

## 養豚場排水処理施設におけるエストロゲンの季節変動と低減化処理の実態

任 勇 翔\*                      中 野 和 典\*                      大 堀 雅 人\*  
 千 葉 信 男\*                      野 村 宗 弘\*                      西 村 修\*

### Seasonal Change and Removal of Estrogen in a Swine Wastewater Treatment Plant

Yong-Xiang REN\*, Kazunori NAKANO\*, Masato OHORI\*, Nobuo CHIBA\*,  
 Munehiro NOMURA\* and Osamu NISHIMURA\*

\* Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aoba 6-6-06, Sendai, 980-8579, Japan

#### Abstract

An investigation on the seasonal change and removal of estrogen in a swine wastewater treatment plant was carried out from July 2004 to September 2005. Natural estrogens (estrone, estradiol and estriol) in raw wastewater showed similar seasonal changes and their peak values reached 162, 872, 4,480 ng · l<sup>-1</sup>, respectively, whereas equol showed a different trend in which the maximum concentration was markedly high at 43,300 ng · l<sup>-1</sup>. The results showed that approximately 93% of the total estrogenicity in raw wastewater was attributed to equol. The sequencing batch reactor (SBR) process of the swine wastewater treatment plant was efficient to remove selected estrogens for quantitative analysis as well as nitrogen and phosphate. More than 99% removal efficiencies for all selected estrogens and total estrogenicity were attained by the SBR process. The total estrogenicity that remained after the SBR process was, however, still higher than the predicted noneffective concentration level for fish (PNEC). It was found that a baffle channel located at the final stage of the treatment flow contributed to decreasing the estrogenicity to the PNEC level. Experimental results in the laboratory showed that filamentous algae inhabiting the bottom of the channel were responsible for the estrogenicity decrease observed in the baffle channel.

**Key words:** estrogen, equol, swine wastewater, filamentous algae, SBR process

#### 1. はじめに

外因性内分泌攪乱化学物質が水生動物へ影響を与えていることが報告されており、原因となる化学物質として従来から問題視されてきた人工的な化学物質だけでなく、人畜由来の天然女性ホルモン（エストロゲン）が近年注目されている。エストロゲンは人工の化学物質に比べ10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>倍の活性を持つため<sup>1)</sup>、エストロゲンを含む排水を受け入れる排水処理施設におけるエストロゲンの消長の把握は非常に重要である。

畜産動物は人間の数倍の排泄量を有しており、平成14年度における産業廃棄物の22.8%を占める家畜糞尿の総排出量は8,980万トンにも上る<sup>2)</sup>。したがって、畜産排水はエストロゲンの主な排出源のひとつとして考えられるが、畜産排水中のエストロゲンに関する調査・研究事例は非常に少ないのが現状である。また、畜産動物の腸内細菌による大豆イソフラボン類の代謝副産物であるイクオール (Equol) が、内分泌攪乱化学物質として知られるビスフェノール A や ノニルフェノールよりも高いエストロゲン様活性を持つことが報告されているが<sup>1, 3)</sup>、畜産排水におけるEquolの存在の実態に関する知見は乏しく、排水処理施設における

除去性も不明である。

そこで本研究では、養豚場排水処理施設におけるエストロゲンとその処理の実態を明らかにすることを目的として調査を実施した。測定の対象を人畜由来のエストロゲンである17βエストラジオール (E2)、エストロン (E1)、エストリオール (E3) と植物性エストロゲンであるEquolとし、未知のエストロゲン様活性物質の存在を考慮してエストロゲン様活性の測定も同時に行うことで養豚場排水処理施設の各処理プロセスにおけるエストロゲンの除去性の評価を試みた。さらに、糸状藻類の存在とエストロゲンの消長に関する実験を行い、養豚場排水処理施設の折り返し水路で観察されたエストロゲン様活性の低下作用について考察した。

#### 2. 方法

##### 2.1 調査対象

調査対象とした宮城県栗原郡高清水町に立地する養豚場では、約10,000頭の豚が飼育されており、そのうちメス豚が約5,000頭を占めている。糞と尿は分離されて回収されており、尿を主体とした畜産排水が、1日に約100トン発生している。当排水は、BOD/MLSS: 0.05を指標として運

\* 東北大学大学院工学研究科 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06



Fig.1. Operation unit of swine wastewater treatment plant. a: SBR, b: oxyc pool, c: baffle channel.

Table 1 Operational conditions of the swine wastewater treatment plant and aeration condition at oxyc pool 2 when water samples were taken.

