

Although detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples was traditionally carried out using either direct microscopic visualization of oocysts by staining techniques and fluorescent antibodies or enzyme immunoassays or cell culture, these detection methods are labor-intensive, require a large number of oocysts for positive detection and are not suitable for high-throughput processing of samples (Ramirez & Sreevatsan 2006). Instead of these conventional methods, molecular (nucleic acid based) techniques have been developed for rapid detection of *Cryptosporidium* oocysts from water samples. Most molecular techniques are based on polymerase chain reaction (PCR) (Monis & Saint 2001; Hirata & Hashimoto 2006; Masago *et al.* 2006). PCR is sometimes combined with cell culture (cell culture-PCR) (Di Giovanni *et al.* 1999). However, these techniques require a high precision instrument (thermal cycler) to amplify target nucleic acids and elaborate methods such as gel electrophoresis for detection of amplified products. Therefore, simpler detection techniques are strongly needed for the routine detection of *Cryptosporidium* oocysts in drinking water treatment plants, bathing facilities, and wherever water quality monitoring is needed.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel nucleic acid amplification technique that relies on an autocycling strand displacement DNA synthesis performed by the *Bst* DNA polymerase large fragment (Notomi *et al.* 2000). A large amount of DNA can be synthesized in a short time (15–60 min). LAMP enables nucleic acid amplification under isothermal conditions ranging from 60 to 65°C, and therefore, LAMP can be performed using a simple incubator or a water bath instead of a thermal cycler (Tani *et al.* 2007). Furthermore, gel electrophoresis is not needed because the LAMP method synthesizes a large amount of DNA so that the products can be detected by simple turbidity (Ohtsuka *et al.* 2005). Thus, LAMP is faster and simpler to perform than PCR. Recently, we have developed the LAMP assay for rapid detection of *Cryptosporidium* oocysts (Momoda *et al.* 2009). The detection limit of the assay was 0.8 oocysts/LAMP test tube, and the sensitivity of the assay was enough to detect even one oocyst. However, it is too difficult to extract and concentrate all target DNA to one test tube because the sample volume of the LAMP assay is usually only 5 µL. Therefore it is necessary to develop a more sensitive assay to obtain stable results even if only one

oocyst exists in water samples. To increase the sensitivity, we focused on rRNA in *Cryptosporidium* oocysts because the number of target (18S) rRNA is much greater than that of target rDNA. We were not sure of the amount of ribosomes in a *Cryptosporidium* oocyst, but expected a large quantity of rRNA. At least some bacterial cells have several thousand of ribosomes per cell (Fegatella *et al.* 1998), and approximately 80 percent of the total RNA in rapidly growing mammalian cells (e.g., cultured HeLa cells) is rRNA (Lodish *et al.* 2000). Moreover detection of nucleic acid sequences would theoretically be a good indicator of which cells are living, since the nucleic acid in a dead cell in a fresh water environment is likely to be degraded by endogenous and environmental nucleases within a relatively short turnover time (Paul *et al.* 1989).

In this study, we developed a one-step reverse-transcription LAMP (RT-LAMP) assay for rapid and high-sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts, and applied the assay to the detection from real water samples collected from surface water and ground water.

METHODS

RT-LAMP assay

The RT-LAMP assay was performed in 25 µL of the total reaction mixture with a Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) containing 5 pmol (each) of outer primers CryF3 and CryB3, 20 pmol (each) of loop primers CryLF and CryLB, 40 pmol (each) of inner primers CryFIP and CryBIP, 1.5U of reverse transcriptase (Roche) and 5 µL of extracted RNA samples. Sequences of these primers are shown in Table 1. The reaction mixture was incubated at 63°C for 60 min, and turbidity was continuously monitored using a Loopamp real-time turbidimeter (LA-320C; Eiken Chemical CO., LTD., Tokyo, Japan). Positive and negative controls for the RT-LAMP reaction were included in every reaction. The positive control was made of RNA with an artificial sequence, which enables one to distinguish the RT-LAMP products between the artificial sequence and the real *Cryptosporidium* sequence by banding patterns on the gel after electrophoresis. The artificial sequence had all primer sequences

Table 1 | Primer oligonucleotides used for RT-LAMP

Primer name	Sequence (5' → 3')	Location*	Reference
CryFIP	TACTTAACTC ATTCCAATTA GAAAACCCAG GGAGGTAGTG ACAAG	502	Momoda et al. 2009
CryBIP	ATAAACCCCT TTACAAGTAT CAATTTATAC GCTATTGGAG CTGG	502	
CryF3	GCGCAAATTA CCCAATCC	413	
CryB3	ACTACGAGCT TTTTAACTGC	611	
CryLF	CCAAAAAGTC CTGTATTG	477	
CryLB	GAGGGCAAGT CTGGTG	528	

*Corresponding nucleotide position of *Cryptosporidium parvum* 18S rRNA gene (Accession No. L16996) of the 5' end.

and the *Eco* RI restriction enzyme site. After an oligo DNA synthesis of the artificial sequence with a T7 RNA polymerase binding site, the positive control was made by using the T7 RNA polymerase (Stratagene). The negative control was the pure water included in the kit.

RNA extraction

Immediately after five freeze (-80°C) and thaw (37°C) cycles, the sample solution including *Cryptosporidium* oocysts was incubated at 60°C for 30 min using a heat block with the solution for nucleic acids extraction (TE: 20 mM, NaCl: 0.1%, TrironX-100: 2 mM, DTT: $0.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Proteinase K: 6 mAnson-U/mL). After that, the sample solution was sonicated for 2 min and incubated at 75°C for 10 min. Then, the solution was incubated at 95°C for 5 min to deactivate Proteinase K. Finally, the extracted RNA solution was immediately cooled down with ice.

Sensitivity test of RT-LAMP assay

Cryptosporidium parvum oocysts (H8 strain, Yagita et al. 2001) which was maintained in our laboratory by passages in infected mice were used for a sensitivity test of the RT-LAMP assay. Oocysts were purified from the feces by a combination of discontinuous density sucrose gradient centrifugation and cesium chloride gradient centrifugation and enumerated with a hemacytometer. The RNA of purified and enumerated oocysts was extracted, and used as template RNA. The template RNA was prepared as 10-fold serial dilutions to obtain final concentrations of 6×10^{-5} – 10^2 oocysts/ $5\ \mu\text{L}$. Then, the RT-LAMP assay was performed in duplicate for each diluted sample.

Detection of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples by conventional microscopic observation and RT-LAMP

Twenty-two surface water samples and nine ground water samples were collected in two Japanese area (Tokyo Metropolitan, Miyagi prefecture). Twenty liters of water samples were concentrated to 5 ml by vacuum filtration with $5\ \mu\text{m}$ polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane filters (90 mm diameter, Omnipore, Millipore). Typically between 1 to 3 filters, or a maximum 10 filters were required to process the entire 20 L sample. Half the volume of concentrated sample solution, namely 2.5 ml of the concentrate which was equivalent to 10 L of water sample, was used for conventional assay based on microscopic observation, and the other half volume was used for the RT-LAMP assay.

The conventional assay was performed by Japanese standard method for detection of *Cryptosporidium* in water supply systems (Ministry of Health, Labour & Welfare 2007). After purification through immunomagnetic separation (IMS) (Dynabeads GC Combo, Invitrogen), *Cryptosporidium* oocysts were separated from magnetic beads using hydrochloric acid, and fixed on a membrane filter. The fixed sample was stained with EasyStain antibody stain (BTF), and observed using an epifluorescent and differential interference contrast microscope.

RNA extraction was performed while *Cryptosporidium* oocysts were captured by magnetic beads. After the washing step in a 1.5 ml tube, the *Cryptosporidium* and beads complex were subjected for RNA extraction in a $20\ \mu\text{L}$ solution. Then, the RT-LAMP assay was performed for the extracted RNA samples. To confirm the results, $1\ \mu\text{L}$

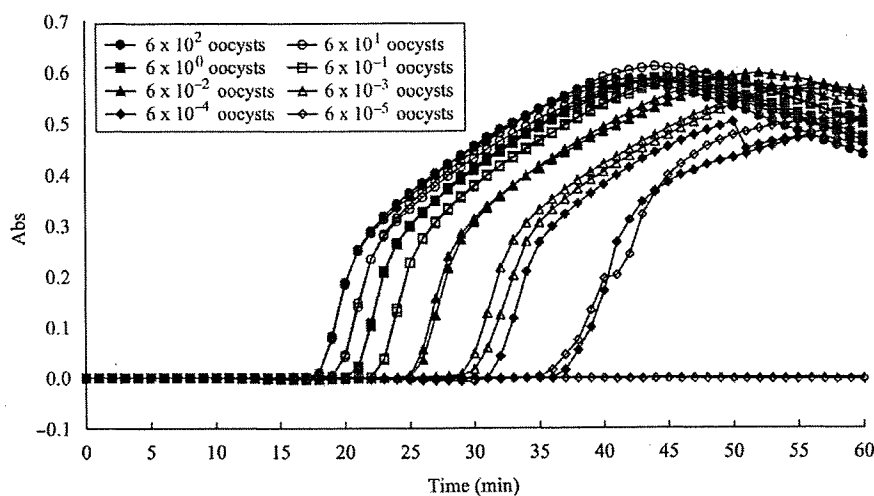


Figure 1 | Detection limit of the RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts.

aliquots of RT-LAMP products of positive samples were electrophoresed on a 2% agarose gel in Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer), followed by staining with ethidium bromide and visualization on a UV transilluminator.

