特集：化学物質の内分泌かく乱作用（いわゆる環境ホルモン）に関する対策の現状と今後

し尿に由来する河川のエストロゲン汚染と魚類の雌性化

田中宏明[1)]，山下尚之[2)]

1）京都大学大学院　工学研究科　附属環境質制御研究センター

2）独立行政法人土木研究所　水循環研究グループ

Feminization of Wild Fish Caused by Estrogenic Pollution due to Human Waste

Hiroaki TANAKA[1)], Masayuki YAMASHITA[2)]

1）Research Center for Environmental Quality Management Graduate School of Engineering, Kyoto University

2）Water Environment Research Group, Public Works Research Institute

抄録

英国では，1980年代前半に，下水処理場放流先河川から雌雄同体化したローチが頻繁に見つかり，下水処理水に含まれるノニルフェノール（NP）のような人工化学物質とともに，17β-エストラジオール（E2），エストロン（E1），エストリオール（E3）のような天然エストロゲン，さらに合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール（EE2）がその主な原因と考えられるようになってきた．

日本でも一級河川や下水処理場でのエストロゲン汚染を把握する調査が行われ，エストロゲンは河川でのE2濃度が最高27ng/Lと他のエストロゲン様物質よりは低いものの，検出率は72%以上と高かった。全国一級河川で採水されたエストロゲン様活性の平均値は0.8ng/L-E2活性等量であり，平均値以下の試料が全体の80%を占めていた．またエストロゲン様活性が高い河川水では，主にE1,E2,NPの3種が寄与しており，特にE1が大きな割合を占めていた．

これまでのわが国の一級河川での実態調査では，オスコイの間性化は，英国のローチの状況よりもはるかに少ない状況であるが，ビテロゲニンは1/4のオスコイから検出されている。しかし仮に英国環境庁が提案している環境基準であるエストロゲン様活性で1ng/L-E2活性等量相当を水域目標と考えると，我が国の一級河川の4分の1はこの水準を達成できていない．

一方，河川の流域人口と河川のエストロゲン様活性との関係を比べると，両者に正の相関が見られるが，流域の汚水整備率と河川水のエストロゲン様活性とは無関係で，汚水処理整備率が上昇してもエストロゲン様活性は低下していない．これらのことは，BODでは有効であった汚水処理整備率の向上だけでは，河川水のエストロゲン様活性を低下させることができないことを示唆している．

わが国の下水処理場では下水中のエストロゲン様活性が中央値で80%と効率的に除去できているが，多くの下水処理水は一級河川よりも1，2桁高いエストロゲン様活性を示し，また下水処理施設によってエストロゲン様活性に大きなバラツキが見られる．下水処理方式，とくにBOD除去を中心とした処理系よりも窒素除去型の高度処理系の方がエストロゲン活性を低減できることが実態調査から示されている．さらに，オゾン酸化や活性炭吸着など物理化学的な処理を加えることでエストロゲン様活性を一層低下させることも可能である．

キーワード：エストロゲン，河川水，下水，雌性化，コイ，エストロゲン活性

Abstract :

In early 1980s fish named Roach living in the UK rivers receiving discharge from sewage treatment plants were frequently found to be in the intersex conditions, which has been considered to be caused from natural estrogens including 17b-estradiol（E2), estrone（E1）and estriol（E3）and synthetic estrogen, ethynylestradiol（EE2）as well as artificial chemicals like nonylphenol.

〒520-0811　滋賀県大津市由美浜1-2

1-2 Yumihama, Otsu, Shiga 520-0811, Japan.

Field surveys on estrogenic pollution in the river water environment and in sewerage systems had been conducted also in Japan. They resulted in that natural estrogens are one of the pollutants most frequently identified in the rivers although their highest concentrations were far less than the other artificial estrogenic substances. Estrogenic activity of the river waters was 0.8 g/L-E2equivalent for mean. E1, E2 and NP mainly contributed to estrogenic activity of the river waters that were observed in high estrogenic activity.

