

◆ 水循環における水質リスク評価特集 ◆

# 多摩川における水生生物への環境ホルモンの移行

高橋明宏\* 玉本博之\*\* 東谷 忠\*\*\* 田中宏明\*\*\*\*

## 1. はじめに

化学物質が生物体内に取り込まれることにより、内分泌系器官に対してホルモンと同じ様な作用をしたり、正常なホルモンの働きを阻害するなどして、その代謝機能や生育さらには生殖機能まで阻害する化学物質の存在、いわゆる内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）問題が新たな環境汚染として危惧されてきている。

特に、環境ホルモンとして従来から環境中に存在し毒性等の生物影響が指摘されていた農薬、PCB（ポリ塩化ビフェニル）、ダイオキシン等の有害物質以外にも、私たちが日常生活や工業製品の原料として一般的に使用している化学物質に女性ホルモンとして作用する物質が数多く存在していることが近年指摘されてきている。例えば、界面活性剤として用いられるアルキルフェノール関連化合物、可塑剤として使用されるフタル酸エステル類、樹脂の原料であるビスフェノール A などがあげられる。さらにヒトや動物から糞尿として排出されているエストロゲン、さらにある種の

植物に含まれている天然物質もホルモン作用を持つことが確認されている。

日本国内においては、国土交通省、環境省および地方自治体が河川、湖沼、海域、下水道、野生生物等を対象として環境ホルモンの実態調査を実施<sup>1),2),3),4)</sup>し、これらの結果から、環境ホルモンを持つと考えられる多様な化学物質の存在が確認されてきている。特に、国土交通省などが実施した河川を対象とした実態調査では、人や家畜の糞尿に含まれるエストロゲンや汎用的な工業製品に用いられているアルキルフェノール類など一部の物質の検出率が高いことが分かってきた。これらの物質は英国においては魚類のメス化の主要な原因物質として確認されているが<sup>5),6)</sup>、日本をはじめとした諸外国では、これらの物質がコイの雌性化の要因となっているかは明らかになっていない。

下水処理場には生活排水や工場排水を經由して天然ホルモンや化学物質等の多種類の環境ホルモンが流入してくる。下水処理場の殆どが生物学的な処理方法を用いており、これらの環境ホルモン物質は概ね除去されているものの完全には除去しきれず、これらの一部が下水処理水放流水として河川や海水に排出されている<sup>2)</sup>。英国では、下水処理場の処理水が流入する河川において、魚類のメス化が確認され、この現象と下水処理水中の環境ホルモン物質との因果関係についても明らかになっており、日本においても種々の実態調査等が行われ原因の確認を行っているところである<sup>7),8)</sup>。

このように魚類のメス化の主要な要因として指摘されている環境ホルモン<sup>9)</sup>が、魚類の生物体内に取り込まれる経路としては、主に2つの可能性が考えられる(図-1)。一つは、生息環境である水、もう一つは食物である。河川では、魚類の主な食物は

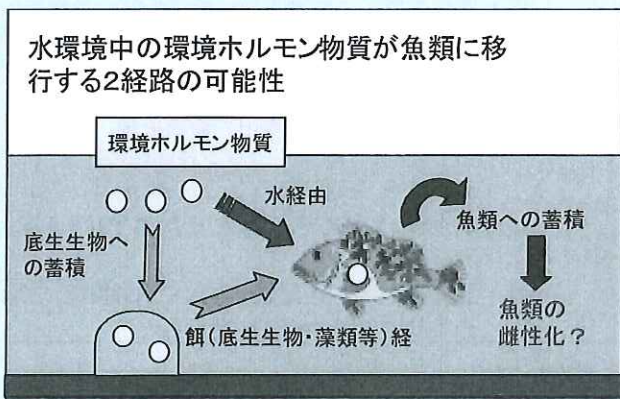


図-1 環境ホルモン物質の水生生物へ移行すると考えられる経路

Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Periphytons and Benthos in the Tama River

