水環境における水質リスク評価に関する研究

鈴木穣[1)] 小森行也[2)] 岡安祐司[3)] 北村友一[4)] 尾崎正明[5)] 落　修一[6)] 諏訪守[7)]
田中宏明[8)] 宮島　潔[9)] 玉本博之[10)] 南山瑞彦[11)] 尾澤卓思[12)] 伊藤弘之[13)]

Evaluation of Water Quality Risk in Water Environment

Yutaka Suzuki, Koya Komori, Yuji Okayasu, Tomokazu Kitamura, Masaaki Ozaki, Shuichi Ochi, Mamoru Suwa, Hiroaki Tanaka, Kiyoshi Miyajima, Hiroyuki Tamamoto, Mizuhiko Minamiyama, Takushi Ozawa and Hiroyuki Ito

要旨

近年、水を経由した微量化学物質や病原微生物などの汚染によって、人の健康や野生生物を含む生態系への影響が懸念されている。このため，「水環境における水質リスク評価に関する重点プロジェクト研究」において，内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン），ダイオキシン類および病原微生物を対象として、汚染実態を明らかにするための手法開発，水環境等における存在実態の解明、水生生物等に対する影響評価，影響を軽減するための対策手法の開発や評価に関する研究を行った。

対象とした水質リスク原因物質のうち，内分泌かく乱化学物質については，環境水、下水、底泥に関する分析方法を開発し，全国河川および下水処理場における存在実態，および，下水処理過程における除去特性を把握するとともに，河川・湖沼における挙動と底泥濃縮の現象を解明した。また，河川水・下水処理水のエストロゲン（女性ホルモン）様作用は、女性ホルモンの一種であるエストロンの寄与が大きいことを明らかにし、雄メダカを試験生物として、エストロゲン様活性が魚類に与える影響を評価した。

ダイオキシン類については，底質からの迅速な抽出が可能な高速溶媒抽出法を提案するとともに、簡易測定法として四重極 GC/MS による方法を提案した。また，水中ダイオキシン類濃度が SS 濃度との間に良好な関係があることを明らかにし，対策工事中のダイオキシン類巻き上げ拡散状況を SS 濃度でモニタリングする手法を提案した。

病原微生物については，病原性原虫およびウイルスを対象として，分子生物学的手法を適用することにより，迅速・簡易かつ高感度な測定法を開発し，これにより、下水処理場におけるウイルスの挙動を把握した。また、病原性原虫の感染性評価方法について開発と評価を行った。

キーワード：　内分泌かく乱化学物質，ノニルフェノール類，エストロゲン，エストロゲン抱合体，エストロゲン様活性、簡易測定法，河川，湖沼，下水道，挙動，魚類影響，メダカ，ダイオキシン類、底質、抽出、簡易モニタリング、病原微生物，クリプトスポリジウム、ノロウイルス、リアルタイム PCR 法、感染性

Synopsis

Water pollution by micorpollutants and pathogens is concerned about because of its possibility of affecting human health and ecosystem.　The priority research project on evaluating water quality risks, targeting the endocrine disrupting chemicals, dioxins and pathogens, was carried out to develop measurement methods, clarify the status of pollution, evaluate the effect on aquatic organisms and develop countermeasures to make the effects smaller.

As for endocrine disrupting chemicals, analytical methods for environment water, wastewater and sediments were developed; the concentration in major rivers and wastewater treatment plants was clarified; the fate in the wastewater treatment process was figured out; the behaviour in the river and lake was clarified.　In addition, major contribution of estron to the estrogen-like activity in river water and treated wastewater was clarified, and the effect of estrogen-like activity on fish was evaluated.

As for dioxins, the pressurized fluid extraction method and the quadrupole GC/MS measurement method were proposed as quick and easy] methods. Also, good correlation between the concentrations of dioxin and suspended solids was found, which led to the proposal of the dioxin resuspensin monitoring way by measuring suspended solids.
As for pathogens, the technique of molecular biology was applied and rapid and simpler measurement methods were developed. The fate of virus in the wastewater treatment plant was clarified, and the evaluation method of infectious ability of pathogenic protozoa was developed.

Key Words: endocrine disrupting chemicals, nonyl phenol, estorgen, conjugate estrogen, estrogen-like activity, quick and easy measurement method, river, lake, sewerage system, fate, behaviour, fish effect, Medaka, dioxin, sediment, extraction, easy monitoring, pathogen, Cryptosporidium, Norovirus, real time PCR, infectious ability

１） 独立行政法人土木研究所 水環境研究グループ 水質チーム 上席研究員
２） 独立行政法人土木研究所 水環境研究グループ 水質チーム 総括主任研究員
３） 独立行政法人土木研究所 水環境研究グループ 水質チーム 主任研究員
４） 独立行政法人土木研究所 水環境研究グループ 水質チーム 研究員
５） 独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ リサイクルチーム 上席研究員
６） 独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ リサイクルチーム 総括主任研究員
７） 独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ リサイクルチーム 主任研究員
８） 元 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 上席研究員
（現 京都大学大学院 工学研究科 附属流域圏総合環境質研究センター 教授）
９） 元 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 主任研究員
（現 東京都下水道局 施設管理部 環境管理課 微生物担当係長）
１０） 元 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 主任研究員
（現 東京都下水道局 北部第二管理事務所 みやぎ水再生センター 水質管理係次席）
１１） 元 独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ リサイクルチーム 主任研究員
（現 国土交通省 国土技術政策総合研究所 下水道研究部 下水処理研究室 室長）
１２） 元 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 河川生態チーム 上席研究員
（現 国土交通省 河川局 河川計画課 河川計画調整室 室長）
１３） 元 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 河川生態チーム 主任研究員
（現 国土交通省 近畿地方整備局 猪名川河川事務所 所長）

水環境における水質リスク評価に関する研究

目　　次

１．序論・・・

3.5　ダイオキシン類のモニタリング手法と溶出抑制手法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
3.5.1　底質ダイオキシン類の簡易調査手法
3.5.2　対策工事に伴う水中ダイオキシン類濃度のモニタリング手法
3.5.5　覆砂によるダイオキシン類の溶出抑制効果
3.6　まとめ
４．病原微生物の検出方法と下水における実態・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4.1　概説・・・
4.2　リアルタイム PCR 法による病原微生物の検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4.2.1　クリプトスポリジウムの検出方法
4.2.2　ノロウイルスの検出方法
4.3　下水処理過程でのノロウイルスの挙動・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4.4　環境中での病原性原虫の感染性消失効果の評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
4.5　まとめ
５．結論・・
参考文献・・
略語対応表・・

1. 序論

近年、水を経由した微量化学物質や病原性微生物などの汚染によって、人の健康や野生生物を含む生態系への影響が懸念されている。

1990 年代に、女性ホルモン様作用を持つ化学物質によって野生生物の生殖異常が発見された。ホルモンに類似した化学物質が生体内に取り込まれると、あたかもホルモン分泌が行われたかのような生体反応（内分泌かく乱作用）が生じたのである。そして 1995 年、コルボーン博士らの「奪われし未来」が出版されると、野生生物と同様なことが人でも起きているのではないかという不安が勃発し、いわゆる環境ホルモン問題が発生した。英国では、下水処理場の下流河川に棲息する魚類に、顕著な雌性化が見られるとの報告がなされたことから、日本においても、下水処理水の生態系への影響が懸念されることとなった。

また，2000 年 1 月 15 日に「ダイオキシン類対策特別措置法」が施行され，環境省（庁）告示によりダイオキシン類に係わる大気、水質、土壌、底質の環境基準が定められたことにより、ダイオキシン類濃度が環境基準値を超えている場合には、可及的速やかに達成されるよう努めることが定められた。

一方、赤痢やコレラなどを原因とする水系感染症は、水道および下水道の建設と塩素を中心とした消毒方法により、大幅に低減されてきた。しかし、1996 年の夏に埼玉県越生町で発生したクリプトスポリジウム症の集団感染は、この水道・下水道システムが、そのまますべての病原微生物に対して有効とは限らないことを示した。さらに、検出が困難であり食中毒の原因となるノロウイルスについて、水系における挙動が注目されている。

以上のことから、本重点プロジェクト研究では、内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン），ダイオキシン類および病原微生物を対象として、水環境における汚染実態を明らかにするための手法開発，水環境等における存在実態の解明、水生生物等に対する影響評価，影響を軽減するための対策手法の開発や評価を目的として，研究を行った。

研究内容は、検出技術の開発に始まり、これをもとにした水環境等における存在実態の解明、そしてこの環境中存在量の影響を評価するための手法の開発、排出源の一つである下水処理場における除去効果の評価から構成されている。**表-1.1** には、それぞれの研究内容ごとに、内分泌かく乱物質とダイオキシン類、病原微生物に分けて、研究対象を整理して示した。

表-1.1　「水環境における水質リスク評価に関する研究」の研究内容および研究対象

		研究内容			
		検出技術の開発	水環境等における実態の解明	影響評価手法の開発	対策効果の評価
内分泌かく乱物質（環境ホルモン）	・ノニルフェノール類 ・女性ホルモン（エストロトゲン） ・女性ホルモン（エストロトゲン）様物質	・機器分析法 ・簡易分析法 ・活性評価法	・河川 ・湖沼 ・下水道	・魚類影響の評価手法	・下水処理場における除去効果
ダイオキシン類	・底質ダイオキシン	・簡易分析法 ・乾燥・抽出法 ・モニタリング法	・河川底質	・対策工事中のモニタリング手法	・対策工事（覆砂）の効果
病原微生物	・クリプトスポリジウム ・ノロウイルス	・分子生物学的手法	・下水道	・感染性評価	・下水処理場における除去効果

２．内分泌かく乱化学物質の分析・測定法と環境中での挙動および評価

2.1　内分泌かく乱化学物質の分析・測定法

2.1.1　概説

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（内分泌かく乱物質）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 17β-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かく乱作用の強さから，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）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ことが必要である。また，エストロゲンが人畜から排出される際には，活性の低い硫酸抱合体あるいはグルクロン酸抱合体となっており，それが脱抱合されることで活性の高い遊離エストロゲンが生成されると言われていることから，これら抱合体の挙動を把握することも重要である。

さらに，現状では、内分泌かく乱化学物質の測定には、高価な機器、熟練した技術等が必要であり、より簡易に、迅速に測定できる手法の開発が求められている。

また，内分泌かく乱化学物質それぞれの濃度を求めるだけではなく，試料水の全体的な女性ホルモン作用を測定する手法も必要である。

以上のことから，本研究においては，河川水・下水・底質中のノニルフェノール類やエストロゲンについて，種々の形態の分析手法を開発するとともに，簡易分析手法および女性ホルモン様活性を測定できる手法の開発を行った。

2.1.2　エストロゲンの分析・測定法

（１）エストロゲン遊離体の分析法

エストロゲン遊離体の分析前処理の簡易化について検討を行った。従来法の前処理は薄層クロマトグラフィー（TLC）又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によるクリーンアップが用いられていた。しかし、TLC，HPLC によるクリーンアップは操作が繁雑であり，また，熟練を要することから，これらの前処理を簡易化することを目的とし，エストロゲンを C18 カートリッジで吸着，溶出後のクリーンアップにフロリジルカートリッジと NH2 カートリッジを用いる前処理法について検討した。分析は**表-2.1** に示す条件により，LC/MS/MS を用いて行った。

標準溶液の繰り返し測定を行った結果より，バラツキを標準偏差（σ）で表した場合の 10σ を検出下限値とすると，実試料を対象とした場合に E2 で 1.3ng/L，E1 で 0.5ng/L，EE2 で 1.6ng/L という結果となり，従来法と同等の精度が得られた。また，河川水試料へのエストロゲン標準物質の添加回収試験を行い，その結果，ほぼ 100%の回収率を得ることができた。

表-2.1 エストロゲン遊離体の LC/MS/MS 測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100	
	カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 2.1φ× 150mm，40℃	
	移動相	アセトニトリル／水(60:40)， 0.15ml/min	
	注入量	10μl	
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	E2	271 → 145
		E1	269 → 145
		EE2	295 → 145
		E2-d3	274 → 145
		E1-d2	271 → 147
		EE2-d4	299 → 147

（２）エストロゲン抱合体の分析法

LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体分析法を（独）土木研究所と帝人エコ・サイエンス（株）が「共同研究」として検討した。

１）分析方法

ａ）標準物質を用いた検討

遊離体のエストロゲン（E1，E2，E3，EE2）の他、E1，E2，E3 の硫酸抱合体（S），グルクロン酸抱合体（G）の標準物質を用い、**表-2.2** に示す LC/MS/MS の測定条件により測定再現性を確認した。

ｂ）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。残査は，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_2 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_4OH／アセトンで溶出後，N2 ガスにより乾固し MeOH に再溶解する。次に NH2 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 NH2 カラムを NH_4OH／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。

表-2.2　エストロゲン抱離体の LC/MS/MS 測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100	
	カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 2.1 ϕ × 150mm，40℃	
	移動相	アセトニトリル：1mM NH4OH = 6：4 0.14ml/min	
	注入量	10 μ l	
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 （ｺﾘｼﾞｮﾝｴﾈﾙｷﾞｰ）	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：ｸﾞﾙｸﾛﾝ酸抱合体 diS：二硫酸抱合体

２）分析結果

ａ）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（σ）を求めた。３σ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。

ｂ）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-2.1** に示す。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 E3-S, E1-G, E2-G，E3-G，E2-S&G，E2-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。

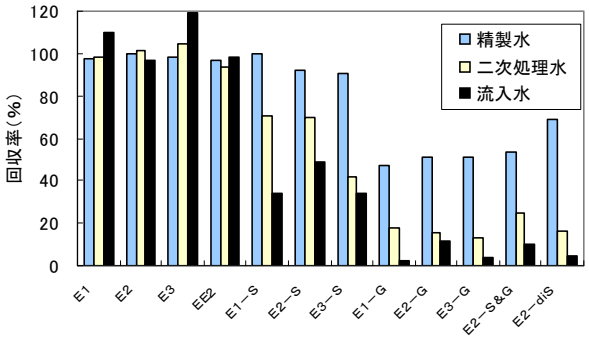


図-2.1　下水試料中のエストロゲン測定結果（添加回収試験）

３）エストロゲン抱合体の分析法改良

グルクロン酸抱合体の回収率を改善するため，前処理について検討を行い、以下の方法を最適条件として設定した。

流入下水 200ml（二次処理水の場合は 300ml）をガラス繊維ろ紙（孔径 1μm）でろ過し，ろ紙に残った浮遊物質（SS）は，メタノール約 10ml で超音波を用いて 2 回抽出する。抽出液をろ液に合わせた後，精製水で約 500ml に希釈する。500ml としたろ液に各サロゲート物質（E2-3S-*d4*，E2-17G-^{13}C4）をそれぞれ 50ng 添加した後，IPC 試薬（0.5mol/l）を 1ml，20%酢酸を 0.2ml 加える。予めメタノールと精製水でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに通水（15ml/min）する。精製水で洗浄した後，カートリッジは遠心分離と窒素ガスパージにより脱水乾燥を行う。次に酢酸エチル/ヘキサン（1:1）約 5ml で洗浄する。次に 2.5% NH3 水溶液 20ml を酢酸エチル/メタノール（1:1）溶液 1000ml に加えて作製した溶出溶液約 6ml でエストロゲン抱合体を溶出させる。溶出液は窒素ガス吹き付けにより乾固直前まで濃縮する。次にアセトニトリル/水（6:4）1ml に溶解後，シリンジスパイクとして E1-3S-*d4* を添加し LC/MS/MS（**表-2.3**）で測定する。

表-2.3　エストロゲン抱離体の LC/MS/MS の測定条件（改良法）

HPLC	装置	Agilent 1100	
	分離カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 , 2.1ϕ × 150mm , 40℃	
	溶離液	A: 10mmol/l ギ酸, B: 10mmol/l ギ酸アセトニトリル	
		A/B: 80/20-10min-40/60(20min)-5min-80/20(5min)	
		0.20ml/nin	
	注入量	5-10μl	
MS/MS	装置	TSQ API-2	
	イオン化	AP-ESI, Negative	
	コリジョンガス	アルゴン	
	測定イオン (ｺﾘｼﾞｮﾝｴﾈﾙｷﾞｰ)	E1-S	349, 269 (35eV)
		E2-S	351, 271 (35eV)
		E3-S	367, 287 (35eV)
		E1-G	445, 269 (35eV)
		E2-G	447, 271 (35eV)
		E3-G	463, 287 (35eV)
		E2-S&G	527, 351 (35eV)
		E2-3S-*d4*	355, 275 (35eV)
		E2-17G-13C4	451, 275 (35eV)

試料として，純水（500ml），二次処理水（300ml），流入水（200ml）にそれぞれ抱合体を各 50ng ずつ添加し，回収率を求めた。その結果，**図-2.2** に示すように，精製水の添加回収試験では，ほぼ 100%に近い回収率が得られた。一方，下水試料では，二次処理水は精製水に近い回収率が得られたのに対し，流入下水は 60～120%の範囲であった。

このため、本改良法は、二次処理水に対しては適用性を有するものの、流入下水への適用についてはさらなる検討が必要である。

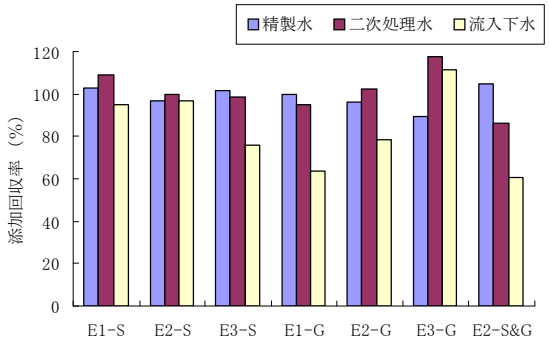


図-2.2　改良法による下水試料中のエストロゲン測定結果（添加回収試験）

（３）エストロゲンの迅速測定法

下水中の 17β-エストラジオール（E2）およびエストロン（E1）を簡易に定量する手法の開発を検討した。迅速測定手法としては、定量性に優れる GC-MS や LC-MS/MS の機器分析による測定手法に比較して、簡易に測定可能な Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）法を選択した。

E2 に関しては、E2 に特異的に反応するモノクローナルまたはポリクローナル抗体をマイクロプレートに固定化した ELISA キットが既に複数の民間企業から市販がなされている。しかし、それぞれのキットにおける、抗体と下水中の類似物質との交差反応性、下水中の他の物質による抗体・酵素など活性の妨害の程度については、完全には把握されていない。一般的には、ELISA 法による測定結果は、交差反応・妨害等に由来すると考えられる理由により、GC-MS や LC-MS/MS の機器分析による測定手法に比較して過大になることが指摘されている [1)]。本研究では、比較的簡易に、下水試料中の E2 を濃縮し、かつ交差反応・妨害等を示す物質を分離できる抽出手法を発見することを目的とした。

E1 に関しては、E1 を定量する ELISA キットは市販されていなかったため、まず ELISA キットの開発に着手した。さらに、比較的簡易に、下水試料中の E1 を濃縮し、かつ交差反応・妨害等を示す物質を分離できる抽出手法を発見することを目的とした。

なお、本研究は、2001 年度は、武田薬品工業株式会社、日本ガイシ株式会社との共同研究で、2002～2004 年度の期間では、武田薬品工業株式会社との共同研究で実施したものである。

１）17β-エストラジオール（E2）測定 ELISA 法

下水試料中の 17β-エストラジオールの抽出方法として、

・C18 固相抽出＋メタノール溶出

・C18 固相抽出＋ジクロロメタン溶出

の２つの設定方法を比較した。両手法とも、17β-エストラジオールの回収率は確保されていた。結果は、

[機器分析結果]＜[C18 固相抽出＋ジクロロメタン溶出と ELISA 法による測定結果]＜[C18 固相抽出＋メタノール溶出と ELISA 法による測定結果]

となり、ジクロロメタン溶出の場合の方が機器分析結果により近い値となり、交差反応・妨害を示す他の物質を分離することが可能であると推定された。しかし、依然として、ELISA 法による測定結果は、機器分析のそれを大きく上回っているため、実試料測定への適用にあたっては、さらに一層のクリーンナップ等の方法を開発する必要がある。

２）E1 測定 ELISA 法

下水試料中のエストロンの前処理として、

・前処理法①：採水、冷蔵保存（3～4 日間）、C18 固相抽出（ジクロロメタン溶出）

・前処理法②：採水時にアスコルビン酸による固定化、冷蔵保存（3～4 日間）、C18 固相抽出＋フロリジル固相抽出＋アミノプロピル固相抽出

の２つの設定方法を比較した。両手法とも、エストロンの回収率は確保されていた。結果を**図-2.3～2.4** に示す。流入下水試料の前処理法①での測定結果が、LC/MS/MS 法による測定結果に比べて、著しく過大となっていたが、流入下水試料の前処理法②、二次処理水試料の前処理法①および②では ELISA 法による測定結果は、LC/MS/MS 法による測定結果に比べて 1.5 倍程度以内であった。

このため、ELISA 法の実試料測定への適用にあたっては、流入下水については前処理法②、二次処理水については前処理法①あるいは②を用いることにより、簡易測定法としての精度を満たすことができると考えられるが、試料の種類ごとに機器分析値との関係を求めておくことが望ましい。

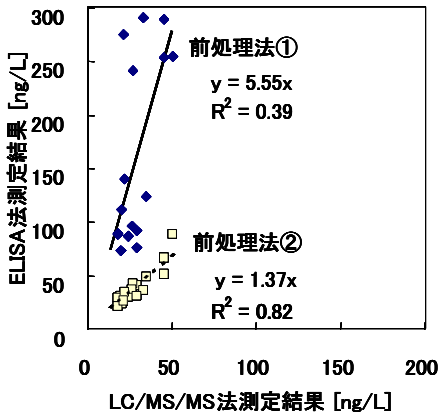


図-2.3 流入下水中のエストロン(E1)の前処理法間の測定結果の比較

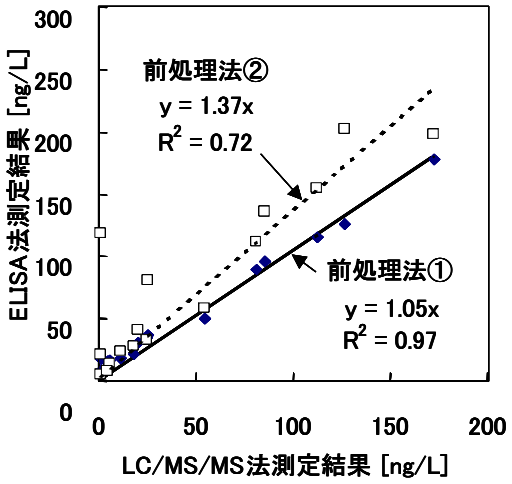


図-2.4 二次処理水中のエストロン(E1)の前処理法間の測定結果の比較

３）前処理法の簡易化に関する検討

前処理法のさらなる簡易化を目的とし、簡易な操作（①SS 除去、②ヒューミン分画の分離、③フミン酸分画の分離）による測定対象エストロゲンと交差反応・妨害物質の分離除去の可能性について検討した。

その結果、フミン酸分画を ELISA 法で測定した場合、流入下水、一次処理水および二次処理水で値が検出される結果となり、特に生物処理を受ける前の段階である流入下水、一次処理水においては測定値が大きかった。その測定値は交差反応・妨害物質によるものであると考えられた。よって、特に流入下水および一次処理水に関しては、フミン酸を分離除去することにより交差反応・妨害物質を除去できる可能性が考えられるが、その手法の詳細については今後の検討課題である。

2.1.3 エストロゲン様活性の分析法

（１） 分画方法の検討

河川水や下水に含まれるエストロゲン様物質を包括的に検出するため、遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定（YES (Yeast Estrogen Screen)）が適用されている。

この酵母は、イギリスBrunel大学のSumpter教授より譲渡されたもので、ヒト女性ホルモン受容体遺伝子が組み込まれている。エストロゲンあるいはエストロゲン様の物質がこの受容体と結合すると、その結合レベルに合わせてβ-ガラクトシダーゼと呼ばれる酵素を産生するので、測定する試料に含まれるエストロゲン様物質の作用をβガラクトシダーゼの活性として総合評価できるバイオアッセイ系である（図-2.5）。

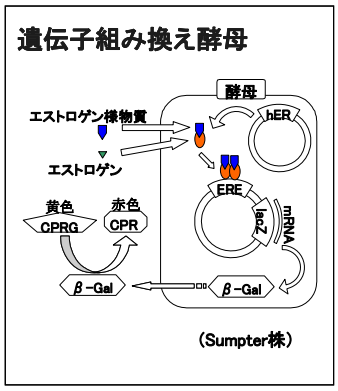


図-2.5 遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン様活性の測定

この遺伝子組換え酵母を下水に適用して得られたエストロゲン様活性については、由来に不明な点が多く残されている。そこで、エストロゲン様活性の性状把握を目的として、極性の違いを利用した分画をおこなった。

水試料は、組換え酵母法の濃縮にしたがって固相抽出した試料を、窒素気流下で乾固した後、ヘキサン:ジクロロメタン＝１：１溶液1000μＬに転溶した。極性分画操作については、アセトン10mL/min、ヘキサン：ジクロロメタン＝１：１溶液10 mL/minでコンディショニングをおこなったシリカゲル固相カートリッジ（Waters社製、充填量：360mg）に、濃縮試料を保持させた。これをヘキサン（Hex）、ジクロロメタン（DCM）、アセトン（Ace）、メタノール（MeOH）の混和液各10mLによって順次溶出させ、溶出液９画分を得た（表-2.4）。これらの試料を窒素気流下で乾固した後、メタノールに転溶し酵母法の試料とした。なお、表-2.4では極性が高くなるにつれてフラクシ

ョン番号は大きくなるよう表示している。

表-2.4　分画番号と溶媒

F1	ヘキサン:ジクロロメタン=1:1
F2	ヘキサン:ジクロロメタン=3:7
F3	ジクロロメタン
F4	ジクロロメタン:アセトン=7:3
F5	ジクロロメタン:アセトン=3:7
F6	アセトン
F7	アセトン:メタノール=7:3
F8	アセトン:メタノール=3:7
F9	メタノール

本年度は、全国の23処理場からサンプルを集め、これらのエストロゲン様活性の極性分布を調査した。試験結果を図-2.6に示す。流入下水におけるエストロゲン様活性はフラクションF2～F9にかけて広く検出されたが、そのほとんどがF2～F4分画で占められていた。また、二次処理水については、F4分画に集中していることが明らかとなった。

エストロゲン様物質の標準物質を用いてこれらが分画されるフラクションを調べた結果、エストロゲン（E1、E2、EE2）はF4分画のみで検出され、NPはF2分画にほとんどが分画された。またNP n EOはF2からF7に認められたが、鎖長が多くなるにつれて極性の高い分画にみられた。このことから、二次処理水のエストロゲン様活性は、E1、E2の寄与が大きいと考えられる。

（２）分画方法の応用

分画手法により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。

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、HPLC 分画に供した（表-2.5）

表-2.5　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						

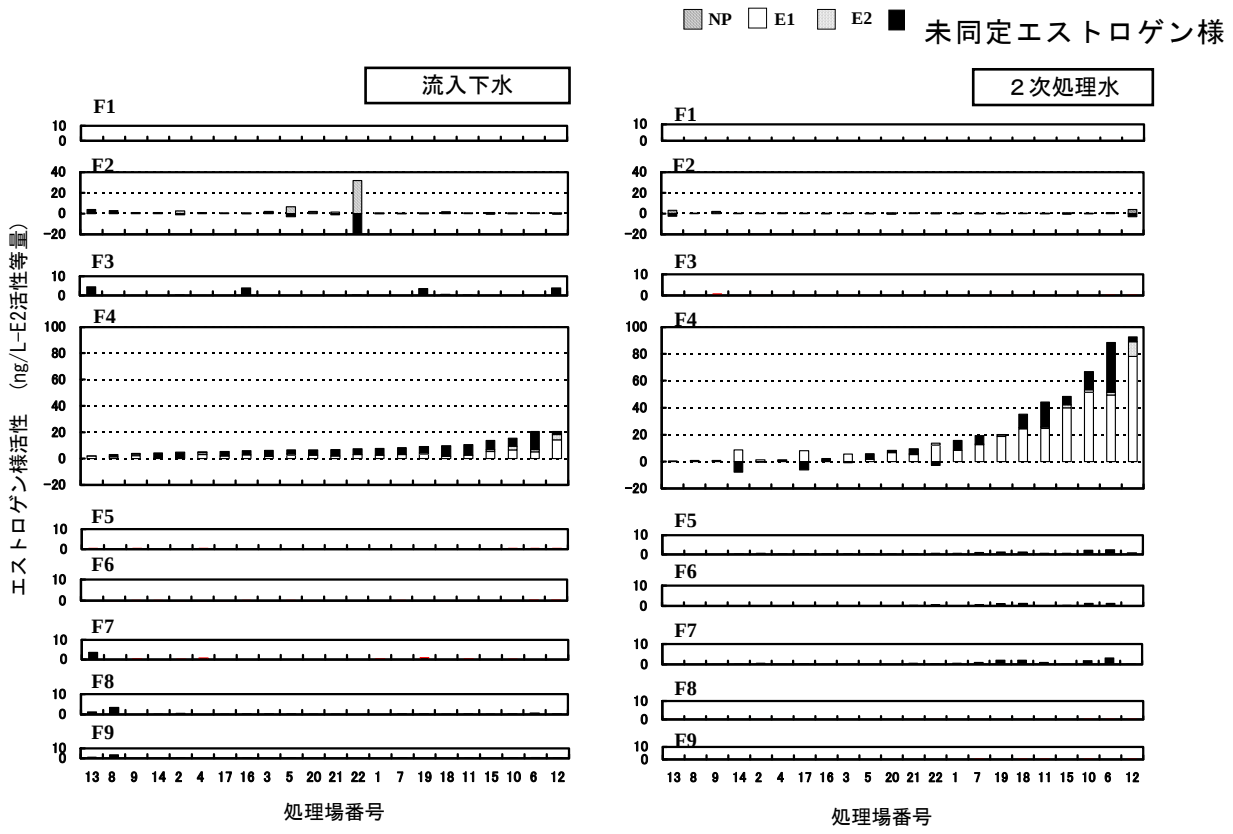


図-2.6　下水中のエストロゲン様活性の極性分画結果と各物質の寄与

標準物質を用いたHPLC分画条件の最適化を行った結果、ほぼすべての成分について分離を行うことができた（図-2.7）。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により明らかになると思われる。

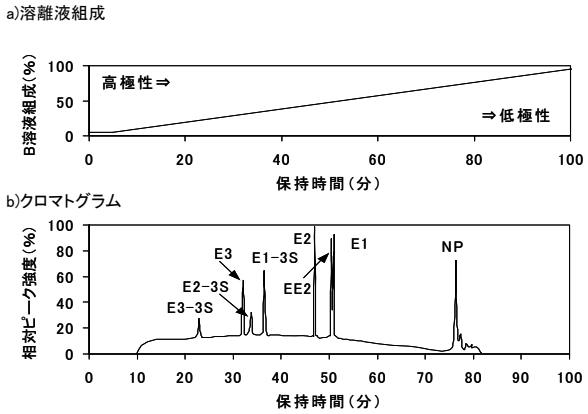


図-2.7 HPLCを利用した極性分画手法(順相)

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硫酸抱合体化物、E2-3S:E2硫酸抱合態化物、E3-3S:E3硫酸抱合態化物、NP:ノニルフェノール

上記の条件を用い、下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分をエストロゲン様活性の測定に供した。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様活性が検出され、さらにE1の寄与が高いことが実測された（図-2.8）。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。

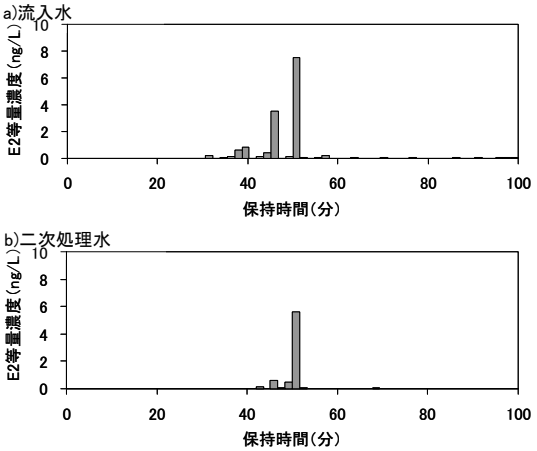


図-2.8 HPLCにより極性分画した下水資料のエストロゲン様活性

2.1.4 底質・汚泥中のノニルフェノールおよびエストロゲンの分析法

河川底質および活性汚泥を用いて，これらに含まれるノニルフェノール類（NP類），エストロゲンの分析法を検討した。具体的には，種々の抽出方法による抽出効率の比較試験を行った。

（1）検討方法

検討に用いた底質は桜川（茨城県土浦市）にて採泥，活性汚泥は霞ヶ浦浄化センター（茨城県土浦市）内に設置された湖北総合実験施設の屋外実験プラントより採取した。なお，検討に用いた底質の含水率は52%，活性汚泥のMLSSはNP・NPEO検討用については2,000mg/L，NPEC検討用については2,200mg/L，エストロゲン検討用については1,800mg/Lであった。

河川底質や活性汚泥に含まれるNP類やエストロゲンを分析する際には，水試料と異なり，前処理操作に先立って，目的物質を抽出する必要がある。ここでは，底質と汚泥について抽出条件が異なるケースでの分析精度を確認した。なお、目的物質の回収率を計算するため、目的物質の添加回収実験も行った。

