



Title	水環境中におけるエストロゲン活性の挙動に関する研究
Author(s)	赤塚, 靖; 鎌田, 素之; 亀井, 翼 他
Description	第7回衛生工学シンポジウム (平成11年11月11日 (木) -12日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 5 水環境・リスク評価 . 5-4
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 7, 166-169
Issue Date	1999-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7286
Type	departmental bulletin paper
File Information	7-5-4_p166-169.pdf



5-4 水環境中におけるエストロゲン活性の挙動に関する研究

○赤塚 靖、鎌田 素之、亀井 翼、眞柄 泰基（北海道大学）

1. はじめに

生物はその生命を維持するために、動的な恒常性（ホメオスタシス）を持っており、このために内分泌系を通じたフィードバックシステムを発達させている。外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）はこの内分泌系に干渉し正常なホルモン作用に影響を与える化学物質である。本来、ホルモンは内分泌腺や視床下部等の神経系の組織、脂肪組織、心臓・血管から分泌され、血流で運ばれ、標的器官のレセプターと結合して作用する。しかし、内分泌攪乱物質は、ホルモン合成異常、レセプターの識別・結合異常、レセプター結合後のシグナル伝達異常などをもたらすとされている。

この内分泌攪乱物質によるヒトや野生生物への影響が報告されているが、このような物質が下水処理場、工場等から排出され、飲料水の水源を汚染している可能性がある。昨年行われた建設省による全国の河川調査でも、内分泌攪乱物質されているノニルフェノール、ビスフェノールA、フタル酸エステル類が検出されている。

そこで、本研究では内分泌攪乱物質のなかでもエストロゲン様物質について、河川水や浄水過程におけるエストロゲン活性の挙動を調べることを目的とし、札幌市近郊のA浄水場、札幌市内のB下水処理場の浄水過程におけるエストロゲン活性の挙動と、実験室内でのA浄水場の水源となる河川水の凝集、塩素添加によるエストロゲン活性の挙動について調べた。

2. 実験方法

2-1 濃縮方法

Sep Pak C18 を用いて濃縮した。サンプル水をガラス繊維ろ紙で吸引ろ過する。ろ過した水を5mLのメタノール（残留農薬試験用）と10mLの精製水でコンディショニングしたSep Pak C18 カートリッジに通水する。通水終了後、精製水10mLで洗浄し、Sep Pak を乾燥させ、2mLのメタノールに溶出させる。溶出させたメタノールを窒素パージで0.5mLに定量する。濃縮倍率は5000倍または1000倍とした。これを、メタノールで6段階に希釈し、エストロゲン活性測定用サンプルとする。

2-2 凝集方法

河川水をガラス繊維ろ紙でろ過したものをジャーテストした。ジャーテストは、凝集剤として硫酸アルミニウムを使用し、凝集剤量は、あらかじめ、サンプルをジャーテストして12mg/L(as Al)と決め、pH7付近、急速攪拌120rpmで5分、緩速攪拌40rpmで20分攪拌した後、30分間静置とした。0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過し、2-1で述べたように5000倍に濃縮した。これをメタノールで6段階に希釈し、エストロゲン活性測定用サンプルとした。

2-3 塩素添加方法

サンプルを2-2の方法でジャーテストし、0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過後、次亜塩素酸ナトリウムを添加した。添加率1.4mg/Lで添加後すぐに2-1のように濃縮するものと、20時間塩素と接触させてから濃縮するもの、添加率4.9mg/Lで20時間静置して塩素と接触させたのち濃縮するものをいずれも、メタノールで6段階に希釈して、エストロゲン活性を調べ比

較した。

2-4 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。この方法は、哺乳類のエストロゲンレセプターを組み込み、形質転換させたイースト菌を用いる。このイースト菌は、細胞核内にエストロゲンレセプター（受容体：ER）をもち、これにエストロゲン様物質が結合し活性化すると、DNA 上のエストロゲン応答性エレメントに結合して、 β -galactosidase を分泌させるレポーター遺伝子の LacZ が転写を開始する。この β -galactosidase を ONPG 溶液により呈色させ吸光度を測定することによってエストロゲン活性を調べる。

測定方法は SD 培地に植種し、30℃、18 時間培養した前培液(v)を SD 培地に加えた後、サンプルを添加する。さらに 30℃で 4 時間培養した後、培養液の 595nm(OD₅₉₅)の吸光度を測定する。残りの培養液を遠心分離し、上澄みを捨て、残った沈殿に 1mg/mL

Zymolyase20T を含む Z-buffer を加え、懸濁した後、37℃、15 分静置する。これに 4mg/mL ONPG 溶液を加え、攪拌した後 30℃で反応を開始し適度に着色した時点で、1M Na₂CO₃ 溶液を加え、反応を停止させ、これを反応時間(t)とした。

これを遠心分離し、上澄みの 420nm(OD₄₂₀)、570nm(OD₅₇₀)の吸光度を測定した。これらの吸光度を下記の式に代入し、エストロゲン活性(U)を算出した。

$$U = \frac{OD_{420} - 1.75 \times OD_{570}}{t \times v \times OD_{595}} \times 1000$$

