

多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その3） —エストロゲン様物質の総量測定法—

嶋津 暉之 和波 一夫 杉江 あゆみ
(現Duke大学)

加田 誠* 高橋 憲一* 加地 弘一**
(*埼玉工業大学) (**非常勤研究員)

要 旨

多摩川の河川水や下水処理水等に含まれるエストロゲン様物質の総量を把握する手法を検討して、それらのエストロゲン作用強度を測定した。主に明らかになったことは次のとおりである。

- (1) バインディングアッセイ法、大阪大学の遺伝子組み換え酵母法、Brunel大学の遺伝子組み換え酵母法の中で、河川水等について有効なエストロゲン作用強度の測定法は、Brunel大学の酵母法であった。
- (2) この方法で求めた各河川水の測定値は、各河川の雄コイにおいて高濃度の血清ビテロジェニンが検出される割合と符合しており、水中のエストロゲン様物質が雄コイの血清ビテロジェニン濃度を高める基本的な要因であると考えられる。
- (3) 上記3方法で求めた各エストロゲン様物質の比活性値を使って、河川水中のノニルフェノールおよびビスフェノールAのエストロゲン作用強度への寄与を検討したところ、その寄与はエストラジオールに比べてわずかなものであった。

キーワード：エストロゲン様物質、遺伝子組み換え酵母、バインディングアッセイ、エストラジオール、ノニルフェノール、ビスフェノールA

1 はじめに

日本で内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）が大きな社会問題になり始めた1998年、多摩川のコイに関する生殖異変の調査結果が横浜市立大、帝京大、東京農工大等のグループから発表された¹⁾。その結果は環境ホルモンの影響で多摩川のコイに雄の雌化などの生殖異変が起きていることを示唆するものであった。当研究所では、この発表を受けて、多摩川のコイ等において生殖異変がどこまで進行しているのか、また、そのような生殖異変を起こす物質、内分泌かく乱化学物質が河川においてどの程度の濃度で存在し、それがどこから排出されているかを明らかにするための調査を開始した。本報告は後者の内分泌かく乱化学物質に関する調査結果の第一報をとりまとめたものである。

内分泌かく乱化学物質として環境庁がリストアップした化学物質は67種類に及ぶ。そのうちの大半がエス

トロジェン（女性ホルモン）として作用するエストロゲン様物質であり、多摩川等の雄コイの生殖異変に関与する可能性がある。しかし、67種類の内分泌かく乱化学物質はとりあえずリストアップされたものであって、似たような化学構造を持つ物質は多数あることから、内分泌かく乱化学物質として作用する物質は今後のスクリーニングテストによって大幅に増加することが予想される。その他に、人体等から排出される天然エストロゲンもあるし、ピルの解禁に伴い、合成エストロゲンも雄コイの生殖異変に関与する可能性がある。

建設省は1998年度、99年度にコイ等の魚類調査とともに、河川と下水処理場について内分泌かく乱化学物質の実態調査を行った。調査対象物質は、年間生産量と環境中での検出状況を勘案して選定したノニルフェノール等の7物質と天然エストロジェンの1物質である。

この調査の結果、多摩川についても多摩川原橋や田園調布堰においてノニルフェノールなど、数種の物質が検出されている。しかし、これらは水系でエストロジェンとして作用する物質のごく一部であり、その他に同様な作用をもつ物質が数多く存在する可能性がある。更に、これらの各物質がエストロジェンとして作用する強度は本報告でも述べるように、物質ごとに大きな差があり、検出されてもその物質が魚類等に影響を及ぼしているとは必ずしも言えない。むしろ、個々の物質の作用というより、多くの物質が複合して魚類等に対して影響を与えている可能性が高い。

このように、水系では数多くのエストロジェン様物質が存在する可能性が高いこと、それぞれの物質の作用強度に大きな差があること、それらの総合作用が重要であることを踏まえれば、個々のエストロジェン様物質を調査するだけでなく、水中のエストロジェン様物質の総量を把握する必要がある。すなわち、河川水中の物質が全体としてエストロジェン作用強度をどの程度持っているかを調べて、エストロジェン様物質の総量を把握し、魚類等への影響とその削減対策を検討することが必要と考えられる。

このような観点から、本研究では多摩川等の河川水や下水処理水のエストロジェン総合作用強度を測定し

て、水中のエストロジェン様物質の総量を把握する手法を検討した。同時に、エストロジェンおよびエストロジェン様物質の中で、最も作用強度が高い天然エストロジェン二種と合成エストロジェンの分析を行い、エストロジェン様物質の総量との関係を検討した。これらの検討結果を報告する。

2 方法

(1) 対象試料

5地点の河川水（多摩川・拝島橋、多摩川・多摩川原橋、浅川・高幡橋、野川・仙川合流点、神田川・水道橋）、下水処理場4か所の放流水（多摩川中流部の北多摩1号処理場、野川流域の三鷹市東部処理場、浅川流域の八王子市北野処理場、神田川流域の落合処理場）を対象試料とした。その他に、都市基盤整備公団八潮団地（埼玉県八潮市）の汚水処理場に設置してある当研究所の実験施設の処理水等も試験測定の対象試料とした。

(2) エストロジェン作用強度の測定法

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングテストの手法として用いられている次の三つの方法を検討した。