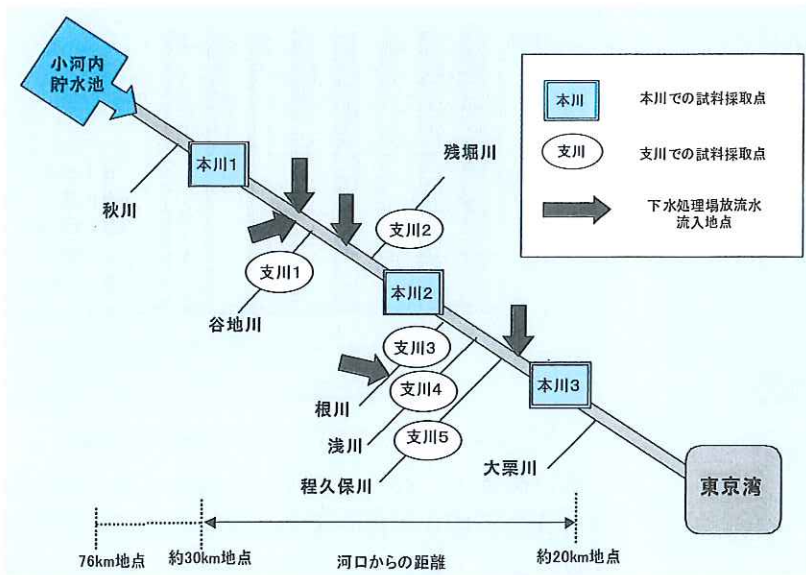


図-2 試料採取地点の概要

付着藻類および水生昆虫などの底生生物が考えられ、これらを魚類が捕食した結果、環境ホルモン物質が魚類体内に取り込まれその多くが分解されないか体外に排出されずそのまま体内に残留、蓄積という可能性である。

しかし、現在のところ前述したように、河川水や下水処理水などの水試料中の環境ホルモン濃度については、様々な全国規模の実態調査が行われ、その結果として多様な環境ホルモン物質の濃度レベルが明らかになってきたものの、食物である付着藻類や底生生物中の環境ホルモンの蓄積量については殆ど把握できていない。本研究においては、餌の摂取は環境ホルモンが魚類に移行する重要な経路であると考え、これらの餌となる生物にどの程度の環境ホルモンが含有・蓄積しているか調査することとした。

環境ホルモンの測定項目は、河川の実態調査においてその検出率が高かったこと、又はその測定濃度と個々に測定した標準物質のエストロゲン様活性<sup>5),6)</sup>の強さから、数種類の物質が国内の水環境において懸念すべき主要な物質として判断し、このうちノニルフェノール、ビスフェノール A 及び 17β-エストラジオールの 3 種類の物質を選定した。また、実態調査では多種類の環境ホルモンが検出されていること、実態調査の対象物質以外にも環境ホルモン作用を持つ物質の可能性も予想されることから、ヒトのエストロゲン受容体を組み込んだ遺伝子組み換え酵母を用いてエストロゲン様活性を測定し、試料中に存在している女性ホルモン作用の総量を評価することとした。

## 2. 検討方法

### 2.1 試料および調査対象物質

今回は多摩川の中流域を調査対象地域に選定した。この流域では、河川水中の環境ホルモン物質が原因と考えられるコイのメス化(捕獲コイの一部に見られた精巢の萎縮)が多摩川の中流域で報告されている<sup>9)</sup>こともあり、現在、この流域に流入する都市排水も含め、国土交通省や東京都などの調査も引き続き行われている。試料採取は、多摩川本川で中流域に 3 地点

(本川 1~3) 及び支川で 5 地点(支川 1~5) の合計 8 地点で採取した(1999 年 11 月に採取)。採取地点の概略を図-2 に示す。

多摩川本川の最上流地点として選定した「本川 1」と最下流地点として設定した「本川 3」の間には、5 つの支川と 5 つの下水処理場がある。また、「本川 1」の上流域には下水処理場は存在していない。図-2 の様に、「本川 2」、「本川 3」及び「支川 3」の 3 地点は、下水処理場が上流域にあり、ここで得られた生物は何らかの影響を受けている可能性がある。

