下水汚泥または畜産廃棄物から製造した コンポスト中に含まれるエストロゲン及び アンドロゲンの残留と内分泌攪乱性評価

本山 充希¹⁾, 古閑 豊和¹⁾, 野見山 桂¹⁾, 中川 修平²⁾, 松尾 英樹¹⁾, 篠原 亮太^{1,2)}

¹⁾熊本県立大学大学院環境共生学研究科

²⁾熊本県立大学環境共生学部 (〒862-8502 熊本県熊本市月出3-1-100)

[平成18年6月26日受理]

The Assessment of the Estrogen and Androgen in the Compost Produced from the Sewage Sludge and Solid Waste of Livestock

Miki MOTOYAMA¹⁾, Toyokazu KOGA¹⁾, Kei NOMIYAMA¹⁾, Shuhei NAKAGAWA²⁾,
Hideki MATSUO¹⁾ and Ryota SHINOHARA^{1,2)}

¹⁾Graduate School of Environmental & Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto

²⁾Faculty of Environmental & Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto
(3-1-100 Tsukide, Kumamoto, Kumamoto 862-8502)

[Received June 26, 2006]

Summary

The estrogen and androgen in the compost produced from sewage sludge and solid waste of livestock were investigated in twenty-six kinds of composts which were sold on the open market.

Estrone (E1) was detected in all kinds of composts. 17 β -estradiol (E2) was detected in twenty-one kinds of composts, and estriol (E3) was detected in one kind of compost. Ethynylestradiol (EE2) was not detected in any compost. Testosterone was detected in twelve kinds of the fifteen kinds of compost analyzed. The quantities of estrogen and androgen in the composts are as follows, E1: 30~580 ng/g; E2: Less than the minimum limit of detection (N.D.) ~23 ng/g; E3: N.D. ~4 ng/g; EE2: N.D. and testosterone: N.D. ~2,100 ng/g.

Estrogenic and androgenic activities were investigated for twenty-one kinds of composts using a yeast two-hybrid assay. Estrogenic activities were confirmed with thirteen kinds of composts and androgenic activities were confirmed with two kinds of composts. The estrogenic and androgenic activities measured by using human estrogen receptor α (hER α), medaka fish estrogen receptor α (medER α) and human androgen receptor (hAR) are as follows, hER α : 14~168 pM E2 equivalency quantity (EEq)/compost (g); medER α : 91~581 pM EEq/compost (g) and hAR: 5~7 pM 5 α -dihydrotestosterone equivalent quantity (AEq)/compost (g). This paper shows that sex hormones were detected in most compost produced from the sewage sludge and solid waste of livestock. Moreover, estrogenic activities were confirmed with over half of these composts.

Key words: Estrogen, Androgen, Sewage sludge compost, Solid waste of livestock compost, Endocrine disruption

1. はじめに

近年、水生生物の生殖系を攪乱する原因物質としてエストロゲン類が注目されている。中でも、天然エストロゲンであるエストロン (E1), 17β -エストラジオール (E2), エストリオール (E3), 及び合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2) といった人畜由来のエストロゲン類が生物に対してエストロゲン活性を示すことが明らかとされている^{1,6)}。

これまでの研究で、これらエストロゲン類の主な排出源として下水処理場が指摘されており^{2,6)}、実際に下水処理水及び下水汚泥中で、エストロゲン類の検出が多数報告されている⁷⁻¹³⁾。下水処理場内におけるエストロゲン類の挙動に注目すると、処理水中のエストロゲン活性は好気活性汚泥処理の過程で明らかな減少が確認されている⁹⁻¹³⁾。しかしながら、エストロゲン類はこの過程で完全に分解されるのではなく、一部活性汚泥に吸着、濃縮していることが明らかとされている^{11,13)}。

我が国では、これまで下水汚泥を廃棄物として最終処分場への埋立て、もしくは海洋投棄で処分することが主流とされてきた。しかしながら、近年は最終処分場の確保が難しくなっており、廃棄物処理法 (1970) 及びロンドン条約改正議定書 (1996) により、2007年2月までに下水汚泥の海洋投棄が全面的に禁止されることから、近年ではこのような下水汚泥をリサイクル資源としてコンポスト化する取り組みが増加している。さらに、エストロゲン類が多量に残存することが予想される畜産排泄物も、2004年11月より施行されている家畜排泄物法の改正によって、同じくコンポスト化の需要が高まっている。しかしながら、このようなコンポスト化肥料を畑に散布した際、降雨等によってコンポスト中に残存したエストロゲン類が水環境中へ溶出することが予想される。一部の報告には、牛舎からの排水が放流される水環境中において、エストロゲン及びアンドロゲン活性が確認されたことが報告されている¹⁴⁾。このことから、生物の内分泌系に影響を与える物質として、我々はエストロゲンに加え、アンドロゲンも注目すべき物質として考えている。生物の内分泌系に影響を与える化学物質として、エストロゲンに代表される E2 は、下水処理場等におけるステロイドホルモンの調査研究により、その挙動が多くの研究で明らかにされてきた。しかしながら、エストロゲンの残存が予想される下水汚泥コンポスト及び畜産廃棄物コンポストについては、研究報告例は少ない^{15,16)}。そこで本研究では、日本国内で製造、販売されている下水汚泥または畜産廃棄物から製造したコンポストの26サンプルについて、E1, E2, E3, EE2及びテストステロンを対象とし、これら5種類の性ホルモン残存量を明らかにした。さらに本研究では、コンポスト中のエストロゲン及