The intersex condition of wild male carp in major Japanese rivers was better than that of Roach in the UK, but a quarter of them had plasma vitellogenin suggesting biomarker of feminization. Assuming that estrogenic activity of river waters should be lower than 1 ng/L E2-equivqlent that is equal to Environmental Quality Standard proposed by UK Environmental Agency, a quarter of river waters could not comply with this standard in Japan.

A positive relationship was found between a population on each river watershed and estrogenic activity of each river water, while an installation ratio of the population whose black and grey water is appropriately treated with treatment facilities to the total population in each watershed （called wastewater facility installation ratio）was not correlated with estrogenic activity of each river water. Estrogenic activity of each river water was not decreased with increase of a wastewater facility installation ratio in each watershed. These facts suggest development of wastewater facility installation ratios that was effective to BOD reduction alone cannot decrease estrogenic activity of river waters.

Sewage treatment plants can effectively reduce estrogenic activity by 80% at mean, but still emit one to two order magnitude larger estrogenic activities in the discharge than those into the rivers. Estrogenic activity in the discharge tends to distribute in a wide range. The field surveys indicate that treatment processes for biological nitrogen removal can make better performance in removal of estrogenic activity than those aiming at BOD removal alone. Further, additional physiochemical treatment such as ozonation and activated carbon absorption can further reduce estrogenic activity in reclaimed wastewater.

Keywords : estrogen, river water, wastewater, feminization, carp, estrogenic activity

1. 環境ホルモンとしてのエスロゲン

生物の恒常的なバランスを保つために，ホルモンは大きな役割を果たしている．ホルモンは，これを信号として捕らえる生体内の受容体（リセプター）に結合し，選択的な信号として働くことで遺伝子を機能させ，体内の機能の調整を行っている．しかし，本来ホルモンが結合すべき受容体に化学物質が結合することで，遺伝子が誤った指令を受けるという問題が注目されている．このことにより生物が利用してきたホルモンによる信号を攪乱させる，いわゆる内分泌攪乱が生じる．

魚類体内のエストロゲン（女性ホルモン）は，雌の魚類の生殖腺分化や生殖腺やその付属器官の発達を支配している．魚類はヒトに比べて性分化の時期が遅く，体内のエストロゲンの生成量も季節変化し，またエラや皮膚から直接水と接触するため，環境水に含まれるエストロゲンあるいはエストロゲン様物質の影響を受けやすい．発達時期にエストロゲン様の物質の暴露を受けると性分化や生殖器の発達に異常が起こる可能性がある．また，雌の卵巣で産生される女性ホルモン（エストロゲン）を信号として，肝臓で卵黄タンパクの前駆体であるビテロゲニン（VTG）と呼ばれるタンパク質を作り，卵巣を発達させる．雄は通常このようなタンパク質をほとんど作らないと考えられている．しかし，水に含まれるエストロゲン様物質に曝露されると，雄であっても雌と同じくVTGが作られるので，雄の体内でのVTGの誘導は，雌性化のバイオマーカーとなると考えられている．

英国では，1980年代前半に，下水処理場放流先河川から雌雄同体化したローチと呼ばれるコイ科の魚が頻繁に見つかり，下水処理水に含まれる未知の原因物質によって雌性化が引き起こされたのではないかと懸念された．このため，雄のニジマスを下水処理水の放流先河川で飼育し，体内でVTGが上昇すること，水試料を分画し，エストロゲン様作用を引き起こす物質を追求した結果，ノニルフェノール（NP）のような人工化学物質とともに，17β-エストラジオール（E2），エストロン（E1），エストリオール（E3）のような天然エストロゲン，さらに合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール（EE2）が主な原因と考えられるようになってきた[1-3]．さらに，下水処理場放流先の河川46地点で魚類捕獲調査が実施された結果，80%の地点で魚類の間性化がみられ，4割もの雄が間性化していることが判明した．

