

図5 大気中ダイオキシン類同族体内の異性体存在比

I : 標準偏差の範囲を示す

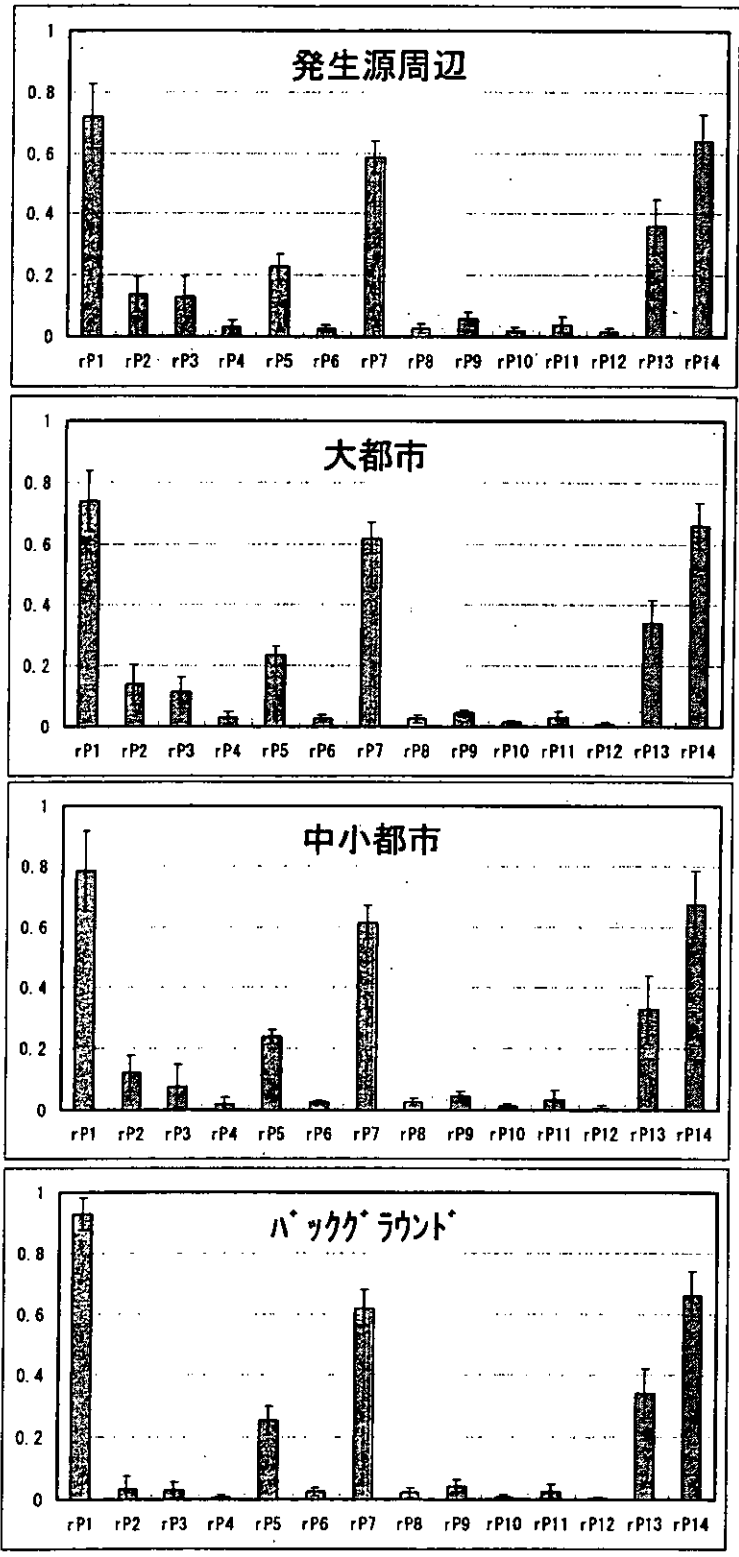


図5 (続き)

