

原 著

三重県内公共用水域におけるエストロゲン様物質の分布

岩崎誠二，高橋正昭，加藤進，山下晃，松田知成^{a)}

ヒト女性ホルモン受容体遺伝子を組み込んだ酵母を利用したバイオアッセイで，エストロゲン様物質の定量を試みた．本バイオアッセイで三重県内の18河川のエストロゲン様物質を定量したところ，最大値は今井橋で4.0 ng/Lであった．また，ろ過液とろ過物を分別してそれぞれを定量したところ，大部分がろ過液で検出された．

河川水のエストロゲン様物質は，COD，NH₄と高い相関性があったので，し尿系排水に由来することが推察された．

キーワード：ヒト女性ホルモン受容体遺伝子，酵母，バイオアッセイ，エストロゲン様物質

はじめに

生体の内分泌機能に対する障害性を持つ化学物質，すなわち内分泌攪乱物質が生体の発生，生殖等に深刻な影響を及ぼすおそれがあることが指摘されている．それらの物質が生態系に与える影響を把握するためには，まず環境における実態を調査しなければならない．しかしながら，従来の調査では物質ごとの分析が主であり，それらの手法では環境における総合的な内分泌攪乱物質の活性を把握するのは困難なことが多い．

P. Sumpter¹⁾は，内分泌攪乱物質のうちエストロゲン様の活性を持つ物質を測定する手法として，組み換え酵母を用いる方法を開発した．すなわち，本組み換え酵母には，染色体中にヒト女性ホルモン受容体遺伝子(human Estrogen Receptor，以下，本酵母をhERという)が組み込まれていて，恒常的に女性ホルモン受容体を発現している(図1)，(1)．ここに女性ホルモン様物質，すなわち，エストロゲン様物質が存在すると，女性ホルモン受容体と結合し，その受容体が活性化する(2)．活性化した受容体は，染色体上の女性ホルモン反応部位と結合し(3)，下流のLacZ遺伝子の転写を活性化する．この結果，β-galactosidaseが生産され(4)，この酵素の活性を検出することができる適当な発色物質(CPRG等)を加えておけば，発色の変化によりエストロゲン様物質を検出することができる(5)．このようにhERには生体内でのホルモンの反応メカニズムが部分的に取り込まれているので，機器分析では測定することができないトータルのエストロゲン活性や，各種物質の複合的な効果を測定できると考えられる．

そこで本研究では，三重県内の公共用水域におけるエ

ストロゲン活性の実態を把握するため，hERを使用したバイオアッセイで，エストロゲン様物質の定量を試みたので報告する．

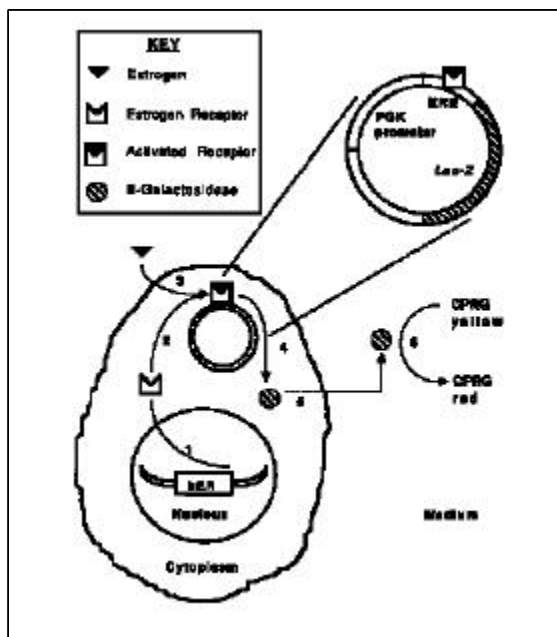


図1 hERによるエストロゲン活性の検出メカニズム

実験方法

1. 調査地点

表1に示す三重県内の18河川，18地点で，平成12年4～8月に1～2回調査した．

2. 調査項目

エストロゲン様物質の他，水素イオン濃度(pH)等11項目実施した(表2)．

^{a)}京都大学大学院工学研究科環境質制御研究センター

表1 調査対象河川名及び地点名

| 河川名 | 地点名 | 類型 |
|------|-------|----|
| 員弁川 | 日の出橋 | B |
| 朝明川 | 朝明橋 | A |
| 海蔵川 | 海蔵橋 | B |
| 三滝川 | 三滝橋 | B |
| 天白川 | 大井の川橋 | D |
| 鈴鹿川 | 小倉橋 | B |
| 金沢川 | 千代崎樋門 | C |
| 中の川 | 木鎌橋 | A |
| 志登茂川 | 今井橋 | C |
| 安濃川 | 御山荘橋 | A |
| 岩田川 | 観音橋 | C |
| 雲出川 | 雲出橋 | A |
| 坂内川 | 荒木橋 | B |
| 櫛田川 | 櫛田橋 | A |
| 外城田川 | 野依橋 | C |
| 宮川 | 度会橋 | AA |
| 勢田川 | 勢田大橋 | C |
| 五十鈴川 | 掘割橋 | A |

