液体クロマトグラフィー/タンデム質量 分析法によるエストロゲン様物質の 分析法の検討と松山平野の河川における分布

高松 公子^{1,2)}, 中河三千代²⁾, 松田 宗明²⁾,
河野 公栄²⁾, 脇本 忠明²⁾

¹⁾愛媛県立衛生環境研究所 (〒790-0003 愛媛県松山市三番町8-234)

²⁾愛媛大学農学部 (〒790-8566 愛媛県松山市樽味3-5-7)

[平成16年11月8日受理]

Analytical Method for Measuring Estrogenic Substances by LC/MS/MS and their Distribution in River Water from Matsuyama, Japan

Kimiko TAKAMATSU^{1,2)}, Michiyo NAKAGAWA²⁾, Muneaki MATSUDA²⁾,
Masahide KAWANO²⁾ and Tadaaki WAKIMOTO²⁾

¹⁾Ehime Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science
(8-234 Sanban-cho, Matsuyama, Ehime 790-0003)

²⁾Faculty of Agriculture, Ehime University
(3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566)

[Received November 8, 2004]

Summary

The purpose of this study is the development of method for synthetically evaluating multiple estrogen-like compounds, present in river water and their effects on organisms. This paper explains an improved analytical method for quantifying the estrogen-like compounds. The present analytical method using LC/MS/MS is very simple and has a detection limit of 1 ppt for all the chemicals analyzed. The estrogen-like compounds present in the river water samples collected from Matsuyama, Japan were also quantified using this method. The estrogen like compounds, estrone (E1), 17 β -estradiol (β -E2), estradiol-3-sulfate (E2-3S) and estrone-3-sulfate (E1-3S) were detected in the river water samples analyzed. The levels of these compounds are as follows: E1: n.d. to 24, β -E2: n.d. to 2.2, E2-3S: n.d. to 0.6 and E1-3S: 0.3 to 4.1 ng/ ℓ . Bisphenols and alkylphenols such as bisphenol A (BPA: n.d. to 240 ng/ ℓ), 4-tert-octylphenol (4-tert-OP: 13 to 410 ng/ ℓ) and 4-nonylphenol (4-NP: 170 to 2800 ng/ ℓ) were also detected. These results show the presence of these man-made chemicals in considerably higher quantities in the river waters of Matsuyama, Japan, which can cause deleterious effects on organisms living there. The possible estrogenic action by these compounds on the organisms may be of great concern in future, indicating the necessity of continuous evaluation of these compounds and their estrogenic action in the organisms living in the rivers of the present study area and their ambient environment.

Key words: estrogen-like compound, endocrine disruptor, LC/MS/MS, environmental water sample, solid phase extraction

1. はじめに

近年、ヒトや野生生物の内分泌機能に悪影響を及ぼす人工化学物質が注目されている¹⁾。我が国においても、環境省が環境ホルモン戦略SPEED'98²⁾を公表し、内分泌攪乱作用を有すると疑われる物質として、65種の人工化学物質をリストアップしている。これら人工化学物質は、性ホルモンあるいは甲状腺ホルモンと類似した作用があり、なかでもビスフェノール A (BPA) やノニルフェノール (NP) 等のようにエストロゲン様作用を有する物質が多くある³⁾。これらは、ポリカーボネート樹脂やフェノール樹脂の原料等に多量に使用され⁴⁾、環境中にも比較的高濃度で存在している⁵⁾。

このようなエストロゲン様作用を有する人工化学物質以外にも、ヒトや家畜からエストラジオール類が直接あるいは抱合体の形で排泄され、環境中で分解し、エストロゲン様作用が強い遊離体のエストロゲンやエストロンとなり、水生生物等に影響を及ぼしているとの報告もある⁶⁾。この様に、環境水中には、エストロゲン様作用を有する種々の人工化学物質や生物由来のエストラジオール類が混在していることが予測された。ところがこれらの各種エストロゲン様物質は、女性ホルモンとしての生物への作用強度が異なり、生物への影響評価を困難にしている。そこで著者らは、複数のエストロゲン様物質の化学分析結果とそれら物質のエストラジオールに対する相対強度をそれぞれ求め、濃度と相対強度の積を等価濃度とし、その等価濃度の総和をもって、河川中のエストロゲン様物質の評価をする方法に着目した。本報告はその基礎データとなる各種エストロゲン様物質の分析法の検討及び松山平野11河川について汚染の現状を調査した。

