

い。

3) 水道水の試験方法に関する考察

CSP800 樹脂は優れた吸着剤であるが極性物質は吸着しにくいという欠点をもつ一方で、XAD7HP 樹脂は吸着性能では CSP800 樹脂に劣るものの弱極性であり極性物質を比較的良好に濃縮できる特徴がある。したがって水道原水のエストロゲン様作用の発現には XAD7HP 樹脂で良好に濃縮される成分、すなわち水中フミン物質が寄与している可能性が高いといえる。実際、試薬フミン酸自体にもエストロゲン様作用がみられた。さらに、TOC 濃度で比較した場合、図-5.2 と図-5.6 とはほぼ同程度の作用強度を示していることから、フミン物質そのものにエストロゲン様作用があると推定するのが妥当である。

また琵琶湖水を塩素処理することでエストロゲン様作用が平均 2.3 倍に強められたが、その原因として、以下の可能性が考えられる。

- ①塩素との反応により有機塩素化合物などが生成し、この中にエストロゲン様作用を持つ分子が存在した結果作用が強められた。
- ②有機物の酸化分解および加水分解により構成成分が低分子化し、細胞膜を通過できる分子が増加した結果エストロゲン様作用が強められた。
- ③水中フミン物質との相互作用（錯体形成・吸着・分配・可溶化）で溶存していた微量の金属化学種や難溶性有機化合物（農薬等）が、フミン物質の構造の変化により開放され、エストロゲン様作用を増加させた。

本実験の塩素処理は、(濾過水の TOC 濃度):(注入塩素濃度) = 1.8:1.3 \approx 3:2 で行った。しかるに試薬フミン酸に関する実験では、(試薬フミン酸の TOC 濃度):(塩素濃度) \approx 1:2 のとき最も酵素活性相対値が大きくなる結果であった。したがって塩素濃度を高くすることでさらにエストロゲン様作用が強めらる可能性がある。

図-5.4 より、(TOC 濃度):(塩素濃度) = 3:2 のときの試薬フミン酸の塩素処理水の酵素活性相対値は 37.0% であり、試薬フミン酸と比較して約 2.5 倍である。一方、XAD7HP 樹脂濃縮法による塩素処理後の酵素活性相対値の増大割合は平均 2.3 倍であり、両者はほぼ等しいものとなった。これは XAD7HP 樹脂濃縮法にてエストロゲン様作用をもった塩素処理副生成物を有効に濃縮できていることを示すもので、XAD7HP 樹脂による濃縮が水道原水のエストロゲン様作用検出に妥当な方法であるといえる。

図-5.6 より添加水量 50ml/ml- 培養液付近から琵琶湖原水のエストロゲン様作用は検出可能となる。本実験では、XAD7HP 樹脂を用いて 6L \rightarrow 12ml へ濃縮しているが、作用の検出だけを目的とする場合には、1.2L を 100 倍濃縮して 12ml とすればよいことになる。塩素処理水である水道水ではエストロゲン様作用は高められているので、この濃縮倍率で作用の検出が可能である。もちろん最終的に得る濃縮水量をさらに少量にできる濃縮装置を準備すれば、必要水量は 1.2L 以下とすることも可能である。

4) 琵琶湖水に関する結果のまとめ

①水道原水および塩素処理水としての水道水のエストロジェン様作用を検出するためには、XAD7HP樹脂を用いるフミン物質の濃縮を目的とした方法が適当であることを示した。

②初期残留塩素濃度 1.0mg/Lで琵琶湖水の塩素処理を行った結果、エストロジェン様作用は2.3倍に強められた。なお、クロロホルムのエストロジェン様作用は認められなかった。

③水道水のエストロジェン様作用を検出するためには、1.2L程度を100倍以上に濃縮して試料を調製すればよいことを示した。

(3) オゾン処理の効果に関する結果

琵琶湖水中に含まれるフミン質（正確にはフミン質に対する濃縮法で濃縮された物質）にエストロジェン様作用が認められる。この作用に対するオゾン処理の効果、およびオゾン促進酸化処理の効果について検討した。促進酸化処理としては、過酸化水素を併用する方法とした。

1) 実験方法

1L容インピンジャーを使用し、1Lずつオゾン処理を行った。オゾン注入量約 1.8mg-O₃/min、オゾン化空気曝気量0.5Nl/min。このときオゾン吸収率約92%。オゾン消費率は、注入オゾン量と排出オゾン量との差から算出した。

