

下水処理水中の化学物質がメダカに及ぼす影響

塩田 勉 森 真朗

要 旨

遺伝的雌雄が判別可能なメダカFLF系統を、下水処理水及び固相抽出により処理水中の化学物質を数倍に濃縮した試料に、孵化後1ヶ月間暴露した。孵化後90日目に鱗の形態から機能的雌雄を判別し、性分化等に対する処理水中の化学物質の影響を調べた。夏季(2001年7月～8月)の試験では、処理水を5倍に濃縮した試験区において、鱗に異常を有する個体が20尾中6尾出現したが、遺伝的オスの機能的メス化は認められなかった。冬季(2002年1月～2月)の試験では、処理水を2倍に濃縮した試験区において、遺伝的オスの10尾中6尾が機能的なメスに性転換した。処理水中の女性ホルモン濃度を測定した結果、女性ホルモンの 17β エストラジオールとエストロンの相加的な作用により、メスへの性転換が誘導されたと考えられた。今後、女性ホルモン同士の複合影響や塩素処理した処理水の影響などについて検討する必要がある。

キーワード：女性ホルモン、メダカ、下水処理水、性転換

1 はじめに

水環境中における内分泌かく乱化学物質の挙動に関する既往の研究から、①女性ホルモン作用を示す物質の主要な排出源は下水処理場であること、②女性ホルモン作用は、エストラジオール(E2)やエストロン(E1)といった人畜由来の天然ホルモンの寄与が大きく、ノニルフェノール(NP)やビスフェノールA(BPA)などの合成化学物質の寄与は遙かに小さいこと、が明らかになりつつある^{1) 2) 3)}。東京都内には、水量に占める下水処理水の割合が高い河川があることから、処理水が河川に生息する魚類に及ぼす内分泌攪乱作用を明らかにする必要がある。

一方、魚類は孵化後の性分化期に性ホルモンに暴露されると、機能的な性が容易に転換する⁴⁾。女性ホルモンに暴露されたオスはメス化、男性ホルモンに暴露されたメスはオス化し、その影響は不可逆的である⁴⁾。従って、魚類の性分化に対する内分泌かく乱化学物質の影響を明らかにするためには、性ホルモンに対する感受性が最も高い性分化期における暴露影響を調べる必要がある。

以上のことから本研究では、下水処理水にメダカを孵化直後から1ヶ月間暴露し、性分化等に及ぼす影響を検討した。また、処理水を固相抽出法により濃縮した試料についても同様の暴露実験を行い、処理水中の化学物質がメダカに影響を及ぼす濃度レベルについても検討した。

2 材料及び方法

(1) 試験魚

試験にはメダカFLF系統を用いた。本系統は名古屋大学において新たに開発されたもので、遺伝的雄の体表に存在する白色素胞により、受精後3日目の卵段階において顕微鏡下で遺伝的雌雄の判別が可能である⁵⁾(図1)。ただし、交差率が3～4%ある。メダカは鱗の形態から機能的雌雄が容易に判別できる。機能的雄は、背鱗の切れ込みと大きな尻鱗を有しているのが特徴である。実験開始前に、遺伝的な性と機能的な性が一致している雌雄をペアとして産卵させ、回収した卵を孵化させた。孵化後24時間以内の仔魚は、直ちに顕微鏡下で雌雄を判別し、雌雄別々に下水処理水等に暴

表1 設定した試験区

対照区	希釈水*のみ
溶媒対照区	希釈水にメタノールを300 μ L/L添加したもの
処理水区	ろ過した処理水
1倍濃縮区	処理水1Lを固相抽出した試料を、希釈水1Lに溶解したもの
2倍濃縮区	処理水2Lを固相抽出した試料を、希釈水1Lに溶解したもの
5倍濃縮区	処理水5Lを固相抽出した試料を、希釈水1Lに溶解したもの
陽性対照区	希釈水に17 β エストラジオールを0.1 μ g/L添加したもの

* 活性炭ろ過した水道水

露した。

(2) 採水

暴露試験は、2001年7月～8月（夏季調査）と、2002年1月～2月（冬季調査）の2回行った。下水処理水は、都内のA処理場において塩素注入前のものを採水した。採水はステンレス製バケツで行い、ポリエチレン製20Lタンクを用いて実験室に運搬した。

