

《LC/MS 分析結果》表5に示すように塩素添加後3分には、すでに BPA は認められず、BPA に代わり  $m/z=261, 295, 329, 365$  を示す物質が検出された。これらの副生成物は反応時間と共に減少し、塩素添加後1時間では  $m/z=365$  を示す物質のみが検出され、塩素添加後24時間では検出されなかった。また、塩素添加後24時間で検出された  $m/z=195, 197$  を示す物質は2,4,6-トリクロロフェノール(MW=197.4)であると確認された(表5)。

表5 BPA の塩素処理による副生成物

	保持時間 (分)	副生成物の質 量数( $m/z$ )
塩素無添加	8.87	227(BPA)
塩素添加後 3分	10.33	261
	11.29	295
	12.06	329
	12.74	365
塩素添加後 10分	12.86	329
	13.71	365
塩素添加後 1時間	12.73	365
	14.66	525
塩素添加後 24時間	11.25	195,197

《塩素処理が BPA のエストロゲン活性に及ぼす影響》

塩素添加後3分では、濃縮倍率100倍で塩素無添加のBPA水溶液よりも強いエストロゲン様活性を示した。塩素添加後10分では濃縮倍率100倍で、1時間の試料では濃縮倍率1000倍で弱いながらもエストロゲン様活性が認められた。塩素添加後24時間の試料にはエストロゲン様活性が認められなかった。塩素添加後3分、10分は濃縮倍率1000倍で酵母の増殖が阻害され、見かけ上エストロゲン様活性が認められなかった(図12)。

また、塩素添加後3分、1時間について副生成物を分取してエストロゲン様活性を測定した。塩素添加後3分では分取した副生成物全てからエストロゲン様活性が認められた。全体で高いエストロゲン様活性を示した濃縮倍率100倍で各副生成物のエストロゲン様活性を比較すると、 $m/z=295, 329$  を示す物質が全体のエストロゲン様活性に対する寄与が大きかった(図13)。塩素添加後1時間では、 $m/z=365$  を示す物質にはエストロゲン様活性が認められたが、 $m/z=525$  を示す物質にはエストロゲン様活性が認められなかった(図14)。

《BPA の塩素処理結果の考察》塩素添加後3分の試料でエストロゲン様活性が認められたのは、LC/MS 分析から BPA が検出されず、分取した副生成物の多くからエストロゲン様活性が認められたことから(図13)、BPA とは別の新たに生成した物質が原因であると考えられる。これらの物質( $m/z=261, 295, 329, 365$ )は、質量数から、BPA に塩素が1個から4個だけ置換した物質であると推定される。これらの中でも、塩素添加後3分の試料を分取した結果(図13)から、塩素置換数1個から3個の物質が、塩素置換数4個の物質よりもエストロゲン様活性が強いと考えられる。塩素添加後24時間でエストロゲン様活性が認められなかったのは、E

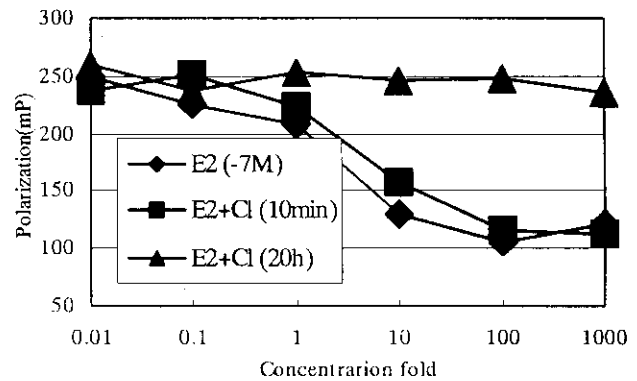


図11 塩素処理時間がエストロゲン receptor に対する E2 の結合性に及ぼす影響

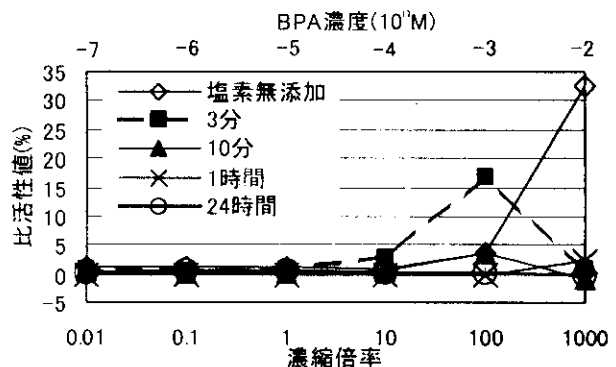


図12 BPA の塩素処理による反応時間とエストロゲン様活性の関係

エストロゲン様活性を示す副生成物が時間の経過とともに消失し、エストロゲン様活性を持たない物質に変化したためであると考えられる。

一方、エストロゲン receptor に対する BPA の結合性も図 15 に示すように塩素添加後 24 時間では、ほとんど消滅し、LC/MS 分析、およびエストロゲン活性試験の結果を裏付けている。

### NP の塩素処理

《LC/MS 分析結果》塩素添加後 10 分に NP が検出されたが、24 時間後では検出されなかった。塩素添加後 24 時間で検出された  $m/z=195,197$  は 2,4,6-トリクロロフェノール(MW=197.4)であると確認された(表 6)。

《塩素処理による NP のエストロゲン様活性の挙動》塩素添加後 10 分ではエストロゲン様活性が認められたが、塩素添加後 24 時間では活性が認められなかった(図 16)。また、塩素添加後 10 分では副生成物を分取してエストロゲン様活性を測定したが、NP( $m/z=219$ )だけがエストロゲン様活性を示し、塩素添加後 10 分における全体のエストロゲン様活性と同程度であった(図 17)。

《NP の塩素処理結果の考察》塩素添加後 10 分でエストロゲン様活性が認められたのは、LC/MS 分析において NP が検出されたこと(表 6 下線部)と、副生成物を分取した結果、NP のみにエストロゲン様活性が認められたことから、塩素と未反応の NP が原因であると考えられる。また、塩素添加後 10 分で検出された副生成物( $m/z=253,287$ )は NP に塩素が 1 個から 2 個置換したものであると推定されるが、これらはエストロゲン様活性を持たない物質であると考えられる。塩素添加後 24 時間において、エストロゲン様活性が認められなかったことは NP が塩素処理により、エストロゲン様活性を持たない物質に変化したためであると考えられる。

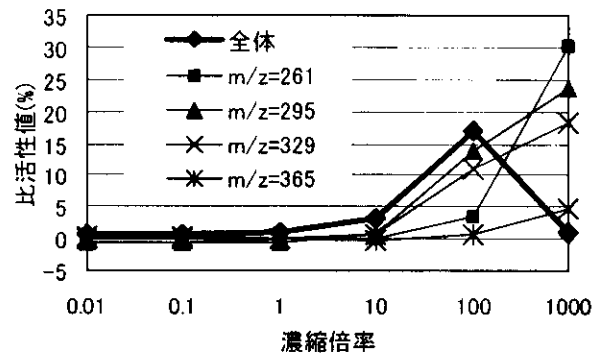


図 13 BPA に塩素添加後 3 分の各副生成物のエストロゲン様活性

表 6 NP の塩素処理による副生成物

	保持時間 (分)	副生成物の質 量数( $m/z$ )
塩素無添加	20.86	219(NP)
塩素添加後 10 分	20.86	<u>219(NP)</u>
	21.72	253
	22.62	287
塩素添加後 24 時間	7.51	237
	9.12	195,197
	9.55	225

