

液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を用いた 下水試料中の女性ホルモン類定量分析法の開発

中村 由美子* 恩田 建介**
高東 智佳子** 宮 晶子**

Development of a Method for Quantitative Analysis of Estrogens in Sewage Water by LC/MS/MS

by Yumiko NAKAMURA, Kensuke ONDA, Chikako TAKATOH, & Akiko MIYA

Sewage treatment plant effluents are suspected to supply natural estrogenic hormones (17β -estradiol (E2), estrone (E1), and estriol (E3)) to environmental water. As estrogens could be strong endocrine disruptors, it seems to be very important to investigate the behavior of estrogens in sewage treatment plants. To achieve this objective, an analytical method to quantify the estrogens in sewage samples was required. In this study, an analytical procedure based on solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) has been developed. Good linearity of the calibration curve ($r>0.998$) was obtained in the concentration range from 0.2 ng/ml to 125 ng/ml for E1, from 0.5 ng/ml to 125 ng/ml for E2 and E3; and the detection limits were 0.2 ng/l for E1, 0.5 ng/l for E2 and E3. The recoveries of standard samples spiked to sewage water were 98.9-102.5%. Using this method, the estrogens in a municipal sewage treatment plant and those in a domestic sewage treatment plant were quantified. The obtained data were compared with the data obtained by ELISA or the estrogen-like activity obtained by yeast assay. The concentrations of E2 by ELISA were generally higher than those by this method. The contribution of E1 was comparably high, especially in the effluent samples. Estrogens were found to contribute greatly to estrogen-like activity of sewage samples.

Keywords: 17β -estradiol, Estrone, Estriol, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Sewage water

1. はじめに

1996年に「Our Stolen Future」¹⁾が刊行されて以来、化学物質による人や野生生物への内分泌攪乱作用が大きな関心を呼び、内分泌攪乱物質に対する世界的な研究が必要であるとの意識が高まった。そして、これを受けて経済協力開発機構(OECD)が1997年に内分泌攪乱化学物質の試験・評価方法を確立するためのワーキンググループ(EDTA)を設置するなど、内分泌攪乱化学物質対策としての本格的な調査・研究が始まった。日本国内では1998年に環境省から「環境ホルモン戦略計画SPEED '98」²⁾が発表され、同年夏からは全国の河川、湖沼、地下水、海域で内分泌攪乱化学物質の実態調査が行われるようになった。

1998年夏に行われた実態調査の結果、アルキルフェノール類、ビスフェノールAに次いで多くの地点で検出されたのが、天然の女性ホルモンである 17β -エストラジオール(E2)だった³⁾。

E2は、内分泌攪乱化学物質と疑われている合成化学物質と比較して女性ホルモン活性が非常に高い。更に、E2と同様、天然女性ホルモンであるエストロン(E1)、エストリオール(E3)も高活性を示すことが知られている。恩田らによると、遺伝子組換え酵母を用いた女性ホルモン様活性値を指標に、代表的な内分泌攪乱化学物質であるノニルフェノールと比較した場合、E1は600倍、E2は2000倍、E3は10倍の活性を示している⁴⁾。このことから、これら女性ホルモン類が環境水中に低濃度でも存在すれば、水生生物の雌性化等が懸念される。女性ホルモン類は人や家畜の尿中に含まれる物質であるため、下水を介して環境水中に放出される可能性が否定できない。下水処理水放流先河川では、雄性魚に雌性化の傾向が認められたという報告もある⁵⁾。以上のような事情から、我々は特に下水処理場における女性ホルモン類の挙

