

source, chemicals added for coagulation, flocculation, chlorination, etc., and process operation. In addition, natural organic matter (NOM) in source water may attach/adsorb on the solids and change the characters of the solid surfaces. Adsorption of DEHP might be controlled by (1) properties of inorganic solids in raw water, (2) characters of organic matter associated with solid particles, (3) complex matrix of coagulated flocs, and (4) gas-liquid interface such as bubble formed due to water pressure change in the processes. This study focused mainly on the second hypothesis, organic matter in different types of solids generated in drinking water treatment processes. To extract the character of organic matter, we use pyrolysis GC/MS technique, which reveals composition of the fragments arising from thermal degradation of complex organic molecules. The compositional variations between the organic matters are compared with concentration of DEHP on solid particles.

## Materials and methods

### Sample collection and DEHP concentration in solids

Samples were collected as mixed liquor of solids and water in pre-cleaned transparent glass bottles at five drinking water treatment plants in Japan in January and February, 2003. All the treatment processes are basically composed of coagulation, flocculation, sedimentation, rapid sand filtration and disinfection. The collected solid samples were classified into three types (floating (scum), settled (sludge), and suspended solids) and solid in backwash water of filtration unit was considered as suspended solid. DEHP concentration was determined originally as the concentration in mixed liquor in units of  $\text{mg}/\text{m}^3$ . In Table 1, the concentrations are given as content in solid in the unit of  $\text{mg}/\text{kg}$ , assuming that all DEHP in mixed liquor was associated with solids. Ignition loss in the unit of percentage of volatile solid (%VS) is also shown in Table 1.

### Sample preparation and pyrolysis-GC/MS characterization

The solids in the mixed liquor samples were separated from the water by GF/F (Whatman) to avoid any further transformation during storage in a freezer and were analyzed within one week after collection. The solids were dried in a freeze-dryer to obtain dry solid samples for pyrolysis GC/MS analysis. The pyrolysis GC/MS consisted of a micro furnace pyrolyzer (PY-2010D, Frontier Lab. Co., Japan), GC (Shimadzu GC-17A) and MS (Shimadzu QP 5000) connected with online operation. Approximate 1–2 mg of homogenized and finely ground freeze-dried sample was inserted into the pyrolyzer (preheated to  $600^\circ\text{C}$ ). After pyrolysis in the micro furnace, the pyrolysis products were flushed with helium gas to a fused silica capillary column (DB-WAX (30 m long  $\times$  0.25 mm i.d. and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), J&W Scientific Inc.). The column temperature was programmed for heating at  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  from 40 to  $220^\circ\text{C}$ , with initial and final holds of 5 and 20 min, respectively. The MS signals were scanned at 2 scans/second from  $m/z$  of 35 to 450 and the MS spectra were identified by comparing matching percentage with mass spectral library of NIST. If the matching percentage was less than 80%, the chemical fragment was defined as unknown fragment. If higher than 90%, the satisfactory match was noted by using the symbol “\*”. Each solid sample was duplicated and the reproductivity of the pyrolysis was confirmed. The identified fragments were categorized into five groups (Table 2) according to the possible origin (parent compound).

Quantification of pyrolysis products is difficult because of the vast quantity and range of pyrolysis fragment obtained (Page *et al.*, 2003). Absolute integration of fragment areas is unreliable because of the different weights of samples and the different relative amounts of organic material in the samples. The relative ratio of area between pyrolysis fragments and one normalizing fragment is used to achieve a fingerprint of the pyrolysis data as shown in

**Table 1** Details of collected sample, DEHP concentration and ignition loss

Treatment Plant	Sampling Date	Type of solids, DEHP concentration and ignition loss		
		Floating solid (scum)	Settled solid (Sludge)	Suspended solid
A	2003/Jan/21-22	Flocculation tank (11.0 mg DEHP/kg) (38%VS)	Sedimentation tank (0.7 mg DEHP/kg) (29%VS)	Filtration tank (backwashing) (3.3-5.2 mg DEHP/kg) (30%VS)
B	2003/Jan/27	Filtration tank (2.7-4.3 mg DEHP/kg) (36%VS)	Sedimentation tank (0.6 mg DEHP/kg) (29%VS)	Return water (8.8-18.8 mg DEHP/kg) (34%VS)
C	2003/Jan/27	Flocculation tank (13.0 mg DEHP/kg) (26%VS)	Sedimentation tank (12.0 mg DEHP/kg) (20%VS)	Draining water (2.5 mg DEHP/kg) (22%VS)
D	2003/Feb/04	(no scum observed)	Adjustment tank (14.0 mg DEHP/kg) (35%VS)	Filtration tank (backwashing) (4.3-4.4 mg DEHP/kg) (36%VS)
E	2003/Feb/25	Filtration tank (1) (5.2 mg DEHP/kg) (38%VS)	Sedimentation tank (7.9 mg DEHP/kg) (25%VS)	Filtration tank (backwashing) (5.3-5.6 mg DEHP/kg) (32%VS)
		Distribution tank (2) (210 mg DEHP/kg) (67%VS)		

**Table 2** Details of proposed origin compounds

	Origin	Description
Pr	Protein and N-containing compound	Structure contains basic molecule of protein and/or nitrogen.
Ps	Polysaccharide	Basic structure is sugar, or fragment of sugar, furan, and/or cellulose.
Lg	Lignin and aromatic compound	Basic structure is aromatic ring.
Lp	Lipid and aliphatic compound	Basic structure is aliphatic compound, long aliphatic chain or paraffinic material.
S	S-containing compound	Structure contains sulfur.

Source: Huang *et al.*, 1998; Christy *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000

Equation (1). The fragment used as normalizer must be present in all samples, have high matching percentage and be a distinctive peak. From the pyrolysis GC/MS analysis, acetonitrile, toluene, 2-cyclopenten-1-one, acetic acid and furfural appeared in all the pyrograms. Due to the high matching percentage and the distinctiveness, toluene was the most suitable fragment as the normalizer for this experiment.

$$\text{Relative ratio} = \frac{\text{Area of fragment}}{\text{Area of normalizing fragment (toluene)}} \quad (1)$$

The average relative ratios were calculated for duplicated samples and the value of 0.10 was selected as the limit of fragment identification (the fragments with the average relative ratio less than 0.10 were neglected). The fragments having average relative ratio higher than 0.20 at least in one of all the solid samples were considered as "important fragments" in this study. The results from fragment identification are shown later in Table 3. The sum of relative ratios in each sample ranged between 9 and 32, and it meant that the criterion of fragment identification at relative ratio 0.10 could neglect minor fragments whose peak area contributed less than 1.1% to total peak area.

## Results and discussion

### Characterization of solids

As shown in Table 1, DEHP concentration and ignition loss (related with organic content) varied between the solids. The highest DEHP concentration (210 mg/kg) was found in the scum collected at a distribution tank in treatment plant E and was significantly higher than others. The scum sample also had distinctively high ignition loss (67%VS) compared with other solids. Table 3 shows average relative ratios of the fragments produced in pyrolysis of the solid samples. The origins of the fragments were estimated according to the reference shown in Table 2 and the estimated origin composition of each solid is listed at the bottom of Table 3. Characterization of the solid samples in terms of chemical structure was done using the pyrolysis result shown in Table 3. To compare between average relative ratios of all samples, the second normalization was employed by each sum of relative ratio. Figure 1 shows a dendrogram generated in cluster analysis based on the second normalized relative ratio using Ward method. From the dendrogram and the percentage of estimated origin composition, the solid samples could be classified into 5 groups: (1) all samples from treatment plant C, floating and settled samples from treatment plant B, and settled sample from treatment plant A (total 6 samples) composed mainly of estimated origin in Pr; (2) all samples from treatment plant D, floating and settled samples from treatment plant A, and

