

会・日本環境毒性学会合同研究発表
会, p79-80 (2004,9)

- 2) 西村哲治, 久保田領志, 田原麻衣子,
清水久美子, 徳永裕司; 浄水処理工
程におけるエストロゲン様活性, 環
境ホルモン学会第7回研究発表会
(2004,12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

浄水処理過程におけるエストロゲン様作用物質の挙動評価

分担研究者 伊藤禎彦
研究協力者 早坂剛幸、宮本太一、
越後信哉、岡山治一

厚生労働科学研究
「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」
分担研究報告書

浄水処理過程におけるエストロゲン様作用物質の挙動評価

分担研究者 京都大学工学研究科 伊藤 禎彦
研究協力者 京都大学工学研究科 早坂 剛幸、宮本 太一、越後 信哉
京都市水道局 岡山 治一

研究要旨

E₁、E₂ およびエストロゲン様作用が、浄水処理過程で除去され低減する過程を把握した。一方、沈殿池汚泥やスカムには、原水の 10~30 倍の高濃度で蓄積しており、その管理の重要性を指摘した。また、凝集フロック中に取り込まれたエストロゲン様作用の大部分は、比較的速やかに脱着され水相に容易に回帰する。以上のことから、浄水場における固相管理の重要性を指摘した。

A. 研究目的

表面浮上物質、沈殿汚泥にフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等が濃縮・蓄積されていること、およびエストロゲン様作用としても濃縮されていることが明らかとなった。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。特に、昨年までの研究で、検出されるエストロゲン様作用とはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル以外の物質によるものと考えられた。

本調査研究では、分析的方法のほか、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ような挙動を示すかを把握する。本年度は、特に、浄水場内におけるエストロゲン様作用の挙動と収支を評価することを試みた。また、凝集処理過程を中心として、エストロゲン様作用物質の固相・水相間挙動について実験的考察を行った。

B. 研究方法

1. 浄水処理過程におけるエストロゲン様作用物質の挙動

1. 1 調査対象と方法

琵琶湖水を原水とする A 市 B 浄水場において調査を行った。処理フローを図 1 に示す。調査を行った時期には前塩素処理は行われていなかった。2004 年 12 月 3 日、12 月 22 日、2005 年 1 月 14 日の計 3 回試料を採取した。

浄水系試料の採取は、着水井、急速攪拌池出口、ろ過池流入部、配水池出口の計 4 箇所で行った。排水系試料は、排泥池において沈殿池汚泥を、ろ過池洗浄配水出口においてろ過池洗浄排水を採取した。また、急速攪拌池出口付近にスカム(表面浮上物)の蓄積があった場合は、それも採取した。なお、ろ過池洗浄排水は経時的に水質が変化するため、目視によりその濃薄を確認しながら、洗浄開始直後、洗浄途中、洗浄終了直前の 3 回に分けて採取した。

試料の採取箇所と測定項目を表 1 に示す。エストロン(E₁)、17β-エストラジオール(E₂)は ELISA 法で測定した。エストロゲン様作用は後述する NRL Assay により測定した。

E₁、E₂ 濃度測定のための前処理法¹⁾を図 2、図 3 に示す。前処理方法は、試料水中 SS

濃度の大小によりその方法を変えた。すなわち、図 2 は採水地点 1,2,3,4,6 の低 SS 濃度試料水に対する方法であり、図 3 は採水地点 5, 7 の高 SS 濃度試料水に対する方法である。

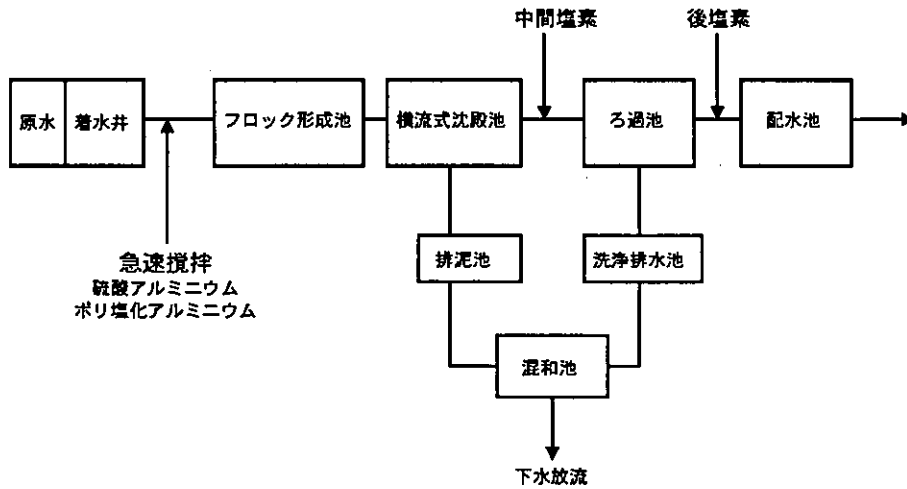


図 1 浄水処理フロー

表 1 採水試料と測定項目

調査試料		採水箇所	測定項目
浄水系	着水井	1. 着水井	SS、DOC、E ₁ 、E ₂ 、エストロゲン様作用
	急速攪拌池	2. 急速攪拌池出口	
	ろ過池	3. ろ過池流入部	
	送水	4. 配水池出口	
排水系	沈殿池汚泥	5. 沈殿池汚泥排泥池（上澄液は捨てない状態で）	
	ろ過池洗浄排水	6. ろ過池洗浄排水出口	
浮上物質	浮上物質	7. 急速攪拌池	

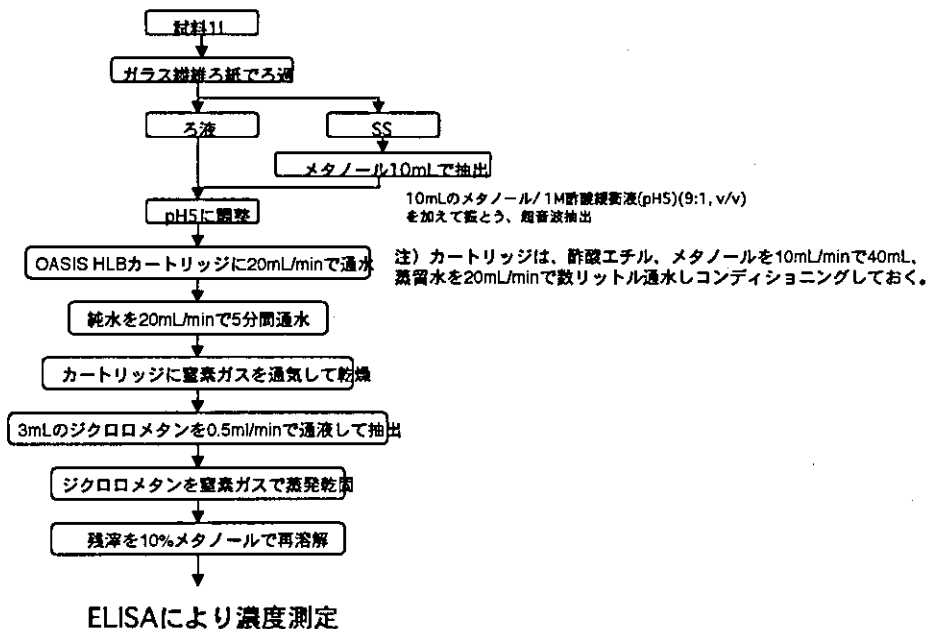


図 2 E₁、E₂濃度測定のための前処理法
(低 SS 濃度試料)

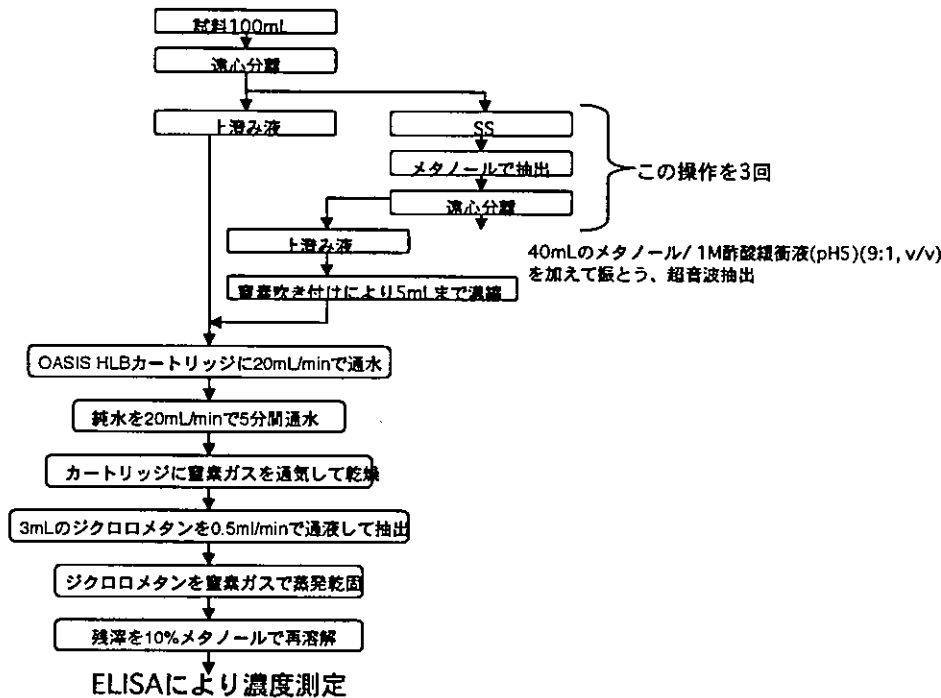


図3 E₁、E₂濃度測定のための前処理法
(高SS濃度試料)

