

水環境における内分泌攪乱作用の 酵母 Two-Hybrid 法による評価と挙動に関する研究

学位論文内容の要旨

近年、内分泌攪乱作用という新たな毒性を有す環境汚染物質の存在が明らかとなり野生生物への様々な影響が報告されている。内分泌攪乱作用はその毒性概念がこれまでの毒性と大きく異なり、暴露時期によって作用や影響の発現濃度が大きく異なり、また非常に低濃度でその作用を発現することが指摘されている。更に内分泌系を攪乱することで生殖器障害を引き起こし、次世代にまでその影響が及ぼす可能性があり、ひいては種の存続の関わるものが危惧されている。しかし、内分泌攪乱化学物質に関する研究はまだ不十分であり、その作用メカニズムはほとんど明らかになっていないのが現状である。また、内分泌攪乱作用を評価する試験法についても基準となる試験法がなく OECD や EDSTAC が化学物質のスクリーニング法の基準化を検討している段階であり、水環境中における内分泌攪乱化学物質の挙動や内分泌攪乱作用の評価法については、研究は始まったばかりであり、その問題の大きさを考えると、内分泌攪乱作用を考慮したバイオアッセイによる水質管理が急務である。

本論文はこれらの状況をふまえ、内分泌攪乱作用の水質管理を考慮した試験法として酵母 Two-hybrid 法に注目した。本法は化学物質のスクリーニング法として開発された試験法であり、測定が比較的簡便で、迅速かつ経済的であるという特長を有している。その一方、*in vitro* 試験であるため生体内における代謝作用を考慮できないことや環境試料を評価する際の前処理法の検討や、共存物質による阻害作用等により適正な評価ができないことが考えられる。そのため、本研究では、水環境中における内分泌攪乱作用評価を目的とした酵母 Two-hybrid 法の適用とそれによる評価を行い、水環境中における内分泌攪乱作用の挙動を明らかにするとともに、内分泌攪乱作用が浄水処理過程において適正に低減されているかについて検討を行い、内分泌攪乱問題を考慮した浄水処理にあり方について提案している。

本論文は7章からなり、(1) 水環境中において認められる内分泌攪乱作用を酵母 Two-hybrid 法を用いるために、本法の環境試料を評価における様々な問題点を明らかにし、迅速かつ簡便な評価が可能な本法で適正なエストロゲン様活性の評価を行う (2) 水環境中、特に浄水処理過程において検出される内分泌攪乱作用がどのような挙動を示

し、また適正に低減されているかについて検討を行い、内分泌攪乱作用を考慮した浄水処理のあり方に提案することを目的とする。

第1章では序論として、内分泌攪乱物質の問題点やこれまでの調査・研究についてまとめ、水質管理におけるバイオアッセイのあり方についてまとめた。さらに、内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイの意義、その中における酵母 Two-hybrid 法の位置づけについて整理し、バイオアッセイを用いた水環境における内分泌攪乱作用評価と管理について述べ、本研究の目的と構成を記した。

第2章では内分泌攪乱作用を評価する酵母 Two-hybrid 法について、化学物質の評価における特性の把握とより適正な評価を行うためにオリジナルの試験法からの変更を試みた。

第3章においては、*in vitro* 試験である酵母 Two-hybrid 法においては考慮することのできない生体内の代謝作用について、これまで Ames 試験等で検討されてきた S9mix を導入することを試み、その条件について検討を行った。この試験法を化学物質に適応し、内分泌攪乱化学物質を代謝活性化も含めた評価が可能であることを明らかにした。

第4章では第2章、第3章で得られた結果に基づき、前処理を含めた酵母 Two-hybrid 法の環境試料への適用の検討を試み、水環境中における内分泌攪乱作用の評価とその原因物質の特定を行った。また、環境試料に本法を適応した際にはエストロゲン様活性発現に阻害作用が認められるため、この低減についての検討を行った結果、本法により環境試料のエストロゲン様活性を評価できることが明らかとなった。

第5章では浄水処理過程に注目し、内分泌攪乱作用がどのような挙動を示すかについて明らかにし、内分泌攪乱作用の低減にはどのような処理が有用であるかについて調査を行った。その結果、これまで一般的な行われている塩素処理においてもエストロゲン様活性が低減することが明らかとなった。

第6章においては第5章で得られた、結果を実証すべく室内実験において凝集沈殿処理、塩素処理における内分泌攪乱作用の低減のメカニズムを明らかにした。

第7章は総括として、本研究で検討を行った酵母 Two-hybrid 法について考察と位置づけについて述べ、浄水処理過程における内分泌攪乱化学物質問題における本研究の意義と今後の展開について述べた。最後の本研究の工学的意義について述べた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	真柄泰基
副査	教授	高桑哲男
副査	教授	清水達雄
副査	教授	渡辺義公
副査	助教授	亀井翼

