

総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の水道水中の挙動と対策等に関する研究

主任研究者 国包 章一 国立公衆衛生院水道工学部 部長

研究要旨 内分泌かく乱作用の疑いのある化学物質のうちフタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ビスフェノールA及びノニルフェノールの4物質と農薬類を主に取り上げ、その水道水中における挙動と対策等に関する3ヶ年計画の研究に着手した。浄水処理過程における挙動及び除去対策に関しては、浄水場2箇所の実験プラントを用いて浄水処理実験を各2回行い、フタル酸類等の4物質が浄水処理によってよく除去されることを確認した。また、日本国内で使用されている農薬のうち、内分泌かく乱化学作用の疑いのある農薬は22種であることを明らかにした。水道用資機材からの溶出特性及び溶出防止対策に関しては、浄水場に2系統の配水管連続通水実験設備を設置し、配水管7種からのフタル酸類等4物質の溶出量の経時変化を調べる実験を開始した。この結果、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの溶出量は通水開始1ヶ月後にむしろ増加するが、その他の3物質については減少することが認められた。また、水道用エポキシ樹脂塗料の組成やその構成モノマーの毒性等に関する情報を整理した。水道水等の内分泌かく乱作用の評価に関しては、蛍光偏光度法、酵母Two-Hybrid System法及びMVLNアッセイ法につき基礎的検討を行うとともに、これらの試験法を用いて浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化等につき検討した。さらに、ビスフェノールAを塩素処理すると、その蛍光偏光度法によるエストロゲン様活性が増加することを明らかにするとともに、その塩素処理生成物につきGC/MS法及び分子軌道法を用いて検討した。

分担研究者 相澤 貴子 国立公衆衛生院水道工学部 室長
安藤 正典 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 部長
伊藤 禎彦 京都大学大学院工学研究科 助教授
大原 憲司 (財)水道技術研究センター 部長
亀井 翼 北海道大学大学院工学研究科 助教授
高木 博夫 国立環境研究所地域環境研究グループ
主任研究員
西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 室長
米沢 龍夫 (社)日本水道協会工務部 課長

A. 研究目的

内分泌かく乱作用の疑いのある化学物質の中で、水道原水や水道水中に比較的高い頻度で検出されるものとしては、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ビスフェノール A 及びノニルフェノールの 4 物質と農薬類がある。水道水の内分泌かく乱化学物質による汚染は、環境汚染に由来する水源起因の場合と水道システム自体に起因する場合に大別される。これらのうち水源汚染に由来する農薬や樹脂添加剤等の化学物質については、水道水中における存在状況とともに、その使用実態や環境中への排出量、水道原水中における存在状況や浄水過程における挙動等について詳細に把握し、その除去対策等についても検討することが重要となる。また、水道システム自体に起因する物質としては、水道管等の水道用資機材に用いられている樹脂・塗料の原材料や添加剤がある。これらの物質が問題となる程度にまで水道水中に溶出するとすれば、それに対する取り組みについても早急に検討する必要がある。

これらのことから、本研究は、内分泌かく乱作用の疑いのある化学物質を対象に、以下のようなことを目的として実施するものである。

- 1) これらの物質の浄水処理過程における挙動を明らかにするとともに、その除去及び制御技術につき検討する。
- 2) これらの物質の水道管等水道用資機材からの溶出特性を明らかにするとともに、その防止対策につき検討する。
- 3) 水道原水や水道水の内分泌かく乱作用の評価手法を確立するとともに、その適用可能性を明らかにする。

なお、本研究では、内分泌かく乱作用の疑いのある化学物質として、水道原水及び水道水中で比較的高い頻度で検出される、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ビスフェノール A 及びノニルフェノールの 4 物質と農薬類を主に取り上げることとする。

B. 研究方法

1. 浄水処理過程における挙動及び除去対策

(1) 浄水処理過程におけるフタル酸類等の挙動

東京都水道局玉川浄水場及び大阪市水道局柴島浄水場の実験プラントを用いて浄水処理実験を行い、それぞれについて原水、凝集沈澱処理水、砂ろ過水、浄水等、各処理工程ごとの試料水を採取して、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール及びビスフェノール A の濃度を測定した。この実験では、原水をそのまま用いた場合のほか、これらの 4 物質を原水に添加した場合についても検討した。