RESULTS AND DISCUSSION

Sensitivity of RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts

Figure 1 shows sensitivity test results for the developed RT-LAMP assay using 10-fold serial dilution of template RNA extracted from *Cryptosporidium parvum* oocysts. Threshold time (T_t), which is defined as the time at which the differential calculation value, exceeds 0.07, increased with the decrease in the template RNA concentration. The T_t value of each diluted sample is listed in Table 2. T_t values were unstable when oocysts concentration was 6×10^{-4} oocysts/LAMP test tube or less. When the concentration was 6×10^{-5} , one turbidity curve did not increase. On the other hand, T_t values were stable in duplicated tests when the concentration was 6×10^{-3} oocysts/LAMP test tube or more. Therefore, we judged the detection limit that shows reproducible results to be 6×10^{-3} oocysts/LAMP test tube. This value is much less than the detection limit by normal LAMP assay. In our previous study, the detection limit of the LAMP assay was investigated by almost the

same method, and the limit was shown as 0.8 oocysts/LAMP test tube. Thus, we succeeded in improving in sensitivity for the detection of *Cryptosporidium* oocysts.

Evaluation of RT-LAMP assay for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples

Table 3 shows the detection results of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples. Two out of 31 water samples were positive in conventional microscopic observation, and these two samples were positive in the RT-LAMP assay, too. Hence, false-negative results were not observed in the RT-LAMP assay. However, 5 more samples were positive in

Table 2 | T_t values of each diluted sample in the RT-LAMP assay

RNA concentration* (oocysts/LAMP test tube)	T_t value (min)	Standard deviations
6×10^2	19.8, 19.8	0.00
6×10^1	21.3, 21.2	0.07
6×10^0	22.5, 22.6	0.07
6×10^{-1}	24.3, 24.3	0.00
6×10^{-2}	27.4, 27.1	0.21
6×10^{-3}	31.3, 32.3	0.71
6×10^{-4}	39.4, 33.2	4.38
6×10^{-5}	39.0, N.D.†	–

*RNA concentration is converted to oocysts concentration in a LAMP test tube.

†Not detected.

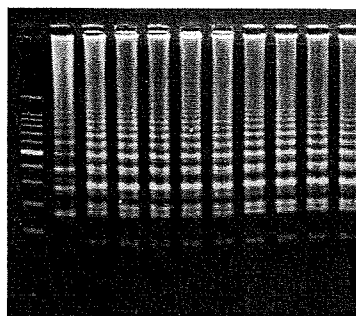
Table 3 | Detection results of *Cryptosporidium* oocysts in real water samples by conventional microscopic observation and RT-LAMP

Sample No.	Sample type	Microscopic observation ¹	RT-LAMP ²
1	Surface water	–	+
2	Surface water	–	–
3	Shallow well water	–	–
4	Shallow well water	–	–
5	Surface water	–	–
6	Surface water	–	–
7	Surface water	–	–
8	Surface water	–	–
9	Surface water	–	–
10	Spring water	–	–
11	Spring water	–	–
12	Surface water	–	–
13	Spring water	–	–
14	Spring water	–	–
15	Surface water	–	–
16	Surface water	–	–
17	Surface water	–	–
18	Surface water	–	–
19	Surface water	–	–
20	Surface water	–	–
21	Surface water	–	+
22	Surface water	–	+
23	Surface water	+	+
24	Surface water	–	+
25	Surface water	–	+
26	Surface water	+	+
27	Surface water	–	–
28	Shallow well water	–	–
29	Shallow well water	–	–
30	Surface water	–	–
31	River-bed water	–	–

¹ +, Positive; –, Negative.

the RT-LAMP assay. Firstly, false-positive results by contamination of positive control in the RT-LAMP assay were considered as the reason. However, it was found by electrophoresis that the contamination did not occur, and RT-LAMP products of these five samples were amplified nucleic acid of *Cryptosporidium* oocysts as shown in Figure 2. Secondly, decreased sensitivity can be

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



M: 100bp DNA ladder
 1: Positive control for LAMP reaction^a
 2: Positive control for electrophoresis^b
 3: Sample no.1-1
 4: Sample no.1-2
 5: Sample no.21
 6: Sample no.22
 7: Sample no.23
 8: Sample no.24
 9: Sample no.25
 10: Sample no.26

Figure 2 | Analysis of RT-LAMP products of positive samples by agarose gel electrophoresis. ^aPositive control for the RT-LAMP assay made of RNA with an artificial sequence. Electrophoretic pattern of this positive control is different from real *Cryptosporidium* oocysts. If the electrophoretic pattern of samples is the same as lane 1, it is an evidence of contamination by the positive control. ^bPositive control for electrophoresis which derives from nucleic acid of real *Cryptosporidium* oocysts. This positive control is not used in LAMP reactions.

caused by failure to separate all oocysts from magnetic beads, insufficient staining and incomplete detection by microscopic examination. Because of these reasons, *Cryptosporidium* oocysts would be more sensitively detected in the RT-LAMP assay than the conventional microscopic observation.

CONCLUSIONS

We successfully developed a one-step RT-LAMP assay for the rapid and highly sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts. The detection limit is as low as 6×10^{-3} oocysts/test tube. Even if water samples contain only one *Cryptosporidium* oocyst, the oocyst can be detected using the developed RT-LAMP assay. Additionally, duplicated tests are possible in this assay. The RT-LAMP assay sensitively detects *Cryptosporidium* oocyst in real water samples. Use of the RT-LAMP assay instead of conventional assay based on microscopic observation will greatly decrease the labor needed for the detection of *Cryptosporidium* oocyst.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (H20-Kenki-ippan-012).

REFERENCES

- Carpenter, C., Fayer, R., Trout, J. & Beach, M. J. 1999 Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 5(4), 579–584.
- Cicirello, H. G., Kehl, K. S., Addiss, D. G., Chusid, M. J., Glass, R. I., Davis, J. P. & Havens, P. L. 1997 Cryptosporidiosis in children during a massive waterborne outbreak in Milwaukee, Wisconsin: clinical, laboratory and epidemiologic findings. *Epidemiol. Infect.* 119(1), 53–60.
- Corso, P. S., Kramer, M. H., Blair, K. A., Addiss, D. G., Davis, J. P. & Haddix, A. C. 2003 Cost of illness in the 1993 waterborne *Cryptosporidium* outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerg. Infect. Dis.* 9(4), 426–431.
- Di Giovanni, G. D., Hashemi, F. H., Shaw, N. J., Abrams, F. A., LeChevallier, M. W. & Abbaszadegan, M. 1999 Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8), 3427–3432.
- Fegatella, F., Lim, J., Kjelleberg, S. & Cavicchioli, R. 1998 Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(11), 4433–4438.
- Hirata, T. & Hashimoto, A. 2006 Genotyping of single *Cryptosporidium* oocysts isolated from sewage and river water. *Water Sci. Technol.* 54(3), 197–202.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. 2000 Processing of rRNA and tRNA. In: *Molecular Cell Biology*, 4th edition, W. H. Freeman and Company, New York. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.section.2975> (accessed 10 June 2009).
- MacKenzie, W. R., Schell, W. L., Blair, K. A., Addiss, D. G., Peterson, D. E., Hoxie, N. J., Kazmierczak, J. J. & Davis, J. P. 1995 Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin. Infect. Dis.* 21(1), 57–62.
- Masago, Y., Oguma, K., Katayama, H. & Ohgaki, S. 2006 Quantification and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in river water by quenching probe PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Water Sci. Technol.* 54(3), 119–126.
- Methods for the Detection of Cryptosporidium, Giardia and Indicator Microorganisms in Water Supply Systems* 2007 Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan.
- Momoda, T., Kojima, T., Ikedo, M., Izumiyama, S. & Endo, T. 2009 Sensitive and rapid detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* by loop-mediated isothermal amplification. *J. Jpn Soc. Water Environ.* 32(6), 321–324.
- Monis, P. T. & Saint, C. P. 2001 Development of a nested-PCR assay for the detection of *Cryptosporidium parvum* in finished water. *Water Res.* 35(7), 1641–1648.
- Nichols, G. 2008 Epidemiology. In: Fayer, R. & Xiao, L. (eds) *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 2nd edition. IWA Publishing, London, UK, pp. 79–118.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000 Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12), e63.
- O'Donoghue, P. J. 1995 *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25(2), 139–195.
- Ohtsuka, K., Yanagawa, K., Takatori, K. & Hara-Kudo, Y. 2005 Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11), 6730–6735.
- Paul, J. H., Jeffrey, W. H., David, A. W., DeFlaun, M. F. & Cazares, L. H. 1989 Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of Southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(7), 1823–1828.
- Peeters, J. E., Mazas, E. A., Masschelein, W. J., Villacorta Martínez de Maturana, I. & Debacker, E. 1989 Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6), 1519–1522.
- Ramirez, N. E. & Sreevatsan, S. 2006 Development of a sensitive detection system for *Cryptosporidium* in environmental samples. *Vet. Parasitol.* 136(3–4), 201–213.
- Tani, H., Teramura, T., Adachi, K., Tsuneda, S., Kurata, S., Nakamura, K., Kanagawa, T. & Noda, N. 2007 Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* 79(15), 5608–5613.
- Yagita, K., Izumiyama, S., Tachibana, H., Masuda, G., Iseki, M., Furuya, K., Kameoka, Y., Kuroki, T., Itagaki, T. & Endo, T. 2001 Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.* 87(11), 950–955.

