

activities at 120 and 180 min are induced mainly by 2,4-dichloro-E2 and 2,4-dichloro-E1.

The above results demonstrate that the products in aqueous chlorinated E2 solution elicited estrogenic activity. It should be noted, however, that the products were obtained under experimental chlorination conditions. In view of the fact that the formation of the byproducts will be affected by factors such as pH, temperature, reaction time, chlorine dose, concentration of E2, and TOC in raw water, etc., the dynamics for aqueous chlorination of E2 and the occurrence of such products in drinking water requires further investigation.

Acknowledgments

Financial support by the National Natural Science Foundation of China [Grants 49925103 and 40024101], the State High Technology Development Project [Grant 2001AA646010-5], and the Japanese Governmental Research Fund (Ministry of Health & Welfare) is gratefully acknowledged.

Literature Cited

- (1) Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, F. S. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *101*, 378.
- (2) Jones, L. A.; Hajek, J.; Hajek, R. A. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 63.
- (3) Miyamoto, J.; Klein, W. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1829.
- (4) Desbrow, C.; Routledge, E. J.; Brighty, G. C.; Sumpter, J. P.; Waldock, M. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 1549.
- (5) Ahlborg, U. G.; Lipworth, L.; Titusemstoff, L.; Hsieh, C. C.; Hanberg, A.; Baron, J.; Trichopoulos, D.; Adami, H. O. *Crit. Rev. Toxicol.* **1995**, *25*, 463.
- (6) Kramer, V. J.; Miles-Richardson, S.; Pierens, S. L.; Giesy, J. P. *Aquat. Toxicol.* **1998**, *40*, 335.
- (7) Routledge, E. J.; Sheahan, D.; Desbrow, C.; Brighty, G. C.; Waldock, M.; Sumpter, J. P. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, *32*, 1559.
- (8) Panter, G. H.; Thompson, R. S.; Sumpter, J. P. *Aquat. Toxicol.* **1998**, *42*, 243.
- (9) Brighty, G. *The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents*; R&D Technical Summary; Environment Agency: Bristol, U.K., 1996; p 38.
- (10) 10th Report on Carcinogens, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. <http://ehp.niehs.nih.gov/roc/toc10.html> (accessed March 2003.)
- (11) Shore, L. S.; Gurevitz, M.; Shemesh, M. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1993**, *51*, 361.
- (12) Aherne, G. W.; Briggs, R. J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 735.
- (13) Knight, W. M. *Estrogens in the Environment*; Elsevier-North Holland: Amsterdam, 1980.
- (14) Tabak, H. H.; Bloomhuff, R. N.; Bunch, R. L. *Dev. Ind. Microbiol.* **1981**, *22*, 497.
- (15) Johnson, A. C.; Belfroid, A.; Corcia, A. Di. *Sci. Total Environ.* **2000**, *256*, 163.
- (16) McKerns, K. W. *Steroid Hormones and Metabolism*; Appleton-Century-Crofts: New York, 1969.
- (17) Orme, M. L. E.; Bock, D. J.; Breckenridge, A. M. *Clin. Pharmacokin.* **1983**, *8*, 93.
- (18) Ishii, Y.; Okita, S.; Torigai, M.; Yun, S. J. *Bunseki Kagaku* **2000**, *49*, 753.
- (19) Kuch, H.; Ballschmiter, K. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3201.
- (20) Baronti, C.; Curini, R.; D'Ascenzo, G.; Gentili, A.; Samperi, R. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 5059.
- (21) Sole, M.; Alda, M. J. L. D.; Castillo, M.; Porte, C.; Ladegaard-Pedersen, K.; Barcelo, D. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 5076.
- (22) Draley, J. E.; Chairman, S. In *Aqueous Chemistry of Chlorine*; Jolley, R. L., Ed.; Ann Arbor Science: Ann Arbor, MI, 1975; p 18.
- (23) Hu, J. Y.; Aizawa, T.; Ookubo, S. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 1980.
- (24) Hu, J. Y.; Xie, G. H.; Aizawa, T. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 2034.
- (25) Nishikawa, J.; Saito, K.; Goto, J.; Dakeyama, F.; Matsuo, M.; Nishihara, T. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *154*, 76.
- (26) Hu, J. Y.; Aizawa, T.; Magara, Y. *Water Res.* **1998**, *33*, 417.
- (27) Tabata, A.; Miyamoto, N.; Ohnishi, Y.; Itoh, M.; Yamada, T.; Kamei, T.; Magara, Y. *Wat. Sci. Technol.* **2003**, *47* (9), 51.

Received for review April 10, 2003. Revised manuscript received September 13, 2003. Accepted September 16, 2003.

ES034324+

「論 文」

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伊 藤 禎 彦
京都大学大学院工学研究科教授・工博中 西 岳
(株)石川島播磨重工業
環境・プラント事業本部・工修早 坂 剛 幸
京都大学大学院工学研究科修士課程

要旨：水道原水のエストロゲン様作用と塩素処理による変化に焦点を当て、水道原水と塩素処理水についてそのバイオアッセイを行うための適切な試料調製法について検討を行った。水中には塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質（主として天然有機物）と減少する物質（主として微量汚染物質）があり、水道水のエストロゲン様作用にはこれらが混在している。本研究では、調製方法や添加塩素濃度に依存して、エストロゲン様作用の増加・減少いずれも検出した例を示した。水道水を対象とした場合、本研究でとりあげた二つの方法（OASIS HLB 調製法、XAD7HP 調製法）を使い分ける必要があり、例として清浄な湖沼水・河川水、及び下水処理水の放流などを受けている都市河川水をとりあげて、その考え方を示した。さらに、トリハロメタン問題との類似性の観点から、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、現在内分泌攪乱性が疑われると指摘されている微量汚染物質の除去に加えて、塩素接触前に、フミン物質を中心とする天然有機物の除去も重視すべきであることを指摘した。

キーワード：エストロゲン、バイオアッセイ (582)、塩素処理 (081)、消毒副生成物、フミン物質
分類項目：塩素及び塩素剤 (050702)、毒性試験・評価 (120105)

1. 緒言

内分泌攪乱を生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いる。そ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¹⁾。
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。

実際、塩素処理副生成物の生殖毒性を示唆する疫学調査²⁾もあり、水処理上、EDSTACが勧告した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重要なことと認識する必要がある

う。上水道としても、内分泌攪乱誘発の可能性があるものとして取りあげ、対応策を検討しておく必要があると考えられる。著者らはこのような観点から、自然水のエストロゲン様作用とその塩素処理による変化に焦点を当て検討を行ってきている。

ところで、本研究ではエストロゲン様作用を検出するためにバイオアッセイを行うが、この場合、一般に試料水の濃縮が必要となる。このとき、濃縮対象物質としていかなる成分を想定するかが重要となる。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）。

これらのうちいかなる物質(群)にエストロゲン様作用があるかを把握した上で、それらを濃縮可能な方法を選択していく必要がある。

著者らはこれまでに、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^{3,4)}。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。これらを背景に消毒副生成物に重点をおいた検討を行ってきたが、その過程で、自然水中のエストロゲン様作用の構成成分としては、 17β -エストラジオールや4-ノニルフェノールの寄与が大きいこともわかった³⁾。

これら知見に基づき本研究では、①フミン物質を中心とする天然有機物、② 17β -エストラジオールや4-ノニルフェノールなどの微量汚染物質、及び、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、これらに注目しつつ、水道水のエストロゲン様作用を検出するバイオアッセイを行うための試料調製方法について検討を行った。その上で、試料調製方法が、塩素処理によるエストロゲン様作用の変化を検出することにはいかなる影響を及ぼすかについて実験的考察を行った。

本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アッセイを行う^{1,5)}。この方法は、EDSTACが、エストロゲン様作用を検出するための*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MCF-7細胞に遺伝子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。

2. 実験方法

2.1 原水と塩素処理水の試料調製方法

大津市由美浜渚公園付近の琵琶湖南湖表流水、及び枚方市枚方大橋左岸の淀川水の2種類の自然水を用いて実験を行った。前者の水質は、溶存有

機炭素(DOC) 2.2~3.3mg/l、260nm紫外線吸光度(E_{260}) 0.031~0.071、pH 7.4~7.6であり、後者はDOC 3.5mg/l、 E_{260} 0.065、pH 7.5であった。

XAD7HP樹脂を用い、フミン物質に対する濃縮法⁶⁾で試料調製する場合の概略を示す。①XAD7HP(オルガノ)樹脂をカラム(30mm径、95mm長、容積70ml)に充填し、以下の条件でコンディショニングを行った。エタノールを、波長235nmにおける10mmセルの吸光度が0.01未満になるまで上向流、流速10ml/minで通液。ついで蒸留水と同じ条件で通水。②試料水を採取し、あらかじめ蒸留水で洗浄した0.45 μ mメンブランフィルターを用いて6lを沝過。③pH 2に調整した後、上記XAD7HP樹脂カラムに17.5ml/minで通水。④0.1M水酸化ナトリウム溶液で溶離し20mlを採取。⑤pH 2に再調整した後、XAD7HP小カラム(10mm径、80mm長、容積8.0ml)に1.2ml/minで通水。⑥0.1M水酸化ナトリウム溶液10mlを通液し10ml採取。⑦コンディショニング済み陽イオン交換樹脂(オルガノ製IR-120B)に通水し、最終的に12mlを得る。濃縮倍率は500倍となる。本法によるDOCの回収率は16-20%であった。この濃縮水をpH7.2に調整後、MVLN細胞に投与した。なお、空試験として、蒸留水及び塩素濃度1mg/lの水溶液6lを通水して作製した試料からは、エストロゲン様作用を示したり、反対に抑制する物質は溶出していないことを確認している。

