



Title	韓国洛東江流域におけるエストロゲン様活性の挙動に関する研究
Author(s)	李, 炳千; 竹田, 誠; 河合, 富貴子 他
Description	第10回衛生工学シンポジウム (平成14年10月31日 (木) -11月1日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 5 環境リスク評価 . 5-2
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 10, 137-140
Issue Date	2002-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7120
Type	departmental bulletin paper
File Information	10-5-2_p137-140.pdf



5-2

韓国洛東江流域におけるエストロゲン様活性の挙動に関する研究

○李 炳千、竹田 誠、河合 富貴子、大野 浩一、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学）
李 哲熙、李 淳和（韓国嶺南大学）

1. はじめに

現代社会では非常に多くの化学物質が様々な用途で我々の身の回りで利用されている一方で、不必要になった化学物質が環境中へと放出されている。近年、それら化学物質の中でも生物の内分泌系に作用し健康障害等の影響を及ぼす恐れがある、いわゆる内分泌攪乱物質による人体、あるいは生態系への影響が危惧されている。このような背景から化学物質個々のホルモン様活性のスクリーニング手法の開発や環境中での汚染実態を調べるためのモニタリングが試みられている。

洛東江は韓国南部最大の河川として、上流域から下流域まで水道水源として利用されている。しかし、都市域や工業地域において家庭下水や工業排水の処理水の放流先となっているのが現状である。

本研究では、洛東江流域におけるエストロゲン様物質による汚染状況を明らかにし、エストロゲン様物質を除去する適切な浄水処理あるいは下水処理手法を提案するために、洛東江の本流、支流、下水処理場におけるエストロゲン様活性およびエストロゲン様物質濃度の現地調査を行ったので、その調査結果を報告する。

2. 実験方法

2. 1 試料水の濃縮方法

採水した試料は、ガラス繊維濾紙（GF/B、Whatman 社製）で吸引濾過した後、ヘキササン、ジクロロメタン、メタノール（残留農薬試験用、Wako 社製）および精製水でコンディショニングした固相カートリッジ Sep Pak C18 に通水した。Sep Pak を洗浄した後、ジクロロメタンにより目的物質を溶出した。溶出液をエバポレータにより減容、さらに窒素気流下で乾固させた後、エストロゲン様活性測定用のサンプルは DMSO、ELISA 法によるエストロゲン様物質の濃度測定用のサンプルは 10%メタノールに再溶解させた。

2. 2 酵母 Two-Hybrid 法によるエストロゲン様活性の測定方法

酵母 Two-Hybrid 法は、哺乳類のエストロゲンレセプター（ER）を組み込み、形質変換させた酵母を用いる。この酵母は、細胞核内にエストロゲンレセプターを持ち、これにエストロゲン様物質が結合し活性化すると、DNA 上のエストロゲン応答性エレメントに結合して、 β -galactosidase を分泌させるレポーター遺伝子の LacZ が転写を開始する。この β -galactosidase を ONPG 溶液により呈色させ吸光度を測定することによってエストロゲン様活性を調べる。

実験手順は、凍結保存してある組み換え酵母菌株を SD 培地に植菌し、30°C で 16 時間培養する（前培養液）。この前培養液に SD 培地を加え測定試料を添加し、30°C で 4 時間培養した後、培養液の 595nm (OD₅₉₅) の吸光度を測定して酵母の菌体量を測定する。残りの培養液を遠心分離し、上澄み液を除去後残った沈殿に 1mg/ml Zymolyase 20T を含む Z-Buffer を加え 37°C で 15 分間静置して、酵母の細胞膜を破壊する。これに 4mg/ml ONPG 溶液を加え 30°C で 30 分間静置して呈色反応させる。1M の Na₂CO₃ を加えることで呈色反応を停止させ、遠心分離後の上澄み液の 420nm(OD₄₂₀ : ONPG の発

色量)、570nm(OD₅₇₀:不純物により散乱吸収量)の吸光度を測る。以上のような操作により、次式からエストロゲン様活性が求められる。

$$\text{エストロゲン様活性} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{570}) / (\text{OD}_{595} \times t \times v)$$

t: 呈色反応時間(min), v: 前培養液の量(ml)

エストロゲン様活性は陽性対照である 17β-Estradiol (以下、E2) の最大活性値を 100%として、これに対する比活性値に測定された各試料のエストロゲン様活性を換算することで評価を行った。

2. 3 ELISA 法によるエストロゲン様物質の濃度測定

環境試料中のエストロゲン様物質の濃度測定は、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (以下 ELISA 法)を用いて行った。今回、測定したエストロゲン様物質は E2 および Estrone (以下、E1)、アルキルフェノール類 (以下、APE) であり、いずれも ELISA キット (武田薬品工業製) を用いて定量を行った。

