

◆ 水質リスクマネジメント特集 ◆

河川水中の環境エストロゲンの評価

宮本宣博* 高橋明弘** 玉本博之*** 田中宏明****

1. はじめに

ダイオキシンや内分泌搅乱化学物質(いわゆる環境ホルモン物質)といった、微量化学物質による環境汚染に伴う人や生態系への影響が社会的な問題になっている。

化学物質の登録は現在2,400万件以上であり、そのうち6万種が日常的に製造されていると推測されている。これらの化学物質のうち現在、内分泌を搅乱する疑いのある物質が、67物質¹⁾挙げられているが、これは全ての化学物質について生物影響を調べた結果ではなく、現時点での報告や研究事例をもとにリストアップしている数である。今後これらの微量化学物質の生物影響について、知見が増えるに従い変化するものと考えられる。

このような背景から、建設省は平成10年より環境庁と連携して、水環境における環境ホルモン物質の全国実態調査²⁾を実施し、女性ホルモン作用を持つ化学物質(以後、環境エストロゲン)が、河川水や都市排水に含まれていることを明らかにしてきた。河川環境中に検出された環境エストロゲンは、プラスチックの可塑剤として使用されるタル酸エステル類や、樹脂原料のビスフェノールA、界面活性剤の原料・分解生成物のノニルフェノールなどの物質に加え、人畜由来の女性ホルモンである 17β エストラジオールなどであった。

特に環境エストロゲンによる水環境の汚染は、水域に棲息する生物にとどまらず、生物濃縮の過程を経て、人体に直接または間接的に悪影響を及ぼす可能性がある。このため環境エストロゲンを生物にとって影響のないレベルに低減させることは、人間への影響を減らし、環境にやさしい社会づくりに貢献できるものと考えている。

そこで、河川中の環境エストロゲンの検出技術として、化学分析に加えてバイオアッセイ(生物検定法)を行い、化学分析との比較検討を行ったので報告する。

Evaluation of Estrogen-like Substances in River Water

2. 水環境の評価のためのバイオアッセイ

化学物質の検出技術としては、これまで個別物質を対象にした化学分析が主に行われてきた。化学分析は、個別物質の量を正確に定量することが可能であるが、環境中に存在する多成分の物質を全て検出することは困難である。そこで環境中の多成分の物質に対する評価手法として、バイオアッセイが注目されつつある。バイオアッセイは、生物に対する影響(阻害、死亡等)を指標として、複合的な毒性を評価しようとするものであり、個別の化学物質の定量的な評価は困難であるが、未知物質を含めた総括的評価が可能となるため、下水や河川水のような多成分系試料の安全評価としての役割が期待されている。

環境エストロゲンのバイオアッセイによる検出技術を表-1に示すが、生物個体の生存率、臓器障害を直接観察する手法に加えて、魚類の卵黄形成蛋白質のビデロジエンをバイオマーカー(化学物質暴露に対する生体応答の生化学的な指標)とする試験や、乳がん細胞を用いた試験、遺伝子組み換え酵母を用いた試験などが報告されている。

これらのバイオアッセイは研究・調査目的によって、供与生物が異なるが、大きく分けて生物個体そのものを用いた実験系(*in vivo*)と、組織培養など試験管内で行う(*in vitro*)系に分けられる。*in vivo*系は、生物個体を環境エストロゲンに暴露または直接投与し、臓器障害、生存率などから毒性を評価する手法であり、混合的な作用の機序の評価、次世代への評価が可能となるが、コスト

表-1 環境エストロゲン検出に利用する生物材料

	バイオアッセイ供与生物	毒性指標
生物個体	げっ歯類(ラット・マウス)	生存率・臓器障害
	魚類(コイ・メダカ)	生存率・臓器障害 血中ビデロジエン濃度
細胞	乳がん細胞	細胞増殖
	遺伝子組み換え酵母	β ガラクトシダーゼ産生

