

(22) 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

Measurement of Estrogen-like Activity in Wastewater using Recombinant Yeast

矢古宇靖子*, 高橋明宏*, 東谷忠*, 田中宏明*

Yasuko YAKOU*, Akihiro TAKAHASHI*, Tadashi HIGASHITANI*, Hiroaki TANAKA*

ABSTRACT ; This study is aiming at examining the conditions of a testing method for comprehensive environmental estrogen-like activity in wastewater using recombinant yeast. Using this method, 43 chemicals that are suspected to have the estrogen-like effects measured. Then, their estrogen-like activities were evaluated as the 17β -estradiol equivalent by comparison with the assay results of 17β -estradiol. 17β -estradiol equivalent of influent and effluent sampled from 10 wastewater treatment plants in summer and autumn were measured with this method. The endocrine disruptors (EDs) concentrations in the wastewater were calculated into the theoretical 17β -estradiol equivalents based on the chemical evaluation. The results suggest that wastewater treatment plants effectively reduce estrogen-like substances during treatment, and that there were some differences between 17β -estradiol equivalent with the recombinant yeast and the theoretical 17β -estradiol equivalent based on the chemical evaluation. Therefore, it is implied that unknown estrogen-like substances or antagonists might exist in wastewater.

KEYWORDS ; endocrine disruptors(EDs), recombinant yeast, estrogen-like activities, 17β -estradiol equivalent, wastewater

1. はじめに

近年、各種環境汚染物質が生体に内分泌攪乱を引き起こすとして社会的に問題となっており、食品のみならず、水や水生生物を経由したヒトや生物への曝露が懸念されている。英国や米国の調査では、下水由来物質による下水処理場放流先河川の魚類への影響が報告されている^{1) 2)}。国内においても、建設省は、平成10年度より、一級河川および主要な河川の主な下水処理場を対象として、環境庁の報告している内分泌攪乱作用を有すると疑われている67物質³⁾のうち、年間生産量と環境中での検出状況等を勘案して選定した22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、ポリ臭化ビフェニール類)に天然の女性ホルモンである 17β エストラジオールを加えた23物質の実態調査を実施している⁴⁾。

一方、内分泌攪乱作用という観点から、エストロゲン(女性ホルモン)様活性の *in vitro* (試験管内) 測定法として、組み換え酵母を用いた方法^{5)~7)}、ヒト乳ガン細胞を用いた方法^{8) 9)}等が報告されている。前者は、酵母にヒトのエストロゲン受容体(レセプター)を介する作用機構を組み込んでいるため、エストロゲン様物質に対する生体反応を一部分反映していると考えられる。後者は、ヒト乳ガン細胞由来のMCF-7が

*建設省 土木研究所 水質研究室 (Water Quality Div., Public Works Research Institute, Ministry of Construction)

エストロゲンレセプター遺伝子を有しており、エストロゲン様物質の存在により増殖する性質を利用している。これらの測定方法は、機器分析では測定できない物質、あるいは、エストロゲン様活性を持つのか否か明確でない物質の、環境水中における総合的なエストロゲン様活性を把握することも可能と考えられる。特に、組み換え酵母を用いた測定方法は簡便であることから、各種環境試料への適用^{リ10~14}も試みられており、河川水にエストロゲン様活性が存在すること、下水・し尿は処理場の経路によりエストロゲン様活性が低減すること、廃棄物処分場浸出水にはエストロゲン様活性がみられないことが報告されている。しかし、測定された試料は限られており、供試酵母が異なるためエストロゲン様活性の強度・結果を単純には比較できず、その測定方法が標準化・最適化されているかは不明である。

そこで、本研究では、環境試料へ組み換え酵母を用いた測定方法を適用するにあたり、安定性・再現性が確認できる条件を検討した。この測定方法に基づき、内分泌攪乱作用を有すると疑われている 43 物質の測定を行い、17 β エストラジオールとの相対的なエストロゲン様活性の強度（17 β エストラジオール比活性値）を評価した。また、建設省の水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査⁴にに合わせて採取した実下水への本測定方法の適用を試み、実態調査対象化学物質の測定濃度から理論的なエストロゲン様活性の総量（17 β エストラジオール等量理論換算値）を求め、本測定方法によるエストロゲン様活性（17 β エストラジオール活性等量）との比較検討を行った。

