

った(①着水井流入水と②原水との比較)。

2) 通常処理系では、③凝集処理水の段階で作用は大きく低減し、ほぼ消失した。塩素注入を行っていることから、塩素による分解が進行した結果と考えられる。

3) これに対し、高度処理系の⑤凝集沈殿処理水では作用は低減していない。塩素注入の有無が大きく影響していることがうかがえる。

4) 高度処理系⑥砂ろ過によって作用は大きく低減し、その後作用はほぼ消失した。

5) オゾン処理によってわずかに作用が増大する傾向を認めた。ただし、この作用はつぎのBAC処理によって消失している。

6) BAC 処理後の塩素添加のエストロゲン様作用への影響は認められない。

7) 以上の結果は、平成 11 年度調査<sup>1)</sup>とおおむね同様の結果である。

## (2) 大阪市試料水

第 1 回目の結果を図-12～図-13 に示し、第 2 回目の結果を図-14～図-15 に示す。以下に要点をまとめる。

1) ②沈殿水、および③中オゾン処理前水に大きなエストロゲン様作用が認められた。

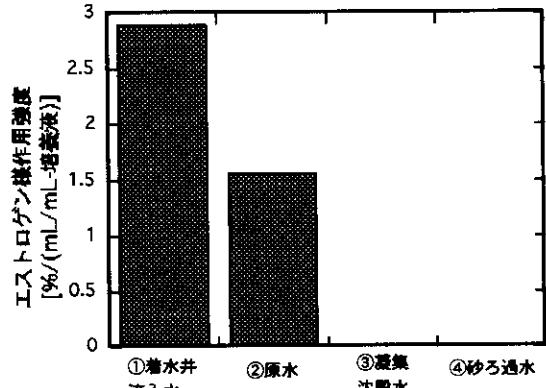


図-10 東京都試料水試験結果 (通常処理系)

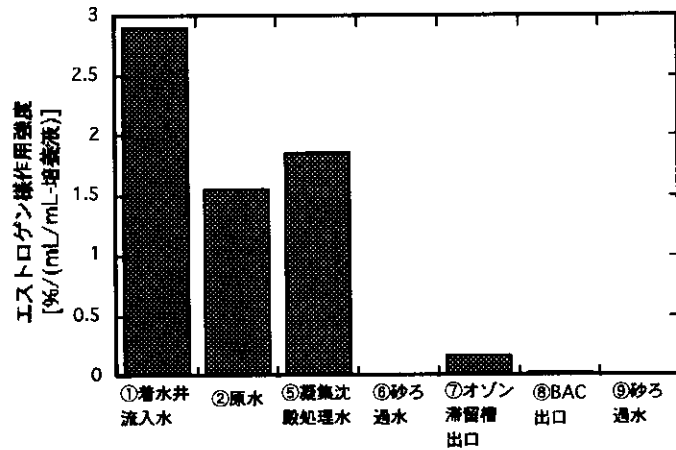


図-11 東京都試料水試験結果 (高度処理系)

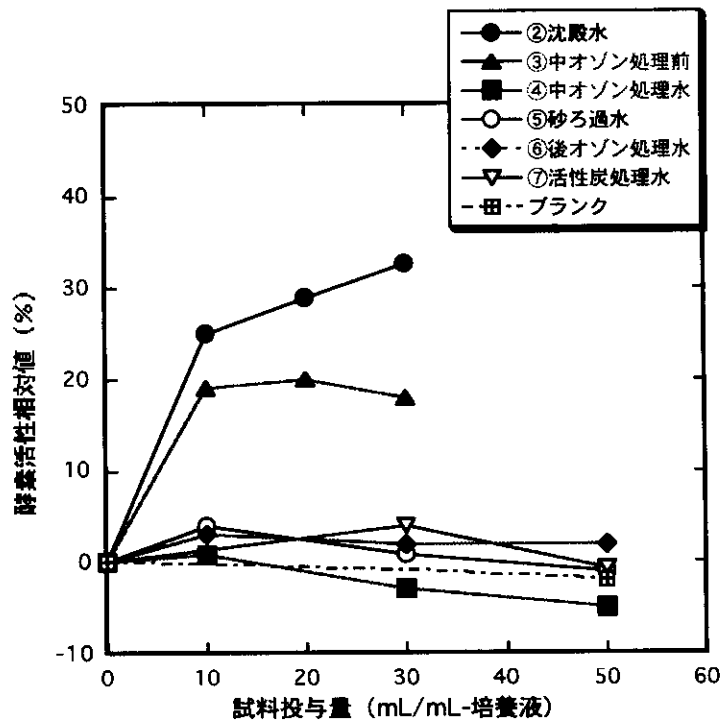


図-12 大阪市試料水の試験結果 (第 1 回目)

2) 第1回目の結果では、④中オゾン処理水の段階で作用が消失している。オゾン酸化によるエストロゲン様作用物質の分解にともなってエストロゲン様作用も大きく低減したといえる。⑤砂ろ過水以降の試料水についてもエストロゲン様作用は認められなかった。

3) 一方、第2回目の結果では、④中オゾン処理水、⑤砂ろ過水の段階でもエストロゲン様作用が残存していた。しかし、⑥後オゾン処理水以降では作用は認められなかった。

4) 以上より、原水に強いエストロゲン様作用がある場合でも、高度処理プロセスによってほぼ除去可能であることがわかる。

**参考文献**

- 1) 伊藤禎彦、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、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中の挙動と対策等に関する研究報告書、pp.149-165, 2000
- 2) 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 (37), 333-344, 2000

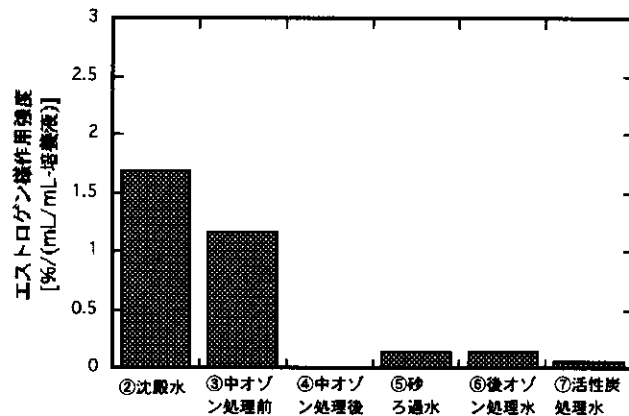


図-13 大阪市試料水試験結果 (第1回目)

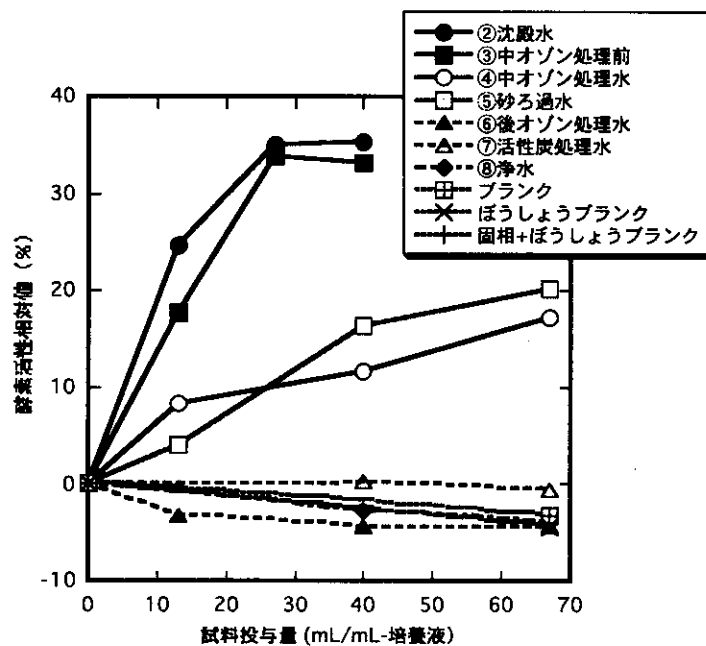


図-14 大阪市試料水の試験結果(第2回目)

