

LC/MS/MSによるエストロゲンの分析法と下水への応用

八十島誠¹・小森行也¹・田中宏明²

¹ 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6)

²正会員 工博 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1番地6)

E-mail:yasoji44@pwri.go.jp

下水中の天然エストロゲン (E2, E1) および合成エストロゲン (EE2) のLC/MS/MSを用いた分析法を開発した。本法では、1~80 μ g/lの範囲で直線性が認められ、下水を用いて行った添加回収試験の結果、回収率は、90%以上と良好であった。検出下限値はE2では0.12ng/l, E1では0.14ng/l, EE2では0.24ng/lであった。本法を実際の下水に応用したところ、下水処理場内ではE2は脱水素化されてE1に形態変化している可能性が示唆された。また、脱水素化は、エアレーションタンクで顕著であることが明らかとなった。

Key Words : 17 β -estradiol, estrone, ethynylestradiol, LC/MS/MS, wastewater

1. はじめに

今日、日常的に5万種を超える化学物質が使用されていると推測されている¹⁾が、極微量で生体などに影響を与える可能性が指摘されている化学物質について、近年、社会問題化している。日本国内では、環境庁(現環境省)が、「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」において、“動物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質”として、67の化学物質をリストアップしている²⁾。これらの物質は、外因性内分泌攪乱化学物質(以下、内分泌攪乱化学物質)と定義²⁾され、一般には、環境ホルモンとして広く認知されている。リストアップは、現時点までに生物影響等が調査・研究された化学物質について、その報告や研究事例を基に行われ

ている。

さまざまな化学物質の最終的な受け入れ先は環境であり、その際、水を介して物質が移動することが多い。内分泌攪乱化学物質においても同様に、水を介して環境に排出されている場合が多いと考えられる。これらの化学物質による水環境の汚染は、水環境での蓄積のほか、水域に棲息する生物に影響を及ぼす。さらには、生物濃縮を経て、人体に影響を及ぼすことも懸念される。これらの状況から、生活排水、工場排水等を受け入れ、処理後、環境へ排出している下水道の果たす役割は極めて重要である。

人の天然のエストロゲンは、現在20種以上が確認されているが、なかでもエストラジオール、エストロン(以下、E1)、エストリオールの3つが主要なエストロゲンである³⁾(図-1)。エストラジオールには、17 α -エストラジオールと17 β -エストラ

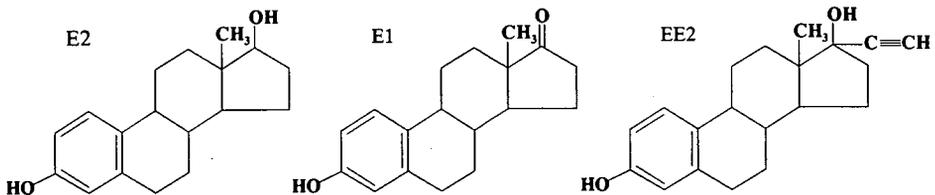


図-1 代表的なエストロゲン

ジオール（以下、E2）が存在するが、前者については、現時点では調査研究が進んでいない⁴⁾。天然のエストロゲンであるE2、E1および経口避妊薬（ピル）の主成分であるエチニルエストラジオール（以下、EE2）は内分泌攪乱化学物質として選定されていないものの、内分泌攪乱化学物質のエストロゲン様活性に比べその活性が高いことが報告されている^{7),6)}。従って、内分泌攪乱化学物質の下水処理場での実態調査あるいは環境への影響評価においてE2、E1、EE2の定量を加えることは重要である。これまでの調査^{7),8),9)}では、E2を対象とし、抗原抗体法（ELISA）を用いた測定が行われてきている。ELISAは、比較的簡易に測定できるものの、E2に加えて類似の物質も合わせて測定するなどの問題がある¹⁰⁾ため、エストロゲンを個別に定量できる新たな方法の開発が必要である。