過酸化水素を併用する場合は、あらかじめ過酸化水素を40mg/Lとなるように添加した上で、オゾン処理を行った。

これらオゾン処理水に対して、XAD7HP樹脂を用い、先に述べた方法で濃縮を行った。

2) 実験結果

オゾン処理前後の水質、およびオゾン処理の状況について表-5.3に示す。MVLNアッセイの結果を図-5.8, 5.9に示す。オゾン消費率1.7mg-O₃/Lの場合が図-5.8であるが、琵琶湖水の作用が大きく変化したとは認められない。一方、過酸化水素を共存させた場合では、大きく低減する結果となった。オゾン消費率を増大させた場合(図-5.9)でも同様の結果と解釈しうる。

(4) 各個化学物質との比較に関する実験

ここでは水道原水に混入する恐れのある化学物質のエストロジェン様作用について調べるとともに、それらの化学物質と濃縮した琵琶湖水の作用強度とを比較することを目的とする。

1) 対象化学物質について

水道水へのエストロジェン様化学物質の混入の経路として、

表-5.3 オゾン処理状況

試水	オゾン消費率 (mg-O ₃ /L)	pH	E260	DOC (mg/L)
琵琶湖水 る水	—	7.4	0.023	2.1
オゾン処理水	1.7	7.4	0.016	1.6
	18.2	7.4	0.009	1.8
オゾン-過酸 化水素処理水	1.7	7.3	0.012	1.6
	21.5	7.1	0.009	1.5

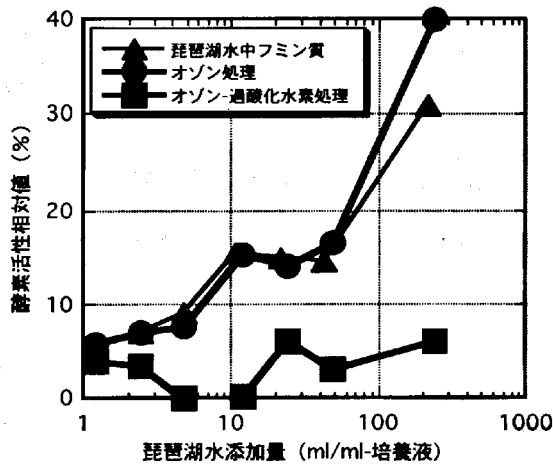


図-5.8 オゾンおよびオゾン-過酸化水素処理の効果
オゾン消費率1.7mg-O₃/L

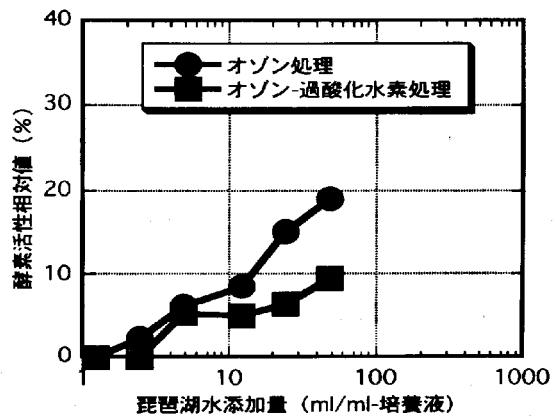


図-5.9 オゾンおよびオゾン-過酸化水素処理の効果
オゾン消費率 オゾン処理のみ : 18.2mg-O₃/L
オゾン-過酸化水素処理 : 21.5mg-O₃/L

①水道原水に含まれており、浄水処理で除去されず水道水に混入する恐れのある化学物質

②水道施設に用いられる資材や塗装、ライニング剤から溶出し、水道水に混入する化学物質が考えられる。

これらの物質の中から特にエストロゲン様作用の疑われる化学物質 16 種を取り上げ試験することとした。対象とした化学物質 16 種類の性状を表-5.4 に示す。

2) 試験結果

対象化学物質は難溶性のものが多いためエタノールに溶解し、0.22 μm メンブレンフィルターで除菌ろ過しつつ MVLN 細胞に添加した。DCC 培養液中のエタノール濃度が 1.0% までは試験結果に影響を与えないことを確認しており、エタノール濃度がす

