

組み換え酵母を用いた環境水（下水及び河川水）の エストロゲン作用の評価に関する研究

田中宏明^{*}、玉本博之[†]、宮本宣博[‡]、東谷忠[§]、中田典秀[¶]、
宮島潔[†]、高橋明宏[†]、矢古宇靖子[‡]、斉藤正義[‡]

Evaluation of Estrogen-like Activity in River Water, Influent and Final Discharge of STPs Water using DNA Recombinant Yeast Assay

by Hiroaki TANAKA, Hiroyuki TAMAMOTO, Nobuhiro MIYAMOTO, Tadashi HIGASHITANI,
Norihide NAKADA, Kiyoshi MIYAJIMA, Akihiro TAKAHASHI, Yasuko YAKOU, Masayoshi SAITO

要旨：

本研究では、世界的に問題となっている内分泌攪乱化学物質問題に対し、水環境中に存在するこれらの物質を包括的、総量的かつ簡便に把握するための手法の検討を行った。まず、遺伝子組換え酵母法によるバイオアッセイ手法の検討及び水試料への応用を試みた。さらに、確立した手法を用い、国内の水環境（下水道及び河川）における内分泌攪乱化学物質汚染の実態把握を行うとともに、成分分画手法を組み合わせることで原因物質の把握と由来の推定を行った。

その結果、下記のことが明らかになった。

- ・水環境試料に適しているのは Sumpter 株であった。
- ・Sumpter 株を用いた方法により全国の一級河川及び下水処理場でのエストロゲン様活性の実態を明らかにした。
- ・河川水中のエストロゲン様活性は季節変動を示し、夏季に比べ冬季に高濃度となる傾向が確認された。
- ・下水処理によってエストロゲン様活性は低減するが、低減レベルにはばらつきが見られた。
- ・下水試料中で検出された活性の大部分は、天然の女性ホルモンである 17β-エストラジオール（E2）とエストロン（E1）、次いでノニルフェノール（NP）によるものであった。
- ・下水処理水及び河川水では、主に E1 による寄与が高かったが、河川水では NP による寄与が高い場合もあった。
- ・本研究により確立されたスクリーニング法及び分画手法に、機器分析手法を組み合わせた結果、未同定のエストロゲン様活性物質の存在が示唆された。
- ・E2、E1、NP については、Sumpter 株を用いたバイオアッセイにおいて相加性が概ね認められ、理論換算値の妥当性が示唆された。

キーワード：内分泌攪乱化学物質、エストロゲン様活性、遺伝子組換え酵母、河川水、下水

Synopsis

Three kinds of DNA recombinant yeast assays were compared in estrogen-like activity of chemicals and aquatic environmental samples. Then, the activities of the samples in major rivers and municipal sewage treatment plants (STPs) in Japan were evaluated using the most appropriate assay among them. Furthermore, a fractionation system, based on the polarity of substances in aquatic samples, was developed in order to isolate and identify the predominant estrogenic chemicals in the water samples. The results were as follows:

1. Yeast estrogen screening (YES) assay provided by Brunel University was most appropriate to the aquatic samples, especially for STP influent than the others.
2. The estrogen-like activity of the effluent was lower than that of influent in the STPs, which means that the estrogenic chemicals were efficiently removed during the treatment.
3. Obvious seasonal trend of the estrogen-like activity was observed in the river survey. The activity was higher in colder season than in warmer season.
4. Combination with instrumental analysis and the yeast assay revealed that the dominant estrogenic chemicals in river and STP samples are natural estrogens, 17β-estradiol and estrone followed by nonylphenol.

Combined approach from the YES assay, fractionation method and instrumental analysis suggest that unknown estrogen-like substances or antagonists existed in the water samples because of some difference between the estrogen-like activity obtained from YES and that estimated from the instrumental analysis.

Key Words: endocrine disruptors, estrogen-like activity, DNA recombinant yeast, river water, sewage

^{*}水循環研究グループ水質チーム上席研究員（工学博士）、[†]水循環研究グループ水質チーム研究員、

[‡]水循環研究グループ水質チーム交流研究員、[§]水循環研究グループ水質チーム専門研究員、[¶]農学博士

目 次

第1章 緒論	1
1.1 緒言	1
1.2 研究の目的	2
1.3 論文の構成	3
第2章 遺伝子組み換え酵母法	4
2.1 概要	4
2.2 3種類の遺伝子組み換え酵母株	4
2.3 Sumpter 株	5
2.4 CIIT 株	8
2.5 Two-hybrid 株	11
第3章 遺伝子組み換え酵母法の評価系の比較	14
3.1 概要	14
3.2 3種類の酵母株による標準物質のエストロゲン様活性の比較	14
3.3 3種類の酵母株による下水の測定	15
3.4 結論	17
第4章 遺伝子組み換え酵母法の下水への適用と下水処理場でのエストロゲン様活性の 全国調査	18
4.1 概要	18
4.2 対象とした下水処理場及び測定項目	18
4.3 流入下水及び2次処理水中のエストロゲン様活性の濃度レベル	18
4.4 下水処理工程におけるエストロゲン様活性の低減	22
4.5 結論	23
第5章 河川の環境エストロゲン様活性	25
5.1 概要	25
5.2 全国一級河川のエストロゲン様活性の実態調査	25
5.3 測定方法	25
5.4 結果及び考察	25
5.5 河川におけるエストロゲン様物質の検出状況とエストロゲン様活性への寄与	26
5.6 結論	28
第6章 乖離の原因の追求	30
6.1 概要	30
6.2 極性分画手法の検討	30
6.3 HPLC を用いた分画	32
6.4 化学物質が混在することによる遺伝子組み換え酵母法への作用特性の確認	34
6.5 結論	37
第7章 結論および今後の課題	40
7.1 結論	40
7.2 今後の課題	41

第1章 緒論

1.1 緒言

近年、世界各地で野生生物の生殖器官や生殖行動の異常が報告されている¹⁾。これらの原因として、人間活動により放出される化学物質による内分泌系の攪乱によるものだと考えられ、そのような一群の化学物質は内分泌攪乱化学物質と分類された。我が国において内分泌攪乱化学物質は“動物の生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質”と定義されている。野生生物への影響は、貝類、魚類、爬虫類、鳥類、そして哺乳類についても世界各地から広く報告されており、個体数の減少や繁殖率の低下など、種の存続にかかわる問題として世界的に注目を集めている。

イギリスでは1960年代から淡水魚において生殖器官に異常をもつ個体が発見されており、世界的にも先駆的な研究が行われてきた。1980年代前半に実施された環境庁の生物調査²⁾において、ロンドン北部を流れるLea川の野生ローチ (*Rutilus rutilus*) に雌雄同体（精巣に卵母細胞をもつ個体）が発見された。その場所は下水処理場の下流部であったため、下水処理水に雌化の原因となる物質が含まれているとの仮説がたてられ、これを解明するための詳細な研究が実施された。

下水処理水の魚類への影響を調べるため、まずフィールドでのケージ試験法が確立された³⁾⁻⁵⁾。この方法は、鉄製ケージに養殖ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を入れ、処理場放流口や放流先河川に設置するものであり、雌化の影響は、雄の血中ビテロジェニン (VTG) 生成量を指標として判定された。VTG はエストロゲンの作用により肝臓で生成される雌特異的な卵黄タンパク前駆物質であるため、エストロゲンの作用の指標とされている。下水処理場の放流口や放流先河川を対象としたフィールド調査は、予備調査の後、1988年夏期³⁾、冬期³⁾、1989年春期³⁾、夏期³⁾、1992年夏期⁴⁾、冬期⁴⁾、1994年春期から夏期⁵⁾に実施された。これらの調査の結果、雄ニジマスの血中VTG濃度は通常0.05~1.80 µg/mL³⁾であるのに対し、放流口に係留されたオスの個体では血中VTG濃度が最大10万倍 (147,000 µg/mL)⁵⁾ほどに増加することが判明した。また、ニジマスのVTG生成は放流口のみで影響のみられる場合や、Aire川のように放流口から下流5km地点までmg/mLレベルの影響が確認される場合があった⁵⁾。さらに、その影響は下流最大15kmまで続くことも明らかとなったが、降雨により増水した河川では、処理水が希釈されて魚類への影響が軽減される可能性も示唆さ

れた。このような調査結果より、河川に係留されたニジマスが、下水処理水の暴露時に何らかのエストロゲン様物質の暴露を受けたことが明らかとなった。

一方、フィールド調査と並行して、魚類に影響を及ぼすと考えられるエストロゲン様物質を用いた室内曝露試験も実施された。その結果、非イオン界面活性剤（工業用洗剤の一つ）の分解産物であるノニルフェノール (NP) とオクチルフェノール (OP) の最小作用濃度はそれぞれ20.3 µg/Lおよび4.8 µg/Lという結果が得られた⁶⁾。先に行われた河川水質調査の結果、フィールド調査でニジマスの顕著なVTG生成が観察されたAire川では、羊毛洗浄工場の排水を受け入れているMarley処理場の放流水のNPは330 µg/Lであり、その下流では180 µg/Lの高濃度であった。そのため、Aire川でニジマスに影響を及ぼしたのは、フィールド調査、室内曝露試験、そして水質調査の結果から判断してNPであると考えられた。NPは非イオン系界面活性剤の主原料であり、その洗剤成分が下水処理工程により原料のNPが生成することが報告されている⁷⁾。そのため、上述の羊毛洗浄工場でNPを主原料とする洗剤が使われ、その排水を処理している処理場の処理工程でNPが高濃度で生成し、放流口付近で魚類の異常が確認されたと考えられた⁸⁾。しかし、その他の河川や処理場でのNPの濃度は0.2未満~12 µg/Lであり、OPの濃度はMarley処理場でも0.5 µg/Lであったほか、河川の全地点で1 µg/L未満であったことより、NP以外のエストロゲン様物質の寄与により魚類の生殖異常が引き起こされたと考えられた。

更なる原因解明のため、アメリカ環境保護局 (EPA) で採用されている環境試料に対する毒性試験法が応用された。この手法は、様々な化学物質の混合物である環境試料を、そこに含まれる化学物質の物理化学的性質を用いて分類（分画）し、分画した試料（画分）をそれぞれ毒性試験に供し、毒性が検出された画分を機器分析により原因物質を特定するものである。イギリスの研究者達により、下水処理水を極性により分画し、得られた画分をヒトのエストロゲン受容体を組み込んだ遺伝子組換え酵母を用いたバイオアッセイと、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) による機器分析を組み合わせ評価・定量する方法が確立された⁹⁾。その結果、イギリスの多くの河川で確認された、下水処理場放流口付近での魚類の生殖異常の原因物質は、天然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)、そして経口避妊薬に含まれる人工エストロゲンあるエチニルエストラジオール (EE2) であ

ることが明らかになった。調査が行われた7つの下水処理場の処理水中のこれらの濃度は、E1が1~80ng/L、E2が1~50ng/Lであり、EE2は検出されない処理場が多いものの、3処理場では0.2~7.0ng/Lであった。同時期に行われたニジマスおよびローチを用いた室内暴露実験⁹⁾の結果、各物質の最小作用濃度は、E2の最小作用濃度はニジマスでは1~10ng/Lの範囲にあり、ローチでは10~100ng/Lの範囲にあり、ニジマスに対するE1の最小作用濃度は25~50ng/Lと推察された。また、過去に行われたEE2のニジマスへの暴露実験の結果、最小作用濃度は0.1~0.5ng/Lの範囲にありと報告された³⁾。これらの報告値より、イギリスのほぼ全土で観察された下水処理放流口付近に生息する魚類の生殖異常は、天然のエストロゲンおよび人工のエストロゲンによるものと結論付けられた。

我が国政府は海外諸国の報告を受け、比較的早くにこの問題に取り組んだ。平成10年度に「内分泌攪乱化学物質問題関係省庁課長会議」が設置され、各省庁において取り組みを進めるとともに、連携による総合的な対策検討され、平成10年5月には「環境庁の内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98—」が発表され、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質が提示されるとともに、内分泌攪乱化学物質を取り巻く様々な課題が提起された。SPEED' 98では67物質(見直しにより65物質)がリストアップされ、そのうち46物質は殺虫剤、殺菌剤、防腐剤などの農薬類で占められ、これらに加え工業品として多量に使用されている樹脂原料やプラスチック可塑剤、さらに界面活性剤やその分解物など、日常生活においても汎用的に使われている物質が含まれている。

先のイギリスでの報告や、国内の一級河川に生息している野生のコイからも雌性化を示すVTGの誘導が観察されたこと、さらに国内における内分泌攪乱化学物質問題への関心の高まりから、国土交通省は全国109水系の一級河川での実態調査を平成10年度から行った。さらに、同省下水道部も地方公共団体と連携し、下水道での汚染物質実態を把握する調査を平成10年度から開始した。河川では平成13年度までの4年間、下水道では平成12年度までの3年間全国的な調査が行われた。調査対象成分はSPEED' 98にリストアップされている化学物質のうち、生産量の多さや環境中での検出状況、使用用途などからアルキルフェノールや、プラスチック関連物質であるビスフェノールA、フタル酸エステル類、スチレン類などが優先的に選定され

た。さらに、その作用の強さから天然のエストロゲン類と人工のエストロゲンについても調査が行われた。

環境省や国土交通省等の実態調査により、環境水中の内分泌攪乱化学物質の汚染レベルがほぼ明らかになった。しかし、現在測定している物質が環境水中に存在する内分泌攪乱作用を有する物質全てを表現している訳ではなく、分解代謝物や未知の物質についてはほとんど実態が把握されていない。

近年、環境計測にはガスクロマトグラフや液体クロマトグラフを装備した質量分析計が用いられている。これらの測定機器は高感度かつ高精度ではあるが、対象とする成分のみを検出・定量するため、分析対象外の成分の影響を検出することができない。一方、魚類を用いたバイオアッセイでは、機器分析では検出できない生態影響を検出することが可能であるが、試験には多大な時間を要し、一次的なスクリーニングには適さない。そのため、環境試料を包括的に評価するためには、生体反応を利用した簡易的なバイオアッセイ手法の確立が必要である。現在までに簡易的なエストロゲン様物質の検出技術として、人の乳がん由来の細胞を用いた試験や、ヒトのエストロゲン受容体を導入した遺伝子組換え酵母を用いた試験などが環境試料へ適用されている。しかしバイオアッセイを環境水の評価に適用していく際には、その試験法の選定が重要であるだけでなく、多くの試料をできるだけ短時間に評価していく必要があるとともに、夾雑物の多い環境試料に適用させるための手法の検討が必須である。またバイオアッセイは生体反応によって評価するため、多成分系の試料では個々の物質の存在量については明らかにできない。そのため、化学分析を併せて行うとともに両者を比較する手法について検討を行う必要があるなど、下水・環境水中のエストロゲン様物質の総合的な評価については取り組むべき多くの課題がある。

1.2 研究の目的

本研究ではエストロゲン様物質を測定する手法として、遺伝子組換え酵母を用いたバイオアッセイに着目して、下水・環境水への適用を中心として試験方法の検討を行った。そして得られた試験法を用いて、全国規模の実態調査を行い環境水、下水に含まれるエストロゲン様活性の実態を明らかにした。また遺伝子組換え酵母法と化学分析を比較する手法について検討を行い、化学分析で明らかにできていない不明なエストロゲン様物質の性状把握について検討を行った。

1.3 論文の構成

本報は7章より構成されている。第1章ではこれまで既往の論文で明らかとなってきた河川水中のエストロゲン様物質の検出状況と魚類の雌化の関係について述べる。また個々の化学物質の評価に加え、エストロゲン様物質の包括的な評価方法の必要性和、両者を比較した手法の必要性について明らかにする。

第2章では研究報告のある3つの遺伝子組換え酵母法についてマイクロプレートを用いた試験方法に改良し、多くの環境水や下水試料の評価が可能な試験方法の開発を試みた。

第3章ではこれらの改良した試験法を用いてエストロゲン様の作用を有する疑いのある物質を測定し、各物質のエストロゲン作用強度を明らかにした。さらに、これらの3つ株を用いた試験法の比較を行うとともに、夾雑物の多い下水試料に本法を適用した場合の特性について検討し、下水試料の測定に適した試験法を選択した。

第4章及び第5章では確立した試験法を用い、河川では季節的変化の解明、河川環境基準類型毎の比較、下水処理場では下水処理工程中での挙動など、エストロゲン様活性の実態を明らかにした。

第6章では化学分析結果と遺伝子組換え酵母法の結果を比較する手法について検討を行い、現在測定している物質でどの程度エストロゲン様活性を説明できているのか検討を行った。また化学分析と遺伝子組換え酵母法を比較した時に見られる由来の不明なエストロゲン様活性の性状の把握を行うため、極性分画手法とHPLC分画手法を用いて検討を行った。

最後に第7章では、これらの結果から得られた結論を述べた。

<参考文献>

- 1) デボラ・キャドバリー、1998、メス化する自然、集英社、371p
- 2) Environment Agency、1997、The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents.
- 3) Purdom C.E.、Hardiman P.A.、Bye V.J.、Eno N.C.、Tyler C.R.、Sumpter J.P.、1994、Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*、8、275-285.
- 4) Harries J.E.、Sheahan D.A.、Jobling S.、Matthiessen P.、Neall P.、Routledge E.J.、Rycroft

- R.、Sumpter J.P. and Tylor T.、1996、A Survey of Estrogenic Activity in United Kingdom Inland Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*、15、1993-2202.
- 5) Harries J.E.、Sheahan D.A.、Jobling S.、Matthiessen P.、Neall P.、Sumpter J.P.、Tylor T. and Zaman N.、1997、Estrogenic Activity in Five United Kingdom Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*、16、534-542.
- 6) Jobling S.、Sheahan D.、Osborne J.A.、Matthiessen P. and Sumpter J.P.、1996、Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*、15、194-202.
- 7) Giger、W.、Stephanou、E.、Shaffner、C.、1981、Persistent organic chemicals in sewage effluents: 1. Identifications of nonylphenols and nonylphenolethoxylates by glass capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Chemosphere*、10、1253-1263.
- 8) Blackburn M.A. and Waldock M.J.、1995、Concentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales. *Water Research*、29、1623-1629.
- 9) Desbrow、C.、Routledge、E.J.、Brighty、G.C.、Sumpter、J.P.、Waldock、M.、1998、Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in Vitro biological screening. *Environmental Science and Technology*、32、1549-1558.
- 10) Routledge、E.J.、Sheahan、D.、Desbrow、C.、Brighty、G.C.、Waldock、M.、Sumpter、J.P.、1998、Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*、32、1559-1565.

第2章 遺伝子組み換え酵母法

2.1 概要

エストロゲン様物質の *in vitro* 系の測定法としては人の乳がん由来の細胞 (MCF-7 細胞) を用いた試験¹⁾や、遺伝子の組み換え操作を行った酵母を用いた試験 (以後、酵母法) などが知られている。ここでは操作が簡便で、多くの試料を測定することが可能な点を考慮し、酵母法について検討を行った。

酵母法は、異なる遺伝子組み換え酵母株を用いた試験法が報告されているが、これらの試験系の特性を踏まえた評価はほとんどなされていない。また、実際の下水試料を用いて比較評価を行った例は全くないのが現状である。

そこで、Brunel 大学²⁾、Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT)³⁾、大阪大学⁴⁾がそれぞれ開発した遺伝子組み換え酵母を用いた測定方法を導入し、下水試料や環境試料への適用と、測定の簡便化について検討を行った。また、これら3種類の遺伝子組み換え酵母によって得られる、標準物質のエストロゲン様活性を比較するとともに、下水試料を測定する上での適用性について評価を行った。

2.2 3種類の遺伝子組み換え酵母株

遺伝子組み換え酵母はイギリス Brunel 大学の Sumpter 教授、アメリカ Chemical Industry Institute of Toxicology の Gaido 博士、大阪大学大学院の西原教授からそれぞれ譲渡を受けた。ここではこれらの3株をそれぞれ Sumpter 株、CIIT 株、Two-hybrid 株と標記する。

これら3種類の酵母株は、組み込まれている遺伝子の種類、受容体導入部位等が異なっている (表 2-1)。組み込まれている遺伝子は、エストロゲン受容体発現遺伝子 (hER、rER: エストロゲン受容体を生成する遺伝子)、エストロゲン受容体応答部位 (ERE: エストロゲンとの結合により、活性化したエストロゲン受容体が結合する応答部位遺伝子) およびレポーター遺伝子 (lacZ: 応答部位の反応によって発現し、 β -ガラクトシダーゼを生成させる遺伝子) である。さらに、Two-hybrid 株にはこれらに加えて哺乳類細胞に存在するコアクチベーター発現遺伝子 (エストロゲン受容体応答部位の反応を促進してレポーター遺伝子に伝えるタンパク質群を生成する遺伝子) が組み込まれており、哺乳類細胞により近い反応機構となっている。これら3種類の組み換えは、エストロゲン受容体にエス

表 2-1 供試した3種類の酵母株の種類

酵母株	エストロゲン受容体	受容体導入部位	コアクチベーター	レポーター遺伝子	参考文献
Sumpter 株	ヒト由来	酵母ゲノム	-	lacZ	Routledge et al. ²⁾
CIIT 株	ヒト由来	プラスミド	-	lacZ	Gaido et.al. ³⁾
Two-hybrid 株	ラット由来	プラスミド	○	lacZ	Nishikawa et al. ⁴⁾

