

4. バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する研究

水循環研究グループ水質チーム 主席研究員 鈴木 穰
主任研究員 宮島 潔
専門研究員 東谷 忠
専門研究員 中田 典秀

1. はじめに

下水処理水やその放流先河川において、雌性ホルモン（エストロゲン）様物質による魚類の雌性化が起こっていると疑われている。わが国においては、下水処理水や河川水にエストロゲン様物質が存在することが明らかにされてきたが、下水処理水の比率が高い都市河川水中のエストロゲン様物質が魚類にどの程度影響を及ぼしているのか、その主要物質は何かについては依然として明らかになっていない。

本研究は、下水処理水やその放流先の都市河川において検出されたエストロゲン様物質を魚類に暴露し、その影響を評価する。また、水試料の分画手法と遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定手法（YES）とを組み合わせることにより、水試料のエストロゲン様作用について評価し、このエストロゲン様活性を魚類雌性化の簡便な評価指標へと確立させることを目指している。

平成 14 年度は、河川における魚類曝露試験について既往事例を整理して課題を選出し、現地魚類曝露試験法の開発およびその予備試験を実施した。さらに、下水処理水を分画抽出することによって、これに含まれるエストロゲン様物質の性状を把握する手法について検討した¹⁾。

平成 15 年度は、河川での魚類曝露試験を継続するとともに、その基礎情報を得るため、エストロゲンを用いた室内曝露試験を実施し、個々の化学物質による魚類影響を明らかにすることとした。また、水試料に対し、分解能の高い高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分画手法の検討を行った。さらに、現地魚類曝露試験を日本各地の河川で実施することを想定し、下水道整備率などの流域情報と、YESによる全国主要河川水中エストロゲン様活性の測定結果との関係について考察を行った²⁾。

平成 16 年度は、昨年度までの調査において、下水処理水のエストロゲン様活性に対して、寄与が高いと推察された人畜由来の 17β-エストラジオール（E2）とエストロン（E1）について、その主な排出起点であると思われる下水処理場にて、各工程での挙動を冬期と夏期に調査した。また、同時に遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の下水処理工程での消長についても調査を行った。

2. 調査方法

2. 1 調査概要

神奈川県内にある下水処理場にて、2004 年 1 月と 7 月に、処理場の定期調査日に合わせて調査を行った。同処理場は、標準活性汚泥法を採用しており、計画処理人口、処理能力はそれぞれ 28,000 人、30,600m³/日であり、現行処理人口、処理能力はそれぞれ 30,500 人、20,400m³/日である。

各調査日において、2 時間毎 24 時間、処理過程毎に試料を採取し（図-1）、流量比例 24 時間コンポジット試料を作成した。得られた試料は、最初沈殿池へ流入する流入下水（スクリーン通過済み）、最初沈殿池流出水、汚泥脱水排水である返流水、最初沈殿池汚泥、エアレーションタンク前段の表層水、同後段の表層水、最終沈殿池流出水、返送汚泥、塩素消毒後の法流水である。分析対象成分の分解を抑えるため、得られた試料にアスコルビン酸を添加し（1g/L）、氷冷しながら研究室に持ち帰った。

2. 2 試料前処理

持ち帰った試料は、GF/B フィルター（孔径 1.0μm）にてろ過し、あらかじめ mili-Q 水、メタノールでコンディショニングを行ったオクタデシルシリカゲル充填カートリッジ（tC18、900mg）により固相抽出、フィルター上の残渣は超音波抽出し、保持成分を抽出した（それぞれ溶存態試料、懸濁態試料）。