一方、自然水中の微量汚染物質の濃縮も目的とした場合の方法の概略を示す。①ウォーターズ製固相抽出用カートリッジに対し、酢酸エチル(上向流)、メタノール(下向流)、蒸留水(上向流)の順に通液してコンディショニングを行った。②試料水を採取し、あらかじめ蒸留水で洗浄した0.45 μ mメンブランフィルターで沝過した後、pH調整。調整pHは特に断らない限り2。③1lを上記カートリッジに20ml/minで通水。④窒素ガスで30分間通気乾燥を行った後、有機溶媒3mlを1ml/minで通液して溶離操作。⑤得られた溶液に窒素ガスを吹き付けて乾固した後、特に断らない限りエタノール1mlで再溶解。これで濃

縮倍率は1000倍となる。この試料を培養液中エタノール濃度が1%以下の範囲で添加した。

2.2 固相抽出用カートリッジを用いる試料調製条件に関する実験方法

本研究では、固相カートリッジを用いる場合の試料調製条件について検討した。主たる検討項目は、調整 pH、吸着固相、溶出溶媒である。

pH については、一般に自然水中微量有機化学物質の濃縮は pH 2 で行うことで良好であることが多く報告されていること、及び 17β -エストラジオールの測定時には pH 5 に調整した後濃縮操作が行われること⁷⁾を考慮して pH 2 と 5 の両者を比較した。

溶出溶媒については、使用例が多い溶媒であること、及び極性を示す誘電率⁸⁾とを考慮し、酢酸エチル/メタノール (5 : 1)、MTBE/メタノール (9 : 1)、ジクロロメタン、ヘキサンをとりあげて比較した。予備実験として水酸化ナトリウムやメタノールについても検討した。

吸着樹脂としては、多孔質ポリマーのうちエストロゲン様作用物質や農薬など微量汚染物質の濃縮・測定に使用されている OASIS HLB と PS-2、及び水中変異原物質の回収に優れている CSP 800⁹⁾をとりあげた。いずれも2.1に記したようにコンディショニングした後使用した。空試験として蒸留水 1 l を通水しジクロロメタンで溶出させた試料からは、エストロゲン様作用を示したり、反対に抑制する物質は溶出していないことを確認している。OASIS HLB については、さらに、塩素濃度 1 mg/l の水溶液 1 l を通水しジクロロメタンで溶出させた試料も作製し、同様に影響がないことを確認した。

一般に、バイオアッセイでは溶媒自身の影響を避けるため、溶出溶媒を蒸発乾固させ、エタノールや DMSO などの補助溶媒に再溶解させることが多い。MVLN アッセイでは DMSO の使用は避けるべきとされている¹⁾ため、ここでは、1%までは細胞毒性のないエタノール、及び蒸留水に再溶解させて比較した。なお、蒸留水を用いる場合は、バイブレータにより試験管に5分程度振動を与えて再溶解操作を行った。

2.3 塩素処理法

試料をあらかじめ蒸留水で洗浄した $0.45\mu\text{m}$ メンブランフィルターでろ過し、その水の塩素要求量 (セントラル科学、CD-20型にて測定) に加えて、所定濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液を希釈して添加した。pH に変化がないのを確認した後、20℃、暗所で24時間密栓、静置した。残留塩素消去剤 (還元剤) は添加せず、試料調製操作に供した。この残留塩素による影響がないことは上述した通りである。

2.4 濃度測定方法

17β -エストラジオールは、試料水 1 l (特に断らない限り pH 5 に調整) を OASIS HLB カートリッジに通水した後、ELISA (NEOGEN 社製キット使用) 法で測定した。DOC は全有機体炭素計 (島津製作所、TOC-5000A) を用いて測定した。また、残留塩素濃度は DPD 滴定法で測定した。

2.5 MVLN アッセイ^{1,5)}法

MVLN 細胞は、作製した機関から直接分与されたものを用いた。細胞培養には通常、ウシ胎児血清 (FBS: Fetal Bovine Serum、Hyclone 社) を 10% 加えた DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、GibcoBRL 社) 培養液を使用するが、アッセイ時には、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 社) を 5% 濃度で DMEM に加えた培養液を使用した。培養法、アッセイ手順は EDSTAC 報告書に記載されている方法¹⁾にしたがった。

まず、アッセイに用いる細胞は、使用の6日前から DCC-FBS を含む培養液で培養し、2日ごとに培養液交換を行う。この細胞を24穴マルチウェルプレートに約 10^5 cells/well となるように播種した。播種して2日後、試料を $0.22\mu\text{m}$ フィルターで除菌ろ過しつつ新しい培養液とともに添加し、24時間培養した。この際、フィルターからの溶出物が試験結果に影響を及ぼさないことを確認している。また、培養液中エタノール濃度が1%までは結果に影響を及ぼさないことを確認しているため、試料をエタノール溶液としている場合には、培養液中濃度が1%以下となるようにした。試料

を含む培養液を除去してから、試料を再度添加し、さらに24時間培養した。

この後、細胞溶解液（ピッカジーン、東洋インキ製造(株)）を加えて細胞を溶解し、発光基質液（ピッカジーン、東洋インキ製造(株)）を使用して一般的なルシフェラーゼアッセイ¹⁰⁾を行った。ルミノメーターにはベルトールドジャパン製 Lumat LB9507を用いた。細胞を溶解した液中のタンパク質濃度はBCA法¹¹⁾を用いて測定し、単位タンパク質あたりの発光量を求めた。1試料に対しては常に2ウェルを用い、その平均値を測定値とした。

試料によって誘起されたルシフェラーゼの活性は、Sotoらの方法¹²⁾を参考に、 17β -エストラジオールによって誘起される活性に対する百分率(%)を求め、酵素活性相対値として表示した。具体的には、 17β -エストラジオールを 10^{-9} M 投与したときに最大の活性が得られるので、このときの値を100%として算出した。

試料調製操作及び本アッセイの繰り返し精度について試験した例を示す。同一琵琶湖水をXAD7 HP樹脂を用いて濃縮し150ml/ml-培養液で投与した結果、5回の平均値は32%、標準偏差は7.8%であった。

3. 水道原水の試料調製法に関する実験結果

本研究では試料水の濃縮法として、XAD7HP樹脂を用いる方法と、固相抽出用カートリッジと加圧送液システムを用いる方法とをとりあげている。前者はフミン物質に対してとられてきた濃縮法であり、後者は微量汚染物質の濃縮を主たる目的とした方法である。XAD樹脂を用いるフミン物質濃縮法は確立されている⁶⁾ので、ここでは水道原水のエストロゲン様作用を検出するのに適した固相カートリッジによる濃縮法を検討した。主たる検討項目は、調整pH、吸着樹脂、溶出溶媒である。以下、3.1 調整pHに関する実験結果から3.5 試料調製方法と必要水量の評価までの実験における試料水には、DOC 3.3mg/l、 E_{260} 0.047、pH 7.5の琵琶湖南湖表流水を用いた。

3.1 調整pHに関する実験結果

エストロゲン様作用の測定結果を表-1に表す。吸着固相にはOASIS HLBを用い、所定の溶媒で

表-1 調整pH及び溶出溶媒の影響

溶出溶媒	酵素活性相対値 (%)	
	pH 5	pH 2
酢酸エチル/メタノール (5:1)	9	43
メタノール	-18	-15

溶出させた。溶媒を乾固した後の再溶解溶媒としてはエタノールを使用したものである。MVLN細胞への琵琶湖水添加量は10ml/ml-培養液とした。

強極性溶媒であるメタノールで溶出した試料では、pHに関係なく負の活性となった。また中間的な極性溶媒である酢酸エチル/メタノール(5:1)で溶出した試料では、pHを低くするとより高い酵素活性が得られた。この結果から、調整pHを2とするのが適当と考えられた。

一方、各pHにおける 17β -エストラジオールの回収率を測定した。0.002 μ g/lの 17β -エストラジオール水溶液1 lをpH調整した後、OASIS HLBに通水し、その後、ジクロロメタンで溶出し濃度測定を行ったものである。pH 2及び5に加えて、pH3.5及び無調整(pH7.6)の場合についても測定した。結果を図-1に示す。pH 5で高い回収率が得られ、pH 2では低くなっている。すなわち 17β -エストラジオールの含有濃度が高ければ、pHを5とした場合に、強いエストロゲン様作用が得られることも考えられる。表-1の結果とあわせて考えると、試料水のpHを2として

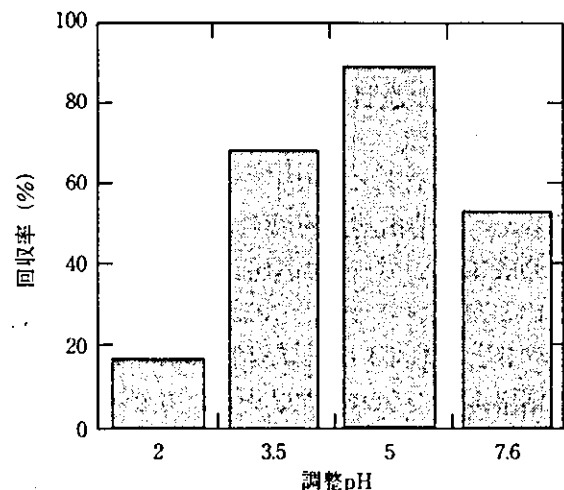


図-1 17β -エストラジオール濃縮における調整pH

固相カートリッジに通水した後、その水の pH を 5 として別の固相カートリッジに通水し、両者からの溶離液を混合することが妥当であるともいえ、今後の課題である。

なお、pH 2 に調整した後回収するという操作は、17 β -エストラジオールの作用には影響を及ぼさないことも確認している。

3.2 溶出溶媒に関する実験結果

pH を 2 に調整した試料水を OASIS HLB に通水した後、各溶媒で溶出した。溶媒を蒸発乾固させ、エタノールに再溶解させた試料について MVLN アッセイを行った。また、MVLN 細胞への琵琶湖水添加量は 10ml/ml-培養液である。結果を表-2 に示す。ジクロロメタンと酢酸エチル/メタノール (5:1) で溶出した試料からエストロゲン様作用が検出されたが、前者の方が酵素活性相対値は大きい。また、ヘキサン溶出試料や、OASIS HLB の溶出溶媒として用いられている MTBE/メタノール (9:1) 溶出試料からは目立った酵素活性はみられなかった。一方、予備実験として水酸化ナトリウム水溶液やメタノールでも同様の実験を行ったが、特に高い酵素活性は得られなかった。