Process	Operational condition	Sampling time			
		Jul. 28, 2004	Nov. 25, 2004	Mar. 14, 2005	Sep. 9, 2005
SBR	MLSS 2000mg · l <sup>-1</sup> , Aeration: 7h, Settling: 5h, HRT: 30h				
Oxic pool 1	HRT: 30h, continuous aeration				
Oxic pool 2	HRT: 30h, intermittent aeration	Aeration on	Aeration off	Aeration on	Aeration on
Oxic pool 3	HRT: 13h, no aeration				
Baffle channel	HRT: 20h				

転されている回分式活性汚泥法 (Sequencing Batch Reactor, 以下SBRと表す)により処理され, 以後酸化池1, 酸化池2, 酸化池3と折り返し水路を経て放流されている。各処理プロセスの様子と処理条件をFig.1とTable 1に示す。

## 2.2 調査方法

調査は2004年7月から2005年9月まで春夏秋冬それぞれ一度ずつ実施し, 養豚場排水処理施設の汚水原水とSBR, 酸化池1, 酸化池2, 酸化池3および折り返し水路それぞれの流出水を採水した。SBRの運転サイクルの影響を考慮し, 採水は午前11時から12時の間に行うようにした。採水においては, 希塩酸で濯いだ後アセトンによる洗浄を行った褐色ガラス瓶を使用した。採水は3.5lのサンプルを2回取ることとし, 試料はアイスボックスに入れて実験室に持ち帰り, 24時間以内に既報<sup>4,5)</sup>に従い次のようなエストロゲンの抽出処理を行った。最大で2lのサンプル水に対して, まずGF/Cろ紙(ワットマン)により懸濁粒子を除き, Empore (3M) C-18 disk(Waters)による固相抽出およびBond Elut florisil cartridge (Varian Inc.)による浄化処理を行った後に-30℃で保存し, 必要に応じてメタノールまたはジメチルスルフォキシドに溶解して分析に使用した。E1, E2, E3およびEquolの濃度はLC/MS (LC-10 AD VP, MS-2010, Shimadzu)により定量した。カラムはXterra MS C18 (Waters)を用い, 移動相は水とアセトニトリルとして流量0.2ml · min<sup>-1</sup>でグラジエント分析を行った。カラム温度は40℃, 注入量は5μlとした。イオン化はESI法(ネガティブ)とし, コリジョンエネルギーは25eVとした。1.5 μg · l<sup>-1</sup>のE1, E2, E3およびEquolの標準試料に対して一連の固相抽出処理を行って得た測定値 (n=5)より標準偏差を算出し, その10倍の値を定量下限値とした結果, 本研究におけるLC/MSでは, E1, E2, E3およびEquolの定量下限値は, それぞれ0.7, 1.3, 1.5 および1.5 μg · l<sup>-1</sup>となった。そこで, 固相抽出に用いるサンプル水量と抽出後の再溶解時の体積を調整し, 固相抽出

における濃縮率を20倍から20,000倍の範囲で調整することによりng · l<sup>-1</sup>のレベルで存在するエストロゲンに対応した。エストロゲン様総活性はE1, E2およびE3のトータルを定量できるES ELISAキット(日本エンバイロケミカルズ)および白石らの酵母Two hybrid 法<sup>5)</sup>(The yeast two-hybrid assay)に従いヒト(hER)およびメダカ(mER)由来のエストロゲン受容体を導入した2種の酵母株を用いて測定した。LC/MSで測定した4物質(E1, E2, E3およびEquol)の濃度は次式によりエストロゲン様総活性のE2等価量(E2 equivalent, 以下EEQと表す)に換算した<sup>6,7)</sup>。

$$EEQ = E2 + 0.16 E1 + 0.0045 E3 + 0.073 Equol$$

## 2.3 折り返し水路から採集した糸状藻類によるエストロゲンの低減化実験

養豚場の折り返し水路は全面的に自然光が利用できる状況にあり, 水路底面には付着性の糸状緑藻類が観察される。Laiら<sup>8)</sup>は藻類の*Chlorella vulgaris*がE2, E1を分解・濃縮できると報告しており, 本水路に生息している糸状藻類がエストロゲンの低減化に貢献している可能性が考えられた。そこで, 糸状藻類の働きを確かめるために, 水路より糸状藻類を採取してエストロゲンの低減化実験に供試した。糸状藻類0.5 gと環境水(東北大学近隣の池の水)50 mlを入れたビーカーを10個用意し, 温度を25℃, 光条件を5,000 lux明暗12時間周期とした人工気象器内で2日間馴致させ, 糸状藻類の生育具合が良好なものを選別して実験に用いた。エストロゲン低減化実験では, 糸状藻類と池の水が入ったビーカーにE1を添加し, E1濃度の経時変化をモニタリングした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 養豚場排水処理プロセスにおけるエストロゲンの消長