びアンドロゲン活性を明らかにするため、酵母 Two-hybrid アッセイ法を用いて、エストロゲン活性及びアンドロゲン活性について調査を行った。

2. 実験方法

2. 1 コンポストの収集

下水汚泥及び畜産廃棄物から製造されたコンポストは、日本国内で製造、販売されているものを対象に調査を行った。下水汚泥コンポストを20サンプル、畜産廃棄物コンポスト6サンプルを全国から無作為に収集し、計26サンプルの調査を行った。サンプルは保管時に微生物等による酸化を防ぐため、Baronti らの方法⁸⁾を参考に、分析するまで -18°C で冷凍保存した。

収集したコンポストの原料、成分を Table 1 に示す。

2. 2 試薬

標準試薬として Estrone (Sigma 社製), 17β -Estradiol (和光純薬製), Estriol (Sigma 社製), Ethynylestradiol (和光純薬製), Testosterone (Sigma 社製), 5α -Dihydrotestosterone (Sigma 社製) を用いた。内標準試薬には Estrone-2, 4, 6, 16- d_4 (CDN 製), 17β -estradiol- $^{13}\text{C}_4$, Estriol- $^{13}\text{C}_4$, Ethynylestradiol-16, 16- d_2 (林純薬製), Testosterone- d_3 (CDN 製), Bisphenol A- $^{13}\text{C}_3$ (林純薬製) 及び Decafluorobiphenyl (Sigma 社製) を用いた。誘導体化試薬には 1, 4-Dithioerythritol, N-Methyl-trimethylsilyl trifluoroacetamide, Iodotrimethylsilane (Sigma 社製) を用いた。

2. 3 試料の調製

エストロゲンの分析は環境省の外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル¹⁷⁾等に定められた前処理法が一般に用いられているが、コンポストのような夾雑物を多く含むサンプルにおいては、先の方法では前処理法が不十分な場合が多い。そこで、本研究では XAD-2 樹脂を用いた固相抽出法を取り入れ、エストロゲンは LC/MS で、アンドロゲンは GC/MS でそれぞれ定量分析を行った。

2. 3. 1 エストロゲン類分析のための試料の調製

コンポスト 2 g にメタノールに溶解したサロゲート物質 (E1-2, 4, 6, 16- d_4 ; E2- $^{13}\text{C}_4$; E3- $^{13}\text{C}_4$; EE2-16, 16- d_2) 1 ppm を 0.1 ml 添加し、1 M 酢酸/メタノール 40 ml 及びメタノール 40 ml で二度抽出後、ロータリーエバポレーターで液量が 10 ml 以下になるまで濃縮を行った。このサンプルを水 200 ml に転溶して XAD-2 樹脂カラム 18 g に通水後、メタノール 50 ml で溶出し、ロータリーエバポレーターで液量が 5 ml 以下になるまで濃縮した。その後、酢酸エチル 20 ml で液-液抽出を行い、酢酸エチル層を回収し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、シリカゲルカ

Table 1 Ingredients of sewage sludge compost and solid waste of livestock compost

	HWS * 1	HWS 2	HWS 3	HWS 4	HWS 5	SS ^b 1
Material	Human waste sludge Digestion tank sludge	Human waste sludge Digestion tank sludge	Human waste sludge	Human waste sludge	Human waste sludge	Sewage sludge
N ^e (%)	4.3	-	2.2	2.8	-	4.0
P ^f (%)	4.3	-	2.2	2.4	-	4.8
K ^g (%)	< 0.5	-	0.1	0.2	-	< 0.5
C/N ^h	-	-	5.6	7.0	-	5.0
	SS 2	SS 3	SS 4	SS 5	SS 6	SS 7
Material	Sewage sludge	Sewage sludge	Sewage sludge	Sewage sludge Digestion tank sludge	Sewage sludge	Sewage sludge Industrial sludge
N (%)	4.0	-	-	-	-	-
P (%)	5.0	6.5	1.0	1.3	-	3.5
K (%)	< 0.5	4.7	1.0	8.4	-	5.6
C/N	4.0	< 0.5	0.5	< 0.7	-	1.5
	SS 8	SS 9	SS 10	PM ¹	PM 2	PM 3
Material	Sewage sludge	Sewage sludge Papermaking residue Waste wood	Sewage sludge Bark Rape cake	PM	PM	PM Sawdust
N (%)	< 0.5	2.5	3.0	1.4	4.3	2.4
P (%)	20	2.0	2.0	4.9	2.5	2.8
K (%)	10	2.0	1.0	2.6	2.2	2.5
C/N	-	-	4.0	-	7.3	10
	CD ^d 1	CD 2	CD 3			
Material	CD Sawdust Oilcake	CD	CD Sawdust Bark			
N (%)	1.1	-	-			
P (%)	1.6	-	-			
K (%)	2.0	-	-			
C/N	15.6	-	-			

a : Human Waste Sludge Compost; b : Sewage Sludge Compost; c : Poultry Manure; d : Cattle Dung;
e : Nitrogen; f : Phosphoric acid; g : Kalium; h : Carbon-nitrogen ratio; i : No data

