

In vitro バイオアッセイによる 微量化学物質の包括的水環境診断

Comprehensive Water Environmental Diagnosis of the Microchemistry Substance by an *In Vitro* Bioassay

赤崎 千香子 郷右近 順子*1 阿部 郁子*2
福地 信一 渡部 正弘
Chikako AKASAKI, Junko GOUKON, Ikuko ABE,
Shinichi FUKUCHI, Masahiro WATANABE

従来から用いていた酵母ツーハイブリッド法による4種の組み替え酵母に加え、一般毒性の指標として利用される発光細菌毒性試験を導入して、河川及び事業所排水の試験を行った。また、フロリジルカラムによる粗分画の酵母アッセイを行った。

キーワード：酵母ツーハイブリッド法；発光細菌毒性試験
Key words : yeast two-hybrid method ; luminescence-bacteria toxicity test

1 はじめに

ダイオキシン類や種々の化学薬品などは、内分泌かく乱作用や遺伝毒性、細胞毒性などを有するものがあるといわれている。これら膨大な数の化学物質の個々の特性とその複合的作用の把握には莫大な時間と労力が必要である。また、化学的項目のみで構成されている従来の判定基準では、物理的、化学的又は生物的变化によって生ずる多種多様な成分や非意図的に生産される成分の評価は困難である。そこで、化学物質の影響を総合的に評価できる手法の開発が急務とされており、近年バイオアッセイ手法が注目されている。

当センターにおいても県内の環境水を対象にバイオアッセイを試み、酵母ツーハイブリッド法を適用したところ、特異的にエストロゲン活性の高い河川を発見し、その原因事業所並びに原因工程を特定するに至った¹⁾。この結果から、さらに機器分析法を主体とした化学分析を導入し、原因物質の特定まで実施した。

今回は、この手法に毒性試験を加え、熱処理、焼却工程を有する事業場へ適用し、周辺の水環境の総合的な評価を試みると共に、化学分析を組み合わせ、県内の調査を行った結果について報告する。

2 対象及び検査方法

2.1 対象

2.1.1 平成21年度河川調査

1) 久保橋、若柳大橋、神取橋、葦神橋、柴田大橋、江尻橋（独）国立環境研究所（以下、国環研とする。）との共同研究における調査地点）

2) 大郷大橋（4月から7月にかけて隔週）

3) 鳴瀬橋、共同排水溝、三本木大橋、感恩橋、伊豆沼出口、小山橋、念仏橋、境橋、二子屋橋

2.1.2 平成21年度事業所調査

半導体工場、合成ゴム工場、製紙工場の3事業所

2.1.3 平成22年度河川調査

久保橋、荒川橋、蔵王大橋

2.1.4 平成22年度事業所調査

工業製品リサイクル業、半導体工場、繊維製品製造業、合成樹脂製造業、プラスチック製品製造業 K、プラスチック製品製造業 A の6事業所

2.2 方法

今回用いた *in vitro* バイオアッセイはヒト・エストロゲン受容体 α 酵母アッセイ（以下、**hER Y.A** とする。）、メダカ・エストロゲン受容体 α 酵母アッセイ（以下、**medER Y.A** とする。）、レチノイン酸受容体（以下、**RAR Y.A** とする。）及びアрилハイドロカーボン体（以下、**AhR Y.A** とする。）の4種の受容体組み込み酵母を使用した。前処理は阿部ら¹⁾による。*in vitro* バイオアッセイは国環研より提示された方法¹⁾に従った。

従来から用いていた4種の組み替え酵母に加えて、一般毒性の指標として利用される発光細菌毒性試験（*Photobacterium Toxicity test*; 以下、**P.B.test** とする。）を導入した。凍結保存してある菌液は室温で解冻し、培地で希釈したのち30℃で2時間静置培養後使用する。黒色マイクロプレートに固相抽出試料を段階希釈して希釈後菌液を分注し、5分後に発光測定装置で発光値を測定する。

*1 現 中南部下水道事務所 *2 現 原子力センター

P.B.test は、海洋性の発光細菌の発光強度が化学物質の影響により弱まることを利用した毒性試験であり、試験は 96 ウェルプレートで行い、希釈等の操作は酵母ツナーハイブリッド法とほぼ同様の操作を行うものである。測定値は発光強度を 50%減少させる濃縮倍率 (IC50) の逆数 (1/IC50) で表す。