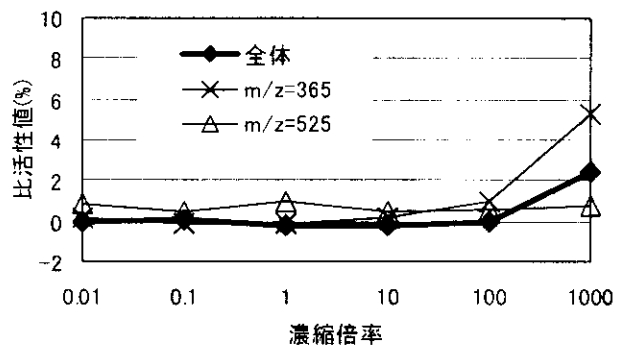


図 14 BPA に塩素添加後 1 時間の各副生成物のエストロゲン様活性

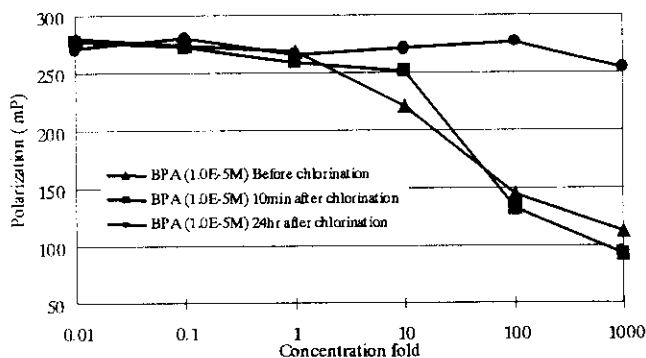


図 15 塩素処理時間が BPA のエストロゲン receptor 結合性に及ぼす影響

#### 塩素処理結果のまとめ

塩素処理において E2 と NP は反応時間とともにそれぞれ未反応の E2、NP が消失し、十分な時間が経過すると、エストロゲン様活性が認められなくなる。BPA は塩素添加後、BPA とは別の物質が生成し、一時的にエストロゲン様活性が増大するが、十分な時間が経過すると、これらの物質の消失とともに、エストロゲン様活性が認められなくなる。したがって、十分な反応時間を設けることにより、塩素処理でエストロゲン様活性の低減が可能であるため、塩素処理はトリカブト生成等の問題はあるが、エストロゲン様活性に関しても、有用な浄水処理手段である。今まで、報告されているエストロゲン物質は芳香核をその化学構造中に有している。芳香核は容易に塩素付加反応および酸化反応を受けて、分解または誘導体に変化する。E2、BPA、NP 通常以外のエストロゲン物質も塩素処理により、そのエストロゲン活性を消失する可能性は高いと考えられる。

#### 4. 浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動

浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動を調査した結果を図 18 - 図 21 に示す。

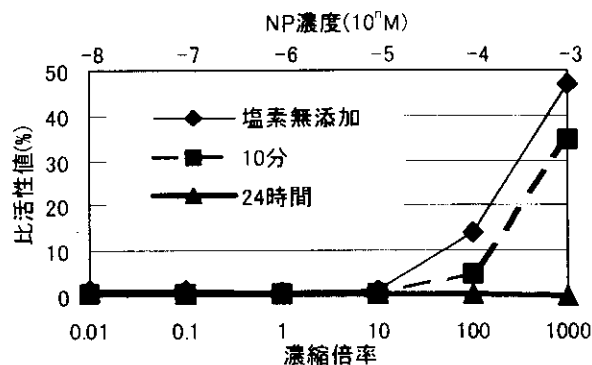


図 16 NP の塩素処理による反応時間とエストロゲン活性の関係

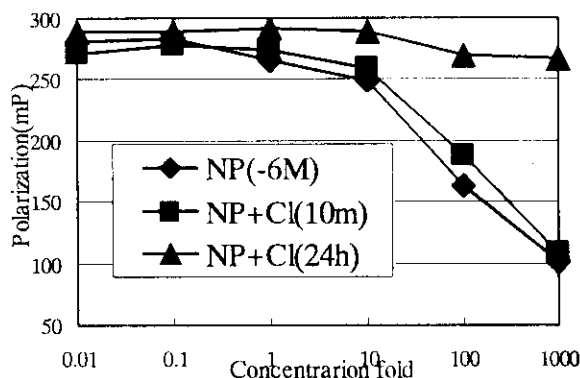


図 17 塩素処理時間が NP のエストロゲン receptor 結合性に及ぼす影響

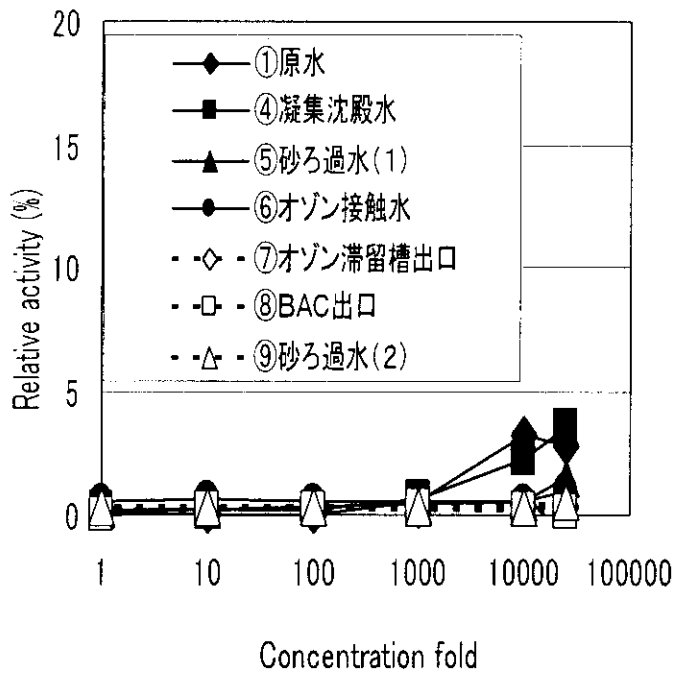


図 18 高度処理実験プラント(多磨川)におけるエストロゲンの挙動(-S9)

