

# 平成11年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

## 分担研究報告書

### 「内分泌かく乱化学物質の水道水からの暴露等に関する調査研究報告書」

#### － 酵母 Two-hybrid 法を用いたエストロゲンの評価に関する研究－

分担研究者 北海道大学工学研究科 亀井 翼

#### 研究要旨

昨年度と同様にラットのエストロゲンレセプターを組み込み、形質転換した酵母を用い(1)昨年度の知見の再確認、(2)環境水中に最大のバックグラウンド有機成分として存在するフミン質のエストロゲン発現性の検討と(3)複合成分系におけるエストロゲン活性発現パターンの検討(4)高度浄水処理システムおよび通常の浄水処理システムによる河川水のエストロゲン発現強度の低減効果の検討を行い以下のような知見を得た。

(1)酵母 Two-hybrid 試験においては positive control のみならず試料の析出による見かけの菌体増加及び真の菌体増加の有無を常に確認し、得られた逆U字型応答曲線がエストロゲン活性反応によって得られたものか、試料の析出あるいは菌体の非増加による見かけ上の逆U字型応答によるものかの判断が必要である。

(2)環境水のようにエストロゲン活性強度が異なる複数成分が共存する場合、エストロゲンの最大発現強度はその複合系における最もエストロゲン活性が強い1成分の最大発現強度に支配され、相加作用はプラス方向ではなくマイナス方向(共存成分による全エストロゲン活性の減少)に作用する。

(3)溶解性のエストロゲン活性成分は凝集処理でほとんど低減されないが、懸濁性成分に付着しているエストロゲン活性成分は凝集処理あるいは砂ろ過により除去される。

(4)エストロゲン活性成分は水道法に定められている給水端で0.1mg/L以上の残留塩素濃度を20時間程度確保する塩素添加量のみで十分に不活性化することができる。

(5)前置する砂ろ過により懸濁性成分に由来すると考えられるエストロゲン活性成分が除去されているためオゾン、生物活性炭によるエストロゲン活性成分の除去効果は確認できなかった。しかしながら、オゾン処理によるエストロゲン活性成分の新たな生成は認められない。

(6)母 Two-hybrid 法においては環境水中にバックグラウンド有機成分として多量に存在するフミン質(Sep-Pak C-18 Cartridge 吸着成分でかつメタノール溶離可能区分)のエストロゲン活性は塩素処理前のみならず塩素処理後でも認められなかった。

#### A.研究目的

昨年度は (1)水道原水として用いられている河川水中にエストロゲン発現成分が存在し、その主たる由来の一つが下水放流水由来であることを確認し、(2)下水放流水中のアルキルフエノールの濃度はエストロゲン発現に寄与出来る濃度レベルではなく 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) のような他の諸成分が下水放流水全体のエストロゲン発現に寄与している可能性があることを示した。さらに (3) 河川水中にエストロゲン発現強度の 30 - 60%は凝集処理により除去され、塩素処理では単独でほぼ 100% 除去されることを見出した。また(4) エストロゲン発現成分が複合系で存在しても相加効果は発現せず、むしろ相減効果が生じることを認めた。

本年度は昨年度と同様な酵母 Two-hybrid 法を用いて(1)昨年度の知見の再確認、(2)環境水中に最大のバックグラウンド有機成分として存在するフミン質のエストロゲン発現性の検討と(3) 河川水を原水とする高度処理システムがどの程度エストロゲン発現強度の低減に効果があるかを明らかにすることを目的とした。

## B. 実験方法

### 1. 酵母 Two-hybrid 法<sup>1)</sup>

昨年度と同様にラットのエストロゲンレセプターを組み込み、形質転換した酵母を用いる。レセプターにテスト物質が結合し活性化されると、レポーター遺伝子の転写が開始し、酵素蛋白である  $\beta$ -ガラクトシダーゼを分泌する。この酵素を ONPG という発色剤で呈色させ、吸光度(420nm 等)を測定し、所定の式に代入してエストロゲン強度として表現した。また必要に応じてエストロゲン活性値は、陽性対照である 17 $\beta$ -エストラジオールの最大活性値を 100 として求めた比活性値で表した。

### 2. 酵母 Two-hybrid 法の実験手順

(1) SD 寒天培地上のイースト菌のコローニをポリプロピレン性プラスチック試験官中の SD 液体培地(2.5-4.0mL)に植菌し、10rpm、30℃で 18~24 時間振とう培養する。これが前培養液となる。

(2) 前培養液 50 $\mu$ L と SD 液体培地 200 $\mu$ L そしてサンプルを 2.5 $\mu$ L<sup>(注)</sup> ずつマイクロテストチューブに加え、ボルテックスし、30℃で 4 時間振とう培養する。

