

バイオアッセイ手法の水環境水への適用と事業場排水調査事例について

Application of Bioassay for Environmental Water and Case Study of Examination Wastewater

阿部 郁子 大金 仁一 阿部 公恵*¹
高橋紀世子 栗野 健 佐々木久雄
嵯峨 京時*²

Ikuko ABE, Jin-ichi OGANE, Kimie ABE
Kiseko TAKAHASHI, Takeshi AWANO, Hisao SASAKI
Kyouji SAGA

異種生物の遺伝子組込酵母を用い、酵母 Two-Hybrid アッセイ法（以下「酵母 Two-Hybrid 法」と略す）を県内河川に適用したところ特異的な反応を示した河川がみられた。詳細調査を行ったところ、原因は流域に立地する事業場排水によることが判明した。このため事業場の協力を得て原因工程究明の調査を行ったところ、エストロゲン様活性の原因は、溶解炉に係わる排脱洗煙廃水及び炉関係廃水による事が判明した。またエストロゲン様活性の低減化を目的に塩素添加実験および活性炭処理実験を行ったところ、この手法が低減化に有効であることが判った。今回の調査研究により酵母 Two-Hybrid 法が内分泌攪乱様物質のスクリーニング手法として有効であることが判った。また内分泌かく乱化学物質を直接使用していない事業場であっても、溶解炉等の燃焼・加熱施設を有する場合には内分泌かく乱様物質が排出される可能性があることが判明した。

キーワード：酵母 Two-Hybrid アッセイ法；内分泌かく乱化学物質；遺伝子組込酵母；エストロゲン様活性

Key words : yeast two-hybrid assay system ; endocrine disrupting chemicals ; gene recombinant yeast ; estrogenic activities

1 はじめに

内分泌かく乱作用を有する化学物質による環境や生物への影響が大きな問題になっているが、その汚染実態や生態系に対する影響等は未解明な部分が多い。近年それらの検索にバイオアッセイを利用して総合的に評価する方法が様々な検討されている。我々はヒト、メダカ、ツチガエルという生物種の異なる受容体遺伝子組込酵母を用い、酵母 Two-Hybrid 法により環境調査および事業場排水調査を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試薬

2.1.1 標準試薬

17β-エストラジオール（以下 E2：和光純薬）、4-ノニルフェノール（同 NP：関東化学）、4-オクチルフェノール（同 OP：関東化学）

2.1.2 使用試薬等

Dimethyl Sulfoxide（同 DMSO：CALBOIOCHEM）、ジクロロメタン（残留農薬・PCB 分析用：和光純薬）、アセトン（残留農薬・PCB 分析用：関東化学）、メタノール（残留農薬・PCB 分析用：関東化学）、酢酸エチル（残留農薬分析用：和光純薬）、次亜塩素酸ナトリウム溶液（鹿 1 級：関東化学）、粉末活性炭（水道用：含水率 50%）、固相カートリッジ（Sep-Pak t C18）

2.2 試料の前処理操作の検討

水試料の環境ホルモン様活性をバイオアッセイで測定するには、前処理操作が必要である。同一水系において環境ホルモン様作用を調査する際は、同時期に採水・処理することが必要であり、複数検体を効率的に処理することが望まれる。我々は白石ら¹⁾の方法を参考に、複数検体を迅速処理すべく検討を行った。固相カートリッジと固相抽出用マニホールドを用いることにより固相の活性化、試料濃縮、乾燥、溶出の一連の操作の半自動化を試み、操作時間の短縮を図った。また環境ホルモン作用の疑われている物質は有機化合物がほとんどであり、対象とされる物質を効率的に抽出すべく、抽出溶媒についても検討を行った。検討した溶媒の抽出条件を表 1 に示す。

表 1 抽出溶媒とコンディショニング方法

溶出溶媒	洗浄・コンディショニング
アセトン	アセトン 5ml, ミリ Q 水 10ml
ジクロロメタン	メタノール 5ml, ジクロロメタン 5ml, メタノール 5ml, ミリ Q 水 10ml
メタノール	メタノール 5ml, ミリ Q 水 10ml
酢酸エチル：メタノール (1：1)	メタノール：酢酸エチル (1+1) 5ml, メタノール 5ml, ミリ Q 水 10ml
酢酸エチル＋アセトン (1＋1)	アセトン 5ml, 酢酸エチル 5ml, メタノール 5ml, ミリ Q 水 10ml

