ＩＳＳＮ　０３８６－５８７８
土　木　研　究　所　資　料
第４０２１号　平成１８年７月

平成17年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2005 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

独　立　行　政　法　人　　土　木　研　究　所

Incorporated Administrative Agency
Public Works Research Institute

Copyright © (2006) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、独立行政法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、独立行政法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

土 木 研 究 所 資 料
第4021号　平成18年7月

平成１７年度下水道関係調査研究年次報告書集

土木研究所　材料地盤研究グループ　リサイクルチーム
水環境研究グループ　水質チーム
耐震研究グループ　振動チーム
材料地盤研究グループ　土質チーム

概要

本報告書集は、平成17年度に独立行政法人土木研究所において実施された下水道に関係する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

Technical Note of PWRI
No.4021 July 2006

FY2005 ANNUAL REPORT OF WASTEWATER MANAGEMENT AND WATER QUALITY CONTROL

RECYCLING RESEARCH TEAM
of MATERIAL AND GEOTECHNICAL ENGINEERING RESEARCH GROUP

WATER QUALITY RESEARCH TEAM
of WATER ENVIRONMENT RESEARCH GROUP

GROUND VIBRATION RESEARCH TEAM
of EARTHQUAKE DISASTER PREVENTION RESEARCH GROUP

SOIL MECHANICS RESEARCH TEAM
of MATERIAL AND GEOTECHNICAL ENGINEERING RESEARCH GROUP

INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY PUBLIC WORKS RESEARCH INSTITUTE

Synopsis

This Annual Report introduces researches on wastewater system, wastewater treatment, advanced wastewater treatment, wastewater sludge and water quality control carried out in Fiscal 2005 by Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute.

Key words: wastewater system, wastewater treatment, advanced wastewater treatment, wastewater sludge, water quality control, recycling

目　　次

Ⅰ　下水道事業調査費による研究

1. 下水汚泥中内分泌かく乱物質の汚泥処理過程および土壌環境中での挙動に関する調査 (リサイクルチーム) ・・・ 1
2. 下水汚泥を活用した有機質廃材の資源化・リサイクル技術に関する調査 (リサイクルチーム) ・・・ 7
3. 下水汚泥焼却灰の無機質特性に着目した有効利用方法に関する調査 (リサイクルチーム) ・・・ 23
4. 下水道における微量化学物質の評価に関する調査 (水質チーム) ・・・ 29
5. 下水道による水環境への影響に関する調査 (水質チーム) ・・・ 35
6. 下水道管渠の補修方法選定のための作用土圧の評価に関する調査 (土質チーム) ・・・ 58
7. 下水道施設の変形量を考慮した液状化対策工の設計法に関する調査 (振動チーム) ・・・ 64

Ⅱ　その他の予算による研究

【リサイクルチーム】

1. 病原性微生物の同定方法および挙動に関する研究 ・・・ 75
2. 底泥中の有機性有害物質の実態および挙動に関する研究 ・・・ 80
3. 下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究 ・・・ 86
4. 草木廃材の緑化資材としての有効利用技術に関する研究 ・・・ 93
5. アジアモンスーン地域の下水処理施設における病原微生物の消長に関する研究 ・・・ 101
6. 水環境中における薬剤耐性菌の実態に関する研究 ・・・ 107
7. 河川流域における PPCPs（医薬品および日用品等由来化学物質）の挙動の解明に関する研究 ・・・ 113

【水質チーム】

1. 水生生態系からみた河川水質の評価に関する調査 ・・・ 129
2. 底泥－水間の物質移動に関する調査 ・・・ 139
3. 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究 ・・・ 157
4. バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する研究 ・・・ 165
5. 都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究 ・・・ 187
6. 遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究 ・・・ 197
7. 河川水質浄化施設の評価と改善に関する調査 ・・・ 203
8. 河川底質のダイオキシン類対策に置けるモニタリング技術の実用化研究 ・・・ 207
9. 水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究 ・・・ 217
10. 難分解性溶存有機物の由来と水域挙動に関する研究 ・・・ 225

Ⅲ　複数年にわたる研究成果のとりまとめ

<第1期中期計画(H13 年度～H17 年度)における重点プロジェクト研究成果報告書（運営交付金以外)>

【水質チーム】

1. 下水道における微量化学物質の評価に関する調査 ・・・ 229
2. 都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究 ・・・ 254

Ⅰ　下水道事業調査費による研究

下水汚泥中内分泌かく乱物質の汚泥処理過程および土壌環境中での挙動に関する調査

リサイクルチーム　　室　　長　尾崎　正明
主任研究員　山下　洋正

１．　はじめに

近年、資源の有効利用の観点から下水汚泥の再利用が進んでいるが、下水中のノニルフェノール類（NP類）やエストロゲン等の内分泌かく乱物質、微量化学物質が，再利用される下水汚泥中に移行し、環境汚染につながることが懸念される。このため、下水汚泥中および下水汚泥リサイクル製品中に含まれるこれら物質の制御技術の開発が求められている。本調査は，下水汚泥中の NP 類、エストロゲン等の内分泌かく乱物質、微量化学物質を分析するための方法を提案し、下水汚泥コンポストの施用時の土壌環境での挙動を把握するとともに、下水汚泥処理過程における挙動および運転条件との関係を解明することを目的としている。

平成１７年度は，下水汚泥処理過程のうちコンポスト化過程におけるノニルフェノールエトキシレート（NP1EO，NE2EO）およびノニルフェノールエトキシ酢酸（NP1EC，NP2EC）類の挙動把握のための室内実験，液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置（LC/MS/MS）を用いた下水汚泥中のエストロゲン類（E1，E2，E3，EE2 および抱合体）の分析法の開発および実処理場のコンポスト中のエストロゲン類の存在実態の調査を行った。

２．　コンポスト化過程におけるノニルフェノール関連物質の挙動把握

下水道に流入するノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)は、下水処理過程で短鎖化・分解され、n がより小さい NPnEO、ノニルフェノールエトキシ酢酸(NPnEC)及びノニルフェノール(NP)を生じる。これらは低極性の物質が多く、大部分が下水汚泥に吸着されて下水処理場外に排出されていると考えられる。特に，嫌気性消化を経ないで排出される下水汚泥（生・余剰汚泥）では，NP が生成されず，NPnEOs および NPnECs の状態で存在していると推測される。これらの汚泥を緑農地利用のためにコンポスト化する場合における NPnEOs および NPnECs の挙動は十分に把握されていない。そこで，実験室規模のコンポスト化装置を用いたコンポスト化実験を行い，下水汚泥のコンポスト化におけるこれら物質の挙動を調査した

２．１　実験方法

嫌気性消化を行っているＫ処理場の生脱水汚泥（最初沈殿池汚泥）および副資材（おがくず）を用いてコンポスト化実験を行った。脱水汚泥および副資材等の性状について表－１に示し，運転温度等の実験条件について表－２に示す。

表－１　脱水汚泥および副資材等性状

	含水率 (%)	強熱減量 (%)	pH (-)	EC (ms/cm)	N (%)	C (%)
生汚泥	82.6	74.2	8.3	32.4	2.58	44.9
おがくず(桧)	18.3	97.9	6.4	0.6	0.29	47.3
種コンポスト	76.6	81.3	8.6	4.2	2.0	49.4

表－２　実験条件

実験		１回目	２回目(再添加)
温度（℃）		35	
期間（日）		14	
混合比率（種または返送コンポスト：おがくず：下水汚泥）		50%:10%:40%	
設定添加濃度 (mg/kg)	NP1EO	190	125
	NP2EO	190	120
	NP1EC	160	145
	NP2EC	80	77

NP1EO または NP2EO に関する実験は，容量 4L のガラス製カラム３本に，脱水汚泥（生汚泥），副資材および返送コンポストの混合物に NP1EO または NP2EO をそれぞれ約 190mg/kg 相当添加して所定量添加したもの

を約 2000g-湿重ずつ充填し，恒温室に設置して温度を管理し，カラム下部より強制通気して好気性条件下で連続運転を行った。実験期間中は０，４，９，１４日目に試料を採取した。２週間経過時にコンポストの引き抜き，返送(50%)および新規材料の投入を行い，返送および新規材料投入時にも NP1EO または NP2EO をそれぞれ約 120mg/kg および約 125mg/kg 相当添加して２回目の実験を行った。

NP1EC または NP2EC を添加したコンポスト化実験は，容量 200mL 程度のアルミ製容器（シャーレ型）に，脱水汚泥，副資材および返送コンポストの混合物に NP1EC または NP2EC をそれぞれ約 160mg/kg および約 80mg/kg 相当添加したものを約 80g ずつ薄く充填し，恒温槽に設置して温度を管理し，好気性条件下で連続運転を行った。０，４，９，１４日目にランダムに選定した容器のコンポストを試料として全量回収した。２週間経過時に返送用試料と新規材料を混合して（各 50%）NP1EC または NP2EC をそれぞれ約 77mg/kg および約 145mg/kg 相当添加したものを同様に容器に約 80g ずつ充填して２回目の実験を行った。

２．２　測定

ノニルフェノールおよび関連物質として，NP，NPnEOs（n=1～15），NPnECs（n=1～10）を LC/MS/MS により既報 [1]の通り測定した。一般項目として，含水率および強熱減量（下水試験方法による），pH および EC（肥料分析法による）ならびに TC・TN（下水試験方法による，CHN コーダーを使用）を測定した。

２．３　結果および考察

NP1EO，NP2EO，NP1EC ，NP2EC を添加した実験の結果をそれぞれ図―１～図－４に示す。ここで，NP3EO～NP10EO ならびに NP3EC～NP10EC はほとんど検出されなかったため，NP1EO ，NP2EO，NP1EC ，NP2EC および NP について示している。 NP1EO，NP2EO 添加の０日目のデータは n=1 であり値のみを示している。NP1EC および NP2EC 添加の２回目（再添加後）の０日目は n=2 であり，算術平均および範囲で示している。それ以外のデータは全て n=3 であり，中央値および範囲で示している。

n=3 のデータについては，ばらつきが大のものが多く見られた。これは，コンポスト試料においては，比較的粒径が大である団粒構造などがみられ，液体試料のような完全な均質化が難しいため，サンプリング段階におけるばらつきが大であるためと考えられる。このため，各測定値が正規分布に従うとの仮定の下で Grubbs の外れ値検定（統計量 G＝｜検定対象値－平均値｜／標準偏差）を行ったが，外れ値と判定されたデータはなかった（n=3 の場合に統計量 G＝1.55 が P=0.05 に相当するが，全て G<1.55 で P>0.05 であった）。従って，n=3 のデータについて，算術平均±標準偏差（または標準誤差）として示すことも不可能ではないが，データ数が少なくばらつきが大である場合は，算術平均よりも中央値の方がより良い推定値を与えると考えて，中央値を用いることとした。

個々のデータにばらつきはあるものの，全体として経時的な減少傾向が観察され，特に添加後０日目と１４日目を比較すると，明らかに減少していることが把握できた。無添加（対照系）は n=1 で実験を行ったが，実験期間中の NP および関連物質の総計は 7～9.9mg/kg でほとんど存在せず変化もみられなかったことから，添加実験における各物質の挙動は，人為的に添加した物質の分解等を反映しているものと考えられた。また，各添加実験において NP がわずかに検出されているものの顕著な増加が見られないことから，コンポスト化実験においてはほぼ好気状態が保たれており，各添加物質の減少が NP 生成によるものでないことが分かる。設定添加濃度と実測濃度との差異は，下水汚泥コンポストからの回収率の低さおよびサンプリング・測定誤差によるものと考えられた。以下，各実験について結果および考察を示す。

（１）NP1EO 添加実験では，１回目（初回添加後）に NP1EO の減少と NP1EC の一時的増加およびその後の減少が見られ，その他の物質についてはほとんど変化がなかった。２回目（再添加後）も同様の挙動が再現されたことから，NP1EO→NP1EC→分解という経路が想定された。

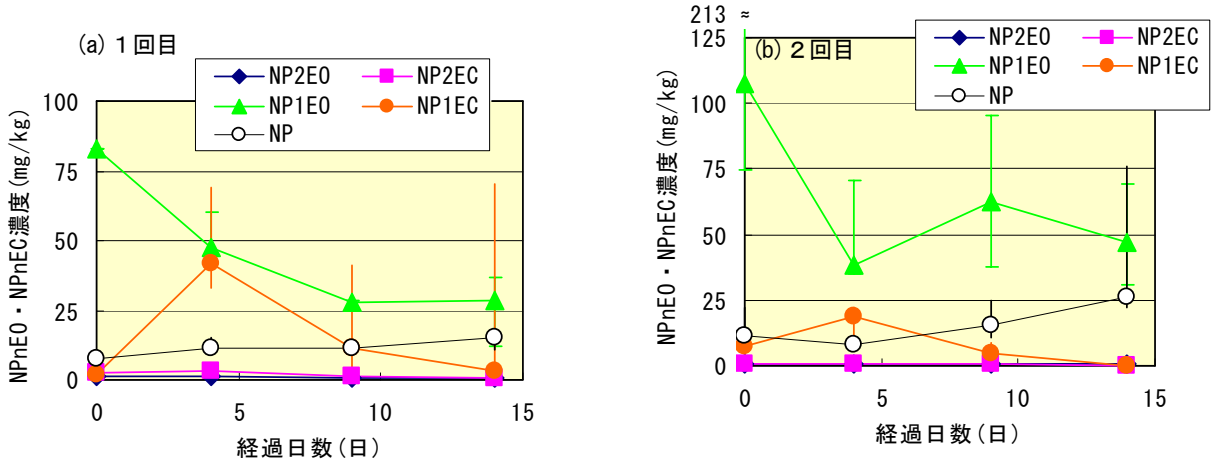
（２）NP2EO 添加実験では，１回目に NP2EO の減少と NP2EC の増加が見られ，その他の物質について

はほとんど変化がなかった。２回目の０日目で高濃度の NP1EO が特異的に検出されたが，４日目以降は NP1EO はほとんど検出されず，NP2EO および NP2EC の減少が見られた。２回目の０日目に検出された高濃度の NP1EO が NP2EO から生成されたものか，あるいは，試料のコンタミネーションや分析ミス等による異常値であるのかは断定できないが，１回目には NP1EO の増加が見られていないことおよび NP1EO 添加実験においても４日目以降にかなり NP1EO が残存しており本実験でのみ速やかに不検出となることは考えにくいことから，何らかの原因による異常値の可能性が高いと想定される。２回目の０日目のデータを異常値として除外すると，NP2EO→NP2EC→分解という経路が想定された。

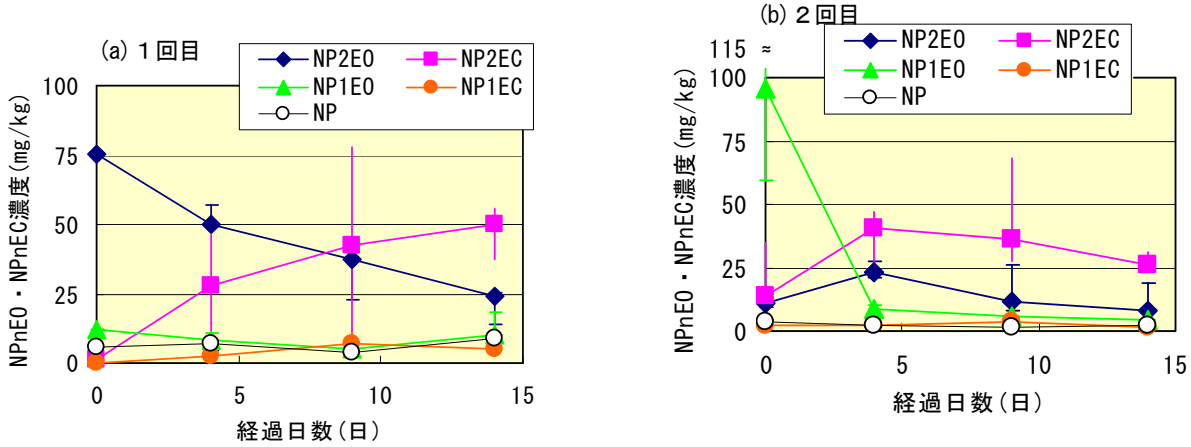
（３）NP1EC 添加実験では，１回目に NP1EC が減少がみられ，その他の物質についてはほとんど変化がなかった。２回目も同様の挙動が再現されたことから，NP1EC→分解という経路が想定された。

（４） NP2EC 添加実験では，１回目に NP2EC が減少がみられ，その他の物質についてはほとんど変化がなかった。２回目も同様の挙動が再現されたことから，NP2EC→分解という経路が想定された。NP1EC の生成が見られなかったことについては，NP1EC が中間分解物として生成された後に速やかに分解されている可能性も否定できないが，それを積極的に支持するデータは得られなかった。

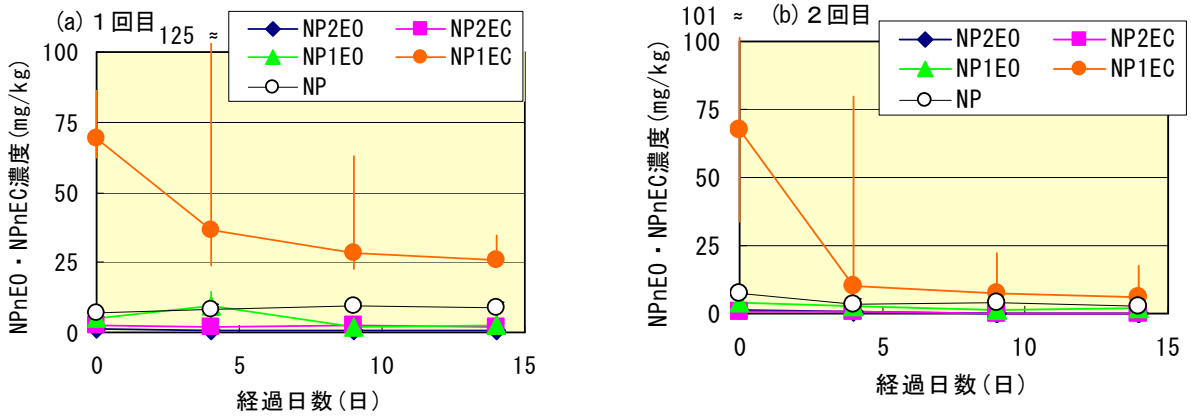
これらの結果より，下水汚泥中の NP1EO，NP2EO，NP1EC および NP2EC のコンポスト化過程における挙動としては, 2EO→2EC→(1EC)→分解または1EO→1EC→分解という経路が主要なものと考えられた。



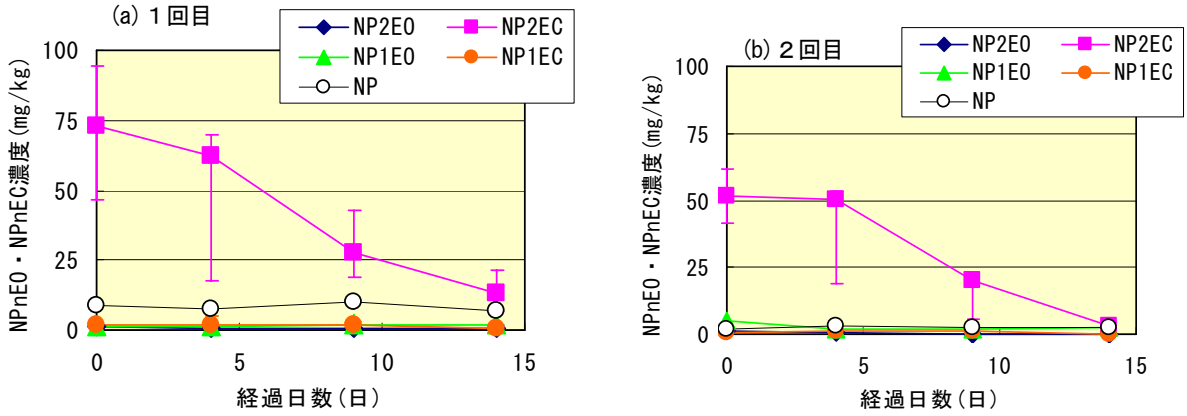
図－１　NP1EO 添加コンポストにおける NP 関連物質の挙動；(a)添加後 0～14 日，(b)50%引き抜き，原料追加，再添加後 0～14 日；n=3（a の 0 日目は n=1），プロットは中央値，バーは範囲を示す



図－２　NP2EO 添加コンポストにおける NP 関連物質の挙動；(a)添加後 0～14 日，(b)50%引き抜き，原料追加，再添加後 0～14 日；n=3（a の 0 日目は n=1），プロットは中央値，バーは範囲を示す



図－３　NP1EC 添加コンポストにおける NP 関連物質の挙動；(a)添加後 0～14 日，(b)50%引き抜き，原料追加，再添加後 0～14 日；n=3，プロットは中央値，（b の 0 日目は n=2，プロットは平均値），バーは範囲を示す



図－４　NP2EC 添加コンポストにおける NP 関連物質の挙動；(a)添加後 0～14 日，(b)50%引き抜き，原料追加，再添加後 0～14 日；n=3，プロットは中央値，（b の 0 日目は n=2，プロットは平均値），バーは範囲を示す

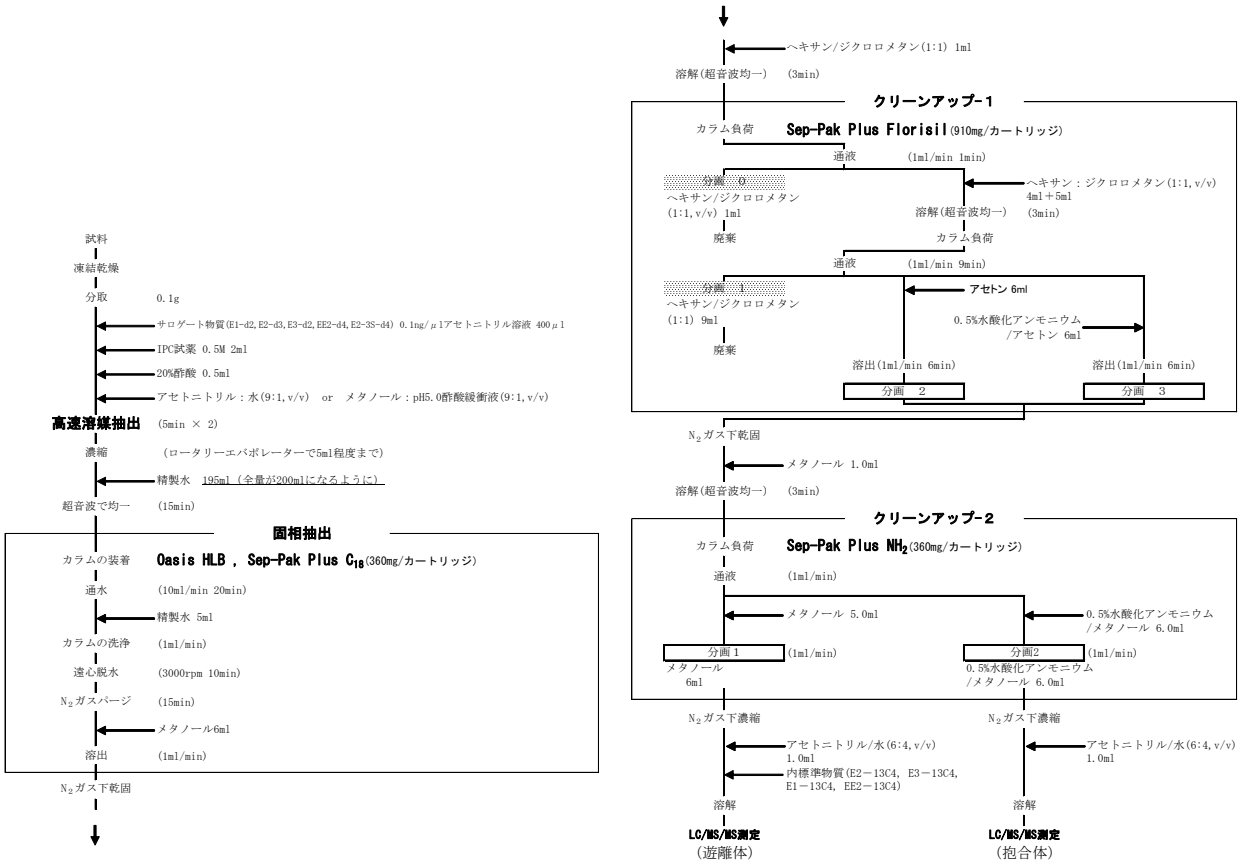
３．　液体クロマトグラフータンデム型質量分析装置（LC/MS/MS）を用いた下水汚泥中のエストロゲン類（E1，E2，E3，EE2 および抱合体）の分析法の開発

下水汚泥等の試料中のエストロゲン類の機器分析については，HPLC による定量が困難であり，GC/MS または LC/MS 以上の高度な分析が必要である。また，ELISA 法等による簡易な測定法も開発されているが，エストロゲン類の内訳を把握することが難しい上に高精度の定量は困難である。従って，下水汚泥中に含まれる多様な物質およびコンポスト副資材のおがくず等の共存物質の妨害ピーク等を回避してエストロゲン類を高精度に測定可能な方法として，LC/MS/MS による測定方法を開発することとした。

測定対象は，E1（エストロン），E2（17βエストラジオール），E3（エストリオール）および EE2（エチニルエストラジオール）ならびにこれらの硫酸抱合体およびグルクロン酸抱合体とした。

３．１　分析方法

抽出は高速溶媒抽出を用い，クリーンアップ方法は，環境庁「外因性内分泌かく乱物質調査暫定マニュアル」[2]，日本下水道協会「下水道における内分泌かく乱物質調査マニュアル（案）」[3] 等を参考にした。検討した測定のフローについて図－５に示し，測定方法については表－３にそれぞれ示した。



図―５ 高速溶媒抽出および LC/MS/MS によるエストロゲン類の測定フロー

表－３ LC/MS/MS によるエストロゲン類測定法

HPLC装置	アジレント社製HPLC（1100 HPLCモジュール）
カラム	Agilent HP Zorbax Eclipse XDB-C18 2.1mm x 150mm
カラム温度	40℃
注入量	10μl
分析時間	イソクラティック溶離法（17分）
溶離液	アセトニトリル：蒸留水（55：45）0.5mM酢酸アンモニウム
流速	0.15ml/min
MS/MS装置	ABI社製4000QTRAPシステム
イオン化法	ESI（TurboSpray）
測定モード	MRM
極性	Negative

３．２ 結果および考察

表－３に示した測定条件では，測定対象物質およびサロゲートのうち，E2-3S&17S および EE2-d4 のピークが検出できなかった。その他の測定イオンについては表－４に示すとおりの条件で測定可能であった。一部のイオンをうまく測定できない理由については未解明であるが，測定フローは図－１のままで，測定法の LC/MS/MS を ThermoQuest TSQ API-2 に変更した場合は全イオンが測定できたため，後述の下水汚泥コンポスト試料の分析についてはその方法で測定した。この方法では，E1-3G および E3-3G の Product イオンがそれぞれ 269(m/e)，287(m/e)に変更となった。

表－４　LC/MS/MS によるエストロゲン類測定における測定イオン

	測定イオン(m/e)			測定イオン(m/e)	
	Target	Product		Target	Product
E1	269	145	E1-13C4	270	148
E2	271	145	E2-13C4	272	147
E3	287	171	E3-13C4	288	173
EE2	295	145	EE2-13C4	296	145
E1-3S	349	269	E1-d2	271	147
E2-3S	351	271	E2-d3	274	145
E3-3S	367	287	E3-d2	289	173
E2-3S&17S	431	(351)	E2-3S-d4	355	275
E2-S&G	527	351	EE2-d4	299	(147)
E1-3G	445	113(269)			
E2-3G	447	271			
E3-3G	463	84.9(287)			

４．　実処理場の下水汚泥コンポスト中のエストロゲン類（E1，E2，E3，EE2 および抱合体）の存在実態

実処理場に流入したエストロゲン類については，水処理における挙動に関する調査報告がなされているが，下水汚泥に移行した後にコンポスト化過程でどのような挙動を示すかについては，十分なデータがない。そこで，実処理場の下水汚泥コンポストを収集してエストロゲン類の分析を行い，その存在実態を把握した。

４．１　調査方法

2003 年秋に国内 17 道県で製造された下水汚泥コンポスト（肥料及び土壌改良材）を収集し、高速溶媒抽出及び LC/MS/MS 法により、エストロゲン類（E1，E2，E3，EE2 および抱合体）を n=3 で分析した。分析法の詳細は図－１に示すとおりである。収集した下水汚泥コンポストの種類・性状については既報[1)]の通りであり，１７種類の下水汚泥コンポストのうち，５種類は嫌気性消化汚泥を原料としており，７種類は生余剰汚泥を原料としており，残り５種類については原材料について十分な情報が得られなかった。

４．２　結果と考察

下水汚泥コンポスト 17 試料中のエストロゲン類の濃度はほとんどが検出下限値未満であった。E1，E2，E3，EE2，E2-3S，E3-3S，E2-S&G，E1-3G，E2-3G および E3-3G は全て検出下限値未満であり，E1-3S は１試料（原材料について十分な情報が得られないもの）１回測定のみ 0.20mg/kg-dry であり，その他は全て定量下限値未満であった。E2-3,17S は２試料（生余剰汚泥を原料とするものおよび上述の E1-3S を含有していたもの）計５回測定で 1.5～2.7mg/kg-dry であり，その他は検出下限値未満または定量下限値未満であった。このように，下水汚泥コンポスト中には抱合体も含めてエストロゲン類がほとんど残存していなかったことから，下水汚泥を好気的にコンポスト化する過程において，エストロゲン類が比較的容易に分解されるものと推定された。また，緑農地利用においても環境影響は想定されないと考えられた。

５．　まとめ

（１）下水汚泥コンポスト過程における NP1EO，NP2EO，NP1EC および NP2EC の挙動は，2EO→2EC→(1EC)→分解または 1EO→1EC→分解という経路が主要なものと考えられた。

（２）下水汚泥中のエストロゲン類の分析方法を開発し，実処理場の下水汚泥コンポスト試料 17 種類を分析した結果，エストロゲン類のほとんどが検出下限値未満であったことから，これらは下水汚泥コンポスト化過程で比較的容易に分解され，緑農地利用においても環境影響は想定されないと考えられた。

参考文献

１）尾崎正明，山下洋正，下水汚泥中内分泌かく乱物質の汚泥処理過程および土壌環境中での挙動に関する調査，平成 16 年度下水道関係調査研究年次報告書集，独立行政法人土木研究所他，pp-45-50，2005.7

２）（社）日本下水道協会，下水道における内分泌かく乱物質調査マニュアル（案），2002.2

３）環境庁水質保全局水質管理課，外因性内分泌かく乱物質調査暫定マニュアル，1998.10

下水汚泥を活用した有機質廃材の資源化・リサイクル技術に関する調査

研究予算 ： 受託業務費
研究期間 ： 平 14～平 17
担当チーム ： 材料地盤研究グループ（リサイクル）
研究担当者 ： 尾崎正明，落修一，庄司仁，牧孝憲

【要旨】
本調査は、草木系のバイオマスと下水処理から発生する下水汚泥の利活用の推進に寄与するために、双方の特性を活かした効果的な利活用技術を開発すべく、草木と下水汚泥の混合嫌気性消化、木質からの有機酸生産、液状汚泥のコンポスト化、木質材の下水汚泥脱水助材化、木質材の緑化資材化について取り組んだ。その結果、木質材に蒸煮爆砕を施したものと下水汚泥との混合嫌気性消化法と液状汚泥をそのままの状態でコンポスト化する液体コンポスト化法を開発した。また、摩砕加工した木質材の脱水助材化と爆砕木質材の園芸資材化の可能性、有効性が高いことを確認した。木質材からの有機酸生産に関しては最適な pH 制御値や安定発酵を司る因子について更なる研究が必要とされた。酸発酵や液体コンポスト化については発酵を担う細菌群集解析を行い、特に液体コンポスト化には詳細な生物学的評価を加えた。
キーワード：バイオマス、下水汚泥、嫌気性消化法、酸発酵、コンポスト、脱水、緑化資材、微生物群集解析

1. はじめに

土木工事をはじめ、道路や河川、海岸、空港、公園などの緑地管理からは、大量の廃木材や刈草が発生している。現状では、これらの草木系バイオマスの利活用手法は限られており、資源としての利用につながる技術開発が必要である。一方、下水処理の過程では多くのエネルギーや薬品を必要としているが、草木系バイオマスによって代替できる可能性がある。また、下水汚泥は多様な微生物群と豊富な無機分を含むことから、草木系バイオマスの生物学的な加工や改質に貢献できると思われる。

