

11. その他の予算による研究  
[水質チーム]

# 1. 水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
 主任研究員 宮島 潔  
 専門研究員 中田 典秀  
 専門研究員 東谷 忠  
 専門研究員 山下 尚之

## 1. はじめに

下水道整備により公共用水域の水質は改善され、水生生物への直接的な影響はある程度改善されてきたと考えられる。しかし都市域では人口の集中化に伴い、河川水に占める下水処理水の割合は年々大きくなっており、その割合が 90%を超えるような河川もみられている。このような河川においては、公共用水域の水質保全に加え、多様な生物が棲めるような「生態系に配慮した取り組み」が必要となっている。また、都市の水循環を考慮し、自己水源である下水処理水の中に含まれる化学物質が放流された後どのような挙動を示すのかについても知見を深める必要がある。

本研究ではこれまでに、河川に隣接する下水処理場の放流口付近において横断調査を行い、放流水と河川水の混合特性について明らかにした<sup>1)</sup>。また、下水処理水の放流地点ならびにその上下流地点に形成される水生生物の調査から、処理水の混入により多様性指数が低下することを明らかにしてきた<sup>2)</sup>。そこで平成 15 年度は、放流水と河川水が混合した後、下水処理水に含まれる化学物質が流下に伴いどのような挙動を示すのかについて調査を行った。また、底生生物の各栄養段階における化学物質の蓄積について調査を行った。

## 2. 調査方法

### 2.1 調査地区の概況

今回の調査の対象とした地区（多摩大橋地区）は、多摩大橋から下流約 3000m までの区間である（図-1）。この地区の上流には羽村取水堰があり、多摩川から水道原水として東京都東村山浄水場などに取水している他、下流域については約 2m<sup>3</sup>/s の流量を水質浄化対策として放流しており、さらに秋川からの水が加わった流量が多摩川本川となりこの地区に到達している。多摩大橋地区の特徴は、この地区の上流域には大規模な下水処理施設がなく、この地区で初めて下水処理場からの放流水が排水樋管を經由して多摩川本川に流入し、河川流量だけでなく栄養塩類等の河川水質も大きく変化している地点であることがあげられる。

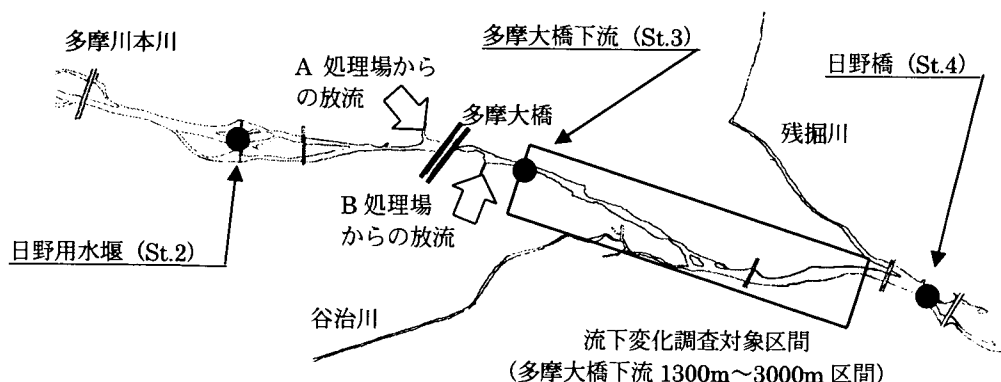


図-1 調査地域の概略図

## 2. 2 流下変化調査地点と調査項目

調査は平成14年8月、15年2月、5月、11月、平成16年2月に実施した。観測地点は、過去の調査において下水処理水と河川水の混合が確認されている多摩大橋から下流1300mから3000mの区間内でほぼ等間隔に3地点（平成14年8月および平成15年2月）もしくは5地点（平成15年5月調査以降）を選出した。この区間には大きな樋管や支川が殆どなく、その負荷量も本川負荷量に比べ非常に少ない。このため流下に伴う化学物質の変化を確認するには適当な区間である。測定項目は、水深、流速（電磁流速計）の他に水質項目として、水温、pH、電気伝導度（現場測定）、CODMn、TOC、アンモニア態窒素（NH<sub>4</sub>-N）、亜硝酸態窒素（NO<sub>2</sub>-N）、硝酸態窒素（NO<sub>3</sub>-N）、総窒素（T-N）、オルトリン酸態リン（PO<sub>4</sub>-P）、総リン（T-P）、エストロゲン類、ノニルフェノール関連物質とした。さらに、有機態窒素（Org-N）、有機態リン（Org-P）の濃度を算出した。なお、平成15年8月に夏期調査を予定していたが、天候不順のため実施できなかった。

## 2. 3 生物濃縮調査地点と調査項目

調査は平成14年9月から15年4月にかけて実施した。調査地点は、人為的な汚染の殆どない地点として、多摩大橋地区から約20km上流に位置する奥多摩橋地点（St.1）、多摩大橋地区の上流地点として日野用水堰（St.2）、下水処理水の合流後の調査地点として多摩大橋下流地点（St.3）、日野橋地点（St.4）を設定した（図-1）。測定項目はエストロゲン類およびノニルフェノール関連物質とした。

## 2. 4 試料の前処理

### 2. 4. 1 水質

試料は1Lガラス瓶で採取した後、アスコルビン酸を1Lに対して1g添加し、アイスボックス中で冷却し、速やかに持ち帰り分析に供した。

### 2. 4. 2 附着藻類

附着藻類はハブラシを用いて河床の砂礫からこそぎ採り、実験室に持ち帰った。この試料を遠沈管に入れ遠心分離（2500ppm、20分間）し、水層と分離させた。この際、ユスリカやブユ等の底生生物が上層に分離されるため、これらを目視にて取り除いた。また下部にはシルトが分離されるため、目視で下層部のシルトを採取しないように注意しながら中層部の試料のみを採取し、この試料を分析試料とした。

### 2. 4. 3 底生生物

底生生物はサバーネット（離合社製、方形枠50×50cm、オープニングメッシュ475μm）を用いて採取した。ここで大型種については、現地でソーティングをし、分析に供した。残りの生物種は実験室に持ち帰り、速やかにソーティングを行うとともに種の同定を行い、分析を行える試料量（湿重量で10g以上）が確保できた種については、種毎に分析を行った。その結果、ヒゲナガカワトビケラについては全地点で試料確保が行えたが、シマトビケラ科、カワゲラ亜科の数種については、試料量が十分に確保できなかったため、科もしくは亜科にまとめた。なおシマトビケラ科、カワゲラ亜科の種の情報は表-1に示した。また、これらの種以外の種については、分析に可能な試料量が確保できなかったため、コンポジットとして分析に供した。

### 2. 4. 4 底質

底質調査は生物調査に併せて実施した。採取した試料はガラスビンに入れ実験室に持ち帰った後、2mmのフルイを用

表-1 分析に供与したシマトビケラ科の試料及びカワゲラ亜科の試料の分類結果

地点	シマトビケラ科	カワゲラ亜科
St.1	コガタシマトビケラ属 ウルマーシマトビケラ ナカハラシマトビケラ シマトビケラ属	カミムラカワゲラ ウエノカミムラカワゲラ フタツメカワゲラ属 クラカケカワゲラ属
St.2	コガタシマトビケラ属 ウルマーシマトビケラ ナカハラシマトビケラ	フタツメカワゲラ属
St.3	ナミコガタシマトビケラ ウルマーシマトビケラ ナカハラシマトビケラ シマトビケラ属	フタツメカワゲラ属 オオヤマカワゲラ
St.4	コガタシマトビケラ属 オオヤマシマトビケラ ウルマーシマトビケラ ナカハラシマトビケラ	フタツメカワゲラ属 オオヤマカワゲラ

いて大きな礫を除いた後、分析に供した。

#### 2. 4. 5 粒子状有機物 (POM)

有機物はプランクトンネット（離合社製、オープニングメッシュ 63 $\mu$ m）を河床置き、その直上の礫を静かに持ち上げ河床の礫間の有機物を捕集した。この集めた有機物を 16mm、1mm のステンレスのフルイに順次通過させた。16mm のフルイに補足された落ち葉および小枝取り除き、各フルイを通過した 16~1mm 分画を CPOM、1~0.063mm 分画を FPOM とした。またこれら全て試料には水生生物が含まれているため、ピンセットを用いて全ての水生生物を取り除くとともに、超純水中にデカントして砂質やシルトを可能な限り分離して、遠心分離（2500ppm、20 分間）を行い、水層と分離して分析に供した。

#### 2. 5 分析方法

水試料中のノニルフェノール (NP) およびノニルフェノールエトキシレート (NPnEO) の分析は小森らの方法<sup>3)</sup>に従い、固相抽出を行った後、高速液体クロマトグラフィーを用いて分析した。またノニルフェノールフェノキシ酢酸 (NPnEC) は八十島らの方法<sup>4)</sup>に従い液体クロマトグラフ/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) 法によって分析した。17 $\beta$  エストラジオール (E2)、エストロン (E1)、エチニルエストラジオール (EE2) は、Komori らの方法<sup>5)</sup>に従い、LC/MS/MS 法によって分析を行った。

付着藻類、底生生物、POM、底質試料は、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル<sup>6)</sup>に準じ、メタノールを用いて固液抽出した。この抽出液を粗抽出試料とし、水試料同様に前述の手法で分析を行った。

### 3. 結果および考察

#### 3. 1 流況観測および流下変化

流速は河川生態系では生息にかかわる重要な因子であり、流量は河川水中に含まれる化学物質の輸送量（負荷量）を評価する上で重要な項目である。また、流下時間は水の移動を知るだけでなく、河川水中での水質変化を評価する上でも重要な項目である。以上のことより、各調査時には流量観測を行い、さらに 2003 年 4 月には浮子を用いて多摩大橋から多摩大橋下流 3000m の区間の流下時間を測定した。各調査における多摩大橋下流 2200m 地点で観測した流量を表-2 に示した。流下変化調査対象区間（多摩大橋下流 1300m~3000m 区間）内には大きな支川や樋管が無いいため、大きな流量の変動は確認されなかった。また、流下変化調査を行った多摩大橋下流 1300m から 3000m 区間の流下時間は約 90 分と見積もられた。

表-2 多摩大橋下流2200m地点における流量および水温

調査日	流量 (m <sup>3</sup> /s)	水温 ( $^{\circ}$ C)
2002年 8月	8.8	30
2003年 2月	8.1	9
5月	5.5	22
11月	8.7	16
2004年 2月	5.9	11

#### 3. 2 窒素、リン、エストロゲン、NP 関連物質の流下変化

調査区間内における各態窒素およびリン化合物の流下に伴う負荷量の変化を図-2、図-3 に示した。いずれの調査においても窒素化合物については硝酸態窒素の占める割合が高く、下水処理行程で硝化が充分行われてから放流されていることが確認された。しかし、夏期の調査（平成 14 年 8 月実施）を除くと、各態窒素化合物の負荷量は流下距離 3km、流下時間 90 分では減少することなく流下ることが明らかになった。夏期の調査においては、調査地点は少ないものの、減少傾向が見られ、その減少量は同区間への負荷量に対し 20%と見積もられた。一方、リン化合物についても夏期の調査において若干の減少傾向（減少率 16%）が確認されたが、他の調査においては窒素化合物同様流下に伴う顕著な濃度の低下は確認されず、分解されにくいことが確認された。

エストロゲンの流下変化を図-4 に示した。平成 15 年 5 月、11 月の調査では E2 が検出下限値以下であったが、他の調査時期におけるエストロゲンの構成は E2 に比べ E1 の割合が高く、これは過去の下水処理場放流口付近での調査結果と同様の傾向であった。また、夏期の調査（平成 14 年 8 月）の調査では、E1 の流下に伴う減少傾向が確認され、その減少割合は 44%と見積もられた。一方、それ以外の調査では顕著な E1 の減少は確認されなかった。夏期は水温が他の時期に比べ最大 20 $^{\circ}$ C も高いため（表-2）、水温に起因する浄化作用が働いているもの

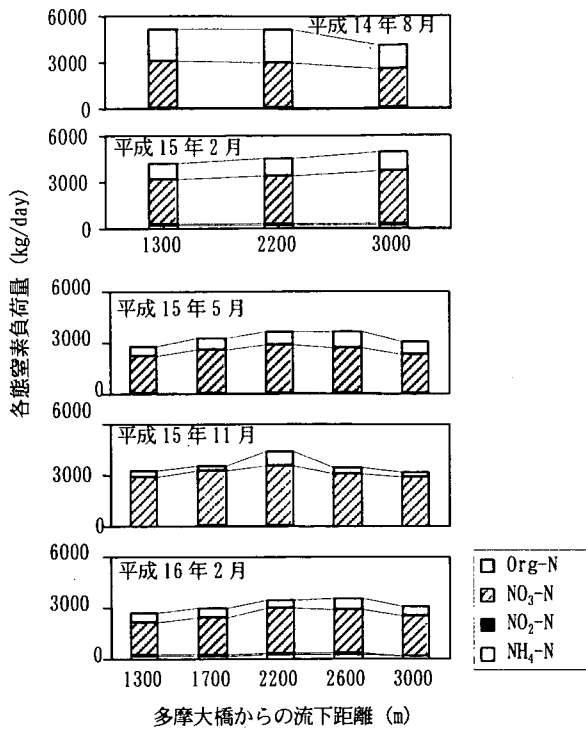


図-2 流下に伴う各態窒素化合物の挙動  
(平成15年8月調査は欠測)

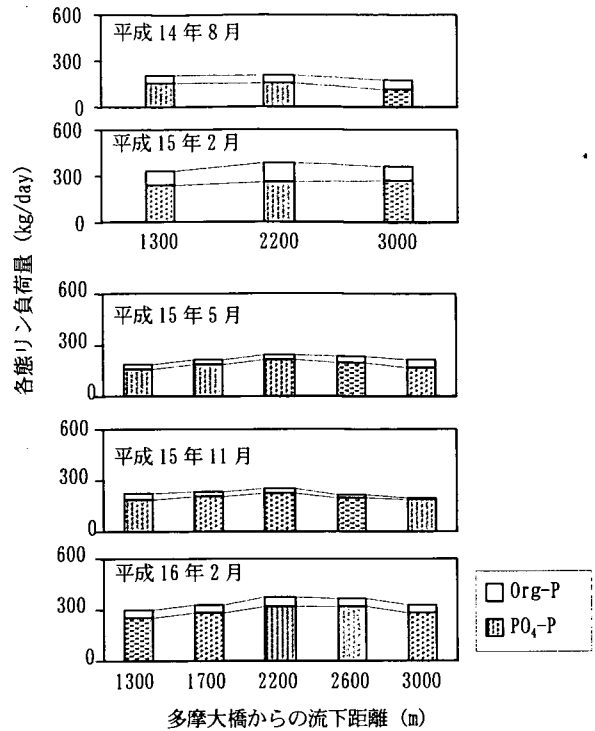


図-3 流下に伴う各態リン化合物の挙動  
(平成15年8月調査は欠測)

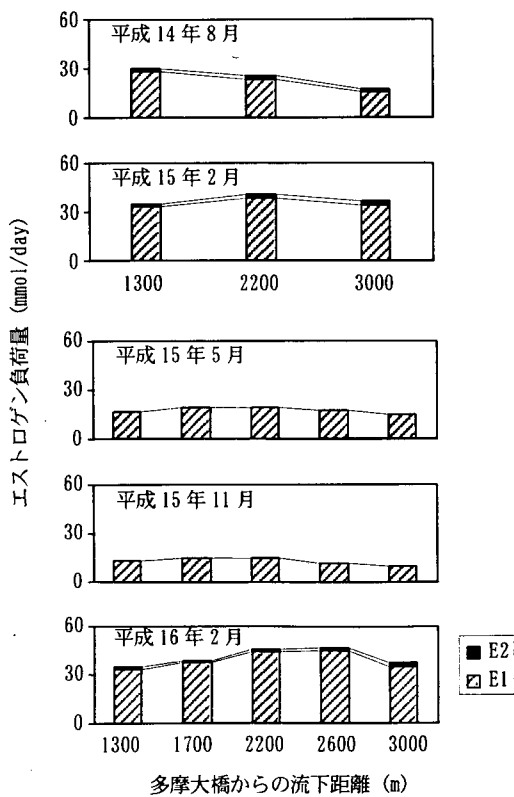


図-4 流下に伴うエストロゲンの挙動  
(平成15年8月調査は欠測)

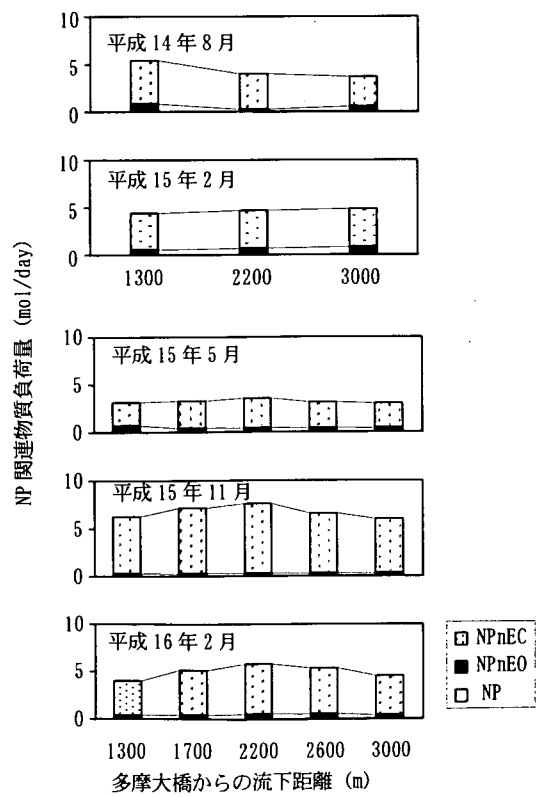


図-5 流下に伴うNP関連物質の挙動  
(平成15年8月調査は欠測)

と思われる。NP 関連物質の流下変化を図-6 に示した。いずれの調査においても NP は検出下限値以下だった。NP 関連物質の大部分は NPnEC であり、その中でも NP1EC および NP2EC の存在割合が高かった。夏期の調査においては NP 関連物質もエストロゲン同様に減少傾向が見られ、その減少割合は 30% (NPnEC) から 35% (NPnEO) と算出された。河川における浄化作用には微生物による分解以外に、河床への沈殿・堆積や懸濁物質への吸着なども広義には含まれる。今回の調査では、夏期にのみ流下に伴う濃度の減少傾向が確認されたことより、水温に起因する浄化作用が示唆された。今年度実施できなかった夏期の調査を追試し、さらに流下過程における化学物質の挙動について明らかにする必要がある。

### 3. 3 生物濃縮

#### 3. 3. 1 エストロゲンおよびNP 関連物質の濃度

各調査地点における水質調査結果を図-6 に示した。下水処理水が合流していない奥多摩橋 (St.1)、日野用水堰 (St.2) 地点では調査期間を通じて E1、E2 は検出されなかったが、下水処理水の合流した後の多摩大橋下流 1300m (St.3)、日野橋 (St.4) では E1、E2 が検出された。また、EE2 は調査期間を通じて検出されなかった。NP およびその関連物質である NPnEO、NPnEC は、最上流地点の St.1 では調査期間を通じて不検出であったが、St.2 では NP1EC がわずかに検出された。また St.3~St.4 では、NP、NPnEO、NPnEC が検出され、下水処理水の合流に対応した変化が確認された。

底質、POM、付着藻類、底生生物の分析結果を図-7 に示した。下水処理水の合流後に検出される項目として、E1、E2、NP2EO、NP3EO、NP2EC が挙げられる。一方、NP や NP1EO、NP1EC は、下水処理水の合流前の対照地点である St.1、St.2 においても検出された。NPnEO は工業用洗剤として事業場を中心に使用されている他、再生紙のトイレットペーパー内にも微量ながら含まれており、下水処理水や浄化槽排水などを通じて環境中へ放出されていることが知られている。またこれらの物質は水質調査では、殆ど検出されていないが、機器検出下限値未満の値で河川中に存在し、生物への蓄積が起こっている可能性がある。エストロゲンおよびNP 関連物質の水生生物への濃縮係数を図-8 に示す。ここで生物濃縮係数は水系の暴露だけでなく、餌を通じた生物濃縮を示す係数として用いられる。しかし野外調査を基礎とした場合、これらの生物の摂食量とその内容物に関する情報を厳密に把握することは困難である。そこでここでは付着藻類、底生生物の検出濃度を水中濃度で割ることによって示したが、この値を生物蓄積係数として用いている場合も多い。また付着藻類、底生生物と比較するために POM や底質についても同様の計算方法で算出し、図中に示した。

この結果から付着藻類および底生生物の生物蓄積係数は  $10^1 \sim 10^3$  程度であり、その蓄積性は高くない。また各項目間の違いについて着目すると、NP1EC を除く各項目は、付着藻類に比べて底生生物の生物蓄積係数が低くなっている。

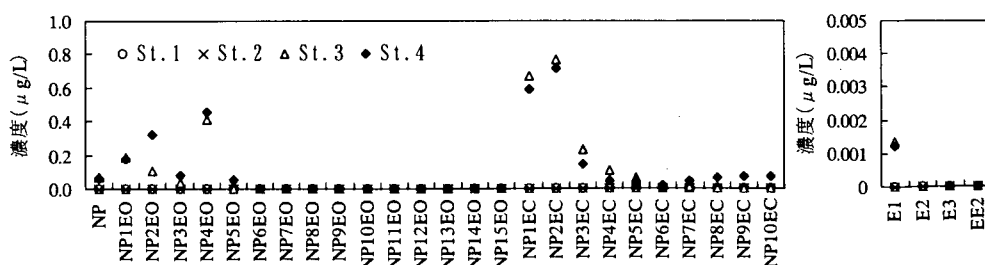


図-6 エストロゲンおよびNP 関連物質の濃度 (水質)

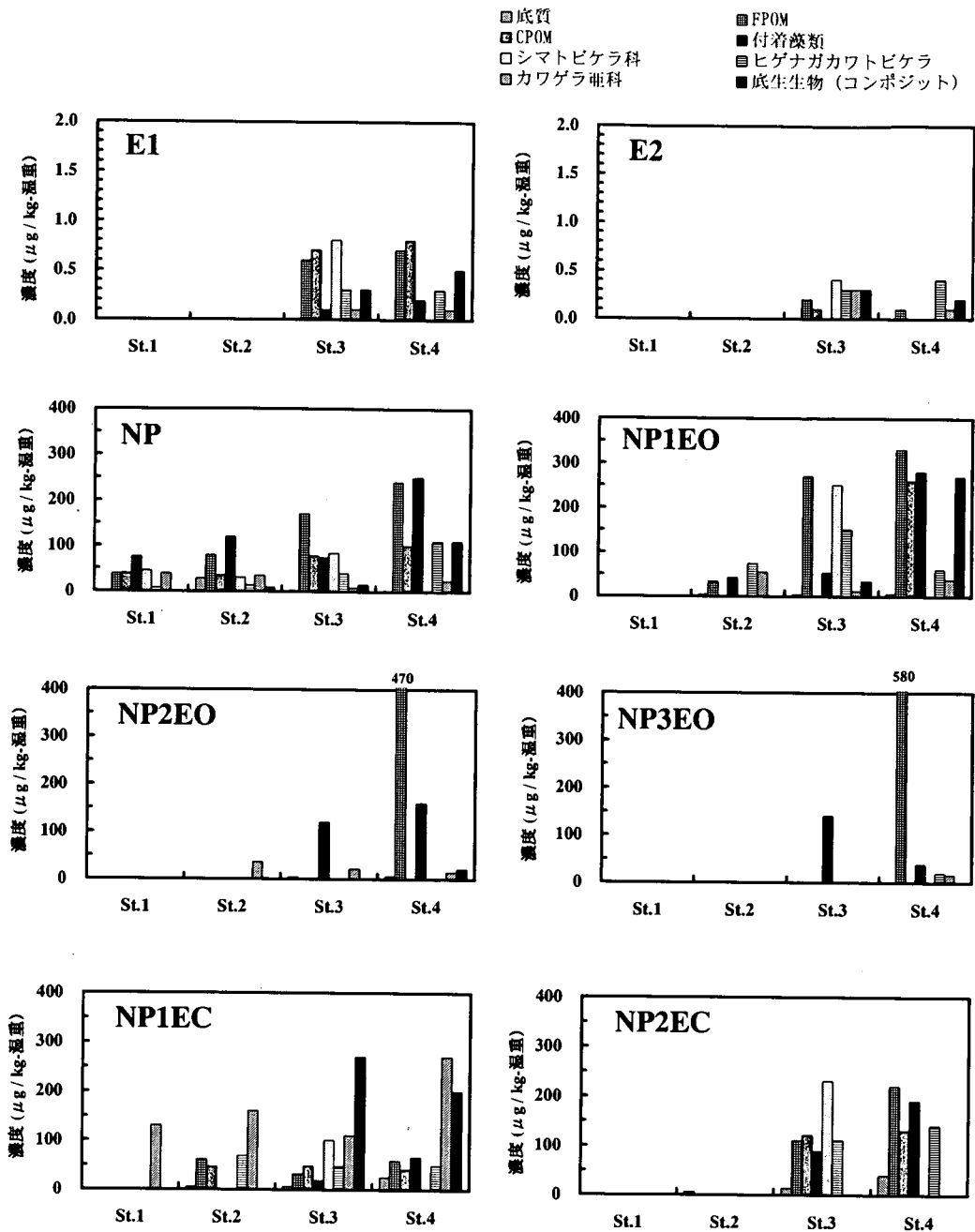


図-7 エストロゲンおよびNP関連物質の底質、POM、水生生物における検出濃度

また、分析を行った底生生物の摂食様式毎の蓄積係数について注目すると、E1 および NP については、ヒゲナガカワトビケラやシマトビケラ科、コンボジットサンプルの濃度に比べ、カワゲラ亜科の濃度が低いことが確認できる。ヒゲナガカワトビケラの摂食機能群は collectors-filterers に区分され、主に流下藻類を中心として食べているが、デトリタスやユスリカなども消化管内に含まれておりその食性は雑食である。シマトビケラ科の摂食機能群も collectors-filterers で、今回採取された種の中では、オオヤマシマトビケラがデトリタス食性であるのを除くと、他の種はヒゲナガカワトビケラ同様、雑食である。またカワゲラ亜科は肉食者で、底生生物内では上位栄養段階に位置する生物である。NP1EC を除く各項目は、1) 種の違いによって生物蓄積係数に差が見られない、もしくは肉食者のカワゲラ亜科の値が低くなっている、2) POM、附着藻類に比べ底生生物

の濃縮係数が低い、ことから底生生物への食物網を通じた蓄積が起こっている可能性は低いものと考えられた。しかし NP1EC はその傾向が異なり、付着藻類に比べ底生生物の蓄積係数が高い値を示すことが多く、カワゲラ亜科が最も高くなった。NP1EC は NP より水溶性が高く、環境水中での検出頻度が高いことが報告されているが、付着藻類や底生生物への影響について報告はない。しかし他の物質と異なり、その濃縮係数が高くないものの、上位栄養段階へ蓄積している可能性もあり、環境中での挙動について検討を行う必要があるものと思われる。

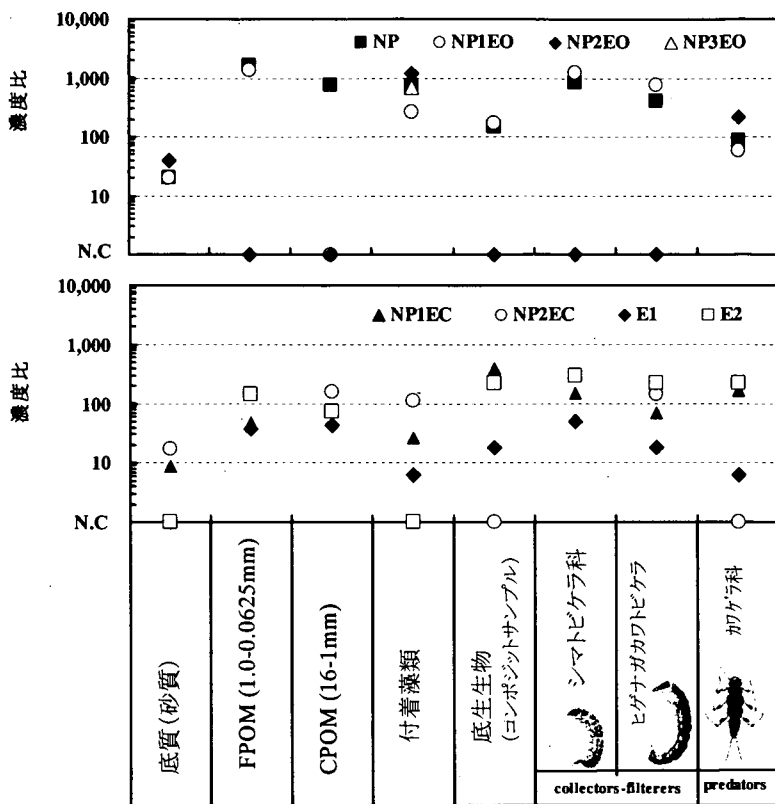


図-8 付着藻類、底質、POM における検出濃度と水質濃度の比 (生物濃縮係数)

#### 4. 結論

下水処理水中に含まれる化学物質の流下に伴う消長、および底生生物の各栄養段階における化学物質の蓄積傾向について調査を行った。本調査により以下の知見を得た。

- 1) 下水処理場の放流口から下流約 3km の区間において、下水処理水を起源とする化学物質の消長について調査を行った。その結果、夏期の調査においては、無機態の窒素およびリンについては下水処理場放流口から下流約 3km においても水中濃度の減少割合が低いが、エストロゲンおよび NP 関連物質については明瞭な減少傾向が見られた。一方、他の時期の調査においては、窒素、リン、エストロゲン、NP 関連物質ともに明瞭な減少傾向が確認されなかったため、水温や生物活動に起因する浄化作用が働いていることが示唆された。
- 2) 下水処理場の放流口付近において河川水と底生生物中の化学物質の分析を行い、種および栄養段階ごとの化学物質の生物濃縮について調査を行った。その結果、エストロゲンおよび NP 関連物質については摂食段階が低位の付着藻類への濃縮は見られるが、高位の底生生物への濃縮は確認されなかった。

なお、本調査研究は、運営費交付金 (治水勘定) により実施されたものである。



#### 〈謝辞〉

本研究の一部は、河川生態学術研究会の総合的な調査研究の一環として実施されたものである。底生生物の調査に関しては、東京大学大学院農学生命科学研究科森林動物教室の加賀谷隆先生との合同調査で実施したものであり、先生には多大なご指導をいただいた。ここに感謝の意を表する。

#### 〈参考文献〉

- 1) 田中宏明他 (2001) 水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究、平成 13 年度下水道関係調査研究年次報告書集
- 2) 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
- 3) 小森行也、八十島誠、田中宏明 (2001) GC/MS によるノニルフェノキシ酢酸類の分析、第 4 回環境ホルモン学会講演要旨集 pp. 95.
- 4) 八十島誠、小森行也、田中宏明 (2001) LC/MS によるノニルフェノキシ酢酸類の分析、第 4 回環境ホルモン学会講演要旨集 pp. 171.
- 5) Koya KOMORI, Akihiro TAKAHASHI, Hiroaki TANAKA (2001) Detection of Estrogens in Wastewater by LC/MS/MS, IWA 2nd World Water Congress, Berlin, Germany CD-ROM (pp. 278)
- 6) 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質、底質、水生生物)、(1998) 平成 10 年 10 月、環境庁水質保全局水質管理課.
- 7) 八十島誠、小森行也、田中宏明 (2004) トイレトペーパー等に含まれる NP およびその関連物質、第 38 回水環境学会講演集.