(3) 培養液をボルテックスし、そのうち 150 $\mu$ L 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吸光度 595nm を測定する。残った培養液を 15000rpm、4℃で 5 分間遠心分離する。

(4) 上澄み液をマイクロピペットで取り除き、そこに 1mg/mL の Zymolyase 20T を含む Z-buffer 200 $\mu$ L を加え、ボルテックスし、37℃で 15 分間静置させる。(細胞壁分解過程)

(5) 4mg/ml ONPG 溶液を 40mL 加え、ボルテックスし、30℃で 30 分間静置させる。(呈色

過程)

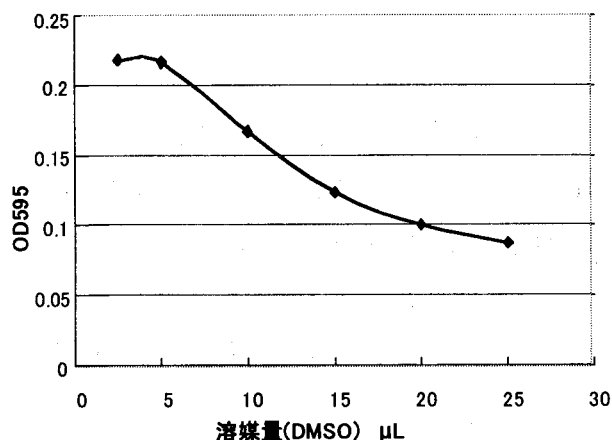


図1 OD595と溶媒量(DMSO)の関係

ーゼ (エストロゲン活性) の値を求める。

$$\text{エストロゲン活性} = 1000 \times [(\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{570})] / [(v \times t \times \text{OD}_{595})]$$

ただし、 $t = 30\text{min}$  (ONPG による呈色時間)

$v = 50 \mu\text{L}$  (前培養液の体積)

(注) 溶媒量とイースト菌増殖の関係

サンプルの溶媒(DMSO)の量が、イースト菌に与える影響を図1に示した。図から溶媒が多いほどイースト菌の増殖を抑制することがわかる。したがって、実験ではサンプル量を  $2.5 \mu\text{L}$  (全体量の  $1/100$ ) とした。(図1)

### 3. エストロゲン活性測定結果の評価方法

試料のエストロゲン活性は、陽性対照である  $17\beta$ -エストラジオール (E2) のエストロゲン活性と比較し、かつ吸光度  $595\text{nm}$  ( $\text{OD}_{595}$ ) の値に影響を与える因子を判定して3回の測定結果の平均を求めて評価した。

### 4. 吸光度 $595\text{nm}$ ( $\text{OD}_{595}$ ) の値に影響を与える因子の判定方法

(1) 試験物質が析出する (疎水性) 場合:

- (i) SD 液体培地  $250 \mu\text{L}$  にサンプル  $2.5 \mu\text{L}$  を添加し、実験手順同様に  $30^\circ\text{C}$  で4時間振とうする。
- (ii) ボルテックスし、 $150 \mu\text{L}$  を96穴マイクロプレートに移し、吸光度  $595\text{nm}$  を測定する。
- (iii) (ii)の吸光度  $595\text{nm}$  の値が、ブランク (注) の値よりも大きいときは析出が生じたもの

(6)  $1 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$   $100 \mu\text{L}$  を加え、 $15000\text{rpm}$ 、 $4^\circ\text{C}$  で5分間遠心分離する。

(反応停止過程)

(7) SD 寒天培地上のイースト菌のコロニーを SD 液体培地  $2.5\text{mL} \sim 4.0\text{mL}$  を入れたファルコンチュー上澄み  $150 \mu\text{L}$  を96穴マイクロプレートに移し、吸光度  $420\text{nm}$ 、 $570\text{nm}$  を測定する。

(8) 吸光度  $420\text{nm}$ 、 $570\text{nm}$ 、 $595\text{nm}$  の値を次式に代入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ

とみなされる。

(2) 試験物質が毒性を有する場合:

(i) SD 液体培地 200  $\mu$ L と前培養液 50  $\mu$ L にサンプル 2.5  $\mu$ L を添加し、ボルテックスして 150  $\mu$ L を 96 穴マイクロプレートに移し、吸光度 595nm を測定する。

(ii) (i)の吸光度 595nm の値が実験手順 3 で求めた値と同等の場合、つまり 4 時間培養前後でイースト菌の増殖がないとき、増殖阻害、殺菌作用が生じたものと考えられる。

