

(表4 つづき)

検定される由来 MSライブラリ 一致率	相対ピーク面積 ¹												フラグメント出現回数 ²													
	T浄水場			K浄水場			L浄水場			N浄水場			M浄水場			浄水場別			分類							
	排水	浮上物質:不遊走	浮上物質:配水池	排水	浮上物質	汚泥	排水	浮上物質	汚泥	排水	浮上物質	汚泥	排水	浮上物質	汚泥	T浄水場(4)	K浄水場(3)	L浄水場(3)		N浄水場(2)	M浄水場(3)	排水(5)	浮上物質(5)	汚泥(5)	Pr(6)	Pr + Ps(6)
フラグメント化合物名																										
Unknown	0.69																									
Unknown	0.25																									
Unknown	0.21																									
Unknown	0.24																									
相対ピーク面積 (>0.20) 合計値	27	10	29	15	16	10	10	10	10	13	12	8	8	12	11	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
フラグメント数 (>0.20)	29	18	60	24	28	16	13	13	13	17	18	14	14	17	15	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
相対ピーク面積総計値	28	12	30	16	18	12	11	14	14	14	13	9	9	13	12	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
フラグメント総数	38	28	65	33	39	28	21	27	24	24	25	22	22	23	19	23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pr (%)	30	53	21	52	31	46	72	22	46	58	63	64	67	67	67	71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ps (%)	12	24	21	20	10	21	12	5	10	10	17	15	8	8	10	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lg (%)	11	10	5	8	6	8	9	4	9	7	8	11	8	8	8	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lp (%)	23	7	21	10	14	6	2	39	2	0	2	5	2	0	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S (%)	0	0	0	2	2	0	3	2	5	5	2	0	3	2	3	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Other (%)	25	6	31	8	36	19	1	28	30	20	9	5	5	13	12	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*MSライブラリによる同定結果が90%以上の適合性を示したものの(合計30フラグメント)に*を付した。

