

B-59 エストロゲン・植物間相互作用における エストロゲンの挙動の検討

○角本 真澄美^{1*}・櫻井 伸治²・藤川 陽子³・濱崎 竜英⁴・菅原 正孝⁴

¹大阪産業大学人間環境学研究科 (〒574-8530大阪府大東市中垣内3-1-1)

²京都大学大学院農学研究科 (〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西2丁目)

³京都大学原子炉実験所 (〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西2丁目)

⁴大阪産業大学人間環境学部都市環境学科 (〒574-8530大阪府大東市中垣内3-1-1)

* E-mail: s06mp04@sub.osaka-sandai.ac.jp

1. 研究の背景と目的

家畜排せつ物を液肥、堆肥として施肥することで家畜が排泄したエストロン、エストラジオール、エストリオール（以下それぞれE1, E2, E3）等の女性ホルモン（エストロゲン）が土壤に投入される。エストロゲンは若干の疎水性があるため、土壤に吸着・残留すると考えられる。また畜産廃棄物にはppbの濃度オーダーでE1が含まれているとの報告があり¹⁾、Laurence (1992)²⁾らの研究では、マメ科のアルファルファ(*Medicago sativa* L.)を生育させた試験で、0.005-0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ の範囲のエストロゲンを含む水で植物生育は促進され、50-500 $\mu\text{g l}^{-1}$ の高濃度では、植物の生育度合は逆に抑制されたとの報告がある。本研究では根圏域土壤中のエストロゲンが植物の生長に及ぼす影響について考察することを目的とし、まず土壤に既知量のエストロゲンを添加して植物ポット試験（土壤植物育成試験）を行った。次に土壤微生物、土壤鉱物、土壤有機物等の土壤マトリックスの影響を排除するために土壤ではなく寒天培地にエストロゲンを加えたものを用意して植物を育成した（寒天植物育成試験）。寒天培地による実験結果を土壤ポット試験の結果と比較することにより、エストロゲンが経根吸収等により植物の生長に影響を及ぼしているのか、根圏域微生物群の活性化・抑制等の作用を及ぼすことで間接的に植物生長に影響するのかを検討した。

2. 実験方法

(1) 土壤植物育成試験

黒ボク土にエストロゲンを10 $\mu\text{g/kg}$ 乾土、ないし100 μ

g/kg乾土相当になるように添加した。本試験ではエストロゲンのうちE1のみを添加して実験を行っている。これは、E2は土壤中で比較的速やかにE1に酸化される性質をもっており、また著者らの扱っている家畜排泄物中からはE3は検出されなかったためである。さらに対照としてエストロゲンを添加しない土壤を準備すると共に、各濃度でシロツメクサを植えていないものも準備（以下、NP）した。これらの土壤を4号ポットに充填し、シロツメクサ(*Trifolium repens*)を植えて超純水で灌漑し3ヶ月間生育させた。試験期間後ポットを解体し、植物体と根圏付近の土壤を採取し植物体の乾燥重量、土壤水中のエストロゲン並びに土壤に吸着されたエストロゲン濃度を測定した。土壤水試料は土壤を超純水にて1日振とうさせ、その後ガラス繊維ろ紙でろ過した。水抽出後の土壤を風乾後、吸着態エストロゲンの測定を行った。メタノール：1M酢酸で振とう・抽出液を得て、引き続き土壤残渣をメタノールで振とうしてこれを先のメタノール・酢酸抽出液と混合して溶媒抽出液としてここから土壤中の吸着態エストロゲン濃度を算出した。各抽出液はC18樹脂にて固相抽出を行い、TMS誘導体化、アセトン転溶後GC-MSにて測定した。供試土壤に含まれる三大栄養成分（可給態のリン、可給態の無機態窒素、交換性カリウム）の分析を行った結果を表1に示す。

表 1 土壤栄養成分

N	P ₂ O ₅	K ₂ O
10.1	17.1	93.0

単位: mg / 100g乾土

この結果より、カリウムは過剰（適性範囲：15～40

mg/100g乾土), 窒素は適正 (適性範囲: アンモニア態窒素1~5 硝酸態窒素5~15mg/100g乾土), リンはやや不足 (適性範囲: 10~20 mg/100g乾土) ³⁾ していた。本試験では生育期間中は栄養成分の補充はせずに植物育成を行った。