(注) SD 液体培地 250  $\mu$ L に DMSO 2.5  $\mu$ L を添加したもの。サンプルの溶媒はすべて DMSO である

## 5. 酵母 Two-hybrid 法を用いた複合試験

内分泌攪乱物質として 17 $\beta$ -エストラジオール (E2)、エストリオール、DES、4-ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジブチル、メトキシクロル、p-ヒドロキシ安息香酸 n-ブチル(SPF)、非内分泌攪乱物質として安息香酸をそれぞれ等量混合して試験した。

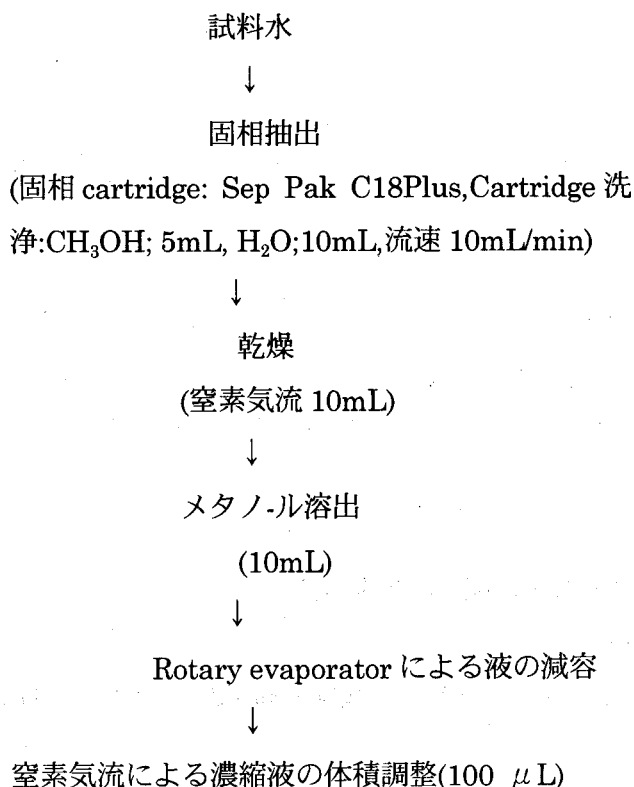


図 2 環境水の濃縮手順

## 6. フミン質のエストロゲン活性値試験に用いた環境水

フミン質のエストロゲン活性値試験として実際の水道原水として用いられている根室市のオンネ沼(1cm セルを用いた紫外部 260nm の吸光度: 0.174)と北見市の常呂川(1cm セルを用いた紫外部 260nm の吸光度: 0.011)を用いた。

## 7. 試料の濃縮方法

今までに報告されているエストロゲン活性物質の大部分は水に難溶性の疎水性成分であるため、水中の微量成分の濃縮には固相カートリッジとして Sep Pak C18 Plus、濃縮装置として Sep Pak Concentrator (いずれも Waters 社製) を用い図 2 に示

すような手順で濃縮を行った。採水した下水処理場処理水（塩素処理前）等の環境水中の粗大懸濁性成分を除くためにはガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 社製）を用いてろ過を行った。ろ過水を 5mL のメタノールおよび 10mL の精製水でコンディショニングした Sep Pak C18 カートリッジに Sep Pak Concentrator を用いて、流速 10mL/min で通水した。固相カートリッジへの通水量は、Sep Pak C18 を直列に 2 つ接続したのに対して 2.5L までとした。通水終了後、精製水で洗浄し窒素気流で乾燥させてから 10mL のメタノールを用いて固相カートリッジに吸着した成分を溶出した。溶出した試料をロータリエバポレータを用いて減容後、さらに窒素気流により 100  $\mu$ L に定量した。

#### 8. 浄水処理実験プラントで得られた試料の濃縮方法

この試料は水中の試料をあらかじめ図 3 に示すような手順で濃縮後、当研究室に送付されたものである。試料水を 1M HCl で pH 3 に調整した後、試料水 20L を固相カートリッジ OASIS<sup>TM</sup>HLB(Sep Pak Plus short)に流速 10ml/min で通水する。固相カートリッジへの通水量は、1 つのカートリッジに対して 1L までとした。窒素パージで 12 分間乾燥させた後、ジクロロメタン 8mL で溶出する。その際、脱水のために脱水カラムの Sep Pak Dry(Waters 社製)を用いる。溶出した試料をロータリエバポレータで濃縮し、4mL に定量後 1mL ずつ 4 つに分取したうちの 1 つの試料が当研究室に送付されたものである。送付された各浄水処理プロセスの試料はさらに 200  $\mu$ L に濃縮したので最終的に 25000 倍に濃縮したことになる。ただし酵母 Two-hybrid 法に於いては前培養液 50  $\mu$ L と SD 液体培地 200  $\mu$ L に対して試料 2.5  $\mu$ L を加えることになるので元々の試料水中の成分は 2500 倍に濃縮された状態でテストされていることになる。

