

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14350

研究課題名（和文）下水由来微量汚染物質と処理水マトリクスの複合作用の解明

研究課題名（英文）Combined effects of unregulated chemicals and wastewater matrix

研究代表者

原 宏江（Hara-Yamamura, Hiroe）

金沢大学・地球社会基盤学系・准教授

研究者番号：70823524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、下水処理水マトリクスと未規制化学物質の複合作用を明らかにするため、下水処理水中の疎水性画分を酸性、中性、塩基性に分画し、それら画分と未規制化学物質が複合的にヒト培養細胞へ与える影響を明らかにするとともに、水晶振動子マイクロバランス（QCM）による吸着量の評価を行った。その結果、合成ホルモンの細胞影響は処理水マトリクスの存在下で低減することが示唆された。また、QCM分析では合成ホルモンの種類によって各画分への吸着特性が異なることがわかった。再利用水の安全性を確保するためには、処理水マトリクスの役割を考慮した水質管理が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果により、再利用水の安全性を確保するために、処理水マトリクスの役割を考慮した水質管理の重要であることが明らかとなった。また、本研究で用いた手法を他の未規制化学物質に適用することにより、監視・制御の対象となる化学物質の優先づけが可能となると考える。さらに、処理水マトリクスには多くの自然由来有機物が含まれていることから、吸着特性データは、自然の水環境中での微量汚染物質の挙動や毒性影響を研究する上でも役立つ。

研究成果の概要（英文）：In this study, the hydrophobic fractions of treated sewage water were fractionated into acidic, neutral and basic fractions to clarify the combined effects of these fractions and unregulated chemicals on human cultured cells, as well as the combined effects of these fractions and unregulated chemicals on human cultured cells by quartz crystal microbalance (QCM) to clarify the combined effects of the treated sewage water matrix and unregulated chemicals. The amount of adsorption was evaluated by quartz crystal microbalance (QCM). The results suggest that the cellular effects of synthetic hormones are reduced in the presence of the treated water matrix. The QCM analysis also showed that the adsorption characteristics of synthetic hormones on each fraction differed depending on the type of synthetic hormone. To ensure the safety of reused water, water quality management should take into account the role of the treated water matrix.

研究分野：衛生工学

キーワード：トキシコゲノミクス 細胞毒性 水晶振動子マイクロバランス 下水再利用

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 ( 共通 )

### 1 . 研究開始当初の背景

都市下水は、身近に存在し、天候に左右されにくい水資源として世界各地で再利用が進められている。しかし、下水中の微量汚染物質の中には、医薬品、農薬、工業化学物質等、高度処理によっても除去困難なものがあるほか、処理過程で様々な副生成物が生じ、これら下水由来の未規制化学物質による人体及び生態系への影響は、水の循環利用における潜在的な懸案事項となっている (Angelakis et al., 2018)。無数にありうる残留物質に対し、機器分析で特定・定量し、個別に毒性評価を行って規制対象に加える、従来の「積み上げ型の水質管理」で対処すれば莫大な時間と費用が見込まれる。限られた人的・経済的資本の下で再利用水の安全性を確保するためには、水試料全体の毒性影響において寄与の大きな成分を明らかにし、残留化学物質を優先づけて制御・監視する「逆算思考型の水質管理」が有効と考える。

水生生物やヒト細胞など様々な生物に対する下水処理水の毒性影響が報告されてきたが、既知の化学物質によっては、処理水全体の有する毒性影響のごく一部しか説明できないことが近年報告され (Escher et al., 2011; Zhang et al., 2018)、主要な毒性成分は未だ明らかになっていない。ところで下水処理水は、処理過程で生じる副生成物・代謝物、微生物由来の溶解性有機物、水道水由来の自然有機物等が織り成す複雑な「処理水マトリクス」であって、単純な化学物質の水溶液ではない。申請者はこれまでに、ヒト細胞を用いた下水処理水の毒性影響解明に取り組み、処理水マトリクス中のフミン物質を含む画分が細胞毒性に寄与する可能性 (Hara-Yamamura et al., 2020)、処理水マトリクスがある種の微量汚染物質 (解熱鎮痛薬) の有する毒性影響を低減すること (Hara-Yamamura et al., 2022) から、処理水マトリクスの重要性を明らかにした。下水由来の未規制化学物質の毒性影響を正しく理解するために、処理水マトリクスと残留化学物質の複合作用に対する理解が不可欠である。