- ・バインディングアッセイ法²⁾
- ・大阪大学の遺伝子組み換え酵母法³⁾

表1 エストロジェン作用強度の測定原理

方法	測定原理
蛍光偏光度計を用いたバインディング法	蛍光標識を付けた合成エストロゲン ¹ を組み換え体ヒエストロゲンレセプター（昆虫細胞の中で培養した時、 <i>in vitro</i> に作製させたもの）にあらかじめ結合させておく。そこに試料を添加すると、試料中のエストロゲン様物質がレセプターに結合する。その結合の度合いは、添加したエストロゲン様物質の量と強度によって左右される。エストロゲン様物質がレセプターに結合すると、その分だけ、合成エストロゲン ¹ が遊離する。この遊離の程度を蛍光偏光度計で測定する。蛍光偏光度は蛍光標識を持つ物質の分子量が大きいほど高い値を示す。レセプターは分子量が大きいので、蛍光標識を付けた合成エストロゲン ¹ がレセプターと結合している状態では偏光度が高く、レセプターから遊離すると、偏光度が低くなる。そこで、蛍光偏光度を測定することによって、添加した試料中のエストロゲン様物質の強度を知ることができる。
大阪大学の遺伝子組み換え酵母法	ヒエストロゲンレセプターを組み替えた酵母にエストロゲン様物質を加え、レセプターとの結合によって生成される酵素の濃度を発色度で測定し、それによってエストロゲンとしての強度を知る方法である。大阪大学の酵母組換え体は、ヒエストロゲンレセプターの二つの結合部位（エストロゲンとの結合部位とDNAとの結合部位）を形成する融合蛋白質を発現する方SPF(核外遺伝子)、およびレセプターと遺伝子転写(遺伝子転写の結果として所定の酵素β-ガラクトシダーゼが生成される)を仲介するアプタペクターを発現する方SPFを組み替えたもので、two-hybrid酵母と言われている。大阪大学の西川淳一博士が開発したものである。
Brunel大学の遺伝子組み換え酵母法	英国Brunel大学のSumpter教授が開発したもので、基本的には大阪大学の酵母法と同じである。この酵母には、ヒエストロゲンレセプター遺伝子と、エストロゲンと結合したレセプターの応答部位、および応答後に転写活性化するレセプター遺伝子が組み込まれている。エストロゲン様物質がレセプターと結合すると、それが更に応答部位に結合してレセプター遺伝子を転写活性化し、酵素β-ガラクトシダーゼを生成する。その酵素の量を発色度で測定する。

・ Brunel 大学の遺伝子組み換え酵母法⁴⁾

各手法の測定原理は表1に示すとおりである。バインディングアッセイ法はパンベラ社製の蛍光偏光度計を使用し、大阪大学の酵母は同大学の西原 力教授から、Brunel大学の酵母は英国Brunel大学のSumpter, J.P.教授から提供を受けた。

これらの方法を用いて、次に示すエストロゲン様物質のエストロゲン作用強度を測定するとともに、(1)の試料について試験測定を行い、その結果に基づいて河川水等の測定に適した方法を選択した。選択した方法についてはまず測定条件を検討し、その上で(1)の河川水と下水処理水の測定を行った。

・ エストロゲン

天然エストロゲン：17β-エストラジオール（以下、エストラジオールと記す）、エストロン、エストリオール

・ エストロゲン様物質

合成女性ホルモン：17α-エチニルエストラジオール（経口避妊薬ピルの主成分、以下、エチニルエストラジオールと記す）

人工化学物質：ノニルフェノール、ビスフェノールA、4-n-オクチルフェノール、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

(3)エストロゲン作用強度の測定手順

採水試料は冷蔵庫に保管した後、図1に示す手順で濃縮乾固し、それを用いて上記の三つの方法により、それぞれ図2~4に示す手順でエストロゲン作用強度を測定した。

(4)エストロゲンの分析法

天然および合成エストロゲンの三物質、すなわち、エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールをELISA法（抗原抗体反応を利用した酵素免疫法）で測定した。

それぞれの分析に用いたキット、抗体は次のとおりである。

- ・ エストラジオール：R-biopharm社のキットRIDA SCREEN 17β-Estradiol
- ・ エストロン：Chemicon社の抗体RABBIT ANTI-ESTRONE とCosmo社の抗体ESTRONE をサンドイッチELISA法に使用
- ・ エチニルエストラジオール：R-biopharm社のキットRIDA SCREEN Ethinylestradiol

