

◆ 水循環における水質リスク評価特集 ◆

遺伝子組み換え酵母法による下水中のエストロゲン様活性の測定

— 3種類の組み換え酵母法の比較 —

宮本宣博* 斎藤正義** 玉本博之*** 田中宏明****

1. はじめに

ダイオキシンや内分泌攪乱化学物質といった、微量化学物質による環境汚染が社会的な問題となっている。このような背景から国内でも内分泌攪乱化学物質の実態調査が実施され、アルキルフェノール類やフタル酸類といったエストロゲン様の作用を持つ化学物質(以後、エストロゲン様物質)が、環境水や下水に含まれていることが明らかとなっている^{1),2)}。環境水中や下水中では、これらの実態調査の対象物質に加えて、分解生成物などの非意図生成物の存在についても考慮する必要があるため、これらの物質を総合的に評価していく必要がある。この総合的な評価を行なう手法として生体反応を利用したバイオアッセイによる評価法が近年注目されてきている。現在までにエストロゲン様物質の検出技術として、人の乳がん由来の細胞(MCF-7細胞)を用いた試験や、遺伝子の組み換え操作を行なった酵母を用いた試験(以後、組み換え酵母法)などが知られているが、組み換え酵母法は操作が簡便で、多くの試料を測定することが可能であるため、環境試料への適用について多くの検討がなされてきた^{3),4),5)}。

これまで多くの研究者は、異なる遺伝子組み換え酵母株を用いた試験法で評価を行なってきたが、これら遺伝子組み換え酵母株の特徴を踏まえた評価についてはほとんどなされていない。また実際の下水試料を用いて比較評価を行なった例は全くないのが現状である。

筆者らはこれまで Brunel 大学, Chemical Industry Institute of Toxicology(CIIT), 大阪大学がそれぞれ開発した遺伝子組み換え酵母を用いた測定方法を導入し、下水試料や環境試料への適用と測定の簡便化について検討を行ってきた^{6),7)}。ここでは、これら3種類の遺伝子組み換え酵母によって得られる、標準物質のエストロゲン様活性を比較するとともに、下水試料の測定への適用性について評価した。

2. 遺伝子組み換え酵母

遺伝子組み換え酵母は、英国 Brunel 大学の Sumpter 教授、Chemical Industry Institute of Toxicology の Gaido 博士、大阪大学大学院の西原教授からそれぞれ譲渡を受けた。ここではこれらの3株をそれぞれ Sumpter 株、CIIT 株および Two-hybrid 株と呼ぶことにする。

これら3種類の酵母株の特徴を表-1に示すが、組み込まれている遺伝子の種類、受容体導入部位等が異なっている。組み込まれている遺伝子は、エストロゲン受容体発現遺伝子(hER, rER: 女性ホルモン受容体を生成する遺伝子)、エストロゲン受容体応答部位(ERE: 女性ホルモンとの結合により、活性化したエストロゲン受容体が結合する応答部位遺伝子)およびレポーター遺伝子(lacZ: 応答部位の反応によって発現し、β-ガラクトシダーゼを生成させる遺伝子)であるが、Two-hybrid 株にはこれらに加えて哺乳類細胞に存在するコアクチベーター発現遺伝子(エストロゲン受

表-1 供試した3種類の酵母株の種類

酵母株	エストロゲン受容体	受容体導入部位	コアクチベータ	レポーター遺伝子	参考文献
Sumpter 株	ヒト由来	酵母ゲノム	—	lacZ	Routledge et al. ³⁾
CIIT 株	ヒト由来	プラスミド	—	lacZ	Gaido et al. ⁴⁾
Two-hybrid 株	ラット由来	プラスミド	○	lacZ	Nishikawa et al. ⁵⁾

Measurement of Estrogen-like Activity in Sewage and Treated Wastewater using DNA Recombinant Yeast
— Comparison of Yeast-based Estrogen Receptor Assays —

