

2. コールタールエナメル塗装板からの溶出液に関する結果

結果を図3に示す。溶出試験液を溶媒抽出して作製した試料（①および③）からは強いエストロゲン様作用が検出された。コールタールエナメル塗装板から何らかのエストロゲン様作用物質が溶出したものと推定できる。そして残留塩素があるないにかかわらず、溶出試験液はエストロゲン様作用をもつことがわかる。残留塩素の有無はコールタールエナメル塗装板からの溶出そのものには影響を与えないこと、および溶出物質が残留塩素と反応してそのエストロゲン様作用を失うことも少ないものと推察できる。

一方、溶出試験液を固相抽出して作製した試料（⑤および⑦）からもエストロゲン様作用が検出されたが、溶媒抽出した試料よりはその作用は弱く評価されている。

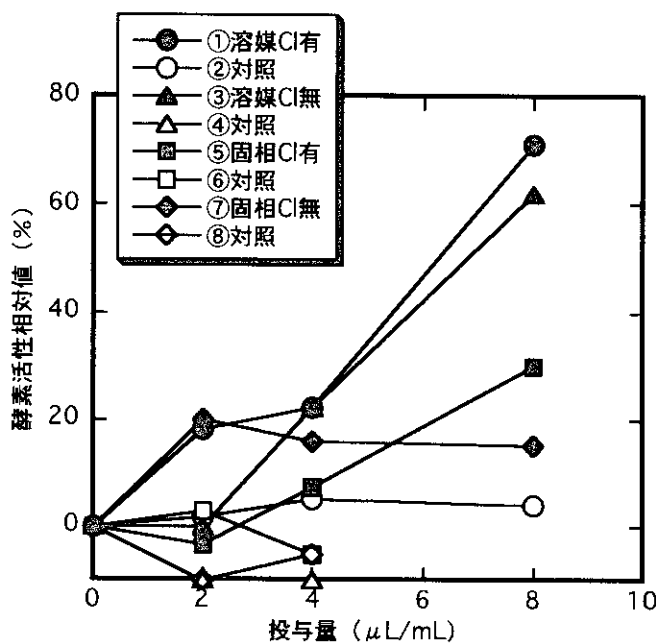


図3 コールタールエナメル塗装板溶出液の試験結果

3. 浄水場内調査に関する追加試料に関する結果

表4に、試料のpH、試料水中SS(mg/L)、試料湿重量、含水量および残さ量をまとめて示す。

表4 試料のpH、SSと重量

浄水場名	I市水道局 J浄水場		
	フロック形成池浮上物質	沈殿池汚泥	ろ過池洗浄水
試料水 pH	6.94	6.77	6.94
試料水中 SS(mg/L)	33540	7110	27
試料湿重量(g)	20.4	20.0	—
含水量(%)	62.9	86.2	99.7
残さ量(mg)	6.4	13.4	1.1

フロック形成池浮上物質と沈殿池汚泥の 2 試料について MVLN アッセイを行った結果を図 4 に示す。投与量は残さ重量に換算して表示している。沈殿池汚泥からエストロゲン様作用が検出されている。フロック形成池浮上物質については、低用量域で作用があるようにもみえるが、いずれも $0 \pm 10\%$ 以内であり陽性とは認められない。