環境ホルモンの測定物質として、国土交通省等で実施した実態調査において多くの地点から比較的高い濃度で検出されていたノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A (BPA)、さらに検出される濃度は低いものの、個々の化学物質が持っている女性ホルモン作用が他の物質に比べて非常に強い人畜由来の女性ホルモン、17β-エストラジオール(E2)を選定した。

おな、今回対象としていない物質の影響も評価するために、環境ホルモンの総量的評価を行う目的で土木研究所水循環研究グループで従来より実施している遺伝子組み換え酵母を用いた手法によりエストロゲン様活性の評価を試みた。

### 2.2 測定方法

#### 2.2.1 試料の前処理

試料の前処理は図-3 の様に、河川水は固相抽出により対象物質の抽出・精製を行い、1,000 倍濃縮後に GC/MS 法(ガスクロマトグラフィー質量分析法)で測定した。付着藻類及び底生生物はメタノールを加えすりつぶした後、遠心分離によ

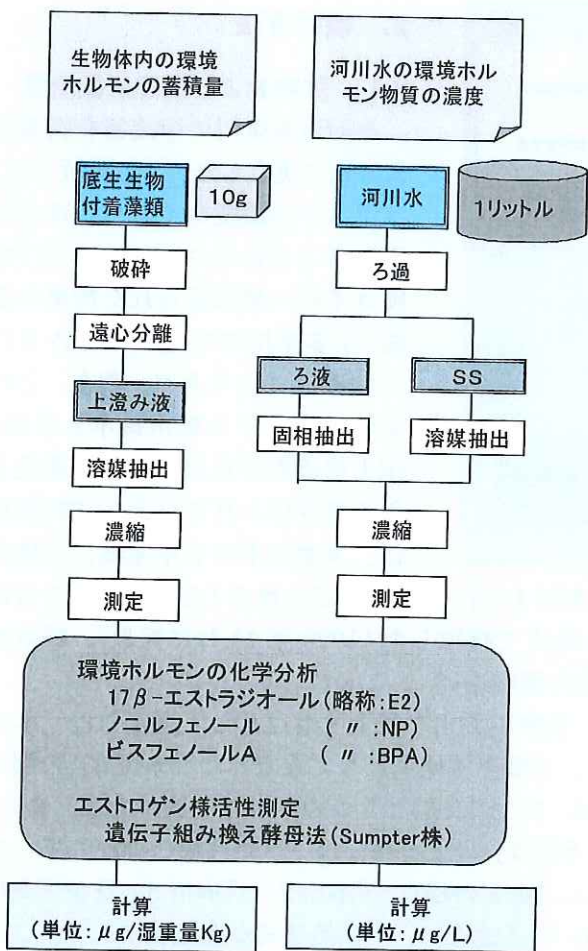


図-3 底生生物、付着藻類及び河川水からの環境ホルモンの抽出方法

りメタノール抽出を行った。

なお、測定値の表記は底生生物及び付着藻類については1kgの重量に換算し直した場合の環境ホルモンの蓄積量として表し、河川水は1リットル中の含有量として表し、両者の比較を行った。

2.2.2 NP、BPA および E2

NP、BPA および E2 は GC/MS を用いて測定した。試料の前処理および GC/MS の測定条件については基本的に環境省の方法を用いた<sup>1),4)</sup>。

2.2.3 エストロゲン様活性

今回の調査で用いた遺伝子組み換え酵母は英国の Brunel 大学、Sumpter 教授より譲渡を受けたものであり、以前から土木研究所水循環研究グループで下水試料や河川水を評価するためその手法の検討を行ってきたものである。この酵母の遺伝子にはヒトの女性ホルモン受容体の合成遺伝子が組み込まれており、試料中に存在している女性ホルモン作用を持つ化学物質がこの女性ホルモン受容体が結合することで菌体内に培養液中の糖類を分解する酵素が合成される。この酵素の合成量

