

3. 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究

水循環研究グループ（水質） 上席研究員 鈴木 穰
主任研究員 小森 行也
主任研究員 津森ジュン
専門研究員 李 富生

【要旨】

本研究は、界面活性剤の分解物質や人畜由来のホルモンなど都市排水由来の内分泌攪乱物質に関し、河川水・底質中などにおける調査分析手法の開発、また水環境中での分解・生成といった変化現象の把握を目的としている。

平成 16 年度は、手賀沼におけるノニルフェノール類の実態調査と挙動シミュレーションモデルの構築、分析法が未確立であり排水・環境中での実態が未解明であるエストロゲン・グルクロン酸抱合体についての分析法の開発、湖沼におけるエストロゲン挙動を把握するために三春ダム前貯水池等の水・底泥試料についてエストロゲン分解速度を測定し、次のことが明らかになった。

- 1) ノニルフェノール（NP）類の手賀沼内水質濃度は流下方向に従って低減するが、底質濃度は逆の傾向を示した。また、NP 類の生分解速度や吸着平衡係数を別途実験により求め、挙動シミュレーションモデルを構築したが、これにより、湖水における NP 類濃度の構成および分布の傾向が再現できた。
- 2) エストロゲンのグルクロン酸抱合体の分析法において、前処理操作を簡易化して抱合体の分解を抑制することにより、添加回収率が二次処理水では 87～120%、流入下水では 60～110%と向上し、信頼性の高い方法が確立できた。
- 3) 17 β エストラジオールの分解速度は、表層底泥の方が中層や下層底泥よりも大きく、また、好気条件下の方が嫌気条件下よりも大きかった。SS 量当たりの分解速度で見ると、水相は底泥相の 2 倍の大きさであった。

キーワード：ノニルフェノール類、エストロゲン、抱合体、湖沼、挙動、シミュレーションモデル

1. はじめに

生物の正常なホルモン作用に影響を与えることが疑われている外因性の物質（内分泌攪乱物質）による環境汚染問題が顕在化してきているなか、都市排水を由来とするエストロゲンとして 17 β -エストラジオール（女性ホルモン、以下 E2）、その代謝生成物であるエストロン（E1）、エストリオール（E3）及び経口避妊薬の主成分であるエチニルエストラジオール（EE2）を挙げることができる。

また、環境中に存在している濃度と内分泌攪乱作用の強さから、エストロゲンに次いで環境に与える影響が大きいと考えられるノニルフェノール（NP）は、都市排水に含まれる非イオン界面活性剤であるノニルフェノールエトキシレート（NPEO）が、下水処理場や河川の中でノニルフェノキシ酢酸（NPEC）等の中間物質を経由して分解されることによって生成しているといわれている。

エストロゲンやノニルフェノール類（NP、NPEO、NPEC、以下 NPs）といった物質による環境リスクを正しく評価するためには、これらの物質の測定法を開発するとともに、水環境中における変化、生成、分解、蓄積、移動といったような挙動を把握することが必要である。

本研究では、環境水の中でのこれら物質の挙動を把握するため、手賀沼におけるノニルフェノール類の実態調査と挙動シミュレーションモデルの構築、昨年度報告したエストロゲン抱合体の分析方法の改良と水相と底泥相微生物によるエストロゲンの分解特性の把握を行った。

2. 研究の内容

2. 1 手賀沼における NP 類の挙動予測

都市排水・事業所排水に含まれている NP 類（界面活性剤のノニルフェノールポリエトキシレート（NPEO）及びその分解中間物質であるノニルフェノールエトキシ酢酸類（NPEC）、ノニルフェノール（NP））が国際的に注目されている^{1) 2) 3) 6) 7) 10) 12)}。NP 類の中、ノニルフェノールが最も高いエストロゲン活性を示すが、NP1EO、NP2EO、NP1EC、NP2EC にも多少のエストロゲン活性が認められる他、NPEC 類の生態毒性が知られている⁸⁾。これらの物質の環境リスクを正確に評価するため、及び、水質対策計画を確立するためには、NP 類の環境水、底質中における挙動に関するプロセス（反応、分解、吸着、揮発など）の定量的な把握が必要である⁹⁾。

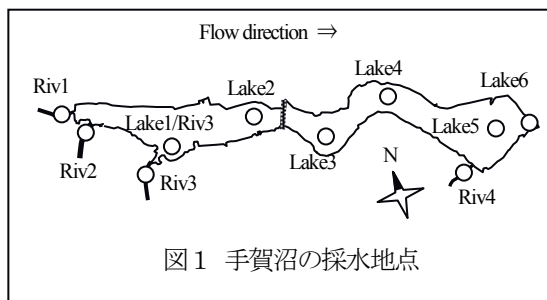
本研究では、手賀沼の実態調査（流入、流出河川、湖内）を行い、NP 類の水中、底泥中濃度を測定し、空間及び時間的な変化の特徴を把握するとともに、実態調査結果及び観測データに基づいて、NP 類の挙動シミュレーションモデルを構築し、予測シミュレーションを行った。

2. 1. 1 方法

（1）実態調査及び分析方法

水質及び底質調査は手賀沼の図 1 に示す調査地点において、今年度の 10 月に 2 回行った。比較のため、以下

昨年度3月に行った調査結果の一部も示す。手賀沼は極端に浅いため（平均水深約90cm）採水は水深約20cmにおいて行った。表層底泥の採泥は直径10cmのコアサンプラで行い、表層の厚さ10cmの試料を均一化し、試料の前処理及び分析を行った。各NP類の分析方法及び定量下限値を表1に示す。



調査地点の記号の説明：Riv1 大堀川ふるさと橋；Riv2 北千葉導水注入口；Riv3 大津川ひどり橋；Riv4 染井入落河口；Lake1/Riv3 大津川河口から約400m湖内。Lake2～Lake6 湖内地点（図1を参照）。

表1. NP類の分析方法及び定量下限値

Chemicals	Method	Water μg/L	Sediment μg/kg d.w.
NP	GC-MS	0.05	1
NP ₁ EO	LC-MS	0.1	1
NP ₂ EO～ NP ₁₅ EO	LC- MS/MS (HPLC)	0.01	1
NP ₁ EC～ NP ₁₀ EC	GC-MS	0.005	0.05

一般水質項目（SS、VSS、TOC、Chl-a など）及び底質項目（含水率、比重、TOC、強熱減量など）の測定は公定法で行った。

(2) 室内実験

1) NP類の生分解実験

NP類の好気性生分解試験の目的は、NP類の図2に示す反応経路の反応速度係数の推定である。生分解試験は手賀沼水に規定のNP物質を添加し、室温、好気状態でいき、各NP化合物濃度の経時変化を求めた。

2) NP類の吸着実験

NP類の吸着実験の目的は、NP類の手賀沼の浮遊物及び底泥粒子への吸着における吸着平衡定数（以下、吸着係数）の固／液分配実験による測定である。

方法：手賀沼湖内調査地点の水質試料を室温で30分攪拌し、浮遊物を1μmのガラスろ紙によってろ過分離し、各NP化合物の溶解性及び浮遊性濃度を測定した。NP類の吸着係数について、物性からの推定、及び本プ

