

学 位 論 文 題 名

水環境におけるエストロゲン様作用の 評価手法に関する研究

学位論文内容の要旨

環境中には膨大な種類の化学物質が排出されて存在し、これらの化学物質は、環境中で種々の化学反応や微生物などによる生合成、生分解によりその形態が変化すると考えられる。さらに、水処理による消毒副生成物のように処理過程で新たに生成する非意図的生成物や未知物質が多数存在する。水環境は、経済活動で用いられた種々の物質の主要な放出の場となっており、化学物質の汚染の影響がより顕著であり、そこに棲息する生物や生態系への影響が懸念される。近年、内分泌攪乱性という新たな有害性の概念が出現し、野生動物では内分泌攪乱化学物質によると考えられる数多くの生殖異常が報告されていることから、内分泌攪乱物質に対する試験法の確立を始めとする対策が急務となっている。このように環境中に存在する膨大な化学物質の種類や量について全てを把握することは工学的に不可能であり、生態影響を含めた毒性学的な情報を整備することも不可能であると考えられる。

このようなことから、有害性が明らかとなっている特定の化学物質の濃度を測定し、その結果のみで、環境中に存在する化学物質のリスクの把握、評価あるいはリスク管理の情報とすることは不十分である。環境汚染物質の有害性に関する情報が非常に不足している状況で、水環境の質的安全性を高めるためには、有害性が明らかになっている化学物質のみならず、有害性が明らかではない化学物質を含め、それらのリスクを評価するためにバイオアッセイを用いて総合的に評価するシステムを構築し、水質管理への導入を図る必要がある。

そこで、環境中に存在する内分泌攪乱化学物質のうち、エストロゲン様作用を有する化学物質に着目し、ヒメダカを用いた *in vivo* 系のバイオアッセイ法によるその評価手法を構築することを目的とした研究を行った。

本論文は、8章から構成され、その概要は次のようである。

第1章では序論として、化学物質を取り巻く現状、特に水環境における有害物質管理の現状と問題点、バイオアッセイの目的とその役割、内分泌攪乱化学物質を取り巻く現状について整理し、本研究の背景と工学的な意義について記した。さらに本研究の目的と本論文の構成を示すことで本論文の中での各章の位置づけを明確にした。

第2章では内分泌攪乱化学物質とそのバイオアッセイに関する文献考察を行い、水環境中で検出頻度の高いノニルフェノール、その主たる用途である非イオン界面活性剤、ビスフェノール A、人畜の糞尿由来でエストロゲンそのものである 17β -エストラジオールを対象とし、それぞれについての物理化学特性、用途、生産量（あるいは使用量）、水環境中における濃度、挙動、環境（生態）影響、さらにこれらの物質に対する既存の環境リスク評価方法について考察した。

第3章では、ヒメダカを用いたエストロゲン（様）作用の評価手法を構築するた

めに被験物質のヒメダカに対する毒性および内分泌攪乱作用の発現について、急性毒性、慢性毒性、雌特異タンパク質の誘導、孵化率、性比、生殖腺組織、ヒレ形成などへの影響について調べた。その結果、17 β -エストラジオールのみならず合成化学物質であるノニルフェノールやビスフェノール A でも、エストロゲン様作用が発現することを明らかにした。

第 4 章では、第 3 章で得られた結果として、雌特異タンパク質の誘導がエストロゲン様作用に対する鋭敏なバイオマーカーであったことに着目し、第 3 章で得られた知見、いくつかの室内で行った予備実験の結果および既存の文献などを参考にし、ヒメダカを用いた雌特異タンパクの 1 つであるビテロジェニンを指標としたエストロゲン様作用の評価手法を構築した。そして、この評価手法を用いてノニルフェノール、ビスフェノール A、17 β -エストラジオールの最小作用濃度がそれぞれ、50 μ g/L、500 μ g/L、5ng/L、最大無作用濃度が 10 μ g/L、200 μ g/L、1ng/L であることを明らかにし、これらの作用濃度を明らかにすることによってこの評価手法の有用性について明確にした。