**Table 3** Average relative ratios in all solid samples based on important fragments

Estimated origin	Important fragment	Average relative ratio <sup>1</sup>														
		A		B		C		D		E						
		Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled			
Pr	* Acetonitrile	3.92	3.45	5.84	4.40	4.70	4.98	5.64	5.14	7.53	3.96	2.37	4.28	2.44	1.51	3.35
Pr	* Pyrrole	0.76	0.83	0.52	0.81	0.66	0.80	0.87	0.94	1.17	0.95	0.77	1.19	0.86	1.18	1.18
Pr	* N,N'-Isophthaloylbis(3-aminobenzoic acid)	0.13	0.20	0.20	0.14	0.13	0.18	0.20	0.15	0.19	0.12	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14
Pr	* 2,4-Pentadienenitrile	0.32	0.45	0.45	0.30	0.28		0.45	0.37	0.50	0.37	0.31	0.38	0.29		0.46
Pr	* Propanenitrile			0.26		0.30	0.33	0.46	0.32	0.35	0.21	0.28	0.29	0.29	0.17	0.20
Pr	Carbamic acid, phenyl ester			0.65		0.29	0.31	0.35	0.33	0.40	0.40	0.33	0.42	2.33	0.73	0.73
Pr	* 1H-Pyrrole, 3-methyl-			0.46	0.16	0.19	0.24	0.25	0.29	0.29	0.20	0.19	0.13	0.13	0.31	0.31
Pr	* Acetamide							0.22	0.22	0.56	0.63	0.26	0.46	0.69	0.69	0.69
Pr	2-Butenenitrile					0.14	0.11	0.21	0.19	0.18	0.18			0.46	0.14	0.14
Pr	1H-Pyrrole, 1-methyl-	0.16	0.17	0.10	0.21								0.33			
Pr	2(1H)-Pyridinone, 1-methyl-							0.33	0.38	0.46	0.53		0.80			
Pr	* Propane, 2-nitro-										0.22	0.24	0.34	0.26	0.31	0.32
Pr	Tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hex-3-ene-3-carbonitrile			0.16	0.79	0.15						0.16				
Pr	Pyrimidine, 2-methoxy-			0.21		0.37						0.32				0.79
Pr	2,3-Dimethyl-aziridine								0.21			0.30				
Pr	3-Hexadecyloxy carbonyl-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylimidazolium ion														0.68	
Pr	* Pentadecanenitrile													0.16	0.34	
Pr	* 1-Tetrazol-2-ylethanone													0.24	0.24	
Pr	2-Azetidinone, 3,3-dimethyl-										0.43				0.38	
Pr	9-Octadecenenamide, (Z)-															
Pr	Azirdine, 1-(2-buten-2-yl)-													0.79		
Pr	Butanenitrile, 4-oxo-															
Pr	Eicosanenitrile	0.21													0.41	
Pr	Ethanol, 2-(2-aminoethoxy)-				0.21											
Pr	* Pyridine															
Ps	* 2-Cyclopenten-1-one	0.31	0.44	0.18	0.25	0.20	0.21	0.18	0.22	0.22	0.28	0.19	0.55	0.42	0.42	0.51



Table 3 Continued.

Estimated origin	Important fragment	Average relative ratio <sup>1</sup>																								
		A		B		C		D		E																
		Suspended	Floating	Suspended	Floating	Suspended	Floating	Suspended	Floating	Suspended	Floating															
Lp	cis-2-Methyl-7-octadecene	0.32																								
Lp	Decanal		0.84																				0.35	0.11		
Lp	n-Hexadecanoic acid																						1.06			
Lp	Octane, 3,5-dimethyl-																								4.50	
Lp	1-Docosene		0.37																						0.26	0.11
Lp	1-Nonene																									0.27
Lp	1-Octanol, 3,7-dimethyl-																									0.29
Lp	* 2-Trifluoroacetoxytetradecane																									0.30
Lp	* 2-Undecanone, 6,10-dimethyl-																									0.75
Lp	3-Heptadecanone																									0.28
Lp	3-Nonyl-2-ol																									0.23
Lp	3-Pentyn-1-ol		0.46																							
Lp	4-Pentyn-2-ol																									0.21
Lp	Butane, 2,2-dimethyl-																									0.20
Lp	Decane, 1-chloro-	0.20																								
Lp	Dotriacontane		1.57																							
Lp	E,E-1,9,17-Docosatriene																									0.22
Lp	* Nonane																									0.30
Lp	Octane, 2,7-dimethyl-																									0.23
Lp	* Octane, 2-methyl-																									0.26
Lp	Tetradecanoic acid																									0.56
Lp	Trifluoroacetic acid, trifluoroacetyl ester		0.20																							
Lg	* Toluene	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lg	α-methylstyrene		0.28	0.15																						
Lg	Di-n-octyl phthalate																									
Lg	Phenol, 2-methyl-																									2.10
S	n-Propanesulphonylacetonitrile	0.20	0.20	0.20	0.20	0.40	0.37	0.34	0.44	0.30																0.16
S	Taurine		0.17	0.23	0.21																					0.28

Table 3 Continued.

Estimated origin	Important fragment	Average relative ratio <sup>1</sup>															
		A		B		C		D		E							
		Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	
S	Sulfurous acid, dipropyl ester (3-Ethynyl-3-methyloxiran-2-yl)methanol	0.25	0.14	0.38	0.29	0.43	0.39	0.43	0.39	0.43	0.36	0.31	0.39	0.34	0.32	0.34	0.29
	* Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene Bis(3-methylbutyl)fluorene-2,7-disulfonate	0.27	0.18	0.32	0.23	0.41	0.45	0.32	0.28	0.12	0.17	0.17					0.17
	* Hydrochloric acid 1,3,5,7-Cyclooctatetraene 2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydride	0.29	0.18	0.82	0.58	1.61	0.26	0.82	0.11	0.11	0.16	0.16	2.14	0.23	0.24	0.24	0.79
	* 2-Methyl-2,3-divinyloxirane 2-Propanol, 1-methoxy- 2-Trifluoroacetoxydodecane Ethyl iso-allocholate Isooctane, (ethenyl)- 2-Pentanone, 5-chloro- 3-Heptafluorobutyryloxypentadecane * 3-Heptafluorobutyryloxypentadecane 5-Cyclopropylcarbonyl-oxypentadecane	0.19	0.17	0.94	0.12	0.25		0.15	0.17	0.14	0.23	0.16	0.16	0.24	0.22	0.30	0.30
	Bicyclo[2.2.0]hex-1-yl-methanol Cyclopentane, (4-octyldecyl)- Cyclopentaneundecanoic acid Dodecane, 1,2-dibromo- Octadecanal, 2-bromo- Oxirane, dodecyl- Undecane, 1,2-dibromo- 2-methyl- Total unknown	0.29	0.27	0.98	0.35	5.04	1.90	0.69	0.41	0.26	0.36	0.41	3.49	5.19	0.38	0.38	0.59

Table 3 Continued.

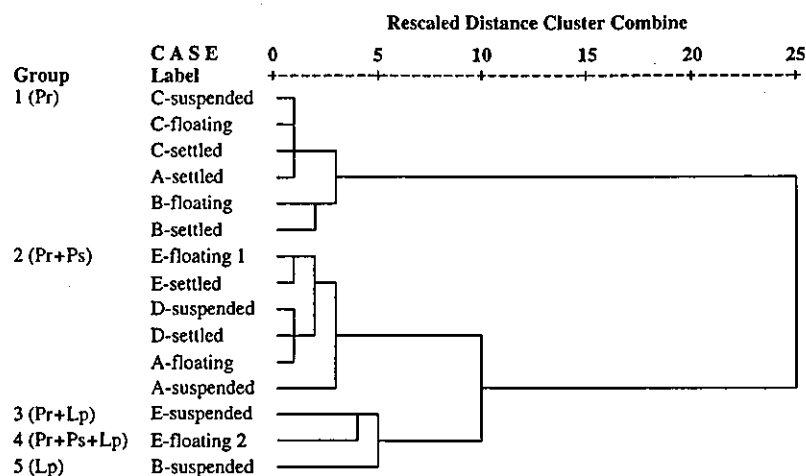
Estimated origin	Important fragment	Average relative ratio <sup>1</sup>																								
		A					B					C					D					E				
		Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled				
Sum of relative ratio	18	12	11	31	14	14	13	12	16	13	9	28	12	30	16	13	9	28	12	30	16					
Percentage of proposed origin <sup>2</sup>	<b>31</b>	<b>46</b>	<b>72</b>	<b>22</b>	<b>46</b>	<b>58</b>	<b>67</b>	<b>67</b>	<b>71</b>	<b>63</b>	<b>64</b>	<b>30</b>	<b>53</b>	<b>21</b>	<b>52</b>	<b>30</b>	<b>64</b>	<b>30</b>	<b>53</b>	<b>21</b>	<b>52</b>					
Pr (%)	<b>10</b>	<b>21</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>21</b>	<b>20</b>					
P <sub>s</sub> (%)	6	8	9	4	9	7	8	8	6	8	11	11	10	5	8	8	11	11	10	5	8					
Lg (%)	14	6	2	<b>39</b>	2	0	2	0	2	2	5	23	7	21	10	2	5	23	7	21	10					
Lp (%)	2	0	3	2	5	5	3	3	4	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2					
S (%)	36	19	1	28	30	20	13	12	10	9	5	25	6	31	8	9	5	25	6	31	8					
Other (%)																										