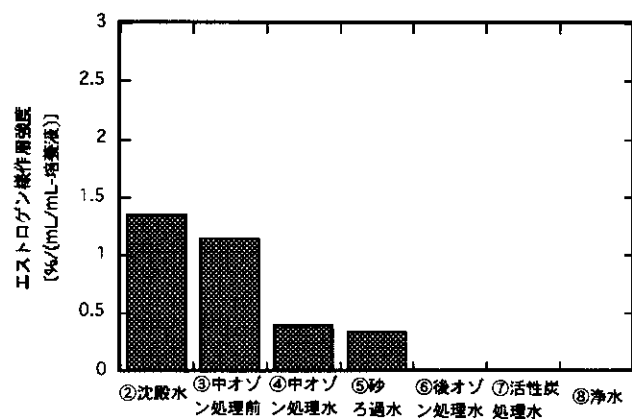


図-15 大阪市試料水試験結果 (第2回目)

- 3) 伊藤禎彦、MVLN アッセイ、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、pp.206-228, 1999
- 4) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Final Report, 1998.
- 5) 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.
- 6) S.Itoh, H.Ueda, T.Nagasaka, G.Nakanishi and H.Sumitomo, Evaluating Variation of Estrogenic Effect by Drinking Water Chlorination with the MVLN Assay, Water Science and Technology, Vol.42, Nos.7-8, pp.61-69, 2000.
- 7) 赤塚靖、鎌田素之、武田誠、亀井翼、眞柄泰基、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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 相澤貴子、大久保慎二、国包章一、胡建英：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、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中の挙動と対策に関する調査研究報告書、2000
- 11) 曾志紅、Behavior of Chlorophenols as Suspected Endocrine Disruptors in Chlorinated Water, 京都大学修士論文、56p, 2001.
- 12) 伊藤禎彦、中西岳、野中愛、水道水のエストロゲン様作用の塩素消毒後の変化、環境ホルモン学会第 3 回研究発表会要旨集、p.93, 2000.

分担研究報告書 7

アルキルフェノール類の塩素処理による副生成物と  
そのエストロゲン様活性

分担研究者 相澤貴子、国包章一  
協力研究者 大久保慎二

# アルキルフェノール類の塩素処理による副生成物と

## そのエストロゲン様活性

### PART 1 浄水処理工程におけるビスフェノール A 塩素処理副生成物の挙動調査および副生成物のエストロゲン様活性の評価

国立公衆衛生院 水道工学部 相澤 貴子、大久保 慎二、国包章一

#### 1.研究の経緯

昨年度の研究では、ビスフェノール A の塩素処理により 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A などの副生成物が生成することを LC/MS などを用いた分析により確認した。また、一部の副生成物は反応原体であるビスフェノール A に対してエストロゲンレセプターとの結合活性が高くなることを蛍光偏光度法により確認した。さらに、分子軌道法を用いてビスフェノール A と塩素との反応メカニズムと反応生成物を理論計算から推定し、LC/MS による実測値と比較した（参考 8、9）。また、副生成物の構造解析及びエストロゲンレセプターとの結合活性の評価には、純度の高い反応生成物が必要となるため、(株)東レリサーチセンターに委託し、数種の副生成物を LC により分取した。さらに、東京都水道局玉川水処理実験施設、及び大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラントにて実施されたビスフェノール A 等の添加処理実験においてビスフェノール A は通常処理、高度処理により分解除去でされることが確認された。特に前塩素処理による効果は大きいものであった。

#### 2.目的

浄水処理によりビスフェノール A は分解除去されるが、エストロゲンレセプターとの結合活性がビスフェノール A に対して高いビスフェノール A の塩素処理副生成物の処理性について調査する必要があるため、本年度は、昨年度および本年度の東京都水道局玉川水処理実験施設にて実施されたビスフェノール A 等の添加処理実験、また、本年度の大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラントにて実施されたビスフェノール A 等の添加処理実験によりサンプリングされた各フローにおける試料水中のビスフェノール A の塩素処理副生成物を LC/MS 等を用いて測定し、処理過程における処理性を評価した。また、昨年度、(株)東レリサーチセンターにより分取されたビスフェノール A の塩素処理副生成物とエストロゲンレセプターとの結合活性を蛍光偏光度法により評価した。

### 3.実験方法

#### 3-1.浄水処理工程におけるビスフェノール A 塩素処理副生成物の生成量と処理性調査

##### 3-1-1.試料調製

試料は平成 11、12 年度に東京都水道局玉川水処理実験施設及び大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラントにて行われたビスフェノール A 等の添加処理実験において採取された。採取試料はそれぞれ、(財)千葉県薬剤師会検査センターにより固相濃縮されたもの(ジクロロメタン溶液)を窒素パージにより乾固後、アセトニトリルにて転溶し、100,000 倍濃縮した。

##### 3-1-2.測定条件

[LC/APCI-MS]

[LC]

使用装置：日立 L-6200

分離カラム：資生堂 CAPCELL PAK C18 UG120 S3(4.6mm×150mm、粒子径 3  
μm)

移動相 A：0.1%酢酸、B：アセトニトリル

流速、温度：1.0ml/min、40℃

試料注入量：2μl

グラジエント条件：

A:80% (0min) →50% (17min) →45% (55min) →40% (60min) →80% (60.1min)

[MS]

使用装置：日立 M1200H

イオン化：APCI/負イオンモード

霧化温度、脱溶媒温度：180℃、400℃

ドリフト電圧、マルチプライヤ電圧、ニードル電圧：80eV、1800eV、2700eV

モニタリング物質(分子量)：

- (1) 2-クロロビスフェノール A (262)、(4) 2,2'-ジクロロビスフェノール A (296)、
- (5) 2,2',6-トリクロロビスフェノール A (330)、
- (6) 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A (364)、
- (8) 2,4,6-トリクロロフェノール (196)、
- (14) (456)、(15) (490)、(16) (524)

※ (14)、(15)、(16) の推定構造は参考 2 を参照

#### 3-2.ビスフェノール A 塩素処理副生成物のエストロゲン様活性の評価

##### 3-2-1.測定試料

- ・ビスフェノール A (和光純薬製、純度 95%)
- ・2-クロロビスフェノール A (分取品、成分内容は参考 5 に示した。)

- ・ 2,2'-ジクロロビスフェノール A (分取品、成分内容は参考 6 に示した。)
- ・ 2,2',6-トリクロロビスフェノール A (分取品、成分内容は参考 7 に示した。)
- ・ 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A (東京化成製、純度 98%)
- ・ 2,4,6-トリクロロフェノール (東京化成製、純度 96%)
- ・ 17 $\beta$ -エストラジオール (和光純薬製、純度 97%)

### 3-2-2.測定方法

FP-Screening-for-Competitors Kit ER  $\alpha$ , high sensitivity (宝酒造製) と蛍光偏光度測定装置である Full Range Beacon 2000 (Pan Vera 製) により励起波長 360nm、蛍光波長 535nm で蛍光偏光度を測定した。

## 4.結果および考察

### 4-1.浄水処理工程におけるビスフェノール A 塩素処理副生成物の生成量と処理性調査

#### 4-1-1.ビスフェノール A 塩素処理基礎実験における 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A および 2,4,6-トリクロロフェノールの生成量

昨年度、実施したビスフェノール A の塩素処理実験方法に基づいて、水温 25°C、pH=7.5 においてビスフェノール A (約 500  $\mu$ g/l、約 2.19  $\mu$ M) に塩素 (約 1.0mg/l、次亜塩素酸換算で約 19.1  $\mu$ M) を添加して、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A および 2,4,6-トリクロロフェノールの生成量を測定し、その結果を図 1 に示した。

塩素添加 1 時間後における 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A の生成量は 184  $\mu$ g/l ( $5.05 \times 10^{-1} \mu$ M) で最も多く、2,4,6-トリクロロフェノールの最も多く生成した塩素添加 3 時間後における生成量は 26  $\mu$ g/l ( $1.33 \times 10^{-1} \mu$ M) であった。

この結果から、1 モルのビスフェノール A

が 8.72 モルの次亜塩素酸と反応して、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A が最大 0.23 モル、2,4,6-トリクロロフェノールでは最大 0.06 モル生成することが確認された。