急速ろ過池洗浄排水のアッセイ結果を図 5 に示す。投与した残さ量そのものが図 4 と比較して少ないが、投与した範囲内ではエストロゲン様作用は認められなかった。

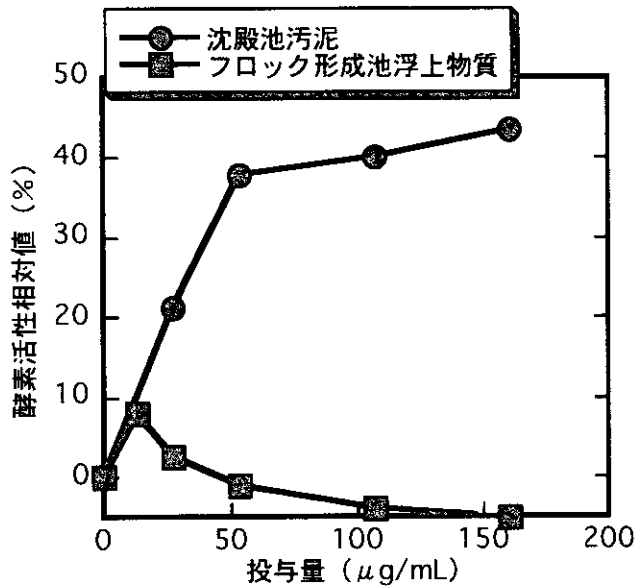


図 4 フロック形成池浮上物質、および沈殿池汚泥のアッセイ結果

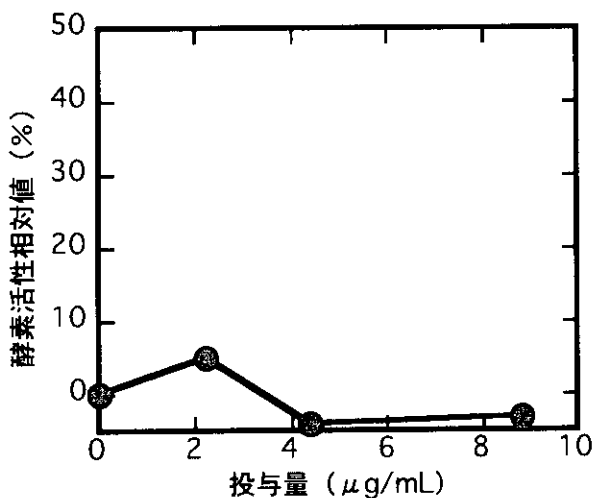


図 5 急速ろ過池洗浄排水のアッセイ結果

D. 考 察

図 4, 図 5 の試験では、沈殿池汚泥にエストロゲン様作用が認められた。しかし、図 1, 図 2 に示した結果や、平成 14 年度の結果¹⁾を合わせて考えると、浄水場内に存在する汚泥やスカ

ム、およびSSには広くエストロゲン様作用が見いだされると考えておく必要があるといえよう。

原因物質については、フタル酸類以外の物質と考えられるものの、エストロゲン様作用に寄与する自然水中物質には微量汚染物質の他に植物エストロゲンやフルボ酸を中心とするフミン物質などが考えられ、原因物質を探索するのは容易ではない可能性がある。

今後は、浄水場内におけるエストロゲン様作用の収支や挙動を評価することが主たる課題となるものと考えている。

E. 結 論

浄水場内水質試料および汚泥試料について、エストロゲン様作用試験を行った。いずれの試料にもエストロゲン様作用を示す場合があったが、汚泥試料の方が陽性検出率は高かった。前年度までの結果と合わせて判断すると、浄水場内に存在する汚泥やスカム、およびSSには広くエストロゲン様作用が見いだされると考えておく必要があることを指摘した。

コールタールエナメル塗装板からの溶出液についてエストロゲン様作用試験を行ったところ、コールタールエナメル塗装板から何らかのエストロゲン様作用物質が溶出していることが推定された。また、残留塩素の有無はコールタールエナメル塗装板からの溶出そのものには影響を与えないこと、および溶出物質が残留塩素と反応してそのエストロゲン様作用を失うことも少ないものと推察された。

参考文献

1) 伊藤禎彦 (2003)、浄水場汚泥のエストロゲン様作用の評価—MVLN アッセイ法—、厚生労働科学研究費補助金 (食品・化学物質安全総合研究事業)「水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究」平成14年度総括・分担研究報告書、pp.165-171.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 伊藤禎彦、中西 岳、早坂剛幸 (2003) 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.

2) 伊藤禎彦、早坂剛幸、岡田朋之 (2003) 蛍光分析による琵琶湖水と塩素処理水中フミン物質の回収性の検討、用水と廃水、Vol.45, No.6, pp.24-28.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権出願・登録情報

該当なし

分担研究報告書 4

多環芳香族炭化水素の塩素化体の検出

分担研究者 西村哲治、安藤正典
協力研究者 綾野絵理

多環芳香族炭化水素の塩素化体の検出

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治, 安藤正典
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所 綾野絵理

要旨

多環芳香族炭化水素類の塩素化体生成条件と、それらの分析方法を検討することを目的とする。

遊離塩素イオン濃度を 1.0ppm, ベンゾピレン(以下 BaP と省略)を最終濃度が 3.0 μ g/L となるように水溶液試料を調製して 20 $^{\circ}$ C で攪拌しながら, 0 時間, 2 時間, 4 時間, 6 時間, 16 時間, 24 時間および 48 時間, BaP と塩素イオンを反応させた。

液体クロマトグラフ/質量分析計による塩素暴露後の生成物の分析条件を確立した。

塩素イオン接触後, 速やかに BaP は減少し, 一塩素化体と推測されるピーク面積が接触時間に依存して増加した。また, 二塩素化体と推測されるピークも接触時間 2 時間目より増加した。これらの結果より, BaP と塩素イオンを接触させることにより塩素化体が生成することが明らかとなった。

A. 研究目的

種々の排出源から放出された多環芳香族炭化水素類は水環境中に流入し, 水道原水として利用されている水に存在している。多環芳香族炭化水素類は比較的水に溶けにくいことから, 凝集沈殿などの浄水処理工程で大部分は除去されていると考えられる。しかしながら, 浄水処理工程で除去しきれなかった多環芳香族炭化水素類はそのまま水道水に混入するおそれがある。また, 水道水用資機材中に不純物として存在するものが水道水に溶出してくる可能性もある。

従来, 多環芳香族炭化水素類としての実態や挙動の把握, 健康に及ぼす影響についての調査や研究は精力的に行われてきた。しかし, 水道水には塩素イオンが存在しており, 水道水中においては, 多環芳香族炭化水素類は共存する塩素イオンと反応して塩素化体になると推測される。これらの塩素化体に関する知見は必ずしも多くはない。これは塩素化体の標準物質の入手が困難な実状もその背景としてある。

本研究では, 多環芳香族炭化水素類の塩素化体生成条件の検討と, それらの分析方法および健康への影響を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 多環芳香族炭化水素類の塩素化体生成条件