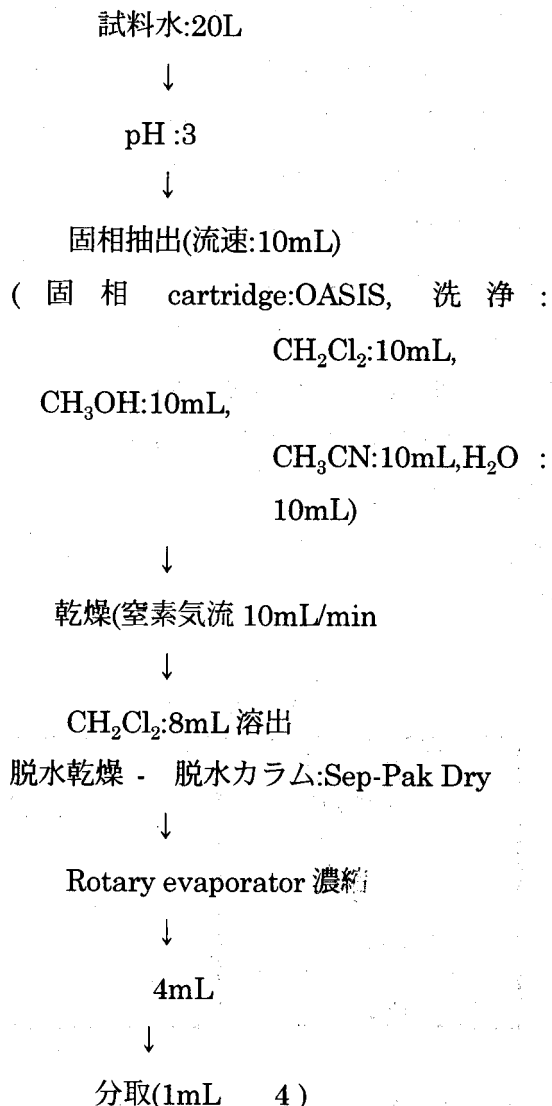


図 3 浄水処理実験プラントで採水した試料の濃縮

## 9. 凝集処理実験

下水処理場処理水（活性汚泥処理水）をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 社製）で吸引ろ過したもので凝集剤量を決めるためにジャーテストを行った。凝集剤として硫酸アルミニウムを用いて、pH を7付近に調整し、急速攪拌 120rpm で5分間、緩速攪拌 40rpm で20分間、攪拌終了後静置30分間とした。最終 pH、濁度、色度、E260、E220 の測定結果を表に示す（表1）。この結果から凝集剤量を、24mg/L（as Al 濃度）とした。

下水処理水を1万倍に濃縮してもエストロゲン活性がほとんどみられなかった下水処理水については17β-エストラジオール（E2）を $10^{-10}$ Mの濃度となるよう添加し、上記凝集条件で凝集処理した。E2を添加した下水処理水およびその凝集処理水を0.45μmメンブレンフィルターでろ過した後それぞれ1000倍に濃縮・希釈し、エストロゲン活性の測定を行った。

次に、超純水に $10^{-10}$ MとなるようにE2を添加し下水処理水と同じ凝集条件で凝集処理をして0.45μmメンブレンフィルターでろ過後、1000倍に濃縮・希釈後エストロゲン活性を測定した。

表1 下水処理水のジャーテスト結果

Al 濃度(mg/L)	0 (原水)	2	4	16	24	36
最終 pH	7.0	6.8	6.6	7.3	7.2	7.1
濁度	0.52	0.27	0.15	0.29	0.20	0.18
色度	16.1	9.5	7.9	5.9	5.5	6.7
UV260nm 吸光度 (E260)	0.108	0.081	0.060	0.053	0.051	0.052
UV220nm 吸光度 (E220)	1.926	1.830	1.811	1.793	1.786	1.791

## 10. 塩素処理実験

あらかじめ予備実験として下水の活性汚泥処理水に次亜塩素酸ナトリウムを添加してから24時間経過後の遊離残留塩素濃度が0.1~0.3mg/Lとなるような塩素添加率10mg/Lを求めた。次に、この添加率で塩素処理した下水処理水を塩素添加から24時間後にSep Pak C18カートリッジを用いて濃縮後エストロゲン活性の測定を行った。

