

福岡市内河川・博多湾におけるエストラジオール類の実態調査

木下誠・中牟田啓子

福岡市保健環境研究所環境科学部門

Research on Detection of Estradiols in Water of Rivers and the Hakata-Bay in Fukuoka City

Makoto KINOSHITA, Keiko NAKAMUTA

Environmental Science Division, Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment

要 約

平成 16 年度に、福岡市内公共用水域における水質中のエストラジオール類実態調査を行った。その結果、17 α -エストラジオール、エチニルエストラジオール、エストリオールはいずれの地点でも検出されなかったが、17 β -エストラジオールは $<0.2 \sim 0.6\text{ng/L}$ の範囲で検出（検出率 29%）され、またエストロンは $<0.2 \sim 3.9\text{ng/L}$ の範囲で検出（検出率 76%）された。17 β -エストラジオール、エストロンの最高検出濃度を東京都や横浜市と比較すると、福岡市の値はいずれも約 1/30 $\sim$ 1/10 と低く、またエストロゲン作用強度からみると、高濃度の血中ピテロジェニンを産出させる可能性は低いことから、首都圏に比べ汚染や魚類に対する影響は少ないと推察された。

Key Words : 福岡市 Fukuoka City, 環境水 Environmental Water ,
エストラジオール Estradiol, エストロン Estrone,
高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析 LC/MS/MS

は じ め に

人や野生生物の内分泌作用に悪影響を引き起こす可能性のある外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）による環境汚染が注目され、環境調査が行われている。このうち、人畜由来の天然女性ホルモンである 17 β -エストラジオール（以下「 β -E2」という。）や合成女性ホルモンのエチニルエストラジオール（以下「EE2」という。）は、ノニルフェノール等の環境ホルモンに比べてエストロゲン作用が強いといわれている¹⁾。エストラジオール類は主に抱合体の形で人畜から排出され、環境中や下水処理場の好気槽中で分解し、エストロゲン作用が強い遊離体やエストロン（以下「E1」という。）となると考えられている。平成 13 年度の環境省全国調査では、環境水中の β -E2 は $<0.1 \sim 7.2\text{ng/L}$ の濃度で検出²⁾されている。また、平成 11 年度には、国内において主成分が EE2 である低用量経口避妊薬が許可されたことから、今後、河川などにおいて EE2 の検出頻度が増加

する可能性が考えられる。

そこで、本市のエストラジオール類の汚染状況を把握するため、平成 16 年度に福岡市内河川・博多湾において水質を調査をしたので報告する。

実 験 方 法

1. 調査地点及び分析項目

福岡市内河川 14 地点・博多湾 3 地点において、平成 16 年 5,11 月に採水を行った。調査地点を図 1 に示す。分析は β -E2, EE2, E1 の他、17 α -エストラジオール（以下「 α -E2」という。）とエストリオール（以下「E3」という。）について行った。なお試料採水時に、アスコルビン酸を酸化防止のために 1g/L の割合で添加した。

