

## ◆ 特集：下水道「循環のみち」への新たな展開 ◆

## メダカを用いた下水処理水の内分泌かく乱作用の評価

中田典秀\* 東谷 忠\*\* 宮島 潔\*\*\* 鈴木 穰\*\*\*\*

## 1. 内分泌かく乱化学物質問題の背景

イギリスでは、1960年代から淡水魚において生殖器官に異常をもつ個体が発見されており、世界的にも先駆的な研究が行われてきた。精巣内に卵を生成している雌雄同体魚の発見に端を発し、河川における雄魚の雌性化という現象について1980年代後半から研究が進められてきた。フィールド調査と被疑物質による曝露試験によって得られた研究成果から、雄魚の雌性化を引き起こす要因は、主として下水処理場から放流される人畜由来の天然エストロゲンである17 $\beta$ -エストラジオール(E2)<sup>1)</sup>とエストロン(E1)<sup>1)</sup>、そして医薬品(ピル)として使用されている合成エストロゲンの17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール(EE2)<sup>2)</sup>による内分泌かく乱作用であることが明らかにされた。また、非イオン界面活性剤の分解産物の一つであるノニルフェノール(NP)<sup>3), 4)</sup>も同様のエストロゲン作用を魚類に引き起こすことも明らかにされた。

日本の河川においても雄魚の雌性化が引き起こされているのかを調べるため、国土交通省は、平成10年(1998年)から全国の一級河川を対象に、天然および合成エストロゲンを含むエストロゲン様作用を有する物質(以下、エストロゲン様物質)の水質、底質の汚染レベル、下水処理場における処理レベルについて調査を行った<sup>5), 6)</sup>。その結果、下水処理場で高率にエストロゲン様物質が除去されているが、完全に除去されなかった物質が水環境へ排出されていることが明らかとなった。また、同省により平成10年から平成13年(2001年)にかけて実施された全国一級河川における魚類実態調査<sup>7)</sup>の結果、29河川69地点で捕獲された雄のコイから、本来雌にしか生成されない卵黄タンパク前駆物質(ビテロジェニン)が検出された。上

記の調査により、日本国内においても野生のコイに内分泌かく乱が生じていることが明らかとなった。

国土交通省や環境省等の実態調査により、環境水中のエストロゲン様物質の汚染レベル、下水処理場における処理実態、そして内分泌かく乱が生じた野生魚の存在が明らかとなった。しかし、測定されたエストロゲン様物質の水中濃度と魚類内分泌系の応答との関係、エストロゲン様物質の複合曝露による影響、曝露を受けた野生魚の繁殖もしくは繁殖行動や次世代への影響は明らかとなっていない。本研究では、これらの影響を確認するため、魚を用い、環境水の曝露試験を行うとともに、魚類内分泌系の応答の観測、曝露水質を測定し、両者の関係を定量化することを目的とした。

## 2. コイを用いた曝露試験(既往研究)

土木研究所水循環研究グループでは、2000~2001年にコイに対し、下水の二次処理水やオゾン処理水の曝露試験を実施した<sup>8)</sup>。その結果、多くの場合、曝露条件や曝露水のエストロゲン作用(遺伝子組み換え酵母を用いて測定されるエストロゲン活性)との間に明瞭な関係が見られず、雄コイの血中ビテロジェニン生成に関わる要因は、曝露水のエストロゲン作用だけに起因するのではなく、水温の季節変化やコイの約1年周期の生殖サイクル等、水質以外の環境要因が影響している可能性が示唆された。

## 3. メダカを用いた魚類曝露試験方法の開発

既往研究により、実際の水環境における魚類影響を評価するためには、生育環境要因を制御し、水質変化にのみ起因する魚類影響を検出する必要があることが明らかになった。そこで、生育環境の制御可能な曝露試験装置を開発し、さまざまな環境要因を排除し、曝露水に含まれるエストロゲン様物質の濃度と、曝露によりメダカに生じる