表-5.4 試験対象化学物質の性状

分類	物質名	分子量	CAS No.	溶解度	原水	資材	主な用途
フタル酸エステル類	フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	390.56	117-81-7	45 μg/l	○	○	プラスチック可塑剤、樹脂原料、接着剤、インキ
	フタル酸ジ-n-ブチル	278.34	84-74-2	400mg/l	○	○	プラスチック可塑剤、樹脂原料、実験動物で精巣重量の減少、精細管萎縮、精子数減少がみられると報告
	フタル酸ブチルベンジル	312.37	85-68-7	2.69mg/l	○	○	プラスチック可塑剤、樹脂原料、接着剤
アジピン酸類	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	370.57	103-23-1	200mg/l		○	塩ビ樹脂可塑剤、潤滑油、耐寒用可塑剤
アルキルフェノール類	フェノール	94.11	108-95-2	6.7g/l (16°C)		○	樹脂原料(フェノール樹脂)
	4-エチルフェノール	122.17	123-07-9			○	樹脂原料その他
	4-オクチルフェノール	206.33	1806-26-4	不溶	○		界面活性剤等の原料、フェノール樹脂の原料
	4-n-ニルフェノール	220.36			○		
	4ノニルフェノール	220.36	25154-52-3		○		非イオン系界面活性剤原料、洗剤、ワニス ポリスチレンから溶出
	p-tert-ブチルフェノール	150.22	98-54-4	水に難溶	○	○	接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし
	2-sec-ブチルフェノール	150.22	89-72-5	水に難溶	○	○	接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし
	2-tert-ブチルフェノール	150.22	88-18-6	水に難溶	○	○	接着剤、樹脂安定剤、生殖毒性なし
	o-ヒドロキシビフェニル	170.21	90-43-7	水に不溶		○	ゴム原料
	ビスフェノール A	228.29	80-05-7	不溶	○	○	塗料・接着剤原料、エポキシ樹脂・ポリカーボネート樹脂原料、PC 樹脂原料、生物分解される。
	エピクロロヒドリン	92.5	106-89-8	60g/L		○	エポキシ樹脂原料 微生物による分解半減期は2週間以内とされる
人畜由来ホルモン	17β エストラジオール	272.39	50-28-2	不溶	○		人畜由来ホルモン

べて1.0%以下の範囲で実験を行った。

MVLNアッセイの結果を以下に順次示す。当該物質が最大活性を与えるときの濃度に対するE₂濃度値については、重量濃度で比較した場合とモル濃度で比較した場合について求めた。またそれぞれの試験は、ICI182,780を共存させた場合についても行っており、レセプターを介してエストロゲン様作用を発現しているといえることを確認した。

①フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (図-5.10)

検出されたのは非常に弱い作用であるが、繰り返し実験を行い、誤差ではないことを確認した。実験した濃度の範囲では細胞毒性はみられなかった。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	12	12
最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値	2.7×10^{-6}	4.0×10^{-6}

②フタル酸ジ-n-ブチル (図-5.11)

エストロゲン様作用は認められなかった。1.1 × 10⁻²g/L以上の濃度では細胞は死滅こそしなかったものの回収されたタンパク質量が非常に少なく、細胞毒性を示していた。

③フタル酸ブチルベンジル (図-5.12)

実験した濃度の範囲では細胞毒性はみられなかった。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	65	65
最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値	4.8×10^{-4}	5.6×10^{-4}

④アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル (図-5.13)

弱いエストロゲン様作用が検出されているが、10%程度の酵素活性相対値は信頼性が低い。9.3 × 10⁻²g/L以上の濃度では細胞毒性により細胞は死滅した。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	12	12
最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値	2.9×10^{-5}	4.0×10^{-5}

⑤フェノール

酵素活性相対値がプラスとなる発光量はみられなかった。5.0 × 10⁻³g/L以上では細胞毒性を示した。ただし培養液中のフェノール濃度が上昇するにつれて発光量は増大しており、目立った細胞毒性はみられないことから、RNA転写活性化～発光量の定量までいずれかの段階で何らかの妨害作用があった可能性がある。すなわちフェノールはエストロゲン様作用を示さないか、もしくはエストロゲン様作用を持つものの本試験法では検出できなかったといえる。

⑥4-エチルフェノール (図-5.14)