2. 分析方法

女性ホルモンの機器分析測定は主に GC/MS で行われ

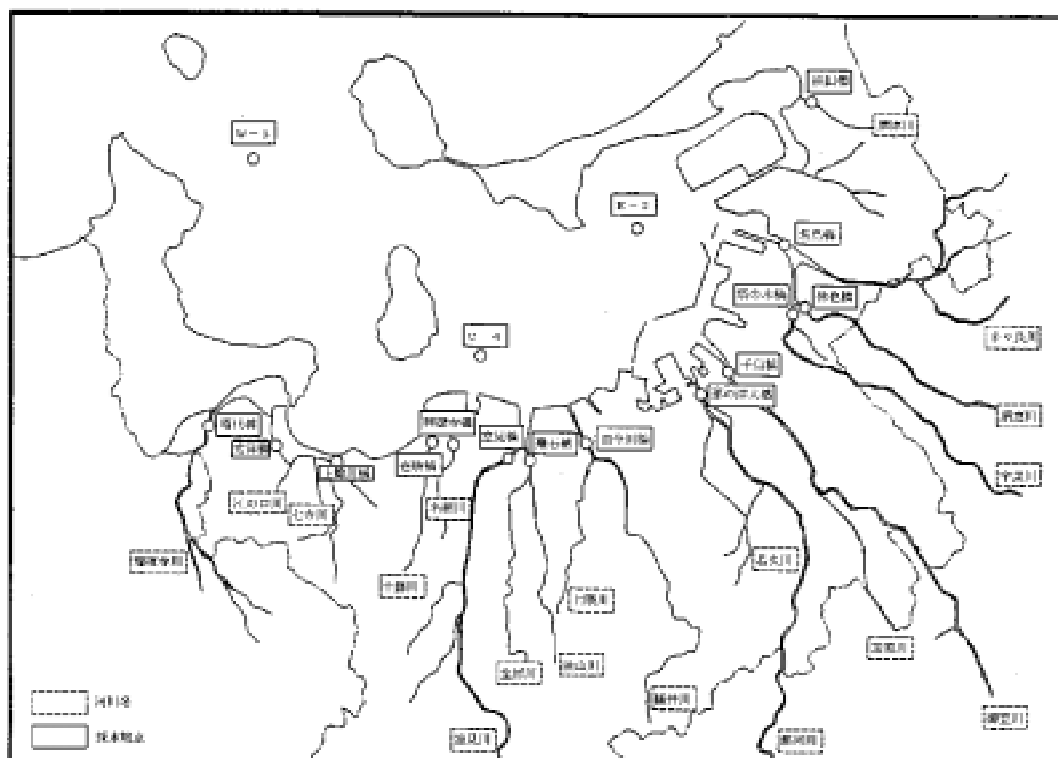


図 1 調査地点

ているが、誘導体化や前処理の煩雑さ等の問題点がある。そこで、今回は誘導体化等の操作を行わなくても良い LC/MS/MS を用いて分析を行った。前処理は要調査項目等調査マニュアル¹⁾のペンタフルオロベンジル誘導体化法に準じて分析を行った。水試料1Lをガラス繊維ろ紙GF/Cでろ過した。ろ紙上のSS分はメタノール10mLを加え、5分間超音波抽出の後抽出液をろ液にあわせ抽出用試料とした。この試料にサロゲートとして17 β -エストラジオール-d4 (以下「 β -E2-d4」という。)アセトン溶液 (2 μ g/mL, 10 μ L) を添加後、メタノール10mL, 精製水10mLでコンディショニングしたSep-Pak C18に流速10mL/minで通水した。精製水5mL, ヘキサン5mLでカラムを洗浄後、メタノール5mLで溶出させた。溶出液を窒素ガスにより溶媒を除去し、メタノール 0.5mL で再溶解し LC/MS/MSで分析した (図 2)。

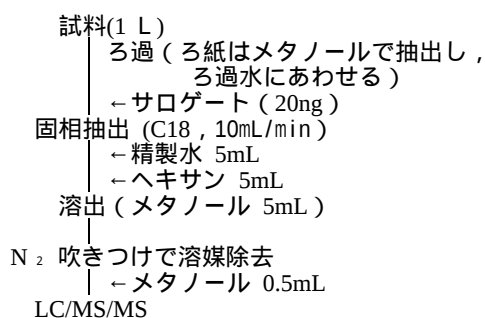


図 2 分析フロー

3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフはAgilent 社製Agilent 1100 シリーズを使用した。質量分析装置(MS/MS)はApplied Biosystems社製 API4000を使用した。

測定条件を下記に、化合物毎の条件を表 1に示す。イオン化はエレクトロスプレー(ESI)によるネガティブモードで行い、選択反応検出法(SRM)を用いて定量を行った。プレカーサーイオンは最も強度の強い[M-H]⁻イオンとした。

(測定条件)

- ・カラム: Waters Sun Fine C18, 2.1mm × 100mm, 3.5 μ m
- ・カラム温度: 40
- ・移動相: A 5mM 酢酸アンモニウム, B メタノール (B 55% → 65%)
- ・流速: 0.2mL/min
- ・注入量: 20 μ L
- ・イオン化: ESI, Negative
- ・イオンスプレー電圧: 5.5kV
- ・イオンソース温度: 750

