

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18404004
 研究課題名（和文） インドネシアにおける内分泌攪乱化学物質による水質・生態・人体影響調査
 研究課題名（英文） Investigation of effects of endocrine disrupters on water quality, ecosystem and human health in Indonesia
 研究代表者
 蔵崎 正明（KURASAKI MASAOKI）
 北海道大学・大学院地球環境科学研究院・助教
 研究者番号：80161727

研究成果の概要：本調査研究においてインドネシア西ジャワ地方を中心に重金属汚染、環境ホルモン汚染の実態を調査し、併せて日本の河川の調査を行ない汚染の構造が日本とは異なっていることを示した。また、インドネシアにある重金属汚染の健康影響の調査を行ない農産物の一部に汚染が広がっていること、その汚染を除去する能力のある細菌の同定、およびインドネシアに多く生息する魚類を用いた重金属汚染バイオマーカーの策定を試み成果を上げた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：環境医学、環境修復学

科研費の分科・細目：化学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境ホルモン、重金属、水銀汚染、重金属耐性菌、汚染バイオマーカー、河川水、ジャワ島、インドネシア

1. 研究開始当初の背景

熱帯のインドネシア西ジャワ地方および中央ジャワ地方は近年開発が進み工場も多く立地している。その周辺に数多く存在する河川は地域住民の生活に密着し生活用水、農業用水あるいは工業用水として直接利用されている。しかしながら、この河川に工業廃水あるいは生活廃水がほとんど未処理の状

態で投棄され、さらには金の非合法的採掘に伴う水銀等の汚染も、これまでの我々の調査（基盤研究C平成12年～13年）により明らかにされつつある。このインドネシアの現状をみるに、かつての高度成長期前後の日本における水俣病等に代表されるような重篤な環境汚染が心配されている。これまでの熱帯域での調査では主に熱帯に特有な生物の生態調査が行われてきたが、過去我が国におい

て体験したような環境汚染あるいは生態系への影響が懸念される内分泌攪乱化学物質に着目した調査は、熱帯地域の発展途上国において、ほとんど行なわれていない。また、これら開発途上国の現状では内分泌攪乱化学物質等についても、安易な投棄が認められるケースが多く、いくつかの内分泌攪乱化学物質が生態系に影響を及ぼす量が十分に水環境中に存在している危険性が予測され、内分泌攪乱因子と水生生物との係わり、それによる生体濃縮および住民への影響などを総合的に調査する必要があると思われる

2. 研究の目的

本調査研究では、インドネシアの西ジャワおよび中央ジャワを中心に、河川流域とその河川により灌漑される農地を対象として、内分泌攪乱化学物質を含む環境汚染の実態の調査解明、汚染化学物質の住民等への健康影響および汚染進展の構造を把握することを目的とした。この目的を達成するために以下の項目の調査研究を行った。

- (1) インドネシアにおいて工業化が進んでいる地域としてジャカルタ近郊および中央ジャワ地区のジョグジャカルタ、工業化が遅れている地域として中央カリマンタンを選択し、現地河川水および生活廃水の水質を調査した。
- (2) また開発途上国に対する対照地域として日本の工業化の進んだ東京エリアおよび農業が中心の北海道エリアを選択し同様の河川水の調査を行なう。
- (3) さらに西ジャワ地区を中心に懸念される水銀汚染の実態調査をチリブン川、チカニキ川の2河川において実施し、河川水と底質および近郊の水田、稲における水銀濃度の測定を行った。
- (4) 重金属汚染の修復への応用のために重金属耐性菌を探索し、その重金属取り込み能および重金属取り込み機構の解明に関する室内実験を行った。
- (5) 重金属汚染の実態を容易に把握するバイオマーカーの選定を試みた。カドミウムあるいは鉛汚染が進んだ湖の3種の魚類の肝臓中重金属結合低分子量タンパク質メタロチオネインの測定を行ない。得られた結果が妥当であるかどうか室内実験において同種の魚を用いて検証した。

以上の調査研究は、現地研究機関、大学との密接な協力がなければその遂行が不可能であるが、研究分担者の岩熊・田中は、所属研究院とインドネシア科学院との間で結ばれた日本学術振興会拠点大学交流事業の責任者の一人であり、研究代表者および他の研究分担者と共にこれまでインドネシア科学

