまとめて排出した。

さらに、曝露水槽の水温を一定に保つことを確実にするため、鑑賞魚用のサーモスタット付投げ込みヒーターを使用した。

試験魚はメダカを選定した。メダカは内分泌攪乱作用を検出するための実験魚として多く用いられており、既存の試験データと比較するうえで好都合と考えられた。また、生理学、生態学など、一般的な生物学の情報も多い魚種である。曝露試験には、土木研究所の実験室で継体飼育している3ヶ月齢のメダカ d-rR 系統の雄を用いた。

照明の点灯時間はプログラムタイマーで調節し、餌は自動給餌器を用いて1日に4回、市販の粉末餌を給餌することとした。なお、この餌は、植物エストロゲンを含まない商品を選択した。

水温、日長時間、エサ、流量などの試験条件は、室内曝露試験と同条件に調節した。流量および水温はそれぞれ 30L/hour、26℃とした。さらに、曝露期間は2週間および4週間とした。これらの曝露条件は環境省の化学物質影響試験の手法に沿って決定した。

写真1に、魚類曝露試験装置を示す。



写真1 現地魚類曝露試験装置

2.2 河川におけるメダカ曝露試験

本研究では、わが国を代表する都市河川であり、下水処理水を受け入れている多摩川で実施した。試験実施地点の模式図を図1に示す。

試験実施範囲の最上流部に位置する拝島橋監視所は、下水処理水は流入していないため、本研究での対照地点と位置づけた。日野橋監視所は3ヶ所の下水処理水を受け入れた後の測定地点であり、さらにその下流に位置する石原監視所は、支川の2つの処理場を含め、合計8ヶ所の下水処理水を受け入れた地点である。

現地曝露試験の実施状況を表 1 に示す。なお、平成 15 年度に実施した 2 回の試験についても一覧に記載した。

平成 16 年度の河川曝露試験は、春期に拝島橋および石原監視所の 2 ヶ所で実施し（通算第 3 回試験）、冬期に日野橋監視所を加えた 3 ヶ所で実施した（同第 4 回試験）。

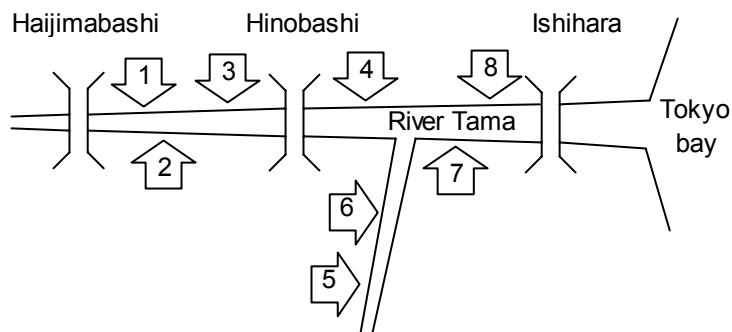


図 1 多摩川 メダカ曝露試験 実施地点模式図

表 1 多摩川 メダカ曝露試験 実施概要

Test series	Duration of exposure	Period of exposure	Medaka		
			No. of male fish	Age (months)	
Test 1	Hajimabashi	2 weeks	27 Feb.- 13 Mar. 2003	20	7
	Hinobashi	2 weeks	17-31 Jan. 2003	20	7
Test 2	Ishihara	2 weeks	14-28 Aug. 2003	20	7
Test 3	Hajimabashi	2 weeks	16-29 Mar. 2004	8	3
		4 weeks	16 Mar.- 13 Apr. 2004	7	3
	Ishihara	2 weeks	16-29 Mar. 2004	9	3
Test 4	Hajimabashi	4 weeks	16 Mar.- 13 Apr. 2004	10	3
		2 weeks	16-29 Mar. 2004	9	3
		4 weeks	16 Mar.- 13 Apr. 2004	10	3
		2 weeks	16 Mar.- 13 Apr. 2004	10	3
	Hinobashi	2 weeks	26 Jan.- 8 Feb. 2005	10	3
		4 weeks	26 Jan.- 22 Feb. 2005	10	3
		6 weeks	26 Jan.- 8 Mar. 2005	10	3
		8 weeks	26 Jan.- 22 Mar. 2005	10	3
	Ishihara	2 weeks	26 Jan.- 8 Feb. 2005	10	3
		4 weeks	26 Jan.- 22 Feb. 2005	10	3
		6 weeks	26 Jan.- 8 Mar. 2005	10	3
		8 weeks	26 Jan.- 22 Mar. 2005	10	3