「論 文」

気相曝露量の実態調査に基づいた水道水中トリハロメタンの
曝露量と飲用寄与率の評価

柳 橋 泰 生

独立行政法人水資源機構環境室水環境課長・工博

権 大 維

京都大学大学院工学研究科
都市社会工学専攻・工修

武 藤 輝 生

新日本製鐵株式会社・工修

伊 藤 禎 彦

京都大学大学院工学研究科
都市社会工学専攻教授・工博

神 野 透 人

厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所
環境衛生化学部第一室長

越 後 信 哉

京都大学大学院工学研究科
都市社会工学専攻准教授・Ph. D.

大 河 内 由 美 子

京都大学大学院工学研究科
都市社会工学専攻助教・工博

要旨：わが国の一般住居における水道水に起因するトリハロメタンのヒトへの曝露の実態を明らかにするため、気相曝露に着目し実態調査を行った。浴室、台所、居間および屋外の空気ならびに給水栓水について、近畿地方の延べ30軒で測定した。空気中の総トリハロメタン (TTHM) の濃度 (中央値) は、浴室 $56.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、台所 $1.62 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、居間 $0.94 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、屋外 $0.29 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、浴室の濃度は、台所や居間と比べて大きな値を示した。水相、気相、食品による曝露量を推計し、平均的な飲用寄与率を算定すると、TCM16%、BDCM24%、DBCM20%、TBM7%となった。また、平均的な曝露量の合計は、TCM $37.8 \mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM $23.3 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $19.9 \mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM $10.9 \mu\text{g}/\text{day}$ となり、経口曝露のTDI相当値と比較すると、TCM6%、BDCM8%、DBCM2%、TBM1%であり十分に低い値であった。

キーワード：トリハロメタン、気相曝露※、浴室※、曝露量評価※、寄与率

分類項目：水質基準 (120103)、健康リスク評価 (120106)、消毒副生成物 (121003)

1. 緒 言

トリハロメタンの水道水の水質基準値は、耐容一日摂取量 (TDI) をもとに飲料水の寄与率を20%として設定されている¹⁾。一般的に、わが国では水道水の水質基準値は飲用寄与率を10%として設定されているが、トリハロメタンには消毒副生成物であるという理由で20%が割りあてられている。しかしながら、飲用寄与率は、種々の経路の曝露実態に即して設定することが望ましい。トリハロメタンは揮発性が高く、気相経路の曝露量が注目される。世界保健機関 (WHO) の飲料水水質ガイドライン (第3版) 補遺²⁾では、飲料水の

摂取による曝露、室内空気の気相曝露、入浴時の気相・経皮曝露および食品の摂取による曝露の4つの経路はほぼ同じ寄与度であるとの認識が示されている。また、Richardsonらが行ったレビュー³⁾では、曝露経路に着目した疫学研究において、塩素消毒された水でシャワー・入浴をしたヒトの群は膀胱ガンのリスクが2倍増加したこと等が示され、気相曝露等の曝露経路を考慮した研究の重要性が述べられている。

トリハロメタンは、水道水の浄水過程における副生成物として生成し、飲用、入浴、室内汚染等によりヒトに曝露するほか、クロロホルム

(TCM) については、工業用製品として使用されることから、環境汚染を通じて、ヒトに曝露することが考えられる。また、汚染された食品を摂取することによりヒトに曝露する可能性がある。さらに、プールや浴場では塩素消毒が行われており、トリハロメタンが生成されることにより、ヒトに曝露することになる。このように、トリハロメタンは、種々の経路を経てヒトに曝露しており、これらを整理して表したのが図-1である。

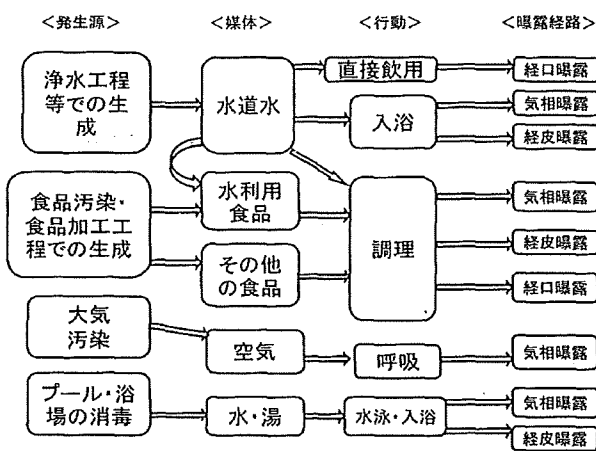


図-1 トリハロメタンの曝露経路

水道水中のトリハロメタンの濃度については、水道法に基づく全国の水道における水質検査結果が公表されており⁴⁾、多くのデータがある。一般住居の入浴時の気相曝露および経皮曝露については、海外では、Kergerら⁵⁾が米国の一般住居で入浴時のトリハロメタンを測定しており、Joら⁶⁾が韓国で屋内空気などの測定を行い、Linら⁷⁾が台湾の住民の入浴、調理時の曝露量についてモデル計算を行っている。食品の摂取による曝露についても多くの研究例^{8)~10)}がある。大気汚染の状況については、TCMに関する多くのモニタリングデータ¹⁷⁾がある。プールや浴場については、少数ではあるが国内の研究例^{18)~20)}がある。このように、トリハロメタンの曝露について飲用以外のデータの蓄積が図られるようになってきているが、わが国における一般住居の入浴時のトリハロメタンの気相曝露の測定データは見あたらない。

本研究では、一般住居における水道水に起因するトリハロメタンのヒトへの曝露の実態を明らか

にするため、気相曝露に着目し調査を実施する。また、気相曝露量と比較するため水道水飲用曝露量および経皮曝露量を推計する。気相曝露量については、実際に人が入浴している際に測定を行うことにより明らかにするとともに、換気の有無等の曝露条件による影響を解明する。さらに、文献調査から得られたデータから食品、大気汚染等の経路による曝露量を推計することにより、トリハロメタンの全曝露量ならびに全曝露量に占める飲用寄与率および水道水寄与率について評価する。

2. 水相および気相中トリハロメタンの調査方法

2.1 調査の対象

調査は、平成17年11月から平成18年12月の間に行った。延べ30軒 (25家庭) の一般住居 (京都市18軒、長岡京市2軒、枚方市2軒、交野市1軒、東大阪市1軒、吹田市1軒、豊中市1軒、四条畷市1軒、高槻市1軒、大津市1軒、草津市1軒) を調査対象として、屋内外の空気および水試料のサンプリングを行った。家屋構造は、木造住宅15軒、鉄骨・鉄筋住宅15軒であった。家族数は、1人が10軒、2人が5軒、3人が9軒、4人が5軒、6人が1軒であった。

2.2 水相中トリハロメタン濃度測定のためのサンプリングと分析方法

(1) サンプリング方法

水道水のサンプリングは、空気のサンプリングの開始時と終了時に2回行った。調査対象の中に家庭用浄水器を使用している住居はなかった。

乾燥したテフロン製ねじ蓋付ガラス瓶 (100mL) に泡立えないように静かに採取し、直ちに満水にして密栓した。なお、ガラス瓶には水道水中の残留塩素を除去するために脱塩素剤としてアスコルビン酸ナトリウム0.05gを事前に添加した。また、サンプリング時点から分析時まで冷蔵して保存した。全ての水試料は、5日間以内に分析を行った。

(2) 分析方法

水試料を酸性条件下においてヘキサンにより抽出し²¹⁾、抽出液をGC-ECD (SHIMADZU GC-14B) で分析を行った。カラムは、Silicone GE SE-30 (2m×2.6mm、SHIMADZU) を用いた。内標準試料としてブロモフルオロベンゼンを用い

て定量を行った。

トリハロメタン混合試薬 (和光純薬) を用いて回収率を確認したところ、TCM $95.1 \pm 22.9\%$ 、ブロモジクロロメタン (BDCM) $87.8 \pm 12.7\%$ 、ジブロモクロロメタン (DBCМ) $91.9 \pm 14.8\%$ 、ブromoホルム (TBM) $99.7 \pm 14.1\%$ であった。また、定量下限値は、TCM $0.26 \mu\text{g/L}$ 、BDCM $0.30 \mu\text{g/L}$ 、DBCМ $0.11 \mu\text{g/L}$ 、TBM $0.50 \mu\text{g/L}$ であった。

2.3 気相中トリハロメタン濃度測定のための サンプリングと分析方法

(1) サンプリング装置

図-2に示すように、吸引ポンプ (GLサイエンス、SP208-100Dual) を用いて、Tenax TA 吸着管 (Supelco) にトリハロメタンを吸着させることで、室内空気を採取した。吸引ポンプと吸着管の接続にはテフロン製のユニオンとチューブ (3 mm ID) を用いた。吸着管はサンプリング前にコンディショナー (MARKES TC-20) でコンディショニングを行った (He 流量 50mL/min 、 100°C 30min、 320°C 3 hr)。コンディショニングおよびサンプリング後の吸着管はアルミホイルで包み、活性炭を入れたステンレス製容器に保存した。

(2) サンプリングの場所、時間、吸引流量

平成17年の調査では、各住居において浴室、台所、居間、寝室、屋外の5カ所の空気を採取したが、その結果では居間と寝室の気中濃度に明確な差が見られなかった。このため、実験協力者のプライベート面を考慮して、平成18年の調査では、浴室、台所、居間、屋外の4カ所でサンプリングを行った。

①浴室

サンプリングにあたっては、事前に操作マニュアルを読んだ実験協力者がサンプリング装置を浴室内に持ち込み、操作を行った。浴室へ入った後にポンプを稼働させ、入浴を終了して退室する前にポンプを停止させた。吸着管2本を直列に接続し、吸引量を1L以内に設定した。なお、研究協力者は入浴の間に退室することがなかった。また、全員が当該家族において当日の一番目の入浴者であった。入浴の方法は普段通りとし、同時にアンケート調査を実施し、換気条件等を記録した。

