

河川における人畜由来のエストロゲン物質の分析

熊谷 哲、宇野 美奈子¹

社会システム環境学大講座、コベルコ科研¹

Analysis of the estrogen material derived from the human and domestic animals in the river.

Tetsu Kumagai, Minako Uno *

Laboratory of Environment for Social System,

School of Human Science and Environment,

University of Hyogo

1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, 670-0092 Japan

Kobelco Research Institute *

Abstract

The environment estrogen concentration in the rivers flowed into Harimanada Sea in Hyogo Prefect. was measured. 17α - and 17β - estradiol which were hormone discharged from human and domestic animals were measured. In addition, estron which was a decomposition product of these estradiols was also measured. 17α -estradiol is a sex hormone which derives from the cow. Since the pastureland and cattle shed with the cow exists in the upstream in the river, the quantity of 17α -estradiol detected near the downstream of rivers was little by the biodegradation. However, it was confirmed to reach the concentration in which the estrogen concentration affects the fish near the outfall of the sewage-treatment plant in the Senba river.

Keywords: Estrogen, Estradiol, Domestic animals, LC/MS, River

1. はじめに

近年、エストロゲン活性を有する内分泌攪乱化学物質による環境への影響が懸念されているが、その一方で、天然の女性ホルモンであるエストロゲン物質自体による影響が危惧されている。特に、 17β -Estradiolは他の化学物質と比較すると非常に高いエストロゲン活性を持ち、10ng/Lで魚類の雄の雌性化を引き起こすことが報告されている。また、エストロゲン物質は人や家畜の排泄物に含まれていることから、下水処理場や畜舎が環境水中への排出源として考えられる。

そこで、本研究では LC/MS/MS(液体クロマトグラフ質量分析装置)によるエストロゲン物質の分析手法を検討し、下水処理場付近の河川水及び底質中におけるエストロゲン物質の挙動の解明を目的としている。

採取河川上流には畜舎が存在し、家畜由来のエストロゲン物質が流れ込んでいる可能性がある。

そこで測定対象物質として人および家畜由来の 17β -Estradiol(β E2)、主として牛などから排泄さ

れる 17α -Estradiol(α E2)、および 17α 及び β -Estradiolの分解生成物であるEstron(E1)を測定した。特に 17α -Estradiolは人からは排泄されないestrogenとして、家畜由来の汚染を知る指標となることが期待される。

2. 実験

2.1 サンプルング

主として人間由来のエストロゲン物質の影響を検討するためにサンプルングは下水処理周辺の河川で行った。

また同時に堆積物へのエストロゲン物質の吸着等による濃縮を検討するため、底質の採取も行った。採取河川は兵庫県の播磨灘海域に流れ込む掛保川、船場川、八家川、加古川の河口付近である。河川水のサンプルングはバンドーン型採水器を用い、底質の採取にはドレッジ型採泥器を用いた。水試料は氷冷下で保存し、速やかに持ち帰り、濃

縮等の前処理を行い、分析した。底質試料は-18℃で冷凍保存後、解凍して測定に供した。試料の採取は2003年8月から2003年の11月にかけて行った。サンプリング地点の位置を図1に示す。

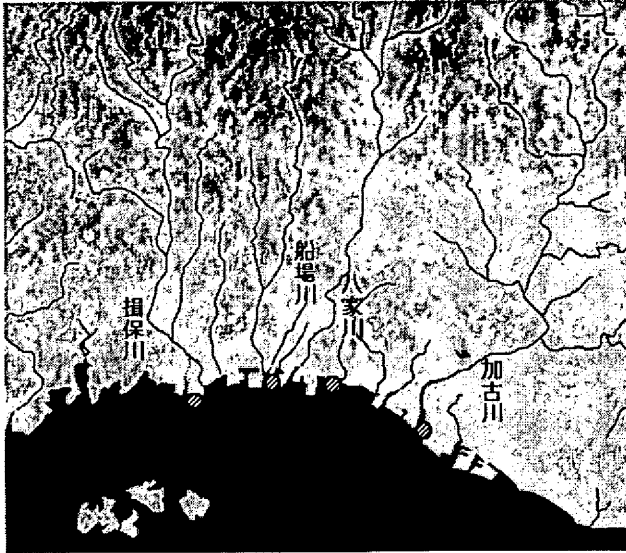


図1 試料のサンプリング地点

2.2 試薬

試薬溶液は主に和光純薬株式会社又は関東化学株式会社製試薬を用いて調整した。試薬は特級規格以上のものを用い、水はイオン交換水を蒸留して用い、必要に応じて超純水も用いた。