2004年7月にELISA法により測定した養豚場排水処理施

設の各処理プロセスにおけるエストロゲン様活性についてFig. 2に示す。調査時には、酸化池2では曝気が行われていた。養豚場排水原水のエストロゲン様活性は、E2等価量に換算して1,820 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>と非常に高かったが、SBRにおける曝気と沈澱処理によりその濃度は9.9 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>まで低下しており、当施設のSBRによるエストロゲン様活性（ELISA法）の除去率は99%以上に達していた。酸化池2以降では、エストロゲン様活性が再び上昇する現象が見られ、酸化池3から放流される際には下水二次処理水レベルの6.8 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>のエストロゲン様活性が残存している状態で折り返し水路に処理水が流入していた。しかし折り返し水路では再びエストロゲン様活性が減少し、その出口では0.9 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>まで活性が減少していることが明らかとなった。折り返し水路の水学的滞留時間より、20時間程度で85%以上のエストロゲン様活性の低減化が生じていたことになり、水路底面に繁茂していた糸状性藻類によりエストロゲン様活性が減少している可能性が考えられた。

夏季である7月に当施設の各処理プロセスにおいて得られたエストロゲン様活性の再現性を確かめるために、冬季である11月に再び採水を行いエストロゲン様活性の測定を行った。7月に採水したサンプルではELISA法によるエストロゲン様活性の測定しか行わなかったため、その活性の内訳となる物質が不明であった。そこで11月に採水したサンプルについては、既知エストロゲン様活性物質としてE1, E2, E3およびEquolの濃度測定をLC/MSにより行った。また、エストロゲン様活性の測定手法として新たに酵母Two-hybrid法を導入し、エストロゲン様活性の測定を行った。これはELISA法以外の手法を用いることで、未知物質由来の活性も含むと考えられるエストロゲン様活性測定値の信頼性を高めることができると考えたためである。さらに、11月に採取したサンプルについては、栄養塩類の測定も実施した。調査時には、酸化池2では曝気が行われていなかった。Fig. 3に原水と豚舎排水処理の各処理プロセス出口における窒素及びリンの濃度を示す。折り返し水路を経た最終的な除去率は総窒素では99%以上、リン酸塩では77.5%であり、当養豚排水処理施設において栄養塩の除去が高度に行えていることが分かった。

原水と豚舎排水処理の各処理プロセスにおけるエストロゲン様活性物質の濃度測定の結果をFig.4に示す。原水で52.4 ng・l<sup>-1</sup>であったE2濃度はSBRで8.4 ng・l<sup>-1</sup>に低下し、その減少率は約84%であった。続く酸化池2では、一度低下したE2の濃度が再び増加する現象が再度見られたが、折り返し水路に放流される際には0.3 ng・l<sup>-1</sup>程度まで低下していた。折り返し水路の出口ではE2は検出されず、折り返し水路を経ると検出限界以下の濃度までE2が除去されていることが分かった。E1の濃度は原水でも定量限界の0.05 ng・l<sup>-1</sup>以下と低く、折り返し水路出口でも定量限界以下であった。E3の濃度は、原水では180 ng・l<sup>-1</sup>を超えておりE1やE2よりも高濃度であったが、SBRで大幅に減少し、各酸化池と折り返し水路では処理に伴って減少する傾向であった。Equol濃度は原水で非常に高く、43,300 ng・l<sup>-1</sup>に達していた。しかしその99%がSBRで除去されており、E2と同様に酸化池1では減少し、酸化池2で一時増加した後、折り返し水路出口での濃度は0.74 ng・l<sup>-1</sup>まで低下していた。これらの結果により、折り返し水路の出口ではE1,E2,E3およびEquolがそれぞれpg・l<sup>-1</sup>レベルにまで低減されていた

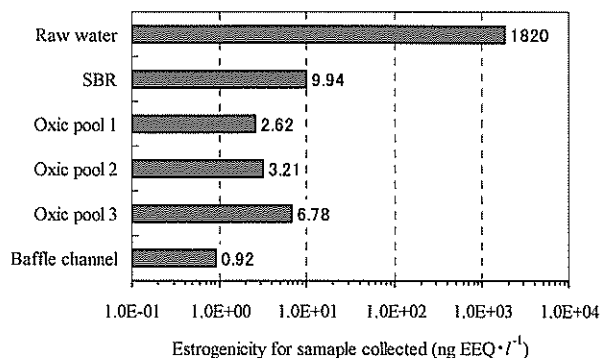


Fig. 2 Estrogenicity determined by ELISA in sample collected on Jul. 28, 2004

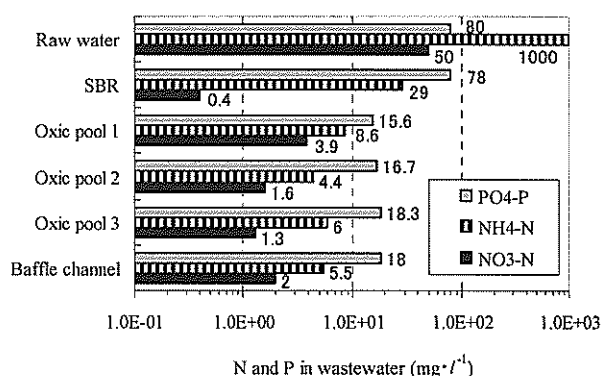


Fig. 3 N and P concentration along the treatment flow in sample collected on Nov. 25, 2004

