

分担研究報告書 6

浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の
推移把握手法の検討に関する研究

分担研究者 西村哲治、安藤正典

浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の推移把握手法の検討に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治 安藤正典

1. はじめに

水道原水には内分泌系をかく乱する恐れのある化学物質が種々含まれている可能性がある。これらの化学物質が浄水処理過程でどのように推移するかを把握することは、除去処理による効果や、水質管理を適切に行なうための方法を今後検討していく上で重要なことである。個々の化学物質の把握手法としての機器による分析手法に加え、対象生理作用のある化学物質を微量な成分を含めて総括的に把握することができ、かつ個々の化学物質の生理作用への共同作用も把握することが期待できる生物指標を用いた手法の検討を行なうこととした。本研究では、タンパク質を用いた系、酵母 Two-Hybrid 法及び MCF-7 レポーターアッセイの 3 種の試験法を用いて、同一試料を分担測定し、浄水過程における水質管理にこれらのスクリーニング法が適用できるか否かの検討を行なうための基礎資料を得ることを目的として、研究を進めることとした。

本年は分担担当として、水道原水を通常の処理系で処理した場合と高度浄水処理系で処理した場合について、浄水処理段階の浄水処理水を対象に、エストロゲン受容体に対する結合親和性をエストロゲンとの競合活性を指標として測定した。また、昨年度の本研究により給水栓水に混入する可能性も示唆された 4 種の化学物質を原水に人為的に加え、上記の浄水処理過程でどのようにエストロゲン様活性が推移するかを、同様のエストロゲン受容体に対する結合親和性をエストロゲンとの競合活性を指標として測定した。

本研究により、内分泌かく乱作用の点から、特に水道原水に含まれる内分泌をかく乱する恐れのある化学物質の除去方法および水質管理手法への今後へ向けた検討のための資料が得られることを期待している。

2. 実験方法

各浄水処理段階から対象とする試料水を各々 20 リットル分取し、参考資料 1 の「試料水の抽出・濃縮法」に従い千葉薬剤師会検査センターにおいて抽出・濃縮した。調製された抽出試料は、5 リットル分をジクロロメタンに溶解した形で提供された。送付された試料にジクロロメタンをさらに 0.5ml 加え、器壁を共洗いしてから窒素を吹き付けてジクロロメタンを除去し、抽出成分を乾固した。乾固した抽出物にジメチルスルホキシド (DMSO) を 50 μ l 加え、十分に溶解し、使用するまで -20°C に保存した。

試料水は、原水、通常処理系の試料水としては浄水処理過程にしたがって凝集沈殿水および砂ろ過水を採水した。また、高度浄水処理系の試料水として、浄水処理過程にしたがって凝集沈殿処理水、砂ろ過水、オゾン接触水、オゾン滞留槽出口水、生物活性炭処理 (BAC) 出口水および砂ろ過水を順次採水した。同様の抽出・濃縮処理を同容量の精製水についても行ない、実験ブランクとした。

人為的に添加した化学物質は、原水にフタル酸ジ-*n*-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-*n*-ブチル、ノニルフェノール (異性体混合物) およびビスフェノール A を、それぞれ 5 μ l/l になるように加え、未添加の場合と同様の設備の実験用浄水処理施設を用い、同様の抽出・

濃縮操作を行った。

エストロゲン様作用の活性測定は、エストロゲン受容体との結合親和性を、被験物質と蛍光標識したエストロゲンとの競合結合活性を指標として測定する方法によった。操作の概略は、蛍光標識したエストロゲンとエストロゲン受容体の複合体を含む反応液(PanVera Corporation, WI, USA; 宝酒造(株)販売) 98 μ l に DMSO に溶解した被験試料 2 μ l を混合し、室温で 60 分間平衡に達するまで静置した。この反応溶液中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光(360nm)を照射し、その蛍光物質から得られた偏光した蛍光の励起光を、Beacon 2000 蛍光偏光度測定装置(Full-Range Beacon 2000 TaKaRa Code VP2370: PanVera Corporation, WI, USA; 宝酒造(株)販売)を用いて、独立した3回の測定を行ない、平均値を算出した。測定した蛍光偏光度から、エストロゲン結合親和性阻害率は、下記の数式で算出し、エストロゲン様活性の推移の検討を行なった。

$$mA = 2000 \times mP \div (3000 - mP)$$

mA: 異方性

mP: 測定偏光度

$$\text{阻害率(\%)} = \{mA(0) - mA\} \div \{mA(0) - mA(100)\} \times 100$$

mA(0) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に結合した状態の異方性の値

mA(100) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に遊離した状態の異方性の値

mA : 被験物質を作用させた際の異方性の値

3. 結果と考察

本研究で用いた試験法の概念は、以下の考え方によっている。反応溶液中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光を照射すると、その蛍光物質から偏光した蛍光が得られる。この蛍光偏光の程度は、蛍光物質の溶液中の運動性に依存して得られる。すなわち、小さい分子は溶液中でブラウン運動を激しくしているため、偏光した励起光を当てても、蛍光の偏光性が一部失われて小さい蛍光偏光度しか得られない。一方、大きな分子は、ブラウン運動による影響が少ないため、蛍光の偏光性が失われず大きい蛍光偏光度が得られる。従って、測定条件が一定であれば、蛍光偏光度を測定することにより蛍光物質(複合体)の分子の大きさを推定することができる。対象物質がエストロゲン受容体と親和性を有する場合、エストロゲン受容体と複合体を形成しているエストロゲンと置き換わり、エストロゲン受容体と結合する。すなわち、蛍光標識したエストロゲンが受容体と分離すると、蛍光標識されたエストラジオールの分子(複合体)状態が、エストラジオール受容体と結合した大きな分子状態から、エストラジオール受容体から分離したエストラジオール自身の小さな分子と変化し、得られる蛍光偏光度が減少する結果が得られることと

なる。したがって、蛍光偏光度を測定することにより標識されたエストラジオールと被験物質のエストラジオール受容体との結合の状態が推定できる。言葉を代えて言えば、反応系に存在するエストラジオールとエストラジオール受容体との結合を、添加された被験物質が置き換わる（阻害する）程度を算定することができる。その程度を、標準物質として用いたエストラジオールのエストラジオール受容体との結合親和性と比較することにより、被験物質のエストラジオール様活性を算定する方法である。

被験試料水抽出物は、最終濃度が抽出試料水の 2000、1000、500、200、100、50、20 および 10 倍の濃度になるように反応液に添加した。前述の方法に従い、蛍光偏光度を測定し、エストロゲン結合阻害率（%）を算定した。被験試料水抽出物は、原水からの抽出物は褐色に呈色しており、浄水処理過程が進むに従って、褐色から薄黄色に外見的に色は薄くなっていた。呈色物質としては何が含まれているかは詳細な検討を行なっておらず、それらの成分は不明であるが、360nm 付近の蛍光を生じる物質が含まれていた。本研究で用いた測定法では、360nm の偏光した励起光をエストラジオールに結合した蛍光物質に照射し、偏光度の変化を測定することから、測定に妨害をきたすと考えられる。実際には 500 倍以上の濃度になるように抽出試料を添加した場合、偏光度の測定上限値を超える場合が出て、測定不能となった。したがって、以下の検討は 200 倍以下の濃度になるように抽出試料を添加した場合について行なうこととした。

