

濃度に依存して出発物質である Bisphenol A は消失して行った (図 5. 4、表 5. 4)。Bisphenol A が約 40% 残存する次亜塩素酸ナトリウム処理条件下で、エストロゲン様活性は高くなる傾向を示した (表 5. 5)。この場合の残存 Bisphenol A の濃度のみでは、エストロゲン様活性は低い。正確な解析はまだ行っていないが、塩素処理によりエストロゲン様活性を示す物質が生成したものと考えられる。この物質の、抽出・濃縮を試みたが、きわめて親水性に富む性質を持つと想像され、アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン、*n*-ヘキサンの有機溶媒で抽出することはできなかった。今後、この物質の同定を行わなければならない。

#### 4) 水道水及び水道原水のエストロゲン様活性の検討

水道水及び水道原水 5 リットルを塩酸で pH1.5 に調整し、GLF 固相カラム (0.5g 充填) と活性炭カラム (0.5g 充填) を直列に連結し 2.5 リットルずつ、2 組の重連カラムに 10ml/l の速さで通水した。浮遊物質は特に除去処理は行わなかった。窒素ガスで乾燥させた後、GLF 固相カラムについてはアセトニトリル 5ml、ジクロロメタン 5ml で脱離、溶出した。活性炭カラムについては、メタノール 1 ml で脱水後、ジクロロメタン 5ml で脱離、溶出した。全ての溶離液を合わせ、40℃の加熱下、窒素パージにより乾固した。乾固物を DMSO 0.5ml に溶解し、試験に供した。水道水濃縮試料では、今回行った試験からでは有意なエストロゲン活性は認められなかった。また、S 川の河川水の濃縮試料を検討した結果、濃度依存性が認められ、初期濃度 (河川水の濃度) の 10 倍濃度に相当する最終濃度で最高活性を示し、 $10^{-8}$  M 17 $\beta$ -エストラジオールの 80.2% の活性があった。河川水の塩素処理試料についても、濃度依存性が認められ、初期濃度の 10 倍濃度に相当する最終濃度で最高活性を示し、 $10^{-8}$  M 17- $\beta$ -Estradiol の 81.4% の活性があった (表 5. 5)。しかしながら、この試料中に含まれている 17- $\beta$ -Estradiol の量については検討していないので、17- $\beta$ -Estradiol 以外の化学物質の寄与については不明である。今後、同一試料について、17- $\beta$ -Estradiol の含量とそのエストロゲン様活性に対する寄与率を算定しなければならない。

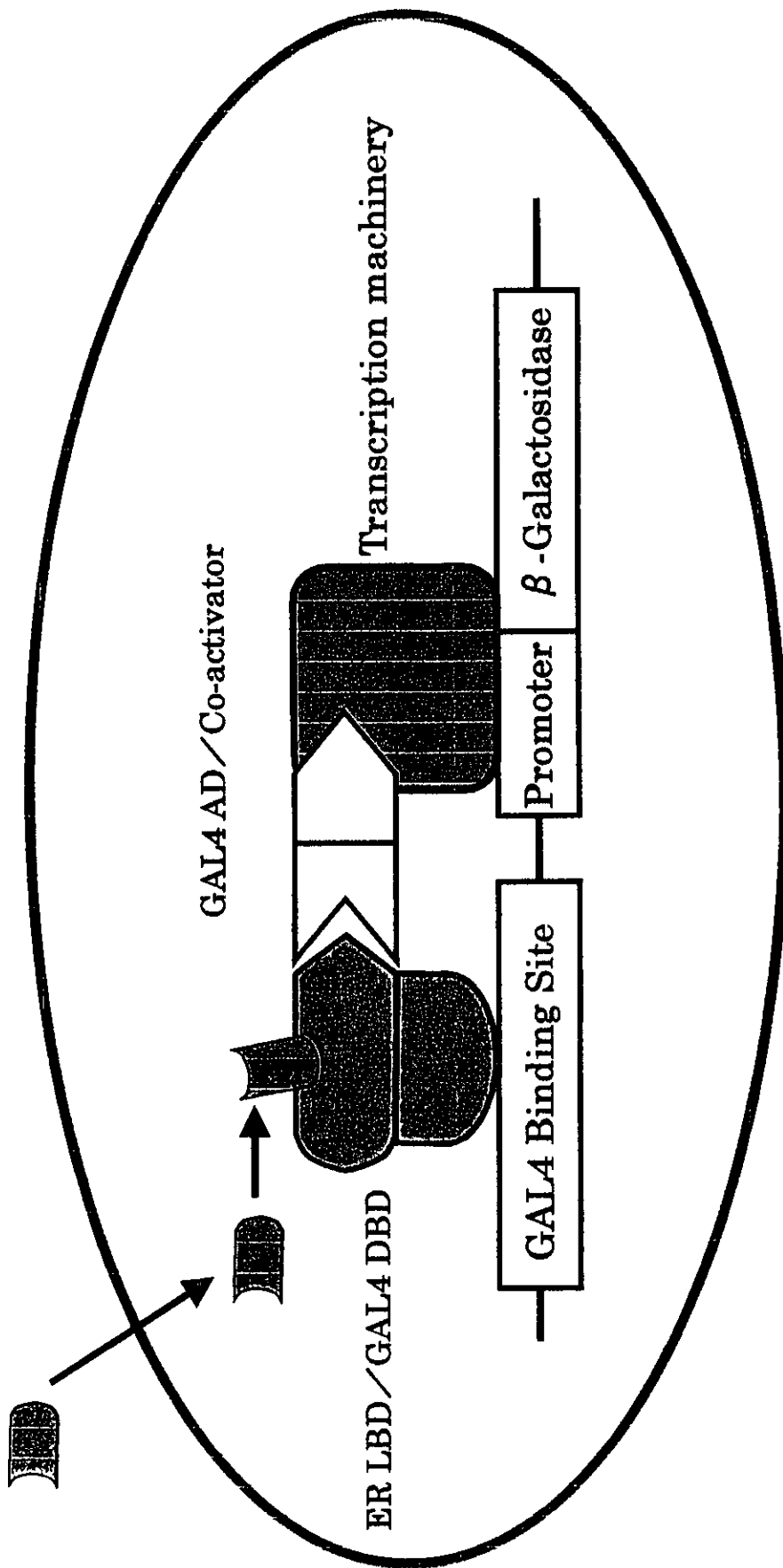
河川水に多量に含まれているフミン酸についてエストロゲン様活性の有無について検討を行った。Aldrich 社製のフミン酸ナトリウムを精製水に溶解し、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、不溶性の画分を除去した。硫酸を用いて、pH7.0 に調整し、再度 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターでろ過し、被検物質とした。この溶液の総有機炭素量は、2200 TOCmg/l であった。この溶液を DMSO で段階希釈し、試験に供した。その結果、試験を行った 88 TOCng/l ~ 22 TOCmg/l の添加量では有意なエストロゲン様活性は認められなかった (結果省略)。