1）NP類 の抽出条件

①試料量，②抽出溶媒（アセトン）量，③抽出回数の違いによる抽出効率の差を把握することを目的に抽出条件を設定した。A法は従来から用いている試料量（底質：1ｇ、汚泥：200～220mg)、抽出溶媒量（底質：5ml、汚泥：5～10ml)、抽出時間（15分×2回）とし、B法は試料量（底質：5ｇ、汚泥：1～1.1ｇ)、抽出溶媒量(底質：25ml、汚泥：25～50ml)、抽出時間（15分×2回)、C法は試料量（底質：5ｇ、汚泥：1～1.1ｇ)、抽出溶媒量(底質：25ml、汚泥：25～50ml)、抽出時間（15分×6回）とした。

2）エストロゲンの抽出条件

エストロゲン類については，A法として当研究チームにてこれまで実施してきたメタノールを用いた超音波抽出による方法、B法として要調査項目等調査マニュアル（環境省環境管理局水環境部企画課，H15.3：以下，提案法）に記載された方法を用いた。B法は試料を凍結乾燥した後アセトン：水（1:1）を用い超音波抽出する方法である。

（2）検討結果

① NP・NPEO

NP・NPEOの添加回収試験では，底質・汚泥のいずれにおいても良好な回収率と安定して低いばらつき（CV値 10%以下）を示した。また，抽出に用いる試料量は底質で1g-dry，汚泥量で200mg-dryで十分であることが確認された。これらのことから，底

質・汚泥中の分析方法は，従来行ってきた方法で十分な精度を確保していたと考えられる。

② NPEC

底質では，添加回収実験において目的物質のピークが認められなかった。活性汚泥では同一の抽出・前処理法でその濃度が確認されていることから考えると，底質においてピークが確認されなかった要因は，機械的問題や前処理方法の問題ではなく，抽出操作において全く回収されなかったことが考えられる。このため，底質に適用可能な NPEC の抽出方法については，更なる検討が必要であると考えられる。

一方，活性汚泥では，従来法（A 法）で抽出した場合は長鎖の NPEC が定量下限値未満となるケースが多かった。抽出に用いる汚泥量を増加させた B 法，C 法では長鎖の NPEC を含む全ての NPEC を濃度として表現できた。したがって，活性汚泥中の NPEC を検出するためには，1g 以上の活性汚泥を抽出対象とする必要があることが明らかとなった。また，各法ともに，測定値のばらつき（CV 値 15～50%）が大きく，精度良く抽出・前処理されている状況にはなかった。このため，底質や汚泥中 NPEC の抽出・前処理法については更なる検討が必要である。

③ エストロゲン類

底質・汚泥中のエストロゲン類の分析については，従来法，提案法のどちらも遊離体については良好な回収率と低いばらつき（CV 値 10%以下）であった。このため，これまで蓄積されてきた底質や汚泥の遊離体の分析データは一定の精度を保有していたものと推測される。

しかしながら，抱合体については，回収率が極めて低い他，そもそも検出されないケースが多かったことから、差ならル検討が必要である。

2.1.5 まとめ

1）エストロゲン分析の前処理として従来用いられていた薄層クロマトグラフを用いる方法をフロリジルカートリッジと NH2 カートリッジを用いる方法に変更することにより，従来法と同様の精度で、前処理の簡易化が図られた。

2）エストロゲンが尿中へ排泄されるときの形態は，グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となっているとされている。エストロゲン挙動解明において抱合体の把握も重要であることから LC/MS/MS による分析法の検討を行い，下水処理水に適用可能である手法を開発した。しかし、流入下水への適用については、さらなる検討が必要である。

3） ELISA 法による下水試料中 17β-エストラジオール測定ための抽出方法を検討し、C18 固相抽出＋ジクロロメタン溶出が、交差反応・妨害を示す物質の低減に有効であること、および、実試料測定への適用のためには、さらなるクリーンナップ等の方法が必要であることを明らかにした。

また、ELISA 法による下水試料中エストロン測定の前処理法として、C18 固相抽出＋ジクロロメタン溶出，および，C18 固相抽出＋フロリジル固相抽出＋アミノプロピル固相抽出について検討し，いずれの方法でも機器分析測定結果の 1.5 倍程度以内となることを確認した。

さらに、下水試料中の E2、E1 測定用 ELISA 法の簡易な前処理法として、フミン酸分画分離手法の可能性を示したが、手法の詳細については今後の検討課題である。

4）下水中エストロゲン様物質の由来を固相カートリッジによる極性分画手法によって検討し，17β-エストラジオール（E2）、エストロン（E1）、ノニルフェノール（NP）により，エストロゲン様物質がほぼ説明できることを明らかにした。さらに，HPLC 分画手法とエストロゲン様活性の測定法を組み合わせ、下水および二次処理水では E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン様活性が検出され、特に E1 の寄与が高いことを明らかにした。

5）ノニルフェノール類（NPs）およびエストロゲンの底質・汚泥分析法の検討を行い，NP・NPEO およびエストロゲン遊離体については、従来の方法で一定の精度を維持して分析可能であることを確認した。

しかし、抱合体については回収率が低く、引き続き検討が必要であることが明らかとなった。

2.2 水環境中での内分泌かく乱化学物質の挙動

2.2.1 概説

日本の河川において、国土交通省が 1998 年から、全国の一級河川を対象とした内分泌かく乱物質の水質・底質の汚染レベルについて調査を行った。その結果、河川水中から内分泌かく乱物質が検出されることが明らかになった。また、同省により 1998 年から 2001 年にかけて実施された全国一級河川における魚類実態調査の結果、29 河川 69 地点で雄コイの血中 VTG 濃度の上昇が確認された。

このため、主要河川における女性ホルモン作用（エストロゲン様活性）の調査を行い、女性ホルモン作用の原因物質について検討するとともに、流域の土地利用状況がこれら物質の流出負荷量に与える影響

について検討した。また、河川、湖沼における内分泌かく乱物質の挙動調査を行い、水域内における変動機構を検討した。

2.2.2　日本の主要河川におけるエストロゲン様活性の検出状況

日本の主要河川における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，流域情報との比較を行いエストロゲン様活性の由来について検討した。

（１）検討試料

試料の採取は，国土交通省河川局の協力を得て，1999 年から 2001 年にかけ水環境における内分泌かく乱物質に関する実態調査（以後，全国河川実態調査）に併せて採水を行った。遺伝子組み換え酵母法の測定を行った地点は，**図-2.9** に示す全国一級河川 94 水系 132 地点である。

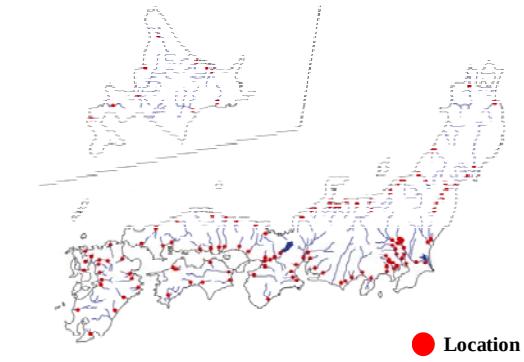


図-2.9　試料採取地点（全国河川実態調査）

（２）分析方法

標準物質のエストロゲン様活性の相対的強度である比活性値は，Tanaka ら [2] の報告に従い E2 の用量反応曲線の最大発色 50%濃度を 1 とし，各物質の用量反応曲線から求めた発色 50%濃度との比較により換算し，比活性値を算出した。比活性値を**表-2.6** に示す。また，化学分析結果については，国土交通省が行った全国河川実態調査の結果を用いた。

表-2.6　各物質の E2 に対する比活性値

物質	略号	REP
17β-エストラジオール	E2	1.0
エストロン	E1	0.3
ノニルフェノール	NP	0.001

（３）流域情報の整理

流域面積は，国土交通省の各工事事務所が作成した河川図及び流域図を利用した。流域情報を整理した地点は，88 水系である。これらの流域図を参考として，各流域に含まれる市町村を調べるとともに，プラニメータを用いて流域内に該当している市町村面積を計測した。この情報をもとに，エストロゲン様活性を測定した地点の流域面積を計測した。各市町村人口は，住民基本台帳（2001 年 1 月 1 日現在）を利用した。また，汚濁処理形態別人口（2001 年）は，国土交通省から資料提供を受けた。各流域に該当する人口は，人口の偏りをここでは考慮せず，流域に該当する面積の比から流域人口を算出した。ただし林野部のみが流域に該当する市町村については，ここでは流域外として扱い，人口の割り当てをしないこととした。これらの計測結果を基に，以下の項目を算出した。

・流域人口密度（人/km）＝流域人口（人）／流域面積（km）
・汚水処理施設整備人口（人）＝下水道人口＋合併浄槽人口＋ｺﾐｭﾆﾃｨﾌﾟﾗﾝﾄ処理人口＋農業集落排水人口
・汚水処理施設整備率（%）＝汚水処理施設整備人口（人）　／流域人口（人）×100

（４）結果

2001 年の秋に行われた調査において、遺伝子組み換え酵母法（YES (Yeast Estrogen Screen)），化学分析ともに値が検出された 17 地点を抽出し，エストロゲン様活性の寄与物質とその寄与率を推定した。ここでは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。その結果を**図-2.10** に示すが，エストロゲン様活性の主要な寄与物質として E１が占めるケースが多いことが確認された。またエストロゲン様活性の上昇要因を探るため，BOD5 や SS などのコンベンショナルな水質項目 6 項目（SS，DO，pH，BOD5，塩素イオン，硫酸イオン）との関係について検討したところ，BOD5 との間に有意な相関（r=0.75）を確認した。

各河川の生活系排水に関する流域情報を整理し，両者の関係を比較した。その結果を**図-2.11** 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確認され，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確認された。

全国の河川と下水中のエストロゲン様活性の濃度分布を**図-2.12** に示す。下水処理場ではその処理工程でエストロゲン様活性が約 80%減少するが，下水処理水として 16ng-E2/l 活性等量エストロゲン様活性の濃度分布（中央値）の濃度で環境水中に放出されることになる。この濃度は河川濃度（中央値）より 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ことを意味する

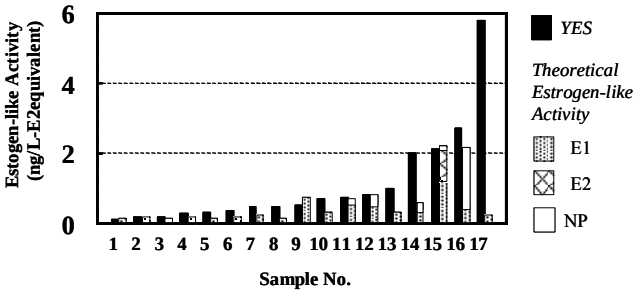


図-2.10　エストロゲン様活性値と各物質の E2 に対する比活性値

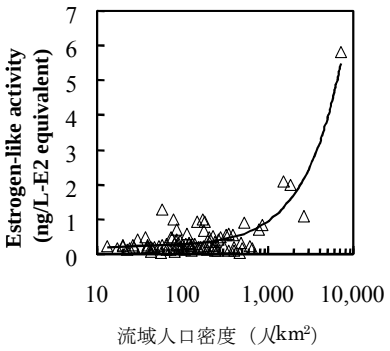


図-2.11　流域人口密度とエストロゲン様活性の関係

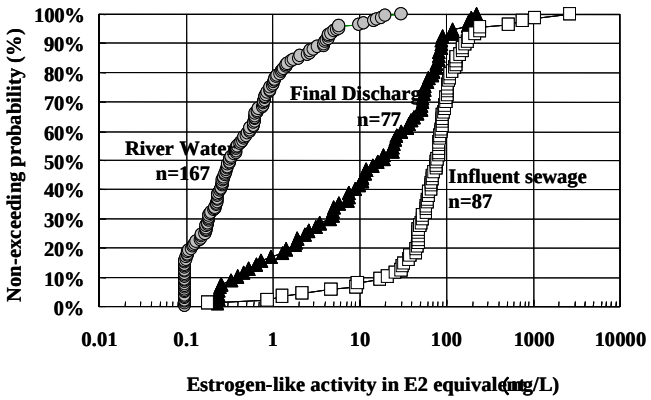


図-2.12　全国の河川水・下水におけるエストロゲン様活性の濃度分析

2.2.3　河川におけるノニルフェノール類，エストロゲンの挙動

（1）ノニルフェノール類，エストロゲンの負荷量実態

1）対象河川及び調査地点

対象河川は，手賀沼の主要な流入河川であり，手賀沼流域のうち，面積で約 23%，人口で約 41%を占める流域をもつ大津川及びその支川である名戸ヶ谷排水路，増尾排水路である（**図-2.13**）。



図-2.13　大津川流域と調査地点

採水地点は，大津川本川及び支川を含め 6 地点（記号：OT①～OT⑥），名戸ヶ谷排水路流末（同：NT），増尾排水路流末（同：MS）とした。大津川流域のフレームの変化を**表-2.7** に示す。

表-2.7　大津川流域フレーム

調査年	流域面積(ha)	土地利用(%)				流域人口(人)	処理形態別人口割合(%)			
		市街地	水田	畑地	林地		下水道	合併処理浄化槽	単独処理浄化槽	汲み取り等
1980	3,669	35.6	9.1	25.2	30.1	146,650	0.0	23.3	37.7	39.0
1986	3,669	42.6	7.8	23.2	26.3	169,060	14.5	17.9	45.0	22.6
1990	3,669	48.0	6.5	22.9	22.6	191,030	23.1	16.5	44.4	16.0
1995	3,698	55.7	6.2	28.3	9.8	196,123	38.2	11.1	39.9	10.8
本調査での対象流域	3,261	54.9	4.3	30.6	10.2	171,451	31.0	12.6	44.2	12.1
大津川本川	2,400	48.1	5.7	36.5	9.7	109,537	20.1	12.5	50.8	16.6
名戸ヶ谷排水路	437	79.4	0.0	11.9	8.8	36,493	75.1	1.6	19.4	3.9
増尾排水路	424	67.9	0.8	16.5	14.9	25,421	15.1	29.0	51.4	4.5

汚水処理形態については，下水道整備が大幅に進んでいるものの，単独処理浄化槽利用者の比率が依然として最も大きい。特に，調査対象河川の流域毎に下水道普及率を見ると，名戸ヶ谷排水路流域の普及率が75%であるのに対し，大津川本川流域と増尾排水路流域はそれぞれ20%, 15%と低い状況にあり，流域によって大きな差がある。

２）調査方法

試料の採水は，対象河川の河川流末であるOT⑥，NT，MSの３地点について2002年11月，2003年2月の2回，その他の地点については2003年2月の1回，晴天日に実施した。

採水頻度は，流末の３地点では３時間間隔で24時間連続採水を行い，試料をそのまま分析に供した。その他の地点は流量比例の１日コンポジット試料に調整したうえで分析に供した。

３）水質分析

分析項目は，NP，NPEO，NPEC，エストロゲンとした。NP，NPEOの分析は「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」[3]に概ね準拠し，HPLCを用いて行った。また，NPEC[4]，エストロゲン[5]の分析は，LC/MS/MSを用いて行った。

４）調査結果

大津川本川OT⑥，名戸ヶ谷排水路流末NT，増尾排水路流末MSの各地点におけるエストロゲン類の測定結果を**図-2.14**に示す。

EE2については，すべての地点において検出されなかった。E2は，秋（11月）よりも冬（2月）の調査で高く，E1はその反対の傾向があった。また、下

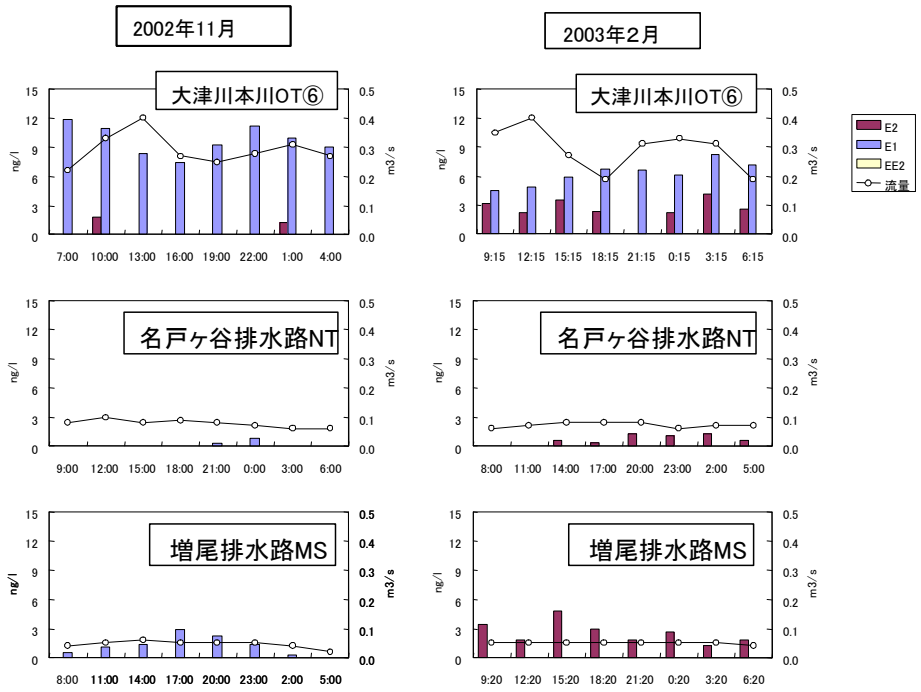


図-2.14　大津川におけるエストロゲン，NPsの経時変化

水道整備率の低い OT⑥および MS において E1、E2 ともに濃度が高い傾向にあった。

（２）ノニルフェノール類，エストロゲンの流下過程での変化

１）対象河川及び調査地点

調査は多摩川の中流部の多摩大橋を基準とし，1,300m 地点から 3,000m 地点の約 1,700m の区間で行った。調査地点は**図-2.15** に示す５地点である。

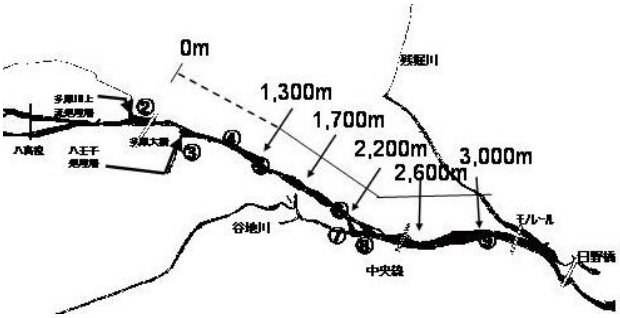


図-2.15　多摩川における負荷量変化調査地点

本地区の直上流域に大規模な下水処理施設があり，下水処理場の処理水が混入した河川が流下している。また，この区間には大きな樋管や支川が殆どなく，その負荷量は本川負荷量に比べ非常に少ない。そこで，この区間を利用して，ノニルフェノール関連物質，エストロゲンの流下過程における変化について、2002 年 8 月～2004 年 8 月まで、定期的に調査を行った。さらに，調査で確認された挙動を解明するため、分解実験を実施した。

２）調査結果

図-2.16に調査結果を示す。初年度の夏期（8月）はノニルフェノール関連物質及び，エストロゲンは流下に伴い減少する傾向が見られ，特にE1は流下に伴い44%減少していた。その後の夏期の調査においては、負荷量の顕著な減少は見られなかったものの、流下に伴い減少する傾向にあった。一方，冬期（２月）の調査では，エストロゲン，ノニルフェノール関連物質については，流下過程での減少傾向は確認されず，夏期調査とは異なった傾向となっていた。これらの要因として流下過程での分解や底質への蓄積等が要因として考えられた。

窒素化合物については硝酸態窒素の占める割合が

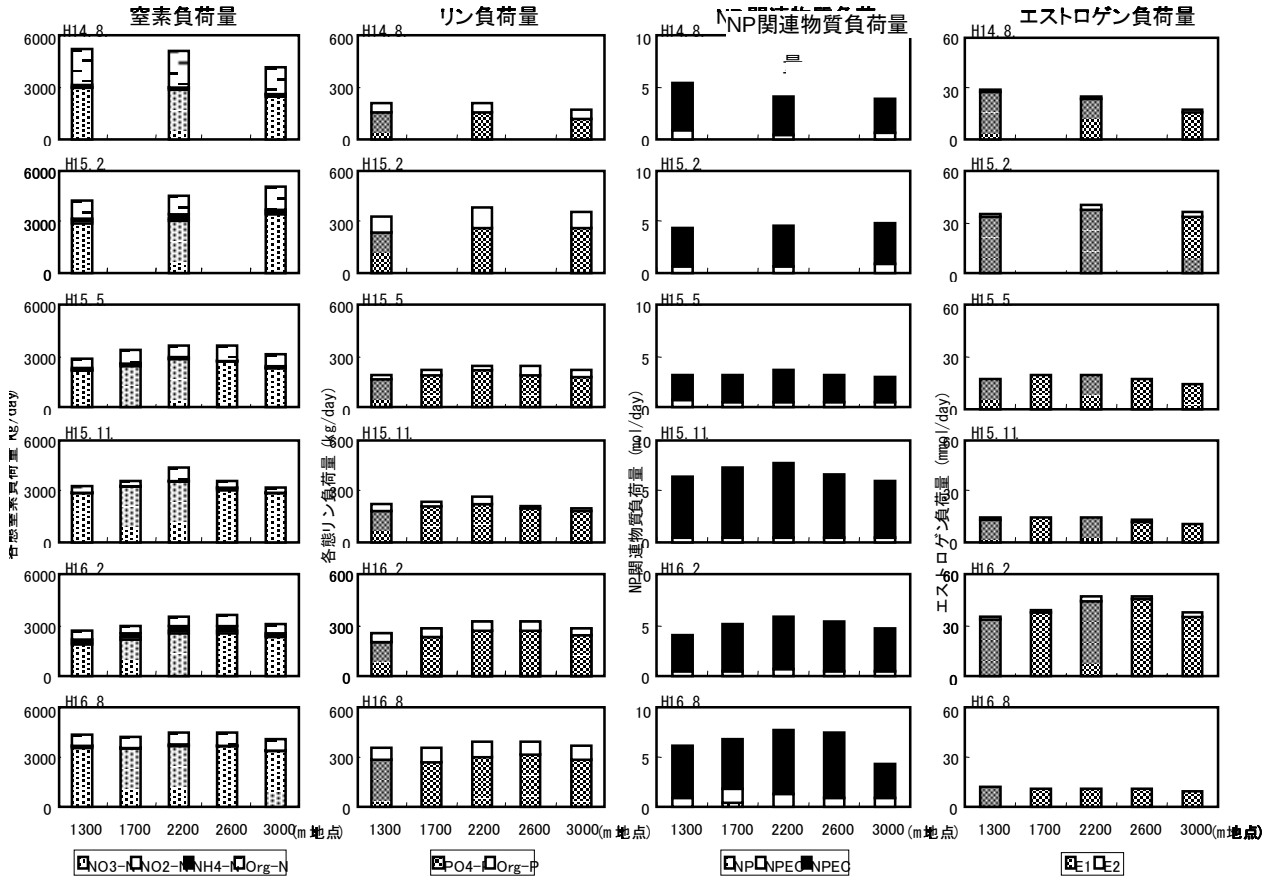


図-2.16　窒素、リン、ノニルフェノール類、エストロゲンの流下に伴う付加量変化

高く，初年度の夏期の調査を除くと，各態窒素化合物の負荷量は流下過程では減少することなく流下していた。リン化合物についても顕著な負荷量の低下は確認されなかった。

（３）ノニルフェノール類，エストロゲンの河川水中での分解

１）調査方法

流下に伴う内分泌かく乱化学物質の水中濃度の減少に係わる環境要因としては，以下の点が考えられる。

・日光による光分解
・河川水中での生物分解
・河床における生物分解
・河床に生存する藻類等の微生物による取り込み
・底質への吸着

そこで，本実験においては上記前2項目を対象として，光透過性のあるガラス円形水槽（明条件）と遮光性のステンレス容器（暗条件）を用い，水中における環境ホルモン関連物質の濃度について経時変化を測定した。

これらの容器を多摩川の河川中に設置し，さらに同じ水塊から採取した水を一定量(3.5L)分注することで，水温（約29℃），水質，日照の条件を統一した。過去の研究より，対象区間の流下時間は約90分と推定され，その間での水質変化が顕著でなかったことから，開始直後(0時間)，2時間後、4時間後、6時間後の各時間において，水質分析用のサンプルを採取した。

また、河床における生物分解や藻類による取り込み速度を評価するため，底質表層を採取して，室内において明・暗条件での水質変化実験を行った。

２）分解実験の結果

現場での分解実験の結果，NPEO，NPECは，いずれの条件においても，明瞭な濃度の減少は確認されなかったE1についても，明条件における光分解の効果はほとんど観察されなかった。

室内での水質変化実験においても，NPCEおよびNPEOについては，現場調査同様、試験の進行に伴う明瞭な濃度の増減の傾向は確認されなかった。

一方，E1については，底質表層が存在する条件、特に明条件において、時間の経過に伴う濃度の減少傾向が確認され，6時間の実験期間において3.6ng/Lが減少した。この分解量から、単位時間・単位面積あたりの濃度低減速度は84ng/h/m^{2}と見積もられ、この速度を用いて多摩川の調査区間における1日当たり分解量を求めると680μmol/dayとなり、同区間の流下負荷量（13～34mmol/day）のおよそ2～5%であることが明らかとなった。

本調査区間における河床の除去効果は小さいが、流下距離が長い場合には、その効果も大きくなると考えられる。

（４）水生生物へのエストロゲン関連物質の蓄積

１）目的

河川環境中でエストロゲン様物質やエストロゲンがどの程度生物に蓄積されているかという情報については、アルキルフェノールを中心に報告[6-8]があるが、エストロゲンについては魚類の体内に女性ホルモンが存在していることもあり、その濃縮性については調査した事例が殆ど見られない。また河川生態系を構成するその他の生物(付着藻類、底生生物)については、Ahel らの報告[9]や Takahashi らの報告[10]などを数えるに過ぎない。

そこで、ここでは下水処理水が放流される河川において、処理水中のエストロゲン関連物質の生物への蓄積の実態について把握することを目的とした。

２）調査方法

a) 調査地点および時期

調査は、**図-2.17** に示すように、多摩川中流の多摩大橋地区および多摩川上流域の奥多摩橋下流で行った。多摩大橋地区の上流地点として日野用水堰（St.2）を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。また人為的な汚染の殆どない地点として、奥多摩橋地点（St.1）を設定した。調査は 2002 年 9 月～2003 年 4 月にかけて実施した。



図-2.17　多摩川における水生生物調査地点

b)調査対象および 調査項目

現場から採取した付着藻類，マクロベントス，粒子状有機物（POM）（16㎜，1㎜ のフルイによる 16～

1mm 分画を CPOM、1～0.063mm 分画を FPOM）について以下の項目を分析した。

・エストロゲン類
（E1, E2）
・ノニルフェノール関連物質
（NPnEO［n=1～15］, NPnEC［n=1～10］

３）調査結果

a) 水質分析結果

下水処理水が合流していない奥多摩橋 St.1、日野用水堰地点 St.2 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 地点 St.3，日野橋 St.4 では E1，E2 が検出された。NP 及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。

b)底質分析結果

エストロゲン類、ノニルフェノール及びその関連物質の水生生物への蓄積状況を**図-2.18** に示す。生物への蓄積状況を表す生物濃縮係数は水からの曝露だけでなく、餌を通じた生物濃縮を示す係数として用いられる。しかし野外調査をベースとした場合、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（μg/kg-湿重）を水中濃度（μg/L）に対する比で示したが、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及び底生生物の生物蓄積係数は 10^1～10^3 程度であり、その蓄積性は高くなかった。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た。

生物蓄積係数に種間差はほとんど無いが、やや肉食者(カワゲラ)の値が低くなっていること、底生動物の餌となる POM や付着藻類に比べ、食物連鎖上位の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。

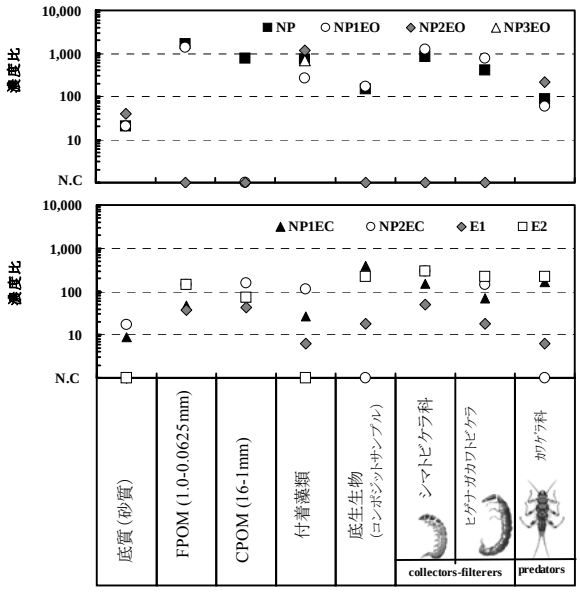


図-2.18 付着藻類，底質，POM における蓄積濃度（湿重当たり）の水質濃度に対する比

2.2.4 湖沼等におけるノニルフェノール類，エストロゲンの挙動

（１）ノニルフェノール類，エストロゲンの水域・表層底泥での濃度実態

流域から湖沼に排出された内分泌かく乱化学物質エストロゲン（E2，E1，E3，EE2），ノニルフェノール類（NP，NPnEO，NPnEC）について湖水の流下方向の分布状況，および表層底泥への蓄積を測定した。

１）調査方法

試料採取は 2003 年 3 月に，**図-2.19** に示す手賀沼の 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。

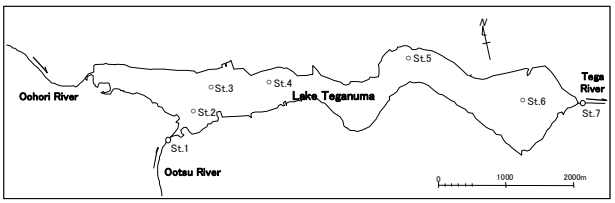


図-2.19 手賀沼における水質・底質調査地点

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）を用いて不かく乱状態で採取したもののうち表層 10cm を用いた。

底質分析[20]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。

湖水試料は，水深 10cm～30cm 程度の表層で採取し，分析は，一般項目（SS，VSS，$CODM_n$，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。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とに分けて検討した。

2）調査結果

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-2.20** に示す。

湖沼内での水質は，NP を除いて流下方向に減少する傾向を示した。また，NP 類は，側鎖の小さなものほど，粒子態の存在割合が高い傾向にあった。

表層底泥中の E1，NPnEO，NPnEC 濃度は，殆どの物質で St.2 において高かったが，NP については，大津川河口付近の St.1 から手賀大橋直上の St.4 にかけて一旦減少するが，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 で最も高い値を示した。

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-2.21** に示す湖水中の VSS，Chl－a を見ると，過去の研究[11]と同様に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。

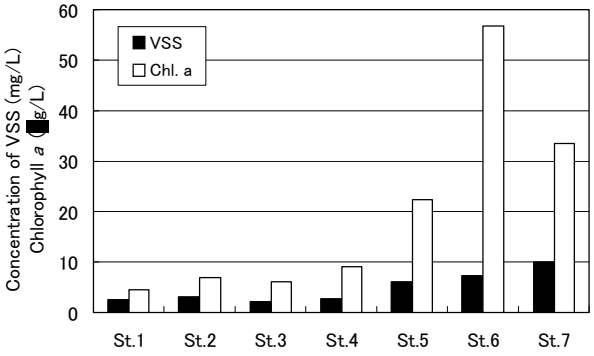


図-2.21　手賀沼湖水中の VSS，SS の流下方向の分布

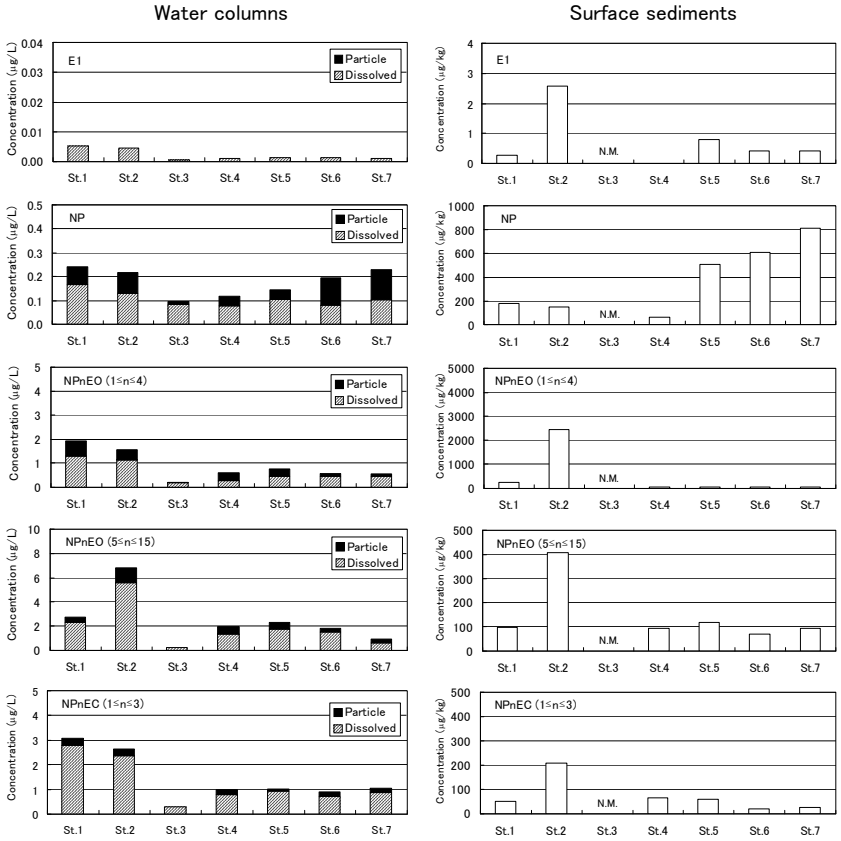


図-2.20　手賀沼における表層底泥中及び湖水中のエストロゲン，ノニルフェノール類の流下方向の分布

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。晴天時，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る。