¹相対ピーク面積の太字表記は、相対ピーク面積総計値の5%以上を占めるフラグメントを意味する。

²フラグメント出現回数の太字表記は、各分類条件に該当する全試料が有するフラグメントを意味する。

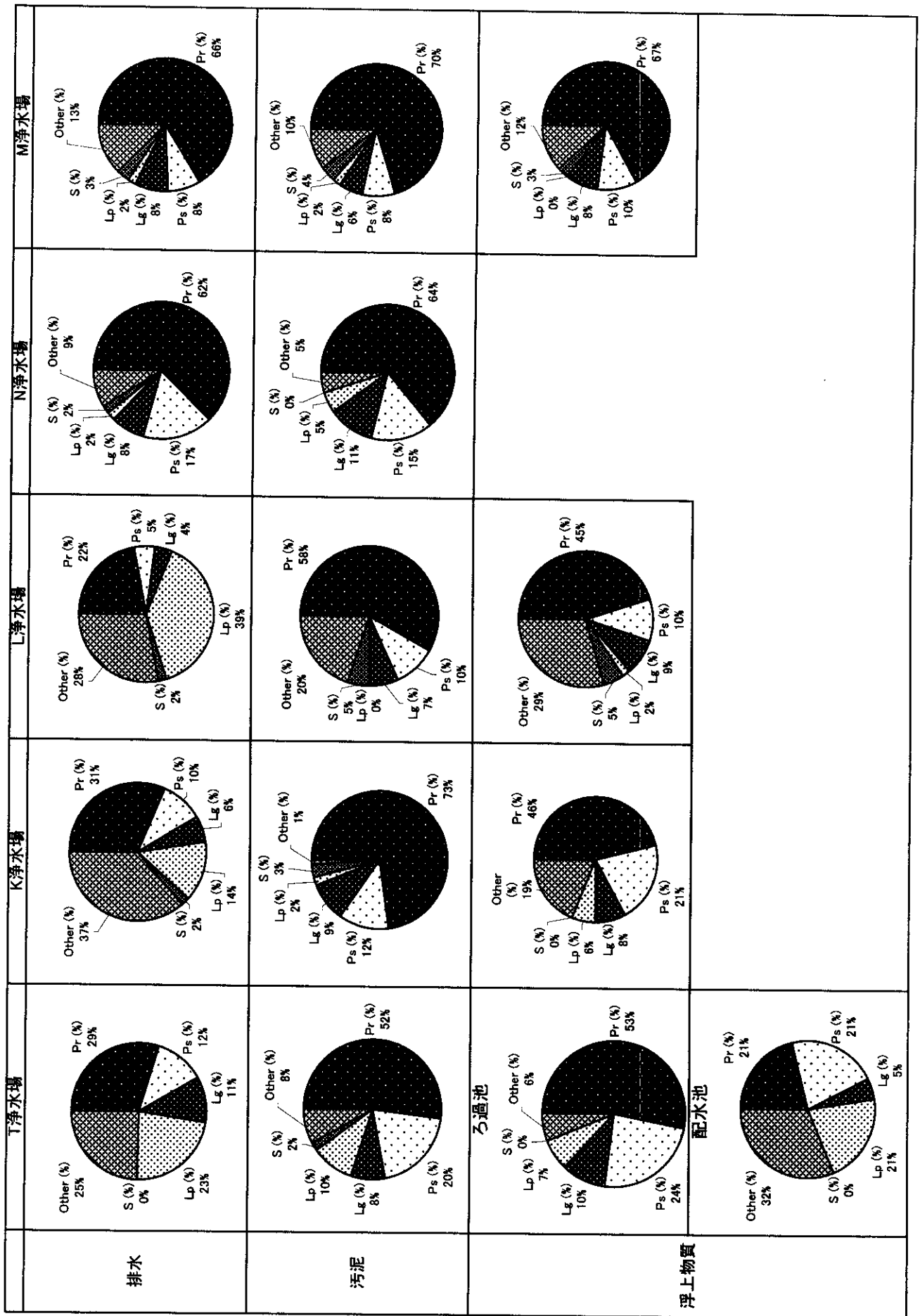


図1 熱分解フラグメント相対ピーク面積構成に基づく各試料の有機物組成

分担研究報告書 3

浄水場汚泥のエストロゲン様作用の評価
—MVLNアッセイ法—

分担研究者 伊藤禎彦

浄水場汚泥のエストロゲン様作用の評価 —MLVN アッセイ法—

分担研究者 伊藤 禎彦 京都大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

表面浮上物質等に、高濃度のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが濃縮・蓄積されていることが明らかとなったが、分析対象となっていない他のさまざまな微量化学物質も同時に濃縮されている可能性が高い。本調査研究では、エストロゲン様作用を示す物質群に焦点を絞り、分析的方法で濃縮物質を明らかにするのではなく、バイオアッセイによって、エストロゲン様作用を示す物質が全体としてどの程度濃縮されているかを把握することを目的とした。結果として、浄水場汚泥の抽出試料の MVLN アッセイを行ったところ、11 試料中、7 試料が陽性であると評価された。すなわち、これらの試料中には、エストロゲン様作用を示す物質が含まれているということができた。また、抽出残渣試料のエストロゲン様作用を既知のエストロゲン様作用物質と比較した結果、最も強い作用を示した抽出残渣試料は、4-ノニルフェノールの約 25 分の 1 のエストロゲン様作用強度であると評価された。

A. 研究目的

平成 13 年度の調査研究の結果、ある浄水場において、フロック形成池周辺に発生するスカムおよび沈澱汚泥、さらにろ過池および配水池の表面浮上物質等に、高濃度のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが濃縮・蓄積されていることが明らかとなった。また、水中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが自然に表層に浮上濃縮されることが、別に行った浮上濃縮実験において示された。その汚染源や濃縮機構の詳細は明らかではないものの、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが濃縮されるということは、分析対象となっていない他のさまざまな微量化学物質も同時に濃縮されている可能性が高い。

以上を背景として、本調査研究では、エストロゲン様作用を示す物質群に焦点を絞り、分析的方法で濃縮物質を明らかにするのではなく、バイオアッセイによって、エストロゲン様作用を示す物質が全体としてどの程度濃縮されているかを把握することを目的とする。

バイオアッセイとしては、米国 EPA が設置した「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* アッセイとして最も推奨している MVLN アッセイ²⁾を行う。これはヒト乳がん細胞である MCF-7 細胞に、ヴィテロゲニンの制御領域エストロゲンレセプター α を含む遺伝子、およびレポーター遺伝子としてホタルの発光反応を触媒するルシフェラーゼの遺伝子とを導入し、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、1990 年フランス国立衛生医学研究所の Pons 博士らによって作製