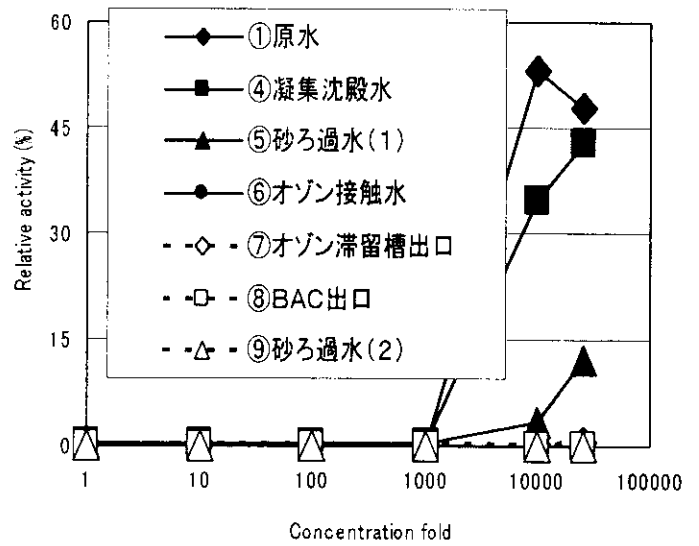


図 19 通常処理実験プラント(多磨川)におけるエストロゲンの挙動(+S9)

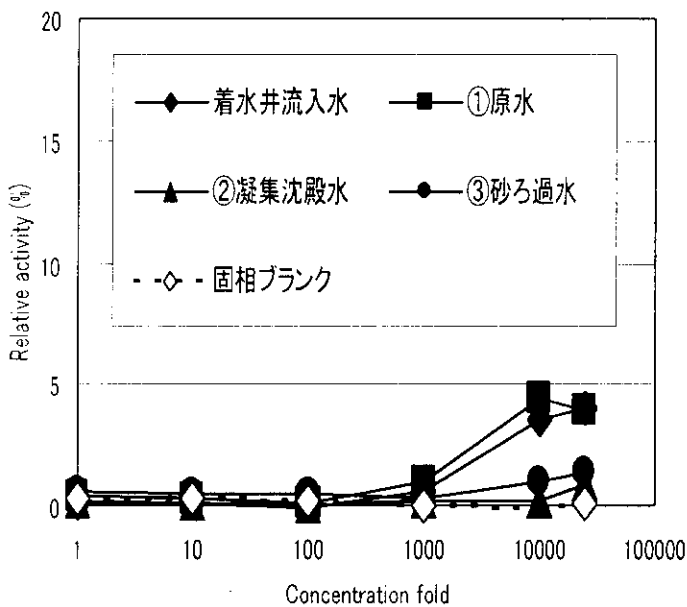


図 20 通常処理実験プラント(多磨川)におけるエストロゲンの挙動(-S9)

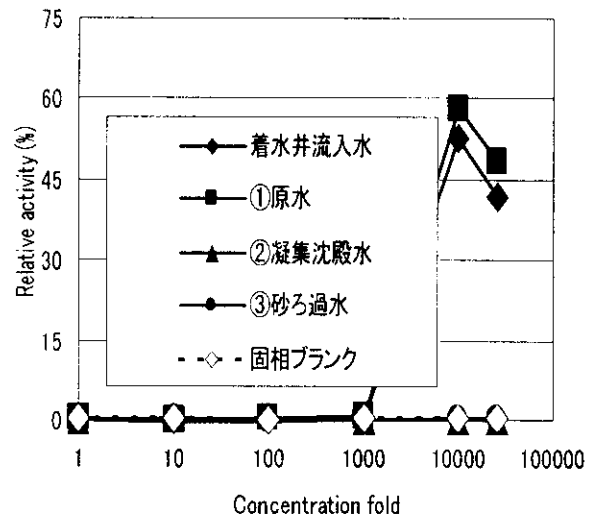


図 21 通常処理実験プラント(多磨川)におけるエストロゲンの挙動(+S9)

図 18, 図 19 に示すようにオゾン処理によりエストロゲ活性は著しく低減している。また昨年度報告したように前塩素処理によりエストロゲ活性は著しく低減することが図 20, 図 21 より明らかである。また酵母 Two-Hybrid 試験を行う際に S9mix の添加が効果的であることは図 18 と図 19, および図 20 と図 21 を対比すれば明らかである。

#### 4. 結論

1) 酵母 Two-Hybrid 試験を通常の方法で環境水中のエストロゲン活性を評価する場合、阻害物質により false negative な結果が得られる場合がある。したがって、エストロゲン活性が認められなかった環境試料については S9mix を酵母 Two-Hybrid 法に込んだ試験法、あるいは逆相系 HPLC を用いた親水順位的な分画により、阻害成分とエストロゲン様物質群とを分離後、酵母 Two-Hybrid 試験を行う確認試験が望ましい。

2) 塩素処理により環境水のエストロゲン活性が消滅する理由は、 $17\beta$ -Estradiol (E2)、Bisphenol-A (BPA)、*p*-Nonylphenol (NP) などのエストロゲン活性物質が塩素処理により変化し、エストロゲン receptor との結合性を失うためと考えられる。

3) 今まで、報告されているエストロゲン物質は芳香核をその化学構造中に有している。芳香核は容易に塩素付加反応および酸化反応を受けて、分解または誘導体に変化する。E2、BPA、NP 以外のエストロゲン物質も塩素処理により、そのエストロゲン活性を消失する可能性は高いと考えられる。

3) 浄水処理実験プラントにおけるエストロゲン活性の挙動を調査した結果、昨年度と同様、前塩素処理、オゾン処理などの酸化処理はエストロゲン活性を低減化させる効果的なプロセスであることを再確認した。

#### 参考文献

1. 平成 11 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、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、pp.127-136,2000.
2. 平成 11 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、酵母 Two-Hybrid 法を用いたエストロゲンの評価に関する研究、pp.137-148,2000.
3. 平成 11 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、水道水のエストロゲン様作用の特性とその制御性に関する研究、pp.149-165,2000.
4. 平成 11 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、ビスフェノール A の塩素処理による反応生成物の同定とエストロゲン様作用の評価、pp.167-186,2000.

分担研究報告書 6

水道水のエストロゲン様作用の特性と  
試料調製法に関する研究

分担研究者 伊藤禎彦

# 水道水のエストロゲン様作用の特性と試料調製法に関する研究

京都大学 伊藤禎彦

## 1. 調査研究の目的と内容

### 1. 1 目的と内容

本調査研究でとりあげるようなバイオアッセイを行う場合、一般に濃縮が必要となるが、この場合、濃縮対象物質としていかなる成分を想定するかが重要となる。水道原水や水道水に含まれるエストロゲン様作用を有する物質群には以下が挙げられよう。

- ① 現在、内分泌攪乱性が疑われるとしてリストアップされている物質
- ② その他、農薬などの微量化学物質
- ③ 人畜由来ホルモン
- ④ 植物エストロゲン
- ⑤ 水中フミン物質
- ⑥ 以上の物質の塩素処理副生成物（塩素添加の場合）

これらのうちいかなる物質（群）にエストロゲン様作用があるかを把握した上で、それらを濃縮可能な方法を選択していく必要がある。

著者らはこれまでに、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、その作用が塩素処理によって増大することを示した<sup>1,2)</sup>。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、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られた。これらを背景に消毒副生成物に重点をおいた検討を行ってきたが、その過程で、自然水中のエストロゲン様作用の構成成分としては、17 $\beta$ -エストラジオールや4-ノニルフェノールの寄与が大きいこともわかった。