エストロゲン様作用測定のための前処理法を図5(採水地点1,2,3,4,6の低SS濃度試料水用)、図6(採水地点5,7の高SS濃度試料水用)に示す。著者ら²⁾は、これまでに水道原水と塩素処理水のエストロゲン様作用について図4を提示し、水道水のエストロゲン様作用の強さとは、塩素によって増大する成分と低減する成分との和であること示した。前処理法では、それらの成分を回収できる方法である必要があり、図5および図6に示す方法はこれを念頭に整備したものである。すなわち、水酸化ナトリウム水溶液によって天然有機物質とその副生成物を回収し、ジクロロメタンによって微量汚染物質とその副生成物を回収する。

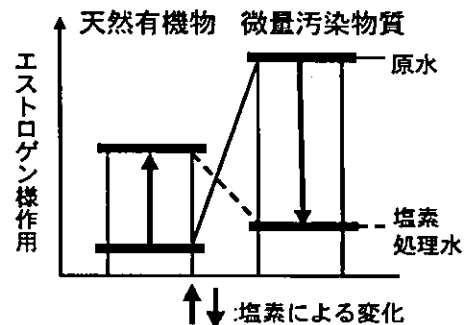


図4 エストロゲン様作用の構成成分と塩素による変化

1. 2 Nuclear Receptor Ligand Assay (NRL Assay、ヒト核内受容体リガンドアッセイ)

核内受容体は、リガンド(17β-エストラジオール等)との結合によりその立体構造が変化し、転写共役因子と相互作用する。NRL Assayはこの原理を利用している³⁾。

操作手順を以下に記す。ヒトエストロゲン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不活化マイクロプレートに対して4℃で一晩静置して固定化する。この操作でエストロゲンレセプターがウェルに固定される。静置後、プレートを氷冷緩衝液で3回洗浄する。洗浄液をタッピングにより完全に除去した後、ヒト転写活性化因子融合タンパク質TIF2-BAP(大腸菌アルカリリンフォスファターゼ)を加える。この状態で、適当な濃度に調製した試料(Ligand)を全容量の1%相当添加し、4℃暗所にて1時間静置する。反応後、氷冷緩衝液で3回洗浄し、洗浄液をタッピングにより完全に除去し、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、30℃で1時間発色反応させる。最後に、0.5M水酸化ナトリウム液を加えて反応を停止し、405nmの吸光度を測定する。

陽性対照として、 10^{-11} から 10^{-6} M の濃度範囲で、 17β -エストラジオール(E_2)の作用を測定し標準 E_2 曲線をプレートごとに得る。また、発色基質液のみの吸光度を試薬ブランクとする。

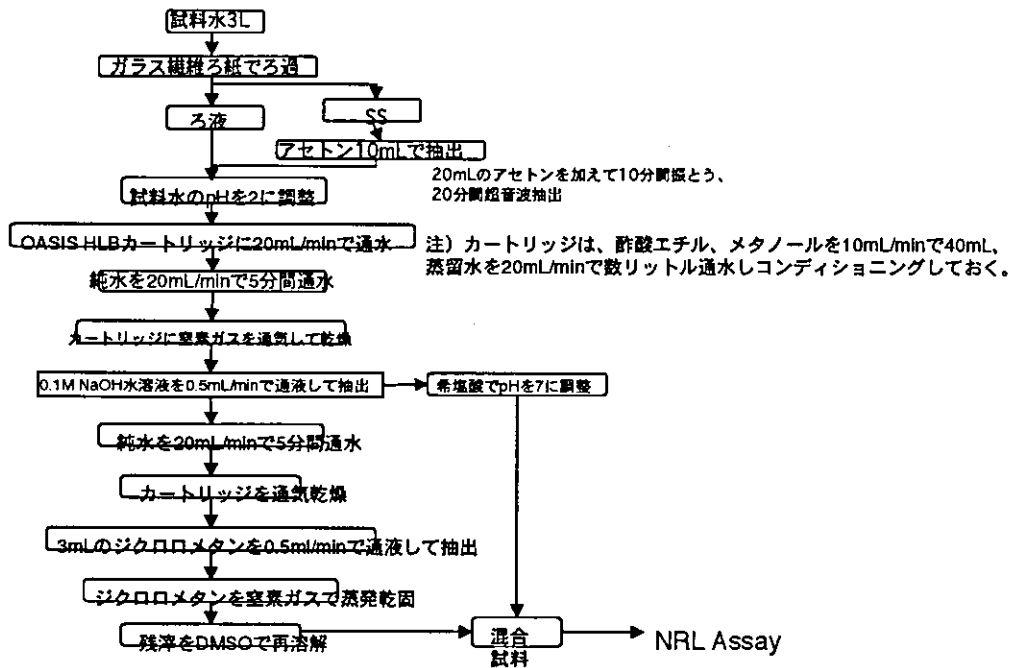


図5 エストロゲン様作用測定のための前処理法 (低SS濃度試料)

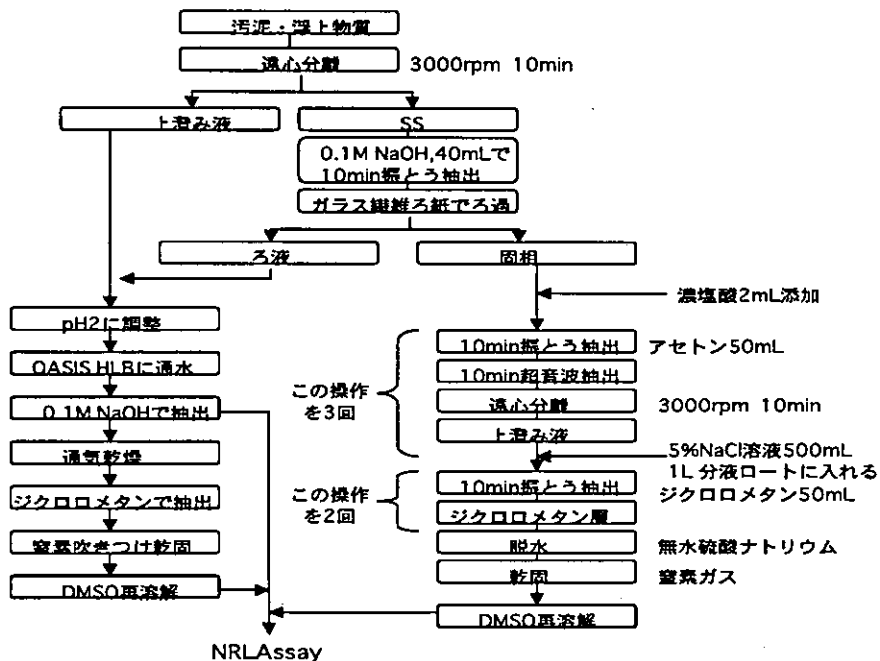


図6 エストロゲン様作用測定のための前処理法 (高SS濃度試料)