表1 試料の由来と重量

サンプル番号	浄水場名	試料採取量 湿重量(g)	含水量(%)	残渣量(mg)	測定機関への 配分残渣量(mg)
1	A水道局 K浄水場 沈殿池 汚泥	71.31	94.2	7.0	2.3
2	B水道局 L浄水場 排泥池 汚泥	102.72	98.4	8.6	2.9
3	C水道局 M浄水場 沈殿池 汚泥	105.22	97.0	28.6	9.5
4	D水道局 N浄水場 調整槽 汚泥	71.28	95.4	58.3	19.4
5	E水道局 P浄水場 沈殿池 汚泥	94.13	93.4	42.2	14.1
6	F水道局 Q浄水場 排泥池入口 汚泥	62.46	96.0	80.2	26.7
7	G水道局 R浄水場 沈殿池 汚泥	79.02	95.6	131.5	43.8
8	H水道局 S浄水場 2系沈殿池8号 汚泥	89.82	92.7	87.3	29.1
9	I水道局 T浄水場 沈殿池 汚泥	90.54	92.0	96.3	32.1
10	I水道局 T浄水場 ろ過池 浮上物質	72.89	93.5	134.5	44.8
11	J水道局 U浄水場 沈殿池 排泥水 汚泥	90.19	92.8	64.8	21.6
①	No. 1 ブランク				
②	No. 2～4 ブランク				
③	No. 5～11 ブランク				

されたものである³⁾。本研究では、本研究所から直接分与された MVLN 細胞を用い、実験を行った。

ただ、バイオアッセイという性格上、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。

B. 研究方法

1. バイオアッセイ用試料の調製

試料に対して、ジクロロメタン 900 μ L を加え、さらに 10 分間の超音波処理を行って溶解した。900 μ L を 3 等分するため 300 μ L ずつを分取し、窒素ガスを吹き付けて半乾固させた。これが各測定機関に送付された。

表1にサンプルが採取された浄水場名、および試料の重量が示されている。各測定機関に送付された量は、これらの 1/3 であり、その残渣重量を最右列に示した。半乾固試料を乾固した後、残渣試料に対して、これを 0.1~0.5mL のエタノールに溶解し、バイオアッセイ用の

試料とした。

2. MVLN アッセイ法

1) 細胞培養法

通常の細胞培養にはガラス製培養フラスコ (VIDREX、底面積 40cm²) を用い、培養液として DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) に 10% のウシ胎児血清 (FBS : Fetal Bovine Serum, Hyclone) を加え使用する (以後 FBS 培養液と呼ぶ)。

これとは別に 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) を 5% 濃度で DMEM に加えた培養液も使用する (DCC 培養液と呼ぶ)。なお両培養液とも pH インジケータのフェノールレッドはエストロゲン様作用を示すので加えていない。細胞培養環境は開放系培養で 5% 炭酸ガス・37℃・100% humidity である。

24 マルチウェルプレート播種用の細胞の準備から、試験物質を細胞に添加しデータを得るまでの一連の操作とタイムスケジュールの詳細は EDSTAC 報告書に記載されている。

上記で得た試料を、培養液中エタノール濃度が 1% 以下となるように添加した。エタノールは、培養液中濃度が 1% 以下であれば試験結果に影響を及ぼさないことを確認しているためである。試料を添加して 1 日培養した後、下記のルシフェラーゼアッセイを行った。

2) ルシフェラーゼアッセイ⁴⁾

エストロゲン様作用の結果、細胞内に産生したルシフェラーゼの酵素活性を定量する。ルシフェラーゼとは、ホタルの尾尻に観察される発光反応を触媒する酵素であり、ルシフェリンを基質とする。

試験手順は一般に行われているルシフェラーゼアッセイ法でよい。ルミノメーターはベルトールドジャパン Lumat LB9507 を用い、酵素反応および発光量測定時間は 20 秒間とした。発光量は相対的な発光量 RLU (Relative Light Unit) で表示される。

3) タンパク質定量法^{5, 6)}

同一プレートにおけるウェル間の細胞数の差による発光量の差を補正し単位タンパク質あたりの発光量を求めるために、BCA 法により細胞溶解液中のタンパク質量を求めた。試薬と反応させた後、562nm の吸光度を吸光度計により測定するものである。

標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA, Bovine Serum Albumin, 和光純薬) を用いて検量線を作成し、濃度を定量した。

4) エストロゲン様作用の強度の表示法

上の測定までで、単位タンパク質あたりの発光量が求められるが、播種細胞数、細胞の状態等、様々な要因により変動があるのが実際である。試験間の誤差要因を除くため、Soto らの方法を参考に⁷⁾同一プレートに添加した 17β エストラジオールを標準物質として、以下の式より酵素活性相対値 (%) を求めた。

