

$$\text{阻害率(\%)} = \{mA(0) - mA\} \div \{mA(0) - mA(100)\} \times 100$$

mA(0) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に結合した状態の異方性の値

mA(100) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に遊離した状態の異方性の値

mA : 被験物質を作用させた際の異方性の値

3. 結果と考察

本研究で用いた試験法の概念は、以下の考え方によっている。反応溶液中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光を照射すると、その蛍光物質から偏光した蛍光が得られる。この蛍光偏光の程度は、蛍光物質の溶液中の運動性に依存して得られる。すなわち、小さい分子は溶液中で激しくブラウン運動をしているため、偏光した励起光を当てても、蛍光の偏光性が一部失われて小さい蛍光偏光度しか得られない。一方、大きな分子は、ブラウン運動による影響が少ないため、蛍光の偏光性が失われず大きい蛍光偏光度が得られる。従って、測定条件が一定であれば、蛍光偏光度を測定することにより蛍光物質（複合体）の分子の大きさを推定することができる。対象物質がエストロゲン受容体と親和性を有する場合、エストロゲン受容体と複合体を形成しているエストロゲンと置き換わり、エストロゲン受容体と結合する。すなわち、蛍光標識したエストロゲンが受容体と分離すると、蛍光標識されたエストラジオールの分子（複合体）状態が、エストラジオール受容体と結合した大きな分子状態から、エストラジオール受容体から分離したエストラジオール自身の小さな分子と変化し、得られる蛍光偏光度が減少する結果が得られることとなる。したがって、蛍光偏光度を測定することにより標識されたエストラジオールと被験物質のエストラジオール受容体との結合の状態が推定できる。言葉を代えて言えば、反応系に存在するエストラジオールとエストラジオール受容体との結合を、添加された被験物質が置き換わる（阻害する）程度を算定することができる。その程度を、標準物質として用いたエストラジオールのエストラジオール受容体との結合親和性と比較することにより、被験物質のエストラジオール様活性を算定する方法である。

被験試料水抽出物は、最終濃度が抽出試料水の 200、100、50、20 および 10 倍の濃度になるように反応液に添加した。前述の方法に従い、蛍光偏光度を測定し、エストロゲン結合阻害率（%）を算定した。被験試料水抽出物は、原水からの抽出物は褐色に呈色しており、浄水処理過程が進むに従って、褐色から薄黄色に外見的に色は薄くなっていた。呈色物質としては何が含まれているかは詳細な検討を行なっておらず、それらの成分は不明であるが、360nm 付近の蛍光を生じる物質が含まれていた。本研究で用いた測定法では、360nm の偏光した励起光をエストラジオールに結合した蛍光物質に照射し、偏光度の変化を測定することから、測定に妨害をきたすと考えられる。実際には 500 倍以上の濃度になるように抽出試料を添加した場合、偏光度の測定上限値を超える場合が出て、測定不能となった。したがって、以下の検討は 200 倍以下の濃度になるように抽出試料を添加した場合について行なうこととした。

T 水道での試料水は、原水、通常処理系の試料水としては浄水処理過程にしたがって凝集沈殿水および砂ろ過水を採水した。また、高度浄水処理系の試料水として、浄水処理過程にしたがって凝集沈殿処理水、オゾン接触水、オゾン滞留槽出口水、生物活性炭処理（BAC）出口水および砂ろ過水を順次採水した。図 1 に、対象物無添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。原水で見られるエストロゲン結合阻害率は、200 倍、100 倍、50 倍および 20 倍の場合 100%以上の阻害率を示すことから、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼし、正しい測定値を算出することができな

くなっていると推察される。これらの結果からは、得られた数値に対して、蛍光物質またはエストロゲン様物質のエストロゲン結合阻害率に及ぼす比率を明らかにすることができない。しかしながら、蛍光物質およびエストロゲン様活性物質を合わせた要素として考察すると、通常処理系での凝集沈殿処理及び砂ろ過処理では、この試験系で測定される両物質の合算量の削減効果は見られるものの、必ずしも十分削減されず残存している可能性があると考えられる。

図2に、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率(%)の推移を示す。浄水処理過程の初期段階では通常処理系と同様に、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼしていることが推測される。高度処理系において、浄水処理過程の後期の段階に進むと、エストロゲン結合阻害率が大きく減少していることから、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の高度処理系での後期処理過程の削減効果は高いと考えられる(200倍濃縮試料添加時、オゾン滞留槽出口水を参照)。しかしながら、その後の砂ろ過水でエストロゲン結合阻害率がわずかに減少しているが、完全に除去するには至っていないことが示唆される。これらの結果から、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の削減にはオゾン処理および生物活性炭処理が有効と思われる。

図3に、4種の対象化学物質添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率(%)の推移を示す。対象とした4化学物質を添加しない場合に比べ(図1)、原水、凝集沈殿処理水及び砂ろ過水のどの場合もエストロゲン結合阻害率が低くなっている。この理由は不明である。しかしながら、浄水過程の段階が進むにつれて4種の化学物質および原水由来のエストロゲン様活性物質のエストロゲン結合阻害率に及ぼす影響は削減されているものの、十分には削減できないことを示唆している。

図4に、対象物添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率(%)の推移を示す。対象とした4種の化学物質を添加しない場合に比べ(図2)、どの処理段階においてもエストロゲン結合阻害率がほぼ同程度か僅かに低くなっている。これは、高度処理系においても対象とした4種の化学物質由来によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を完全に削減できない可能性を示唆している。特に、浄水処理初期の凝集沈殿水、砂ろ過水では、ほとんど同レベルでエストロゲン結合阻害率が推移しており、これらの処理では対象とした4種の化学物質によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を削減することは十分でないと考えられる。この結果は通常処理系での結果とも一致している。また、対象物添加条件ではオゾン処理による削減効果は、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率の推移の結果(図2)と比べ、低い結果となっていた。オゾン滞留槽出口水ではさらにエストロゲン結合阻害率が僅かではあるが増加していることから、オゾン処理後に残存物質による反応が起こりエストロゲン様作用物質がさらに生成する可能性も考えられオゾン処理の条件設定に検討の余地があるかもしれない。

さらに、オゾン処理を含め各浄水処理過程でのこれら4種の化学物質の挙動を把握することにより、浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の推移に関する情報が蓄積されるものと思われる。

T水道において浄水処理過程通常処理系での対象物添加条件におけるエストロゲン結合阻害率(%)の推移を再実験した結果を図5に示す。T水道で着水井流入水に4対象物質を添加した後、通常処理系に従って浄水処理過程を行い、試料水として着水井流入水、原水、凝集沈殿水および砂ろ過水と処理過程に従って採水した。この試料水に対する結果では、図3で得られた結果と同様、エストロゲン様物質やこの検出系で検出される蛍光物質の除去効果は十分でないことがうかがわれる。また、高度浄水処理系の試料水として、着水井流入水に4対象物質を添加した後、浄水処理過程にしたがって凝集沈殿処理水、砂ろ過水、オゾン滞留槽出口水、生物活性炭処理(BAC)出口水および砂ろ過水を順次採水し検討した(図6)。凝集沈殿後の砂ろ過まではエストロゲン様物質やこの検出系で検出される蛍光物質の除去効果は十分でないが、オゾン滞留槽出口でエストロゲン様物質やこの検出系で検出される物質は減少しており、図4で示した結果と同様の傾向

を示した。

図7および図8（再実験）では、〇水道局における浄水処理過程高度処理系での対象物添加条件におけるエストロゲン結合阻害率（%）の推移を再実験した結果を示す。高度処理工程におけるエストロゲン様物質やこの検出系で検出される蛍光物質は後オゾン処理水では減少し、さらに活性炭処理水で減少することが見られた。これらの結果は、T水道局での高度浄水処理工程で処理過程に従って推移した傾向と類似したものであった。