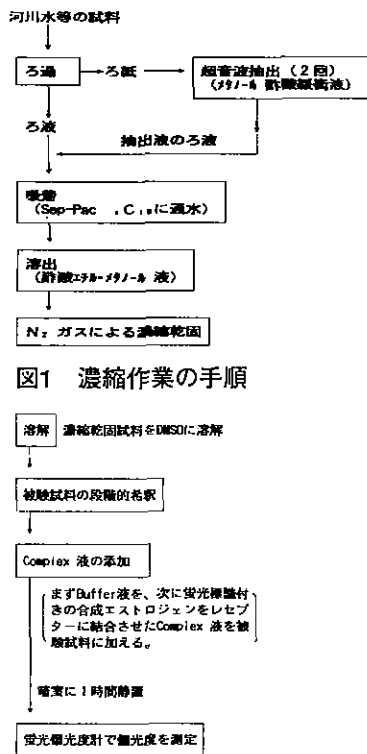


図1 濃縮作業の手順

図2 バインディングアッセイ法の測定手順

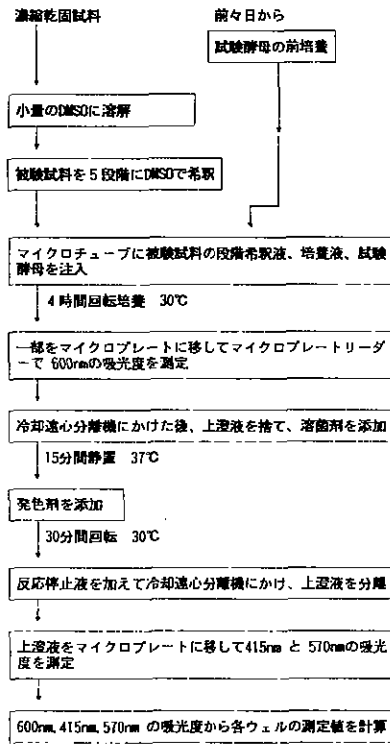


図3 大阪大学酵母法の測定手順

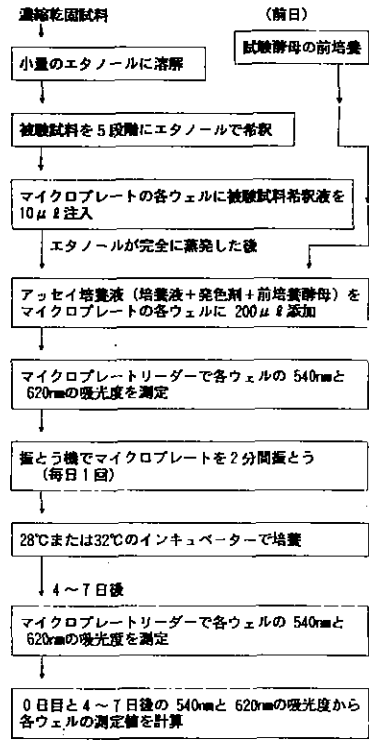


図4 Brunel大学酵母法の測定手順

3 結果

(1) 三つの方法によるエストロゲン作用強度の測定

1) バインディングアッセイ法

ア. エストロゲン様物質

バインディングアッセイ法によって6種類のエストロゲン様物質を測定した結果を図5に示す。各物質を段階的に希釈してそれぞれの濃度について測定し、横軸を濃度、縦軸を蛍光偏光度にとって測定結果を図示した。同図は、各物質の濃度が高くなると、エストロゲンとしての作用が大きくなって蛍光偏光度が大きくなることを示している。各物質のエストロゲン作用強度（比活性値）は、エストラジオールを基準にした値で示す。その値は、エストラジオールの蛍光偏光度の最大値と最小値の平均（中間値）に相当する濃度を折れ線グラフから読み取ることから求められる。例えば、エストラジオールとノニルフェノールはこの中間値に相当する濃度がそれぞれ1650nm/l、373000nm/lであるから、ノニルフェノールのエストロゲン作用強度はエストラジオールの $1650 \div 373000 = 0.004$ 倍となる。

このように各エストロゲン様物質の比活性値を求めた結果を図6に示す。ノニルフェノールとビスフェノールAは0.004程度、エストロンとエストリオールは0.04~0.05であり、一方、エチニルエストラジオールは2.1という高い値であった。

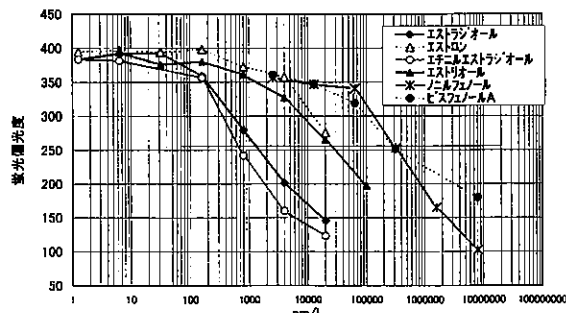


図5 バインディングアッセイ法によるエストロゲン様物質の測定結果

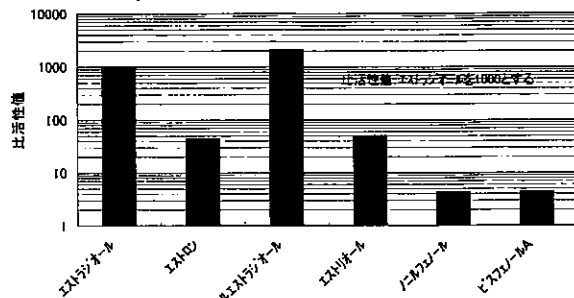


図6 エストロゲン様物質の比活性値 (バインディングアッセイ法)

イ. 実試料

バインディングアッセイ法を用いて、汚水処理水と流入原水を分析した結果を図7に示す。この場合も試料を段階的に希釈して、各希釈試料について測定し、濃縮倍数を横軸にとって測定結果を図示した。この測定例では、汚水処理の方式によって濃縮倍数と偏光度との関係が異なり、一応の傾向が得られている。

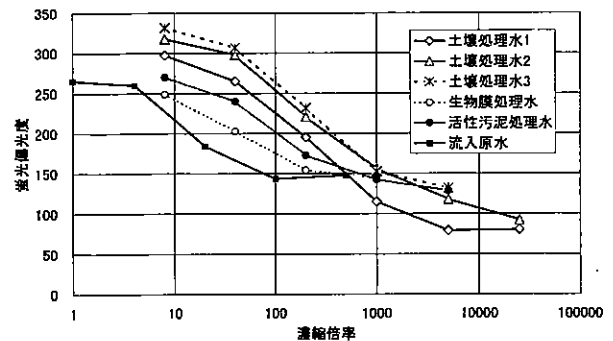


図7 汚水処理水等のエストロゲン作用強度 (バインディングアッセイ法)

各試料のエストロゲン作用強度は、同時に測定した標準（エストラジオール）の中間値に相当する濃縮倍数から求める。例えば、土壌処理水1は300倍である。これからエストラジオール換算濃度を求めると、標準の中間値は1650nm/lであるから、 $1650 \text{ nm/l} \times 272 \div 300 \text{ 倍} = 1500 \text{ ng/l}$ となる（272はエストラジオールの分子量）。しかし、この試料は生活排水を処理したもので、そのエストロゲン作用強度は、人体のエストロゲン排出量から推測すると、数十ng/l程度になるはずであり、それと比べると、この分析法は数十倍以上も大きい値を示した。他の試料についてもきわめて大きな作用強度が得られた。

その原因として次の2点が考えられる。

- 試料に含まれている蛍光物質が測定を妨害する。
- エストロゲンとしての作用をもたないもの、例えば、カテキン等のポリフェノール類もエストロゲンレセプターに結合して、蛍光標識の付いた合成エストロゲンを遊離させる。