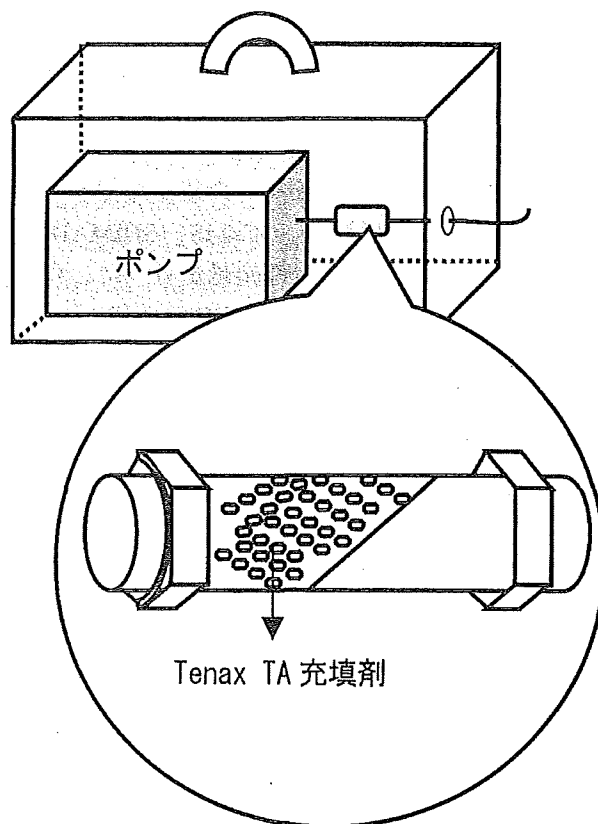


図-2 空気サンプリング装置

②台所

台所でのサンプリングについては、サンプリング装置を現場の状況に応じて設置したが、調理場とダイニングルームが一体となっている場合は、全て調理場に設置した。ポンプの流量を $20 \sim 30 \text{ mL/min}$ に設定し、総吸引量は $0.19 \sim 4.51 \text{ L}$ であった。研究協力者が普段通りに調理、食器の洗浄などで在室する際にポンプを稼働させた。

③居間と屋外

居間と屋外でのサンプリングは、ポンプのタイマー機能を利用し、平成17年の調査では、 4 mL/min の流量で15時間 (一日目の18時～翌日の9時)、平成18年の調査では、 5 mL/min の流量で12時間 (一日目の19時～翌日の7時) 稼働させ、空気を採取した。一部の研究協力者の都合によりサンプリング時間を変えた場合はあったが、総吸引量は同じとした。

④トラベルブランク

トラベルブランク試験用の吸着管を1本ずつ用意した。採取操作以外は他の吸着管と同様に扱い、

分析し、トラベルブランク値とした。

(3)分析方法

採取空気中の各トリハロメタン濃度は、Tenax TA 吸着管からの加熱脱着 (SHIMADZU TDTS-2010) (280℃、10分間) を行った後、冷却トラップ (-15℃) で濃縮し、GC-MS (SHIMADZU QP-2010) に導入して、分離定量を行った。カラムは、キャピラリーカラム RESTEK RTX-1 (60 m×0.32mm×1 μm) を用いた。

23種 VOCs の混合標準液 (和光純薬) を用いて検量線を作成した。吸着管内に採取したトリハロメタンの絶対量を吸引した空気量で除することにより空気中の濃度を計算した。定量下限値は、TCM0.1ng、BDCM0.1ng、DBCM0.1ng、TBM0.2 ng であった。

2.4 統計解析手法

調査結果を比較する際は、Kaleida Graph (Version 4.0) を用いて Wilcoxon-Mann-Whitney 検定 (有意水準：5%) を行った。

なお、定量下限値未満の分析値については定量下限値の2分の1の値をあてはめた。

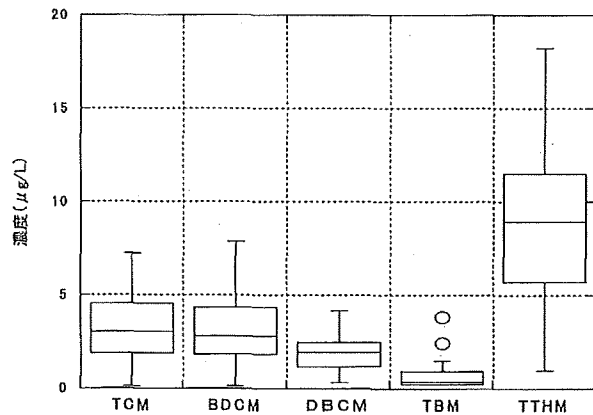
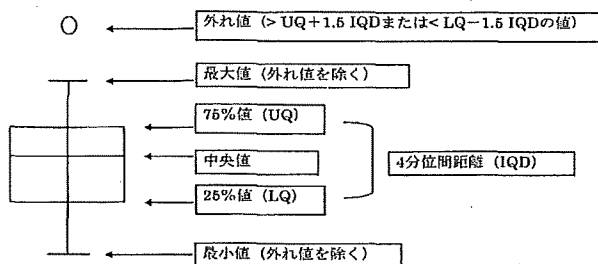


図-3 給水栓水中のトリハロメタン濃度
注) 図の表記の意味は次のとおりである。



3. 水相および気相中トリハロメタンの調査結果

3.1 入浴時間および台所の水使用時間

30軒の調査対象者の入浴時間は、最大値60分、平均値24.8分、中央値21分、最小値4分であった。また、台所における水使用時間は、最大値70分、平均値14分、中央値10分、最小値0分であった。

3.2 給水栓水中のトリハロメタン濃度

各住居で採取した給水栓水のトリハロメタン濃度を図-3に示した。DBCMは30軒全てで検出され、TCM、BDCM、TBMは、それぞれ25軒、29軒、20軒の水試料から検出された。中央値をみると、水中濃度は高い方からTCM、BDCM、DBCM、TBMの順であった。

3.3 屋内外の空気中のトリハロメタン濃度

屋内外の空気中のトリハロメタン濃度の測定結果を表-1に示す。入浴中の浴室空気中におけるTCM濃度の最大値は178 μg/m³、平均値は34.0 μg/m³、中央値は22.2 μg/m³であった。TTHM

表-1 トリハロメタンの気相濃度 (μg/m³)

項目	場所	検出数	最大値	平均値	中央値
TCM	浴室	30	178	34.0	22.2
	台所	26	9.68	1.45	0.76
	居間	29	1.75	0.68	0.49
	屋外	30	0.50	0.22	0.22
BDCM	浴室	29	104	25.5	19.1
	台所	22	4.89	0.87	0.44
	居間	20	1.22	0.40	0.25
DBCM	浴室	29	44.4	13.9	11.6
	台所	26	1.65	0.46	0.27
	居間	30	0.78	0.24	0.18
TBM	浴室	25	8.0	2.6	1.7
	台所	19	0.53	0.16	0.13
	居間	17	0.21	0.07	0.05
TTHM	浴室	-	331	73.4	56.5
	台所	-	16.4	3.00	1.62
	居間	-	3.58	1.38	0.94
	屋外	-	0.57	0.29	0.29

濃度の最大値は $331 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値は $73.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は $56.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。浴室空气中の測定結果を図-4に示す。浴室、台所および居間の空气中濃度を比較すると、浴室の TTHM 濃度は、最大値で台所や居間空气中濃度に対して 20~92倍、平均値で 24~53倍、中央値で 35~60倍と桁違いに大きな値を示した。

トリハロメタンの給水栓水中濃度と浴室の空气中濃度の相関を解析したところ、相関係数 r は TCM0.49、BDCM0.64、DBCM0.35、TBM0.59、TTHM0.48と比較的低かった。

屋外については、TCM 濃度が他の物質に比べて大きな値を示したことから、TCM は、水道水とは別に一般大気中濃度に影響を与える発生源があると考えられた。TCM 濃度の平均値、中央値ともに $0.22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、環境省がとりまとめた平成18年度の全国の有害大気汚染物質モニタリング調査結果 (363地点) の平均値 $0.23 \mu\text{g}/\text{m}^3$ とほぼ同様の値であった¹⁷⁾。

3.4 気相曝露条件が浴室空气中濃度に与える影響

トリハロメタンの浴室空气中の濃度に大きな影響を与える条件としては、換気の有無、シャワーの使用の有無、家屋構造および水道水中濃度が考えられる。このため、条件の違いによるトリハロメタンの濃度を比較した。なお、給水栓水中の濃度の影響を除くため、「空气中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) / 給水栓水中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)」(以下、「空气中濃度の対水中濃度比」という。)を算出した上で比較した。

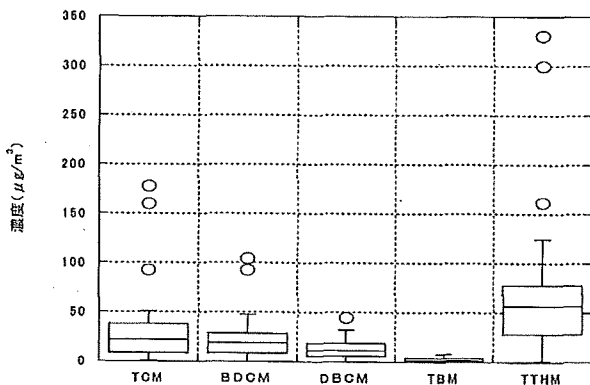


図-4 浴室空气中のトリハロメタン濃度
注) 図の表記の意味は図-3と同じである。

(1)換気の有無による違い

トリハロメタンの全ての項目で、最大値、平均値、中央値ともに、換気なし (20軒)の方が換気あり (10軒)より大きな値を示し、中央値で1.7~3.3倍の値となった。TTHMの空气中濃度の対水中濃度比は、換気なしが8.33、換気ありが3.94であった。浴室の空气中濃度の対水中濃度比は、BDCM以外は、換気がある場合に比べ換気がない場合の方が有意に高かった。図-5は TTHMの結果を示したものである。

