中国松花江における女性ホルモン活性と 糞便性ステロール類の濃度調査

永 洞 真一郎*
中 嶋 敏 秋*

芥 川 智 子*
宋 男 哲**

村 田 清 康*
翟 平 陽***

Investigation of Estrogenic Activity and Fecal Sterols in Songhua River, China

Shinichiro NAGAHORA*, Tomoko AKUTAGAWA*, Kiyoyasu MURATA*,
Toshiaki NAKAJIMA*, Nan Zhe SONG** and Ping Yang ZHAI***

* Hokkaido Institute of Environmental Sciences, Kita-19 Nishi-12, Kita-ku, Sapporo 060-0819 Japan

** Heilongjiang Provincial Environmental Monitoring Station, 2 Weixing Street, Taiping Dist., Harbin, China

*** Heilongjiang Provincial Institute of Environmental Science, 356 Nanzhi Road, Taiping Dist., Harbin, China

Abstract

Estrogenic activity on the surface of Songhua River, China water was investigated. The estrogenic activity was detected in some samples by yeast two-hybrid assay, and natural estrogen (estrone) was detected by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). The natural estrogen seemed to originate from fecal contamination. On the basis of this supposition, we attempted to detect 10 fecal sterols in these estrogenic samples by GC/MS. The results varied depending on the source of samples and the season. However, sample C collected in January showed a high concentration of β sitosterol. This implied that there are large dairy farming or stockbreeding sites along Nenjiang River in comparison with those along Di'er Songhua River. These results were consistent with those reported in literature and showed the possibility of determining the origin of fecal contamination by fecal sterol analysis.

Keywords: yeast two-hybrid assay, natural estrogen, GC/MS, fecal sterols

1. はじめに

北海道は中国黒龍江省と友好提携地域であり、1996年度に「環境保全に関する協定」を締結し、環境保全に関する技術支援を随時行っている。黒龍江省の省都である哈爾濱(ハルビン: Harbin)の市街地北部を流れる松花江(ショウカコウ: Songhua River)では、近年水質の悪化が深刻視されている¹⁾。特に2005年11月に流域で起きた化学工場の爆発事故では、大量の化学物質が流出したと報じられた。

この川は全長1,927km、流域面積約545,000km²、平均流量約2,530m³・s⁻¹という、河川交通にも利用される大河である²⁾。Fig. 1に示すとおり、北朝鮮国境の長白山(Changbai Shan: 白頭山とも呼ばれる)の天池(テンチ: Tianchi)を源とする第二松花江(Di'er Songhua River)³⁾と、黒龍江省北部の大興安嶺山脈(ダイコウアンレイ: Daxing'an ling)の伊勒呼里山(イルフリ: Ilehuli)を源とする嫩江(ドンコウ: Nenjiang River)が哈爾濱の西で合流して松花江となり、哈爾濱の北部、佳木斯(チャムス: Jiamusi)を流下する。その後ロシアとの国境を流れるアムール川に合流し間宮海峡で海に注ぐ。当センターでは、2002年度に、この流域において環境ホルモン物質による汚染実態調査を実施した。そ

の中で女性ホルモン活性を測定した結果、いくつかの地点において女性ホルモン活性が検出された。一般的に河川水

Fig.1 Drainage basin of Songhua River

* 北海道環境科学研究センター 〒060-0819 札幌市北区北19条西12丁目

** 中国黒龍江省環境観測センター ハルビン市太平区衛星路2号

*** 中国黒龍江省環境保護科学研究院 ハルビン市太平区南直路356号

Table 1 Outline of sample treatment

分析項目	固相抽出樹脂	サンプル量 (ml)
女性ホルモン活性	Empore C18FF	1000
女性ホルモン類 (E1, β E2)	Empore C18	1000
糞便性ステロール類	Empore SDB-XC	500

中における女性ホルモン活性は、人畜排泄物に起因する女性ホルモン類によるものと考えられている。このことから、女性ホルモン活性が認められた地点における女性ホルモン類と、糞便性ステロール類の濃度に関する調査を行ったので報告する。

2. 方 法

2. 1 調査方法

調査は、2002年9月にFig. 1に示すA, B, C, Dの4地点において、2003年1月にA, Cの2地点において採水を行った。試料は採水後できるだけ速やかにガラス繊維ろ紙 (Whatman社製GF/Cフィルター、保持粒径 $1.2\mu\text{m}$) にてろ過し、3M社製エムポアディスクを用いた固相抽出法により測定対象物質の抽出を行った。抽出の際には目詰まりを防ぐためフィルターエイドを使用した。ガラス繊維ろ紙、抽出に供したディスク及びフィルターエイドはガラスバイアルに移し、 4°C 以下に保ち当センターに持ち帰った。溶出は、女性ホルモン活性の測定にはジクロロメタンを、女性ホルモン及び糞便性ステロール類の分析にはアセトンを経るガラスバイアルに添加して超音波処理を行い、その後ガラス繊維ろ紙を用いてろ別し抽出溶液を得た。この抽出溶液を適宜濃縮、転溶し試料液とした。分析項目と使用した固相抽出ディスクの種類、サンプル量をTable 1に示す。