5.0 × 10⁻¹g/Lでは細胞は死滅しており、細胞毒性を示していた。

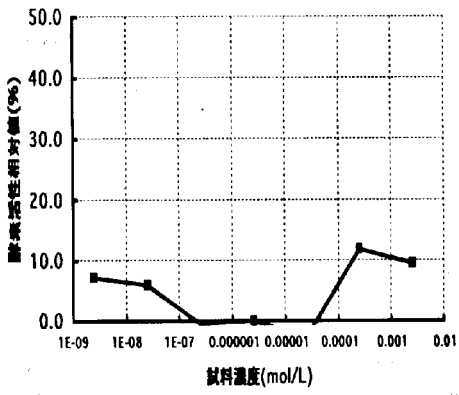


図-5.10 フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの試験結果

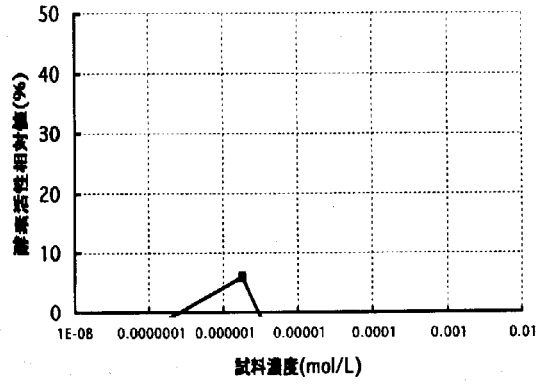


図-5.11 フタル酸ジ-n-ブチルの試験結果

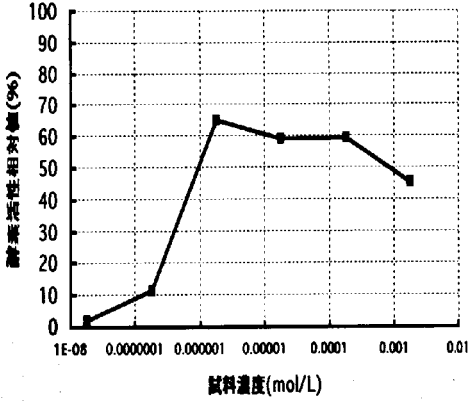


図-5.12 フタル酸ブチルベンジルの試験結果

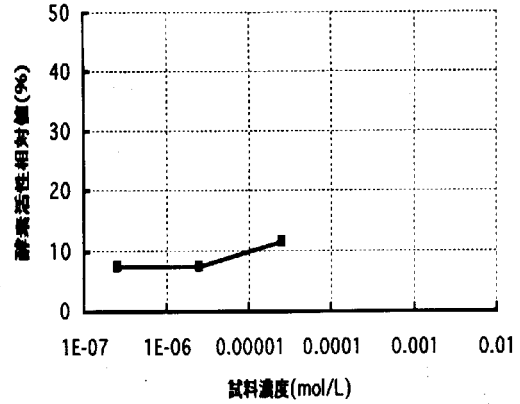


図-5.13 アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの試験結果

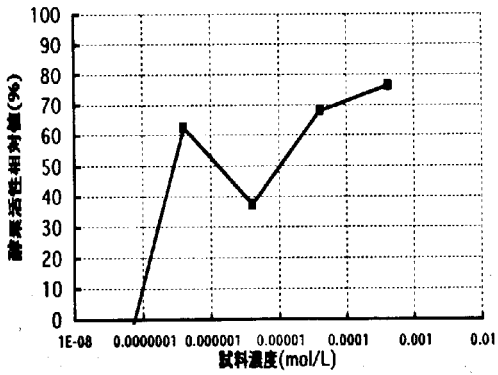


図-5.14 4-エチルフェノールの試験結果

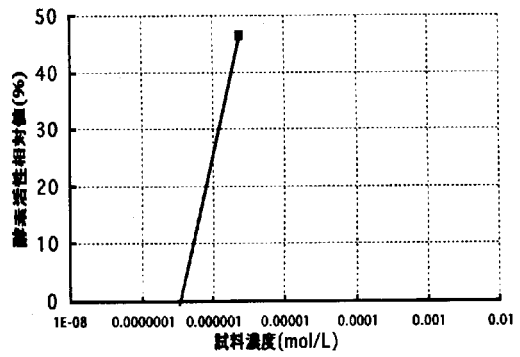


図-5.15 4-オクチルフェノールの試験結果

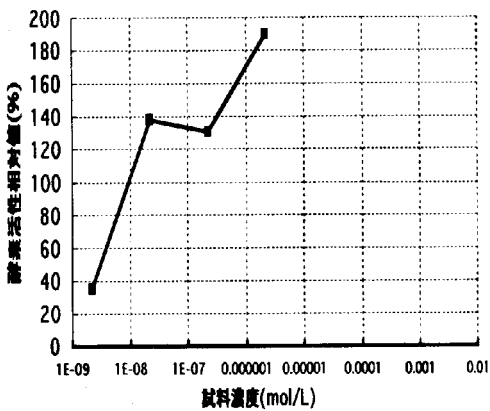


図-5.16 4-ニトロフェノールの試験結果

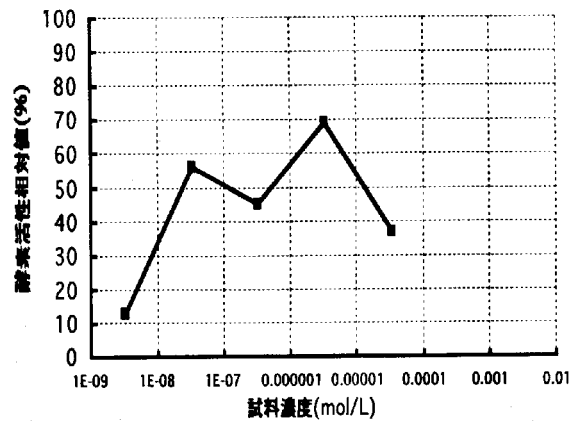


図-5.17 p-t-ブチルフェノールの試験結果

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	63	63
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	5.4×10^{-3}	2.4×10^{-3}