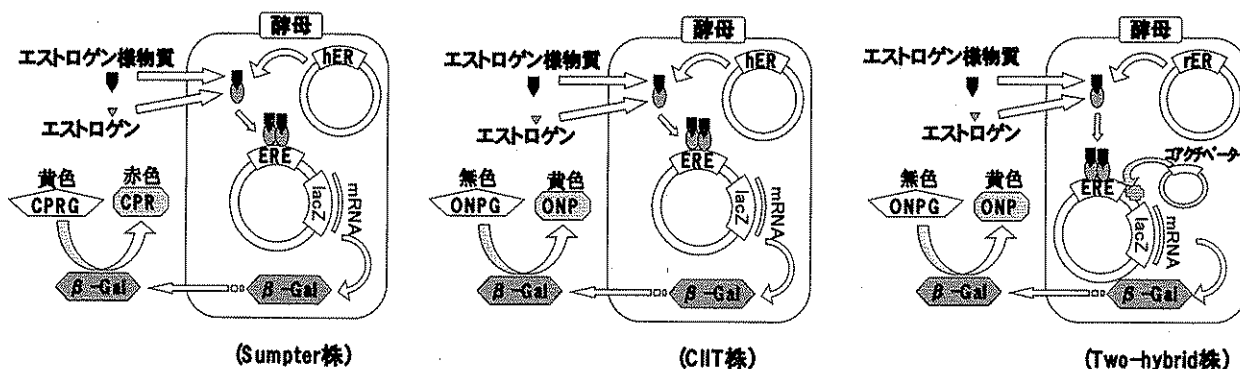


図 2-1 3種類の酵母法測定原理の比較

トロゲンやエストロゲン様物質がエストロゲン受容体と結合すると、 β -ガラクトシダーゼが産生されるよう設計されており、発色試薬と反応させることにより β -ガラクトシダーゼ濃度を算出し、その濃度がアッセイに供したエストロゲンもしくはエストロゲン様物質濃度に依存するため、エストロゲン様物質を測定することが可能である（図 2-1）。

2.3 Sumpter 株

2.3.1 測定方法

操作手順は、酵母付属のマニュアル（OESTROGEN (hER) SCREEN PROTOCOL）に準拠した。以下に概略を示す。凍結保存の組み換え酵母菌株を三角フラスコ中の Growth Medium に植菌し、28℃で 24 時間旋回培養した（前培養）。培養液である Assay Medium は、発色試薬であるクロロフェノールレッド β -D-ガラクトピラノシド（CPRG）を含む Growth Medium に、前培養液を 0.5 ~ 2.0 mL (4×10^7 cells) となるように添加し調整した。標準曲線用のエストロゲンである 17 β -エストラジオール（E2、ポジティブコントロール）および他の化学物質は、溶媒に溶解後、供試試料とした。96 穴マイクロプレートのウェル内に、各希釈段階の供試試料および Blank としての希釈溶媒を 10 μ L 分注し（n=3）、揮発性の溶媒は蒸発させた後、Assay Medium 200 μ L を添加した（ウェル内の物質濃度は添加濃度の 1/21 となる）。培養前に、マイクロプレートリーダーで 550 nm および 600 nm での吸光度（OD550 値：CPRG の発色、OD600 値：酵母の増殖量）を測定した。測定後、プレートはオートクレーブテープで封をし、32℃で 4 日間静置培養し、培養後、再度マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。換算値は、マニュアルに従い、以下の換算式（式 1）に測定値を挿入して算出した。

換算値 = (供試試料の OD550 値) - [(供試試料の OD600 値) - (Blank の OD600 値)] （式 1）

その際、試料の色の影響を除くため、培養後の測定値から培養前の測定値を差し引いた。

2.3.2 測定条件の検討

1) 増殖曲線の作成

供試酵母の基本的情報の 1 つとして増殖曲線を作成した。植え込み菌量（OD600 値）は 2 種類、培養温度は 28℃、32℃とし、菌体量として OD600 値の経時変化を測定した。

2) 供試溶媒の検討

測定対象となる化学物質は溶媒に溶解させて用いる。しかし、マニュアルに記載されているメタノール（MeOH）は、揮発性が高く取り扱いが困難である。そこで、各種溶媒の本測定系への影響の確認を行った。供試物質は、ポジティブコントロールとして E2 を用い、検討溶媒は、MeOH、エタノール（EtOH）、ジメチルスルホキシド（DMSO）の 3 種類、ウェル内の最終濃度は 1% とした。また、MeOH、EtOH は氷浴上で調製し、マニュアル通りウェル内で揮発させ、難揮発性である DMSO は溶液（20%DMSO）の状態で Assay Medium と混合した。また、試験者間による操作上のばらつきを確認するため、異なる試験者 2 人により同希釈系列を調製し測定を行った。

3) 培養条件の検討

マニュアルでは、Assay Medium をマイクロプレートに植菌し 32℃で 4 日間培養（1 回/日振とう）後測定を行う。しかし、測定効率を考慮すると、4 日間の培養は日程的に難しいと考えられる。そこで、ポジティブコントロールである E2 を用い、32℃、4 日間培養と 28℃、7 日間培養との測定結果を比較した。

4) 植菌量の確認

マニュアルには前培養後の Assay Medium への植菌数が記載されているため、簡便なコロニーカウント法を用いて酵母菌数（コロニー形成単位：CFU）を測定した。また、植菌量の用量反応曲線への影響をみるため、供試物質としてポジティブコントロールである E2、ビスフェノール A（BPA）、ヒドロキシエストラジオール（HEDL）の 3 種類を用い、植菌量を 5×10^6 、 4×10^7 cells の 2 種類として測定を行った。

2.3.3 結果と考察

1) 増殖曲線の作成

結果を図 2-2 に示した。増殖曲線は植菌時の菌量（培養開始時の OD600 値：菌量少 = 0.016、菌量多 = 0.035 の 2 種類）に依存しており、培養温度による差はほとんどみられなかった。培養後 20 ~ 24 時間では、いずれも対数増殖期に達し、OD600 値は約 0.4 であった。以上より、前培養液は、昼夜培養後 OD600 値を測定し、約 0.4 と対数増殖期に達していることを確認、測定用培地に植菌し用いることとした。

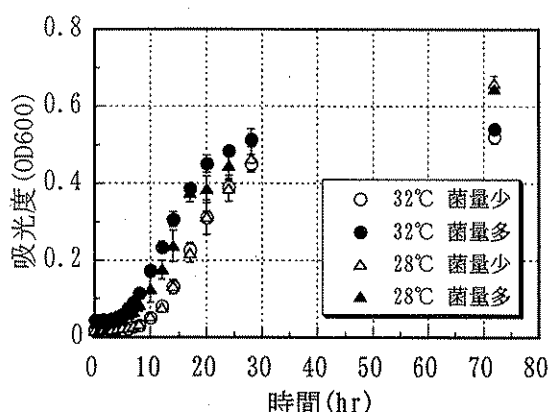


図 2-2 酵母の増殖曲線

2) 供試溶媒の検討

結果を図 2-3 に示した (A, B は試験者)。なお、X 軸の濃度はウェル内の濃度、Y 軸は式 1 による換算値である。MeOH 溶液は、氷浴上にも関わらず調製時に揮発したためか、試験者間での発色の差が大きかった。一方、EtOH、DMSO 溶液を用いた場合は試験者間のばらつきが小さく、明確な用量反応曲線が得られた。しかし、EtOH は易揮発性であり氷浴上での希釈作業が必要となるため、取り扱いやすさの点から、DMSO が適当であると考えられた。従って、以後は DMSO を用いることとした。

3) 培養条件の検討

図 2-4 に示すように、28℃ の場合 7 日目、32℃ の場合 4 日目で、明確な用量反応曲線が得られた。また、32℃ の場合、培養期間 4 日目より 7 日目の方が低濃度でも発色が進むため、高濃度域のプロットと低濃度域のプ

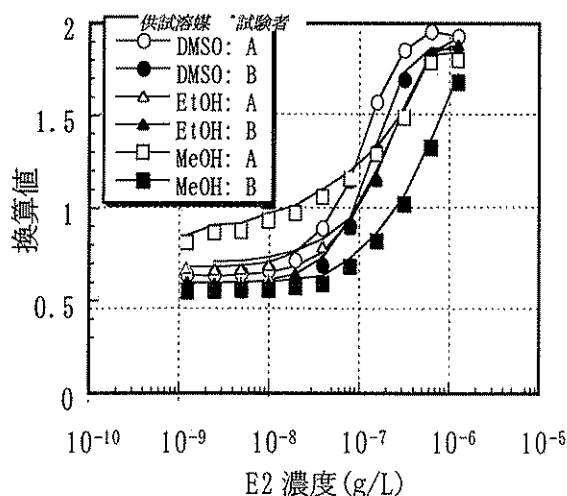


図 2-3 溶媒の検討

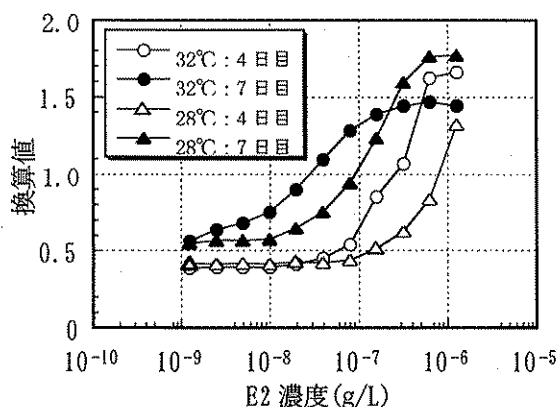


図 2-4 培養条件の検討

ロットの発色差が小さくなる傾向がみられた。活性測定において、7 日間培養は測定効率が良く、発色の差の大きい方が換算しやすい。以上を考慮し、以後は 28℃、7 日間培養で測定を行うこととした。

4) 菌体量の確認

マニュアルに従い前培養した際の酵母数 (CFU) は $7.1 \sim 9.5 \times 10^6$ cells/mL であり、記載されている酵母数 ($2 \sim 8 \times 10^7$ cells/mL) の約 1/10 であった。マニュアル記載の Assay Medium への添加酵母数は 4×10^7 cells であり、コロニーカウント法では菌数が少な目に計測される可能性はあるものの、このまま添加し測定を行うと測定時の酵母数が確保できないことになる。OD600 値と酵母数をプロットしてみると図 2-5 に示す通り相関がみられ、回帰曲線が得られた。そこで、前培養液の OD600 値から回帰曲線を用いて酵母数を換算

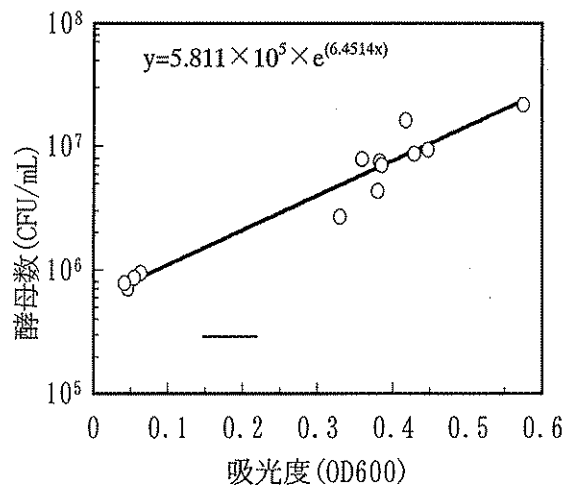


図 2-5 吸光度と酵母数の関係

し、遠心分離による濃縮を行い、植菌量を 5×10^6 、 4×10^7 cells として測定を行った。結果は図 2-6 に示した。第 3 章で後述する E2 に対する比活性値で比較すると、植菌量 5×10^6 cells では、ビスフェノール A : 0.00008 (BPA)、ヒドロキシエストラジオール (HEDL): 0.021、 4×10^7 cells ではそれぞれ 0.00012、0.023 であり、若干の差がみられた。このことから、測定日毎の変動を少なくするためには酵母数を一定にして植菌を行う必要があることが示唆された。そこで、以後は前培養した酵母培養液の OD600 値から回帰曲線を用いて酵母数を換算後、マニュアル記載の酵母数を確保するため遠心分離で濃縮し、Assay Medium に植菌することとした。

1)～4)の検討結果より、供試溶媒は DMSO とし（添加時は 20% DMSO 溶液）、前培養液の OD600 値を確認し酵母菌数を換算後、遠心濃縮して Assay Medium に植菌し、マイクロプレートに播種、28℃、7 日間培養後測定を行うこととした。

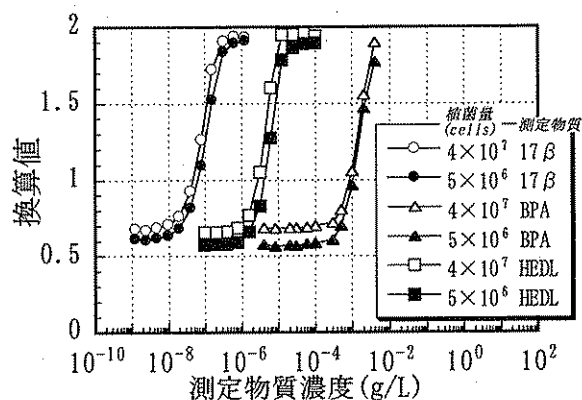


図2-6 植菌濃度の検討

2.3.4 結論

組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性を安定して測定するために、条件検討を行った。測定において供試溶媒は DMSO とし、前培養液は OD600 値を確認後遠心濃縮して添加し、28℃、7 日間の培養により行うことが適当である。本検討によって得られた試験方法のフローを図 2-7 に示した。

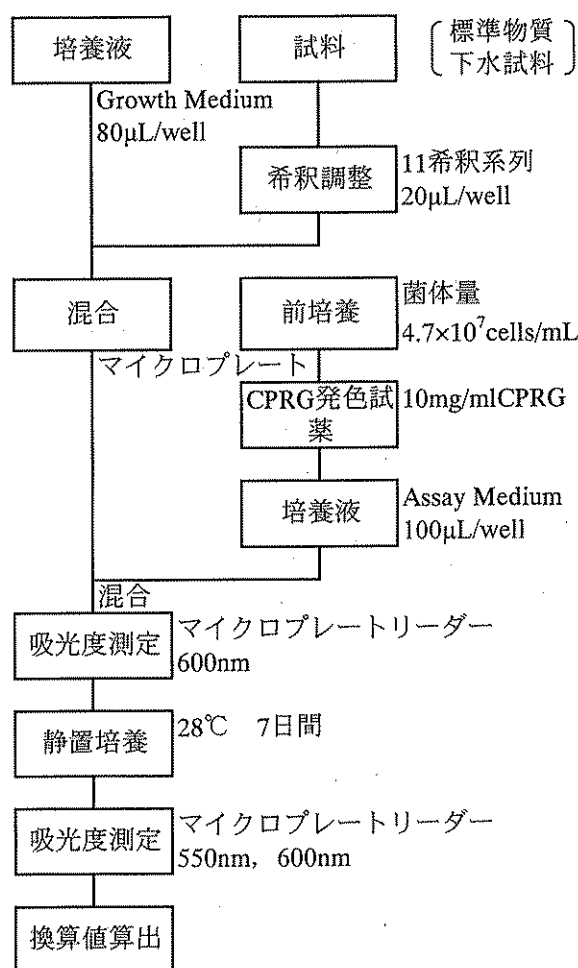


図2-7 組み換え酵母法の測定フロー

2.4 CIIT株

譲渡を受けたアメリカ Chemical Industry Institute of Toxicology の Kevin W. Gaido らが報告したアッセイ手法³⁾を、環境試料へ適用するために E2 を用いて改良・検討を行った。

2.4.1 測定方法

本株を用いた試験方法は Gaido らの測定方法³⁾を参考に、試験管法から多数の試料を同時に測定できるマイクロプレートを用いた方法への簡便化を図った。すなわち、凍結保存してある遺伝子組み換え酵母株を三角フラスコ中の Selective 培地に植菌し、30℃で一晩振とう培養した。あらかじめ Selective 培地 120 μ L が含まれる各マイクロプレート (FALCON 社製) のウェルに培養液 30 μ L を添加した。酵母の植菌量は実験によって最適な条件を検討した。その後、ポジティブコントロール (E2 標準液) もしくは前処理を行った試料を 3 μ L ずつ添加した。これを 30℃の条件下で静置培養した。

培養後の試料は 620nm の吸光度を測定した後、Zymolyase-20T 酵素溶液 (Z-buffer、メルカプトエタノールを含む) を添加し、酵母細胞壁を破壊した。その後、30℃条件下でさらに一定時間、静置培養を行った。その後、ONPG 溶液を添加し振とう後、30℃の条件下で発色反応を行った。その後、反応停止試薬として 1M-NaCO₃ を 1 ウェルあたり 75 μ L 添加し、414nm、540nm での波長の吸光度 (それぞれ OD420、OD540) を測定した。供試試料のエストロゲン様活性を示す β -ガラクトシダーゼ活性は、Gaido らの試験法³⁾に記載された下記の式により算出した。

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = \frac{(OD420 - 1.75 \times OD540)}{(t \times q \times OD600)}$$

t: 反応速度、q: 培養液量

2.4.2 測定条件の検討

1) マイクロプレート中の菌体濃度の測定

エストロゲン様活性は単位菌体量当たりの β -ガラクトシダーゼ活性から導かれるため、正確な酵母の菌体量の測定が必要となる。以下では酵母の菌体量をマイクロプレートで測定できるかを確認した。

酵母の菌体濃度は吸光光度計による OD600 値に一定範囲 ($10 \leq \text{透過率 } T \leq 70$; $0.16 \leq OD600 \leq 1.00$) で比例し、吸光光度計で測定できる。マイクロプレートでも同様に菌体濃度を測定できるかを検討した。OD600 (10mm Cell) = 1.00 に濃度調整した酵母の濃度

を酵母相対濃度 1.0 とし、これを希釈または濃縮した菌体溶液を、吸光光度計とマイクロプレートリーダーで OD600 値をそれぞれ測定した。

2) 酵母溶解剤の変更

標準の方法で用いられている酵母細胞壁溶解酵素 Oxalyticase は入手が困難で、なおかつ高価なため、代わりに入手が容易で安価な Zymolyase を検討した。E2 を添加して一晩培養した酵母菌体溶液 150 μ L に 10mg/mL Zymolyase 添加 Z-buffer 30 μ L を添加、シールして蒸発を防いだ状態で、30℃、30 分間保持、酵母を溶解した。その後 4mg/mL ONPG 添加 Z-buffer を 40 μ L/well 添加、30℃、30 分間保持して発色反応させた。そして 1M-NaCO₃ 溶液を 75 μ L/well 添加して発色反応を停止させて OD420 を測定した。

3) 暴露培養時間の検討

暴露培養時間は測定作業の効率を考慮して、2 日間で操作を行う 17 時間 (一晩) と 1 日間で操作を終える 2 時間の 2 条件に設定し、30℃で培養した。

4) 培養時の初期植菌量の検討

OD600=1.0 に調整した前培養液を培養液で 2 倍希釈することを繰り返し、測定培養時の酵母初期菌体量を培養液全体の 2^{-3} 倍とした。そして培養時間 17 時間では $2^{-3} \sim 2^{-9}$ の 7 条件を、培養時間 4 時間では $2^{-1} \sim 2^{-6}$ の 6 条件を設定した。

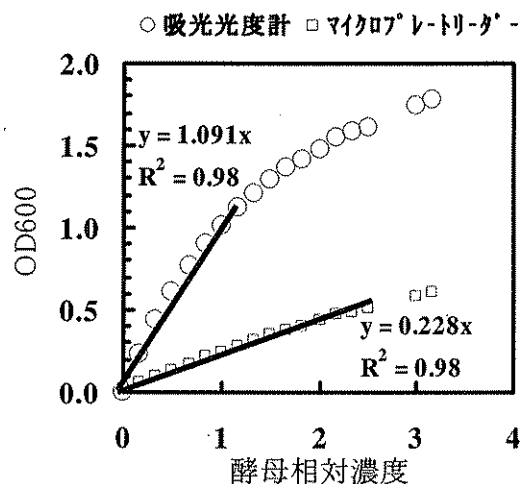


図2-8 酵母相対濃度とOD600

2.4.3 結果および考察

1) マイクロプレート中の菌体濃度の測定

酵母相対濃度とマイクロプレートリーダー、吸光度計で測定した OD600 値の関係を図 2-8 に示した。吸光度計による OD600 値は約 1.0 を示す菌体濃度(酵母相対濃度=1)までは非常に良好な相関関係 ($R^2=0.98$) を示した。マイクロプレートリーダーによる OD600 値についても OD600=0.5 を示す菌体濃度(酵母相対濃度=2.1)までは非常に良好な相関関係 ($R^2=0.98$) を示し、マイクロプレート中の菌体濃度を測定できることが確認された。

ここで、増殖した CIIT 酵母はマイクロプレートのウェル中に沈降する。マイクロプレート用の吸光度計は垂直方向に光を透過させ、吸光度を測定する。そのため、酵母が懸濁している状態と沈降している状態で、OD600 の測定値に差があるかを比較した。懸濁させた菌体溶液の OD600 値を測定し、シールして蒸発を防ぎ 10℃ で 2 時間静置し CIIT 酵母を沈降させた後、再び OD600 値を測定した。その結果、図 2-9 に示すように沈降操作の前後で OD600 値に差はなく、非常に良好な相関関係 ($R^2=1.00$) を示した。よって静置によって酵母が沈降した状態でも OD600 値の測定が行えることが分かった。

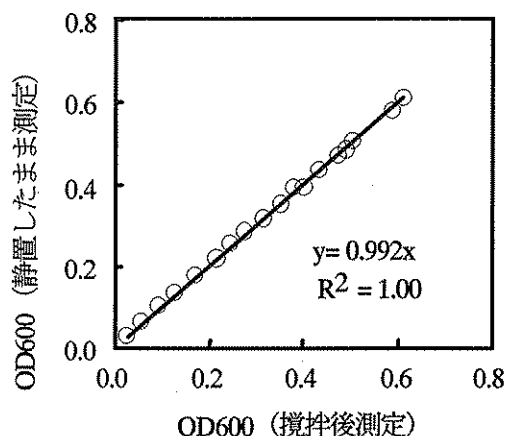


図2-9 OD600測定時の菌体状態の比較

2) 酵母溶解剤の変更

Zymolyase は酵母溶解剤として普通に用いられ、報告例も多い^{5) 6)}。そこで Gaido らの方法で使用していた、Oxalyticase に変え Zymolyase について検討を行った。その結果を図 2-10 に示すが、良好な用量反応曲線が得られたため、Zymolyase の利用が可能であるこ

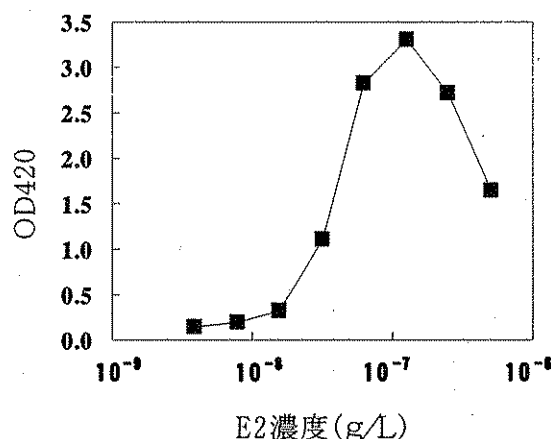


図2-10 17β エストラジオールに対する用量反応曲線 (酵母溶解剤 Zymolyase)