ロマトグラフィーでクリーンアップを行った。E1, E2, EE2をアセトン：ヘキサン (35:65, v/v) 35mℓで溶出し (フラクション 1), E3を酢酸エチル：メタノール (7:3, v/v) 20mℓで溶出した (フラクション 2)。フラクション 1 及びフラクション 2 をロータリーエバポレーターで液量 1 mℓ以下に濃縮後、窒素気流下でさらに 0.1mℓまで濃縮した。最後に内標準物質としてビスフェノール A-¹³C₃ 1 ppm を 0.2mℓ添加し、LC/MS 測定に供した。

2. 3. 2 テストステロン分析のための試料の調製

コンポスト 2 g にメタノールに溶解したサロゲート物質 (テストステロン-d₃) 200ppb を 40 μℓ添加し、「2. 3. 1 エストロゲン類分析のための試料の調製」と同様な操作を酢酸エチル抽出まで行った。シリカゲルクロマトグラフィーでは、テストステロンをアセトン：ヘキサン (35:65, v/v) 35mℓで溶出し、ロータリーエバポレーターで液量 1 mℓ以下に濃縮後、窒素気流下で乾固させた。これに誘導体化試薬として MSTFA: TMIS: DTE (1000: 2: 2, v/v/w) 40 μℓ¹⁸⁾を加え、60°Cで15分間誘導体化を行った。最後に内標準物質として Decafluorobiphenyl 20ppb を 40 μℓ添加し、GC/MS 測定に供した。

2. 4 装置及び測定条件

エストロゲンの分析には高速液体クロマトグラフィー

質量分析装置 (LC/MS) を用いた。テストステロンの分析には、陸らの方法¹⁹⁾を参考にガスクロマトグラフィー質量分析装置 (HRGC/HRMS) を使い、クリーンアップ処理により除去の難しい多数の夾雑物のノイズから定量ピークを特定するため、分解能10,000で測定を行った。LC/MSの測定条件及びGC/MSの測定条件を Table 2 に示す。本研究で目的物質とした E1, E2, E3, EE2, テストステロンの化学構造式を Fig. 1 に示す。E1, E2, E3, EE2及び内標準物質であるビスフェノール A-¹³C₃のクロマトグラムと、テストステロンのクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

2. 5 酵母 Two-hybrid アッセイ

コンポスト 2 g を実験方法2. 3. 1で示される XAD-2 樹脂カラムを用いたクリーンアップ法で試料の調製を行い、各フラクション処理液を窒素気流下で乾固させた後、Dimethyl sulphoxide (DMSO, 500 μℓ) に溶解させたものを酵母 Two-hybrid アッセイに供した。

本研究で用いた酵母 Two-hybrid アッセイ²⁰⁾は、エストロゲン活性試験としてヒトエストロゲンレセプター α (hERα), 及びメダカエストロゲンレセプター α (medERα), アンドロゲン活性試験としてヒトアンドロゲンレセプター (hAR) の各核内受容体を組み込んだ酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*: Y190) を用いて、白石らが開発した96-well プレートを用いる化学発光測定法²¹⁾によ

Table 2 LC/MS and GC/MS conditions

LC condition		MS condition	
Column	GL Science Inertsil ODS-3V Length 250 mm, I.d. 0.25 mm, diameter 5 μ m	Ionization	APCI (Atmospheric pressure Chemical Ionization)
Oven temp.	40 °C	Ion Mode	Negative ions
Flow	1 mL/min	Nebulizing gas	Nitrogen
Vol. injection	20 μ l	Vaporizer temp.	400 °C
Mobile phase	A : 50% Methanol, 50% Water B : 100% Methanol Elution gradient time (min) A (%) B (%) 0 100 0 60 0 100	Orifice 1 temp.	100 °C
		Multiplier	520.6 volts
		Needle KV	3.819
		Monitor ion (m/z)	Estrone 269.1 17 β -estradiol 271.1 Ethinylestradiol 295.1 Estriol 287.1 Estrone-2,4,5,16-d ₂ 273.1 17 β -estradiol- ¹³ C ₄ 275.1 Ethinylestradiol-16,16-d ₂ 299.1 Estriol- ¹³ C ₄ 291.1 Bisphenol A- ¹³ C ₃ 230.1
GC condition		MS condition	
Gas chromatograph	6890GC (Agilent)	Ion source temp	200 °C
Injection Mode	Splitless	Ionization voltage	70 eV
Injection temp.	270 °C	Ionization current	300 μ A
Carrier gas	He, Constant flow 1 mL/min	Ionization mode	EI+
Column	DB-5 (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.1 μ m film thickness)	Accel. Voltage	10 kV
Oven temp.	80 °C (1 min) - 10 °C/min - 280 °C (5 min)	Resolution	>10,000
Mass spectrometer	JMS-700D (JEOL)	Monitor ion (m/z)	Testosterone 432.2880 Testosterone - d ₃ 435.3036 Decafluorobiphenyl 333.9840
Vol. Injection	2 μ l

Estrone (E1)

17 β -Estradiol (E2)

Estriol (E3)

Ethinylestradiol (EE2)

Testosterone

Fig. 1 Chemical structures of E1, E2, E3, EE2 and Testosterone

る。簡便かつ高感度な酵母 Two-Hybrid アッセイシステムを用いて行った。

hER α は medER α に比べて、E2 や E1 (ステロイドホルモン) に対する感度が高いが、アルキルフェノールや

植物エストロゲンに対しては逆であり、両者を併用することで、それぞれ E2 等量に換算比較した場合、両者が同等の値のときは活性に寄与する物質はほとんどが E2 関連物質であることが推測され、大幅に medER α の値が