精製水 1L に対して 100mM のリン酸緩衝液 (pH7.0) を 1mL 添加し, 模擬水試料とした。次亜塩素酸ナトリウムを添加して遊離塩素イオン濃度を 1.0ppm とし, ベンゾピレン(以下 BaP と省略)を最終濃度が 3.0 μ g/L となるように添加した。20 $^{\circ}$ C で攪拌しながら,

0時間、2時間、4時間、6時間、16時間、24時間および48時間、BaPと塩素イオンを反応させた。反応時間後、残留塩素濃度を測定した。

2. 多環芳香族炭化水素類塩素化体の分析方法

反応停止時に、塩素イオンは、アスコルビン酸ナトリウムを1Lあたり20mg添加し消去した。2.5mg/Lの濃度にサロゲートとしてBaP-d₁₂を添加し、硝酸(1:10)を用いてpHを3.5程度に調整した後、固相カートリッジOasisHBL PLUSを用いて固相抽出を行った。固相カートリッジは、ジクロロメタンを5mL、メタノールを5mL、精製水を5mL、順番に通した後、10mL/minの速度で供試水をカートリッジに通水した。約20mLの精製水で固相カートリッジを洗浄後、窒素ガスを10分間通気し、固相カートリッジの乾燥を行った。その後、5mLのジクロロメタンによりカートリッジから捕捉された物質の溶出を行った。窒素ガスをふきつけ、乾固直前までジクロロメタンをとばした後、0.5mLのアセトニトリルを加えた。超音波を10分かけ再溶解し、液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)による分析試料とした。下記の条件で分析を行った。

LC/MS 測定条件

LC 条件： 装置	Agilent 1100
カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×250 mm 粒子径 5 μm)
流速	1.0 mL/min
カラム温度	25 °C
移動相	A：0.05%トリフルオロ酢酸 B：アセトニトリル 20%A/80%B (0分) - 20%A/80%B (17分) - 100%B(17.5分) - 100%B(70分)*

*但し、検量線の場合は30分までの分析で測定。

MS 条件： 装置	Agilent 1100 LC/MSD SL
イオン化法	ESI
フラグメンター電圧	200 V
ネブライザー	N ₂ (60 psi)
乾燥ガス	N ₂ (10 L/min, 350 °C)
キャピラリー電圧	Positive(4000V),
測定モード	SIM
測定イオン	ベンゾ(a)ピレン(m/z: 252, 253) ベンゾ(a)ピレン-d ₁₂ (m/z: 264, 265)
推定測定イオン	ベンゾ(a)ピレン一塩素化体(m/z: 286, 288) ベンゾ(a)ピレン二塩素化体(m/z: 320, 322)

C. 研究結果

塩素イオン接触後、速やかに BaP は減少し、接触時間 2 時間後には添加濃度の 6.6% になった (図 1)。BaP の減少に従って、一塩素化体と推測されるピーク (R.T.: 約 25.9 分) の面積が接触時間に依存して増加し、24 時間目には一定量が存在する状態となった。また二塩素化体と推測されるピークも接触時間 2 時間目より増加し、4 時間目に一定量が存在する状態となった (図 2 および図 3)。

図 1 塩素残存量

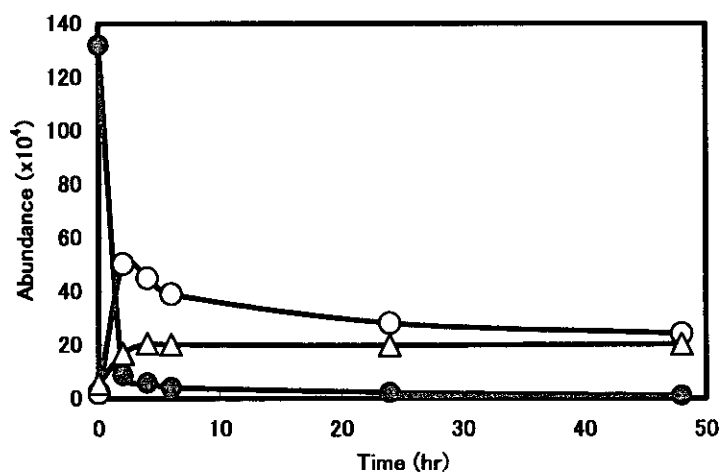
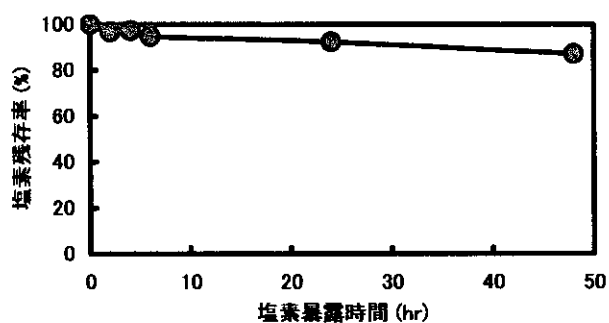


図 2 BaP 量および BaP 塩素化体の生成の経時変化

- ベンゾ(a)ピレン
- ベンゾ(a)ピレン一塩素化体 (推定)
- △ ベンゾ(a)ピレン二塩素化体 (推定)