がかかる上、結果を得るのに時間がかかる欠点がある。

一方 *in vitro* 系では、毒性を細胞レベルでの評価しかできないが、毒性機序が明瞭であり、多量の化学物質の評価を迅速に行えるメリットがある。

このように *in vivo* 系、*in vitro* 系の手法はそれぞれ長所、短所を有するため、目的に応じた選択が必要である。

3. 環境エストロゲンの検出技術

3.1 遺伝子組み換え酵母の測定原理

環境モニタリングを行う場合、多検体の処理や、迅速性が要求されるため、*in vitro* 系の試験法が有効である。我々は、*in vitro* 系の環境エストロゲン検出手法として、遺伝子組み換え酵母を用いた試験方法(以後、酵母法とする。)について検討を行ってきた。

遺伝子組み換え酵母は、イギリス Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いた。この酵母は、ヒト女性ホルモン受容体遺伝子の LacZ レポーターを導入した遺伝子組み換え酵母で、ラクトースを取り込む際に必要な β ガラクトシダーゼ酵素を產生する遺伝子 (LacZ) が導入されている。今回用いた遺伝子組み換え酵母による、環境エストロゲンの検出原理を図-1 に示す。

エストロゲンがエストロゲン受容体と結合すると活性化受容体が形成され、その結果として β ガラクトシダーゼが産生される。この β ガラクトシダーゼが CPRG (クロロフェノールレッド- β -D-ガラクトピラノシド) 発色試薬と反応して黄色

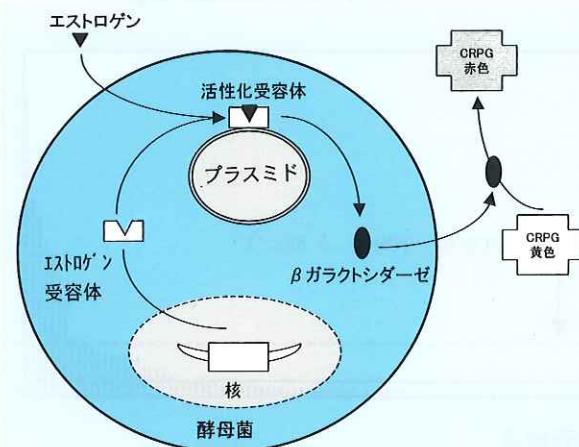


図-1 遺伝子組み換え酵母の測定原理

から赤色に変色することによって、環境エストロゲンの受容体への結合を検出することが可能となる。

この酵母による検出技術は、哺乳動物と比べて膜の透過性、代謝が異なるといった課題もあるが、試験操作が簡単で、エストロゲン様物質の作用について迅速に測定できるため、環境モニタリングに有用である。

3.2 試験方法

試料の前処理方法については固相抽出を行った後、ジメチルスルホキシド (DMSO) で転溶した。操作のフローを図-2 に示す。

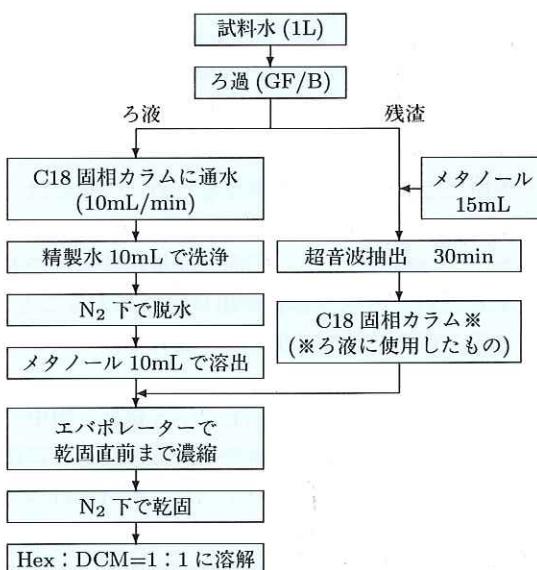


図-2 試料の前処理のフロー

測定方法は Sumpter³⁾ らの方法を改良した矢古宇らの方法⁴⁾に従った。すなわち前培養した遺伝子組替え酵母の濁度から菌体濃度を求め、 4.7×10^7 cells の菌体を混合した測定培地を調製し、96well のマイクロプレート上で DMSO の Well 内濃度が 1% 以下になるよう調製・希釈を行った測定試料と測定培地を混合、28 °C で 6 日間培養する。培養後、発色色素の対象波長 (544nm) と、菌体自身の濁度を測定する波長 (600nm) を測定し、その差をエストロゲンの影響による活性値とした。この活性値から求めた標準物質 17β エストラジオール (E2) と試料の用量反応曲線を比較し、試料のエストロゲン活性を 17β エストラジオール活性等量 (E2 活性等量) として算出した。