## 2. 底泥－水間の物質移動に関する調査

水循環研究グループ水質チーム  
 水質チーム 水質チーム 水質チーム 水質チーム  
 水質チーム 水質チーム 水質チーム 水質チーム

### 1.はじめに

流域からの汚濁負荷の他に、底泥からの汚染物質の溶出が水質改善の遅れの原因となっており、また同時に、棲息する生物環境にも悪い影響を与えている。効果的な底泥の対策を立てるため、また、将来の水質を予測するために、底質に含まれる栄養塩類等の汚染物質の変化機構を解明し、底泥が水質に与える影響を評価する手法の確立が求められている。本調査では、対象物質として栄養塩類を中心とし、底泥からの溶出機構の解明、底泥が水質に与える影響の推定方法の提案及び底泥からの溶出量推定のための試験法の提案を行うものである。

### 2.調査の内容

#### 2.1 溶出量推定のためのモニタリングシステムの開発

底泥からの栄養塩類などの溶出量を推定するため、14年度より湖沼等の現地における水柱及び表層底泥のモニタリングシステムを検討している。これは、水温、DO及びORPセンサー等による連続測定を行うことにより貯水池内環境を把握し、その結果をから栄養塩類の溶出を推定するとともに、測定結果を活用した効率的な運転制御を行いながら、高濃度酸素水を底層部に供給することにより底層環境を改善することを目的としている。本実験は、(独)土木研究所、横河電機(株)と松江土建(株)の共同研究として実施している。

平成15年7月から8月に三春ダム牛糞前貯水池において高濃度酸素水による底層環境改善システム<sup>1)</sup>の現地実験と水温、DO及びORPセンサーによる連続モニタリングを行い、栄養塩類の溶出量との関係について検討を行った。モニタリング装置等の配置を図-1に示す。

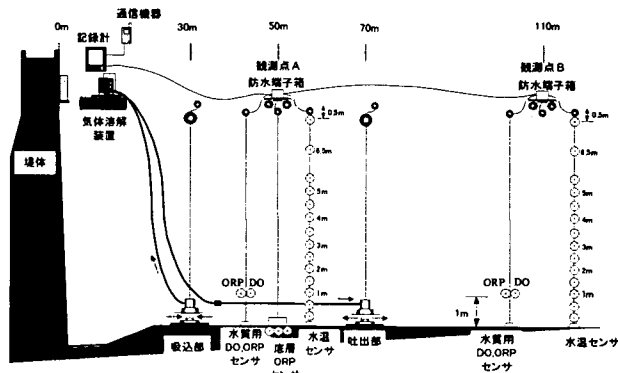


図-1 連続測定装置の概要

現地実験はRun I (6/30～7/18) とRun II (7/28～8/18)の2回実施した。酸素水の吐出速度は14年度と同様にRun Iでは30m³/hr、Run IIでは90m³/hrと設定した。なお、Run Iではコンプレッサーの故障により7月2日21時から8日14時まで運転が停止した。Run IIの効果を見るためにRun IとRun IIの間は10日間装置を停止させた。この期間において貯水池底層が嫌氣的環境になるのに伴い生じる栄養塩類の溶出状況とそれに伴う貯水池の水質変化を捉えることとした。

#### 2.1.1 水温、DO及びORPの経時変化

図-2に6月29日(Run I開始1日前)から8月22日(Run II終了後5日後)までの観測点Bで測定した水温のうち毎日9時値の経時変化を示す。水温は水面から0.5m、1.5m、2.5m及び以降0.5m毎に水深6.0mまで

測定した。

図-2より水深が違う位置での水温差が大きくなっていることから、実験期間中に水温躍層が発達していることが分かる。調査期間中の7月7日、8日やRun IIの直前、直後の期間には総雨量が50mmを超えるような降雨があったので、流入量が増加し水深0.5mから3mまでは水温差が小さくなっていることが確認出来る。また、水深0.5mの水温は気温の変化に追従すること、水深が深くなるにつれ、その変化は小さいことを確認した。図-3に観測点Bの湖底面上1mのDOとORPの経時変化を示す。

図-3からRun IではDO濃度は増加するもののDO濃度が0mg/lなることもあるなど時間変動が確認された。これに対して供給停止をした7月18日から7月27日までの9日間におけるDOの時間変動幅はRun Iの間より小さいとともに、DOが0mg/lになることは無かった。

これをORPの経時変化結果と比べてみると、観測を開始した6月29日の時点からDOの時間変動が大きいRun Iの間ではORPは負の値か0mvとなることがあるのに対し、Run I終了後からRun IIの間のようにDOが0mg/lにならない期間では常にORPは正值となっていた。このことからDOとORPの測定の組み合わせにより水中の酸化還元状況をリアルタイムで推定出来ると考えられた。

### 2.1.2 底層環境の変化による栄養塩類濃度の変化

牛糞前貯水池における底層水中への酸素供給停止に伴う栄養塩類の濃度変化を調べるため、Run Iの最終日7月18日、23日(停止5日後)と28日(停止10日後)に採水を行い、速やかに水質分析をした。分析項目は、NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, T-N, DTN(溶存態総窒素), PO<sub>4</sub>-P, T-P, DTP(溶存態総リン), DOCであり、リン窒素自動分析機器(TRAACS2000)とTOC計(SHIMAZU5000A)を使用した。

図-4aより高濃度酸素水の供給停止日、5日後、10日後と徐々に底層部の酸素が消費されることが確認出来た。また図-4bに見られるように底層部ORPは徐々に負値となり還元的状態になっていった。

これと栄養塩濃度の変化を比べるため、図-5a, 5bにDTP, DTNの経時変化を示す。DTPは7月18日、23日の水深4m以下では定量下限値以下であり、28日には水柱全体で増加が見られた。28日は降雨があったため図-2から明らかのように上層部では水深が異なっても水温が同程度であることから混合が生じたと考えられ、

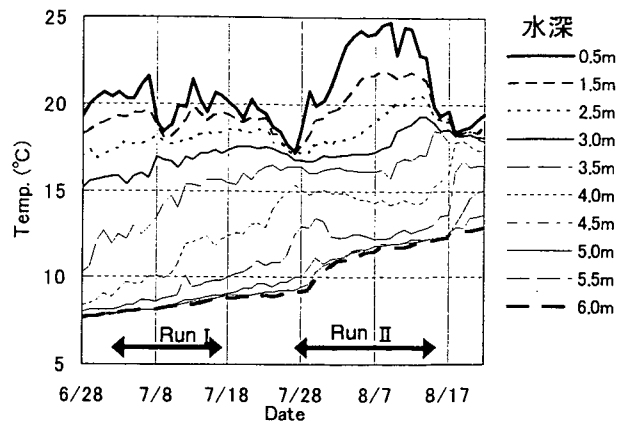


図-2 B地点の9時水温の経時変化

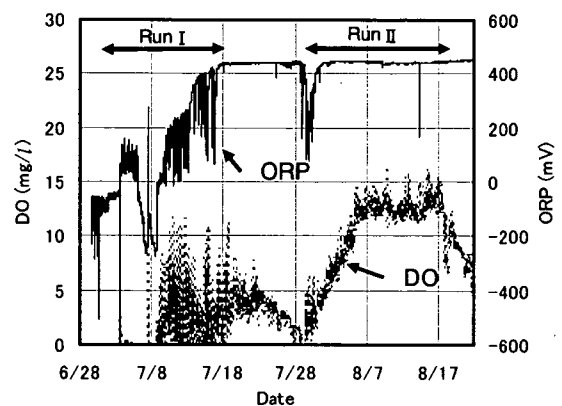


図-3 B地点水深6mのDO,ORPの経時変化

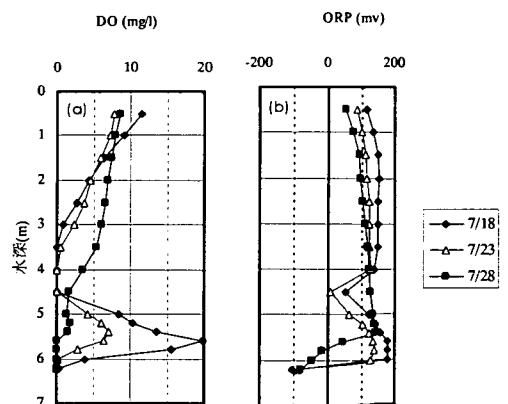


図-4 B地点での溶存酸素, ORPの経時変化

上層部の DTP 濃度の増加は混合と降雨時流入水の影響に起因すると考えられた。

これに対し図-2より底層部では水温差の変化は見られないことから、流入水の影響は受けていないことと鉛直方向等の流動は起こっていないと考えられたことから、DTP の上昇は底泥からの溶出が起因していると考えられた。図-5b に示す DTN は 23 日に底層部で一旦増加したが、28 日は 18 日と同レベルになり、DTP のように明確な増加は認められなかった。また 15 年度は冷夏であり底層部の水温が 10℃以下と 14 年度と比べ 5℃程度低かったことから栄養塩類の溶出速度も小さくなり、14 年度と比べ栄養塩類濃度が低くなったと考えられた。

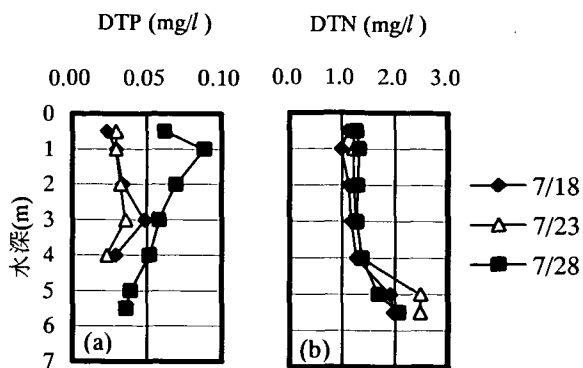


図-5 B 地点での栄養塩濃度の経時変化

## 2.2 底層環境の相違による底質性状の変化

### 2.2.1 調査方法

高濃度酸素水の供給による底質性状の変化を調べるため、図-6 に示した牛糞前貯水池の調査地点 A と調査地点 D にて酸素供給実験以前の状況確認を目的に 5 月に 5 回、実験開始前の 6 月 30 日と 7 月から 8 月の現地実験期間中及び終了後の 9 月に計 15 回ほど底質を採取した。

試料は柱状採泥器 (HR 型, 離合社製) を用いて、直径 10 cm, 高さ 50 cm の円筒アクリル製容器に採取した。試料は各地点 3 本を実験室に持ち帰り、1 本はそのまま鉛直方向に 2cm 毎に分割し、間隙水分析及底質含有量分析に用い、残り 2 本はそれぞれ溶出試験と酸素消費速度試験に供した。溶出試験と酸素消費速度試験は 20℃ 恒温室にて図-7 に示す底泥実験装置<sup>2)</sup>を用いて行った。この装置の特徴は、不攪乱採取した底泥が入っているサンプリング管をそのまま試験チャンバーに利用できること、底泥直上水中の水温、DO 及び ORP の連続計測によるオンライン記録ができることである。

実験期間中は直上水の水温、DO、ORP、pH の変化を 5 分間隔でモニタリングした。溶出試験に用いた直上水は、貯水池の湖底上 0.5m から採水した湖水を用い、窒素曝気により DO 2mg/l 以下とした後、DO 条件の制御は行わなかった。原則として実験開始日及び 1, 3, 5, 7, 10 日目にシリンジを用いて底泥上の約 10cm 位置から採水を行い、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、T-N、DTN (溶存態総窒素)、PO<sub>4</sub>-P、T-P、DTP (溶存態総リン)、DOC の分析を行った。水質分析にはリン窒素自動分析機器 (TRAACS2000, ブラウルーベ社製) と TOC 計 (SHIMAZU5000A, 島津製作所製) を使用した。溶出試験試料は試験後に鉛直方向に 2cm 毎に分割して試験前試料と同様に間隙水水質及び底質含有量の分析を行った。

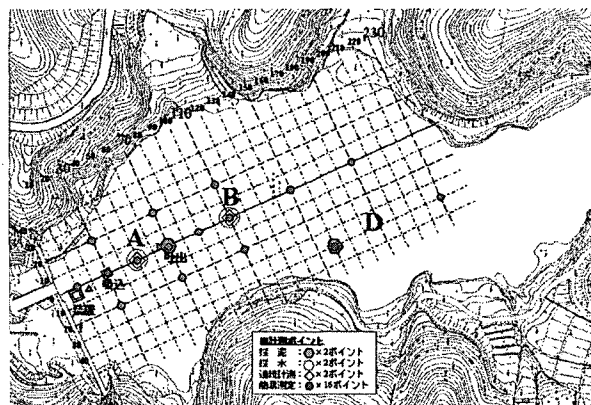
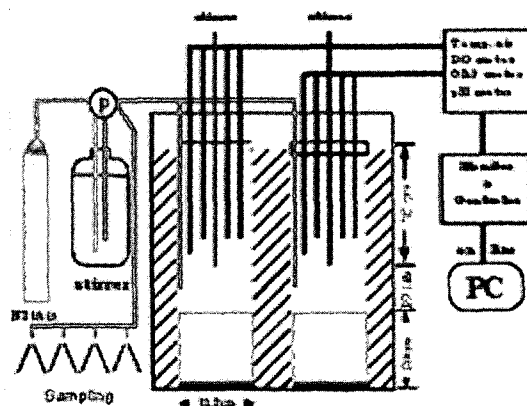


図-6 調査地点の概要



Recuspension experimental apparatus

図-7 底泥実験装置の概要

## 2.2.2 結果と考察

Run I 開始前の6月30日とRun Iの酸素供給停止10日後の7月28日に調査地点Aで採取した試料を用いて行った溶出試験の結果を図-8に示す。図-8aに示す6月30日試料のT-P濃度は4日目にピークを迎えた後に減少した。これに対し7月28日試料のT-P及び両日のT-Nは単調に増加している(図-8b, c, d)。この相違を期間中に直上水で測定したDO, ORPの計測結果から考察してみる。(図-9)

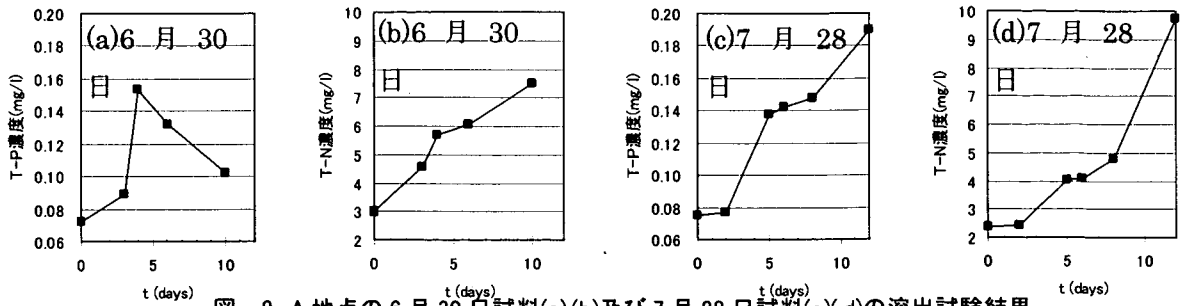


図-8 A地点の6月30日試料(a),(b)及び7月28日試料(c),(d)の溶出試験結果

実験初期に窒素曝気を行ったにもかかわらず、初期にはDO, ORPが上昇した。図に示さないが7月28日試料においても同様であった。その後、6月30日試料では2日目、7月28日試料では4日目までDOは存在した後に減少した。6月30日試料ではT-P濃度が減少した前後の7日目初期、9日目と10日目に若干のDOの上昇とORPの上昇が認められた。これに対し、7月28日試料では4日目以降にはDOの再度の上昇は認められないが、ORPの上昇は認められた。

これらのことから、何らかの生物学的な作用か化学的な作用が影響した結果、酸化還元状態が変化したと考えられる。T-Nは6月30日(図-9b), 7月28日(図-9d)とも単調に増加し減少が認められないことから、酸化還元状態の作用は窒素の溶出速度の変化には効かず、リンに特異的に作用することが示唆された。今後、実験系の改良を行うなどして、今回生じたリンの変化現象の原因の解明を行う必要があると考えられた。

なお、初期DOの上昇は、底泥間隙中に微細気泡となって存在する酸素の移動によるものとも考えられ

たが、通常底泥中は嫌気化しており、微量でも酸素が存在するとは考えにくいことから、これも今後の検討課題であると考えられた。図-8c, dからT-Nの溶出傾向を読みとると溶出速度については6月30日試料、7月28日試料ともに同程度であると考えられ、高濃度酸素水の供給による底質からの窒素の溶出速度の変化は確認出来なかった。

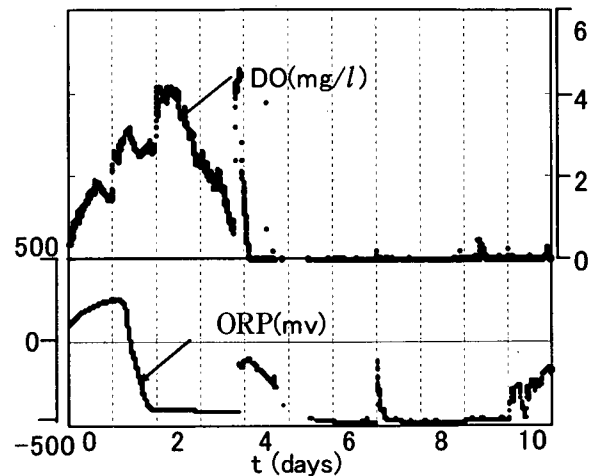


図-9 A地点の6月30日試料の溶出試験期間における

直上水のDO, ORPの経時変化(左目盛はORP, 右目盛はDO濃度を示す。)

## 2.3 貯水池底泥による栄養塩類の溶出挙動

栄養塩類の溶出は底泥中で物理的・化学的・生物学的な複雑な機構が相互的に影響しあって生起する現象であるため、その量は底泥の性状、水温、DO、微生物群集などの因子により左右され、水域によって異なる。そこで三春ダムの前貯水池(牛絵前貯水池)を調査対象として、既往の現地調査結果と室内コア溶出試験結果を参考に、リンの溶出ポテンシャルを底泥生息微生物の活性の評価試験と室内での振とう回分溶出試験に

より検討した。

### 2.3.1 実験方法

三春ダム牛糞前貯水池の上・中・下流3地点を対象にした現地調査を平成15年12月20日と16年1月17日に実施し、コア採泥器にて採取した底泥(厚さ約35cm)を栄養塩類の形態分析<sup>3)</sup>に供した。また、下流地点の底泥については、採取直後から窒素雰囲気を保ちながら持ち帰り、実験室にて2cmずつ切り出した底泥層のうち、その表層(SL, 0~2cm)、中層(ML, 14~16cm)および下層(BL, 28~30)の3層について、遠心分離した後の遠沈泥(3000rpmで5分)を回分式実験に供した(表1)。遠沈泥の含水率はそれぞれ59.9%(SL)、55.7%(ML)及び41.4%(BL)であった。

表-1 上・中・下3層の底泥固形分の性状

	VSS	C	N	P
	mg/g-dry			
表層(SL)	125.9	30.7	3.15	2.20
中層(ML)	112.3	23.1	2.01	1.71
下層(BL)	102.4	18.0	1.33	1.33

振とう回分溶出試験は嫌気と好気、20℃と5℃の条件下で振とう培養器を用い、以下の通り行った。上・中・下層の3層の遠沈泥をそれぞれ2g計り取り200ml(H15.12.20)と300ml(H16.1.17)の

pH調整済みのMilli-Q水(嫌気の場合では脱酸素済みのMilli-Q水)を入れたガラス容器(500mlの三角フラスコ)に加えた。その後、ガラス容器を10秒程度激しく振り混ぜ、光を遮断した条件下で振とう(120rpm)を始めた。一定時間毎にガラス容器から混合溶液を採取し、遠心分離(3000rpmで3分間)ろ過(0.45μmのPTFEフィルター)の後に、ろ液中の窒素(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N)とリン(PO<sub>4</sub>-P)及び全有機炭素(TOC)の測定を行った。なお、T-P, DTN, T-Nは検水量が少ないため分析を行わなかった。

### 2.3.2 実験結果

PO<sub>4</sub>-Pの溶出濃度は嫌気の場合(図-10a)が好気の場合(図-10b)より高い値を示した。上・中・下の3つの底泥層による溶出挙動については、好気の場合には溶出濃度に明確な差はないが、嫌気の場合では実験開始6時間までの段階において上層泥(SL)の溶出量が最も大きかった。リンの溶出が緩慢になった後期においては、その濃度値は中層泥(ML)が最大となり、中・上・下層の順で低下した。また、5℃の場合に比べて20℃の場合の方がPO<sub>4</sub>-Pの濃度が高く(図-10c)、その影響は嫌気と好気の場合ともに確認された。

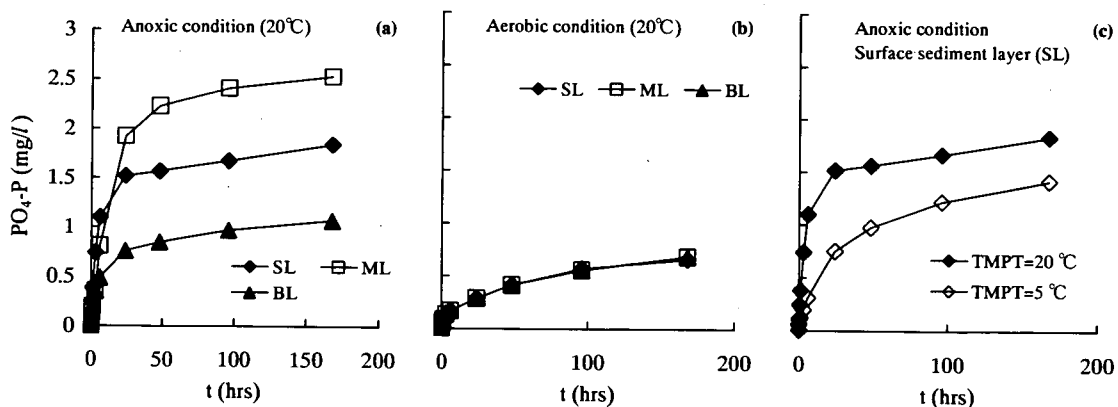


図-10 嫌気と好気条件下におけるPO<sub>4</sub>-Pの溶出濃度の変化

実験初期におけるリンの溶出による水中濃度は直線的に上昇しているケースが多かったため、直線回帰分析を行い、得られた勾配係数をリンの溶出速度係数とした。いずれの底泥においても、PO<sub>4</sub>-Pの溶出速度係数は、好気の場合に比べて嫌気の場合の方が、また、5℃の場合に比べて20℃の場合の方が大きいことから、リンの溶出速度は嫌気と高い温度の条件下で促進されることが確認された(図-11)。

リンの溶出が緩慢になった時点(今回の実験では開始から 168 時間後)での容器内の底泥からのリンの溶出量と底泥中リンの実験開始時の含有量との比を見かけの「溶出ポテンシャル」として求めたところ、底泥中リン(1.33~2.2 mg P/g-dry)の溶出ポテンシャルは上・中・下 3 層の平均値として、それぞれ 34% (嫌気/20℃), 10% (好気/20℃), 24% (嫌気/5℃), 3% (好気/5℃)となった。これは上層泥で嫌気/20℃の場合を例にしてみると、底泥中の無機態リン<sup>3)</sup>(Al, Fe, Ca の結合型, 0.65mg P/g-dry)の約 100%, 交換可能なリン<sup>3)</sup>(無機態+有機態, 0.85mg P/g-dry)の約 75%に相当する値となっている。

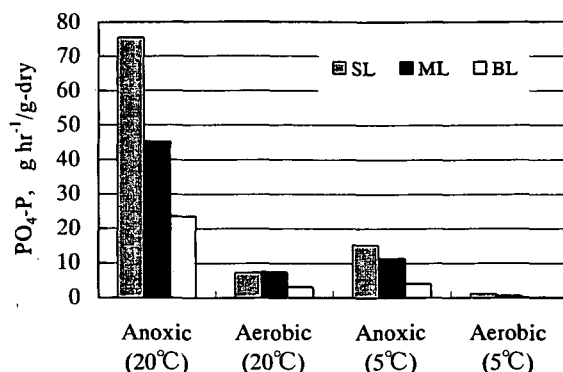


図-11 底泥からのPO<sub>4</sub>-Pの溶出速度係数

### 3. まとめ

本研究は、底泥からの栄養塩溶出量の推定手法を検討するため、貯水池における現地調査と溶出試験など室内実験を行った。また、回分試験を実施し、水温、溶存酸素などの諸因子が溶出速度に及ぼす影響を定量的に評価することで溶出機構の検討を行った。これらの検討から以下のことが明らかになった。

- 1) 14 年度ほど明確ではないものの、高濃度酸素水の供給、停止実験を行った現地観測から、D0 が高く好気的環境に保たれていた時に比べ、高濃度酸素水の供給停止後に D0 濃度の低下とともにリン濃度が増加する傾向が見られるが、窒素については大きな変化は見られなかった。
- 2) 嫌気的な条件での室内静置溶出試験からは、酸素供給前後に採取した底質試料の間で、窒素の溶出速度に変化はなく、同一の実験環境下では溶出が同程度であった。
- 3) 深さの異なる底質を用いた振とう回分溶出試験の結果から、好気的環境下ではリン溶出濃度が低く、また上層、中層、下層の底質間での溶出濃度の差も小さかった。
- 4) 嫌気的環境下の振とう回分溶出試験の結果、リンの溶出濃度は、嫌気と比較的高い温度の条件下では促進されることが示された。

今後も現地で底層水や底泥の酸化還元状態の確認を水温・D0 等のセンサにより行い、サンプリングによる水質及び底質の分析結果と併せて現場の溶出状況を把握し、栄養塩類の溶出量推定に必要な現地観測手法の確立を目指す予定である。また、底質中の栄養塩類濃度やリン溶出に関連が深いと考えられている底質中の金属イオン濃度と、静置溶出試験や振とう回分溶出試験の結果を検討し、栄養塩の溶出量推定のための室内試験法を確立し、溶出試験系の体系化を図っていく予定としている。

なお、本調査研究は、運営交付金（治水勘定）により実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 佐々木稔, 田中宏明, 李建華, 和田順之輔, 中村圭吾, 柴田省三, 田中克知, 福井真司: 底層環境改善のためのモニタリング技術と活用, 学会誌「EICA」, Vol.7, No.2, pp237-240, 2002.11.
- 2) 李建華, 天野邦彦, 鈴木宏幸, 安田佳哉: リンの溶出に及ぼす巻き上げの影響に関する実験的解析, 第 34 回日本水環境学会年会年会講演集, p.492, 2000.3
- 3) 土壤養分測定法委員会: 土壤養分分析法, pp.225-239, 1997

### 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チーム 首席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
津森ジュン  
専門研究員 李 富生  
交流研究員 壬生 勝泰

#### 【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 15 年度は、水環境中に与える影響が大きいと考えられる下水を対象としてエストロゲン抱合体の分析法の開発と、河川及び湖沼の水中、底質中におけるエストロゲン、ノニルフェノール類の実態調査と底質中におけるエストロゲンの挙動に関する室内実験を行い、次のことが明らかになった。

- 1) LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体の分析法を開発した。下水に対するエストロゲン遊離体及びその抱合体の添加回収試験の結果、遊離体の回収率は 94~120%と良好な結果が得られたが、抱合体については回収率が低かった。
- 2) 手賀沼で水中、表層底泥中のエストロゲン、ノニルフェノール類の水平分布を調査した。NP は流下方向で増加傾向にあり、一方、エストロゲン、NPEO、NPEC は流入河川河口付近で最大となり流下方向では低下傾向にあった。これは、内部生産により増加した藻類など懸濁物質への吸着、沈降機構が寄与しているものと考えられた。
- 3) 三春ダム前貯水池の底泥に E2 を添加し、振とう装置を用いた生物分解試験を行った。底泥位置や水温、好気嫌気などの実験条件による相違を検討した結果、中層、下層に比べて上層底泥の方が、E2 の分解が早く、分解速度係数が著しく大きかった。

キーワード：NP, NPEO, NPEC, エストロゲン, 河川水, 底泥, 挙動, 生分解

#### 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 $\beta$ -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、環境水中でのこれら物質の挙動を把握するため、流域の汚水処理形態等に着目し、異なる流域（多摩川、大津川）で実態調査を実施するとともに、底質については千葉県の手賀沼と福島県に近年建設された三春

ダムの前貯水池底質を対象にした実態調査と室内実験を行った。さらに前処理、抽出法の改良を行い環境試料に対するエストロゲン関連物質の機器分析手法を開発した。

#### 2. 研究の内容

##### 2.1 エストロゲン抱合体の分析法開発

水試料を対象とした調査として下水道におけるエストロゲンの挙動把握についての調査<sup>1)</sup>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。下水道、河川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、人あるいは動物の体内から排泄されるエストロゲン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の報告例<sup>2) 3)</sup>は少ない。本研究は、河川及び下水試料を対象とした抱合体を含むエストロゲンの分析法について LC/MS/MS による検討を行ったものであり、(独) 土木研究所と帝人エコーサイエンス(株)が「共同研究」として実施した。

##### 2.1.1 分析方法

###### 1) 標準物質を用いた検討

本研究では、遊離体のエストロゲンとして E1, E2, EE2 に合わせてエストリオール（E3）及び E1, E2, E3 の硫酸抱合体（S）、グルクロン酸抱合体（G）について検討を行った。標準物質のメタノール溶液を用い表-1 に示す



LC/MS/MS の測定条件により測定再現性を確認した。

表-1 LC/MS/MS 測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100		
	カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 2.1φ × 150mm, 40°C		
	移動相	アセトニトリル:1mM NH <sub>4</sub> OH = 6:4 0.14ml/min		
	注入量	10 μl		
MS/MS	装置	TSQ API-2		
	イオン化	ESI, 負イオン検出		
	コリジョンガス	Arガス		
	測定イオン (コリジョンエネルギー)	E1	269 → 145	(50eV)
		E2	271 → 145	(45eV)
		E3	287 → 171	(45eV)
		EE2	295 → 145	(45eV)
		E1-S	349 → 269	(40eV)
		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-diS		431 → 351	(35eV)	

S: 硫酸抱合体 G: グルクロン酸抱合体 diS: 二硫酸抱合体

## 2) 精製水, 下水試料を用いた検討

精製水, 河川水よりも分析条件の悪い二次処理水と流入水を用いて添加回収試験を行った。各試験水に一定量のエストロゲンを添加し以下の分析操作を行った。

試料をガラス繊維ろ紙 (GF/B) を用いてろ過する。残渣は, MeOH で抽出し, ろ過試料と合わせる。MeOH 抽出液を合わせたろ過試料を Oasis HLB カートリッジに通水後, MeOH で溶出する。N<sub>2</sub> ガスによる乾固後, ヘキサン/ジクロロメタンで溶解する。これを Florisil カラムに通しクリーンアップする。NH<sub>4</sub>OH/アセトンで溶出後, N<sub>2</sub> ガスにより乾固し MeOH に再溶解する。次に NH<sub>2</sub> カラムに通しクリーンアップする。MeOH により溶出し, 乾固後, アセトニトリル/水で溶解し LC/MS/MS で遊離体を測定する。MeOH 溶出済みの NH<sub>2</sub> カラムを NH<sub>4</sub>OH/MeOH で溶出し, 乾固後, アセトニトリル/水で溶解し LC/MS/MS で抱合体を測定する。

### 2.1.2 分析結果

#### 1) 標準物質を用いた検討

各エストロゲン及びその硫酸抱合体, グルクロン酸抱合体のメタノール標準液 (2μg/l) の繰り返し測定結果から標準偏差 (s) を求めた。3s を検出下限値と定義するとエストロゲン及びその抱合体の検出下限値は, 0.07~0.5μg/l であった (表-2 参照)。実試料 (流入水, 二次処理水) の分析では, 抽出・精製の前処理により流入水で1,000倍, 二次処理水で2,000倍濃縮されることから, 実試料における検出下限値は, 流入水では0.07~0.5ng/l,

二次処理水では0.04~0.3ng/l となる。

表-2 標準液の繰り返し測定結果(n=7)

		平均値		3s	
E1	2.2	0.19	E1-S	2.1	0.07
E2	2.0	0.43	E2-S	2.4	0.11
EE2	1.8	0.50	E3-S	2.1	0.08
E3	2.5	0.31	E1-G	2.0	0.36
E2-S&G	2.2	0.35	E2-G	2.1	0.43
E2-diS	1.9	0.30	E3-G	1.9	0.39

単位: μg/l

## 2) 精製水, 下水試料を用いた検討

精製水 (添加濃度 40ng/l), 二次処理水 (添加濃度 40~100ng/l), 流入水 (添加濃度 70~200ng/l) に対する添加回収試験の結果を図-1 に示した。精製水, 二次処理水, 流入水とも遊離体の回収率は 94~120% で良好な結果が得られたが, 抱合体 (特に E<sub>3</sub>-S, E<sub>1</sub>-G, E<sub>2</sub>-G, E<sub>3</sub>-G, E<sub>2</sub>-S&G, E<sub>2</sub>-diS) については回収率が50%にも満たず, さらに検討が必要な結果となった。

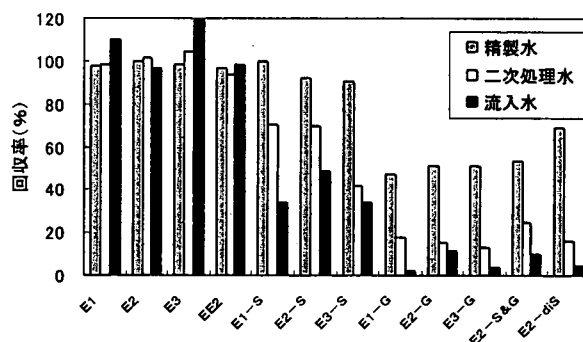


図-1 下水試料中のエストロゲン測定結果

エストロゲン抱合体の分析法開発を下水試料 (流入水, 二次処理水) を用いて検討を行ってきたが, 河川水等へ本分析方法を適用する場合に当たっては水質が同レベルである二次処理水と同等の検出下限値, 回収率が得られるものと考えられる。

## 2.2 ノニルフェノール類, エストロゲンの水域での挙動に関する調査

流域から水域に排出される内分泌攪乱化学物質が水域でどのように挙動するのか検討するため, 湖沼及びその底泥中における物質の蓄積状況を調査した。湖沼に関する報告事例は少なく, その実態は不明な点が多い。調査は, 人間活動の影響を強く受けている手賀沼においてエストロゲン (E2, E1, E3, EE2), ノニルフェノール類 (NP, NPnEO, NPnEC) について表層底泥, 湖水の流下方向の分布状況を測定した。

### 2.2.1 調査方法

試料採取は2003年3月に、図-2に示すSt.1からSt.7の7地点において行った。調査地点は大津川の流入河口から手賀沼流出河川である手賀川まで、公共用水域水質調査地点を含み、流下方向を考慮して選定した。

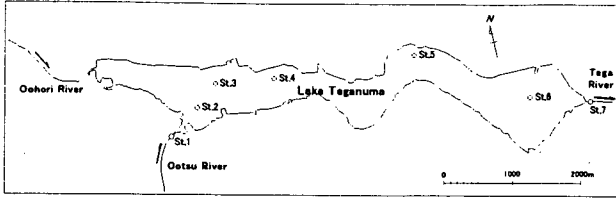


図-2 調査地点

表層底泥試料は潜水作業によりアクリル製パイプ（直径 10cm×高さ 100cm）を用いて不攪乱状態で採取した

もののうち表層 10cm を用いた。

底質分析<sup>4)</sup>は、一般項目（密度、含水率、強熱減量IL、全有機炭素 TOC、全窒素 TN、全リン TP、硫化物 T-S）、エストロゲン（E2, E1, E3, EE2）、ノニルフェノール類（NP, NPnEO, NPnEC）とした。エストロゲンの分析は LC/MS/MS を用いて行い、NP、NPnEO 及び NPnEC の分析はそれぞれ固相抽出 GC/MS 法を用いた。

湖水試料は、水深 10cm~30cm 程度の表層で採取し、分析<sup>4)</sup>は、一般項目（SS, VSS, COD<sub>Mn</sub>, TOC, TP, TN, クロロフィル a (Chl-a)、糞便性大腸菌、塩素イオン、pH, DO、水温、電気伝導率）と底質と同じエストロゲン、ノニルフェノール類とした。エストロゲンの分析は LC/MS/MS を用いて行った。NP、NPnEO の分析は HPLC を用いて行い、NPnEC の分析は LC/MS/MS を用いて行

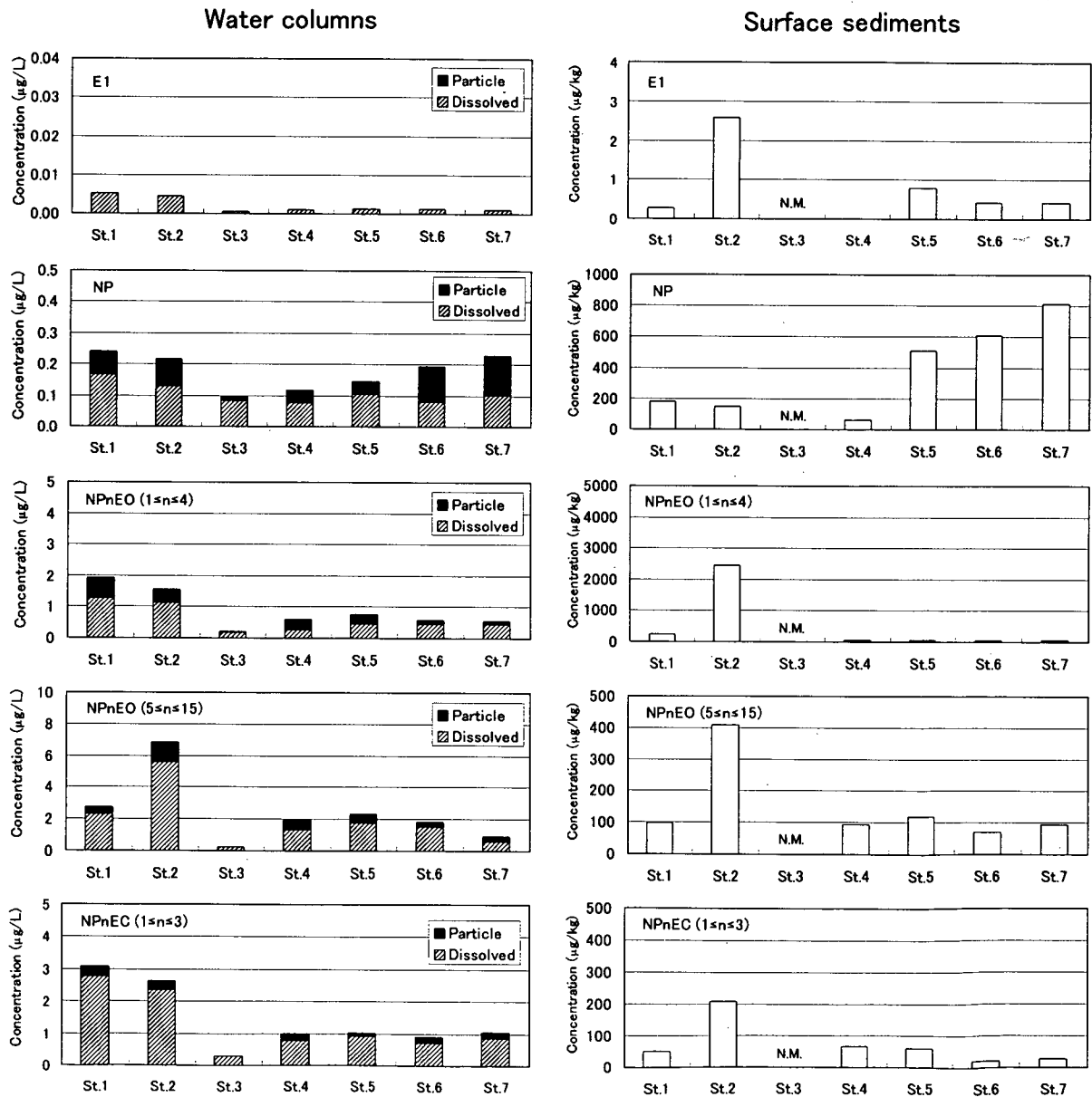


図-3 表層底泥中及び湖水中のエストロゲン、ノニルフェノール類の流下方向の分布

った。なお、湖水試料のエストロゲン、ノニルフェノール類の分析にあたっては、ガラス繊維ろ紙 (GF/B) により試料をろ過し、残渣を超音波抽出したものとろ液とを別々に測定し、各物質を懸濁態成分と溶存態成分に分けて検討した。

## 2.2.2 調査結果

### 1) エストロゲン、ノニルフェノール類の水平分布

表層底泥中及び湖水中のエストロゲン、ノニルフェノール類の調査結果を図-3 に示す。

E3 及び EE2 は全ての表層底泥と湖水で検出されず、E2 は St.1 と St.2 のみ検出下限値程度で検出された。

表層底泥中の E1, NPnEO, NPnEC 濃度は、いずれも St.2 で最も高く、E1 が 2.57  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ , NPnEO ( $1 \leq n \leq 4$ ) が 2,457  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ , NPnEO ( $5 \leq n \leq 15$ ) が 409  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ , NPnEC ( $1 \leq n \leq 3$ ) が 208  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$  であった。NP は大津川河口付近の St.1 で 179  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ , 手賀大橋直上の St.4 では 62  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$  と一旦減少するが、それから下流に向かい徐々に増加し、手賀川へ流出する直前の St.7 で最も高い 812  $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$  であった。