これまでのエストロゲン濃度調査は、前述のとおりELISAを用いて行われており、E2、E1は、ng/lレベルで検出されている^{7),8),9)}（EE2は検出下限値未満）。したがって、エストロゲンの分析には、少なくともng/lレベルの検出が要求されるため、高感度、高選択性の機器が使用されることが多い。これまでは、ガスクロマトグラフ/質量分析（GC/MS）法^{11),12),13),14),15),16),17),18)}、ガスクロマトグラフに質量分析計をタンデム接続したGC/MS/MS法^{19),20),21),22)}、液体クロマトグラフに質量分析計をタンデム接続したLC/MS/MS法^{10),23),24),25),26)}などが報告されている。GC/MS、GC/MS/MS法では、試料水を固相抽出後クリーンアップし、誘導体化して測定を行っており、E2の検出下限値は、0.2~12.5ng/lである。GC/MSは、近年の微量化学物質問題解決のためのツールとして広く使用されてきたこともあり、汎用的で、かつ、高感度な測定が期待できる。しかし、エストロゲンのようにその構造に水酸基を有する化学物質を分析する場合には、一般に、前処理工程において誘導体化を要することから、熟練した腕と煩雑な処理を要する。一方、LC/MS/MS法では、試料水を固相抽出後クリーンアップして測定を行っており、E2の検出下限値は、0.25~0.5ng/lである。LC/MS/MSは、その報告例が少ないことから現時点では汎用機とは言い難いものの、測定対象となる化学物質数がGC/MSより多く、かつ、前処理が容易であるなどの特徴がある。前処理が容易であれば、前処理操作における目的物質の損失を抑えることも可能になる。また、LC/MS/MSでは、その測定対象の広範さから遊離のエストロゲンだけでなく、抱合体についても

分析できる可能性がある。LC/MS/MSを用いたこれまでの報告例^{23),24)}では、エストロゲンの抽出から分析までの操作の詳細については記載されておらず、従って、報告された方法を用いて分析を行うことが困難であるなどの問題がある。河川水および下水処理場放流水中のエストロゲンの分析法については、抽出から分析までを詳細に記載した報告²⁶⁾はあるものの、河川水や下水処理場放流水等に比べて格段に夾雑物質の多い流入下水への適用は行われていない。

本研究では、操作性と感度の観点からLC/MS/MSを用いて、下水を対象としたE2、E1、EE2の分析法を確立し、第三者が本報を用いて直ちに分析できるように、前処理や分析法の詳細に至るまで記載することを第一の目的とした。次にこの分析法を、実際の下水に応用することを第二の目的とした。

2. 分析方法

(1) 試薬等

本試験では、標準試薬として和光純薬製のE2（97~103%）、E1（minimum98%）、EE2（minimum98%）をメタノールに溶解して使用した（以下、STD）。サロゲート物質としては、CDN ISOTOPE（カナダ）製の17 β -エストラジオール-16,16,17-*d*3（98atm%*d*）（以下、E2-*d*3）、エストロン-2,4-*d*2（99atm%*d*以上）（以下、E1-*d*2）、エチニルエストラジオール-2,4,16,16-*d*4（98atm%以上）（以下、EE2-*d*4）をメタノールに溶解して使用した。その他の試薬類は、すべて和光純薬製または、関東化学製の試薬特級以上のものを用いた。100mg/l、1mg/lのSTDは、冷蔵（約5℃）保存により少なくとも1年間は安定であった。

固相抽出にはWaters製C18カートリッジ（充填剤量：360mg）、クリーンアップには、Waters製Sep-Pak フロリジルカートリッジ（充填剤量：910mg）、Waters製Sep-Pak NH₂カートリッジ（充填剤量：360mg）を用いた。ガラス繊維濾紙は、Whatman GF/B（粒子保持能1 μ m）をアセトン洗浄後使用した。使用したすべてのガラス器具類は、洗剤および水道水による洗浄後、純水、アセトンの順に洗浄して使用した。

(2) 前処理

試料1,000mlをGF/Bろ紙でろ過した。ろ紙に残った浮遊物質（SS）は、メタノール10mlを加えた後、超音波により2回抽出し、抽出液をろ液に合わ

せた。なお、試料のSS濃度が高く、ろ過の際に複数枚のろ紙を要した場合は、ろ紙が浸る量のメタノールを加えた後、超音波抽出した。SS抽出液は、ロータリーエバポレータにより50ml（試料量の5%）以下に濃縮し、ろ液に合わせた。ろ液にサロゲート物質（E2-d3, E1-d2, EE2-d4）を20 μ l添加した後、通水直前にメタノールと精製水でコンディショニングしたC18カートリッジに試料を10ml/minの流速で通水し、E2, E1, EE2を保持させた。通水後、C18カートリッジは、遠心分離と窒素ガスパージにより脱水した。次に、酢酸エチル：メタノール=5：1を6ml通し、E2, E1, EE2を溶出させた。溶出液は、窒素気流により濃縮乾固した。次に、ヘキサン：ジクロロメタン=1：1を1ml添加し、超音波を用いて乾固物を溶解させた。この溶解液をフロリジルカートリッジに通しクリーンアップした。溶解液の入っていた容器は、1mlのヘキサン：ジクロロメタン=1：1で洗いフロリジルカートリッジに通した。次にフロリジルカートリッジヘキサン：ジクロロメタン=1：1を10ml通し不純物を洗い流した。フロリジルカートリッジに吸着したE2, E1, EE2は、アセトン：ジクロロメタン=1：9を6ml添加して溶出させた。溶出液を窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール1mlに再溶解した。これをNH₂カートリッジに通しカチオン系の不純物を吸着除去した。再溶解液を通したNH₂カートリッジにメタノールを5ml通した。NH₂カートリッジを通過したメタノールを窒素気流により濃縮乾固した後、メタノール1mlを加え再溶解した。このメタノール溶液を遠心分離した後の上澄液をLC/MS/MS測定試料とした。本試験における前処理フローは、図-2に示すとおりである。