3. 実験結果および考察

3. 1 エストロゲン様物質の濃度分布

図 1 は韓国南部で最大の河川である洛東江において、2001 年 9 月および 2002 年 5 月に調査を行った洛東江中・下流域の本流と支流、さらに下水処理場の採水地点を示している。採水を行ったのは、洛東江本流 6 地点、支流 4 地点、家庭排水系と工場排水系に分けて処理を行っている下水処理場の流入水および処理放流水である。表 1 には各地点でのエストロゲン様物質の濃度の測定結果を示した。下水処理場において、流入水と処理放流水を比較すると、処理後に濃度が減少しているものの、E1 と E2 については 0.02~0.05μg/l、APE は 11.4~23.8mg/l という濃度で河川に放流されていることが明らかとなった。

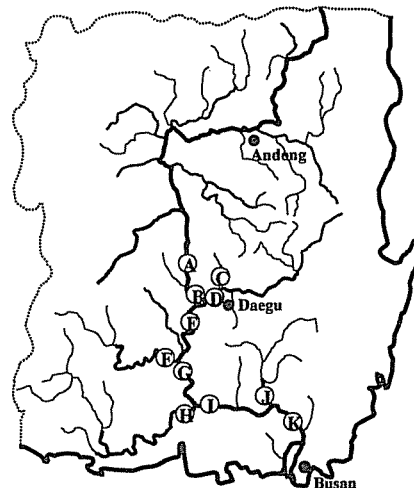


図1. 洛東江の各採水地点

表 1. 洛東江の各地点のエストロゲン様物質濃度

(濃度: μg/l, mg/l(APE), 負荷量: mg/hr, g/hr(APE))

地点	E1		E2		APE		DOC mg/l	E260 cm ⁻¹	
	濃度	負荷量	濃度	負荷量	濃度	負荷量			
本流	A-倭館	0.0007	68.0	0.0067	647.5	0.501	48.7	2.29	0.049
	B-江亭	0.0007	42.3	0.0067	423.5	0.504	31.8	2.04	0.045
	E-高靈橋	0.0033	196.2	0.0111	669.6	2.293	137.8	9.35	0.060
	G-赤布橋	0.0019	86.8	0.0107	499.0	1.439	67.4	11.60	0.052
	I-南旨	0.0047	544.9	0.0089	1023.4	1.648	190.0	6.21	0.055
	K-梅里	0.0028	365.7	0.0124	1616.1	1.382	179.6	11.74	0.054
支流	D-琴湖江	0.0073	50.8	0.0063	43.7	4.032	28.0	12.95	0.097
	F-黄江	0.0011	2.5	0.0183	40.9	0.957	2.1	6.97	0.025
	H-南江	0.0025	51.1	0.0197	396.9	1.063	21.4	4.48	0.038
	J-密陽江	0.0031	71.8	0.0098	225.9	1.312	30.2	11.46	0.024
C-達西川下水処理場	Dom.In	0.1740	253.7	0.0463	67.5	163.09	237.8	39.58	0.455
	Dom.Out	0.0265	38.7	0.0274	39.9	11.36	16.6	21.66	0.320
	Ind.In	0.0429	26.8	0.0526	32.9	262.64	164.2	74.17	0.824
	Ind.Out	0.0248	15.5	0.0371	23.2	23.76	14.8	57.62	0.699

相対標準偏差 RSD : <5%, n=3

Dom.In : 家庭排水系流入水、Dom.Out : 家庭排水系処理放流水

Ind.In : 工場排水系流入水、Ind.Out : 工場排水系処理放流水

3. 2 洛東江のエストロゲン様活性の挙動

図 2 は、洛東江流域のエストロゲン様活性の挙動を、本流、支流、下水処理場に分けて示したものである。中上流域にある A、B 地点についてもエストロゲン様活性が認められた。A 地点の近郊には工業団地があることから、この工業団地からの排水が A、B 地点のエストロゲン様活性に影響を与えている可能性が考えられる。また、支流の D 地点では C 地点の下水処理場に加えて、韓国で 3 番目に大きな都市である Daegu から排出される家庭下水及び工業排水の処理水等の影響により、他の支流の採水地点よりもエストロゲン様活性が高くなっているものと考えられる。支流 D 地点が流入した本流 E 地点のエストロゲン様活性が上流の B 地点よりも高い原因についても、Daegu から排出される負荷の影響であると考えられる。

前節で示したように下水処理場において処理前後でエストロゲン様物質の濃度は減少しているにもかかわらず、エストロゲン様活性が処理後に増大する傾向が得られた。図 3 は下水処理場のエストロゲン様活性を示している。工場排水系の流入水は、濃縮倍率 1000 倍