以上より、溶出溶媒としては、検出されるエストロゲン様作用の強さ、及び溶媒としての扱い易さの点から、ジクロロメタンが適当であると考えられた。

表-2 溶出溶媒の影響

溶 媒	酵素活性相対値 (%)
ジクロロメタン	19
酢酸エチル/メタノール (5:1)	10
ヘキサン	5
MTBE/メタノール (9:1)	-12

3.3 吸着樹脂に関する実験結果

pH を 2 に調整した試料水を各吸着樹脂に通水した後、ジクロロメタンで溶出した。ジクロロメタンを蒸発乾固させ、エタノールに再溶解させた試料について MVLN アッセイを行った。また、MVLN 細胞への琵琶湖水添加量は 10ml/ml-培養液である。

結果を表-3 に示す。実験方法で述べたように、いずれの固相も空試験では MVLN アッセイに影響を及ぼさないことを確認している。OASIS HLB と PS-2 からは同程度の酵素活性が検出され、いずれも使用可能であると評価できる。一方、CSP800 を用いた場合には目立ったエストロゲン様作用は認められず、著者らがこれまでに行った結果³⁾と同様であった。CSP800 は変異原物質の回収に優れているとされるが、OASIS HLB 及び PS-2 と差が生じた理由は不明である。個別の化学物質の回収率測定や、高速液体クロマトグラフなどを用いた分析により濃縮物質の差を明らかにすることが今後の課題である。

表-3 吸着樹脂の影響

吸着樹脂	酵素活性相対値 (%)
OASIS HLB	12
PS-2	11
CSP800	-5

3.4 再溶解溶媒に関する実験結果

はじめに、pH を 2 に調整した試料水を OASIS HLB に通水した後、ジクロロメタンで溶出した。ジクロロメタンを蒸発乾固させた後、再溶解溶媒としてエタノールと蒸留水を用いて投与用試料を作製した。結果を表-4 に示す。若干の琵琶湖水添

表-4 再溶解溶媒の影響

溶 媒	琵琶湖水添加量 (ml/ml-培養液)	酵素活性相対値 (%)
再 蒸 留 水	15	13
エタノール	22.5	15

加量の差はあるものの、エタノール溶解でも蒸留水溶解でも同様の酵素活性が検出された。これより溶解させやすいエタノールを用いることとした。

以上の実験結果から、以後、水道原水のエストロゲン様作用試験のためには、試料水の pH を 2 に調整し、吸着固相 OASIS HLB に通水し、ジクロロメタンで溶出した後、エタノールに再溶解する方法で試料調製することとした。なお、表-3 に示したように吸着固相としては PS-2 も使用する

ことが可能である。

3.5 試料調製方法と必要水量の評価

OASIS HLB を用い上述の方法で調製した試料と、XAD7HP を用いる方法で調製した試料のエストロゲン様作用を比較した結果を図-2に示す。図の横軸は、MVLN 細胞の培養液 1 ml 中に琵琶湖水何 ml 分を添加したかを表している。なお、XAD7HP による調製試料では250ml/ml-培養液以上、OASIS HLB による調製試料では40ml/ml-培養液以上を添加すると細胞毒性が強くなり MVLN アッセイを行うことができなかった。

試料調製方法によってエストロゲン様作用は大きく異なり、XAD7HP による調製試料よりも OASIS HLB による調製試料の方が、少ない添加量で作用を誘発していることがわかる。実験方法で述べたように、XAD7HP を用いる方法では溶出液として水酸化ナトリウム溶液を使用している。これはフミン物質の濃縮を目的とする操作であり、微量汚染物質の濃縮を意図したものではない。一方、OASIS HLB を用いる方法では溶出液としてジクロロメタンを使用しており、これは自然水中微量汚染物質の濃縮を目的として頻用される方法である。MVLN アッセイではフミン物質にもエストロゲン様作用が認められ³⁾、これは XAD7HP で濃縮されるわけであるが、図-2の結果からは、琵琶湖水中に含まれるエストロゲン様作用物質は、OASIS HLB 濃縮法によってより効率よく

濃縮されると推定することができる。

10%のエストロゲン様作用を検出するのに必要な琵琶湖水添加量を比較すると、XAD7HP による試料調製方法では約40ml/ml-培養液が必要であるのに対し、OASIS HLB を用いた調製方法では約 3 ml/ml-培養液の添加量でも10%に達している。

MVLN アッセイに24穴マルチウェルプレート (培養液量 1 ml) を使用する場合、OASIS HLB 調製方法では培養液 1 ml あたり最大10 μ l まで添加できる。したがって、3 ml/ml-培養液となるように添加するのに必要な濃縮倍率は300倍である。一方、XAD7HP 調製方法では培養液の希釈の影響を受けない最大添加量が100 μ l であるので、必要濃縮倍率は400倍となる。本研究での濃縮操作によって得られる最終液量は、OASIS HLB 調製方法では 1 ml、XAD7HP 調製方法では10ml であるので、必要な試料水量は、それぞれ0.3l、4 l と評価され、13倍の差となる。OASIS HLB を用いる方法では、琵琶湖水の場合、試料水量が 1 l あれば十分このアッセイを行うことができるといえる。

4. 塩素処理によるエストロゲン様作用の変化に関する実験結果と考察

著者らはこれまでに、フミン物質を中心とする天然有機物に注目した場合、塩素処理によりエストロゲン様作用が増加することを示してきた³⁾。一方、17 β -エストラジオールは塩素処理によって分解を受けつつ作用が低減することも確認している⁴⁾。

試料調製方法が異なれば、これら現象の現れ方も当然異なるであろう。本節では、OASIS HLB を用いた調製方法と XAD7HP を用いた調製方法によって、塩素処理におけるエストロゲン様作用の変化を比較する。

4.1 OASIS HLB 調製法における塩素処理の影響

琵琶湖水と淀川水、及びその塩素処理水の試験結果を図-3に示す。塩素は初期残留塩素濃度が 1 mgCl₂/l となるように添加しており、また OASIS HLB を用いる方法で試料を調製したものである。

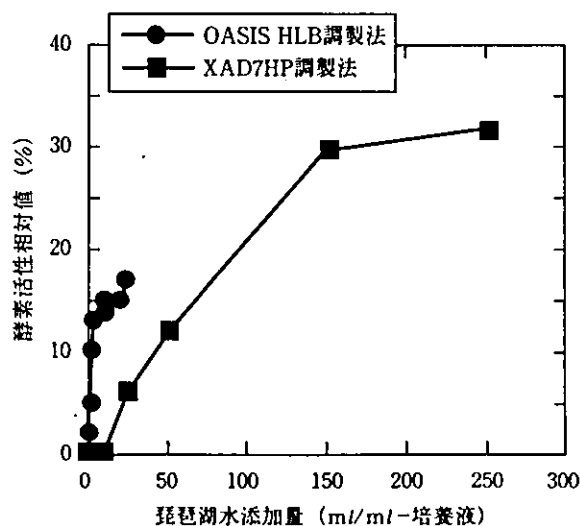


図-2 琵琶湖水のエストロゲン様作用検出における濃縮法の比較

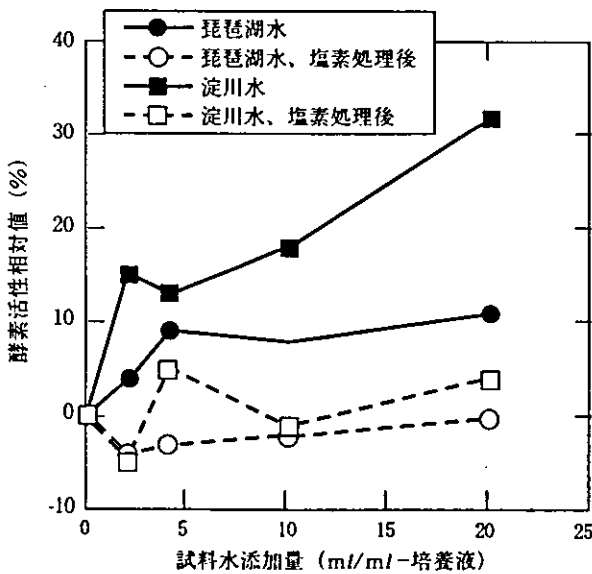


図-3 琵琶湖水、淀川水の作用試験と塩素による変化
 琵琶湖水：DOC 26mg/l、 E_{200} 0.046、pH 7.6
 淀川水：DOC 35mg/l、 E_{200} 0.065、pH 7.5

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。また通常の浄水処理で行われる程度の塩素処理によって、どちらの水もエストロゲン様作用をほぼ失う結果となった。XAD7HPを用いて試料調製を行った場合、塩素処理によってエストロゲン様作用は増大するという結果が得られる³⁾が、図-3の結果はこれとは正反対の現象である。この理由については4.4で詳しく考察を行う。

一方、各試料中の17β-エストラジオール濃度を測定した。結果を表-5に示す。17β-エストラジオール濃度は淀川水の方がわずかに高かったが、塩素処理を行っても琵琶湖水、淀川水いずれも変化がみられなかった。すなわち、図-3において塩素処理によるエストロゲン様作用低減における17β-エストラジオールの寄与は明らかではなかった。しかし、いずれも検出・定量限界付近の濃度なので、測定値の信頼性はあまり高くない。