一方、湖水中の E1 については、ほとんどが溶存態成分であり、溶存態成分と懸濁態成分を合わせた濃度は 0.5 (検出下限値) ~ 5.1  $\text{ng}/\text{l}$  の範囲であった。また、NP が 0.10~0.24  $\mu\text{g}/\text{l}$  (14~59%), NPnEO ( $1 \leq n \leq 4$ ) が 0.2~1.9  $\mu\text{g}/\text{l}$  (16~56%), NPnEO ( $5 \leq n \leq 15$ ) が 0.3~6.8  $\mu\text{g}/\text{l}$  (0~32%), NPnEC ( $1 \leq n \leq 3$ ) が 0.3~3.1  $\mu\text{g}/\text{l}$  (4~22%) の範囲であり、括弧内は懸濁態成分の割合を示す。NP, NPnEO ( $1 \leq n \leq 4$ ) は、E1, NPnEO ( $5 \leq n \leq 15$ ), NPnEC ( $1 \leq n \leq 3$ ) と比較して懸濁態成分の割合が高かった。

物質ごとに表層底泥、湖水における分布が異なる理由は、それぞれ懸濁物質への吸着性が異なること、また、場所により懸濁物質の存在量と由来が異なることで吸着特性も変化するためと考えられた。例えば図-4 に示す湖水中の VSS, Chl-a を見ると、手賀沼下流部ほど値が高く、内部生産による藻類を主体とする有機物の濃度が下流ほど増加することが分かる。

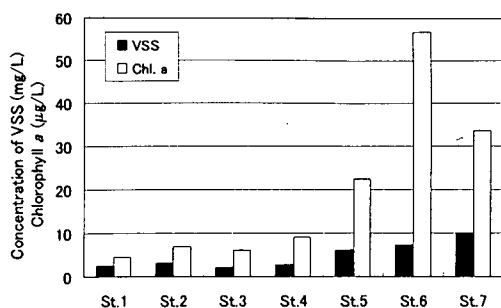


図-4 湖水中の VSS, SS の流下方向の分布

今回の表層底泥中の物質の空間分布は以下のようなシナリオで形成されると考えられる<sup>4)</sup>。晴天時には生活系や産業系等の陸域由来の懸濁物質の流入に加え、内部生産による流下方向への藻類由来の懸濁物質の増加が見られる。湖水中の NP は、流入した陸域からの懸濁物質の沈降が一旦起こるが、その後、藻類の増殖により形成された有機物に吸着し下流方向に運ばれ、その一部は沈降し、湖の表層底泥に再び堆積する。これにより、表層底泥中の NP は手賀沼の流下方向に向かって次第に高くなる分布を形成すると推測される。

NP は E1, NPnEO, NPnEC に比べオクタノール水分分配係数が大きいことから、藻類由来の懸濁物質に吸着しやすいと考えられ、これは観測された現象と一致していると考えられた。

また、降雨時には初期流出によって、流域から大量の SS が湖内に流出する<sup>5)</sup>が、湖内への流入で流速が急落し河口付近に SS が多量に沈降する。E1, NP, NPnEO, NPnEC は SS に吸着・沈降し、流入河川河口付近に比較的高い濃度分布を形成するものと考えられる。

こうしたことから、今後、水環境中での SS を始めとする微細粒子などが微量化学物質の動態にどのように関与するのか検討する必要がある。

### 2.3 エストロゲン、ノニルフェノール類の底泥中の挙動に関する調査

流域から排出される生活排水中に存在する E2 や E1 などのエストロゲン様物質の多くは下水処理場内において除去されるが、処理プロセスの管理や運転条件によっては、その一部が放流水に残存したままで河川や湖沼などの水域に排出される。これら排出された物質は 2.2 で述べたように水や底泥への移行のほか、水中及び底泥中での物理的、化学的、生物的な因子により、その挙動が決まると考えられる。

これまでにエストロゲン様物質の水域における実態調査は幾つか行われているが<sup>6)</sup>、様々な微生物が多量に生息する底泥における挙動に関しては未だに検討されていない。そこで、エストロゲン、ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出や底泥での分解など底泥に係わる現象の解明のため実態調査と室内実験を行った。

調査は都市化による流域の変化が激しい手賀沼と、都市化の影響を受けず社会的な変化も小さい、かつ最近のダム建設により新たに堆積が始まった三春ダムの牛糞前貯水池を対象に、手賀沼の底泥はエストロゲン、ノニルフェノール類の鉛直分布を調査し、牛糞前貯水池の底泥は回分式実験により E2 の分解特性を検討した。

### 2.3.1 手賀沼底泥中の鉛直分布

エストロゲンとノニルフェノール類の底泥中の鉛直分布を調べるため、2.2 で述べた表層の堆積濃度が高い大津川河口付近の調査地点 St.2 において、潜水作業によりアクリル製パイプ（直径 10cm×高さ 100cm）を用いて底泥柱状試料を不攪乱状態で採取した。分析は表層から深さ 50cm までは 1cm 毎に分割し、50cm 以深 87cm までは 10cm 毎に分割した。また、底泥の堆積履歴を検討するため底泥の年代測定を行った。底泥の堆積年代測定は、底泥柱状試料を 5cm に切り乾燥した後、Pb-210 法と Cs-137 法により行った。

エストロゲンの鉛直分布を図-5 に示す。また、併せて、14 年度に調査した St.6 の鉛直分布を示す。

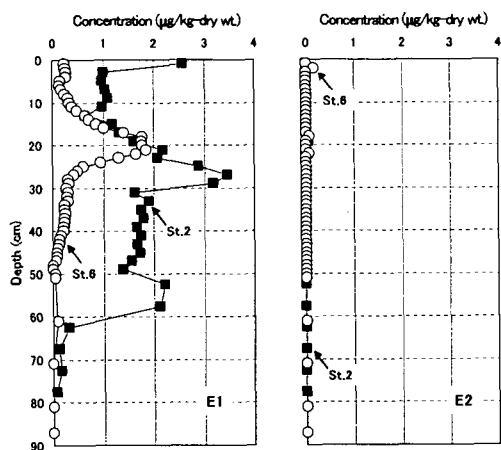


図-5 手賀沼底泥中の E1 及び E2 の鉛直分布

E2 はほとんど検出されず、また E3 及び EE2 は全く検出されなかった。E1 については、大津川河口付近の St.2 では、深さ 27cm, 55cm で濃度ピークが存在し、14 年度調査の手賀沼流出付近の St.6 では、深さ 20cm のみにピークが存在した。底泥中にこの様な濃度ピークが存在す

ることは、堆積底泥中では E1 が分解を受けにくい物質であることを強く示唆している。同じ深さ同士で E1 濃度を比較した場合、20cm の深さを除いては、St.6 に比べ St.2 の方が高かった。最も高い E1 濃度は St.2 で 3.5 μg/kg-dry (深さ 27cm), St.6 で 1.8 μg/kg-dry (深さ 30cm) であった。これは、中田ら<sup>9)</sup>が東京湾で行った調査で測定した E1 より一桁小さい値であった。

次に、底泥中のノニルフェノール類の鉛直分布を図-6 に示す。エストロゲンと同様に、14 年度に調査した St.6 の鉛直分布を併せて示す。

St.2 における NP 濃度は、36 μg/kg-dry から 21 mg/kg-dry の範囲であった。20cm 以深では、St.2 の NP 濃度の方が St.6 より高く、20cm 以浅では逆に St.6 の方が高かった。また、St.2 における NPnEO の底泥中濃度は最大 2.5 mg/kg-dry, NPnEC の底泥中濃度は最大で 1.4 mg/kg-dry であった。St.6 における NPnEO と NPnEC の底泥中濃度は、どの深さにおいても St.2 に比べ低い濃度であった。

### 3) 手賀沼底泥の堆積年代測定

図-7 に St.2 の底泥柱状試料の年代測定結果を示す。

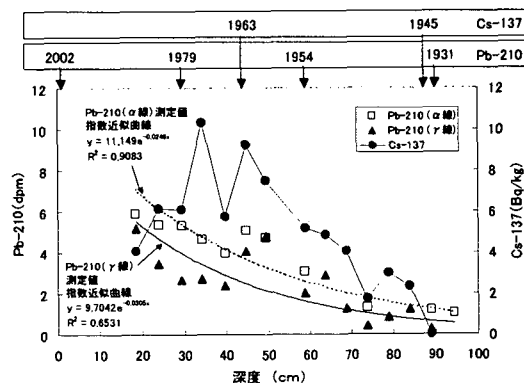


図-7 手賀沼底泥中の堆積年代測定結果

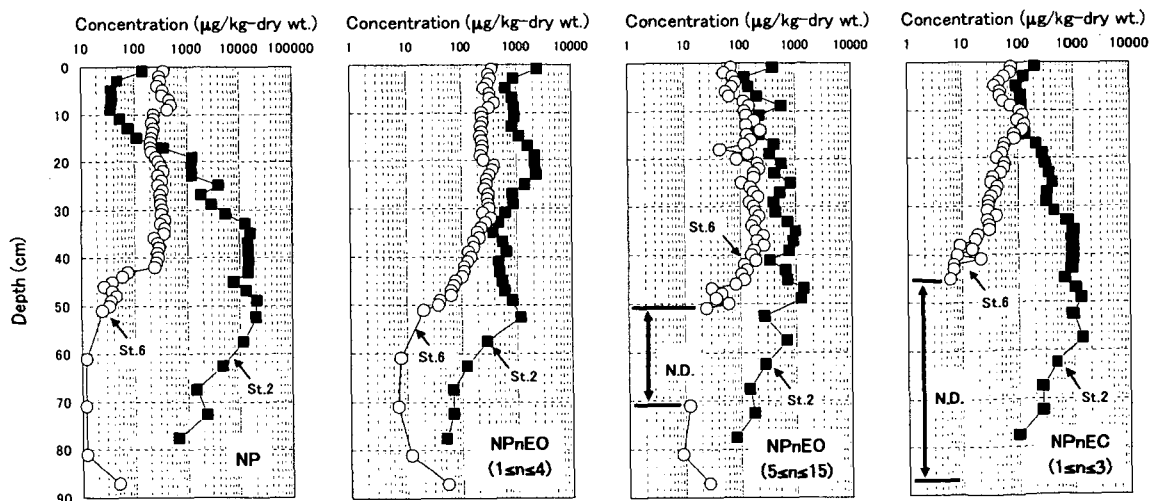


図-6 手賀沼底泥中の NP, NPnEO, NPnEC の鉛直分布

年代測定は、Pb-210 法と Cs-137 法により行った。なお、Pb-210 については、 $\alpha$ 線放射と $\gamma$ 線放射の両方の測定を行い、Cs-137 については、 $\gamma$ 線放射の測定を行った。表層付近(深さ0~15cm)は、ばらつきが大きいので、この3点の測定結果を除いて、堆積速度を求めた<sup>7)</sup>。

この結果、Pb-210 の $\alpha$ 線測定値の指数近似曲線の相関が高く( $R^2=0.9083$ )、また、 $\gamma$ 線測定値による推定結果と比べCs-137 による堆積年度の推定結果と近いので、このPb-210 の $\alpha$ 線測定値から堆積速度を求めたところ1.27cm/年であった。これは、14年度に土木研究所が測定したSt.6の堆積速度や濱田の報告<sup>8)</sup>に近い結果であった。これより、St.2の底泥中のE1濃度が急激に増加している深さ60cmは1950年代半ばとなり、流域人口が増加し始めた時期に対応していると考えられた。また、E1濃度のピークである27cmは1980年となり、手賀沼流域で1981年に流域下水道が供用開始した前年に相当する。このため、この層より浅い層での濃度低下は、下水道整備により下水が手賀沼をバイパスした効果と考えられた。

### 2.3.2 貯水池底泥微生物によるE2の分解特性

エストロゲンの底泥中での移動・拡散・変換などの挙動の解明を目的とし、底泥微生物によるE2の分解特性を実際の貯水池の底泥を用いて回分式実験により検討した。

#### 1) 実験用底泥とE2原液の調整

三春ダム牛糞前貯水池の水質・底泥調査地点A<sup>9)</sup>を対象に、平成15年12月20日と平成16年1月17日にコア採泥器にて採取した底泥(厚さ約35cm)を窒素雰囲気の中なかで2cmづつ切り出し、その表層(SL, 0~2cm)、中層(ML, 14~16cm)及び下層(BL, 28~30cm)を試料に用いた。試料はそれぞれ遠心分離(3,000rpmで5分)した後、上澄み液を捨てた残りを「遠沈泥」として実験に供した。また、底泥粒子へのE2の付着性を調べるため、中層遠沈泥の一部をオートクレーブにて滅菌処理(120℃で30分間)した。本実験ではE2を唯一の炭素源として添加しており、市販E2標準物質約20mgをMilli-Q水1lに計り取り、室温10℃の恒温槽で24時間攪拌した後、0.2 $\mu$ mのメンブレンフィルターでろ過し、得られたろ液を添加用原液とした。なお、その濃度は0.6mg/lと定量した。

#### 2) 回分式分解実験

回分式分解実験は、それぞれ平成15年12月20日と平成16年1月17日に採取した遠沈泥を用いて振とう培養器にて行った。二回の実験ともRun1~Run20とし、嫌気と好気、20℃と5℃の条件下における上・中・下層の3つの底泥層によるE2分解挙動を比較した。

一回目(12月20日試料)の実験では、底泥微生物の活性の有無による違いを評価するため、滅菌処理した底泥試料を用いた実験系を、二回目の実験(1月17日試料)では底泥微生物による硝化反応を促進させるため、NH<sub>4</sub>-Nを添加した。E2分解に伴って生成するE1の挙動を追跡するため、2回目実験では上層の遠沈泥を用いた20℃の4つの実験系(好気と嫌気)について、後半の運転開始約290時間後にE2を再添加するとともに、NO<sub>3</sub>-N(嫌気の場合)又はNH<sub>4</sub>-N(好気の場合)の添加を行った。

いずれの実験も遠沈泥2gを200ml(一回目の実験の場合)と300ml(二回目の実験の場合)のpH調整済みのMilli-Q水(嫌気の場合では脱酸素済みのMilli-Q水)を入れた容器(500mlの三角フラスコ)に加え、その後E2が30 $\mu$ g/lになるようにE2原液を素早く添加し、反応器を10秒程度激しく振り混ぜたのち振とう培養器にセットした。振とう培養は、光を遮断した条件下で120rpmの回転速度で開始した。一定時間後に反応器から混合溶液を採取し、遠心分離後(3000rpmで3分間)、ろ過(0.45 $\mu$ mのPTFEフィルター)の後に、ろ液中のE2、E1およびE3の濃度を内部標準LC/MS/MS分析法から定量した。

### 2.3.2 実験結果

#### 1) E2の経時変化の動き

嫌気及び20℃の場合におけるE2濃度の経時変化を例にして図-8に示す。E2濃度は時間の増加に伴って低下し、その割合は運転初期において大きく、中層と下層の遠沈泥に比べて上層の底泥の方が大きくなっている。

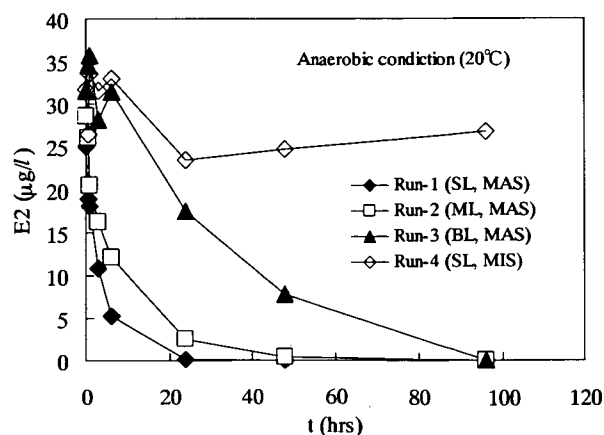


図-8 嫌気及び20℃におけるE2の経時変化

オートクレーブにて不活化処理した底質(Microbe Inactivated Sediment, MIS)を用いた実験Run4では、E2は残留率として約80%の濃度レベルに収束した。不活化処理をしていない底質(Microbe Activated Sediment, MAS)を用いたRun1~3との比較から、底泥中におけるE2の挙

動は物理作用・化学的付着・吸着反応によるよりも生物的反応によって制御されていることが示された。図-9に示す温度の影響をみると、5℃の場合に比べて20℃の場合の方がE2濃度の低下が速く、その影響は上層に比べて中層・下層の底泥の方で大きくなっている。上・下層底泥の鉛直方向の深さの違いは30cmであり、かつVSS、N、P、Cなどの底質性状指標値に大差はなかったため、E2分解性の底泥位置での違いは主に底泥の生息微生物密度や種類に起因するものと推察された。

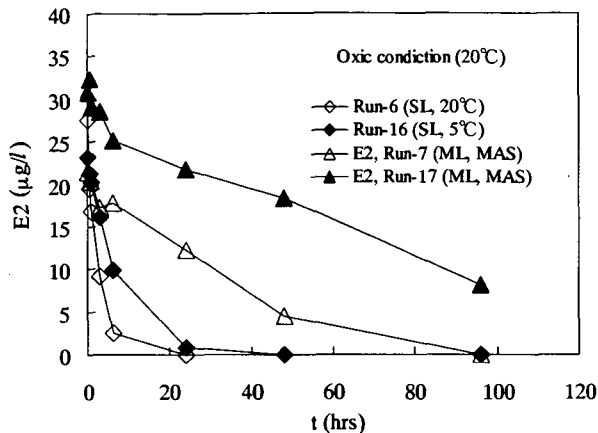


図-9 E2の挙動に及ぼす温度の影響(好気)

E2が分解されるとE1が形成されるが、形成されたE1は好気条件の場合では活性汚泥の場合<sup>10)</sup>のように、検出下限値以下になり、そのまま低下した。しかし、嫌気条件の場合では、図-10のように、E1の生成・消失が繰り返されたことから、分解のほかに底泥中微生物によるE1の吸着、脱着や蓄積、放出などの機構の関与が示唆された。E2再添加の場合にも、添加したE2は速やかに分解されたが、その分解速度は嫌気の場合ではNO<sub>3</sub>-Nを添加した方が、好気の場合ではNH<sub>4</sub>-Nを添加した方が大きくなった。E3はどの実験においても検出されなかった。

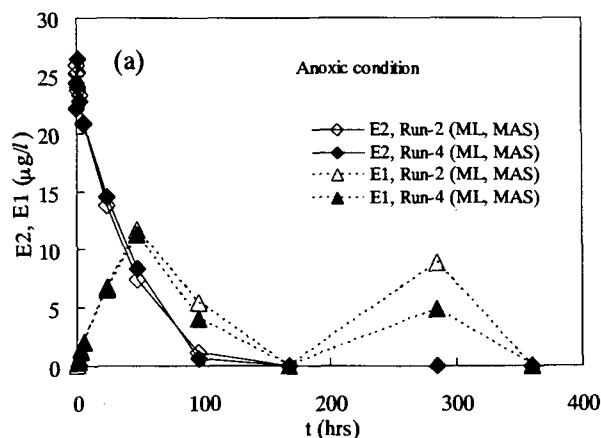


図-10 E2とE1の経時変化及び実験の再現性

## 2) E2の分解速度係数

E2濃度の経時変化を生分解の一次反応と仮定した場合(図-11)の分解速度係数( $k$ )は図-12のように推定された。

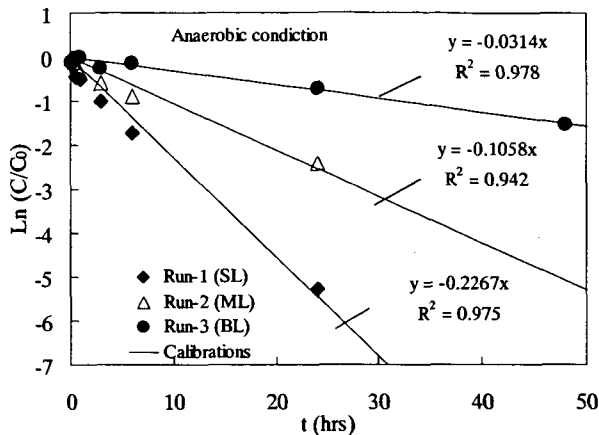


図-11 生分解一次反応式による解析

E2の分解速度係数( $k$ )の値は上層に比べて中層・下層の底泥の方が、また20℃に比べて5℃の場合の方が小さくなっている(図-12a)。また、上層の底泥を用いた場合、 $k$ の値は好気の場合が嫌気の場合により2倍ほど大きくなっている。実験開始287.5時間後にE2を再度添加した実験系では、嫌気と好気とも、 $k$ の値はE2を最初に添加した場合を上回った(図-12b)。

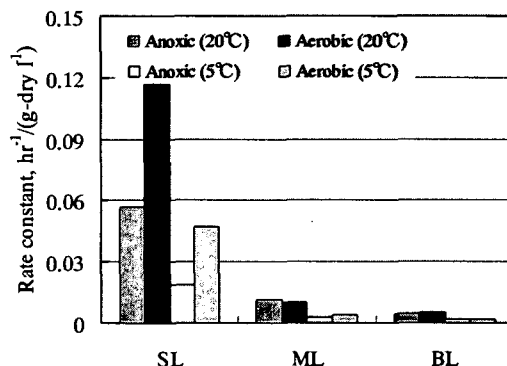


図-12(a) 分解速度係数(二回目試料のE2当初添加)

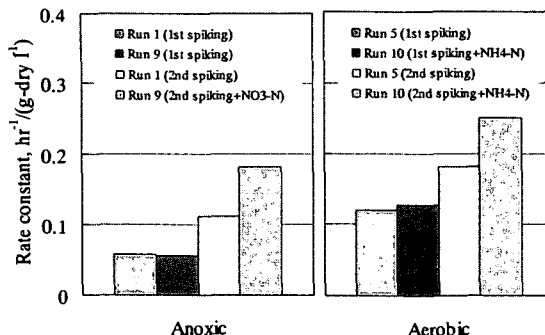


図-12(b) 分解速度係数(二回目試料のE2再添加)

また、底泥微生物の脱窒・硝化効果に随伴するように、嫌気の場合では $\text{NO}_3\text{-N}$ 、好気の場合では $\text{NH}_4\text{-N}$ をE2と同時に添加するに従い、分解速度係数が大きくなった。

今後は、異なる性状を持つ底質を用いて同様の実験を行い微生物に着目した底泥中の内分泌攪乱物質の変化機構について検討を進める。

### 3. まとめ

本研究では、エストロゲン抱合体の測定法及び内分泌攪乱物質の水環境中での挙動及び底質中の挙動について検討を行い、以下の結果を得ることができた。

1) 環境水中の下水に対するエストロゲン抱合体の添加回収試験の結果から、回収率が低いことより更なる検討を要することが分かった。

2) 手賀沼を対象に平面的な底質への蓄積状況を調査した結果、エストロゲン、NPnEO及びNPnECについては、大津川河口地点で最も高濃度になっていたが、流下方向に従って低下していった。しかし、NPはそれら物質とは異なり、湖沼の流下方向に従って濃度が高くなっていた。この理由として流下方向で増殖した藻類などの有機物にNPが吸着しやすいことが関連しているものと考えられた。

3) 同じ湖沼の下流調査地点の結果と同様に大津川河口地点でもE1濃度はある深さにピークが見られるが、その深さは下流地点とは異なっており、これは堆積過程の相違に基づくものと推察された。底泥年代測定の結果から、流域の人口、下水道などの排出機構の変化はE1、ノニルフェノール類の底泥中鉛直分布に大きく影響を与えていることが推察された。

4) 三春ダム前貯水池の底泥試料にE2を添加した振とう生物分解試験の結果より、底泥位置、水温及び好気嫌気などの条件によりE2の分解挙動が変化することを確認した。この結果、E2の分解には底泥中に生息する微生物の作用が大きいことが示唆され、その分解速度は中層・下層の底泥に比べて上層の底泥の方が、また5℃に比べて20℃の方が著しく早かった。また、E2の分解過程においてE1が形成され、形成されたE1が嫌気的条件下では生成と消失が繰り返され、底泥中に生息する微生物による吸着、蓄積、脱着や放出などの機構の関与が示唆された。

今後は、エストロゲン、ノニルフェノール類について、河川内での分解や変化の要因について検討を進めるとともに、水中、底泥中における微細粒子との吸着、微生物による分解について更に検討を進める予定である。

なお、本調査研究は運営交付金(一般勘定)により実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 国土交通省：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，2001
- 2) 辻村 他：LC/MS/MSによる環境中エストロゲン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.58-59，2000
- 3) 石井 他：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.514-515，2002
- 4) Mibu K. *et al.* : Distribution of estrogen, nonylphenol and its derivatives in the sediments of a shallow lake, *Wat. Sci. Technol.* (in press).
- 5) 壬生勝泰 他：下水道整備途上の流域での汚濁負荷流出の変遷に関する研究，土木技術資料，第45巻，10号，pp.46-51，2003
- 6) 中田典秀 他：「東京湾堆積物中の女性ホルモン，環境ホルモン，女性ホルモン活性の平面および鉛直分布」，第10回環境化学討論会講演要旨集，pp.132-133，2001
- 7) Robbins, J. A. *et al.* : Determination of recent sedimentation rates in Lake Michigan using Pb-210 and Cs-137, *Geochim. Cosmochim. Acta.*, Vol. 39, pp.285-304, 1975
- 8) 濱田崇臣：「湖沼堆積物を用いた手賀沼の環境変遷の検討(その2) - 鉛-210法・セシウム-137法による年代測定と珪藻化石による手賀沼の環境変化 -」，電力中央研究所報告書，1998
- 9) 佐々木稔 他：底層環境改善のためのモニタリング技術と活用，学会誌「EICA」，Vol.7, No.2, pp.237-240, 2002
- 10) Temes TA *et al.* : Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *Sci. Total. Environ.*, 225, 91-99, 1999

## 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調査

水循環研究グループ水質チーム 田中 宏明  
宮島 潔  
東谷 忠  
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、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。

本研究では、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で、下水処理水やその放流先の都市河川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、下水中のエストロゲン様活性の濃度レベルを明らかにするとともに、化学分析結果と比較することによって現在測定しているエストロゲンやエストロゲン様物質のエストロゲン様活性への寄与を検討した。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。<sup>1)</sup>

平成 15 年度は、水試料の分画抽出について、より分解能の高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による手法の検討を行った。また、現地魚類暴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. 調査方法

#### 2. 1 組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定

##### 2. 1. 1 水試料の固相抽出法による濃縮

水試料 1L を GF/B (保持粒径 1 $\mu$ m) フィルターによってろ過して得たろ液を、Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters 社製、充填量: 360mg) に上向流で通水 (10ml/min) した。このカートリッジを窒素気流下で乾燥させた後、メタノール 10ml で溶出し、抽出液を得た。一方、ろ紙上の残渣はメタノールに浸し超音波抽出 (10分) を 2 回行った後、ろ液の濃縮に使用した前述のカートリッジに通水し、ろ液のメタノール抽出液と合わせた。この抽出液をロータリーエバポレーターによって濃縮し、約 1mL に調整した後、この試料を窒素気流下で乾固し、100 $\mu$ L の DMSO に転溶した。そして遺伝子組み換え酵母法の測定前に滅菌蒸留水によって 5 倍に希釈し、最終的な試料濃縮倍率を 2000 倍とした。

##### 2. 1. 2 遺伝子組み換え酵母法 (Sumpter 株)

遺伝子組み換え酵母は、イギリス Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いた。遺伝子組み換え酵母はエストロゲンやエストロゲン様物質がエストロゲンレセプター (ER) に結合すると  $\beta$ -ガラクトシダーゼが発現するように組み込まれている。

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法については Routledge らの方法<sup>2)</sup>を改良した矢古宇らの方法<sup>3)</sup>に従った。すなわち凍結保存の組み換え酵母菌株を三角フラスコ中の Growth Medium に植菌し、28 $^{\circ}$ C で 24 時間旋回培養した。培養液は、Assay Medium (発色試薬: クロロフェノールレッド  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (CPRG) を含む Growth Medium) に  $4 \times 10^7$  cell/ml となるように添加した。この Assay Medium を 96 穴マイクロプレート (FALCON 社製) の各ウェル内に、180 $\mu$ l ずつ添加し、標準物質 (n=8) および濃縮操作を行った河川試料 (n=3) の希釈系列を作成し、これらを 20 $\mu$ l ずつ添加し、マイクロプレートリーダー (Wallac 社 ARVO SX1420) を用いて吸光度 (550nm, 600nm) を測定した。その後、28 $^{\circ}$ C で 7 日間静置培養し、再度マイクロプレ-



トリーダーで吸光度を測定した。換算値は、以下の換算式に測定値を挿入して算出した。

「換算値＝培養後の OD550 値－(培養後の OD600 値－Blank の OD600 値)」

化学物質のエストロゲン様活性の算出には 17β-エストラジオール濃度とβ-ガラクトシダーゼ活性との用量反応曲線を用いた。すなわち試料のβ-ガラクトシダーゼ活性の最大値と最小値より得られる活性 50%値とそれに対応する E2 の用量反応曲線から得られる EC50 値との比から算出して E2 活性等量値を得た。また試料の 50%作用濃縮倍率が得られない場合は、50%値に近い吸光度から外挿して計算を行った。また試験者間による操作上のばらつきを考慮し、異なる試験者 2 人が測定を行い、その平均値を試料濃度として採用した。

### 2. 1. 3 化学分析

エストロゲン様物質の分析項目は全国実態調査の結果<sup>4)</sup>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、ノニルフェノール (NP) を対象とした。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、ノニルフェノール関連物質) についても測定を行った。

E1 及び E2 については、小森らの方法<sup>5)</sup>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<sup>6)</sup>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<sup>7)</sup>に従い LC/MS/MS を用いて測定を行った。

### 2. 1. 4 理論活性値

上記 3 物質 (E1、E2、NP) のエストロゲン様活性への寄与を算出するため各物質の理論活性値を算出した。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<sup>3)</sup>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 NPnEO 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、昨年度報告した値<sup>1)</sup>を用いた。

### 2. 1. 5 極性の違いによる分画方法の検討

水質チームでは、遺伝子組換え酵母を用いて下水処理水中に含まれる YES を行ってきた。さらに、試料中に含まれる化学物質の物理的性質 (極性) の差差を利用した分画手法を確立した。そして、機器分析、YES、分画手法を用い、処理水中に含まれるエストロゲン活性の原因物質として、天然のエストロゲンの寄与が高いことを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。しかし、検出された活性の一部は機器分析を行った成分だけでは説明がつかず、更なる原因物質解明のための検討が課題となった。

そこで、従来のシリカゲル固相カートリッジ (Waters 社製、充填量：360mg) による分画手法に加え、より分離能が高い HPLC を用いた分画手法の検討を行った。

環境試料の分画の前に、天然のエストロゲンである E1、E2、エストジオール (E3)、E1、E2、E3 の硫酸抱合態化合物 (それぞれ E1-3S、E2-3S、E3-3S)、人工のエストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2)、そしてノニルフェノール (NP) の標準物質を用い、HPLC での分画条件の最適化、分画位置の確認を行った。

## 2. 2 全国一級河川調査結果と流域情報の比較

### 2. 2. 1 全国調査

試料の採取は、国土交通省が実施した「水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査」(以後、全国河川実態調査) に併せて実施した。調査地点を図-1 に示した。平成 11 年から平成 13 年にかけて 94 水系 132 地点で調査を行い、エストロゲン様活性を測定した。

### 2. 2. 2 流域情報の整理

国土交通省が作製した河川流域地図を元に、88 河川の流域データを用いた。各流域内の市町村を流域地図より参照した。参照した市町村面積を面積計 (MT-500V, MT precision) を用いて測定した。各市町村の人口は住民台帳 (平成 14 年 1 月 1 日現在) より得

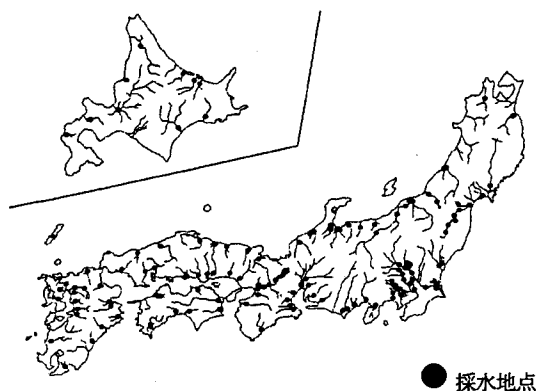


図-1 全国実態調査における採水地点

た。汚水処理整備人口（都市下水道事業、合併浄化槽、農業集落排水処理、コミュニティプラントなど）は国土交通省より得た。得られた情報を計算に用いた。

$$PWF = PPS + PST + PAA + PCP$$

ここで、PWFは汚水処理整備人口、PPSは公共下水道整備人口、PSTは合併浄化槽整備人口、PAAは農業集落排水処理人口、PCPはコミュニティプラント整備人口である。さらに、

$$R_{PWR} = PWF / P_T$$

ここで、 $R_{PWR}$ は流域内の総人口に対する汚水処理整備人口の比であり、 $P_T$ は流域内の総人口である。ここで、単独浄化槽を利用している人口情報が得られなかったため、単独浄化槽利用者人口はPWFには含まれていない。

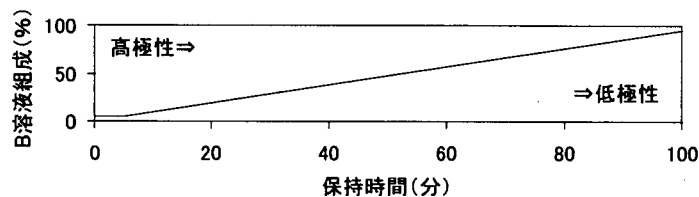
### 3 結果および考察

#### 3.1 組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定結果

##### 3.1.1 HPLCを用いた分画方法の検討

標準物質を用いたHPLC分画条件の最適化を行った。今回の検討では逆相系での分離を検討したため、カラムに導入された化学物質は極性の高いものから溶出し、極性の低い化学物質ほど溶出位置が遅くなる。検討の結果、ほぼすべての成分について分離を行うことができた（図-2）。E1とE2については保持時間が近く、完全に分離することはできなかったが、各物質の寄与は機器分析の結果と比較することにより明らかになると思われる。

a) 溶離液組成



b) クロマトグラム

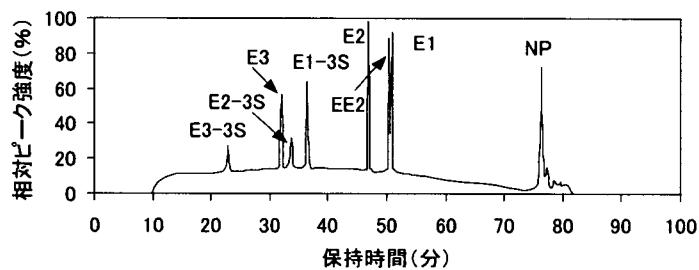


図-2 HPLC を利用した極性分画手法（順相）

溶離液組成: A液(0.1%ギ酸水溶液)  
B液(0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液)  
E1: エストロン、E2: 17β-エストラジオール、E3: エストリオール、E1-3S: E1硫酸抱合化合物、E2-3S: E2硫酸抱合化合物、E3-3S: E3硫酸抱合化合物、NP: ノニルフェノール

表-1 HPLC 分析条件

HPLC	GILSON社製Model321H1						
カラム	Hypersil Green ENV (4.6mm x 250mm)						
流量	1.0mL/min						
検出器	UV (210nm, 254nm)						
移動相	A溶液: 0.1%ギ酸水溶液 B溶液: 0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液						
移動相組成	時間(分)	0	5	100	110	110.1	125
	B溶液(%)	5	5	95	95	5	5
分画条件	試料注入10分後より100分まで1.5分毎(=1.5mL)に採取						

上記の条件を用い、下水処理場の流入下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分をYESに供した。その結果、いずれの試料においてもE1およびE2の溶出位置に高いエストロゲン活性が検出され、さらにE1の寄与が高いことが実測された（図-3）。また、流入下水においてはE1やE2より早い保持時間に活性が検出された。溶