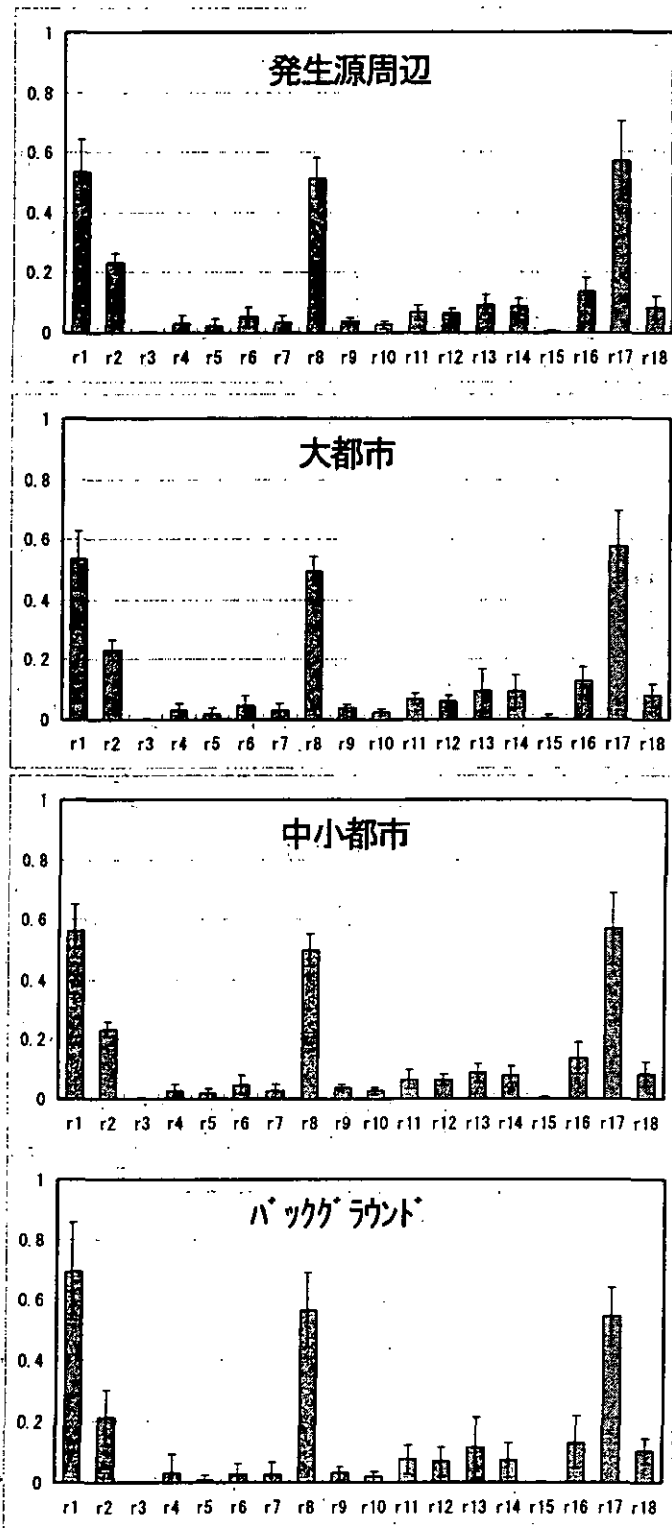


図6 降下ばいじん中ダイオキシン類同族体内の異性体存在比

I : 標準偏差の範囲を示す

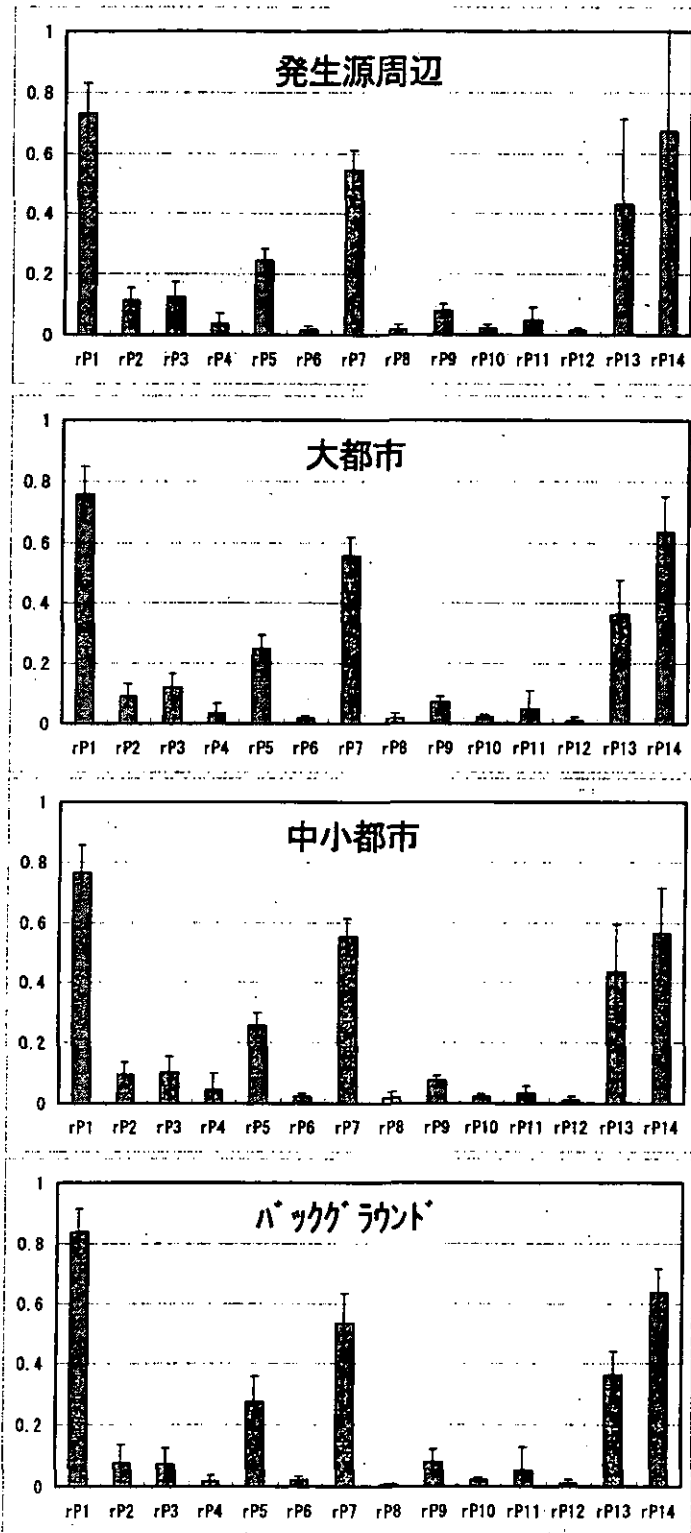


図6 (続き)

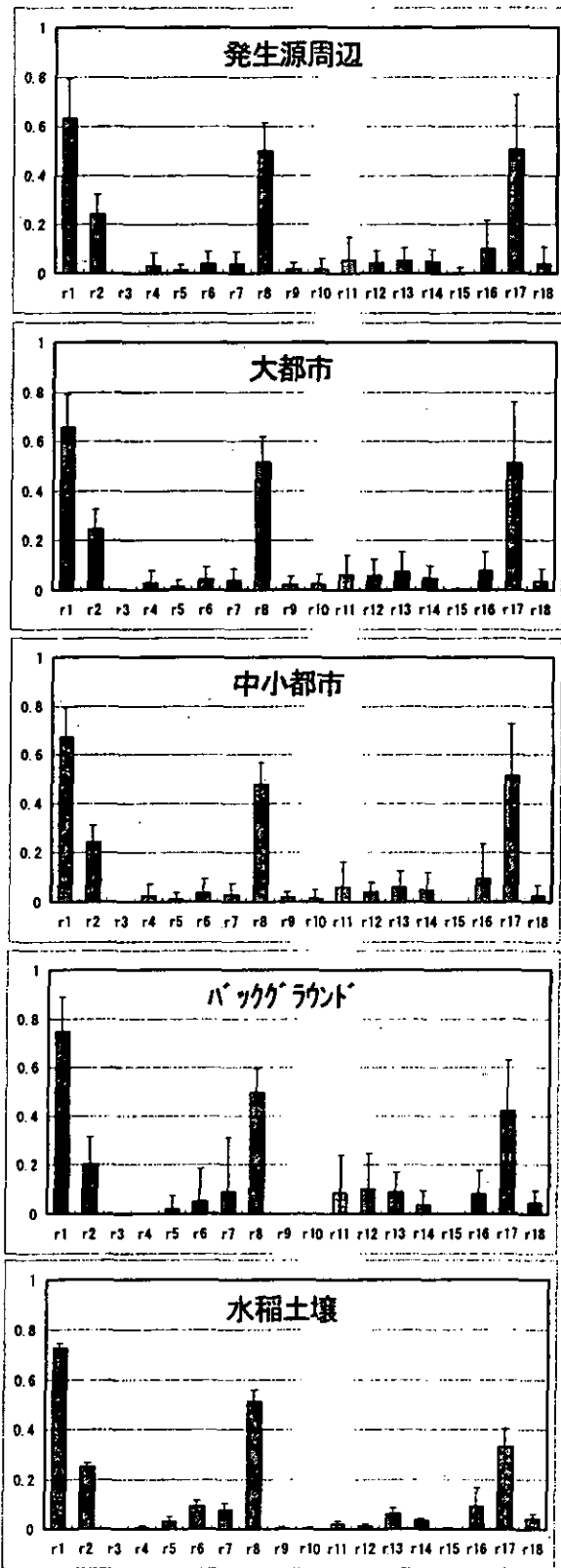


図7 土壤中ダイオキシン類同族体内の異性体存在比  
 I : 標準偏差の範囲を示す

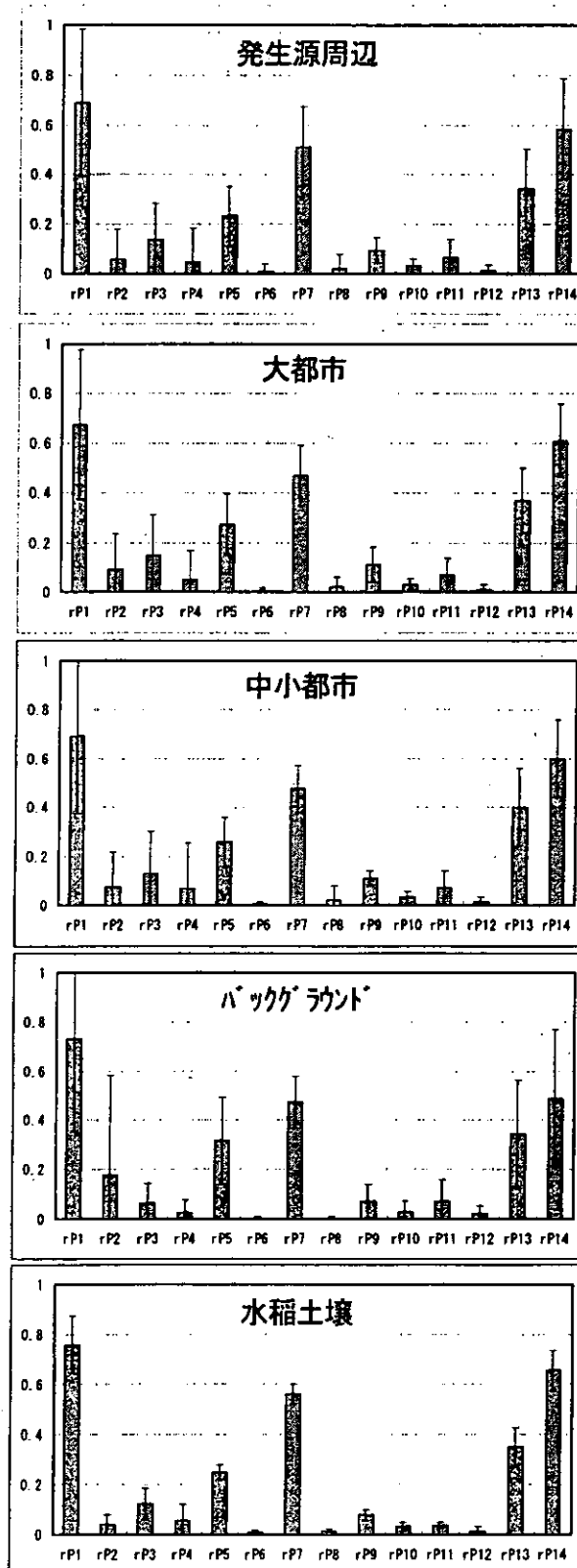


図7 (続き)

