

◆ 水の安全特集 ◆

DNA組み替え酵母を用いた環境ホルモンの検出

田中宏明* 高橋明宏** 矢古宇靖子***

【要旨】

環境中の化学物質が野生生物の生殖等に影響を与えており、その事例が報告され、環境ホルモン問題として評価方法の検討、実態の調査、対策方法の検討等が進められている。筆者らは河川水や排水中の化学物質が生物に及ぼす影響を直接調べ水質を総合的に評価するバイオアッセイ法を環境ホルモンの測定に適用するための検討を行っている。今回は遺伝子操作によりヒトの遺伝子を組み込んだ酵母菌を用い、化学物質の女性ホルモン活性を測定する手法を下水試料に適用するための検討を行った。(1) 測定手順を検討した結果、①使用する有機溶媒はジメチルスルホキシド(DMSO)が適していた。②酵母菌数を測定し、試験に用いる菌数を一定にすることで測定結果が安定した。③試験条件は28°C、7日間が適していた。

(2) 標準物質として女性ホルモンおよびその関連化合物、アルキルフェノール等の界面活性剤、フタル酸エステル類等の可塑剤、植物由来のホルモン物質等を測定した結果、女性ホルモンおよびその関連化合物の活性が大きく、アルキルフェノール類の活性は女性ホルモンの1/1,000以下、フタル酸エステル類の活性は検出下限以下であった。(3) 実試料として下水処理場の流入水および放流水を測定した結果、女性ホルモン作用は下水処理過程で削減されることが推察された。

1. はじめに

近年、化学物質の製造、使用は増加の一途をたどっており、それの中には有害な物質も含まれていることから、水域の汚染が懸念されている。特に環境ホルモンと呼ばれる一連の化学物質は、従来考えられていた化学物質の生体影響と異なる作用機構を持つとともに、極微量でも生物に対して影響を持つことが懸念されていることから、環境中の濃度を測定、把握することが求められている。

環境ホルモンの生物に対する影響としては、女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモン等の

Detection of Endocrine Disruptors Using DNA Recombinant Yeast Assay

作用が報告されているが、建設省が化学物質の製造や使用状況等から環境中に存在する可能性が高いと判断し、実態調査の対象に選択した物質はいずれも女性ホルモン作用を持つと推定されていること、イギリスの河川でオスの魚がメス化した事例等も報告されていることから、女性ホルモン活性の測定方法について検討を行うこととした。

測定方法としては生物を用いて生物に対する影響そのものを評価する手法(バイオアッセイ)が多種類の物質が含まれる排水や環境水の生物に対する影響を総合的に評価する手法として注目されつつあることから、バイオアッセイ法を用いることとした。

環境ホルモンを測定するバイオアッセイ法としてはDNA組み替え酵母¹⁾、ヒトの乳ガン細胞²⁾等の培養細胞を用いる試験方法と魚類、マウス、ラット等の高等生物を用いる試験方法が提案されている。今回は実験操作が簡便であること、多数のサンプルの測定に適していること、毒性物質に対する耐性があること等の利点に着目し、DNA組み替え酵母を用いて環境ホルモンを検出する方法について基礎検討を行うとともに下水試料への適用を検討したので結果を紹介する。

2. 検討方法

2.1 酵母菌および測定原理

検討に用いたDNA組み替え酵母は英国Brunel大学Sumpter教授より譲渡を受けた。

図-1に示すように、この酵母にはエストロゲンレセプター(女性ホルモンと特異的に結合する生体高分子、生物体内において女性ホルモンが作用する際に必ず結合する)を生成する遺伝子と、女性ホルモンとの結合により活性化したエストロゲンレセプターの応答部位(エストロゲンレセプターと結合する遺伝子部位)およびそれに続くレポーター遺伝子(エストロゲンレセプターの結合により発現する遺伝)が組み込まれており、生体内における女性ホルモンの作用機構の一部が機能している。