2. 2 女性ホルモン活性強度の測定

河川水中の女性ホルモン活性強度の測定には、大阪大学の西原らが開発したTwo-hybrid酵母⁴⁾を使用し、白石らが構築した簡便法⁵⁾により 17β エストラジオール (β E2) 等量濃度として評価した。試料としてジクロロメタンを用いて溶出した試料を窒素ガスを用いて乾固し、ジメチルスルホキシド溶液として測定に供した。試験方法及び β E2等量濃度の算出法は白石らの報告⁵⁾に基づいて行った。なお、測定に使用した酵母菌株は、西原教授より供与頂いたヒトエストロゲンレセプター α (hER- α) を導入した菌株を使用した。

2. 3 女性ホルモン類及び糞便性ステロール類の機器分析

GC/MS システムはThermoquest社製TRACE-GC2000/Finnigan社製POLARIS-Qに、キャピラリカラムとしてAgilent社製HP-5msを装着して用いた。エストロン (E1) 及び β E2の分析は、アセトン溶出溶液を乾固した後、内部標準物質 (β E2-d4) 溶液を添加しトリメチルシリル誘導体化 (TMS化) を行った後、GC/MS/MSモードによる分析を行った。クロマトグラムにおけるS/N比から、定量下限値を $1.0\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ とした。糞便性ステロール類の分析は、コプロスタノン、コプロスタノール、エビコプロスタノール、コレステロール、コレスタノール、スチグマステロール、スチグマスタノール、 β シトステロール、カンベステロール、フコステロールの10種類を対象とした。アセトン溶出溶液を乾固した後、内部標準物質 (コレステロールd-6) 溶液を添加しTMS化を行った後、GC/MSモードによる分析を行った。クロマトグラムにおけるS/N比から、定量下限値を $20\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ とした。分析条件をTable 2に示す。

Table 2 GC/MS(/MS) conditions for analyzing estrogens and fecal sterols

Analytical condition of estrogens	
Column Temp.	$150^{\circ}\text{C}(1\text{min})-20^{\circ}\text{C}/\text{min}-310^{\circ}\text{C}(4\text{min})$
Carrier Gas	He, 1ml constant flow
Sample Injection	$5\mu\text{l}$, PTV (large volume inlet)
Injector Temp.	$50^{\circ}\text{C}-\text{Evaporate } 100^{\circ}\text{C}(0.2\text{min})-\text{transfer } 300^{\circ}\text{C}(1\text{min})-\text{Cleaning } 300^{\circ}\text{C}(5\text{min})$
Ion source temp.	230°C
m/z of MS/MS	E1: precursor342-product257 β E2: precursor416-product285 β E2d4(I.S.): precursor420-product289
Analytical condition of sterols	
Column Temp.	$70^{\circ}\text{C}(1\text{min})-20^{\circ}\text{C}/\text{min}-250^{\circ}\text{C}(0\text{min})-3^{\circ}\text{C}/\text{min}-310^{\circ}\text{C}(10\text{min})$
Carrier Gas	He, 1ml constant flow
Sample Injection	$2\mu\text{l}$, PTV (splitless inlet)
Injector Temp.	$50^{\circ}\text{C}-\text{transfer } 300^{\circ}\text{C}(1\text{min})-\text{Cleaning } 300^{\circ}\text{C}(5\text{min})$
Ion source temp.	250°C
m/z of detection	Cprostanol: 215, 355, 370 Epicoprostanol: 215, 355, 370 Coprostanone: 316, 231, 386 Cholesterol: 368, 329, 353 Cholestanol: 215, 355, 445 Campesterol: 382, 255, 343 Stigmasterol: 255, 394, 484 Stigmastanol: 215, 383, 473 β Sitosterol: 396, 255, 357 Fucosterol: 296, 281, 386 Cholesterol-d6(I.S.): 374, 261, 359

Table 3 Results of estrogenic activity by yeast two-hybrid assay and the concentrations of natural estrogens by GC/MS/MS method)
(unit of estrogenic activity : ng(E2 equivalent) · l⁻¹)
(unit of estrogens: ng · l⁻¹)
NA : Not Analyzed

Points	Sep.2002		Jan.2003	
	Two-Hybrid	GC/MS/MS	Two-Hybrid	GC/MS/MS
A	0.14	E1 <1.0 β E2 <1.0	0.26	E1 <1.0 β E2 <1.0
B	weak	E1 <1.0 β E2 <1.0	NA	NA
C	negative	E1 <1.0 β E2 <1.0	0.26	E1 = 3.3 β E2 <1.0
D	negative	E1 <1.0 β E2 <1.0	NA	NA

3. 結果と考察

3.1 女性ホルモン活性強度と女性ホルモン濃度

各試料における女性ホルモン活性強度の測定結果と、E1及びβE2の定量結果をTable 3に示す。この結果から、この水系の表層水6サンプル中4サンプルから弱い女性ホルモン活性が認められた。またGC/MS法の結果から、2003年1月における試料CからE1が3.3ng · l⁻¹検出された。この試料からは、βE2等量濃度で0.26ng · l⁻¹の女性ホルモン活性が検出されている。E1の女性ホルモン活性強度は、同一の酵母菌株を用いたレセプターアッセイ法においてβE2の約8分の1と報告されている⁹⁾。このことから、これらの結果は

