

# 水環境中におけるエストロゲン作用物質の検出 - バイオアッセイによるアプローチ -

中西・益永・中井研究室 学籍番号 99DB122 古市琢磨

## 1. はじめに

近年、未同定物質や物質間の相互作用によって引き起こされる複合的な汚染が懸念されている。このような状況に対応するため、環境試料を総括的に評価できるバイオアッセイは、化学物質の環境管理において重要な役割を果たすと期待される。そこで本研究では、水環境における総エストロゲン活性を、バイオアッセイの一つであるMVLN細胞を用いて評価し、化学分析の結果と併用することで、総活性に対する各物質の寄与率を推定することを目的とした。今回、エストロゲン作用物質の水環境への排出源である下水処理施設を評価対象とした。

## 2. 本研究の流れ

最初に MVLN 細胞を用い、個別のエストロゲン作用物質の相対エストロゲン活性を算出した。次に、MVLN 細胞における相加性について検討した。最後に下水処理場の各処理過程におけるエストロゲン活性挙動について検討した。

## 3. 実験方法

【相対エストロゲン活性の算出】 天然エストロゲン 3 種類、エストロゲン抱合体 8 種類、合成化学物質 3 種類を対象とした。算出は、E2 の最大活性を 100%E2-max とし、用量-反応曲線より 50%E2-max における E2 濃度(mol/l)およびエストロゲン作用物質の濃度(mol/l)を直線式より求め、以下の式からおこなった。

$$\text{相対エストロゲン活性} = \text{E2 濃度} / \text{各抱合体濃度}$$

【相加性試験】 相加性試験は、エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、エストリオール(E3)を共存させた。実際に得られた活性値：バイオアッセイ E2 等価量と、相対エストロゲン活性に個別物質の濃度を乗じた活性値：理論 E2 等価量とを比較し、相加性の検討をおこなった。

【下水試料の濃縮】 2000 年 5 月、多摩川上流処理場にて、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(放流水)を採水した(図 1)。試料は、ガラスろ紙で濾過し、SDB-XC 固相抽出ディスクに通水後、溶出させ、ロータリーエバポレータ、N<sub>2</sub> パージで適宜濃縮し、粗抽出試料とした。

【下水試料の分画】 粗抽出試料はさらにシリカゲルを用いて分画し、アセトン、ヘキサンを用いて 4 つの画分(F1~F4)に分け、分画試料とした。

【エストロゲン活性の測定】 MVLN 細胞に試料を添加し、3 日間培養後、誘導されたルシフェラーゼによる発光からエストロゲン活性を測定した。

## 4. 結果と考察

【相対エストロゲン活性】 エストロゲン抱合体の用量反応曲線を図 2 に示した。 $\beta$ E2-3G-17S と E2-3-17di-S を除く全ての抱合体にエストロゲン活性が見られた。抱合体の活性は、合成化学物質に比べ 10-1000 倍程度高いことが示唆された。

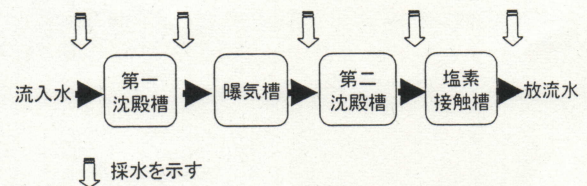


図 1 採水地点

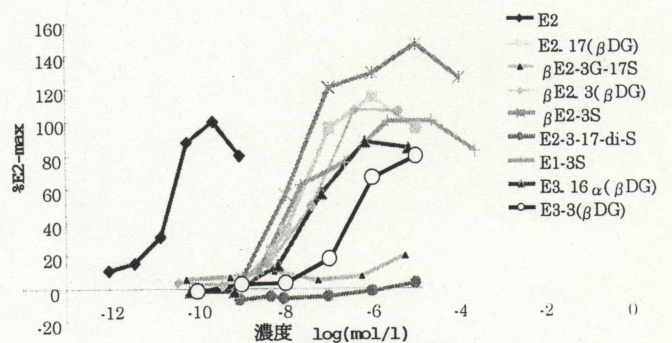


図 2 エストロゲン抱合体の用量反応曲線



【相加性試験】 図3にMVLN細胞における相加性の試験結果を示した。バイオアッセイ E2 等価量は理論 E2 等価量に比べて小さいが、2つの間に良い一致が見られた。よって、E2+E1+E3において、相加性が成り立つ事がわかった。

