

IX. 科学技術庁振興調整費による研究

1. 都市排水に含まれる

水道原水影響物質の評価方法に関する基礎的研究

水質研究室	室	長	田中 宏明
	主任	研究員	小森 行也
	研	究	員
	重点研究	支援協力員	高橋 明宏
	同		東谷 忠
	交	流	研究員
			矢古宇靖子
			齋藤 正義

1. はじめに

都市域からの下水道を経由した排水量が増加するとともに、河川の上流域に下水道整備が拡大したことにより、下水道由来の排水が水道の取水源に混入する割合が高くなってきている。下水道が整備された結果、水環境における易分解性有機物などの濃度は低減されてきている。しかし、難分解性有機物や微量化学物質については、本来除去対処と考えておらず下水道での挙動が把握されておらず、水環境における実態も解明されていない。本研究はこのような物質に関して必要に応じて排水側の制御を検討するため、下水中の多環芳香族化合物などの難分解で蓄積性がある有機物質をガスクロマトグラフ質量分析計などによる化学分析手法と変異原性試験などの生物学的手法により評価する方法の確立を目的としている。

環境中には変異原のように遺伝子に直接働きかけて発ガンを起こすものの他に、細胞内のホルモン受容体に結合することで発ガンを起こすことが懸念される化学物質もあることが分かっている^{1) 2)}。水道原水中にも人間活動に由来する多くの化学物質が存在し、変異原性の他にエストロゲン作用を持つ様々な物質が存在していると考えられることから、それらが複合的に作用し水道水を通してヒトへ影響を及ぼすことを考慮する必要がある。

平成12年度は、発ガン性との関係も疑われている環境エストロゲンを水道原水影響物質として注目し、検討を行うこととした。環境エストロゲンとしては、人畜由来の女性ホルモンとその関連物質、界面活性剤の原料、合成樹脂の原料等様々な物質が考えられるが、これらの物質は排出源が異なると考えられるだけでなく下水道や河川中での挙動も異なると考えられる。そこで、下水処理水やその放流先河川水中の環境エストロゲンを抽出後、いくつかのグループに分離し、それらのエストロゲン活性を生物学的手法により評価する事で、試料のエストロゲン活性の原因物質を把握すると同時にそれらの由来についても把握できる手法の検討を行った。

2. 調査方法

エストロゲン活性の抽出と分離は河川水を対象として環境ホルモンを抽出、分画し、各物質の濃度を定量している Giesy³⁾ らの方法を参考とした。Giesy らは化学物質を抽出後、順相および逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組み合わせて行い、化学物質を分離・定量しているが、本研究では個々の物質を定量するのが目的ではなく、特徴のある化学物質のグループ毎にエストロゲン活性を把握することが目的であるため、抽出後の分離を順相の HPLC のみとした。

エストロゲン活性の測定方法としては、培養細胞を用いた方法^{4) 5)}、組み換え酵母を用いた方法^{6) 7)}、体細胞を用いた方法⁸⁾ 等が報告されているが、今回は操作が簡易であること、データの蓄積があること、毒性物質の影響を受けにくいこと等の利点を持つ組み換え酵母を用いた。

標準物質を用いて分画方法の基礎検討を行った後、環境試料を対象に抽出、分画およびエストロゲン活性の測定を行った。

2. 1 抽出および分画方法

Giesy³⁾らの文献を参考とし、抽出、分画を行った。操作方法を図-1に示す。

河川水等の環境水に含まれる環境ホルモンの濃度は微量であること、分画を行った場合 HPLC 等の操作における回収ロスが予想されることから、大量の試料から効率よくエストロゲン活性を持つ化学物質を抽出する必要があると判断した。今回は大量の試料を短時間で処理できる固相ディスク法を採用した。固相ディスクは、固相カートリッジに比べて化学物質の回収率は劣るものの、大量の試料を効率よく処理できる利点がある。

