



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	浄水汚泥を用いたエストロゲン様活性および活性阻害作用に関する研究
Author(s)	栗原, 沙織; 竹田, 誠; 大野, 浩一 他
Description	第12回衛生工学シンポジウム (平成16年11月4日 (木) -5日 (金) 北海道大学クラーク会館) . 一般セッション . 2 水環境 . 2-4
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 12, 69-72
Issue Date	2004-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/1232
Type	departmental bulletin paper
File Information	2-4_p69-72.pdf



2-4 浄水汚泥を用いたエストロゲン様活性及び活性阻害作用に関する研究

○栗原 沙織、竹田 誠、大野 浩一、亀井 翼、眞柄 泰基 (北海道大学)
河合 富貴子 (富士電機アドバンステクノロジー)

1. 研究の背景と目的

内分泌攪乱物質 (いわゆる環境ホルモン) は、ヒトや野生生物の内分泌系に干渉し、生体の恒常性、生殖発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、受容体への結合やそのホルモン作用などの諸過程を阻害する物質である。内分泌攪乱物質と疑われている物質は 70 種類ほどあり、代表的なものに DDT などの農薬類や Bisphenol-A、フタル酸エステル類やダイオキシン類などがある。内分泌攪乱物質の影響としては、ヒトにおける精子数の減少や劣化、前立腺がん・乳がんや子宮内膜症などの増加をもたらす可能性があるといわれている。

これまでに内分泌攪乱物質に関して、水道水及び水道原水の汚染実態、浄水処理における除去特性、水道管からの溶出特性など、浄水場における原水や処理水の内分泌攪乱作用に関する研究がなされており、塩素処理によってエストロゲン様活性を低減できるということが明らかとなっている¹⁾。また、浄水場における沈殿池の汚泥・スカムには、内分泌攪乱作用が疑われているフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の物質が濃縮・蓄積しているといわれている²⁾。

そこで、本研究では酵母 Two-Hybrid 法を用いて、浄水場の汚泥・スカム及びフタル酸エステル類におけるエストロゲン様活性とあわせて活性阻害作用についても検討し、浄水汚泥やスカムにおけるエストロゲン様活性について明らかにすることを目的とした。なお、環境水の場合エストロゲン様物質が何らかの物質により、本来のエストロゲン様活性よりも活性が低く評価される危険性 (false negative) があることから、エストロゲン様活性の有無を正確に評価するために活性阻害作用についても考慮した。

2. 実験方法

測定試料として、A~J 浄水場の汚泥及び I 浄水場のスカムと試薬のフタル酸エステル類を用いた。フタル酸エステル類として、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジメチル (DMP)、フタル酸ジブチル (DBP) を用いた。

2-1 試料の抽出方法

図 2-1 のように、脱水した汚泥 20g に塩酸 5mL 及びアセトン 50mL を加え、振とう抽出・超音波抽出をそれぞれ行い、上清溶液部分を分取した。この抽出液を塩化ナトリウム水溶液 500mL に加え、ジクロロメタン 50mL で 2 回抽出を行った。抽出液を脱水し、窒素気流下で乾固させた。さらに、DMSO に転溶し、順次希釈したものを供試した。