図 1 に、対象物無添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。原水で見られるエストロゲン結合阻害率は、200 倍、100 倍、50 倍の場合ほぼ同一（各々、67.1%、67.9%、60.1%）であることから、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼし、正しい測定値を算出することができなくなっていると推察される。これらの結果からは、蛍光物質またはエストロゲン様物質のエストロゲン結合阻害率に及ぼす比率を明らかにすることができない。しかしながら、蛍光物質およびエストロゲン様活性物質を合わせた成分として考察すると、通常処理系での凝集沈殿処理及び砂ろ過処理では、この試験系で測定される両物質の合算量の削減効果は見られるが、必ずしも十分削減されず残存している可能性があると考えられる。

図 2 に、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。通常処理系ほどではないが、浄水処理過程の初期段階では、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼしていることが考えられる。高度処理系において、浄水処理過程の後期の段階に進むと、エストロゲン結合阻害率が大きく減少していることから、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の高度処理系での後期処理過程の削減効果は高いと考えられる（200 倍濃縮試料添加時、生物活性炭処理水（BAC 出口水））。その後の砂ろ過水でエストロゲン結合阻害率がわずかに上昇（エストロゲン結合阻害率；200 倍濃縮試料添加時 9.5%、100 倍濃縮試料添加時 14.2%）しているが、これについては現在のところ不明である。これらの結果から、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の削減にはオゾン処理および生物活性炭処理が有効と思われる。

図 3 に、4 種の対象化学物質添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。対象とした 4 化学物質を添加しない場合に比べ（図 1）、原水、凝集沈殿処理水及び砂ろ過水のどの場合もエストロゲン結合阻害率が高くなっている。これは、通常処理系では、対象とした 4 種の化学物質由来によるエストロゲン結合阻

害率に及ぼす作用を十分に削減できないことを示唆している。

図4に、対象物添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率(%)の推移を示す。対象とした4種の化学物質を添加しない場合に比べ(図2)、どの処理段階においてもエストロゲン結合阻害率が高くなっている。これは、高度処理系においても対象とした4種の化学物質由来によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を完全に削減できない可能性を示唆している。特に、浄水処理初期の凝集沈殿水、砂ろ過水では、ほとんど同レベルでエストロゲン結合阻害率が推移しており、これらの処理では対象とした4種の化学物質によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を削減することは十分でないと考えられる。この結果は通常処理系での結果とも一致している。また、対象物添加条件ではオゾン処理による削減効果は、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率の推移の結果(図2)と比べ、低い結果となっていた(100倍濃縮試料では27.9%、50倍濃縮試料では32.2%の削減効果)。対象物無添加条件のオゾン処理でエストロゲン結合阻害率が対象物添加条件に比べ減少した割合が高かったのは、①エストロゲン様活性物質の濃度が低いため、オゾン処理による反応が十分に進行した結果、エストロゲン様活性物質が分解されエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用が減少した割合が高くなった、②オゾン処理で分解効率が高かったのは添加した4種の化学物質とは異なるエストロゲン様活性物質であり、③または蛍光物質であり、添加された4種の化学物質の分解効率が悪いために残存した結果、対象物無添加条件に比べ対象物添加条件ではエストロゲン結合阻害率に及ぼす影響が大きく観察された、等の可能性が考えられる。オゾン滞留槽出口水ではさらにエストロゲン結合阻害率が減少していることから、オゾン処理の時間が分解効率に及ぼす影響も考慮する必要があるかもしれない。

さらに、オゾン処理を含め各浄水処理過程でのこれら4種の化学物質の挙動を把握することにより、浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の推移に関する情報が蓄積されるものと思われる。

4. おわりに

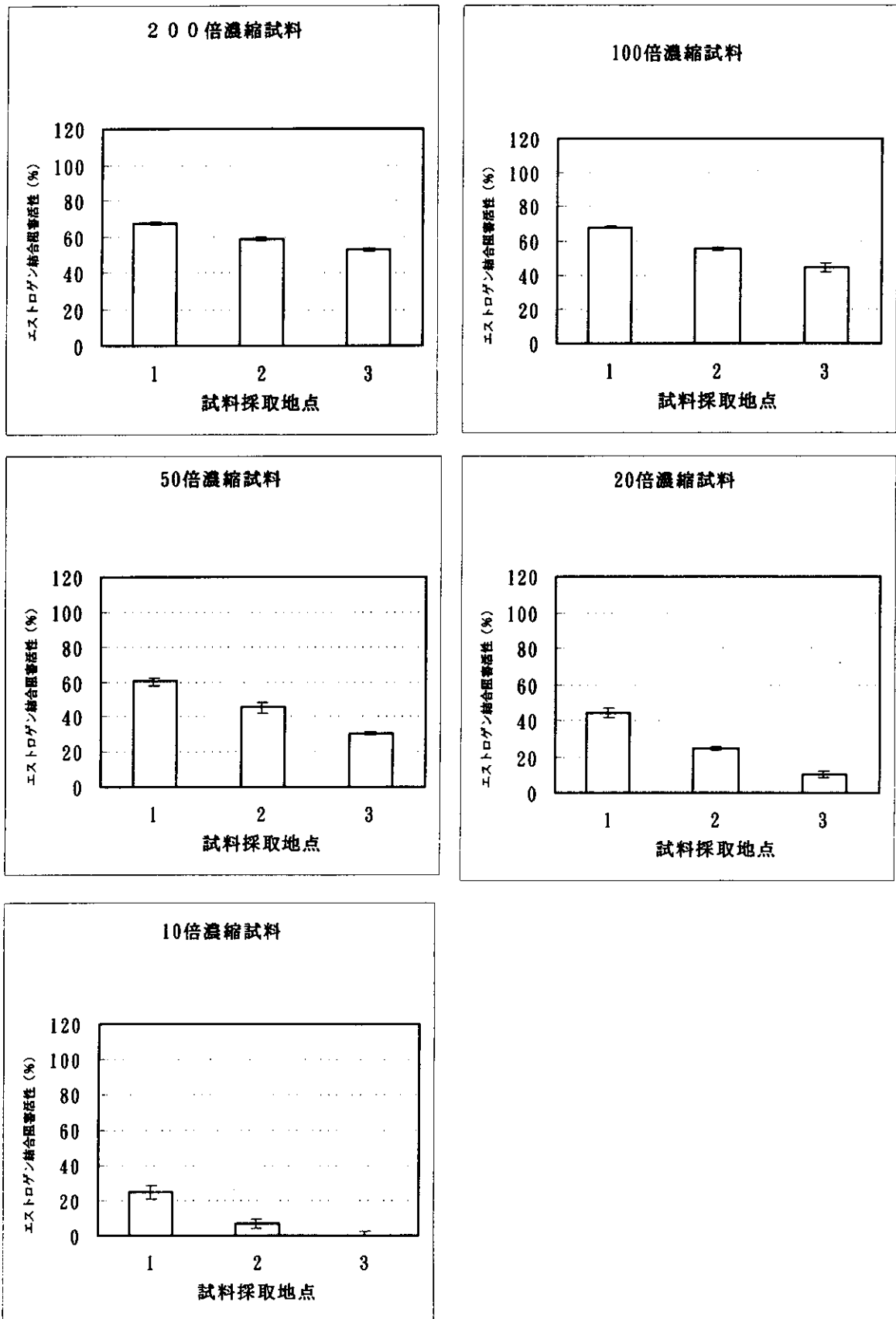
本試験研究において、浄水処理により原水に含まれている蛍光物質またはエストラジオール様物質は削減されていることが示唆された。削減効率は、通常処理系に比べ高度浄水処理系の方が高いと考えられ、特に、オゾン処理およびBAC処理後には蛍光物質またはエストラジオール様活性物質が削減されていると思われる。しかし、BAC処理後、砂ろ過処理をすることによりエストラジオール様活性がわずかではあるが上昇する傾向が見られた。通常処理系や高度処理系の初期段階での凝集沈殿や砂ろ過処理では削減効果は不十分な結果であった。