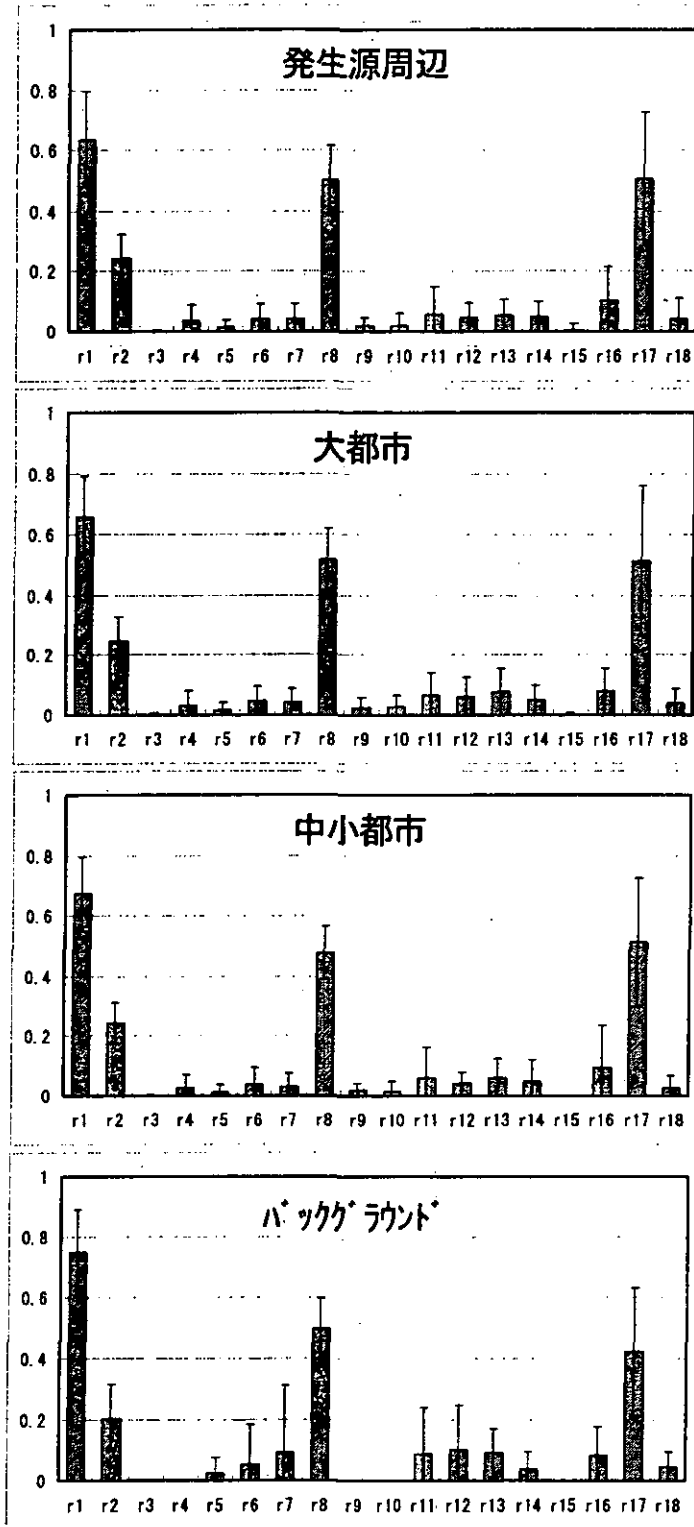


図8 底質中ダイオキシン類同族体内の異性体存在比

I : 標準偏差の範囲を示す

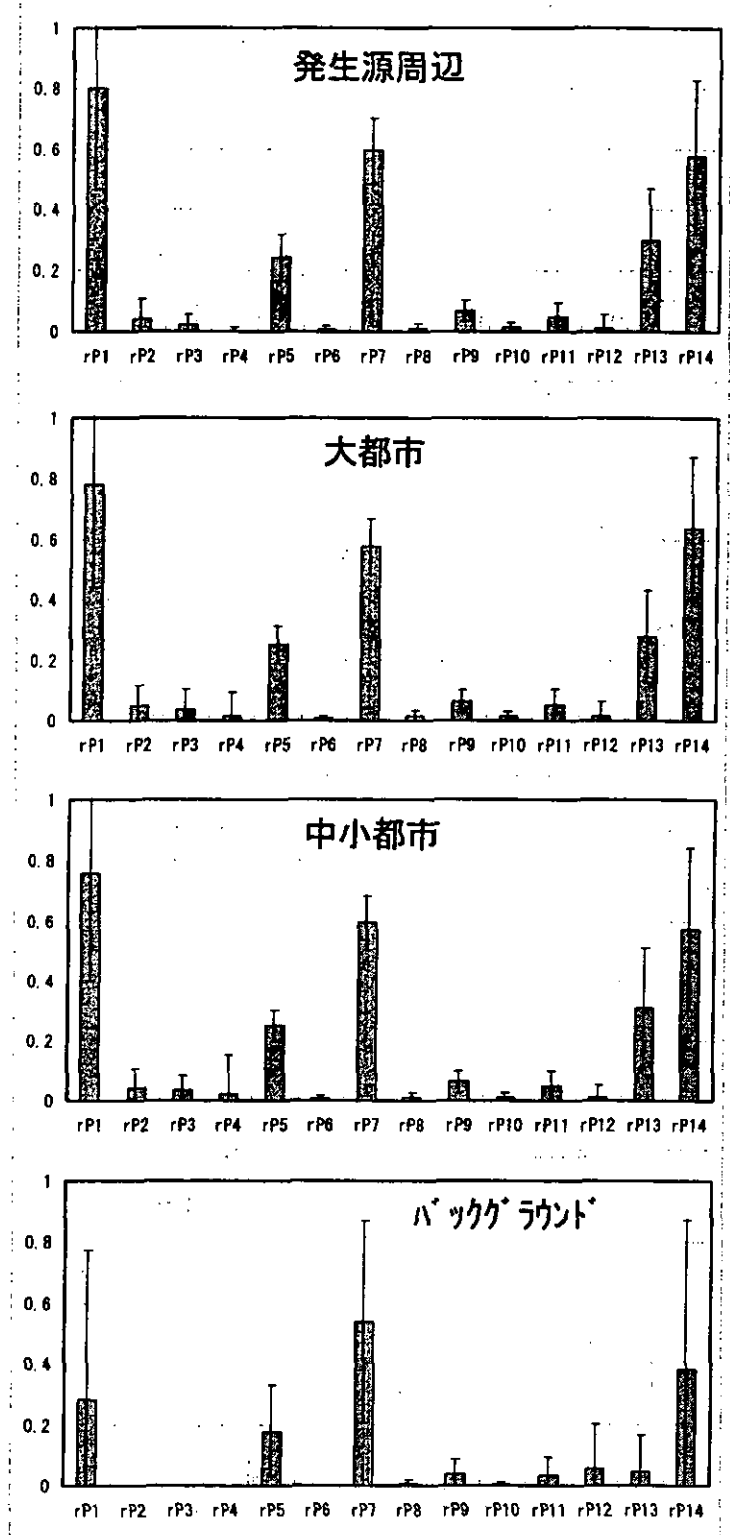


図8 (続き)



