

北海道の水環境における内分泌かく乱化学物質 (環境ホルモン)の包括的研究

永洞 真一郎 阿賀 裕英 芥川 智子 沼辺 明博 村田 清康 坂田 康一

要 約

内分泌かく乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)は、生体内の内分泌系、特に性ホルモンの作用をかく乱するとされている。今回我々は、女性ホルモン様作用を検出するために開発された酵母Two-Hybrid法と、誘導体化GC/MS法によって水環境中の女性ホルモン様作用を持つとされる化学物質の高感度検出システムの構築を試みた。その結果、石狩川流域においてはビスフェノールAがわずかに検出されたが、酵母Two-Hybrid法に応答は見られなかった。一方、茨戸湖表層水では今回対象とした女性ホルモン様化学物質は検出されなかったが、酵母Two-Hybrid法にわずかな応答が見られた。

Key words: 内分泌かく乱化学物質、固相抽出法、誘導体化GC/MS法、酵母Two-Hybrid法

1 はじめに

近年、生物の内分泌系の働きをかく乱する内分泌かく乱化学物質(Endocrine Disrupting Chemicals: EDCs)、いわゆる環境ホルモン物質が問題となっている。環境ホルモン物質の多くは環境水中に存在しており、水棲生物やその生物を捕食する生物に大きな影響を及ぼしていると考えられる。内分泌かく乱化学物質として特に注目されているのが女性ホルモン様物質である。これらの化学物質は、生体内の女性ホルモンレセプターに作用することによって性成熟がかく乱されたり、オスがメス化するとされている。しかし、どのような化学物質が女性ホルモン様作用を持つのか、またどの程度の強度で女性ホルモン様の作用を引き起こすのかは断定できないため、女性ホルモン様作用を評価するバイオアッセイ法がいくつか開発されている。今回、その中で操作法が簡便でかつ比較的高感度な手法である大阪大学の西川らによって開発された酵母Two-Hybrid法¹⁾を採用し、本道の水環境中に存在する化学物質総体の女性ホルモン様作用の評価を試みた。また、これまでの研究などによって女性ホルモン様作用が比較的強いとされる化学物質について誘導体化GC/MS法による高感度定量法に関する検討も行った。

2 方法

2.1 試料水の採取、前処理

試験的に分析を実施した環境試料は、2001年6月12日、7月10日、7月18日、8月13日に石狩川下流にかかる石狩河

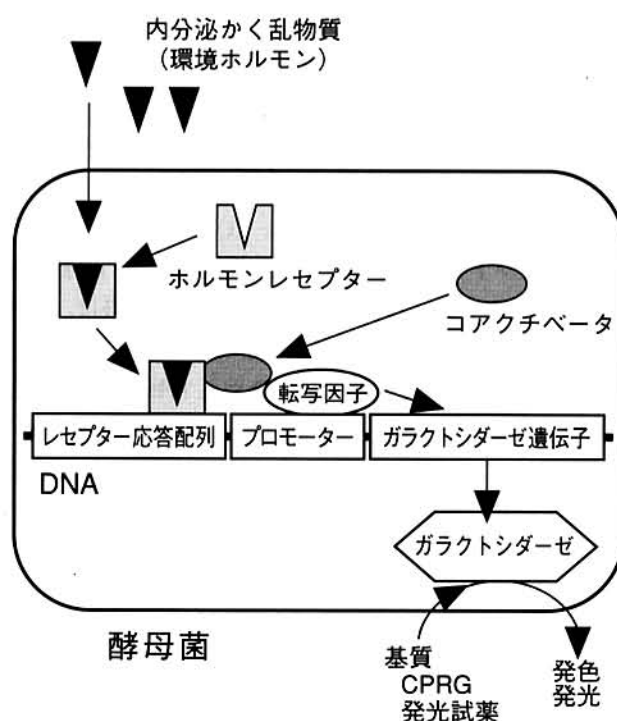
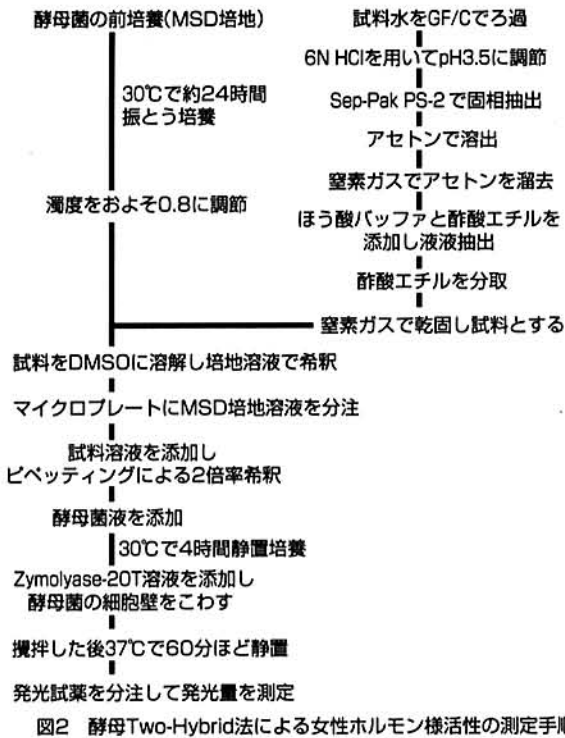