2.3 下水処理場におけるメダカ曝露試験

本研究では、過年度にコイ曝露試験を実施した下水処理場 1 ヶ所において、放流水および二次処理水を対象にメダカ曝露試験を実施した。この放流水は、コイ曝露試験に用いた処理水であり、塩素滅菌した後に砂ろ過処理が行われたものである。

曝露試験の実施状況を表 2 に示す。

第 1 回の試験（Test A）は、二次処理水でのメダカ飼育の可能性を探るため、予備試験と位置づけて 2 週間の曝露試験を実施した。

また、二次処理水でのメダカ飼育を確認できたため、第 2 回試験（Test B）は、河川での試験と同じく 8 週間の曝露試験を実施し、2 週間ごとに水質およびメダカへの影響を観察することとした。

表 2 下水処理場 メダカ曝露試験 実施概要

Test series	Duration of exposure	Period of exposure	Medaka	
			No. of male fish	Age (months)
Test A Secondary T.W. Effluent	2 weeks	13 Dec.- 27 Dec. 2004	30	3
	2 weeks	13 Dec.- 27 Dec. 2004	30	3
Test B Secondary T.W. Effluent	2 weeks	18 Jan.- 2 Feb. 2005	10	3
	4 weeks	18 Jan.- 15 Feb. 2005	10	3
	6 weeks	18 Jan.- 1 Mar. 2005	10	3
	8 weeks	18 Jan.- 15 Mar. 2005	10	3
	2 weeks	18 Jan.- 2 Feb. 2005	10	3
	4 weeks	18 Jan.- 15 Feb. 2005	10	3
	6 weeks	18 Jan.- 1 Mar. 2005	10	3
	8 weeks	18 Jan.- 15 Mar. 2005	10	3

2.4 ビテロジェニンおよび水質の分析

雌性化の指標として、雄魚の個体ごとに曝露後のビテロジェニン濃度を測定した。測定は、肝臓抽出液を用いるメダカビテロジェニン ELISA キット（エンバイオティックラボラトリーズ社製造）を用いた。曝露後のメダカは、体重、全長、体長を測定し、開腹して肝臓を取り出した。肝臓の重量を測定した後、キット付属のサンプルバッファー内ですりつぶし、遠心分離によって肝臓抽出液を作製した。肝臓抽出サンプルは測定に供するまで、ディープフリーザーで保管した。

メダカビテロジェニン ELISA キットは、抗ビテロジェニン抗体を固相化した 96 穴マイクロプレートや試薬など測定に要する試薬がキット化されており、プロトコールどおりに測定を実施した。

エストロゲン活性は、ブルーネル大学から分与された遺伝子組換え酵母を用い、定法に沿って測定した。また、エストロン、エストラジオールおよびエチニルエストラジオールは、LC/MS/MSを用いて定法に沿って測定した。

さらに、分画手法を導入して、エストロゲン作用をもつ成分を特定することとした。

3. 結果および考察

3.1 河川におけるメダカ曝露試験結果

平成 16 年春期に実施したテスト 3 では、本研究の試験実施範囲の最下流に位置する石原監視所において、曝露開始後 2 週間および 4 週間のすべての雄メダカに肝臓ビテロジェニンが検出された。しかしながら、冬期に実施したテスト 4 の 8 週間の曝露試験では、2 週間ごとにメダカビテロジェニンを確認したところ、これを生成している個体はいずれの地点および曝露期間においても確認されなかった。雄メダカのビテロジェニン測定結果を表 3 に示す。