採水間隔は1週間に1回で、4週間に渡り計4回採水した。夏季調査では午前中に採水したものを試料とした。冬季調査では午前と午後の2回に分けて採水し、両者を1:1で混合したものを試料とした。試料は、そのまま暴露する分はガラス製ビーカーに移して冷蔵保存（4℃）し、固相抽出する分は直ちにろ過・固相抽出した。

(3) 固相抽出

まず、試料を孔径1 μ mのガラス繊維濾紙（ワットマンGF/B）により濾過した。塩酸及び1M酢酸緩衝液（pH5.0）を用いてpHを5.0に調整したのち、ディスク型固相（3M社製 エムポアC-18FF）に100mL/min以下の速度で通水した。通水量は、1L、2L、5Lの3通りとした。ディスクを乾燥後、メタノール10mLで抽出し、窒素気流下で約100 μ Lまで濃縮した。一連の固相抽出操作は、3M社製6連マニホールド及び専用ガラスホルダーを用いて行った。濃縮した試料は、冷凍庫内（-20℃）にて保存した。

(4) 暴露試験

試験は、室温24 \pm 1℃、16時間明：8時間暗条件のステンレス製恒温室にて行った。1Lのガラス製ビーカーに試験溶液を500mL入れ、孵化直後の仔魚を雌雄各13尾ずつ、別々に暴露した。試験区は、表1に示す7通りを設定した。

暴露は半止水式で行い、暴露溶液は24時間毎に全量を交換した。換水の際、仔魚はスポイトを用いて移し替えた。換水の約6時間前と1時間前の1日2回、餌として孵化後24時間以内のブラインシュリンプ幼生を飽食量与えた。

暴露は孵化直後から30日間行った。暴露終了後、希釈水中に移して孵化後90日目まで飼育した。

(5) 観察項目

暴露期間中毎日、暴露溶液のpH及びDOを測定し、死魚を計数した。暴露終了時（孵化後30日目）に、試験魚の全長を測定した。その後は水換えの時に生存数を計数し、試験終了時（孵化後90日目）には、試験魚の全長の測定、鰭の形態観察を行った。

(6) 処理水中の女性ホルモン濃度の測定

採水した処理水中の女性ホルモン濃度を以下の方法で測定した。処理水1Lをろ過し、ろ紙をメタノールと1M酢酸緩衝液（pH5.0）を9:1で混合した溶液10mLで洗浄し、ろ液と合わせた。これを固相カートリッジ（Waters社製セップパックC-18）に15mL/minで通水し、蒸留水5mLとヘキサン5mLで洗浄後、ジクロロメタン10mLにより溶出した。窒素ガス気流下で濃縮・乾固後、10%メタノールに溶解して、ELISA法で測定した。ELISAには、武田薬品工業（株）製の①17 β -Estradiol（E2）ELISAキット、及び②Estrogen（E1/E2/E3）ELISAキットを用いた。①の測定値をE2濃度、②の測定値から①の測定値を引いた値をE1濃度とした。

(7) 統計解析

対照群と暴露群の有意差の検定は、以下の方法で行った。全長については、ダネットの方法により母平均の多重比較を行った。生存率、遺伝的性と機能的性

表2 下水処理水暴露試験の結果

試験区		対照	溶媒対照	処理水	1倍濃縮	2倍濃縮	5倍濃縮	陽性対照
(2001/7月5-8月) 夏季調査	生存率 (30日目) (%)	92	96	81	92	92	77	92
	全長 (30日目) (cm)	13.3	13.4	12.3	13.8	13.2	10.7**	13.3
	全長 (90日目) (cm)	31.2	30.5	31.1	30.5	30.5	30.1	30.9
	遺伝的性と機能的性が不一致のオス	1/13	1/13	0/9	1/13	1/12	1/9	12/12**
	鱗に異常を有する個体	0/24	0/25	0/21	0/24	1/24	6/20**	0/24
(2002/1月5-2月) 冬季調査	生存率 (30日目) (%)	85	96	50**	100	81	0**	81
	全長 (30日目) (cm)	10.6	11.1	8.5**	11.1	10.6	-	10.5
	全長 (90日目) (cm)	28.1	27.9	29.3	27.7	29.2	-	28.2(雌)
	遺伝的性と機能的性が不一致のオス	0/11	0/12	1/7	2/13	6/10**	-	-
	鱗に異常を有する個体	0/21	0/25	0/13	0/26	0/19	-	0/12