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[12]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。

（２）ノニルフェノール類の湖沼浮遊物への吸着特性

水環境中のノニルフェノール類の挙動について検討するため，湖沼浮遊物へのノニルフェノール類の吸着実験を実施し，吸着および溶出特性を把握した。

１）実験方法

2005 年 8 月 11 日，「手賀沼中央」の水質観測地点から試料を採取し，ろ過によって 2 倍に濃縮した。この操作により，SS 懸濁液の SS 濃度は 45mg/L, VSS 濃度は 14.7mg/L 程度となった。

所定の濃度の NP 類を試料水に添加し，30 分間撹拌後，ガラス繊維濾紙でろ過して，ノニルフェノール類の分析を行った。

２）実験結果と考察

表-2.8 に得られた各対象物質の吸着定数を示す。単一化合物の吸着定数と混合系でのそれはほぼ一致する傾向にあった。また，混合系において，ＮＰの吸着定数が他の物質よりも大きいことから，湖沼水環境中において，NP が浮遊物に吸着して挙動する傾向の大きいことが推測される。

（３）ノニルフェノール類，エストロゲンの湖沼底泥の深さ方向蓄積

湖沼から底泥を採取し，エストロゲン（E1，E2，EE2, E3）とノニルフェノール類（NP, NPEO, NPEC，以下，NPs）の鉛直分布を測定するとともに底泥の年代測定を行った。

表-2.8　各対象物質の吸着定数と線形近似における相関係数および最大平衡濃度

対象物質	吸着定数 K_{ads}[L/mgVSS]	相関係数 R^2	最大平衡濃度 μg/L
NP	0.142	0.997	23.00
NP2EO	0.270	0.996	14.39
NP3EC	0.021	0.755	33.19
NP類(混合)			
NP	0.386	0.989	2.96
NP1EO	0.222	0.977	4.87
NP2EO	0.224	0.928	5.04
NP3EO	0.233	0.925	4.57
NP4EO	0.227	0.922	4.02
NP5EO	0.216	0.923	3.75
NP6EO	0.213	0.917	3.80
NP7EO	0.207	0.933	3.67
NP8EO	0.209	0.939	3.57
NP9EO	0.226	0.903	3.55
NP10EO	0.208	0.953	3.51
NP11EO	0.189	0.957	3.10
NP12EO	0.200	0.929	2.99
NP13EO	0.189	0.954	2.92
NP14EO	0.191	0.950	2.96
NP15EO	0.198	0.958	3.05
NP1EC	0.061	0.937	3.06
NP2EC	0.048	0.957	3.13
NP3EC	0.069	0.969	3.13
NP4EC	0.110	0.954	2.93
NP5EC	0.124	0.974	3.16
NP6EC	0.109	0.944	3.34
NP7EC	0.121	0.965	3.18
NP8EC	0.125	0.922	3.33
NP9EC	0.130	0.949	3.29
NP10EC	0.134	0.949	3.24

１）調査方法

調査は 2002 年 4 月に，手賀沼において環境基準点である St. 6 付近において実施した。

底泥試料は，ダイバーが潜水により水中作業でアクリル製パイプ（10cmφ×100cm）を用いて不かく乱状態で採取し，深さ方向に 1 ㎝毎に分割した。分析項目は，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（E1, E2, EE2），NPs（NP, NPEO, NPEC）と，年代推定（Pb210）とした。

２）調査結果

ａ）一般項目

一般項目の鉛直分布の代表例として含水率，TOC，T-S を図-2.22 に示す。含水率は表層付近の 90%から深さ方向に低下し，60 ㎝以深では 60%程度であった。TOC の鉛直分布は 30 ㎝深まで低下するものの，40～60 ㎝深において高くなる傾向が見られた。硫化物は 30 ㎝深まで高い傾向を示し，30 ㎝以深は低い値であった。

ｂ）エストロゲン，NPs

表層底泥中の E1 及び NPs の濃度（乾重 kg 当たり）は，流入している大津川の河川水中の濃度（L 当たり≈kg 当たり）に比べ，かなり高い結果であった。このことは，国土交通省での河川実態調査[13]の結果と同様である。また，表層以外でも高い汚染が認められた。

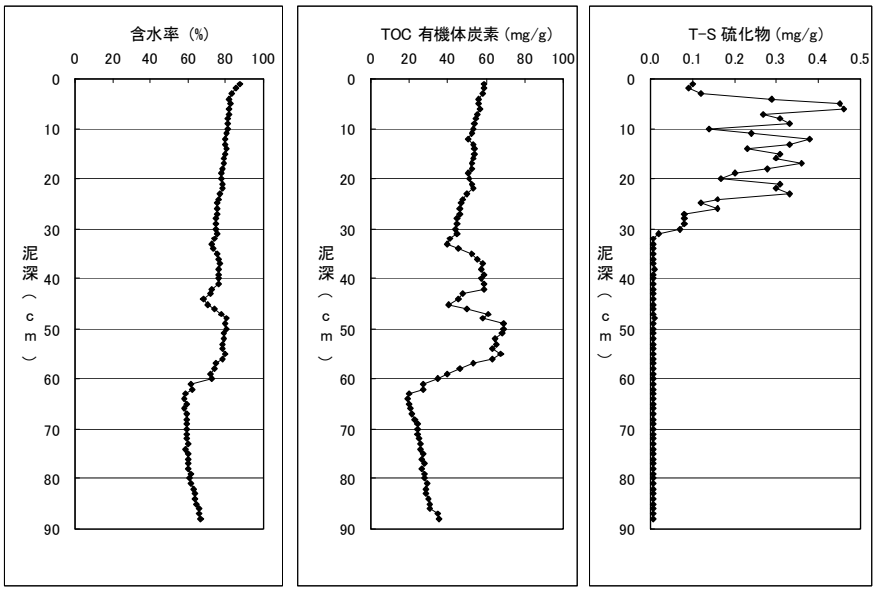


図-2.22　手賀沼底泥の一般項目の鉛直分布(含水率, TOC, T-S)

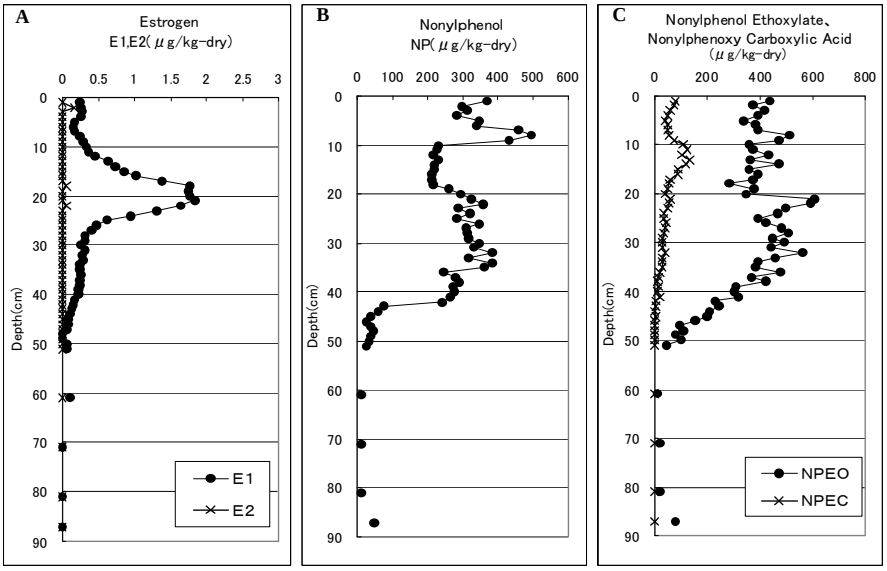


図-2.23　手賀沼底泥のエストロゲンおよびNPs鉛直分布

エストロゲンについては，E2 が殆ど検出されず，EE2 は全く検出されなかった。検出された E1 の蓄積状況をみると，泥深 30～20㎝の間で比較的高い濃度がみられた。NPs については，35cm 以浅で濃度となっていた (図-2.23Ｂ，Ｃ)。NPEC は NP，NPEO に比べ含有率が低かった (図-2.23Ｃ)。

E1 の鉛直分布をみると，20cm 以浅で減少傾向がみられており，後述する手賀沼への流入負荷の低減による可能性が考えられる。一方，NPs は，40cm 以浅で減少する傾向がみられない。これについては，負荷量や形態の変化を解明する必要がある。

手賀沼に流入する大津川の調査結果より得られた，河川水中の mol ベースでの存在比は NP：NPEO：NPEC＝0.09～0.10：0.50～0.62：0.28～0.41 である。NPEC の対象とするエチレン鎖の範囲に違いがあるものの，底泥の NP の存在比は水中に比べ５倍程度増加しており，NPEC の存在比は３分の１～４分の１に減少していた。

ｃ）年代推定（Pb210）

1～87cm までの 10cm 間隔の試料について Pb210 の壊変数 dpm/ｇを測定するとともに，含水率と密度から積算重量を求め，両者の関係から年代推定を行った。この結果，１0cm 層が 1995 年，20cm 層が 1989

年，30 cm 層が 1982 年，40cm が 1975 年，87cm 層は，1922 年と推定された

ｄ）エストロゲン，NPｓの蓄積年代の推定

年代推定結果より，人畜由来の E1 が増加し始めたのは 1972 年頃（泥深 47cm），急激な増加が始まったのは 1982 年頃（泥深 30cm），ピークがみられたのは 1989 年頃（泥深 20cm）と推定された。

図-2.24 に示す手賀沼の流域人口は，1970 年から 1980 年までの 10 年間で約 60 万人から約 100 万人にほぼ倍増している。E1 の顕著な増加は，流域人口の急増に加え，**図-2.25** に示す手賀沼流域の下水道整備状況の変化からも説明される。人口増とともに、手賀沼に放流される終末処理場や浄化槽からの処理水が増加し、手賀沼へ排出されるエストロゲン量も増加した。しかしその後，新たに流域下水道が整備されると，この流域の排水が手賀沼をバイパスされ，さらに流域内にあった終末処理場も廃止されたことにより，エストロゲンの負荷量が顕著に減少した。

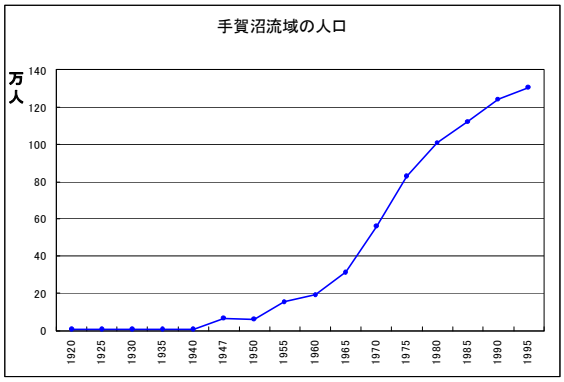


図-2.24　手賀沼流域の人口の推移

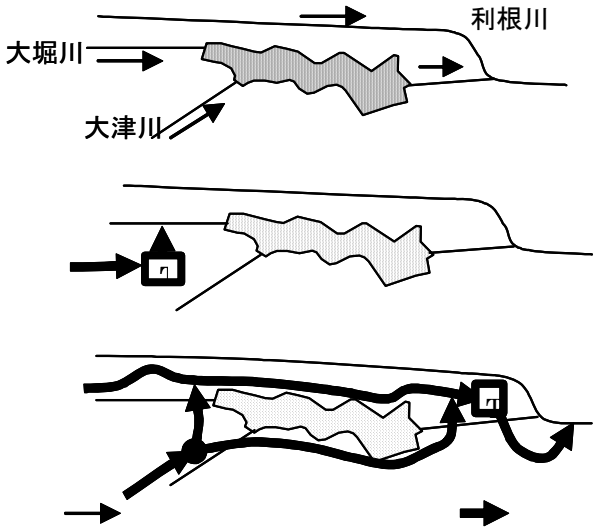


図-2.25　手賀沼流域の下水道整備状況の変化

また，主に工業由来と考えられる NPs の増加が顕著となったのは 1963 年～1978 年頃（泥深 50～35cm）と推定された。NP，NPEO は現在に至っても減少の傾向がみられないことから，下水道に取り込まれていない排水の存在が示唆され，手賀沼への流入は継続していると考えられる。

（４）湖沼におけるノニルフェノール類の挙動予測

ノニルフェノール類は，分解等により形態が変化するため，水域での挙動把握を目的として，本研究では，手賀沼の実態調査（流入，流出河川，湖内）を行い，実態調査結果及び観測データに基づいて，NP 類の挙動シミュレーションモデルを構築した。

１）方法

ａ）実態調査及び分析方法

水質及び底質調査は手賀沼の**図-2.26** に示す調査地点において行った。

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

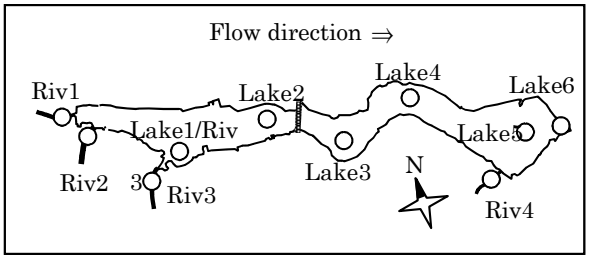


図-2.26　手賀沼の採水・採泥地点

ｂ）室内実験

①NP 類の生分解実験

NP 類の好気性生分解試験の目的は，NP 類の**図-2.27** に示す反応経路[14)～17)]の反応速度係数の推定である。生分解試験は手賀沼水に規定の NP 物質を添加し，室温，好気状態で行い，各 NP 化合物濃度の経時変化を求めた。

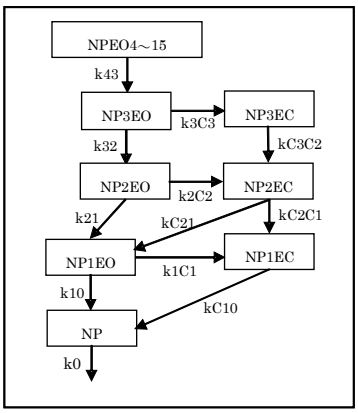


図-2.27　ＮＰ類の反応経路と反応速度係数

②NP 類の吸着実験

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

方法：　手賀沼湖内調査地点の水質試料を室温で 30 分攪拌し，浮遊物を１μm のガラスろ紙によってろ過分離し，各 NP 化合物の溶解性及び浮遊性濃度を測定した。

ｃ）モデル開発

数理モデルの構造およびプロセスの特徴は以下の通りである。

・　空間的に１次元（流下方向，完全混合槽列）；

・　水柱と底泥間の物質移動を支配する要因は底泥の波による巻上げである（浅い湖沼）；

・　生化学反応の速度は溶解性化学物質濃度及び有機性浮遊物濃度（VSS）に依存する；

・　化学物質は VSS 及び底泥の有機性固形物（強熱源量分）に吸着する。吸着平衡は線形的である。

モデルの水柱における一般的な物質収支式は以下の通りである。

V(dC/dt)＝流入―流出＋生成―分解＋溶出―吸着＋吸収―揮発　　・・・・・（式 2.2-1）

ここに、V：水中体積、C：物質の溶存態濃度

このモデルで, 各対象物質の図 2.2-19 に示す生成及び分解反応を考慮し，例として NP の生化学反応を以下の式に示す。この式によると，NP は NPEO 及び NP1EC の分解により生成されるが, 同時に分解もする。左側の変化の符号及び絶対値は各反応速度係数 k（L/mg/day），物質全濃度[XX]（nmol/L），吸着係数 K ads(L/mgVSS) 及びバイオマス濃度 Xbio(mg/L）に依存する。本研究では，Xbio＝VSS とした。

$$\frac{d[NP]}{dt} = k_{10}[NP1EO]\times\frac{X_{bio}}{1+K_{ads1}X_{bio}} + k_{1C0}[NP1EC]\times \times\frac{X_{bio}}{1+K_{ads1C}X_{bio}} - k_0[NP]\times\frac{X_{bio}}{1+K_{ads0}X_{bio}}$$

・・・・・（式 2.2-2）

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

数理モデルの計算プログラムは動的システム解析言語の Stella Research Ver.7.0.2（HPS Inc.）で作成した。

２）研究成果

ａ）室内実験の結果

生分解実験結果から推定した NP 類の生分解速度係数（ｋ）を**図-2.28** に示す。また、吸着実験の結果から求めた吸着係数を**表-2.9** に示す。なお、**表-2.10** に示す NP4～15EO の値は平均値である。

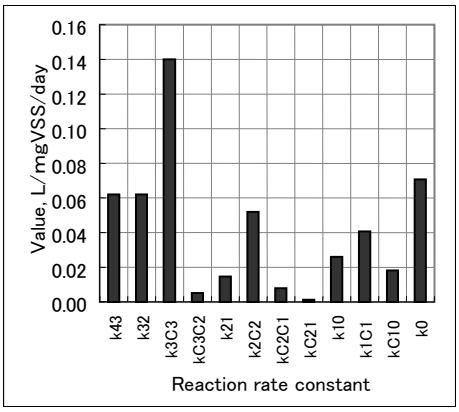


図-2.28　室内実験から求めた NP 類の分解速度係数

表-2.9　各ＮＰ化合物質の吸着係数（L/mg VSS）

Chemical	Teganuma Experiment
NP4 ～ 15EO	0.0257
NP3EO	0.0253
NP2EO	0.0109
NP1EO	0.0098
NP3EC	0.0064
NP2EC	0.0065
NP1EC	0.0063
NP	0.0890

ｂ）シミュレーション結果

各 NP 化合物濃度の実測値及びシミュレーション値を**図-2.29** に示す（定常状態）。「Reach」は手賀沼の区間,「meas」は実測値,「sim」はシミュレーション値を表す。

また，定常状態シミュレーションにおける各ＮＰ化合物の手賀沼全体における挙動予測結果を**図-2.30** に示す。

３）考察

図-2.29 に示す様に，手賀沼の各区間において，NP 類濃度の合計の実測値とシミュレーション値の

一致は良好であった（平均誤差は 13.1%）。また，各区間において，NP 類の濃度分布パターンをシミュレーションにより再現することが可能であった。流下方向の濃度低下は小さいが，これは低水温及び大量の導水注入（自然流量の約４倍）に伴う滞留時間の減少によると考えられる。

シミュレーションモデルを用いて NP 類の手賀沼全体における挙動の予測を行った（**図-2.30**）。各 NP 類の大気との交換は無視できる程度である。底質との交換はいずれの物質においても底泥→水柱の方向となっているが，特にＮＰの場合に著しく，その「内部負荷」は流入負荷の約 30%を占める。この現象は，それまでに底質に蓄積した高い濃度の NP が、導水に伴う水相 NP の低濃度化によって溶出したためであると考えられる。各 NP 類の反応による変化においては，分解は生成を上回っている。その程度は NP

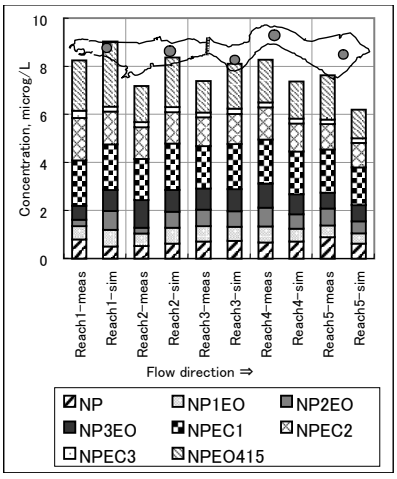


図-2.29　手賀沼湖水のＮＰ類濃度についての実測値とシミュレーション値の比較

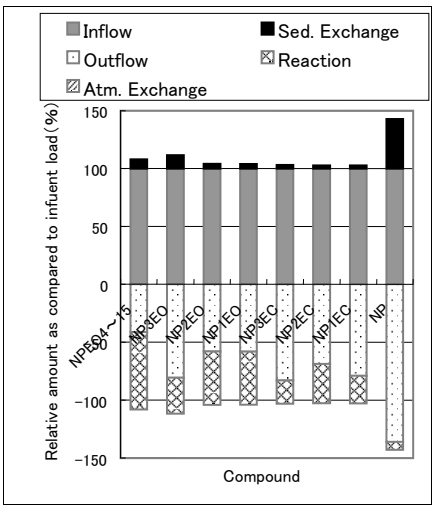


図-2.30　手賀沼水柱におけるＮＰ類挙動の計算結果

の場合最も少ないが，この原因として NP の溶解性濃度が低いことが挙げられる

（４）水相と底泥相微生物による E2 の分解特性

都市下水処理場や浄化槽などの排水処理施設から自然水域に排出されるエストロゲン様物質のうち，17βエストラジオール(E2)はエストロゲン様活性が著しく強いと報告されている。同物質の湖沼における運命を把握するためには，水相と底泥相で生起する物理化学的・生物学的諸反応による E2 の移動・変換・分解などの諸挙動を的確に評価することが重要である。

このため，水相，底泥ごとのエストロゲン分解速度について，嫌気／好気，温度等の影響について検討した。

１）底泥深さおよび嫌気・好気条件の影響

ａ） 方法

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

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

実験は振盪培養器により，嫌気と好気/20℃の条件下で行った。嫌気条件は反応器の混合液中に湿潤窒素を連続的に導入することにより維持した。

ｂ） 結果

① E2 の経時変化の動き

E2 の分解挙動を牛縊前貯水池の A 地点における底泥直上水(BW)と上層の底泥(SL)の場合を例にして**図-2.31** に示す。水相と底泥相ともに，E2 の分解は主に副次生成物 E1 の分解を経由して行われている。E2 の分解過程における E3 の形成は認められなかった。

② E2 の分解速度

生分解の一次反応式に基づいて推定した底泥による

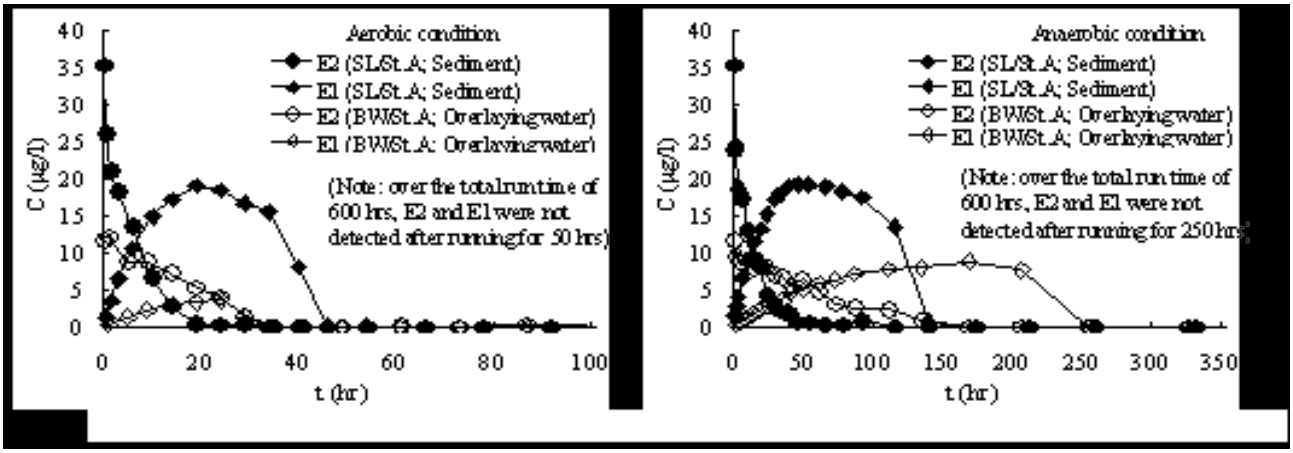


図-2.31　好気と嫌気下における E2 の分解挙動（20℃，三春ダム牛縊前貯水池地点 A の直上水と底泥を使用）

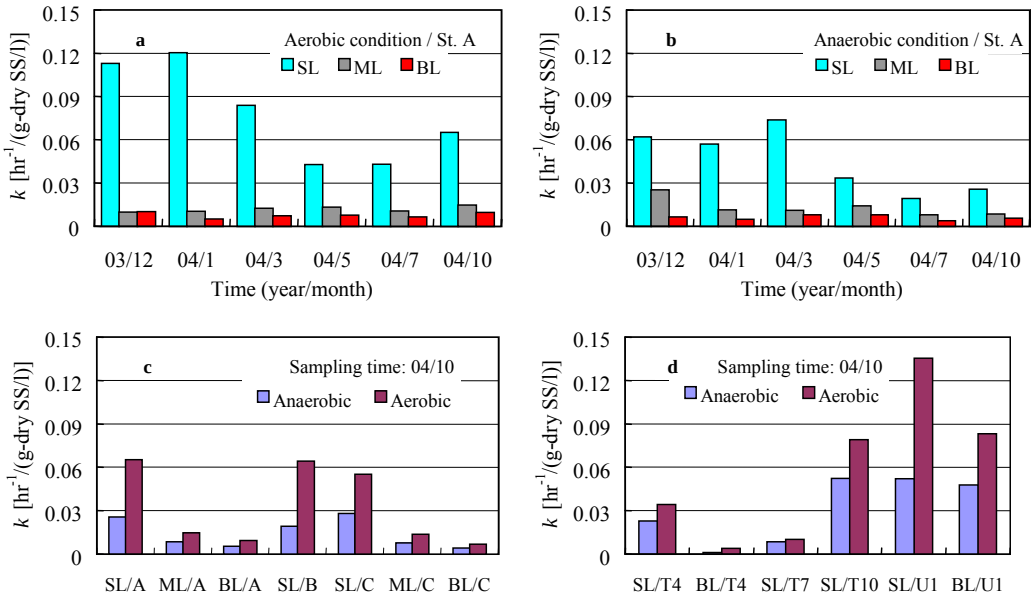


図-2.32　底泥生息微生物による E2 の好気と嫌気下での分解速度係数（20℃）

（使用底泥：a&b は三春ダム牛縊り前貯水池地点 A；　c は三春ダム牛縊前貯水池地点 A，B，C；d は手賀沼上流 T4，中流 T7，下流 T10，牛久沼中央 U1）

E2 の分解速度係数(k)を図-2.32 に示す。k の値は好気下では 5 月，嫌気下では 5，7 及び 10 月の場合の方が小さく，E2 の分解速度は底泥の季節によって変化することが明らかになった(図-2.32a と図-2.32b)。また，いずれの採泥時期の場合も，k の値は上層の方が大きく，中層と下層の間では差が小さかった。また，全ての底泥層において，嫌気に比べて好気条件の方で大きな k 値を示た。

牛縊前貯水池の流下方向における分解速度を比較すると，図-2.32c のように，いずれの底泥層の場合にも，上流・中流・下流の間における k 値の差が小さく，E2 に対する分解速度は類似している。また，図-2.32 において，砂質が多く，VSS の含有量が少ない手賀沼の上流と中流の 2 地点(T4 と T7)において，分解速度が著しく小さかった。

２）温度および微生物不活化の影響

ａ）実験用底泥の調整

三春ダム牛縊前貯水池の水質・底泥調査地点 A を対象に，コア採泥器にて採取した底泥について E2 を添加した回分実験を行った。なお，底泥微生物への影響を調べるため，底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。

回分分解実験では，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。

なお，底泥微生物による硝化脱窒反応を促進させるため，NH_4-N や NO_3-N を添加した。

b）実験結果

①微生物不活化の影響

図-2.33 に示すように，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 Run 4 では，E2 の減少速度は田のケースに比べて極端に小さくなった。このことから，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。

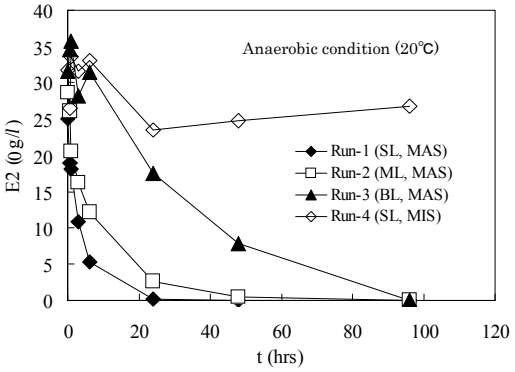


図-2.33　嫌気及び20℃におけるE2の経時変化

②温度の影響

図-2.34 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。

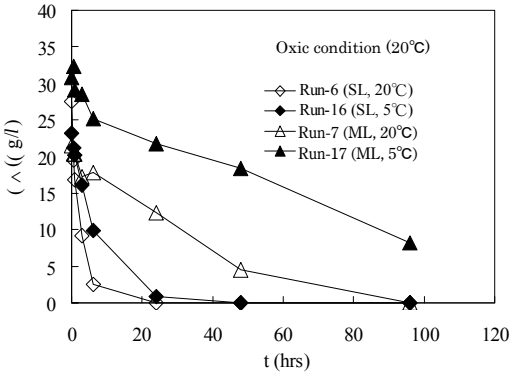


図-2.34　E2 の挙動に及ぼす温度の影響（好気）

③ 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の分解速度係数の値は、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た(**図-2.35**)。また，上層の底泥を用いた場合，分解速度係数は、好気の場合が嫌気の場合より 2 倍ほど大きい値であった。

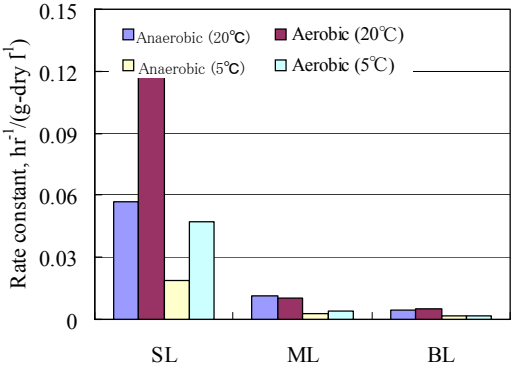


図-2.35　底泥各層の E2 分解速度係数

2.2.5 まとめ

1）河川水のエストロゲン様活性は、エストロンが主要寄与物質であるケースが多く、また、流域人口密度と相関があった。下水処理水のエストロゲン様活性が河川水のそれよりオーダーが高いため、河川水に占める下水処理水の割合によって、エストロゲン様活性が上昇するものと考えられる。

2）流域内の下水道整備状況が異なり、かつ、下水処理水が放流されていない河川における実態調査を行い，都市排水由来のエストロゲン等の流入状況を検討した。その結果、内分泌かく乱化学物質は、下水道未整備区域からの負荷が大きいことが明らかになった。

3）下水処理水が流入する河川において、内分泌かく乱化学物質の河道における変化や河床底泥への蓄積状況を検討した。その結果、河道内における分解あるいは変化の割合は小さいこと，底生生物への食物網を通じた蓄積は小さいことが明らかとなった。

4）湖沼における平面的な底質への蓄積状況を調査した結果，多くの内分泌かく乱化学物質の濃度は，流入河川河口地点で最も高濃度になっており，流下方向に低下していた。しかし，NP は，湖沼の流下方向に従って濃度が高くなっており、この理由として藻類などの有機物に NP が吸着しやすいことが理由として考えられた。

また、底泥の深さ方向における内分泌かく乱化学物質の蓄積状況と底泥年代測定の結果から，E1，ノニルフェノール類の底泥中鉛直分布は、流域の人口や下水道などの整備状況に大きく影響されていることが推察された。

5）実態調査結果及び観測データに基づいて，NP 類の挙動シミュレーションモデルを構築し，予測シミュレーションを行った。本モデルにより，湖水に

おける NP 類濃度の構成および分布の傾向が再現できた。

6）ダム湖底泥を用いた検討により、E2 の分解には底泥中に生息する微生物の作用が大きく、その分解速度は、好気・嫌気条件や水温、底泥位置の影響を受けることが明らかとなった。

2.3 内分泌かく乱化学物質の下水道における挙動

2.3.1 概説

下水中の内分泌かく乱作用が懸念される化学物質の実態については調査が実施されており、下水処理工程において、大部分が除去されていることが判明してきている。しかし、詳細な下水処理工程における挙動、運転条件と除去率の関係についての知見は限られているのが現状である。

このため、下水道に流入しているエストロゲンおよびノニルフェノール類について、挙動把握とその評価技術をまとめ、下水道における微量化学物質の対策に資する。

2.3.2 人畜由来エストロゲンの挙動

人畜由来のエストロゲン女性ホルモンのホルモン作用は、合成化学物質のエストロゲン様活性に比べ非常に強い[18]ことが知られていることから、エストロゲンの挙動について調査を行った。

（1）全国下水処理場の実態

1） 調査対象とした下水処理場

遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定は，1998 年～2002 年にかけて全国 60 処理場で調査を行った。

また 2002 年は春期に全国 23 処理場でエストロゲン及びエストロゲン様物質の化学分析等を併せて行った。調査対象とした下水処理場の処理方式と処理水量を図-2.36 に示す。

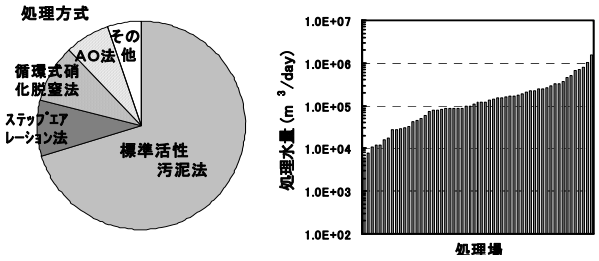


図-2.36 調査対象処理場の処理方式と処理水量

2） 流入下水及び2次処理水のエストロゲン様活性の濃度レベル

全国 60 処理場で遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定を行なった調査結果（図-2.12（前掲））によると、中央値を基準とした場合、流入下水に比べ２次処理水の方が約 76%程度低い値であり、下水処理によってエストロゲン様活性が低減されていた。また流入下水の濃度レベルとしては概ね 30～110ng/L の間にある試料が多く、この区間に全体の 72%が含まれていたが、２次処理水については非常に広い濃度分布をしており、処理方法や運転条件等の多くの要因によってその低減率は大きく変化していることが推測された。