α E2はシグマアルドリッチ社製、エストロン、 β E2、 β E2-16,16,17- d_3 標準品、酢酸、酢酸ナトリウム三水合物、酢酸エチルは和光純薬工業株式会社製、アセトン、メタノール、ジクロロメタン及びヘキサンは残留農薬・PCB試験用5000倍濃縮検定品、アセトニトリルは高速液体クロマトグラフィー用、トリエチルアミン、L(+)-アスコルビン酸、上記試薬は全て関東化学株式会社製を用いた。

2.3 分析装置

前処理のためのカラム濃縮・分離には Waters 社製の Sep-Pak Concentrator Plus を用い、分析は Applied Biosystems 社の API 3000, HPLC は Agilent 1100 を用いた LC/MS/MS 分析により行った。

2.4 実験操作

前処理法の検討を行い、以下の方法により河川水及び底質の処理を行った。

河川水試料 前処理法

- ① 水試料 1L をガラス繊維濾紙($\phi=1\mu\text{m}$)で減圧濾

過し、濾過し終えた濾紙を 100mL 容のピーカーに入れ、濾紙が浸かる程度のメタノールを加えて超音波抽出を 10 分間行い、濾紙上の懸濁物質を抽出し、この抽出液を分取した。

- ② 再度 100mL 容のピーカーにメタノールを加え、超音波抽出を行った後、上澄み液を合わせてロータリーエバポレーターで約 20mL まで濃縮し、濾液に加えた。
- ③ 試料に 1M ABS を加えて pH 5 に調整し、その後、内部標準物質である β -E2- d_3 を 50ng 添加した。
- ④ 予めメタノールと蒸留水で洗浄及びコンディショニング行っていた Sep-Pak Plus C18 カートリッジに試料を通水し、固相抽出を行った。通水後、このカートリッジにシリンジを接続し、空気を吹き付けることによって脱水を行った。
- ⑤ カートリッジに吸着させている目的物質をメタノール：酢酸エチル(1:5)溶液 6mL で遠沈管に溶出し、窒素吹き付けにより濃縮乾固させた。
- ⑥ これをヘキサン：ジクロロメタン(1:1)溶液 1mL に転溶した後、Sep-Pak Plus Florisil に通水し、ヘキサン：ジクロロメタン(1:1)10mL でカートリッジを洗浄してからアセトン：ジクロロメタン(1:9)6mL で溶出した。
- ⑦ この溶液を Sep-Pak Plus NH₂ を用いてクリーンアップし、窒素ガス吹き付けにより濃縮乾固させてメタノール 1mL に転溶した。
- ⑧ 12000rpm で 20 分間、遠心分離することで沈殿物除去を行い、ガラス製バイアル瓶に移して LC/MS/MS 測定に用いた。

堆積物試料 前処理法

- ① 冷凍保存していた堆積物試料を自然解凍して、100mL 容ピーカーに約 10g 採取し、内部標準物質 β -E2- d_3 を 50ng 添加した。
- ② メタノール：1M 酢酸緩衝溶液(pH=5)=9:1 を 80mL 加え、10 分間超音波抽出を行い、上澄みを分取した。
- ③ ②の操作を再び繰り返し行い、先程の溶液と合わせ、遠心分離によって泥の除去を行った。
- ④ その溶液をロータリーエバポレーターで 10mL まで濃縮した。
- ⑤ 超純水 1L に溶解させ、予めメタノールと超純水でコンディショニングを行った Sep-Pak C18 カートリッジに通水して固相抽出を行った。通水後、このカートリッジにシリンジを接続し、空気を吹き付けることによって脱水を行った。

- ⑥ カートリッジに吸着させている目的物質をメタノール：酢酸エチル(1：5)溶液 6mL で遠沈管に溶出し、窒素吹き付けにより濃縮乾固させた。
 - ⑦ これをヘキサン：ジクロロメタン(1：1)溶液 1mL に転溶した後、Sep-Pak Plus Florisilに通水し、ヘキサン：ジクロロメタン(1：1)10mL でカートリッジを洗浄してからアセトン：ジクロロメタン(1：9)6mL で溶出した。
 - ⑧ この溶液を Sep-Pak Plus NH₂ を用いてクリーンアップし、窒素ガス吹き付けにより濃縮乾固させてメタノール 1mL に転溶した。
 - ⑨ 12000rpm で 20 分間、遠心分離することで沈殿物除去を行い、ガラス製バイアル瓶に移して LC/MS/MS 測定に用いた。
- また堆積物試料の水分含有量も測定し、dry 換算で測定値を得た。