図1 酵母Two-Hybrid法による内分泌かく乱化学物質の検出メカニズム

口橋において採水したものを、2001年6月20日に茨戸湖表層にて採水したものを、2001年7月18日に石狩川上流にかかる永山橋と中流にかかる伊納大橋において採水したものをWhatman社製GF/Cガラスフィルター(保持粒径1.2 μ m)にてろ過し、6N HClにてpHをおよそ3.5としてからSep-Pak plus PS-2に11通水して固相抽出したものをアセトン3mlで2回溶出した。



2.2 酵母Two-Hybrid法の検討

酵母Two-Hybrid法の女性ホルモン様化学物質の検出メカニズムを図1、操作手順を図2に示す。操作手順は既報²⁾を参考にして96ウェルの黒色マイクロプレートを使用して行った。菌株はhER- α を導入した酵母菌を使用した。 β ガラクトシダーゼ活性の検出は、ICN社製AURORATMGAL-XEキットを使用して発光量に変換し、ATTO社製ルミネッセンサーAB-2100にて測定した。環境試料は、表層水中に存在するフミン物質の影響を取り除くため、既報³⁾にしたがって前処理を行った。すなわちアセトンで溶出したものをN₂ガスでアセトンを溜去し、pH=9.05のほう酸バッファで3mlにメスアップした後、酢酸エチル2mlで2回液液抽出した後、N₂ガスパージにて乾固し、ただちにジメチルスルホキシド(DMSO)溶液として試験に供した。

2.3 誘導体化GC/MS法の検討

女性ホルモン様化学物質として、その活性が強いとされている化学物質の高感度定量法に関してはいくつかの分析法が報告されている⁴⁾。女性ホルモン様活性が比較的に強いとされる化学物質は構造中に水酸基を有するため、