出位置から判断すると、E1-3S の保持時間に近いため、同物質の寄与が考えられるが、今後機器分析の結果と合わせて検討を行っていききたい。

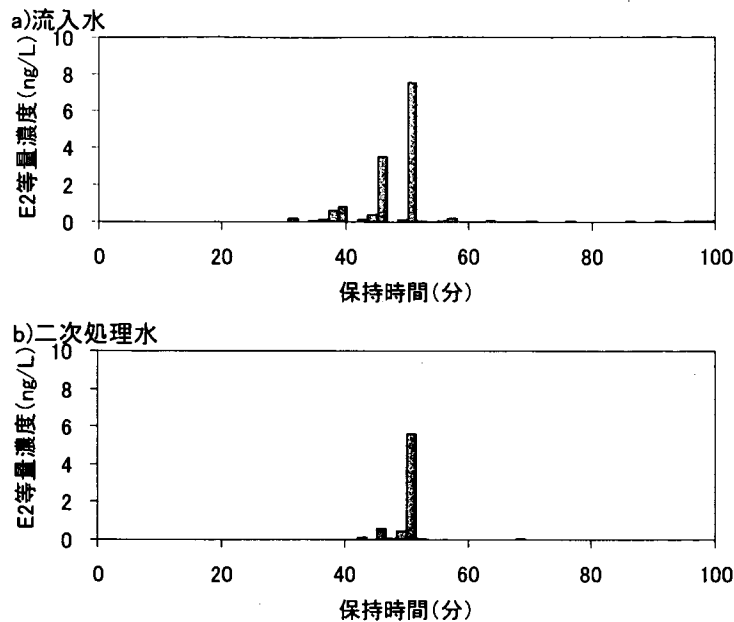


図-3 HPLC を利用した下水試料の極性分画

### 3. 2 全国一般河川調査と流域情報との比較結果

平成 11～13 年度に、全国 94 水系 132 地点でエストロゲン様活性の測定した結果を表-2 に示す。各年度でサンプル数が異なるものの中央値で評価した場合、経年的な変化は少ないと推測される。

表-2 全国 1 級河川におけるエストロゲン様活性の調査結果 (単位: ng/L-E2)

年度	水系	地点	最小値	25%値	中央値	75%値	最大値
1 1	19	114	ND	0.3	0.3	0.9	20
1 2	8	15	ND	0.3	0.5	0.8	4.4
1 3	94	112	ND	0.2	0.3	0.5	5.8
合計	94	132	ND	0.2	0.3	0.5	20

ND: not detected

エストロゲン様活性が高い地点について各調査地点の周辺状況を確認したところ、都市部を通過する地点であった。また、エストロゲン様活性の寄与物質とその寄与率を推定するため、平成13年度調査において遺伝子組み換え酵母法、化学分析ともに値が検出された17地点について、各物質に比活性値を乗じてE2換算濃度の換算した値と、遺伝子組み換え酵母法のエストロゲン様活性値を比較した。その結果、図-4に示すように、エストロゲン様活性の主要な寄与物質として

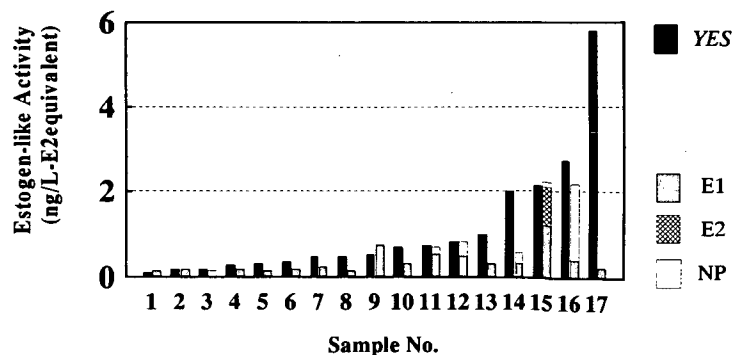


図-4 遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン様活性(YES)と化学分析によるエストロゲン様物質(E1、E2、NP)を E2 換算した活性値との比較

E1が占める場合が多かった。

そこで、エストロゲンの排出源と考えられる生活系排水に関する各河川の流域情報を整理し、エストロゲン様活性との関係を調べた。その結果を図-5に示す。流域人口密度とエストロゲン様活性には正の相関がみられ、人口の集中がエストロゲン様活性に大きく寄与していることがわかった。この結果は、生活系の排水とエストロゲン様活性の関係が大きいことを示すものと考えられる。

次に、生活系排水が処理されることによる効果を調べるため、污水处理施設整備人口とエストロゲン様活性の関係についても検討を行った。その結果、図-6に示すように污水处理施設整備率とエストロゲン様活性との間に明瞭な傾向は確認できなかった。しかしながら、流域人口密度の高い地点(1000人/km<sup>2</sup>以上)に注目すると、污水处理施設整備率が90%以上と高い場合でもエストロゲン様活性は必ずしも小さくならないということがわかった。下水処理場の処理工程では、エストロゲン様活性が中央値で約80%減少することを報告<sup>1)</sup>しているが、下水処理水に含まれる濃度は、河川のそれより1~2桁も高い値であり、放流先の河川に占める下水処理水の割合によっては、エストロゲン様活性が上昇すると推測される。都市部に位置する河川では、水資源の複雑な運用に伴い、下水処理水などの再生水が河川に占める割合は非常に高くなっており、河川流量に占める污水处理水量の割合が高まっていることが原因として考えられる。

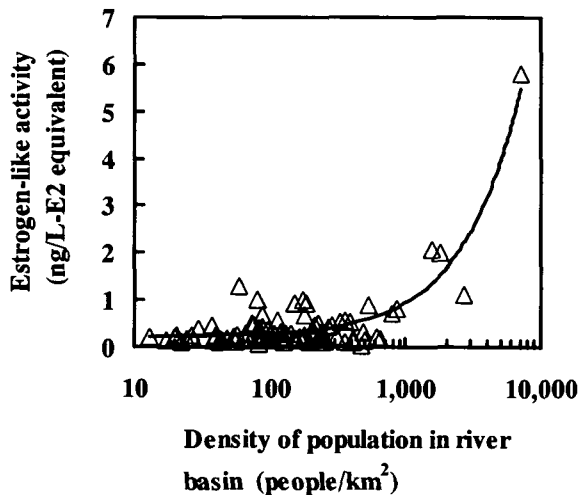


図-5 河川流域の人口密度と河川水中のエストロゲン様活性との関係

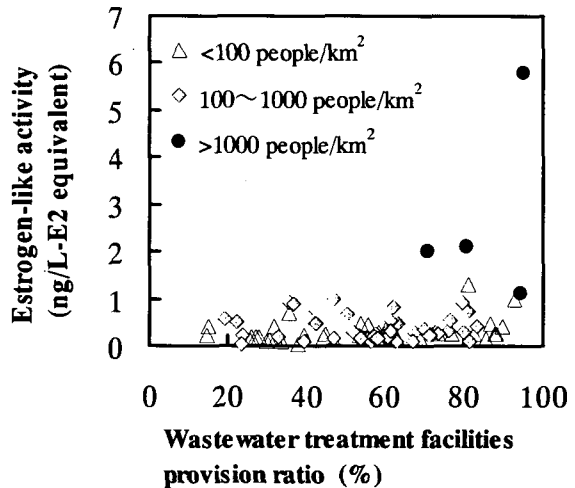


図-6 河川流域の污水处理整備率と河川水中のエストロゲン様活性との関係

#### 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) 標準物質を用いた HPLC 分画条件の最適化を行った結果、エストロゲン類およびそれらの硫酸抱合体化合物の成分について分離を行うことができた。下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分を YES に供した結果、いずれの試料においても E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン活性が検出されるとともに、E1 の寄与が高いことが実測された。
- (2) エストロゲン様活性と人口密度との比較から、主要河川水中のエストロゲン様活性に対し、人口密度は重要な因子となっていることが示された。
- (3) 流域人口に対する污水处理整備人口比と、河川水中のエストロゲン様活性との間には明瞭な関係は確認されなかった。しかしながら、人口密度が高い (>1,000 人/km<sup>2</sup>) 地域では、污水处理整備率が高くなってもエストロゲン様活性は必ずしも小さくなるわけではないことがわかった。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

#### 参考文献

- 1) 田中宏明他；(2002) N-イソットールによるエストロゲン様物質の指標に関する研究、平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 国土交通省；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）に関する調査の結果について, <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/kisha/naibun010509.html>, 2001
- 5) 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) .
- 6) 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).
- 7) 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).

## 5. 水環境の評価に関する調査

水循環研究グループ水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
 主任研究員 津森ジュン  
 宮島 潔  
 専門研究員 東谷 忠  
 山下 尚之  
 交流研究員 壬生 勝泰

### 1. はじめに

本調査は、利根川、多摩川等の河川流域を対象に、流域条件と水量・水質の関係把握、栄養塩の実態と富栄養化ポテンシャルの評価、水質と生物影響の関係、特に一次生産に対する影響の評価、都市排水が水生生物に与えるホルモン作用の把握を行い、河川の水環境の現状把握を行うとともに、今後も良好な水環境を保全するために有用なデータの収集を行うものである。

平成 15 年度は、下水道整備途上の河川である利根川水系手賀沼に流入する大津川で降雨時汚濁負荷量調査を行うとともに、利根川等を対象としたマイクロプレートを用いた AGP 試験を行うことにより富栄養化ポテンシャルの評価を試みた。また、14 年度に続き多摩川の石原水質自動監視所においてメダカを用いた現地での曝露評価試験の改良を行うとともに、新たに中川の八条水質自動監視所においても曝露評価試験を行った。

### 2. 水・物質循環機構理解のための実態把握

本調査では、下水道整備途上の流域を持つ河川を対象として、SS、BOD などの一般的な汚濁関連水質項目について降雨時負荷流出の実態調査を行うとともに、既往の平常時の水質調査結果の検討及び降雨時調査との比較検討を行い、水量水質の構成要因に関する考察を行った。

#### 2.1 調査方法

##### 2.1.1 対象河川と流域概要

対象河川は、利根川水系手賀沼（千葉県）の主要な流入河川であり、過去から土木研究所で調査を行っている大津川である。

大津川流域では下水道整備が大幅に進んできているものの、排出汚濁負荷量が大きい単独処理浄化槽の利用者の割合が依然として大きな比率を占めている状況にある。なお、大津川流域における下水道整備は手賀沼流域下水道により行われており、汚水は大津川をバイパスして手賀沼下流部にある下水処理場に収集、高度処理された後、利根川に放流されている。

##### 2.1.2 調査地点

調査地点を図-1 に示す。なお、大津川中の橋付近には千葉県による河川直接浄化施設が設置されており、その取水用ラバー堰により生じる背水の影響が及ばないように調査地点を設定した。

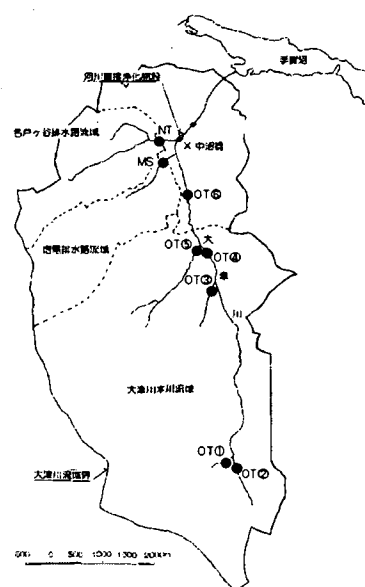


図-1 対象河川と調査地点

### 2.1.3 採水と水質分析

降雨時調査は2003年5月に実施した。採水は、OT⑥、NT、MSと、大津川上流地点のOT①、OT②の5地点で実施し、採水間隔は降雨初期の水質変動が比較的大きい時間帯は頻度を高くし、数分～数時間間隔で行った。

水質分析は、一般項目(SS、BOD5、CODMn、各態窒素、各態リン)について行った。分析方法は、SS、BOD5、CODMnについては、河川水質試験法によった。各態窒素及び各態リンについては、ブラン・ルーベ社製自動比色分析装置 TRAACS2000 により分析した。

## 2.2 結果と考察

### 2.2.1 降雨時調査結果

2003年5月31日から6月2日の2日間にかけて実施した降雨時調査結果を図-2に示す。なお、総降雨量は2日間合計で59mm、最大15mm/hrであった。COD、全窒素、全リンのいずれも、流量の増加に従って濃度が晴天時よりも高くなった。これを負荷量ベースに換算して、前年度に調査した晴天時と比較すると降雨時には晴天時と比較してCODで13~37倍、全窒素で2.6~4.8倍、全リンで6.8~20倍という非常に大きな負荷の流出が観測された。なお、降雨調査は2日間実施したため、晴天2日分の負荷量と比較した。

### 2.2.2 晴天時調査結果

2002年度に実施した3回分の大津川流域の晴天時流出負荷量を土木研究所で過去に行った調査結果と比較した。(図-3)。比較のため、2002年度調査における大津川流域の流出負荷は、OT⑥、NT、MSの流出負荷量の和として算定した。図-3によると、晴天時の流出負荷量は大きく減少している。一方、濃度ベースで見ると有機汚濁指標であるBOD、CODについては改善しているものの、全窒素と全リンについてはその傾向は見られない。このことは、流域に残る単独処理浄化槽や合併処理浄化槽では、し尿や雑排水中の窒素やリンといった栄養塩の除去効果が期待できないものと推察された。

## 2.3 まとめ

本調査では、下水道整備途上の流域を対象に、汚濁関連水質項目について実態調査を行い、以下の結果を得た。

1) 晴天時の流出汚濁負荷は、下水道整備により大きく減少傾向にあることを確認した。しかし、水質濃度ベースで見ると栄養塩である全窒素は増加傾向にあり、この主な原因は流域に残る単独処理浄化槽や合併処理浄化槽等の排出源は窒素やリンといった栄養塩の除去効果が期待できないためと推察された。

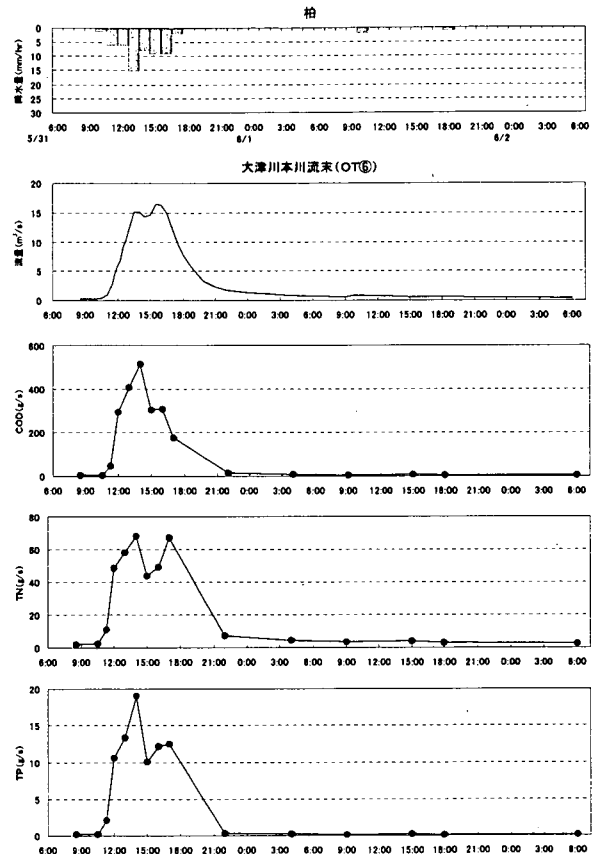


図-2 降雨時負荷量調査結果(一般項目)

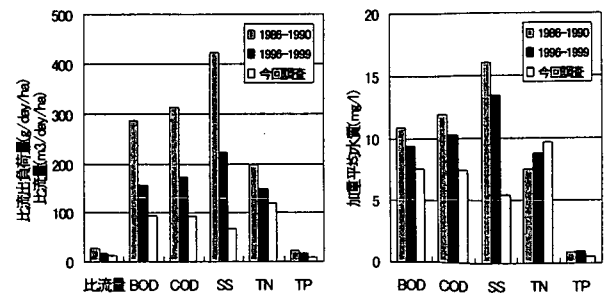


図-3 晴天時汚濁負荷の推移

2) COD, 全窒素, 全リンの降雨時の流出負荷は晴天時と比較して非常に大きく, 今回観測した降雨のケースでは, COD や全リンについて1降雨で数十倍にもものぼることが観測された。

今後は, これまで得られた実態調査のデータをもとに水量・水質の変化や流出に関してシミュレーションモデルを用いた数値解析を行い, 下水道整備と流域からの流出負荷の変化について検討する必要がある。

### 3. 水生生物等の実態把握

本調査では, 水質と水生生物の関係を把握することを検討するため, 多数のサンプルを迅速に処理する手法であるマイクロプレートを用いたAGP試験について検討を行った。その上で, 様々な排水が流入する利根川流域を対象として調査を行い, 利根川流域におけるAGP値の分布や栄養塩類との関係について明らかにした。

#### 3.1 試験方法

AGP試験の供試藻類としては, 藻類試験に一般的に用いられる緑藻類 *Selenastrum capricornutum* (NIES-35) を用いた。*Selenastrum* は藻類培養用のAAP培地を用いて継代培養を行い, 植え継ぎ後4~7日後の対数増殖期のものを試験に用いた。AGP試験は96穴のマイクロプレート (Falcon社製) を用いて行い, 培養温度24℃, 照度4000Lux, 120rpmの振とう条件で培養を行った。培養期間中, マイクロプレートリーダーを用いて藻類増殖量の変化を吸光度 (波長450nm) により測定し, 藻類量が一定になった時点での藻類増殖量をAGP値とした。

利根川流域における調査は, 2003年6月および2004年1月に関東地方整備局が行った採水サンプルの提供を受け実施した。採取したサンプルは, ガラスファイバーフィルター (GF/B, Whatman) およびメンブレンフィルター (0.2μm, Advantec) によりろ過を行った後, 試験に供するまでの間, -30℃にて冷凍保存を行った。AGP試験は, 凍結保存しているサンプルを融解した後, 希釈系列を作成しマイクロプレートを用いて行った。また同時に, 採取したサンプルについて, オートアナライザー (Bran Lubbe社製, TRAACS800) により, 窒素およびリン濃度についても測定を行った。

### 3.2 結果と考察

#### 3.2.1 利根川流域におけるAGP試験結果

図-4に2004年1月の採水試料による利根川流域におけるAGP値の分布を示す。

図-4より, 利根川本川におけるAGP値は, 上流から下流部に行くに従ってその値が上昇するというわけではなく, 本川においても値が上下するなどの変化様式を示した。一方, 東京都心部を流れて東京湾へと注ぐ河川である江戸川や中川については, 利根川本川と比較して

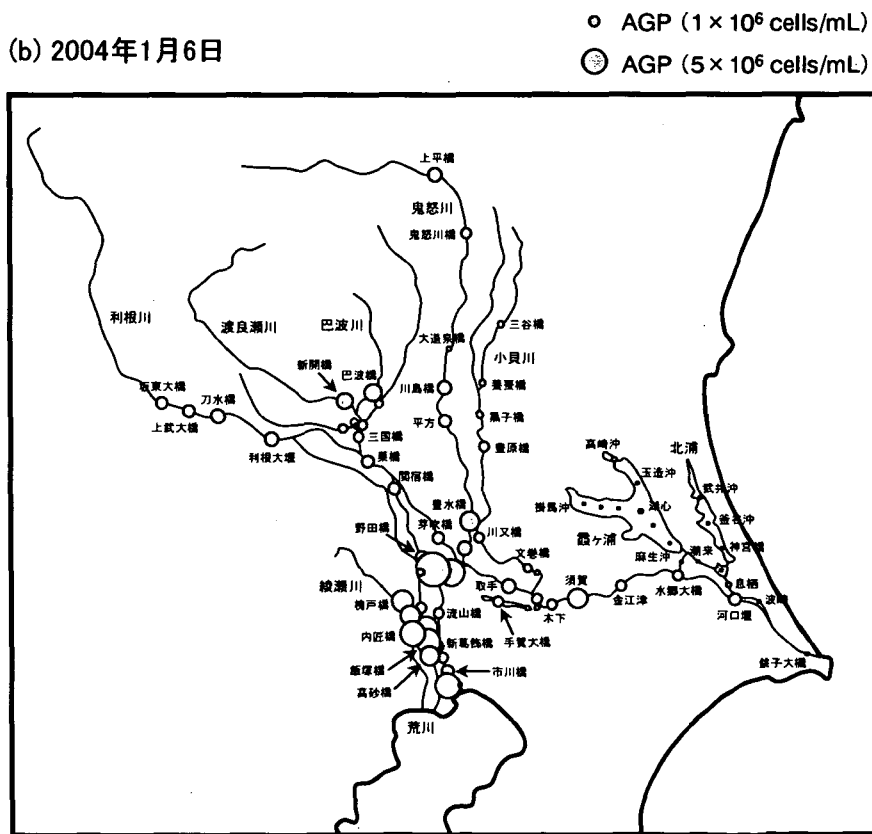


図-4 利根川流域におけるAGP値の分布



AGP 値はかなり高い値となった。例えば、中川下流部に位置する飯塚橋での AGP 値は、利根川本川下流部にある金江津での AGP 値と比較して、約 5 倍の値となっていた。これら都心部を流れる河川には、流域から多くの栄養塩類負荷が流入する。なかでも、綾瀬川は我が国における河川のなかでも、最も汚濁の進行した河川の 1 つであり、AGP 値も高い値が示された。

また、2003 年 6 月（未掲載）と 2004 年 1 月の AGP データを比較すると、一般的に 1 月の AGP 値のほうが高い値となった。低温期である 1 月と比較して、6 月の高温期のほうが河川内に存在する付着藻類や他の生物の活性が上昇する。このことから、冬期に比べて 6 月のほうが、水中の栄養塩類の消費が早くなると考えられ、6 月の AGP 値は低くなったと推察される。

### 3.2.2 栄養塩類との関連

図-5 に栄養塩類の濃度と AGP 値との相関を示す。図-5 にはそれぞれ、無機態窒素濃度（Dissolved inorganic nitrogen, DIN）と AGP 値、および無機態リン濃度（Dissolved inorganic phosphorus, DIP）と AGP 値との相関関係を示している。図-4 より、栄養塩類濃度と AGP 値の間には、正の相関関係が見られた。特に、無機態リン濃度と AGP 値との関係については、より高い相関関係が見られた。一般に、河川等の水域においては、リンが藻類増殖の制限物質となることが多いと言われている。このことから、AGP 値は水中のリン濃度に規定されることとなり、無機態リン濃度と AGP 値との間に高い相関関係が観察されたものと考えられる。

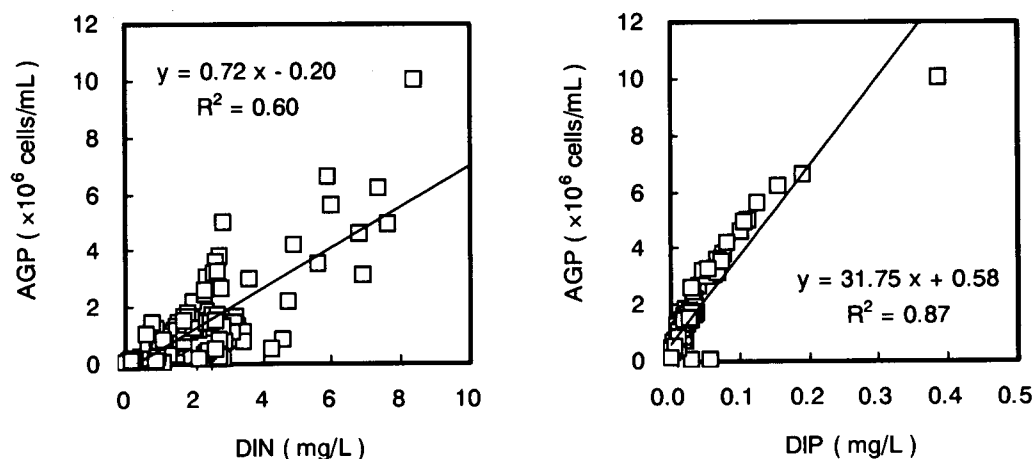


図-5 栄養塩類濃度とAGP値との関係

### 3.3 まとめ

本調査により、利根川流域における AGP 値に関する基礎的な情報が得られた。また、この AGP 値と窒素およびリンといった栄養塩類との関係についても情報を得ることができた。近年、化学物質の管理や水質環境基準の設定に生態系へ配慮する動きが強まっていることから、河川水質管理においても藻類 AGP 試験などを用いた経年的なバイオモニタリングを行う必要があると考えられる。また、これまで河川や湖沼などの富栄養化防止の観点からや窒素、リンといった栄養塩について調査されてきたが、近年、河川を通じた陸域由来の物質による海域の生態系影響の調査研究の必要性が提唱され、河川から海へのシリカ、鉄の供給などについて議論が交わされている。今後は、AGP 値に関する情報を蓄積してゆくとともに、陸水域におけるシリカの挙動についても焦点を当てて調査を進める必要がある。

#### 4. 生態系への影響要因に関する検討（メダカを用いた化学物質影響評価試験）

本調査では、河川中のエストロゲン様物質が魚類の雌性化に及ぼす影響を把握するための「魚類モニタリング技術」を構築することを目的として、河川水においてヒメダカの曝露試験を行っている。

平成 13 年度から水質自動監視所内での予備試験を開始し、平成 15 年度は水質自動監視所におけるメダカ曝露試験を継続するとともに、魚類影響を検出するためにより適した曝露法を検討することとした。

##### 4.1 調査方法

平成 15 年 8 月に中川水系八条水質監視所と多摩川水系石原水質監視所においてヒメダカ *Oryzias latipes* を用いた曝露試験を行った。曝露試験に供した試験水（河川水）は水温、17β-エストラジオール（E2）[LC/MS]、エストロン（E1）[LC/MS]、ノニルフェノールエトキシレート[LC/MS]、エストロゲン活性[酵母 two hybrid assay]を測定した。また、ヒメダカの分析項目は、被鱗体長、体重、肝臓重量、肝臓中ピテロジェニン濃度（ELISA）及び肝臓中ピテロジェニン mRNA 濃度（HPA）である。

##### 4.2 結果

###### 4.2.1 中川八条水質監視所におけるヒメダカ曝露試験

中川八条水質監視所においては、水中のエストロゲン、ノニルフェノール類ともに検出されず、全ての雄メダカの肝臓中ピテロジェニン濃度は定量下限値未満（<0.5 ng/mg liver）でありピテロジェニン生成も検出されなかった。

###### 4.2.2 多摩川石原水質監視所におけるメダカ曝露試験

多摩川石原水質監視所における曝露試験の開始時、7日後ならびに14日後に採取した試験水の17β-エストラジオール（E2）、エチニルエストラジオール（EE2）、エストロン（E1）、ノニルフェノール（NP）、ノニルフェノールエトキシレート（NPEO）濃度ならびにエストロゲン活性（酵母 Two Hybrid Assay）を表-1に示した。

表-1 試験水の水質（多摩川石原水質監視所）

項目	単位	試験開始 2003/8/14	第1週 2003/8/21	第2週 2003/8/28
E2	ng/L	ND	12.3	ND
E1		5.8	8.1	4.4
EE2		ND	ND	ND
NP	μg/L	ND	Tr(0.14)	Tr(0.14)
NP1EO		Tr(0.08)	Tr(0.05)	Tr(0.07)
NP2EO		Tr(0.06)	Tr(0.06)	ND
NP3EO		ND	ND	ND
NP4EO		Tr(0.12)	ND	Tr(0.07)
NPEO (n=5-15)		全て ND	全て ND	全て ND
エストロゲン活性	ng/L	6.31	8.29	6.56

###### 4.2.3 曝露後のヒメダカの体長、体重、肝重量、ピテロジェニン濃度

多摩川石原水質監視所において14日間曝露したヒメダカの全長、体重、肝重量ならびにELISAによる肝臓中のピテロジェニン濃度を表-2に示した。20個体中2個体の肝臓から低いレベルでピテロジェ

表-2 曝露後のヒメダカの体長、体重、肝重量とピテロジェニン濃度（多摩川石原水質監視所）

	体長	体重	肝重量	肝指数	VTG濃度 (ELISA)
	mm	mg	mg	%	ng/mg liver
最大	32.7	613.0	11.6	2.4	
最小	27.5	398.3	5.0	1.2	1.7~3.5 (n=2)
平均	29.7	468.6	9.1	1.9	その他全てND*
標準偏差	1.5	61.1	1.9	0.3	

\*ND <0.5ng/mg liver

ニンが検出された(再測確認済み)。その他の 18 個体の肝臓中ピテロジェニン濃度は定量下限値未満であった(<0.5 ng/mg liver)。

#### 4.3 考察

石原監視所にて実施した試験では、雄メダカ 2 個体 (10%) で肝臓中でのピテロジェニン生成が検出された。これらのピテロジェニン濃度は、それぞれ 1.7 および 3.5ng/mg-liver weight であった。この地点のエストロゲン活性は E2 換算値で 6.3~8.3ng/L-E2 であった。室内試験結果で得られた E2 の 14 日間最小作用濃度 5.0ng/mL (別途試験研究成果) を超えており、雄メダカにエストロゲン作用が及んだものと考えられるが、メダカ全数でみるとピテロジェニンのレベルは当該室内試験よりも低いものであった。

平成 14 年度に実施した日野橋監視所での 14 日間曝露試験では、エストロゲン活性の E2 換算値は 6.6~12.5ng/L-E2 であり、石原監視所より高い値であった。しかしながら、雄メダカのピテロジェニン生成は認められず、影響を検出することはできなかった。室内試験では十分ピテロジェニン誘導がみられるエストロゲン活性の河川水にもかかわらずピテロジェニン生成が認められなかった点については、理由は明確ではない。

この理由として、日野橋では、石原に比べ水温が低かったことが影響している可能性があると考えられる。石原監視所での試験は夏期、日野橋監視所での試験は冬期であり、それぞれの水温は石原が 24~26℃、日野橋が 20~22℃であった。こうした曝露水槽の水温の差異が影響したのではないかと考えられた。

#### 4.4 まとめ

現場型魚類曝露試験装置を魚類影響検出システムとして確立させるため、室内試験と同様に水温を制御すること、また、メダカの成長段階による感受性の相違を明らかにし、試験方法に反映させることが重要と考えられる。そこで、メダカの成長段階を考慮した試験内容として、受精卵から曝露を開始して、若魚期や成熟前などの成長段階ごとにピテロジェニン測定に供する試験が必要である。

また、河川水には、フミン質やフルボ酸等の他の有機物が大量に存在しており、これらの複合作用も理由として考えられる。こうした影響要因を特定するためには、エストロゲン活性とエストロゲン様物質の濃度を比較するだけでなく、分画手法を用いてエストロゲン作用をもつ物質を特定する試験が必要と考えられる。

#### 5. おわりに

本研究の成果として、以下に示す結果と課題が明らかになった。

- ① 大津川においては下水道整備により BOD など有機物の減少が見られたものの、栄養塩濃度については増加傾向が見られた。
- ② 利根川本川と比べると江戸川、中川及び綾瀬川の方が AGP 値が高いという結果になった。利根川流域の栄養塩濃度と AGP 値に関する基礎的な情報が得られた。これに加えて、近年、陸域からの排出が海域の生態系に大きな影響があると考えられているシリカについても AGP 値との関係を検討する必要がある。
- ③ メダカを用いた曝露試験によりピテロジェニン生成が確認されたが、水温の制御とメダカの成長段階による感受性の相違を考慮して曝露期間や曝露月齢について更に検討が必要である。

平成 16 年度以降においては、引き続き利根川、多摩川等の関東地方の河川に関する実態調査及び生態系への影響評価を行うとともに、得られた情報を基に水環境の評価手法に関する提案を試みる。また、水環境における生物学的基礎データの収集方法等の検討や流域情報の収集を行い、流域管理や汚濁解析に有用なデータの収集を行う必要がある。

なお、本調査研究は、関東地方整備局からの受託業務費により実施されたものである。

## 6.都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響 と指標化に関する研究

国土交通省

(委託先) 独立行政法人土木研究所

水循環研究グループ水質チーム

田中 宏明

小森 行也

宮島 潔

東谷 忠

中田 典秀

八十島 誠

研究期間

平成 14 年度～ 17 年度

平成 15 年度当初予算額

30,640 千円

## Effects of Estrogen-Like Substances in Urban Wastewater on Fish And Their Indication

(FY2002 ~ 2005)

Hiroaki Tanaka, Koya Komori, Kiyoshi Miyajima, Tadashi Higashitani, Norihide Nakada, Makoto Yasojima  
Water Quality Research Team, Water Environment Research Group

Independent Administrative Institution Public Works Research Institute  
Ministry of Land, Infrastructure and Transport

The purpose of this study is to evaluate the influence of estrogen-like substances contained in river water receiving effluent of urban wastewater treatment plant on the feminization of male fish by keeping the fish in the river water; to develop a simple indicator of fish feminization by combining estrogenic activity measured by DNA recombinant yeast and water fractionation method; to clarify the source of the estrogen-like substances in urban wastewater for the control of the fish feminization. Research results of FY2003 are as follows; 1) When adult male medaka were exposed for 14 day to 17 $\beta$ -estradiol (E2) solution, Lowest-observed adverse effect level (LOAEL) was 5ng/L, which concentration could be termed high level among those in urban wastewater. On the other hand, when exposure periods were 2 or 7 days, no observed adverse effect level (NOAEL) of E2 was 5ng/L. Therefore, when male fish is exposed to low estrogen concentration, longer period is effective to detect the estrogenic activity. 2) The potential of estrogenic activity of estrone (E1) to produce vitellogenin in male medaka was 0.18-0.26 times of that of E2. 3) Adult male medaka were exposed to river water receiving treated urban wastewater at the site of automatic water quality monitoring stations, and if the estrogenic activity exceeded the LOAEL, hepatic vitellogenin was detected from 10% as hepatic vitellogenin induction for endpoint. 4) As a result of optimizing the fractionation of the estrogen-like substances in the effluents of wastewater treatment plants, estrogens and their conjugates were effectively separated, and it was shown that E1 greatly contributed to the estrogenic activity of the effluents.

