

表5. 1 DMSO 濃度のエストロゲン様

活性に及ぼす影響

DMSO 濃度 (最終濃度%)	エストロゲン様 活性 (units)
1.0	143.9
2.0	121.2
3.0	75.9
5.0	51.2
10.0	32.9

(但し、Bisphenol A  $10^{-4}$ M を含む)

表5. 2 フェノール類のエストロゲン様活性

被験化学物質名	評価 (units (concentration))	
Phenol	Negative	
4-tert-Butylphenol	Positive	95.5 ( $1 \times 10^{-4}$ M)
4-sec-Butylphenol	Positive	374.4 ( $3 \times 10^{-4}$ M)
3-tert-Butylphenol	Negative	
2-tert-Butylphenol	Negative	
2-sec-Butylphenol	Negative	
4-Pentylphenol	Positive	126.2 ( $1 \times 10^{-5}$ M)
4-tert-Octylphenol	Positive	169.8 ( $1 \times 10^{-5}$ M)
4-n-Octylphenol	Negative	
4-n-Nonylphenol	Negative	
Bisphenol A	Positive	164.4 ( $1 \times 10^{-5}$ M)
17- $\beta$ -Estradiol	(Positive)	548.2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)

表5. 3 Bisphenol A の塩素処理後における残存量

(高速液体クロマトグラフ法)

Concentration of NaClO(mg/L)	Area	Recovery (%)
0	27921	100
5	28234	101
10	28092	101
25	16900	60.5
50	10911	39.1

表5. 4 Bisphenol A の塩素処理後のエストロゲン様活性

	エストロゲン 様活性	Bisphenol 残存量
2.2x10 <sup>-5</sup> M Bisphenol A 未処理	0.123 (100%)	100%
2.2x10 <sup>-5</sup> M Bisphenol A 50mg/l NaClO, 1h, 処理	0.215 (175%)	39.1%

表5. 5 水道水および水道原水のエストロゲン様活性の評価

	溶媒対照-1	溶媒対照-2	Milli-Q 水-1
100 倍濃度	0.0	0.0	0.0
10 倍濃度	0.0	0.0	0.0
1 倍濃度	0.0	0.0	0.0
0.1 倍濃度	0.0	0.0	0.0
0.01 倍濃度	0.0	0.0	0.5
0.001 倍濃度	0.0	0.0	0.5
17-β-estradiol	100	100	100

	水道水-1	水道水-2	河川水	河川水塩素処理
100 倍濃度	0.0	0.0	62.1	62.9
10 倍濃度	0.0	0.0	80.2	81.4
1 倍濃度	0.0	0.0	23.1	58.2
0.1 倍濃度	0.6	0.0	0.0	0.0
0.01 倍濃度	0.0	0.0	0.0	0.0
0.001 倍濃度	0.0	0.0	0.0	0.0
17-β-estradiol	100	100	100	100

(10<sup>-8</sup> M 17-β-エストラジオールの活性に対する割合 (%))

## 5.1.2. 浄水システムにおけるエストロゲン活性の挙動

### 1. 研究目的

内分泌攪乱物質のなかでもエストロゲン様物質について、上水道水源となる河川水や浄水過程におけるエストロゲン活性の発現要因を明らかにすることを目的とした。さらに、環境水におけるエストロゲン活性発現の要因と機構を理解するためにエストロゲン活性と他の毒性発現との関連（今回は発がん性との関連）及び河川水のように内分泌攪乱物質が複合系で存在する場合におけるエストロゲン活性の発現機構を理解するために、モデル水（今回は2成分共存系）を調整し、内分泌攪乱物質が単独系で存在する場合と他の内分泌攪乱物質（あるいは非内分泌攪乱物質）が共存する場合に於いて、内分泌攪乱性がどのように異なるか、を明らかにすることも目的とした。また微小な化学構造の差がエストロゲン活性に及ぼす影響についても検討を行った。

