

E. 今後の課題

EGTA 添加中に、試験片表面だけでなく流出水中の細菌数も減少したことから、一時的な添加だけではなく、通水開始当初から EGTA を添加した場合についても検討する必要がある。また、生物膜中の細菌種については、API キットではすべて陰性反応を示し同定不能となる場合があったことから、遺伝子解析による細菌種の同定を併用することが望ましい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 岩田和隆, 島崎大, 国包章一 (2008) 配水過程における微生物再増殖と細菌種に及ぼす管材質及び残留塩素の影響, 第 59 回全国水道研究発表会講演集, 490-491.

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

モデルシミュレーションによる配水過程における
微生物再増殖性および汚染事故発生時の健康リスク評価

研究分担者 船水 尚行
研究協力者 伊藤 竜生

モデルシミュレーションによる配水過程における微生物再増殖性 および汚染事故発生時の健康リスク評価

研究分担者 北海道大学大学院工学研究科 船水 尚行
研究協力者 北海道大学大学院工学研究科 伊藤 竜生

研究要旨

研究目的

残留塩素に依存しない系、またはできるだけ低濃度にする系において、リスク値を一定以下にするための方策（浄水系の運転管理法、給配水系の構成と改善方法）をこれまでに開発してきた原水水質＋処理系＋消毒系＋配水池＋配水管網＋給水系を包括的に表現し、健康リスクを確率的に推算するシミュレーションモデルを用いて検討する。2008 年度はシミュレーションによる浄水水質と微生物再増殖の関係の把握による検討を目的とした。すなわち、残留塩素濃度、原水中菌数、有機物と微生物再増殖の関係を検討した。

研究方法

原水水質（過マンガン酸カリウム消費量、大腸菌群数）と浄水場出口での残留塩素濃度を入力条件とし、配水管網内と高架水槽における塩素消費、微生物再増殖を計算するシミュレーションモデルを用い、水道統計から定めた規模の大きな配水区を対象に計算を行った。

結果

まず始めに、微生物濃度の経日変化について検討した。その結果、今回対象とした管網では、約 15 日程度で微生物濃度は定常に達した（計算初期値として、管網内の微生物量をゼロとした）。シミュレーションでは浄水の残留塩素濃度をゼロから 2mg/L の範囲で変化させて計算を行ったが、残留塩素濃度が極めて低レベルの場合（0.005mg/L 以下）にのみ、微生物の増殖が見られた。

次に定常状態に達した後の水道水中微生物濃度について管網内分布の特徴を検討した結果、管網内の比較的上流部で微生物濃度が最大となっているという計算結果であった。また、配水池から最初のパイプにおける微生物濃度の増加が著しくなっていた。下流部での微生物濃度変化幅は相対的に小さい結果であった。

次に水道水中微生物濃度に与える原水中有機物濃度の影響を調べた。その結果、有機物濃度が高いほど、水中微生物濃度が高く、かつ濃度のピークが流下過程の早い段階で生じていることがわかった。

次に、塩素注入率との関係を検討した。管網内で微生物の増殖がみられるような残留塩素濃度が低レベルの場合には、残留塩素濃度の大小が微生物濃度に大きな影響を与えていない結果となった。

最後に、原水中微生物濃度を約 1桁変化させた場合の結果を比較した。その結果、原水中微生物濃度は管網内の微生物濃度にほとんど影響を与えていないという計算結果であった。

結論

規模の大きな配水区を対象とし、これまでに開発してきた、「原水水質から浄水処理、配水池、管

網、高架水槽全体を対象として扱い、管網内および高架水槽内の微生物濃度をシミュレーションするモデル」を用いて、原水中有機物濃度、微生物濃度ならびに、浄水中残留塩素濃度が管網内の微生物濃度に与える影響について検討した。その結果、残留塩素濃度が管網内の微生物増殖を決定していることが示された。

A 研究目的(3年間の研究構想と2008年度の目的の関係)

本研究では、次のQuestionを用意している:

残留塩素に依存しない系、またはできるだけ低濃度にする系において、リスク値を一定以下にするためには

- (1) 浄水系の運転管理法はどのようにすればよいか?
- (2) 給配水系は現状のままよいか?
- (3) 改善の方策は?

そして、上記の Question に対して答えを用意するためには、

- (1) 原水+浄水系+配水系+給水系全体を対象とした検討
- (2) システム要素に関する検討

が必要となる。

系全体を対象とした検討では次の項目が必要となる。

(1-1)シミュレーションモデルの検証

アニュラーリアクターによる実験結果との照合。昨年度まで実施した実験に加え、異なる AOC、残留塩素濃度、消毒レベルの場合も検討(データの入手の可能性?、もし可能ならば)

(1-2)浄水水質と微生物再増殖の関係の把握:シミュレーションモデルによる検討

検討要素としては

- ① 残留塩素濃度、浄水中菌数、AOC と微生物再増殖の関係
 - ② 配水区の大きさ、高架水槽の有無
- があげられる。

(1-3)浄水効率の変動特性と微生物再増殖の関係の把握:シミュレーションモデルによる検討

ここでは、運転管理(処理効率変動の分散)と微生物再増殖の関係の検討が主となる。すなわち、原水水質の変動特性+浄水効率(生物、物理、化学処理+消毒)の変動特性と浄水の AOC、病原微生物濃度、従属栄養細菌濃度の変動特性の関係が入力条件となる。

(1-4)消毒レベル変動(不活化の平均値と分散)と微生物再増殖の関係の把握

ここでは、運転管理のうち、消毒効率の変動に注目し、消毒効率の一時的な低下に対する配水管網内微生物増殖の関係を検討する。

(1-5)類型化した3つの対象について、長期間シミュレーションによる

- ① 浄水水質と健康リスクの関係の把握
- ② 浄水効率変動特性と健康リスクの関係
- ③ 消毒レベルと健康リスクの関係
- ④ 上記項目について、効果的な管理シナリオの検討(処理システムの管理、管路洗浄頻度)