2.4 LC/MSの測定条件

表 1 に液体クロマトグラフィー質量分析法による測定条件を示す。

表 1 LC/MS/MS 条件

Instrument	Applied Biosystems API 3000
HPLC	Agilent 1100
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法(ESI)
イオン化モード	ネガティブモード
Precursor ion	β -E ₂ m/z=270.9 E ₁ m/z=268.9 α -E ₂ m/z=270.9 β -E ₂ -d ₃ m/z=273.9
Product ion	β -E ₂ m/z=144.7 E ₁ m/z=144.9 α -E ₂ m/z=144.7 β -E ₂ -d ₃ m/z=144.9
Column name	ODS-HG-5 2 μ m×50mm
Flow rate	0.2ml/min
Solvent A	5mM TEA/H ₂ O
Solvent B	5mM TEA/CH ₃ CN
Injection Volume	20 μ L
Gradient	A100%(0-1min)→A50%(13-18min)→A100%(20-35min)

全ての試料の測定は 3 回行い、平均値を用いて濃度を算出した。

3. 結果と考察

3.1 検量線

LC/MS/MS測定における検量線はすべて内標準法により作成した。図 2 - 図 4 に 17 β -Estradiol、17 α -Estradiol、および Estron 検量線を示す。縦軸は内標準物質との強度比を示している。それぞれメタノール標準溶液をバイアル瓶に取り、全てのバイアル瓶

に、内標準物質である β -E₂-d₃ を 50ng/mL とするように加えた。これらを LC/MS/MS で測定し、 β -E₂、E₁、及び α -E₂ の各測定物質と内標準物質である β -E₂-d₃ とのピーク面積比から検量線を作成した。

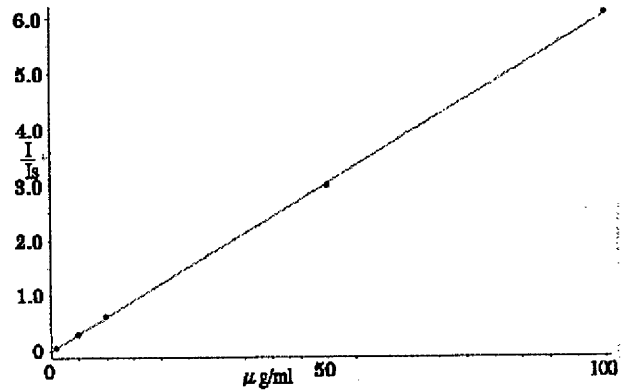


図 2 Estron の検量線

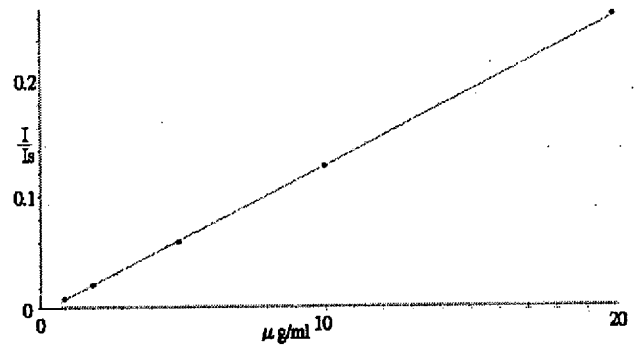


図 3 17 β -Estradiol の検量線

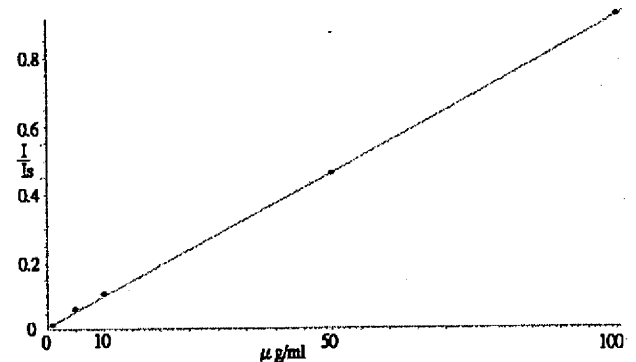


図 4 17 α -Estradiol の検量線

図示した範囲内では良好な直線性を示した。

3.2 添加回収試験結果

添加回収試験は、分析法の正確さを確認する方法の一つで、前処理による損失や試料中の夾雑物質による対象物質の変性や阻害などを検討するのに必要である。試料(河川水、堆積物)に既知濃度の目的成分と内標準物

