



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | ヒメダカピテロジェニンアッセイを用いた浄水汚泥および浮上物質のエストロゲン様作用の評価                                     |
| Author(s)        | 小関, 直; 大野, 浩一; 亀井, 翼 他  |
| Description      | 第13回衛生工学シンポジウム (平成17年11月17日 (木) -18日 (金) 北海道大学クラーク会館) . 一般セッション . 5 水環境 . 5-5   |
| Citation         | 衛生工学シンポジウム論文集, 13, 167-170  |
| Issue Date       | 2005-11-16  |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/1358">https://hdl.handle.net/2115/1358</a> |
| Type             | departmental bulletin paper   |
| File Information | 5-5_p167-170.pdf  |



## 5-5 ヒメダカビテロジェニンアッセイを用いた浄水汚泥および浮上物質のエストロゲン様作用の評価

○小関 直、大野 浩一、亀井 翼、眞柄 泰基 (北海道大学大学院)、宮谷 伸之 (荏原製作所)

### 1. 背景と目的

浄水汚泥、浮上物質（スカム）とは水道の浄水処理過程において発生する物質である。特に凝集剤を加えた後の沈殿池において浄水汚泥は多量に発生し、沈殿池の底に堆積する。

スカムの生成機構は未だに明らかとなっていないが、汚泥の腐敗の際に発生したガスによって水面に浮上した物質、曝気によって汚泥に泡が付着し浮上した物質と考えられている。

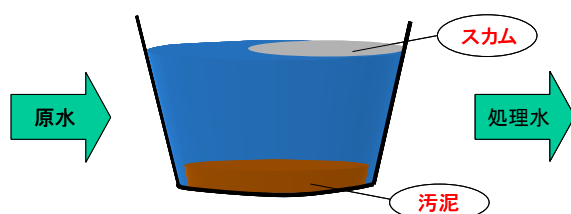


図 1 浄水処理過程で発生する汚泥、スカム

これまでの研究<sup>1)2)</sup>により、浄水汚泥やスカムにはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等が高濃度で濃縮・蓄積されることが指摘されており、他にも様々な汚染物質が濃縮されている可能性が高い。一般に浄水施設ではスカム等の除去装置は備えられておらず、高濃度に蓄積された化学物質が再び水道水中に移行するおそれがある。また、フタル酸エステル類については内分泌攪乱作用の可能性が疑われているが、明らかになっていない点が多い。

そこで本研究では、浄水汚泥、スカムのエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用を評価した。ヒメダカビテロジェニンアッセイを用いて、浄水汚泥、スカムおよび、フタル酸エステル類のエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用について検討をおこなった。

### 2. ビテロジェニンアッセイ

ビテロジェニン（VTG）とは鳥類や両生類、魚類などの卵生脊椎生物における卵黄タンパク質の前駆体であり、本来雌に特異的なタンパク質である。雌では卵巣でエストロゲンが分泌され、肝臓へ運ばれると VTG が合成される。しかし、雄においてもエストロゲン様物質に曝露されると肝臓で合成され血中に誘導されることから、エストロゲン様作用評価の有効な指標とされている。

ビテロジェニンアッセイとは、この VTG をエストロゲン様作用のバイオマーカーとして用いた評価方法である。

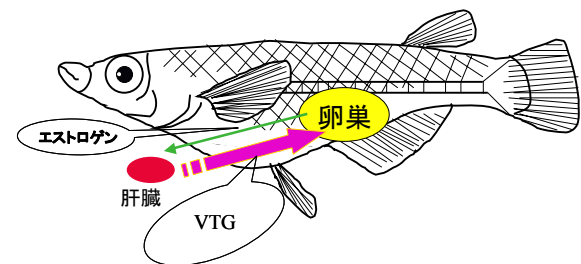


図 2 雌メダカの VTG 発現経路

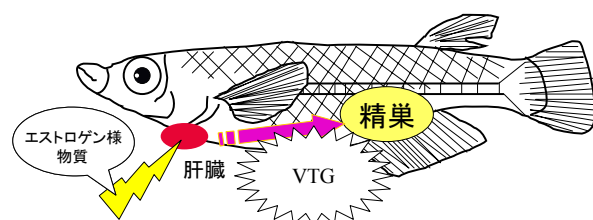


図 3 エストロゲン様物質に曝露された雄メダカの VTG 発現経路

### 3. 実験方法

#### 3-1 試験物質

K 浄水場の浄水汚泥、スカムの濃縮サンプル

および、試薬のフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(以下 DEHP)、フタル酸ジ-n-ブチル(以下 DBP)を用いた。