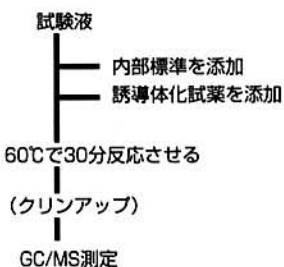


図3 誘導体化の手順

GC/MSによる高感度分析のためには複雑な誘導体化を必要とする⁵⁾。しかし今回、出来るだけ簡便な手法による一斉分析法についての検討を試みた。すなわち誘導体化はトリメチルシリル化(以下TMS化)とアシル化、そしてトリフルオロアセチル化(以下TFA化)について検討した。その手順を図3に示す。対象とした化学物質はTMS化法が17 β エストラジオール(以下E2)、エストロン(以下E1)、エストリオール(以下E3)、ジエチルスチルベストロール(以下DES)、エチニルエストラジオール(以下EE2)、ビスフェノールA(以下BPA)、の6種類、アシル化およびTFA化法がE2、E1、E3の3種類である。使用した反応試薬はTMS化がトリメチルシリルイミダゾール(以下TMSI)、アシル化が無水酢酸、TFA化が無水トリフルオロ酢酸を使用した。検出下限値の目標は、今回は実試料濃度で1ng/lとした。使用した機器はTMS化法がHewlett-Packard社製GC-6890にキャピラリカラムとしてHewlett-Packard社製HP-5(内径0.25mm、膜厚0.25 μ m、長さ30m)を使用し、日本電子製Automass-2によって検出した。アシル化法およびTFA化法はThermoquest社製Polaris-QにキャピラリカラムとしてHewlett-Packard社製HP-5(内径0.25mm、膜厚0.25 μ m、長さ30m)を用いた。なお、内部標準試薬には、ビスフェノールA-d₁₆と17 β エストラジオール¹³C₄を使用した。

表1 対象化学物質の構造と酵母Two-Hybrid法による女性ホルモン様活性の強度比

| 物質名 | 構造 | EC \times 10活性強度 | |
|-------------------------|----|--------------------|---------|
| 17 β エストラジオール(E2) | | 70pM | 1.0 |
| エストロン(E1) | | 930pM | 1/133 |
| エストリオール(E3) | | 60nM | 1/857.1 |
| ジエチルスチルベストロール(DES) | | 300pM | 1/4.3 |
| エチニルエストラジオール(EE2) | | 130pM | 1/1.9 |
| ビスフェノールA(BPA) | | 3.2 μ M | 1/45700 |