Fig. 2 SIM Chromatograms of E1, E2, E3, EE2, Bisphenol A-¹³C₃ and Testosterone

a: E1, E2 and EE2 were analyzed with LC/MS (Fraction 1); b: E3 and Bisphenol A-¹³C₃ were analyzed with LC/MS (Fraction 2); c: Testosterone was analyzed with GC/MS

高いときは、工業汚染化学物質（ノニルフェノールなど）あるいは植物エストロゲン等の寄与が推測される²²⁾。

コンポスト中のエストロゲン活性及びアンドロゲン活性の強さを評価する方法として、化学物質の各濃度における化学発光比が次の希釈濃度の2倍以上を示すような試験濃度領域で回帰直線式を求め、その計算式から化学発光比を10倍誘導する濃度を10倍影響濃度（EC_{×10}）として算定した。コンポスト処理液のEC_{×10}の値から、同じ活性値を示す各受容体のリガンド（hERα及びmedERαは17β-Estradiolを使用し、hARは5α-Dihydrotestosteroneを使用した）の濃度を算出し、エストロゲン活性はE2等量（E2 equivalency quantity: EEq）に、アンドロゲン活性は5α-Dihydrotestosterone等量（5α-Dihydrotestosterone equivalent quantity: AEq）に換算して評価した。

2. 6 添加回収試験

コンポスト（下水汚泥コンポスト：SS 1）2gにメタノールに溶解したエストロゲン標準溶液（E1, E2, E3, EE2）1ppmを0.1mlとテストステロン標準液200ppbを40μl添加し、2. 3. 1及び2. 3. 2に示されるエストロゲン類及びテストステロン分析のための試料の調製と同様な操作を行った。回収率はE1が82%, E2が83%, E3が87%, EE2が71%, テストステロンが96%とそれぞれ良好な結果が得られた。

2. 7 検出下限, 定量下限

LC/MS及びGC/MSの検出下限及び定量下限は、LC/MSについては検出下限がE1で60pg, E2で60pg, E3で300pg, EE2で300pgであった。GC/MSについてはテストステロンの検出下限が0.2pgであった。測定方法と分

析機器の検出下限より算出された定量下限は、E1が0.2ng, E2が0.2ng, E3が1ng, EE2が1ng, テストステロンが0.5pgであった。

3. 結果・考察

3. 1 コンポスト中のエストロゲン及びテストステロン残存量

全国から収集した下水汚泥コンポストを20サンプル、畜産廃物コンポストを6サンプルの計26サンプルのエストロゲン類及びテストステロンの測定結果をTable 3に示す。

3. 1. 1 下水汚泥コンポスト中の性ホルモン

一般に市販または無料で配布されている下水汚泥コンポスト（下水汚泥[Sewage Sludge: SS]コンポスト、し尿汚泥[Human Waste Solid: HWS]コンポスト）を全国から無作為に収集し、これらコンポスト中のエストロゲン類およびテストステロンについて残存量を調査した。下水汚泥コンポスト中にはE1が30~580ng/g, E2がN.D.~23ng/g, E3がN.D.~4ng/g, テストステロンがN.D.~2,100ng/gの値で検出された。下水汚泥20サンプル中E1は全てから検出され、E2は16サンプル、E3は1サンプルのみに検出された。また、合成エストロゲンであるEE2は検出されなかった。テストステロンは調査を行った15サンプル中12サンプルに検出された。

これまでの研究で、下水汚泥コンポストの原料となる脱水汚泥中のエストロゲン量はE1が25ng/g, E2が1.3ng/g, E3が0.42ng/g程度であることが明らかにされている¹³⁾。本実験結果からも、E1がE2より多く残存するという点で橋本らの報告と同じ傾向がみられた。E1とE2の残存比に注目すると、橋本らの報告では脱水汚泥におけるE2に対するE1の比は8倍程度である¹³⁾。

Table 3 Residual quantity of the estrogen and testosterone in the compost

Estrogen and androgen / Sewage sludge compost (ng/g)																
	HWS 1	HWS 2	HWS 3	HWS 4	HWS 5	SS 1	SS 2	SS 3	SS 4	SS 5	SS 6	SS 7	SS 8	SS 9	SS 10	SS 11
E1	180±17	300±22	41±9	53±17	240±15	160±8	200±33	66±14	54±6	37±5	97±0	30±0	38±2	33±0	330±3	580±30
E2	23±5	14±9	5±2	8±2	15±3	3±0	4±1	8±1	N.D.	4±2	5±2	N.D.	1±0	4±0	N.D.	8±4
E3	N.D. ^b	N.D.	4±3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
EE2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T ^a	2,100±170	1,900±23	160±22	44±14	150±0	110±0	160±19	N.D.	N.D.	N.D.	180±13	35±0	9±0	82±0	160±10	-

Estrogen and androgen / Solid waste of livestock compost (ng/g)					
	PM 1	PM 2	PM 3	CD 1	CD 2
E1	220±7	240±2	54±6	31±0	43±0
E2	13±6	N.D.	18±0	20±4	10±0
E3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
EE2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
T	73±2	270±9	57±0	35±0	41±0

a: Testosterone; b: Less than the minimum limit of detection; c: No data

Data calculated for standard deviation (n=3)