2. 水道原水中のエストロゲン様作用物質の固相・水相間挙動

ここでは凝集処理前の場を想定し、水道原水中におけるエストロゲン様作用物質の固

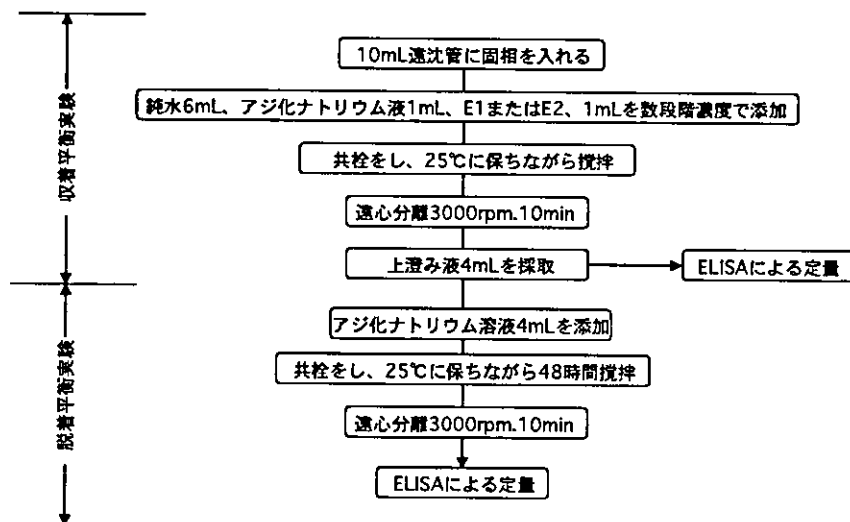


図7 収着・脱着平衡実験フロー

相・水相間挙動を明らかにする。すなわち、固相・水相間の収着および脱着平衡実験を行い、それぞれ収着・脱着等温線を得る。

2. 1 琵琶湖水の浮遊性固形物 SS の回収

水道原水中の固相として、琵琶湖水から浮遊性固形物 SS を回収した。琵琶湖南湖水を $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルターろ過し、フィルター上に捕捉された SS をかき集め、常温乾燥させた。

2. 2 収着および脱着平衡実験方法⁸⁾

収着および脱着平衡実験フローを図7に示す。アジ化ナトリウムを添加した理由は、 E_1 、 E_2 の生物分解を防ぐためである。

得られた E_1 、 E_2 濃度から、以下の式1により収着平衡時の E_1 、 E_2 の固相中濃度 q_{es} を算出した。

$$q_{es} = (C_{w0} \times 8/1000 - C_{w1} \times 8/1000) / M \quad (\text{式1})$$

ここに、 q_{es} : 固相中の E_1 、 E_2 濃度 ($\mu\text{g/g}$)、 C_{w0} : 初期濃度設定が等しいコントロールの E_1 、 E_2 水相濃度 ($\mu\text{g/L}$)、 C_{w1} : 収着平衡時 E_1 、 E_2 水相濃度 ($\mu\text{g/L}$)、 M : 固相乾燥重量 (g)。

脱着平衡実験段階で得られる平衡時の E_1 、 E_2 水相濃度: C_{w2} ($\mu\text{g/L}$) を得て、以下の式2により脱着平衡時の E_1 、 E_2 の固相中濃度: q_{ed} ($\mu\text{g/g}$) を算出した。

$$q_{ed} = (C_{w0} \times 8/1000 - C_{w1} \times 4/1000 - C_{w2} \times 8/1000) / M \quad (\text{式2})$$

ただし、4: 0.2 g/L アジ化ナトリウム水溶液で置換した水相量 (mL)

3. 凝集プロセスにおけるエストロゲン様作用物質の挙動

ここでは、浄水場に流入したエストロゲン様作用物質が、凝集過程でどの程度除去されるのかを把握する。

水中濁質量に差がある試料水として、蒸留水、淀川水、琵琶湖水をとりあげた。標準 E_1 、 E_2 を初期濃度 $0.1\mu\text{g/L}$ となるように添加した。24 時間室温で静置し、その後凝集処理を行った。この過程で E_1 、 E_2 水相濃度を測定し、 E_1 、 E_2 の水中粒子への収着過程と、凝集による除去効果を区別して測定した。琵琶湖水は南湖渚公園の湖岸から採取したものであり、淀川水は枚方大橋左岸から採取した。凝集処理は、ポリ塩化アルミニウムを用いて、最適注入率を求めつつ行った。

エストロゲン様作用試験のための試料調製法を図8に示す。図4に示したように、水道原水のエストロゲン様作用を構成する物質群は、微量汚染物質と天然有機物の二成分に大別される。これに対応して、 0.1M 水酸化ナトリウム溶液によって天然有機物質を回収し、

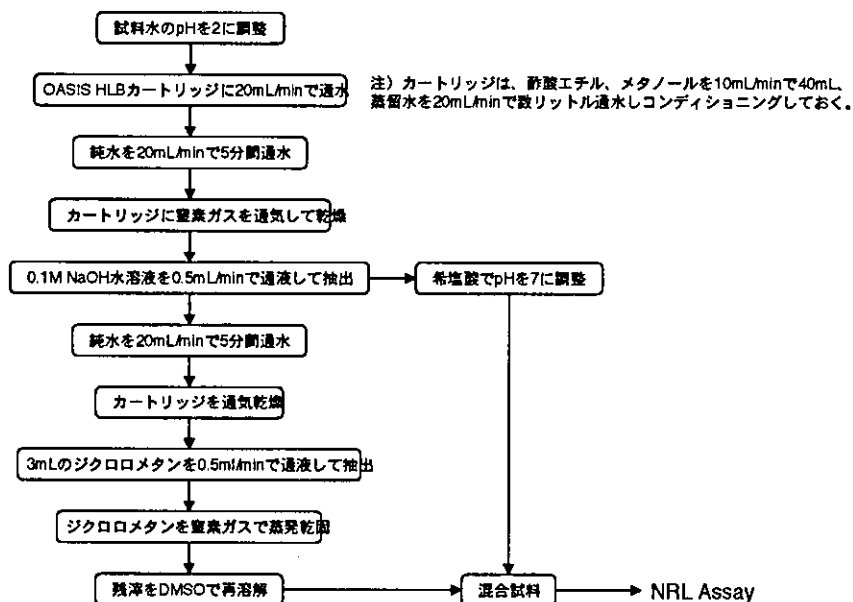


図8 エストロゲン様作用試験のための試料調製方法

その後、ジクロロメタンによって微量汚染物質を回収する方法となっている。両者を混合してNRL Assay用試料とする。

4. 凝集処理後におけるエストロゲン様作用物質の固相・水相間挙動と収着・脱着速度

ここでは、凝集後の固相・水相間挙動を明らかにする。具体的には、 E_1 、 E_2 の固相(凝集ブロック)に対する収着・脱着平衡実験を行う。加えて収着・脱着速度実験や、凝集ブロックからのエストロゲン様作用自体の脱着実験も併せて行う。

4. 1 収着・脱着平衡および収着・脱着速度

凝集後の固相として、琵琶湖水から凝集ブロックを作製した。琵琶湖南湖水に、凝集処理を行って得た凝集ブロックを、遠心分離機を用い3000rpmで10分間遠心分離を行い回収した。回収した凝集ブロックは、湿泥のまま4°C暗所に保存して使用した。

収着および脱着平衡実験は、固相として凝集ブロックを共栓付き遠沈管に入れ、3節と同様の方法で行った。

4. 2 凝集ブロックからのエストロゲン様作用脱着実験

淀川水(枚方大橋左岸より採取)を凝集してブロックを回収した。淀川水2.5Lにつき湿重量1.5gの凝集ブロックを得た。

ブロックを、4本の300mL三角フラスコに湿重量1.5g(淀川水2.5L相当)ずつ入れ、さらに蒸留水200mLを入れて共存させた。そのフラスコを攪拌器で攪拌した。攪拌後、3000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄み液を得た。回収した上澄み液は、OASIS HLBを用いた固相抽出法により濃縮した。ただし、本実験では抽出溶媒としてジクロロメタンのみを用い水中の微量汚染物質を抽出回収した。

以上の操作を処した試料をNRL Assayに供し、凝集ブロックから水相に脱着したエストロゲン様作用を測定した。

一方で、凝集ブロック自体が持つエストロゲン様作用も測定した。つまり、凝集ブロックに対しアセトンを用いた液々抽出を行い、ブロック中微量汚染物質を回収してNRL Assayに供した。以下に、その前処理法を記す。

凝集ブロック(湿重量1.5g)と濃塩酸2mLを100mL共栓付き三角フラスコに入れてよく混合した。アセトン50mLを加えて10分間振とう抽出し、さらに超音波洗浄機を用いて10分間抽出操作を行った。3000rpmで10分間遠心分離して上澄み液を取り出した。この

抽出操作を3回行い、上澄み液を合わせて5%塩化ナトリウム水溶液500mLを入れた分液ロート(1L)に加えた。これにジクロロメタン50mLを加え10分間振とう抽出した。この抽出操作を2回行い、合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、窒素吹き付けにより蒸発乾固した。残った残滓をDMSOに再溶解しNRL Assay試料とした。

5. 浄水場内水質試料および汚泥試料のMVLNアッセイ

平成14年度、15年度調査に引き続き、浄水場内水質試料および汚泥試料のエストロゲン様作用試験を行った。平成16年度はH市水道局K浄水場を対象とし、試料採取と前処理が行われた。方法は前年度までと同様である⁴⁾。