⑦ 4-オクチルフェノール (図-5.15)

5.0×10^{-4} g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性となっていた。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	47	47
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	5.4×10^{-4}	4.2×10^{-4}

⑧ 4-ノニルフェノール (図-5.16)

強いエストロゲン様作用を検出した。 5.0×10^{-5} g/L以上では細胞は死滅した。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	140	140
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	5.6×10^{-2}	4.5×10^{-2}

⑨ 4-n-ノニルフェノール

酵素活性相対値がプラスとなる発光量はみられなかった。 5.0×10^{-3} g/L以上の濃度では細胞は死滅した。ただし濃度に応じて発光量は増加しており、細胞毒性が特に強いいため本来のエストロゲン活性が検出できなかつた可能性が考えられる。また類似の構造の4-ノニルフェノールが非常に強いエストロゲン様作用を有していることより、4-n-ノニルフェノールにはエストロゲン様作用を発現する性質が無い、もしくは細胞毒性が強くエストロゲン様作用を検出できない物質であるといえる。

⑩ p-t-プチルフェノール (図-5.17)

5.0×10^{-2} g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	56	56
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	5.4×10^{-2}	3.0×10^{-2}

⑪ 2-sec-プチルフェノール (図-5.18)

7.8×10^{-6} g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	19	19
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	3.5×10^{-2}	1.9×10^{-2}

⑫ 2-tert-プチルフェノール (図-5.19)

7.8×10^{-4} g/L以上では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	19	19
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	3.5×10^{-4}	1.9×10^{-4}

⑬ o-ヒドロキシジフェニル (図-5.20)