2.3 添加回収試験

今回検討した前処理操作の確認を行うため、DMSO に溶解した E2 (200nM)、NP (200μM)、OP (100μM) の各標準物質、及びミリ Q 水 500ml に E2 (200nM)、NP (200μM)、OP (100μM) の溶液をそれぞれ 50μl 添加し

* 1 現 仙台保健福祉事務所塩釜総合支所

* 2 現 共和コンクリート工業株式会社

表2 抽出溶媒の回収率

	n=3		
	E2 回収率	NP 回収率	OP 回収率
アセトン	89.1	25.9	34.1
ジクロロメタン	90.8	68.6	115.9
メタノール	91.7	43.5	49.6
酢酸エチル：メタノール	81.0	33.5	32.1
酢酸エチル+アセトン	76.1	66.8	63.4

前処理操作を行ったものを酵母 Tow-Hybrid 法で測定をした。各標準物質の抽出溶媒ごとの回収率は表2に示すようにE2で5種すべての有機溶媒において76.1～91.7% (n=3)と良好であった。しかしNP, OPでは抽出溶媒により回収率に差がみられた。E2, NP, OPの3化学物質すべてに良好な回収率が得られたのはジクロロメタンであった。アセトン抽出では水溶性の高い物質についても幅広く溶出されてしまうことや、メタノールを用いる際、抽出後の乾固に時間がかかること等を加味し、今後の操作にはジクロロメタンを用いることとした。今回行った試料の前処理操作法の概略を図1に示す。固相カートリッジと固相抽出用マニホールドを用いることにより試料ごとに行っていた固相の活性化、試料濃縮、乾燥、溶出の一連処理操作を同時に行うことが可能となり、複数検体を効率的に処理し、時間の短縮、処理方法の簡便化が図られた。

2.4 酵母 Tow-Hybrid 法

国立環境研究所の白石ら¹⁾の方法に準じて行った。供試菌株は、2002年度および2004年度に国立環境研究所より分与された生物種(ヒト h ER a, メダカ m ER a, ツチガエル frER a)のエストロゲン受容体 a 遺伝子組込酵母を用いた。活性の判定については、各試料の希釈濃度ごとの化学発光強度(CLN)の平均値(T)とDMSO発光強度の平均(B)から化学発光強度比(T/B)を算定し、濃度に依存した発光比の増加がみられ、最大発光比が4以上を示すものをアゴニスト作用陽性とした。また回帰式からT/Bを10倍誘導する濃度(ECX10値)を求め指

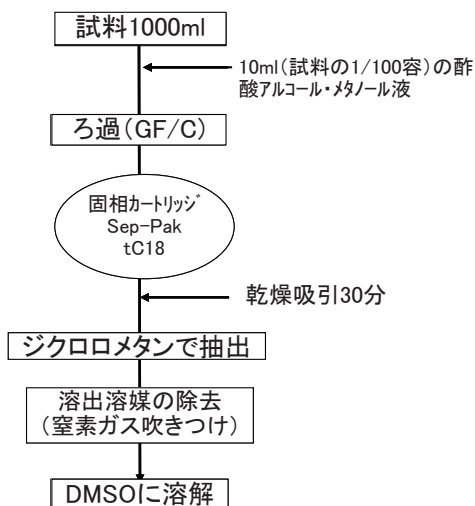


図1 水試料の前処理操作方法

標とした。また試料に含まれる化学物質の酵母への毒性作用を評価するため、酵母 YTOX 株を用いた毒性試験を行った。毒性によるβ-ガラクトシダーゼの抑制が40%以上みられ、量-反応関係が認められる場合を毒性として、試料の50%抑制濃縮率(IC50)を回帰直線式より求め毒性の指標とした。また標準物質のエストロゲン様活性を確認したところ、E2に比べNP, OPともに約1000分の1の活性であり文献値と比較しても大きな差はなく妥当な値が得られた。

2.5 環境調査

2.5.1 調査期間

2003年に宮城県内の中小河川19地点を調査したところ、鉛川においては上流部に生活排水などの流入が少ないにもかかわらずエストロゲン様活性が高い結果が得られている²⁾。そこで鉛川流域に絞り2004年12月から2005年10月に環境調査を行った。