蛍光偏光度によるエストロゲン様活性物質の検討には、原水を10000倍濃縮すれば充分であった。また、試料量としては、最少量15 μ lで試験は可能であった。ブランクの1000倍濃縮試料ではエストロゲン結合阻害活性が観察された。これは、使用した固相カートリッジのポリマー充填剤由来のエストロゲン様物質が十分除去されていなかった可能性が考えられる。カラムの前処理法に検討の余地が残されている。

濃縮試料は着色していた。呈色成分に蛍光物質が含まれており、本試験系では妨害作用を及ぼすと考えられる。得られた結果が、エストラジオール様活性だけを示すのではなく、

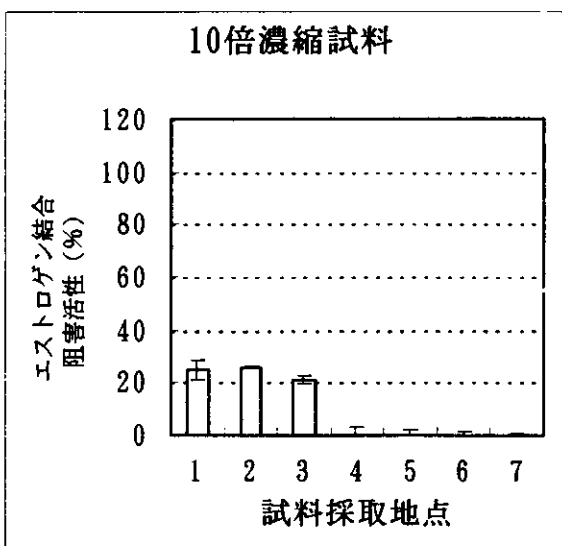
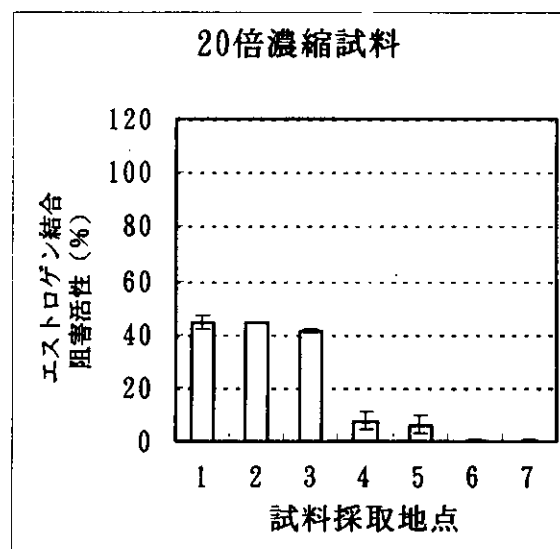
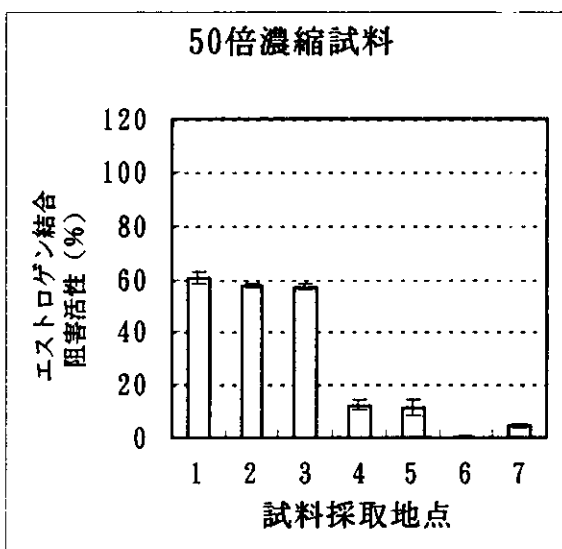
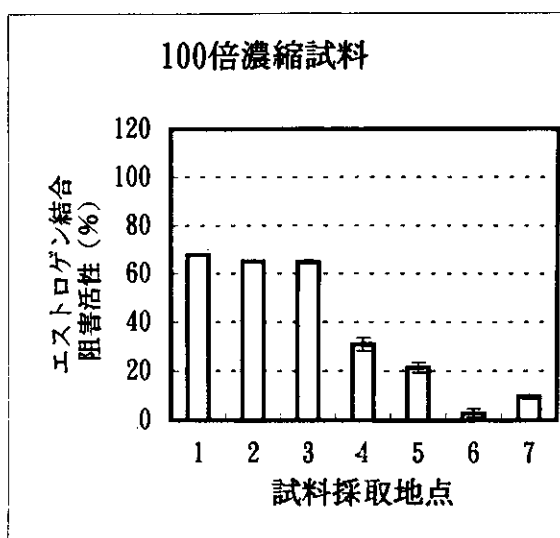
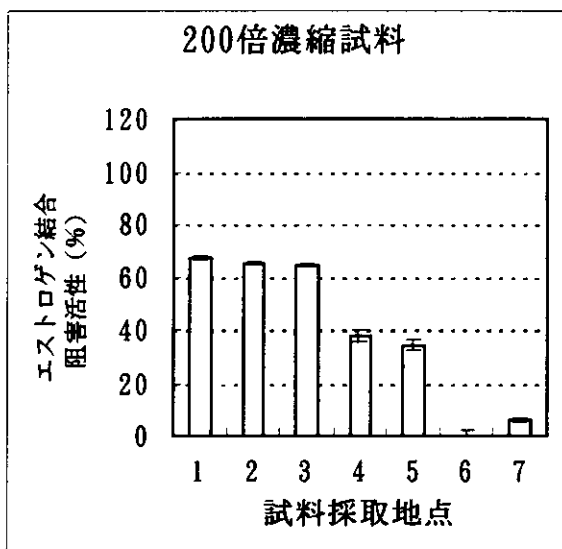
蛍光物質成分が偏光度を変化させている可能性が含まれていることを考慮しなければならない。また、抽出成分にタンパク質を変性させる物質が高濃度含まれている場合は、受容体（タンパク質）を変性させることにより蛍光標識されたエストラジオールを遊離し、偏光度を変化させる可能性も考慮しなくてはならない。今後、濃縮試料中の蛍光を生じる物質やタンパク質を変性させる物質の除去など、試料調製について検討していかなければならないであろう。

