

# 水道水のエストロゲン様作用の特性とその制御性に関する研究

京都大学 伊藤禎彦

## 1. 調査研究の目的と内容

### 1. 1 目的と内容

「内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験法に関する諮問委員会」(Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, EDSTAC)では、個別の化学物質に加えて、次の6つのタイプの混合物についても試験を行うことを勧告している<sup>1,2)</sup>。①母乳、②大豆ベースの乳幼児食中の植物エストロゲン、③有害廃棄物処分場で一般的に検出される混合物、④農薬・肥料、⑤消毒副生成物、⑥ガソリン。

EDSTACが勧告した6つの混合物の中に「消毒副生成物」が含まれていることは重要である。わが国の水道としても内分泌攪乱誘発の可能性のあるものとして取り上げ、対応策を検討しておく必要があると考えられる。

実際、平成10年度までの研究で、琵琶湖水中からエストロゲン様作用を検出するとともに、その作用が塩素処理によって増大することを示した<sup>2,3)</sup>。また、試薬フミン酸を用いた実験でもエストロゲン様作用は塩素処理によって増大した。この実験的知見は、内分泌攪乱誘発性からみた安全管理が今後本格化すると考えられる中で、個別の化学物質のほかに消毒副生成物も管理対象とすべきであることを示唆したものとして重要と考えている。

以上から本調査研究では、消毒副生成物に重点をおいている。目的の第一は、自然水中のエストロゲン様作用の構成を把握、推定した上で、塩素によってエストロゲン様作用が強められる原因について実験的検討を行うこととした。

一方、上記検討を行った上でもエストロゲン様作用を示す原因物質や、その有害性については不明点が残らざるを得ない。しかし、水道水からエストロゲン様作用を検出できるのは事実である。したがって、水道としては処理過程での挙動の把握や、現状での除去程度、技術選択の方向性などに関する基礎資料を整備していく必要がある。この観点から、目的の第二として、凝集、活性炭吸着を取り上げ、バイオアッセイで検出されるエストロゲン様作用全体の処理性について検討する。

また、東京都玉川水処理実験施設で採取されたサンプルのエストロゲン様作用試験の結果を6. に報告する。

### 1. 2 バイオアッセイの方法について

本調査研究ではエストロゲン様作用を検出するためのバイオアッセイとしてはMVLNアッセイを行う<sup>1,4)</sup>。この方法は、EDSTACが、エストロゲン様作用を検出するためのin vitro試験として最も推奨しているものである。MVLN細胞は、ヒト乳がん細胞であるMCF-7細胞に遺伝子導入し安定形質発現を実現したものである。この細胞を用いたアッセイは、化学物質がレセプターと結合した後の転写の活性化の程度を調べるもので、実際には転写活性化の結果産生されるルシフェラーゼの酵素活性を

測定する。MVLN細胞は、作製された機関から直接分与されたものを用いた。

このアッセイは、酵母を用いるバイオアッセイなどと同様に、ある物質が細胞内でエストロゲン様の作用を有するかを調べるものである。したがって、その試験結果が陽性であるからといって、その物質が生体内において内分泌攪乱作用を有する有害物質であると結論づけられるわけではないことに注意する必要がある。

## 2. 水道原水のエストロゲン様作用の特性の検討

これまでに、琵琶湖水からエストロゲン様作用を検出する実験を行ってきた。そしてこの作用に個別物質として寄与しうるものは、17-β-エストラジオールと4-ノニルフェノールであると推定している<sup>2,3)</sup>。ここではこれら物質の琵琶湖水中濃度を測定しつつ、その寄与度について実験的考察を行った。

### 2.1 実験方法

#### (1) 分析方法

17-β-エストラジオールは、試料水1L(pH5に調整)をOASIS HLBカートリッジ(Waters社製)に通水した後、ELISA(NEOGEN社製キット使用)法で測定した<sup>2,5)</sup>。この方法により、検出下限0.0002 μg/L、定量下限0.0006 μg/Lが分析可能である。

4-ノニルフェノールは、試料水1L(pH3.5に調整)をOASIS HLBカートリッジ(Waters社製)に通水した後、GC/MSで測定した<sup>6)</sup>。