2.5.2 調査地点

河川上流部より地点Aから地点Fの6地点のほか、河川に排出している事業場排水、事業場関連の排水が流入している支川及び対照地点等の計10カ所である(図2)。なお採水にはガラス製ガロン瓶を用いた。

2.6 事業場調査

環境調査の結果より事業場からの影響が想定されたため、2005年12月及び2006年8月には流域に立地する事業場の場内について工程調査を行った。事業場内の排水処理経路の概略を図3に示す。排水系統は大きく分けて6系統で、凝集沈殿および砂ろ過を用いて処理を行っている。今回はエストロゲン様活性の低減化を目指し、

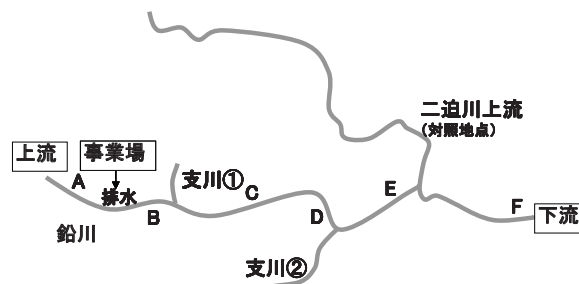


図2 調査地点の概要

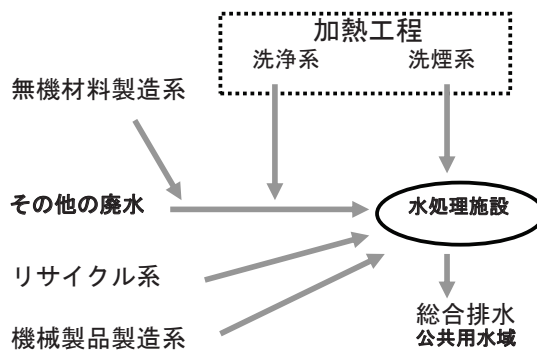


図3 事業場の排水処理系統の概略図

塩素添加実験及び活性炭処理実験を行った。

2.7 エストロゲン様活性の低減化実験

2.7.1 塩素添加実験

凝集沈殿・砂ろ過を用いる一般的な浄水処理においては、エストロゲン様活性の十分な不活性化が望めず、塩素処理を行うことにより活性が低下すると報じられている³⁾。このため採取試料に段階的に次亜塩素酸ナトリウムを添加することで有効塩素濃度を変化させ、エストロゲン様活性の変化を調べた。実験方法を次に示す(図4)。

2.7.2 活性炭処理実験

活性炭処理は活性炭が持つ吸着特性から水道水の異臭味除去を始め農薬等の微量有害物質の除去に広く用いられている。このため今回はエストロゲン様活性を持つ試料を対象に、粉末活性炭懸濁液を段階的に添加して濃度を変化させ、その有効性について調査を行った。実験方法を次に示す(図5)。

3 結果および考察

3.1 環境調査

2004年12月の4地点(地点B, C, D, E)における調査結果を表3に示す。-S9試験で佐野橋(地点B)から久保橋(地点E)の中流域でヒト、メダカのエストロゲン受容体遺伝子組換え酵母を使用した際、全ての地点で活性がみられた。ツチガエルにおいては藤沢橋(地点D)ではN.D.を示したものの、残りの地点では活性が認められた。種別で特に活性が高かったのはメダカで、以下ヒト、ツチガエルの順であった。メダカ試験系はヒト試験系に比べエストラジオール関連物質に対する感受性が

低く、アルキルフェノール類に対しては高い感受性を示すとの報告⁴⁾があり、調査結果より試料中の主たるエストロゲン様活性が工業系化学物質によるものと推測された。活性は上流の佐野橋がもっとも高く、流下に伴い低下したが、久保橋で再び軽度上昇した。佐野橋および久保橋付近あるいはその上流域に活性をもたらす要因があると推察された。また酵母 YTOX 株を用いた毒性試験を行ったところ、-S9試験では毒性は認められなかったが、+S9試験では毒性が認められた。このため見かけ上各地点において+S9試験で活性が低くなっているが、代謝による低下なのか毒性によるものなのかは判断が難しい結果となった。この結果をふまえ、それ以降の環境調査は-S9試験のみとし、メダカのエストロゲン受容体遺伝子組換え酵母を用いることとした。