** 危険率1%で有意差有り

が不一致のオスの出現率、及び鱗に異常を有する個体の出現率については、Z検定により母比率の差の検定を行った。

3 結果

(1) 夏季調査

2001年7月～8月に採水した処理水を用いた暴露試験の結果を表2の上段に示す。

試験に用いた処理水のpHは7.59～8.02、希釈水のpHは7.25～7.53であった。また、暴露溶液のDOは、水換え直前の処理水で4 mg/L以下になることが4回あったが、その他の全ての暴露溶液では4 mg/L以上を維持した。

暴露期間中の生存率については、すべての試験区で対照区に対する有意差は認められなかった。

全長については、暴露終了時（孵化後30日目）の5倍濃縮区で対照区に比較して有意な低下が認められたが、試験終了時（孵化後90日目）では、全ての試験区で対照区に対する有意差は認められなかった。

試験終了時に、遺伝的オスの鱗の形態から機能的性を判定した。陽性対照区では、全ての遺伝的オスが機能的メスに転換した。それ以外の試験区では、機能的メスに転換した個体数は0または1であり、その出現率に関して対照群に対する有意差は認められなかった。

一方、5倍濃縮区において、鱗に異常を有する個体が20尾中6尾（オス2尾、メス4尾）と高い割合で出現した。それらの個体では背鱗や尻鱗が異常に小さく、ほとんど鱗が存在しない個体もあった（図2）。

(2) 冬季調査

試験に用いた処理水のpHは7.31～7.99、希釈水のpHは7.01～7.52であった。また、暴露溶液のDOは、水換え直前の処理水で4 mg/L以下になることが2回あったが、その他の全ての暴露溶液では4 mg/L以上を維持した。

2002年1月～2月に採水した処理水を用いた暴露試験の結果を表2の下段に示す。

暴露終了時までには、5倍濃縮区では全ての個体が、処理水区でも半数の個体が死亡した。その他の試験区では対照区に対する生存率に有意差は認められなかった。しかし、陽性対照区の遺伝的オスでは、暴露終了後から試験終了後までの期間中に病気が発生したため、全てのオスが死亡した。

暴露終了時の全長については、処理水区で対照区に対する有意な低下が認められた。一方、試験終了時では、全ての試験区で対照区に対する有意差は認められなかった。

試験終了時に遺伝的オスの機能的性を判定した結果、固相抽出法を用いた試験区において、濃縮倍率の増加に伴う、機能的メスの出現率の増加が認められた。

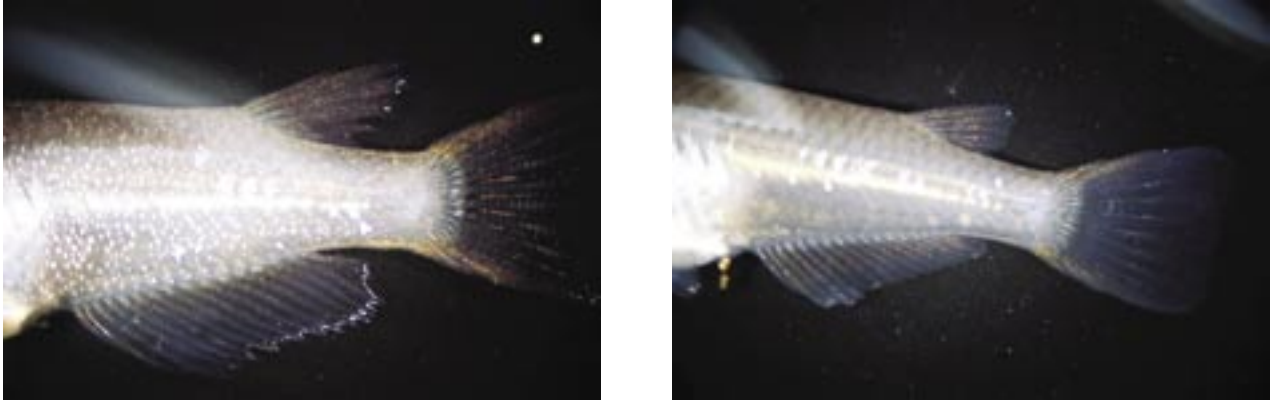


図1 F L F系統メダカ (a 遺伝的オス、b 遺伝的メス)