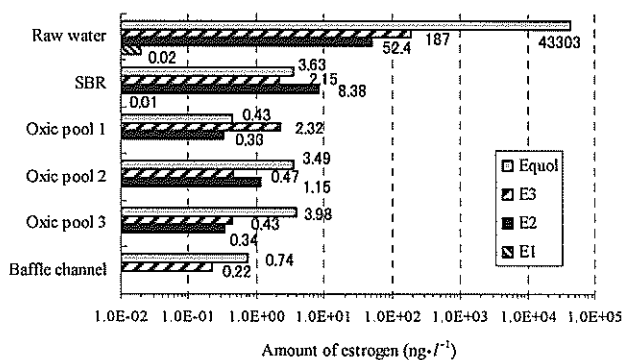


Fig. 4 Estrogen determined by LC/MS in sample collected on Nov. 25, 2004

こと、各物質の折り返し水路での動態は同一ではなく、特にE2が減少していたことが明らかとなった。

LC/MSでの測定値に基づいた4物質（E1, E2, E3およびEquol）の濃度をEEQに換算したエストロゲン様活性の総和と、2種の酵母株を用いた酵母Two hybrid法により測定したEEQ活性を比較した結果をFig. 5に示す。原水とSBRのサンプルでは、酵母Two hybrid法による活性の値がLC/MSで測定した4物質の活性の総和を下回る結果となった。酵母Two hybrid法における反応阻害物質としてフミン等の存在が報告されており<sup>9)</sup>、酵母法での反応がサンプルに含まれるフミン等の物質に阻害され、活性値として低く検出されたためこのような結果となったと考えられた。一方、処理プロセスの下流部では、十分に希釈したサンプルを用いることで酵母法での反応の阻害を回避することが

可能であった。酸化池から下流のサンプルでは、酵母Two hybrid 法による活性の値がLC/MSで測定した4物質の活性の総和を上回る結果となり、未知物質由来活性の存在が示唆された。折り返し水路出口のサンプルでは、LC/MSで測定した4物質由来のエストロゲン様活性の総和は0.02 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>以下であったが、酵母法のhERおよびmERによる活性値では、それぞれ0.38および0.64 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>となり、未知物質由来の活性の割合が高いことが分かった。また、折り返し水路出口のサンプルでは、2004年7月に行ったELISA法による活性測定においても0.92ng・l<sup>-1</sup>の値が得られており、酵母法での測定値は同様のオーダーであった。折り返し水路までの各エストロゲンとエストロゲン様活性の除去率はすべて99%以上であり、最終的な放流水中のエストロゲン様活性は1 ng-EEQ・l<sup>-1</sup>以下であった。この濃度は魚類に対する予測無影響濃度 (PNEC) として報告されている0.5 ng-EEQ・l<sup>-1</sup><sup>10)</sup>と同等のオーダーであり、河川における希釈作用を考慮すれば、当排水処理施設のエストロゲン低減化性能は十分なレベルにあると評価できる。

2004年11月の調査において観察された酵母Two hybrid 法における阻害の影響を回避するため、2005年3月14日に採取したサンプルの測定ではフミンの除去に効果があるとされているAccell Plus QMA (Waters)によって分子量5,000以上の阻害物を除去する前処理を経て酵母法を実施した<sup>11)</sup>。調査時には酸化池2の曝気装置は稼働していた。

Fig.6 に示されるように、LC/MSで測定したE3濃度は処理プロセスに従って徐々に減少する傾向となったが、E3以外のエストロゲン濃度は、酸化池3で増加する現象が見られた。一方、原水中のE1, E2およびE3の濃度は2004年11月の結果と比べ著しく大きな値であった。E1, E2およびE3の濃度は、それぞれ162, 872および4,480 ng・l<sup>-1</sup>に達していた。酵母法によりエストロゲン様活性を測定した結果をFig.7に示す。原水とSBRのサンプルではQMAによる前処理を行ったにもかかわらずLC/MSで測定した各エストロゲンの活性換算値の総和よりも低い値となっており、酵母Two hybrid 法による測定に影響を及ぼす物質の除去が十分ではなかったことが示唆された。しかし、酸化池以降のサンプルでは、酵母Two hybrid法による総活性値とLC/MSで測定した4物質の活性の総和が同程度となっており、折り返し水路を経た放流水においても2004年11月のデータ (Fig.5)に見られたようなLC/MSで測定した4物質のエストロゲン様活性と酵母Two hybrid 法 (hERおよびmER)での大きな差は見られなかった。したがってFig.5で示唆された放流水中に残存する未知活性物質は、QMAによる前処理で除去された可能性が考えられる。Fig.5とFig.7に示される2回の調査におけるhERとmERで得られた活性を比較すると、酸化池1まではより高い活性がhERに現れ、酸化池2以降では活性の大小関係が逆転しより高い活性がmERに現れる傾向となったが、有意水準を0.05として行った適合度検定 (χ<sup>2</sup>検定)の結果、有意差は認められなかった。