院陸水研究所、カリマンタンのパランカラヤ大学、あるいはジョグジャカルタのイスラムインドネシア大学等と密接な協力関係のもと調査あるいは共同研究を前提とした公開セミナー等を行なった実績を持つため、調査研究に必要なインドネシア科学院の許可も速やかにおり、現地研究協力者の研究の下に順調に調査研究を進めることができた。

3. 研究の方法

以下の手順で調査研究を進めた。

- (1) 西ジャワ地区、3河川、5湖沼計19地点、中央ジャワ地区1河川、1湖沼3地点、中央カリマンタン地区2河川5地点で毎年サンプリングを行ない、これらのサンプル水中のCOD、pH、電気伝導度、りん濃度、窒素濃度等を測定し、さらに大腸菌検査を行なった。また東京エリア4河川11地点、北海道エリア8河川29地点でサンプリングを行ない、同様にCOD、pH、電気伝導度、りん濃度、窒素濃度等を測定した。またNa、CaおよびK濃度は原子吸光光度計を用いた炎光分析法(Hitachi Flame Atomic Absorption Spectrophotometer model 180-80)で、Cd、Pb、Co、Ni、Cu、Zn、AlおよびSn濃度についてはICPマス(ICP-MS, Seiko SPQ-6500, Tokyo, Japan)を用いて測定した。環境ホルモンおよびエストロジオールの測定は酵素抗体法を用いて行ない、またデータ解析には主成分分析法および分散分析を用いて行った。
- (2) 水銀汚染の実態を解明するために西ジャワ地区2河川3湖沼12地点および近傍の水田から底質と河川湖沼水のサンプリングを行ない(1)で述べた一般水質項目を測定の後、前処理を行ない重金属濃度はICPマス、水銀濃度は水銀分析計(Hiranuma Sangyo Co.,Ltd, Japan)を用い測定した。
- (3) 西ジャワ地区より採取した底質中のCd耐性菌を高濃度Cd培地より選択し、菌種を核遺伝子のPCR法で同定した。また菌のCd取り込み量は原子吸光法で測定し、Cd結合タンパク質はセファデックスG-50を用いたゲル濾過法で行った。
- (4) 重金属汚染のバイオマーカー選定のために西ジャワ地区2湖沼より3種の魚15尾を採捕し、肝臓中の重金属を湿式灰化後、原子吸光法で測定し、低分子量重金属結合タンパク質メタロチオネインの量の測定はセファデックスG-50を用いたゲル濾過法で行った。

4. 研究成果

(1) インドネシアの環境汚染

インドネシアジャワ島ではアルミニウム、マグネシウムなどが高濃度で検出され、いくつかの河川から環境ホルモン物質も検出されたが、カリマンタン島では大きな汚染は認められなかった。日本の河川からは亜鉛などが基準値以下であるが比較的多く検出されている。個々のデータを提示するのがわかりやすいがスペースの問題があるため、主成分分析の結果のみを以下に示す。

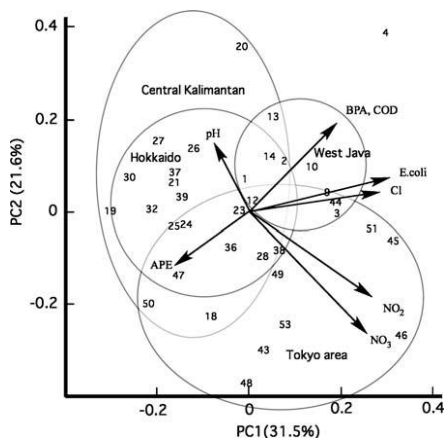
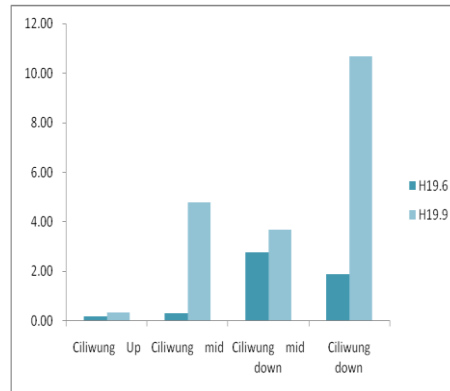


Fig. 1 Principal component analysis for water quality in four areas. Each circle shows the sampling area. The X-axis is a principal component 1. The Y-axis is a principal component 2. The values in parentheses are contribution ratios for each component. The vector arrows show the direction and quantity of loading for each parameter. Parameters are COD, NO₂, NO₃, Cl, E. coli, APE and BPA