2. 実験方法

今回実験に用いた組み換え酵母は、英国 Brunel 大学 Sumpter 教授より譲渡を受けた株である。この酵母には、ヒトのエストロゲンレセプター遺伝子と、エストロゲン様物質との結合により活性化したエストロゲンレセプターの応答部位およびそれに続くレポーター遺伝子（*lacZ*）が組み込まれている。エストロゲン様物質は、酵母の細胞壁を透過すると発現しているエストロゲンレセプターと結合し、更に応答部位に結合する。それによりレポーター遺伝子が転写活性化するため、生成される β -ガラクトシダーゼの活性を測定することでエストロゲン様活性の測定が可能となる。

実験手順は、酵母付属のマニュアル（OESTROGEN(hER) SCREEN PROTOCOL）に準拠した。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。培養液は、Assay Medium（発色試薬：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 0.5~2.0ml（ 4×10^7 cells）となるように添加した。標準曲線用の女性ホルモンである 17 β エストラジオールおよび供試試料は、溶媒に溶解後、適宜希釈した。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、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吸光度を測定した（OD550 値：CPRG の発色、OD600 値：酵母の増殖量）。測定後、プレートはオートクレープテープで封をし、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、以下の換算式に測定値を挿入して算出した。

$$\text{「 換算値 } = \text{ 供試試料の OD550 値 } - (\text{供試試料の OD600 値} - \text{Blank の OD600 値}) \text{」} \quad (\text{式 1})$$

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. 1 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面倒である。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 17 β エストラジオールを用い、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、ウェル内での濃度は最終 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 と接触させた。

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) 測定温度の検討

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 17 β エストラジオールを用い、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 17 β エストラジオール、ビスフェノール A、ヒドロキシエストラジオールの 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. 2 標準物質の測定

環境庁における実態概況調査での調査対象項目¹⁹⁾を参考とし、建設省における実態調査での測定対象物質 (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、および、ホルモン類から標準物質 (表 1) を選定し、それらのエストロゲン様活性を 2. 1 で検討した測定方法に従って測定した。各化学物質は 2 g/L の濃度より順次希釈し、測定に用いた。17 β エストラジオールに対する標準物質の有するエストロゲン様活性の相対的強度である「17 β エストラジオール比活性値」は、17 β エストラジオールの用量反応曲線の最大発色に対する 50%発色の際の濃度と、各物質の用量反応曲線から 17 β エストラジオールの 50%発色値を示す濃度を求め、両者を比較し、17 β エストラジオールの濃度を 1 とした相対値として換算した。

更に、試薬メーカー間の活性の差を確認するため、供試物質をエストラジオール、エストロンとし、メーカーを SIGMA、MERCK、和光純薬、東京化成の 4 社として、比較測定を行った。

2. 3 実試料の測定

建設省が平成 10 年 7 月 (夏期) と 11 月 (秋期) に行った実態調査で対象とした、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、放流水を採水し、2. 1 で検討した測定方法によりエストロゲン様活性を測定した。

試料水 1L は、ガラス繊維ろ紙 (GF/B 相当) で吸引ろ過後、コンディショニング済 (MeOH、H₂O 各 10ml で洗浄) の C18 固相カラム (固相 500mg 以上充填品) に通水した。通水後、カラムの脱水を行い、MeOH 10ml で溶出させた。試料水をろ過したろ紙は、ガラス容器中で MeOH 15ml を加えて超音波処理 (30 分間) による抽出を 2 回繰り返した。MeOH 抽出液 (30ml) は、前述により使用済みの C18 固相カラムを通し、残さを除去した。カラムからの溶出液とろ紙からの抽出液を合わせ (40ml)、ロータリーエバポレーターを用いて (40℃以下) 約 1ml に濃縮した。その後、窒素ガスの吹き付けにより乾固させ、乾固物に DMSO 100 μ l を添加し溶解させた。この 10,000 倍濃縮物を蒸留水で 5 倍に希釈し (20% DMSO 溶液、2,000 倍濃縮物)、測定に用いた。今回、試料中に含まれるエストロゲン様活性の総量を 17 β エストラジオールに換算した「17 β エストラジオール活性等量」は、17 β エストラジオールの用量反応曲線から最大発色の 50%濃度を求め、その濃度を実試料の用量反応曲線から得られた発色 50%の濃縮倍率の濃度と見なし、更に濃縮倍率 1 倍 (原水) 当たりに割り戻して換算した。