4. 全国河川の環境エストロゲン活性

酵母法により、平成 10 年から平成 11 年にわたり、全国主要河川において調査した 150 試料のエストロゲン活性図-3 に示す。この全国レベルの調査結果で、エストロゲン活性の平均値は 1.6ng/L であり、平均値以下の試料が全体の 83% を占めていた。平成 11 年の季節別エストロゲン活性を表-2 に示す。

表-2 調査時期別のエストロゲン様活性

	17 β エストラジオール活性等量 (ng/L)		
	試料数	平均	範囲
平成 11 年度			
春期	28	0.22	0.008 ~ 18
夏期	53	0.26	0.02 ~ 4.4
秋期	25	0.17	0.05 ~ 2.1
冬期	12	1.4	0.04 ~ 20

季節によって試料数が異なるため、一概には言えないが、平均値は冬期に高くなる傾向が見られた。この要因として、①河川流量が低水位で安定するため、汚水の影響が相対的に高まること、②水温の低下によって生分解が進行しにくいことが推察される。

また河川の平均値 1.6ng/L という値は、田中らの報告⁵⁾による下水処理水の平均値 5.8ng/L に比べて低い値であったが、いくつかの河川試料については、5.8ng/L を上回るものも見られた。今回、エストロゲン活性が下水処理水の平均値 5.8ng/L を超えた地点は、いずれも都市部に位置し下水や事業場の排水の影響が考えられる地点である。検出値の中には 20~30ng/L と下水処理水より明ら

かに高い値を示す地点も見られ、汚水流入の影響に加え、エストロゲン活性を持つ物質が分解等によって、より活性の強い物質に形態変化している可能性も考えられた。

例えば環境中で検出頻度の比較的高い、人畜由来のエストロゲンは、エストロン、17 β エストラジオール、エストリオールがよく知られており、図-4 に示すようなステロイド骨格の 3 位、17 位もしくは 16 位に酸素あるいは、ヒドロキシル基を有している。

これらのエストロゲンは遊離体のエストゲンと呼ばれ、他に 3 位あるいは 17 位等に、硫酸もしくはグルクロン酸が結合している抱合体が存在し、女性の尿は妊娠期を除くと大部分が抱合体であることが知られている⁶⁾。

表-3 に示すようにエストロゲンの比活性値から考えると、遊離体のエストロゲン活性値が圧倒的に強く、河川の調査結果では遊離体の 17 β エストラジオールの活性値が全体のエストロゲン活性の殆どを占めている試料が多く見られたため、河川