#### (2) 自然水の濃縮方法<sup>2)</sup>

基本的にはフミン物質に対する濃縮法である<sup>7)</sup>。以下、概略を示す。

①琵琶湖水採水。TOC 3.3mg/L, E260 0.047, pH 7.5。②0.45 μm フィルターろ過水6L(pH2)をコンディショニング済みXAD7HP(オルガノ)樹脂カラム(30mm径、95mm長、容積70ml)に通水。17.5ml/min。③0.1N NaOHで溶離。120mL採取。④XAD7HP小カラム(10mm径、80mm長、容積8.0ml)にて②、③を繰り返す。0.1N水酸化ナトリウム溶液10mlを通液10mL採取。⑤コンディショニング済み陽イオン交換樹脂(オルガノ製IR-120B)に通水。最終12mL(500倍濃縮)。

上記濃縮水をpH7.2に調整後、MVLN細胞に投与した。

#### (3) MVLNアッセイ

ルシフェラーゼ・アッセイを行い、酵素活性相対値、作用強度を評価した<sup>3)</sup>。酵素活性相対値は17-β-エストラジオールのエストロゲン作用に対する百分率(%)として表したものである。作用強度は、エストロゲン様作用を与える濃度の17-β-エストラジオールとの差と、酵素活性相対値とを乗じたものである。

### 2.2 実験結果と考察

#### (1) 琵琶湖水の作用に対する17-β-エストラジオール、4-ノニルフェノールの寄与

琵琶湖水(ろ過後)、およびXAD7HPによる濃縮水中の17-β-エストラジオール

および4-ノニルフェノール濃度を測定した。結果を表-1に示す。XAD7HPによる濃縮水についてもOASIS HLBによる固相吸着操作を行っている。

一方、濃縮琵琶湖水の

MVLNアッセイの結果を図-1中の実線に示す。酵素活性相対値で20%以下と大きくはなかった。

この作用に対する濃縮琵琶湖水中の17-β-エストラジオールおよび4-ノニルフェノールの寄与について考えてみる。表-1に示したように、500倍に濃縮した琵琶湖水中の17-β-エストラジオール濃度は、 $1.4 \times 10^{-10} \text{M}$ である。図-1での最高投与量は250mL/mL-培養液で、このとき培地中に含まれるエストラジオール濃度は $7.0 \times 10^{-11} \text{M}$ となる。17-β-エストラジオールのエストロゲン作用を図-2に示すが、 $7.0 \times 10^{-11} \text{M}$ における酵素活性相対値は約86%であると見積もることができる。このようにして描いたのが図-1中の一点鎖線である。また、4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用試験結果を図-3に示すが、同様の方法で計算し、図-1中の破線を描いた。

図-1からわかるように、含有17-β-エストラジオール、および4-ノニルフェ

表-1 琵琶湖水および濃縮琵琶湖水中の濃度例

	琵琶湖水(μg/L) (1999.12.11)	濃縮琵琶湖水 (μg/L)	XAD7HPによる 回収率(%)
E2	0.0009 ( $=3.3 \times 10^{-12} \text{M}$ )	0.039	8.8
NP	0.8 ( $=1.4 \times 10^{-10} \text{M}$ )	85.6	22.6

(E2: 17-β-エストラジオール、NP: 4-ノニルフェノール)