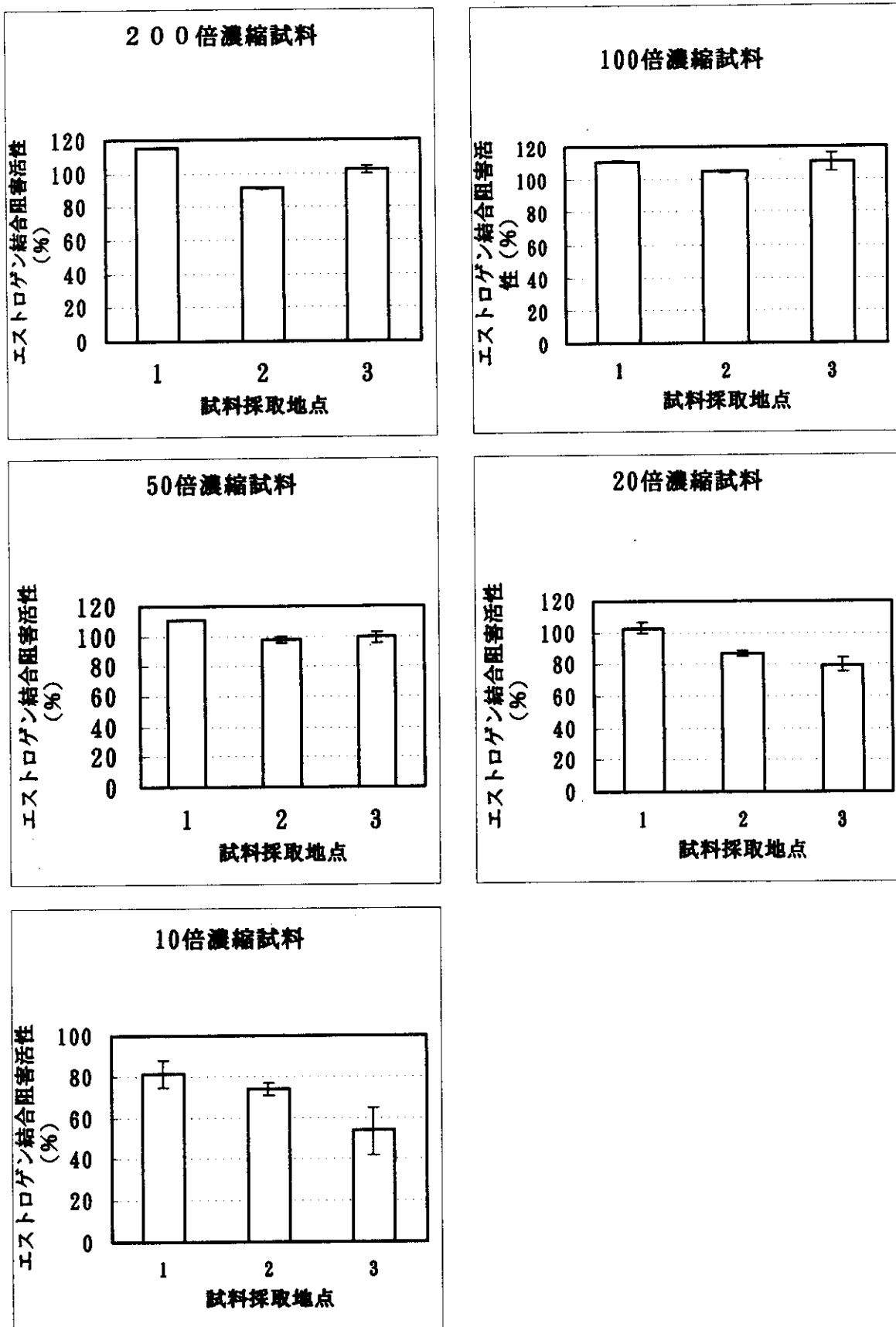
4. おわりに

本試験研究において、浄水処理により原水に含まれている蛍光物質またはエストラジオール様物質は削減されていることが示唆された。削減効率は、通常処理系に比べ高度浄水処理系の方が高いと考えられ、特に、オゾン処理およびBAC処理後には蛍光物質またはエストラジオール様活性物質が有意に削減されていると思われる。しかし、BAC処理後、砂ろ過処理をすることによりエストラジオール様活性がわずかではあるが上昇する傾向も見られ、最終段階の浄水においても完全に除去するには至っていない可能性も考えられる。通常処理系や高度処理系の初期段階での凝集沈殿や砂ろ過処理では削減効果は不十分な結果であった。

蛍光偏光度によるエストロゲン様活性物質の検討には、原水を10000倍濃縮すれば充分であった。また、試料量としては、最少量15 μ lで試験は可能であった。ブランクの1000倍濃縮試料ではエストロゲン結合阻害活性が観察された。これは、使用した固相カートリッジのポリマー充填剤由来のエストロゲン様物質が十分除去されていなかった可能性が考えられる。カラムの前処理法に検討の余地が残されている。

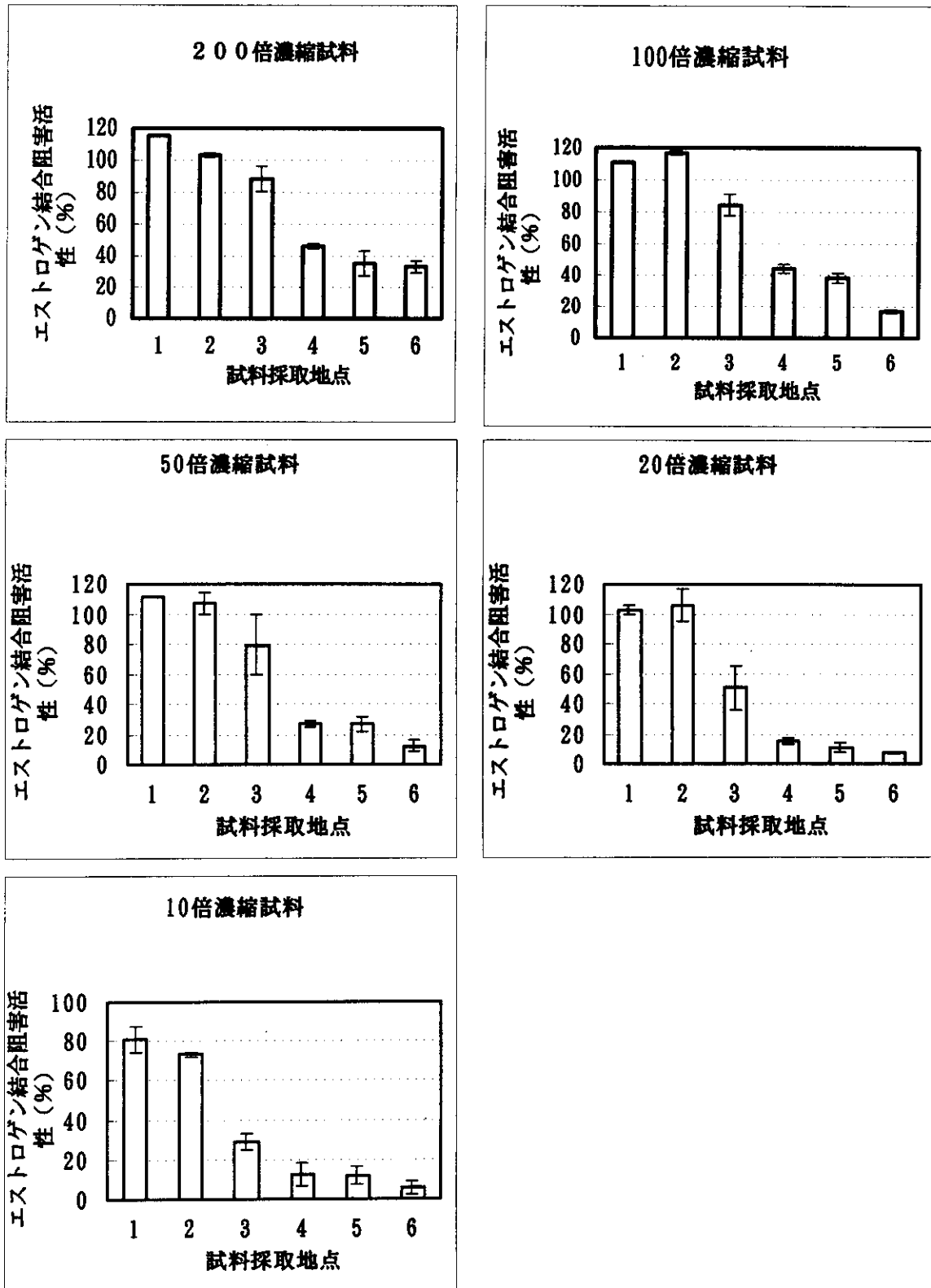
濃縮試料は着色していた。呈色成分に蛍光物質が含まれており、本試験系では妨害作用を及ぼすと考えられる。得られた結果が、エストラジオール様活性だけを示すのではなく、蛍光物質成分が偏光度を変化させている可能性が含まれていることを考慮しなければならない。また、抽出成分にタンパク質を変性させる物質が高濃度含まれている場合は、受容体（タンパク質）を変性させることにより蛍光標識されたエストラジオールを遊離し、偏光度を変化させる可能性も考慮しなくてはならない。今後、濃縮試料中の蛍光を生じる物質やタンパク質を変性させる物質の除去など、試料調製について検討していかなければならないであろう。