#### 4-1-2.平成 11 年度東京都水道局玉川水処理実験施設の試料の結果

表 1、2 に平成 11 年 11 月 19 日及び平成 12 年 1 月 14 日にサンプリングされた各工程の試料におけるモニタリング物質の検出状況を示した。また、通常処理の凝集沈殿処理水中に検出された 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A (6)、M.W.456 (14)、M.W.490 (15)、M.W.524 (16) のクロマトグラムを参考 1~4 に示した。

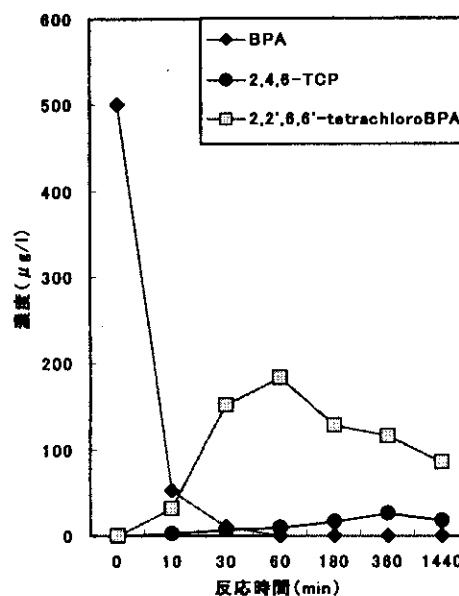


図 1 ビスフェノール A 塩素処理基礎実験の結果

表 1 より、平成 11 年 11 月 19 日に実施された添加処理実験における固相ブランクを除く全試料において 2,4,6-トリクロロフェノール (8)、2-クロロビスフェノール A (1)、2,2'-ジクロロビスフェノール A (4)、2,2',6-トリクロロビスフェノール A (5) はバックグラウンドが高いため、検出できなかった。2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A (6)、M.W.456 (14)、M.W.490 (15)、M.W.524 (16) の各物質は通常処理の凝集沈殿処理水にて検出された。2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A (6) 標準溶液を調製して、検量線を作成した結果、通常処理の凝集沈殿処理水中に  $0.09 \mu\text{g/l}$  ( $0.25 \text{ nM}$ )

表 1 東京都水道局玉川水処理実験施設 (1999.11/19) 添加処理実験試料中のビスフェノール A 塩素処理副生成物の検出状況

サンプリング日時	サンプル名	モニタリング物質 ( $\mu\text{g/l}$ )							
		(8)	(1)	(4)	(5)	(6)	(14)	(15)	(16)
平成11年11月19日	① 着水井流入水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	② 原水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	通常処理								
	③ 凝集沈殿水	<0.02	不検出	不検出	不検出	0.09	検出	検出	検出
	④ 砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	高度処理								
	⑤ 凝集沈殿処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	⑥ 砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	⑦ オゾン滞留槽出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	⑧ BAC出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
⑨ 砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
固相ブランク	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
定量下限値	0.02	×	×	×	0.02	×	×	×	

注 (8) 2,4,6-トリクロロフェノール  
 (1) 2-クロロビスフェノールA  
 (4) 2,2'-ジクロロビスフェノールA  
 (5) 2,2',6-トリクロロビスフェノールA  
 (6) 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノールA  
 (14) M.W.456の物質  
 (15) M.W.490の物質  
 (16) M.W.524の物質  
 定量下限値中の×は標準物質が市販されていないため、算出できなかった。

存在することが確認された。

前塩素処理を行っている通常処理の凝集沈殿処理水中において、(6) 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A、(14) M.W.456、(15) M.W.490、(16) M.W.524 が検出されたが、前塩素処理を行っていない高度処理の凝集沈殿処理水中に検出されなかったことから、前塩素処理によりビスフェノール A は分解除去されるが、副生成物が生成することが示唆された。

塩素処理基礎実験で得られた結果から、 $5 \mu\text{g/l}$  ( $2.19 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ) のビスフェノール A に対して、 $1.8 \mu\text{g/l}$  ( $5.05 \text{ nM}$ 、反応原体であるビスフェノール A に対する生成率 23%) 程度 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A が生成されることが示唆される。しかし、添加処理実験での通常処理の凝集沈殿処理水中に検出された 2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A は  $0.09 \mu\text{g/l}$  ( $0.25 \text{ nM}$ 、反応原体であるビスフェノール A に対する生成率 1%程度) であり、基礎実験に比べて生成量が少なかった。pH の影響があると考えられたが、添加処理実験時における通常処理の凝集沈殿処理水の pH は 7.2 であり、基礎実験の pH 値 (7.5) とほぼ同等であるため、pH の影響はほとんどないことが示唆された。



平成 12 年 1 月 14 日に実施された添加処理実験の各試料に関して、表 2 より、全てのモニタリング物質は不検出であった。

表 2 東京都水道局玉川水処理実験施設（2000.1/14）添加処理実験試料中のビスフェノール A 塩素処理副生成物の検出状況

	サンプル名	モニタリング物質 (μg/l)								
		(8)	(1)	(4)	(5)	(6)	(14)	(15)	(16)	
平成12年1月14日	①着水井流入水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	②原水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	通常処理	③凝集沈殿水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		④砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	高度処理	⑤凝集沈殿処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑥砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑦オゾン滞留槽出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑧BAC出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑨砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	固相ブランク	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	定量下限値	0.02	×	×	×	0.02	×	×	×	

4-1-3.平成 12 年度東京都水道局玉川水処理実験施設の試料の結果

表 3 に平成 12 年度東京都水道局玉川水処理実験施設において実施された添加処理実験の処理水中のモニタリング物質の検出状況を示した。

表 3 より、各処理水中には全てのモニタリング物質は不検出であった。

表 3 東京都水道局玉川水処理実験施設添加処理実験試料中のビスフェノール A 塩素処理副生成物の検出状況

	サンプル名	モニタリング物質 (μg/l)								
		(8)	(1)	(4)	(5)	(6)	(14)	(15)	(16)	
東京	①着水井流入水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	②原水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	通常処理	③凝集沈殿水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		④砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	高度処理	⑤凝集沈殿処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑥砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑦オゾン滞留槽出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑧BAC出口	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑨砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	固相ブランク	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	定量下限値	0.02	×	×	×	0.02	×	×	×	

4-1-4.平成 12 年度大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラントの試料の結果

表 4 に平成 12 年度大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラントにおいて実施された添加処理実験の各処理水中のモニタリング物質の検出状況を示した。

表 4 大阪市水道局柴島浄水場高度処理実証プラント添加処理実験試料中のビスフェノール A 塩素処理副生成物の検出状況

	サンプル名	モニタリング物質 (μg/l)								
		(8)	(1)	(4)	(5)	(6)	(14)	(15)	(16)	
大阪	②沈殿水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	③中オゾン処理前	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出	
	高度処理	④中オゾン処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑤砂ろ過水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑥後オゾン処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		⑦活性炭処理水	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
		固相ブランク	<0.02	不検出	不検出	不検出	<0.02	不検出	不検出	不検出
	定量下限値	0.02	×	×	×	0.02	×	×	×	

表 4 より、各処理水において全てのモニタリング物質は不検出であった。

#### 4.2.ビスフェノール A 塩素処理副生成物のエストロゲン様活性の評価

図 2 にビスフェノール A、2-クロロビスフェノール A、2,2'-ジクロロビスフェノール A、2,2',6-トリクロロビスフェノール A、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A、17 $\beta$ -エストラジオール、2,4,6-トリクロロフェノールのエストロゲンレセプター結合活性の変化を示した。表 5 には上記 7 物質のエストロゲンレセプター結合阻害率 50% 時の濃度およびビスフェノール A に対する活性倍率、17 $\beta$ -エストラジオールに対する活性倍率を示した。表 5 より、ビスフェノール A の塩素処理副生成物である 2,4,6-トリ