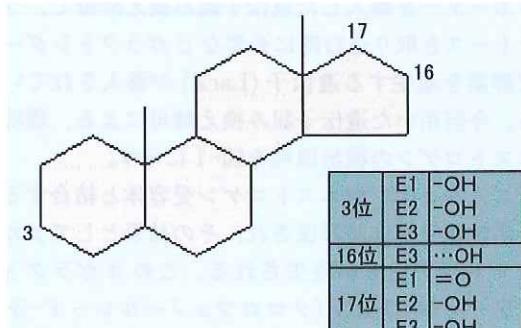


図-4 ステロイドの基本骨格

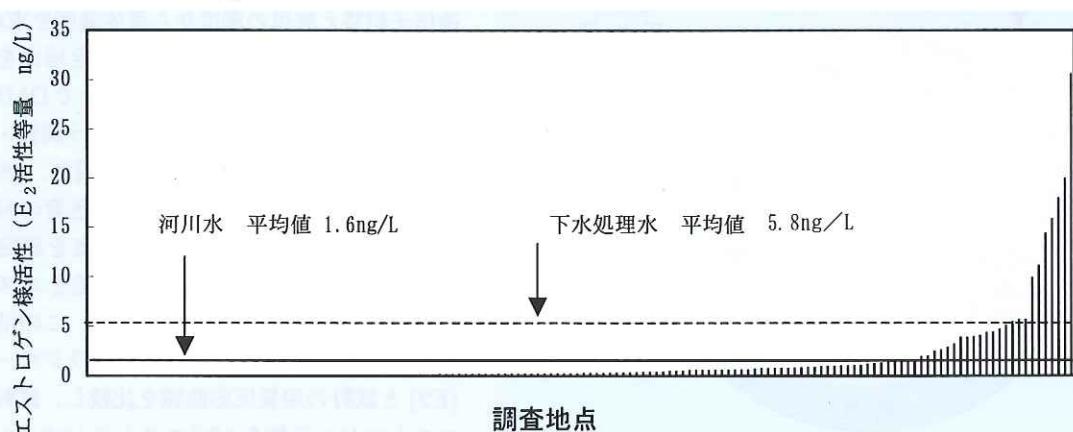


図-3 全国主要河川における環境エストロゲンの検出結果

内の分解過程によって活性のある物質に変化している可能性があることが示された。

人畜由来のエストロゲンだけでなく、ノニルフェノールなども、分解過程を経て活性が変化していくことが予想されるため、このような環境エストロゲンの挙動について、包括的な把握を行って

表-3 人畜由来のエストロゲンの比活性

化 学 物 質	比活性値
遊離型	
17 β エストラジオール	1
17 α エストラジオール	0.05
エストロン	0.61
エストリオール	0.0034
抱合型	
エストロン β D-グルクロニト	—
エストロン-3-サルフェイト	—
17 β エストラジオール-3-サルフェイト	0.00004
エストリオール-3- β D-グルクロニド	—

備考 1) 17 β エストラジオールを1として算出

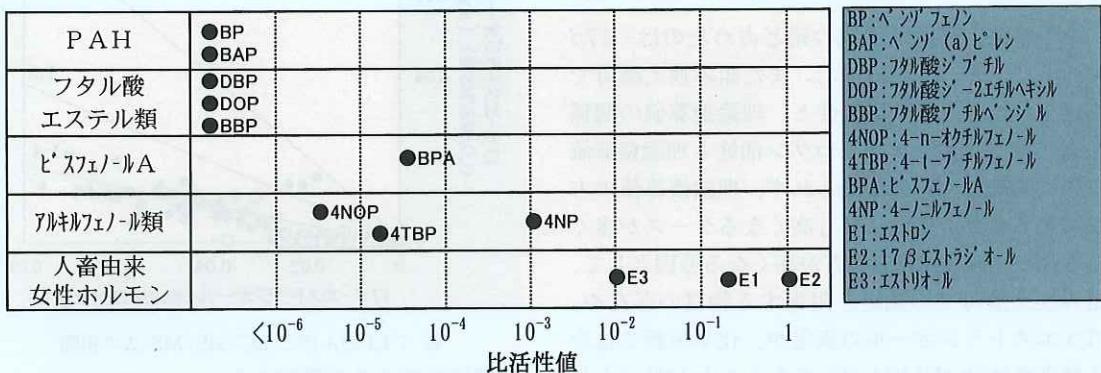
2) —は比活性が充分に低いことを示す。

いく必要があるものと思われる。

5. 環境エストロゲンのハザードとリスク

図-5に17 β エストラジオールの活性を基準とした、環境エストロゲン物質の活性の強さ(比活性値)を示す。

環境エストロゲンなどの化学物質に関する議論で重要なのは、ハザードとリスクの区別である。単位当たりの毒性量が他の物質に比べて大きい場合はその物質は危険物(ハザード)である。しかし、生物への影響(リスク)はその物質の毒性の強さと摂取量ないし暴露量によって決まるため、強いハザードでも暴露量が小さければリスクは小さくなる。環境エストロゲンのハザード指標はエストロゲン活性で示され、摂取量はその水環境中の存在量から推定される。エストロゲン活性の高い物質は、人畜由来のエストロゲンで、多芳香族化合物(PAH)やフタル酸エステル類は、エストロゲン活性が相対的に非常に低い。また建設省

