

茨戸川表層水における内分泌かく乱化学物質 （環境ホルモン）の調査

永洞真一郎 五十嵐聖貴 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。これまでに我々は、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法によって北海道の水環境中の女性ホルモン様物質の調査を実施してきた。今回、茨戸川表層水において、弱いながらも女性ホルモン様活性が認められたため、この結果に基づいて原因物質の解明を試みた。その結果、ビスフェノールA、p-ノニルフェノールの他に多環芳香族炭化水素(PAH)の1種のピレンの代謝物である1-ヒドロキシピレンが検出された。この物質は酵母Two-Hybrid法によって、女性ホルモン様活性を有することが判明した。

Key words: 内分泌かく乱化学物質、誘導体化GC/MS法、酵母Two-Hybrid法、
多環芳香族炭化水素 (PAH)

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。1997年1月にワシントンで開催されたスミソニアン会議の定義によれば、環境ホルモン物質とは女性ホルモン、男性ホルモン、甲状腺ホルモンの働きをかく乱する物質とされているが、その中で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、生体中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という問題に関しては、調査研究を推進している段階である。1998年に環境庁（現在の環境省）が環境ホルモン戦略計画（いわゆるSPEED'98）の中で発表した「内分泌かく乱作用が疑われる化学物質」のリストに基づいた調査研究が全国で実施されているが、このリストの約70物質の中で内分泌かく乱作用を有すると断定されたのは、現時点でノニルフェノールとオクチルフェノールの2種類のみである。このことから、現時点における環境調査は、特定の化学物質の定量分析のみではなく女性ホルモン様作用をトータルで評価するバイオアッセイの手法も平行して実施することが重要と考えら

れる。女性ホルモン様作用を評価するバイオアッセイ法はいくつか開発され、実際のスクリーニングに応用されている。その中で昨年度我々は操作法が簡便でありながら比較的高感度である、大阪大学の西川らによって開発された酵母Two-Hybrid法¹⁾を採用して、北海道内の水環境における女性ホルモン様活性の調査結果を報告した²⁾。その中で弱いながらも女性ホルモン様活性を検出した茨戸川に関して、酵母Two-Hybrid法による女性ホルモン様作用の季節変動調査を行った。そしてその結果をふまえて、化学分析の手法による原因物質の同定を試みた。

2 方法

2.1 試料水の採取、前処理

茨戸川表層水試料は、2002年4月26日、7月29日、9月25日に図1に示す地点において採水を行った。試料水のデータを表1に示す。採水にはテフロンライナー付きガラスビンを使用した。試料水は12時間以内にWhatman社製GF/Cガラスフィルター（保持粒径1.2 μ m）でろ過し、速やかに6N HClにてpHをおよそ3.5としてからエムポアディスクC18FFに1 ℓ 通水して固相抽出を行った。抽出したディスクはステンレスシャーレに入れて-20 $^{\circ}$ C以下で保存した。分析に供する際には37 $^{\circ}$ Cで2時間ほど乾燥した後、アセトン5mlで2回溶出したものを用いた。

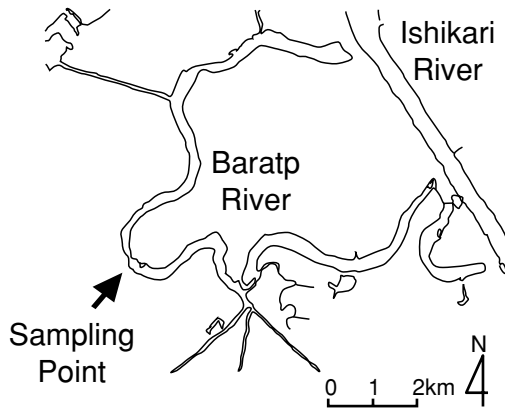


図1 採水地点図

表1 茨戸川表層水の水質測定結果

| | 4月26日 | 7月29日 | 9月25日 |
|---------------|-------|-------|-------|
| 採水時刻 | 10:44 | 11:45 | 10:29 |
| 水温 (°C) | 12.7 | 22.6 | 18.8 |
| pH | 7.78 | 7.93 | 8.01 |
| 電気伝導度 (ms/cm) | 0.430 | 1.037 | 1.030 |
| 溶存酸素 (mg/l) | 10.79 | 11.26 | 13.88 |
| 透視度 | 28 | >30 | 25 |