また、前年度までと同じ試験方法とするため、エストロゲン様作用試験としてはヒト乳がん細胞を用いるMVLNアッセイを行った。

C. 研究結果と考察

1. 浄水処理過程におけるエストロゲン様作用物質の挙動

1. 1 実験結果

原水水質の測定結果を表2に示す。また、中間塩素、後塩素添加率および残留塩素濃度を表3に示す。

例として、浄水場各点におけるE₁、E₂濃度の測定結果を図9、10に示す。3回の平均値を、最大値、最小値と併せて図示したものである。ただし、5.沈殿池汚泥と7.スカムの値は他と比べ大きかったため数値を記入した。浄水処理における低減過程が把握できているといえる。一方、沈殿池汚泥やスカムには原水の数十倍という高濃度で蓄積されていることもわかった。エストロゲン様作用の測定結果を、浄水系と排水系に分けて図11、図12に示す。エストロゲン作用強度は、NRL Assayの結果からE₂濃度換算値(ng/L)として表示している。

図4に示すように、塩素によって増大する成分も含まれるはずであるが、低減し続けるという結果となっている。また、沈殿池汚泥やスカムに原水の10~30倍の高濃度でエストロゲン様作用が蓄積されていることもわかる。

以上の結果に対し、沈殿池からの排出汚泥量やろ過池洗浄排水量を含む浄水場での流量データを用いて、フラックスを算出した。ろ過池洗浄排水については、経時的に採取した計3試料(6.ろ過池洗浄排水No.1~No.3)の測定結果に、ろ過池洗浄排水量/3 m³/dayを乗じて、その総和をフラックスとした。

表2 原水水質

	第1回調査(04.12.03)	第2回調査(04.12.22)	第3回調査(05.01.14)
水温(℃)	15.0	13.0	6.1
pH	8.0	7.9	7.9
濁度(-)	1.8	2.1	1.7

表3 調査時の塩素添加率と残留塩素

	第1回調査(04.12.03)	第2回調査(04.12.22)	第3回調査(05.01.14)
中間塩素添加率(mgCl ₂ /L)	4.0	4.0	4.0
後塩素添加率(mgCl ₂ /L)	6.4	6.4	3.6
残留塩素濃度(mgCl ₂ /L)	0.6	0.6	0.5

SS、 E_1 、 E_2 、エストロゲン様作用の結果をそれぞれ図 13、図 14、図 15、図 16 に示す。いずれも 3 回の平均値を示している。

また、残存率から算出される浄水処理工程別除去率を図 17 に示す。エストロゲン様作用をみると、その除去は主として凝集処理と塩素処理によってなされることがわかる。一方、 E_1 、 E_2 ともに砂ろ過ではほとんど除去されていない。

凝集処理におけるエストロゲン様作用、および E_1 、 E_2 の除去率は、それぞれ 38%、15%、26%であり、後述の室内実験結果と比較するとやや大きな値となった。これは、室内実験では水相の溶存態エストロゲン様作用物質のみを回収しているが、本調査では SS に収着している収着態エストロゲン様作用物質も回収し評価している。この SS 収着態エストロゲン様作用物質の凝集特性が、除去率増大に寄与したと考えられる。

総じて、水中の溶存態エストロゲン様作用物質の凝集による除去はあまり期待できない。しかし、浄水処理における物質収支全体をみれば、SS の凝集除去に付随し収着態エストロゲン様作用物質も除去されるため、エストロゲン様作用物質の凝集除去率はやや大きくなるといえる。

このように、エストロゲン様作用の凝集除去効果は 4 割程度と比較的大きい。したがって、固相収着態エストロゲン様作用を浄水系外にできるだけ除外する重要性、すなわち固相管理の重要性を指摘できる。

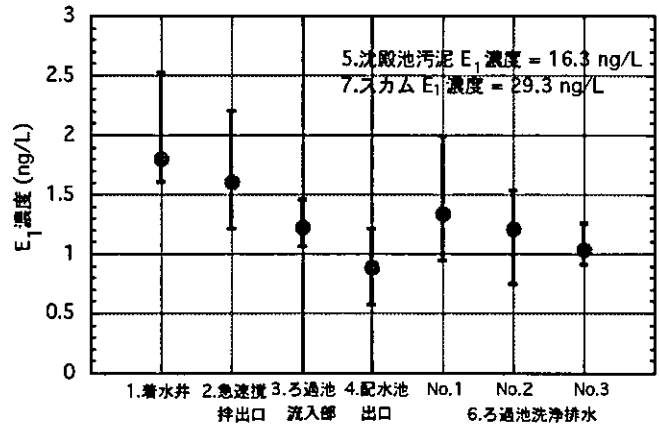


図9 浄水場各点における E_1 濃度測定結果

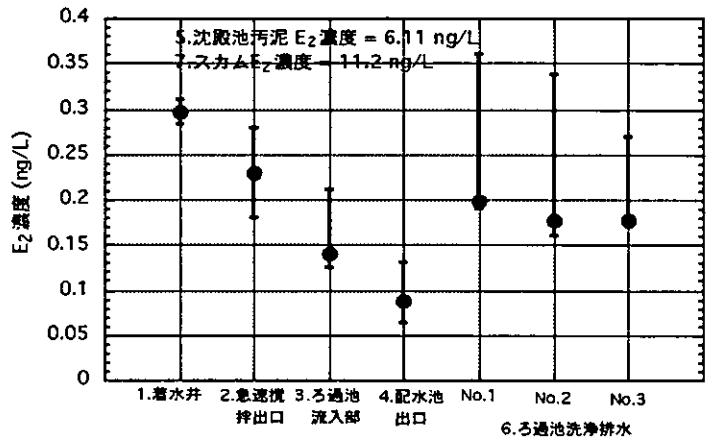


図10 浄水場各点における E_2 濃度測定結果

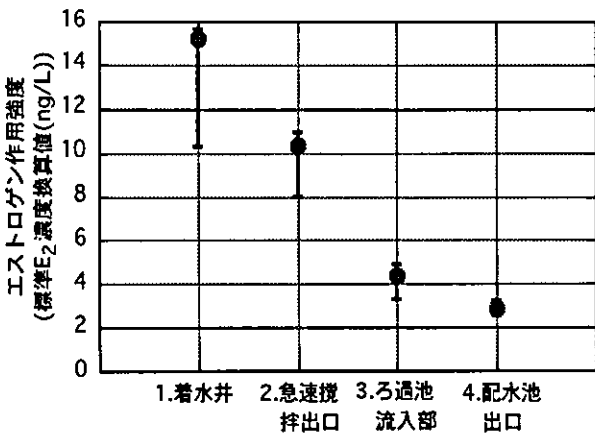


図11 浄水場各点におけるエストロゲン様作用測定結果 (浄水系)

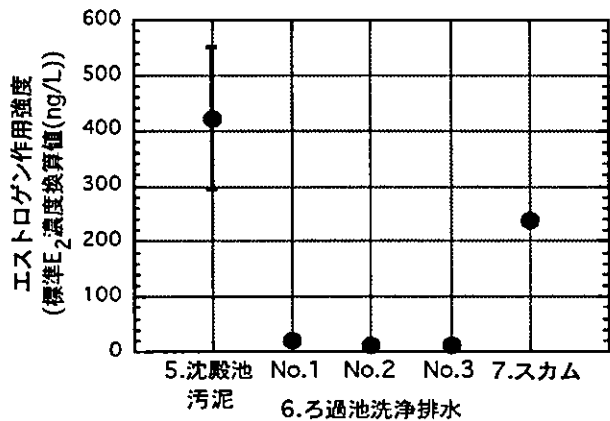


図12 浄水場各点におけるエストロゲン様作用測定結果 (排水系)

塩素による変化をみると、中間塩素と後塩素処理により E_1 、 E_2 濃度とエストロゲン様作用が低減した。図4に示すように、水道水中のエストロゲン様作用を構成する物質は、天然有機物と微量汚染物質、およびそれらの副生成物である。しかし、本調査の結果を見る限りでは、エストロゲン様作用の増大傾向はみられず、浄水処理過程におけるエストロゲン様作用の強さは、微量汚染物質が卓越しているものと推察される。

1. 2 まとめ

(1) E_1 、 E_2 濃度およびエストロゲン様作用は、浄水処理過程で除去され低減する。ただし、沈殿池汚泥やスカムには、原水の 10~30 倍の高濃度で蓄積しており、その管理の重要性が指摘される。

(2) 浄水処理過程における E_1 、 E_2 およびエストロゲン様作用のフローを得た。その結果、浄水処理による最終的な除去率は、エストロゲン様作用で 81%、 E_1 で 56%、 E_2 で 77% であった。

