

(34) 水道水のエストロゲン様作用の特性と制御性に関する研究

Characteristics of Estrogenic Effect of Drinking Water and Its Control

伊藤禎彦*・長坂俊樹*・中西岳*・野中愛*・百々生勢**

Sadahiko ITOH*, Toshiki NAGASAKA*, Gaku NAKANISHI*, Ai NONAKA*, Okinari DODO**

ABSTRACT; Characteristics of estrogenic effect formed by chlorination of drinking water were investigated focusing on chlorination by-products. The MVLN assay was carried out to detect estrogenic effect. It was suggested that 17β -estradiol would be a possible chemical that contributes to the estrogenic effect detected in the Lake Biwa water. It was speculated, however, that the effect of 17β -estradiol is greatly suppressed by coexisting with organic matter in the Lake Biwa water. The main factor affecting the increase of estrogenic effect by chlorination would be the effect of chlorination by-products. The estrogenic effect of the Lake Biwa water was reduced by coagulation and granular activated carbon treatment. The estrogenic effect disappeared almost after activated carbon treatment. The reduction of the estrogenic effect by granular activated carbon treatment was consistent with the removal of TOC. In the meantime, the estrogenic effect of water after coagulation and activated carbon treatment increased by chlorination. The important result is to find that there is a problem equal to the production of trihalomethanes even in the estrogenic effect of drinking water. The result shows that the estrogenic effect is formed as a result of the reaction of chlorine with organic matter remained after water treatment.

KEYWORDS; estrogenic effect, MVLN assay, disinfection by-products, 17β -estradiol, 4-nonylphenol

1. 緒 言

内分泌攪乱を生起する可能性がある化学物質に関して、多方面から調査研究が進められている。そこでは具体的に化学物質名をあげて調査研究を行うことがほとんどであるが、一方、「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験法に関する諮問委員会」(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)では、個別の化学物質に加えて、次の6つのタイプの混合物についても試験を行うことを勧告している。①母乳、②大豆ペースの乳幼児食中の植物エストロゲン、③有害廃棄物処分場で一般的に検出される混合物、④農薬・肥料、⑤消毒副生成物、⑥ガソリン。

実際、塩素処理副生成物の生殖毒性に関する疫学調査として、Wallerら²⁾が、米カリフォルニア州において水道水中に含まれるトリハロメタンの量と水の摂取量、および流産との関係を調べた例がある。この結果では、総トリハロメタン摂取量の多い妊婦(妊娠3ヶ月余まで)のグループでは、流産率が増大していることがわかった。一方、クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係は、流産のリスクを含めて関係が認められなかったという報告も多くみられ、「国際化学物質安全性計画」(International Program on Chemical Safety, IPCS)では、クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係はあるかもしれないが、さらに調査研

* 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 (Dept. of Environmental Eng., Kyoto University)

** 東京設計事務所 (Tokyo Engineering Consultants Co. Ltd.)

究が必要であるとしている³⁾。

水処理上、EDSTACが勧告した6つの混合物の中に「消毒副生成物」が含まれていることは重要なことと認識する必要があるだろう。上水道としても、内分泌攪乱誘発の可能性のあるものとして取り上げ、対応策を検討しておく必要があると考えられる。

実際、著者らの研究で、琵琶湖水中からエストロゲン様作用を検出するとともに、その作用は塩素処理によって増大することがわかった^{4,5)}。また、試薬フミン酸を用いた実験でもエストロゲン様作用は塩素処理によって増大した。この実験的知見は、内分泌攪乱誘発性からみた安全管理が今後本格化すると考えられる中で、個別の化学物質のほかに消毒副生成物も管理対象とすべきであることを示唆したものとして重要と考えている。

以上の背景のもと、本研究の目的の第一は、自然水中のエストロゲン様作用の構成成分を把握、推定した上で、塩素によってエストロゲン様作用が強められる原因について実験的検討を行うものとした。これまでに、琵琶湖からエストロゲン様作用を検出する実験を行ってきたが、この作用に個別物質として寄与しうるものは、17 β -エストラジオールと4-ノニルフェノールであると推定している^{4,5)}。内分泌攪乱作用が疑われる物質について琵琶湖で測定された濃度値からエストロゲン様作用の強さを推算し、これと濃縮した琵琶湖水のエストロゲン様作用とを比較した結果、現時点では、17 β -エストラジオールと4-ノニルフェノールの寄与が大きいと考えたものである。本研究ではまず、これら物質の水中濃度を測定しつつ、その寄与度について実験的考察を行う。その上で、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する要因について検討する。

一方、水道水からエストロゲン様作用が検出される事実に対し、水道としては上記の機構解明的アプローチに加えて、処理過程での挙動の把握や、現状での除去程度、技術選択の方向性などに関する基礎資料を整備していく必要があるだろう。この観点から、目的の第二として、凝集、活性炭吸着を取り上げ、エストロゲン様作用の処理性について検討する。

なお、本研究ではエストロゲン様作用を検出するためのバイオアッセイとして、MVLNアッセイを行う^{1,6)}。この方法は、EDSTACが、エストロゲン様作用を検出するための*in vitro*試験として最も推奨しているものである。試験に用いるMVLN細胞は、ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞に遺伝子導入し安定形質発現を実現したものである。この細胞を用いたアッセイは、化学物質がレセプターと結合した後の転写の活性化の程度を調べるものであるが、実際には転写活性化の結果産生されるルシフェラーゼの酵素活性を測定する。