上記のシミュレーションを可能とするために必要なシステム要素に関する検討では、以下の項目が必要となる。

(2-1) 処理系における水質事故、配水・給水系における事故の生起確率の表現法の検討

原水水質変動特性、処理効率変動特性を確率分布による表現するが、この中に事故の発生確率も加えることが必要となる。

(2-2) 消毒副生成物（化学物質）による発ガンリスクと病原微生物によるリスクの同時表現法の検討

健康リスク評価について、病原微生物と化学物質によるものとし、DALY による評価を行うため。

(2-3) 消毒剤と副生成物

各種消毒剤について、その副生成物と化学的な健康リスクとの関係を整理する。

上記の項目のうち、2008 年度はシミュレーションによる浄水水質と微生物再増殖の関係の把握による検討を目的とした。すなわち、残留塩素濃度、原水中菌数、有機物と微生物再増殖の関係を検討した。

B 研究方法:

(1)シミュレーションモデル

先の研究において、図-1のように原水→浄水処理→消毒→配水池→配水管網→(高架水槽)→水道水までを一括して扱うシミュレーションモデルを構築した。基本的な構造は原水水質(過マンガン酸カリウム消費量、大腸菌群数)と浄水場出口での残留塩素濃度を入力条件とし、配水管網と高架水槽における塩素消費、微生物再増殖を計算することにより、給水栓における残留塩素濃度、微生物カウントを推算するものである。配水・給水系のパイプやタンクにおける微生物の増殖、塩素消費は図-2のように液中と壁面の2者についてモデル化している。

また、入手可能な水質データの中から、有機物の指標として過マンガン酸カリウム消費量、病原微生物の指標として大腸菌群数をとりあげ、統計データをもとに処理系における除去効率とその変動特性を定めている。原水水質の変動や処理効率の変動については、変動の確率分布を与えることにより長期間のシミュレーションができるように工夫している。

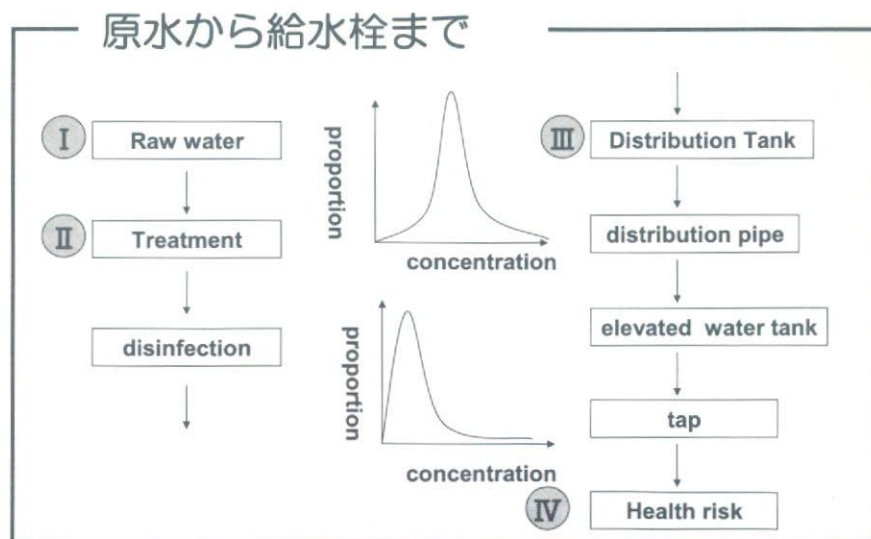
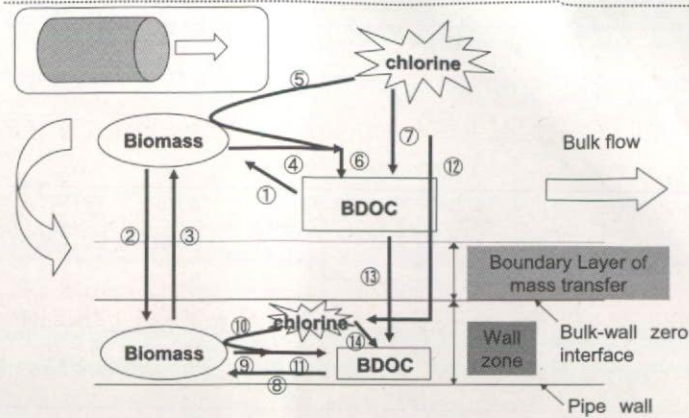


図-1 シミュレーションモデルの概要

給配水系のモデル



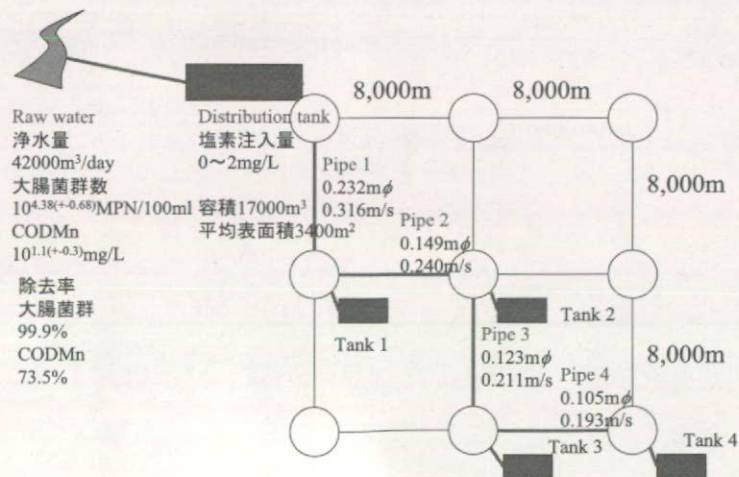
図一 給配水系における微生物の増殖，塩素消費のモデル

(2) シミュレーション対象の設定

水道統計にある浄水量，大腸菌群数，過マンガン酸カリウム消費量を指標とした主成分分析により，シミュレーション対象の規模を3種類に分類した．類型化されたシステム，原水水質変動特性は表一のように整理されている．