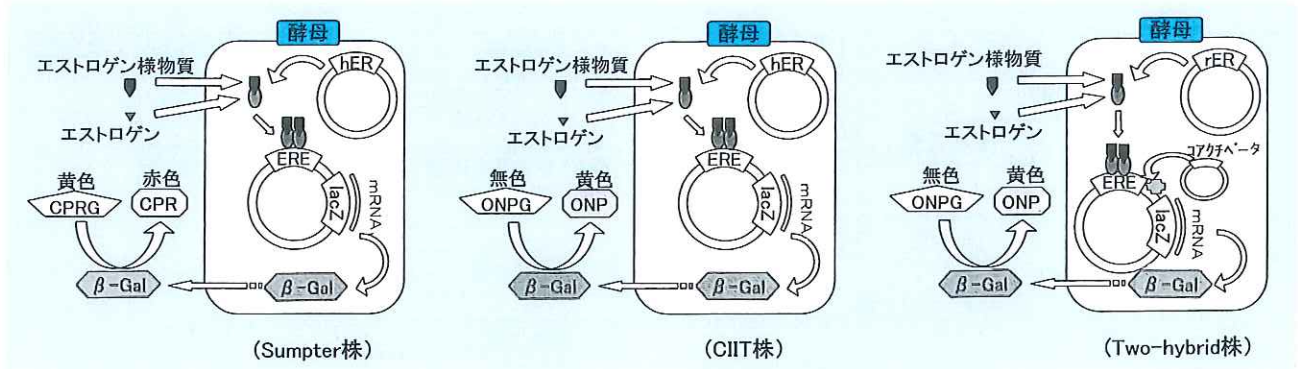


図-1 3種類の酵母法測定原理の比較

容体応答部位の反応を促進してレポーター遺伝子に伝えるタンパク質群を生成する遺伝子)が組み込まれており、哺乳類細胞により近い反応機構となっている。またこれら3種類の組み換え酵母法の測定原理を図-1に示すが、女性ホルモン受容体にエストロゲンやエストロゲン様物質がエストロゲン受容体と結合すると、β-ガラクトシダーゼが産生されるよう設計されており、発色試薬との反応により発色の程度が変化し、エストロゲン様物質を測定することが可能になっている。

3. 試験方法

3.1 標準物質

標準物質は人畜由来ホルモン、合成ホルモンの他に、内分泌かく乱作用が疑われているアルキルフェノール類、フタル酸エステルなどのエストロゲン様物質、合計13物質を用いた。なお3種類の測定法で用いた標準物質は、それぞれ同一ロットのものを使用した。

3.2 下水試料

下水試料は固相抽出法を用いて濃縮試料とした。すなわち試料1Lをグラスファイバーフィルター(GF/Bフィルター：保持粒子径1.0μm)を用いてろ過し、ろ液を固相カートリッジ(Sep-Pak C18)に保持させた後、メタノールによって溶出させた。GF/Bフィルターに残った残渣については、メタノールを加え超音波抽出を行なった後、前述の使用済みのC18カートリッジに通水し残渣を除去した。これらの抽出液を混合し、ロータリーエバポレーター(濃縮装置)によって濃縮し、液量を約1mLに調整した。この試料を窒素気流下で乾固した後、ジメチルスルホキシド(DMSO)100μLに転溶した。試料は組み換え酵母法の測定前に5倍希釈し、最終濃縮倍率を2,000倍濃縮とし、さら

にこの試料を測定時に段階的に希釈して組み換え酵母試験の試料とした。

3.3 遺伝子組み換え酵母による測定方法

(1) Sumpter株による測定方法

Sumpter株による測定法はRoutledgeらの方法³⁾を改良した矢古宇らの方法⁶⁾に従った。操作のフローを図-2に示す。すなわち前培養した酵母の菌体量を濁度から求め、菌数を 4.7×10^7 cells/mLに調整した。マイクロプレート上でDMSOの容器内濃度が1%以下になるよう試料を調製・希釈し、菌体を混合した測定培地を添加し、マイクロプレートリーダーによって600nmの波長の吸光度(Abs600_{0day})を測定した。その後、28℃の条件下で6日間培養を行い、再度、550nmの波長の吸光度(Abs550)と、600nmの波長の吸光度(Abs600_{5days})を測定し、これら試験法^{3),6)}に示してある計算式に従い、換算値(Corrected Absorbance)を算出した。

換算値(Corrected Absorbance)

$$= \text{Abs550} - (\text{Abs600}_{5\text{days}} - \text{Abs600}_{0\text{day}})$$