2. 実験方法

2.1 MVLNアッセイ

MVLN細胞は、作製された機関から直接分与されたものを用いた⁶⁾。細胞培養には通常、ウシ胎児血清(FBS: Fetal Bovine Serum, HyClone社)を10%加えたDMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL社)培養液を使用するが、アッセイ時には、FBSからホルモン等の物質をCharcoal-Dextran処理により除去したDCC-FBS (HyClone社)を5%濃度でDMEMに加えた培養液を使用した。培養法、アッセイ手順はEDSTAC報告書に記載されている方法¹⁾にしたがった。まず、アッセイに用いる細胞は、使用の6日前からDCC-FBSを含む培養液で培養し、2日ごとに培養液交換を行う。この細胞を24穴マルチウェルプレートに約10⁵cells/wellとなるように播種した。播種して2日後、試料を0.22 μ mフィルターで除菌ろ過しつつ新しい培養液とともに添加し、24時間培養した。試料を含む培養液を除去してから、試料を再度添加し、さらに24時間培養した。この後、細胞溶解液(ピッカジーン、東洋インキ製造(株))を加えて細胞を溶解し、発光基質液(ピッカジーン、東洋インキ製造(株))を使用して一般的なルシフェラーゼ・アッセイ⁷⁾を行った。ルミノメーターには、ベルトルドジャパン製Lumat LB9507を用いた。細胞を溶解した液中のタンパク質濃度はBCA法⁸⁾を用いて測定し、単位タンパク質あたりの発光量を求めた。

試料によって誘起されたルシフェラーゼの活性は、Sotoらの方法⁹⁾を参考に、17 β -エストラ

ジオールによって誘起される活性に対する百分率(%)を求めることにより、酵素活性相対値として表示した。また、ある試験物質の酵素活性相対値が最大値に達するときの投与濃度(モル基準)を C_i として、以下の式により最大活性濃度に対する17 β -エストラジオール(E_2)濃度値を求めた。この式において C_E は酵素活性が最大となる E_2 の最小濃度($0.27 \mu\text{g/L}=1.0 \times 10^{-9}\text{M}$)である。

$$\text{最大活性濃度に対する } E_2 \text{ 濃度値} = C_E/C_i \quad (1)$$

酵素活性相対値と最大活性濃度に対する E_2 濃度値を掛け合わせることで17 β -エストラジオールに対する作用強度(17 β -エストラジオールを1としたときの試験物質のエストロゲン様作用の強度)を求めることができ、これを用いて試験物質間の強弱比較を行う。

2. 2 自然水の濃縮方法

基本的にはフミン物質に対する濃縮法である¹⁰⁾。以下、概略を示す。①大津市渚公園付近の琵琶湖湖南湖表流水を採水。② $0.45 \mu\text{m}$ メンブレンフィルターでろ過した水6LをpH2に調整し、コンディショニング済みXAD7HP(オルガノ)樹脂カラム(30mm径、95mm長、容積70ml)に17.5ml/minで通水。③0.1N水酸化ナトリウム溶液で溶離し120mLを採取。④pH2に再調整した後、XAD7HP小カラム(10mm径、80mm長、容積8.0ml)に1.2mL/minで通水。⑤0.1N水酸化ナトリウム溶液10mLを通液し、10mL採取。⑥コンディショニング済み陽イオン交換樹脂(オルガノ製IR-120B)に通水し、洗浄用蒸留水2mLとあわせて最終的に12mLを得る。濃縮倍率は500倍となる。本法におけるTOCの回収率は16-20%であった。

この濃縮水をpH7.2に調整後、MVLN細胞に投与した。

2. 3 分子量分画

2. 2の方法で濃縮した試料について、分子量分布を把握するため分画を行った。分画に用いたUF膜は、Amicon社製直径14mmのYM1(公称分画分子量1000)、YM10(同10000)、YMT(同30000)で、洗浄した膜をAmicon社製MPS限外ろ過ユニットにセットした。これに濃縮水0.8mLをいれ、3000rpm(1350g)で30分間遠心分離を行い、ろ過液についてTOCを測定した。

2. 4 塩素処理

琵琶湖水、および2. 5に示す凝集処理水、活性炭処理水に対して塩素処理を行った。各試料水の塩素要求量(セントラル科学、CD-20型にて測定)に加えて、1.0mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを希釈して添加し、20℃、暗所に1日静置した。琵琶湖水の場合、1日後の残留塩素は0.7mg/L程度であった。

一方、17 β -エストラジオール(E_2)または4-ノニルフェノール(NP)の塩素処理については、それぞれの物質を蒸留水に入れ、次亜塩素酸ナトリウムを所定濃度添加して行った。それぞれの物質の保存液はエタノールであるが、希釈の結果、水中エタノール濃度は $\mu\text{g/L}$ レベルで塩素処理においては無視量と考えられた。塩素添加後、pH6.5、20℃、暗所に静置した。所定日数経過後、濃度測定およびMVLNアッセイを行った。

2. 5 凝集および活性炭吸着操作

琵琶湖湖南湖表流水(大津市渚公園付近)を採水し、ジャーテスターを用いて凝集処理を行った。凝集剤としてはポリ塩化アルミニウム(キシダ化学製)を用い、これを20mg/Lとなるように添加した。急速攪拌、緩速攪拌の後、15分間静置して沈殿させ、その後サイフォンによって上澄み水を採取した。凝集前の原水および凝集処理水ともに、2. 2に示した方法で濃縮した。10Lを15mLに濃縮したところ、TOCとしての回収率は18%であった。

上記の凝集処理水に対してさらに活性炭処理を行った。カルゴン社製粒状活性炭F400の新炭を使用し、粒径は0.85-1.15mm範囲とした。これを内径18mm、長さ300mmのガラスカラムに充填(充填高さ280mm)し、直列に4本連結した。処理は活性炭層厚がやや小さいほかは、通常の粒状活性炭処理¹¹⁾に近い以下の条件で行った。線速度9.4m/hr、空間速度8.4m³/m³/hr、接触時間7.1分、流量は上向流にて40mL/min。処理水は、TOCなどの水質を測定するとともに、凝集処理水と同様な濃縮を行いMVLNアッセイに供した。