表一 シミュレーション対象の類型化結果

類型	主要処理方式	平均浄水量 m ³ /day	原水水質変動特性(上段:平均値, 下段:標準偏差)	
			過マンガン酸消費量	大腸菌群数
I	急速ろ過	40,000	平均: $10^{1.09}$ 標準偏差: $10^{0.31}$	平均: $10^{4.36}$ 標準偏差: $10^{0.65}$
II	急速ろ過	3,000	平均: $10^{0.61}$ 標準偏差: $10^{0.35}$	平均: $10^{1.95}$ 標準偏差: $10^{1.85}$
III	消毒のみ	1,300	平均: $10^{-0.25}$ 標準偏差: $10^{0.38}$	平均: $10^{-1.43}$ 標準偏差: $10^{1.15}$



図一 三 シミュレーション対象

今年度のシミュレーションでは、表一1の類型I、すなわち規模の大きな配水区を対象とした。規模ごとに配水区の大きさも類型化の段階で調べており、そのデータをもとに図一3の規模の配水管網を用意した。

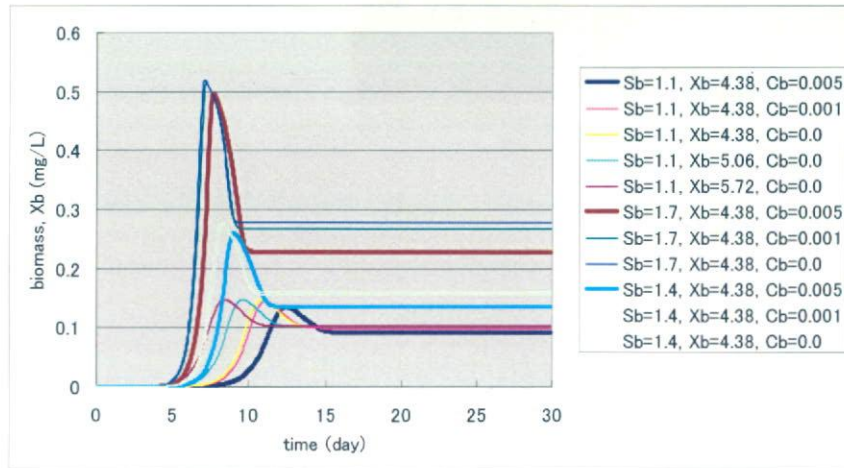
C, D 研究結果と考察

以下、シミュレーション結果と考察を記す。

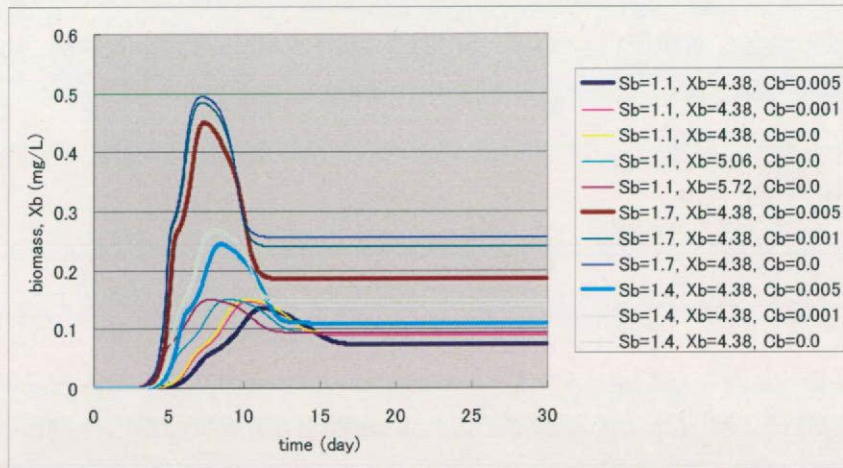
(1) 経日変化

図一4にパイプ4における水道水中微生物濃度の経日変化のシミュレーション結果を示す。シミュレーションでは、0日の初期状態において、壁面の微生物量をゼロとし、何日程度で管網全体が定常状態に達するか計算した結果である。図からわかるように、一辺1.6km程度の管網では遅くとも約15日程度で定常状態（微生物濃度の変化がなくなる状態）に達することがわかる。シミュレーションでは浄水の残留塩素濃度をゼロから2mg/Lの範囲で変化させて計算を行ったが、図に示すように残留塩素濃度が極めて低レベルの場合（0.005mg/L以下）にのみ、微生物の増殖が見られている（図中のCbが設定浄水中残留塩素濃度値を示す）。計算結果を示していないが、パイプ4における残留塩素濃度は0.0035mg/L（浄水中で0.005mg/Lの場合）となっている。有機物濃度（図中のSb）や浄水中残存微生物濃度（図中Xb）の違いは計算結果に大きな違いを与えておらず、残留塩素濃度が低いほど、水道水中微生物濃度が高く、かつ、定常に達するまでの時間が短くなっている。

図一5には、高架水槽4における微生物濃度の経日変化の計算結果を示した。パイプ内と同様に、定常に達するまでの時間は約15日程度となっている。この場合にも塩素濃度が微生物濃度に大きく影響している。



図一4 パイプ4における水道水中微生物濃度の経日変化



図一5 高架水槽4における水道水中微生物濃度の経日変化

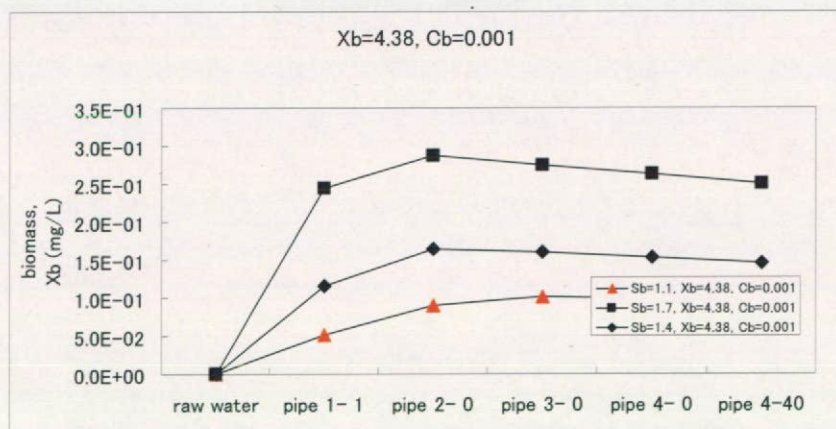
(2) 有機物濃度の影響

次に定常状態に達した後の水道水中微生物について、有機物濃度の影響を調べた結果を図一6に示す。はじめに、配水管網内の場所と微生物濃度の関係についてみてみると、パイプ内ではパイプ2で、高架水槽については高架水槽1において、微生物濃度が最大となっている。また、配水池→パイプ1への流下過程で微生物濃度の増加が著しく、かつ、下流での変化幅が小さい。