なおSumpter株は、後述する2株の測定系と比べ、培養時間は長いですが、細胞壁を破壊する操作がなく、培養後の試験操作をほとんど必要としない特徴がある。

(2) CIIT株による測定方法

CIIT株による測定法はGaidoらの方法⁴⁾を改良した斎藤らの方法⁷⁾に従った。操作のフローを図-3に示す。すなわち前培養を行った酵母を試験時の菌体量を揃えるため、吸光波長600nmの吸光度(Abs600)が1.0になるよう酵母前培養液を調整した。この酵母調整液と増殖培地をマイクロプレート上で混合した後、恒温器にて30℃の条件下で17時間、静置培養(本培養)を行った。培

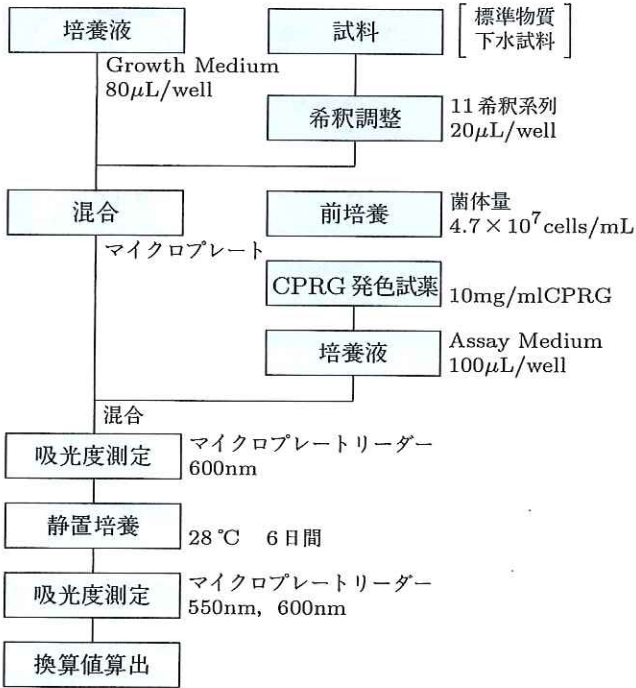


図-2 組み換え酵母法の測定フロー (Sumpter 株)

養後、マイクロプレートリーダーで 600nm の波長の吸光度 (Abs600) の測定を行った後、菌体内にある β-ガラクトシダーゼを測定するため酵素 (ザイモラーゼ) を添加し、酵母細胞壁を溶解させた。これにオルトニトロフェノール-β-D-ガラクトピラノシド (ONPG) を添加し、β-ガラクトシダーゼと反応させ、再びマイクロプレートリーダーで 420nm, 540nm の波長の吸光度 (Abs420, Abs540) を測定し、試験法⁴⁾ に示してある計算式に従って、β-ガラクトシダーゼ活性値を求めた。

β-ガラクトシダーゼ活性値

$$= (\text{Abs}420 - 1.75 \times \text{Abs}540) / (t \times q \times \text{Abs}600)$$

t: 反応時間 q: 培養液量

CIIT 株は培養時間が Sumpter 株より短く、短期間で結果を得ることが可能であるが、培養後に若干の分析操作が必要である。

(3) Two-hybrid 株による測定方法

Two-hybrid 株による測定法は Nishikawa らの方法⁵⁾ を改良して行った。Two-hybrid 株による測定方法は、CIIT 株で示した測定フローとほぼ同じである。CIIT 株による測定系との違いは、遺伝子組み換え酵母の種類と本培養の期間が 24 時間という点である。

(4) 計算方法

エストロゲン様活性の算出には 17β-エストラ

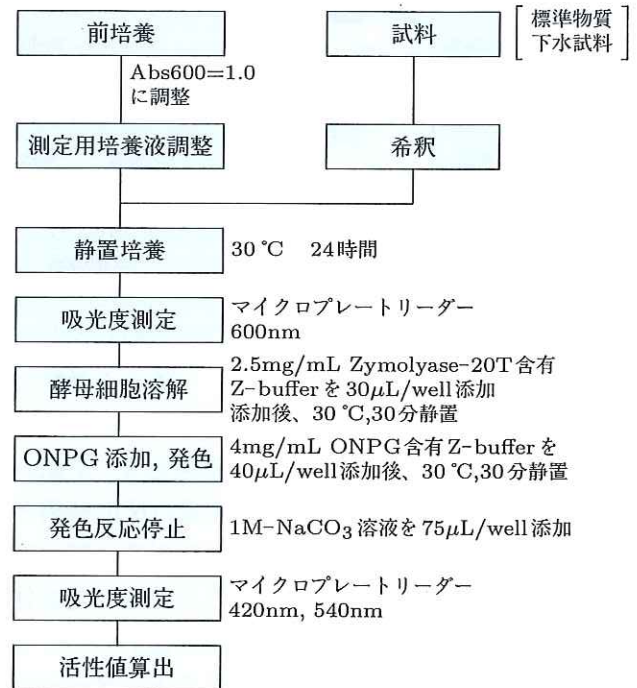


図-3 組み換え酵母法の測定フロー (CIIT 株)

