

# 浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の推移把握手法の検討に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所 西村哲治 安藤正典

## 1. はじめに

水道原水には内分泌系をかく乱する恐れのある化学物質が種々含まれている可能性がある。これらの化学物質が浄水処理過程でどのように推移するかを把握することは、除去処理による効果や、水質管理を適切に行なうための方法を今後検討していく上で重要なことである。個々の化学物質の把握手法としての機器による分析手法に加え、対象生理作用のある化学物質を微量な成分を含めて総括的に把握することができ、かつ個々の化学物質の生理作用への共同作用も把握することが期待できる生物指標を用いた手法の検討を行なうこととした。本研究では、タンパク質を用いた系、酵母 Two-Hybrid 法及び MCF-7 レポーターアッセイの 3 種の試験法を用いて、同一試料を分担測定し、浄水過程における水質管理にこれらのスクリーニング法が適用できるか否かの検討を行なうための基礎資料を得ることを目的として、研究を進めることとした。

本年は分担担当として、水道原水を通常の処理系で処理した場合と高度浄水処理系で処理した場合について、浄水処理段階の浄水処理水を対象に、エストロゲン受容体に対する結合親和性をエストロゲンとの競合活性を指標として測定した。また、昨年度の本研究により給水栓水に混入する可能性も示唆された 4 種の化学物質を原水に人為的に加え、上記の浄水処理過程でどのようにエストロゲン様活性が推移するかを、同様のエストロゲン受容体に対する結合親和性をエストロゲンとの競合活性を指標として測定した。

本研究により、内分泌かく乱作用の点から、特に水道原水に含まれる内分泌をかく乱する恐れのある化学物質の除去方法および水質管理手法への今後へ向けた検討のための資料が得られることを期待している。

## 2. 実験方法

各浄水処理段階から対象とする試料水を各々 20 リットル分取し、参考資料 1 の「試料水の抽出・濃縮法」に従い千葉薬剤師会検査センターにおいて抽出・濃縮した。調製された抽出試料は、5 リットル分をジクロロメタンに溶解した形で提供された。送付された試料にジクロロメタンをさらに 0.5ml 加え、器壁を共洗いしてから窒素を吹き付けてジクロロメタンを除去し、抽出成分を乾固した。乾固した抽出物にジメチルスルホキシド (DMSO) を 50  $\mu$ l 加え、十分に溶解し、使用するまで -20°C に保存した。

試料水は、原水、通常処理系の試料水としては浄水処理過程にしたがって凝集沈殿水および砂ろ過水を採水した。また、高度浄水処理系の試料水として、浄水処理過程にしたがって凝集沈殿処理水、砂ろ過水、オゾン接触水、オゾン滞留槽出口水、生物活性炭処理 (BAC) 出口水および砂ろ過水を順次採水した。同様の抽出・濃縮処理を同容量の精製水についても行ない、実験ブランクとした。

人為的に添加した化学物質は、原水にフタル酸ジ-n-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール (異性体混合物) およびビスフェノール A を、それぞれ 5  $\mu$ l/l になるように加え、未添加の場合と同様の設備の実験用浄水処理施設を用い、同様の抽出・

濃縮操作を行った。

エストロゲン様作用の活性測定は、エストロゲン受容体との結合親和性を、被験物質と蛍光標識したエストロゲンとの競合結合活性を指標として測定する方法によった。操作の概略は、蛍光標識したエストロゲンとエストロゲン受容体の複合体を含む反応液(PanVera Corporation, WI, USA ; 宝酒造(株)販売) 98  $\mu$ l に DMSO に溶解した被験試料 2  $\mu$ l を混合し、室温で 60 分間平衡に達するまで静置した。この反応溶液中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光(360nm)を照射し、その蛍光物質から得られた偏光した蛍光の励起光を、Beacon 2000 蛍光偏光度測定装置(Full-Range Beacon 2000 TaKaRa Code VP2370 : PanVera Corporation, WI, USA ; 宝酒造(株)販売)を用いて、独立した3回の測定を行ない、平均値を算出した。測定した蛍光偏光度から、エストロゲン結合親和性阻害率は、下記の数式で算出し、エストロゲン様活性の推移の検討を行なった。