図1 対象物無添加における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン様活性の推移



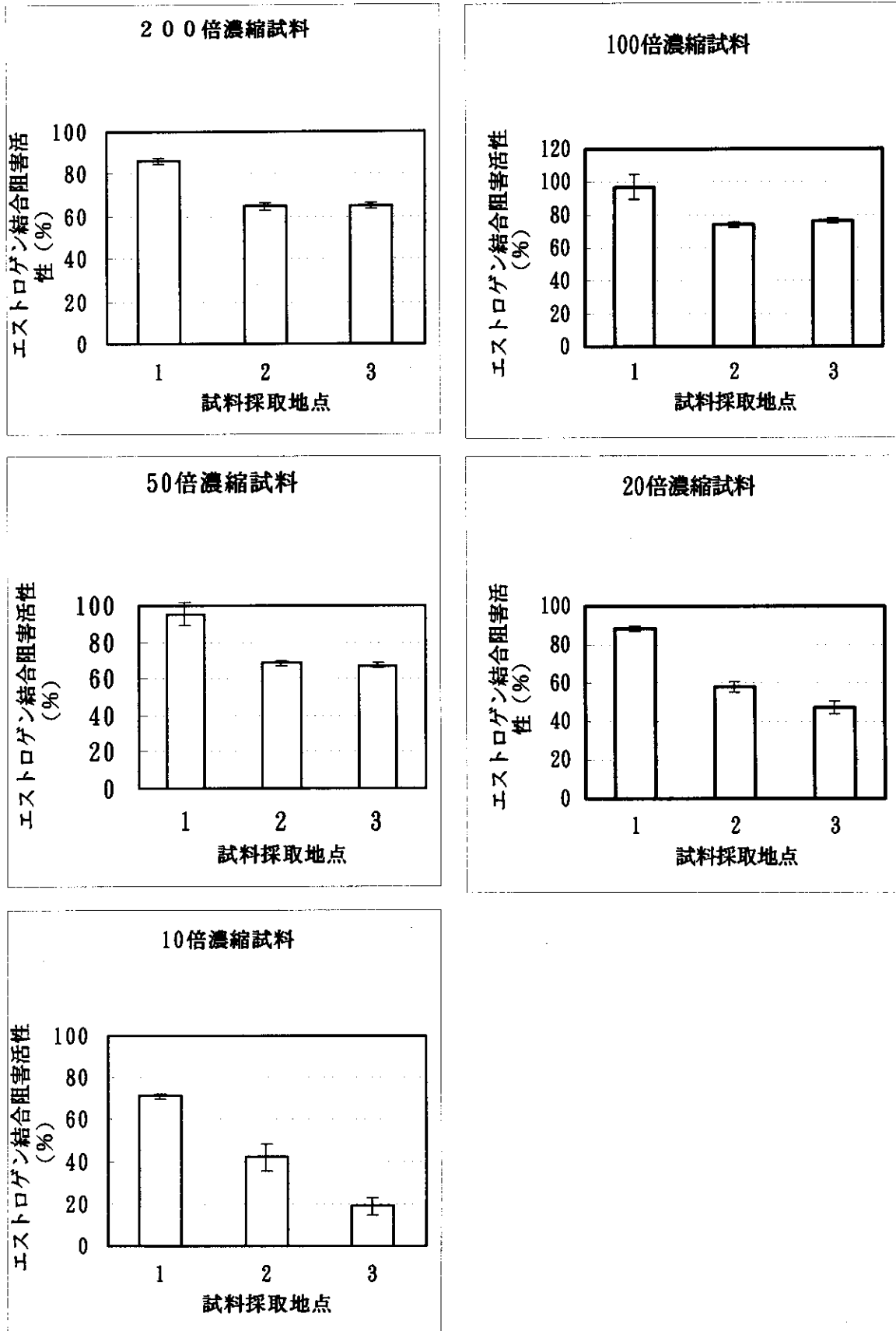
試料採取地点 ; 1 : 原水, 2 : 凝集沈殿処理水, 3 : 砂ろ過水,

図2 対象物無添加における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン様活性の推移



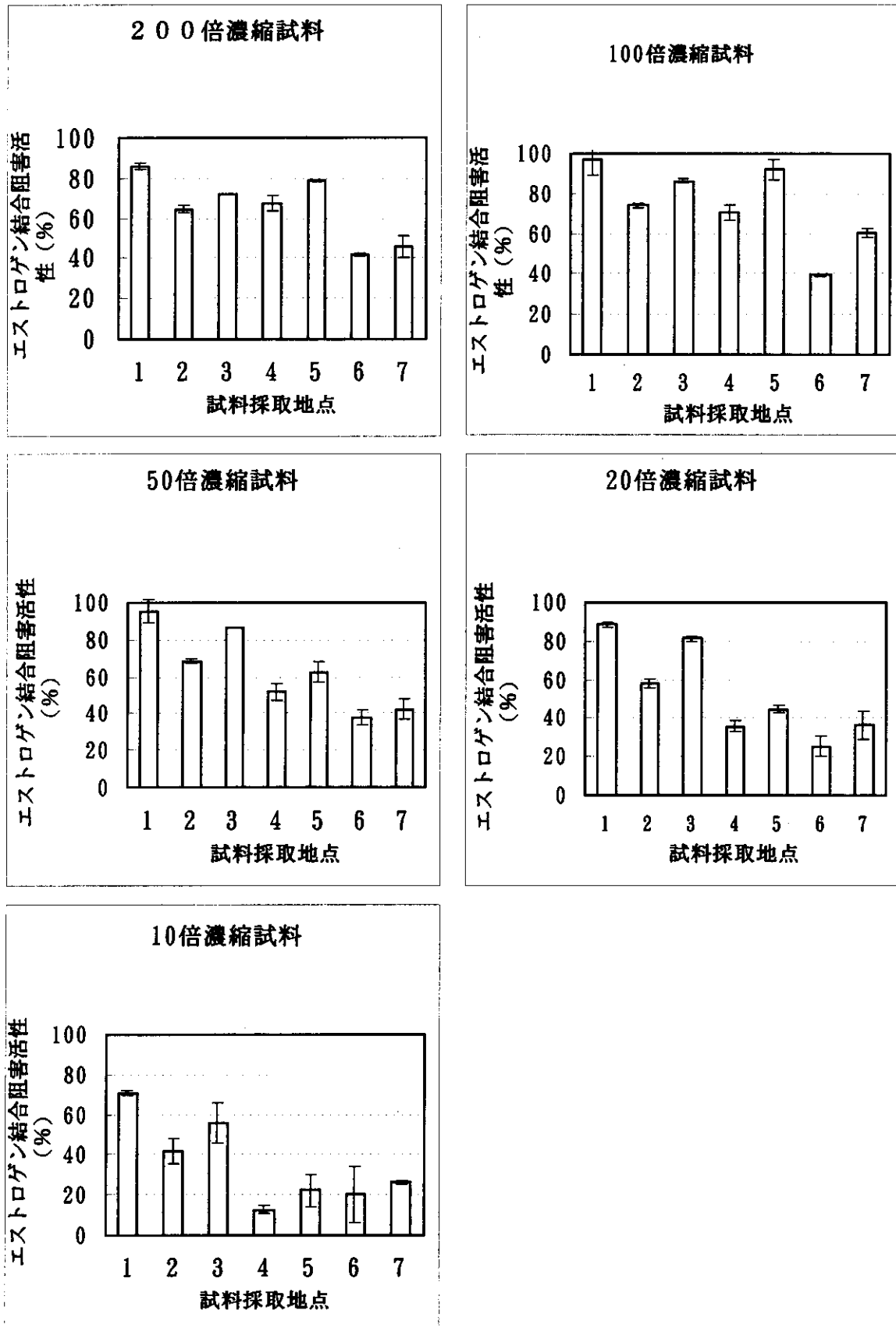
試料採取地点； 1：原水， 2：凝集沈殿処理水， 3：オゾン接触水，
4：オゾン滞留槽出口水， 5：BAC出口水， 6：砂ろ過水