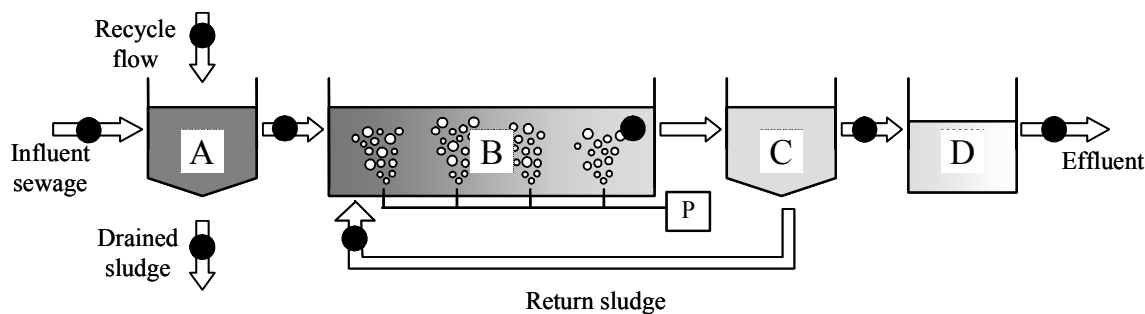


Figure 1. Sampling location (indicated with a closed circle) in a municipal sewage treatment plant.

A: Primary settling tank; B: Biological reaction tank; C: Final sedimentation tank ; D: Chlorination tank; P: Aeration pump

2. 3 化学分析

溶存態試料および懸濁態試料について、以下の分析を行った。エストロゲン様物質の分析項目は、全国実態調査の結果²⁾と、各物質のエストロゲン様活性のポテンシャルを考慮して、E1、E2、エストリオール (E3)、硫酸抱合体化E1 (E1-3S)、硫酸抱合体化E2 (E2-monoS)、経口避妊薬に含まれる人工エストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2)、ノニルフェノール (NP) とした。またノニルフェノールエトキシレート (NPnEO)、ノニルフェノールフェノキシ酢酸 (NPnEC) (以後、NP関連物質) についても測定を行った。

E1、E2、E1-3S、E2-monoSについては、小森らの方法³⁾に従いLC/MS/MSを用いて測定を行った。またNP、NPnEOについては下水試験法追補暫定版⁴⁾に従いHPLCを用いて測定を行った。NPnECについては八十島らの方法⁵⁾に従いLC/MS/MSを用いて測定を行った。

上述の微量物質の分析とともに、各試料について一般項目、つまり、浮遊粒子状物質質量 (SS および VSS)、溶存炭素量 (DOC)、各態無機窒素濃度、生化学的酸素要求量 (BOD)、化学的酸素要求量 (COD) の分析を、下水試験法に従い行った。

2. 4 バイオアッセイ

溶存態試料および懸濁態試料について、バイオアッセイを実施した。バイオアッセイは、イギリスBrunel大学のSumpter教授より譲渡された遺伝子組み換え酵母を用い実施した。この遺伝子組み換え酵母には、エストロゲン受容体が組み込まれており、エストロゲンやエストロゲン様物質が結合すると、その濃度に応じて β -ガラクトシダーゼが発現するように組み込まれている。この β -ガラクトシダーゼ量を計ることにより、エストロゲン様活性を定量する。伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定法についてはRoutledgeらの方法⁶⁾を改良した矢古宇らの方法⁷⁾に従った。

3 結果および考察

3. 1 処理工程での各成分の濃度変動

冬季 (2004年1月) および夏季 (2004年8月) に実施した24時間調査における、一般項目の分析結果を表-1に示した。両調査における処理、および処理水の水質の大きな違いは、流入水温および硝化の進行程度である。つまり、夏季の流入水温は、冬季のそれに比べ約10°C高い。また、夏季においては、処理の進行とともにアンモニア態窒素濃度が減少し、それに伴い若干の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素濃度の増加が確認された。一方、冬季においては、アンモニア態窒素濃度の減少は小さく、また、亜硝酸および硝酸態窒素濃度の増加も確認されなかった。つまり、冬季においては硝化抑制的な運転が結果として行われたことが推察される。なお、SS、BOD およびCODの除去率は、両調査ともに90%以上であった。

