

京都大学大学院工学研究科環境工学専攻

○ 伊藤禎彦

同上

野中 愛

同上

早坂剛幸

1. はじめに

筆者らはこれまでに、自然水のエストロゲン様作用とその塩素処理による変化について検討を行ってきた。その結果、水道水のエストロゲン様作用に関して、水処理の後なお残存する有機物と塩素が反応すればエストロゲン様作用が新たに生成するという点で、いわゆるトリハロメタン問題と同じ構造を有することを指摘したり。そこで本文では、塩素処理によるエストロゲン様作用の生成とその後の変化特性について調べ、「中間体」や「生成能」を含むトリハロメタン問題と同様な概念を形成していけるかを検討することとした。基礎実験としてここでは、水中有機物の主体をなすフミン物質に焦点をあて、その塩素処理水のエストロゲン様作用が加水分解をうけてどう変化するかをバイオアッセイを用いて測定した。

2. 実験方法

2. 1 試薬フミン酸の塩素処理および加水分解

試薬フミン酸 (Aldrich) 3.0g を 0.1N NaOH 1 L 溶液に一晩攪拌して溶解させ、グラスファイバーろ紙を用いて不溶成分をろ別した後、HCl を用いて pH7.0 に調整し試薬フミン酸溶液とした。このフミン酸溶液（最終濃度 820mg-TOC/L）を pH5.0 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液（最終 100mM）と共存させ、次亜塩素酸ナトリウム溶液（最終 1500mg/L）を添加し、20℃の暗所で 2 日間静置して塩素処理を行った。静置後の残留塩素はゼロであり、この溶液を塩素処理水とした。次に、pH を 7 および 10 に調整し、その後のエストロゲン様作用の経時的変化を測定した。また、塩素処理水の pH を所定の値に変化させるとともに 80℃湯浴で 1 時間保温する操作も行った。保温後ただちに氷冷し、エストロゲン様作用の変化を測定した。

2. 2 MVLN アッセイ

エストロゲン様作用を検出するためのバイオアッセイは、MVLN 細胞を用いるルシフェラーゼアッセイを行った^{2,3)}。この方法は「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) 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。

MVLN 細胞は、作成された機関から直接分与されたものを用いた³⁾。細胞培養には通常、ウシ胎児結成 (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にしたがった²⁾。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った。この細胞を 24 穴マルチウェルプレートに約 5×10^4 cells/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、48 時間培養した。フミン酸としての添加濃度はすべて 20mg-TOC/L とした。

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・アッセイを行った。細胞を溶解した液中の蛋白質濃度は BCA 法を用いて測定し、単位蛋白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、 17β -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⁴⁾。

3. 実験結果と考察

3. 1 pH変化の影響

塩素処理後の試薬フミン酸に対し、そのpHを変化させ、エストロゲン様作用の経時変化を測定した結果を図1に示す。残留塩素がすでにないにもかかわらず、ただ静置するだけで、エストロゲン様作用が次第に増大する結果となった。pH7、10としたものの共にエストロゲン様作用は経時的に増大したが、pH10の方が速やかに増大している。これはpHを10にすることで塩素処理水中の有機物の加水分解が促進されたためと考えられ、いわゆるトリハロメタン問題と同様に、エストロゲン様作用においても、塩素処理後、時間が経過し加水分解が進むことによって作用が増大する特性をもつことを示している。しかし、pH10とした場合、3日目に作用が大きく低減しており、塩素処理水のエストロゲン様作用は、塩素処理後、加水分解が進むとともに次第に増大するものの、加水分解がさらに進むと低減に転ずると推定することができる。

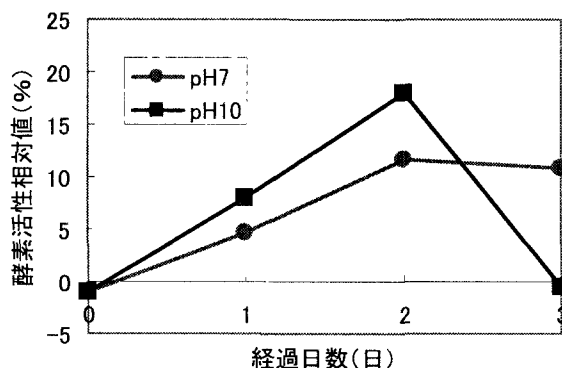


図1 塩素処理水のエストロゲン様作用の経時変化

3. 2 pH変化と加熱の影響

一方、加水分解を促進するためには、pHを高めるほかに水温を高める方法がある。そこで塩素処理水のpHを変化させるとともに80℃で1時間保温しエストロゲン様作用の変化を測定した結果を図2に示す。pH7、pH8で保温した場合、塩素処理水のエストロゲン様作用は大きく増大したが、pH9以上の条件で