本調査は、草木系バイオマスを中心とした有機質廃材と下水汚泥との混合により資源化を行う技術、および有機質廃材を加工して下水処理に活用する技術を開発し、草木系バイオマスと下水汚泥の利活用の推進に寄与することを目的とする。

2. 調査方法

下水処理場では、下水汚泥をメタン発酵する嫌気性消化法を行っている所が多い。このために、既設の消化槽を活用する下水汚泥と草木との混合嫌気性消化を行う方法について調べた。また、下水処理場では栄養塩類の除去を図る高度処理の必要性が高まっていることから、高度処理に必要な有機酸を木質から生産する酸発酵について調べた。さらに、これらの発酵液残渣の利用のための液体コンポスト化法について調べた。

下水汚泥は微粒子群で構成される典型的な難脱水性の汚泥であり、実際の脱水には多くの薬品とエネルギーを必要としていることから、木質破砕物を脱水助材として活用する可能性について調べた。

木質材は爆砕処理により構造的に良好な緑化資材となるものであったが、成分的に発芽障害があることが難点であった。このために、木質爆砕物の効果的な安定化手法として、下水汚泥を添加してコンポスト化する方法の効果について調べた。

これらの調査は全て室内実験により行った。なお、実験で採用した測定や分析の方法は、特別の記載がない限り下水試験方法(1997)[1]に従った。また、機器分析では揮発性脂肪酸（VFA）は高速液体クロマトグラフ（HITACHI La Chrom Elite L-2000）を、ガス分析はガスクロマトグラフ（TCD：㈱島津製作所製 GC-3BT）を、固形物の元素分析は元素分析計（㈱アムコ製 FLASH EA 1112）を用いた。

3 調査結果

3. 1 草木と下水汚泥の混合嫌気性消化法

木質材や乾燥した草類は、そのままの有機質の性状では発酵されにくく、発酵に係わる微生物に利用され易い性状に改質する必要がある。本調査では、このための改質方法として蒸気加圧爆砕法[2]を検討することとした。蒸気加圧爆砕法は、試料を圧力容器中で高温高圧の水蒸気により短時間蒸煮後、瞬時に圧力を解放・減圧する方法であり、草木に蒸気加圧爆砕を施すと、草木は改質・低分子化と同時に微細化される。調査では、草木に蒸気加圧爆砕を施したものと下水汚泥とを混合してメタン発酵する技術を確立するために、蒸気加圧爆砕方法に関する実験、混合メタン発酵方法に関する実験、発酵液の粘性および脱水性を調べる実験を行った。

3. 1. 1 実験方法

(1) 蒸気加圧爆砕方法に関する実験

実験に用いた爆砕装置の概要を**図－1**に示す。実験では、堤防管理から発生した刈草の乾燥物と、広葉樹チップ(ブナとナラの混合物)及び針葉樹(スギ)チップを用い、蒸気による圧力とその蒸煮時間をそれぞれ 1～3MPa、1～30 分に変え、瞬時解放して爆砕処理した。得られた爆砕物について水溶性成分を調べた。**表－1**に水溶性有機物組成の分析方法を示す。

(2) 混合嫌気性消化法に関する実験

下水汚泥と爆砕物の混合嫌気性消化法を実施設へ適用するに際しては、メタンガスの生産性もさることながら、既存の消化槽が過負荷となり系全体が酸発酵に陥ることが最も懸念されることから、許容される負荷条件を連続実験により把握しておく必要がある。

実験は、予備的な実験から易分解性と認められ、最も実用性が高いと思われた[広葉樹チップを2MPa－15 分の強度で爆砕した物]を用い、下水汚泥への混合比を変え、1日1回の引き抜きと投入を行う連続式のメタン発酵実験を、35℃にて 50 日間行った。

実験は、タイマー付きマグネチックスターラー(15 min-ON／3hr)を装備した10Lの密閉ガラス瓶6台を設置して、これに消化汚泥の初期量を6L として、休日を除き 1 日 1 回 300mL づつ消化汚泥の引き抜きと基質の投入を行う方法を取った。投入する基質は、固形物量比で下水汚泥に対して爆砕物がそれぞれ0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 倍量混合することを目標に調整した。

(3) 消化汚泥の粘性に関する実験

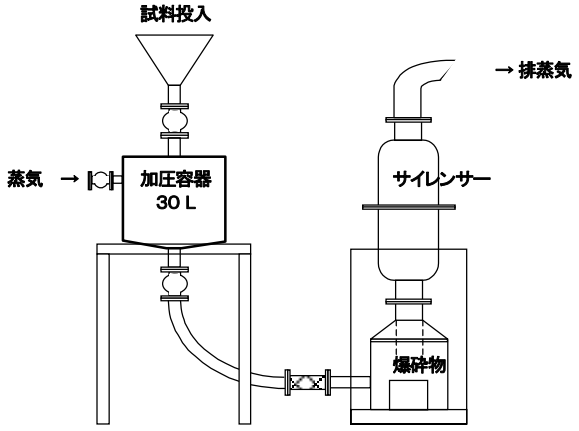
実際の消化槽に蒸煮・爆砕木質を投入することを想定して、その場合の消化槽内の撹拌に係わる槽内消化汚泥の粘性評価に主眼を置き、これに必要な試料を得るための下水汚泥と蒸煮・爆砕木質の混合比率を変えた35℃による回分式の嫌気性消化実験を行った。

実験は、マグネチックスターラ(15min－ON／2hr)を装備した空容積が 10L のガラス瓶 5 台に、**表－2**に示す条件で仕込み、初発液量8L で開始し、定期的に試料採取・分析を行いながら延べ 41 日間行った。粘度はリオン㈱製粘度計 VISCOTESTER VT-04 で測定した。

(4) 消化汚泥の脱水性に関する実験

実験は、下水汚泥のみと、下水汚泥と爆砕物を固形物比で1:1に混合したものを、**表－3**の条件で 91 日間連続実験した消化汚泥に対して、凝集剤にポリシリカ鉄(PSI-050)、塩化第Ⅱ鉄及び高分子凝集剤(ヘルスフロック C809)を用い、次の操作を行った。

① 試料 250mL を 250mL 用のポリビン計量する。



図－1 実験に用いた爆砕装置の概要

表－1 爆砕物・水溶性有機物組成分析方法

項 目	操 作 及 び 方 法
水抽出試料作成方法	① 爆砕物 100g-湿重に精製水2Lを加え、35℃にて1hr振盪 ② 遠心分離にて上澄液を回収し、ろ紙 GF/B にてろ過 ③ ろ液の pH を 1N-NaOH で 7.5 に調整 ④ ロータリーエバポレータで 200mL に濃縮
固形分	凍結乾燥法
総 糖	フェノール硫酸法
多糖類	アルコール沈殿法
低分子糖質(単～六糖)	HPLC(ｶﾗﾑ：Shodex KS-802)法
単・二糖(同定定量)	ゲル濾過, PMP誘導体化、HPLC(ｶﾗﾑ：Waters Symmetry ODS 300A)法 重水置換、^{1}H, ^{13}C-NMRスペクトル測定法
揮発性脂肪酸	HPLC(ｶﾗﾑ：昭和電工RSpak KC-811×2)法
タンパク	BCAタンパク測定キット(PIERCE製 No.23227)適用
TOC	燃焼酸化－赤外線式分析法
T-N	総和法(アンモニア化・蒸留・インドフェノール青吸光光度法) 硝酸, 亜硝酸 ： デバルダ合金還元蒸留法 アンモニア, 有機態 ： 硫酸銅－硫酸カリウム－硫酸分解法
T-P	硝酸－硫酸・加熱蒸発分解・モリブデン青吸光光度法

表－2 粘性に関する嫌気性消化の実験条件

実 験 ケ ー ス		B-0	B-0.25	B-0.5	B-0.75	B-1.0
消化汚泥	volume (L)	4	4	4	4	4
	TS (g/L)	20	25	30	35	40
投入汚泥	volume (L)	4	4	4	4	4
下水汚泥	TS (g)	160	160	160	160	160
蒸煮・爆砕木質	TS (g)	0	40	80	120	160
固形物 濃度	TS (g/L)	40	50	60	70	80
全体・固形物濃度	TS (g/L)	30	37.5	45	52.5	60

表－3 脱水性に関する嫌気性消化の実験条件

実験ケース	基質	[下水汚泥]			[下水汚泥] ＋ [爆砕物]		
	番号	C-20	C-30	C-40	B-20	B-30	B-40
発酵温度		35 ℃					
発 酵 槽		槽 容 積 ： 5 L, 液 量 ： 4 L					
投入・引抜き量		200	130	100	200	130	100
投入・引抜き方法		1日1回の引抜き・投入 (休祭日を除く)					
撹拌方法		タイマー作動によるマグネチックスターラー撹拌 (15min-ON／3hr)					

② 鉄系凝集剤の所定量を滴下して手動にて急速撹拌する。

③ 高分子凝集剤の所定量を加えて手動にて緩速撹拌する。

④ 脱水用濾布を装着したロート加工の 250mL ポリビンに注ぎ、濾過する。

⑤ 200～300mL 用の遠心分離管の底部にガラスビーズを敷き詰め、その上部を飛散防止のために濾紙(ﾜｯﾄﾏﾝ GF/B)で覆う。

⑥ ④にて、ポリビンの濾布上に残った凝集汚泥の全量を2枚重ねした

表－4 水溶性有機物組成の分析結果

組成項目	含有率（mg／g-DS・爆砕物） 広葉樹系	針葉樹系	雑草系
固形分	226.6	101.5	147.3
総糖	149.6	61.8	75.9
多糖類	4.9	1.3	61.0
低分子（単～六糖）糖質	82.2	20.1	7.8
六糖	5.0		
五糖	5.2		
四糖	7.9		
三糖	9.9		
二糖	16.0 *	2.3 **	0.8
単糖	38.1	15.6	3.4
マンノース	2.6	6.1	0.3
ラムノース			0.0
グルコース	2.4	6.3	1.1
ガラクトース	2.5	1.5	0.4
キシロース	29.5	1.5	1.1
アラビノース	1.0	0.2	0.4
フルフラール	3.0	15.5	
揮発性脂肪酸	54.6	23.4	11.2
コハク酸	0.9	0.2	0.4
乳酸	n.d	n.d	n.d
ギ酸	8.4	7.0	4.0
酢酸	45.3	16.2	6.8
プロピオン酸	n.d	n.d	n.d
イソ酪酸	n.d	n.d	n.d
酪酸	n.d	n.d	n.d
イソ吉草酸	n.d	n.d	n.d
吉草酸	n.d	n.d	n.d
タンパク	152.1	77.8	76.7
TOC	88.4	38.6	65.4
T-N	0.26	0.14	5.09
T-P	0.067	0.039	0.820

* 15種類の二糖が確認され、その内の1種が約70%を占めた。
この1種は、主にキシロースで構成される二糖と推定された。
** 11種類の二糖が確認され、その約42%を占める1種類が存在した。
この1種は、主にグルコースとマンノースで構成される二糖と推定された。

薄紙(株)クレシア製ワィパー S-200)に移し、それを⑤で準備した遠心分離管内にセットする。

⑦ 1,500G-10min の遠心分離を施す。

⑧ 脱水された汚泥部のみを回収して、含水率を測定する。

3. 1. 2 実験結果

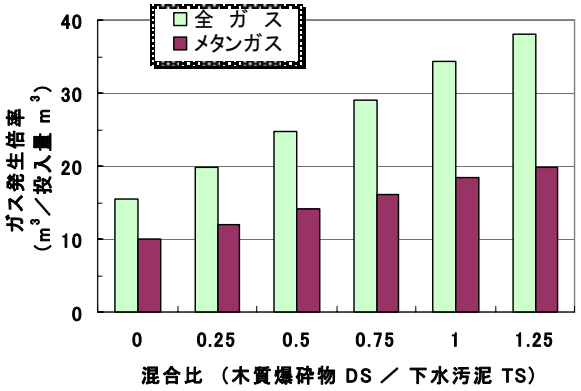
(1) 蒸気加圧爆砕方法に関する実験

爆砕は容易且つ円滑に実施できた。観察からは、広葉樹の爆砕物は総じて糖蜜臭を呈していた。針葉樹は広葉樹よりも堅固な繊維質のものが得られた。雑草は、爆砕強度をチップ破砕と同レベルとすると堅固な繊維質と泥状物との混合体を呈した。

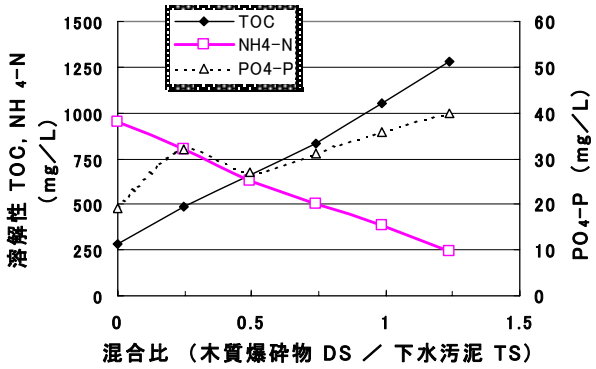
水溶性の有機物組成の一例を**表－4**に示す。大きな特徴として3つが挙げられる。1つは、溶解性の有機物を多量に含み、中でも広葉樹系での含有量が多いこと。2つ目は、揮発性脂肪酸を多く含み、それが酢酸とギ酸に限られていること。3つ目は、雑草系の窒素とリンの含有量は木質系の 10 倍以上となっていることである。本調査では、これらの特徴を生かした用途開発を進める必要がある。

(2) 混合嫌気性消化法に関する実験

実験は、全ての系が酸発酵に陥ることなく、円滑に進行した。実験系が実験条件に対して定常状態となっていると思われる期間における平均的なガス発生量の結果を**図－2**に、消化汚泥中の溶解性の TOC、NH_4-N、PO_4-P の結果を**図－3**に示す。



図－2 爆砕物と下水汚泥の混合比とガス発生倍率の関係



図－3 爆砕物と下水汚泥の混合比とメタン発酵液中の TOC, NH_4-N, PO_4-P の関係

ガスの発生は爆砕物と下水汚泥との混合比に比例していた。一方、消化汚泥中では、爆砕物の混合量の増加に伴って溶解性の TOC と PO_4-P が大幅に残存する傾向を示し、逆に NH_4-N は著しく低減する傾向を示した。これより、消化汚泥中の TOC と PO_4-P が低減できれば実用性は非常に高いと思われる。

(3) 消化汚泥の粘性に関する実験

消化汚泥の固形物（TS）濃度の経日変化を**図－4**に、粘度の経日変化を**図－5**に示す。蒸煮・爆砕木質が混合しているケースでは、混合の比率が高いほどに仕込み初期の粘度も高いものとなっているが、20 日が経過した時点では既に相当に低下し、一般的な消化汚泥の粘度の範疇[3]に入るものとなっている。そして、20 日以降の粘度は、各ケース間において消化汚泥の固形物濃度には大きな差異が生じたままとなっているにも拘わらず、蒸煮・爆砕木質の混合比率に関係なく殆ど類似した値を維持している。この結果から、実際の連続式の消化槽では、常時、図－4に示された経過日数が 20 日以降における何れか

の固形物濃度に維持されているものであり、蒸煮・爆砕木質の混合による消化槽内の固形物濃度の上昇が槽内の撹拌設備に対して大幅な負荷増大に繋がる危険性は少ないと言える。

(4) 消化汚泥の脱水性に関する実験

脱水汚泥の含水率の結果を下水汚泥のみの系について**図－6**に、爆砕物混合系について**図－7**に示す。下水汚泥の脱水では、汚泥の凝集・調質に高分子凝集剤のみを用いるケースが多く、その添加率は 0.8～1.2 %(Polymer 重／汚泥固形物重)が一般的である。実験の結果は、通常の添加率の範囲で、高分子系凝集剤に鉄塩を併用するだけで良好な脱水成績が得られることを示している。特に、爆砕物を混合した系の脱水汚泥の含水率は下水汚泥単独系の場合よりも低くなり、これには、消化汚泥中に木質由来の未分解の粗繊維が存在することが有効に作用した要因と思われる。また、脱水時のろ液中の TOC や PO_4も効果的に減少していた。

3. 2 木質材からの有機酸の生産

3. 2. 1 実験方法

実験は、基質に精製セルロースを用いたpH の影響を調べる基礎的な実験と、蒸煮爆砕木質からの有機酸生成を調べる回分式実験と連続式実験を行った。これらの実験では共通して**表－5**に示す組成の液体培地を用いた。

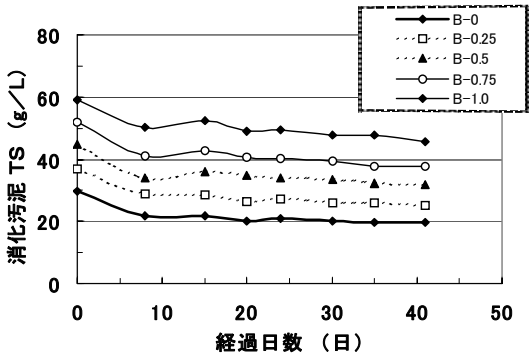
(1) セルロースを用いた酸発酵実験

実験は、2L のガラス瓶を培養器とし、マグネチックスターラとpH 制御装置およびガス捕集袋を装備したものを用い、35℃恒温室において回分式で行った。pH 制御の目標値は、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 とした。また、pH 制御用の試薬には 0.1 N と 1 N の NaOH 水溶液を用いた。

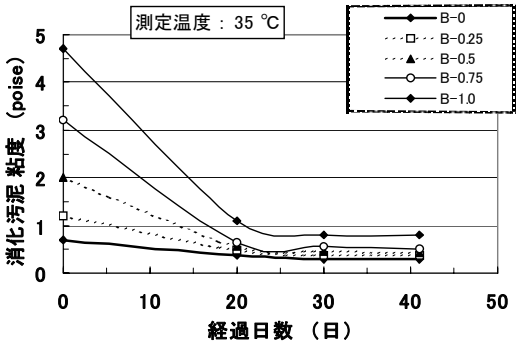
実験は、表－5の液体培地中でセルロースパウダーの濃度が20g/L となるよう初期値を設定し、極少量の嫌気性消化汚泥を植種して仕込み、窒素ガスでパージした後、連続撹拌、pH 制御しながら 36 日間行った。

表－5 酸発酵用培地の培養液組成

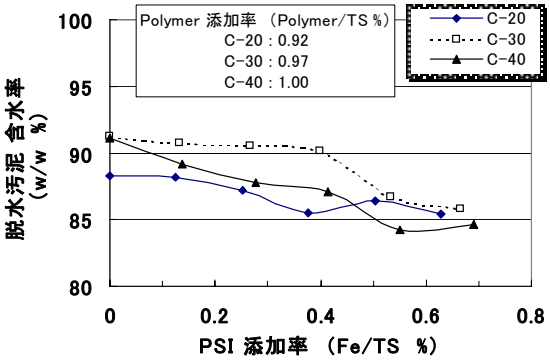
NH_4Cl	2.0 g	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g
KH_2PO_4	0.5 g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
CH_3COONa	0.1 g	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg
グルコース	0.1 g	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	5 mg
デンプン	0.1 g	$MnSO_4 \cdot 4\text{-}6H_2O$	1 mg
酵母エキス	0.1 g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.5 mg
		$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 mg
水 道 水		1 L	



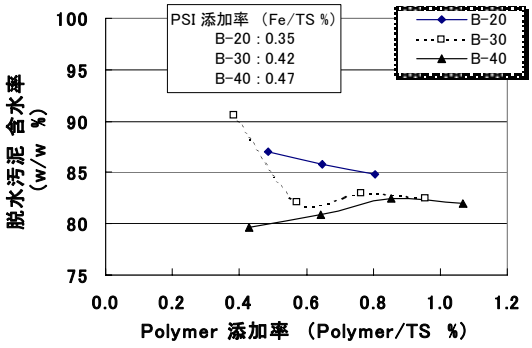
図－4 消化汚泥固形物(TS)濃度の経日変化



図－5 消化汚泥の粘度の経日変化



図－6 下水汚泥のみの系の脱水汚泥の含水率



図－7 爆砕物混合系脱水汚泥の含水率

(2) 蒸煮爆砕木質を用いた酸発酵実験

1) 回分実験

実験は、培養器に 10Lのガラス瓶を用い、表－6に示す培養条件で、撹拌しながら pH 制御用の NaOH 水溶液が消費されなくなった時点の32日間行った。各系列の32日目の試料は、真正細菌（メタン細菌は含まない）の 16S rRNA 遺伝子を標的とするPCR-DGGE 法の解析に供した。DGGE で検出されたバンドは、塩基配列の解読までを行い、系統的な位置を整理した。

2) 連続実験

実験は、2L のガラス瓶4個を培養器とし、セルロースパウダー：10g、下水汚泥：50mL、液体培地（表－5に $NaHCO_3$:0.7g/L 混合したもの）：1.5L を混合して、それぞれの培養器に密封し、35℃において、0.25N-NaOH 水溶液を用いてpH を 5.5、6.0、6.5、7.0 に自動制御しながら 57 日間行った。

実験では、酸発酵の進行状況を確認しながら、セルロースパウダーを基質とする連続培養の成立を図ってから培養後 42 日目に爆砕木質の投入に切り替えた。なお、本実験における連続培養は、引き抜きと投入の操作を1週間に1回の頻度で行うことを意味している。

3. 2. 2 実験結果

(1) セルロースを用いた酸発酵実験

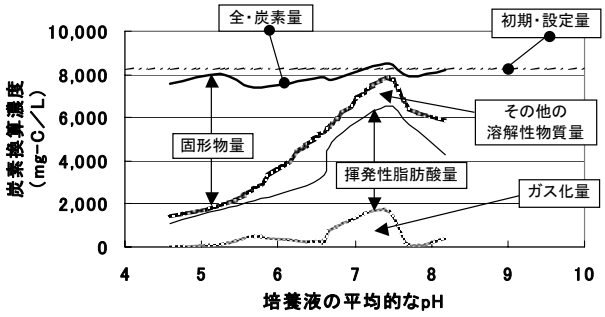
可溶化がピークに達した時点の諸物質の存在量を培養液中の炭素濃度で表し、培養液の平均的なpH との関係を図－8に示す。図において、[全・炭素量]から[固形物量]を引いた量がセルロースの可溶化量である。これより、可溶化が最も進行したのは pH 7.5 近傍であり、ここの可溶化率は 92 %に達していた。

培養液の平均的な pH における揮発性脂肪酸の内訳の濃度分布を図－9に示す。揮発性脂肪酸の中で最も多く産したのは、酢酸であり、次いでプロピオン酸、n-酪酸の順であった。この他に i-酪酸、乳酸、ぎ酸、コハク酸なども pH 制御のケースによっては検出される場合もあったが、その濃度は僅かであった。pH 6.5 以上では、生成した揮発性脂肪酸のうち酢酸が約 80%を占めていた。また、最大の揮発性脂肪酸濃度 13、000 mg／L が得られ、そのセルロースからの収率は 650 mg-VFA／g-cellulose であった。これらの値を、前掲の図－8における[揮発性脂肪酸量]と[ガス化量]から考察すると、ガス化量の大部分はその組成からメタン発酵に起因するものであったことから、これは元来、揮発性脂肪酸、中でも酢酸を経由して産せられ、実際は、得られた最大の揮発性脂肪酸濃度や収率よりも高い値となっていたものであり、得られたこれらの値は実現可能な値とみなせるだろう。

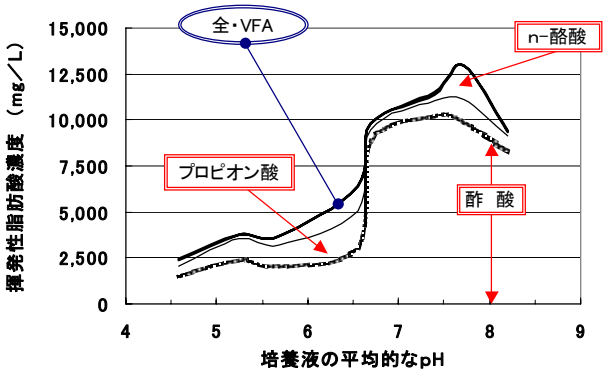
表－6 回分式酸発酵実験条件

	発酵基質	総投入量	培地*2	消化汚泥
A系	セルロース	240 gDS	9 L	75 mL
B系	蒸煮・爆砕物	194 gDS	9 L	75 mL
C系	Bの固形分*1	243 gDS	9 L	75 mL
共通な設定：pH 制御目標値 7.0, 温度 35℃（恒温室）				

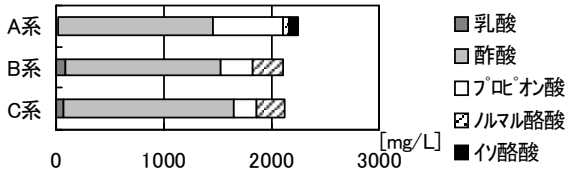
*1：蒸煮・爆砕物を水洗したもの　*2：表－5液体培地



図－8 培養液の平均的なpH と可溶化ピーク時における存在形態別の炭素構成

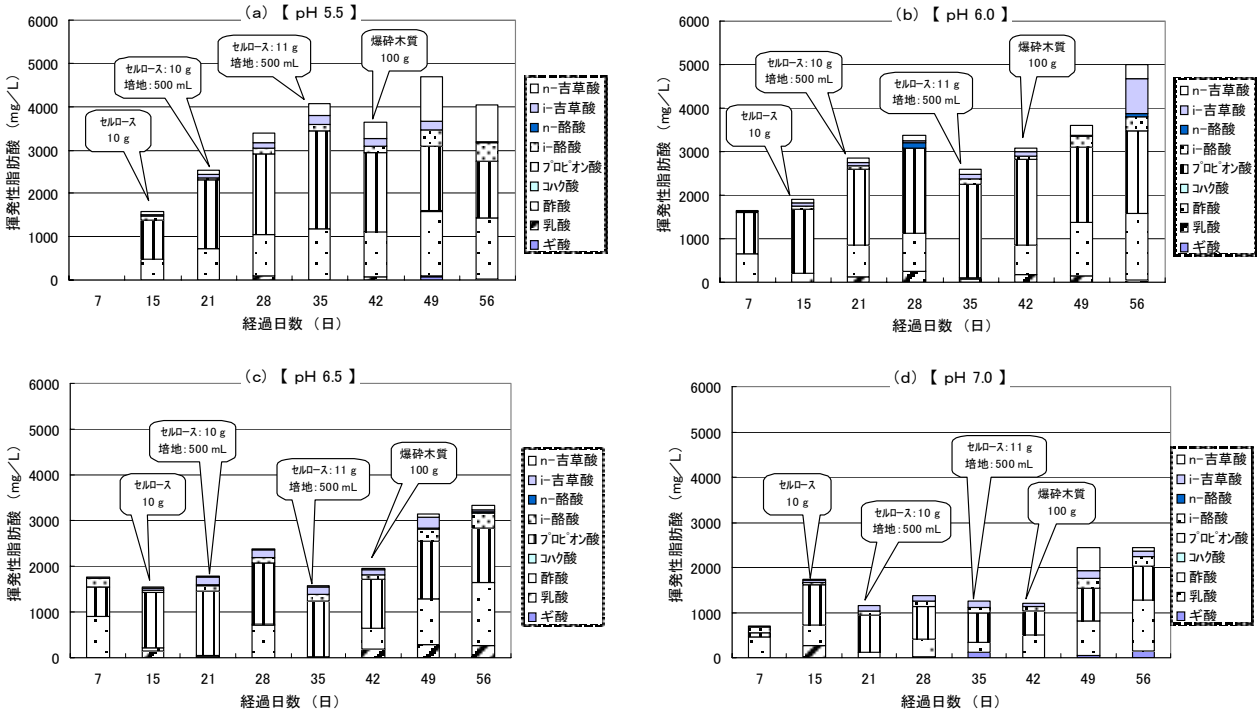


図－9 培養液の平均的なpH と可溶化ピーク時に生成された揮発性脂肪酸濃度の関係



図－10 回分実験における有機酸濃度の測定結果

微生物の活動には窒素やリンなどの栄養塩を必要とする。本実験からは、セルロースの可溶化量にともなう NH_4 および PO_4 の摂取・減少量の比として、それぞれ次の N-NH_4／C-cellulose＝0.059、P- PO_4／C-cellulose＝0.0055 が得られた。この値が、実際の酸発酵プロセスを構築する際に必要とする N と P の量を決定付けるものであり、セルロース質バイオマスへの下水汚泥の混合比率の基になる。



図－11　連続実験における揮発性脂肪酸生成量の経日変化

(2) 蒸煮爆砕木質を用いた酸発酵実験

1) 回分実験

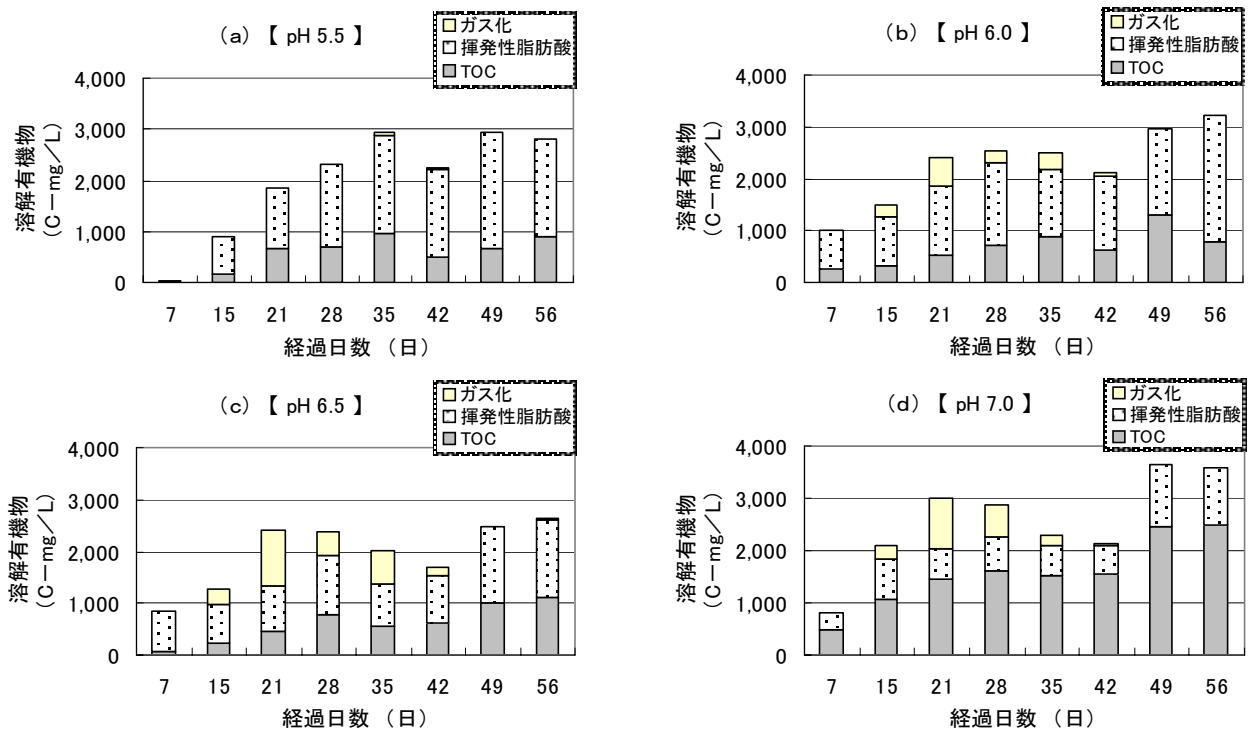
主な有機酸濃度の測定結果を図－10に示した。いずれの基質を投入した場合も、32日時点での有機酸濃度は同程度で、その主成分は酢酸である。したがって、蒸煮・爆砕木質とセルロースは、有機酸生産という目的に対しては同等に活用できると考えられる。一方、累積ガス発生量を加味した溶解性成分生成量、即ち可溶化量は炭素量換算でセルロース基質(A 系):29.9 C-g、蒸煮・爆砕物(B 系):12.8 C-g、蒸煮・爆砕物の固形分(C 系):18.5 C-g であったことから、精製品であるセルロースパウダーの方が天然系の爆砕木質よりも酸発酵し易かったといえる。

