

バイオアッセイと化学分析を用いたエストロゲン作用物質の検出 -畜産排水を例に-

横浜国立大学大学院環境情報学府・研究院 ○古市琢磨、益永茂樹
独立行政法人 畜産草地研究所 鈴木一好

Identification of Estrogenic Substances in Animal Wastewater samples with Instrumental Analysis and in vitro Bioassay, Takuma FURICHI, Shigeki MASUNAGA (Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National Univ.), Kazuyoshi SUZUKI (National Institute of Livestock and Grassland Science)

1. はじめに

都市河川や下水処理場を対象とし、これまでに数多くのエストロゲン作用物質に関するモニタリング等の研究が報告されてきたが、畜産排水を対象としたものは殆ど無い。Burnison et al.¹⁾は、堆肥試料中の *In-Vitro* のバイオアッセイを用いてエストロゲン活性を測定し、その活性の内訳について分画及び機器分析を用いて調べたところ、女性ホルモン物質のみならず植物系のホルモン物質もエストロゲン活性に寄与していると報告している。

そこで本研究では、環境保全型農業の実現に向けた畜産排水処理として開発された豚舎汚水処理施設において、豚舎汚水原水および処理水を対象とし、*In-Vitro* のバイオアッセイを用いてエストロゲン活性を測定し、活性の除去率を算出した。また、活性の性状を明らかにする為、分画により、幾つかの画分に分け、バイオアッセイ及び LC/MS/MS を用いてエストロゲン活性に寄与する物質の推定を試みた。

2. 実験方法

2.1 対象物質 人畜由来のホルモン物質として 17β エストラジオール(E2)、エストロン(E1)およびエストリオール(E3)、合成化学物質としてエチニルエストラジオール (EE2)、4-ノニルフェノール (NP) と tert-オクチルフェノール (OP)、および、ビスフェノールA (BPA)、また、植物エストロゲンとしてゲネスイチン (GEN)、イクオール (EQO) を調査対象物質とした。

2.2 調査試料

2003年7月及び10月に、(独)畜産草地研究所(つくば市)にて豚舎汚水原水、及びその生物処理水を採水した。生物処理は嫌気性処理(UASB)と好気性処理(散水濾床)の組み合わせである。採水した試料は4℃で保存し、その日のうちに研究室に持ち帰り、前処理をおこなった。

2.3 試料の前処理

試料(豚舎汚水原水: 50~75 mL、処理水: 330~500 mL)を固相カートリッジに通水し、メタノール/5mM トリエチルアミン 10 mL で溶出した。濃縮乾固後、0.3 mL のメタノールで再溶解させ、これを粗抽出試料としてバイオアッセイに供した。残りの試料 0.1 mL を GPC カラムを用いて、流量 0.5 mL/min で 12 画分(F1~F12)に分けた。これらを濃縮乾固させ、メタノール 0.5 mL で再溶解し、分画試料としてバイオアッセイに供した。また、対象物質の画分については、LC/MS/MS または LC/MS を用いて測定し、得られた活性値と各調査物質の比活性を乗じ、寄与率について推算した。

2.4 エストロゲン活性の測定

エストロゲン活性の測定は、ヒト乳癌由来細胞である MVLN 細胞を用いた。得られた活性値は、E2 の最大活性値を 1 としたときの相対活性値(E2-Max)で、濃度は E2 等価量: (ng E2-eq/L) で表現した。濃度はロジスティックモデルを用い、用量反応曲線の 0.5 E2-Max における E2 濃度と試料の濃縮倍率より算出した。また、濃度分布を考慮するため、試料の用量反応曲線から 95%信頼区間を算出した。

3. 結果および考察

図1に、粗抽出試料より得られた用量反応曲線の結果を示した。豚舎汚水原水において低い濃縮倍率からエストロゲン活性の上昇が見られた。処理水においては、エストロゲン活性が 0.5 E2-Max 未満の結果 (7月: 0.25 E2-Max, 10月: 0.43 E2-Max) となり、夾雑物による細胞毒性影響が考えられた。次に、用量反応曲線から E2 等価量を算出した結果を図2に示した。豚舎汚水原水では、7月: 2600 ng E2-eq/L, 10月: 940 ng E2-eq/L であったが、処理水では、7月: 2 ng E2-eq/L, 10月: 22 ng E2-eq/L であり、エストロゲン活性は概ね除去されていることがわかった(除去率% 7月: >99%, 10月: >97%)。豚舎汚水原水及び処理水の等価量に変動が見られたことから今後更に調査を継続し、再現性を明確にしていく。また、エストロゲン活性に寄与する物質については発表時に報告する。

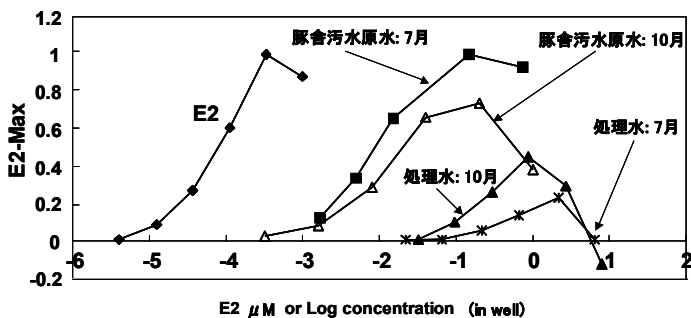


図1. 粗抽出試料における用量反応曲線

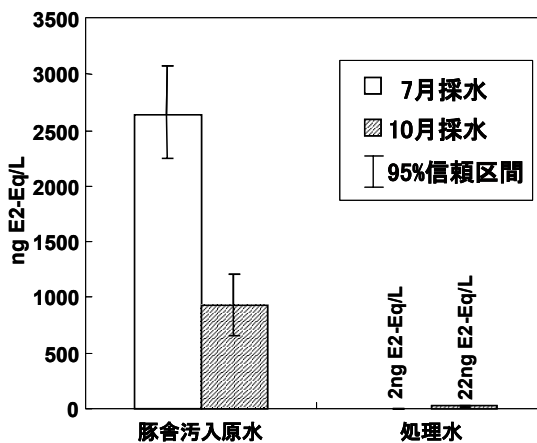


図2. 豚舎汚水原水および処理水のE2等価量

参考文献 1) Burnison et al., 2003, *Environ. Toxicol. Chem.*, 22 (10), 2243~2250.