

バイオアッセイと化学分析を用いた環境水中におけるエストロゲン作用物質の検出

Detection of Estrogenic Substances in Environmental Water Using In Vitro Bioassay and Instrumental Analysis

環境マネジメント専攻 責任指導教官：益永茂樹
古市琢磨 (Takuma FURUICHI)

ABSTRACT

A number of estrogenic compounds have been found in aquatic environments, and their effects on normal endocrine functions of aquatic organisms are of concern. In this study, we examined the use of gel permeation chromatography (GPC) as a sample fractionation procedure followed by in vitro gene expression bioassay using MVLN cells, and instrumental analysis for the identification of estrogenic activity and compounds responsible for the activity in the environmental water samples. The study also aimed to determine the relative contributions of various potentially estrogenic substances quantitatively, using liquid chromatograph-mass spectrometer (LC/MS) or liquid chromatograph tandem mass spectrometer (LC/MS/MS).

1. はじめに

近年、水環境中におけるエストロゲン作用物質が水生生物の内分泌系に対して影響を及ぼすことが危惧されている [1-4]。また、環境水中には様々なエストロゲン作用物質が混在しており複合的な影響も懸念されている。こうしたエストロゲン作用物質の汚染を解明するにはエストロゲン作用の総量を把握し、それに対して個別物質がどの程度寄与するのかをより定量的に把握する事が重要な鍵となる。この観点を踏まえて、本研究では In vitro のバイオアッセイの一つである MVLN 細胞を用いて環境水中の総エストロゲン活性を測定し、同時に、機器分析により個別物質の定量を試み、そのデータを併せることで総活性に対する個別物質の寄与率を算出する事を最大の目的とした。また、エストロゲン作用物質を対象として、バイオアッセイと化学分析を用いたアプローチに必要となる手順を提示することも目的の一つとして加えた。

本研究は第七章から構成されている。図 1 に各章の概略図を示した。

ノール (NP) やオクチルフェノール (OP) が共存することで MVLN 細胞に対して細胞毒性または拮抗作用を示した。筆者が知る限りでは、MVLN 細胞における相加性に関する報告は極めて少なく、貴重な知見を得る事ができた。

以上のように、第三章ではバイオアッセイと化学分析を用いたアプローチに必要となる MVLN 細胞における REP と相加性についての基礎的な知見を得ることができた。

3. 下水処理過程におけるエストロゲンの挙動

下水処理場処理水は、エストロゲン作用物質の負荷源であり、下水処理場放流口付近においてコイの精巣異常が報告されている [1,2]。よって、下水処理過程において、どの物質がどの程度の活性を有し、そしてどの程度除去されるかを把握することは、内分泌攪乱物質のリスクを考える上で重要な知見となる。そこで第四章『下水処理過程におけるエストロゲンの挙動』では、第三章で得られた各エストロゲン作用物質の REP や相加性の情報を基とし、バイオアッセイと化学分析によるアプローチの下水処理場各処理過程水への適用について検討することを主眼とした。

採水は、多摩川上流処理場各処理過程の計 5 地点(流入水、第一沈殿槽流出水、曝気槽流出水、第二沈殿槽流出水、塩素接触槽流出水)よりおこなった。取水した試料を固相抽出法により濃縮・抽出し、これをバイオアッセイに供した。流入水、第一沈殿槽流出水の粗抽出試料についてエストロゲン活性の測定を行ったところ、活性の抑制が見られた。この原因として細胞毒性または活性を抑える物質の存在が考えられた。そこで、粗抽出試料をシリカゲルにより分画したところ、一定程度の毒性や拮抗作用物質を除去することが明らかとなった。また、分画試料に対してバイオアッセイを行うことでエストロゲン活性を有する画分を見つけ出した。その画分について LC/MS により対象物質を測定したところ、エストロン (E1)、E2 およびビスフェノール A (BPA) を検出した。曝気槽流出水において、化学分析による E1 と E2 濃度算出された計算 E2 等量は、バイオアッセイから得られた E2 等量をほぼ説明することができた。このことから、下水処理過程におけるエストロゲン活性は E1 および E2 が寄与していることが示唆された。しかし他方で、流入水や第一沈殿槽流出水では、アッセイと化学分析による E2 等量のよい一致は見られず、シリカゲルによる分画は、毒性・拮抗物質の分離に関しては完全ではないことが示され、また、化学分析の定量に対して影響を及ぼすマトリックス成分を完全には分離できなかった。