生体反応を観測した。

### 3.1 試験魚の選定

試験魚としてコイに比べて小型のメダカを用いることとした。メダカは内分泌かく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る。また、生理学的、生態学的な情報も多く、コイに比べ短期間で成魚になることから、小規模な装置で並列試験を行うことが可能である点も、コイを用いた試験に比べ、好都合と考えられた。

### 3.2 魚類曝露試験装置の開発

水質に起因する魚類への影響を検出するためには、水質以外の影響要因となる水温、流量、明暗周期、餌など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ため、コイを用いた試験と同様に現場設置型の流水式曝露試験装置を開発した。魚類曝露試験装置の全景を写真-1に示す。本装置の第1槽は、貯水および浮遊物質の除去を目的とするとともに、第2槽へ流下させるキャピラリーの内径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構造とした。ステンレス製の第2槽は水温調節機に接続しており、

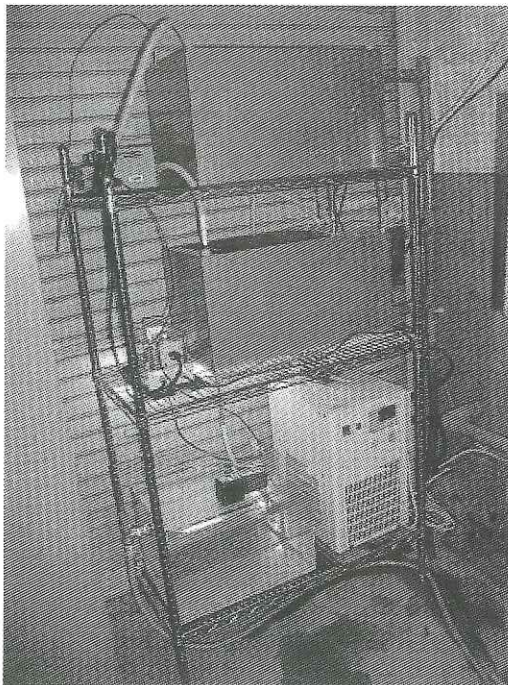


写真-1 魚類曝露試験装置

曝露試験水が両者を循環して水温が一定に保たれる仕組みとした。続いて、水温調節された供試水はサイフォンによってガラス製の曝露水槽へと流下させることとしたが、これは、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試験水で巻き上げられ、排水口から押し流されることを期待したものである。

さらに、曝露水温を一定に保つことが重要と考えられたため、冬期の試験では水温管理を確実にするためサーモスタット付き投げ込みヒーターを使用した。

水温、流量、日長周期、エサなどの試験条件は、環境省の化学物質影響試験<sup>9)</sup>に準じて設定した(表-1)。なお、餌は自動給餌器を用いて、植物エストロゲンを含まない市販の粉末製品を給餌した。

### 3.3 魚類影響指標および水質の測定方法

本調査では、雌性化の指標として一般に採用されている雄魚中のビテロジェニン濃度を測定した。メダカのビテロジェニン濃度は、メダカビテロジェニンELISA(酵素結合免疫吸着測定法)キットを用い、肝臓中の濃度を測定した。メダカを氷冷して体重、全長、体長を測定した後、開腹して肝臓を取り出し、肝臓重量を測定した。肝臓は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、 $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーで保管した。

試験期間中に定期的に曝露水を採取した。得られた試料は、ガラス繊維ろ紙(孔径 $1.0\mu\text{m}$ )を用いてろ過し、固相抽出カートリッジにより試料中に含まれる有機物質を濃縮・抽出した。試験水中に含まれる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て測定した<sup>10)</sup>。この活性はE2換算濃度(単位:  $\text{ng/L-E2}$ )として表される。

表-1 メダカ現地曝露試験条件一覧

| 項目   | 条件                          |
|------|-----------------------------|
| 試験魚  | ヒメダカ <i>Oryzias latipes</i> |
| 試験水  | 間欠流水式                       |
| 流量   | 0.5L/min (30L/h)            |
| 試験温度 | 水温 $26^{\circ}\text{C}$     |
| 日長条件 | 16時間-明、8時間-暗                |
| 餌    | 粉末餌、一日あたり3回の給餌              |