2.2 酵母Two-Hybrid法による女性ホルモン様活性の評価

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2、操作手順を図3に示す。操作手順は既報³⁾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AURORA™ GAL-XEキットを使用して発光量に変換し、ATTO社製ル

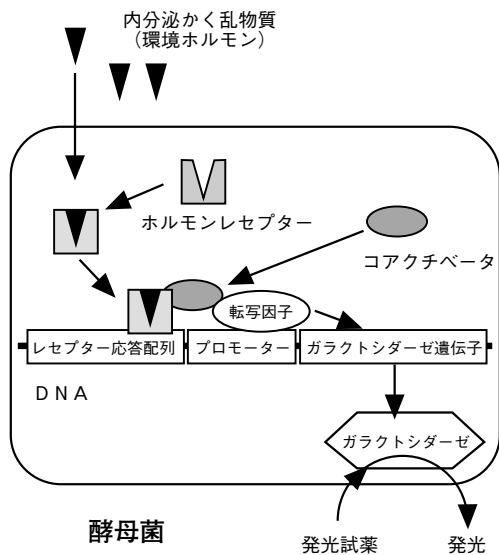


図2 酵母Two-Hybrid法による内分泌かく乱化学物質の検出メカニズム

ミネッセンサーAB-2100で測定した。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⁴⁾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後N₂ガスでアセトンを留去し、pH=9.05のほう酸バッファ3 mlと酢酸エチル 2 mlで2回液々抽出した。酢酸エチル相を分取し、N₂ガスパージし乾固後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。また化学物質そのものの女性ホルモン様活性を評価する-S9試験の他に、生体内で代謝されて生成する物質の女性ホルモン様活性も評価するため、キッコーマンS9 mix (ラット肝ホモジネートの上清) を用いて+S9試験も実施した。さらに-S9試験においては試料の毒性を評価するため、発光細菌 (*Vibrio fischerii*) を用いた急性毒性試験も実施した。

2.3 TMS化GC/MS法による女性ホルモン様活性物質の分析

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⁵⁾。女性ホルモンもしくは女性ホルモン様活性を疑われる化学物質は構造中に水酸基を有するため、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⁶⁾。今回我々は既報⁷⁾に従ってTMS誘導体化による一斉分析法を採用した。対象とした化学物質は表1に示す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stilベ

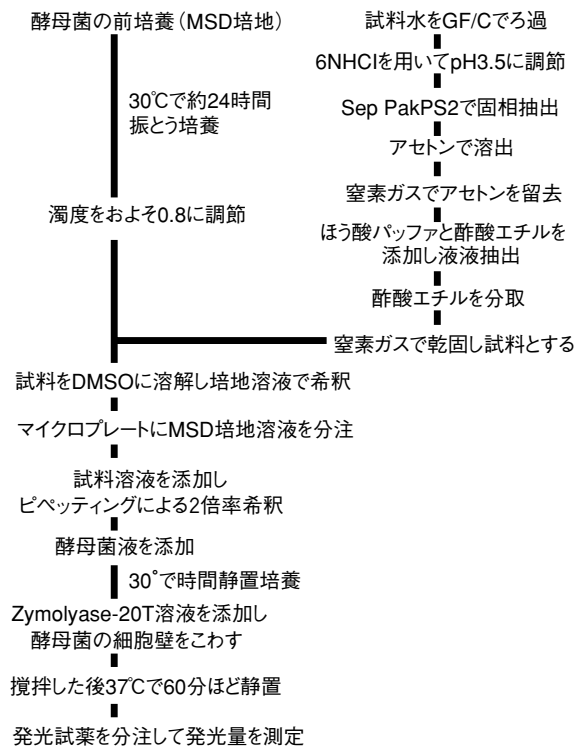
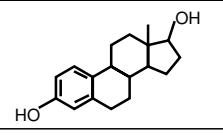
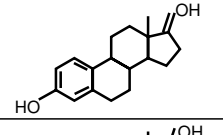
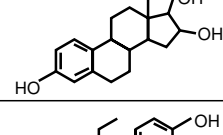
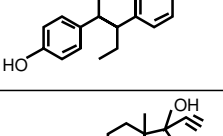
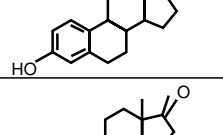
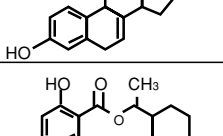
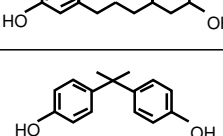
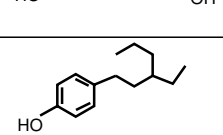
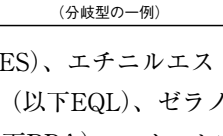