表2 調査項目及び分析方法

| 調査項目名 | 略称 | 分析方法 |
|-----------|-----|------------|
| 水素イオン濃度 | pH | JIS K 0102 |
| 電気伝導度 | EC | " |
| 化学的酸素要求量 | COD | " |
| 浮遊物質 | SS | 本文調査方法4.8) |
| 硝酸イオン | NO3 | JIS K 0102 |
| 亜硝酸イオン | NO2 | " |
| アンモニウムイオン | NH4 | " |
| リン酸イオン | P04 | " |
| 全窒素 | T-N | " |
| 全リン | T-P | " |

3. エストロゲン様物質の分析方法¹⁾

1)hER hERは、Brunel大学のP.Sumpter教授から分与を受けた(平成11年9月)。

2)基礎培地 組成を表3に示す。

3)増殖培地 組成を表4に示す。

4)保存培地 保存培地は基礎培地85mLにグリセリンを15mL加えたものを使用した。

5)酵母培養液の保存

増殖培地50mLに分与されたhERを50µL殖種し、28℃で24時間振とう培養を行ったのち、3000rpmで10分遠心分離して集菌した。この菌体に保存培地5mLを加え混合、懸濁し、マイクロチューブに100µLづつ分注して-80℃で保存した。

6)酵母培養液の前培養

増殖培地50mLに2)の保存酵母を50µL殖種し、28℃で24時間振とう培養した。

7)アッセイ培地

増殖培地50mLにCPRG溶液0.5mLおよび酵母培養液0.4mLを加えたものを使用した。

表3 最小培地の組成

| | 1Lあたり |
|---------------------|--------|
| リン酸二水素カリウム | 13.61g |
| 硫酸アンモニウム | 1.98g |
| 水酸化カリウム | 4.2g |
| 硫酸マグネシウム | 0.2g |
| 硫酸第二鉄(40mg/50mL)水溶液 | 1mL |
| L-ロイシン | 50mg |
| L-ヒスチジン | 50mg |
| アデニン | 50mg |
| L-アルギニン塩酸塩 | 20mg |
| L-メチオニン | 20mg |
| L-チロシン | 30mg |
| L-イソロイシン | 30mg |
| L-リシン塩酸塩 | 30mg |
| L-フェニルアラニン | 25mg |
| L-グルタミン酸 | 100mg |
| L-バリン | 150mg |
| L-セリン | 375mg |
| 121、10分間滅菌 | |

表4 増殖培地の組成

| | |
|-------------------|---------|
| 最小培地 | 45mL |
| D-(+)-グルコース溶液 | 5mL |
| L-アスパラギン酸溶液 | 1.25mL |
| ビタミン溶液 | 0.5mL |
| L-スレオニン溶液 | 0.4mL |
| 硫酸銅溶液 | 125µL |
| (各溶液の調製法) | |
| D-(+)-グルコース溶液 | 20w/v% |
| 121、10分間滅菌 | |
| L-アスパラギン酸溶液 | 4mg/mL |
| 121、10分間滅菌 | |
| ビタミン溶液 | |
| チアミン | 8mg |
| ピリドキシン | 8mg |
| パントテン酸 | 8mg |
| イノシトール | 40mg |
| ビオチン溶液(2mg/100mL) | 20mL |
| 0.2µmフィルタで除菌 | 200mL |
| L-スレオニン溶液 | 24mg/mL |
| 121、10分間滅菌 | |
| 硫酸銅溶液 | 20mM |
| 0.2µmフィルタで除菌 | |

標準試料として17 エストラジオール(以下、E2という)をエタノール(和光, 残留農薬分析用)に溶解し、100µg/Lの溶液を調製した

9)試料水の濃縮

試料水の濃縮は、建設省法に従った。すなわち、試料水500~2000mLをGF/Cろ紙でろ過し、ろ液とろ過物に分別した。なお、GF/Cろ紙は500℃で4時間、乾燥したのち、