\* Matching percentage higher than 90% (total 30 fragments)

<sup>1</sup> Bold number: higher than 5% when compared with sum of relative ratio in each sample

<sup>2</sup> Bold number: high percentage of estimated origin





**Figure 1** Hierarchical cluster analysis dendrogram using Ward method, squared Euclidean distance

floating 1 and settled samples from treatment plant E (total 6 samples) composed mainly of estimated origin in Pr and Ps; (3) suspended sample for treatment plant E composed mainly of estimated origin in Pr and Lp; (4) floating 2 sample from treatment plant E composed mainly of estimated origin in Pr, Ps and Lp; and (5) suspended sample from treatment plant B composed mainly of estimated origin in Lp as shown in Figure 1.

**Identification of specific fragment**

According to Table 3, acetonitrile, toluene, 2-cyclopenten-1-one, acetic acid and furfural were produced by pyrolysis of all the solid samples. Pyrrole, N,N'-isophthaloylbis(3-aminobenzoic acid), 2,4-pentadienenitrile, propanenitrile and (3-ethynyl-3-methyloxiran-2-yl) methanol were found in the pyrograms of at least 12 among 15 samples. These fragments can be recognized as common pyrolysis fragments of the solid samples in the drinking water treatment processes.

Other fragment may specifically appear in a group categorized by (1) locations (Treatment A, B, C, D and E), (2) types of solids (floating, suspended and settled), and (3) the dendrogram (Group 1 to 5 in Figure 1). A criterion to judge the specificity was defined as Equation (2), comparing number of appearing fragments in a group, number of samples in a group, and number of appearing fragments in all the groups.

Fragment X is defined as "specific fragment" of a group when:

$$\left\{ \left( \frac{\text{number of fragment X in group}}{\text{number of sample in group}} > 0.5 \right) \wedge \left( \frac{\text{number of fragment X in group}}{\text{number of fragment X in all samples}} > 0.5 \right) \right\} \quad (2)$$

Comparing between groups of location by following the criterion, specific fragments were found: 1-methyl-1H-pyrrole, octadecanal, azulene and dipropyl ester sulfurous acid in treatment plant A, taurine,  $\alpha$ -methylstyrene and 1-methoxy-2-propanol in treatment plant B, 1-methyl-2(1H)-pyridinone in treatment plant C, dodecane in treatment plant D, and 2-nitropropane, 1,3,5,7-cyclooctatetraene, 1-undecene and 3-decyn-2-ol in treatment plant E. Between groups of sample type, 1-chloro-octadecane, 4-ethyl-1-octyn-3-ol, 2-dodecen-1-yl(-)succinic anhydride, 1-methyl-1H-pyrrole and 1-methyl-2(1H)-pyridinone were specific in settled solids, and 2-methoxy-pyrimidine and tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hex-3-ene-3-carbonitrile were specific fragments in the group of suspended solids. However, no specific fragment can be found in the group of floating solids. When classified according to the dendrogram, specific fragments were n-propanesulphonylacetonitrile, bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene,

**Table 4** Fragments having percentage of average relative ratio higher than 5% at least in one of all the solid samples

Estimated origin	Important fragment	Percentage of Average relative ratio <sup>1</sup>														
		A			B			C			D			E		
		Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating	Settled	Suspended	Floating 1	Settled 2
Pr	* Acetonitrile	22	29	51	14	35	37	44	44	46	31	27	15	21	5 <sup>2</sup>	21
Pr	* Pyrrole	4	7	5	3	5	6	7	8	7	7	9	4	7	2	7
Pr	Carbamic acid, phenyl ester		5	3			2	2	3	2	3	4		4	8	5
Pr	Aziridine, 1-(2-buten-2-yl)-													7		
Ps	* Acetic acid	3	5	3	1 <sup>2</sup>	3	3	2	2	1	8	8	4	7	6	9
Ps	Furfural	3	4	2	1 <sup>2</sup>	3	2	3	5	4	5	2	4	4	2	6
Lp	Octadecane, 1-chloro-	1			9		1						1			
Lp	* 1-Iodo-2-methylundecane				7		1						16		0	4
Lp	n-Hexadecanoic acid					5										
Lp	Dotriacontane					8										
Lp	Phytol					8										
Lg	* Toluene	6	8	9	3	7	7	8	8	6	8	11	4	9	3	6
Lg	Di-n-octyl phthalate						12	2		5	1		7	2		
Lg	* Hydrochloric acid		2										8	3	3	

<sup>1</sup> Bold number: specific fragment in sample

<sup>2</sup> Specifically less compared with other samples

bis(3-methylbutyl) fluorene-2,7-disulfonate and 2-butenenitrile in group 1 and acetamide in group 2. E,E-1,9,17-docosatriene was specific in group 3. In group 4, 1-Tetrazol-2-ylethano-*n*, (Z)-9-octadecenamide, eicosanenitrile, crotonic acid, 3,7-dimethyl-1-octanol, 2-trifluoroacetoxytetradecane, 6,10-dimethyl-2-undecanone, 3-heptadecanone, 3-nonyl-2-ol, nonane, 2,7-dimethyl-octane, 2-methyl-octane, tetradecanoic acid, 5-chloro-2-pentanone, 3-heptafluorobutyroxydodecane, 3-heptafluorobutyroxy-pentadecane, 5-cyclopropylcarbonyloxypentadecane, cyclopentaneundecanoic acid and dodecyl-oxirane were considered as specific fragments. 2-(2-aminoethoxy)-ethanol, 1-docosene, 3-pentyn-1-ol, dotriacontane, phytol, n-octadecyl ester trifluoroacetic acid and 2-bromo-octadecanal were specific fragments in group 5.

To find a specific fragment compound in each sample, not in a group, the fragment having percentage of average relative ratio higher than 5% at least in one of all the samples were extracted and listed in Table 4. The fragment of 1-(2-buten-2-yl)-aziridine had comparatively high percentage in floating 1 sample from treatment plant E. The fragments of n-hexadecanoic acid and di-n-octyl phthalate were highly contained in suspended solid from treatment plant E. The fragments of 1-chloro-octadecane, 1-iodo-2-methylundecane, dotriacontane, and phytol were found with high value in suspended solid from treatment plant B. On the other hand, acetonitrile and pyrrole in floating 2 sample from treatment plant E were less compared with other solids. The ratios of acetic acid and furfural were slightly less in suspended sample from treatment plant B than in other samples. The results of these specific fragment identification are summarized in Table 5.