また、平成 22 年度にはフロリジルカラムによる粗分画の酵母アッセイを行った。試験方法は固相カートリッジから抽出・乾固した試料をヘキサソール/ジクロロメタン (3:1) 溶液 (以下、Hx/DCM 液とする。) で溶解後、フロリジルカラムに重層し、Hx/DCM 液で抽出 (FL1) する。次に 10%アセトン/ジクロロメタン (以下、A/DCM

液とする。) で抽出 (FL2) し、さらにメタノール (以下、MeOH 液とする。) で抽出 (FL3) する。各分画を窒素ガス吹き付け状態で 40℃にて蒸発乾固し、DMSO 100μL にて溶解した。この試料について酵母アッセイを行う。

3 結果及び考察

3.1 河川調査結果

平成 21 年度の県内河川 18 地点の各酵母アッセイの結果を表 1 に示す。表 1 から表 5 の全国河川水平均値は白石ら²⁾の H21 全国調査結果の平均値である。(以下、全国平均とする。)

表 1 河川のバイオアッセイ結果 (平成 21 年度)

河川名	橋名	hER Y.A (ppt as E2)(-S9)		medER Y.A (ppt as E2)(-S9)		RAR Y.A (ppt as at-RA)		AhR Y.A (ppt as b-NF)		発光細菌毒性試験	
		H21		H21		H21		H21		H21	
		n	平均	n	平均	n	平均	n	平均	n	平均
鉛川	久保橋	2	1.1	2	17.7	1	2.4	1	430	2	0.0445
迫川	若柳大橋	1	0.1	1	N.D.	1	N.D.	1	36	1	0.0025
北上川	神取橋	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	32	1	0.002
荒川	葦神橋	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	33	1	0.0025
	荒川橋上流	4	0.1	4	0.5	4	4.3	4	38	4	0.0023
	荒川橋下流	4	0.2	4	1	4	6.1	4	35	4	0.0027
白石川	柴田大橋	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	26	1	0.002
阿武隈川	江尻橋	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	53	1	0.002
鳴瀬川	鳴瀬橋	1	0.1	1	N.D.	1	5.6	1	18	1	0.002
	共同排水溝	1	0.2	1	0.8	1	N.D.	1	24	1	0.0025
	三本木橋	1	N.D.	1	N.D.	1	1.7	1	13	1	0.002
	感恩橋	1	0.1	1	N.D.	1	N.D.	1	16	1	0.002
吉田川	二子屋橋	2	0.2	2	0.4	2	4	2	31	2	0.0032
	大郷大橋	8	0.1	8	0.5	8	3.1	8	35	8	0.0023
奥田川	境橋	2	0.4	2	0.4	2	5.2	2	31	2	0.0032
砂押川	念仏橋	2	0.6	2	0.7	2	1.3	2	34	2	0.0025
増田川	小山橋	1	N.D.	1	N.D.	1	9.8	1	28	1	0.0025
伊豆沼	出口	1	0.1	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	0.002
県内河川水平均値		0.20		1.40		3.1		43		0.0048	
鉛川を除く県内河川水平均値		0.15		0.42		3.3		32		0.0024	
全国河川水平均値 ²⁾		0.22		0.75		1.4		28		0.0042	

hER Y.A.の平均は 0.20ppt as E2 (以下、単位は ppt とのみ表記。) であり、全国平均²⁾の 0.22ppt と同程度である。全国平均²⁾以上の活性が見られた河川は鉛川久保橋、奥田川境橋、砂押川念仏橋であった。

鉛川久保橋は活性が過去と同様にみられ、阿部らの報告¹⁾では燃焼、加熱工程を有する事業場排水に起因すると記述しているが、今回も同様であると推定される。砂押川念仏橋は市街地を経由した下流のため、人間活動による排水由来と推定される。奥田川境橋は田園地帯の河川であるが、上流域は事業場誘致のため開発中である。

medER Y.A.の県内河川の平均は 1.40ppt as E2 (以下、単位は ppt とのみ表記。) であり、全国平均²⁾の 0.75ppt に比較して高値である。特に鉛川久保橋で平均 17.7ppt と高値であった。鉛川を除いた平均は 0.42ppt と全国平均以下である。medER Y.A.は hER

Y.A.に比べて化学物質に対する活性が高く、鉛川久保橋において顕著に高い活性がみられた原因は前述のとおりである。

RAR Y.A.の県内河川の平均は 3.1ppt as at-RA (以下、単位は ppt とのみ表記。) であり、全国平均²⁾の 1.4ppt と比較しても高値である。