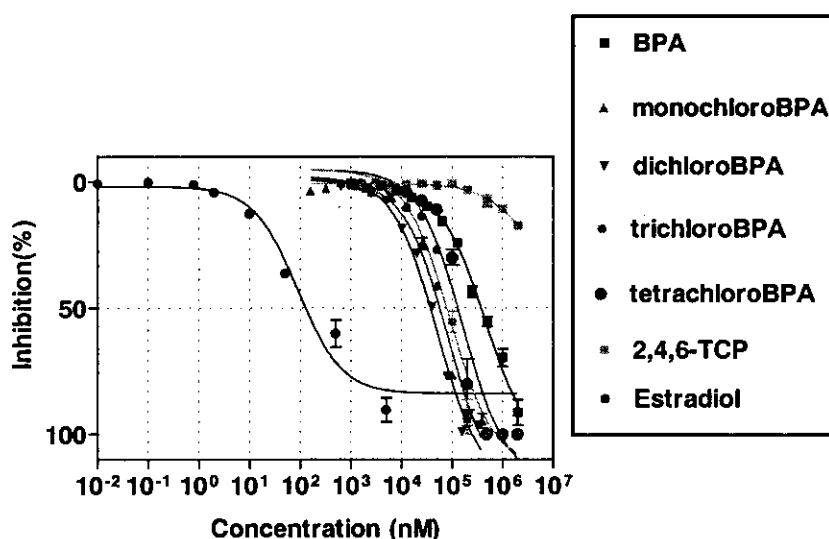


図 2 ビスフェノール A 塩素処理副生成物のエストロゲンレセプター結合活性の変化

クロフェノールを除く 2-クロロビスフェノール A、2,2'-ジクロロビスフェノール A、2,2',6-トリクロロビスフェノール A、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A はビスフェノール A に対して結合活性が高かった。

ビスフェノール A に対する活性倍率は 2,4,6-トリクロロフェノールで 0.15 倍、2-クロロビスフェノール A で 5.5 倍、2,2'-ジクロロビスフェノール A で 9.1 倍、2,2',6-トリクロロビスフェノール A で 5.1 倍、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノール A では 2.8 倍であった。

2-クロロビスフェノール A、2,2'-ジクロロビスフェノール A、2,2',6-トリクロロビスフェノール A は分取品であり、参考 7 の 2,2',6-トリクロロビスフェノール A の分取品の純度から、測定結果の信頼性は高い。また、参考 6 より、2,2'-ジクロロビスフェノ

ルAの分取品は2,4,6-トリクロロフェノールの存在比率が25.4%と比較的高いが、2,4,6-トリクロロフェノールは結合活性が低いため、2,2'-ジクロロビスフェノールAの測定結果の信頼性も高い。しかし、2-クロロビスフェノールAの分取品は(10) M.W.220の存在比率が41.9%で、2,2'-ジクロロビスフェノールAの存在比率が24.2%であるが、2-クロロビスフェノールAの存在比率は2.5%であるため、測定結果の信頼性は低くもとのとなった。

同定されたビスフェノールA、及び塩素処理副生成物のエストロゲン様活性を17β-エストラジオールと比較すると表5のようであり、17β-エストラジオールに対する活性倍率は10<sup>-5</sup>~10<sup>-3</sup>のオーダーであるため、17β-エストラジオールに比べて、結合活性

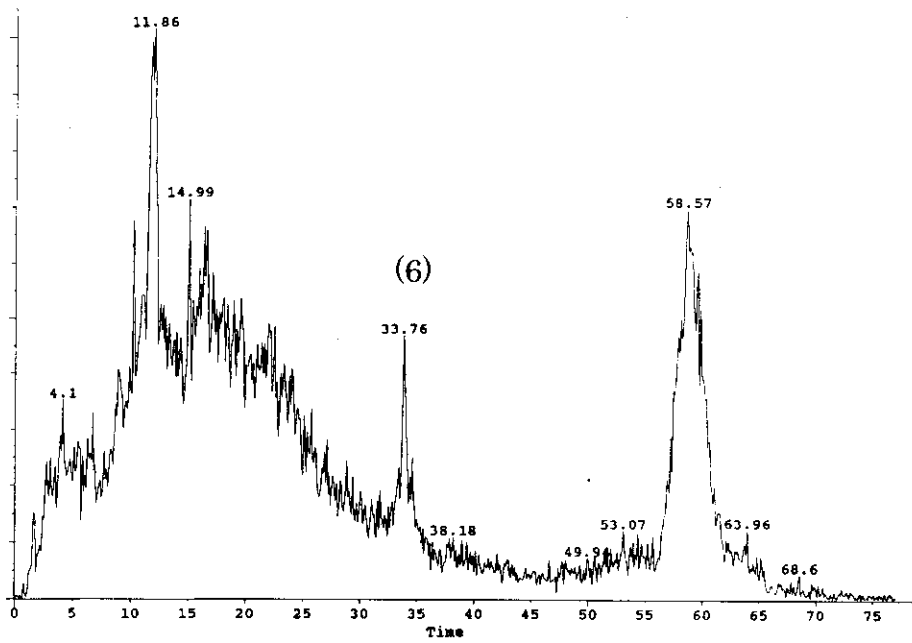
表5 ビスフェノールA 塩素処理副生成物のエストロゲン様活性の評価

物質名	IC50(nM)	ビスフェノールAに対する活性倍率	17β-エストラジオールに対する活性倍率
ビスフェノールA	4.55E+05	1.0E+00	2.0E-04
2-クロロビスフェノールA	8.28E+04	5.5E+00	1.1E-03
2,2'-ジクロロビスフェノールA	5.03E+04	9.1E+00	1.8E-03
2,2',6-トリクロロビスフェノールA	9.00E+04	5.1E+00	9.9E-04
2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノールA	1.64E+05	2.8E+00	5.4E-04
17β-エストラジオール	8.92E+01	5.1E+03	1.0E+00
2,4,6-トリクロロフェノール	2.98E+06	1.5E-01	3.0E-05