当養豚場におけるエストロゲンの季節的な変動を確認するため、2005年の9月に再度調査を行った。採水時には酸化池2では曝気が行われていた。LC/MS法によるエストロゲンの測定結果をFig.8に示す。各エストロゲンおよびエストロゲン活性換算値の総和の動態は以前の3回の調査と同様の傾向を示しており、E3以外のエストロゲン濃度が酸

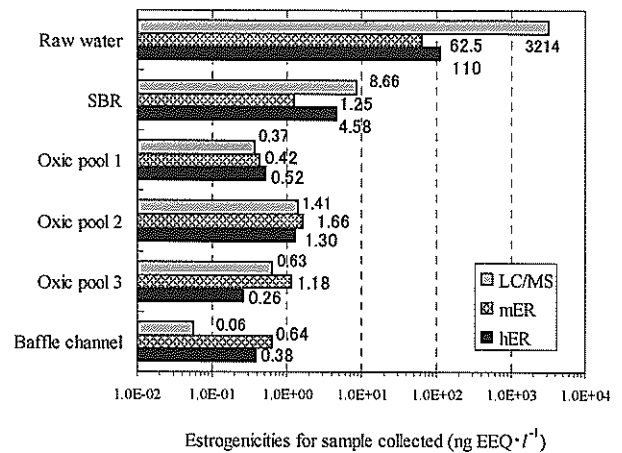


Fig. 5 Comparison of estrogenicity determined by LC/MS and the yeast two-hybrid assay in sample collected on Nov. 25, 2004

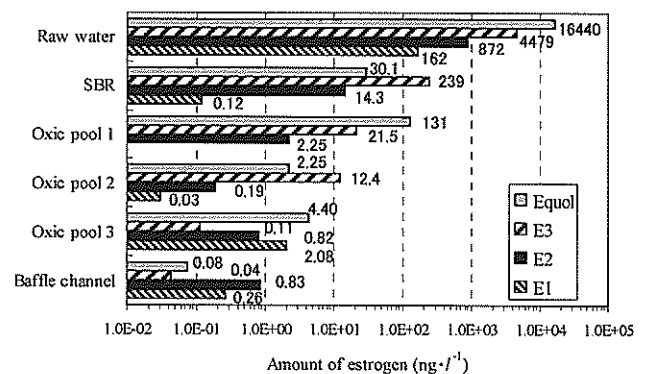


Fig. 6 Estrogen determined by LC/MS in sample collected on Mar. 14, 2005

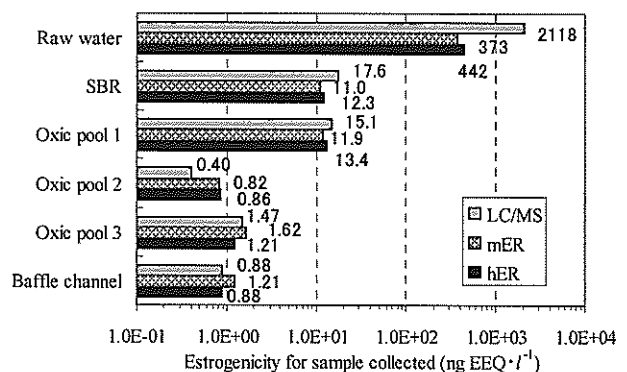


Fig. 7 Comparison in estrogenicity determined by LC/MS and the yeast two-hybrid assay in sample collected on Mar. 14, 2005

化池3で増加する現象も2005年3月に引き続き観察され、当排水処理施設におけるエストロゲンの消長が、季節によらず一定の傾向を示すことが明らかとなった。

2004年から2005年にかけて異なる季節に実施した各エストロゲン濃度のLC-MSによる測定結果をTable 2にまとめた。原水のエストロゲン濃度の内訳は大きく変動しており、E1, E2 および E3 の濃度が最も高かったのは2005年3月のサンプルであったが、Equalの濃度が最も高かったのは2004年11月のサンプルであった。しかし、