英国で魚類に顕著な雌性化が見られるとの報告がなされたことから，日本でも水環境と下水処理場での汚染実態を把握する調査が行われた．特に，下水道は，トイレの水洗化をその目的のひとつとして普及を進めてきており，当然，屎尿とともに下水処理場にはエストロゲンが流入している．エストロゲンそのものが，魚類に対して内分泌攪乱を起こすとなると由々しき事態であると心配された．

2. 河川で広がるエストロゲン汚染

全国109水系の一級河川での環境ホルモンの汚染実態調査[4]が平成10年から4年間にわたって行われ，多くの汚染物質が

検出された．この中でエストロゲンは，河川でのE2濃度が最高27ng/Lと他の検出された汚染物質よりは低いものの，検出された割合は72%以上と最も大きかった．ただし，これらの測定はELISA法で行われたもので，機器分析によって求められたE2よりも大きな値を示す傾向にあり，むしろ相関性が高いE1の存在濃度に近いと考えられる．その後も，エストロゲン汚染が見られる一級河川でLC/MSを用いた測定が行われており，E1が最高30ng/L，またE2は1箇所でのみで測定であるが，最高3.4ng/Lで検出されている[5]．

エストロゲン様作用を有する個々の化学物質の強さや化学物質の範囲は，調査開始し始めた当時よく分かっていなかった．このため，筆者らは前述の河川の実態調査と連携し，英国Brunel大学より譲渡されたヒトエストロゲン受容体遺伝子が組み込まれた酵母を用いて河川水のエストロゲン様物質の包括的な測定を行った[6,7]．エストロゲンあるいはエストロゲン様の物質が，この受容体と結合するとβ-ガラクトシダーゼと呼ばれる酵素を産生する．エストロゲン様物質が受容体に結合するレベルに合わせて酵素が作られるので，試料に含まれるエストロゲン様物質の作用をβ-ガラクトシダーゼ産生量として測定し，E2相当に換算することで総合評価できる．

平成11年から平成13年に全国一級河川で採水された247試料のエストロゲン様活性を図―1に示す[8]．全国一級河川のエストロゲン様活性の平均値は0.8ng/L-E2活性当量であり，平均値以下の試料が全体の80%を占めていた．また試料中のエストロゲン様作用を有する個々の物質がどの程度寄与しているかを，対象物質濃度とその相対的なエストロゲン様活性から検討した結果，エストロゲン様活性が高い河川水では，エストロゲン様活性に主に寄与しているのは，E1,E2,NPの3種であり，特にE1が大きな割合を占めていた（図―2）．しかし，多くの河川水からは，エストロゲンなどの化学物質が機器分析では検出されてないにもかかわらず，エストロゲン様活性が認められた．エストロゲン様活性の検出感度よりも機器分析の方が低いことが原因と考えられる．

3. わが国河川でのコイの雌性化

日本の河川での魚類の雌性化状況を確かめるため，北海道を除いて広く分布している野生のコイを全国10の一級河川で捕獲し，精巣の異常の観察とともに，血中VTGをバイオマーカーとして雌性化状況が調査された[4, 9-10]．4年間で捕獲された931尾のコイのうち，雄は551尾であった．雄コイの血中VTGは，73.9%が0.1μg/mL未満であったが，26.1%は0.1μg/mL以上，10.7%が1μg/mL以上，3.4%が10μg/mL以上であった．このことから，日本の河川に生息する雄コイの一部が体内でVTGを生成していることが確認された．検出方法が異なるものの，これらの割合は，米国内務省地質調査所が全米の河川で行った調査[9]で，野生雄コイにVTGが検出された割合と同程度であり，英国でVTGが見つかった雄のローチの比率よりも遥かに少なかった．また，精巣に異常がみられた雄コイは17%で，このうち精巣組織に雌特有の卵細胞がみられたもの（図―3）は3%であり，英国のローチよりもはるかに低い割合である．

各調査地点での水中および底質中のE2，NP，ビスフェノールAの濃度と雄コイのVTG検出率には有意な関係は見いだされなかったが，水中のエストロゲン様活性と雄コイのVTGには有意な正の相関がみられた．また，精巣異常の雄コイの比率と河川水の内分泌攪乱化学物質の濃度にも有意な相関性はみられなかった[10) 11]．

