

13. 下水道による水環境への影響に関する調査

水質チーム 首席研究員 田中 宏明
 主任研究員 佐々木 稔
 専門研究員 東谷 忠
 交流研究員 壬生 勝泰

1. はじめに

下水道の整備に伴い河川水に占める下水処理水の割合が変化し、下水処理水が放流先河川の水生生態系に与える影響が大きなものとなっている可能性がある。特に都市域では水資源の再利用に伴い、下水処理水の河川へ占める割合は大きくなっており、再利用比率が90%を超えるような河川も報告されている。

本調査では、下水道の整備が河川水質や水生生態系といった水環境に及ぼす影響や、下水処理水中に存在している化学物質、特に女性ホルモン作用を持つ内分泌攪乱物質が魚類を始めとした水生生物に及ぼす影響について検討する。

平成14年度は、手賀沼に流入する都市河川である大津川における汚濁負荷量の実態調査を行い、流域条件の相違が流況及び流出汚濁負荷量に与える影響を検討した。また、下水処理水のエストロゲン作用が魚類に及ぼす影響を調べるため、下水処理場に設置した水槽により鯉を用いた曝露試験を実施した。

2 流域水循環機構の変化に関する検討

下水道整備等による流域条件の変化が、水量並びに有機物及び栄養塩等の汚濁物質の循環にどのように寄与しているか把握するために、流域からの負荷量実態調査を実施した。

1) 対象流域の概要

千葉県にある手賀沼は水質汚濁が著しく進んでいる湖沼として知られており、千葉県が主体となって手賀沼水循環回復行動計画（平成15年7月）を立案、その回復に向けて様々な行動メニューが提案され、一部施策は既に実行に移されている。

本調査では、手賀沼の主要な流入河川であり、手賀沼全流域に対し面積約23%、人口約41%を占める流域をもつ大津川（図2-1）を対象とした。

2) 調査地点

採水地点は、大津川本川及び支川を含め6地点（記号：OT①～OT⑥）、名戸ヶ谷排水路流末（同：NT）、増尾排水路流末（同：MS）とした。

大津川流域の土地利用状況及び污水处理状況を表2-1に示す。これより大津川流域の土地利用は、都市化の進行により、主として林地が市街地に変化していることがわかる。污水处理形態別人口については、下水道整備が進んでいるものの、単独処理浄化槽による污水处理が依然として大きな比率を占めている。

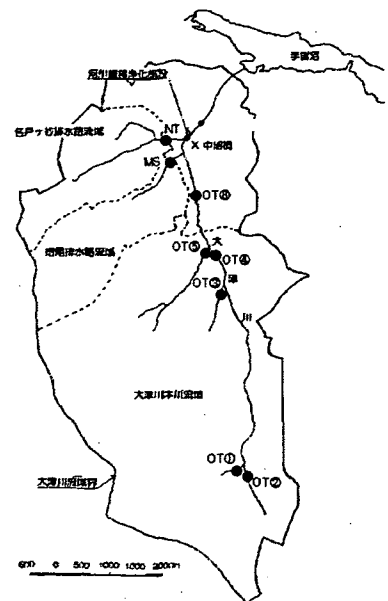


図2-1 大津川流域図と調査地点

表 2-1 大津川流域フレーム

調査年	流域面積 (ha)	土地利用%				流域人口 (人)	処理形態別人口割合(%)				
		市街地	水田	畑地	林地		下水道 浄化槽	合併処理 浄化槽	単独処理 浄化槽	汲み取り 等	
1980	3,669	35.6	9.1	25.2	30.1	146,650	0.0	23.3	37.7	39.0	
1986	3,669	42.6	7.8	23.2	26.3	169,030	14.5	17.9	45.0	22.6	
1990	3,669	48.0	6.5	22.9	22.6	191,030	23.1	16.5	44.4	16.0	
1995	3,668	55.7	6.2	23.3	9.8	196,123	38.2	11.1	39.9	10.8	
本調査の対象流域		3,261	54.9	4.3	30.6	102	171,451	31.0	12.6	44.2	12.1
大津川本川		2,400	48.1	5.7	36.5	9.7	109,537	20.1	12.5	50.8	16.6
名戸ヶ谷排水路		437	79.4	0.0	11.9	8.8	36,488	75.1	1.6	19.4	3.9
増尾排水路		424	67.9	0.8	16.5	14.9	25,421	15.1	29.0	51.4	4.5