酵母混合液中に存在する女性ホルモンは酵母の

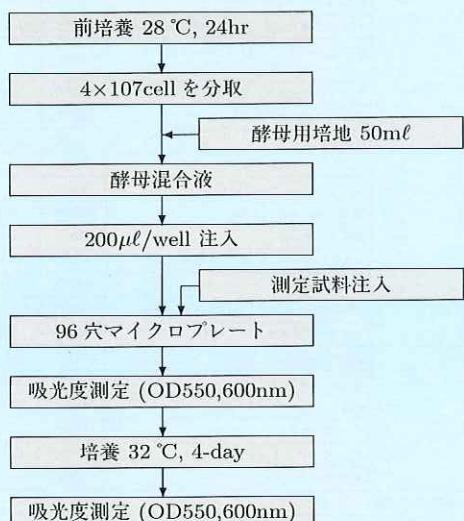
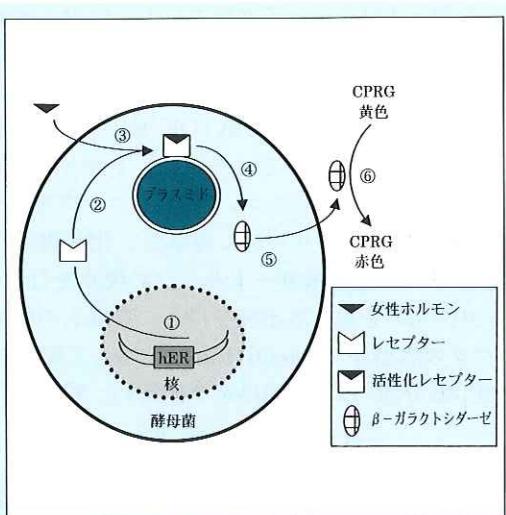


図-1 エストロゲン様物質測定の原理¹⁾と測定フロー
酵母のDNAにヒトの女性ホルモン受容体(hER)遺伝子が組み込まれており、①、定常的にhERが生産される。酵母細胞内に入った女性ホルモンはhERと結合し活性化し-②。これが酵母内のプラスミド上にある活性化レセプター反応部位に作用する。この結果、プラスミド内のプロモーター遺伝子(lac-Z)が発現し-④、酵素β-ガラクトシダーゼを産生する-⑤。この酵素量をCPRGの発色を利用して測定する-⑥。

細胞壁を透過し、酵母細胞内のエストロゲンレセプターと結合し、この結合分子が応答部位に結合する。その結果レポーター遺伝子が発現し、酵素β-ガラクトシダーゼが生成され、発色基質(β-ガラクトシダーゼ)の作用を受けて赤色に発色する物質、クロロフェノールレッドβ-D-ガラクトピラノシド(CPRG)が黄→赤に発色する。ここで女性ホルモン量(濃度)と酵母菌が生成するβ-ガラクトシダーゼの量(=基質の赤色濃度)には一定の相関があるため、酵母混合液の色を測定することで

女性ホルモンの量を求めることができる。

エストロゲンレセプターは女性ホルモン以外の化学物質(=女性ホルモン作用を持つ化学物質:エストロゲン様物質)とも結合することがわかっており、それらが試料中に存在した場合、エストロゲンレセプターへの結合力に応じて検出され、試料の女性ホルモン作用を測定することができる。さらに本測定法により検出された女性ホルモン作用は、測定メカニズムが動物の体内におけるホルモンの作用機構の一部であることから、生物への影響を判断する材料になると考えられる。

測定手順は酵母菌の作成者が提案するマニュアル(OESTROGEN(hER) SCREEN PROTOCOL)に準拠した。概略のフローを図-1に示す。マニュアルでは培養を96穴マイクロプレートにて行い、培養前の状態をマイクロプレートリーダーで測定(OD550:CPRGの発色、OD600:酵母の菌体濃度)した後、恒温器にて32°C、4日間静置培養(1回振とう攪拌/日)を行う。培養後、再度マイクロプレートリーダーで測定(OD550、OD600)し、以下の式(1)に従い換算値を求める(試料の色の影響を除くため、培養後の測定値から培養前の測定値を差し引く)。

$$\text{換算値} = \text{供試試料の OD550 値} - (\text{供試試料の OD600 値} - \text{Blank の OD600 値}) \quad (1)$$

2.2 測定条件の検討

マニュアルに記載されている測定方法を確認するとともに、より安定した測定を行うことを目的として、使用する有機溶媒の検討、培養温度および培養時間の検討、酵母菌体量の検討を行った。