* (株)荏原総合研究所 グラフトプロジェクト

** 同 生物研究室

** 同 化学研究室

分析化学 Vol. 52, No. 2, pp. 107-114 (2003) に掲載されたものを一部加筆、修正した。

動を把握することが重要であると考えた。

女性ホルモン類の分析法については、E2を酵素免疫測定法（ELISA法）で定量する手法が主流で、全国の実態調査もこの方法で行われている⁶⁾。しかし、ELISA法は交差反応の影響が指摘されており、特に環境水と比較して夾雑成分を多く含むと考えられる下水試料に適用した場合、過剰評価の可能性が高くなる。この問題を克服する手段の一つに機器分析法があり、これまでもGC/MS^{6~10)}やLC/MS/MS^{10~13)}を用いて女性ホルモン類を分析する方法が開発され、環境水や下水放流水中の濃度を測定した例が報告されている。一方、下水流入水に関しては、夾雑有機物が非常に多いため、分析はより困難である。今までも測定例はいくつか有るものの^{14~16)}、分析法について詳細に検討された例は少ない^{15~17)}。しかし、下水処理場における女性ホルモン類の処理実態を把握するためには、下水流入水から放流水に至るまでの下水試料全般について女性ホルモン類濃度を正確に定量することが不可欠である。

本研究では、下水試料に適用可能な液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析装置（LC/MS/MS）を用いたE1, E2, E3の一斉分析法について検討し、実際に下水処理場の試料を分析したので、得られた結果と知見について報告する。

2. 実験

2-1 試薬

標準物質として17 β -エストラジオールは和光純薬製、エストロン、エストリオールはSIGMA製を用いた。内部標準物質として17 β -エストラジオール-16, 16, 17-d₃ (E2-d₃)はAldrich製、エストロン-16, 16-d₂ (E1-d₂)、エストリオール-2, 4-d₂ (E3-d₂)はCDN Isotopes製を用いた。ジエチルエーテルは和光純薬製の残留農薬試験用（2000倍濃縮検定品）、アセトニトリル、蒸留水は和光純薬の高速液体クロマトグラフィー用、メタノール、アセトンは和光純薬製の試薬特級を使用した。固相抽出カートリッジは、濃縮用としてWaters製のOasis HLB plusを、クリーンアップ用としてWaters製のSep-Pak NH₂ Plusを用いた。

2-2 試料の採取

試料は、主に生活排水を受け入れる団地下水処理場と首都圏近郊の都市下水処理場において最初沈殿池越流水（以下、原水）及び生物処理水（以下、処理水）を採水した。

2-3 試料の前処理方法

LC/MS/MS測定用の試料は、原水の場合は500 ml、処理水の場合は1000 mlを量り取り、ガラス繊維ろ紙（GF/C；Whatman製）でろ過した。ろ液には内部標準物質としてE1-d₂, E2-d₃, E3-d₂の混合溶液を添加し、メタノール、超純水でコンディショニング済みの濃縮用固相に20 ml/minの速度で通水し、目的成分を保持させた。通水後のカートリッジは超純水10 ml、30%アセトン5 mlで順次洗浄後、遠心分離によって脱水し、メタノール5 mlで溶出した。この溶出液を窒素パージで水分だけが残るまで濃縮し、超純水を加えて1 mlとした。この水溶液に対して、ジエチルエーテル2 mlで2回の抽出操作を行い、エーテル層を集め、窒素パージで500 μ l程度まで濃縮した。この濃縮液は硫酸ナトリウムで脱水後、ジエチルエーテルでコンディショニングしたクリーンアップ用の固相に通した。固相からの溶出は、まずジエチルエーテル5 mlでE1とE2を、次にメタノール5 mlでE3を溶出させた。各溶出液を窒素パージで濃縮し、50%メタノール400 μ lで再溶解させ、測定用試料とした。

ELISA及び女性ホルモン様活性測定用の試料は、ガラス繊維ろ紙（GF/C；Whatman製）でろ過し、ろ紙に残った残さは、ろ紙ごとメタノールで抽出後、ろ液と混合した。この溶液をあらかじめメタノール、純水でコンディショニングした濃縮用固相（Sep-Pak environmental C18 Plusカートリッジ；Waters製）に10 ml/minの速度で通水し、純水による洗浄、乾燥後、5 mlのメタノールあるいはジクロロメタンで溶出した。溶出液は窒素パージで濃縮乾固し、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解した。