(2) 寒天培地植物育成試験

500mlのピーカーを植物育成ポットとし、ホーグランド培養液 (硝酸カリウム5mmol/L、リン酸カリウム1mmol/L、硝酸カルシウム5mmol/L、硫酸マグネシウム2mmol/L) にE1またはE2を10ppb, または100ppbとなるように加え、寒天濃度0.4w/v%で固化して、シロツメクサの種を播種した。また対照試験としてエストロゲンを添加しないポットとNPのポットについても実験を行った。約1ヶ月間生育させた後に実験系を分解して植物体の重量も測定した。分解後の寒天培地を遠心分離 (1500×g), 0.2μmフィルターにてろ過し、先の試験と同様の操作を行って、寒天中エストロゲン濃度をGC-MSにて測定した。また、植物体中エストロゲン濃度については農作物中の残留農薬分析法を参考に測定した。植物体とアセトニトリル (1:2.5) をホモジナイズし、遠心分離して上澄みを分取後、遠心分離後の残渣をアセトニトリル (20ml) と混合してホモジナイズした。これを再度遠心分離して、遠心分離後の上澄みを混合し植物抽出液とした。分液ろうとに5%塩化ナトリウム溶液15mlと植物抽出液5ml, ジクロロメタン50mlを添加して5分振とうさせ、ジクロロメタン層を40ml分取した後50mlのジクロロメタンを再度添加して5分振とうし、ジクロロメタン層を40ml分取して計80mlとした。ここから40ml分取し、硫酸ナトリウムで脱水後、真空遠心分離にて乾固した。これをヘキサン: ベンゼン (1:1) で10ml溶解し、GCB (グラファイトカーボンブラック) 500mgと硫酸ナトリウム10gを充填させたカラムに10mlの溶解液を全量負荷した。トルエン: アセトニトリル (1:1) にて10ml溶出し、溶出液を窒素乾固させた。これに10ppmのd体のE2を10μl添加し、TMS誘導体化後アセトンに転溶し、GCMSにて測定を行った。

3. 結果と考察

(1) 土壌植物育成試験

本試験で土壌に添加したE1のE2, E3への変化は見られなかった。水抽出液中のE1濃度もほとんど検出下限 (0.02μg/L) 未満で土壌水へのE1の脱離は認められなかった。土壌中の吸着態E1濃度の経時変化を表2に示す。

全ての系で4weekまでに吸着態E1は初期濃度の20%以下の濃度となっていた。4~8週間目までは比較的急激な減少があるものの、それ以降の減少は緩やかであった。また添加濃度100μg/kg乾土の条件において、8週目以降は植

表2 溶媒抽出液から算出したE1添加土壌植物育成試験における吸着態E1濃度の経時変化 (単位: μg/kg 乾土)

Time (week)	10	100	NP100
0	8.6	27.5	27.5
2	1.4	9.8	18.8
4	1.2	欠測	16.4
8	1.0	6.9	8.0
10	ND	6.0	4.2
12	1.2	5.1	4.2

ND: 検出下限 (0.6μg/kg乾土) 未満

物の有無に関係なくE1濃度はほぼ同じであった。このことから黒ボク土における吸着態E1濃度の減少要因としては植物の存在下で活発化する微生物学的分解や経根吸収より、むしろ土粒子への吸着や土壌鉱物による無機化学的分解が支配的であった可能性が考えられる。なお、エストロゲンを添加直後の土壌の吸着態エストロゲン濃度 (0week) を測定したところ添加濃度の30%未満しかエストロゲンが検出されなかった。このため底質のエストロゲン測定法に準拠した吸着態エストロゲン濃度測定では回収率が不十分な可能性があり、測定前処理方法の再検討が必要なが示唆された。

濃度別の植物乾燥重量を表3に示す。植物乾燥重量をみると28日の時点ではエストロゲン添加なしのポットの

表3 植物乾燥重量 (g)

添加E1量 (μg/kg乾土)	0	10	100
28day	1	0.3±0.0	0.2±0.0
56day	5	5.3±0.2	3.0±0.0
84day	8.2	13.0±0.3	13.3±3.9

生長が一番良かったが、84日後の時点で添加なしのポットの生長が一番悪いという結果になった。また、84日後の10および100μg E1/kg乾土の乾燥重量の平均値はいずれも13gで大きな差はみられなかった。ただし添加量100μg E1/kg乾土のポットでは値にばらつきがあり再現性の確認が必要である。全体に84日後の時点でE1添加なしのポットよりも10および100μg E1/kg乾土ポットの生長が良かったことから長期的にはE1が植物の生長を促進した可能性も考えられる。このことから土壌中に吸着態E1が数μg/kg乾土のレベルで含まれることで植物に何らかの影響を与える可能性が考えられた。ただし後述するように植物体によるE1の経根吸収は、我々の実験系では認められていない。これについて、エストロゲンが土壌微生物群を活性化させたという報告⁴⁾があり、植物生長に関与する微生物がエストロゲンの影響を受けることが推定される。

(2) 寒天培地植物育成試験

植物のエストロゲン濃度に対する影響について、植物生育後の寒天中エストロゲン濃度を表4に示す。

植物の有無で寒天中エストロゲン濃度に大きな差が生じた植物のある寒天では初期濃度 (10, 100μg/L) に関わらず、

表4 生育期間(1ヶ月)後の寒天中のエストロゲン濃度
(単位: $\mu\text{g/L}$, ND: 検出下限($0.2\mu\text{g/L}$))

植物	E1		E2	
	有	無	有	無
E1 $10\mu\text{g/L}$	0.28	2.66	ND	1.12
E2 $10\mu\text{g/L}$	0.38	2.29	0.80	3.99
E1 $100\mu\text{g/L}$	0.70 ± 0.62	101.59	ND	21.95
E2 $100\mu\text{g/L}$	1.44 ± 0.85	20.45	0.23 ± 0.06	101.94

