

学 位 論 文 題 名

水環境における内分泌攪乱作用と塩素処理効果の評価

学位論文内容の要旨

環境中に放出された化学物質が野生生物などの生態系に影響を与えていることは従来から知られているが、主として致死作用、催奇形性や発癌性といった作用についての評価が行われてきた。しかし、化学物質の中には生態系の動物や実験動物の内分泌系に作用し、性成長を含めた成長阻害や生殖能力に影響を及ぼすものも存在することが明らかになっている。内分泌攪乱化学物質と呼ばれるこれらの物質の影響がヒトに対しても起こりうる現象であるかを明らかにすることが求められているが、内分泌攪乱化学物質を原因とする健康影響が起こっていることを明確に証明することは、現状では困難である。しかし、内分泌系の働きは脊椎動物間ではあまり差が無く、野生生物で起こっている問題はヒトに対しても起こりうる問題として考える必要がある。

このような背景から本論文では、我々の生活において欠くことのできなくなった水道水の源であり、また、水生生物の生活の場でもある水環境の内分泌攪乱作用を評価、管理するためのバイオアッセイ手法を確立することを目的とした。水環境の評価、管理手法としてバイオアッセイに求められる条件として、水環境の実態を正確に把握できること（定量的な評価）、日常的な排水や処理水の水質管理に利用可能であること（評価の迅速性、測定操作の簡便性、経済性）などが考えられる。そこで、酵母 Two-Hybrid 法およびヒメダカビテロジェニンアッセイという 2 つの試験法に関して、水環境の内分泌攪乱作用評価における適用性、適用範囲を明らかにするとともに、迅速で簡便な評価が行える試験操作、条件の提案を行った。また、内分泌攪乱作用を低減させる水処理プロセスとして塩素処理の効果について、内分泌攪乱作用の低減化のみならず塩素処理副生成物の生成抑制という観点から、適正な塩素処理条件の提案を行った。

本論文は第 1 章から第 8 章で構成され、各章の内容は以下の通りである。

第 1 章では、本研究の背景として内分泌攪乱化学物質に関する既往の知見についてまとめるとともにその問題点を指摘し、バイオアッセイを用いた内分泌攪乱作用評価、管理の意義について述べ、本研究の目的および論文の構成について記した。

第 2 章では、酵母 Two-Hybrid 法を用いて水環境の内分泌攪乱作用の測定を行い、得られた結果について水環境中の内分泌攪乱化学物質（17 β -estradiol）濃度と関連させて、酵母 Two-Hybrid 法による内分泌攪乱作用の評価の妥当性を検討した。その結果、酵母 Two-Hybrid 法では環境水の内分泌攪乱作用の過小評価が生じるという問題点を提起した。

第 3 章では、はじめにヒメダカビテロジェニンアッセイを用いて迅速簡便に内分泌攪乱作用評価が行える実験条件の提案を行った。半止水式で短期曝露試験による内分泌攪乱化学物質の作用評価を行い、流水式、長期曝露試験を用いた既往の研究結果と比較することで、評価の妥当性を

検討し短期半止水式曝露試験による内分泌攪乱作用評価法として確立した。次に、この短期半止水式曝露試験を用いて環境水の内分泌攪乱作用の評価を行った。その結果、酵母 Two-Hybrid 法でみられたような内分泌攪乱作用の過小評価は認められず、ヒメダカピテロジェニンアッセイにおいては定量的な評価が行えることを明らかにした。

第4章では、第2章および第3章の結果に基づき、酵母 Two-Hybrid 法でみられた内分泌攪乱作用の過小評価の要因（妨害作用物質）を特定し、これらを分離することで内分泌攪乱作用の適正な評価が行える試験プロトコルの提案を試みた。HPLC を用いた分画などを行った結果、妨害作用は減少するものの、これらの手法では完全に妨害作用を消失させることはできないことを明らかにした。しかし、酵母 Two-Hybrid 法改良法（buffer 系）あるいは buffer 系と HPLC を用いた分画手法を組み合わせることで、妨害作用が減少し検出感度が上昇することから、水環境の内分泌攪乱作用の評価がより適正に行えることが明らかとなった。