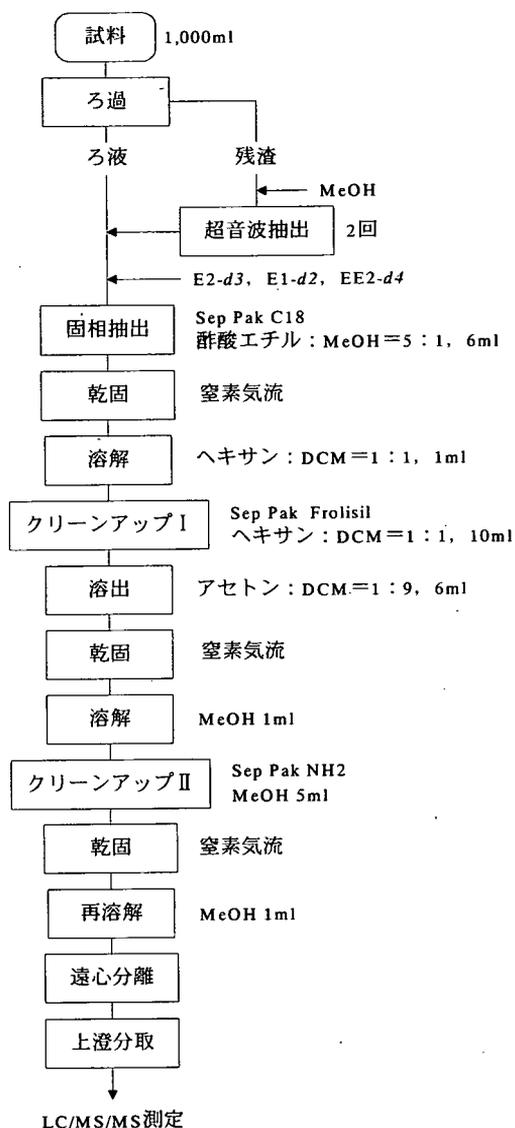


図-2 前処理方法

(3) 測定条件

エストロゲンの同定、定量は、LC/MS/MSを用いて行った。高速液体クロマトグラフは、Agilent 1100型、質量分析計は、Thermo Quest製TSQを用いた。カラムは、逆相カラムであるAgilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1mm ϕ × 150mm) にガードカラムを付けて使用した。移動相は、アセトニトリル：水=6：4とした。カラム温度は40 $^{\circ}$ C、流速は0.15ml/min、注入量は10 μ lとした。イオン化はネガティブ-ESIで行い、コリジョンエネルギーは、E2,E1,EE2ともに45eVとし、コリジョンガスにはアルゴンを用いた。

3. 結果および考察

(1) 分析方法検討結果

a) LC/MS/MSによる分析

測定時のモニターイオンを決定するために、E1, E2, EE2のSTDについて、スキャン測定を行った。その結果、1段目の取り込み (Parent) イオンを [M-H]⁻とし、2段目の取り込み (Product) イオンを $m/z = 145$ とした時に強いピークが認められた。各物質の保持時間は、RT (min) = 4.0, 4.8, 4.3,

3.9, 4.8, 4.3 (E2, E1, EE2, E2-d3, E1-d2, EE2-d4)であった。また、定量時には、サロゲート物質の回収率による定量結果の補正を行った。エストロゲンのSTDを測定した際のクロマトグラムは、図-3に示すとおりである。なお、E2測定時にE2のピークの後ろにピークが認められるが、これは17 α -エストラジオールによるものであることを17 α -エストラジオールの標準測定により確認した。

b) 検量線

E2, E1, EE2のSTDを0, 1, 5, 20, 80 $\mu\text{g/l}$ (メタノール溶液)の5段階の濃度に調製し、測定前に一定量(20 $\mu\text{g/l}$)のサロゲート物質(E2-d3, E1-d2, EE2-d4)を添加して測定した。STD面積値(I), サロゲート物質面積値(Is)の比(I/Is)とSTD濃度($\mu\text{g/l}$)の関係から作成した検量線は、図-4に示すとおりである。1 $\mu\text{g/l}$ ~80 $\mu\text{g/l}$ の範囲で一次回帰した直線の相関係数(r^2)は0.99以上であり、良好な直線性が認められた。なお、試料の分析時には毎回、0, 1, 5, 20, 80 $\mu\text{g/l}$ のSTDとサロゲート物質の混合物を測定し、これらの面積比(I/Is)とSTD濃度の関係から一次回帰した検量線を作成し、検量線の範囲で試料の定量を行った。