1ヶ月後の寒天培地中のエストロゲン濃度は検出下限($<0.2\mu\text{g/L}$)~ $1.5\mu\text{g/L}$ までに激減した。1カ月の間に植物の存在がエストロゲン濃度の変化に関与をしたことが明らかである。また植物がある場合は、無い場合に比べてE2のE1への酸化が促進される傾向があり(E2 $100\mu\text{g/L}$ 添加時)E2のみを添加した寒天培地からもE1が検出されており、このE1が植物の草丈の伸長に何らかの影響を与える可能性も考えられた。

エストロゲンの植物成長に対する影響について、寒天培

表5 乾燥重量(mg)

試料名	
無添加	360 ± 48
E1 10ppb	337 ± 46
E2 10ppb	362 ± 22
E1 100ppb	342 ± 23
E2 100ppb	353 ± 21

地で約1ヶ月間生育させた植物の乾燥重量を表5に示す。添加したE1,E2濃度に関わらず、生育1ヶ月後の植物重量には差がなかった。このことから、寒天培地中のE1は土壌中のE1と比べて植物生長への影響は小さいと考えられる。一方、エストロゲンの水-オクタノール分配係数($\log K_{ow}$)は2.6—4.0の間で、農薬に関する既存の研究から植物が経根吸収できる範囲内であることが判っている⁹⁾。植物を育成した寒天中から失われたエストロゲンが経根吸収された可能性を明らかにするため植物体中のエストロゲン濃度を測定したが、検出下限値($0.6\mu\text{g/g}$ 乾重)以下であった。さらに、培地中のエストロゲンの有無により植物生育にも大きな差がみられなかったことから、寒天中から失われたエストロゲンは1カ月の生育期間の間に植物体内で代謝、分解されたかもしくは寒天培地中で分解した可能性が考えられる。

総じて寒天培地の実験では、土壌によるエストロゲンの固定化の影響は無視できるため、エストロゲンの物質収支をより簡単な条件下で検討できたといえる。一方、植物存在下で寒天培地からエストロゲンが失われているにもかかわらず、E1の植物成長への影響は土壌の場合と異なり認められないという結果になった。

4. まとめ

植物が生育媒体中エストロゲン濃度におよぼす影響は、土壌と寒天培地で大きく違う結果になった。黒ボク土に添加したE1は、植物の有無にかかわらず4週間で当初の20%程度に減少した。土壌中エストロゲン濃度減少の原因は、土粒子への吸着や土壌鉱物による無機化学的分解が主だと考えられた。寒天培地に添加したE1およびE2は、植物のない場合は1カ月を経過しても添加時の50から80%が培地中に残存したが、植物のある場合は1カ月後には当初添加量の1から10%が培地中に検出されるにとどまった。さらに、植物体中からエストロゲンは検出されなかったことから、エストロゲンの消失に関するメカニズムとして、植物体によるエストロゲンの代謝・分解か、寒天培地中でのエストロゲンの分解、もしくは植物体へのE1の吸着後のE1の速やかな分解が考えられた。またこれらのことから、植物根圏域のエストロゲンは、黒ボク土中・寒天培地中を問わず1カ月で80から90%が分解もしくは土壌に固定化されると考えられる。

生育媒体中のエストロゲンによる植物生育への影響も、土壌と寒天培地とで異なる結果となった。土壌ポット試験では、黒ボク土に添加したE1が植物の生育に何らかの影響を与えていることが確認された。しかし、寒天培地で生育させた植物には、成長に差はみられなかった。これらの結果から、土壌媒体ではエストロゲンが根圏域微生物群の活性化・抑制等の作用を及ぼすことで間接的に植物生長に影響を与えている可能性が考えられた。微生物群が植物成長に影響を及ぼすメカニズムとして、植物根圏域で微生物が可給態の栄養素を増やす役割をするという報告がある⁹⁾。今後、土壌微生物を植種した寒天培地による植物生育試験を実施し、植物生育状況や寒天培地および植物体中のエストロゲン濃度を測定し、エストロゲンが土壌細菌の活性化を通じて植物成長に影響を与えるという仮説を検証する予定である。

参考文献

- 1) 折立ら; 第40回日本水環境学会年会講演集, p409
- 2) Laurence. S. Shore *et al.* 1992. Effects of estrone and 17 β -estradiol on vegetative growth of *Medicago sativa*, *Physiolgia Plantarum*. 84, 217-222
- 3) 藤原俊六郎, 安西徹郎, 加藤哲郎著 1996: 土壌診断の方法と活用, 農文協 96-103
- 4) Soul Chun *et al.* Influence of Agricultural Antibiotics and 17 β -estradiol on the Microbial Community of Soil, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41, 923-935, 2006
- 5) Geoffrey G. Briggs *et al.*, *Pesticide Science*, 13, 495-504, 1982.
- 6) Rodriguez H and Frega R, 1999 Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17. 319-339