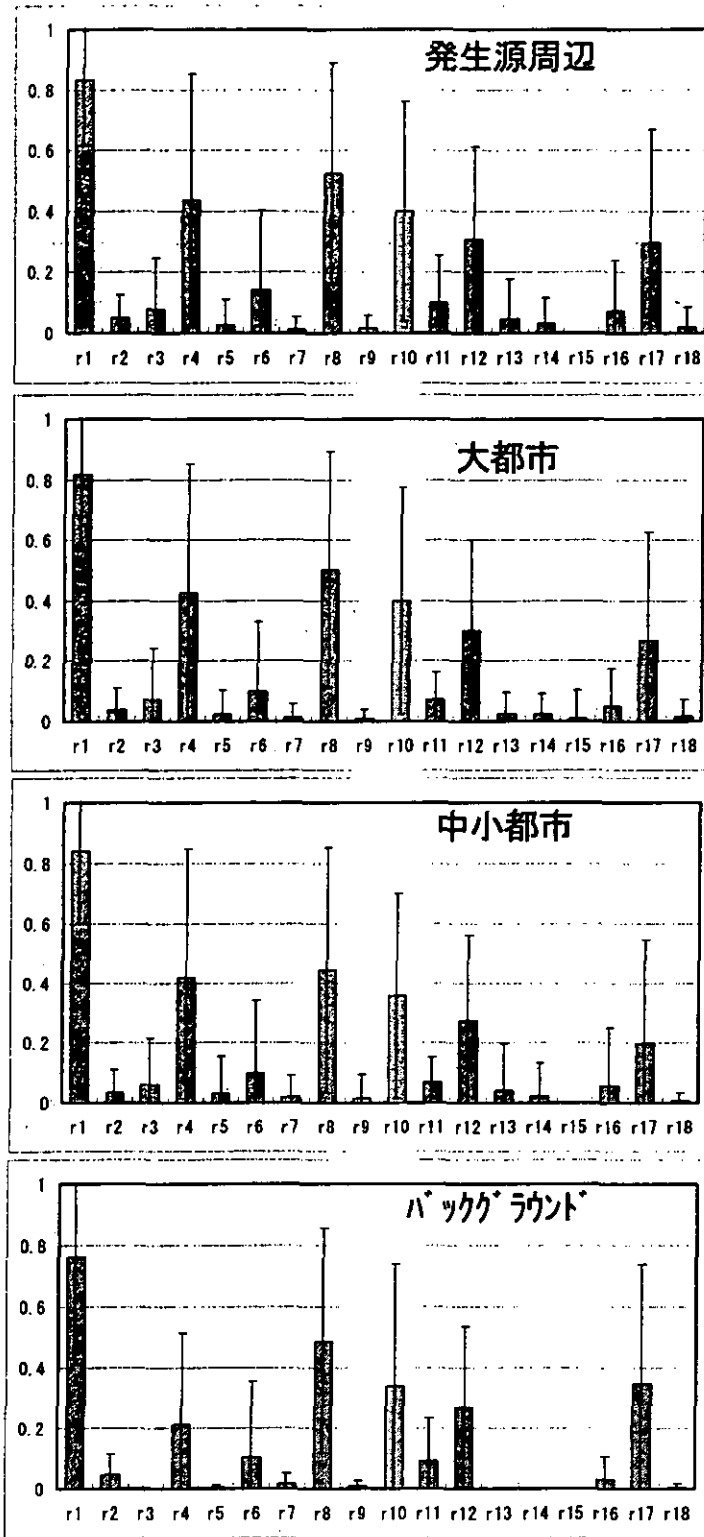


図9 水生生物中ダイオキシン類同族体内の異性体存在比

I : 標準偏差の範囲を示す

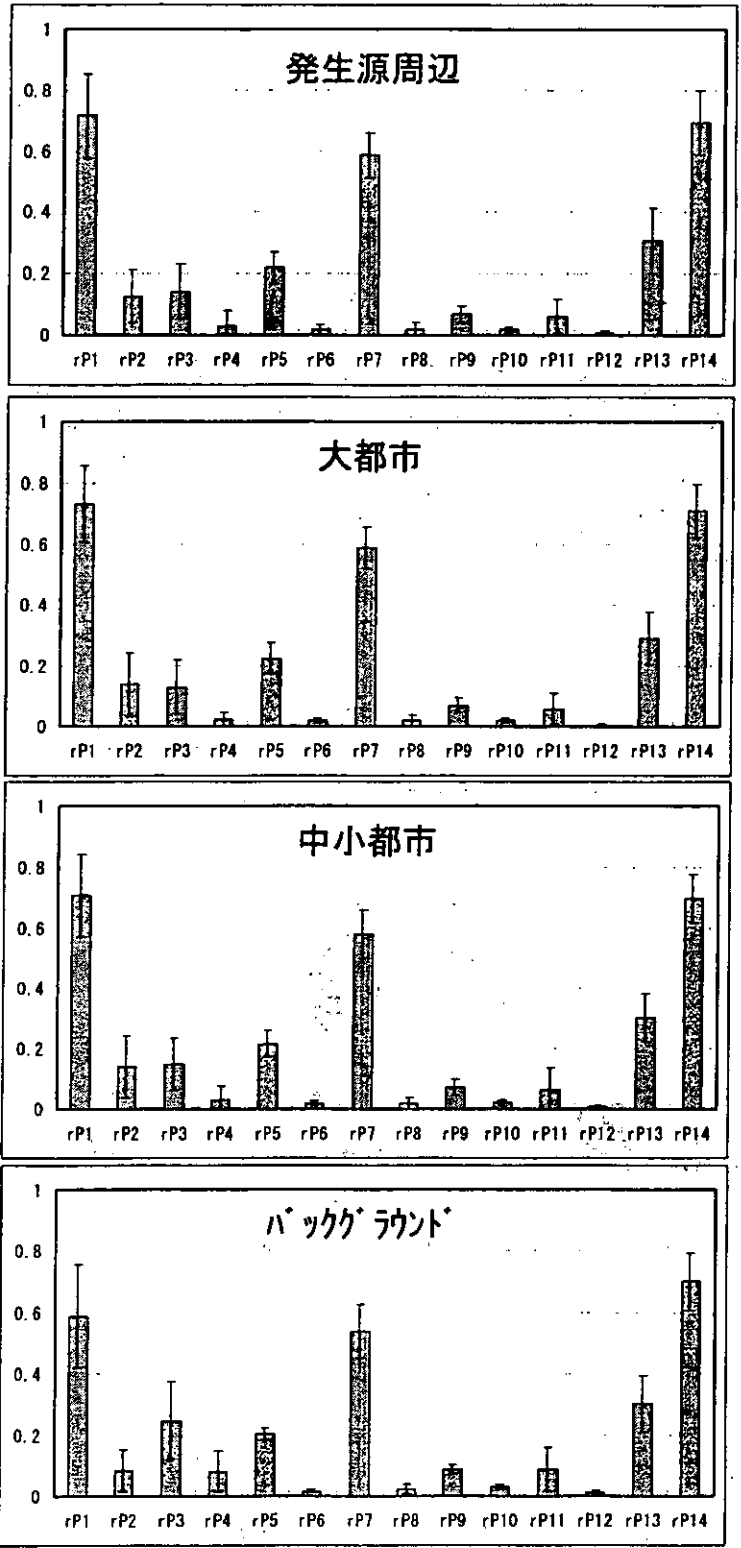
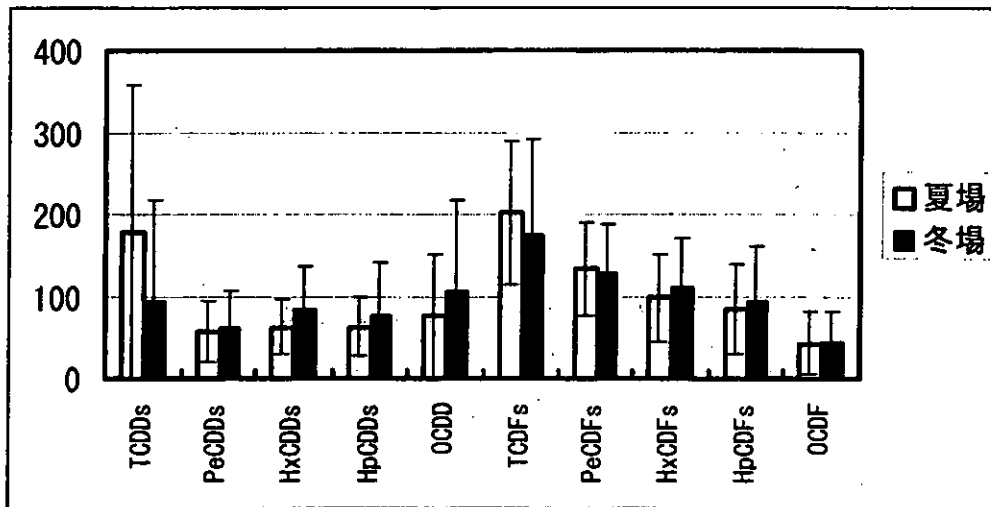


図9 (続き)