デシケータ内で放冷，そのまま保存し，使用直前に秤量した。

ろ液は，Sep-pak C18カートリッジ（Waters社製，メタノール（和光，残留農薬分析用）10mLおよびミリQ水10mLで洗浄済み）に通水したのち，ミリQ水10mLで洗浄した。カートリッジを遠心分離（3000rpm，10分）で脱水し，10mLメタノールで溶出した。溶出液をエバポレータで約2mLに濃縮し，スピッツ試験管に移しかえ，窒素気流下でメタノールを留去したのち，200 μ Lジメチルスルホキシド（和光，生化学用）で溶解し，測定試料とした。

ろ過物は，40 $^{\circ}$ Cで2時間乾燥して秤量し，メタノール10mLで超音波抽出を10分，2回行い，抽出液をガラスフィルタでろ過したのち，エバポレータ操作以下をろ液と同様に行った。

10) バイオアッセイ方法

標準試料および測定試料をエタノールで順次3倍希釈し，96穴マイクロプレートに10 μ Lずつ移し，そのままエタノールを蒸発させたのち，200 μ Lのアッセイ培地を加え，32 $^{\circ}$ Cで72時間培養した。培養後，マイクロプレートリーダーで540nmの吸光度を測定し，E2の標準曲線から試料中のエストロゲン様物質量を算出した。

4. その他水質項目の分析方法

試験方法は表2のとおりである。

実験結果及び考察

1. 酵母法によるE2の検量線

酵母法を利用して，代表的な女性ホルモン物質であるE2を標準物質として作成した検量線が，図2である。横軸の濃度が対数で示された検量線で，図のとおりシグモイド様の曲線を示した。540nmの吸光度でブランクが0.6，フルスケール値で2.4程度であり，それらの中央値における標準の濃度は約12pgであった。また，標準物質濃度が0.41~3.7 μ g/Lの範囲で曲線部分を直線で近似したところ，回帰係数0.99を上回った。

2. 河川水のE2濃度

本調査では，河川水をGF/Cろ紙（孔径0.45 μ m）で，ろ液とろ過物に分別してそれぞれのエストロゲン活性を分析した。それぞれの分別物に含まれるエストロゲン様物質の濃度を，次のとおり略称した。

- ・D-E2：ろ液1Lあたりのエストロゲン様物質（単位:ng/L）
- ・S-E2：検水1Lあたりのろ過物に含まれるエストロゲン様物質（単位:ng/L）

・T-E2：D-E2とS-E2の合計（単位:ng/L）

・F-E2：ろ過物に含まれるエストロゲン様物質量（単位： μ g/kgまたはppb）

三重県内18地点の河川水をそれら各態のエストロゲン様物質ごとに分析した結果を表したのが，表3である。

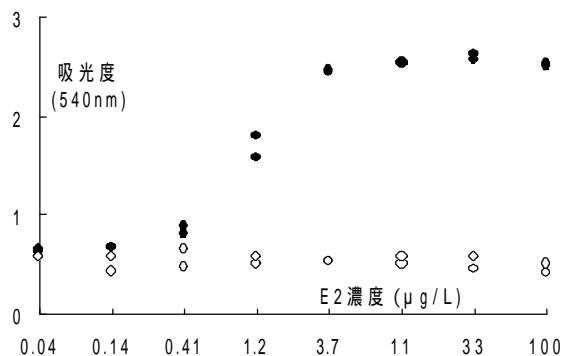


図2 酵母法によるE2の検量線

最大値はT-E2およびD-E2で今井橋の4.0ng/Lおよび3.9ng/L，S-E2は千代崎の0.5ng/L，F-E2は中の川の245 μ g/kgであった

酵母法ではE2以外にビスフェノールA及びノニルフェノールがエストロゲン様物質として検出される。しかしながら感度はE2の 10^{-4} 程度であり¹⁾，河川水に含まれる程度のビスフェノールA等を検出するのは困難であると考えられる。また，下水道，浄化槽排水等し尿系の排水には高濃度のE2及びその抱合体が含まれていて，抱合体も酵母法で検出されることもあるので，本研究で酵母法が検出しているのは大部分がE2及びその抱合体等であると思われる²⁾。

水環境のエストロゲン活性が生物に与える影響を評価する方法として，魚類の血清中に存在するピテロジェニンというリン脂質タンパクの定量がしばしば行われている^{3,4)}。ピテロジェニンはエストロゲン活性に反応して誘導されるので，魚類のピテロジェニンの濃度が上昇したということは，水中に，魚類に対し影響を及ぼすほどのエストロゲン様物質が存在することを表している。メダカを用いた調査では10ng/L以下でもピテロジェニンの濃度が上昇したという報告^{3,4)}もあるので，県内河川のエストロゲン様物質についても継続して調査する必要がある。