### 2 . 研究の目的

本研究では、下水処理水マトリクスと未規制化学物質の複合作用を明らかにするため、3 種類の内分泌攪乱物質を対象として、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて下水処理水マトリクスと対象物質の吸着特性を調べるとともに、ヒト細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析により対象物質と処理水マトリクスが複合的に生じる細胞影響を明らかにする。

### 3 . 研究の方法

#### 3.1 被験物質

3 種類のステロイドホルモン、エストロン (E1)、17 エストラジオール (E2)、17 エチニルエストラジオール (EE2) は、Sigma-Aldrich 社 (東京、日本) から購入した。各薬品の 1,000 mg/L ストック溶液は、和光純薬 (東京、日本) の LC-MS グレードの MeOH 溶媒を用いて調製した。10mg/l から 1ng/l までの選択した化学物質の連続希釈液を調製し、細胞毒性試験、qPCR アッセイ、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 分析に使用した。化学物質は、使用前に琥珀色のガラスバイアルに入れ、40℃ で保管した。

#### 3.2 分画

下水処理場からの流出試料を 0.22 μm フィルターでろ過し、Fang et al., 2017 に記載されているように、MCX/MAX 分画法により疎水性酸 (HOA)、疎水性塩基 (HOB) および疎水性中性 (HON) 画分に分画した。

#### 3.3 化学分析

HOA、HON、HOB 画分中の全有機炭素 (TOC) は、全有機炭素分析装置 (TOC-V CPH、島津製作所) で分析した。TOC 分析に先立ち、試料 1mL を 40℃ で緩やかな窒素気流で乾燥させ、19mL の Milli-Q 水で再構成することにより、試料の溶媒交換を行った。励起発光マトリクス (EEM) は、蛍光分光光度計 (FP-8200, Jasco, Japan) を用いて、各画分の有機物濃度を 2 mg C/L に調整して分析した。EEM スペクトルは、スペクトル補正、フィルター補正、ラマン正規化、ブランク減算を考慮して再処理した (Murphy et al.)

#### 3.4 細胞培養と暴露

ヒト肝芽腫 HepG2 細胞は、理研バイオリソースセンター細胞バンク (つくば、日本) から購入した。細胞は、10% のウシ胎児血清 (FBS) と 60 mg/mL のカナマイシンを含むイーグル最小必須培地 (MEM) (日水製薬、東京、日本) で維持した。HepG2 細胞は、5% CO<sub>2</sub> 加湿インキュベーター内で 37℃ で培養した。曝露前に、メタノールベースの E1、E2、EE2、HOA、HOB および HON サンプル 100 mL を、1% FBS および 60 mg/mL カナマイシンを含む 10 mL の x10 濃縮 MEM と混合し、7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液を添加して pH を 7.2~7.5 に調整した。ステロイドホルモンと dEfOM の混合物は、1mg/l のステロイドホルモンと 0.5mg/l の各 EfOM 画分を 1:1 (V:V) の比率で添加して調製した。合計 100 mL の混合試料を、1% FBS と 60 mg/mL のカナマイシンを含む 10 mL の x10 濃縮 MEM と合わせ、7.5% 炭酸水素ナトリウム溶液を加えて pH を 7.2~7.5 に調整した。

細胞を 96 ウェルプレート (細胞生存率試験用) または 60mm 培養ディッシュ (トランスクリプトーム解析用) に 105 細胞/mL で播種し、一晚培養して 40~50% コンフルエントに増殖させた。通常の培地と交換することにより、細胞をホルモンおよび EfOM 画分サンプルに曝露し、48 時間培養した。

### 3.5 細胞毒性試験

細胞生存率は、0.1 ng/l から 10 mg/l の範囲の単一化学物質と、1 mg/l : 0.5mg/l = ステロイドホルモン : dEfOM 画分の混合物の 2 つの条件で測定した。48 時間曝露後の HepG2 の細胞生存率は、3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウム (MTT) (シグマアルドリッチ、日本) の還元によって生じるホルマザンの量を測定する MTT アッセイによって決定した。

### 2.6 混合毒性予測

単回曝露試験で得られた細胞生存率データを濃度添加 (CA) モデルに入力し、予想される混合物効果を予測した。次に、予測結果をモデル偏差比 (MDR) を用いて、観察された実験的混合物毒性与比較した MDR 値は、予測された細胞生存率と観察された細胞生存率に基づいて、式 1 (Belden ら、2007) のように計算された。MDR = 2 の場合、dEfOM の存在が化学物質の細胞毒性作用を増強する相乗効果が示唆された。逆に、MDR = 0.5 の場合は、共存する dEfOM が化学物質の細胞毒性作用を抑制する拮抗作用が示唆された。MDR の値が 0.5~2 の場合は、相加効果があると考えられた。