AhR Y.A.の県内河川の平均は 43ppt as b-NF (以下、単位は ppt とのみ表記。) であり、全国平均²⁾の 28ppt と比較しても高値である。特に鉛川で 430ppt と特異的に高値であった。鉛川を除いた平均は 32ppt と全国河川の平均値程度である。

4 種の酵母アッセイ全てが全国平均²⁾以下の地点は白石川柴田大橋、鳴瀬川感恩橋、伊豆沼出口の 3 地点であった。AhR Y.A.を除く 3 種の酵母アッセイで全国平均²⁾以下であった地点は上記 3 地点に加え迫川若柳大橋、北上川神取橋、荒川葦神橋、阿武隈川江尻橋

の4地点である。その他の11地点はいずれか二つ以上の酵母アッセイで全国平均²⁾値以上であった。

今回調査した地点の中で、鉛川久保橋を除き酵母アッセイで特徴的に高い活性を示す地点はなかった。

発光細菌試験については、試験した濃度範囲で毒性の認められない試料は500倍濃縮値をIC50とし0.002とした。弱い毒性が認められたものは400倍濃縮値をIC50とし0.0025とした。1/IC50における河川水の評価基準はないことから、国環研との共同研究における全国110河川の平均との比較を行った。

県内河川全調査地点における1/IC50の平均は0.0048、標準偏差は0.0137であった。平成22年度の県内6河川を含む1/IC50の全国平均²⁾は0.0042、標準偏差は0.0028である。県内河川18地点35件の平均は全国平均²⁾よりやや上回るが、鉛川久保橋を除くと平均は0.0024、標準偏差0.0007となり、全国110河川と比較しても県内河川の発光細菌毒性は低値

である。

また、全国110河川中において1/IC50の最大は0.016であった。全国河川調査と採水時期が異なったために共同研究の集計に含まれなかった鉛川久保橋の0.083は全国河川の最大値²⁾よりも5倍程度高活性であり、前述した酵母アッセイと同様に特徴的である。

平成22年度の3河川5地点の結果を表2に示す。鉛川久保橋は平成21年度と同様に高い活性を認めた。

また、他の2河川は平成21年の県内河川平均と同程度であった。

発光細菌試験の3河川5地点での調査による県内河川の平均は0.0051、鉛川久保橋を除くと平均は0.0028、標準偏差0.00091となった。鉛川久保橋は平成21年度と同様に高活性を示していた。

表2 河川のバイオアッセイ結果(平成22年度)

河川・事業場名	地点・採水名	hER Y.A (ppt as E2)(-S9)		medER Y.A (ppt as E2)(-S9)		RAR Y.A (ppt as at-RA)		AhR Y.A (ppt as b-NF)		発光細菌毒性試験	
		H22		H22		H22		H22		H22	
		n		n	平均	n		n		n	
鉛川	久保橋	1	0.38	1	5	1	0.92	1	610	1	0.032
荒川	荒川橋上流	5	N.D.	5	0.2	4	2.9	5	34	5	0.0027
	荒川橋下流	5	N.D.	5	N.D.	4	1.7	5	25	5	0.0028
松川	蔵王大橋上流	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	22	1	0.003
	蔵王大橋直下	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	0.0025
県内河川水平均値(H21)		0.20		1.40		3.1		43		0.0051	
鉛川を除く県内河川水平均値(H21)		0.15		0.42		3.3		32		0.0028	
全国河川水平均値(H21) ²⁾		0.22		0.75		1.4		28		0.0042	

3.2 事業場調査

平成21年度に調査した3業種の排水の結果を表3に示す。

表3 事業場のバイオアッセイ結果(平成21年度)

事業場調査	事業場名	hER Y.A (ppt as E2)(-S9)		medER Y.A (ppt as E2)(-S9)		RAR Y.A (ppt as at-RA)		AhR Y.A (ppt as b-NF)		発光細菌毒性試験	
		n	(-S9)	n	(-S9)	n		n		n	
事業場調査	半導体工場	1	0.4	1	2.3	1	N.D.	1	28	1	0.017
	合成ゴム工場	1	0.8	1	10.7	1	1.5	1	360	1	0.0099
	製紙工場	1	0.2	1	11.5	1	N.D.	1	1200	1	0.024
鉛川を除いた県内河川の平均値		0.15		0.42		3.3		32		0.0024	
全国河川水平均値(H21) ²⁾		0.22		0.75		1.4		28		0.0042	