表 1 化合物毎の条件

Compound	SRM Trace(m/z)	Declustering Potential (V)	Collision Energy(V)
E1	269.1→145.0 (269.1→159.2)	115	50
α-E2	271.2→145.0 (271.2→239.1)	100	54
β-E2	271.2→145.0 (271.2→183.2)	110	52
EE2	295.2→145.0 (295.2→267.2)	100	52
E3	287.2→145.2 (287.2→170.8)	110	56
β-E2-d4	275.2→146.9	105	54

()は確認用イオン

実験結果及び考察

1. 添加回収試験および検出下限

添加回収試験として、精製水 1L に標準物質 20ng を添加し回収率を測定した。その結果を表 2 に示す。回収率は 81 ~ 108%と良好な回収率であった。

機器の検出下限は、標準溶液 0.5ng/mL を 5 回繰り返して測定し、標準偏差の 3 倍とした。その結果と試料の検出下限を表 3 に示す。試料の検出下限を機器検出下限から求めるとエストラジオール類は 0.075 ~ 0.103ng/L だったが、環境試料では夾雑物による影響があるため、ノイズの 3 倍のピークが得られる 0.2ng/L を検出下限とした。なお、E3 はリテンションタイムが早く、また海水・河川水試料では妨害ピークの影響があっ

表 2 エストラジオール類の回収率

	回収率 (n=3)
E1	108 (8.0)
α-E2	93 (5.6)
β-E2	98 (3.7)
EE2	91 (5.7)
E3	81 (8.5)

回収率右 () 内の数値は CV%

表 3 エストラジオール類の検出下限

	機器検出下限 (pg)	試料検出下限 (ng/L)
E1	3.0	0.2
α-E2	3.1	0.2
β-E2	3.6	0.2
EE2	3.9	0.2
E3	4.2	0.5

たため、妨害ピークがあっても検出できるレベルの 0.5ng/L を検出下限とした。

2. 調査結果

各地点の β-E2, E1 濃度について、5 月の結果を図 3 に、11 月の結果を図 4 に示す。また、β-E2 と E1 のスタンダード、サンプルのクロマトグラムを図 5 に示す。なお、α-E2, EE2, E3 はいずれの地点でも検出されなかった。β-E2 は <0.2 ~ 0.6ng/L の範囲で検出され、検出率は 29%だった。平成 13 年度の環境省全国調査²⁾で <0.1 ~ 7.2ng/L の範囲で検出され、検出率が 40%であった結果と比較すると、福岡市の最高検出濃度は低かった。また、東京都では <0.1 ~ 17.7ng/L (ELISA 法で分析)³⁾、横浜市では 0.3 ~ 11ng/L (横浜市平成 15 年度環境ホルモン調査結果)と報告されているが、その値と比較しても福岡市の最高検出濃度は低かった。5 月と 11 月を比較すると 5 月の方が検出率は高かった。

E1 は <0.2 ~ 3.9ng/L の範囲で検出され、検出率は

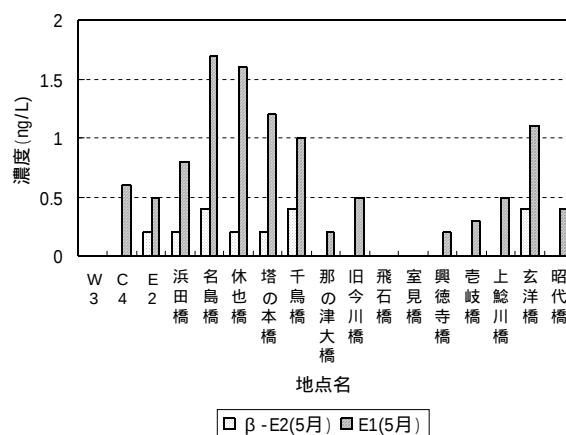


図 3 実態調査結果 (5 月)

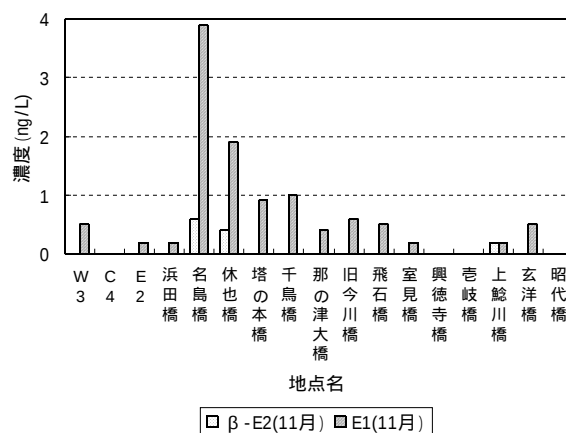


図 4 実態調査結果 (11 月)