ロジェクトでの過去のデータ解析からの推定を行った。物性からの推定はオクタノール／水分解係数を利用して、Namkungら¹⁰⁾の方法で、以下の計算式によって行った。

$$K_{ads}(L/mg) = 6.3 \times 10^{-7} f_{TOC} K_{ow} \quad (1)$$

ここで、 f_{TOC} はVSSの有機炭素比率（g/g）であり、微生物の場合一般的な値は0.53である。

(3) モデル開発

化学物質挙動シミュレーションモデル開発の目的は、これらの物質の水環境における挙動の理解を深めると共に、水質改善対策に活用可能なツールの構築である。

数理モデルの構造およびプロセスの特徴は以下の通りである。

- ① 空間的に1次元（流下方向、完全混合槽列）；
- ② 水柱と底泥間の物質移動を支配する要因は底泥の波による巻上げである（浅い湖沼）；
- ③ 生化学反応の速度は溶解性化学物質濃度及び有機性浮遊物濃度（VSS）に依存する；
- ④ 化学物質はVSS及び底泥の有機性固形物（強熱源量分）に吸着する。吸着平衡は線形的である。

モデルの水柱における一般的な物質収支式は以下の通りである。

$$V(dC/dt) = \text{流入} - \text{流出} + \text{生成} - \text{分解} + \text{溶出} - \text{吸着} + \text{吸収} - \text{揮発}$$

このモデルで、各対象物質の図2に示す生成及び分解反応を考慮し、例としてNPの生化学反応を以下の式に示す。この式によると、NPはNP₁EO及びNP₁ECの分解により生成されるが、同時に分解もする。左側の変化の符号及び絶対値は各反応速度係数 k （L/mg/day）、物質全濃度 $[XX]$ （nmol/L）、吸着係数 K_{ads} （L/mgVSS）及びバイオマス濃度 X_{bio} （mg/L）に依存する。本研究では、 $X_{bio} = VSS$ とした。

$$\begin{aligned} \frac{d[NP]}{dt} = & k_{10}[NP_1EO] \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads1}X_{bio}} + k_{1c0}[NP_1EC] \times \\ & \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads1c}X_{bio}} - k_0[NP] \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads0}X_{bio}} \end{aligned} \quad (2)$$

以上の式（2）に示す様に、NP類の反応速度は溶解性濃度（ $= [全濃度] / (1 + K_{ads}X_{bio})$ ）に依存するので、吸着しやすいものの反応速度が低減される。

本モデルは120本の連立微分方程式からなるもので、設定パラメータ（定数、係数、初期値、物性など）の数は251である。数理モデルの計算プログラムは動的システム解析言語のStella Research Ver.7.0.2（HPS Inc.）で作成した。

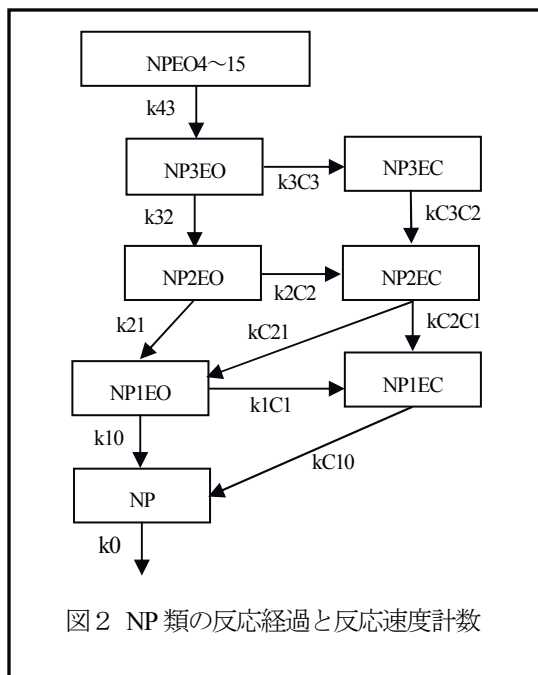


図2 NP類の反応経過と反応速度計数

2. 1. 2 研究結果

(1) 実態調査結果

昨年度、NPEO類のHPLC（蛍光）による分析において、水質試料の一部で、NP4EO、NP6EO、NP9EO、底質試料の一部で、NP6EO、NP14EOの濃度が予想より高かったため、分析に対する妨害物質の存在が疑われたので、河川調査地点 Riv4（染井入落）において採水を行い、LC-MS/MS及びHPLC法の分析結果を比較した。採水時のNP類濃度が低かったため、物質の一部はHPLC法の定量下限値以下となっていたが、図3に示す様に、NP4EO分析に妨害する物質の存在を確認した（プラスエラー）。この結果、以降の分析は妨害問題のないLC-MS/MS法で行った。調査時の主な環境状況などを表2に示す。

表2. 主な調査状況

Conditions	Survey 1	Survey 2	Survey 3
Month	October	October	March
Tw, °C	19.4	17	10.8
Rain, mm	227	175	8
Inflow, m ³ /s	10.2	3.1	11.5
Wind, m/s	0.7	0.4	1.5
SS Riv, mg/L	30	2	8
SS Lake, mg/L	20	23	20

Twは手賀沼下流における水温、Rainは調査日1週間前の期間の合計雨量（我孫子气象台）、Inflowは流入水量の合計である。Riv2 調査地点である北千葉導水第二機場注入口における流量は、Survey 1 及び2においてほぼゼロで

あったが、Survey 3においては9.5 m³/sであり、流入量の大半を占めた。Windは風速の1日平均値（我孫子气象台）、SS Rivは流入河川の浮遊物濃度の調査平均値、SS Lakeは湖内浮遊物濃度の調査平均値である。（備考：SS Riv及びSS Lakeの平成10年～14年の平均値はそれぞれ9.2及び40 mg/Lであった。）

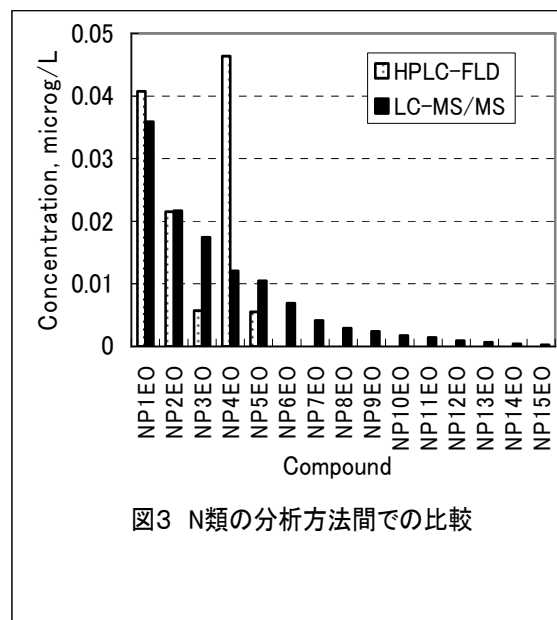


図3 N類の分析方法間での比較

Survey1～Survey3のNP類の水質調査結果を図4a～図4cに示す、また、Survey1及びSurvey3のNP類の底質調査結果を図5a～図5bに示す。図4a～図5bの右縦軸に示すA/All,%の意味は以下の通りである。

$A/All, \% = (NP + NP1 \sim 3EO + NP1 \sim 3EC \text{ 濃度}) / (\text{全てのNP類の濃度}) \times 100$ 。

(2) 室内実験の結果

生分解実験結果から推定したNP類の生化学反応速度係数（k）を図6に示す。

(3) 吸着実験の結果

吸着実験の結果から求めた吸着係数（K）及びその他の方法で推定した吸着係数を表3に示す。

表3. 各NP化合物の吸着係数 (L/mg VSS)

