

[研究報告]

鴨川及びその流入水路の水における内分泌かく乱化学物質の濃度とそのエストロゲンリセプター結合能

茂木守 細野繁雄 野尻喜好

要 旨

過去の調査で比較的高い濃度の内分泌かく乱化学物質(EDCs)が検出されている鴨川の水の内分泌かく乱性を評価するため、本川4地点及びその流入水路11地点の水について18種類のEDCs(アルキルフェノール類、フタル酸エステルなど)と17-エストラジオールを測定し、さらに河川水、流入水路水と検出されたEDCsについてヒトエストロゲンリセプター(ER α)及び(ER β)に対する結合能をELISA法により調べた。

測定したEDCsのうち、いずれかの河川水または流入水路水で検出された物質は、4-ノニルフェノール(NP)、4-t-オクチルフェノール(4-t-OP)、ビスフェノールA(BPA)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)、ベンゾフェノン(BP)であった。また17-エストラジオールは15地点中4地点の水で検出されたが、いずれも検出下限値(0.001 μ g/L)であった。河川水等のER α 結合能は、ジエチルstilbestロール(DES)換算値で<0.42~2.1nM、ER β 結合能は<0.68~4.1nMの範囲であった。

検出されたEDCsでは、NP、4-t-OP、BPAにDESの1/70~1/40のER α 結合能があり、1/20~1/13のER β 結合能があることがわかった。DEHP、DBP、DEHA、BPには、ほとんど結合能がなかった。河川水、流入水路水について、検出されたEDCsの濃度をER結合能にDES換算した総和は、試料水のER α 、ER β 結合能DES換算値の2~22%(ER α)、4~29%(ER β)であった。

キーワード: 河川水、流入水路水、内分泌かく乱化学物質、エストロゲンリセプター、ELISA法

1 はじめに

内分泌かく乱化学物質は、動物体内の正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質で、環境省では内分泌かく乱作用を有すると疑われる約70の物質(以下、「EDCs」という)をリストアップしている¹⁾。

埼玉県では、平成10年度から県内の河川についてEDCsの調査を行っており、その結果いくつかの都市河川において比較的高い濃度のEDCsが検出されている²⁾。しかし、これらのEDCsについて基準値はなく、河川水の内分泌かく乱作用をその濃度だけでは評価できない状況にある。

EDCsの中には、エストロゲン様作用を持つものが多く知られており、ニジマスやローチ(コイの一種)の雌性化、雌雄同体化などにノニルフェノールや人畜由来の女性ホルモンが関与している可能性が示唆されている。これらの作用は、細胞核内に存在するエストロゲンリセプター(ER)を介して起

こる現象と考えられている。

EDCsのエストロゲン活性やエストロゲンリセプター結合能を測定する方法は、蛍光偏光法³⁾、ELISA法⁴⁾、組み換え酵母を用いたTwo-Hybridレポーター遺伝子アッセイ⁵⁾などがあるが、比較的操作が簡単なものはELISA法である。

そこで、EDCsが県内の他の河川よりも比較的高い濃度で検出された鴨川及びそこに流入する排水路の水について、検出頻度の高いEDCsの濃度を測定した。また、それらの水と検出されたEDCsについて、2種類のヒトエストロゲンリセプター α と β の結合能であるER α 結合能及びER β 結合能をELISA法により測定し、試料の内分泌かく乱性とEDCsの寄与について評価を試みた。

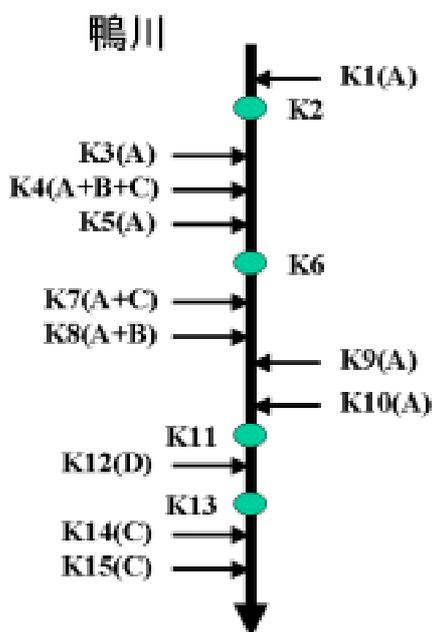
2 方法

2.1 河川現況調査

埼玉県南部を流れる鴨川は、上尾市に起点を発生し、さいたま市で荒川に合流する全長19.2kmの1級河川である。下流の中土手橋における平成11年度の生物化学的酸素要求量(BOD)の平均値は13mg/Lで、生活排水等の流入により汚濁の進んだ都市河川といえる。