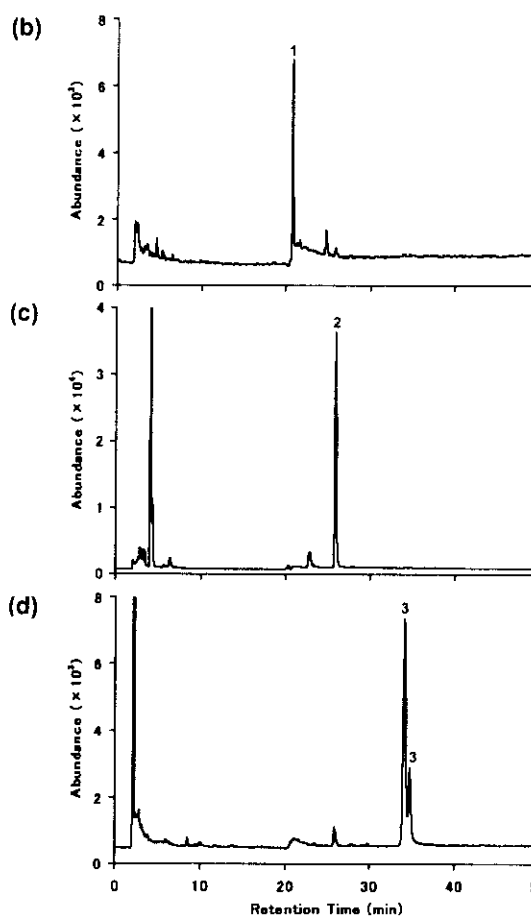
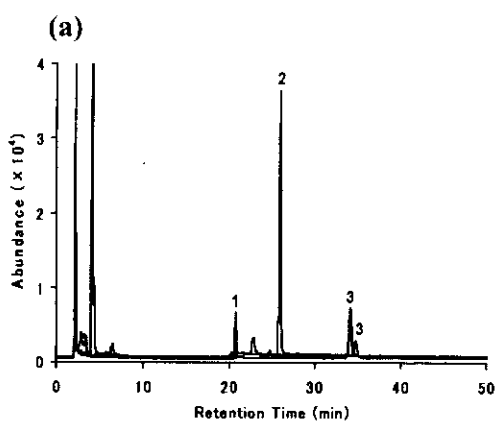


図3 BaP および BaP 塩素化体の LC/MS クロマトグラム(SIM)

- (a) 全体
- (b) 1 : BaP
- (c) 2 : BaP 一塩素化体 (推定)
- (d) 3 : BaP 二塩素化体 (推定)

D. 考察

これらの結果より、BaP と塩素イオンを接触させることにより塩素化体が生成することが示唆された。今後、標準化合物を入手し、同定されたピークの確認と定量を行っていく予定である。

分担研究報告書 5

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

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

分担研究者 国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治, 安藤正典

要旨

浄水工程におけるエストロゲン様活性物質の挙動を把握するため、汚泥・脱水ケーキ・浮上物質及び浄水場送水や返送水等に含有されている有機物質のエストロゲン様活性の評価を目的として検討を行った。

全国の代表的な浄水場の沈殿池汚泥および浮上物質、脱水ケーキを採取し、脱水後、アセトン抽出画分を分取し、そこからジクロロメタンに溶解する成分について抽出・濃縮を行った。返送水等の水試料は、1 Lからジクロロメタン抽出画分を溶媒抽出・濃縮を行った。試料は、DMSOに溶解し、エストロゲン様活性をエストラジオール受容体 α に対する親和性を指標として評価した。

汚泥ではエストロゲン様活性として抽出成分 mg 当たり 0.02ng~2.80ng, 湿重量 g 当たりでは 0.30~105.75ng の 17 β -エストラジオールに相当する量として検出され、水道原水の水質により大きな差があることがわかった。平成16年度に採取した1浄水場からの沈殿池汚泥のエストロゲン様活性は、平成15年度の同一浄水場から採取した試料に比べ非常に低い値であることがわかった。

一方、浮上物質に含まれるエストロゲン様物質は、同一浄水場の汚泥に比べ残さ重量当たりでは2.22倍、湿重量当たりでは4.74倍に相当し、汚泥に比べ水道原水からの濃縮率が高いことが示唆されることわかった。

脱水ケーキから抽出された物質に含まれるエストロゲン様活性は、今回の調査では0.08~0.56ng 17 β -エストラジオール/g 乾燥重量に相当した。最大値と最低値では7倍の差があり、浄水場により幅があることが明らかとなった。

送水のエストロゲン様活性は、0.03~0.27ng 17 β -エストラジオール/Lであった。送水に比べ返送水および上澄水のエストロゲン様活性は高い傾向にあることがわかった。送水においても浄水場間で9倍の活性の差が見られ、浄水場により大きな差があることが明らかとなった。

水道原水に含まれるエストロゲン様活性物質は汚泥や浮上物質等に凝集・除去され、そのエストロゲン様活性は色々な要素に影響され、時期や流域の環境に影響されて大きく変動する可能性が示唆された。

コールタールエナメル塗装板からのエストロゲン様活性物質の抽出方法を検討する。

塗装メーカーより提供されたコールタールエナメル塗装ガラス板について、JWWA K135に準じて1mg/L 塩素水もしくはミネラルウォーターに浸け、溶出成分をジクロロメタン溶媒抽出法により抽出・濃縮した。