図3 酵母Two-Hybrid法による女性ホルモン様活性の測定手順

表2 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×10 | 活性強度 |
|-------------------------------|---|--------|---------|
| 17βエストラジオール (E2) |  | 70pM | 1.0 |
| エストロン (E1) |  | 930pM | 1/18.8 |
| エストリオール (E3) |  | 60nM | 1/718 |
| ジエチルスチル ベルトロール (DES) |  | 300pM | 1/4.3 |
| エチニル エストラジオール (EE2) |  | 130pM | 1/2.1 |
| エキリン (EQL) |  | 2.3nM | 1/13.1 |
| ゼラノール (ZNL) |  | 11nM | 1/63 |
| ビスフェノールA (BPA) |  | 3.2 μM | 1/72000 |
| p-ニルフェノール (NP) (分岐型の一例) |  | 170nM | 1/2425 |

ストロール（以下DES）、エチニルエストラジオール（以下EE2）、エキリン（以下EQL）、ゼラノール（ZNL）、ビスフェノールA（以下BPA）、p-ニルフェノール（分岐型混合体、以下NP）の9種類とした。使用したTMS化試薬は、水酸基を完全にTMS化するため、3種類のTMS化剤の混合液であるSylon BTZ（BSA:TMCS:TMSI=3:2:3）を使用した。反応条件は、標準溶液にSylon BTZを100 μlほど添加し、約60℃で1時間ほど反応させた。室温で放冷後n-ヘキサンとMilli-Q水で液液抽出を行いクリンアップした後、n-ヘキサン相を分取し内部標準としてフルオランテン-d-10溶液を添加して試料とした。分析に使用した機器はHewlett-Packard社製GC-5890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 μm、長さ30m）を装着し、四重極型質量分析装置として日本電子社製Automass-2を用いた。環境試料は、アセトン溶出溶液をN₂ガスパーシジ乾固した後標準試料と同様に反応させた。その後の操作は標準物質と同様に調製を行った。

2.4 環境試料中の多環芳香族炭化水素（PAH）sの定量

環境試料中の多環芳香族炭化水素（PAH）の定量は、アセトン溶出溶液を濃縮後、n-ヘキサンに転溶してから内部標準物質としてフルオランテン-d-10を添加して分析に供した。分析機器はEDCsと同一のものを使用した。

3 結果

3.1 酵母Two-Hybrid法による環境中の女性ホルモン様活性（-S9）

酵母Two-Hybrid法による、-S9における陽性対照物質（ポジティブコントロール）として使用するE2のEC×10（ベースラインに比べて発光強度が10倍になる濃度）はおよそ70pMであった。酵母Two-Hybrid法による、-S9におけ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2に示す。バイオアッセイの場合、ポジティブコントロールの応答にばらつきが生じるため、EC×10の比と活性強度が一致していない。しかしこの表から、女性ホルモン様活性物質には、その活性強度にかなりの差があることわかる。この表に示した値は、昨年我々が報告した値²⁾と若干異なっているものの同様の傾向を示していることから、今回はこの結果を用いて環境試料の評価を試みた。次に、茨戸川表層水の酵母Two-Hybrid法による評価の結果（-S9および+S9）と発光細菌を用いた急性毒性評価の結果（-S9のみ）を図4に示す。この図から、-S9条件下においては4月の試料が最も女性ホルモン様作用が強く、10倍の発光強度比を示していた。この結果から線形近似法により発光強度比が10倍の応答を示す濃縮倍率（EC×10）を求め、その値と陽性対照物質（ポジティブコントロール）として使用したE2の応答から4月の表層水中の女性ホルモン様活性物質総体のE2換算濃度を算出すると0.154ng/lであった。一方7月と9月の試料は応答が10倍に達しておらず定量下限値以下と判定した。しかし発光細菌を用いた急性毒性試験の結果を見ると、すべての試料において、最大濃縮倍率で発光強度がほぼ50%となっている。酵母菌と発光細菌では生物種が異なるため毒性の発現様式や用量応答が異なると考えられるが、毒性によって酵母菌に対するエストロゲン活性の応答も抑制されている可能性が示唆された。