表1 供試標準物質一覧

* 17β エストラジオールを1として

物質名		略号	比活性値*	メーカー名
ホルモン類	17β エストラジオール	17β	1.00	SIGMA
	17α エストラジオール	17α	0.05	SIGMA
	17β エストラジオール-3-サルフェイト	17BS	0.00004	SIGMA
	β エストラジオール-3-サルフェイト-17-グルクロニド*	BSG	—	SIGMA
	2-ヒドロキシエストラジオール	HEDL	0.01	SIGMA
	β エストラジオール-17-アセテート	EDA	0.05	SIGMA
	エストロン	ESN	0.3	SIGMA
	エストロン β-D-グルクロニド*	EDG	—	SIGMA
	エストロン-3-サルフェイト	E3S	—	SIGMA
	2-ヒドロキシエストロン	HESN	0.002	SIGMA
	エストリオール	ESL	0.002	SIGMA
	エストリオール-3-β-D-グルクロニド*	E3G	—	SIGMA
	2-ヒドロキシエストリオール	HESL	0.00001	SIGMA
合成ホルモン	17α エチニルエストラジオール	EED	0.5	SIGMA
	ジエチルスチルベステロール	DES	0.3	SIGMA
アルキルフェノール類	4-t-ブチルフェノール	tBP	0.00002	関東化学
	4-n-ペンチルフェノール	PeP	0.0007	関東化学
	4-n-ヘキシルフェノール	HxP	0.0006	関東化学
	4-ヘプチルフェノール	HpP	0.00006	関東化学
	4-n-オクチルフェノール	4nOP	0.000005	関東化学
	4-ノニルフェノール	4NP	0.001	関東化学
フタル酸エステル類	フタル酸ジエチル	DEP	—	和光純薬
	フタル酸ジ-n-プロピル	DnPP	—	関東化学
	フタル酸ジブチル	DBP	—	和光純薬
	フタル酸ジ-n-ペンチル標準品	DPPS	—	関東化学
	フタル酸ジヘキシル標準品	DPS	—	関東化学
	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル標準品	DOP	—	和光純薬
	フタル酸ジシクロヘキシル	DCHP	—	関東化学
	フタル酸ブチルベンジル	BBP	—	関東化学
	フタル酸ジフェニル	DPP	—	関東化学
	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル標準品	DEHA	—	関東化学
ビスフェノールA、 クロロフェノール類	ビスフェノールA	BPA	0.00006	関東化学
	2,4ジクロロフェノール	DCP	0.000002	関東化学
芳香族化合物	ベンゾフェノン	BP	0.0000006	和光純薬
	4-ニトロトルエン	4NT	—	Dr. Ehrenstorfer
	オクタクロロスチレン	OCS	—	Dr. Ehrenstorfer
	n-ブチルベンゼン	BB	—	和光純薬
陰イオン界面活性剤	直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸	ABS	—	和光純薬
	直鎖トデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	SDS	—	和光純薬
非イオン界面活性剤	ポリエチレングリコール-モノ-4-ノニルフェノールエーテル(n=10)	10NEP	—	東京化成
	ポリエチレングリコール-モノ-4-ノニルフェノールエーテル(n=15)	15NEP	—	東京化成
	ポリオキシエチレン(10)オクチルフェノールエーテル	POE	—	和光純薬
植物由来	ゲンスタイン	GEN	0.00008	SIGMA

— : 2g/Lで換算可能なデータが得られなかったもの

3. 実験結果

3. 1 測定条件の検討

(1) 増殖曲線の作成

結果を図 1 に示す。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。

(2) 供試溶媒の検討

結果は図 2 に示す (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) 測定温度の検討

図 3 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、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、濃度による発色の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 4 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 5 に示す。前述した 17β エストラジオール比活性値と比較すると、植菌量 5×10^6 cells では、ビスフェノール A : 0.00008、ヒドロキシエストラジオール : 0.021、 4×10^7 cells では、0.00012、0.023 であり、若干の差がみられた。このことから、測定日による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。