表-5 17β-エストラジオール測定結果

試 料		17β-エストラジオール (μg/l)
琵琶湖水	未処理水	0.0002
	塩素処理水	0.0002
淀川水	未処理水	0.0004
	塩素処理水	0.0004

4.2 添加塩素濃度の影響

つぎに、琵琶湖水のエストロゲン様作用に対する添加塩素濃度の影響について調べた。初期残留塩素濃度が1 mgCl₂/l、DOC: Cl₂ = 1 : 4、1 : 10となるように添加したものである。このとき琵琶湖水のDOCは2.2mg/lであったので、DOC: Cl₂ = 1 : 4、1 : 10の場合の塩素添加量は、それぞれ8.8mgCl₂/l、22mgCl₂/lであった。24時間経過後の残留塩素濃度を表-6中に示してある。

エストロゲン様作用試験結果を図-4に示す。未処理の場合は約15%前後の酵素活性を示した。浄水処理で通常行われる塩素添加濃度 (1 mgCl₂/l) では作用は減少した。一方、注目すべきことは、塩素添加量をさらに増加させると、逆に作用が増加する現象がみられる点である。琵琶湖水添加量20mlの部分で比較すると、未処理水と比較して約3倍の増加が認められた。

このときの17β-エストラジオール濃度を測定

表-6 17β-エストラジオール測定結果

塩素添加量	残留塩素 (mgCl ₂ /l)	17β-エストラジオール (μg/l)
未処理	-	0.0002
1 mgCl ₂ /l	0.8	0.0001
DOC: Cl ₂ = 1 : 4	6.2	0.0001
DOC: Cl ₂ = 1 : 10	15.2	0.0001

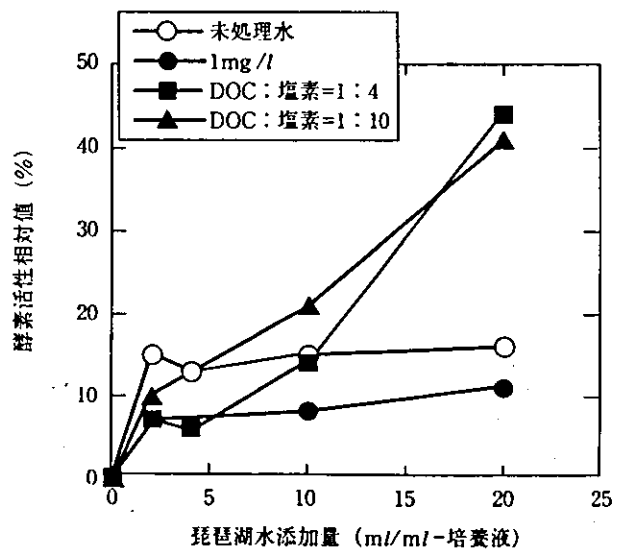


図-4 エストロゲン様作用に対する塩素添加量の影響
 琵琶湖水：DOC 2.2mg/l、 E_{200} 0.031、pH 7.4

した結果を表-6に示す。塩素処理の濃度を増加させても、 17β -エストラジオール濃度の変化は明確にはみられなかった。すなわち、図-4において塩素処理によるエストロゲン様作用変化における 17β -エストラジオールの寄与は明らかではない。しかし、いずれも検出・定量限界付近であり測定値の信頼性は高くない。

著者らはこれまでに、試薬フミン酸に塩素処理を行うとそのエストロゲン様作用が増大することを示した³⁾。また、塩素添加量との関係については、DOC: $\text{Cl}_2 = 1 : 2.5$ でエストロゲン様作用が最大となり、フミン酸の作用の約3倍に達するが、添加塩素を DOC: $\text{Cl}_2 = 1 : 5$ に増加させると、エストロゲン様作用は DOC: $\text{Cl}_2 = 1 : 2.5$ の場合より弱まることを示した。この試験で残留塩素が影響を及ぼさないことも確認している。このようにフミン酸の作用が塩素によって増大する理由については、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定した⁴⁾。

つぎに著者らは、いくつかの塩素処理副生成物を取りあげてMVLNアッセイを行ったところ、2,4-ジクロロフェノールにエストロゲン様作用があることを確認した⁴⁾。これを受けて曾は、2,4-ジクロロフェノールをはじめとするクロロフェノール類の生成とエストロゲン様作用との関係について論じている¹³⁾。試薬フミン酸に対し塩素添加量を増大させると、クロロフェノール類は速やかに生成し、その濃度も高かった。同時に、クロロフェノール類は中間生成物であることから、塩素濃度が高いと速やかに消失していき、上述した、添加塩素が多いとエストロゲン様作用が低下に転ずることと対応していることもわかった。このように、添加塩素濃度によって、副生成物の生成速度や濃度が異なり、エストロゲン様作用の強さに影響を与えているものと考えられる。

上記をもとに図-4の結果を解釈してみる。まず、原水中には、微量汚染物質を中心とするエストロゲン様作用を示す物質と、フミン物質を中心とする天然有機物とが存在する。塩素を添加すると、前者のエストロゲン様作用は低下するものが多く、後者のエストロゲン様作用は逆に増大する。通常

の注入塩素濃度（初期残留塩素濃度 $1 \text{ mgCl}_2 / \text{l}$ ）の場合、天然有機物と塩素との反応によってエストロゲン様作用を示す物質が生成しているものの、微量汚染物質が分解されてエストロゲン様作用を失う効果の方が大きく、全体として原水よりもエストロゲン様作用が低下したと考えられる。一方、添加量を増大させると、天然有機物からエストロゲン様作用物質が生成する効果が大きくなり、作用が減少した物質の効果を上回った結果、見かけ上エストロゲン様作用が増大したと推定することができる。この考え方を図示したものが後述する図-6であり、4.4において、他の実験結果もふまえて総合的な考察を行う。

一方、今後は、上記の推定を確認するため、個別の化学物質の回収率測定や、高速液体クロマトグラフなどを用いた分析により濃縮物質の差を明らかにすることが課題である。

4.3 OASIS HLB 調製方法と XAD7HP 調製方法との比較

OASIS HLB 調製方法での塩素処理によるエストロゲン様作用の変化と、XAD7HP 調製方法での変化をまとめたものを図-5に示す。XAD7HP 調製方法を用いた場合、エストロゲン様作用は増大するものとして検出されるが、OASIS HLB 調製方法を用いた場合には低減する結果となる。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。この理由については次節で詳しく考察する。

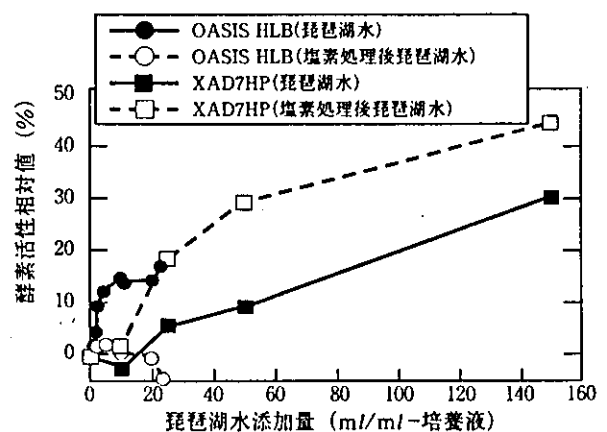


図-5 エストロゲン様作用検出における試料調製法の比較

琵琶湖水: DOC 2.7 mg/l , $E_{260} 0.040$, pH 7.6

4.4 水中エストロゲン様作用の構成成分と水道水の試験法に関する考察

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^{14,15)}と、増大したとする報告¹⁶⁾がみられる。また、個別物質の中にも、ビスフェノール A のように塩素との反応によってエストロゲン様作用が増大する物質があることが報告されている¹⁷⁾。

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。XAD7HP 調製方法を用いた場合、エストロゲン様作用は増大するものとして検出されるが、OASIS HLB 調製方法を用いた場合には低減する結果となる (図-5)。すなわち、水道原水中には、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があり、水道水のエストロゲン様作用にはこれらが混在しているのである。本研究では、調製方法や添加塩素濃度に依存して、エストロゲン様作用の増加・減少いずれも検出した例を示したといえる。

以上の結果をふまえ、水中のエストロゲン様作用の構成成分と塩素による変化に関する概念を図-6に示した。まず、フミン物質を中心とする天然有機物は塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する。一方、微量汚染物質については、ビスフェノール A のように一時的に作用が増大する物質もあるものの、多くの物質は作用が減少すると考えられる。すなわち、琵琶湖水中には、塩素

処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があること、及び、その塩素処理水のエストロゲン様作用とは、塩素によって増大した作用と低減した作用の和として現れるものであることを示している。

本研究で用いた XAD7HP を用いる方法は、フミン物質の濃縮を目的としており溶出液として水酸化ナトリウム溶液を使用している。これにより、図-6のうち作用が増大する物質を主として回収したと推定できる。一方、OASIS HLB を用いる方法では、微量汚染物質の濃縮を目的とし溶出液としてジクロロメタンを使用している。これにより、図-6のうち作用が減少する物質を主として回収したと推定できる。結果として、図-5に示したように、塩素処理による影響が二つの調製法の間で逆に現れるものと考えられる。さらに、OASIS HLB 調製方法においても、浄水処理で通常行われる添加塩素濃度では作用は低減するが、塩素量を増加させると逆に作用が増加する結果となった (図-4)。4.2で述べたように、この現象は、回収された成分の中で、作用が減少した物質よりも増大した物質の量が上回った結果と解釈できる。