質を添加したものを実際のサンプルと同様の処理を行い、得られた分析結果と実際の添加量を比較し、その分析法の正確さを判断した。また、これにより得られた分析結果から回収率を算出し、実際のサンプルの測定値を回収率で除することによって、実際のサンプル中の濃度を算出した。

本研究では、河川水 1L に β -E2、E1、 α -E2 を各 100ng、内標準物質 β -E2-d₃ を 50ng 添加し、前述の前処理法に基づいて処理を行った。また、堆積物 10g に対しても β -E2、E1、 α -E2 を各 100ng、内標準物質 β -E2-d₃ を 50ng 添加し、前述の前処理法に基づいて処理を行った。これによって得られた試料液をそれぞれ河川水と堆積物の添加回収試験液とした。

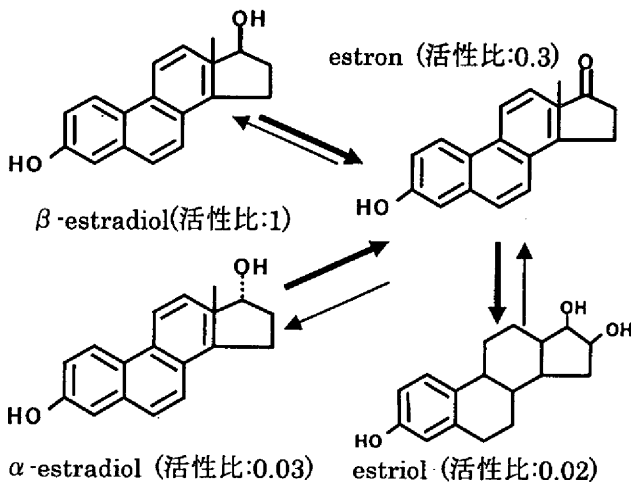
河川水試料の添加回収率は以下に示す値が得られた。

β -E2:102.3%、E1:85.6%、 α -E2:102.3%

試料の夾雑物による影響を考慮すると、この回収率は良好であると考えられる。

3.3 エストラジオールの分解過程

環境中に排出された人畜由来の主なエストロゲンは分解過程を経てそのエストロゲン作用を失っていく。17-estradiolの活性を1としたときのそれぞれのエストロゲンの活性比と分解過程を図5に示す。



サンプリング点では下水処理場の放流水による人由来のエストロゲン作用が大きいと考えられる。水環境中のE1、 β -E2、EE2が魚類にエストロゲン作用を及ぼしていることが数多く報告されている(3,4,6,14)。さらに、室内実験の結果から、10ng/L以上の β -E2に暴露することによって、ピテロジェニン

濃度が有意に上昇することが報告されている(16)。

3.4 測定結果及び考察

表2-1 揖保川河川水中のエストロゲン濃度(ng/L)

	放流口		下流	
	表層	底層	表層	底層
E1	0.31	0.13	0.20	0.13
β -E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
α -E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表2-2 揖保川堆積物中のエストロゲン濃度(ng/g-dry)

	放流口	下流
E1	0.53	0.55
β -E2	0.34	N.D.
α -E2	N.D.	N.D.

揖保川河川水、堆積物共に全ての地点においてE1が最も高い値を示した。また、 α -E2に関しては全ての地点で検出限界値を下回る結果となった。

河川水試料では、底層水と比較すると表層水で高い濃度のエストロゲン物質が検出された。これは、測定した塩分濃度の値から、底層水が海水による希釈を受けているためだと考えられる。

放流口付近においても下流における濃度とあまり差が見られず、比較的低いエストロゲン濃度となった理由については、放流された処理水が水路を経てサンプリングポイントである河口付近に流入しているため、その間に微生物などによる分解が進んだためだと推測される。さらに、揖保川下水処理場では高度処理が行われているため、放流水に含まれるエストロゲン物質が非常に微量だったことも要因の1つだと考えられる。

表3-1 船場川河川水中のエストロゲン濃度(ng/L)

	上流		放流口		下流	
	表層	底層	表層	底層	表層	底層
E1	1.76	1.39	20.29	N.D.	1.61	N.D.
β -E2	6.36	0.99	9.59	0.66	1.05	0.54
α -E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表3-2 船場川堆積物試料中のエストロゲン濃度(ng/g-dry)

	上流	放流口	下流
E1	3.58	5.07	1.27
β-E2	0.33	1.53	0.32
α-E2	N.D.	N.D.	N.D.

