



| | |
|------------------|---|
| Title | 浄水処理によるエストロゲン活性の挙動に関する研究 |
| Author(s) | 竹田, 誠; 赤塚, 靖; 鎌田, 素之 他 |
| Description | 第8回衛生工学シンポジウム (平成12年11月16日 (木) -17日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 2 環境 保全・リスク環境 . P2-9 |
| Citation | 衛生工学シンポジウム論文集, 8, 106-109 |
| Issue Date | 2000-11-01 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/7217 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 8-2-9_p106-109.pdf |



2-9

浄水処理によるエストロゲン活性の挙動に関する研究

○竹田 誠、赤塚 靖、鎌田 素之、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学大学院）

1. はじめに

エストロゲンに代表されるステロイドホルモンは内分泌系の主要な構成物質であり、生物の恒常性（ホメオスタシス）の維持、性の機能分化および生物の成長と老化の誘導、性成熟と生殖の調整といった生物が生きていく上で重要な役割を担っている。ステロイドホルモンは生体内外の情報に応じて甲状腺、精巣、卵巣などの内分泌腺や視床下部などの神経組織の内分泌細胞によって生産・分泌され、血液中を移動し作用を及ぼすべき組織や器官の標的細胞に到達すると細胞核内にあるレセプターと結合し活性化、標的遺伝子の転写量が調節され機能が発現する。

外因性内分泌攪乱物質と呼ばれる化学物質群が生物の内分泌系を攪乱することにより、生殖異常やホルモンが関係する様々な疾患の一因である可能性が指摘されている。環境庁は 67 物質を内分泌攪乱作用が疑われる物質として挙げ¹⁾、建設省では平成 10 年、11 年に全国 1 級河川、下水道を対象とした調査を行い、いずれの調査においてもビスフェノール A や人畜由来女性ホルモンなどの内分泌攪乱物質が検出されている²⁾。このように内分泌攪乱物質は河川等に存在し、水道原水を汚染している可能性がある。

以上のことより、本研究では酵母 Two-hybrid 法を用いて浄水処理によるエストロゲン活性の挙動を調べることを目的とし、実験室内で札幌市内 A 下水処理場の二次処理水をサンプルとして凝集、塩素処理実験を行いエストロゲン活性の挙動について調べた。さらに、実験室で得られた結果を再確認するために、東京都 B 浄水場の実験プラントで行われたエストロゲン様物質添加実験のサンプルについてもエストロゲン活性を測定し、その挙動について検討した。

2. 実験方法

2. 1 実験室における濃縮方法

サンプリングした二次処理水はすぐにガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 社製）で吸引ろ過し、冷暗所に保存した。これをメタノール（残留農薬試験用、Wako 社製）と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 Plus（Waters 社製）に通水する。通水終了後、精製水で洗浄、Sep Pak を窒素気流下で乾燥させ 10mL のメタノールで溶出した。溶出液をロータリエバポレータおよび窒素パージにより減容させメタノールで 100 μ L に定量することで 50000 倍に濃縮した。これを、6 段階に希釈しエストロゲン活性を測定するサンプルとした。

2. 2 凝集処理実験

二次処理水（2000 年 1 月サンプリング）を pH7 付近、急速攪拌 120rpm で 5 分間、緩速攪拌 40rpm で 20 分間、攪拌終了後静置 30 分間の条件で、凝集剤として硫酸アルミニウムを用いて予備実験を行い、濁度、波長 260nm の紫外外部吸光度（E260）などを指標として最も除去率の高かった凝集剤添加量 24mg/L（as Al 濃度）で凝集処理実験を行った。凝集処理後の二次処理水を 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過してフロックを取り除き、上記 2. 1 で述べた濃縮方法で濃縮してエストロゲン活性を測定、凝集処理前後のエストロゲン活性の変化を比較した。

2. 3 塩素処理実験

塩素処理実験の前に予備実験を行い、水道法に規定されている末端給水栓における遊離残留塩素濃度 0.1mg/L 以上を確保することを前提として、二次処理水（1999 年 12 月サンプリング）について次亜塩素酸ナトリウム添加から 24 時間経過後の遊離残留塩素濃度が 0.1~0.3mg/L の範囲となるような塩素添加率 10mg/L を求めた。この塩素添加率で塩素処理実験を行い、濃縮して塩素処理前後のエストロゲン活性の変化を比較した。