2-4 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフィーはHP1100システム（Hewlett Packard製）を使用した。カラムはL-カラム ODS（2.1 mm \times 150 mm, 5 μ m；化学物質評価研究機構製）を使用し、カラムオープン温度を40 $^{\circ}$ Cに設定した。移動相はアセトニトリル/水の系を用い、40%アセトニトリル/水から80%アセトニトリル/水へ2分間でリニアに変化させ、流速0.2 ml/minで流した。また、ポストカラムで0.05%アンモニア/メタノールを0.03 ml/minで添加し、質量分析計へ導入した。試料の注入量は20 μ lとした。

質量分析計にはQuattro II（Micromass製）を用い、イオン化法はエレクトロスプレー法のネガティブイオンモード、イオン源温度100 $^{\circ}$ C、コーン電圧50 Vとした。また、MS/MSの衝突ガスにはアルゴンガスを使用し、

衝突エネルギーは38 eVとした。MRMの測定イオンとしてE2はm/z271→145, E1はm/z269→145, E3はm/z287→171, E2-d₃はm/z274→145, E1-d₂はm/z271→145, E3-d₂はm/z289→173を設定した。

ELISA法によるE2の測定はE2 ELISAキット(武田薬品工業)を用いて行った。濃縮後の試料は、DMSOの最終濃度が2%となるようキット付属の緩衝液で希釈して使用した。その他はキットの操作方法に従った。

バイオアッセイ法は、英国Brunel大学Sumpter教授から分譲された酵母株を用い、Routledgeらの方法を一部改変した恩田らの方法¹⁸⁾で行った。

3. 結果と考察

3-1 LC/MS/MS 諸条件の検討

本研究では、試料中の目的成分をいかに選択的に検出するかが最大の課題であり、これを解決するために、まず、分離手段としては、目的成分である女性ホルモン類を誘導体化することなく、直接導入できる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を選択した。ガスクロマトグラフィー(GC)は分離能が高いことが魅力だが、女性ホルモン類をGCで分析するには誘導体化が必要である。今回のように、分析対象が3化合物(内部標準物質も含めると6化合物)あり、E1, E2, E3のそれぞれに、誘導体化される部分(水酸基)が1箇所から3箇所あるケースで、更に、ここに多くの夾雑成分含まれることを考えると、副生成物が多くなり、後処理が複雑になることが予想された。次に、検出器にはタンデム質量分析装置(MS/MS)を選んだ。一つの目的成分につき、分子量由来の前駆イオン(プレカーサーイオン)の値と、前駆イオンを不活性ガスと衝突させた時に得られる生成イオン(プロダクトイオン)の値を選択するので、二重の絞り込みができ、選択性に優れた検出方法である。

標準試料を用いて、まず、MS/MSのイオン化法及び各種パラメータの検討を行った。イオン化法については、大気圧化学イオン化法(APCI法)とエレクトロスプレーイオン化法(ESI法)について、ポジティブ、ネガティブモードを比較した結果、ESIのネガティブモードで最大の感度が得られた。また、この時のベースピークは[M-H]⁻の擬分子イオンだった。そこで次に、ESIのネガティブモードで[M-H]⁻をプレカーサーイオンに設定してMS/MS測定に関する各種パラメータの最適化を行い、イオン源温度を100℃、コーン電圧を50 V、衝突エネルギーを38 eVに設定した。

次に、LCについて、E1, E2, E3の混合溶液を用い

て移動相溶媒の組成とグラジエント条件を検討した。一般に、ESIのネガティブ測定を行う場合、アルコール系の溶媒を用いることでイオン化が安定すると言われており、実際にメタノールを使用した場合には、アセトニトリルを使用した場合に比べ、若干の感度向上が見られた。しかし、水/メタノール系ではカラム圧が高くなり、グラジエント分析では初期状態に戻ってからの平衡化に時間がかかるため、本分析においてはアセトニトリル/水系を用いることとした。また、グラジエントを急勾配にかけることで、1サイクル16分という比較的短い時間で、夾雑成分の多い試料にも耐え得る分析が可能となった。

更に、LCでの分離を損なわず、MSでの感度を向上させるために、ポストカラムで0.05%アンモニア/メタノールを添加した。液性をアンモニアで塩基性にすることで目的化合物のイオン化を促進し、メタノール添加によりイオン化を安定する効果を期待したものである。実際に0.05%アンモニア/メタノールを30 μl/min加えた場合、E2で30%程度の感度上昇が得られた。