### 2. 実験方法

《エストロゲン活性の測定》測定には西原、西川が開発した酵母 Two-hybrid 法を用いた。酵母 Two-hybrid 法は蛋白質-蛋白質間相互作用を調べるために開発された方法であるが、これを核内レプターと転写共役因子のリガンド依存的な相互作用の検出に応用したものである。酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域 (GAL4 DBD) および転写活性化領域 (GAL4 AD) に相互作用を調べたい蛋白質を繋ぎ、もし蛋白質が相互作用すれば、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子が発現するという原理に基づいている。今回用いた酵母は GAL4 DBD に  $ER\alpha$  を繋ぎ、マウスのエストロゲンレプターのリガンド結合領域 (ER LBD) を、GAL4 AD に共役転写因子 (Co-activator) として TIF2 遺伝子を繋いだものを酵母 Y190 に遺伝子導入したものである。その仕組みを図-5.1.2.1 に示す。

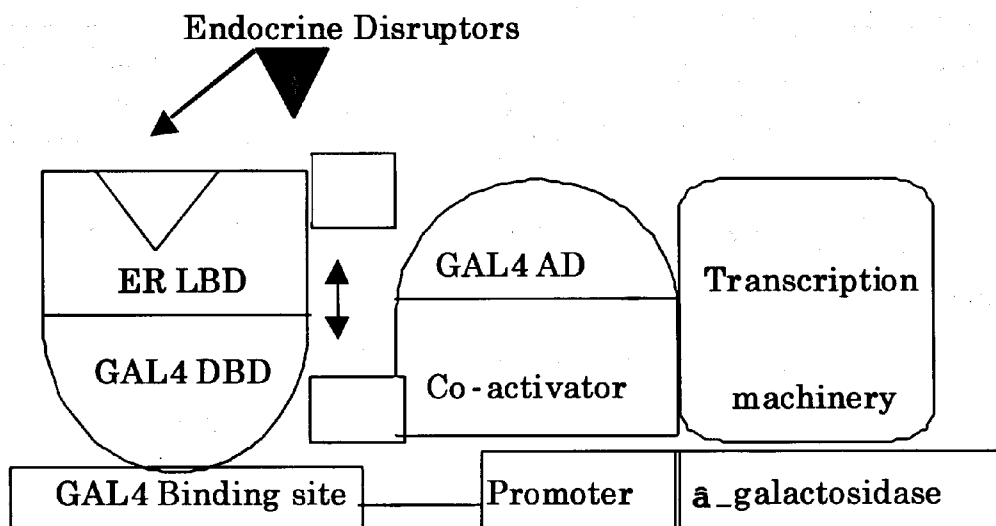


図-5.1.2.1 酵母 Two-hybrid 法の原理

上述のように形質転換した酵母を 1ml の SD(-Trp, -Leu)medium に植菌した後、30℃で一晩 (18 時間) 培養し、これを前培養液とした。前培養液 (= v) 50 μl を 200 μl の SD(-Trp, -Leu)medium に加えた後、試験物質を 25 μl 添加した。これを試料濃度とする。さらに 30℃で 4 時間培養した後、150 μl の培養液を 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで 595nm の吸光度を測定した。これを OD<sub>595</sub> とする。残りの培養液 100 μl を 4℃、15000rpm で 5 分間遠心分離した後、上澄液をマイクロペットでとり、残った沈殿に 200 μl の 1mg/ml Zymolyase 20T を含む Z-buffer を加え、懸濁した後、37℃で 15 分間静置した。これに 4mg/ml ONPG solution を 40 μl 加え、攪拌した後、30℃で反応を開始し、適度に着色した時点で、100 μl 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution を加え、反応を停止させ、反応時間 (= t) を記録した。これを 4℃、15000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄 150 μl を 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで 420nm と 570nm の吸光度を測定した。これらをそれぞれ OD<sub>420</sub>、OD<sub>570</sub> とする。これらの得られた値を下記の式に代入し β-galactosidase 活性 (U) を算出し、これをエストロゲン活性とした。

$$U = 1000 \times [(OD_{420}) - (1.75 \times OD_{570})] / [(t) \times (v) \times (OD_{595})]$$

t = time of reaction (min)、v = volume of preculture used in assay (ml)

なお、Positive Control として測定毎に 17-βEstradiol のエストロゲン活性を求めた。

《濃縮方法》河川水、下水放流水などの試料水はあらかじめガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/B) により粗懸濁質を分離後 Sep Pak C<sub>18</sub> を用いて 5000 倍濃縮した。これを 6 段階に希釈してエストロゲン活性の測定用サンプルとした。