(2) 農薬の使用実態とそのエストロゲン様活性

内分泌かく乱作用の疑いのある農薬を対象に、日本国内におけるその使用実態を文献調査した。また、トリアジン系農薬等のエストロゲン様活性につき、酵母 Two-Hybrid System 法を用いて検討した。

2. 水道用資機材からの溶出特性及び溶出防止対策

(1) 水道管からのフタル酸類等の溶出特性

国内の水道で広く使用されている 7 種類の配水管を調査対象として選び、各配水管からのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール及びビスフェノール A 溶出量の経時変化を調べるための実験に着手した。この実験では、東京都水道局玉川浄水場の構内にこれらの配水管を直列に接続した実験設備を設け、残留塩素を含む水道水を常時連続的に通水するようにした。そして、一定期間ごとに配水管を取り外して試験室に搬入し、一般的な試験条件下で溶出試験して各配水管ごとの溶出量を測定することにした。また、各管種ごとにメーカーを変えて 2 品目を選び、2 系列の実験設備とした。実験期間は 2 年間で予定している。

初年度に当たる本年度は、通水初期に当たる平成 12 年 2 月及び通水開始後 1 ヶ月間を経過した 12 年 3 月の 2 回にわたって溶出試験を行った。

(2) 水道用塗料中の化学物質に関する基礎情報整理

水道用資機材からの化学物質の溶出は、その内面塗装に用いられている塗料の組成や配合割合に関係していると考えられることから、わが国における水道用塗料に関する規格の変遷と現状、各塗料の組成、構成モノマーの毒性等につき文献調査した。

3. 水道水等の内分泌かく乱作用の評価

(1) 酵母 Two-Hybrid System 法による代謝活性化の効果

ビフェニル類を対象として酵母 Two-Hybrid System 法によりエストロゲン様活性を評価するとともに、代謝活性化した場合の活性の変化につき検討した。

(2) 蛍光偏光度法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

水道の浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき、蛍光偏光度法を用いて検討した。試料水としては、東京都水道局玉川浄水場実験プラントにおいて浄水処理実験を行った際の原水、凝集沈澱処理、砂ろ過水、浄水等を用いた。

(3) 酵母 Two-Hybrid System 法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

酵母 Two-Hybrid System 法による水道水等のエストロゲン様活性の評価に関して基礎的検討を行うとともに、この試験法を用いて、東京都水道局玉川浄水場実験プラント等での浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき検討した。

(4) MVLN アッセイ法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

遺伝子導入ヒト乳がん由来細胞を用いた MVLN アッセイ法により、琵琶湖水等のエストロゲン様活性につき検討するとともに、東京都水道局玉川浄水場実験プラントでの浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき検討した。

(5) ビスフェノール A の塩素処理に伴うエストロゲン様活性の変化

水道原水中において比較的高い頻度で検出され、しかも塩素処理によって簡単に消失するビスフェノール A を対象として、その塩素処理による化学構造及びエストロゲン様活性等の変化につき検討した。

C. 研究結果及び考察

1. 浄水処理過程における挙動及び除去対策

(1) 浄水処理過程におけるフタル酸類等の挙動

東京都水道局玉川浄水場の実験プラントを用いて、平成 11 年 11 月及び 12 年 1 月の 2 回にわたって浄水処理実験を行い、それぞれについて原水、凝集沈澱処理、砂ろ過水、浄水等、各処理工程ごとの試料水を採取して、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ノニルフェノール及びビスフェノール A の濃度を測定した。この実験では、原水をそのまま浄水処理した場合のほか、原水にこれらの 4 物質をそれぞれ $1\mu\text{g/l}$ ずつ添加した場合及び $5\mu\text{g/l}$ ずつ添加した場合についても検討した。その結果、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル及びノニルフェノールは砂ろ過で、フタル酸ジ-n-ブチルは砂ろ過、オゾン処理及び生物活性炭処理で、ビスフェノール A は砂ろ過及びオゾン処理で、それぞれよく除去されることが示された。なお、無添加の場合における原水中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃度は、1 回目が $0.20\mu\text{g/l}$ 、2 回目が $0.75\mu\text{g/l}$ であったが、その他の物質は定量下限値前後の濃度であった。