図3 対象物添加における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン様活性の推移



試料採取地点； 1：原水， 2：凝集沈殿処理水， 3：砂ろ過水，

図4 対象物添加における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン様活性の推移



試料採取地点; 1:原水, 2:凝集沈殿処理水, 3:砂ろ過水, 4:オゾン接触水,
5:オゾン滞留槽出口水, 6:BAC出口水, 7:砂ろ過水

図5 4対象物質添加における浄水処理過程通常処理系におけるエストロゲン様活性の推移

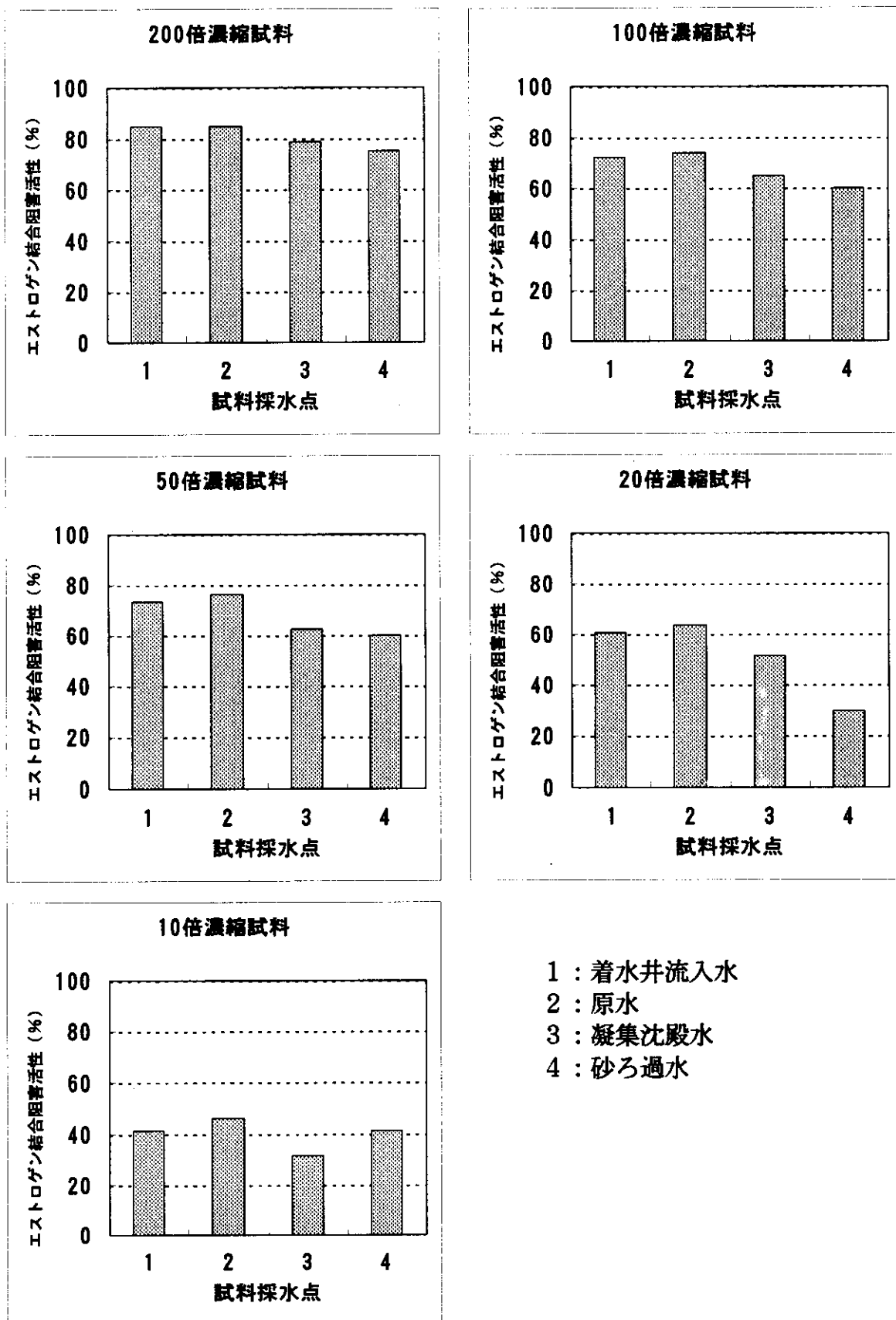
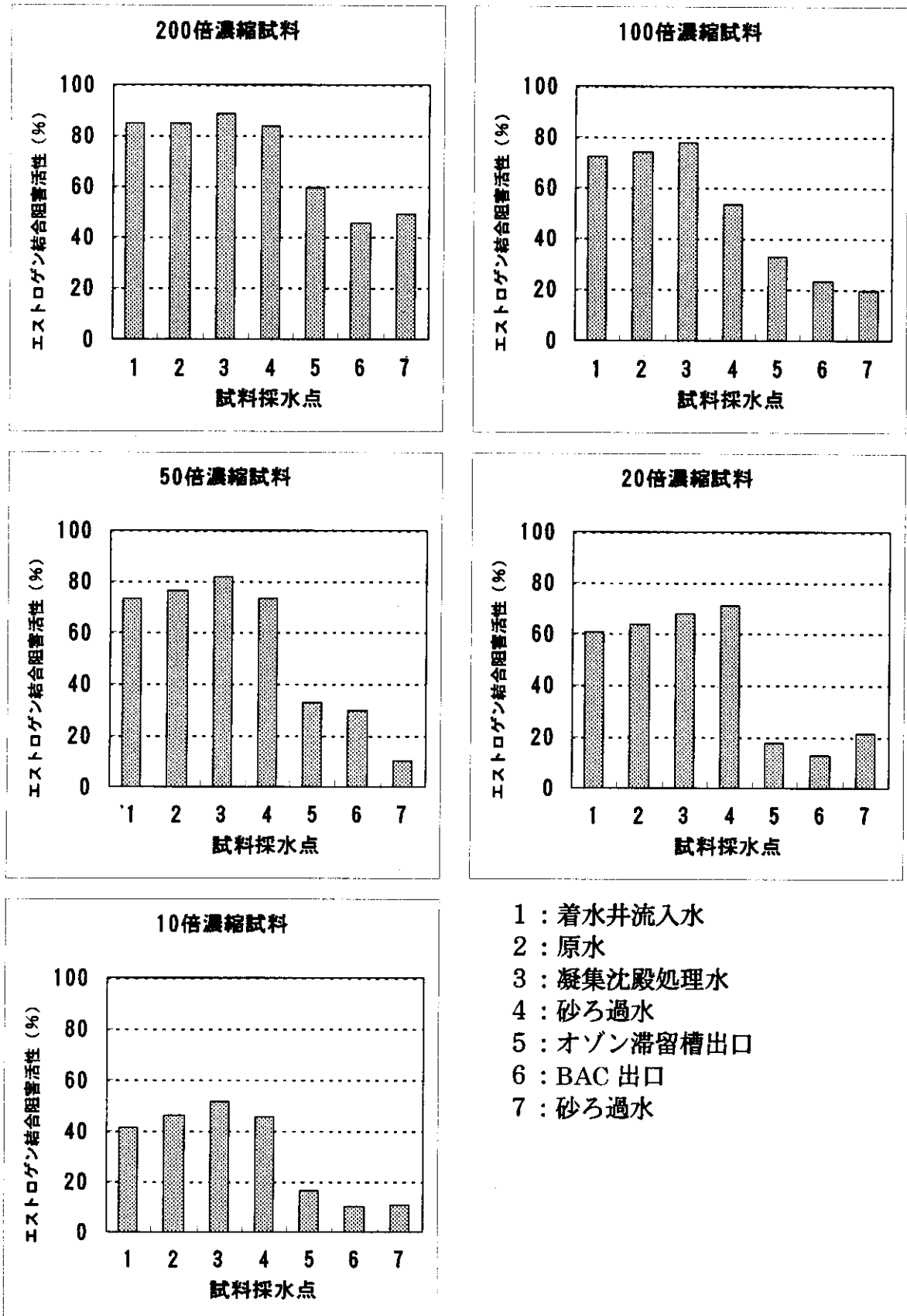
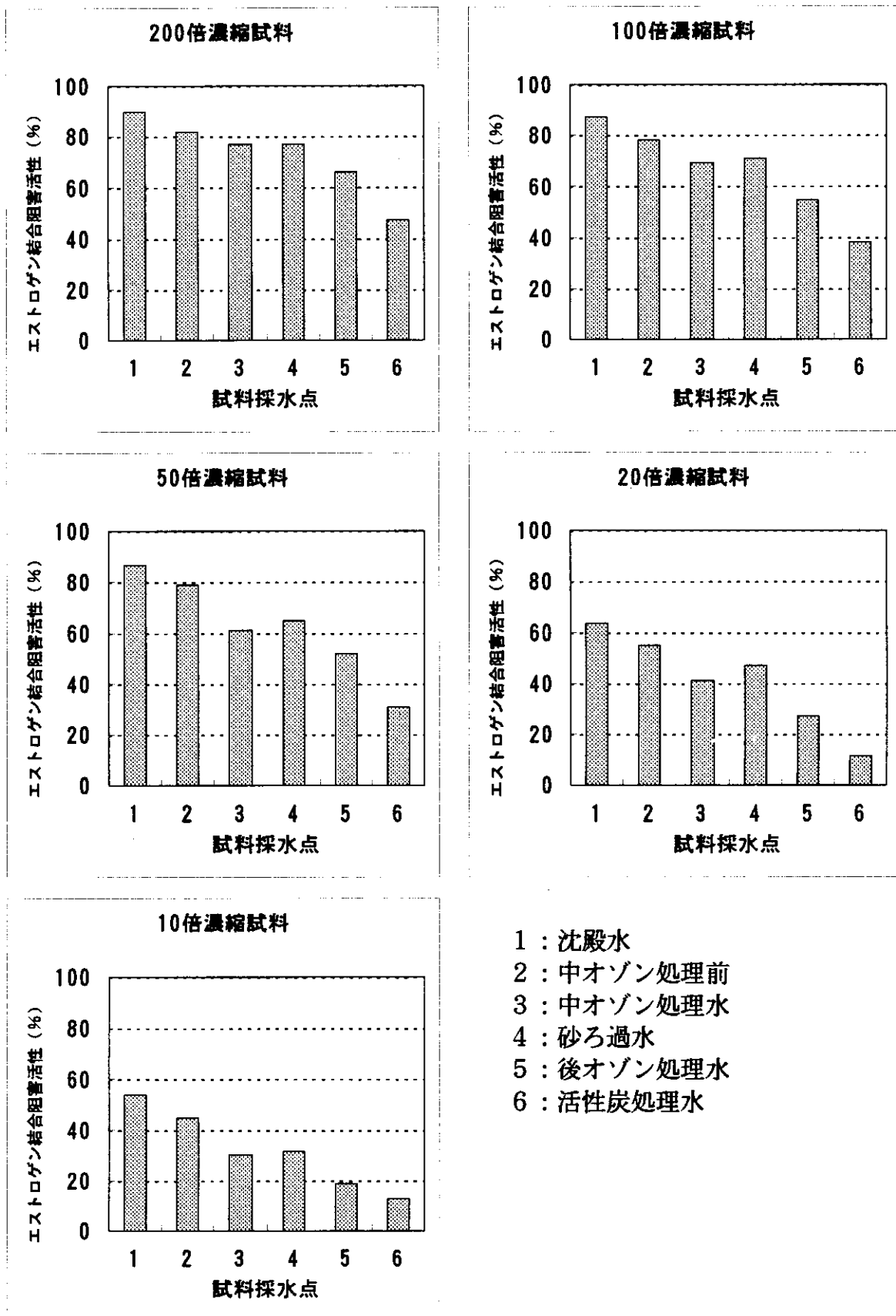