#### 4. メダカを用いた下水処理水の曝露試験

下水処理水のメダカへの曝露試験は、3. 2に示した曝露装置を実際の下水処理場に設置して行った(図-2)。この処理場では、標準活性汚泥処理(生物処理)を採用し、主に家庭排水を処理している。生物処理後の最終沈殿池流出水(二次処理水)に若干の塩素を添加し、砂ろ過後に放流している(放流水)。曝露試験では、二次処理水と放流水を曝露水として用いた。

曝露試験の実施状況を表-2に示す。初回の試験(Test A)では、2週間の曝露を行った。後述

するTest Aの結果より、長期試験の必要性が示唆されたため、それぞれ8週間と6週間の長期曝露実験を行った(それぞれTest BとTest C)。いずれの試験においても、2週間ごとにエストロゲン活性の測定およびメダカへの影響を観測した。

##### 4.1 短期試験 (Test A) の結果

図-3に試験結果を示す。二次処理水中のエストロゲン活性は2.7~18.7ng/L-E2(平均11.4ng/L-E2)であり、エストロゲン作用は下水処理の状況によって変動することがうかがわれた。また、放流水中のエストロゲン活性は2.6~18.9ng/L-E2(平均9.9ng/L-E2)であり、二次処理水と同レベルであった。

2週間の二次処理水の曝露により、雄メダカ29匹のうち7匹にビテロジェニン生成が確認された。検出された雄メダカのビテロジェニン濃度は1.4~

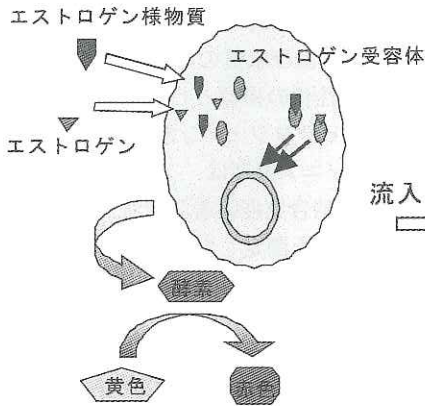


図-1 遺伝子組換え酵母概略図

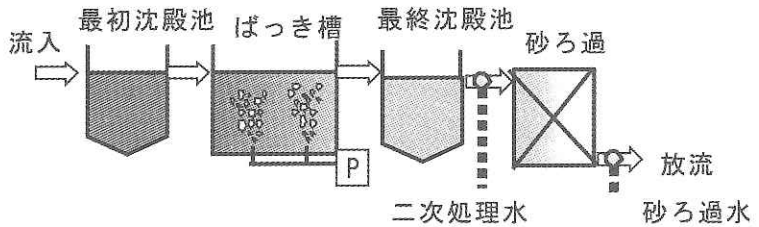


図-2 下水処理場の採取ポイント

表-2 下水処理場におけるメダカ曝露試験の実施状況

| Test   | 曝露水   | 曝露期間 | 実施期間               | メダカ |       |              |
|--------|-------|------|--------------------|-----|-------|--------------|
|        |       |      |                    | 月齢  | 曝露個体数 | 曝露後のVTG陽性個体数 |
| Test A | 二次処理水 | 2週間  | 平成16年12月13日~12月27日 | 3   | 30    | 7            |
|        | 放流水   | 2週間  | 12月13日~12月27日      | 3   | 30    | 0            |
| Test B | 二次処理水 | 2週間  | 平成17年1月18日~2月2日    | 3   | 10    | 10           |
|        |       | 4週間  | 1月18日~2月15日        | 3   | 10    | 10           |
|        |       | 6週間  | 1月18日~3月1日         | 3   | 10    | 10           |
|        |       | 8週間  | 1月18日~3月15日        | 3   | 10    | 8            |
|        | 放流水   | 2週間  | 1月18日~2月2日         | 3   | 10    | 3            |
|        |       | 4週間  | 1月18日~2月15日        | 3   | 10    | 9            |
|        |       | 6週間  | 1月18日~3月1日         | 3   | 10    | 10           |
|        |       | 8週間  | 1月18日~3月15日        | 3   | 10    | 10           |
| Test C | 二次処理水 | 2週間  | 平成17年8月3日~8月17日    | 4   | 20    | 3            |
|        |       | 4週間  | 8月3日~8月31日         | 4   | 10    | 0            |
|        |       | 6週間  | 8月3日~9月14日         | 4   | 20    | 4            |
|        | 放流水   | 2週間  | 8月3日~8月17日         | 4   | 20    | 10           |
|        |       | 4週間  | 8月3日~8月31日         | 4   | 10    | 1            |
|        |       | 6週間  | 8月3日~9月14日         | 4   | 20    | 5            |