第 5 章では、第 4 章で構築したヒメダカビテロジェニンを指標としたエストロゲン様作用の評価系を水環境試料そのものの総エストロゲン様作用や処理の有効性の評価、あるいは各種処理水や排水の監視などの水質管理に導入するために、エストロゲン（様）作用には相加性があること、エストロゲン（様）作用（ビテロジェニン誘導）には可逆性があること、血清ビテロジェニン濃度と肝臓ビテロジェニン濃度には高い相関があることについて明らかにした。

第 6 章では、ヒメダカビテロジェニンを指標とした評価系を用いて、塩素処理によるエストロゲン様作用の挙動を明らかにすることを目的として室内実験を行い、塩素処理によってエストロゲン様作用は低減されること、塩素置換ビスフェノール A のエストロゲン様作用の有無と作用濃度を明らかにした。特に塩素処理により、エストロゲン様作用を低減化させるには、水道の消毒で汎用されている遊離塩素処理の条件が必要であり、下水処理水の消毒で汎用されている結合塩素処理では不十分である可能性があることを明らかにした。

第 7 章では、ヒメダカビテロジェニンを指標としたエストロゲン様作用の評価系を水質管理に導入するための適用例として、実際の浄水場において原水および浄水に対してヒメダカの曝露実験を行い、原水および浄水のエストロゲン様作用を評価した。その結果、対象とした浄水場の原水および浄水にはエストロゲン様作用が認められないことを明らかにするとともに、この評価手法の水質管理への導入の有用性を明らかにした。

第 8 章では、総括として、各章のまとめと本論文の結論について記した。

以上要するに、本論文は内分泌攪乱化学物質のうち、そのほとんどを占めるエストロゲン様物質について、水環境においてその作用を総合的に評価可能なヒメダカを用いた *in vivo* 系のバイオアッセイ法を構築し、この評価系を点汚染源の制御（排水基準の確立、処理水監視、毒性削減）、水環境の評価・監視（汚染水域の同定、長期的評価、短期間変化の検出）、用水管理（塩素処理副生成物など）などの水質管理へ導入することが可能であることを明らかにしたものである。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	眞 柄 泰 基
副 査	教 授	高 桑 哲 男
副 査	教 授	渡 辺 義 公
副 査	教 授	清 水 達 雄
副 査	助教授	亀 井 翼

学 位 論 文 題 名

水環境におけるエストロジェン様作用の 評価手法に関する研究

環境中には膨大な種類の化学物質が排出されて存在し、これらの化学物質は、環境中で種々の化学反応や微生物などによる生合成、生分解によりその形態が変化すると考えられる。さらに、水処理による消毒副生成物のように処理過程で新たに生成する非意図的生成物や未知物質が多数存在する。水環境は、経済活動で用いられた種々の物質の主要な放出の場となっており、化学物質の汚染の影響がより顕著であり、そこに棲息する生物や生態系への影響が懸念される。近年、内分泌攪乱性という新たな有害性の概念が出現し、内分泌攪乱物質に対する対策が急務となっている。このように環境中に存在する膨大な化学物質の種類や量について全てを把握することは工学的に不可能であり、生態影響を含めた毒性学的な情報を整備することは不可能であると考えられる。

このようなことから、有害性が明らかとなっている特定の化学物質の検出を測定し、その情報から、環境中に存在する化学物質のリスクの把握、評価あるいはリスク管理の情報とすることは不十分である。そこで、有害性が明らかになっている化学物質のみならず、有害性が明らかではない化学物質を含め、それらのリスクを評価するためにバイオアッセイを用いて総合的に評価するシステムを構築し、水質管理への導入を図る必要がある。そこで、環境中の内分泌攪乱性化学物質のうち、エストロジェン様作用を持つ化学物質に着目し、ヒメダカを用いた *in vivo* 系のバイオアッセイ系によるその評価手法を構築することを目的とした研究をおこなった。