溶出水として、塩素水とミネラルウォーターを比較した場合、溶媒抽出法と固相抽出法のどちらもミネラルウォーターを用いた方が高いエストロゲン様活性を示した。溶媒抽出法と固相抽出法を比較した場合、溶出水に関わりなく固相抽出法により調製した方が高いエストロゲン様活性を示した。

塩素水を溶出水に用いた場合には、溶出された物質が共存する遊離塩素の作用により酸

化反応を受けてエストロゲン様活性を示さない物質に変化した可能性が考えられる。

今後の検討には、ミネラルウォーターで溶出し、固相抽出法により試料を調製することが良いと考えられる。

A. 研究目的

水道原水には多種多様の物質が含まれており、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。例えば、水溶解性が低い性質の内分泌かく乱物質は、沈殿池で沈殿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点において、また汚泥の処理の観点において、汚泥に含有されている有機物質のエストロゲン様活性の把握を行うことは重要であると考え、水場沈殿池汚泥のエストロゲン様活性の評価を目的として検討を行った。また、浮上物質として除去される物質についても同様の観点からエストロゲン様活性の評価を行った。

B. 研究方法

1. 沈殿池汚泥および浮上物質からの抽出

平成15年、水道事業体のご協力を得て、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採取した。採取し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、遠心分離操作でまず脱水を行った。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。アセトン50mLによる振とう抽出以下の操作を、さらに2回繰り返す。得られた上清溶液部分を回収して合わせた。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層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ー中に放置した後、重量を正確に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ずつ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本ずつ送付した。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す。

平成16年には、平成15年に採取した浄水場の中から1浄水場を選び沈殿池汚泥を採取し、上記と同様の条件で抽出を行った。表2に、汚泥の、試料採取湿重量、含水量およ

び残さ量をまとめて示す。

2. 脱水ケーキからの抽出

採取した脱水ケーキ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、遠心分離操作で脱水を行った。脱水した試料を乾燥重量あたり約 5g 程度となるように、脱水試料（湿泥）の適量を 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。アセトン 50mL による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。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層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、前もって一晚デシケーター中に放置した後、重量を正確に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 ずつ 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 本ずつ送付した。試料残さは、使用直線まで -20°C で保存した。表 2 に、試料採取湿重量、含水量および残さ量をまとめて示す。

3. 水質試料からの抽出

試料水 1 L を 2 L 分液ロートにとり、塩酸で pH を 3 前後に調整後、塩化ナトリウム 30g を加えた。塩化ナトリウムを十分に混合して溶解し、ジクロロメタン 50mL を加えて 10 分間振とう抽出を行った。ジクロロメタン層を分取した後、さらにジクロロメタン 50mL を加え、同様に 10 分間振とう抽出を行った。分取したジクロロメタン層をともに合わせ、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 の共栓試験管に移し替え、窒素ガスを吹き付けて濃縮した。全量が 900 μ L となるように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 ずつ 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 本ずつ送付した。試料残さは、使用直線まで、 -20°C で保存した。表 3 に、試料採取湿重量、含水量および残さ量をまとめて示す。

4. コールタールエナメル塗装板からの抽出液試料の調製

塗装メーカーより提供されたコールタールエナメル塗装ガラス板について、JWWA K135 に準じて溶出を行った。

溶媒抽出は、溶出試験液 1 L に対し塩化ナトリウム 50g を加え、十分に混合して溶解した。ジクロロメタンを 50mL 加え、10 分間振とう抽出した後、ジクロロメタン層を分取した。さらにジクロロメタン 50mL を加え、同様に 10 分間振とう抽出を行った。分取したジクロロメタン層をともに合わせ、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 10mL まで減圧濃縮した。濃縮液を 10mL の共栓試験管に移し替え、窒素ガスを吹き付けて濃縮した。

固相抽出は、溶出試験液 1 L を、あらかじめジクロロメタン 5mL、メタノール 5mL、精製水 5mL で順次通してコンディショニングした固相カートリッジ Sep-Pac PS-2 に 20mL/分 で通水した。通水後、精製水 10mL で固相カートリッジを洗浄し、30 分間通気乾燥した。ジクロロメタン 5mL で捕捉物質を溶出した。同様の操作を 2 回行い、溶出試験水 2 L 分を合わせ、ロータリーエバポレーターにより約 10mL まで減圧濃縮した。濃縮液を 10mL の共栓試験管に移し替え、窒素ガスを吹き付けて濃縮した。

溶出には、ミネラルウォーターおよび残留塩素 1mg/mL に調整した精製水を用いた。残留塩素はチオ硫酸ナトリウムで中和した後、抽出を行った。

5. エストロゲン様活性の検討

試料は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解し、超音波処理を 10 分間行い、DMSO に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°C で、一晚吸着させた。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容量の 1% に相当する容量加え、4°C 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°C 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 17 β -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^{-6} 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 17 β -エストラジオール相対活性を求める方法で評価して、17 β -エストラジオール相当重量を算出した。