2005年6月, 8月, 10月の調査結果を表4に示す。この調査からは流域に立地する事業場排水も調査対象に加えた。上流から下流に行くにつれ活性は低下し、事業場に関連する支川(支川②)の流入によりやや上昇が見られた。6月と10月の調査では事業場排水、及び事業場に関連する支川からの影響が示唆される結果となり、2回の調査で同じ傾向を示していた。一方8月の調査では全体的に活性が低い結果となったのは、この調査の前後において事業場の加熱工程が点検のため停止していた事が後日判明した。なお事業場正門前、および柳沢(五輪原橋の上流部に位置する支川)、新橋(対照とした合流河川の上流部)からは活性が認められなかった。このことから鉛川におけるエストロゲン様活性の原因は流域に立地している事業場排水であることが判った。

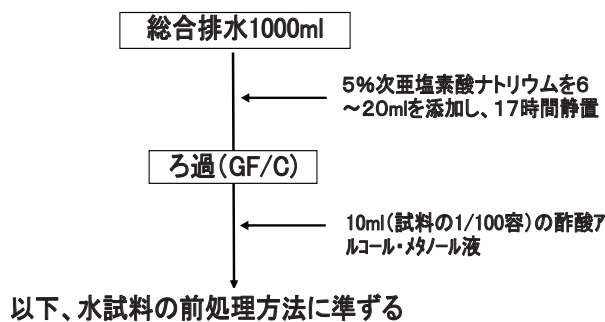


図4 総合排水への塩素添加実験の方法

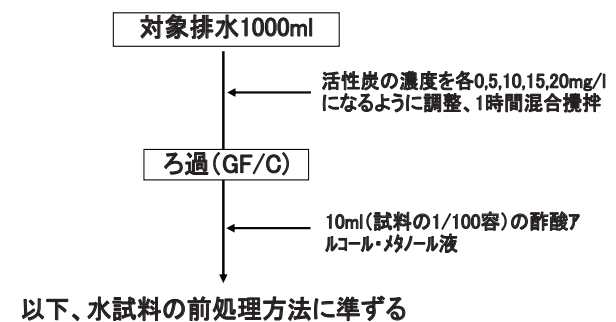


図5 活性炭処理実験の方法

表3 鉛川流域の測定結果(2004年12月)

	hER(-S9)	hER(+S9)	mER(-S9)	mER(+S9)	frER(-S9)	frER(+S9)	YTOX(-S9)	YTOX(+S9)
	ppt as E2	ppt as E2	ppt as E2	ppt as E2	ppt as E2	ppt as E2	IC50(C.R.)	IC50(C.R.)
佐野橋 地点B	0.8	1.0	25	14	0.4	0.7	毒性認めず	8.5
五輪原橋 地点C	0.4	N.D.	9.2	N.D.	0.2	N.D.	毒性認めず	9.2
藤沢橋 地点D	0.3	N.D.	6.0	N.D.	N.D.	N.D.	毒性認めず	10.4
久保橋 地点E	0.6	N.D.	12	3.1	0.4	N.D.	毒性認めず	10.1

表4 鉛川流域の測定結果 (2005年6~10月)

地点	地図上の地点	mER (ppt as E2)		
		2005年6月	2005年8月	2005年10月
事業場正門前	A	N.D.	N.D.	N.D.
事業場総合排水	工場排水	86	3.5	68
佐野橋	B	53	2.7	27
柳沢	支川①	N.D.	N.D.	N.D.
五輪原橋	C	19	N.D.	15
藤沢橋	D	9.9	N.D.	6.3
藤沢捨石堆石場	支川②	27	N.D.	20
久保橋	E	11	N.D.	13
豊後橋	F	-	N.D.	2.4
新橋	対照地点	-	N.D.	N.D.