2. 4 実験プラントにおける濃縮方法

試料水は pH3 に調整され、ジクロロメタン、アセトニトリル、メタノールおよび精製水でコンディショニングした固相カートリッジ OASISTMHLB（Waters 社製）に通水する。通水終了後、乾燥させジクロロメタン 8mL で溶出した。溶出液をロータリエバポレータおよび窒素パージに

より乾固させ、200 μ LのDMSOに転溶することで25000倍に濃縮した。これを、6段階に希釈してエストロゲン活性を測定するサンプルとした。

2.5 実験プラントにおける浄水処理実験

浄水処理によるエストロゲン活性の挙動を調べるために、エストロゲン様物質添加実験を行った。実験プラントの着水井において、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、ビスフェノールAの4物質をそれぞれ5 μ g/Lの濃度となるように添加しこれを原水として実験が行われた。図2.5.1に示すように、本実験では凝集沈殿、砂ろ過からなる通常処理系と通常処理系にオゾン処理と生物活性炭（BAC）を付加した高度浄水処理系の2つの系について、それぞれの処理プロセスで採水し2.4で示した濃縮方法で濃縮後、エストロゲン活性を測定し各処理プロセスのエストロゲン活性を比較した。凝集剤はいずれの系もPACを用いて、添加率25mg/Lで凝集処理を行っている。また、通常処理系では塩素添加率7.6mg/Lで前塩素処理、高度浄水処理系ではオゾン添加率1.26mg/Lでオゾン処理、生物活性炭処理後に塩素添加率2.0mg/Lで塩素処理をそれぞれ行っている。

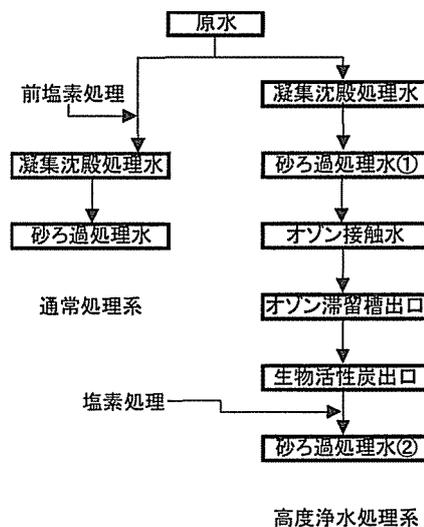


図2.5.1 実験プラント概略図

2.6 エストロゲン活性の測定方法

エストロゲン活性の測定には酵母 Two-hybrid 法を用いた。この試験法は哺乳類のエストロゲンレセプター（ER）を組み込んだ酵母（Yeast）を用いる。酵母の細胞核内に組み込まれたERにエストロゲン様物質が結合して活性化すると、DNA上のエストロゲン応答配列に結合してレポーター遺伝子のLacZの転写が開始される。LacZにより誘導、分泌される酵素 β -galactosidaseをONPG溶液で呈色させ、その吸光度を測定することで β -galactosidase活性を求めることで評価する転写活性試験である。この β -galactosidase活性をエストロゲン活性とした。

測定方法は、SD培地に酵母を植菌し、30 $^{\circ}$ Cで1昼夜振とう培養した酵母懸濁液（前培養液）にSD培地を加え、サンプルを添加した後、さらに30 $^{\circ}$ Cで4時間培養する。この際、SD培地によりサンプルは1/100に希釈される。4時間経過後、酵母の菌体濃度を表す波長595nmの吸光度（OD₅₉₅）を測定する。残りの培養液を遠心分離し、上澄み液を捨て沈殿した酵母に1mg/L Zymolyase 20Tを含むZ-bufferを加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間静置して酵母の細胞膜を破壊する。これにONPG溶液を加えて、30 $^{\circ}$ C、30分間静置して β -galactosidaseを呈色させる。1MのNa₂CO₃溶液を加えることで呈色反応を停止させ、遠心分離後上澄み液の β -galactosidaseの吸収を表す波長420nmおよび夾雑物の散乱吸収を表す570nmの吸光度（OD₄₂₀、OD₅₇₀）を測定する。 β -galactosidase活性は次式により、求められる。