2.2.1 使用溶媒の検討

測定対象となる化学物質および環境試料等の濃縮物は溶媒に溶解する必要がある。しかし、マニュアルに記載されているメタノール(MeOH)は揮発性が高い為、濃度変化が起こりやすく、取扱に注意が必要である。そこで酵母菌に対して毒性が低く、かつより揮発性の低い溶媒としてエタノール(EtOH)、ジメチルスルホキシド(DMSO)を選定し、各有機溶媒を使用した際の本測定方法の安定性を比較した。

標準物質として17βエストラジオールを用い、それぞれ3種類の溶媒を用いて希釈系列を作成し、測定操作を行った。このときMeOH、EtOH

は氷浴上で作業を行い、マニュアル通り、マイクロプレートのウェル内で揮発させ、難揮発性であるDMSOは溶液(20%DMSO)を酵母混合液と混合した。また、試験者間による操作上のばらつきを確認するため、異なる試験者2人により同様に希釈系列を作成し、測定を行った。

2.2.2 培養温度および培養時間の検討

マニュアルでは32°Cで4日間培養(1回振とう攪拌/日)を行うことになっている。ここでは17βエストラジオールを用い、32°Cおよび28°Cの条件で培養し、培養温度の比較および最適な発色が得られる培養期間の検討を行った。

2.2.3 植菌量の検討

本測定方法は酵母菌が生成するβ-ガラクトシダーゼの量から測定試料の持つ女性ホルモン作用を測定するため、試験に用いる酵母菌数を一定にすることが重要と考えられる。

始めに、マニュアルに従い、前培養を行った場合の前培養液中の酵母菌数濃度を、簡便な寒天平板培地を用いたコロニーカウント法により測定した。

次に測定に用いる酵母菌数が異なった場合、測定結果にどのような影響を及ぼすのか検討するため、17βエストラジオール、ビスフェノールA、ヒドロキシエストラジオールの3物質を用いて、酵母混合液に加える酵母菌数を 5×10^6 、 4×10^7 cellsの2条件として結果を比較した。

2.3 標準物質の測定

環境庁が実施している環境ホルモンの実態概況調査での調査対象項目を参考とし、建設省における環境ホルモンの実態調査対象物質(アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、ビスフェノールA、クロロフェノール類)、芳香族化合物、陰イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、植物由来およびヒト由来のホルモン類から標準物質(表-1)を選定し、それらの女性ホルモン作用を2.2で検討した測定方法に従って測定した。測定結果から、17βエストラジオールに対する標準物質の女性ホルモン作用の相対強度を17βエストラジオール比活性値として求めた(17βエストラジオールの容量反応曲線の最大発色50%阻害濃度をIとし、各物質の容量反応曲線から求めた50%阻害濃度との比較により換算した)。

2.4 実試料の測定

下水処理場の流入水、放流水を採水し、2.2で検

討した測定方法に従って女性ホルモン作用を測定した。試料はそのままでは女性ホルモン作用が低いため、濃縮を行う必要がある。濃縮操作は、試料水1ℓを、ガラス纖維ろ紙(GF/B)で吸引ろ過し、ろ液と残渣に分ける。ろ液は、予め MeOH、純水各10mlを通水してコンディショニングを行ったC18固相カートリッジに通水し、化学物質を吸着させた。通水後カートリッジの脱水を行い、MeOH10mlを通し溶出液を得た。ろ紙上の残渣はガラス容器中で MeOH15mlを加えて超音波処理(30分間)による抽出を2回行い、得られた