2. 実験方法

公定法^{7,8)}及び環境省暫定マニュアル⁹⁾においては、水試料中のBPA、アルキルフェノール類及びエストラジオール類の測定は、固相抽出後、直接あるいは誘導体化して、ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) で測定する方法が用いられている。しかしながら、エストラジオール類の硫酸抱合体やグルクロン酸抱合体をGC/MSで個別定量するのは困難である。その点、液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) あるいは液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (LC/MS/MS) は、GC/MSでは分析困難な難揮発性物質や高極性物質等が容易に分析でき、クリーンアップ操作や誘導体化等の煩

雑な操作を行うことなく、種々の化学物質が定量可能であるため、近年、環境試料へ適用報告が増えつつある¹⁰⁻¹²⁾。そこで本報では、LC/MS/MSを用いた簡便なエストロゲン様物質の定量法について検討を行い、若干の改良を行った分析法を用いて、河川水のエストロゲン様物質を測定した。

2. 1 試薬類

- 1) 定量標準試薬: Table 1 に示し、その構造式は Fig. 1 に図示した。
- 2) 内標準化合物: 以下の4物質を用いた。
 - ① エストラジオール- d_3 (E2- d_3), 和光純薬製
 - ② エストロン- d_4 -3-硫酸 (E1- d_4 -3S), シグマ社製
 - ③ ビスフェノール A- d_{14} (BPA- d_{14}), 和光純薬製
 - ④ 4- n -ノニルフェノール- d_4 (4- n -NP- d_4), 和光純薬製
- 3) 有機溶媒等: アセトニトリルは和光純薬製高速液体クロマトグラフ用, アセトン, メタノール, 酢酸エチル, ジクロロメタン及びヘキサンは和光純薬製残留農薬試験用, 塩酸, 濃アンモニア水及びトリメチルアミンは和光純薬製特級試薬を使用した。

Table 1 Target Compounds

Compound	Abbreviated name
Estradiol	
17 α -Estradiol	α -E2
17 β -Estradiol	β -E2
Estrone	E1
Estriol	E3
Ethinylestradiol	EE2
Estradiol-3-sulfate	E2-3S
Estrone-3-sulfate	E1-3S
Estradiol-3-glucuronide	E2-3G
Estrone-3-glucuronide	E1-3G
Bisphenol	
Bisphenol A	BPA
Bisphenol B	BPB
Bisphenol F	BPF
Bisphenol S	BPS
Tetrabromobisphenol A	TBBPA
Alkylphenol	
4-Nonylphenol	4-NP
4-n-Octylphenol	4-n-OP
4-tert-Octylphenol	4-tert-OP

Fig. 1 Chemical structures of target compounds

- 4) 精製水：超純水製造装置（オートピュア WEX + WR600G, ヤマト科学製）で精製後、環境ホルモン分析用 EDS ポリッシャーを通過させた水（Milli-Q 水）を使用した。
- 5) 固相吸着剤：Waters 製固相カートリッジ OASIS HLB Plus を用いた。なおこのカートリッジに試料水を通水する際は、Waters 製加圧型固相抽出用定流量ポンプ Sep-Pak コンセントレーター Plus を用いた。

2. 2 装置及び測定条件

エストラジオール類、ビスフェノール類及びアルキルフェノール類の分析に用いた液体クロマトグラフタンデム質量分析計装置並びに測定条件を Table 2 に示す。各物質とも、前駆イオンは最も強度の強い [M-H]⁻イオンとし、衝突ガスにアルゴンガスをを用いてプロダクトイオンを生成させた。生成したプロダクトイオンの中で最も強度の強いイオンを定量用のモニターイオンとして用いた。

2. 3 河川水試料

分析対象の河川水試料は2003年10月に愛媛県松山平野内の10河川と下水処理場放流水の計11試料を採取した。その試料採取地点を Fig. 2 に示す。水試料は褐色ガラス瓶に採取し、直ちに分析に供した。一部は分析まで対象化合物の分解を考慮して冷蔵保存した。