(3) 凝集処理によりエストロゲン様作用は 38%、 E_1 は 15%、 E_2 は 26% 程度が除去され、その除去率は比較的大きい。凝集処理の重要性と、その後の固相管理の重要性が指摘される。また、残存する E_1 、 E_2 およびエストロゲン様作用は、中間塩素、後塩素処理によってさらに低減していた。

2. 水道原水中のエストロゲン様作用物質の固相・水相間挙動

例として、 E_2 の琵琶湖水中 SS に対する収着等温線、脱着等温線 ($T=25^\circ\text{C}$) を図 18 に示す。以下に示す Freundlich 式でよく表された。

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad (\text{式 3})$$

ここに、 q_e ($\mu\text{g/g}$): 固相中の収着質濃度、 K_f ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1/n} \cdot \text{L}^{1/n}$): 収着能に関する定数、 C_e ($\mu\text{g/L}$): 平衡時の収着質濃度、 $1/n$: 親和性に関する定数。

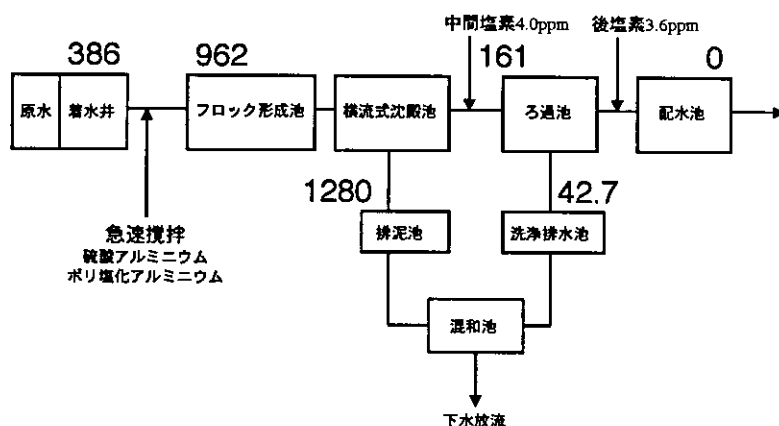


図13 SSの挙動 (3回の平均, 単位: kg/day)

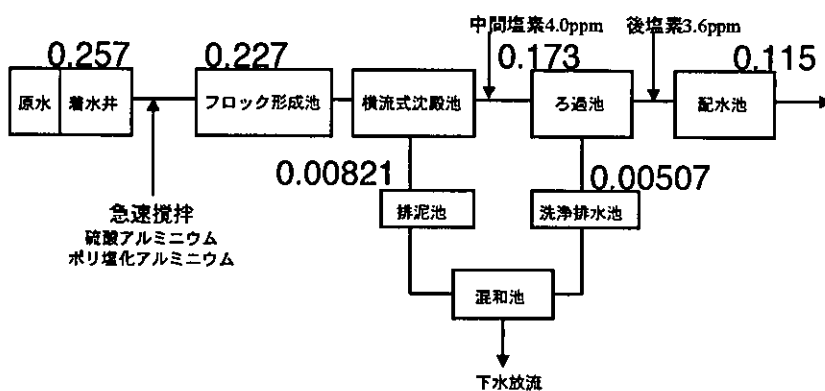


図14 E_1 の挙動 (3回の平均, 単位: g/day)

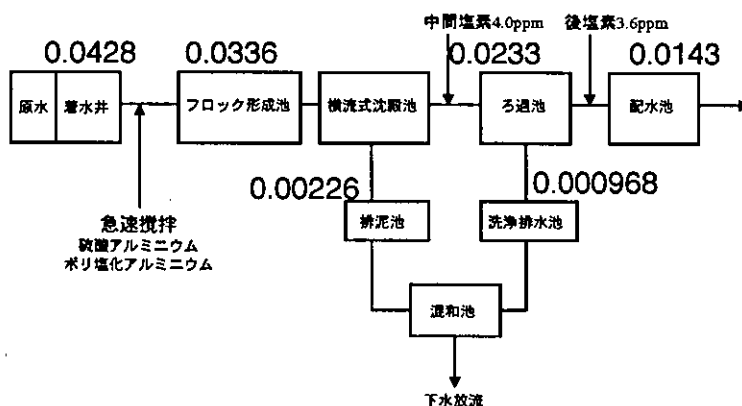


図15 E_2 の挙動 (3回の平均, 単位: g/day)

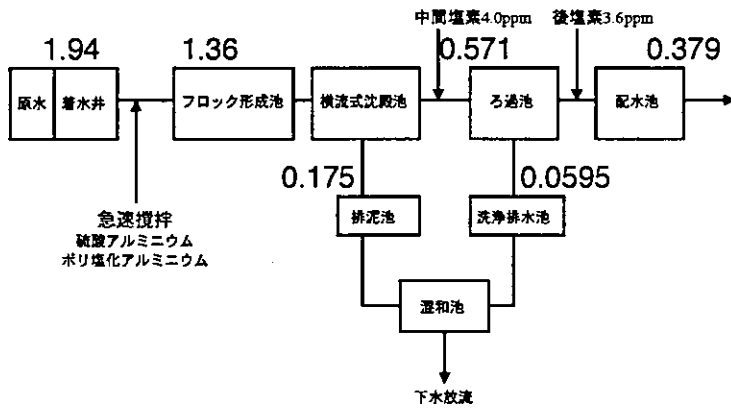


図16 エストロゲン様作用の挙動
(3回の平均, 単位: E₂濃度換算値(g/day))

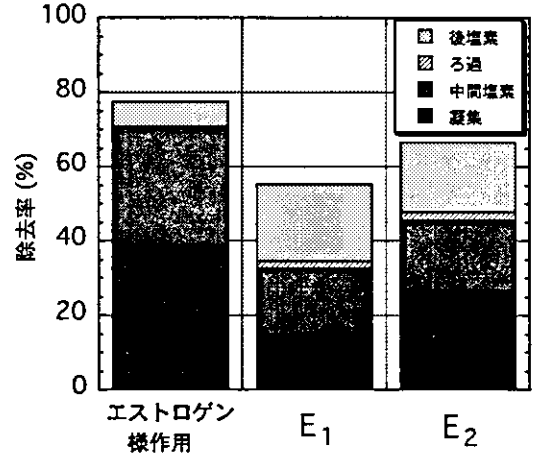


図17 浄水処理工程別除去率

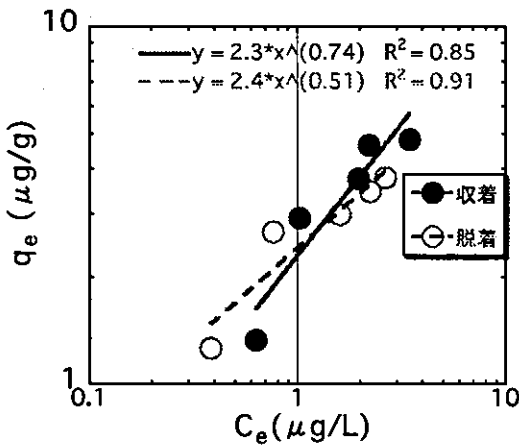


図18 E₂吸着・脱着平衡実験結果

吸着および脱着等温線はほぼ一致する結果となった。つまり、E₂のSSに対する吸着と脱着は、可逆的に生じているといえる。E₁についても同様の傾向であった。

K_f値について、NP、BPAの結果とあわせて表4に示す。同時にlog K_{ow}の値も示した。log K_{ow}値とK_f値には相関が見られ、K_{ow}が大きいほどK_f値も大きくなっている。一方、BPAでは吸着および脱着時のK_f値にやや大きな差が認められる。

以上まとめると、まず、凝集前、すなわち水道原水中におけるE₁、E₂の固相・水相間の吸着および脱着等温式を得た。等温式は、Freundlich式でよく表され、K_f値をもとに両物質の挙動が把握できた。

また、水道原水中のE₁、E₂は、固相と吸着・脱着の可逆的平衡を保ちながら存在していると推定された。

表4 K_f値 (固相:SS)

	log K _{ow}	K _f	
		吸着	脱着
NP	6.0	9.9	11
E ₂	3.9	2.3	2.4
E ₁	3.4	0.14	0.067
BPA	3.3	0.07	0.17