(2)シャワー使用の有無による違い

シャワーを使用した浴室のデータ (11軒) とシャワーを使用しなかった浴室のデータ (9軒)を比較したところ、空气中濃度の対水中濃度比に有意な差はなかった。

(3)家屋の構造による違い

家屋が鉄筋構造 (15軒) か木造構造 (15軒)かの違いによる空气中のトリハロメタンの濃度の違いをみるため、鉄筋構造と木造構造のデータを比較したところ、空气中濃度の対水中濃度比に有意な差はなかった。

3.5 飲用曝露量の推計

実測調査結果をもとに式-1により飲用曝露量を推計した。

$$\text{飲用曝露量} (\mu\text{g}/\text{day}) = \text{吸収率} \times \text{水中濃度} (\mu\text{g}/\text{L})$$

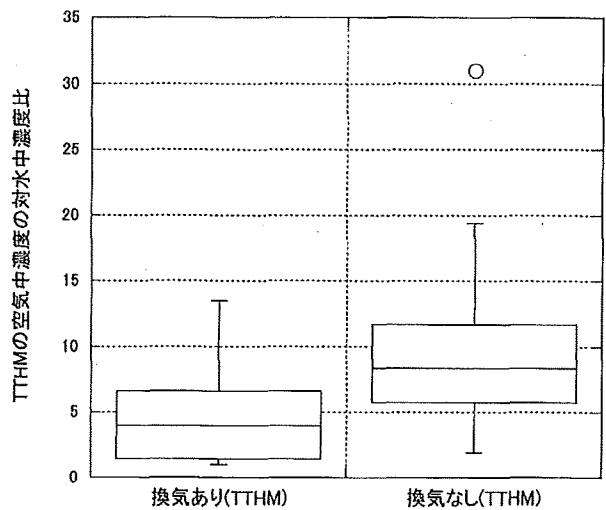


図-5 TTHMの浴室空气中濃度の対水中濃度比に対して換気が及ぼす影響
注) 図の表記の意味は図-3と同じである。

×水摂取量 (L/day) ……式-1

吸収率は1、水摂取量は2 L/dayとした。

本研究で実測した水サンプルの水中濃度を式-1にあてはめると、TCMの飲用曝露量は、最大値14.5 μg/day、平均値6.07 μg/day、中央値6.09 μg/dayであり、TTHMの飲用曝露量は、最大値36.5 μg/day、平均値17.7 μg/day、中央値17.9 μg/dayとなった。

3.6 気相曝露量の推計

実測調査結果をもとに気相曝露量を推計した。推計には次式を用いた。

気相曝露量 (μg/day) = 吸収率 × 空気中濃度 (μg/m³) × 呼吸量 (m³/day) ……式-2

入浴時の呼吸量 (m³/day) = 1日の呼吸量 (m³)

×浴室在室時間 (hr)/24 (hr/day) ……式-3

台所在室の呼吸量 (m³/day) = 1日の呼吸量 (m³)

×台所在室時間 (hr)/24 (hr/day) ……式-4

居間在室の呼吸量 (m³/day) = 1日の呼吸量 (m³)

×居間在室時間 (hr)/24 (hr/day) ……式-5

吸収率は1とした。在室時間は、浴室および台所はサンプリング時間、居間は16時間とした。また、1日の呼吸量は15 m³とした^{22), 23)}。なお、入浴は1日1回とした。

トリハロメタンの気相曝露量の推計値を表-2に示す。TCMの中央値は浴室4.73 μg/day、台所0.367 μg/day、居間4.86 μg/day、それらの合計値12.7 μg/dayであり、TTHMの中央値は浴室11.8 μg/day、台所0.697 μg/day、居間9.40 μg/day、それらの合計値28.3 μg/dayであった。居間は、空気中の濃度は低いものの、滞在時間が長いため、曝露量としては浴室と同等 (TCMの場合)あるいは近い値 (TTHMの場合)を示した。ただし、居間の空気中濃度の測定は研究協力者の協力を容易にすることから夜間を中心に12~15時間行ったため、昼間の住居で過ごす者の曝露量とは異なる可能性がある。

3.7 経皮曝露量の推計

実測調査結果をもとに経皮曝露量を推計した。水溶液が皮膚に付着している場合の化学物質の経皮曝露量を求める算出式としては、米国のEPA²⁴⁾が次式を示している。

t_{event} < または = t* の場合

表-2 トリハロメタンの気相曝露量 (μg/day)

項目	場所	最大値	平均値	中央値
TCM	浴室	30.0	8.15	4.73
	台所	3.33	0.698	0.367
	居間	17.5	6.85	4.86
	合計	45.3	15.7	12.7
BDCM	浴室	19.0	5.69	3.51
	台所	2.32	0.475	0.179
	居間	12.2	3.97	2.55
	合計	25.7	10.1	8.95
DBCМ	浴室	11.9	3.28	3.00
	台所	2.36	0.266	0.119
	居間	7.80	2.40	1.75
	合計	19.7	5.94	4.54
TBM	浴室	2.92	0.605	0.308
	台所	0.745	0.0782	0.0388
	居間	2.12	0.675	0.519
	合計	5.08	1.36	0.893
TTHM	浴室	58.0	17.5	11.8
	台所	7.38	1.52	0.697
	居間	35.8	13.8	9.40
	合計	92.9	32.8	28.3

$$DA_{event} = 2FA \times K_p \times C_w \times (6 \tau_{event} \times t_{event} / \pi)^{1/2} \dots\dots式-6$$

t_{event} > t* の場合

$$DA_{event} = FA \times K_p \times C_w \times ((t_{event} / (1+B)) + 2 \tau_{event} \times ((1+3B+3B^2) / (1+B)^2)) \dots\dots式-7$$

$$B = K_p \times (MW)^{1/2} / 2.6 \dots\dots式-8$$

DA_{event}: 単位面積当たりの曝露量 (mg/cm²)

FA: 吸収率 (-)

K_p: 皮膚透過係数 (cm/hr)

C_w: 水中濃度 (mg/cm³)

τ_{event}: ラグタイム (hr)

t_{event}: 曝露時間 (hr)

t*: 定常状態に達する時間 (hr) = 2.4 τ_{event}

B: 角質層の透過係数の生きた表皮層の透過係数に対する比率 (-)

MW: 分子量 (g/mole)

$$\text{経皮曝露量 (mg)} = SA \times DA_{event} \dots\dots式-9$$

SA: 体表面積 (cm²)

体表面積 (SA) は、次に示す DuBois 式で算出した。

$$\text{体表面積 (SA) (cm}^2\text{)} = 71.82 \times \text{身長}^{0.725} \text{ (cm)} \times \text{体重}^{0.425} \text{ (kg)} \dots\dots\text{式-10}$$

なお、体表の100%が浴槽水あるいはシャワー水に浸っているものとし、皮膚透過係数およびラグタイムは、Xu²⁵⁾ が報告した値を用いた。FA は 1 とした。

実測調査における協力者の身長は150cm から179cm の範囲であり、体重は49kg から85kg の範囲であり、体表面積は、14,300cm² から19,600cm² の範囲であった。TCM の経皮曝露量は、最大値19.3μg/day、平均値7.52μg/day、中央値7.27μg/day であり、TTHM の経皮曝露量は、最大値61.8μg/day、平均値22.1μg/day、中央値18.2μg/day であった。

4. 文献調査に基づく食品等の他経路による曝露量の推計

4.1 食品による曝露量の推計

食品の摂取による曝露の研究は、国内では、仙台市衛生研究所の玉川ら^{8)~11)} や大阪府公衆衛生研究所の桑原ら¹²⁾ が陰膳方式による実態調査、横浜市衛生研究所の宮田ら^{13)、14)} がマーケットバスケット方式による実態調査を実施した。また、環境省では、全国7~9地区で、11年間にわたり毎年度3日間、陰膳方式により食事中的TCM濃度等の調査を実施した¹⁵⁾。Miyaharaら¹⁶⁾ は、13種類の調理前の食品中のTCM等を分析し、TCMが全ての食品から検出され、汚染原因として食品製造工程における次亜塩素酸ナトリウムの使用が考えられることを報告している。

陰膳方式により食事の試料中のトリハロメタンの濃度を測定した場合は、各調査研究の中で、食事(試料)量に乗ずることにより、トリハロメタンの曝露量が算出されている。表-3にそれらの結