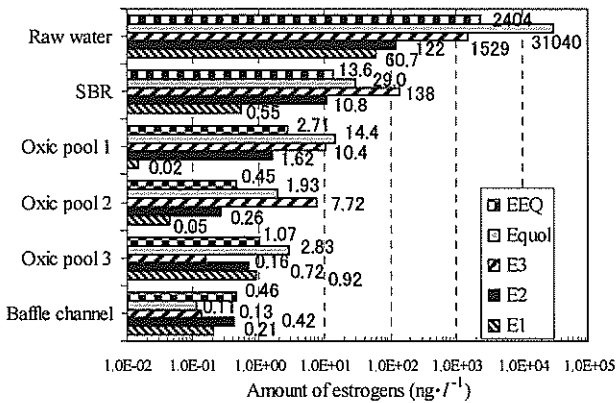


Fig. 8 Estrogen determined by LC/MS in sample collected on Sep. 9, 2005

Table 2 Estrogen detected in sample water at different season

Estrogens	Influent			SBR			Effluent		
	Nov. 2004	Mar. 2005	Sep. 2005	Nov. 2004	Mar. 2005	Sep. 2005	Nov. 2004	Mar. 2005	Sep. 2005
E2	52.4	872	122	8.4	14.3	10.8	0.0	0.8	0.4
E1	21.3	162	60.7	12.8	0.1	0.6	0.2	0.3	0.2
E3	187.1	4480	1530	2.2	239	138	0.4	0.1	0.1
Equol	43300	16400	31000	3.6	30.1	29.0	0.7	0.1	0.1

\* unit of all data:  $ng \cdot l^{-1}$

これら4物質の濃度をEEQに換算したエストロゲン様活性の総和の計算値は、2005年3月のサンプル ( $2,115 ng\text{-}EEQ \cdot l^{-1}$ ) よりも2004年11月のサンプル ( $3,218 ng\text{-}EEQ \cdot l^{-1}$ ) の方が高いことが分かった。3回の調査結果を平均すると、エストロゲン様活性の総和のうち Equol 由来の活性が占めていた割合は92.7%にもなり、養豚排水原水のエストロゲン様活性のほとんどが Equol 由来であることが明らかとなった。また、下水処理場の流入水での報告例と異なり<sup>12)</sup>、本研究で調査を行った養豚場排水原水では、E2濃度がE1より著しく高いという特徴が見られた。

当養豚場の排水処理施設のSBRでは、季節にかかわらず常に99%以上の高いエストロゲン除去効果が認められた。活性汚泥を用いた回分実験においてエストロゲンの93.6~98.0%が汚泥への吸着で除去されることが既往の研究により報告されている<sup>13)</sup>。また、MLSS当たりの有機物負荷が低いほど活性汚泥によるエストロゲンの分解速度が高くなることが確認されており<sup>14)</sup>、比較的low負荷条件 ( $BOD/MLSS : 0.05$ ) で運転されていた当養豚場施設のSBRの条件がエストロゲンの分解や吸着に適していたと考えられた。また、養豚排水の原水から最高で  $43,300 ng \cdot l^{-1}$  にも達する高濃度の Equol が検出されたが、このような高濃度の Equol も99%以上がSBR処理により除去されていた。活性汚泥を用いた回分実験において<sup>13)</sup>、Equolの98.0%が吸着で除去され、かつ脱着しにくいという結果が得られており、当SBRにおいても汚泥への吸着により Equol が除去されている可能性が高い。

一方、E3は処理プロセスに従って常に減少し、E3以外のエストロゲンで見られた酸化池における濃度や活性

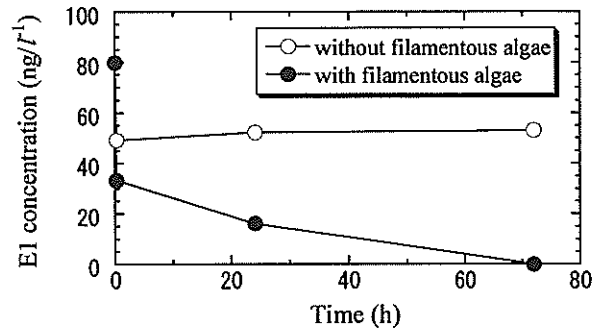


Fig. 9 Time course of E1 concentration in the system with/without filamentous algae

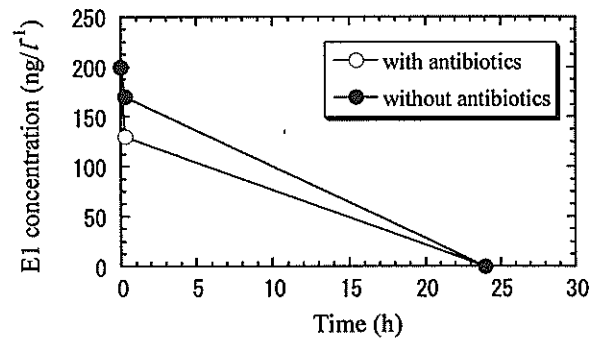


Fig. 10 Time course of E1 concentration in the presence of filamentous algae with/without antibiotics addition