この方法を実試料に適用するためには、これらの問題を解決することが必要であり、今回は河川水等の測定法として採用しないことにした。

2) 大阪大学の遺伝子組み換え酵母法

ア. エストロゲン様物質

大阪大学酵母法によって6種類のエストロゲン様物質を測定した結果を図8に示す。各物質は段階的に希

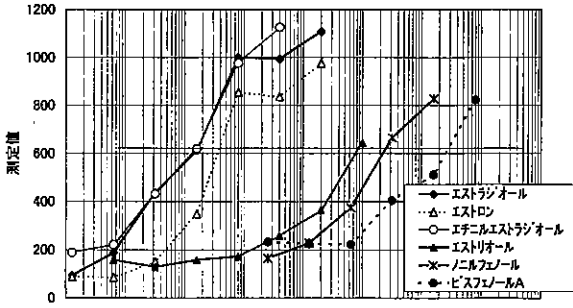


図8 大阪大学酵母法によるエストロゲン様物質の測定結果

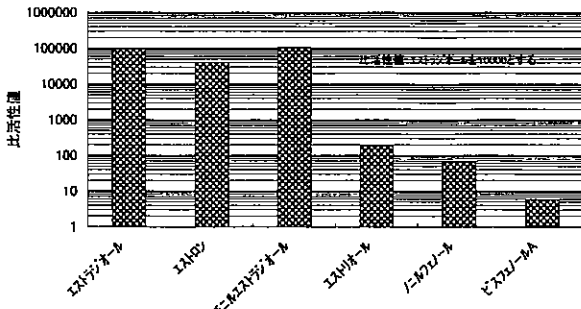


図9 エストロゲン様物質の比活性値 (大阪大学酵母法)

積して横軸に濃度、縦軸に測定値(415nm、570nm、600nmの吸光度から求めた計算値)をとって図示した。同図は、各物質の濃度が高くなるほど、測定値が大きくなり、エストロゲンとしての作用が大きくなったことを示している。1)と同様に、エストラジオールの中間値(測定値450)に相当する濃度を各物質の折れ線グラフから読み取って、各物質のエストラジオール換算のエストロゲン作用強度(比活性値)を求めた。

各エストロゲン様物質の比活性値を求めた結果を図9に示す。ノニルフェノールとエストリオールが0.001、ビスフェノールAが0.0001のオーダーで、エストロンは0.4、エチニルエストラジオールは1.1であり、バイディングアッセイ法の結果とは異なっている。

イ. 実試料

大阪大学酵母法で河川水と下水処理水を分析した結果を図10に示す。濃縮倍数を横軸にとり、測定値を図示した。濃縮倍数の上昇とともに、測定値も大きくなり、それなりの傾向が読み取れる。しかし、これらの試料の最大測定値は300程度にとどまり、上記のエストラジオールの中間値450には達しなかった。これは試料の濃縮倍数の上昇により、酵母の増殖を阻害する物質の濃度が高まったからだと推測される。

図10において濃縮倍数が1000倍を超えると、折れ線の伸びが小さくなって阻害物質の影響がみられるものが

多い。図9において中間値450に相当するエストラジオールの濃度は160 nm/l = 44 μg/lであるから、たとえば実試料のエストロゲン作用強度が10ng/lの場合は、中間値より右側では4400倍以上の濃縮が必要になって阻害作用が働く範囲に入ってしまう。

このように今回の結果では、大阪大学酵母法でエストロゲン作用強度を求めるためには、濃縮倍数をこの程度まで上げなければならず、他方、そこまで濃縮倍数を上げると、酵母増殖の阻害物質が影響してしまうという問題が生じたので、総合作用強度の測定法として本法の採用を見合わせることにした。ただし、これはあくまで今回の結果だけからの判断であり、阻害物質の影響等については今後の検証が必要である。

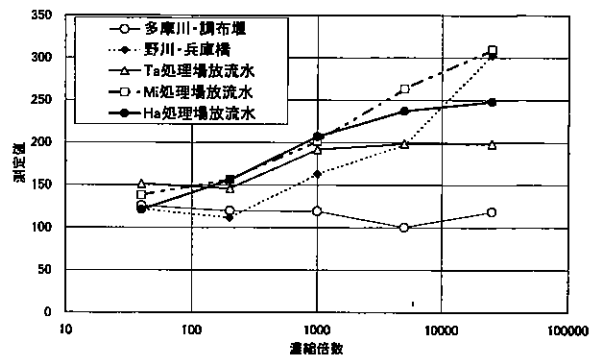


図10 河川水等のエストロゲン作用強度 (大阪大学酵母法)

3) Brunel大学の遺伝子組み換え酵母法

ア. エストロゲン様物質

Brunel大学酵母法によって8種類のエストロゲン様物質を測定した結果を図11に示す。各物質は段階的に希釈して横軸に濃度、縦軸に測定値(540nmと620nmの吸光度から求めた計算値)をとって図示した。同図は図8と同様、各物質の濃度が高くなるほど、測定値が大きくなり、エストロゲンとしての作用が大きくなったことを示している。1)、2)と同様に、エストラジオールの中間値(測定値0.75)に相当する濃度を各物質の折れ線グラフから読み取って、各物質のエストラジオール換算のエストロゲン作用強度(比活性値)を求めた。

その結果を図12に示す。ノニルフェノールとビスフェノールAが0.0001のオーダー、エストロンが0.3程度、エチニルエストラジオールが1程度であり、バイディングアッセイ法や大阪大学酵母法の結果とは異なるところがある。また、4-n-オクチルフェノールはノニルフェノールより1桁低く、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル

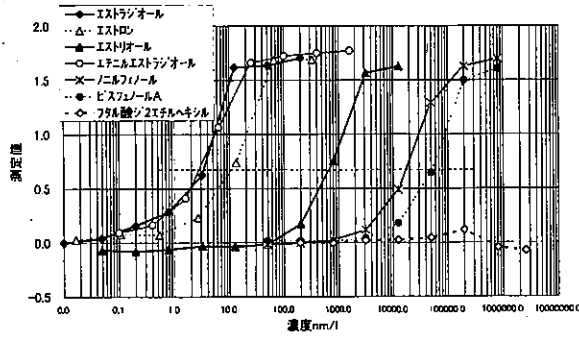


図11 Brunel大学酵母法によるエストロゲン様物質の測定結果

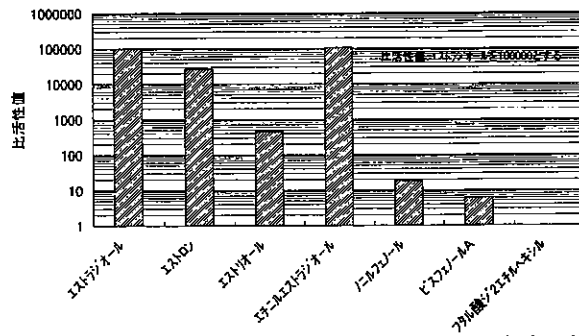


図12 エストロゲン様物質の比活性値 (Brunel大学酵母法)