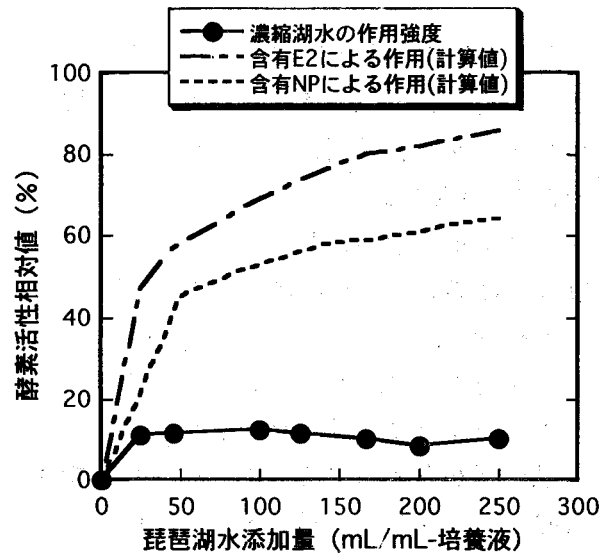


図-1 琵琶湖水のエストロゲン様作用と含有物質の作用との比較

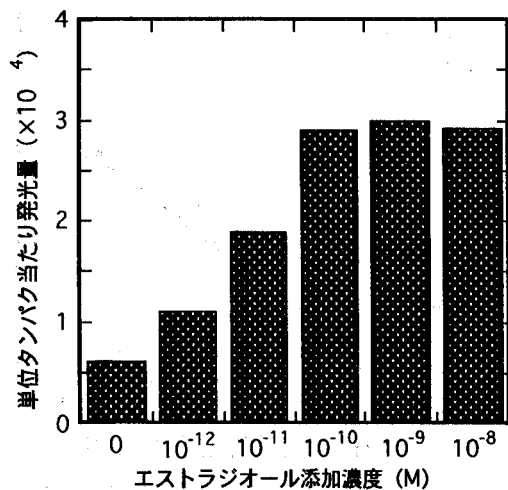


図-2 エストラジオールのエストロゲン活性

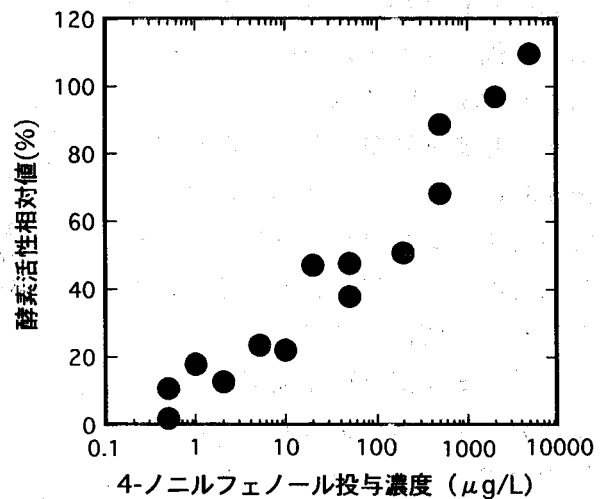


図-3 4-ノニルフェノールのエストロゲン様活性

ノールのみで、濃縮琵琶湖水の作用を大きく上回る作用を示すものと評価された。したがって水中有機物がこれら物質のエストロゲン様作用を抑制していることが考えられる。以下、この機構についてさらに検討するための実験を行った。  
**(2) 反応の相加、相殺作用に関する検討**

琵琶湖濃縮水に17-β-エストラジオールを約 $5 \times 10^{-9}$ Mとなるように添加した後、20℃、暗所に3日間静置した。その後、MVLNアッセイに供した。同様に蒸留水に添加したものも20℃および4℃に静置し、その後、MVLNアッセイを行った。

結果を図-4に示す。17-β-エストラジオールは琵琶湖濃縮水と共存することで作用が低下することがわかる。理由としては以下が考えられる。1) 水中有機物がアンタゴニスト作用（弱いアゴニスト作用含む）を示す結果、17-β-エストラジオールとレセプターとの結合機会が減少し、17-β-エストラジオールの作用が見かけ上弱められた。2) 17-β-エストラジオールと水中有機物とが結合・相互作用した結果、17-β-エストラジオールの活性が弱められた。

なお、4-ノニルフェノールについては、水中での安定性が問題となり、結果は別に(4)で示す。

**(3) ELISA法による17-β-エストラジオールの測定値について**

自然水中の17-β-エストラジオール濃度をELISAによって測定すると、過大評価となるとの理解が定着しつつある<sup>8)</sup>。もし表-1の17-β-エストラジオール濃度値が過大評価されているとすれば、図-1を用いて考察した内容も修正する必要があることになる。ここではフミン酸、および琵琶湖水中有機物の影響について調べた。