これら知見に基づき本調査研究では、フミン物質を中心とする一般有機物と17 $\beta$ -エストラジオールなどの個別物質、およびこれらの塩素処理副生成物をエストロゲン様作用を有する可能性のある物質としてとりあげ、これらに注目しつつ水道水のエストロゲン様作用試験のための試料調製方法について検討を行った。その上で、塩素処理がエストロゲン様作用をいかに変化させるかについて検討した。

また、塩素処理副生成物のうち2,4-ジクロロフェノールにエストロゲン様作用があることを確認している<sup>3)</sup>ので、本物質を含むクロロフェノール類の生成特性を把握する実験を行った。

さらに、東京都および大阪市の施設を用いた浄水処理過程におけるエストロゲン様

活性の挙動調査結果を6節で報告する。

## 1. 2 バイオアッセイの方法について

本調査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は MVLN アッセイを行う<sup>4,5)</sup>。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。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、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。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。

このアッセイは、酵母を用いるバイオアッセイなどと同様に、ある物質が細胞内でエストロゲン様の作用を有するかを調べるものである。したがって、その試験結果が陽性であるからといって、その物質が生体内において内分泌攪乱作用を有する有害物質であると結論づけられるわけではないことに注意する必要がある。

## 2. 水道原水の試料調製法に関する検討

フミン物質とその塩素処理副生成物にエストロゲン様作用があると想定し、吸着樹脂 XAD7HP を用いた濃縮を行ってきた。しかしその後、琵琶湖水のエストロゲン様作用に寄与しうるものは  $17\beta$ -エストラジオールや 4-ノニルフェノールなど、水中ですでにエストロゲン様作用をもつ個別の物質が中心であることがわかってきた。そこで試料調製方法を項目ごとに再検討することとした。主たる検討項目は、調整 pH、吸着樹脂、溶出溶媒である。

### 2. 1 実験方法

#### (1) 調整 pH

水中フミン物質、および個別物質の濃縮において使用されている pH 例を表-1 に示す。

表-1 主な試料調製時の pH

pH	用途
2	水中フミン物質の濃縮
3.5	4-ノニルフェノール濃度分析
5	$17\beta$ -エストラジオール濃度分析

ここでは、一般に自然水中物質の濃縮は pH2 で行うことで良好であることが多く報告されていること、および  $17\beta$ -エストラジオールの測定時には pH を 5 に調整した後濃縮操作が行われることを考慮して比較した。



琵琶湖南湖表流水を採水し、0.45  $\mu\text{m}$  メンブランフィルターで加圧ろ過した。ろ過水は、塩酸を用いて pH2 に、また酢酸緩衝液を用いて pH5 に調整した後、ウォーターズ社コンディショニング済みの OASIS-HLB カートリッジに 20mL/min で通水し、蒸留水で脱塩した。なお、コンディショニングは、酢酸エチル 20mL、メタノール 20mL、蒸留水 100mL を通液することで統一した。通水後、カートリッジを十分乾燥させた後、酢酸エチル/メタノール (5 : 1) とメタノールで吸着物質を溶出させた (溶媒量 3mL, 1mL/min)。溶出液を減圧蒸発させ、残渣物をエタノール 1mL に再溶解させた。これで濃縮倍率は 1000 倍となる。この試料を培養液 1mL に対して最大 10  $\mu\text{L}$  添加した。琵琶湖水添加量は 10mL/mL-培養液となる。

エストロゲン様作用を検出するためには、MVLN細胞を用いるルシフェラーゼ・アッセイ (MVLNアッセイ) を行った。24穴マルチウェルプレートを用い、培養液1mL に対して上記試料を添加した。この際、培養液中エタノール濃度は1%以下となるようにしている。試験結果は17 $\beta$ -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、酵素活性相対値(%)として表示した。

17 $\beta$ -エストラジオールの回収試験では、0.002  $\mu\text{g/L}$ の17 $\beta$ -エストラジオール水溶液1LをpH調整した後OASIS HLBに通水した。その後、ジクロロメタンで溶出し濃度測定に供した。17 $\beta$ -エストラジオールは、ELISA(NEOGEN社製キット使用)法で測定した。

## (2) 溶出溶媒

自然水調製に使われる溶媒を表-2 に示す。溶媒の極性を示す指標としての誘電率  $\epsilon$  も同時に示した。

表-2 溶媒の極性と使用用途

溶媒	誘電率 $\epsilon$	使用用途
酢酸エチル/メタノール (5 : 1)	6.05	17 $\beta$ -エストラジオールの測定
MTBE/メタノール (9 : 1)	-	4-ノニルフェノールの測定
DMSO	46.45	変異原物質の濃縮など
ジクロロメタン	8.93	
ヘキサン	1.89	水中微量汚染物質の
メタノール	32.66	溶出
エタノール	24.55	

本研究ではこの中から代表的な、酢酸エチル/メタノール (5 : 1)、MTBE/メタノール (9 : 1)、ジクロロメタン、ヘキサンについて検討した。予備実験として水酸化ナトリウムやメタノールについても検討した。

濃縮操作は調整 pH で記した方法と同様であるが、試料水の pH は 2 に調整した。

### (3) 吸着樹脂

多孔質ポリマーのうちエストロゲン様作用物質や農薬など微量汚染物質の濃縮・測定に使用されている OASIS HLB と PS-2、および水中変異原物質の回収に優れている CSP800 をとりあげた。

### (4) 再溶解溶媒

溶出溶媒は直接 MVLN 細胞に与えると毒性が生じる可能性があるため、溶媒自体の添加濃度についても検討した。溶媒自身の影響を避けるため、バイオアッセイでは溶出溶媒を蒸発乾固させ、エタノールや DMSO などの補助溶媒に再溶解させることが多い。本実験では各溶媒の溶出結果を比較するので、1%までは細胞毒性のないエタノールに再溶解させた。また、再溶解自体の検討として蒸留水溶解とエタノール溶解の比較も行った。

## 2. 2 実験結果

### (1) 調整 pH に関する実験結果

エストロゲン様作用の測定結果を表-3 に表す。

表-3 pH および溶出溶媒別のアッセイ結果

溶出溶媒	pH5	pH2
酢酸エチル/メタノール (5:1)	9	43
メタノール	-18	-15

強極性溶媒であるメタノールで溶出した試料では、pH に関係なく負の活性となった。

また中間的な極性溶媒である酢酸エチル/メタノール (5:1) で溶出した試料では、pH を低くするとより高い酵素活性が得られた。この結果から、pH2 での調整を行うのが適当と考えられた。