3) 試料の採水と水質分析

2003年1月の晴天時に24時間連続採水調査(3時間間隔)を行い、浮遊物質量(SS)、生物学的酸素要求量(BOD5)、化学的酸素要求量(CODMn)、各態窒素(T-N, NH4-N, NO2-N, NO3-N)、各態リン(T-P, PO4-P)について、河川水質試験法(案)1997年版に基づく水質分析を実施した。

4) 調査結果

大津川本川 OT⑥, 名戸ヶ谷排水路 NT, 増尾排水路 MS における負荷量を表 2-2 に示す。

増尾排水路の流出負荷量が他の流域と比較して大きい。これは、汚水処理に占める単独処理浄化槽、あるいは合併処理浄化槽の影響が大きいのではないかと考えられた。また今回の実態調査で把握した負荷量からは汚水処理形態別人口から考えられる負荷量比以上に、大津川本線 OT⑥に比べ増尾排水路 MS における流出負荷量が大きい傾向がある。これは今回調査したような晴天時においては、河道内への汚濁物質の堆積やあるいは分解が盛んであり、河道が長く、流下時間の大きい大津川本川は河道内での減少があるのではないかと考えられた。

従って、処理形態別人口等の流域情報や、河道条件、河道内での堆積や分解の機構は、下水道整備等をはじめとする流域条件が、水量や有機物、栄養塩等の汚濁物質の循環に与える寄与を把握するモデルを構築する上で不可欠なものであるといえる。

表 2-2 実態調査結果

河川名	地点名	負 荷 量					処理形態別人口				
		T-N	T-P	SS	COD	BOD	流域全体	下水道 水酸化	合併浄化槽 人口	単独浄化槽 人口	汲取り 人口
		g/day/ha	g/day/ha	g/day/ha	g/day/ha	g/day/ha	人/ha	人/ha	人/ha	人/ha	人/ha
大津川本川	OT⑥	156	11	163	164	203	45.6	9.2	5.7	23.2	7.6
名戸ヶ谷排水路	NT	94	2	114	69	71	83.5	62.7	1.4	16.2	3.3
増尾排水路	MS	462	19	637	469	776	60.0	9.1	17.4	30.8	2.7

3 生物検定法の高度化に関する検討

これまでの下水処理水によるコイ曝露試験の結果、早春に雌雄のコイを同所的に曝露した場合に限り雄コイの VTG 生成が認められた。このことから、雄コイが VTG を生成した現象について、早春に雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲンがアロマトラーゼの酵素作用によってエストロゲンに変化し、これが VTG を合成する原因になった可能性が示された。アンドロゲンの生成については、雌雄が同所的に曝露飼育されているため、雌の放出するフェロモンによって雄の生殖活動が活発化された結果である可能性が考えられた。さらに、アロマトラーゼについては、下水処理水に曝露されたことによってこれが生成している可能性が考えられた。

そこで、本年度はこの仮説を検証するため、春期に雌雄を同所的に曝露する試験を実施することとした。さらに、薬物代謝酵素のはたらきを明らかにするため、その活性のひとつである EROD について測定を試みた。

1) 試験魚および影響指標

試験魚としてコイ *Cyprinus carpio* を選定し、体重 800~900g の養殖コイを業者から購入し試験に用いた。影響指標としては雄コイの血中 VTG を採用した。

2) 試験水槽

曝露試験は、下水処理場敷地内に流水式の野外試験水槽を 5 つ並べて設置した。

試験水槽は、コンクリートブロックを積み上げ、表面をモルタルで仕上げたもので、コイ曝露槽と調整槽から成り立っている。コイ曝露槽の大きさは、長さ 4m、幅 2m であり、水深は水流にともない 0.5m から 0.7m へと深くなる。コイ曝露槽の容積は 4,800L である。

調整槽 (2×2×0.7m) では、それぞれにエアポンプを取り付け、毎分 60L のエアレーションによって酸素の供給、および処理水、水道水 (対照試験区) の脱塩素処理をおこなった。なお、曝露槽には鳥の捕食を防止するネットを張り、調整槽上部には藻類の発生を抑制する日除けを設けた。

3) コイ曝露試験の基本的条件

コイの試験個体数は、水槽あたり 15 匹を基本設定とした。この場合、曝露水槽での個体密度は 3.1 匹/m³ となる。個体ごとの経時的な VTG 生成を追跡するため、すべてのコイに識別タグを取り付けた。エサは、植物性エストロゲンとしてコイに影響を及ぼす可能性のある大豆を含まない市販の餌 (おとひめ 8 号、日清飼料 (株)) を週に 1 回適量与えた。