モデル偏差比 (MDR) = (単回曝露から予測される混合細胞生存率) / (観察された混合細胞生存率) 式 1。

### 3.6 MEGA アッセイ

分子レベルのストレス応答を評価することにより、ステロイドホルモンと EfOM 画分の混合物のヒト健康リスクを調べるために、先行研究で開発されたリアルタイム PCR ベースのトランスクリプトーム解析、MEGA (multiple-endpoints gene-alteration based) アッセイを適用した (Fukushima, Hara-Yamamura, Nakashima, Tan, & Okabe, 2017)。NNMT, VNN1, FABP1, LGALS3, AQP3, AKR1B10, SERPINE1 を含む 7 種類の細胞毒性関連遺伝子を調べた。CDKN1A, GADD45, MDM2, BCL2, TP53I3 遺伝子については遺伝毒性を調べた。シトクロム P450 関連遺伝子、すなわち CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 については、排水中の微量汚染物質の存在を示す指標となりうる異種生物応答を調べた (Escher et al.) ハウスキーピング遺伝子として GAPDH 遺伝子を利用した。遺伝子発現は、リアルタイム逆転写 (RT) qPCR で定量的に解析した。cDNA 合成には PrimeScript™ RT 試薬キット (Perfect Real Time; TaKaRa Bio, Shiga, Japan) を用いた。定量は Ct 法で行った。相対 mRNA 発現量は、各標的遺伝子について  $2^{-Ct}$  で計算し、log2 fold change (FC) で表した。発現レベルはハウスキーピング (GAPDH) 遺伝子の発現レベルに対して正規化した。

### 3.7 アドミッタンス法に基づく水晶振動子マイクロバランス (QCM-A)

アドミッタンス法 (Quartz Crystal Microbalance based on Admittance method: QCM-A) 分析は、分子間相互作用をリアルタイムでモニタリングする高感度な方法である。この方法では、周波数を印加してセンサーを振動させ、ターゲット分子のセンサーへの吸着による周波数変化を測定することで、吸着膜厚に変換する。27 MHz AT カット金電極 (QCMSC-SPP1AU; ULVAC, Inc, Japan) センサーをピラニア溶液 (H2SO4 : H2O2 = 3 : 1 v/v) で 2 回洗浄した後、超純水で洗浄した。よく乾燥させたセンサーをエイデン・スピネーター SC4001 型の回転台に固定し、1000rpm と 1500rpm の回転数でそれぞれ 1 分間反応させた。10mg/l の合成ホルモン溶液 10ul を回転させながら金電極上に滴下した。ホルモン固定化 QCM センサーを Affinix QN pro アナライザーに取り付け、センサーが緩衝液中で安定したところで、480mg/l の濃縮 dEfOM 画分を 5 μl 加え、1 時間後に dEfOM 画分の吸着厚さを測定した。

### 3.8 統計分析

単一曝露条件と混合曝露条件間の有意差は、一元配置分散分析 (ANOVA) 検定で評価した。p 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。階層的クラスタリング解析は、ユークリッド距離と「完全連鎖」を用いた Morpheus ソフトウェアを用いて行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 EfOM 画分の特徴

HOA, HOB および HON 画分の TOC 濃度は、それぞれ 1.237 mg/L, 0.707 mg/L および 0.516 mg/L であり、合計で dEfOM 全体の 40.1% に相当する疎水性有機物 (HPO) を含んでいた。HPO のうち、HOA が 50.3% と最も多く、次いで HOB が 29.7%, HON が 21.0% と最も少なかった。HPO の組成がやや低いことは、5 つの異なる WWTPS から得られた EfOM が 20~42% の HPO と 80~40% の親水性画分からなると報告した Quaranta, 2009 と一致していた。EEM スペクトルにおいて、HOB 画分は、

280/380 Ex/Em, 220/360 Ex/Em, 270/300 Ex/Em にそれぞれ微生物産物, トリプトファン, チロシンの存在を示す非集中的な狭いピークを示した。HON は 220/340 nm (Ex/Em) 付近に高強度のピークを示し, これはトリプトファンと同定できる。トリプトファンやチロシンを示すタンパク質のような蛍光は, dEfOM によく見られる (Quaranta, 2009)。3 つの画分のうち, HON は (Xue et al., 2011) で報告されているように, 強いタンパク質様蛍光を示した