**Relationship between DEHP and specific fragment**

To discuss the relationship between DEHP concentrations and characteristics of organic matter in solids, we should focus on the floating 2 sample from treatment plant E which contains more than ten times as high concentration of DEHP as other solids. The floating sample was categorized in group 4 by cluster analysis and the estimated origins were Pr, Ps and Lp. The specific fragments in the pyrograms of the floating sample were mostly aliphatic

**Table 5** Fragments categorization by locations, solid types and groups in dendrogram (Figure 1)

Location	Type of solid	Floating substance	Sludge	Suspended solid
	Considering on type of solid Considering on location			2-methoxy-pyrimidine, tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hex-3-ene-3-carbonitrile
B	taurine, alpha-methylstyrene, 1-methoxy-2-propanol*	<b>Group 1</b> n-propanesulphonylacetonitrile, bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene*, bis(3-methylbutyl) fluorene-2,7-disulfonate, 2-butenenitrile		2-(2-aminoethoxy)-ethanol, 1-docosene, 3-pentyn-1-ol, dotriacontane, phytol, n-octadecyl ester trifluoroacetic acid, 2-bromo-octadecanal, 1-chloro-octadecane, 1-iodo-2-methylundecane, <furfural>
C	1-methyl-2(1H)-pyridinone <sup>1</sup>			<b>Group 5</b>
A	1-methyl-1H-pyrrole <sup>1</sup> , octadecanal, azulene, dipropyl ester sulfurous acid			
D	dodecane*			
E	2-nitro-propane*, 1,3,5,7-cyclooctatetraene, 1-undecene*, 3-decyn-2-ol	<b>Scum 2</b> <b>Group 4</b> 1-Tetrazol-2-ylethano- <i>n</i> , (Z)-9-octadecenamide, eicosanenitrile, crotonic acid, 3,7-dimethyl-1-octanol, 2-trifluoroacetoxytetradecane*, 6,10-dimethyl-2-undecanone*, 3-heptadecanone, 3-nonyl-2-ol, nonane, 2,7-dimethyl-octane, 2-methyl-octane, tetradecanoic acid, 5-chloro-2-pentanone, 3-heptafluorobutyroxydodecane, 3-heptafluorobutyroxy-pentadecane, 5-cyclopropylcarbonyloxypentadecane, cyclopentaneundecanoic acid, dodecyl-oxirane, acetonitrile, pyrrole	<b>Scum 1</b> 1-(2-buten-2-yl)-aziridine	<b>Group 2</b> Acetamide* <b>Group 3</b> E,E-1,9,17-docosatriene, n-hexadecanoic acid, di-n-octyl phthalate <b>Common fragments</b> acetonitrile, toluene, 2-cyclopenten-1-one, acetic acid, furfural, pyrrole, N,N'-Isophthaloylbis (3-aminobenzoic acid), 2,4-Pentadienenitrile, Propanenitrile, (3-Ethynyl-3-methyloxiran-2-yl) methanol

\* matching percentage more than 90% <> common fragment but comparatively small proportion in this sample <sup>1</sup> appearing in two categories

compounds. It might be indicated that DEHP could be easily adsorbed by such aliphatic compounds.

Except for the case of the floating 2 sample from treatment plant E with an extraordinary high DEHP concentration, the comparison between the solids might have to be limited within each treatment plant because the content of DEHP must reflect the raw water quality. In treatment plant A, samples in group 2 (Pr and Ps) contained higher concentration of DEHP than group 1 (Pr). In case of treatment plant B, DEHP concentration in group 5 (Lp) was higher than in group 1 (Pr). From these comparisons, polysaccharide, lipid and aliphatic compounds seemed to adsorb more DEHP than protein and N-containing compounds.

## Conclusions

This study focused on organic matter on different solid types of solids generated in drinking water treatment processes in relation with di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) concentration. The pyrolysis GC/MS was used to compare organic matter in solid samples from five water treatment processes. The pyrolysis fragments were categorized by their specificity in group of locations, solid types and fragment compositions classified by cluster analysis and summarized in a matrix shown in Table 5. When compared with concentration of DEHP and characteristics of organic matter, a solid specifically containing many aliphatic fragments contained significantly high concentration of DEHP.

## References

- Arcadi, F.A., Costa, C., Imperatore, C., Marchese, A., Rapisarda, A., Salem, M., Trimarchi, G.R. and Costa, G. (1998). Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the long-evans rat. *Food and Chemical Toxicology*, **36**, 963–970.
- Bauer, M.J. and Herrmann, R. (1997). Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from house wastes. *The Science of the Total Environment*, **208**, 49–57.
- Christy, A.A., Bruchet, A. and Rybacki, D. (1999). Characterization of natural organic matter by pyrolysis/GC-MS. *Environment International*, **25**(2/3), 181–189.
- Cimini, A.M., Sulli, A., Stefanini, S., Serafini, B., Moreno, S., Rossi, L., Giorgi, M. and Ceru, M.P. (1994). Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on peroxisomes of liver, kidney and brain of lactating rats and their pups. *Cellular Molecular Biology*, **40**, 1063–1076.
- DeFoe, D.L., Holcombe, G.W. and Hammermeister, D.E. (1990). Solubility and toxicity of eight phthalate esters to four aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 623–636.
- Fromme, H., K uchler, T., Otto, T., Pilz, K., M uller, J. and Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, **36**, 1429–1438.
- Huang, Y., Stankiewicz, B.A., Eglinton, G., Snape, C.E., Evans, B., Latter, P.M. and Ineson, P. (1998). Monitoring biomacromolecular degradation of *Calluna vulgaris* in a 23 year field experiment using solid state <sup>13</sup>C-NMR and pyrolysis-GC/MS. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**(12), 1517–1528.
- Long, J.L.A., House, W.A., Parker, A. and Rae, J.E. (1998). Micro-organic compounds associated with sediments in the Humber rivers. *The Science of the Total Environment*, **210/211**, 229–253.
- Lu, X.Q., Hanna, J.V. and Johnson, W.D. (2000). Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state <sup>13</sup>C CP/MAS NMR and Py-GC/MS study. *Applied Geochemistry*, **15**, 1019–1033.
- Page, D.W., van Leeuwen, J.A., Spark, K.M. and Mulcahy, D.E. (2003). Application of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for characterization of dissolved organic matter before and after treatment. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **67**, 247–262.
- Tan, G.H. (1995). Residue levels of phthalate esters in water and sediment samples from the Klang river basin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**, 171–176.
- Vitali, M., Guidotti, M., Macilenti, G. and Gremisni, C. (1997). Phthalate esters in freshwaters as markers of contamination sources – a site study in Italy. *Environment International*, **25**(3), 337–347.

■水道水がもつ環境ホルモン作用の全体像が明らかになってきた。

# 水道水のエストロゲン様作用の構造

伊藤 禎彦

いとう さだひこ 京都大学大学院工学研究科都市社会工学専攻教授/工博

## 1 水道水中の内分泌攪乱化学物質に関する動向

### 1.1 水道水中の内分泌攪乱化学物質に関する調査研究

内分泌攪乱化学物質問題が注目を浴びてから、多方面でさまざまな調査研究が行われてきた。ここでは水道水に関わる動向を概観することにする。

国内の水道分野での組織的研究としては、平成10年度から実施されてきた厚生(労働)科学研究(いずれも主任研究者は国立保健医療科学院国包章一)がある(文献1,3)。表1にその概要を示す。

これにより水道水および水道原水の汚染実態、浄水処理過程における除去特性、水道管からの溶出特性などに関して有益かつ包括的な情報が蓄積されてき

た。この調査研究の過程で、特に、浄水施設内においてスカムなどの水表面に浮遊する懸濁物質にフタル酸 ジ・2-エチルヘキシル等が高濃度で濃縮・蓄積されることが判明したことから、平成14年度からの研究では、この問題に焦点をあてた研究が展開されている。国際的にもユニークな調査研究であるといえる。

国際水協会(IWA)では、2003年から「先導的水処理技術に関する国際会議(IWA Leading-Edge Conference on Water and Wastewater Technologies)」を開催している。第1回は2003年にオランダ、第2回は2004年にチェコで開かれ、第3回は2005年に札幌で開催されることになっている。

第1回(2003年)では水道水由来

の内分泌攪乱化学物質(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)に関するセッションがもたれ、そのとりまとめも行われた(文献4)。下水処理場の放流水中に含まれるEDCsは水環境中の生物に影響を与えることが示され、対応策についても種々の検討が行われている(文献5)。一方、水道水中のEDCsがヒトの健康に悪影響を及ぼすことがありうるのか、という問題意識がある。

まず、EDCsの水道水由来の曝露量は、食品経由などと比較して少なく、健康影響が顕在化する可能性は低いかもしれない、としている。また、EDCsの規制が存在しないのは、科学的根拠が欠落しているためなのか、ヒトの健康影響に対する重要度が低いために規制を設けなくて良いのかを明確にしておく必要が

あるとしているが、現状では明らかに前者である。

浄水処理プロセスにおける処理性については、凝集処理、活性炭吸着、膜ろ過、塩素処理、オゾン処理、紫外線処理に関して報告されまとめられている。著者も、塩素処理の影響について、本稿で述べる内容を中心として報告を行った。総じて、高度浄水処理に使用される処理法によれば、EDCsは高い除去率で除去されるとしている。