2. 4 試料前処理

2. 4. 1 エストラジオール類の前処理

内標準物質を添加した水試料 1 ℓ を固相抽出カートリッジに毎分20mℓの流速で通水して目的物質を捕集・濃縮した。次に、カートリッジを室温で30分間通気さ

せ、さらにカートリッジを40%メタノール/水 3 mℓ 及び 10%メタノール/ 2 %アンモニア水 3 mℓ で洗浄した後、酢酸エチル/メタノール (1:2, v/v) 6 mℓ で目的物質を溶離させた。溶離溶液を窒素気流下で乾固するまで濃縮後、アセトニトリル:水 (1:1), 1.0mℓ で再溶解し LC/MS/MS 用試料とした。

2. 4. 2 ビスフェノール類及びアルキルフェノール類の前処理

試料捕集・濃縮及びカートリッジの通気操作を 2. 4. 1 と同様に行い、さらにカートリッジを室温で30分間通気させ、カートリッジを 5 %メタノール/水 3 mℓ で洗浄した後、アセトニトリル 6 mℓ で目的物質を溶離させた。溶離溶液を窒素気流下で乾固するまで濃縮後、アセトニトリル:水 (1:1), 1.0mℓ で再溶解し LC/MS/MS 用試料とした。

2. 5 固相抽出法による溶出溶媒及び洗浄溶媒の検討

2. 5. 1 エストラジオール類

エストラジオール類については、遊離体と抱合体を個別に溶出させて LC/MS/MS で測定した報告¹⁰⁾はあるが、本研究では遊離体と抱合体を同時に溶出できる条件を検討した。検討した溶出溶媒は、①メタノール、②酢酸エチル/メタノール (1:2, v/v)、③アセトニトリル/メタノール (1:2, v/v)、④酢酸エチル溶出後メタノール、⑤アセトニトリル溶出後メタノールの 5 通りを用いた。その結果を Table 3 に示した。抽出効果のよい②の溶媒では、E3の回収率は66%とやや低いのが、他の物質では 84~99%と安定した回収率が得られた。

河川等の環境水を分析する場合、固相抽出カートリッジに通水・吸引乾燥後に直ちに溶出させると、多量の妨害物質も同時に溶出してしまい、イオン化の妨げとなっ

Table 2 LC/MS/MS Conditions

	Estradiols				Bisphenols and alkylphenols							
LC conditions	Agilent 1100				Agilent 1100							
Column	Xterra MS C18(3.5µm, 2.1mm×150mm)				Xterra MS C18(3.5µm, 2.1mm×150mm)							
Mobile phase	A: water(20mM TEA), B: acetonitrile(20mM TEA)				A: water, B: acetonitrile							
	Gradient B: 0– 2min: 10%				Gradient B: 0– 5min: 10%							
	2– 25min: 10-60%				5– 40min: 10-90%							
	25– 30min: 60%				40– 50min: 90%							
Flow	0.20mℓ/min				0.20mℓ/min							
Oven temperature	40℃				40℃							
Injection volume	10µℓ				10µℓ							
MS/MS conditions	TSQ Quantum				TSQ Quantum							
Ionization mode	Negative-ESI				Negative-ESI							
Spray voltage	3.9kV				3.5kV							
Heated capillary	350℃				350℃							
Collision gas	Argon 1.5mTorr				Argon 1.5mTorr							
Compound*	α-E2	m/z	271.1→145.1, 44V	E2-3S	m/z	351.1→271.2, 40V	BPA	m/z	227.0→212.0, 22V	4-n-OP	m/z	205.0→106.2, 22V
(SRM monitoring ion and Collision energy)	β-E2	m/z	271.1→183.1, 42V	E2-3G	m/z	447.1→271.2, 44V	BPB	m/z	241.1→223.1, 22V	4-tert-OP	m/z	205.0→133.1, 28V
	E1	m/z	269.3→145.1, 42V	E1-3S	m/z	349.0→269.2, 38V	BPF	m/z	199.0→ 93.1, 26V	4-NP	m/z	219.0→133.1, 28V
	E3	m/z	287.0→171.1, 38V	E1-3G	m/z	445.1→269.2, 42V	BPS	m/z	249.2→108.1, 30V	BPA-d ₁₄	m/z	241.1→223.1, 22V
	EE2	m/z	295.2→145.1, 42V	E2-d ₃	m/z	274.0→185.1, 44V	TBBPA	m/z	542.7→419.4, 46V	4-n-NP-d ₄	m/z	223.1→110.2, 26V
				E1-d ₄ -3S	m/z	353.0→273.2, 38V						

*The abbreviation of compound names is as follows the names listed in table 1.