第5章では、第2章から第4章までに得られた結果をまとめ、酵母 Two-Hybrid 法における妨害作用の作用機序について考察を行った。これに加えて、水環境の内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイとして、酵母 Two-Hybrid 法および短期半止水式曝露試験によるヒメダカピテロジェニンアッセイの適用性、適用範囲について結論づけた。

第6章では、内分泌攪乱作用を低減させる水処理プロセスとして塩素処理の効果について検討を行った。内分泌攪乱作用を示す Bisphenol A (BPA) は、塩素処理によって BPA よりも強い内分泌攪乱作用を有する副生成物として塩素置換 BPA を生成することを明らかにした。さらに、塩素反応による塩素置換 BPA および内分泌攪乱作用の挙動について調べた結果、塩素置換 BPA も塩素によって分解され、それにともない内分泌攪乱作用も消失することを示し、内分泌攪乱作用を低減化する塩素処理条件を明らかにした。

第7章では、第6章で内分泌攪乱化学物質の塩素処理副生成物が、新たに内分泌攪乱作用を示す場合があることを受けて、未同定物質を含めた塩素処理副生成物の指標として TOX を用いて、内分泌攪乱作用の低減と TOX の生成抑制という観点から、各種塩素処理手法の評価を行った。その結果、遊離塩素処理と同様に結合塩素処理についても、内分泌攪乱作用に対する低減効果が認められ、かつ、遊離塩素処理に比べ TOX の生成を抑制可能な手法であることを明らかにした。

第8章は、本研究で得られた結論を総括し、今後の研究の展望について記した。

環境水の内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイとして、酵母 Two-Hybrid 法およびヒメダカピテロジェニンアッセイに関して、特に酵母 Two-Hybrid 法については水環境における妨害作用の作用機序に関する考察を行い、それぞれ適正な評価を行うための実験手法の確立、適用範囲の提案をした。また、本研究で採用した塩素処理の結果から、内分泌攪乱作用に対する水処理システムのあり方について述べた。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	亀井	翼
副査	教授	渡辺	義公
副査	教授	船水	尚行
副査	助教授	岡部	聡

学位論文題名

水環境における内分泌攪乱作用と塩素処理効果の評価

化学物質の中には生態系の動物の内分泌系に作用し、性成長を含めた成長阻害や生殖能力に影響を及ぼすものも存在することが明らかになっている。このような背景から本論文では、水道水の源であり、また、水生生物の生活の場でもある環境水の内分泌攪乱作用を評価、管理するためのバイオアッセイ手法を確立することを目的とした。環境水の評価、管理手法としてバイオアッセイに求められる条件として、定量的な評価、評価の迅速性、測定操作の簡便性、経済性などが考えられる。そこで、酵母 Two-Hybrid 法およびヒメダカビテロジェニンアッセイという 2 つの試験法に関して、環境水の内分泌攪乱作用評価における適用性、適用範囲を明らかにするとともに、迅速で簡便な評価が行える試験操作、条件の提案を行った。また、内分泌攪乱作用を低減させる水処理プロセスとして塩素処理の効果について、内分泌攪乱作用の低減化のみならず塩素処理副生成物の生成抑制という観点から、適正な塩素処理条件の提案を行った。

第 1 章では、本研究の背景として内分泌攪乱化学物質に関する既往の知見についてまとめるとともにその問題点を指摘し、バイオアッセイを用いた内分泌攪乱作用評価、管理の意義について述べ、本研究の目的および論文の構成について記した。

第 2 章では、酵母 Two-Hybrid 法を用いて環境水の内分泌攪乱作用の測定を行い、得られた結果について環境水中の内分泌攪乱化学物質（ 17β -estradiol）濃度と関連させて、酵母 Two-Hybrid 法による内分泌攪乱作用の評価の妥当性を検討した。その結果、酵母 Two-Hybrid 法では環境水の内分泌攪乱作用の過小評価が生じるという問題点を提起した。