とが確認された。

3) 暴露培養時間の検討

測定培養時間及び酵母初期菌体量の検討

(1) 17 時間培養

図 2-11 に 17 時間培養した場合の E2 に対する用量反応曲線を示した。OD420 値に示される E2 に対する反応はすべての酵母初期菌体量の条件において、E2 の濃度増加に伴って増大した。酵母初期菌体量が 2^{-7} ~ 2^{-3} 倍量の場合では、OD420 値の極大値に大きな差はなかったが、 2^{-9} ~ 2^{-8} 倍量まで少なくなると、OD420 値の極大値は菌体量の減少に伴って小さくなった。また 2^{-9} ~ 2^{-7} 倍量と菌体量が少ないと、OD420 値は E2 濃度増加に伴った増大後、低下した。一方、OD420 値の基底値 (E2 濃度が最も低いときの OD420 の値) は酵母初期菌体量

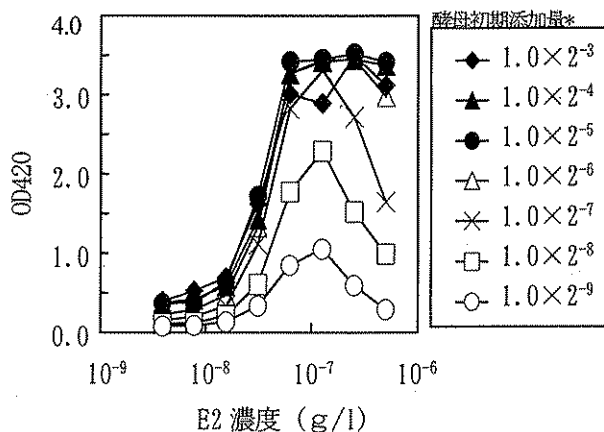


図 2-11 酵母初期添加量と E2 用量反応の曲線の関係 (17 時間培養)

*OD600=1.0 に調整した前培養液からの希釈濃度

が多いほど大きかった。しかし最も初期菌体量が多かった条件では、ばらつきも 15~30%と大きかった。

エストロゲン様活性を測定するためには、活性を示す OD420 値の極大値が大きい一方で、できるだけ OD420 値の基底値が低いことが望ましい。よって OD420 値の極大値が大きく、できるだけ OD420 値の基底値が小さいことから得られた酵母初期菌体量の最適条件は 2^{-7} 倍量 (約 1/100 倍量) であった。

(2) 4 時間培養

図 2-12 に暴露培養時間を 4 時間培養とした場合の E2 に対する用量反応曲線を示した。OD420 値の基底値、極大値は酵母初期菌体量が多いほど大きかった。4 時間培養において極大値が最も大きかった条件 (酵母初期菌体量が培養液全体の 2^{-1} 倍) でも、その値は 17 時間培養で得られた値の半分以下で、またその一方で基底値は大きかった。よって 4 時間培養では 17 時間培養と比較して適切な測定条件は得られなかった。

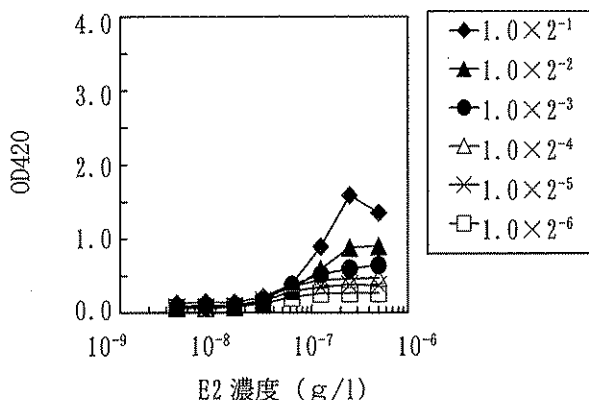


図 2-12 酵母初期添加量と E2 反応曲線の関係 (4 時間培養)

2.4.4 結論

組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性を安定して測定するための条件を検討した。培養時の初期植菌量は前培養液を $MgSO_4$ 添加 selective medium で希釈し、 $OD_{600}=1.0$ とする条件が最適であった。培養時間は 17 時間が適当である。また、酵母溶解剤は Oxalyticase から Zymolyase に変更しても問題はないことが確認された。これらの検討結果から得られた CIIT 株を用いたマイクロプレート簡便法のフローを図 2-13 に示した。

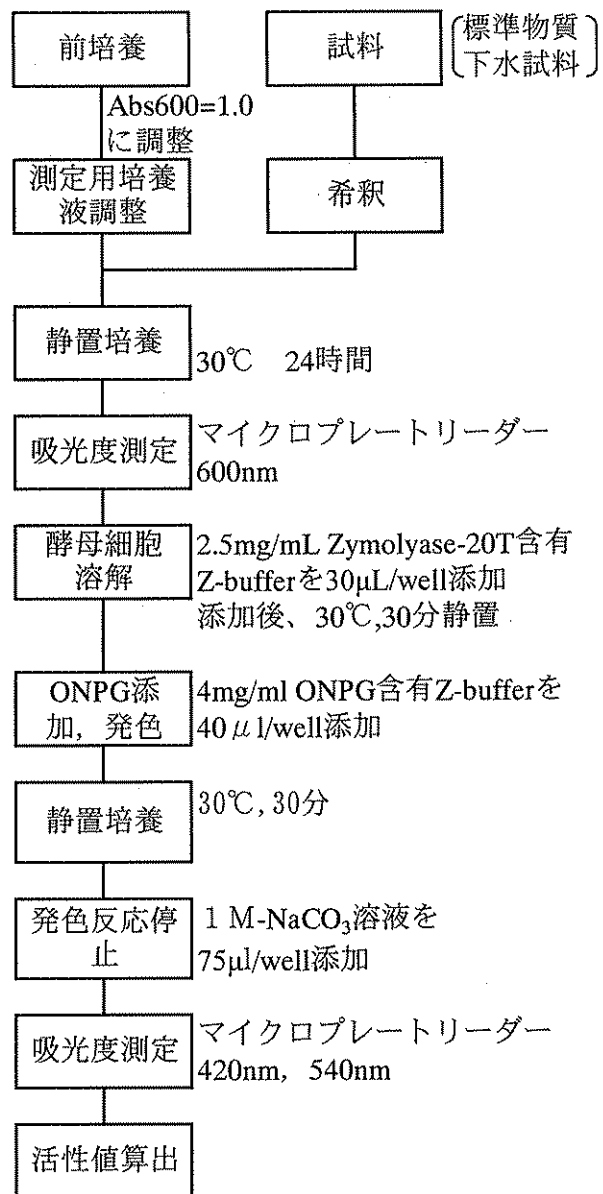


図2-13 組み換え酵母法の測定フロー

2.5 Two-Hybrid 株

本株を用いた試験方法はNishikawaらの文献³⁾を改良して、マイクロプレートを用いた簡便化について検討を行った。すなわち、凍結保存してある遺伝子組み換え酵母株を三角フラスコ中のSD培地に植菌し、30℃で一晩振とう培養した。あらかじめSD培地120 μ Lが含まれる各マイクロプレート (FALCON 社製) のウェルに培養液 30 μ L を添加した。酵母の植菌量は実験によって最適な条件を検討した。その後、ポジティブコントロール (E 2 標準液) もしくは前処理を行った試料を 3 μ L ずつ添加した。これを 30℃の条件下で静置培養した。

培養後の試料は 620nm の吸光度を測定した後、Zymolyase-20T 酵素溶液 (Z-buffer、メルカプトエタノールを含む) を添加し、酵母細胞壁を破壊した。その後、30℃条件下でさらに一定時間、静置培養を行った。その後、ONPG 溶液を添加し振とう後、30℃の条件下で静置培養を行った。その後、1M炭酸ナトリウムを1ウェルあたり 75 μ L 添加し、吸光度(414nm、540nm) を測定した。

2.5.1 測定方法の検討

1) 暴露時間の変更

酵母の化学物質に対する暴露時間の検討を行った。なお、本試験は酵母前培養濃度を OD600=1.0 に調整し、30℃の条件下で 4 時間、24 時間、48 時間の 3 条件にて静置培養した。酵母破壊溶液は 15 μ L 添加し、30 分静置して反応させた後、発色基質を加え 3 時間反応させた。測定条件の検討には E2 を用いた。

2) 発色基質の反応時間

基質 (ONPG) 溶液を加えてから反応停止剤を加えるまでの反応時間について検討を行った。なお、本試験は酵母前培養濃度を OD600=1.0 に調整し、30℃の条件下で 24 時間培養した。酵母破壊溶液は 15 μ L 添加し、30 分静置した後、反応時間を 1 時間から 6 時間まで 1 時間毎の 6 条件を設定して検討した。検討には E 2 を用いた。

3) 酵母破壊液量の検討

化学物質への暴露後、酵母の細胞壁の破壊に必要な Zymolyase-20T 酵素溶液の添加量について検討を行った。なお、本試験は酵母前培養濃度を OD600=1.0 に調整し、30℃の条件下で 24 時間培養した。酵母破壊溶液は 15 μ L および 30 μ L 添加し、15 分および 30 分

静置した条件で検討を行った。その後、発色基質を加え 3 時間反応させた。同じく検討には E 2 を用いた。

4) 培養時の初期植菌量

暴露培養後の酵母量が適切な量であることは、正確な測定を行う上で重要な要因である。そこで初期接種菌体量と β ガラクトシダーゼ活性の関係について検討を行った。

2.5.2 結果と考察

1) 暴露時間の変更

暴露時間の検討結果を図 2-14 に示した。24 時間および 48 時間暴露させた系では、 4.0×10^{-6} g/L の濃度から β ガラクトシダーゼ活性が現れており、ともに同じ傾向が確認された。一方、4 時間暴露した系では平均的な発色強度は高いが、ばらつきが大きかった。これらの結果から化学物質の暴露時間は 24 時間とすることとした。

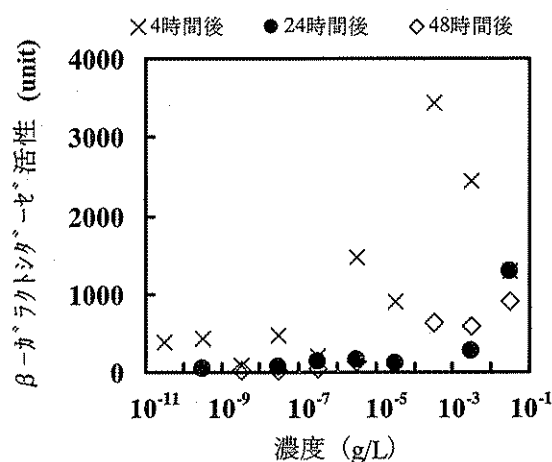


図2-14 暴露時間の検討

2) 発色基質の反応時間

発色基質の反応時間の検討結果を図 2-15 に示した。3 時間後まではほとんど発色が見られず、3 時間および 4 時間反応させた場合は、化学物質の濃度に応じた発色が観察された。また 6 時間反応させた場合は全てのウェルで発色が起こってしまい、計算が困難であった。これらの結果から発色基質との反応時間は 3 ~ 4 時間程度が望ましいと考えられる。そこで発色基質の反応時間を 3 時間と設定した。

3) 酵母溶解剤液量の検討

酵母溶解剤液量の検討を行った。その結果、加える酵素液量を $15\mu\text{L}$ から $30\mu\text{L}$ とし、経時的に発色を追った。その結果、添加量 $15\mu\text{L}$ 添加系では発色が確認されなかったが、 $30\mu\text{L}$ 添加系ではわずか30分で容量応答的な発色が目視により容易に確認された。このため加える液量は $30\mu\text{L}$ とし、30分の静置時間を設定した。

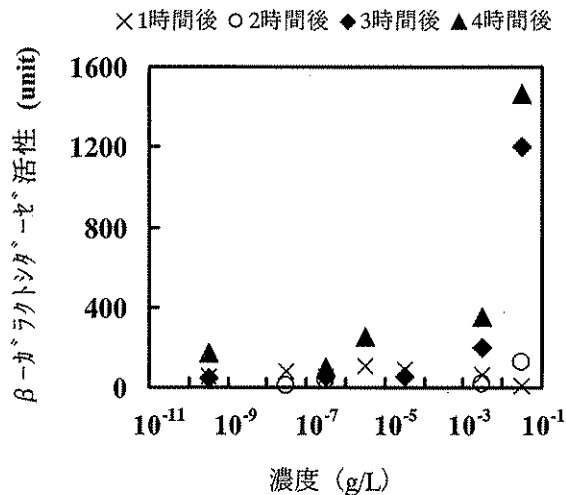


図2-15 基質との反応時間の検討

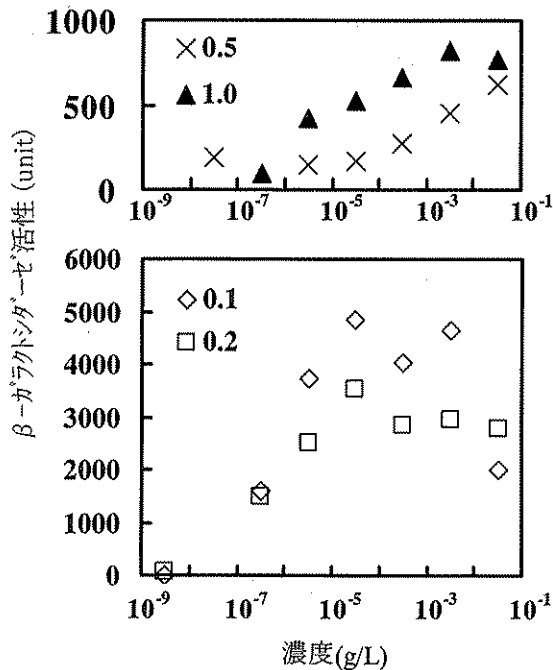


図2-16 培養時の初期植菌量の検討

[上図: OD600=0.5, 1.0
下図: OD600=0.1, 0.2]

4) 培養時の初期植菌量

培養時の初期植菌量の検討を行った。その結果を図2-16に示した。 β -ガラクトシダーゼ活性の算出にあたっては、OD420 (ONPG試薬による発色量: β -ガラクトシダーゼ産生量) を OD600 (菌量の指標) で割るため、初期植菌量が低い系列で高くなった。

OD600=0.5, 1.0 では化学物質の濃度に応じた発色変化が確認され、 β -ガラクトシダーゼ活性の立ち上りが良好であった。一方、初期植菌量が0.1, 0.2のケースでは、化学物質の濃度に応じた発色変化が見られなかった。これは初期植菌量が少なすぎるため、初期植菌時のバラツキが反映しているものと考えられる。このためここでは化学物質の濃度に応じた発色変化が確認された OD600=1.0 の条件を採用した。

2.5.3 結論

組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性を安定して測定するために、条件検討を行った。培養時の初期植菌量は OD600=1.0 に調整し、化学物質の暴露時間は24時間、発色基質の反応時間は3時間、酵母溶解剤は $30\mu\text{L}$ 添加し30分間静置することが最適条件であった。これらの検討結果から得られた Two-Hybrid 株を用いたマイクロプレート簡便法のフローを図2-17に示した。

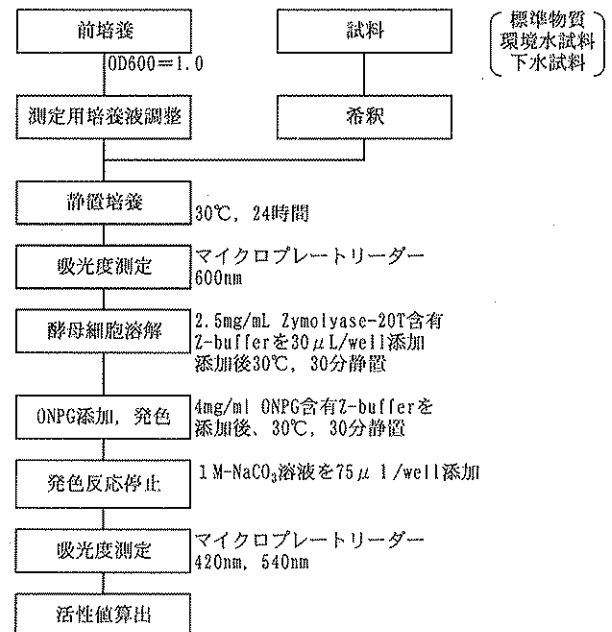


図2-17 遺伝子組み換え酵母法の測定フロー (Two-Hybrid株)

〈参考文献〉

- 1) Pons, Metal., 1996, A new cellular model of response to estrogens: A bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules *Biotechnology*, 9, 450-459.
- 2) Routledge, E. J., Sumpter, J. P., 1996, Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environmental Toxicology Chemistry*, 15, 241-248.
- 3) Gaido K. W., Leonard L. S., Lovell S., Gould J. C., Babai D., Portier C. J., McDonnell D. P., 1997, Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in yeast based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicology and applied pharmacology*, 143, 205-212.
- 4) Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M., Nishihara T., 1999, New Screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicology and applied pharmacology*, 154, 76-83.
- 5) 杉山純多、渡辺信、大和田紘一、黒岩常祥、高橋秀夫、徳田元、新版微生物学実験法、株式会社 講談社、東京。
- 6) 井上達、内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社、東京。

第3章 遺伝子組み換え酵母法の評価系の比較

3.1 概要

第2章で検討した3種の遺伝子組み換え酵母株を用いて、標準物質及び下水試料中のエストロゲン様活性の測定を行った。さらに、得られた結果より、これらの酵母株の特性について評価を行った。

3.2 3種の酵母株による標準物質のエストロゲン様活性の比較

3.2.1 対象物質

環境庁における実態調査¹⁾での調査対象項目¹⁾を参考とし、建設省における実態調査²⁾での測定対象物質(アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、ビスフェノールA・クロロフェノール類)、芳香族化合物、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、植物由来ホルモン、そして人工及び天然のホルモン類を対象標準物質とした(表3-1)。これらの化学物質のエストロゲン様活性を第2章で確立した手法に従って測定した。つまり、各化学物質は2 g/Lの濃度より順次希釈し、測定に供した。各化学物質のエストロゲンとしての強度は、もっとも強度の高いエストロゲンである17β-エストラジオール(E2)に対する相対強度、「E2比活性値」(以後、比活性値)として示した。比活性の算出は、E2の用量反応曲線の最大発色に対する50%発色の際の濃度(EC50)と、各物質のEC50を求め、両者を比較し、E2の濃度を1としたときの相対値として換算した(図3-1)。

また試薬メーカー間の活性の差を確認するため、4つの試薬メーカー(SIGMA、MERCK、和光純薬、東京化成)からE2及びエストロン(E1)を購入し、Sumpter株を用いて比較測定を行った。

3.2.2 標準物質の測定結果

表3-1に3種類の遺伝子組み換え酵母法で測定した標準物質の比活性値を示した。ここでは供試濃度を2 g/Lとして測定を行い、この濃度でエストロゲン様活性が得られなかった試料は陰性判定とした。

供試物質の中ではポジティブコントロールとしたE2などの人畜由来のホルモンや、合成ホルモンであるジェチルスチルベステロール、エチニルエストラジオールなどが、高い活性を示した。またアルキルフェノール類の活性はホルモン類に比べて低く、フタル酸エステル類は更に低かった。また供試濃度(2 g/L)では換算できないものも多かった。

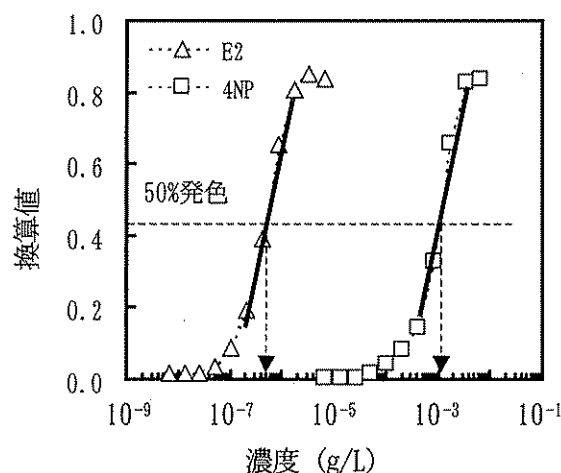


図3-1 比活性値の算出方法

表3-1 3種類の酵母株によって得られた標準物質の比活性値

標準物質	略号	比活性値		
		Sumpter株	CIIT株	Two-hybrid株
天然ホルモン	17β-エストラジオール	E2	1	1
	17α-エストラジオール	17α	0.05	0.04
	2-ヒドロキシエストラジオール	HEDL	0.01	0.05
	エストロン	E1	0.3	0.05
	2-ヒドロキシエストロン	HESN	0.002	0.005
	エストリオール	E3	0.002	0.002
合成ホルモン	エチニルエストラジオール	EE2	0.5	2
	ジェチルスチルベステロール	DES	0.3	2
アルキルフェノール類	4-ノニルフェノール	4NP	0.001	0.0006
	4-n-オクチルフェノール	4nOP	0.000005	—
	4-t-オクチルフェノール	4tOP	0.0006	0.003
	ビスフェノールA	BPA	0.00006	0.00002
フタル酸エステル類	フタル酸ジブチル	DBP	—	—