試薬フミン酸（和光純薬）を、ここで用いた17-β-エストラジオールのELISAキットの試料として測定した結果を図-5に示す。試薬フミン酸が、

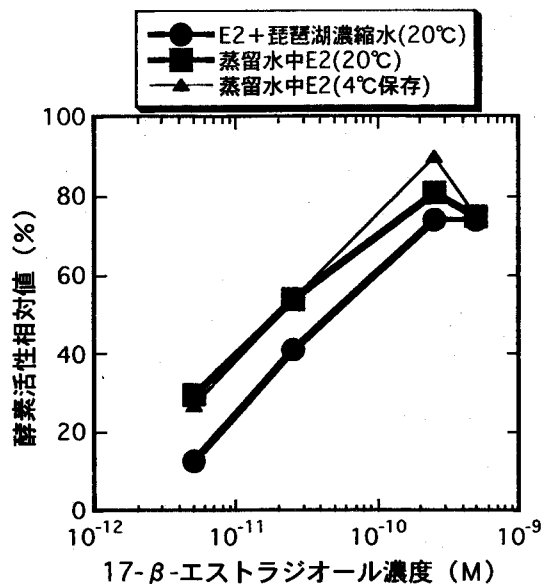


図-4 琵琶湖濃縮水による17-β-エストラジオールの作用抑制試験

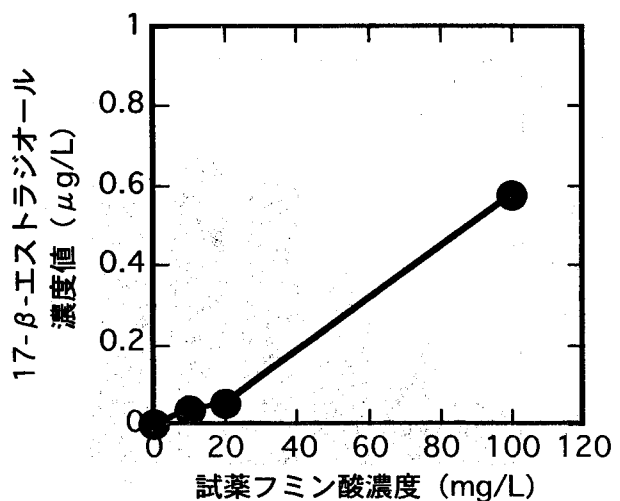


図-5 17-β-エストラジオールのELISA測定におけるフミン酸の影響

17-β-エストラジオール抗体と結合した結果、あたかも17-β-エストラジオールであるかのように測定されている。フミン酸は、過大評価の原因となりうる事がわかる。図-5では、濃度的には試料とした試薬フミン酸に対して非常に低濃度の17-β-エストラジオール測定値となっているように見えるが、水中の17-β-エストラジオール濃度からみて、この程度の値でも十分過大評価の原因となりうる。

一方、図-4の実験において、17-β-エストラジオール濃度を測定した結果が表-2である。琵琶湖濃縮水のTOCは210mg/Lであり、濃縮水中有機物が試薬フミン酸と同様の効果をもつとすると、1μg/Lレベルの増大効果となりうるが、両者に差はみられない。すなわち、試薬フミン酸と琵琶湖中有機物では特性が異なり、琵琶湖中有機物による過大評価の効果は小さいと考えてよいだろう。以上から、表-1の値の過大評価の影響は小さいと考えている。

表-2 琵琶湖濃縮水中および蒸留水中の17-β-エストラジオール濃度測定結果

	17-β-エストラジオール濃度 (μg/L)
琵琶湖濃縮水試料中	1.51
蒸留水中	1.61

#### (4) 4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用の安定性

(2)の実験と同様に、琵琶湖濃縮水に4-ノニルフェノールを5mg/Lとなるように添加し、20℃、暗所に3日間静置した。その後、MVLNアッセイを行った。同様に蒸留水に添加したのも20℃および4℃に静置し、その後、MVLNアッセイを行った。

結果を図-6に示す。いずれもほとんどエストロゲン様作用はみられないという結果となった。図-3の4-ノニルフェノールそのものの試験結果と比較すると結果が全く異なることがわかる。この実験は図-4と同様に、琵琶湖濃縮水による4-ノニルフェノールの作用抑制試験を行ったものであったが、4℃の蒸留水中でも作用が大きく低減する結果となった。4-ノニルフェノールは水中では非常に不安定であることが考えられる。