NP関連物質およびエストロゲン類の分析結果 (溶存態と懸濁態の合計) を、各成分の定量下限値とともに表-2に示した。NP、NPEOについては、両調査において高い除去が確認された。しかし、NPECについては、特に冬季において、処理の進行とともに濃度が増加し、処理の進行に伴う生成が示唆された (表-2)。一方、E1については、

処理の進行、特に最初沈殿池の前後で濃度の増加が確認され、その傾向は冬期に強かった。返流水、最初沈殿池汚泥、返送汚泥中でも高濃度で検出されていることより、これらの寄与については次章で取り扱う。EE2 については、いずれの調査、試料中からも検出されなかった。1999 年 9 月に一般での使用が解禁されたが、同処理場では検出に至るほどの流入水中濃度ではなかった。E3 については、妨害物質の影響により、流入水中濃度が定量されなかったが、処理の進行に伴い、濃度の減少が伺われた。E1、E2 の硫酸抱合体化物については、処理の進行により濃度が変わらないか、夏期においては増加が確認された。この傾向は、冬期、処理の進行に伴い濃度が上昇する NPEC や E1 などとはことなり、他の抱合体化物からの脱抱合による生成機構が、NPEC や E1 などとは異なることが示唆された。

エストロゲン様活性は、E1 とほぼ同様の挙動を示した。そのため、次章ではその動態について考察を進める。

Table 1
Characterization of wastewater concerning samples along the treatment process.

Month	Sample	T _w (°C)	SS (mg/L)	VSS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	NO ₂ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	BOD (mg/L)	COD _{Mn} (mg/L)
January 2003 (Winter survey)	Influent	16.4	80.0	71	35.7	20.2	0.20	0.19	172	144
	Recycle flow	-	307	273	30.2	18.7	0.67	0.39	-	-
	Effluent of primary settling tank	-	72.0	64	30.3	21.6	0.00	N.D.	121	70
	Drained sludge	-	5230	4650	98.9	28.2	0.00	N.D.	-	-
	Return sludge	-	3980	3280	6.76	17.9	0.02	0.02	-	-
	Supernatant of aeration tank	-	1440	1200	6.98	19.2	0.13	0.07	-	-
	Supernatant of aeration tank	-	1340	1120	6.32	16.9	0.32	0.41	-	-
	Secondary effluent	-	4.5	3.7	6.79	17.2	0.46	0.45	8.7	8.6
Finally effluent	-	2.0	2.0	5.98	15.0	1.09	1.25	1.8	10	
July 2003 (Summer survey)	Influent	26.7	160	138	34.1	18.7	0.00	N.D.	169	112
	Recycle flow	-	200	172	31.6	11.6	0.89	0.86	-	-
	Effluent of primary settling tank	-	68	59	31.8	15.7	0.18	N.D.	114	62
	Drained sludge	-	3980	3480	91.8	23.9	0.03	N.D.	-	-
	Return sludge	-	3280	2700	8.58	6.37	0.02	0.05	-	-
	Supernatant of aeration tank	-	1160	965	8.33	10.8	0.38	0.42	-	-
	Supernatant of aeration tank	-	1260	1030	7.96	4.43	0.05	3.23	-	-
	Secondary effluent	-	3.0	2.0	7.07	4.72	0.33	5.88	9.0	11
Finally effluent	-	3.0	2.0	7.38	7.53	0.83	2.69	0.9	10	

N.D.: not detected; -: not measured

Table 2
Fates of nonylphenol (NP), total nonyl phenol ethoxylates (Σ NPhEO), total nonyl carboxylates (Σ NPhEC), 17 β -estradiol (E2), estrone (E1), estriol (E3), sulfated E1 (E1-3S) and sulfated E2 (E2-monoS) along the wastewater treatment process and limits of quantification (LOQ) of each compound.