はゼロに近かった。

イ. 実試料

Brunel大学酵母法で河川水と下水処理水を分析した結果を図13(2)に示す。同図(1)のエストラジオールの折れ線と対応するように、各試料は濃縮倍数による折れ線を描いており、エストラジオールの中間値に相当する各試料の濃縮倍数を読み取ることができる。エストラジオールの中間値相当の濃度は3.5 nm/l = 952ng/lであり、2)の大阪大学酵母法と比べると、本法は感度が約50倍高い。その結果として、中間値に相当する試料の濃縮倍数は、500倍以下になっており、この程度の濃縮倍数であれば、酵母増殖阻害物質の影響がないと推測される。

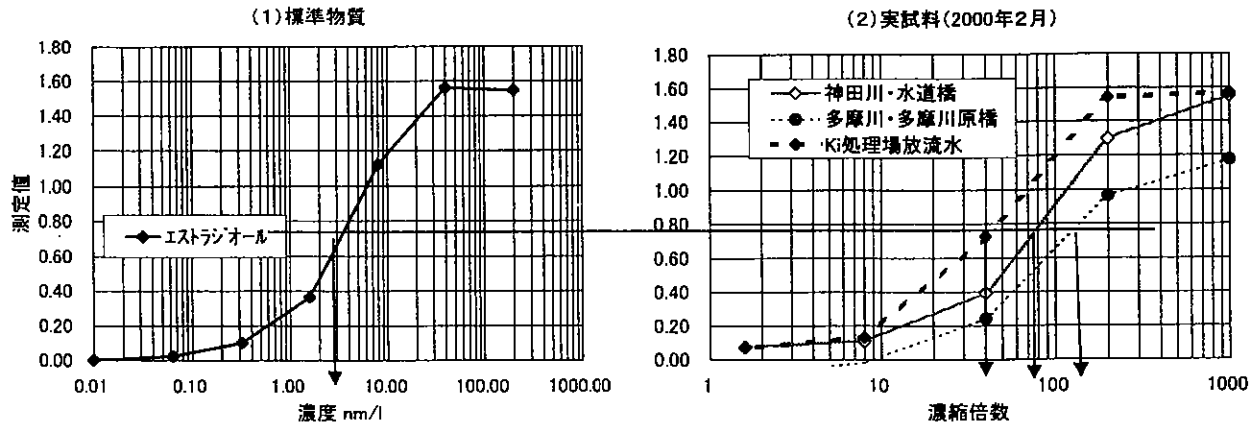


図13 河川水等のエストロゲン作用強度 (Brunel大学酵母法)

このように、Brunel大学酵母法によって河川水等のエストロゲン作用強度を求めることが可能と判断されたので、本研究ではBrunel大学酵母法を採用することにした。

(2) Brunel大学酵母法の測定条件と測定結果

1) 測定条件

Brunel大学酵母法で実試料を分析するにあたり、同方法の測定条件を検討した。検討項目は次のとおりである。

酵母の添加量、培養温度、培養日数

図14に酵母の添加量を変化させた場合の測定値の経時変化を示す。酵母添加量は、酵母の前培養液の620nm吸光度(1cmセル)が1の時、試験培養液(Assay Medium)に4%の濃度で添加した場合を1とし、その1.5倍、2倍の3段階とした。酵母添加量を2倍まで増やすと、培養日数が6日を過ぎる段階で、測定値の伸びが小さくなる傾向がみられる。このように酵母量によって測定値が変わることがあるので、実試料の測定では酵母添加量を1倍に統一することにした。

図15に培養温度を変えた場合の測定値の経時変化を示す。28℃の場合は7日で、32℃の場合は5日で測定値が最大を示しており、実試料の測定では、この培養日数を確保することにした。

2) 測定結果

Brunel大学酵母法で河川水と下水処理水を測定した結果を表2に示す。河川水等の試料は6月、8月、11月、2月と、延べ4回採水したが、試料の濃縮と保管に当初は想定していない課題があることが分かった。具体的には次のとおりである。

a. 多くの試料は1998年10月の環境庁のエストラジオール分析マニュアルにしたがって、採水試料を濃縮し、

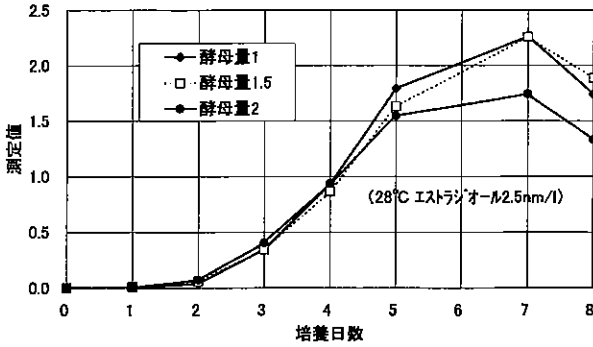


図14 Brunel大学酵母法の酵母培養試験 (酵母量の検討)

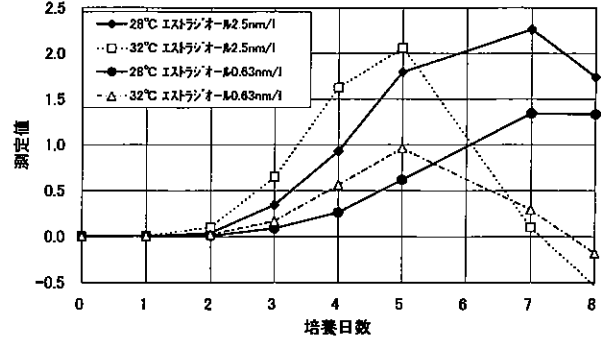


図15 Brunel大学酵母法の酵母培養試験 (培養日数の検討)

表2 Brunel大学酵母法によるエストロゲン作用強度の測定結果 (2000年2月採水試料)