表5 地点別の各態E2濃度

| 地点名 | 調査月 | T-E2 ng/L | D-E2 ng/L | S-E2 ng/L | F-E2 ppb |
|-------|-----|--------------|--------------|--------------|-------------|
| 日の出橋 | 4月 | 0.7 | 0.3 | 0.4 | 233 |
| | 7月 | 0.4 | 0.4 | <0.2 | <1 |
| 朝明橋 | 4月 | 0.8 | 0.4 | 0.4 | 195 |
| | 7月 | 0.4 | 0.4 | <0.2 | <1 |
| 海蔵橋 | 5月 | 1.0 | 0.6 | 0.5 | 78 |
| | 7月 | 0.4 | 0.4 | <0.2 | <1 |
| 三滝橋 | 5月 | 1.6 | 1.2 | 0.5 | 51 |
| | 7月 | 0.5 | 0.5 | <0.2 | <1 |
| 大井の川橋 | 5月 | 0.7 | 0.3 | 0.4 | 80 |
| 小倉橋 | 5月 | 1.2 | 0.7 | 0.5 | 200 |
| | 7月 | 0.5 | 0.5 | <0.2 | <1 |
| 千代崎樋門 | 5月 | 3.4 | 2.4 | 1.0 | 28 |
| 木鎌橋 | 5月 | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 245 |
| | 8月 | 2.1 | 1.7 | 0.3 | 13 |
| 今井橋 | 5月 | 2.7 | 2.7 | <0.2 | <1 |
| | 8月 | 4.0 | 3.9 | 0.1 | 17 |
| 御山荘橋 | 5月 | 2.2 | 2.1 | 0.2 | 19 |
| | 8月 | 1.7 | 1.6 | 0.2 | 3 |
| 観音橋 | 5月 | 1.2 | 1.1 | <0.2 | 7 |
| | 8月 | 1.5 | 1.3 | 0.1 | 36 |
| 雲出橋 | 5月 | 0.5 | 0.5 | <0.2 | <1 |
| 荒木橋 | 5月 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <1 |
| 榎田橋 | 5月 | 1.0 | 1.0 | <0.2 | <1 |
| 野依橋 | 5月 | 1.9 | 1.8 | <0.2 | 12 |
| 度会橋 | 5月 | <0.2 | <0.2 | <0.2 | <1 |
| 勢田大橋 | 5月 | 2.2 | 2.0 | 0.2 | 7 |
| 掘割橋 | 5月 | 0.6 | 0.3 | 0.3 | 114 |

3. 各態のエストロゲン様物質濃度

表6は調査した全項目の相関行列である。これらの項目の中で、T-E2とD-E2は相関係数0.97と高い相関性があった。また図3に示す散布図から推定して、D-E2はT-E2のおおよそ90%を占めるものと考えられ、水環境中のエストロゲン様物質は、量的には大部分が溶存態であると推察される。一方、SSに吸着していたE2量は絶対量では少ないとはいうものの、SSの重量あたりのE2、すなわちF-E2では最大で245ppbと、媒体あたりの濃度ではD-E2より高い値を示していた。ただF-E2は地点によって非常にばらつきが大きかったことや、T-E2またはD-E2との相関が認められなかったことを考えると、F-E2の値にはSSの種類も関連していると思われる。

また、アッセイ時の妨害物質の存在も考えられるので、水環境におけるエストロゲン活性を正しく評価するためには、標準添加法、あるいは液体クロマトグラフィーによる分画等を行って、妨害成分を追求することが必要である。