Explanation about abbreviation of compost samples in this figure are listed in Table 1

Fig. 3 a に、下水汚泥及びし尿汚泥から製造したコンポスト中の E1 及び E2 の残存比を示した。Fig. 3 には、E2、E1 及びテストステロンが検出された、し尿汚泥及び下水汚泥コンポストの中から、エストロゲン及びテストステロン量が比較的高い 3 試料を選抜して記載している。この結果から、下水汚泥コンポスト中の E2 に対する E1 の比は 7~73 倍と、脱水汚泥よりも E1 の割合が増加していることが確認された。E2 は活性汚泥中に生息する微生物の代謝によって、E1 に酸化すると考えられている²⁰⁾。下水汚泥コンポストの製造には、一般に嫌気性発酵（一次発酵）及び好気性発酵（二次発酵）等の過程を経ることが必要であり、好気性発酵の際には微生物の働きを活性化するために、切返しによる酸素の送り込み作業が行われる。今回調査を行った下水汚泥コンポスト中の E2 に対する E1 の割合が、脱水汚泥のものよりも増加していたことから、コンポストの製造過程において E2 の酸化が進み、E1 へ形態変化したことが示唆される。また、下水汚泥コンポスト中の E2 量とテストステロン

量とを比較すると（Fig. 3 b），テストステロンが E2 の 6~136 倍程度高く残存していることが確認された。下水汚泥コンポストの中で、テストステロン量が他のサンプルに比べて特に高い 2 サンプル（HWS 1, 2）は、共にし尿汚泥から製造されたコンポストであった（Table 3）。

非妊娠期の成人女性はエストロゲン（E1 及び E2）を約 5 $\mu\text{g/day}$ 、アンドロゲン（Testosterone 及び Androsteronedione）を約 10 mg/day 排出しており、成人男性ではエストロゲンを約 1.5 $\mu\text{g/day}$ 、アンドロゲンを約 13 mg/day 排出していることが明らかにされている¹⁶⁾。これによると、エストロゲンに対するアンドロゲンの排出比は、女性で約 2,000 倍、男性で約 8,400 倍である。下水汚泥コンポストから検出されたエストロゲンとアンドロゲンについては、テストステロンがエストロゲン（E1, E2）の排出量を大きく上回っているという点で Shore らの報告と同様な結果がみられたが、排出時のエストロゲンに対するアンドロゲンの比にはばらつきがみられた。

Fig. 3 Quantity of the E1, E2 and Testosterone in the sewage sludge compost and solid waste of livestock compost

a: E1 and E2 quantity in the sewage sludge compost; b: E2 and Testosterone quantity in the sewage sludge compost; c: E1 and E2 quantity in the solid waste of livestock compost; d: E2 and Testosterone quantity in the solid waste of livestock compost. Explanation about abbreviation of compost samples in this figure are listed in Table 1

下水汚泥コンポスト中の性ホルモンの残存量は、下水処理場周辺に居住するヒトの生理状態や年齢、性別等によって大きく変化することが予想される。また、今回調査を行った下水汚泥コンポストにおいては、原料がおがくずや工業汚泥等の副資材が用いられているものもあり (Table 1)、このような原料の性質や製造方法等もコンポスト中の性ホルモンの残存量にばらつきが生じた要因と考えられる。

3. 1. 2 畜産廃棄物コンポスト中の性ホルモン

畜産廃棄物コンポスト (鶏糞 [Poultry Manure: PM], (牛糞 [Cattle Dung: CD]) 中には E1 が 30~240 ng/g, E2 が N.D.~20 ng/g, テストステロンが 35~270 ng/g の値で検出された。また, E3 及び EE2 は検出されなかった。雌鶏については, E2 を 2~3 $\mu\text{g/day}$, E1 を 0.5~3 $\mu\text{g/day}$ 排出することが明らかにされている¹⁰⁾。この結果と本研究の結果を比較すると、鶏糞中の E2 に対する E1 の比は 3~17 倍と、排出時よりも E1 が高い残存比で確認された (Fig. 3 c)。この結果から、本研究で調査を行った鶏糞 (PM 1-3) は、E2 に対する E1 の残存比が排出時よりも高いことから、コンポストの発酵等による酸化によって E2 が E1 へ形態変化したことが示唆された。さらに雌鶏の糞中には E2 が 533 ng/g dry wt., テストステロンが 254 ng/g dry wt. 含まれており、雄鶏の糞中には E2 が 93 ng/g dry wt., テストステロンが 670 ng/g dry wt. 含まれることが明らかにされている¹⁰⁾。今回調査を行った鶏糞については、E2 に対するテストステロンの比は 3~6 倍と (Fig. 3 d)、テストステロンが E2 より残存比が高

いという点で、雄の鶏糞と類似する結果が得られた。

また牛糞については、妊娠期の牛が排出した牛糞には、800~1,300 ng/g のエストロゲンが含まれていることが明らかにされている¹⁰⁾。今回調査を行った牛糞 (CD 1-3) 中のエストロゲン量は、妊娠期の牛糞中エストロゲン量よりも低い値であった (Table 3)。また、E2 に対する E1 の比は 2~4 倍であり (Fig. 3 c), E2 に対するテストステロンの比は 2~4 倍であった (Fig. 3 d)。