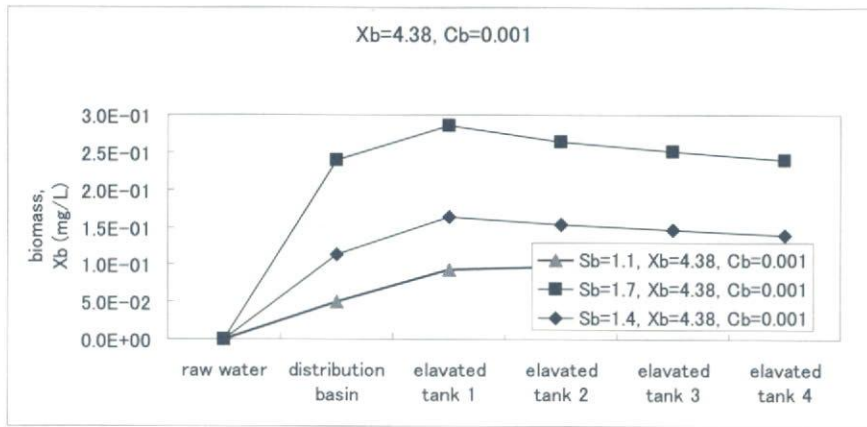
有機物濃度の微生物濃度への影響を見てみると、有機物濃度が高いほど、微生物濃度が高く、かつ濃度のピークが流下過程の早い段階で生じていることがわかる。

パイプならびに高架水槽中の微生物濃度は水中での微生物の有機物を用いた増殖、壁面への付着・脱着のバランス関係によって決まっていることから考えると、水道水中の微生物濃度は管網上流部の水中における有機物を用いた微生物の増殖により決定され、下流部では壁面への付着による濃度減少がわずかに生じていると判断される。

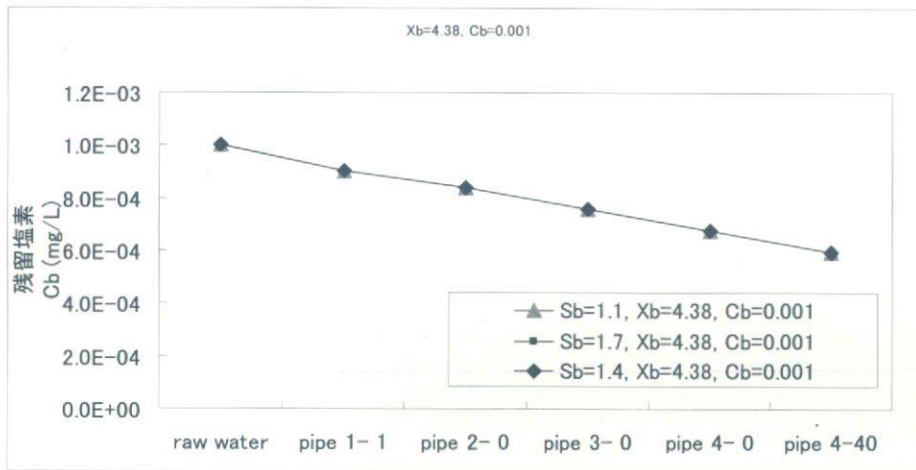
参考までに、残留塩素濃度が管網内でどのように変化しているかを示す計算結果を図一7に示す。現段階のモデルでは、塩素濃度は一次反応で低下するという簡単なモデルを用いているため、有機物濃度による残留塩素濃度低下の差をうまく計算できていない。この点は改良が必要である。



図一6(a) 定常後の水道水中微生物濃度と有機物濃度との関係 (パイプ内)



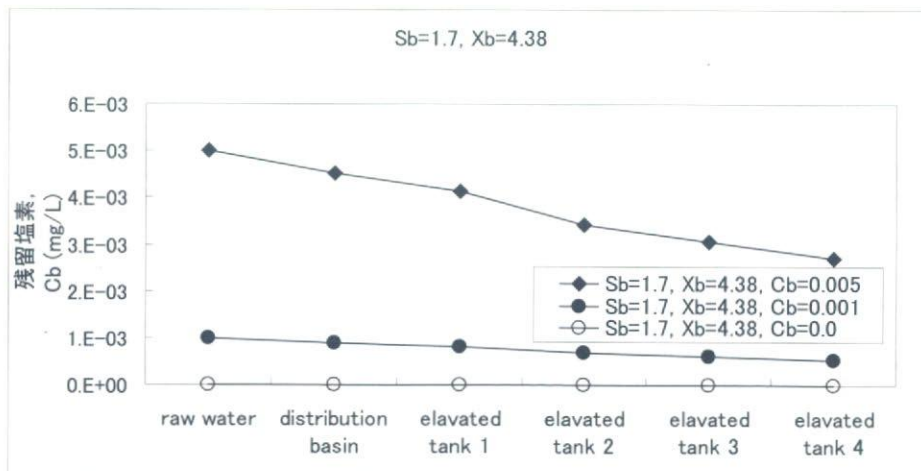
図一6 (b) 定常後の水道水中微生物濃度と有機物濃度との関係 (高架水槽内)