《凝集処理》凝集剤として硫酸アルミニウムを限界凝集 (最大除去率) に至るまで添加した試料水を凝集処理水として用いた。

《塩素処理》塩素添加は凝集ろ過後、添加率 1.4、4.9mg/L で添加直後に濃縮するものと 20 時間接触させてから濃縮するものとを比較した。

### 3. 実験結果と考察

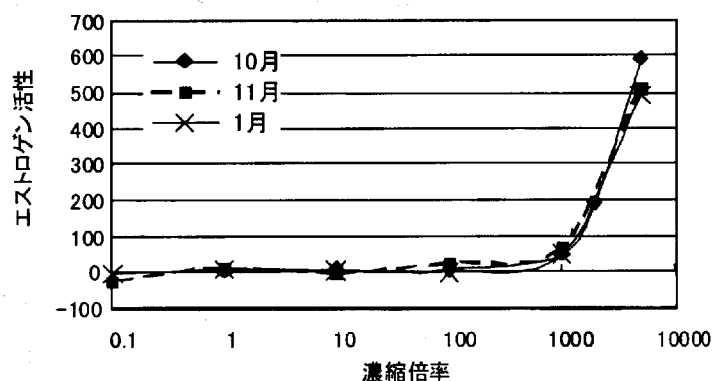


図-5.1.2.2 浄水場原水におけるエストロゲン活性

《原水（河川水）》図-5.1.2.2 に示すように農業排水からの負荷のない厳冬期に於いても秋季に採水した原水とほぼ同程度のエストロゲン活性がみられた。この河川水のE260(1cmを用いたUV260nmの吸光度)がほぼ0.08で、E220/E260(UV220とUV260nmの比)が5程度であることから、この河川には下水放流水が10%程度混入していると推測され、かつこの河川水のエストロゲン活性は季節変動が見られなかったことからエストロゲン活性の原因物質は季節変動によらない下水処理場由来(図-5.1.2.3)のニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸エステル類、17β-エストラジオール(E<sub>2</sub>)等が考えられる。しかしながら、非イオン界面活性剤の一種であるアルキルフェノールエトキシレート(APE)の生物代謝産物であるニルフェノールのような様々なタイプのアルキルフェノール(AP)類の濃度は高々2~3μg/L以下であり、後述する図-5.1.2.10に示すように200~300程度のエストロゲン活性を示す為には1~2mg/L程度のアルキルフェノール(AP)類の濃度を必要とするので河川水のエストロゲン活性に寄与するニルフェノールのような様々なタイプのアルキルフェノール(AP)類の役割は小さいものと考えられる。

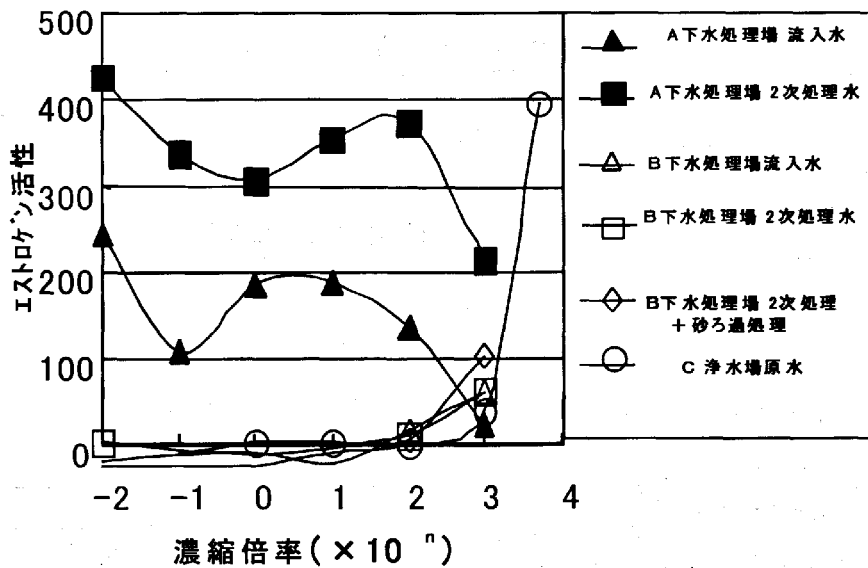
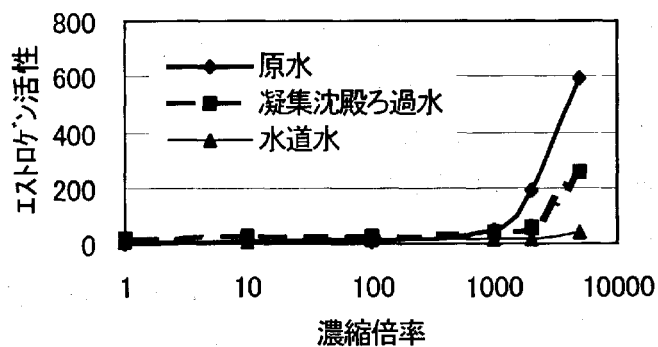