3. 凝集プロセスにおけるエストロゲン様作用物質の挙動

本実験で用いた琵琶湖水と淀川水のSS、DOC、濁度の測定結果を表5に示す。

凝集実験の結果を図19に示す。24時間後の蒸留水中濃度を100%とし、水相濃度残存率(%)で表した。なお、凝集前後のpHに大きな変化はなかった。水中粒子の少ない琵琶湖水では、E₁とE₂の間に差はみられない。しかし、水中粒子の多い淀川水では、E₁に比べE₂の固相への移行が顕著であった。E₁に比べlog K_{ow}値の大きいE₂の方が固相に吸着されやすいと考えられる。この結果は、前章の吸・脱着平衡実験の結果とも一致する。しかし、凝集除去率はE₁、E₂ともに10%未満と小さく有意な差はみられなかった。アルミニウムポリマー自体に吸着する(sweep flocculation)効果と考えられる。

表5 琵琶湖水と淀川水の水質

	SS(mg/L)	DOC(mgC/L)	濁度
琵琶湖水	13	2.0	1.0
淀川水	57	2.5	4.6

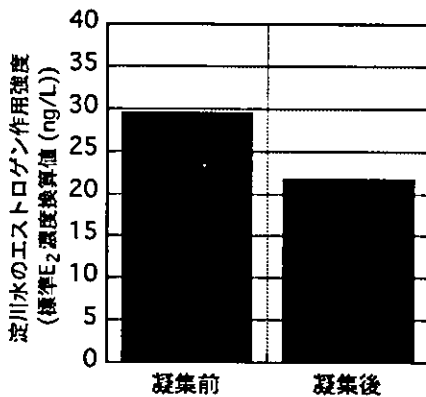


図20 淀川水のエストロゲン様作用凝集除去

4. 1 実験結果

例として E₂ の凝集フロックに対する収着等温線、脱着等温線 (T=25°C) を図 21 に示す。Freundlich 式でよく表された。脱着等温線が収着等温線に比べ上に描かれ、脱着等温線が収着等温線へ回帰していない。つまり、凝集フロックに対しては、収着よりも脱着の方が生じにくく収着・脱着は不可逆的であるといえる。これは収着・脱着は可逆となった凝集前固相(SS)の実験とは異なる。E₁ についても同様の結果であった。

得られた K_f 値を、SS を固相とした場合の K_f 値と併せて表 6 に示す。収着時の K_f 値を見ると、SS に比べフロックに対する K_f 値が、E₂ の場合で 1.2 倍、E₁ の場合で 2 倍程度大きく、E₁、E₂ は SS よりもフロックに収着しやすい傾向がある。また、固相がフロックの場合は、収着時 K_f 値に比べ脱着時 K_f 値が E₁、E₂ ともに 2~3 倍ほど大きく、反応が不可逆であることを示している。

次に、凝集フロックからのエストロゲン様作用脱着実験結果を図 22 に示す。脱着は開始からわずか 6 時間で完了し、しかも凝集フロック中作用の 88% が水相に移行する結果となった。主に疎水性作用により固相に収着していたエストロゲン様作用物質の脱着に起因すると考えられる。固相管理の重要性が再認識される。

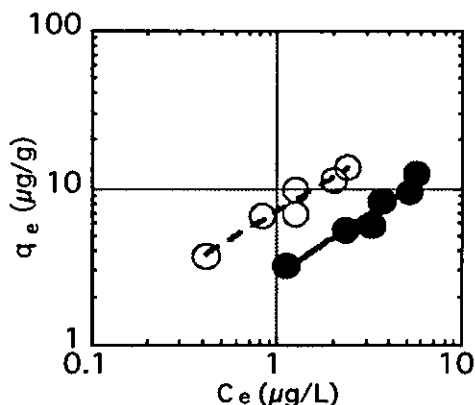


図21 E2の凝集フロックに対する収着・脱着等温線 (25°C)

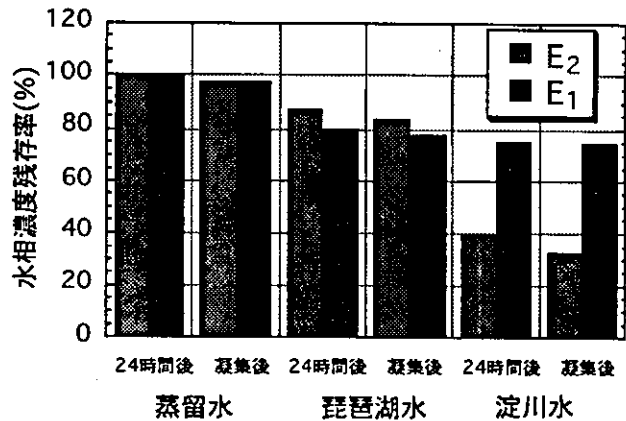


図19 凝集実験結果

淀川水のエストロゲン様作用の凝集実験結果を図 20 に示す。除去率は 27% となり、E₁ や E₂ の除去率に比べてやや高い値となった。それでも、除去率自体は 3 割以下にとどまっておき、大きな除去効果とはいえない。

4. 凝集処理後におけるエストロゲン様作用物質の固相・水相間挙動と収着・脱着速度

4. 2 まとめ

表6 K_f 値の比較

	log K _{ow}	K _f			
		SS		フロック	
		収着	脱着	収着	脱着
E ₂	3.9	2.3	2.4	2.8	7.1
E ₁	3.4	0.14	0.067	0.30	1.1

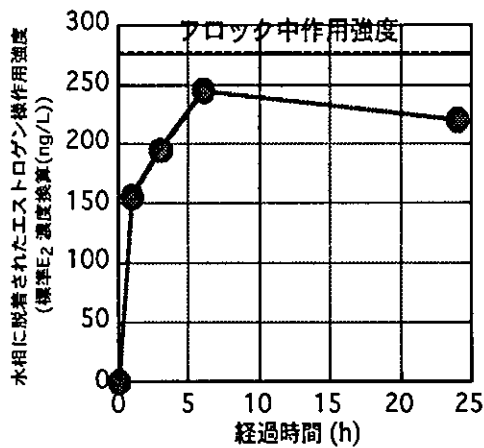


図22 凝集フロックからのエストロゲン様作用脱着実験結果

E₁、E₂の凝集フロックに対する収着および脱着は不可逆的であり、収着に比べ脱着が生じにくい。また、K_f値は、SSに対するそれよりも大きく、両物質は凝集フロックにより収着されやすい。

凝集フロック中エストロゲン様作用の約9割が、6時間以内に脱着され水相に容易に回帰する。E₁、E₂脱着速度が大きいこともわかっており、浄水場における固相管理の重要性が指摘される。

5. 浄水場内水質試料および汚泥試料の MVLN アッセイ

H市水道局K浄水場における水質試料および汚泥試料のMVLNアッセイの結果を図23および図24に示す。2004年5月および9月に採取された試料の結果を示した。

結果を示した。

図23でのエストロゲン様作用強度(%/mL/mL)とは、%/mL-試料水/mL-培養液のことであり、1mL-試料水/mL-培養液を投与したときに誘発されたエストロゲン様作用(E₂の作用を100%としたときの割合)を示す。一方、図24でのエストロゲン様作用強度(%/mg/mL)とは、%/mg-乾燥汚泥/mL-培養液のことであり、1mg-乾燥汚泥/mL-培養液を投与したときに誘発されたエストロゲン様作用を示す。

2つの図の中に、エストロゲン様作用を有意に示した試料を*印で示した。MVLNアッセイでは、酵素活性相対値(%)が10%以上となった場合に、その試料がエストロゲン様作用をもつとみなすことができる。エストロゲン様作用をもつと判断される試料は多いわけではないことがわかる。また、*印を付さなかった試料は、エストロゲン様作用が擬陽性または陰性であることを示す。*印を付した陽性試料のエストロゲン様作用強度との間に大差があるわけではなく、このことから、陽性試料のエストロゲン様作用も強いものではないと推察できる。