Chemical	Teganuma Experiment	Calculated from K_{OW}	Act. Sludge Experiment
NP4~15EO	0.0257	0.0034	0.0026
NP3EO	0.0253	0.0358	0.0082
NP2EO	0.0109	0.0667	0.0112
NP1EO	0.0098	0.1272	0.0194
NP3EC	0.0064	0.0609	0.0134
NP2EC	0.0065	0.1133	0.0201
NP1EC	0.0063	0.2111	0.0112
NP	0.0890	0.1925	0.0185

表3に示すNP 4～15EOの値は平均値である。推定方法で利用した K_{ow} 値はNPにおいて文献実測値であるが、その他の化合物については、分子構造をもとにした推定値である¹¹⁾。Act. Sludge Exprimintは下水処理場活性汚泥における実測値である（2002年）。

（4）シミュレーション結果

各NP化合物濃度の実測値（Survey3）及びシミュレーション値を図7に示す（定常状態）。「Reach」は手賀沼の区間、「meas」は実測値、「sim」はシミュレーション値を表す。

また、Survey3の条件での定常状態シミュレーションにおける各NP化合物の手賀沼全体における運命予測結果を図8に示す。

2. 1. 3 考察

（1）実態調査結果について

NP類の水中濃度（図4a～図4c）が示す様に、流入河川水中のNP類濃度の合計値は湖内水中濃度より約2～3倍高い。これは、河川での滞留時間が短いため分解が進んでいないこと及び河川での浮遊物の沈殿は少ないことからであると思われる。（備考：図4cに示すRiv2調査地点は例外である。手賀沼浄化水として水質の比較的良好な利根川の水を大量に注入していたためと考えられる。）

湖内傾向として、流下方向に従って、NP類の濃度が減少する。その減少の程度はSurvey 2において最も著しい。その理由は、流入量が最も少ないため滞留時間が長くなり、分解反応及び沈降（物質の底質への移動）が進んだことによると考えられる。

内分泌かく乱物質として活性の最も高いNPについては、Survey1（図4a）における濃度が最も高かった。NPの浮遊物への吸着性が高いので、浮遊物濃度のやや高いSurvey 1において濃度が高くなったものと考えられる。

図4a～図4cに示す様に、NP+NP1～3EO+ NP1～3ECの濃度の合計は全てのNP類濃度の合計の約7～8割を占め、これらの物質の挙動を把握することにより、NP類の全体的な挙動も把握できると考えられる。

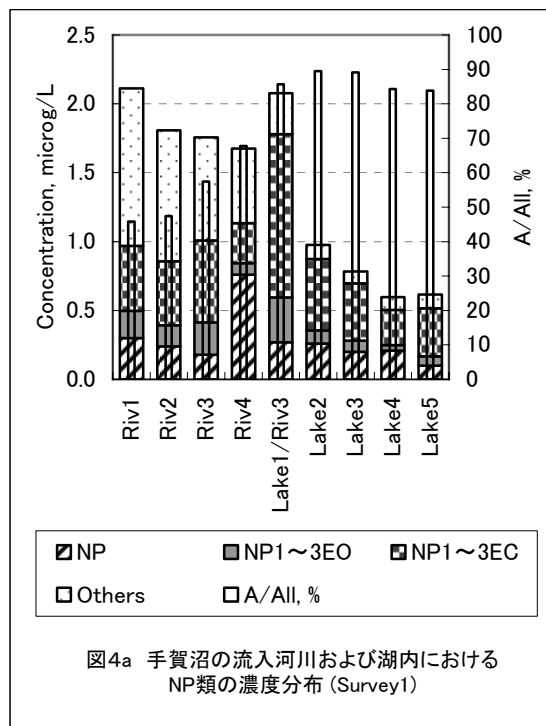


図4a 手賀沼の流入河川および湖内におけるNP類の濃度分布 (Survey1)

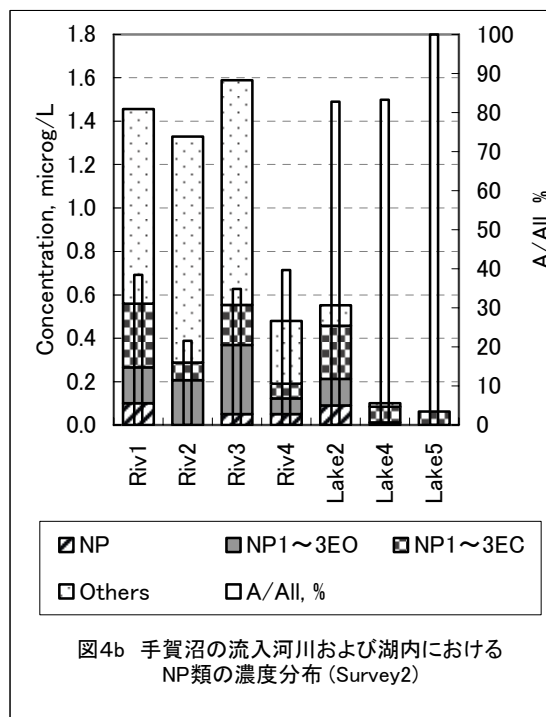
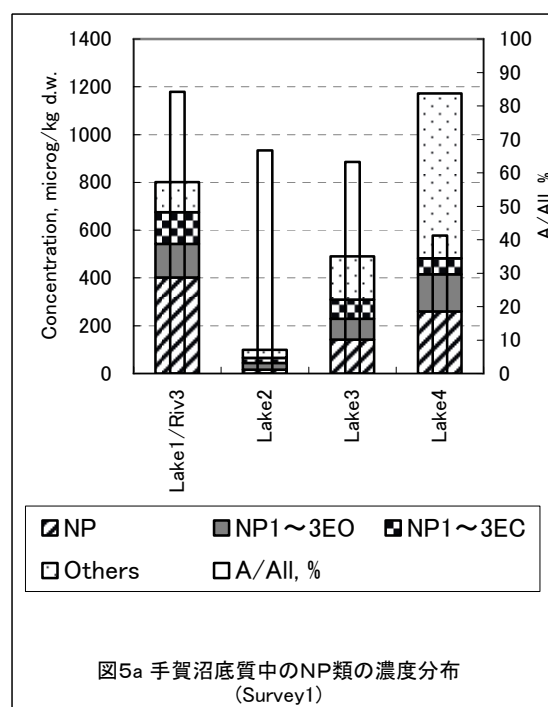
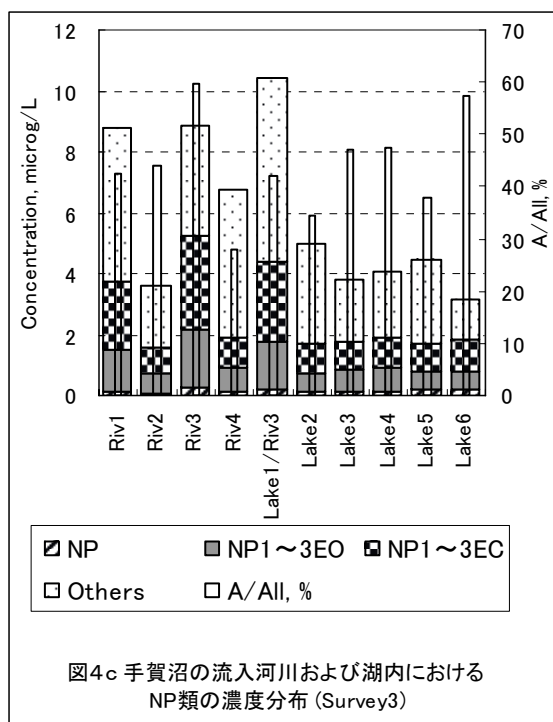