従って一級河川では，主にE1に由来するエストロゲン様活性によって，野生の雄コイの生殖器の間性化が生じているとはいえないが，VTGの誘導は起こっている可能性が高い．雄のコイにVTGの誘導が見られることが，生殖上どのような問題を持っているのかは依然明らかではないが，高濃度の化学物質を用いた室内実験からは，VTGの誘導と生殖器での精巣卵の発生，受精卵の孵化率の低下が見られるとの報告もあり，野生の雄コイや他の魚種のモニタリングを継続して行うことが必要であろう．

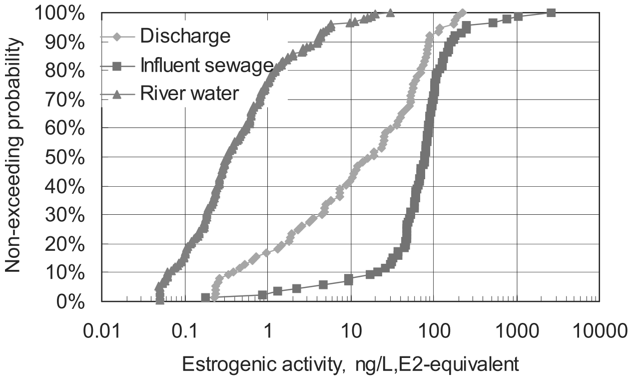

Figure 1 Estrogenic Activity of River Water, Final Discharge from Sewage Treatment Plants and Influent Sewage

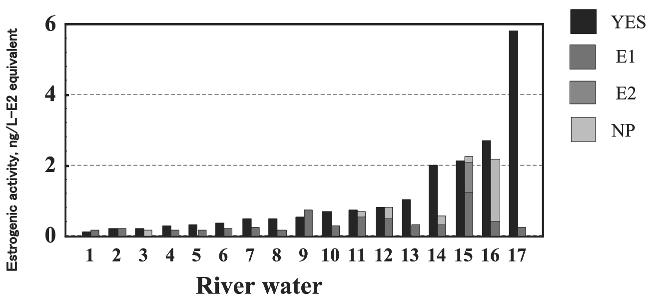

Figure 2 Theoretical Estrogenic Activity due to Estrone (E1), 17 b- estradiol (E2) and Nonylphenol (NP) Accounted for the Total Estrogenic Activity Measured with Yeast Estrogen Screen (YES) Assay

Table 1 Concentrations of Selected Estrogens and their Conjugates in Influent and Effluent from 20 Sewage Treatment Plants

	Influent(ng/l)			Effluent(ng/l)		
	Min.	Median	Max.	Min.	Median	Max.
E1	9.3	21	52	< 0.5	13	180
E2	< 0.5	5.8	22	< 0.5	< 0.5	11
E3	22	90	190	< 0.5	1.4	5.5
EE2	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5
E1-S	35	120	500	11	18	48
E2-S	54	230	840	39	74	140
E3-S	19	64	230	89	170	380
E1-G	29	460	3700	190	410	790
E2-G	46	150	880	310	600	1400
E3-G	100	560	1900	290	560	1200
E2-S&G	7.7	53	370	15	36	70
E2-diS	200	1700	15000	1000	2200	9400

estrone-3-sulfate (E1-S), β-estradiol 3-sulfate (E2-S), estriol 3-sulfate (E3-S), estrone β-D-glucuronide (E1-G), β-estradiol17-(b-D)-glucuronide (E2-G), estriol 3-(_β-D-glucuronide) (E3-G), β-estradiol 3-sulfate 17-glucuronide (E2-S&G), estradiol 3,17-disulfate (E2-diS)