図6 4対象物質添加における浄水処理過程高度処理系におけるエストロゲン様活性の推移



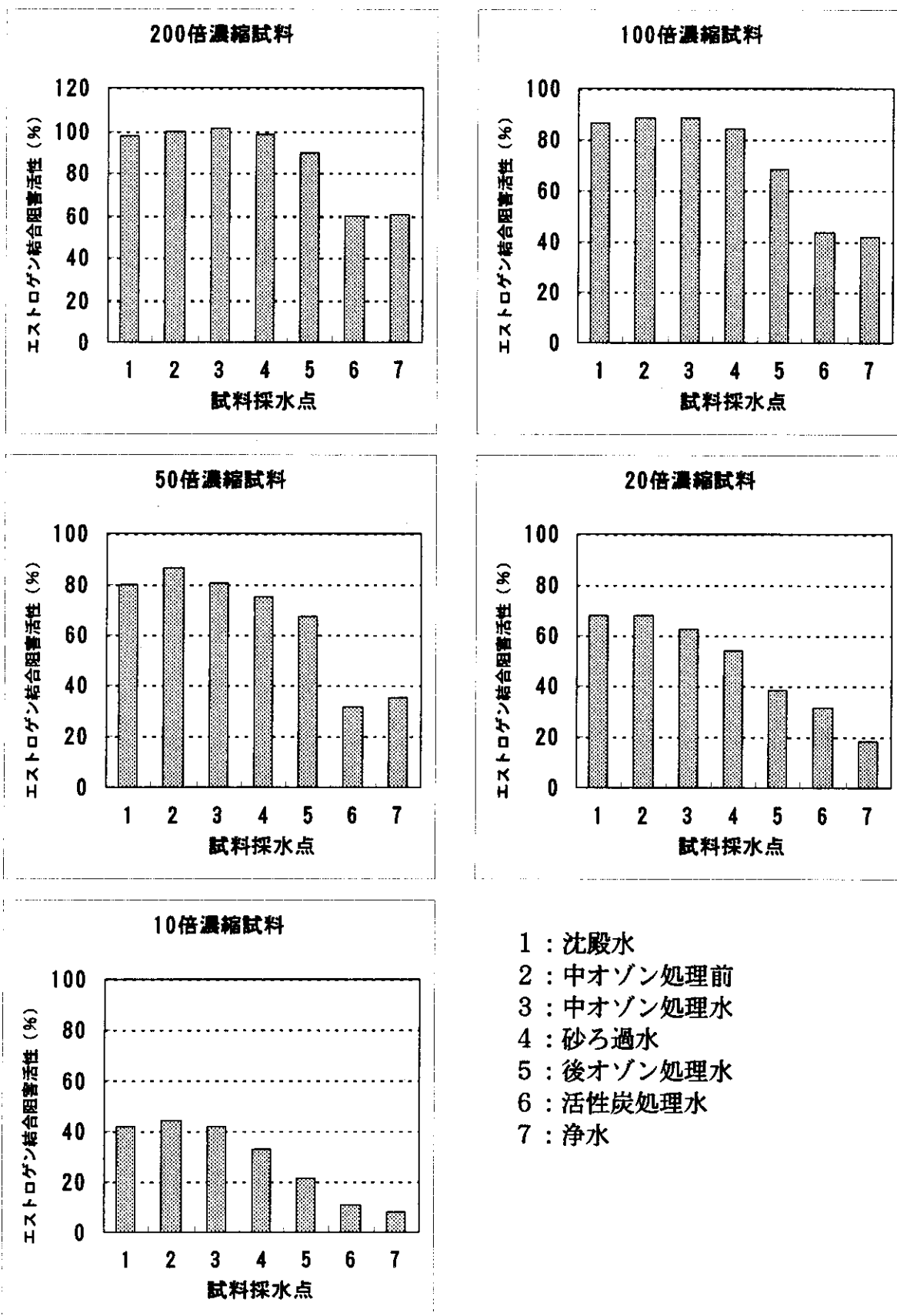
- 1 : 着水井流入水
- 2 : 原水
- 3 : 凝集沈殿処理水
- 4 : 砂ろ過水
- 5 : オゾン滞留槽出口
- 6 : BAC 出口
- 7 : 砂ろ過水

図7 4対象物質添加における浄水処理過程高度処理系におけるエストロゲン様活性の推移



- 1 : 沈殿水
- 2 : 中オゾン処理前
- 3 : 中オゾン処理水
- 4 : 砂ろ過水
- 5 : 後オゾン処理水
- 6 : 活性炭処理水

図8 4対象物質添加における浄水処理過程高度処理系におけるエストロゲン様活性の推移



分担研究報告書 5

エストロゲン活性試験における試料前処理方法の検討と
塩素処理によるエストロゲン活性の低減機構の解明

分担研究者 亀井 翼

エストロゲン活性試験における試料前処理方法の検討と塩素処理によるエストロゲン活性の低減機構の解明

北海道大学工学研究科 亀井 翼

要約

前年度までの研究の結果、(1)環境水中にはエストロゲン物質が存在するにもかかわらず、そのエストロゲン濃度に対応するエストロゲン活性が発現されない、(2)塩素処理により環境水のエストロゲン活性が低下すること等が明らかとなっている。したがって本年度は(1)環境水のエストロゲン活性を見いだすための試験法の開発(2)環境水中に普遍的に存在すると考えられる 17 β -Estradiol (E2)、Bisphenol-A (BPA)、*p*-Nonylphenol (NP) を用いて塩素処理による元々の物質の変化と新たなる生成物のエストロゲン活性の強度を明らかにする。その結果、(1)の環境水のエストロゲン活性を見いだすための試験法の開発については、

1. 環境試料のエストロゲン活性試験において S9mix を酵母 Two-Hybrid 法試験系の 10%量(体積%)を添加するという簡単な方法でエストロゲン様活性を発現させることを可能にした。これは S9mix が環境水のエストロゲン potential(S9mix 無添加ではエストロゲン活性を発現しないが S9mix 添加により代謝活性化されてエストロゲン活性が発現するようになる成分)成分を代謝活性化することによりエストロゲン活性を発現させたというよりも S9mix 中のいずれかの成分が環境試料中のエストロゲン活性阻害成分の阻害効果を masking することにより試料中の共存物質による阻害作用が消失したことに起因するものと考えられる。
2. 逆相系 HPLC を用いた親水順位的な分画により、エストロゲン様活性を示す物質と減少させる物質の分画が可能となった。従って、通常の酵母 Two-Hybrid 測定ではエストロゲン活性が認められない場合でも、分画により活性の発現を確認できる。
3. 液-液抽出操作(*n*-ヘキサン-水)によりエストロゲン活性発現の阻害物と考えられる弱親水性成分を除去後も、エストロゲン活性の増加は認められなかった。逆に除去後、活性値が低下する場合もあり、エストロゲン様物質の水層側への移動も考えられた。今後、別な液-液抽出操作を適用することにより、環境試料のエストロゲン様活性を発現させる可能性も考えられる。したがって、環境試料のエストロゲン活性試験においては、最終的に、操作の迅速、簡単性、コストなどを考慮して上記のいずれかの方法を酵母 Two-Hybrid 試験に適用することが false-positive な結果を避けるために望ましいと考えられる。

環境水中に普遍的に存在すると考えられる 17 β -Estradiol (E2)、Bisphenol-A (BPA)、*p*-Nonylphenol に対する塩素処理のエストロゲン活性低減効果については、

- 1) 塩素処理において E2 と NP は反応時間の経過とともに E2、NP が消失し、十分な時間 (20-36 hr) 経過後は、エストロゲン様活性も消失した。BPA は塩素添加後、BPA とは異なる物質が生成し、一時的(塩素添加 3min 後)にエストロゲン様活性が増大するが、十分な時間が経過すると、中間反応生成物の消失とともに、エストロゲン様活性も消失した。塩素処理によりエストロゲン receptor に対する結合性が消失することがエストロゲン活性消失の主要な要因と考えられる。塩素処理によりエストロゲン物質とアンドロゲン物質が生成し、アンドロゲン物質がエストロゲン活性発現を阻害していることも、可能性としては考えられるので、この点に関しての最終的な確認が必要である。
- 2) 今まで、報告されているエストロゲン物質は芳香核をその化学構造中に有している。芳香核は容易に塩素付加反応および酸化反応を受けて、分解または誘導体に変化する。E2、BPA、NP 以外のエストロゲン物質も塩素処理により、そのエストロゲン活性を消失する可能性は高いと考えられる。