表-1 供試標準物質一覧

*17βエストラジオールを1として

| | 物質名 | 略号 | 比活性値* |
|------------|-----------------------------------|-------|-----------|
| ホルモン類 | 17βエストラジオール | 17β | 1.00 |
| | 17αエストラジオール | 17α | 0.05 |
| | 17βエストラジオール-3-サルフェイト | 17BS | 0.00004 |
| | βエストラジオール-3-サルフェイト-17-グルクロニド | BSG | — |
| | 2-ヒドロキシエストラジオール | HEDL | 0.01 |
| | βエストラジオール-17-アセテート | EDA | 0.05 |
| | エストロン | ESN | 0.3 |
| | エストロンβ-D-グルクロニド | EDG | — |
| | エストロン-3-サルフェイト | E3S | — |
| | 2-ヒドロキシエストロン | HESN | 0.002 |
| | エストリオール | ESL | 0.002 |
| | エストリオール-3-β-D-グルクロニド | E3G | — |
| | 2-ヒドロキシエストリオール | HESL | 0.00001 |
| 合成ホルモン | 17αエチニルエストラジオール | EED | 0.5 |
| | ジエチルスチルベスチロール | DES | 0.3 |
| アルキルフェノール類 | 4-t-ブチルフェノール | tBP | 0.00002 |
| | 4-n-ベンチルフェノール | PeP | 0.0007 |
| | 4-n-ヘキシルフェノール | HxP | 0.0006 |
| | 4-ヘプチルフェノール | HpP | 0.00006 |
| | 4-n-オクチルフェノール | InOP | 0.000005 |
| | 4-ノニルフェノール | 4NP | 0.001 |
| フタル酸エステル類 | フタル酸ジエチル | DEP | — |
| | フタル酸ジ-n-プロピル | DnPP | — |
| | フタル酸ジブチル | DBP | — |
| | フタル酸ジ-n-ベンチル標準品 | DPPS | — |
| | フタル酸ジヘキシル標準品 | DPS | — |
| | フタル酸ジ-2-エチルヘキシル標準品 | DOP | — |
| | フタル酸ジクロヘキシル | DCHP | — |
| | フタル酸ブチルベンジル | BBP | — |
| | フタル酸ジフェニル | DPP | — |
| | アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル標準品 | DEHA | — |
| ビスフェノールA | ビスフェノールA | BPA | 0.00006 |
| クロロフェノール類 | 2,4ジクロロフェノール | DCP | 0.000002 |
| 芳香族化合物 | ベンゾフェノン | BP | 0.0000006 |
| | 4-ニトロトルエン | 4NT | — |
| | オクタクロロスチレン | OCS | — |
| | n-ブチルベンゼン | BB | — |
| 陰イオン界面活性剤 | 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム | ABS | — |
| | 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム | SDS | — |
| 非イオン界面活性剤 | ポリエレングリコールモノ-4-ノニルフェノールエーテル(n=10) | 10NEP | — |
| | ポリエレングリコールモノ-4-ノニルフェノールエーテル(n=15) | 15NEP | — |
| | ポリオキシエチレン(10)オクチルフェノールエーテル | POE | — |
| 植物由来 | ゲニスティン | GEN | 0.00008 |

— : 2g/Lで換算可能なデータが得られなかったもの

MeOH をろ液の抽出に用いた使用済みの C18 固相カートリッジに通し、残渣を除去した抽出液を得た。カートリッジからの溶出液と残渣からの抽出液を合わせ、ロータリーエバポレーターを用いて(40 °C 以下)約 1ml に濃縮後、窒素ガスの吹き付けにより乾固させる。濃縮物に DMSO 100 μ l を加え、溶解した後、純水 400 μ l を加え濃縮試料(20%DMSO 溶液、2000 倍濃縮液)とした。

今回は、試料中の女性ホルモン作用の総量を 17β エストラジオールに換算した 17β エストラジオール活性等量として求めた(17β エストラジオールの容量反応曲線から最大発色の 50% 阻害濃度を求め、その濃度を実試料の容量反応曲線から得られた発色 50% 阻害の濃縮倍率の濃度と見なし、さらに濃縮倍率 1 倍(原水)当たりに割り戻して換算)。

また、下水中の女性ホルモン作用に占める割合が高いと報告³⁾のある 17β エストラジオールの濃度を測定するため、同様の濃縮操作を行い、ELISA 法 (Assay Design 社製、Correlate EIA 17β -Estradiol Enzyme Immunoassay Kit を使用)で測定した。