2.1.1 調査地点

調査地点は、鴨川本川4地点(K2:内野橋、K6:学校橋、K11:徒歩橋、K13:中土手橋)、流入水路11地点(K1:鴨川中雨水3号幹線排水路、K3:五味貝戸都市下水路、K4:準用河川新川、K5:鴨川下雨水3号幹線排水路、K7:島根排水路、K8:江川排水路、K9:白神川、K10:作田放水路、K12:千貫樋排水路、K14:中土手橋下流右岸約20mの工場の排水路、K15:中土手橋下流右岸約100mの工場の排水路)を選定した(図1)。試料は平成12年10月17日の順流時に採取した。



カッコ内の記号は流入水の種類を示す。

A:生活排水 B:農業排水 C:工場排水 D:釣り堀の排水

図1 採取地点模式図

2.1.2 測定項目

これまでの県内河川の調査で検出されたEDCsを中心に、4-ニルフェノール(NP)、4-t-オクチルフェノール(4-t-OP)、4-n-オクチルフェノール(4-n-OP)、4-t-ブチルフェノール(4-t-BP)、4-n-ペンチルフェノール(4-n-PP)、4-n-ヘキシルフェノール(4-n-HxP)、4-n-ヘプチルフェノール(4-n-HpP)、ビスフェノールA(BPA)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)、フタル酸ブチルベンジル(BBP)、フタル酸ジ-n-ブチル(DBP)、フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)、フタル酸ジエチル(DEP)、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHA)、ベンゾフェノン(BP)、フタル酸ジペンチル(DPeP)、フタル酸ジヘキシル(DHP)、フタル酸ジプロピル

(DPrP)の18種類を選定した。

また、女性ホルモンである17 β -エストラジオール(17 β -E₂)と化学的酸素要求量(COD)を測定した。

さらに、河川水、流入水路水のエストロゲンリセプター(ER)及びエストロゲンリセプター(ER)結合能をELISA法により調べた。

2.1.3 測定方法

EDCs及び17 β -E₂の測定(GC/MS法)は、「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)」⁶⁾に準拠した。CODは、日本工業規格K0102の17(COD_{Mn})に基づき測定した。

ER結合能の測定は、試料水約1Lを1M塩酸でpH3に調整し、塩化ナトリウム50gを添加後、ジクロロメタン100mL×2回で抽出した。抽出液は無水硫酸ナトリウムに通じて脱水し、ロータリーエバポレーターで約5mLに減圧濃縮後、N₂気流下、35℃で約500 μ Lに濃縮した。その後、ジメチルスルホキシド(DMSO)とヘキサンを各1mL加え、攪拌後、N₂気流下、35℃で1mLに濃縮した。DMSO転溶した試料は、東洋紡(株)製のELISAキットLigand Screening System Estrogen Receptor()でヒトエストロゲンリセプター(ER)結合能を測定した(図2)。

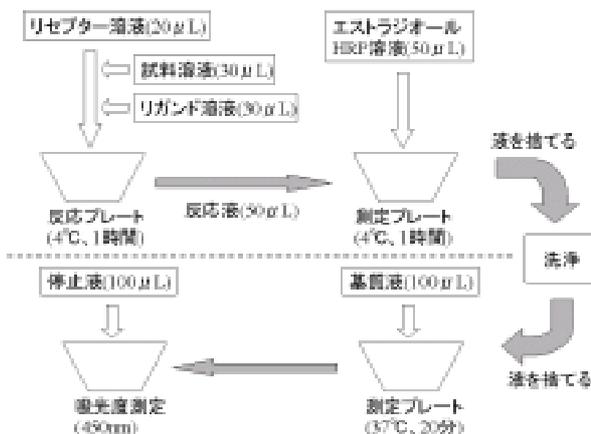


図2 ELISA法によるER結合能分析の手順

ブランク試験には1LのミリQ水(ミリポア)を用いた(OB)。

試料は、キットの緩衝液で10、30、100倍に希釈してから測定した。得られた吸光度から結合阻害度(=試料の吸光度÷DES(300nM)の吸光度)を求め、その阻害曲線から50%結合阻害度(IC₅₀)を読みとり、試料のER結合能ジエチルシチルベストロール(DES)換算値(=DESのIC₅₀(nM)÷試料濃縮率)を計算した。