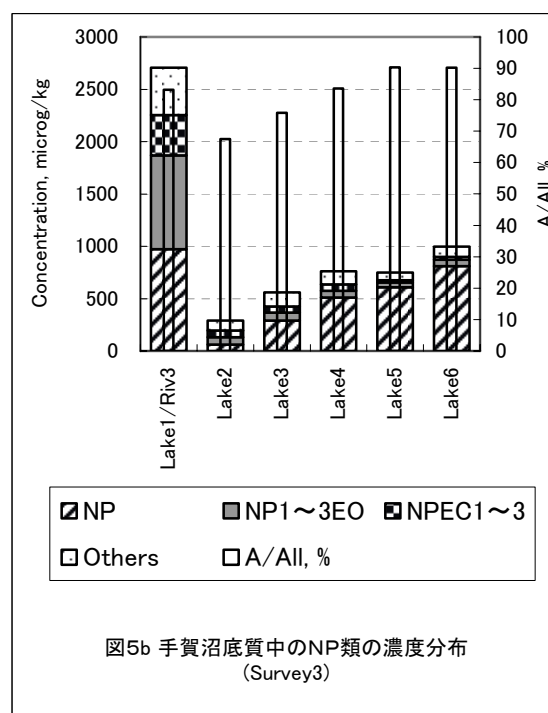
図4b 手賀沼の流入河川および湖内におけるNP類の濃度分布 (Survey2)



底質調査は、湖内調査地点において行った。
図5a及び図5bに示す様に、湖内流下方向に従って、表層底質のNP類含有量が増加する。一方、大津川河口付近のNP類含有量は、湖内のその他の調査地点と比較して著しく高い。この二つの現象について、以下の仮説が考えられる。河口付近の高い値は、直径が比較的大きく沈降しやすいSSへの吸着NP類による。一方、湖内流下方向で増加傾向を示すのは、流入する細かい粒子および藻類への吸着NP類による。手賀沼の内部生産の下流方向での増大傾向は過去から知られていて、下流側の生産量及び植物プランクトン濃度が高いといわれている¹²⁾。

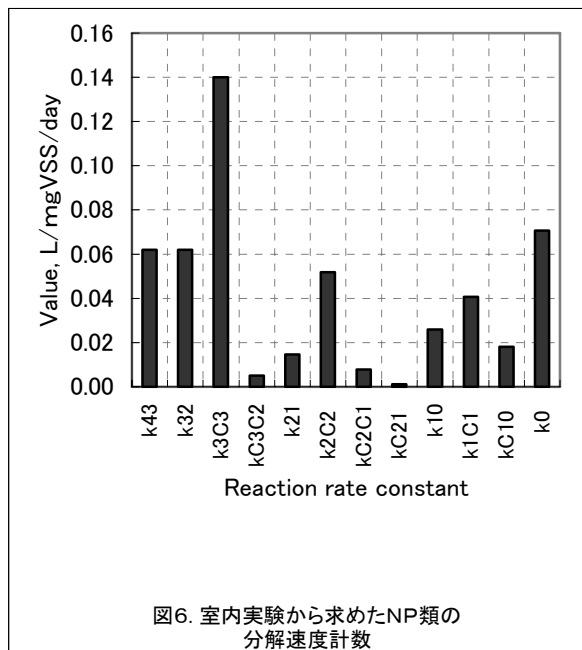
(2) 生分解実験

反応速度係数の値を求めるため、図2に示す反応経路に類似する経路を仮定し、動的反応数理モデルを作成した。そのモデルによって、バッチ生分解実験のシミュレーションを行い、実測値と計算値の誤差の最小化によって分解経路を決め、各k値を求めた。図6に示す様に、NPEO類 → NPEC類の反応、 $NP_{4-15}EO \rightarrow NP_3EO \rightarrow NP_2EO$ 、及びNPの分解反応速度が比較的大きい。反応速度の相対的な大きさから、 NP_1EO 、 NP_2EO 、 NP_1EC 、 NP_2EC の環境中の長期間の存在及び蓄積の説明は可能であるが、NPについて他の要因、例えば溶解性濃度の吸着による低減も考慮する必要がある。NP類の反応経路について様々な研究^{13)~16)}が行われたが、そのメカニズムは十分に解明されていないので、図2に示す経路とした。



(3) NP類の吸着

極性の低い有機化合物は水中・底泥中粒状有機物に吸着しやすい。吸着した物質については溶解性濃度が減少するため、生化学反応速度が低下する。



線形的な吸着平衡を仮定すると、ある化合物の溶解性濃度 (C_W) / 全濃度 (C_T) の比率は以下通り計算される。
(式3：水柱；式4：底泥。)

$$\frac{C_W}{C_T} = \frac{1}{1 + K_{ads} VSS} \quad (3)$$

$$\frac{C_W}{C_T} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon + (1 - \varepsilon) K_{ads} \rho_{sed}} \quad (4)$$

ここで、 K_{ads} は吸着係数 L/mg、 VSS は有機性浮遊物濃度 (mg/L)、 ε は空隙率、 ρ_{sed} は底泥固形分の比重 (mg/L) である。吸着実験及び推定結果を表3に示す。手賀沼実験結果と K_{ow} から推定した結果を比べると、NP、NP3EO及びNP2EOについては満足できる程度一致しているが、他のNP類については大きく異なっている。手賀沼の VSS と活性汚泥 VSS への吸着結果を比較すると、オーダー的に近いものが多いがNPについては約5倍の相違が見られている。この結果から、各化合物の K_{ow} の実測値及び吸着係数の信頼性について更に研究する必要があると思われる。

本研究のシミュレーションにおいては、手賀沼実験によって得られた吸着係数値を使用した。

NP化合物の水柱及び底泥における吸着の影響を論証するために、表3に示す「Teganuma Experiment」欄の最小値 (NP1EC) と最大値 (NP) 及び手賀沼の平均的な VSS 濃度 (8 mg/L) 及び平均的な底質空隙率 (0.81) と比重 (2.33×10^6) を考慮し、式 (3) 及び式 (4) によって溶解性物質濃度の全濃度に対する比 ($C_W/C_T \times 100$) を算出した。その結果を以下の表4に示す。

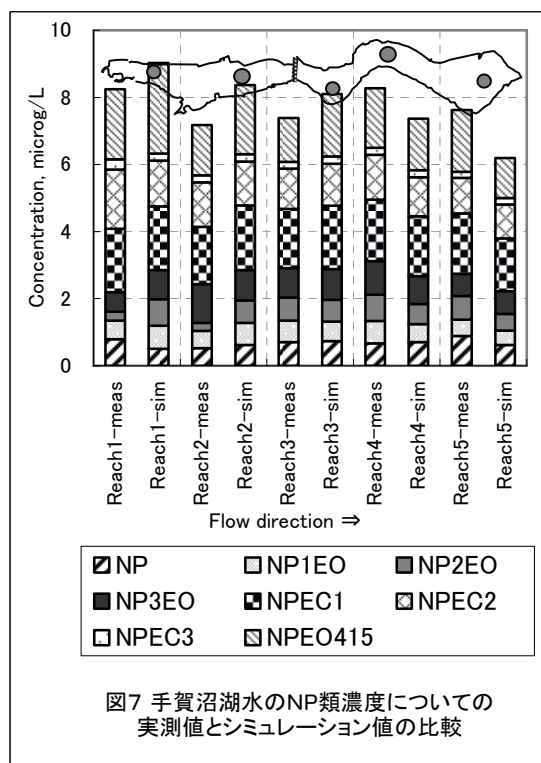
表4. NP類化合物の水中浮遊物及び底泥固形物への吸着の溶解状比率への影響

Medium	Compound	C_W/C_T (%)
Water column	NP1EC	95.2
	NP	58.4
Sediment surface	NP1EC	2.9
	NP	0.21