2. 6 濃度測定方法

17β-エストラジオールは、試料水 1 L (pH5 に調整)を OASIS HLB カートリッジ (Waters 社製) に通水した後、ELISA(NEOGEN 社製キット使用)法で測定した^{12, 13)}。4-ノニルフェノールは、試料水 1 L (pH3.5 に調整)を OASIS HLB カートリッジ (Waters 社製) に通水した後、GC/MS で測定した¹⁴⁾。TOC は全有機体炭素計 (島津製作所、TOC-5000A) を用いて測定した。

3. 実験結果と考察

3. 1 水道原水のエストロゲン様作用の特性に関する実験結果

これまでに琵琶湖水からエストロゲン様作用を検出する実験を行った結果、その作用に個別物質として寄与しうるものは、17β-エストラジオールと4-ノニルフェノールであると推定した^{4, 5)}。ここではこれら物質の琵琶湖水中濃度を測定しつつ、その寄与度について考察を行う。

(1) 琵琶湖水の作用に対する 17β-エストラジオール、4-ノニルフェノールの寄与

琵琶湖水 (ろ過後)、および XAD7HP による濃縮水中の 17β-エストラジオールおよび 4-ノニルフェノール濃度を測定した。測定結果の例を表 1 に示す。XAD7HP による濃縮水についても OASIS HLB による固相吸着操作を行っている。

一方、濃縮琵琶湖水の MVLN アッセイの結果を図 1 中の実線に示す。酵素活性相対値で 20% 以下と大きくはなかった。

この作用に対する濃縮琵琶湖水中の 17β-エストラジオールおよび 4-ノニルフェノールの寄与について考えてみる。表 1 に示したように、500 倍に濃縮した琵琶湖水中の 17β-エストラジオール濃度は 0.039 μg/L である。図 1 での最高投与量は 250mL/mL-培養液で、このとき培地中に含まれる濃度は 0.020 μg/L となる。17β-エストラジオールのエストロゲン作用を図 2 に示すが、0.020 μg/L における酵素活性相対値は約 86% であると思積もることができる。このようにして描いたのが図 2 中の一点鎖線である。また、4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用試験結果を図 3 に示すが、同様の方法で計算し、図 1 中の破線を描いた。

図 1 からわかるように、含有 17β-エストラジオール、および 4-ノニルフェノールのみで、濃縮琵琶湖水の作用を大きく上回る作用を示すものと評価された。したがって水中有機物がこれら物質のエストロゲン様作用を抑制していることが考えられる。以下、この機構について検討するためにに行った実験結果を示す。

(2) 反応の相加、相殺作用について

2. 2 の方法で濃縮した琵琶湖濃縮水 (TOC 210mg/L) に 17β-エストラジオールを約 1.5 μg/L となるように添加した後、20℃、暗所に 3 日間静置した。濃縮した琵琶湖水中にも 17β-エストラジオールが含まれるが、表 1 に示すようにその濃度は 10⁻² μg/L オーダであり無視できる (実際の測定値は後に表 2 で示す)。静置後、MVLN アッセイ

表 1 琵琶湖水および濃縮琵琶湖水中の濃度例

	琵琶湖水(μg/L) (1999.12.11)	濃縮琵琶湖水 (μg/L)	XAD7HPによる回収率(%)
E ₂	0.0009	0.039	8.8
NP	0.8	85.6	22.6

(E₂: 17β-エストラジオール、NP: 4-ノニルフェノール)