PCDD/Fs



Co-PCBs

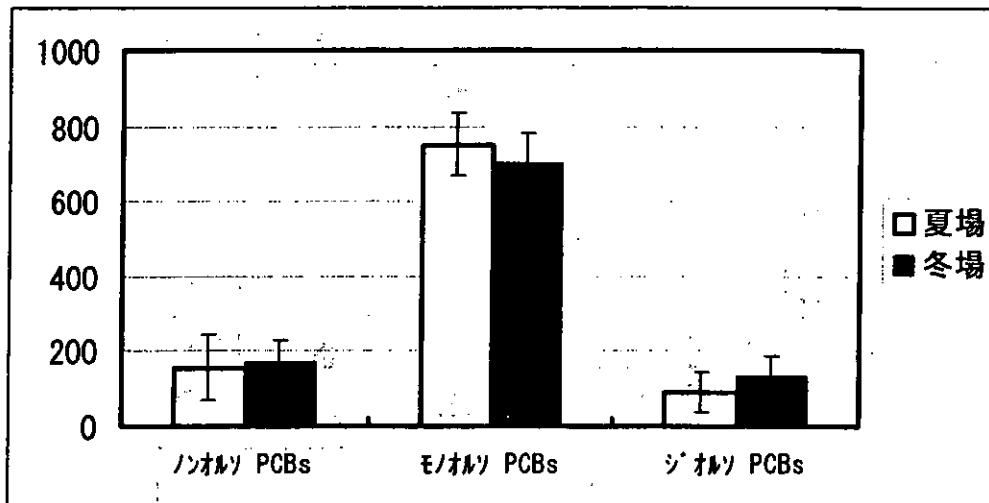


図10 夏場と冬場における大気中ダイオキシン類同族体組成比

I : 標準偏差の範囲を示す

## バイオアッセイ系を利用した環境複合系への影響評価に関する研究

研究者 松井三郎、松田知成 京都大学

### 研究要旨

バイオアッセイ系を利用した環境複合系への影響評価に関して、文献調査と実験的検討を行った。文献調査は“the Science of the Total Environment”の1999年の特集号、“Drugs and Hormones as Pollutants of the Aquatic Environment: Determination and Ecotoxicological Impact”を読み、その要約を添付した。実験的検討は、複雑な環境試料をHPLCで分離分画し、バイオアッセイを組み合わせることにより、環境汚染物質のプロファイリングや毒性に対する寄与率の推定を行った。その結果を報告する。

### A. 研究目的

環境中の次世代影響物質とは何かと聞かれたら、今なら多くの人が「環境ホルモン」と答えるであろう。また、10年前に同じ質問をしたら多くの人が「環境変異原」と答えたに違いない。「環境ホルモン」の集合と「環境変異原」の集合は重なりがわずかで、「環境ホルモン」は新たな脅威として認識されている。ただし、最近では重金属なども内分泌攪乱物質として認識されるなど、古典的な毒性学を新しい角度から解釈しなおす作業が進行中である。

環境汚染物質の生物影響を評価する方法として、大きく分けて、バイオモニタリングとバイオアッセイがある。バイオモニタリングは、汚染物質の環境中濃度における生物に対する実際の影響を評価できるので、より真実に近い系である。例えば、生物濃縮などの複雑な現象を内包している。しかし、裏を返せば、汚染濃度と生物影響の間のブラックボックスを抱えていることになる。バイオアッセイは、実験室内でコントロールされた状況で行われるので、環境質の評価法としては精度の高い方法である。また、後述するが、HPLCなどと組み合わせることにより、毒性物質の特定にも応用が利く。どちらが良いというのではなく、バイオアッセイ、バイオモニタリング、機器分析を組み合わせると環境汚染の全体像がより鮮明に浮かび上がってくる。今後、このような共同研究体制の整備が必須である。

「環境変異原」に関しては既に膨大な研究が行われている。ところが、評価の対象が遺伝子損傷という一点にほとんど絞られてしまうため、ツールとしては、バイオアッセイ、バイオモニタリングあわせても、主要なものは両手の指の数を超えない。

「環境ホルモン」についてはどうかというと、まだまだ使えるツールが少ないが、環境変異原と違って評価の対象が極めて広いため、これから多種多様なバイオアッセイ、バイオモニタリングが開発されることと思われる。いかに重要なものを選択できるかが、研究者の腕の見せ所になるだろう。本報告書に、“the Science of the Total Environment”の1999年の特集号、“Drugs and

Hormones as Pollutants of the Aquatic Environment: Determination and Ecotoxicological Impact”の要約を添付したが、この1999年の段階ではまだ、女性ホルモン様物質の検出が主であった。我々の研究室でも長年、バイオアッセイによる環境汚染評価を行ってきている。本報告では、我々の研究例を紹介することにする。

## B. 研究方法

バイオアッセイによる環境汚染評価は通常、環境試料を濃縮し、それをバイオアッセイに供するという手法をとる。しかしながら、環境中には様々な物質が存在しているため、それらの複合効果や、毒性によるマスキング等の問題があり、環境汚染の状況を正しく評価できない可能性がある。また、様々な環境汚染物質の中で何が主要な物質なのかを同定する必要もあるだろう。そこで我々は、HPLCで環境試料の濃縮物を分画し、各分画についてバイオアッセイを行い、あたかも検出器のようにバイオアッセイを利用する手法を好んで使っている。この手法は、環境中の汚染物質をその生物影響に応じて一覧するのに最適である(図-1)。我々は、この手法を用いて様々な環境試料について、その中に含まれる汚染物質のプロファイリングを行った。

## C. 研究結果および考察

### C-1. 下水中の女性ホルモン用物質

環境ホルモン問題が注目されたきっかけの一つとして、河川中の魚のオスのビテロゲニンの誘導や、精巣卵等のメス化現象があげられる。我々は、これらの原因物質を特定するために、水環境の主要な汚染源である下水に着目して研究を行ってきた。今となっては素朴な系であるが、ヒト女性ホルモン受容体を染色体に組み込んだ酵母のレポーター試験系(図-2)(ブルネル大学サンプター教授より授与)を用いて、下水や、下水処理水の、女性ホルモン様活性の調査を行った。同時にELISAによる女性ホルモンの測定も行い、その寄与率を推定したところ、下水処理水においては、その活性のほとんどすべてが天然の女性ホルモンによるものであることが推定された。また、生下水では、天然の女性ホルモン以外の女性ホルモン様物質の存在が示唆された。以上の結果をより確かなものにするために、生下水、および下水処理水をオクタデシル系の固層抽出で濃縮し、濃縮液をHPLCの逆相カラムで分離し、30秒ごとに分画をとった。この分画の女性ホルモン様活性をサンプターの酵母アッセイで評価した。結果を図-3に示す。図中Dはダイゼイン、Gはジェニステイン、BPAはビスフェノールAをそれぞれ表す。見ると、生下水の女性ホルモン様活性は、E2(エストラジオール)、E1(エストロン)以外にも複数の物質が寄与している可能性が示唆された。考えられる女性ホルモン用物質の溶出位置を図に示したが、まだ帰属できない未知のピークが存在し、未知の環境ホルモン物質の存在が示唆される。一方、下水処理水の場合はその活性のほとんどがE1とE2で説明できた。このことから、生下水中に合った未知の環境ホルモン物質は処理過程で分解されたか除去されたと考えられる。

## C-2. 尿中の AhR リガンドの同定

環境汚染物質のダイオキシン様活性を評価するために、Arylhydrocarbon Receptor (AhR)と、Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)遺伝子を組み込んだ酵母株 YCM3 によるレポーター試験系を採用した(図-4a、チューレン大学、ミラー博士より授与)。都市下水にこの方法を適用した結果、下水中に AhR リガンドが存在することが明らかとなった。さらに詳しく調べていくと、この活性はどうやら人間の尿中に存在することが明らかとなってきた。ブルーレーヨンを用いて、尿中の有機物を濃縮し、YCM3 株でダイオキシン様活性を評価した結果を図-4b に示す。人間の尿は強いダイオキシン様活性を示し、生理的な濃度レベル (concentration factor=1) の場合でも活性が認められた。この活性は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理により 10 倍上昇し、硫酸処理により 1000 倍上昇した。このことから、尿中ダイオキシン様物質のグルクロン酸抱合体や、硫酸抱合体の存在が示唆された。次に、酸処理した尿のブルーレーヨン抽出物を HPLC で分画し、酵母アッセイした結果を図-4c に示す。図中の実線は 540nm における吸光度のトレースで、棒グラフが、ダイオキシン様活性を示している。この結果、人間の尿中から 2 種類のダイオキシン様物質が単離でき、その色からそれぞれ B1 (blue compound 1)、R1 (red compound 1)と名付けた。図-4d にそれらの吸光スペクトルを示した。精製した B1、R1 のダイオキシン様活性を、酵母の系を用いて測定したところ、B1、R1 ともに極めて強いダイオキシン様活性を示した。特に R1 は 2,3,7,8-TCDD の約 50 倍も強い活性を示した。また、B1 も TCDD とほぼ同等の活性を示した (図-5)。R1、B1 の濃度を定量したところ、どちらも尿中に約 0.2nM 存在することがわかった。これほど活性の強い物質が、尿中にこれほどの濃度で普遍的に存在しているのは驚きである。なぜこれらの物質が人間に対して毒性を示さず、TCDD が毒性を示すのかは今後の課題である。また、これらの物質が水環境中に放出された場合、水生生物にどのような影響を与えるかも今後の検討課題である。