4. 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調査については前年度の調査結果と同様な結果が得られた。すなわち、凝集処理では完全なエストロゲン活性の低減が期待できないが、前塩素処理を行っている通常処理系列、オゾン処理を行っている高度処理系列のいずれのシステムもエストロゲン活性レベルは control のレベルにまで低減し、酸化処理はエストロゲン活性を低減する上で有効であることを再確認した。

目次

1. はじめに
2. 環境水のエストロゲン活性試験法の開発
 - 2.1 S9mix を酵母 Two-Hybrid 法に組み込んだ試験法
 - 2.2.エストロゲン発現阻害成分とエストロゲン物質を HPLC 的に分画して試験を行う方法
 - 2.3. エストロゲン活性発現の阻害物を液-液抽出操作により除去する方法
3. 塩素処理による E2、BPA、NP のエストロゲン活性の低減
4. 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
5. 結論

1. はじめに

前年度までの研究の結果、(1)環境水中にはエストロゲン物質が存在するにもかかわらず、そのエストロゲン濃度に対応するエストロゲン活性が発現されない、(2)塩素処理により環境水のエストロゲン活性が低下することが明らかとなっている。環境水中にはエストロゲン物質が存在するにもかかわらず、そのエストロゲン濃度に対応するエストロゲン活性が発現されない理由としては(1) 共存するある種の成分が酵母のエストロゲン receptor に結合することにより本来のエストロゲン物質が receptor に結合することを阻害、(2) 共存するある種の成分が酵母細胞膜表面に結合し、エストロゲン物質の細胞膜透過を抑制する、(3)共存するある種の成分がエストロゲン物質と結合し、酵母細胞膜の透過あるいは酵母のエストロゲン receptor への結合を阻害するなどの様々な理由が考えられる。そこで(1) S9mix を酵母 Two-Hybrid 法に組み込み、エストロゲン発現を阻害するある種の共存成分の阻害機能を S9mix により抑制する、(2)環境水中のエストロゲン発現阻害成分とエストロゲン物質を chromatography 的に分離して Two-Hybrid 試験を行う(3)環境水中のエストロゲン発現阻害成分とエストロゲン物質を液-液抽出法により分離して Two-Hybrid 試験を行うことなどにより、通常の方法(環境水中のエストロゲン物質を Sep Pak C18 に吸着させ、その後、ジクロロメタン等の有機溶媒を用いて溶出し酵母 Two-Hybrid 試験を行う)では見いだし得ない環境水のエストロゲン活性を見いだすことが考えられる。

塩素処理により環境水のエストロゲン活性が低下する理由としては(1)エストロゲン物質が塩素の酸化または付加反応により分解または誘導体に変化し、本来のエストロゲン活性作用を失い、かつ(2)塩素の酸化または付加反応により新たに生成した反応生成物もエストロゲン活性を有しない成分であることなどが考えられる。したがって本年度は(1)環境水のエストロゲン活性を見いだすための試験法の確立(2)環境水中に普遍的に存在すると考えられる 17 β -Estradiol (E2)、Bisphenol-A (BPA)、*p*-Nonylphenol(NP)を用いて塩素処理による元々の物質の変化と新たな生成物のエストロゲン活性の強度を明らかにすることを目的とした。

2. 環境水のエストロゲン活性試験法の開発

2.1 S9mix を酵母 Two-Hybrid 法に組み込む試験法

実験に供した試料

化学物質として、E2, BPA, NP, Methoxychlor 等、20 種のエストロゲン様物質を用いた。環境試料には、下水処理水、河川水、工場排水等を用いた。

試料の調製

化学物質は DMSO もしくは精製水に溶解させ、これを順次希釈したものを試料とした。

環境試料については、採水後、ガラス繊維濾紙 (GF/C Whatman 社製) を用いて濾過を行い、予めコンディショニングした Sep Pak C18 (Waters 社製) に吸着させ、その後、ジクロロメタンで溶出し、段階的に希釈したものをサンプルとした。

エストロゲン様活性の測定

エストロゲン様活性の測定には、酵母 Two-Hybrid 法を用いた。この方法は、組み換え酵母の染色体中に組み込んだエストロゲンレセプターとエストロゲン様物質が結合することにより、遺伝子の転写が活性化され、分泌される酵素 (β -galactosidase) の量を測定し、それをエストロゲン様活性とする。代謝活性化を考慮する系 (+S9 系) では、試料と酵母懸濁液を混合する際に S9mix (オリエンタル酵母社製) を試験系の 10% 量になるよう添加し、酵母の培養と S9mix の反応を同時に行った。なお、エストロゲン様活性は陽性対照である E2 の最大活性に対する比活性値で表現した。

エストロゲン濃度の測定

環境試料中のエストロゲン濃度の測定には、抗原抗体反応を利用する ELISA 法と LC/MS を用いた。ELISA 法は抗体の結合部位を酵素標識した抗原と検体中の抗原とで競合させ、酵素反応による発色で検体中の濃度を測定する方法である。

試料中の阻害作用の確認

各濃縮倍率の環境試料に一定濃度の E2 ($10^{-6}M$) を添加することで、E2 の活性に与える試料の阻害作用を評価した。

LC を用いた試料の分画

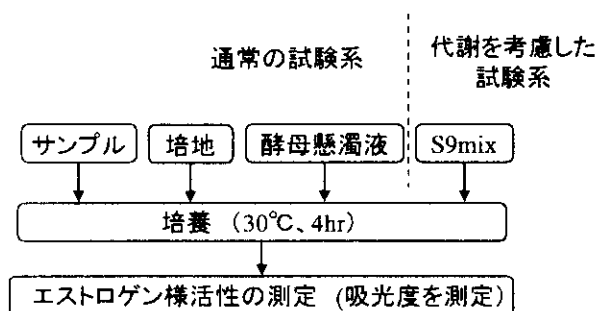


図1 酵母 Two-Hybrid 法の測定手順

分画は表 1 に示す分画条件で行い、2 分間の溶出液を 1 フラクションとして分取し、40 分間、計 20 フラクションを得た。その後、溶媒を乾固させて DMSO に転溶し、50000 倍濃縮試料としてエストロゲン様活性の測定を行った。また、分画試料においても、E2 ($10^{-6}M$) との共存実験を行った。

結果および考察

表 1 LC による環境試料の分画条件

Instrument	HP1100
Column	Hypersil BDS-C18 (4.0×250mm) 5-Micron
Elute	A: Water B: MeOH B: 0%-100% (0-10min)
Flow rate	0.2mL/min
Oven temp.	40°C
Injection vol.	60μL
Detector	DAD

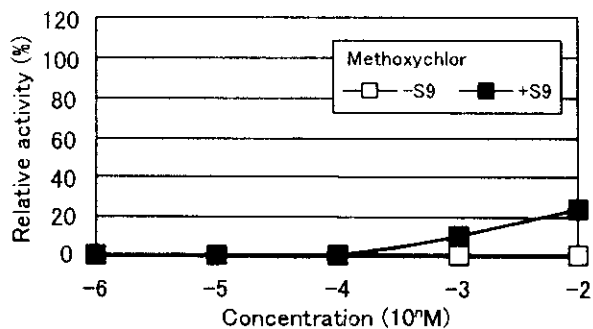


図2 S9mixによるエストロゲン様活性の変化

S9mix を組み込んだ酵母 Two-Hybrid 法の開発

S9mix を導入した試験系では、S9mix 添加の際、従来の方法に大幅な変更を加えることなく最も効率的に試験を進めるためには、酵母 Two-Hybrid 法における培養と S9mix との反応を同時に行うことが最適であると考えた。従って、培養溶液中の培地の量を減少させ、その代わりに S9mix を添加する方法を適用した。反応に関与する因子としては、S9mix の添加量および反応時間に関して検討を行った。試験物質として E2 を用い、S9mix の添加量について、試験系の 5%、10% および 20% 量(体積%)の 3 条件で検討した。その結果、5% の添加量では S9mix 無添加時のエストロゲン様活性パターンに近く、反応が不十分なようであった。10% および 20% の場合、両者の活性パターンは非常に類似しており、添加量による違いは認められなかった。しかし、S9mix の量を増やすことは培地量を減少させることになり、酵母の増殖ひいてはエストロゲン様活性に影響を与えることになりかねないため、本法では 10% 添加量を用いることとした。

反応時間に関しては、最大 48 時間の反応となるよう時間を設けた。まず 4 時間の反応時間でエストロゲン様活性の発現濃度が高濃度側に移動する現象が見られた。その後はあまり変化が認められなかったが、時間とともに活性は徐々に低下していく傾向にあった。このことより、反応時間を 4 時間とすることで、エストロゲン様活性に十分な影響が認められたと判断した。