(エストラジオール換算濃度 ng/l)								
多摩川・拝島橋	多摩川・多摩川原橋	浅川・高幡橋	野川・仙川合流点	神田川・水道橋	北多摩1号処理場放流水	落合処理場放流水	三鷹市処理場放流水	八王子市処理場放流水
0.2	7.0	2.5	1.8	7.2	13.7	6.6	10.8	19.6

抱合体分解の処理を行ったが、その抱合体分解の過程でエストロゲン様物質そのものが分解し、低い測定値しか得られないことが多かった。

b. 濃縮と測定の方法の検討にかなりの日数を要したため、一部の試料は冷蔵庫に長期間保管することになった。エストラジオールは微生物による分解性が比較的高く、室温では1週間で約半分まで分解する。冷蔵保管の場合は数週間以内であれば、分解率はわずかであるが、それを超えると、次第に無視できない分解が進行していく。エストロゲン様物質も同様と推測され、長期間保管の結果、測定値が予想外に低い値になった。

以上のことから、適切な濃縮と保管ができた2月の試料の測定結果のみを示した。表2のとおり、エストラジオール換算のエストロゲン作用強度は河川水で0 ~ 7 ng/l、下水処理水で7 ~ 20ng/lの値が得られた。河川水の中で最も高いエストロゲン作用強度を示したのは、多摩川・多摩川原橋と神田川・水道橋であった。両者とも、下水処理場の影響が大きい地点である。また、下水処理水の値は処理場による差が大きく、最大と最小で約3倍の違いがみられた。

(3)エストロゲン3成分の分析結果

エストロゲンおよびエストロゲン様物質の中でエストロゲン作用強度の大きい三物質、すなわち、エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオール (以下、エストロゲン3成分という) を分析した結果を表3に示す。平均値をみると、河川水、下水

処理水とも多摩川・拝島橋を除くと、3成分の中でエストロンの濃度が最も高く、エストラジオールの2倍程度の値を示し、エチニルエストラジオールはエストラジオールの1/10程度であった。河川水についてはエストラジオールが多摩川・拝島橋を除くと、ほぼ同じような値を示し、エストロンは下水処理場の影響が大

表3 エストロゲン3成分の分析結果 (ng/l)

	エストラジオール				
	6月	8月	11月	2月	平均
多摩川・拝島橋	0.6	1.9	0.4	0.4	0.8
多摩川・多摩川原橋	4.2	3.9	2.1	6.6	4.2
浅川・高幡橋	3.2	2.6	5.4	7.1	4.6
野川・仙川合流点	4.5	3.5	5.1	5.9	4.7
神田川・水道橋	9.1	2.4	5.8	5.1	5.6
北多摩1号処理場放流水	5.4	3.9	6.2	13.0	7.1
落合処理場放流水	2.5	3.9	4.0	8.8	4.8

	エストロン				
	6月	8月	11月	2月	平均
多摩川・拝島橋	0.5	1.2	0.6	0.3	0.6
多摩川・多摩川原橋	10.8	3.6	12.2	12.5	9.7
浅川・高幡橋	3.0	5.5	6.5	7.0	5.5
野川・仙川合流点	2.0	7.2	13.6	3.8	6.7
神田川・水道橋	7.3	8.1	18.3	11.4	11.3
北多摩1号処理場放流水	12.0	12.7	40.6	15.5	20.2
落合処理場放流水	6.1	6.6	13.4	18.8	11.2

	エチニルエストラジオール				
	6月	8月	11月	2月	平均
多摩川・拝島橋	0.3	0.6	0.1	0.1	0.3
多摩川・多摩川原橋	0.7	0.3	0.5	0.6	0.5
浅川・高幡橋	0.5	0.3	0.4	0.4	0.4
野川・仙川合流点	0.6	0.3	0.5	0.6	0.5
神田川・水道橋	0.8	0.6	0.6	0.6	0.6
北多摩1号処理場放流水	0.7	0.7	0.8	0.6	0.7
落合処理場放流水	0.7	0.6	0.4	0.7	0.6

きい多摩川・多摩川原橋と神田川・水道橋の値が大きかった。また、下水処理場のうち、北多摩1号処理場は3成分とも河川水よりかなり大きな値を示し、落合処理場は河川水とほぼ同じか、やや大きい値であった。

4 考察

(1)エストロゲン作用強度の評価

1)雄コイの血清ビテロジェニン濃度との対応

前出の表2に示した河川水・下水処理水のエストロゲン作用強度の測定結果では、大半の下水処理水は河川水よりかなり高い値を示し、河川水の中では下水処理水の影響が大きい多摩川・多摩川原橋と神田川・水道橋が他の河川水の数倍以上の値を示した。

この河川水の値は、前報⁵⁾で報告した雄コイのビテロジェニンの測定結果と符合している。6回の調査の合計値をみると、雄コイの血清ビテロジェニン濃度が1000ng/mlを超える尾数の割合は多摩川・多摩川原橋46%、神田川・水道橋24%、野川・仙川合流点4%、浅川・高幡橋6%、多摩川・拝島橋10%であった。雄コイの血清ビテロジェニン濃度を高める要因はいくつかあると考えられるが、最も基本的な要因は河川水中のエストロゲン様物質の作用強度である。多摩川原橋と水道橋の雄コイに見られる高濃度の血清ビテロジェニンは、河川水中のエストロゲン作用強度の高さを反映している。

2)エストロゲン排出量との関係

エストロゲン作用強度は、天然エストロゲン、合成エストロゲン、ノニルフェノール等の人工化学物質が合わさって持つ総合作用強度を示している。このうち、天然エストロゲンが占める割合は現段階では明らかではないが、かなりの割合を占めているものと推測される。そこで、天然エストロゲンの排出量との関係を検討した。

北多摩1号処理場を例にとれば、その平均処理水量は約20万m³/日、処理対象人口は約50万人である。エストロゲンは、女性の体内ではエストラジオールが主分泌産物であるが、その一部は肝臓でエストロン、エストリオールなどに代謝される。エストラジオールとその代謝物はその多くがグルクロン酸や硫酸の抱合体となって、主に尿中より排出される。その総排出量は一人一日数~60μg程度である。ただし、妊娠中の女性

