

# 酵母ツーハイブリッド法による東郷池流入河川水等の エストロゲン活性調査

【食品衛生室・保健衛生室・環境化学室】

福田武史 上田豊 齋尾美春 畠山恵介 山根一城

Examination of Estrogen Activity in the Togo Pond River Inflow Water Using the Yeast Two-Hybrid System

Takeshi FUKUTA, Yutaka UEDA, Miharuru SAIIO, Keisuke HATAKEYAMA, Kazuki YAMANE

## Abstract

We measured the estrogen activity of natural water from Tottori Prefecture's rivers, lakes, and wetlands using the yeast two-hybrid method, and detected 39 cases. In a year-long study conducted of the river inflow into Togo Pond, estrogen activity was detected between May and November of a single year. When compared to the results of similar studies throughout Japan, the value we detected is in line with national findings.

## 1 はじめに

内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンはこれまでの有害物質と異なり、体内で擬似ホルモンとして働くことで体内調節機能をかく乱するため、人間を含む生物の生殖機能などの生理作用に重大な影響を与える可能性があり、各種影響が危惧されている。鳥取県においても、内分泌かく乱作用の疑われるいくつかの物質について、環境中の濃度の測定を実施<sup>1)</sup>してきた。

一方、現在、化学物質の生物影響は個々の物質ごとに評価され、その化学物質を単独で生物に暴露したときの評価で使用基準や環境基準が設定されている。鳥取県の現状としては、農薬による水棲生物への悪影響の可能性が高い地域であるとの報告<sup>2)</sup>があるが、農薬は様々な種類があり、それらの複合的な作用による生物への影響が懸念されている。

県内の河川や湖沼では多種類に渡る化学物質の実態は調べられていない。よって、鳥取県での化学物質による生物へ影響を把握し、必要であれば早期に原因物質の削減等汚染防止対策を講じる必要がある。

このような、様々な化学物質の複合的な影響を検出する手法としてはバイオアッセイが有効である。今回は比較的簡便な操作で化学物質の影響を測定可能なバイオアッセイとして、遺伝子組み換え酵母を用いてエストロゲン様活性測定を行う酵母ツーハイブリッド法<sup>3) 4)</sup>を用いて調査を行った。

当所では国立環境研究所との共同研究の一環として、河川水のモニタリングに参加したので報告する。

## 2 調査方法

### 1) 調査地点

#### (1) 鳥取県内の湖沼及び河川水

県内の環境水のエストロゲン活性について一般的な傾向を探るため、2005年11月から2007年9月まで計5回、河川及び湖沼の水を用いて試験を実施した。採取地点は湖山池湖心及び流入河川4地点、東郷池湖心及び流入河川4地点、狐川(鳥取市)、野花地区水路(湯梨浜町)、玉川(倉吉市)、天神川(北栄町)、由良川(北栄町)、加勢蛇川(琴浦町)の環境水を不定期に採水し、試験に供した。

#### (2) 東郷池流入河川水

農薬の影響が懸念される東郷池流入河川である舎人川、東郷川、羽衣石川、埴見川、野花地区水路の5地点について、2007年5月から2008年3月まで毎月1回定期的に採水して試験に供した。

### 2) 試験方法

#### (1) 抽出

採取した試料は白石らの方法<sup>3)4)</sup>により抽出した。

試料1LをGF/Cグラスフィルターでろ過し、酢酸：水：メタノール(1:9:90)10mLを添加した。この試料600mLをC18ディスクで固相抽出し、これをメタノール6mLで溶出したものに窒素ガスを吹き付け濃縮乾固した。

#### (2) 分画及び精製

乾固した試料にn-ヘキサン(Hx)：ジクロロメタン(DCM)(3:1)1mLを加え溶解し、フロリジルミニカラム(500mg)に重層し、Hx:DCM(3:1)2mLで2回溶出した(Hx/DCM画分)。続いて10%アセトン-ジクロロメタン