学位論文題名

水環境における内分泌攪乱作用の 酵母 Two-Hybrid 法による評価と挙動に関する研究

内分泌攪乱作用を有する化学物質が環境中に存在することが明らかとなっている。内分泌攪乱作用はこれまで環境リスク管理の対象としてきた毒性機序と異なり、暴露時期によって作用や影響の発現濃度が大きく異なり、また極低濃度でその作用を発現することが指摘されている。内分泌攪乱作用を評価する試験法について OECD や EDSTAC が検討している段階であるように、この分野の科学的な研究は緒に着いた段階である。しかし、その影響の特性などを考えると、水環境中における内分泌攪乱作用を有する化学物質のバイオアッセイ法の確立やそれを用いた内分泌攪乱化学物質の挙動を明らかにするとともに水質管理技術を確立すべきである。

本論文は、内分泌攪乱作用についての水質管理のためのバイオアッセイ法として酵母 Two-hybrid 法の有効性を検討した。すなわち、化学物質のスクリーニング法として開発された試験法である本法は測定が比較的簡便で、迅速かつ経済的であるが、その一方、*in vitro* 試験であるため生体内における代謝作用を考慮できないことや環境試料を評価する際の前処理法の検討や、共存物質による阻害作用等について検討されていない。そこで、それらについての検討を行い水環境試料の内分泌攪乱作用を評価出来る方法を確立した。さらに、確立された方法により、水環境中における内分泌攪乱作用の挙動を明らかにするとともに、水道原水に認められる内分泌攪乱性が浄水処理過程においてどのように推移し、現在の浄水処理システムにおける内分泌攪乱性のリスク管理特性を明らかにした。

第1章では序論として、内分泌攪乱物質の問題点やこれまでの調査・研究についてまとめ、水質管理におけるバイオアッセイのあり方についてまとめた。さらに、内分泌攪

乱作用を評価するバイオアッセイの意義、それらの中で酵母 Two-hybrid 法の位置づけについて整理し、バイオアッセイを用いた水環境における内分泌攪乱作用評価と管理について述べ、本研究の目的と構成を記した。

第 2 章では内分泌攪乱作用を評価する酵母 Two-hybrid 法について、化学物質の評価における特性の把握と、より適正な評価を行うためにオリジナルな試験法を改良した試験法を確立した。

第 3 章においては、*in vitro* 試験である酵母 Two-hybrid 法においては考慮することのできない生体内の代謝作用を組み込むため、S9mix を導入することを試み、その条件について検討を行った。この試験法を化学物質に適用し、内分泌攪乱化学物質の代謝活性化も含めた評価が可能であることを明らかにした。

第 4 章では第 2 章、第 3 章で得られた結果に基づき、前処理を含めた酵母 Two-hybrid 法の環境試料への適用の検討を試み、水環境中における内分泌攪乱作用の評価とその原因物質の特定を行った。また、環境試料に本法を適用する際にはエストロゲン様活性発現に阻害作用が認められるため、この低減についての検討を行った結果、本法により環境試料のエストロゲン様活性を評価できることが明らかとなった。

第 5 章では浄水処理過程に注目し、内分泌攪乱作用がどのような挙動を示すかについて明らかにし、内分泌攪乱作用の低減にはどのような処理が有用であるかについて調査を行った。その結果、水道の浄水技術で汎用されている塩素処理によってもエストロゲン様活性が低減することが明らかとなった。

第 6 章においては第 5 章で得られた結果を実証すべく、室内実験において凝集沈殿処理、塩素処理における内分泌攪乱作用の低減のメカニズムを明らかにしている。

第 7 章は総括として、本研究の結果は水環境試料の内分泌攪乱性を評価する上で改良した酵母 Two-hybrid 法が有効なバイオアッセイ法であること、また、浄水処理における単位プロセスの内分泌攪乱性の特性を明らかにし、内分泌攪乱性を考慮した浄水処理システムの構築に際しての考え方を明らかにしている。

これを要するに著者は、水環境中の内分泌攪乱性を有する化学物質等を評価するための酵母 Two-hybrid 法というバイオアッセイ法を確立し、浄水処理システムの内分泌攪乱性の制御機能を明らかにしたものである。これは水環境中に存在する化学物質のリスク管理工学の進歩に資するものであり、都市環境工学特に環境衛生工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格があるものと認める。