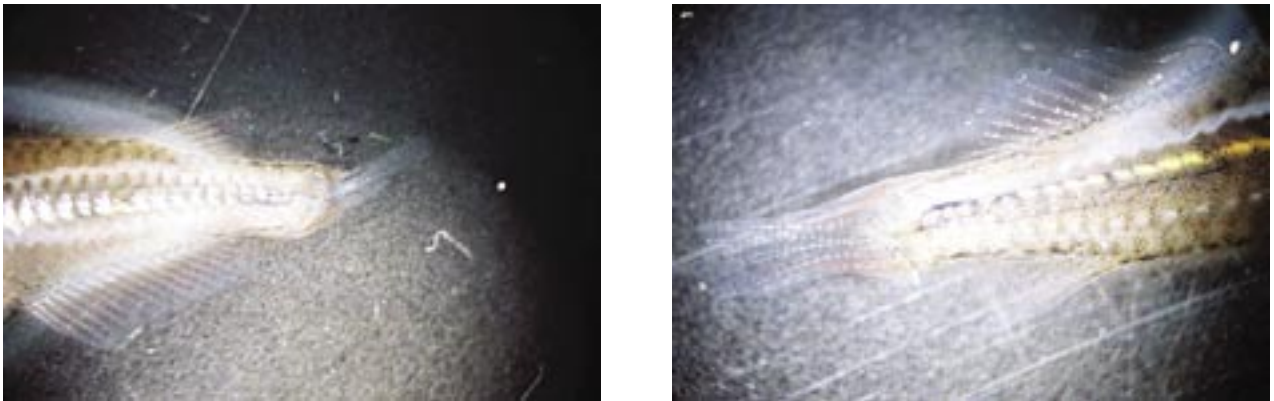


図2 鱗が異常に小さいメダカ (いずれも夏季調査の5倍濃縮区)



図3 機能的メスに転換した遺伝的オス (冬季調査の2倍濃縮区)

表3 処理水中の女性ホルモン濃度測定結果 (ng/L)

採水日	夏季調査 (2001/7月~8月)				冬季調査 (2002/1月~2月)							
	2001/7/25	2001/8/1	2001/8/9	2001/8/15	2002/1/17		2002/1/24		2002/1/31		2002/2/7	
					AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM
17βエストラジオール	5.7	5.0	6.6	5.5	13	14	17	17	23	14	20	20
					14		17		19		20	
エストロン	23	16	47	34	61	33	67	100	252	88	63	95
					47		84		170		79	

注) 冬季調査の測定値のうち、下段はAMとPMの平均値

1倍濃縮区では13尾中2尾が、2倍濃縮区では10尾中6尾が機能的メスに転換した(図3)。このうち2倍濃縮区の出現率は、対照区に比べて有意に高かった。

一方、冬季の調査においては、夏季の調査に見られたような鱗に異常を有する個体は出現しなかった。

(3) 処理水中の女性ホルモン濃度

処理水中のE2及びE1濃度の測定結果を表3に示す。

2物質ともに、夏季より冬季において濃度が高いことがわかった。E2は、夏季は5~7ng/Lであったが、冬季は13~23ng/Lで夏季より数倍高かった。E1についても、夏季は16~47ng/Lであったが、冬季は33~252ng/Lと遙かに夏季より高かった。また、2物質の濃度を比較してみると、常にE1濃度がE2濃度を大きく上回っていた。

4 考察

(1) 生存率及び全長に対する影響

処理水区では、冬季調査において生存率と全長が有意に低下した。1倍濃縮区では影響が見られないことから、これらの原因物質は、固相抽出されない物質と考えられる。処理水中のアンモニア性窒素濃度は、夏季(8mg/L前後)に比べて冬季の方が比較的高く(9.6~15.6mg/L)、pH(7.5~8.0)や温度(24±1℃)を考慮すると、冬季における非イオン化アンモニア(T-NH₃)濃度は0.5~0.8mgNH₃/Lに達していたと考えられる。この濃度は、魚類に急性的な致死や成長速度の低下をもたらすレベルである⁶⁾。従って、処理水区における生存率や全長の低下はT-NH₃が原因物質である可能性が高いと考えられる。