同様な議論は、2002年豪州で開催されたIWA会議でのワークショップでも行われている(文献6)。

ところで、こうした国際的研究動向にみられる特徴は、わが国の旧環境庁がリストアップしたような化学物質の他に、医薬品も検討対象としているという点で

表1 厚生(労働)科学研究で行われている研究内容

年度	研究題目	研究項目
平成10	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	1. 水道水等の汚染状況に関する現場調査 2. 水道用資機材からの溶出に関する調査 3. 水道水等の内分泌かく乱化学作用評価手法の検討 4. 空気の汚染状況に関する調査
平成11~13	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	1. 浄水処理過程における挙動及び除去対策 (1) 浄水処理過程におけるフタル酸類等の除去特性 (2) 浄水場でのスカム等によるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮特性 (3) 農業の使用実態とその水道水源等における検出状況 2. 水道用資機材からの溶出特性及び溶出防止対策 3. 水道水等の内分泌かく乱化学作用の評価 (1) 蛍光偏光度法による水道水等のエストロゲン活性の評価 (2) 酵母 Two-Hybrid 法による環境水のエストロゲン活性の評価 (3) MVLN アッセイ法による水道水等のエストロゲン活性の評価 (4) ビスフェノールA、ノニルフェノール、17β-エストラジオール、エストロンの塩素処理副生成物とそのエストロゲン活性の評価 (5) 酵母 Two-Hybrid 法による農業のエストロゲン活性の評価
平成14~16	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	1. フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等による汚染実態等に関する検討 (1) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等による汚染実態の詳細調査 (2) 浄水場におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の除去方法に関する検討 2. フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の濃縮機構に関する検討 (1) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の浮上濃縮に関する再現実験 (2) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の浮上濃縮モデルに関する検討 (3) 表面浮上物や沈殿汚泥のエストロゲン様作用の評価 3. 水道管からのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の溶出に関する検討 (1) タール系樹脂塗装管等からの溶出特性に関する検討 (2) タール系樹脂塗装からの浸出水等に関するエストロゲン様作用の評価

表2 新しい水道水質基準体系における内分泌攪乱関連化学物質

分類	番号	項目	用途	基準値 (mg/ℓ)	目標値 (mg/ℓ)
1. 水質基準	基03	カドミウム		0.01	
	基05	水銀		0.0005	
	基07	鉛		0.01	
2. 水質管理 目標設定項目	目09	フタル酸ジ (2-エチルヘキシル)			0.1
3. 要検討項目	検07	17β-エストラジオール			0.00008P
	検08	エチニル-エストラジオール			0.00002P
	検10	エピクロロヒドリン			0.0004P
	検16	スチレン			0.02
	検17	ダイオキシン類			1pgTEQ/ℓ (P)
	検19	ノニルフェノール			0.3P
	検20	ビスフェノール			0.1P
	検24	フタル酸ジ (n-ブチル)			0.2P
	検25	フタル酸ブチルベンジル			0.5P
検27	有機すず化合物			0.0006P (TBTO)	
4. 農薬類 (目15) の対象農薬	2	シマジン (CAT)	除草剤		0.003
	19	2,4ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)	除草剤		0.03
	47	アラクロール	除草剤		0.01
	48	カルバリル (NAC)	殺虫剤		0.05
	63	アトラジン	除草剤		0.01
	69	エンドスルファン(エンドスルフェート、ベンゾエピン)	殺虫剤		0.01
	73	マラソン (マラチオン)	殺虫剤		0.05
	74	メソミル	殺虫剤		0.03
	75	ベノミル	殺菌剤		0.02
	100	トリフルラリン	除草剤		0.06

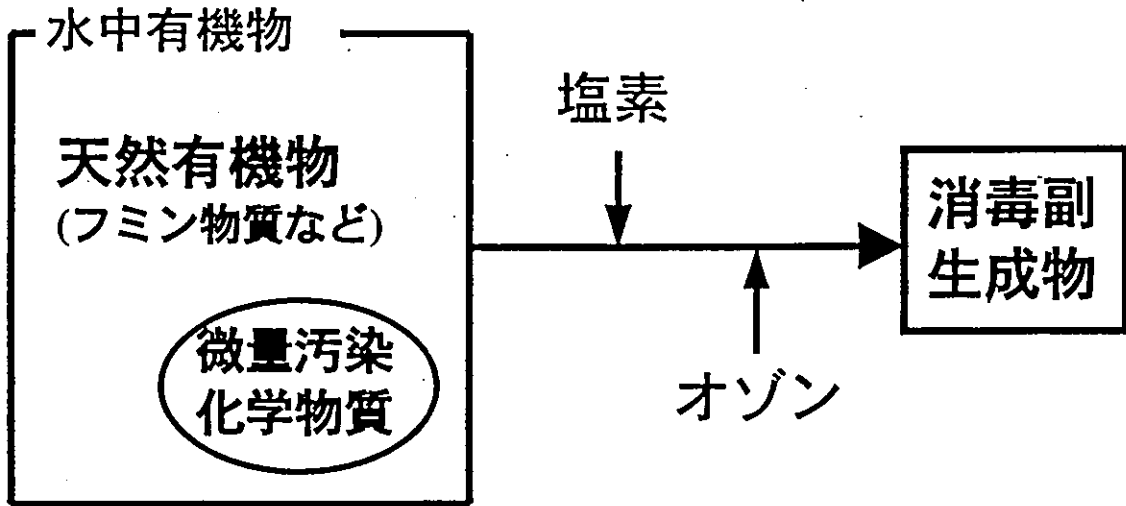


図1 エストロゲン様作用研究の枠組み

とところで、この消毒副生成物の前駆物質は、一般にはフミン物質を中心とする天然有機物と考えられる。しかし、これに加えて個別の人工化学物質と消毒剤が反応して生成する物質も消毒副生成物という。さらに、消毒剤と反応する前の化学物質自体がエストロゲン様作用などをもつ場合

れているもの、流産のリスクを含めて関係が認められなかったという報告も多々みられる。「国際化学物質安全性計画」(International Safety, IPCS) (文献15)やその他のレビュー(文献16)では、クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係はあ

もある。整理すると、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可能性のある物質群には以下があげられよう。

- 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
- ②①以外の微量汚染物質
- ③人畜由来ホルモン
- ④植物エストロゲン
- ⑤フミン物質を中心とする天然有機物
- ⑥以上の物質の塩素処理副生成物(塩素添加の場合)

著者ら(文献17)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。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。一方、自然水中のエストロゲン様作用の構成成分としては、 $\text{D}_4$ 、エストラジオールや $\text{E}_2$ 、エストラジオールなどの微量汚染物質、および、③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、検討を

継続している。図1は、この考え方を示したものである。

一連の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MVLNアッセイを行っている(文献18)。この方法は、EDSTACが、エストロゲン様作用を検出するための $\text{in vitro}$ 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MCF7細胞に、ヴェテロジエニンの制御領域エストロゲンレセプター $\alpha$ 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Pois博士らによって作製されたものである(文献18)。本研究所から直接分与されたMVLN細胞を用いて実験を行った。

なお、このバイオアッセイは、 $\text{in vitro}$ で行うものであり、広く行われている酵母を用いた方法と同様に、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

著者ら(文献17)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。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。一方、自然水中のエストロゲン様作用の構成成分としては、 $\text{D}_4$ 、エストラジオールや $\text{E}_2$ 、エストラジオールなどの微量汚染物質、および、③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、検討を

ある。すなわち、EDCsとしてリストアップされたものの中に医薬品そのものが含まれていたことがきっかけとなり、医薬品による環境汚染・水質汚染がクローズアップされた。EU諸国ではこれを受けて、医療機関や家庭から排出される医薬品による水質汚染問題や必要な対策技術について検討するための大きなプロジェクト(POSEIDON Project)が進められたのである(文献7)。一方、わが国では、この問題については、やっと報告がなされるようになってきた、という段階である。

## 1.2 内分泌攪乱化学物質のリスク評価 価について

さて、EDCsに関するリスク評価や規制ほどの程度進んでいるのであろうか。もともと科学的データに基づく評価をめざす以上、ある程度の時間を要するプロセスである。それは以下のような課題を克服する必要があるからである。