コンポストの原料となる畜産廃棄物は、畜産等の目的ごとに飼育性が大きく異なる。さらに今回調査を行った畜産廃棄物コンポストには、油かすやおがくず等の副資材が使用されているものもあることから、畜産廃棄物コンポスト中の性ホルモン残存比に影響していると考えられる。

3. 2 酵母 Two-hybrid アッセイによるコンポスト中のエストロゲン及びアンドロゲン活性

3. 2. 1 下水汚泥コンポスト中のエストロゲン及びアンドロゲン活性

下水汚泥コンポスト 20 サンプルのうち 15 サンプルについて、ヒト及びメダカのエストロゲンレセプター (hER α and medER α) 及びヒトのアンドロゲンレセプター (hAR) の各核内受容体を組み込んだ酵母を用いて酵母 Two-Hybrid アッセイを行った。コンポスト中のエストロゲン及びアンドロゲン活性の結果を Table 4 に示す。

hER α では、下水汚泥 15 サンプル中 9 サンプルにエス

Table 4 Estrogenic and androgenic activities in the compost for hER α , medER α and hAR

E2 / Sewage sludge compost (nM/g)															
	HWS 1	HWS 2	HWS 3	HWS 4	HWS 5	SS 1	SS 2	SS 3	SS 4	SS 5	SS 6	SS 7	SS 8	SS 9	SS 10
hER α ^a	168	138	40	17	N.A.	66	37	38	16	14	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
medER α ^b	260	397	581	N.A. ^c	N.A.	395	241	91	225	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
5 α -Dihydrotestosterone / Sewage sludge compost (nM/g)															
	HWS 1	HWS 2	HWS 3	HWS 4	HWS 5	SS 1	SS 2	SS 3	SS 4	SS 5	SS 6	SS 7	SS 8	SS 9	SS 10
hAR ^d	7	5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
E2 / Solid waste of livestock compost (nM/g)															
	PM 1	PM 2	PM 3	CD 1	CD 2	CD 3									
hER α	92	299	15	38	N.A.	N.A.									
medER α	253	299	116	100	N.A.	N.A.									
5 α -Dihydrotestosterone / Solid waste of livestock compost (nM/g)															
	PM 1	PM 2	PM 3	CD 1	CD 2	CD 3									
hAR	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.									

a : human estrogen receptor α ; b : medaka fish estrogen receptor α ; c : not activity; d : human androgen receptor

Estrogenic and androgenic activity were recorded as EC₁₀ which was defined as the concentration of the sample solution producing a chemiluminescent signal 10 times that of the blank control. The inverse of the obtained EC₁₀ values of E2 and 5 α -Dihydrotestosterone were set to positive control.

Explanation about abbreviation of compost samples in this figure are listed in Table 1

トロゲン活性が確認され、14~168nM EEq/Compost (g) であった。また medER α では、下水汚泥コンポスト15 サンプル中7 サンプルにエストロゲン活性が確認され、91~581nM EEq /Compost (g) であった。hER α と medER α における下水汚泥コンポスト中のエストロゲン活性を比較すると、同じ下水汚泥コンポストにおいても medER α のほうが hER α よりも E2換算値においてエストロゲン活性値が高かった (Fig. 4a)。hAR では、下水汚泥15サンプル中2 サンプルにアンドロゲン活性が確認され、5~7 nM AEq/Compost (g) であった。下水汚泥コンポスト中で、hER α と hAR におけるエストロゲン及びアンドロゲン活性値が高い上位2 サンプル (HWS 1, 2) は、共にし尿汚泥から製造されたコンポストであった。

3. 2. 2 畜産廃棄物コンポスト中のエストロゲン及びアンドロゲン活性

畜産廃棄物コンポスト6 サンプルについて、下水汚泥コンポストと同様、hER α 、medER α 及び hAR を用いたエストロゲン及びアンドロゲン活性試験を行った。hER α におけるエストロゲン活性は6 サンプル中4 サンプルで確認された。このうち、鶏糞は3 サンプル中すべてにエストロゲン活性が確認され、15~299nM EEq/Compost (g) であった。牛糞は3 サンプル中1 サンプル (CD 1) においてのみエストロゲン活性が確認され、38nM EEq/Compost (g) であった。medER α におけるエストロゲン活性は、畜産廃棄物コンポスト6 サンプル中4 サンプルで確認された。このうち鶏糞は3 サンプル中すべてに116~299nM EEq/Compost (g) のエストロゲン活性が確認され、牛糞は3 サンプル中1 サンプル (CD 1) においてのみ100nM EEq/Compost (g) のエストロゲン活性が確認された。また鶏糞、牛糞共に hAR におけるアンドロゲン活性は確認されなかった。

hER α と medER α における畜産廃棄物コンポスト中のエストロゲン活性を比較すると、hER α 及び medER α において共に高いエストロゲン活性を示したのは鶏糞であり、今回調査を行った畜産廃棄物コンポストに関しては、鶏糞は牛糞よりも濃度及びエストロゲン活性において高い値を示すことが明らかとなった (Table 3, Table 4)。また、畜産廃棄物コンポストにおける hER α 及び medER α によるエストロゲン活性値を比較すると、エストロゲン活性が確認された PM 1~3 及び CD 1において、PM 2のみ hER α と medER α におけるエストロゲン活性が E2換算値において同値であったが (Fig. 4b)、その他の試料においては hER α より medER α のほうが E2換算値においてエストロゲン活性値が高いことが明らかとなった (Fig. 4b)。