表4に示す値から、吸着がない場合と比較して、水中溶解性濃度は水溶性の比較的大きいNP1ECで5%、疎水性の強いNPで40%低下することが分かる。底泥においては、その低下程度は97~99.8%である。以上の値はNP類の底泥における蓄積を説明するものとなっている。

(4) 実測値とシミュレーション結果の比較

図7に示す様に、手賀沼の各区間において、NP類濃度の合計の実測値とシミュレーション値の一致は良好である (平均誤差は13.1%)。更に、各区間において、NP類の濃度分布パターンの実測値及びシミュレーション値が類似している。流下方向の濃度低下は小さいが、これは低水温及び大量の導水注入 (自然流量の約4倍) に伴う滞留時間の減少による。



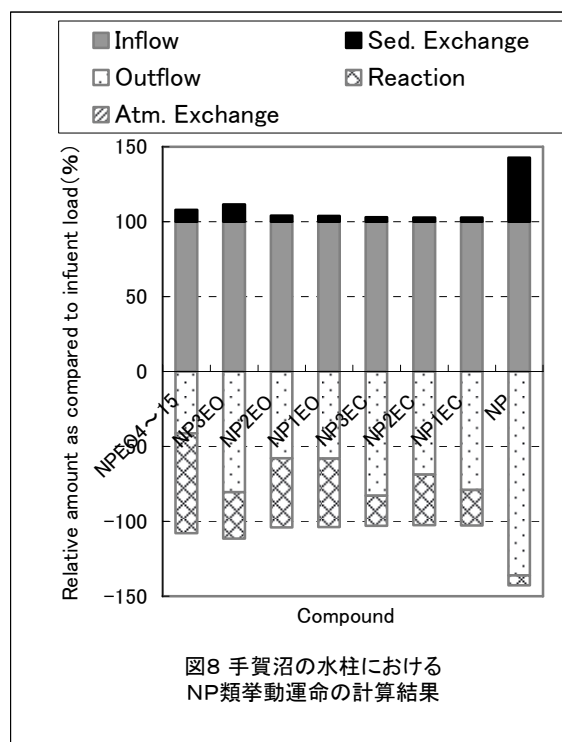
シミュレーションモデルを用いて Survey3 条件下でのNP類の手賀沼全体における挙動、運命の予測を行った (図8)。各NP類の大気との交換は無視できる程度である。底質との交換はいずれの物質においても底泥→水柱の方向となっているが、特にNPの場合に著しく、その「内部負荷」は流入負荷の約30%を占める。この現象

は、それまでに底質に蓄積した高い濃度の NP 及び大きい導水量に伴う水相の低 NP 濃度が原因であると考えられる。各 NP 類の反応による変化においては、分解は生成を上回っている。その程度は NP の場合最も少ないが、この原因として NP の溶解性濃度が低いことが挙げられる。

2. 1. 4 まとめ

NP 類に関して手賀沼の実態調査を行うとともに、NP 類の挙動シミュレーションモデルを構築した。得られた成果は以下のとおりである。

- 1) NP 類の河川及び湖沼水、底泥における濃度及び濃度変化の傾向を把握した。
- 2) NP 類の生分解速度及び水中浮遊物への吸着係数を実験等により求めた。
- 3) NP 類の挙動を表すシミュレーションモデルを構築し、湖沼水における NP 類濃度の構成および分布の傾向が再現できることを確認した。



定常状態シミュレーションによる化学物質対策方法の事前検討・計画、実施中対策の評価・改善。

年中動的シミュレーションによる化学物質最大濃度予測及びその低減対策。

2. 2 エストロゲン抱合体の分析法改良

水試料を対象として河川、下水道におけるエストロゲンの実態把握についての調査¹⁷⁾¹⁸⁾が実施されているが、E1、E2 及び合成エストロゲンの EE2 の測定にとどまっている。河川、下水道等におけるエストロゲンの挙動解明の点から、これら遊離体の他、抱合体の測定は重要であ

るが、現時点において抱合体を含めた分析方法^{19) 20)}の報告例は少ない。本研究において、下水試料を対象とし抱合体を含むエストロゲンの分析法について LC/MS/MS による検討を行っており昨年度報告した。既報では下水試料を用いての添加回収試験結果は、硫酸抱合体では二次処理水 42~71%、流入下水 34~49%であったが、グルクロン酸抱合体では二次処理水 13~18%、流入下水 4~11%であり十分とはいえない状況にあった。本研究では回収率向上を目的とし前処理操作の改良を(独)土木研究所と帝人エコ・サイエンス(株)が「共同研究」として実施した。

2. 2. 1 検討項目

前処理操作、測定条件の設定に当たり以下の項目について検討を行った。

- ・ 固相抽出カートリッジの選択

逆相の固相抽出カートリッジとして一般にシリカ担体に C18 をコーティングした系が用いられており、エストロゲン遊離体のうち E1、E2 及び EE2 を測定対象とする場合に適用することができる。しかし、抱合体の回収率が低いため Oasis について検討した。

- ・ 固相抽出カートリッジの洗浄溶媒

固相抽出以降の精製処理を省略し、その代わりに固相抽出カートリッジに吸着する目的成分以外の物質を洗浄溶媒により除去する方法について検討した。洗浄溶媒は、酢酸エチルと n-ヘキサンの混合溶媒とし、5 通りの混合比 (100/0、70/30、50/50、30/70、1/100) について検討した。

- ・ 固相抽出カートリッジの溶出溶媒

固相抽出カートリッジからエストロゲン抱合体を溶出させる溶媒の検討を行った。溶出溶媒として酢酸エチルとメタノールの混合液をそれぞれの溶媒の混合比 (0/1~1/0) の範囲で 10~20% の間隔で変化させ、アンモニア (NH₃) : 0.02%、水 : 2.0% (v/v)、液量 6 ml でその回収率を求めた。

2. 2. 2 検討結果

(1) 検量線

E1-S、E2-S、E3-S、E1-G、E2-G、E3-G、E2-S&G の混合標準液を 5、10、20、30、50、80、100 µg/l の 7 段階の濃度に調製し、サロゲート (E2-17G-¹³C₄、E2-3S-d₄) を 50 µg/l 濃度で添加して、測定対象物 (I) とサロゲート (Is) の面積比 (I/Is) と標準液の濃度比の関係から検量線を作成する。0~100 µg/l の範囲で一回帰した直線の相関係数 (r) は 0.9934~0.9997 の範囲であり、良好な直線性が認められた。

(2) 検出下限値

装置の検出下限値は、検量線の最も低い濃度である 5 μ g/L (注入量、25pg) の標準液を 6 回繰り返し測定した結果から求めた。繰り返し測定結果の標準偏差 (s) の 3 倍値 (3 s) を検出下限値とした。その結果、硫酸抱合体では、0.9pg $\sim$ 1.8pg、グルクロン酸抱合体では 4.4pg $\sim$ 5.8pg であった。

(3) 固相抽出カートリッジの選択

遊離体の E3 及び抱合体を測定対象とした場合、C18 系では回収率が劣りポリマー共重合系カートリッジのほうが優れていることを確認した。そこで性能及び回収率が安定している点からジビニルベンゼン/ピロリドン共重合系の Oasis HLB を選択した。