3. 結果

3.1 測定条件の検討結果

3.1.1 使用溶媒の検討

結果を図-2 に示す(AB は試験者)。なお、図-2~4,6~8 において X 軸の濃度はウェル内の濃度、Y 軸は式(1)による換算値である。

溶媒に MeOH を用いた場合、氷浴上で作業を行ったにもかかわらず調整時に揮発したためか試験者間での発色の差が大きかった。溶媒に EtOH、DMSO を用いた場合は試験者間のばらつきが小さく、明確な容量反応曲線が得られた。しかし、EtOH は易揮発性であり、氷浴上の作業が必要となるため作業の簡略化の点から DMSO が適していると考えられた。

3.1.2 培養温度および培養時間の検討

結果を図-3 に示す。28 °C の場合 7 日間、32 °C の場合 4 日間の培養を行うことで明確な容量反応曲線が得られた。また、培養期間 4 日間より 7 日間の方が低濃度でも発色が進むため、濃度による発色の差が小さくなる傾向が見られた。活性測定において、7 日間培養は測定作業の効率が

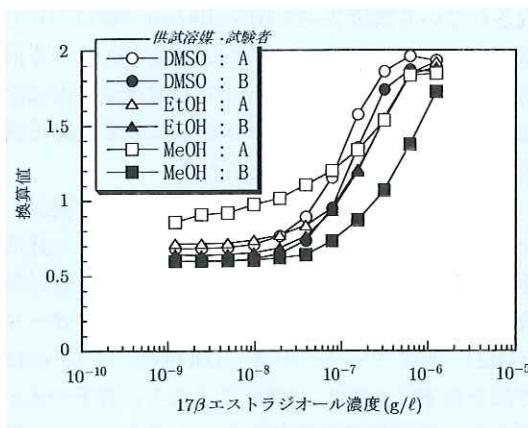


図-2 使用溶媒の検討結果

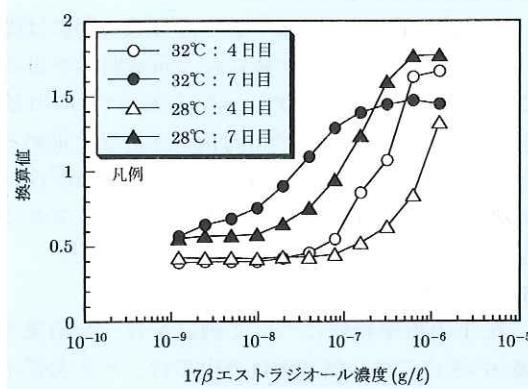


図-3 培養温度及び培養期間の検討

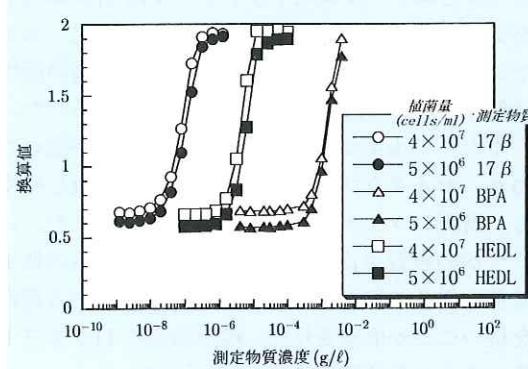


図-4 酵母菌数の測定への影響

良く、また発色の差が大きい方が活性値を計算しやすいことを考慮し、培養は 28 °C、7 日間の条件で行うこととした。

3.1.3 酵母菌体量の検討

マニュアルに従い前培養を行った際の酵母菌数濃度 (CFU) は $7.1 \sim 9.5 \times 10^6$ cells/ml であり、記

載されている数値 $2 \sim 8 \times 10^7 \text{ cells/ml}$ の約 $1/10$ であった。このためマニュアルに記載されている前培養液の添加量 ($0.5 \sim 2.0 \text{ ml}$) では酵母混合液に添加する酵母菌数が少なくなり測定に必要な酵母菌数が得られないことが考えられた。

次に植菌量による測定結果のばらつきを検討した結果を図-4に示す。 17β エストラジオール比活性値で比較すると、酵母混合液に添加した酵母菌数 $5 \times 10^6 \text{ cells}$ では、ヒドロキシエストラジオール : 0.021、ビスフェノール A : 0.00008、 $4 \times 10^7 \text{ cells}$ ではそれぞれ 0.023、0.00012 となり、若干の差が見られ、測定結果の変動を少なくするために添加する酵母菌数を一定にして酵母混合液を調整する必要があると考えられた。