DGGE の結果は、基質の違いによりバンドパターン(細菌群集構造)が異なり、それぞれの基質に応じて異なる塩基配列を持つ(＝異なる種類の)細菌が存在していることを示した。しかし解読したバンドの塩基配列を既存のデータベースと照らし合わせると、大部分が *Clostridium* 属もしくは *Bacteroides* 属と近縁なものであった。これは、どの基質を与えた場合も、属としては同じような細菌によって群集が形成されていたことを意味する。また近縁種として名前の挙がった *Clostridium* 属や *Bacteroides* 属の細菌は、草食動物の腸内に存在するような高い酸発酵能力(セルロースの嫌気的分解能力)を持ち、そして非常に一般的なものである。これは、蒸煮・爆砕木質の分解には、通常の発酵性細菌だけで十分であることを意味している。

2) 連続実験

揮発性脂肪酸生成量の経日変化を図－11に、可溶化した有機物の形態別の経時変化を図－12に示す。日常観察からは、酸発酵自体は順調に進んでいたかのように思われたが、結果は前掲項(1)や(2)の 1)の実験結果と異なった。一つは、これまでと異なり pH が低い領域で酸発酵が進行する傾向を示した。pH6.5 や pH7.0 のケースでは 28 日経過時点までメタン発酵によると思われるガス発生が確認され、炭素量 C で評価した場合、この時点までは全て同等の成績を示していたが、その後は pH 5.5 の成績が卓越する結果となった。もう一つは、固形有機物からの可溶化量としては殆ど差異がないものの、可溶化した有機物(TOC)から有機酸(揮発性脂肪酸)への転換が pH 7 で制限されていたことである。なお、図－12の TOC には揮発性脂肪酸の分は含まれない。

以上の結果から、もし pH が 5.5 近傍の低い領域での酸発酵が可能ならば工学的にはpH 制御に必要なアルカリ剤が少なくて済み好都合となる。しかし、前掲項(1)の実験から得られた結果は中性付近が旺盛となっており更に追究、確認が必要である。また、実験からは週1回の「引き抜き」と「投入」による連続運転ではあったが、比較的安定した発酵が維持され、連続運転が困難視されていた酸発酵に可能性がでてきた。しかし、その連続性を保証する制御因子を確定するまでには至っていないことから今後



図－12 連続実験における可溶化した有機物の形態別の経時変化

の課題である。

3. 3 液体コンポスト化法

下水汚泥をはじめとする各種のスラリー状有機質を緑農地還元するためには、脱水により含水率を低減させてからコンポスト化することが一般的である。本調査では、発酵液残渣を有効利用に資するために、スラリー状の有機質に対して汎用的に適用できる液体コンポスト化法の開発を目的に余剰汚泥および消化汚泥を用いた実験を行った。

3. 3. 1 実験方法

実験は、液体コンポスト化における反応過程を調べる実験と反応過程に関与する微生物群を解析する実験から構成され、反応過程を調べる実験はそれぞれの現象把握のためにRun-1からRun-4まで行われた。

(1) 反応過程に関する実験

実験は、回分式で行い、汚泥試料が入った1Lのガラスビーカーを2L のステンレス製耐圧容器に密閉し、2気圧分の純酸素を充填して、ガス組成を測定しながら必要に応じて酸素を追加供給する方法を取った。実験期間中は、耐圧容器内の汚泥試料はマグネチックスターラーで連続撹拌し、耐圧容器は温度制御のために必要に応じて恒温水槽内にセットした。実験では、事前に温度条件に馴致した種汚泥を得るために、2種類の余剰汚泥と下水汚泥コンポストを混合して、20, 35, 50, 60, 70℃の各温度条件で約1ヶ月間培養した。

実験は、Run-1 として、余剰汚泥（基質）に少量の種汚泥を混合して温度条件：20, 35, 50, 60, 70℃で3週間培養した。次に、Run-2 として、消化汚泥（基質）に Run-1 から得られた汚泥を種汚泥として少量混合し、同様の温度条件で3週間培養した。Run-2の途中からは、70℃のケースについてのみ、更にそれぞれの温度で馴致した汚泥を植種して 20, 35℃で培養する Run-3 を2週間行った。最後に、Run-4 として、液体コンポストの保全性を調べるために、余剰汚泥を 35℃－5週間の条件で液体コンポスト化したものを 20℃と5℃に約2ヶ月間静置して、その間の成分変動を調べた。

(2) 微生物群集解析に関す実験

Run-1からRun-4までの実験から得られた液体コンポストについて、PCR-DGGE法によるバンドパターンから反応を担う細菌群集構造を調べた。また、次の方法により細菌の同定・定量の詳細検討を行い、液体コンポスト化法を生物学的に評価した。

① 試料を FastDNA Spin Kit for Soil で DNA を抽出した。この抽出液を MonoFas キットで精製して PCR 反応に供した。使用したプライマーは、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を標的とする8fおよび1492rである。

② PCR 産物を再び MonoFas で精製した後、TaKaRa Blunting Kination Ligation Kit によるライゲーション反応、E. coli JM109 Competent Cell による形質転換を、それぞれ付属のプロトコルに従って行った。

③ LB 培地に塗布して、37℃で一晩の培養後、白色のコロニーを無作為に選び、滅菌した爪楊枝で少量を採取した。このコロニーと PCR 混

合液、ベクターのM13を標的とするM13-M4およびM13-Rvプライマーを用いて、同様にPCR反応を行った。得られたPCR産物は、アガロースゲル電気泳動によってインサートのサイズを確認した後、適切と判断された各試料の約50個について、MonoFasで精製を行った。

④ 得られたクローンを対象に、付属のプロトコルに従って、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitによるシーケンシング反応、およびオートシーケンサーABI377での解析を行った。すべてのクローンについて、341fをシーケンシングプライマーとする解析から約600bpの塩基配列を得た。異なる塩基が4bpまでを同一のOTU(operational taxonomic unit)として、各OTUに518rプライマーを用いた解析も行い、合わせて約1000bpの塩基配列を得た。これらの近縁配列を、相同性検索プログラムBLASTで検索した。

3. 3. 2 実験結果

(1) 反応過程に関する実験

1) 余剰汚泥の液体コンポスト化過程(Run-1)

コンポスト化過程の進行状況の評価は、有機物の安定化(酸化分解)にともなう二酸化炭素の発生量を指標とし、投入MLVSS当たり二酸化炭素発生量を**図－13**に示した。

既存の研究[4)]では、60℃の条件であれば、熱分解による汚泥の可溶化が数時間程度で進むとされている。一般的に、有機物の分解反応では固形分の可溶化が律速段階となっているので、高温条件は反応の高速化を促す要因の一つである。今回の実験で用いた植種源(活性汚泥や安定化後のコンポスト)には、その馴致条件から考えて、超好熱性の細菌がほとんど含まれていないはずである。これらのことから、70℃で分解が進まないのは生物反応が起きないため、60℃以下の条件で温度順の分解速度となっているのは熱分解後に生物反応が起きているためと考えられる。

結果は、いずれの温度でも15日程度で二酸化炭素の発生が頭打ちとなっており、この時点でコンポスト化が完了しているとみなせる。なお、得られた液体コンポストは次の性状を有していた。

① 色調:色の変化は少なく、余剰汚泥と同じ好気的な汚泥の色を呈している。ただし高温では、若干の白色化が見られる。遠心分離後の上澄み液は、どの温度でも腐植質のような茶褐色となっている。

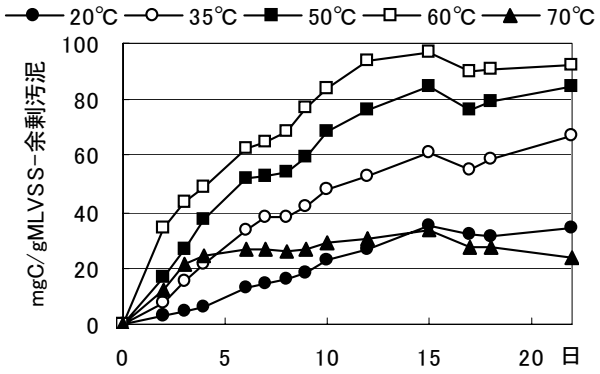
② 粘性:MLSSとして10g/L程度が残存していても、粘度はかなり低下する。

③ 臭気:70～80℃では、高圧蒸気滅菌器のような熱分解にともなう臭気が強い。それ以下の温度では、高温ほど通常のコンポスト臭が、低温ほど汚泥臭が強いものの、両者を混合したような臭気である。

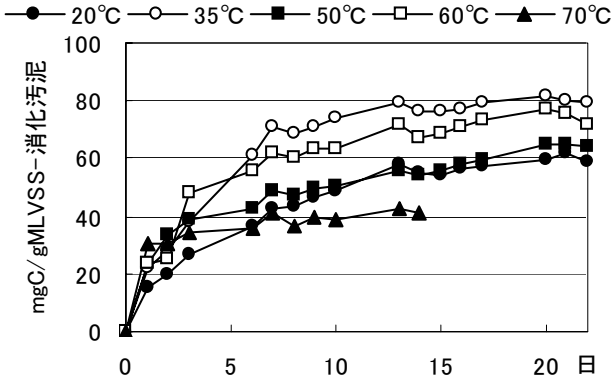
2) 消化汚泥の液体コンポスト化過程(Run-2)

Run-1の場合と同様に、二酸化炭素発生量の変化を**図－14**に示した。ここで、生物分解の寄与が小さいと予想された70℃については、二酸化炭素発生の頭打ちを確認した14日目で実験を打ち切り、得られた汚泥試料はRun-3の基質とした。

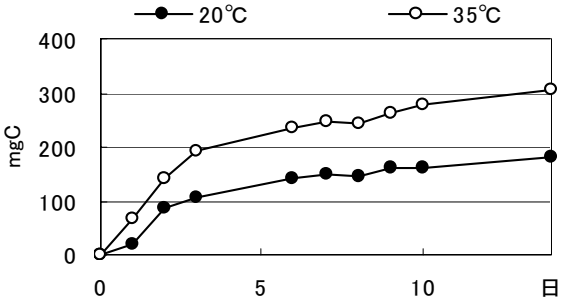
消化汚泥を基質とする場合では、温度条件が異なって



図－13 余剰汚泥基質におけるMLVSS当たりの二酸化炭素発生量の推移

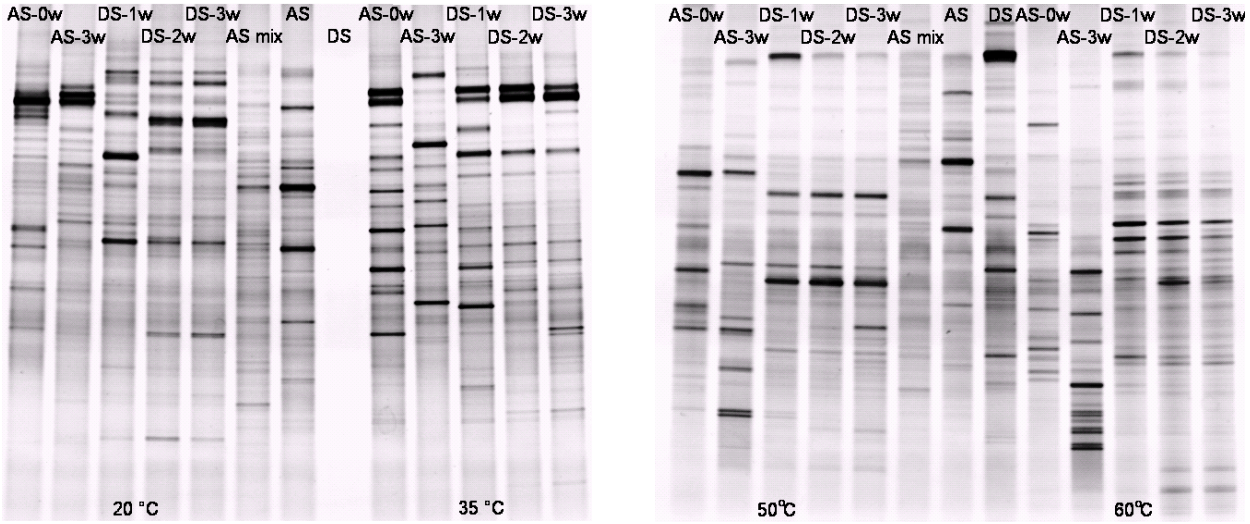


図－14 消化汚泥基質におけるMLVSS当たりの二酸化炭素発生量の推移



図－15 消化汚泥基質の70℃可溶化における二酸化炭素発生量の推移

も、分解速度や量の差があまり大きくない。また、70℃を除いて考えても、高温条件から順に分解速度や量が並んでいるわけではない。この原因としては、原料汚泥の馴致過程と本プロセスとの「条件の近さ」が考えられる。たとえば好気条件かつ常温で馴致された活性汚泥は、同様の条件(Run1の20℃)を続けても分解が遅い。しかし、熱分解や異なる細菌群集(好熱細菌)の生物反応となる条件



AS-0W:Run1への植種汚泥、AS-3W:Run1の22日目かつRun2の植種汚泥、DS-1,2,3W:Run2の7日，14日，22日目、AS mix:Pre-Run の植種汚泥、AS:Run1の基質（余剰汚泥）、DS:Run2の基質（消化汚泥）　　〈左図 DS はバンドが検出できていないが，右図 DS と同じものである。〉

図－16　Run-1，2 における基質および植種汚泥と 60℃までの条件における経時変化の細菌群集解析結果

（Run1の 60℃）では分解が速い。これに対して消化汚泥は、嫌気的な環境での生物分解を経ている。したがって、好気的な液体コンポスト化過程では、温度によらず別の細菌群集（好気性細菌）の生物反応となるため、分解は常温でも速い（Run2の 20℃）。実際、嫌気／好気条件の繰り返しによって、常温で汚泥の可溶化が促進されるという研究事例も報告されている[5)]。

これらの結果は、本手法を他のスラリー状有機質に適用する際の留意点として以下を示唆している。

- し尿や畜産廃水のように主に嫌気的な環境（動物の消化管）を経ているものは、容易に安定化が進む。
- 活性汚泥（余剰汚泥）のように好気的な環境を経ているものは、高温条件による熱分解が必要となる。

なお、液体コンポストの性状は次のとおりであった。

① 色調：好気的な汚泥の色を呈しているが、高温では若干の白色化が見られる。遠心分離後の上澄み液は、どの温度でも腐植質のような茶褐色となっている。
② 粘性：元の粘性が低かったので、変化は少ない。
③ 臭気：70℃では、高圧蒸気滅菌器のような熱分解にともなう臭気が強い。それ以下の温度では、高温側では通常のコンポスト臭が、低温側では腐葉土に近い臭気がある。

3）高温条件の前処理としての効果（Run-3）

本実験は、70℃での可溶化－常温での生物分解という手法を念頭に行ったものでありる。Run-1，2 と同様に二酸化炭素発生量の変化を**図－15**に示した。

結果は、70℃で分解した後でも常温～中温で生物分解される有機物が多量に残存していたことを示している。測定された二酸化炭素の発生量は、溶解性 TOC の減少量とほぼ等しかったので、熱分解によって可溶化された成分が生物分解されたものと考えられた。また二酸化炭素の発生で評価すると、70℃での熱分解には3日程度、その後の生物分解には10 日弱しか必要ないことが分かる。この日数の合計は、Run-1，2 で得られた単一の温度条件で安定化までに要した日数の約15日より短い。したがって、加温の費用を抑えつつ安定化を促すためには、熱分解のための高温条件と、生物分解のための常温～中温条件を組み合わせることが有効である。なお、臭気は、本実験により元の熱分解臭から腐葉土臭へと変化していた。

4）液体コンポストの保存性

溶解性の TOC は 2 ヶ月で 4 割ほど減少したが、肥料成分として重要なアンモニア性窒素は、常温・冷蔵とも 8 割以上が残存していた。これらの結果から、一定の成分変動は見られるものの、肥料としての質には大きく影響しないと考えられる。また、冷蔵保存する必要性は低く、常温での保存に耐えられることも分かった。

なお、懸念される腐敗については、外見および臭気的にも問題なく、同時期に採取して冷蔵保存した実験用原料汚泥（濃縮汚泥）に見られた「黒色化」や「腐敗臭（硫化水素臭）」といった現象は液体コンポストでは見られなかった。したがって、液体コンポスト化を行うことで、2 ヵ月程度の常温保存で成分的・外見的な問題が発生しない程度に、汚泥の安定化が達成されていたものである。

(2) 微生物群集解析に関す実験

1）液体コンポスト化過程における細菌群集構造

Run-1，2 における基質および植種汚泥と、60℃までの条件における経時変化の解析結果を**図－16**に示した。全体的な傾向として、温度や基質によってバンドパターン

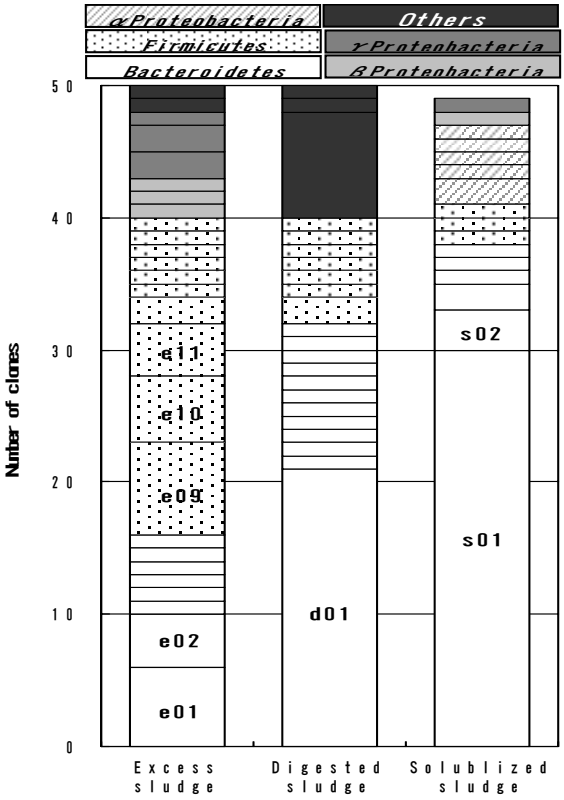
がまったく異なる。バンドパターンにこれほどの違いが見られるならば、実際の細菌群集構造も異なっている。また、コンポスト化の進行した22日目のバンドパターンが、植種源および基質のどちらとも異なっていた。

2) 細菌の同定・定量結果

余剰汚泥、嫌気性消化汚泥、可溶化汚泥を原料とする液体コンポストについて、検出されたクローンを**図－17**に整理した。余剰汚泥では *Bacteroidetes* 門（特に *Flexibacter* 属や *Chitinophaga* 属）および *Firmicutes* 門（特にClostridium 目）に近縁なクローンが大部分であり、複数の *Bacteroidetes* および *Firmicutes* 近縁細菌による多様な群集が形成されていた。消化汚泥でも、大部分が *Firmicutes*、*Bacteroidetes* に近縁であった。さらに後者では、42%相当がOTU-d01（余剰汚泥のOTU-e01と同じもの）に集中していた。細菌群集の多様性を残しながらも、*Firmibutes* 近縁クローンの減少と、それにともなう特定の *Bacteroidetes* 近縁クローンへの集中が特徴であった。可溶化汚泥では、*Bacteroidetes* に近縁なOTU-s01（e01やd01とは異なる）が61%を占めており、他の系列に比べて多様性が低かった。次に多かったのは、*α-Proteobacteria* に近縁なもので、余剰汚泥や消化汚泥で多く検出された *Firmicutes* グループの割合は6%のみであった。

このように、原料汚泥ごとの細菌群集の特徴は、*Bacteroidetes* と *Firmicutes* の比率に現れている。嫌気性消化や可溶化など分解過程を経た汚泥ほど、*Firmicutes* の割合が低下して *Bacteroidetes* の割合が高まった。この傾向には、汚泥の性状（固形分量）の影響が考えられる。一般に Clostridium 目やその近縁種は、高分子有機物を嫌気的に分解（加水分解、発酵）する特性を持つ。したがって、液体コンポストのように酸素を供給した場合には、固形分の近傍または内部といった局所的な嫌気条件に存在する可能性が高い。本研究での固形分負荷量は、消化汚泥が余剰汚泥の4割ほど、可溶化汚泥は1割強であった。このような固形分負荷の差異が、局所的な嫌気条件の実現状況を通じて、Clostridium 目の優占度に影響を及ぼしていると考えられる。

一方で、*Flexibacter* 属や *Chitinophaga* 属に近縁なもの（OTU-d01、s01）は、Clostridium 目との対照的な挙動から、好気的な環境条件で溶解性有機物を基質として利用する可能性が高い。すなわち、Clostridium 目に近縁な細菌が汚泥の（嫌気的な）可溶化を、*Flexibacter* 属や *Chitinophaga* 属に近縁な細菌が好気分解を、それぞれ分担しているという仮説が立てられる。クローニング法だけでは細菌の機能を推定することができないという限界があ



図－17 余剰汚泥、嫌気性消化汚泥、可溶化汚泥を原料とする液体コンポストにおいて検出されたクローン

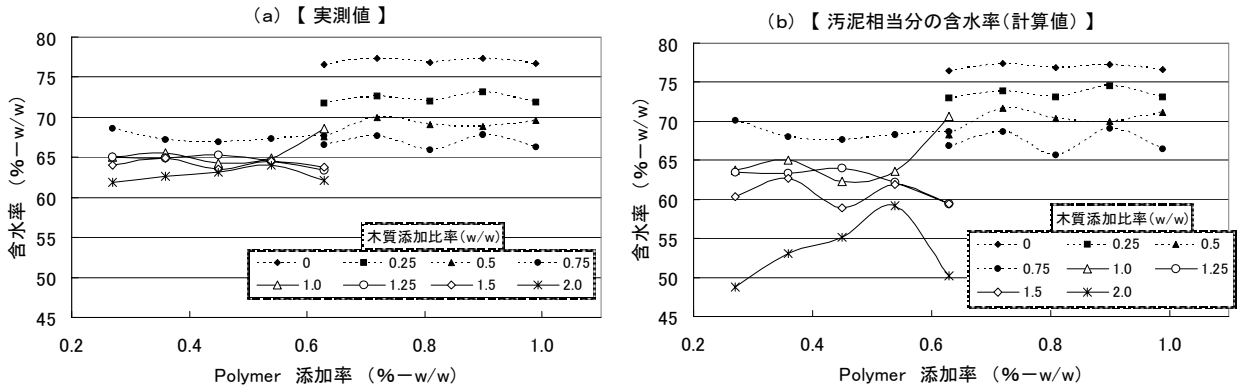
るため、このような仮説の実証は今後の課題として残される。

本研究で優占していた *Firmicutes*（*Clostridium* 目）や *Bacteroidetes* は、多くのコンポストでも検出例が報告されている。これに対して、活性汚泥での優占が知られている *α*、*β*、*γ-Proteobacteria* は、余剰汚泥系列の液体コンポストにおいてさえも 2 割以下しか検出されなかった。この結果は、液体コンポスト化を経ることによって、投入した下水汚泥の細菌群集が大きく変化したことを示唆している。このような細菌群集の変化が、有機物分解過程で一般的に観察されるならば、細菌群集を有機物安定化の評価指標とすることも可能だろう。ただし、既存の研究では細菌群集に関する情報に乏しく、*Firmicutes*（*Clostridium* 目）や *Bacteroidetes* などの重要と考えられる細菌群の定量的な情報の蓄積が必要である。

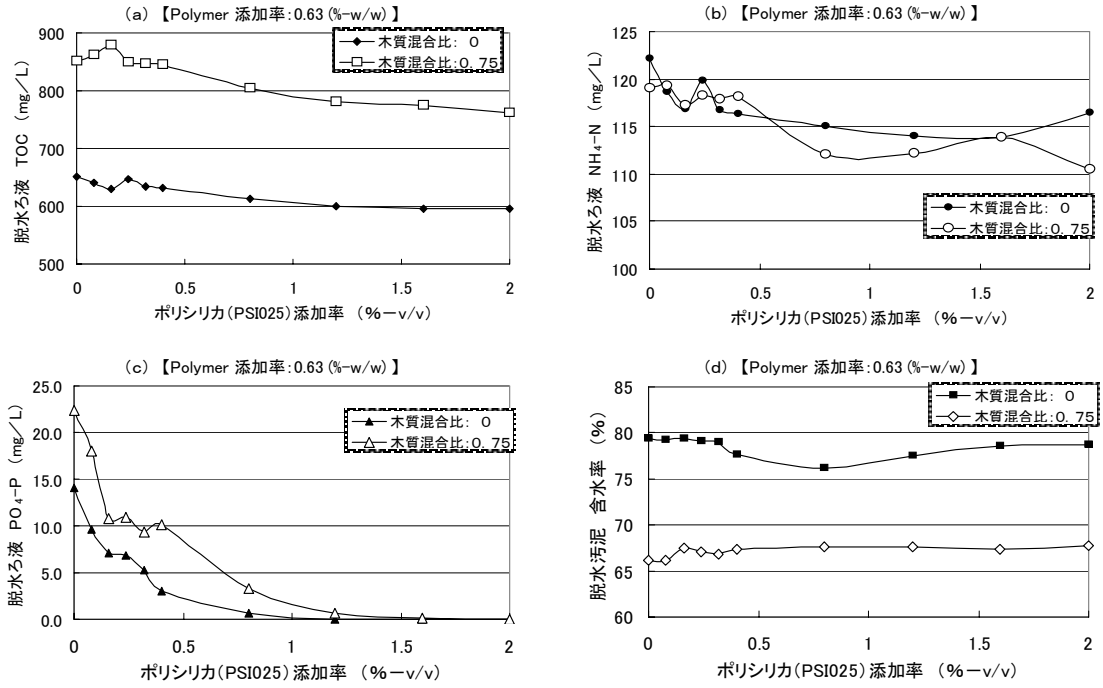
3. 4 木質材の脱水助材性

3. 4. 1 実験方法

実験は、木質材に街路樹管理から発生した枝材を機械的にチップ化した後、更に摩砕したものを譲り受け適用した。その形状は長さが最大でも1cmほどの粉砕物であり、強さはハダに刺激を感じないほどに柔らかく解された状



図－18 Polymer の添加率と脱水汚泥の含水率の関係



図－19 木質材の混合率と Polymer 添加率を一定とした場合のポリシリカ鉄添加率と脱水成績

態のものである。下水汚泥には、脱水に供するまえの混合生汚泥を譲り受け適用した。

実験は、下水汚泥に対する木質材の混合率を固形物比で 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2 と成るよう混合し、これに下水汚泥を譲り受けた下水処理場で使用されていた高分子凝集剤(Polymer)を作用させ脱水性を調べた。また、木質材由来の溶解性物質の低減効果をみるために、鉄系凝集剤(ポリシリカ鉄:PSI 025)をも作用させた。脱水性は、前掲 **3.1.1** の**(4)**項に示した操作①～⑧と同様(但し、④では 500mL ロート加工ポリビンを適用した。)に行った。

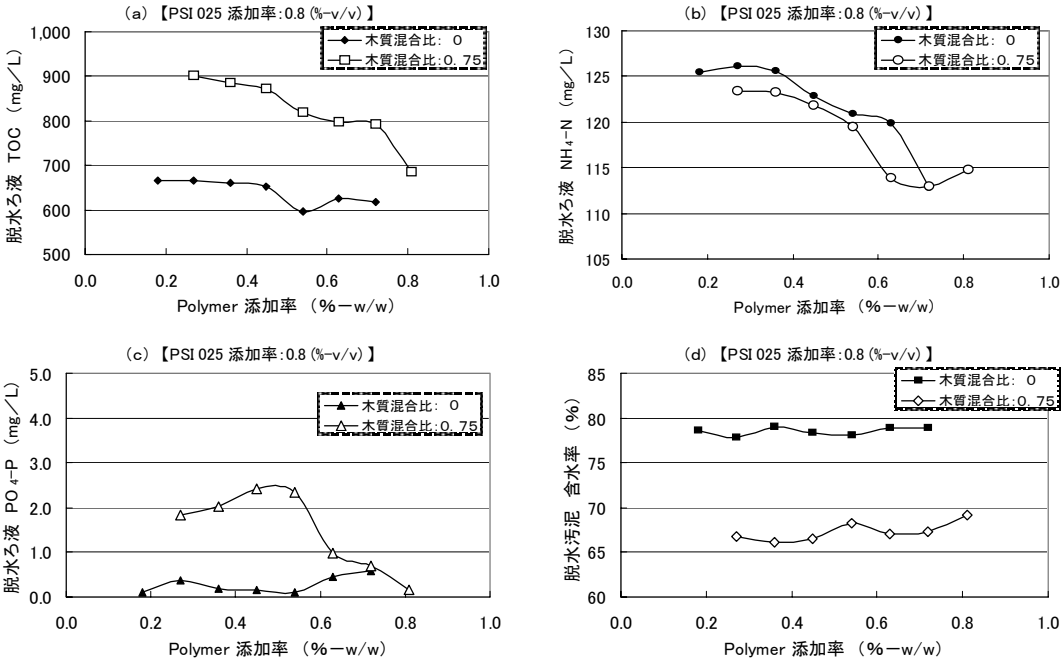
3. 4. 2 実験結果

下水汚泥に木質材を混合し、Polymer の添加率を変えた脱水実験における脱水汚泥の含水率の結果を**図－18**に示す。(a)図の含水率は実際に脱水汚泥の含水率を分析した結果を表示したものであり、(b)図は、木質混合による下水汚泥の脱水性改善効果をみるために、混合した木質材持ち込み分を差し引いた下水汚泥のみの含水率として算出、表したものである。

結果は、木質材の混合により下水汚泥の脱水性が格段に改善されることを示し、その効果は下水汚泥に対する混合率が1よりも低い領域で顕著に現れるものとなっている。

図－19は、木質材の混合率と Polymer 添加率を一定とし、ポリシリカ鉄の添加率を変えた結果である。ポリシリカ鉄添加はリン以外への効果は少ない。

図－20は、木質材の混合率とポリシリカ鉄の添加率を一定とし、Polymer の添加率を変えた結果である。鉄塩と Polymer 併用は、適度な添加率の組合せを取ることで脱



図－20 木質材の混合率とポリシリカ鉄の添加率を一定とした場合の Polymer の添加率のと脱水成績

水ろ液から TOC や NH_4、PO_4を効果的に削減できる可能性を示し、また、その効果は木質を混合した場合に大きいものとなっている。

以上の結果は、木質材の混合は下水汚泥の脱水性改善に大いに効果があることを示した。実際の下水処理場に適用する場合は、その木質材の入手が容易、或いは担保できることの他に、下水処理場そのものに大きなメリットが生じる必要がある。例えば、脱水後のコンポスト化や乾燥、炭化、燃焼等において大幅なエネルギー改善と品質向上が図れることなどが考えられる。さらには、下水処理場を地域に於ける資源化基地と位置付け、下水処理には負担増となっても地域全体で大幅な改善ができれば適用の価値は大きい。

3. 5 爆砕木質の緑化資材化

緑化資材に天然のピートモスが用いられており、これに替わる資材を土木工事や緑地管理由来の伐採・抜根材を原料に開発している。そこでは、構造的には発生材に蒸煮爆砕を施す方法が有効であり、法面等の厚層吹付け材として実用できることが分かっている[6)]。しかし、ピートモスは園芸用としても用いられており、直接の使用に耐え得るには木質の蒸煮爆砕物が有する発芽障害を取り除く必要がある。このために、木質蒸煮爆砕物に生物学的な安定化を図るコンポスト化の実験を行った。

3. 5. 1 実験方法

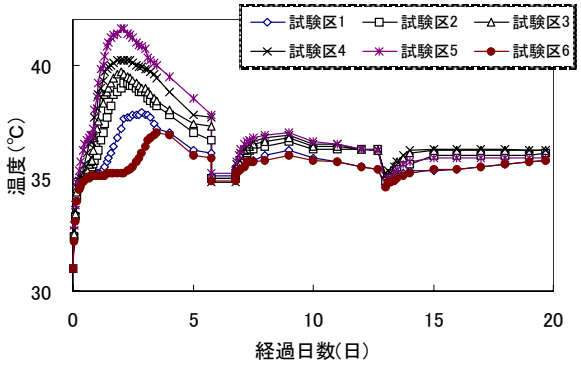
実験は、最初に、種コンポストを作るために、針葉樹系と広葉樹系の爆砕物のそれぞれ 5L に対して、活性汚泥 200mL、下水汚泥コンポスト 250g、炭酸カルシウム 15.6g を混合し、保温材で覆ったアクリル樹脂製の発酵カラム（φ10cm×H65cm）に仕込み約1ヶ月間のコンポスト化を図った。