3. 3 コンポスト中のエストロゲン活性に関する考察

下水汚泥コンポストにおける hER α 及び medER α によるエストロゲン活性値を比較すると、エストロゲン活性が確認された HWS 1~3 及び SS 1~4 において、hER α より medER α のほうが E2換算値におけるエストロゲン活性が高いことから (Fig. 4a)、これらの試料には E2関連物質ではないエストロゲン様化学物質の存在が示唆された。

また、畜産廃棄物コンポストにおいては PM2 において、hER α と medER α におけるエストロゲン活性値が同値であったことから (Fig. 4b)、PM2 のエストロゲン活性は E2関連物質によるものと考えられる。さらに PM 1, 3, CD 1 のエストロゲン活性値が E2換算値において hER α よりも medER α のほうが高かったことから (Fig. 4b)、これらの試料にもエストロゲン様化学物質の存在が示唆された。

本実験結果から、hER α 及び medER α においては、エストロゲン活性に相違がみられた。このことから、E2換算値におけるエストロゲン活性が hER α よりも medER α のほうが高いサンプルでは、エストロゲン様化学物質の存在が示唆される結果となった。

3. 4 コンポスト中のアンドロゲン活性に関する考察

代表的なアンドロゲン物質であるテストステロンは、調査を行ったコンポスト26サンプル中18サンプルに検出された。今回調査を行ったコンポスト26サンプルにおいて、エストロゲンの指標である E2及びテストステロンの残存量が最も高いのは、し尿汚泥から製造されたコンポストであることが明らかになった (Table 3)。し尿処理場は数万~数十万人というヒトの排泄物を処理しているため、ここから発生するし尿汚泥を用いたコンポストには、処理人口に相当する性ホルモンの一部が蓄積することが考えられる。このため、下水処理場に比べて、し尿処理場ではヒトの排泄物処理量の割合が多いことが E2及びテストステロンの残存量が高い理由として考えられる。

また、テストステロンはエストロゲンよりも高濃度に残存しているにも関わらず、アンドロゲン活性が確認されたサンプルは、テストステロン残存量の高かったし尿汚泥コンポストの2 サンプル (HWS 1, 2) のみであった (Table 4)。このことから、アンドロゲンのリガンドとして、テストステロンは感受性が低いことが示唆された。アンドロゲンのリガンドはテストステロンの代謝物質である5 α -ジヒドロテストステロンであるため、本実験における酵母 Two-hybrid アッセイでは、5 α -ジヒドロテストステロンをリガンドとして評価している。本研究では、リガンドである5 α -ジヒドロテストステロンに対するテストステロンの感度を明らかにするため、

Fig. 4 Comparison between hERα and medERα of estrogenic activity
a: Estrogenic activity in the sewage sludge compost
b: Estrogenic activity in the solid waste of livestock compost
Explanation about abbreviation of compost samples in this figure are listed in Table 1

hAR におけるアンドロゲン活性を 5 α -ジヒドロテストステロン、テストステロン、メチルテストステロンの 3 種のリガンドを用いて測定した。それぞれから得られた EC $_{10}$ は 5 α -ジヒドロテストステロンが 4.6 nM, テストステロンが 21 nM, メチルテストステロンが 17 nM であった (Fig. 5)。このことから、テストステロンに対する感受性はリガンドとしての 5 α -ジヒドロテストステロンに対して 20% 程度であることが確認された。生物はアンドロゲンの排出のうち、70% 近くをテストステロンとして排出している¹⁷⁾。そのため、コンポスト中のテストステロンは、hAR におけるアンドロゲン活性を直接的に誘導していることが示唆される。本実験で hERα におけるリガンドである E2 のエストロゲン活性の測定を行った結果、算出された EC $_{10}$ は平均 165 pM であった。このことから、

アンドロゲン受容体はエストロゲン受容体と比較して感受性が低いため、エストロゲンと比較して残存量の多いテストステロンにも関わらず、アンドロゲン受容体は活性を示さなかったと考えられる。

4. まとめ

今回無作為に購入したコンポストの半数以上からエストロゲン及びテストステロンを検出した。しかしながら、下水汚泥及び畜産廃棄物コンポストにおける性ホルモンの残存量にはばらつきがあり、コンポストの原料や製造方法によって、その残存率が大きく変化していると考えられる。また性ホルモンの排出量に関しては、生物の生理状態、性別比等によってその排出量が大きく変化

Fig. 5 Androgenic activity for Methyltestosterone, Testosterone and 5α-Dihydrotestosterone

Methyltestosterone EC₅₀: 17 nM; Testosterone EC₅₀: 21 nM and 5α-Dihydrotestosterone EC₅₀: 5 nM

Each point represents the mean of three replicates.

Standard errors were smaller than the symbols used to represent the means and consequently are not shown.

