



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の低減効果に関する研究
Author(s)	伊藤, 和徳; 竹田, 誠; 鎌田, 素之 他
Description	第10回衛生工学シンポジウム (平成14年10月31日 (木) -11月1日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 5 環境リスク評価 . 5-4
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 10, 145-148
Issue Date	2002-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7122
Type	departmental bulletin paper
File Information	10-5-4_p145-148.pdf



5-4 浄水処理過程におけるエストロゲン様活性の低減効果に関する研究

○伊藤 和徳、竹田 誠 (北海道大学大学院)、鎌田 素之 (国立保健医療科学院)
大野 浩一、亀井 翼、真柄 泰基 (北海道大学大学院)

1.背景と研究目的

内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) は内分泌系に干渉し、生体の恒常性、生殖、発生に関与する種々の生体ホルモンの合成、受容体への結合やその作用、ホルモンのクリアランスなどに関わる諸過程を阻害する物質である。内分泌系の阻害が野生生物の雌化、生殖異常や、ヒトに関しては、乳がんや子宮内膜症、精巣がんなどの増加の原因である可能性が指摘されている。現在まで内分泌攪乱物質として疑われているものは、Bisphenol-A、フタル酸エステル類、ダイオキシン類など約 70 種存在している。

内分泌攪乱物質は主に下水処理場等を介して河川へと放出されることから、河川中に低濃度であるが広く存在していることが、旧建設省や旧環境庁の調査^{1),2)}により明らかになっている。従って、特に都市域では内分泌攪乱物質が存在する河川水を水源として利用している可能性が高く、水道水を介した内分泌攪乱物質の暴露が危惧される。

ヒトや野生生物に対してどの程度の暴露濃度、暴露期間で影響が生じるのかは未だ解明されておらず、水道水を介した内分泌攪乱物質の暴露による健康リスクを評価する上で、まず浄水処理システムによる内分泌攪乱物質の挙動を把握することが不可欠である。

これまでの研究から、水環境中から検出頻度が高い Bisphenol-A や Nonylphenol、さらに人畜由来ホルモンであり、エストロゲン様活性が最も高いことから水生生物への影響が懸念されている 17 β -Estradiol (以下 E2) といった化学物質を高濃度に調整した水溶液に塩素処理を行った結果、十分な反応時間を設けることによりエストロゲン様活性をブランクレベルまで低減できることが明らかとなっている³⁾。

本研究では、実際に浄水場の原水となっている河川水を用いて、エストロゲン様活性の低減が達成される塩素添加率と反応時間の関係について検討し、化学物質単独に対し塩素処理を行った場合と同様に、現状の浄水場で行われている塩素処理条件がエストロゲン様活性の低減に対して十分な効果を有するものであるかを検討した。

2.実験方法

測定試料は札幌市近郊の浄水場に隣接した浄水処理実験プラントにおける凝集沈殿・三層砂濾過処理水を用いた。この実験プラントの原水となる河川の上流には下水処理場が存在し、その処理放流水が流入している。本研究では、三層砂濾過処理水に対して塩素処理を行い、エストロゲン様活性を測定すると共に、E2 に関しても ELISA 法によりその濃度を測定した。

2.1 塩素添加方法

採水した試料水に対して予備実験を行い、塩素添加濃度、反応時間を設定した。所定の塩素添加率の次亜塩素酸ナトリウムを試料水に加え、室温で暗所に静置した。所定の反応時間後直ちにアスコルビン酸を添加し、残留塩素を消去した。

表 1 設定した塩素添加率と反応時間

塩素添加率 1ppm	塩素添加率 2ppm	塩素添加率 4ppm
反応直後	反応直後	反応直後
15分	15分	15分
90分	45分	45分
3時間	90分	90分
6時間	3時間	3時間
24時間	6時間	6時間

2.2 試料の濃縮

試料水は固相抽出法により濃縮を行った。ジクロロメタン、メタノール (残留農薬試験

用、Wako 社製)、精製水でコンディショニングした固相カートリッジ Sep Pak C18(Waters 社製)に試料水を通水し、ジクロロメタンで溶出した。溶出液をエバポレーターで減容し、さらに窒素気流下で乾固させ、濃縮倍率 5 万倍になるように DMSO に転溶した後、段階希釈し試験に供した。