5.0×10^{-3} g/L以上の濃度では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

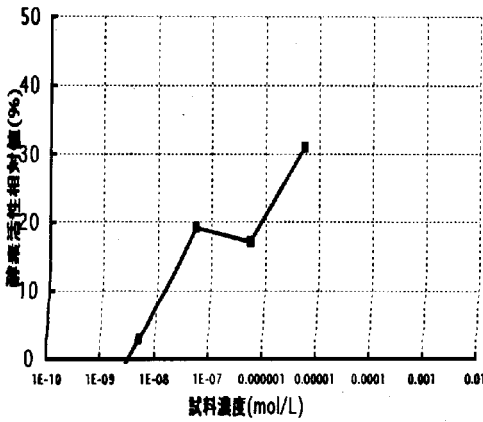


図-5.18 2-sec-ブチルフェノール試験結果

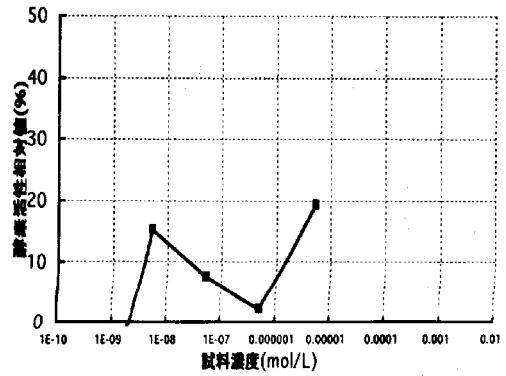


図-5.19 2-tert-ブチルフェノール試験結果

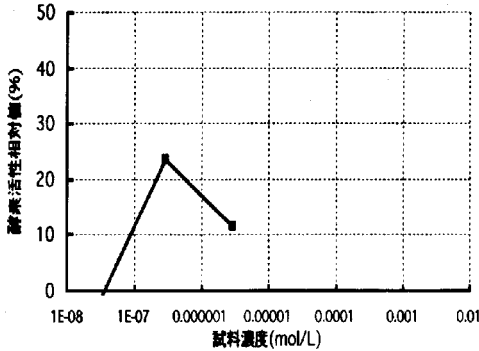


図-5.20 o-ヒドロキシフェニールの試験結果

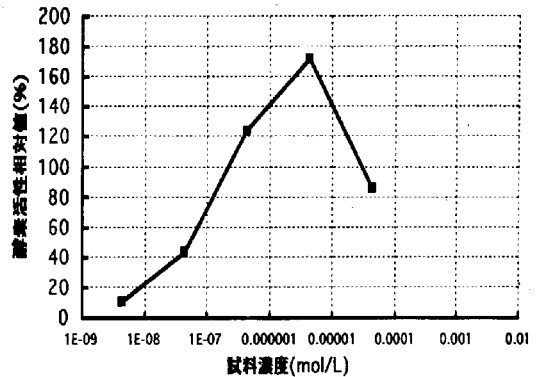


図-5.21 ビスフェノールAの試験結果

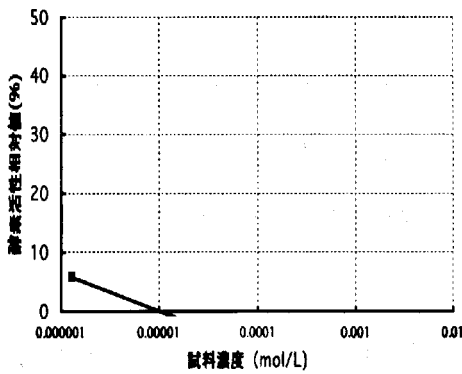


図-5.22 エピクロロヒドリンの試験結果

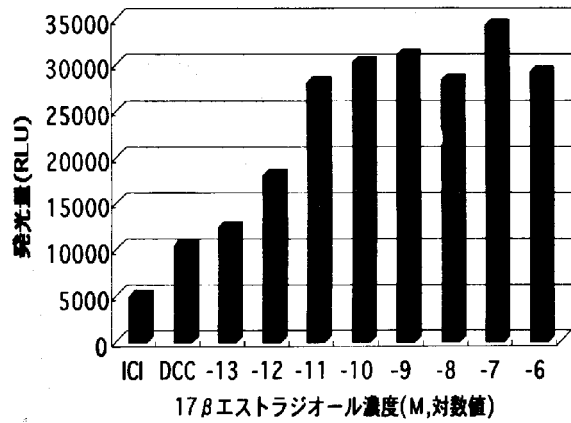


図-5.23 17βエストラジオールの濃度と発光量の関係

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	23	23
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	5.4×10^{-3}	3.4×10^{-3}

⑭ビスフェノールA (図-5.21)

強いエストロゲン様作用を検出した。いずれの濃度においても細胞毒性は観察されなかった。

	重量濃度基準	モル濃度基準
酵素活性相対値 (%)	120	120
最大活性濃度に対する E ₂ 濃度値	2.7×10^{-3}	2.3×10^{-3}

⑮ エピクロロヒドリン (図-5.22)

エストロゲン様作用は検出されなかった。1.2 × 10⁻¹g/L以上の濃度では細胞は死滅しており、細胞毒性を示した。

⑯ 17 β エストラジオール (図-5.23)

DCC 培養液中、およびICIを添加した場合とともに示す。1.0 × 10⁻⁹M付近で発光量は飽和に達し、その後は定常状態を保ちながら徐々に減少することがわかる。このときの濃度を重量で表示すると、2.7 × 10⁻⁷g/Lとなる。

⑰ 試薬フミン酸

図-5.2, 5.3の結果より、酵素活性相対値および最大活性濃度に対するE₂濃度値を計算した。

	重量濃度基準(フミン酸)	重量濃度基準(塩素処理水)
酵素活性相対値 (%)	26	69
最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値	9.1 × 10 ⁻⁶	4.5 × 10 ⁻⁶

⑱ 琵琶湖水中フミン物質 (XAD7HP樹脂により濃縮)

図-5.6の結果より、酵素活性相対値および最大活性濃度に対するE₂濃度値を計算した。

	重量濃度基準(フミン物質)	重量濃度基準(塩素処理水)
酵素活性相対値 (%)	32	81
最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値	1.8 × 10 ⁻⁶	1.1 × 10 ⁻⁶

3) 試験結果の評価

最大活性濃度に対するE₂濃度値を横軸に、酵素活性相対値を縦軸にとり、試験結果をプロットしたものを図-5.24に示す。なお横軸は重量基準の数値を用いている。

4-ノニルフェノールやビスフェノールAといった、内分泌攪乱作用の原因であると報告されている化学物質が17 β エストラジオールの近くに位置している。それに対して、試薬フミン酸、水中フミン物質およびこれらの塩素処理水は、図の左下部分に位置し、エストロゲン様作用は相対的に弱いことがわかる。

つぎに、

作用強度 = (酵素活性相対値) × (最大活性濃度に対するE₂濃度値)……(1)
 により各化学物質の作用強度を算出した。作用強度とは17 β エストラジオールを1としたときの当該物質のエストロゲン様作用の強度を表している。この数値と全国の環境水中における検出濃度¹⁷⁾を掛け合わせ、相対的重要度を求めた(式2)。

$$\text{相対的重要度} = (\text{作用強度}) \times (\text{水中検出濃度}) \dots\dots (2)$$

調査例として、建設省河川局による『水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果(前期調査)』(1998年10月)をとりあげている。