これらの結果から、化学物質の種類やその発生源については不明であるが、河川

水には内分泌をかく乱する化学物質が含まれていることがわかった。さらに、河川水に含まれる物質を塩素処理しても、物質自身の違い（変化）はあるにしても、総合的には、エストロゲン様活性は減少しない可能性が示唆された。この物質の同定は重要な今後の課題である。また、水道水中にはエストロゲン様の活性を示す物質は、この評価法では検出できるレベル以下であり、河川水に内分泌かく乱化学物質が含まれていても、浄水過程で充分除去されている可能性が高いことがわかった。さらに、多くの地点からの試料について今後検討を行っていく必要がある。

図5. 1

外因性内分泌かく乱化学物質



ER LBD : Estrogen Receptor Ligand Binding Domain

GAL4 DBD : GAL4 DNA Binding Domain

GAL4 AD : GAL4 Activation Domain

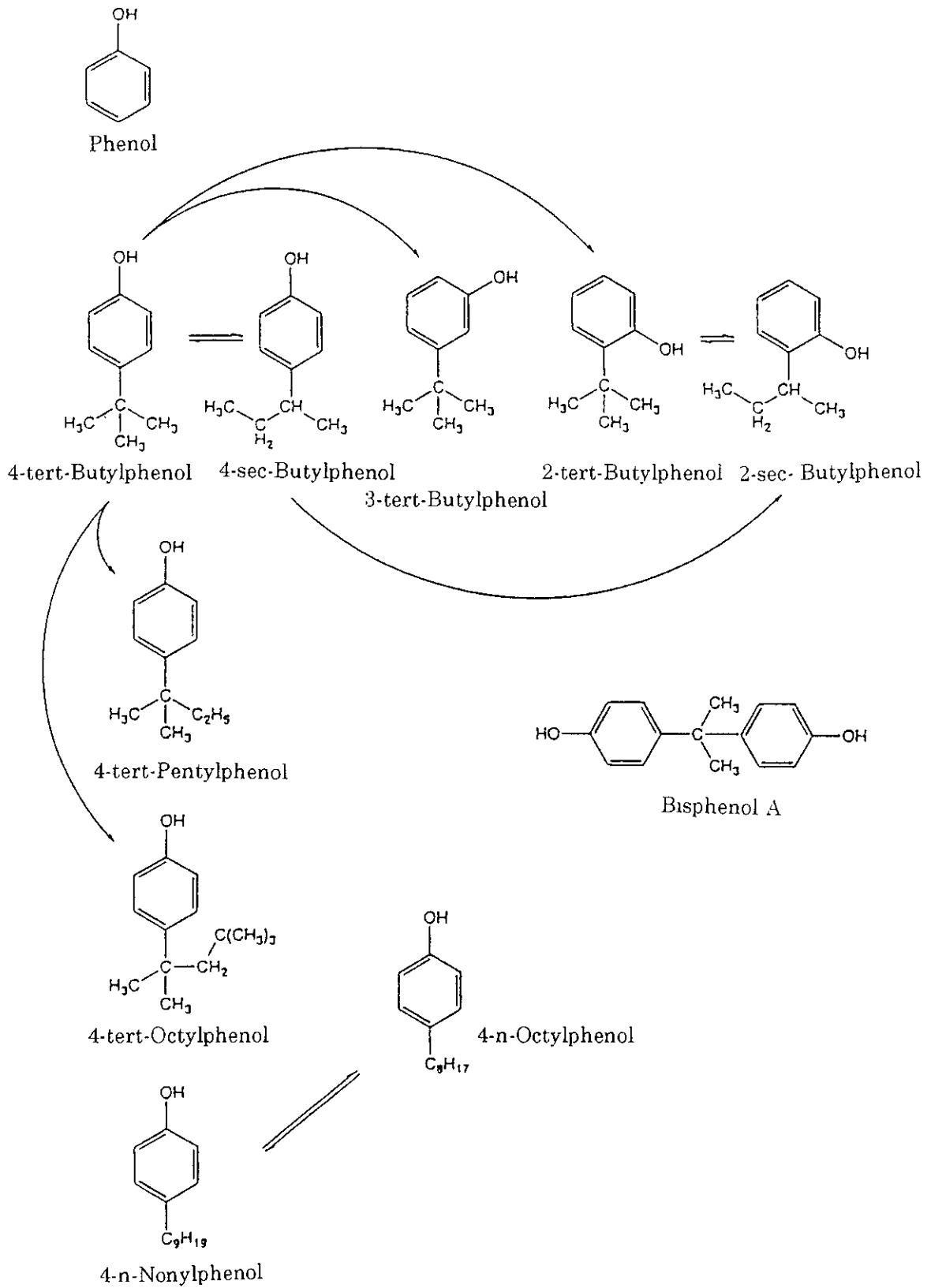


図5. 2 フェノール類の構造

図5. 3 フェノール類のエストロゲン様活性

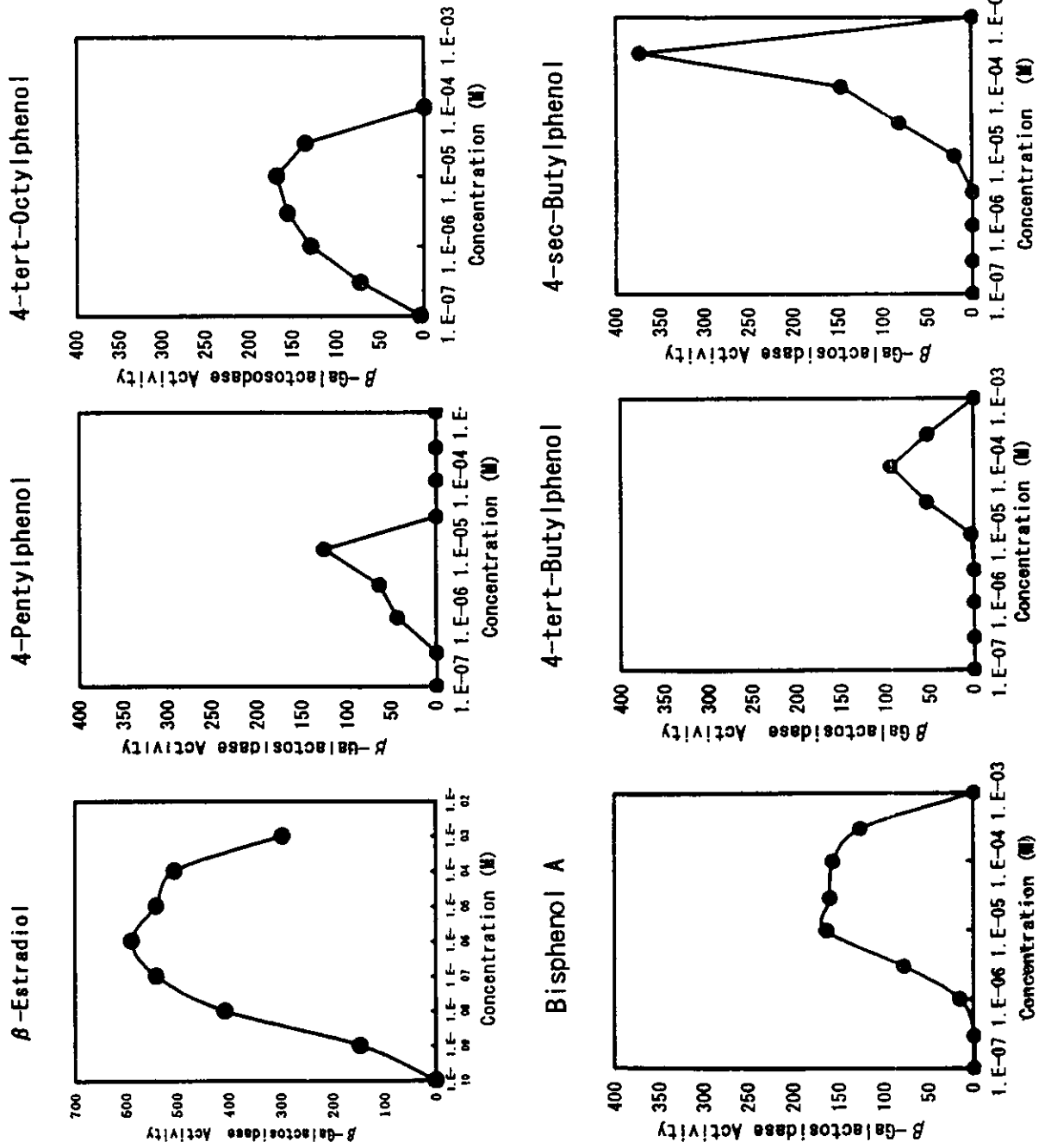
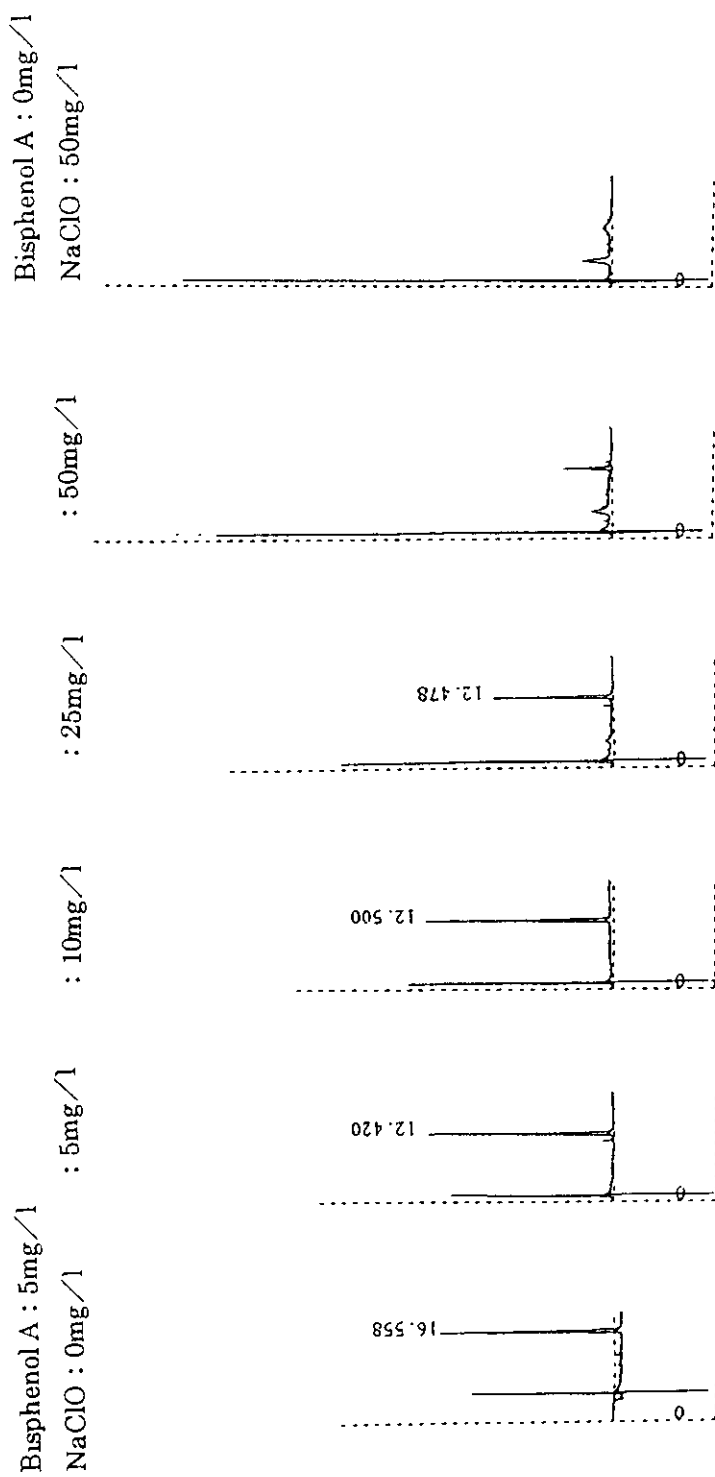