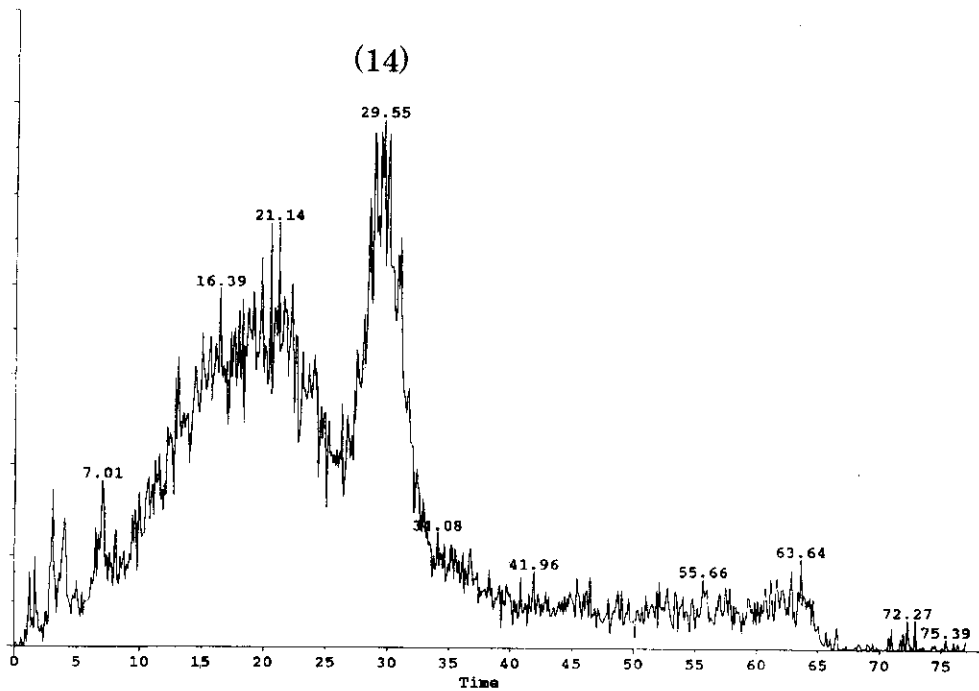
はかなり低い結果となった。

## 5.まとめ

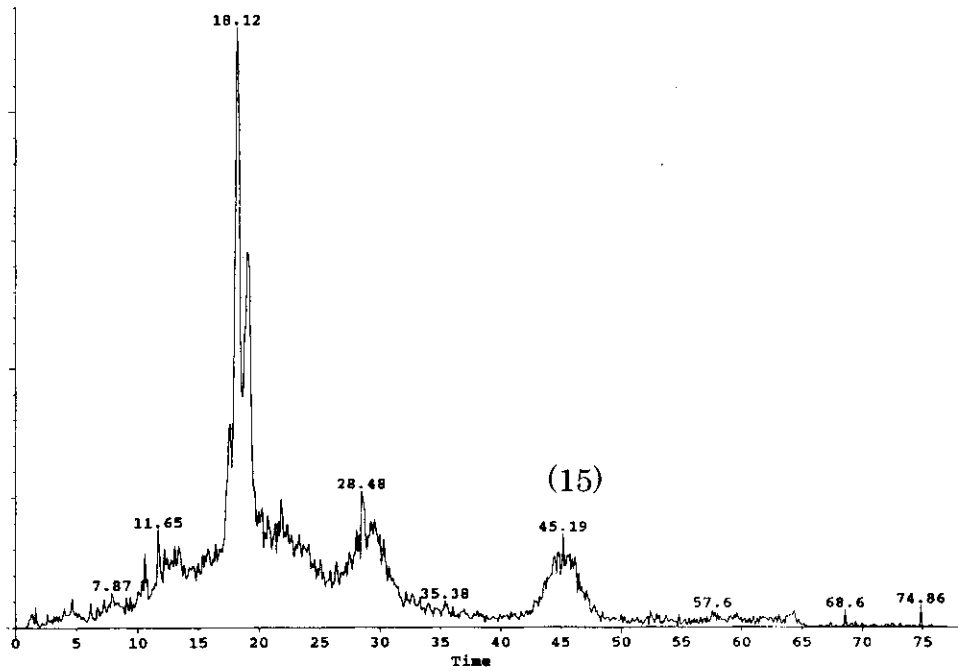
- 1) ビスフェノールAの塩素処理副生成物は通常処理工程の前塩素処理により生成するが、砂ろ過により完全に分解除去される。また、高度処理においては塩素との接触がないため、生成しないことが確認された。
- 2) ビスフェノールAの塩素処理副生成物である2-クロロビスフェノールA、2,2'-ジクロロビスフェノールA、2,2',6-トリクロロビスフェノールA、2,2',6,6'-テトラクロロビスフェノールAはビスフェノールAに対して、活性が高いが、17β-エストラジオールに比べて10<sup>-5</sup>~10<sup>-3</sup>のオーダーとかなり低かった。
- 3) 通常処理工程の凝集沈殿処理水中に検出されたビスフェノールAの塩素処理副生成物である(14) M.W.456、(15) M.W.490、(16) M.W.524を分取して、構造解析およびエストロゲンレセプターとの結合活性の評価を今後行う予定である。



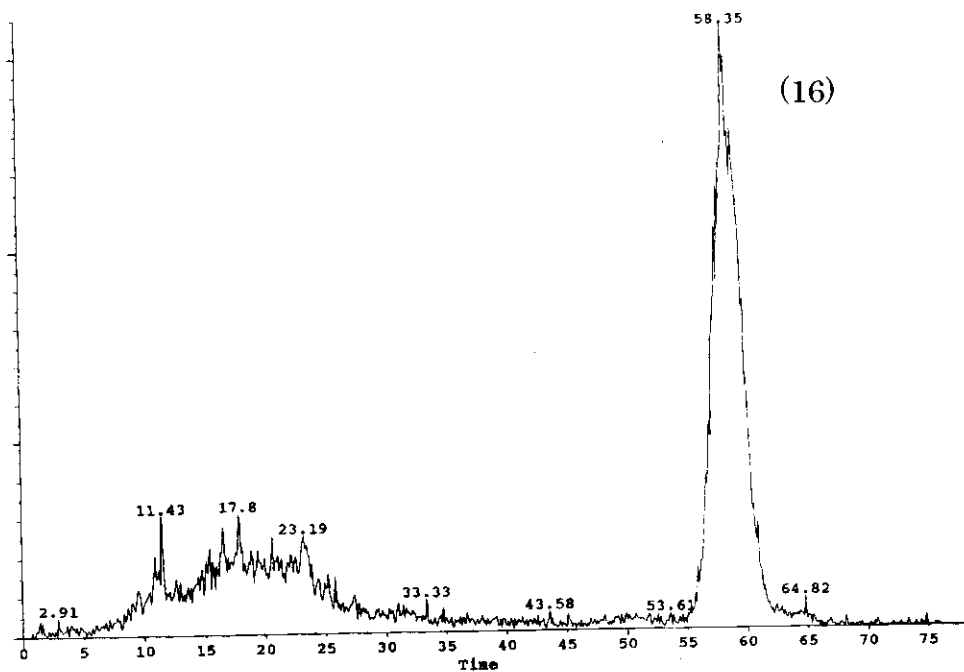
参考 1 通常処理の凝集沈殿処理水において検出された (6) 2,2',6,6'-tetrachloroBPA のクロマトグラム (1999.11/19 東京都水道局玉川水処理実験施設添加処理実験)



参考 2 通常処理の凝集沈殿処理水において検出された (14) M.W.456 のクロマトグラム (1999.11/19 東京都水道局玉川水処理実験施設添加処理実験)



参考 3 通常処理の凝集沈殿処理水において検出された (15) M.W.490 のクロマトグラム (1999.11/19 東京都水道局玉川水処理実験施設添加処理実験)



参考 4 通常処理の凝集沈殿処理水において検出された (16) M.W.524 のクロマトグラム (1999.11/19 東京都水道局玉川水処理実験施設添加処理実験)

参考5 2-クロロビスフェノールAの分取品中に存在する物質の面積値に基づいた存在比率

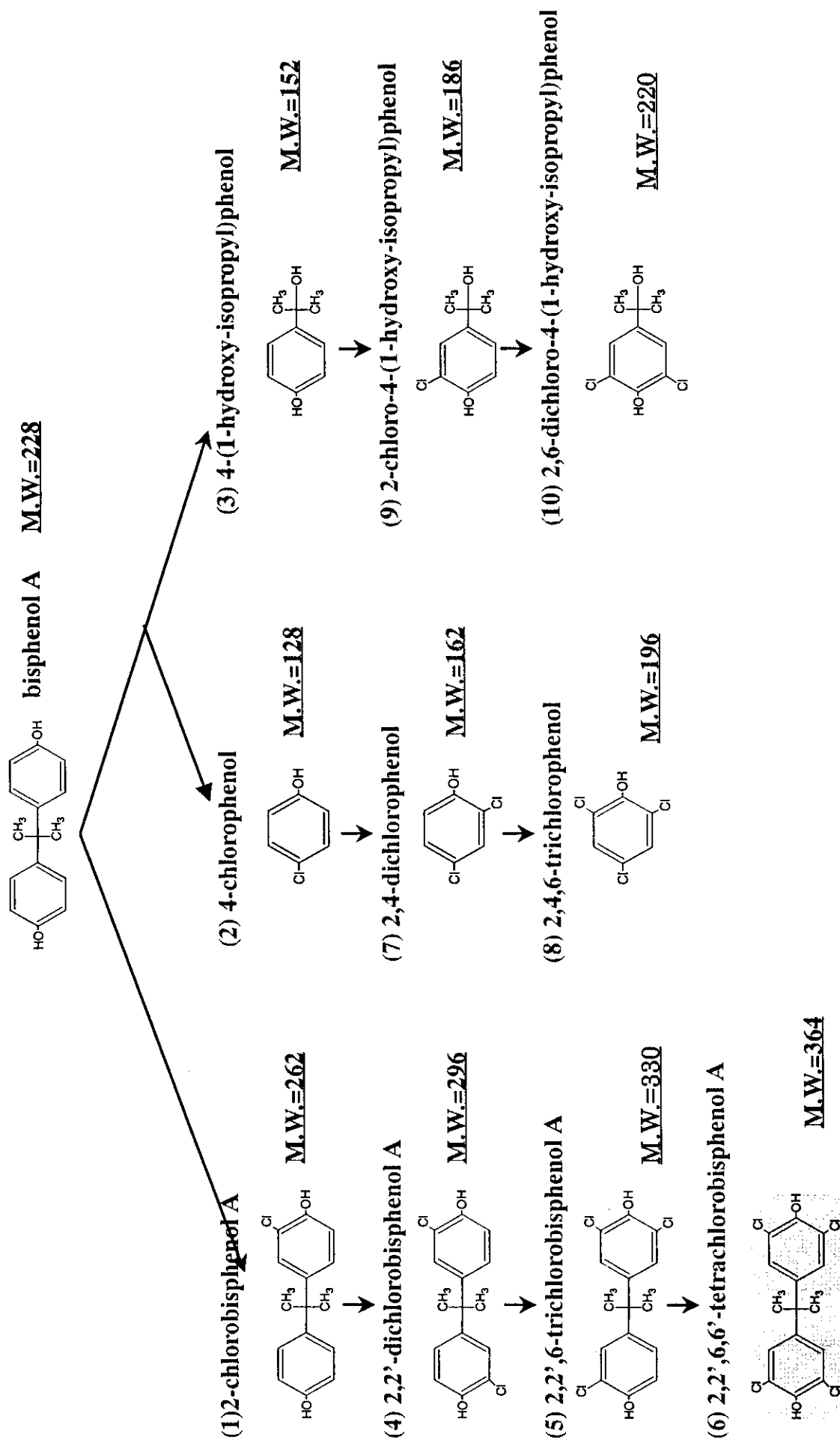
物質No.	M.W.	面積値	全ピーク面積値中の各物質の比率
(10)	220	185810	41.9
(1)	262	11235	2.5
(8)	196	95279	21.5
(4)	296	107516	24.2
(5)	330	14655	3.3
(13)	380	11984	2.7
(6)	364	17490	3.9