(備考) 表中の — は2g/Lで換算可能なデータが得られなかったことを示す。

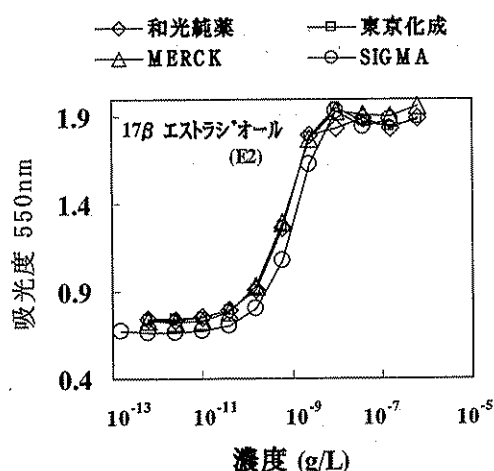


図 3-2 各メーカーの標準物質 (E2) の容量反応曲線の比較

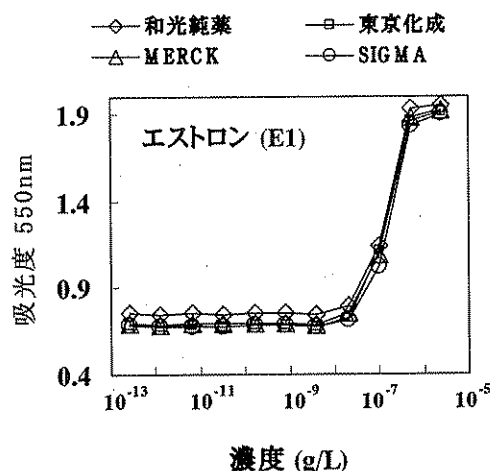


図 3-3 各メーカーの標準物質 (E1) の容量反応曲線の比較

アルキルフェノール類は、揮発性が高いためか、マイクロプレートのウェル内で拡散しやすく、周囲の未添加ウェルへの影響による発色がみられた。物質（例：アルキルフェノール類）によっては、高濃度になると OD600 値の低下に伴う発色の抑制がみられることから、酵母に対して毒性を示すと考えられる。

また Sumpter 株を用いて各メーカー間の活性を比較したところ、E2（図 3-2）、E1（図 3-3）ともに明瞭な差は確認されなかった。

これらの酵母株の測定法によって得られる E2 の EC50 値は、Sumpter 株が $0.09 \mu\text{g/L}$ 、Two-hybrid 株が $0.47 \mu\text{g/L}$ 、CIIT 株が $0.046 \mu\text{g/L}$ であった。EC50 が低いということは、低い濃度で反応が確認されるということを示しており、これら 3 株の EC50 の相違は、感受性（感度）の差として表される。すなわち、E2 に対する感受性の高さは、CIIT 株 > Sumpter 株 > Two-hybrid 株、の順となっており、E2 に対する感受性が最も低い Two-hybrid 株は、他の 2 株が検出した 4-n-オクチルフェノールの活性を検出できなかった。その一方で、合成ホルモンには他の 2 株に比べ高い比活性を示すなど、他の 2 株に比べ特徴的な傾向を有することも確認された。

また 13 種類の標準物質の比活性値を相互に比較した結果を図 3-4 に示すが、先に示したように個別の物質では、3 株の間に異なった比活性値が確認されたものの、標準物質全体で見ると、正の相関性があることが確認された。

3.3 3 種類の酵母株による下水の測定

下水試料は建設省が平成 10 年 7 月（夏期）と 11 月（秋期）に行った実態調査において、2 水系に処理水を放流

している 10ヶ所の処理場の流入水、2 次処理水とした。

試料は固相抽出法を用いて濃縮した。すなわち、試料 1L をガラスファイバーフィルター（GF/B フィルター：保持粒径 $1.0 \mu\text{m}$ ）を用いてろ過し、ろ液を固相抽出カートリッジ（Sep-Pak C18）に保持させた後、メタノールで抽出させた。GF/B フィルター上に保持された残渣は、メタノールに浸漬し、超音波抽出を行った。フィルター抽出液はろ液抽出液と合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、液量を約 1mL に調整した。この試料を窒素気流下で乾固した後、ジメチルスルホキシド（DMSO） $100 \mu\text{L}$ に転溶した。試料は組み換え酵母法による測定前に 5 倍希釈し、最終濃縮倍率を 2000 倍とし、さらにこの試料を測定時に段階的に希釈して組み換え酵母試験に供した。

3.3.1 細胞毒性物質による測定妨害

3 種類の酵母株による測定系によって流入下水及び下水処理水のエストロゲン様活性を測定した。その結果、測定方法によっては酵母に対する毒性（細胞毒性）物質の存在により、酵母が増殖できず測定が出来ないケースが確認された（図 3-5）。つまり、高濃縮試料の添加時には酵母が増殖せず、 β -ガラクトシダーゼの産出が検出できなかった。

また表 3-2 に示すように Sumpter 株では、全ての流入下水及び下水処理水のエストロゲン様活性の測定が可能であったが、CIIT 株では流入下水 5 試料において酵母の増殖阻害による測定妨害が認められた。また Two-hybrid 株では流入下水 9 試料、下水処理水 5 試料についても同様の測定妨害により結果が得られなかった。これらの結果から、下水試料に含まれる細胞毒性物質に対して最も

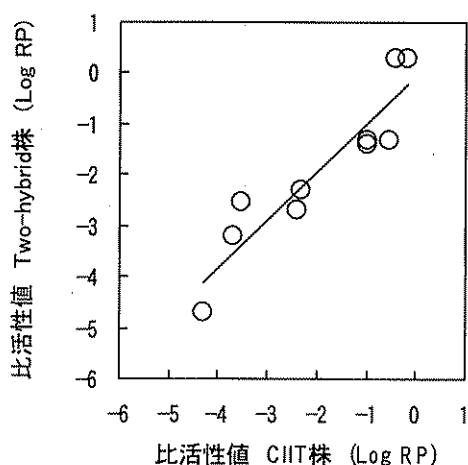
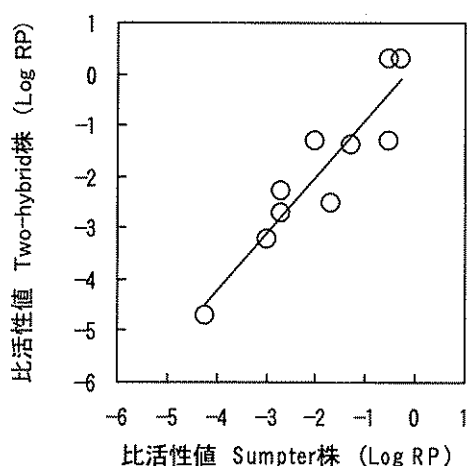
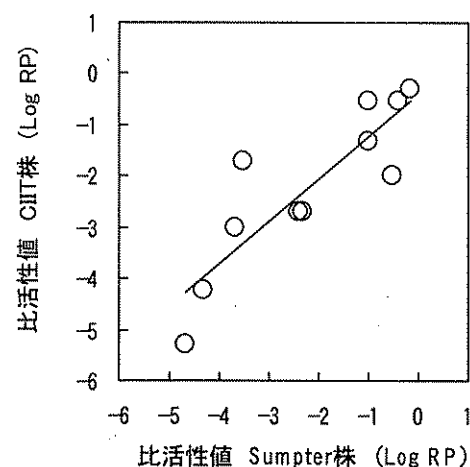


図 3-4 3種類の組み換え酵母法による標準物質の比活性値の比較

影響を受けやすいのはTwo-hybrid株で、逆にSumpter株は細胞毒性物質の影響を受けにくいことが確認された。このため下水試料のように酵母の増殖を阻害する毒性物質が存在している試料のエストロゲン様活性を測定するには、Sumpter株が3株の中で最も適していると考えられた。

表 3-2 下水試料中に含まれる細胞毒性によって測定ができなかった検体数

酵母株	流入下水	処理水
Sumpter 株	0/13	0/13
CIIT 株	5/13	0/13
Two-hybrid 株	9/13	5/13

備考：(測定のできなかった検体数)/(全検体数)

3.3.2 下水試料の測定結果の比較

下水試料を測定した結果から、酵母株の違いによるエストロゲン様活性値を比較した。なお先に示したように、Two-hybrid株の測定結果が少ないため、ここでは、Sumpter株、CIIT株の2種類の株による測定結果のうち、酵母の増殖阻害の影響が見られなかった流入下水8試料、下水処理水13試料の結果を比較した(図3-6)。

下水処理水については2つの株の測定結果間に正の相関が確認できたが、概ねSumpter株の方がCIIT株より高い値を示す傾向が見られた。

流入下水は、Sumpter株で高い値を示した試料が、CIIT株では測定できなかったため、比較対象とした試料の濃度レベルが近く、両者の相関は明瞭とならなかった。また、CIIT株によるエストロゲン様活性はSumpter株によ

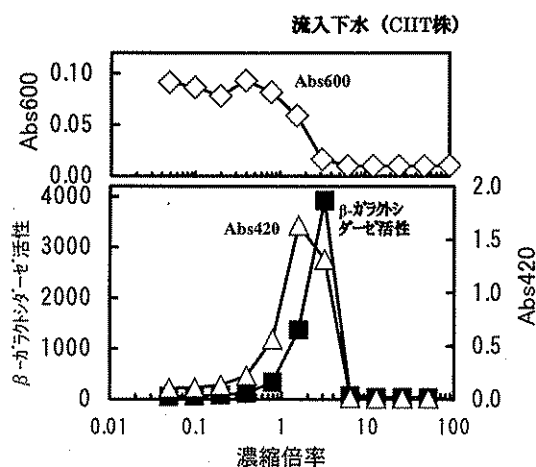


図3-5 酵母毒性が見られる場合の用量-反応曲線(CIIT株を使用、流入下水測定時)

る結果に比べ、低く評価される傾向が確認された。このことから、酵母株の違いによって、結果が異なる場合があることに注意が必要である。

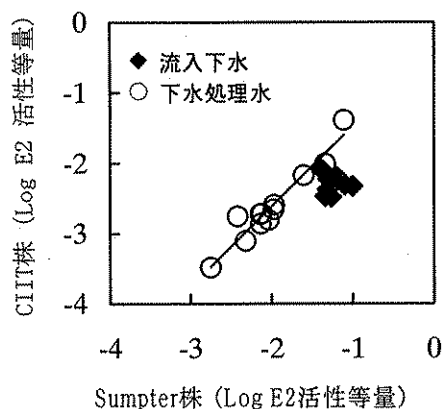


図3-6 Sumpter株, CIIT株による流入下水、下水放流水のE2活性等量の比較

3.4 結論

(1) 3種類の酵母株の標準物質に対するエストロゲン様活性について整理した。その結果、E2に対する感受性の高さは、Two-hybrid株が最も低く、CIIT株の1/10程度であった。またTwo-hybrid株は他の2株が検出した4-n-オクチルフェノールの活性を検出しなかった一方で、合成ホルモンには高い比活性を示した。これらのことから、酵母株の違いによって特徴的な検出特性の違いも見られた物質もあったが、13標準物質の間には、正の相関性が見られた。

(2) 下水中のエストロゲン様活性を3種類の組み換え酵母法によって測定した。その結果、下水中に含まれる細胞毒性成分の影響により、Two-hybrid株やCIIT株では測定の出来ない試料があった。しかしSumpter株は、全ての下水処理水の測定が可能であったため、夾雑成分が多い下水試料を評価するには、Sumpter株は有利であることが確認された。またSumpter株及びCIIT株の測定結果の比較を行った結果、Sumpter株に比べてCIIT株によるエストロゲン様活性値が低く評価される傾向も確認された。

エストロゲン様活性値の真値については確認できないため、「どちらの試験系で得られた値のほうが、正確か？」という議論は難しいが、これらの差を理解した上で評価を進めていくことが重要である。

また下水試料への適用という観点では、細胞毒性に強

く下水試料と環境試料を同じ試験方法で評価出来る点を考慮すると、Sumpter株による評価が適切と考えられた。そこで6章以降は、遺伝子組み換え酵母法の測定をSumpter株で評価することとした。

＜参考文献＞

- 1) 環境省：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の実態概況調査（夏期）結果（速報）について、1998.12.
- 2) 建設省河川局河川環境課、下水道部流域下水道課：平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果、1999.3.

第4章 遺伝子組換え酵母法の下水への適用と下水処理場でのエストロゲン様活性の全国調査

4.1 概要

本章では全国規模の下水処理場において、流入下水及び2次処理水に含まれるエストロゲン様活性の濃度レベルと、下水処理工程におけるエストロゲン様活性の消長を把握することを目的とした。また、遺伝子組換え酵母法によって測定されるエストロゲン様活性と、化学分析結果を比較することにより、エストロゲン様活性の由来の推定を行った。

4.2 対象とした下水処理場及び測定項目

遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定は、平成10年～14年にかけて全国60処理場で行った。なお、平成10年から12年においては、建設省が実施した「下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査」¹⁾（以後、全国下水実態調査とする）にあわせて採水した。また、平成13年から平成14年においては、全国23処理場で採水し、遺伝子組換え酵母法による測定を行うとともに、分析機器を用いてエストロゲン及びエストロゲン様物質の測定（化学分析）等についても行った。調査対象とした下水処理場の処理方式と処理水量を図4-1に、下水処理場内での採水箇所を図4-2に示した。

化学分析の対象成分は、17 β -エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、ノニルフェノール (NP)、ノニルフェノールエトキシレート類 (NPnEO)、ノニルフェノールエトキシ酢酸類 (NPnEC) とした。E2 及び E1 の分析方法は LC/MS/MS を用いて分析²⁾を行った。NP 及び NPnEO は HPLC を用いて分析³⁾を行った。NPnEC については八十島らの方法⁴⁾に従い、LC/MS/MS を用いて分析を行った。

4.3 流入下水及び2次処理水中のエストロゲン様活性の濃度レベル

平成10年～14年にかけて行った全国60処理場におけるエストロゲン様活性の調査結果を図4-3に示した。その結果、流入下水、2次処理水のエストロゲン様活性は67ng/L-E2活性等量、16ng/L-E2活性等量（中央値）であった。流入下水の濃度レベルとしては概ね30～110ng/Lの間にある試料が多く、この区間に全体の72%が含まれた。しかし2次処理水については非常に広い濃度分布をしており、処理方法や運転条件等の多くの要因によって減少率が大きく変化しているものと推測された。

またエストロゲン様活性の減少率は76%（中央値）であり、全国下水実態調査¹⁾における各物質の減少率と比較した場合、若干低い値であった（図4-4）。また、全国下水道実態調査結果と各物質のエストロゲン作用強度

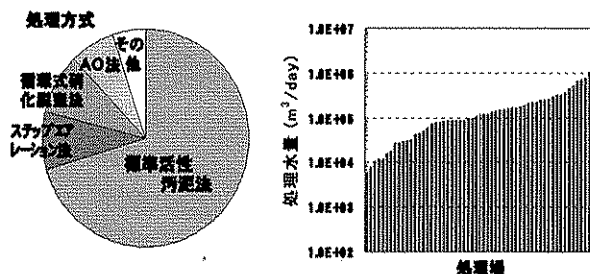
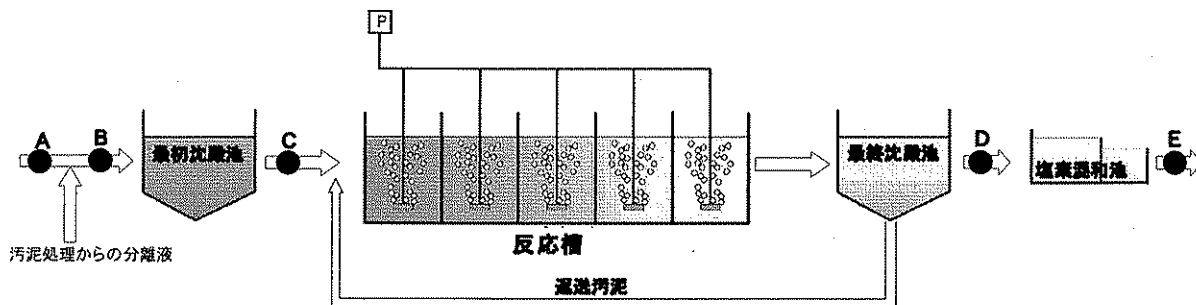


図4-1 調査対象処理場の処理方式と処理水量



● サンプルング場所 (A:流入下水, B:最初沈殿池 流入水, C:最初沈殿池 流出水, D:最終沈殿池 流出水, E:放流水)

図4-2 下水処理工程における採水箇所

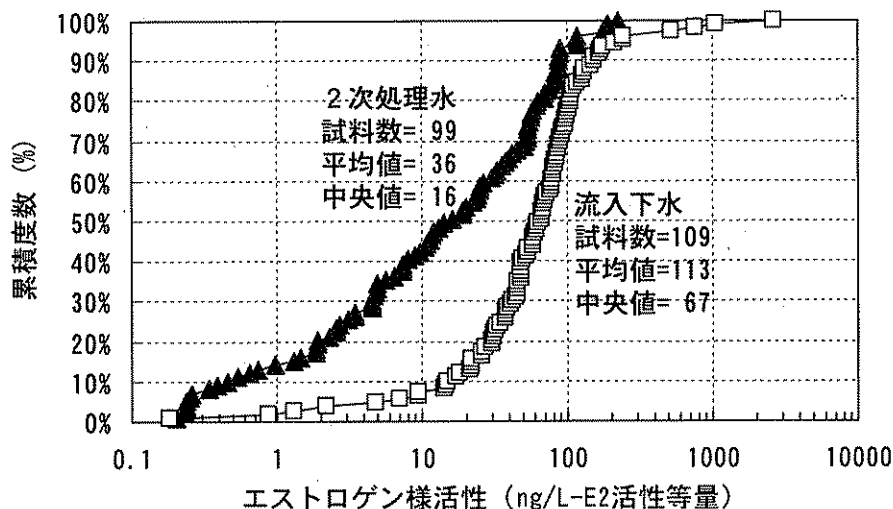


図4-3 流入下水及び2次処理水の濃度分布

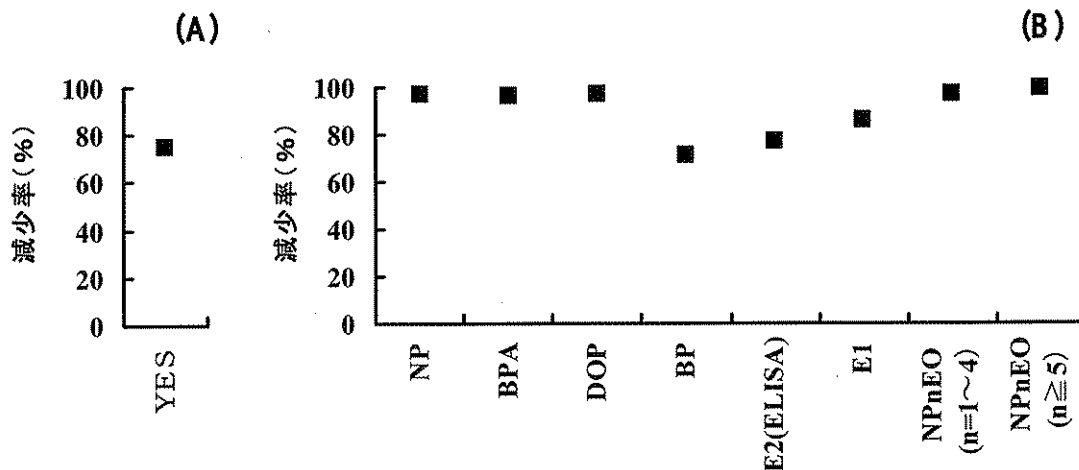


図4-4 下水中におけるエストロゲン様活性およびエストロゲン様物質、エストロゲンの除去率

(A) 遺伝子組換え酵母法 (YES) で測定したエストロゲン様活性の除去率 (中央値ベース)

(B) 全国下水実態調査¹⁾におけるエストロゲン様物質及びエストロゲンの除去率

略号) YES: エストロゲン様活性, NP: ノニルフェノール, BPA: ビスフェノールA, DOP: フタル酸ジ-2-エチルヘキシル,

E2: 17βエストラジオール, E1: エストロン, NPnEO: ノニルフェノールエトキシレート,

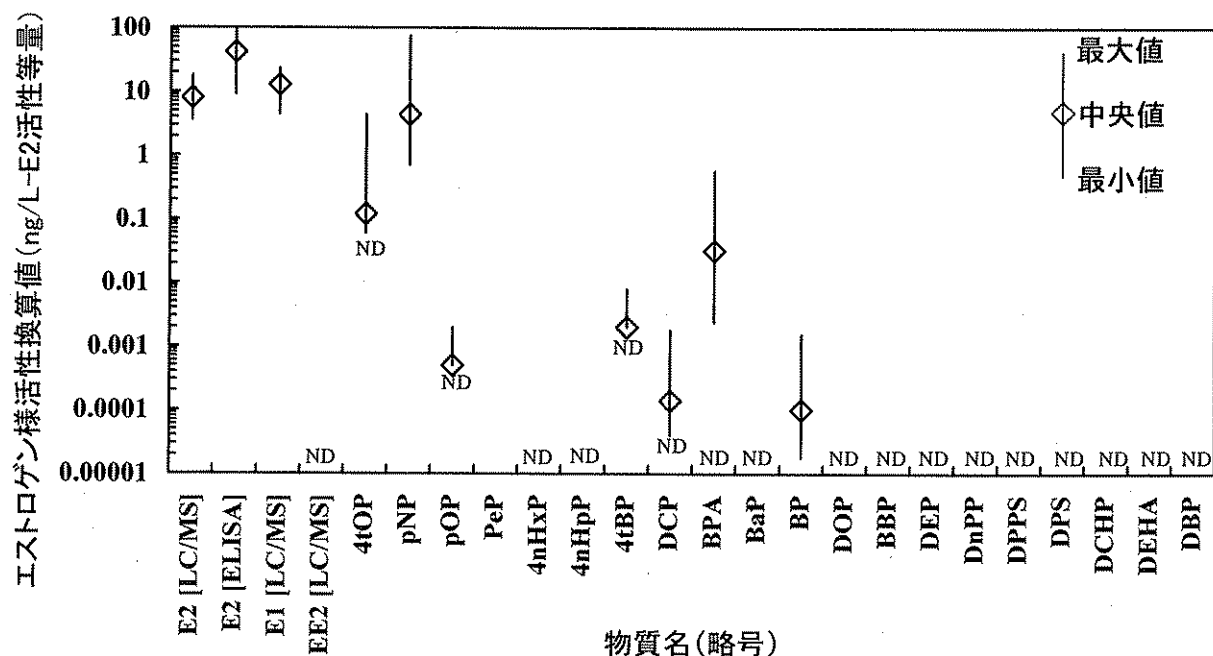
(比活性値) から、実測されたエストロゲン様活性への寄与物質を推定した (表4-1、図4-5 および表4-2、図4-6)。フタル酸エステル類については、検出頻度、検出濃度がともに高いが、比活性値が他の成分に比べ低いため、エストロゲン様活性へ殆ど寄与しないと考えられる。そのため、寄与物質の候補からは除外し、比活性値、検出頻度ともに高い E1、E2、NP に絞って考察を進めた。なおここでは、これらの物質が混在することによる相互作用は相加的であると仮定し、各物質の理論活性値 (各化学物質の濃度と比活性値を掛け、E2 等量濃度とした値) を積