## C-3. 道路路面粉塵中の AhR リガンド活性

水環境汚染を考えた場合、下水のような特定汚染源に加えて、非特定汚染源の問題も重要である。主要な非特定汚染源として、道路の路面粉塵があげられる。これは、自動車排出ガス、アスファルト、タイヤのかす等から構成される。主要な汚染物質は、PAHs、重金属、ニトロアレーンなどである。

道路清掃車によって収集された路面粉塵をふるいにかけて、粒径 53~106 $\mu$ m の粉塵から、アセトン-ヘキサンで有機物を抽出した。この抽出液を濃縮し、バイオアッセイを行った。バイオアッセイとして、hER 酵母によるエストロゲン様活性の測定、YCM3 酵母によるダイオキシン様活性の測定及び、L-MAT 細胞(免疫細胞)に対する急性毒性試験の 3 種類を行った。このうち、L-MAT 細胞は、特に TCDD に対する感受性が高いとされており、その毒性発現には AhR を介していないことがわかっている。したがって、ダイオキシン様物質の AhR を介する毒性経路以外の毒性経路を、この細胞で評価することができる。結果を図-6 に示す。路面粉塵抽出物は、エストロゲン

様活性を示さなかったが、約 5  $\mu$ g/ml の濃度で、L-MAT 細胞に毒性を示した(免疫毒性)。さらに、約 0.5  $\mu$ g/ml の濃度で AhR のリガンド活性が認められた。

次に、この抽出物を HPLC により分画し、酵母の AhR アッセイに供した結果を図-7 に示す。主要な多環芳香族化合物及びダイオキシン類の溶出位置を矢印で示した。これら化合物の濃度を GC-MS で測定し、全体の活性に対する寄与率を算出したところ、いずれの物質も寄与率は 1% 以下であった。従って、路面粉塵中には今回調べた物質以外の物質の AhR リガンド活性が大きく寄与していることになる。グラフを見ると、少なくとも大きな山が 6 つあり、主要な AhR リガンドが 6 種類以上存在することが示唆された。

#### D. 結論

HPLC-バイオアッセイ検出法による、環境汚染物質のプロファイリング法について検討した。この方法は、複雑な混合物である環境試料中の汚染物質を、その生物活性(毒性)の寄与に応じて一覧できるという利点がある。今後、この方法を用いて、環境汚染物質の寄与率を計算するとともに、未知の毒性物質の単離同定の作業も進めたい。