表2 下水処理水の塩素添加率と24時間後残留塩素濃度の関係

塩素添加率 mg/L	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	12.5
残留塩素濃度 mg/L (24時間後)	0.03	0.03	0.05	0.10	0.23	1.53
最終 pH	7.46	7.53	7.50	7.50	7.50	7.51

## 11. 浄水処理実験プラントにおける浄水処理実験

浄水処理によるエストロゲン活性の挙動を調べるために、対象物質としてエストロゲン様作用物質を図4に示すような実験プラントの着水井に添加し浄水処理実験を行った。

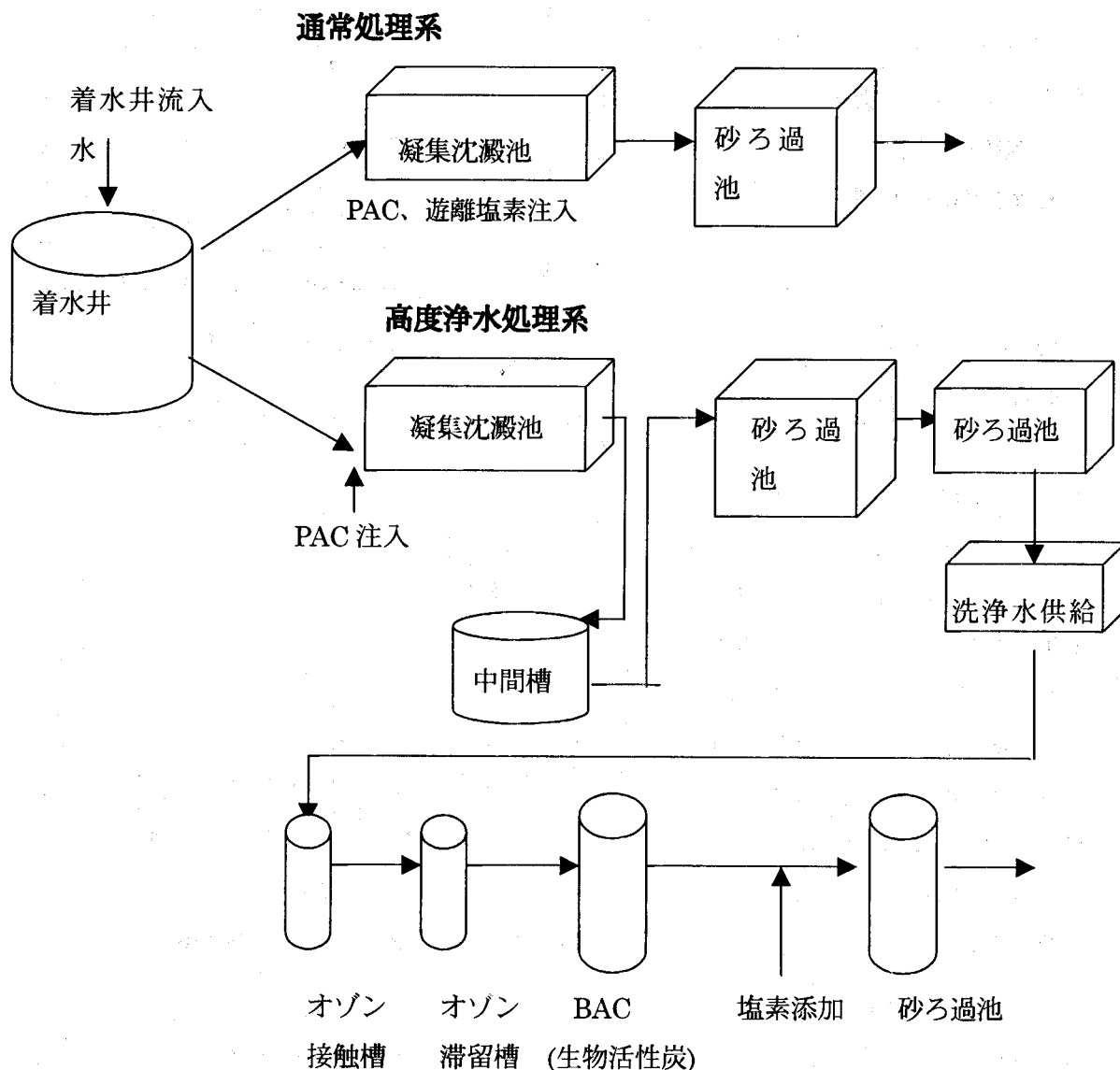


図4 浄水処理実験プラントの概略図

対象物質は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール、ビスフェノールAの4種類であり、各物質をそれぞれ $5\mu\text{g/L}$ の濃度で添加された。エストロゲン活性の測定試料は、着水井流入水、原水、通常処理系として凝集沈殿水、砂ろ過水、高度浄水処理系として凝集沈殿処理水、砂ろ過水、オゾン接触水、オゾン滞留槽出口、BAC（生物活性炭）出口、砂ろ過水の10サンプルである。凝集剤はいずれの系もPAC（ポリ塩化アルミニウム）を用いて、添加率 $25\text{mg/L}$ で凝集処理を行っている。なお、通常処理系においては前塩素処理が、高度浄

