

B-45 種間差を考慮した、下水試料および河川水のエストロゲン様作用の評価

○大野 満理子^{1*}・井原 賢¹・Vimal KUMAR¹・成宮 正倫¹・花本 征也¹・
宮川 信一²・井口 泰泉²・田中 宏明¹

¹京都大学工学研究科 (〒520-0811 大津市由美浜1-2 京都大学工学研究科附属
流域圏総合環境質研究センター)

²自然科学研究機構基礎生物学研究所 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺東山5-1)

* E-mail: mariko.o@biwa.egc.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

医薬品の1つである合成ホルモン剤や、界面活性剤の原料に利用されるアルキルフェノール類は内分泌攪乱物質(EDCs)の1つとして問題になっている。下水処理場からの放流水は EDCs の水環境中への主な排出源の一つであると考えられており、現在までに多くの魚類が EDCs の影響を受けていると報告されている。生物多様性保護の観点から、多種の水生生物への内分泌攪乱性の評価が必要であると考えられる。本研究では、ヒトや魚類のエストロゲンレセプター α (ER α)を用いたアッセイを行うことで、感受性の異なる生物への下水や河川水中のエストロゲン様作用の種間差を評価することを目的とした。従来の酵母レポータージーンアッセイでは、ヒトやメダカの ER α が主に使用されてきたが、本研究ではヒトとメダカに加えてコイ、ファットヘッドミノー(以下、ミノー)、ゼブラフィッシュ(以下、ゼブラ)の ER α を用いた培養細胞レポータージーンアッセイによって、二次処理水および河川水のエストロゲン様作用を評価した。

2. 実験方法

(1) レポータージーンアッセイの試験方法

HEK293 細胞(ヒト胎児腎由来)を 96 well plate で培養し、翌日に ER α とルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを細胞へ導入した。導入する ER α の生物種を変えることで、生物種ごとのエストロゲン様作用の評価が可能である。プラスミドを導入した約 4 時間後に試料を細胞に曝露した。試料の曝露後約 40 時間後にルシフェラーゼによる発光量を測定し、発光量の大きさからエストロゲン様作用の強さを評価した。

(2) 標準化学物質を用いたアッセイ

標準化学物質によるエストロゲン様作用の種間差を評価するために、エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、エストリオール(E3)、ビスフェノール A (BPA)を用いてアッセイを行った。E1、E2、E3、BPA はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解したものを使用した。E1、E2、E3 は細胞曝露濃度が 10^5 M から 10^{14} M、BPA は細胞曝露濃度が 10^4 M から 10^{10} M となるように、それぞれ公比 10 で希釈列を作成し、細胞曝露時の DMSO 濃度が 0.1% となるように調整した。

(3) 下水試料・河川水を用いたアッセイ

a) 試料の採水地点

下水試料を用いたアッセイには、2011 年 1 月 27 日に A 下水処理場で採水した二次処理水と、2011 年 2 月 28 日に B 下水処理場で採水した二次処理水をアッセイに供した。A 下水処理場は凝集剤添加活性汚泥法、B 下水処理場は標準活性汚泥法による下水処理を行っている。また、河川水を用いたアッセイでは、淀川水系の地点 C と地点 D の 2 地点で 2011 年 3 月 23 日に採水した河川水をアッセイに供した。下水処理水の混入割合は、地点 C が約 41%、地点 D が約 16%である。

b) 試料の前処理

以下の方法に従って Oasis HLB(200mg/6cc, Waters)を用いた固相抽出を行い、試料を濃縮した。試料をガラス繊維ろ紙でろ過した後、Oasis HLB に通水した。Oasis HLB からメタノール 5 mL によって溶出した。溶出液を N_2 パージによって乾燥し、DMSO 濃度が 0.2%となるように DMEM 培地で希釈した溶液 500 μ L で再溶解した。試料の濃縮倍率が 10^5 から 100 倍濃縮で、細胞毒性が確認されない範囲で細胞へ曝露した。試料を細胞へ曝露する際には、DMSO 濃度が 0.1%となるように調節した。

(4) データ解析方法

GraphPad Prism 5(Graph Pad Software, Inc.)を用いて解析した。標準化学物質については用量応答曲線から EC_{50} 値を算出した。E2 に対する EC_{50} 値を E1、E3、BPA それぞれに対する EC_{50} 値で割ることで比活性を求めた。下水試料および河川水中については、用量応答曲線から E2 の 25% 活性(EC_{25} E2)と同じ活性を示す試料の濃縮倍率(EC_{25} sample)を求めた。 EC_{25} E2 を EC_{25} sample で割ることで、試料の持つエストロゲン作用の E2 当量(Estradiol Equivalency Quantity: EEQ)を求めて評価した。