船場川においてもα-E2は全ての地点で検出限界を下回っていた。また、河川水、堆積物ともに放流口付近で高濃度のエストロゲン物質が検出された。特に、河川水試料の放流口表層では極めて高い値となった。この地点の水温や塩分濃度が他の地点のものとは著しく異なっていることから、下水処理放流水の影響を強く受けていることが原因となっていることがわかる。上流からもエストロゲン物質が検出された理由としては、塩分濃度の値からもわかるように、満ちてきた海水によって放流水の一部が上流へと押し流されたことが推測できる。

河川水試料において、E1よりもβ-E2が高い濃度で検出された地点においても、堆積物中ではE1が最も高い濃度となった。これは、堆積物に蓄積されている間に、微生物などによってβ-E2からE1へと変化したためだと考えられる。

表 4-1 八家川河川水試料中のエストロゲン物質濃度 (ng/L)

	上流		放流口		下流	
	表層	底層	表層	底層	表層	底層
E1	3.81	1.00	2.38	0.73	0.88	0.31
β-E2	7.51	1.14	2.24	1.00	0.38	0.48
α-E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

表 4-2 八家川 堆積物試料中のエストロゲン濃度 (ng/g-dry)

	上流	放流口	下流
E1	4.12	2.1	0.37
β-E2	0.64	0.37	0.15
α-E2	N.D.	N.D.	N.D.

八家川においてもα-E2が検出された地点はなかった。また、船場川同様、河川水試料ではβ-E2濃度が高かった地点においても、堆積物中ではE1が最も高い値を示していた。

船場川と異なり、放流口付近ではなく、上流で最もエストロゲン物質が検出される結果となった。水温や

塩分濃度の値から、上流でも放流口付近のように放流水の影響を受けていることが考えられる。さらに、採水時に放流口から下水処理排水が放流されている様子が見受けられなかったため、放流口付近の濃度が船場川と比較してあまり高くなかったことや、上流のサンプリング地点は河川からの流入水と海水がぶつかり合い、水の流れがあまり見られなかったため、潮流によって上流へ押し流されたエストロゲン物質が滞留していたことが原因の1つに挙げられる。

表 5 加古川 堆積物試料中のエストロゲン物質濃度 (ng/g-dry)

	上流	放流口 (合流式)	放流口 (分流式)	下流
E1	3.65	5.85	3.00	3.22
β-E2	0.67	0.58	0.25	0.51
α-E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