10.8ng/mg-liverであった。一方、放流水では、雄メダカにビテロジェニン生成は確認されなかった。以上の結果から、曝露水中のエストロゲン活性が同レベルであっても、メダカの内分泌系に影響が現れる場合とそうでない場合があることが分かった。この原因として、エストロゲン様物質の曝露

により、定常的なビテロジェニン産出を確認するには、2週間の曝露時間により検討することが必要であると考えられる。または、本研究で測定しているエストロゲン活性以外の水質要因の影響により、上記のような差異が生じている可能性が考えられる。そこで、まず前者を明らかにするために、2週間より長期の曝露試験を実施した。

4.2 長期試験 (Test BとTest C) の結果

二次処理水または放流水を曝露水として、長期曝露試験を実施した。その結果、第2週以降、両試験区とも、ほぼすべての時期でビテロジェニン生成が確認された (図-4と図-5)。どちらの試験においても、放流水中で同じ試験の二次処理水に比べ、相対的に高い濃度のエストロゲン活性が認められた。実験開始時、砂ろ過によるエストロゲン活性とメダカへの作用の低減を期待したが、長期試験実施時以降、放流水中のエストロゲン活性が、二次処理水中の活性より高くなる現象が確認されている (図-4と図-5)。この原因については現在調査中である。

Test Bでは、放流水試験区の第6週目に高いエストロゲン活性が検出され、その前後に雄メダカの高いビテロジェニン濃度が確認された。Test C

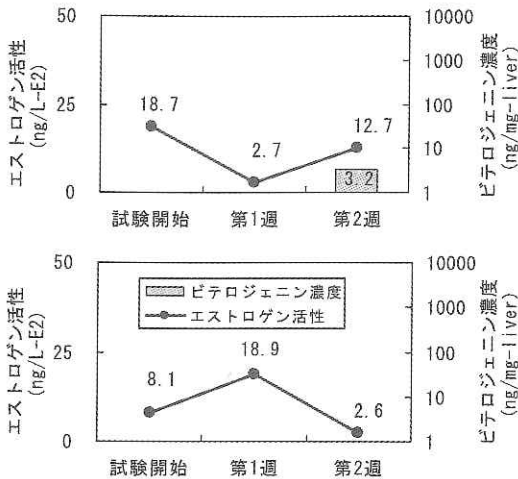


図-3 Test A (2週間曝露後)の雄メダカ陽性個体ビテロジェニン濃度の平均値と試験水エストロゲン活性の推移 (上:二次処理水試験区、下:放流水試験区)