$$mA = 2000 \times mP \div (3000 - mP)$$

mA : 異方性

mP : 測定偏光度

$$\text{阻害率(\%)} = \{mA(0) - mA\} \div \{mA(0) - mA(100)\} \times 100$$

mA(0) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に結合した状態の異方性の値

mA(100) : 蛍光標識されたエストラジオールがエストラジオール受容体と完全に遊離した状態の異方性の値

mA : 被験物質を作用させた際の異方性の値

### 3. 結果と考察

本研究で用いた試験法の概念は、以下の考え方によっている。反応溶液中の蛍光物質に偏光フィルターを用いて偏光した励起光を照射すると、その蛍光物質から偏光した蛍光が得られる。この蛍光偏光の程度は、蛍光物質の溶液中の運動性に依存して得られる。すなわち、小さい分子は溶液中でブラウン運動を激しくしているため、偏光した励起光を当てても、蛍光の偏光性が一部失われて小さい蛍光偏光度しか得られない。一方、大きな分子は、ブラウン運動による影響が少ないため、蛍光の偏光性が失われず大きい蛍光偏光度が得られる。従って、測定条件が一定であれば、蛍光偏光度を測定することにより蛍光物質(複合体)の分子の大きさを推定することができる。対象物質がエストロゲン受容体と親和性を有する場合、エストロゲン受容体と複合体を形成しているエストロゲンと置き換わり、エストロゲン受容体と結合する。すなわち、蛍光標識したエストロゲンが受容体と分離すると、蛍光標識されたエストラジオールの分子(複合体)状態が、エストラジオール受容体と結合した大きな分子状態から、エストラジオール受容体から分離したエストラジオール自身の小さな分子と変化し、得られる蛍光偏光度が減少する結果が得られることと

なる。したがって、蛍光偏光度を測定することにより標識されたエストラジオールと被験物質のエストラジオール受容体との結合の状態が推定できる。言葉を代えて言えば、反応系に存在するエストラジオールとエストラジオール受容体との結合を、添加された被験物質が置き換わる（阻害する）程度を算定することができる。その程度を、標準物質として用いたエストラジオールのエストラジオール受容体との結合親和性と比較することにより、被験物質のエストラジオール様活性を算定する方法である。

被験試料水抽出物は、最終濃度が抽出試料水の 2000、1000、500、200、100、50、20 および 10 倍の濃度になるように反応液に添加した。前述の方法に従い、蛍光偏光度を測定し、エストロゲン結合阻害率（%）を算定した。被験試料水抽出物は、原水からの抽出物は褐色に呈色しており、浄水処理過程が進むに従って、褐色から薄黄色に外見的に色は薄くなっていた。呈色物質としては何が含まれているかは詳細な検討を行なっておらず、それらの成分は不明であるが、360nm 付近の蛍光を生じる物質が含まれていた。本研究で用いた測定法では、360nm の偏光した励起光をエストラジオールに結合した蛍光物質に照射し、偏光度の変化を測定することから、測定に妨害をきたすと考えられる。実際には 500 倍以上の濃度になるように抽出試料を添加した場合、偏光度の測定上限値を超える場合が出て、測定不能となった。したがって、以下の検討は 200 倍以下の濃度になるように抽出試料を添加した場合について行なうこととした。

図 1 に、対象物無添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。原水で見られるエストロゲン結合阻害率は、200 倍、100 倍、50 倍の場合ほぼ同一（各々、67.1%、67.9%、60.1%）であることから、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼし、正しい測定値を算出することができなくなっていると推察される。これらの結果からは、蛍光物質またはエストロゲン様物質のエストロゲン結合阻害率に及ぼす比率を明らかにすることができない。しかしながら、蛍光物質およびエストロゲン様活性物質を合わせた成分として考察すると、通常処理系での凝集沈殿処理及び砂ろ過処理では、この試験系で測定される両物質の合算量の削減効果は見られるが、必ずしも十分削減されず残存している可能性があると考えられる。

図 2 に、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。通常処理系ほどではないが、浄水処理過程の初期段階では、試料に含まれている蛍光物質が測定値に影響を及ぼしていることが考えられる。高度処理系において、浄水処理過程の後期の段階に進むと、エストロゲン結合阻害率が大きく減少していることから、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の高度処理系での後期処理過程の削減効果は高いと考えられる（200 倍濃縮試料添加時、生物活性炭処理水（BAC 出口水））。その後の砂ろ過水でエストロゲン結合阻害率がわずかに上昇（エストロゲン結合阻害率；200 倍濃縮試料添加時 9.5%、100 倍濃縮試料添加時 14.2%）しているが、これについては現在のところ不明である。これらの結果から、蛍光物質またはエストロゲン様活性物質の削減にはオゾン処理および生物活性炭処理が有効と思われる。