表-3 陰膳方式による食事中トリハロメタンの調査

調査者	調査年、対象等	一日摂取量 (μg/day)				
		TCM	BDCM	DBC	TBM	
環境省 ¹⁵⁾	平成3年度~13年度 秋季、各年度7~9地区 各地区3世帯3日間	世帯・日単位の最大値	108			
		平均値(年度・地区)の最大値	29			
		幾何平均値(年度)の平均値	6.5			
玉川ら ⁸⁾	昭和61年7月 21人成人女性 朝、昼、夜3食分	最大値	178.38			
		平均値	45.4			
		幾何平均値	26.8			
渡部ら ⁹⁾	平成3年1月 仙台市内3家庭 3日間	最大値	1.9	2.6	0.8	
		平均値	1.1	0.6	0.2	
		幾何平均値	1.0	0.4	0.2	
佐藤ら ¹⁰⁾	平成5年11月~12月 仙台市内5家庭の主婦 3日間	最大値	8.14	1.61	0.46	
		平均値	6.73	0.84	0.2	
		幾何平均値	6.17	0.71	0.15	0.27
山田ら ¹¹⁾	平成7年2月 仙台市内主婦3人 連続7日間	最大値	35.4	2.32	1.7	
		平均値	6.51	1.07	0.70	
		幾何平均値	4.99	0.94	0.59	
桑原ら ¹²⁾	平成2年度~5年度 冬季、大阪府内3地区 連続3日間	最大値	46.58	3.53	1.45	0.48
		平均値	7.54	1.2	0.45	0.19
		幾何平均値(年度)の平均値	6.11	0.93	0.38	0.08

果をまとめた。環境省の調査結果によると、平成3年度から平成13年度までの各地区単位のTCMの食事（飲料水由来を含む。）による曝露量（平均値）の最大値は $29 \mu\text{g/day}$ （平成3年度、仙台市）、世帯・日単位の最大値は $108 \mu\text{g/day}$ （平成12年度、札幌市）であり、11年間の各年度幾何平均値の平均値は $6.5 \mu\text{g/day}$ であった。

マーケットバスケット方式の調査結果では、宮田ら¹³⁾が1988年の14食品群の分析から、曝露量としてはTCM $32.5 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $3.8 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $0.6 \mu\text{g/day}$ 、このうち水道水の占める割合をTCM51.7%、BDCM87.6%、DBCMM80.3%と報告している。笹尾¹⁴⁾は、1989年から1993年の調査結果から、水道水の占める割合をTCM50%、BDCMおよびDBCMM90%と報告している。

Miyaharaら¹⁶⁾の調査においてTCMが検出された調理前の食品中の平均的濃度に対して、国民栄養調査（厚生労働省）等から得られた摂取量のデータを掛け合わせ曝露量を算出した結果を表-4に示す。13食品からの曝露量の合計は平均で $2.56 \mu\text{g/day}$ となった。

4.2 大気汚染による曝露量の推計

大気汚染の状況については、大気汚染防止法に基づき国および地方公共団体においてTCMを含む有害大気汚染物質の大気環境モニタリングが行われており、毎年度、全国の大気中のTCM濃度についてとりまとめた結果が環境省から報告されている¹⁷⁾。1日24時間曝露した場合、気相曝露量は平成9年度から19年度の全国平均で $4.54 \mu\text{g/day}$ となった。また、最大値では $585 \mu\text{g/day}$ となった。

また、本研究の実測調査で得られた屋外におけるトリハロメタン濃度の中央値を用いて24時間滞在した場合の気相曝露量を求めると、TCM $3.33 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $0.21 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $0.21 \mu\text{g/day}$ 、TBM $0.42 \mu\text{g/day}$ 、THHM $4.38 \mu\text{g/day}$ となった。

4.3 プール水泳および公衆浴場の曝露量の推計

野崎ら¹⁸⁾は、平成11年度に東京および大阪の74箇所のプールの水質に関する実態調査を実施しており、その中で、水中のトリハロメタンの濃度測定を行っている。有賀ら¹⁹⁾も、東京の屋内プールの水および空気中のトリハロメタンの濃度測定を

表-4 食品中のTCM濃度から推計した曝露量

食品	濃度平均値 ($\mu\text{g/kg}$)	濃度最大値 ($\mu\text{g/kg}$)	食品の摂取量 (kg/day)	曝露量平均値 ($\mu\text{g/day}$)	曝露量最大値 ($\mu\text{g/day}$)
もやし	153.7	320	0.0060 ^{27) 28)}	0.923	1.92
コーラ	29	41	0.0219 ²⁹⁾	0.635	0.898
バター	27.4	37	0.001 ²⁵⁾	0.0274	0.037
マーガリン	27.4	32	0.0015 ²⁵⁾	0.0411	0.048
牛乳	2.54	11	0.106 ²⁹⁾	0.270	1.17
ケーキ	1.4	1.5	0.0033 ²⁶⁾	0.00462	0.00495
ジュース	1.25	8.2	0.0107 ²⁹⁾	0.0134	0.0877
米	0.10	2	0.158 ²⁹⁾	0.0158	0.315
乳飲料	4.16	29	0.0266 ^{28) 30)}	0.111	0.772
アイスクリーム	4.96	27	0.00266 ^{28) 31)}	0.0132	0.0717
プレーンヨーグルト	2.17	5.1	0.0202 ^{28) 32)}	0.0438	0.103
豆腐	11.4	36	0.0386 ²⁹⁾	0.440	1.39
アイスマルク	8.2	26	0.00260 ^{28) 31)}	0.0213	0.0675
合計				2.56	7.56

注) 濃度はMiyaharaら¹⁶⁾のデータによる。国民栄養調査（厚生労働省）²⁵⁾については、生の食材のデータが得られる平成12年の調査結果を利用した。

実施した。また、高橋ら²⁰⁾が浴場施設の浴槽水および空気のトリハロメタンの測定を行っている。

有賀ら¹⁹⁾は、平成15年2月に東京都内の遊泳用屋内プール20施設において、プール水、原水の水道水、室内空気(7施設のみ)を採取し、トリハロメタン等を測定した。室内空気中の濃度については、TCMは、最大値 $281.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値 $82.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、DBCMは、最大値 $6.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値 $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。スポーツライフに関する調査³³⁾から、この1年間に水泳を行ったと回答があった170人の平均実施回数(44.33回/年)および1回あたりの実施時間(74.40分/回)を掛け合わせると、屋内プール施設における気相曝露量は、濃度の最大値をとるとTCM $8.56 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $0.185 \mu\text{g}/\text{day}$ 、濃度の中央値をとるとTCM $2.51 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $0.009 \mu\text{g}/\text{day}$ となった。

野崎ら¹⁸⁾のデータを用いて、3.7に示した手法により水泳時の経皮曝露量を推計すると、水中濃度の最大値をとると、TCM $110 \mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM $4.84 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $2.32 \mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM $3.93 \mu\text{g}/\text{day}$ 、水中濃度の中央値をとると、TCM $13.3 \mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM $0.88 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $0.29 \mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM $0.39 \mu\text{g}/\text{day}$ となった。

高橋ら²⁰⁾は、井戸水を原水とした公衆浴場(循環式浴槽施設)6箇所において、浴槽水および室内の空気に含まれるトリハロメタンを測定した。浴槽水中のTTHM濃度は、最大値 $243.1 \mu\text{g}/\text{L}$ 、中央値 $33.3 \mu\text{g}/\text{L}$ であり、室内空気中のTTHM濃度は、最大値 $290 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値 $59.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、TCM濃度は最大値 $270 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。入浴時間を30分とすると、TCMの気相曝露量は、最大値 $84.4 \mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値 $16.6 \mu\text{g}/\text{day}$ 、経皮曝露量は、最大値 $615 \mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値 $84.1 \mu\text{g}/\text{day}$ と推計された。

なお、体表面積は本研究の調査協力者の中央値である $17,300\text{cm}^2$ を用いた。

5. 曝露量の評価

5.1 評価方法

複数の経路による曝露を評価する方法としては、経路によって代謝、吸収率、エンドポイント等が異なることから、各経路毎の毒性評価結果に基づいた曝露量評価が考えられる。しかしながら、環

境省が行った複数媒体影響に関する調査研究^{34)、35)}では、TCMについて、経口曝露と気相曝露の単一媒体曝露と比較して複数媒体曝露では腎細胞ガン等の顕著な増加がみられており、各経路毎の評価のみでは健康影響を過小に見積もる可能性がある。

このことから、複数経路の曝露がある場合の曝露量の評価として、経路毎に独立的に評価するとともに、経路毎の曝露量を足し合わせて評価し、全曝露量に対する飲用および水道水の寄与率の評価を行った。

5.2 経路毎の評価

(1) 経口曝露

わが国のトリハロメタンに係る水道水質基準を設定する際の根拠となっている耐容一日摂取量(TDI)は、TCM $12.9 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、BDCM $6.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、DBCM $21 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、TBM $17.9 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であり¹⁾、これらを体重 50kg で換算すると、TCM $645 \mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM $305 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $1050 \mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM $895 \mu\text{g}/\text{day}$ となる。今回調査を行った30軒の一般住居の飲用曝露量の最大値は、TCM $14.5 \mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM $15.8 \mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM $8.34 \mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM $7.65 \mu\text{g}/\text{day}$ であり、TDI相当値に対する割合は、TCM 2.2% 、BDCM 5.2% 、DBCM 0.8% 、TBM 0.9% であった。しかしながら、今回調査を行った地域は全国的にみれば水道水中のトリハロメタン濃度が比較的低い地域であり⁴⁾、トリハロメタン濃度の高い地域では水質管理への十分な配慮が必要と考えられた。また、食事による経口曝露量をみると、TCMでは $100 \mu\text{g}/\text{day}$ を超える場合があり留意が必要と考えられた。