### 3-2 浄水汚泥、スカムの濃縮方法

図4に示すように、脱水した浄水汚泥、スカム10gに塩酸5mL、アセトン50mLずつを加え、振とう抽出・超音波抽出を行い、アセトン抽出液を分取した。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で2回抽出した。脱水後、窒素気流下で乾固させ1mLに濃縮、300 $\mu$ Lずつ分注後メタノールに転溶し、濃縮サンプルとした。

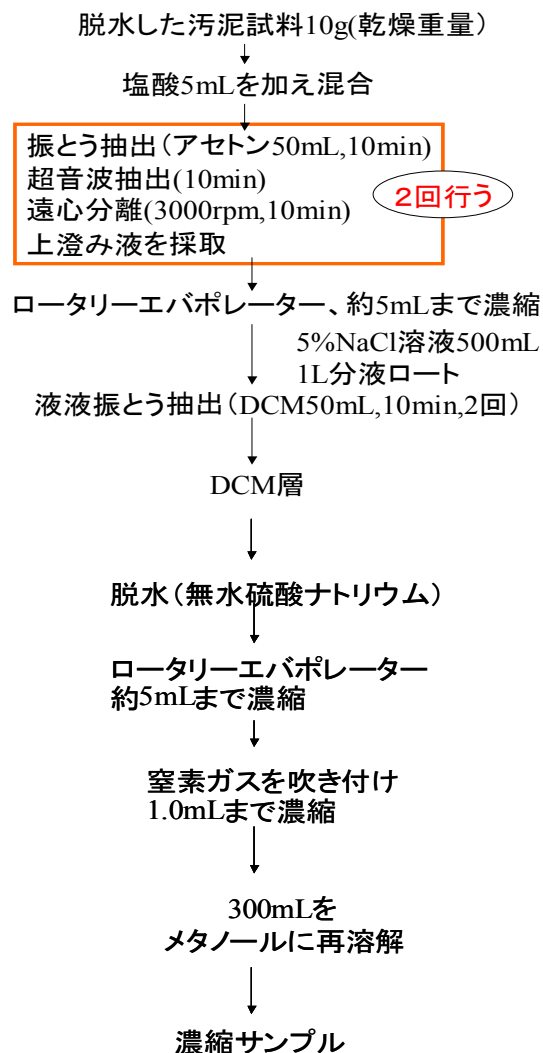


図4 浄水汚泥、スカムの濃縮方法

### 3-3 曝露水の調整

浄水汚泥、スカムについては、濃縮サンプル150 $\mu$ Lを脱塩素水道水で希釈し3Lとしたもの

を用いた。DEHP、DBPについては濃度を100 $\mu$ g/Lまたは1000 $\mu$ g/Lに調整した水溶液を3L用いた。

### 3-4 曝露試験方法

供試魚には、成魚の雄ヒメダカを脱塩素水道水中で2週間以上雌と分離飼育したものを用いた。

曝露水槽には3Lのガラス製セパラブルビーカーを用いて、曝露水を1日に1度全量交換する半止水式で曝露を行った。1試験区につき7匹のヒメダカを用いた。水温は23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、明暗周期を12時間とし、曝露期間中の給餌は行わなかった。

エストロゲン様作用の検討では、各曝露水への曝露3日後の血清中VTG濃度を測定した。抗エストロゲン様作用の検討では、各曝露水に17 $\beta$ -エストラジオール(以下E2)を添加、E2濃度を50ng/Lに調整し、曝露1日後の血清中VTG濃度を測定した。

VTG濃度はヒメダカビテロジェニンELISAキットを用いて測定した。ビテロジェニンの詳しい測定方法は後述する。

### 3-5 VTG測定方法

VTG測定試料として、ヒメダカの血清の上清を用いた。採取したヒメダカを氷冷麻酔し体重を測定後、尾びれ上部をメスで切断し、毛細管(パストールピペットの管径を1mm以下に加工したもの)を用いて5~10 $\mu$ L程度採血した。採取した血液を4 $^{\circ}$ C、10分間、12000rpmで冷却遠心分離し、得られた血清をVTG測定試料とした。

血清中VTG濃度は、メダカVTG測定用ELISAキット(トランスジェニック株製)を用いた。このELISAキットは、固相に固定化した一定量の抗体に測定対象抗原を捕捉させ、この結合体にさらに酵素標識抗体を結合させ、その標識抗体を検出する手法であるサンドイッチ法を利用したものである。測定原理を図5に示す。