図-5.1.2.3 環境水のエストロゲン活性

浄水場における調査結果は図-5.1.2.4に示すように凝集沈殿ろ過処理のみでは完全に除去し得なかったエストロゲン活性成分が塩素処理により除去されている。



《室内における凝集、塩素処理実験》

図-5.1.2.4 浄水場におけるエストロゲン活性の変化

図-5.1.2.5に示すように、実験室における凝集処理実験によってもエストロゲン活性成分は残存しエストロゲン活性の原因物質は凝集処理では十分に除去されない低分子成分であることを示している。また図-5.1.2.6に示すように塩素添加直後ではエストロゲン活性は低減せず、20時間接触後ではエストロゲン活性がなくなることからエストロゲン活性の原因物質は遊離塩素により徐々に酸化分解すると考えられる。凝集によって十分にはエストロゲン活性が除去されなかったのはエストロゲン様物質が低分子量のもので、塩素添加によってエストロゲン様物質がゆっくりと反応し不活性化すると考えられる。

また実験室内で得られた結果は浄水場で得られた結果を再現している。

《2成分共存系における内分泌攪乱物質のエストロゲン活性》  
 内分泌攪乱物質が単独系で存在する場合と他の内分泌攪乱物質（あるいは非内分泌攪乱物質）が共存する場合に於いて、内分泌攪乱性がどのように異なるかを検討した結果の一例は図-5.1.2.7のようである。