尚、測定ごとに陽性対象として 17 β -エストラジオール(E2)のエストロゲン活性を測定した。図 2.4.1 に E2 のエストロゲン活性とともに内分泌攪乱物質とされるノニルフェノール、ビスフェノール A のエストロゲン活性を示す。

3. 実験結果

3-1 浄水プロセスにおけるエストロゲン活性の挙動

A 浄水場原水のサンプリング月別のエストロゲン活性と E2 換算値を図 3.1.1 に示す。A 浄水場、B 下水処理場の処理

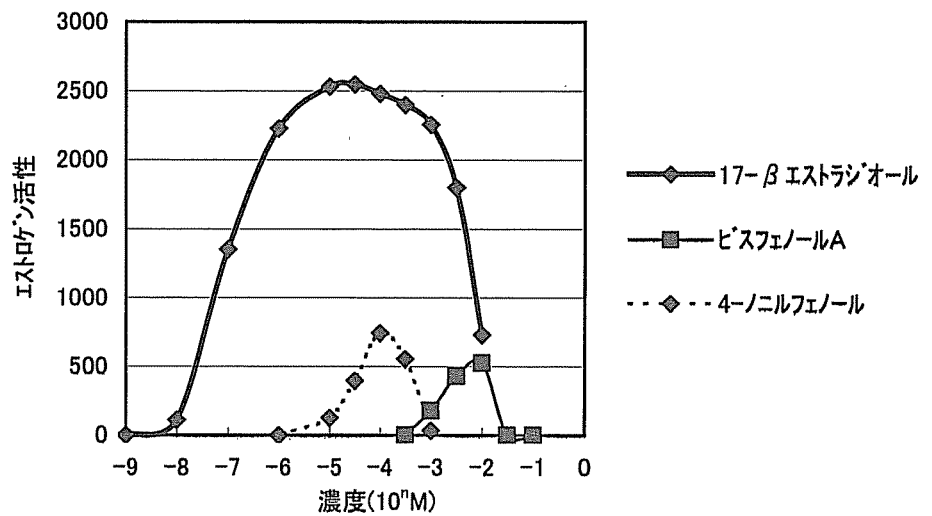


図 2.4.1 内分泌攪乱物質のエストロゲン活性

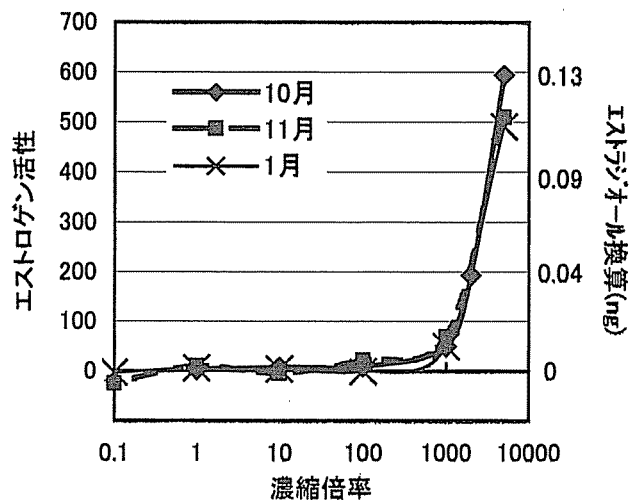


図 3.1.1 サンプル月別 A 浄水場原水のエストロゲン活性の挙動

過程におけるエストロゲン活性の挙動を図 3.1.2、図 3.1.3 に示す。濃縮倍率は図 3.1.1、3.1.2 では最高で 5000 倍、図 3.1.3 では最高で 1000 倍である。浄水場原水からはサンプリング時期によらず一定のエストロゲン活性がみられた。浄水場においては、浄水過程によってエストロゲン活性が低減しているが、下水処理場では、エストロゲン活性が除去されていなかった。

3-2 実験室内での凝集、塩素添加によるエストロゲン活性の挙動

A 浄水場原水を凝集、塩素添加を行ってエストロゲン活性の挙動を調べた結果を図 3.2.1、図 3.2.2 に示す。濃縮倍率は最高で 5000 倍である。図 3.2.1 から凝集によってエストロゲン活性が十分に除去されないことがわかった。図 3.2.2 から塩素添加直後ではエストロゲン活性が不活性化してはなかったが、20 時間後では、いずれの添加率でもエストロゲン活性が不活性化することがわかった。