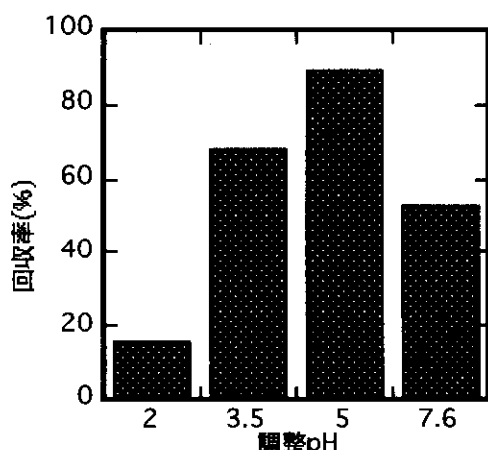


図-1 17β-エストラジオール濃縮における調整pHの影響

一方、各 pH における 17β-エストラジオールの回収率を測定した。結果を図-1 に示す。pH5 で高い回収率が得られ、pH2 では低くなっている。すなわち 17β-エストラジオールの含有濃度が高ければ、pH を 5 とした場合に、強いエストロゲン様作用が得ら

れることも考えられる。表-3 の結果とあわせて考えると、試料水の pH を 2 として固相カートリッジに通水した後、その水の pH を 5 として別の固相カートリッジに通水し、両者からの溶離液を混合することが妥当であるともいえ、今後の課題である。

なお、pH2 に調整した後回収するという操作が 17β-エストラジオールの作用にいかにかに影響しているかは確認しておらず、今後注意する必要がある可能性もある。

## (2) 溶出溶媒に関する実験結果

結果を表-4 に示す。ジクロロメタンと酢酸エチル/メタノール (5:1) で溶出した試料からは、エストロゲン様作用が検出された。両者を比較すると、ジクロロメタンの方が、安定した作用を検出できた。また、ヘキサン溶出試料や、OASIS-HLB の溶出溶媒として用いられている MTBE/メタノール (9:1) 溶出試料からは目立った酵素活性はみられなかった。一方、予備実験として水酸化ナトリウム水溶液やメタノールでも同様の実験を行ったが、特に安定した酵素活性は得られなかった。

以上より、溶出溶媒としては、エストロゲン様作用検出の安定性、および溶媒としての扱いやすさの点から、ジクロロメタンが適当であると考えられた。

表-4 溶出溶媒の影響

溶 媒	酵素活性相対値(%)
ジクロロメタン	19
酢酸エチル/メタノール (5:1)	10
ヘキサン	5
MTBE/メタノール (9:1)	-12

## (3) 吸着樹脂に関する実験結果

結果を表-5 に示す。CSP800 を用いた変異原物質濃縮法では目立ったエストロゲン様作用は認められなかった。OASIS-HLB と PS-2 からは同程度の酵素活性が検出された。

表-5 吸着樹脂の影響

吸着樹脂	酵素活性相対値 (%)
OASIS-HLB	12
PS-2	11
CSP800	-5

## (4) 再溶解溶媒に関する実験結果

再溶解溶媒としてエタノールと蒸留水を比較した結果を-6 に示す。若干の琵琶湖水添加量の差はあるものの、エタノール溶解でも再蒸留水溶解でも同様の酵素活性が検出された。以後は溶解させやすいエタノールを用いることとした。

表-6 再溶解溶媒の影響

溶媒	琵琶湖水添加量 (mL/mL-培養液)	酵素活性相対値 (%)
再蒸留水	15	13
エタノール	22.5	15

### (5) 調製方法と必要水量の評価

個別物質のエストロゲン様作用測定における横軸（濃度軸）は対数目盛であることを考慮し、琵琶湖水添加量と酵素活性が対数関係にあると仮定し、各調製方法と必要水量を評価してみる。OASIS-HLB と XAD7HP を用いる方法とを比較したものを図-2 に示す。

10%のエストロゲン様作用を検出するのに必要な琵琶湖水添加量を算出すると、OASIS-HLB を用いた調製方法では 4mL/mL-培養液、XAD7HP による試料調製方法では 34mL/mL-培養液となり、約 8 分の 1 の水量で検出できることがわかる。

MVLN アッセイに 24 穴マルチウェルプレート（培養液量 1mL）を使用する場合、OASIS-HLB 調製方法では培養液 1mL あたり最大 10 $\mu$ L まで添加できるので必要濃縮倍率は 400 倍、XAD7HP 調製方法では培養液の希釈の影響を受けない最大添加量が 100  $\mu$ L であるので、必要濃縮倍率は 340 倍となる。濃縮による最終液量は、OASIS-HLB 調製方法では 1mL、XAD7HP 調製方法では 10mL であるので、必要な試料水量は、それぞれ 0.4L、3.4L となり、必要水量も 1/8.5 となる。OASIS-HLB を用いる方法では、琵琶湖水の場合、試料水量が 1L あれば十分このアッセイを行うことができるといえる。

### 2. 3 ま と め

水道原水のエストロゲン様作用試

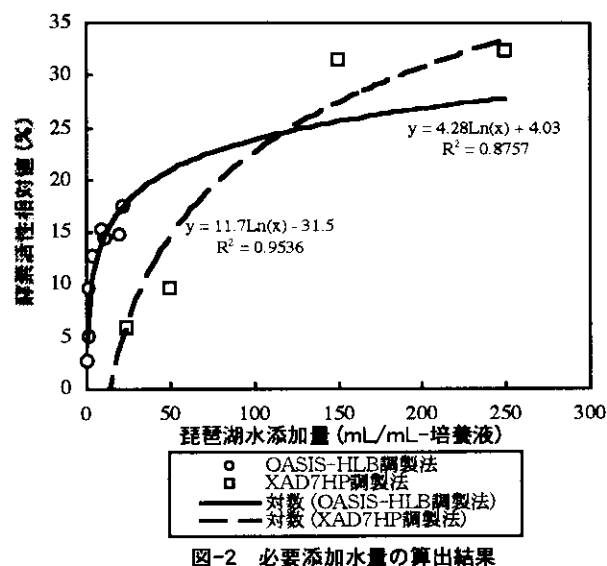


図-2 必要添加水量の算出結果

験のためには、試料水の pH を 2 に調整し、吸着樹脂 OASIS-HLB に通水し、ジクロロメタンで溶出した後、エタノールに再溶解する方法が適当であることを示した。

この方法によって、XAD7HP 樹脂を用いる著者らの従来法に比べて必要水量は 1/8.5 となり、試料水が 1L あれば十分アッセイが可能となった。

一方、pH 2 では 17 $\beta$ -エストラジオールの回収率は低下するので注意する必要があることを指摘した。

### 3. 塩素処理によるエストロゲン様作用の変化に関する実験

フミン物質を中心とする一般有機物に注目すると、塩素処理によりエストロゲン様作用が増加することを示してきた。一方、17 $\beta$ -エストラジオールは塩素処理によって分解を受けつつ作用が低減することも確認している。

濃縮方法が異なれば、これら現象の現れ方も当然異なるであろう。本節では、OASIS-HLB を用いた調製方法と XAD7HP を用いた調製方法によって、塩素処理におけるエストロゲン様作用の変化を比較する。