以上の結果、下水処理場各処理過程水におけるエストロゲン活性は、E1 や E2 による寄与が大きいと示唆

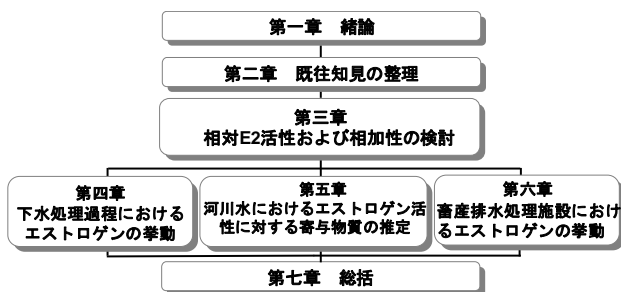


図 1. 本研究の概略図

2. 相対 E2 活性および相加性の検討

第三章『相対 E2 活性および相加性の検討』では、本研究を遂行する上で必要となる知見を得るため、2 種類の室内実験をおこなった。一つは、21 種類のエストロゲン作用物質の標準試料を用いて MVLN 細胞における個別物質のエストロゲン活性を測定した。そして 17β エストラジオール (E2) に対する相対 E2 活性 (REP) を算出した。もう一つは、エストロゲン作用物質を 2~3 種選定し、計 20 通りの組み合わせの混合試料を準備し、MVLN 細胞における相加性について検討した。

エストロゲン作用物質の相対 E2 活性を算出した結果、天然エストロゲンの REP は合成化学物質 (E2 は除く) に比べて高く、抱合体については同程度~1000 倍程度高かった。

相加性試験の結果、混合した試料 20 種のうち 17 種が 2 倍の範囲以内で相加性を示した。また、ノニルフェ

されたが、シリカゲルの分画では妨害物質の除去が不十分なため、活性に対する個別物質の寄与率について定量的な議論をすることができなかった。今後、更に分画操作の検討が必要であることがわかった。

4. 河川水におけるエストロゲン活性に対する寄与物質の推定

第五章『河川水におけるエストロゲン活性に対する寄与物質の推定』では、第四章で課題となった分画手法に改良を加え、多摩川の河川水または下水処理場放流水中におけるエストロゲン活性に対する個別物質の寄与率を算出することを目的とした。

固相抽出法により、環境水を抽出・濃縮し粗抽出試料を得た。これをバイオアッセイに供しエストロゲン活性を測定したところ、全ての試料において有意なエストロゲン活性が観察された。中でも北多摩一号放流水は、最も高い最大活性値を示した。そこで粗抽出試料のエストロゲン活性の内訳を把握するため、GPC (Gel permeation chromatography) により 10 個の画分に分けた後、エストロゲン活性を測定したところ、画分 F7、画分 F8 および画分 F9 においてエストロゲン活性が確認された。また、これら活性画分は対象物質の溶出画分と一致した。そこで、LC/MS/MS) により対象物質を測定したところ E1 と E2 が検出され、それらの濃度レベルは画分 F7~画分 F9 の活性の殆どを説明した。この結果は、E1 と E2 が試料中のエストロゲン活性に高く寄与することを示唆した。更に、E1 と E2 の総活性に対する寄与率を算出した結果、E1、E2 はそれぞれ 0.49~0.98、0.31~1.1 となった。個別物質のエストロゲン活性に対する寄与率を算出した例は殆どなく、本研究で得られた結果は貴重であると言える。

MVLN を用いて粗抽出試料と分画試料の E2 等価量を測定した結果、分画試料は粗抽出試料に比べ、1.1 倍~2.7 倍大きい結果となった。この結果、GPC の分画により細胞毒性・拮抗物質が除去されたことを意味し、本分画の有用性が示された。

多摩川の河川水および下水処理放流水において、エストロゲン抱合体 (E1-3S、E1β D-G、E2-3S、β E2-3 (β DG)) は検出限界値以下であった。

以上の結果、多摩川の河川水および下水処理放流水におけるエストロゲン活性は、E1 と E2 による寄与が高いことが示された。また、GPC による分画手法は試料中の細胞毒性物質や夾雑物を除去する上で有用であることが示された。