### 1. はじめに

下水処理水やその放流先河川において、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、これらが魚類の雌性化を起こしているのかは依然として明らかになっていない。下水道の急速な普及によって下水処理水等の都市排水が都市河川に占める割合は急速に大きくなりつつある。よって、下水処理水の比率が高い都市河川に存在する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明確にする必要があり、状況によって下水道や都市排水の対策をとる必要がある。

本研究は、下水処理水やその放流先の都市河川において魚類を曝露飼育することによって、エストロゲン様物質が魚類の雌性化に及ぼす影響を評価する。さらに、水試料の分画法と遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン活性を組み合わせることによって、水試料のエストロゲン作用について評価し、このエストロゲン活性を魚類の雌性化を表すことのできる簡便な評価指標へと完成させることをめざすものである。加えて、下水処理水と放流先河川に存在するエストロゲン様物質の由来を推定し、雌性化を抑制するために必要な都市排水由来の要因を明らかにすることをめざすものである。

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抽出し、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。

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て、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、水試料の分画抽出について、より分解能の高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による手法の検討を行った。

## 2. エストロゲンによるメダカへの影響

### 2.1 目的

これまで下水処理水や河川水などについて、国土交通省によってエストロゲン様物質の実態把握に関する調査が行われてきた<sup>1)</sup>。この結果、一部にノニルフェノールなどエストロゲン様作用をもつ化学物質の寄与が比較的大きいと考えられる水域があるものの、多くの水域では天然エストロゲンである 17 $\beta$ -エストラジオール (E2)、エストロン (E1) の寄与が相対的に大きいことが示唆されている。

本研究では、河川水や下水処理水など環境水中に存在するエストロゲン様物質の魚類影響を評価する方法の一つとして、河川水質自動監視所を活用してメダカなど試験魚を実際に河川水に曝露する試験法の開発に着手している。これは、環境水のエストロゲン様作用の評価を目的としているので、本来は雌魚に特異的な蛋白であるピテロジェニン<sup>2)</sup>を生物指標に用いる調査(ピテロジェニン・アッセイ)、すなわち環境水で曝露した場合にとくに雄魚でピテロジェニン誘導が起こるかを調査する方法である。

したがって、メダカを試験魚種として環境水での曝露試験を行って魚類影響を評価するためには、E2 や E1 に対するメダカ感受性、例えば、雄メダカにおける環境水中の E2 あるいは E1 濃度と曝露されたメダカ体内のピテロジェニン濃度の関係などを明らかにしておく必要がある。E2 は、ノニルフェノールやビスフェノール A などエストロゲン様作用が疑われる化学物質でのピテロジェニン・アッセイにおいて陽性対照物質として用いられるため、曝露濃度が実際の環境水中の濃度よりもかなり高い場合が多い<sup>2)</sup>。そのため、ピテロジェニン誘導の最小作用濃度や最大無作用濃度の把握を目的として実施された試験(例えば、公比 3 以下の 5 濃度区以上での曝露試験)の報告例は少ない。また E1 については、陽性対照物質としての使用を含めて、雄メダカを用いたピテロジェニン・アッセイの報告例はほとんど無いのが実情である。

そこで、雄メダカを用いた環境水での曝露試験結果の評価のための基礎的知見を蓄積することを目的として、E2 および E1 を被験物質として、雄ヒメダカの成魚を用いた実験室内での曝露試験(ピテロジェニン・アッセイ)を行い、肝臓中のピテロジェニン濃度から両物質の最小作用濃度、最大無作用濃度、曝露期間と肝臓中のピテロジェニン濃度の関係について検討することとした。

### 2.2 材料および方法

#### 2.2.1 被験物質および曝露濃度

被験物質は 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) およびエストロン (E1) (ともに和光純薬) とし、試験濃度

は以下の5濃度とした。また、試験液の調製に用いた溶解助剤のみを添加した助剤区を設けた。

設定濃度：5.0、12.6、31.6、79.5、200ng/L

### 2.2.2 供試魚

試験には、試験施設において3世代以上継代飼育されている群から採卵、飼育した月齢約5か月のヒメダカ成魚の雄を用いた。供試個体数は、試験区あたり60個体とした。供試時の体重は、 $333 \pm 57$ mg（平均±標準偏差）であった。

供試ヒメダカの飼育は、受精卵は脱塩素水道水による半止水式、ふ化後から成熟期（親魚期）までは脱塩素水道水を飼育水とした流水式水槽（5換水/day）で行った。飼育水温は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明条件は16時間明/8時間暗とした。餌料は、ふ化直後はシオミズツボワムシ、約2週齢以降はアルテミアのふ化幼生を1～3回/dayの頻度で与えた。また、成熟期に達した月齢4か月において、二次性徴（臀鰭の形状）により雌雄を選別し、以降は供試まで雄個体のみで飼育した。

### 2.2.3 曝露方式および装置

曝露には、内装ステンレス張りの恒温室に設置したミニダイリ्यूター式の流水式曝露装置を用いた。試験水槽は硬質ガラス製水槽（有効量10L）とした。なお、曝露装置および試験水槽において、試験液との接する箇所に用いられている材料は、ガラス、テフロン、ステンレスのみである。

曝露実験に用いたミニダイリ्यूター式の流水式曝露装置では、装置上部の希釈水槽（ガラス製）からガラス製キャピラリー管を通して、一定流量で希釈水が混合槽（ガラス製）に供給される。一方、混合層には、定量ポンプによって被験物質の原液が一定流量で供給される。混合槽内で原液と希釈水と混合されることにより、設定濃度の試験液が調製される。調製された各濃度の試験液は、ガラス管を通して各試験水槽に連続的に供給される。

### 2.2.4 試験条件

曝露試験は下記の条件で実施した。

曝露方式：流水式

試験区数：被験物質5濃度区および助剤区

連数：1連/試験区

供試生物：雄ヒメダカ（成魚）

供試生物数：60個体/試験区

曝露期間：最長14日間

試験液量：10L

換水率：約10換水/日

試験水温： $24 \pm 1^\circ\text{C}$

照明：16時間明/8時間暗

エアレーション：なし

給餌：ブラインシュリンプふ化幼生を1回/日、飽食量を給餌

### 2.2.5 試験液の調製

#### (1) 希釈水

希釈水には、水道水を活性炭濾過機に通水して残留塩素および化学物質等を除去した脱塩素水道水を用いた。希釈水は、流水曝露装置の希釈水タンク（ガラス製水槽）に貯め、十分に通気した。また、水温調整装置により試験水温に温度調整するとともに、常時、活性炭フィルターに通水しながら循環濾過した。希釈水については、一般項目および重金属類、農薬類などを測定し試験用水として問題が無いことを確認した。

## (2) 試験原液の調製

試験原液は、溶解助剤としてジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて調製した。試験原液として E2 および E1 の最高設定濃度 (200ng/L) の 1000 倍濃度 (200 $\mu$ g/L) の被験物質溶液を調製した。試験原液の DMSO 濃度は 100mL/L (10% v/v) とした。

試験原液は、曝露期間中に 2 回/週の頻度で新調した。

## (3) 試験液の調製

試験液は、試験原液と希釈水を一定流量で混合することにより調製し、連続的に試験水槽に供給した。試験原液はダブルプランジャー型ポンプ (日本精密株式会社) を用いて、毎分 100 $\mu$ L の流量で曝露装置の混合槽に供給、同じく混合槽に希釈水を毎分 100mL の流量で供給することにより 1/1000 に希釈した。すなわち、試験原液を希釈水で連続的に 1/1000 倍に希釈して 200ng/L の試験液を調製した。また 79.5ng/L の試験液は、200ng/L の試験液を希釈水で 1/2.5 倍に希釈することにより調製した。同様に順次、各試験液を希釈水で 1/2.5 倍に希釈することにより 31.6~5.0ng/L の各試験液を調製した。

助剤区の試験液は、希釈水に被験物質の最高濃度区と同じ濃度 (100 $\mu$ L/L) になるように DMSO を添加することにより調製した。

なお、17 $\beta$ -エストラジオール曝露試験の 31.6ng/L 区および 200ng/L 区については、曝露 14 日後に試験原液の供給を止めて、希釈水でさらに 14 日間飼育を継続した。助剤区も同様に曝露 14 日後に DMSO の添加を止めて希釈水でさらに 14 日間飼育を継続した。

## 2.2.6 試験液中の被験物質濃度

各試験区 (助剤区を含む) の試験液中の被験物質濃度は、曝露開始日 (曝露 0 日目)、曝露 7 日目および 14 日目の計 3 回測定した。

### (1) 試験液の採取

分析に供する各試験区の試験液は、ガラス製ピペットで水槽中央の中層から分析必要量 (10~1000mL) を水道水および残留農業分析用アセトンで洗浄したガラス製容器に採取した。採取した試料は、直ちに前処理 (抽出) に供した。

### (2) 前処理

試験液はガラス繊維フィルターでろ過し、得られたろ液を分析用試料とした。

ろ液は 1M 酢酸緩衝液 (pH5.0) で pH5.0 に調整し、メタノールおよび蒸留水でコンディショニングした C18 固相カートリッジに通水した。蒸留水およびヘキサンで洗浄後、ジクロロメタンで溶出した。この溶液に窒素ガスを噴きつけてジクロロメタンを除去し、抽出物を乾固させた。抽出物を 10% メタノールで再溶解し定容したものを ELISA 測定の試料とした。

### (3) ELISA 測定および定量

調製した試料の被験物質濃度は 17 $\beta$ -Estradiol (E2) ELISA キットおよび Estrone (E1) ELISA キット (日本エンバイロンケミカル) で定量した。測定方法および手順は、キットの操作方法に従った。測定はすべて二重測定で行い、吸光度の平均値を基に標準曲線から試料中の被験物質濃度を算出し、これを前処理に供した試験液の濃縮倍率で除して試験液中の被験物質濃度を算出した。また、助剤区の試験液を用いて添加回収試験 (添加濃度: 20ng/L および 200ng/L) を行った。最終的に添加回収試験の平均回収率 (E2: 91.8%, E1: 82.4%) で補正した濃度を試験液中の被験物質濃度とした。

### (4) 試験液中の被験物質濃度

試験液中の E2 濃度の測定結果を表 1 に示した。

設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均 17 $\beta$ -エストラジオール濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は <0.5ng/L であった。各試験区の平均実

測濃度は設定濃度の 96~111%であったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。また、試験液中の E1 濃度の測定結果を表 2 に示した。

表 1 試験液中の 17β-エストラジオール濃度

設定濃度 (ng/L)	実測濃度(ng/L)			平均
	0 日目	7 日目	14 日目	
助剤区	<0.5	<0.5	<0.5	
5.0	5.6	5.1	4.4	5.0
12.6	15.5	13.4	11.9	13.6
31.6	37.7	32.1	33.6	34.5
79.5	95.0	80.8	n.a	87.9
200	212	180	182	191

\* 14 日目の 79.5 ng/L 区は、ELISA 測定において吸光度が検量線の定量範囲外になったため欠測とした。

表 2 試験液中のエストロン濃度

設定濃度 (ng/L)	実測濃度(ng/L)			平均
	0 日目	7 日目	14 日目	
助剤区	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
5.0	4.5	5.8	5.6	5.3
12.6	12.0	14.0	14.1	13.4
31.6	25.0	33.1	34.4	30.8
79.5	83.3	87.2	90.0	86.9
200	180	201	234	205

設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均エストロン濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は<0.2ng/L であった。各試験区の平均実測濃度は設定濃度の 97~109%であったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。

### 2.2.7 曝露

曝露装置は曝露開始日の 3 日前から稼働させ、各試験区の被験物質濃度が設定濃度になっていることを確認した。また、供試魚の投入前に試験液の水温、溶存酸素濃度および pH を測定し、試験環境に問題がないことを確認した。

曝露開始日に曝露試験用の雄ヒメダカ群（約 500 個体）から無作為に 60 個体ずつ 6 試験区の供試魚を取り上げ各試験水槽に投入して曝露試験を開始した。曝露期間中は、1 日 1 回、アルテミアふ化幼生を飽食量を目安に給餌した。また、給餌時に死亡の有無、一般症状（外見、行動、摂餌活動の異常）を観察した。死亡がみられた場合は、直ちに除去した。水槽内に残餌や糞がみられた場合は、適宜、サイフォンを用いて除去した。

曝露開始時、曝露期間中および曝露終了時に各濃度区からヒメダカを取り上げて体長および体重、肝臓重量、肝臓中のピテロジェニン濃度を測定した。

また E2 曝露試験では、14 日間の曝露後、31.6ng/L 区、200ng/L 区および助剤区について、残った個体をそれぞれ清浄な試験水槽に移し、希釈水（流水式）で 14 日間飼育を継続した。この飼育期間中も曝露期間と同様に 1 日 1 回、アルテミアふ化幼生を給餌した。そして清浄な試験水槽に移行後の飼育 7 日後および 14 日後に各試験区からヒメダカを取り上げ、曝露期間と同様に体長および体重、肝臓重量、肝臓中のピテロジェニン濃度を測定した。

### 2.2.8 肝臓中のピテロジェニン濃度分析

#### (1) 肝臓の採取



助剤区、被験物質の最低濃度区から最高濃度区の順に、各試験水槽から清浄なタモ網で雄ヒメダカを取り上げた。取り上げたヒメダカは水で麻酔した。水冷麻酔により動きが停止したヒメダカを1個体ずつピンセットで取り上げ、ペーパータオルで体表面の水分を除去してから、デジタルノギスで体長、電子天秤で体重を測定した。

体長および体重測定後、解剖バサミで腹面の胸緒基部を切開し、さらに腹面正中線上を肛門の直前まで切り開いた。実態顕微鏡下でピンセットを用いて腹腔壁を押し広げて肝臓を露出させた状態にして、消化管や胆嚢を破損しないように注意して肝臓を摘出した。肝臓に付着した脂肪組織等は完全に除去した。摘出した肝臓はマイクロチューブ（容量 1.5mL）を風袋として、電子天秤で重量を測定した。

採取後の肝臓は、直ちに冷却して前処理に供するまで-80℃以下で凍結保存した。

また、各個体の肝臓重量および体重から、下記の式により肝指数（HSI）を算出した。

$$\text{肝指数 (\%)} = \text{肝臓重量} / \text{体重} \times 100$$

## (2) 肝臓の前処理

肝臓が入ったマイクロチューブに水冷した Buffer（ピテロジェニン濃度の測定に用いる ELISA キットの検体希釈液）を肝臓 1 mg あたり 50 $\mu$ L 添加し、清浄なマイクロホモジナイザーでホモジネートした。ホモジネート後、冷却遠心機で遠心処理（4℃、13,000 g、10 分間）して、肝臓の抽出液、脂肪および肝臓組織を分離した。ELISA 測定の試料として、試料の中層に分離された肝臓抽出液をマイクロチューブ（容量 0.5mL）に分取（1 個体あたり 3 本）した。前処理操作はすべて氷冷下で行った。

マイクロチューブに分注した肝臓抽出液は、ELISA での測定に供するまで-80℃以下で凍結保存した。

## (3) ELISA によるピテロジェニン濃度測定

肝臓抽出液中のピテロジェニン濃度は、市販のメダカ・ピテロジェニン測定用の ELISA キット（株式会社トランスジェニック）を用いて定量した。肝臓抽出液は、キットの検体希釈液でさらに 10 倍以上に希釈して ELISA に供した。ELISA の手順および条件等は、キットの説明書に従った。測定はすべて二重測定で行った。

試料（希釈した肝臓抽出液）中のピテロジェニン濃度は、二重測定した吸光度の平均値を基に標準曲線から算出した。これに肝臓抽出液の希釈倍率を乗じて、肝臓抽出液中のピテロジェニン濃度を算出した。ELISA における定量範囲（Working range）は 2~64ng/mL とした。すなわち、肝臓中のピテロジェニン濃度の定量下限は、すべての曝露実験において 1ng/mg-liver weight とした。

## 2.2.9 統計処理

曝露試験における各曝露濃度区と助剤区の肝指数、肝臓中のピテロジェニン濃度について、スティーラの多重比較検定（ノンパラメトリック検定）により有意差検定した。検定における有意水準は 0.05 とした。

なお、肝臓中のピテロジェニン濃度が定量下限未満であった個体については、上記の検定および平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

## 2.3 結果

### 2.3.1 E2 での曝露期間中のピテロジェニン濃度

E2 での曝露期間における肝臓中のピテロジェニン濃度（VTG）を図 1 に示す。また各濃度区におけるピテロジェニン濃度の経時変化を図 2 に示す。

対照系である助剤区の VTG は、曝露期間を通してすべての個体が 1ng/mg 未満であった。E2 曝露では、各曝露期間において、E2 濃度に依存して肝臓中 VTG が高くなる傾向がみられた。また各 E2 濃度区でも曝露期間に依存して VTG が高くなる傾向がみられた。E2 濃度が最も低い 5.0ng/L では、各曝露期間において VTG が定量下限（1ng/mg）未満の個体もみられたが、VTG が 1ng/mg 以上の個体数は、曝露 2 日後が 1 個体、7 日後が 3 個体、14 日後が 8 個体と曝露期間に依存して増加する傾向にあった。

統計学的な検定の結果、5濃度区すべてでVTGを測定した曝露2、7および14日後のうち、曝露2および7日後には最低濃度である5.0ng/L区で助剤区と統計学的に有意差は認められなかった。しかし、曝露14日後には、5.0ng/L区でも有意差 ( $p<0.01$ ) が認められた。12.6ng/L以上の濃度区は曝露2日後から有意差 ( $p<0.05$ ) が認められた。また、曝露1日後には、12.6ng/Lは有意差が認められなかった。

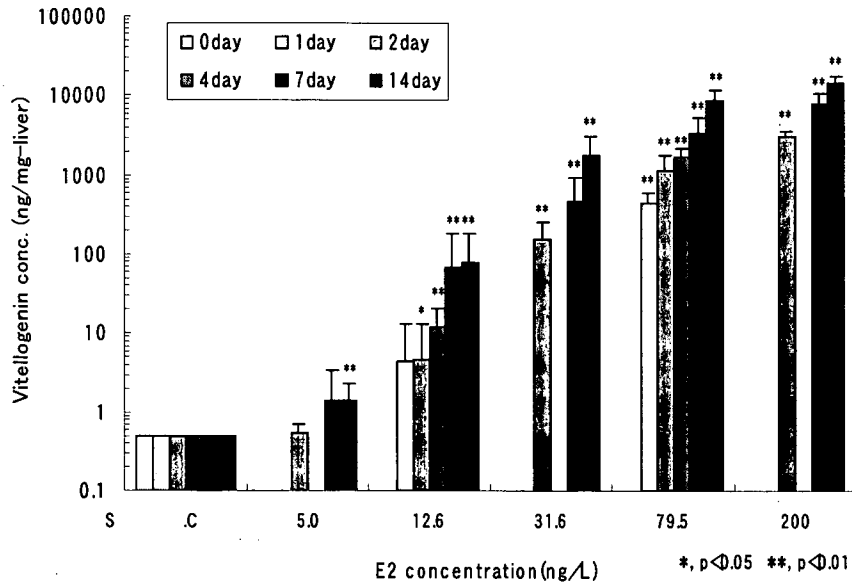


図1 E2曝露による肝臓中ピテロジェニン濃度

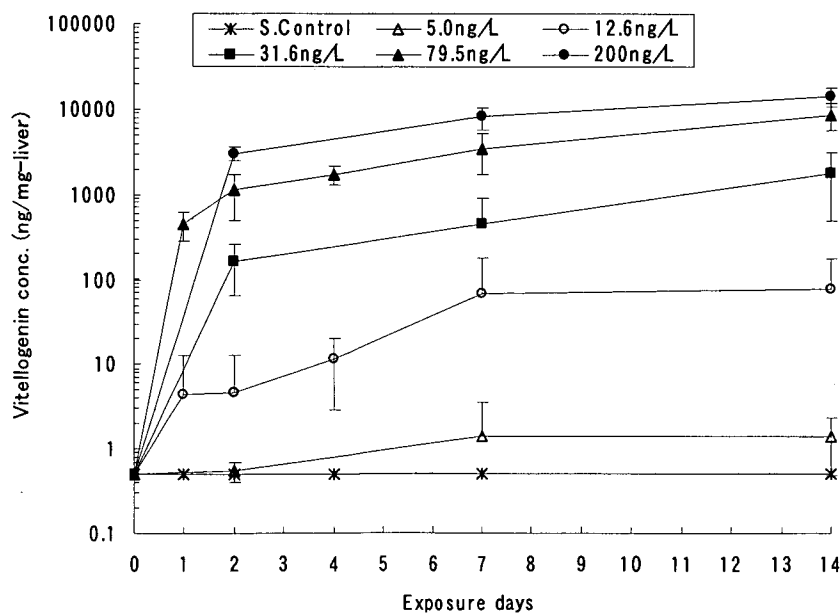


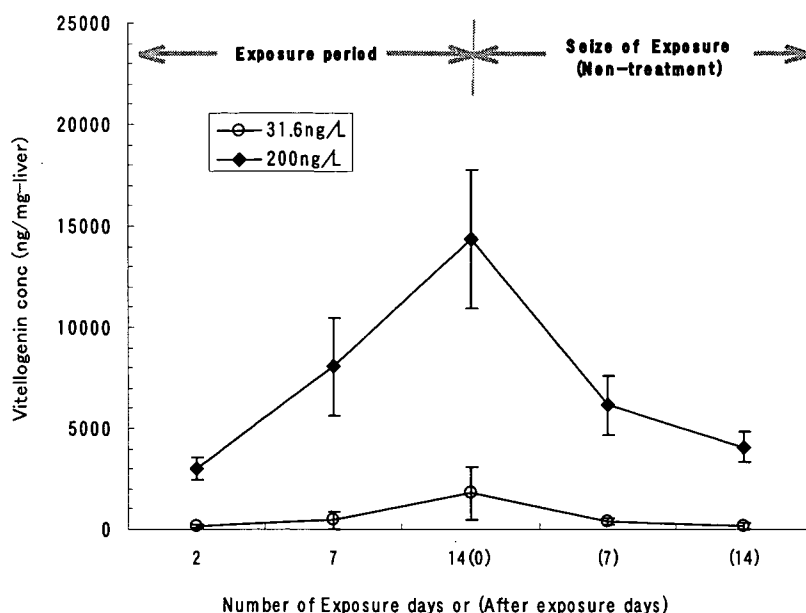
図2 E2曝露による肝臓中ピテロジェニン濃度の経時変

### 2.3.2 曝露後の清水飼育期間中のピテロジェニン濃度

E2の31.6ng/Lおよび200ng/Lでの曝露14日後の希釈水での飼育期間における肝臓中のピテロジェニン濃度の経時変化 (E2での曝露2日後から曝露後の飼育14日後まで) を図3に示す。

前述のようにE2での曝露により曝露期間にVTGは上昇し、曝露14日後 (曝露後の飼育0日目) のVTGは31.6ng/L曝露群で平均1810ng/mg、200ng/L曝露群で14400ng/mgとなった。このE2での曝露後にE2を含まない希釈水 (脱塩素水道水) に移行したことにより、31.6ng/L曝露群ではVTGが飼育7日後には378ng/mg、14日後には167ng/mgとE2での曝露2日後と同程度まで低下した。200ng/L曝露群で

も、E2 曝露後の飼育 7 日後には 6170ng/mg、14 日後は 4080ng/mg となり、31.6 ng/L 曝露群と同様に肝臓中の VTG は、E2 での曝露 2 日後と同程度まで低下した。ただし、飼育 14 日後の VTG は、E2 での曝露 2 日後と同程度であり、曝露開始時（助剤区の 0day）よりも高いレベルにあった。



### 2.3.3 E1 での曝露期間中のピテロジェニン濃度

E1 での各曝露濃度における肝臓中のピテロジェニン濃度（VTG）を図 4 に示す。また各濃度区におけるピテロジェニン濃度の経時変化を図 5 に示す。

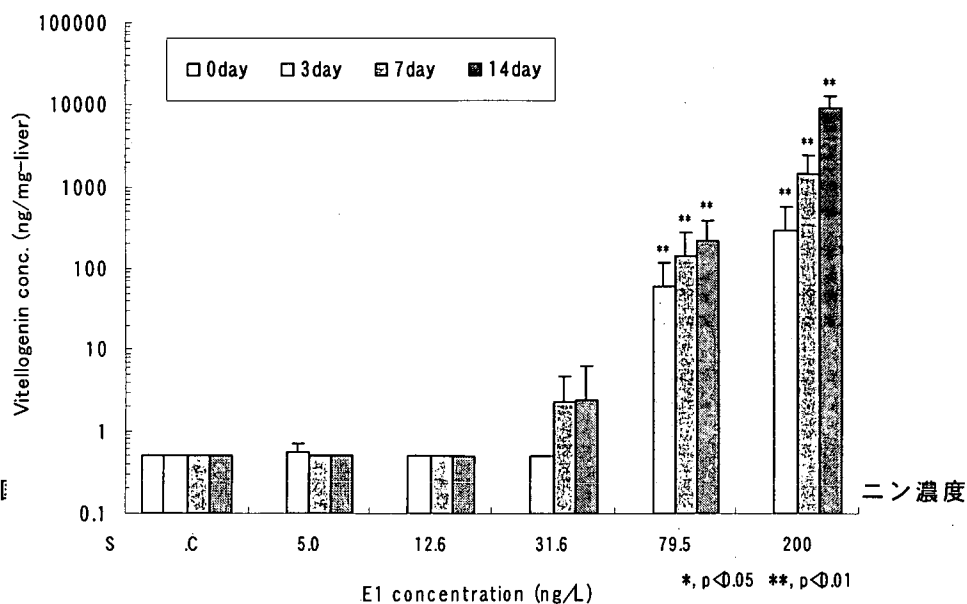


図 4 E1 曝露による肝臓中ピテロジェニン濃度

助剤区の VTG は、曝露期間を通してすべての個体が定量下限 (1ng/mg) 未満であった。また、5.0ng/L 区および 12.6ng/L 区も、5.0ng/L 区の曝露 3 日後で 1 個体が 1.0ng/mg であった以外は、すべての個体が曝露期間を通して肝臓中の VTG は定量下限未満であった。31.6ng/L 区では、曝露 3 日後は 10 個体がすべて定量下限未満であったが、曝露 7 日後および 14 日後は 10 個体のうち各 4 個体が 1.0ng/mg 以上の VTG を示し、平均値で見ると曝露 14 日後がやや高かった。79.5ng/L 区および 200ng/L 区では曝

露期間に依存して肝臓中 VTG が高くなる傾向がみられた。経時的にみると、31.6ng/L 以上の濃度区では、曝露時間に依存して肝臓中の VTG も増加する傾向がみられた。

統計学的な検定の結果、31.6ng/L 以下の濃度区では各曝露期間とも助剤区と  $p < 0.05$  の水準で有意差は認められなかった。79.5ng/L 区および 200ng/L 区では、曝露 3、7 および 14 日後とも助剤区と有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。

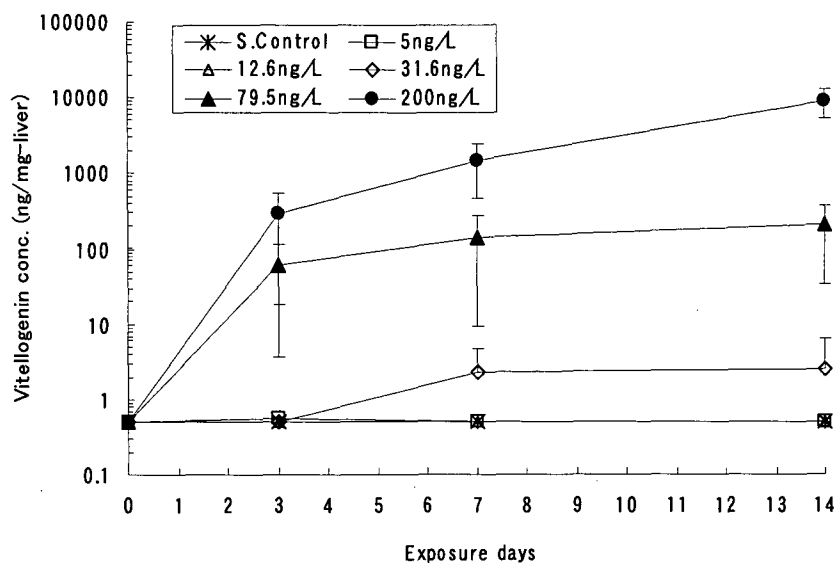


図 5 E1 曝露による肝臓中ピテロジェニン濃度の経時変化

## 2.4 考察

### 2.4.1 E2 および E1 の作用濃度

室内曝露試験から得られた 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) およびエストロン (E1) における雄ヒメダカ成魚でのピテロジェニン誘導の最小作用濃度および最大無作用濃度を表 3 に示す。ここでは、曝露期間ごとに肝臓中のピテロジェニン濃度 (VTG) に助剤区と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた最も低い濃度 (設定濃度) を最小作用濃度、有意差が認められなかった最も高い濃度を最大無作用濃度とした。

表 3 17 $\beta$ -エストラジオール及びエストロンの作用濃度

被験物質	曝露期間 (day)	最大無作用濃度 (ng/L)	最小作用濃度 (ng/L)
17 $\beta$ -エストラジオール	2	5.0	12.6
	7	5.0	12.6
	14	<5.0	5.0
エストロン	3	31.6	79.5
	7	31.6	79.5
	14	31.6	79.5

雄ヒメダカの肝臓中の VTG を上昇させる E2 の最小作用濃度は、2 および 7 日間の曝露期間で 12.6ng/L、14 日間で 5.0ng/L であった。最大無作用濃度は、それぞれ 5.0ng/L、<5.0ng/L であった。一方、E1 の最小作用濃度は、3、7 および 14 日間の曝露期間とも 79.5ng/L、最大無作用濃度は 31.6ng/L であった。

E2 の最大無作用濃度から、実際の河川水や下水処理場を対象とした曝露試験 (現地での曝露試験) で雄ヒメダカの肝臓中 VTG をバイオマーカーとした場合、環境水の E2 濃度が 5ng/L 以下のレベルであっても、曝露期間を 14 日間またはそれ以上とすれば、メダカ (魚類) の肝臓中 VTG は上昇するが、E1 では 30ng/L 程度では 14 日間の曝露では肝臓中の VTG の有意な上昇がみられないことが分かった。

## 2.4.2 肝臓中VTGの環境水での曝露試験への適用性

表 3 に示した E2 の最小作用濃度は、人為的に濃度設定された曝露試験における一定の段階的な設定濃度から推定されたものである。現地での曝露試験においても、一定期間（例えば 14 日間）の曝露後に供試した雄ヒメダカの VTG を測定して、コントロール群（ネガティブ・コントロール又はイニシャル・コントロール）と有意差検定することによって、試験対象とした環境水中の E2 濃度（E2 当量換算したエストロゲン濃度）が VTG を上昇させたか否かを推定できる。しかしながら、環境水のエストロゲン（様）物質濃度は未知であり、また時間的に変動すると考えられる。

環境水の E2 濃度と肝臓中 VTG 濃度の関係を定量的に比較することをおこなった。E2 曝露における E2 濃度と曝露 14 日後における肝臓中 VTG を図 6 に示す。肝臓中の VTG と環境水中の E2 濃度の関係を推定するためには両者の関係を線形化する必要がある。ここでは E2 濃度（x）と VTG（y）の対数変換値を一次回帰直線に当てはめることによって両者の関係式を求めた。すなわち、肝臓中の VTG（y）と E2 の曝露濃度（x）の関係は次式により近似した。なお、肝臓中の VTG は漸近線を持つと考えられることから、最高濃度である 200ng/L の VTG は、近似式の算出データから除外した。

$$\text{Log}(y) = a \cdot \text{Log}(x) + b$$

すなわち、

$$y = B \cdot x^a \quad (\text{ただし、} B = 10^b)$$

得られた近似式（ $y = 0.000827x^{3.26}$ ）から曝露 14 日後に雄ヒメダカにある濃度の VTG を誘導させる E2 濃度を推定できる。例えば、雄ヒメダカの肝臓中に 5ng/mg、10ng/mg、100ng/mg の VTG を誘導させる E2 濃度は、それぞれ 7.1ng/L、8.8ng/L、17.9ng/L と見積もられた。ただし、図 6 のように、個体の VTG のバラツキが 12.6ng/L の E2 では大きい。

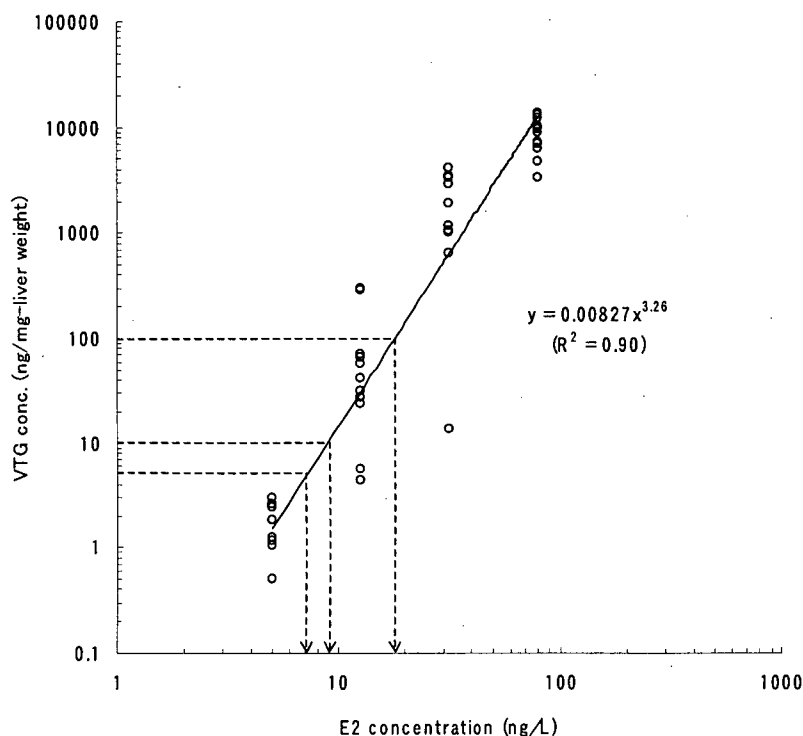


図 6 曝露 14 日後の肝臓中 VTG と E2 濃度の関係

E2 のヒメダカに対する影響濃度に関する既往知見は少ないが、フルライフサイクル試験（受精卵から 2 世代に渡る曝露試験）の結果、受精卵から連続的に曝露した F0 世代において、ふ化後 60 日齢で雄の生殖腺（精巣）に精巣卵を生じさせた E2 の最小作用濃度は 27.9ng/L（最大無作用濃度は 8.66ng/L）、また統計学的に有意とは言えないが 8.66ng/L でも 1 個体で精巣卵がみられたとの報告<sup>3)</sup>がある。

E2 曝露試験の結果から推定した曝露 14 日後に 5ng/mg または 10ng/mg の VTG を誘導させる E2 濃度

は、フルライフサイクル試験において雄ヒメダカの生殖腺に精巣卵を生じさせた濃度<sup>3)</sup>と同程度であった。このことは、現地での曝露試験において曝露 14 日後の肝臓中 VTG が 5ng/mg を超えたか否かを指標とすることによって、間接的かつ平均的な曝露状況の評価になるものの、試験対象とした環境水中のエストロゲン様物質が魚類（メダカ）の生殖腺に影響を与えるレベルであったか否かも評価可能であることを示唆している。

ただし、曝露後の VTG から魚類影響の程度を評価する場合は、試験に曝露前の肝臓中 VTG が十分に低い雄ヒメダカ（例えば定量下限未満）を用いる必要がある。また、ヒメダカの系統、供試前の飼育環境、月齢などによっても、E2 に対する感受性や反応性が異なることも考えられるため、曝露試験に用いる雄ヒメダカの統一、あるいは供試する雄ヒメダカを用いた E2 での曝露試験結果（E2-VTG の作用曲線）による評価基準の補正などが必要になると考えられる。

### 2.4.3 エストロンのエストロゲン作用強度

エストロン（E1）について、曝露試験の結果から曝露 3、7 および 14 日後における曝露濃度（VTG が定量下限以上であった 31.6~200ng/L）と肝臓中 VTG の関係を前項と同様の手順で一次回帰することによって、近似式（ $y = b \cdot x^a$ ）を求めた（図 7）。同様に 17 $\beta$ -エストラジオール（E2）について、曝露試験の結果から曝露 2、7 および 14 日後における曝露濃度（5~72.9ng/L）と VTG の関係の近似式を求めた（図 8）。ここで得られた E1 濃度と VTG の近似式（図 7）、E2 濃度と VTG の近似式（図 8）により、各直線の中央付近にある 10、50 および 100ng/mg の VTG を誘導する E1 および E2 濃度（表 4）をそれぞれ算出した。

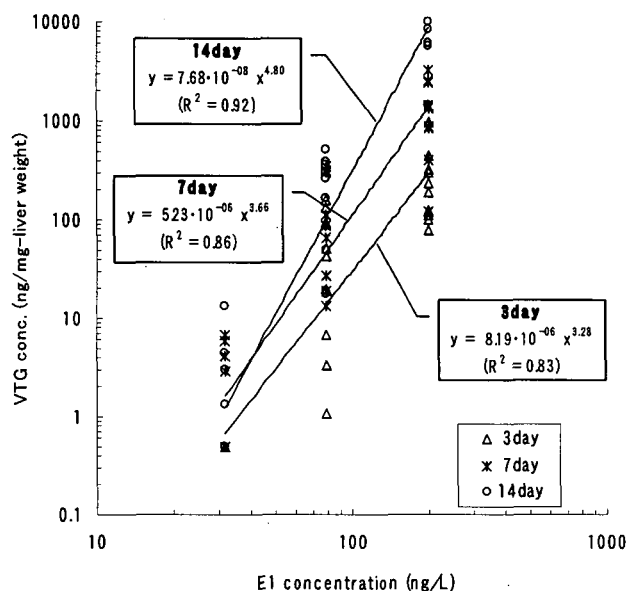


図 7 各曝露期間における肝臓中 VTG と E1 濃度の関係

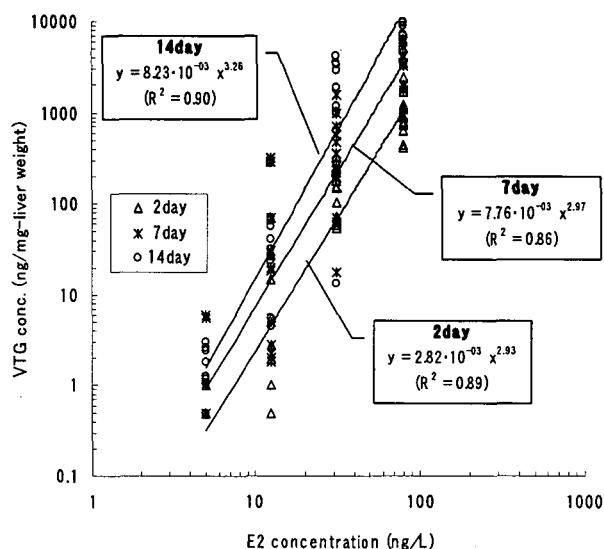


図 8 各曝露期間における肝臓中 VTG と E2 濃度の関係

各曝露期間において各 VTG を誘導する E2 濃度に対する E1 濃度の比（E2 濃度/E1 濃度）を表 5 に示す。E2 濃度に対する E1 濃度の比は、E2 に対する E1 の VTG 誘導に関する相対的な強度を示していると考えられる。したがって、雄ヒメダカにおける肝臓での VTG 誘導を指標にした場合、エストロンの持つエストロゲン作用は 17 $\beta$ -エストラジオールの 0.18~0.26 倍の強さと推定された。

表 4 VTG を誘導する E1 及び E2 濃度

ピテロジェニン濃度 (ng/mg-liver)	VTG を誘導する E1 濃度 (ng/L)		
	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
10	71.7	52.0	49.0
50	117	80.8	68.6
100	145	97.6	79.2