た。そのため目的物質を溶出させる前に、できるだけ多くの妨害物質を溶離除去させる洗浄溶媒について検討を行った。まずメタノール/水系で洗浄した後、10%メタノール/2%アンモニア水で洗浄することにした。河川試料1ℓを2.4.1に示すように捕集・濃縮及びカートリッジの通気操作を行い、洗浄には5~40%メタノール溶液を用い、酢酸エチル/メタノール(1:2, v/v)で溶

出させ、窒素気流下で乾固後、アセトニトリル:水(1:1) 1 mlに再溶解したものを測定溶液とした。Fig. 3(a)には5%メタノール溶液で洗浄した測定溶液のSRM (Selected Reaction Monitoring) クロマトグラムを示した。リテンションタイム(R.T.) 2~10分に最も大きなピーク(m/z 271.1→183.1)がみられた。また目的物質が検出され始めるR.T.13分以降では、R.T.18~24分

Fig. 2 Sampling sites in Matsuyama Plain

Table 3 Recoveries(%) of estrogen-like compounds with solvent desorption from the solid phase (OASIS HLB)

	Compound*								
	E1	α -E2	β -E2	EE2	E3	E1-3G	E1-3S	E2-3G	E2-3S
Spiked amount (ng)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Solvent									
①Methanol	87	90	99	78	82	63	90	59	85
②Ethylacetate/Methanol (1:2, v/v)	88	93	92	95	66	87	99	84	97
③Acetonitrile/Methanol (1:2, v/v)	84	89	80	87	59	74	94	70	90
④Ethylacetate and Methanol	79	98	93	110	49	100	96	100	92
⑤Acetonitrile and Methanol	78	92	94	97	37	64	100	68	97

* The abbreviation of compound names is as follows the names listed in table 1.

に最も大きなピーク (m/z 349.0→269.2) がみられた。これら2つのピークについて、メタノール溶液洗浄による妨害物質除去の効果を Fig. 3 (b) 及び (c) に示した。メタノールの割合が高くなるにつれてピークが小さくなっており、妨害物質除去の効果がみられた。40%メタノールによる洗浄操作でも目的物質の回収率低下はほとんどみられなかったため、洗浄操作には、まず40%メタノール/水で洗浄し、固相カートリッジ内に残った洗浄溶媒を水で流した後、10%メタノール/2%アンモニア水で洗浄することにした。

2. 5. 2 ビスフェノール類及びアルキルフェノール類

ビスフェノール類及びアルキルフェノール類について、エストラジオール類との同時抽出が可能かどうか、前出の溶媒②を用いて、溶離操作を行ったが、アルキルフェノール類の回収率が40%程度であったため、エストラジオール類とは別操作で固相抽出することとした。ビ

スフェノール類及びアルキルフェノール類分析法は米久保らの方法¹⁹⁾を若干改良した。溶出溶媒にはジクロロメタンとアセトニトリルを検討した。ジクロロメタンはTBBPAが120%となり、その他の物質は72~89%であった。アセトニトリルは4-*n*-OPが64%とやや低いものの、その他の物質は88~100%と比較的よい回収率であったため、溶出溶媒にはアセトニトリルを用いることとした。また洗浄溶媒には米久保らが用いた5%メタノールを使用した。

2. 6 添加回収試験

河川水1ℓに標準溶液25ng (ただしTBBPAは50ng, 4-NPは250ng) を添加し、添加回収率を測定した。その結果を Table 4 に示す。エストラジオール類ではE2-3Gが69%, E1-3Gが72%とグルクロン酸抱合体がやや低い値を示したが、その他は91~110%と良好な回収率で

Fig. 3 Effects of interference elimination for river water extracts with pre-elution

- (a) SRM chromatograms of nine estrogen and estrogen-like compounds without pre-elution.
- (b) Effects of interference elimination on 17β-estradiol chromatogram.
- (c) Effects of interference elimination on estrone-3-sulfate chromatogram.