み上げることによって示した。

全国23処理場で遺伝子組換え酵母法と分析機器を用いてエストロゲン及びエストロゲン様物質の測定 (化学分析) を行い、両者の結果を比較した結果を図4-7に示す。各処理場におけるエストロゲン様活性と E1、E2、NP の分析結果を基に算出した理論活性値を比較した。その結果、E1、E2、NP の理論活性値の総和によってほとんどが説明できるケースも見られたが、これらの3物質だけでは説明が出来ないエストロゲン様活性を含む試料が多いことが明らかになった。またこれらの3物質では説明できな

表4-1 流入下水中に含まれるエストロゲン様物質及びその関連物質の検出範囲¹⁾と比活性値⁵⁾

物質名	試料数	検出下限値	最小値	中央値	最大値	比活性値
17 β -エストラジオール(LC/MS)	23	0.0005	0.0036	0.0081	0.018	1.0
17 β -エストラジオール(ELISA)	125	0.0002	0.0091	0.042	0.094	1.0
エストロン(LC/MS)	23	0.0005	0.015	0.043	0.077	0.3
エチルエストラジオール(LC/MS)	23	0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.5
4-tert-オクチルフェノール	77	0.1	<0.1	0.2	7.4	0.0006
ノニルフェノール	132	0.1	0.7	4.4	75	0.001
4-n-オクチルフェノール	35	0.1	<0.1	<0.1	0.4	0.00001
4-n-ペンチルフェノール	8	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.0007
4-n-ヘキシルフェノール	8	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.0006
4-n-ヘプチルフェノール	8	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00006
4-tert-ブチルフェノール	8	0.1	<0.1	<0.1	0.4	0.00002
2,4-ジクロロフェノール	52	0.02	<0.02	0.1	0.9	—
ビスフェノールA	133	0.01	0.04	0.5	9.6	0.00006
ベンゾ(a)ピレン	32	0.01	<0.01	<0.01	0.14	—
ベンゾフェノン	102	0.01	0.03	0.17	2.6	—
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	132	0.2	1.4	12.0	68.0	—
フタル酸ブチルベンジル	77	0.2	0.0	0.2	1.9	—
フタル酸ジエチル	52	0.2	0.9	3.1	8.9	—
フタル酸ジプロピル	8	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	—
フタル酸ジペンチル	8	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	—
フタル酸ジヘキシル	8	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	—
フタル酸ジシクロヘキシル	8	0.2	<0.2	<0.2	0.3	—
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	103	0.01	<0.01	0.1	6.9	—
フタル酸ジ-n-ブチル	77	0.2	<0.2	2.6	14	—

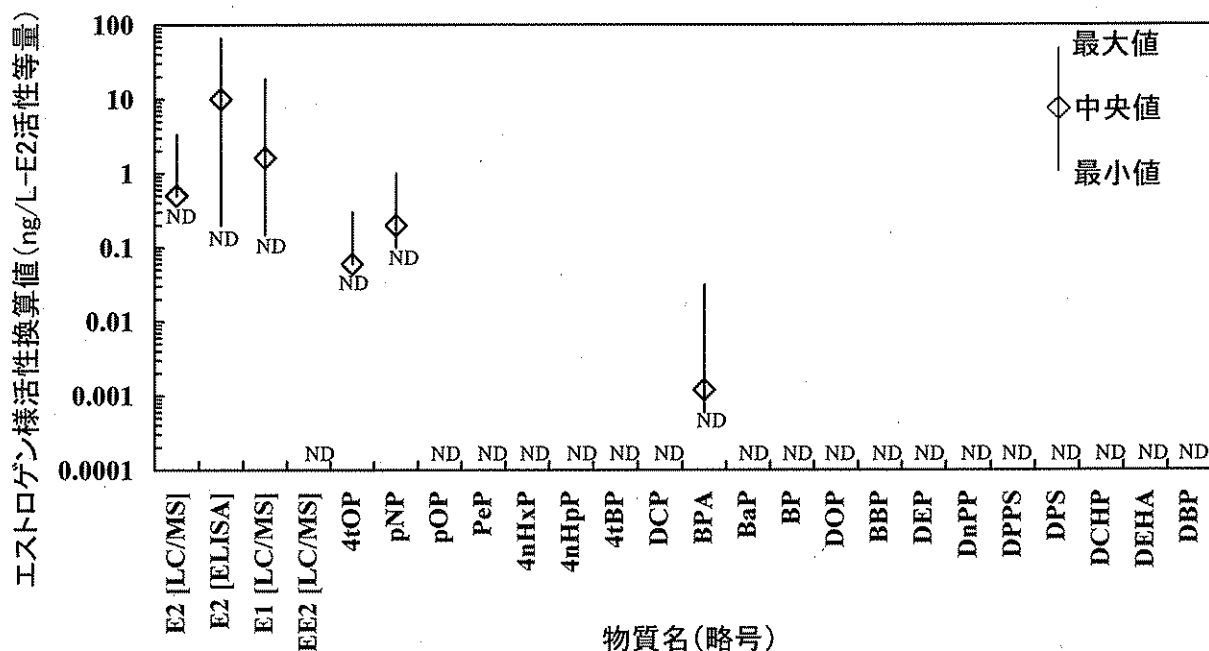


図中の「ND」は、有効な活性値が得られなかったことを示す。

図4-5 流入下水中に含まれる各物質のエストロゲン様活性換算値

表4-2 下水処理水に含まれるエストロゲン様物質及びその関連物質の検出範囲¹⁾と比活性値⁵⁾

物質名	試料数	検出下限値	最小値	中央値	最大値	比活性値
17β-エストラジオール(LC/MS)	24	0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0033	1.0
17β-エストラジオール(ELISA)	146	0.0002	<0.0005	0.010	0.066	1.0
エストロン(LC/MS)	24	0.0005	<0.0005	0.0054	0.063	0.3
エチルエストラジオール(LC/MS)	24	0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.5
4-tert-オクチルフェノール	93	0.1	<0.1	<0.1	0.5	0.0006
ノニルフェノール	155	0.1	<0.1	0.2	1.0	0.001
4-n-オクチルフェノール	48	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00001
4-n-ペンチルフェノール	10	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.0007
4-n-ヘキシルフェノール	10	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.0006
4-n-ヘプチルフェノール	10	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00006
4-tert-ブチルフェノール	10	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.00002
2,4-ジクロロフェノール	58	0.02	<0.02	<0.02	0.14	-
ビスフェノールA	154	0.01	<0.01	0.02	0.52	0.00006
ベンゾ(a)ピレン	37	0.01	<0.01	<0.01	0.01	-
ベンゾフェノン	110	0.01	<0.01	0.05	1.0	-
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	155	0.2	<0.2	0.4	6.2	-
フタル酸ブチルベンジル	93	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジエチル	58	0.2	<0.2	<0.2	0.3	-
フタル酸ジプロピル	10	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジペンチル	10	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジヘキシル	10	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジシクロヘキシル	10	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	123	0.01	<0.2	<0.2	0.2	-
フタル酸ジ-n-ブチル	93	0.2	<0.2	<0.2	0.7	-



図中の「ND」は、有効な活性値が得られなかったことを示す。

図4-6 下水処理水中に含まれる各物質のエストロゲン様活性換算値

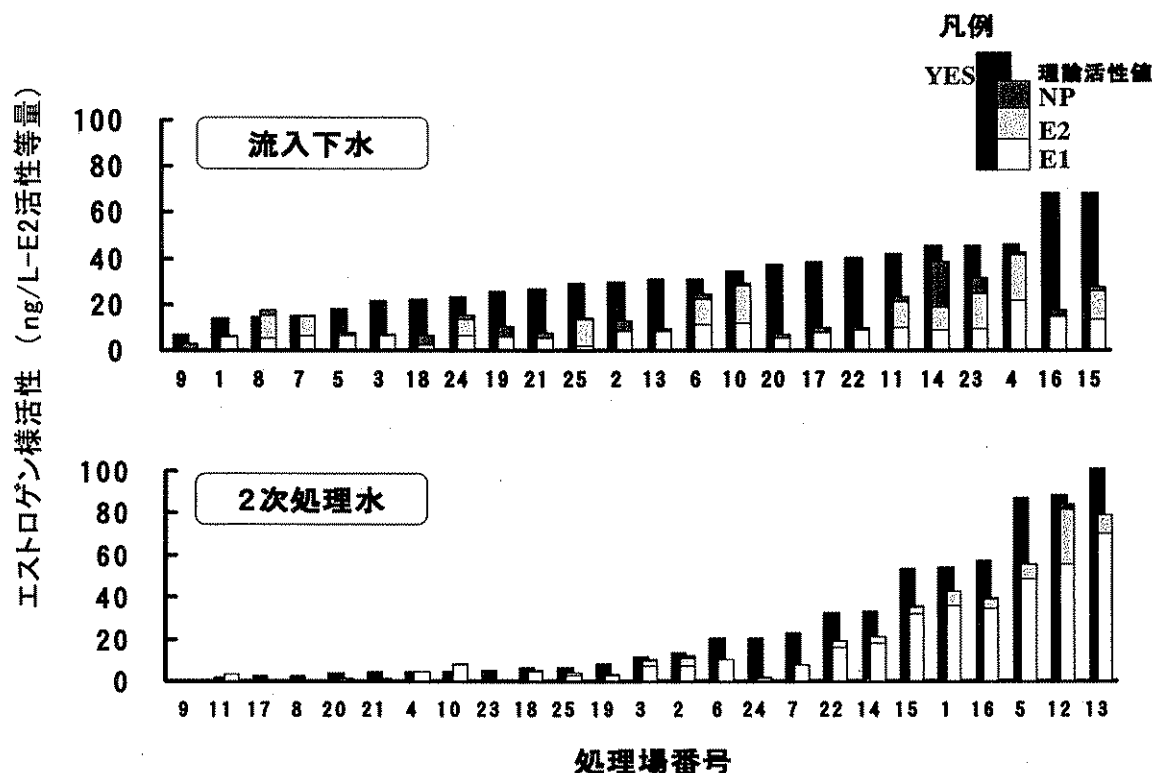


図4-7 エストロゲン様活性への各物質の寄与

いエストロゲン様活性は流入下水で多く存在していることが分かった。

さらに、各物質の寄与に着目すると、処理場毎に異なるが、多くの場合、流入下水では実測されたエストロゲン様活性に対し、E1、E2が大きく、NPも高い場合があることが確認された。2次処理水についてはE1の寄与が他の成分に比べ非常に大きく、E1が主要な寄与物質であることが確認された。

4.4 下水処理工程におけるエストロゲン様活性の低減

下水処理は、BODやSS等の処理を目的として運転されているが、これまでに示したようにエストロゲン様物質の低減にも効果があることが確認された。

そこで下水処理工程のどの処理プロセスにおいてエストロゲン様物質がどの程度減少しているかを明らかにするため、各処理工程で調査を実施した。

調査は、3つの処理場で実施した（それぞれA～C処理場とした）。A～Cの処理場の下水処理方式は標準活性汚泥法である。各処理場の反応槽の運転状況（HRT、SRT）を表4-3に示した。A、Bの処理場では、流入下水、最初沈殿池流入水、最初沈殿池流出水、最終沈殿池流出水の4地点について、3時間毎に採水を行い、コンポジット

サンプルを作成した（図4-2参照）。C処理場では反応槽内の挙動に着目し、図4-8に示すように反応槽内で詳細な採水を実施した。なおC処理場のサンプルリングはスポットサンプルである。C処理場の反応槽内9箇所て採取した試料は、採取後直ちに静置（約10分間）し、その上澄水を試験室に持ち帰りGF/Bフィルターでろ過したろ液を分析用試料とした。その他の試料はろ液と残さを合わせて分析した。

A～C処理場の下水処理工程におけるエストロゲン様活性の変化を図4-8に示した。A～C処理場ともに最初沈殿池の流入、流出間では、エストロゲン様活性の低減は少なく、最初沈殿池内での除去はほとんど生じていないことが分かった。また、A、B処理場では反応槽の流出水が調査されていないが、最初沈殿池流出水～最終沈殿池流出水の間で、エストロゲン様活性は減少していた。また、反応槽内を細かく調査したC処理場のケースでは、反応槽内で速やかにエストロゲン様活性が減少していることが確認された。

前述の全国下水実態調査（4.1章）では各処理プロセスの流入および流出水を中心として採水を実施している。この調査結果を図4-9に示すが、最初沈殿池流出水～最終沈殿池流出水、つまり反応槽内でエストロゲン様活性

が大きく低減するという同様の傾向が確認された。

表 4-3 調査時運転状況

処理場	HRT (時間)	SRT (日)
A	6.9	4.5
B	6.4	4.9
C	8.0	10.7

4.5 結論

全国規模の下水処理場における実態調査を行い、流入下水及び2次処理水に含まれるエストロゲン様活性の濃度レベルと、下水処理工程におけるエストロゲン様活性の消長の把握を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 全国の流入下水中のエストロゲン様活性の中央値は67ng/L-E2 活性等量であり、30~110ng/L-E2 活性等量に全体の7割が含まれる分布であった。一方、2次処理水は非常に広い濃度分布を示し、処理方法や運転条件などの要因によって減少率が大きく変化していることが確認された。
- 2) 下水処理工程における変化に着目した場合、反応槽でエストロゲン様活性の大幅な減少が確認された。またエストロゲン様活性の減少率は中央値ベースで76%であり、国土交通省が実施した全国実態調査で示された個々のエストロゲン様物質の減少率に比べると低めであった。
- 3) エストロゲン様活性をエストロゲン様物質と比較した場合、流入下水ではE2、E1の寄与が、2次処理水ではE1

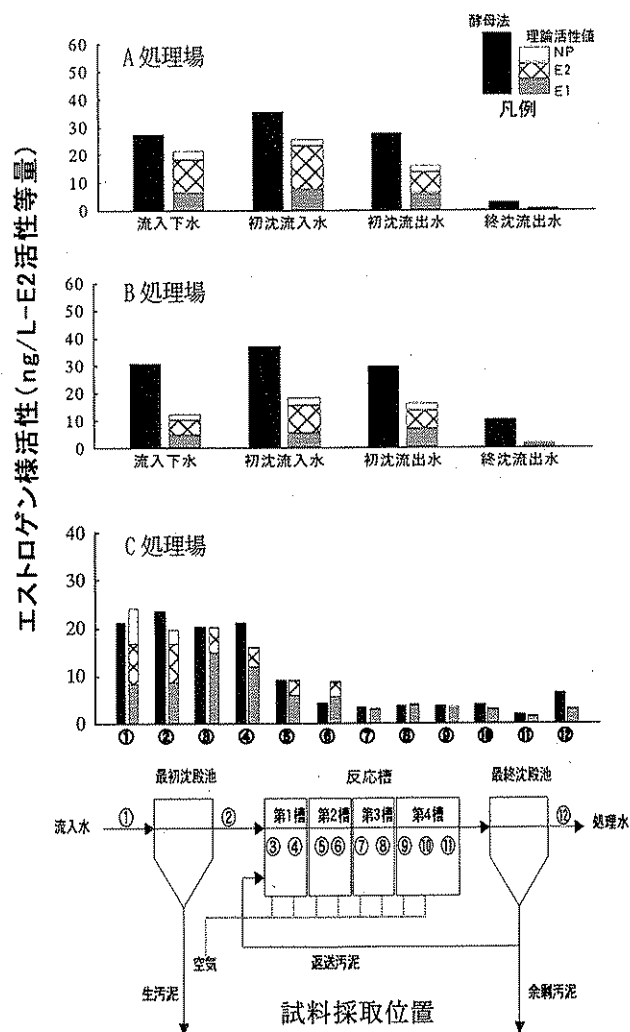


図4-8 下水処理工程におけるエストロゲン様活性の変化

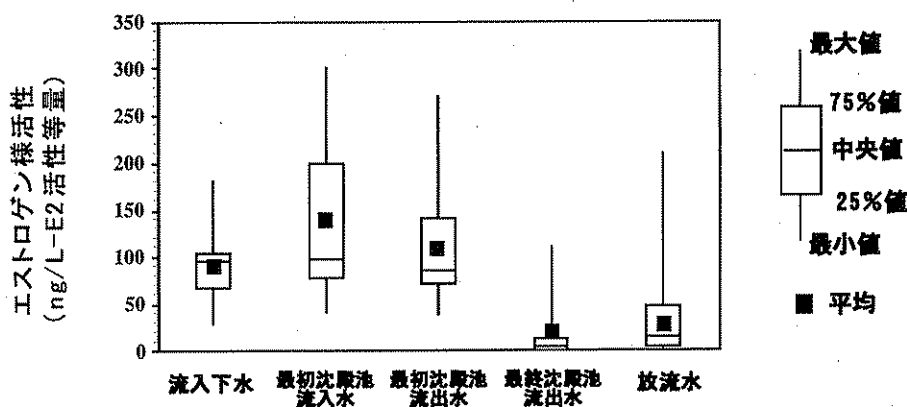


図 4-9 下水処理工程におけるエストロゲン様活性の変化

の寄与が大きいことが明らかとなったが、今回測定を行った物質では説明できない不明なエストロゲン様活性が、多くの下水試料に存在していることが明らかになった。

〈参考文献〉

- 1) 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攪乱物質に関する調査
- 2) 小森行也、八十島誠、高橋明宏、矢古宇靖子、田中宏明、下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析、土木技術資料、Vol.43、No.11、p44-49 (2001)
- 3) 小森行也、田中宏明、竹歳健治、活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動、下水道研究発表会講演集、pp.700-702(1999)。
- 4) 八十島誠、小森行也、田中宏明、下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析、第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集、p.526 (2002)
- 5) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明(1999) 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、環境工学研究論文集、36、199-204.

第5章 河川の環境エストロゲン様活性

5.1 概要

本章では河川におけるエストロゲン様活性の検出状況を明らかにするとともに、その変動要因について検討を行った。また、エストロゲン様物質の実態調査と比較を行い、エストロゲン様活性への各物質の寄与について推定した。

5.2 全国一級河川のエストロゲン様活性の実態調査

試料の採取は、国土交通省が実施した「水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査」¹⁾（以後、全国河川実態調査）に併せて実施した。調査地点を図5-1に示す。調査は表5-1に示すように平成11年から平成13年にかけて94水系132地点で調査を行い、251試料のエストロゲン様活性を測定した。

表5-1 全国実態調査におけるエストロゲン様活性の調査水系数及び地点数

調査年	水系	地点
平成11年	19	51
平成12年	8	15
平成13年	94	112
合計	94	132

5.3 測定方法

エストロゲン様活性は2章で示した Sumpter 株を用いた方法で測定した。化学分析結果については平成13年全国河川実態調査結果¹⁾を引用した。

5.4 結果及び考察

全国一級河川のエストロゲン様活性の測定結果を図5-2に示す。全国一級河川のエストロゲン様活性の平均値

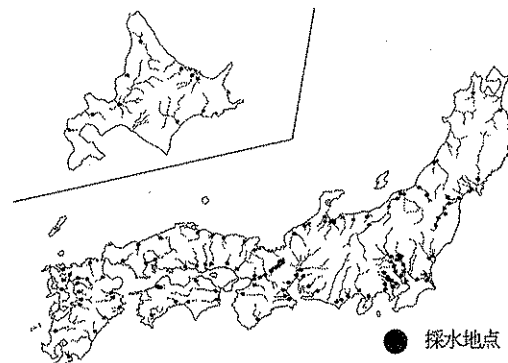


図5-1 全国実態調査における採水地点

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。河川におけるエストロゲン様活性の季節変化を図5-3及び図5-4に示した。図5-3は3年間の河川実態調査により得られた結果を季節毎に整理したものである。平均値及び中央値の比較から、冬期にその活性値が高くなる傾向が確認された。また、試料数は少ないが、同一地点でのエストロゲン様活性の変化を比較した結果（図5-4）、冬期に高くなる傾向が再確認された。このように冬期にエストロゲン様活性が高くなる要因として、①冬期になると河川流量が低水位で安定するため、河川に占める都市排水の水量が相対的に高まること②水温の低下によって河川水中の生分解が進行しにくいこと、などが推察される。

本調査により、エストロゲン様活性が高かった地点は、その多くが都市部に位置し、下水や事業場の排水の影響が大きいのと考えられる地点であった。また、これらの地点では調査期間を通じて検出濃度が高いケースが多く、由来物質の検討や生物への影響について調査を進める必要があるものと考えられる。