(4) 固相抽出カートリッジの洗浄溶媒

精製水では洗浄液側への溶出はみられなかったが、二次処理水や流入下水では、酢酸エチルが 100% あるいは酢酸エチル/n-ヘキサンが 70/30 と酢酸エチルの比率が高い場合は、E1-S、E2-S が洗浄液側へ溶出することから、洗浄液として酢酸エチル/n-ヘキサン組成 50/50 を選択した。

(5) 固相抽出カートリッジの溶出溶媒

酢酸エチル 100% では、抱合体は溶出されず、回収率は 1% 以下であった。また、抱合体の種類により、若干、傾向の差があるものの、酢酸エチルとメタノールの混合比のメタノールの比率が 30 $\sim$ 40% を超えると抱合体の溶出がほぼ同程度になることが判明した。一方、メタノールの比率が高くなるほど、他の夾雑妨害成分の溶出も多くなることから溶出溶媒として弱塩基性の酢酸エチルとメタノール混合比 1 : 1 を選択した。

(6) 改良した前処理操作及び LC/MS/MS の測定条件

流入下水 200ml (二次処理水の場合は 300ml) をガラス繊維ろ紙 (孔径 1 μ m) でろ過し、ろ紙に残った浮遊物質 (SS) は、メタノール約 10ml で超音波を用いて 2 回抽出する。抽出液をろ液に合わせた後、精製水で約 500ml に希釈する。500ml としたろ液に各サロゲート物質 (E2-3S-d4, E2-17G-¹³C4) をそれぞれ 50ng 添加した後、IPC 試薬 (0.5mol/l) を 1ml, 20% 酢酸を 0.2ml 加える。予めメタノールと精製水でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに通水 (15ml/min) する。精製水で洗浄した後、カートリッジは遠心分離と窒素ガスパージにより脱水乾燥を行う。次に酢酸エチル/ヘキサン (1:1) 約 5ml で洗浄する。次に 2.5% NH₃ 水溶液 20ml を酢酸エチル/メタノール (1:1) 溶液 1000ml に加えて作製した溶出溶液約 6ml でエストロゲン抱合体を溶出させる。溶出液は窒素ガス吹き付けにより乾固直前まで濃縮する。次にアセトニトリル/水 (6:4) 1ml に溶解後、シリンジスパイクとして E1-3S-d

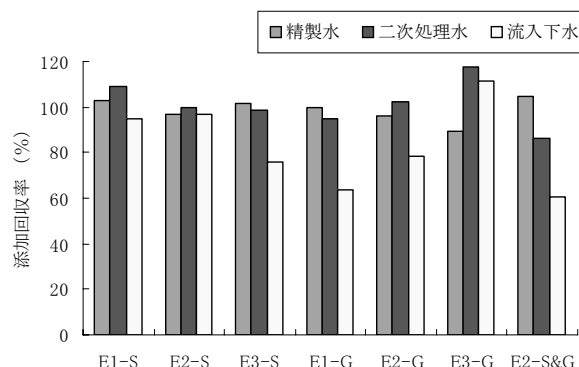
4 を添加し LC/MS/MS 表 5 で測定する。

表 5 LC/MS/MS の測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100	
	分離カラム	Agilent Zorbax Extend-C18, 2.1 ϕ $\times$ 150mm, 40 $^{\circ}$ C	
	溶離液	A: 10mmol/l 酢酸, B: 10mmol/l 酢酸アセトニトリル	
		A/B: 80/20-10min-40/60(20min)-5min-80/20(5min)	
MS/MS		0.20ml/min	
	注入量	5-10 μ l	
	装置	TSQ API-2	
	イオン化	AP-ESI, Negative	
	コリジョンガス	アルゴン	
	測定イオン (コリジョンエネルギー)	E1-S	349, 269 (35eV)
		E2-S	351, 271 (35eV)
		E3-S	367, 287 (35eV)
		E1-G	445, 269 (35eV)
		E2-G	447, 271 (35eV)
		E3-G	463, 287 (35eV)
		E2-S&G	527, 351 (35eV)
		E2-3S-d4	355, 275 (35eV)
		E2-17G- ¹³ C4	451, 275 (35eV)

(7) 添加回収試験

試料として、純水 (500ml)、二次処理水 (300ml)、流入水 (200ml) にそれぞれ抱合体を各 50ng ずつ添加し、回収率を求めた。その結果、図 9 に示すように、精製水の添加回収試験では、ほぼ 100% に近い回収率が得られた。一方、下水試料では、二次処理水は精製水に近い回収率が得られたのに対し、流入下水は 60 $\sim$ 120% の範囲でばらつきが認められた。



2. 2. 3 まとめ

本研究では、昨年度報告したエストロゲン抱合体の分析で課題であったグルクロン酸抱合体の回収率の問題を解決する手法を検討した。前処理操作中におけるグルクロン酸抱合体の分解を軽減するために操作を簡易化することにより、回収率が向上しより信頼性の高い測定方法を確立できた。

改良法を用いた実試料 (流入下水及び二次処理水) への添加回収率は、二次処理水では 87 $\sim$ 120%、流入下水 60 $\sim$ 110%、であり、下水試料への適用が可能であると判断された。

2. 3 水相と底泥相微生物による E2 の分解特性

都市下水処理場や浄化槽などの排水処理施設から自然

水域に排出されるエストロゲン様物質のうち、 17β エストラジオール(E2)はエストロゲン活性が著しく強いと報告されている。同物質の自然水域における運命を把握するためには、水相と底泥相で生起する物理化学的・生物学的諸反応によるE2の移動・変換・分解などの諸挙動を的確に評価することが重要である。昨年度の報告では、実際の貯水池の底泥によるE2の分解経路と水温の影響について得た結果を示した。本報では、貯水池の水相と底泥の両相によるE2の分解特性の季節的依存性について、好気と嫌気の両条件下で得た結果を報告するとともに、異なる水域の底泥による分解速度の違いについて比較検討した結果を報告する。

2. 3. 1 実験方法

国土交通省東北地方整備局三春ダム牛縊前貯水池をフィールドとし、本ダムとの分離堰からそれぞれ50m, 150m, 230m離れたA, B, Cの3地点を対象に、2003/12, 2004/1, 2004/3, 2004/5, 2004/7及び2004/10に採水と直径4cmのコアサンプラーによる採泥をそれぞれ行った。採取した底泥を窒素雰囲気の中で2cmずつ切り出し、その表層(SL, 0~2cm), 中層(ML, 14~16cm)および下層(BL, 28~30)の遠心分離後に沈降した底泥(遠沈泥と称す)を回分式実験に供した。また、水中浮遊微生物による分解挙動を評価するため、採取した水相の表層水(SW), 中層水(MW), 底泥直上の下層水(BW)についても回分式実験を行った。

比較のため、牛縊前貯水池に流入直前の地点での流入河川水(Inflowと称す)、手賀沼の上流、中流及び下流に位置する3地点(それぞれT4, T7及びT10と称す)と牛久沼の中央に位置する1地点(U1と称す)で採取した底泥と直上水も回分式実験に供した。

実験は振盪培養器により、嫌気と好気/20℃の条件下で行った。底泥を用いた実験の場合には、遠沈泥2gを300mlのpH調整済みのMilli-Q水(嫌気の場合には脱酸素も行