また、雄メダカのビテロジェニン生成が検出されたテスト 3 では、石原監視所河川水のエストロンおよびエストロゲン活性はそれぞれ 6.7~33.1ng/L および 5.3~27.9ng/L-E2 であった。水質測定結果を表 4 に示す。また、テスト 3 での石原監視所での雄メダカビテロジェニン生成とエストロゲン活性の推移を図 2 に示す。

テスト 3 では、石原監視所河川水のエストロゲン活性は試験開始時 27.9ng/L-E2、第 2 週で 18.7ng/L-E2 と高く、このエストロゲン作用が雄メダカのビテロジェニン生成に作用したものと考えられた。さらに、曝露 4 週間後では、雄メダカのビテロジェニン生成は、河川水のエストロゲン作用の低下にともない減少したと考えられた。なお、石原監視所河川水のエストロゲン作用の主成分は、エストロゲン活性に比例して推移したエストロンであると考えられた。

表3 多摩川 メダカ曝露試験結果 (メダカに関するデータ)

Test series	Duration of exposure	Medaka				Vitellogenin		
		No. of male fish	Body length (mm)	Body wet weight (mg)	Liver wet weight (mg)	No. of positive	Average (ng/mg-liver)	Range [min - max] (ng/mg-liver)
Test 1								
Hajimabashi	2 weeks	20	29.0 ± 1.7	479.8 ± 89.6	13.9 ± 4.1	0	-	-
Hinobashi	2 weeks	20	28.0 ± 1.0	356.5 ± 40.4	5.7 ± 1.4	0	-	-
Test 2								
Ishihara	2 weeks	20	29.7 ± 1.5	468.6 ± 61.1	9.1 ± 1.9	2	2.6	1.7 - 3.5
Test 3								
Hajimabashi	2 weeks	8	22.0 ± 1.6	220.5 ± 41.9	6.6 ± 2.3	0	-	-
	4 weeks	7	24.6 ± 0.7	230.6 ± 24.5	3.7 ± 0.8	0	-	-
Ishihara	2 weeks	9	22.3 ± 1.5	219.9 ± 35.2	7.0 ± 1.9	9	19.1 ± 11.4	7.9 - 42.0
	4 weeks	10	24.7 ± 0.9	234.5 ± 17.3	4.3 ± 1.3	10	11.3 ± 6.0	4.3 - 21.6
Test 4								
Hajimabashi	2 weeks	10	21.5 ± 1.3	192.1 ± 33.0	3.2 ± 1.3	0	-	-
	4 weeks	10	24.2 ± 1.1	303.1 ± 42.9	5.9 ± 2.4	0	-	-
	6 weeks	10	26.7 ± 1.3	401.3 ± 35.9	13.0 ± 4.2	0	-	-
	8 weeks	9	28.1 ± 1.7	453.6 ± 97.3	9.7 ± 7.3	0	-	-
Hinobashi	2 weeks	10	23.0 ± 1.1	220.8 ± 23.8	3.5 ± 1.6	0	-	-
	4 weeks	10	24.2 ± 1.2	304.4 ± 40.0	6.3 ± 2.8	0	-	-
	6 weeks	10	27.9 ± 1.2	428.4 ± 50.2	10.8 ± 3.6	0	-	-
	8 weeks	10	27.2 ± 0.9	373.0 ± 43.2	6.7 ± 4.7	0	-	-
Ishihara	2 weeks	10	23.2 ± 1.1	227.3 ± 27.5	3.5 ± 1.7	0	-	-
	4 weeks	10	23.6 ± 1.0	256.2 ± 23.0	3.8 ± 1.2	0	-	-
	6 weeks	10	26.7 ± 1.3	443.1 ± 52.4	15.6 ± 5.2	0	-	-
	8 weeks	10	27.6 ± 1.3	437.3 ± 53.2	9.1 ± 3.6	0	-	-