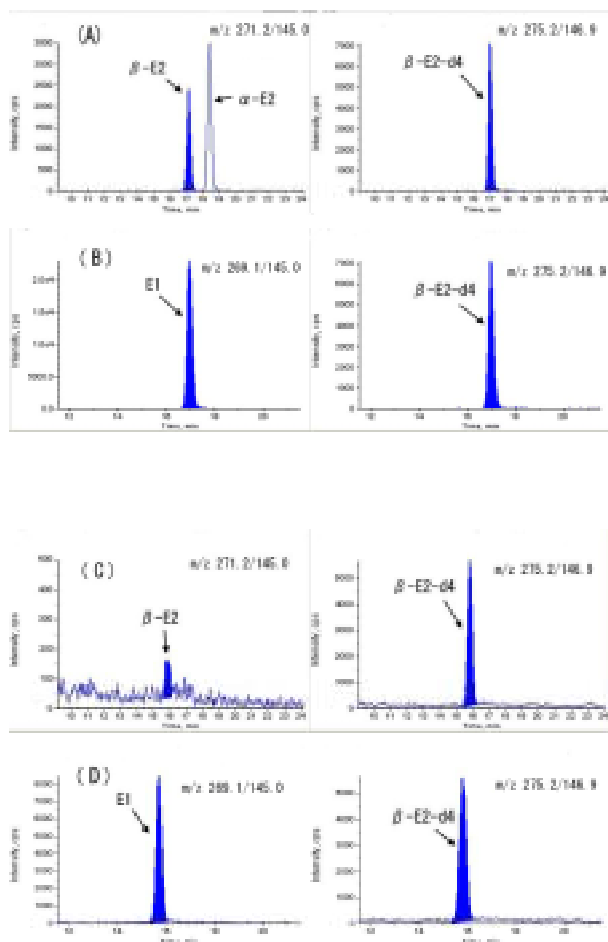


図5 β -E2 と E1 のクロマトグラム
(A) β -E2 スタンダード (std 10 μ g/L)
(B) E1 スタンダード (std 10 μ g/L)
(C) β -E2 サンプル(5月名島橋)
(D) E1 サンプル(5月名島橋)

76%であり、 β -E2 より高濃度かつ高い割合で検出された。また、ほとんどの地点で β -E2 よりも高い値を示し、11 月の上鯉川橋を除いて、E1 は β -E2 の 2.5 ~ 8 倍の濃度だった。 β -E2 に対する E1 の比が河川水で 5 ~ 7 倍、下水処理水で 4 ~ 9 倍という報告³⁾があるが、福岡市の結果も同じような値であった。なお、E1 濃度が東京都では <0.1 ~ 107.1ng/L (ELISA 法で分析)³⁾、横浜市では <0.2 ~ 46ng/L (横浜市平成 15 年度環境ホルモン調査結果)と報告されているが、それらの値と比較して β -E2 と同様に福岡市の最高検出濃度は低かった。

地点毎にみると、5 月、11 月とも名島橋が β -E2 と E1 が最も高い値を示した。その他では休也橋、塔の本橋、千鳥橋、玄洋橋において E1 が 1.0ng/L 前後と高い値を示し、 β -E2 も検出した。 β -E2 や E1 等の排出源は都市では下水処理場が主であるといわれているが、名島橋はすぐ上流に、また千鳥橋も上流に下水処理場があり、

その放流水の影響により β -E2 や E1 が高くなったと推察された。また、休也橋と塔の本橋についても上流にそれぞれし尿処理施設があり、その放流水の影響で休也橋と塔の本橋の β -E2 や E1 が高くなったと推察された。東京都と横浜市の結果も下水処理場の下流で β -E2 と E1 が高くなることが報告されており^{3), 5)}、福岡市も同様の傾向を示した。玄洋橋には上流に下水処理場はないため、 β -E2 や E1 が高くなる原因は不明である。しかし、浄化槽を持つ施設がいくつかあるため、浄化槽排水の影響が原因である可能性も考えられた。なお、博多湾については 5 月に C-4 及び E-2 の地点で β -E2 と E1、11 月に W3 で E1 が検出されたが、いずれも低濃度だった。