3-2 前処理法の検討

下水処理場から採水したサンプルに標準試料溶液を添加して、種々の前処理方法を検討した。

サンプルろ過時の残さに関しては、量が少なく、このメタノール抽出物に関して予備試験をした結果、女性ホルモン類は検出されなかったため、以後、残さは抽出せずに廃棄することとした。

前処理の第一ステップである固相抽出では、回収率を高く保ち、しかも夾雑成分をできる限り排除する目的で、溶出前に低濃度の有機溶媒で固相を洗浄することを検討した。その結果、30%アセトンでの洗浄が効果的であることがわかった。そして、この操作を加えたことで、次のステップであるエーテル抽出時のエマルジョン生成が緩和されるようになった。

エーテル抽出物は、場合によってはそのまま濃縮してLC/MS/MS測定することも可能だったが、特にE2において、夾雑物による妨害が大きくなる場合が多く、更に精製過程が必要と考えられた。ここでも種々の方法を検討したが、石井らの方法⁶⁾を参考にNH₂カートリッジを用いることとし、更に溶出方法を検討して、溶出溶媒を低極性のエーテルと、高極性のメタノールの2段階にすることで、下水試料中のE1, E2, E3をLC/MS/MSで個々に感度良く定量できるまでに至った。

3-3 標準試料による検量線作成

標準試料と内部標準物質の混合溶液を測定用試料濃度として調製し、検量線を作成したところ、E1では0.2

表1 下水原水, 処理水, 超純水に女性ホルモン類を添加した場合の回収率 (n=4)
Table 1 Recoveries of estrogens added to influent, treated sewage, and purified water (n=4)

	E1			E2			E3		
	20 ng/l			20 ng/l			200 ng/l		
原水 Influent	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)
	70.7	91.4	102.8	37.9	57.8	103.5	998.8	1201.7	99.4
	71.1	91.3	102.3	36.9	57.1	100.0	1011.1	1196.5	96.8
	71.2	91.3	102.3	37.5	56.1	95.0	994.4	1199.3	98.2
	70.4	91.4	102.8	36.1	57.4	101.5	1007.7	1205.7	101.4
平均 Average	70.9	91.4	102.5	37.1	57.1	100.0	1003.0	1200.8	98.9
処理水 Treated sewage	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)
	8.7	28.6	98.6	1.1	21.1	100.1	11.6	31.8	103.4
	8.9	28.9	100.1	1.1	21.1	100.1	11.2	31.0	99.4
	8.9	29.3	102.1	1.1	20.8	98.6	11.2	31.4	101.4
	9.0	28.8	99.6	1.0	21.1	100.1	10.5	31.2	100.4
平均 average	8.9	28.9	100.1	1.1	21.0	99.8	11.1	31.4	101.1
超純水 Purified water	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)	添加前 Blank (ng/l)	添加後 Added (ng/l)	回収率 Recovery (%)
	0.0	10.1	101.0	0.0	9.8	98.0	0.0	9.8	98.0
	0.0	10.0	100.0	0.0	9.8	98.0	0.0	9.7	97.0
	0.0	10.1	101.0	0.0	9.9	99.0	0.0	10.0	100.0
	0.0	10.3	103.0	0.0	10.1	101.0	0.0	10.1	101.0

ng/mlから125 ng/ml, E2, E3では0.5 ng/mlから125 ng/mlの範囲で0.998以上の良好な相関係数が得られた。また下水処理場原水では, 特にE3の濃度が高いことから, 原水用に別の検量線を引き, E1, E2は1.0 ng/mlから100 ng/mlの範囲で, E3は10 ng/mlから1000 ng/mlの範囲で直線性の良い検量線が得られた。