一方、5倍濃縮区では夏季調査において全長が、冬季調査において生存率が有意に低下した。5倍濃縮区でメダカに影響を及ぼした原因物質は、固相抽出さ

れた有機物であると考えられる。しかし、処理水中のE1、E2濃度は、5倍濃縮してもメダカに致死や成長速度の低下をもたらすレベルではない。従って、この2物質以外の有機物が原因物質と考えられるが、詳細は不明である。

(2) 性分化に及ぼす影響

冬季調査の2倍濃縮区において、遺伝的オスの10尾中6尾が機能的メスに転換した。機能的メス化は、E1やE2などの天然女性ホルモン、合成女性ホルモンであるエチニルエストラジオール(EE2)、NPなどの女性ホルモン様作用を持つ内分泌かく乱化学物質、により誘導されることが既往の研究から明らかにされている⁷⁾。このうちEE2は、処理水中から検出された事例がほとんど無い⁸⁾。NP等の女性ホルモン様物質についても、これまでに処理水中から検出された濃度はほとんどが1μg/L以下であり⁸⁾、メス化を引き起こす濃度(NP:>30μg/L⁷⁾⁹⁾よりはるかに低い。このことから、メス化を引き起こした原因物質は、天然女性ホルモンのE1とE2である可能性が高い。

一方、今回と全く同じ条件でFLF系統の遺伝的オスをE2及びE1に暴露した試験の結果では、E2は30ng/Lで0%、100ng/Lで93%がメス化し、E1は100ng/L及び300ng/Lで25%が、1000ng/Lで100%がメス化した⁸⁾。以下、これらのデータに基づく容量反応直線を仮定し、処理水中のE1、E2濃度とメス化割合について検討を行った。

夏季調査について、処理水中のE1、E2濃度を5倍してみると、E1が80~235ng/L、E2が25~33ng/Lとなる。計算上、E1単独で最大25%、E2単独で最大7%のメス化を誘導するレベルである。一方、実際の機能的メス化率は9尾中1尾(11%)であり、計算値よりやや低かった。この要因として、E1の100~300ng/L

におけるメス化率を一律に25%と仮定しているため、300ng/L以下でメス化率を高く見積もっている可能性がある。より詳細な検討を行うには、E1 300ng/L以下の濃度で再試験を行う必要がある。

一方、冬季調査について、処理水中のE1、E2濃度を2倍してみると、E1が94~340ng/L、E2が28~40ng/Lとなる。計算上、E2単独で最大22%のメス化、E1単独で最大33%のメス化を誘導するレベルである。一方、実際の機能的メス化率は10尾中6尾(60%)であり、E1及びE2がそれぞれ単独で誘導可能な割合ではない。そこで、E1とE2が相加的に作用すると仮定すると、メス化率は22+33=55%となり、ほぼ計算値に一致する。類似の作用を持つ物質は相加的に働くことから¹⁰⁾、機能的メス化に関してE1とE2が相加的に働く可能性は大きいと考えられる。しかし、その他の物質による複合影響なども考えられるため、高い割合でメス化を誘導した要因については、複合影響も含めてさらに詳しい検討が必要である。

夏期調査の5倍濃縮区を90日目に観察したところ、20尾中6尾が鰭に異常に小さかった。鰭の二次性徴はホルモンの作用により形成されることがわかっているが、化学物質が鰭の大きさに及ぼす影響について検討した事例はない。固相抽出された何らかの有機物が原因であると考えられるが、詳細については今後の検討が必要である。