一方前培養液の OD600 値と酵母数の間には図-5に示すように相関が見られ、回帰曲線を得ることができた。このため、前培養液の OD600 値を測定し、前培養液中の酵母菌数を計算で求めると同時に、遠心分離による濃縮を行い $4 \times 10^7 \text{ cells}$ の酵母菌数を酵母混合液に添加し、マニュアルに記載された酵母菌数を確保することとした。

3.2 標準物質の測定

表-1 の標準物質について測定を行った結果を図-6~8 に示す。供試物質の中では、ヒト女性ホルモンである 17β ストラジオールの活性が最も高く、合成ホルモンであるジエチルエチルベステロールとエチニルエストラジオールは 17β エストラジオールの約半分の活性を示した。また、ホルモン類に比較して、アルキルフェノール類の活性は低く、フタル酸エステル類はさらに低かった。

また、アルキルフェノール類は揮発性が高いためか、マイクロプレートのウェル内で拡散しやすく、周囲のウェルへの影響が見られた。また、いくつかの物質は高濃度になると OD600 値の低下に伴う発色の抑制が見られ、酵母菌に対する毒性を持つことが推察された。標準物質の 17β エストラジオール比活性値を表-1 に示した。

3.3 実試料の測定結果

全国 10ヶ所の下水処理場において採水した流入水および放流水の測定結果を図-9,10 に示す。流入下水を測定した結果、 17β エストラジオールは $0.026 \sim 0.056 \mu\text{g/l}$ の範囲で検出されたのに対し、酵母法を用いて測定した女性ホルモン作用の総量である 17β エストラジオール活性等量は

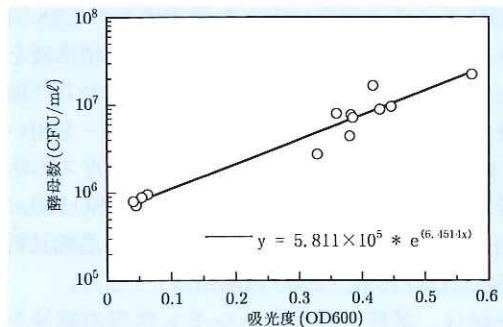
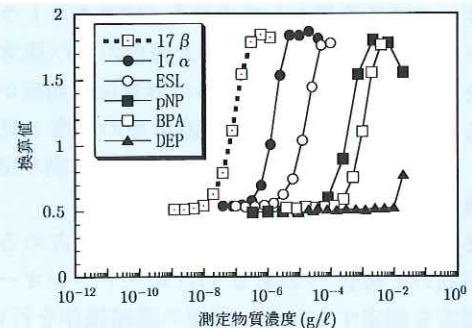
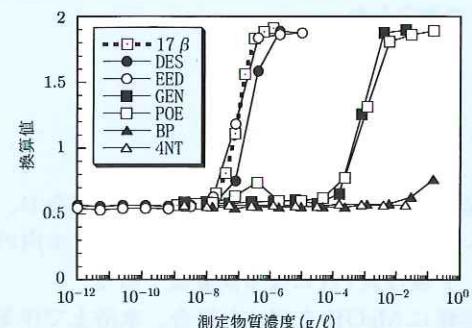
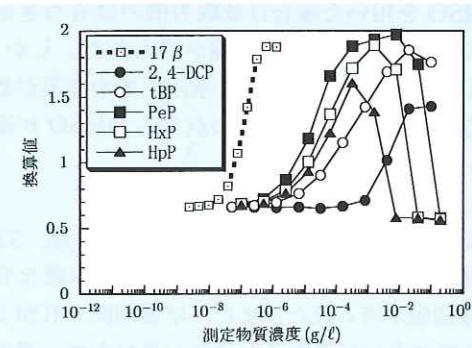


図-5 OD6600 値と酵母菌数の相関

図-6 標準物質による容量反応関係 (その 1)
($17\beta, 17\alpha, ESL, pNP, BPA, DEP$)図-7 標準物質による容量反応関係 (その 2)
($17\beta, DES, EED, GEN, POE, BP, 4N$)図-8 標準物質による容量反応関係 (その 3)
($17\beta, 2,4-DCP, tBP, PeP, HxP, HPP$)