事業場排水の1/IC50の平均は0.017、標準偏差0.0070であった。

酵母アッセイでの事業場排水の評価基準はないこと、また、製紙工場以外は排水を河川放流することから、国環研との共同研究における河川の全国平均²⁾の10倍値を評価基準とした。

hER Y.A.は河川の全国平均²⁾0.22pptと比較すると合成ゴム工場がやや高い活性を示した以外は全国河川平均とほぼ同じ程度であった。medER Y.A.は河川の全国平均²⁾0.75pptと比較して合成ゴム工場と製紙工場が10倍以上高い活性を示すが、半導体工場は全国平均²⁾の3倍程度であった。RAR Y.A.は合成ゴム工場以外はN.D.であり、全国平均²⁾の1.4pptと

比較しても同程度（1.5ppt）でありほとんど活性が見られなかった。AhR Y.A.は河川の全国平均²⁾28pptに比較して半導体工場は全国平均²⁾と同じ28pptであったが、合成ゴム工場は13倍であった。

事業場の発光細菌毒性試験は河川の全国平均²⁾

0.0042と比較すると2倍から5倍の毒性を示した。1/IC50は合成ゴム工場で0.010、半導体工場は0.016、製紙工場0.024であった。

平成22年度は対象業種を4業種増やして5業種9地点について調査した。結果を表4に示す。

表4 事業場のバイオアッセイ結果（平成22年度）

河川・事業場名	地点・採水名	hER Y.A (ppt as E2)(-S9)		medER Y.A (ppt as E2)(-S9)		RAR Y.A (ppt as at-RA)		AhR Y.A (ppt as b-NF)		発光細菌毒性試験	
		H22		H22		H22		H22		H22	
		n		n		n		n		n	
工業製品リサイクル業	放流水	1	1.7	1	26	1	1.9	1	2400	1	0.0099
半導体工場	工程水①	1	N.D.	1	0.7	1	N.D.	1	36	1	0.0025
	工程水②	1	N.D.	1	N.D.	1	2.9	1	53	1	0.002
繊維製品製造業	工程水	1	0.66	1	5.5	1	N.D.	1	26	1	0.0054
合成樹脂製造業	工程水①	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	0.0025
	工程水②	1	N.D.	1	5.3	1	N.D.	1	17	1	0.0066
プラスチック製造業K	工程水①	1	0.2	1	5.9	1	N.D.	1	32	1	0.0071
	放流水	1	0.2	1	6.4	1	N.D.	1	21	1	0.0025
プラスチック製造業A	工程水	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	38	1	0.0026
鉛川を除く県内河川水平平均値(H21)		0.15		0.42		3.3		32		0.0051	
全国河川水平平均値(H21) ²⁾		0.22		0.75		1.4		28		0.0028	

事業場排水の5業種6事業場9地点での1/IC50の平均は0.0046であった。

工業製品リサイクル業は特異的にエストロゲン活性が高い事業場であり、今回の調査では4種類の酵母アッセイ全てで全国平均²⁾より高い活性を示し、過去の調査で特異的な高いエストロゲン活性を示したmedER Y.A.とAhR Y.A.で高い活性を認めた。工業製品リサイクル業を除く4業種についてはmedER Y.A.で高い活性を示した以外は全国平均²⁾程度か活性が見られなかった。

半導体工場の工程水については排水基準項目のすべてを測定したが、工程水①の生物学的酸素要求量（以下BOD）以外は基準を満たしていた。工程水①のBODはDO5がDO1より高い現象によりBOD測定不能であった。

3.3 粗分画結果

フロリジルカラムによる粗分画の各画分の酵母アッセイ結果と分画しない（以下分画(-)）酵母アッセイの結果を表5に示す。両者を比較したところ、合成樹脂製造業の工程水①では分画(-)で酵母アッセイ活性が認められなかったが、粗分画した2画分で活性を検出した。分画(-)で検出した活性より、粗分画の各画分で検出した活性を足し合わせた活性が高いものや、今回粗分画の酵母アッセイの導入が、分画(-)の酵母アッセイを実施した時より遅く、同時にアッセイ出来なかったため多少の活性が失われた可能性は否定できないが、粗分画の各画分で検出した活性を足し合わせた活性の方が小さく、分画することで活性が減少したり、失われたりしたと考えられる検体があった。