本論文は8章から構成され、その概要は次のようである。

第1章では序論として、化学物質を取り巻く現状、特に水環境における有害物質管理の現状と問題点、バイオアッセイの目的とその役割、内分泌攪乱化学物質を取り巻く現状について整理し、本研究の背景と工学的な意義について記した。さらに本研究の目的と本論文の構成を示すことで本論文の中での各章の位置づけを明確にした。

第2章では内分泌攪乱化学物質とそのバイオアッセイに関する文献考察を行い、

水環境中から頻度高く検出されるノニルフェノール、その主たる用途である非イオン界面活性剤、ビスフェノール A、人畜の糞尿由来でエストロジェンそのものである 17 β -エストラジオールを対象とし、それぞれについての物理化学特性、用途、生産量（あるいは使用量）、水環境中における濃度、挙動、環境（生態）影響、さらにこれらの物質に対する既存の環境リスク評価方法について考察した。

第 3 章では、ヒメダカを用いたエストロジェン様作用の評価手法を構築するために被験物質のヒメダカに対する毒性および内分泌攪乱作用の発現について、急性毒性、慢性毒性、雌特異タンパク質の誘導、孵化率、性比、生殖腺組織、ヒレ形成などへの影響について調べた。その結果、17 β -エストラジオールのみならず合成化学物質であるノニルフェノールやビスフェノール A でも、エストロジェン作用が出現することを明らかにした。

第 4 章では、第 3 章で得られた知見などを参考にし、化学物質のエストロジェン様作用ヒメダカのビテロジェニンを指標とすることが再現性のある結果が得られることを明らかにし、この原理をもちいた評価系を確立した。そして、この評価手法を用いて個々の物質について、最小作用濃度および最大無作用濃度を明らかにすることで、この評価手法の有用性について明確にした。

第 5 章では、第 4 章で構築したヒメダカビテロジェニンを指標としたエストロジェン様作用の評価系を水環境試料そのものの総エストロジェン様作用や処理の有効性の評価、あるいは各種処理水や排水の監視などの水質管理に導入するために、エストロジェン（様）作用には相加性があること、エストロジェン様作用（主にビテロジェニン誘導）には可逆性があること、血清ビテロジェニン濃度と肝臓ビテロジェニン濃度には高い相関があることについて明らかにした。

第 6 章では、ヒメダカビテロジェニンを指標とした評価系を用いて、塩素処理によるエストロジェン様作用の挙動を明らかにすることを目的として室内実験を行い、塩素処理によってエストロジェン様作用は低減されること、塩素置換 BPA のエストロジェン様作用の有無と作用濃度を明らかにした。特に、塩素処理によりエストロジェン作用を低減化させるには、水道の消毒で汎用されている遊離塩素処理の条件が必要であり、下水処理水の消毒で汎用されている結合塩素処理では不十分であることを明らかにした。

第 7 章では、ヒメダカビテロジェニンを指標としたエストロジェン様作用の評価系を水質管理に導入するための適用例として、実際の浄水場および下水処理場でヒメダカの曝露実験を行った。その結果、水処理工程におけるエストロジェン様作用挙動を明らかにし、この評価手法の水質管理への導入の有用性を明らかにした。

第 8 章では、総括として、各章のまとめと本論文の結論である。すなわち、水環境において内分泌攪乱化学物質の内、最も重要であるエストロジェン作用化学物質について、その作用を総合的に評価可能なヒメダカを用いた in-vivo 系のバイオアッセイ法を構築し、この系を点汚染源の制御、水環境の評価・監視、用水管理などの水質管理へ導入することが可能であることを明らかにしたものである。

これを要するに、著者は水環境におけるエストロジェン様作用の評価手法について新知見を得たものであり、これは水環境および環境衛生施設のリスク評価に資するものであり、都市環境工学とくに環境衛生工学に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あるものと認める。