でエストロゲン様活性を示すことから、他の試料よりも明らかに活性が高いことがわかる。しかし、濃縮倍率 50000 倍において 10000 倍に比べてエストロゲン様活性が減少する傾向がみられた。これまでの研究より、エストロゲン様物質あるいは高いエストロゲン様活性を有している環境試料において、高濃度（高濃縮倍率）で活性が減少するという知見が得られている。これは高濃度のエストロゲン様物質が、測定に用いている酵母に対して何らかの毒性を示すことで、見かけ上活性が減少したように結果が得られたものと考えられる。また、環境試料に関してはエストロゲン様物質自体だけではなく、共存している様々な物質が影響することが予想される。以上のことから、図 2 において工場排水系では処理後にエストロゲン様活性が増大しているのではなく、流入水の活性が本来示すべき値よりも低く測定されているものと判断される。

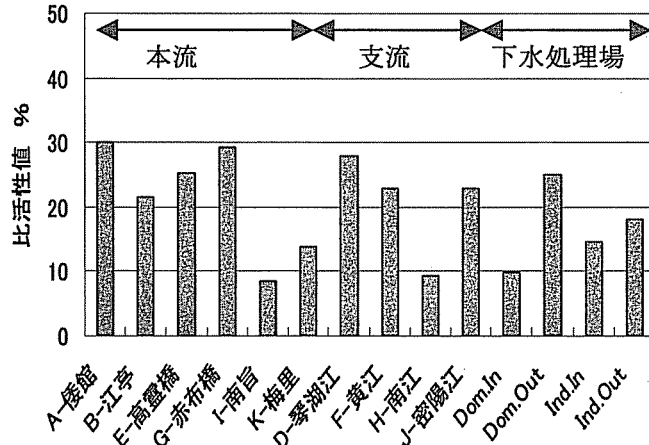


図 2. 各採水地点のエストロゲン様活性 (5 万倍濃縮)

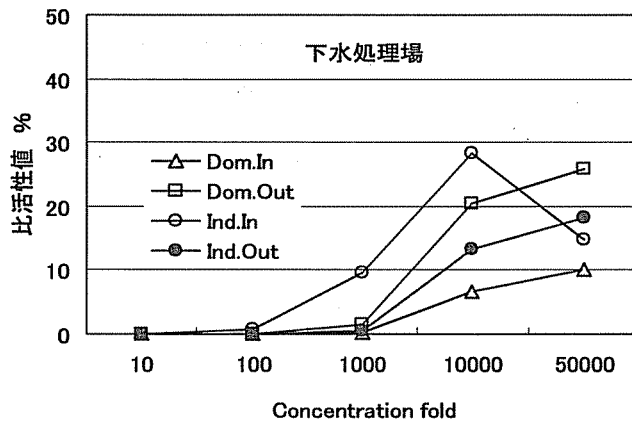


図 3. 下水処理場のエストロゲン様活性

一方、家庭排水系についても流入水よりも処理水の方がエストロゲン様活性が増大している。図 3 より工場排水系の場合と異なり高濃縮倍率で活性が減少するような現象は認められなかった。家庭排水系は工場排水系に比べ、化学物質よりも人畜糞尿由来の E2 等がエストロゲン様活性に対して寄与する割合が大きいと考えられる。E2 はエストロゲン様活性を示さない抱合体化された形態で人体から排出されるが、環境中で抱合体が分解された結果、再びエストロゲン様活性を示すという報告があり、処理水でエストロゲン様活性が増大した理由のひとつの可能性として考えられる。

4. まとめ

韓国の洛東江中下流域の本流、支流、下水処理場におけるエストロゲン様活性の挙動を明らかにするために、2 度の現地調査を実施しエストロゲン様活性およびエストロゲン様物質の濃度の分析を行った結果、次のような知見が得られた。

- ・洛東江流域では、都市周辺や下水処理場の下流域だけではなく、都市からの排水が流入することが少ない上流域などにおいてもエストロゲン様活性が検出されたことから、中・下流域全体にエストロゲン様物質が分布していることが示唆された。
- ・下水処理放流水中には 0.02~0.05 $\mu\text{g/l}$ 程度の E2、E1、11.4~23.8 mg/l の APE が存在していることから、下水処理場はエストロゲン様物質の主要な汚染源となっている。

このように、現状の下水処理場ではエストロゲン様物質を完全に除去できないため、洛東江流域における主要な汚染源となっている。今後は、エストロゲン様物質を効果的に除去可能な下水処理あるいは浄水処理手法の開発を行っていく必要がある。

5. 参考文献

1. T.A. Ternes, P. Kreckel, J. Mueller, Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic batch experiments with activated sludge, The Science of the total Environment, vol.225, pp91-99, 1999
2. 鎌田素之、水環境中における内分泌攪乱作用の酵母 Two-hybrid 法による評価と挙動に関する研究、博士論文、北海道大学、2002