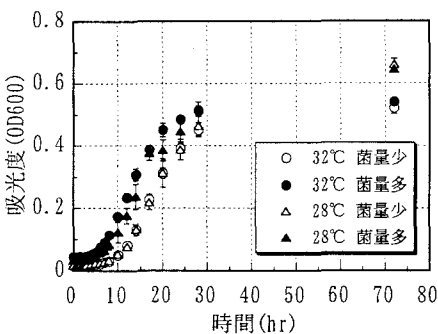


図 1 酵母の増殖曲線

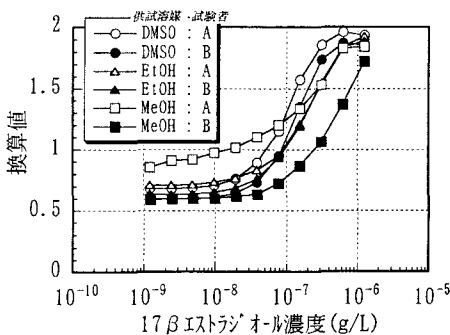


図 2 溶媒の検討

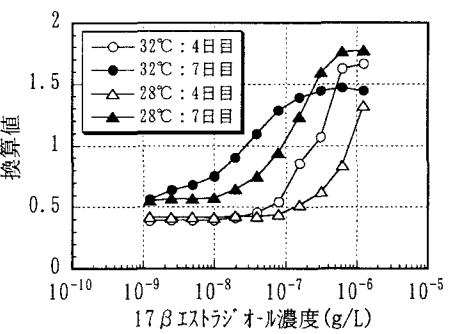


図 3 測定温度の検討

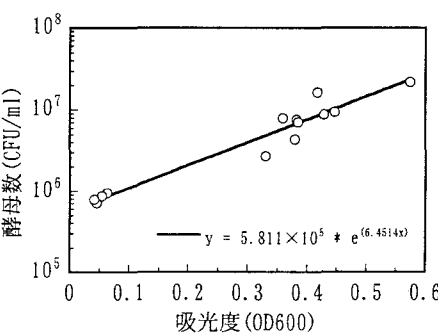


図 4 吸光度と酵母数の相関

(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。

3. 2 標準物質の測定

表 1 の標準物質について測定を行った結果、図 6～8 に示す通り、報告⁹⁾と同様の用量反応曲線が得られた。供試物質の中ではポジティブコントロールとした 17β エストラジオールの活性が最も高く、合成ホルモンであるジエチルスチルベステロールとエチニルエストラジオールは 17β エストラジオールより若干低い活性を示した。ホルモン類に比較して、アルキルフェノール類の活性は低く、フタル酸エステル類は更に低かった。また、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。なお、個々の物質の 17β エストラジオール比活性値を表 1 に示した。供試濃度 (2 g/L) では換算できないものも多かった。

また、エストラジオール、エストロンについて、各メーカー間の活性を比較したところ、活性にほとんど差はみられなかった。

3. 3 実試料の測定

建設省の調査対象処理場において実態調査と同一時に採取された試料を対象に、土木研究所において測定を行った。その結果の一部を図 9 に示す。X 軸の濃度はウェル内の濃縮倍率、Y 軸は式 1 による換算値である。流入水、放流水とも、用量反応曲線が得られた。流入水では、濃縮倍率が高くなると、OD600 値の低下に伴う発色の抑制という酵母に対する毒性がみられたものもあった。また、放流水では、供試濃縮倍率ではほとんど活性がみられないものもあった。次に、用量反応曲線より求めた 17β エストラジオール活性等量と実態調査における 17β エストラジオール測定値⁹⁾に関して、まず流入水と放流水を比較した (図 10)。なお、17β エストラジオール測定値は、Assay Design 社製 ELISA 測定キットで測定されたものである。いずれも、流入水に比べて放流水では、ほとんど低減がみられない場合から検出されないレベルに低減されている場合まで、幅広く分布していた。

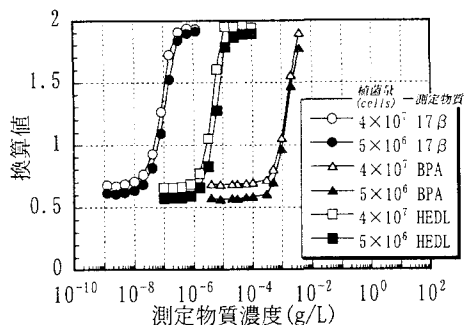


図5 植え込み菌濃度の検討

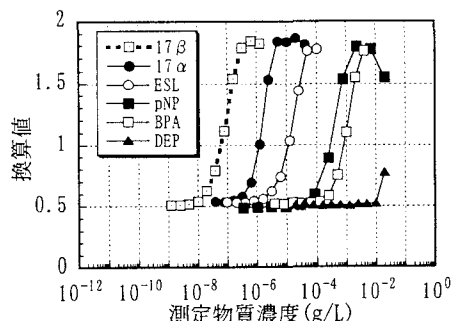


図6 標準物質による用量反応関係(その1)
(17β, 17α, ESL, pNP, BPA, DEP)