った)を入れた反応器(500mlの三角フラスコ)に加えたのち、E2濃度が約 $30\mu\text{g/l}$ になるように、一定量のE2原液(有機溶媒を使用せずにMilli-Q水に溶かしたもの)を素早く添加し、反応器を10秒程度激しく振り混ぜたのちに振盪培養器にセットし、光遮断下で回転培養(120rpm)を開始した。嫌気条件は反応器の混合液中に湿潤窒素を連続的に導入することにより維持した。一方、水相実験の場合には、曝気処理後の試料水300ml(好気実験の場合)、又は、脱酸素処理後の試料水300ml(嫌気実験の場合)に、E2を直接に添加する形で実験を行った。嫌気条件は上述の底泥実験の場合と同様に、湿潤窒素を連続的に導入することにより維持した。

E2とその副次生成物と考えられるE1及びE3は内部標準LC/MS/MS分析法により定量した。

2. 3. 2 実験結果

(1) E2の経時変化の動き

E2の分解挙動を牛縊前貯水池のA地点における底泥直上水(BW)と上層の底泥(SL)の場合を例にして図10に示す。水相と底泥相ともに、E2の分解は主に副次生成物E1の分解を経由して行われている。E2の分解過程におけるE3の形成は認められなかった。

(2) E2の分解速度

生分解の一次反応式に基づいて推定した底泥によるE2の消失速度係数(k)を図11に示す。 k の値は好気下では5月、嫌気下では5, 7及び10月の場合の方が小さく、E2の分解速度は底泥の季節によって変化することが明らかになった(図11aと図11b)。また、いずれの採泥時期の場合も、 k の値は上層の方が大きく、中層と下層の間では差が小さかった。また、全ての底泥層において、嫌気に比べて好気条件の方で大きな k 値を示している。

生物の全体的密度は下層にいくほど低く、また、上層と下層ではそれぞれ好気性と嫌気性の微生物群集が多数を占めることが考えられる。こうした推測を考慮すれば、

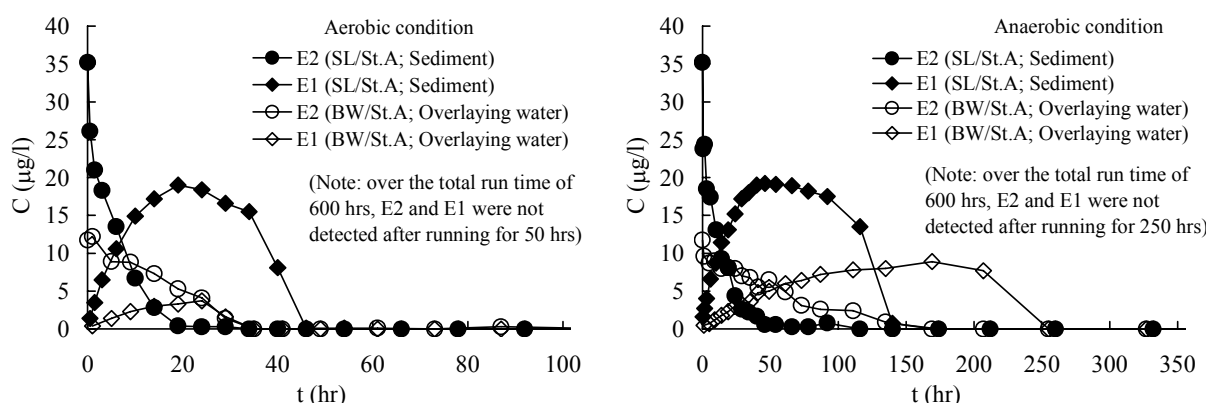


図10 好気と嫌気下におけるE2の分解挙動(20℃, 三春ダム牛縊前貯水池地点Aの直上水と底泥を使用)

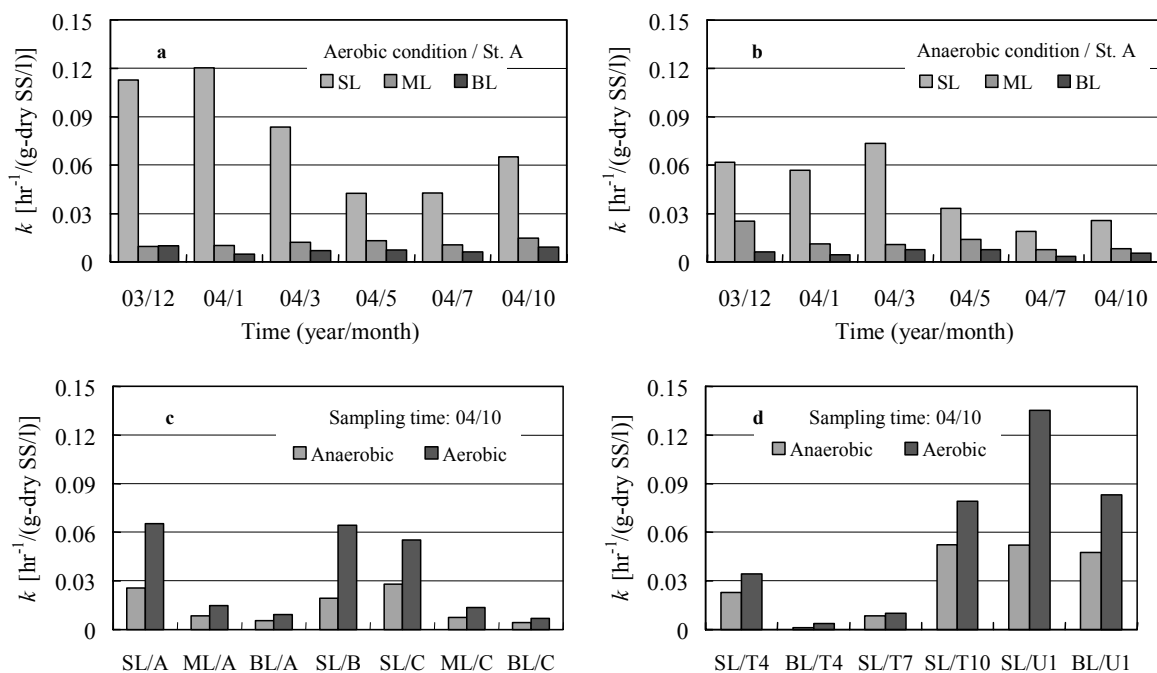


図11 底泥生息微生物によるE2の好気と嫌気下での分解速度係数(20℃)
(使用底泥:a & bは三春ダム牛糞貯水池地点A; cは同地点A, B & C; dは手賀沼上流T4, 中流T7, 下流T10, 牛久沼中央U1)

好気と嫌気下によるE2の分解速度の相違は、微生物そのものに帰着されるのみではなく、実際の底泥相内における好気性と嫌気性微生物の分布密度の違いが一因と考えられる。これを解明するためには、下水処理上の好気性の活性汚泥²¹⁾と嫌気性の消化汚泥を用いた対照実験や、長期にわたって直上水に酸素と窒素をそれぞれ連続的に供給することにより形成してきたほぼ完全な好気層と嫌気層からなる静止カラム実験が有効と考えられ、今後の対応が望まれる。

牛糞貯水池の流下方向における分解速度を比較すると、図11cのように、いずれの底泥層の場合にも、上流・中流・下流の間における k 値の差が小さく、E2に対する分解速度は類似している。また、今回検討した3つの水域については、砂質が多く、VSSの含有量が少ない手賀沼