ジオール濃度と β-ガラクトシダーゼ活性との用量反応曲線を用いた。この β-ガラクトシダーゼ活性値の最大値と最小値より得られる 50%活性値と、各物質の用量反応曲線から 17β-エストラジオールの 50%活性値を示す濃度を求め、両者を比較し、17β-エストラジオール等量あたりの換算値として示した。なお、試料の 50%作用濃縮倍率が得られない場合は、50%値に近い吸光度から外挿して計算を行った。

各標準物質のエストロゲン様活性のポテンシャルを比較するため、各標準物質のエストロゲン様活性を測定し、同濃度での E2 のエストロゲン様活性値を基準とした比 (比活性値: RP) によって示した。

4. 測定結果

4.1 標準物質の測定結果

3 種類の酵母株による測定法を用いて標準物質を測定し、比活性値を算出した。その結果を表-2 に示す。いずれの酵母株の測定系でも天然ホルモン、合成ホルモンの比活性値は高い値を示したが、アルキルフェノール類の比活性値は天然ホルモン類に比べて低く、17β-エストラジオールと比べ 10⁻³~10⁻⁶ 倍程度であった。またフタル酸エステル類については、2g/L の試料調整濃度でも、エストロゲン様活性が全く検出されず、比活性値

表-2 3種類の酵母株によって得られた標準物質の比活性値

標準物質		比活性値		
		Sumpter株	CIIT株	Two-hybrid株
天然ホルモン	17β-エストラジオール	1	1	1
	17α-エストラジオール	0.05	0.1	0.04
	2-ヒドロキシエストラジオール	0.01	0.3	0.05
	エストロン	0.3	0.1	0.05
	2-ヒドロキシエストロン	0.002	0.005	0.005
	エストリオール	0.002	0.004	0.002
合成ホルモン	エチルエストラジオール	0.5	0.7	2
	ジエチルスチルベストロール	0.3	0.4	2
アルキルフェノール類	4-ノニルフェノール	0.001	0.0002	0.0006
	4-n-オクチルフェノール	0.000005	0.00002	—
	4-t-オクチルフェノール	0.0006	0.0003	0.003
	ビスフェノール A	0.00006	0.00005	0.00002
フタル酸エステル類	フタル酸ジブチル	—	—	—

備考) 表中の — は2g/Lで換算可能なデータが得られなかったことを示す。

の算出ができなかった。

これらの酵母株の測定法によって得られる E2 の EC₅₀ 値 (半数影響濃度; 全体の半数が影響を受ける濃度) は、Sumpter 株が 0.09μg/L、Two-hybrid 株が 0.47μg/L、CIIT 株が 0.046μg/L であった。EC₅₀ 値が低いということは、低い濃度で反応が確認されるということを意味しており、これら3株の EC₅₀ 値の相違は、感受性 (感度) の差として表される。すなわち、E2 に対する感受性の高さは、

CIIT 株 > Sumpter 株 > Two-hybrid 株

の順となっており、最も 17β-エストラジオールに対する感受性が低い Two-hybrid 株は、他の2株が検出した 4-n-オクチルフェノールの活性を検出できなかった。またその一方で、合成ホルモン

には他の2株に比べ高い比活性を示すなど、他の2株に比べ特徴的な傾向を有することも確認された。

13種類の標準物質の比活性値を相互に比較した結果を図-4に示すが、先に示したように個別の物質では、3株の間に異なった比活性値が確認されたものの、標準物質全体で見ると、正の相関性があることが確認された。

4.2 下水試料の測定

(1) 細胞毒性物質による測定妨害

3種類の酵母株による測定系によって流入下水および下水処理水のエストロゲン様活性を測定した。その結果、図-5に示すように測定方法によっては、酵母に対する毒性 (細胞毒性) 物質の存在により、酵母が増殖できず測定が出来ないケースが確認された。