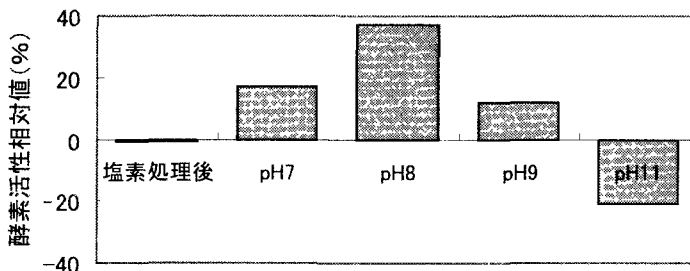


図2 塩素処理水の加熱によるエストロゲン様作用変化

80℃保温した場合には増大した作用が低減に転じた。したがってこの結果からも、塩素処理後、加水分解が進むとともにエストロゲン様作用は次第に増大するものの、加水分解がさらに進むと低減に転ずると推定することができる。

3. 3 エストロゲン様作用の構造に関する考察

以上の結果から、水道水のエストロゲン様作用は、塩素処理後、加水分解が進むにつれ増大していき、その後さらに加水分解が進むと低減するという特性をもつと思われる。しかし、水道水の配水過程のような中性、常温の条件下に限ると、塩素処理水のエストロゲン様作用は増大していく方向にあると考えてよいだろう。すなわち、実用上は、水道水のエストロゲン様作用について図3のような構造であると推定でき、「エストロゲン様作用中間体」、「エストロゲン様作用生成能」として定義できる成分が存在しているものと思われる。つまり、塩素処理が終了した直後はエストロゲン様作用を示す成分は少ないが、「中間体」が存在してお

り、時間とともにエストロゲン様作用を示すものになっていくと考えられるのである。

トリハロメタン生成の場合^{5,6)}、塩素で生成した全有機ハロゲン化合物のうち、トリハロメタンはごく一部を占めるにすぎない。塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の中に、トリハロメタン中間体が存在し、時間とともにトリハロメタンに変わっていく。トリハロメタンと中間体をあわせた全体は、トリハロメタン生成能とよばれている。トリハロメタンの生成過程は反応速度とともに理解され、例えば、配水過程でトリハロメタン濃度が増大していく事実や、中間塩素処理の有効性と限界に関する説明が可能となっている。この意味にお

いて塩素処理水のエストロゲン様作用の生成特性は、トリハロメタン生成の構造と同一であるということができ、実用上、「エストロゲン様作用中間体」、「エストロゲン様作用生成能」とよべる成分を想定できる。

一方、自然水中にはフミン物質を中心とする一般有機物の他、 17β -エストラジオールなどの個別化学物質が存在する。これら化学物質も塩素との反応によりそのエストロゲン様作用は変化するが、実際、筆者らは、 17β -エストラジオールや4-ノニルフェノールが塩素によって分解され作用を失うことを確認している¹⁾。今後は、本研究で示したエストロゲン様作用の変化が自然水の塩素処理においていかに現れるかを調べることで、およびその上で水道水の試験方法⁷⁾を提示することが課題と考えている。

4. おわりに

試薬フミン酸の塩素処理水のエストロゲン様作用は、加水分解が進むとともに次第に増大するが、加水分解がさらに進むと低減に転じた。実用上は、「エストロゲン様作用中間体」、「エストロゲン様作用生成能」とよべる成分を想定することができ、塩素処理が終了した直後はエストロゲン様作用を示す成分は少ないが、「中間体」があり、時間とともにエストロゲン様作用を示すものになっていくと考えられた。これはトリハロメタンの生成特性と同一であることを指摘した。

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。

参考文献

- 1) 伊藤禎彦、長坂俊樹、中西岳、野中愛、百々生勢、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、環境工学研究論文集、Vol.37、pp.333-344、2000。
- 2) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC): Final Report、1998。
- 3) 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, Bio Techniques, Vol.9, No.4, pp.450-459,1990。
- 4) 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。
- 5) 丹保憲仁編著、水道とトリハロメタン、技報堂出版、273p.、1983。
- 6) 梶野勝司、塩素処理過程におけるトリハロメタン中間体の生成とトリハロメタン生成に及ぼす影響、水道協会雑誌、第51巻、第7号、pp.33-39、1982。
- 7) 伊藤禎彦、中西岳、野中愛、早坂剛幸、塩素処理にともなうエストロゲン様作用生成能と水道水の試験法に関する実験、環境衛生工学研究、Vol.15、No.3、pp.153-158、2001。

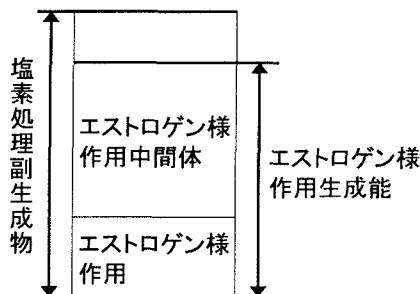


図3 塩素処理水におけるエストロゲン様作用生成機構