3-4 添加回収試験

本分析法の精度確認のための添加回収試験として, 超純水のほか, 団地下水処理場の原水及び処理水に標準試料と内部標準物質を添加して一連の操作を行った。結果を表1に示した。E1, E2, E3のいずれも, 回収率は4回の平均で98.9%から102.5%と, 非常に良好な結果が得られた。また, これとは別に, 前処理操作での絶対回収率を調べる目的で, サンプルに標準試料のみ添加して前処理操作を行い, LC/MS/MS測定の前直前に内部標準物質を加えて測定を行った。結果を表2に示した。それぞれ5回の平均で72.0%から93.4%であり, 本分析法が下水試料中の女性ホルモン類の定量に適用可能であると考えら

表2 下水原水, 処理水, 超純水に女性ホルモン類を添加した場合の絶対回収率

Table 2 Absolute recoveries of estrogens added to influent, treated sewage, and purified water (20 ng/l each was added. n=5)

	E1	E2	E3
原水 Influent	89.4	82.0	88.0
処理水 Treated sewage	76.5	93.4	79.1
超純水 Purified water	89.4	91.9	72.0

れた。

3-5 繰り返し精度と検出下限値

標準試料に一連の前処理操作を施し, LC/MS/MS測定する, という手順で繰り返し測定を行った (n=4)。結果を表3に示す。この4回の測定値から標準偏差 (σ) を算出し, 求めた検出下限値 (3σ) 表3に示したとお

表3 超純水へ女性ホルモン類を添加した場合の繰り返し精度 (n=5)
Table 3 Repeatability of estrogens added to purified water (n=5)

	試料濃度 Sample concentration	測定結果 Measured concentration	測定値の平均 Average	標準偏差 Standard deviation (σ)	3 σ
E1 (ng/l)	2.0	2.1 2.1 2.2 2.1 2.1	2.12	0.04	0.13
E2 (ng/l)	2.0	2.1 2.1 2.0 1.8 2.1	2.02	0.13	0.39
E3 (ng/l)	2.0	2.2 2.1 2.0 2.1 1.9	2.06	0.11	0.34

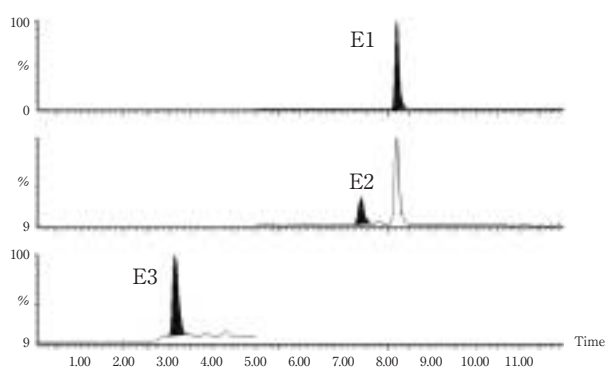


図1 下水原水中女性ホルモン類のMRMクロマトグラム
Fig. 1 MRM chromatogram of estrogens in influent

りである。しかし、実試料に適用する際の検出下限値は s/n も考慮して $s/n > 3$ となることを条件にした。その結果、E1, E2, E3の検出下限値をそれぞれ0.2 ng/l, 0.5 ng/l, 0.5 ng/lとした。

3-6 下水試料への適用

団地下水処理場の原水及び処理水を、週に一度採水し、本分析法を用いて女性ホルモン類の定量を行った。原水を分析した際のクロマトグラムを図1に示す。夾雑成分が多いにもかかわらず、E1, E2, E3がそれぞれ分離され、ピーク形状良く検出された。表4に6週間分の定量値と、比較のために行った都市下水処理場の定量値を示す。原水の場合、団地下水ではE1が50.8から106.7 ng/l, E2が14.9から50.0 ng/l, E3が504.5から754.5 ng/lであり、都市下水ではE1が42.2 ng/l, E2が29.0 ng/l, E3

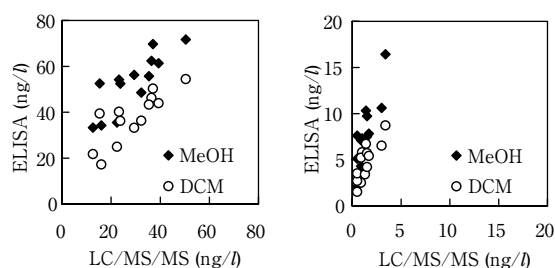


図2 下水原水(左)及び処理水(右)中E2濃度をLC/MS/MSで測定した場合とELISAで測定した場合の比較。ELISA測定用の試料は固相からメタノール(MeOH)若しくはジクロロメタン(DCM)で抽出した。

Fig. 2 Comparison of E2 concentration in influent (left) and treated sewage (right) detected by LC/MS/MS and by ELISA. For ELISA, samples were extracted from solid phase extraction cartridges by methanol (MeOH) or dichloromethane (DCM).