#### 3. 1 実験方法

2 地点の自然水を使用した。採水地点を表-7 に示す。

表-7 採水地点

名称	採水地点
琵琶湖水	大津市由美浜（渚公園）
淀川水	枚方市（枚方大橋南詰）

0.45 $\mu$ m メンブランフィルターで加圧ろ過した水の塩素要求量を塩素要求量計（CD-20, 平沼産業）で測定し、初期残留塩素濃度が所定の濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加した。pH に変化がないのを確認した後、20 $^{\circ}$ C の暗所で 24 時間密栓、静置した。塩素処理後の残留塩素濃度は DPD 滴定法で測定した。残留塩素消去剤（還元剤）は添加せず、濃縮操作に供した。

ろ過水および塩素処理水 2L を、塩酸により pH2 に調整した。コンディショニング済みの OASIS-HLB カートリッジに通水し、蒸留水で脱塩しジクロロメタンを用いて溶出させた。溶出液を減圧蒸発させ、残渣物をエタノール 1mL に再溶解させた。この操作により濃縮倍率 2000 倍、最大試料水添加量 20mL/mL-培養液となる試料を作製した。

#### 3. 2 実験結果

琵琶湖水と淀川水、およびその塩素処理水の試験結果を図-3 に示す。

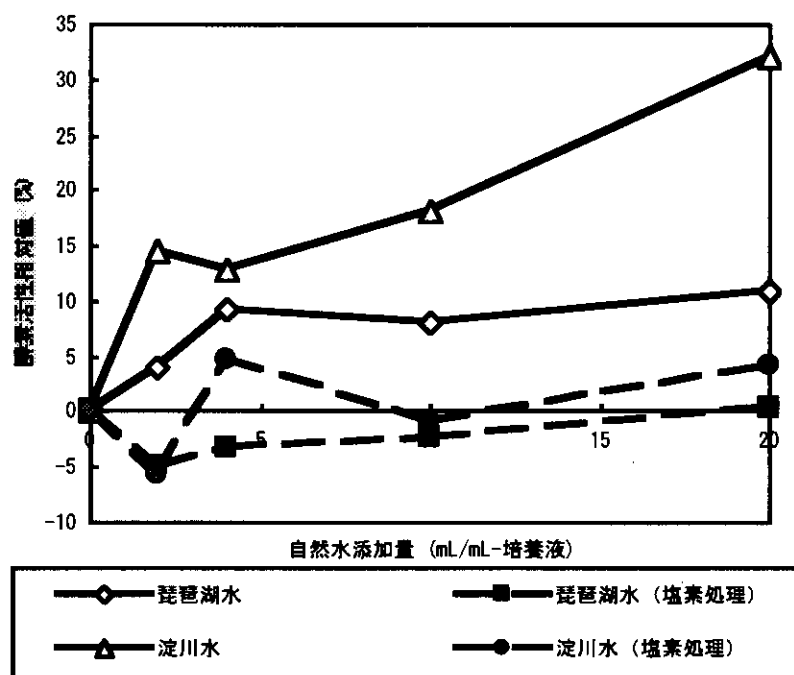


図-3 エストロゲン様作用と塩素処理による変化

淀川水の方のエストロゲン様作用が強く、琵琶湖水に比べて約3倍の活性を示した。また通常の浄水処理で行われる塩素処理によって、どちらの水もエストロゲン様作用を失った。これはXAD7HPとは正反対の現象である<sup>1,2)</sup>。

一方、各試料中の $17\beta$ -エストラジオール濃度を測定した。結果を表-8に示す。

表-8  $17\beta$ -エストラジオール測定結果

試料		$17\beta$ -エストラジオール( $\mu\text{g/L}$ )
琵琶湖	未処理	0.0002
水	塩素処理	0.0002
淀川	未処理	0.0004
水	塩素処理	0.0004

$17\beta$ -エストラジオール濃度は淀川水の方がわずかに高かったが、塩素処理を行っても琵琶湖水・淀川水いずれも変化がみられなかった。すなわち、図-3において塩素処理によるエストロゲン様作用低減における $17\beta$ -エストラジオールの寄与は明らかではなかった。しかし、いずれも検出・定量限界付近の濃度なので、測定値の信頼性はあまり高くない。

つぎに、琵琶湖水 (TOC=2.2mg/L) のエストロゲン様作用に対する添加塩素濃度の影響について調べた。初期残留塩素濃度が 1mgCl<sub>2</sub>/L, TOC : Cl<sub>2</sub>=1 : 4, 1 : 10 となるように添加したものである。結果を図-4 に示す。

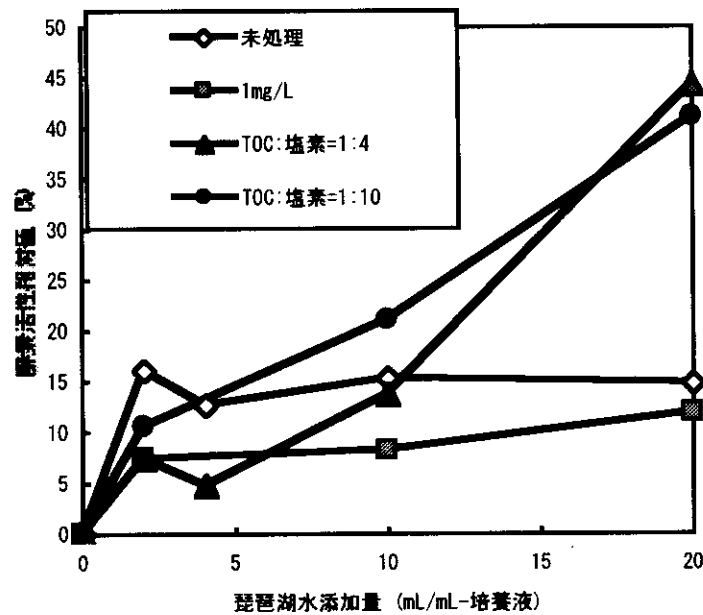


図-4 塩素添加濃度と活性の変化

未処理の場合は約 15%前後の酵素活性を示した。浄水処理で通常行われる塩素添加濃度では作用は減少した。塩素添加量をさらに増加させると、逆に琵琶湖水添加量が増加するにつれ作用が増加した。琵琶湖水添加量 20mL の部分で比較すると、約 4 倍の増加が認められた。

このときの 17β-エストラジオール濃度を測定した結果を表-9 に示す。

表-9 17β-エストラジオール測定結果

塩素添加量	残留塩素(mgCl <sub>2</sub> /L)	17β-エストラジオール(μg/L)
未処理	-	0.0002
1mgCl <sub>2</sub> /L	1.3	0.0001
TOC : Cl <sub>2</sub> =1 : 4	6.2	0.0001
TOC : Cl <sub>2</sub> =1 : 10	15.2	0.0001

塩素処理の濃度を増加させても、 $17\beta$ -エストラジオール濃度の変化は明確にはみられなかった。すなわち、図-4において塩素処理によるエストロゲン様作用変化における $17\beta$ -エストラジオールの寄与は明らかではない。しかし、いずれも検出・定量限界付近であり測定値の信頼性は高くない。

既報<sup>3,6)</sup>において、試薬フミン酸を用いた場合、 $\text{TOC}:\text{Cl}_2=1:2.5$ でエストロゲン様作用が最大となることを報告した。通常の塩素添加範囲では、原水中に存在するエストロゲン様作用物質が分解されて作用を失う効果大きいですが、添加量を増大させるとフミン物質を中心とする一般有機物と塩素との反応によってエストロゲン様作用物質が生成する効果が大きくなるものと推定することができる。