2.3 エストロゲン様活性の測定

エストロゲン様活性の測定には酵母 Two-Hybrid 法⁴⁾を用いた。この試験法は、哺乳類のエストロゲンレセプター、コアクチベータを組み込んだ酵母を用いる。酵母の核内にあるエストロゲンレセプターにエストロゲン様物質が結合すると、活性化して二量体を形成し、DNA 上のエストロゲン応答配列に結合する。その後、 β -galactosidase を誘導するレポーター遺伝子の *LacZ* の転写が開始される。この誘導された β -galactosidase を ONPG 溶液で呈色させ、吸光度を測定することによりエストロゲン様活性を評価する試験法である。測定手順は図 2-1 に示す。また、エストロゲン活性値は以下の式に代入して求める。

$$\text{エストロゲン様活性値} = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{570}}{t \times v \times OD_{595}} \times 1000$$

t : ONPG を加えた後の静置時間(min)

v : 培養液の量(mL)

OD₄₂₀、OD₅₇₀、OD₅₉₅ : 420、570、595nm の吸光度

エストロゲン様活性値は陽性対照である E2 の最大活性値を 100%とし、これに対する比活性値で評価した。

2.4 E2 濃度の測定

E2 濃度の測定には ELISA キット (武田薬品工業) を用いた。ELISA 法は抗原とそれに対して生体内で合成された抗体が特異的に結合する抗原抗体反応を利用しており、標的測定物質 (抗原) と特異的に結合する抗体を作成し、その結合量を定量化する方法である。ELISA キットの測定方法⁵⁾は、マイクロプレート内面に固相化した抗体の結合部位を前処理した試料水中の抗原 (E2) と酵素標識した

抗原とで競合反応させる。競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、抗体に結合した酵素標識抗原を発色させ、吸光度を測定することにより濃度を求める。ELISA 法の測定手順を図 2-2 に示す。

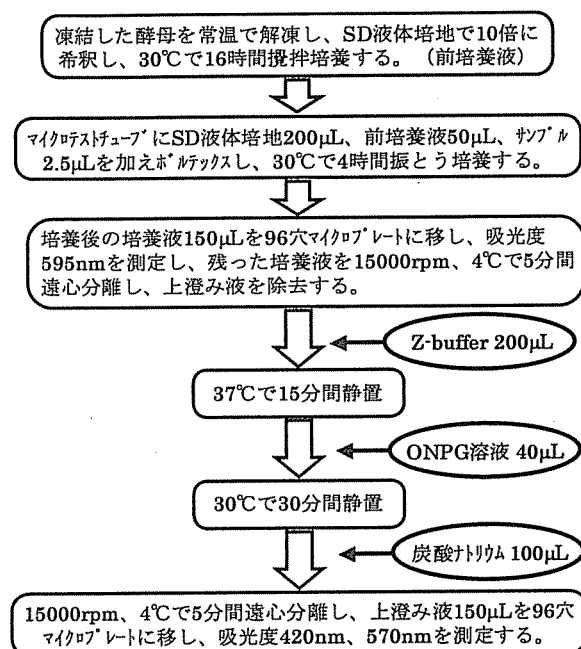


図 2-1 酵母 Two-Hybrid 法の測定手順

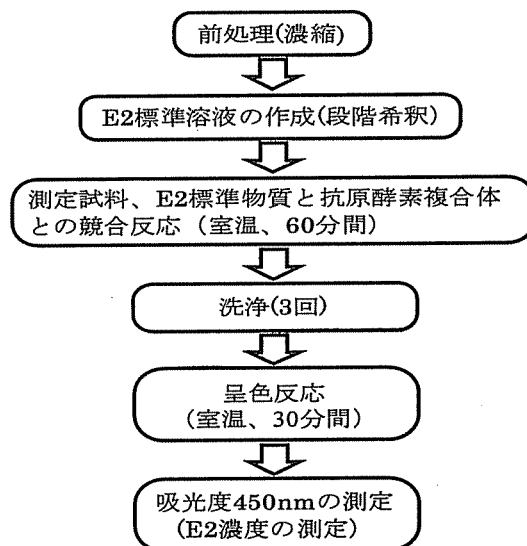


図 2-2 ELISA 法の測定手順

3.結果と考察

3.1 塩素未処理水のエストロゲン様活性

浄水処理実験プラント原水と三層砂濾過水のエストロゲン様活性を図 3-1 に示す。これより、凝集沈殿、三層砂濾過処理水は原水と比較するとエストロゲン様活性が低減するも