加古川では採水が行えなかったため、堆積物のみを試料とした。

加古川の堆積物試料においても、α-E2は検出限界値以下となり、3物質の中でE1が最も高く、その次にβ-E2が高い濃度となった。

図6及び図7に測定したエストロゲン物質の濃度に活性比(17β-estradiolを1とする)を乗じた値の和を河川水及び底質について示している。

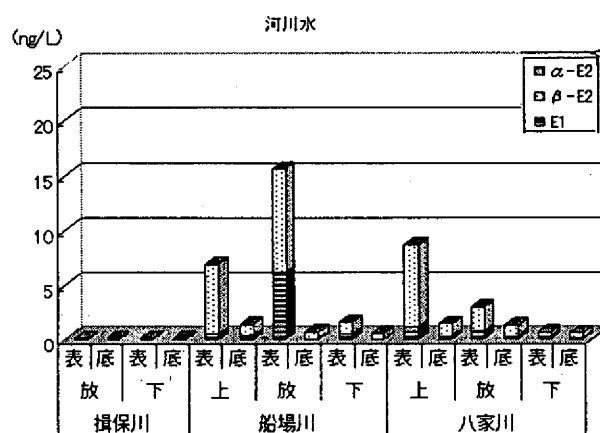


図 6 河川中のエストロゲン活性値

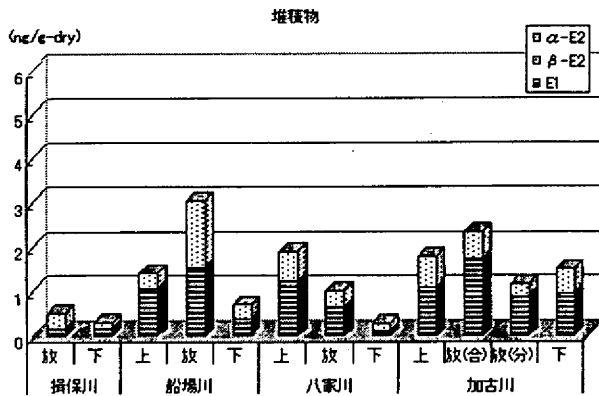


図7 河川底質中のエストロゲン活性値

河川水では、 β -E2によるエストロゲン活性の寄与が大きいものに対して、堆積物中においては概ねE1に寄与していることがわかる。E1の活性比は β -E2の0.3であるにも関わらず、このような結果となった理由は、河川水で β -E2が微生物などによる分解を受けE1として堆積物へ移行した。あるいは、堆積物中でE1へと分解され蓄積し、エストロゲン物質の大部分がE1として存在しているためだと考えられる。このことは、各河川における河川水と堆積物中のE1とE2濃度の関係からも裏付けられる。したがって、最も高い活性を有する β -E2の濃度が一般に注目されているが、堆積物についてはE1の濃度についても今後検討する必要がある。

まとめ

エストロゲン濃度の高かった、船場川の放流口付近ではエストロゲン活性値も高く、魚類において雄の雌性化を引き起こすと言われている10ng/Lを上回る値となった。国土交通省により発表された全国一級河川における平成15年度実態調査の結果では、河川水中におけるE1濃度がN.D.~0.5ng/L、 β -E2がN.D.~0.7ng/Lであるので、この結果と比較しても船場川におけるエストロゲン濃度が著しく高いことがわかる。

参考文献

- 1) 環境省 化学物質と環境 年次報告書 平成15年度版
- 2) 内海英雄 水環境と内分泌攪乱化学物質
- 3) 中室克彦 内分泌攪乱化学物質問題の現状 内分泌攪乱家宅物質問題の最前線(2002)
- 4) 井口泰泉 水環境と水生動物への内分泌攪乱物質の影響 水環境学会誌 Vol.22, No.8(1999)
- 5) 高橋正宏 人と生き物を護る下水道の新しい役割

- 6) 社団法人 日本水環境学会関西支部編 アプローチ 環境ホルモン-その基礎と水環境における最前線-
- 7) 藤森観之助ら 厚生科学研究「畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究」エストラジオール-17 β の体内動態平成11年度研究報告
- 8) 松井三郎ら 天然及び人口エストロゲンの下水道と環境中での挙動
- 9) 日本化学会 化学総説 内分泌かく乱物質研究の最前線
- 10) Schwarzenberger, F et al. [A review of faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in mammals] International Journal of Mammalian Biology, 62 (Suppl. II): 214-221, (1997)
- 11) Schwarzenberger, F et al. [Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals] Animal Reproduction Science 42: 515-526 (1996)
- 12) Y, Tashiro et al. [Livestock waters as a source of estrogens and their effects on wildlife of Manko tidal flat, Okinawa] Marine Pollution Bulletin 47 143-147, 2003
- 13) Raman DR et al [Estrogen content of dairy and swine wastes] Environ Science & Technology 38(13):3567-73 (2004)
- 14) 早川幸恵 下水処理場放流水のコイ血漿ピテロジェニン濃度に及ぼす影響
- 15) 川合真一郎 内分泌活性物質の生態影響 化学総説 内分泌かく乱物質研究の最前線
- 16) 原彰彦 水環境における汚染影響評価のバイオマーカーとしてのピテロジェニン 環境毒性学会誌 (1999)
- 17) 国土交通省 平成15年度 水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について
- 18) 松井三郎 環境ホルモンと水質汚染 環境技術 Vol.27 No.9 (1998)
- 19) Jianying Hu et al. Products of Aqueous Chlorination of 17 β -Estradiol and Their Estrogenic Activities Environmental Science & Technology Vol.37, No.24 (2003)

(平成17年10月3日受付)