図1 対象物無添加における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン様活性の推移



試料採取地点 ; 1 : 原水, 2 : 凝集沈殿水, 3 : 砂ろ過水

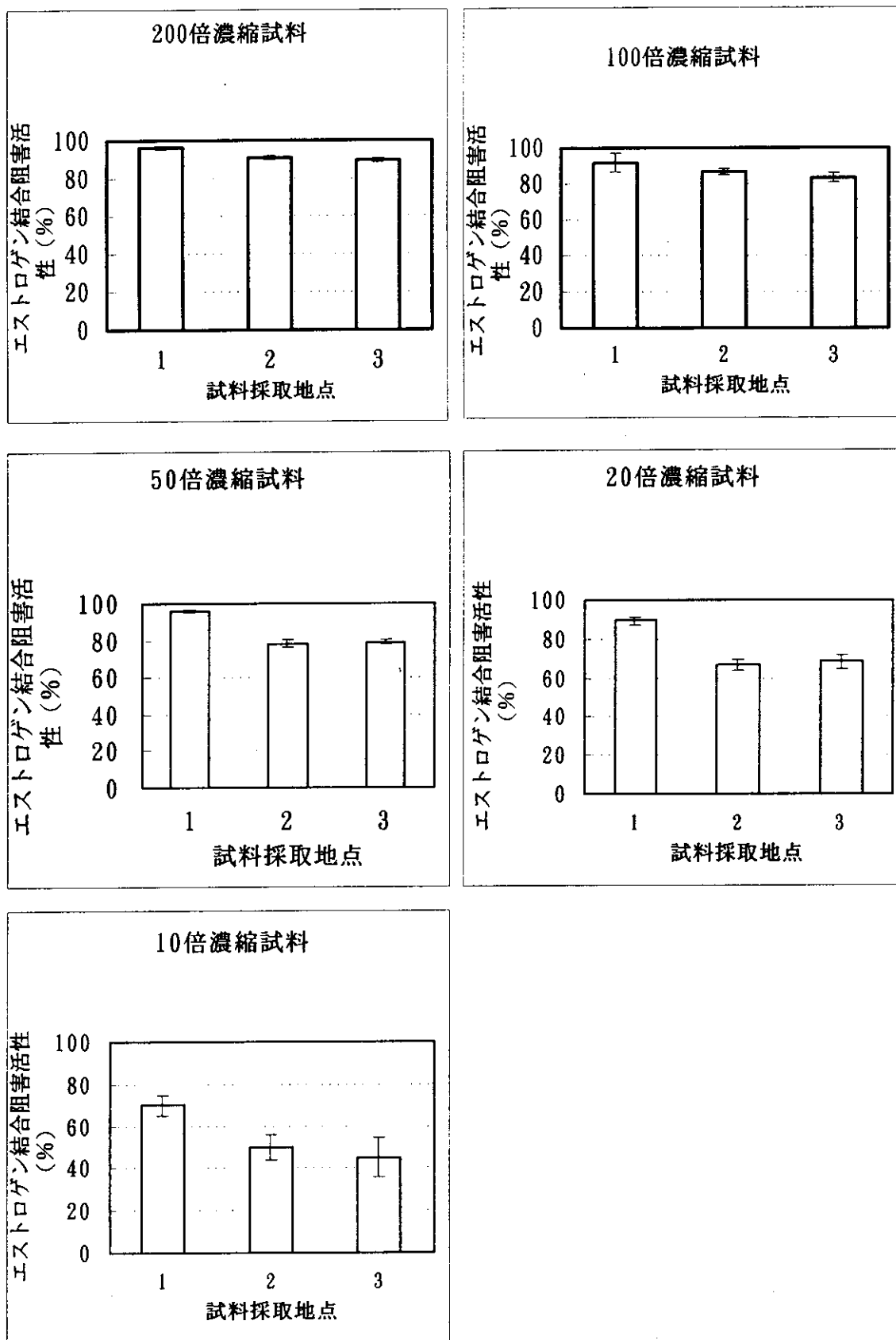
図2 対象物無添加における浄水処理過程高度浄水処理系でのエストロゲン様活性の推移



試料採取地点：

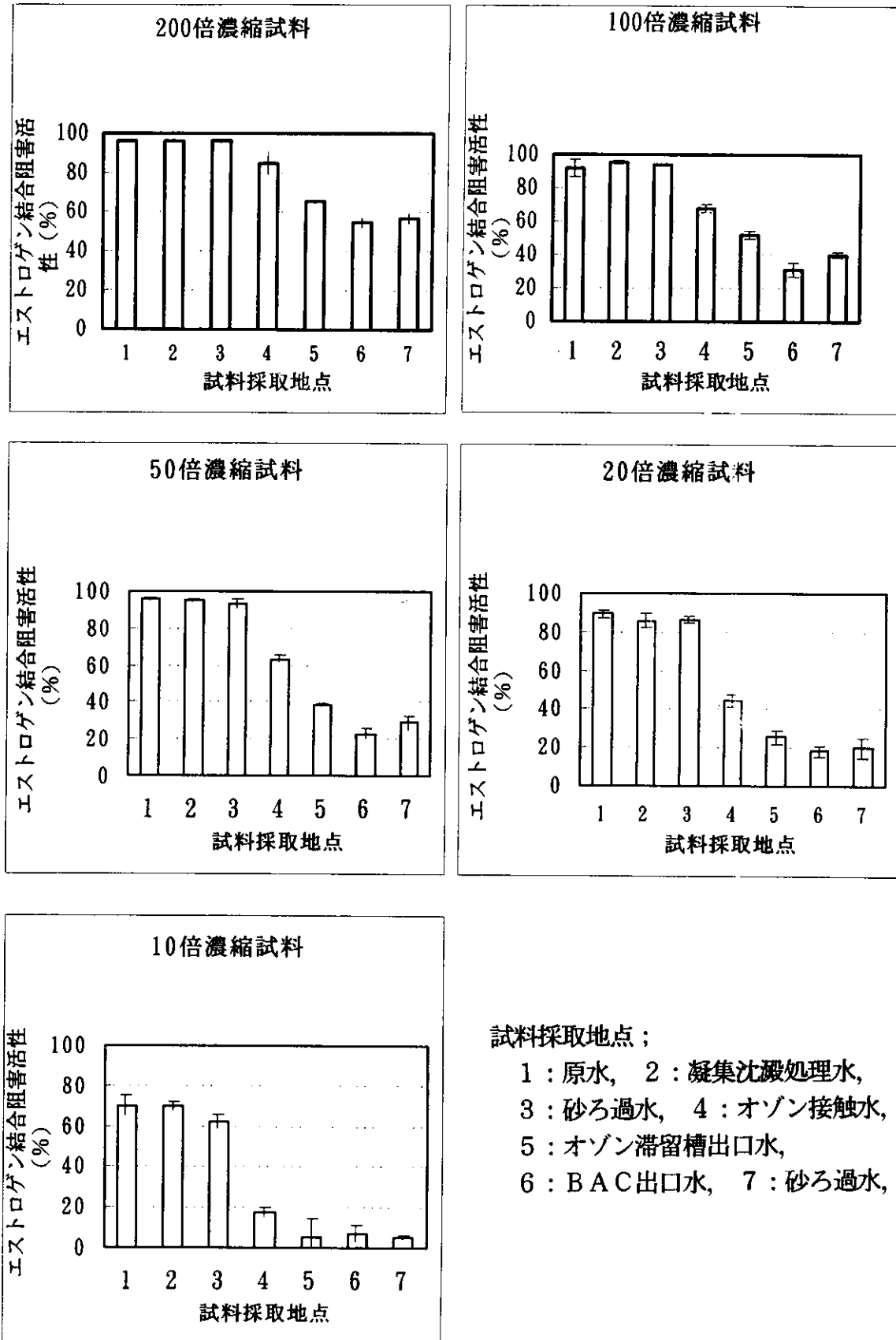
- 1：原水， 2：凝集沈殿処理水，
- 3：砂ろ過水， 4：オゾン接触水，
- 5：オゾン滞留槽出口水，
- 6：BAC出口水， 7：砂ろ過水，