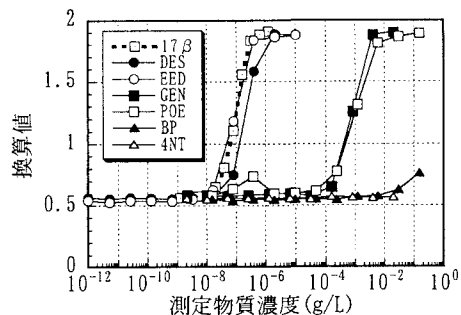


図7 標準物質による用量反応関係(その2)
(17β, DES, EED, GEN, POE, BP, 4NT)

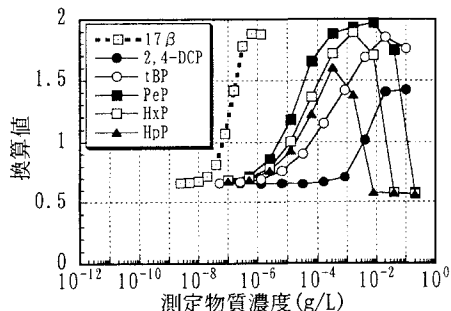


図8 標準物質による用量反応関係(その3)
(17β, 2,4-DCP, tBP, PeP, HxP, HpP)

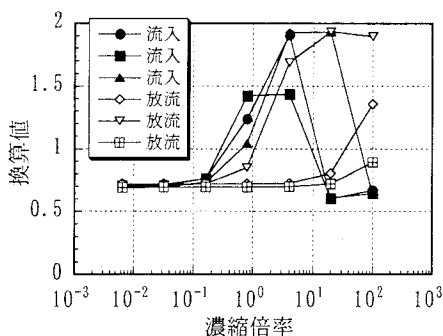


図9 下水流入水・放流水の用量反応関係

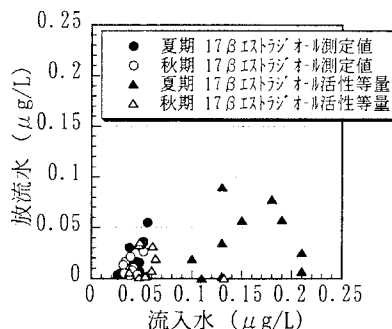


図10 下水中の17βエストロゲン測定値と17βエストロゲン活性等量の関係

また、17βエストロゲン活性等量に関しては、夏期と比較して秋期では流入水、放流水ともに活性が低く処理場間のばらつきも少ない傾向がみられた。更に、流入水中では17βエストロゲン測定値の分布幅と比べて17βエストロゲン活性等量の分布幅の方が大きい傾向がみられた。

また、建設省が実施した実態調査の報告⁴⁾における調査対象化学物質の分析濃度(表2)と表1の17βエストロゲン比活性値より、17βエストロゲン等量理論換算値を求め、17βエストロゲン活性等量、17βエストロゲン測定値と比較した。ここで、「17βエストロゲン等量理論換算値」とは、

表2 流入下水・放流水における基本調査対象物質の測定結果

4)を元に作成

物質名 [検出下限値 (定量下限値)] (μg/L)	流入下水*					放流水				
	測定範囲(μg/L)		検出状況 (該当地点数/調査地点数)			測定範囲(μg/L)		検出状況 (該当地点数/調査地点数)		
	範囲	中央値	定量下限 値以上	tr	ND	範囲	中央値	定量下限 値以上	tr	ND
4-n-オクチルフェノール ¹⁾ [0.1(0.3)]	ND~0.5 ND~0.4	ND ND	2/10 1/10	1/10 1/10	7/10 8/10	ND ND	ND ND	0/10 0/10	0/10 0/10	10/10 10/10
4-t-オクチルフェノール ¹⁾ [0.1(0.3)]	tr(0.1)~3.3 ND~2.3	tr(0.3) 0.3	5/10 5/10	5/10 4/10	0/10 1/10	ND~tr(0.1) ND~tr(0.1)	ND tr(0.1)	0/10 0/10	1/10 6/10	9/10 4/10
ニルフェノール ¹⁾ [0.1(0.3)]	1.9~45 1.7~75	4.5 7.5	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	tr(0.2)~0.7 tr(0.2)~0.9	0.4 0.4	7/10 9/10	3/10 1/10	0/10 0/10
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル ¹⁾ [0.2(0.6)]	2.6~40 11~48	18 27	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	ND~4.9 ND~4.0	0.6 1.5	5/10 7/10	2/10 2/10	3/10 1/10
フタル酸ブチルベンジル ¹⁾ [0.2(0.6)]	ND~1.5 ND~1.9	tr(0.2) tr(0.2)	3/10 3/10	3/10 4/10	4/10 3/10	ND ND	ND ND	0/10 0/10	0/10 0/10	10/10 10/10
フタル酸ジ-n-ブチル ¹⁾ [0.2(0.6)]	3.0~17 1.1~4.4	6.9 2.2	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	ND~tr(0.5) ND~tr(0.2)	ND ND	0/10 0/10	4/10 2/10	6/10 8/10
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル ²⁾ [0.01(0.03)]	1.5~5.8 0.35~2.5	3.2 1.2	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	tr(0.02)~0.15 ND~0.05	0.07 ND	8/10 1/10	2/10 0/10	0/10 9/10
ビスフェノールA [0.01(0.03)]	0.34~1.7 0.35~2.0	1.3 1	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	tr(0.01)~0.51 ND~0.13	0.06 0.04	9/10 6/10	1/10 3/10	0/10 1/10
スチレン/マー [0.1(0.3)]	ND -	ND -	0/10 -	0/10 -	10/10 -	ND -	ND -	0/10 -	0/10 -	10/10 -
スチレンの2及び3量体 ³⁾ [0.01(0.03)]	- ND~tr(0.01)	- ND	- 0/10	- 4/10	- 6/10	- ND	- ND	- 0/10	- 0/10	- 10/10
17βエストロゲン [0.0002(0.0006)]	0.026~0.056 0.032~0.052	0.044 0.040	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0.0032~0.055 0.0028~0.030	0.014 0.012	10/10 10/10	0/10 0/10	0/10 0/10