次に、化学分析から得られた E1、E2、NP の濃度と比活性値から理論活性値を算出し、これらの物質が組み換え酵母法によって得られたエストロゲン様活性にどの程度寄与しているかを検討した。

なお、比活性値とは、エストロゲン類のうち最も活性が高い 17β-エストラジオール(E2)のエストロゲン様活性を基準とした場合に、基準値に対する各物質のエストロゲン様活性の比率である（前掲　表-2.6）。

各処理場におけるエストロゲン様活性（YES（yeast estrogen　screen））と E1、E2、NP の理論活性値を図-2.37 に示す。これらの３物質によって説明できない不明なエストロゲン様活性の割合は、処理場によって異なり、E1、E2、NP の理論活性値によってほとんどが説明できるケースも見られたが、多くのケースではこれらの３物質では説明が出来ないエストロゲン様活性が多くの試料中に含まれてい

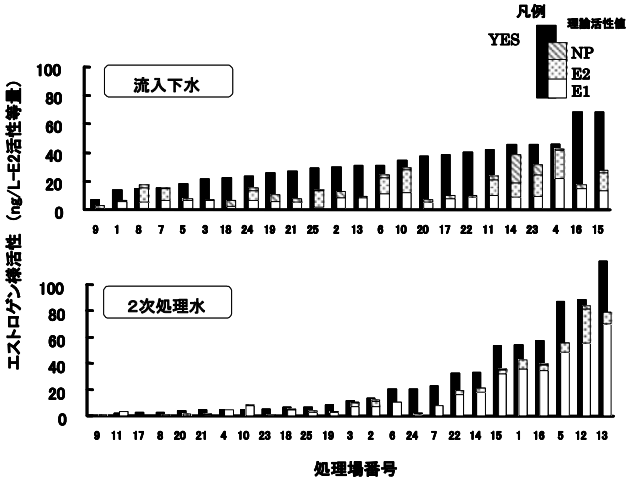


図-2-37 エストロゲン様活性への各物質の寄与

ることが明らかになった。またこれらの不明なエストロゲン様活性は流入下水で多く見られた。

また、各物質の寄与について着目すると流入下水ではE1、E2、NPが寄与しているのが確認されたが、2次処理水についてはE1の寄与が非常に高く、2次処理水中に見られるエストロゲン様活性の主要な寄与物質としてE1が重要であることが確認された。

（２）下水処理場におけるエストロゲン抱合体の実態

下水道におけるエストロゲンについての報告[19)～24)]は、遊離体のエストロゲンに関するものが多く、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結果は少ない。このため、下水処理場における抱合体の実態について調査を行った。

これら硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体の回収率は数%から50%程度と低く、更に検討が必要な方法ではあるが、流入水、二次処理水に適用し測定した結果を**図-2.38**に示す。下水処理による各エストロゲンの除去率は、遊離体が89～99%であるのに対し、抱合体ではE2-Gの58%～E1-Gの93%の範囲であった。グルクロン酸抱合体については活性汚泥により容易に分解し、E2となることが報告[25)]されている。また、本測定結果から、流入水、二次処理水中のエストロゲン抱合体の濃度は、遊離体の濃度に比べ数倍から100倍程度高いことが分かった。

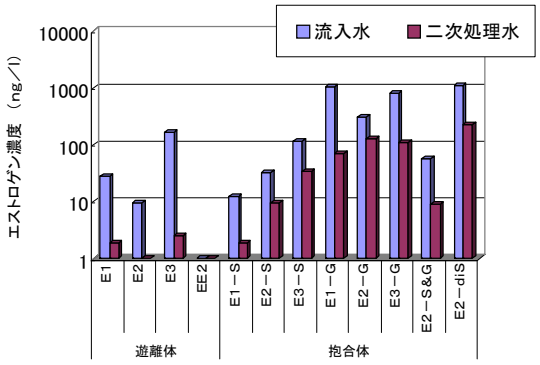


図-2.38　エストロゲン測定結果（回収率補正済み）

また、これまでに国内で報告[26)～28)]された流入下水中の硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体濃度E1-S(6.4ng/l)、E2-S(2.7-62.9ng/l)、E3-S(4.5ng/l)、E2-G(<0.8-12.7ng/l)と比較するとE1-S、E2-Sは同程度の値を示していたが、E3-S、E2-Gは30倍程度の値であった。

さらに引き続き、処理水量が12,000m³/dayから680,000m³/dayの20箇所の下水処理場（標準活性汚泥法:13処理場、嫌気-好気活性汚泥法:3処理場、その他：4処理場）において、各処理場の流入下水と二次処理水をスポット採取し、遊離体および抱合体エストロゲンについて、測定分析を実施した。

流入下水及び二次処理水の測定結果を**表-2.10**に示す。流入下水、二次処理水中のE1、E2、E3、EE2等、遊離の各エストロゲンについては、これまで報告されている値[19) 20) 26)～28)]と大きく異なることはなかった。しかし、流入下水中の硫酸又はグルクロン酸抱合体については、報告例[26) 27) 28) 29)]が少ない中で比較すると、これまでの報告値に比べ数倍大きな値となっていた。また、二次処理水中のエストロゲン抱合体の報告例[19) 29)]はほとんど無く、本調査によりその実態を明らかにすることができた。特に、E2-diSの存在については、本調査により初めて明らかにすることができた。

二次処理水に含まれる遊離のエストロゲンに対する抱合体の存在量の合計（中央値）は、E1では約7倍、E2では約300倍以上、E3では約90倍であった。

全処理場の中央値を用いて除去率を求めると E2、E3は、下水処理により大きく減少し、除去されているが、E1はやや低く50%の除去率である。一方、分析上の回収率の低いグルクロン酸抱合体とE2-diSは、下水処理により増加している結果となった。

表-2.10 下水処理場におけるエストロゲンの実態調査結果

	流入下水(ng/l)			二次処理水(ng/l)		
	最小値	中央値	最大値	最小値	中央値	最大値
E1	10	24	57	＜0.5	12	180
E2	＜0.5	5.7	21	＜0.5	＜0.5	11
E3	27	110	220	＜0.5	1.5	5.8
EE2	＜0.5	＜0.5	＜0.5	＜0.5	＜0.5	0.5
E1-S	12	41	170	7.5	13	34
E2-S	26	110	410	27	52	94
E3-S	6.5	22	79	37	69	160
E1-G	0.7	11	88	34	74	140
E2-G	5.3	18	100	47	91	210
E3-G	4.1	22	73	37	72	150
E2-S&G	0.8	5.4	38	3.7	8.9	17
E2-diS	9.0	78	670	160	360	1500

（３）下水処理場におけるEE2の実態

内分泌かく乱化学物質に関する物質のうち、人畜由来のエストロゲンついては、国内外における多くの調査により下水処理場における遊離体又は抱合体エストロゲンの存在実態が解明されつつある。しかし、経口避妊薬ピルの主成分である合成エストロゲンのエチニルエストラジオール（EE2）についてみると、海外ではいくつかの処理場の流入水、処理水から検出されているが、国内においてはどの調査においても検出下限値以下（nd）との報告であり、そ

の存在濃度レベルは未だ不明である。[19) 21) 22) 23) 30) 31) 32)]

ピルの使用が普及している欧米諸国での検出濃度は、流入水では 0.5ng/l 以下から 10ng/l、処理水では nd から 42ng/l である。従来日本ではピルの使用は認められていなかったが、1999 年に医師の処方が必要な医療用医薬品として承認された。土木研究所では 1999 年にピルの使用が一般に普及する前の状況把握調査を 4 ヶ所の処理場で実施[33)]し、既に公表した。

本調査は、ピルの普及から数年が経過した下水処理場における EE2 の実態把握を目的としたものであり、2005 年 1 月、2 月に各処理場においてスポット採水を行った。EE2 の測定方法は、土木研究所がこれまで開発・検討してきた GC/MS による高感度分析手法[32)]（HR-GC/MS）とし、従来より一桁低い濃度レベル（検出下限値：0.05ng/L）での測定を行った。調査対象とした処理場は、日平均処理水量約 3,000～620,000m³/day の 10 ヶ所の処理場である。また、全 10 ヶ所の処理場について LC/MS/MS による測定[34)]（検出下限値：0.13ng/L）を行うとともに 5 ヶ所の処理場については ELISA による測定[33)]も行った。ELISA による測定を行った 5 ヶ所の処理場の内、A、B、C、D の 4 ヶ所の処理場は 1999 年に土木研究所が EE2 の調査を行った処理場と同じ処理場である。

10 処理場における EE2 の測定結果を**表-2.11** に示す。HR-GC/MS による方法では、流入水ですべて nd（検出下限値以下）、処理水で nd から 0.28ng/l であった。従来から用いられている LC/MS/MS による方法では流入水、処理水とも全て nd であり、検出感度が存在濃度に対して十分でない結果となった。また、ELISA による方法では流入水で 6.3～25ng/l、処理水で nd～11ng/l の濃度が検出された。

HR-GC/MS による測定では、流入水が検出下限値以下であったが、これは流入水では夾雑成分が多いため、ベースラインのノイズが大きかったことによると考えられる。一方、ELISA による測定値が高い値を示したが、これは目的成分（EE2）以外の類似化学物質の影響を受けたためと考えられる。
以上のことから、流入水についての実態は不明であるものの、処理水中には 0.05ng/L 程度の濃度で EE2 が存在していることが明らかとなった。

（4）下水処理工程での運転条件と除去率の関係

1）下水処理場におけるエストロゲンの挙動

表-2.11　EE2 測定結果（ng/l）

処理場	HR-GC/MS		LC/MS/MS		ELISA	
	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水
A	nd	0.06	nd	nd	11	nd
B	nd	0.07	nd	nd	25	11
C	nd	0.07	nd	nd	9.8	nd
D	nd	0.05	nd	nd	22	3.4
E	nd	nd	nd	nd	6.3	3.5
F	nd	nd	nd	nd	ー	ー
G	nd	nd	nd	nd	ー	ー
H	nd	0.12	nd	nd	ー	ー
I	nd	0.07	nd	nd	ー	ー
J	nd	0.28	nd	nd	ー	ー

注：nd は not detectable（検出下限値以下）、ーは未測定

a)　**調査方法**

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

各調査日において、2 時間毎 24 時間、処理過程毎に試料を採取し、流量比例 24 時間コンポジット試料を作成した。採取試料は、最初沈殿池へ流入する流入下水（スクリーン通過済み）、最初沈殿池流出水、汚泥脱水排水である返流水、最初沈殿池汚泥、エアレーションタンク前段の表層水、同後段の表層水、最終沈殿池流出水、返送汚泥、塩素消毒後の放流水である。

b）**調査結果**

E2 は両調査において高い除去率が確認された（冬期：70%、夏期：87%）のに対し、E1 については、物質フローの大きさを矢印等の幅で表した**図-2.39** に示すように、冬期は処理工程が進むにつれ負荷量が増加し、また、夏期においては処理工程で減少したものの、返送汚泥による負荷が大きく、処理水中の負荷量は流入水と同程度であった。

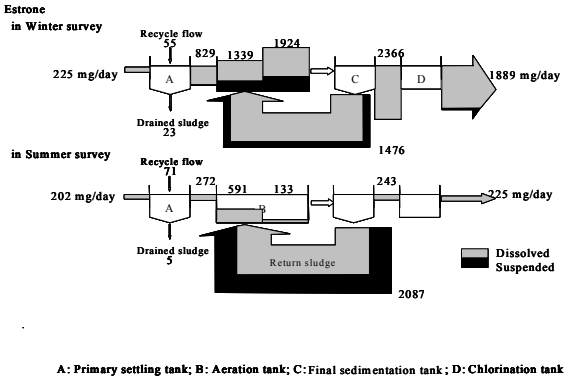


図-2.39 エストロン(E1)の下水処理過程における挙動

エストロゲン様活性についても、E1 と同様に表した図-2.40 に示すように、冬期の調査においては処理工程が進むにつれ活性値が増加したが、夏期は処理により減少していた。機器分析により定量した E1、E2、ノニルフェノール濃度より、下水処理過程の各水試料中で検出されたエストロゲン様活性値の大部分は E1 の寄与によることが確認された。

夏期は、ある程度硝化が進行するSRT、DO濃度で運転が行われていたが、冬期には、硝化抑制のため、曝気量を制限する運転が行われていた。このような運転条件がエストロゲンの処理に影響したものと考えられる。

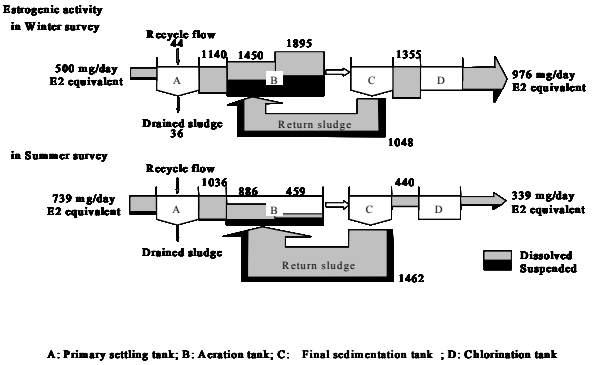


図-2.40 エストロゲン様活性の下水処理過程における挙動

2）高DO，長SRT条件下でのエストロゲンの除去特性

下水処理場の好気工程における除去に関して、最も有利と考えられる処理条件（高い DO 濃度、長い固形物滞留時間）を設定して、エストロゲンの除去特性を求めるため、精密ろ過（MF（Micro Filtration））膜を用いた連続実験を行った。

a）連続実験装置

連続実験装置の概略を図-2.41 に示す。連続実験の汚泥は、標準活性汚泥法を採用している実下水処理施設の好気槽より種汚泥を採取して、以下の実験条件で 3 か月間馴致した。なお、連続実験は冬期に行ったため、水温は 10℃程度にまで低下した。

各槽における溶存酸素濃度は、実験期間を通じて 5mg/L 以上を維持した。固液分離には、交差流型中空糸膜モジュール（三菱レイヨン製超精密濾過フィルター STNM424、保持粒径 0.1μm）を用い、分離液は、一日あたりの流入水（一次処理水）投入量に相当する流量で連続的に排出し、反応槽における水理学的滞留時間（HRT）は 8 時間に設定した。余剰汚泥の排出は、1 日あたり 120mL の反応槽混合溶

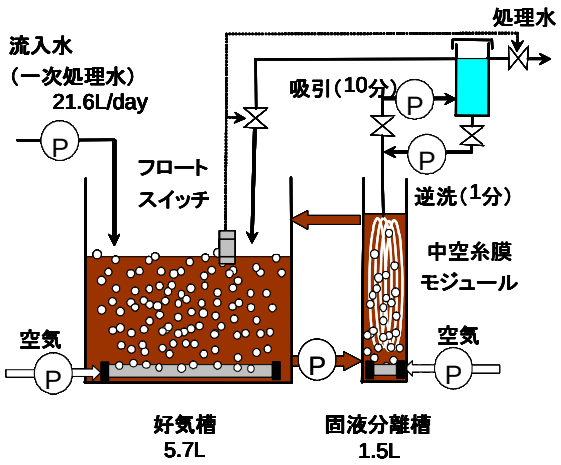


図-2.41 連続実験装置の概要

液を採取することで行い、固形物滞留時間（SRT）は 60 日に設定した。なお、連続運転期間中 pH や水温の調整は行わなかった。

b）結果と考察

反応槽の平均的な汚泥濃度は、MLSS/VSS=2900/2500mg/L 程度であり、処理水中の溶解性窒素の形態は 80%以上を硝酸性窒素が占め、概ね硝化が進行していた。図-2.42 にエストロゲンの測定結果を示す。　遊離体エストロゲンはほぼ完全に除去がなされる一方、エストロゲン硫酸抱合体のうち、E2-S、E1-S、E3-S に関しては一部の除去がなされるが、E2-diS に関してはほとんど変化を受けていないと考えられた。よって、これらのエストロゲン硫酸抱合体は、遊離体エストロゲンと比較して、最も生物分解に有利な条件であっても、好気工程における分解性が小さいと考えられる。

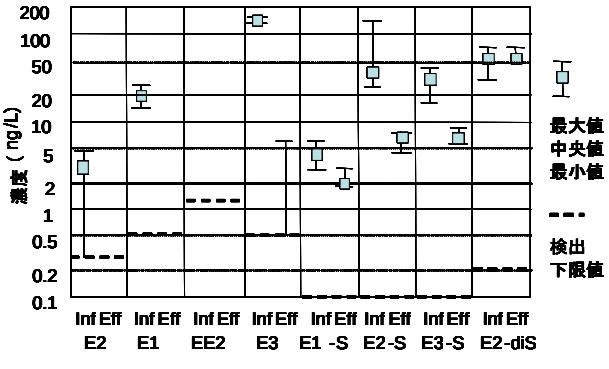


図-2.42 流入水および処理水中のエストロゲン濃度

3）DO 濃度の条件とエストロゲンの除去特性の関係

下水処理水中の遊離体エストロゲンを安定的に削

減できる運転条件を発見するための処理工程における DO 濃度とエストロゲン関連物質の除去特性との関係について検討した。

a) エアレーションタンク流下過程を再現した回分実験

① 調査内容

下水処理場の生物処理工程（エアレーションタンク）におけるエストロゲン関連物質の変化を考察するために、押し出し流れ型のエアレーションタンクにおける流下過程を再現する好気回分実験（実験時間：8h）を、最初沈殿池流出水と返送汚泥を用いて実施した。最初沈殿池流出水および返送汚泥は、茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場の流入下水を用いた標準活性汚泥法パイロットプラント（エアレーションタンク規模 10m^3）より入手した。なお、パイロットプラントの運転条件は、SRT=約 10 日、HRT=8 時間であり、硝化が十分に進行していた。

実験装置は 3 系列準備し、1 系列は攪拌のみを実施する嫌気系、他の 2 系列では好気系（溶存酸素濃度の最終値がそれぞれ 0.5mg/L 以下、3.0mg/L 程度になるように曝気風量を制御）とした。

各系列において、2 時間間隔で活性汚泥混合液を採取し、20 分間程度静置後、上澄水を GF/B ろ紙によりろ過して水質分析用の試料とした。

② 結果と考察

図-2.43 に反応槽溶液の水質の経時変化を示す。

嫌気系において、E2 は実験期間中に検出下限値（2.2ng/L）以下にまで低下したが、E1、E3 に関しては減少せず、むしろ増加する傾向であった。エストロゲン硫酸抱合体については、いずれも大きな変化は見られなかった。

好気系で DO を 0.5mg/l 以下に抑えた系では、DO 濃度が低かったものの、硝化は進行した。遊離体エストロゲンは、E2、E3 が疑似嫌気条件下においても減少し、2 時間後には検出下限値以下になった。一方 E1 は、実験期間中を通じて大きな変化は見られなかった。エストロゲン硫酸抱合体は、E1-S、E2-S、E3-S は実験初期段階で減少したが E2-diS はほぼ変化しない傾向であった。

好気系で DO を最終的に約 3mg/l に調節した系では、やや早く硝化が進行した。遊離体エストロゲンについては、E2 は疑似嫌気条件下においても減少し、2 時間後には検出下限値以下になった。一方 E1 濃度は、実験開始後 6 時間後までは大きな変化が見られなかったが、MLDO が上昇した時点で急激な低下が観測された。エストロゲン硫酸抱合体は、DO を 0.5mg/l 以下に抑えた系と同様の傾向を示した。

以上より、E1 の減少速度は、硝化の進行の有無にかかわらず、溶存酸素濃度に大きく依存すると推定された。

b) エアレーションタンク後段を無酸素条件に設定した連続実験

エアレーションタンク内での E1 の減少には、エアレーションタンク末端部分の MLDO が影響していることが明らかとなった。現在、実用化されている下水処理方式の中には、エアレーションタンク末端部を無酸素条件とする運転方法（硝化内生脱窒法）があり、本運転方法では、エストロゲンの除去率が低いことが危惧される。そこで、ここでは、硝化内生脱窒法を想定した連続実験を行い、エストロゲンの挙動について検討した。

①実験方法

連続実験は、茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場内の実験施設室内に設置した活性汚泥法実験プラント（有効水深 2m、最初沈殿池容量 0.5m^3、反応槽容量 2m^3、最終沈殿池容量 0.5m^3、HRT＝8 時間、SRT＝約 10 日、返送比＝0.4）を用いて実施した。なお、連続実験は、夏季の 3 週間に行い、期間中の水温は 25～27℃程度であった。実験では、4 つに区切った反応槽の末部の送風を、最低限撹拌が行える程度に

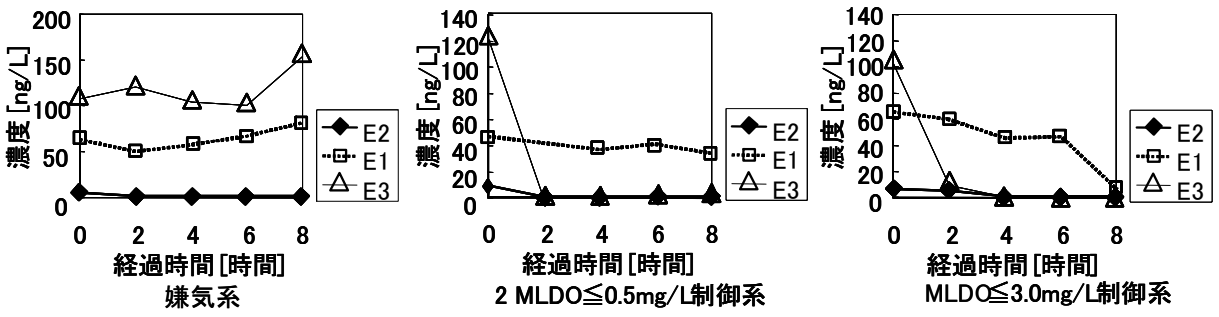


図-2.43　遊離体エストロゲン(E1, E2, E3)の時間変化

絞り、擬似的な無酸素状態とした。

②実験結果と考察

二次処理水中の溶解性窒素の形態は 98%以上を硝酸性窒素が占め、概ね硝化が進行していた。また、反応槽④の無酸素条件下では、わずかに内生脱窒が観察された。

E1 は、**図-2.44** に示すように、好気条件下では流下方向に沿って減少したが、無酸素槽および最終沈殿池では増加する傾向が見られた。このことから、易分解性有機物が分解された後の無酸素条件下でも、E1 が増加する機構が存在すると考えられた。E1 は、抱合体エストロゲンの脱抱合、活性汚泥からの脱着・放出、分解代謝物の還元等により生じると考えられるが、今後 E1 が増加する機構の詳細について検討を行う必要がある。

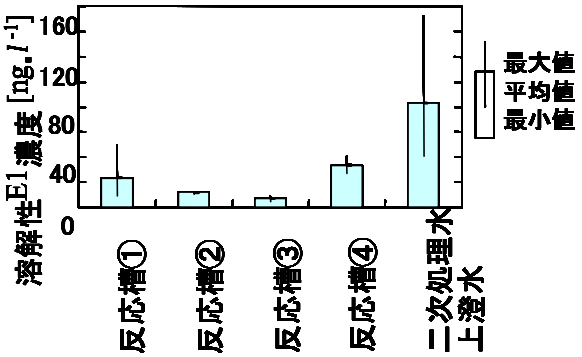


図-2.44　実験装置各部の溶解性エストロンの濃度

2.3.3　ノニルフェノール類の挙動

（１）下水処理場での溶存態の挙動把握

ノニルフェノール関連物質は、下水道での存在量が他の環境ホルモンに比べ多いことから、下水道におけるノニルフェノール関連物質の挙動について調査を行った。

計画処理水量 250,000m³/日のＡ下水処理場の標準活性汚泥法による運転を行っている系列で初沈流入水、初沈流出水、曝気槽内（9 ヶ所）、終沈流出水の各処理プロセスにおける下水試料を採取してろ過を行い、ノニルフェノール関連物質であるノニルフェノール（NP）、ノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）、ノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）の溶存態濃度を測定し、下水処理場での挙動把握を行った。

NP、NPnEO、NPnECは、曝気槽で濃度が大きく変動した。具体的には、NP、NPnEOは初沈流入水、初沈流出水に比べて1/10～1/100程度に濃度が減少し、NPnECは2倍以上に濃度が増加した。

図-2.45に示すように，NPnEOは、初沈流入および初沈流出時にはNP1EO～12EOがほぼ均等に存在していたが、曝気槽以降でEO付加モル数5以上のNPnEOが消失し、最終的にNP1EO～4EOで構成された。

一方、NPnECは、初沈流入、初沈流出時には2～3ECはやや多いものの、NP1EC、NP4EC～10ECはほぼ均等に存在していた。曝気槽以降ではEO付加モル数5以上のNPnECが減少、EO付加モル数4以下が増加し、最終的にNP1EC～4ECが全体の約96%を占めた。

これらの結果から、NPnEOは曝気槽内で急激な分解を受けており、NPnEOのままEO鎖が短鎖化を受ける場合と、NPnECに形態を変えてEO鎖が短鎖化を受ける場合があると考えられる。また、NPnECのEO付

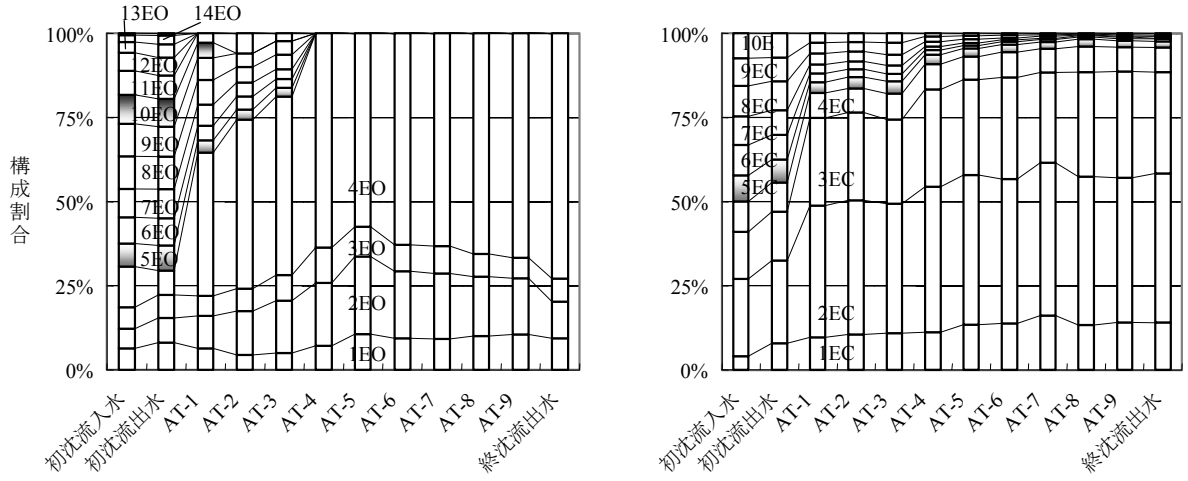


図-2.45　下水処理過程での NPEO、NPEC の EO 連鎖分布

加モル数5以上では顕著な濃度増加が認められなかったことから、NPnEOからNPnECへの形態変化は、EO付加モル数5以下で進行している可能性がある。

（２）実験装置による挙動把握

下水処理の活性汚泥処理の好気工程での NPnEO の変化とそれに伴う NPnEC, NP の生成について、活性汚泥吸着態を含めた検討を行った。

活性汚泥処理実験装置を室温25℃の実験室内に設置し、水理学的滞留時間（HRT）24 時間、エアレーションタンクの溶存酸素濃度 1.0mg/L 以下、固形物滞留時間（SRT）7 日～14 日程度、唯一の有機基質を NPnEO（average n=10）として活性汚泥を馴致した。各水質項目の指標が安定した後、水質測定を実施した。

流入水、エアレーションタンク混合液、処理水中の NP、NPnEO、NPnEC 濃度の測定結果を図-2.46 に示す。流入水中には基質として供給した NPnEO のみが存在した。一方、エアレーションタンク混合液および処理水中には、鎖長の短い NPnEO（n≦４）、NPnEC（n≦４）および NP が存在していた。流入水中の NPnEO は、エアレーションタンクにおいて、活性汚泥により生分解を受け、鎖長の短い NPnEO および NPnEC、さらに、一部は NP にまで変化したと考えられる。

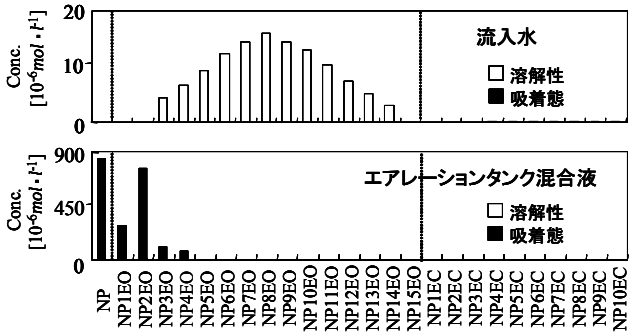


図-2.46　流水下水、エアレーションタンク混合液における NP、NPnEOs および NPnECs の濃度

この現象について詳細に調べるため、馴致活性汚泥を用いて、鎖長が短い NPnEO の好気回分分解試験を実施した。馴致活性汚泥は既に吸着態 NPnEO を蓄積していたので、新たに NPnEO の添加は行わず、初期の MLVSS を 38mgVSS/L とした活性汚泥で、クーロメータを用いて好気回分実験を実施した。溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度を維持した。

水と活性汚泥に含まれる NPnEO、NPnEC、NP の時間変化を図-2.47～2.48 に示す。実験期間中には、NP2EO の分解に伴って、NP2EC の生成が見られたが、NP1EO や NP の生成は見られなかった。

エアレーションタンクにおいて実際に起こったと考えられる鎖長の短い NPnEO や NPnEC からの NP 生成が再現できなかったが、その原因のひとつとして、NP 生成の反応の進行は溶存酸素濃度によって大きく阻害をうけることが考えられる。エアレーションタンクの溶存酸素濃度は 1.0mg/L 以下であったのに対して、好気回分試験の溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度であったため、後者では、溶存酸素により反応の進行が妨げられた可能性がある。

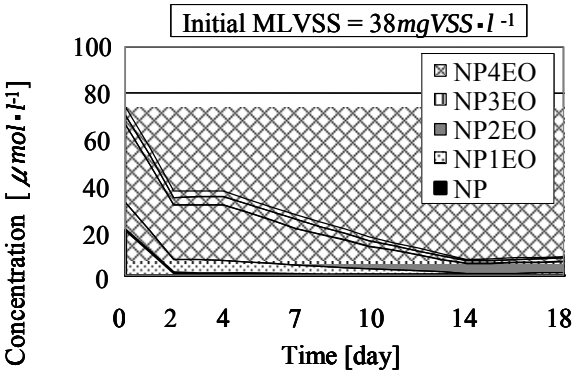


図-2.47　NP（溶解性+吸着態）および NPnEOs（n=1～15）（溶解性+吸着態）の濃度

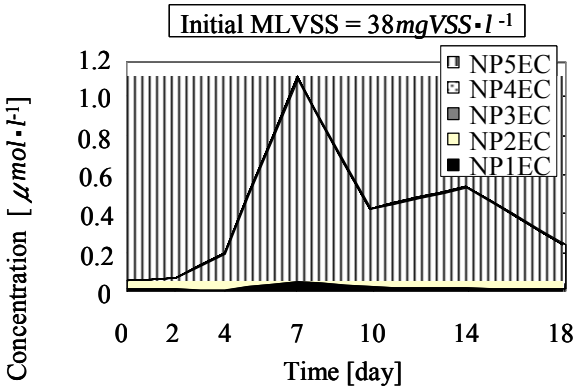


図-2.48　NPnECs（n=1～10）（溶解性+吸着態）の濃度

2.3.4　まとめ

１）全国下水処理場実態調査から、下水処理水中のエストロゲン様活性の主要寄与物質は、エストロンであることが明らかとなった。

２）合成エストロゲンのエチニルエストラジオール（EE2）が、下水処理水中から 0.1ng/L 程度の微量で検出された。

３）流入下水、下水二次処理水中のエストロゲン抱合体の濃度は、遊離体エストロゲンの濃度に比べ数倍から 100 倍程度高いことが分かった。

膜分離活性汚泥法を用いた好気的生分解に有利な

処理条件において、遊離体エストロゲンの除去は完全に行われたが、抱合体は二次処理水に残留したことから、エストロゲン硫酸抱合体は難分解性が強いことが明らかになった。

4）活性汚泥の好気回分実験により、E1 の減少速度は、硝化の進行の有無にかかわらず、溶存酸素濃度に大きく依存することが明らかとなった。

また、実下水処理場において、硝化抑制のため曝気量を制限した場合に、処理過程で E1 濃度が大きく増加したこと、および、連続実験のエアレーションタンクの後段部分を無酸素条件に設定した連続実験において、無酸素条件下および最終沈殿池で溶解性 E1 濃度の増加が観察されたことから、溶解性エストロゲンの挙動は、エアレーションタンク末端での溶存酸素濃度の設定に大きく依存することが明らかとなった。

5）ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）は、活性汚泥処理により短鎖化の反応が進み、NPnEO, からノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）への形態変化は、においてもEO付加モル数5以下で進行すると考えられた。