なお、血清中VTG濃度の定量下限値は200ng/mLとした。また、定量下限値未満のも

のはその半数値(100ng/mL)をとりグラフに反映させた

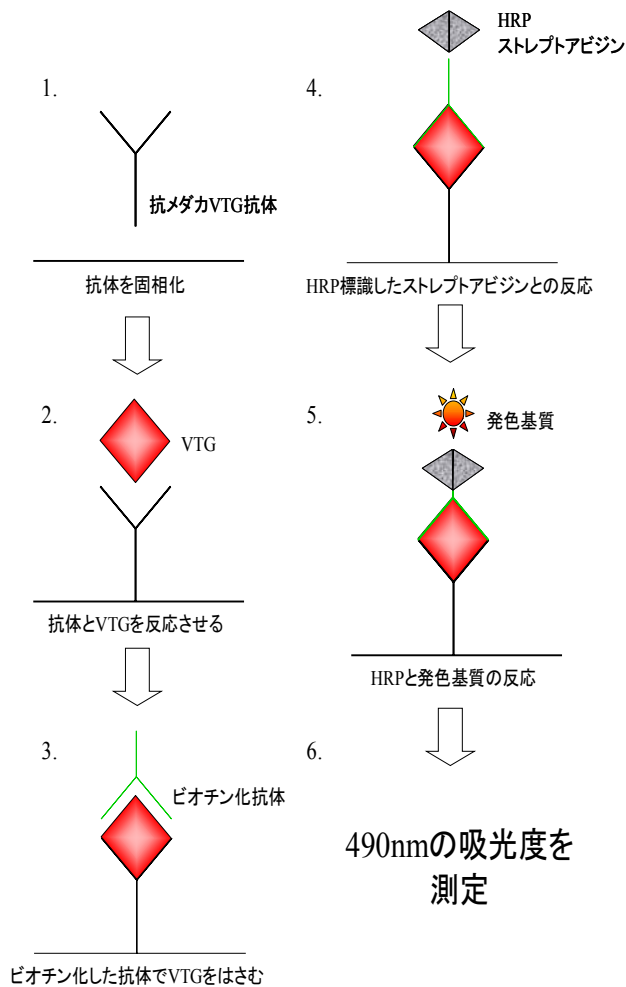


図5 VTG濃度測定原理

#### 4. 結果および考察

##### 4-1 エストロゲン様作用についての検討

浄水汚泥、スカムに対する曝露3日後の血清中VTG濃度を図6に示す。浄水汚泥、スカムに対する曝露では、全ての個体でVTG濃度は定量下限値未満だった。

次に、DEHPおよびDBPに対する曝露3日後の血清中VTG濃度を図7に示す。DEHP、DBPに対する曝露においても、全ての個体でVTG濃度は定量下限値未満だった。

以上より、浄水汚泥、スカム、DEHPおよびDBPのいずれも、エストロゲン様作用を示さないと推測される。

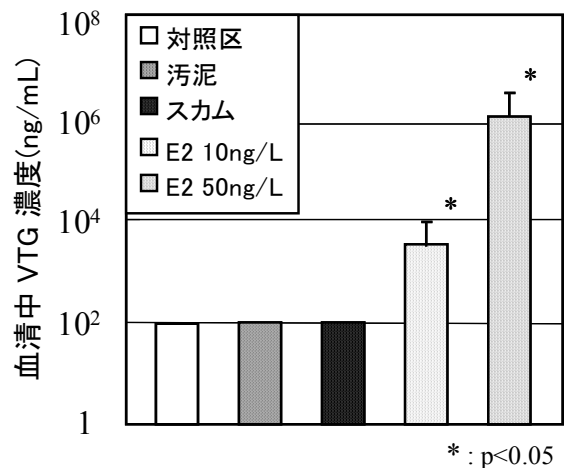


図6 汚泥、スカム曝露3日後の血清中VTG濃度

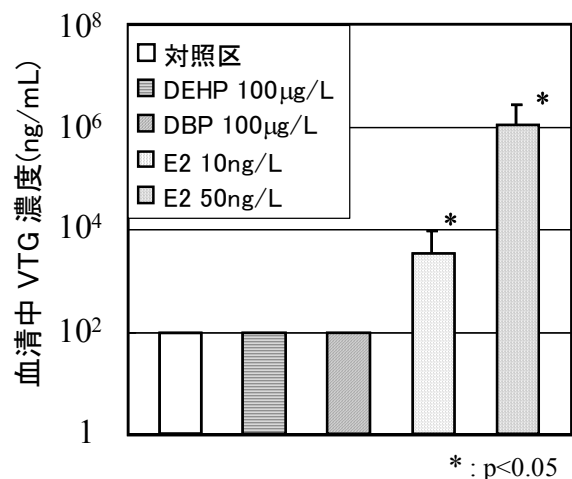


図7 DEHP、DBP曝露3日後の血清中VTG濃度

##### 4-2 抗エストロゲン様作用についての検討

E2 50ng/L共存下における浄水汚泥、スカムに対する曝露1日後の血清中VTG濃度を図8に示す。E2単独の陽性対照区と比べ、両試験区ではVTG濃度の有意な減少は認められなかった。