図5. 4 Bisphenol A の塩素処理後における残存量 (高速液体クロマトグラフ法)



Analytical Condition;  
 Column : Inertsil ODS 80A (4.6 x 150 mm)  
 Mobile Phase:32%(v/v) acetonitrile  
 Flow Rate :1.2ml/min  
 Detection :285nm(UV)  
 Injection :20 $\mu$ l

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。

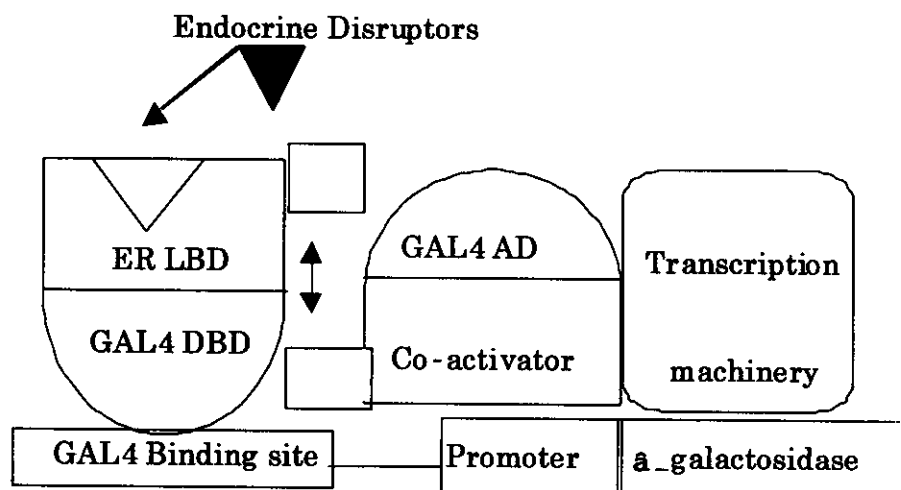


図-5.1.2.1 酵母 Two-hybrid 法の原理

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。

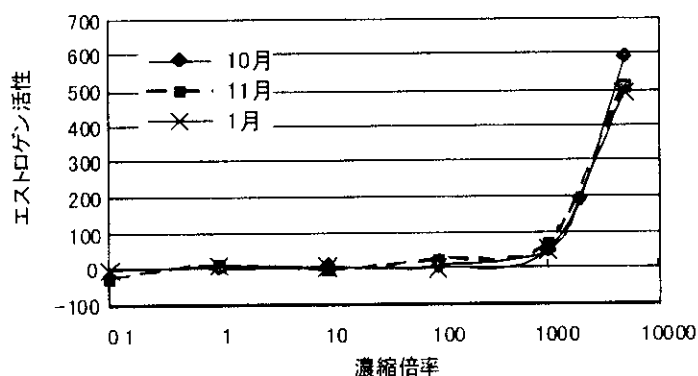


図-5.1.2.2 浄水場原水におけるエストロゲン活性

### 3. 実験結果と考察

《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。

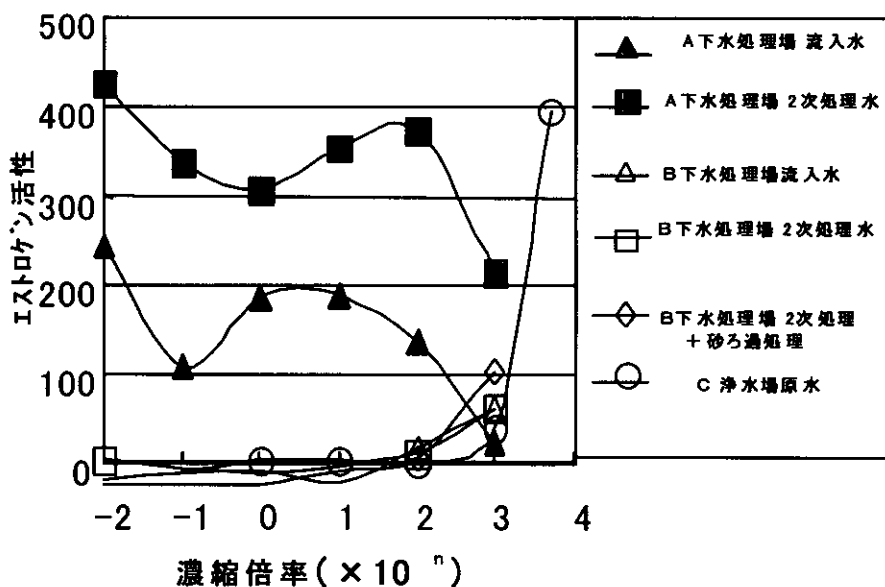


図-5.1.2.3 環境水のエストロゲン活性