表4 多摩川 メダカ曝露試験 水質測定結果

Test series			Start of test	1st week	2nd week	4th week	6th week	8th week	
Test 1	Hajimabashi	EA (ng/L-E2)	0.16	0.16	0.12	-	-	-	
		E2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-	
		E1 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-	
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-	
	Hinobashi	EA (ng/L-E2)	12.54	6.59	10.62	-	-	-	
		E2 (ng/L)	1.5	Tr (1.0)	1.7	-	-	-	
		E1 (ng/L)	21.9	12.2	15.2	-	-	-	
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-	
Test 2	Ishihara	EA (ng/L-E2)	6.31	8.29	6.56	-	-	-	
		E2 (ng/L)	ND	Tr (0.4)	ND	-	-	-	
		E1 (ng/L)	5.8	8.1	4.4	-	-	-	
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-	
Test 3	Hajimabashi	EA (ng/L-E2)	0.35	0.24	0.24	Tr (0.05)	-	-	
		E2 (ng/L)	ND	ND	ND	ND	-	-	
		E1 (ng/L)	ND	ND	ND	ND	-	-	
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	ND	-	-	
		Ishihara	EA (ng/L-E2)	27.94	5.34	18.65	6.37	-	-
			E2 (ng/L)	2.7	Tr (0.8)	4.6	ND	-	-
			E1 (ng/L)	33.1	6.7	24.3	7.0	-	-
			EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	ND	-	-
Test 4	Hajimabashi	EA (ng/L-E2)	0.17	-	0.20	0.24	0.19	0.35	
		E2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND	
		E1 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND	
		EE2 (ng/L)	ND	-	ND	Tr (0.6)	ND	ND	
		Hinobashi	EA (ng/L-E2)	3.86	-	2.98	1.91	1.84	1.85
			E2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND
			E1 (ng/L)	4.9	-	1.4	1.9	2.5	2.6
			EE2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND
		Ishihara	EA (ng/L-E2)	14.77	-	8.38	11.20	9.45	5.49
			E2 (ng/L)	ND	-	Tr (2.3)	ND	ND	ND
			E1 (ng/L)	14.8	-	9.3	13.3	12.3	7.5
			EE2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND

ND : under the minimum limit of detection

Tr : above the minimum limit of detection, under the minimum limit of quantifying

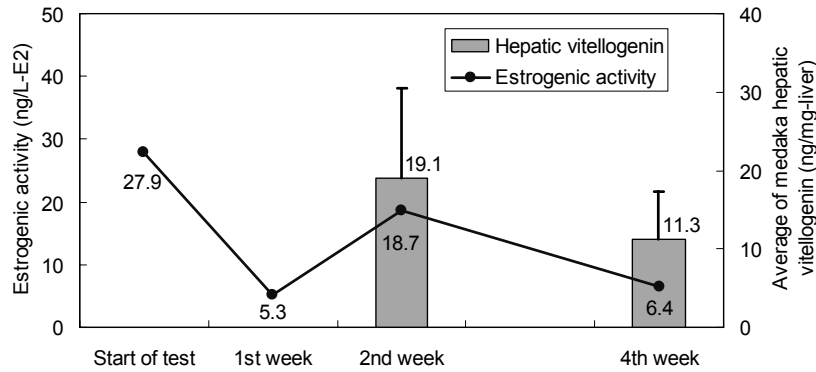


図2 多摩川 メダカ曝露試験結果 Test3 メダカビテロジェニンとエストロゲン活性の推移

テスト3での拝島橋および石原監視所でのエストロゲン活性、電気伝導度の推移を図3に示す。石原監視所では水位の観測も行われているので合わせて図示した。

石原監視所でのエストロゲン活性の推移は電気伝導度の推移に似ていると考えられる。電気伝導度は河川水に占める下水処理水の割合を反映するものであるため、石原監視所河川水のエストロゲン作用は、河川に占める下水処理水の比率が変化したことによって変動したものと考えられ、このエストロゲン作用つまりエストロンの発生原因は下水処理水であると考えられた。