C 研究結果

1. 沈殿池汚泥、浮上物質および脱水ケーキのエストロゲン様活性

表 1 に示すように、平成 15 年採取した試料については、NRL assay において、汚泥ではエストロゲン様活性として抽出成分 mg 当たり 0.02ng~2.80ng の 17 β -エストラジオール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 0.30~105.75ng の 17 β -エストラジオールに相当する量として検出され、水道原水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 の量のエストロゲン様活性が検出できることから、今回調査した全ての試料から検出下限値以上の活性を検出した。平成 16 年度には 1 浄水場から沈殿池汚泥を採取した (表 2)。平成 15 年度の同一浄水場から採取した試料に比べ非常に低い値であった。

一方、浮上物質に含まれるエストロゲン様物質は、同一浄水場の汚泥に比べ残さ重量当たりでは 2.22 倍、湿重量当たりでは 4.74 倍に相当し、汚泥に比べ水道原水からの濃縮率が高いことが示唆された (表 1)。

表1 試料湿重量, 含水量, 残さ量, 試料重量およびエストロゲン α
受容体親和性

サンプル 番号		試料採取量 湿重量(g)	含水量 (%)	残さ量 (mg)	試料 重量 (g)	エストロゲン受容体 α	
						エストロゲン 換算量 (ng/mg 残さ)	エストロゲン 換算量 (ng/g 重量)
1	沈殿池 汚泥	71.31	94.2	7.0	4.14	0.83	1.41
2	排泥池 汚泥	102.72	98.4	8.6	1.64	0.06	0.30
3	沈殿池 汚泥	105.22	97.0	28.6	3.16	0.15	1.37
4	調整槽 汚泥	71.28	95.4	58.3	3.28	0.02	0.33
5	沈殿池 汚泥	94.13	93.4	42.2	6.21	0.24	1.64
6	排泥池入口 汚泥	62.46	96.0	80.2	2.50	0.85	27.42
7	沈殿池 汚泥	79.02	95.6	131.5	3.48	2.80	105.75
8	2系沈殿池8号 汚泥	89.82	92.7	87.3	6.56	0.27	3.58
9	沈殿池 汚泥	90.54	92.0	96.3	7.24	0.32	4.27
10	ろ過池 浮上物質	72.89	93.5	134.5	4.74	0.71	20.25
11	沈殿池 排泥水 汚泥	90.19	92.8	64.8	6.49	1.63	16.32

表2 試料湿重量, 含水量, 残さ量, 試料重量およびエストロゲン α
受容体親和性

採取場所	試料種類	試料採取量 湿重量(g)	含水量 (%)	乾燥試料重量 (g)	エストロゲン換算量 (ng/g 乾燥重量)
A浄水場	脱水ケーキ	13.79	62.9	5.11	0.08
B浄水場	脱水ケーキ	14.77	58.3	6.15	0.56
C浄水場	脱水ケーキ	20.15	71.0	5.84	0.37
D浄水場	沈殿池 汚泥	192.94	97.4	5.01	0.01

脱水ケーキから抽出された物質に含まれるエストロゲン様活性は, 今回の調査では0.08~0.56ng 17 β -エストラジオール/g 乾燥重量であった(表2)。3水道事業体の試料であるが, 最大値と最低値では7倍の差があり, 浄水場により幅があることが認められた。脱水ケーキに含まれるエストロゲン様物質を17 β -エストラジオールに換算をすると, 乾燥重量トン当たり, 80~560 μ gと計算される。

2. 返送水などのエストロゲン様活性

4浄水場を例として, 送水や返送水等のエストロゲン様活性を調べた(表3)。送水のエストロゲン様活性は, 0.03~0.27ng 17 β -エストラジオール/Lであった。A浄水場の結果では, 送水に比べ返送水, 上澄水は2倍, 約4倍と高かった。C浄水場の結果では, 返送水は2倍の活性が見られ, ろ過池洗浄排水では送水と同程度であった。B浄水場の結果では, 送水の活性が4浄水場の中で最も高く, 最も低かったA浄水場に比べ9倍であった。返送水は送水と同程度であり, 他の2浄水場の結果が送水の2倍であったのとは異なった

結果であった。脱水ろ液は、0.49ng/Lと今回測定した試料の中で最も高い値であった。D浄水場の結果では、送水と濃縮槽からの上澄水と同程度であった。

表3 試料湿重量, 含水量, 残さ量, 試料重量および
エストロゲン α 受容体親和性

試料水		エストロゲン換算量 (ng/L)
A浄水場	送水	0.03
	返送水	0.06
	上澄水2	0.11
B浄水場	送水	0.27
	返送水	0.25
	脱水ろ液	0.49
C浄水場	送水	0.11
	返送水	0.22
	ろ過池洗浄排水	0.10
D浄水場	送水	0.10
	濃縮槽からの上澄水	0.11

3. コールタールエナメル塗装板からの抽出液試料のエストロゲン様活性

コールタールエナメル塗装したガラス板を、1mg/Lの遊離塩素を含む精製水もしくはミネラルウォーターに浸け、溶出した物質を溶媒抽出法もしくは固相抽出法により抽出・濃縮し、エストロゲン様活性を測定した(表4)。

溶出水として、塩素水とミネラルウォーターを比較した場合、溶媒抽出法と固相抽出法のどちらもミネラルウォーターを用いた方が高いエストロゲン様活性を示した。溶媒抽出法と固相抽出法を比較した場合、溶出水に関わりなく固相抽出法により調製した方が高いエストロゲン様活性を示した。