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。

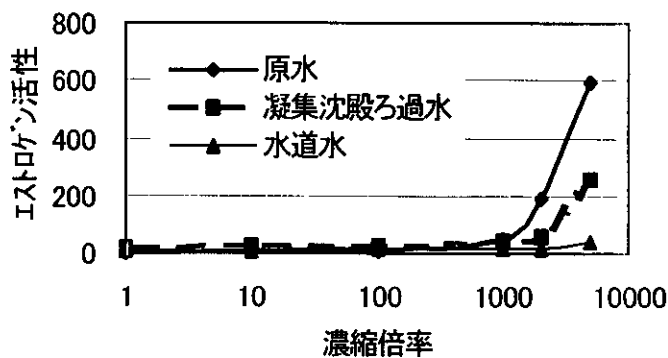


図-5.1.2.4 浄水場におけるエストロゲン活性の変化

《室内における凝集、塩素処理実験》

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ものと考えられる。

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。

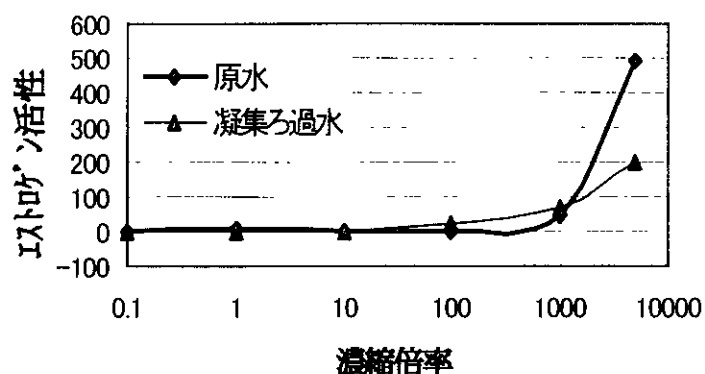


図-5.1.2.5 凝集処理によるエストロゲン活性の変化

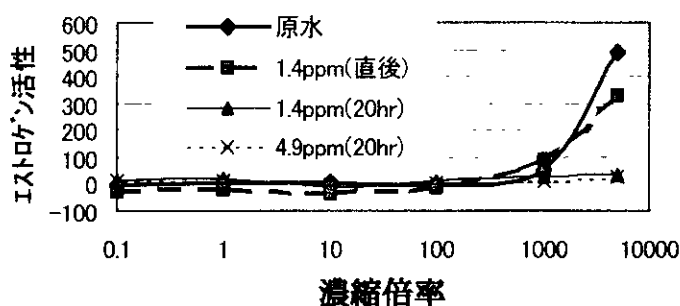


図-5.1.2.6 塩素処理によるエストロゲン活性の変化

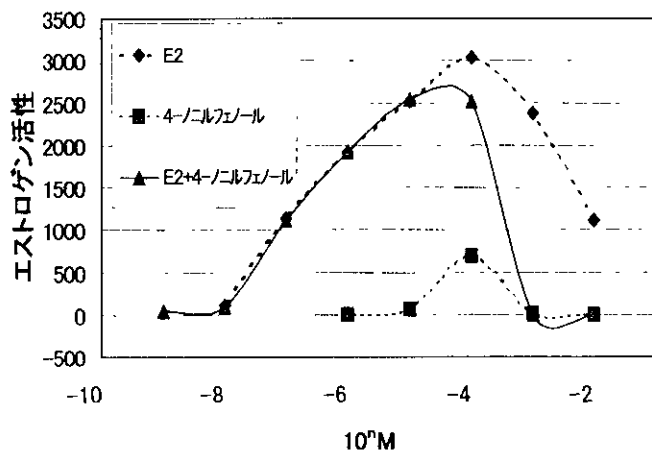


図-5.1.2.7 2成分系におけるエストロゲン活性の変化

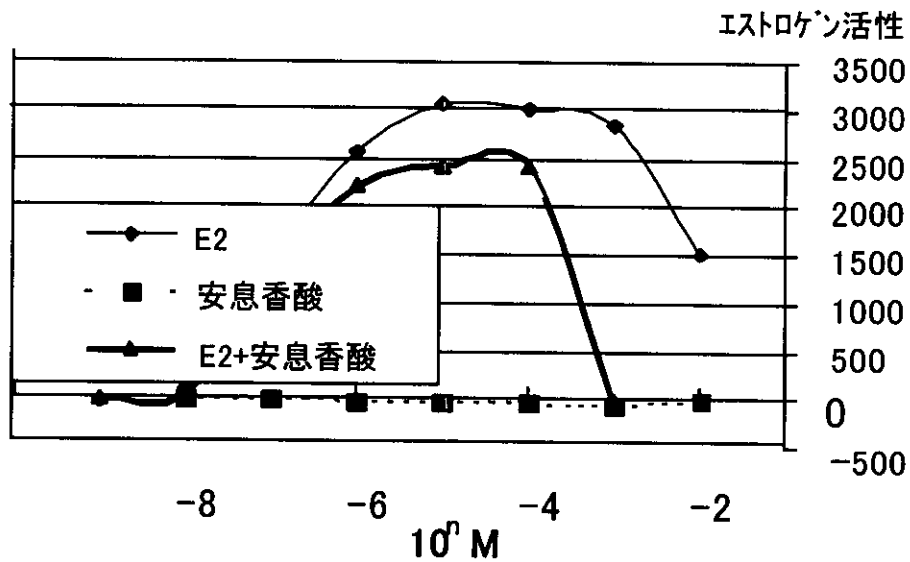


図-5.1.2.8 非エストロゲン活性成分がエストロゲン活性成分に与える影響 (E2+安息香酸:=1:1)

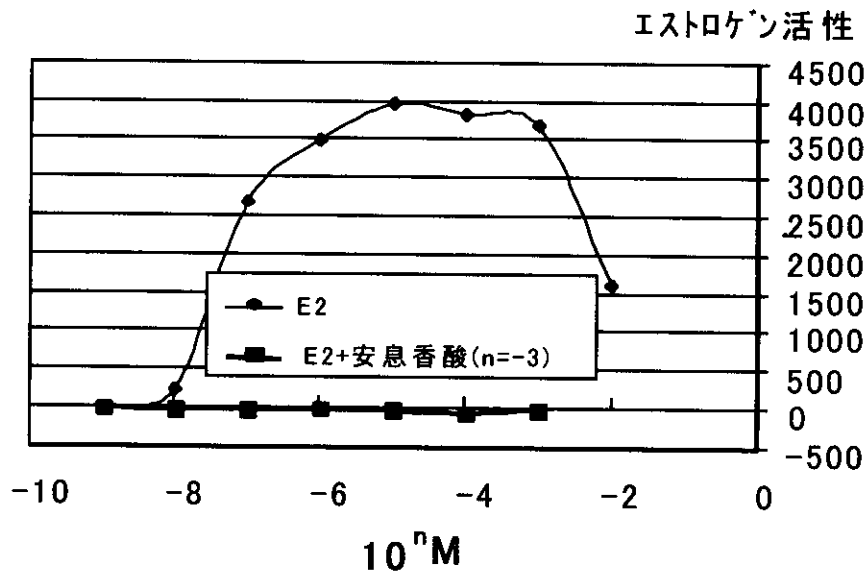


図-5.1.2.9 非エストロゲン成分による E2 のエストロゲン発現の抑制