4. 下水道に流れ込むし尿由来のエストロゲン

ヒト体内で作られるステロイドホルモンは，成人女性では1日当たり25～100μg，妊娠すると30mgまで増加し，また男性でも1日2～25μgが分泌されている[12]．ステロイドホルモンは，最終的には肝臓で薬物代謝酵素によって不活化され，肝臓や小腸でそのほとんどは硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体に代謝され，最終的には5%程度が尿として[13]，残りの大部分は尿として排泄されるといわれている[14]．排泄されるエストロゲンは，遊離体や抱合体となって体外に排出され，女性の尿には一日当たり，数μg～60μg，妊娠中の女性からは200～400μgが排出されている．

これまで，下水中に含まれるエストロゲンを測定した例は少ないが，最もデータが多いのは国土交通省[15]が行った42処理場を対象とした調査で，下水にはE2が3.6～18ng/L（中央値9.1ng/L），E1が15～77ng/L（中央値43ng/L）の範囲で存在していた．筆者ら[16]は，最近エストロゲン抱合体の測定方法を開発し，20の下水処理場の流入下水及び二次処理水の遊離体及び抱合体のエストロゲンを測定した（表―1）．これまで下水管中などで多くのエストロゲン抱合体は脱抱合体化され，多くは遊離体のエストロゲンを生成し，下水処理場では遊離体となっていると報告されていたが，流入下水の遊離体のエストロゲンよりも，硫酸およびグルクロン酸抱合体もかなり多く存在していることが明らかになった．

5. 下水処理でどの程度除去されるのか

下水道は，水域環境基準を達成するため，工場排水規制とともに，生活排水を主として収集，処理するための水質保全施設として建設が進められてきた．このため，下水処理場は有機物，浮遊物質，病原性微生物を除去するために設計されている．また，最近では放流先が閉鎖性水域である場合には，窒素やリンを除去するための高度処理も実施されている．

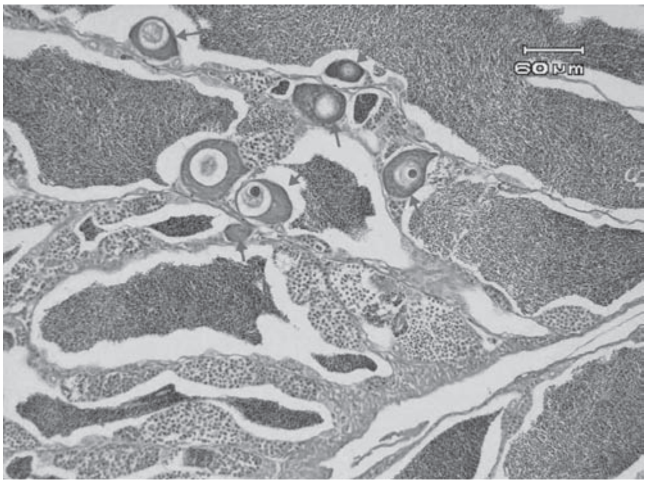

Figure 3 Sliced Tissue and Testisova (arrows) in the Abnormal Gonad of a Wild Male Carp

しかしながら，エストロゲンがどの程度除去されるのか，これまでほとんど分かっていなかった．国土交通省の全国調査[15]からは，放流水には最高でE2が3.3ng/L，E1が63ng/Lまで残留しており，中央値ではそれぞれND（0.5ng/L未満）と5.4ng/Lであることが分かった．下水処理場での除去率は，中央値では，E2が95%以上，E1が86%の除去率であり，平均的にはよく除去されているが，処理場の中にはほとんど除去されず，むしろ処理水の濃度が流入下水よりも高くなっている場合もあった．

筆者らの調査[16]でも，多くの処理場では遊離体のE2は，下水処理により減少しており，除去されているが，E1が残留する場合があることが分かっている（表―1）．下水処理過程では，反応槽においてE2は次第に低下していくが，E1は流入濃度より一旦増加し，その後低下する傾向がみられた．このことから好気的条件下で，E2の脱水素反応によりE1が生成し，一時的に増加し，その後E2，E1ともにさらに分解を受けていくものと考えられる．また硫酸又はグルクロン酸抱合体となっているエストロゲンはあまり除去されず，むしろ下水処理で増加している場合が見られ，流入下水中には測定されていない形態のエストロゲンが存在している可能性が示唆される．またエストロゲン抱合体は遊離体よりも親水性が強く，汚泥に吸着されにくいため，除去率が低いのかもしれない．しかし，活性汚泥を用いたバッチ試験ではエストロゲンのグルクロン酸抱合体のほとんどが20時間でグルクロニドとE2に分解するとの報告もあり，抱合体の挙動をさらに把握する必要性がある．