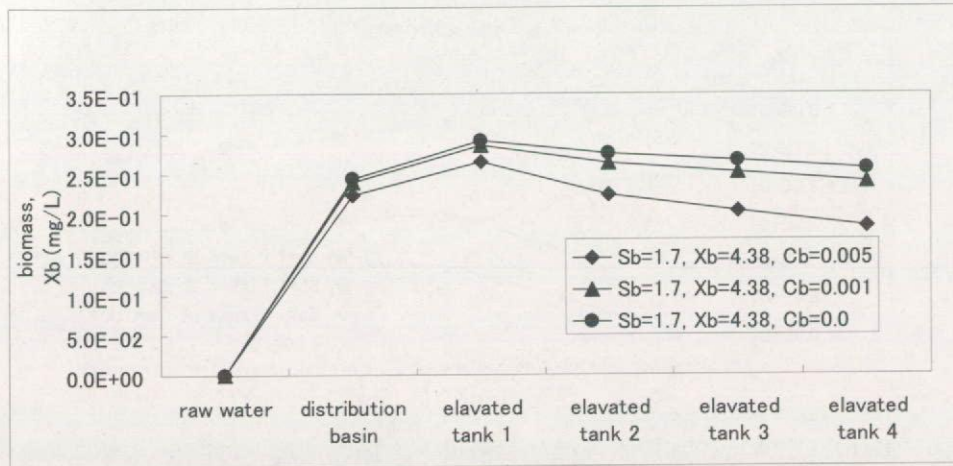
図一7 管網内の残留塩素濃度の変化 (有機物濃度を变化させた場合の比較)

(3) 残留塩素濃度の影響

次に浄水中残留塩素濃度を变化させた場合の結果を示す. まず, 管網内での残留塩素濃度の変化を図一8に示す. このような状態での, 水中微生物濃度の管網内の分布は図一9のように計算された. 微生物の増殖がみられるような残留塩素濃度が低レベルの場合には, 図の結果のように残留塩素濃度の大小が微生物濃度に大きな影響を与えていない.



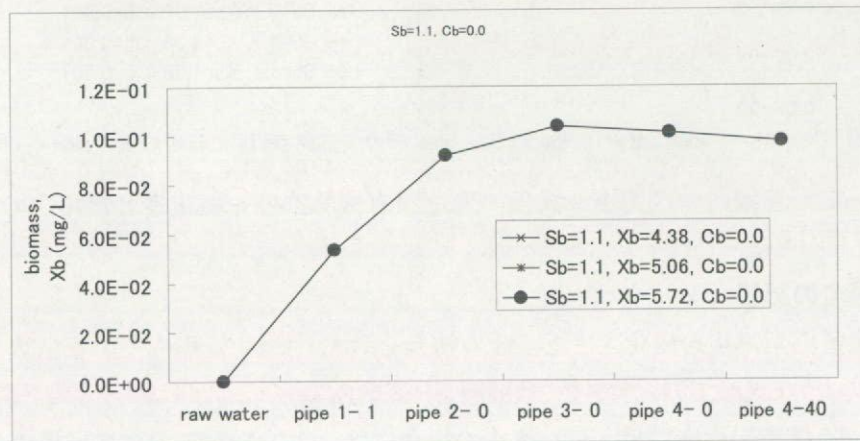
図一8 管網内での残留塩素濃度の変化 (初期残留塩素濃度が異なる場合の比較)



図一 9 管網内での微生物濃度の変化 ((初期残留塩素濃度が異なる場合の比較))

(4) 初期微生物濃度の影響

原水中の微生物濃度を $10^{4.38} \sim 10^{5.72}$ と約 1 桁変化させた場合について、管網内の水中微生物濃度の変化の計算結果を図一10に示す。図の結果から、原水中微生物濃度は管網内の微生物濃度にほとんど影響を与えていない。



図一 1 0 管網内での微生物濃度変化 (原水中微生物濃度が異なる場合の比較)

E. 結論と今後の課題

規模の大きな配水区を対象とし、これまでに開発してきた、「原水水質から浄水処理、配水池、管網、高架水槽全体を対象として扱い、管網内および高架水槽内の微生物濃度をシミュレーションするモデル」を用いて、原水中有機物濃度、微生物濃度ならびに、浄水中残留塩素濃度が管網内の微生物濃度に与える影響について検討した。その結果、残留塩素濃度が管網内の微生物増殖を決定していることが示された。すなわち、管網内における残留塩素濃度変化の計算精度がシミュレーションの可否を決定することになると考えられる。

この意味から、シミュレーション結果に大きな影響を与える、(1)残留塩素の減少速度係数の影響の検討、(2)残留塩素濃度減少に有機物の影響の考慮が必要である。また、残留塩素濃度変化計算の妥当性の検証も求められる。

これらの計算上の課題を解決することにより、有機物、配水区規模に応じた適正な塩素注入率の決定が行えると考えられる。

F 健康危険情報

(該当なし)

G 研究発表

1. 論文発表
(該当なし)
2. 学会発表
(該当なし)

H 知的財産権の出願・登録状況

(該当無し)

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

(該当なし)

2. 学会発表

- 1) 岩田和隆, 島崎大, 国包章一 (2008) 配水過程における微生物再増殖と細菌種に及ぼす管材質及び残留塩素の影響, 第 59 回全国水道研究発表会講演集, 490-491.
- 2) Sadahiko Itoh, Yuki Yoshimura, Tomoyuki Okada (2008) Components of estrogenic effect in chlorinated drinking water, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on Environmental Engineering (CD-ROM).
- 3) Yumiko Ohkouchi, Ly Bich Thuy, Sadahiko Itoh (2008) Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on Environmental Engineering (CD-ROM).
- 4) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2008) 従属栄養細菌の迅速定量を目的としたプロモデオキシウリジンラベル化 DNA の定量方法に関する基礎的検討, 環境衛生工学研究, Vol. 22, No. 3, pp.124-27.
- 5) Kasuga, I., Saito, H., Kurisu, F. and Furumai, H. (2008) Characterization of actively respiring bacterial community responding to organic matter in biological drinking water treatment, The 12th International Symposium on Microbial Ecology, PO02-0151.
- 6) 中垣宏隆, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2009) 高度浄水処理用生物活性炭へのアンモニア酸化細菌及び古細菌の定着過程, 第 43 回日本水環境学会年会講演要旨集 (発表予定).
- 7) 大瀧雅寛, 溝添倫子, 林紗綾佳 (2009) 紫外線および二酸化塩素処理における大腸菌の細胞損傷レベルの測定, 第 60 回全国水道研究発表会講演集 (発表予定).