まとめるとインドネシアの中央カリマンタンと北海道は汚染が少なく同じような水質挙動を取っているが、東京エリアとジャカルタ近郊では汚染の方向性が異なっていた。つまりジャカルタ近郊では大腸菌汚染と環境ホルモンの汚染が顕著であり、東京近郊では硝酸性窒素の汚染が認められた。インドネシアでは一部地域に限定される重金属汚染を除くと大きな汚染は認められず、東京近郊のように工業廃水系の汚染はほとんど認められなかった。汚染源と推定されるのは生活廃水であり、下水道の整備が為されれば汚染の多くは改善することが予測される。このような提言ができたことが、本研究の大きな成果であり、結果は取りまとめ論文として公表されている(Kido et al. Environ. Monit. Assess, in press 2008年8月に on line で公表済み)。

また、酪農地域の河川水中に混入したエストラジオール量を測定したところ、



(単位は ng/L)

同じく酪農地帯である北海道の西別川流域に比べて3~5倍の高値を示していた。

このように開発途上国であるインドネシアと開発国である日本のそれぞれの現状を把握することは、今後開発がさらに進むことが予想されるインドネシアの河川環境を改善・保全するための基礎的なデータともなることが期待される。

(2) インドネシアの水銀汚染

インドネシア一部河川水において2000年以前は1ppm近い水銀が検出されていた。この水銀汚染は砂金の不法盗掘とアマルガム法による金の不法精錬によるものであることが知られている。



写真 上：不法金精錬家内工場、中、金－水銀アマルガム、下、粗精錬金

インドネシア当局の取り締まりと住民の水銀汚染への認知度の高まりにより、現在も金精錬こそ続いているが河川水中の水銀濃度は0.1~0.3ppbと大幅に低減していた。しかし一方底質中の水銀濃度は表に示すように1ppm前後の高い値を示し、金精錬工場近くの水田から採取されたコメサンプルからは日本の阿賀野川流域のコメサンプルの16倍もの水銀濃度が検出された。インドネシア人のコメの消費量（日本人の3~4倍）を考慮に入れると健康被害を与える蓄積量となる恐れがあり、今後のモニタリングが継続して必要であると考えられた。

Table Total Hg Concentrations in Sediment Samples

	Sep.2006	Jun.2007	Sep.2007
Total Hg	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
Chikaniki R st1	1.15	—	0.96
Chikaniki R st2	0.82	—	0.84
rice field	—	—	0.63
Paddy Sample	—	—	0.08

(3) Cd 耐性菌の探索

将来のインドネシアにおける重金属のバイオレメディエーション法の開発を見据えて、カドミウム濃度が比較的高いジャワ島河川水田よりカドミウム耐性菌を探索し、その耐性機構を解明することを目的とした。インドネシアジャワ島のラワカロン湖およびチリブン川の底質から500 ppmカドミウムで生育する菌を選別し、その菌種の同定および同定された菌へのカドミウムの取り込み能を調べた。さらにカドミウム耐性菌内でのカドミウム結合物質および原核生物におけるCd耐性遺伝子としてよく知られている cadA 遺伝子の有無をゲル濾過法およびPCR法などを用いて調べた。その結果、ラワカロン湖の底質土壌より500 ppmのCdで生育する菌をそれぞれ得ることができた。菌の同定試験により、このカドミウム耐性菌は *Alcaligenes sp.* と同定された。この菌へのカドミウム取り込みを調べると1時間で培養液に添加したカドミウムの60%が菌中に取り込まれること、および取り込まれたカドミウムの約半分が菌の可溶性画分に存在していることが確かめられた。またゲル濾過の結果より可溶性画分中のカドミウムは分子量8万以上の生体高分子に結合していること、およびPCR法の結果より cadA 遺伝子のプライマーにより増幅する断片が認められないことが明らかになっ

た。以上のことから、このカドミウム耐性菌は真核生物におけるメタロチオネインや、原核生物での cadA のようなカドミウム耐性分子が存在していない可能性が考えられ、カドミウムを速やかに取り込んだ後にカドミウムの取り込みを制限する機構が機能発現していることも考えられた。今後さらにこの菌の cadA 遺伝子以外のカドミウム耐性遺伝子の探索およびCdの取り込み機構を調べることにより、カドミウムのバイオレメディエーションへの応用が期待される。