2.2 内分泌かく乱化学物質標準品のER結合能

2.2.1 測定項目

河川現況調査で検出された7種類のEDCs(NP、4-t-OP、BPA、DEHP、DBP、DEHA、BP)について、その標品(全て関東化学(株)製、環境分析用)のER結合能及びER結合能を測定した。

2.2.2 測定方法

ER結合能の測定は、各標品をDMSOに溶解して試料液とし、これをDMSOで5段階に希釈したものをELISAキットで測定した。

各化学物質のIC₅₀は、結合阻害度の反応曲線から濃度を求め、さらに相対結合親和性(RBA=DESのIC₅₀÷化学物質のIC₅₀)を算出した。

3 結果と考察

3.1 河川水、流入水路水のEDCs濃度

今回の鴨川本川(4地点)及び流入水路(11地点)の調査では、測定した18種類のEDCsのうち7種類が検出された。その検出率は、NP(80%)、4-t-OP(80%)、BPA(93%)、DEHP(87%)、DBP(13%)、DEHA(33%)、BP(60%)であり、環境庁が平成12年度に実施した河川水(124地点)の全国調査結果⁷⁾をいずれも上回っていた(表1)。

表1 全国調査結果との比較

物質名	NP	4-t-OP	BPA	DEHP	DBP	DEHA	BP	17β-E ₂	DDP
今回の鴨川調査 n=17	80%	80%	93%	87%	13%	33%	60%	0.06	0.001
環境庁全国調査 n=124	71%	67%	82%	83%	13%	26%	51%	0.12	0.002

今回の調査では、NPが<0.1~1.8 µg/L、4-t-OPが<0.01~0.31 µg/L、BPAが<0.01~0.17 µg/L、DEHPが<1~42 µg/L、DBPが<0.6~3.4 µg/L、DEHAが<0.01~0.19 µg/L、BPが<0.01~0.05 µg/Lの範囲で検出された。17-エストラジオールは4地点で検出されたが、いずれも検出下限値(0.001 µg/L)であった(表2)。

表2 河川水、流入水路水の測定結果

物質名	NP	4-t-OP	BPA	DEHP	DBP	DEHA	BP	17β-E ₂	DDP
検出下限値	0.1	0.01	0.01	1	0.6	0.01	0.01	0.001	0.001
#K1	<0.1	0.01	0.06	2	<0.6	<0.01	<0.01	<0.001	2.8
#K2	0.3	0.13	0.03	12	<0.6	<0.01	<0.01	<0.001	2.8
#K3	0.6	0.03	0.05	4	<0.6	<0.01	0.05	<0.001	11
#K4	0.1	0.02	0.03	20	<0.6	<0.01	0.02	<0.001	2.8
#K5	<0.1	0.02	0.03	3	<0.6	0.02	0.05	<0.001	12
#K6	1.8	0.05	0.03	4	<0.6	<0.01	<0.01	<0.001	2.8
#K7	0.6	0.01	0.15	32	3.4	0.01	0.02	<0.001	17.9
#K8	0.1	0.01	0.03	4	<0.6	0.19	0.01	<0.001	11
#K9	0.2	0.02	0.04	9	<0.6	0.05	0.01	<0.001	2.8
#K10	1.1	0.02	0.03	31	<0.6	0.03	0.02	<0.001	10
#K11	1.2	0.02	0.04	31	<0.6	<0.01	0.01	<0.001	2.8
#K12	<0.1	<0.01	0.02	2	1.1	<0.01	0.02	<0.001	2.4
#K13	1.2	0.02	0.12	0.1	<0.6	<0.01	0.04	<0.001	12
#K14	0.2	<0.01	<0.01	3	<0.6	<0.01	<0.01	<0.001	2.4
#K15	0.3	<0.01	0.03	3	<0.6	<0.01	<0.01	<0.001	17

調査したEDCsのうち、4-n-OP(0.01 µg/L)、4-t-BP(0.01 µg/L)、4-n-PP(0.01 µg/L)、4-n-HxP(0.01 µg/L)、4-n-HpP(0.01 µg/L)、BBP(0.2 µg/L)、DCHP(0.2 µg/L)、DEP(0.7 µg/L)、DPeP(0.2 µg/L)、DHP(0.2 µg/L)、DPrP(0.2 µg/L)は、全ての検体で不検出であった(カッコ内は検出下限値)。