## 4.2 ステロイドホルモンの細胞への影響

### 4.2.1 細胞毒性

E1, E2, EE2 の HepG2 への暴露において, いずれのホルモンでも 1 mg/L までは細胞生存率の有意な減少や増加は観察されず, 選択された化学物質は環境的に適切な濃度では細胞毒性を示さないことが示された。しかし, 1 mg/L 濃度を超えると, すべてのホルモンで細胞生存率が 30%~50%程度に激減した。

### 4.2.2 トランスクリプトーム応答

E2 および EE2 に暴露した HepG2 細胞における 20 のマーカー遺伝子の発現変化を図 3 のヒートマップにまとめた。1mg/L の E2 亜致死暴露では, VNN1, AQP3, NNMT を除く細胞毒性カテゴリーの遺伝子がすべて下方変動された。Frasor et al., 2003 は, E2 に暴露されたヒト乳がん細胞 (MCF-7) において, 多くの遺伝子 (12,000 以上の遺伝子のうち 70%) が下方変動されたことを報告している。一方, CYP2D6 遺伝子の発現は最も低下した ( $\log_2$  FC = -3.04)。遺伝毒性関連遺伝子の変化は, 細胞毒性関連遺伝子 ( $\log_2$  FC: -2.08~6.54) および化学物質応答関連遺伝子 ( $\log_2$  FC: -3.04~0.08) に比べて比較的小さかった ( $\log_2$  FC: -1.30~0.57)。逆に, 1 mg/L の EE2 亜致死暴露では, すべての遺伝子が発現上昇した。また, NNMT ( $\log_2$  FC = 2.40), VNN1 ( $\log_2$  FC = 2.16), SERPINE1 ( $\log_2$  FC = 2.16) の 3 遺伝子も EE2 曝露により顕著に発現が上昇した。E2 同様, 細胞毒性関連遺伝子 ( $\log_2$  FC: 0.32~3.25) および化学物質応答関連遺伝子 ( $\log_2$  FC: 0.03~3.30) に比べ, 遺伝毒性関連遺伝子の変化は比較的小さかった ( $\log_2$  FC: 0.67~1.04)。



図 2 E2 及び EE2 曝露に対するマーカー遺伝子の発現変動

## 4.3 dEfOM を混合したステロイドホルモンの細胞への影響

### 4.3.1 細胞毒性

HOA, HOB, HON の存在下での E1, E2, EE2 の細胞生存率はいずれも 100%前後で推移し, コントロールと比較して細胞生存率に有意な変化がなかった。HOB は細胞生存率が 12.7%増加し, HOA は 6.8%増加した。HON は, E1 による顕著な影響は見られなかった。対照的に, HON 画分は E2 および EE2 に対して最大の細胞生存率効果を示し, E2 および EE2 と混合した場合, すべての dEfOM 画分について同様の傾向が観察された。E2+HOA, E2+HOB, E2+HON は, それぞれ 18.3%, 13.1%, 28.3%の細胞増殖の増加を引き起こした。HOA は EE2 には影響を与えなかったが, EE2+HOB と

EE2+HON はそれぞれ 7.1%と 15.6%の増加を引き起こした。すべての MDR 値は 1.01～1.23 の間にあり、HepG2 に対する相加的な細胞毒性作用を示した。