c) 検出下限値と定量下限値

装置の検出下限および定量下限は、2.0 $\mu\text{g/l}$ の濃度の標準液希釈溶液を5回繰り返し測定した結果により決定した。すなわち、繰り返し測定結果の標準偏差(S)の3倍(3S)を検出下限値、10倍(10S)を定量下限値と定義²⁷⁾した。測定および演算の結果、装置の検出下限値は、E2では0.12 $\mu\text{g/l}$, E1では0.14 $\mu\text{g/l}$, EE2では0.24 $\mu\text{g/l}$ であった。同様に定量下限値は、E2では0.39 $\mu\text{g/l}$, E1では0.47 $\mu\text{g/l}$, EE2では0.80 $\mu\text{g/l}$ であった。また、この時の測定値の変動係数(coefficient of variation: CV), つまり標準偏差/平均値は、E2では2.0%, E1では2.1%, EE2では3.1%であった。本法では、試料を1,000倍濃縮することから、試料における下限値は、それぞれの1,000分の1となる。本研究における下限値は、これまでの報告例^{10),12)~26)}(E2の検出下限として0.05~12.5ng/l)と比較しても低いレベルにあり、高感度測定が可能と判断された。繰り返し測定結果および検出・定量下限値は、表-1に示すとおりである。

d) 添加回収試験

一般に、分析法の妥当性を評価するためには、測定しようとする試料を用いて添加回収試験を行うことが必要である。本試験では、流入下水を対象に、試料にSTDを添加した標準添加試料(Sa)と試料(S)の測定値の差(Sa-S)と添加濃度の関

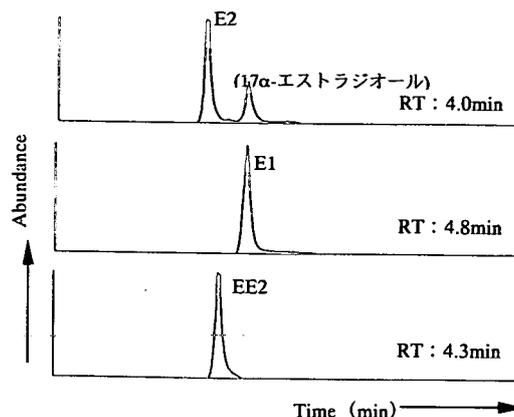


図-3 STD測定結果

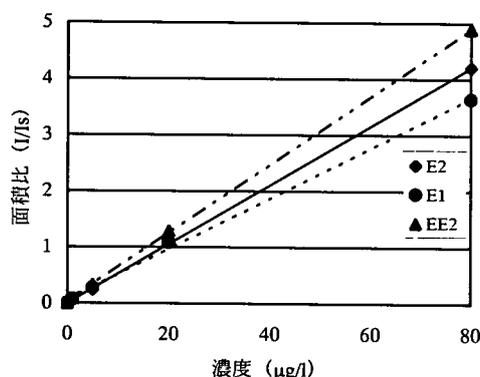


図-4 検量線

表-1 装置の検出下限値

測定物質	濃度	平均値(n=5)		S	3S	CV
		($\mu\text{g/l}$)				
E2	2.0	2.0	0.04	0.12	2.0	
E1	2.0	2.5	0.05	0.14	2.1	
EE2	2.0	2.6	0.08	0.24	3.1	

係から回収率を求め、方法の妥当性を評価した。

流入下水を用いた添加回収試験の平均回収率(n=5)は、E2では105%, E1では90%, EE2では98%であり、本分析操作においては、添加した試料のほとんどが回収され、大幅な損失は認められなかった。なお、本試験でのSTDの添加濃度は、20ng/lであり、回収率の算出にあたっては、サロゲート補正を行った。また20ng/lのSTDを添加した流入下水の測定値の平均(n=5)は、E2では34ng/l, E1では44ng/l, EE2では20ng/lで、その時の回収率の標準偏差は、E2では1.9%, E1では3.7%, EE2では5.3%と

良好であった。E2の回収率が100%を上回った原因は、測定した試料そのもののばらつきなどによるものと考えられる。添加回収試験結果は、表-2に示すとおりである。流入下水を測定した際のクロマトグラムは、図-5に示すとおりである。添加回収試験において測定した流入下水クロマトグラムのピーク形状は、明瞭なシングルピークであることから本法では、下水試料中のE2、E1、EE2を良好に分離できると判断された。

e) ブランク試験

正確な定量を行うために、前処理操作におけるコンタミネーションがないことを確認する必要がある。本試験では、MILLIPORE製純水装置で得られた純水（Milli-Q水）を用いて試料濃縮操作を含む全ての分析操作を行い、ブランク値の確認を行った。