すなわち、図-1では4-ノニルフェノールの作用を水中濃度から推定したが、4-ノニルフェノールは水中でこのような作用を有するかどうかは疑問である。

#### 2. 3 まとめと課題

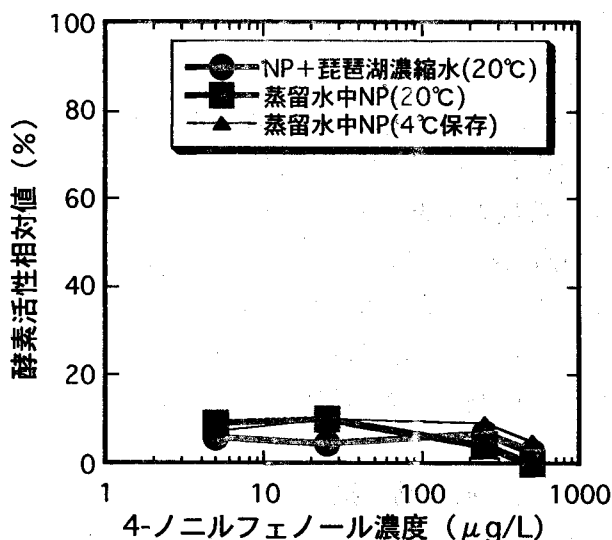


図-6 4-ノニルフェノールのエストロゲン様作用の安定性

以上の結果を総合すると、琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用に個別物質として寄与する主たる物質のひとつに17-β-エストラジオールが考えられるが、その作用は琵琶湖水中有機物と共存することで大きく抑制されていると推定される。

一方、本研究ではXAD7HP樹脂を用いる方法で琵琶湖水を濃縮しているが、表-1に示すように、17-β-エストラジオールおよび4-ノニルフェノールの回収率はそれぞれ10%以下、20%程度であった。今後は、OASIS HLBなどを用いる固相抽出法と比較しつつ、水道水のエストロゲン様作用検出のための試料調製方法についてさらに検討する必要がある。

### 3. 塩素処理によるエストロゲン様作用の増大要因に関する検討

琵琶湖水から検出されるエストロゲン様作用は、塩素処理によって増大することがわかっている。また、試薬フミン酸を用いた実験でもエストロゲン様作用は塩素処理によって増大する<sup>2,3)</sup>。この原因としては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。

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

#### 3. 1 17-β-エストラジオールと4-ノニルフェノールの塩素処理によるエストロゲン様作用の変化

##### (1) 実験方法

蒸留水に17-β-エストラジオールまたは4-ノニルフェノールを入れ、塩素を1mg/Lとなるように添加した。それぞれの物質の保存液はエタノールであるが、希釈の結果、水中エタノール濃度はμg/Lレベルで塩素処理においては無視量と考えられた。塩素添加後、pH6.5、20℃、暗所に静置した。所定日数経過後、濃度測定およびMVLNアッセイを行った。

##### (2) 実験結果

17-β-エストラジオールと4-ノニルフェノールの濃度変化を図-7に示す。

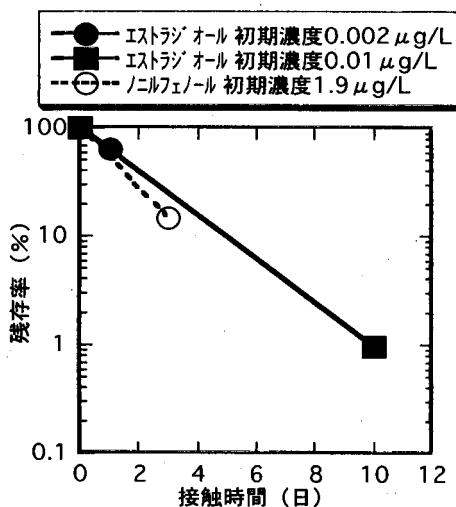


図-7 17-β-エストラジオールと4-ノニルフェノールの塩素による分解性

この間、残留塩素は約0.9mg/Lに保たれていた。17-β-エストラジオールの場合、10日間で約1/100となっており、両物質とも塩素分解は比較的緩やかであるといえる。

一方、17-β-エストラジオールについて1日後のエストロゲン作用変化を調べた結果を表-3に示す。ELISAによって濃度は1日後65%残存していると測定されたが、エストロゲン作用の残存率はわずか3.6%であると評価された。レセプターとの結合性に変化を与える反応が起きている可能性がある。

表-3 17-β-エストラジオールの塩素分解におけるエストロゲン作用の変化

	酵素活性相対値 (%)
塩素処理前	91.0
塩素1日接触後	3.3 (残存率3.6%)

(E<sub>2</sub> 2 × 10<sup>-10</sup>Mにおける活性で比較)

また4-ノニルフェノールについては、図-6に示したように、エタノール溶媒中で保存しているものを水で希釈、静置するだけでエストロゲン様作用が大きく低減する特徴がみられ、塩素処理後の作用もほとんどみられなかった。