表5 事業場内系統別エストロゲン様活性の測定結果(2005年12月)

調査地点		hER(-S9)	mER(-S9)
		ppt as E2	ppt as E2
加熱工程	洗浄系	13	270
	洗煙系	15	250
無機材料製造系		N.D.	N.D.
リサイクル系		0.3	7.3
機械製品製造系		N.D.	N.D.
その他		N.D.	N.D.
総合排水		1.6	36

表6 機器分析によるアルキルフェノール類の測定結果

項目	測定地点		魚類への予測無影響濃度 ^{5)~7)}
	洗煙系廃水	事業場排水	
	2006.8	2006.10	
4-tert-ブチルフェノール	30	0.69	-
4-tert-オクチルフェノール	0.58	0.01	0.992
ニルフェノール	5.2	0.30	0.608
ビスフェノールA	1.3	0.21	24.7、47

また鉛川における事業場排水が占める平均割合を、年4回の流量調査から算出したものを図6に示す。事業場排水の直後の地点である佐野橋(地点B)では流量全体の74%を事業場排水が占めていた。下流に従い河川全体に占める事業場排水の割合は下がるが、調査地点の最下流域の豊後橋(地点F)でも23%と全体の約4分の1を占めており、事業場排水が河川全体に大きく影響していることが判る。

3.2 事業場調査

環境試料の調査結果から事業場排水からの影響が示唆されたため、原因工程を究明すべく、2005年12月に場内の排水系統を系統別に調査した。系統別のエストロゲン様活性の測定結果を表5に示す。E2換算したエストロゲン様活性は加熱工程で高値を示した。他の系統については排水経路内の循環水の影響があるものの、殆ど活性がみられなかった。また総合排水水におけるエストロゲン様活性の推移を図7に示す。2005年8月の値が低いのは加熱工程が停止していた時期と一致しており、系統別の測定結果とも合致する。これらのことからエストロゲン様活性の原因は、溶解炉に係わる排脱洗煙廃水及び炉関係廃水による事が判る。原因物質特定のため、洗煙系廃水及び事業場排水を対象に機器分析を行った結果を表6に示す。事業場排水についてはいずれの項目も

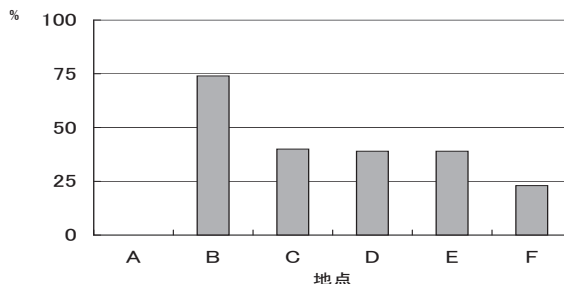


図6 鉛川における事業場排水が占める平均割合

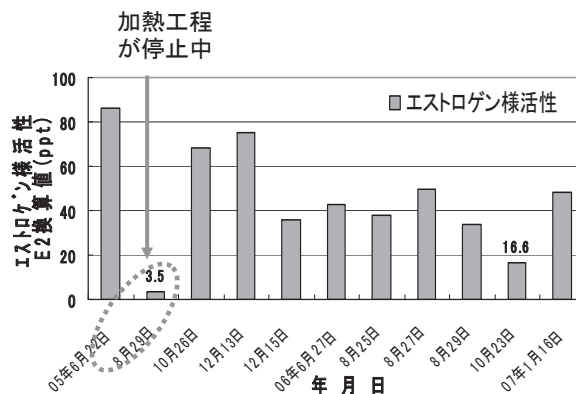


図7 総合排水水におけるエストロゲン様活性の推移

魚類への予測無影響濃度には達しておらず原因物質の特定には至っていない。

3.3 エストロゲン様活性の低減化実験

3.3.1 塩素添加実験

事業場排水に次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加・混合し、17時間静置後にエストロゲン様活性を測定したところ、有効塩素濃度が高い試料ほど活性が低下することが判った。この実験は同一試料について2回行い、その結果を表7に示すと共に、2回の実験結果をまとめて図8に示す。この事から塩素添加がエストロゲン様活性の低減化に有効であることが判った。

3.3.2 活性炭処理実験

酵母ツーハイブリッド法でエストロゲン様活性が認められた事業所の工程水及び総合排水に対し、活性炭濃度が15~20mg/lになるよう粉末活性炭懸濁液を段階的に添加し、スターラーで1時間攪拌・混合した後にガラスフィルター(GF/C)を用いてろ過し、エストロゲン様活性を調べた。その結果を表8及び図9に示す。

洗煙系及び総合排水水ともに活性炭濃度が高くなるほどエストロゲン様活性が低下し、試験液の活性炭濃度が20mg/lにおける除去率は97%程度に至っている。これらの結果をエストロゲン様活性濃度(E2換算)と活性炭添加量として両対数グラフに表すと、ほぼ直線的な除去特性を示した(図10)。この事から活性炭処理がエストロゲン様活性の低減化に有効であることが判った。