研究成果の刊行物・別刷

(8-5) 配水過程における微生物再増殖に対する管材質及び残留塩素の影響

○岩田 和隆(国立保健医療科学院) 島崎 大(国立保健医療科学院)
 国包 章一(国立保健医療科学院)

1. はじめに

水道法では、微生物学的な安全確保の視点から塩素消毒と残留塩素保持が義務づけられているが、その一方で塩素消毒剤由来の異臭味や消毒副生成物等により、過剰注入とならないよう、塩素剤の注入率を低減することも求められている。しかし、残留塩素濃度を下げることによって、消毒効果が弱まり、配水過程における微生物再増殖のポテンシャルは増大する。そのため、残留塩素濃度の低減を図ると同時に、微生物学的に安定した水質の水道水を提供する必要がある。本研究では、異なる管材質における微生物再増殖性の相違について実験的検討を行うとともに、グラム染色法および API キット（日本ビオメリュール（株））を用いて生物膜中の細菌種の簡易同定を行った。

2. 実験方法

生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、管路内における微生物の付着及び増殖を疑似的に再現した。試験片の材質は鋳鉄、SUS304、コンクリート被覆ポリカーボネイトの3種類とし、順に系統1~3とした。

原水は国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムを添加することにより、各系統の試料水の遊離塩素濃度が 0.0mg/L となるように調整し、36 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した（表-1）。ただし、通水開始 28 日後は、全系統において一時的に遊離塩素濃度を 0.7mg/L 前後となるように次亜塩素酸ナトリウム（以下、次亜という。）を添加し（表-2）、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べた。流入量は 10mL/分に設定し、滞留時間を約 100 分（容積約 1L）とした。回転ドラムを 180rpm の速度で回転させ、流速 50cm/秒、内径 200mm に相当する配水管内の状況を再現した。各試料水の水温は 22℃前後に維持した。流入水、流出水及び試験片表面に付着した微生物を週 2 回の間隔でサンプリングし、各系統の流入水、流出水および試験片表面における一般細菌数と従属栄養細菌数を測定した。

また、菌種を同定するにあたり、試験片表面試料から 1 白金耳を採取し、普通寒天培地に 37℃で 3~4 日間培養後、独立したコロニーを釣菌し、再び普通寒天培地に 37℃で 2~3 日間培養し増菌させた後、増菌させた分離株各々についてパーミー法によるグラム染色を行った。そこでグラム陰性桿菌と判定できた分離株について、グラム陰性桿菌の同定が可能な API20E 及び API20NE を用いて菌種の簡易同定を行った。

3. 結果と考察

水温以外の水質項目については使用した水道水の水質によるが、AOC 濃度は 240 μg/L と国内の他の測定例と比べて高く、微生物学的安定性が低い（微生物の再増殖性が高い）水質であったといえる。系統 2 及び 3 においては、次亜添加後、設定した遊離残留塩素濃度に近い濃度となったが、系統 1 においては、試験片から多量の鉄が溶出するとともに、試験片表面が激しく酸化され、次亜添化中も遊離残留塩素濃度は 0.04mg/L までしか上昇せず、消毒効果が損なわれていた可能性が高い。

表-1 流入水の水質（平均値）

水温	20.9℃
pH	7.34
TOC	0.78mg/L
AOC	240 μg/L
NO ₃ -N	1.9mg/L
NO ₂ -N	0.003mg/L
PO ₄	0.13mg/L

流出水及び試験片表面においては、材質にかかわらず、一般細菌、従属栄養細菌とも15日前後で定常期に達したと考えられる。定常期における試験片表面の一般細菌数、従属栄養細菌数は、いずれも系統1が系統2及び3よりも1桁前後高かった(図-1、2)。一方、流出水の一般細菌数、従属栄養細菌数は、いずれも材質の違いによる細菌数の差は小さかった。次亜を添加すると、系統1の試験片表面を除き、流出水及び試験片表面の細菌数は減少した。次亜の添加を終了後、一般細菌数は2日程度で定常期まで回復したが、従属栄養細菌は7日程度要し、一般細菌の方が従属栄養細菌よりも塩素濃度の変動に対する応答が鋭敏であった。

同定された細菌種は、材質の違いにより異なっていた(表-3)。また、系統2及び3については、次亜添加前はグラム陰性菌のみであったが、次亜添加中はグラム陽性菌の割合が90~100%を占め、同定された細菌種も添加前から変化した。次亜添加終了後は、グラム陰性菌の割合が83~90%まで回復し、次亜添加前と同一の細菌種が再び同定された。

表-2 各系統の遊離残留塩素濃度(平均値)

経過日数	系統1	系統2	系統3
0~27日後(次亜なし)	0.01	0.00	0.00
27~28日後(次亜あり)	0.04	0.78	0.76
28~35日後(次亜なし)	0.01	0.01	0.00

(単位: mg/L)

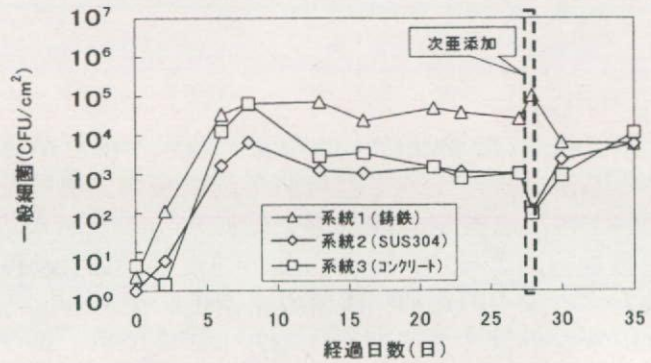


図-1 一般細菌数経日変化(試験片表面)