6）NPnEOの好気的連続処理における形態変化を、活性汚泥吸着態も含めて評価したところ、鎖長n=1～4のNPnEOおよびNPの活性汚泥への蓄積が観察された。

2.4　内分泌かく乱化学物質が魚類に及ぼす影響

2.4.1　概説

（1）イギリスでの先行研究

イギリスでは、1960年代から淡水魚において生殖器官に異常をもつ個体が発見されており、世界的にも先駆的な研究が行われてきた。精巣内に卵を生成している雌雄同体魚の発見に端を発し、河川における雄魚の雌性化という現象について1980年代後半から研究が進められてきた。フィールド調査と被疑物質による曝露試験によって得られた研究成果から、雄魚の雌性化を引き起こす要因は、主として下水処理場から放流される人畜由来の天然エストロゲンである17β-エストラジオール（E2）とエストロン（E1）、そして医薬品（ピル）として使用されている合成エストロゲンの17α-エチニルエストラジオール（EE2）[35]であることが明らかにされた。また、非イオン界面活性剤の分解産物の一つであるノニルフェノール（NP）[36]が羊毛洗浄工場から多量に排出された河川では、このようなエストロゲン様物質により同様の魚類影響が引き起こされたことも明らかにされた。

（2）日本における既往調査

日本の河川においても雄魚の雌性化が引き起こされているのかを調べるため、国土交通省は、1998年から、全国の一級河川を対象としたEDCsの水質、底質の汚染レベル、下水処理場における処理レベルについて調査を行った。その結果、下水処理場で高率にEDCsが除去されているが、完全に除去されなかった物質が水環境へ排出されていることが明らかとなった。また、同省により1998年から2001年にかけて実施された全国一級河川における魚類実態調査の結果、29河川69地点で雄コイのエストロゲン様物質による暴露の兆候、つまり血中ビテロゲニン（VTG）濃度の上昇が確認された。VTGは、通常雌個体の体内でエストロゲンの作用によって肝臓で生成される雌特異的な卵黄タンパク前駆物質である。このことから、魚類のエストロゲン暴露の指標として用いられている。雄個体の血中VTG濃度の上昇は、雌性化の極めて初期の生体反応であるが、上記の調査により、日本国内においても野生のコイがエストロゲンもしくはエストロゲン様物質の曝露を受けている事が明らかとなった。

（3）研究の目的

イギリスに比べわが国の下水道普及率は低いものの、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る。

このため、まず都市河川水や下水処理水のエストロゲン様活性の主要部分を占めるエストロゲンについて、魚類の雌性化影響を検討するとともに、下水処理水やその放流先の都市河川において魚類を飼育し、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ことを目的として研究を行った。

2.4.2 エストロゲンのメダカ雌性化への影響

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ためには、純物質としての魚類雌性化影響を調べる必要がある。

日本における魚類の代表性や試験の容易さ、化学物質評価への適用実績から、試験魚として雄メダカを選定し、E2 および E1 を被験物質として、実験室内での曝露試験を行い、肝臓中のビテロゲニン

濃度から両物質の最小作用濃度、最大無作用濃度等について検討した。

（１）材料および方法

１）被験物質および曝露濃度

被験物質は 17β-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）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±57mg（平均±標準偏差）であった。

３）曝露方式および装置

曝露には、流水式曝露装置を用い、試験水槽は硬質ガラス製水槽（有効量 10L）とした。

混合槽に被験物質原液と希釈水を供給して混合し、設定濃度となった試験液を各試験水槽に連続的に供給した。

４）試験条件

曝露試験は下記の条件で実施した。

曝 露 期 間：最長 14 日間
換　　水　　率：約 10 換水／日
試 験 水 温：24±1℃
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

５）測定の分析

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、肝臓中のビテロゲニン濃度を測定した。

市販のメダカ・ビテロゲニン測定用の 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。

（２）結果

１）E2 での曝露期間中のビテロゲニン濃度

E2 での曝露期間における肝臓中のビテロゲニン濃度（VTG）を**図-2.49** に示す。また各濃度区におけるビテロゲニン濃度の経時変化を**図-2.50** 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

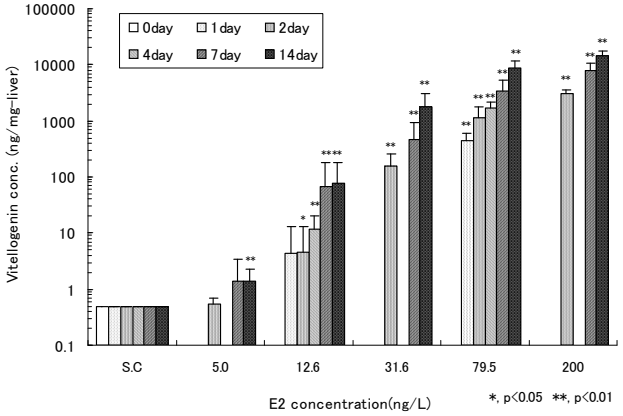


図-2.49　E2 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度

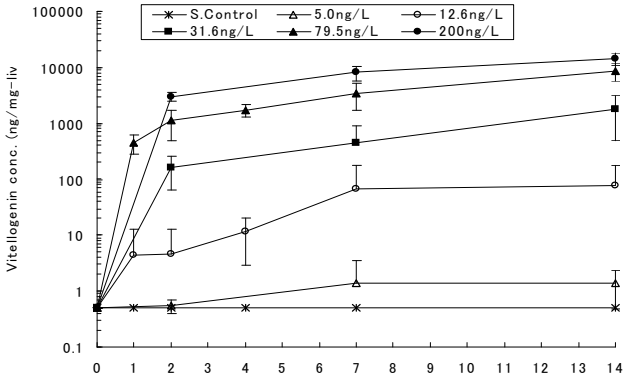


図-2.50　E2 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度の経時変化

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 の 14 日曝露において、E2 濃度が 12.6ng/L 以上であると、雄メダカに顕著にビテロゲニンが生成されていた。

２）曝露後の清水飼育期間中のビテロゲニン濃度

E2 31.6ng/L および 200ng/L での 14 日間曝露後に、希釈水で飼育した場合の肝臓中のビテロゲニン

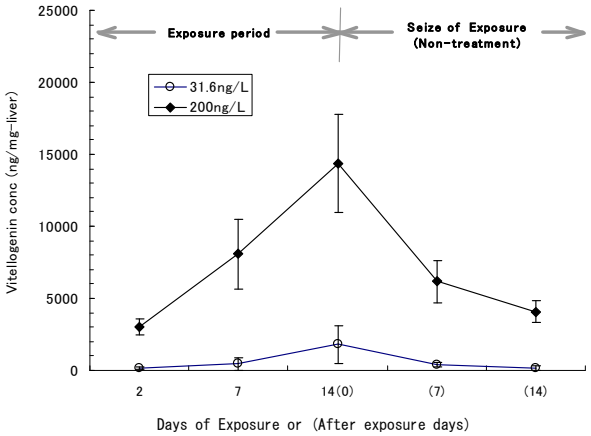


図-2.51　E2 での曝露期間およびその後の希釈水での飼育期間のビテロゲニン濃度の経時変化

濃度（VTG）の経時変化を**図-2.51** に示す。

前述のように E2 での曝露により 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、E2 曝露 2 日後と同程度まで低下した。ただし、清水飼育 14 日後の VTG は、E2 での曝露 2 日後と同程度であり、曝露開始時よりも高いレベルにあった。

3）E1 での曝露期間中のビテロゲニン濃度

E1 での各曝露濃度における肝臓中のビテロゲニン濃度（VTG）を**図-2.52** に示す。また各濃度区におけるビテロゲニン濃度の経時変化を**図-2.53** に示す。

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 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。

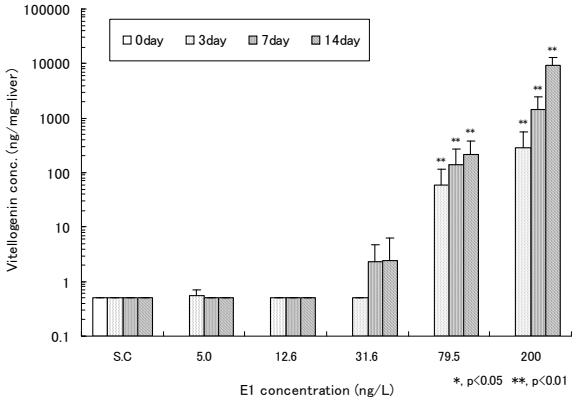


図2.4-4 E1曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度

図-2.52 E1 曝露による肝臓中ﾋﾃﾞﾛｹﾞﾆﾝ濃度

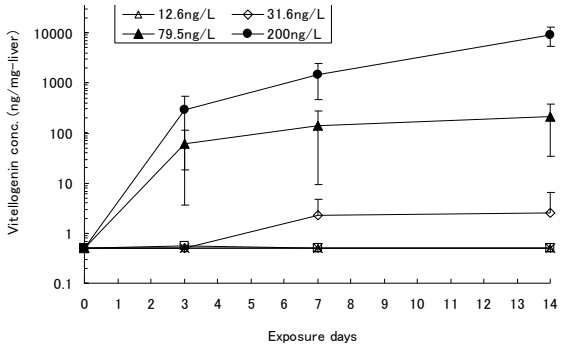


図-2.53 E1 曝露による肝臓中ﾋﾄﾞﾛｹﾞﾆﾝ濃度の経時変化

E1 濃度が 31.6ng/L 以上あると、雄メダカにビテロゲニンが生成される傾向にあった。

4）E2濃度と肝臓中VTGの関係

試験水の E2 濃度と肝臓中 VTG 濃度の関係を定量的に比較した。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-2.54** 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。

$$\mathrm{Log}(y) = a \cdot \mathrm{Log}(x) + b \quad \cdots\cdots (式\ 2.4\text{-}1)$$

すなわち、

$$y = B \cdot x^{a} \quad (ただし、B = 10^{b}) \quad \cdots\cdots (式\ 2.4\text{-}2)$$

得られた近似式（$y = 0.000827\,x^{3.26}$）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-2.54** からわかるように、12.6ng/L の E2 では個体の VTG のバラツキが大きい。

E2 のヒメダカに対する影響濃度に関する既往知見

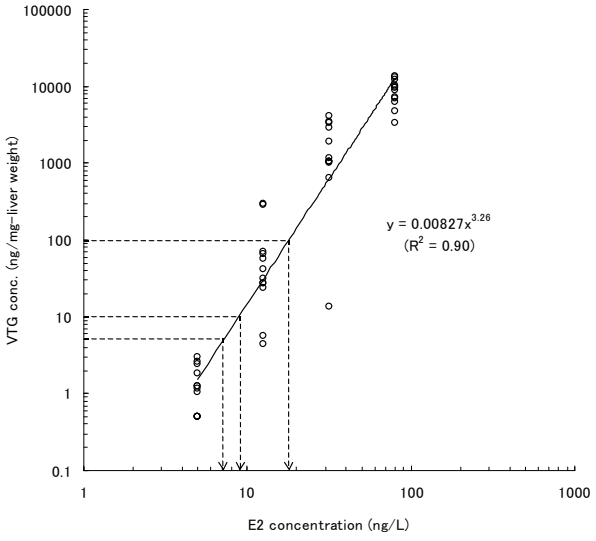


図-2.54　曝露 14 日後の肝臓中 VTG と E2 濃度の関係

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）であるとの報告[37]がある。このような E2 27.9ng/L においては、ビテロゲニンは高い確率で生成され、その濃度も数百 ng/mg になると推定される。

５）E1 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。同様に 17β-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。これらの近似式により、10、50 および 100ng/mg の VTG を誘導する E1 および E2 濃度（**表-2.12**）をそれぞれ算出した。

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-2.13** 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 17β-エストラジオールの 0.18～0.26 倍の強さと推定された。

表-2.12　VTG を誘導する E1 及び E2 濃度

ビテロジェニン濃度	VTG を誘導する E1 濃度（ng/L）		
(ng/mg-liver)	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
ビテロジェニン濃度	VTG を誘導する E2 濃度（ng/L）		
(ng/mg-liver)	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-2.13　E1 の E2 に対する総体的なエストロゲン作用強度

ビテロジェニン濃度	E1 の作用強度（E1 濃度/E2 濃度）		
(ng/mg-liver)	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

2.4.3　河川水がメダカ雌性化に及ぼす影響

エストロゲン様物質による魚類の雌性化について、その影響要因を特定するには、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雌性化を発生させた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を明らかにすることが必要である。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。

このため、水質自動監視所を活用して新鮮な河川水を用いる魚類試験装置を考案して、予備的に現地魚類試験を実施した。この試験結果から得られた魚類試験装置に関する課題は、下記の通りであった。

(1)監視所によって取水状況（ポンプ稼動時間帯、取水量）が異なっていた。また、水位低下などによってポンプが停止し、取水が行われない場合があった。このため、どのような取水状況にも対応できる魚類試験装置を設計する必要があると考えられた。

(2)河川水とともに流入する砂泥が予想以上に多く、これが目詰まりの原因となった。砂泥の除去方法に工夫を要すると考えられた。

(3)河川水中の藻類量の変動により、メダカを順調に飼育することが不可能であった。今後の試験では、試験条件として餌を明確に定め、その種類や給餌量を規定する必要があると考えられた。

(4)この試験では水温や餌を規定せず河川の状況を反映させる試験とした。今後はこれらの条件を含めすべての曝露条件を統一し、水質自動監視所間で試験結果の比較検討が可能となるように試験法を確立すべきと考えられた。

そこで本研究では、これらの課題をもとに考案した新たな魚類曝露試験装置を作製し、これを河川水質自動監視所に設置して曝露試験を実施することとした。

（１）方法

１）試験実施場所

試験実施河川として代表的な都市河川である多摩川を選定し、下水処理水の流入しない拝島橋監視所、複数の下水処理場の下流に位置する日野橋監視所、およびさらに下流に位置し8箇所の下水処理場の処理水を受ける石原監視所を試験実施地点とした（**図-2.55.**）。

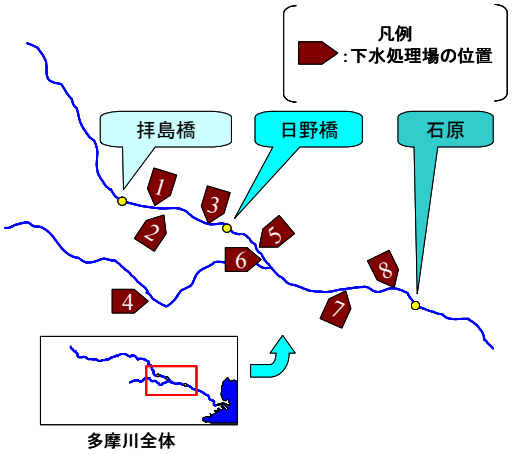


図-2.55　試験実施場所と下水処理場の位置

２）試験対象魚と生物指標

試験対象魚としてヒメダカ（*Oryzias latipes*）を選定した。環境省はヒメダカを用いた室内試験の結果から、NPおよびOPが内分泌かく乱作用（エストロゲン作用）を有していることを報告した。そこで、環境省の試験を実施した研究機関からメダカの供給を受け、現地試験に用いた。

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VTGを用いることとし、測定はメダカVTG－ELISAキット（国土環境株式会社）によった。

３）河川水のエストロゲン様物質濃度の測定

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）、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測定した。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、組換え酵母法[26]によるエストロゲン様活性を測定した。

４）試験装置

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。

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（30L）へと導水するものである。

５）試験条件

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が、餌を市販の粉末餌とし、自動給餌器を用いて与える点について変更した。試験条件を**表-2.14**に示す。

６）試験期間およびメダカ個体数

2003年～2005年にかけて、合計6回の試験（Test1～Test6）を行った。それぞれのTestでは2～8週間の曝露期間とし、メダカの個体数は10程度～20とした。

（２）結果および考察

１）雄メダカの河川水曝露によるVTG生成

Test3 の石原監視所において、河川水のエストロゲン作用は、河川水に占める下水処理水の割合を反映する電気伝導度の推移に似ていた。**図-2.56** に石原監視所での水位（WL）、電気伝導度（EC）、エストロゲン様活性（EA）を示す。降雨によって河川流量が上昇すると、河川に占める処理水割合が低下して電気伝導度が低下し、エストロゲン様活性も低下していた。電気伝導度はエストロゲン様活性やエストロンのよい指標になると考えられた。

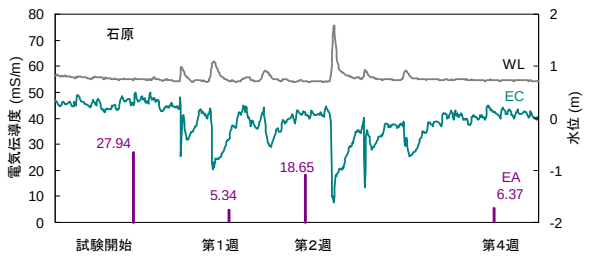


図-2.56　石原監視所における河川の水位（WL）、電気伝達度（EC）、ｴｽﾄﾛｹﾞﾝ様活性（EA）

曝露開始後 2 週間および 4 週間のすべての雄メダカに肝臓ビテロジェニンが観察された（**図-2.57**）。水質分析の結果、メダカ曝露水槽でのエストロンおよびエストロゲン様活性はそれぞれ 6.7～33.1ng/L、および 5.3～27.9ng/L-E2 であり、エストロンが雄メダカの肝臓ビテロジェニンを生成させた要因と考えられた。

２）雄メダカの VTG 生成に関わるエストロゲン類濃度

試験開始時のエストロゲン様活性は 20ng/L-E2 を越えており、その後降雨による変動はあるものの高

表-2.14　メダカ現地曝露試験　試験条件一覧

試験魚	ヒメダカ　*Oryzias latipes*
試験期間	2週間
試験水	流水式
流量	0.5L/min(30L/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

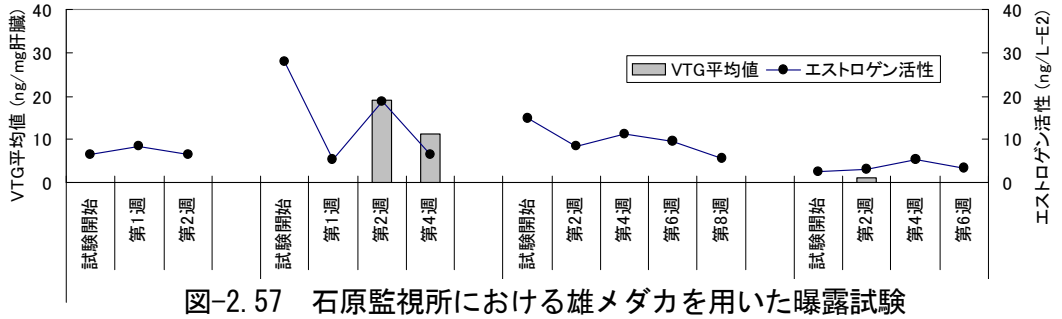


図-2.57　石原監視所における雄メダカを用いた曝露試験

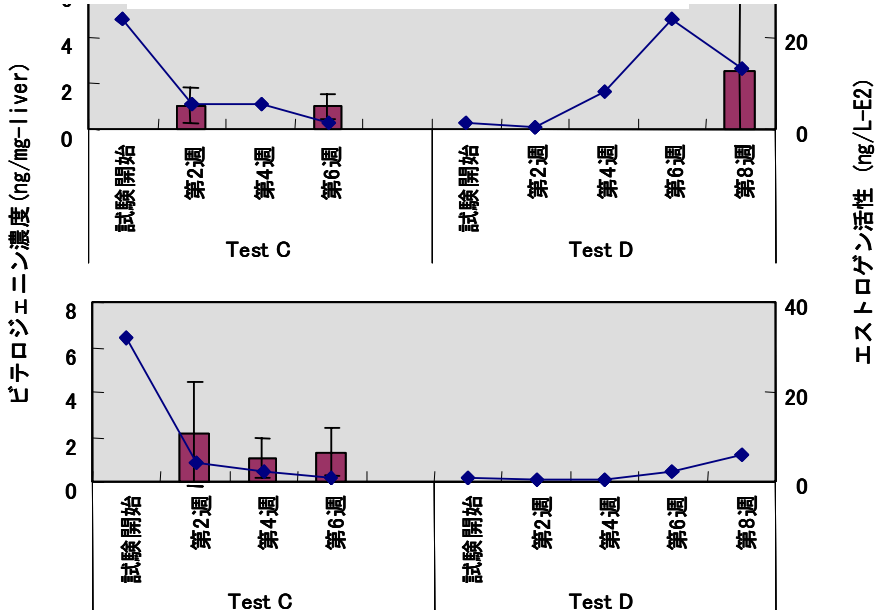


図-2.58　TestC と TestD における雄メダカ陽性個体ビデロジェニン濃度の平均値と試験水エストロゲン活性の推移(上段：二次処理水試験区、下段：砂ろ過水試験区)

試験開始時のエストロゲン様活性は20ng/L-E2を越えており、その後降雨による変動はあるものの高いレベルで推移していた。このことから、試験開始時にみられたエストロゲン作用の強さが雄メダカのVTG 生成に関与したと推定され、一度生成されたVTG は、代謝されるまで体内に蓄積されているのではないかと考えられる。

エストロゲンの純物質への曝露実験から、E2、E1濃度がそれぞれ 12.6、31.6ng/L 以上でビテロゲニン濃度が顕著に増加する結果が得られている。これらの値は、エスロトゲン様活性として 10ngE2/L ほどであることから、この値を超えた場合に、ビテロゲニン生成が観察されたものと考えられる。

2.4.4　下水処理場におけるメダカを用いた曝露試験

（1）長期曝露試験

1）試験方法

メダカに対する下水処理水の曝露試験を、河川水曝露試験に用いた装置を用いて行った。下水処理場は、主に家庭系排水を処理しており、処理および消毒方式は、一般的な標準活性汚泥処理および塩素消毒が行われている。曝露水には、生物処理後の二次処理水と、二次処理水を塩素消毒し、砂ろ過処理を行った放流水を用いた。

TestA～D の曝露試験を行い、TestA、B では雄メダカのみ、TestC では雄メダカと雌メダカの混合、TestD では TestC で得られた卵を用いて試験を行った。

2）結果および考察

TestA では VTG の生成は殆ど観察されなかったものの、TestB では、エストロゲン様活性が100ngE2/L ほどと極端に上昇したことによって、雄メダカのビテロゲニンも最高値 1000ng/mg-liver を超えるものが測定された。この試験の実施中、放流

水取水地点で補修工事が行われていたため、何らかの理由で放流水のエストロゲン作用が上昇したものと考えられる。

TestC と TestD におけるメダカビテロゲニン濃度とエストロゲン濃度を図-2.58 に示す。

TestC においては、二次処理水曝露試験区および砂ろ過水曝露試験区のいずれにおいても VTG を生成した雄メダカを確認した。エストロゲン様活性は、二次処理水曝露試験区、砂ろ過水試験区共に、試験開始時に 20～30ngE2/L-E2 と高い値であったが、その後徐々に低下し、6 週後では 1ng E2/L ほどに低下した。以上のことから、試験開始時にみられたエストロゲン作用の強さが雄メダカのビテロゲニン生成に関与したと推定され、一度生成されたビテロゲニンは、代謝されるまで体内に蓄積されているものと考えられた。

Test D では、第 6 週に 20ngE2/mL を超えるエストロゲン様活性の上昇がみられた二次処理水試験区において、第 8 週で雄メダカのビテロゲニン生成がみられた。

雄メダカのビテロゲニン生成に関与するエストロゲン様活性の値は、エストロゲン曝露試験において 10ngE2/L 程度が得られていることから、Test C および D の結果はこれに整合するものと考えられる。

（２）短期曝露試験

メダカへの下水処理水の曝露における、短期的な影響を把握するために、観測頻度の高い短期曝露試験を行った。

１）方法

短期曝露試験を実施した処理場は、主に家庭排水の処理を行っている。同処理場内にある標準活性汚泥法パイロットプラント（有効水深 2m，曝気槽容量 10m^3，HRT＝8hr）の、曝気槽（生物処理槽）の第 2 槽から混合液を引き抜き、沈澱処理した越流水および生物処理後の沈殿池越流水を前述の曝露装置に引き込み、水温を約 25℃にしたのち、メダカに曝露した。

試験開始日に、雄メダカ成魚 30 匹を投入し、2 日後、7 日後、14 日後、28 日後にそれぞれ 2、7 日後には 5 匹ずつ、14、28 日後には 10 匹ずつ回収し、肝臓中 VTG 濃度を前述の ELISA キットで測定した。また、試験開始日、メダカの各回収日に曝露水を 4L ずつ採取し、エストロゲン様活性およびエストロゲン様物質の濃度測定に供した。各試験区を、曝気第 2 槽、最終沈殿池とした。

２）短期曝露試験の結果

どちらの試験区においても、すべてのメダカに 2 日後から高い VTG 生成が確認された。特に、曝気第 2 槽試験区では、最終沈殿池試験区に比べ、1～2 桁高い VTG 濃度が観察され、その後急速に低下した。エストロゲン様活性、E1 濃度ともに試験開始時に高い値が観察された（図-2.59）。

曝気第 2 槽試験区で高い VTG 濃度が確認された原因として、各曝露水中の最高 E2 濃度が、曝気第 2 槽流出水中からは 12.6ng/L、最終沈殿池流出水からは 3.67ng/L 検出されており、前者が本研究で算出された E2 の最小作用濃度 12.6ng/L を超えていることによる可能性が考えられる。

2.4.5 曝露水のエストロゲン様活性とメダカ雌性化との関係

１）メダカへの河川水曝露試験結果

多摩川の水質試験監視所内での雄メダカ成魚を用いて行った曝露試験の結果すべてについて、曝露期間 2 週目以降のエストロゲン様活性の平均値（2 週間の移動平均)）と雄メダカの肝臓中 VTG 濃度を比較すると、エストロゲン様活性が 10ngE2/L を超えると、VTG の生成が見られる傾向が得られた(図-2.60)。また、メダカへの E1 の作用強度は、E2 に対し 0.18～0.26 であることを考慮し、エストロゲン濃度（E2 濃度+E1 濃度×0.22）と雄メダカの肝臓中 VTG 濃度とを比較すると、エストロゲン濃度が 10ng/L より低い濃度で VTG が生成される整理結果となった。

２）メダカへの下水処理水曝露試験結果

雄メダカ成魚に対し二次処理水と放流水を曝露した際の、曝露水のエストロゲン様活性と肝臓中 VTG 濃度の関係について、長期影響を明らかにするため、Test B、C および D、短期曝露試験における第 2 週以降の観測結果を用いて整理した。なお、Test B の二次処理水曝露区での試験結果は、本施設の下水処理状況が安定せず、活性汚泥が流亡した可能性があるため、除外した。また、河川水暴露試験同様、エストロゲン濃度（E2 濃度+E1 濃度×0.22）と雄メダカの肝臓中 VTG 濃度との比較も行った(図-2.60)。

その結果、両者には正の相関関係が認められ、曝露水中のエストロゲン様活性が 10ngE2/L 程度以上

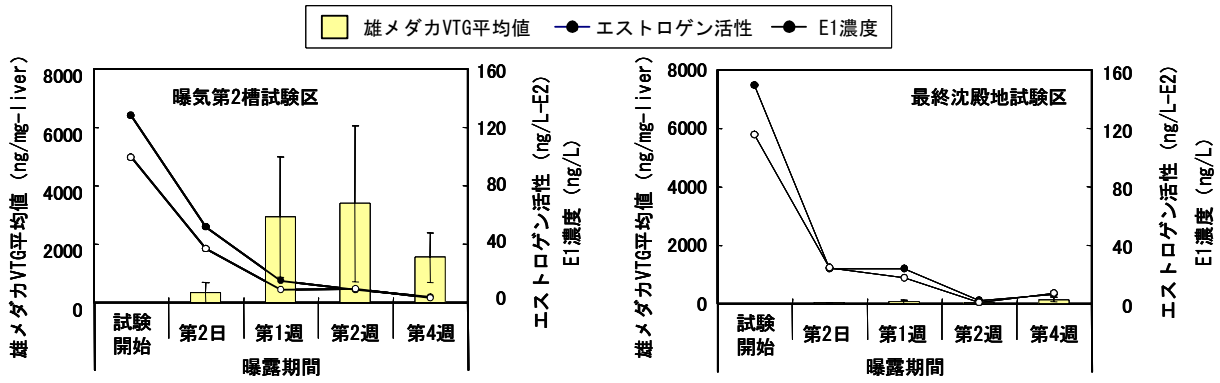


図-2.59 メダカを用いた下水処理の短期曝露試験における雄メダカ VTG 生産量と E1 濃度、エストロゲン活性の推移

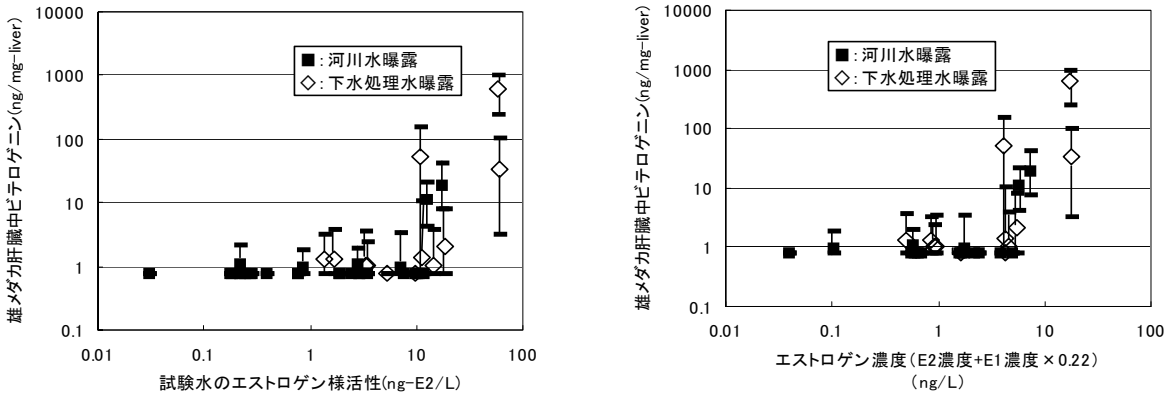


図-2.60 雄メダカの河川水・下水処理水への曝露におけるエストロゲン様活性（左）あるいはエストロゲン濃度（右）とビテロゲニン濃度との関係 （水質は、試験開始より 2 週間後のデータについての移動平均値）

となると、雄個体中でのビテロジェニンの産出量が増加する傾向にあることが確認された。

2.4.6 まとめ

1）E2 および E1 を被験物質として、雄メダカの成魚を用いた実験室内での曝露試験を行い、それぞれ 12.6、31.6ng/L 以上の濃度において、肝臓中に VTG が生成される結果が得られた。

2）都市河川の水質監視所内に曝露試験装置を設置し、雄メダカを用いた河川水の曝露試験を実施した。その結果、下水処理水の流入地点より下流において、エストロゲン様活性が 10ngE2/L を越えた場合に、雄メダカ個体において VTG の産出が確認された。

3）主に家庭排水を処理している標準活性汚泥処理法の下水処理場において、雄メダカを用いた下水処理水の曝露試験を実施した。その結果、河川水を用いた曝露試験同様に、曝露水のエストロゲン様活性が 10ngE2/L を超えると、雄メダカ体内で VTG の生産が確認された。

３．ダイオキシン類の存在形態とモニタリング・分析手法

3.1　概説

ダイオキシン類については、国民の健康の保護を図ることを目的に、「ダイオキシン類対策特別措置法」が 1999 年 7 月 16 日に公布され、2000 年 1 月 15 日から施行されている。また、法律の施行に伴い、旧環境庁告示「ダイオキシン類による大気の汚染、水質の汚濁及び土壌の汚染に係わる環境基準について（平成 11 年環告 68)」及び環境省告示「ダイオキシン類による大気の汚染、水質の汚濁及び土壌の汚染に係わる環境基準について（平成 14 年環告 46)」によりダイオキシン類に係わる大気、水質、土壌、底質の環境基準が定められるとともに、底質中のダイオキシン類濃度が環境基準値を超えている場合には、可及的速やかに達成されるよう努めることが定められた。

河川底質のダイオキシン類汚染対策を実施するために、先ず、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のか見極める必要がある。そのためには、汚染区域を詳細に調査することが重要であるが、既存の分析方法(公定法)では、高価な分析機器が必要、分析費用が高額、前処理が煩雑で分析に時間を要する等課題も多い。そのため、公定法と比較して簡易に、迅速に、一般的な実験室や現場にて、試料の前処理から測定までできる新たな技術の開発が望まれている。

本研究では、抗原抗体法（ELISA 法）などを用いた簡易な分析技術の開発、底質試料の前処理工程の内、乾燥、抽出工程の迅速化に関する検討、簡易な調査手法・モニタリング手法の開発や覆砂の溶出防止効果を評価を目的とし研究を行った。また、公定法の精度管理手法は分析同様複雑で、専門家以外による判定が難しいが、本研究ではこれらをパターン化、システム化し、簡単に判定する手法の検討を行った。

3.2　ダイオキシン類の簡易分析手法

3.2.1 研究方法

（１）　簡易検出技術の整理

河川底質のダイオキシン類対策を実施することを想定した場合、公定法での監視の他に①調査段階では汚染範囲の確認調査、②工事段階では工事境界での底質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、中間処理・処分施設等の監視を行う必要がある。また、③工事終了後において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必要がある。

これらのモニタリングでは多数の試料の測定、連続的モニタリングが対象となることから、分析時間が短い、あるいは低コストである方法について検討を行うことが必要である。また、簡易分析法であっても分析信頼性の確認は重要であり、その分析方法の特徴を十分把握した上で目的にあった利用が望まれる。