(5) LC/MS/MSによるエストロゲン類の分析

二次処理水と河川水中の E1、E2、E3 濃度を測定した。

a) 前処理方法

以下の方法に従い Oasis HLB(200mg/6cc, Waters)を用いた固相抽出を行った。試料をガラス繊維ろ紙でろ過後、20%酢酸と E1、E2、E3 のサロゲートを添加し、Oasis HLBに通水した。Oasis HLBを MilliQ 水 5mL で洗浄し吸引脱水した。Oasis HLBを Sep-pak NH2(360mg, Waters)に連結し、メタノール 8mL で溶出した。溶出液を N_2 パージによって乾燥し、アセトニトリル: MilliQ 水=1:9 溶液 1ml で再溶解したものを測定した。

b) UPLCによる分析

LCには、Waters ACQUITY UPLC™ (Waters)を使用し、カラムには ACQUITY BEH C18を使用した。カラム温度は 40℃、移動相には水/アセトニトリルを用いて流速を 0.2 mL/minとした。質量分析計には、Micromass Quattro PremierMS/MS (Waters)を用いた。イオン化は ESI とし、ソフトウェアには MassLynx 4.1 を用いた。

3. 結果と考察

(1) 標準化学物質の結果と考察

E2 を曝露したときの各生物種 $ER\alpha$ へのエストロゲン活性の用量応答曲線を図 1 に示す。図 1 に示すように、全ての生物種に対して E2 によるエストロゲン作用の用量応答曲線が確認された。

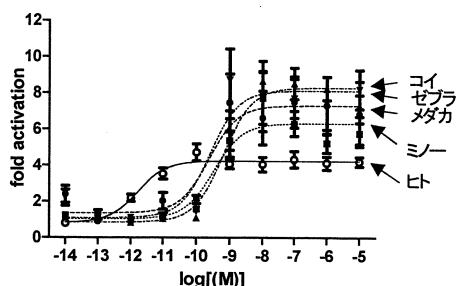


図1 E2によるエストロゲン作用の用量応答曲線

E2 のエストロゲン活性を 100%とした時の、E2 に対する E1、E3、BPA の比活性を表 1 に示す。

表1 標準化学物質の比活性(%)

	E2	E1	E3	BPA
メダカ	100	9.79±1.20	6.20±1.46	$8.47 \times 10^2 \pm 3.70 \times 10^2$
ミノー	100	7.48±1.48	23.7±4.35	$5.37 \times 10^2 \pm 9.18 \times 10^3$
コイ	100	10.5±1.05	19.4±3.62	$2.63 \times 10^2 \pm 2.90 \times 10^3$
ゼブラ	100	6.31±0.999	9.78±1.64	$1.09 \times 10^2 \pm 1.58 \times 10^3$
ヒト	100	2.05±0.836	10.2±1.98	$4.20 \times 10^4 \pm 1.38 \times 10^4$

表 1 から以下のことが得られた。E1 の比活性は大きい順にメダカ 9.79、コイ 10.5、ミノー 7.48、ゼブラ 6.31、ヒト 2.05 であった。特にメダカはヒトの約 4.8 倍の比活性であり、E1 のエストロゲン様作用に種間差があることが示された。E3 の比活性は大きい順にミノー 23.7、コイ 19.4、ヒト 10.2、ゼブラ 9.78、メダカ 6.20 であった。特にミノーはメダカの約 3.8 倍の比活性であり、E3 によるエストロゲン様作用には種間差があることが示された。BPA の比活性は大きい順にメダカ 8.47×10^2 、ミノー 5.37×10^2 、コイ 2.63×10^2 、ゼブラ 1.09×10^2 、ヒト 4.20×10^4 であった。特にメダカはゼブラの約 7.8 倍の比活性であり、魚類はヒトよりも BPA によるエストロゲン様作用が高く、魚類の中でも種間差があることが示された。

(2) 下水試料の結果と考察

a) A 下水処理場の二次処理水

A 下水処理場の二次処理水の用量応答曲線を図 2 に示す。

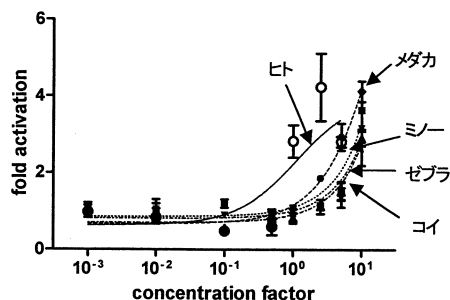


図2 二次処理水によるエストロゲン様作用の用量応答曲線(A 下水処理場)

図 2 では全ての生物種に対して、二次処理水の用量依存的な応答が得られた。二次処理水の EEQ は、メダカが 7.98 ± 0.620 ng/L、ミノーが 6.19 ± 0.594 ng/L、コイが 5.88 ± 1.49 ng/L、ゼブラが 2.42 ± 0.659 ng/L、ヒトが 0.595 ± 0.154 ng/L であった。また、二次処理水中の E1 濃度は 3.3 ng/L、E2 濃度は 0.8 ng/L、E3 は未検出であった。

b) B 下水処理場の二次処理水

B 下水処理場の二次処理水のエストロゲン様作用は、コイ以外の全ての生物に対して用量依存的な応答が得られた。二次処理水の EEQ は、メダカが 9.75 ± 1.79 ng/L、

