

植物によるエストロゲン消失に家畜排泄物が及ぼす影響の検討

-植物由来の酵素消失効果およびエストロゲンの植物移行の可能性を中心に-

京大農 ○櫻井 伸治 京大炉 藤川 陽子 福井 正美 高橋 千太郎 京大農 梅田 幹雄
(株)ハイテック 角本 真澄美 大阪産業大 濱崎 竜英 菅原 正孝

1.はじめに 家畜排泄物を原料としたメタン発酵消化液（以下、単に消化液）を農地へ適用することで天然女性ホルモンのエストロン、エストラジオール、エストリオール（エストロゲン、以下それぞれ E1, E2, E3）等が土壤に投入されるが、植物が生育媒体中のエストロゲンの挙動に及ぼす影響に関する報告は少ない。植物を生育させた寒天培地中のエストロゲン濃度が植物を生育させていないそれと比べて、1ヵ月で劇的に低くなったことを報告した¹⁾。これらの消失効果の原因として植物から浸出した酵素によるエストロゲン分解、植物による摂取、植物体への吸着などが考えられる。実際、植物や菌類から浸出するある種の酵素（例、ラッカーゼ）がエストロゲンを分解する²⁾ことが報告されている。しかし植物浸出液中に含まれる酵素（ペルオキシダーゼ）は土壤マトリックスによって吸着または変質の効果を受けて不活性化することも報告されており³⁾、土壤中や多くの夾雑物が存在する消化液中では植物のエストロゲン分解促進効果は低下することも考えられる。一方、エストロゲンの疎水性は強くなく（log Kow 値, E1: 3.1-3.4, E2: 3.1-4.0, E3: 2.6-2.8）⁴⁾、Briggs ら⁵⁾の報告からエストロゲンの植物体への移行は十分に考えられる。そこで本研究では消化液を添加した寒天で植物の生育試験を行い、生育期間後、寒天中および植物体中のエストロゲン濃度を測定することにより、消化液が植物のエストロゲン消失効果に及ぼす影響およびエストロゲンの消失経路に関して検討した目的とした。

2.実験方法 寒天植物生育試験 消化液は京都府南丹市八木バイオエコロジーセンターで採取した。消化液はポサイズ 0.2 μ m のミリポアフィルターで滅菌ろ過したもの（以下、ろ過消化液）とろ過していない消化液（以下、生消化液）を用意した。寒天培地と Hoagland 培養溶液の混合液 500mL に 0%, 1%（生消化液またろ過消化液）、5%（ろ過消化液のみ）（v/v）の濃度で添加、さらに E1 を初期濃度が 10, 100 μ g/L になるように寒天に添加した。なお、消化液無添加の寒天には E2 を添加したものも準備した。消化液入りの寒天で E2 を添加しなかったのは消化液存在下では E2 は排泄物等に由来する微生物により容易に E1 に酸化されることが判っているためである。ろ過消化液 5% 添加の寒天では消化液からの栄養成分があることから、Hoagland 培養液添加量はその分減らして加えた。寒天固化後、シロツメクサ(*Trifolium repens*, 以下、単に植物)の種子を 0.2g 直播種して実験室で生育させた。生育温度は 20-25°C である。ただし、消化液無添加の寒天では 10-15°C で生育させた実験系も用意した。生育期間は 2 週間（ろ過消化液を除く）、1ヵ月とした。所定期間生育後、ポットを解体し、植物の湿重量を測定した後、植物を葉と根に分解して植物体中エストロゲン濃度ならびに寒天中エストロゲン濃度（寒天を遠心分離後、C18 樹脂による固相抽出）を GC-MS にて測定した。なお対照試験として植物を植えていない寒天培地についても同様な試験を行った。**植物体中エストロゲン濃度測定** 植物体とアセトニトリルをホモジナイズして植物抽出液とした。5%塩化ナトリウム水溶液、植物抽出液およびジクロロメタンを混合して液液抽出し、ジクロロメタン中にエストロゲンを分配させて、真空遠心分離にて乾固した。乾固後、ヘキサン：ベンゼン(1:1, v/v) に転溶し、GCB（グラファイトカーボンブラック）を充填させたカラムに全量負荷した。トルエン：アセトニトリル(1:1, v/v)にてカラムから溶離して溶出液を窒素雰囲気下で乾固させた。乾固後 TMS にて誘導体化、アセトンに転溶して GC-MS にてエストロゲン測定を行った。

3.結果と考察 寒天中エストロゲン濃度 本研究では添加した E1 および E2 から E3 への変化は観察されなかった。植物生育 1ヵ月後の消化液無添加寒天中の E1 および E2 濃度を表 1 に示した。表 1 から生育温度によって試験期間後のエストロゲン濃度に有意な差が見られ、10-15°C で植物を生育させた寒天ではエストロゲンが若干残留した。図では示さないが、20-25°C の方が植物生育は良好であったことから植物生長の差によってエストロゲン消失効果に差が生じたことが示唆された。また植物のない寒天中において E1 が E2 に還元されたことも観測されたが、この原因

キーワード メタン発酵消化液, エストロゲン消失, 寒天植物生育試験, 植物体中エストロゲン濃度, 植物移行

〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 2-1010 京都大学原子炉実験所 放射線管理学 高橋研究室 TEL 072-451-2447