ここで水中濃度の不明な化学物質については相対的重要度を算出せず、琵琶湖水中有機物に関しては水中濃度を1.8mg-TOC/Lとした。また琵琶湖南湖および北湖における濃度データのあるものについてはその算出結果も併記した。なお検出下限値以上、

定量下限値未満を示す tr については検出下限値の数値を計算に用いた。結果を表-5.5 および図-5.25 に示す。

図より、琵琶湖水中有機物およびその塩素処理水の相対的重要度が、一般に他の化学物質よりも大きいことがわかる。琵琶湖においては値がこれを越えているのは4-ノ

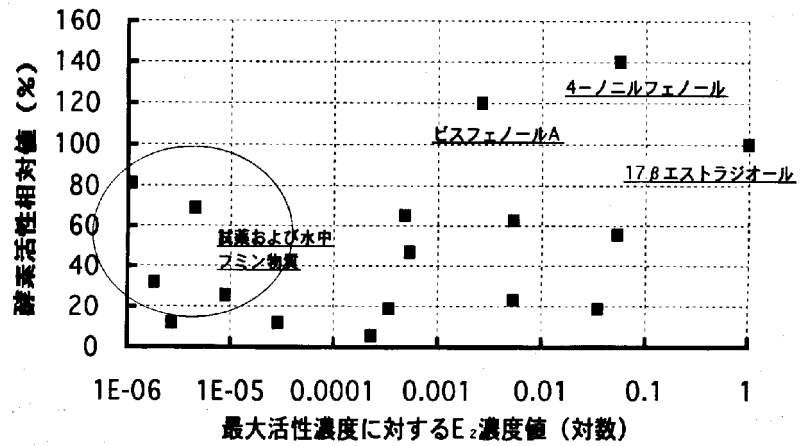


図-5.24 各化学物質の最大活性濃度に対するE₂濃度値と酵素活性相対値との関係

ニルフェノールのみである。これはすなわち、XAD7HP樹脂で濃縮されたフミン物質を主体とする物質群が、水道原水中のエストロジェン様作用の主要な成分であることを示している。その作用は塩素処理によって2.3倍程度に高まることはすでに示した。

また、17βエストラジオールも琵琶湖水中有機物およびその塩素処理水とオーダーが同じであるといえる。このように、今後着目すべき物質として、4-ノニルフェノールおよび17βエストラジオールとを指摘することができる。

実験上の課題としては、XAD7HP樹脂で濃縮されエストロジェン様作用を示した物質群の中にこれら2物質がどの程度寄与しているかを調査する必要がある。

また、水道資材からの化学物質の溶出についてのデータを得、同様な相対的重要度の評価をする必要がある。しかし、ここで示した結果から、水道資材からの溶出化学物質よりは、水道原水由来あるいは消毒副生成物によるエストロジェン様作用の方が圧倒的に強いと推測してもよいものと思われる。

エストロジェン様作用が強いかかわらず水中の測定値が無く相対的重要度が不

表-5.5 水中での相対的重要度の評価

化合物名	最大活性濃度に対するE ₂ 濃度値(重量)	酵素活性相対値	作用強度	水中濃度例(μg/L)	相対的重要度
17βエストラジオール(E ₂)	1.0	100%	1	ND~0.027	0~2.7×10 ²
フタル酸ジ-エチルヘキシル	2.7×10 ⁻⁶	12%	3.2×10 ⁻⁷	ND~9.4	0~3.0×10 ⁶
フタル酸ブチルベンジル	4.8×10 ⁻⁴	65%	3.1×10 ⁻⁴	ND~1.0	0~3.1×10 ⁴
アジピン酸ジ-エチルヘキシル	2.9×10 ⁻⁵	12%	3.5×10 ⁻⁶	ND~0.16	0~3.4×10 ²
4-エチルフェノール	5.4×10 ³	63%	3.4×10 ³	---	---
4-オクチルフェノール	5.4×10 ⁴	47%	2.5×10 ⁴	ND~tr	0~2.6×10 ³
4-ノニルフェノール	5.6×10 ²	140%	7.8×10 ²	ND~1.9	0~1.5×10 ¹
p-t-ブチルフェノール	5.4×10 ²	56%	3.0×10 ²	---	---
2-sec-ブチルフェノール	3.5×10 ²	19%	6.7×10 ³	---	---
2-tert-ブチルフェノール	3.5×10 ⁻¹	19%	6.7×10 ⁵	---	---
o-ヒドロキシジフェニル	5.4×10 ³	23%	1.2×10 ⁴	---	---
ビスフェノールA	2.7×10 ⁻³	120%	3.3×10 ⁻³	ND~1.4	0~4.6×10 ⁴
エピクロロヒドリン	2.3×10 ⁻⁴	5.9%	1.4×10 ⁵	---	---
試薬フミン酸	9.1×10 ⁻⁶	26%	2.4×10 ⁻⁶	1.8×10 ³	4.3×10 ³
試薬フミン酸塩素処理水	4.5×10 ⁻⁶	69%	3.1×10 ⁻⁶	1.8×10 ³	5.6×10 ³
琵琶湖水中フミン物質(XAD7HP樹脂)	1.8×10 ⁻⁶	32%	5.8×10 ⁻⁷	1.8×10 ³	1.0×10 ³
琵琶湖水中フミン物質塩素処理水(XAD7HP樹脂)	1.1×10 ⁻⁶	81%	8.9×10 ⁻⁷	1.8×10 ³	1.6×10 ⁴