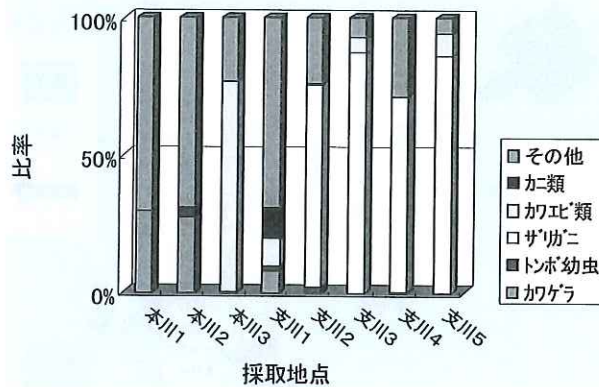


図-4 採取した底生生物の生物構成比(乾重量)

と酵母菌体内に取り込まれた女性ホルモン活性を持つ物質の総量が比例することから、この酵素反応量を測定することで試料の女性ホルモン作用を測定することができる。試料の測定方法は矢古宇らの方法<sup>10)</sup>に従い、試料のエストロゲン活性の大きさは天然の女性ホルモンである17β-エストラジオールの濃度に換算したE2-活性等量として求めた。

3. 結果および考察

今回の調査に伴う生物試料の採取により、多摩川にどのような生物が分布していたかを表-1に示した。この図は各採取地点で採取した底生生物の主な種類の構成をその乾燥重量をもとにその比率で表したものである。残念ながら、今回採取した底生生物の種類は本川と支川ではその生物種構成比が異なるため、これらを用いた環境ホルモンの測定結果を単純に比較しても、種ごとの濃縮の特異性がでてしまい断定的な事までは言えないが、測定地点の生物群における比較として、環境ホルモンの生物への蓄積について知見を得ることは可能であると判断した。

3.1 付着藻類及び底生生物の環境ホルモン

河川水、付着藻類および底生生物中の環境ホルモンの濃度とエストロゲン様活性の測定結果について、各地点ごとの比較を行った結果を図-4に示す。

NPの濃度範囲は、河川水では0.1~0.4μg/Lであったのに対し付着藻類では8~130μg/湿重量kg、底生生物では8~140μg/湿重量kgと生物からの測定値が全て河川水の値を上回っていることが分かった。