第 3 章では、はじめにヒメダカビテロジェニンアッセイを用いて迅速簡便に内分泌攪乱作用評価が行える実験条件の提案を行った。半止水式で短期曝露試験による内分泌攪乱化学物質の作用評価を行い、流水式、長期曝露試験を用いた既往の研究結果と比較することで、評価の妥当性を検討し短期半止水式曝露試験による内分泌攪乱作用評価法として確立した。次に、この短期半止水式曝露試験を用いて環境水の内分泌攪乱作用の評価を行った。その結果、酵母 Two-Hybrid 法でみられたような内分泌攪乱作用の過小評価は認められず、ヒメダカビテロジェニンアッセイにおいては定量的な評価が行えることを明らかにした。

第4章では、第2章および第3章の結果に基づき、酵母 Two-Hybrid 法でみられた内分泌攪乱作用の過小評価の要因（妨害作用物質）を特定し、これらを分離することで内分泌攪乱作用の適正な評価が行える試験プロトコルの提案を試みた。HPLC を用いた分画などを行った結果、妨害作用は減少するものの、これらの手法では完全に妨害作用を消失させることはできないことを明らかにした。しかし、酵母 Two-Hybrid 法改良法（buffer 系）あるいは buffer 系と HPLC を用いた分画手法を組み合わせることで、妨害作用が減少し検出感度が上昇することから、環境水の内分泌攪乱作用の評価がより適正に行えることが明らかとなった。

第5章では、第2章から第4章までに得られた結果をまとめ、酵母 Two-Hybrid 法における妨害作用の作用機序について考察を行った。これに加えて、環境水の内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイとして、酵母 Two-Hybrid 法および短期半止水式曝露試験にヒメダカピテロジェニンアッセイの適用性、適用範囲について結論づけた。

第6章では、内分泌攪乱作用を低減させる水処理プロセスとして塩素処理の効果について検討を行った。内分泌攪乱作用を示す Bisphenol A (BPA) は、塩素処理によって BPA よりも強い内分泌攪乱作用を有する副生成物として塩素置換 BPA を生成することを明らかにした。さらに、塩素反応による塩素置換 BPA および内分泌攪乱作用の挙動について調べた結果、塩素置換 BPA も塩素によって分解され、それにともない内分泌攪乱作用も消失することを示し、内分泌攪乱作用を低減化する塩素処理条件を明らかにした。

第7章では、第6章で内分泌攪乱化学物質の塩素処理副生成物が、新たに内分泌攪乱作用を示す場合があることを受けて、未同定物質を含めた塩素処理副生成物の指標として TOX を用いて、内分泌攪乱作用の低減と TOX の生成抑制という観点から、各種塩素処理手法の評価を行った。その結果、遊離塩素処理と同様に結合塩素処理についても、内分泌攪乱作用に対する低減効果が認められ、かつ、遊離塩素処理に比べ TOX の生成を抑制可能な手法であることを明らかにした。

第8章は、本研究で得られた結論を総括し、今後の研究の展望について記した。

環境水の内分泌攪乱作用を評価するバイオアッセイとして、酵母 Two-Hybrid 法およびヒメダカピテロジェニンアッセイに関して、特に酵母 Two-Hybrid 法については環境水における妨害作用の作用機序に関する考察を行い、それぞれ適正な評価を行うための実験手法の確立、適用範囲の提案をした。また、本研究で採用した塩素処理の結果から、内分泌攪乱作用に対する水処理システムのあり方について述べた。

これを要するに著者は、水環境における内分泌攪乱作用の程度を評価するバイオアッセイ法を確立したものであり、さらに確立したバイオアッセイ法を用いて、主たる水処理プロセスの一つである塩素処理方法が内分泌攪乱作用の低減に効果的なプロセスであることを明らかにしたものである。

これは水環境中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。