以上より、水道水のエストロゲン様作用試験を行おうとする場合には、天然有機物と微量汚染物質とを区別して扱う必要があると指摘できる。琵琶湖水を用いた本実験の場合、原水のエストロゲン様作用試験のためには、検出に必要な水量も少量ですむ OASIS HLB を用いた調製方法を推奨できる。しかし、塩素処理後の水を対象とすると OASIS HLB ではほとんど作用を検出できないことから、XAD7HP を用いる方法が望ましい。琵琶湖水以外の水にも拡張して考えると、結局、対象とする水において、原水中に含まれ塩素との反応で作用が低減するエストロゲン様作用物質の量、及び塩素との反応によって新たにエストロゲン様作用が生成するような前駆物質の量を調べ、二つの方法のいずれか、または両者を使用する必要があることになる。例として、微量汚染物質が少ない清浄な湖沼水・河川水を考えると、フミン物質を中心とする天然有機物を主対象とすればよいことから、原水、塩素処理水ともに XAD7HP を用いる調製方法を使用すればよい。一方、下水処

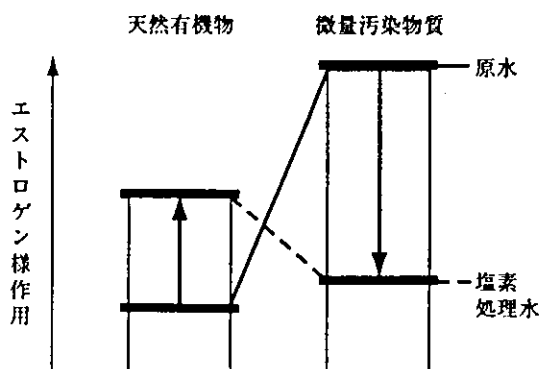


図-6 エストロゲン様作用の構成成分と塩素による変化
↑↓: 塩素による変化

理水の放流などを受け微量汚染物質が比較的多く含まれる都市河川水の場合には、原水においては OASIS HLB を用いた調製方法が適するが、塩素処理水には XAD7HP を用いる調製方法を使用する必要があると推定できる。

ところで、フミン酸、フルボ酸の抽出はこれまで XAD 樹脂を用いる方法が多用されてきたが、今日では特に微量有機物質の抽出を目的として固相抽出用カートリッジと加圧送液システムを用いる方法が普及してきている。フミン物質の抽出にもこのような固相カートリッジを用いることができれば、上記のように水道水の試験に二つの方法 (OASIS HLB 調製法、XAD7HP 調製法) を併用することなく、1種類の固相で行える可能性がある。このために著者らはまず、OASIS HLB に通水した後、水酸化ナトリウム水溶液で溶出させた試料を三次元蛍光分析に供することにより、琵琶湖水及びその塩素処理水中有機物が XAD7HP の場合と同様に回収できると評価した¹⁸⁾。水酸化ナトリウム水溶液による溶出を行った後の OASIS HLB に対しては、ジクロロメタンなどの有機溶媒で溶出させる。この方法によれば、図-6に示した、作用の増大に寄与する成分と低減に寄与する成分の両者を1種類の固相で濃縮できる可能性があり、今後の課題と考えている。

一方、著者らは、塩素処理水のエストロゲン様作用は、残留塩素のない条件であっても、時間とともに次第に増大する特性を有することを示し、「エストロゲン様作用中間体」、「エストロゲン様作用生成能」という成分を想定できることを指摘している¹⁹⁾。本研究結果と総合すると、水道水のエストロゲン様作用の強さを決定する要因としては以下をあげることができる。①塩素注入量、②反応時間、③反応時の pH 及び水温。本研究では、ある水道水のエストロゲン様作用強度を測定するための調製法を扱っているが、その水のエストロゲン様作用の最大値である「エストロゲン様作用生成能」を測定するためには、上記の条件を明らかにしていく必要がある。

さらに、本研究による成果から指摘されるべき他の重要な点は、フミン物質を中心とする天然有機物と塩素とが反応すればエストロゲン様作用が

増大するという点である。活性炭処理後の水に塩素処理を行うことでエストロゲン様作用が新たに生成するという結果も得ている⁴⁾。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という点で、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といえることができる。

したがって、水道水の水質管理上は、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、現在リストアップされているような個別の微量汚染物質の除去に加えて、塩素接触前に、全有機炭素(TOC)、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される有機物の除去も重視すべきであると指摘しうる。

5. 結言

(1) 水道原水の試料調製法について

水道原水のエストロゲン様作用試験のためには、試料水の pH を 2 に調整し、吸着樹脂 OASIS HLB に通水し、ジクロロメタンで溶出した後、エタノールに再溶解する方法が適当であることを示した。また、試料水は 1 l あれば十分アッセイが可能であった。

一方、pH 2 では 17β -エストラジオールの回収率は低下するので注意する必要があることを指摘した。

(2) 水道水のエストロゲン様作用の特性と試料調製法について

琵琶湖水、及び淀川水に OASIS HLB を用いた調製方法によって試料水を作製し、エストロゲン様作用を検出した。また通常の浄水処理で行われる塩素処理では、これらの作用はほとんど消失した。一方、注目すべきことに、塩素添加濃度を増加させたところ、逆にエストロゲン様作用の増大が認められた。

結果を総合し、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質 (主として天然有機物) と減少する物質 (主として微量汚染物質) があり、水道水のエストロゲン様作用にはこれらが混在していることを指摘した。本研究では、調製方法や添加塩素濃度に依存して、エストロゲン様作用の増加・減少いずれも検出した例を示した。結局、

対象水において、原水中に含まれ塩素との反応で作用が低減するエストロゲン様作用物質の量、及び塩素との反応によって新たにエストロゲン様作用が生成するような前駆物質の量とを調べ、二つの方法 (OASIS HLB 調製法、XAD7HP 調製法) を使い分ける必要がある。例として清浄な湖沼水・河川水、及び下水処理水の放流などを受けている都市河川水を取りあげ、その考え方を示した。

このように、水道水のエストロゲン様作用とは、塩素によって増大した作用と低減した作用の和として現れるものである。このうち、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という点では、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といえることができる。したがって、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、現在リストアップされているような個別の微量汚染物質の除去に加えて、塩素接触前に、全有機炭素 (TOC)、過マンガン酸カリウム消費量などとして測定される有機物の除去も重視すべきであることを指摘した。

謝辞 本研究を行う機会を与えていただいた住友恒京都大学名誉教授/ポリテクカレッジ滋賀短大校長に謝意を表す。さらに本研究の一部は、平成12年度厚生科学研究費補助金「内分泌かく乱化学物質の水道水中の挙動と対策等に関する研究」、及び日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (2) 課題番号11650559 (平成11-12年) を受け行ったものであり謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Final Report (1998)
- 2) K. Waller, S. H. Swan, G. DeLorenze, and B. Hopkins, Trihalomethanes in Drinking Water and Spontaneous Abortion, *Epidemiology*, Vol.9, pp.134~140 (1998)
- 3) S. Itoh, H. Ueda, T. Nagasaka, G. Nakanishi and H. Sumitomo, Evaluating Variation of Estrogenic Effect by Drinking Water Chlorination with the MVLN Assay, *Water Science and Technology*, Vol.42, Nos.7~8, pp.61~69 (2000)
- 4) 伊藤禎彦、長坂俊樹、中西 岳、野中 愛、百々生勢、水道水のエストロゲン様作用の特性と制御性に関する研究、*環境工学研究論文集*, Vol.37, pp.333~344 (2000)
- 5) M. Pons, D. Gagne, J. C. Nicolas, M. Mehtai, A New Cellular Model of Response to Estrogens: A Bioluminescent Test to Characterize (Anti) Estrogen Molecules, *BioTechniques*, Vol.9, No.4, pp.450~459 (1990)
- 6) E. M. Thurman and R. L. Malcolm, Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, *Environmental Science and Technology*, Vol.15, No.4, pp.463~466 (1981)
- 7) 環境庁水質保全局水質管理課、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (1998)
- 8) 有機合成化学協会編、*溶剤ポケットブック* (1997)
- 9) 鈴木基之、内海英雄編、*バイオアッセイ 水環境のリスク管理*、講談社サイエンティフィック、p.262 (1998)
- 10) 横田 崇、新井賢一、*遺伝子導入と発現・解析法*、羊土社 (1997)
- 11) P. K. Smith, R. I. Krohm, G. T. Hermanson, A. K. Mullia, F. H. Gratner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*, Vol.150, pp.76~85 (1985)
- 12) A. Soto, C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea, and F. O. Serrano, 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)
- 13) 曾志紅、内分泌攪乱性が疑われるクロロフェノール類の塩素処理水中での挙動に関する研究、*京都大学大学院工学研究科修士論文*、57p. (2001)
- 14) 赤塚 靖、鎌田素之、武田 誠、亀井 翼、眞柄泰基、西原 力、水処理プロセスにおける Estrogen 活性の挙動に関する研究、第34回日本水環境学会年会講演集、p.204 (2000)
- 15) H. Takigami, T. Matsuda, and S. Matsui, Detection of Estrogen-like Activity in Sewage Treatment Process Waters, *Environmental and Sanitary Engineering Research*, Vol.12, No.3, pp.214~219 (1998)
- 16) 矢古字靖子、高橋明宏、東谷 忠、田中宏明、下水処理場内でのエストロゲン様活性の挙動、第34回日本水環境学会年会講演集、p.419 (2000)
- 17) 相澤貴子、大久保慎二、国包章一、胡 建英、ビスフェノール A の塩素処理による反応生成物の同定とエストロゲン様作用の評価、平成11年度厚生科学研究費補助金 内分泌かく乱化学物質の水道水中の挙動と対策に関する調査研究報告書 (2000)
- 18) 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)
- 19) 伊藤禎彦、中西 岳、野中 愛、早坂剛幸、塩素処理にともなうエストロゲン様作用生成能と水道水の試験法に関する実験、*環境衛生工学研究*、Vol.15, No.3, pp.153~158 (2001)

(平成14年 8 月19日受付)

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

Concentration of Humic Substances in Lake Biwa Water and Its Chlorinated Water by Fluorescence Analysis