これらのことから、鴨川では本川の水だけではなく、流入水路水にもEDCsが存在することがわかった。特に島根排水路(K7)では激しい腐敗臭があり、CODが175mg/Lと高く、DEHP(42 µg/L)とDBP(3.4 µg/L)は、平成12年度に環

境庁が行った全国調査結果の最大値を超えていた。この地点の上流には食品製造工場があり、その排水の影響が考えられる。

3.2 エストロゲンリセプター結合能

3.2.1 河川水、流入水路水

河川水、流入水路水の1Lあたりのエストロゲンリセプター結合阻害度を図3、4に示し、エストロゲンリセプター結合能のDES換算値を表3に示す。

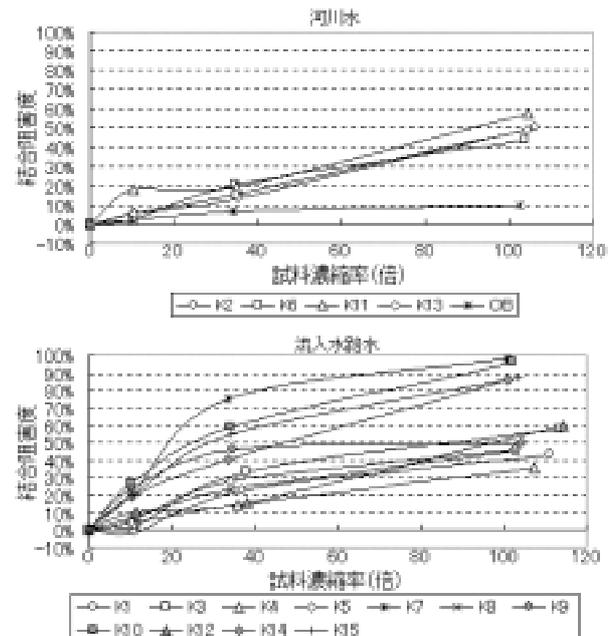


図3 河川水、流入水路水のER 結合阻害度

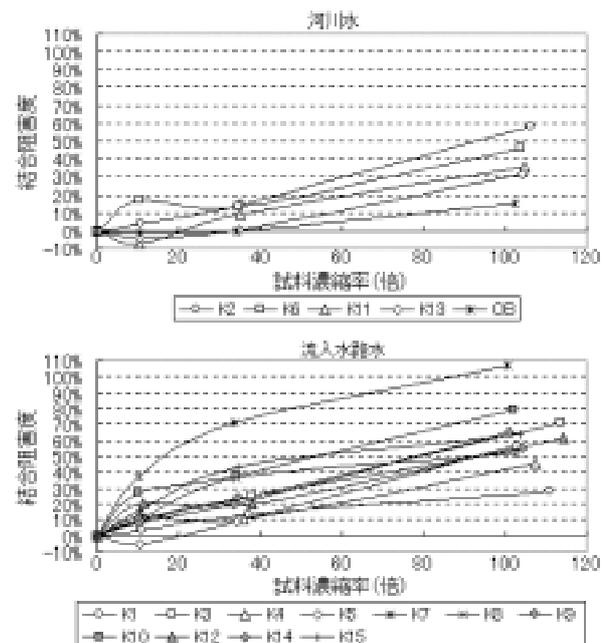


図4 河川水、流入水路水のER 結合阻害度

表3 河川水、流入水路水のER結合能DES換算値(nM)

	*K1	K2	*K3	*K4	*K5	K6	*K7	*K8
ER α	<0.42	<0.42	0.47	<0.42	<0.42	<0.42	21	<0.42
ER β	<0.68	0.73	0.86	<0.68	0.73	<0.68	4.1	0.72

	*K9	*K10	K11	*K12	K13	*K14	*K15	OB
ER α	<0.42	1.7	<0.42	<0.42	<0.42	0.45	0.73	<0.42
ER β	0.72	1.3	<0.68	<0.68	<0.68	0.70	1.1	<0.68

*: 流入水路水

測定した河川水、流入水路水のうち、グラフからER 結合阻害度のIC₅₀が得られた試料は15地点中5地点(全て流入水路水)であり、その結合能は0.45~2.1nMの範囲であった。ER 結合能はK7、K10、K15、K14、K3の順に高かった。K7の水は主に食品製造工場の排水と生活排水で、K15とK14の水は工場排水である。