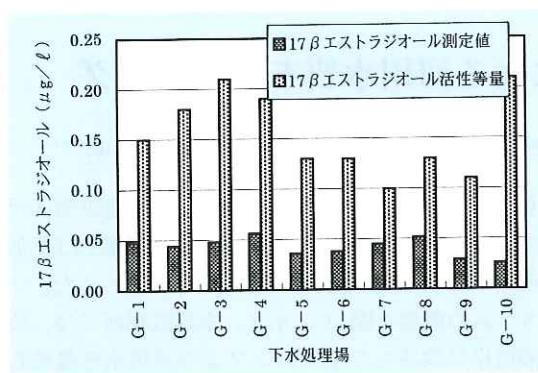


図-9 流入下水の測定結果

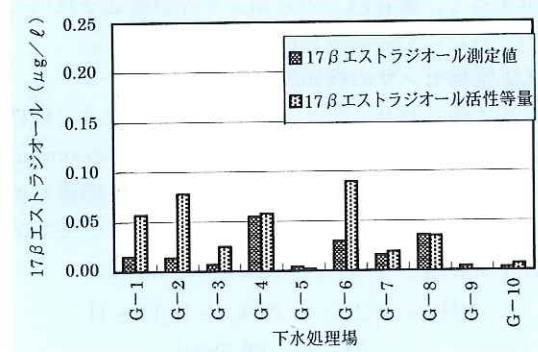


図-10 放流水の測定結果

0.100~0.210 $\mu\text{g}/\ell$ の範囲で検出された。

放流水については 17β -エストラジオールは 0.003~0.055 $\mu\text{g}/\ell$ 、 17β -エストラジオール活性等量は 0.002~0.090 $\mu\text{g}/\ell$ の範囲であった。図に示したように流入水の 17β -エストラジオールおよび 17β -ストラジオール活性等量はいずれの処理場からも検出されており、そのばらつきは放流水の結果よりも小さくなっていた。

また、 17β -エストラジオールと 17β -エストラジオール活性等量の測定結果から、下水流入水および放流水中には 17β -エストラジオール以外にも女性ホルモン作用を持つ化学物質がかなりの量存在

すること、下水処理により 17β -エストラジオールおよび 17β -エストラジオール活性等量が削減されることが示唆された。

4.まとめ

DNA組み替え酵母を用いて環境ホルモンを測定する方法を検討した結果、使用する有機溶媒の検討、培養温度および培養期間の検討、酵母植菌量の検討を行った。結果、有機溶媒にDMSOを使用すること、酵母混合液の調整時に酵母菌数を測定すること、培養条件を28°C、7日間とすることで良好かつ安定した測定結果を得ることができた。また、この方法を用いて建設省が環境ホルモンの実態調査で対象としている物質を中心に44の物質を測定し、女性ホルモン作用をヒト女性ホルモン 17β -エストラジオールと比較した結果、ピルとして用いられるエチニルエストラジオール等の 17β -エストラジオール関連化合物の女性ホルモン作用が強く、アルキルフェノールやフタル酸エステル等は弱かった。

下水処理場の流入下水及び放流水についても測定を行い、これらの女性ホルモン作用の強さを比較した結果、下水処理により女性ホルモン作用がある程度除去されていることが推察された。

参考文献

- 1) Routledge,E.J and Sumpster,J.P : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol.15, No.3, pp.241-248,1996.
- 2) Soto,A.M. et al : The E-screen assay as a tool to identify estrogens:an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 103, pp.113-122, 1995.
- 3) H.Takigami et al : Detection of Estrogen -like Activity In Sewage Treatment Process Waters, *Environ. Sanit. Eng. Res.*, Vol.12, No.3, pp.214-219,1998.

田中宏明*



建設省土木研究所
下水道部水質研究室長
Hiroaki TANAKA

高橋明宏**



建設省土木研究所
下水道部水質研究室
研究员
Akihiro TAKAHASHI

矢古宇靖子***



建設省土木研究所
下水道部水質研究室
重点研究支援協力員
Yasuko YAKOU