表4 試料湿重量, 含水量, 残さ量, 試料重量
およびエストロゲン α 受容体親和性

試料		エストロゲン 換算量 (pg/cm ²)
抽出方法	溶出水	
溶媒抽出	1mg/L 塩素水	定量下限値未満
	ミネラルウォーター	0.04
固相抽出	1mg/L 塩素水	0.16
	ミネラルウォーター	0.40

D. 考察

NRL assay において、汚泥に含まれるエストラジオール様活性として、抽出成分 mg 当たり 0.02ng~2.80ng、湿重量 g 当たりでは 0.30~105.75ng の 17β-エストラジオールに相当する量として検出された。水系や水道原水の水質により、エストロゲン様活性に大きな差が認められた。一方、送水のエストロゲン様活性は、0.03~0.27ng 17β-エストラジオール/L であり、送水に比べ返送水、上澄水が高い傾向が見られた。

これらの結果から、水道原水に含まれるエストロゲン様活性物質は沈殿池等の汚泥に濃縮・除去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。平成16年度に採取した試料では、平成15年度に採取した同一浄水場の試料に比べ非常に低い値であった。これは、一般環境へ排出される水の水質が良くなったのか、季節的な要素があるのか、汚泥の種類が異なるのか等、原因を明確にして比較はできないが、調査時点では水質が良い状態であったことが考えられる。

脱水ケーキから抽出された物質にもエストロゲン様活性は認められ、今回の調査では 0.08~0.56ng17β-エストラジオール/g 乾燥重量であった。3水道事業体の試料であるが、最大値と最低値では7倍の差があり、浄水場により幅があることが認められた。

一方、浮上物質に含まれるエストロゲン様物質は、同一浄水場の汚泥に比べ残さ重量あたりでは 2.22 倍、湿重量当たりでは 4.74 倍に相当し汚泥に比べ水道原水からの濃縮率が高いことが示唆された。

これらの結果によると、流量が不明であるため結論を述べることはできないが、水道原水に含まれるエストロゲン様活性物質は汚泥や浮上物質等に凝集・除去され、そのエストロゲン様活性は色々な要素に影響され、時期や流域の環境に影響されて大きく変動する可能性が示唆された。

コールタールエナメル塗装したガラス板を、1mg/L の遊離塩素を含む精製水もしくはミネラルウォーターに浸け、溶出した物質を溶媒抽出法もしくは固相抽出法により抽出・濃縮し、エストロゲン様活性を調べた結果、溶媒抽出法と固相抽出法のどちらもミネラルウォーターを用いた試料が高いエストロゲン様活性を示した。この結果は、溶出水の溶出効率の相違が影響していることも考えられるが、塩素水を溶出水に用いた場合には、溶出された物質が共存する遊離塩素の作用により酸化反応を受けてエストロゲン様活性を示さない物質に変化した可能性が考えられる。従って、遊離塩素を含む水道水の場合はたとえエストロゲン様活性物質が溶出することがあっても、溶出後には活性が低い物質に変化することが推測される。

溶媒抽出法と固相抽出法を比較した場合、溶出水に関わりなく固相抽出法により調製した試料が高いエストロゲン様活性を示した。溶媒抽出法と固相抽出法で抽出された物質に共通する物質が存在するか否かは不明ではあるが、固相抽出法の濃縮効率が高いか、溶媒抽出法の際の減圧濃縮操作で喪失する物質が存在する可能性が考えられる。

今後の検討には、ミネラルウォーターで溶出し、固相抽出法により試料を調製することが良いと考えられる。さらに、溶出水に塩素を添加してエストロゲン様活性の増減を比較することが必要である。一方、今回の結果では、塩素水の溶出試料はミネラルウォーター

に比べ約 40%の活性を示しているが、長時間塩素共存下の条件におけるエストラジオール活性の変化である。従って、塩素暴露時間の長さによるエストラジオール活性の変化についても検討が必要と考えられる。

E. 結論

水道浄水場の沈殿池からの汚泥や浮上物質、脱水ケーキ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明らかとなった。汚泥や浮上物質のアセトン/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、してエストロゲン様活性を示す主となる特定の化学物質を同定することはできず（平成15年度報告書）、多種多様の物質の複合的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る。今後、別の機器分析手法を用いて物質の検索を行い、特定物質の同定と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する。

塗装から溶出してくる物質のエストロゲン様活性の評価を行う場合、ミネラルウォーターで溶出し、固相抽出法により試料を調製することが良いと考えられる。

F. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) T. Oka, N. Adachi, T. Shinkai, K. Sakuma, T. Nishimura and K. Kurose (2003)
Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 877-882.

2. 口頭発表

- 1) 西村哲治, 安藤正典, 西川淳一, 西原力, 橋本安弘: 核内受容体リガンドアッセイによる内分泌攪乱化学物質の評価, 第6回日本環境学会シンポジウム講演集, p. 184 (2003.9) 神戸.

