

VII-43

緑藻類 *Spyrogyra sp.*による天然環境ホルモン（エストロン）の除去

東北大学工学部 学生会員○大堀雅人 東北大学大学院工学研究科 正会員 中野和典 西村 修

1. はじめに

環境中に存在し、生体内に取り込まれるとホルモンに似た働きを行って内分泌系を攪乱する物質を内分泌攪乱化学物質(Endocrine Disrupters)と呼ぶ。一般的には「環境ホルモン」とも呼ばれている内分泌攪乱化学物質は、オス化・メス化、生殖異常、発生・発育異常、免疫異常、行動異常など非常に広範囲における影響を与えることが明らかになり、社会問題化している。

これらの化学物質は、水を介して環境中に排出されることが多いと考えられる。そのため、水域に生息する生物を通じた生物濃縮を経てヒトにまで暴露し、影響を与えることが懸念される。従来から、人工的な産物由来の化学物質が問題とされてきたが、近年人畜由来の天然女性ホルモン（エストロゲン）が問題となってきた。エストロゲンは他の化学物質に比べ $10^3 \sim 10^4$ 倍のエストロゲン様活性をもつといわれ¹⁾、下水処理場から環境水中に多量に排出されている。下水処理は、人間活動における排水（生活排水、工場排水等）を受け入れ、処理後環境中へ排出するため、内分泌攪乱化学物質の放出を左右する点において非常に重要である。エストロゲンはオゾン処理や活性炭処理等の高度処理によって除去可能であるが、これらの処理法は低コストかつ環境にやさしい処理法とはいえない。

本研究では、低コストかつ環境にやさしい処理法の確立を目指し、下水処理水の放流口などにも見られる緑藻類を利用したエストロゲンの除去の可能性について検討を行った。17 β -エストラジオールは酸化されてエストロンに変換され易いこと、そしてエストロンは17 β -エストラジオールの0.2~0.5倍²⁾とややエストロゲン様活性が低いものの、約5~20倍近くの量が検出される³⁾。このことから、本研究では特にエストロンの除去処理に焦点をあてた。まず、LC/MSによるエストロン測定方法を確立した。そして緑藻類 *Spyrogyra sp.*(アオミドロ)の有無によるエストロン濃度の経時変化の違いをLC/MSより測定し、そのエストロン除去能力について評価す

ることを試みた。

2. 実験方法

(1) LC/MS 法の前処理の確立

エストロンは環境水中に ng/L レベルの極めて低濃度で存在するために、LC/MS で測定するための前処理が重要となる。本研究では、サンプルをマイクロピペットにより採水し、希釈後、シリンジで吸引、カートリッジ（MILLEX, MILLIPORE）にて濾過する方法と環境省の GC/MS, ELISA 法で使用されている、17 β -エストラジオールの固相抽出法⁴⁾の二つの方法を検証した。検証は、濃度既知のエストロン溶液を作成しそれぞれの回収率を比較することで行った。

(2) アオミドロによるエストロン除去実験

アオミドロ(0.5g)と池の水(50ml)をビーカー(100ml)にいれ、2日間人工気象器内(5000Lux, 室温 25℃)で馴致させて、生育具合が良好なアオミドロを選別して用いた。選別したアオミドロと池の水が入ったビーカーにエストロンを添加し、エストロン濃度の経時変化を LC/MS にてモニタリングした。サンプル採取は0, 1, 3日目とし、ビーカーの池の水全量を測定した。サンプルの前処理は検証した固相抽出法により行い、エストロン濃度は LC/MS 分析にて決定した。

3. 結果と考察

前処理法の確立に関連する実験によりエストロンが非常にプラスチック製品に付着しやすく、シリンジやカートリッジに付着したエストロンの回収が重要であることが分かった。その例として、エストロン溶液を採水したマイクロピペットへのエストロンの付着とアセトンによる回収の様子を表1に示した。このデータより前処理法の選定においては、付着によるロスのリスクを考慮することが重要であることが判断できる。固体抽出法では、エストロンの付着によるロスがなく、ほぼ回収率が 100%を示した。簡便性より、本研究では固体抽出法を選定することにした。