【下水処理場のエストロゲン活性挙動】 図4に各処理過程における粗抽出試料の用量反応曲線の結果を示した。曝気槽流出水では原液及び希釈水でも活性が高く、第二沈殿槽流出水、塩素接触槽流出水では10倍濃縮までは、倍率の上昇とともに活性が高くなった。流入水、第一沈殿槽流出水の場合は、粗抽出試料を濃縮すると活性の抑制が見られた。図5に各処理過程における分画試料のエストロゲン活性の結果を示した。全処理過程において、F2画分の活性が最も高く、活性を有する物質は、この画分に存在すると考えられる。曝気槽流出水、第二沈殿槽流出水、塩素接触槽流出水では、F2画分の活性は、粗抽出試料の活性とほぼ同程度であった。流入水、第一沈殿槽流出水では、粗抽出試料では活性が見られないが、逆に抑制傾向があったにもかかわらず、F2画分では活性がみられた。このことから、これら処理水の粗抽出試料には活性を抑制する物質が存在し、分画によってそれら抑制物質が除かれた為、見かけ上、活性が上昇したと考えられる。図6に各処理過程におけるF2画分のE2等価量(バイオアッセイ)および、化学分析(スナルデイの結果より)から計算したE2等価量の結果を示した。バイオアッセイの結果から、曝気槽流出水のE2等価量は、流入水の活性に比べ、5倍程度上昇していることがわかる。この原因として、曝気処理過程において、人畜由来の天然エストロゲン物質の抱合体が微生物の脱抱合により活性を取り戻した可能性が考えられた。また、化学分析のE2等価量は、流入水、第一沈殿槽流出水、曝気槽流出水において、バイオアッセイに比べ高くなった。しかし、第二沈殿槽流出水、塩素接触槽流出水では、逆の結果になった。この原因として、細胞の活性を抑制している物質が全て除去されていないことや、化学分析の前処理過程が異なるためであると考えられた。

今後の課題は、活性の得られた画分について化学分析をおこない、活性に寄与する物質を特定することである。

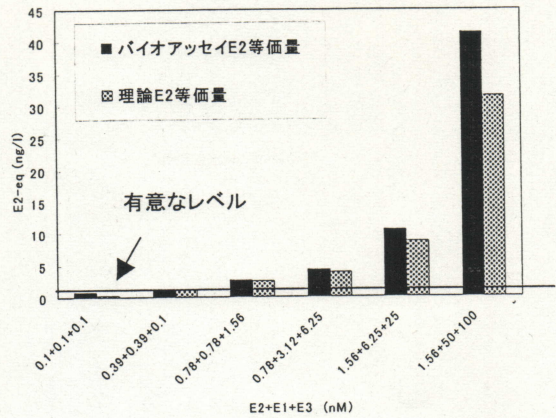


図3 MVLN細胞における相加性

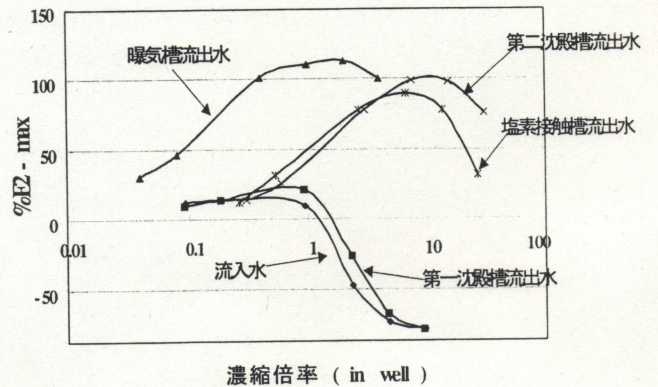


図4 各処理過程における粗抽出試料の用量反応曲線

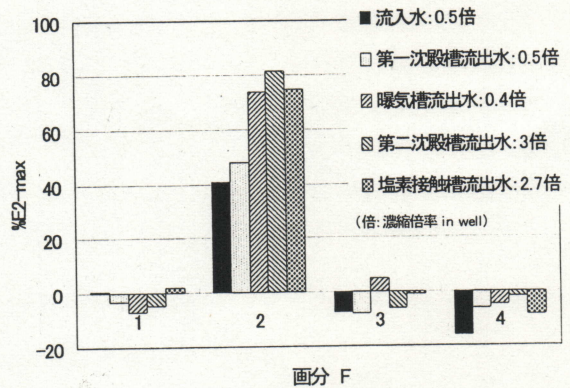


図5 各処理過程における分画試料のエストロゲン活性

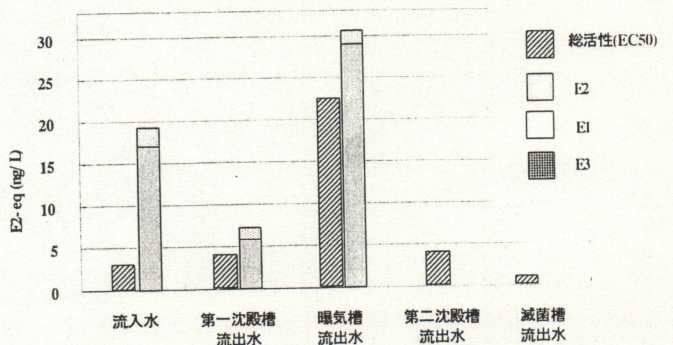


図6 バイオアッセイと化学分析のE2等価量