(3) 機能的メス化に対する下水処理水のリスク

オスの機能的メス化に対する下水処理水のリスクは、季節による差が大きいことがわかった。夏季の処理水は、5倍に濃縮してもメス化が誘導されず、リスクは大きくないと考えられた。これに対して冬季の処理水は、2倍に濃縮した試験区で60%が機能的メス化し、夏季よりリスクが高いことがわかった。下水処理過程における女性ホルモンの挙動は十分には解明されていないが、活性汚泥によりある程度分解されると報告されている¹¹⁾。活性汚泥処理は水温の影響を大きく受ける。従って、水温が高く生物分解速度が速い夏季の方が、処理水中の女性ホルモン濃度が低くなると考えられる。ただし、今回の採水は週に1回のスポット採水であり、必ずしも処理水の水質を代表しているとは言い切れない。今後、処理水を連続的に供給できる施設で、孵化時から成熟するまで連続的に暴露する

実験を行い、影響を把握することが望まれる。

また、本実験に用いた処理水は塩素処理前のものである。水環境中に放出される処理水は塩素処理されたものであるから、水環境に対する影響を正確に把握するためには、塩素処理した放流水の影響を調べる必要がある。処理水の女性ホルモン様活性は、塩素処理によって大幅に低減するとの報告もある¹²⁾。今後は、塩素処理の効果も含めて、処理水が水生生物に及ぼす影響を評価しなければならない。

謝 辞

下水処理水採水に当たり、お世話になった関係各位に深く感謝の意を表します。

また、本研究を遂行するに当たり、ご助言を頂きました、前基盤研究部長若林明子氏(現淑徳大学教授)に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 嶋津暉之ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(その3)，東京都環境科学研究所年報2000，pp.165-175
- 2) 中田典秀ら：GC-MSおよび遺伝子組み換え酵母を用いた下水処理放流水中の内分泌系を攪乱する化学物質の推定，第9回環境化学討論会講演要旨集，pp.122-123(2000)
- 3) Desbrow C. et al. : Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, Environ. Sci. Technol., 32(11), pp.1549-1558 (1998)
- 4) Yamamoto T. : Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka, J. Exp. Zool. 123, pp. 571-594 (1953)
- 5) Wakamatsu Y. : New medaka strains for endocrine- disrupting substance testing, Proceedings of International Symposium on Endocrine-Disrupting Substance Testing in Medaka, p.33 (2000)
- 6) 菊池幹夫，若林明子：アンモニア汚染の環境リスク評価，東京都環境科学研究所年報1997，pp.143-148
- 7) 萩野哲ら：内分泌攪乱作用が疑われている化学物

- 質のS-rR系メダカ性転換試験, 日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集, p.51 (1999)
- 8) 東京都下水道局:平成12年度下水道における内分泌かく乱化学物質の実態調査結果 (2001)
- 9) 塩田勉, 森真朗:初期生活段階におけるエストロゲン暴露がメダカに及ぼす影響, 第36回日本水環境学会年会講演集, p.82 (2002)
- 10) 若林明子著:化学物質と生態毒性, 社団法人産業環境管理協会, pp.143-162 (2000)
- 11) 田中美奈子ら:エストラジオールおよび類縁物質の活性汚泥による分解とその経路, 第36回日本水環境学会年会講演集, p.160 (2002)
- 12) 山田 卓ら:ヒメダカを用いた内分泌かく乱化学物質の影響評価に関する研究, 第36回日本水環境学会年会講演集, p.83 (2000)

Effects of chemicals present in sewage-treatment work effluents on Medaka

Tsutomu Shioda and Masaaki Mori

Summary

FLF-strain medaka, in which genotypic sex can be identified, were exposed to sewage-treatment work (STW) effluents or the solutions of sewage extracts for 1 month after hatch. The effects of STW effluents on sexual differentiation of medaka were investigated by comparing genotypic sex with functional sex determined by the shapes of dorsal and fins. In the experiment using STW effluents in summer, the fish exposed to the solution of sewage extracts (five times concentrated than STW effluent) had abnormal fins. Functional sex reversal of genotypic male was not observed in all treatments. However, in the experiment using STW effluents winter, genotypic male exposed to the solution of sewage extracts (twice concentrated than STW effluent) had become functional female. Measured concentrations of natural estrogens indicated that functional sex reversal was induced by additive effects of 17β -estradiol and estrone. Farther studies focused on interactive effects of estrogens and effects of chlorination of STW effluents are necessary.

Keywords : estrogen, medaka, STW effluent, sex reversal