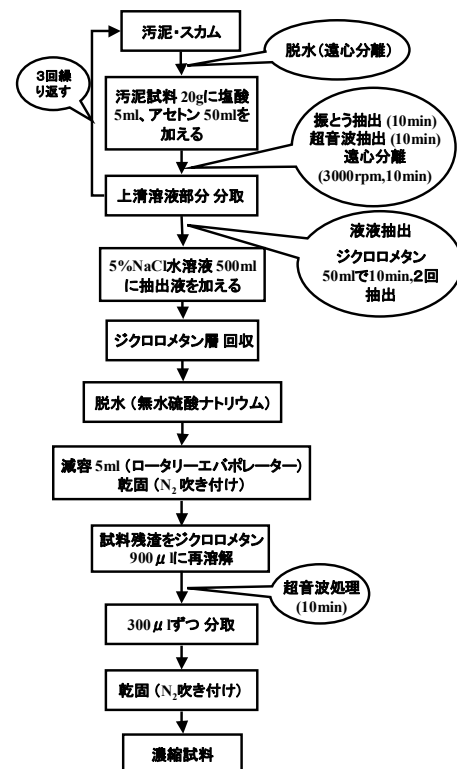


図2-1 浄水汚泥・スカム抽出試料の抽出方法

2-2 エストロゲン様活性の測定

酵母Two-Hybrid法³⁾を用いて、通常の試験系(normal系)とリン酸緩衝溶液を添加した試験系(+buffer系)の両試験系で、エストロゲン様活性の測定を行った。酵母Two-Hybrid法は、核内に哺乳類のエストロゲンレセプターを組み込んで形質変化させた酵母を用いる。図2-2に示す測定手順のように、あらかじめ16時間培養した酵母懸濁液とサンプル、SD培地をともに4時間培養する。このときnormal系ではSD培地200 μ Lを、+buffer系ではSD培地175 μ L、リン酸緩衝溶液25 μ Lを加える。酵母の核内にあるエストロゲンレセプターにエストロゲン様物質が結合すると、活性化して二量体を形成し、DNA上のエストロゲン応答配列に結合する。その後、レポーター遺伝子LacZが転写され、酵素(β -galactosidase)が分泌される。培養後に菌体増殖量(OD₅₉₅)を測定し、遠心分離により上澄みを捨て、

Z-buffer溶液で細胞壁を破壊し β -galactosidaseをONPG溶液で呈色させる。その発現量を吸光度(OD₄₂₀)で測定し、以下の式に基づいてエストロゲン様活性値を求める。

$$\text{エストロゲン様活性値} = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{570}}{t \times v \times OD_{595}} \times 1000$$

ただし、t=30min (ONPGによる呈色時間)、v=0.05mL (前培養液の体積)

OD₄₂₀、OD₅₇₀、OD₅₉₅ : 420、570、595nmの吸光度

エストロゲン様活性値は、陽性対照である17 β -Estradiol (E2)の最大活性値を100%とし、これに対する比活性値で評価した。また、測定時に各試料とE2(10⁻⁶mol/L)を共存させることで得られるエストロゲン様活性は低くなり、その活性値がE2(10⁻⁶mol/L)の活性値に対してどれだけ下がっているかをみることで、活性阻害作用についての評価を行った。

2-3 浄水汚泥・スカム試料中の共存物質による活性阻害の評価

浄水汚泥・スカム抽出試料中の有機物などの共存物質による活性阻害の影響をみるために、抽出試料(希釈倍率1倍)の波長260nmの吸光度(E260)を測定し、E260と活性阻害との関係について調べた。活性阻害の評価は以下の式で評価した。

+buffer系における活性阻害率(%)

$$= \frac{\text{E2}(10^{-6}\text{mol/L})\text{の活性値} - \text{E2共存下での各抽出試料(希釈倍率1倍)の活性値}}{\text{+buffer系のE2}(10^{-6}\text{mol/L})\text{の活性値}} \times 100$$

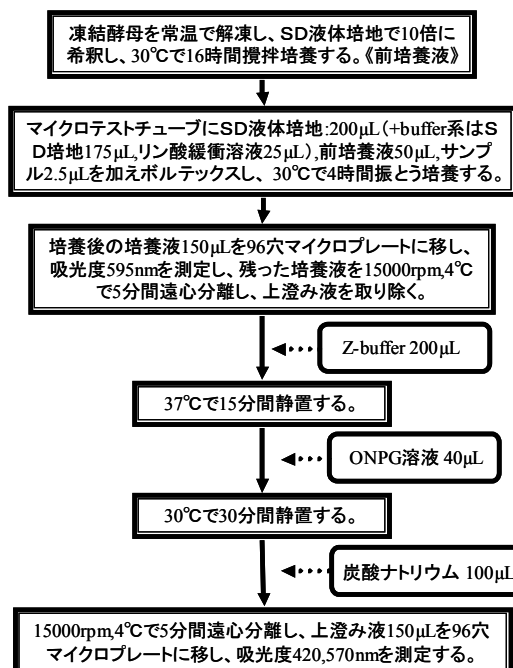


図2-2 酵母 Two-Hybrid 法の測定手順

3. 実験結果と考察

3-1 浄水汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン様活性

A~J 浄水場の汚泥及び I 浄水場のスカム抽出試料のエストロゲン様活性を図 3-1 に示す。この結果、酵母 Two-Hybrid 法では、すべての汚泥・スカム抽出試料においてエストロゲン様活性は認められなかった。