3.2 酵母Two-Hybrid法による環境中の女性ホルモン様活性（+S9）

+S9条件下においては4月の試料は3倍以上の発光強度比を示し陽性と判定したが7月と9月の試料は陰性であった。S9 mixはラットの肝臓をホモジネートしたものであり、チトクロムP-450などの酵素が含まれている。この

- S 9

+ S 9

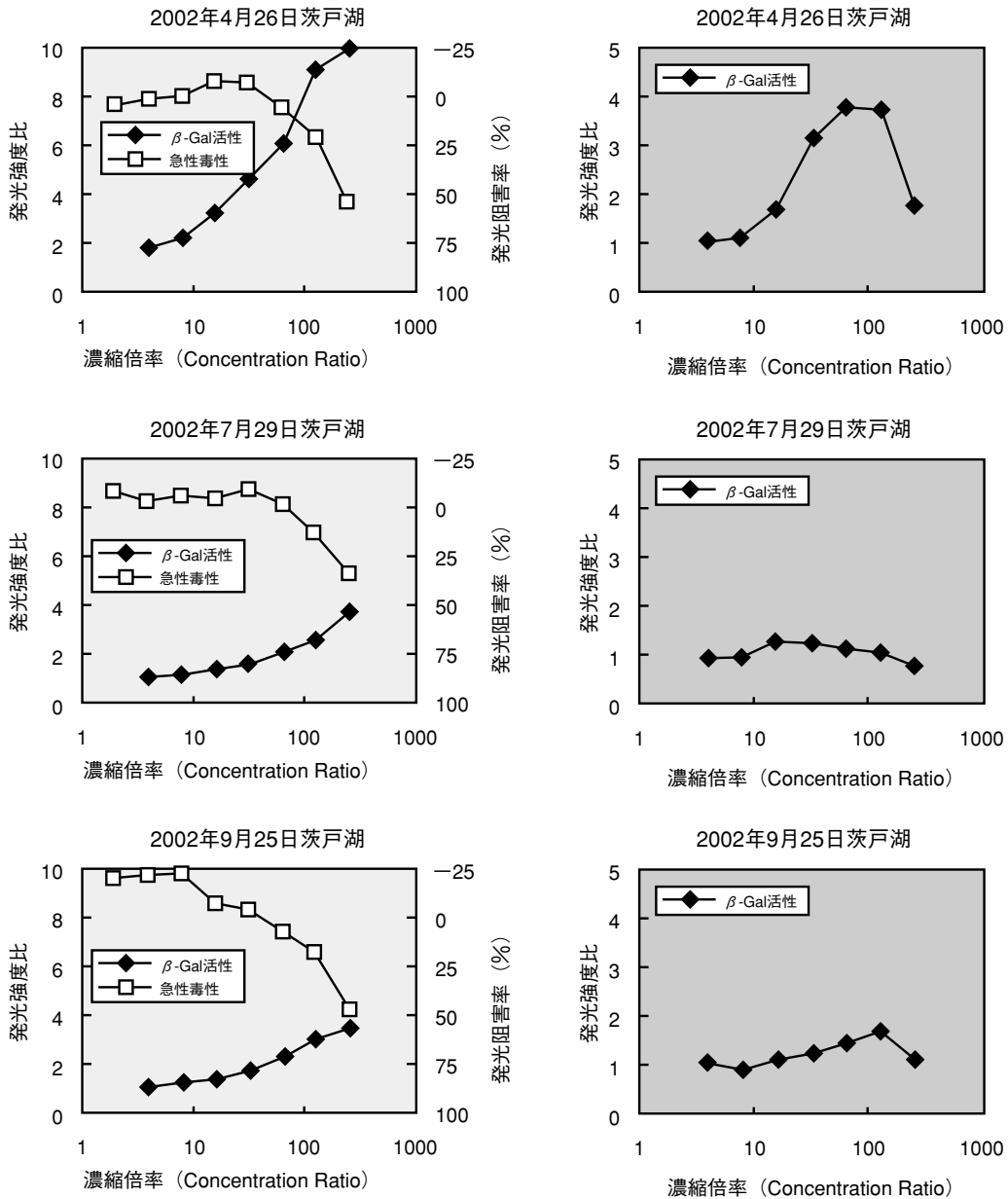


図4 酵母Two-Hybrid法によるエストロゲンアゴニスト活性評価の結果(左に-S9、右に+S9)と発光細菌による急性毒性評価の結果(-S9のみ)