ピテロジェニン濃度 (ng/mg-liver)	VTG を誘導する E2 濃度 (ng/L)		
	曝露 3 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
10	16.3	11.5	8.8
50	28.2	20.0	14.5
100	35.7	25.3	17.9

表 5 E1 の E2 に対する相対的なエストロゲン作用強度

ピテロジェニン濃度 (ng/mg-liver)	E1 の作用強度 (E1 濃度/E2 濃度)		
	曝露 2-3 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
5	0.23	0.22	0.18
10	0.24	0.25	0.21
100	0.25	0.26	0.23

### 3. 河川でのメダカ曝露試験

#### 3.1 目的

個々のエストロゲン様物質による魚類の雌性化を防止するには、①河川において魚類曝露試験をおこない雌性化が発生するか否かを判定する、②雌性化を生じる河川水を詳細に調べて原因物質を特定する、さらに③その疑わしい物質を用いた室内での魚類曝露試験を実施して最小作用濃度、あるいは無影響濃度を明らかにすることが必要である。また、個々の物質に代わってエストロゲン活性を総合的な指標とすることも有効と考えられる。この場合、in vivo である魚類の VTG をそのインディケーターとすることが考えられる。この場合、とくに河川での魚類曝露試験では、性状変化のない新鮮な河川水を用いることが必要となる。

そこで本研究では、エストロゲン様物質による魚類影響について、現場にて検出するために必要な魚類曝露試験装置を考案・作製し、これを河川水質自動監視所や下水処理場に設置して曝露試験を実施した。

#### 3.2 方法

##### 3.2.1 試験実施場所

試験実施河川として多摩川および中川を選定した。多摩川はわが国を代表する都市河川であり、下水処理水の流入する上下流で魚類影響試験が実施可能であることから本研究の試験実施河川と選定した。また、国土交通省の魚類実態調査において、化学物質濃度が低いと考えられる地点（拝島橋）においても魚類影響があると疑われた河川である。

多摩川の試験実施地点は、複数の下水処理場の下流に位置する石原監視所とした。また、中川では八条橋監視所を試験実施地点とした。試験は、平成 15 年 8 月に実施した。

##### 3.2.2 試験装置

一般に、魚類曝露試験では水温、流量、光周期（日長）、餌などの試験条件を制御することによって、水質による魚類への影響を判断することが可能となる。そこで、試験条件の制御可能なメダカ曝露試験装置を作製した<sup>4)</sup>。

メダカ曝露水槽の容積は30Lと設定した。なお、この試験装置は3つの水槽から成り立っており、第1槽で砂泥の除去、第2槽で水温調節を行い、第3槽のメダカ曝露槽へと導水するものである（写真1参照）。

### 3.2.3 試験魚と生物指標

試験対象魚としてヒメダカ（*Oryzias latipes*）を、また、魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）として、肝臓中のビテロジェニン（VTG）を用いることとした。この測定はメダカ VTG-ELISA キット（製造：株式会社トランスジェニック、販売：国土環境株式会社）を用い、室内試験と同様に測定した。すなわち、肝臓中 VTG 濃度の定量下限は、1ng/mg-liver weight とした。

### 3.2.4 試験条件

本試験における試験条件は、環境省の実施した室内試験に合わせ設定した。試験期間は、環境省試験が14日間曝露とされており、今回の室内試験結果から想定される14日間と同様である。現場試験としての変更点は、餌を植物性エストロゲンの含まれていない市販の粉末餌とし、自動給餌器を用いて与えることとした。試験条件を表6に示す。

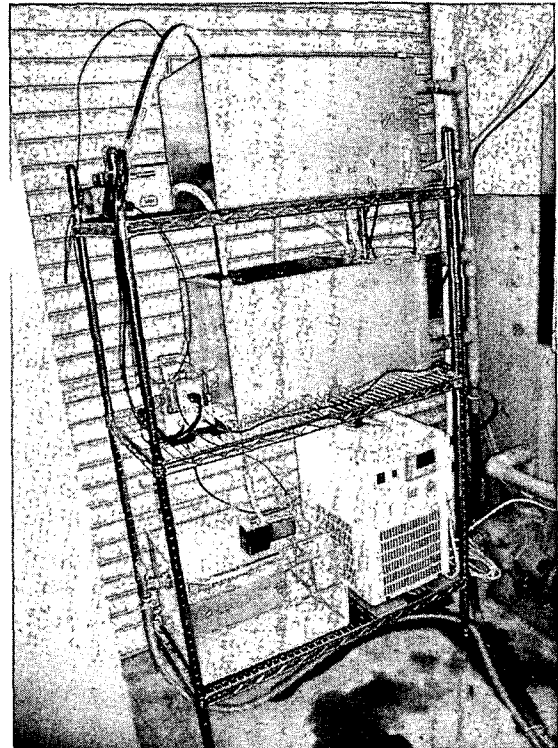


写真1 現場型メダカ曝露試験水槽

表6 メダカ現地曝露試験 試験条件一覧

試験魚	ヒメダカ <i>Oryzias latipes</i>
試験個体数	雄成魚 30個体/水槽
試験期間	2週間
試験水	流水式
流量	0.5 L/min (30 L/h)
試験温度	水温 25℃
日長条件	16時間-明、8時間-暗
餌	粉末餌、一日あたり3回の給餌

### 3.2.5 エストロゲン様物質の水質測定

メダカの雌性化を引き起こす可能性のある物質として、天然・合成エストロゲンやノニルフェノール等の人工化学物質を含むエストロゲン様物質があげられる。本試験では、これまでの水質チームの研究等から、水環境のエストロゲン様作用として重要な17β-エストラジオール（E2）、エストロン（E1）、エチニルエストラジオール（EE2）を、後者のうちノニルフェノール（NP）、ノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）を対象として、河川水に含まれるこれらの濃度を調べることにした。さらに、エストロゲン作用の総合的な強度を確認するため、遺伝子組換え酵母法によるエストロゲン活性（E2活性）<sup>5)</sup>を測定することとした。

### 3.3 結果および考察

石原監視所での試験において測定したエストロゲン等の水質および雄メダカ肝臓中のVTG濃度等を表7および表8に示す。本監視所の試験では、雄メダカ2個体（10%）で肝臓中のVTG生成が検出された。これらのVTG濃度は、それぞれ1.7および3.5ng/mg-liver weightであった。この地点のエストロゲン活性はE2換算値で6.3~8.3ng/L-E2であった。室内試験結果で得られたE2の14日間最小作用濃度5.0ng/mLを超えており、雄メダカにエストロゲン作用が及んだものと考えられるが、メダカ全数でみるとVTGのレベルは室内試験よりも低いものであった。

一方、八条橋監視所にて実施した試験の結果を表9および表10に示す。水質分析では、エストロゲ



ン活性以外の項目は定量下限値未満であり、雄メダカの VTG 生成は認められなかった。

平成 14 年度に実施した日野橋監視所での 14 日間曝露試験では、エストロゲン活性の E2 換算値は 6.6~12.5ng/L-E2 であり、石原監視所より高い値であった。しかしながら、雄メダカの VTG 生成は認められず、影響を検出することはできなかった。

石原監視所での試験は夏期、日野橋監視所での試験は冬期であったため、この試験システムでの曝露水槽の水温は、石原では 24~26℃、日野橋では 20~22℃であった。水温を維持する機能の改善が必要である。

エストロゲン活性が高いにもかかわらず VTG 生成が認められなかった点については、理由が明確ではない。室内試験では十分 VTG 誘導がみられるエストロゲン活性の河川水である。この理由として、日野橋では、石原に比べ水温が低かったことが影響している可能性があると考えられる。水温と化学物質の影響については、農薬を対象とした試験が行われている。DDT の毒性は、15~30℃の範囲において、低温ほど作用が強い。一方、殺虫剤サイメット Thimet の毒性は、高温ほど作用が強い<sup>6)</sup>。このように、水温によって化学物質に対するメダカ感受性が異なるため、両監視所での試験結果にも矛盾が生じたと考えられる。このほか、河川水には、

試験水に含まれている助剤 (DMSO など) は存在していないと考えられる。一方、フミン質やフルボ酸等の他の有機物が大量に存在している。これらの複合作用としての相違も理由として考えられる。

現場型魚類曝露試験装置を魚類影響検出システムとして確立させるためには、メダカ試験に最適な水温を明らかにするとともに、その水温に制御すること、さらに、メダカの成長段階による感受性の相違を明ら

表 7 多摩川石原監視所の水質分析結果

	単位	試験開始	第1週	第2週	検出下限	定量下限
E2	(ng/L)	ND	Tr(0.4)	ND	0.30	1.00
E1		5.8	8.1	4.4	0.20	0.60
EE2		ND	ND	ND	1.30	4.40
NP	(ug/L)	ND	Tr(0.14)	Tr(0.14)	0.10	0.30
NP1E0		Tr(0.08)	Tr(0.05)	Tr(0.07)	0.04	0.13
NP2E0		Tr(0.06)	Tr(0.06)	ND	0.04	0.13
NP3E0		ND	ND	ND	0.06	0.18
NP4E0		Tr(0.12)	ND	Tr(0.07)	0.04	0.12
NP5E0		ND	ND	ND	0.05	0.16
NP6E0		ND	ND	ND	0.07	0.23
NP7E0		ND	ND	ND	0.05	0.18
NP8E0		ND	ND	ND	0.08	0.25
NP9E0		ND	ND	ND	0.07	0.22
NP10E0		ND	ND	ND	0.15	0.50
NP11E0		ND	ND	ND	0.07	0.22
NP12E0		ND	ND	ND	0.14	0.45
NP13E0		ND	ND	ND	0.18	0.59
NP14E0		ND	ND	ND	0.16	0.52
NP15E0		ND	ND	ND	0.23	0.76
エストロゲン活性	(ng/L)	6.31	8.29	6.56	0.05	0.12

表 8 曝露後のヒメダカの体長、体重、肝重量、ビテロジェニン濃度-多摩川石原監視所

個体No.	体長 mm	体重 mg	肝重量 mg	肝指数 %	VTG濃度(ELISA) ng/mg liver
THJ01-					
1401	30.6	455	7.8	1.71	3.5
1402	29.6	482.8	10.4	2.15	ND
1403	28.4	424.2	7.6	1.79	ND
1404	29.2	406.4	9.1	2.24	1.7
1405	31.9	613	11.3	1.84	ND
1406	29.2	430.6	7.2	1.67	ND
1407	28.9	445.8	8.5	1.91	ND
1408	32.7	582.1	11.5	1.98	ND
1409	28.7	445.6	8.9	2	ND
1410	27.9	451.8	9	1.99	ND
1411	29	465.7	11.1	2.38	ND
1412	28.8	399.2	6.5	1.63	ND
1413	29	480.3	10.9	2.27	ND
1414	31.2	519.9	11.6	2.23	ND
1415	32.6	568.7	10.8	1.9	ND
1416	30	463	9.9	2.14	ND
1417	30.1	497	8.8	1.77	ND
1418	28.6	411.5	5	1.22	ND
1419	29.6	430.2	9.5	2.21	ND
1420	27.5	398.3	7	1.76	ND
最大	32.7	613	11.6	2.4	-
最小	27.5	398.3	5	1.2	-
平均	29.7	468.6	9.1	1.9	-
標準偏差	1.5	61.1	1.9	0.3	-

\*ND <0.5 ng/mg liver

表 9 中川八条橋監視所の水質分析結果

	単位	試験開始	第1週	第2週	検出下限	定量下限
E2	(ng/L)	ND	ND	ND	0.30	1.00
E1		ND	ND	ND	0.20	0.60
EE2		ND	ND	ND	1.30	4.40
NP	(ug/L)	Tr(0.22)	Tr(0.17)	Tr(0.16)	0.10	0.30
NP1E0		Tr(0.07)	Tr(0.05)	ND	0.04	0.13
NP2E0		ND	Tr(0.04)	ND	0.04	0.13
NP3E0		ND	ND	ND	0.06	0.18
NP4E0		ND	Tr(0.05)	ND	0.04	0.12
NP5E0		ND	ND	ND	0.05	0.16
NP6E0		ND	ND	ND	0.07	0.23
NP7E0		ND	ND	ND	0.05	0.18
NP8E0		ND	ND	ND	0.08	0.25
NP9E0		ND	ND	ND	0.07	0.22
NP10E0		ND	ND	ND	0.15	0.50
NP11E0		ND	ND	ND	0.07	0.22
NP12E0		ND	ND	ND	0.14	0.45
NP13E0		ND	ND	ND	0.18	0.59
NP14E0		ND	ND	ND	0.16	0.52
NP15E0		ND	ND	ND	0.23	0.76
エストロゲン活性	(ng/L)	0.93	0.22	Tr(0.11)	0.05	0.12

かにし、試験方法に反映させることが重要と考えられる。

また、影響要因を特定するためには、エストロゲン活性とエストロゲン様物質の濃度を比較するだけでなく、分画手法を用いてエストロゲン作用をもつ物質を特定する試験が必要と考えられる。このため、下記第4章の検討をすすめる。さらに、今回は成魚を2週間曝露する試験であったため、今後は感受性の高い胚から曝露を開始し、次世代までの影響をみる必要があると考えられる。

#### 4. 分画方法の応用

土木研究所水質チームでは、遺伝子組換え酵母を用いて下水処理水中に含まれるエストロゲン活性の測定 (YES) を行ってきた<sup>7)</sup>。さらに、試料中に含まれる化学物質の物理的性質 (極性) の差違を利用した分画手法を確立した<sup>4)</sup>。そして、機器分析、YES、分画手法を用い、処理水中に含まれるエストロゲン活性の原因物質として、天然のエストロゲンの寄与が高いことを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。しかし、検出された活性の一部は機器分析を行った成分だけでは説明がつかず、更なる原因物質解明のための検討が課題となった。

そこで、従来のシリカゲル固相カートリッジ (Waters社製、充填量: 360mg) による分画手法に加え、より分離能が高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分画手法の検討を行った。

##### 4.1 方法

環境試料の分画の前に、天然のエストロゲンであるエストロン (E1)、17βエストラジオール (E2)、エストリオール (E3)、E1、E2、E3の硫酸抱合態化合物 (それぞれ E1-3S、E2-3S、E3-3S)、人工のエストロゲンであるエチニルエストラジオール (EE2)、そしてノニルフェノール (NP) の標準物質を用い、HPLCでの分画条件の最適化、分画位置の確認を行った。

水試料は、組換え酵母法の濃縮に従って固相抽出し、抽出液を窒素気流下で濃縮乾固後、アセトアルデヒドに転溶し、HPLC分画に供した (表11)。

表11 HPLC分析条件

HPLC	GILSON社製Model321H1						
カラム	Hypersil Green ENV (4.6mm x 250mm)						
流量	1.0mL/min						
検出器	UV (210nm, 254nm)						
移動相	A溶液: 0.1%ギ酸水溶液 B溶液: 0.1%ギ酸/アセトニトリル溶液						
移動相組成	時間(分)	0	5	100	110	110.1	125
	B溶液(%)	5	5	95	95	5	5
分画条件	試料注入10分後より100分まで1.5分毎(≒1.5mL)に採取						

##### 4.2 結果

標準物質を用いた HPLC 分画条件の最適化を行った。今回の検討では逆相系での分離を検討したため、カラムに導入された化学物質は極性の高いものから溶出し、極性の低い化学物質ほど溶出位置が遅くなる。検討の結果、ほぼすべての成分について分離を行うことができた (図9)。E1とEE2については保持時間が近く、完全に分離することはできなかったが、各物質の寄与は機器分析の結果と比較すること

表10 曝露後のヒメダカの体長、体重、肝重量、ビテロジェニン濃度—中川八条橋監視所

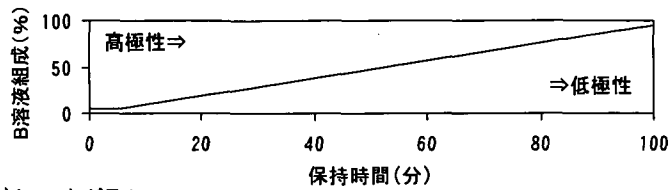
個体No. THN01-	体長 mm	体重 mg	肝重量 mg	肝指数 %	VTG濃度(ELISA) ng/mg liver
1401	27.4	389.5	6.3	1.62	ND
1402	31.2	485.2	11.3	2.33	ND
1403	27.9	335.3	5	1.49	ND
1404	27.1	344.1	6.2	1.8	ND
1405	27.2	321.9	5.3	1.65	ND
1406	26.2	358.9	6.9	1.92	ND
1407	27.7	367.3	7	1.91	ND
1408	29	387.9	8.4	2.17	ND
1409	28.8	360.2	5.5	1.53	ND
1410	30.2	502.9	10.6	2.11	ND
1411	27.3	361.1	6.9	1.91	ND
1412	24.9	286.7	6.1	2.13	ND
1413	30.4	472.7	8.3	1.76	ND
1414	30.4	496.8	12.3	2.48	ND
1415	28.6	420.7	8.8	2.09	ND
1416	29.4	446.4	10	2.24	ND
1417	29.7	438.1	6.2	1.42	ND
1418	28.5	344.8	6.3	1.83	ND
1419	27.4	394.1	8.6	2.18	ND
1420	27.5	434.5	10	2.3	ND
最大	31.2	502.9	12.3	2.5	—
最小	24.9	286.7	5	1.4	—
平均	28.3	397.5	7.8	1.9	—
標準偏差	2	62	2.1	0.3	—

ND <0.5 ng/mg liver

により明らかになると思われる。

上記の条件を用い、下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分を YES に供した。その結果、図 10 に示すように、いずれの試料においても E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン活性が検出され、さらに E1 の寄与が高いことが実測された。また、流入下水においては E1 や E2 より早い保持時間に活性が検出された。溶出位置から判断すると、E1-3S の保持時間に近いため、同物質の寄与が考えられるが、今後機器分析の結果と合わせて検討を行っていく。

a) 溶離液組成



b) クロマトグラム

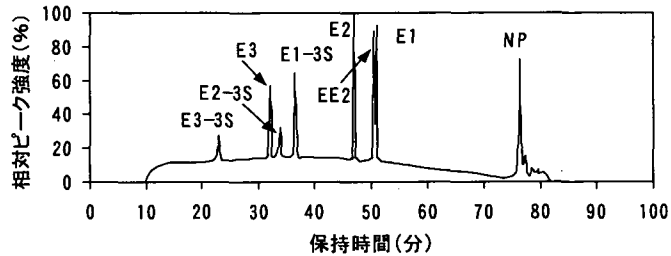
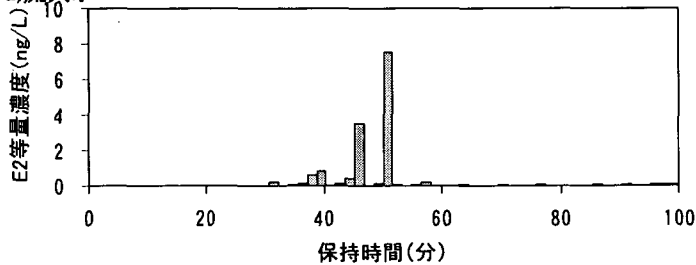


図 9 HPLC を利用した極性分画手法 (順相)

溶離液組成: A液 (0.1% 酢酸水溶液)  
 B液 (0.1% 酢酸/アセトニトリル溶液)  
 E1: エストロン、E2: 17β-エストラジオール、E3: エストリオール、E1-3S: E1 硫酸抱合体化物、E2-3S: E2 硫酸抱合体化物、E3-3S: E3 硫酸抱合体化物、NP: ノニルフェノール

a) 流入水



b) 二次処理水

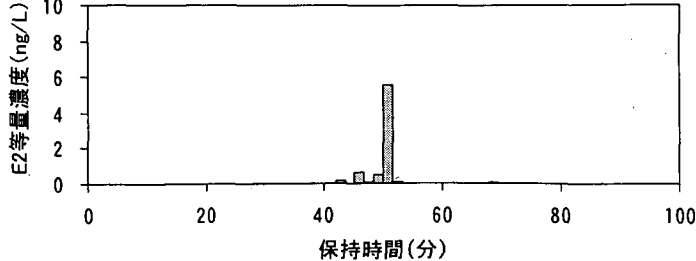


図 10 HPLC を利用した下水試料の極性分画

## 5 まとめ

本年度の研究は、下記のとおり成果を得た。

- (1) 17β-エストラジオール (E2) のメダカへの最小作用濃度は、肝臓 VTG をエンドポイントとする場合、14 日間曝露の場合で 5.0ng/mL と考えられた。その一方、曝露期間が 2 および 7 日間の場合では、最大無作用濃度が同じく 5.0ng/mL と考えられた。河川等の水環境において、エストロゲン濃度が低

くても曝露期間が長くなるとエストロゲン作用を受けたか否かを評価できる可能性が示唆された。

- (2) メダカに及ぼすエストロン (E1) の作用は、最小作用濃度は、3、7 および 14 日間の曝露期間とも 79.5ng/L、最大無作用濃度は 31.6ng/L であった。E2 の 0.18~0.26 倍と推定された。E2 に比べエストロゲン作用の弱い E1 においても、E2 と同様に時間経過にともないメダカに及ぼす作用が大きくなることが明らかとなった。
- (3) 河川水質自動監視所にて、都市排水を対象に現地メダカ曝露試験を 14 日間実施し、エストロゲン活性 (E2 換算値) が E2 の最小作用濃度を越えている地点では、雄メダカにエストロゲン作用が認められることが確認された。
- (4) 標準物質を用いた HPLC 分画条件の最適化を行った結果、エストロゲン類およびそれらの硫酸抱合体化合物の成分について分離を行うことができた。下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分を YES に供した結果、いずれの試料においても E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン活性が検出されるとともに、E1 の寄与が高いことが実測された。

なお、本調査研究は、環境省からの受託業務費により実施されたものである。

## 6 参考文献

- 1) 国土交通省;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)に関する調査の結果について,  
<http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/kisha/naibun010509.html>, 2001
- 2) Ministry of the Environment, Japan; MEDAKA *Oryzias latipes*, Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals,  
<http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html>, 2003
- 3) 財団法人化学物質評価研究機構;平成14年度環境省請負業務結果報告書 内分泌攪乱化学物質による生態影響に関する試験法開発, 2003
- 4) 独立行政法人土木研究所水循環研究グループ水質チーム;都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究(平成14年度地球環境保全等調査研究費報告書), 2003
- 5) 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, 36, pp.199-208, 1999
- 6) 岩松鷹司;メダカ学全書, 大学教育出版, 1997
- 7) 小森行也, 岡安祐司, 八十島誠, 田中宏明;下水処理場におけるエストロゲンの実態調査, 第40回下水道研究発表会講演集, pp.111-113, 2003

## 7 研究発表

- 1) Tanaka H, Yakou Y, Takahashi A, Komori K, Okayasu Y. (2001), Evaluation of environmental estrogens in Japanese rivers, CDROM of Proceedings of WEFTEC'2001.
- 2) Higashitani T and Tanaka H. (2001), Study of the Estrogenic Effects on Fish Exposed to Sewage Treatment Plant Effluents, The 3rd Japan-UK Joint Workshop on Endocrine Disrupting Chemicals, pp.18-19.
- 3) 田中宏明(2001), 水環境における環境ホルモンの汚染状況と魚類の雌性化調査の現状, 日本内分泌攪乱化学物質学会第8回講演会テキスト, pp.27-38.
- 4) 宮本宣博, 玉本博之, 八十島誠, 小森行也, 田中宏明(2001), 下水中のエストロゲン活性の由来に関する検討, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, p.217.
- 5) 東谷忠, 玉本博之, 宮本宣博, 田中宏明, 田村くに江(2001), 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, p.237.
- 6) Miyamoto N, Tanaka H, Tamamoto H, Komori K. (2002), Fractionation method for estimating the cause of estrogen-like Activity in Sewage, CDROM of Proceedings of WEFTEC'2002.
- 7) Higashitani T, Tamamoto H, Takahashi A, Tanaka H. (2003). Study of Estrogenic Effects on Carp (*Cyprinus*

carpio) Exposed to Sewage Treatment Plant Effluents, *Water Science & Technology*, Vol.47, No.9, pp93-100.

8) 東谷忠, 玉本博之, 宮本宣博, 八十島誠, 田中宏明(2002), 下水処理水に曝露した雄コイのピテロジェニン誘導に関する研究, *環境工学研究論文集*, Vol.39, pp.97-108.

9) 玉本博之 宮本宣博 八十島誠 小森行也 東谷忠 田中宏明(2002), 河川水中に存在するエストロゲン様活性の消長と寄与物質の挙動, *日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集*, p.170.

10) Tanaka H, Higashitani T, Miyamoto N, Tamamoto H, Komori K, Tsujihara K, Onishi Y. (2003), Estrogenic activity of riverwater and feminization of wild carp in Japan, CDROM of Proceedings WEFTEC' 2003.

11) Higashitani T, Miyajima K, Nakata N, Yasojima M, Tanaka H. (2004), Development of On-site Fish Exposure System Placed in Water Quality Monitoring Stations Along a River. 4<sup>th</sup> IWA World Water Congress (accepted)

## 7. 遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究

水循環研究グループ 水質チーム    首席研究員  田中宏明  
                                  主任研究員  宮島  潔  
                                  専門研究員  東谷  忠  
                                  専門研究員  山下尚之

### 1. はじめに

人間生活の質的向上にともなって、新規の化学物質が用いられることが多くなってきた。とくに、日常生活で消費される医薬品や合成洗剤などは下水道に集中するため、下水処理場の放流先では、水生生物への新たな環境ストレスを生み出している可能性があり、さらには水利用によるヒトへの影響についても危惧される。

水生生物におけるさまざまな環境ストレスを評価する手法として、生物の応答によってその程度を検出するバイオアッセイが行われている。しかしながら、従来のバイオアッセイでは、生体における微妙な変化を検出することは困難であり、慢性毒性や急性毒性などさまざまな環境ストレスに共通して対応できる手法は開発されていない。一方、ヒトを対象とする医学分野では、遺伝病の疾病因子つまり遺伝子を明らかにする研究が進んでおり、近年では、疾病遺伝子の発現状況をもとにした遺伝子診断が行われている。そして最近になって、この遺伝子解析手法を環境分野に適用して、生物個体への環境ストレスを検出する新たなバイオアッセイとして確立しようと研究が進められている。

生体における遺伝子発現は、免疫反応に代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルにおいて環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待される。とくに、慢性毒性および急性毒性のそれぞれに、あるいは両者に共通して対応する遺伝子を使用することができれば、1つのサンプルからさまざまな環境ストレスを検出することの可能な手法になると期待できる。

そこで本研究は、医学分野における遺伝子レベルでの研究手法をもとに、これを環境ストレスの評価に応用するための基礎的検討に着手し、新たなバイオアッセイの一手法を開発することとした。

### 2. 遺伝子診断技術の選定

遺伝子レベルでの発現解析を行う方法として、現在、DNA マイクロアレイが定着している。これは、スライドガラスなどの基板上に多数の遺伝子を貼り付けた DNA チップを準備し、これに生体サンプルから抽出した mRNA を適用して、これらの結合反応の状態から遺伝子発現について解析する手法である。

DNA チップは、その作製方法から網羅的 DNA チップおよび機能的 DNA チップに分類される。

網羅的 DNA チップには、公開されているデータベースの情報をもとに、DNA ライブラリーからランダムに DNA を選んでスポットしたものや、文献など既知の情報をもとに研究目的に合った遺伝子を選んでスポットしたものがある。網羅的 DNA チップの前者では、対象とする影響とは無関係な遺伝子の発現変動によって解析が困難になるという欠点が、多数の事例でみられている。また後者は、少ないスポット数であっても多くの情報が得られる解析しやすいチップと考えられるが、既知のデータベースによるため新規の遺伝子は存在せず、本来関係するはずの遺伝子を見落として可能性がある。

一方、機能的 DNA チップは、対象とする影響に対し発現量に差のある遺伝子をあらかじめ選出してスポットしたものであり、解析する場合に多くのスポットで遺伝子発現の差がみられる。さらに、遺伝子を選び出す際にはその遺伝子の機能などに関する情報を必要としないので、これらの中に新規遺伝子が発見されることも期待される。

そこで、本研究では、機能的 DNA チップを用いる DNA マイクロアレイを遺伝子解析手法と選定し、今後の研究を進めることとした。

機能的 DNA チップを用いる本研究の進め方を表 1 に示す。

表 1 本研究の進め方

機能的 DNA チップの作製	
変動遺伝子の抽出・選定	
実験生物の選定	メダカ
第 1 環境ストレスの選定	KCN
曝露試験	
遺伝子の抽出	KCN 曝露 - 非曝露 (対照) 間での発現変動
cDNA ライブラリーの作製	Megaclone
変動遺伝子の選択	Megasort
DNA チップの作製	
スポッティング	

### 3. 機能的 DNA チップの作製

環境ストレスによって生体に生じる遺伝子発現の変動は、平常時における遺伝子発現と影響下での遺伝子発現を比較することによって検出できる。また、個々の影響ごとに発現変動する遺伝子があると考えられるため、調べたい影響ごとに遺伝子変動が明らかであればさらに都合がよい。

機能的 DNA チップは、調べたい影響によって変動する遺伝子をスポッティングしたチップであるため、その作製には、あらかじめ調べたい影響によって生物を曝露し、その結果得られる生体サンプルから変動遺伝子を抽出する必要がある。

#### 3.1 実験生物の選定

生物の遺伝子情報の解析は、実験動物として一般的な生物種から着手されており、水生生物では魚類のメダカやゼブラフィッシュ、さらには水産有用魚種で顕著に進んでいる。

本研究では、内分泌攪乱作用や毒性試験などさまざまな調査・研究に用いられているメダカを対象とした。メダカは、河川での化学物質による魚類影響を明らかにするため一般的に用いられている魚種であり、実験動物としての研究事例が多く、他の生物に比べメダカ自体についての生物学的知見も多い。

#### 3.2 第 1 環境ストレスの選定

本研究では、最初の機能的 DNA チップを作製するにあたって、1 番目の環境ストレスをシアン化合物 (KCN) に選定した。シアン化合物は毒性作用が強いため、遺伝子変動が顕著に表れると考えられ、最初のチップを作製するうえで目安になると考えられた。

また、魚類斃死事故の事例では、シアンが原因であった場合もあることから、将来的には、このチップが事故原因を直ちに特定するツールになるとも想定された。

#### 3.3 メダカ曝露試験

シアンに対するメダカの遺伝子発現の変動を検出するため、曝露方法は半数致死濃度での 96 時間急性毒性試験法を採用した。シアン化合物 (KCN) の濃度は、コイの半数致死濃度である 0.5mg/L と設定した。

生体サンプルは、96 時間の曝露の結果生存した個体の肝臓およびエラとした。これらの個体では、シアンに対する薬物代謝等の防御反応をとることに成功し、遺伝子レベルでの対応が効果的に行われたと考えられる。また、肝臓およびエラは、それぞれ代謝および呼吸に関与する組織であり、シアンによって遺伝子変動が生じやすい組織であると同時に、平常時においても細胞分裂の活発な組織である。

96 時間の曝露後、生存した個体は、体サイズを測定した後に肝臓およびエラを取り出して、これらを速やかに液体窒素で凍結した。また、曝露途中で死亡した個体についても、死亡を確認した時点で同様の解剖を行った。

メダカ曝露試験の試験条件を表 2 に示す。また、シアン曝露群および対照群のメダカについて、解剖時の体サイズを表 3 に示す。

表 2 メダカ曝露試験の試験条件

試験方法	内容	詳細
影響物質	KCN	
設定濃度	0.5 mg/L	参考：コイの EC50 値
試験魚	ヒメダカ (d-rR 系統)	土木研究所飼育個体
曝露方式	半止水式	24 時間ごとに全量交換
試験水槽	2L ガラス製円形水槽	
個体数	48 個体 (雌雄各 24 個体)	(♂4 + ♀4) / 水槽 × 6 水槽
試験密度	4 個体 / L	1 個体 0.3g として、1.2 g/L
日長条件	16 時間明 - 8 時間暗	照明点灯：8:00 ~ 24:00
水温	26°C	

表 3 曝露試験に用いたメダカの体サイズ

分類	個体数	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (mg)
KCN 生存オス	14	27.9±1.3	22.7±1.1	170.9±25.6
KCN 生存メス	15	28.1±2.2	23.3±2.0	179.7±52.0
Control オス	10	29.8±1.0	25.0±1.4	228.6±21.9
Control メス	10	28.4±1.5	24.0±1.4	195.8±30.3

### 3.4 遺伝子の抽出

シアン曝露メダカおよび対照メダカから得られた組織サンプルについて、雌雄および臓器ごとに分けて RNA の抽出および精製を行った。なお、RNA の純度については、抽出・精製の各段階における OD 測定の際に Agilent 2100 Bioanalyzer によって電気泳動パターンを確認して行った。

#### (1) RNA 抽出

各組織サンプルは、TRIzol (Invitrogen 社) 3~6ml を加えてホモジナイズした後、同製品のプロトコールに従い RNA を抽出し、最終的に 50µl の DEPC 処理水に溶解した。抽出した total RNA の一部を用いて、OD260 および OD280 を測定して濃度を算出した。

#### (2) total RNA および poly(A)+RNA の精製

抽出 RNA をフェノール/クロロホルム処理、クロロホルム処理した後、イソプロパノール沈殿により回収した。この total RNA を 400µl の DEPC 処理水に溶解し、1µg あたり約 0.2U の RNase-free DNase I (Takara) を添加し、37°C で 30 分間処理した。フェノール/クロロホルム処理、クロロホルム処理した後、イソプロパノール沈殿により回収し、50µl の DEPC 処理水に溶解した。この精製 total RNA の一部を用いて、OD260 および OD280 を測定して濃度を算出した。

poly(A)+RNA の精製は、Oligotex-dT30<Super> mRNA purification kit (Takara) を用いて、製品プロトコールに従って行った。エタノール沈殿・乾燥後、DEPC 処理水 5~10µl に溶解した。得られた poly(A)+RNA は、一部を用いて OD 測定して濃度を算出した。

表 4 に RNA の抽出・精製結果を示す。

肝臓由来の精製 total-RNA は、シアン曝露および対照ともに十分な収量があり、濃度を表す OD260/280 値は期待値 1.7 をよく上回っていた。しかし、エラ由来の抽出 RNA は、十分な収量が確保できないことが判明した。

#### (3) 解析用サンプルの調製

機能的 DNA チップを作製するためのこれ以後の操作に必要な RNA サンプルには、肝臓由来の精製 poly(A)+RNA を用いることとした。さらに、雌雄の肝臓由来 RNA を等量混合して、表 5 に示す 2 つのサンプルを得た。



表4 RNAの抽出・精製段階における収量(μg)とその濃度(OD260/280値)

分類 (カッコは個体数)	抽出RNA		精製 total-RNA		精製 poly(A)+RNA	
	μg	OD260/280	μg	OD260/280	μg	OD260/280
KCN 生存オス・肝臓(14)	294	1.72	198	1.64	3.3	1.75
				全量精製→		
KCN 生存メス・肝臓(15)	897	1.77	712	1.70	5.0	1.73
				260μg 精製→		
KCN 生存オス・エラ(14)	242	1.67	—	—		
KCN 生存メス・エラ(15)	295	1.73	—	—		
Control オス・肝臓(10)	265	1.75	210	1.85	3.5	1.53
				200μg 精製→		
Control メス・肝臓(10)	634	1.87	557	1.85	4.9	1.63
				250μg 精製→		
Control オス・エラ(10)	276	1.77	180	1.81	4.0	1.66
Control メス・エラ(10)	212	1.75	144	125μg 精製→		
				125μg 精製→		

表5 解析用サンプル

名称	精製 poly(A)+RNA	
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	KCN 生存オス・肝臓(14)	1.5μg
	KCN 生存メス・肝臓(15)	1.5μg 等量混合
メダカ肝臓コントロール Mix	Control オス・肝臓(10)	1.5μg
	Control メス・肝臓(10)	1.5μg 等量混合

### 3.5 cDNA ライブラリーの作製

第1号となる機能的 DNA チップには、シアン曝露によって変動するメダカ遺伝子をスポットティングする。変動遺伝子の抽出・選択などの作業を行うためには、多数の遺伝子クローンを増幅した後、ライブラリーを作製して塩基配列ごとに整理しておく必要がある。そのため、解析用サンプルとして調製したメダカ肝臓のシアン曝露 Mix とコントロール Mix の poly(A)+RNA 各 2μg を用いて、それぞれの cDNA (complementary DNA ; mRNA を鋳型として逆転写酵素によって合成される相補的 DNA) を合成・増幅させ、ライブラリーを作製した。

ここでは cDNA ライブラリー作製方法として、メガクローン (Megaclone) と呼ばれる技術を用いた。これは、発現しているほぼすべての遺伝子を網羅的に捕獲し、直径 5μm のマイクロビーズに固定化する技術である。