$$\text{酵素活性相対値(\%)} = \frac{L_t - L_c}{L_E - L_c} \times 100$$

L_E : 1.0×10^{-9} M における 17β エストラジオールの単位タンパク質あたりの発光量

表2 エストロゲン様作用試験結果

サンプル番号	浄水場名	培養液中残渣濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	酵素活性相対値 (%)	エストロゲン様作用強度 ($\%/ \mu\text{g/mL}$)
1	A水道局 K浄水場 沈殿池 汚泥	46.6	47.0	1.01
2	B水道局 L浄水場 排泥池 汚泥	28.6	6.0	0.21
3	C水道局 M浄水場 沈殿池 汚泥	95.4	14.4	0.15
4	D水道局 N浄水場 調整槽 汚泥	194	20.1	0.10
5	E水道局 P浄水場 沈殿池 汚泥	141	10.5	0.07
6	F水道局 Q浄水場 排泥池入口 汚泥	107	2.6	0.02
7	G水道局 R浄水場 沈殿池 汚泥	175	-1.3	-0.01
8	H水道局 S浄水場 2系沈殿池8号 汚泥	116	33.2	0.29
9	I水道局 T浄水場 沈殿池 汚泥	128	12.6	0.10
10	I水道局 T浄水場 ろ過池 浮上物質	179	-6.0	-0.03
11	J水道局 U浄水場 沈殿池 排泥水 汚泥	86.4	47.1	0.55
①	No. 1 ブランク		1.2	
②	No. 2~4 ブランク		4.3	
③	No. 5~11 ブランク		-0.5	

17 β -エストラジオール	2.72E-04 (1.0E-9 M)	100.0	367000
4-ノニルフェノール	4.0	100.0	25

L_c : DCC 培養液のみのときの単位タンパク質あたりの発光量

L_t : 試験物質の単位タンパク質あたりの発光量

なおここで相対値の算出に L_E として $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ における 17 β エストラジオールの単位タンパク質あたりの値を用いているのは、この濃度で反応が最大に達するためである。

C. 研究結果および考察

細胞毒性がみられず、エストロゲン様作用が正しく検出できたとみなせる試験結果を表2に一覧した。

サンプル番号(日)~(火)のブランク試料の酵素活性相対値は、-0.5~4.3%となっている。このよ

うに、MVLN アッセイにおいては、ブランクまたはコントロール試料でもこの程度の数値が得られるのが通常であり、エストロゲン様作用が陽性であると判定できるのは、おおむね酵素活性相対値が 10% 前後以上となった場合である。

したがって、酵素活性相対値 (%) の値から、No.2 (L 浄水場) 試料は擬陽性と判断され、陽性と判定できるのは No.1 (K 浄水場)、No.3 (M 浄水場)、No.4 (N 浄水場)、No.5 (P 浄水場)、No.8 (S 浄水場)、No.9 (T 浄水場、沈澱池汚泥)、No.11 (U 浄水場) の各試料である。これらの試料中には、エストロゲン様作用を示す物質が含まれているといえることができる。

つぎに残渣試料のエストロゲン様作用の強さを比較してみる。測定された酵素活性相対値 (%) を、培養液中残渣濃度 ($\mu\text{g/mL}$) で除し、エストロゲン様作用強度 ($\%/\mu\text{g/mL}$) を算出した。表 2 中にこの数値を示すとともに、算出結果を図示したものが図 1 である。

残渣試料のエストロゲン様作用の強さは、K 浄水場、U 浄水場、S 浄水場の順であることがわかる。

さらに、このエストロゲン様作用の強さを、よく知られているエストロゲン様作用物質のそれと比較してみる。標準物質として、17 β -エストラジオールと 4-ノニルフェノールをとりあげ、これまでに行ってきた MVLN アッセイの結果から、上記と同様にエストロゲン様作用強度 ($\%/\mu\text{g/mL}$) を算出した。これによって、これら標準物質と残渣試料との間で、単位重量あたりのエストロゲン様作用の強さを比較することが可能となる。