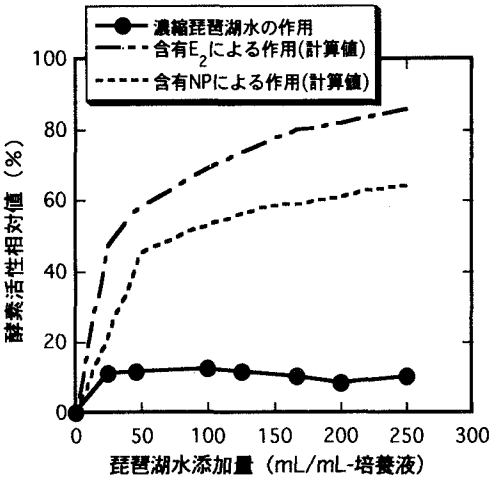


図 1 琵琶湖水のエストロゲン様作用と含有物質の作用との比較

E₂: 17β-エストラジオール、NP: 4-ノニルフェノール

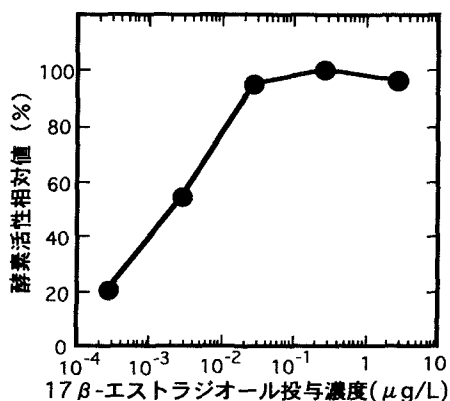


図2 17β-エストラジールのエストロゲン作用

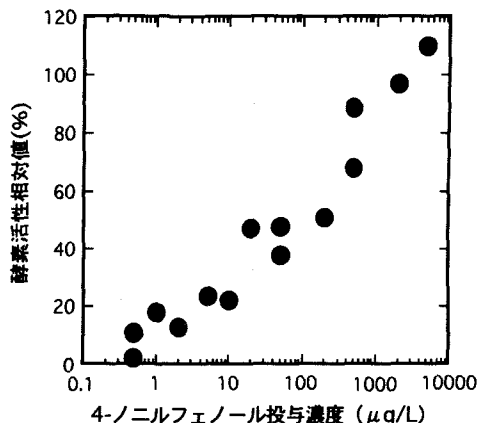


図3 4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用

に供した。同様に蒸留水に添加したものも20℃および4℃に静置し、その後、MVLNアッセイを行った。

結果を図4に示す。上記の溶液を100倍希釈したものまでのアッセイ結果を示している。上記のように、濃縮した琵琶湖水中に含まれていた17β-エストラジールは無視量であるため、横軸の濃度値は添加した17β-エストラジールの値のみを示している。17β-エストラジールは琵琶湖濃縮水と共存することで作用が低下することがわかる。理由としては以下が考えられる。①水中有機物がアンタゴニスト作用（弱いアゴニスト作用含む）を示す結果、17β-エストラジールとレセプターとの結合機会が減少し、17β-エストラジールの作用が見かけ上弱められた。②17β-エストラジールと水中有機物とが結合・相互作用した結果、17β-エストラジールの活性が弱められた。

なお、4-ノニルフェノールについては、水中での安定性が問題となり、結果は別に（4）で示す。

(3) ELISA法による17β-エストラジールの測定値について

自然水中の17β-エストラジール濃度をELISAによって測定すると、過大評価となることが報告されている^{15,16,17}。もし表1の17β-エストラジール濃度値が過大に評価されているとすれば、図1を用いて考察した内容も修正する必要があることになる。ここではフミン酸、および琵琶湖水中有機物の影響について調べた上で考察を行う。

試薬フミン酸（和光純薬）を、ここで用いた17β-エストラジールのELISAキットの試料として測定した結果を図5に示す。試薬フミン酸が、17β-エストラジール抗体と結合した結果、あたかも17β-エストラジールであるかのように測定されている。フミン酸は、過大評価の原因となりうるということがわかる。図5では、濃度的には試料とした試薬フミン酸に対して非常に低濃度の17β-エストラジール測定値となっているように見えるが、

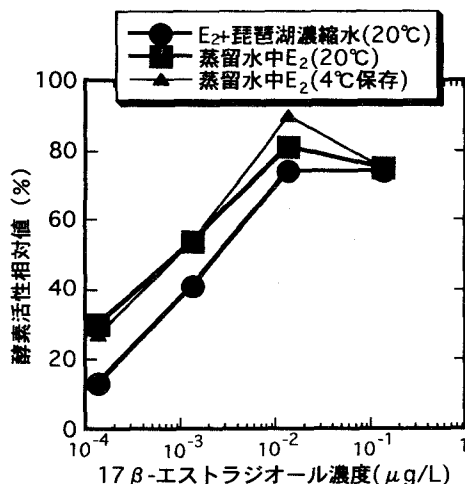


図4 琵琶湖濃縮水による17β-エストラジール(E₂)の作用抑制試験

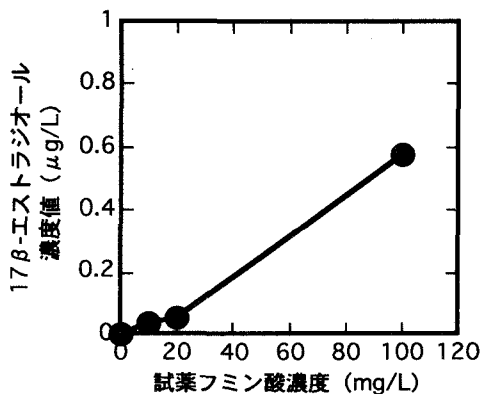


図5 17β-エストラジオールのELISA測定におけるフミン酸の影響

表2 琵琶湖濃縮水中および蒸留水中の17β-エストラジオール濃度測定結果

	17β-エストラジオール濃度 (μg/L)
琵琶湖濃縮水試料中	1.51
蒸留水中	1.61

水中の17β-エストラジオール濃度からみて、この程度の値でも十分過大評価の原因となりうる。

一方、図4の実験において、17β-エストラジオール濃度を測定した結果が表2である。琵琶湖濃縮水のTOCは210mg/Lであり、濃縮水中有機物が試薬フミン酸と同様の効果をもつとすると、図5より1μg/Lレベルの増大効果となりうるが、両

者に差はみられない。すなわち、試薬フミン酸と琵琶湖中有機物では特性が異なり、本研究で用いたXAD7HP樹脂によって濃縮された琵琶湖中フミン質による過大評価の効果は小さいと考えてよいだろう。しかし、17β-エストラジオールのELISA測定においては、他にも17β-エストラジオールに構造の似た交差反応性を示す物質群が存在し、表1の値が過大評価となっている可能性がある。

しかし、仮に表1の17β-エストラジオール測定値が数倍の過大評価になっているとしても、図2の作用試験における横軸は対数目盛であるため、図1の濃縮琵琶湖水の作用を含有17β-エストラジオールによる作用（計算値）が上回る事実に変化はなく、(1)で図1を用いて考察した内容に修正が必要になることはない。

(4) 4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用の安定性

(2)の実験と同様に、琵琶湖濃縮水に4-ノニルフェノールを5mg/Lとなるように添加し、20℃、暗所に3日間静置した。その後、MVLNアッセイを行った。同様に蒸留水に添加したものを20℃および4℃に静置し、その後、MVLNアッセイを行った。

結果を図6に示す。いずれもほとんどエストロゲン様作用はみられないという結果となった。

図3の4-ノニルフェノールそのものの試験結果と比較すると結果が全く異なることがわかる。この実験は図4と同様に、琵琶湖濃縮水による4-ノニルフェノールの作用抑制試験を行ったものであったが、4℃の蒸留水中でも作用が大きく低減する結果となった。