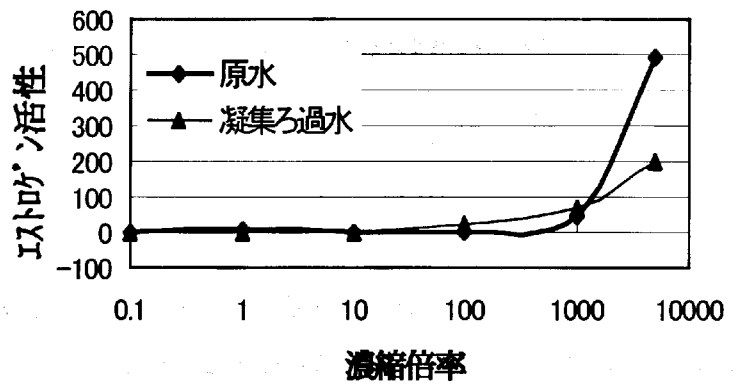


図-5.1.2.5 凝集処理によるエストロゲン活性の変化

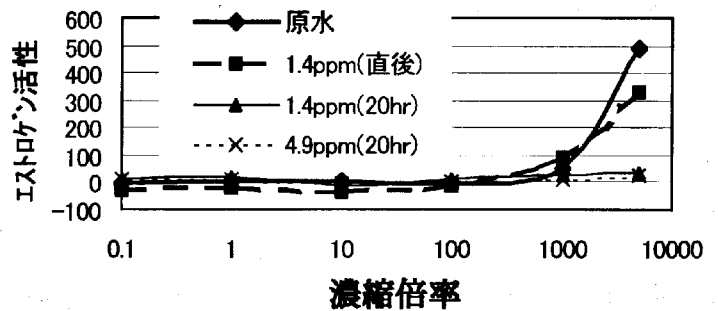


図-5.1.2.6 塩素処理によるエストロゲン活性の変化

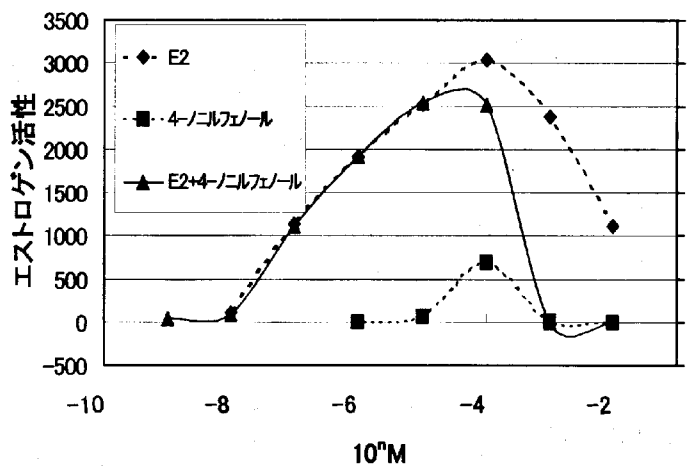


図-5.1.2.7 2成分系におけるエストロゲン活性の変化

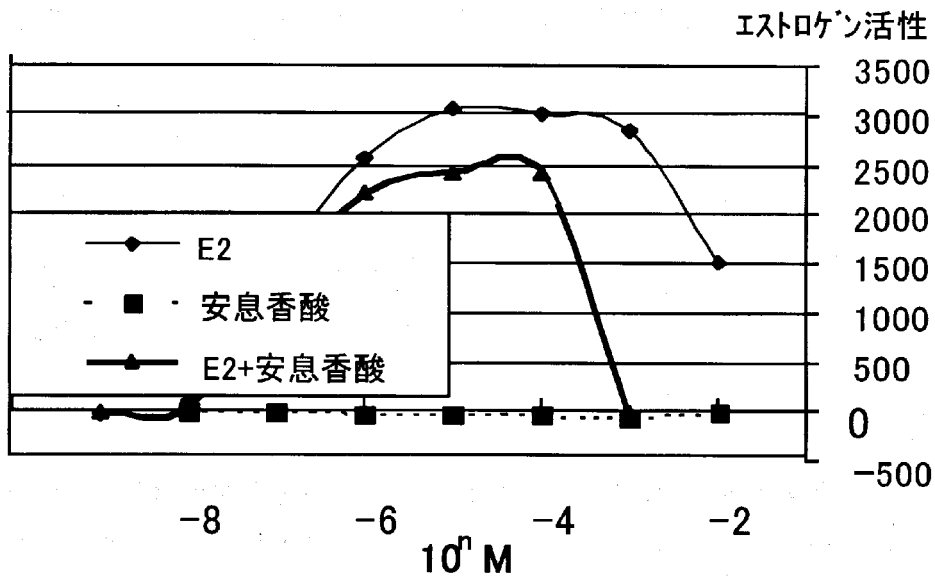


図-5.1.2.8 非エストロゲン活性成分がエストロゲン活性成分に与える影響(E2+安息香酸=:1:1)

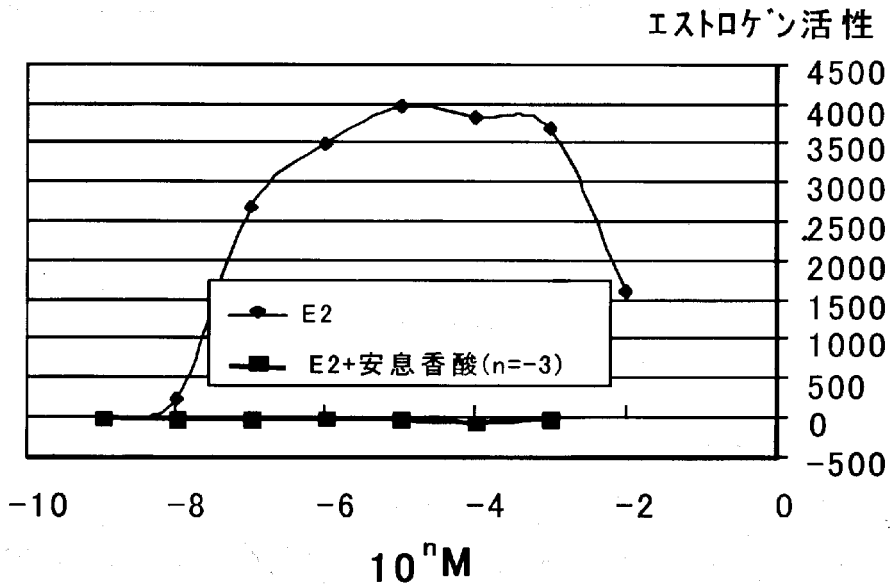


図-5.1.2.9 非エストロゲン成分による E2 のエストロゲン発現の抑制

エストロゲン活性の最大値よりも高濃度側でエストロゲン活性が著しく低下する一方、低濃度側では相乗効果のみならず、相加効果も認められない。

このことは複合系の環境水のエストロゲン活性を低下させるためには一部のエストロゲン活性成分を除去しても効果は低く、全てのエストロゲン活性成分を除去する必要があることを示唆しているものと考えられる。