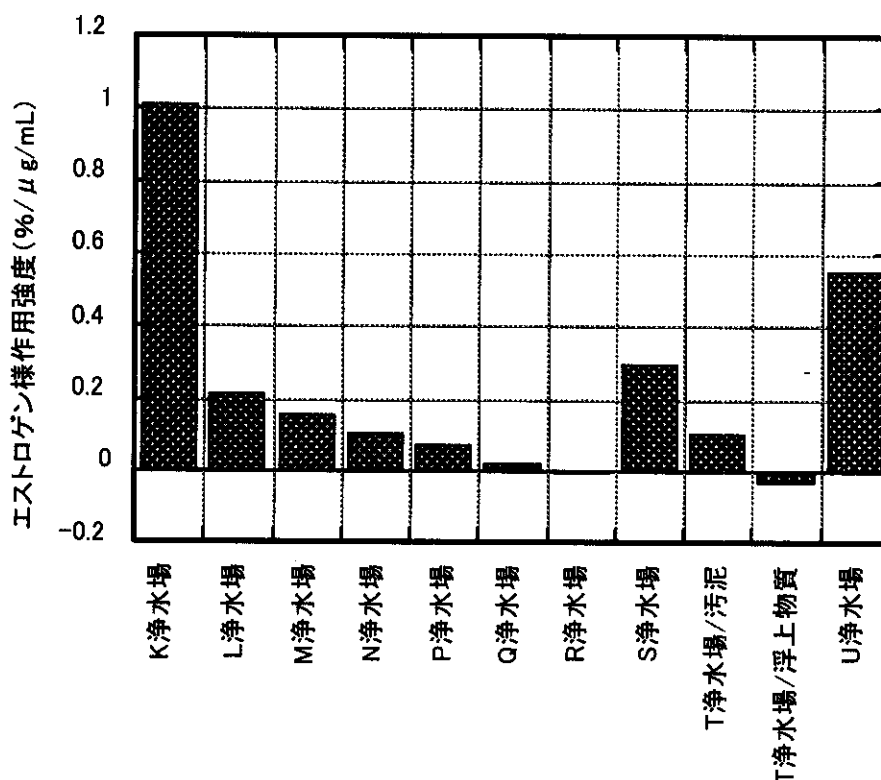


図1 浄水場汚泥抽出試料のエストロゲン様作用試験

参 考

エストロゲン様作用強度 17 β -エストラジオール:367000
($\%/\mu\text{g/mL}$) 4-ノニルフェノール : 25

まず、4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用 (25 %/ $\mu\text{g}/\text{mL}$) は 17 β -エストラジオール (367000 %/ $\mu\text{g}/\text{mL}$) の約 15000 分の 1 の強さである。このように評価すると、最も強い作用を示した No.1 (K 浄水場) の抽出残渣試料は、4-ノニルフェノールの約 25 分の 1 のエストロゲン様作用を示したと評価することができる。

D. 結論

1) 浄水場汚泥の抽出試料に対して MVLN アッセイを行ったところ、11 試料中、7 試料が陽性であると評価された。すなわち、これらの試料中には、エストロゲン様作用を示す物質が含まれているということができた。

2) 抽出残渣試料のエストロゲン様作用を既知のエストロゲン様作用物質と比較した結果、最も強い作用を示した抽出残渣試料は、4-ノニルフェノールの約 25 分の 1 のエストロゲン様作用強度であると評価した。

参考文献

- 1) 厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業 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、平成 13 年度総括・分担研究報告書(2002)
- 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, BioTechniques, Vol.9, No.4, pp.450-459(1990)
- 4) 横田崇、新井賢一、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社 (1997)
- 5) 堀尾武一、山下仁平、蛋白質・酵素の基礎実験、南江堂 (1981)
- 6) 日本生化学会編、新生化学実験講座□、タンパク質、東京化学同人 (1990)
- 7) A.Soto: The E-SCREEN Assays as tool to Identify Estrogens: An update on Estrogenic Environmental Pollutants, Environmental Health Perspectives, Vol.103,(Supplement 7), pp.113-122 (1995)

E. 健康危険情報

ただちに取り上げるべきものはない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤禎彦、早坂剛幸、岡田朋之、三次元蛍光分析を用いた水道水中フミン物質の回収性の検討、環境衛生工学研究, Vol.16, No.3, pp.113-118 (2002)
- 2) Sadahiko Itoh and Shinya Echigo, Characterization of Estrogenic Effects and By-products Formed during Water Disinfection Processes: Some Applications of Membrane Separation Techniques, Special Seminar on Membrane Technology, Kyoto University, Japan, pp.75-82 (2002)

3) 伊藤禎彦、中西 岳、早坂剛幸、塩素処理によるエストロゲン様作用の変化と試料調製法に関する実験的考察、水道協会雑誌、第 72 巻、第 4 号 (第 823 号) , pp.10-20 (2003)

2. 学会発表

1) 伊藤禎彦, 吉村友希,塩素処理後の水道水のエストロゲン様作用の増大要因について, 第 5 回環境ホルモン学会要旨集, p.213 (2002)

浄水場沈澱池汚泥および浮上物質の
エストロゲン様活性評価—NRLアッセイ法—

分担研究者 西村哲治、安藤正典

浄水場沈殿池汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性評価—NRL アッセイ法—

国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部
西村哲治, 安藤正典

1. 目的

水道原水には種々多様な物質が含まれている。その中には内分泌系をかく乱する可能性のある物質も含まれている。これらの物質の大部分は浄水工程で除去または分解されていると推測されているが、浄水工程での挙動に関して詳細なことは不明である。水溶性が低い性質を持つ内分泌かく乱物質は、沈殿池で汚泥として濃縮除去されていると考えられるが、明確な情報は少ない。これらのことから、浄水工程におけるエストロゲン様活性の挙動を把握する意味から、また汚泥の処理の観点からも、汚泥付着性有機物質のエストロゲン様活性の把握を行うことを目的とした。