簡易分析技術に関する既往の報告[38)～46)]から底質への応用の可能性のある技術をまとめ**表-3.1**に示す。

①の方法は、比較的安価な四重極 GC/MS によりダイオキシン類の一部を測定するものであり、公定法で用いる高分解能 GC/MS（HRGC/HRMS）に比べ感度が劣るが、この問題を緩和するため GC に注入する試料濃縮液を従来より数十倍多くし、溶媒を先に揮発放出させてからダイオキシン類を分離カラムに導入するプログラム昇温気化（Programmed Temperature Vaporizer : PTV）法を用いる場合が多い。

②の方法は、四重極イオントラップ型 GC/MS/MS によりダイオキシン類の一部を測定する方法であり、対象化合物が持つ特有の２次イオンを選択することにより選択性の高い分析を行うことができる。この装置も比較的安価である。

③の方法は、抗原と、抗原に対してきわめて高い特異性を持つ抗体との結合能力を利用した測定方法であり、ダイオキシン類の一部を抗原として取得したモノまたはポリクロナール抗体を用いている。

④の方法は、ダイオキシン類の識別に Ah レセプターバインディング法を、そしてその検出過程に免疫測定法を利用した方法であり、Ah レセプターに反応する物質を測定する。

⑤の方法は、ダイオキシン類の生物への毒性発現メカニズムを用いた方法である。Ah レセプターに結合する物質があるとルシフェラーゼを誘導する遺伝子を組み込んだヒト肝細胞を用いている。

⑥の方法は、半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定するものである。ダイオキシン類

は、難揮発性有機ハロゲン化合物であることからダイオキシン類の代替指標として検討されている。測定に用いる全有機ハロゲン（TOX）計は比較的安価で操作も簡便なことから容易に結果を得ることができる。

以上、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分析結果を得るまでの時間も短縮でき、また、分析費用も安価となる可能性のある技術である。

表-3.1　簡易検出技術

簡易検出技術	文献
①四重極 GC/MS による方法	38) 39)
②四重極イオントラップ型 GC/MS/MS による方法	40) 41)
③免疫測定（ELISA）による方法	42)
④Ah レセプターバインディングアッセイによる方法	43)
⑤生物検定による方法	44) 45)
⑥半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定する方法	46)

（２）　免疫抗体による簡易分析法の河川底質の測定利用性の検討

簡易分析技術に関する共同研究を、積水化学工業（株）・（株）矢内原研究所・大塚製薬（株）・東洋建設（株）とはウサギ抗ダイオキシンポリクロナール抗体を用いた ELISA 法（以下、$ELISA_{ECO}$ 法）について、（株）クボタとはダイオキシン類の識別にアリール炭化水素（Ah)レセプターバインディング法と検出過程に免疫測定法を利用した方法（以下、AhR 法）について、第一ファインケミカル（株）とはマウス抗ダイオキシンモノクロナール抗体を用いた ELISA 法（以下、$ELISA_{DT2}$ 法）について行った。

簡易分析法の検討は、以下の手順で行った。

①ダイオキシン類標準物質に対する交差性

②河川底質試料を用いた適用性の比較

ここで、測定前処理の底質からの抽出については、風乾した試料を高速溶媒抽出法により行い、精製については、硫酸処理と多層シリカゲルカラムクロマトグラフあるいは多層クロマトグラフィーとアルミナカラムによる精製方法を適用した。抽出条件はトルエンを抽出溶媒として、抽出時間 10 ないし 15 分、圧力 2000psi、オーブン温度 150℃、サイクル数は 1 ないし 2 回である。抽出溶媒は揮散させ、最終的にジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶解させた。また、検討に使用した河川底質は 2000 年度および 2001 年度の国土交通省が実施した全国一級河川ダイオキシン類調査において同一地点で採取され、保存されていた底質試料を用いた。

（３）　ダイオキシン類簡易検出手法

簡易分析手法の検討・評価にあたり、乾燥法、抽出法、精製法、検出法を組み合わせた分析手法で行うことは重要である。このため、**図-3.1** に示すように、抽出条件としてソックスレー抽出、高速溶媒抽出、加熱流下法を増やし、精製方法として多層シリカと三層シリカ、さらに活性アルミナと活性炭吸着を適宜組み合わせた場合を検討した。また、簡易検出は、前述した免疫測定法の他、四重極 GC/MS、を用いた場合と、HRGC/HRMS を用いた公定法とを比較した。本研究では、比較的汚染濃度が高い地域で採取した同一試料を用いて乾燥・抽出・精製と種々の検出手法との組み合わせ技術について研究を行った。

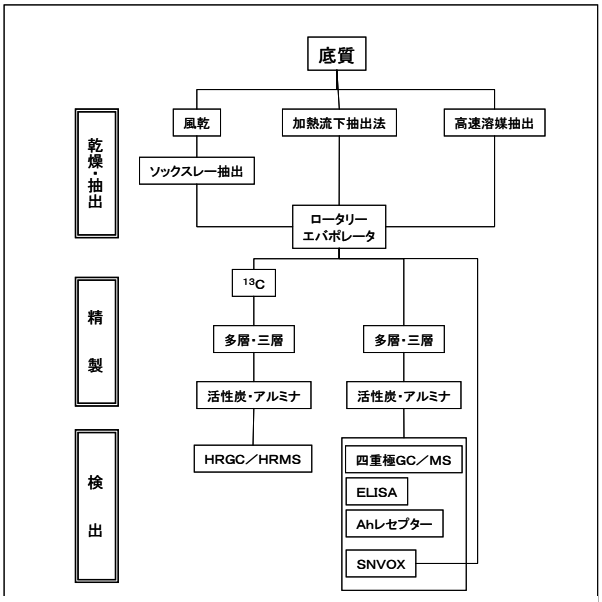


図-3.1　ダイオキシン類簡易分析技術の比較検討

（４）　精度管理手法の検討

河川水、底質のダイオキシン類の分析において、データの信頼性を確保する手法の提案を目的とし、既存マニュアルの精度管理手法を整理し検討するとともに、現在、専門家が実施している精度管理手法をパターン化、システム化し、比較的簡単に判定できる手法に関する検討を行った。

3.2.2.　研究結果

（１）　簡易分析技術の開発要件の整理

河川底質のダイオキシン類対策にあたって必要となる簡易モニタリング技術の要件を、**表-3.2** に示し、

表-3.2　河川底質のダイオキシン類対策にあたって必要となる簡易モニタリング技術の要件

	調査段階		工事段階				工事終了後	
	汚染範囲確認調査	工事の影響範囲調査	工事境界における底質の巻き上げ、上下流への輸送の監視	工事区域外の水質、底質への影響の監視	中間処理・処理施設での固液分離液、仮置きヤードのモニタリング	底質処分場からの漏出の有無の監視	汚染現場の改善効果の把握	底質処分場の環境影響の監視
分析時間短縮	○	○	○	◎	○	◎	○	◎
連続モニタリング			◎		◎	○		
低コスト化	◎	◎		○			◎	○
分析信頼性	○	○	○	○	○	○	○	○

注：簡易モニタリングの検討において考慮すべき事項　◎：最も優先すべき事項　○：優先すべき事項

整理した。

対策実施前の調査（調査段階）では、汚染範囲確認調査と工事の影響範囲調査がある。特に底質対策の範囲を確定するためには、公定法に基づかねばならないが、最終的に公定法で測定する範囲に絞り込むために時間がかからず、費用が安い方法が期待される。

また、対策実施中の調査（工事段階）や中間処理・処分施設では、水中のダイオキシン類の連続モニタリングが可能或いは短時間に結果が得られる方法が望まれる。

対策実施後の調査（工事終了後）については、汚染現場の改善効果を確認するため、公定法を用いるための補助手段として低コストの底質分析方法が望まれる。また、底質処分場は、底質処分場の環境影響を把握するため短時間で結果が得られる水質分析方法が望まれる。

本研究では、主に汚染範囲確定の補助として用いる底質の簡易測定法を検討することとした。

（２）免疫抗体による簡易分析法の河川底質の測定利用性の検討

１）ダイオキシン類標準物質に対する交差性と検出下限値

共同研究で用いた簡易測定キット（$ELISA_{ECO}$、AhR、

表-3.3　異性体の TEF と測定キットの交差反応性及び実測濃度（中央値）に占める各異性体の割合

異性体		TEF	交差反応性			実測濃度に占める割合(%)
			$ELISA_{ECO}$	$ELISA_{DT2}$	AhR	
PCDD	2,3,7,8-TCDD	1	1	1	1	0
	1,2,3,7,8-PCDD	1	0.1	0	0.8	0.023
	1,2,3,4,7,8-HCDD	0.1	0.003	0	0.5	0
	1,2,3,6,7,8-HCDD	0.1	0.001	0	0.5	0.11
	1,2,3,7,8,9-HCDD	0.1	0.003	0	0.5	0.13
	1,2,3,4,6,7,8-HCDD	0.01	0.002	0	0.2	3.3
	OCDD	0.0001	<0.001	0	0.003	58
PCDF	2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1	0.33	0.06	0.028
	1,2,3,7,8-PCDF	0.05	0.006	0	0.07	0.032
	2,3,4,7,8-PCDF	0.5	0.6	0.002	0.9	0.042
	1,2,3,4,7,8-HCDF	0.1	0.005	0	0.08	0.067
	1,2,3,6,7,8-HCDF	0.1	0.004	0	0.6	0.035
	1,2,3,7,8,9-HCDF	0.1	0.002	0	0.6	0
	2,3,4,6,7,8-HCDF	0.1	0.002	0	0.5	0.074
	1,2,3,4,6,7,8-HCDF	0.01	<0.001	0	0.06	0.80
	1,2,3,4,7,8,9-HCDF	0.01	<0.001	0	0.07	0
	OCDF	0.0001	<0.001	0	0.008	1.4
Co-PCB	3,4,4',5-TeCB (#81)	0.0001	0.01	0	0.03	0
	3,3',4,4'-TeCB (#77)	0.0001	0.02	0.05	0.01	1.9
	3,3',4,4',5-PeCB (#126)	0.1	0.01	0	0.3	0
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	0.01	<0.001	0	0.06	0
	2',3,4,4',5-PeCB (#123)	0.0001	<0.001	0	0.002	0.16
	2,3',4,4',5-PeCB (#118)	0.0001	0.01	0	0.0002	19
	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	0.0001	0.007	0	0.0003	8.0
	2,3,4,4',5-PeCB (#114)	0.0005	0.004	0	0.001	0.27
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	0.00001	0.002	0	0.0001	0.86
	2,3,3',4,4',5-HxCB (#156)	0.0005	0.005	0	0.001	2.3
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	0.0005	<0.001	0	0.002	0.48
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	0.0001	0.002	0	0.0002	0

ELISA$_{DT2}$）はダイオキシン類に対する交差反応性が課題である。毒性等価係数（TEF）を有するダイオキシン類に対する交差反応性を**表-3. 3** に示す。ダイオキシン類は、その濃度を表す際に各異性体にそれぞれ固有の TEF を乗じた後、総量を毒性等量（TEQ）として表す。同表にはダイオキシン類の異性体（以下、異性体）毎に簡易測定キットで検出した値（濃度）も、2,3,7,8-TCDD 相当量（DEQ）として表している。

TEF と交差率が全く同じ異性体の場合、公定法と簡易測定キットによる測定値（以下、測定値）が同じ数値となる。TEF に比べ交差率が小さい場合、公定法より測定値が小さく、逆に TEF に比べ交差率が大きい場合、公定法より測定値が大きくなる。このように TEF に対する交差率の値はキットの特徴を表す重要なファクターである。

各測定キットが、各異性体に対して表 3.2-3 の交差反応性を示し、相互の異性体が相加的に反応を示すと仮定すると、与えられた複数の異性体構成によって予想される DEQ を理論換算 DEQ と呼ぶことにする。

河川底質ダイオキシン類実態調査のデータから得られたダイオキシン類異性体構成比(**図-3. 2**)を用いて、ELISA$_{ECO}$、AhR、ELISA$_{DT2}$ の理論換算 DEQ を求めると、その値は公定法 TEQ に対してそれぞれ 3 倍、8 倍、0.7 倍となる。従って、全国平均的な底質に対して、理論換算 DEQ は公定法 TEQ に比べて ELISA$_{ECO}$、AhR が過大、ELISA$_{DT2}$ が過小となることが予想される。

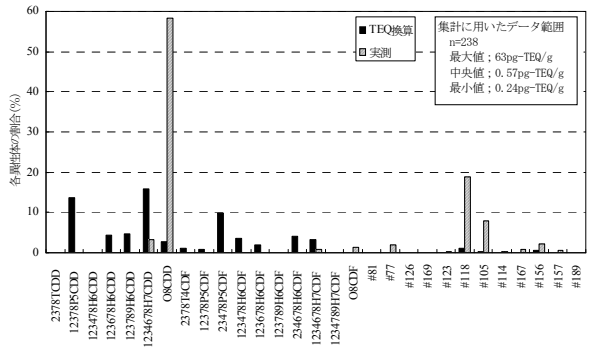


図-3.2　total TEQ/総実測濃度に占める各異性体の割合

２）ダイオキシン類簡易分析手法技術の比較検討

公定法による乾燥・抽出・精製を行った試料を用い、ELISA$_{ECO}$、AhR、ELISA$_{DT2}$ に四重極 GC/MS による方法を加えた 4 検出法を公定法と比較した。

四重極 GC/MS 法は多くの異性体の中から特定の異性体だけを選択し、その異性体の存在濃度を測定し、公定法によって測定された TEQ との相関をとって、四重極 GC/MS で測定された特定の異性体の濃度をもとに未知試料の TEQ を推定する方法である。このため、四重極 GC/MS で測定する異性体の選択が重要となる。本検討では、全国の底質調査データを集計・整理した代表的ダイオキシン類異性体（図 3.2-2）の中からに TEQ に大きく寄与している上位３つの異性体 1,2,3,7,8-P5CDD, 2,3,4,6,7,8-H7CDD, 2,3,4,7,8-P5CDF を分析することとした。

ダイオキシン類濃度（pg-TEQ/g）とそれぞれの簡易検出法で求めた値と公定法の値の関係を**図-3. 3** に示す。試料数が少なく明確な相関性は認められなかった。ELISA、AhR については前述した理論換算 DEQ との関係についても検討したところ相関性は認められなかった。

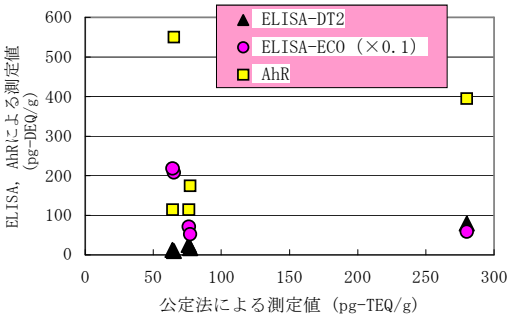


図-3.3　公定法の TEQ と ELISA$_{DT2}$ 法、ELISA$_{ECO}$ 法、AhR 法での DEQ との比較

次に、1,2,3,7,8-P5CDD、1,2,3,4,6,7,8-H7CDD、2,3,4,7,8-P5CDF の 3 異性体の HRGC/HRMS と四重極 GC/MS で測定した値の関係を**図-3. 4** に示す。両者は比較的良い相関性を示しており、四重極 GC/MS でも今回測定対象とした 3 異性体を比較的よい精度で測定できていることがわかる。

しかし、HRGC/HRMS での測定値に比べ低い値となっていることから測定対象物質すべてを検出できていない可能性があり、測定感度等に課題がみられる。

３）精度管理手法の検討

ダイオキシン類の測定分析に関しては『測定値の信頼性確保』のために，公定法（JIS K 0312）では種々の品質管理項目が定められている。品質管理項目のデータは測定分析機関に記録として保管され、依頼業務の場合、その一部は測定値と共に依頼元へ報告される。しかしながら、ダイオキシン類の測定分析

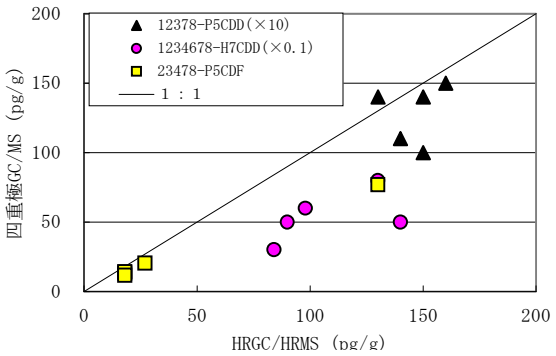


図-3.4　HRGC/HRMS と四重極 GC/MS による各異性体の測定結果

注：(×10) は実測濃度の 10 倍、(×0.1)は実測濃度の 10 分の 1

結果の妥当性を，品質管理項目をも含めて確認するためには高い専門知識が必要である。これまで専門家が行ってきたダイオキシン類測定データの精査作業の一部をパターン化、システム化することで、報告された測定値が公定法で定められた品質管理規格を満足する状態で得られたものであるかを確認するソフトウェアを作成した。

本システムでの判定項目の 1 例を**表-3.4** に示す。本ソフトウェアの使用方法は、ソフトウェアを測定分析機関等の依頼先へ配布し、測定分析機関は測定分析終了後、数値等をソフトウェアに入力する。本ソフトウェアでは入力されたデータの内容に矛盾や規格逸脱があれば指摘し、また公定法で定められた規格を満足する状態でなければ出力（印刷等）が不可能とすることで判定が分かりやすい。依頼元は本ソフトウェアの出力結果の提出を要求することにより、定められた品質管理規格を満足しているダイオキシン類測定分析値を得ることが可能となる。

表-3.4　精度管理のための判定項目と判定基準(例)

判定項目			判定基準
ｸﾘｰﾝｱｯﾌﾟｽﾊﾟｲｸ	PCDD，PCDF		各塩素数ごとに2,3,7,8-位塩素置換体１種類を添加しているか
	Co-PCB	ﾉﾝｵﾙﾄ体	全種類を添加しているか
		ﾓﾉｵﾙﾄ体 ｼﾞｵﾙﾄ体	各塩素化合物ごとに１種類ずつ添加しているか
分解能			10,000以上であるか
ｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞ周期			１秒以下であるか
測定質量数			正しい質量数で測定が行われているか
			試料、内標準物質各塩化物ごとに２つ以上の質量数とロックマス用選択イオンの質量数を測定しているか
ｸﾘｰﾝｱｯﾌﾟｽﾊﾟｲｸの回収率			５０－１２０%の範囲にあるか
ｻﾝﾌﾟﾘﾝｸﾞｽﾊﾟｲｸの回収率			７０－１３０%の範囲にあるか
塩素同位体比			±１５%（検出下限の３倍以下の場合は±２５%）の範囲にあるか
検量線作成時のRRFからの変動範囲			±２０%の範囲にあるか

3.3　底質中ダイオキシン類の迅速な乾燥・抽出手法

3.3.1　研究方法

河川底質試料を用い、乾燥・抽出手法の違いが分析結果に及ぼす影響を検討した。

一般に、固体試料からの抽出には、振とう抽出法[47)]、ソックスレー抽出法[47)]、高速溶媒抽出法[48)]（Pressurized Fluid Extraction 法、以下、PFE 法)、マイクロウェーブ抽出法[49)]、超音波抽出法[50)]、超臨界流体抽出法[51)]、加熱流下抽出法[52)]等が用いられる。これらの抽出手法を用いた、固体試料からのダイオキシン類等の抽出に関する検討も多くなされているが、これらの検討の多くは、飛灰や土壌を検討対象としているものであり、底質を対象としている場合でも、乾燥工程を含めた迅速化の検討を行っている例は少ない。

本検討では、乾燥方法としては風乾、凍結乾燥、加熱乾燥、溶媒脱水、抽出方法としてはソックスレー抽出法、湿泥－ヘキサン抽出法[47)]、PFE 法、超音波抽出法を用いた乾燥・抽出条件の比較検討を行った。検討した各手法の主な操作と所要時間を**表-3.5** に示す。

公定法（風乾＋ソックスレー抽出法）は前述の通り、環境庁マニュアルに用いられている方法である。本法は、試料を風乾した後、トルエンを抽出溶媒として用いて 16 時間以上の抽出を行う方法である。

湿泥－ソックスレー抽出法は、環境庁マニュアルで公定法の代替法として注記されている方法の一つである。本法は、試料にアセトンまたはメタノールを加えて乾燥させた後、トルエンで 24 時間以上ソックスレー抽出を行う方法である。公定法より所要時間が短く、省力化が可能である。なお、本検討では抽出時間を公定法にそろえている。

湿泥－ヘキサン抽出法は湿泥－ソックスレー抽出法とともに環境庁マニュアルで公定法の代替法として注記されている方法である。本法は、試料に水酸化カリウムエタノール溶液を加え、１夜室温で放置した後、ヘキサンで振とう抽出を行う方法である。

PFE 法は、試料と抽出溶媒を高温、高圧条件下で接触させ、目的物質を比較的短時間で抽出する方法である。PFE 法での抽出条件は、公定法の抽出条件を参考としつつ、底質からの迅速なダイオキシン類抽出を目指して本検討の中で設定したものである。

風乾＋PFE 法は、公定法における抽出操作のみを PFE 法に置きかえた操作条件である。これは、16 時間以上とされているソックスレー抽出法による抽出時間を 40 分程度に短縮することを期待して設定し

表-3.5　公定法と各乾燥、抽出手法の分析値の比較

名称	風乾＋ソックスレー抽出法	湿泥－ソックスレー抽出法	凍結乾燥＋ソックスレー抽出法	加熱乾燥＋ソックスレー抽出法	風乾＋高速溶媒抽出法	湿泥－ヘキサン抽出法	超音波抽出法
乾燥	風乾（数日～十日）	アセトンろ過＋風乾（1日）	凍結乾燥	加熱乾燥（50℃）	風乾（数日～十日）	水酸化カリウムエタノール溶液を入れ、室温放置（1夜）＋ヘキサンで振とう抽出（10分3回）	アセトンで抽出（30分）＋トルエンで抽出（30分）＋ヘキサンで抽出（30分）
抽出	トルエンでソックスレー抽出（16時間以上）	トルエンでソックスレー抽出（16時間以上）	トルエンでソックスレー抽出（16時間以上）	トルエンでソックスレー抽出（16時間以上）	トルエンで高速溶媒抽出（20分2回）		
備考	公定法					公定法（注9A）	

名称	高速溶媒抽出法(PFE法)						
	条件①	条件②	条件③	条件④	条件⑤	条件⑥	条件⑦
乾燥・抽出	トルエンで抽出（20分2回）	20%アセトン含有トルエンで抽出（20分2回）	アセトンで抽出（20分）＋トルエンで抽出（20分）	アセトンで抽出（20分、120℃）＋トルエンで抽出（20分）	アセトンで抽出（10分）＋トルエンで抽出（10分）	アセトンで抽出（10分）＋トルエンで抽出（10分）＋ヘキサンで抽出（10分）	エタノールで抽出（20分）＋トルエンで抽出（20分）

た。

PFE 法条件①～⑦は、一般に数日を要する風乾を行わないことによる迅速化を期待して設定した。PFE 法条件①は、風乾＋PFE 法から乾燥工程を省いた操作条件である。PFE 法条件②～⑥はアセトン、条件⑦はエタノールによる脱水を期待して設定した。

超音波抽出法は、試料と抽出溶媒の接触をより効率的に行うために超音波を用いる方法である。超音波抽出法での抽出条件は、アセトンによる脱水に期待した条件設定とした。

試料の採取および抽出工程より後の分析操作は、環境庁マニュアルに従って行った。分析対象物質はポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン（PCDDs）、ポリ塩化ジベンゾフラン（PCDFs）およびコプラナーポリ塩化ビフェニル（Co-PCBs）とした。

3.3.2　研究結果

各乾燥・抽出手法で得られた分析結果（毒性等量）を比較したところ、公定法である風乾＋ソックスレー抽出法より高い分析結果となったのは、凍結乾燥

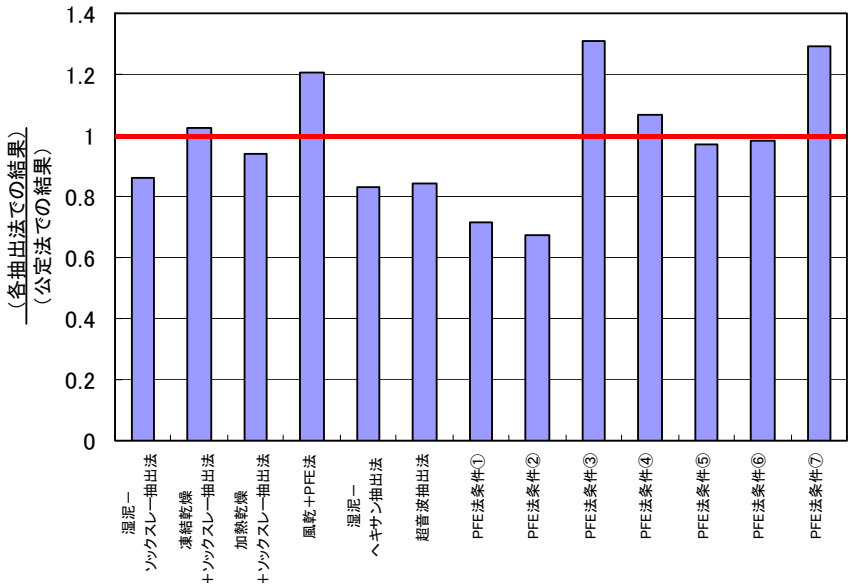


図-3.5　公定法と各乾燥、抽出手法の分析値の比較

＋ソックスレー抽出法、風乾＋PFE 法、PFE 法の条件③④⑦であった（**図-3.5**）。

各乾燥・抽出手法で得られた分析結果（毒性等量）の変動係数を比較したところ、公定法と同程度以下の変動係数となったのは、風乾＋PFE 法と PFE 法条件④、超音波抽出法であった。

PFE 法は抽出時間が比較的短かい抽出方法である。特に、条件①～⑦では乾燥に要する時間が短縮される。これらのうち、条件③④⑦では毒性等量が公定法より高い値を示しただけでなく、ほとんどの化合物で分析結果が公定法での分析結果より高くなっており、安全側の値を示す傾向にあった。これらのうち、条件④での変動係数が比較的小さいこと、他の操作条件に比べて操作条件が穏やかであることから、底質中のダイオキシン類含有量の迅速・簡易な乾燥・抽出手法としては、PFE 法条件④が有望な手法の一つであると考えられる。

ここまでの検討に使用した底質とは性状の異なる 4 種類の底質について、公定法と PFE 法条件④で得られた分析結果（毒性等量）を比較したところ、PFE 法条件④で得られた分析結果が公定法での結果と同等以上の値を示し、安全側の値を示す傾向にあることが明らかとなった。

3.4　迅速乾燥・抽出手法と簡易検出法との組み合わせ

3.4.1　研究方法

複数の河川底質試料を用い、迅速乾燥・抽出手法と簡易検出法との組み合わせに関する検討を行った。

比較検討した乾燥・抽出手法は、公定法と PFE 法条件④である。各乾燥・抽出手法により得られた抽出液を公定法で精製した後、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（HRGC/HRMS）を用いる公定法、水質チームで検討した ELISA 法（$ELISA_{ECO}$ 法、$ELISA_{DT2}$ 法）、Ah レセプターバインディングアッセイ法（AhR 法）の各検出法で測定し、その結果を比較した。

3.4.2　研究結果

簡易検出法で得られた実測値と、公定法での各化合物の分析値と交差率の積から算出される計算値を比較し、**図-3.6** に示す。縦軸の値が 1 に近づくほど、計算値に近い値、即ち、純物質で得られた値に近づくことになる。PFE 法を用いることにより概ね

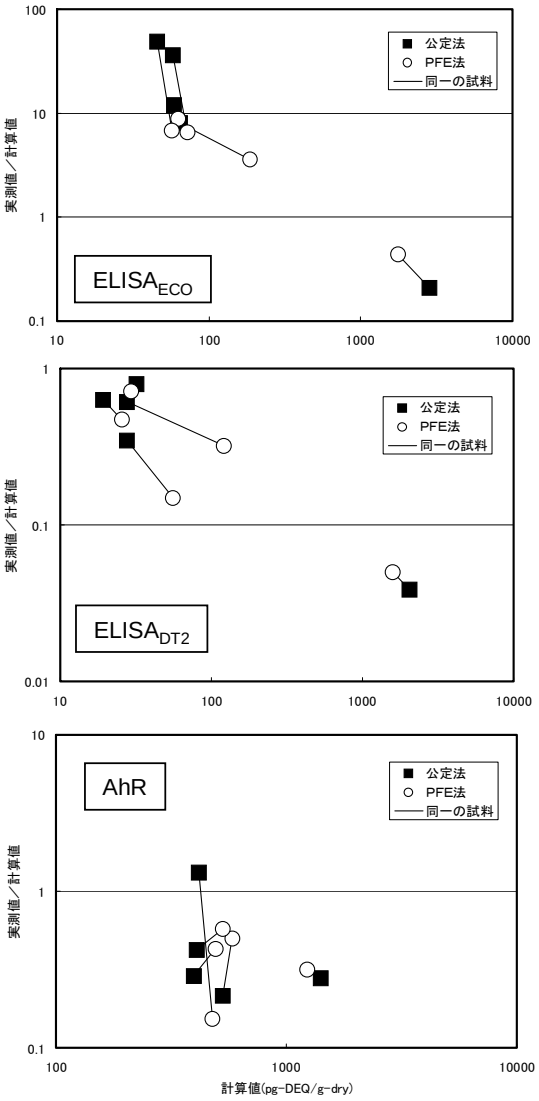


図-3.6　抽出法と検出法の組み合わせによる測定値と理論値との比較

$ELISA_{ECO}$ 法、AhR 法では 1 に近づき、$ELISA_{DT2}$ 法では 1 から離れる傾向にあり、それぞれの機構を明確には把握できなかった。PFE 法と簡易検出法との組み合わせに関しては、より多くの試料を用いた検討が必要であると考えられる。

3.5　ダイオキシン類のモニタリング手法と溶出抑制手法

ダイオキシン類対策を適切かつ効率的に実施するためには、ダイオキシン類の汚染分布を正確に把握したり、対策工事中の底質の巻き上げに伴う水中ダイオキシン類濃度を把握する必要がある。しかし、現状では公定法によるダイオキシン類の分析には高

額の費用と長期間を要するため、調査においては予算や時間上の制約が生じているのが現状である。このため、より安価かつ短時間で可能な調査・モニタリング手法として、強熱源量、TOC、SS、濁度といった底質や水質の一般的な指標値を用いて、底質や水中のダイオキシン類濃度を把握する手法について検討した。

3.5.1　底質ダイオキシン類の簡易調査手法

底質中の有機分量を表す強熱減量及び TOC をダイオキシン類の代替指標とした場合の、ダイオキシン類濃度との相関関係について検討した。

現地河川において測定された底質ダイオキシン類濃度と強熱減量や TOC との相関関係を**表-3.6** に示す。いずれのケースも、ダイオキシン類濃度と有機物指標の間に相関関係が認められ、相関係数が高い。Y 川上流を除き 99%以上の信頼度で相関関係が成立している。また、相関係数が低い N 川上流のケースについても、相関直線から大きく外れた少数のデータが相関係数を低くしており、それ以外のデータについては比較的良好な相関を示している。

強熱減量や TOC はダイオキシン類濃度との間には特に物性上の関係は無く、またダイオキシン類はかなり局所的に分布していると見られるが、全体的な分布傾向としては、ダイオキシン類の付着基盤や沈降・堆積状況を指標するものとして、ダイオキシン類濃度を指標するものと考えられる。

また、底質ダイオキシン類濃度が高い範囲に絞って行われた Y 川下流や N k 川の調査では、いずれも相関が高くなっており、ダイオキシン類の汚染度が高い水域においては、これら代替指標がより有効になると考えられる。

表-3.6　底質ダイオキシン類と強熱減量、TOC の相関

対象区域	ｻﾝﾌﾟﾙ数	相関係数	a	b	指標
A 川	48	0.84	4.76	−14.88	強熱減量
N 川	27	0.64	7.17	−17.30	〃
N 川下流＋Y川下流	27	0.87	9.20	−25.33	〃
Y 川下流	15	0.93	10.02	−23.08	〃
Y 川上流	31	0.63	9.11	−14.29	〃
T 川	23	0.77	1.42	0.56	〃
Yd 川	25	0.93	3.51	−2.0	〃
Nk川	9	0.95	0.21	3.52	TOC

＊ダイオキシン類＝a×強熱源量（又は TOC）＋b

Nk 川の調査結果を用いて、TOC とダイオキシン類の相関関係と、これにより環境基準値を超えて汚染された底質に対する TOC の目安値の設定方法を**図-3.7** に示す。底質ダイオキシン類と TOC の相関関係を踏まえた上で95%の安全率で底質環境基準に相当するダイオキシン類が存在する TOC の下限値を求めたものである。環境基準値を越える底質ダイオキシン類の 95%以上は TOC＞25 の範囲に存在する。