次に、これを種コンポストとして、植種（返送コンポスト）率および種子の発芽生育状況を調べるために、試験区1～6を設定し、それぞれ植種率を 1, 5, 10, 20, 30, 0%として仕込み、35℃の恒温室において針葉樹および広葉樹試験区について、それぞれ 20 日間と 21 日間のコンポスト化を行った。仕込みでは、中和資材として炭酸カルシウムを 3g/L となるように混合し、それらに種コンポストを加え、十分混合した後に発酵カラムに充填した。このときの含水率は針葉樹系:72～74%、広葉樹系:66～70%であった。発酵カラムは、種コンポストを準備したものと同じであり、発酵カラムの下部から空気を供給、発酵温度をモニターしながら1週間経過毎に切り返しを行った。

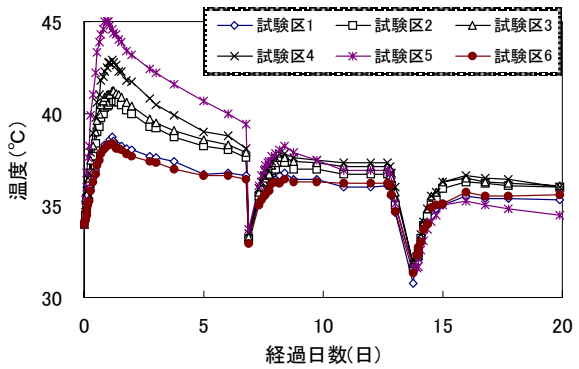
種子の発芽生育状況は、コンポスト化過程で得られた発酵物にコマツナ、メドハギ、トールフェスクを播種したものを 20℃の恒温室に静置して調べた。その播種方法は、コンポストを滅菌シャーレ（φ90mm×H15mm）に敷き、表面を均した上に各種子３粒ずつ播種、その上にコンポストを覆土として表面を均し、イオン交換水を適当量滴下してシャーレ上蓋で覆った。

3. 5. 2 実験結果

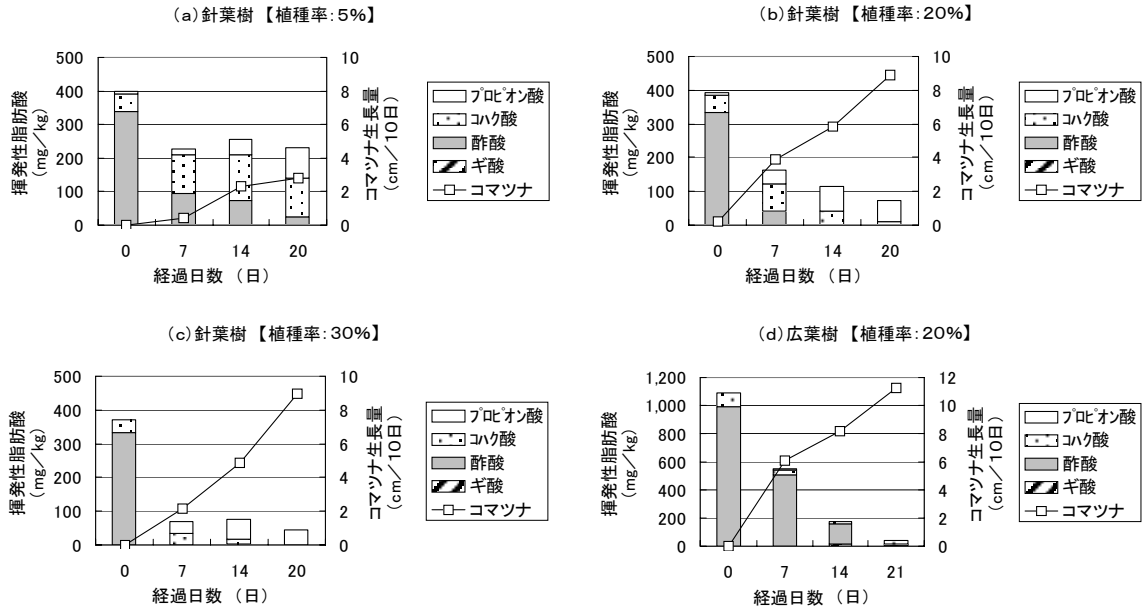
発酵温度の経時変化を**図－21と22**に示す。針葉樹



図－21　針葉樹系における発酵温度の推移



図－22　広葉樹系における発酵温度の推移



図－23　醗酵過程における揮発性脂肪酸量の変化と、それぞれの時点の醗酵物に播種したコマツナの10 日間生長量の関係(一例)

および広葉樹を用いた試験区ともに実験開始直後から温度が上昇し、最も速く温度が上昇したのは当然のことながら試験区 5 で次いで植種率が高い順に試験区 4、3、2、1、6 であった。この順番は最高温度についても同様で、最も温度が高かったのも試験区 5 であった。到達温度は針葉樹よりも広葉樹の方が高く、生物分解性の有機物を多く含んでいることを示した。醗酵温度は、温度が高くなったケースでも3週間ほどで低下、安定化する傾向を示し、醗酵の終了を示唆した。

醗酵物中の溶解性有機物の推移も醗酵温度に追従した傾向を示し、発芽障害要因と考えられた揮発性脂肪酸も効果的な減少を示した。また、いずれの資材、試験区においてもpHやECは発酵の進行にともない安定する傾向を示し、値自体も植物生育に支障ない範囲にあった。

播種した3種の植物は、植物種による違いはあるもの醗酵の進行とともに発芽率の向上とより大きな成長を示した。

ここで、**図－23**は、醗酵過程における揮発性脂肪酸量の変化と、それぞれの時点で醗酵物に播種したコマツナの 10 日間生長量の関係の一例である。図の(a), (b), (c)に見られるように針葉樹系においては植種率が高くなるほどに揮発性脂肪酸も効果的に減少し、さらにコマツナの生長量も向上している。しかし、図(d)の広葉樹の結果と比較すると、広葉樹では酢酸が多量に存在している時点でも、揮発性脂肪酸が殆ど存在しない針葉樹の図(c)よりも大きな成長を示し、針葉樹系にはコマツナ成長を阻害する揮発性脂肪酸以外の物質が存在することを示唆している。この現象は他の播種植物でも確認されたことから、針葉樹系ではより長い醗酵期間、安定期間が必要と思われる。一方、広葉樹系は、前掲の図－22からも示された

ように、効果的な温度上昇が図れるよう植種率を5%以上とし、そのもとで高温醗酵期を経験するとともに連続醗酵の過程で常温近くまで自然に温度降下したものであれば、ピートモス代替としての園芸資材化が可能と思われる。

4. まとめ

草木と下水汚泥の混合嫌気性消化法に関して以下が得られた。

(1) 草木は爆砕により効果的に微細化、低分子化され、その程度は原料の種類により異なる。

(2) 広葉樹系の爆砕物には溶解性の有機物が多量に含まれる。

(3) 広葉樹系爆砕物と下水汚泥との混合メタン発酵は円滑に進行し、双方の固形物混合比で1:1以上でも酸発酵に陥ることはなかった。

(4) 蒸煮・爆砕された木質が発酵槽に投入されることによる槽内撹拌動力への影響を発酵液の粘性から調べた結果、蒸煮・爆砕木質の混合比の増加に比して発酵液の粘性増加は相当に低く、蒸煮・爆砕木質と下水汚泥との固形物混合比が1:1以内までは、槽内撹拌設備への大幅な負荷増大に繋がる危険性は少ないと思われた。

(5) メタン発酵液中には溶解性のTOCとPO_4が多く残存する傾向を示したが、これは鉄系の凝集剤で効果的に除去され、実際には脱水工程で鉄塩を併用すればよいものであった。また、メタン発酵液中のNH_4は爆砕物の混合比が増すごとに大幅に減少していた。

(6) 爆砕物と下水汚泥との混合メタン発酵系の発酵液の脱水では下水汚泥単独の場合より低い含水率が得られた。

有機酸発酵に関して以下が得られた。

(7) セルロースの可溶化・酸発酵はpHの影響を大きく受け、pH 6を境にそれより低い領域と高い領域における発現傾向に違いが認められた。

(8) 可溶化が最も進行したpHは7.5近傍にあり、そこでの可溶化率は92 %であった。また、酸発酵活性はpH 6.5～8の中性領域で高く、そこでの主成分は酢酸であり、その濃度は10、000 mg／Lを越えるものであった。揮発性脂肪酸全体の最大の濃度として13、000 mg／Lが得られ、そのセルロースからの収率は650 mg-VFA／g-cellulose であった。

(9) セルロースの可溶化・酸発酵にともなうNH_4およびPO_4の摂取に関して、炭素の可溶化量と窒素およびリンの量の比としてそれぞれ、N-NH_4／C-cellulose＝0.059、P-PO_4／C-cellulose＝0.0055が得られた。

(10) 蒸煮・爆砕処理した木質廃材は、純粋なセルロースと同様に、酢酸を主成分とする有機酸発酵の原料として使用可能であった。ただし副成分には相違があり、セルロース基質に比べてプロピオン酸が少なく、酪酸が多かった。

(11) 有機酸の回収率を高めるためには、メタン発酵まで進行させないような運転管理手法、具体的には反応時間の設定が重要である。

(12) いずれの基質を用いた場合でも、反応系内に存在していたのは *Clostridium* 属と *Bacteroides* 属に近い種類の細菌であった。ただしPCR-DGGE法で検出されたバンドパターンは異なっており、種で見れば群集構造に違いがあった。

(13) pHを5.5, 6.0, 6.5, 7.0に制御した週1回の「引き抜き」と「投入」による連続実験からは、各pH間において固形有機物からの可溶化量には殆ど差異がなかったが、可溶化した有機物から揮発性脂肪酸への転換がpH7で制限されていた。実用化までには、これまでの結果に反する中性近傍よりも酸性側で旺盛な酸発酵が現れたことや安定した連続発酵を維持できた支配因子が不明であることから、これらについて更なる追究が必要である。

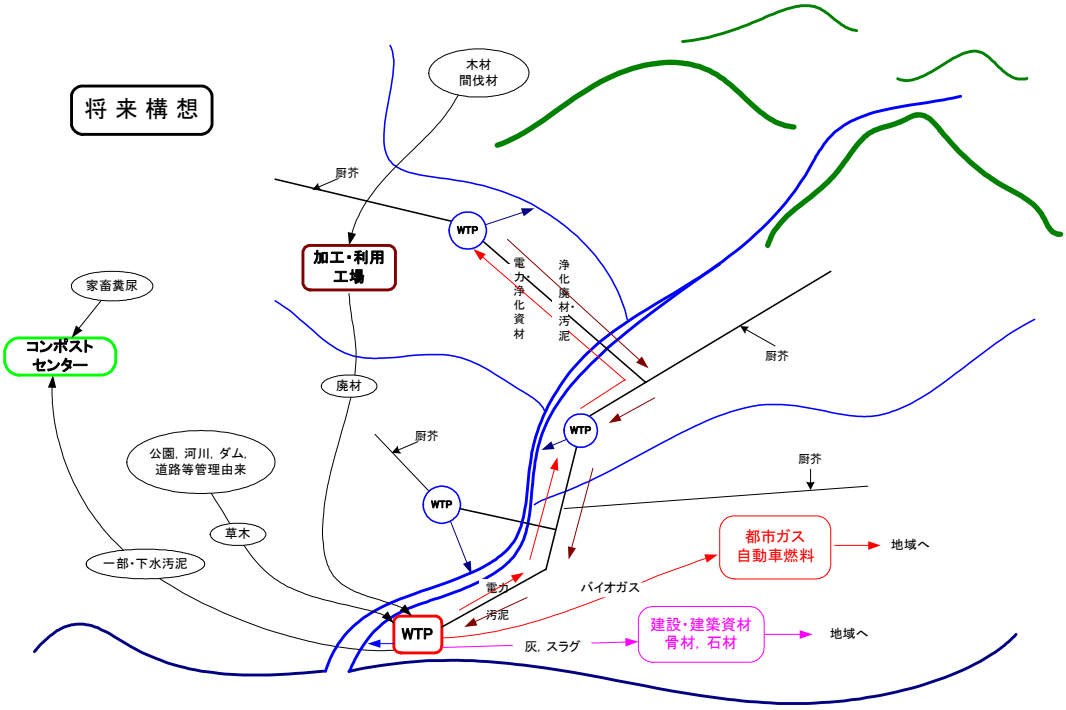
液体コンポスト化法に関して以下が得られた。

(14) 余剰(濃縮)汚泥、消化汚泥とも、酸素を加圧充填した液体コンポスト化手法によって、2週間程度で安定化させることができた。70℃以上では熱分解が、60℃以下では生物分解が主要な反応であった。

(15) 高温での熱分解は、主に固形分の可溶化反応であった。可溶化された成分は生物に利用されるので、短期間の高温条件の後に常温～中温条件を設定すれば、熱分解と生物分解を効率よく組み合わせられる。

(16) 液体コンポストには、温度や原料汚泥に応じた多様な細菌群集が形成されていた。余剰汚泥を原料とした場合は *Bacteroidetes* 門(特に *Flexibacter* 属や *Chitinophaga* 属)および *Firmicutes* 門(特にClostridium目)に近縁なクローンが大部分であり、複数の *Bacteroidetes* および *Firmicutes* 近縁細菌による多様な群集が形成されていた。

(17) 消化汚泥を原料とした場合でも、大部分が *Firmicutes*、*Bacteroidetes* に近縁であり、特に *Bacteroidetes* では42%相当がOTU-d01に集中していた。余剰汚泥の場合と同様に細菌群集の多様性を残しながらも、*Firmibutes* 近縁クローンの減少と、それにともなう特定の *Bacteroidetes* 近縁クローンへの集中が特徴



図－24　下水処理場を核とした有機質廃材の地域的な資源化・リサイクルシステムの構想図

的であった。

(18) 70℃を経験した可溶化汚泥を原料とした場合は、*Bacteroidetes* に近縁な OTU-s01（e01 や d01 とは異なる）が 61%を占めており、他の系列に比べて多様性が低かった。

(19) 原料汚泥ごとの細菌群集の特徴は、*Bacteroidetes* と *Firmicutes* の比率に現れ、嫌気性消化や可溶化など分解過程を経た汚泥ほど、*Firmicutes* の割合が低下して *Bacteroidetes* の割合が高まった。これには供試汚泥の固形分量の影響が考えられた。

木質材の脱水助材性に関して以下が得られた。

(20) 木質材に街路樹管理から発生した枝材を機械的にチップ化後、更に摩砕したものを下水汚泥（混合生汚泥）に混合して脱水性を調べた結果、木質材の混合は下水汚泥の脱水性を大幅に改善した。

(21) その改善効果は下水汚泥に対する混合比率が1よりも低い領域で顕著に現れた。

(22) 木質材混合による脱水ろ液の水質悪化に対しては、鉄塩と高分子凝集剤の併用で対応できる可能性が高い。

爆砕木質の緑化資材化に関して以下が得られた。

(23) 木質爆砕物において、成長阻害要因であると考えられる揮発性脂肪酸は、コンポスト化を行うことで効果的に減少する。また、コンポスト化により植物の発芽率や成長量も向上する。

(24) 広葉樹系爆砕物は5%以上の返送コンポスト率（実験では植種率と称した）の基で、旺盛な高温醗酵を経験し、醗酵温度が低下、安定してきたならば植物への障害は大部分取り除かれたと判断してよく、ピートモス代替となり得る可能性が高い。

(25) 針葉樹系爆砕物中には揮発性脂肪酸以外の植物成長阻害物質を含有していると思われ、その障害を除去するためにはコンポストの醗酵期間を広葉樹系よりもより長く取る必要がある。具体的には、旺盛な高温醗酵期が終了した後も、堆積等により、ある程度の常温醗酵期間（安定期間）を取る必要がある。

5. 総　括

本調査は、**図－24**に示す下水処理場を核とした有機質廃材の地域的な資源化・リサイクルシステムを構築するために必要な資源化技術を整備する一環として実施したものである。

調査結果は、木質廃材の利用に関して、爆砕木質と下水汚泥の混合嫌気性消化法は実用可能と判断され、資源としてのメタンガス生産に大きく寄与できる。また、発酵液残渣に関しては緑地・農地利用に資するための液体コンポスト化法の有用性を見出した。これらの実用化は機械設備的な検討を待つのみにあると言える。

木質廃材を摩砕したものは下水汚泥の脱水助材として有効であることが示された。また、爆砕木質に少量の下水汚泥を添加してコンポスト化を施せば、ピートモスに替わる園芸資材と成り得ることが示された。これらは直ちに実用可能と思われる。

有機質廃材からの有機酸発酵に関しては、発酵そのものを確認、維持することができたが、それを維持・持続させる制御因子が不明であり、実用化には更なる追究が必要である。

参考文献

1) 社団法人日本下水道協会：下水試験方法、1997

2) 森川弘道：木材のポップコーン－Explosion 法とその産物－、化学と生物、Vol.19、No.5、pp.286_291、(1981)

3) 建設省土木研究所下水道部汚泥研究室、「下水汚泥の流動特性に関する調査報告書」、土木研究所資料第 3363 号、p.57 (1995)

4) 長谷川進、三浦雅彦、桂健治：好熱性微生物による有機性汚泥の可溶化、下水道協会誌、Vol.34、No.408、pp76-82、1997

5) 宮永一彦、高野俊、丹治保典、海野肇：繰り返し嫌気－好気反応における汚泥中の生菌率評価、第39回日本水環境学会年会講演集、p79、2005

6) 宮本綾子、根本健児、舛田智江、高橋徳、牧孝憲、落修一：草木廃材を用いた吹付け緑化資材の開発、土木技術資料、Vol.47、No.2、pp28-33、2005

下水汚泥焼却灰の無機質特性に着目した有効利用方法に関する調査

土木研究所　リサイクルチーム　上席研究員　尾﨑　正明
主任研究員　山下　洋正
宮本　綾子

1. はじめに

下水汚泥の約８割が焼却されて焼却灰が多量に生成されているが、その無機質特性は十分に解明されておらず、系統立てた有効利用方法が研究されていない。そのため、含有リンを資源として回収する場合に処理コストの面で問題があり、建設資材利用の安定的かつ有効な技術も限られている。本研究では、下水汚泥焼却灰のリン資源回収および建設資材利用の観点から、無機質の存在・分布状態や反応特性を明らかにするとともに、新たな資源回収方法と建設資材利用方法の提案および開発を行う。

汚泥からのリンの回収にどのような方法か有効であるかを検討するために、下水汚泥中でリンがどのような形態で存在し、処理過程でどのような変化をしているかを調査することが有効であると考えられる。このため､平成 17 年度は水および汚泥の処理方式が異なる処理場で採取した各処理段階の汚泥およびを対象とし、SEM-EDS を用いた観察、逐次抽出試験を行い、各試料中のリンの化合状態および分布について調査した。

また、下水汚泥の建設資材への有効利用としては、2002 年に溶融スラグについて「一般廃棄物、下水汚泥等の溶融固化物を用いたコンクリート用細骨材」(TR A 0016)と「一般廃棄物、下水汚泥等の溶融固化物を用、いた道路用骨材」(TR A 0017)の 2 つの TR が公表されており、今後、JIS として標準化される見通しとなっている。コンクリート用骨材 JIS には、利用の際、金属鉄を含有する場合は発錆による着色および密度変化の原因となる可能性があるとされ、含有量の基準値が設定されている。今年度は、金属鉄の新たな測定方法として JIS に追加されることとなったメスバウアー分光分析法による溶融スラグ中の金属鉄を定量し、従来の分析方法との比較を行った。

2. 調査内容

2.1 下水汚泥の逐次抽出試験

処理場に流入した後、下水中に含有されるリンの存在形態は水および汚泥の処理過程で変化すると考えられる。リンの回収を行う場合にどの処理過程で回収すれば効率がよいか、また、どのような回収方法が適用できるかを検討するにあたって、その化学形態を明らかにすることが有効となる。ここでは、水および汚泥の処理方式が異なる汚泥を対象に、汚泥や底質に含まれる元素の形態別定量手法として用いられている逐次抽出試験を適用し、処理過程におけるリンの形態の変化を調査した。本実験では、表 1 に示すように標準活性汚泥法あるいは A2O 法の処理系をもつ処理場を対象として、流入水、活性汚泥（エアレーションタンクあるいは好気槽終端より採取)、濃縮汚泥、消化汚泥を採取し、試料とした。使用している凝集剤は表 1 に示したとおりである。

2.1.1 試験方法

焼却灰以外の試料は 3000rpm/20min にて遠心分離し、1g-DS にあたる量を使用した。

無機態の詳細な分画を行うために、逐次抽出試験は川崎らの方法によった。これらの分画試験による形態分別は底質を対象として最適化されているため、本実験の供試試料である下水汚泥から抽出された形態が必ずしも同じであるとは限らず、むしろそれぞれの操作によって結合力の強さを分画している。5 つの画分の

うち第 1 から第 3 の画分は比較的易溶性であり、第 1 画分交換性、第 2 画分は弱酸に溶解する形態であり、第 3 画分は還元状態になると可溶化するとされている[1),2)]。

抽出試験後の試料の一部は 110℃-2h で炉乾燥したのち、エネルギー分散型 X 線分析装置（SEM-EDS）を用いた元素分析を行った。

2.1.2　分析結果

逐次抽出試験に用いた汚泥の 1g-DS あたりのリンを王水分解して ICP-AES で計測した結果を表 1 にあわせて示す。なお、サンプリング時の聞き取りによれば、処理場 B は A2O 法で処理を行っているものの、リンのほとんどはポリ鉄によって除去されており、嫌気槽でのリンの吐き出しは A2O 法を用いている他の処理場の約 1/10 とのことであった。

表 1　各試料の詳細とリン含有量

	A	B	C	
凝集剤	PAC	ポリ鉄	なし	
処理方式	A2O	A2O	標準活性汚泥法	
流入水	4.8	2.9	6.9	mg/L
活性汚泥	22.8	32.0	13.8	mg/g･DS
濃縮汚泥	－	16.3	16.4	
消化汚泥	28.3	32.2	21.9	
焼却灰	82.0	－	－	

表 2　逐次抽出試験の回収率

	A	B	C
活性汚泥	49.0	78.2	74.4
消化汚泥	46.4	91.4	72.5
焼却灰	75.5	76.1	75.9

2.1.3 分析結果

リンの逐次抽出試験結果について計算した回収率を表 2 に示す。これは、第 1～第 4 画分および残渣態で定量されたリンの総量と全量分解で得られたリンの総量との比である。A 処理場では 50%以下と非常に低く、その他の汚泥では 75%前後のものが多かった。A 処理場の回収率が低かった原因としては、試料の採取から試験の開始までの時間が他の 2 つと比較して長かったことから、その間に固相中のリンが液中に移動したことが原因と考えられた。

主要元素の逐次抽出試験の結果を図 1 に示す。汚泥中のリンは残渣、ついで第４画分（有機態）に分画される割合が高く、DS1g あたりの含有量としては焼却灰で他の 3 倍以上となっていた。また、A 処理場の汚泥は他の処理場のものと比較して活性汚泥、消化汚泥で易溶性に分画される割合が高く、それぞれ 34%、24%となった。この実験に先立って行った試薬の逐次抽出試験では、リン酸アルミニウム、リン酸鉄等に含まれるリンは 85-100%が残渣態に分画されていた。この結果と A および C 中の鉄、カルシウム、アルミニウムの分画結果をあわせると、第４画分中にはリン酸カルシウムが含まれ、ポリ鉄を添加した B のリンは高い割合でリン酸鉄として存在している可能性があった。また、B は活性汚泥および消化汚泥で残渣態の割合が 90%前後であったことから、アルミニウムにより凝集されたリンよりもポリ鉄によって凝集したほうが結合が強いことが示唆された。しかしながら焼却後は A もほとんどが残渣態となっていることから、焼却の過程を経ることで難溶性の鉄・アルミ等との化合物に変化するとみられた。

逐次抽出の結果のうち、重金属類の結果の一例を図 2 に示す。元素ごとに特徴のある挙動をしているが、残渣態以外に分画される割合が高いものも多く、焼却灰以外では特に Cu、Se では 75-85%程度が第４画分に抽出された。また、As、Se などでは、焼却後に易溶性画分の占める割合が急激に増加していることがわかった。例えば As や Se では、焼却の際に揮発して灰粒子表面に再付着する可能性も指摘されていることから、粒子中の位置的な分布も溶出特性に影響を与えるとみられる。これらの結果から、仮にリン回収を灰から行う場合、たとえば資源回収の前処理として灰の洗浄などをすることで重金属類の有価物側への移行を制御す

ることができる可能性もある。

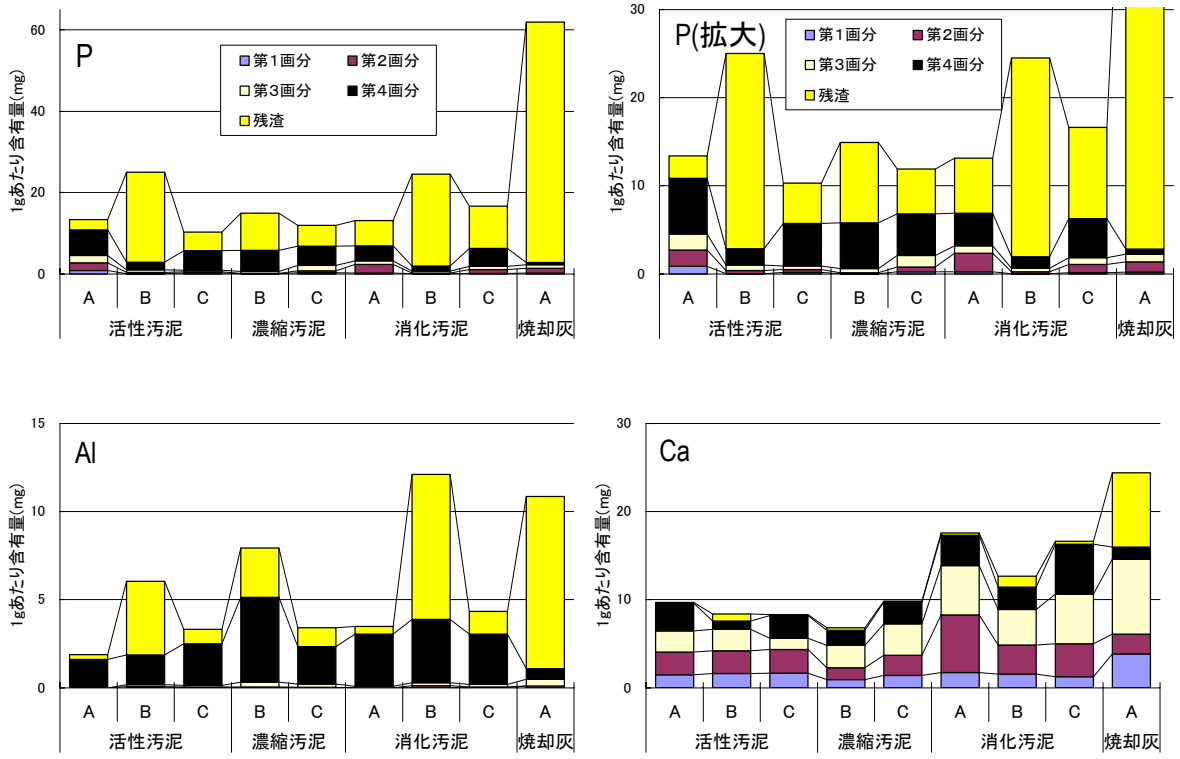


図１　逐次抽出試験結果

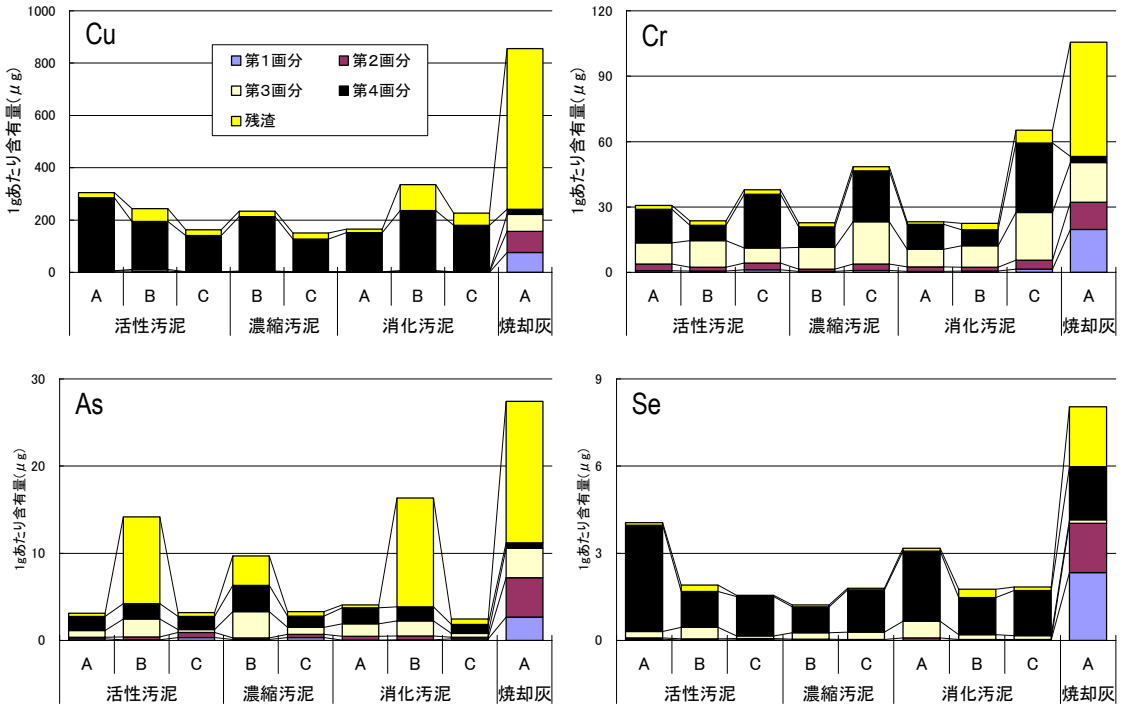


図２　逐次抽出試験結果

一方で、逐次抽出試験後の残渣を電子線マイクロアナライザ(EPMA)で分析したところ、第４分画で抽出できると考えていたリン酸カルシウムとみられる化合物が残っている箇所もみられた。また、粒子ごとの成分組成は、全量分解による元素分析の結果とは大きく異なっており、多くの粒子は複数の化合物からなっていたが、一部には特定の元素濃度の高い粒子もみられた。これらのことから、この方法の逐次抽出試験の結果のみでリンの存在形態について判断することは困難であり、異なる逐次抽出試験との比較、あるいは分析方法もあわせて考えていく必要がある。

今回の結果から、汚泥に含有されるリンのうち、この分画方法での易溶性に分画されるものはどの処理段階でも限られた量であり、ポリ鉄を添加した場合はPAC添加あるいは凝集剤非添加の場合と比較して消化汚泥での残渣態の割合が増加するなど、凝集剤が大きく影響していることがわかった。

有効なリンの回収方法として１）濃縮汚泥・消化汚泥の有機態からの回収　２）残渣態からの回収　の２点があげられるが、実処理場を想定すると、規模が小さく集約的に処理を行う場合には処理までの成分の安定していることが望ましい。また、焼却灰には有機物が含まれないことからリンが高度に濃縮されている。現在、焼却灰からのリン回収手法としては酸/アルカリ抽出などが検討されているが、これらの方法は焼却灰中の残渣態からリンが抽出されていることになる。

2.3　下水汚泥溶融スラグの分析

2.3.1　金属鉄の分析

下水汚泥溶融スラグ中の金属鉄含有量の分析は、これまでフェロニッケルスラグに適用される金属鉄分析法と同様の化学分析（湿式分析）が行われることとされていた。しかし、この分析方法では下水汚泥溶融スラグに特有であるリン鉄なども金属鉄として定量されてしまい、測定値が基準値の 1%を超える場合があり、このままではJIS規格適用の支障となる可能性が高い。一方、メスバウアー分光分析では化合物中の鉄を価数ごとに定量できるため、より精度の高い金属鉄の分析が可能と考えられ、コンクリート用溶融スラグ JISの付属書に記載されることとなった。今回の調査では、メスバウアー分析によるスラグ中金属鉄の定量を行うとともに、湿式分析の結果と比較した。また、鉄化合物の試薬について同様の湿式分析を行い、妨害となっている可能性のある化合物を調べた。