あった。ビスフェノール類及びアルキルフェノール類では、*n*-OPが79%, BPSが130%となったが、その他の物質については90~120%と良好な回収率であった。本報の遊離体と抱合体を同時に溶離させる方法を検討した結果、ほぼ満足できる回収率がえられた。

2. 7 検出下限, 定量下限

分析機器の検出下限は、ノイズの3倍のピークが得られる濃度とした。また定量下限は分析方法と分析機器の検出下限量から求めた。その結果をTable 5に示す。

3. 河川水の分析結果と考察

本報告で開発した分析法を用いて、愛媛県松山平野の10河川水と下水処理場放流水の計11地点のエストラジオール類、ビスフェノール類及びアルキルフェノール類濃度を測定した。エストラジオール類のクロマトグラム例(Site 4 試料と標準物質)をFig. 4に、ビスフェノール類及びアルキルフェノール類のクロマトグラム例(Site 5 試料と標準物質)をFig. 5に示す。またTable 6にエストラジオール類、ビスフェノール類及びアルキルフェノール類の測定結果を示し、検出濃度の分布図をFig. 6に示す。

3. 1 エストラジオール類

エストラジオール類は、 β -E2, E1, E2-3S及びE1-3Sが検出され、 α -E2, E3, EE2, E2-3G及びE1-3Gは検

出されなかった。環境省の全国調査⁵⁾では、 β -E2がN.D.~8.3(中央値0.3) ng/l, α -E2がN.D.~0.3[中央値N.D.(<0.1)] ng/lで、国土交通省の調査¹⁰⁾では、E1がN.D.~30[中央値N.D.(<0.5)] ng/lの範囲で検出され、EE2は検出されていない。今回の調査では、これまでの全国調査の最大値を超える濃度は検出されなかったが、中央値を超える地点が松山平野北部に多くみられた。下水処理場の処理工程で遊離体は減少するものの、二次処理水中には、E1がN.D.~180(中央値12) ng/l, β -E2がN.D.~11[中央値N.D.(<0.5)] ng/l, E3がN.D.~5.8(中央値1.5) ng/l検出されたとの報告¹⁰⁾と比較すると、地点11(下水処理場放流水)のE1及び β -E2はやや高濃度であった。この下水処理場放流水が地点4に大量に流入しており、高濃度を示す原因のひとつと考えられる。また地点4を含む北部地域では下水道が未整備のため、流域周辺からの浄化槽排水の影響も考えられる。

また抱合体を分析した事例¹⁰⁾では、硫酸抱合体のE1-3S, E2-3Sは検出されているが、グルクロン酸抱合体は検出されておらず、今回の調査結果と概ね一致した。女性ホルモンは、硫酸あるいはグルクロン酸抱合体の形で排泄されることが知られているが、グルクロン酸抱合体は環境中で脱抱合しやすく、 β -E2やその酸化物であるE1を生成していると考えられる。特に松山平野北部の河川については、E1が比較的高濃度で検出されており、

Table 4 Recoveries of estrogen-like compounds from river water sample

Compound* ¹	Spiked amount(ng)	Recovery(%)
α -E2	25	94 (2)* ²
β -E2	25	95 (5)
E1	25	91 (6)
E3	25	110 (11)
EE2	25	99 (6)
E1-3S	25	100 (3)
E2-3S	25	100 (2)
E1-3G	25	72 (6)
E2-3G	25	69 (7)
BPA	25	120 (7)
BPB	25	110 (5)
BPF	25	120 (8)
BPS	25	130 (8)
TBBPA	50	89 (8)
4-n-OP	25	78 (7)
4-tert-OP	25	100 (4)
4-NP	250	93 (4)

*1 The abbreviation of compound names is as follows the names listed in table 1.

*2 Figure in parenthesis is coefficient of variation.