が171.4 ng/lであった。いずれの場合も、原水ではE3の濃度が非常に高かった。一方、処理水の場合には、団地下水ではE1が2.0から15.6 ng/l, E2が0.8から2.8 ng/l, E3が3.0から6.5 ng/lであり、都市下水ではE1が8.6 ng/l, E2は検出下限値(0.5 ng/l)未満, E3が2.4 ng/lであった。処理水では、いずれの場合もE1の濃度が比較的高かった。このことから、下水処理において、女性ホルモン類の中ではE1の除去が最も困難であると考えられた。

次に、団地下水の原水及び処理水についてELISAによるE2の定量値と本分析法による定量値を比較した(図2)。ELISAによるE2濃度はLC/MS/MSによる値よ

表4 下水試料中の女性ホルモン類濃度
Table 4 Concentration of estrogens in sewage samples

	原水 Influent (ng/l)			処理水 Treated sewage (ng/l)		
	E3	E2	E1	E3	E2	E1
団地下水 Domestic sewage						
9/Nov/00	504.5	22.8	50.8	6.5	1.0	2.0
16/Nov/00	548.2	35.0	101.6	5.4	2.8	15.6
22/Nov/00	506.5	14.9	106.7	4.2	2.5	10.9
1/Dec/00	534.1	38.9	68.0	4.4	1.2	5.2
7/Dec/00	582.3	36.6	51.1	3.6	0.8	5.7
14/Dec/00	754.4	50.0	64.7	3.0	0.9	6.0
都市下水 Municipal sewage						
13/Dec/00	171.4	29.0	42.2	2.4	n.d	8.6

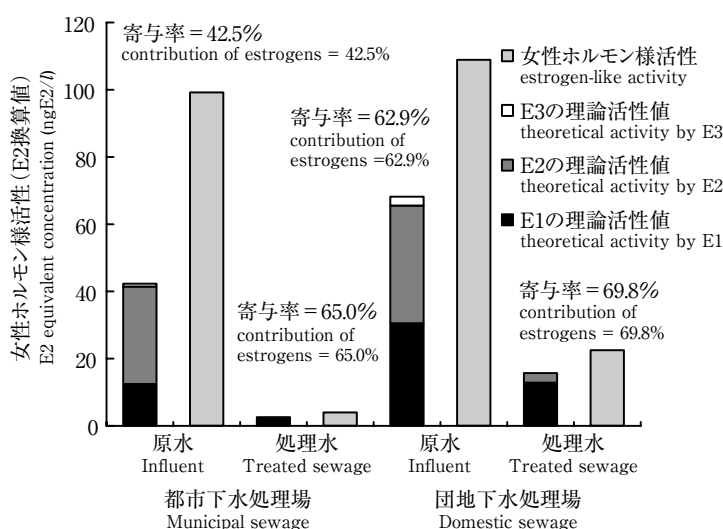


図3 下水試料の女性ホルモン様活性に対する女性ホルモン類の寄与
Fig. 3 Contribution of estrogens to estrogen-like activity in sewage samples

り高くなる傾向にあり、特に処理水においてはその傾向が顕著であった。そこで、ELISAで測定する際、濃縮用固相からの抽出をメタノールからジクロロメタンに変更すると定量値が低下し、特に原水では本分析法との相関性が高くなった。この原因は、メタノール溶出の場合に比べ、ジクロロメタン溶出の場合には、ELISAで正の誤差を生じさせる夾雑成分の一部が溶出されなくなったためと考えられる。郷田らによれば、フミン酸ナトリウムや直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムがこれらの夾雑成分にあたる¹⁹⁾。しかし、なおもELISAの値は高くなる傾向にあり、以上の結果から少なくとも下水試料を扱う場合、正確なE2濃度を知るにはLC/MS/MS等の機器分析を用いる必要があるということがわかった。またその一方で、ELISAは機器分析を用いる場合と比較して前処理が非常に簡便であり、多数