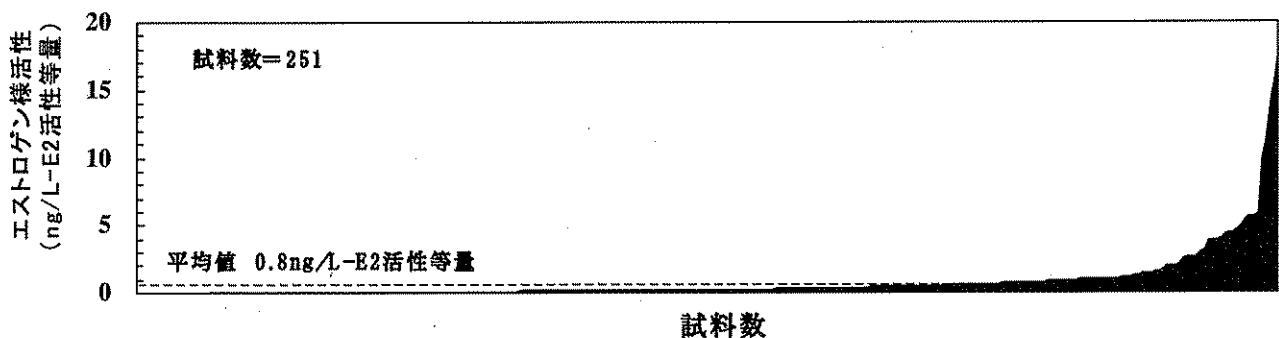


図5-2 全国一級河川におけるエストロゲン様活性の分布（平成11年～13年）

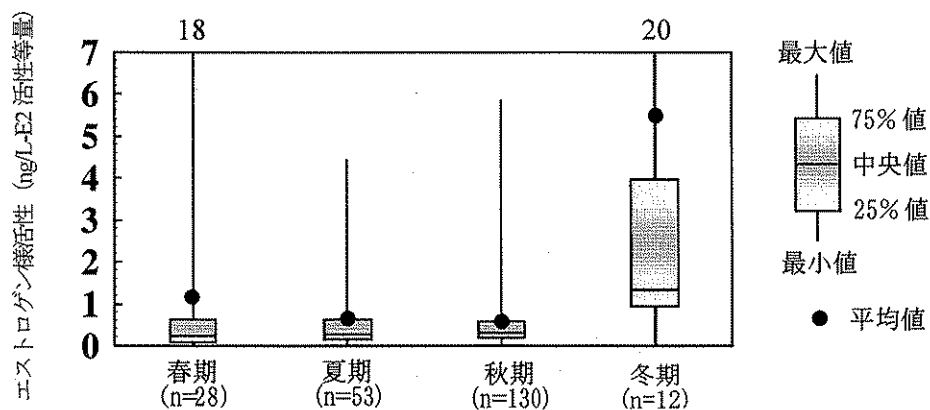


図5-3 全国一級河川における季節毎のエストロゲン様活性の濃度分布

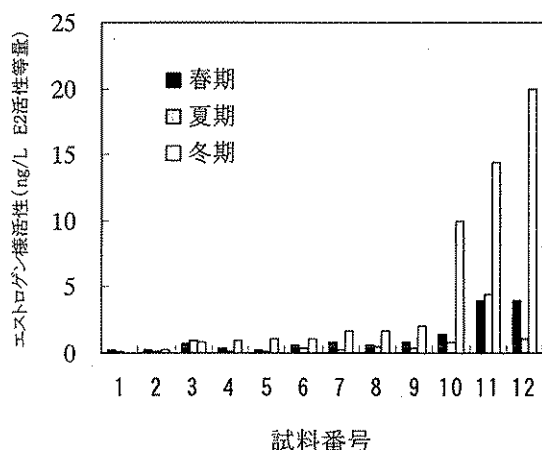


図5-4 同一地点におけるエストロゲン様活性の季節変化

表5-2 類型別エストロゲン様活性の比較
(平成13年調査結果)

	エストロゲン様活性 (ng/L-E2活性等量)					
	類型 AA	A	B	C	D	E 全体
試料数	5	54	40	9	3	1 112
最小値	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	2.1	- <0.2
最大値	0.4	1.1	1.4	1.7	5.8	- 5.8
平均値	0.2	0.3	0.4	0.7	3.3	2.7* 0.5
中央値	0.2	0.2	0.3	0.7	2.1	- 0.3

*:E類型は試料数が1検体のため平均値の欄に結果を示した。

また、平成13年に94水系112地点についてエストロゲン様活性の一斉調査を行い、生活環境の保全に関する環境基準における類域指定別に結果を整理した。類型別の基礎統計資料を表5-2に、結果を図5-5に示した。その結果、類型ランクの低下に伴いエストロゲン様活性は高くなる傾向が確認され、A-B類型間、B-C類型間では類型の差(t-検定、有意水準5%)は確認できなかったが、A-C類型間では有意な差(t-検定、有意水準5%)が確認された。

5.5 河川におけるエストロゲン様物質の検出状況とエストロゲン様活性への寄与

国土交通省が行った「水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果」¹⁾²⁾の検出濃度と、比活性値(第3章)から、E2換算値(各化学物質の濃度と比活性値を掛け、E2等量濃度とした値)を算出し、エストロゲン様活性への寄与の高い物質を推定した(表5-3、図5-6)。その結果、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)の寄与が高いと推測された。次いで、検出頻度、比活性値がともに高いノニルフェノール(NP)の寄与が確認された。一方、多芳香族化合物(PAH)やフタル酸エステル類は比活性値が非常に低く、エストロゲン様活性への寄与は低いものと推察される。

そこで平成13年全国河川実態調査で得られた各エストロゲン様物質及びエストロゲンの検出結果から理論換算値を算出し、これらの物質がエストロゲン様活性にどの程度寄与しているか評価した。

今回測定を行った112試料の内、E1、E2、NPのいずれかが検出された地点は17地点であり、残りのエストロゲン様活性が検出された89地点はその活性の由来が不明という結果となった。この要因として分解生成物や未測定

表5-3 流入下水中に含まれるエストロゲン様物質及びその関連物質の検出範囲¹⁾²⁾と比活性値

物質名	試料数	検出下限値	最小値	中央値	最大値	比活性値
単位: $\mu\text{g/L}$						
17 β -エストラジオール(LC/MS法)	131	0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0013	1.0
17 β -エストラジオール(ELISA法)	910	0.0002	<0.0002	0.0006	0.0024	1.0
エストロン(LC/MS法)	131	0.0005	<0.0005	<0.0005	0.0054	0.3
エチルエストラジオール(LC/MS法)	14	0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	0.5
4-tert-オクチルフェノール	1166	0.1	<0.1	<0.1	0.8	0.0006
ノニルフェノール	1166	0.1	<0.1	<0.1	3.3	0.001
4-n-オクチルフェノール	918	0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.00001
4-n-ヘンチルフェノール	34	0.01	<0.01	<0.01	0.03	0.0007
4-n-ヘキシルフェノール	34	0.01	<0.01	<0.01	0.01	0.0006
4-n-ヘプチルフェノール	34	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.00006
4-tert-ブチルフェノール	48	0.01	<0.01	<0.01	0.04	0.00002
2,4-ジクロロフェノール	34	0.01	<0.01	<0.01	0.07	-
ビスフェノールA	1166	0.01	<0.01	<0.01	1.7	0.00006
ベンゾ(a)ピレン	48	0.01	0.00	0.00	0.00	-
ベンゾフェノン	179	0.01	0.00	0.00	0.84	-
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	918	0.2	<0.2	<0.2	9.4	-
フタル酸ブチルベンジル	918	0.2	<0.2	<0.2	3.1	-
フタル酸ジエチル	34	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジプロピル	34	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジベンチル	34	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジヘキシル	34	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
フタル酸ジシクロヘキシル	34	0.2	<0.2	<0.2	<0.2	-
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	918	0.01	<0.01	<0.01	0.16	-
フタル酸ジ-n-ブチル	1149	0.2	<0.2	<0.2	1.3	-

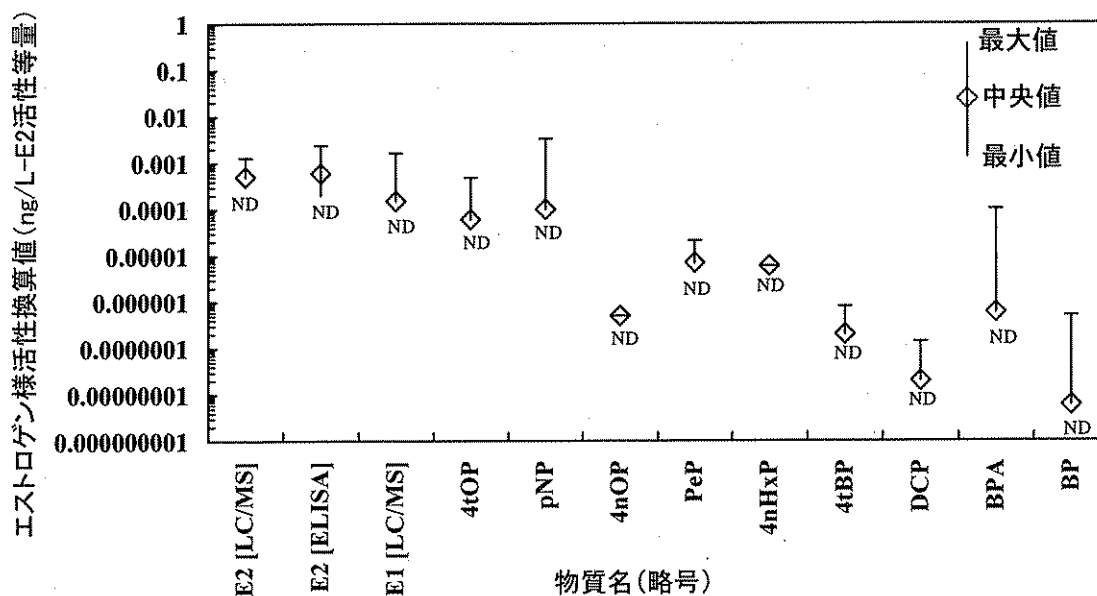


図5-6 流入下水中に含まれる各物質のエストロゲン様活性換算値

備考: 1) 図中の「ND」は、有効な活性値が得られなかったことを示す。
2) 4nOP及び4nHxPは、1検体のみ定量下限値と同値で検出された。

の物質の影響も考えられるが、遺伝子組換え酵母法と化学分析法の下限値に差があることも挙げられる。遺伝子組換え酵母法では検出下限値 0.1ng/L を設定しているが、例えば E2、E1 の検出下限値は 0.5ng/L であり、エストロゲン様活性と比較するため E2 換算量にした場合、E2 については 0.1~0.5ng/L、E1 については 0.1~0.15ng/L の値が化学分析では評価できていないことになる。(表 5-4 参照)

表 5-4 エストロゲン様物質およびエストロゲン様活性の検出状況 (平成 13 年)

エストロゲン様活性の検出濃度の範囲	地点数	機器分析			
		3物質のいずれかが検出	内訳		
			NP	E1	E2
定量下限値(0.20)以上	79	17	7	17	3
定量下限値(0.20)~検出下限値(0.08)	34	0	0	0	0
検出下限値(0.08)未満	2	0	0	0	0

そこで、遺伝子組み換え酵母法、化学分析ともに検出下限値を越えている 17 地点を抽出し、エストロゲン様活性の寄与物質とその寄与率を推定した。その結果、エストロゲン様活性の主要な寄与物質として E1 が占めるケースが多いことが確認された(図 5-7)。また、これら 3 物質の活性寄与量で説明のできないエストロゲン様活性は中央値ベースで見ると 28% であった。また調査地点によってはエストロゲン様活性の殆どが、これらの 3 物質では説明できない地点も確認された。

そこでこれらの説明のできないエストロゲン様活性の由来を推定するため、全国河川実態調査で測定を実施している 4-tert-オクチルフェノール、ビスフェノール A、フ

タル酸エステル類についても理論換算値を算出し、相加的に作用すると仮定した条件で寄与量を推定したが、これらの物質の検出頻度は低く、理論換算値も無視できるほど低い値であった。

5.6 結論

遺伝子組換え酵母法によって得られるエストロゲン様活性と化学分析結果の結果を比較し、複数のエストロゲン様物質の相加性を仮定し、以下の結論を得た。

- 1) 今回検討した遺伝子組換え酵母法を用いて全国一級河川のエストロゲン様活性の測定を行った。平成 11 年~13 年度の 3 カ年の実態調査により、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 活性等量であること、また、平成 11 年の結果から冬期においては、河川水のエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。
- 2) 全国一級河川 106 水系の 122 地点でエストロゲン様活性の一斉調査(秋期)を行いその活性レベルを把握するとともに、河川の環境基準類型毎のエストロゲン様活性の特性把握を行った。その結果、環境基準類型が C、D、E の水質汚濁が高い河川になるとエストロゲン様活性は高くなる傾向が見られ、A-B 類型間から B-C 類型間でのエストロゲン様活性値の差は確認できなかった。また A-C 類型については(t-検定、有意水準 1%)で有意な差が確認されたものの、顕著な違いがあるとまではいえなかった。
- 3) 化学分析によるエストロゲン様物質の結果と遺伝子組換え酵母法で得られるエストロゲン様活性の比較を行った。その結果、112 地点中 106 地点でエストロゲン様活性を検出したが、E1、E2、NP のいずれかが検出された地点は僅か 17 地点であり、多くの地点ではエストロゲン様活

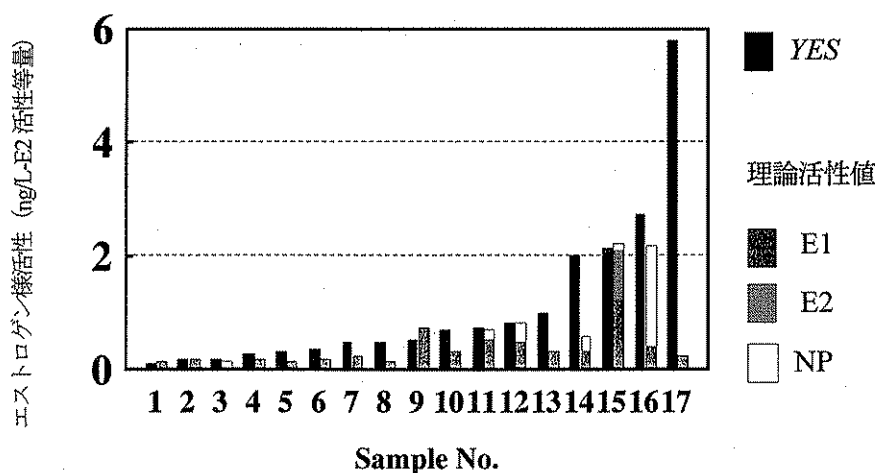


図 5-7 化学分析から算出された理論活性値と、エストロゲン用活性 (YES) の比較

性の由来が不明であった。またE1、E2、NPのいずれかが検出された17地点について、これらの物質のエストロゲン様活性への寄与を推定した結果、E1の占める割合が高いケースが多いことが確認された。また上記3物質でエストロゲン様活性が殆ど説明できる地点も見られたが、多くの調査地点ではこれらの3物質ではエストロゲン様活性を十分に説明できず、多くの河川水中に由来の特定できないエストロゲン様活性が存在することが確認された。

〈参考文献〉

- 1) 国土交通省河川局 河川環境課(2002) 平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果
http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha02/05/051212_.html.
- 2) 国土交通省河川局河川環境課(2001) 平成12年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について
http://www.mlit.go.jp/river/press/200107_12/010724b/010724.html

第6章 乖離の原因の追求

6.1 概要

4章及び5章において、下水及び河川水中にエストロゲン様活性が含まれることを明らかにした。さらに、環境中において主要なエストロゲン様活性への寄与物質として考えられる物質から算出した理論活性値では説明ができないエストロゲン様活性の存在を確認した。このため本章では、遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性と化学分析の結果を比較する手法の検討と、両者の結果が乖離している原因について検討を行った。

遺伝子組み換え酵母法と化学分析を比較する場合以下のような要因が考えられる。

- ① 化学分析では測定していない未知の物質が存在するため
- ② 複数のエストロゲン様物質が組み合わされることによる相乗/拮抗的な作用による影響
- ③ 夾雑物による測定系への影響

未知物質の存在とその寄与を解明するため、6.2章では極性の違いを利用した分画を、6.3章では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分画手法を検討した。

また 6.4 章～6.6 章では複数の物質が混在することによって起こる作用、いわゆる相互作用について検討を行った。6.4 章では標準物質間、6.5 章では極性分画試料間について検討を行い、6.6 章では河川試料への標準物質を添加した場合について検討を行った。なお、エストロゲン様活性の測定には Sumpter 株を用いた。

6.2 極性分画を用いたエストロゲン様活性の由来の推定

6.2.1 極性分画手法の検討

極性分画は中田らが行った検討結果¹⁾を参考に、シリカゲルカートリッジを用いて行った。すなわち、固相

抽出液を窒素気流下で乾固し、ヘキサン (Hex) : ジクロロメタン (DCM) = 1 : 1 溶液 1000 μ L に転溶した環境試料を、アセトン (Ace) 10ml/min, Hex : DCM = 1 : 1 溶液 10ml/min でコンディショニングを行ったシリカゲル固相カートリッジ (Sep-Pak-silica) に保持させた。これを Hex, DCM, Ace, メタノール (MeOH) の混和液各 10ml によって、順次溶出させ 9 画分 (F1～F9、図 6-1) を得た。これらの試料を窒素気流下で乾固した後、MeOH に転溶し、化学分析及び酵母法に供した。

6.2.2 化学分析

17 β -エストラジオール (E2) 及びエストロン (E1) の分析方法は小森らの方法²⁾に従い、LC/MS/MS を用いて分析を行った。ノニルフェノール (NP) 及びノニルフェノールエトキシレート類 (NPnEO) についても小森らの方法³⁾に従い、HPLC を用いて分析を行った。ノニルフェノールエトキシ酢酸類 (NPnEC) については八十島らの方法⁴⁾に従い、LC/MS/MS を用いて分析を行った。

6.2.3 結果および考察

1) 標準物質の極性分画

環境試料の分画に先立ち、化学分析における対象成分の、極性分画手法による分画位置の確認を行った (図 6-2)。NP は F2 に殆どが分画されたが、F3 でも僅かに検出された。またエストロゲン (E2、E1) や合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2) は F4 のみで検出された。また NPnEO や NPnEC は鎖長が多くなるにつれて極性の高い画分に溶出が確認され、NPnEO は F2～F7、NPnEC は F7～F9 で確認された。

2) 下水中のエストロゲン様活性の極性分画

4章で E1、E2、NP の理論活性値によって、酵母法で検出したエストロゲン様活性が説明できるケースとできないケースを示した。そこで本章では、これらの 3 物質では説明できないエストロゲン様活性の性状把握を目的とし、極性の違いを利用した分画方法により、下水に含まれるエストロゲン様活性の性状解明を行った。平成 14 年に実施した全国 23 処理場におけるエストロゲン様活性の極性分画の結果を図 6-3 に示す。

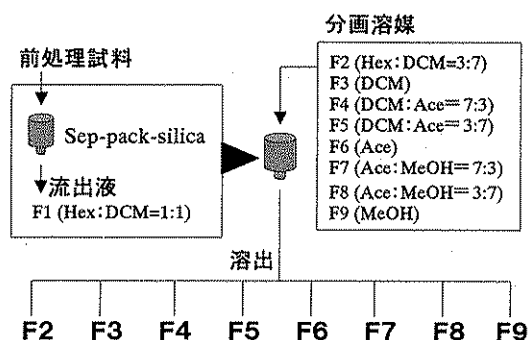


図6-1 固相カートリッジを用いた極性分画手法

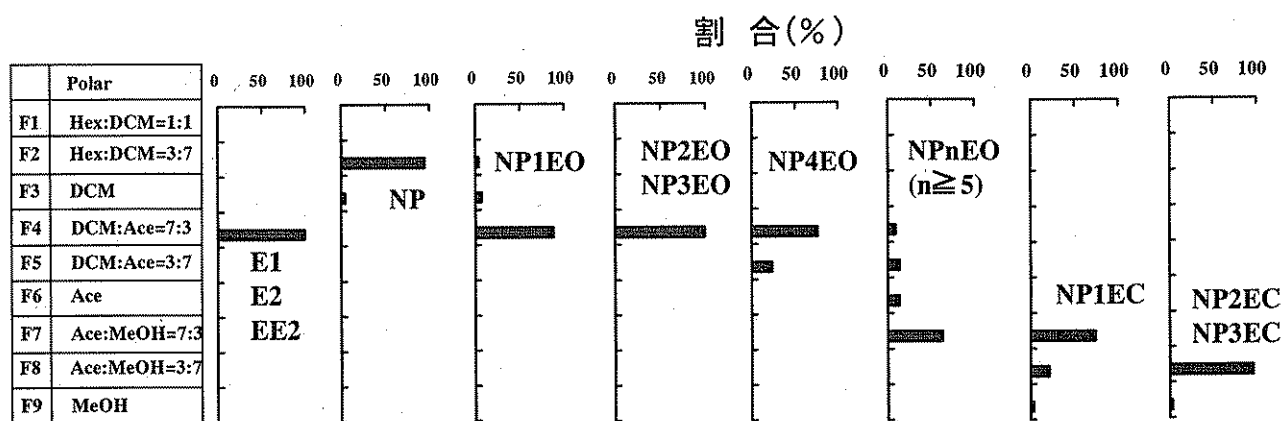


図6-2 固相カートリッジを用いた極性分画による化学物質の分画結果

流入下水におけるエストロゲン様活性は F2～F9 にかけて広く検出されたが、その殆どが F2～F4 で占められていた。また 2 次処理水は、F4 でほとんど説明できる結果となった。なお夾雑物の多い流入下水の方が分画操作に伴う回収率が低くなった。このため、流入下水と 2 次処理水のエストロゲン様活性値を直接比較することはでき

ないことに注意が必要である。また、これらの各画分のエストロゲン様活性と E1、E2 及び NP の寄与を推定したが（図 6-3）、F4 では E1 の理論活性値の寄与が高く、流入下水では E2 の理論活性値の寄与が大きい地点も確認された。E1、E2、NP で説明できないこれらの不明なエストロゲン様活性について検討するため、NP 関連物質である