事業場排水にフロリジルカラムによる粗分画の酵母アッセイを適用することで、隠れていた活性を顕在化することや活性が低減化することが確認された。このことから、アゴニスト活性やアンタゴニスト活性を有する物質の存在が推定される。

4 まとめ

今回調査した河川調査地点の中で、鉛川久保橋を除きバイオアッセイで特徴的に高い活性を示す地点はなかった。

事業所調査については、酵母アッセイでの事業場排水の評価基準はないこと、また製紙工場以外は排水を河川放流することから、白石らとの共同研究における河川の全国平均²⁾の10倍値を評価基準としたが、これを超えるような事業所があり、詳細調査が必要と思われるような事業所もあった。

事業場排水にフロリジルカラムによる粗分画の酵母アッセイを適用することで、隠れていた活性を顕在化することや活性が低減化することが確認された。このことから、アゴニスト活性やアンタゴニスト活性を有する物質の存在が推定された。

参考文献

- 1) 阿部郁子, 大金仁一, 阿部公恵, 高橋紀世子, 栗野健, 佐々木久雄, 嵯峨京時: 宮城県保健環境センター年報, 25, 98-102(2007)
- 2) 白石不二雄, 私信

表5 粗分画による酵母アッセイ(−S9)結果(平成22年度)

河川・事業場名	分画	hER Y.A (ppt as E2)(−S9)		medER Y.A (ppt as E2)(−S9)		RAR Y.A (ppt as at-RA)		AhR Y.A (ppt as b-NF)	
		H22		H22		H22		H22	
		n	平均	n	平均	n	平均	n	平均
鉛川	分画(−)	1	0.38	1	14	1	0.92	1	610
久保橋	分画FL1	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.		−
	分画FL2	1	0.41	1	5.7	1	N.D.	1	560
	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.
工業製品リサイクル業 放流水	分画(−)	1	1.7	1	75	1	1.9	1	2400
	分画FL1	1	N.D.	1	3.5	1	N.D.	1	540
	分画FL2	1	1.7	1	29	1	N.D.	1	2300
半導体工場 工程水①	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.
	分画(−)	1	N.D.	1	0.7	1	N.D.	1	36
	分画FL1		−		−		−		−
半導体工場 工程水②	分画FL2		−		−		−		−
	分画FL3		−		−		−		−
	分画(−)	1	N.D.	1	N.D.	1	2.9	1	53
繊維製品製造業 工程水	分画FL1		−		−		−		−
	分画FL2		−		−		−		−
	分画FL3		−		−		−		−
合成樹脂製造業 工程水①	分画(−)	1	0.66	1	5.5	1	N.D.	1	26
	分画FL1	1	N.D.	1	N.D.		−	1	N.D.
	分画FL2	1	0.62	1	2.3		−	1	86
合成樹脂製造業 工程水②	分画FL3	1	0.36	1	0.66		−	1	N.D.
	分画(−)	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.
	分画FL1	1	N.D.	1	2		−	1	110
合成樹脂製造業 工程水②	分画FL2	1	N.D.	1	2.3		−	1	180
	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.		−	1	N.D.
	分画(−)	1	N.D.	1	5.3	1	N.D.	1	17
プラスチック製造業K 工程水	分画FL1	1	N.D.	1	N.D.		−	1	N.D.
	分画FL2	1	0.17	1	3		−	1	25
	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.		−	1	N.D.
プラスチック製造業K 放流水	分画(−)	1	0.2	1	5.9	1	N.D.	1	32
	分画FL1	1	N.D.	1	1.2		−	1	52
	分画FL2	1	0.3	1	4.9		−	1	76
プラスチック製造業A 工程水	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.		−	1	24
	分画(−)	1	0.2	1	6.4	1	N.D.	1	21
	分画FL1	1	N.D.	1	N.D.		−	1	41
プラスチック製造業A 工程水	分画FL2	1	0.5	1	5.6		−	1	78
	分画FL3	1	N.D.	1	1.2		−	1	N.D.
	分画(−)	1	N.D.	1	N.D.	1	N.D.	1	38
県内河川水平均值(H21)	分画FL1	1	N.D.	1	N.D.		−	1	24
	分画FL2	1	N.D.	1	N.D.		−	1	76
	分画FL3	1	N.D.	1	N.D.		−	1	N.D.
鉛川を除く県内河川水平均值(H21)		0.20		1.40		1.4		3.1	
全国河川水平均值(H21) ²⁾		0.15		0.42		0.42		3.3	
		0.22		0.75		0.75		1.4	