1個のマイクロビーズにはあらかじめ1種類の Anti-tag 配列が固定化されている。Anti-tag 配列は4塩基からなるワード8種類を8個並べたものであり(表6参照)、その数は8<sup>8</sup>つまり約1,700万種類が準備されている。この Anti-tag 配列に相補的な Tag 配列を poly(A)+RNA 由来の cDNA に付加させておくと、Tag と Anti-tag の特異的な結合によって1個のマイクロビーズに1コピー由来の cDNA が捕獲されたビーズライブラリーを調製することができる。

表7に、最終的に調整された各サンプルの遺伝子数(マイクロビーズ数)を示す。

表6 Anti-tag 配列の8つのワード

ワード1	ワード2	ワード3	ワード4	ワード5	ワード6	ワード7	ワード8
CATT	CTAA	TCAT	ACTA	TACA	ATCT	TTTC	AAAC

表7 Megaclone マイクロビーズ数

メダカ肝臓コントロール Mix	メダカ肝臓シアン曝露 Mix
-----------------	----------------

### 3.6 変動遺伝子の選択

シアン曝露によって変動したメダカ遺伝子を抽出・選択するため、ここではメガソート (Megasort) と呼ばれるソーティング技術を用いた。

これは、Megaclone で網羅的に得られた発現遺伝子から、2種類のサンプル間で発現差のある遺伝子を取り出す技術である。2種類の細胞由来の遺伝子を異なる蛍光物質で標識し、Megaclone で得られたビーズ上で競合ハイブリダイゼーションさせ、セルソーターで分離し、蛍光強度差から既知・未知にかかわらず発現差のある遺伝子を網羅的に分取するものである。さらに、分取したビーズに捕獲されている遺伝子をシーケンシングすることにより、その配列情報を得ることができる。表 8 に解析用サンプルとそれぞれの標識蛍光色素を示す。

表 8 解析用サンプルと標識蛍光色素

サンプル	蛍光色素	
	Fluorescein	Cy5
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	—	○
メダカ肝臓コントロール Mix	○	—
シアン曝露 Mix とコントロール Mix の cDNA 等量混合物	○	○

#### (1) プレソート

図 1 にシアン曝露によるメダカ遺伝子に関する発現変動検出結果を示す。

図の右図で検出されたように、シアン曝露およびコントロールで得られたメダカ遺伝子は、ほとんどが同レベルの発現量であると認められる一方、発現量の変動した遺伝子も明瞭に区分された。同レベルの発現量を示す遺伝子は  $y = x$  の直線上にプロットされ、この直線の下側のプロットは、コントロール Mix で発現しているもののシアン曝露によってその発現が抑制された遺伝子である。これに比べ遺伝子数は少ないが、シアン曝露によって発現を促進された遺伝子も認められた。

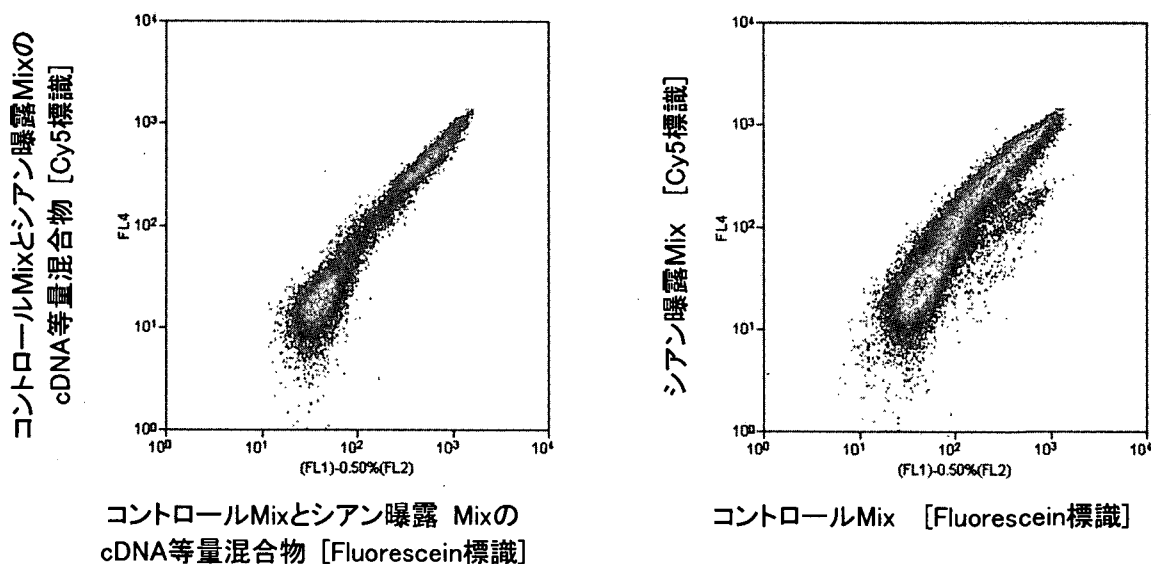


図 1 シアン曝露メダカ遺伝子の発現変動(左: 蛍光物質による標識の確認、右: 発現変動)

#### (2) メガソート

変動遺伝子をより明瞭に区分するため、ゲート設定として、ブロッカーとハイブリダイズしない遺伝子を検出することとした。続いてブロッカーとハイブリダイズしなかったマイクロビーズを用

いて、プレソートと同様に変動遺伝子を抽出し、ソーティングを実施した。

図2にメガソートのソーティング範囲を示す。また、表9に検出遺伝子数を示す。

このソーティングの結果、メダカのシアン曝露によって変動する遺伝子として、シアンによって発現促進される遺伝子 889 個、抑制される遺伝子 2859 個を選別することができた。

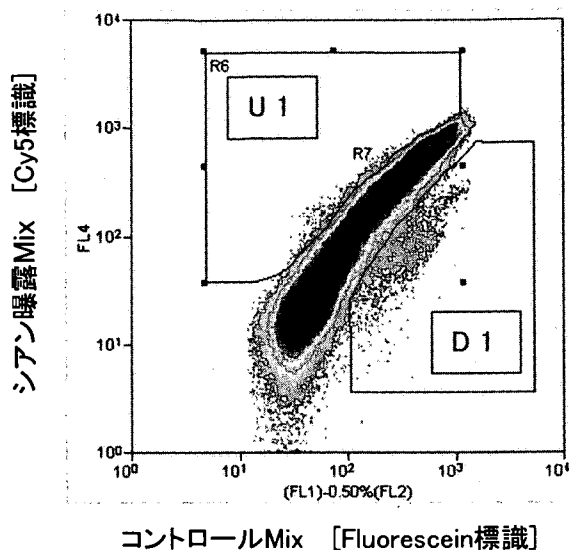


図2 シアン曝露メダカ遺伝子の発現変動とソーティング

表9 検出遺伝子数（マイクロビーズ数）とその割合

シアン曝露-コントロール 共通ビーズ数	ゲート内ビーズ数	U1	D1
684,000	532,000 78%	889 0.13%	2859 0.44%

### 3.7 変動遺伝子のスポッティング

シアン曝露によって発現変動した遺伝子のうち、発現促進 (U1) および発現抑制 (D1) のうち変動幅の大きい遺伝子からスポッティング可能な配列長をもつ遺伝子それぞれ 90 個を用いて、機能的 DNA チップの第 1 号を作製した。

なお、これらの塩基配列を既存のデータベースに照合したところ、D1 において最も変動幅の大きい遺伝子は、エストロゲンによって合成される卵黄タンパク前駆物質ピテロジェニン I であった。

## 4. 今後の課題

本研究の成果として、メダカ DNA チップ第 1 号を作製した。今後は、このメダカ DNA チップに搭載した遺伝子群が、シアンのほか、多岐にわたる環境ストレスによってどのように発現変動するのかを調べ、さまざまな環境ストレスに対する応答性を調べる必要がある。これによって、広範な環境ストレスを検出することの可能な DNA チップへと性能拡大するため、あらためて搭載遺伝子を探索していく必要を明らかにできる。

また、シアン曝露による遺伝子変動の表れ方について、曝露経過時間にもともなう発現変動を追跡することによって環境ストレスによるメダカ体内での反応、対応速度を明らかにできると考えられる。

なお、本試験研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

## 8. 河川水質浄化事業の評価と改善に関する調査

水質チーム 上席研究員 田中宏明  
主任研究員 小森行也  
研究員 岡安祐司

### 1. はじめに

河川環境管理の水質目標を達成するため、河川直接浄化施設等による河川浄化事業が実施されている。しかし、どのような水質改善の事業効果がみられるのか、また、河川直接浄化施設の機能が維持されているか情報が必ずしも十分ではない。また、直接浄化施設の適正な機能を維持するために必要な設計や維持管理の方法が必ずしも十分研究されていない。このため、行政や現場からこれらを解明する研究が求められている。

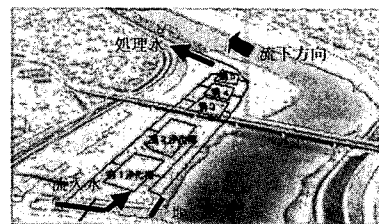
本調査は、土木研究所が河川浄化事業に関する評価と改善を国土交通省水質連絡会の共通テーマとし指導するとともに、河川直接浄化施設での微量汚染物質（エストロゲン様活性等）の除去およびアンモニア除去（水道原水と生態系保全に削減が重要）に焦点を当て、除去機構の理解を深めるとともに、設計や維持管理の改善の提言を行うことを目標としている。平成 15 年度は、河川直接浄化施設におけるエストロゲン様活性の除去特性調査を実施するとともにアンモニア除去機構解明のための河川直接浄化施設の実験模型を作製した。

### 2. 調査方法

#### 2. 1 河川浄化施設におけるエストロゲン様活性の除去特性調査

図-1 に示す K 浄化施設において調査を行った。処理方式はバッキ付礫間接触酸化方式、処理水量 216,000m<sup>3</sup>/日、水理的滞留時間 2.5-3.5 時間の施設である。水質調査項目は、エストロゲン様活性<sup>1)</sup>とし、この他 SS、BOD のデータを K 浄化施設の管理者より提供を受けた。

処理方式：バッキ付礫間接触酸化方式  
処理水量：216,000 m<sup>3</sup>/日  
水理的滞留時間：2.5 - 3.5 時間



#### 2. 2 河川浄化施設の実験模型作製

河川浄化施設におけるアンモニア除去機構解明のためのデータ取得が可能な実験装置とするため、①水理的滞留時間の変更が可能、②反応槽内での反応時間を考慮した試料採取が可能、③好気・嫌気の両条件の運転が可能な実験装置となるよう設計した。

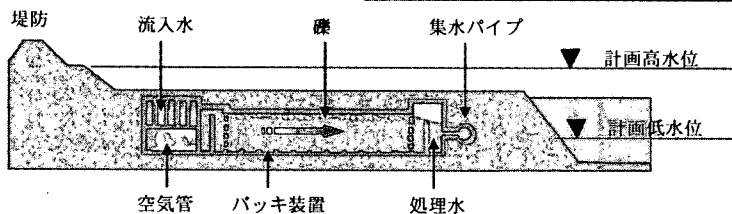


図-1 K 浄化施設の概要

### 3. 調査結果

#### 3. 1 河川浄化施設におけるエストロゲン様活性の除去特性調査

調査期間中 6 回水質測定を行い、その結果を表-1 に示した。平均値を用い河川浄化施設におけるエストロゲン様活性の除去率を求めると 67% であり、SS 除去率 66%、BOD 除去率 40% に比べ同等

あるいはそれ以上であった。

### 3. 2 河川浄化施設の実験模型作製

処理水量を 144L/日、反応槽での水理学的滞留時間を 2 時間に設定し実験装置の基本設計を行った。図-2 に示すように、30L の反応槽に碎石を充填（有効容積 15L）し、5 つに仕切ることにより反応時間を考慮した試料採取ができる設計とした。No.1 をエアレーション有、No.2 をエアレーション無とする 2 組み作製した。流入水ポンプは流量可変式とし滞留時間の設定（1-4 時間）が可能な設計とした。実験装置作製後、リチウムをトレーサーとし滞留時間の確認試験を実施した。実験装置の流入水量を 144L/日に設定、水理学的滞留時間を 2 時間に設定し、1g/10mL の塩化リチウム溶液を約 1ml 添加し 15 分間隔で処理水を採取しリチウム濃度をイオンクロマトグラフィで測定した。トレーサー試験結果を図-3 に示した。実験装置 No.1、No.2 とも設定した滞留時間とほぼ同じ 2 時間を示した。

表-1 水質調査結果

	エストロゲン様活性 (ng/l)		SS (mg/l)		BOD (mg/l)	
	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水
1	1.3	0.3	5	0.5	3.9	2.8
2	1.4	0.6	1	0.5	3.1	2.7
3	2.1	0.1	3	0.5	3.6	2.7
4	2.2	0.8	19	2.6	7.5	2.1
5	3.1	0.8	7	3	5.7	2.8
6	2.3	1.4	8	7	4.4	3.7
最大値	3.1	1.4	19	7	7.5	3.7
最小値	1.3	0.1	1	0.5	3.1	2.1
平均値	2.1	0.7	7	2.4	4.7	2.8

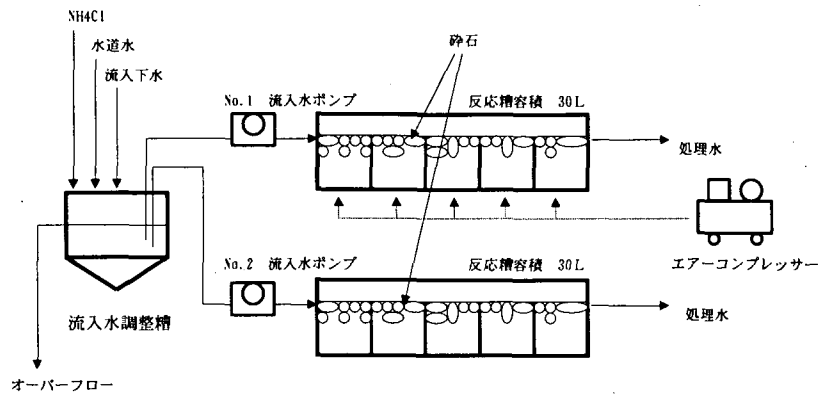


図-2 実験装置

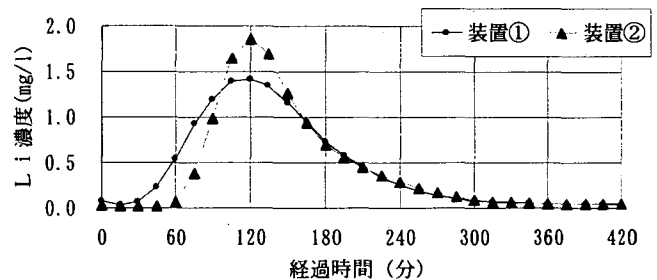


図-3 トレーサー試験結果

### 4. まとめ

本調査の成果として、以下のことが明らかとなった。

- 1) K河川直接浄化施設においてエストロゲン様活性の除去特性の調査を実施した結果、除去率は 67%であり、SS 除去率 66%、BOD 除去率 40%に比べ同等あるいはそれ以上であった。
- 2) 水理学的滞留時間の変更が可能な礫間接触酸化方式の河川直接浄化施設の実験模型を作成した。トレーサー試験を行い接触酸化槽での平均的な滞留時間を調査したところ、設定した水理学的滞留時間とほぼ同じ値を示した。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

### 5. 参考文献

- 1) 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、第 36 巻、pp.199-208、平成 11 年

## 9. 河川底質のダイオキシン類対策における

### モニタリング技術の実用化研究

水質チーム 上席研究員 田中宏明  
主任研究員 小森行也  
研究員 岡安祐司  
交流研究員 八十島誠

#### 1. はじめに

ダイオキシン類は、従来から指摘されている発がん性等の有害性に加えて外因性内分泌かく乱物質（いわゆる環境ホルモン）としても注目されている物質である。平成 12 年 1 月 15 日にダイオキシン類による環境の汚染の防止及びその除去等をするため、ダイオキシン類に関する施策の基本とすべき基準を定めるとともに、必要な規制、汚染土壌に係る措置等を定めることにより、国民の健康の保護を図ることを目的とした「ダイオキシン類対策特別措置法」が施行され、ダイオキシン類汚染に対して適切な対応を取ることが必要となった。河川管理においても河川水・底質の汚染に対して適切な対応を取る必要がある。これまでの調査<sup>1), 2), 3), 4)</sup>により河川水・底質のダイオキシン類汚染の状況も明らかになりつつあるが、これらの調査により高濃度の汚染が判明したところにあっては対策の実施が必要である。平成 14 年 7 月 22 日に環境省告示第四十六号により「水底の底質」の環境基準（基準値:150pg-TEQ/g 以下）が示された。底質のダイオキシン類の分析は、「ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル」<sup>5)</sup>（以下、公定法）に準拠して行われているが、公定法では高度な前処理技術と高価な分析装置を要し、1 検体の分析費用は、含有量試験で 20 万円、溶出試験で 16 万円<sup>6), 7)</sup>と高額である。また試料採取後、分析結果が報告されるまでには一ヶ月程度の期間を要する場合が多い。「ダイオキシン類対策特別措置法に基づく底質環境基準の施行について（通知）」<sup>8)</sup>（以下、通知）によると底質において環境基準値を超える汚染が判明した場合は、対策を講じることとされているが、底質環境基準値超過が判明した場合、まず、どこが最も汚染されていて優先的に対策を講じる必要があるかを見極める必要がある。そのためには、汚染範囲を詳細に調査することが重要であるが、公定法では、より正確な結果が得られる反面、分析費用が高額、結果を得るまでに時間が掛かる等課題も多い。そこで、安価に、かつ、迅速にダイオキシン類濃度を知る方法（以下、簡易分析技術）があれば、この方法を用いて対策を講じる範囲を決定することも可能になる。そのため、対策実施のためにも簡易分析技術の開発が望まれている。

ダイオキシン類の簡易分析技術については、これまでも多くの報告があり、ダイオキシン類そのものを測定する方法と、ダイオキシン類と相関があるとされる代替指標を測定する方法に大別される。ダイオキシン類そのものを測定する方法としては、①四重極 GC/MS による方法<sup>9), 10)</sup>、②四重極イオントラップ型 GC/MS/MS による方法<sup>11), 12)</sup>、③抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイによる方法<sup>13)</sup>、④抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイによる方法<sup>14)</sup>、⑤リポータージーンアッセイによる方法<sup>15), 16)</sup>などがある。代替指標を測定する方法としては、⑥クロロベンゼン、クロロフェノールを測定する方法<sup>17)</sup>、⑦半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定する方法<sup>18)</sup>などがある。これらの方法は、土壌や排ガス、焼却灰等に適用した例は多いが、

底質を対象とした例は少ない。一方でこれらの方法は、分析精度に課題はあるものの、公定法に比べ前処理の簡易化も行っていることから時間短縮、コスト縮減等が期待できる。また、公定法の前処理は、乾燥に数日から一週間、抽出に 16 時間と前処理にも時間が掛かることから、前処理（乾燥・抽出・精製）の簡易化についても検討を行うことが重要である。

河川底質のダイオキシン類対策実施を想定すると、調査段階、工事段階、工事終了後においてダイオキシン類の測定が必要となる<sup>19)</sup>。『調査段階』では汚染範囲の確認調査及び工事の影響範囲調査、『工事段階』では工事境界での底泥の巻き上げ状況把握、上下流への輸送状況の監視、工事区域外の水質、底質への影響及び中間処理・処分施設等の監視を行う。『工事終了後』では汚染現場の改善効果の把握、底質処分場の環境影響を監視する目的でモニタリングを実施する。モニタリングでは多数の試料の迅速な測定、対策中の監視とフィードバックが必要となることから、迅速な分析が可能で、低コストの方法であることが望ましい。

簡易分析技術の適用は、通知において、「汚染範囲確定のための詳細調査範囲を絞り込む場合に用いることは差し支えない」とされている。従って、調査段階における汚染範囲確認調査においては簡易分析技術の適用が可能である。他の工事段階では、簡易分析技術の適用は明確化されていないが、公定法を用いてダイオキシン類濃度をモニターした場合、分析結果が得られるまで工事が進捗しないなど課題も多い。このため、他の工事段階においても簡易分析技術を適用できる可能性が高いと考えられる。しかし、簡易分析技術であっても分析信頼性の確認は重要であり、その方法の特徴を十分把握した上で目的にあった利用が必要である。

## 2. 本研究の目的

本研究の目的は、複数提案されているダイオキシン類の簡易分析技術が、ダイオキシン類の底質汚染が見られる現場でのダイオキシン類の公定法による測定結果の推定に利用できる可能性があるか、また、利用の際の信頼性の評価方法について、実際の汚染現場の底質試料を用いて検討することにある。ここでの利用シナリオとしては、汚染現場の底質汚染の範囲確定を目的とする場合に絞り込む。対象とした簡易分析技術は、土木研究所が公募した「底質ダイオキシン類の簡易測定技術の開発に関する共同研究」に対し応募のあった、抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイによる方法、抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイによる方法と四重極 GC/MS による方法、半・難揮発性有機ハロゲン化合物 (SNVOX) を測定する方法とした。また、測定方法と並んで重要な要素として、乾燥・抽出・精製の前処理のプロセスがある。この方法として、時間の掛かる乾燥を行わずに抽出が可能な高速溶媒抽出法<sup>20)</sup>、加熱流下抽出法<sup>21)</sup>について検討を行った。精製については、公定法の多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーを簡略化した 5 層シリカゲルカラムクロマトグラフィーについて検討した。

## 3. 本研究の方法

### 3. 1 測定方法

抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイによる方法、抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイによる方法では、共同研究を実施している第一ファインケミカル(株)の ELISA キット (DELFLIA TCDD Test Kit: 以下 ELISA(DT2))、積水化学工業(株)・(株)矢内原研究所・大塚製薬(株)・東洋建設(株)グループの ELISA キット (エコアッセイ®ダイオキシン ELISA キット: 以下 ELISA(ECO)) 及び(株)クボタの Ah レセプターバインディングアッセイ (Ah-イ

ムノアッセイ™：以下 Ah-IA) を用いた。ELISA(DT2)の測定原理は、抗マウス IgG 抗体結合ウエルに抗ダイオキシンモノクロナール抗体溶液とサンプルを加え反応させ、次にヨーロピウム(Eu)標識ダイオキシン溶液を加え未反応の抗ダイオキシンモノクロナール抗体と反応させる。最後にエンハンサーを加え形成される Eu キレートが発する蛍光を測定する方法である。ELISA(ECO)の測定原理は、ウサギ抗ダイオキシンポリクロナール抗体を結合したウエルにサンプルとビオチン化ダイオキシンを加え反応させ、次に酵素標識ストレプトアビジンを加えて反応させる。最後に発色試薬として酵素反応基質液を加えて発色させ吸光度を測定方法である。Ah-IA の測定原理は、DRE バインダを固定したウエルに Ah レセプター(AhR)、ARNT、DRE とサンプルを加え反応させると、反応によりダイオキシン類は AhR 複合体を形成しウエル上に固定される。次に複合体に対する抗体、発色酵素を結合させた抗体を加える。最後に酵素に反応し発色する基質を添加し発色させ吸光度を測定する方法である。それぞれの測定方法についてはメーカーの説明書に従って実施した。

四重極 GC/MS による方法は、ダイオキシン類の中から毒性等価係数(TEF: Toxicity Equivalent Factor)を有するポリ塩化ジベンゾーパラジオキシン(PCDDs)の7異性体とポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)の10異性体を同一カラムを用いて同時分析する。分離カラムは、J&W社製のDB-17(内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 $\mu$ m)を用い、パルスドスプリットレス方式で前処理した試料を1 $\mu$ l導入し、昇温(70 $^{\circ}$ C(3min) $\rightarrow$ 25 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 180 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 5 $^{\circ}$ C/min $\rightarrow$ 280 $^{\circ}$ C(4min))分析した。ここでは、特定の異性体濃度からダイオキシン類濃度を推定する方法の検討として、測定17異性体のうち2,3,7,8-TCDDの測定値(以下四重極GC/MS(2378D))について検討した。

半・難揮発性有機ハロゲン化合物(SNVOX)を測定する方法は、燃焼-電量滴定装置により全有機ハロゲンを測定する方法(以下SNVOX)と燃焼-イオンクロマトグラフ装置により塩素イオンを測定する方法(以下SNVOCI)について検討した。試験方法については文献18に従った。

これらの測定方法は、公定法の高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)で測定する方法に比べ、測定値を得るまでの時間を大幅に短縮できる。公定法ではデータの確認作業を含め通常結果を得るまでに一ヶ月程度を要しているが、これらの測定法は1週間程度で結果を得ることができる。

### 3. 2 前処理方法

ソックスレー抽出を用いた公定法のほか、乾燥・抽出を簡易化した高速溶媒抽出法<sup>20)</sup>、加熱流下抽出法<sup>21)</sup>について検討した。高速溶媒抽出法は、湿泥をアセトン(120 $^{\circ}$ C、10.3MPa、20分)で抽出した後、トルエン(160 $^{\circ}$ C、10.3MPa、20分)で抽出し、各抽出液を合わせて次の精製操作を行った。加熱流下抽出方法は、湿泥をエタノール脱水法を用いて水分を除去した後、抽出カラムに充填し常圧下においてカラム上部から加熱したトルエンを一定速度の押し出し流れで通液し抽出する方法である。抽出時間は、高速溶媒抽出で約40分、加熱流下抽出で約2時間であり、ソックスレー抽出の16時間に比べ大幅に短縮できる。

精製については公定法が多層シリカゲルカラムクロマトグラフィー(多層シリカ)、活性炭カラムクロマトグラフィー(活性炭)、アルミナカラムクロマトグラフィー(アルミナ)に加え5層シリカゲルカラムクロマトグラフィー(5層シリカ)について検討した。5層シリカは、公定法が多層シリカのうち22%硫酸シリカゲルと水酸化カリウムシリカゲルとその間のシリカゲルを除いたものである。精製カラム作成時間を短縮でき有害薬品の使用量・廃棄量を削減できる。



### 3. 3 前処理法と測定方法の組み合わせ

本研究で実施した前処理と測定との組み合わせを図-1に示した。ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS (2378D) と SNVOX、SNVOCl では前処理の組み合わせは異なるものの、いずれも5つの前処理である。本検討では大量の底質を一括抽出した後、分割し種々の精製を行いそれぞれ異なる測定方法により測定した。この間の前処理から測定にいたる操作ブランク補正は行っていない。また、活性炭、アルミナ精製のダイオキシン画分を測定に供した。

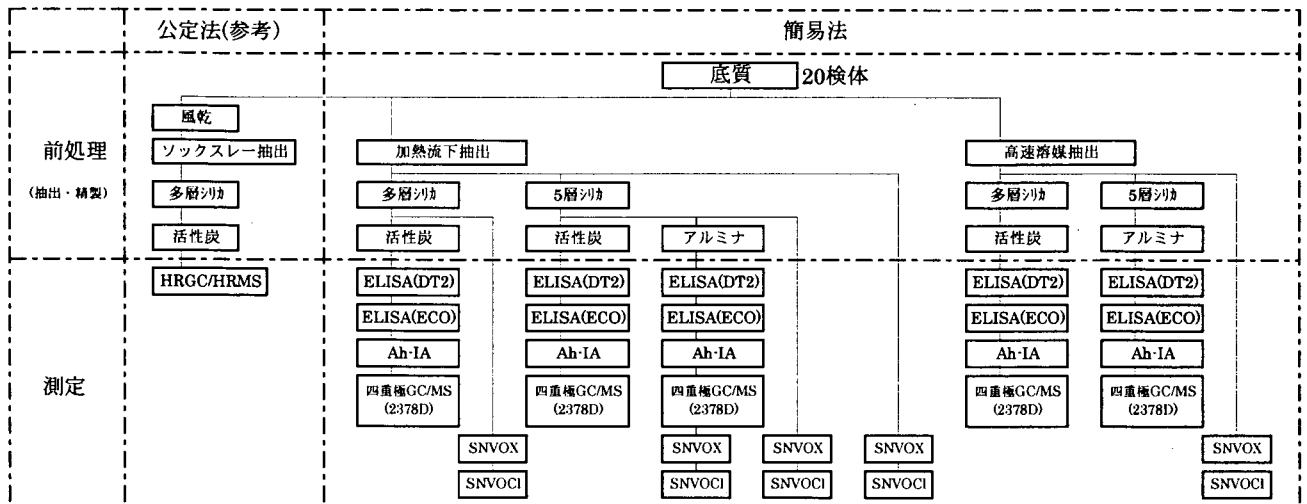


図-1 簡易測定法による底質ダイオキシン類測定手法の検討フロー

### 3. 4 測定試料

検討試料は、表-1に示すように5地域の汚染された底質20検体である。同じ汚染現場でA河川では5地点、B河川では9地点、C河川では1地点、D河川では4地点、E河川では1地点で、エクマンバージ型採泥器を用いて表層10~20cmを採取したものである。A河川のA-①からA-④の底質は、total TEQに占めるPCDDsの割合は50.3~59.1%、PCDFsが35.8~43.2%、Co-PCBsが4.5~6.5%であり異性体構成も同様であったが、A-⑤は、PCDDsが23.9%、PCDFsが35.0%、Co-PCBsが41.1%とA-①からA-④の底質に比べCo-PCBsの割合が高い異性体構成であった。B河川のB-①からB-⑧の底質は、PCDDsが31.0~41.2%、PCDFsが30.5~51.6%、Co-PCBsが13.4~28.3%でありA河川の底質と比べるとPCDDsが低くPCDFs、Co-PCBsの割合が高い異性体構成であった。B-⑨の底質は、PCDDsが78.1%、PCDFsが11.6%、Co-PCBsが10.3%であり他の底質とは異なりPCDDsの占める割合が高い異性体構成であった。C河川、D河川、E河川の底質は、D-②の底質がPCDDsが13.2%、PCDFsが76.2%、Co-PCBsが10.6%でありPCDFsの占める割合が高い底質であったが、他はPCDDsが29.1~36.0%、PCDFsが42.4~47.6%、

表-1 検討試料一覧

河川名	試料No.	強熱減量 (%)	含水率 (%)	DXNs (pg-TEQ/g)
A河川	A-①	17.1	72.4	65
	A-②	14.3	70.3	76
	A-③	12.0	64.0	64
	A-④	12.1	62.0	77
	A-⑤	9.6	50.3	280
B河川	B-①	13.0	39.7	160
	B-②	14.0	41.8	140
	B-③	13.7	44.5	190
	B-④	6.8	30.5	210
	B-⑤	16.1	44.3	330
	B-⑥	12.2	39.5	160
	B-⑦	15.0	47.9	310
	B-⑧	12.9	45.7	280
	B-⑨	8.4	38.9	640
C河川	C-①	25.9	72.1	130
D河川	D-①	7.3	48.3	75
	D-②	19.2	71.9	400
	D-③	13.8	71.5	150
	D-④	7.4	55.6	74
E河川	E-①	12.5	69.7	88

Co-PCBs が 22.3～26.9%であり B 河川の B-①から B-⑧と似通った異性体構成であった。

#### 4. 結果

測定結果は、ELISA(DT2)、ELISA (ECO)、Ah-IA は、標準物質である 2,3,7,8-TCDD 換算の DEQ 値 (Dioxin Equivalent) として、四重極 GC/MS 法は、測定対象とした異性体量として、また SNVOX および SNVOCl は、ハロゲン総量あるいは塩素換算量として表示される。簡易分析技術の測定結果は、そのままダイオキシン類量として表示されるわけではなく、公定法に基づく TEQ 値が別途測定され、その結果と簡易分析技術での前述した測定値との相関関係を把握し、回帰式を求め、それに基づき濃度未知の試料を簡易分析技術の測定値からダイオキシン類の TEQ を推定することになる。一般に、簡易分析技術と公定法との相関をとる場合、X 軸を簡易法の測定値 (x)、Y 軸を公定法の TEQ (y) とし、回帰線を線形、べき乗等とする。ここでは、回帰線をべき乗とした場合の結果で以下議論する。つまり  $y = ax^b$  とし、a、b は定数である。また相関係数は、両対数を取って線形化した場合の値である。

ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS(2378D)、SNVOX、SNVOCl の 6 つの測定方法と高速溶媒抽出法、加熱流下抽出法の 2 つの抽出方法、さらに精製方法の簡易化について 30 の組み合わせを対象に検討した結果を以下に示す。

##### 4. 1 公定法と簡易分析法の相関性

簡易分析技術による測定値と公定法によるダイオキシン類測定値 (pg-TEQ/g) の相関を表-2 に示した。本検討で用いた 20 試料は、前述したとおり採取河川が違うことからダイオキシン類の異性体構成もそれぞれ異なっている。

高濃度汚染の範囲を簡易に推定する場合への適用を考えた場合、ある程度狭い範囲ではその汚染原因も同一と考えられ、底質の異性体構成も類似の可能性が高い。比較的狭い範囲での推定に適用することを想定し、本検討試料 20 検体の中から、B 河川で採取した底質 9 試料の異性体構成を比較し、異性体構成がほぼ同じ 8 試料(B-①から⑧)について公定法と簡易分析技術の関係を求めた。

検討した 30 の組み合わせの結果は表-2 に示すとおりであるが、20 試料の結果について、測定方法から整理すると、ELISA(DT2)は、加熱流下抽出+5 層シリカ+アルミナの組み合わせを除きどの前処理との組み合わせにおいても相関係数(r)が 0.5～0.6 であった。ELISA(ECO)は、加熱流下抽出+多層シリカ+活性炭、高速溶媒抽出+5 層シリカ+アルミナの組み合わせ以外で r が 0.6～0.7 であった。Ah-IA は、加熱流下抽出+多層シリカ+活性炭、高速溶媒抽出+多層シリカ+活性炭の組み合わせで r が 0.6 であった。四重極 GC/MS(2378D)は、加熱流下抽出+5 層シリカ+アルミナの組み合わせを除いて、どの前処理との組み合わせにおいても r が 0.7 を超えていた。なかでも高速溶媒抽出+多層シリカ+活性炭の組み合わせは r が 0.891 であった。SNVOX は、加熱流下抽出+5 層シリカを除きどの前処理との組み合わせにおいても r は 0.6 程度であった。SNVOCl は、どの組み合わせにおいても r は 0.6 程度であった。r が 0.7 を超えた組み合わせについて回帰式の傾きを比較すると四重極 GC/MS(2378D)で測定したケースで傾きが小さく(0.27～0.37)、TEQ 濃度差が小さい試料間の区別判定の観点からも優れている結果となった。

8 試料の場合では、ELISA(DT2)、ELISA(ECO)は、加熱流下抽出+5 層シリカ+アルミナ、高速溶媒抽出+5 層シリカ+アルミナの組み合わせで r が 0.7 を超えた。Ah-IA は、加熱流下+5 層シリカ+アルミナの組み合わせで r が 0.8 を超えた。四重極 GC/MS(2378D)は、加熱流下抽出+多層シリカ+活性炭、加熱流下抽出+5 層シリカ+アルミナの組み合わせを除いて、どの前処理との

検出方法	抽出方法	精製方法		y=ax <sup>b</sup> (n=20)			y=ax <sup>b</sup> (n=8)			
				a	b	r	a	b	r	
ELISA(DT2)	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	15.5	0.46	0.535	343	-0.09	0.223	
		5層シリカ	活性炭	5.30	0.56	0.594	12.4	0.44	0.699	
	高速溶媒抽出	多層シリカ	アルミナ	15.4	0.39	0.365	11.8	0.43	0.751	
		5層シリカ	活性炭	12.8	0.47	0.592	87.4	0.16	0.374	
ELISA(ECO)	加熱流下抽出	多層シリカ	アルミナ	11.6	0.46	0.565	6.02	0.60	0.733	
		多層シリカ	活性炭	19.6	0.32	0.368	449	-0.12	0.264	
	高速溶媒抽出	5層シリカ	活性炭	1.26	0.66	0.614	16.4	0.34	0.661	
		5層シリカ	アルミナ	2.51	0.61	0.711	19.6	0.33	0.717	
	Ah-IA	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	6.74	0.41	0.672	60.4	0.15	0.452
			5層シリカ	アルミナ	0.65	0.75	0.382	4.41	0.53	0.704
高速溶媒抽出		多層シリカ	活性炭	5.61	0.56	0.610	940	-0.23	0.280	
		5層シリカ	活性炭	447	0.14	0.225	2.02	0.68	0.549	
四重極GC/MS (2378D)	加熱流下抽出	多層シリカ	アルミナ	35.7	0.21	0.298	1.16	0.70	0.828	
		多層シリカ	活性炭	11.6	0.38	0.608	37.3	0.24	0.661	
	高速溶媒抽出	5層シリカ	アルミナ	202	-0.03	0.036	14.1	0.33	0.641	
		多層シリカ	活性炭	100	0.30	0.710	198	0.03	0.068	
	SNVOX	加熱流下抽出	5層シリカ	活性炭	105	0.27	0.773	89.1	0.33	0.808
			5層シリカ	アルミナ	119	0.25	0.612	169	0.10	0.271
高速溶媒抽出		多層シリカ	活性炭	79.7	0.37	0.891	82.5	0.36	0.888	
		5層シリカ	アルミナ	93.0	0.29	0.789	129	0.17	0.743	
SNVOCl	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	249	0.43	0.614	205	-0.04	0.072	
		5層シリカ	アルミナ	239	0.63	0.650	253	0.35	0.633	
	高速溶媒抽出	5層シリカ	精製なし	140	0.57	0.433	203	0.26	0.301	
		精製なし	32.5	0.50	0.589	28.9	0.57	0.720		
	SNVOCl	加熱流下抽出	多層シリカ	精製なし	22.3	0.58	0.632	86.9	0.26	0.573
			多層シリカ	活性炭	254	0.44	0.624	205	-0.04	0.073
高速溶媒抽出		5層シリカ	アルミナ	239	0.63	0.645	253	0.35	0.630	
		5層シリカ	精製なし	165	0.72	0.604	225	0.39	0.664	
精製なし	32.9	0.51	0.600	29.5	0.57	0.755				
精製なし	24.2	0.56	0.627	88.4	0.26	0.595				