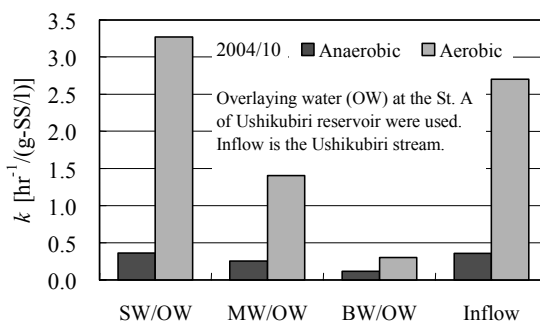


図12 水相浮遊微生物によるE2の分解速度係数(20℃)

の上流と中流の2地点(T4とT7)の方で分解速度が著しく遅いことが図11cと図11dからわかる。

底泥相に比べて、水相における微生物の個数が少ないので、E2の分解は図10のように遅いが、SS当たりの分解速度は2倍以上に速いことが明らかである(図12と図13)。

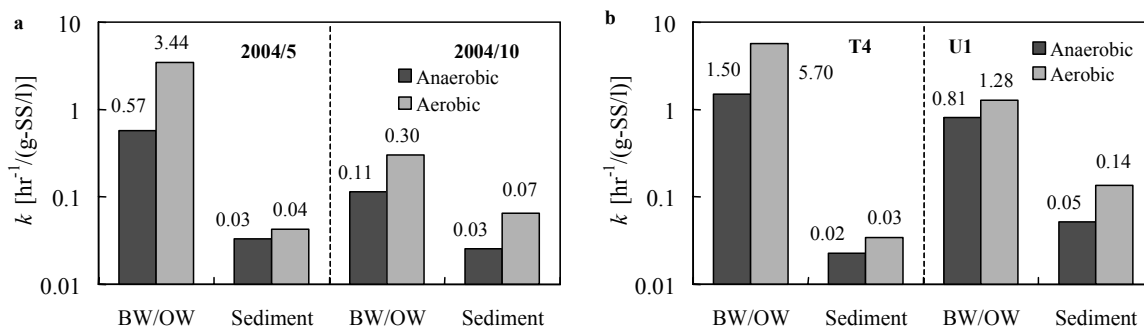


図13 E2の水相と底泥相での分解速度の比較(20℃, aは牛糞貯水池地点A, bは手賀沼と牛久沼の場合)

また、水相微生物群には底泥相の場合と同様に、好気性と嫌気性の微生物が共存し、それを反映するように、嫌気下においてもE2は分解されている。

2. 3. 3 まとめ

湖沼におけるエストロゲン挙動を把握するために三春ダム前貯水池等の水・底泥試料についてエストロゲン分解速度を測定した。この結果、17 β エストラジオールの分解速度は、表層底泥の方が中層や下層底泥よりも大きく、好気条件下の方が嫌気条件下よりも大きいことが明らかになった。また、SS量当たりの分解速度で見ると、水相は底泥相の2倍の大きさであった。

3. まとめ

都市排水由来の内分泌攪乱物質に関し、調査分析手法の開発、また水環境中での分解・生成といった変化現象の把握を目的として研究を行い、以下の成果を得た。

- 1) 手賀沼におけるノニルフェノール (NP) 類濃度の実態を調査したところ、水質濃度は流下方向に従って低減するが、底質濃度は逆の傾向を示した。また、NP類の生分解速度や吸着平衡係数を別途実験により求め、挙動シミュレーションモデルを構築した。これにより、湖水におけるNP類濃度の構成および分布の傾向が再現できた。
- 2) エストロゲンのグルクロン酸抱合体の分析法において、前処理操作を簡易化して抱合体の分解を抑制することにより、添加回収率が二次処理水では87~120%、流入下水では60~110%と向上し、信頼性の高い方法が確立できた。
- 3) 三春ダム前貯水池から水・底泥試料を採取し、17 β エストラジオールの分解速度を調査した。その結果、分解速度は、表層底泥の方が中層や下層底泥よりも大きく、また、好気条件下の方が嫌気条件下よりも大きかった。SS量当たりの分解速度で見ると、水相は底泥相の2倍の大きさであった。

なお、本研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

4. 参考文献

- 1) Fauser P. et al.: Phthalates, Nonylphenols and LAS in Roskilde Wastewater Treatment Plant, NERI Technical Report, No. 354, Denmark, 2001.
- 2) Bennie, D.T.: Review of the Environmental Occurrence of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates, *Water Qual. Res. J. Canada*, 34 (1), pp. 79-122, 1999.
- 3) Birkett, J.W. & Leste, J.N.: Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes, CRC Press, Boca Raton, 2003.
- 4) Tamamoto, H. et al.: Study for Characterization of Isolated Fractions of Estrogen-like Activity from River Water and Wastewater, Proc. 3rd IWA World Water Congress, Melbourne, Australia, April 7-12, paper No. e21055a, 2002.
- 5) Takahashi, A. et al.: Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Peryphytons and Benthos in the Tama River, Proc. 3rd IWA World Water Congress, Melbourne, Australia, April 7-12, paper No. e21209a, 2002.
- 6) 磯部友彦 他: 水環境におけるノニルフェノールの挙動と環境影響、*水環境学会誌*, 21(4), 1998.
- 7) Mibu, K. et al.: Distribution of Estrogen, Nonylphenol and Its Derivatives in the Sediments of a Shallow Lake, *Water Science and Technology*, 50(5), pp.173-179, 2004.
- 8) Argese E. et al.: Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradative derivatives. *Environ. Toxicol. and Chem.* 13(5), pp.737-742, 1994.
- 9) Yamamoto, H. et al.: Estimated Fate of the Selected Estrogenic Compounds in the Activated Sludge Process: Effects of Natural Organic Matter, Proc. IWA World Water Congress and Exhibition, Marrakech (Morocco), Sept. 19-24, poster paper No. 26539, 2004.
- 10) Namkung, E. and Rittmann, B.E.: Estimating volatile organic compound emission from publicly owned treatment works. *Journal of WPCF*, 59(7), 1987.
- 11) US-EPA: Estimations Programs Interface, EpiWin Ver.3.1, 2001.
- 12) 小林節子 他: 内部生産からみた印旛沼、手賀沼のCOD、窒素、リンの水質特性、千葉県水質保全研究所、水保研資料 No.51, pp. 87, 1989.
- 13) John, D.M. & White, G.F.: Mechanism for Biotransformation of Nonylphenol Polyethoxylates to Xenoestrogens in *Pseudomonas putida*, *Journal of Bacteriology*, Sept. pp. 4332-4338, 1998.
- 14) Ahel, M. et al.: Aerobic Transformation of Short-Chain Alkylphenol Polyethoxylates by Mixed Bacterial Cultures, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, pp. 540-548, 1994.
- 15) Quiroga, J.M. et al.: Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate (NPEO) in River Water, Proc. 4th World Surfactant Congress, pp. 417-425, 1996.
- 16) 藤井克彦 他: ノニルフェノール分解微生物、*Journal of Tokyo University of Fisheries*, 87, pp.1-12, 2001.
- 17) 国土交通省(2002)平成13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、国土交通省河川局
- 18) 国土交通省(2001)平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）に関する調査報告、国土交通省都市・地方整備局水道部
- 19) 辻村 他(2000)LC/MS/MSによる環境中エストラジオール及び類縁物質の同時分析法の開発、第9回環境化学討論会講演要旨集, pp. 58-59
- 20) 石井 他(2002)LC/MS/MSによるエストロゲン抱合体

の分析法について、第 11 回環境化学討論会講演要旨集,
pp. 514-515

21) Ternes TA, Kreckel P, Mueller J: Behaviour and occurrence
of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic
batch experiments with activated sludge, Sci. Total. Environ.,
225, 91-99, 1999.