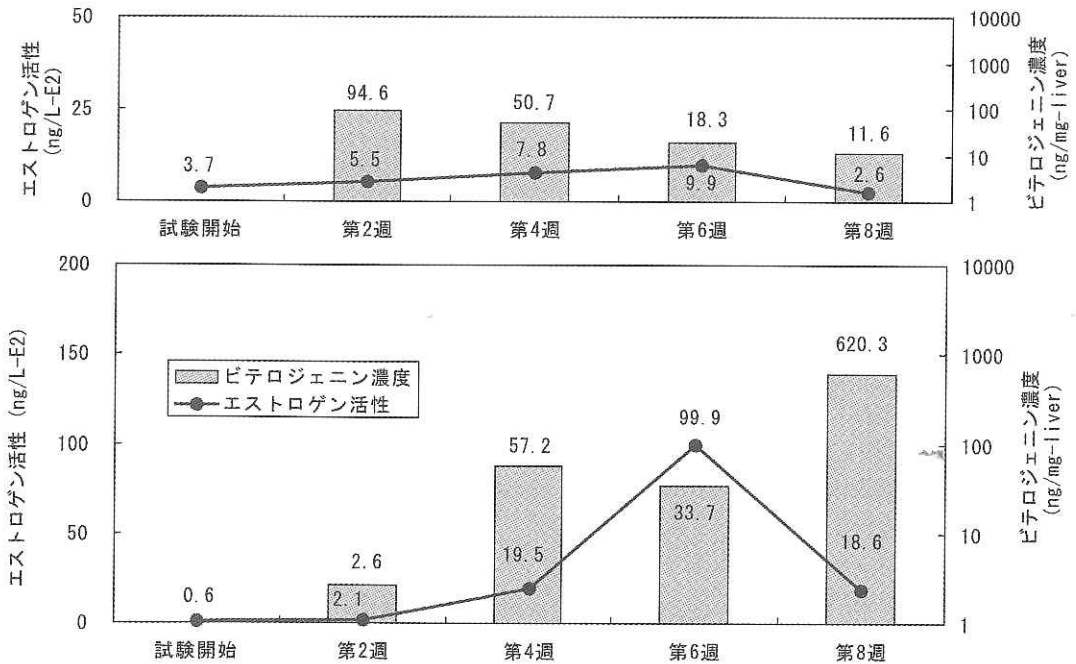


図-4 TestB (2週間毎)の雄メダカ陽性個体ビテロジェニン濃度の平均値と試験水エストロゲン活性の推移 (上:二次処理水試験区、下:放流水試験区)

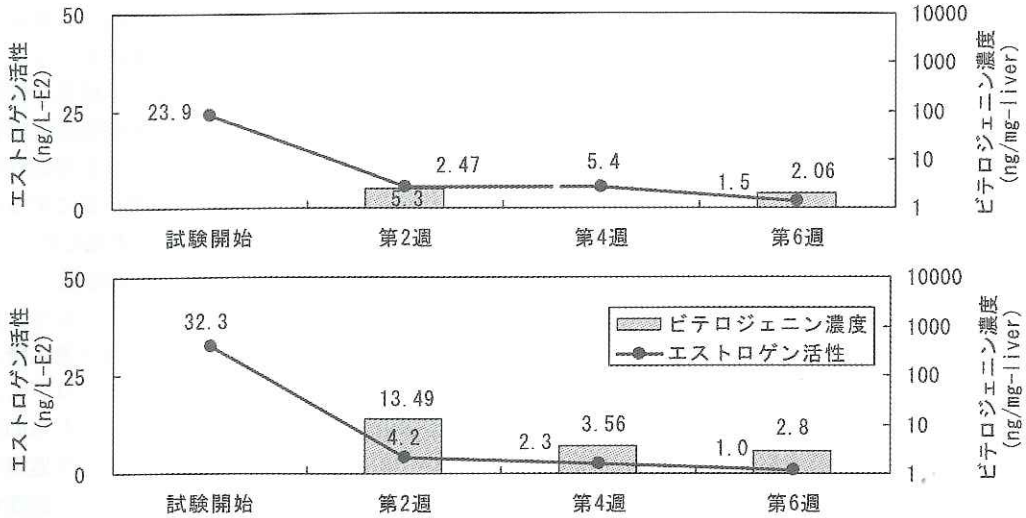


図-5 Test C (2週間毎) の雄メダカ陽性個体ビテロジェニン平均値と試験水エストロゲン活性の推移 (上: 二次処理水試験区、下: 放流水試験区)