のその低減効果は低いことがわかる。

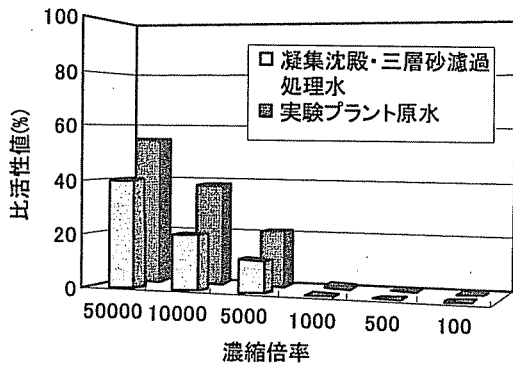


図 3-1 原水と濾過水のエストロゲン様活性

3.2 残留塩素濃度

三層砂濾過水を塩素処理した際の残留塩素濃度について表 3-1 に示す。この表から、塩素との反応は添加直後から速やかに進行し、塩素添加率が高いほど、消費塩素量も多くなった。

表 3-1 塩素処理時の残留塩素濃度

反応時間	(塩素添加率)		
	1.0ppm	2.0ppm	4.0ppm
	残留塩素濃度 (ppm)		
添加直後	0.09	0.17	1.73
15分	0.05	0.09	0.62
45分	—	0.06	0.61
90分	0.02	0.05	0.56
3時間	0.02	0.04	0.53
6時間	0.02	0.03	0.52
24時間	0.01	—	—

※—は未設定

3.3 塩素処理によるエストロゲン様活性と E2 濃度の挙動

塩素処理時間に対する E2 濃度(5 万倍濃縮時)とエストロゲン様活性の関係を塩素添加率 1、2、4ppm について、図 3-2、図 3-3、図 3-4 にそれぞれ示す。これらの結果より塩素濃度が高いほど短時間でエストロゲン様活性が低減する傾向が得られた。また、表 3.1、図 3-2 より、塩素添加率 1ppm では添加直後の段階で残留塩素がわずかにしか存在していないにもかかわらず、エストロゲン様活性は低減した。

エストロゲン様活性が 5 万倍濃縮時にプラ

ンクレベルまで低減するのに必要な時間は塩素添加率 1ppm において 3 時間、2ppm では 45 分、4ppm では 15 分であった。一方、E2 濃度についてもエストロゲン様活性と同様に時間経過と共に減少することが認められ、反応時間 6 時間では E2 濃度は塩素濃度が高いほど低くなった。以上の結果より、塩素濃度が高いほど E2 をはじめその他のエストロゲン様活性を有する物質が速やかにエストロゲン様活性を有さない物質に化学構造が変化したと考えられる。また、塩素濃度が低い場合であっても、残留塩素が存在している条件であれば塩素とエストロゲン様物質との反応が進行し、より長い反応時間が必要となるもののエストロゲン様活性が低減可能であることが明らかになった。

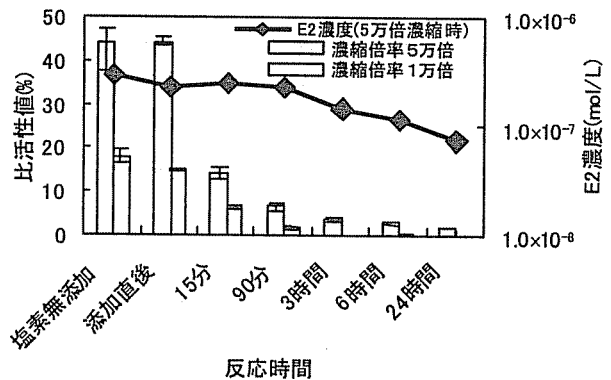


図 3-2 エストロゲン様活性と E2 濃度の関係(1ppm)