3-2 フタル酸エステル類のエストロゲン様活性

フタル酸エステル類 4 種類のうち、試薬フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) のエストロゲン様活性を図 3-2 に示す。これより、本研究で用いた酵母 Two-Hybrid 法では、エストロゲン様活性は確認されなかった。また、他のフタル酸エステル類であるフタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジメチル (DMP)、フタル酸ジブチル (DBP) においても同様の結果が得られた。

3-3 浄水汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン様活性阻害作用

エストロゲン様活性同様、A~J 浄水場の汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン様活性阻害作用を図 3-3 に示す。E2 (10^{-6} mol/L) の活性に対する阻害作用について、B 浄水場では阻害作用が認められなかったが、その他の浄水場においては阻害の程度は異なるが活性阻害が認められた。

3-4 フタル酸エステル類のエストロゲン様活性阻害作用

試薬フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) のエストロゲン様活性阻害作用を図 3-4 に示す。これより、本研究で用いた酵母 Two-Hybrid 法ではエストロゲン様活性及び活性阻害作用は共に確認されず、他のフタル酸エステル類であるフタル酸ジエチル (DEP)、フタル酸ジメチル (DMP)、フタル酸ジブチル (DBP) においても同様の結果が得られた。

以上のことから、浄水汚泥・スカム抽出試料における活性阻害は、フタル酸エステル類によるものではなく、他の共存物質による影響であると考えられる。

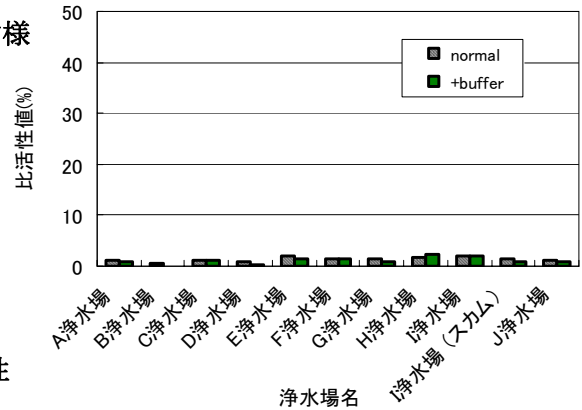


図3-1 各浄水場の汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン様活性

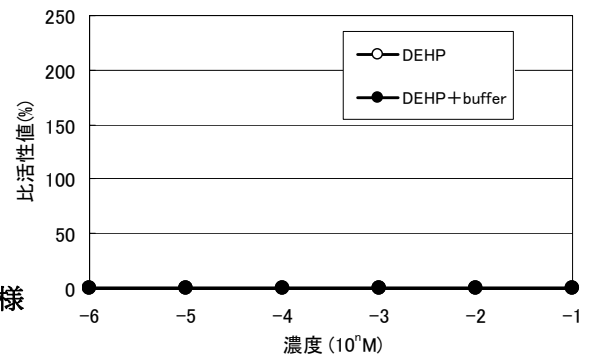


図3-2 DEHPのエストロゲン様活性

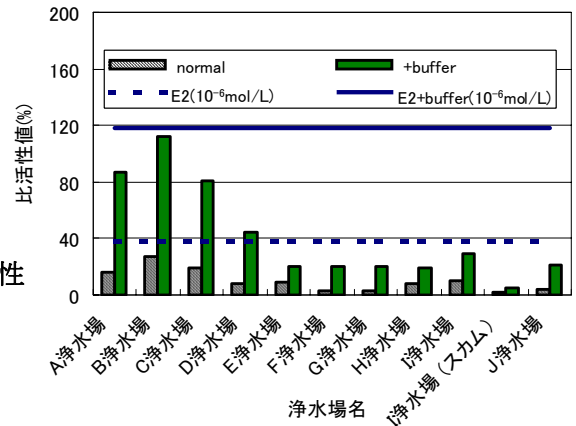


図3-3 各浄水場の汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン様活性阻害作用

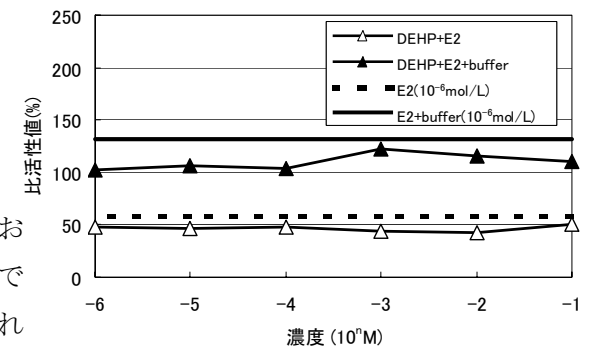