2.3.2　試験方法

溶融スラグは処理場で採取した後約１週間以内に100μm以下に粉砕して各試験に用いた。粉砕後のスラグは、酸化を防ぐために真空状態で保存した。なお、スラグBは生成時に分離したメタルも参考のために測定したが、このメタルは前述の粒度まで粉砕できなかったため、2mm程度のものを用いた。主要元素の分析は、Sは有機元素分析計、それ以外の元素はICP-AESを使用して王水マイクロウェーブ分解後に測定した。

金属鉄分析は湿式分析とメスバウアー分光分析を行った。湿式法はJIS5011-2付属書に規定された臭素メタノール分解による方法であり、メスバウアー法はCr担持の ^{57}Coを線源とし、室温で測定した。

2.3.3　結果

試薬の湿式分析の結果を表3に示す。ここで溶解率とは、試料の式量から求めた全鉄に対する湿式法で得られた金属鉄の割合である。酸化鉄は溶解率が0-1.7%となっており湿式分析が有効であることが確かめられた。スラグ中の鉄はP,Sと化合している可能性があるため、それらとの化合物についても同様に分析した。リン酸鉄n水和物は溶解率が3.7%であったが、900℃・2hの加熱後に測定した結果0%となった。スラグ中に存在する可能性のあるリン化鉄と硫化鉄はいずれも溶解率が高く、それぞれ30.5%、72.1%であった。スラグの主要元素分析結果からSの含有量はすべての試料で1%以下であったものの、仮にその全量が硫化鉄となっていた場合は湿式分析による金属鉄の分析値が1%を超過することになる。

スラグの主要元素および金属鉄の湿式分析結果を表 4 にあわせて示す。サンプル A の 6.96%以外はすべて基準を満たす結果となった。スラグ C は ICP-AES による分析では Fe 含有量が高かったものの湿式分析の金属鉄定量結果は 0.46%と低くなった。スラグ C は水処理過程で PAC を添加しているためリン鉄の含有量が少ないことに起因している可能性がある。X 線回折（XRD）の結果から、スラグに含まれる鉄化合物は、スラグ A および B ではリン化鉄・硫化鉄とみられるピークが存在したが、スラグ C は鉄化合物のピークが検出されず非晶質中に含有されているとみられた。

メスバウアー分析の結果から得られたパラメータを表 5 に示す。スラグ A では金属鉄を示すスペクトルが得られ、その面積強度は 1.6%となった。スラグ A の全鉄含有量が 10.9%であったことから金属鉄含有量は 0.17%と求められた。その他のスラグからは金属鉄は検出されなかった。XRD の結果とあわせると Fe のほとんどは 2 価あるいは 3 価とみられ、2 価あるいは 3 価の化合物もしくはガラス構造中に含まれていると推定された。

表 3　試薬の湿式分析結果

試料	測定結果 (%)	Fe含有量(wt%)	含有Fe中の溶解率(%)
酸化鉄(Ⅱ)	1.3	77.7	1.7
酸化鉄(Ⅲ)	0.0	69.9	0.0
四三酸化鉄	0.0	72.3	0.0
α-酸化鉄(Ⅲ)	0.0	69.9	0.0
リン化3鉄	25.6	84.4	30.4
硫化鉄(Ⅱ)	22.9	63.5	36.1

表 4　湿式分析と含有量試験結果

	湿式分析(%)	含有量(Wt%)			
	金属鉄	Fe	P	S	Al
A	6.96±0.02	10.9±0.22	4.65±0.02	0.89±0.03	6.99±0.05
B	0.64±0.01	2.51±0.02	14.63±0.07	0.05±0.01	6.90±0.02
B(メタル)	21.14±0.04	93.7±2.0	12.21±0.04	−	0.23±0.09
C	0.46±0.02	7.58±0.02	2.63±0.01	0.11±0.01	4.45±0.02

表 5　メスバウアー分析結果

	partial	area[%]	ISOMER SHIFT	Q. SPLITTING	LINE WIDTH	MAGN. FIELD [T]	PHASE
A	DOUBLET (1)	22.0%	0.21	−0.28	0.73		Fe3+
	DOUBLET (2)	22.3%	1	1.71	0.73		Fe2+
	DOUBLET (3)	9.0%	0.4	1.09	0.73		Fe3+
	MIXED M+Q (1)	1.6%※	0	0	0.35	33.2	α−Fe
	MIXED M+Q (2)	27.5%	0.32	0.06	1.44	18.1	Fe3P
	MIXED M+Q (3)	17.6%	0.32	0	0.81	25.5	
B	DOUBLET (1)	33.7%	0.42	0.85	0.83		Fe3+
	DOUBLET (2)	66.3%	1.04	2.1	0.83		Fe2+
C	DOUBLET (1)	81.1%	0.29	1.19	0.73		Fe3+
	DOUBLET (2)	18.9%	1.03	2.01	0.73		Fe2+

※1.6±0.4%

これらの結果から、湿式分析では金属鉄以外のリン鉄あるいは硫化鉄等の鉄化合物が金属鉄として検出されていることがわかった。しかし、メスバウアー法で金属鉄が検出されなかったスラグでも発錆とみられる事例があることから、今後は発錆が起きる要因あるいは原因となる化合物を同定し、対策を講ずる必要がある。

３．まとめ

① 下水汚泥を対象とした逐次抽出試験を行った結果、汚泥中のリンは第４分画あるいは残渣態に分画される割合が高かった。残渣態に分画される割合に与える凝集剤の影響は大きく、ポリ鉄を添加した場合で残渣態に分画される割合が特に高くなった。

② 凝集剤を添加していない汚泥および PAC を使用している汚泥では、リン酸カルシウムとみられる化合物の割合が高かったが、焼却することで残渣態の割合が増加し、鉄あるいはアルミニウムとの化合物に変化した可能性がある。その他の重金属は逐次抽出の結果、元素ごとに特徴のある挙動をしており、汚泥からの有価物回収に際してはこれらの結果も考慮する必要がある。

③ 下水汚泥溶融スラグおよびスラグ中に含まれる可能性のある鉄化合物について、湿式分析とメスバウアー分析の結果を比較した。この結果、湿式分析ではリン鉄などの化合物を金属鉄として測定していることがわかった。また、メスバウアー分析の結果、基準値の 1%をオーバーする金属鉄が検出される試料はなかった。

参考文献

1) T. Taylor Eighmy et al., Comprehensive Approach toward Understanding Element Speciation and Leaching Behavior in Municipal Solid Waste Incineration Electrostatic Precipitator Ash, Environ. Sci. Technol. Vol. 29, 1995 pp.629-646

2) 川崎晃、木村龍介、新井重光（2001）. 廃水処理汚泥中の微量元素の存在形態、農業環境技術研究所資料、第 25 号

下水道における微量化学物質の評価に関する調査

研究予算：受託経費（下水道事業調査費）
研究期間：平 13～平 17
担当チーム：水循環研究グループ（水質）
研究担当者：鈴木　穣、小森行也、岡安祐司

【要旨】
本調査は、下水中のエストロゲンの迅速測定法の提案、および下水処理過程でのエストロゲン、ノニルフェノール類の挙動の解明を目的とするものである。
平成 17 年度は、エストロゲンの下水処理過程での挙動把握を行った。具体的には、下水処理の好気工程における溶解性エストロゲンの遊離体や抱合体の挙動特性を、ベンチスケールの実下水処理連続実験装置で馴養した活性汚泥による回分実験において検討した。連続実験では、有機物除去に加えて、硝化も促進する程度の長い SRT に設定した。この連続実験で得られた活性汚泥を用いて、活性汚泥処理のエアレーションタンクでの流下を再現した好気回分実験では、曝気工程終了時の MLDO を 3mg/L 以下に設定した場合には溶解性エストロゲン遊離体（エストロン）の減少が見られたが、曝気工程終了時の MLDO を 0.5mg/L 以下に設定した場合には明確な減少がみられなかった。さらに、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では、溶解性エストロゲン（エストロン）の増加が観察された。このことから、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。
キーワード：内分泌かく乱物質、エストロゲン、下水処理、エアレーションタンク、溶存酸素濃度

１．はじめに

下水道施設へ流入する内分泌かく乱作用が懸念される化学物質の多くは、未規制であり、下水道に流入する可能性があるが、下水処理施設での挙動・運命についての知見は不十分な状況である。下水中の内分泌かく乱作用が懸念される化学物質は、機器分析に基づく手法により測定されるが、高価な機器、熟練した技術等が必要であり、幅広く下水中での挙動を把握できる状況ではない。そのため、簡易かつ迅速に測定できる手法の開発が求められている。

さらに、これらの物質は、下水処理工程において、大部分が除去され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。将来的に、これらの微量化学物質対策に下水道が取り組む場合には、下水処理場における運転条件が化学物質の環境への排出に及ぼす影響を予測、評価することが必要となる。本研究では、このような背景を受け、以下の課題を目的とする。

・下水道における内分泌かく乱物質の簡易・迅速測定法を確立し、監視を行う。
・下水道に流入している内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質（エストロゲンおよびノニルフェノール類）の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．研究内容

２．１．はじめに

既往の調査によれば、① 内分泌撹乱作用が疑われる物質の中に、河川水中や下水道に広く存在するものがあり、② 下水処理場の放流先河川の一部の雄コイの血清中からビテロジェニンが検出されている。現在のところ、下水処理水とビテロジェニン誘導の因果関係は、完全には確認されていないが、下水処理水の *in vivo* の試験系による評価は検討されているところである。一方で、*in vitro* の試験系（Yeast Estrogen Screen Assay）によるエストロゲン様活性の測定手法と水中の化学物質の分画手法を用いた、下水中の内分泌かく乱化学物質の同定に関する調査結果によれば、下水処理水のエストロゲン様活性は下水処理場ごとに大きく異なっており、その大部分は E2 やエストロン E1 などの遊離体エストロゲンの寄与によるものであることが判明している。このため、下水処理場の放流先河川における魚類のビテロジェニンの誘導を抑える対策として、下水処理場における E2 や E1 などの遊離体エストロゲンを削減することが有効である可能性が大きいと考えられる。

本研究では、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、下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化の特性を把握することを目的とした。なお、日本の下水処理場の大部分は標準活性汚泥法で運転されているため、本法における DO 濃度の条件とエストロゲン関連物質の除去との関係を把握することとした。

２．２．エアレーションタンク流下過程を再現した回分実験

１）分析対象物質の分析方法

本調査で測定対象としたエストロゲンは、女性ホルモンの E2、その代謝生成物である E1、エストリオール（E3）、合成エストロゲンの EE2、(以上の 4 物質を総して遊離体エストロゲンと呼ぶこととする)、また、E2、E1、E3 それぞれの硫酸抱合体である、estrone-3-sulfate（E1-S）、β-estradiol-3-sulfate（E2-S）、estriol-3-sulfate（E3-S）、estradiol 3,17-disulfate（E2-diS）の 8 化合物である。これらの対象物質は、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS/MS）により測定した。測定条件、検出下限値、標準物質の添加回収率などの詳細は文献[10]のとおりである。

２）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。実験装置は、攪拌機を備えた容量 150L のステンレス製容器を 3 系列準備し、各系列に均等となるように、最初沈殿池流出水 55L と返送汚泥 25L を注入し攪拌した。3 系列のうち 1 系列は攪拌のみを実施する嫌気系とした。また、他の 2 系列では、エアストーンを通じてエアポンプにより曝気し、併設した溶存酸素計の指示値と連動して曝気風量を調整することにより、1 系列を溶存酸素濃度が最終的にほぼ 0.5mg/L 以下になるように、また、残りの 1 系列を溶存酸素濃度が最終的にほぼ 3.0mg/L 以下になるように制御した。

各系列において、実験前後の MLSS および MLVSS（ガラス繊維ろ紙法）を測定するとともに、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 ろ紙によりろ過した。ろ液は、エストロゲン関連物質を測定するための試料として 1L 分取し、酸化防止のために 1g のアスコルビン酸を添加後直ちに冷蔵・保存した。分析は 2 日以内に固相抽出までを実施した。また、ろ液の一部は回分実験の進行状況を観察するため、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N および、NO_3^--N を併せて測定した。なお、本検討は 8 月に実施した。実験実施時の反応水槽の水温は 27-29℃であった。また、実験日以前の 3 日間は、降雨は無かった。

３）結果と考察

①　嫌気系

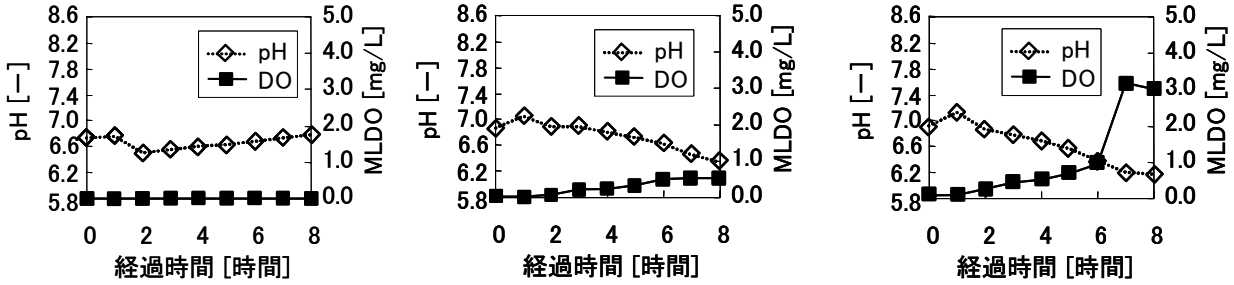
図Ⅰ-1 に反応槽溶液の pH、MLDO の変化を、図Ⅱ-1 に反応槽溶液の DOC および溶解性窒素の形態の変化を示す。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-1）は、実験開始時に E2（6.2ng/L）、E1、E3 が検出され、E2 は実験期間中に検出下限値（2.2ng/L）以下にまで低下したが、E1、E3 に関しては減少せず、むしろ増加する傾向であった。活性汚泥への吸着態の再溶解や、抱合体の脱抱合、それ以外の要因などの可能性が考えられる。なお、EE2（検出下限値 0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-1）については、いずれも大きな変化は見られなかった。

②　曝気工程終了時の MLDO を 0.5mg/L に制御した系列

図Ⅰ-2 に反応槽溶液の pH、MLDO の変化を示す。本系列では攪拌に加えて曝気を実施したが、曝気開始当初は供給した溶存酸素が直ちに消費され、見かけ上嫌気状態となった。1 時間経過後以降 MLDO が上昇し始め、曝気開始後 6 時間後には、設定値である 0.5mg/L に到達した。以降はほぼ 0.5mg/L となるよう風量を制御した。図Ⅱ-2 に反応槽溶液中の DOC および溶解性窒素の形態の変化を示す。MLDO が 0.5mg/L 以下であったが硝化は進行した。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-2）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（E2：2.2ng/L、E3：0.4ng/L）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。なお、EE2（検出下限値 0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-2）は、E1-S、E3-S は遊離体エストロゲンのレベルより低く、E2-S はほぼ同等、E2-diS は高い濃度で検出され 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。

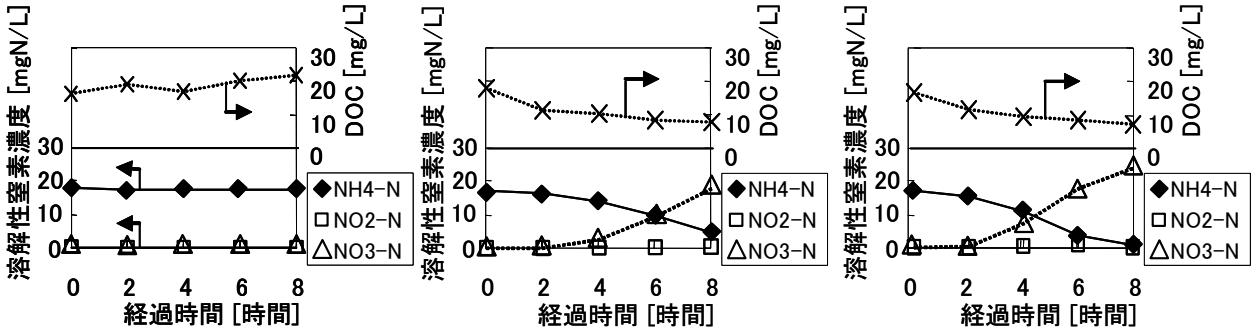
③　曝気工程終了時のMLDOを3.0mg/Lに制御した系列

図Ⅰ-3に反応槽溶液のpH、MLDOの変化を示す。本系列でも２）と同様に曝気開始当初は供給した溶存酸素が直ちに消費され、疑似的な嫌気状態となったが、1時間経過後以降MLDOが観測され始め、曝気開始後7時間後には、設定値である3.0mg/Lに到達し、以降はほぼ3.0mg/Lとなるよう風量を制御した。図Ⅱ-3に反応槽溶液中のDOCおよび溶解性窒素の形態の変化を示す。２）に比べてやや早く硝化は進行した。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-3）については、E2は疑似嫌気条件下においても減少し、2時



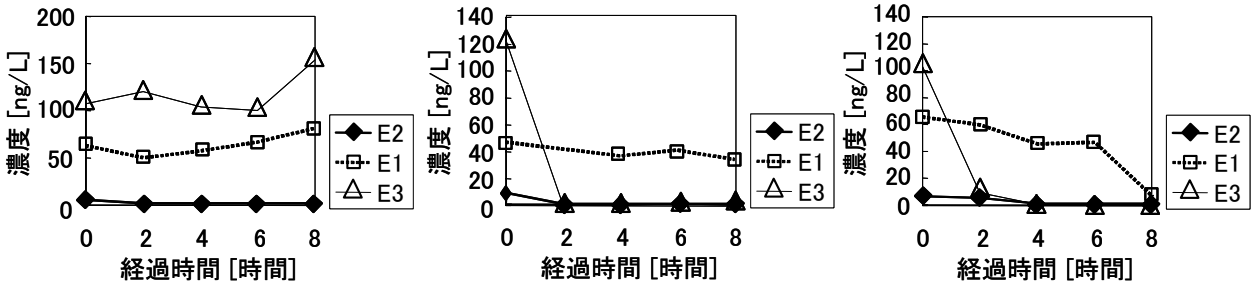
図Ⅰ-1 嫌気系　図Ⅰ-2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅰ-3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅰ-1, 2, 3 pH, MLDOの時間変化



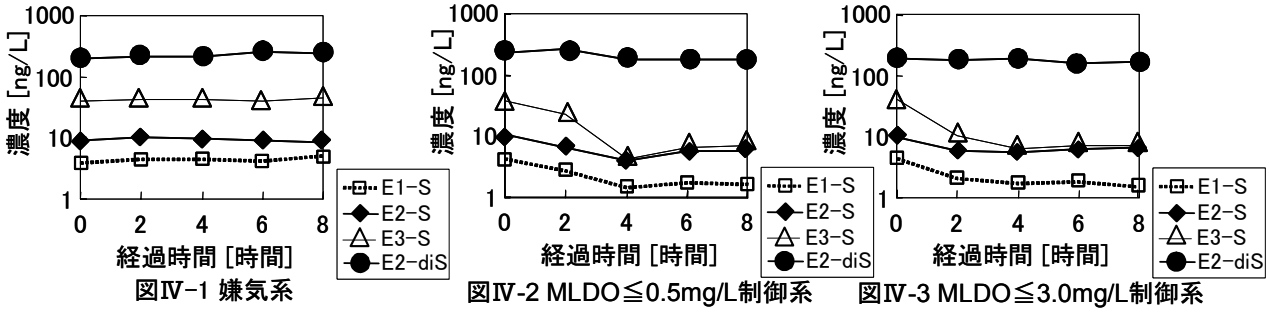
図Ⅱ-1 嫌気系　図Ⅱ-2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅱ-3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅱ-1, 2, 3 DOC, 溶解性窒素濃度の時間変化



図Ⅲ-1 嫌気系　図Ⅲ-2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅲ-3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅲ-1, 2, 3 遊離体エストロゲン(E2, E1, E3)の時間変化



図Ⅳ-1 嫌気系　図Ⅳ-2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅳ-3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅳ-1, 2, 3 エストロゲン硫酸抱合体(E1-S, E2-S, E3-S, E2-diS)の時間変化

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。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。EE2（検出下限値0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-3）は、②と同様の傾向を示した。

２．３．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

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標準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、本報告の連続実験は、夏季の3週間に行われたものであり、期間中の水温は25～27℃程度であった。また、本実験では、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絞り、擬似的な無酸素状態とした。

２）　測定方法

測定対象物質は、遊離体エストロゲンのE2、E1、E3（エストリオール）、合成エストロゲンのEE2の計4化合物である。これらの物質の分析計量は週1回、反応槽の4箇所および二次処理水でスポット採取した試料のろ液について実施した。分析方法は、下水試験方法[11]によった。一般項目（MLSS/VSS、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N）の分析計量は、週2回、エストロゲン分析用試料と流入水および最初沈殿池流出水試料をそれぞれスポットサンプリングして実施した。

３）　実験結果と考察

実験期間中の反応槽の平均汚泥濃度はMLSS/VSS＝1575/1230mg/Lであった。図1に示すように、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、反応槽末部の無酸素条件（図2）下では、わずかに内生脱窒が観察された。遊離体エストロゲンは、E2およびEE2は、いずれの試料においても検出されなかった。E3は好気槽前段では検出されたが、後段および二次処理水では検出されなかった。E1は、図3に示すように、好気条件下では流下方向に沿って減少する傾向が見られたが、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、E1が増加する何らかの機構が存在する可能性が考えられた。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。今後はE1が増加する機構の詳細について検討を行っていく予定である。

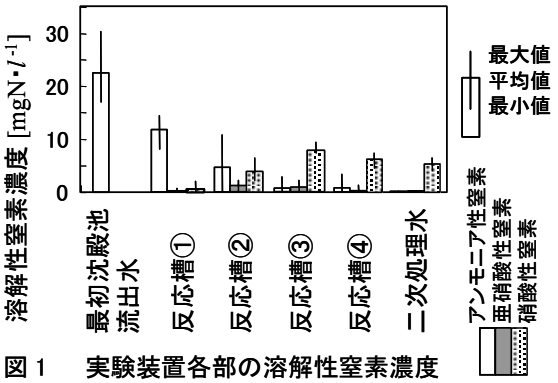


図1　実験装置各部の溶解性窒素濃度

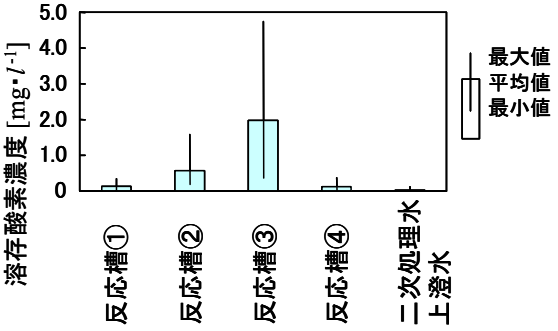


図2　実験装置各部の溶存酸素濃度

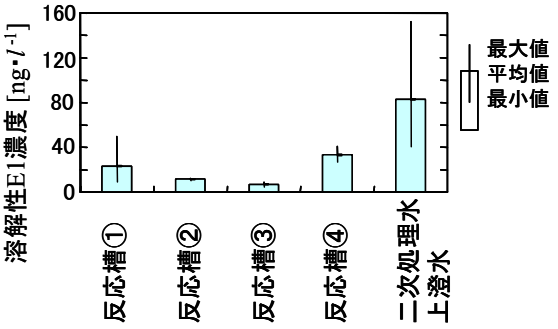


図3　実験装置各部の溶解性エストロンの濃度

３．まとめ

本研究の達成目標と、それに対応する主な研究成果は、以下のとおりである。

１）下水中のエストロゲンの迅速測定法の提案

① ELISA法による17β-エストラジオールの測定

下水試料中の17β-エストラジオール（E2）の抽出方法として、

１）C18固相抽出＋メタノール溶出

２）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、E2 の回収率は確保されていた。結果は、武田薬品工業製の ELISA キット、Assay Design 社製の ELISA キットとも、

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

となり、ジクロロメタン溶出の場合の方が、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。武田薬品工業製 ELISA キットと Assay Design 社製の ELISA キットを比較すると、武田薬品工業製 ELISA キットの測定結果の方が、機器分析による測定結果に近い傾向がみられた。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、さらに一層のクリーンナップ等を実施する必要があると考えられた。

② ELISA 法によるエストロンの測定

水中のエストロン（E1）を定量する ELISA キットを開発し、下水試料の前処理法として、①冷蔵保存、C18 固相抽出（ジクロロメタン溶出）②採水時にアスコルビン酸による固定化、冷蔵保存、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つの設定方法について、ELISA 法による測定結果と LC/MS/MS 法による測定結果を比較した。

二次処理水では、①、②のいずれの方法でも、ELISA 法による測定結果は、LC/MS/MS 法による測定結果の 1.5 倍程度以内であった。

③ 下水試料中の ELISA 法測定妨害物質除去に関する検討

下水試料中の E2、E1 測定用 ELISA 法における、交差反応及び妨害物質を除去する簡易な前処理法として、SS 除去、ヒューミン分画の分離およびフミン酸分画の分離について検討し、特に生物処理を受ける前の段階の下水試料に関しては、フミン酸分画の分離が効果的であることが推察された。

２）微量化学物質の下水道での挙動把握

① エストロゲンの下水処理過程での挙動の解明

・下水処理プロセスでのE2、E1は、初沈での減少はなく曝気槽内で減少しており活性汚泥により容易に分解された。

・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。

・20 箇所の下水処理場においてエストロゲン及びエストロゲンの遊離体及び抱合体の実態調査を実施した。この結果、E2、E3 は、下水処理で高い除去が認められたが、E1 は 50%程度の除去であった。また、これまで報告例が少ないエストロゲン抱合体の流入下水、二次処理水中の存在濃度を明らかにし、これらにはエストロゲン抱合体として存在するエストロゲンがかなり多いことが明らかになった。従って、遊離体だけではなく抱合体を含めたエストロゲンの挙動解析が必要と考えられる。また、エストロゲン抱合体の一部は下水処理を受けることにより増加する場合が見られ、流入下水中には測定対象以外の形態のエストロゲンが存在していることも考えられる。しかし、エストロゲン抱合体の分析においては、回収率が低いため、改善が必要である。

・下水処理の好気工程におけるエストロゲンの遊離体及び抱合体の挙動特性をラボスケールの実下水を用いた連続実験装置において検討した。MLDO>5mg/L、SRT=60 日という好気的生分解に有利な処理条件においては、遊離体エストロゲンの除去は完全に行われ、エストロゲン硫酸抱合体も減少を示したが、依然、抱合体は二次処理水に残留する結果となった。好気条件下では、エストロゲン硫酸抱合体の難分解性が強いことが明らかになった。

・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、エアレーションタンクにおける流下過程を再現した MLDO 制御の好気回分実験を実施した。① 嫌気条件下では、E1 はやや増加する傾向が見られたが、吸着態の再溶解、E2 からの生成、硫酸抱合体の脱抱合やそれ以外の要因により生成が生じていると推定された。② 曝気工程終了時の MLDO を 0.5mg/L に制御した系列では、硝化が進行し、E2 の減少は観察されたが、E1 については実験期間中を通じて大きな変化は見られなかった。③ 曝気工程終了時の MLDO を 3.0mg/L に制御した系列では、硝化が進行し、E2 の減少は見られたが、MLDO が低い段階では E1 については変化が見られなかった。しかし、MLDO が 3mg/L 程度に達した時点で急激に減少した。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ことが明らかとなった。

・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では、硝化が進行し、無酸素条件下ではわずかながら内生脱窒が観察された。溶解性 E1 の濃度は、無酸素条件下および最終

沈殿池での増加が観察された。

以上から、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。E1 は、E2 やエストロゲン抱合体の代謝生成物であると考えられ、これらの物質からの生成速度と、E1 の減少速度との差によって E1 濃度が決まると考えられるため、これらの点に配慮した検討も進めていく必要があると考えられる。

・10 ヶ所の下水処理場において合成エストロゲンのエチニルエストラジオール（EE2）の実態を調査した。HR-GC/MS、LC/MS/MS の機器分析と ELISA により測定したところ、流入水、処理水中の EE2 濃度は極微量であることが分かった。最も高感度で検出可能な HR-GC/MS によれば、流入水ではすべて nd、処理水では nd から 0.28ng/l であった。

② ノニルフェノール類の下水処理過程での挙動の解明

・ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）は、活性汚泥処理ではNPまでは分解されず、NPnEO, ノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）のどちらの形態においてもEO付加モル数1～4までの分解にとどまる傾向が見られた。

・NPnEO を、唯一の炭素源として、DO を 1mg/L 程度の下水処理のエアレーションタンクと同様な条件の下で、好気的に連続系で処理した際に、鎖長 n=1～4 の NPnEO の活性汚泥への蓄積と NP の生成が観察された。この活性汚泥を用いて、飽和溶存酸素濃度の条件下で、短鎖長の NPnEO の好気回分分解試験を実施したところ、ノニルフェノール（NP）の生成は見られなかった。このため、短鎖長の NPnEO から NP の生成反応には、高濃度の溶存酸素濃度は阻害的に働き、低 DO 濃度が必要であると考えられた。

参考文献

1) Yuji Okayasu, Yutaka Suzuki, Koya Komori, Makoto Yasojima, Occurrence of estrogeni-like substances in wastewater in Japan, Proceedings of International workshop on rainwater and reclaimed water for urban sustainable water use, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), pp.103-120, (2005.06.)

2) Koya Komori, Yuji Okayasu, Yutaka Suzuki, Occurrence of nonylphenol, nonylphenol ethoxylate surfactants and nonylphenol carboxylic acids in wastewater in Japan, PROGRAM and ABSTRACTS of IWA International Conference Sustainable Development of Chemical Industries with the Environment ～Waste and Wastewater Management～, International Water Association, pp.190-192 (2005.07.)

3) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穣, 下水試料中の合成エストロゲンの測定, 第42回下水道研究発表会講演集、（社）日本下水道協会、pp.61-63 (2005.07.)

4) 岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣, 下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化に与える DO 濃度の影響, 第 42 回下水道研究発表会講演集、（社）日本下水道協会、pp.64-66 (2005.07.)

5) Yuji Okayasu, Koya Komori, Makoto Yasojima Yutaka Suzuki, Degradation of Free Estrogens and their Conjugates in Wastewater Treatment Process, Technology 2005 2nd Joint Specialty Conference for Sustainable Management of Water Quality Systems for the 21st Century: Working to Project Public Health, Water Environment Federation, CD-ROM 05C pp.291-297 (2005.08)

6) Koya Komori, Yuji Okayasu, Makoto Yasojima, Yutaka Suzuki, Hiroaki Tanaka, Occurrence of Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylate Surfactants and Nonylphenol Carboxylic Acids in Wastewater in Japan , Technology 2005 2nd Joint Specialty Conference for Sustainable Management of Water Quality Systems for the 21st Century: Working to Project Public Health, Water Environment Federation, CD-ROM 05E pp.305-310 (2005.08)

7) 小森行也、岡安祐司、鈴木穣, 下水処理場におけるエチニルエストラジオールの実態, 環境ホルモン学会 第 8 回研究発表会要旨集、pp.71 (2005.09)

8) 岡安祐司、小森行也、鈴木穣、田中宏明、八 十島誠, 活性汚泥処理における、ノニルフェノールエトキシレートからのノニルフェノールの生成, 水環境学会誌、（社）日本水環境学会、Vol.28、No.11、pp.671- 676 (2005.11.)

9) 岡安祐司、小森行也、鈴木穣, 活性汚泥処理におけるエストロゲンの挙動について, 第40回日本水環境学会年会講演集、日本水環境学会、pp.247 (2006.3.)