#### E. 研究発表

1. 論文発表： 投稿中論文 1 報あり。

#### F. 知的所有権の取得状況

特に無し

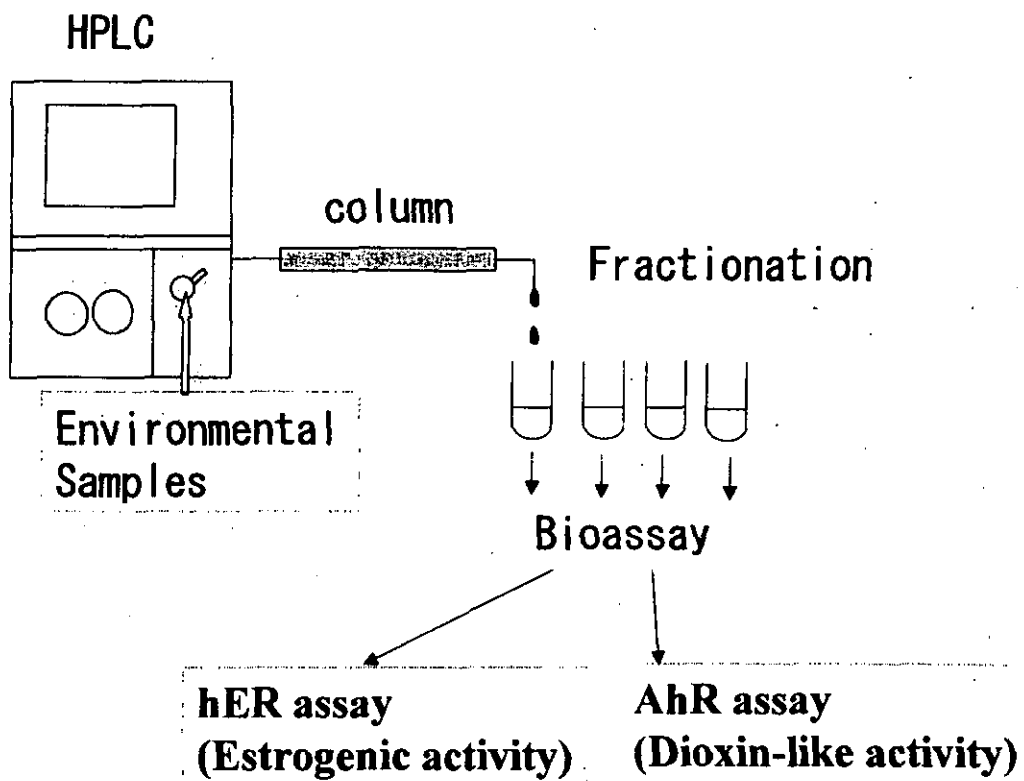


図-1 HPLC-バイオアッセイ検出器の概念。

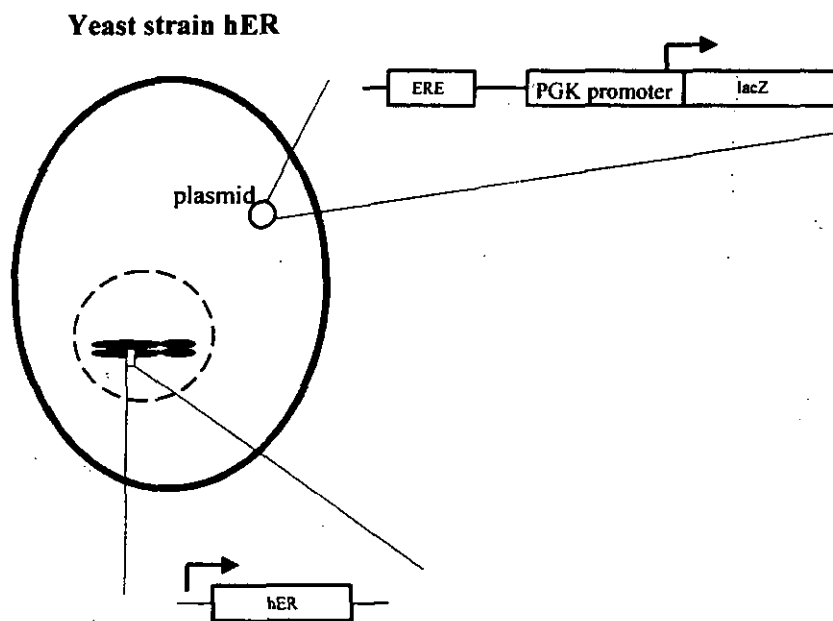


図-2 酵母株 hER による女性ホルモン様活性の測定



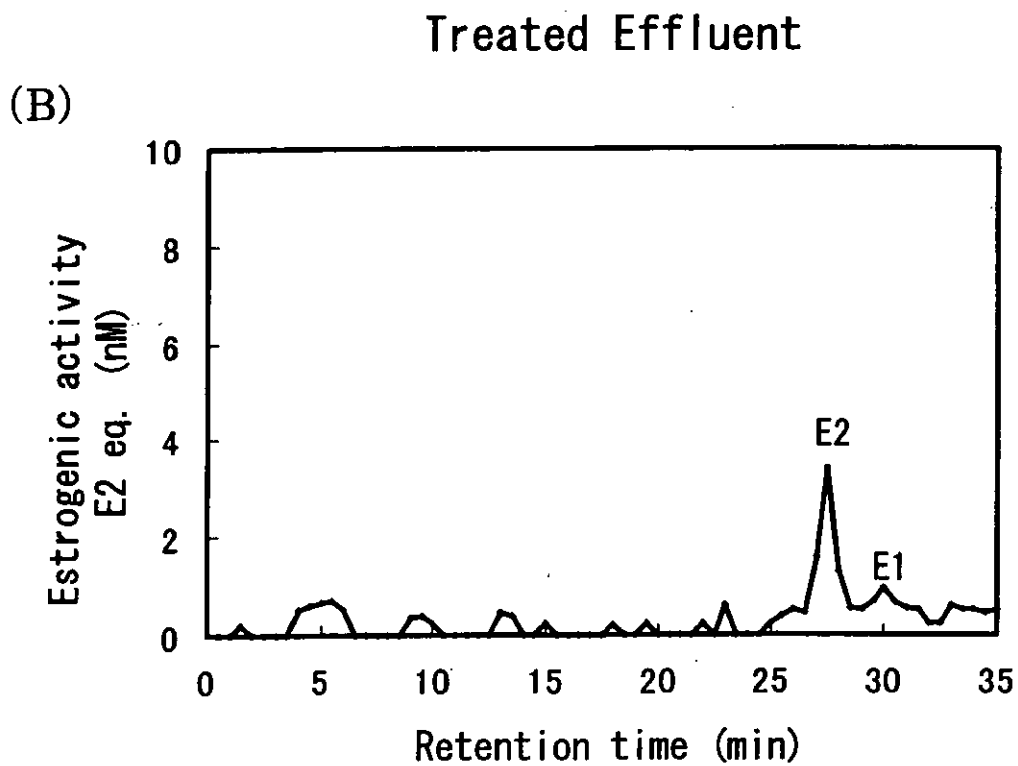
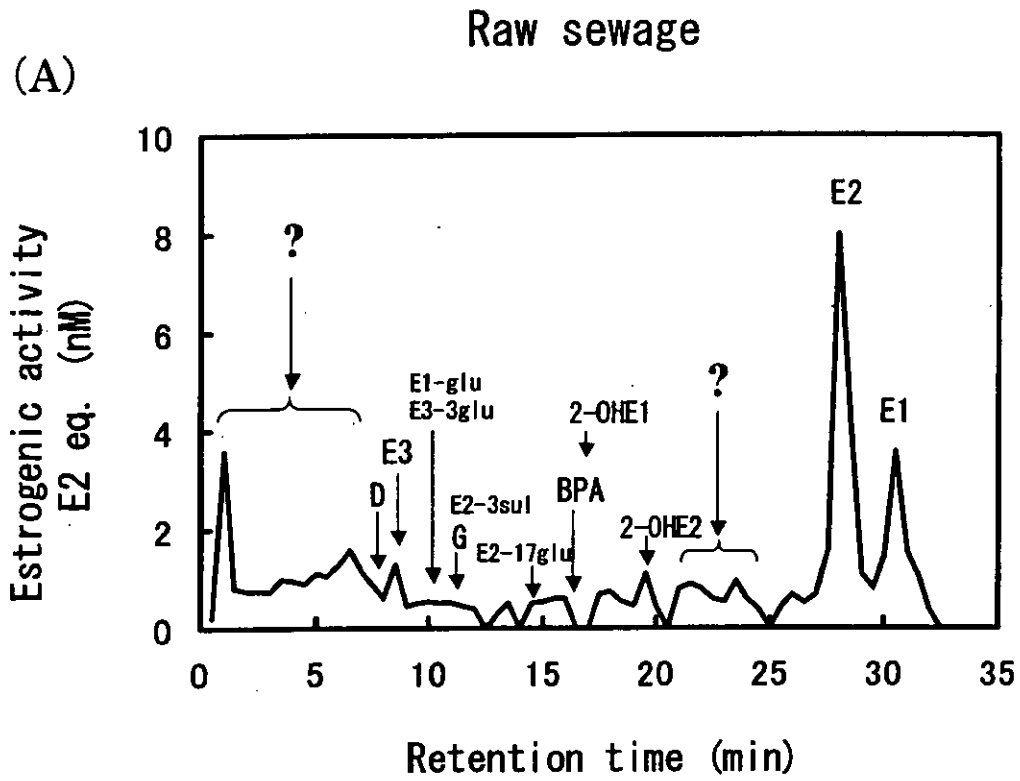


図-3 HPLC-バイオアッセイ法による生下水 (A) 及び下水処理水 (B) 中の女性ホルモン様物質のプロファイリング

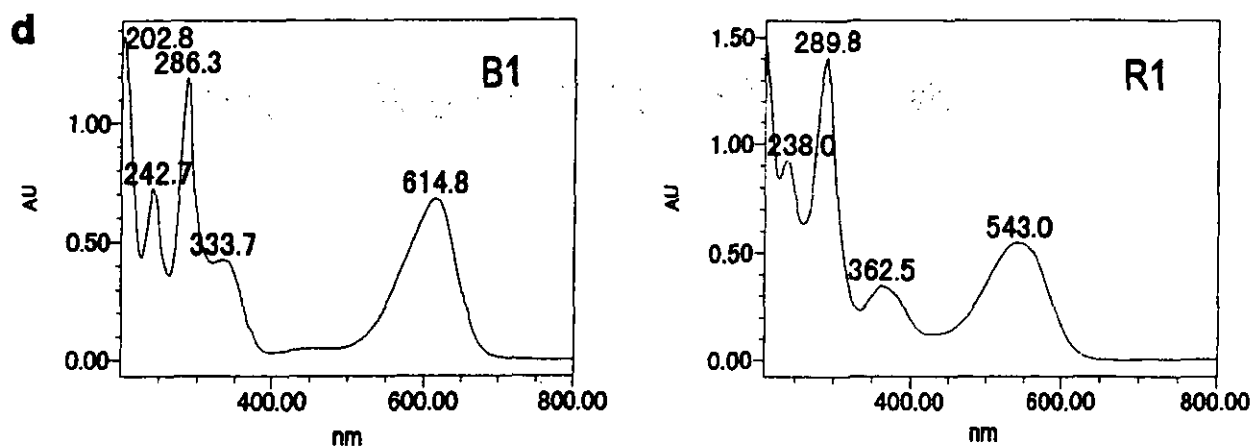
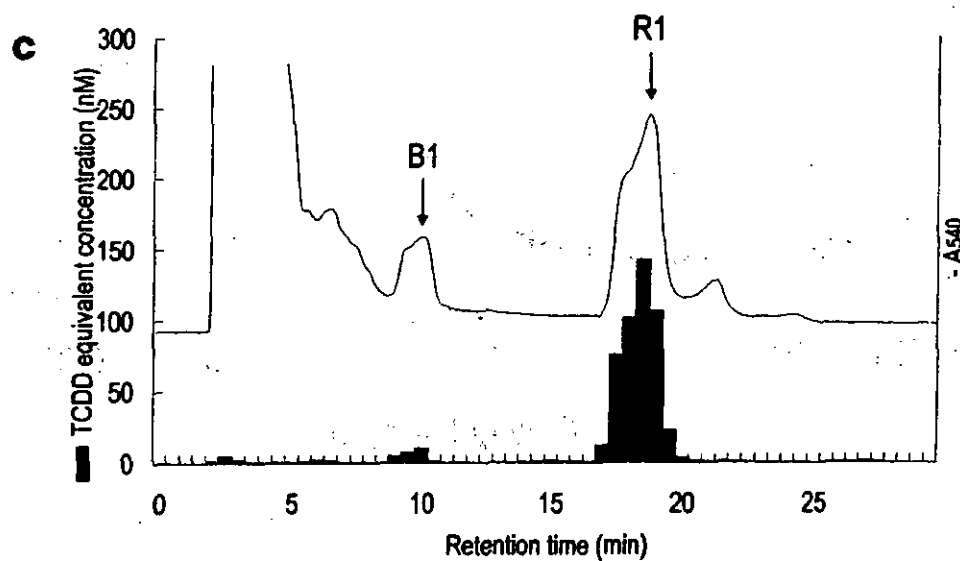
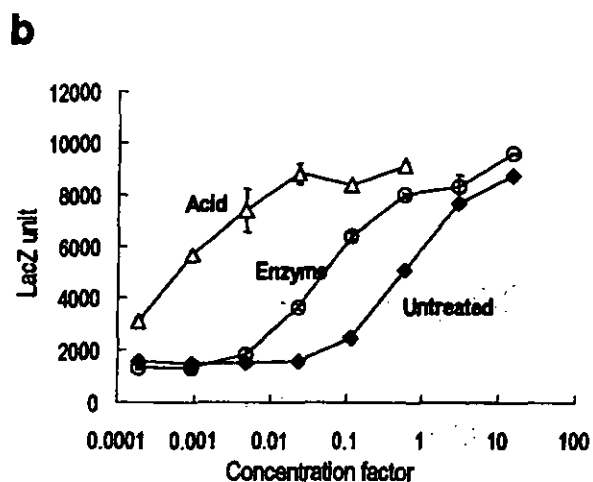
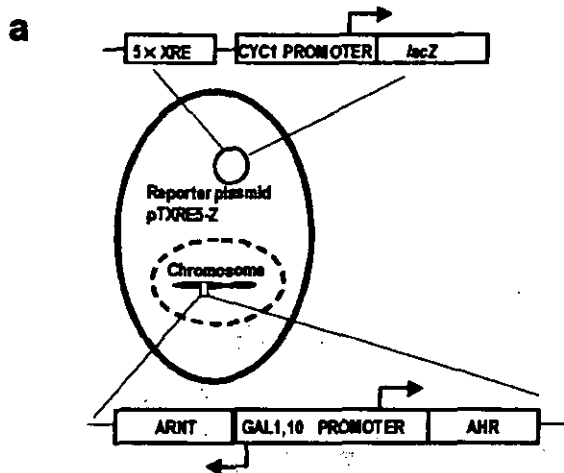