塩素添加の影響については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<sup>7,8)</sup>と、増大したとする報告<sup>9)</sup>がみられる。また、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があることが報告されている<sup>10)</sup>。

著者らは、塩素処理によるエストロゲン様作用の増加・減少どちらも確認したことになる。XAD7HP 調製方法を用いた場合、エストロゲン様作用は増大するものとして検出されるが、OASIS-HLB 調製方法を用いた場合には低減する結果となる。さらに、OASIS-HLB 調製方法においても、浄水処理で通常行われる添加塩素濃度では作用は低減するが、塩素量を増加させると逆に作用が増加する結果となった。すなわち、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があり、調製方法や添加塩素濃度に依存して、そのいずれも検出できるといえる。

OASIS-HLB 調製方法での塩素処理によるエストロゲン様作用の変化と、XAD7HP 調製方法での変化をまとめたものを図-5に示す。

水道原水のエストロゲン様作用検出に限れば、エストロゲン様作用検出に必要な琵琶湖水添加量も少量ですむ OASIS-HLB を用いた調製方法を推奨できる。しかし、塩素処理を行った水道水を対象とすると OASIS-HLB ではほとんど作用をできないことから、XAD7HP を用いる方法が望ましい。結局、対象とする水において、原水中に含まれ塩素との反応で作用が低減するエストロゲン様作用物質の量、および塩素との反応によって新たにエストロゲン様作用が生成するような前駆物質の量とを調べ、二つの方法のいずれか、または両者を使用する必要があることになる。



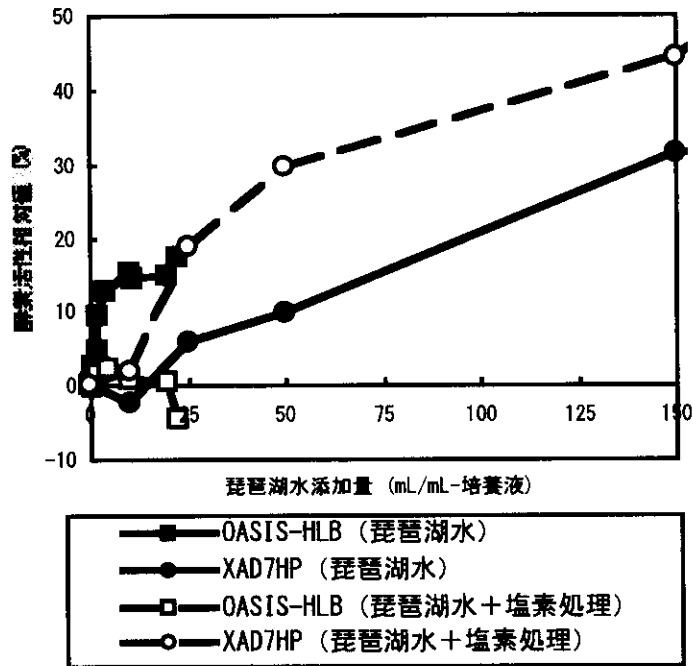


図-5 試料調製法とエストロゲン様作用

### 3. 3 ま と め

琵琶湖水、および淀川水に OASIS-HLB を用いた調製方法によって試験を行い、エストロゲン様作用を検出した。また通常の浄水処理で行われる塩素処理では、これらの作用はほとんど消失した。

一方、塩素添加濃度を増加させたところ、逆にエストロゲン様作用の増大が認められた。

これまでの検討を総合すると、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があり、調製方法や添加塩素濃度に依存して、そのいずれも検出できることを示した。結局、対象水において、原水中に含まれ塩素との反応で作用が低減するエストロゲン様作用物質の量、および塩素との反応によって新たにエストロゲン様作用が生成するような前駆物質の量とを調べ、二つの方法（OASIS-HLB 調製法、XAD7HP 調製法）のいずれか、または両者を使用する必要があることになる。

## 4. クロロフェノール類の生成特性に関する実験

### 4. 1 実 験 方 法

フミン酸（最終 820mg/L）に pH7.0 リン酸緩衝液（最終 200mM）と塩素を添加し、20℃、暗所に、密封条件で静置した。所定時間経過後、pH2 に調整し、ジクロロメタンで液々

抽出した。減圧濃縮および窒素ガス吹きつけによって乾固したあと、BSFTAを加えてTMS化した。ピレン-d<sub>10</sub>を内部標準物質としてGCMSで濃度を定量した。

一方、塩素処理水に対し、加水分解の影響を調べる実験を行った。フミン酸(最終820mg/L)にpH6.0リン酸緩衝液(最終200mM)と塩素(最終820mg/L)を添加し、3日間静置した。3日後pHは5.9で沈殿生成しなかった。また、残留塩素はゼロであった。この試料水のpHを7および10に調整し、1日または2日間静置し、同様に濃度測定を行った。

#### 4.2 実験結果

GCMSで同定できた物質は2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)と2,4,6-トリクロロフェノール(2,4,6-TCP)であり、これらの測定結果を図-6、図-7に示す。2,4-DCP、2,4,6-TCPともに生成した後低減していくことがわかる。また塩素添加率を変えた両図を比較すると、塩素添加量が多い図-7の方が生成量が多いこと、および速やかに生成していることがわかる。

この他、生成が推定された物質として、2,5-DCP、2,6-DCP、3,4-DCP、2,4,5-TCP、2-モノクロロフェノール(2-MCP)、4-MCPがあった<sup>11)</sup>。

塩素処理後、そのpHを変化させてクロロフェノール濃度を測定した結果を図-8に示す。pHを7としたもの、および10としたものともにクロロフェノール濃度

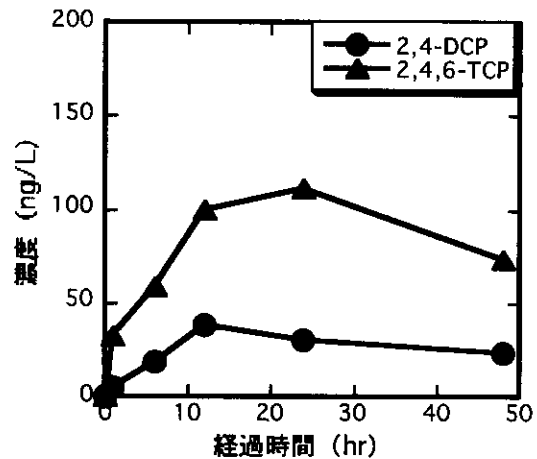


図6 フミン酸からのクロロフェノール類の生成 (塩素:TOC=0.5:1)