曝露試験の開始時にコイの全長、体長、体重を測定し、試験終了後、生殖腺を観察して雌雄を決定した。また、その重量をもとに生殖腺体指数 (GSI; 体重あたりの生殖腺重量比率) を求めて成熟状況を観察した。

4) コイ VTG の測定

コイの血中 VTG を定期的に測定するため、各個体からの採血量は、コイの活動に支障をきたさないこと、さらに測定に必要な血清量を確保することを考慮して 0.5mL とした。

VTG の測定には、コイ VTG-ELISA キット (株式会社トランスジェニック) を用い、添付のプロトコールに従い測定した。なお、血清試料およびビテロジェニン標準試料はすべて二重測定をおこない、変動係数が 10% 以内であるデータをもとに濃度を算出した。

5) EROD の測定

EROD (Ethoxy resorufin-o-deethylase) は、薬物代謝酵素 P4501A1 依存性のエトキシレゾルフィン O-脱エチル化活性であり、化学物質によって引き起こされる肝臓での P4501A1 遺伝子の発現の指標となる。

この測定は、肝臓サンプルから調製されたマイクロゾームに蛍光物質を添加することによって、蛍光分光と HPLC を組み合わせて測定検出感度を向上させた Tatarazako らの方法¹⁾に従い実施した。

6) エストロゲン様活性及びエストロゲン様物質の水質測定

試験水のエストロゲン作用を明らかにするため、遺伝子組換え酵母によるエストロゲン様活性のほか、LC/MS/MS によるエストロゲン類 E2、E1 および EE2 の同時測定、およびエストロゲン様物質の NP およびその前駆物質であるノニルフェノールエトキシレート (NPnEO) について 2 週間ごとに測定した。

7) 試験内容

第1回曝露試験 (Run1) は、下水処理水によって雄コイの VTG 生成は誘導されるのか否かを明らかにすることを目的として実施した。Run2 は処理水のエストロゲン作用を弱めると考えられるオゾン添加試験区及び希釈試験区、Run3 は脱塩素水道水を用いて雌から雄への作用を確認する試験を実施した。

さらに Run4 では、Run1 と同じ季節に雄のみを用いて試験を実施した。Run1 および Run2 では、試験開始時にコイの雌雄を区別せず、終了後に生殖腺を観察して判定した。Run3 および Run4 では、精液を放出する個体を雄として、さらに購入時の VTG 値を参考に雌雄を判定した。

ここでは、Run1 および Run4 の結果について紹介するとともに、これらの結果から得られた生理学的作用について述べる。

曝露試験区は下水処理水試験区 (砂ろ過放流水 100%) および対照試験区 (脱塩素水道水) のそれぞれに雄単独試験区、雌雄混合試験区を設け、合わせて4試験区とした。最長曝露期間は8週間とし、その間2週間ごとに血液を採取して VTG を測定することとした。また、曝露試験終了時には、薬物代謝酵素の生成可能性を探るため、P4501A1 生成の指標である EROD 活性を測定することとした。

さらに、雄 VTG 生成の時間経過による上昇の様子や到達濃度を把握するとともに、対照試験において雄の血中 VTG の正常値を明らかにすることとした。試験は、経時変化を詳しく調べるため、試験期間を8週間と設定し、1週間ごとに血清サンプルを得た。コイは、各試験区に9匹を曝露した。試験終了後に雌雄を判定した結果、処理水試験区では雄5匹、雌4匹、対照区では雄7匹、雌2匹であった。なお、対照区の雌2匹は試験途中で死亡した。