BPAもNPと同様の傾向であり、河川水では0.02~0.15μg/L、付着藻類では2~8.8μg/湿重

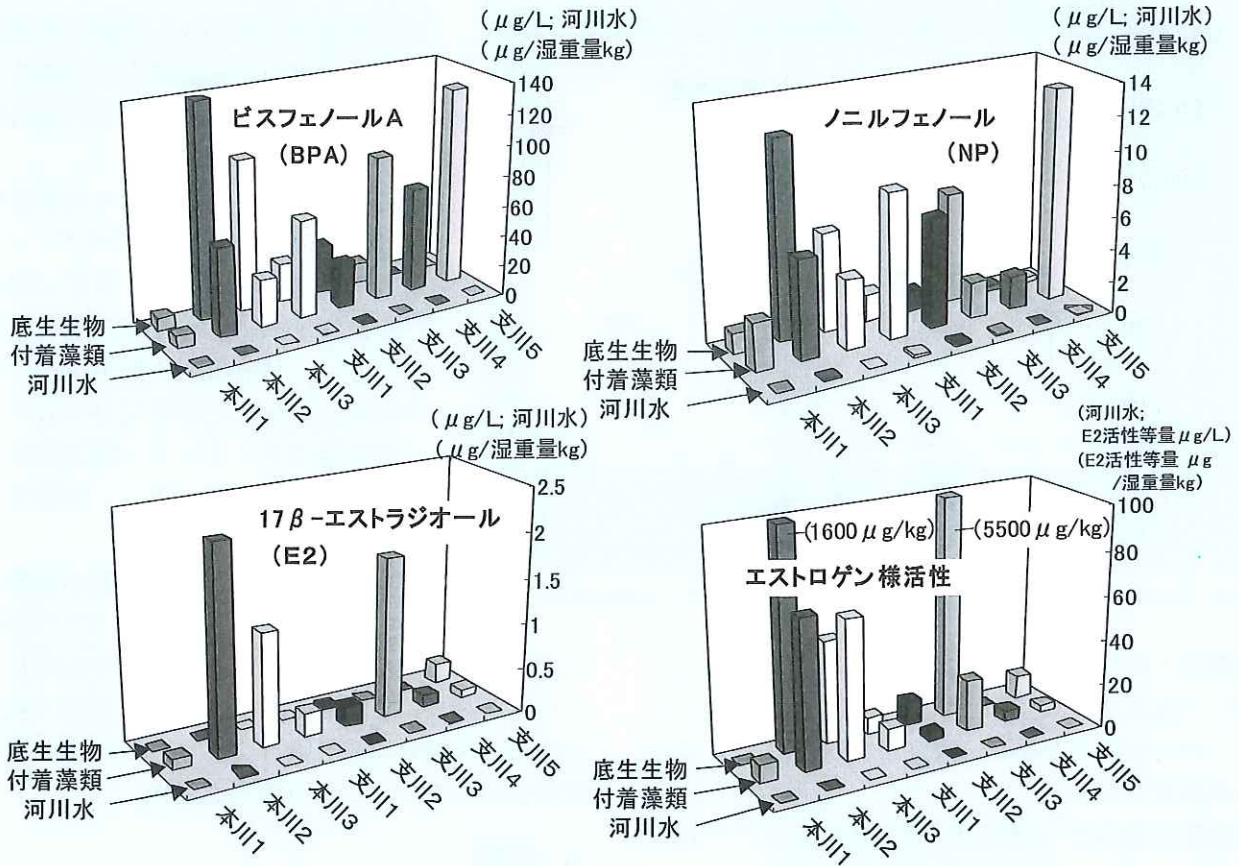


図-5 底生生物、付着藻類及び河川水から抽出した環境ホルモンとエストロゲン様活性の測定結果

量 kg、底生生物では 0.3~12μg/湿重量 kg であった。

E2の濃度範囲は、河川水では 0.0001~0.0076μg/L、付着藻類では 0.09~2.26μg/湿重量 kg、底生生物では <0.01~0.22μg/湿重量 kg と底生生物では検出下限値を下回るほど蓄積量が低いものも見られた。

### 3.2 環境ホルモンの生物濃縮

今回得られた結果をもとに、河川水中の環境ホルモンがどの程度付着藻類や底生生物に移行しているか推定するため濃縮率を算出し、その値の高低により生物への蓄積状況を把握することとした。

本来、生物濃縮を評価する係数(濃縮率)としては 2 種類用いられており、生物濃縮計数 (BCF; Bioconcentration Factor) と生物蓄積計数 (BAF; Bioaccumulation Factor) がある。このうち、生物濃縮係数 (BCF) は水からの汚染物質の直接的な取り込みだけを考慮した指標値であり、生物蓄積係数 (BAF) は餌に蓄積している汚染物質が食物連鎖を通じて上位の生物に蓄積されていくことも加えて考慮した値である。従って、今回の評価値である濃縮率は BAF に相当するものと考え