琵琶湖水のエストロゲン様作用に個別物質として寄与しうるものは、17-β-エストラジオールと4-ノニルフェノールであると推定しているが、以上のように、塩素処理によってその作用が増大する現象はみられず、これら2物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大要因ではないと考えられる。

水中有機物と相互作用によって溶解していた17-β-エストラジオールや4-ノニルフェノールが、塩素の作用によって相互作用から解放される結果、エストロゲン様作用を増大させる可能性も考えられたが、仮にそのような機構があるとしても解放された物質は塩素によって分解されつつエストロゲン様作用を失うと考えられる。したがって、ここにとりあげたこれら2物質は、塩素による琵琶湖水の作用の増大要因ではないと考えられる。

### 3. 2 塩素副生成物のエストロゲン様作用試験

クロロホルムなど典型的な副生成物を取りあげてMVLNアッセイを行った。試験結果は17-β-エストラジオールの作用強度を1として評価した<sup>2,3)</sup>。

結果を表-4に示す。2,4-ジクロロフェノールを除きエストロゲン様作用はみられなかった。参考として示した物質の作用強度と比較すると、2,4-ジクロロフェノールの作用強度は、ビスフェノールA、4-ノニルフェノールといった強いエストロゲン様作用を示す物質と同レベルで、比較的強いエストロゲン様作用をもつといえる。

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

### 3. 3 分子量分布の変化との関係

塩素処理の前後での分子量分布の変化を測定し、エストロゲン様作用の変化との関係を調べた。

### (1) 実験方法

すでに示したと同様の方法で琵琶湖南湖表流水を濃縮した。すなわち、あらかじめ0.45 μmメンブランフィルターでろ過し、樹脂にはXAD7HPを用い、9Lを12mLに濃縮した。ろ過水およびその濃縮水のTOCはそれぞれ2.4mg/L、279mg/Lで、回収率は16%であった。この濃縮水について、分子量分布を把握するため分画を行った。塩素処理は、ろ過水の塩素要求量に加えて所定濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムを希釈して添加し、20℃、暗所に1日静置した。

分画に用いたUF膜は、Amicon社製直径14mmのYM1(公称分画分子量1000),YM10(同10000),YMT(同30000)で、洗浄した膜をAmicon社製MPS限外ろ過ユニットにセットした。これに濃縮水0.8mLをいれ、3000rpm(1350g)で30分間遠心分離を行い、ろ過液についてTOC測定を行った。

### (2) 実験結果

塩素処理前後の琵琶湖水を濃縮した水について、その分子量分布を測定した結果を図-8に示す。

これまでに塩素処理によってエストロゲン様作用は2倍程度に増大することを示した<sup>2,3)</sup>。濃縮琵琶湖水中の有機物のうち、MVLN細胞中に入り、この作用に寄与するのは分子量1000以下であると想定すると、図-8から、その分子量画分の増加はわずかである。すなわちエストロゲン様作用の増大において、塩素によって低分子化が進み、細胞内に入る物質が増えるという要因は大きくなく、塩素によって物質の構造自体が変化する影響の方が大きいものと推察される。

## 3.4 まとめ

### (1) 塩素による増大要因について

表-4 典型的塩素処理副生成物のエストロゲン様作用試験結果

化合物名	エストロゲン様作用強度
クロロホルム	0
ジクロロ酢酸	0
トリクロロ酢酸	0
抱水クロラール	0
o-クロロフェノール	0
2,4-ジクロロフェノール	$4.1 \times 10^{-3}$
(参考)	
17-β-エストラジオール	1.0
4-ニルフェノール	$7.8 \times 10^{-2}$
ビスフェノールA	$3.3 \times 10^{-3}$
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	$3.2 \times 10^{-7}$
フタル酸ブチルベンジル	$3.1 \times 10^{-4}$
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	$3.5 \times 10^{-6}$
4-エチルフェノール	$3.4 \times 10^{-3}$
4-オクチルフェノール	$2.5 \times 10^{-4}$
p-t-ブチルフェノール	$3.0 \times 10^{-2}$
2-sec-ブチルフェノール	$6.7 \times 10^{-3}$
2-tert-ブチルフェノール	$6.7 \times 10^{-5}$
o-ヒドロキシジフェニル	$1.2 \times 10^{-4}$
エピクロロヒドリン	$1.4 \times 10^{-5}$