図3 対象物添加における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン様活性の推移



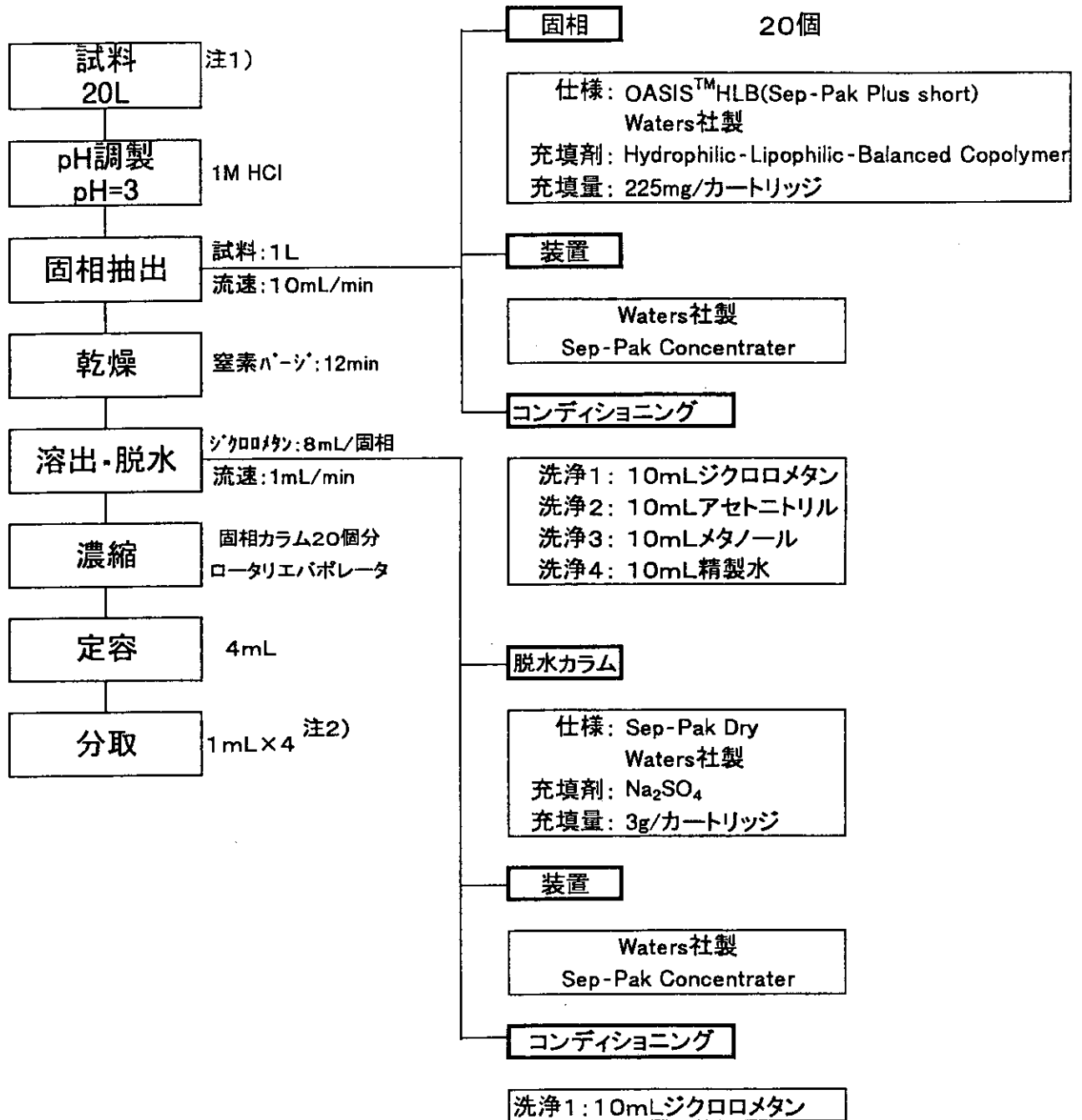
試料採取地点； 1：原水， 2：凝集沈殿処理水， 3：砂ろ過水，

図4 対象物添加における浄水処理過程高度浄水処理系でのエストロゲン様活性の推移



試料水の抽出・濃縮法

固相抽出分析フロー



注1) 固相の処理(通水)量は、1個につき最大1Lまでとした。

注2) 濃縮試料は、窒素パージで乾固寸前まで溶媒を留去した。

分担研究報告書 7

酵母Two-Hybrid法を用いた
エストロゲンの評価に関する研究

分担研究者 亀井 翼

平成11年度厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

分担研究報告書

「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」

－ 酵母 Two-hybrid 法を用いたエストロゲンの評価に関する研究－

分担研究者 北海道大学工学研究科 亀井 翼

研究要旨

昨年度と同様にラットのエストロゲンレセプターを組み込み、形質転換した酵母を用い(1)昨年度の知見の再確認、(2)環境水中に最大のバックグランド有機成分として存在するフミン質のエストロゲン発現性の検討と(3)複合成分系におけるエストロゲン活性発現パターンの検討(4)高度浄水処理システムおよび通常の浄水処理システムによる河川水のエストロゲン発現強度の低減効果の検討を行い以下のような知見を得た。

(1)酵母 Two-hybrid 試験においては positive control のみならず試料の析出による見かけの菌体増加及び真の菌体増加の有無を常に確認し、得られた逆U字型応答曲線がエストロゲン活性反応によって得られたものか、試料の析出あるいは菌体の非増加による見かけ上の逆U字型応答によるものかの判断が必要である。

(2)環境水のようにエストロゲン活性強度が異なる複数成分が共存する場合、エストロゲンの最大発現強度はその複合系における最もエストロゲン活性が強い1成分の最大発現強度に支配され、相加作用はプラス方向ではなくマイナス方向(共存成分による全エストロゲン活性の減少)に作用する。

(3)溶解性のエストロゲン活性成分は凝集処理でほとんど低減されないが、懸濁性成分に付着しているエストロゲン活性成分は凝集処理あるいは砂ろ過により除去されうる。

(4)エストロゲン活性成分は水道法に定められている給水端で0.1mg/L以上の残留塩素濃度を20時間程度確保する塩素添加量のみで十分に不活性化することができる。

(5)前置する砂ろ過により懸濁性成分に由来すると考えられるエストロゲン活性成分が除去されているためオゾン、生物活性炭によるエストロゲン活性成分の除去効果は確認できなかった。しかしながら、オゾン処理によるエストロゲン活性成分の新たな生成は認められない。

(6)母 Two-hybrid 法においては環境水中にバックグランド有機成分として多量に存在するフミン質(Sep-Pak C-18 Cartridge 吸着成分でかつメタノール溶離可能区分)のエストロゲン活性は塩素処理前のみならず塩素処理後でも認められなかった。

A.研究目的

昨年度は (1)水道原水として用いられている河川水中にエストロゲン発現成分が存在し、その主たる由来の一つが下水放流水由来であることを確認し、(2)下水放流水中のアルキルフエノールの濃度はエストロゲン発現に寄与出来る濃度レベルではなく 17 β -エストラジオール (E2) のような他の諸成分が下水放流水全体のエストロゲン発現に寄与している可能性があることを示した。さらに (3) 河川水中にエストロゲン発現強度の 30 - 60%は凝集処理により除去され、塩素処理では単独でほぼ 100% 除去されることを見出した。また(4) エストロゲン発現成分が複合系で存在しても相加効果は発現せず、むしろ相減効果が生じることを認めた。

本年度は昨年度と同様な酵母 Two-hybrid 法を用いて(1)昨年度の知見の再確認、(2)環境水中に最大のバックグラウンド有機成分として存在するフミン質のエストロゲン発現性の検討と(3) 河川水を原水とする高度処理システムがどの程度エストロゲン発現強度の低減に効果があるかを明らかにすることを目的とした。

B. 実験方法

1. 酵母 Two-hybrid 法¹⁾

昨年度と同様にラットのエストロゲンレセプターを組み込み、形質転換した酵母を用いる。レセプターにテスト物質が結合し活性化されると、レポーター遺伝子の転写が開始し、酵素蛋白である β -ガラクトシダーゼを分泌する。この酵素を ONPG という発色剤で呈色させ、吸光度(420nm 等)を測定し、所定の式に代入してエストロゲン強度として表現した。また必要に応じてエストロゲン活性値は、陽性対照である 17 β -エストラジオールの最大活性値を 100 として求めた比活性値で表した。