5月試料と9月試料とを比較してみる。5月試料では水質試料の作用が全体的に小さく、

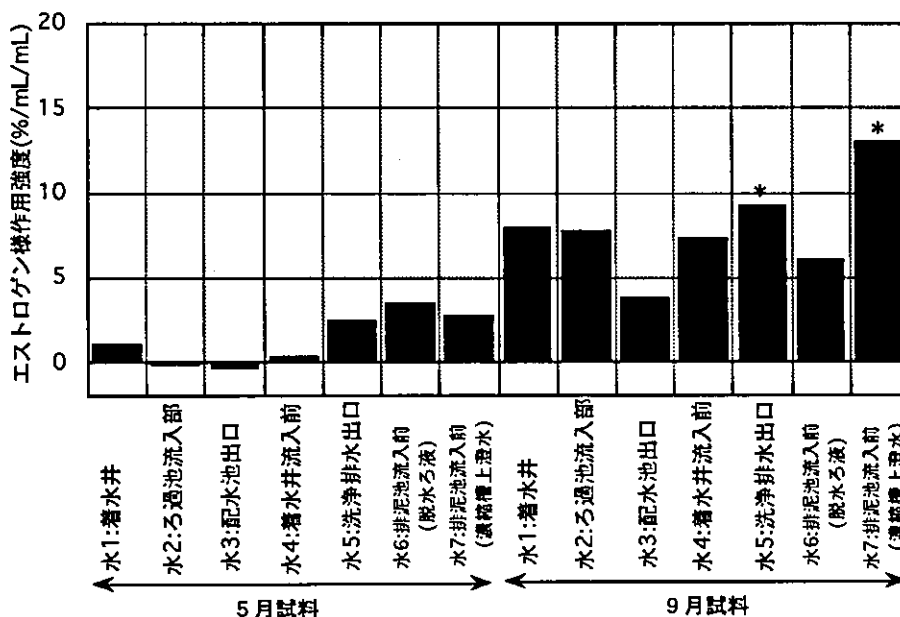


図23 H市水道局K浄水場水質試料の試験結果 (*:エストロゲン様作用を有意に認めた試料)

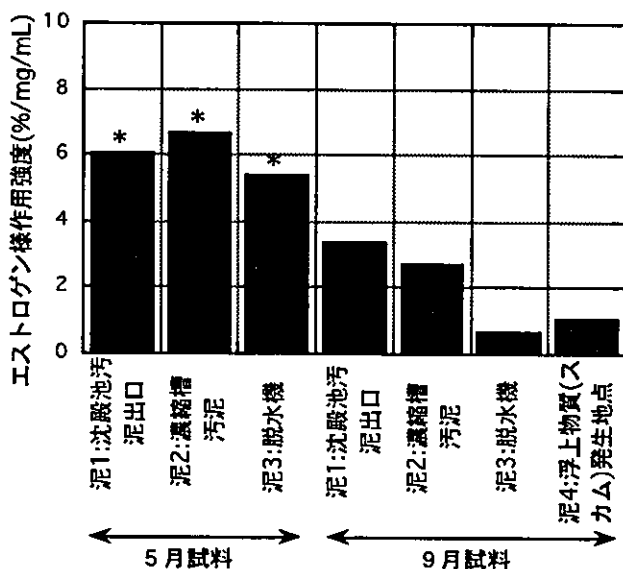


図24 H市水道局K浄水場汚泥試料の試験結果
(*:エストロゲン様作用を有意に認めた試料)

汚泥試料の作用が大きい。これとは逆に、9月試料では、水質試料の作用が大きく、汚泥試料の作用が小さい。5月試料では、水相のエストロゲン様作用が浄水処理過程でよく除去され、汚泥に移行している割合が大きいが、9月試料では、除去が十分にはなされず、水相に残存しているエストロゲン様作用が検出されたという可能性を指摘することができる。

D. 結 論

(1) 浄水場内における E_1 、 E_2 、およびエストロゲン様作用の挙動を把握した。

E_1 、 E_2 濃度およびエストロゲン様作用は、浄水処理過程で除去され低減する。ただし、沈殿池汚泥やスカムには、原水の 10~30 倍の高濃度で蓄積しており、その管理の重要性が指摘される。

凝集処理によりエストロゲン様作用は 38%、 E_1 は 15%、 E_2 は 26%程度が除去された。特に、エストロゲン様作用の除去率は比較的大きく、凝集処理の重要性と、その後の固相管理の重要性を指摘した。また、残存する E_1 、 E_2 およびエストロゲン様作用は、中間塩素、後塩素処理によってさらに低減した。

浄水処理による最終的な除去率は、エストロゲン様作用で 81%、 E_1 で 56%、 E_2 で 77%であった。

(2) E_1 、 E_2 、およびエストロゲン様作用をとりあげ、室内実験により、凝集前後での固相・水相間挙動を把握した。

まず、水道原水中の E_1 、 E_2 は、固相と収着・脱着の可逆的平衡を保ちながら存在していると推定された。一方、両物質は、原水中 SS よりも凝集フロックにより収着しやすい。また、凝集フロックに対する収着および脱着は不可逆的であり、収着に比べ脱着が生じにくい。

E_1 、 E_2 の凝集による除去率はともに 10%未満と小さく、大きな除去効果は期待できない。

エストロゲン様作用の凝集による除去性は、 E_1 や E_2 に比べてやや高い。ただし、除去率自体は3割以下であった。

凝集フロック中に取り込まれたエストロゲン様作用の大部分は、比較的速やかに脱着され水相に容易に回帰する。浄水場における固相管理の重要性を示す結果といえる。

(3) 浄水場内水質試料および汚泥試料の MVLN アッセイを行ったところ、弱いエストロゲン様作用を示す試料を見いだした。

参考文献

- 1) 環境庁(1999)外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル
- 2) 伊藤禎彦(2005)水道原水のエストロゲン様作用の構造, 月刊「水」, Vol.47-1, pp.17-33
- 3) T. Kanayama, S. Mamiya, T. Nishihara and J. Nishikawa (2003) Basis of a High-Throughput Method for Nuclear Receptor Ligands, The Journal of Biochemistry, Vol.133, No.6.
- 4) 伊藤禎彦 (2004)浄水場内におけるエストロゲン様作用の挙動評価、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 15 年度総括・分担研究報告書、pp.119-127.

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤禎彦 (2005) 水道水のエストロゲン様作用の構造、水、Vol.47-1 (No.666), pp.17-33.

2. 学会発表

- 1) S. Itoh, Y. Yoshimura, T. Okada, and Y. Tsujimura (2004) Detection of estrogenic effect formation potential in chlorinated drinking water, 2nd IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Treatment Technologies, Prague, Czech Republic, 1-4June, 2004, pp.60-62.
- 2) 伊藤禎彦、吉村友希、岡田朋之、辻村泰聡(2004)水道水のエストロゲン様作用の構造、環境ホルモン学会第7回研究発表会要旨集、p.119

ヒメダカを用いた浄水汚泥・スカムの
エストロゲン様作用の評価

分担研究者 亀井 翼
研究協力者 小関 直、宮谷伸之、竹田 誠、
大野浩一、眞柄泰基

平成 16 年度分担研究報告

ヒメダカを用いた浄水汚泥・スカムのエストロゲン様作用の評価

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 小関直、宮谷伸之、竹田誠、大野浩一、真柄泰基

研究要旨

浄水施設において、浄水過程で発生する沈殿池汚泥や浮上物質(スカム)には、フタル酸ジ・2-エチルヘキシル等のフタル酸エステル類が濃縮・蓄積されている。フタル酸エステル類については、エストロゲン様作用，抗エストロゲン様作用，抗アンドロゲン様作用など，様々な内分泌作用の可能性が指摘されている。本研究では，*in vivo*ヒメダカビテロジェニン(VTG)アッセイを用いて，フタル酸エステル類、単独と浄水汚泥やスカムのエストロゲン様作用，抗エストロゲン様作用に関する検討を行い、以下のような知見が得られた。

- (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)、などのフタル酸エステル類が単独で存在する場合のエストロゲン様活性をヒメダカビテロジェニン(VTG)アッセイを用いて行ったが、エストロゲン様活性は認められなかった。
- (2) K 浄水場の脱水浄水汚泥及びスカム 10g のアセトン抽出-ジクロロメタン抽出・濃縮試料についてもヒメダカビテロジェニン(VTG)アッセイを用いて行ったが、エストロゲン様活性は認められなかった。
- (3) 一方で E2 50ng/L 共存下における DEHP 及び DBP に対する曝露 1 日後のヒメダカ血清中 VTG 濃度は E2 単独の陽性対照区と比べ、DEHP100, 1000 μ g/L 及び DBP1000 μ g/L の試験区で VTG 濃度の有意な減少が認められた。したがって、DEHP 及び DBP は抗エストロゲン様作用を有すると考えられた。
- (4) 今回用いた浄水汚泥及びスカムでは抗エストロゲン様作用が認められなかった。各試料に含まれていた DEHP, DBP の濃度が、試薬を用いた実験の濃度よりも低かったことが大きな理由の一つと考えられる。

A. 研究目的

浄水施設において、浄水過程で発生する沈殿池汚泥や浮上物質(スカム)には、フタル酸ジ・2-エチルヘキシル等のフタル酸エステル類や、他の様々な化学物質が高濃度で濃縮・蓄積されている。また、それらの化学物質が再び水道水中に移行し、内分泌攪乱作用を引き起こす可能性が指摘されている。フタル酸エステル類については、エストロゲン様作用、