6.下水処理水はコイの雌性化を起こすのか

下水処理水のエストロゲン様活性は，明らかに河川水よりも高く，下水処理水の占める割合が多い都市河川で高いエストロゲン様物質が見られた．また，河川水のエストロゲン様物質によって雄コイにVTG誘導される傾向にある．したがって，わが国でも下水処理場からの放流水に含まれるエスト

ロゲン様物質により魚類の雌性化が生じていることが示唆されるため，筆者らは下水処理水に成熟したコイを曝露する実験を行った[11, 17]．エストロゲン様活性が全国の代表的レベルである下水処理水で飼育実験を行った結果，下水処理水に曝露してから2週間目に雄コイにVTG誘導がみられたが，下水処理水への暴露をやめるとVTGは低下し，4週間後には低いレベルに戻った．このため，下水処理水に含まれるエストロゲン様活性によって雄のコイにVTGが可逆的に起こることが確かめられた．

しかしながら，VTG誘導は常に生じるわけでなく，繰り返した実験全体では，エストロゲン様活性6ng/L-E2当量の下水処理水で16%の雄のコイにVTG誘導が起こる結果になった．異なる季節に実験を行った場合，VTG誘導は見られず，下水処理水に含まれるエストロゲン様物質が作用する他に，季節とともに体内でのエストロゲン誘導を起こす薬物代謝酵素活性を増大させる物質が関与している可能性がある．しかし，下水処理水への暴露で血中VTG濃度の上昇が見られない季節においても，エストロゲン様物質が下水処理水よりも低い河川に棲息する野生の雄コイの約25%からVTGの誘導が見られている．この相違は水だけでなく，食物網からの曝露も考慮すべきことを示唆しているのかもしれない．実際，筆者らは，エストロゲンやエストロゲン様物質が付着藻類や底生生物へ濃縮が，数十倍～1000倍程度で生じていることを明らかにしている[17, 18]．

7. エストロゲン汚染への対応を目指す英国

E2が1～10ng/Lで，E1が25～50ng/Lで，成熟した雄のニジマスにVTG誘導が見られ，ローチではE2が10～100ng/LでVTGが誘導したと報告されている[2]．また，メダカを使った試験では，E2が8ng/LでVTGが誘導されたとする報告も出されている[19]．筆者らは，成熟した雄のメダカを使った実験室内での暴露実験をおこなった結果[20]，肝臓でのVTG誘導をエンドポイントとする場合，E2の最小作用濃度は，2週間では5ng/L，2および7日目の最大無作用濃度は5ng/Lとなった．一方，E1の最小作用濃度は，暴露期間3，7，14日目とも79.5ng/L，最大無作用濃度は31.6ng/Lであった．

英国環境庁は雌性化をもたらしている主な原因であるエストロゲンを削減するため，河川での環境基準の設定として，E2 1ng/L，E1 3ng/L,EE2 0.1ng/Lとすることを提案している[21]．さらに，英国環境庁は河川で起こっている魚類の雌性化の原因である下水処理水質を改善させるため，2005年から2010年までデモンストレーションプログラムとして2カ所の下水処理場の放流水のエストロゲンレベルを下げるための実証実験を水会社に指示している[22]．この結果，その放流先の河川での魚類の雌性化がどのように改善されるかが検討される予定である．さらに，その結果を受けて2010年以降他の下水処理場でも処理水質の改善が本格的に行われる見込みである．