ER では15地点中9地点でIC₅₀を算定でき、その結合能は0.70~4.1nMの範囲であった。ER 結合能は、K7、K10、K15、K3の順に高く、いずれも流入水路であった。

これらのことから、工場排水を含む流入水路水のER結合能が高い傾向があったが、K3、K10などの生活排水を主体とする流入水路水もこれらと同等のER結合能があるため、個々の排水の種類、起源により差があるものと考えられる。

河川水では、ER 結合能がK2地点で0.73nM検出された以外は、いずれも検出下限値未満であった。

CODの値が特に高いK7地点を除いて、河川水、流入水路水のER結合能DES換算値とCODとの相関を見ると、ER (n=4)、ER (n=8)とも正の相関が見られ、寄与率はそれぞれR²=0.5638、R²=0.7827であった(図5)。このことからCODが、水試料におけるER結合能判定の目安となる可能性があることが示唆された。

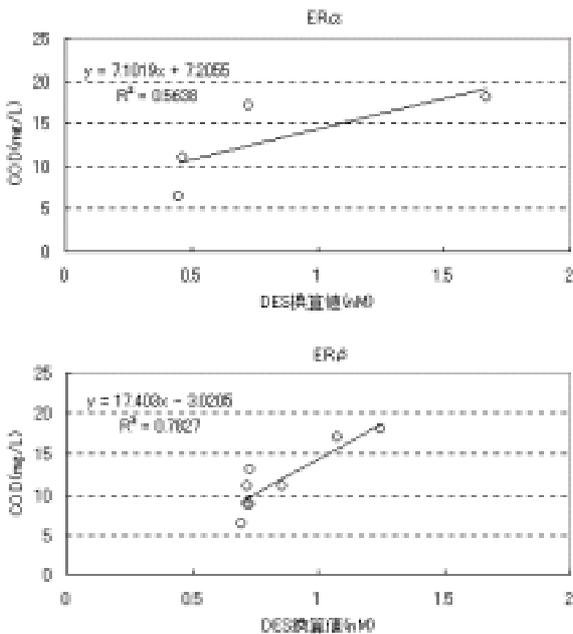


図5 河川水、流入水路水のER結合能とCODの関係

琵琶湖や瀬田川の水のER結合を蛍光偏光度測定システムで調べた報告では、エストラジオール(E₂)換算で39.6~51.1pptとなっている³⁾。これは、E₂モル換算で0.15~0.19nMに相当し、E₂とDESの結合能を同等と仮定すると、今回の調査結果よりも低い値である。鴨川本川の河川水では、K2地点でER 結合能が0.73nM検出されたが、この地点のCODが8.8mg/Lであるのに対して、琵琶湖の北湖、南湖と瀬田川の水の平成2年度から平成11年度のCOD平均値がそれぞれ2.5、3.1、3.2mg/L⁹⁾と低いため、この差は有機的な汚濁によるものとも考えられる。

また、DES換算値がER、ERとも算出された流入水路5地点のうち、K10を除く4地点(K3、K7、K14、K15)でERよりもERの方がDES換算値が高かった。これは、河川水中のヒトエストロゲンリセプター親和性物質を測定した報告³⁾でもERよりもERに対する親和性が強いとなっており、今回の調査結果と一致している。