参考6 2,2'-ジクロロビスフェノールAの分取品中に存在する物質の面積値に基づいた存在比率

物質No.	M.W.	面積値	全ピーク面積値中の各物質の比率(%)
(10)	220	14124	0.2
(8)	196	1478461	25.4
(4)	296	3692606	63.3
(5)	330	283548	4.9
(6)	364	164904	2.8
(14)	456	198155	3.4

参考7 2,2',6-トリクロロビスフェノールAの分取品中に存在する物質の面積値に基づいた存在比率

物質No.	M.W.	面積値	全ピーク面積値中の各物質の比率(%)
(5)	330	13994000	93.0
(6)	364	1049346	7.0



※ 黄緑色で塗りつぶされた物質は通常処理の凝集沈殿処理水に検出された物質である。

図7 ビスフェノール A の塩素反応メカニズム (1)

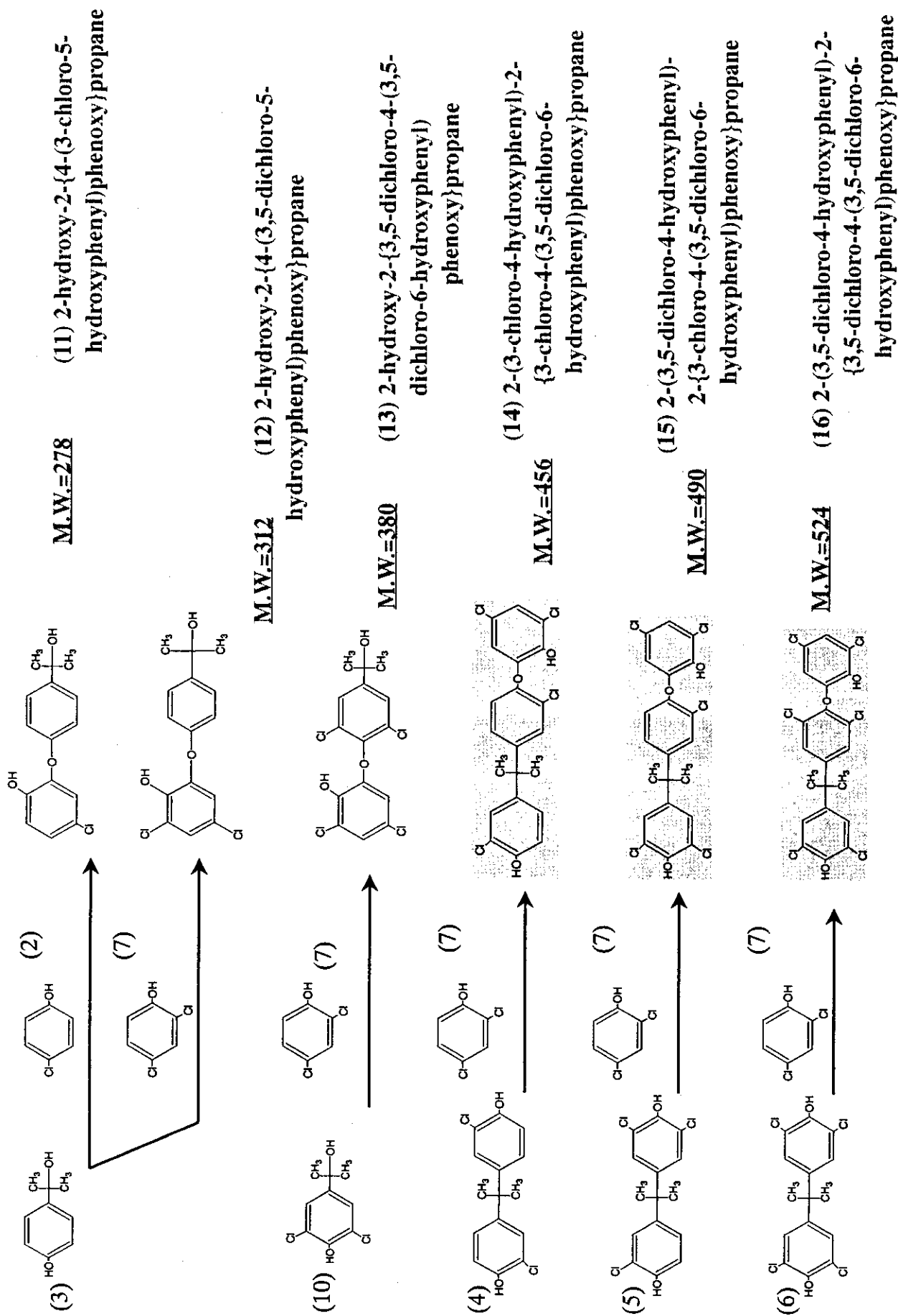


図8 ビスフェノールAの塩素反応メカニズム (2)



## Part2 ノニルフェノールの塩素処理による内分泌攪乱作用の活性変化 とその評価

国立公衆衛生院水道工学部 相澤貴子、大久保慎二、国包章一  
北京大學城市環境学系 胡建英

### 1. はじめに

ノニルフェノール (NP) は魚類、鳥類、哺乳動物類に対するエストロゲン様作用が多く報告されている。NPがエストロゲンレセプターと結合して、低い濃度で魚類の vitellogenin を誘導することや、ラットと魚類へのNP暴露実験結果から、NPのエストロゲン様作用は精巣発育を阻害することなどが明らかになっている。NPのエストロゲン様作用はエストラジオールより低い、非イオン界面活性剤の生分解物としてNPの河川水等に検出される頻度やその濃度が高いことから、NP暴露によるリスクが懸念されている。

NPの人間暴露経路の一つは飲料水であるため、浄水処理過程における NP の除去性など挙動を究明し水道におけるNPが引き起こす内分泌攪乱作用を正確に評価する必要がある。通常、フェノール類物質は浄水処理の塩素消毒に用いる塩素との反応性が高いという化学特性を有する。従って、NPが存在する水道原水を水源とする場合は、NP が塩素と反応し、塩素化NPなどの物質が生成されると推定できる。NPの水道における内分泌攪乱作用を正確に評価するには、NP の塩素反応生成物を同定し、その生成物のエストロゲン様活性への寄与を考慮しなければならない。