ミノーは 7.69 ± 0.536 ng/L、ゼブラは 5.22 ± 0.00890 ng/L、ヒトは 5.62 ± 1.98 ng/L であった。また、二次処理水中の E1 濃度は 37.0 ng/L、E2 と E3 は検出下限値以下であった。

c) 下水試料の考察

A 下水処理場と B 下水処理場の二次処理水を用いたアッセイから、エストロゲン様作用の感受性には種間差があることが示された。

二次処理水中の E1、E2、E3 の濃度および表 1 の比活性から E1、E2、E3 による理論 EEQ を算出した。レポータージーンアッセイによる EEQ の実測値と理論値を表 2 に示す。

表 2 二次処理水の実測と理論 EEQ (ng/L)

	A 下水処理場		B 下水処理場	
	実測値	理論値	実測値	理論値
メダカ	7.98 ± 0.620	1.33	9.75 ± 1.79	3.60
ミノー	6.19 ± 0.594	1.05	7.69 ± 0.536	2.77
コイ	5.88 ± 1.49	1.15	反応なし	3.89
ゼブラ	2.42 ± 0.659	1.01	5.22 ± 0.00890	2.33
ヒト	0.595 ± 0.154	0.868	5.62 ± 1.98	0.759

二次処理水中のエストロゲン様物質が E1、E2、E3 のみであると仮定した場合、実測値と理論値が等しくなるはずであるが、表 2 では実測値と理論値は一致しない。この原因としては、二次処理水中にはノニルフェノール (NP) やオクチルフェノール (OP) など他のエストロゲン様物質やエストロゲン様作用があると知られていない未知の化学物質が存在すること、複数のエストロゲン様物質が存在することによる複合影響の可能性が考えられる。

(3) 河川水の結果と考察

a) 地点 C

地点 C で採水した河川水のエストロゲン様作用は、コイ以外の全ての生物に対して用量依存的な応答が得られた。各生物種の ER α に対する地点 C の河川水の EEQ は、メダカが 2.88 ± 0.227 ng/L、ミノーが 1.09 ± 0.286 ng/L、ゼブラが 0.433 ± 0.0254 ng/L、ヒトが 0.198 ± 0.0437 ng/L であった。また、河川水中の E1 濃度は 3.9 ng/L、E2 と E3 は未検出であった。

b) 地点 D

地点 D で採水した河川水のエストロゲン様作用はヒトとメダカに対して用量依存的な応答が得られた。ヒトとメダカの ER α に対する EEQ は、メダカが 0.505 ± 0.164 ng/L、ヒトが 0.0599 ± 0.0304 ng/L であった。また、河川水中の E1 濃度は 1.8 ng/L、E2 と E3 は未検出であった。

c) 河川水の考察

河川水を用いたアッセイから、エストロゲン様作用には種間差があることが示された。特にメダカはヒトよりも感受性が高いことが示された。河川水中の E1、E2、E3 の濃度および表 1 の比活性から E1、E2、E3 による理論 EEQ を算出した。レポータージーンアッセイによる

EEQ の実測値と理論値を表 3 に示す。

表 3 河川水の実測と理論 EEQ (ng/L)

	地点 C		地点 D	
	実測値	理論値	実測値	理論値
メダカ	2.88 ± 0.227	0.381	0.505 ± 0.164	0.176
ミノー	1.09 ± 0.286	0.292	反応なし	0.135
コイ	反応なし	0.410	反応なし	0.189
ゼブラ	0.433 ± 0.0254	0.264	反応なし	0.114
ヒト	0.198 ± 0.0437	0.0780	0.0599 ± 0.0304	0.0369

河川水中のエストロゲン様物質が E1、E2、E3 のみであると仮定した場合、実測値と理論値が等しくなるはずであるが、表 3 では実測値と理論値は一致しない。この原因としては、二次処理水と同様に、河川水中には NP や OP など他のエストロゲン様物質やエストロゲン様作用があると知られていない化学物質が存在すること、複数のエストロゲン様物質が存在することによる複合影響が考えられる。

4. まとめ

下水処理水と河川水が多種類の生物 ER α に対してエストロゲン様作用を示したことから、環境水中の内分泌攪乱性を評価する際には、ヒトだけでなく多種類の生物種の ER α を用いることの必要性が示された。種間差の原因となっている化学物質(既知または未知のエストロゲン様物質)の同定や、EEQ 実測値と理論値の乖離の原因と考えられる化学物質の複合影響については、現在研究を進めている。

謝辞：本研究は(財)河川環境管理財団、戦略的創造研究推進事業 CREST、科学研究費助成事業及び、環境省の日英共同研究からの助成により実施されたものである。記して感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 井口泰泉、生殖異常 環境ホルモンの反逆、株式会社かもがわ出版
- 2) 社団法人 日本水環境学会関西支部編、アプローチ環境ホルモン-その基礎と水環境における最前線、技報堂出版
- 3) Kumal V. et al., *Chemosphere* 77 (2009) 1440–1446