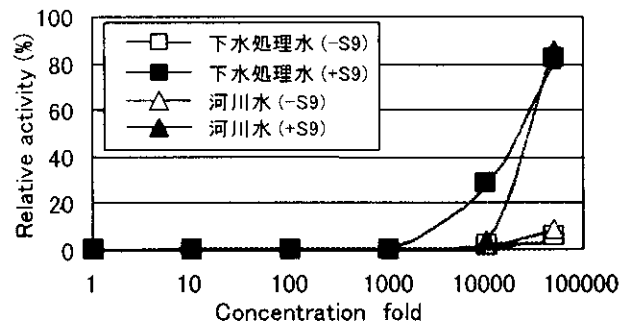


図3 環境試料におけるエストロゲン様活性の変化

S9mix による化学物質のエストロゲン様活性

上述の方法を用いて、20 物質のエストロゲン様活性を測定した。その結果、半数は±S9 系で違いが見られなかった。また、-S9 系と+S9 系におけるエストロゲン様活性に変化が認められる物質には、S9mix を添加することによって低濃度側で活性が大幅に低下するものがあった。また、高濃度側で上昇するもの、全体的に上昇するものもあったが、それらの活性値の変動はあまり大きくなかった(図2)。

S9mix による環境試料のエストロゲン様活性

環境試料に本法を適用した場合は、化学物質の場合と異なり、活性に大きな変動が見られた。ELISA 法の測定結果から、試料中にはエストロゲン様活性を発現するのに十分な E2 の存在が確認された。しかし、酵母 Two-Hybrid 法において、-S9 系ではほとんどの試料でエストロゲン様活性は認められなかったが、+S9 系では活性値の大幅な上昇が確認された。図3に一例を示す。このような活性の増大は、化学物質の測定結果(試験した20種類の物質の中、S9mix によるエストロゲン様活性増加の最大値は高々20%程度)と考え合わせると、エストロゲン様物質が代謝活性化されたためとは考えにくい。エストロゲン様活性の発現を阻害している共存物質の阻害作用が S9mix により減少し、本来のエストロゲン様活性が現れたものと考えられる。しかしながら、(1) 環境水中のいかなる成分がエストロゲン様活性発現を阻害するのか?、(2) S9mix 中のいかなる成分が masking 剤として機能するのか?、(3) いかなる条件下でも、添加した S9mix は E2 のようなエストロゲン物質よりも、エストロゲン阻害成分を選択的に masking し、本来のエストロゲン物質によるエストロゲン発現を可能にするのか?等に関しては今後、明らかにすべき課題である。

表 2. S9mix 及び活性汚泥処理下水中のエストロゲン阻害成分が E2 のエストロゲン活性に及ぼす影響

	濃度レベル	エストロゲン比活性値
E2	10^{-6} M	80
E2+. S9mix	10^{-6} M(E2)	5
E2+活性汚泥処理下水(濃縮倍率: 10^4)	10^{-6} M(E2)	40
E2+活性汚泥処理下水(濃縮倍率: 10^4) +. S9mix	10^{-6} M(E2)	80

S9mix を組み込む酵母 Two-Hybrid 法のまとめ

- 1) 化学物質の中には、S9mix によりエストロゲン様活性に変化の現れるものが存在するが、活性値の大幅な上昇は見られなかった。
 - 2) S9mix を用いない環境試料のエストロゲン活性試験では、本来のエストロゲン様活性を正確に評価できていない可能性がある。その原因としては、共存物質の阻害作用によるところが大きい。
 - 3) 環境試料において+S9系の試験でエストロゲン様活性が上昇した。試料中の共存物質による阻害作用が消失したためであると考えられる。
- 以上のことから、特に環境試料について+S9系の試験を行うことは、false negative な結果を避けるために必要と考えられる。

2.2. エストロゲン発現阻害成分とエストロゲン物質を HPLC 的に分離して試験を行う方法

実験方法

《実験に用いた試料》実験には A・B・C 下水処理場二次処理水、B 初沈流入水、茨戸河川水、北村泥炭水、江別浄水場原水、パルプ排水を用いた。

エストロゲン様活性の測定、エストロゲン濃度の測定、HPLC を用いた分画と活性値の測定、は先に述べた方法と全く同じである。

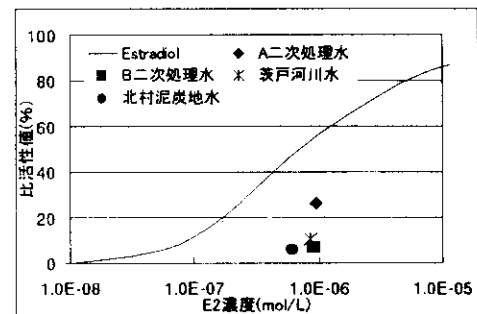


図 4. E2 濃度と活性値の比較

測定結果と考察

《活性値の測定結果》 E2 濃度と比活性値の関係を図 4 に

表した。縦軸には濃縮倍率 50000 倍のサンプルの比活性値を示した。図から E2 濃度の測定結果から算出すると活性を示すのに十分なサンプルでも、酵母 Two-Hybrid 法では活性が認められていないことがわかる。

《分画したサンプルの活性値と阻害率》活性が認められなかった試料水も、HPLC 分画により B 二次処理水、河川水、泥炭水が活性を示した。図 5 から A 二次処理水でエストロゲン様活性を示したのは、フракシオン No.12 のサンプルであり、他の活性が認められたサンプルも同様に No.12 のサンプルで活性が認められた。E2 を環境水と同様に分画・測定した場合にも同じフракシオンで活性が認められたことから、今回行った逆相系カラムによる分画方法でエストロゲン様活性を示す物質群の分離が可能であるといえる。また、図 6 において、E2 のみの比活性値は 60% であるのに対して、フракシオン No.11 及び 13 では阻害成分の影響によりエストロゲン活性値が著しく減少していることがわかる。

まとめ

濃縮した環境水のエストロゲン様活性は E2 の濃度から算出されるエストロゲン様活性を下回る傾向が認められ、その原因として共存する物質がエストロゲン様活性の発現を何らかの形で阻害していることが明らかになった。

HPLC を用いた分画によるエストロゲン様物質群の分離の可能性が示されたと同時に、エストロゲン様活性を示す物質と減少させる物質の存在が認められた。従って、通常の測定では活性が認められない場合でも、分画により活性の発現を確認できる。

活性を減少させる物質は近接するフракシオンに存在することから類似した構造をもつことが予測され、そのことから単独ではエストロゲン様物質として存在する物質が、E2 と共存することでレセプターに対して飽和状態になり、結果的に活性値が減少している可能性が考えられる。

2.3. エストロゲン様活性発現阻害成分を液-液抽出により除去する方法

実験方法 環境水は下水二次処理水、河川水、パルプ工場廃水を用いた。

《試料の前処理法》 試料の懸濁性、溶解性は、ガラス繊維濾紙 (GF/B) あるいは PTFE メンブレンフィルター (孔径 0.5 μ m) を用いて濾過し分離した。懸濁性は濾紙を乾燥させメタノールによる超音波抽出 (15 分×5 回) を行い、窒素ガスによる減容後 DMSO に転溶し試料とした。溶解性は、濾液を固相カートリッジ (Sep Pak C18, Sep Pak CSP800) を直列に用いて濃縮し、2 種類の溶媒 (ジクロロメタン、メタノール) で溶出、減容を行い試料とした。

《阻害物質確認実験》 10⁻⁵ mol/L の E2 とサンプルを 2.5 μ L ずつ添加し、エストロゲン様活性を測定した。

《阻害物質除去実験》 エストロゲン様物質の多くは疎水性物質であることから親水性物質を取り除く。濃縮サンプルを 5 分間振とう、3000rpm で 5 分間遠心分離を行い精製水層、n-ヘキサン層に分配させ、ヘキサン層を回収する。窒素ガス後 DMSO に溶媒転溶し、エストロゲン様活性の測定を行った。

実験結果、考察 PTFE メンブレンフィルターを用いた場合 A 下水処理水でエストロゲン様活性が認められ、懸濁性、溶解性で活性があった (図 7)。エストロゲン様活性が発現する場合は懸濁性、溶解性双方に見られ、いずれか一方にのみ活性が発現することは見られなかった。

《阻害物質確認実験》 E2 のみの場合に比べ、懸濁性、溶解性の両サンプル共に、1 倍から 1 万倍濃縮サンプルの比活性値は環境水によって 20% から 50% ほど低くなり、10 万倍濃縮サンプルでは 55% から 75% 活性が下がった。これら実験結果から、サンプル中に何らかの阻害物質が存在しているものと考えられる (図 8)。