組み合わせにおいてもrが0.7を超えた。なかでも、高速溶媒抽出+多層シリカ+活性炭の組み合

表-2 公定法と簡易分析技術の関係

わせはrが0.888であった。この8試料の2,3,7,8-TCDDの実測値は、12~64pg/gであり四重極GC/MSで測定可能な濃度であったこと、TEFを持つ異性体構成が類似していたことが他の組み合わせに比較して強い相関を示した要因として考えられる。

これらの結果から、同一河川の比較的狭い範囲で汚染原因が同じと考えられる底質へ適用する場合には、公定法と簡易分析技術の関係は比較的強い相関が得られる場合があると考えられる。

## 5. 考察

### 5.1 簡易分析技術の現場への適用

簡易分析法の現場へ適用する場合として、次の2つのケースが考えられる。

#### ①高濃度汚染分布の推定

公定法と簡易分析技術の関係(回帰式)から底質濃度を推定し、高濃度汚染現場を推定する場合であり、公定法と簡易分析技術の相関の強さによって、推定の誤差が大きく影響する。誤差を含むことを前提として汚染濃度分布を推定し、範囲確定のために公定法によって最終的に測定し、汚染範囲を確定することが必要である。

#### ②基準値(150pg-TEQ/g)の超過の判定

簡易分析技術によって高濃度汚染範囲や基準値超過の有無の判定に適用する場合であり、false negativeとなるある信頼区間の上限値を用いてTEQを推定することが考えられる。信頼区間の上限値としては、一般に90%、95%、99%などが考えられるが、判断の重要性によって信頼度を決定する必要がある。この場合、回帰線の最確値からはかなりのマージンをもって基準値を大きく下回

っていると判定できるが、当然マージンが大きいほど false positive となる量は大きくなるため、処分費用がかさむ。

### 5. 2 公定法と簡易分析技術の回帰式選択の妥当性

4. 1では、公定法と簡易分析技術の相関を回帰線がべき乗となる場合で議論したが、直線回帰とべき乗回帰によりその関係式を求め、両者の違いを議論するため、ELISA(DT2)の関係を例として図-2に示した。

公定法と簡易分析技術の相関を相関係数で比較すると大きく異なることはなく、両者に大きな違いはみられない。ここには示していないが、このほかの場合においても同様な傾向にあった。したがって、公定法と簡易分析技術の関係式を用い高濃度汚染の範囲を推定する場合には、いずれの回帰式を用いても大きな差はないと考えられる。しかし、底質環境基準値(150pg-TEQ/g)を超過しているか否かの判定に使用する場合では、簡易分析技術のデータの信頼性を考慮し $\alpha\%$ (例えば95%)信頼区間の上限値を用いてTEQを推定する方法が考えられる。この場合、図-2からも明らかのように直線回帰では95%信頼区間の上限曲線のy切片は基準値を超えており、簡易分析値が

仮に0 pg/gであった場合でも許容されない結果となる。一方、べき乗回帰を用いた場合、底質環境基準値を簡易分析技術の値から95%信頼区間の上限値を用いて推定可能である。

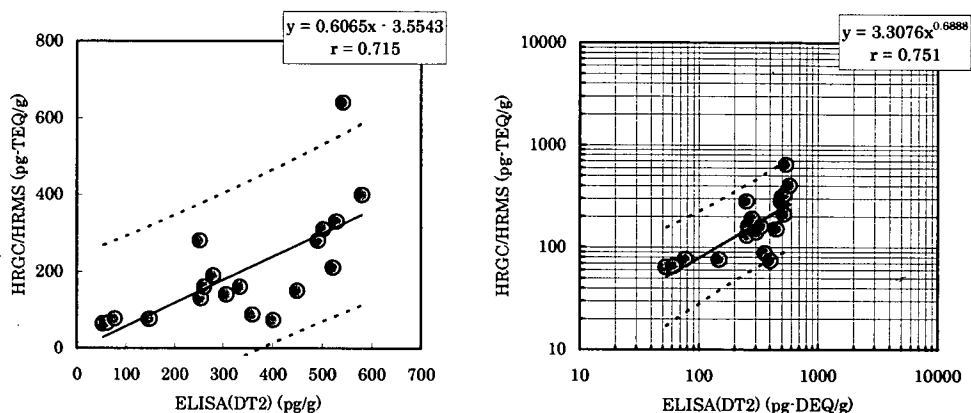


図-2 公定法測定値 (pg-TEQ/g) とELISA(DT2)の関係 (点線は95%信頼区間)

以上のことから公定法と簡易分析

法との関係式からTEQを推定する場合にあってはべき乗回帰を用いる方が実用的であると考えられる。

### 5. 3 false negativeを防ぐための信頼区間と相関性の関係

簡易分析技術によってある基準値を超過しているか否かの判定等に適用する場合、測定値の信頼性を考慮する必要がある。例えば、図-3のようにELISA(DT2)を例にすると、環境基準値150pg-TEQ/gに相当するELISA(DT2)の測定値は、回帰線上の値である、254pg/gの可能性が最も高い。しかし、この値を超える可能性もあることから、 $\alpha\%$ の信頼度をもつ回帰線の信頼区間の上限値を推定して用いる必要がある。 $\alpha$ としては、90%、

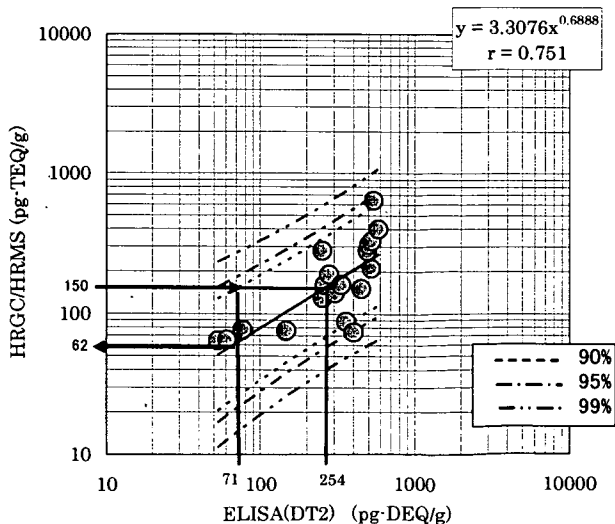


図-3 回帰式の90%,95%,99%信頼区間

95%、99%などが通常取られる。 $\alpha=90\%$ が取られたとすれば、 $y=150\text{pg/g}$ に相当する90%の信頼区間上限値のELISA(DT2)による推定値は $71\text{pg/g}$ となるが、その値に対して最も可能性が高い公定法による値は $62\text{pg/g}$ に相当する。従って、環境基準値 $150\text{pg/g}$ を90%信頼区間上限値で推定するとその2.4倍程度の安全サイドの判定をすることになる。回帰式から推定する値の信頼区間を大きくすると、その推定幅も当然大きくなるため、信頼区間をいくつにとるかについては目的に応じて判断する必要がある。

簡易分析技術を環境基準値 $150\text{pg}\cdot\text{TEQ/g}$ 超過の判定に使用する場合の安全側のマージンの大きさと回帰線の相関性の強さとは、当然関係があると考えられる。仮に $\alpha=95\%$ を信頼区間の上限値と回帰線から推定された最確値の比と回帰式の決定係数との関係を図-4に示すが、両者に負の相関が認められる。本検討で用いた20試料で相関をとる場合、相関係数0.7を超えるケースでは95%信頼区間の上限値/最確値は約3である。この結果から、簡易分析技術を基準値( $150\text{pg}\cdot\text{TEQ/g}$ )超過の判定に使用する場合、最確値からの乖離を3倍以下に抑える意味においても回帰式の相関係数は0.7以上であることが望ましい。ただし、図では検討を前述の同一汚染現場8個の場合にした場合で、両者の関係が異なることが分かるように、公定法と簡易分析技術の関係を求める際の試料の特性、試料数等により相違があることに留意する必要がある。

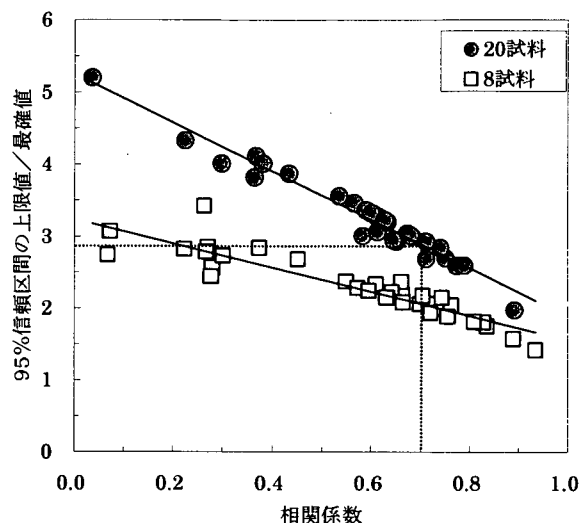


図-4 決定係数と95%信頼区間の上限値/最確値の関係

#### 5. 4 公定法と簡易分析技術との相関関係を求める際の低濃度試料の重要性

これまで本検討に用いた20試料のダイオキシン類濃度は、 $64\sim 640\text{pg}\cdot\text{TEQ/g}$ であった。これら

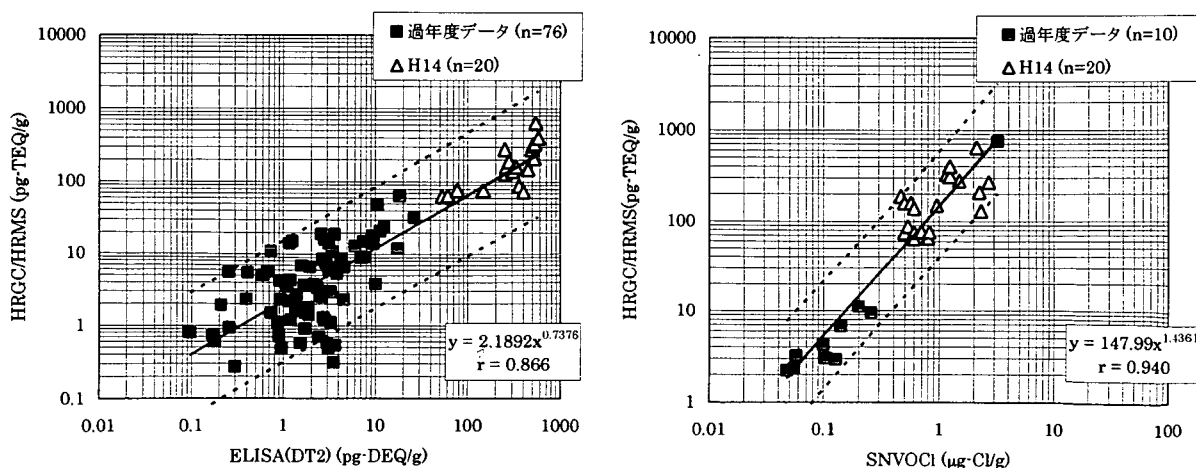


図-5 公定法と簡易分析技術の関係 (過年度測定 of 低濃度試料を含む)  
(点線は95%信頼区間)

のデータを用いての関係式から数～数十 pg-TEQ/g の値を外挿することには無理がある。低濃度試料の推定のため、過去に測定した低濃度の全国河川底質データも合わせて公定法と簡易分析技術の関係を求めたところ、図-5 に示すように 20 試料のケースに比べ相関が改善した。ELISA(DT2) は、高速溶媒抽出+多層シリカ+活性炭の前処理の組み合わせのデータであり、相関係数が 0.592 から 0.866 に改善した。SNVOC1 は、加熱流下抽出+5 層シリカの前処理の組み合わせのデータであり、相関係数が 0.604 から 0.940 に改善した。

これらのことから、公定法と簡易分析技術の関係を求めるに当たっては、推定する濃度域をカバーする広い濃度範囲の試料について関係を求める必要があるが、平面的に広い範囲の試料を採取すると汚染原因が異なることが考えられるため、汚染原因が同じと考えられる比較的狭い範囲、たとえば鉛直方向での採取を含めた狭い平面範囲で低濃度域から高濃度域まで底質を採取する工夫が必要である。

## 6. 結論と今後の課題

本研究で得られた結論は以下のとおりである。

- ①ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS(2378D)、SNVOX、SNVOC1 の 6 つの検出方法と高速溶媒抽出法、加熱流下抽出法の 2 つの抽出方法、さらに精製方法の簡易化について 30 の組み合わせを対象に、汚染レベルが比較的高い 5 カ所の 20 地点の底質を用いて、簡易分析技術と公定法での底質ダイオキシン類 TEQ 濃度との関係を比較した。
- ②簡易分析技術と公定法との相関性は、四重極 GC/MS(2378D)がどの前処理との組み合わせでも比較的高い相関関係にあり、なかでも高速溶媒抽出+多層シリカ+活性炭の組み合わせの相関性が最も良好であった。2,3,7,8-TCDD が四重極 GC/MS で測定可能な濃度であったこと、TEF を持つ異性体構成が類似していたことが要因として考えられる。
- ③公定法と簡易分析技術の相関で使用する回帰式は、直線回帰とべき乗回帰でも決定係数は大きく異なることはないが、基準値 (150pg-TEQ/g) を超過しているか否かの判定に使用する場合には、直線回帰では信頼区間を考慮した判定が不可能な場合があることから、べき乗回帰を用いる方が実用的である。また、公定法と簡易分析技術の関係は広い濃度範囲の試料を用いて求めることで、相関性が向上するため、比較的狭い汚染範囲の中で低濃度域から高濃度域まで底質を採取する工夫が必要である。

本検討では限られた試料を用い、限られた分析技術について検討を行ったものであり、このデータのみから一般的な結論を導くことはできないため、今後は以下の点についてさらに検討を行う必要がある。

- ①公定法と簡易分析技術の関係をより明確に評価するため、数 pg-TEQ/g から数百 pg-TEQ/g のより広範囲な試料やより多くの同一汚染現場の試料を用いてさらに検討する必要がある。複数箇所の汚染現場での検討を行うことで、どのような汚染原因にどのような簡易分析技術が適しているのかを今後検討を行う必要がある。
- ②本検討では 6 つの測定方法について同一試料を用いた検討・評価を実施したが、リポータージーンアッセイ等他の簡易分析技術についても検討を行う必要がある。
- ③簡易分析技術は、簡易な前処理との組み合わせで使用することにより、よりその利点が生かせることから各簡易分析技術に適した簡易な前処理法の検討が必要である。

④これら簡易分析技術を用いて、底質ダイオキシン類の対策が行われる実際の現場において、ここで検討した方法により、調査・モニタリング等を試行し、現場適用にあたっての問題点や実用化に向けての検討を実施する必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

## 7. 参考文献

- 1) 国土交通省, 平成 11 年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果について (2000)
- 2) 国土交通省, 平成 12 年全国一級河川におけるダイオキシン類に関する実態調査等の結果について (2001)
- 3) 国土交通省, 平成 13 年全国一級河川におけるダイオキシン類に関する実態調査等の結果及び今後の対応について (2002)
- 4) 国土交通省, 平成 14 年全国一級河川におけるダイオキシン類に関する実態調査の結果について (2004)
- 5) 環境庁, ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル (2000)
- 6) (財) 建設物価調査会, 建設物価 2004 年 4 月号 (2004)
- 7) (財) 経済調査会, 積算資料 2004 年 4 月号 (2004)
- 8) 環境省環境管理局水環境部長, ダイオキシン類対策特別措置法に基づく底質環境基準の施行について (通知) (2002)
- 9) 永柳衍, 4 重極 GC/MS によるダイオキシン類の簡易測定技術, 資源環境対策, 37, 921-925 (2001)
- 10) 上東浩, ダイオキシン類測定分析の迅速化・簡易化, 資源環境対策, 37, 942-947 (2001)
- 11) 大川真, GC/MS/MS によるダイオキシン類の簡易分析, 資源環境対策, 37, 932-935 (2001)
- 12) 中村朋之, 加藤譲一, 鈴木滋, 山岸陽子, 大容量注入装置を用いたイオントラップ型 GC/MS/MS によるダイオキシン類分析法の検討, 第 9 回環境化学討論会, 248-249 (2000)
- 13) 坂田一登, 松本宏和, 岡本巧誠, 谷岡洋平, 藤本昇, 高速溶媒抽出法と免疫測定法を組み合わせた迅速ダイオキシン分析技術, 資源環境対策, 37, 979-983 (2001)
- 14) 小林康男, 中西俊夫, Ah イムノアッセイ™による環境サンプルのダイオキシン類測定の実例, 造水技術, 27 (4), 3-8 (2002)
- 15) 橋場常雄, リポータージーンアッセイ法によるダイオキシン類の分析について, 造水技術, 27 (4), 14-19 (2002)
- 16) 村田弘司, ジーン・バイオアッセイによるダイオキシン類の測定, 資源環境対策, 37, 970-974 (2001)
- 17) 前田恒昭, クロロベンゼン・クロロフェノール測定による焼却炉煙道でのダイオキシンの連続測定, 資源環境対策, 37, 936-941 (2001)
- 18) 加藤みか, ダイオキシン類の測定を正確かつ大幅に効率化できる方法, 第 2 回効率的な環境管理のための最新の簡易測定技術, エコケミストリー研究会 (2001)
- 19) 小森行也, 八十島誠, 田中宏明, 南山瑞彦, 鈴木穰, 伊藤弘之, 河川底質のダイオキシン類対策に必要な簡易測定技術, 学会誌「EICA」, 7, 255-258 (2002)
- 20) 南山瑞彦, 落修一, 鈴木穰, 底質中のダイオキシン類の抽出手法, 土木技術資料, 44 (7), 40-45

(2002)

- 21) 加藤みか, 浦野紘平, 清水優子, 小口正弘, 伊藤日本男, 栗原浩, 固体試料からのダイオキシン類等高沸点有機物の「高速流下抽出装置」, 第12回環境化学討論会講演要旨集, 616-617 (2003)





## 10. 水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究

水循環研究グループ水質チーム

首席研究員	田中宏明
主任研究員	小森行也
主任研究員	宮島 潔
専門研究員	山下尚之

### 1. はじめに

近年、産業活動の拡大発展に伴い、様々な化学物質が広範囲に使用されており、排水や河川水中にも多種多様な化学物質が存在することが明らかになっている。下水処理水からも環境ホルモン様物質等に代表される様々な化学物質の存在が報告されており<sup>1,2)</sup>、その生物への影響が懸念される。このことから、水環境中に放出された化学物質が、水域に生息する生物にどのような影響を与えるかを明らかにすることは重要である。

化学物質による生態系への影響を探る学問分野としては、生態毒性学 (Ecotoxicology) がある。これは、生態学 (Ecology) と毒性学 (Toxicology) を組み合わせた造語であり、一般的には、「生態系における毒性のある物質の運命と生態系への影響に関する研究」と定義されている<sup>3)</sup>。欧米では、生態毒性関連の研究は盛んに行われており、研究者の数も多く層も厚い。我が国において、生態毒性の研究者は少数ではあるが、農村地帯の河川水、下水、廃棄物浸出水等に関していくつかの報告がなされている<sup>4,9)</sup>。畠山らは、つくば市とその周辺を流れる農村地帯の河川水について、水生生物への影響を調べている<sup>4,5)</sup>。採取した河川水について、藻類および甲殻類の試験を実施した結果、試験水中の *Selenastrum capricornutum* の増殖阻害は5月初旬から始まり、5月中旬にはほぼ完全に増殖が阻害されたこと、阻害の原因は除草剤の影響であったことを報告している。また、その河川水をヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) に曝露した結果、ヌカエビの死亡率は、5月中旬から6月上旬にかけて高く、この原因はこの時期に散布された殺菌剤、殺虫剤の影響であることを報告している。また、松原らは、マイクロトックス、藻類、カエル胚を用いて、下水および環境水について毒性試験を実施している<sup>7)</sup>。その結果、マイクロトックス、藻類、カエル胚試験とも、流入下水からは毒性を検出しているが、その毒性は、下水の生物処理後には検出されなくなったことを報告している。一方、下水処理において、生物処理後の塩素添加量が多い処理場については、マイクロトックスおよび藻類による試験で毒性が上昇する場合があることを報告している。

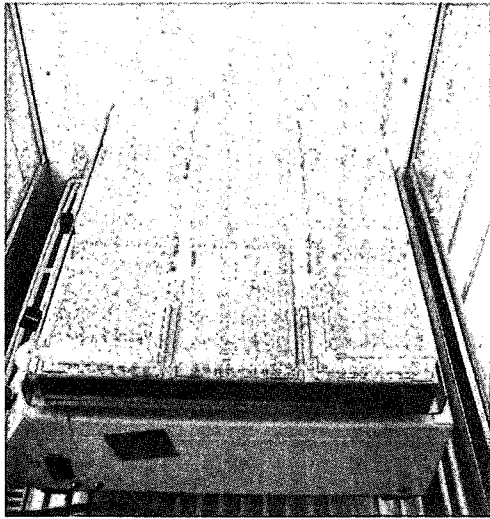
本調査は、水環境中の化学物質が及ぼす生態影響について明らかにすることを目的としている。本年度は主として、下水処理水が流入する河川水中に含まれる化学物質の生態影響を明らかにすることを目的とし、多摩川を対象に調査を行った。調査では、多摩川河川水および多摩川へ流入する下水処理水のサンプルを採取して藻類生長阻害試験を行い、下水処理場から排出された化学物質による水域生態系への影響について検討した。また、固相抽出カートリッジを用いてサンプルの濃縮を行い、濃縮サンプルについても藻類生長阻害試験を実施し河川水質への下水処理水の影響を評価した。

### 2. 試験方法

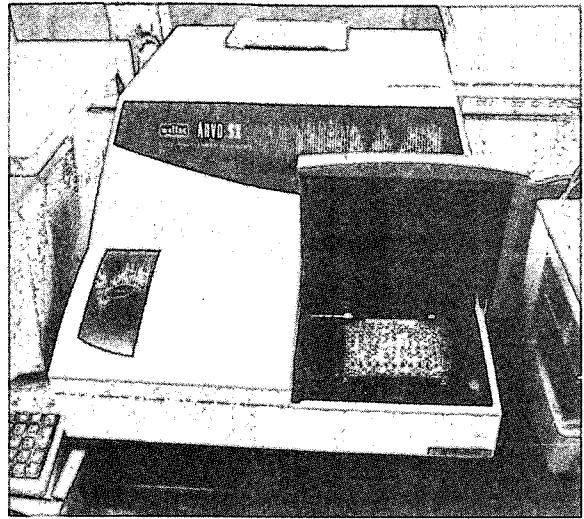
#### 2.1 マイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験

藻類生長阻害試験の供試藻類としては、藻類試験に一般的に用いられる緑藻類 *Selenastrum capricornutum* (NIES-35) を用いた。*Selenastrum* は藻類培養用の AAP 培地<sup>10)</sup>を用いて継代培養を行い、植え継ぎ後3~5日後の対数増殖期のものを試験に用いた。藻類生長阻害試験については、Blaise らの方法<sup>11,12)</sup>を参考にして、マイクロプレートを用いて実施した。培養温度 24℃、照度 4000Lux、120rpm の振

とう条件で培養を行い、培養期間中マイクロプレートリーダー（Wallac 社製、ARVO SX-1420）を用いて藻類増殖量の変化をモニタリングした。培養および測定の様子を図-1 に示す。



(a) マイクロプレート法による培養



(b) マイクロプレートリーダーによる測定

図-1 藻類生長阻害試験の様子

## 2.2 亜鉛を用いた藻類生長阻害試験

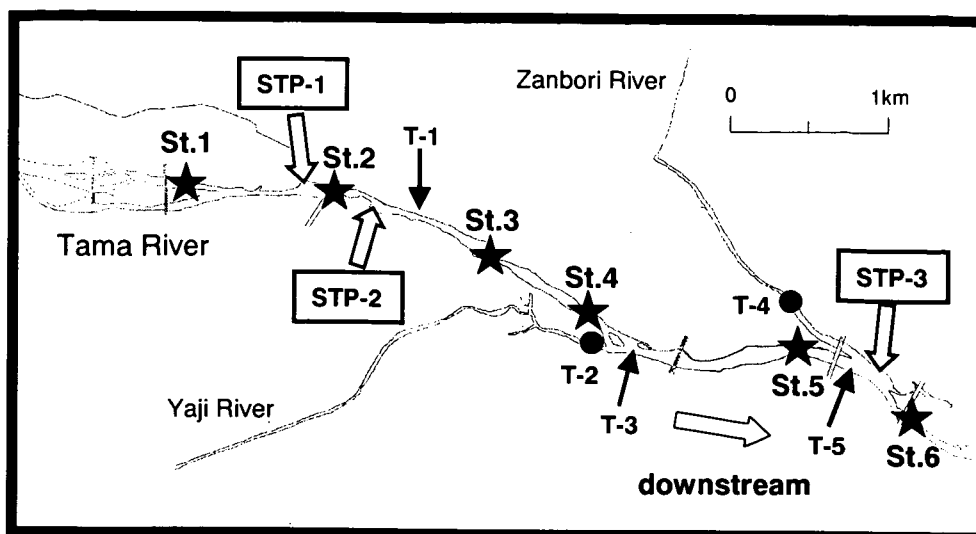
標準毒性物質として亜鉛を選び、藻類生長阻害試験を実施した。亜鉛は藻類生長阻害試験の標準物質としてよく利用される物質である。硫酸亜鉛（ $ZnSO_4$ ）を亜鉛濃度換算で  $3.1\sim 800\mu g/L$  となるよう添加して、マイクロプレートを用いて藻類生長阻害試験を行った。

## 2.3 多摩川における調査

多摩川におけるサンプリングは、2003年2月に実施した。調査地点を図-2に示す。サンプリングでは、多摩川河川水、多摩川へ流入する下水処理水および支川の水についてサンプル採取を行った。採取したサンプルは、直ちに実験室に持ち帰り、ガラスファイバーフィルター（GF/B, Whatman）およびメンブレンフィルター（孔径  $0.2\mu m$ , Advantec）によりろ過を行った後、試験に供するまでの間、 $-30^\circ C$ にて凍結保存を行った。試験は、凍結保存しているサンプルを融解した後、希釈系列を作成してマイクロプレートを用いて行った。

## 2.4 固相抽出カートリッジを用いた試料の濃縮

多摩川河川水および下水処理水の数サンプルについては、固相抽出カートリッジにより濃縮を行った。固相抽出カートリッジとしては、GL-Pak PLS-2（GL-Sciences、以下 PLS-2 と表記）を用いた。PLS-2 をメタノールおよび精製水各 10mL によりコンディショニングを行った後、サンプルのろ液 500mL を固相に通水した。サンプルの通水後、窒素ガスによりパージを行い、メタノール 10mL により、固相に捕集された成分について溶出を行った。溶出に用いたメタノールを DMSO に置換した後、藻類生長阻害試験に供した。



St.1-St.6: Sampling stations in the Tama River  
 STP-1, STP-2, STP-3: Sewage treatment plant effluents  
 T1-T5: Tributaries flowing into the Tama River

図-2 調査地点

### 3. 結果および考察

#### 3.1 亜鉛を用いた藻類生長阻害試験

図-3 に亜鉛標準液に関する藻類生長阻害試験の結果について示す。亜鉛濃度を  $3.1 \sim 800 \mu\text{g/L}$  の間で変化させ、藻類生長阻害試験を行った。亜鉛濃度が  $50 \mu\text{g/L}$  以上になると影響が見られはじめ、 $200 \mu\text{g/L}$  以上の濃度では、阻害率はほぼ 100% となった。また、この結果から亜鉛に関する 50% 影響濃度 (EC50) を求めた結果、その値は  $67 \mu\text{g/L}$  となり、他の文献値<sup>12)</sup>に近い値となった。

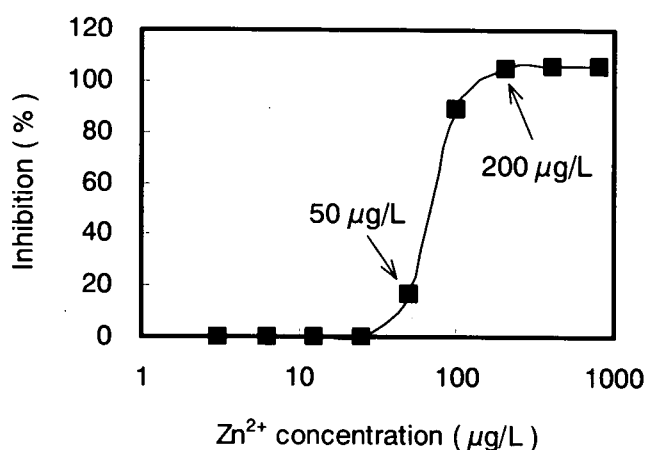


図-3 亜鉛標準液に関する藻類生長阻害試験結果

### 3.2 多摩川試料に関する藻類生長阻害試験

多摩川から採取したサンプルについて、藻類生長阻害試験を実施した。表-1 に藻類生長阻害試験を行った結果を示す。試験の結果、多摩川河川水および下水処理水について、コントロールと比較と比較した場合に藻類増殖量の低下は見られず、藻類の生長阻害は観察されなかった。一方、多摩川へ流入する支川に関しては、ほとんどの支川について藻類の生長阻害は観察されなかったが、T-1 の排水樋管から採取した水についてのみ、藻類への生長阻害が見られた。その毒性は、コントロールと比較した場合、約20%の阻害率であり、強い毒性は見られなかったが、この結果は何かの毒性物質が含有されていることを示している。T-1 の排水樋管の水は、多摩川本川

表-1 多摩川試料に関する藻類生長阻害試験結果

地点名	阻害率(%)
St. 1	—
St. 2	—
St. 3	—
St. 4	—
St. 5	—
St. 6	—
STP-1	—
STP-2	—
STP-3	—
T-1	19.2
T-2	—
T-3	—
T-4	—
T-5	—

—:阻害なし

に流入しているが、流入後の多摩川河川水については、藻類への生長阻害は観察されなかった。藻類の生長阻害を引き起こした原因物質については、今後検討が必要である。

### 3.3 多摩川の濃縮試料に関する藻類生長阻害試験

図4 に下水処理水の STP-1 サンプルに関する濃縮倍率と阻害率との関係を示す。濃縮倍率が 1.6 以下ではほとんど阻害が見られないが、3.1 以上の値になると阻害が観察されはじめ、25 以上の濃縮倍率では、ほぼ 100%の阻害率であった。この濃縮倍率-阻害率の関係より EC50 を計算すると、EC50=6.6 となった。同様に、他のサンプルについて EC50 値を計算した結果を表-2 に示す。EC50 の値は、河川水については 14~17、下水処理水については 5.4~9.1 となり、下水処理水のほうが河川水と比較して EC50 の値が低い傾向にあった。

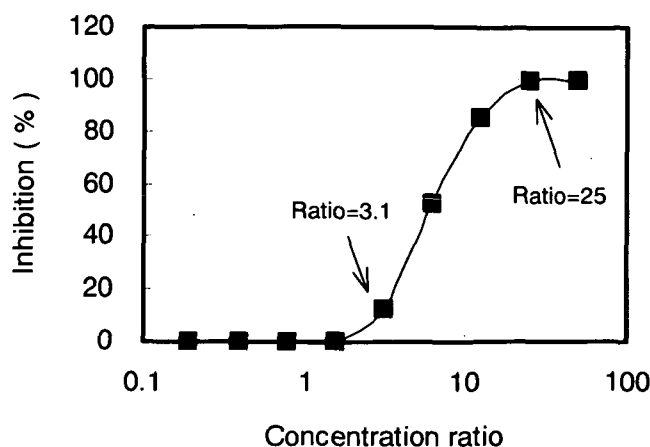


図-4 固相抽出サンプル(STP-1)に関する濃縮倍率と阻害率

EC50 の逆数である毒性単位 (TU) を計算した結果を同様に表-2 に示す。毒性単位の値は、河川水については 0.06~0.07, 下水処理水については 0.11~0.18 となり、下水処理水のほうが河川水と比較して高い傾向にあった。毒性単位は、その値が高いほうが毒性が強いことを意味することから、下水処理水のほうが河川水と比較して数倍強い毒性を持つことが示された。

表-2 多摩川河川水および下水処理放流水のEC50値と毒性(TU)  
( TU = 1/EC50 )

地点名	EC50値	TU
St.3	14.0	0.07
St.4	16.5	0.06
St.5	17.0	0.06
STP-1	6.6	0.15
STP-2	5.4	0.18
STP-3	9.1	0.11

#### 4. まとめ

本調査では、藻類生長阻害試験を用いて下水処理水および河川水の毒性について調査を行った。また、固相抽出カートリッジを用いてサンプルの濃縮を行った後、藻類生長阻害試験を実施した。その結果、濃縮を行わない場合には、多摩川河川水および下水処理水について藻類への毒性は検出されなかった。一方、固相抽出による濃縮を行ったところ、毒性が検出できないサンプルについても毒性が検出され、濃縮を行うことにより、毒性に関してサンプル間の相互比較を行うことが可能であるということが示された。今後は、マイクロトックスによる発光細菌や甲殻類であるミジンコなどのアッセイ系を構築し、生態毒性を多面的に見ることを予定している。また、今回試験を行った多摩川河川水については、比較的その毒性が低かったが、今後は都市河川の水質に大きな影響を与える路面流出水等についても、調査を行っていく予定である。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

#### 〈参考文献〉

- 1) 田中宏明：水環境における内分泌攪乱化学物質の実態調査，水環境学会誌，22，629-632，1999
- 2) 田中宏明，小森行也，岡安祐司：下水道における微量化学物質の評価に関する調査，平成14年度下水道関係調査研究年次報告書集，129-132，2002
- 3) 若林明子：化学物質と生態影響，p.1，丸善，2003
- 4) 畠山成久，白石寛明，浜田篤信：霞ヶ浦水系河川のヌカエビ (*Paratya compressa improvisa*) 生物試験による農薬毒性の季節変動，水質汚濁研究，14，460-468，1991
- 5) 畠山成久，福嶋悟，笠井文絵，白石寛明：河川の藻類生産に及ぼす除草剤の影響評価，陸水学雑誌，53，327-340，1992

- 6) Okamura, H., Omori, M., Luo, R., Aoyama, I., Liu, D. : Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land runoff, *Sci. Total Environ.*, 234, 223-231, 1999
- 7) 松原正明, 原田新, 田中宏明 : 藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試験への適用, *水環境学会誌*, 20, 768-775, 1997
- 8) 岡村秀雄, 青山勲, 羅栄, D. Liu, G. Persoone : 産業廃棄物埋立地浸出水の生態毒性評価および毒性のキャラクター化, *環境毒性学会誌*, 1, 43-50, 1998
- 9) 岡村秀美, 豊田智子, 市川大介, 吉本祥子, 岡村秀雄, 井上雄三, 毛利紫乃, 山田正人, 国本学 : 藻類増殖阻害試験の簡易化と埋立処分場浸出水の有害性評価への適用, *水環境学会誌*, 765-768, 26, 2003
- 10) 日本下水道協会 : AGP 試験, *下水試験方法 上巻 (1997年版)*, 554-562, 1997
- 11) Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., Van Coillie, R., Vasseur, P. : A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, *Toxicity Assessment*, 1, 261-281, 1986
- 12) St-laurent, D., Blaise, C., Macquarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B. : Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedure, *Environ. Toxicol. Wat. Qual.*, 7, 35-48, 1992