ほぼ一致していると考えられ、地点Cにおける女性ホルモン活性はE1による寄与が大部分を占めていると推察された。一方地点Aの試料からは女性ホルモン類は検出されなかった。しかし地点Aにおける女性ホルモン活性がβE2によるものであっても、GC/MS法の定量下限値以下と考えられることから、原因物質に関する示唆は得られなかった。なお、今回の結果は高橋らが中国瀋陽市を流下する渾河水系で行った調査結果⁹⁾(βE2等量濃度4.0~14ng · l⁻¹)と比較して低かった。

3.2 糞便性ステロール類の濃度パターン

TMS化GC/MS法により求められた糞便性ステロール類の濃度をFig. 2に示す。この結果、分析を行ったすべての試料からコプロスタノールが検出され、人畜排泄物由来の汚染の可能性が示唆された。しかし採取地点や季節による変動が大きく、Leemingらの文献⁷⁾における各種動物の排泄物におけるステロール類濃度のパターンとの比較においても汚染起源に関する明瞭な特徴は得られなかった。しかし地点Cにおいて1月に採取された試料は、他の試料と比較して明らかにβシトステロール濃度が高かった。βシトステロールは植物ステロールの一種であり⁸⁾、草食動物の排泄物に多く含まれていることが指摘されている⁹⁾。地点A、Bの試料はβシトステロール濃度が低く、第二松花江からの流入とは考えられないことから、地点Cの上流で合流している嫩江流域において酪農業あるいは畜産業が行われていると推察された。呉らの文献¹⁰⁾によると、齊齊哈爾及び大慶周辺は草質優良な牧畜基地とされており、矛盾しない結果が得られているものと推察された。

Fig.2 Concentrations of fecal sterols by GC/MS method (unit : ng · l⁻¹)

4. ま と め

環境ホルモン問題以降、微量でも生体に影響を及ぼすことが懸念される生理活性物質による環境問題が関心を集めている。本報告において我々が報告した女性ホルモン類だけでなく、環境中における医薬品類による生態系への影響も懸念されている。そうした生理活性物質は、その多くが人畜排泄物とともに水環境へ放出されていると考えられている^{11,12)}。このことから、人畜排泄物に起因する水質汚濁源の解明手法を確立することはきわめて重要である。糞便性ステロール類の化学分析法だけでなく、胆汁酸類の化学分析¹³⁾や、腸内細菌の遺伝子解析に基づいた生物学的手法¹⁴⁾を応用することにより起源生物や汚染起源の特定が可能になるものと考えられる。

謝 辞

国立保健医療科学院の眞壁朝宏氏ならびに浅見真理氏に貴重なご助言を賜りました。ここに記して謝意を表します。

(原稿受付 2006年5月30日)

(原稿受理 2006年12月13日)

参 考 文 献

- 1) 張傑ら (2005) 中国における健全な水循環と豊かな水環境システムへの歩み, 下水道協会誌, **42**, 41-50.
- 2) 日本大百科全書(電子ブック版) (1998) 小学館, 東京.
- 3) 白頭山資料集 (1993) 朝鮮民主主義人民共和国科学院・人文科学院.
- 4) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83.

- 5) 白石不二雄, 白石寛明, 西川淳一, 西原力, 森田昌敏 (2000) 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*, **10**, 57-64.
- 6) 高橋悟, 池田享司, 金一和, 白石不二雄 (2003) 酵母Two-Hybridアッセイ法による中国・瀋陽市と岩手県内河川の比較, 第12回環境化学討論会講演要旨集, pp. 494-495.
- 7) Leeming, R., Ball, A., Ashbolt, N and Nicholas, P. (1996) Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters, *Wat. Res.*, **30**, 2893-2900.
- 8) 林典夫, 廣野治子編 (1993) シンプル生化学 (改訂第二版), 南江堂.
- 9) Isobe, K. O., Tarao, M., Zakaria, M. P., Chiem, N. H., Minh, L. Y. and Takada, H. (2002) Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 4497-4507.
- 10) 呉傳鈞, 郭煥成編 (1994) 中国的土地利用, 科学出版社, 北京 (<http://www-cger.nies.go.jp/lugec/Translation/ch3-1-1-4.pdf>).
- 11) Tanaka, H., Sato, C., Komori, K., Yakou, Y., Tamamoto, H., Miyamoto, N. and Higashitani, T. (2003) Occurrence of endocrine disruptors in sewage and their behavior in sewage treatment plants in Japan, *Environ. Sci.*, **10**, 1-24.
- 12) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹 (2004) わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, *水環境学会誌*, **27**, 685-691.
- 13) Elhmmali, M. M., Roberts, D. J. and Evershed, R. P. (1997) Combined analysis of bile acids and sterols/stanols from riverine particulates to assess sewage discharges and other fecal sources, *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 39-46.
- 14) Bernhard, A. E. and Field, K. G. (2000) Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 1587-1594.