《2成分共存系における非内分泌攪乱物質のエストロゲン活性》

非内分泌攪乱物質が単独系で存在する場合と他の内分泌攪乱物質が共存する場合に於いて、内分泌攪乱性がどのように異なるかを検討した結果の一例は図-5.1.2.8 及び図-5.1.2.9 のようである。17β-エストラジオール (E<sub>2</sub>) のエストロゲン活性は (E<sub>2</sub>) が存在するにもかかわらず見かけ上エストロゲン活性は認められないことになる。

《エストロゲン活性と他の毒性発現との関連 (今回は発がん性との関連)》

今回検討を行った6種類の化合物 (Aflatoxin B<sub>1</sub>, 1,2Benzanthracene, 1,2,5,6Dibenzanthracene, 1,8-Dinitropyrene, 2-Nitrofluorene, PhIP) に関する限りでは PhIP が 10<sup>-6</sup>M のとき 80 程度のエストロゲン活性を示したのが最大で (このときの E<sub>2</sub> のエストロゲン活性値は 3800) 内分泌攪乱性と発がん性との関連は認められなかった。

《微小な化学構造の差がエストロゲン活性に及ぼす影響》

微小な化学構造の差がエストロゲン活性に及ぼす影響を検討するために非イオン界面活性剤の一種であるアルキルフェノールエトキシレート (APE) の生物代謝産物である様々なタイプのアルキルフェノール (AP) のエストロゲン活性を検討した結果を図-5.1.2.10 に示す。エチレンオキシド (EO) 鎖の数が 2 程度 (n≒2) の NPEO (n≒2) のエストロゲン活性はエチレンオキシド (EO) 鎖の数が 10 程度 (n≒10) の NPEO (n≒10) のエストロゲン活性と比較しても顕著な差は認められず、基本構造が同一で分子量が若干異なる程度の化合物類のエストロゲン活性はほぼ同様なものと考えられる。しかしながら、アルキル鎖が分岐型を含む 4-NP のエストロゲン活性が比較的強い一方、アルキル鎖が直鎖型の 4-n-NP の場合には、エストロゲン活性がほとんど認められず、分子量がほぼ同一であっても、エストロゲン活性は側鎖の若干の違いにより大きく異なる場合があることを示している。