水処理系においては生物活性炭処理後の砂ろ過の前に塩素処理がそれぞれ行われている。塩素添加率は通常処理系の前塩素処理が7.6mg/L、高度処理系は2.0mg/Lである。

**(倫理面への配慮)**

実験に用いた酵母菌はオートクレーブ殺菌を行っているため環境中に放出される恐れはない。

**3. 実験結果・考察**

**1. 複合系におけるエストロゲン発現パターン**

図5に示すように逆U字型応答曲線の低濃度側での発現パターンは活性が高い物質（ここではNP）に支配され、活性値は単独の場合よりも同じか、下まわった。このことは、試験したすべての物質についても同様の結果が得られた。逆U字型応答曲線の高濃度側では、エストロゲン活性がより低濃度レベルで減少する物質に支配されるように見えるが、これは図6に示すように物質の濃度が高い領域では物質の毒性によるイースト菌の増殖阻害によってもたらされ

たものであると考えられ、生物本来の内分泌攪乱効果によるものではない可能性がある。高濃度ではそのほかに水溶解度が低い物質の析出も問題となり、これは単独系、多成分系の両者に共通している。毒性の強い物質を試験するときは酵母の菌体量を、疎水的な物質を試験するときは溶解度を考慮しなければ誤った判断をすることになる。

環境試料と内分泌攪乱物質を共存させた

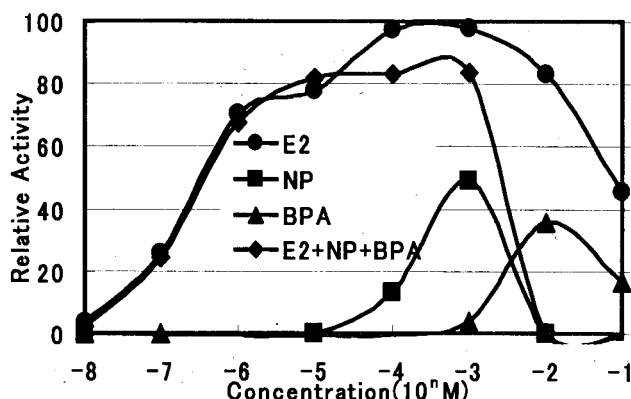


図5 3成分系のエストロゲン発現パターン

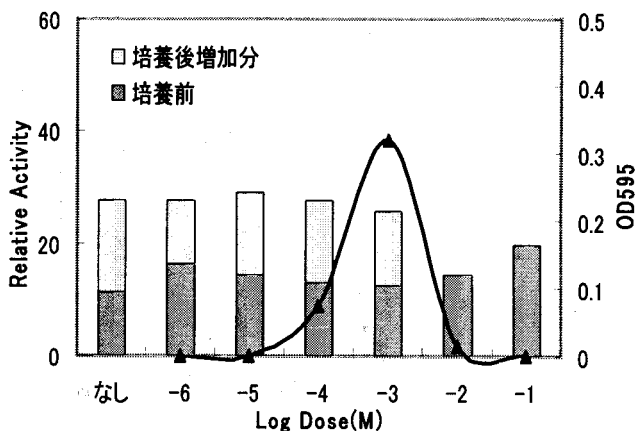


図6 4-NP の培養前後 OD595(菌体濃度)

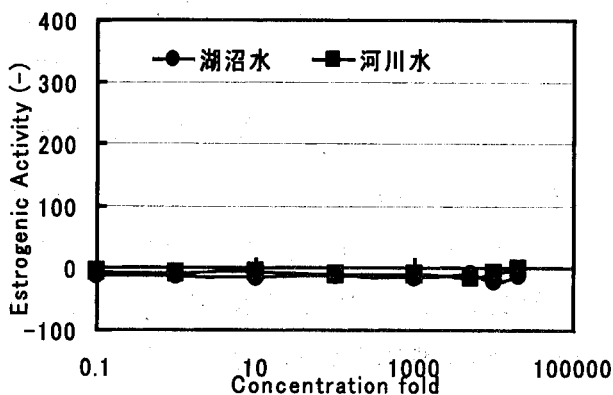


図7 フミン質を主体とする環境水のエストロゲン活性



場合も、酵母の増殖阻害が認められないにもかかわらず、エストロゲン活性は減少した。原因の1つとして、酵母の細胞表面に物質が吸着し内分泌攪乱物質の膜透過を阻害したのではないかと考えられる。