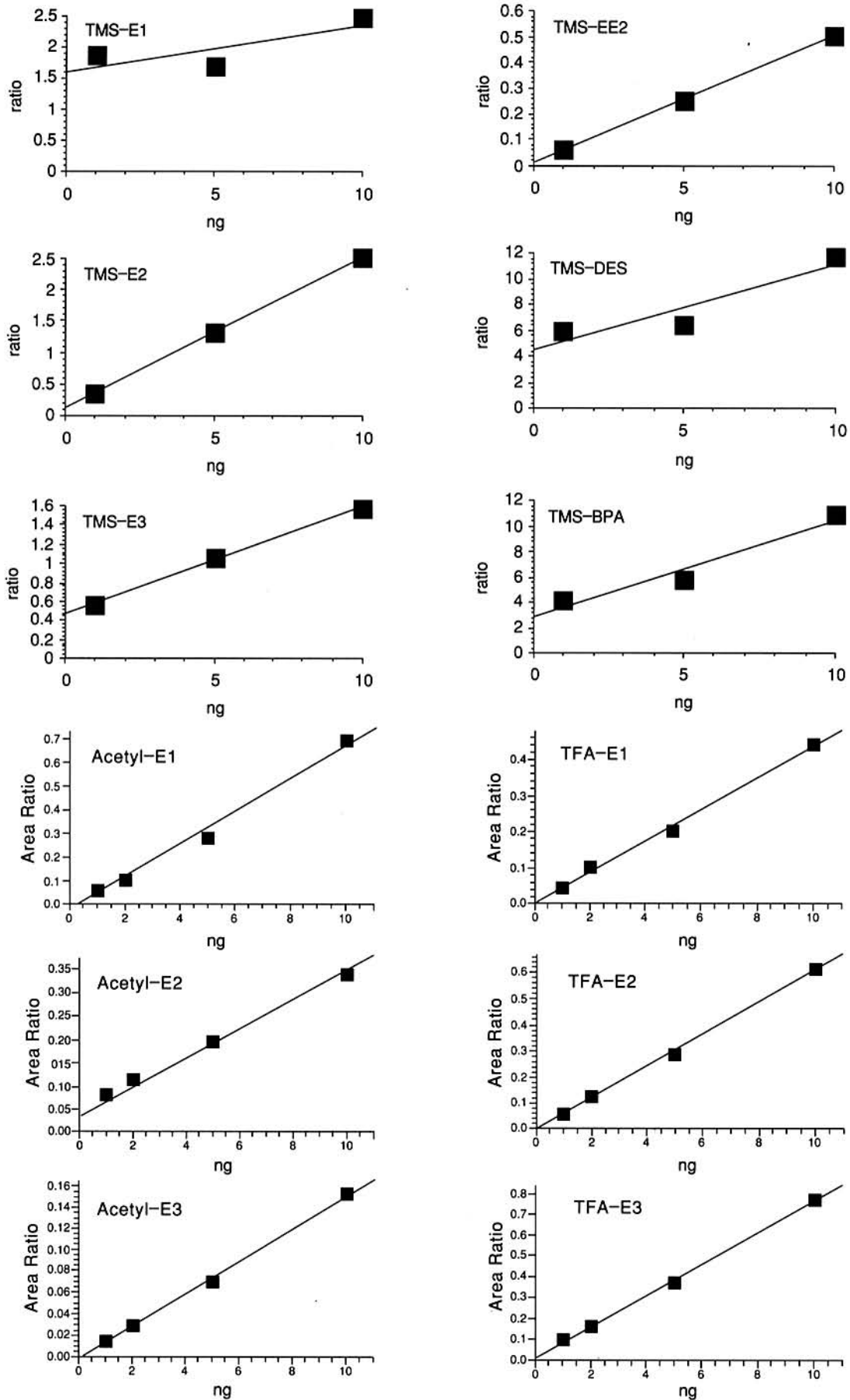


図4 誘導体化GC/MS法による内分泌かく乱物質の検量線

表2 TMS誘導体化GC/MS法と酵母Two-Hybrid 法による環境試料水の分析結果

| | 採水日 採水地点 | 6月12日 石狩河口橋 | 7月10日 石狩河口橋 | 7月18日 石狩河口橋 | 8月13日 石狩河口橋 | 6月20日 茨戸湖 | 7月18日 永山橋 | 7月18日 伊納大橋 |
|-----------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|---------------|
| 化学 分析 法 | エストロン | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| | 17βエストラジオール | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| | エストリオール | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| | エチニルエストラジオール | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| | ジェチルスチルベストロール | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d | n.d |
| | ビスフェノールA | 25.0 | 11.1 | 28.7 | 4.0 | n.d | 6.6 | 22.9 |
| 酵母Two-Hybrid (E2換算濃度) | n.d | n.d | n.d | n.d | Tr | n.d | n.d | |

2.4 環境試料中のEDCsの定量

TMS化法を用いて環境試料中のEDCsの定量を試みた。環境試料は、アセトン溶液をN₂ガスパージにて乾固し、トルエン数滴に転溶した後TMSIを250 μlほど添加し、約60℃で30分以上反応させて試料とした。

3 結果

酵母Two-Hybrid法による、ポジティブコントロールとして使用するE2のEC×10はおよそ70pMであった。これを定量下限値とすると、環境試料を250倍濃縮した場合の定量下限値は280fM（およそ76pg/l）となる。酵母Two-Hybrid法による、各標準試料の女性ホルモン様作用の強度をEC×10として比較した結果を表1に示す。この表から、内分泌かく乱化学物質には、その活性強度にかなりの差があることわかる。次に、誘導体化GC/MS法による各化学物質の検量線を図4に示す。TMS誘導体化による検量線から、E1を除いてはほぼ良好な直線性を得た。また、目標とした検出下限値はE1とDES以外の物質では達成できた。しかしTMSIを用いた反応系では、E3のクロマトグラムに複数のピークを生じ、3つの水酸基すべてが完全にTMS化されていないことが示唆された。次にアセチル誘導体化およびTFA誘導体化によるE1, E2, E3の検量線から、1ngまではきわめて良好な直線性が得られたが、無水酢酸を使用したアセチル誘導体化法は、試薬に起因すると思われるブランクピークが認められた。これらの結果から、E1, E2, E3に関してはTFA化法が最適と推察された。次に酵母Two-Hybrid法とTMS化GC/MS法による環境試料の分析結果を表2に示す。この結果から、石狩川の表層水からはすべての試料においてBPAが検出された。しかし濃度は低く、表1から女性ホルモン様活性の強度もE2の4万分の1以下であることから、この濃度では酵母Two-Hybrid法による女性ホルモン様活性は検出されていない。また、茨戸湖表層水では、今回対象とした化学物質は検出されなかったが、酵母Two-Hybrid法ではわずかながら女性ホルモン様活性を示した（発光強度がブランクの10倍に達していないためTr.と表示する）。今後はTFA誘導体化GC/MS法に