Table 5 Detection limits and quantification limits of estrogen-like compounds

Compound*	Detection limit (pg)	Quantification limit (ng/l)
α -E2	5.1	0.51
β -E2	8.2	0.82
E1	6.0	0.60
E3	8.4	0.84
EE2	11	1.1
E1-3S	1.7	0.17
E2-3S	2.3	0.23
E1-3G	4.9	0.49
E2-3G	5.4	0.54
BPA	8.3	0.83
BPB	8.7	0.87
BPF	11	1.1
BPS	15	1.5
TBBPA	21	2.1
4-n-OP	8.8	0.88
4-tert-OP	8.3	0.83
4-NP	40	4.0

*The abbreviation of compound names is as follows the names listed in table 1.

Fig. 4 Standard and sample chromatgrams of estradiols

Table 6 Concentrations of estrogen-like compounds in environmental water samples

River name	Concentration of compound* ¹ (ng/l)													
	α-E2	β-E2	E1	E3	EE2	E2-3S	E1-3S	E2-3G	E1-3G	BPA	BPB	BPF	BPS	TBBPA
1:Oh Kawa	N.D.* ²	2.2	3.4	N.D.	N.D.	0.5	2.1	N.D.	N.D.	34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2:Kuma Gawa	N.D.	2.1	14	N.D.	N.D.	0.6	4.1	N.D.	N.D.	22	N.D.	N.D.	4.3	N.D.
3:Taisanji Gawa	N.D.	2.0	6.1	N.D.	N.D.	0.3	2.0	N.D.	N.D.	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4:Miyamae Gawa	N.D.	0.8	20	N.D.	N.D.	0.6	2.8	N.D.	N.D.	63	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5:Dohnomoto Gawa	N.D.	N.D.	7.6	N.D.	N.D.	0.3	1.2	N.D.	N.D.	240	N.D.	N.D.	N.D.	45
6:Senchi Gawa	N.D.	0.9	5.9	N.D.	N.D.	0.4	3.1	N.D.	N.D.	22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7:Shigenobu Gawa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	1.0	N.D.	N.D.	7.8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
8:Kunichika Gawa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.5	N.D.	N.D.	7.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9:Nagaotani Gawa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	N.D.	N.D.	54	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
10:Ohtani Gawa	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	0.7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
11:Sewage-treatment plant water	N.D.	1.0	24	N.D.	N.D.	0.4	0.6	N.D.	N.D.	58	0.9	N.D.	N.D.	N.D.

*1 The abbreviation of compound names is as follows the names listed in table 1.

*2 N.D.: Not detected

Fig. 5 Standard and sample chromatograms of bisphenols and alkylphenols

Fig. 6 Concentrations of endocrine disruptors in water samples of Matsuyama Plain

環境水中では、人や家畜から排泄された女性ホルモンは、抱合体が脱抱合で遊離体となり、最終的に酸化され、E1になることが推定される。

3. 2 ビスフェノール類及びアルキルフェノール類

ビスフェノール類及びアルキルフェノール類では、BPA、4-tert-OP、4-NPが広範囲に検出され、BPB、BPS、TBBPAについては一部の地点で検出された。またBPF及び4-n-OPについては全地点で検出されなかった。全国調査⁵⁾でも、BPAはN.D.～19,000〔中央値30〕ng/ℓの範囲で、4-tert-OPはN.D.～920〔中央値N.D. (<10)〕ng/ℓ、4-NPはN.D.～8,400〔中央値N.D. (<100)〕ng/ℓの範囲であり、今回の調査結果はその範囲内に入っていた。全国調査の中央値と今回のデータを比較すると、下水処理場下流地点4をはじめとして松山平野北部の河川にアルキルフェノール類、特に界面活性剤の分解物である4-NPが170～2,400ng/ℓと高濃度で検出されている。その理由は地点1～3の地域で現在、下水処理場が建設中であり、松山市の下水道普及率は52.9%と全国平均66.7%に比べて低く¹⁰⁾、生活排水等が大量に河川に流入しているのが原因であることが推定される。また地点5ではBPAが240ng/ℓと他の地点に比べて1桁以上高濃度で検出され、TBBPAも45ng/ℓのレベルで検出されている。BPAは合成樹脂の原料、TBBPAは難燃剤の原料として使用されており⁴⁾、地点5の上流域に、これらフェノール類の汚染に寄与する汚染源が存在することが懸念された。