2. 試料の抽出調製

全国の代表的な10浄水場の沈殿池汚泥および1浄水場の浮上物質を、水道事業体のご協力を得て採取した。採取された汚泥および浮上物質はガラス瓶に詰めた上、低温下で搬送して千葉県薬剤師会検査センターに集め、抽出・濃縮処理を行った。採取試料は水分を多く含んでいるため、遠心分離操作で脱水を行った。脱水した汚泥試料20gを100mLの共栓遠心管にとり、塩酸5mLを加えた後、アセトン50mLを加えて10分間振とう抽出を行った。さらに、10分間超音波抽出を行った後、3,000rpmで10分間遠心分離して上清溶液部分を分取した。振とう抽出以下の操作を、さらに2回繰り返し、得られた上清溶液部分を回収して合わせた。抽出液をあらかじめ500mLの5%塩化ナトリウム水溶液を入れた分液ロートに加え、ジクロロメタン50mLで10分間2回抽出を行い、それぞれのジクロロメタンを回収して、合わせた。このジクロロメタンを無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで約5mLまで濃縮した。濃縮液を10mLの共栓遠心管に移し、窒素ガスを吹き付けることにより乾固直前まで濃縮した。それぞれの10mLの共栓遠心管は、前もって一晩デシケータ中に放置した後、重量を正確に

表1 汚泥または浮上物質の試料採取湿重量、含水量および残さ量

浄水場名	試料採取量 湿重量(g)	含水量(%)	残さ量(mg)
A水道局K浄水場 沈殿池 汚泥	71.31	94.2	7.0
B水道局L浄水場 排泥池 汚泥	102.72	98.4	8.6
C水道局M浄水場 沈殿池 汚泥	105.22	97.0	28.6
D水道局N浄水場 調整槽 汚泥	71.28	95.4	58.3
E水道局P浄水場 沈殿池 汚泥	94.13	93.4	42.2
F水道局Q浄水場 排泥池入口 汚泥	62.46	96.0	80.2
G水道局R浄水場 沈殿池 汚泥	79.02	95.6	131.5
H水道局S浄水場 沈殿池 汚泥	89.82	92.7	87.3
I水道局T浄水場 沈殿池 汚泥	90.54	92.0	96.3
I水道局T浄水場 ろ過池 浮上物質	72.89	93.5	134.5
J水道局U浄水場 沈殿池 排泥水 汚泥	90.19	92.8	64.8

測定したものを使用した。濃縮・乾固した試料とともに 10mL の共栓遠心管の重量を正確に測定し、前もって測定した空重量を差し引き、試料残さ重量を求めた。試料残さを 900 μ L のジクロロメタンに溶解し、10 分間超音波処理を行った後、300 μ L づつ 3 本に分注した。分注した試料残さ溶液は、窒素ガスを吹き付けることにより乾固直前まで濃縮し、北海道大学と京都大学にそれぞれ 1 本づつ送付した。試料残さは、使用直線まで、 -20°C で保存した。

表 1 に、汚泥および浮上物質の採取浄水場毎の、試料採取湿重量、含水量および残さ量をまとめて示した。

3. 残さのガスクロマトグラフ質量分析法による解析

抽出・濃縮した試料の一部をジクロロメタンに溶解し、ガスクロマトグラフ質量分析法により含まれる物質の同定を試みた。

ガスクロマトグラフ測定装置：	HP6890
質量分析計測定装置：	HP5973
試料導入方法：	スプリットレス方式
注入口温度：	230 $^{\circ}\text{C}$
分離カラム：	J&W, DB-5
カラム昇温条件：	50 $^{\circ}\text{C}$ (2mini) $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -280°C (2min)
キャリアーガス：	ヘリウム, 1mL/min
注入量：	2 μ L
インターフェイス温度：	230 $^{\circ}\text{C}$
イオン化電圧：	70V
イオン源温度：	230 $^{\circ}\text{C}$
イオン検出法：	マスキロマトグラフ法

図 1 は溶媒として用いたジクロロメタン、図 2 は K 浄水場の、図 3 は L、M および N 浄水場の、図 4 は P、Q、R、S、T および U 浄水場の試料の抽出・濃縮の操作ブランク試料のクロマトグラムを示す。図 5 から図 15 は、それぞれの試料のクロマトグラムを上段に、特異的なピークの中で最も高いピークのフラグメントイオンシグナルを下段に示した。

それぞれのクロマトグラムからピークの高い順に選び、ライブラリーから化学物質の同定検索を行ったが、既知の化学物質のフラグメントイオンと一致するものは見出すことは出来なかった。