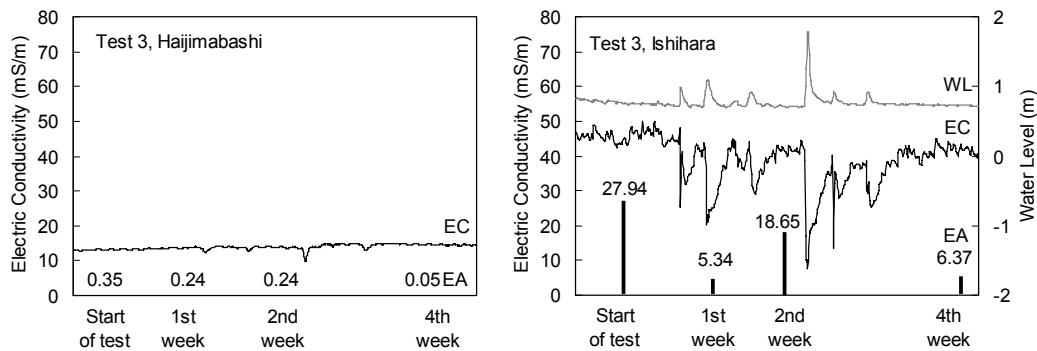


図3 多摩川 メダカ曝露試験結果 Test3 河川水の電気伝導度とエストロゲン活性の推移

3.2 下水処理場におけるメダカ曝露試験結果

予備試験と位置づけて実施した2週間曝露試験では、二次処理水に曝露した雄メダカのうち、7匹でビテロジェニンの生成が確認された。この試験では、放流水に曝露したメダカではビテロジェニンの生成は認められなかったため、二次処理水のエストロゲン作用がメダカに影響を及ぼしたものと考えられた。二次処理水のエストロゲン活性およびエストロンの濃度は、それぞれ12.7~18.9ng/L-E2および18.6~33.9 ng/Lであり、これらの濃度は、河川での曝露試験でビテロジェニン生成が確認されたテスト3での石原監視所河川水と同程度のエストロゲン作用であったと考えられた。

しかしながら、8週間曝露試験として実施したテストBでは、放流水に曝露した雄メダカが高濃度のビテロジェニンを生成している現象が認められた。

雄メダカのビテロジェニン測定結果を表5に示す。また、水質測定結果を表6に示す。

表5 下水処理場 メダカ曝露試験結果 (メダカに関するデータ)

Test series	Duration of exposure	Medaka				Vitellogenin		
		No. of male fish	Body length (mm)	Body wet weight (mg)	Liver wet weight (mg)	No. of positive	Average (ng/mg-liver)	Range [min - max] (ng/mg-liver)
Test A								
Secondary T.W.	2 weeks	29	26.6 ± 1.4	370.0 ± 46.6	6.1 ± 2.2	7	3.2	1.4 - 10.8
Effluent	2 weeks	29	27.2 ± 1.5	401.6 ± 65.4	5.9 ± 2.2	0	-	-
Test B								
Secondary T.W.	2 weeks	10	30.0 ± 0.7	467.7 ± 45.7	6.8 ± 1.4	10	94.6 ± 59.0	10.1 - 201.1
	4 weeks	10	30.2 ± 1.3	584.0 ± 64.1	15.5 ± 3.6	10	50.7 ± 34.0	8.5 - 126.5
	6 weeks	10	29.9 ± 0.7	574.9 ± 55.1	10.5 ± 4.9	10	18.3 ± 14.9	7.1 - 48.2
	8 weeks	10	30.4 ± 1.4	580.3 ± 76.7	9.3 ± 4.5	8	11.6 ± 10.8	2.2 - 31.5
Effluent	2 weeks	10	29.4 ± 1.3	452.9 ± 38.1	8.1 ± 3.4	3	2.6	2.2 - 3.3
	4 weeks	10	28.8 ± 1.4	451.7 ± 67.1	9.3 ± 2.6	9	57.2 ± 44.9	15.5 - 160.0
	6 weeks	10	30.5 ± 1.1	570.1 ± 63.8	11.3 ± 3.4	10	33.7 ± 35.8	3.3 - 103.3
	8 weeks	10	29.2 ± 1.4	505.7 ± 81.8	9.7 ± 2.5	10	620.3 ± 258.6	250.9 - 1002.2