また、大阪市水道局柴島浄水場の実験プラントを用いて、前記と同様の浄水処理実験を行った。この実験では、原水ではなく凝集沈澱処理水に 4 物質を添加した。その結果、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルは砂ろ過及び生物活性炭処理で、フタル酸ジ-n-ブチルは生物活性炭処理で、ノニルフェノール及びビスフェノール A はオゾン処理で、それぞれよく除去されることが示された。

以上のような除去特性の違いは、主として両者の処理システムの相違によるものと考えられた。

(2) 農薬の使用実態とそのエストロゲン様活性

日本国内で使用されている農薬のうち、内分泌かく乱化学作用の疑いのある農薬は 22 種であり、その内訳は殺虫剤が 6 種、殺菌剤が 16 種であった。これらの農薬の過去 8 年間における出荷量データを整理した。

また、トリアジン系農薬 5 種（いずれも除草剤）及び国内河川で検出されている農薬 16 種（殺虫剤 10 種、殺菌剤 1 種、除草剤 5 種）の総計 21 種につき、酵母 Two-Hybrid System 法によりエストロゲン様活性を調べた。その結果、agonist としては S9 の添加の有無にかかわらずいずれもエストロゲン様活性は認められなかったが、antagonist としてはプロモブチドなど 6 種について S9 無添加系で活性が認められた。

2. 水道用資機材からの溶出特性及び溶出防止対策

(1) 水道管からのフタル酸類等の溶出特性

東京都水道局玉川浄水場に設置した 2 系統の配水管連続通水実験設備を用いて、配水管 7 種からのフタル酸類等 4 物質の溶出量の経時変化を調べた。この結果、溶出が認められた管は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては当初に 3 種、1 ヶ月後に 2 種、フタル酸ジ-n-ブチルについては当初に 2 種、1 ヶ月後に 0 種、ノニルフェノールについては当初に 3 種、1 ヶ月後に 1 種、ビスフェノール A については当初に 4 種、1 ヶ月後に 1 種で、い

ずれについても実験開始当初と 1 ヶ月後とを比べるとその数が減っていた。1 ヶ月後にいずれかの物質の溶出が認められた管は、すべて実験開始当初においても同じ物質の溶出が認められていた。また、このうちフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの溶出が 1 ヶ月後に認められた 2 種の管については、実験当初に比べて溶出量がいずれも増加していた。しかし、その他の 3 物質については、いずれの場合も溶出量が減少していた。実験当初及び 1 ヶ月後を通じて、単位接水面積当たりの各物質の最大溶出量は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルが $23 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、フタル酸ジ-n-ブチルが $13 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、ノニルフェノールが $12 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 、ビスフェノール A が $0.60 \mu\text{g}/\text{m}^2$ であった。なお、メーカーが異なる同種の管で、同時に同じ物質の溶出が認められた例は全くなかった。

(2) 水道用塗料中の化学物質に関する基礎情報整理

水道用塗料に関連する規格の変遷と現状につきレビューするとともに、最も代表的な水道用塗料であるエポキシ樹脂塗料数種を取り上げて、各々の組成と構成モノマー、及び、構成モノマーの毒性につき明らかにした。

3. 水道水等の内分泌かく乱作用の評価

(1) 酵母 Two-Hybrid System 法による代謝活性化の効果

ビフェニル類 6 種を対象として酵母 Two-Hybrid System 法によりエストロゲン様活性を調べたところ、*p*-ヒドロキシビフェニル及び 4,4'-ジヒドロキシビフェニルにつき有意な活性が認められた。さらに、S9 を添加して代謝活性化した場合における活性の変化につき検討したところ、ビフェニル及び *m*-ヒドロキシビフェニルで明らかに活性が認められるようになったほか、*p*-ヒドロキシビフェニル及び 4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは活性の増強が確認された。

(2) 蛍光偏光度法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

東京都水道局玉川浄水場実験プラントでの浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき、蛍光偏光度法により評価した結果、オゾン処理及び生物活性炭処理による活性の減少が顕著に認められた。