2. 酵母 Two-hybrid 法の実験手順

(1) SD 寒天培地上のイースト菌のコローニをポリプロピレン性プラスチック試験管中の SD 液体培地(2.5-4.0mL)に植菌し、10rpm、30℃で 18~24 時間振とう培養する。これが前培養液となる。

(2) 前培養液 50 μ L と SD 液体培地 200 μ L そしてサンプルを 2.5 μ L⁽²⁾ ずつマイクロテストチューブに加え、ボルテックスし、30℃で 4 時間振とう培養する。

(3) 培養液をボルテックスし、そのうち 150 μ L を 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーで吸光度 595nm を測定する。残った培養液を 15000rpm、4℃で 5 分間遠心分離する。

(4) 上澄み液をマイクロピペットで取り除き、そこに 1mg/mL の Zymolyase 20T を含む Z-buffer 200 μ L を加え、ボルテックスし、37℃で 15 分間静置させる。(細胞壁分解過程)

(5) 4mg/ml ONPG 溶液を 40mL 加え、ボルテックスし、30℃で 30 分間静置させる。(呈色

過程)

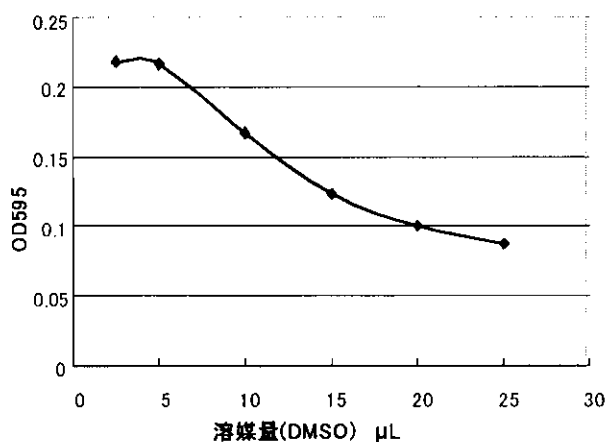


図1 OD595と溶媒量(DMSO)の関係

ーゼ (エストロゲン活性) の値を求める。

$$\text{エストロゲン活性} = 1000 \times [(\text{OD}420 - 1.75 \times \text{OD}570)] / [(v \times t \times \text{OD}595)]$$

ただし、 $t = 30\text{min}$ (ONPG による呈色時間)

$v = 50 \mu\text{L}$ (前培養液の体積)

(注) 溶媒量とイースト菌増殖の関係

サンプルの溶媒(DMSO)の量が、イースト菌に与える影響を図1に示した。図から溶媒が多いほどイースト菌の増殖を抑制することがわかる。したがって、実験ではサンプル量を $2.5 \mu\text{L}$ (全体量の $1/100$) とした。(図1)

3. エストロゲン活性測定結果の評価方法

試料のエストロゲン活性は、陽性対照である 17β -エストラジオール (E2) のエストロゲン活性と比較し、かつ吸光度 595nm (OD_{595}) の値に影響を与える因子を判定して3回の測定結果の平均を求めて評価した。

4. 吸光度 595nm (OD_{595}) の値に影響を与える因子の判定方法

(1) 試験物質が析出する (疎水性) 場合:

- (i) SD 液体培地 $250 \mu\text{L}$ にサンプル $2.5 \mu\text{L}$ を添加し、実験手順同様に 50°C で 4 時間振とうする。
- (ii) ボルテックスし、 $150 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートに移し、吸光度 595nm を測定する。
- (iii) (ii)の吸光度 595nm の値が、ブランク⁽⁷⁾の値よりも大きいときは析出が生じたもの

(6) $1 \text{MNa}_2\text{CO}_3$ $100 \mu\text{L}$ を加え、 15000rpm 、 4°C で 5 分間遠心分離する。

(反応停止過程)

(7) SD 寒天培地上のイースト菌のコロニーを SD 液体培地 $2.5\text{mL} \sim 4.0\text{mL}$ を入れたファルコンチューブ上澄み $150 \mu\text{L}$ を 96 穴マイクロプレートに移し、吸光度 420nm 、 570nm を測定する。

(8) 吸光度 420nm 、 570nm 、 595nm の値を次式に代入し、 β -ガラクトシダーゼ

とみなされる。

(2) 試験物質が毒性を有する場合:

(i) SD 液体培地 200 μ L と前培養液 50 μ L にサンプル 2.5 μ L を添加し、ボルテックスして 150 μ L を 96 穴マイクロプレートに移し、吸光度 595nm を測定する。

(ii) (i)の吸光度 595nm の値が実験手順3で求めた値と同等の場合、つまり4時間培養前後でイースト菌の増殖がないとき、増殖阻害、殺菌作用が生じたものと考えられる。

(注) SD 液体培地 250 μ L に DMSO 2.5 μ L を添加したもの。サンプルの溶媒はすべて DMSO である

5. 酵母 Two-hybrid 法を用いた複合試験

内分泌攪乱物質として 17 β -エストラジオール (E2)、エストリオール、DES、4-ノニルフェノール(NP)、ビスフェノール A(BPA)、フタル酸ジブチル、メトキシクロル、p-ヒドロキシ安息香酸 n-ブチル(SPF)、非内分泌攪乱物質として安息香酸をそれぞれ等量混合して試験した。

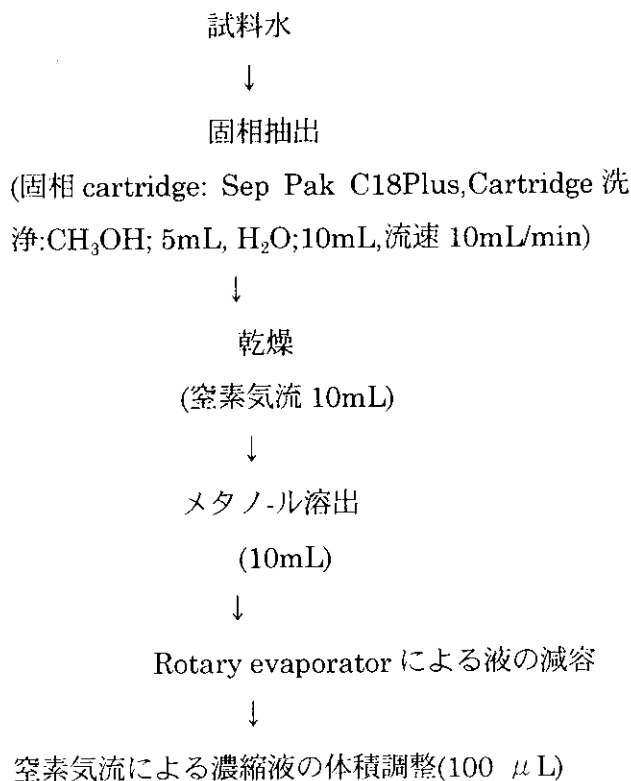


図2 環境水の濃縮手順

6. フミン質のエストロゲン活性値試験に用いた環境水

フミン質のエストロゲン活性値試験として実際の水道原水として用いられている根室市のオンネ沼(1cm セルを用いた紫外部 260nm の吸光度: 0.174)と北見市の常呂川(1cm セルを用いた紫外部 260nm の吸光度: 0.011)を用いた。

7. 試料の濃縮方法

今までに報告されているエストロゲン活性物質の大部分は水に難溶性の疎水性成分であるため、水中の微量成分の濃縮には固相カートリッジとして Sep Pak C18 Plus、濃縮装置として Sep Pak Concentrator (いずれも Waters 社製) を用い図 2 に示