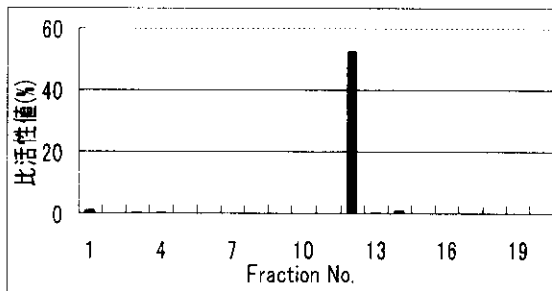


図 5. 二次処理水のサンプルのみの各フракシオンの比活性値

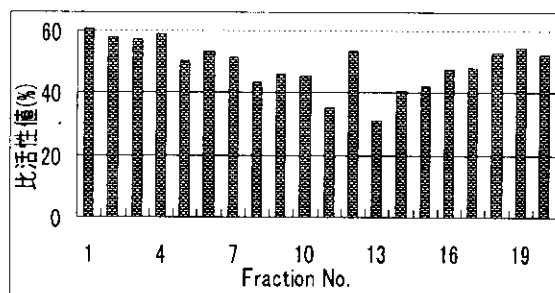


図 6. 二次処理水に E2 添加した時の各フракシオンの比活性値

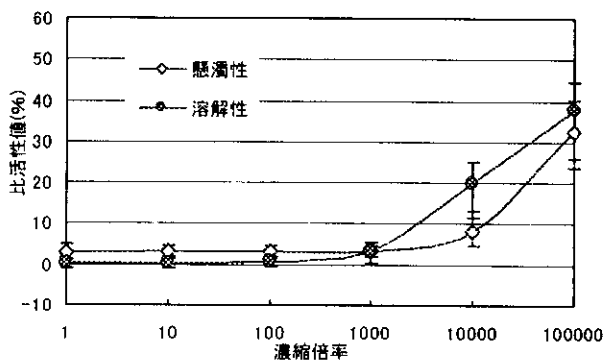


図 7. 下水処理場におけるエストロゲン活性発現の例

《阻害物質除去実験》 阻害物と考えられる成分を抽出後、一回ごとの実験データのばらつきは減少したが、エストロゲン様物質の存在が認められていた試料で活性が発現する事は無く、また最大比活性値の増加(図9)は無かった。除去後、活性値が下がった結果もあり、エストロゲン様物質の水層側への移動や、疎水性物質による阻害の可能性も考えられる。

まとめ ①今回の調査では、2種類の環境水の懸濁性試料中にエストロゲン様活性が認められ、その場合は溶解性試料にもエストロゲン様活性があった。②環境試料を酵母Two-Hybrid法で測定する場合、発現するはずのエストロゲン様活性が阻害物質の影響で見られないといった問題があり、その阻害物質除去を目的として液液抽出を行った。その結果、実験毎のデータのばらつきは減少したが、活性に関しては十分な成果が得られなかった。

3. 塩素処理による E2、BPA、NP のエストロゲン様活性低減

これまでの研究で、浄水過程におけるエストロゲン様活性の挙動を実験室および浄水場で調べてきた。その結果、エストロゲン様活性を低減させることにおいて、凝集処理では不十分だが、塩素処理は有効であるということが明らかとなってきた。本研究ではエストロゲン様活性低減に有効な塩素処理に焦点を当て、塩素処理によるエストロゲン様活性低減の理由を解明することを目的とした。E2、BPA、NPを試験物質とし、以下のことを行った。

- ・ 塩素との反応時間によるエストロゲン様活性の変化測定
- ・ LC/MSによる副生成物の分析
- ・ エストロゲン receptor 結合試験

3.1 実験方法

塩素処理方法

10^{-7} M E2(MW=272.39)、 10^{-5} M BPA(MW=228.29)、 10^{-6} M NP(MW=220.35)水溶液を調製し、これに次亜塩素酸ナトリウムを加えた。塩素添加率は塩素添加後24時間ないし36時間後も残留塩素が検出されるように設定した。E2には塩素を1.5ppm添加し、反応時間は10分、20時間、36時間とした。BPAには7.5ppm添加し、反応時間は3分、10分、1時間、24時間とした。NPには1.5ppm添加し、反応時間は10分、24時間とした。いずれの試料もアスコルビン酸を用いて塩素との反応を停止させた。

エストロゲン Receptor Competetitor assay

物質がどの程度、ヒトのエストロゲンレセプター(ER- α , β)に結合し易いかを判定する試験は Receptor Competetitor assay Kit(PanVera, Madison, WI,USA)を用いて行った。

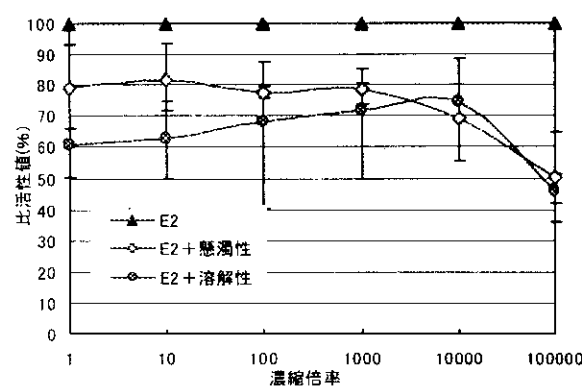


図 8. 下水懸濁性成分及び溶解性成分中の阻害成分が E2 のエストロゲン活性に及ぼす影響

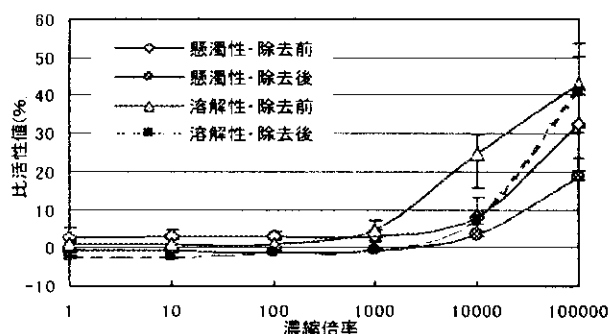


図 9. 下水放流水中の懸濁性成分、溶解性成分中の阻害成分を液液抽出による分離後のエストロゲン活性変化

3.2 実験結果および考察

E2 の塩素処理

《LC/MS 分析》塩素添加後 10 分では E2 が検出されたが、その後は検出されなかった。塩素添加後いずれの時間でも $m/z=355,401$ を示す物質が検出された(表 3)。

《E2 濃度の測定》E2 濃度は塩素添加後 10 分には約 25%程度に減少し、36 時間後では約 0.1%程度になった(表 4)。

《エストロゲン様活性の変化》塩素添加後 10 分の試料はエストロゲン様活性が認められ、時間の経過とともにエストロゲン様活性が低減し、36 時間後には活性がほとんど認められなくなった(図 10)。

《エストロゲンレセプター-(ER- α,β) 結合性の変化》塩素添加後 10 分の試料は E2 が残存するためエストロゲンレセプター結合性が認められたが、時間の経過とともにエストロゲンレセプター結合性が低減し、20 時間後にはエストロゲンレセプター結合性がほとんど認められなくなった(図 11)。

この結果はエストロゲン様活性試験及びエストロゲンレセプター-(ER- α,β) 結合性試験の結果と一致する。

《E2 の塩素処理結果の考察》塩素添加後 10 分でエストロゲン様活性が認められたのは、LC/MS 分析で E2 が検出されたこと(表 3 下線部)と、E2 濃度測定結果から、未反応の E2 が原因であると考えられる。塩素添加後 20 時間でエストロゲン様活性が認められたことについても、未反応の E2 が存在していたことが原因であると考えられる。塩素添加後のいずれの時間でも検出された副生成物($m/z=355,401$)は構造を推定できないが、反応時間とともにエストロゲン様活性が低減しているにもかかわらず増加傾向にあることから、エストロゲン様活性を持たない物質であると考えられる。これらのことから、E2 は塩素処理をするとエストロゲン様活性を持たない物質に変化することでエストロゲン様活性が低減すると考えられる。

BPA の塩素処理

表 3 E2 の塩素処理による副生成物

	保持時間(分)	副生成物の質量数(m/z)
塩素無添加	10.06	271(E2)
塩素添加後 10 分	10.29	<u>271(E2)</u>
	10.58	355,401
塩素添加後 20 時間	9.93	355,401
	11.60	389
塩素添加後 36 時間	10.44	355,401

表 4. 塩素処理による E2 濃度の変化

	E2 濃度($\mu\text{g/L}$)	E2 濃度(M)
塩素無添加	17.4	0.640×10^{-7}
塩素添加後 10 分	4.23	0.156×10^{-7}
塩素添加後 36 時間	0.0229	0.842×10^{-10}

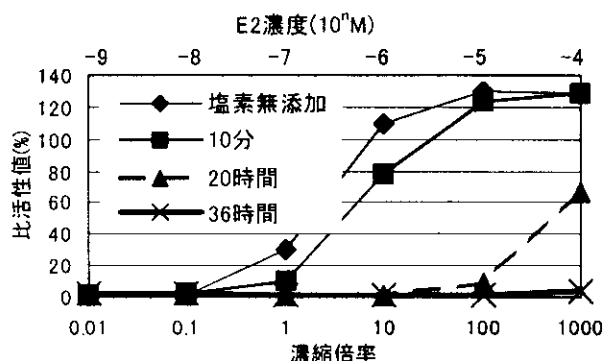


図 10 E2 の塩素処理による反応時間とエストロゲン様活性の関係