この結果に対しさらに以下のような確認および検討を行った。①蒸留水中の4-ノニルフェノール濃度をGC/MSで測定したところ添加量の82%値が得られ、ガラス容器への吸着などの影響は小さい。②細胞培養液中の共存溶媒であるエタノールの影響について検討したが、4-ノニルフェノールを水に溶解（1日間静置）した場合、培養液中でのエタノールの有無にかかわらずエストロゲン様作用はみられない。以上から、4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用は水中では不安定である可能性が考えられる。

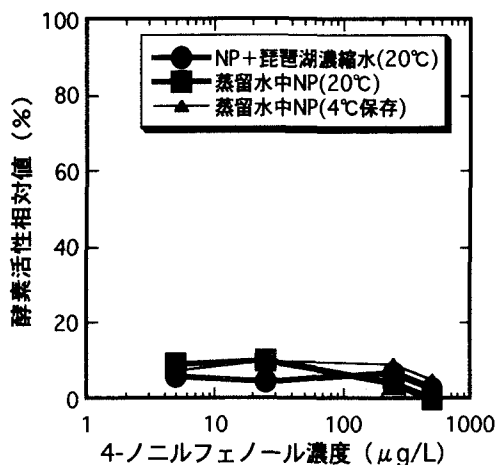


図6 4-ノニルフェノール(NP)のエストロゲン様作用の安定性

すなわち、図1では4-ノニルフェノールの作用を水中濃度から推定したが、4-ノニルフェノールは水中で実際にこのような作用を有するかどうかは疑問である。

(5) ま と め

以上の結果を総合すると、琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用に個別物質として寄与する主たる物質に17 β -エストラジオールが考えられるが、その作用は琵琶湖水中有機物と共存することで大きく抑制されていると推定される。

一方、本研究ではXAD7HP樹脂を用いる方法で琵琶湖水を濃縮しているが、表1に示すように、17 β -エストラジオールおよび4-ノニルフェノールの回収率はそれぞれ10%以下、20%程度であった。今後は、OASIS HLBなどを用いる固相抽出法と比較しつつ、水道水のエストロゲン様作用検出のための試料調製方法についてさらに検討する必要がある。

3. 2 塩素処理によるエストロゲン様作用の増大要因に関する実験結果

著者らのこれまでの検討で、琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用は、塩素処理によって増大することがわかった。また、試薬フミン酸を用いた実験でもエストロゲン様作用は塩素処理によって増大した^{4,5)}。ここではこれら増大要因を調べるために行った実験結果を示す。

(1) 17 β -エストラジオールと4-ノニルフェノールの塩素処理によるエストロゲン様作用の変化

はじめに、17 β -エストラジオールと4-ノニルフェノールについて、塩素による分解性とエストロゲン様作用変化を調べた。図7は濃度変化の測定結果である。この間、残留塩素は17 β -エストラジオールの場合で約0.9mg/L、4-ノニルフェノールの場合で約0.4mg/Lに保たれていた。17 β -エストラジオールの場合、10日間で約1/100となっており、4-ノニルフェノールと比べると塩素分解は比較的緩やかである。また、4-ノニルフェノールは3日目以降、定量限界(0.1 μ g/L)付近まで低下していった。

一方、17 β -エストラジオールについて1日後のエストロゲン作用変化を調べた結果を表3に示す。ELISAによって濃度は1日後65%残存していると測定された(図7)が、エストロゲン作用の残存率はわずか3.6%であると評価された。レセプターとの結合性に変化を与える反応が起きている可能性がある。

また4-ノニルフェノールについては、図6に示したように、エタノール溶媒中で保存している

ものを水で希釈、静置するだけでエストロゲン様作用が大きく低減する特徴がみられ、塩素処理後の作用もほとんどみられなかった。

琵琶湖水のエストロゲン様作用に個別物質として寄与しうるものは、17 β -エストラジオールと4-ノニルフェノールであると推定したが、以上のように、塩素処理によってその作用が増大する現象はみられず、これら2物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大要因ではないと考えられる。

水中有機物と相互作用によって溶解していた17

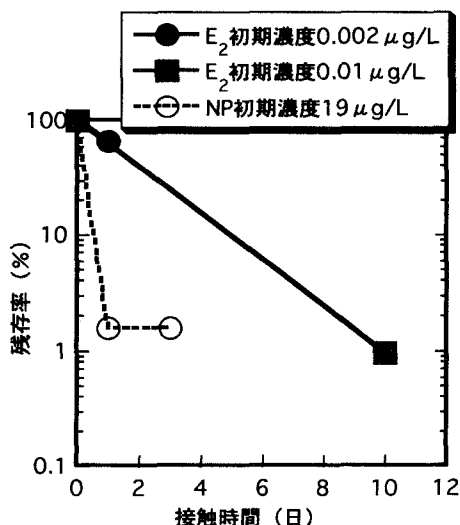


図7 17 β -エストラジオール(E₂)と4-ノニルフェノール(NP)の塩素による分解性

表3 17 β -エストラジオールの塩素分解におけるエストロゲン作用の変化

	酵素活性相対値 (%)
塩素処理前	91.0
塩素1日接触後	3.3 (残存率3.6%)

(17 β -エストラジオールの0.05 μ g/Lにおける作用で比較)

β -エストラジオールや4-ノニルフェノールが、塩素の作用によって相互作用から解放される結果、エストロゲン様作用を増大させる可能性も考えられたが、仮にそのような機構があるとしても解放された物質は塩素によって分解されつつエストロゲン様作用を失うと考えられる。したがって、ここにとりあげた2物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大には寄与していないと考えられる。