8. わが国でのエストロゲン汚染の軽減のために

これまでのわが国の一級河川での魚類雌性化の実態調査結果では，雄コイの雌性化は，英国のローチのほどは深刻な状況ではない．対象としている魚類が同じコイ科ではあるが，種の相違が大きい，英国で頻繁に検出されているEE2がわが国では現在はほとんど検出されていないことなどが理由として考えられるが，仮に英国での環境基準であるエストロゲン様活性で1ng/L相当を水域目標と考えると，図―2に示したように，我が国の一級河川の4分の1はこの水準を達成できていない．

一方，河川の流域人口と河川のエストロゲン様活性との関係を比べると，両者に正の相関が見られるが，流域の汚水整備率（下水処理人口＋農村集落排水人口＋コミプラ処理人口＋合併処理人口の総人口に対する比率）と河川水のエストロゲン様活性とは無関係で，汚水処理整備率が上昇してもエストロゲン様活性は低下していない[23]．これらのことは，BODでは有効であった汚水処理整備率の向上だけでは，河川水のエストロゲン様活性を低下させることができないことを示唆している．

図―4に示したように，わが国の下水処理場では下水中のエストロゲン様活性が中央値の比較で80%と効率的に除去できているが，多くの下水処理水は一級河川よりも1,2桁高いエストロゲン様活性を示し，また下水処理施設によってエストロゲン様活性に大きなバラツキが見られる．下水処理方式，とくに水理的滞留時間や固形物滞留時間によるファクターが除去率に大きな影響を与えており[15]，図－4に示すようにBOD除去を中心とした処理系よりも窒素除去型の高度処理系の方がエストロゲン様活性を低くできることが実態調査からも示されている[24, 25]．さらに，オゾン酸化や活性炭吸着な

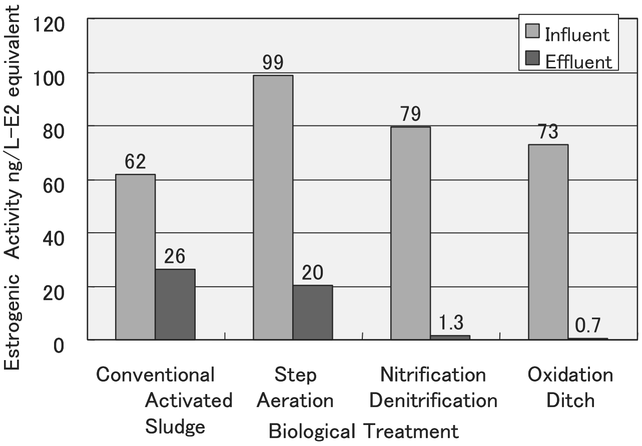

Figure 4　Comparison of Removal Efficiency of Estrogenic Activity among Different Wastewater Treatment Processes -Biological Nitrogen Removal Process And Oxidation Ditch Have Good Performance in Reduction of Estrogenic Activity

ど物理化学的な処理を加えることでエストロゲン様活性が一層低下させることも可能であろう．このようなend-of-pipe型対応とともに，河川からの取排水量を低減させるための再利用の積極的実施など流域的視点からの水質管理が必要となるであろう．

参考文献

1) Jobling S, Nolan M, Tyler, CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science & Technology 1998; 32: 2498-506.

2) Routledge EJ, Sheehan D, Desbrow C, Brighty G, Waldock M, Sumpter JP. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. II: Biological activities. Environmental Science & Technology 1998; 32, 1559-65.

3) Harries JE, Shehan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, Tylir T, Zaman N. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged Male Trout. Environmental Toxicology and Chemistry 1997; 16（3）: 534-42.

4) 国土交通省河川局．平成13年度水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査報告書. 東京：国土交通省；2002.

5) 国土交通省河川局．平成15年度水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査結果について，http://www.mlit.go.jp/river/press/200407_12/040707/pdf/naibunpikakuran.pdf，国土交通省Home Page. 国土交通省; 2004.

6) 矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明．組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定．環境工学研究 1999；36: 199-208.

7) Tanaka H, Yakou Y, Takahashi A, Higashitani T, Komori, K. Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment. Water Science and Technology 2001; 43（2）: 125-32.