10) K. Komori *et al.*, Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan, IWA Publishing, pp.93-100(2004)

11) （社）日本下水道協会編、下水試験方法（追補暫定版）、2002

下水道による水環境への影響に関する調査

水環境研究グループ水質チーム　　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　宮島　潔
主任研究員　阿部千雅
主任研究員　岡安祐司

第１章　　汚濁物質の循環機構に関するモデルの構築

１．はじめに

下水道の整備に伴い河川水に占める下水処理水の割合が変化し、下水処理水が放流先河川の水生生態系に与える影響が大きなものとなっている可能性がある。また、これらの整備により都市排水の排出形態が変化し河川の流量や水質そのものにも変化を及ぼしていると考えられる。特に都市域では水資源の再利用に伴い、下水処理水の河川へ占める割合は大きくなっており、再利用比率が 90%を超えるような河川も報告されている。しかしながら、こうした都市河川の実態を明らかにするための実証的調査はほとんど行われていない。

本調査では、下水道の整備が河川流域の変化に与える影響（河川水量、有機物、栄養塩類等の物質の循環等）を把握するとともに、このような変化が河川水質や水生生態系といった水環境に及ぼす影響や、下水処理水中に存在している化学物質、特に女性ホルモン作用を持つ物質（内分泌攪乱物質）が魚類を始めとした水生生物に及ぼす影響について検討するものである。

平成 17 年度は、下水道整備等の流域条件が水・物質循環に与える影響を検討するため、下水道整備途上の千葉県の手賀沼流入河川である大津川を対象に、過年度までに構築した汚濁解析モデルを用いて、既往の水質実態調査結果をもとにキャリブレーションを行い、年間の汚濁負荷流出の実態を推定した。

２．水量・水質の循環機構に関するモデルのキャリブレーション

平成 16 年度に大津川流域を対象に構築した Wallingford 社の InfoWorks(HydroWorks の機能を含む上位版ソフトウェアでいくつかの機能が付加されている）を使用した流出解析モデルを用いて、汚濁負荷流出解析を行った。キャリブレーションに際しては、平成 16 年度報告書にて報告した既往の実態調査結果（流量、水質について、晴天時５回、雨天時３回調査を実施)、河道情報、土地利用状況などの流域情報を利用した。

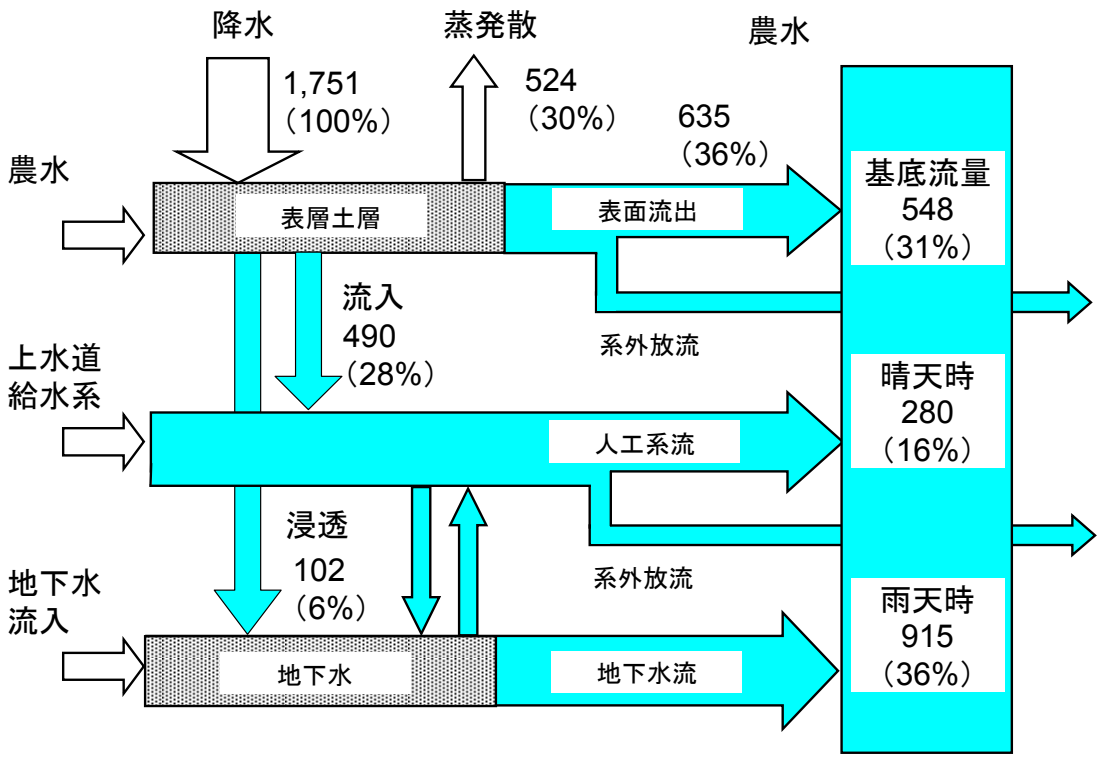
３　汚濁負荷量収支の検討

キャリブレーションを実施した後の汚濁流出解析モデルを用いて、平成 15 年度に関して、年間汚濁負荷流出量を推定した。

３－１　水収支

大津川流域の水収支の推定結果を図―１に示す。水収支としては、上水道給水系の排水、降水による表面流出、地下水に大別される。晴天時には、事業系排水や浄化槽等の人工系排水が河川に流入するが、下水道などによって系外へ放流されるものがある。雨天時には、表面流出する雨水が河川に流入し、河川流量を大きく変動させる。雨水の一部は地下への浸透と蒸発散などにより消失する。地下水の収支については、他にも地下水揚水による利用や生活系排水の漏水や散水による地下への浸透などが考えられるが、実態が把握できないことから、モデル上では、すべて人工系流出に含ませるものとして計算した。また、農水の収支については省略している。なお、雨天時において、降雨初期に表面を濡らして水溜まりを作ったり、一部地下へ浸透して消失したりする量、および雨水管などの人工系に流入し系外放流される量は、初期損失値としてモデル上に組み込んである。また、蒸発散で消失する分は流出係数に反映させ、表面流出量を算出している。地下浸透と蒸発散を除いた残りが表面流出し、河川に流入す

ることになる。なお、年間降水量は、気象庁我孫子観測所（千葉県我孫子市）における平成 15 年度のデータを用いた。(年間総降水量 1,751mm)



３－１　負荷量収支

大津川流域の負荷量収支としては、生活系汚濁負荷量、事業系汚濁負荷量、自然系汚濁負荷量および畜産系汚濁負荷量に大別される。小流域内での汚濁負荷量を算定する原単位は、平成 16 年度にとりまとめた値（表―１、２）を用いた。年間の負荷量収支は、年間の水収支をベースにシミュレーションを行い、大津川河口の手賀沼へ流達する負荷量として整理した。

表―１　排出原単位

形態		単位	BOD	備考
生活系	単独浄化槽	g/人・日	35	①
	合併浄化槽	g/人・日	4	①
	し尿処理場	g/人・日	30	①
自然系	水田	g/ha・日	88	②
	畑地・雑地	g/ha・日	88	②
	山林	g/ha・日	8.42	②
	市街地	g/ha・日	8.42	②
畜産系	牛	g/頭・日	12.8	②
	豚	g/頭・日	6.0	②

出典）① 環境庁「生活雑排水対策指針」
② 千葉県公害防止計画水域別汚濁負荷量（BOD）の作成

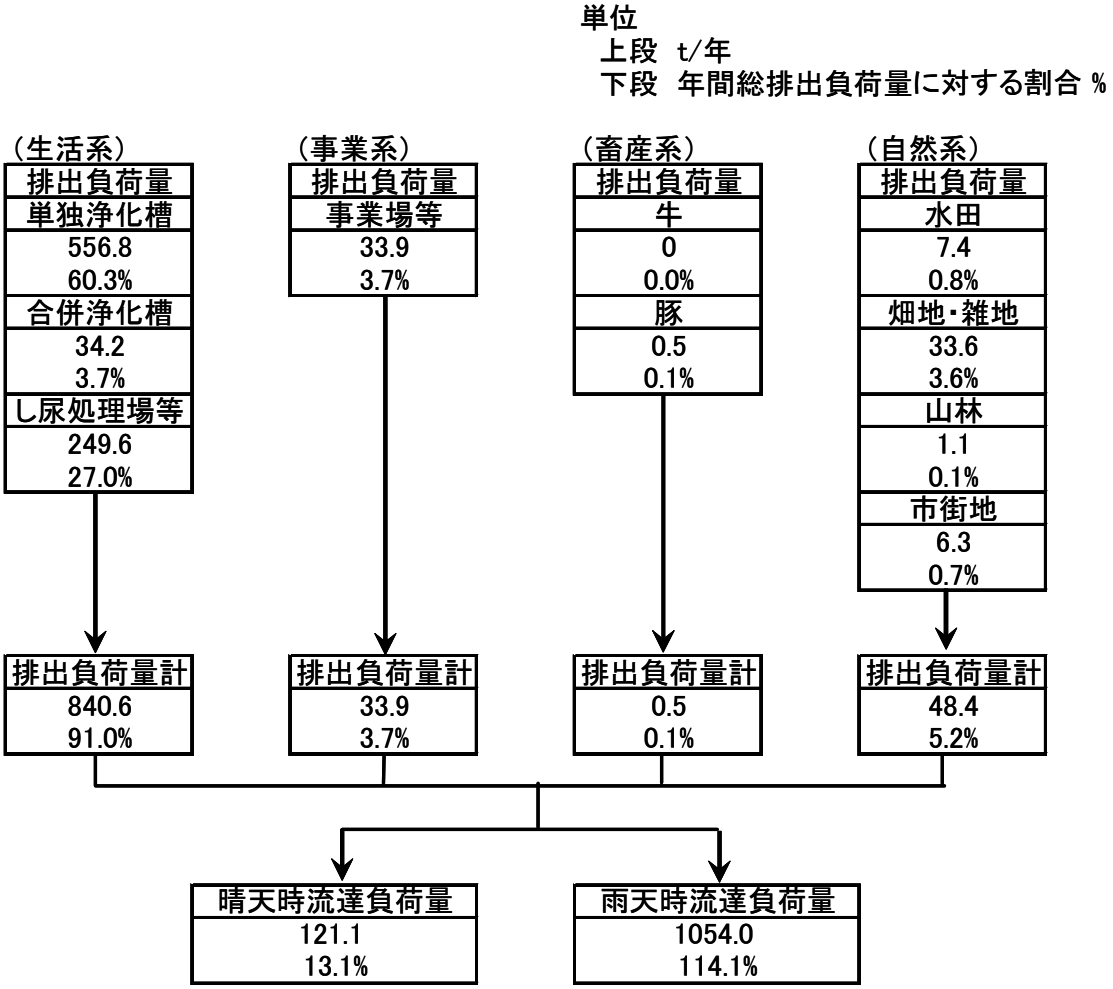
表―２　汚濁負荷量

小流域 No.	生活系	事業系	自然系	畜産系	合計	小流域 No.	生活系	事業系	自然系	畜産系	合計
OT-01	16.7	0.7	7.0	0.0	24.4	OT-22	75.0	2.8	3.7	0.0	81.5
OT-02	1.7	0.0	1.1	0.0	2.8	OT-23	196.8	0.8	4.4	0.0	202.0
OT-03	11.2	0.0	1.2	0.0	12.4	OT-24	2.6	0.0	1.7	0.0	4.3
OT-04	11.6	0.0	1.9	0.0	13.5	OT-25	29.5	0.4	3.3	0.0	33.2
OT-05	87.3	0.0	1.4	0.0	88.7	OT-26	62.2	3.2	8.1	0.0	73.5
OT-06	2.9	0.0	1.9	0.0	4.8	OT-27	57.6	3.9	1.2	0.0	62.7
OT-07	5.1	0.1	1.3	0.0	6.5	OT-28	26.8	0.0	1.5	0.0	28.3
OT-08	8.0	0.4	1.8	0.0	10.2	OT-29	31.5	0.0	0.4	0.0	31.9
OT-09	11.6	1.9	2.8	0.0	16.3	OT-30	139.5	0.8	2.4	0.0	142.7
OT-10	1.3	1.8	1.9	0.0	5.0	OT-31	55.4	0.6	2.0	0.0	58.0
OT-11	26.2	0.7	6.0	0.0	32.9	OT-32	49.8	0.2	5.2	0.0	55.2
OT-12	0.7	8.8	3.1	0.0	12.6	OT-33	38.8	0.0	5.2	0.0	44.0
OT-13	28.3	3.7	2.7	0.0	34.7	OT-34	14.6	0.7	1.0	0.0	16.3
OT-14	5.0	1.1	1.0	0.0	7.1	OT-35	7.7	0.1	1.0	0.0	8.8
OT-15	122.5	5.2	2.6	0.0	130.3	OT-36	14.1	0.0	2.1	0.0	16.2
OT-16	0.5	0.0	1.8	0.0	2.3	OT-37	113.1	1.0	6.1	0.0	120.2
OT-17	29.5	0.9	2.4	0.0	32.8	OT-38	231.3	4.4	2.3	0.0	238.0
OT-18	63.4	0.4	8.7	0.4	72.9	OT-39	21.5	2.2	3.9	0.0	27.6
OT-19	51.5	1.8	4.3	0.0	57.6	OT-40	10.8	0.2	1.3	0.0	12.3
OT-20	97.3	9.6	4.3	0.0	111.2	OT-41	266.9	10.8	3.2	0.0	280.9
OT-21	112.4	5.4	2.5	0.0	120.3	OT-42	162.9	17.9	10.7	0.9	192.4
						合計	2303.1	92.8	132.7	1.3	2529.9

年間の負荷量収支を模式的に描くと、図―２のとおりとなる。原単位法による年間総排出負荷量は、約 923tBOD/年と算出された。一方、シミュレーション結果による流達する負荷量は、晴天時が約 121tBOD/年、雨天時が約 1,054tBOD/年と算出された。流達率は、晴天時で 13.1%，雨天時は 114.1%となり、総流達率は合計で 127.2%となった。これらの結果から、大津川流域では、晴天時には、排出された負荷が河道などの流域内に留まり、雨天時に掃流される機構が存在することが示唆された。原単位法により積算した排出負荷量に比べて、推定総流達量がやや大きな値をとっているのは、原単位は幅広い分布の中の平均的な数値を採用していることから、やや過小評価になったり、過大評価になったりする側面があることが考えられる。河川の基底負荷量も加味したシミュレーション結果から大津川の水質（BOD 年平均）を算定すると、晴天時で約 9mg/L、雨天時で約 23mg/L となった。

表―３　シミュレーション結果による水質の推定

	負荷量 t/年	流量 m^3/年	水質（BOD） mg/L
晴天時	289.2	33,897,270	9
雨天時	1,343.1	57,369,478	23



図―２　年間負荷量収支図

４．まとめ

下水道整備等の流域条件が水・物質循環に与える影響を検討するため、下水道整備途上で比較的単独浄化槽やし尿処理場等からの排出負荷量の割合が大きい千葉県の手賀沼流入河川である大津川を対象に、過年度までに構築した汚濁解析モデルを用いて、既往の水質実態調査結果をもとにキャリブレーションを行い、年間の汚濁負荷流出の実態を推定した。BOD 流達率は、晴天時では 13.1%，雨天時を含めた総流達量を考えると 127.2%となった。これらの結果から、大津川流域では、晴天時に排出された BOD 負荷が河道などの流域内に留まり、雨天時に掃流される機構が存在することが示唆された。

第２章　　水質と水生生物との関連性の検討

その１　下水処理水に含まれる栄養塩がノリの品質に与える影響に関する調査

１．はじめに

ダム開発，森林荒廃や都市化の進展など流域の変化，また水利用の高度化等に伴い，流域から河川を経由し海域へ供給される栄養塩の物質収支が変化し，沿岸海域生物に影響を与えているとの指摘がある。本研究では，都市域から海域に供給される下水処理水中に含まれる栄養塩が,ノリの生長に与える影響について平成 16 年度から継続的に調査している。H16 年度には，実際にノリ養殖の行われている海域の流域内２箇所の異なる処理場の処理水を用いたノリの室内培養実験を行い，実験の濃度範囲内においては下水処理水がノリの生長を阻害しないこと，処理水中の栄養塩がノリに利用されること等を確認した。平成 17 年度も平成 16 年度と同じ海域の流域内処理場の処理水とノリ養殖が実際に行われている時期の現地海水とを用いて室内培養試験を行い，処理水中の栄養塩類がノリの品質（色，味等）に与える効果について調査するとともに，対象地先海域において処理水の拡散状況を把握するための現地観測及び水質調査を行ったので，結果について報告する。

２.室内培養試験

2.1 調査方法

2.1.1 実験材料

1）対象下水処理場と処理水

実際にノリ養殖の行われている海域の沿岸部に位置する処理場を対象とした。処理能力 14,200m3/日(H16 年度末時点)，標準活性汚泥法の処理場である。実験では最終沈殿池越流水を平成 18 年 2 月の晴天時の一日間，1 時間間隔で 24 回採水したものを,管路圧送を一部区間で採用していることを勘案して等量比により混合して処理水試料とした。

2）現地海水

現地海水は，処理水やノリ養殖の影響が直接ないと考えられる近傍の海岸（対象処理場から約 20km 南）の海水を用いた。採水は 2 月の晴天時に行った。

3)河川水

処理水が放流先河川でまず河川水と混合しその後海域に流入することを再現するため，近傍海域に最も大きな影響を与えている直近一級河川の順流域最下端で採水したものを河川水試料とした。

3）供試ノリ

ノリは一般に養殖に用いられるスサビノリ品種を用い，冷凍網に着生している葉体を用いた。

2.1.2 実験方法

1）試験区設定と培養液の作成

表１に実験条件の設定を示す。ノリ養殖が行われている海域の現状を勘案し，海水と淡水（河川水及び処理水の混合液）の混合割合は一定とし，淡水中の河川水と処理水の割合を変化させた実験区を設定した。海水と淡水の混合割合は別途実施した現地海域の塩分濃度観測結果から算出し,4.4%に設定した。また淡水中の処理水割合については，河川流量の季節変動等を考慮して，60%から 0%までの間で設定した。また，河川水に人工的に窒素($NaNO_3$)及びリン(K_2HPO_4)を添加した対象区も設定した。培養液の水質を表 2 に示す。

2）培養方法及び測定項目

各条件とも培養液を水槽に満たし，培養液攪拌のためにエアレーションを施して、これに全長 5cm 程度以

表１　試験区の設定　　（単位:%）

	淡水		自然海水	栄養塩添加
	下水処理水	河川水		
実験区①	2.6	1.8	95.6	－
実験区②	1.8	2.6	95.6	－
実験区③	0.9	3.5	95.6	－
対照区①	0	4.4	95.6	－
対照区②	0	4.4	95.6	○

表２　培養液の水質　　（単位:mg/L）

	D-TN	NH4-N	NO3-N	D-TP	PO4-P
実験区①	1.00	0.36	0.13	0.06	0.038
実験区②	0.77	0.27	0.14	0.06	0.035
実験区③	0.57	0.16	0.16	0.06	0.036
対照区①	0.41	0.04	0.17	0.04	0.023
対照区②	0.91	0.04	0.73	0.06	0.039

下のノリ葉体が付着しているノリ網を目合いの 3 辺ずつに切り取って入れ、8 日間培養した。水槽内の栄養塩濃度が下がりすぎないよう，培養液は 4 日間毎に水質測定し、その後培養液の交換を行った。

培養条件は，水温 15～18℃，照度 5,000～7,000 lx（3 波長型昼白昼蛍光灯による人工照明），光周期 11 時間明期 13 時間暗期に設定した。

全試験区の実験開始時と培養液交換時，実験終了時及び下水処理水原液を対象として各態窒素，各態りんを分析した。また，ノリ葉体の葉長・葉幅・湿重量を４日に１回測定するとともに，開始時及び終了時の葉体について，吸光光度の測定，窒素，炭素，リン含有量のＣＨＮコーダによる測定，アミノ酸含有量のアミノ酸自動分析計による測定を行った。各条件３連ずつ培養し結果は平均値とした。なおアミノ酸測定のみ分析の制約上 12 日間の培養後の葉体を用いている。

2.2　調査結果と考察

2.2.1 生長比

実験終了時の生長比を図 1 に示す。湿重量の増加率（開始時重量に対する比）を生長比として算出したところ，全ての実験区でノリの生長がみられ，8 日間培養後の湿重量は開始時の 7.3 倍～10.3 倍となった。培養水の窒素濃度によって若干の生長差が見られるが、今回実験で設定された処理水添加率の範囲においては、栄養塩濃度による生長の顕著な違いは認められなかった。また実験区①と対象区②の生長比の比較においてほとんど違いが見られなかったことから，ノリの生長に対して処理水中の栄養塩以外の成分による悪影響はないと考えられる。

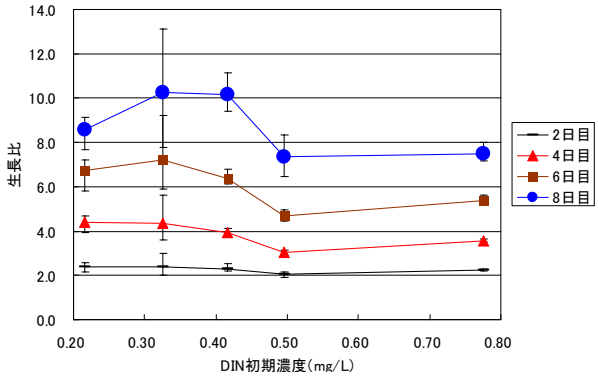


図１　培養水の初期 DIN 濃度とノリの生長比

2.2.2　葉体のアミノ酸含有量

各試験区の培養後葉体の遊離アミノ酸量を比較した結果を図 2 に示す。実験区①～③と対象区①の４試験区の比較では，培養液中の処理水濃度が高いほどアミノ酸量が多い結果となった。アミノ酸生成には窒素などの栄養塩が不可欠であり，今回の実験においては処理水中の栄養塩がアミノ酸生成に利用されたと推測される。また遊離アミノ酸の中でもアラニン（甘味）、グルタミン酸（旨み）、アスパラギン酸（酸味）、グリシン（甘味）の 4 つのアミノ酸量が多いほどノリはおいしくなるとされる。4 種のアミノ酸組成を比較すると特にアラニンの含有量の変動が大きいことが示された。ノリは窒素源としてアンモニア体窒素を用いた場合にはその吸収は速やかで、吸収された窒素の相当量がアラニンに合成されるといわれている。処理水比率が高い試験区はアンモニア態窒素濃度が高かったことがこの理由と考えられる。また処理水を添加せず栄養塩のみ人工的に添加した対

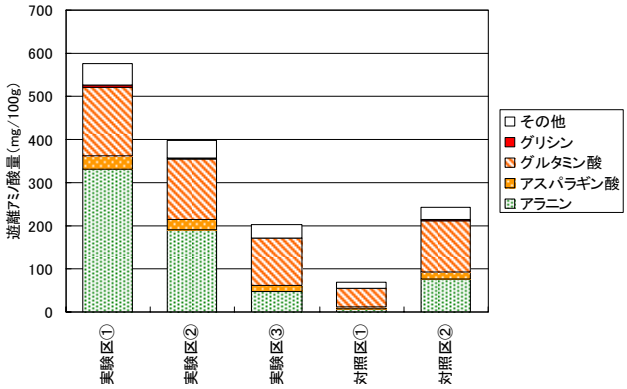


図２　ノリ葉体の遊離アミノ酸量

象区②において栄養塩濃度が同程度である実験区①と比較してアミノ酸量がかなり低い値となっていたが，硝酸態窒素を添加したことでアンモニア態窒素濃度が低くアラニン合成量が少なかったことが大きく影響していると考えられる。処理水中の窒素，特にアンモニア態窒素はノリの味を良くする可能性があると考えられる。

2.2.3　葉体色調

培養後の葉体の色調を吸光度により比較した。ノリ葉体の属する紅藻類に含まれる主な光合成色素の吸収極大波長を表３に、また培養後の各試験区のノリ葉体の特定波長における吸光度を図３に示す。ノリの色調はノリの持つそれぞれの色素の割合と量で決まるとされ，色素の生成にはアミノ酸が不可欠であるが，栄養塩が不足するとアミノ酸合成が不十分となり，葉体の生長にアミノ酸が優先的に使われる結果色素が充分に生成されず，ノリの色調が低下する。実験区①～③と対象区①の４試験区の比較では培養液中の処理水濃度が高いほど吸光度が高く，処理水中の栄養塩が色素の生成に利用されたことが推察された。ノリは色調が濃いほど品質が良いと評価されるため，処理水による栄養塩の供給はノリの品質を高める可能性がある。

表３　紅藻類に含まれる主な光合成色素

色素	性状	色	吸収極大波長
クロロフィル*a*	脂溶性	緑色	440、680nm付近
カロテン	脂溶性	黄色	450nm付近
フィコエリスリン	水溶性	紅色	495、565nm付近
フィコシアニン	水溶性	青色	620nm付近

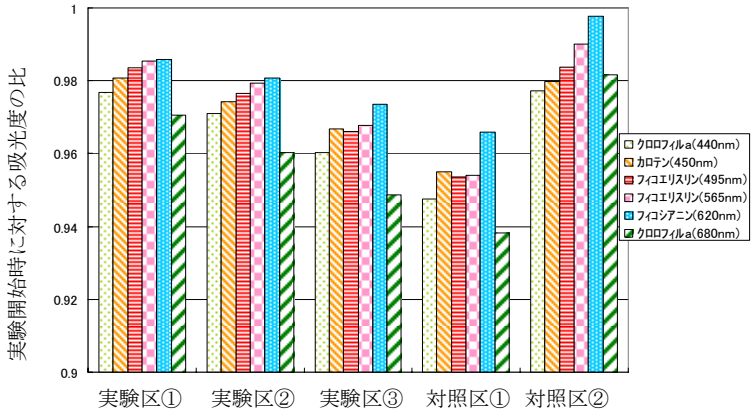


図３　特定波長におけるノリ葉体の吸光度

３．処理水拡散状況調査

3.1 調査方法

ノリ期前(10 月）及びノリ期中（2 月）に有明海域において現地海域調査を行った。潮周りは中潮前後を選び，下げ潮時、干潮時、上げ潮時、満潮時の時間帯に採水、観測等を行った。対象とした処理場、放流先河川、地先海域及びノリ網の位置関係図を図-4 に示す。

また，比較のため，近辺の流入河川及び対象処理場処理水についても水質分析を行った。

水質分析は、T-N 、NO3-N、NO2-N、NH4-N 、T-P 、PO4-P （以上の項目はろ過サンプルを用いる）と窒素安定同位対比（ろ過しないサンプルを用いる）とした。

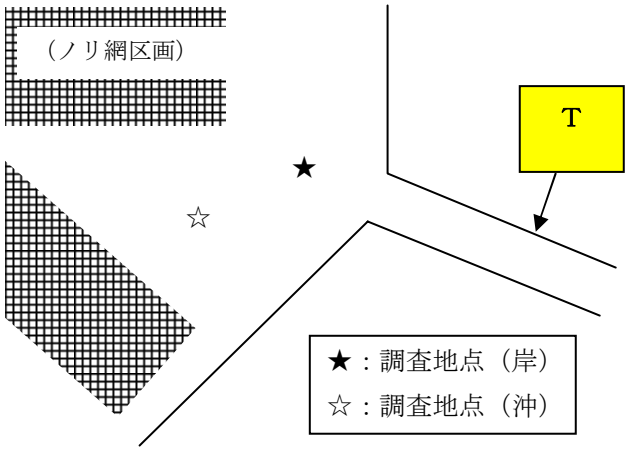
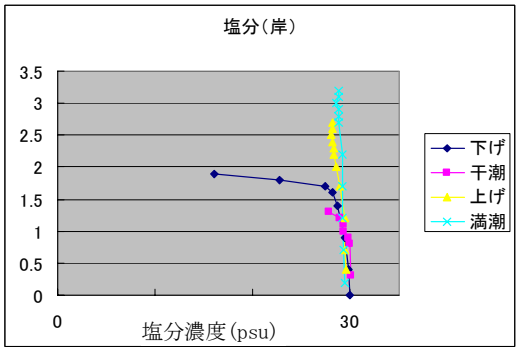


図-4　　地先海域調査地点関係図

3.2 調査結果

3.2.1 塩分濃度の観測による淡水の海域での拡散状況

ノリ期前の現地海域調査では処理水混じりの河川水が潮汐により海域でどのような拡散状況を示すか把握した。満潮時に河川水（処理水混じり）は河口奥に停滞するが引き潮にのって表層付近をあまり上下混合せずに沖へ運ばれる。次に上げ潮にのって，かなり上下混合しながら岸側へ戻ってくる。(図-5) このため引き潮時の表層塩分濃度はかなり下がることが明らかになった。また干潮時の塩分濃度から，地先海域での海水への淡水混合率は 4.4%と推定された。



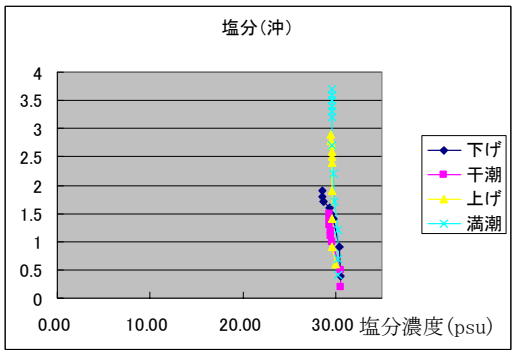


図-5　塩分濃度観測結果

3.2.2 アンモニア体窒素濃度の観測による河川水中での処理水の拡散状況

図-4 の中の河川Ｂの河口において，図-6.1，6.2 にしめすように横断方向，垂直方向にアンモニア態窒素を測定し，下水処理水の放流先河川中での拡散状況を把握した。

表 4 のとおり処理水は横断方向にはあまり拡散せず，鉛直方向に厚みのある水塊となって存在し，潮汐によってそのまま流下方向に移動することが分かった。

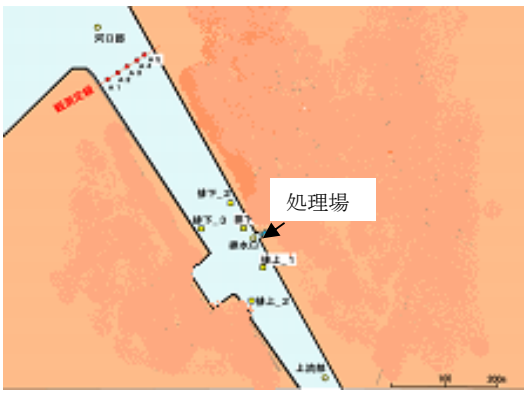


図-6.1　河川Ｂ河口部での水質観測点

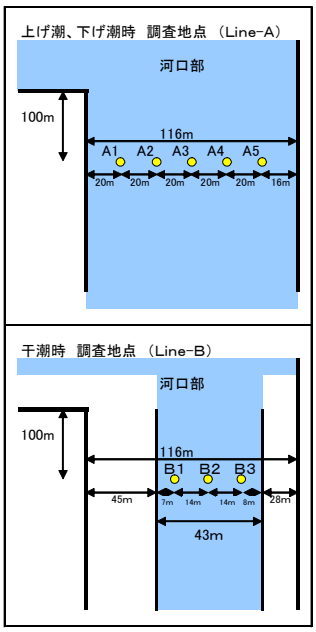


図-6.2　潮汐毎の水質観測点の配置

表-4　河川 B 河口部における河川断面上の水質分析結果（アンモニア態窒素）

【下げ潮】

調査点 採取層	A1 左岸	A2	A3	A4	A5 右岸
0cm	0.10	0.08	0.09	0.15	0.63
5cm	0.09	0.07	0.07	0.14	0.47
10cm	0.10	0.09	0.06	0.20	0.56
20cm	0.11	0.11	0.10	0.12	0.55
30cm	0.18	0.07	0.06	0.05	0.13
50cm	0.03	0.03	0.05	0.03	0.06
70cm	－	－	－	0.03	－

【干潮】

調査点 採取層	左岸	B1	B2	B3	右岸
0cm	－	0.36	0.35	0.54	－
5cm	－	0.28	0.35	0.57	－
10cm	－	0.32	0.55	0.58	－
20cm	－	0.23	0.19	0.31	－

【上げ潮】

調査点 採取層	A1 左岸	A2	A3	A4	A5 右岸
0cm	0.12	0.08	0.04	0.03	0.04
5cm	0.07	0.08	0.04	0.03	0.04
10cm	0.07	0.07	0.04	0.03	0.04
20cm	0.05	0.07	0.04	0.02	0.03
30cm	0.04	0.04	0.04	0.02	0.02
50cm	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02

3.2.3 窒素同位体の測定結果

本調査では，海域における下水処理水の拡散状況を把握するトレーサーとして窒素同位体を用いることの可能性を確認するために分析を行った。今回の結果では、淡水の安定同位体の分析結果は通常いわれている値の範囲にあると考えられたが、海域側との比較において及び処理水の値をみると、通常いわれる関係は認められなかった。この理由は不明であるが、放流後処理水の挙動を知るためのトレーサーとしては利用できないものと考えられた。

４．まとめと今後の課題

本調査は，下水処理水に含まれる栄養塩類がノリの質（色，味）にどのような効果があるかを，なるべくノリ養殖現場に近い条件の中で検証する目的で実施したものである。本調査の結果から，下水処理場から放流される処理水中の栄養塩は、実際の海域で想定される範囲の濃度においてはノリの生長を阻害することはなく，品質を高めることに大きく寄与する可能性が高いことが示された。