からは妊娠初期で200~400μgが排出され、一方、男性の尿からも数μg程度が排出される⁶⁾。処理対象人口の半分が女性であるとして、女性ホルモンの排出量を平均で一人一日30μgとすれば、処理場流入水のエストロゲン濃度は38ng/lとなる。

体外に排出されたエストロゲンは下水管での流下の過程や下水処理場において微生物や酵素による分解を受けて、抱合体のほとんどが遊離体となるとともに、一部はエストロゲンとしての形態を変え⁷⁾、一部は更に分解されて消失すると考えられる。抱合体はエストロゲンとしての活性がないが、遊離体になって再び活性を取り戻す。

建設省の調査によれば^{8),9)}、下水処理場でのエストラジオールの除去率は平均で約70%であった。他のエストロゲンも同じ除去率であると仮定すれば、処理水のエストロゲン濃度はおよそ10ng/lとなる。

一方、北多摩1号処理場のエストロゲン作用強度の測定値は14ng/lであり、これに近い値が得られている。このように今回の測定値はエストロゲンの排出量からみて、妥当な値であると判断される。

(2)エストロゲンと人工化学物質

1)ノニルフェノール等の寄与度

表4は建設省が1998年度と99年度に全国河川の内分泌かく乱化学物質を調査した結果から、多摩川・多摩川原橋の平均値をみたものである^{10),11)}。調査対象の9項目のうち、検出されたのは4項目であった。

表5は三種類のエストロゲン作用強度測定法で求めたエストロゲン様物質の比活性値を整理したものである。検出された物質がエストロゲンとしてどの程度作用しているかを知るため、この比活性値を使って、表4の各物質のエストラジオール換算濃度を求めてみた。

その結果を表6に示す。ノニルフェノールとビスフェノールAは検出濃度ではそれぞれエストラジオールの16倍、3倍あるが、作用強度でみると、それぞれエストラ

表4 建設省の内分泌かく乱化学物質の調査結果(多摩川・多摩川原橋)

	(ng/l)				平均
	1998前期	1998後期	1999前期	1999後期	
4-tert-オクチルフェノール	0	40	20	0	15
ニルフェノール	100	170	200	0	118
ビスフェノールA	10	50	30	30	30
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	0	0	0	0	0
フタル酸ジ-n-ブチル	0	0	0	0	0
フタル酸ブチルベンジル	0	0	0	0	0
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	0	0	0	0	0
17β-エストラジオール	23	6	3	3	9

表5 エストロジェン様物質のエストロジェン作用強度 (エストラジオールを1とした場合)

	エストラジオール	エストロン	エストリオール	エチニルエストラジオール	ノルフェノール	ビスフェノールA	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	オクチルフェノール
バインディングアッセイ法	1	0.044	0.050	2.1	0.0044	0.0044	—	—
大阪大学酵母法	1	0.40	0.0018	1.1	0.00065	0.00006	—	—
Brunel大学酵母法	1	0.27	0.0045	1.1	0.00018	0.00006	0.00000	0.00001

表6 内分泌かく乱化学物質のエストラジオール換算濃度 (多摩川・多摩川原橋)

	(ng/l)		
	バインディングアッセイ法	大阪大学酵母法	Brunel大学酵母法
4-tert-オクチルフェノール	—	—	0.0002
ノルフェノール	0.52	0.076	0.022
ビスフェノールA	0.13	0.0017	0.0018
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	—	—	0.0000
17β-エストラジオール	8.7	8.7	8.7

ジオールの1/360 ~ 1/15、1/5900~1/80である。4-n-オクチルフェノールの作用強度はもっと小さい。このように、内分泌かく乱化学物質として取り上げられている河川水中の化学物質をエストロジェン作用強度で評価すると、エストラジオールに比べてわずかなものである。

しかし、これはあくまで今回のデータだけで試算したものであり、化学物質の影響が小さいとは断定できない。第一に、河川水中にはエストロジェン活性をもつ化学物質がこの他に数多く存在し、それらがもっと大きな作用強度を持つ可能性がある。第二に、エストラジオールの分析に用いたELISA法は、2)で述べるように、交差反応性があるため、実際の濃度よりかなり高めの分析値になることが多く、その点で、河川水中のエストラジオール濃度が表4よりもっと低いことが予想される。このような可能性があるため、化学物質の影響度については今後の調査が必要である。

2)エストロジェン3成分との関係

2月の試料についてエストロジェン作用強度とエス

トロジェン3成分分析値を対比した結果を表7に示す。3成分の合計値はBrunel大学酵母法で求めたエストロンとエチニルエストラジオールの比活性値を乗じて、エストラジオール換算濃度で示した。3成分の合計値はエストロジェン作用強度を上回っており、逆転現象が生じている。当初は、エストロジェン様物質の総量を示す作用強度から3成分の合計値を差し引いて、様々な化学物質が持つエストロジェン作用強度を求める考えであったが、それがマイナスとなり、当初の目的を達成することができなかった。

エストロジェンの分析法として使用したELISA法は、測定対象以外の物質にも反応して、GC-MSやLC-MS/MSによる分析値より大きな値を示すことがある。これはELISA法の交差反応性の問題である。ただし、測定対象のエストロジェンが微妙な形態変化をして、GC-MS等にかからない構造になる可能性もあるので、GC-MS等の測定結果がエストロジェンの存在量を表しているとは必ずしも言えない。

前年度まで使用されてきた市販のELISA法キットによる測定値はいずれのキットもかなり高めの値になることが指摘されており、最近市販された交差反応性が小さいELISA法キットを用いた結果と比較すると、概ね2倍以上の値になっている。したがって、3成分の実際の濃度は表7に示した値の1/2以下であると考えられ、仮に分析値に1/2を乗じれば、エストロジェン作用強度の測定結果に近い値になるものが多い。このように、

表7 エストロジェン作用強度とエストロジェン3成分 (2000年2月採水試料)

(エストラジオール換算濃度 ng/l)