(2) 塩素副生成物のエストロゲン様作用試験

クロロホルムなど典型的な副生成物を取りあげてMVLNアッセイを行った。試験結果は17 β -エストラジオールの作用強度を1として評価した。

結果を表4に示す。2,4-ジクロロフェノールを除きエストロゲン様作用はみられなかった。参考として示した物質の作用強度と比較すると、2,4-ジクロロフェノールの作用強度は、ビスフェノールA、4-ノニルフェノールといった強いエストロゲン様作用を示す物質と比較すると小さいことがわかる。2,4-ジクロロフェノールのエストロゲン様作用は、組み換え酵母を用いた試験法でも検出されている¹⁸⁾。

2,4-ジクロロフェノールの塩素処理水中濃度は低く、エストロゲン様作用に寄与するほどではないと考えているが、塩素処理水のエストロゲン様作用を調べる上でクロロフェノール類は今後検討すべき物質群といえる。

(3) 分子量分布の変化との関係

琵琶湖水の塩素処理の前後の水について、2.2の方法で濃縮し分子量分布の変化を測定した。

分子量分布の測定結果を図8に示す。注入塩素量は、1mg/L(塩素要求量に加えて)のほか、TOC:Cl=1:4での注入(塩素注入率9.6mg/L)も行った。これまでに塩素処理によってエストロゲン様作用は2倍程度に増大することを示した^{4,5)}。濃縮琵琶湖水中の有機物のうち、MVLN細胞中に入り、この作用に寄与するのは分子量1000以下であると想定すると、図8から、その分子量画分の増加はわずかである。すなわちエストロゲン様作用の増大において、塩素によって低分子化が進み、細胞内に入る物質が増えるという要因は大きくなく、塩素によって物質の構造自体が変化する影響の方が大きいものと推察される。

(4) まとめと考察

著者らのこれまでの検討で、琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用は、塩素処理によって増大することがわかっている⁴⁾が、この原因としては以下の可能性が考えられよう。

①塩素との反応により有機塩素化合物などが生成し、この中にエストロゲン様作用を持つ分子が存在した結果作用が強められた。

②有機物の酸化分解および加水分解により構成成分が低分子化

表4 典型的塩素処理副生成物のエストロゲン様作用試験結果

化合物名	エストロゲン様作用強度
クロロホルム	0
ジクロロ酢酸	0
トリクロロ酢酸	0
抱水クロラル	0
o-クロロフェノール	0
2,4-ジクロロフェノール	7.7×10^{-5}
(参考)	
17 β -エストラジオール	1.0
4-ノニルフェノール	7.8×10^{-2}
ビスフェノールA	3.3×10^{-3}
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	3.2×10^{-7}
フタル酸ブチルベンジル	3.1×10^{-4}
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	3.5×10^{-6}
4-エチルフェノール	3.4×10^{-3}
4-オクチルフェノール	2.5×10^{-4}
p-t-ブチルフェノール	3.0×10^{-2}
2-sec-ブチルフェノール	6.7×10^{-3}
2-tert-ブチルフェノール	6.7×10^{-5}
o-ヒドロキシジフェニル	1.2×10^{-4}
エピクロロヒドリン	1.4×10^{-5}

参考覧に示した物質の試験結果は文献4に記載のもの。

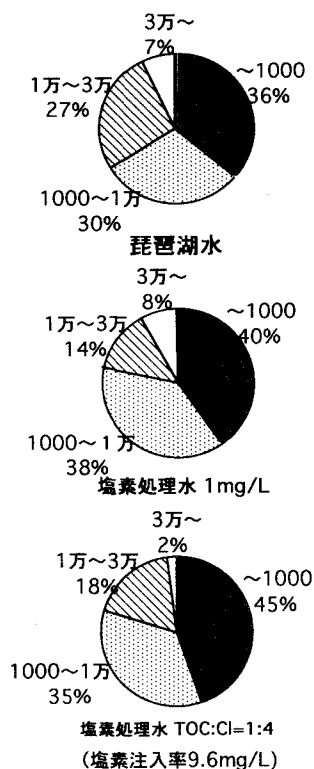


図8 琵琶湖濃縮水の分子量分布と塩素処理による変化

し、細胞膜を通過できる分子が増加した結果エストロゲン様作用が強められた。

③水中フミン物質との相互作用(錯体形成・吸着・分配・可溶化)で溶存していた微量の有機化合物(農薬等)が、フミン物質の構造の変化により開放され、エストロゲン様作用を増加させた。

ここでは上記3つの可能性を念頭に、塩素処理によって作用が増大する要因について検討を行った。まず、②の影響は小さいことが示された。また、③の可能性はあるにしても、 17β -エストラジオールの実験で示したように、相互作用が解放された後、塩素と反応し速やかにエストロゲン様作用を失う可能性が高い。したがって、主として①の要因、すなわち、塩素による塩素化または酸化作用の結果生成する物質の効果が大きいものと推察される。エストロゲン様作用を有する塩素処理副生成物として、ここでは2,4-ジクロロフェノールをみいだした。

工学的立場からは、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、個別物質の除去に加えて、TOC、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される一般有機物の除去も重視すべきであると指摘しうる。

これまでの結果を総合すると、琵琶湖水のエストロゲン様作用に対する個別物質の寄与、および塩素による変化について、ほぼ図9のように理解できるものと考えられる。塩素処理前は、 17β -エストラジオールの作用が卓越しているが、水中有機物によって抑制され、琵琶湖水としては低い作用しか検出されない。塩素処理を行うと、フミン質を含む一般有機物の作用は増大する一方、 17β -エストラジオールの作用は大きく低減する。結果として、エストロゲン様作用は増大したものとして検出されることになる。