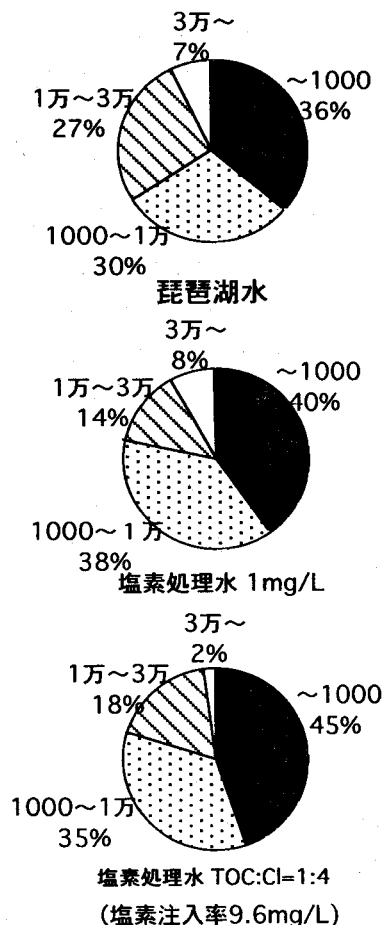


図-8 琵琶湖濃縮水の分子量分布と塩素処理による変化



塩素処理によるエストロゲン様作用の増大要因について検討を行ったが、これまでの結果からは、ここに示した以外の要因、すなわち、塩素による塩素化または酸化作用の結果生成する物質の効果が大きいものと推察される。

工学的立場からは、水道水のエストロゲン様作用低減化のためには、個別物質の除去に加えて、TOC,  $KMnO_4$  消費量などとして測定される一般有機物の除去も重視すべきであると指摘しうる。

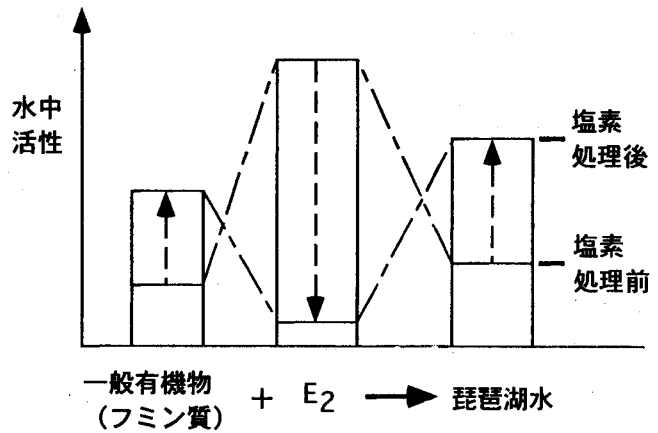


図-9 水中エストロゲン様活性の構成と塩素処理による変化の推定図

---▶ : 塩素処理を行ったときの活性変化

## (2) 水中エストロゲン様作用の構成と塩素による変化について

これまでの結果を総合すると、琵琶湖水のエストロゲン様作用による個別物質の寄与、および塩素による変化について、ほぼ図-9のように理解できるものと考えられる。

ただ、この構造および変化は琵琶湖水について推定されたもので、 $17-\beta$ -エストラジオールなどエストロゲン様作用を示す物質の存在量や自然水の特長などによって、また塩素の注入量によって変化することも考えられる。

## 4. エストロゲン様作用の浄水処理過程での処理性の検討

### 4.1 実験方法

#### (1) 凝集

琵琶湖南湖表流水を採水し、ジャーテスターを用いて凝集処理を行った。凝集剤としてはポリ塩化アルミニウム（キシダ化学製）を用い、これを  $20\text{mg/L}$  となるように添加した。急速攪拌、緩速攪拌の後、15分間静置して沈殿させ、その後サイフォンによって上澄み水を採取した。

凝集前の原水および凝集処理水ともに、水中フミン質の抽出を目的とした方法によって濃縮した。樹脂には XAD7HP を用い、 $10\text{L}$  を  $15\text{mL}$  に濃縮した。TOC としての回収率は約  $18\%$  である。