	多摩川・拝島橋	多摩川・多摩川原橋	浅川・高幡橋	野川・仙川合流点	神田川・水道橋	北多摩1号処理場放流水	落合処理場放流水
エストロジェン作用強度の測定値	0.2	7.0	2.5	1.8	7.2	13.7	6.6
エストロジェン3成分の合計値	0.6	10.6	9.5	7.6	8.9	17.8	14.7

今回は3成分の真値が明らかではないので、人工化学物質がエストロゲン作用強度に占める割合を求めることはできなかった。

なお、3成分のうち、エチニルエストラジオールは、ピルの主成分であり、ピルの使用解禁に伴って排出量の増加が予想されている。現在は要処方箋薬であるので、急速な増加はないが、徐々に増加していくと思われる。エチニルエストラジオールの投与量の全部が人体から排出されるとすれば、一日30~40 μ gとなり、天然エストロジェンの量に匹敵する。しかし、エチニルエストラジオールの血中濃度が高まるとともに、エストロジオールの血中濃度が低下することが報告されており、ピルを服用しても、天然および合成エストロジェンの総排出量はあまり増加していないとも考えられている⁶⁾。

5 おわりに

多摩川の河川水や下水処理水等を対象として、エストロゲン作用強度を測定し、水中のエストロゲン様物質の総量を把握する手法を検討した。同時に天然および合成エストロゲンについて分析を行った。その結果、次のことが明らかになった。

- (1) 河川水等のエストロゲン作用強度の測定法としてバインディングアッセイ法、大阪大学の遺伝子組み換え酵母法、Brunel大学の遺伝子組み換え酵母法の三方法を取り上げ、比較試験を行ったところ、有効な方法はBrunel大学の酵母法であった。
- (2) Brunel大学の酵母法で求めたエストロゲン作用強度はエストラジオール換算で河川水では0~7 ng/l、下水処理場放流水では7~20ng/lの値が得られた。
- (3) この各河川水の測定値は、各河川の雄コイにおいて高濃度の血清ビテロジェニンが検出される割合と符合しており、エストロゲン様物質が雄コイの血清ビテロジェニン濃度を高める基本的な要因であると考えられる。
- (4) また、下水処理場放流水の測定値は、人体からのエストロジェンの排出量と処理場での除去率から検討して妥当な値であった。
- (5) 上記三方法で求めた各エストロゲン様物質の比活性値を使って、河川水中のノニルフェノールおよびビスフェノールAのエストロゲン作用強度への寄与を検討したところ、その寄与はエストラジオールに比べて

わずかなものであった。

(6) エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオールのエストロゲン3成分をELISA法で分析したところ、その合計のエストラジオール換算濃度は、上記のエストロゲン作用強度を大幅に上回る値になった。これは、ELISA法の交差反応性によるものと推測される。

今後は河川水および下水処理水についてエストロゲン作用強度の全面的な測定を行うとともに、エストロゲン3成分の分析法を検討して、河川水等のエストロゲン作用強度に対する天然・合成エストロゲン、人工化学物質のそれぞれの寄与度を明らかにし、エストロゲン様物質の削減対策を検討していくことにしたい。

本研究におけるエストロゲン3成分の分析は(株)ヤクルト本社中央研究所への委託により行った。

酵母法の試験を進めるにあたって都立衛生研究所の狩野文雄主任研究員からいろいろとご教示をいただき、また、京都大学環境質制御センターの松田知成氏と(株)荏原総合研究所の恩田健介氏から貴重な助言をいただいた。大阪大学の西原力教授と英国Brunel大学のSumpter,J.P.教授には、遺伝子組み換え酵母の提供を快く了承していただいた。以上の方々に厚く謝意を表す。

参考文献

- 1) 中村 将ら：多摩川にみる魚類の異変、科学68,7, p.515-518(1998)
- 2) 近藤昭宏ら：蛍光偏光法を用いた環境ホルモン測定、エコインダストリー,4,8,p.28-34(1999)
- 3) 西川淳一：エストロゲン様物質の検出系、ファルマシア,35,3,p.241-245(1999)
- 4) Routledge,E.J.&Sumpter,J.P.:Yeast Screen Protocol(1996)
- 5) 和波一夫ら：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究(その2)、東京都環境科学研究所年報 2000, p.153-164.
- 6) 中央薬事審議会：ピルの内分泌攪乱化学物質としてのまとめ(1999年3月)
- 7) 足立 淳ら：17 β -エストラジオール及びその抱合体の下水中における挙動、第34回日本水環境学会講演集, p.481(2000年3月)

- 8) 矢古宇靖子ら：組み換え酵母法を用いた下水中のエストロゲン活性の測定、環境工学研究論文集 36,p199-208(1999)
- 9) 栗林 栄ら：下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査、用水と廃水,42,6,p.21-28(2000)
- 10) 建設省：平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(1999年3月)
- 11) 建設省：平成11年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(2000年7月)

Study on Endocrine Disrupters in Tokyo's Rivers (3) — Measurement Methods of Total Amount of Estrogen-like Substances —

Teruyuki Shimazu, Kazuo Wanami, Ayumi Sugie*,
Makoto Kata**, Kenichi Takahashi** and Koichi Kaji***
*Duke University **Saitama Institute of Technology
***Associate Researcher

Summary

We examined several methods for measuring total amounts of estrogen-like substances in Tokyo's rivers and in the drainage from sewage treatment plants. Using these methods, we measured the estrogenic activity intensity of these waters. The following results were obtained:

- (1) Among three methods, the binding assay method; the recombinant yeast method of Osaka University; and the same of Brunel University, the last method was the most effective for measuring estrogenic activity intensity of river waters.
- (2) The assessment of river water measured by this method correlated closely with the ratio of high vitellogenin concentration detected in the plasma of male carp in the river. On this basis, it was concluded that the estrogen-like substances in the water would be the basic factors to raise the vitellogenin concentration in the plasma of the male carp.
- (3) Using the above three methods we measured the estrogenic activity intensity of each estrogen-like substances and calculated the contribution of nonylphenol and bisphenol A to total estrogenic activity intensity. It was concluded that the contribution was very small compared with estradiol.

Keywords: estrogen-like substance, recombinant yeast method, binding assay, estradiol, nonylphenol, bisphenol A