処理水試験区の VTG 測定結果を図に示す。

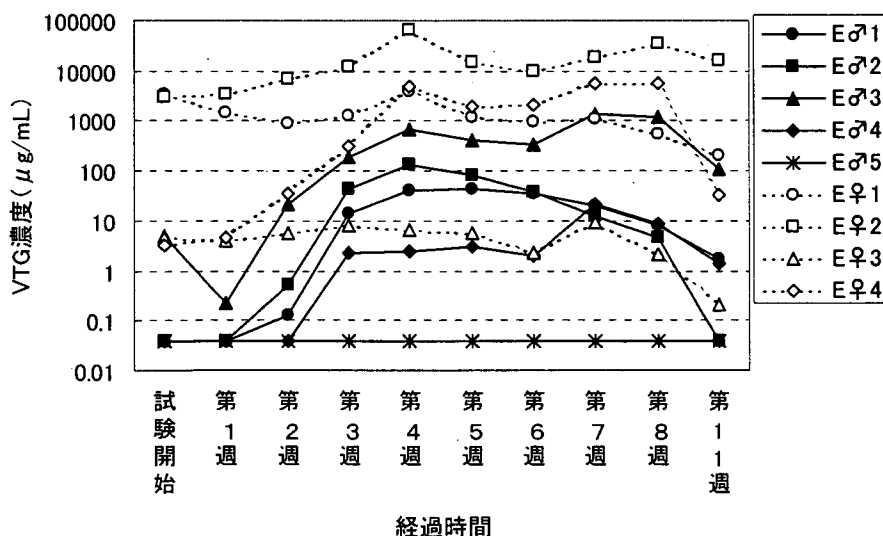


図3-1 下水処理水に曝露したコイの VTG 経時変化 (Run1)

下水処理水に曝露した雄のうち4匹では、時間の経過にともない VTG が上昇し、4週目には $1,000 \mu\text{g/mL}$ ほどに達する個体が現れた。その後変動はあるものの $1 \mu\text{g/mL}$ 以上のレベルで推移し、8週経過した時点で脱塩素水道水に戻したところ、11週目 (水道水3週目) には雄の VTG は低下した。曝露中の雄のコイ VTG 最高値は $1,400 \mu\text{g/mL}$ であった。なお、1個体では試験開始時に VTG が生成していたが、曝露開始後一度 VTG が減少し再び上昇した。また、処理水試験区の雄1匹では、曝露による VTG 生成は認められなかった。

試験終了後に精巣を観察した結果、VTG を生成した雄4匹の GSI は $4.5 \sim 12.0\%$ であり、成熟途中であると考えられた。VTG を生成しなかった雄の GSI は 8.3% であった。また、対照区では雄7匹すべてが定量下限

値 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満のまま経過し、VTG の生成は認められなかった。これらの GSI は 1.7~7.1% であった。

さらに、対照試験区の雄のコイ VTG はすべて定量下限値 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であったため、雄の正常値は定量できないレベルにあると考えられた。

水質測定の結果、処理水のエストロゲン活性は 0.0036~0.0094 $\mu\text{g}/\text{L}$ (E2) の範囲にあり、E2 (ELISA) では 0.0246~0.0843 $\mu\text{g}/\text{L}$ であった。なお、NP や NPnEO は検出されなかった。

表 3-1 Run1 及び Run4 の水質測定結果

水質項目	曝露試験	試験区	試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週
エストロゲン活性 (ng/L) 0.02 ≤ Tr < 0.07 ND < 0.02	Run1	100%処理水	-	5.2	3.6	5.9	4.8
		100%処理水(流入)	9.4	4.8	5.5	7.3	6.0
		対照	1.5	ND	ND	ND	ND
		対照(流入)	1.3	ND	ND	ND	ND
	Run4	100%処理水	8.7	8.1	6.2	7.4	4.7
		O ₃ 10mg/L処理水	1.0	ND	ND	0.07	0.3
		O ₃ 2mg/L処理水	9.5	8.6	0.8	0.3	5.5
		対照	0.07	ND	0.14	ND	ND
E2(ELISA) (ng/L) 0.1 ≤ Tr < 0.3 ND < 0.1	Run1	100%処理水	-	58.0	52.7	57.5	44.0
		100%処理水(流入)	24.6	84.3	58.7	67.4	40.1
		対照	ND	ND	ND	ND	2.9
		対照(流入)	ND	ND	ND	ND	ND
	Run4	100%処理水	45.3	38.9	24.3	32.6	32.0
		O ₃ 10mg/L処理水	ND	ND	ND	ND	ND
		O ₃ 2mg/L処理水	38.8	41.4	7.7	4.3	31.2
		対照	ND	ND	ND	ND	ND
E2(LC/MS/MS) (ng/L) 0.4 ≤ Tr < 1.0 ND < 0.4	Run4	100%処理水	-	8.6	-	3.0	1.2
		O ₃ 10mg/L処理水	-	9.9	-	ND	Tr(0.21)
		O ₃ 2mg/L処理水	-	16.5	-	Tr(0.78)	3.1
		対照	-	Tr(0.70)	-	Tr(0.45)	ND

ND : 検出下限値未満

Tr : 検出下限値以上、定量下限値未満

これらの結果、下水処理水に雄コイの雌化を引き起こす原因物質が含まれているものと考えられた。しかし、その後の試験では雄の VTG 生成は再現されず、下水処理水に曝露した雄コイに VTG 生成が確認されたのは、早春に雄と雌が混在していた場合に限られた。