(2) 気相曝露

TCMの気相曝露の毒性評価については、環境省の中央環境審議会において検討が行われ、動物実験の結果から $18 \mu\text{g}/\text{m}^3$ が指針値とされた^{22)、36)}。1日の呼吸量を 15m^3 とすると、指針値に相当する1日あたりの曝露量は $270 \mu\text{g}/\text{day}$ となる。今回調査を行った30軒の一般住居における気相曝露量の最大値は、TCM $45.3 \mu\text{g}/\text{day}$ であり、指針値相当値の 16.8% であった。ただし、経口曝露と同様に水道水中のトリハロメタン濃度の高い地域では水質管理への十分な配慮が必要と考えられた。

また、公衆浴場では $84.4 \mu\text{g/day}$ 、大気汚染による曝露量では、特異的ではあるが年平均値で $585 \mu\text{g/day}$ に達する地点があり、留意が必要と考えられた。

(3)経皮曝露

今回調査を行った30軒の一般住居における入浴による経皮曝露量の最大値は、TCM $19.3 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $15.3 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $15.6 \mu\text{g/day}$ 、TBM $20.2 \mu\text{g/day}$ であった。また、文献の調査結果から推計すると、経皮曝露量の最大値は、プール水泳では、TCM $110 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $4.84 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $2.32 \mu\text{g/day}$ 、TBM $3.93 \mu\text{g/day}$ 、公衆浴場の入浴では、TCM $615 \mu\text{g/day}$ に達した。経皮的に血液中に吸収された後の標的臓器は経口曝露と同じと仮定し経口曝露と同じTDIを当てはめると、公衆浴場の入浴による経皮曝露量は、TCMについてTDI相当量に近い水準に達することがわかる。

5.3 水道水に起因する曝露量と飲用および水道水寄与率の評価

トリハロメタンの曝露経路は次の3つに分けることができる。

- ①水道水の直接的な飲用
- ②水道水中のトリハロメタンに起因する曝露(①を除く)
- ③水道水中のトリハロメタンとは関係のない曝露

また、飲用寄与率および水道水寄与率を次のように定義する。

飲用寄与率=①による曝露量/全曝露量

水道水寄与率=①および②による曝露量/全曝露量

②の曝露量は①の曝露量に比例すると考えられる。したがって、②の曝露量を抑制するには水道水中濃度の制御が必要である。③は食品汚染、プールや公衆浴場の消毒等に起因するものである。水質基準の算定にあたって水道水の直接的な飲用量として2Lを用いる場合は、飲用寄与率を用いることが必要である。TCM、BDCM、DBCMMおよびTBMについて、①、②および③の経路別に曝露量を整理したのが表-5である。

水道水に起因するものと起因しないものを分け

てトリハロメタンのヒトへの気相曝露量を推計するため、水道水の使用がない場合の気相曝露量について、屋内と屋外のトリハロメタンの濃度は同一と仮定し、本研究の実態調査により得た屋外濃度に1日24時間曝露されるものとして算定した。一方、水道水に起因するトリハロメタンは屋内濃度から屋外濃度を差し引いて求めた曝露濃度と在室時間(浴室および台所:サンプリング時間、居間:16時間)を用いて算定した。

食品による曝露は、水道水に起因する平均的な曝露量に食品汚染によるものが上乗せされるとみなした。平均的曝露量から、マーケットバスケット調査による研究¹⁴⁾で得られた水道水の飲用以外の割合を掛け合わせ、②に係る食品からの曝露量を推計した。③に係る食品からの曝露量は、調理前の食品中の濃度を調べた研究¹⁶⁾をもとに推計した。

以上の結果、トリハロメタンの経路別の平均的な曝露量について、水道水の直接的な飲用による曝露量は、TCM $6.09 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $5.61 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $3.88 \mu\text{g/day}$ 、TBM $0.73 \mu\text{g/day}$ 、プール水泳および公衆浴場の曝露を加えない場合、水道水に由来する曝露量は、TCM $27.4 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $19.6 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $15.6 \mu\text{g/day}$ 、TBM $4.4 \mu\text{g/day}$ となり、全曝露量は、TCM $37.8 \mu\text{g/day}$ 、BDCM $23.3 \mu\text{g/day}$ 、DBCMM $19.9 \mu\text{g/day}$ 、TBM $10.9 \mu\text{g/day}$ となった。全曝露量について、経口曝露のTDI相当値と比較すると、その割合は、TCM 6%、BDCM 8%、DBCMM 2%、TBM 1%となった。平均的な曝露量から推計した飲用寄与率(プール水泳および公衆浴場の曝露を加えない場合)は、TCM 16%、BDCM 24%、DBCMM 20%、TBM 7%、水道水寄与率は、TCM 72%、BDCM 84%、DBCMM 79%、TBM 41%となった。プール水泳および公衆浴場の曝露量を加えると、TCMの飲用寄与率は4%、水道水寄与率は11%となった。

今回の研究では、浴室等の気相曝露を中心に実測調査を行ったが、水道水の精確な寄与率を求めるためには、食事からの曝露量について水道水由来とそれ以外のものを分けることができる方法を用いて、各地の世帯において気相曝露等と同時に

表-5 トリハロメタンの経路別曝露量、飲用寄与率および水道水寄与率

曝露経路 (分類)	物質	TCM				BDCM		DBCМ		TBM	
		家庭	家庭	公衆浴場	公衆浴場	家庭	家庭	家庭	家庭	家庭	家庭
	入浴形態										
	プールでの水泳	無	有	無	有	無	有	無	有	無	有
経口 (①)	水道水の直接的な飲用による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	6.09 (1)	6.09 (1)	6.09 (1)	6.09 (1)	5.61 (1)	5.61 (1)	3.88 (1)	3.88 (1)	0.73 (1)	0.73 (1)
経口 (②)	水道水を使用して調理した食事からの曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	3.25 (0.53)	3.25 (0.53)	3.25 (0.53)	3.25 (0.53)	0.09 (0.02)	0.09 (0.02)	0.04 (0.01)	0.04 (0.01)	—	—
気相 (②)	水道水を使用した入浴時の呼吸による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	4.66 (0.77)	4.66 (0.77)	—	—	3.50 (0.62)	3.50 (0.62)	3.00 (0.77)	3.00 (0.77)	0.30 (0.41)	0.30 (0.41)
気相 (②)	台所における調理時の呼吸による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	0.21 (0.04)	0.21 (0.04)	0.21 (0.04)	0.21 (0.04)	0.18 (0.03)	0.18 (0.03)	0.11 (0.03)	0.11 (0.03)	0.04 (0.05)	0.04 (0.05)
気相 (②)	居間における呼吸による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	3.05 (0.50)	3.05 (0.50)	3.05 (0.50)	3.05 (0.50)	2.44 (0.43)	2.44 (0.43)	1.45 (0.37)	1.45 (0.37)	0.24 (0.33)	0.24 (0.33)
経皮 (②)	水道水を使用した入浴時の水との接触による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	7.27 (1.19)	7.27 (1.19)	—	—	5.66 (1.01)	5.66 (1.01)	4.97 (1.28)	4.97 (1.28)	1.33 (1.82)	1.33 (1.82)
小計：水道水に由来する曝露量 ($\mu\text{g/day}$)		27.4 (4.49)	27.4 (4.49)	14.7 (2.41)	14.7 (2.41)	19.6 (3.49)	19.6 (3.49)	15.6 (4.03)	15.6 (4.03)	4.4 (6.05)	4.4 (6.05)
経口 (③)	水道水に由来しない食事による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	2.56	2.56	2.56	2.56	—	—	—	—	—	—
気相 (③)	大気汚染等による屋内外空気の吸入 ($\mu\text{g/day}$)	3.33	3.33	3.33	3.33	0.21	0.21	0.21	0.21	0.42	0.42
気相 (③)	プール水泳における呼吸による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	—	2.51	—	2.51	—	—	—	0.01	—	—
経皮 (③)	プール水泳における水との接触による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	—	13.3	—	13.3	—	0.88	—	0.29	—	0.39
気相 (③)	公衆浴場での入浴時の呼吸による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	—	—	16.6	16.6	—	—	—	—	—	—
経皮 (③)	公衆浴場での水との接触による曝露量 ($\mu\text{g/day}$)	—	—	84.1	84.1	—	—	—	—	—	—
曝露量合計 ($\mu\text{g/day}$)		37.8	53.6	123.7	139.5	23.3	24.2	19.9	20.2	10.9	11.3
飲用寄与率 (%)		16	11	5	4	24	23	20	19	7	6
水道水寄与率 (%)		72	51	12	11	84	81	79	78	41	39

注) 曝露経路の分類：①水道水の直接的な飲用、②水道水中のトリハロメタンに起因する曝露 (①を除く)、③水道水中のトリハロメタンと関係のない曝露。

曝露量の数値の下の () 内は、水道水の直接的な飲用による曝露量に対する比率。

水道水を使用して調理した食事からの曝露量について、TCM は環境省調査¹⁵⁾ の11年間の各年度幾何平均値 ($6.5\mu\text{g/day}$) の平均値の50%、BDCM 及びDBCМ は桑原らの調査¹²⁾ の3年間の各年度幾何平均値 ($0.93\mu\text{g/day}$ 及び $0.38\mu\text{g/day}$) の10%とした。

調査を行うこと、また気相曝露についてどの場所で過ごしているかという生活時間を詳しく把握することが望ましいと考えられた。さらに、プールでの水泳や公衆浴場での入浴による曝露量が大い可能性があることから実態調査の例数を増やし、可能な限り曝露を抑制する方策を講ずることが必

要であると考えられた。

6. 結 語

わが国の一般住居におけるトリハロメタンの気相曝露の実態調査を行った。また、文献調査により、食品経由の曝露量、プールでの水泳や公衆浴場における曝露量について推計を行った。その結