①化学物質の影響について因果関係を証明すること。しかしこれさえも、野生生物における証拠はいくつもあるものの、ヒトへの影響に関するデータは信頼性が不十分であるとされる(文献8)。②EDCsについては特に多種多様にあるエンドポイントから評価すべきものを選択すること。③逆U字反応を示すとされる用量-反応関係を含む作用機序を説明しておくこと。④毒性評価のための試験

法を確立すること。⑤曝露データを蓄積すること。

環境省では、内分泌攪乱作用が疑われる物質のうち、優先してリスク評価に取り組みべき物質を選定し順次試験を行っている(文献9)。ヒトおよび生態系への内分泌攪乱作用について試験が進められており、これまでのところ、ビスフェノールAなどいくつかの物質について、特に魚類に対する内分泌攪乱作用を有することが確認されている。一方、ヒトに対する影響では、低用量(文献情報等により得られた人推定曝露量を考慮した比較的低用量)での明らかでない内分泌攪乱作用は認められず、高用量での一般毒性のみが認められている。

つぎに基準体系をみてみよう。表2は、平成16年(2004年)から施行されている新しい水道水質基準体系(文献10)の中で、旧環境庁が内分泌攪乱の疑いがあるものとしてリストアップしていた化学物質をとりあげたものである。表中の「番号」は、水質基準などの表に記載されている番号をそのまま記載している。農業については、総農薬方式がとられて水質管理目標設定項目に位置づけられ、10種類が対象となっているが、その中で内分泌攪乱の疑いがあるとされたのが表中4つ目に示した10物質である。このように多くの物質がリストアップされ、目標値などが定められているが、

内分泌攪乱性という観点から評価が確定した物質はない。また、ビスフェノールAのように、特にヒトへの低用量域での健康影響に関して現在のところ評価は確定しておらず、内分泌攪乱性からの評価は見送られた物質もある。今後、精緻な動物実験が行われ、信頼できる新たなデータが得られれば、その段階で毒性評価が行われることになる。2003年に改訂されたWHO水道水質ガイドライン(文献12)でもEDCsに対する確定的な毒性評価は行われていない。

## 2 研究の背景と目的

以下、著者らが行った研究を中心に、水道水の内分泌攪乱化学物質問題について述べる。特に、水道水のエストロゲン様作用の構造を把握することに焦点をあてた基礎的・原理的な検討を進めてきた。

内分泌攪乱を惹起する可能性がある化学物質に関して、多方面から調査研究が進められてきた。ここでは具体的に化学物質名をあげて調査研究を行うことがほとんどであるが、一方、「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)では、個別の化学物質に加えて、次の6つのタイプの混合物についても試験を行うことを勧告している(文献13)。

①母乳  
②大豆ベースの乳幼児食中の植物エストロゲン

③有害廃棄物処分場で一般的に検出される混合物

④農薬・肥料

⑤消毒副生成物

⑥ガソリン

混合物といっても世の中には多種多様なものがあるわけで、EDSTACが特に選定して勧告したわずか6つの混合物の中に「消毒副生成物」が含まれていることは、水処理上、重要なことと認識する必要があらう。実際、塩素処理副生成物の生殖毒性に関する疫学調査として、*Σ*BCPら(文献14)が、米カリフォルニア州において水道水中に含まれるトリハロメタンの量と水の摂取量、および流産との関係を調べた例がある。5144人の妊婦(妊娠3カ月余まで)を対象とした調査の結果、水道水中総トリハロメタン濃度が0.075mg/l以下の場合、もしくは1日に飲む水の量がコップ5杯以下の場合には、流産率が9.5%であったのに対し、総トリハロメタン濃度0.075mg/l以上の水を1日5杯以上飲んでいただけの場合には、流産率は15.7%であったことがわかった。

クロロホルムまたはトリハロメタン量と生殖・発生毒性との関係は、ほかにもアイオアやニュージャーシーでも報告さ



表3 典型的塩素処理副生成物のエストロゲン様作用試験結果

化合物名	エストロゲン様作用強度
クロロホルム	0
ジクロロ酢酸	0
トリクロロ酢酸	0
抱水クロラール	0
o-クロロフェノール	0
2,4ジクロロフェノール	$7.7 \times 10^{-5}$
(参考)	
17β-エストラジオール	1.0
4-ノニフェノール	$7.8 \times 10^{-2}$
ビスフェノールA	$3.3 \times 10^{-3}$
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	$3.2 \times 10^{-7}$
フタル酸ブチルベンジル	$3.1 \times 10^{-4}$
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	$3.5 \times 10^{-6}$
4-エチルフェノール	$3.4 \times 10^{-3}$
4-オクチルフェノール	$2.5 \times 10^{-4}$
p-tブチルフェノール	$3.0 \times 10^{-2}$
2-secブチルフェノール	$6.7 \times 10^{-3}$
2-tertブチルフェノール	$6.7 \times 10^{-5}$
o-ヒドロキシジフェニル	$1.2 \times 10^{-4}$
エピクロロヒドリン	$1.4 \times 10^{-5}$

参考覧に示した物質の試験結果は文献22に記載したものの。

17。試薬フミン酸そのものも弱いエストロゲン様作用を有するが、その強さは塩素処理により最大で約2.9倍に強められた。

本実験において最も重要な点は、水道水のエストロゲン様作用においても、いわゆるトリハロメタン問題と同じ構造の問題が存在することが明らかになったことである。すなわち、水処理後の残存有機物と塩素とが反応すればトリハロメタンが必ず生成するのと同様に、残存有機物と塩素との反応によりエストロゲン様作用が生成することがわかった。

工学的立場からは、水道水のエストロ

ゲン様作用低減化のためには、現在、調査研究の対象としてリストアップされているような個別物質の除去に加えて、塩素接触前に、TOC、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される一般有機物の除去も重視すべきであると指摘しうる。

#### 4 エストロゲン様作用が塩素処理で増大する理由

これまでの検討で、琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用は塩素処理によって増大した。また、試薬フミン酸のエストロゲン様作用も塩素処理によって

増大する。この原因としては以下の可能性が考えられよう。

①塩素との反応により有機塩素化合物などが生成し、この中にエストロゲン様作用を持つ分子が存在した結果作用が強められた。

②有機物の酸化分解および加水分解により構成成分が低分子化し、細胞膜を通過できる分子が増加した結果エストロゲン様作用が強められた。

③水中フミン物質との相互関係（錯体形成・吸着・分配・可溶化）で溶存していた微量の有機化合物（農薬等）が、フミン物質の構造の変化により解放され、エストロゲン様作用を増加させた。

ここでは上記3つの可能性を念頭に、塩素処理によって作用が増大する要因について検討を行った。

#### 4.1 塩素副生成物のエストロゲン様作用試験

クロロホルムなど典型的な副生成物をとりあげてMVLNアッセイを行った。試験結果は17β-エストラジオールの作用強度を1として評価した。

結果を表3に示す（文献20,22）。2,4ジクロロフェノールを除きエストロゲン様作用はみられなかった。参考として示した物質の作用強度と比較すると、ビスフェノールA、4-ノニルフェノールといった

強いエストロゲン様作用を示す物質と比較すると小さいことがわかる。2,4ジクロロフェノールのエストロゲン様作用は、組み換え酵母を用いた試験法でも検出されている（文献23）。

2,4ジクロロフェノールの塩素処理水中濃度は低く、エストロゲン様作用に寄与するほどではないと考えているが、塩素処理水のエストロゲン様作用を調べる上でクロロフェノール類は今後検討すべき物質群といえる。

#### 4.2 分子量分布の変化との関係

琵琶湖水の塩素処理の前後の水について、分子量分布の変化を測定した（文献20）。XAD7HP樹脂を用いる方法で濃縮した試料について、UF膜を用いて分画を行った。Aieion社製造直径14mm、公称分画分子量1000、10000、30000の膜を使用し、MPS限外ろ過ユニットにセットし、3000rpm（1350g）で遠心分離を行った。ろ過液についてTOCを測定した。

測定結果を図4に示す。注入塩素量は、1mg/l（塩素要求量に加えて）のほか、TOC:Cl=1:4での注入（塩素注入率9.6mg/l）も行った。図2に示したように、塩素処理によってエストロゲン様作用は2〜3倍程度に増大する。濃縮琵琶湖水中の有機物のうち、MVLN細胞中に入り、この作用に寄与するのは分子量1000以下であると想定すると、