しかし処理水が淡水であることや水温が高めであることなど，成分以外の要素の中にはノリの生長に悪影響を与える可能性のあるものもあり，今後はこれらの要素のノリへの影響等について検討する必要がある。さらに，ノリの養殖が行われる海域が閉鎖性水域である場合には，処理水による栄養塩の海域への供給が富栄養化を助長しかねないという指摘もあり，ノリへの栄養塩の供給という目的での処理水の活用にあたってはこれらの指摘について充分検討した上で対応する必要がある。

参考文献

1) 能登谷正浩著、ベルソーブックス 012（社）日本水産学会 監修 海苔という生き物、成山堂書店、2002
2) 山本民次，高尾允英，スサビノリ *Porphyra yezoennsis* 葉体のアンモニア態及び硝酸態窒素の取り込みに及ぼす温度の影響，藻類 Jpn. J. Phycol. 36：37-42，March 10，1988
3) 徳田廣，大野正夫，小河久朗著，海藻資源養殖学，株式会社緑書房，1987
4) 岩田静昌、JF 全漁連 海苔海藻部編集、JF 全漁連のりごよみ、全国漁業共同組合連合会、2005
5) 能登谷正浩編著、海苔の生物学、成山堂書店、2000
6) 佐藤孜郎、佐藤美和、伊藤啓二、松本文夫、アサクサノリの生化学的研究-Ⅰ,窒素添加培養による窒素成分の変化,Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,Vol.25、Nos.10-12、1959

第２章　その２　環境ホルモン関連物質の生物への蓄積

1. はじめに

近年では様々な微量物質が生物に及ぼす影響が懸念されるようになってきている。その中の一つとして、化学物質が次世代に影響を及ぼすという内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン物質）問題が世界的にも大きな問題として取り上げられた。

これらの化学物質が実際の環境中において生物へ与える影響は、水からの直接暴露だけでなく、餌を通じた化学物質の取り込みによる部分もあり、正確な影響評価を行う上では、餌を含めた評価が必須である。しかし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[1-4]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[5]や Takahashi らの報告[6]などを数えるに過ぎない。

そこで本研究では、下水処理水を放流する実験水路を用いて微量物質の一つである環境ホルモン関連物質の生物相への移行について、基礎情報を得ることを目的とした。

2. 方法

河川では自然的攪乱によって日常的に藻類の増殖環境が大きく変化している。藻類の増殖段階によって、エストロゲン様物質およびエストロゲン類の藻類への取り込み速度が変化することも、考えられるが、増殖段階を考慮した研究例は殆ど見られない。そこで河床へのエストロゲン様物質及びエストロゲン類の移行量を評価することを目的に、人工水路を用いた実験系を利用し実験を行った。

(1) 実験水路

水中から河床の付着藻類へのエストロゲン類の蓄積について、流量変化や水質の変動をできるだけ抑制した条件下で試験するために、茨城県霞ヶ浦浄化センター（湖北処理場）内に高度処理水を流下させる人工水路を設置して実験を行った。

実験に使用した人工水路を図 1 に示す。この水路は幅約 30cm、長さ約 5m で、河床にφ3～5cm の礫を敷き詰めた構造である。また、水路内に素焼き板（9×9cm）を設置し、単位面積あたりの生物量の把握に用いた。

なお、実験水路の物理環境は、流速は平均で 0.16m/s（n=3，0.14～0.18）、水温はロガーにより記録した結果、変動幅はおよそ 15～18℃の範囲内であった。

図 1 実験用人工水路

(2) 藻類回収作業

試験は平成 18 年 1 月 20 日から 2 月 16 日の期間で実施し、藻類の回収は藻類の増殖速度を考慮しながら行った。その結果、実験開始から 3(1/23)、11(1/31)、20(2/9)、27 日(2/16)後に採取を行った。

藻類の回収操作は、人工水路内に設置した小石を手で静かに掬いとり、Milli-Q 水を約 1～2Ｌ程度ステンレスバケツに移し、手で付着した藻類を擦り落とした。また人工水路の最下流部にプランクトンネット（NXX13：オープニングメッシュ 100μm）を設置しておき、藻類を水路から掬い取った際に剥離した藻類の回収を行い、合わせて藻類をステンレスバケツに移した。

また、人工水路内に設置したトンプラットについては、静かに手で持ち上げ、バットの上に持っていき、ハブラシを用いて一定面積の付着藻類を擦り落とした。この試料を蒸留水を用いてポリビンに移した。この作業は２回繰り返し、1 検体についてはクロロフィル a の検体とし、もう一検体については、グルタルアルデヒド溶液を用いて藻類を固定し、顕微鏡観察用の検体とした。

3. 結果

(1) 付着藻類の状態

付着板から一定面積量回収した付着藻類について、クロロフィル a の測定結果及び藻類の全出現細胞数を整理した結果を図 2 に示す。また藻類優占種の推移を表 1 に示す。

出現した実験期間中に出現した種は 2 綱 4 目 8 科 10 属 26 種であり、種数としては珪藻類の出現種が多かった。特に出現の多い種は、*Synedra rumpens* や *Gomphonema parvulum*，*Nitzchia palea*，*Stigioclonium* sp.であった。

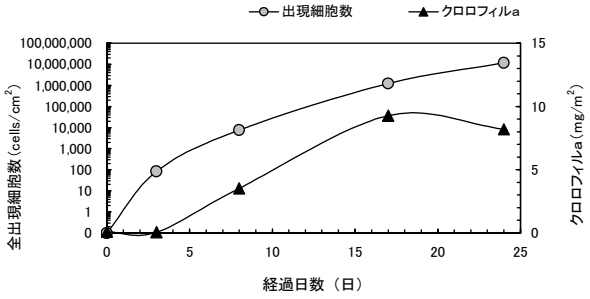


図 2 実験水路における藻類増殖

表 1 実験水路における付着藻類の優占種推移

	1月23日		1月31日		2月9日		2月16日	
	種　名	出現細胞数	種　名	出現細胞数	種　名	出現細胞数	種　名	出現細胞数
第1優占種	*Aulacosira varians*	21	*Synedra rumpens*	3,436	*Gomphonema parvulum*	699,150	*Gomphonema parvulum*	3,495,750
第2優占種	*Synedra rumpens*	18	*Gomphonema parvulum*	2,722	*Synedra rumpens*	142,200	*Nitzschia palea*	2,488,500
第3優占種	*Synedra ulna*	18	*Synedra ulna*	481	*Synedra ulna*	116,130	*Stigeoclonium* sp.	2,014,500
第4優占種	*Navicula confervacea*	12	*Gomphonema clavatum*	481	*Nitzschia palea*	68,730	*Synedra rumpens*	1,244,250
第5優占種	*Stigeoclonium* sp.	2	*Gomphonema pseudoaugur*	100	*Navicula seminulum*	54,510	*Gomphonema pseudoaugur*	1,007,250

(2) 供給水の水質

①一般項目（SS, BOD, 窒素，リン, D-TOC）

実験期間中の一般項目の経時変化を図 3 に示す。ＳＳについては実験期間中 0.5mg/L 以下の低い値で推移した。Ｄ・ＴＯＣについては 2/3 に 6.5mg/L を示したのを除くと、4～5mg/L の範囲で推移した。またＢＯＤについては 2/9 の値が実験期間中最も高い値を示した。窒素については硝酸態窒素が占める割合が高かったが、1/24 調査時にはアンモニア態窒素の占める割合が高くなった。総リンについては 0.121～0.217mg/L で推移しており、総リンに占めるオルトリン酸態リンの割合は、26～79%（平均：61%）であった。

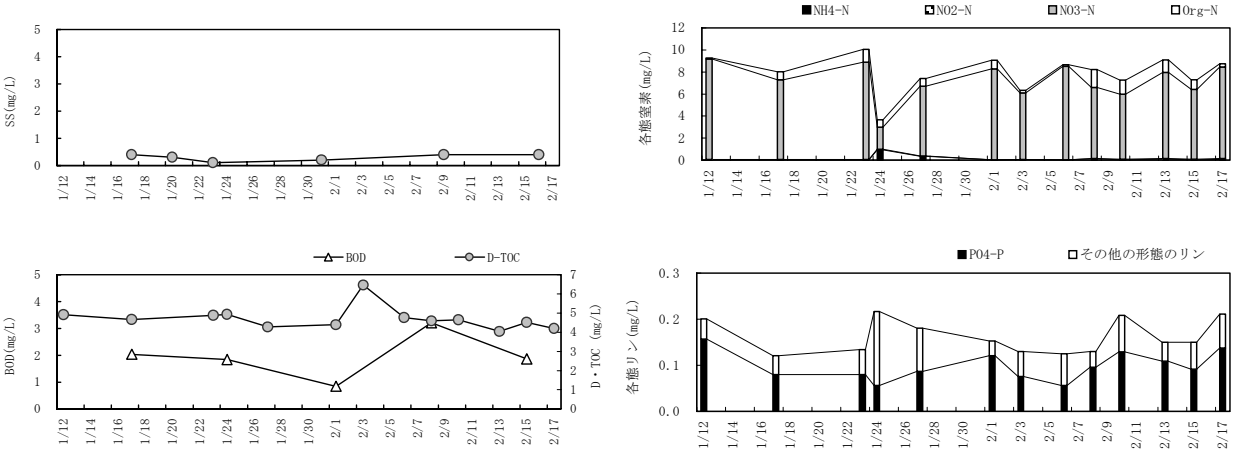


図 3 人工水路における水質の変化（一般項目）

藻類の増殖制限因子としては一般に窒素及びリンであり、藻類への取り込み比は N:P＝16:1（Redfield ratio）目安として利用される。ここで藻類の取り込みに直接関係のある無機の形態について整理すると、ＤＩＮ／ＩＰ比は 46～152（平均：78）となっており、リンが制限因子であることが推測された。ただし下水処理水には藻類の増殖には十分なオルトリン酸態リンが存在しており、栄養塩類によって藻類増殖が制限されている可能性は低いものと考えられる。

②エストロゲン類及び合成エストロゲン

エストロゲン類として遊離態のエストロゲン（エストロン：E1、17βエストラジオール：Ｅ２、エストリオール：Ｅ３）及び抱合態のエストロゲン（グルクロン酸抱合態、硫酸抱合態）について分析を行った。ま

た合成エストロゲン（エチニルエストラジオール：ＥＥ２）についても併せて分析を行った。その結果、Ｅ３、エストロン-3 グルクロニド（Ｅ１－３Ｇ）、βエストラジオール－3、17 グルクロニド(Ｅ２－3&17G)、エストリオール－3、17 グルクロニド（Ｅ３－3&17G）ＥＥ２については実験期間を通じて検出されなかった。

実験期間中のエストロゲン類の経時変化を図 4 に示す。

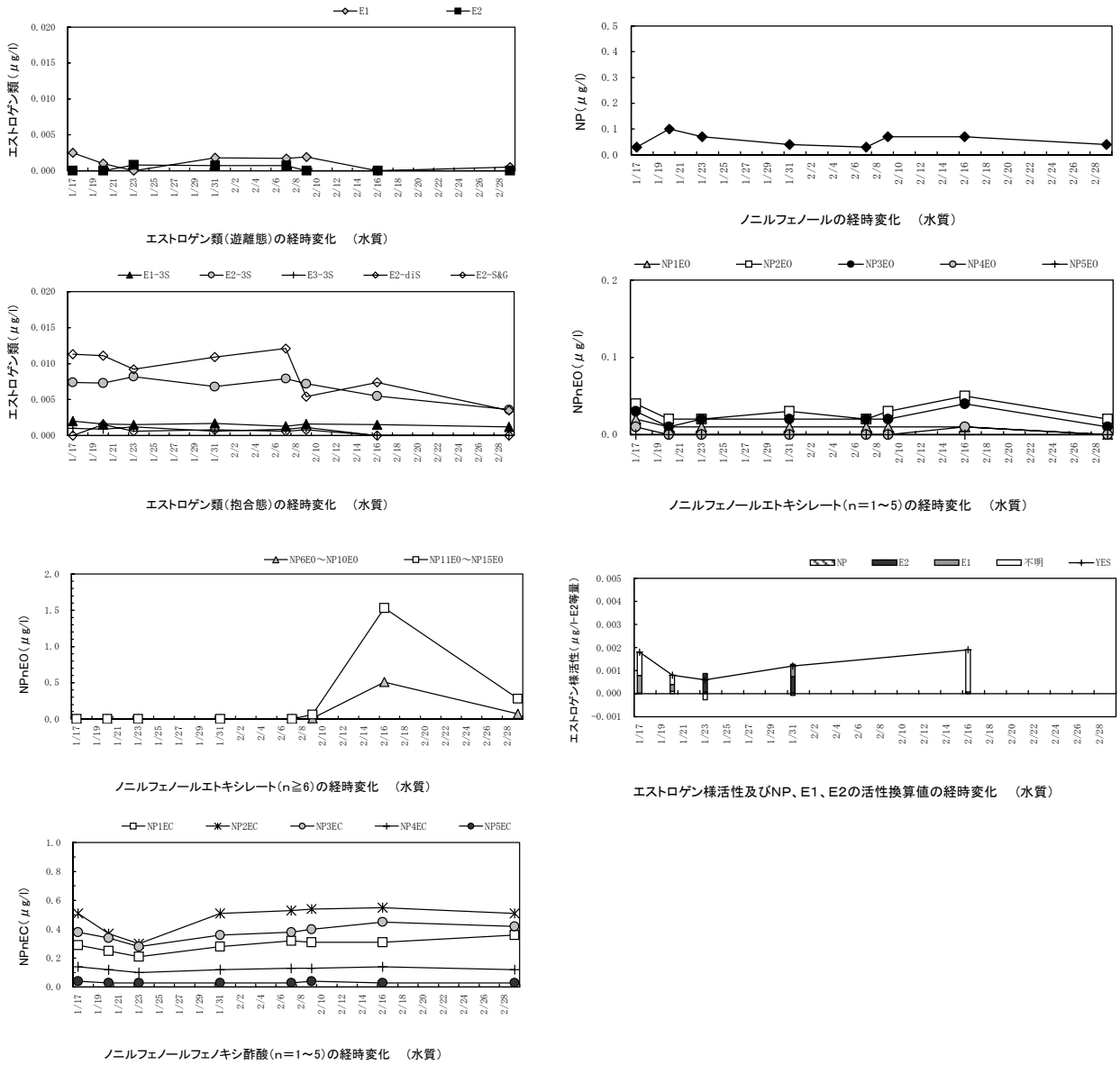


図 4 環境ホルモン関連物質の水中濃度変化

エストロゲン類の内、検出濃度が高いのは、抱合態のエストロゲンであり、特に硫酸抱合態の検出頻度が高いことが確認された。また硫酸抱合態の中でも、βエストラジオール－3 サルフェイト(Ｅ２－3S)、βエストラジオール－3、17 サルフェイト(Ｅ２－diS)は、他の検出されたエストロゲン類に比べ高い値であった。

③ノニルフェノール関連物質

ノニルフェノールエトキシレート（ＮＰｎＥＯ）及びその分解生成物であるノニルフェノールフェノキシ酢酸（ＮＰｎＥＣ）、ノニルフェノール（ＮＰ）について分析を行った。実験期間中のノニルフェノール関連物質の経時変化を図 4 に示す。ＮＰｎＥＯについては、実験開始の 1/17～2/9 までの期間はＥＯ付加モル数が 5 以下のものを中心として検出されたが、2/16、3/1 の調査ではＥＯ付加モル数が 5 以上の占める割合が高くなった。ノニルフェノールフェノキシ酢酸については、実験期間を通じ、ＥＣ付加モル数が 6 以上のものは検出されなかった。また実験開始の 1/17～1/23 にかけてＮＰｎＥＣは減少する傾向が見られたが、1/31 の調

査時には実験当初の 1/17 と同じ程度の濃度となった。その後は大きな変動は見られず安定した推移を見せた。ノニルフェノールについては 0.03～0.10μg/L で推移し、実験期間中を通じ大きな変動は確認されなかった。

④エストロゲン様活性

遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定結果と、ＮＰ、Ｅ１、Ｅ２の結果を比較し、これら３物質がエストロゲン様活性にどの程度寄与しているか推定した。なおＮＰｎＥＣについてはエストロゲン様活性がないことが確認されている。またＮＰｎＥＯについてはＮＰ１ＥＯ、ＮＰ2ＥＯに非常に弱いエストロゲン様活性が確認されているが、そのＥ２理論換算値がＮＰやＥ１、Ｅ２に比べ非常に低くなることからここでは活性の寄与について議論しないこととした。各物質の比活性値については、矢古宇らの方法 [7]に従いＮＰ=0.001、Ｅ１=0.3、Ｅ２=1.0 とした。その結果を同じく図 4 に示す。1/23,1/31 の調査時については、エストロゲン様活性はＥ２、Ｅ１でほぼ説明できたが、1/17、1/20 の調査時についてはＥ１、Ｅ２ではエストロゲン様活性の半分程度しか説明できなかった。また 2/16 の調査についてはエストロゲン様活性の殆どがＮＰ、Ｅ１、Ｅ２では説明できない結果となった。

(3) 藻類中の環境ホルモン関連物質

①エストロゲン類

付着藻類中のエストロゲン類の濃度変化を図 5 に示す。遊離態のエストロゲン類についてはＥ１、Ｅ２が検出された。また抱合態については硫酸抱合態（Ｅ１－３Ｓ、Ｅ２－３Ｓ、Ｅ３－３Ｓ）のみが検出され、グルクロン酸が抱合したエストロゲン類は検出されなかった。経時的な変化に着目すると、特徴的な変化が確認されたのはＥ１－３Ｓであり、藻類の増殖量の増加につれ、藻類への蓄積濃度が高くなる傾向が確認された。

一方、Ｅ２－３ＳやＥ３－３Ｓについては、調査時における変動が大きく明瞭な傾向が得られなかった。またＥ１、Ｅ２についても特徴的な変化は確認されなかった。

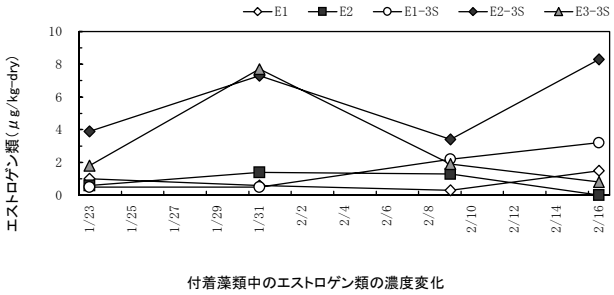


図 5 付着藻類中のエストロゲン類濃度

②ノニルフェノー.

付着藻類中のＮＰの濃度変化を図 6 に示す。ＮＰ濃度は調査開始時の 1/23 に 1100μg/kg-dry を示したが、1/31 日調査では 340μg/kg-dry に減少した。その後の 2/9 調査時には同じ値を示したが、翌 2/16 調査時には 570μg/kg-dry となり、再び増加傾向となった。

付着藻類中のＮＰｎＥＯの濃度変化を図 7 に示す。ＮＰｎＥＯについては付加モル数が 1～５の物質については、同じ傾向が得られ 1/31 調査時に最も高くなり、その後減少傾向となった。一方、付加モル数が６以上の物質についての検出濃度は、付加モル数が 1～５の物質に比べ高い値であったが、経時的な変動はなく、概ね実験期間を通じ安定した値で推移した。

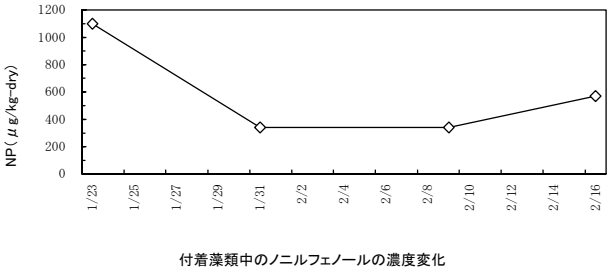


図 6 付着藻類中の NP 濃度

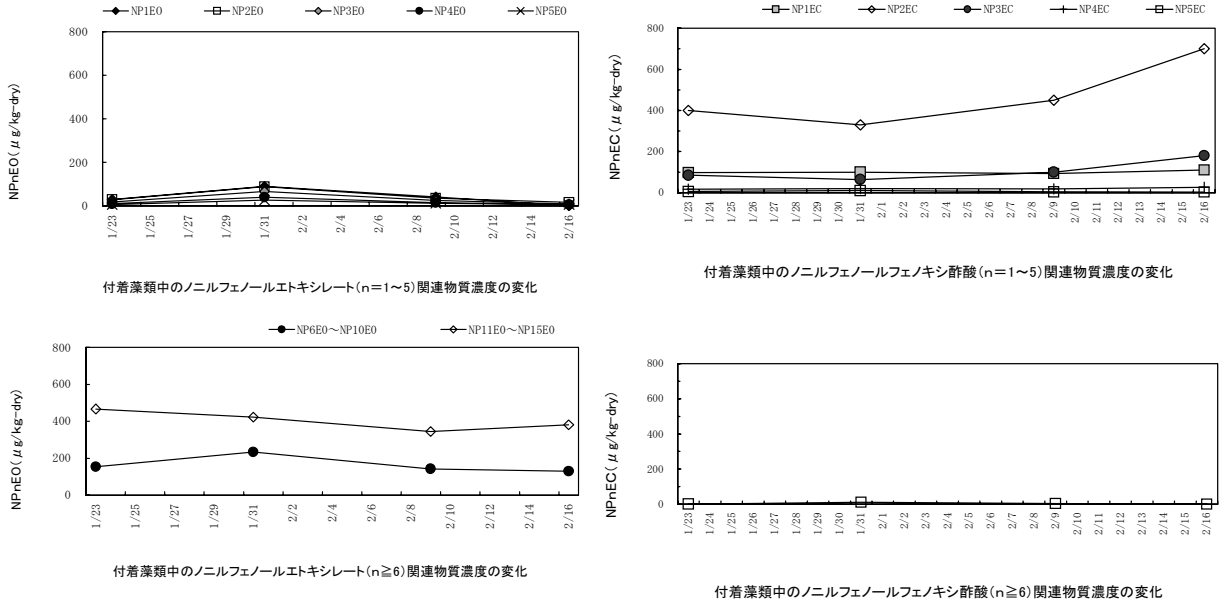


図 7 付着藻類中の NP 関連物質濃度

付着藻類中のＮＰｎＥＣの濃度変化を図 7に示す。ＮＰｎＥＣについてはＮＰ２ＥＣが最も高い濃度を示した他、実験期間を通じて蓄積濃度が上昇する傾向が確認された。このような傾向はＮＰ３ＥＣについても確認されたが、ＮＰ１ＥＣやＮＰ４ＥＣ、ＮＰ５ＥＣについては確認されなかった。一方、ＮＰＥＯでは付加モル数が６以上の物質の検出濃度は、付加モル数が 1～５の物質に比べ高い結果であったが、ＮＰｎＥＣについては付加モル数が６以上の物質は殆ど検出されなかった。

4. 考察とまとめ

本実験の結果から、エストロゲン類は藻類の生育段階に応じて蓄積量に若干の変動はみられるものの、その差は小さく、概ね一定であった。従って、付着藻類の生物量および種構成が変化する遷移段階においてもエストロゲン類の蓄積量に大きな違いはないといえる。

一方、ノニルフェノール関連物質については、藻類の生育段階に応じて蓄積量に大まかな傾向として次のような変化がみられた。

供給水質については実験期間を通してほぼ一定であったことから、付着藻類中の環境ホルモン関連物質蓄積量に変化が生じた場合の要因は、水質変化ではなく、付着藻類相への移行効率の変化とみなすことができるため、物質ごとの特徴は以下のようにまとめられる。

・NP：藻類の生物量の増加（または種構成の変化）に対応して低下
・NPEO：藻類の対数増殖期に上昇し、その後低下（付加モル数が小さいほど傾向大）
・NPEC：藻類の生物量の増加（または種構成の変化）に対応して上昇（付加モル数が小さいほど傾向大）

なお、種構成については細胞数からみると、いずれの生育段階においても基本的に珪藻類が優占していたが、容積からみると実験後期には緑藻類の糸状体が多くみられるようになり、これらの違いがＮＰやＮＰＥＣの変化の要因である可能性が考えられる。

また、付着藻類群集への環境ホルモン関連物質の蓄積に関するメカニズムとしては、「取り込み」と「吸着」が考えられる。特にＮＰＥＯの場合は細胞数が短期間に急激に増加する対数増殖期に蓄積濃度が高くなっていることから、取り込みによる作用が大きい可能性もうかがわれる。

一方、環境ホルモン関連物質の影響把握や対策等を検討する際には、河川における物質収支の面からデータを整理する必要が生じる。この際、水中から河床への移行量を把握することが求められるが、河川の中では付着藻類等の生物群集が常に遷移していることから、現地調査からのデータをそのまま全ての時点に適用

できるかどうかが課題となるが、今回の試験結果から、本実験でみられた傾向が有意な変化だとすれば、実際の河川における環境ホルモン関連物質の収支計算を行う場合の河床への蓄積量（移行量）を見積もる際にはノニルフェノール関連物質については、藻類量だけではなく、その遷移段階や構成種等を考慮する必要があるといえる。

なお、今回の実験における課題としては、(i)実験が１回のみのため、これらの傾向を確認するためのデータの積み重ねが必要，(ii)含有量の経時的な変化が、バイオフィルムの質的な変化（シルト含有率や藻類群集の変化）による影響であるかどうかまでは特定できない、といった点があげられる。

従って、今後はさらにデータを積み重ねるとともに、シルト成分への吸着を評価する実験系を別途考えるなど、新たな試験手法も取り入れていく必要がある。

参考文献

1) Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M(2000) 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa.Chemosphere 41,757-762.
2) Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M(2001)Evaluation of 4-nonylphenols and 4-tert-octylphenol contamination of fish in rivers by laboratory accumulation and excretion experiments. Water Reseach 35(7),1786-1792.
3) Rice et.al(2003), Alkylphenol and Alkylphenol- Ethoxylates in carp,Water, and Sediments from the Cuyahoga River, Ohaio.Environ.Sci. Technol.(37) 3747-3754.
4) Kannan, K.；Keith, T.L.；Naylar, C.G.；Staples C.A.；Snyder, S.A.；Giesy, J.P(2003) Arch.Environ. Contam. Toxicol,44,77-82.
5) Ahel M, McEvoy J, Giger W(1993) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. Environmental Pllution 79(3):243-248.
6) Takahashi, A.；Higashitani, T.；Yakou Y.；Tanaka H. (2002) 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
7) 矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明（1999）組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン様活性の測定，環境工学研究論文集,Vol.36,199-204.

第３章　生物検定法の高度化に関する検討

下水処理水による魚類曝露試験とその影響評価

１　はじめに

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、英国では、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として、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-エストラジオールとエストロン、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であることが明らかにされた。また、エストロゲン様構造をもつノニルフェノール（非イオン界面活性剤の分解産物の一つ）が羊毛洗浄工場から多量に排出された河川では、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。

日本の河川において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、平成 10 年（1998 年）から、全国の一級河川を対象とした水質、底質および魚類実態調査、さらに下水処理場を対象とした下水処理実態調査に着手してきた。その結果、下水処理場で高率に除去しているけれども、除去し切れなかったエストロゲンおよびエストロゲン様物質が排出されていることが明らかにされた。

また、河川における雄魚の雌性化については、平成 10 年から平成 13 年（2001 年）にかけて実施された上記魚類実態調査によって、29 河川 69 地点（ともにのべ数）における雄コイのエストロゲン影響が明らかにされた。雌性化の指標であるビテロジェニン（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）を血清中に 0.1μg/mL 以上生成している雄個体は 551 匹のうち 144 匹（26.1%）にみられ、エストロゲン作用による影響が引き起こされていると疑われた。このうち、3～4 回の調査によって 30 匹以上の雄コイを採捕することのできた 9 地点のデータをみると、各地点におけるビテロジェニン生成雄個体の出現率は、当該地点の河川水のエストロゲン活性平均値に対しある程度の相関がある（相関係数 r=0.69）ことが判明した。

しかしながら、河川に生息する雄コイがビテロジェニンを生成する可能性として、餌由来の植物性エストロゲンや底質に存在するエストロゲン類が関わっているなどの疑問が残されている。さらに、日本では養殖コイが各地で放流されていることやコイの移動性など、水質との相関を不明確にする要因が残されている。このため、下水処理場放流水のエストロゲン作用と魚類の雌性化との影響要因の関係は依然として明らかになっていない。

下水道の急速な普及によって下水処理水等の都市排水が都市河川に占める割合は急速に大きくなりつつある。よって、下水処理水の比率が高い都市河川に存在するエストロゲンや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。さらに、その状況によって下水道や都市排水の対策をとる必要があると考えられる。

この問題に対処するため、土木研究所水質チームでは下水処理水による雄魚の雌性化について調べることとした。エストロゲン類の標準物質による魚類影響の解明は、他の研究機関が進めているが、日本の水環境で起きている現象を知るためには、実際の下水処理水を対象とすることが重要と考えられる。

２　本テーマの研究経過と本年度研究内容

下水処理水が雄コイに及ぼすエストロゲン影響の有無、およびその程度を明らかにするため､下水処理水への直接的なコイ曝露試験法について検討し､曝露試験を繰り返し実施した。その結果、早春に雌雄のコイを同所的に曝露した場合に限り、雄コイのビテロジェニン生成が認められた。コイ曝露試験を継続的に実施している間、処理水のエストロゲン活性に変動はみられなかったため、雄コイのビテロジェニン生成は、下水処理水のエストロゲン作用が直接関与した可能性のほか、早春に始まる生殖活動の活性化にともなって、雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲン(男性ホルモン)をもとに酵素によってエストロゲンが合成され、この内因性のエストロゲンが雄コイのビテロジェニン生成を誘導した可能性もあると考えられた。

コイは、定期的に採血することが可能であるため、各個体の経時的変化を追跡することのできる実験魚である。しかし、成熟に 2 年～3 年を要し、また成熟後の生殖周期も一年単位であることから、実験魚として活用するには不便な点があった。さらに、コイヘルペスによってわが国の水環境中および養殖中のコイが激減する現象が顕在化し、コイに生じる魚類影響の判定がより複雑なものとされた。と同時に、実験用のコイの入手が困難となった。

そこで、魚類試験で一般的に用いられているメダカを用いて、下水処理水のエストロゲン影響を調べることとした。

平成 15 年度は、コイ曝露試験を実施した下水処理場にて、同じ処理水（塩素消毒後に砂ろ過処理をした場内用水）を用いてメダカ曝露予備試験を実施した。しかしながら、雄メダカではビテロジェニン生成はみられず、この下水処理場の砂ろ過水では、メダカにエストロゲン影響を及ぼさないほどに処理が進められていることが想定された。そこで､平成 16 年度は、同処理場において、塩素消毒前の二次処理水を用いた曝露試験を追加し、砂ろ過水曝露試験との比較を行った（Test A, B)。Test A では、2 週間の曝露によって、二次処理水試験区で雄メダカのビテロジェニン生成を確認することができた。そこで、Test B は曝露期間を延長して、両試験区における差異をもとに魚類影響要因を探ることとした。この結果、下水処理水による魚類影響の主要因はエストロンであると考えられたが、砂ろ過水においてエストロゲンが急激に上昇する現象がみられ、この場合に雄メダカのビテロジェニン生成も大きくなる現象が確認された。

本年度は二次処理水および砂ろ過水でのメダカ曝露試験を継続して、それぞれの処理水のエストロゲン作用と雄メダカのビテロジェニン生成との関係を明らかにして、処理レベルと魚類影響との関係を明らかにすることとした。さらに、外因性の影響要因に感受性の高い稚魚を用いて、稚魚期から若魚期での下水処理水の影響を明らかにすることとした。

３　方法

3.1　試験実施地点

本研究での魚類曝露試験は、コイ曝露試験から協力を得ている下水処理場にて、コイ試験と同じ場内用水（二次処理水に塩素消毒および砂ろ過処理を加えたもの）および塩素消毒前

の二次処理水を用いることとした。

この下水処理場は、おも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。

3.2　試験魚と現地魚類曝露試験システム

試験対象魚は、過年度試験に継続してメダカ *Oryzias latipes* を選定した。

メダカは、成熟に要する時間が 3 ヶ月と短く、さらに、次世代を得ることが容易なため、わが国における魚類研究の中心となっている魚種である。エストロゲン作用による魚類影響の試験対象魚として、環境省や OECD で確立が急がれている標準試験法としても採用が考えられており、データの蓄積が図られている。