ただ、この構造および変化は琵琶湖水について推定されたもので、 17β -エストラジオールなどエストロゲン様作用を示す物質の存在量や自然水の特性などによって、また塩素の注入量によっても変化しうると考えられる。実際、河川水や下水処理水を対象として、塩素処理によってエストロゲン様作用が低減したとする報告^{19, 20)}と、増大したとする報告²¹⁾がみられ、試料調製方法を確立しつつさらに検討を行う必要がある。一方、個別物質の中にも、ビスフェノールAのように塩素との反応によってエストロゲン様作用が増大する物質²²⁾もあり、調査研究にあたっては留意する必要がある。

3. 3 エストロゲン様作用の浄水処理過程での処理性

琵琶湖原水、凝集処理水、凝集および活性炭処理水の水質測定結果を図10に示す。凝集および活性炭処理によってTOCは約80%除去されている。

MVLNアッセイの結果を図11に示す。まず、原水のエストロゲン様作用は、凝集によって半減し、さらに活性炭処理を行うことによってほぼ消失していることがわかる。活性炭処理にともなうエストロゲン様作用の低減は、TOCの除去性とほぼ対応しているものと考えられる。

また、図11には、これらの試料水を塩素処理したものの試験結果も示した。いずれの場合も、塩素処理を行った水の方がエストロゲン様作用は強い結果となっている。琵琶湖原水、凝集処理水、凝集および活性炭処理水の順に、エストロゲン様作用は低減しているものの、凝集および活性炭処理によってほぼ消失したエストロゲン様作用が塩素処理によってやや増大することがわかる。

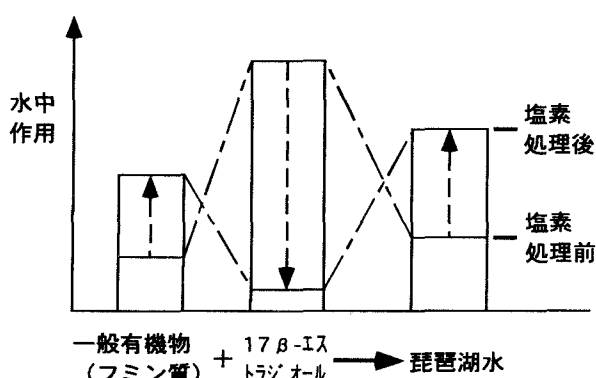


図9 水中エストロゲン様作用の構成成分と塩素処理による変化の推定図

---▶: 塩素処理を行ったときの作用変化

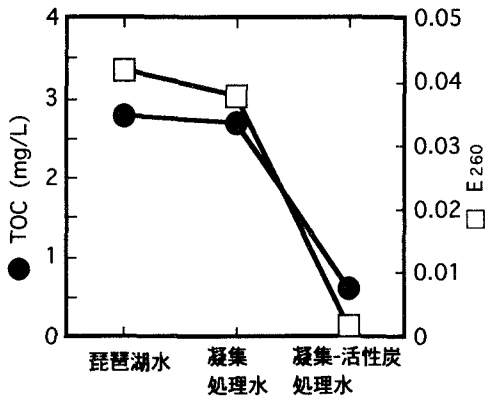


図10 凝集および活性炭処理における水質変化

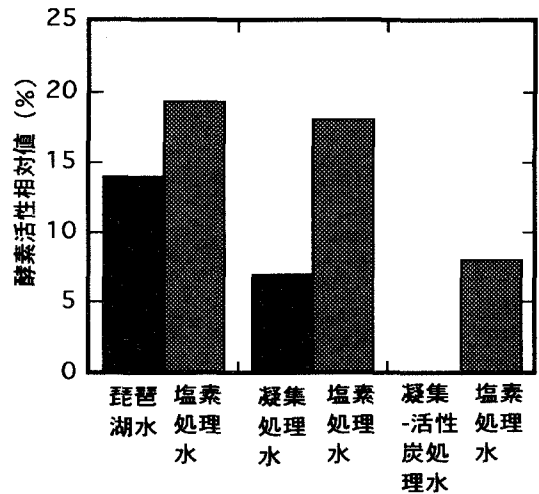


図11 琵琶湖水のエストロゲン様作用の変化

一方、これらのエストロゲン様作用とその変化に対する個別物質の寄与については、3. 1 および 3. 2 で論じたのと同様な説明が可能である。まず、濃縮水中に含まれる 17β -エストラジオールから計算されるエストロゲン作用強度は、図11の琵琶湖原水的作用強度を上回っている。すなわち、 17β -エストラジオールのエストロゲン作用は、琵琶湖水中有機物との相互作用により抑制されていると考えられる。また、塩素処理によって 17β -エストラジオールのエストロゲン作用は大きく低減するので、図11に示される塩素による作用の増大要因は 17β -エストラジオールにあるのではない。

以上まとめると、図11中の塩素処理前の水のエストロゲン様作用に対しては、フミン質を含む一般有機物の他に個別物質として 17β -エストラジオールが寄与している可能性がある。しかし、塩素処理後のエストロゲン様作用に対しては、水中有機物の塩素化または酸化作用の結果生成する物質の効果が大きいものと考えられる。

なお、 17β -エストラジオールをはじめ4-ノニルフェノールなどの凝集、活性炭処理過程での濃度変化は測定しておらず、今後の課題である。

本実験において最も重要な点は、水道水のエストロゲン様作用においても、いわゆるトリハロメタン問題と同じ構造の問題が存在することが明らかになったことである。すなわち、水処理後の残存有機物と塩素とが反応すればトリハロメタンが必ず生成するのと同様に、残存有機物と塩素との反応によりエストロゲン様作用が生成することがわかった。

工学的立場からは、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、現在、調査研究の対象としてリストアップされているような個別物質の除去に加えて、塩素接触前に、TOC、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される一般有機物の除去も重視すべきであると指摘しうる。