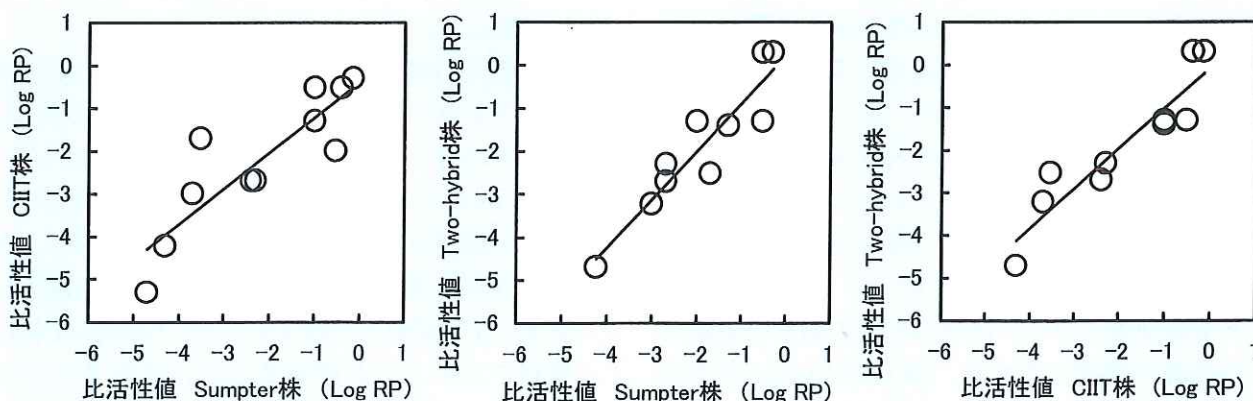


図-4 3種類の組み換え酵母法による標準物質の比活性値の比較

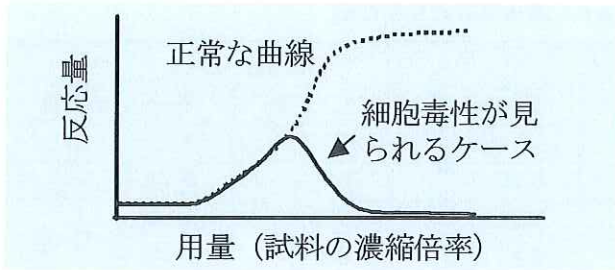


図-5 細胞毒性が見られる場合の用量反応曲線

表-3 下水試料中に含まれる細胞毒性によって測定ができなかった検体数

酵母株	流入下水	処理水
Sumpter 株	0/13	0/13
CIIT 株	5/13	0/13
Two-hybrid 株	9/13	5/13

備考： (測定のできなかった検体数)/(全検体数)

表-3 に示すように Sumpter 株では、全ての流入下水および下水処理水のエストロゲン様活性の測定が可能であったが、CIIT 株では流入下水 5 試料において酵母の増殖阻害による測定妨害が認められた。また Two-hybrid 株では流入下水 9 試料、下水処理水 5 試料についても同様の測定妨害により結果が得られなかった。

これらの結果から、下水試料に含まれる細胞毒性物質に対して最も影響を受けやすいのは Two-hybrid 株で、逆に Sumpter 株は細胞毒性物質の影響を受けにくいことが確認された。このため下水試料のように酵母の増殖を阻害する細胞毒性が存在している試料のエストロゲン様活性を測定するには、Sumpter 株が 3 株の中で最も適していると考えられた。

(2) 下水試料の測定結果の比較

下水試料を測定した結果から、酵母株の違いによるエストロゲン様活性値を比較した。なお先に示したように、Two-hybrid 株の測定結果が少ないため、ここでは、Sumpter 株、CIIT 株の 2 種類の株についてのみ整理した。また酵母の増殖阻害の影響が見られなかった流入下水 8 試料、下水処理水 13 試料を比較対象とした。Sumpter 株、CIIT 株による測定によって得られたエストロゲン様活性の関係を図-6 に示す。