ND: 検出下限値未満 tr: 検出下限値以上、定量下限値未満

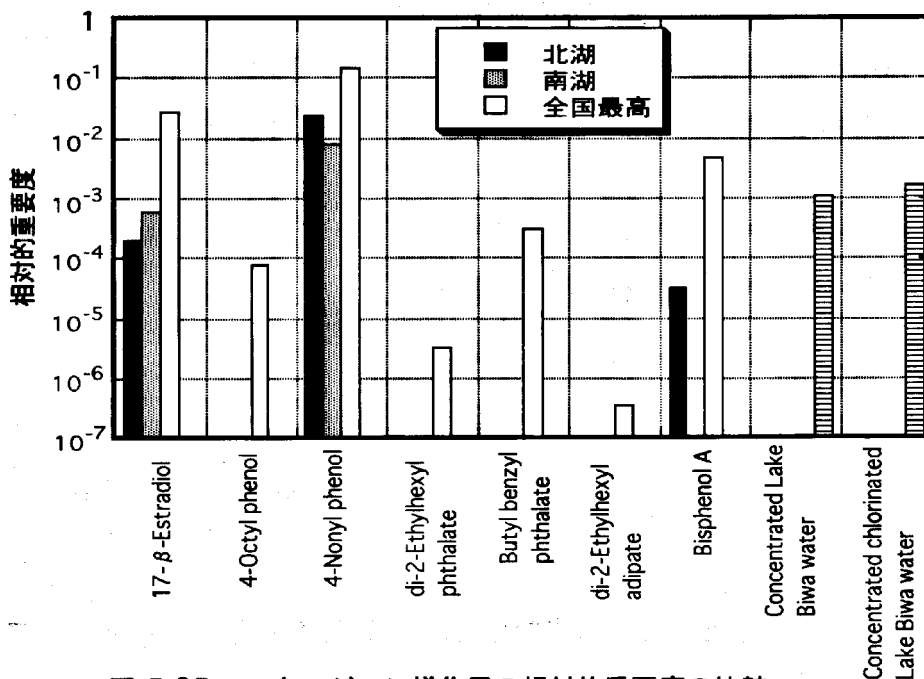


図-5.25 エストロジェン様作用の相対的重要度の比較

明であった物質、例えば4-エチルフェノール等に関しては、今後環境水中の濃度をま
ず測定する必要があるだろう。

さらに、ここで用いた化学物質は浄水処理において塩素と反応しうる。本実験では
各化学物質の塩素処理については検討を行わなかったが、実際はビスフェノールAの
ように塩素によって速やかに分解されるものもあり、その分解生成物も含めてさらに
検討が必要であると考えらる。

4) 化学物質との比較に関するまとめ

①水道水に含まれる化学物質 16 種についてエストロジェン様作用を調べた。4-
ノニルフェノールやビスフェノールAなど内分泌攪乱化学物質としてリストアップさ
れる物質のエストロジェン様作用が相対的に強かった。

②水中存在濃度を考慮し相対的重要度によって評価したところ、XAD7HP樹脂で濃
縮される琵琶湖水中有機物および塩素処理水の重要度が高く、水道水中のエストロ
ジェン様作用の主要な成分であることを指摘した。

③個別の化学物質としては、4-ノニルフェノールおよび17βエストラジオールに
ついて今後着目すべきであることを指摘した。

5. 2. 5 ま と め

EDSTACがエストロジェン様作用検出のためのin vitro試験として最も推奨してい
るMVLNアッセイを導入した。これを用いて、消毒副生成物のエストロジェン様作用
について検討する必要があるとの観点から調査研究を行った。得られた結果を以下に
まとめる。

(1) 水道水のエストロジェン様作用検出のための試料調製方法について