(A/DCM) 溶液2mLで2回溶出し(A/DCM画分)、最後に、メタノール(MeOH) 2mLで2回溶出した(MeOH画分)。

溶出液はそれぞれ窒素ガスで乾固し、N,N-ジメチルスルホキシド(DMSO)60  $\mu$ Lに溶解し、酵母ツーハイブリッド・アッセイに供した。

なお、この分画操作は第15回環境化学討論会において白石らにより提唱<sup>4)</sup>され、2006年7月以降の試験において用いた。

### (3) 酵母ツーハイブリッド試験方法

#### a 使用培地、試薬など

- ・ 0.75%MSD med. :SD培地のグルコース量を2%から0.75%に変更したもの
- ・ 細胞壁破壊液 : Zymolyase 100T 1.1mgとZymolyase 20T 4.3mgを37 に加温したZ buffer (リン酸緩衝液に塩化カリウムと硫酸マグネシウムを添加したもの)7mlに溶解したもの
- ・ 発光基質液、発光促進液 : Aurora GAL-XE (MPバイオメディカル社製)

#### b 試験酵母の調整

試験に用いた酵母は独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境暴露計測研究室から提供された、ヒトエストロゲンレセプター(hER)又はメダカエストロゲンレセプター(medER)を組み込んだものを用いた。

酵母液0.8mLにMSD med. 30mLを加え、24時間30 で振とう培養。その後、10倍希釈液においてOD<sub>595nm</sub>で濁度0.180になるようにMSD med. で希釈し、プレート添加まで冷蔵保存する。(長期保存の場合、10倍希釈液においてOD<sub>595nm</sub>で濁度0.3に調整後、10%グリセロール(MSD med. で調整)に、調整済み酵母液1/10量を加え、-80 にて凍結保存する。)

#### c アゴニスト試験

まず、MSD med.を37 水浴中で室温に戻す。続いて、MSD med.480  $\mu$ L+環境試料20  $\mu$ L(25倍希釈)を調整する。

96ウェルプレートを一枚用意し、横1列目にはMSD med. を60  $\mu$ L、横2~8列目には2% DMSO添加MSD med. を60  $\mu$ L加える。

横1列目2行に、試料60  $\mu$ L添加する。横1~7列目まで、60  $\mu$ Lで段階的に希釈する(7列目の60  $\mu$ Lは廃棄)。最後に酵母浮遊液を全ウェルに60  $\mu$ L添加

し、攪拌後、加湿インキュベーターにて30・4時間静置する。

細胞壁破壊液:発光基質液=7:3で作成したものを各ウェル80  $\mu$ Lに添加し攪拌後、加湿インキュベーターにて37・1時間静置して溶菌させる。

発光促進液を発光測定装置のポンプで50  $\mu$ L/well添加しながら、3秒後の1秒間の積算化学発光強度より -ガラクトシダーゼを測定する。

データ処理は、各試料において倍率希釈濃度ごとの発光比(T/B)が4以上に示すもの、をアゴニスト陽性とした。(T:各試料において倍率希釈濃度ごとの化学発光強度の平均値、B:最終列(横8列目)のDMSO(対照)の化学発光強度の平均値。)

平行して、濃度既知の17 -エストラジオール(E2)のガラクトシダーゼ活性を測定し、試験結果をE2換算濃度として表した。

## 3 調査結果

### 1) 県内湖沼・河川水のモニタリング調査結果

#### (1) 県内河川水の調査

2005年11月に、汚染の可能性が高い都市河川として狐川(鳥取市)を、農業地域として野花地区(湯梨浜町)を選定し、河川水についてモニタリング調査を実施した。

試験結果は、狐川においてhER酵母試験で0.16pptが、medER酵母試験において0.86pptのE2に相当するエストロゲン活性が検出された。

#### (2) 湖山池及び東郷池の調査(2006年2月及び3月)

鳥取県内の主要な湖沼である湖山池及び東郷池について、湖心の上層下層及び流入河川(湖山池:枝川、湖山川、三山口川、福井川、東郷池:舎人川、東郷川、羽衣石川、埴見川)のモニタリング調査を実施した。

試験結果は、2006年2月はすべて検出下限未満であった。2006年3月は、hER酵母試験において東郷池湖心上層で0.22ppt、東郷池湖心下層で0.34pptが、medER酵母試験では東郷池湖心上層で0.28pptが検出された。