酵素はモノオキシゲナーゼであり、体内に取り込まれた有害な化学物質の水溶性を高めて体外への排泄を促進するとされている⁸⁾。このため、表2に示した物質はS9 mixの働きによって女性ホルモン様活性を失うが、全く別の化学物質が女性ホルモン様活性を示すように変化してしまう可能性がある。こういった物質として多環芳香族炭化水素 (PAH) の1種であるベンゾ (a) ピレンが知られている⁹⁾。このS9 mixを反応させた実験において女性ホルモン様活性が検出されたことから、茨戸川表層水には、ベンゾ (a) ピレンのように生物代謝を受けることによって初めて女性ホルモン様活性を発現する化学物質が含まれていることが示唆された。

3.3 化学分析の手法と酵母Two-Hybrid法による環境中の女性ホルモン様活性物質の定性と定量

次に4月の試料の女性ホルモン様活性の原因物質の解明をTMS化GC/MS法により試みた。この結果を表3に示す。この結果、p-ニルフェノールとビスフェノールAが検出されたが、ここで検出された濃度をE2濃度に換算するとそれぞれ0.0418ng/l、0.000289ng/lとなり、合計しても酵母Two-Hybrid法から求められたE2換算濃度0.154ng/lに達せず、未検出の女性ホルモン様物質の存在が示唆された。次に、4月の表層水は+S9において陽性を示したことから、ベンゾ (a) ピレンを含む多環芳香族炭化水素 (PAH) 類の分析を試みた。多環芳香族炭化水素 (PAH) 類は、自動車やストーブなどの燃焼機関からの排出ガスや、自動

表3 TMS化GC/MS法による茨戸川表層水中のエストロゲンアゴニストの定量分析結果

| 4月26日茨戸川 | |
|---------------|-------|
| エストロン | <0.1 |
| β-エストラジオール | <0.1 |
| エストリオール | <0.1 |
| ジエチルスチルベストロール | <0.1 |
| エチニルエストラジオール | <0.1 |
| エキリン | <0.1 |
| ゼラノール | <0.1 |
| ビスフェノールA | 20.8 |
| p-ノニルフェノール | 101.4 |

単位：ng/ℓ

表4 GC/MS法による表層水中の多環芳香族炭化水素(PAH)とその水酸化物の定量分析結果

| 4月26日茨戸川 | |
|-------------------|-------|
| アセナフチレン | 0.18 |
| アントラセン | <0.05 |
| フェナンスレン | 0.24 |
| フルオレン | <0.05 |
| ピレン | 0.79 |
| ベンゾ (a) アントラセン | <0.05 |
| ベンゾ (a) ピレン | 0.25 |
| ベンゾ (b+k) フルオランテン | 0.90 |
| 1-ヒドロキシピレン | 0.52 |
| 9-フェナンスロール | <0.1 |

単位：μg/ℓ

車のタイヤ粉塵等に含まれており、この化学物質の1つであるベンゾ (a) ピレンは変異原性を指摘されているほか、SPEED'98のリストにも掲載されており、環境ホルモン物質と危惧されている。この分析の結果、表4に示すとおりアセナフチレン、フェナンスレン、ピレン、ベンゾ (a) ピレン、ベンゾ (b) フルオランテンあるいはベンゾ (k) フルオランテンが検出された。この結果から、これらの物質によって+S9において陽性を示したものと推察された。さらに、茨戸川表層水には多環芳香族炭化水素 (PAH) 類が代謝されて生成する水酸化物の存在が予想されたため、入手可能であった水酸化物2種 (フェナンスレンの代謝物である9-フェナンスロール、ピレンの代謝物である1-ヒドロキシピレン) を購入し酵母Two-Hybrid法によってS9における女性ホルモン様活性の測定を行った。この結果を図5に示す。この図から、9-フェナンスロールは