#### (2) 活性炭吸着

上記の凝集処理水に対してさらに活性炭処理を行った。カルゴン社製粒状活性炭 F400 の新炭を使用し、粒径は  $0.85\text{--}1.15\text{mm}$  範囲とした。これを内径  $18\text{mm}$ 、長さ  $300\text{mm}$  のガラスカラムに充填（充填高さ  $280\text{mm}$ ）し、直列に 4 本連結した。処理は活性炭層厚がやや小さいほかは、通常の粒状活性炭処理<sup>9)</sup>に近い以下の条件で行った。線速度  $9.4\text{m/hr}$ 、空間速度  $8.4\text{m}^3/\text{m}^3/\text{hr}$ 、接触時間  $7.1$  分、流量は上向流にて  $40\text{mL}/\text{min}$ 。

処理水は、TOCなどの水質を測定するとともに、凝集処理水と同様な濃縮を行いMVLNアッセイに供した。

### (3) 塩素処理

琵琶湖原水、凝集処理水、活性炭処理水に対して塩素処理を行った。各試料水の塩素要求量（約1.0mg/L）に加えて、1.0mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウムを希釈して添加し、20℃、暗所に1日静置した。1日後の残留塩素は0.7mg/L程度であった。

## 4. 2 実験結果

琵琶湖原水、凝集処理水、凝集および活性炭処理水の水質測定結果を図-10に示す。凝集および活性炭処理によってTOCは約80%除去されている。

MVLNアッセイの結果を図-11に示す。まず、原水のエストロゲン様作用は、凝集によって半減し、さらに活性炭処理を行うことによってほぼ消失していることがわかる。活性炭処理にともなうエストロゲン様作用の低減は、TOCの除去性とほぼ対応しているものと考えられる。

また、図-11には、これらの試料水を塩素処理したものの試験結果も示した。いずれの場合も、塩素処理した水の方がエストロゲン様作用は強い結果となっている。琵琶湖原水、凝集処理水、凝集および活性炭処理水の順に、エストロゲン様作用は低減しているものの、凝集および活性炭処理によってほぼ消失したエストロゲン様作用が塩素処理によってやや増大することがわかる。

一方、これらのエストロゲン様作用とその変化に対する個別物質の寄与については、2. および3. で論じたのと同様な説明が可能である。まず、濃縮水中に含まれる17-β-エストラジオールから計算されるエストロゲン様作用強度は、図-11の琵琶湖原水の作用強度を上回っている。すなわち、17-β-エストラジオールのエストロゲン様作用は、琵琶湖水中有機物との相互作用により抑制されているも

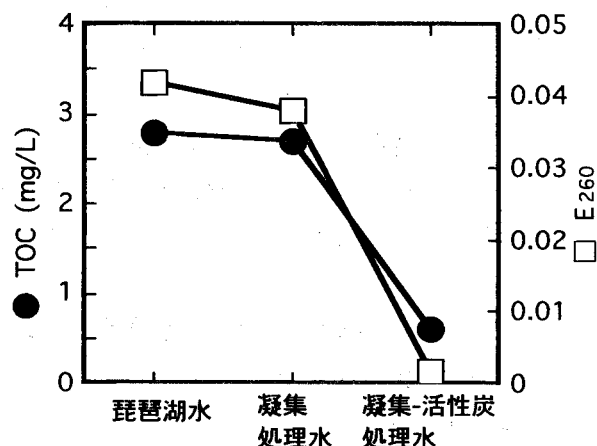


図-10 凝集および活性炭処理における水質変化

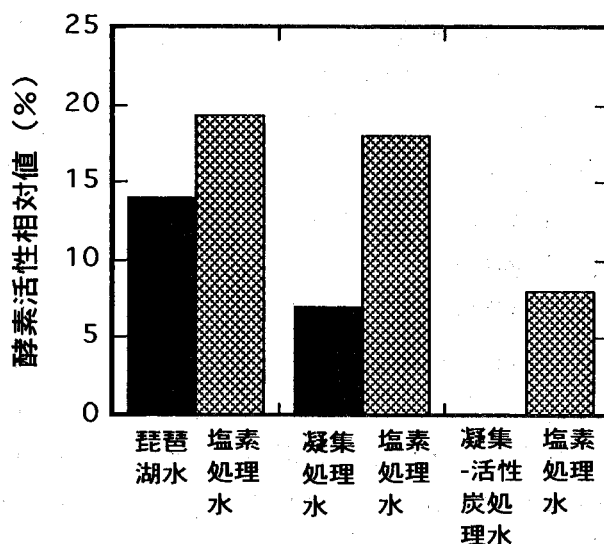


図-11 琵琶湖水のエストロゲン様作用の変化