果、得られた主要な知見を以下に記す。

- (1)浴室、居間、台所および屋外の空気ならびに給水栓水中のトリハロメタンについて、近畿地方の延べ30軒の一般住居において測定を行った。その結果、台所や居間と比べると、浴室の濃度が最大値で居間や台所濃度の20~92倍、平均値で24~53倍、中央値で35~60倍と桁違いに大きな値を示した (TTHM 濃度)。
- (2)換気を行った場合と行わなかった場合を比較すると、換気を行っていない場合は、換気を行った場合と比べ、空气中濃度の対水中濃度比は、中央値で1.7~3.3倍であり、BDCM 以外は有意な差があった。
- (3)今回の測定により得られたデータをもとにトリハロメタンの屋内における気相曝露量の推定を行ったところ、TCM は最大値45.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、平均値15.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値12.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、TTHM は最大値92.9 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、平均値32.8 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値28.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ であった。また、TTHM の気相曝露量は浴室が最も大きく、居間については空气中濃度は低かったが、在室時間が長いいため曝露量は浴室に近いものとなった。
- (4)文献により食品経路の曝露量を調査したところ、地域や日による差異が大きく、TCM で100 $\mu\text{g}/\text{day}$ を超える場合もあったが、平均値は6.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ であった。プールで水泳をした場合は、TCM の気相曝露量は、最大値8.56 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値2.51 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、経皮曝露量は、最大値110 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、中央値13.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ と推計された。
- (5)各種経路の平均的な曝露量を合計すると、プール水泳および公衆浴場の曝露を加えない場合、TCM37.8 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、BDCM23.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、DBCM 19.9 $\mu\text{g}/\text{day}$ 、TBM10.9 $\mu\text{g}/\text{day}$ となり、経口曝露の TDI 相当値と比較すると、TCM 6%、BDCM 8%、DBCM 2%、TBM 1%であり十分に低い値であった。
- (6)水道水の直接的な飲用による曝露量の全曝露量に対する比率を飲用寄与率、水道水の直接的な飲用によるものに水道水に起因するその他の経路によるものを加えた曝露量の全曝露量に対する比率を水道水寄与率と定義すると、プールにおける水泳および公衆浴場の曝露を加えない場

合、平均的な曝露量から推計した飲用寄与率は、TCM16%、BDCM24%、DBCM20%、TBM 7%、水道水寄与率は、TCM72%、BDCM84%、DBCM79%、TBM41%となった。

参考文献

- 1) 厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会：水質基準の見直しにおける検討概要、平成15年4月
- 2) WHO: Guidelines for drinking-water quality, first addendum to third edition, 2006
- 3) S. D. Richardson, M. J. Plewa, E. D. Wagner, R. Schoeny, D. M. DeMarini: Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research, *Mutation Research*, 636, pp.178-242, 2007
- 4) 厚生労働省健康局水道課：平成17年度水道統計 (水質編)
- 5) B. D. Kerger, C. E. Schmidt, D. J. Paustenbath: Assessment of airborne exposure to trihalomethanes from tap water in residential showers and baths, *Risk Analysis*, Vol. 20, No. 5, pp.637-651, 2000
- 6) W. Jo, K. Kwon, J. Dong, Y. Chung: Multi-route trihalomethane exposure in households using municipal tap water treated with chlorine or ozone-chloride, *Science of Total Environment*, Vol. 339, pp.143-152, 2005
- 7) T. Lin, S. Hoang: Inhalation exposure to THMs from drinking water in south Taiwan, *The Science of the Total Environment*, Vol. 246, pp.41-49, 2000
- 8) 玉川勝美、三島靖子、関敏彦、角田行：食品経路によるトリハロメタンの一日摂取量、*食品衛生学雑誌*、Vol. 29、No. 2、pp.156-160、1988
- 9) 渡部津子、吉本守一、玉川勝美、高畑陽子、関俊彦、角田行、藤田昌彦：仙台市の住民を対象とした低沸点有機ハロゲン化合物の摂取量調査 (第1報)、*仙台市衛生研究所報*、Vol. 20、pp.210-221、1990
- 10) 佐藤尚美、渡部津子、口田圭吾、高畑寿太郎、玉川勝美、加藤丈夫、木場正彦：仙台市の住民を対象とした揮発性有機ハロゲン化合物の摂取量調査 (第2報)、*仙台市衛生研究所報*、Vol. 23、pp.163-168、1993
- 11) 山田信之、佐藤尚美、高畑寿太郎、玉川勝美、加藤丈夫：陰膳方式による揮発性有機化合物の一日摂取量調査、*仙台市衛生研究所報*、Vol. 24、pp.125-133、1994
- 12) 桑原克義、安藤剛、西宗高弘：食事からの揮発性有機ハロゲン化合物の1日あたり摂取量、*大阪府立公衆衛生研究所報*、*食品衛生編*、Vol. 25、pp. 1-6、1994
- 13) 宮田忠由、朝倉倫子、木川寛、河村太郎：マーケットバスケット方式による低沸点有機塩素化合物の一日摂取量、*横浜市衛生研究所年報*、Vol. 28、pp.93-96、1989
- 14) 笹尾忠由：マーケットバスケット方式による低沸点有機

- 塩素化合物の一日摂取量の経年変化、横浜市衛生研究所年報、Vol.35、pp.67-70、1996
- 15) 環境省：指定化学物質等検討調査、平成3年度～平成13年度
- 16) M. Miyahara, M. Toyoda, K. Ushijima, N. Nose, Y. Saito: Volatile halogenated hydrocarbons in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.43, pp.320-326, 1995
- 17) 環境省：地方公共団体等における有害大気汚染物質モニタリング調査結果について、平成10年度～平成19年度
- 18) 野崎貞彦他：全国のプール水質に関する実態調査、平成11(1999)年度厚生科学研究費補助金(健康安全確保総合研究分野生活安全総合研究事業)
- 19) 有賀高成、川本厚子、岡本寛、押田裕子、安田和男：遊泳用屋内プールの水及び空気中のトリハロメタン濃度、東京都健康安全研究センター年報、Vol.54、pp.283-289、2003
- 20) 高橋淳子他：各種浴場施設内における消毒副生成物の曝露評価、ビルと環境、No.117、pp.27-32、2007
- 21) USEPA: Liquid-Liquid extraction gas chromatographic method, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 20th edition, pp.636-641, 1998.
- 22) 中央環境審議会大気環境部会健康リスク総合専門員会：アセトアルデヒド、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン及び1,3-ブタジエンに係る健康リスク評価について、平成18年10月
- 23) 環境省：平成13年度指定化学物質等検討調査結果、平成15年3月
- 24) USEPA: Risk assessment guidance for superfund Volume I: Human health evaluation manual (Part E, Supplemental guidance for dermal risk assessment) final, July 2004
- 25) X. Xu: Dermal and inhalation exposure to disinfection by-products in drinking water, Ph. D. dissertation, Rutgers University, 2002
- 26) 厚生労働省：国民栄養の現状(平成12年国民栄養調査結果)、平成14年3月
- 27) 総務省統計局：家計調査、(品目分類)第4表 1世帯当たり年間の品目別支出金額、購入数量及び平均価格(全世帯・勤労者世帯)
- 28) 総務省自治行政局市町村課：住民基本台帳に基づく人口・人口動態及び世帯数(平成18年3月31日現在)
- 29) (財)日本炭酸飲料検査協会：炭酸検清涼飲料関係統計情報(2006年度清涼飲料生産量と1人当りの消費量)、<http://www.tansan.jp/inryou2006-11.html>
- 30) (社)日本乳業協会：牛乳等生産量、平成19年8月31日、<http://www.jdia.or.jp/association/index.html>
- 31) (社)日本アイスクリーム協会：統計情報編 アイスクリーム類及び氷菓の販売物量・金額、<http://www.icecream.or.jp/data/statistics01.html>
- 32) (社)全国はっ酵乳酸菌飲料協会：はっ酵乳・乳酸菌飲料の生産量及び都市別1世帯当たり支出額、<http://www.nyusankin.or.jp/production/production1.html>
- 33) SSF 笹川スポーツ財団：スポーツライフ・データ2002、2002年
- 34) 環境省環境保健部環境安全課・環境リスク評価室：複数媒体汚染化学物質調査研究の結果について、平成15年6月13日
- 35) K. Nagano, H. kano, H. Arito, S. Yamamoto, T. Matsushima: Enhancement of renal carcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to chloroform in male rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Vol.69, pp.1827-1842, 2006
- 36) 中央環境審議会：今後の有害大気汚染物質対策のあり方について(第八次答申)、平成18年11月8日

(平成21年5月18日受付)

Components of Estrogenic Effect in Chlorinated Drinking Water

Sadahiko ITOH*, Yuki YOSHIMURA** and Tomoyuki OKADA***

* Department of Urban Management, Kyoto University, C-1 Kyotodaigaku Katsura, Nishikyo, Kyoto 615-8540, Japan,

** Department of Water Works, OSAKA Prefectural Government, 2-30-18, Ohba, Moriguchi 570-0009, Japan,

*** Kyoto Municipal Government, 488, Homojimae-cho, Nakagyo, Kyoto 604-8571, Japan.

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.

Keywords: Chlorination, Disinfection by-products, Endocrine disrupting chemicals, Estrogenic effect, Reproductive/developmental toxicity, MVLN assay.

INTRODUCTION

Chlorination of drinking water forms by-products such as trihalomethanes (THMs) during 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; Richardson *et al.*, 2007). 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, still-birth, birth defects and so on may be associated with THMs and chlorination byproducts, 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 μm 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 $\mu\text{g/L}$, 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