伊藤 禎彦* 早坂 剛幸* 岡田 朋之*

1. 緒 言

筆者らはこれまでに¹⁾、自然水のエストロゲン様作用とその塩素処理による変化に焦点を当てた検討を行なってきた^{1)~3)}。結果として、水道水のエストロゲン様作用に関して、浄水処理の後なお残存する有機物と塩素が反応すればエストロゲン様作用が新たに生成するという点で、トリハロメタン問題と同じ構造を有することを指摘した²⁾。

また、自然水中には、フミン物質を中心とする天然有機物と、 17β -エストラジオールや4-ノニルフェノールなど微量汚染物質とが含まれるが、塩素処理によってエストロゲン様作用が増大する物質と減少する物質があることを指摘し、調製方法や添加塩素濃度に依存して、そのいずれも検出できることを示した³⁾。すなわち、XAD-7HP樹脂(オルガノ(株)製)を用い水酸化ナトリウムで溶出するという調製方法の場合には、エストロゲン様作用は増大するものとして検出されるが、固相抽出カートリッジOASIS HLB(日本ウォーターズ(株)製)を用いジクロロメタンで溶出するという

調製方法をとった場合には、逆に低減する結果となるのである。

以上より、水道原水および水道水の試料濃縮法としては、図1に示す手順が適当であるとの仮説を設定した。すなわち、

- 1) 試料のpHを2に調整する
- 2) OASIS HLBに通水する
- 3) 水酸化ナトリウムにより溶出する
- 4) ジクロロメタンにより溶出する

本法を用いる場合、まずフミン物質が、XAD-7HPと同様にOASIS HLBによって回収できると好都合である。すなわち、フミン酸、フルボ酸の抽出はこれまでXAD樹脂を用いる方法⁴⁾が多用されてきたが、今日ではとくに微量汚染物質の抽出を目的として固相抽出カートリッジと加圧送液システムを用いる方法が普及してきている。そこで、3次元蛍光分析を用いて、OASIS HLBによる濃縮試料とXAD-7HPによる濃縮試料の比較を行ない、フミン物質を中心とする天然有機物の回収性の評価を行なうこととした。さらに、いくつかのエストロゲン様作用物質を取り上げ、その回収性

* Sadahiko ITOH, Takayuki HAYASAKA, Tomoyuki OKADA 京都大学大学院工学研究科都市社会工学専攻
〒606-8501 京都市左京区吉田本町, Department of Urban Management, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Yoshidahonmachi, Sakyou-ku, Kyoto-shi 606-8501 Japan (E-mail: itoh@urban.env.kyoto-u.ac.jp)

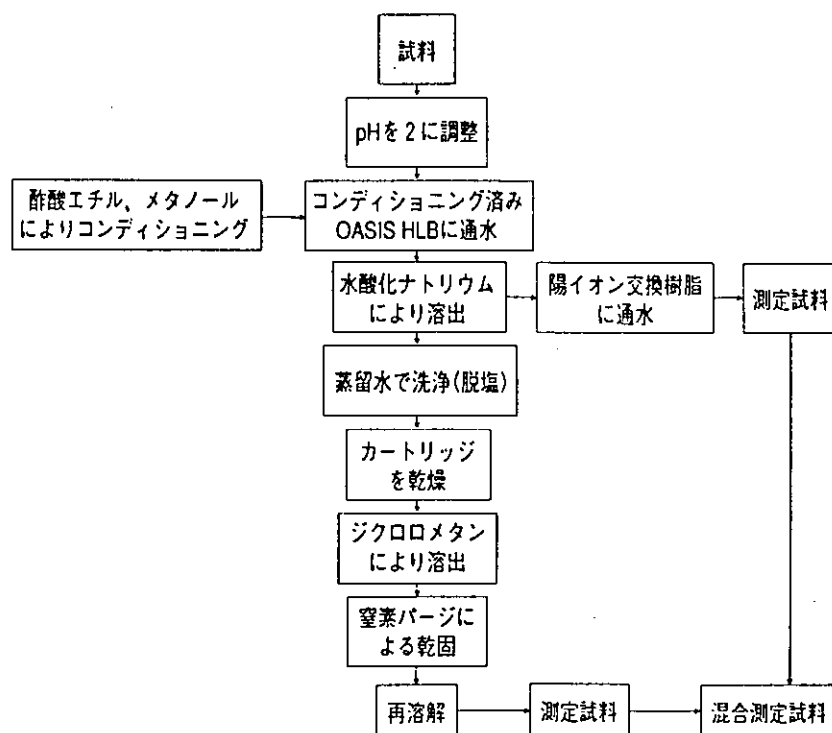


図1 水道原水および水道水のエストロゲン様作用検出のための試料濃縮法

についても検討した。

2. 実験方法

2.1 フミン物質を対象とした濃縮方法

琵琶湖水の濃縮法の概略を示す。①琵琶湖表面流水を採取 (DOC2.1mg/l), ②0.45 μ mメンブランフィルターを用いて加圧ろ過, ③ろ過水4lをpH2に調整後, コンディショニング済みのXAD-7HP樹脂カラム (30mm径, 95mm長, 容積70ml) またはOASIS HLBカートリッジに15ml/minで通水, ④0.1M水酸化ナトリウムで溶出し, XAD-7HPの場合200ml, OASIS HLBの場合10mlを採取, ⑤XAD-7HPからの溶出液 (200ml) をpH2に調整後, XAD-7HP小カラム (1mm径, 8mm長, 容積8ml) に再度通水, ⑥方法⑤の小カラムを0.1M水酸化ナトリウムで溶出し10mlを採取, ⑦方法④で採取したOASIS HLBからの溶出液, および方法⑥で採取した溶出液を, コンディショニング済みの陽イオン交換樹脂 (オルガノ (株)製IR-120B) に通水し最終的に10ml (400倍濃縮) を得た。

また, 琵琶湖水を塩素処理した試料についても

2lを同様の濃縮方法で濃縮し最終的に10ml (200倍濃縮) を得た。

得られた溶液を試料として蛍光分析, DOC測定 (株島津製作所製TOC-5000A使用) を行なった。

2.2 試薬フミン酸を用いた実験

試薬フミン酸溶液 (Sigma-Aldrich社製TOC892mg/l) の400倍希釈溶液, およびその塩素処理水を2.1と同様の方法により濃縮した試料を蛍光分析, DOC測定に供した。

2.3 塩素処理方法

塩素処理後の琵琶湖水の残留塩素濃度が約1.0mg-Cl₂/lとなるように塩素要求量に1.0mgを加えた量の次亜塩素酸ナトリウム溶液を希釈して添加し, 密栓, 20 $^{\circ}$ C, 暗所にて24時間静置した。

2.4 蛍光分析

濃縮した試料を蒸留水でふたたび希釈した後, 石英吸光セルに注入し, 分光蛍光光度計 (株日立製作所製F-4500型) を用いて3次元励起・蛍光スペクトルを測定した。また, ブランクとして蒸留水のスペクトルを測定し, 補正を行なった。同時にDOCを測定し, 回収率を求めた。

2.5 水道水中のエストロゲン様作用物質を考慮した濃縮方法

筆者らはこれまでに, 水道原水を対象としたエストロゲン様作用試験のための試料調製法として「pHを2に調整し, OASIS HLBに通水, ジクロロメタンで溶出する」という方法が適当であることを示した³⁾。そこで, ここでは, 試料を以下の方法で濃縮し, DOCおよび個別物質の回収性について検討を行なった。①試料をpH2に調整後コンディショニング済みのOASIS HLBに10ml/minで通水, ②0.1M水酸化ナトリウムで溶出し10mlを採取, ③水酸化ナトリウム溶出後のカートリッジをジクロロメタンで溶出し, 3ml

を採取，④窒素パーズによりジクロロメタンを乾固後，蒸留水10mlに再溶解，とした。

水酸化ナトリウム，ジクロロメタンそれぞれによる溶出液を測定試料とし，回収率を測定した。なお，個別物質の濃度測定にはELISA法（武田薬品工業(株)製またはIBL社製）を用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 OASIS HLBによる水中フミン物質の抽出性に関する実験結果

塩素未処理水（琵琶湖水）を，XAD-7HP，OASIS HLB両樹脂を用いて，フミン物質を対象とした濃縮方法を2.1，すなわち，水酸化ナトリウムによる溶出によって濃縮試料を作製した。試料の蛍光スペクトルを図2に示す。表1にピーク位置，ピーク強度をまとめて示す。これらと比較すると，3個所の蛍光ピークの出現位置が類似していることがわかる。また，これらのピーク1，2の位置は表2に示すフミン物質の蛍光ピーク位置の報告⁵⁾とも類似している。DOC回収率を表3に示す。XAD-7HPによる濃縮で約20%，OASIS HLBによる濃縮で約25%回収している。

以上をまとめると，従来のXAD-7HPを用いた濃縮法と比して，OASIS HLBを用いた濃縮法で

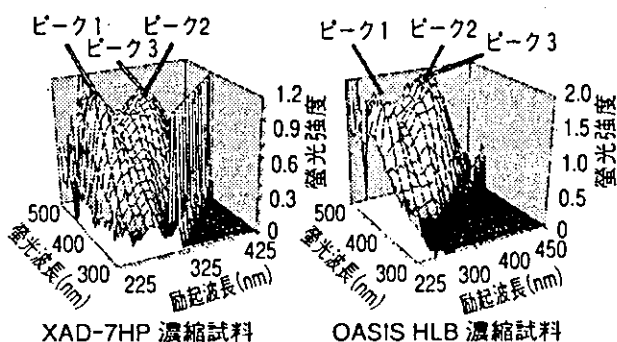


図2 琵琶湖水（塩素未処理水）濃縮試料の3次元励起・蛍光スペクトル

表1 琵琶湖水（塩素未処理水）濃縮試料のピーク位置とピーク強度

	ピーク位置(励起波長/蛍光波長)(nm)	ピーク強度
XAD-7HP濃縮試料	①255/415 ②325/430 ③340/465	①1.22 ②1.08 ③1.04
OASIS HLB濃縮試料	①245/420 ②325/435 ③340/465	①1.95 ②1.91 ③2.02