8) Tanaka H, Yakou Y, Takahashi A, Komori K., Okayasu Y. Evaluation of environmental estrogens in Japanese rivers. Proceedings of WEFTEC 2001 held at Atlanta（CDROM）, Water Environment Federation, 2001.10.

9) Goodbred SL, Gilliorm RJ, Gross TS, Denslow NP, Bryant WL, Schob TR. Reconnaissance of , U.S. Geological Survey Open-File Report. 1997. pp.6-627, http://water.wr.usgs.gov/pnsp/rep/carp2.

10) Tanaka H, Higashitani T, Miyamoto N, Tamamoto H, Komori K, Tsujihara K, Onishi Y. Estrogenic activity of river water and feminization of wild carp in Japan, Proceedings of WEFTEC 2003（CDROM）. 2003.

11) Higshitani T, Tamamoto H, Takahashi A, Tanaka H. Study of estrogenic effects on carp （Cyprinus carpio） exposed to sewage treatment plant effluents. Water Science & Technology 2003; 47（9）: 93-100.

12) 松井三郎，足立淳，松田知成，滝上英孝，清水芳久．天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動，日本化学会編． 季刊化学総説50 内分泌かく乱物質研究の最前線. 東京：日本化学会；2001. p.86-92.

13) Ranney J Toxicol Environ Health, 1977; 3:139-166.

14) Andreolini F, Borra C, Caccamo F, Di Corcia A, Samperiet R. Estrogen conjugates in late-pregnancy fluids: extraction and group separation by a graphitized carbon black cartridge and quantification by high-performance liquid chromatography. Analytical Chemistry 1987; 59: 1720-1725.

15) 国土交通省都市地域整備局下水道部,平成12年度下水道における内分泌撹乱化学物質に関する調査報告書, 2001；国土交通省.

16) Komori K, Tanaka H, Okayasu Y, Yasojima M, Sato C. Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, Water Science & Technology 2004; 50（5）: 93-100.

17) 東谷忠，玉本博之，宮本宣博，八十島誠，田中宏明．下水処理水に曝露した雄コイのビテロジェニン誘導に関する研究．環境工学研究 2002；39，7-108.

18) Takahashi A, Higashitani H, Yakou Y, Saitou M, Tamamoto H, Tanaka H. Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disruptors into periphytons and benthos in the Tama River, Water Science & Technology 2003；47（9）: 71-76.

19) 石橋弘志、鑪迫典久、有薗幸司. メダカを利用したモニタリング，エンバイオ 2002; 2，pp.39-44.

20) 田中宏明、小森行也，宮島潔. 都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究, 平成15年度独立行政法人土木研究所水循環研究グループ成果報告書 2004; 89-104.

21) Terry L. Endocrine disruptors, The Environment Agency's perspective, UK Environmental Agency Home Page 2004; http://www.swig.org.uk/T%20Long Endocrine.pdf

22) Hilton A.（2005） No going back for sex change fish, UK Environmental Agency Home Page 2005; http://www.environment-agency.gov.uk/news/821453?lang=_e%C2%AEion=&projectstatus=&theme=&subject=&searchfor=&topic=&area=&month=

23) Miyamoto N, Tanaka H, Sato C, Nakada N, Miyajima K, Tamamoto H. Evaluation of characteristic inducement of estrogen-like activity in river water, Japan. Proceedings of the 4th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in

Water -ECOHAZARD 2003-. IWA; 2003. pp.53/1-53/4.
24）Tanaka H. Endocrine disrupting chemicals and estrogenic activities in wastewater treatment and receiving waters. Water Science & Technology (in press)（IWA Leading Edge Conference Series _ Global Conference on Leading Edge Water and Wastewater Treatment Technologies, 26-28 May 2003, Noordwijk/Amsterdam, The Netherlands）.
25）田中宏明. 求められる新しい視点の河川水質管理、環境ホルモン問題を軸として. 第486回建設技術講習会テキスト. 全日本建設技術協会；2004. p.3-22.