数値は、上段が夏期調査分、下段が秋期調査分

ND:検出下限値未満 tr:検出下限値以上かつ定量下限値未満

1) 夏期調査と秋期調査とで分析方法が異なる

2) 夏期調査は内部標準法による定量、秋期調査はサロゲート法による定量

3) 流入下水は2,4,6-トリフェニルヘキセン(他は全処理場でND)、放流水は5形態のすべてが全処理場でND

* 夏期調査における測定は、試行分析として実施。精度管理結果から、二重測定、クロスチェックの変動が大きく、測定結果については精度上の問題が残っていると判断される。

試料のエストロゲン様活性が調査対象化学物質に由来し、かつ、それらの化学物質が相加作用を持つと仮定して求めたものであり、化学分析の結果より得られた各物質の濃度と 17 β エストラジオール比活性値を乗じて 17 β エストラジオール等量を換算し、これらを加算することにより、実試料のエストロゲン様活性を理論的に 17 β エストラジオール等量に換算したものである。今回は換算に、4-ノニルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ビスフェノール A を用いた。結果は、夏期調査分を図 11、12 に、秋期調査分を図 13、14 に示す。流入水では、17 β エストラジオール測定値より 17 β エストラジオール活性等量、17 β エストラジオール等量理論換算値の方が大きい傾向がみられた。また、放流水では、17 β エストラジオール測定値と 17 β エストラジオール等量理論換算値との差は小さい傾向がみられた。

4. 考察

組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定結果の表現方法に関しては、明確な定義はされておらず、実試料の測定においても「内分泌攪乱作用」¹⁰⁾、「17 β エストラジオール当量値」¹¹⁾ ¹⁴⁾、「17 β エストラジオール等価値」¹²⁾、「エストロゲン比活性値」¹³⁾、と表現が異なっている。本報告では、化学物質では 17 β エストラジオールに対する「比活性値」、実試料では「17 β エストラジオール活性等量」、化学物質の濃度とその比活性値からの換算では「17 β エストラジオール等量理論換算値」と表現したが、今後、用語の統一が課題である。

実試料の測定において、流入水から放流水へのエストロゲン様活性の低減がみられ、処理場による削減効果が示唆された。各処理場の処理方式は、標準活性汚泥法：2 ヶ所、標準活性汚泥法／一部高度処理：4 ヶ所、標準活性汚泥法＋高度処理：2 ヶ所、活性汚泥循環変法：1 ヶ所、標準活性汚泥法（嫌気好気運転）：1 ヶ所である。なお、処理場により削減効果が異なるが、処理方式と削減効果に関連はみられなかった。また、その削減効果は、1) 活性汚泥への吸着によるのか、2) 分解によるのか、未確認であり、夏期と秋期の差は、1) 季節変動によるのか、2) 採水方法（時間帯、コンポジット採水でない）によるのか、2 回の調査からは明らかでない。

図 11～14 より、17 β エストラジオール等量理論換算値は、今回換算に用いた化学物質（4-ノニルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ビスフェノール A）において