するため、個々のコンポストにおける評価が必要である。

生物への影響については、酵母 Two-hybrid アッセイによって、エストロゲン及びアンドロゲン活性が確認された試料も存在した。hERα と medERα のエストロゲン活性値の相違から、コンポスト中にはエストロゲンに加えてエストロゲン様化学物質の存在が示唆された。

また、エストロゲン及びアンドロゲン活性が高値で確認されたサンプルは、し尿汚泥から製造されたコンポストであった。さらに、テストステロン量が他のサンプルに比べて、特に高い値を示したし尿汚泥コンポストにはアンドロゲン活性が確認された。このことから、アンドロゲン物質の存在も生物の内分泌系攪乱の影響を評価するうえで重要であると考えられる。今後さらに下水汚泥や畜産廃棄物のコンポスト化が予想される現代において、コンポスト中の性ホルモンの残存量と共に、コンポスト散布後の性ホルモンの挙動及び生物に対する影響についても調査が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり、アッセイ用酵母をご提供頂きました独立行政法人国立環境研究所の白石不二雄博士に深く感謝いたします。

要 約

下水汚泥または畜産廃棄物コンポスト中のエストロゲン及びアンドロゲン残存量の調査を行った。コンポスト26サンプル中からE1はすべてのサンプルから検出され、E2は21サンプル、E3は1サンプルに検出された。EE2は検出されなかった。テストステロンは21サンプル中18サンプルに検出された。酵母 Two-hybrid アッセイによる内分泌攪乱性調査の結果、エストロゲン活性はコンポスト21サンプル中13サンプルから確認され、アンドロゲン活性は2サンプルに確認された。本研究結果から、一般に市販される下水汚泥または畜産廃棄物コンポスト中から性ホルモンが検出され、その半数以上にエストロゲン活性が確認された。

文 献

- 1) Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M. and Sumpter, J.P.: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1559-1565 (1998)
- 2) Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P.: Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2498-2506 (1998)
- 3) 和波一夫, 嶋津暉之, 宮下雄博, 田村 基: 多摩川

- 等の環境ホルモン問題に関する研究（その8）－都内河川におけるコイの精巣等の調査（総まとめ）－，東京都環境科学研究所年報，45-55（2002）
- 4) Jobling, S., Brerresford, N., Nolan, M., Gray, T. R., Brightly, G.C., Sumpter, J.P. and Tyler, C.R.: Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treatment sewage effluents. *Biol. Reprod.* **66**, 272-281 (2002)
 - 5) 塩田 勉，森 真朗：下水処理水中の化学物質がメダカに及ぼす影響，東京都環境科学研究所年報，90-96（2002）
 - 6) Ankley, G.T. and Johnson, R.D.: Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. *ILAR Journal*. **45**, 469-483 (2004)
 - 7) Layton, A.C., Gregory, B.W., Seward, J.R., Schultz, T.W. and Saylor, G.S.: Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in tennessee U.S.A. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3925-3931 (2000)
 - 8) Baronti, C., Curini, R., D'ascenzo, G., Corcia, A.D., Gentili, A. and Samperi, R.: Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 5059-5066 (2000)
 - 9) Holbrook, R.D., Novak, J.T., Grizzard, T.J. and Love, N.G.: Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 4533-4539 (2002)
 - 10) 嶋津暉之，和波一夫，柳田房洋，田村 基：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その11）下水処理場におけるエストロジェンの収支，東京都環境科学研究所年報，75-83（2002）
 - 11) Andersen, H., Siegrist, H., Sørensen, B.H. and Ternes, T.A.: Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4021-4026 (2003)
 - 12) 宮 晶子，恩田建介：下水処理場における内分泌かく乱物質の除去特性と分解微生物，*J. Environ. Biotechnol.* **3**, 15-22 (2003)
 - 13) 橋本敏一，恩田建介，中村由美子，多田啓太郎，宮晶子，三品文雄：下水処理場における内分泌攪乱物質の消長と挙動，水環境学会誌，**27**, 797-802 (2004)
 - 14) Soto, A.M., Calabro, J.M., Prechtel, N.V., Yau, A.Y., Orlando, E.F., Daxenberger, A., Kolok, A.S., Guillette, Jr., L.J., Bizac, B.L., Lange, I.G. and Sonnenschein, C.: Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern nebraska, USA. *Environ. Health Persp.* **112**, 346-352 (2004)
 - 15) Hakk, H., Millner, P. and Larsen, G.: Decrease in water-soluble 17 β -estradiol and testosterone in composted poultry manure with time. *J. Environ. Qual.* **34**, 943-950 (2005)
 - 16) Shore, L.S. and Shemesh, M.: Naturally produced hormones and their release into the environment. *Pure Appl. Chem.* **75**, 1859-1871 (2003)
 - 17) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質，底質，水生生物），<http://www.env.go.jp/chemi/end/manual/water.html>
 - 18) Hartmann, S. and Steinhart, H.: Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. **704**, 105-117 (1997)
 - 19) 陸 明，堀口敏宏，白石寛明，柴田康行，安保 充，大久保明，山崎素直：ガスクロマトグラフィー／質量分析法による海産巻貝類におけるステロイドホルモンの同定と定量，分析化学，**50**, 247-255 (2001)
 - 20) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T.: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharm.* **154**, 76-83 (1999)
 - 21) 白石不二雄，白石寛明，西川淳一，西原 力，森田昌敏：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 (2000)
 - 22) Terasaki, M., Shiraishi, F., Nishikawa, T., Edmons, J.S., Morita, M. and Makino, M.: Estrogenic activity of impurities in industrial grade bisphenol A. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3703-3707 (2005)
 - 23) Ternes, T.A., Kreckel, P. and Mueller, J.: Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plant-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total. Environ.* **225**, 91-99 (1999)