#### (3) 県内河川水の調査(2006年11月)

狐川及び野花地区の再試験を実施した。今回からC18ディスクで抽出した試料をフロリジルカラムで分画処理して酵母試験に供した。

試験結果は、hER酵母試験において野花地区で

1.34ppt、狐川で4.15pptが、medER酵母試験では狐川で2.63pptが、いずれもA/DCM画分から検出された。

#### (4) 県内河川水の調査(2007年9月)

独立行政法人国立環境研究所との共同研究で、過去に調査を行った2地点に一級河川及び二級河川等を加えた6地点の調査を実施した。

試験結果は、hER酵母試験において、由良川で0.16ppt、玉川で0.32pptが、いずれもA/DCM画分から検出された。

#### 2) 東郷池流入河川水経年調査結果

農業地域で環境中に放出される化学物質として主要な部分を占める農薬の経年変化を確認するため、東郷池流入河川水の年間調査を実施した。

結果はTable.1のとおり、農繁期と重なる5月から11月においてエストロゲン活性が散見された。表には示していないが、12月から3月において、エストロゲン活性は検出されなかった。

なお、検出されたエストロゲン活性は、ほとんどがA/DCM画分由来で、一部Hx/DCM画分由来のものがあった。

Table.1 東郷池流入河川水経年調査結果

採水年月	2007.5		2007.6		2007.7		2007.8		2007.9		2007.10		2007.11	
	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母	medER 酵母	hER 酵母
舎人川	<0.42	<0.12	1.39	<0.22	1.63	<0.14	<0.82	<0.18	<0.57	<0.20	<0.77	<0.23	0.94	<0.27
東郷川	0.48	<0.12	1.69	0.73	1.7	<0.14	1.61	<0.18	<0.57	<0.20	<0.77	<0.23	0.86	<0.27
羽衣石川	0.46	<0.12	0.80	<0.22	0.92	<0.14	1.59	<0.18	0.92	<0.20	<0.77	<0.23	0.93	<0.27
埴見川	0.61	0.25	1.79	1.58	0.79	<0.14	<0.82	<0.18	<0.57	<0.20	1.3	<0.23	1.58	<0.27
野花	1.56	<0.12	2.02	<0.22	1.33	<0.14	1.38	<0.18	2.91	0.41	<0.77	<0.23	1.7	<0.27

黄色のセルは 2ppt 以上の検出、薄黄色のセルは 1ppt 以上の検出を示す。

#### 4 考察

本県の河川水も含まれている白石らの調査結果<sup>5)</sup>によると、全国的な河川水のE2活性は何らかの特異的な発生源が無い限り、飛びぬけて高いE2活性は検出されていない。

本研究で得られた、鳥取県内で検出されたE2活性の値を全国的な値と比較したところ、鳥取県内で検出された値は最も高い場合でも全国的な値と同程度、通常検出される値では全国に比較して低いものとなっている。エストロゲン活性だけに注目した場合、当初危惧されていた農業地域における化学物質による水棲生物への影響は無いもの考えられる。

#### 5 まとめ

- 1) 鳥取県内の河川及び湖沼の環境水のエストロゲン活性を酵母ツーハイブリッド法により延べ178件測定したところ39件で検出され、検出された値は17 - エストラジオール換算で最高4.15pptであった。

- 2) 東郷池流入河川の通年調査では、単年の結果ではあるが農繁期にエストロゲン活性がわずかに検出された。
- 3) 検出された値を全国の調査結果と比較したところ、一般的に検出される数値であり、危惧された農薬による環境の汚染は無いものと思われる。

#### 6 謝辞

エストロゲン受容体導入酵母の供与及び酵母ツーハイブリッド法の試験技術についてご教授いただいた、独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 白石不二雄先生ならびに環境暴露計測研究室の皆様へ深謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 環境ホルモン/とりネット/鳥取県公式サイト  
<http://www.pref.tottori.lg.jp/dd.aspx?menuid=20426>

- 2) 高梨ルミ, 亀屋隆志, 小林剛, 糸山景子, 浦野紘平: 人の健康保護を考えた自主管理のための環境管理参考濃度の提案とPRTR対象物質への適用, 環境科学会誌, Vol.18 No.2 71-83(2005)
- 3) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏: 酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発, 環境化学, Vol.10 No.1 57-64(2000)
- 4) 白石不二雄, 鎌田亮, 深澤均, 渡辺雅之, 大谷仁己, 中嶋智子, 丸尾直子, 堀口敏宏, 白石寛明: 環境水のエストロゲン活性モニタリングのための新しい試料調製法の提案, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 492-493
- 5) 白石不二雄, 中島大介ほか: *In vitro* バイオアッセイを用いる河川水の曝露モニタリングに関する基礎的研究 - その1; 日本の13都道府県80河川水試料の調査 -, 第17回環境化学討論会講演要旨集, 594-595