表6 下水処理場 メダカ曝露試験 水質測定結果

Test series			Start of test	1st week	2nd week	4th week	6th week	8th week
Test A	Secondary T.W.	EA (ng/L-E2)	18.72	18.89	12.70	-	-	-
		E2 (ng/L)	ND	Tr (3.1)	Tr (2.7)	-	-	-
		E1 (ng/L)	25.3	33.9	18.6	-	-	-
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-
	Effluent	EA (ng/L-E2)	8.08	2.66	2.59	-	-	-
		E2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-
		E1 (ng/L)	7.2	2.4	2.5	-	-	-
		EE2 (ng/L)	ND	ND	ND	-	-	-
Test B	Secondary T.W.	EA (ng/L-E2)	3.70	-	5.52	7.81	9.90	2.55
		E2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	Tr (2.7)
		E1 (ng/L)	5.4	-	5.7	11.2	8.9	2.2
		EE2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND
	Effluent	EA (ng/L-E2)	0.63	-	2.09	19.54	99.89	18.64
		E2 (ng/L)	ND	-	ND	Tr (3.4)	10.8	Tr (2.4)
		E1 (ng/L)	6.9	-	Tr (0.7)	21.0	77.7	21.5
		EE2 (ng/L)	ND	-	ND	ND	ND	ND

ND : under the minimum limit of detection

Tr : above the minimum limit of detection, under the minimum limit of quantifying

テスト B では、放流水のエストロゲン活性およびエストロンの濃度は、それぞれ 0.63~99.9ng/L-E2 および 0.7~77.7 ng/L であった。エストロゲン作用が極端に上昇したことによって、雄メダカのビテロジェニンも最高値 1000ng/mg-liver を超えることとなった。この試験の実施中、放流水取水地点で補修工事が行われていたため、何らかの理由で放流水のエストロゲン作用が上昇したものと考えられる。下水処理場での工事にあたっては、誤って高濃度のエストロゲン作用を有する処理水を流してしまう可能性があると考えられる。

また、テスト B の二次処理水の試験結果に着目すると、雄メダカのビテロジェニンは曝露直後に上昇し、その後減少したものと考えられる。しかし、この水のエストロゲン作用をみると、曝露開始によってビテロジェニンが急上昇するような要因はみられない。これらの水質測定項目のほかに、何らかの影響要因がはたらいた可能性が考えられる。

3.3 エストロゲン作用の特定（分画手法の適用）

本研究では、メダカにエストロゲン作用を及ぼす成分を特定するため、試験水を分画するとともに、それぞれの画分でのエストロゲン活性を測定する分画手法を取り入れた。

テスト4での石原監視所河川水の分画手法適用結果を表7に示す。

表7 分画手法適用結果（Test4 石原監視所）

標準溶液を用いた HPLC 分画手法では、19 画分に E2、21 画分に EE2、22 画分に E1、27 画分に NP が分取される。テスト4での石原監視所河川水の結果では、エストロン（E1）の作用が最も大きいことが明らかとなった。しかし、エストロゲン作用を有するその他の画分も多数みられることから、不明な物質も多数あることも判明した。

Test series	Fraction	Start of test	2nd week
Test 4 Ishihara	F1	(ng/L-E2)	n.d.
	F2		n.d.
	F3		n.d.
	F4		n.d.
	F5		n.d.
	F6		n.d.
	F7		0.115
	F8		n.d.
	F9		n.d.
	F10		n.d.
	F11		0.09
	F12		n.d.
	F13		0.095
	F14		n.d.
	F15		n.d.
	F16		n.d.
	F17		n.d.
	F18		n.d.
	F19		0.645
	F20		0.1475
	F21		0.1
	F22		7.375
	F23		4.76
	F24		0.305
	F25		0.175
	F26		n.d.
	F27		n.d.
	F28		0.085
	F29		n.d.
	F30		0.07
	F31		n.d.
	F32		n.d.
	F33		n.d.
	F34		n.d.
	F35		n.d.
	F36		n.d.
	F37		n.d.
	F38		n.d.
	F39		n.d.