その結果、ブランク値の平均（n=5）は、E2、EE2では検出下限値未満（N.D.）、E1では0.18ng/lであった。本試験で検出されたE1のブランク値は、別々に用意し前処理した5検体の全てから検出され、また、別の日に再度前処理から分析を行っても検出された。E2、EE2は、どちらの試験においてもN.D.であった。E1のみにブランク値が検出される理由は不明であるが、もともと純水に含まれていたとは考えにくく、測定時にサロゲートとして添加したE1-d2中に重水素化が十分でないものが含まれており、その一部がE1として検出された結果と推測される。

f) 試料の安定性

実際の調査においては、様々な理由により採水した試料を直ちに前処理できないケースもある。したがって、採水した試料中の目的物質の安定性は、正確な分析を行う上で重要な情報である。下水中のエストロゲンは、4℃で保存した場合、E1は濃度変化は少ないものの、E2は48時間後には初期濃度の90%程度まで減少したとの報告²⁸⁾もある。

本試験では、下水試料を採取後冷蔵保存した場合（CASE-1）と採取後アスコルビン酸を添加した後に冷蔵保存した場合（CASE-2）について、試料の安定性を評価した。試験はE2、E1濃度が比較的高濃度である流入下水を用いて行った。CASE-1では、試料をガラス瓶に入れ冷蔵（約5℃）保存した。CASE-2では、試料をガラス瓶に入れた後アスコルビン酸を添加（1g/l）し、CASE-1と同様の状態で保存した。保存期間は、7日間とし、採水直後および7日後の濃度の比較により安定性を評価した。アスコルビン酸を添加しなかった系では、E2濃度は減少、E1濃度は増加し、添加した系では、E2、E1

表-2 添加回収試験結果

測定物質	回収率					平均
	1	2	3	4	5	
E2	105	107	105	106	102	105
E1	90	89	91	86	96	90
EE2	92	99	97	106	95	98

単位：%

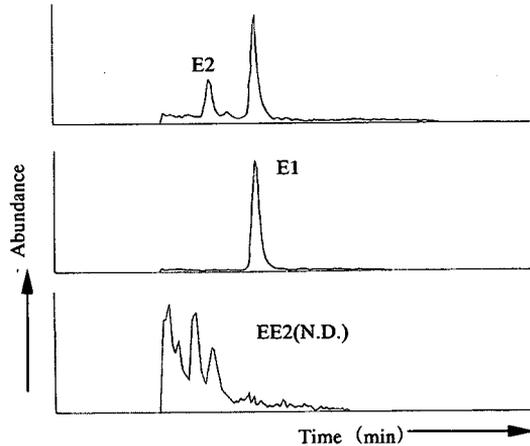


図-5 流入下水測定結果

表-3 試料の安定性試験結果

採取直後	7日後の濃度				濃度変化	
	CASE-1		CASE-2		CASE-1	CASE-2
	濃度	濃度	濃度	濃度	変化	変化
E2	47	35	47	-12	0	
E1	1.4	6.8	1.5	5.4	0.1	
EE2	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	

単位：ng/l

備考1) EE2は採取直後、7日後ともにN.D.であったため濃度変化についての評価は行わなかった

備考2) CASE-1: 冷蔵保存

CASE-2: アスコルビン酸添加後冷蔵保存

ともに濃度変化は認められなかった。したがって、アスコルビン酸の添加によりエストロゲンは、少なくとも7日間は安定であることが確認された。アスコルビン酸無添加の系では、E2は、7日の試験の間に脱水素化されるなどして別の物質に形態を変えた（例えばE1）ため濃度が減少したものと考えられる。また、E1は、E1自身が形態を変える量より、E1以外の物質が形態変化によりE1を生成する量が多いため、濃度が増加したものと考えられる。なお、EE2については採取直後の濃度、7日後の濃度はともにN.D.であった。試料の安定性試験結果は、表-3に示すとおりである。

(2) 下水への応用

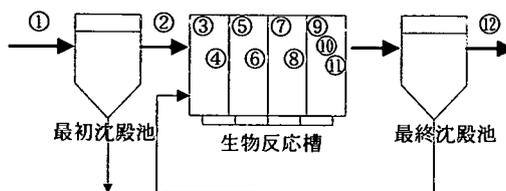
下水処理場からの放流水は、水環境中で検出されるエストロゲンの原因の一端として挙げられる。その意味から、下水処理場に流入する下水としてどの程度のエストロゲンの負荷があるのか、また、下水処理を受けることでエストロゲンはどのように変化しているかを把握することは重要である。そこで、これまでの検討を踏まえ、本法を用いて下水処理過程でのエストロゲン分析を行った。