(3) 酵母 Two-Hybrid System 法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

水道水等の酵母 Two-Hybrid System 法によるエストロゲン様活性の評価においては、試料水中の成分の析出等による影響に注意する必要があること、水道原水中に多く含まれるフミン質は塩素処理をするしないにかかわらず活性が認められないことなどを明らかにした。

また、東京都水道局玉川浄水場実験プラントでの浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき、酵母 Two-Hybrid System 法により検討した結果、砂ろ過による活性の低下が認められた。

(4) MVLN アッセイ法による水道水等のエストロゲン様活性の評価

琵琶湖水やその凝集沈澱処理水及び活性炭処理水と、これらを塩素処理した試料水につき、MVLN アッセイ法によるエストロゲン様活性を比較した結果、いずれも塩素処理した場合により高い活性が認められた。

また、東京都水道局玉川浄水場実験プラントでの浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化につき、MVLN アッセイ法により検討した結果、凝集沈澱処理及びオゾン処理による活性の低下が認められたほか、一部の 경우에는 砂ろ過による活性の低下が認められた。

(5) ビスフェノール A の塩素処理に伴うエストロゲン様活性の変化

ビスフェノール A の塩素処理生成物を LC/MS 法により測定した結果、数種類の塩素付加物などの存在が確認された。また、これとは別に分子軌道法を用いて、ビスフェノール A と塩素との反応経路につき推定した。

さらに、ビスフェノール A の蛍光偏光度法によるエストロゲン様活性は、その塩素処理によって増加することを明らかにした。

D. 結論

内分泌かく乱作用の疑いのある化学物質のうちフタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジ-n-ブチル、ビスフェノールA及びニルフェノールの4物質と農薬類を主に取り上げ、その水道水中における挙動と対策等に関する3ヶ年計画の研究に着手した。

浄水処理実験プラントを用いた標準物質添加実験等により、フタル酸類等の4物質が浄水処理によってよく除去されることを確認した。凝集沈澱、砂ろ過、オゾン処理、活性炭処理等の個々の単位処理プロセスによるフタル酸類等の除去特性については、今後さらに詳しく検討する必要があると考えられる。また、日本国内で使用されている農薬につき文献調査し、このうち内分泌かく乱化学作用の疑いのある農薬は22種であることを明らかにした。今後、これらの物質のエストロゲン様作用につきさらに詳しく検討する必要がある。

水道用配水管7種からのフタル酸類等4物質の溶出量につき調査し、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの溶出量は通水開始1ヶ月後にむしろ増加するが、これ以外の3物質の溶出量は減少することを明らかにした。今後、溶出量の経時変化につき継続して調査することになっている。また、水道用エポキシ樹脂塗料の組成やその構成モノマーの毒性等につき文献調査した。

このほか、水道水等の内分泌かく乱作用の評価手法を確立するため、蛍光偏光度法、酵母Two-Hybrid System法及びMVLNアッセイ法につき基礎的検討を行うとともに、これらの試験法を用いて浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の変化等につき検討した。これらの試験法の適用可能性に関してはまだ十分な成果が得られておらず、今後さらに検討を続ける必要があると考えられる。また、ビスフェノールAを塩素処理することによって、蛍光偏光度法によるエストロゲン様活性が増加することを明らかにするとともに、その塩素処理生成物につきGC/MS法及び分子軌道法を用いて検討した。塩素処理による反応経路の解明等が今後の検討課題である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ・国包章一(1999) 内分泌攪乱作用を疑われている化学物質の水道における実態調査、水環境学会誌、Vol. 22, pp.633-635.
- ・亀井 翼ほか(1999) 水環境と内分泌攪乱物質、廃棄物学会誌、Vol.10、No.4、pp.288-292.
- ・Hu, J., Morita, T., Magara, Y., and Aizawa, T.(2000) Evaluation of reactivity of pesticides with ozone in water using the energies of frontier molecular orbitals, Water Research, Vol.34, (8) pp.2215-2222.
- ・S. Itoh, H. Ueda, T. Nagasaka, G. Nakanishi, and H. Sumitomo(1999) Evaluating variation of estrogenic effect by drinking water chlorination with the MVLN assay, Proceedings of the 3rd IWA Specialized Conference on Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants -Ecoazard '99-, pp.92-99.