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>, 1,2-Benzanthracene, 1,2,5,6-Dibenzanthracene, 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 NPnEO (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 NPnEO (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。

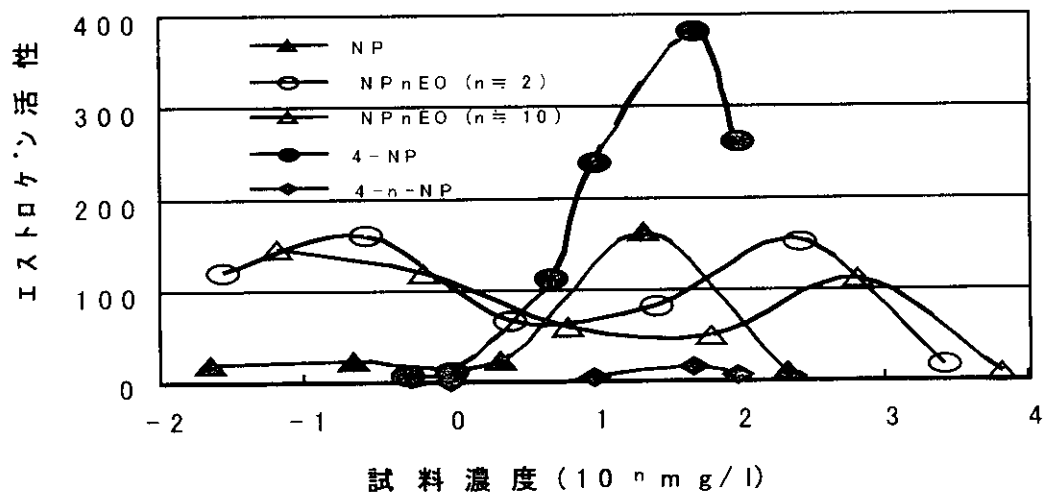


図-5.1.2.10 化合物の微小な化学構造の差がエストロゲン活性に及ぼす影響

#### 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



④農薬・肥料

⑤消毒副生成物

⑥ガソリン

このうち消毒副生成物については、EPA では試験の優先順位付けの作業を行っているほか、NIEHS(The National Institute for Environmental Health Sciences)/NTP (The National Toxicology Program)では、約 10 種類の化合物について発がん性、免疫毒性、生殖毒性に関する試験を開始しているという。