調査は、A処理場で行った。A処理場の概要は、表-4に示すとおりである。A処理場では、循環式硝化脱窒法に併せて嫌気・無酸素・好気法（A₂O法）、標準活性汚泥法による処理を行っている。本研究では、国内の下水処理場の代表的な処理方式の一つである標準活性汚泥法による運転を行っている水処理系列を対象に、特にエアレーションタンク内での変化に着目して調査を実施した。調査は、平成14年4月に行った。調査箇所は、初沈流入水、初沈流出水、エアレーションタンク（9箇所：AT1～AT9）、二次処理水の12箇所である（図-6）。エアレーションタンクでは、採水後静置しMLSSを除いた上澄み液を採取した。採水した試料は、洗浄したガラス瓶に入れて持ち帰り、直ちに前処理を開始した。なお、エアレーションタンクおよび二次処理水では、エストロゲン濃度が低いことが予想されたため、採水量を2,000mlとしこれを2,000倍濃縮して測定した。調査箇所でのエストロゲン濃度の測定結果は、表-5、図-7に示すとおりである。

流入後、最初沈殿池流出までは、E2、E1濃度に変化はないが、エアレーションタンクにおいてE2は次第に検出されなくなった。E1は流入濃度に対していったん2倍程度増加したもののエアレーションタンク2槽目（AT3、AT4）では流入時の濃度より低くなった。最終沈殿池を経た二次処理水では、エアレーションタンク4槽目（AT8、AT9）に比べてE2、E1ともに濃度が増加した。エアレーションタンク1槽目（AT1、AT2）では、E1の濃度が初沈流出水に比べて2倍程度増加した。エアレーションタンクでは、曝気により好気条件が維持されており、加水分解や脱水素化が促進されると考えられる。このため、抱合体の加水分解やE2の脱水素化によるE1の生成等により一時的にE1の濃度が増加したものと考えられる。また、その後の連続的な空気曝気により、E2、E1ともにさらに分解を受け、濃度が減少したと考えられる。二次処理水においてエアレーションタンクよりエストロゲン濃度が増加したことから、十分な好気条件下でエストロゲンが分解

表-4 調査対象下水処理場の概要

処理区面積 (ha)	8,413
処理人口 (人)	276,230
処理水量 (m ³ /day)	81,000
排除方式	分流式 (一部合流式)
水処理方式	循環式硝化脱窒法
出典：平成12年度版 下水道統計 行政編	



- ①：初沈流入水 ③～⑪：エアレーションタンク
②：初沈流出水 ⑫：二次処理水

図-6 調査箇所

表-5 下水処理過程におけるエストロゲン濃度
単位：ng/l

	E2	E1	EE2
初沈流入水	8.5	26.6	N.D.
初沈流出水	8.0	28.2	N.D.
AT1	5.1	48.5	N.D.
AT2	4.0	39.2	N.D.
AT3	3.1	18.5	N.D.
AT4	3.0	17.8	N.D.
AT5	N.D.	8.6	N.D.
AT6	N.D.	12.2	N.D.
AT7	N.D.	9.9	N.D.
AT8	N.D.	9.2	N.D.
AT9	N.D.	3.9	N.D.
二次処理水	N.D.	8.9	N.D.

される可能性が示唆された。

体内で生合成されたエストロゲンは、肝臓でE1、Estrinol（E3）、16 α -Hydroxyestroneなどに代謝される。これらの代謝物は、硫酸やグルクロン酸と抱合され抱合体として主に尿中から排泄される^{3),29)}。いずれも明確に分析法は示されていないものの、月経周期中の女性の尿中のE2濃度は2～7 μ g/day、E1濃度は4～14 μ g/dayと報告されている^{30),31)}。妊娠中のエストロゲン排泄量は月経周期中に比べて100倍と報告されている³²⁾。一方、男性の尿からもE2では

0.7 $\mu\text{g/day}$, E1では1.0 $\mu\text{g/day}$ の排泄が報告されている³⁰⁾。また、尿中では男女問わずE2は、全体の1%程度で、4種(17 β -Estradiol 3-sulfate, β -Estradiol 3,17-disulfate, 17 β -Estradiol 3-(β -D-glucuronide), β -Estradiol 17-(β -D-glucuronide))の抱合体が全体の90%以上を占めたと報告されている^{31,4)}。