反応生成物の同定にはGC/MS法やLC/MS法等分析手段が有力であるが、反応メカニズムが明らかにされていない反応ではこれらの分析手段のみではすべての副生成物を同定するには時間と労力を要する。昨年度、我々は有機合成分野で化学反応経路を予測するによく使われている分子軌道法とGC/MS法やLC/MS法と組み合わせる方法を確立し、塩素処理におけるビスフェノールAの反応経路を推定した。ビスフェノールAと塩素との反応はベンゼン環上の塩素付加反応とフェノール類の二量体の生成反応が挙げられ、生成物のエストロゲン様作用はビスフェノールA原体より高いとの結果が得られた。

本研究では、昨年度開発した分析方法と分子軌道法と組み合わせた方法を用いて、塩素処理過程におけるNP分解経路など反応メカニズムの解明を試みた。最後に酵母 Two-hybrid 法を用いて、塩素処理により、NPの内分泌攪乱作用の活性変化を調べた。

### 2. 実験方法

#### 2.1 反応経路に関する計算方法

NPと次亜塩素酸との反応解析に必要な部分電荷、HOMO軌道密度、分子軌道エネルギー、最適化構造、反応座標、振動スペクトル (IR) の計算には半経験分子軌道法プログラムのCACHe MOPAC(CACHe Scientific社)のPM3ハミルトニアンを用いた。

#### 2.2 塩素処理条件

4Lの超純水に2mgのNP(約500 $\mu$ g/l)を溶解し、NaClO(1.3mg/l)を添加してからH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>溶

液でpH約7.5にした。反応温度は22℃とした。塩素反応時間0、10分、1、2、3、4と10時間の間隔で試料各々0.5Lを採水し、Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>で残留塩素を消去した。7mlのCH<sub>3</sub>OH/t-butyl methyl ether(10:90)混合液、5mlの水でWaters OASIS HLB固相カートリッジをコンディショニングし通水した後、5mlのCH<sub>3</sub>OH/t-butyl methyl ether(10:90)混合液で抽出した。4.5mlの抽出液を窒素パーズで溶媒を完全除去してからDMSOで0.1mlにメスアップし、酵母Two-hybrid法で測定した。残った0.5mlの抽出液をヘキサンまたはアセニトリルに転溶してGC/MSを用いた測定を行った。

### 2.3 GC/MS分析条件

本実験でNPと反応生成物の同定にはGC/MS機器を用いた。GCはHewlett Packard(HP) 5890 Series II、MSはHewlett Packard(HP) 5971MSDで、分析カラムはHP-5MS(30m x 0.25mm x 0.25um)で、注入量は2μlであった。測定条件は注入口温度230℃、検出器温度280℃で、EI 70eVであった。カラムの昇温プログラムは50℃(20℃/分)から200℃まで上昇した後に2分間保持し、5℃/分の速度で260℃まで昇温した。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 GC/MS法による副生成物の同定

多くの文献にも報告されているように、環境中に検出されたNPは多くの異性体の混合物である。本研究のGC/MS分析条件では、11個のピークが検出された。図-1(a)は反応10分後のSCANモードで得られたGC/MSクロマトグラムである。塩素処理によりNPが迅速に分解されることを確認できた。表-1は保持時間15分前後に現れる10個のピークのマス

スペクトルを示しており、NP塩素生成物としてジクロロノニルフェノール(以下DCNP、分子量=288)を確認した。DCNP以外にモノクロロノニルフェノール(以下MCNP、分子量254)も検出された。さらにSCANモードでは検出されなかったが、SIMモードで極微量のトリクロロフェノールも検出された。その際、NPの残留濃度は

表-1 NP塩素置換数2のマススペクトル

No	保持時間(min)	マススペクトル (RI%)
1	14.327	175(36),189(100),203(6),231(39),245(12),288(12)
2	14.560	175(6),189(4),203(100),288(7)
3	14.667	175(43),189(61),203(42),217(100),259(18),288(22)
4	14.774	175(45),189(85),203(96),217(100),259(15),288(28)
5	14.870	175(8),189(6),203(100),288(10)
6	14.934	175(80),189(100),203(18),231(95),245(21),288(16)
7	15.019	175(58),189(43),203(100),217(99),245(28),288(11)
8	15.115	175(76),189(92),203(17),231(100),288(12)
9	15.307	175(11),189(3),203(100),288(5)
10	15.403	175(29),189(9),217(100),288(5)

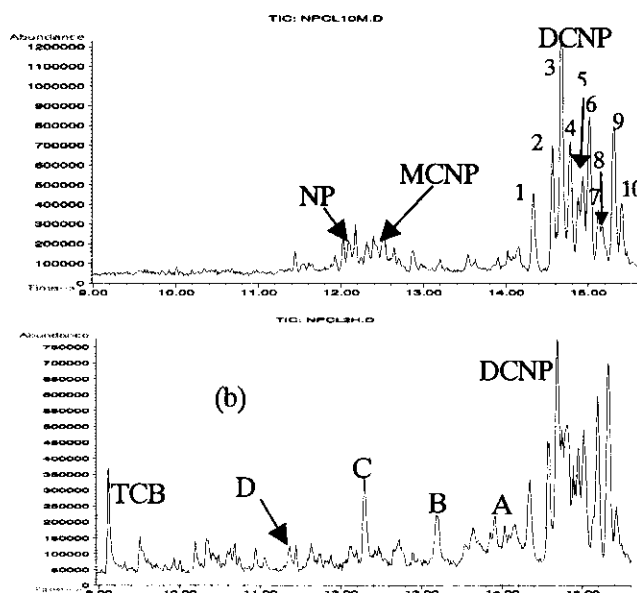


図-1 NP塩素処理液のGC/MSクロマトグラム  
(a)反応時間10分；(b)反応時間2時間

初期濃度の 15%であり、生成物の中では、DCNPの生成量が最も高かった。

図-1 (b)に反応2時間後の反応生成物のGC/MSクロマトグラムを示した。反応10分と比べて、MCNPのピークが消え、DCNPのピーク高さが低くなる一方、トリクロ

ロフェノール(以下、TCP)生成量が高くなり、それ以外にも数種類の物質が検出された。特に、保持時間11.34分(D)、12.278分(C)、13.181分(B)と14.309分(A)に現れるピークにおけるマススペクトルの基準イオンはm/z205であり、分子イオンはそれぞれ220、234、248と262であった。例として、図-2に保持時間13.181分に検出された物質(B)のマススペクトルを示した。図に示したマススペクトルからこの物質は二個の塩素原子を含有するもので、NPのアルキル基に壊裂反応が起こり、図-2に示したような構造を持つ物質が推定された。

また分子イオンが220、234と262の物質は図に示した構造中の-Rがそれぞれ-CH<sub>3</sub>、-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>とC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>の物質である。上記物質以外にも数種類副生成物が検出されたが、具体的な構造は推定できなかった。

各塩素反応時間毎の濃縮試料をGC/MS (SIMモード)で測定して得られたNP及び副生成物の面積値を図-3に示す。反応時間10分においてMCNPの生成量がすでに最大に達したのに対して、DCNPの生成量は反応時間10分になっても増加しているが、反応時間2時間になってから急速に減少し、TCPなどの物質へと分解した。