Month	Sample	NP (μ g/L)	Σ NPhEO (μ g/L)	Σ NPhEC (μ g/L)	E2 (ng/L)	E1 (ng/L)	EE2 (ng/L)	E3 (ng/L)	E1-3S (ng/L)	E2-monoS (ng/L)
January 2003 (Winter survey)	Influent	3.4	106	11.1	23.4	18.2	N.D.	n.a.	2.9	6.4
	Recycle flow	2.2	14.6	14.7	17.2	133	N.D.	11.4	1.8	4.1
	Effluent of primary settling tank	2.6	68.9	10.0	5.5	65.3	N.D.	72.5	2.8	5.6
	Drained sludge	67	435	18.6	59.4	85.6	N.D.	80.2	2.1	4.5
	Return sludge	13	97.6	50.3	17.4	181	N.D.	4.4	2.1	4.4
	Supernatant of aeration tank	7.5	55.8	29.4	13.8	65.4	N.D.	5.2	2.4	3.8
	Supernatant of aeration tank	8.2	58.8	32.3	13.3	94.0	N.D.	N.D.	1.7	2.9
	Secondary effluent	0.4	3.7	11.9	11.5	192	N.D.	N.D.	1.9	3.5
Finally effluent	0.4	3.0	12.7	7.0	154	N.D.	5.5	2.1	3.3	
July 2003 (Summer survey)	Influent	1.7	48.3	19.3	3.9	15.1	N.D.	n.a.	1.1	2.5
	Recycle flow	0.5	4.3	10.8	2.7	49.1	N.D.	8.4	2.8	5.8
	Effluent of primary settling tank	1.0	36.7	18.1	3.8	19.3	N.D.	n.a.	1.8	4.5
	Drained sludge	24	197	33.3	17.2	20.3	N.D.	43.7	7.9	10.4
	Return sludge	4.2	56.1	45.6	31.1	257	N.D.	24.8	15.0	16.5
	Supernatant of aeration tank	2.4	37.8	25.3	8.1	26.6	N.D.	6.8	9.5	13.9
	Supernatant of aeration tank	1.2	27.5	24.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.9	18.0
	Secondary effluent	N.D.	1.6	10.7	N.D.	15.3	N.D.	5.8	2.6	6.8
Finally effluent	0.2	1.4	11.7	N.D.	22.2	N.D.	5.6	2.6	6.6	
LOQ		0.1	1	0.01	1	2	2	2	0.1	0.4

N.D.: not detected n.a.: not available

3. 2 処理工程での各成分の負荷量変動

各調査におけるエストロゲン様活性値、E1 濃度（表-2）と、処理場において計測された流量より、各成分のフラックスを算出した（図-2、3）。エストロゲン様活性値は、冬期においては最初沈殿池で負荷量が増加し、エアレーションタンクに流入した（図-2）。その際、辺流水、最初沈殿池汚泥の引き抜きによる負荷量増加、負荷量減少は無視できるほど小さいことが示唆された。エアレーションタンクでは、最終沈殿池からの返送汚泥によりさらに負荷量が増加し、除去されることなく最終沈殿池、塩素処理過程を経て放流されていることが明らかとなった。夏期においては、同様に返送汚泥としての負荷が確認されたが、エアレーションタンク内での除去が卓越していることが示唆された。その結果、最終沈殿池、塩素処理過程ではエストロゲン様活性が低下しないが、放流水中の値としては、冬期に比べ低い値で放流されていることが明らかとなった。一方、E1 についても同様の挙動が確認された（図-3）。

