

## バイオアッセイと化学分析を用いた環境中における エストロゲン作用物質の検出 環境水を例として

横浜国立大学大学院環境情報学府 古市琢磨、山崎首春、益永茂樹、中西準子

Identification of Estrogenic Activity in the Environment with Instrumental Analysis and in-vitro Bioassay (1) River Water, by Takuma FURICHI, Shuharu YAMAZAKI, Shigeki MASUNAGA, and Junko NAKANISHI (Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National Univ.)

### 1. はじめに

水環境にはエストロゲン作用を持つ物質(エストロゲン作用物質)が存在し、水棲生物へのメス化の影響が懸念されている。エストロゲン作用物質は、主に人畜由来のホルモン物質と合成化学物質に分けられ、それらがどの程度エストロゲン作用に寄与しているかは明らかではない。そこで本研究は、MVLN 細胞を用いた *in vitro* バイオアッセイ、LC/MS(/MS)、及び GPC による分画手法を用い、環境水におけるエストロゲン活性に寄与する物質の推定を試みた。

### 2. 実験方法

**2.1 対象物質** 人畜由来のホルモン物質として 17 エストラジオール(E2)、エストロン(E1)およびエストリオール(E3)、合成化学物質としてエチニルエストラジオール (EE2)、ノニルフェノール (NP) とオクチルフェノール (OP) および、ビスフェノール A (BPA) を調査対象物質とした。

**2.2 調査試料** 多摩川の 6 地点において河川水を採水した。

**2.3 試料の前処理** 試料 1L を固相抽出カートリッジ (EDS-1, Shodex)に通水し、メタノール/5mM トリエチルアミン 10ml で溶出した。濃縮乾固後、0.3ml のメタノールで再溶解させ、GPC カラムを用いて 10 画分(F1 ~ F10)に分けた。これら試料を濃縮乾固させ、メタノール 0.2ml で再溶解し、バイオアッセイに供した。また、対象物質の画分については、LC/MS/MS または LC/MS を用いて測定し、得られた活性値と各調査物質の比活性を乗じ、寄与率について推算した。

**2.4 エストロゲン活性の測定** MVLN 細胞を用いて各画分のエストロゲン活性を測定した。得られた活性値は、E2 の最大活性値を 1 としたときの相対活性値 (E2-max)で、濃度は E2 等価量 : (E2-eq [ng/l])で表現した。E2 等価量はロジスティックモデルを用い、E2 及び試料の用量反応曲線の 0.5-E2-max より算出した。また、測定変動を考慮するため、試料の用量反応曲線から 95%信頼区間を算出した。

### 3. 結果および考察

図 1 に、分画より得られたエストロゲン活性の結果の一部を示す。画分 F7~F9 にエストロゲン活性を有する物質の存在が確認された。対象物質の溶出画分と比較したところ、F7 には E2、E3、F8 には E1、E2、EE2、BPA、そして F9 には E1 が溶出する為、E2 活性はこれら物質による可能性が示された。次に、F6~F9 に溶出する対象物質について化学分析し(図 2)、E2 等価量を算出した(図 3)。F6 では、NP、OP が検出されたが、E2 等価量を算出したところ、両者の値はバイオアッセイにおける検出限界以下であった。よって NP、OP はエストロゲン活性に寄与しないことがわかった。

F7 では、E2、BPA が検出され、測定された E2 等価量に対し E2 が高く寄与していることがわかった。F8 では、E2、E1、BPA が検出され、E2 と E1 が測定された E2 等価量のほとんどを説明した。F9 においても E1 が、測定された E2 等価量に高く寄与した。F7~F9 までの画分を足し合わせ、総エストロゲン活性に対する E2、E1 の寄与率を算出したところ、それぞれ 45.1%、46.5%となり、活性の約 90%はこれら物質によるものと思われた。以上は丸子橋の例であるが、他の試料では測定された E2 等価量が、計算されたエストロゲン活性を上回るケースも見られ、E2、E1 以外の何らかの物質もエストロゲン活性に寄与している可能性が示唆された。

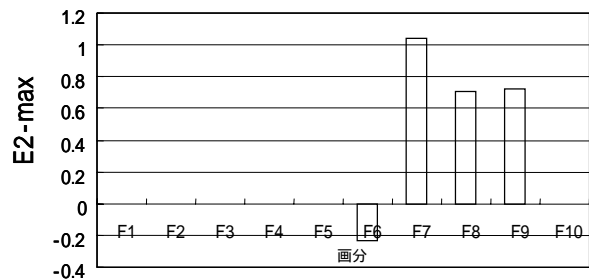


図.1 各画分におけるエストロゲン活性 (丸子橋)

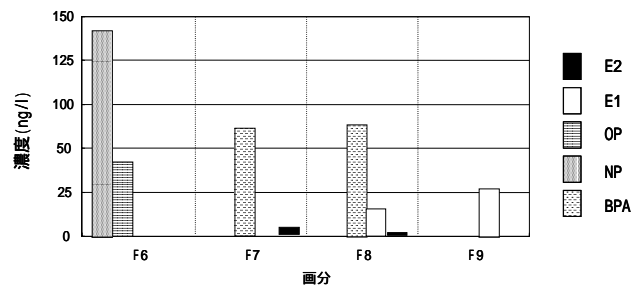


図2. 各画分における対象物質の濃度 (丸子橋)

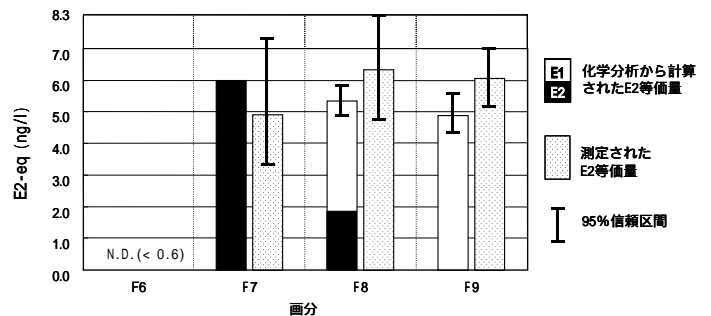


図.3 化学分析から計算されたE2等価量および各画分におけるE2等価量の比較 (丸子橋)

**謝辞** 本研究は文部科学省産官学連携イノベーション創出事業費補助金 (独創的革新技術開発研究提案公募制度) の支援を受けた。また、(株)環境管理センター 石井氏に多大な協力を戴いた。ここに記して謝意を表す。