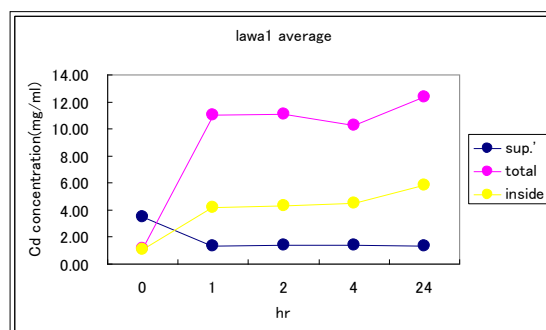


図2 ラワカロン湖より採取された *Alcaligenes sp.* のCd取り込み

(4) 重金属汚染のバイオマーカー選定

西ジャワ地区においてCdおよびPbが環境基準値を超えた底質湖沼より3種15尾の魚の肝臓の金属量を測定するとCdおよびPbは多くは検出されなかったが、オレンジプレコ肝臓からは高濃度のCuが検出された。この魚の肝臓中の重金属結合タンパク質メタロチオネインを調べると肝臓1gあたり500 μg 以上のCu結合メタロチオネインが存在していることが明らかになった。現在、同種の魚を用いた室内実験を終え、Cuメタロチオネインと金属汚染の程度の間に関連関係があるか否か、またこの魚が汚染のバイオマーカーとして有効なものになるか否かについて検証中である。本研究は最終年度後半に着手されたものであり、現在研究継続中である。

(5) まとめ

本調査研究において、インドネシアの河川環境は近年開発が進んでいる割には深刻な汚染は進行しておらず、むしろ生活廃水による汚染が深刻であることが窺えた。これは今後下水道の整備が進めば改善されていくことがききたいされる。一方、環境ホルモンおよび酪農等によるエストロジオールの汚染は日本より進行しており、今後生態系への影響が懸念される。継続したモニタリングが必要であると思われる。また、金の不法採掘による水銀汚染はインドネシア当局の努力によりかなり改善されているが、底質にはまだ高濃度の水銀が残留しており、コメなどの農産物への蓄積も窺わせた。住民への健康被害が

起こるか否かの検証をやはり継続して行なう必要があると考えられた。

これらの重金属汚染の今後の修復方法および汚染モニタリング法開発のために、Cd 耐性菌の探索および汚染湖沼の魚の重金属濃度および重金属結合タンパク質の測定等を行ない、1. 有効な Cd 耐性菌を見出し、その菌が Cd の取り込み能があること、魚の 1 種オレンジプレコの肝臓中 Cu 結合メタロチオネインが重金属汚染のバイオマーカーとして有効である可能性を示した。これらの研究は今後も継続して、開発途上国の有用な重金属汚染対策として確立されることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① M. Kido, Yustiawati, M. S. Syawal, Sulastri, T. Hosokawa, S. Tanaka, T. Saito, T. Iwakuma, and M. Kurasaki. Comparison of general water quality of rivers in Indonesia and Japan. Environmental Monitoring and Assessment, in press 2008 Aug 30. (査読有)
- ② K. Aoki, M. Egawa, T. Saito, T. Hosokawa and M. Kurasaki. Effects of gamma-hexachlorocyclohexane on apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. Journal of Environmental Science and Health B, 43, 471-475, 2008. (査読有)
- ③ 三浦真理, 蔵崎正明, 八若保孝, 齋藤健. ラットにおける亜鉛過剰摂取による銅吸収阻害機構. 北海道歯学雑誌 29, 87-98, 2008. (査読有)
- ④ M. Kawakami, R. Inagawa, T. Hosokawa, T. Saito and M. Kurasaki. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. Food and Chemical Toxicology, 46, 2157-2164, 2008. (査読有)
- ⑤ S. Sato, Y. Mukai, J. Yamate, J. Kato, M. Kurasaki, A. Hatai and M. Sagai. Effect of polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract on blood pressure elevation and macrophage infiltration in the heart and kidney of spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 35, 43-49, 2008. (査読有)
- ⑥ A. Otsuki, and T. Iwakuma. Life history, growth patterns and feeding habits of two predatory stoneflies, *Skwala pusilla* (Perlodidae) and *Kamimuria tibialis* (Perlidae) in northern Japan. Aquatic Insects, 30, 29-41, 2008. (査読有)
- ⑦ T. Iwakuma, Yulintine and S. Gumiri. The importance of zoobenthos in the ecosystems of tropical oxbow lakes. Verhandlungen der Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, 30, 35-41, 2008. (査読有)
- ⑧ Y. Akiyama and T. Iwakuma. Survival of glochidial larvae of freshwater pearl mussel, *Margaritifera laevis* at different temperatures: A comparison between two populations with and without recruitment (Bivalvia: Unionoida). Zoological Science, 24, 890-893, 2007. (査読有)
- ⑨ S. Sato, S. Fujita, M. Funaoka, M. Komori and M. Kurasaki. Protective effect of lignophenol derivative from beech (*Fagus crenata* Blume) on copper- and zinc-mediated cell death in PC12 cells. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 99, 353-357, 2006. (査読有)
- ⑩ Yustiawati, M.S. Syawal, M. Terashima and S. Tanaka. Speciation analysis of mercury in river water in West Java, Indonesia, TROPIC(The Japan Society of Tropical Ecology), 15, 425-429, 2006. (査読有)
- ⑪ Y. Matsumoto, N. Terui and S. Tanaka. Electrochemical Detection and Control of the Interaction between DNA and Electroactive Intercalator using DNA-alginate Complex Film Modified Electrode., ES&T(American Chemical Society), 40, 4240-4244, 2006. (査読有)
- ⑫ Y. Matsumoto, H. Kuramitz, S. Itoh and S. Tanaka. New fluorometric enzyme immunoassay for 17 β -estradiol by homogeneous using biotinylated estradiol, Talanta, 69, 663-668, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 湯川 俊、細川敏幸、齋藤健、蔵崎正明. インドネシア河川湖沼水における重金属汚染のバイオマーカーの構築. 第 20 回微量元素学会 2009 年 7 月 3 日 (東京)
- ② 小林健一、湯川 俊、細川敏幸、齋藤健、蔵崎正明. インドネシアラワカロン湖におけるバクテリアの Cd 耐性. 第 20 回微量元素学会 2009 年 7 月 2 日 (東京)
- ③ 高橋久美子、細川敏幸、齋藤健、蔵崎正明. フタル酸ジエチル及びステビアの PC12 細胞に誘導したアポトーシスに及ぼす影響. 第 77 回日本衛生学会 2008 年 3 月 30 日 (大阪)
- ④ M. Kurasaki, M. Kawakami, T. Hosokawa and T. Saito. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. Trace Elements in Diet, Nutrition, & Health:

Essentiality and Toxicity. Oct. 22, 2007
(Creta, Greece)

- ⑤ M. Kido, Yustiawati, Sulastri, M.S. Syawal, S. Tanaka, T. Hosokawa, T. Iwakuma and M. Kurasaki. Environmental contaminants of the rivers in West Java and Kalimantan, Indonesia. International Symposium on Nature and Land Management of Tropical Peat Land in South East Asia, Indonesia, Sep. 20, 2006 (Bogor)

〔図書〕(計 3件)

- ① 大崎満・岩熊敏夫(編著).ボルネオ 燃える大地から水の森へ. 岩波書店, 159+4 pp. 東京 2008.
- ② 蔵崎正明:化学物質の影響評価、環境修復の化学と技術 (田中俊逸、新岡 正編) 北大図書刊行会 pp21-46, 2007.
- ③ 蔵崎正明:ダイオキシン類の分解、環境修復の化学と技術 (田中俊逸、新岡 正編) 北大図書刊行会, pp177-185, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵崎 正明 (KURASAKI MASAOKI)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・助教
研究者番号: 80161727

(2) 研究分担者

岩熊 敏夫 (IWAKUMA TOSHIO)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・教授
研究者番号: 60124335

田中 俊逸 (TANAKA SYUNITZ)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・教授
研究者番号: 30142194

齋藤 健 (SAITO TAKESHI)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号: 40153811

細川 敏幸 (HOSOKAWA TOSHIYUKI)
北海道大学・高等教育機能開発総合センター・教授
研究者番号: 00157025

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

小森 幹育子 (KOMORI MIYAKO)
北海道大学・地球環境科学研究院・非正規職員

城戸 麻千子 (KIDO MACHIKO)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

菊池 敦紀 (KIKUCHI ATSUNORI)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

安田 優臣 (YASUDA MASAOMI)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

寺西 亮博 (TERANISHI AKIHIRO)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

小林 健一 (KOBAYASHI KENICHI)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

湯川 俊 (YUKAWA SYUN)
北海道大学・大学院環境科学院・修士課程

Yustiawati (YUSTIAWATI)
インドネシア科学院・陸水研究所・研究員

M Suhaem Syawal (M SUHAEMI SYAWAL)
インドネシア科学院・陸水研究所・研究員

Sulmin Gumiri (SULUMIN GUMIRI)
パラカラヤ大学・水産学部・教授