

<研究発表>

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、小森行也、鈴木 穣

独立行政法人土木研究所水環境研究グループ(〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6 E-mail: nakada55@pwri.go.jp)

概要

魚類を用いた下水処理水中のエストロゲンの評価手法を確立するため、現場設置型の流水式魚類曝露試験装置を開発し、メダカを入れた水槽に下水処理水を引き込み、2~8週間の曝露試験を行った。曝露期間中、定期的にメダカ肝臓中ビテロジエニン濃度を酵素結合免疫吸着測定法により測定し、同時に曝露水中のオクチルフェノール、ノニルフェノール、ノニルフェノール関連物質、エチニルエストラジオール、エストロン、 17β -エストラジオールをLC-MS/MS等、エストロゲン活性を遺伝子組み換え酵母法により測定した。その結果、曝露期間の進行、曝露水中のエストロゲン活性の増加に伴い、メダカ肝臓中のビテロジエニン濃度増加が確認された。

キーワード: メダカ、内分泌かく乱化学物質、ビテロジエニン、流水式曝露試験、下水処理水

1. はじめに

近年、世界各地で野生生物の生殖器官や生殖行動の異常が報告されている。我が国においても、下水処理水の割合が高い都市河川に生息する雄のコイにおいて、精巣に卵細胞を持つ個体や、精巣が著しく萎縮した個体が発見されている¹⁾。

演者らは、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²⁾。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エニン(VTG)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。

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ことが必要である。そこで、生育環境環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物質の濃度と、曝露により魚類に生じる生体反応を観測した。評価にはメダカを用いた。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、好都合である。

2. 実験方法

2.1 曝露装置

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、エサなどの

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することとした。魚類曝露試験装置の全景をFig. 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、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。統いて、水温調節された供試水(以下、曝露水とする)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

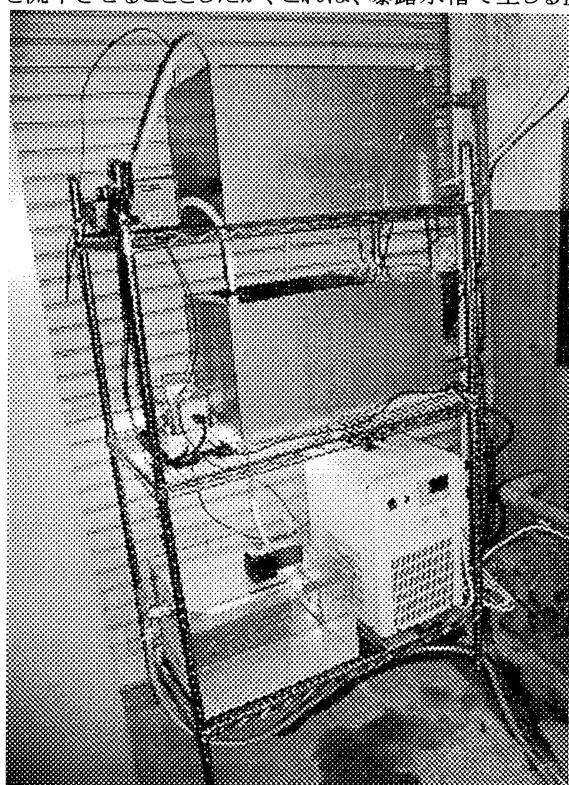


Fig. 1 One-site fish exposure system

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することとした。

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3)に準じて設定した(Table 1)。なお、エサ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。

Table 1 Exposure test conditions

Test fish	<i>Medaka Oryzias latipes</i>
Water supply	Intermittent flow through
Flow rate	0.5 L/min (30 L/h)
Water temp.	26 °C
Light	Light: 16 h, Dark: 8 h
Diet	Commercial diet, 4 times/day

2.2 内分泌かく乱化学物質の測定

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、ガラス纖維ろ紙(孔径1.0 μm)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。

分析項目は、エストロン(E1), 17 β -エストラジオール(E2), ノニルフェノール(NP)を対象とした。またノニルフェノールエトキシレート(NPnEO), ノニルフェノールフェノキシ酢酸(NPnEC)(以後、ノニルフェノール関連物質)についても測定を行った。E1及びE2については、小森らの方法に従いLC-MS/MSを用いて測定を行った4)。また、NP, NPnEOについては、下水試験法追補暫定版に従いHPLCを用いて測定を行った5)。

2.3 エストロゲン活性の測定

曝露水のエストロゲン作用を明らかにするため、前項同様、試験期間中に定期的に曝露水を採取し、ろ過、固相抽出を行い、試料中に含まれるエストロゲン活性を測定した。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、矢古宇らの方法6)に従い実施した。この活性は、E2換算濃度(単位:ng-E2/L)として表される。

2.4 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VTG濃度を、メダカVTG 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。以降の操作は、キット添付のマニュアルに従って行った。