表 3-2 河川・下水処理水の水質比較

水質項目	対象	中央値	平均値	最小値	最大値	検体数
エストロゲン活性 (ng/L) 0.02 ≤ Tr < 0.07 ND < 0.02	下水処理水 ²⁹⁾	4.7*	23.9*	ND	78.0	100
	河川 ³⁰⁾	2.2*	1.6	ND	31.0	150
	Run1-下水処理水	5.5	5.8	3.6	9.4	5
	Run2,4-下水処理水	4.6	5.4	3.1	8.7	10
E2(ELISA) (ng/L) 0.1 ≤ Tr < 0.3 ND < 0.1	下水処理水 ²⁰⁾	10.0	-	ND	66.0	138
	河川 ¹⁷⁾	-	-	ND	27.0	532
	Run1-下水処理水	57.5	54.1	24.6	84.3	5
	Run2,4-下水処理水	33.7	35.3	24.3	45.8	10

* : 元の文献に記載されていないが、算出することが可能であった数値

曝露試験でのエストロゲン活性および E2 (ELISA) 測定結果と、国土交通省が実施した河川や下水道の実態調査における E2 (ELISA) 測定結果、さらに実態調査の際に同時に採水して測定したエストロゲン活性について表 3-2 に示した。

Run1 での下水処理水のエストロゲン活性および E2 (ELISA) の平均値は、それぞれ $0.0058 \mu\text{g/L}$ (E2) および $0.0541 \mu\text{g/L}$ であった。Run2 と Run4 でのエストロゲン活性および E2 (ELISA) の平均値は、それぞれ $0.0054 \mu\text{g/L}$ および $0.0353 \mu\text{g/L}$ であり、Run1 に比べほぼ同等のエストロゲン作用であると考えられた。よって、雄コイの VTG 生成に関わる要因は、処理水のエストロゲン作用だけではないと考えられた。

一方、Run1 の水質測定結果と実態調査結果およびエストロゲン活性測定結果を比較すると、調査対象となった処理場の放流先や河川ではエストロゲン活性は比較的高いと考えられ、コイの雌化が発生する可能性があると考えられた。

本年度の試験では、下水処理水に曝露した雄コイは、雄単独試験区、雌雄混合試験区いずれにおいても VTG の生成は認められなかった。また、脱塩素水道水を用いた対照試験区においても同様に、雄コイの VTG 生成はみられなかった。曝露試験水の水質測定結果は、過年度に実施した試験に比べ大きな差異は認められなかったため、今回、雄の VTG 誘導がみられなかった理由は、試験開始が 4 月であったことから、生理的活動が活発になる早春を過ぎていたためと考えられた。

下水処理水に曝露した試験区で EROD 活性が上昇している傾向であったことは、下水処理水によって薬物代謝酵素が誘導されている可能性を示すものと考えられ、アンドロゲンからエストロゲンへの反応を触媒する薬物代謝酵素アロマターゼについても誘導している可能性が考えられる。今後は、アロマターゼ自体を測定し、この現象を明らかにする必要がある。

4 まとめ

本年度の研究は、下記の通り成果を得た。

(1) 流域水循環機構の変化に関する検討では、下水道による水環境への影響を把握するためには、有機物や栄養塩等の河道内での堆積や分解に関して検討を進める必要性が明らかになった。

(2) 下水処理水による魚類への影響を把握するため、コイの曝露試験を春期に雄単独試験および雌雄混合試験を実施した。この結果、いずれの試験区においても雄コイの VTG 生成は認められなかった。また、脱塩素水道水を用いた対照試験区においても同様に、雄コイの VTG 生成はみられなかった。

(3) 曝露試験水の水質は、過年度に実施した試験に比べ大きな差異は認められなかったため、雄コイの VTG 誘導がみられなかった理由は、試験開始が 4 月であったことから、生理的活動が活発になる早春を過ぎていたためと考えられた。

(4) EROD 活性の測定を導入し、コイの P4501A1 生成について試験することが可能となった。下水処理水に曝露した試験区では EROD 活性が上昇している傾向があったため、下水処理水によって薬物代謝酵素が誘導されている可能性が示された。

- 1) Tatarazako N., Takigami H., Koshio M., Kawabe K., Hayakawa Y., Arizono K., Morita M.; New Measurement Method of P450s Activities in the Liver Microsome with Individual Japanese Medaka (*Oryzias latipes*), *Environmental Sciences*, 9(6), pp.451-462, 2002