抽出に用いる固相ディスクは、あらかじめアセトン 15ml、ジクロロメタン (DCM) 15ml、メタノール (MeOH) 15ml および純水 20ml を順次通水し、それぞれ2分間ずつ保持して活性化を行った。抽出は試料 5L を 90mm のグラスファイバーろ紙 (GF/F)、90mm の固相ディスク (SDB-XC)、90mm のグラスファイバーろ紙 (GF/C) の順に重ねて装着したステンレスフィルターホルダーに、定量ポンプ用いて 100ml/min の流速で通水して行った。

固相ディスクおよびグラスファイバーろ紙 (GF/F) からの溶出は、これらを合わせてフィルターホルダーにセットし、アセトン 15ml、DCM 25ml、ヘキサン (Hex) 10ml を順次通水して行った。この溶出液はまとめて無水硫酸ナトリウムで脱水後、乾固させないように濃縮しながらイソオクタン 1ml に転溶した。これに 40% の Hex を含む DCM を 1ml 加えて分画用の試料とした。

分画はシリカゲルカラム (250mm×4.6mm、5 μ m) を用いた順相の HPLC で行った。HPLC の条件は順に溶離液として DCM : Hex=3 : 7 を 15min、DCM100% を 20min、MeOH100% を 20min 流した後、カラムを洗浄、初期化するため、さらに DCM100% を 10min、DCM : Hex=3 : 7 を 35min 流した。この条件で 0-20min に流出した画分を Fr.1、20-45min に流出した画分を Fr.2、45-70min に流出した画分を Fr.3 とした。

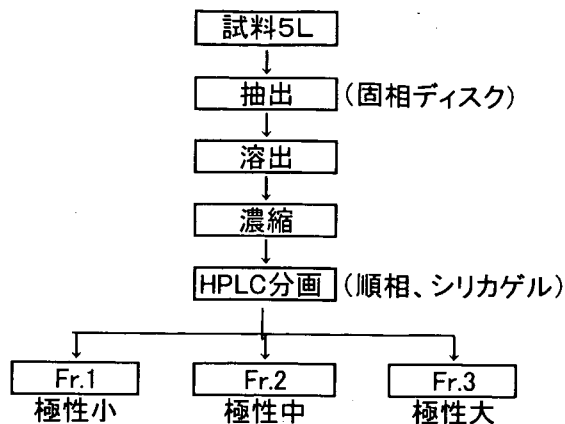


図-1 抽出、分画のフロー

2. 2 標準物質を用いた分画の基礎検討

基礎検討に用いる標準物質には、国土交通省の下水道や河川の実態調査¹⁾における検出頻度および化学物質のエストロゲン活性の強さ⁹⁾から 17 β -エストラジオール (E₂)、エストロン (E₁)、ノニルフェノール (NP)、ビスフェノール A (BPA) を選定した。それぞれの標準物質について、2. 1 抽出および分画方法で述べた条件および操作で3つの画分 Fr.1、Fr.2、Fr.3 に分画した。各分画は標準の測定方法¹⁰⁾に従い化学分析を行い、各物質の流出する画分を確認した。

2. 3 環境試料を用いた分画の検討

環境試料として河川水および下水処理水のある一級河川の中流域において採水した。採水は、採水場所および採水量の関係で3日に分けたが、採水条件をできるだけそろえるために休日等をさけて晴天の平日に行った。各採水地点の位置関係を上流地点を 0km として図-2に示す。採水地点は本川の上流および下流地点、その間に下水処理水を放流している A 処理場および B 処理場の放流口および支川 C 川の本川合流点付近の5カ所である。採取地点の概要は次の通りである。上流地点：この地点より上流域には下水処理場が無い。また生活排水の流入も少ないため、水質が非常に良好である。A 処理場および B 処理場：主に生活排水を処理する標準活性汚泥法の処理場である。両処理場の処理水量は、下流地点の約 15% である。支川 C 川：この支川の流域には規模の小さい下水処理場がいくつか存在する。また、生活排水の流入もあるため、水質は上流地点よりも悪