られる。

$$\text{濃縮率(倍)} = \frac{\text{付着藻類中の濃度または底生生物中の濃度}}{\text{河川水中の濃度}}$$

濃縮率の算出結果を図-6 に示すが、NP の濃縮率は付着藻類では 160~650 倍、底生生物では 63~990 倍であった。BPA の濃縮率は、付着藻類では 18~650 倍、底生生物では 8~170 倍であった。底生生物の種類によっては付着藻類を食物としていることから、NP および BPA の濃縮率は、付着藻類よりも底生生物の方で高いことが予想されたが、今回の結果から推定する限りで必ずしも高くはないことが示唆された。この理由として、底生生物には水生昆虫、甲殻類やその他の生物が含まれており、NP や BPA は底生生物の生物体内で代謝、分解されていることが考えられた。E2 の濃縮率は、付着藻類では 64~1200 倍、底生生物では 100~160 倍であった。付着藻類では E2 の濃度比が NP および BPA の濃度比よりも高くなっていたが、底生生物でそれほど大きな差は見られなかった。付着藻類と底生生物では E2 の

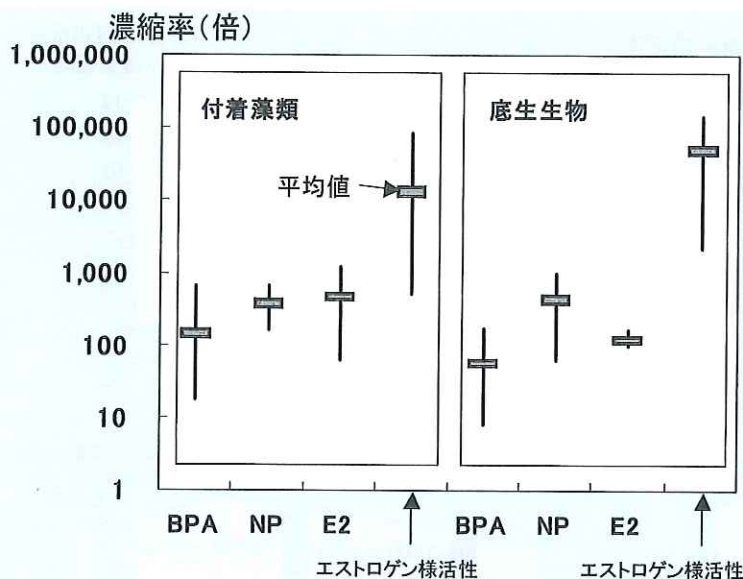


図-6 河川水に対する付着藻類及び底生生物の環境ホルモンの濃縮率及び範囲

濃縮率は傾向が異なり、底生生物の濃度比の方が低いか検出濃度が定量下限以下が多かったことから、底生生物の体内ではE2が代謝されていることが推察された。

底生生物及び付着藻類の体内中のエストロゲン様活性を持つ物質の総量を推定するために行ったエストロゲン様活性の測定では、その活性値の範囲が河川水では0.0001~0.0464 $\mu$ g E2活性等量/L、付着藻類では3.4~66.8 $\mu$ g E2活性等量/湿重量kg、底生生物では7.4~5458 $\mu$ g E2活性等量/湿重量kgであった。河川水のエストロゲン様活性に対する付着藻類と底生生物のエストロゲン様活性の比は、上述した環境ホルモンの濃縮率よりも大きくなっていった(図-6)。特に、底生生物のエストロゲン様活性は、河川水のエストロゲン様活性に対して最大で約 $10^5$ であった。

これらの結果から、付着藻類においては河川水中のエストロゲン類似物質が濃縮されていることや植物エストロゲンのようなエストロゲン類似物質が付着藻類中で生成されていることが考えられ、また底生生物においてはエストロゲン類似物質が底生生物の体内で合成されていることなどが考えられた。

遺伝子組み換え酵母で測定したNPおよびBPAの純粋物質のみのエストロゲン様活性は、E2に対してそれぞれ0.0001、0.00007の比率のレベルである<sup>10)</sup>。これらの物質(NP、BPA及びE2)の個々のエストロゲン様活性のポテンシャルと各試料から検出されたそれぞれの物質の濃度を乗じて

算出した計算値(エストロゲン様活性の理論換算値)は、遺伝子組み換え酵母でその総量を測定したエストロゲン様活性よりもすべての試料において低い値であった。

この差は、河川水よりも付着藻類と底生生物の方が大きくなっていった。このことは未知のエストロゲン様活性を持つ未知物質の存在を示唆するとともに、付着藻類や底生生物には今回測定対象した物質以外にもかなりの割合でエストロゲン様活性を持つ物質が存在していることが示唆された。