表7 総合排水への塩素添加実験の結果

1回目		2回目	
有効塩素濃度 (mg/l)	エストロゲン様活性 (ppt as E2)	有効塩素濃度 (mg/l)	エストロゲン様活性 (ppt as E2)
0	36	0	30
6.1	8	3.66	25
12.2	ND	7.32	ND
		12.2	ND

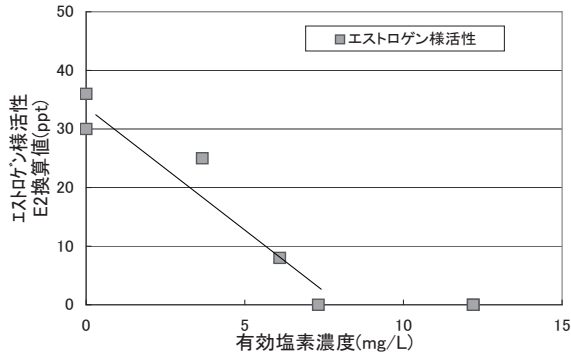


図8 総合排水への塩素添加実験の結果

4 まとめ

酵母ツーハイブリット法が内分泌攪乱様物質のスクリーニング手法として有効であることが判った。また内分泌かく乱化学物質を直接使用していない事業場であっても、溶解炉等の燃焼・加熱施設を有する場合には内分泌かく乱様物質が排出される可能性があることが判明した。今回の事例におけるエストロゲン様活性の低減化には塩素処理および活性炭処理が有効であることが判った。しかしながら鉛川でエストロゲン様活性を示した原因物質の特定には至っておらず、国立環境研究所と共同で物質の特定に取り組んでいる。

参考文献

- 1) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 環境化学, 10, 57-64 (2000)
- 2) 三沢松子, 名村真由美, 千葉美子, 阿部公恵, 大庭和彦: 宮城県保健環境センター年報, 22, 123-129 (2004)
- 3) 鎌田素之, 眞柄泰基: 用水と廃水, Vol.44 No.1, 28-33 (2002)

表8 活性炭処理実験の結果

単位: ppt as E2

活性炭濃度 (mg/l)	ケース1	ケース2	ケース3	ケース4
	洗煙系	洗煙系を希釈	総合排出水	総合排出水
0	500	140	69	16
5	200	88	44	N.D.
10	110	45	N.D.	N.D.
15	38	23	N.D.	N.D.
20	13	9	N.D.	N.D.

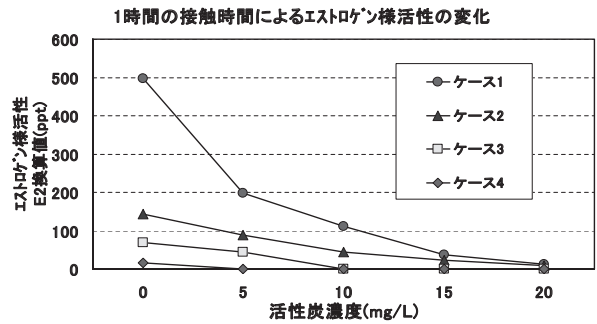


図9 活性炭処理実験の結果

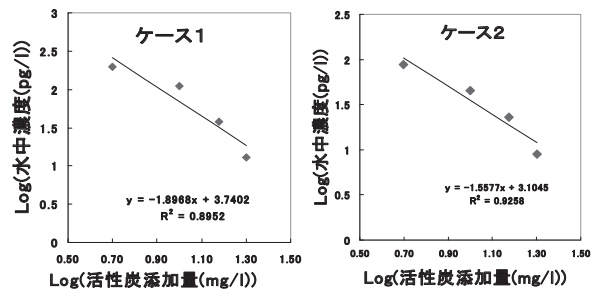


図10 エストロゲン様活性の活性炭による除去特性

- 4) 白石不二雄, 白石寛明, 西川智浩, 西川淳一, 丸尾直子, 森田昌敏: 第12回環境化学討論会, 58-59 (2003)
- 5) 環境省平成14年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会, 資料5 (2002)
- 6) 環境省平成13年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会, 資料2-2 (2001)
- 7) 環境省平成16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会, 資料5-2 (2004)