3.2.2 検出されたEDCsの標準品

対象としたEDCsとER結合阻害度の関係を図6に示し、またIC₅₀、RBAを表4に示す。

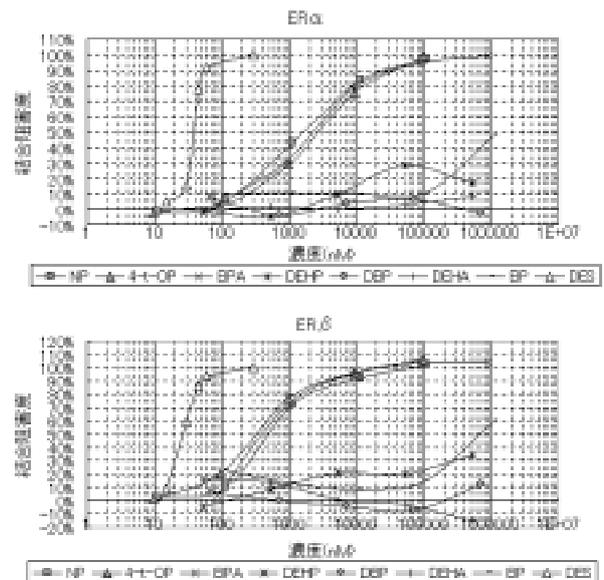


図6 EDCs濃度とER結合阻害度の関係

表4 EDCsのER結合阻害度(IC₅₀)とRBA

EDCs	NP	4-t-OP	BPA	DEHP	DBP	DEHA	BP	DES
IC ₅₀ (nM)	1500	2530	2060	-	-	-	-	37.0
RBA	0.025	0.045	0.018	-	-	-	-	1.000

EDCs	NP	4-t-OP	BPA	DEHP	DBP	DEHA	BP	DES
IC ₅₀ (nM)	4.90	307	381	-	-	-	660000	23.4
RBA	0.080	0.028	0.081	-	-	-	0.00004	1.000

表4からER 結合阻害度の強さは、NP(1,500nM) > BP A(2,060nM) > 4-t-OP(2,530nM)で、DESのIC₅₀(37.0nM)に対するRBAは、それぞれ0.025、0.018、0.015であった。DEHP、DBP、DEHA、BPは、最高濃度でもIC₅₀を満たさなかった。

ELISA法を用いてEDCsのER 結合能を測定した報告では、DES(IC₅₀)に対するRBAがNPで0.02222、4-t-OPで0.0163、BPAで0.00205となっている¹⁰⁾。今回の測定結果をこれらと比較すると、NPはほぼ同じであるが、4-t-OPとBPAは約10倍になっていた。次にER 結合阻害度の強さは、4-t-OP(307nM) > BPA(381nM) > NP(470nM) BP(660,000nM)で、DESのIC₅₀(23.4nM)に対するRBAは、それぞれ0.076、0.061、0.050、0.00004であった。DEHP、DBP、DEHAは、IC₅₀が得られなかった。

ER とER のRBAを比較すると、ER の方がNP、4-t-OP、BPAでそれぞれ2倍、5倍、3倍高いことがわかった。このことから、各化学物質がERの違いにより、結合能に差があることが示唆された。

3.3 河川水、流入水路水のER結合能に対するEDCsの寄与

河川水、流入水路水のNP、4-t-OP、BPA、BP濃度にRBAを掛けて算出したER結合能DES換算値と河川水、流入水路水のER結合能DES換算値を比較した(表5)。

表5 河川水、流入水路水と検出されたEDCsのER結合能DES換算値の比較

ER _α	EDCsのDES換算値 (検出濃度(μg/L) × 1000 ÷ 分子量 × RBA)					抽出率	河川水、流入水路水のDES換算値	河川水、流入水路水に占めるEDCsの割合
	NP	4-t-OP	BPA	BP	合計			
RBA	0.022	0.016	0.002	-	-	-	-	-
#E1	-	0.002	0.005	-	0.007	-	<0.42	-
#E2	0.004	0.013	0.006	-	0.023	-	<0.42	-
#E3	0.007	0.002	0.004	-	0.013	-	0.47	10%
#E4	0.011	0.001	0.002	-	0.014	-	<0.42	-
#E5	-	0.001	0.006	-	0.007	-	<0.42	-
#E6	0.20	0.006	0.002	-	0.21	-	<0.42	-
#E7	0.023	0.016	0.002	-	0.041	-	0.42	検
#E8	0.021	0.002	0.002	-	0.025	-	<0.42	-
#E9	0.022	0.001	0.002	-	0.025	-	<0.42	-
#E10	0.12	0.001	0.002	-	0.12	-	1.2	検
#E11	0.12	0.002	0.002	-	0.12	-	<0.42	-
#E12	-	0.002	0.002	-	0.004	-	<0.42	-
#E13	0.12	0.002	0.002	-	0.12	-	<0.42	-
#E14	0.10	-	-	-	0.10	-	0.42	検
#E15	0.004	-	0.002	-	0.006	-	0.75	検