図3-4 DEHPのエストロゲン様活性阻害作用

3-4 浄水汚泥・スカム抽出試料のエストロゲン活性阻害率と E260 の関係

+buffer 系における A~J 浄水場の汚泥及び I 浄水場のスカム抽出試料のエストロゲン(E2)の活性阻害率と E260 の関係を図 3-5 に示す。これより、F・H・J 浄水場を除く浄水場では、E260 の値が大きいほど、E2 の活性阻害率が高くなるという傾向がみられた。したがって、フタル酸エステル類は活性阻害作用を示さなかったことから、E260 を発現するような有機物が活性阻害作用に影響を及ぼす可能性があると考えられる。

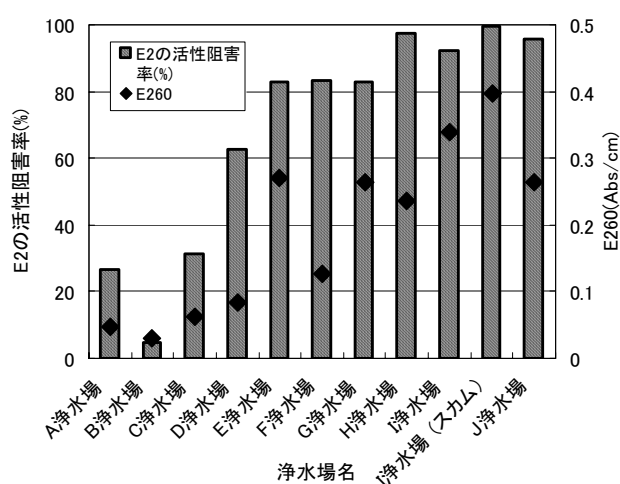


図3-5 +buffer 系における各浄水場の E2 の活性阻害作用率と E260

4. 結論

本研究で用いた酵母 Two-Hybrid 法では、浄水汚泥・スカムにはエストロゲン様活性がみとめられず、一方で活性阻害作用があることが明らかとなった。また、その活性阻害作用については、浄水汚泥・スカム中に含まれるフタル酸エステル類が起因しているのではなく、他の共存している有機物などの影響による可能性が高いということが示唆された。

参考文献

- 1) 伊藤和徳：浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の低減効果に関する研究、第 10 回衛生工学シンポジウム論文集、p.145-p.148 (2002)
- 2) 西村哲治、安藤正典：浄水場沈殿池汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性評価-NRL アッセイ法-、厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)「水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構に関する研究」平成 14 年度総括・分担研究報告書、p.1-p.4(2003)
- 3) Jun-ichi Nishikawa, Koichi Saito, Jun Goto, Fumi Dakeyama, Masatoshi Matsuo and Tsutomu Nishihara, New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Co activator., *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.154, No.1, p.76-p.83 (1999)