表6 各項目の相関行列

| | pH | EC | ECOD | SS | NO3 | NO2 | NH4 | PO4 | T-N | T-P | T-E2 | S-E2 | F-E2 | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-----|
| pH | *** | | | | | | | | | | | | | |
| EC | -0.01 | *** | | | | | | | | | | | | |
| ECOD | -0.18 | 0.34 | *** | | | | | | | | | | | |
| SS | -0.24 | 0.27 | 0.45 | *** | | | | | | | | | | |
| NO3 | 0.04 | -0.34 | -0.10 | 0.02 | *** | | | | | | | | | |
| NO2 | -0.27 | -0.06 | 0.34 | 0.38 | 0.49 | *** | | | | | | | | |
| NH4 | -0.12 | 0.41 | 0.78 | 0.34 | -0.04 | 0.31 | *** | | | | | | | |
| PO4 | -0.40 | 0.11 | 0.40 | 0.41 | 0.28 | 0.29 | 0.56 | *** | | | | | | |
| T-N | -0.22 | -0.05 | 0.19 | 0.18 | 0.81 | 0.44 | 0.33 | 0.65 | *** | | | | | |
| T-P | -0.43 | 0.13 | 0.43 | 0.43 | 0.22 | 0.30 | 0.59 | 1.00 | 0.60 | *** | | | | |
| T-E2 | -0.16 | 0.06 | 0.74 | 0.47 | 0.10 | 0.46 | 0.78 | 0.48 | 0.26 | 0.51 | *** | | | |
| D-E2 | -0.07 | 0.05 | 0.74 | 0.43 | 0.19 | 0.53 | 0.76 | 0.47 | 0.32 | 0.49 | 0.97 | *** | | |
| S-E2 | -0.37 | 0.05 | 0.22 | 0.30 | -0.35 | -0.14 | 0.25 | 0.16 | -0.15 | 0.20 | 0.37 | 0.14 | *** | |
| F-E2 | -0.14 | -0.07 | -0.19 | -0.27 | -0.40 | -0.23 | -0.17 | -0.22 | -0.41 | -0.19 | -0.13 | -0.27 | 0.53 | *** |

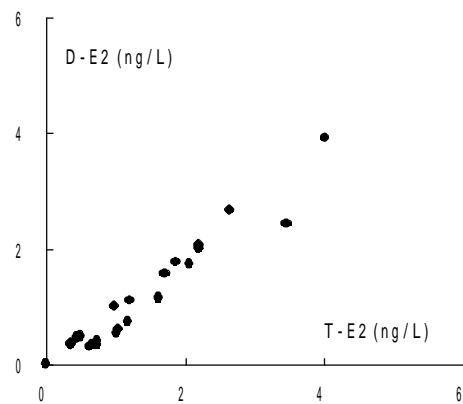


図3 T-E2とD-E2の関係

4. 他の項目とE2の相関

エストロゲン様物質と他の項目との相関性としてT-E2とCOD及びNH4はそれぞれ0.74、0.78と高い相関があり、またSS、NO2、PO4及びT-Pも0.5前後の相関係数であった。河川水中のエストロゲン様物質は大部分が浄化槽、下水道排水あるいは畜産系排水に由来するE2であると考えられている²⁾。そのため、それらの排水に大量に含まれる窒素、リン等とは高い相関性があることは、ある程度予想されたところであった。一方、S-E2及びF-E2は、他の項目との相関は小さかった。環境中のエストロゲン様物質については報告が少ないので、今後とも調査を継続する必要がある。

まとめ

組み換え体酵母を利用したエストロゲン様物質のバイオアッセイを試みたところ、次のとおりであった。

1) E2を標準物質として検量線を作成したところ、EC50で12pgであった。

- 2) 県内河川のE2を調査したところ、T-E2で<0.2~4.0 ng/Lであった。
- 3) 各態E2の中で、T-E2はD-E2と相関が高く、水試料中のE2の大部分が溶存体であった。
- 4) T-E2はCOD、NH4と相関が高く、県内河川水のE2は主としてし尿系排水由来であることが推察された。

- Toxicology and Chemistry , 15, 241-248 (1996) .
- 2) 滝上英孝, 松井三郎, 松田知成: 水道処理施設における女性ホルモン様物質の挙動, 環境技術, 28, 9-12 (1999) .
- 3) Routledge E.J. et al.: Environ.Sci.Technol. , 32, 1559-1565 (1998) .
- 4) 原 彰彦, : 科学, 68, 591 (1998) .

文 献

- 1) Routledge E.J. and Sumpter J.P.: Environmental

Distribution of Estrogenic Substance in Public Waters

Seiji IWASAKI, Masaaki TAKAHASHI, Susumu KATO, Akira YAMASHITA,
and Tomonari MATSUDA^{a)}

Key words: DNA sequence of the human estrogen receptor, Yeast, Bioassay, Estrogenic substance

Estrogenic substances were assessed with the yeast integrated the DNA sequence of the human estrogen receptor into its genome. The estrogenic activities of river water at 18 rivers in Mie prefecture were measured, and the maximum value was 4.0 ng/L at Imai hashi. The sample water was filtered, and the filtrate and the residue were measured respectively. The majority of these substances existed in the filtrate.

^{a)} Research Center for Environmental Quality Control Kyoto University