表2 フミン物質のピーク位置⁵⁾

ピーク位置(励起波長/蛍光波長)(nm)
①250/435 ②335/435

表3 琵琶湖水試料のDOC回収率

	DOC(mg/l)	回収率(%)
琵琶湖水(未濃縮)	2.1	—
XAD-7HP濃縮試料(400倍)	167	20
OASIS HLB濃縮試料(400倍)	207	25

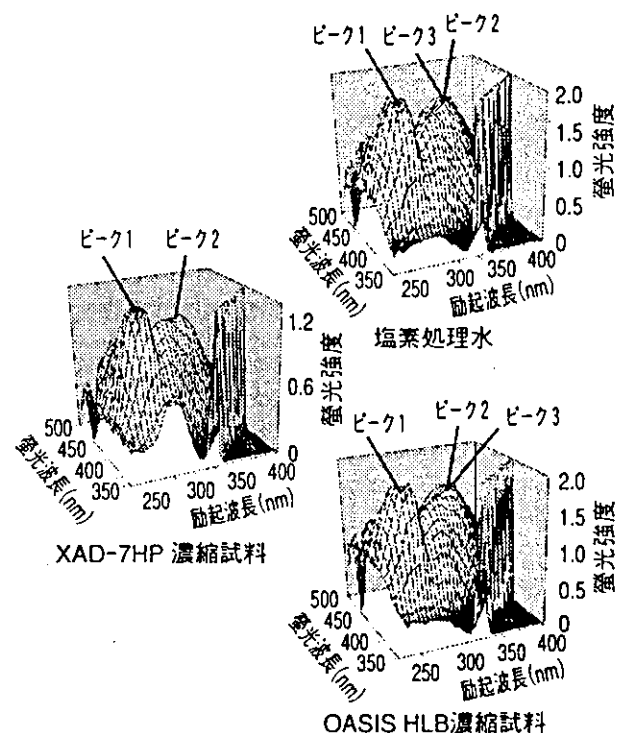


図3 琵琶湖水塩素処理水濃縮試料の3次元励起・蛍光スペクトル

自然水中のフミン物質を回収できていると判断できる。

塩素処理水について同様な濃縮操作を行ない，試料を作製した。試料の蛍光分析の結果を図3に示した。表4にピーク位置，ピーク強度を示す。

この場合，XAD-7HPによる濃縮試料で2個所，OASIS HLBによる濃縮試料と未濃縮試料で3個所のピークを検出したが，両樹脂による濃縮試料および未濃縮試料で蛍光ピーク1，2の出現位置が類似している。塩素

表4 塩素処理水未濃縮・濃縮試料のピーク位置とピーク強度

	ピーク位置(励起波長/蛍光波長)(nm)	ピーク強度
塩素処理水(未濃縮)	①265/370 ②325/405 ③345/465	①2.04 ②1.77 ③1.61
XAD-7HP濃縮試料	①265/370 ②325/405	①1.31 ②1.11
OASIS HLB濃縮試料	①265/365 ②325/415 ③340/460	①1.95 ②1.75 ③1.59

表5 試薬フミン酸濃縮試料のピーク位置とピーク強度

	ピーク位置(励起波長/蛍光波長)(nm)	ピーク強度
塩素未処理水	試薬フミン酸希釈水(未濃縮)	①255/480 ②445/525
	XAD-7HP濃縮水	①255/470 ②445/525
	OASIS HLB濃縮水	①255/480 ②445/525
塩素処理水	塩素処理水(未濃縮)	①250/450
	XAD-7HP濃縮水	①255/445
	OASIS HLB濃縮水	①255/470

未処理のものに比べて蛍光波長が低波長側に移動しているが、これは、スペクトルの形状が測定試料中の物質の存在比によって形成されるものであり、また、分子量の小さいグループは、大きいグループと比べて、蛍光ピークの出現波長が低波長側にみられたとする報告⁶⁾があることから、フミン物質と塩素との反応の結果であると考えられる。DOC回収率は両樹脂とも約25%であった。以上の結果から、塩素処理水を対象とした場合にもOASIS HLBを用いて、XAD-7HPを用いた場合と同様の濃縮ができると考えられる。

一方、試薬フミン酸を用いた実験結果を表5に示した。この場合においても、塩素処理前後ともに、XAD-7HP、OASIS HLB両樹脂による濃縮試料および未濃縮試料のスペクトル形状が類似している。また、DOC回収率は、XAD-7HPによる濃縮で約28%、OASIS HLBによる濃縮で約26%となった。よって、水中フミン物質のみではなく、泥炭由来とされる試薬フミン酸についてもOASIS HLBを用いて回収することができると考えられる。

3.2 エストロゲン様作用物質の回収性に関する実験結果

3.1の実験結果を踏まえ、濃縮法としてOASIS HLBを用い、溶出溶媒として水酸化ナトリウムおよびジクロロメタンを併用する濃縮法を用いて、各エストロゲン様作用物質の回収性を検討した結果を図4に示す。DOCの回収性に関しては

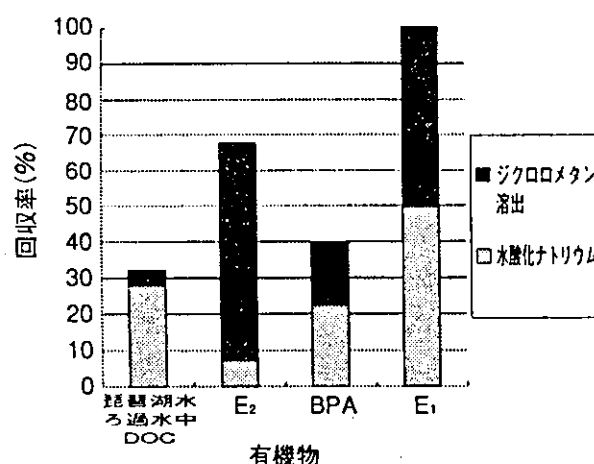


図4 琵琶湖水中DOCおよびエストロゲン様作用物質の回収率

琵琶湖水ろ過水を、個別物質の回収性に関してはそれぞれの物質を蒸留水中に溶解したものを、それぞれ試料として2.5の方法に従って濃縮したものである。

琵琶湖水中DOCは、水酸化ナトリウムによる溶出で27%程度回収でき、続くジクロロメタンによる溶出では数%上乗せする程度にとどまった。17β-エストラジオール(E₂)はおもに第2段階のジクロロメタンによる溶出で回収され、合計で約70%の回収率となった。ビスフェノールA(BPA)やエストロン(E₁)でも同様に、第2段階のジクロロメタンによる溶出で多く回収できるという結果となった。一方、BPAの場合は回収率の合計は40%にとどまったが、水酸化ナトリウ

ムによる加水分解の影響の可能性も否定できない。

4. 結 言

本文では、水道原水および水道水試料のエストロゲン様作用試験のための方法論を確立することをめざし、一連の実験を行なった。得られた結果を以下にまとめる。

- 1) 濃縮試料の3次元励起・蛍光スペクトルを比較することにより、OASIS HLB固相抽出カートリッジを用いた濃縮法で、従来のXAD-7HPを用いた濃縮法と同様に水中フミン物質、泥炭由来の試薬フミン酸、およびそれらの被塩素処理物質を濃縮回収できると考えられた。
- 2) 水酸化ナトリウムおよびジクロロメタンを用いて2段階で溶出を行なう濃縮法によって、エストロゲン作用物質がいかに回収されるかを示した。
- 3) 以上の結果、水道水中のエストロゲン様作用構成成分を考慮した試料濃縮法として、①pHを2に調整、②OASIS HLBに通水、③水酸化ナトリウムで溶出、④ジクロロメタンで溶出、とする方法が適すると考えられる。

水道水のエストロゲン様作用試験のための方法論を確立するに当たっては、濃縮した各物質の相互作用によりエストロゲン様作用強度に影響を及ぼす可能性等も考えられるため、エストロゲン様作用試験を行ないつつ検討する必要がある、今後の課題となる。

—参考文献—

- 1) Itoh, S., Ikeda, D., Nagasaka, T., Nakanishi, G., Sumitomo, H.: Evaluating Variation of Estrogenic Effect by Drinking Water Chlorination with the MVLN Assay, *Water Science and Technology*, 42 (7~8) 61~69 (2000).
- 2) 伊藤禎彦, 長坂俊樹, 中西 岳, 野中 愛, 百々生勢: 水道水のエストロゲン様作用の特性と制御性に関する研究, *環境工学研究論文集*, 37, 333~344 (2000).
- 3) 伊藤禎彦, 中西 岳, 野中 愛, 早坂剛幸: 塩素処理にともなうエストロゲン様作用生成能と水道水の試験法に関する実験, *環境衛生工学研究*, 15 (3) 153~158 (2001).
- 4) Thurman, E. M., Malcolm, R. L.: Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances, *Environmental Science & Technology*, 15 (4) 463~466 (1981).
- 5) 福島武彦, 中島俊之, 今井章雄, 松重一夫, 尾崎則篤: EEMSによる水中溶存有機物の特性解析, *水環境学会誌*, 24 (10) 686~692 (2001).
- 6) 南有田智子, 宮永政光, 野上祐作: 浄化槽の処理水中に残存するCOD物質へのフルボ酸の寄与率の推定, *日本水環境学会年会講演集*, 35, 120 (2001).