本研究ではE2, E1, EE2の分析法を確立したが、現時点では、排泄物のほとんどを占める抱合体の分析法についての報告は極めて少なく、これらを含めた定量的な議論ができない状況にある。活性汚泥を用いたバッチ試験では、エストロゲンのグルクロン酸抱合体のほとんどが20時間でグルクロニドとE2に分裂したとの報告²²⁾もあり、このことから抱合体挙動把握⁴⁾の必要性が示唆される。今後は、エストロゲン全体の挙動を把握するために、遊離のエストロゲンに加えて抱合体の挙動把握も視野に入れる必要があり、抱合体分析法の早期確立が望まれる。

4. まとめ

本研究では、まず、下水試料を対象にLC/MS/MSを用いたエストロゲン(E2, E1, EE2)の分析法を確立した。本方法では、GC/MS法に比べ前処理操作を簡略化することができた。1,000倍濃縮時の試料における定量下限値は、E2では0.39ng/l, E1では0.47ng/l, EE2では0.80ng/lであり、既報に比べて高感度であった。また、流入下水を用いた添加回収試験における回収率は、E2では105%, E1では90%, EE2では98%で、CV値はE2では0.9%, E1では1.5%, EE2では5.2%と良好であり、本法は下水に適用可能と判断された。

下水処理過程でのエストロゲン濃度調査を実施したところ、初沈流入水で検出されたE2は、エアレーションタンクで急激に濃度が減少した。E1については、エアレーションタンクの第1槽で初沈流入水で検出された濃度を上回ったが、最終的には3分の1程度の濃度となった。この結果から、エアレーションタンクでは、抱合体の加水分解やE2の脱水素化によるE1の生成等により一時的にE1の濃度が増加したものと考えられた。また、その後の連続的な曝気により、E2, E1ともにさらに分解を受け、濃度が減少したと考えられた。

本研究では、EE2はN.D.であったものの、平成11年6月に低用量経口避妊薬(ピル)の承認が「可」とされた³³⁾ことを受けて、今後、その濃度が検出されるレベルとなる可能性がある。さらにバッチ試験

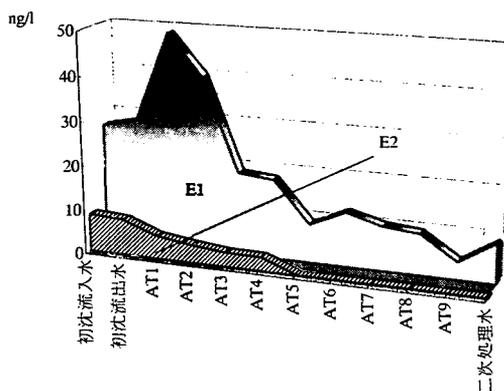


図-7 下水処理過程におけるエストロゲン濃度測定結果

では、EE2は、好気条件の活性汚泥中にほぼ安定して存在することが報告²²⁾されており、E2やE1と同様に注目すべき物質であると考えられる。

体内で生合成されたエストロゲンは、抱合体として主に尿中から排泄される^{31,28)}が、尿中では男女を問わずE2は、全体の約1%程度に過ぎず、そのほとんどは抱合体が占めたと報告されている^{31,4)}。また、活性汚泥を用いたバッチ試験では、グルクロン酸抱合体のほとんどが20時間でグルクロニドとE2に分裂したとの報告²²⁾もあり、抱合体の挙動把握⁴⁾の必要性が示唆される。今後は、エストロゲン全体の挙動を把握するために、抱合体分析法の早期確立が望まれる。

参考文献

- 1) 松井三郎, 足立淳, 松田知成: 家庭排水中の内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン), 用水と廃水, Vol.44, No.1, pp.34-38, 2002.
- 2) 環境庁: 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-環境ホルモン戦略計画SPEED'98-, 1998.
- 3) 五十嵐正雄: 内分泌婦人科学-生殖内分泌の基礎と臨床-, 南山堂, p.17, 1978.
- 4) 松井三郎, 足立淳, 松田知成, 滝上英孝, 清水芳久: 天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動, 季刊化学総説-内分泌かく乱物質研究の最前線-, pp.86-92, 日本化学会, 2001.
- 5) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み替え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol.36, pp.199-208, 1999.
- 6) 宮本宣博, 高橋明宏, 玉本博之, 田中宏明: 河川水中の環境エストロゲンの評価, 土木技術資料, Vol.43,