4-NPが魚類に与える内分泌攪乱作用に関して、最大無作用濃度 (NOEC) は6.08 µg/ℓとの報告¹⁸⁾があるが、エストロゲン様作用を持つといわれている人工化学物質は、環境中に数多く存在しており、それらすべての物質の化学物質が総体として生物に影響を及ぼす。したがって総体としての評価は難しい。そこで各エストロゲン様物質の作用強度をもとにして総合的に生物への影響を評価する手法の開発が必要であると示唆された。

謝 辞

本研究にあたり助言いただいた愛媛県環境創造センターの立川涼所長に深く感謝いたします。

要 約

環境水中の内分泌攪乱物質による汚染は環境問題の重要な課題である。LC/MS/MSを用いた既存の分析方法をもとにエストロジオール類とその抱合体を同時に抽出する方法を検討し、その手法を用いて、松山平野の河川水及び下水処理場放流水試料、計11地点を分析した。分析結果、今回の調査で検出されたエストロゲン様物質はβ-E2、E1、E2-3S、E1-3S、BPA、BPB、BPS、TBBPA、

4-tert-OP及び4-NPであった。検出された化合物中で、4-NPが最も高濃度 (2,800ng/ℓ) で検出され、人工化学物質の生物への影響が懸念された。本研究で一般河川水中に10種の生物由来と人工汚染物質が確認され、これらを総合的に生物への影響評価を可能にする手法の開発が必要である。

文 献

- 1) Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J. P.: "Our Stolen Future", Dutton Signet, New York (1996)
- 2) 環境庁環境保健部環境安全課：外因性内分泌攪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 SPEED' 98— (2000年11月版) (2000)
- 3) 井口泰泉：環境ホルモンの生態系への影響と世界の対応, pp3-31, 「環境ホルモンの最新動向」シーエムシー, 東京 (1999)
- 4) 化学工業日報社：13599の化学商品, 東京 (1999)
- 5) 環境省環境管理局水環境部企画課：平成14年度内分泌攪乱化学物質における環境実態調査結果 (水環境) について (2003)
- 6) Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P.: Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1559-1565 (1998)
- 7) 日本工業標準調査会：用水・排水中のビスフェノール A 試験方法 JIS K 0450-10-10 (2002)
- 8) 日本工業標準調査会：用水・排水中のアルキルフェノール類試験方法 JIS K 0450-20-10 (2002)
- 9) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質, 底質, 水生生物) (1998)
- 10) Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Sinoda, A., Suzuki, H. and Morita M.: Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **984**, 195-202 (2003)
- 11) 長谷川敦子, 鈴木 茂：液体クロマトグラフィー/質量分析法による水質試料中テトラプロモビスフェノール A の分析, 環境化学, **14**, 73-79 (2004)
- 12) D'Ascenzo, G., Corcia, A.D., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M. and Samperi, R.: Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.*, **302** 199-209 (2003)
- 13) 米久保淳, 佐々木俊哉, 一木満貴子, 金井みち子, 佐々木秀輝：ビスフェノール A 及びノニルフェノールの固相抽出による濃縮/液体クロマトグラフィー及び直接液体クロマトグラフィー/質量分析, 分析

- 化学, **48**, 571-577 (1999)
- 14) 伊藤伸一, 上村 仁: 河川水中のエストロゲン及びその抱合体の分析, 水道協会雑誌, **807**, 33-37 (2001)
- 15) 国土交通省河川局河川環境課: 平成14年度水環境における内分泌かく乱物質に関する実態調査結果について (2003)
- 16) Komori, K., Tanaka, H., Yasojima, M. and Sato, C.: Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. *Water Sci. Technol.*, **50**, No.5, 93-100 (2004)
- 17) 社団法人日本下水道協会: 下水道の普及率と実施状況, http://www.jswa.jp/05_arekore/07_fukyu/index.html
- 18) 環境省総合環境政策局環境保健部: ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (2001)