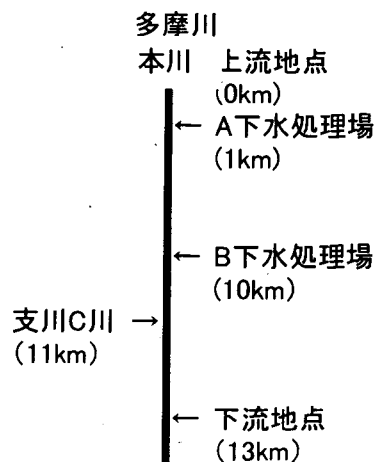


図-2 試料採取地点の概要

い。なお、この支川は上流地点の約1/2の水量がある。下流地点：下流地点において河川の水量に占める下水処理水の割合は約20%である。

試料は、ガラスビンに採取後、冷蔵して実験室に搬入し、2. 1抽出および分画方法で述べた方法により処理した。得られた画分は溶媒留去後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に再溶解し、エストロゲン活性の測定に供した。エストロゲン活性は、Brunel大学の Sumpter 教授より譲渡を受けた組み換え酵母を用いて矢古宇らの方法⁹⁾により測定した。この組み換え酵母には、ヒトの女性ホルモン受容体合成遺伝子、エストロゲン様物質と結合し活性化した女性ホルモン受容体により発現が誘導される酵素β-ガラクトシダーゼの合成遺伝子等が遺伝子操作により組み込まれており、試料のエストロゲン活性を酵素の生成量として測定することができる。

3. 結果および考察

3. 1 標準物質を用いた分画の基礎検討

添加回収実験の結果、それぞれE₂はFr.3に、E₁はFr.2に、NPはFr.1に、BPAはFr.3に分離されることを確認した。

3. 2 環境試料を用いた分画の検討

5つの試料を分画しエストロゲン活性を測定した結果を図-1に示す。上流地点の河川水はエストロゲン活性が検出されないが、下流地点では検出されている。このことは河川水中のエストロゲン活性は生活排水や下水処理水等に由来していることを示している。A処理場の処理水とB処理場の処理水はエストロゲン活性のパターンが似ており、エストロゲン活性の内訳についてはFr.2の割合が約80%と高くなっている。このことは下水処理水のエストロゲン活性にFr.2に含まれるE₁が大きく影響している可能性を示唆している。また、支川についても処理水ほどではないがFr.2の割合が高くなっている。

しかし、これらの支川や処理水が流入した後の下流地点はFr.2のエストロゲン活性が低く、それよりもFr.1、Fr.3のエストロゲン活性が高くなっている。上流地点から下流地点の間には、A処理場、B処理場の他に下水処理場が2箇所ある。2つの処理場は、いずれも主として生活排水を処理する標準活性汚泥法の処理場であり処理水の水質はA処理場、B処理場と同程度と考えられる。また、支川についてもC川の他に小さな支川が数本ある。

これらの条件から考察されることとしては、①上流地点から下流地点の間にはFr.1のグループに分類される環境エストロゲンを排出する下水処理場以外の汚染源が存在する、②流下過程で分解等によりエストロゲン活性を持つ物質が変化し、分画した場合Fr.2でなくFr.1またはFr.3に分画されるようになる、③流下過程で分解等により新たにエストロゲン活性を持つ物質が生成する等がある。③に当てはまる物質としては、界面活性剤として用いられているノニルフェノールエトキシレートがあり、この物質は分解を受けるとNPとなりエストロゲン活性を持つことが知られている。また、E₁はE₂の誘導体であり、生物作用により相互変化する事も知られている。以上のような可能性が考えられるが、今回のデータのみでは判断が難しい。