図 3 に、4 種の対象化学物質添加条件における浄水処理過程通常処理系でのエストロゲン結合阻害率（%）の推移を示す。対象とした 4 化学物質を添加しない場合に比べ（図 1）、原水、凝集沈殿処理水及び砂ろ過水のどの場合もエストロゲン結合阻害率が高くなっている。これは、通常処理系では、対象とした 4 種の化学物質由来によるエストロゲン結合阻

害率に及ぼす作用を十分に削減できないことを示唆している。

図4に、対象物添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率(%)の推移を示す。対象とした4種の化学物質を添加しない場合に比べ(図2)、どの処理段階においてもエストロゲン結合阻害率が高くなっている。これは、高度処理系においても対象とした4種の化学物質由来によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を完全に削減できない可能性を示唆している。特に、浄水処理初期の凝集沈殿水、砂ろ過水では、ほとんど同レベルでエストロゲン結合阻害率が推移しており、これらの処理では対象とした4種の化学物質によるエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用を削減することは十分でないと考えられる。この結果は通常処理系での結果とも一致している。また、対象物添加条件ではオゾン処理による削減効果は、対象物無添加条件における浄水処理過程高度処理系でのエストロゲン結合阻害率の推移の結果(図2)と比べ、低い結果となっていた(100倍濃縮試料では27.9%、50倍濃縮試料では32.2%の削減効果)。対象物無添加条件のオゾン処理でエストロゲン結合阻害率が対象物添加条件に比べ減少した割合が高かったのは、①エストロゲン様活性物質の濃度が低いため、オゾン処理による反応が十分に進行した結果、エストロゲン様活性物質が分解されエストロゲン結合阻害率に及ぼす作用が減少した割合が高くなった、②オゾン処理で分解効率が高かったのは添加した4種の化学物質とは異なるエストロゲン様活性物質であり、③または蛍光物質であり、添加された4種の化学物質の分解効率が悪いために残存した結果、対象物無添加条件に比べ対象物添加条件ではエストロゲン結合阻害率に及ぼす影響が大きく観察された、等の可能性が考えられる。オゾン滞留槽出口水ではさらにエストロゲン結合阻害率が減少していることから、オゾン処理の時間が分解効率に及ぼす影響も考慮する必要があるかもしれない。

さらに、オゾン処理を含め各浄水処理過程でのこれら4種の化学物質の挙動を把握することにより、浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の推移に関する情報が蓄積されるものと思われる。

#### 4. おわりに

本試験研究において、浄水処理により原水に含まれている蛍光物質またはエストラジオール様物質は削減されていることが示唆された。削減効率は、通常処理系に比べ高度浄水処理系の方が高いと考えられ、特に、オゾン処理およびBAC処理後には蛍光物質またはエストラジオール様活性物質が削減されていると思われる。しかし、BAC処理後、砂ろ過処理をすることによりエストラジオール様活性がわずかではあるが上昇する傾向が見られた。通常処理系や高度処理系の初期段階での凝集沈殿や砂ろ過処理では削減効果は不十分な結果であった。

蛍光偏光度によるエストロゲン様活性物質の検討には、原水を10000倍濃縮すれば充分であった。また、試料量としては、最少量15 $\mu$ lで試験は可能であった。ブランクの1000倍濃縮試料ではエストロゲン結合阻害活性が観察された。これは、使用した固相カートリッジのポリマー充填剤由来のエストロゲン様物質が十分除去されていなかった可能性が考えられる。カラムの前処理法に検討の余地が残されている。

濃縮試料は着色していた。呈色成分に蛍光物質が含まれており、本試験系では妨害作用を及ぼすと考えられる。得られた結果が、エストラジオール様活性だけを示すのではなく、

蛍光物質成分が偏光度を変化させている可能性が含まれていることを考慮しなければならない。また、抽出成分にタンパク質を変性させる物質が高濃度含まれている場合は、受容体（タンパク質）を変性させることにより蛍光標識されたエストジオールを遊離し、偏光度を変化させる可能性も考慮しなくてはならない。今後、濃縮試料中の蛍光を生じる物質やタンパク質を変性させる物質の除去など、試料調製について検討していかなければならないであろう。