今回の水質調査では、 β -E2 が高濃度に検出された地点はあまりなかったが、水質からは検出されなくても底質から検出されている例⁴⁾もあり、底質の状況も把握する必要があると思われる。その場合は LC/MS/MS 分析では前処理の検討が必要である。

3. エストロゲン作用強度の比較

レポーター遺伝子アッセイ(酵母)法や受容体結合アッセイ法等の *in vitro* 試験法によるエストロゲン作用強度⁵⁾を表 4 に示す。この表より、魚類に与える内分泌攪乱作用が既に確認されているノニルフェノールと *t*-オクチルフェノールに比べ、 β -E2 が約 300 ~ 3000 倍、E1 が約 40 ~ 500 倍エストロゲン作用強度が高いことがわかる。一方、東京都は都内河川で採捕した雄コイの血中ピテロジェニン濃度と河川水中のエストロゲン作用強度との関係を調べており、エストロゲン作用強度が 10ng/L 以上あれば雄コイに 1 μ g/mL 以上の血中ピテロジェニンを産出させる可能性が高いと報告している⁶⁾。なお、エストロゲン作用強度(Y_{E1+E2})は下記の(1)式で産出する。

$$Y_{E1+E2} = X_{E2} + X_{E1} \times 0.27 \dots (1)$$

X_{E1} : E1 濃度 (ng/L, ELISA 法)

X_{E2} : β -E2 濃度 (ng/L, ELISA 法)

(1)式に従い、今回の福岡市の結果からエストロゲン作用強度を算出すると、最も高い 11 月の名島橋でもエストロゲン作用強度は 1.65ng/L であった。 β -E2 について、ELISA 法では LC/MS/MS 法よりも 4 ~ 5 倍程度高い値となる傾向があると報告されている⁷⁾が、それを考慮しても 10ng/L 未満となり、高濃度の血中ピテロジェニンを産出させる可能性は低いと推察された。

また、今回のエストロゲン類調査では同時にノニルフェノールや *t*-オクチルフェノール、ビスフェノール A も測定したので、ノニルフェノール等の環境ホルモン物質の影響を加えるため、表 4 の値を参考にそれ

表 4 各種 *in vitro* 試験法によるエストロゲン作用強度の比較

	E2 比強度 (β -E2 のエストロゲン作用を 1 とした場合の強度)			
	レポーター遺伝子アッセイ (酵母)			受容体結合アッセイ
	西川ヒト ER ^{a)}	西川メダカ ER ^{b)}	Sumpter ヒト ER ^{c)}	ヒト ER
β -E2	1	1	1	1
E1	0.16	0.17	0.27	0.44
ノニルフェノール	0.00033	0.0026	0.0002	0.0011
t-オクチルフェノール	0.0021	0.0044	-	0.0012
ビスフェノール A	0.000042	0.00029	0.00006	0.0020

注 a) : 西川⁵⁾の試験系でヒトの ER (女性ホルモン受容体) を使用

注 b) : 西川⁵⁾の試験系でメダカの ER を使用, 注 c) : Sumpter⁵⁾の試験系でヒトの ER を使用

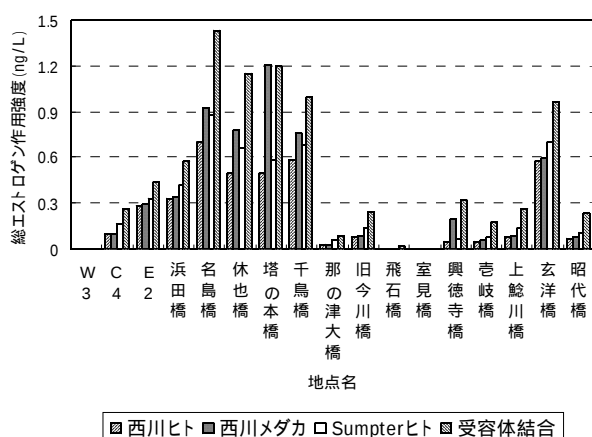


図 6 各地点の総エストロゲン作用強度 (5 月)