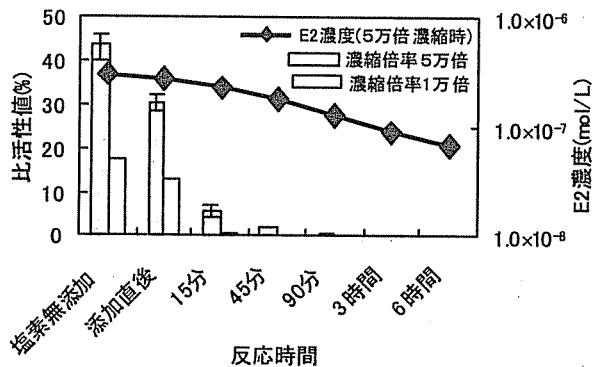


図 3-3 エストロゲン様活性と E2 濃度の関係(2ppm)

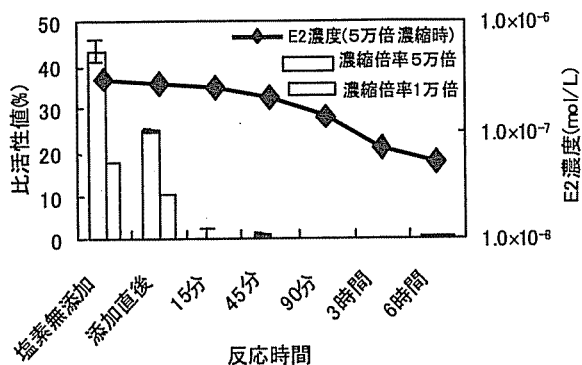


図 3-4 エストロゲン様活性と E2 濃度の関係

3.4 エストロゲン様活性と E2 濃度の関係

図 3-2~図 3-4 より、塩素添加後 15 分において、いずれの塩素添加率でも E2 濃度は同程度にも関わらず、エストロゲン様活性は塩素添加率が高くなるにつれて大きく低減している。この原因としてはエストロゲン様活性を測定する酵母 Two-Hybrid 法と E2 濃度を測定する ELISA 法の測定原理の違いが考えられる。ELISA 法では交差反応（抗原物質が非常に類似しているために起こる抗体活性の縮退性によるもの）する可能性が示唆されており、E2 の抱合体や塩素処理副生成物である塩素置換体や E2 の二量体による交差反応が生じ、これらの物質も含めて E2 濃度として検出された可能性がある。一方、酵母 Two-Hybrid 法では、これらの交差反応を起こした物質はレセプターに結合できなかったか、結合できたとしても転写活性化が起きなかったため、エストロゲン様活性は低減したと考えられる。ELISA 法に交差反応の問題があり、また、塩素処理後に新たに生成する物質の情報を得る上でも、LC/MS や GC/MS 等の機器分析で測定する必要があると考えられる。

4. まとめ

三層砂濾過水を塩素濃度、反応時間という 2 つの操作因子を変化させて塩素処理を行った結果、塩素濃度が高いほど短時間でエストロゲン様活性がブランクレベルまで低減された。また、E2 濃度に関しても、エストロゲ

ン様活性と同様の傾向が得られた。エストロゲン様活性に関しては、共存物質が存在する環境水においても、最も低い濃度である 1ppm で、残留塩素がわずかしか存在しない状態でも、反応時間 3 時間でブランクレベルまで低減され、E2 濃度はどの塩素添加率でも 6 時間塩素と反応させれば酵母 Two-Hybrid 法ではエストロゲン様活性を示さない程度 ($1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$) まで低減した。

以上の結果より、塩素処理を行ってから給水栓までの輸送時間を考慮すると、過剰に塩素を添加することなく、現在一般に浄水場で行っている給水栓で 0.1ppm の残留塩素を確保する程度の塩素処理で十分にエストロゲン様活性を低減することが可能であり、トリハロメタン等の消毒副生成物の問題を持つ塩素処理だが、エストロゲン様活性の低減効果は高いことが明らかとなった。

5. 参考文献

- 1) 建設省：水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果（平成 12 年度）
- 2) 環境庁：水環境中の内分泌攪乱化学物質実態調査（平成 11 年度）
- 3) 赤塚 靖：塩素処理によるエストロゲン様活性の低減に関する研究、平成十二年度修士論文
- 4) Jun-ichi Nishikawa, New Screening Methods for Chemicals with Hormonal Activities Using Interaction of Nuclear Hormone Receptor with Coactivator, *Toxicology and Applied Pharmacology* 154,p76-p83(1999)
- 5) 武田薬品工業：17β-Estradiol ELISA キット 使用説明書 p2~ p 6