の試料を測定する場合に適した分析法である。したがって、場合によりこの両者をうまく使い分けことが望ましいと考えられる。

更に、下水試料の女性ホルモン様活性に対し、天然の女性ホルモン類がどの程度寄与しているかを知る目的で、E1、E2、E3の寄与率を算出した。すなわち、本分析法により求められたE1、E2、E3の濃度に、E2に対する比活性を乗じて合算したものを女性ホルモン類由来の理論活性値とし、酵母法によるバイオアッセイで得られた全女性ホルモン様物質由来の活性値と比較した(図3)。なお、比活性はバイオアッセイで事前に測定し、E1は0.3、E3は0.005として使用した。団地下水については、特に処理水で女性ホルモン様活性が高い11月16日の値を代表として選んだ。どちらの処理場においても、女性ホルモン類の寄与率はバイオアッセイによるE2等

価値の42.5%から69.8%と高い割合を占め、処理水では特にE1の寄与が高かった。

4. ま と め

LC/MS/MSを用いて下水処理場の原水、処理水中のE1, E2, E3を個別に定量できる分析法を開発した。本分析法により、これまではあまり実態がつかめなかったE3が、下水処理場の原水では非常に高濃度に存在すること、生物処理水ではE1がE2, E3よりも高濃度に残存していることなど、処理実態の把握が可能となった。

また、ELISA法と本分析法との比較の結果から、ELISA法を用いて測定したE2濃度は、本分析法による値よりも高くなる傾向にあり、特に処理水において両者の相関性が低いことがわかった。

更に、酵母を用いたバイオアッセイ法による女性ホルモン様活性値との比較から、下水試料の持つ女性ホルモン様活性に対して、天然の女性ホルモン類の寄与が大きかった。

参 考 文 献

- 1) T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers : "Our Stolen Future" (1996), (Published by Dutton/Penguin., New York)
- 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) 環境庁：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（夏季）結果（1998）
- 4) 恩田建介, 中村由美子, 宮晶子, 葛甬生：第38回下水道研究発表会講演集, 160 (2001)
- 5) C.E. Purdom, P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler, J.P. Sumpter : Chemistry and Ecology. 8, 275 (1994)
- 6) 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)
- 7) 鳥貝真, 石井善昭, 尹順子, 橋場常雄：環境化学, 10, 595 (2000)
- 8) C. Kelly, J. Chromatogr. A, 872, 309 (2000)
- 9) A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino : Sci. Total Environ., 225, 101 (1999)
- 10) T.R. Croley : Rapid Commun. Mass Spectrom., 14, 1087 (2000)
- 11) 石井善昭, 沖田智, 鳥貝真, 尹順子：分析化学 (Bunseki Kagaku), 49, 753 (2000)
- 12) 田嶋晴彦, 辻村和也, 山口政俊：分析化学 (Bunseki Kagaku), 49, 843 (2000)
- 13) M.J. Ropez de Alda, D. Barcelo, J. Chromatogr. A, 892, 391 (2000)
- 14) A.C. Johnson, A. Belfroid, A. Di Corcia : Sci. Total Environ., 256, 163 (2000)
- 15) T.A. Ternes, M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.D. Wilken, M. Servos : Sci. Total Environ., 225, 81 (1999)
- 16) C. Baronti, R. Curini, G.D' Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi : Environ. Sci. Technol., 34, 5059 (2000)
- 17) 小森行也, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明：第38回下水道研究発表会講演集, 897 (2001)
- 18) 恩田建介, 宮晶子, 葛甬生, 田中俊博：水環境学会誌, 24 (2001)
- 19) 郷田泰弘, 小林綾子, 藤本茂, 池道彦, 藤田正憲：第35回水環境学会年会講演集, 162 (2001)