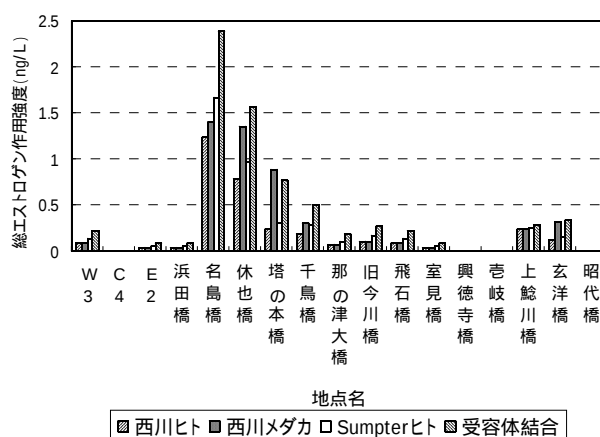


図 7 各地点の総エストロゲン作用強度 (11 月)

ぞれの試験法による総エストロゲン作用強度 (E1 等の濃度に E2 比強度を乗じたものの和) を算出した . その 5 月の結果を図 6 , 11 月の結果を図 7 に示す . 前述の , 雄コイに $1 \mu\text{g/mL}$ 以上の血中ビテロジェニンが産出すると予測されるエストロゲン作用強度 (10ng/L) は , レポーター遺伝子アッセイ (酵母) 法の Sumpter ヒト ER の E2 比強度を用いている . Sumpter ヒト ER の値を用いた総エストロゲン作用強度で , 福岡市の最も高い値は 11 月の名島橋の 1.66ng/L であった . この値も ELISA 法の値に換算したとしても 10ng/L 未満であることから , 高濃度の血中ビテロジェニンを算出させる可能性は低いと推察された .

まとめ

平成 16 年度に , 福岡市内公共用水域における水質中のエストラジオール類実態調査を行った . その結果 , 以下のことが明らかとなった .

1. β -E2 と E1 が検出されたが , α -E2 , EE2 , E3 はいずれの地点でも検出されなかった . β -E2 は $<0.2 \sim 0.6\text{ng/L}$ の範囲で検出され , 検出率は 29% だった . E1 は

$<0.2 \sim 3.9\text{ng/L}$ の範囲で検出され , 検出率は 76% と β -E2 より高濃度かつ高い割合で検出された . そしてほとんどの地点で β -E2 よりも高い値を示した .

2. 地点別の β -E2 , E1 濃度を比較すると , 上流に下水処理場やし尿処理施設がある名島橋 , 休也橋 , 塔の本橋 , 千鳥橋が高かった . いずれもそれらの放流水の影響を受けたと推察された .

3. β -E2 と E1 の最高検出濃度を東京都や横浜市と比較すると , 福岡市の値はいずれも約 $1/30 \sim 1/10$ と低く , またエストロゲン作用強度からみると , 高濃度の血中ビテロジェニンを産出させる可能性は低いことから , 首都圏に比べ汚染や魚類に対する影響は少ないと推察された .

しかし , 実際の環境水には今回対象とした女性ホルモンやノニルフェノール , t-オクチルフェノール以外にもエストロゲン作用を示す物質がある可能性も考えられ , 今後の研究の動向をみる必要がある .

文 献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課 : 要調査項目等調査マニュアル , 2000

- 2)環境省環境管理局水環境部：平成 13 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査，2002
- 3)和波一夫他：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その 10），東京都環境科学研究所年報，66 ～ 73，2002
- 4)橋本和久他：広島市におけるエストロジオール類の調査結果，広島市衛生研究所年報，22，119 ～ 121，2003
- 5)倉林輝世他：横浜市内河川における環境ホルモン物質のモニタリング調査，横浜市環境科学研究所所報，28，39 ～ 45，2004
- 6)和波一夫他：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その 8），東京都環境科学研究所年報，45 ～ 55，2002
- 7)日本下水道協会：下水試験方法（追補暫定版）-2002 年版-，2002