2. 学会発表

- ・伊藤安紀、守田康彦、浅見真理、相澤貴子(2000) LC/MSによる非温界面活性剤及び生分解生成物の一斉分析法の検討、第34回日本水環境学会年会講演集,京都, pp.84.
- ・胡建英、大久保慎二、相澤貴子(2000) フェノール類の塩素処理分解物のエストロジェン様作用の評価、第34回日本水環境学会年会講演集,京都, pp.573.
- ・大久保慎二、相澤貴子、国包章一、胡建英(2000) ビスフェノールAの塩素処理によるエストロジェン様作用への影響及び副生成物の挙動、第51回全国水道研究発表会講演集、pp.610-611.
- ・J. Hu, T. Aizawa, and S. Kunikane(2000) Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic compound, 1st World water congress of the international water association, July.3-7, Paris.
- ・Y. Magara, T. Kamei and S. Kunikane(1999) Study on environmental endocrine disrupting chemicals in water supply, Proc. of 5th US-Japan Governmental Conference on Water Quality Management, Colorado Springs, USA.
- ・H. Sumitomo, S. Itoh, and H. Ueda(1998) Detection of Endocrine disrupting effect of humic acid in water by reporter gene assay, Proc. of fourth Kansai-Quebec International Workshop in Environmental Sciences, pp.6-7, Montreal.
- ・住友恒、伊藤禎彦、植田洋行、長坂俊樹、中西岳(1999) 水道原水中のエストロゲン様作用の検出に関する実験、第50回全国水道研究発表会講演集、pp.556-557.
- ・住友恒、伊藤禎彦、植田洋行、長坂俊樹、藤井健生(1999) 水道原水のエストロゲン様作用に対する塩素およびオゾン処理の影響、第50回全国水道研究発表会講演集、pp.552-553.
- ・澤田恵枝、増田修一、守田康彦、浅見真理、胡建英、相澤貴子(1999) 非イオン界面活性剤(APE)の分析法について、第50回全国水道研究発表会講演集、pp.578-579.
- ・胡建英、守田康彦、増田修一、相澤貴子(1999) フェノール類物質のエストロゲン受容体結合活性に関する構造活性相関、1999 計算化学討論会、日本化学プログラム交換機構(JCPE).

- Y. Magara, T. Aizawa, M. Ando, M. Morita, H. Ito, Y. Seki, T. Matumura(1999) Determination of Low Dioxins and PCBs concentration in ambient water using volume in situ pre-concentration system, Proc. of Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs-Dioxin Symposium, Vol.40, pp.205-210, Venice, Italy.
- 伊藤禎彦、長坂俊樹、中西 岳(2000) 琵琶湖水のエストロゲン様作用に対する 17β -エストラジオールと4-ノニルフェノールの寄与、第34回日本水環境学会年会講演集、p.313.
- 伊藤禎彦、長坂俊樹、百々生勢(2000) 水道原水のエストロゲン様作用の凝集および活性炭による処理性、第51回全国水道研究発表会講演集、pp.602-603.
- 伊藤禎彦、中西岳、野中愛(2000) 塩素による水道原水のエストロゲン様作用増大に関する実験的考察、第51回全国水道研究発表会講演集、pp.604-605.
- 亀井 翼ほか(1999) 非イオン界面活性剤(NPnEO)の生分解過程におけるエストロゲン活性に関する研究、日本水環境学会、第33回日本水環境学会年会講演集、pp.393.
- 亀井 翼ほか(2000) 酵母 Two-hybrid 法における多成分発現パターンに関する研究、日本水環境学会、第34回日本水環境学会年会講演集、pp.314.
- 亀井 翼ほか(1999) 水処理プロセスにおける Estrogen 活性の挙動に関する研究、北海道大学衛生工学会第7回衛生工学シンポジウム論文集、pp.166.
- 西村哲治、埴岡伸光、神野透明、田中聡子、安藤正典、平川江美、鈴木和人、西川淳一、西原 力(2000) 酵母 Two-Hybrid System による水質汚染物質のエストロゲン様活性の評価、第34回日本水環境学会年会講演集、pp.426.