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は十分に注意する必要がある。

### 3 浄水処理過程におけるエストロゲン様作用の変化

以下、著者らの研究によって得られた主な内容を紹介する。この際、論旨を明確にするために、実験方法・手順は概略のみ示した。詳しくは、参考文献をご参照いただければ幸いである。

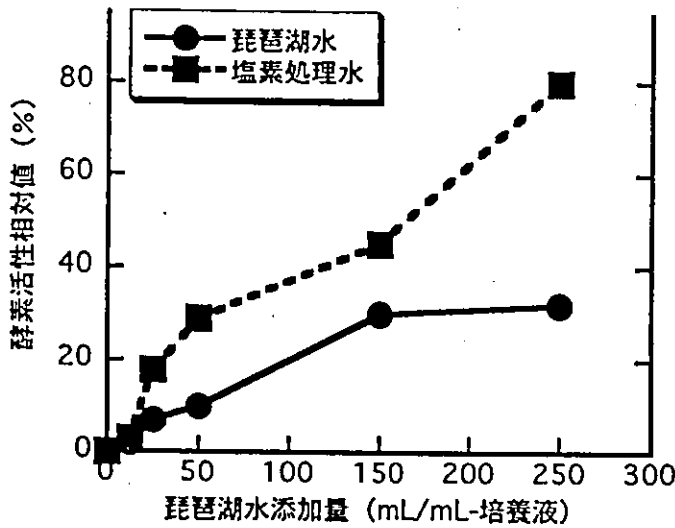


図2 琵琶湖水と塩素処理水のエストロゲン様作用

琵琶湖水（南湖表流水）のエストロゲン様作用試験の結果を図2に示す。試料水の調製・濃縮は、基本的にフミン物質に対する方法で行ったものである（文献19, 20）。まず試料水のpHを2に調整し、XAD7HP（オルガノ）樹脂に通水する。その後、0.1M水酸化ナトリウム溶液で溶離操作を行った。この操作により琵琶湖水6 lを12 mlに濃縮した。本法におけるTOCの回収率は20%程度である。この濃縮水をpH7.2に調整後、MVLN細胞に投与した。

図の縦軸は、17 $\beta$ -エストラジオールをMVLN細胞に投与した場合に得られるルシフェラーゼ活性を100%として、試料投与によって得られる活性値を示している（文献17）。横軸は、培養液1 ml中に添加した琵琶湖水量を表している。添加湖水量50 ml/ml培養液付近からエストロゲン様作用が検出されていることがわかる。添加湖水量が150 ml/ml培養液で酵素活性相対値は最大の32%を示し、それ以降は横這いとなった。このように、水道原水のひとつである琵琶湖水からエストロゲン様作用を検出した。

塩素処理を行った後の結果も示した。初期残留塩素濃度が1.0 mg/lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを希釈して添加し、20℃、暗所に1日静置したものである。塩素処理によってエスト

ロゲン様作用は強められ、最大で添加湖水量が250 ml/ml培養液のときに酵素活性相対値は81%であった。塩素処理により最大3.1倍、平均2.3倍にエストロゲン様作用が強められた。

つぎに、エストロゲン様作用の浄水処理過程での処理性を調べた（文献20）結果を図3に示す。

同じく、琵琶湖水を採水し、ポリ塩化アルミニウム20 mg/lとなるように添加して、凝集処理を行った。また、この凝集処理水に対してさらに活性炭処理を行った。粒状活性炭を内径18 mm、長さ300 mmのガラスカラムに充填（充填高さ280 mm）し、直列に4本連結した。処理は活性炭層厚がやや小さい場合は、通常の粒状活性炭処理（文献21）に近い以下の条件で行った。線速度9.4 m/hr、空間速度8.4 m<sup>3</sup>/hr、接触時間7.1分、流量は上向流にて40 ml/min。

図3から、まず、原水のエストロゲン様作用は、凝集によって半減し、さらに活性炭処理を行うことによってほぼ消失していることがわかる。活性炭処理にと

もなうエストロゲン様作用の低減は、TOCの除去性とほぼ対応していた。また、図3には、これらの処理水を塩素処理したものの試験結果も示した。いずれの場合も、塩素処理を行った水の方がエストロゲン様作用は強い結果となっている。琵琶湖水、凝集処理水、凝集および活性炭処理のもの、特に、凝集および活性炭処理によってほぼ消失したエストロゲン様作用が塩素処理によってやや増大したことが注目される。

このように、塩素によってエストロゲン様作用が増大する現象は、試薬フミン酸を用いた場合にも得られている（文献

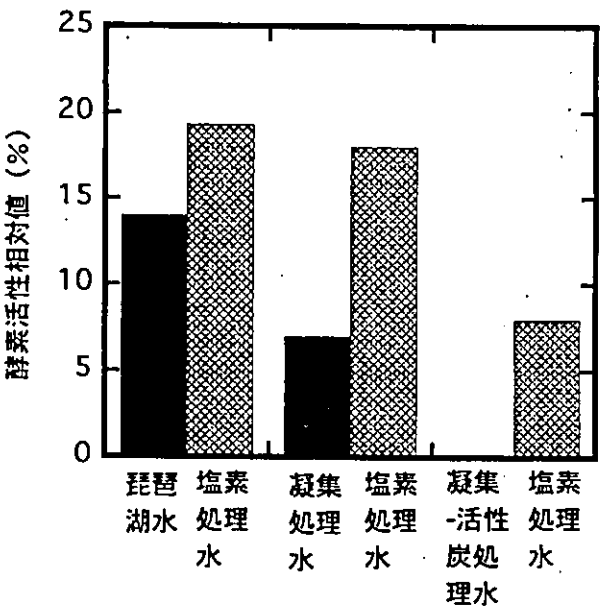


図3 琵琶湖水のエストロゲン様作用の変化

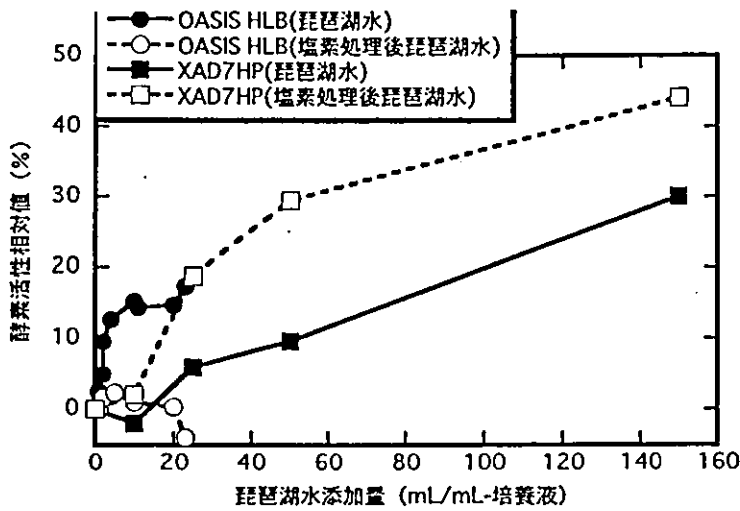


図5 エストロゲン様作用検出における試料調製法の比較 (琵琶湖水: DOC2.7mg/ℓ, E<sub>260</sub> 0.040, pH7.6)

この結果、試料水の調整pHは2とし、吸着固相にはウオーターズ製 OASIS HLBを用い、溶出液媒にはジクロロメタン、さらにジクロロメタンを蒸発させて試料を乾燥させたあとの再溶解液媒にはエタノールを使用することとした。

この個別の微量汚染物質の濃縮を目的とする OASIS HLB を用いる方法と、主としてフミン物質を中心とする天然有機物の濃縮を目的とする XAD7HP を用いる方法 (この場合、吸着後の溶離は水酸化ナトリウム水溶液を使用) を用いて、琵琶湖水とその塩素処理水を濃縮し、MVLNアッセイを行った結果を図5に示す。

### 5 水道水のエストロゲン様作用の構造

にしても、相互作用が解放された後、塩素と反応し速やかにエストロゲン様作用を失う可能性が高い。したがって、主として一番目の要因、すなわち、塩素による塩素化または酸化作用の結果生成する物質の効果が大きいものと推察される。エストロゲン様作用を有する塩素処理副生成物として、ここでは $\beta$ -シクロロフェノールをみいだした。