$$\beta\text{-galactosidase 活性} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{570}) / (\text{OD}_{595} \times t \times v)$$

t : ONPG 溶液を加えた後の静置時間 = 30 分
v : 前培養液の量

3. 実験結果および考察

3.1 実験室内における凝集、塩素処理によるエストロゲン活性の挙動

実験結果はエストロゲン活性と測定の際の陽性対象である17 β -エストラジオール（以下E2）のエストロゲン活性から算出したE2濃度換算値を示す。二次処理水を用いて凝集処理を行い、その前後におけるエストロゲン活性の測定結果を図3.1.1に示す。この結果から凝集処理によりエストロゲン活性は低減されていないことがわかる。凝集処理は凝集剤の有する荷電中和能力と架橋作用により、水中の懸濁性物質などを衝突結合させフロックを形成させるものであるため、溶解性物質の中でもフミン酸類のような分子量の比較的大きなものに対しては除去効果が大いだが、分子量の小さなものに対しては除去されにくい。二次処理水中でエストロゲン活性への寄与

が最も大きいと考えられる人畜由来女性ホルモンの E2 は、分子量が 270 程度であるため凝集処理によりエストロゲン活性が低減されなかったものと考えられる。

次に、二次処理水を凝集処理せずに直接塩素処理を行い、その前後におけるエストロゲン活性の測定結果を図 3.1.2 に示す。この結果から塩素の酸化作用によってエストロゲン活性が完全に低減化されていることがわかる。浄水処理における塩素処理の主要な目的は、病原性細菌の殺菌と再汚染を防止することであり、この塩素処理本来の目的達成と同時に、エストロゲン活性の不活性化にも効果があることが明らかとなった。

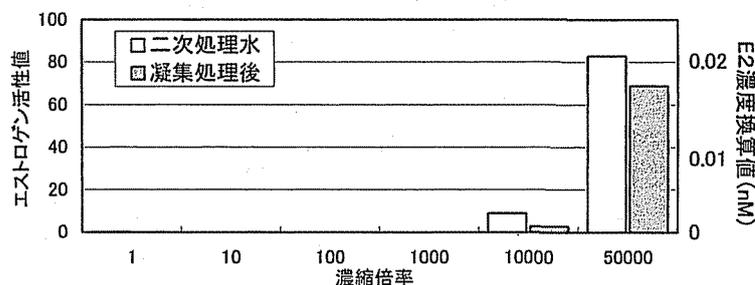


図3.1.1 凝集処理によるエストロゲン活性の挙動

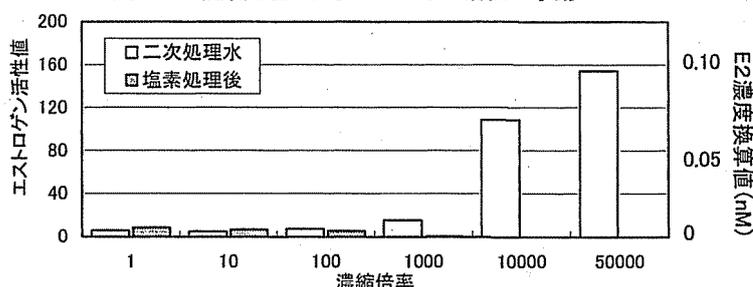


図3.1.2 塩素処理によるエストロゲン活性の挙動

3. 2 実験プラントでの浄水 処理によるエストロゲン活性の挙動

通常処理系、高度浄水処理系ともにエストロゲン様物質を添加した着水井で採取された試料を原水とし、各処理プロセスにおけるエストロゲン活性を測定した。図 3.2.1 に通常処理系のエストロゲン活性の測定結果を示す。凝集沈殿処理で原水にみられたエストロゲン活性が低減されており、次段階の砂ろ過処理においてもエストロゲン活性はみられなかった。一方、図 3.2.2 に示したように高度浄水処理系では、凝集沈殿処理でエストロゲン活性は低減されず砂ろ過処理①で不活性化された。これは溶解性のエストロゲン様物質が凝集沈殿処理で除去できないような微フロックに付着し、この微フロックが砂ろ過処理により除去されたためだと考えられる。また、エストロゲン活性が不活性化された砂ろ過処理①以降のオゾン処理、生物活性炭処理といった高度浄水処理プロセスについては、そのエストロゲン様物質除去能を今回の実験で確認することはできなかった。