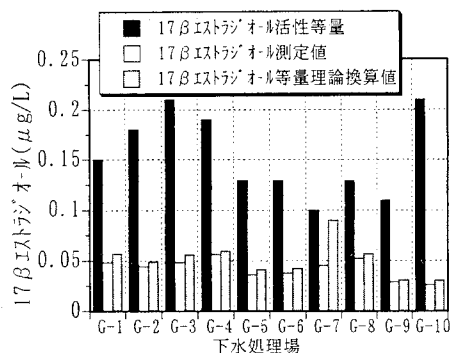


図11 夏期流入水の17 β エストラジオール活性等量、測定値、等量理論換算値の比較

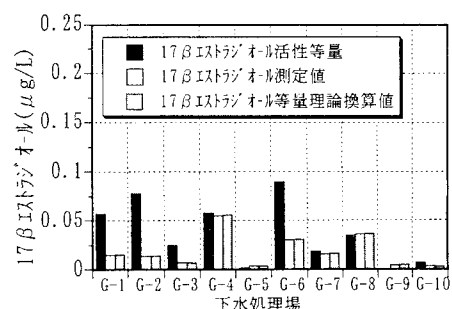


図12 夏期放流水の17 β エストラジオール活性等量、測定値、等量理論換算値の比較

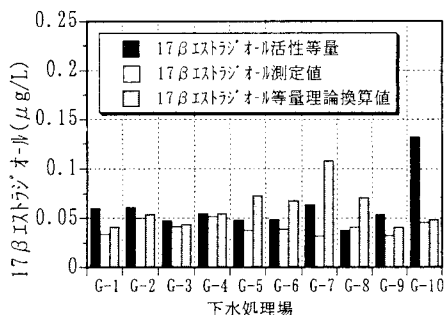


図13 秋期流入水の17 β エストラジオール活性等量、測定値、等量理論換算値の比較

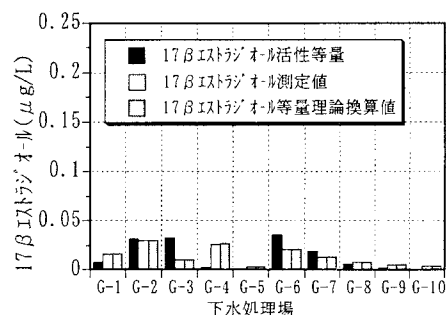


図14 秋期放流水の17 β エストラジオール活性等量、測定値、等量理論換算値の比較

は、ノニルフェノールの測定値が高い場合（主に流入水）に 17β エストラジオール測定値との差が大きくなった。しかし、それ以外の場合（主に放流水）は 17β エストラジオール等量理論換算値に対してほとんど影響せず、 17β エストラジオール等量理論換算値は 17β エストラジオールでほぼ説明できる。また、 17β エストラジオール活性等量の方が 17β エストラジオール等量理論換算値より大きい場合が生じた。この原因として、1)測定対象となっていない未知のエストロゲン様活性物質が含まれている、2)化学物質に相乗効果がある、ことが示唆される。逆に、 17β エストラジオール等量理論換算値の方が 17β エストラジオール活性等量より大きい場合も生じた。この原因として、1)本測定方法によるエストロゲン様活性を阻害する物質が存在している、2)ELISA 測定キットによる 17β エストラジオール測定と組み換え酵母を用いた測定の実施時期が多少異なることにより実試料が変成する、3)ELISA 測定キットでの 17β エストラジオールの測定に課題がある、ことが推定される。

なお、報告¹¹⁾に示されている、放流水中のエストロゲン様活性はほぼ 17β エストラジオールとみなせるという結果は、いくつかの処理場では確認されなかった。これは、1)環境水の固相抽出からの抽出溶媒が報告¹¹⁾では EtOH とジエチルエーテル、本報告では MeOH と異なる、2)採水した処理場における下水の特性が異なる、ことが考えられる。今回、固相抽出の前段でろ過を行い、ろ紙上の残渣からも抽出を行っているが、固相抽出の条件に関しては回収率等を検討せずに測定を実施していることから、エストロゲン様活性物質の抽出が充分であったかは定かでない。しかし、 17β エストラジオールの測定も同一方法で抽出した試料を用いていることから、回収率は同程度であったと推定される。また、下水処理場内での各プロセスにおけるエストロゲン様活性物質の収支や挙動を把握する必要が生じた場合、環境水の測定は比較的容易であるが、活性汚泥等の固形分からの抽出物の測定は困難と考えられる。以上を踏まえ、河川水や下水等の環境試料への適用に関しては、前処理方法、回収率を含め、更に検討を進める必要がある。