## 2. 環境水中のフミン質のエストロゲン活性

図7に示すように紫外部 260nm の吸光度が 0.174 と高い原水を Sep Pak C18 カートリッジを用いて 20000 倍に濃縮したレベルに於いてもエストロゲン活性の発現は認められない。

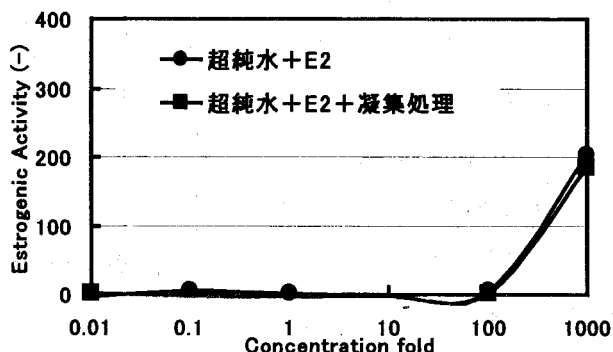


図8 凝集処理が E2 添加純水のエストロゲン活性に及ぼす効果

## 3. 凝集処理によるエストロゲン活性除去効果

微量の  $17\beta$ -エストラジオール (E2) を超純水に添加して凝集処理を行った場合にはほぼ全ての E2 は溶解性の状態で存在していると考えられるので図8に示すように凝集処理ではほとんど除去されていない。この実験結果は図11に示すような実際の河川水を用いた高度浄水処理実験プラントで得られた結果とも一致する。

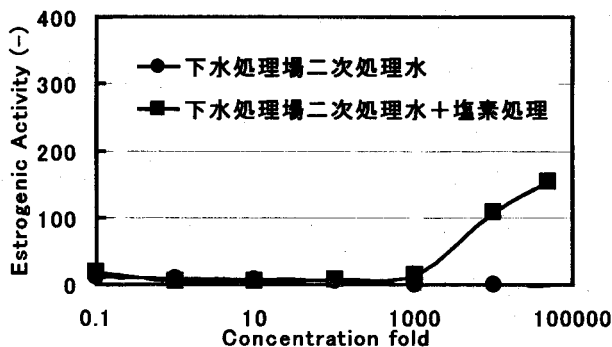


図9 塩素処理による下水処理水のエストロゲン活性

## 4. 塩素処理によるエストロゲン活性除去効果

図9に示すように、活性汚泥下水処理水を直接亜塩素酸ナトリウムにより塩素処理を行った場合には前年度の結果と同様にエストロゲン活性はバックグラウンドのレベルにまで低減している。同じ化学種成分であってもエストロゲン活性は構造の微小な違いにより発現する場合としない場合があるので、塩素処理に伴う酸化による化学構造の微

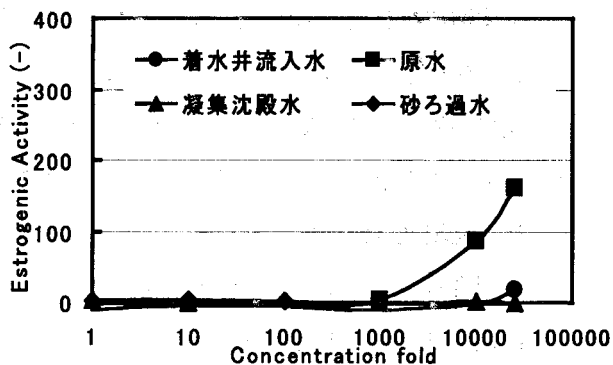


図10 浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動(通常処理系)

少な変化によりエストロゲン活性が消滅したものと考えられる。

## 5. 高度浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動

高度浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動の調査においても室内実験の結果と同様に凝集処理ではエストロゲン活性が低減されていない。一方、通常処理系では凝集処理でエストロゲン活性が一見、低減されているように見える(図10)。

別個の室内実験の結果では凝集処理でエストロゲン活性が低減されず、塩素処理によりエ

ストロゲン活性が低減されている。したがって実際は前塩素処理による塩素の酸化作用によりエストロゲン活性が低減されたものと考えられる。高度処理系においては、砂ろ過でエストロゲン活性がすでに除去されているため、オゾン処理と生物活性炭処理による除去効果を評価することができなかった。しかしながら、図11に示すように少なくともオゾン処理による新たなエストロゲン活性成分の生成はないものと考えられる。