以上のことから、通常処理系と高度浄水処理系の凝集沈殿処理においてエストロゲン活性の挙動に対して、相反する結果が得られた。しかし、通常処理系の凝集沈殿処理でエストロゲン

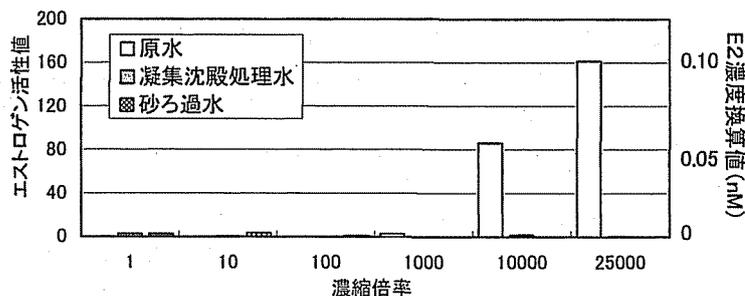


図3.2.1 通常処理系におけるエストロゲン活性の挙動

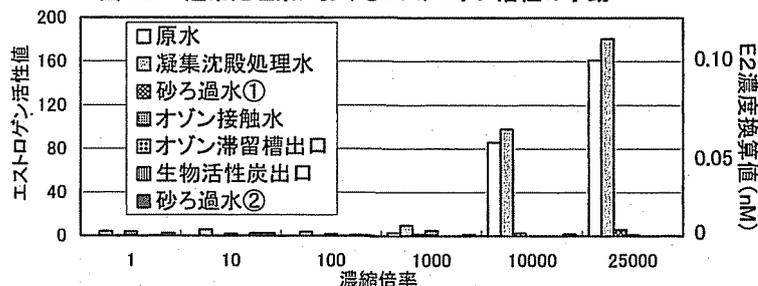


図3.2.2 高度浄水処理系におけるエストロゲン活性の挙動

活性が不活性化されたのは、通常処理系でのみ行われている前塩素処理によるものと考えられ、このことからエストロゲン活性に対する塩素処理の有効性が確認されたといえる。

4. まとめ

実験室における凝集・塩素処理実験の結果と実験プラントの結果は、ともにエストロゲン活性に対して凝集処理はその低減能力をほとんど期待することができず、その一方で塩素処理がエストロゲン活性の低減化に大きな効果があることを示している。さらに、環境水中のエストロゲン活性の不活性化には過剰の塩素が要求されず、水道法で決められている末端給水栓で 0.1mg/L 以上の遊離残留塩素を確保できる塩素量で十分不活性化が期待できるという結果が得られた。また、実験プラントにおいて砂ろ過処理でエストロゲン活性が低減されたのは、溶解性のエストロゲン様物質が凝集沈殿処理で除去できないような微フロックに付着し砂ろ過処理で微フロックとともに除去されたためだと考えられる。

今後、エストロゲン様物質の懸濁物質への吸着性や砂ろ過処理のエストロゲン活性の低減能、今回の実験で確認することのできなかつたオゾン処理・生物活性炭処理のエストロゲン活性低減能について実験室で確認する必要がある。さらに、これまで報告されているエストロゲン活性成分は全て疎水性成分であることから、今回も疎水性成分を対象とする濃縮方法を採用した。したがって、親水性成分の濃縮方法およびエストロゲン活性について検討していく必要がある。

5. 参考文献

- 1) 環境庁：環境ホルモン戦略計画 SPEED '98
- 2) 建設省：平成 11 年度水環境中における内分泌攪乱物質に関する実態調査報告