#### 4.3.2 トランスクリプトーム応答

dEfOM 画分存在下、選択したステロイドホルモンに曝露した HepG2 細胞における 20 のマーカー遺伝子の遺伝子発現変化を図 3 のヒートマップにまとめた。E2+HOA の曝露では、細胞毒性カテゴリーの NNMT (log<sub>2</sub> FC: 3.76) と AQP3 (log<sub>2</sub> FC: 0.36) を除くすべてのマーカー遺伝子が下方変動され、E2 の単独曝露でも同様に上方変動された (NNMT: 6.54, AQP: 0.77)。HOA が存在すると、細胞毒性関連遺伝子の発現レベルは、E2 単独曝露に比べて log<sub>2</sub> FC で最大 16 倍低下した。一方、化学物質応答遺伝子は、E2+HOA 曝露で、単独曝露よりも大きく下方変動された (すなわち、-1.23～-3.11)。CYP2D6 遺伝子は、混合物曝露 (log<sub>2</sub> FC=-3.11) でも単独曝露 (log<sub>2</sub> FC=-3.04) でも最も多く発現した。E2+HOB 曝露では、CYP2E1 (log<sub>2</sub> FC: 0.93) と CYP3A4 (log<sub>2</sub> FC: 0.83) を除き、化学物質応答遺伝子も下方変動され、一部の遺伝子では単独曝露から遺伝子発現レベルが最大 3 倍まで低下した。細胞毒性関連遺伝子の大部分 (AKR1B10, LGALS3, SERPINE1, FABP1 など) および遺伝毒性関連遺伝子は、E2+HOB 曝露では発現量が増加したが、E2 単独曝露および E2+HOA 曝露では発現量が減少した。HOB の存在は、選択された遺伝子の一般的な遺伝子発現パターンを変化させたが、遺伝子の変調の規模、すなわち FC の絶対値は、単一曝露に比べて比較的小さかった (log<sub>2</sub> FC: -1.43～2.50)。HON が存在する場合、選択された遺伝子の発現変動はさらに小さかった (log<sub>2</sub> FC: -2.00～2.12)。NNMT 遺伝子と 3 つの CYP 遺伝子 (すなわち、CYP2D6, CYP2C8, CYP2B6) は、比較的高い遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウレギュレーションを示した。単一 E2 および E2+HOA 曝露と同様に、発現変動は細胞毒性カテゴリーで最も大きく、遺伝毒性カテゴリーで最も小さかった。EE2 と EfOM 画分の混合曝露は、EE2 単独曝露と同様に、HepG2 細胞において選択されたマーカー遺伝子のアップレギュレーションを引き起こした。EE2+HOA 曝露では、CYP1A2 (log<sub>2</sub> FC=2.48) と CYP2B6 (log<sub>2</sub> FC=2.41) で最も大きな調節が観察されたが、混合物曝露 (log<sub>2</sub> FC: -1.27～2.48) では、単一曝露 (log<sub>2</sub> FC: 0.03～3.30) に比べて遺伝子発現レベルは比較的低かった。また、EE2+HOB および EE2+HON の log<sub>2</sub> FC は、それぞれ -1.07～2.78, -0.95～1.76 であった。したがって、HOB と HON の存在は、EE2 曝露による遺伝子変調を緩和した。

#### 4.3 EfOM 画分のステロイドホルモンへの吸着

1 時間後の E1, E2, EE2 固定化 QCM センサー表面への EfOM 画分の厚さ吸着を表 1 に示す。HOA 画分では、ペアセンサー上に既にコーティングされていた E1 の 0.55 nm の厚さの層が 1 時間で剥離した。しかし、HOA の非直線的な吸着と脱着は、全時間を通して時々刻々と観察された (補足情報)。従って、E1 と HOA の間に強い結合が形成されなかったか、または E1 と HOA が結合して新しい化合物を形成し、その後新しく形成された化合物がセンサーから脱着したものと考えられる。E2 および EE2 のいずれの場合も、dEfOM 画分は HOA < HON < HOB の順にステロイドホルモンに吸着する傾向があった。

表 1 E1, E2, EE2 をそれぞれ固定したセンサー表面における 1 時間後の吸着厚さ (nm)

	E1	E2	EE2
HOA	-0.55	0.60	0.19
HOB	1.09	3.91	1.58
HON	1.50	1.18	1.24

#### 4. 結論

本研究では、dEfOM (HOA, HOB および HON 画分) の存在は、E1, E2 および EE2 に対して相加的な細胞生存率効果を引き起こすが、単一化合物または混合物は、亜致死条件下で HepG2 に対して有意な細胞毒性効果をもたらさないことが示された。dEfOM 分は E2 と EE2 に吸着し、吸着量は HOB > HON > HOA であった。この結果は、疎水性 dEfOM が、おそらく新たに出現した汚染物質を捕捉することによって、ステロイドホルモンの潜在的な細胞への悪影響を緩和している可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 大谷恭平, 原宏江, 山村寛, 池本良子, 本多了	4. 巻 Vol.78, No.7
2. 論文標題 機械学習を用いた3次元蛍光データに基づく飲用水と高度下水処理水の水質比較	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 土木学会論文集G(環境)	6. 最初と最後の頁 111_73-111_80
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 原 宏江	4. 巻 27
2. 論文標題 化学物質複合系としての下水試料とその生体影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 環境毒性学会誌	6. 最初と最後の頁 S105~S117
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.11403/jset.27.S105	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷恭平, 原宏江, 山村寛, 池本良子, 本多了
2. 発表標題 機械学習を用いた3次元蛍光データに基づく飲用水と高度下水処理水の水質比較
3. 学会等名 第59回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------