4. 残さのエストロゲン様活性の検討

残さ試料は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解して用いた。試料によっては溶解しない成分が認められたことから、超音波処理を 10 分間行い、溶解した成分のみを試験に供した。

エストラジオール様活性は、西川らが開発した Nuclear Receptor Ligand Assay (NRL assay) を用いて評価した。試験方法の概略を以下に述べる。ヒトエストゲン α 受容体のグ

ルタチオン融合タンパク質を、96穴のグルタチオン免疫賦活化マイクロプレートに対して4℃で、一晩吸着させた。このマイクロプレートにヒト転写活性化因子融合タンパク質 TIF II-BAP (大腸菌アルカリンフォスファターゼ) を加えた後、DMSO に溶解した供試試料を全

表2 エストロゲン様活性から求めたエストロゲンとしての重量

		試料のエストロゲン相当の重量	
		残さ重量当り (ng/mg)	湿重量当り (ng/g)
K浄水場	汚泥	5.56	9.40
R浄水場	汚泥	4.66	176.18
T浄水場	汚泥	10.32	137.31
T浄水場	浮上物質	0.08	2.34

容量の1%に相当する容量加え、4℃で1時間静置した。反応後、*p*-ニトロフェニルフォスフェイトを発色基質として加え、37℃で3時間、BAPによる発色反応を行い、405nmの吸光度をプレートリーダーで測定した。

陽性対照として、 10^{-9} から 10^{-6} Mの濃度範囲で 17β -エストラジオールによる活性を測定し、濃度-反応性に直線関係が得られる濃度範囲で特定濃度(10^{-8} M)における活性を求めた。供試試料についても、同様の方法で活性を求め、その値に対する 17β -エストラジオール相対活性を求める方法で評価して、 17β -エストラジオール相当重量を算出した。

NRL assayにおいて、汚泥ではエストラジオール活性として抽出成分mg当たり4.66ng~10.32ngのエストロゲンに相当する量として検出された。また、湿重量g当たりでは9.40~176.2ngのエストロゲンに相当する量として検出され、地域の水質により大きな差があることがわかった。この検出系では0.272pgの量でエストロゲン活性が検出できることから、水道原水に含まれるエストロゲン様活性物質が沈殿池等の汚泥に濃縮されている可能性が示唆された。しかし、汚泥量がどの程度の水道原水量由来であるのかは算出が難しく、エストロゲン様物質の水道原水からの濃縮率や水道原水における含有量の検討は今後の課題として残されている。一方、浮上物質に含まれるエストロゲン様物質は、汚泥に比べ少なく、同一浄水場の汚泥に比べ残さ重量あたり0.8%、湿重量当たり1.7%に相当し、水道原水からの移行は低いことが示唆された。

5. 今後の検討

水道浄水場の沈殿池からの汚泥や浮上物質には量の多い少ないは見られるが、エストロゲン様活性物質が移行濃縮されていることがわかった。アセトン/ジクロロベンゼン抽出画分に含まれる物質をガスクロマトグラフ-質量分析法で分析した結果、主たる成分からは特定の化学物質を同定することはできず、多種多様の物質の複合作用によりエストロゲン様活性が検出されたのであろうと推測された。今後、別の機器分析手法を用いて物質の検索を行い、特定物質の含有量を測定することにより水道原水中の内分泌かく乱化学物質の種類や浄水工程での挙動を明らかにし、除去処理条件の確立の一助としたい。さらに、検討を行った3浄水場以外の浄水場についても、汚泥抽出成分のエストロゲン様活性の評価をすすめ、水質指標との関係等について検討を行なって行く。

図1 溶媒対照 (ジクロロメタン)

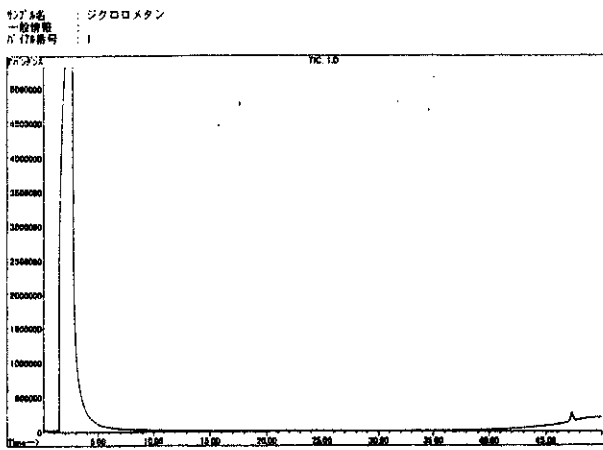


図2 ブランク (K浄水場)