すような手順で濃縮を行った。採水した下水処理場処理水（塩素処理前）等の環境水中の粗大懸濁性成分を除くためにはガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 社製）を用いてろ過を行った。ろ過水を 5mL のメタノールおよび 10mL の精製水でコンディショニングした Sep Pak C18 カートリッジに Sep Pak Concentrator を用いて、流速 10mL/min で通水した。固相カートリッジへの通水量は、Sep Pak C18 を直列に 2 つ接続したのに対して 2.5L までとした。通水終了後、精製水で洗浄し窒素気流で乾燥させてから 10mL のメタノールを用いて固相カートリッジに吸着した成分を溶出した。溶出した試料をロータリエバポレータを用いて減容後、さらに窒素気流により 100 μ L に定量した。

8. 浄水処理実験プラントで得られた試料の濃縮方法

この試料は水中の試料をあらかじめ

図 3 に示すような手順で濃縮後、当研究室に送付されたものである。試料水を 1M HCl で pH 3 に調整した後、試料水 20L を固相カートリッジ OASISTMHLB(Sep Pak Plus short)に流速 10ml/min で通水する。固相カートリッジへの通水量は、1 つのカートリッジに対して 1L までとした。窒素パージで 12 分間乾燥させた後、ジクロロメタン 8mL で溶出する。その際、脱水のために脱水カラムの Sep Pak Dry(Waters 社製)を用いる。溶出した試料をロータリエバポレータで濃縮し、4mL に定量後 1mL ずつ 4 つに分取したうちの 1 つの試料が当研究室に送付されたものである。送付された各浄水処理プロセスの試料はさらに 200 μ L に濃縮したので最終的に 25000 倍に濃縮したことになる。ただし酵母 Two-hybrid 法に於いては前培養液 50 μ L と SD 液体培地 200 μ L に対して試料 2.5 μ L を加えることになるので元々の試料水中の成分は 2500 倍に濃縮された状態でテストされていることになる。

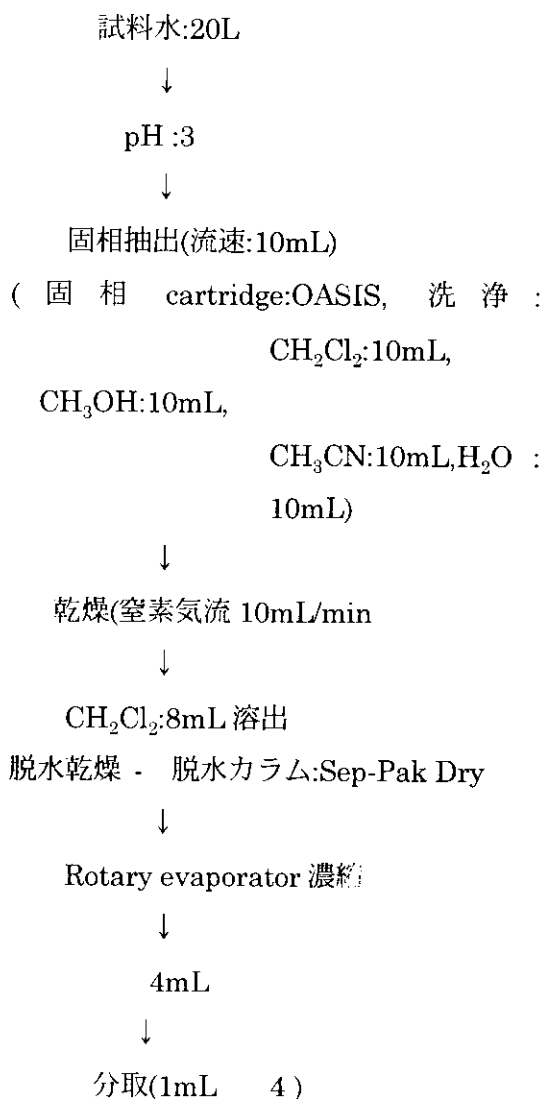


図 3 浄水処理実験プラントで採水した試料の濃縮

9. 凝集処理実験

下水処理場処理水（活性汚泥処理水）をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 社製）で吸引ろ過したもので凝集剤量を定めるためにジャーテストを行った。凝集剤として硫酸アルミニウムを用いて、pH を 7 付近に調整し、急速攪拌 120rpm で 5 分間、緩速攪拌 40rpm で 20 分間、攪拌終了後静置 30 分間とした。最終 pH、濁度、色度、E260、E220 の測定結果を表に示す（表 1）。この結果から凝集剤量を、24mg/L（as Al 濃度）とした。

下水処理水を 1 万倍に濃縮してもエストロゲン活性がほとんどみられなかった下水処理水については 17β-エストラジオール（E2）を 10^{-10} M の濃度となるよう添加し、上記凝集条件で凝集処理した。E2 を添加した下水処理水およびその凝集処理水を 0.45μm メンブレンフィルターでろ過した後それぞれ 1000 倍に濃縮・希釈し、エストロゲン活性の測定を行った。

次に、超純水に 10^{-10} M となるように E2 を添加し下水処理水と同じ凝集条件で凝集処理をして 0.45μm メンブレンフィルターでろ過後、1000 倍に濃縮・希釈後エストロゲン活性を測定した。

表 1 下水処理水のジャーテスト結果

Al 濃度(mg/L)	0 (原水)	2	4	16	24	36
最終 pH	7.0	6.8	6.6	7.3	7.2	7.1
濁度	0.52	0.27	0.15	0.29	0.20	0.18
色度	16.1	9.5	7.9	5.9	5.5	6.7
UV260nm 吸光度 (E260)	0.108	0.081	0.060	0.053	0.051	0.052
UV220nm 吸光度 (E220)	1.926	1.830	1.811	1.793	1.786	1.791

10. 塩素処理実験

あらかじめ予備実験として下水の活性汚泥処理水に次亜塩素酸ナトリウムを添加してから 24 時間経過後の遊離残留塩素濃度が 0.1~0.3mg/L となるような塩素添加率 10mg/L を求めた。次に、この添加率で塩素処理した下水処理水を塩素添加から 24 時間後に Sep Pak C18 カートリッジを用いて濃縮後エストロゲン活性の測定を行った。

表 2 下水処理水の塩素添加率と 24 時間後残留塩素濃度の関係

塩素添加率 mg/L	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	12.5
残留塩素濃度 mg/L (24 時間後)	0.03	0.03	0.05	0.10	0.23	1.53
最終 pH	7.46	7.53	7.50	7.50	7.50	7.51