次に分画によるエストロゲン活性の収支を表-1に示す。下流地点、A処理場、B処理場の収支は概ね良好であった。C川は分画によるエストロゲン活性の回収率が50%と低く、図-1に示したようにトータルのエストロゲン活性が低いと回収率が低くなっていることや今回の分画条件で3つの画分に出てこないエストロゲ

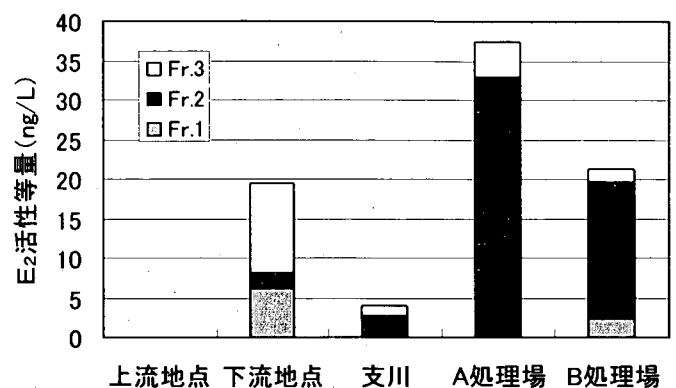


図-3 分画試料のエストロゲン活性

表-1 分画によるエストロゲン活性の回収率*

	Fr.1	Fr.2	Fr.3	合計
上流地点**	(14)	(25)	(33)	(71)
下流地点	35	11	63	108
支川	2	31	17	50
A処理場	0	107	15	122
B処理場	8	60	5	73

*数値は未分画試料のエストロゲン様活性を100としたときの相対値

**活性値が低いので参考値として表記

ン活性を持つ物質が存在している可能性も考えられる。

4. まとめ

固相ディスクを用いた抽出法と順相の HPLC を用いた分画法を組み合わせ、環境水中に含まれているエストロゲン活性の組成や由来を検討する手法を検討した。結果、水環境中で検出頻度が高くかつ高いエストロゲン活性を持つ物質を3つの画分に分離することができた。また、それらのエストロゲン活性を組み換え酵母を用いて測定することで、エストロゲン活性の排出源や水環境中での挙動について知見が得られることを確認した。今後は、機器分析による物質濃度の確認や室内実験による物質変化の検討等が必要と考えられる。また、今回の HPLC 条件では E₂ と BPA は同じ画分 (Fr.3) に出てしまうため、エストロゲン活性の由来、内訳を特定するのに不十分な面もある。今後は条件を検討し、それぞれが別の画分に分離される条件を確立することも有効と考えられる。

〈参考文献〉

- 1) 建設省河川局河川環境課, 下水道部流域下水道課; 平成 10 年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果, 1999. 3.
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課, 水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) 実態調査結果, 環境庁, 1999. 10.
- 3) John P. Giesy et al; Analytical Methods for Detection of Selected Estrogenic Compounds in Aqueous Mixtures, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 2814-2820.
- 4) Soto, A.M. et al; The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives.*, Vol. 103, 113-122, 1995.
- 5) Pons, M. et al.; A New Cellular Model of Response to Estrogens: Abioluminescent Test to Characterize (Anti) Estrogen Molecules, Research Report, 9 (4), 450-459, 1990.
- 6) Sumpter, J.P et al; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 15, No. 3, 241-248, 1996.
- 7) H. Takigami et al.; Detection of Estrogen-like Activity In Sewage Treatment Process Waters, *Environ. Sanit. Eng. Res.*, Vol. 12, No. 3, 214-219, 1998.
- 8) Jean M. W. Smeets et al; In vitro Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti) Estrogenic Activity of Xenobiotics, *Toxicology and Applied Pharmacology* 157, 68-76, 1999.
- 9) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol. 36, 199-204, 1999.
- 10) 建設省都市局下水道部; 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル (案), (社) 日本下水道協会, 1999.