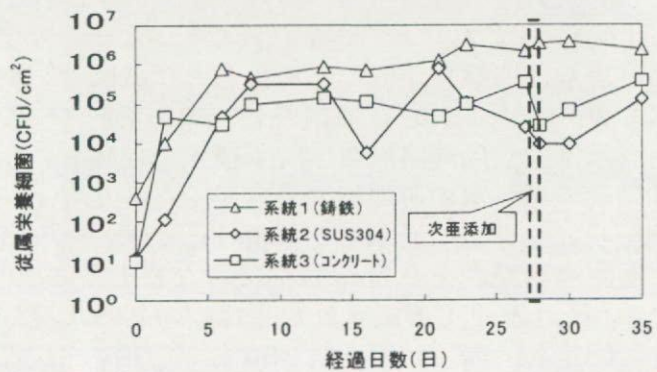


図-2 従属栄養細菌数経日変化(試験片表面)

表-3 試験片表面の細菌種(API20NE)

系統	21日後(次亜なし)	27日後(次亜なし)	28日後(次亜あり)	30日後(次亜なし)
1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pasteurella spp</i>	<i>Pasteurella spp</i>	<i>Pasteurella spp</i>
2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	グラム陽性菌のため同定不能	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

4. まとめ

- 試験片表面上の細菌数は材質が铸铁の場合に多く、定常期の細菌数は他の材質よりも1桁前後高かった。一方、流出水中の細菌数はいずれの材質も同程度であった。
- 試験片表面上の細菌群は、材質や次亜の添加による影響を受け、グラム陽性菌及び陰性菌の割合や、同定された細菌種について相違が見られた。

【参考文献】高井ら、配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響、日本水道協会、第58回全国水道研究発表会講演集、pp.616-617、2007

Components of Estrogenic Effect in Chlorinated Drinking Water

*Sadahiko Itoh¹, Yuki Yoshimura², and Tomoyuki Okada³

¹Department of Urban Management, Kyoto University, C-1 Kyotodaigaku Katsura, Nishikyo, Kyoto 615-8540, Japan, ²Department of Water Works, OSAKA Prefectural Government, 2-30-18, Ohba, Moriguchi 570-0009, Japan, ³Kyoto Municipal Government, 488, Honnojima-cho, Nakagyo, Kyoto 604-8571, Japan

Key words: chlorination; disinfection by-products; endocrine disrupting chemicals; estrogenic effect; MVLN assay.

ABSTRACT

The estrogenic effect of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in chlorinated water was investigated by a bioassay using human breast tumor cells. Coagulation and activated carbon treatment decreased the estrogenic effect of Lake Biwa water, but chlorination increased the estrogenic effect of Lake Biwa water and treated waters. It should be emphasized that this phenomenon is similar to the formation of trihalomethanes (THMs) during the water treatment process because natural organic matters (NOMs) are major precursors for both the estrogenic effect and THMs. It was found that organic matters of which the estrogenic effect increases or decreases after chlorination are present in natural water. The detection of the increase or decrease upon chlorination is dependent on the sample preparation procedure. The estrogenic effect of the chlorinated water increased even without the presence of residual chlorine. The components, which are called the "estrogenic effect formation potential" and the "estrogenic effect intermediates", are defined in a chlorinated humic acid solution. The formation of these components is similar to the process for THM formation. Therefore, NOMs in addition to suspected EDCs should be removed before chlorination.

INTRODUCTION

Chlorination of drinking water forms by-products such as trihalomethanes (THMs) during

¹Professor

the inactivation of microorganisms by the reaction of chlorine with naturally occurring organic matter in the source water. Many epidemiology studies have been carried out to investigate the possible association between exposure to these by-products and incidence of human cancer (Zavaleta *et al.*, 1999; Villanueva *et al.*, 2001). Results from these studies suggest there may be a slightly increased risk of bladder, colon, and rectal cancer after a long-term exposure to chlorinated drinking water. It has been also pointed out that there is insufficient evidence to associate a cancer risk with the consumption of chlorinated drinking water.

The potential risk of endocrine disrupting chemicals (EDCs) has been given the greatest attention from the public since the late 1990s. Thus, much of concern has focused on the possibility of adverse reproductive and developmental effects associated with disinfection by-products (DBPs) in addition to their carcinogenicity.

Hundreds of compounds are currently listed as suspected EDCs. However, the final report of the Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC, 1998) has recommended that in addition to these single compounds, six kinds of mixtures be subjected to the assays to evaluate their potential for endocrine disruption. One of these mixtures includes DBPs in drinking water.

A number of epidemiology studies have been conducted to examine the relationship between adverse reproductive and developmental outcomes with an exposure to chlorinated drinking water (Zavaleta *et al.*, 1999; Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000). Much attention was paid to the results of the study conducted by Waller *et al.* (1998) which have shown that the relative risk of an early-term miscarriage increased in the women with high exposures to total THMs. Some reviews (International Programme on Chemical Safety, 1998; Zavaleta *et al.*, 1999; Nieuwenhuijsen *et al.*, 2000) have suggested that adverse outcomes such as spontaneous abortion, stillbirth, birth defects and so on may be associated with THMs and chlorination by-products, and more research is required since no associations were reported in other studies.

Thus, it is important to measure the estrogenic effect of natural water and the estrogenic effect of chlorination by-products in addition to suspected EDCs and to develop a water treatment process to decrease the estrogenic effect in drinking water. The purpose of this study is to investigate the characteristics of the estrogenic effect formed by chlorination focusing on chlorination by-products and to compare the formation processes between the estrogenic effect and THMs.

MATERIALS AND METHODS

Concentration of Lake Biwa water

Lake Biwa is the largest lake in Japan and is the major water source for 14 million people in the Kansai area in Japan. The organic matters in Lake Biwa were concentrated by the adsorption and desorption method using XAD7HP (Organo Corporation) and OASIS HLB (Nihon Waters K.K.) resins. The XAD7HP resin was used to isolate and concentrate humic substances, while the OASIS HLB resin was used to concentrate trace organic compounds in the water.