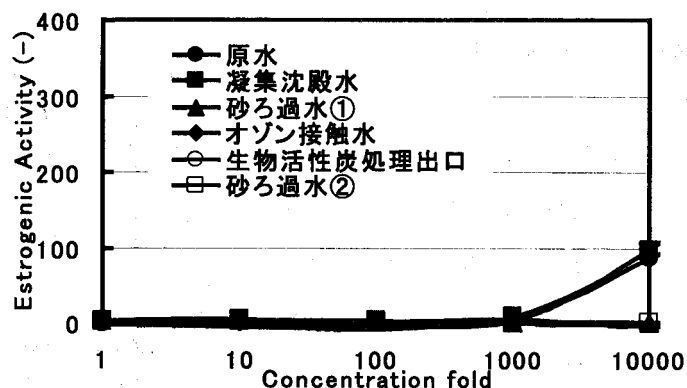


図11 浄水処理実験プラント(高度処理系)におけるエストロゲン活性の挙動

## 6. まとめ

昨年度の知見を再確認し、さらに以下のような結論を得た。

- (1) 酵母 Two-hybrid 試験においては positive control のみならず試料の析出による見かけの菌体増加及び真の菌体増加の有無を常に確認し、得られた逆U字型応答曲線がエストロゲン活性反応によって得られたものか、試料の析出あるいは菌体の非増加による見かけ上の逆U字型応答によるものかの判断が必要である。
- (2) 環境水のようにエストロゲン活性強度が異なる複数成分が共存する場合、エストロゲンの最大発現強度はその複合系における最もエストロゲン活性が強い1成分の最大発現強度に支配され、相加作用はプラス方向ではなくマイナス方向(共存成分による全エストロゲン活性の減少)に作用する。
- (3) 溶解性のエストロゲン活性成分は凝集処理でほとんど低減されないが、懸濁性成分に付着しているエストロゲン活性成分は凝集処理あるいは砂ろ過により除去される。

- (4) エストゲン活性成分は水道法に定められている給水端で 0.1mg/L 以上の残留塩素濃度を 20 時間程度確保する塩素添加量のみで十分に不活性化することができる。
- (5) 前置する砂ろ過により懸濁性成分に由来すると考えられるエストロゲン活性成分が除去されているためオゾン、生物活性炭によるエストロゲン活性成分の除去効果は確認できなかった。しかしながら、オゾン処理によるエストロゲン活性成分の新たな生成は認められない。
- (6) 酵母 Two-hybrid 法においては環境水中にバックグランド有機成分として多量に存在するフミン質 (Sep-Pak C-18Cartridge 吸着成分でかつメタノール溶離可能区分) のエストロゲン活性は塩素処理前のみならず塩素処理後でも認められなかった。

## 参考文献

1. Nishikawa. J., Saito. K., Goto. J., Dakeyama. F., Matsuo. M., and Nishihara. T.. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. Toxicology and applied pharmacology, Vol. 154, No.1, pp. 77-83(1999)

## 5. 研究発表

1. 非イオン界面活性剤(NPnEO)の生分解過程におけるエストゲン活性に関する研究. 日本水環境学会, 第 33 回日本水環境学会年会講演集, p393, 1999.
2. 酵母 Two-hybrid 法における多成分発現パターンに関する研究.  
日本水環境学会, 第 34 回日本水環境学会年会講演集, p314, 2000
3. 水処理プロセスにおける Estrogen 活性の挙動に関する研究.  
北海道大学衛生工学会, 第 7 回衛生工学シンポジウム論文集, p166, 1999
4. 水環境と内分泌攪乱物質. 廃棄物学会, 廃棄物学会誌, Vol.10, No.4, pp288-292, 1999  
水環境と内分泌攪乱物質  
(以下予定)
5. 酵母 Two-hybrid 法を用いた環境試料評価に関する検討. 日本環境化学会, 第 9 回環境化学討論会, 2000
6. Contribution of NPEO upon the occurrence of estrogenic activity in the aquatic environment. IAWQ, 1<sup>st</sup> World Congress of the International Water Association, 2000  
Contribution of NPEO upon the occurrence of estrogenic activity in the aquatic environment.
7. Effect of Water Treatment on the Minimization of Endocrine Disruptors. IWSA-

ASPAC, 12<sup>th</sup> IWSA-ASPAC Region Conference & Exhibition, 2000