ER _β	EDCsのDES換算値 (検出濃度(μg/L) × 1000 ÷ 分子量 × RBA)					抽出率	河川水、流入水路水のDES換算値	河川水、流入水路水に占めるEDCsの割合
	NP	4-t-OP	BPA	BP	合計			
RBA	0.020	0.002	0.001	2.5E-05	-	-	-	-
#E1	-	0.012	0.016	-	0.12	-	<0.82	-
#E2	0.008	0.008	0.002	1.0E-04	0.16	-	0.75	21%
#E3	0.14	0.011	0.002	3.7E-06	0.16	-	0.88	19%
#E4	0.023	0.007	0.008	3.0E-06	0.038	-	<0.82	-
#E5	-	0.002	0.002	3.0E-06	0.004	-	0.12	検
#E6	0.41	0.003	0.008	-	0.42	-	<0.82	-
#E7	0.044	0.002	0.006	3.0E-06	0.18	-	4.1	検
#E8	0.023	0.011	0.008	1.0E-06	0.042	-	0.75	検
#E9	0.044	0.002	0.011	-	0.057	-	0.75	検
#E10	0.22	0.007	0.016	3.0E-06	0.27	-	1.2	21%
#E11	0.27	0.002	0.01	3.0E-06	0.31	-	0.82	検
#E12	0.27	0.002	0.002	3.0E-06	0.29	-	0.82	検
#E13	0.27	0.002	0.002	3.0E-06	0.29	-	0.82	検
#E14	0.20	-	-	-	0.20	-	0.70	20%
#E15	0.008	-	0.008	-	0.016	-	1.1	検

流入水路5地点のER 結合能DES換算値に占めるEDCsのDES換算値の割合は2~22%であったが、K14(22%)、K3(16%)で比較的高い値が認められた他は、いずれも数%程度であった。他の地点(河川4地点と流入水路6地点)は、そのDES換算値が検出下限値未満であったため、寄与率を算定できなかった。

河川1地点、流入水路8地点でのER 結合能DES換算値に占めるEDCsの割合は4~29%であり、比較的高い割合は、流入水路(K14=29%、K10=21%、K3=19%)だけでなく、河川(K2=21%)からも認められた。他の地点(河川3地点と流入水路3地点)は、そのDES換算値が検出下限値未満であったため、寄与率を算定できなかった。

今回の調査で河川水、流入水路水におけるEDCsのER 結合能DES換算値の割合が最も高かったのはK14地点であった。これは、この地点の水が洗濯工場の排水であるためと考えられるが、生活排水主体のK3、K10地点の水においても比較的その割合が高かったことから、その原因についても今後検討する必要がある。

河川水、流入水路水中のEDCsのDES換算値を物質別に見た場合、NPの値が4-t-OPやBPAに比べて大きい河川水、流入水路水が多い。また、今回用いた測定法では、原理上17-E₂の測定ができないが、17-E₂にDES相当の結合能があると仮定しても、今回検出された濃度(0.001 μg/L)では、DES換算値は0.004nM程度であるため、ほとんど影響しないと考えられる。これらのことから、今回の調査で鴨川の河川水及び流入水路水から検出されたEDCsの中では、NPの寄与が高いことがわかった。

ELISA法を用いて環境水のER結合能とEDCsのER結合能の関係を調べた報告はないが、Behnisch¹¹⁾は管理型埋立地の浸出水処理工程水やその処理水、放流先の河川水のエストロゲン活性をE-screen assayで、さらにそれらの水中のニルフェノール、4-オクチルフェノール、ビスフェノールAをGC/MS法で測定した。これらのEDCsのエストロゲン活性に試料中の濃度をかけた総和を試料のエストロゲン活性と比較すると、EDCsの寄与は未処理の浸出水では1.4%で、河川水では0.25%にすぎなかった。

今回、我々が測定した河川水や流入水路水では、この報告よりも高い割合となっている。これは、ELISA法がER結合能を測定する方法であるのに対し、E-screen assayは培養細胞を用いてエストロゲン活性を測定する方法であるため、測定方法の違いによるものと考えられた。

4 まとめ

- (1) 鴨川の河川水だけでなく、流入水路水からも比較的高濃度のEDCsが検出された。
- (2) 工場排水主体の流入水路水に比較的高いER結合能が見られた。また、河川水、流入水路水のER結合能とCODの間に正の相関が認められた。
- (3) NP、4-t-OP、BPAに比較的高いER結合能が認められた。
- (4) ER結合能に対するEDCsの寄与率が20%を超える流入水路水があった。また寄与率の大部分をNPが占める流