の一時的な上昇現象は見られなかった。E1, E2と比較して活性汚泥のE3吸着容量は大きく、かつE3の分解が従属栄養細菌の活性と関連し、E3の生分解性が高いことが著者らの研究で明らかとなっており<sup>14)</sup>、吸着性と生分解性の両面で除去性が高いことが、E3が安定して除去されていた機構として考えられた。

本調査では調査期間の一年間を通して、分析方法や季節にかかわらず、E3以外のエストロゲン濃度や活性の一時的な上昇現象が酸化池で見られたが、曝気が行われていない時にサンプリングを行った調査時に本現象が顕著であり、本現象は酸化池2の曝気の有無と関連していたと考えられた。一度低下したE1濃度が嫌気条件下において再び増加する現象が季<sup>15)</sup>の実験で観察されており、嫌気性消化過程においては抱合体エストロゲンの脱抱合によってエストロゲンの増加が生じる可能性が報告されている<sup>16)</sup>。また、底泥に残存しているエストロゲンのほとんどが底泥に生息する生物体内に蓄積されていること<sup>15)</sup>や底泥中の有機物濃度が高いほどエストロゲンの底泥への吸着性が高くなること<sup>17)</sup>が報告されている。したがって、本研究で確認されたE3以外のエストロゲン濃度や活性の一時的な上昇現象の機構を明らかにするためには、抱合体エストロゲンの存在や酸化池の底泥におけるエストロゲンの蓄積を調査する必要がある。

### 3.2 折り返し水路における糸状藻類とエストロゲン低減化の関係

調査結果より、当養豚場排水処理施設の処理プロセスにおいては、酸化池3までの処理水には  $1 ng\text{-}EEQ \cdot l^{-1}$  を上回るエストロゲン活性が残っており、最後の折り返し水路がなければ魚類に対するPNECとして報告されている  $0.5 ng\text{-}EEQ$

・ $l^{-1}$ のオーダーまでエストロゲン様活性が低下しないことが明らかとなった。そこで、折り返し水路におけるエストロゲン低減化機能について検討を行うことにした。本折り返し水路は全面的に自然光が利用できる状況にあり水路底面に付着性糸状藻類が観察されたことから、本水路から採集した糸状藻類にエストロゲンを接触させ、エストロゲンの低減化が生じるか否かを確かめる実験を行った。エストロゲンとしてE1を選択し、糸状藻類を入れたビーカーに既知濃度のE1を添加してE1濃度の経時変化を測定した。結果をFig.9に示す。投入量をもとに計算したビーカー内でのE1初濃度は $80 \text{ ng} \cdot l^{-1}$ であったが、E1濃度は投入直後に明らかに減少し、糸状藻類が存在しない系では $49.3 \text{ ng} \cdot l^{-1}$ に、糸状藻類が存在する系では $33.3 \text{ ng} \cdot l^{-1}$ にまで減少していた。この濃度の減少はE1がビーカーの壁面に吸着したためと考えられる。そしてその後の経時変化では、糸状藻類が存在しないブランクではE1濃度が平衡的に一定となったのに対して、糸状藻類が存在する系では徐々にE1濃度が減少する傾向が観察され、72時間後のサンプルからはE1は検出されなかった。この実験結果により、糸状藻類が存在する系にはE1低減化作用があることが確認できた。

次に糸状藻類が存在する系での時間経過に伴う緩やかなE1の減少における共存細菌の影響を確かめるために、糸状藻類に抗生物質(クロラムフェニコール、ストレプトマイシン)を投与した系を準備し、E1を添加してその濃度の経時変化を測定した。結果をFig.10に示す。ここに示されるように抗生物質の投与の有無にかかわらず、どちらの系でもE1濃度は減少し、24時間後には検出されなくなった。これにより、E1濃度の減少は糸状藻類自体の作用が主であることが示された。さらに、実験後に糸状藻類を取り出してアセトン抽出操作を行ったところ、水中から喪失したE1の70%程度を回収できたことから、E1が糸状藻類に吸着していたことが考えられた。これらの結果より、折り返し水路の底面に繁茂していた糸状藻類がエストロゲン様活性の低減化に貢献していた可能性が示された。