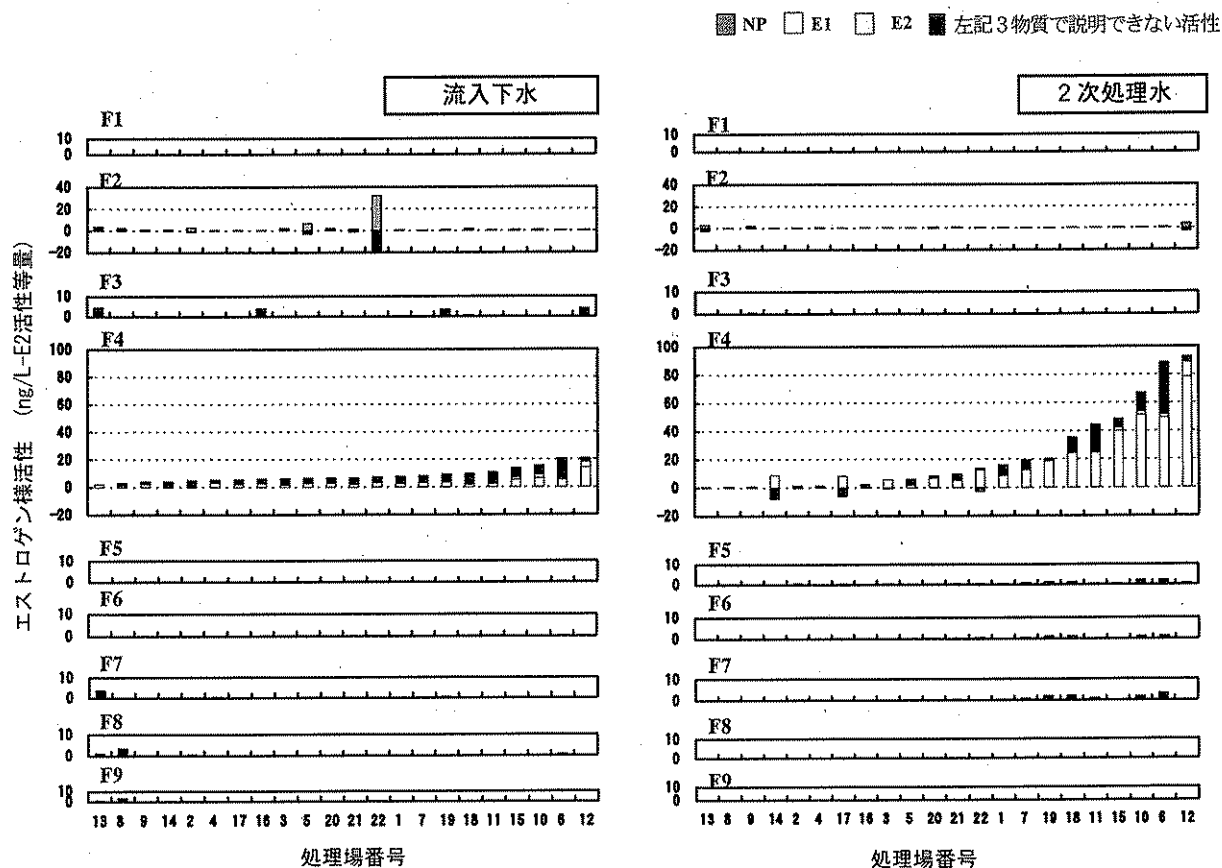


図 6-3 下水中のエストロゲン様活性の極性分画結果と各物質の寄与

NPnEO 及び NPnEC の比活性値について検討を行った。しかし、NPnEO、NPnEC のエストロゲン様活性は殆ど確認されず、これらの物質では不明なエストロゲン様活性を説明できなかった。

6.3 HPLC を用いた分画

6.3.1 分画手法の検討

環境試料中で検出されるエストロゲン様活性に対し、E1、E2、NP のエストロゲン様活性への寄与を極性分画以外の方法で明らかにするため、HPLC を用いた分画手法を検討した。今回検討を行った分画方法は、Giesy ら⁵⁾の手法を参考に、順相カラムと HPLC を組み合わせ、E1、E2、NP を大きく3つのグループに分画する条件を検討した(図6-4)。

分画の検討にはこれらの標準物質を使用し、個々の画分に分離可能かを確認した。

6.3.2 河川水及び下水処理水の HPLC 分画手法の適用

河川水及び下水処理場放流水 5L を 90mmφ の固相ディスク (Empore Disk; SDB-XC) を用いて抽出操作を行った。この抽出液を、図6-4に示した手法を用い、30%DCM、DCM 及び MeOH の順に連続的に溶出させ、3画分を得た。

未分画及び分画試料は、遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定、及び LC/MS/MS (E1 及び E2)²⁾、GC/MS (NP)⁶⁾ を用いた化学分析を行った。

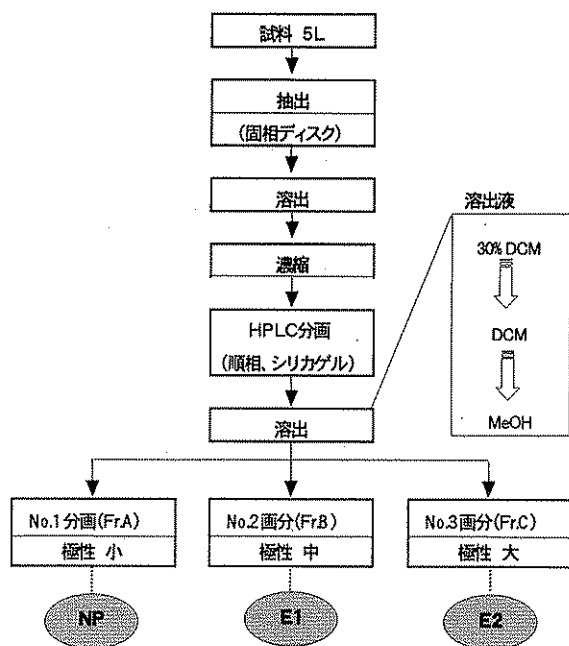


図6-4 試料の抽出及び分画操作フロー

6.3.3 結果及び考察

1) 標準物質を用いた分画手法の検討

標準物質とし E1、E2 及び NP を用いて分画操作を行った結果、それぞれ F2、F3 及び F1 の個々の画分に分離できることを確認した。

2) 実試料中のエストロゲン様活性及び理論活性値

実試料は、図6-5に示したように、下水処理場からの放流水を2地点を含め合計5地点から採水した試料を用いた。今回採水を行った河川は、一級河川の中流域にあたり、この上流域では下水処理場がなく、また水道水源として利用されており、良好な水質レベルを維持している。下水処理場A、Bとも活性汚泥法による処理を行っており、主として生活排水を処理している施設である。下流地点ではこれらの下水処理場放流水や支川の流入の他、排水路からの生活排水の流入も受けている。

未分画試料のエストロゲン様活性の測定と理論活性値の算出を行い、両者を比較した。その結果を図6-6に示すが、エストロゲン様活性については、上流地点及び支川で低く下水処理水及び下流地点でこれらの地点よりも高い値であった。また、理論活性値を算出した結果、今回主要物質として用いた3物質のうちE1の占める割合が高いことが確認された。しかし、エストロゲン様活性が理論活性値を大きく上回っており説明の出来ないエストロゲン様活性も多く存在していることが分かった。

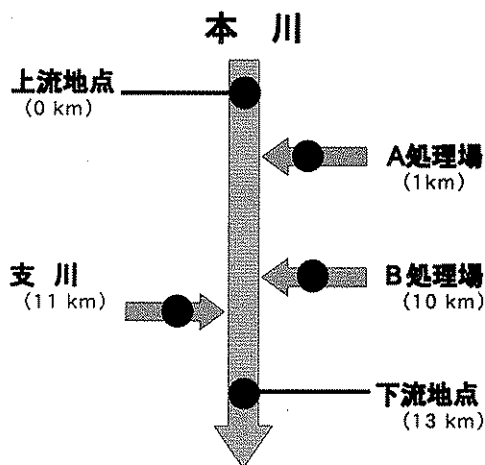


図6-5 試料採取地点の概要

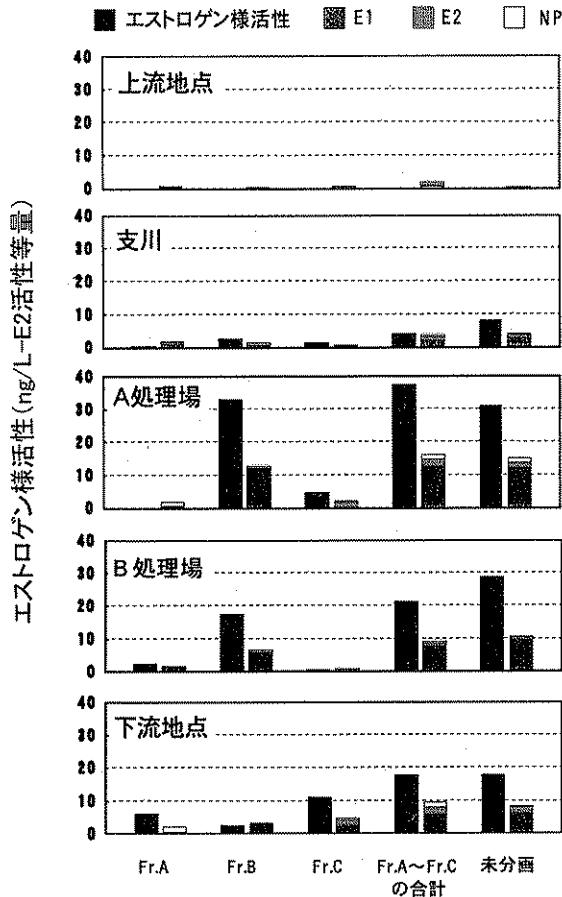


図6-6 HPLCによる分画結果

3) 分画試料中のエストロゲン様活性及び理論活性値

分画操作により、エストロゲン様活性は3つの画分に分離できたが、このうち下水処理場放流水のエストロゲン様活性はFr.Bにその多くが分画されていた。ただし、このうちFr.Bのエストロゲン様活性はその半量以上が理論活性値では説明できないエストロゲン様活性で占められていた。また、下水処理場放流水にはE1の他に、E1と類似した極性のエストロゲン様活性が多量に存在していることが示唆された。

4) 分画後のエストロゲン様活性の変化

理論活性値では説明の出来ないエストロゲン様活性が、分画前後でどのように変化しているかを確認するためエストロゲン様活性値と理論活性値の差を、図6-7のように、各試料、各画分ごとに表記した。

この結果、各画分に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値 (Fr.A~Fr.Cの合計値) と未分画の値には明瞭な差は見られなかった。このことは、説明の出来ないエストロゲン様活性を主要3物質のグループに分画しても、変化が見られなかったことを表している。仮に、試料中にこの3グループ間での相乗作用が存在していれば、各分画試料中に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値は未分画の値よりも低くなることが推定できる。しかし、今回の調査では分画の前後でこれらの活性値に明瞭な差が見られなかったことから、これらの3グループ間での相互作用が、説明の

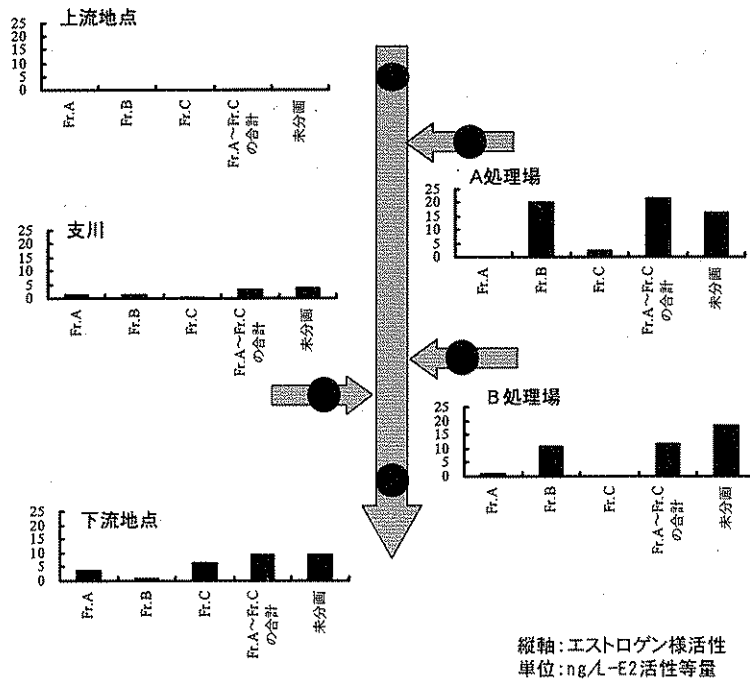


図6-7 遺伝子組み換え酵母法によるHPLC分画試料の測定結果

出来ないエストロゲン様活性を生じさせている可能性は小さいことが示唆された。

ただし、今回の検討に限られた試料に基づくため、今後多様な試料についても同様の調査を行い、データの収集を行う必要がある。また、下水処理水に存在していた説明の出来ないエストロゲン様活性の由来把握については、より詳細な分画を行い E1 とどの程度類似した性状のものが多量に存在しているかも把握する必要があると考えられる。

6.4 化学物質が混在することによる遺伝子組み換え酵母法への作用特性の確認

6.4.1 組み換え酵母法における濃度-反応曲線の定式化

遺伝子組み換え酵母法における各標準物質の濃度-反応曲線の定式化を行った。ここでは Scholze ら⁷⁾、Rajapakse らの報告⁸⁾を参考に、用量-反応モデルとしてよく利用されているロジスティックモデルに加えゴンベルツデル、ヒルモデルについて検討し、最も遺伝子組み換え酵母法の用量-反応曲線とフィッティングの良いものを検討した。

検討を行ったモデルの数式を表 6-1 に示す。回帰式の計算は Origin ver. 7 (Originlab 社製、評価版) を用いて行い、非線形最小二乗法によって算出した。

表 6-1 用量反応モデル

モデル	数式
ロジスティック	$y = \frac{1}{1 + e^{-k(x-x_c)}}$
ゴンベルツ	$y = ae^{-e^{-k(x-x_c)}}$
ヒル	$y = V_{\max} \frac{x^n}{k^n + x^n}$

ただし x は用量、k、a、 x_c 、 $V_{\max}$ 、n は係数

6.4.2 試験方法

1) 対象物質及び標準物質の調整濃度

各エストロゲン様物質、エストロゲンの比活性値⁹⁾¹⁰⁾と、環境省、国土交通省の調査結果^{4) 5)}や既往の文献¹¹⁾¹²⁾を考慮し、エストロゲン様物質の中から主要なエストロゲン様活性の寄与物質として E1、E2、NP を選択した。またこれらの標準物質の調整濃度は河川試料を固相抽出で濃

縮する際の濃縮率も考慮し、表 6-2 に示すような希釈系列を作成した。

表 6-2 標準物質の調整濃度

化学物質	濃度 (mg/L)					
E1	0	0.10	0.20	0.50	1.0	—
E2	0	0.025	0.05	0.10	0.25	—
NP	0	1.0	2.5	5.0	10	25

2) 標準物質間の複合作用確認試験

上記で作成した各標準物質の希釈系列について、各標準物質とも 100 μ L ずつ分取して混合し、これら 3 物質の希釈系列の全ての組み合わせ 150 通りについて試料調整を行った。またこれらの試料は試験時に滅菌蒸留水で 5 倍に希釈した後、遺伝子組み換え酵母法によって測定を行った。

3) 河川試料への標準物質添加試験

河川試料は茨城県内の一級河川から水質汚濁が確認される小河川の 5 地点を選び採取した。この河川試料を固相抽出により 2000 倍濃縮試料とし、この試料の一部を分取し、エストロゲン様活性の測定 (YES_{RP}) を行った。残りの濃縮試料については、表 6-2 に示した E1、E2、NP 標準物質の各希釈系列を河川試料に添加し、エストロゲン様活性の測定 (YES_{ADD}) を行った。またこれら標準物質の各希釈系列についても、エストロゲン様活性の測定 (YES_{SP}) を行い、河川試料に標準物質を添加した際に得られる標準物質のエストロゲン様活性 ($YES_{ADD}-YES_{RP}$) と比較した。

6.4.3 結果と考察

1) 化学物質が混在することによる遺伝子組み換え酵母法への応答特性の確認

用量-反応曲線の数量的な解析は様々なモデルが提唱されているが、一般的にはプロビットモデル、ロジスティックモデルが良く用いられる¹³⁾。また遺伝子組み換え酵母法で検討を行った例では、ゴンベルツモデルを用いた例が報告されている¹⁴⁾。ここでは表 6-1 に示す 3 モデルについて注目し、E2、E1、NP の各標準物質を用いて各モデルの適合性を検討した。その結果、どのモデルにおいても相関係数は 0.99 以上と良好な結果が得られた。またエストロゲン様活性値の変動係数を考慮すると有意な差ではないが、低濃度域でのフィッティングはゴンベルツモデルが最も良好であった。環境試料の多くが低濃度の試料であることも考慮し、ここではゴンベルツ式によって定式化を行うこととした。

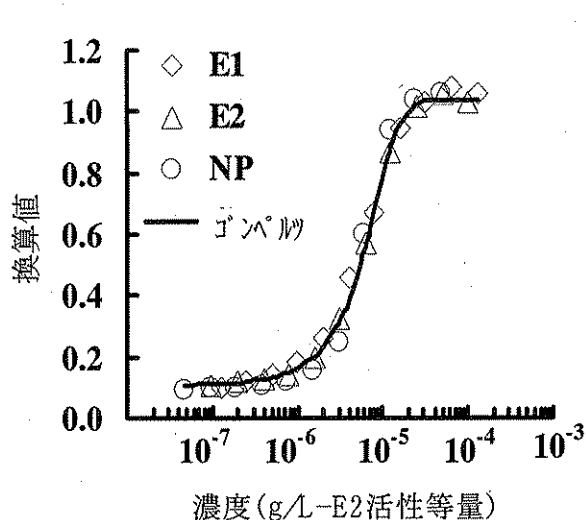


図6-8 各物質をE2換算濃度に換算した際のゴンペルツ曲線とのフィティング

またNP、E1の試料濃度に比活性値を乗じてE2換算値とした後、E2の測定結果から算出したゴンペルツ回帰式と比較した。その結果を図6-8に示すが、NPやE1についてもE2濃度に換算した場合、E2標準物質の回帰式によって表現が可能であることが確認された。これはE1、E2、NPを混合した場合、その複合的な作用が相加的であれば、各物質の理論換算値からゴンペルツ回帰式を表現できることを意味するものである。

そこで各物質のE2換算値の和を相加的理論活性値（A.T.E: Additive Theoretical Estrogen-like activity）と定義し、遺伝子組み換え酵母法を用いて測定した実測値（O.E: Observed Estrogen-like activity）と比較することによって相互作用の有無を検討した。サンプルは表6-2に示す希釈系列を用いて行い、すべての組み合わせ（150通り）について混合した試料について、相加的理論活性値と実測値の関係について検討した。その結果を図6-9、6-10に示すが、両者の間には概ね1:1の直線関係が確認されたことから、相加的な関係にあることが推測された。また詳細を見るとE1、E2濃度の最も高い希釈系列が含まれる試料は相加理論活性値に比べ、実測値の方が高くなる傾向が確認されたが、個々の測定結果の変動係数内であり、誤差との区別は困難であった。これらの結果から明瞭な相乗あるいは拮抗作用は確認できなかったため、3物質が含まれる試料の相互作用は相加的であり、理論活性値の総和で表現が妥当であるものと考えられた。

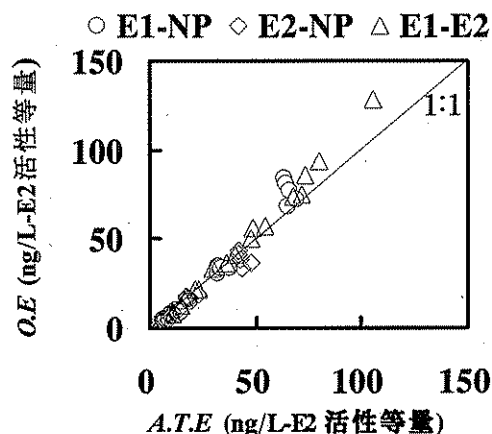


図6-9 標準物質2物質を混合して測定したエストロゲン様活性値（O.E）と理論換算値（A.T.E）の関係：（○）E1-NP、（◇）E2-NP、（△）E1-E2

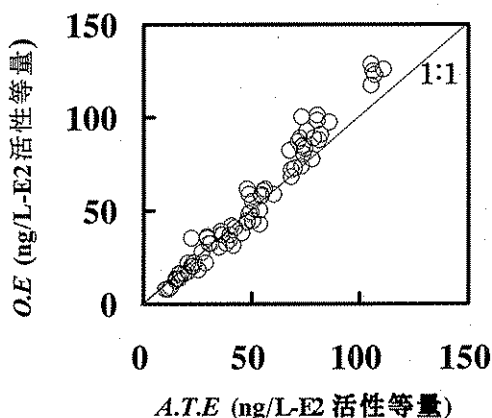


図6-10 標準物質3物質を混合して測定したエストロゲン様活性値（O.E）と理論換算値（A.T.E）の関係

6.4.4 極性分画試料間の相互作用の検討

6.4.3章では河川や下水で主要な構成要素となる3物質間について、その相互作用を相加的と評価した場合、過大（過小）評価を生じないことを確認した。しかしこれは環境中で検出される可能性のある全ての物質間で行った結果ではなく、これらの関係についても常に相加的な関係が成り立つかは不明である。しかしながらこれら全ての物質について、相互作用を把握することは不可能である。そこで極性分画を行った試料間における複合作用について検討することによって、複数の物質間の複合作用を検討した。試料は下水処理場への流入水を使用した。これらを先に（6.2章）示した極性分画方法によって分画し、F1～F9の9つの画分を得た。この分画試料を等

量ずつ混合し、全ての画分についての組み合わせ（36 通り）の試料を調製した。この試料を組み換え酵母法でエストロゲン様活性を分析した。また各画分の活性値の和を相加的理論活性値と定義し、両者を比較した。その結果を図 6-11 に示すが、F7 を加えた系では組み換え酵母法で測定した値の方が高くなる傾向が見られ、F6 を加えた系についても若干高くなる傾向が確認された。その他の組み合わせにおいては、概ね相加的理論活性値と測定値の間に有為な差は確認できなかった。また F7 は酵母に対して強い毒性が観察され、発泡性を有していることも確認されており、エストロゲン様物質以外に、酵母に対して毒性を与える物質が存在していると考えられた。

6.4.5 組み換え酵母法に及ぼす界面活性剤の影響

先に示したように F7 は他の分画と混合すると相乗的な作用を示すほか、発泡性と酵母毒性を有しているため、酵母毒性物質として界面活性剤に焦点を絞り検討を行った。界面活性剤の国内生産量を考慮し、陰イオン界面活性剤の代表物質として直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）を、非イオン界面活性剤の代表物質としてノニルフェノールエトキシレート類（NPnEO）を選び、これら

の標準物質について極性分画を行った。その結果、図 6-12 に示されるように、LAS 及び NPnEO（ $n=10$ ）が F6～F7 に含まれることが確認された。