(原稿受付日: 2003年 1月16日)

(原稿受理日: 2003年 3月27日)

BEHAVIOR OF ESTROGENIC ACTIVITY OF BIS-PHENOL A BY CHLORINATION

M. Takeda*, M. Kamata**, K. Ohno*, T. Kamei* and Y. Magara*

* Graduate School of Engineering, Hokkaido University, N13, W8, Kita-ku, Sapporo, 060-8628, Japan

** Department of Water Supply Engineering, National Institute of Public Health, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8638, Japan

ABSTRACT

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) such as bis-phenol A (BPA) and nonylphenol (NP) have been frequently detected in environmental water. The objectives of this study are to evaluate the effects of chlorination on estrogenic activity of BPA and its chlorination by-products. To quantify the estrogenic activities, yeast two-hybrid assay was used. For the measurements of BPA and its chlorination by-products, high performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) analysis was used. As a result of chlorination of BPA, monochloro BPA, dichloro BPA, trichloro BPA and tetrachloro BPA were detected in addition to the original BPA. Monochloro BPA, dichloro BPA and trichloro BPA showed higher estrogenic activities than BPA itself. But the estrogenic activities of these compounds decreased and were finally eliminated as the reaction time elapsed. From these results, it is concluded that chlorination of BPA is effective to eliminate the estrogenic activity in the end, although chlorinated BPAs, which have a stronger estrogenic activity than BPA, was formed temporarily.

KEYWORDS

bis-phenol A; estrogenic activity; yeast two hybrid assay; chlorination by-products; LC/MS

INTRODUCTION

EDCs are suspected to cause adverse effects on sexual development and reproductive functions in wildlife (Fry, 1995; Guillette *et al.*, 1995). Although effects of EDCs on humans are not clear, their effects may become apparent in the future. EDCs, especially estrogenic chemicals such as BPA (Krishnan *et al.*, 1993; Perez *et al.*, 1998) and NP (Soto *et al.*, 1991; White *et al.*, 1994), exist in a variety of environmental waters including river waters used as the source waters for water supply (Lee and Peart, 1995; Kunikane *et al.*, 2001). Although chlorination is very effective to protect against microbial risks of drinking water, it has the problem to increase cancer risks posed by trihalomethanes and other disinfection by-products. Therefore, it is important to know whether chlorination can reduce the estrogenic activities of EDCs or increase them. The objectives of this study are to evaluate the behavior of the estrogenic activities induced by BPA and its reaction products as a result of chlorination.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Stock solution for BPA (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) were prepared at 10^{-2} mol/L in methanol and stored at 4°C. Purified substances of 3-ChloroBPA (Cl-BPA), 3,3'-dichloroBPA (diCl-BPA) and 3,3',5-trichloroBPA (triCl-BPA) were generous gift from Dr. Y Terao (University

of Shizuoka, Japan). TetrachloroBPA (tetraCl-BPA) was purchased from TCI (Tokyo Kasei Kogyo Co., LTD., Tokyo, Japan). Stock solution for these chlorinated BPAs were prepared at 10^{-1} mol/L in methanol and stored at 4°C.

Chlorination procedure

To prevent the change of pH during chlorination, BPA stock solution was diluted with phosphate buffer (pH 6.9) just before chlorination. Initial concentration of BPA used for chlorination was 10^{-6} mol/L (228 µg/L). Sodium hypochlorite (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd., Osaka, Japan) was used as the chlorination agent. Chlorination was carried out in stoppered dark glass bottles without headspace. Reaction with chlorine proceeded under the conditions in dark place and room temperature, which was kept around 23°C. Initial free chlorine dose was 1.0 mg/L and residual free chlorine concentration after 24 hr reaction was about 0.4 mg/L. The residual free chlorine was quenched by addition of ascorbic acid at each allocated reaction time.

Extraction of reaction products

BPA and its chlorination by-products were extracted by solid phase extraction method. Sep Pak C18 cartridge (Waters, USA) was pre-washed and conditioned sequentially with 10 mL of dichloromethane, 10 mL of methanol and 20 mL of purified water. 3000 mL (for the measurement of the estrogenic activity) or 100 mL (for LC/MS analysis) of sample waters were introduced into the cartridge. After the introduction of the sample, the cartridge was washed with purified water. Then, the remaining water in the cartridge was removed by passing a nitrogen gas stream. BPA and its chlorination by-products adsorbed onto the cartridge were eluted by passing through with 10 mL of dichloromethane. The eluate was dried under nitrogen gas stream, and recovered extracts were resolved with methanol before analysis. The amount of methanol used was 300 µL for the measurement of estrogenic activity or 100 µL for LC/MS analysis.

LC/MS analysis

BPA and its chlorination by-products were identified and quantified by LC/MS (Agilent1100MSD, USA) analysis. Mass spectrometry was carried out in negative ion mode on quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization interface. The injection volume of sample was 10 µL. The samples were separated on Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA) column (4.6 mm × 30 mm, 3.5µm) at 40°C. The initial mobile phase composition was methanol/water (75%/25%, v/v). This composition was changed as follows: Gradient condition (75% methanol to 85% methanol for 5 min, 85% methanol to 100% methanol for 10 min and kept for another 25 min). A fraction collector (SF-3120, ADVANTEC MFS, Inc., Tokyo, Japan) was used to collect typical products formed as a result of chlorination of BPA. Detection of these products was performed with diode array detector at a wavelength of 220 nm. The injection volume of sample was 25 µL. The samples were separated on Hypersil BDS-C18 (Agilent, USA) column (4.0 mm × 250 mm, 5.0µm) at 40°C. The initial composition was acetonitrile/water (75%/25%, v/v). The composition was changed as follows: Gradient condition (75% acetonitrile to 85% acetonitrile for 30 min, 85% acetonitrile to 100% acetnitrile for 60 min and kept for another 10 min).

Yeast two-hybrid assay

The estrogenic activities of sample waters before and after chlorination were examined with yeast two-hybrid assay (Nishikawa *et al.*, 1999). This assay is based on the ligand-dependent interaction of two-proteins, a hormone receptor and a co-activator, and hormonal activity is measured by the

level of β -galactosidase activity. The yeast cells were pre-incubated overnight at 30°C in SD medium. The culture in micro test tube was then mixed with a methanol solution of test samples and incubated for 4 hr at 30°C. Absorbance at 595 nm was read on micro plate reader (Model 550, BIO RAD, USA) for the determination of yeast cell density at the end of 4 hr incubation. Then washing by centrifugation, the cells were digested enzymatically by incubation with 1 mg/mL Zymolyase 20T (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA) at 37°C for 15 min. The lysate was mixed with 4 mg/mL *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyrnoside (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and reacted at 30°C for 30 min before the reaction was stopped by the addition of 1 M Na₂CO₃. Absorbances at 420 nm for the measurement of β -galactosidase and 570 nm for light scattering by impurity were read to estimate estrogenic activity. The results were evaluated as relative estrogenic activity (estrogenic activity of the samples to that of maximum 17 β -Estradiol used as positive control).

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of chlorination time on the estrogenic activity of BPA

Fig.1 shows the estrogenic activities before chlorination and after 45 min chlorination of BPA. The estrogenic activity after 45 min chlorination increased compared with that before chlorination at concentration fold of 1000 (c.f.1000). This result may suggest that chlorination of BPA for 45 min result in the formation of estrogenic by-products that have greater estrogenic activities than the original BPA. In contrast, the estrogenic activity after 45 min chlorination decreased in comparison with that before chlorination at concentration fold of 10000 (c.f.10000). The sample after 45 min chlorination at c.f.10000 caused the inhibition of yeast proliferation (data not shown). This result may suggest that chlorination by-products have toxic effects to the yeast at c.f.10000, therefore, apparent decrease of estrogenic activity was observed. Accordingly, this result was not appropriate case to evaluate the estrogenic activity. The change of estrogenic activity with chlorination time is presented in Fig.2. The estrogenic activity increased temporarily after 45 min or 90 min chlorination at c.f.1000, then decreased as the reaction time elapsed, and was finally eliminated after 720 min chlorination at c.f.1000 and c.f.10000.

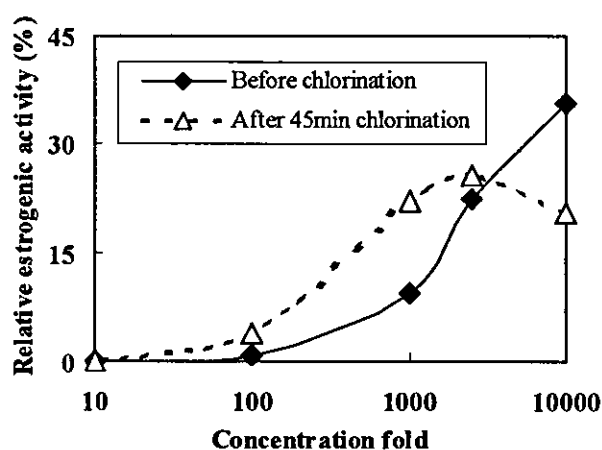


Fig.1 The estrogenic activity before and after 45 min chlorination of BPA

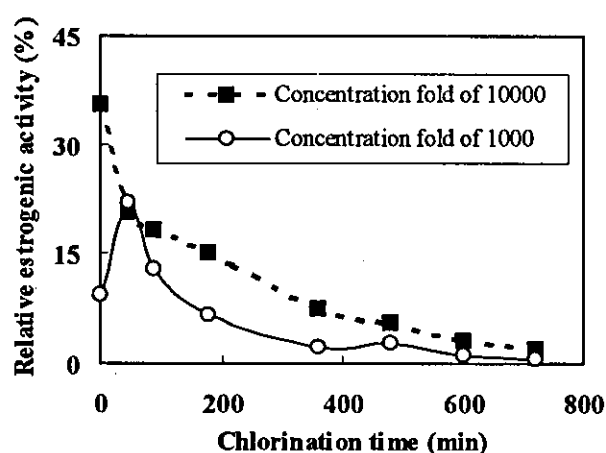


Fig.2 Effects of chlorination time on the decrease of estrogenic activity induced by BPA