2.5 曝露試験

2.1に示した曝露装置、条件により、下水処理場内でメダカへの二次処理水、砂ろ過水の曝露試験を行った。試験開始時、途中、終了時に曝露水を採取し、内分泌かく乱物質およびエストロゲン活性の測定を行った。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Table 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週間の長期曝露試験を行った(それぞれTest BとTest C)。Test Cにおいて、6週後にその水槽内で得られた卵を用いてTest Dを行った。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。

Table 2 Fish exposure tests in a sewage treatment plant

Test series and type of sample	Duration of exposure (weeks)	Medaka	
		No. of male fish	Age (months)
Test A			
Secondary effluent	2	30	3
Final effluent	2	30	3
Test B			
Secondary effluent	2	10	3
	4	10	3
	6	10	3
	8	10	3
Final effluent	2	10	3
	4	10	3
	6	10	3
	8	10	3
Test C			
Secondary effluent	2	20	3
	4	20	3
	6	20	3
Final effluent	2	20	3
	4	20	3
	6	20	3
Test D			
Secondary effluent	8	20	0.5
Final effluent	8	20	0

3.結果および考察

3.1 短期試験(Test A)の結果

試験結果をFig. 2に示す。二次処理水中のエストロゲン活性は2.7~18.7 ng-E2/L(平均11.4 ng-E2/L)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2.6~18.9 ng-E2/L(平均9.9 ng-E2/L)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VTG生成が確認された。検出された雄メダカのVTG濃度は1.4~10.8 ng/mg-liverであった。一方、放流水では、雄メダカにVTG生成は確認されなかつた。

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、エストロゲン活性が採水時の瞬間的な値を示しているのに対し、メダカ肝臓中のVTG濃度は、曝露期間の平均的な水質を表しているためと考えられる。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、より長期の曝露試験を実施した。

3.2 長期試験(Test B, C, D)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VTG生成が確認された(Fig. 2)。どちらの試