図1にアオミドロをいれたビーカー内でのエスト

ロン濃度の経時変化を示した。エストロンの投入量より理論的に初濃度は 80ng/L となるはずが、エストロン濃度は投入直後に明らかに減少し、アオミドロが存在しない系で 49.3ng/L アオミドロが存在する系では 33.3ng/L となっていた。しかし、その後の経時変化では、アオミドロが存在しないブランクではエストロン濃度が一定なのに対して、その後徐々に、アオミドロが存在すると濃度が減少することから、アオミドロにはエストロン除去能があることが分かった。投入した直後からエストロン濃度が減少する現象について機構を確かめるために蒸留水、池の水、アオミドロを 2 日間馴致した池の水 (S-)、2 日間馴致したアオミドロが入っている池の水 (S+) のそれぞれにエストロンを加え、直後のエストロン濃度を測定した。その結果を表 2 に示す。S- と池の水を比較するとあまり差がないことから、アオミドロが生産した分泌物とエストロンが反応したことでエストロンが減少したのではなく、池の水にもともと含まれていた物質となんらかの反応をし、他の物質へと変化したことが考えられた。そこで生成物質を LC/MS の分子量スキャンで検出し、物質を特定することを試みたが、ピークは観察されず、検出はできなかった。また、S+ と S- の違いよりアオミドロがエストロンを吸着・吸収または分解していることが考えられた。そこでアオミドロを取り出してアセトン洗浄し、吸着または吸収したエストロンを抽出することを試みた結果、38.5 (ng/L) の濃度に相当するエストロンを得ることができた。

これらの結果より、投入直後のエストロンの減少は池の水に含まれる物質との反応とアオミドロへの吸着・吸収の両方によることが明らかとなった。アオミドロの存在する系で 3 日目までに観察されたエストロンの減少と消失はアオミドロが存在しないブランクでは観察されなかったことから、アオミドロの存在する系では、エストロンの吸着・吸収に続いて、エストロンの分解が起こっていることが考えられた。

4. まとめ

アオミドロはエストロンの除去能があることが分かったが、分解産物を検出することはできず、その詳細な機構は明らかとなっていない。今後の予定としては、抗酸化物質を投入し、投入直後のエストロン

の減少が妨げられるか否かを検証して、池の水物質との反応が、酸化であったかを検証する。また、エストロン減少の原因はアオミドロ自体にあるのか、まわりの微生物にあるのか、抗生物質を投与し、藻類と微生物を分けて再度実験を行う予定である。また、エストロンが減少しても、他のエストロゲン活性の物質に変化している可能性があるため、ELISA 法を用いてエストロゲン活性の変化を測定する予定である。

表 1 マイクロピペットチップへのエストロン付着とアセトンによる回収

洗浄回数	0	1	2
回収率 (%)	44	78	100

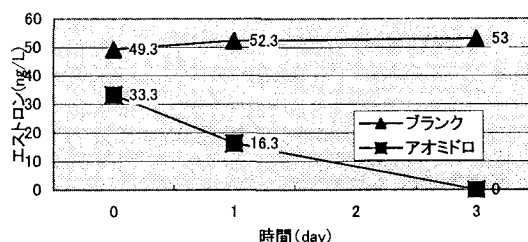


図 1 エストロン濃度の経時変化

表 2 添加 10 分後のエストロン濃度

サンプル	エストロン濃度 (ng/L)
蒸留水	349.5
池の水	190.0
S-	205.5
S+	130.4

参考文献

- 1) 西村ら (1999) 酵母 Two-Hybrid System 法によるフェノール類のエストロゲン様活性の検討, 33 回日本水環境学会年会講演集, pp. 179.
- 2) Routledge E. J., Shbahani D., Desbrow C., Brighty G. C., Waldock M. and Sumpter J. P. (1998). Environ. Sci. Technol., 32(11), 1559-1565.
- 3) 辻村ら (1999) 環境中天然由来化学物質の測定法について—LC/MS/MS による環境中 17β エストラジオール分析法の開発—, 化学品検査協会創立 50 周年記念講演会及び第 4 回研究発表会講演要旨集, pp. 17-26.
- 4) 環境省ホームページ
http://www.env.go.jp/chemi/end/manual/pdfs/11_estradiol.pdf