質を中心とする天然有機物とその塩素処理副生成物に焦点をあてたものであるといえる。図1に示したように、自然水または水道原水中には、これに加えて、個別の微量汚染物質が存在する。ここではこれらを考慮した場合、水道水のエストロゲン様作用とはいかなる構造と考えればよいかについて述べる。

5.1 エストロゲン様作用検出における試料調製法の影響

はじめに、水道原水中でエストロゲン様作用を示すような個別の微量汚染物質を濃縮するのに適当な方法について検討を行った (文献26)。

驚いたことに、XAD7HP調製法を用いた場合、エストロゲン様作用は増大するものとして検出されているが、OASIS HLB調製法を用いた場合には、逆に低減する結果となった。すなわち、塩素処理による影響が、二つの調製法の間で全く逆に現れるのである。

別の例として、OASIS HLB調製法を用いて淀川水とその塩素処理水のエストロゲン様作用試験を行った結果を図6に示す (文献26)。琵琶湖水の結果も同時に示してある。塩素は初期残留塩素濃度が1mgCl<sub>2</sub>/ℓとなるように添加し、24時間経過後に濃縮操作を行った。

まず、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2~3倍の活性を示していることがわかる。そして、淀川水の場合もエストロゲン様作用をはば失う結果となった。

一方、各試料中の $\beta$ -シクロラジオール濃度をELISA法で測定したが、いずれも0.2~0.4ng/ℓと検出・定量

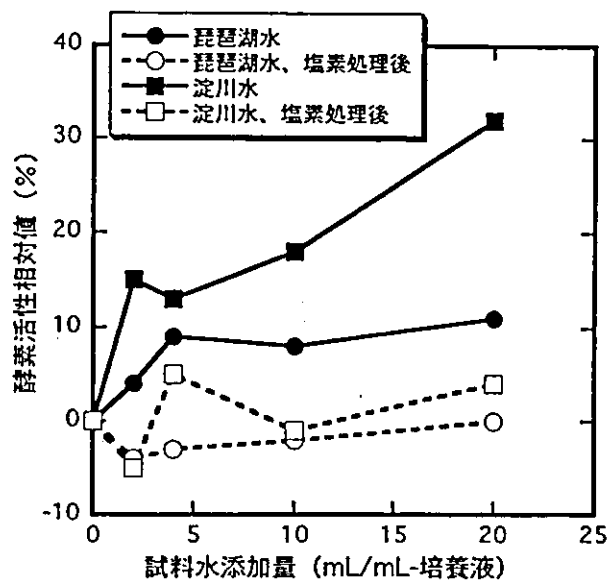


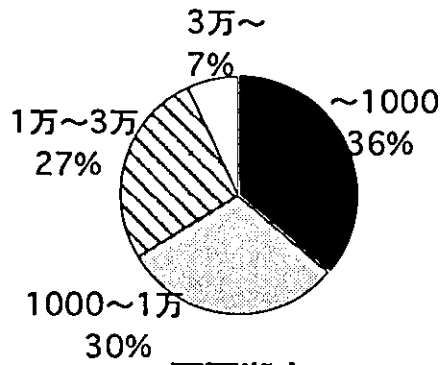
図6 琵琶湖水、淀川水の作用試験と塩素による変化 (琵琶湖水: DOC2.6mg/ℓ, E<sub>260</sub> 0.040, pH7.6、淀川水: DOC3.5mg/ℓ, E<sub>260</sub> 0.065, pH7.5)

限界付近であり、塩素処理後の濃度低下も明瞭ではなかった。

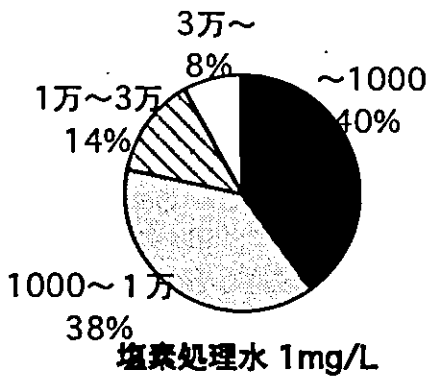
5.2 水道水のエストロゲン様作用の構成成分

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 (文献27, 28) と、増大したとする報告 (文献29) がみられる。

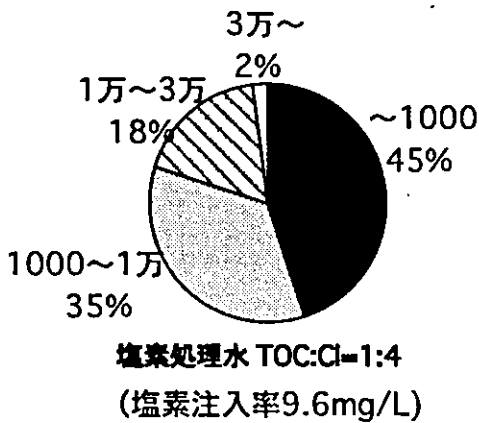
これに対し著者らは、塩素処理によるエストロゲン様作用の増加・減少どちらも確認したことになる。図5に示すように、それは試料の調製方法に依存している。すなわち、水道原水中には、塩素処



琵琶湖水



塩素処理水 1mg/L



塩素処理水 TOC:Cl=1:4 (塩素注入率9.6mg/L)

図4 琵琶湖濃縮水の分子量分布と塩素処理による変化

表4 エストロゲン様作用物質の塩素分解における濃度とエストロゲン様作用の変化

物質名	初期濃度 (μg/l)	物質残存率 (%)	エストロゲン様作用残存率 (%)
E <sub>2</sub>	2.2	4.7	22
E <sub>1</sub>	1.8	5.9	30
BPA	460	1.3	5.2
NP	46	1.5	0

図4から、その分子量画分の増加はわずかである。すなわちエストロゲン様作用の増大において、塩素によって低分子化が進み、細胞内に入る物質が増えるという要因は大きくなく、塩素によって物質の構造自体が変化する影響の方が大きいものと推察される。

#### 4.3 典型的なエストロゲン様作用物質の塩素処理におけるエストロゲン様作用の変化

例として、1,1'-エストラジオール(同)、エストロン(同)、ビスフェノールA (BPA)とヤノニルフェノール(NP)について、塩素による分解性とエストロゲン様作用変化を調べた。表に示すそれぞれの初期濃度の水溶液に初期残留塩素として1mg/lを添加し、20℃、暗所に

24時間静置させた後、測定したものである。結果を表4に示す。

いずれの物質も塩素によって濃度が低下するとともに、エストロゲン様作用も低減していることがわかる。なお、濃度の残存率とエストロゲン様作用としての残存率に対応していないように見える物質があるが、これはMVLNアッセイの用量-反応曲線における用量が対数表示されるからである。すなわち濃度が1/10になったからといってエストロゲン様作用も1/10になるわけではない。ここでは、濃度低下とともにエストロゲン様作用も低減することを把握したということである。

既報文献<sup>24)</sup>で、琵琶湖水中から検出されるエストロゲン様作用に個別物質とし

て寄与しうるものは、1,1'-エストラジオールとヤノニルフェノールであると推定したが、以上のように、塩素処理によってその作用が増大する現象はみられず、これらの物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大要因ではないと考えられる。

ただし、ビスフェノールAやヤノニルフェノールについては、塩素処理後エストロゲン様作用が増大する場合もあるとの報告がなされている(文献<sup>24)</sup>、<sup>25)</sup>。しかしこの場合も、処理時間を長くしたり塩素の添加量を増やしたりすると、いずれも作用は低減する結果となっている。

水中有機物と相互作用によって溶解していた1,1'-エストラジオールやヤノニルフェノールが、塩素の作用によって相互作用から解放される結果、エストロゲン様作用を増大させる可能性も考えられたが、仮にそのような機構があるとしても、解放された物質は塩素によって分解されつつエストロゲン様作用を失うと考えられる。したがって、ここにとりあげた物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大には寄与していないと考えられる。

#### 4.4 まとめ

塩素処理によって作用が増大する要因について、先に記した3つの可能性について検討を行った。まず、低分子化することの効果は小さいと推定された。また、相互作用の解放効果の可能性はある