3. 3 放流水中にエストロゲン様活性に対する、各分析対象成分の寄与

放流水中に含まれるエストロゲン様活性に対し、本調査で分析対象成分とした各物質が、どの程度寄与しているのかについて考察を行った。理論活性値は各物質濃度に比活性値を乗じることによって算出した。比活性値については矢古宇らの文献⁹⁾に従いE1=0.3、E2=1.0、NP=0.001とした。また矢古宇らの文献に記載のないNPnE0やNPnECについては、文献に記載された試験方法に従い試験し、過年度に報告した¹⁾。その結果、冬期、夏期ともに、放流水中で検出されるエストロゲン様活性の約85%がE1によるものであり、残り約10%がE2であると算出された。他の成分（例えばNP）による寄与は多くても数%であると算出された。今回調査を行った処理場のように、冬期に処理効率が低下する場合、放流先の河川水量が減少する冬期には、処理水中のエストロゲン様活性の希釈が不十分となり、魚類への影響の増加が懸念される。このことより、水生生物保護のために放流水中のエストロゲン様活性を低減するためには、下水処理過程において効果的にE1を除去することが必要であることが明らかとなった。

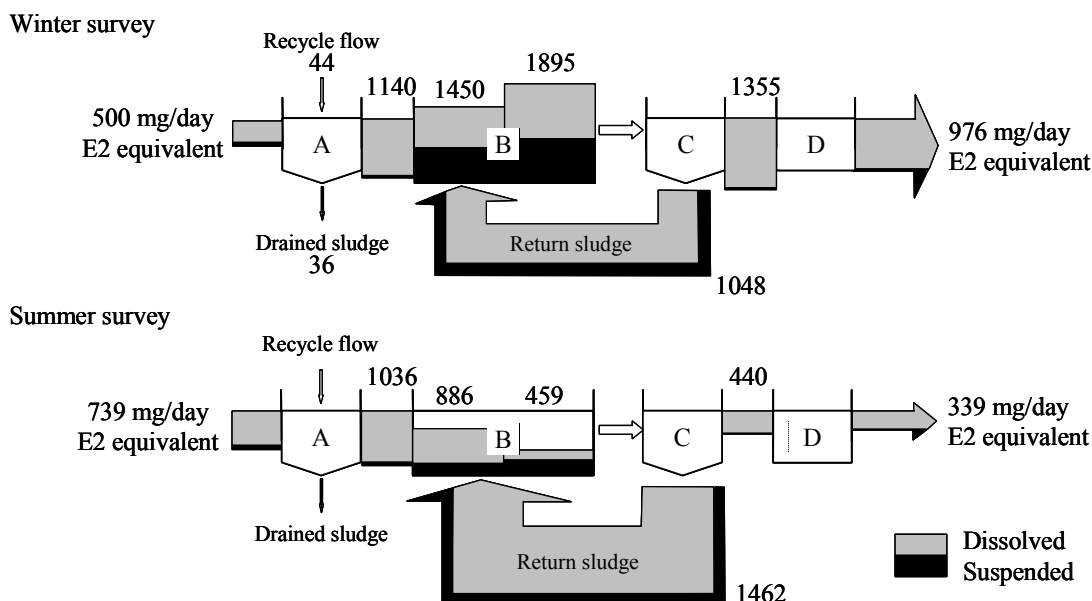


Figure 2. Mass balance of estrogenic activity (in mg/day, E2 equivalent) through physicochemical treatment (A and C), biological treatment (B), and chlorination process (D) during winter and summer in a municipal sewage treatment plant in Japan. A: Primary settling tank; B: Aeration tank; C: Final sedimentation tank; D: Chlorination tank