11. 浄水処理実験プラントにおける浄水処理実験

浄水処理によるエストロゲン活性の挙動を調べるために、対象物質としてエストロゲン様作用物質を図4に示すような実験プラントの着水井に添加し浄水処理実験を行った。

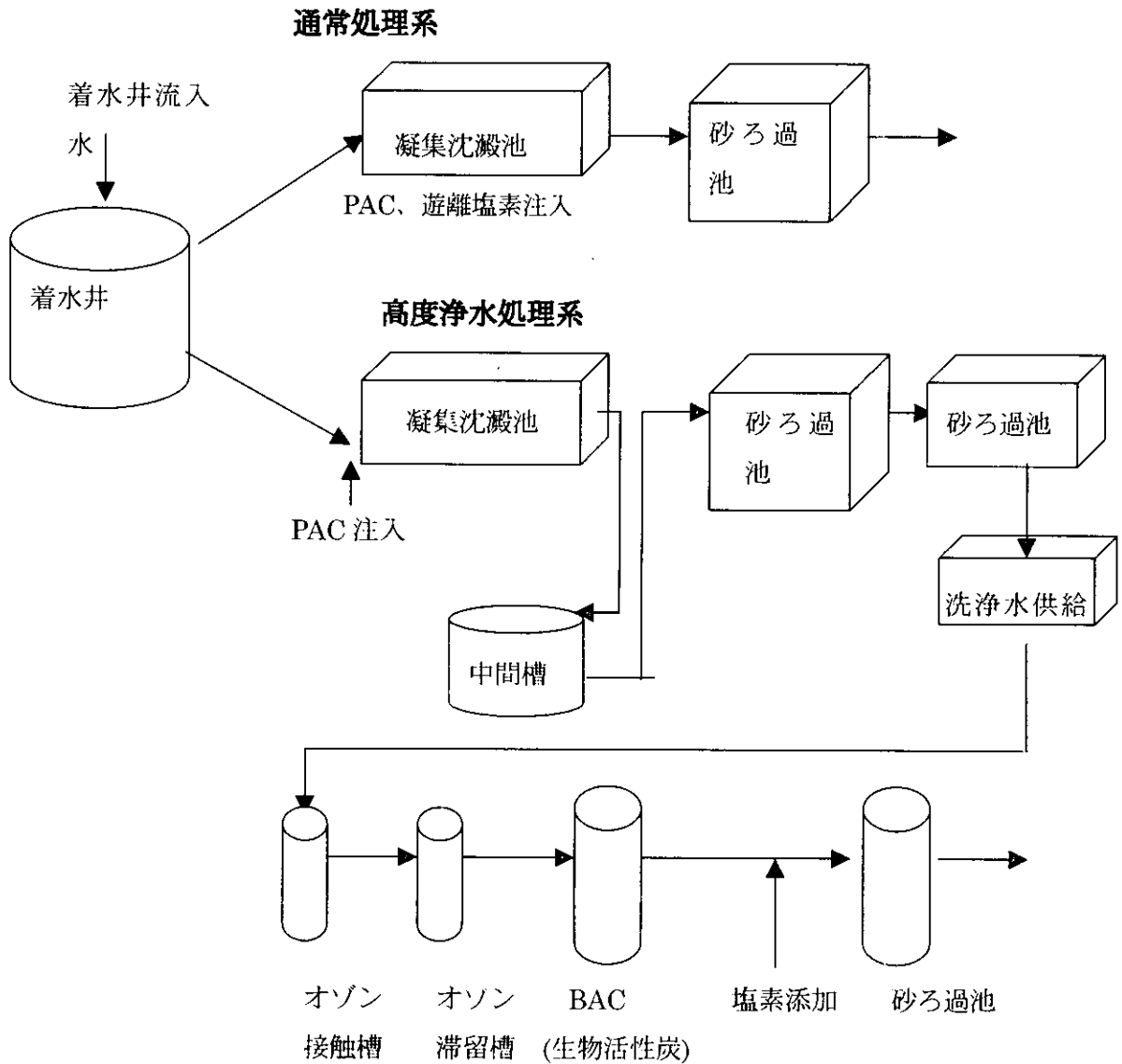


図4 浄水処理実験プラントの概略図

対象物質は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール、ビスフェノールAの4種類であり、各物質をそれぞれ5 $\mu\text{g/L}$ の濃度で添加された。エストロゲン活性の測定試料は、着水井流入水、原水、通常処理系として凝集沈殿水、砂ろ過水、高度浄水処理系として凝集沈殿処理水、砂ろ過水、オゾン接触水、オゾン滞留槽出口、BAC (生物活性炭) 出口、砂ろ過水の10サンプルである。凝集剤はいずれの系もPAC (ポリ塩化アルミニウム) を用いて、添加率25mg/Lで凝集処理を行っている。なお、通常処理系においては前塩素処理が、高度浄

水処理系においては生物活性炭処理後の砂ろ過の前に塩素処理がそれぞれ行われている。塩素添加率は通常処理系の前塩素処理が7.6mg/L、高度処理系は2.0mg/Lである。

(倫理面への配慮)

実験に用いた酵母菌はオートクレーブ殺菌を行っているため環境中に放出される恐れはない。

3. 実験結果・考察

1. 複合系におけるエストロゲン発現パターン

図5に示すように逆U字型応答曲線の低濃度側での発現パターンは活性が高い物質（ここではNP）に支配され、活性値は単独の場合よりも同じか、下まわった。このことは、試験したすべての物質についても同様の結果が得られた。逆U字型応答曲線の高濃度側では、エストロゲン活性がより低濃度レベルで減少する物質に支配されるように見えるが、これは図6に示すように物質の濃度が高い領域では物質の毒性によるイースト菌の増殖阻害によってもたらされたものであると考えられ、生物本来の内分泌攪乱効果によるものではない可能性がある。高濃度ではそのほかに水溶解度が低い物質の析出も問題となり、これは単独系、多成分系の両者に共通している。毒性の強い物質を試験するときは酵母の菌体量を、疎水の物質を試験するときは溶解度を考慮しなければ誤った判断をすることになる。

環境試料と内分泌攪乱物質を共存させた

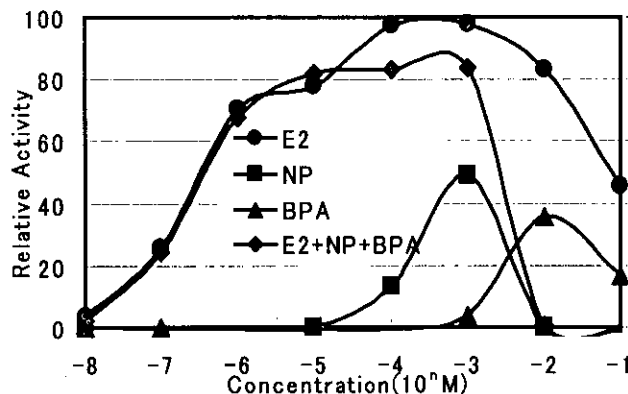


図5 3成分系のエストロゲン発現パターン

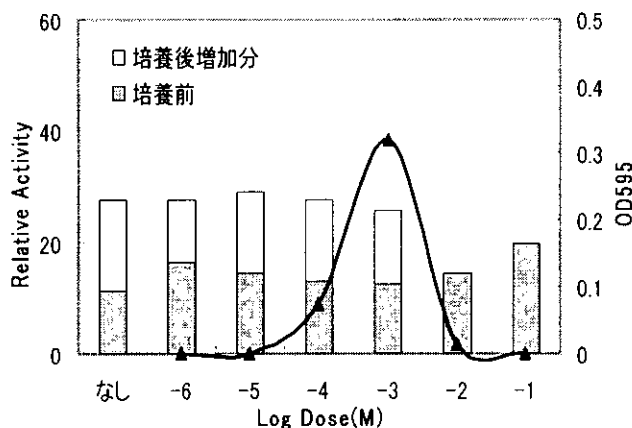


図6 4-NP の培養前後 OD595(菌体濃度)

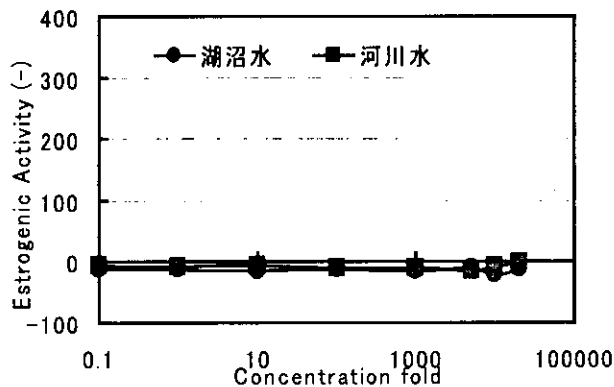


図7 フミン質を主体とする環境水のエストロゲン活性