組み換え酵母を用いた測定系は、1)化学物質の酵母細胞壁の透過性が良くない、2)アゴニストとアンタゴニストの区別がつきにくい、という問題が指摘されている¹⁶⁾。また、内分泌攪乱作用機序には、1)エストロゲンレセプターを介したもの、2)エストロゲンレセプターを介さないもの、等¹⁷⁾があるが、本測定方法では1)のエストロゲン様活性しか測定できず、更に、ここで示しているエストロゲン様活性がどの程度生体内の反応を反映しているかは不明である。しかし、in vivo（生体内）試験と比較し操作は簡便であり、環境試料への適用は有効であることから、今後は、魚等を用いた in vivo 試験との比較検討が必要と考えられる。

5. 結論

1) 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。

2) 標準物質等の測定を行い、各々の 17β エストラジオール比活性値を求めた。 17β エストラジオールの活性が最も高く、合成ホルモンであるジエチルスチルベステロールとエチニルエストラジオールは 17β エストラジオールより若干低い活性を示した。また、ホルモン類に比較して、アルキルフェノール類の活性は低く、フタル酸エステル類は更に低かった。これは報告⁹⁾と同様の結果であった。

3) 下水処理場の実下水の測定を行い、 17β エストラジオール活性等量に換算した。流入水に比べて放流水では程度の差はあるがエストロゲン様活性は低減しており、処理場による削減効果が示唆された。

4) 複数の化学物質が相加作用を持つと仮定し、試料中に理論的に含まれるエストロゲン様活性を 17β エストラジオールに換算したものを、「 17β エストラジオール等量理論換算値」と新たに提言した。建設省での実態調査対象 23 物質のうち、4-ノニルフェノール、4-n-オクチルフェノール、ビスフェノール A の測定結果を元に換算した場合、組み換え酵母で測定した 17β エストラジオール活性等量と差がみられた。その結果、化学分析では測定できない未知のエストロゲン様活性物質、活性阻害物質の存在等が推察された。

< 謝辞 >

本研究を行うにあたりご助言いただいた、京都大学環境質制御研究センター松井三郎教授、横浜市立大学理学部井口泰泉教授、並びに、測定にご協力いただいた関係各位に感謝致します。

< 参考文献 >

- 1) Environment Agency ; The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents, 1997
- 2) Folmer,L.C. et al. ; Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in fetal male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant, *Environmental Health Perspectives*, Vol.104, No.10, pp.1096-1101, 1996
- 3) 環境庁 ; 外因性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一環境ホルモン戦略計画 SPEED'98一, 1998
- 4) 建設省河川局・都市局下水道部 ; 平成10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, 1999
- 5) Routledge,E.J. and Sumpter,J.P. ; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.15, No.3, pp.241-248,1996
- 6) Arnold,S.F. et al. ; A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens, *Environmental Health Perspectives*, Vol.104, No.5, pp.544-548, 1996
- 7) Nishikawa,J. et al. ; New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol.154, pp.76-83,1999
- 8) Pons,M. et al. ; A new cellular model of response to estrogens : a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules, *Biotechniques*, Vol.9, No.4, pp.450-459, 1990
- 9) Soto,A.M. et al. ; The E-screen assay as a tool to identify estrogens : an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives*, Vol.103, pp.113-122, 1995
- 10) 中室克彦 他 ; 酵母 Two-Hybrid System による水中内分泌攪乱化学物質の検出, 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会要旨集, p.5, 1998
- 11) 滝上英孝 他 ; 環境水中エストロゲン様物質の検出・評価, 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会要旨集, p.44, 1998
- 12) 恩田健介 他 ; 下水中の女性ホルモン様物質の評価, 第33回日本水環境学会講演集, p.175, 1999
- 13) 川越保徳 他 ; 酵母 Two-hybrid 法による海面埋立廃棄物処分場浸出水のエストロゲン様活性の評価, 第33回日本水環境学会講演集, p.177, 1999
- 14) 滝上英孝 他 ; し尿処理場を対象としたヒトエストロゲンの分析, 第33回日本水環境学会講演集, p.178, 1999
- 15) 環境庁水質保全局水質管理課 ; 水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) 実態概況調査 (夏季) 結果速報, 1998
- 16) 金子秀雄 他 ; 女性ホルモン様物質の検出系, *科学*, Vol.68, No.7, pp.598-605, 1998
- 17) 環境庁リスク対策検討会監修 ; 環境ホルモン 外因性内分泌攪乱化学物質問題に関する研究班中間報告書, 1997