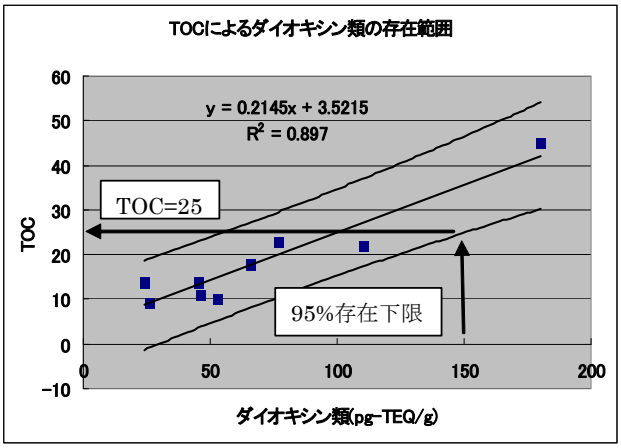


図-3.7　TOC とダイオキシン類の相関関係と底質環境基準に対応する TOC の目安の設定

3.5.2　対策工事に伴う水中ダイオキシン類濃度のモニタリング手法

底質のダイオキシン類が基準値を超える場合には対策が必要となるが、対策時には汚染底質のかく乱、巻き上げが予想されるため、これが 2 次汚染を引き起こさないよう、あらかじめダイオキシン類濃度を予測し、対策方法を検討したり、施工時中に水質ダイオキシン類のモニタリングを行い、その結果を適宜施工状況にフィードバックする必要がある。

ダイオキシン類の拡散状況を直接予測したり、リアルタイムでモニタリングすることは現状では困難であるが、SS と水質ダイオキシン類について一定の関係が成立すれば、SS の拡散予測計算をしたり、SS 又は SS と高い相関があると考えられる濁度を測定することにより、水質ダイオキシン類濃度を把握することが可能となる。実際、対策施工時には巻き上げにより SS 濃度が上昇し、このような状況では SS 濃度に比例して懸濁態のダイオキシン類濃度が卓越し、ダイオキシン類濃度と SS 濃度の間に良好な相関関係が成立することが予想される。

このため、室内実験及び現地実験により、底質巻き上げ時の SS と水中のダイオキシン類濃度の相関関係について調べた。

（１）室内実験

底質巻き上げ時の SS とダイオキシン類濃度の間に原理的に相関関係が成立することを確認するため、室内実験において単純な条件の巻き上げを発生させ、水質を測定した。室内実験では、直径 0.2m、高さ 1m水槽の底面に現地河川で採取した底質を 10cm 程度敷き詰め、底質を乱さないよう蒸留水を注入し、攪拌機により強度の異なる巻き上げを発生させ、巻き上げ中の粒度分布、強熱減量、ダイオキシン類濃度を測定した。

①底質の性状

底質ダイオキシン類は 37pg-TEQ/g（PCDD：16.9pg-TEQ/g、PCDF：11.8pg-TEQ/g、COP-PCB：8.8pg-TEQ/g）で、粒度分布は砂分 64%、シルト分 28%、粘土分 8%であった。

②光学式濁度計と SS の相関

光学式濁度計の測定値と SS は高い相関を示したことから、最初に現地の底質を用いた濁度計の補正を行っておけば、同一の底質については SS を濁度により高い精度で計測できると考えられる。このため、以下では SS を代替指標とした場合についてのみ検討する。

③SS とダイオキシン類の相関

SS とダイオキシン類の相関は図-3.8 のとおりである。データ数は多くないが、SS 濃度とダイオキシン類濃度の間に極めて高い相関が成立しており、底質の性状が同一であれば、SS からダイオキシン類濃度を高い精度で推定することが可能であることが分かる。また、光学式濁度計と SS 濃度の関係を事前に求めておけば、光学式濁度計によりダイオキシン類濃度をリアルタイムで測定することも可能である。

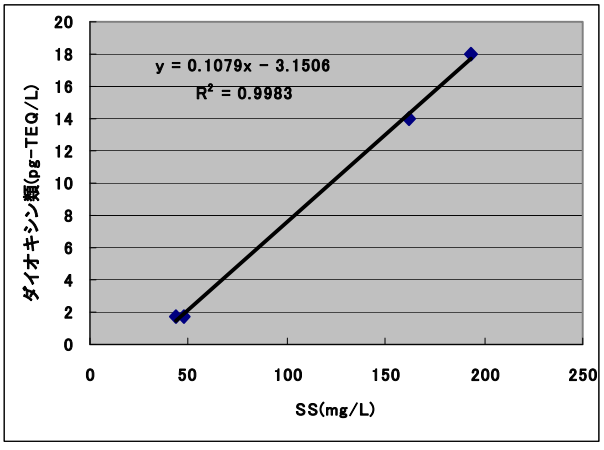


図-3.8　SS とダイオキシン類濃度の関係（室内実験）

室内実験で得られた SS とダイオキシン類濃の相関式は y＝0.1079 x －3.1506 であり、SS 1g あたりのダイオキシン類濃度は 107.9pg-TEQ/g であるが、ダイオキシン類が底質中に一様に分布し、これがそのまま巻き上がったと仮定すれば 37pg-TEQ/g となることから、これに比べて約 3 倍の値となっている。これは底質の巻き上がり時に比較的軽い有機分や小さな粒子成分が優先的に巻き上がり、これらにダイオキシン類が比較的多く付着していたためと考えられる。

底質ダイオキシン類濃度を用いて、水中の SS とダイオキシン類濃度の関係を推定するのは危険側の評価となる恐れがある。

（２）現地実験

現地実験では、Y 川及び Nk 川において浚渫工事を行った際の水質ダイオキシン類や SS、濁度を測定し、SS や濁度とダイオキシン類の相関を調べた。

①　Y 川における水質測定

Y 川においては、2002 年 2 月に浚渫工事に伴い、ダイオキシン類等の水質測定を行っている。採水地点は浚渫地点を中心に、上下流方向それぞれ 800m の範囲に設定し、施工前、施工中及び施工後において水質調査を行った。施工前、施工中、施工後における SS とダイオキシン類濃度の関係を図-3.9 に示す。

施工前においては、最下流の地点でダイオキシン類の高い値が出現しているが、その他はいずれも SS が 8～12mg/L 程度、ダイオキシン類が 1.5pg-TEQ/L 前後で、両者に相関は見られない。これらの値は水域のバックグランド値を示すと考えられる。

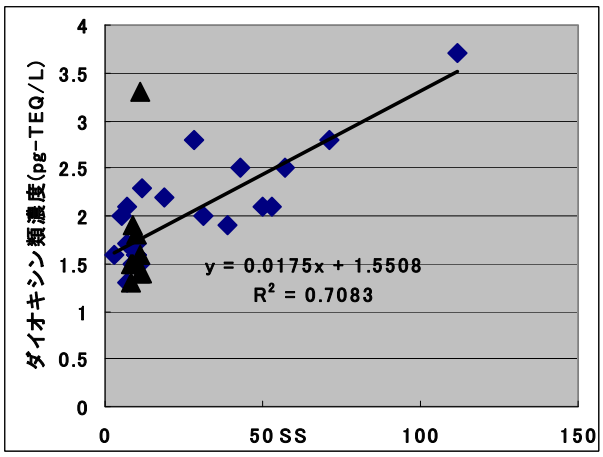


図-3.9　Y 川における浚渫施工前・中における SS とダイオキシン類濃度

次に、施工中には SS は浚渫箇所の直下流地点で 112mg/L 以上に、ダイオキシン類も 3.7pg-TEQ/L に達するとともに、SS とダイオキシン類の相関係数も 0.84 となり、明らかに相関関係が成立している。浚渫工事により、底質巻き上げが卓越し、これによる SS やダイオキシン類への寄与分が大きくなったためと考えられる。

浚渫地点の底質ダイオキシン類は、高濃度 1 地点で 180pgTEQ/g、その他の 8 地点で 1～40pgTEQ/g であり、局所的にダイオキシン類が存在していたが、現地では 1.5m程度の深度まで掘削が行われ、汚染度合の異なる底質が混在して巻き上げられた結果、相関直線から得られる単位 SS 当たりのダイオキシン類量が 17.5pg-TEQ/g になったと考えられる。

②Nk 川における水質測定

Nk 川においては、2002 年 10 月 18～23 日に浚渫工法や汚濁防止枠の効果を見るための浚渫試験施工を行い、その際に水質中のダイオキシン類と SS を同時に測定している。

汚濁防止枠等が設置された場合は、巻き上げられた底質が汚濁防止工を通過する際に、SS 中の粒子構成が変化し、SS とダイオキシン類の相関関係が変化する恐れがある。このことは、SS からダイオキシン類濃度を換算する上で重要であるため、本調査において検討した。

測定結果のうち汚濁防止枠を使用したケース２，３，５について、汚濁防止枠の内・外をあわせた SS とダイオキシン類の相関関係を**図-3.10** に示す。

汚濁枠の内外の位置で、SS やダイオキシン類濃度が 1/10 程度減少するが、SS とダイオキシン類の相関関係は、汚濁防止枠の通過前後でもほとんど変わらず一定の相関関係が見られる。

このことは、汚濁防止対策等を実施しても SS とダイオキシン類の相関に大きな変化はなく、２次汚染防止工等が設置されている場合にも、SS を代替指標として水質をモニタリングしたり、あらかじめシミュレーションを行いダイオキシン類濃度を予測することの妥当性を示している。

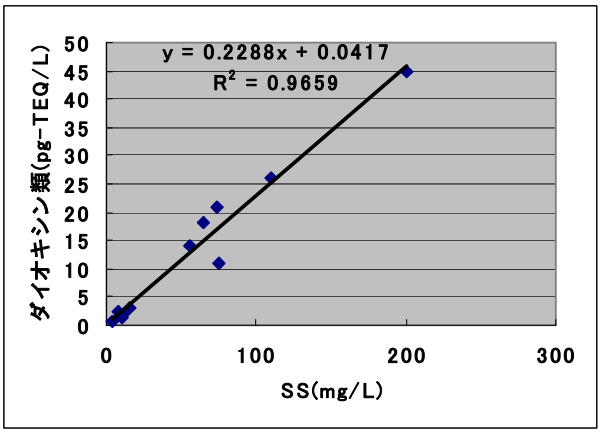


図-3.10　SS とダイオキシン類の関係

3.5.3　覆砂によるダイオキシン類の溶出抑制効果

覆砂はダイオキシン類に汚染された底質を清浄な砂で覆い、ダイオキシン類の巻き上げや溶出を抑制するものである。巻き上げ防止効果は、底質を覆う砂の層が、水の流体運動が底質をかく乱するのを物理的に遮断することにより発揮されるもので、覆砂材の物理的な性状から流体運動に対する覆砂工の安定性を確保すればよい。これに対して、溶出はダイオキシン類の分子拡散によるものであり、覆砂の効果は汚染底質や覆砂材料の化学的性状に大きく依存すると考えられるが、覆砂工によるダイオキシン類の抑制効果は明らかになっていないのが現状である。このため、本研究では以下の実験により、覆砂工の溶出抑制効果を評価した。

１）実験方法

溶出実験はＮｋ川で採取した底質(ダイオキシン類 28000pg/g（120pg-TEQ/g）)をサンプルとし、直径 0.8m、高さ 1.5ｍのシリンダーを用いて、**表-3.7** に示すケースについて行った。溶出期間は 2.5 ヶ月とし、その期間中は１日１回程度底質を移動させない程度上水を攪拌させた他は、静置した。

表-3.7　実験ケース

ケース１	ケース２	ケース３	ケース４	ケース５
覆砂なし	覆砂(0.2mm) 15cm 厚	覆砂(0.2mm) 30cm 厚	覆砂(2mm) 15cm 厚	覆砂(2mm) 30cm 厚

２）実験結果

2.5 ヶ月後の上水の水質測定結果を**図-3.11** に示す。ダイオキシン類濃度については極めて低いため、毒性当量ではなく各物質の総量で表し、検出下限値以下については 0 とした。

実験条件での覆砂は一定のダイオキシン類溶出抑制効果を有するものの、抑制効果は覆砂諸元にほとんど関係なく約 30%程度であった。また、ケース１では懸濁態成分は全体の 65%程度、ケース２では 24%程度であり、覆砂は主にダイオキシン類の懸濁態成分の上水への移行抑制に効果を発揮しているこ

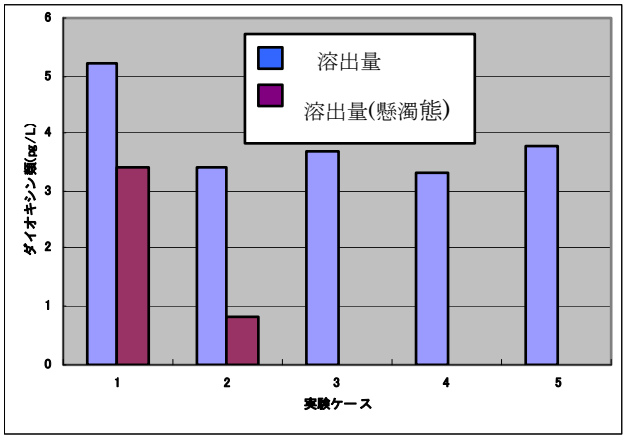


図-3.11　溶出実験の結果（２．５ヶ月後）

とが分かる。

ダイオキシン類の静的な溶出量は極めて小さく、現地におけるダイオキシン類の底質から水域への移行も、動的な巻き上げがそのほとんどを占めると考えられる。また、覆砂の静的な溶出に対する抑制効果は30%程度であるが、覆砂のダイオキシン類対策効果は、汚染底質の巻き上げを抑制することにより発揮されると考えられ、この効果は覆砂工が安定している限りにおいては、かなり高いものと予想される。

3.6　まとめ

底質ダイオキシン類について、簡易分析手法、迅速乾燥・抽出法、対策工事中におけるモニタリング手法等について検討を行い、以下の結果を得た。

1）ELISA 等の簡易分析手法において、理論換算 DEQ と実測 DEQ の比較から、TEF を持たない物質との交差反応の可能性が示され、精製法の検討が重要であることが明らかとなった。

2）測定値の信頼性確保のため専門家が行っていた測定データの精査作業の一部をパターン化、システム化し、報告された測定値が公定法で定められた品質管理規格を満足する状態で得られたものであるかを確認するソフトウェアを作成した。

3）底質中のダイオキシン類分析のための乾燥及び抽出工程の迅速化に関する検討を行ったところ、PFE 法の応用による工程の迅速化が可能であることが明らかとなった。

4）底質中の強熱源量、TOC といった有機物指標とダイオキシン類濃度との間に比較的良好な相関が見られることから、対策工事における高濃度汚染箇所の絞り込みにおいて、この関係が利用できると考えられる。

5）底質の巻き上げが卓越する状況において、SS と水質ダイオキシン類の間に良好な関係が成立するため、対策工事に伴うダイオキシン類の拡散を、SS を代替指標としてモニタリングしたり、予測計算を行うことが可能であると考えられる。

6）覆砂は懸濁態のダイオキシン類の移行を低減することにより、ダイオキシン類の溶出抑制効果を発揮すると考えられる。

４．病原微生物の検出方法と下水における実態

4.1　概説

下水処理水が関与した病原性微生物による集団感染の未然防止、また、下水処理水や汚泥の再利用にあたり、下水処理水や下水汚泥に含まれる病原性微生物に関する安全性確保が求められている。このため、極微量の病原性微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発や、下水処理過程や環境水中での病原性微生物の挙動を解明することが重要である。

本研究課題では、分子生物学的手法（特に PCR (Polymerase Chain Reaction) 法）により、環境水中・下水中・汚泥中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出する手法について検討した。また、下水処理過程や環境中でのウイルスおよび原虫の挙動を解明することも目的としていた。なお、本研究で研究対策としている病原ウイルスはノロウイルス、原虫はクリプトスポリジウムである。

4.2 リアルタイム PCR 法による病原微生物の検出方法

4.2.1　クリプトスポリジウムの検出方法

近年、PCR により増幅される DNA を蛍光シグナルによりリアルタイムで検出できるようになったことから、試料中の DNA を簡便に定量することが可能となってきた。即ち、既知試料について DNA の対数直線増殖領域の蛍光強度を測定し、ある蛍光強度に到達するサイクル数と初期 DNA 濃度の関係を求めておくことにより、未知試料の PCR を行った場合に、ある蛍光強度に達するまでのサイクル数から、未知試料中の標的 DNA が定量される。本研究では、リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムの定量検出法について検討した。

（１）熱ショック蛋白質遺伝子を標的としたプライマーとプローブの設計

クリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質(Heat Shock Protein)遺伝子の全塩基配列は決定されており、インターネット上で公開されている。このため、クリプトスポリジウムの PCR 検出には熱ショック蛋白質遺伝子を標的とすることとし、プライマーとプローブを設計した。また、PCR 中の DNA の蛍光標識方法として、２本鎖状態のＤＮＡに特異的に結合するサイバーグリーン蛍光試薬を利用する方法（以下サイバーグリーン法）と、PCR により合成された DNA の内部の塩基配列に特異的に結合する蛍光標識を利用する法（以下ハイブリダイゼーションプローブ法）について検討した。

その結果、サイバーグリーン法では、PCR 中にプライマーダイマー（プライマー同士が結合すること）が形成されて検出されたため、定量性に問題があった。

ハイブリダイゼーションプローブ法では特異性が高く標的遺伝子のみを検出することが可能であり、オーシスト数 20 個以上から検出可能となることが明かとなった。

（２）18SrDNA を標的とした Primer と Probe の設計

Heat Shock Protein 遺伝子よりも、高感度検出が可能と考えられる 18S リボソーム RNA 遺伝子（以下では 18SrDNA とする）を標的遺伝子とし、検出感度の向上を目指した。

クリプトスポリジウムの 18SrDNA を Real Time PCR により検出するための Primer と probe は、GeneBank access number AF093489 (Human *Cryptosporidium parvum*)より設計した。設計した Primer と Probe の位置および塩基配列を**図-4.1** に示す。この Primer により増幅される区間の塩基配列を BLAST（相同性検索）検索した結果、*C.parvum* の他に、C.meleagridis、*C.felis* が検出される可能性があった。ヒトに感染性を有する *C.parvum* のみが検出できることが望ましいが、 18SrDNA 領域は、クリプトスポリジウム種間で、配列の異なる部位が少なく、*C*.parvum のみを検出できる Primer および Probe を設計することは困難であった。

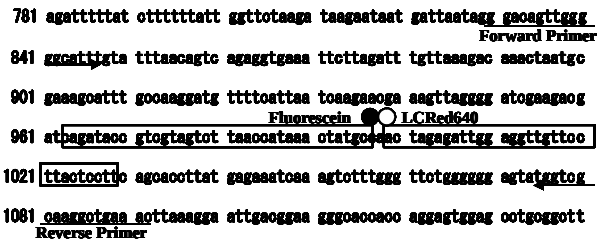


図-4.1　Cryptosporidium 18SrDNA 検出用の Primer 及び Probe の位置

GeneBank-Access number AF093489,Human Cryptosporidium parvum より設計、増幅領域 DNA サイズ:263bp

クリプトスポリジウムオーシストの個数と Real Time PCR での検出限界を明らかにするため、クリプトスポリジウムオーシスト（HNJ-1 株）の 87 個, 29 個, 8.7 個, 2.9 個, 0.87 個, 0.29 個, 0 個の 6 段階の希釈系列を作成し、Real Time PCR 適用により、検出限界と定量限界を明らかにした。次に、下水試料への Real Time PCR の適用性を検討した。なお、試料は、フィルター濃縮の後に免疫磁気ビーズによりオーシストを精製し、DNA 抽出を行った。

なお、本実験での Real Time PCR 法によるオーシストの検出は、Hybridization Probe 法により行い、反応試薬には、QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen)を使用した。

図-4.2 は、クリプトスポリジウムオーシストの 0～87 個の希釈系列試料の Real Time PCR 結果である。図よりオーシスト数 0.87 個以上から、蛍光強度が増加していることがわかる。**図-4.3** は、オーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するまでに要するサイクル数の関係で整理したものであり、良好な相関関係が認められた。

Heat Shock Protein を標的とした Real Time PCR では、オーシスト数 20 個が検出限界であったが、標的遺伝子を 18SrDNA に変更することにより、検出限界を約 1 個まで低下することが可能となった。

図-4.4 は、実流入下水中の *Cryptosporidium* オーシストを Real Time PCR により定量検出した結果と顕微鏡観察による定量検出結果の関係である。オーシストが顕微鏡観察で 2 個以上検出できるレベルであれば、Real Time PCR でも *Cryptosporidium* DNA が検出できることがわかる。

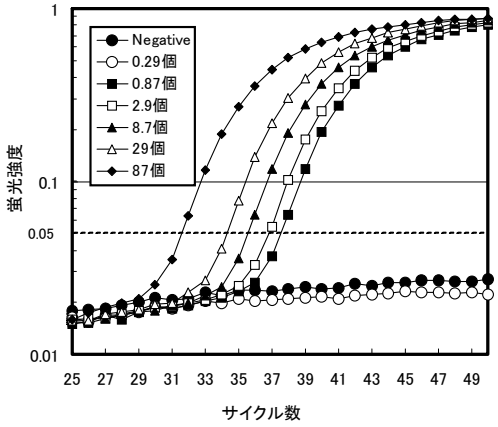


図-4.2　Cryptosporidium オーシストの Real Time PCR 結果

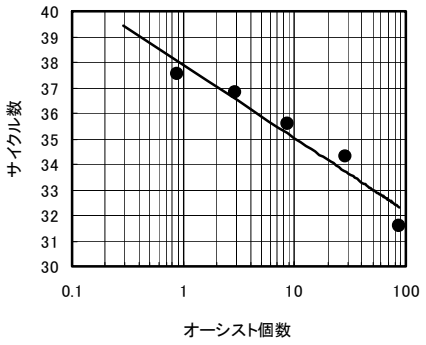


図-4.3 オーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するに要するサイクル数の関係

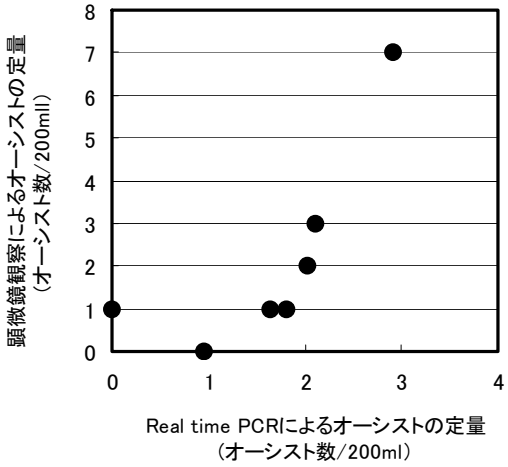


図-4.4　Real Time PCR によるオーシストの定量と顕微鏡観察による定量の関係

Real Time PCR は、顕微鏡観察と同等のレベルまで *Cryptosporidium* を検出することが可能であり、しかも、1 時間程度で 32 サンプル（LightCycler の場合）の同時定量検出が可能であるため、有効な手法であると考えられる。

（3）流入下水からのオーシスト回収率の向上方法

リアルタイム PCR 法によるオーシストの測定感度は 1 オーシストであるが、試料中のオーシストを測定する場合には濃縮・回収・精製プロセスが必要であるため、実際に含まれる個数に対する測定個数は低くカウントされる。これら回収割合を把握するための回収率試験結果では、流入下水試料 20%、処理水 20～50%、ミリ Q 水 40～70%程度と特に流入下水では低レベルであった。このため検出感度の向上を目的に測定試料の前処理法を見直し、回収率改善のための検討を行った。

従来の測定法では、夾雑物などが超音波剥離やビーズによる精製に悪影響を及ぼしている可能性が推

定された。このため、夾雑物の影響を極力回避するため、流入下水の前処理法として100G、200Gの10分間の粗遠心処理を行った。遠心処理後、上澄液をポリカーボネート製メンブランフィルター（公称孔径2μm）でろ過し超音波剥離させ免疫磁気ビーズで分離精製の後、PCR 法により定量を行い回収率を算出した。併せて従来の測定法や顕微鏡観察による定量法によっても回収率試験を行い、その割合を比較して向上率を把握した。

オーシスト回収率の向上検討実験結果を**表-4.1**に示す。従来法は目開きが20μmのふるいで夾雑物を除去するものであるが、その平均回収率は20%程度であった。前処理として100G、200Gの10分間の粗遠心処理を行った流入下水試料では、各々40、33%程度と回収率は従来法と比較して10～20%程度向上し、処理水の回収率とほぼ同等となった。これは、粗遠心処理による夾雑物の除去量がふるいよりも多く、かつ、前処理の遠心力が100Gあるいは200Gと比較的低く、オーシスト自体が沈降せず夾雑物との分離が比較的良好に行えたことによると考えられる。

表-4.1 流入下水からのオーシストの回収率 (%)

前処理法 / 検出法	ふるい（従来法）	遠心処理（100 G）	遠心処理（200 G）
リアルタイムPCR法	26	40	33
顕微鏡における検鏡	33	43	27

4.2.2 ノロウイルスの検出方法

従来、腸管系ウイルスの検出では、細胞培養法が適用されてきたが、細胞培養法で検出ができないノロウイルスについては、電子顕微鏡観察による検出が行なわれていた。しかし、感度が低く、高濃度（10^6個/ml）のノロウイルスが存在しているふん便試料などにしか適用できず、環境水中の低濃度のノロウイルスを検出することはできなかった。このため、リアルタイムPCR法によって、環境水や下水処理水中のノロウイルスを定量する方法について検討した。

（1）下水試料に適したウイルス濃縮・誘出法およびReal Time PCR法によるウイルス定量感度

1）ウイルス濃縮・誘出法

クリプトスポリジウムの測定と同様に、下水中のウイルスは通常、低濃度であることから、検出の前処理として濃縮・誘出操作が必要となる。濃縮法としては膜、凝集剤、超遠心法など、誘出法としては牛肉エキスやグリシン緩衝液、NaOH 溶液などを利用するものがある。

本研究では、モデルウイルスとして Qβ ファージを利用し各種の濃縮・誘出法により回収率を求め、下水試料に適した濃縮・誘出法の提案を目的とした。さらに、ノロウイルス、エンテロウイルスおよびQβファージのクローニングした cDNA を用いて、Real Time PCR 法の定量感度を評価した。

検討を行ったウイルスの濃縮・誘出法を以下に示す。ここでは、ともに一本鎖 RNA を遺伝子として持ち、形態や大きさなどがノロウイルスと類似したQβファージをモデルウイルスとして実験に用いた。また、ファージの定量法は大腸菌 K12F$^+$株を宿主菌としたプラック法とした。

①セルロース濃縮・凝集法

試料水 20 *l* に対し DEAEーセルロース、アニオン系高分子凝集剤を各々10m*l* 添加、撹拌混合し DEAEーセルロースを凝集させた。凝集処理した試料を不織布バックでろ過して DEAEーセルロースを回収し、pH9.5 の牛肉エキス溶液（10mL）でウイルスを誘出させ、この誘出液をメンブランフィルターでろ過した後、pH7.0 に補正しウイルス濃縮液とした。

②陽電荷膜法

試料水に塩酸を添加し pH3.5 に調整した後、$AlCl_3$溶液（終濃度0.05mM）を添加しウイルス凝集塊を形成させた。これを陽電荷膜に通水させウイルスを捕捉させた後、pH11.5 のグリシン緩衝液（10mL)でウイルスを誘出させた。この誘出液をメンブランフィルターー(孔径 0.2μm)でろ過した後、pH7.0 に補正しウイルス濃縮液とした。

③陰電荷膜法[53)]

試料水に$MgCl_2$を添加（終濃度 2.5mM）した後、陰電荷膜（HA 膜）に通水させウイルスを捕捉させた後、pH10.5 の水酸化ナトリウム溶液（10mL)でウイルスを誘出させた。この誘出液をメンブランフィルター(孔径 0.2μm)でろ過した後、pH7.0 に補正しウイルス濃縮液とした。

④超遠心法

試料水を粗遠心処理（3,000×*g*, 20 分間）して上澄液を回収、この上澄液を 30%ショ糖溶液を入れた遠心管に重層し、超遠心処理（160,000×*g*, 2 時間）を行い沈査を回収した。この沈査を RNase-Free 水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。

⑤ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法

試料水に PEG＃6000(終濃度 8%)および NaCl(終濃度 0.4M)を添加撹拌し完全に溶解させた。４℃で一夜静置した後、遠心処理(10,000×*g*, 30 分間)を行い沈査を回収した。この沈査を RNase-Free 水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。

Real Time PCR 法によるウイルスの定量感度の評価では、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Kit(QIAGEN 社)を用いたグアニジン法によりウイルスＲＮＡを抽出し、RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN 社)でウイルス RNA を精製した。抽出したウイルス RNA 試料 1μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社)を用いた逆転写反応により cDNA を作製し 2.5μl を Real Time PCR に供した。Real Time PCR は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社)を用いて行った。

セルロース吸着・凝集法によるファージの回収率は、砂ろ過水で約 100%、二次処理水で約 60%であったが、ファージを添加した場合に二次処理水、砂ろ過水とも回収率が５%程度に低下した。これは、添加したファージの量に対してセルロース担体量が少なかったためであると推定される。このため、高濃度のウイルスが含まれる試料に対しては、最適なセルロース担体の添加量を検討する必要がある。

他の方法である陽電荷膜法、陰電荷膜法、超遠心処理法、PEG(ポリエチレングリコール)沈殿法によるファージの回収率を**表-4.2** に示す。陽電荷膜、陰電荷膜法では、ファージの回収率は非常に低い結果となった。データは示していないが各々の電荷膜への吸着率は 95%以上であり、膜に吸着したファージの大部分が誘出されていないため回収率が低いものと考えられた。陰電荷膜法では、酸洗浄、アルカリ誘出を行っているが、これらの工程によりファージの感染能力が低下し回収率が低くなっていることも予想される。このため、誘出液中のファージについてリアルタイム PCR 法により定量を行ったが、プラーク法と同程度の濃度であった。一方、同様な手法によるウイルスの回収率は 60%程度であるとの報告[53] もあり、誘出操作を含めこの原因を究明する必要があると考えられた。

PEG 沈殿法では、超遠心法に比較して全体的に若干高い回収率が得られた。これはポリエチレングリコールを添加することで、より低い遠心力で効率良くファージを回収できることを示している。

表-4.2　各種濃縮法によるQβファージの回収率

濃縮法	回収率(%)		
	流入下水	2次処理水	3次処理水
陽電荷膜法	0.68	2.3	13
陰電荷膜法	5.5	1.7	0.6
超遠心法	59	30	20
PEG沈殿法	58	36	38

超遠心法では、試料中の懸濁物量の増加に伴いファージの回収率が向上する傾向が見られることから、懸濁物とウイルスの共沈作用が影響しているものと考えられる。

２）定量感度

リアルタイム PCR 法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルス G1 型[54] G2 型[54]、エンテロウイルス[55] および Qβ ファージについて各々の高度保存領域をクローニングしたコントロール cDNA を作製し、TaqMan プローブを用いて、その希釈系列に対してリアルタイム PCR を行った。

ノロウイルス G2 型のみの結果について示すが、**図-4.5** は各希釈系列について PCR サイクル数に対する蛍光強度、**図-4.6** は各希釈系列について蛍光強度が指数的に増加し始めるサイクル数と希釈濃度の対数値に対してプロットし得た検量線である。ノロウイルス（G1、G2）型、エンテロウイルス、Qβ フ

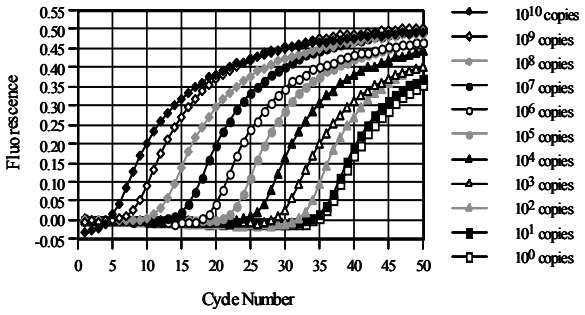


図-4.5　ﾘｱﾙﾀｲﾑ PCR 法における当初ﾉﾛｳｲﾙｽｺﾋﾟｰ数ごとのサイクル数と増幅程度の関係

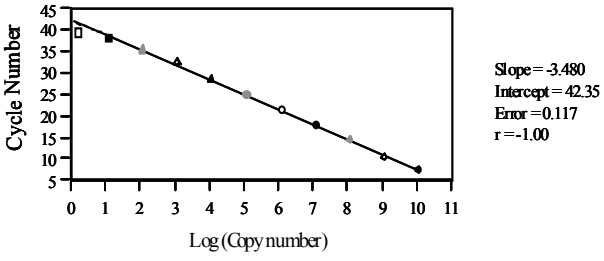


図-4.6 各希釈系列と PCR サイクル数の関係

ァージともに５～10^{10}コピーの間で蛍光強度と相関性があり、この範囲で定量測定が可能であると推定された。また、この反応系における PCR の増幅効率は 93.8%であった。

（２）ウイルス濃縮法の最適化

比較的高い回収率が得られる、セルロース・吸着凝集法およびポリエチレングリコール法について濃縮法の最適化を検討した。

実下水処理場の流入下水、二次処理水および三次処理水（嫌気－無酸素－好気法と凝集剤添加活性汚泥法の処理水を混合して急速ろ過を行ったもの）に対して既知量のファージ Qβ を添加して、各濃縮法によりウイルスを回収し、ウイルス濃縮液とした。得られた濃縮液に含まれる Qβ 数はプラック法およびリアルタイム PCR 法によって測定し、回収率を算出した。

試料水にファージ Qβ を添加して、セルロース吸着・凝集法によりウイルス濃縮を行った結果、ファージ添加量の増加に従い、回収率が 60～100%から 5%程度に低下した。

その原因として、ファージ Qβ 添加量(10^6 PFU 以上)に対してセルロース担体量が少なかったためであると考え、セルロース担体量を 0.5g から 1g に増加して回収試験を行ったが、回収率は低下した。ウイルス誘出液 10 ml に対して担体が過剰になり、誘出効率が低下したためと考えられる。

誘出時間を増加することで誘出効率が上がることを予想し、ファージ誘出時間を増加したが、プラック法で測定した場合の回収率は低下した。リアルタイム PCR 法で測定した場合の回収率は一定であったことから、pH 9.5 の誘出液に長時間曝露されたことによりウイルス感染力が低下したことが原因と考えられる。