6 L of Lake Biwa water filtered with a 0.45 μ m membrane filter, which had a dissolved

organic carbon (DOC) of 1.8 mg/L, was concentrated using the XAD7HP resin according to an isolation procedure for aquatic humic substances (Thurman and Malcolm, 1981). The adsorbed substances were desorbed by 0.1 M NaOH. The concentration factor was 230 times with a recovery of 27%. Consequently, the DOC of concentrated water was 110 mg/L.

1 L of filtered Lake Biwa water was also concentrated using a cartridge packed with 2 mL of OASIS HLB. Sample water adjusted at pH 2 was fed into the cartridge at a flow rate of 50 mL/min. The adsorbed substances were desorbed by 1 mL dichloromethane. After the dichloromethane was evaporated with nitrogen gas, the residue was dissolved with ethyl alcohol. Since it was confirmed that ethyl alcohol did not influence the MVLN assay up to a concentration of 1% in the culture media, the ratio of an added sample to the media was less than 1%.

Filtered Lake Biwa water was chlorinated at an initial concentration of 1.0 mg/L. The residual chlorine and total organic halide (TOX) after 24 hours were approximately 0.1 mg/L and 110 μ g/L, respectively. Chlorinated water was concentrated by the same procedure used for raw water. It is supposed that humic substances and their chlorination by-products are recovered by the extraction using the XAD7HP resin and NaOH. Individual compounds and their by-products are supposed to be recovered by the extraction using the OASIS HLB resin and dichloromethane (Itoh *et al.*, 2003a). The chlorinated water was not dechlorinated so as not to change the estrogenic effect. It was confirmed that residual chlorine did not influence the MVLN assay.

Coagulation and activated carbon treatment

Lake Biwa water was coagulated using 20 mg/L of polyaluminum chloride (PAC). Rapid mixing and slow mixing were conducted for 1 min and 15 min, respectively, in a 1 L beaker. After standing for 15 min, the supernatant was obtained by a siphon. After the coagulation, activated carbon adsorption was performed using granular activated carbon (Calgon Far East Co. Ltd., F400). The upflow activated carbon column (18 mm i. d.) was 1.12 m long. The detention time in the column at a flow rate of 40 mL/min was 7.1 minutes. Treated waters were also chlorinated at an initial concentration of 1.0 mg/L for 24 hours.

Sample waters after the coagulation and activated carbon adsorption and chlorinated waters were concentrated using the XAD7HP resin and NaOH to extract humic substances and their chlorination by-products.

Chlorination of humic acid

Commercial humic acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) was used as a model substrate in water. The total organic carbon (TOC) of the humic acid solution was 1030 mg/L. Chlorination was performed by adding the desired amount of sodium hypochlorite solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). First, the humic acid solution in a 200 mM phosphate buffer at an initial pH of 6.0 was treated with 1500 mg-Cl₂/L of chlorine. This experiment carried out using commercial humic acid at a high TOC concentration and a high concentration of chlorine is for examining the fundamental characteristics of the estrogenic effect in chlorinated water, and it does not intend to estimate the change in actual drinking water. Chlorination proceeded in a dark room for 72 hours, after which trace of residual chlorine (less than 0.05 mg-

Cl₂/L) was detected. The chlorinated water was not dechlorinated. It was confirmed that chlorine did not influence the MVLN assay up to a concentration of 30 mg-Cl₂/L in the culture media, which means residual chlorine up to a concentration of 300 mg-Cl₂/L in a sample solution did not influence the assay since substances in a solution were diluted to one tenth in the media.

The hydrolysis effect of chlorinated water was examined to investigate the characteristics of the estrogenic effect in chlorinated water. The pH of the chlorinated humic acid solution was readjusted and then the solution stood at 20°C over a pH range of 7-10. Finally, the estrogenic effect was measured. pH adjustment in this experiment is for examining the effect of hydrolysis, and it does not intend the operation in actual water treatment process.

The MVLN assay

EDSTAC has recommended the MVLN assay to screen compounds or mixtures which have estrogenic effects. This assay utilizes an MCF-7 derivative that has been stably transfected with the Vit-Luc reporter gene (Pons *et al.*, 1990). Thus, the MVLN cell line expresses the endogenous estrogen receptor of MCF-7 and simultaneously contains an exogenous estrogen responsive reporter (luciferase). Therefore, the estrogen specific transcription activity of a test chemical is directly related to the luciferase activity measured in the lysate of treated MVLN cells.

In this study, we used the MVLN assay to measure the estrogenic effect. The MVLN cell line (Pons *et al.*, 1990) was obtained from the L'Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM) in Paris, France. For routine maintenance, the cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL Life Technologies, Inc.) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂/95% air under saturating humidity.

MVLN cells used in the assay were withdrawn from estrogen 6 days prior to passage. Cells grown in the DMEM/10% FBS medium were collected, washed three times with PBS, and resuspended and cultured in the 10% dextran coated charcoal (DCC) FBS (Hyclone) medium. Until seeded into a well plate, the medium was changed to fresh 10% DCC FBS medium every other day. The MVLN cells cultured without estrogen were seeded into a 24-well plate at a density of approximately 5×10^4 cells/well with 1 mL/well of 10% DCC FBS medium. Two days after seeding, the medium was replaced with a treatment medium, which contained a test chemical and a sample prepared in this study. The medium was replaced with fresh treatment medium on the third day after seeding. Then on the fourth day after seeding, the cells were lysed by adding 0.5 mL of a lysis buffer (TOYOINK MFG.Co.Ltd.). Cell lysate was collected, and the luciferase activity was detected with a luminometer (Lumat LB9507, Berthold). The protein concentration in the cell lysate was measured using sodium bicinchoninate (Smith *et al.*, 1985), and the luminescence units per milligram of protein (relative light units, RLU) were calculated.

The relative luciferase activity was calculated using 17β-estradiol (E₂) as a standard chemical (Itoh *et al.*, 2000a) as follows:

$$\text{Relative luciferase activity (\%)} = \frac{L - L_C}{L_E - L_C} \times 100 \quad (1)$$