よる一斉分析法の検討と実試料への応用を試み、対象とする化学物質も追加していく予定である。

4 まとめ

現在我々の身の回りで使用されている合成化学物質は数万種類とも言われている。その他に天然由来の化学物質も含めれば、さらに膨大な数となる。これらの化学物質の中で内分泌かく乱作用をもつ化学物質が果たしてどの程度あるのか。また、このような化学物質が自然環境中で何らかの化学変化を受けた場合、生体内に取り込まれて初めて内分泌かく乱作用を発現する場合、さらに女性ホルモン様作用ではなく、男性ホルモン様作用を有する場合など、未解明の課題は多く残されている。今後は、こういった疑問にも焦点をあて、他の研究機関との連携や情報交換を行い、本研究を発展させたいと考えている。

5 参考文献

- 1) J.Nishikawa, K.Saito, J.Goto, F.Dakeyama, M.Matsuo, and T.Nishihara: New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* vol.154, pp.76-83, 1999
- 2) 白石不二雄,白石寛明,西川淳一,西原力,森田昌敏: 酵母Two-Hybrid Systemによる簡便なエストロゲンアッセイ系の開発. *環境化学*, vol.10, No.1, pp.57-64, 2000
- 3) 永洞真一郎,阿賀裕英,芥川智子,沼辺明博,村田清康,坂田康一,白石不二雄: 固相抽出-酵母Two-Hybrid法による環境試料中のエストロゲン活性物質アッセイにおけるフミン物質の影響. 第10回環境化学討論会講演要旨集, pp.324-325, 2001
- 4) S.A.Snyder, D.L.Villeneuve, E.M.Snyder, and J.P.Giesy: Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* vol. 35, pp.3620-3625, 2001
- 5) 白石寛明,白石不二雄,永洞真一郎,森田昌敏: 水中ステロ

イドホルモンのNCI-GC/MS分析法の開発とその応用.
第2回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集, pp.4,1999

**Comprehensive investigation of endocrine disrupting
chemicals in the aquatic environment in Hokkaido**

**Shinichiro NAGAHORA,
Hirohide AGA, Tomoko AKUTAGAWA,
Akihiro NUMABE, Kiyoyasu MURATA,
and Koichi SAKATA**

Abstract

Some chemicals called endocrine disrupting chemicals (EDCs) are suspected to affect human health by disrupting endocrine function, especially sex hormone system. We tried to establish the highly sensitive EDCs detection system for the surface water. Also, we tried to detect the estrogen receptor agonist activity by Yeast Two-Hybrid system and identify to the cause chemicals by derivatization GC/MS method. The results showed that trifluoroacetyl derivatization is the most effective method to detect estrone (E1), estradiol (E2), estriol (E3). And we tried to detect EDCs in the surface waters of Ishikari River and Lake Barato. Bisphenol-A was found in the Ishikari River water but the concentration was too low to detect the estrogen receptor agonist activity. Meanwhile the surface water of Lake Barato showed weak estrogenicity but we couldn't detect chemicals causing the estrogenicity.