- No.9, pp.34-39, 2001.
- 7) 国土交通省河川局：平成12年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果，2001.
- 8) 国土交通省都市・地域整備局：平成12年度下水道における内分泌攪乱物質（環境ホルモン）に関する調査の結果，2001.
- 9) 環境庁水質保全局：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の実態調査，1999.
- 10) 小森行也，高橋明宏，矢古字靖子，田中宏明：LC/MS/MSによる下水試料中のエストロゲンの測定，第9回世界湖沼会議発表文集，pp.225-228，2001.
- 11) 環境省環境管理局：平成12年度水環境中の内分泌化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果，2001.
- 12) 中田典秀，中嶋亜梨紗，高田秀重：東京湾堆積物中の女性ホルモン，環境ホルモン，女性ホルモン活性の平面および鉛直分布，第10回環境化学討論会要旨集，pp.132-133，2001.
- 13) 丸尾直子，白石寛明，今須淳子，高木博夫，森田正敏：環境水中エストロゲン測定用全自動EIA法の構築とその評価，第10回環境化学討論会要旨集，pp.322-323，2001.
- 14) 中村貞夫，滝埜昌彦，代島茂樹：ガスクロマトグラフィー／負イオン化質量分析法によるクロロフェノール類，ビスフェノールA，及び17 β -エストラジオールの定量，分析化学，Vol.49，No.3，pp.181-187，2000.
- 15) 鳥買真，石井義昭，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.
- 16) 鷹野洋，小倉肇：河川水中の環境ホルモン及び女性ホルモンの同時分析について，第8回環境化学討論会要旨集，pp.350-351，1999.
- 17) 上田祥久，小野寺潤，森田徹一郎，樋口哲夫：エストラジオール類縁化合物のGC/MSによる分析，第9回環境化学討論会要旨集，pp.352-353，2000.
- 18) Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter J.P. and Waldock, M. : Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening, *Environmental Science & Technology*, 32, pp.1549-1557, 1998.
- 19) Huang, C.H. and Sedlak, D.L. : Analysis of Estrogenic Hormones in Municipal Wastewater Effluent and Surface Water Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.20, No.1, pp.133-139, 2001.
- 20) Belfroid, A.C., Horst, A.V., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijis, G.B.J., Wegener, J. and Cofino, W.P. : glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, *The Science of the Total Environment*, 225, pp.101-108, 1999.
- 21) Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D. and Servos, M. : Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, *The Science of the Total Environment*, 225, pp.81-90, 1999.
- 22) Ternes, T.A., Kreckel, P. and Mueller J. : Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *The Science of the Total Environment*, 225, pp.91-99, 1999.
- 23) Jhonson, A.C., Belfroid, A.C. and Corcia, A.D. : Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent, *The science of Total Environment*, 256, pp.163-173, 2000.
- 24) 恩田建介，中村由美子，宮晶子，葛甬生：生物処理工程における女性ホルモン様物質の挙動，第38回下水道研究発表会講演集，pp.160-162，2001.
- 25) 小森行也，八十島誠，田中宏明：LC/MS/MSによるエストロゲンの分析，第36回日本水環境学会年会講演集，p.431，2002.
- 26) 石井善昭，沖田智，鳥貝真，尹純子：液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法による環境水中のエストロゲンの定量，BUNSEKI KAGAKU，Vol.49，No.10，pp.753-758，2000.
- 27) 尾関徹：検出限界と定量限界，ぶんせき，pp.56-61，2001.
- 28) 中村由美子，恩田建介，高東智佳子，宮晶子：下水中のエストロゲンの分析，第36回日本水環境学会年会講演集，p.165，2002.
- 29) 岩井正二，林基之，松本清一：臨床産婦人科全書，金原出版，pp.4-5，1972.
- 30) 坂元正一，倉智敬一，品川信良，竹内正七，東條伸平，前田一雄，武田佳彦：図解臨床産婦人科講座第2巻ホルモンの使い方，メジカルビュー社，pp.42-43，1977.
- 31) 五十嵐正雄：内分泌婦人科学－生殖内分泌の基礎と臨床－，南山堂，p.105，1978.
- 32) 秋谷清，鈴木秋悦，広井正彦，森憲正：エッセンシャル産婦人科学，医歯薬出版，pp.307-308，1988.
- 33) 厚生省医薬安全局：低用量経口避妊薬（ピル）の承認を「可」とする中央薬事審議会答申について，1999.

(2002. 6. 20受付)

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR ESTROGENS IN WASTEWATER USING LC/MS/MS

Makoto YASOJIMA, Koya KOMORI and Hiroaki TANAKA

Estrogens are deemed to be important substances that may give estrogenic effects on fish in the water environment due to their occurrence in river water and wastewater. Therefore, we developed a novel analysis method for natural estrogens (E2,E1) and synthetic estrogen (EE2) in wastewater by LC/MS/MS. Detection limit and recovery ratio of the estrogens in this method ranged 0.12-0.24ng/l and 90-105% respectively.

We measured estrogens concentration in the sewage treatment process by using this method. The results suggest that E2 is dehydrated in sewage treatment process, and is changed into E1. Such a dehydration was remarkably observed in the aeration tank .