図-5 各物質のエストロゲン活性の強さ (矢古宇らの資料⁴⁾より作成)表-4 全国河川・湖沼の調査結果²⁾

物質名	濃度範囲 ($\mu\text{g}/\text{L}$)		検出地点数 / 調査地点数	
	前期調査	後期調査		
4-n-オクチルフェノール	ND(<0.1)	ND(<0.03)	1/256	0/261
4-t-オクチルフェノール	ND(<0.1)~0.2	ND(<0.03)~0.8	5/256	8/261
ノニルフェノール	ND(<0.1)~1.9	ND(<0.1)~3.0	110/256	135/261
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	ND(<0.2)~9.4	ND(<0.2)~4.9	131/256	96/261
フタル酸ブチルベンジル	ND(<0.2)~1.0	ND(<0.2)~3.1	3/256	3/261
フタル酸ジ-n-ブチル	ND(<0.2)~1.3	ND(<0.2)~0.8	69/256	39/261
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	ND(<0.01)~0.16	ND(<0.01)~0.06	127/256	44/261
ビスフェノールA	ND(<0.01)~1.4	ND(<0.01)~1.4	147/256	109/261
スチレンモノマー	ND(<0.1)	—	0/256	—
スチレン2及び3量体	ND(<0.1)	ND(<0.01)~0.02	—	2/261
17 β -エストラジオール	ND(<0.0002)~0.027	ND(<0.0002)~0.024	222/256	189/261

備考) NDは検出下限値未満で、()内に目標検出下限値を表記した。

が行った、内分泌搅乱化学物質に関する実態調査結果²⁾を表-4に示す。検出地点数が最も多いのは、 17β エストラジオールであり、それに続いてノニルフェノール、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-ブチル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ビスフェノールAなどの検出地点が多い。また検出濃度から見ると、検出地点が最も多かった 17β エストラジオールは、他の物質に比べ1/10~1/100程度の検出濃度となっている。

そこで河川の実態調査結果から、 17β エストラジオール、4-ノニルフェノール、ビスフェノールAについて着目し、以下のような式によって理論上の、エストロゲン活性の換算を行った。比活性値は矢吉宇ら⁴⁾の報告値とした。なお、上記3物質以外については、比活性値が十分に低いため計算から除外した。

$$\text{理論換算値} = \Sigma(\text{各物質の比活性値} \times \text{各物質の濃度})$$

その結果、理論活性値の殆ど占めたのは、 17β エストラジオールであった。また組み換え酵母で測定したエストロゲン活性と、理論換算値の間に明確な相関は認められず、理論換算値の方がエストロゲン活性よりも高くなるケースが多く見られた。理論換算値の方が高くなる原因として、組み換え酵母での測定を阻害する物質の存在や、 17β エストラジオールの測定が、化学分析ではなく酵素免疫法(ELISA法)であることが挙げられる。図-7に建設省が行った下水試料のELISA法と化学分析法(LC/MS/MS法)の相関⁷⁾を示すが、ELISA法はLC/MS/MS法に比べ値が4倍程度高くなる傾向が見られる。

この要因としてELISA法では環境中のエストロゲンを測定する際には、構造が類似している物質が存在する場合、それらも測定してしまう問題点について報告がされている⁸⁾。

また逆に理論換算値の方が低くなる原因としては、理論換算値で対象としていないエストロゲン活性を持つ化学物質の存在が要因として挙げられる。今後は、上述した 17β エストラジオールの機器測定に加えて、エストロゲン活性を阻害する物質や未測定のエストロゲン活性を持つ化学物質