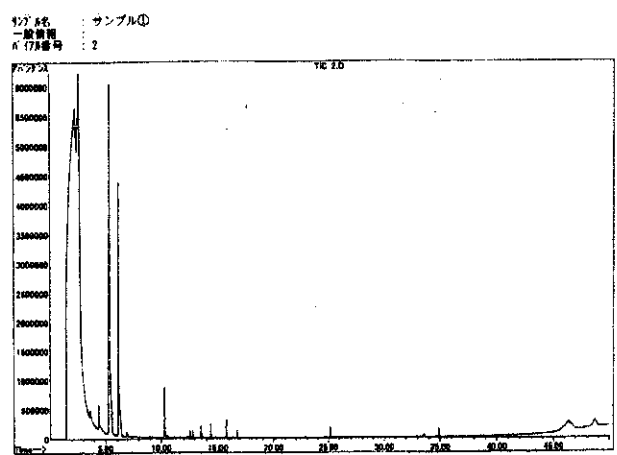


図3 ブランク (L, MおよびN浄水場)

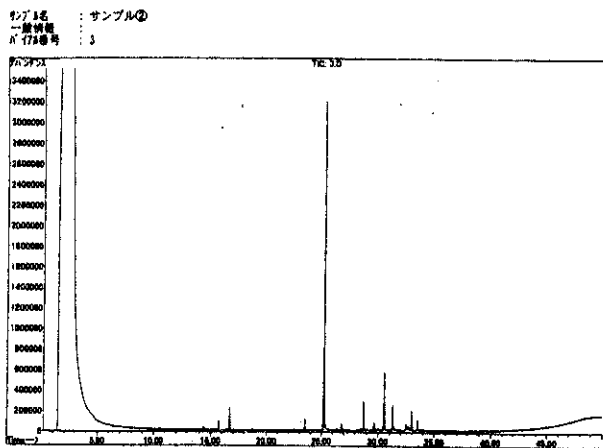


図4 ブランク

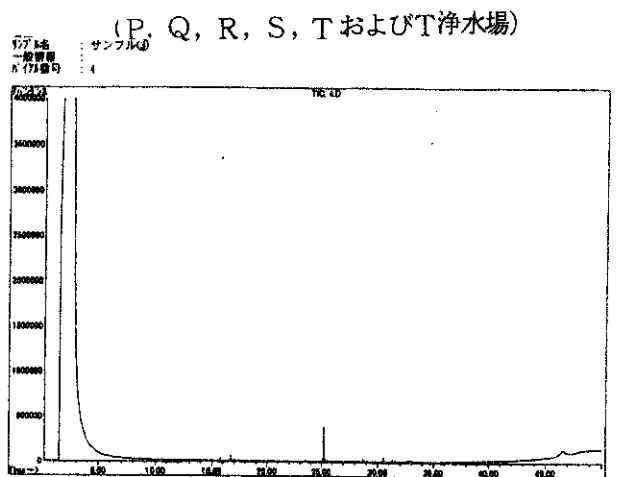


図5 K浄水場汚泥試料

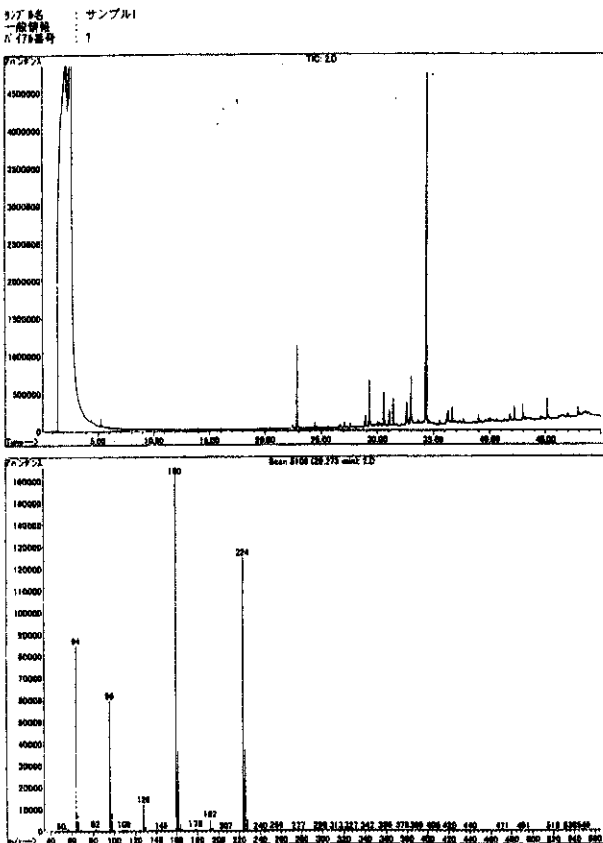


図6 L浄水場汚泥試料