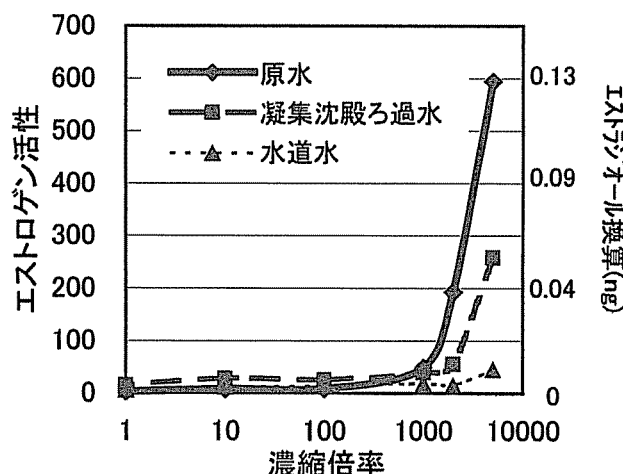


図 3.1.2 A 浄水場におけるエストロゲン活性の挙動

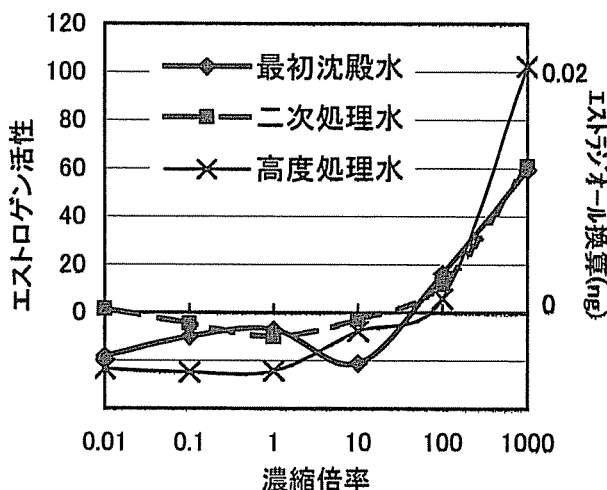


図 3.1.3 B 下水処理場におけるエストロゲン活性の挙動

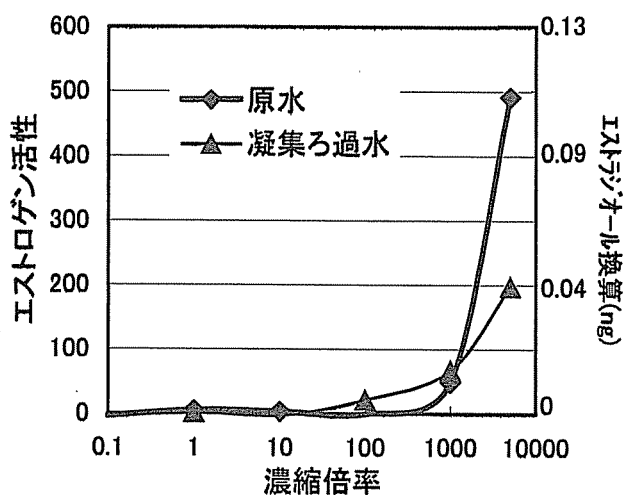


図 3.2.1 凝集によるエストロゲン活性の挙動

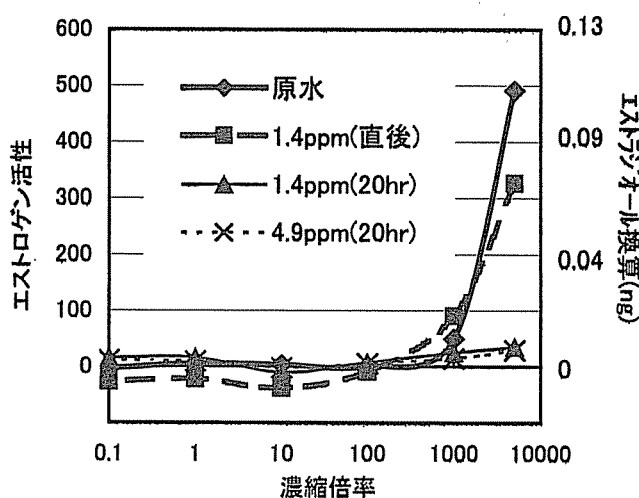


図 3.2.2 塩素添加によるエストロゲン活性の挙動

4. 考察

A浄水場原水はサンプリング時期にかかわらずエストロゲン活性がみられ、下水処理場においてエストロゲン活性が低減されていないことから、エストロゲン活性の原因物質は季節変動によらない下水処理場由来のノニルフェノール (NP)、ビスフェノールA(BPA)、 17β -エストラジオール (E2) などが挙げられる。この中でも、E2 のエストロゲン活性が発現する濃度がNP、BPA に比べ非常に低く、活性値も高いことから、E2 のエストロゲン活性への寄与が大きいものと考えられる。

凝集処理においてエストロゲン活性が十分に除去されないのは、エストロゲン活性の原因物質が低分子量のものであるためであると考えられる。

塩素は不飽和炭素結合を有する有機化合物との反応性がよいことから、塩素添加によってエストロゲン様物質がゆっくりと反応し不活性化するものと考えられる。実験室内の結果は浄水場の結果を再現している。

5. まとめ

季節変動によらずエストロゲン活性が発現する河川水では、下水放流水の負荷がエストロゲン活性に大きく寄与し、主な原因物質は 17β -エストラジオールと考えられる。凝集処理においては 河川水中のエストロゲン活性を十分に除去できないが、塩素処理により不活性化させることが可能である。