ND : under the minimum limit of detection

Tr : above the minimum limit of detection, under the minimum limit of quantifying

4. まとめ

(1) 河川における魚類へのエストロゲン様物質の影響を調べるため、メダカを用いた現地魚類曝露試験システムを開発した。多摩川において3ヶ所の河川水質自動監視所にそれぞれ1セットずつシステムを設置し、曝露試験を実施した。

(2) 春期に実施したテスト3の結果、8ヶ所の下水処理場の放流水が流下する石原監視所での試験では、すべての雄メダカが2週間および4週間の曝露でビテロジェニンを生成していた。さらに、雄メダカに影響を及ぼした要因は、下水処理水に由来するエストロゲン作用であり、その主成分はエストロンである可能性が示された。さらに、河川水のエストロゲン作用の変動にともなって、メダカのビテロジェニン生成も変動する可能性のあることが示された。

(3) 下水処理場での曝露試験の結果、放流水のエストロゲン作用が極端に上昇し、雄メダカのビテロジェニンが高濃度に生成される場合のあることが明らかとなった、処理場での工事によって何らかの原因が発生したものと考えられ、誤って高濃度のエストロゲン作用を有する処理水を流してしまう可能性があると考えられた。

(4) 分画手法によって河川水のエストロゲン作用を詳細にみたところ、エストロンの作用が最も大きいことが確認された。しかしながら、エストロゲン作用を有する不明な物質の存在も明らかとなった。これらの物質を特定することも重要と考えられた。

なお、本調査研究は、環境省からの受託業務費により実施されたものである。

参考文献

- 1) 国土交通省;平成13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/200207_12/021212/siryoy1.pdf, 2002
- 2) Tanaka H., Higashitani T., Miyamoto N., Tamamoto H., Komori K., Tsujihara K. and Ohnishi Y.; Estrogenic activity of river water and feminization of wild carp in Japan. In CD-ROM of WEFTEC'03 Conference Proceedings, 76th Annual Technical Exhibition and Conference, 2003
- 3) Higashitani T., Tamamoto H., Miyamoto N., Yasojima M. and Tanaka, H.; Feminization of wild carp and carp exposure tests using sewage treatment plant effluents. In Proc. of the 4th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water –ECOHAZARD 2003-, Aachen, 14-17 September, 2003
- 4) 東谷忠, 玉本博之, 宮本宣博, 八十島誠, 田中宏明; 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, 環境工学研究論文集, 39, pp.97-108, 2002
- 5) Takahashi A., Higashitani T., Yakou Y., Saitou M., Tamamoto H. and Tanaka H.; Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disrupters into periphytons and benthos in the Tama river, Wat. Sci. Tech., 47(9), pp.73-76, 2003
- 6) 環境省 ; Medaka *Oryzias latipes*: Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. <http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html>, 2003
- 7) 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
- 8) Tanaka H., Yakou Y., Takahashi A., Higashitani T. and Komori, K.; Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment. Wat. Sci. Tech. , 43(2), pp125-132, 2001
- 9) Miyamoto N., Tanaka H., Tamamoto H. and Komori, K.; Fractionation method for estimating the cause of estrogen-like activity in sewage. In CD-ROM of proceedings of WEFTEC'2002, 2002
- 10) Komori K., Tanaka H., Okayasu Y., Yasojima M. and Sato, C. ; Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, In Proc. of the 4th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water –ECOHAZARD 2003-, Aachen, 14-17 September, 2003
- 11) 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,2001
- 12) 岩松鷹司 ; メダカ学全書, 大学教育出版, 1997
- 13) 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. Environ. Sci. Technol. 32(11), pp.1549-1558, 1998
- 14) Harries J.E., Shehan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tyler T. and Zaman N.; Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environ. Toxicol. Chem. 16(3), pp.534-542, 1997
- 15) Tanaka H., Sato C., Komori K., Yakou Y., Tamamoto H., Miyamoto N. and Higashitani T.; Occurrence of endocrine disruptors in sewage and their behavior in sewage treatment plants in Japan, Environ. Sci. 10(1), pp.1-24, 2003