下水処理水については 2 つの株の測定結果間に正の相関が確認できたが、概ね Sumpter 株の方が CIIT 株より高い値を示す傾向が見られた。

流入下水は、Sumpter 株で高い値を示した試料

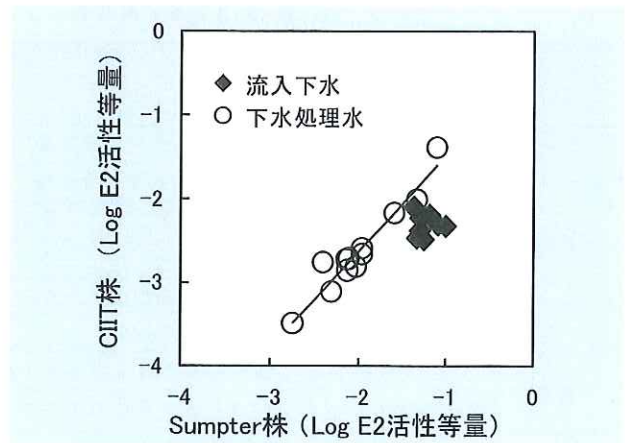


図-6 Sumpter 株, CIIT 株による流入下水、下水放流水の E2 活性等量の比較

が、CIIT 株では測定できなかったため、比較対象とした試料の濃度レベルが近く、両者の相関は明瞭とならなかった。これらの酵母株の違いによって、得られる結果が異なる場合があることに注意が必要なことが確認された。

5. まとめ

3 種類の組み換え酵母を用いて、標準物質、および流入下水、下水放流水の測定を行い、酵母株の違いによる各測定法の特性的把握と下水試料への適用を検討した。その結果、以下の知見を得た。

(1) 3 種類の酵母株の標準物質のエストロゲン様活性について整理した。その結果、E2 に対する感受性の高さは、Two-hybrid 株が最も低く、CIIT 株の 1/10 程度であった。また Two-hybrid 株は他の 2 株が検出した 4-n-オクチルフェノールの活性を検出しなかった一方で、合成ホルモンには高い比活性を示すなど、酵母株の違いによって特徴的な違いも見られた。しかし、全体として見ると正の相関性が見られることが確認された。

(2) 3 種類の酵母株による試験系によって下水中のエストロゲン様活性を測定した。その結果、下水中に含まれる細胞毒性成分の影響により、Two-hybrid 株や CIIT 株では測定の出来ない試料が確認された。しかし Sumpter 株は、全ての下水処理水の測定が可能であり、夾雑成分が多い下水試料を評価するには、Sumpter 株は有利であることが確認された。また Sumpter 株および CIIT 株の測定結果を比較した結果、Sumpter 株に比べて CIIT 株による試験系の方

が低く評価される傾向も確認された。

エストロゲン様活性の真値については確認できないため、「どちらの試験系で得られた値のほうが正確か？」という議論はしにくいですが、これらの差について理解した上で評価を進めていくことが必要である。また下水試料への適用という観点では、細胞毒性に強く下水試料の評価が行なえる点で、Sumpter 株による評価が有利であるものと考えられる。

今後は下水、環境水におけるエストロゲン様活性の実態把握していくとともに、化学分析を併せた評価を行い、下水中や環境水中に含まれるエストロゲン様活性の由来について把握する必要があるものと考えられる。

参考文献

- 1) 建設省河川局；平成 11 年度 水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果，建設省，2000. <http://www.mlit.go.jp/river/press/>
- 2) 国土交通省，下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査結果，2001/5/9 発表
- 3) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environmental Toxicology Chemistry*, Vol.15, No.3, pp.241-248, 1996.
- 4) Gaido K. W., Leonard L. S., Lovell S., Gould J. C., Babai D., Portier C. J. and McDonnell D. P. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in yeast based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicology and applied pharmacology*, Vol.143, pp.205-212, 1997.
- 5) Nishikawa J., Saito K., Goto J., Dakeyama F., Matsuo M. and Nishihara T. New Screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicology and applied pharmacology*, Vol.154, pp.76 -83, 1999.
- 6) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定，環境工学研究論文集. Vol36. pp199-204, 1999.
- 7) 斎藤正義、高橋明宏、矢古宇靖子、東谷忠、田中宏明：酵母を用いたエストロゲン様活性測定の検討、第 37 回下水道研究発表会講演集. pp270-272, 2000.

宮本宣博*



独立行政法人土木研究所
水循環研究グループ水質
チーム交流研究員
Norihiro MIYAMOTO

斎藤正義**



(前) 水循環研究グループ
水質チーム交流研究
員)
Masayosi SAITO

玉本博之***



同 水循環研究グループ
水質チーム研究員
Hiroyuki TAMAMOTO

田中宏明****



同 水循環研究グループ
水質チーム上席研究員
Hiroaki TANAKA