上記のGC/MS法による分析結果から、図-4にNPと次亜塩素酸との反応経路が推定された。

### 3. 2 分子軌道法による反応経路解析

上記の反応メカニズムを究明し、反応経路を確認するために本研究では反応経路に分子軌道法の適用を試みた。

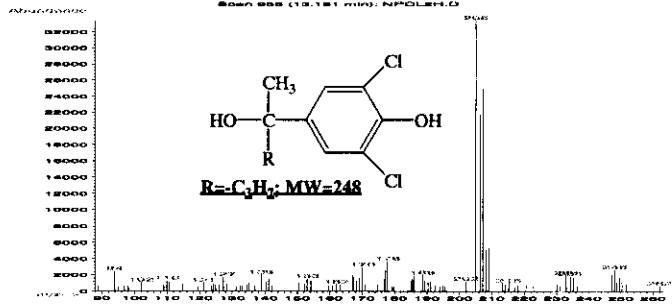


図-2 反応2時間後混合液中の生成物のマススペクトル  
保持時間13.181分

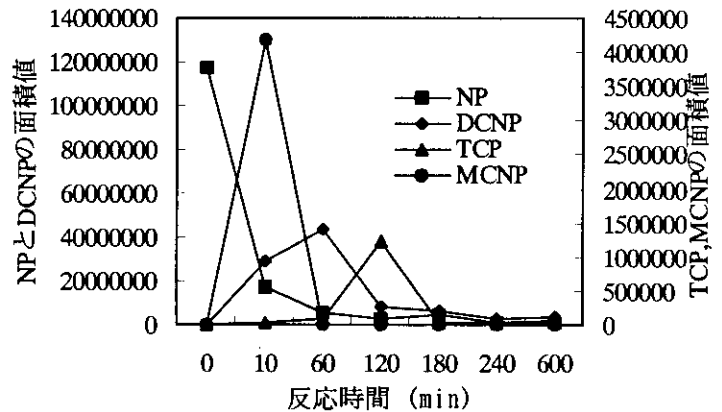


図-3 塩素処理によるNP副生成物

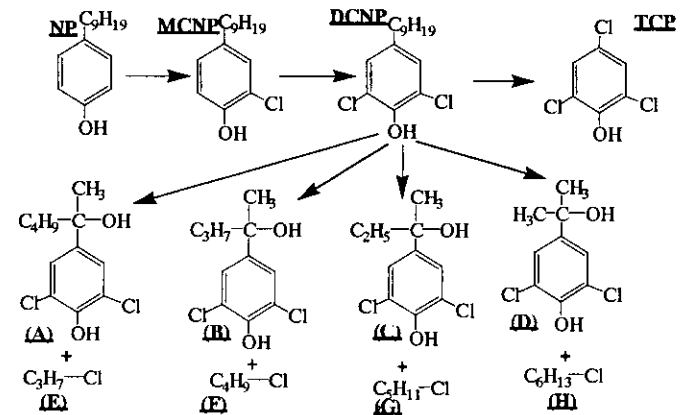


図-4 塩素処理過程におけるNPの分解経路

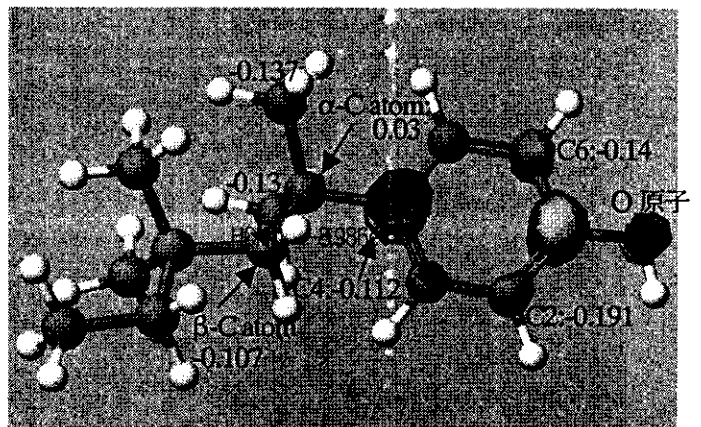


図-5 NPの各原子上の電荷とHOMO密度  
緑と水色はHOMO密度、数字は電荷

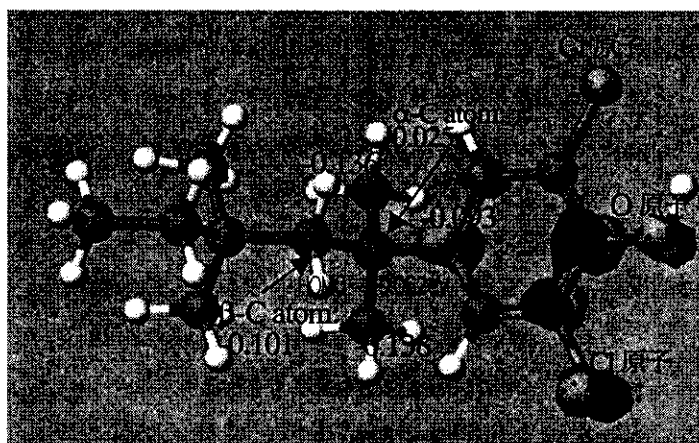
NPの異性体は多いため、図一5に示した構造を仮定して、NPと次亜塩素酸との反応メカニズムを検討した。まずキーワードESPを用いて静電ポテンシャル電荷を求め、水素原子以外のベンゼン環上の負電荷が高い三つの炭素原子の値を図一5に示した。NPが電荷支配的な反応の場合は、最も負の電荷を持つC2炭素原子が次亜塩素酸分子において正電荷を持つ塩素原子の攻撃を受けると考えられる。一方、HOMOにおけるNPの各原子の密度も図に示した。各原子のHOMO密度を比較すると、ベンゼン環上のC4原子が最も大きく、求電子攻撃を受けやすいと考えられる。従って、塩素のベンゼン環の付加位置を決めるには、塩素とNPとの反応は分子軌道的な反応か、それとも静電ポテンシャルを見るべきかを決めなければならない。そのために、塩素付加反応の遷移状態を求め、活性化エネルギーの大きさを比較した。

まず、C2に塩素原子の攻撃を受けた生成物を最適化し、遷移状態を求めて、活性化エネルギーを計算すると、0.12kcal/molとなった（計算方法は昨年度の報告書と同様）。

次に、比較のために、HOMO密度がC2より高く、部分電荷がC2より負から遠いC4位置の塩素付加反応の活性エネルギーも求めた。この反応活性化エネルギーは0.14kcal/molで、上記反応より高くなっている。その結果から、NPベンゼン環への付加反応は電荷が支配的な反応が示唆された。

上記計算とGC/MS分析の結果から、NPは次亜塩素酸と反応して、MCNPが生成された後に速やかにDCNPになると

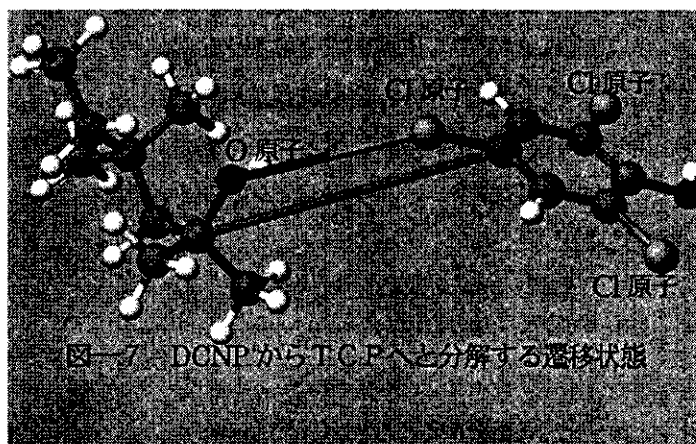
考えられる。DCNPが次亜塩素酸と更に反応して、どのような反応生成物が形成されるかを検討した。図一6はDCNP分子の各原子毎の電荷とHOMO密度を示した。ノニル基の $\alpha$ -Cは0.025という



図一6 DCNP各原子の電荷とHOMO密度  
緑と水色はHOMO密度、数字は電荷

正電荷を持ち、その隣の全ての炭素原子は負

電荷を持つ。上記の計算で分かったように、DCNPと次亜塩素酸との反応は電荷的な反応であるため、次亜塩素酸分子中の負電荷を持つO原子がノニル基の正電荷を持つ $\alpha$ -Cに攻撃すると同時に正電荷を持つCl原子が相隣のベンゼン環上のC4原子、またはノニル基上の負電荷を持つ相隣 $\beta$ -C原子に攻撃することにより、新しい物質が生成されると考えられる。図一7は次亜塩素酸分子中の負電荷を持つ



図一7 DCNPからTCPへと分解する遷移状態

O原子が $\alpha$ -Cを攻撃し、正電荷を持つC1原子が相隣するベンゼン環上のC4原子に攻撃する場合の遷移状態を示す。一連の計算結果により、その反応の活性エネルギーは0.07kcal/molである。一方、