消毒副生成物は当然、混合物であるが、トリハロメタン類やハロ酢酸類といった典型的な化合物についての試験がまず実施されることになろう。しかし、こうした容易に測定、定量できる個別の副生成物に加えて、「塩素処理水」や「オゾン処理水」といった、副生成物全体の作用を検出、評価するといった態度も要求される。本調査研究では、後者の立場に立ち、個別の副生成物に関する作用試験には重点をおかず、処理水全体の作用を検出し、評価を行うこととした。

2) 塩素処理副生成物の生殖毒性に関する疫学調査例

Waller ら<sup>2)</sup> は、米カリフォルニア州において水道水中に含まれるトリハロメタンの量と水の摂取量、および流産との関係について調査を行った。5,144 人の妊婦（妊娠 3ヶ月余まで）を対象とした調査の結果、水道水中総トリハロメタン濃度が 0.075mg/L 以下の場合、もしくは 1日に飲む水の量がコップ 5杯以下の場合には、流産率が 9.5%であったのに対し、総トリハロメタン濃度 0.075mg/L 以上の水を 1日 5杯以上飲んでいていたグループの場合には、流産率は 15.7%であることがわかった。

クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係は、ほかにもアイオアやニュージャージーでも報告されているものの、流産のリスクを含めて関係が認められなかったという報告も多くみられる。これらの結果から「国際化学物質安全性計画」(International Programme on Chemical Safety, IPCS)では、クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係はあるかもしれないが、さらに調査研究が必要であるとしている<sup>3)</sup>。

EDSTAC は、各種の混合物の中から試験を勧告する対象混合物を選定するにあたって、いくつかの判断基準を設けている。このうち消毒副生成物については、上記のような調査例などをもとにして、勧告された 6種の中に含まれたものと考えられる。

3) フミン質の化学構造に関する考察

現在、内分泌攪乱作用が疑われリストアップされている化学物質の中には、フェノール類が多くみられるが、フミン質もフェノール類、またはポリフェノールということができる<sup>4, 5)</sup>。

このことから、エストロゲン様の作用などを調べる *in vitro* 試験においては、試験細胞内に水中フミン質の一部が侵入でき、レセプターと接触機会があれば、フミン質とレセプターとが結合することは十分予想できるといえそうである。また、そのような作用があるとすれば、フミン質が塩素やオゾンと反応した後、作用強度がいかに

変化するかについても検討を行う必要がある。

さらに、フミン質そのものにエストロジェン様の作用がみられた場合、その濃度に関する考察が必要になる。すなわち、内分泌攪乱作用が疑われる化学物質は自然水中に存在するとしても、一般にng/L～μg/Lのオーダーである。これに対してフミン質を含む水中有機物はmg/Lのオーダーで存在する。したがって、水道水の主たるエストロジェン様作用は、in vitro 試験における見かけ上、フミン質とその消毒副生成物に由来する可能性もあるということになる。

もちろんフミン質とレセプターとが結合し、試験結果が陽性であるからといって、フミン質など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は注意を要する。

以上を総合すると、消毒副生成物に関する試験の必要性について以下のようにまとめることができる。

- (1) EDSTAC が消毒副生成物に関する試験を行うことを勧告していること。
- (2) 塩素処理副生成物が生殖に関連した毒性を有するとの疫学調査例が存在すること。
- (3) 水中有機物の主体をなすフミン質そのものがエストロジェン様作用を有する可能性があること。

環境水中には種々の人工化学物質が含まれるが、水中有機物として主体を成すのはフミン物質（フミン酸、フルボ酸）である。上記のような背景のもと、本調査研究では各化学物質とともに、水中フミン物質も試験対象とする。また、そのエストロジェン様作用に対する塩素処理の影響について検討する。

### 5. 2. 3 調査研究の方法

#### (1) バイオアッセイの方法（MVLN アッセイ）

EDSTAC の提案した試験プログラムは段階的アプローチをとっており、高効率予備素クリーニング法（High Throughput Pre-screening, HTPS）、Tier 1 Screening (T1S)、Tier 2 Testing (T2T) から構成される。

ホルモンシステムに直接影響を及ぼすものとしては、エストロジェン、アンドロジェン、甲状腺ホルモンの3種があり、T1Sでは、化学物質がこのうちのどの作用を有するかを推定・検証することが求められている。しかし、現在、内分泌攪乱性が疑われている化学物質の多くは、エストロジェン様の作用を有するとされ、研究の多くもまずエストロジェン様作用の有無について調べられている。さらに工学・水道分野の実験室が比較的容易に導入できるのはin vitroのアッセイであろう。

以上のことから、アッセイ法としては、エストロジェン様の作用を検出するためのin vitroアッセイをまず導入することとした。T1Sではこれはエストロジェン転写活性試験に属する。エストロジェン転写活性を検出するための細胞は種々つくられてきたが、EDSTAC 報告書ではこのうち、MVLN細胞を用いる方法を最も推奨してい

る。これはヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞に、ヴィテロジェニンの制御領域エストロジェンレセプター $\alpha$ を含む遺伝子、およびレポーター遺伝子としてホタルの発光反応を触媒するルシフェラーゼの遺伝子とを導入し、安定形質発現を実現したものである。この細胞を用いたアッセイは、化学物質がレセプターと結合した後の転写の活性化の程度を調べるもので、実際には転写活性化の結果産生されるルシフェラーゼの酵素活性を測定する。

MVLN細胞は、1990年フランス国立衛生医学研究所のPons博士らによって作製されたものである<sup>6)</sup>。本研究では、本研究所から直接分与されたMVLN細胞を用い、実験を行った。