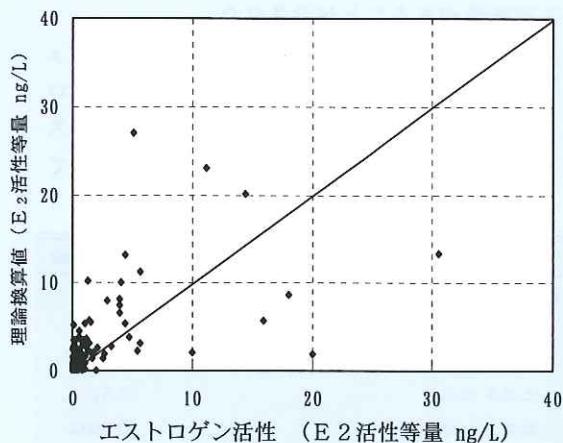


図-6 理論活性値と酵母法の比較

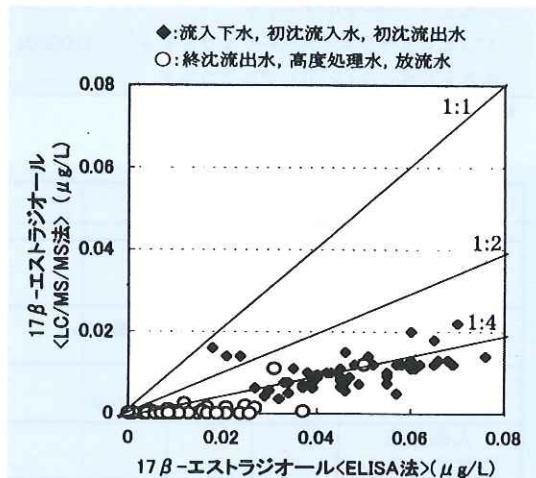


図-7 ELISA法とLC/MS/MS法の相関の解明を進める必要がある。

6.まとめ

これまでの結果から、遺伝子組み換え酵母による河川中の環境エストロゲンについて評価を行った。その結果、以下のようなことが明らかとなった。

- (1) 酵母法と化学分析を組み合わせることにより、環境エストロゲンの評価を行った。全国河川の実態調査を行った結果、都市河川の一部では下水処理水よりも高い値を示す場所が見られた。またエストロゲン活性の主要な構成要素は、 17β エストラジオールであったが、 17β エストラジオール以外の物質の関与が示唆される地点も見られた。

(2) 化学分析結果から算出した理論活性値と、酵母法の活性値に明確な相関が得られなかった。この要因として、 17β エストラジオールの定量方法、エストロゲン活性を阻害する物質、未測定のエストロゲン活性を持つ化学物質が挙げられる。今後これらの点について解明を進める必要がある。

参考文献

- 1) 環境省：外因性内分泌搅乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED'98-, 1998.
- 2) 建設省河川局、建設省都市局下水道部：平成 11 年度水環境における内分泌搅乱化学物質に関する実態調査結果、建設省、2000., <http://www.mlit.go.jp/river/press/>
- 3) Sumpter, J. P et al : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., Vol.15, No.3, pp.241-248, 1996.
- 4) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み換え酵母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, Vol.36, pp.199-204, 1999.
- 5) 田中宏明、高橋明宏、東谷忠、矢古宇靖子：生態系からみた下水処理評価方法に関する調査、土木研究所資料、第 3755 号、平成 11 年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.229-234, 1999.
- 6) エッセンシャル産婦人科学：医歯薬出版株式会社
- 7) 国土交通省：下水道における内分泌搅乱化学物質に関する調査結果、2001.5.9, 発表 <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/information/>
- 8) 矢古宇靖子、高橋明宏、斎藤正義、小森行也、田中宏明：下水中のエストロゲン、エストロゲン様活性の測定、第 36 回下水道研究発表会講演集, pp.154-156, 2001.

宮本宣博*



独立行政法人土木研究所
水循環研究グループ
(水質) 交流研究員
Norihiro MIYAMOTO

高橋明宏**



東京都下水道局
(前 独立行政法人土木
研究所水循環研究グル
ープ(水質) 研究員)
Akihiro TAKAHASHI

玉本博之***



独立行政法人土木研究所
水循環研究グループ
(水質) 研究員
Hiroyuki TAMAMOTO

田中宏明****



同 水循環研究グループ
(水質) 上席研究員
Hiroaki TANAKA