4. 結 言

(1) 水中エストロゲン様作用の構成成分と塩素による変化について

琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用に個別物質として寄与する物質のひとつに 17β -エストラジオールが考えられるが、その作用は琵琶湖水中有機物と共存することで大きく抑制されていると推定された。水中のエストロゲン様作用の構成成分と塩素による変化について、図9のように推定した。塩素処理によるエストロゲン様作用の増大要因については、塩素による塩素化または酸化作用の結果生成する物質の効果が大きいものと推察された。

(2) 浄水処理過程での処理性について

琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用は、凝集、さらに活性炭処理を経るにつれて低減し、活性炭処理後の作用はほぼ消失した。活性炭処理にともなうエストロゲン様作用の低減は、TOCの除去性とほぼ対応しているものと考えられた。一方、塩素処理を行うと、エストロゲン様作用はいずれの水でも増大した。

重要な点は、水道水のエストロゲン様作用においても、いわゆるトリハロメタン問題と同じ構造の問題が存在することが明らかになったことである。すなわち、水処理後の残存有機物と塩素とが反応すればエストロゲン様作用が生成することを指摘した。

工学的立場からは、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、個別物質の除去に加えて、塩素接触前に、TOC、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される一般有機物をできるだけ除去しておくことが重要であるといえる。

謝辞 本研究を行う機会を与えていただいた、京都大学 住友恒教授に謝意を表す。また本研究の一部は、平成11年度厚生科学研究費補助金、および日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究(C) (課題番号 11650559, 平成11-12年度)の助成を得て行ったものであり、ここに謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC): Final Report, 1998.
- 2) K. Waller, S.H. Swan, G. DeLorenze, and B. Hopkins: Trihalomethanes in Drinking Water and Spontaneous Abortion, *Epidemiology*, Vol.9, pp.134-140, 1998.
- 3) International Programme on Chemical Safety: Environmental Health Criteria, Disinfectants and Disinfectant By-products, 1998.
- 4) 平成10年度厚生科学研究費補助金 内分泌かく乱化学物質の水道水からの暴露等に関する調査研究報告書, 5.2 MVLN アッセイ, pp.206-228, 1999.
- 5) S. Itoh, H. Ueda, T. Nagasaka, G. Nakanishi and H. Sumitomo: Evaluating Variation of Estrogenic Effect by Drinking Water Chlorination with the MVLN Assay, *Proceedings of The 3rd IWA Specialized Conference on Hazard Assessment And Control of Environmental Contaminants-ECOHAZARD '99*, 5-8 Dec. 1999, Otsu, Japan, pp.92-99.
- 6) M. Pons, D. Gagne, J.C. Nicolas, M. Mehtai: A New Cellular Model of Response to Estrogens: A Bioluminescent Test to Characterize (Anti) Estrogen Molecules, *BioTechniques*, Vol.9, No.4, pp.450-459, 1990.
- 7) 横田崇, 新井賢一: 遺伝子導入と発現・解析法, 羊土社, 1997.
- 8) P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Grätner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk: Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*, Vol.150, pp.76-85, 1985.
- 9) A. Soto, C. Sonnenschein, K.L. Chung, M.F. Fernandez, N. Olea, and F.O. Serrano: The E-SCREEN Assays as tool to Identify Estrogens: An update on Estrogenic Environmental Pollutants, *Environmental Health Perspectives*, Vol.103 (Supplement7), pp.113-122, 1995.
- 10) E.M. Thurman and R.L. Malcolm: Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, *Environmental Science & Technology*, Vol.15, No.4, pp.463-466, 1981.
- 11) 生物起因の異臭味水対策の指針 1999年版, 日本水道協会, 345p., 1999.
- 12) 平成10年度厚生科学研究費補助金 内分泌かく乱化学物質の水道水からの暴露等に関する調査研究報告書, 270p., 1999.
- 13) 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.
- 14) 水町昌代, 小田原光宏, 山本仁史: アルキルフェノール及びビスフェノールAの同時分析法に関する検討, 第50回全国水道研究発表会講演集, pp.562-563, 1999.

- 15) Y.Goda, A.Kobayashi, K.Fukuda, S.Fujimoto, M.Ike and M.Fujita: Development of the ELISAs for Detection of Hormone-Disrupting Chemicals, Proceedings of The 3rd IWA Specialized Conference on Hazard Assessment And Control of Environmental Contaminants-ECOHAZARD '99-, 5-8 Dec.1999, Otsu, Japan, pp.121-128.
- 16) 高橋明宏, 小森行也, 矢古宇靖子, 岡安祐司, 齊藤正義, 東谷忠, 田中宏明: 下水試料中の女性ホルモン測定法の課題—LC/MS/MSとELISAの比較から—, 第3回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.175-176, 2000.
- 17) 森川良雄, 飯田邦裕, 松本茂之: 水中17 β -エストラジオール分析におけるELISA法及びGC/MS法の比較検討, 第3回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.177-178, 2000.
- 18) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み換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.
- 19) 赤塚靖, 鎌田素之, 武田誠, 亀井翼, 眞柄泰基, 西川淳一, 西原力: 水処理プロセスにおけるEstrogen活性の挙動に関する研究, 第34回日本水環境学会年会講演集, p.204, 2000.
- 20) H.Takigami, T.Matsuda, and S.Matsui: Detection of Estrogen-like Activity in Sewage Treatment Process Waters, Environmental and Sanitary Engineering Research, Vol.12, No.3, pp.214-219, 1998.
- 21) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 下水処理場内でのエストロゲン様活性の挙動, 第34回日本水環境学会年会講演集, p.419, 2000.
- 22) 胡建英, 大久保慎二, 相澤貴子: フェノール類の塩素処理副生成物のエストロジェン様作用の評価, 第34回日本水環境学会年会講演集, p.573, 2000.