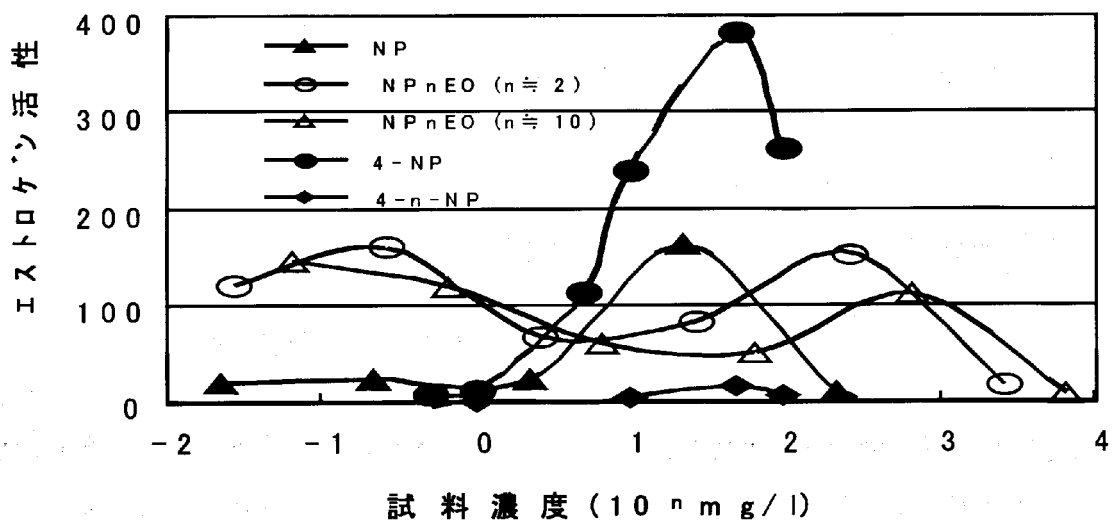


図-5.1.2.10 化合物の微小な化学構造の差がエストロゲン活性に及ぼす影響



#### 4. まとめ

現在まだ確定的な結論を述べる状況ではないので、以下に述べるような事項の確認を継続して行う。

- 季節変動によらずエストロゲン活性が発現するような河川水に於いては下水放流水の負荷がエストロゲン活性に大きく寄与するものと考えられる。しかしながら非イオン界面活性剤の一種であるアルキルフェノールエトキシレート (APE) の生物代謝産物である $n$ -アルフェノールのような様々なタイプのアルキルフェノール (AP) 類は河川水のエストロゲン活性には大きく寄与しないものと考えられる。
- 凝集処理では河川水中のエストロゲン活性物質を十分には除去し得ないが、塩素処理によりエストロゲン活性を大きく低下させることが可能である。
- 環境水のように内分泌攪乱物質が複合系で存在する場合のエストロゲン活性発現のパターンは単独系の場合と異なる。
- 今回検討を行った6種類の化合物に関する限りではエストロゲン活性と発がん性との関連は認められない。
- アルキルフェノール (AP) 類のエストロゲン活性に関する限り、基本構造が同一で分子量が若干異なる程度 (エチレンオキシド鎖の数が2程度と10程度の違い) の化合物類のエストロゲン活性はほぼ同様なものであるが、分子量がほぼ同様な化合物でも側鎖が直鎖型と分岐型のような比較的微小な構造の差によりエストロゲン活性は大きく異なる。

#### 参考文献

1. 鎌田 素之. 非イオン界面活性剤 NPEO の生分解過程におけるエストロゲン活性の挙動に関する研究. 北海道大学修士論文 (1999).

## 5. 2 MVLN アッセイ法

### 5. 2. 1 調査研究の内容と目的

「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験法に関する諮問委員会」(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)<sup>1)</sup> は、エストロゲン様作用を検出するための *in vitro* 試験としては、MVLN 細胞を用いる方法を最も推奨している。MVLN アッセイの位置づけは 5. 2. 3 に記すが、この方法は前に述べられた酵母法と同様に、ある物質が細胞内でエストロゲン様の作用を有するかを調べるものである。したがって、その試験結果が陽性であるからといって、その物質が生体内において内分泌攪乱作用を有する有害物質であると結論づけられるわけではないことに注意する必要がある。

しかし一方で、*in vivo* のアッセイによっては得ることが困難な情報を取得できることも事実である。すなわち、この種のアッセイを水質指標の一つとして位置づけ、そこから有益な情報を取捨選択し、よりベターな水道システムを構築するのに活用することが賢明であると考えられよう。

ここでは、MVLN アッセイを用いて、水道原水中のエストロゲン様作用を検出するとともに、塩素処理による変化に関して調査研究を行った。上記の大きな目標からすればその結果は中途段階であるといわざるを得ないが、調査研究の主たる目的は、水道事業に対する有益性を鑑み、以下の①～③とした。

- ①水道水のエストロゲン様作用に関するバイオアッセイのための試料調製方法を確立すること。
- ②水道水に含まれるエストロゲン様作用の主体をなす成分を推定すること。
- ③塩素処理がエストロゲン様作用に及ぼす影響を与えるか検討すること。

### 5. 2. 2 調査研究の背景

#### (1) 消毒副生成物に関する試験の必要性について

本調査研究では、個別の化学物質がもつエストロゲン様作用とともに、自然水中有機物から生成する消毒副生成物のエストロゲン様作用に関する試験にも重点を置いている。ここではこの実験的検討を行う意義についてまとめておく。

#### 1) 「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験法に関する諮問委員会」

(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC) の勧告<sup>1)</sup>

EDSTAC では、個別の化学物質に加えて、次の 6 つのタイプの混合物についても試験を行うことを勧告している。

- ①母乳
- ②大豆ベースの乳幼児食中の植物エストロゲン
- ③有害廃棄物処分場で一般的に検出される混合物