入水路水が多かった。

今回の調査では、河川水、流入水路水のER結合能という観点から、ELISA法を用いて内分泌かく乱化学物質と比較検討することができた。しかし、ER結合能が検出下限値未満の試料もあったため、抽出法の改良、前処理方法の開発、他の河川でのデータの蓄積などにより、この方法による河川水、流入水路水への適用可能性をさらに検討する必要がある。

また、今回の調査で検出されたEDCsのうち、NP、4-t-OP、BPAに比較的高いER結合能が認められたことから、今後はこれらの物質を中心に、水生生物への影響等を検討していきたい。

謝 辞

本研究のデータの一部は、埼玉県環境防災部ダイオキシン対策室と実施した化学物質環境保全事業の調査結果を使用した。ダイオキシン対策室の各位に謹んで謝意を表します。また、試料のCODは当センター水環境担当の金主任が分析したものである。謹んで謝意を表します。

文 献

- 1) 環境庁(1998)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-
- 2) 埼玉県(2000)平成12年版埼玉県環境白書
- 3) Bolger, R., Wiese, T. E., Ervin, K., Nestich, S. and Checovich, W. (1998) Rapid Screening of Environmental Chemicals for Estrogen Receptor Binding Capacity, *Environ. Health Perspect.*, 106, 551-557.
- 4) Garrett, S. D., Lee, H. A., and Morgan, R. A. (1999) A Nonisotopic Estrogen Receptor-based Assay to Detect Estrogenic Compounds, *Nat. Biotechnol.*, 17, 1219-1222.
- 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(1), 57-64.
- 6) 環境庁水質保全局水質管理課(1998)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).
- 7) 環境省環境管理局水環境部水環境管理課(2001)平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果.
- 8) 近藤昭宏, 麻柄由樹, 辻本善政, 加藤郁之進 (1999) 蛍光偏光度測定システムを用いた河川水のエストロゲン受容体結合試験, 第33回日本水環境学会年会講演集, 401.
- 9) 滋賀県立衛生環境センター(2001)平成12年度琵琶湖水質調査報告書.
- 10) Sato, K., Nagai, F. and Aoki, N. (2001) Several Environmental Pollutants Have Binding Affinities for Both Androgen Receptor and Estrogen Receptor, *J. Health Sci.*, 47(5), 495-501.
- 11) Behnisch, P. A., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I. and Sakai, S. (2001) Estrogenic and Dioxin-like Potency in Each Step of a Controlled Landfill Leachate Treatment Plant in Japan, *Chemosphere*, 43, 977-984.

Concentration of Endocrine Disrupting Chemicals and Binding Ability of Estrogen Receptors in the Waters of the Kamogawa River and Its Inflow Channels

Mamoru MOTEGI, Shigeo HOSONO and Kiyoshi NOJIRI

Abstract

Eighteen kinds of endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as alkylphenols and phthalic acid esters, and 17-estradiol ($17\beta\text{-E}_2$) were determined in the waters of the Kamogawa river, where comparatively high concentrations of EDCs were found in the past investigation, and those of its inflow channels. Furthermore, to evaluate the endocrine disrupting action, the binding abilities of estrogen receptors ($\text{ER}\alpha$) and ($\text{ER}\beta$) for the water samples and the EDCs detected in this investigation, were also determined by the ELISA method. Nonylphenol (NP), 4-t-octylphenol (4-t-OP), bisphenol A (BPA), di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), di-n-butyl phthalate (DBP), di-2-ethylhexyl adipate (DEHA), and benzophenone (BP) were detected in some of the water samples. Moreover, $17\beta\text{-E}_2$ was detected at four of the fifteen sampling points. The binding abilities of $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ for the water samples were ranged from <0.42 to 2.1nM and from <0.68 to 4.1nM in diethylstilbestrol (DES) equivalent, respectively.

The ratios in binding abilities of NP, 4-t-OP and BPA were between 1/70 and 1/40 of DES for $\text{ER}\alpha$ and between 1/20 and 1/13 of DES for $\text{ER}\beta$. DEHP, DBP, DEHA and BP have weaker or no binding abilities. The total binding abilities of $\text{ER}\alpha$ in DES equivalent from the concentration of the EDCs, which were detected in the water samples, contributed 2 to 22% for $\text{ER}\alpha$ and 4 to 29% for $\text{ER}\beta$ to that of the water samples.

Key words: River water, inflow channel water, endocrine disrupting chemical, estrogen receptor, ELISA method