#### 4. おわりに

本研究では、E1, E2, E3およびEquolに焦点を絞り、養豚排水処理施設における季節変化を調査し、調査事例の少ない養豚場排水処理施設におけるエストロゲンの実態を明らかにすることを試みた。その結果、原水のエストロゲンには大きな季節変動があり、当養豚場では春季に高いこと、また餌由来であるEquolが数万 $\text{ng} \cdot l^{-1}$ 程度の非常に高い濃度で含まれていることが明らかになった。また、当排水処理施設では窒素、リンが高度に除去されているだけでなく、季節にかかわらずエストロゲンおよびエストロゲン様活性の除去率も99%以上であり、処理プロセスの途中で一時的なエストロゲンの上昇現象が見られたものの最終的にエストロゲン様活性は魚類に対して報告されているPNEC値と同等のレベルとなっていた。さらに、当排水処理プロセスにおいてエストロゲン様活性がPNECと同等レベルまで低減化していた下流部の折り返し水路に糸状藻類が繁茂していたことから、糸状藻類を採取してエストロゲン低減化実験を行ったところ、糸状藻類がエストロゲン活性物質を低減化する作用を有していることが確認できた。このようなエストロゲン活性を低減化する糸状藻類の作用は、下水処理場や浄

化槽の処理水の放流水路に見られる糸状藻類でも発揮されている可能性がある。今回の実験は回分で行ったものであり、今後、糸状藻類を連続的にエストロゲンに晒した場合のエストロゲンの除去性やその定量的評価、藻類の種類によるエストロゲン低減化機能の差異、糸状藻類に吸着または吸収されたエストロゲン様活性物質のその後の動態を明らかにする必要があるが、処理水に残存する内分泌攪乱作用の低減化に貢献できるプロセスとして糸状藻類を発生させた水路が利用できる可能性が示唆されている。

#### 謝辞

本研究にあたり、国立環境研究所の白石不二雄先生より酵母Two-Hybrid法についてのご指導と試験株の譲与を賜りました。ここに記して深く謝意を表します。また、本研究は、財団法人日本環境整備教育センターの平成16年度浄化槽に関する調査研究助成と文部科学省科学研究費補助金(若手研究(A) 課題番号17681006)により行われました。ここに謝意を表します。

(原稿受付 2007年5月1日)

(原稿受理 2008年1月11日)

#### 参考文献

- 1) Nishihara T., Nishikawa J., Kanayama T., Dakeyama F., Saito K., Imagawa M., Takatori S., Kitagawa Y., Hori S. and Utsumi H. (2000) Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Science*, **46** (4) 282-298.
- 2) 環境省, 平成17年度環境白書.
- 3) Morito K., Hirose T., Kinjo J., Hirakawa, T., Okawa M., Nohara T., Ogawa S., Inoue, S., Muramatsu M. and Masamune Y. (2001) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 351-356.
- 4) 日本下水道協会 (2002) 下水試験方法 -内分泌攪乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編-(追補暫定版).
- 5) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏 (2000) 酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発, *環境化学*, **10**, 57-64.
- 6) 宮城県保健環境センター報告 (2004) バイオアッセイによる環境化学物質へのアプローチ.
- 7) Miyahara M., Ishibashi H., Inudo M., Nishijima, H., Iguchi T., Guillet L. J. and Arizono K. (2003) Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$  in an experimental animal. *J. Health Science*. **49**(6) 481-491.
- 8) Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2002) Biotransformation and Bioconcentration of Steroid Estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Environ. Micro.* **68** (2) 859-864.
- 9) 細川特洋, 劉鋭, 亀屋隆志, 久保隆, 浦野弘平 (2004) 河川水の酵母Two-Hybrid試験における女性ホルモン活性物質の濃縮回収方法と試験阻害物質の除去方法の開発, *水環境学会誌*, **27** (11), 679-684.
- 10) Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. and Sumpter, J.P. (1998) Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ. Sci. Technol.* **32** (11) 1559-1565.
- 11) 平井友希子, 竹田誠, 大野浩一, 亀井翼 (2005) 酵母Two-Hybrid法を用いた環境水のエストロゲン様作用評価における妨害作用および改良試験法の検討, 第39回日本水環境学会年会講演集, 66.
- 12) D' Ascenzo, G., Coria, A. Di., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari M. and Samperi, R. (2003) Fate of

- natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ.* **302**, 199–209.
- 13) Ren, Y. X., Nakano, K., Chiba, N., Nomura, M. and Nishimura, O. (2007) A Thermodynamic Analysis on Adsorption of Estrogens in Activated Sludge Process. *Water Res.* **41**, 2341–2348.
- 14) Ren, Y. X., Nakano, K., Chiba, N., Nomura, M. and Nishimura, O. (2007) Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge. *Water Res.* **41**, 3089–3096.
- 15) 李富生, 津森ジュン, 山下尚之, 田中宏明, 鈴木穰. (2004) 好気と嫌気条件下における17βエストラジオールの貯水池底泥中での分解挙動と経路に関する検討. *環境工学研究論文集***41**, 447–458.
- 16) Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Rihle, P. R. and Siegrist, H. (2004) Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization. *Environ. Sci. Technol.* **38** (11), 3047–305.
- 17) Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2000) Binding of waterborne steroid estrogens to solid phase in river and estuarine systems. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3890–3894.