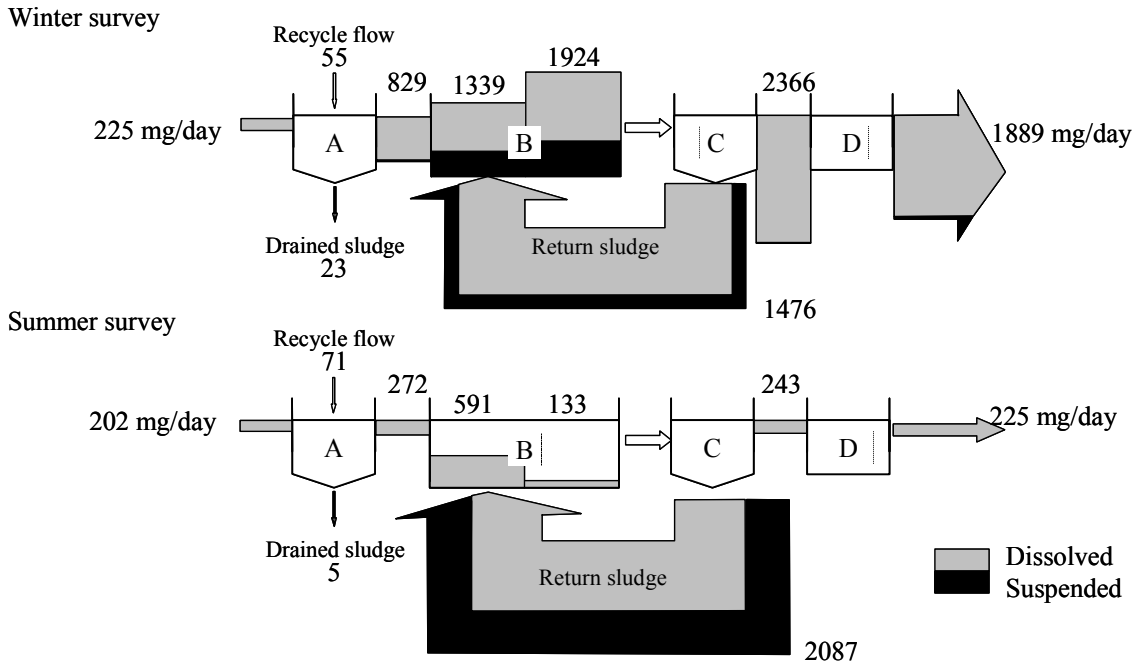


Figure 3. Mass balance of estrone (in mg/day) through physicochemical treatment (A and C), biological treatment (B), and chlorination process (D) during winter and summer in a municipal sewage treatment plant in Japan.

A: Primary settling tank; B: Aeration tank; C: Final sedimentation tank; D: Chlorination tank

4. まとめ

本年度の調査・研究により、下記の結果が得られた。

- 1) E2、E1、エストロゲン様活性とともに、冬期に比べ夏期に高い除去率が確認された。同時に測定を行ったSS、BOD、CODについては、両調査ともに良好な除去率（90%以上）が確認されたが、T-Nについては冬期に低い除去率が確認された（冬期：16%、夏期：41%）。
- 2) E2は両調査において高い除去率が確認された（冬期：70%、夏期：87%）のに対し、E1については処理工程が進むにつれ濃度が増加（冬期：740%増加、夏期：50%増加）し、その傾向は特に冬期に顕著であった。
- 3) エストロゲン様活性についてもE1同様に、冬期の調査においては処理工程が進むにつれ活性値の増加が確認された（除去率として冬期：-97%、夏期：39%）。機器分析により定量したE1、E2、ノニルフェノール濃度より、下水処理過程の各水試料中で検出されたエストロゲン様活性値の大部分はE1の寄与によることが再確認された。このことより、放流水中のエストロゲン様活性を低減するためには、下水処理過程において効果的にE1を除去することが必要であることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 田中宏明他（2002）水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究、平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集
- 2) 田中宏明他（2003）水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究、平成 15 年度下水道関係調査研究年次報告書集
- 3) 小森行也，八十島誠，高橋明宏，矢古宇靖子，田中宏明；下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析，土木技術資料，Vol. 43(11)，pp44-49(2001) .
- 4) 社団法人日本下水道協会編：下水試験方法 追補暫定版（内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編），(2002).
- 5) 八十島誠，小森行也，田中宏明；LC/MSによるノニルフェノキシ酢酸類の分析，第4回日本内分泌攪乱

化学物質学会研究発表会要旨集, pp171(2001).

- 6) Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. ; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15(3), pp241-248 (1996).
- 7) 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, pp199-204, (1999).