## (2) 濃縮の方法について

水道水や塩素処理水をそのまま試験に供しても一般にエストロジェン様作用を認めることは困難であるため、濃縮が必要となる。この場合、濃縮対象物質としていかなる成分を想定するかが重要である。自然水中に含まれるエストロジェン様作用を有する(in vitroアッセイにおいて)物質群には以下のようなものが挙げられよう。

- ・ 現在、内分泌攪乱性が疑われるとしてリストアップされている物質
- ・ 女性ホルモンであるエストラジオールそのもの
- ・ 植物性エストロジェン
- ・ 水中フミン物質
- ・ その他、農薬などの微量汚染物質

本調査研究では、水中フミン物質とその消毒副生成物のエストロジェン様作用を測定し、その強さを他の化学物質やエストラジオールなどと比較検討することを目的としている。そこで、

### ①水中フミン物質

### ②塩素処理による副生成物

の濃縮を目的とした方法をまず採用する。

水中フミン物質の濃縮のためには、非イオン性多孔質のXAD樹脂が広く用いられている<sup>7)</sup>。文献的にはXAD8が用いられているが、製造中止となっており、代替品として販売されているXAD7HPを用いた。なお、本研究では濃縮する対象が水中の有機物であるという点から、フミン酸とフルボ酸の分画は行わずフミン物質として一括濃縮を行うこととした。

塩素処理副生成物の濃縮法は、変異原性試験のための試料調製に関連して種々の検討が行われてきた。この中で浦野<sup>8)</sup>らは、塩素処理水の変異原性検出を目的として詳細に検討した結果、非イオン系多孔質ポリスチレン樹脂のCSP800樹脂を用いた方法を提示している。

これら二つの濃縮法を比較すると、まずXAD7HP樹脂は非イオン系ポリアクリル酸エステル弱極性樹脂でTOC吸着性が良く、中性付近で解離している弱酸性基のカルボキシル基やフェノール基等を分子構造に多く有するフミン物質を濃縮するのに特に

優れると考えられる<sup>9)</sup>。一方、CSP800樹脂は樹脂粒径の細かい疎水性樹脂であり、特に変異原物質や塩素処理副生成物の濃縮には効果を発揮する。また、エストロゲン様作用を示す化学物質は、疎水性の有機化合物が多いことから、このCSP800樹脂を用いる方法はエストロゲン様物質の濃縮に有効であるとも考えられる。

### (3) 実験手順の概略

#### 1) MVLNアッセイの方法

通常の細胞培養にはガラス製培養フラスコ (VIDREX、底面積40cm<sup>2</sup>) を用い、培養液としてDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) に10%のウシ胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum, Hyclone) を加え使用する (以後FBS培養液と呼ぶ)。

これとは別にFBSからホルモン等の物質をCharcoal-Dextran処理により除去したDCC-FBS (Hyclone) を5%濃度でDMEMに加えた培養液も使用する (DCC培養液と呼ぶ)。なお両培養液ともpHインジケータのフェノールレッドはエストロゲン様作用を示すので加えていない。細胞培養環境は開放系培養で5%炭酸ガス・37℃・100% humidityである。

12マルチウェルプレート播種用の細胞の準備から、試験物質を細胞に添加しデータを得るまでの一連の操作とタイムスケジュールを図-5.1に示す。実験手順の詳細はEDSTAC報告書に記載されている。

#### 2) ルシフェラーゼアッセイ<sup>10)</sup>

エストロゲン様作用の結果、細胞内に産生したルシフェラーゼの酵素活性を定量する。ルシフェラーゼとは分子量62,000の単一ポリペプチドで、ホタルの尾尻に観察される発光反応を触媒する酵素であり、ルシフェリンを基質とする。反応は温度依存性で最適温度範囲は20~25℃なので、測定に用いる試薬はウォーターバスで適温に保温してから使用する。

試験手順は一般に行われているルシフェラーゼアッセイ法<sup>7)</sup>でよい。ルミノメーターはベルトールドジャパンLumat LB9507を用い、酵素反応および発光量測定時間は20秒間とした。発光量は相対的な発光量RLU (Relative Light Unit) で表示される。

#### 3) タンパク質定量法<sup>11,12)</sup>

同一プレートにおけるウェル間の細胞数の差による発光量の差を補正し単位タンパ

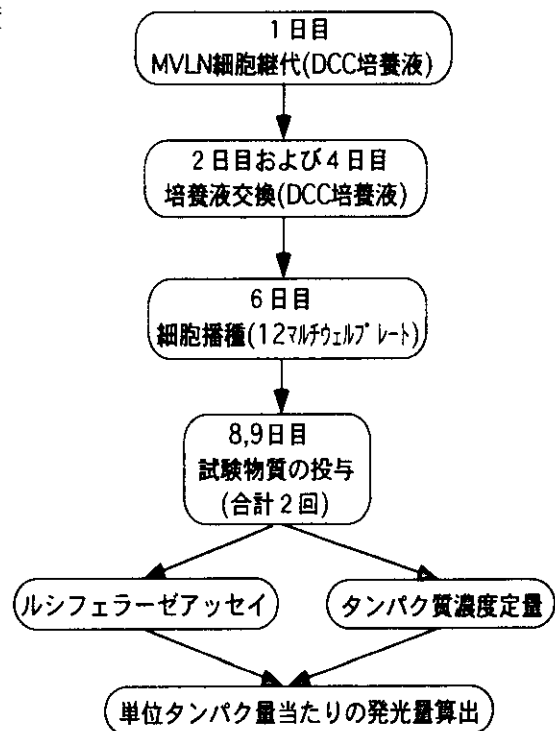


図-5.1 MVLNアッセイの手順