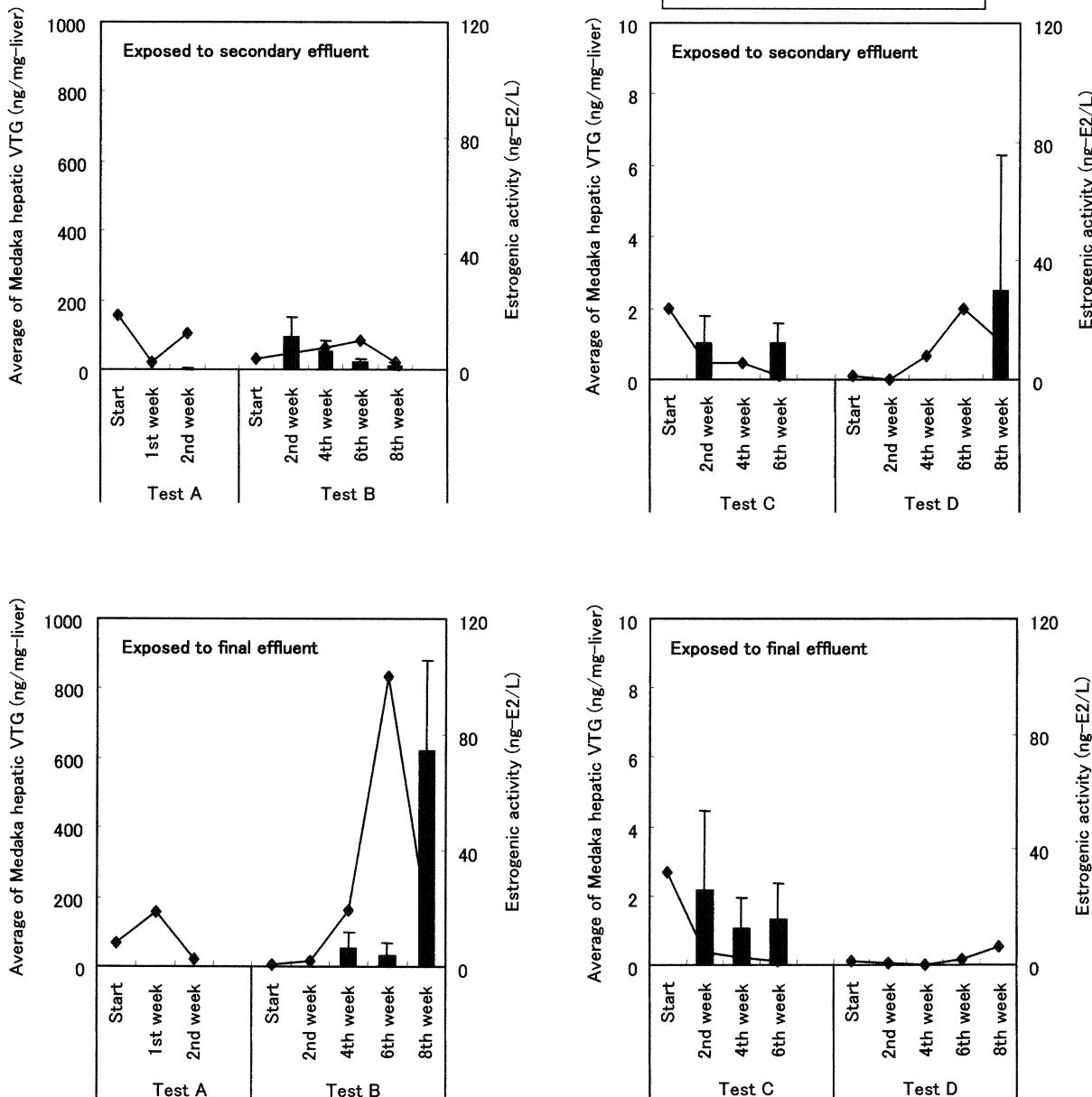


Fig. 2 Relations between VTG concentration in liver of Medaka and estrogenic activity of samples to which Medaka was exposed in the on-site exposure test.

験においても、放流水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、最終放流前の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。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VTG濃度が確認された。Test C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VTG濃度の上昇に比べると低いが、相対的に高いVTG濃度が確認された。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VTG濃度との間には明瞭な関係が見られなかった。雄メダカにVTG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はなく、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。

Test Dにおいて、稚魚期から若魚期まで8週間曝露した雄メダカでは、二次処理水曝露試験区の生残雄7匹中2匹(29%)にVTG生成が認められた。一方、砂ろ過水曝露試験区の生残雄13匹ではVTGを生成している個体は検出されなかつた。

3.3 曝露水中エストロゲン活性と雄個体肝臓中 VTG濃度の関係

本研究で用いた遺伝子組換え酵母によるエストロゲン活性の測定から、雄メダカ成魚に対する下水処理放流水の影響を評価するため、現場曝露試験における曝露水のエストロゲン活性と肝臓中 VTG 濃度を比較した(Fig. 3)。この際、下水処理放流水による長期影響を確認するため、Test B、Test C における放流水曝露試験区での観測結果を用いた(n=91)。その結果、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が 10ng-E2/L を超え

たとき、雄個体中での VTG の産出量が増加する傾向が確認された。

環境省の報告では、NP および OP がメダカの内分泌系をかく乱すると認められており、その際、 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ の NP の曝露により $10\sim20\text{ ng/mg-liver}$ の肝臓 VTG の誘導が確認されている³⁾。また、同濃度で孵化後のメダカを 60 日間曝露すると、雄から雌への性転換が起こると報告されている。本研究で用いたメダカに対するエストロゲン物質の影響のエンドポイントを性転換とすると、エストロゲン活性の閾値は約 10 ng-E2/L と見積られる。

4.まとめ

都市排水に含まれるエストロゲン物質による魚類に対する内分泌かく乱のエンドポイントを性転換と設定すると、過去の報告より、そのときの雄メダカの肝臓中 VTG 濃度は 10 ng/mg-liver とされている。本研究により観察された雄メダカの肝臓中 VTG 濃度が 10 ng/mg-liver となるときのエストロゲン活性は、遺伝子組換え酵母により測定される値で $10\sim20\text{ ng-E2/L}$ に相当した。実際、エストロゲン活性が 10 ng-E2/L を超えると、雄メダカの肝臓中 VTG 濃度の上昇が確認された。以上のことより、本研究で用いた遺伝子組み換え酵母法による放流水質の評価が可能であることが明らかとなった。

水環境におけるエストロゲン活性の主要な排出源と考えられる下水処理場の放流水は、放流時に河川水や海水により希釈されることが期待されている。しかし、処理水の受入れ水域において、本研究で得られた雄メダカに性転換を引き起こす可能性がある閾値、 $10\sim20\text{ ng-E2/L}$ を超えないためには、それよりも低い放流水のエストロゲン活性である必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 中村将、井口泰泉、科学、68、515-517(1998)
- 2) 東谷忠、玉本博之、宮本宣博、八十島誠、田中宏明、環境工学研究論文集、39、97-108 (2002)
- 3) Ministry of the Environment, Japan;
<http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html>, 2003
- 4) 小森行也ほか、土木技術資料、43, pp44-49(2001)
- 5) 社団法人日本下水道協会編:下水試験方法 追補暫定版(内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスボリジウム編), (2002).
- 6) 矢古宇靖子ほか、環境工学研究論文集、36、199-208 (1999)

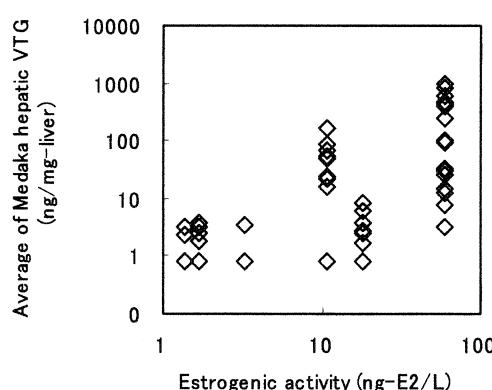


Fig. 3 Comparison between estrogenic activity (moving average during 2 weeks) of samples exposed to medaka and VTG concentration in liver of Medaka in the on-site exposure test in a sewage treatment plant