では、両試験区ともに試験開始時に高いエストロゲン活性が検出され、Test Bで観察されたビテロジェニン濃度の上昇に比べると低い、相対的に高い値が確認された。しかし、それ以外の時期では、曝露水中のエストロゲン活性と、雄メダカのビテロジェニン濃度との間には明瞭な関係が見られなかった。これは、エストロゲン活性が瞬間的な値を示しているのに対し、ビテロジェニン濃度は、曝露期間の平均濃度を表しているためと考えられる。また、雄メダカにビテロジェニン生産を誘導する要因はエストロゲン活性の高低のみだけでなく、それぞれの活性レベルに応じた作用に必要な曝露期間が存在するものと思われる。

#### 4.4 曝露水中エストロゲン活性と雄個体肝臓中ビテロジェニン濃度の関係

長期曝露試験 (Test B, C) で観測された、曝露水中のエストロゲン活性と雄個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の比較を行った。この際、長期影響を明らかにするため、Test BおよびCにおける第4週以降の観測結果を用いた。結果を図-6に示す。弱いながら、両者には正の相関関係が確認され、曝露水中のエストロゲン活性の上昇とともに、雄個体中でのビテロジェニンの産出量が増加する傾向にあることが確認された。

#### 5. まとめ

生育環境条件の制御可能な曝露試験装置を開発

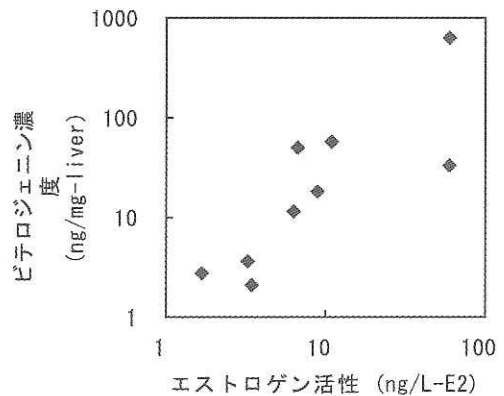


図-6 メダカを用いた曝露試験におけるエストロゲン活性 (2週間の移動平均値) と雄メダカ陽性個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の平均値との関係

し、メダカを用いて下水処理水への曝露試験を実施したところ、以下のことが明らかとなった。

- (1) 下水処理水の曝露により、ほぼすべての場合において、雄メダカにビテロジェニンが生成された。
- (2) エストロゲン活性とビテロジェニン濃度の間には、弱いながらも正の相関関係が確認された。
- (3) 2週間の曝露試験により、曝露水中のエストロゲン活性による雄メダカのビテロジェニン生成を確認できることが明らかになった。

今後は、長期曝露による繁殖や次世代への影響とともに、曝露水のエストロゲン活性の変動に対



するビテロジェニン生成の時間的応答性を調べる必要がある。また、より低濃度での曝露試験、懸濁物質由来のエストロゲンの影響評価を検討し、メダカを用いた環境中のエストロゲンの評価系の確立を図る予定である。

10) 矢古宇靖子、高橋明宏、斎藤正義、東谷 忠、田中宏明：下水処理場でのエストロゲン様活性の低減、第9回世界湖沼会議、発表文集第3分科会、pp.237-240, 2001.

参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Harries 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 国土交通省、平成13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/200207\\_12/021212](http://www.mlit.go.jp/river/press/200207_12/021212) (2002)
- 8) 東谷 忠、玉本博之、田中宏明：下水処理水が魚類の雌性化に及ぼす影響。土木技術資料, 44 (7), pp.28-33, 2002.
- 9) 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

中田典秀\*



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所水環境研究グループ水質チーム専門研究員、農博  
Dr. Norihide NAKADA

東谷 忠\*\*



(前 水環境研究グループ水質チーム専門研究員)  
Tadashi HIGASHITANI

宮島 潔\*\*\*



東京都下水道局施設管理部係長(前 水環境研究グループ水質チーム主任研究員)  
Kiyoshi MIYAJIMA

鈴木 穰\*\*\*\*



独立行政法人土木研究所つくば中央研究所水環境研究グループ水質チーム上席研究員  
Yutaka SUZUKI