以上の結果より、セルロース吸着・凝集法はファージ量 10^5 PFU 以下の濃度の低い試料水にのみ適していると考えられる。

一方、ポリエチレングリコール沈殿法によるウイルス回収率評価では、流入下水、200mL、2 次処理水、3 次処理水 1L に対して、10^4、10^6、10^{10} PFU のファージをそれぞれ添加し評価を行ったが、すべてにおいて 60 %前後の高い回収率を示した。

（３）低濃度試料に対応したウイルス測定法

下水中のウイルスは処理過程の進行や河川水などへの放流により希釈され低濃度となるため、その測定値にバラツキが生ずる可能性がある。特に抽出遺伝子の逆転写効率は、安定した測定値を得る上で重要な測定プロセスの１つと考えられる。

このため、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにして信頼性の評価を行うとともに、抽出遺伝子の逆転写効率の向上手法を検討した。

１）方法

検出限界の検討では、陰性コントロール（水、すなわちノロウイルス 0 コピー）を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定（20 重）を行った。

定量限界の検討では、2、5、10、20 コピー/リアルタイム PCR 反応液のノロウイルス G1 型および G2 型遺伝子（DNA）を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定（18 重）を行い、相対標準偏差（RSD）を調べた。

使用したノロウイルス遺伝子は、260 nm の吸光度を測定し、次式から濃度を算出した。

ノロウイルス遺伝子濃度（コピー数/μl）=[260 nm の吸光度]×50×10^{-9}×6.02×10^{23}/ノロウイルス遺伝子の塩基数/660　　・・・・・　（式 4.2-1）

＊今回使用したノロウイルス遺伝子の塩基数は、ノロウイルス G1 型：85 塩基、ノロウイルス G2 型：98 塩基である。

さらに、抽出遺伝子の逆転写効率向上のため、同一試料を用いてプライマーの種類および濃度の違いによる逆転写反応の効率を評価した。さらに、逆転写反応に関与する逆転写酵素の反応効率を向上させるため、反応基質として添加する抽出遺伝子濃度の最適化を検討した。

２）検討結果

検出限界値の検討結果を**表-4.3** に示す。検出限界値は下水試験方法[56]を参照して、以下の式から算出した。

$x_L = x_b + k\sigma_B$　（k=3）　　・・・・・　（式 4.2-2）

検出限界値 x_L、平均値 x_b、標準偏差 σ_B

測定結果から得られた平均値、標準偏差を上の式に代入し、ノロウイルス G1 型の検出限界値：2.63 コピー/リアルタイム PCR 反応液、ノロウイルス G2 型の検出限界値：2.46 コピー/リアルタイム PCR 反応液、が得られた。

表-4.3 陰性コントロール(0 コピー)の多重測定結果 (n=20)

使用したﾌﾟﾗｲﾏｰ及びﾌﾟﾛｰﾌﾞ	測定値平均（コピー）[ ]内は測定値の範囲	標本標準偏差
ノロウイルスG1型検出用	0.375 [0 – 2.607]	0.75
ノロウイルスG2型検出用	0.595 [0 – 2.148]	0.62

次に、定量限界値の検討結果を**表-4.4** に示す。ノロウイルス G1 型および G2 型とも 10 コピーの場合に最小の RSD 値(29%)を示すことを明らかになった。定量的評価では 10 コピー以上の濃度が必要であると考えられた。

プライマーの種類および濃度の違いによる逆転写反応の効率を評価した結果を**表-4.5** に示す。

表-4.4 リアルタイム PCR によるノロウイルス遺伝子測定の RSD (n=18)

使用したﾌﾟﾗｲﾏｰ及びﾌﾟﾛｰﾌﾞ	ﾉﾛｳｲﾙｽ遺伝子ｺﾋﾟｰ数（ｺﾋﾟｰ/ﾘｱﾙﾀｲﾑPCR反応液）	RSD(%)
ノロウイルスGI型検出用	2	107
	5	68
	10	29
ノロウイルスGII型検出用	2	63
	5	42
	10	29

表-4.5 逆転写反応に及ぼすプライマーの影響

逆転写反応に使用したﾌﾟﾗｲﾏｰ	ﾉﾛｳｲﾙｽ濃度（ｺﾋﾟｰ/L）
ﾗﾝﾀﾞﾑﾌﾟﾗｲﾏｰ(ﾍｷｻﾏｰ)（終濃度 1 μM）(従来法)	1.48×10^{2}
ﾗﾝﾀﾞﾑﾌﾟﾗｲﾏｰ(ﾍｷｻﾏｰ)（終濃度 10 μM）	3.30×10^{2}
ﾗﾝﾀﾞﾑﾌﾟﾗｲﾏｰ(ﾉﾅﾏｰ)（終濃度 10 μM）	2.90×10^{2}
ｵﾘｺﾞdTﾌﾟﾗｲﾏｰ（終濃度 1 μM）	2.30×10^{1}
ﾗﾝﾀﾞﾑﾌﾟﾗｲﾏｰ(ﾍｷｻﾏｰ)（終濃度 10 μM）＋ｵﾘｺﾞdTﾌﾟﾗｲﾏｰ（終濃度 1 μM）	3.47×10^{1}
ﾗﾝﾀﾞﾑﾌﾟﾗｲﾏｰ(ﾉﾅﾏｰ)（終濃度 10 μM）＋ｵﾘｺﾞdTﾌﾟﾗｲﾏｰ（終濃度 1 μM）	8.83×10^{0}

従来法に比べて、ランダムプライマー(ヘキサマー)を 10 倍量（終濃度 10μM）添加して逆転写反応を行った場合、従来法より検出感度は約 2.2 倍向上した。またランダムプライマー(ノナマー)を終濃度 10μM 添加して逆転写反応を行った場合も、従来法より検出感度は約 2 倍向上した。これは、添加量が多いほどランダムプライマーが抽出遺伝子と効率よく結合して逆転写反応を開始できるためであると考えられる。

一方、オリゴ dT プライマー(終濃度 1μM)を使用した場合は、従来法の 16%程度のウイルス量しか検出できなかった。

以上の結果から、終濃度 10μM のランダムヘキサマーを逆転写反応に用いることで反応効率を向上させ、検出感度を高めることができた。

次に、逆転写酵素の反応基質となる抽出遺伝子濃度の最適化を検討した結果を**図-4.7** に示す。抽出遺伝子濃度の増加に伴い逆転写効率が向上し、抽出遺伝子濃度 0.5μg で逆転写効率が最大となり、従来法の 1.0μg では逆転写効率が低下した。一般に酵素反応においては基質濃度の増加とともに反応速度が増加するが、基質濃度が過剰になると反応速度は平衡に達し減少する。逆転写反応も逆転写酵素による酵素反応であるため、同様の傾向を示した。

以上の結果から、添加する抽出遺伝子の最適濃度を0.5μgとすることで検出感度を約4.3倍に向上させられることが明らかになった。

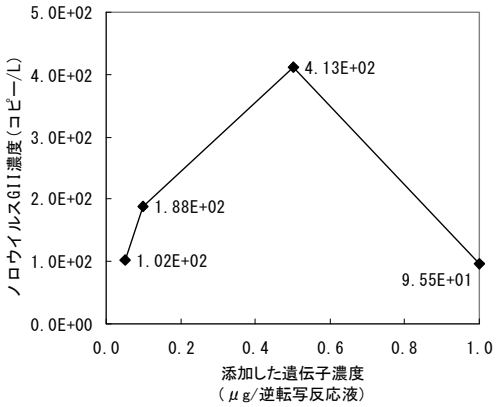


図-4.7 逆転写反応に及ぼす鋳型遺伝子濃度の影響

4.3 下水処理過程でのノロウイルスの挙動

細胞培養法で検出ができないノロウイルスについては、環境水中での存在実態などの知見がなく、また、下水処理場への流入実態やその除去率など未解明な部分が多い。

このため、下水処理過程での消長と実態を明らかにすることを目的に、リアルタイム PCR 法を適用して、流入下水、二次処理水、三次処理水中の Norovirus G1 型、Norovirus G2 型の定量的検出を 2004 年 6 月

に行った。ウイルスの濃縮はポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によった。

下水試料中のウイルスの定量結果を**表-4.6**に示す。流入下水中にノロウイルス濃度が 10^2 コピー/L 程度検出されたが、二次処理水以降にはウイルスは検出されなかった。

表-4.6　A 下水処理場のウイルス量

採水月	試料	ノロウイルス量（コピー/L）	
		G1 型	G2 型
2004 年 6 月	流入下水	3.2×10^1	3.3×10^2
	2 次処理水	ND	ND
	3 次処理水	ND	ND

ND：検出限界（ 5 コピー/ L）以下

4.4　環境中での病原性原虫の感染性消失効果の評価

環境水中でクリプトスポリジウムオーシストがどの程度の期間感染能力を有しているかを明らかにすることは、クリプトスポリジウムの感染リスクを評価する上で重要となる。Fayer らは、クリプトスポリジウムオーシストの感染性は 10℃の海水中では 3 ヶ月以上[57]、10℃の水中では 5 ヶ月以上[58]、保持されることを報告している。

ここでは、日本における平均的な水温における海水、河川水、水道水中でのクリプトスポリジウムオーシストの感染能力の消長について検討した。

（1）マウス幹線試験によるクリプトスポリジウムの感染性の消長評価

図-4.8に示すオーシスト保存装置（細胞培養用マイクロプレートを代用）を用いて実験を行った。オーシストの保存液は、実海水、実河川水、水道水とし、マイクロプレートは、20℃のインキュベーター内に保存した。水道水は、1～3 日、海水、河川水は 1 週間に 1 回交換した。

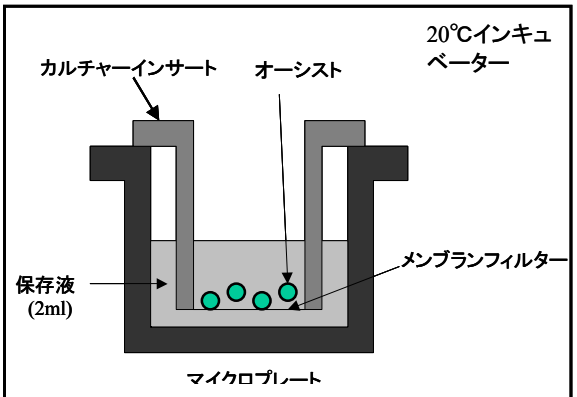


図-4.8　オーシストの保存装置

1 ヶ月経過後、カルチャーインサート内からオーシストを回収し、乳のみマウス感染試験を行った。感染試験の結果を**表-4.7**に示す。

20℃の水道水、海水、河川水中に 1 ヶ月間保存した後でも、クリプトスポリジウム オーシストは、感染能力を有していた。腸管から回収されるオーシスト数およびマウス感染確率は、海水が最も小さく、次いで水道水、河川水の順であった。よって、クリプトスポリジウムオーシストの感染性低下に対する影響は、海水、水道水、河川水の順に強いものと考えられる。

（2）細胞培養法によるクリプトスポリジウム感染能力の把握

マウスによる感染試験については、維持管理、操作性、費用、倫理面などの観点から問題があり、これに代わる方法として、細胞培養法による評価手法が注目されている。このため、細胞培養法によりオーシストの感染能力を測定するため、顕微鏡観察および ELISA 法の適用性について評価を行った。

表-4.7 乳のみマウス感染試験の結果

保存環境	乳のみマウス番号	腸管から回収されたオーシスト数	腸管オーシストの平均値と感染確率
水道水	1	46000	46280
	2	2400	
	3	43000	
	4	140000	4/5
	5	0	
海水	1	400	17700
	2	85000	
	3	0	
	4	3100	3/5
	5	0	
河川水	1	7800	95360
	2	100000	
	3	290000	
	4	63000	5/5
	5	16000	
コントロール	1	97000	103500
	2	110000	
	3	食殺*	
	4	食殺*	
	5	食殺*	

* 親マウスが子マウスを殺してしまうこと。

細胞培養法にはヒト回盲腸管由来細胞の HCT-8 株を用いた。感染方法は、細胞から維持培地を取り除いた後、新たに維持培地を加え、オーシストを細胞表面に添加して接着させる方法とした。これを 37℃、５％炭酸ガスの CO_2 インキュベーター内に静置して、２時

間接着後に PBS で表面を洗浄し、接着しなかったオーシストを除去した。　感染後は、再度細胞維持培地を添加して 37℃、5％炭酸ガスの CO_2 インキュベーター内で 48 時間まで培養を行った。

培養後の感染能力の測定は、顕微鏡観察、および、固定した細胞を免疫染色しプレートリーダーで吸光度を測定する ELISA 法によった。

細胞培養法による顕微鏡観察結果を**図-4.9** に示す。細胞に２時間感染させ洗浄を行った後に細胞表面に残存した平均オーシスト数は、10 視野あたり平均 210 個程度であった。培養時間の経過とともに観察されるオーシスト数は減少し、24 時間後では平均で７個となった。これは、オーシスト内のスポロゾイトが細胞に侵入することで、細胞表面に存在していたオーシストが減少したものと推定される。しかし、48 時間後には平均で 58 個のオーシストが観察されており、細胞内で生活環を進行させた新たなオーシストが細胞表面に出現したものと考えられた。マウスによる感染試験と比較すれば、短期間で感染能力の把握が行える可能性があると考えられる。

ELISA 法での測定では、全てのケースで吸光度の増加が認められたことから、組織培養法による ELISA 法によっても感染能力を測定できると考えられるが、オーシスト接種量と吸光度との関係は、かならずしも比例関係ではないことから、今後のさらなる検討が必要である。

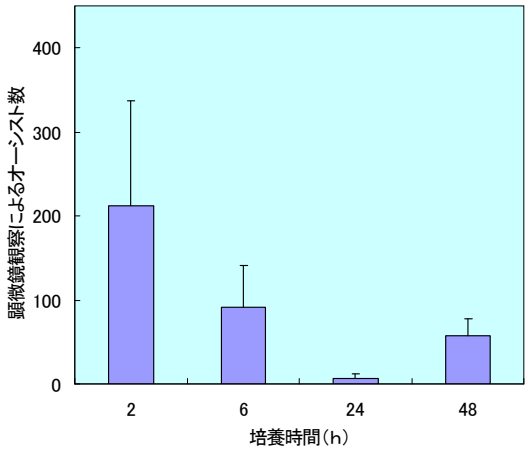


図-4.9　培養時間経過によるオーシスト数の推移

（３）生存クリプトスポリジウムの mRNA による検出方法

生きているクリプトスポリジウムの検出は、mRNA を標的とすることにより可能と考えられている[59]。そこで、リアルタイム PCR 法によってクリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子の mRNA の検出を試みた。

50％のキッチンハイター（主成分は次亜塩素酸ナトリウム）中に一晩（約 15 時間）と 65℃で 30 分間不活化処理を施したオーシストと、さらに、対照として不活化処理を施していないオーシストを準備し、45℃20 分間の条件で mRNA を誘導発現した後、リアルタイム PCR 法による測定を行った。

図-4.10 および**表-4.8** は、塩素と加熱による不活化処理を施したオーシストおよび不活化処理を施していないオーシストをリアルタイム PCR により検出した結果である。図および表より RNA を抽出した試料を DNase 処理し、リアルタイム PCR を行うことにより生きているオーシストを検出することが可能であった。

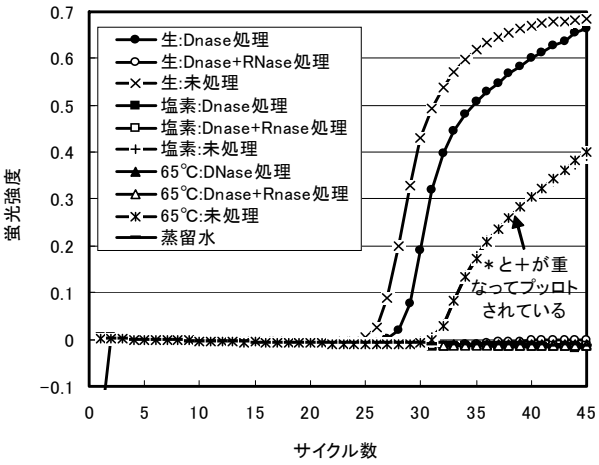


図-4.10　不活化処理を施したクリプトスポリジウムのリアルタイム PCR 検出結果

表-4.8　不活化処理を施したオーシスト RT-PCR および PCR 検出結果

	不活化処理方法	DNase	DNase+RNase	未処理
	不活化処理なし	＋	－	＋
RT-PCR	塩素処理（50%のｷｯﾁﾝﾊｲﾀｰ中で一晩）	－	－	＋
	65℃で30分間加熱	－	－	＋
	不活化処理なし	－	－	＋
PCR	塩素処理（50%のｷｯﾁﾝﾊｲﾀｰ中で一晩）	－	－	＋
	65℃で30分間加熱	－	－	＋

4.5　まとめ

分子生物学的手法（特に、リアルタイム PCR 法）を活用し、病原性原虫およびウイルスの迅速・高感度検出法、下水処理過程でのウイルスの挙動、環境中での病原性原虫の感染性消失効果について検討を行い、以下の結果を得た。

１）18S リボソーム DNA 遺伝子を標的としたプロ

ーブ、プライマーを適用することで、オーシスト数 1 個相当から定量検出可能とすることが可能となった。また、リアルタイム PCR 法は顕微鏡観察と比較して、高濃度域においても同程度の検出感度であることが明らかとなった。

2）流入下水からのオーシスト回収において、試料の前処理法として粗遠心処理を行うことで回収率を向上させることができた。

3）リアルタイム PCR 法によるノロウイルスの検出において、各種の濃縮・誘出法を検討し、流入下水では超遠心処理法やポリエチレングリコール沈殿法、二次処理水等ではセルロース吸着・凝集法を適用することで高回収率が得られることを明らかにした。また、ノロウイルスの検出・定量限界値を求め、安定した測定値を得るために必要な遺伝子量を求めた。さらに、適用プライマーとその添加濃度、さらに抽出遺伝子濃度の違いによる逆転写効率を評価し、最適条件を確立した。以上により、リアルタイム PCR 法によるウイルス検出感度を高めることができた。

4）細胞培養法による顕微鏡観察および ELISA 法によって、クリプトスポリジウムの感染能力判定が可能であること、また、mRNA を標的としたリアルタイム PCR 法により、生存クリプトスポリジウムの検出が可能であることを示したが、手法の詳細については、さらなる検討が必要である。

５．結論

「水環境における水質リスク評価に関する重点プロジェクト研究」において、内分泌かく乱化学物質，ダイオキシン類および病原微生物を対象として、水環境における汚染実態を明らかにするための手法開発，水環境等における存在実態の解明、水生生物等に対する影響評価，影響を軽減するための対策手法の開発や評価について，研究を行った。

以下に、本研究で得られた成果の概要を示す。

（１）内分泌かく乱化学物質について

１）エストロゲン分析に関し、前処理方法の簡易化手法を提案するとともに、ELISA 法の精度向上のための前処理法を開発した。また、下水二次処理水に適用可能な LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体分析法を開発した。

さらに、下水中エストロゲン様物質の極性分画により、エストロゲン様活性の由来が 17β-エストラジオール（E2)、エストロン（E1)、ノニルフェノール（NP）によりほぼ説明できることを明らかにした。

２）全国の河川および下水処理場におけるエストロゲン様活性とエストロゲン濃度の実態調査を行い、河川水や下水処理水のエストロゲン様活性がほぼエストロン濃度で説明できること、および、下水処理水のエストロゲン様活性が河川水のそれよりオーダーが高いことを明らかにした。

３）都市流域およびそこを流下する河川での水質・底生生物の実態調査を行い、、下水道未整備区域からの内分泌かく乱化学物質の負荷が大きいこと、河道内における内分泌かく乱化学物質の分解あるいは変化の割合は小さいこと，底生生物への食物網を通じた蓄積は小さいことを明らかにした。

また、湖沼・貯水池における水質・底質調査を行い、湖沼底質への蓄積は流入河川河口地点で最も高く流下方向に低下すること、ノニルフェノールではその傾向が異なること、底泥の深さ方向蓄積は、流域人口や下水道整備状況などの流域条件の経年的変化を表していることを明らかにするとともに、貯水池における E2 分解には底泥中に生息する微生物の作用が大きく、その分解速度は、好気・嫌気条件や水温、底泥位置の影響を受けることを明らかにした。

４）下水処理場やパイロットプラントにおける調査・実験を行い、流入下水、二次処理水中のエストロゲン抱合体の濃度は、遊離体の濃度に比べ数倍から 100 倍程度高いこと、硝化抑制のため曝気量を制限したプロセスにおいて遊離エストロゲンが増加すること、活性汚泥によるエストロンの分解は溶存酸素濃度の影響を受けることを明らかにした。

さらに、ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）は、活性汚泥処理により短鎖化が進み、EO付加モル数1～4のNPnEOおよびNPが汚泥中に蓄積することを明らかにした。

５）エストロゲン純物質を用いたメダカ曝露実験により、雄ヒメダカに卵黄蛋白前駆物質生成を引き起こすエストロゲン濃度を明らかにした。また、メダカの河川水および下水処理水曝露実験を行い、エストロゲン様活性が 10ngE2/L を越えた場合に、雄メダカに卵黄蛋白前駆物質が生成されることを明らかにした。

（２）ダイオキシン類について

河川底質中のダイオキシンについて、ELISA 法等の簡易分析法適用の検討を行い、さらなる精製法が必要等の評価を行った。また、底質中からの抽出方法に関する検討を行い、高速溶媒抽出法が有効であることを明らかにした。

また、河川底質の対策工事に関する検討を行い、対策工事に伴うダイオキシン類の拡散は SS を代替指標としてモニタリングすることが可能であること、覆砂は懸濁態ダイオキシン類の移行を低減する効果があることを明らかにした。

（３）病原微生物について

分子生物学的手法によるクリプトスポリジウムの定量検出手法について検討を行い、クリプトスポリジウムの 18S リボソーム DNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法による定量検出技術を開発した。

同様に、ノロウイルスの検出手法の検討を行い、リアルタイム PCR 法で定量検出するための濃縮方法や分析条件の最適化を行った。

５．結論

「水環境における水質リスク評価に関する重点プロジェクト研究」において、内分泌かく乱化学物質，ダイオキシン類および病原微生物を対象として、水環境における汚染実態を明らかにするための手法開発，水環境等における存在実態の解明、水生生物等に対する影響評価，影響を軽減するための対策手法の開発や評価について，研究を行った。

以下に、本研究で得られた成果の概要を示す。

（１）内分泌かく乱化学物質について

１）エストロゲン分析に関し、前処理方法の簡易化手法を提案するとともに、ELISA 法の精度向上のための前処理法を開発した。また、下水二次処理水に適用可能な LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体分析法を開発した。

さらに、下水中エストロゲン様物質の極性分画により、エストロゲン様活性の由来が 17β-エストラジオール（E2）、エストロン（E1）、ノニルフェノール（NP）によりほぼ説明できることを明らかにした。

２）全国の河川および下水処理場におけるエストロゲン様活性とエストロゲン濃度の実態調査を行い、河川水や下水処理水のエストロゲン様活性がほぼエストロン濃度で説明できること、および、下水処理水のエストロゲン様活性が河川水のそれよりオーダーが高いことを明らかにした。

３）都市流域およびそこを流下する河川での水質・底生生物の実態調査を行い、、下水道未整備区域からの内分泌かく乱化学物質の負荷が大きいこと、河道内における内分泌かく乱化学物質の分解あるいは変化の割合は小さいこと，底生生物への食物網を通じた蓄積は小さいことを明らかにした。

また、湖沼・貯水池における水質・底質調査を行い、湖沼底質への蓄積は流入河川河口地点で最も高く流下方向に低下すること、ノニルフェノールではその傾向が異なること、底泥の深さ方向蓄積は、流域人口や下水道整備状況などの流域条件の経年的変化を表していることを明らかにするとともに、貯水池における E2 分解には底泥中に生息する微生物の作用が大きく、その分解速度は、好気・嫌気条件や水温、底泥位置の影響を受けることを明らかにした。

４）下水処理場やパイロットプラントにおける調査・実験を行い、流入下水、二次処理水中のエストロゲン抱合体の濃度は、遊離体の濃度に比べ数倍から 100 倍程度高いこと、硝化抑制のため曝気量を制限したプロセスにおいて遊離エストロゲンが増加すること、活性汚泥によるエストロンの分解は溶存酸素濃度の影響を受けることを明らかにした。

さらに、ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）は、活性汚泥処理により短鎖化が進み、EO付加モル数1～4のNPnEOおよびNPが汚泥中に蓄積することを明らかにした。

５）エストロゲン純物質を用いたメダカ曝露実験により、雄ヒメダカに卵黄蛋白前駆物質生成を引き起こすエストロゲン濃度を明らかにした。また、メダカの河川水および下水処理水曝露実験を行い、エストロゲン様活性が 10ngE2/L を越えた場合に、雄メダカに卵黄蛋白前駆物質が生成されることを明らかにした。

（２）ダイオキシン類について

河川底質中のダイオキシンについて、ELISA 法等の簡易分析法適用の検討を行い、さらなる精製法が必要等の評価を行った。また、底質中からの抽出方法に関する検討を行い、高速溶媒抽出法が有効であることを明らかにした。

また、河川底質の対策工事に関する検討を行い、対策工事に伴うダイオキシン類の拡散は SS を代替指標としてモニタリングすることが可能であること、覆砂は懸濁態ダイオキシン類の移行を低減する効果があることを明らかにした。

（３）病原微生物について

分子生物学的手法によるクリプトスポリジウムの定量検出手法について検討を行い、クリプトスポリジウムの 18S リボソーム DNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法による定量検出技術を開発した。

同様に、ノロウイルスの検出手法の検討を行い、リアルタイム PCR 法で定量検出するための濃縮方法や分析条件の最適化を行った。

［参考文献］

1) 田中宏明、岡安祐司：「ELISA法の水環境でのエストロゲン測定への利用」、免疫化学測定法研究会第６回（2001年）学術集会講演要旨集、pp.25-26、2001.6

2) Tanaka, H. et al. (2001). Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay And from Chemical analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, Water Science & Technology, Vol.43, No.2, ppl25-132, IWA.

3） 社団法人日本下水道協会：「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」, pp.250-262，2002

4） 八十島誠，小森行也，田中宏明：「下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析」，第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集，p.256，2002

5） 小森行也，八十島誠，田中宏明他：「LC/MS/MS によるエストロゲンの分析」，第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集，p.431，2002

6) Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M, “4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa.”, Chemosphere 41, pp.757-762., 2000

7) Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M, “Evaluation of 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments.”, Water Reseach 35(7), pp.1786-1792. 2001

8) Rice et.al, “Alkylphenol and Alkylphenol- Ethoxylates in carp, Water, and Sediments from the Cuyahoga River, Ohaio.” Environ.Sci. Technol.(37) , pp.3747-3754, 2003

9) Ahel M, McEvoy J, Giger W., “Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms.” Environmental Pllution 79(3), pp.243-248, 1993

10) Takahashi, A.; Higashitani, T.; Yakou Y.; Tanaka H., “Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Periphytons and Benthos in the Tama River”, CD-ROM of Proceedings of 3rd IWA World Water Congress E21209a, 2002

11) 小林節子　他：内部生産からみた印旛沼，手賀沼のＣＯＤ，窒素，りんの水質特性，千葉県水質保全研究所，水保研資料 No.51, pp. 87, 1989.

12) 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

13) 国土交通省，河川局　平成 13 年度水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査結果，2002.125）

14) John, D.M. & White, G.F.: Mechanism for Biotransformation of Nonylphenol Poly- ethoxylates to Xenoestrogens in Pseudomonas putida, *Journal of Bacteriology*, Sept. pp. 4332-4338, 1998.

15) Ahel, M. et al.: Aerobic Transformation of Short-Chain Alkylphenol Polyethoxylates by Mixed Bacterial Cultures, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, pp. 540-548, 1994.

16) Quiroga, J.M. et al.: Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate (NPEO) in River Water, Proc. *4th World Surfactant Congress*, pp. 417-425, 1996.

17) 藤井克彦　他：ノニルフェノール分解微生物，*Journal of Tokyo University of Fisheries*, 87, pp.1-12, 2001.

18) 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、1999

19) A.C.Johnson et al., Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from effluent, The Science of the Total Environment, 256, pp.163-173, 2000

20) 小森行也 他,LC/MS による下水試料中の 17β-ｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙの分析, 第９回環境化学討論会講演要旨集, pp.346-347, 2000

21) C.Desbrow et al., Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, Environmental science and Technology, Vol.32, No.11, pp.1549-1557, 1998

22) A.C. Belfroid et al., Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands, The Science of the Total Environment, 225, pp.101-108, 1999

23) 鳥貝真 他,GC/MS による下水処理場放流水及び河川水中のｴｽﾄﾛｹﾞﾝの分析, 環境化学, Vol.10, No.3, pp.595-600, 2000

24) Ching-Hua Huang et al., Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol.20, No.1, pp.133-139, 2001

25)T. A. Ternes, P. Kreckel, J. Mueller：Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants –II. Aerobic batch experiments with activated sludge, The Science of the Total Environment, 225, pp.91-99, 1999

26)辻村和也、田嶋晴彦、LC/MS/MS による環境中エストラジオール及び類縁物質の同時分析法の開発、第 9 回環境化学討論会講演要旨集、2000.6

27)石井善昭、沖田智、尹順子、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、2002.6

28)松井三郎、足立淳、松田知成、滝上英孝、清水芳久、天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動、内分泌かく乱物質研究の最前線、日本化学会編、2001.9
29) G. D Asecenzo et al., Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, The Science of The Total Environment, 302, pp.199-209, 203
30) T.A.Ternes et al., Behavior and coccurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada, and Brazil, The Science of the Total Environment, 225, pp.81-90, 1999
31）高橋 他, 下水試料中の環境ホルモン物質の測定, 第37回下水道研究発表会講演集, pp.264-266, 2000
32) 末岡 他,下水試料を対象としたエストロゲンのGC/MSによる高感度測定法, 第6回日本水環境学会シンポジウム講演集, p.97,2003
33) 小森行也、八十島誠、田中宏明、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによるエストロゲンの分析、第36回日本水環境学会年会講演集、p.431、2002.3
34) K. Komori et al., Analysis and Occurrence of Estrogen in Wastewater in Japan, Water Science and Technology, (50)5, pp93-100, 2004
35)Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., and Sumpter, J. P., Identification of Estrogenic chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and roavh Environ. Sci. Tech., 32, 1559-1565 (1998)
36)Blackburn, M.A. and Waldock, M. J., Concentrations of alkyphenols in rivers and esturies in England and Wales Water Research, 29, 1623-1629 (1995)
37)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 内分泌撹乱化学物質による生態影響に関する試験法開発, 2003
38) 永柳、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、Vol.37,pp.921-925 (2001)
39) 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、Vo.37,pp.942-947 (2001)
40) 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、Vo.37,pp.932-935 (2001)
41) 中村朋之 他、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、pp.248-249 (2000)
42) 坂田一登 他、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、Vol.37,pp.87-91 (2001)
43) 小林康男 他､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、Vol.27,pp.3-8 (2002)
44) 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､Vol.27,pp14-19 (2002)
45) 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、Vol.37,pp.970-974 (2001)
46) 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(2002)
47）環境庁水質保全局水質管理課： ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル, 2000
48）U.S.EPA： Pressurized Fluid Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3545A, 2000
49）U.S.EPA： Microwave Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3546, 2000
50）U.S.EPA： Ultrasonic Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3550C, 2000
51) U.S.EPA: Supercritical Fluid Extraction of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Organochlorine Pesticides, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3562, 1998
52) 浦野紘平,加藤みか: 高沸点有機ハロゲン化合物汚染の効率的な調査・監視・対策のための測定方法, 廃棄物学会誌, Vol.12, No.6, pp.376-385, 2001
53) 片山浩之、嶋崎明寛、大垣眞一郎(2002) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発、水環境学会誌、25(8),469-475.
54） 篠原美千代、影山努 (埼玉県衛生研究所、R&D Center.BML) (2002) 蛍光プローブを用いたRT-PCR法 日本臨床、60(6),1181-1187.
55) 影山努、小嶋慈之、福士秀悦、片山和彦(2001)蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発. Vita. 18 (1),42-49.
56) 下水試験方法 上巻－1997 年度版－p. 46～48.
57) R. Fayer, T. K. Graczyk, E. J. Lewis, J. M. Tront, C. A. Farley (1998) Surviaval of Infectious Cryptosporidium parvum Oocysts in Seawater and Eastern Oyster (Crassostrea virginica) in the Chesapeake Bay, Applied and Environmental Microbiology, 64(3),1070-1074.
58) R. Fayer, J. M. Tront, M. C. Jenkins (1998) Infectivity of Cryptosporidium parvum Oocysts Stored in Water at Environmental Temperature, journal of

parasitolgy, 84(6), 1165-1169.
59) Christine Kaucner and Timothy Stinear (1998) Sensitive and Rapid Detection of Viable Giardia Cysts and Cryptosporidium parvum Oocysts in Large-Volume Water Samples with Wound Fiberglass Cartridge Filters and Reverse Transcription-PCR, Appl. Envir. Microbiol., 64, 1743-1749.

略語対応表

略語	名称
E1	エストロン
E2	17β-エストラジオール
E3	エストリオール
EE2	17α-エチニルエストラジオール
NP	ノニルフェノール
NPs	ノニルフェノール類
NPEO, NPnEO	ノニルフェノールエトキシレート
NPEC, NPnEC	ノニルフェノキシ酢酸
VTG	ビテロゲニン
YES	遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定（Yeast Estrogen Screen）