として寒天培地中に繁殖した菌類の影響が考えられる。実際、糸状体菌類の一種(*Cochliobolus lunatus*)がE1とE2を酸化還元反応に関与する酵素(17 β -hydroxysteroid dehydrogenases)を有していることが知られている⁶⁾。しかし本研究ではその酵素および菌類の同定までは至らなかった。なお植物のない寒天ではE1+E2量は初期エストロゲン添加量に対して約60%以上残留した。生育期間後のエストロゲン消失率(%)を表2に

表1 1ヵ月後の温度別の植物存在下寒天中エストロゲン濃度(単位: $\mu\text{g/L}$, BLD: below limit of detection 0.01 $\mu\text{g/L}$)

Initial	E1		E2	
	10-15 $^{\circ}\text{C}$	20-25 $^{\circ}\text{C}$	10-15 $^{\circ}\text{C}$	20-25 $^{\circ}\text{C}$
E1 10 $\mu\text{g/L}$	0.57 \pm 0.49	BLD	0.10 \pm 0.14	BLD
E2 10 $\mu\text{g/L}$	0.30 \pm 0.02	BLD	0.60 \pm 0.01	BLD
E1 100 $\mu\text{g/L}$	0.55 \pm 0.50	0.01 \pm 0.02	BLD	BLD
E2 100 $\mu\text{g/L}$	1.13 \pm 0.70	0.02 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04	0.01 \pm 0.02

表2 植物生育後のエストロゲン消失率(%) (上段: 2週間, 下段: 1ヵ月)

	2週間	無添加(10-15 $^{\circ}\text{C}$)	無添加(20-25 $^{\circ}\text{C}$)	ろ過消化液(1%)	ろ過消化液(5%)	生消化液(1%)
	E1 10 $\mu\text{g/L}$	未実施	未実施	94.2	未実施	未実施
E1 100 $\mu\text{g/L}$	未実施	未実施	96.0	未実施	未実施	58.0 \pm 11.5
	1ヵ月	無添加(10-15 $^{\circ}\text{C}$)	無添加(20-25 $^{\circ}\text{C}$)	ろ過消化液(1%)	ろ過消化液(5%)	生消化液(1%)
E1 10 $\mu\text{g/L}$		93.3 \pm 5.1	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9
E1 100 $\mu\text{g/L}$		99.4 \pm 0.5	99.99 \pm 0.0 ₄	>99.99	99.1 \pm 1.5	>99.9

示した。生育期間2週間後のエストロゲン消失率を比較すると、生消化液が存在することでエストロゲン消失率は低下していることが観測できた。すなわち消化液の添加によってエストロゲン消失は緩慢になることが示された。しかし試験開始1ヵ月後植物存在下で消化液を添加した全ての寒天中E1濃度はほぼ検出下限(0.01 $\mu\text{g/L}$)以下になり、エストロゲン消失は消化液無添加の場合とほぼ同等になった。これらの結果から消化液によってエストロゲン消失効果は若干低下するものの、時間とともに確実に消失が進行することが判った。また生消化液を添加した寒天の植物は、消化液無添加の寒天の植物と比較して草丈を指標とした植物生長が悪かったため、この植物生長不良によってエストロゲン消失効果の低下が生じた可能性も考えられたが、消化液による消失率の低下に対する具体的な原因の解明には至らず今後の検討課題である。**植物体中エストロゲン濃度** 本研究では植物の葉根部位別、全52検体中13検体で植物体中にエストロゲンが検出された。さらに消化液を添加した寒天ではE1のみを寒天中に添加したが葉や根からE2も検出された。寒天と接触していない葉部でもエストロゲンが検出されていることから根から葉への移行が生じていることが示唆された。試験終了時に植物体から検出されたエストロゲン量は0.11~1.55 μg で添加エストロゲン量に対する植物体中エストロゲン量は数%程度であった。このことからエストロゲンの消失経路として植物体への移行後の消失と寒天中での消失の両者が考えられる。なお、試験終了時には、植物体中エストロゲン濃度/寒天中エストロゲン濃度比は50-870と非常に高い値をとった。Briggsら⁵⁾の報告によると残留農薬等の有機物の植物体中の濃度/環境中濃度比は0.65-85.8であり、この値と比較すると本研究でエストロゲンについて観測された濃度比は1桁高かった。今後植物によるエストロゲン摂取、植物体内中の分布および植物体内中でのエストロゲン分解、代謝について詳細に検討する必要がある。

4.まとめ 今回の研究で消化液が共存する寒天中では植物によるエストロゲン消失効果が低減すること、ほとんどの植物検体でエストロゲンは検出されなかったものの、植物へのエストロゲンの移行の可能性が考えられることが判った。さらに植物のない条件下では菌類によるものと考えられるE1からE2への還元が観測された。また、E1のみ添加した寒天で生育した植物体内中でE2が検出されたことから植物存在下でもE2の生成の可能性も示唆された。E2はE1よりエストロゲン活性が高いことから、E2が生成されるメカニズムが存在するとすればその解明が重要である。今後、エストロゲン消失経路を具体的に解明するために、生育培地中の微生物および酵素の影響の定性的、定量的検討および植物体内に取り込まれたエストロゲンの消失速度を明らかにする必要がある。 **参考文献** 1) 櫻井ら, 第62回土木学会年会講演集, 2007; 2) M. Graubard *et al.* 1941, *Physiol.* 27, 149-152; 3) H. Claus *et al.*, 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 506-511; 4) T.A. Hanselman *et al.* 2003, *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471-5478; 5) G.G. Briggs *et al.* 1982, *Pestic. Sci.* 13, 495-504; 6) T.L. Rižner *et al.* 2001. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171, 193-198