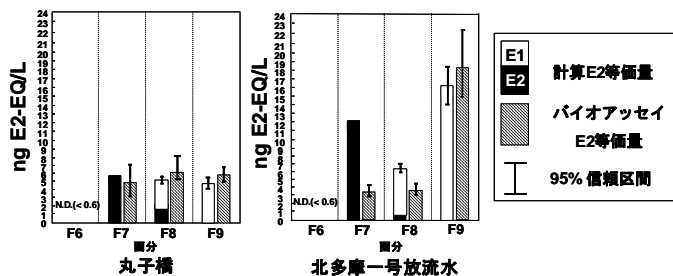


図 2. 画分 F6~9 における計算 E2 等価量およびバイオアッセイ E2 等量

5. 畜産排水処理施設におけるエストロゲンの挙動

畜産排水中には、家畜由来のホルモン物質および飼料に含まれる植物由来のホルモン物質など様々なエストロゲン活性を有する物質が存在する。しかし、畜産排水

施設におけるエストロゲンの挙動や、エストロゲン作用物質の濃度レベル等についての報告例は筆者が知る皆無である。そこで第六章『畜産排水処理施設におけるエストロゲンの挙動』では、豚舎汚水処理施設の各処理過程水におけるエストロゲン活性に対する寄与物質を推定すること、そして、各処理過程水におけるエストロゲン活性、およびエストロゲン作用物質の除去率について検討することを目的とした。

豚舎汚水原水、UASB 処理水および散水濾過床処理水の 3 地点から採水をおこなった。粗抽出試料を測定した結果、全ての処理過程水からエストロゲン活性が観察された。そして GPC による分画の結果、全ての各処理過程水において、画分 F7、画分 F8 および画分 F9 からエストロゲン活性が観察され、対象物質の溶出画分と一致した。そこで、対象物質のエストロゲン活性に対する寄与率を算出したところ、散水濾過床処理水 (7 月) を除く全ての過程において、E2 および E1 が総バイオアッセイ E2 等価量に対して 37%~60% を説明し、またエストリオール (E3) とイクオール (EQO) も 1~3% 程度、総活性に対して寄与した。他方、本研究で対象とした物質では説明することが出来ない活性が認められ、未知のエストロゲン作用物質の存在が示唆された。

豚舎汚水原水から散水濾過床処理水における対象物質とエストロゲン活性の除去率を算出したところ、エストロゲン活性および天然ホルモン物質は 97% 以上、そして NP と OP は 75~84.5% であった。

粗抽出試料と分画試料の E2 等価量を比較したところ、分画試料により細胞毒性・拮抗物質が除去され、分画試料の E2 等価量は粗抽出試料に比べ 1.3~6.7 倍大きい結果となった。この結果から GPC による分画は、試料中に存在する細胞毒性または拮抗物質を除去する上で有効であることがわかった。

以上の結果、畜産排水において E1 や E2 がエストロゲン活性に高く寄与することが明らかとなったが、対象物質では説明出来ない活性も多く見られたことから、未知のエストロゲン作用物質を検索することが今後の課題として挙げられる。また、本論文で述べてきた分画手法、バイオアッセイ、それに化学分析を利用したエストロゲン活性物質を対象にした実験手法は、畜産汚水の処理過程におけるエストロゲン活性と活性物質の挙動を把握するのに役立つことが示された。

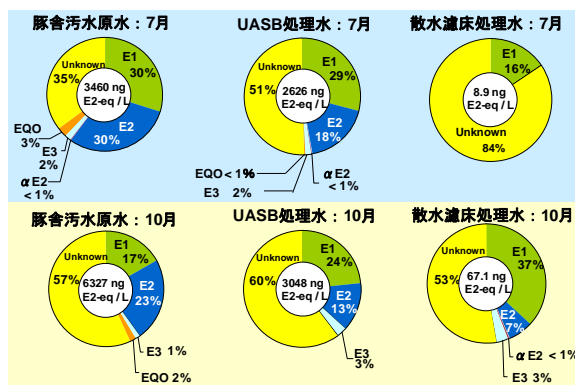


図 3. 畜産排水における総エストロゲン活性に対する個別物質の寄与率

参考文献

- [1] Purdom *et al.*, 1994. *J. chem. Ecol.*, 8, 275-285.
- [2] 和波一夫, 2002. 水情報, 22, 13-17.
- [3] Desbow *et al.*, 1998. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1549-1558.
- [4] Routledge *et al.*, 1998. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1559-1565.