次に、E2 50ng/L共存下におけるDEHPおよびDBPに対する曝露1日後の血清中VTG濃度を図9に示す。E2単独の陽性対照区と比べてDEHP100、1000µg/LおよびDBP1000µg/Lの試験区ではVTG濃度の有意な減少が認められた。

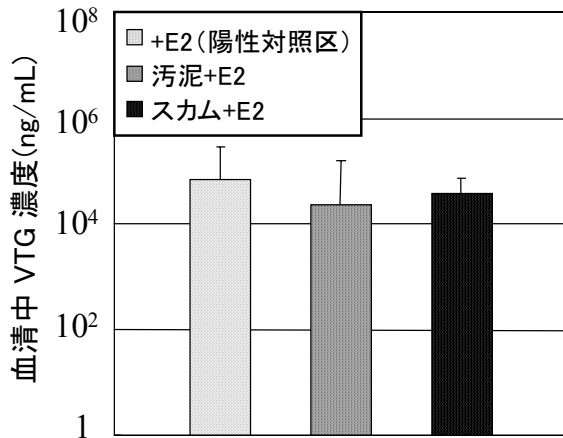


図8  
E2 50ng/L 共存下における汚泥、スカム曝露1  
日後の血清中 VTG 濃度

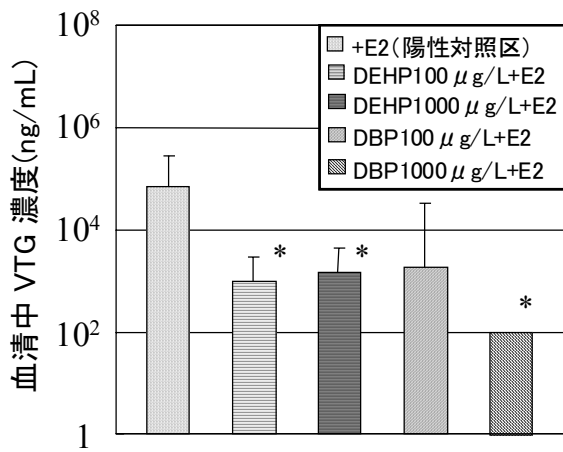


図9  
E2 50ng/L 共存下における DEHP、DBP 曝露1日  
後の血清中 VTG 濃度

\*: p<0.05

これらの結果からDEHP、DBPは抗エストロゲン様作用を有するものの、今回用いた浄水汚泥、スカムにおいて抗エストロゲン様作用が認められなかった。この理由の一つとして、各試料に含まれていた DEHP、DBPの濃度が、試薬の DEHP、DBPを用いた実験の濃度よりも低かった可能性が推測される。今回の実験に用いた浄水汚泥、スカムと時期は異なるものの、同じ浄水場で採取された浄水汚泥 (n=3)、スカム (n=3) の DEHP 濃度はそれぞれ 10000 ~ 11000μg/kg-dry、18000~27000μg/kg-dry、DBP 濃度はそれぞれ 73~100μg/kg-dry、定量下限値 (<25) ~130μg/kg-dry、と報告されている<sup>2)</sup>。

この値を曝露水 1Lあたりに換算すると浄水汚泥、スカムの DEHP 濃度はそれぞれ、5.6 ~ 6.7μg/L、11~16μg/L、DBP濃度はそれぞれ、0.04~0.06μg/L、定量下限値~0.08μg/Lとなり、今回の試薬を用いた試験において有意差が得られた濃度よりもかなり低かった。

また、その他の理由として、浄水汚泥、スカム中の共存物質との吸着等の相互作用により DEHP、DBP の効果が低減した可能性も推測される。

## 5. まとめ

本研究では、ヒメダカビテロジェニンアッセイを用いて、浄水汚泥、スカムおよび、浄水汚泥、スカムに高濃度で含まれているフタル酸エステル類 (DEHP、DBP) のエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用について検討をおこなった。その結果、今回実験で用いた浄水汚泥、スカムにはエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用は認められなかったが、その一方で DEHP、DBP 自体では抗エストロゲン様作用を示した。

浄水汚泥、スカムで抗エストロゲン様作用が確認されなかった原因は、汚泥、スカムに含まれていた DEHP、DBP の濃度が低かった、共存物質との相互作用によって DEHP、DBP の効果が低減した、などの理由が推測された。

## 参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業：水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究、平成 14 年度総括・分担研究報告書
- 2) 厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業：水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究、平成 15 年度総括・分担研究報告書