抗エストロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用など、様々な内分泌作用の可能性が指摘されている。本研究では、*in vivo*ヒメダカビテロジェニン(VTG)アッセイを用いて、浄水汚泥やスカム及びそれらに含まれるフタル酸エステル類のエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用に関する検討を行った。

B. 研究方法

《試験物質》 K 浄水場の浄水汚泥及びスカム

ムの濃縮サンプルと、試薬のフタル酸ジ-
エチルヘキシル(以下 DEHP)及びフタル酸ジ-
n-ブチル(以下 DBP)を用いた。

《浄水汚泥及びスカムの濃縮方法》 脱水し
た汚泥あるいはスカム 10g に塩酸 5mL, アセ
トン 50mL ずつを加え, 振とう抽出・超音波
抽出を行い, アセトン抽出液を分取した。こ
の抽出液を塩化ナトリウム水溶液 500mL に
加えジクロロメタンで2回抽出した。脱水後,
窒素気流下で乾固させ, メタノール 300 μ L
に転溶し, 濃縮サンプルとした。

《曝露水の調整》 浄水汚泥及びスカムにつ
いては濃縮サンプル 150 μ L を脱塩素水道水
で希釈し 3L としたものを用いた。DEHP 及
び DBP については濃度を 100 μ g/L または
1000 μ g/L に調整した水溶液 3L を用いた。

《曝露試験方法》 供試魚には, 成魚雄ヒメ
ダカを脱塩素水道水中で 2 週間以上分離飼
育したものを用いた。

曝露水槽には 3L のガラス製セパラブルビ
ーカーを用いて, 曝露水を 1 日に 1 度全量交
換する半止水式で曝露を行った。1 試験区に
つき 7 匹のヒメダカを用いた。水温は 23 \pm
1 $^{\circ}$ C, 明暗周期を 12 時間とし, 曝露期間中
の給餌は行わなかった。

エストロゲン様作用の検討では, 各曝露水
への曝露 3 日後の血清中 VTG 濃度を測定し
た。抗エストロゲン様作用の検討では, 各曝
露水に 17 β -エストラジオール(以下 E2)を 1L
あたり 50ng 添加し, 曝露 1 日後の血清中
VTG 濃度を測定した。VTG 濃度はヒメダカ
ピテロジェニン ELISA キットを用いて測定
した。定量下限値は 200ng/mL であり, 定
量下限値未満の場合はその半数値を測定値
とした。有意差の検定は Mann-Whitney
U-test によって行った。

(倫理面への配慮)
ヒメダカを用いたピテロジェニン(VTG)ア

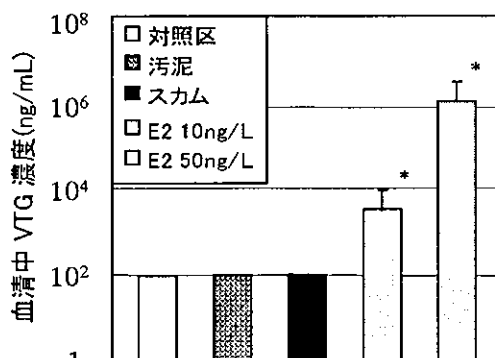


図1 汚泥・スカム曝露3日後の血清中VTG濃度 * : p<0.05

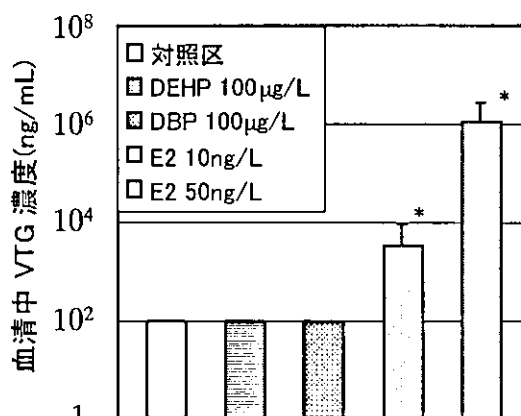


図2 DEHP及びDBP曝露3日後の血清中VTG濃度 * : p<0.05

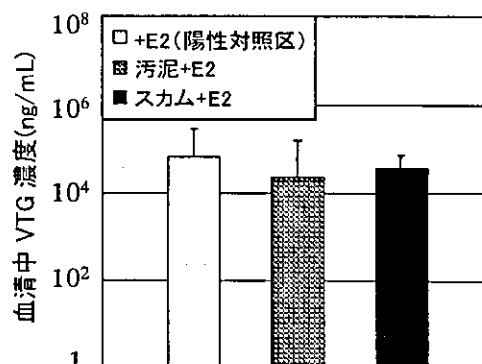


図3 E2 50ng/L共存下における汚泥及びスカム曝露1日後の血清中VTG濃度
ツセイは氷冷麻酔を用いて行っている。

C. 研究結果

エストロゲン様作用についての検討 浄水
汚泥及びスカムに対する曝露 3 日後の血清
中 VTG 濃度を図 1 に示す。浄水汚泥及びス
カムに対する曝露では, 全ての個体で VTG
濃度は定量下限値未満だった。次に, DEHP
及び DBP に対する曝露 3 日後の血清中 VTG

濃度を図2に示す。DEHP及びDBPに対する曝露においても、全ての個体でVTG濃度は定量下限値未満だった。以上より、浄水汚泥、スカム、DEHP、DBPのいずれも、エストロゲン様作用を示さないと考えられた。

抗エストロゲン様作用についての検討

E2 50ng/L 共存下における浄水汚泥及びスカムに対する曝露1日後の血清中VTG濃度を図3に示す。E2 単独の陽性対照区と比べ、両試験区ではVTG濃度の有意な減少は認められなかった。次に、E2 50ng/L 共存下におけるDEHP及びDBPに対する曝露1日後の血清中VTG濃度を図4に示す。E2 単独の陽性対照区と比べ、DEHP100, 1000µg/L 及びDBP1000µg/Lの試験区ではVTG濃度の有意な減少が認められた。よって、DEHP及びDBPは抗エストロゲン様作用を有すると考えられる。今回用いた浄水汚泥及びスカムで抗エストロゲン様作用が認められなかったのは、各試料に含まれていたDEHP、DBPの濃度が、試薬を用いた実験の濃度よりも低かったためと考えられる。また、浄水汚泥及びスカムに含まれている物質との吸着等の相互作用によってDEHP、DBPの効果が低減した可能性も考えられる。

D. 考察

図4に示したようにE2 単独の陽性対照区と比べ、DEHP100, 1000µg/L 及びDBP1000µg/Lの試験区ではVTG濃度の有意な減少が認められた。よって、DEHP及びDBPは抗エストロゲン様作用を有すると考えられる。今回用いた浄水汚泥及びスカムで抗エストロゲン様作用が認められなかったのは、各試料に含まれていたDEHP、DBPの濃度が、試薬を用いた実験の濃度よりも低かったためと考えられる。また、浄水汚泥及びスカムに含まれている物質との吸着等の相互作用によってDEHP、DBPの効果が低減した可能性も考えられる。

E. 結論

本研究で用いた浄水汚泥及びスカムにはエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用は認められなかった。しかし、高濃度のDEHP及びDBPは、抗エストロゲン様作用を有することが示された。今後は、浄水汚泥及びス

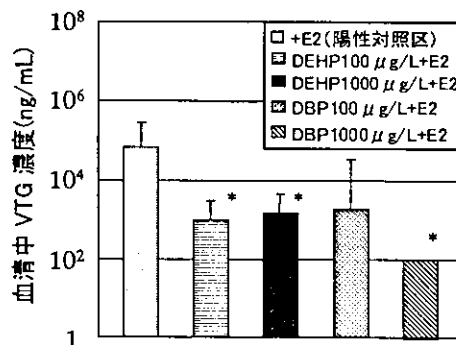


図4 E2 50ng/L 共存下における DEHPおよびDBP 曝露1日後の血清中VTG濃度

*: p<0.05
カムにE2とDEHP及びDBPを共存させ、抗エストロゲン様作用が確認されるかを検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 該当なし.

2. 学会発表

河合富貴子、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基：酵母 Two-hybrid 法を用いた環境水のエストロゲン様活性評価における妨害作用低減の検討、

38 回日本水環境学会年会講演集, p101(2004).

宮谷伸之、竹田誠、大野浩一、亀井翼、河合富貴子、田畑彰久、眞柄泰基：ヒメダカピテロジェニンアッセイによる環境水のエストロゲン様作用評価に関する研究. 第10回バイオアッセイ研究会, 3B-12(2004).

竹田誠、宮谷伸之、大野浩一、亀井翼、眞柄泰基、田畑彰久：酵母とヒメダカを用いた2種のバイオアッセイにおける化学物質のエストロゲン様作用の比較. 38 回日本水環境学会年会講演集, p664(2004).