このため、これらの両物質による影響を確認するため、標準物質（E2）20ng/L に界面活性剤（LAS、NPnEO）を濃度別に添加し、エストロゲン様活性の変化を調べた。その結果を図 6-13 に結果を示すが、NPnEO については、エストロゲン様活性に変化がなく、酵母測定系への影響は殆ど確認されなかったが、LAS については添加量の増加に伴いエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。LAS は流入下水では N.D～9.8mg/L 程度含まれていると報告¹⁰⁾されており、この報告を合わせて考えると LAS の共存下ではエストロゲン様活性は最大 2.5 倍程度高く見積もられる可能性が示唆された。LAS や NPnEO（ $n \geq 5$ ）はエストロゲン様活性がないため、酵母測定系への誤差要因として働いているものと考えられた。このため組み換え酵母法の測定にあたっては LAS が高濃度に存在している場合で、試料を高濃縮する場合、その分離除去が必要であり、分離方法について今後検討を行う必要があるものと考えられる。

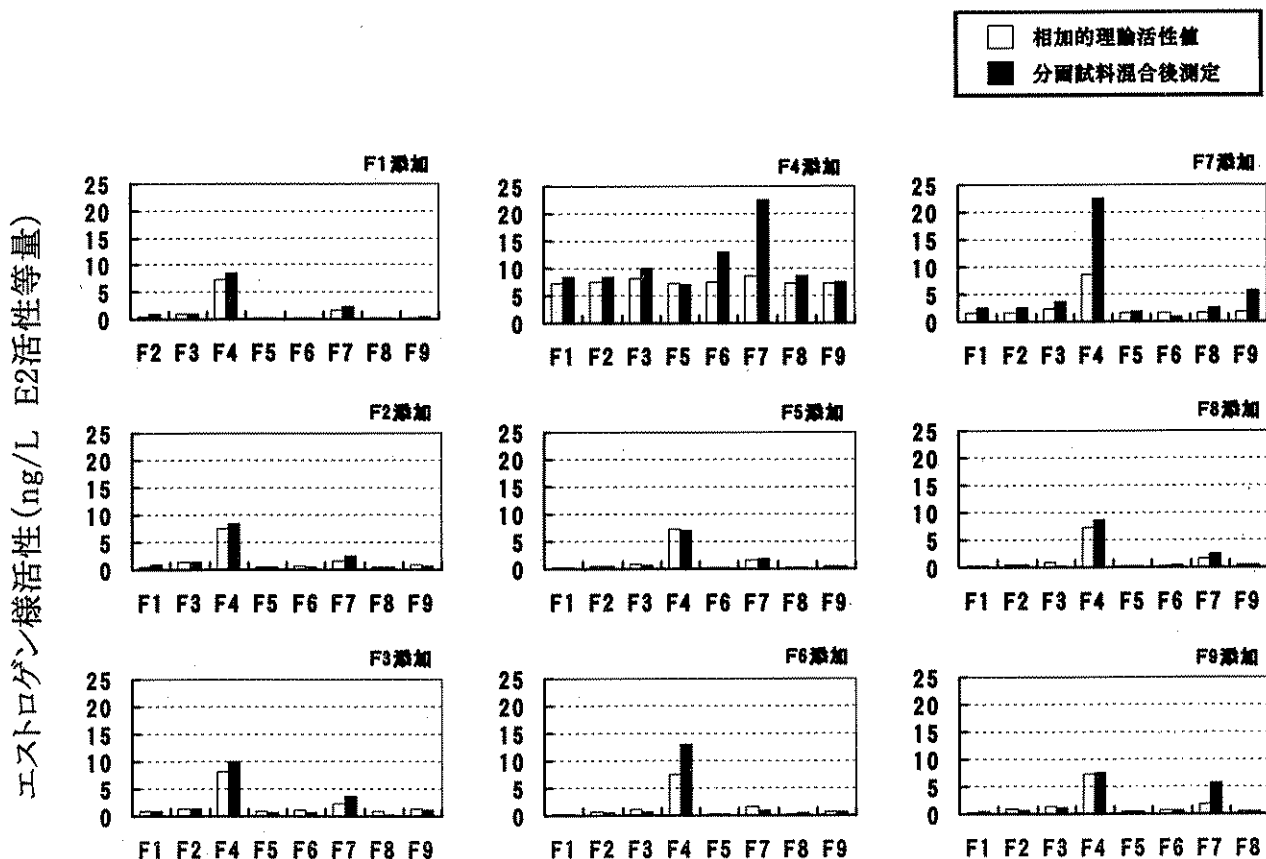


図6-11 各組み合わせにおける相加的理論活性値と分画試料を混合した後、測定した結果の比較

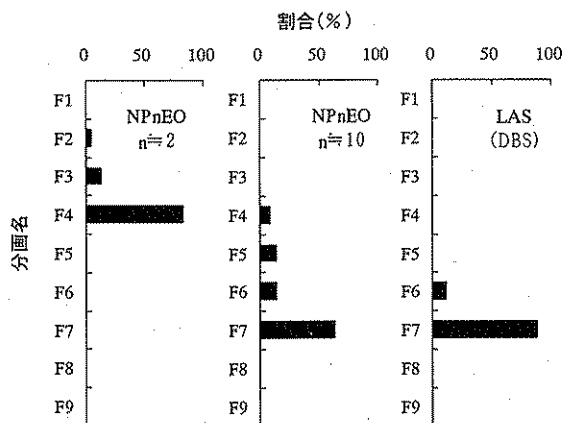


図 6-12 界面活性剤の極性分画結果

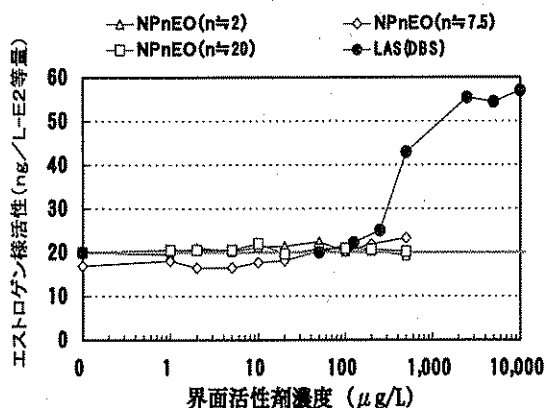


図 6-13 遺伝子組み換え酵母法における界面活性剤添加の影響

6.4.6 河川試料への標準物質添加試験

様々な物質が混在する環境試料水では、夾雑物の影響により標準物質の測定結果と比べ、変化が生じることも考えられる。そこで、河川水に標準物質を添加した場合と、蒸留水に標準物質を添加した場合の違いに着目して、河川水中に含まれる共存物質の影響について検討を行った。今回検討に用いた5河川のエストロゲン様活性は $<0.10 \sim 1.5$ ng/L-E2 活性等量であった。これらの各河川水に標準物質を添加した後、エストロゲン様活性の測定 (YES_{ADD}) を行い、各河川水のエストロゲン様活性 (YES_{RW}) を引いた値 ($YES_{ADD}-YES_{RW}$) と、各標準物質のエストロゲン様活性 (YES_{ST}) を比較した。その結果を図 6-14 に示すが、両者の間には 1:1 良好な相関が確認された。

また $YES_{ADD}-YES_{RW}$ と YES_{ST} の差は、NP を添加した一部の試料を除き $\pm 20\%$ 程度の範囲内であった。この一部の試料とは、NP の調整濃度が最も低い系列を添加した試料であり、遺伝子組み換え酵母法の定量下限値付近の添加

濃度であったことが大きな要因と考えられる。今回の結果からは、共存物質の存在によるエストロゲン様活性の変動は確認できなかったが、河川水中に存在する共存物質の影響としては、LAS による影響が確認されている。LAS はエストロゲン様活性を持たないことが知られており¹¹⁾、夾雑物として測定系に影響を与え、 0.2 mg/L 以上の濃度で過大に評価されることが確認されている。そこで LAS による影響を確認するため今回調査を行った試料について、MBAS の測定を行ったが、これらの試料の検出濃度はいずれも 0.1 mg/L 以下であり、LAS の影響は確認できなかった。このため今回の試験結果は、LAS 以外の共存物質のエストロゲン様活性への影響について検討を行った結果として理解できるが、今回の結果からは共存物質の影響は確認できなかった。

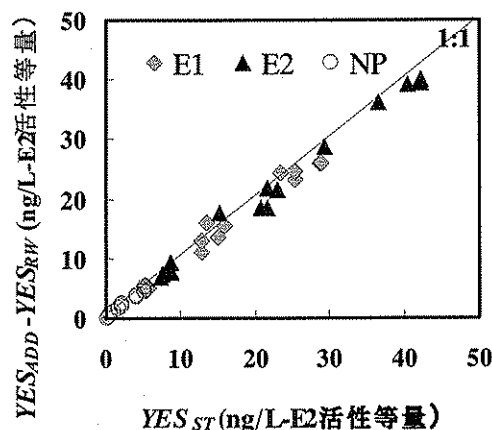


図6-14 YES_{ST} と $YES_{ADD}-YES_{RW}$ の関係
 YES_{ST} : 標準物質のエストロゲン様活性
 YES_{RW} : 河川試料のエストロゲン様活性
 YES_{ADD} : 河川試料に標準物質を加えた際のエストロゲン様化

6.5 結論

1) 極性分画手法を用いて下水中のエストロゲン様活性の由来について検討した結果、以下の結論を得た。

- ① 今回検討を行った手法は、NP やエストロゲンなどを分離することが可能な手法であることが確認された。
- ② 下水試料を分画した結果、エストロゲン様活性は低極性～高極性まで広く検出されたが、NP やエストロゲンが分画される F2 から F4 でほとんどを占めた。
- ③ 由来の不明なエストロゲン様活性は、流入下水については低極性から高極性まで広く検出されたが、2 次処理水については、ほとんどが F4 であり、この分

画の検討が、今後重要であることが確認された。

2) 下水処理水及び放流先河川について、HPLC を用いた分画を行い、以下の結論を得た。

- ① 今回検討した HPLC を用いた分画手法は、水環境中に存在する主要な 3 物質 (E1、E2 及び NP) を別々の画分に分画できる手法であることを確認できた。
- ② 河川水及び下水処理水を 3 つの主要成分の画分に分離した結果、下水処理水のエストロゲン様活性の多くが Fr. B (E1 が分離される画分) に分画された。しかし、この Fr. B には、理論活性値だけでは説明の出来ないエストロゲン様活性が多量に存在していることも確認できた。
- ③ 説明の出来ないエストロゲン様活性は下水処理水や下流地点に多く存在していたが、この活性値は分画の前後で顕著な変化を示さなかった。この結果から、今回分離した主要 3 分画の相互 (相乗) 作用の影響はほとんどないことが示唆された。

3) 化学物質が混在することによる遺伝子組み換え酵母法への作用特性の確認を行い以下の結論を得た。

- ① 遺伝子組み換え酵母法における用量反応曲線の定式化について検討した。その結果、今回検討した曲線はどれもフィッティングは良好であった。また環境試料の多くは低濃度域での評価となるため、低濃度でのフィッティングに着目した場合、ゴンベルツ曲線が最も良い結果であった。
- ② 河川および下水中で検出されるエストロゲン様活性の主要な寄与物質である、E1、E2、NP の相互作用を検討するため、これらの物質の混合試験を行い、遺伝子組み換え酵母法の応答特性を確認した。その結果、この 3 物質間では、相加的であり、相乗的、拮抗的になる傾向は確認できなかった。
- ③ 下水試料の分画試料間の相互的な作用について検討した。その結果、極性画分の F7 と組み合わせた試料は、相加的理論活性値より明らかに高い結果となり、相乗的な作用が確認された。
- ④ 極性画分の F7 は発泡性があり、強い酵母毒性があることから界面活性剤が原因していることが示唆された。このため、界面活性剤の添加の検討を行った結果、LAS 濃度の添加量を増やすとエストロゲン様活性が上昇する傾向が確認された。LAS はエストロゲン様活性を持たないため、測定系への妨害物質として作用していることが推察された。
- ⑤ 河川試料に標準物質を添加した場合の応答特性を検討し、河川水中に含まれる物質の相互作用を考

察した。その結果、両者の間には明瞭な違いは確認できず、今回の結果からは河川試料中に含まれる物質によるエストロゲン様活性への影響は確認できなかった。

〈参考文献〉

- 1) 中田典秀、磯部友彦、西山肇、奥田啓司、堤史薫、山田淳也、熊田英峰、高田秀重、環境試料中の内分泌攪乱化学物質の包括的分析、分析化学、Vol. 48 (6)、pp535-547 (1999)。
- 2) 小森行也 他、下水試料中のエストロゲンおよびノニルフェノキシ酢酸類の分析、土木技術資料、Vol. 43、No. 11、p44-49 (2001)
- 3) 小森行也 他、活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動、下水道研究発表会講演集、pp. 700-702 (1999)。
- 4) 八十島誠 他、下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析、第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集、p. 526 (2002)
- 5) Gissiy .et. al Anakytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures, Enviromental science and technology, Vol.33、pp2814-2820 (1999)。
- 6) 社団法人日本下水道協会編：下水試験方法 追補暫定版 (内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編)、(2002)。
- 7) Scholze M.、Boedeker W.、Faust M.、Backhaus T.、Altenburger R.、A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low effect concentrations. Enviromental Toxicology and Chemistry、Vol.20 (2)、pp. 448-457 (2001)。
- 8) Rajapakse N.、Ong D. and Kortenkamp A.、Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens、Toxicological sciences、vol60、96-304 (2001)
- 9) Routledge、E. J. and Sumpter、J. P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen、Enviromental Toxicology and Chemistry、15 (3)、241-248。
- 10) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明 (1999) 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、環境工学研究論文集、36、199-204。
- 11) 遺伝子組み換え酵母を用いた下水処理放流水中の内分泌系を攪乱する化学物質の推定、第 9 回環境化学

討論会講演要旨集、92-93.

- 12) Masunaga, S., Itazawa, T., Furuichi, T., Sunardi, Villeneuve, D. L., Kannan, K., Giesy, J. P., Nakanishi, J. (2000) Occurrence of estrogenic activity and estrogenic compounds in the Tama River, Japan. *Environmental Sciences*, 7 (2), 101-117.
- 13) 吉村功、大橋靖雄(1992) 毒性試験データの統計解析、地人書館
- 14) Nissanka Rajapakse, Delia Ong and Andreas Kortenkamp (2001) Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens, *Toxicological sciences*, 60, 296-304.
- 15) 日本水環境学会編、水環境と洗剤、p55.

第 7 章 結論および今後の課題

7.1 結論

本研究はエストロゲン様物質の包括的な評価手法である遺伝子組み換え酵母法の評価、環境水、下水への適用について検討した。また、下水・環境水中のエストロゲン様活性の実態を明らかにした。さらに、エストロゲン様物質の化学分析結果と遺伝子組み換え酵母法で得られるエストロゲン様活性を比較・検討した。本研究によって以下のことが明らかになった。

1) 下水・環境水の評価に適した遺伝子組み換え酵母法の評価

エストロゲン様活性の包括的な評価手法として遺伝子組み換え酵母法に着目し、異なる 3 種の株 (Sumpter 株、Two-hybrid 株、CIIT 株) を用いた試験法を検討し、下水・環境水への適用方法を改良するとともに、酵母株の違いによる特性を評価した。

その結果、 17β エストラジオール (E2) に対する感受性は、Two-hybrid 株が最も低く、最も感度の高い CIIT 株の 1/10 程度であった。また、エストロゲン様活性が報告されている 13 標準物質の測定値の間には正の相関が確認されたが、Two-hybrid 株は他の 2 株が検出した 4-n-オクチルフェノールの活性を検出できなかったが、Two-hybrid 株は合成ホルモンには高い比活性を示した。これらのことから酵母株の違いによって標準物質に対する活性値に違いがあることが確認された。

下水試料を測定した際、Two-Hybrid 株や CIIT 株は酵母毒性によって測定できない場合があったが、Sumpter 株では全ての下水試料の測定が可能であった。このことから下水・環境水を併せて評価するには Sumpter 株が有利であると考えられた。

2) 下水及び下水処理水中のエストロゲン様活性の実態とその寄与物質の解明

下水中のエストロゲン様活性の濃度レベルを把握するとともに、下水処理工程におけるエストロゲン様活性の消長を明らかにした。

その結果、処理工程における変化に着目した場合、反応槽でエストロゲン様活性の大幅な減少が確認され、この傾向は国土交通省とともに土木研究所が行ったエストロゲン様物質の調査結果とも一致した。またエストロゲン様活性の減少率は中央値ベースで 76% であり、個々のエストロゲン様物質の減少率に比べると低い値であった。

また、全国の流入下水中のエストロゲン様活性の中央値は 67ng/L-E2 活性等量であり、30~110ng/L-E2 活性等量に全体の 7 割が含まれる分布であった。2 次処理水は非常に広い濃度分布を示し、処理方法や運転条件などの要因によって減少率が大きく変化していることが示唆された。またエストロゲン様活性を主要なエストロゲン様物質の理論活性値と比較した場合、流入下水では E2、エストロン (E1) の寄与が大きく、ノニルフェノール (NP) も大きくなる場合があること、2 次処理水では E1 の寄与が大きいことが確認された。しかし、E1、E2、NP では説明できない不明なエストロゲン様活性が多く、下水試料に存在していることが明らかになった。

3) 河川水中のエストロゲン様活性の実態とその寄与物質の解明

全国の一級河川 94 水系の 112 地点でエストロゲン様活性の実態調査を行った。その結果、112 地点中 132 地点でエストロゲン様活性を検出し、その平均値は 0.8ng/L-E2 活性等量であった。また、環境基準類型が下がるに伴いエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。

河川水中で見られるエストロゲン様活性への E1、E2、NP の寄与を推定した結果、E1、E2、NP のいずれかが検出された地点は 17 地点のみであり、多くの地点ではエストロゲン様活性の由来が不明であった。また E1、E2、NP のいずれかが検出された 17 地点について、エストロゲン様活性へのこれらの物質の寄与を推定した結果、E1 の占める割合が高いケースが多く確認された。しかし、多くの調査地点ではこれらの 3 物質ではエストロゲン様活性を十分に説明できず、河川水中に由来の特定できないエストロゲン様物質が存在することが確認された。

4) 化学物質間の相互作用についての検討

遺伝子組み換え酵母法によって得られるエストロゲン様活性と化学分析による理論的エストロゲン様活性値の乖離を検討するため、E1、E2、NP の相互作用について整理した。その結果、下水、下水処理水、そして河川水中で測定された濃度範囲では、E1、E2、NP の作用は概ね相加的であった。このことから、これらの混合液のエストロゲン様活性は個々の物質の理論換算値の総和となることが確認された。

河川試料に標準物質を添加し、河川水中に存在する物質による影響について試験を行った。その結果、E1、

E2、NP の 3 物質については相加的であり、エストロゲン様活性への相乗作用や拮抗作用は確認されなかった。しかし、下水試料では、分画試料を再度混合した試験から、特定の画分を添加した場合、エストロゲン様活性が非常に高くなる傾向が確認された。原因物質として、陰イオン界面活性剤の 1 つである LAS であることが示唆された。しかし、LAS はエストロゲン様活性を有さないため、酵母法の測定系に対し、夾雑物として正の誤差を与えていることが示唆された。

5) 乖離要因の追求と不明なエストロゲン様活性の性状把握

下水・環境水試料に含まれる不明なエストロゲン様活性の性状の把握を行うため、シリカゲル固相カートリッジを用いた極性分画と HPLC を用いた分画について検討を行った。

極性分画では、下水試料を対象とし、全国 22 処理場の試料について極性分画を実施した。その結果、エストロゲン様活性は低極性から高極性の画分にかけて広く検出されたが、NP やエストロゲン類が分画される F2～F4 にほぼすべての活性が含まれていることが明らかになった。この傾向は流入下水、2 次処理水に共通した傾向であったが、2 次処理水はエストロゲンが分画される F4 にほぼすべての活性が存在することが明らかになった。

HPLC を用いた分画では、下水処理水とその放流先河川に存在する主要な 3 物質（E1、E2 及び NP）を個々のグループに分画し、河川水及び下水処理水を 3 つの主要成分の画分に分画した。その結果、下水処理水のエストロゲン様活性の多くが、E1 の存在する画分に分画された。この画分には E1 の理論活性値だけでは説明の出来ないエストロゲン様活性が多量に存在していることも確認できた。

これら 2 つの分画方法の結果から、エストロゲン以外にもエストロゲンに非常に類似した化学的性状をもつ未知物質が、試料中で検出されるエストロゲン様活性に大きく寄与していることが明らかになった。

7.2 今後の課題

これまでの調査から下水中、環境水中に含まれているエストロゲン様活性の実態が明らかとなった。その結果、以下のような課題について今後検討していく必要があると考えられる。

1) 不明なエストロゲン様活性の由来追求

今回報告した結果では、多くの下水、河川水中に由来の不明なエストロゲン様活性が含まれていることを報告した。この物質が測定を行っていない、例えばエストリオール、エストロゲン抱合体、植物エストロゲンなのか、あるいは分解生成物や消毒生成物などの非意図的物質に由来するのか、それとも、エストロゲン様作用が低く検出頻度の高い物質との相互作用によるものかを明らかにし、下水、環境水から検出されるエストロゲン様活性の由来を追求していく必要がある。

また本研究では試験管系（*in vitro*）の試験系を中心に検討したが、魚類の雌雄化に関する評価を行う上では、生体を利用した試験（*in vivo*）も必要である。不明なエストロゲン様活性についても、今後の遺伝子組換え酵母法と化学分析から評価、同定された物質を、*in vivo* 系で評価を行っていく必要があるものと考えられる。

2) エストロゲン様活性の下水道と河川における挙動の把握

エストロゲンは生活系、畜産系を中心として排出されていることが推測される。下水処理場内でのエストロゲンの挙動を詳細に調べることは、これからの削減対策に不可欠である。また、下水道の普及によって下水処理水が河川流量の大半を占める場合もあり、河川水よりもエストロゲン様活性が高い下水処理水の排出が無視できない場合もあると考えられる。また、河川ではエストロゲン様物質が流下に伴い沈殿や分解をしており、これら排出源との関係を議論する上では、河川内での挙動についても十分な情報を得ていく必要があるものと考えられる。これは、水以外にも魚類等の生態系への餌や底質を通じた暴露を考慮するためにも必要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、水循環グループ水質チーム小森行也主任研究員、八十島誠交流研究員には貴重な分析データを頂いた。ここに感謝の意を表する。