本調査の結果から、魚類が環境ホルモンであるNP、BPA、E2に暴露

する経路として食物が重要であることを示唆している。さらに、魚類の食物である付着藻類や底生生物には未知のエストロゲン活性を持つ未知の物質が存在していることが確認された。

#### 4. 結論

多摩川において、河川水、付着藻類、底生生物を採取し、試料に含まれるNP、BPAおよびE2をGC/MSを用いて測定した。また、試料のエストロゲン様活性を遺伝子組み換え酵母を用いて測定した。

河川水と付着藻類および底生生物に含まれる環境ホルモンの濃度を比較した結果、付着藻類、底生生物ともに河川水の濃度よりもかなり高いことが分かった。また、底生生物は藻類よりも低い蓄積量であったことから、NP、BPAおよびE2は底生生物の体内で代謝分解されていることが示唆された。また、化学物質とエストロゲン様活性の測定の結果から、河川水、付着藻類及び底生生物にはNP、BPA及びE2以外にもエストロゲン様活性が存在していることが示唆され、1つの可能性としてこれらの物質が生物体内で生産されている可能性が考えられた。

今回の調査結果より魚類は、藻類や底生生物を餌とする蓄積経路は、水からの直接的な経路同様に、NP、BPA及びE2が移行する重要な経路であると考えられた。

現在、魚類についても同様の調査を行いこれらの主要な環境ホルモンがどの程度蓄積しているか

確認すること、また、餌を経由した曝露レベルを把握するため魚類の胃内容物中の環境ホルモンの蓄積量についても調査しておく必要があると考えている。また、対象物質の蓄積性にバラツキが見られたことから生物種や食物連鎖の関係をさらに検討する必要がある。

参考文献

- 1) 環境省：外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'-, 1998.
- 2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告書, 2001.5.
- 3) 建設省河川局河川環境課、下水道部流域下水道課：平成 10 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, 1999.3.
- 4) 環境省：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の実態概況調査（夏期）結果（速報）について, 1998.12.
- 5) Colborn, T et al., Our Stolen Future: Are We Threatening Our fertility, Intelligence and Survival? - A scientific detective story, Dutton. 1998.
- 6) UK Environment Agency, UKEA, The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents, Environment Agency, 1997.
- 7) 井口泰泉：多摩川でみられた魚類の異常, 科学, 岩波出版, Vol.68, No.7, pp.515-519, Iwanami Publishing Ltd. 1998.
- 8) Routledge, E. J. et al. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach, Environmental Science & Technology, Vol.32, No.11, pp.1559-1565. 1998.
- 9) Folmer, L.C. et al. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in fetal male carp (Cyprinus carpio) captured near a major metropolitan sewage treatment plant, Environmental Health Perspectives, Vol.104, No.10, pp.1096-1101. 1996.
- 10) 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、環境工学論文集、Vol.36, pp.199-204, 1999.12.
- 11) Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ.Toxicol.Chem., Vol.15, No.3, pp.241-248. 1996.
- 12) Akihiro Takahashi, Tadashi Higashitani, Hiroyuki Tamamoto and Hiroaki Tanaka : Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Periphytons and Benthos in the Tama River, IWA 3rd World Water Congress (CD-ROM), 2002.4.

高橋明宏\*



東京都下水道局三河島処理場水質管理主任  
(前 国土交通省土木研究所下水道部水質研究室研究員)  
Akihiro TAKAHASHI

玉本博之\*\*



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研究員  
Hiroyuki TAMAMOTO

東谷 忠\*\*\*



同 水循環研究グループ水質チーム専門研究員  
Tadashi HIGASHITANI

田中宏明\*\*\*\*



同 水循環研究グループ水質チーム上席研究員  
Hiroaki TANAKA