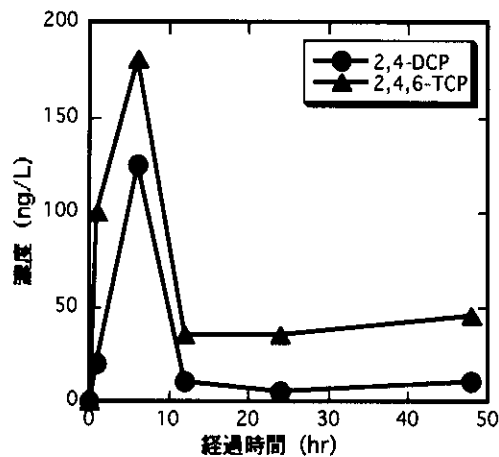


図7 フミン酸からのクロロフェノール類の生成 (塩素:TOC=3:1)

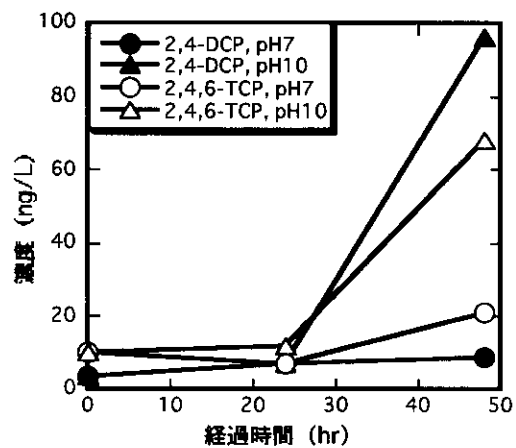


図8 塩素処理水中クロロフェノールの変化

は増大した。また、pH7 よりも 10 としたもののほうが、クロロフェノール濃度は速やかに増大したことがわかる。

以上の実験で重要な点は以下の通りである。1) クロロフェノール類は中間生成物であり、生成した後残留塩素と反応することで形を変えていく。2) クロロフェノール中間体があり、加水分解によって次第に生成してくる。

今後はこの生成物の変化傾向と、エストロゲン様作用の変化傾向とを比較する<sup>12)</sup>ことが課題である。

## 5. ま と め

### (1) 水道原水の試料調製法について

水道原水のエストロゲン様作用試験のためには、試料水の pH を 2 に調整し、吸着樹脂 OASIS-HLB に通水し、ジクロロメタンで溶出した後、エタノールに再溶解する方法が適当であることを示した。

この方法によって、XAD7HP 樹脂を用いる著者らの従来法に比べて必要水量は 1/8.5 となり、試料水が 1L あれば十分アッセイが可能となった。

一方、pH 2 では 17 $\beta$ -エストラジオールの回収率は低下するので注意する必要があることを指摘した。

### (2) 水道水のエストロゲン様作用の特性と試料調製法について

琵琶湖水・および淀川水に OASIS-HLB を用いた調製方法によって試験を行い、エストロゲン様作用を検出した。また通常の浄水処理で行われる塩素処理では、これらの作用はほとんど消失した。

一方、塩素添加濃度を増加させたところ、逆にエストロゲン様作用の増大が認められた。

これまでの検討を総合すると、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があり、調製方法や添加塩素濃度に依存して、そのいずれも検出できることを示した。結局、対象水において、原水中に含まれ塩素との反応で作用が低減するエストロゲン様作用物質の量、および塩素との反応によって新たにエストロゲン様作用が生成するような前駆物質の量とを調べ、二つの方法 (OASIS-HLB 調製法、XAD7HP 調製法) のいずれか、または両者を使用する必要があることになる。

### (3) 副生成物との関係について

塩素処理水中の 2,4-ジクロロフェノールと 2,4,6-トリクロロフェノール濃度を測定した。クロロフェノール類は中間生成物であり、生成した後残留塩素と反応することで形を変えていくこと、クロロフェノール中間体があり、加水分解によって次第に生成

してくることを示した。

今後はこれら生成物の変化傾向と、エストロゲン様作用の変化傾向とを比較することが課題であることを指摘した。

## 6. 浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の挙動調査結果

### 6. 1 試験方法

- ①ジクロロメタンに溶解しているサンプルに対し、窒素パージを行い、乾固。
- ②所定量のエタノール(600~1000  $\mu$ L)を添加して再溶解。濃縮倍率は3000~5000倍。
- ③MVLN細胞の培養液に添加。培養液中のエタノール最大濃度1%。
- ④2日培養後、ルシフェラーゼ・アッセイ。

### 6. 2 試験結果の評価法

#### 1) 酵素活性相対値

各投与量における転写活性の大きさは、 $17\beta$ -エストラジオールの活性を100%として、百分率として表示した。

#### 2) エストロゲン様作用強度

MVLN細胞の培養液1mLあたりに添加する試料量を1mL増加させたときの、酵素活性相対値の増加量で表示。これは後に示す図-9、図-10の傾きに相当する。単位は、%/ (mL/mL-培養液)。

### 6. 3 試験結果

#### (1) 東京都試料水

結果を図-9～図-11に示す。以下に要点をまとめる。

1) まず、①着水井流入水にエストロゲン様作用が認められる。この作用には $17\beta$ -エストラジオールなどが寄与している可能性が考えられる。原水自体に強いエストロゲン様作用が認められるため、 $5\mu\text{g/L}$ の物質添加によって作用は増大しな

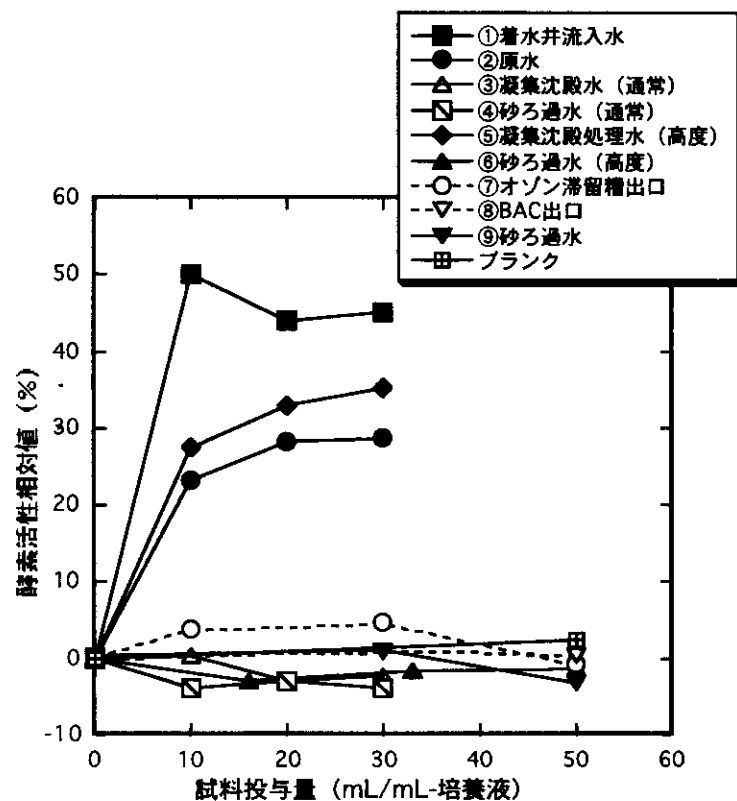


図-9 東京都試料水の試験結果