分担研究報告書 6

浄水汚泥・スカムのエストロゲン様作用

分担研究者 亀井 翼
協力研究者 栗原沙織、竹田 誠、
大野浩一、眞柄泰基

浄水汚泥・スカムのエストロゲン様作用

分担研究者 北海道大学工学研究科 亀井翼

研究協力者 北海道大学工学研究科 栗原沙織、竹田誠、大野浩一、真柄泰基

研究要旨

- (1) 浄水汚泥や浮上物質中に濃縮されているフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、フタル酸ジ-n-ブチル (DBP)、フタル酸ジメチル (DMP) およびフタル酸ジエチル (DEP) などのフタル酸エステル類のエストロゲン様活性を酵母 Two-Hybrid 法を用いて行ったが、エストロゲン様活性は認められなかった。
- (2) 全国 10ヶ所 A-J 浄水場の汚泥試料および I 浄水場ろ過池浮上物質の抽出・濃縮試料についても酵母 Two-Hybrid 法ではエストロゲン様活性は認められなかった。
- (3) 一方でエストロゲン様活性阻害作用があることが明らかとなった。浄水汚泥や浮上物質によるエストロゲン様活性阻害作用については、汚泥・スカム中に含まれるフタル酸エステル類が主たるエストロゲン様活性阻害要因物質ではなく、自然由来の E260 発現による可能性が高いと考えられる。

A. 研究背景と研究目的

内分泌攪乱作用が疑われる様々な物質が水道原水からも検出されている。これらの物質に関する水道原水の汚染実態、各浄水処理過程における除去特性等については明らかとなってきている¹⁾。一方、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の物質は、浄水処理によって処理水からは除去されるものの、浄水施設内において沈殿池汚泥や浮上物質 (スカム) 中に高濃度に濃縮された状態で存在している²⁾。したがって、このように高濃度に濃縮された内分泌攪乱物質が再び浄水処理工程あるいは水道水中に移行してしまう可能性も考えられる。また、汚泥の処分方法についても検討が必要である。

そこで本研究では、フタル酸エステル類のエストロゲン様活性、さらに実浄水場より採取された浄水汚泥のエストロゲン様活性およびエストロゲン様活性阻害作用について検討を行った。

B. 実験方法

フタル酸エステル類

フタル酸エステル類の標準試料として、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)、

フタル酸ジ-n-ブチル (DBP)、フタル酸ジメチル (DMP) およびフタル酸ジエチル (DEP) を用いた。各物質を DMSO に溶解させ、順次段階希釈したものを供試した。

浄水汚泥および浮上物質の前処理

全国 10 ヶ所 A-J 浄水場の汚泥試料および I 浄水場ろ過池浮上物質を採取後、抽出・濃縮処理を行った。脱水後の汚泥試料 20g に塩酸 5mL およびアセトン 50mL を加えて、振とう抽出 (10min)、超音波抽出 (10min) を行い、遠心分離後の上清溶液を回収した。この操作を 3 回繰り返した後、抽出液を 5%塩化ナトリウム溶液 500mL に加え、ジクロロメタン 50mL で 2 回 (10min) 抽出した。ジクロロメタンを乾固させ DMSO に再溶解させたものを試料とした。

エストロゲン様活性の測定

エストロゲン様活性の測定には、酵母 Two-Hybrid 法を用いた³⁾。エストロゲン様活性は陽性対照である 17β-エストラジオール (E2) の最大活性値 (100%) に対する比活性値として評価を行った。また、試料と同量の E2 (10⁻⁶mol/L) を添加することで、フタル酸類、汚泥試料による E2 のエストロゲン様活性阻害作用についても検討を行った。

C. 実験結果および考察

フタル酸エステル類のエストロゲン様活性

フタル酸エステル類のエストロゲン様活性を図 1 に示す。いずれのフタル酸エステル類もエストロゲン様活性は認められなかった。フタル酸エステル類と同様に水道原水からの検出頻度が高い 4-ノニルフェノール (NP) と比較しても、エストロゲン様活性を示さないことがわかる。一方、図 2 に示すように DEHP による E2 のエストロゲン様活性減少率は 29-7%程度であった。

浄水汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性

浄水汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性の測定結果を図 3 に示す。全ての試料において比活性値が 2%以下 (ブランクと同等) となり、汚泥試料にエストロゲン様活性が認められないという結果が得られた。特に、I 浄水場の浮上物質中には 52μg/g-脱水汚泥重量と他の汚泥試料に比べて高濃度の DEHP が存在していたが、エストロゲン様活性は認められず標準物質の場合と同様の結果となった。また、汚泥にはフタル酸エステル類以外のエストロゲン様物質が濃縮されている可能性も考えられたが、本研究の結果より、そのような物質が存在したとしても、エストロゲン様活性を示すような濃度レベルまで濃縮されていないと推測される。

浄水汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性阻害作用

汚泥試料と E2 を共存させた場合における E2 の活性減少率、および汚泥濃縮試料を 1000 倍希釈して測定した波長 260nm の紫外部吸光度 (E260) を図 4 に示す。F 浄水場と I 浄水場汚泥試料を除くと、E2 の活性減少率と E260 からみた有機物量に対応関係がみられた。つまり、有機物量が多い程エストロゲン様活性阻害作用が大きくなる傾向がみられた。また、I 浄水場浮上物質については活性減少率が最も大きく、この試料中に高濃度で存在する DEHP(図 3)がエストロゲン様活性