図-4 尿中のAhRリガンド活性

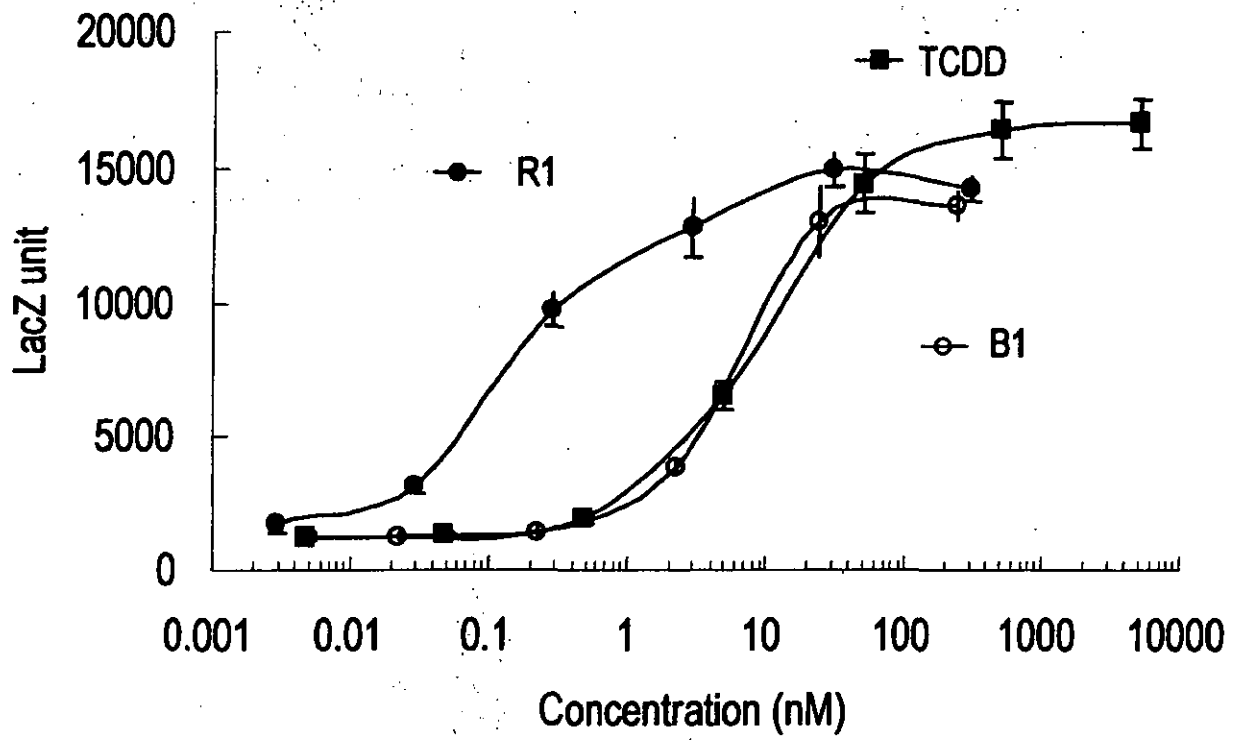


図-5 R1、B1のAhRリガンド活性

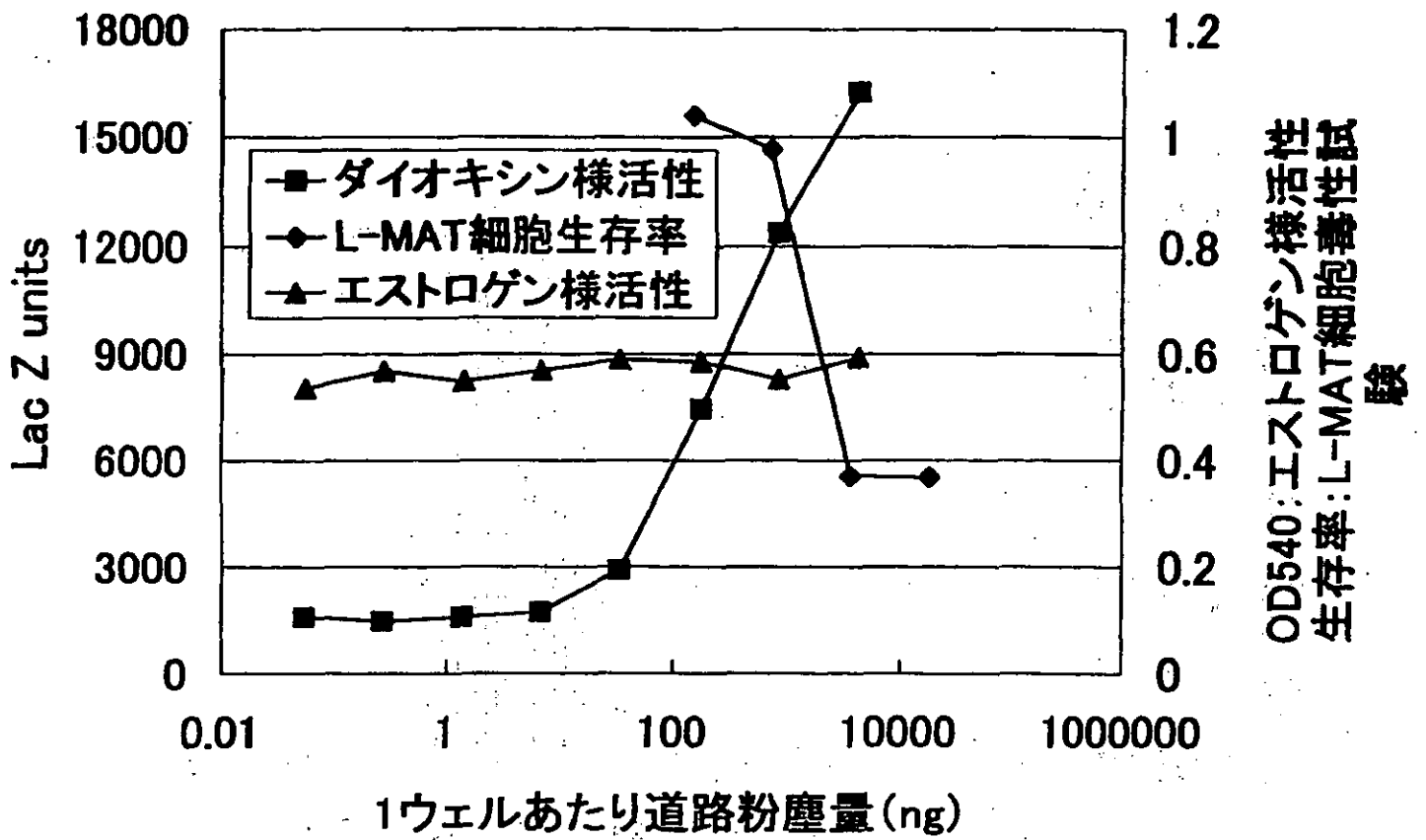


図-6 道路粉塵の毒性