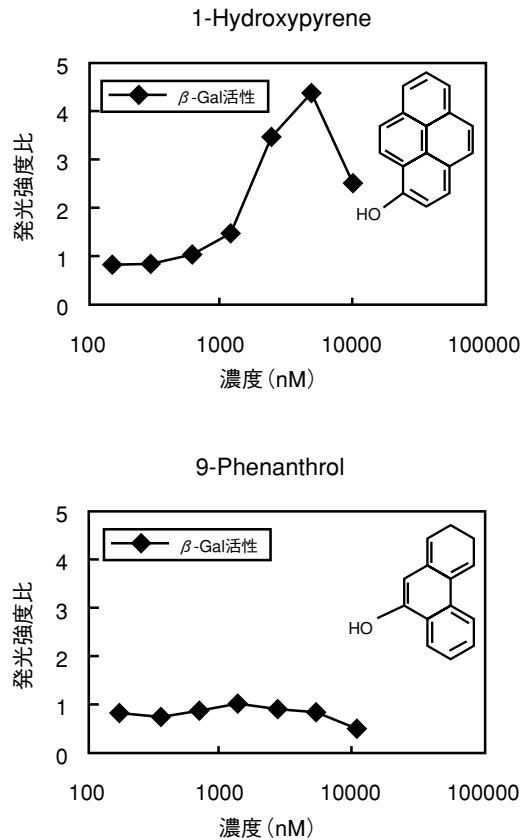


図5 酵母Two-Hybrid法による多環芳香族炭化水素(PAH)の水酸化物のエストロゲンアゴニスト活性

女性ホルモン様活性を有しないが、1-ヒドロキシピレンは女性ホルモン様活性を有することが示され、EC×10はおよそ6.7 μM、E2に対する比活性値は6万分の1程度と求められた。この結果をもとにして、TMS化GC/MS法により4月の茨戸湖表層水中の9-フェナンスロールと1-ヒドロキシピレンの濃度を分析した。この結果、表4に示すとおり茨戸川表層水から1-ヒドロキシピレンが検出された。求められた1-ヒドロキシピレンの濃度とE2に対する比活性値から、茨戸川表層水における女性ホルモン様活性への寄与率は5%程度であった。NP、BPAの寄与率を合算しても3分の1程度にとどまり、残りの3分の2は未知の環境ホルモン物質によるものである可能性が示唆された。

4 まとめ

固相抽出-酵母Two-Hybrid法によって茨戸川表層水中の女性ホルモン様活性を評価し、誘導体化GC/MS法によってその原因物質の解明を試みた。その結果、

1. 茨戸川表層水には女性ホルモン様活性を示す物質が存在することが示され、その活性強度は、4月が最大であった。
2. 4月の表層水中の女性ホルモン様活性(S9)の原因物質と

して、p-ノニルフェノール、ビスフェノールA、1-ヒドロキシピレンが検出された。しかしこれらの物質の女性ホルモン様活性の強度と、表層水中の濃度を積算しても酵母Two-Hybrid法によって得られた結果の3分の1程度であり、残りの3分の2の活性は未知の女性ホルモン様活性物質によるものである可能性が示唆された。

3. 4月の表層水中の女性ホルモン様活性(+S9)の原因物質は不明であるが、化学分析においてベンゾ(a)ピレンが検出されたことから、この物質がS9mixによって代謝されて女性ホルモン様活性物質が生成した可能性が示唆された。

今回の結果が季節的なものであるかどうかを断定するには、更なる調査が必要と考えられた。

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) 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, 北海道環境科学研究センター所報, vol.28,37-41,2002
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 鳥貝真, 石井善昭, 尹順子, 橋場常雄: GC/MSによる下水処理場放流水及び河川水中のエストロゲンの分析. *環境化学*, vol.10, No.3, pp.595-600, 2000
- 8) 武森重樹, 小南思郎: チトクロムP-450. 東京大学出版会,1990
- 9) T.Nishihara, J.Nishikawa, T.Kanayama, F.Dakeyama, K.Saito, M.Imagawa, S.Takatori, Y.Kitagawa, S.Hori

and H.Utsumi: Estrogenic activities of 517 chemicals by Yeast Two-Hybrid assay. *J.Health.Sci.* vol.46, pp.282-298, 2000

The investigation on endocrine disrupting chemicals in the surface water of Barato River

Shinichiro NAGAHORA, Seiki IGARASHI,
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 investigated the female hormone antagonist activity by Yeast Two-Hybrid assay system in the surface water of Barato River in April, July, and September. The results showed that the surface water in April had an estrogenicity at both -S9 and +S9 conditions. We could detect bisphenol-A, p-nonylphenol, and 1-hydroxypyrene as estrogenic chemicals by the trimethylsilyl derivatised GC/MS analysis method. The estrogenic activity of 1-hydroxypyrene was evaluated as $6.7 \mu\text{M EC} \times 10$ by Yeast Two-Hybrid assay system.