写真 1　現地魚類曝露試験水槽

メダカ曝露試験に用いる試験水槽は、水質チームが考案・作製した現場型魚類曝露試験システムを継続して用いることとした（写真 1 参照）。

この装置の特徴は、現地試験において新鮮な環境水を導水するとともに、水温、流量、日照時間等の試験条件を制御可能とするものである。試験水を除いたその他の試験条件を統一することが可能なので、複数の曝露試験において、水質と魚類影響との関係を比較検討することが可能となる。メダカ曝露試験における試験条件を表 1 に示した。これは、環境省の室内試験に整合させたものであり、現地試験としての変更点は、餌を市販の粉末餌とし、自動給餌器を用いて与えることとした。

表1　メダカ現地曝露試験　条件一覧

項 目	条 件
試験魚	ヒメダカ *Oryzias latipes*
試験水	間欠流水式
流量	0.5 L/min（30 L/h）
試験温度	水温 26 ℃
日長条件	16 時間－明，8 時間－暗
餌	粉末餌、一日あたり 3回の給餌

3.3　曝露試験（Test C、Test D）

Test C として、過年度と同様に成魚を対象とした曝露試験を実施した。今回は、二次処理水試験区および砂ろ過水試験区ともに、雄メダカ 60 匹と雌メダカ 10 匹を投入し、6 週間の曝露試験を行うこととした。続いて、6 週後にその水槽内で得られた卵を用いて Test D を行うこととした。Test D では、孵化仔魚の初期減耗を考慮し、およそ 300 卵を試験開始時に準備することを目標とした。

表2　下水処理場におけるメダカ曝露試験の実施状況

曝露試験		曝露期間	実施期間		メダカ	
					個体数	開始月齢
Test C	二次処理水	2週間	平成17年	8月3日～8月17日	20	3
		4週間		8月3日～8月31日	20	3
		6週間		8月3日～9月14日	20	3
	砂ろ過水	2週間		8月3日～8月17日	20	3
		4週間		8月3日～8月31日	20	3
		6週間		8月3日～9月14日	20	3
Test D	二次処理水	8週間	平成17年	9月28日～11月9日	20	0.5
	砂ろ過水	8週間		9月14日～11月9日	20	0

3.4　魚類影響指標

魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）として、この分野の研究では一般的な指標であるビテロジェニンを継続することとした。なお、この測定はメダカビテロジェニンーELISA キットを用いた。

回収した雄メダカのビテロジェニン測定は、下記のとおり実施した。メダカを氷冷麻酔し、動きの停止したメダカを 1 個体ずつピンセットで取り上げ、ペーパータオルで体表面の水分を除去した後、電子天秤で体重を測定し、デジタルノギスで全長・体長を測定した。

体重・体長などの測定後、解剖バサミで腹面の胸鰭基部を切開し、さらに腹面正中線上を肛門の直前まで切り開いた。実態顕微鏡下でピンセットを用いて腹腔壁を押し広げて肝臓を露出させ、消化管や胆嚢を破損しないように注意して肝臓を摘出した。肝臓に付着した脂肪組織などは完全に除去した。摘出した肝臓はマイクロチューブ（容量 1.5mL）を風袋として、電子天秤で重量を測定した。採取後の肝臓は直ちに冷却して、前処理に供するまで-80℃で凍結保存した。

肝臓が入ったマイクロチューブに氷冷した Buffer（メダカビテロジェニンーELISA キットの検体希釈液）を肝臓 1mg あたり 50μL 添加し、清浄なマイクロホモジナイザーでホモジネートした。ホモジネート後、冷却遠心機で遠心処理（4℃、13,000ｇ、10 分間）し、肝臓組織および脂肪などを分離して、マイクロチューブの中層に分離された肝臓抽出液を ELISA 測定の試料として分取した。前処理操作はすべて氷冷下で行った。マイクロチューブに分注した肝臓抽出液は、ELISA での測定に供するまで-80℃で凍結保存した。

肝臓抽出液は、メダカビテロジェニン-ELISA キットの検体希釈液を用いてさらに 10 倍以上に希釈して測定に供した。ELISA の手順および条件等は、キットの説明書に従った。測定はすべて二重測定で行った。試料（希釈した肝臓抽出液）中のビテロジェニン濃度は、二重測定した吸光度の平均値を基に標準曲線から算出した。これに肝臓抽出液の希釈倍率を乗じて、肝臓抽出液中のビテロジェニン濃度を算出した。ビテロジェニン標準溶液の濃度系列は 100、50、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56ng/mL とした。ただし、標準曲線の作成にあたっては、安定した測定値の得られた 3.13ng/mL 以上を用いることとした。したがって、肝臓中のビテロジェニン濃度の定量下限値は、3.13ng/mL に肝臓抽出液の希釈倍率 10 倍およびホモジナイズに用いた Buffer 量 0.05mL/mg-liver を乗じて算出される 1.56ng/mg-liver とした。

3.5　水質分析

メダカ曝露試験水のエストロゲン作用を明らかにするため、エストロゲンおよびエストロゲン様物質の濃度を2週間ごとに測定した。

エストロゲンの測定項目は、遺伝子組換え酵母によるエストロゲン活性、天然エストロゲンの 17β-エストラジオール（E2)、エストロン（E1)、エストリオール（E3)、合成エストロゲンの17α-エチニルエストラジオール（EE2)、さらにエストロゲン抱合体を対象とした。また、エストロゲン様物質の測定項目は、ノニルフェノール（NP）およびノニルフェノールエトキシレート（NPnEO,1≦n≦15）とした。

水試料の前処理および測定は、既報の調査研究と同様の方法を採用した。

4　試験結果

4.1　成魚曝露試験（Test C）

6週間のメダカ成魚曝露試験において､2週ごとに雄メダカのビテロジェニン生成状況を観察した結果、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ビテロジェニンを生成した雄メダカを確認した。しかしながら、これを生成していない個体も多くみられた（表3参照)。

二次処理水曝露試験区では、曝露開始から2週後に2匹（10%)、6週後に4匹（20%）の雄メダカでビテロジェニンが確認された。陽性個体のビテロジェニン生成最大値は、2 週後および6週後で、それぞれ3.9および2.4ng/mg-Leverdであった。

この試験区でのエストロゲン活性は、試験開始時に23.9ng/L-E2であったが、その後徐々に低下し、6週後では1.5ng/L-E2であった（表4参照)。

一方､砂ろ過水曝露試験区では､曝露開始から2週後に8匹(40%)､4週後に1匹(10%)､6週後に5匹（25%）の雄メダカにビテロジェニンが確認された。陽性個体のビテロジェニン生成最大値は､2週後､4週後および6週後で､それぞれ99.0､3.5､および3.8 ng/mg-Leverであった。

この試験区でのエストロゲン活性は、試験開始時に32.3ng/L-E2であったが、二次処理水と同様にその後徐々に低下し、6週後では1.0ng/L-E2であった。

4.2　稚魚－若魚期曝露試験（Test D）

稚魚期から若魚期まで8週間曝露した雄メダカでは、二次処理水曝露試験区の生残雄7匹中2匹（29%）にビテロジェニン生成が認められた。一方、砂ろ過水曝露試験区の生残雄13匹ではこれを生成している個体は検出されなかった。

二次処理水のエストロゲン活性を2週間ごとに測定した結果、0.3～24.0 ng/L-E2であった。砂ろ過水試験区では0.3～6.1 ng/L-E2であった。

表3　　下水処理場におけるメダカ曝露試験結果

曝露試験	曝露期間	メダカ				ビテロジェニン			
		個体数	体長 (mm)	湿重量 (mg)	肝重量 (mg)	陽性個体	出現比 (%)	平均値 (ng/mg-liver)	最小－最大 (ng/mg-liver)
Test C									
二次処理水	2週間	20	23.5 ± 1.6	161.3 ± 37.8	2.7 ± 1.1	2	10.0	1.02 ± 0.76	ND – 3.85
	4週間	10	23.1 ± 0.9	165.9 ± 16.2	2.6 ± 0.5	0	0.0	–	–
	6週間	20	24.4 ± 1.2	246.1 ± 33.1	6.8 ± 2.4	4	20.0	1.03 ± 0.54	ND – 2.40
砂ろ過水	2週間	20	23.2 ± 1.8	160.0 ± 46.3	1.8 ± 0.9	8	40.0	6.99 ± 21.78	ND – 99.01
	4週間	10	24.7 ± 1.3	222.1 ± 30.1	4.5 ± 1.1	1	10.0	1.06 ± 0.87	<1.56 – 3.53
	6週間	20	24.4 ± 1.3	341.4 ± 42.2	5.6 ± 1.9	5	25.0	1.33 ± 1.05	ND – 3.78
Test D									
二次処理水	8週間	7	19.6 ± 2.4	127.8 ± 42.7	4.6 ± 0.6	2	28.6	2.51 ± 3.80	ND – 10.98
砂ろ過水	8週間	13	21.2 ± 1.8	160.2 ± 41.3	4.7 ± 1.9	0	0.0	–	–

表 4　曝露試験水の水質分析結果（抜粋）

Test C		試験開始	第2週	第4週	第6週					下限値	
Test D					試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週	検出限界	定量限界
二次処理水											
エストロゲン活性	(ng/L-E2)	23.87	5.32	5.41	1.51	0.30	8.22	24.01	12.94	0.05	0.08
E2	(ng/L)	1.2	0.7	0.5	Tr(0.08)	Tr(0.14)	ND	1.2	1.5	0.05	0.16
E1	(ng/L)	27.5	5.4	4.2	1.8	0.3	12.4	2.1	11.7	0.02	0.08
EE2	(ng/L)	1.6	0.91	ND	0.9	ND	ND	1.1	0.3	0.04	0.12
E3	(ng/L)	ND	Tr(0.20)	ND	0.5	ND	ND	2.3	0.4	0.07	0.25
NP	(μg/L)	0.140	0.040	0.022	0.350	0.092	0.160	0.540	0.370	0.0029	0.0096
砂ろ過雑用水											
エストロゲン活性	(ng/L-E2)	32.29	4.24	2.32	1.01	0.55	0.25	2.10	6.10	0.05	0.08
E2	(ng/L)	2.60	0.33	0.50	ND	ND	ND	2.80	0.79	0.05	0.16
E1	(ng/L)	32.60	3.26	1.57	0.70	Tr(0.07)	ND	21.30	4.88	0.02	0.08
EE2	(ng/L)	ND	1.53	ND	Tr(0.07)	ND	ND	2.70	ND	0.04	0.12
E3	(ng/L)	ND	ND	1.73	ND	ND	ND	2.52	ND	0.07	0.25
NP	(μg/L)	0.160	0.072	0.012	0.430	0.130	0.073	0.590	0.440	0.0029	0.0096

ND：検出下限値未満
Tr：検出下限値以上，定量下限値未満

5　考察

雄メダカのビテロジェニン生成に関わるエストロゲン類の濃度

成魚を曝露した Test C では、両試験区で雄メダカのビテロジェニン生成が確認されたが、その生成状況に大きな差異は認められなかった。この理由として、両試験区の処理水のエストロゲン活性およびエストロンは、いずれもほぼ同様の傾向を示しながら推移したことによると考えられた（図 1 参照）。また、両試験区とも試験開始時のエストロゲン活性は 20 ng/mL-E2 を越えていたが、その後は Test C が終了するまでエストロゲン活性が 10 ng/mL-E2 を超えることはみられなかった。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ビテロジェニン生成に関与したと推定され、一度生成されたビテロジェニンは、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た。Test D では、第 6 週に 20ng/mL-E2 を超えるエストロゲン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ジェニン生成がみられた。

雄メダカのビテロジェニン生成に関与するエストロゲン類の濃度として、われわれ水質チ

ームは、17β-エストラジオールの最小作用濃度は 12.6 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）、最大無作用濃度は 5.0 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）と報告した。このことから、10ng/L を超える 17β-エストラジオールに曝露されると、2 日後にはビテロジェニンを生成している可能性があり、これは、今回下水処理場での試験で得られた Test C および D の結果と整合するものと考えられる。

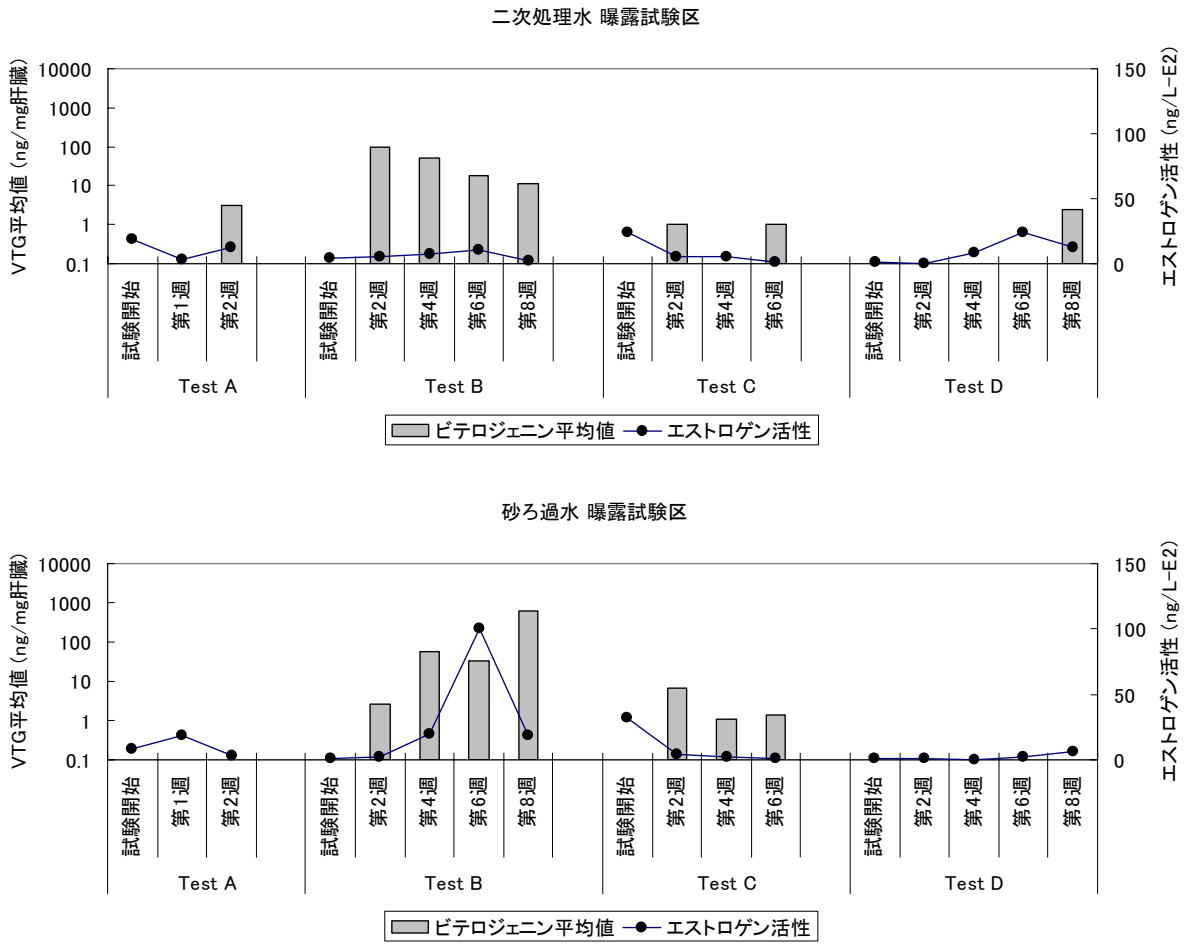


図 1　下水処理場におけるメダカ曝露試験結果（Test A～D）
（上：二次処理水曝露試験区、下：砂ろ過水曝露試験区）

雄メダカのビテロジェニン生成に必要な時間

本研究では、試験水のエストロゲン作用を 2 週間ごとに追跡することとした。しかし、過年度の Test B での二次処理水試験区でみられたように、雄メダカが高濃度のビテロジェニンを生成しているにも関わらず、水質の影響要因は把握できないことがある。

われわれは、14 日間曝露における 17β-エストラジオールの最小作用濃度は 5.0ng/L と報告した。このことから、試験水のエストロゲン作用とメダカの反応との関係は、エストロゲン濃度が高いほど短時間に影響が出現することや、たとえ低濃度でも長時間曝されることによって影響が表れてくることは明らかである。

Test B の二次処理水試験区での試験開始時および 2 週間後のエストロゲン類の濃度は、雄メダカに高濃度ビテロジェニンを生成させるような要因はみあたらない。この現象を生じさ

せた要因として、エストロゲン類の濃度が短時間に上昇・下降したものと考えられる。このため、水質の影響要因を追跡するためには、より短時間での水質変動を把握する必要があると考えられる。

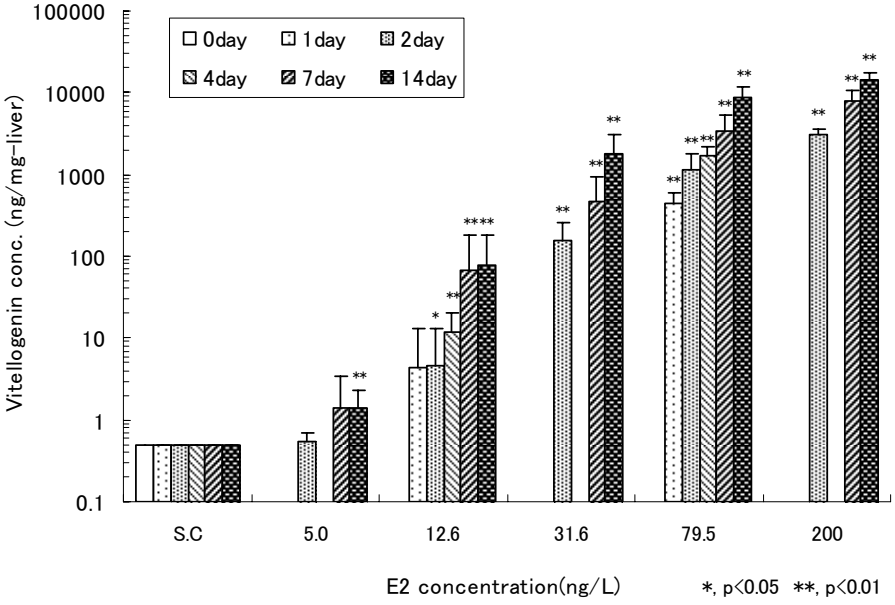


図 2　E2 曝露における雄メダカのビテロジェニン生成

6　まとめ

本研究において、次のとおり成果を得た。

(1) 下水処理水のエストロゲン作用は、その大部分をエストロンが占めると考えられる。

(2) 下水処理場から排出される水のエストロゲン活性が 10ng/L-E2 を超えるレベルになると、雄メダカのビテロジェニンが生成される可能性がある。

下水処理場での二次処理水試験区および砂ろ過水試験区での雄メダカの比較試験を実施してきた。これらの試験区を設定した理由は、予備試験において砂ろ過水試験区では雄メダカのビテロジェニン生成がみられなかったため、この試験区を対照試験区と位置づけることが可能であり、二次処理水試験区（塩素消毒前）において得られる結果を用いて処理過程による影響の低減効果を比較検討することが可能になると期待したものであった。しかしながら、両試験区のエストロゲン作用は同レベルの時期があることや、さらには逆転現象のあることも判明した。これらは、処理水を排水するという点で、検討すべき課題でもあると考えられる。

効率的な下水道整備に関する研究

（２）下水道管渠の補修方法選定のための作用土圧の評価に関する調査

独立行政法人土木研究所材料地盤研究グループ（土質）　上席研究員　小橋　秀俊
主任研究員　桑野　玲子
交流研究員　堀井　俊孝

１．はじめに

下水道整備の拡大とともに既存施設が増大するにつれて、耐用年数を超過した管渠も増え始めており、今後老朽化は急速に進むと予測される。しかし、補修工法を選定する重要な要素となる、補修時における既設管渠に作用する外力等の状態は不明な点が多く、管渠に予想以上の作用土圧が発生し構造上の問題が生じる可能性や、場合によっては管渠に想定以下の土圧しか作用せず、補修が過剰となる場合もある。そこで、合理的な下水道管渠の維持、補修を進めるにあたっては、管渠に作用する土圧の経年変化や管渠周辺地盤の乱れやゆるみの状態を明らかにし、的確な土圧評価をする必要がある。本研究は、下水管渠に作用する土圧の経年変化を調べるとともに、その作用土圧に乱れやゆるみを発生させるような外部撹乱要因について調査し、管渠更新時を念頭においた合理的管渠埋設方法の提案をめざすものである。

２．研究のアウトライン

本研究に先駆けて実施した“下水道管渠の補修工法選定のための作用土圧の評価に関する調査（平成１３～１５年度）”で、管渠に作用する土圧変化には管渠及び周辺地盤の変形が重要な影響要因である事がわかった。管渠埋設材料に固結性をもたない通常の土質材料を用いた場合、十分に締固めを行い良好な施工状態でかつ管渠の健全性が保たれていれば、時間経過に伴う周辺地盤の変形は顕著でなく土圧も変化しないと考えられるが、管に劣化や破損が生じると破損部からの土砂流出により周辺地盤に乱れやゆるみが発生しやすい。一方、改良土など自硬性のある材料で埋戻すと、埋設後の時間経過により周辺地盤は安定し、管の変形も抑制される傾向にある。現地の発生土や砂質土等の埋め戻し材料を管渠埋設に使用している場合は、補修工法選定において、周辺地盤に変形を及ぼさない（ゆるませない）方法の選択が有効であると共に、今後は“ゆるみにくい”適切な埋戻し材料の選定が効果的であることがわかった。

本研究では、埋設管渠の作用土圧の長期挙動を調査すると共に、作用土圧の攪乱要因を調べることにより“ゆるみにくい”埋設条件を明らかにし、管渠の合理的維持・補修に資することを目的とする。昨年度は、まず下水管渠の状況が周辺地盤に与える影響の実態を把握するため、道路陥没と下水管渠状況の関連の実態調査を行った。管渠のわずかな破損や継ぎ目ズレからの土砂流出により地盤内空洞・ゆるみが形成され道路陥没を引き起こす可能性がある事、またそのような現象には降雨が強く関連する事がわかった。また、移動床土槽を用いた矩形埋設構造物模型の土圧測定実験を行い、周辺地盤の沈下に伴う埋設構造物作用土圧の変化を検討した。土砂流出による空洞・ゆるみで埋設地盤が損傷した場合、周辺地盤の密度低下が起こらなくても沈下などの変形を受けた場合は、それぞれ性格は異にするが、長期の埋設環境において作用土圧に攪乱を与える重要な要因となりうる。本年度は、実態調査をふまえた各種地盤材料の土砂流出実験、管模型を使用した移動床土槽による土圧測定実験を実施し、これらの作用土圧の主たる“攪乱要因”について実験的検討・考察を進めた。

３．更新に配慮した埋設手法に関する検討　－地盤材料の土砂流出特性－

３．１　調査概要

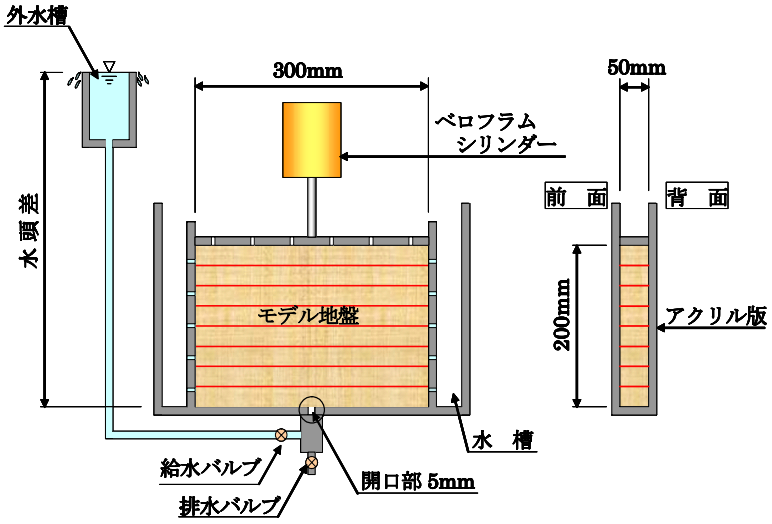
下水管の破損等に起因する道路陥没は、春から秋の多雨の季節に、降雨後に起こることが多く、降雨と深く関連していると思われる。そこで、降雨による地下水位上昇、あるいは集中豪雨時に下水管渠内の雨水が破損部等から周辺に溢れ出す現象を想定し、小型土槽を用いた土砂流出実験を実施した。

薄型の小型土槽底版の開口部から水の給排水を繰り返すことにより、上記の現象をシミュレーションした。砂、細粒分まじり砂、細粒土、レキ混じり砂を用い、空洞形成における地盤材料の影響を考察した他、画像解析と実験時の流出排土量測定から、ゆるみの定量評価を試みた。

３．２　実験装置

図－１に実験装置概要図を示す。

前面及び背面からの観察が可能なアクリル製の小型土槽の底面に管渠破損部を模擬した幅 5mm のスリット状の開口部を設け、排水・排土することによってモデル地盤内に空洞・ゆるみを発生させた。地盤の変形が奥行き方向になるべく一様となるように薄い形状とした。モデル地盤への水の給水時は、外水槽と実験土槽の水頭差により流入水圧を管理した。また、外水槽には目盛りを付け、給水量を管理した。モデル地盤上にはベロフラムシリンダーにより土被り 80cm 相当の上載荷重を載荷した。

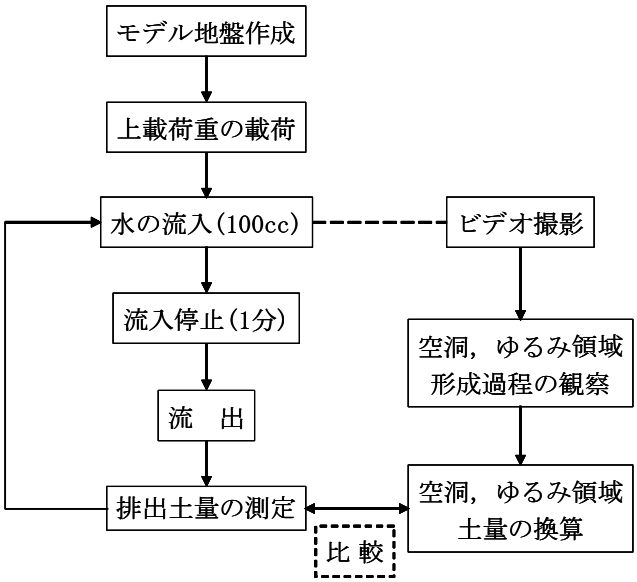


図－１　実験装置概要図

３．３　実験方法

３．３．１　実験手順

図－２に実験フローを示す。地盤高 20cm のモデル地盤は、１層 2.5cm で８層とし、所定の相対密度（Dr=80%）となるように１層毎に計量して突固めにより作成した。ビデオ撮影画像によるゆるみ領域算定のため、色砂を 2.5cm ピッチで薄く敷設した。モデル地盤作成時、開口部には砂糖を詰め、開口部からの土砂流出を防止した。この砂糖は、初回の水流入時に速やかに溶け、その後の土砂排出には障害とならない。また、地盤作成後、下



図－２　実験フロー

水道管渠の土被り圧を想定し、ベロフラムシリンダーにより土被り厚 80cm 相当の上載荷重を載荷した。

実験では、100cc の水を 10kPa（水頭差Δh=100cm）の流入水圧で開口部から給水した。予定量の水が流入したところで給水バルブを閉じ、一定の停止時間（1 分間）を設けた後、排水バルブを開けて排水・排土した。これらの一連の動作を 1 サイクルとし、給排水サイクルの繰返しに伴う空洞・ゆるみの進展を土槽前面からのビデオ撮影により記録した。また、1 サイクルごとの排土量を測定した。ただし、モデル地盤内の空洞が大きく成長すると、給水量が 100cc では空洞内が水で満たされず、ゆるみや空洞がそれ以上進展しなくなる。よって、空洞が大きくなった場合は、空洞内が水で満たされる程度の給水量を確保することとした。なお、水の給水時に地盤上面より水が溢れだす場合は吸水ポンプにより汲み出した。給排水サイクルは地盤上面まで空洞が拡がったのを目視により確認した時点で終了とした。

３．３．２　実験条件と地盤材料

本実験の実験条件を表－１に示す。

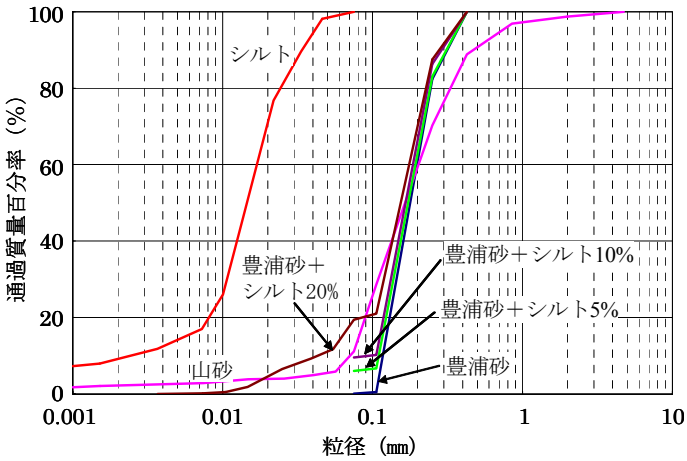
表－１　実験条件

No.	地盤材料	密度	開口幅	上載荷重	流入水圧（kPa）	給排水サイクル
1	豊浦砂	相対密度 ８０％*1)	５mm	土被り厚 80cm 相当	10	空洞・ゆるみがモデル地盤表面に到達するまで繰り返す。*2)
2	山砂				10	
3	シルト				10～20	
4	豊浦砂＋シルト５％				10	
5	豊浦砂＋シルト１０％				10	
6	豊浦砂＋シルト２０％				10	

*1) シルト地盤では相対密度 80%では水が流入した直後に地盤が収縮し地盤内にクラックが発生したため、相対密度を高く設定し（114%）クラックの発生を抑制した。

*2) 山砂地盤では 15 サイクル目に色砂部分が浸食され水みちが出来たため、この時点で実験終了とした。また、シルト地盤では、水の給水，停止，流出を 20 サイクル繰り返した時点でゆるみや空洞に大きな進展が見られなかったため実験終了とした。

本実験では６種類の異なる地盤材料を使用し、空洞形成における地盤材料の影響を調べた。各地盤材料の物理特性を表－２に、粒度を図－３に示す。山砂の最大粒径は 2mm とし、シルトについては、石材を加工する際に発生する石材粉を 75 μm ふるいでふるい分けしたものを使用した。



図－３　地盤材料の粒度

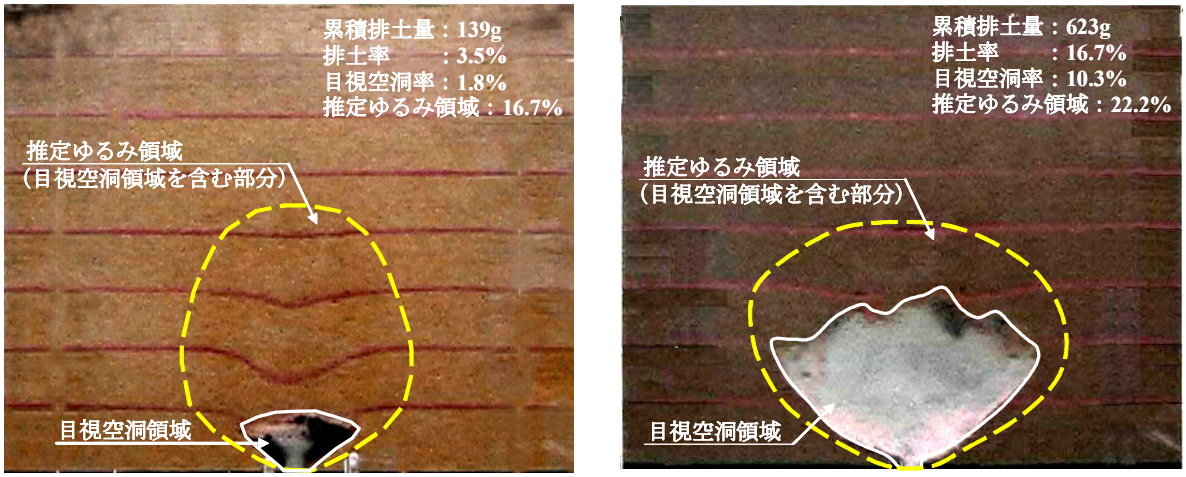
表－２　地盤材料及びモデル地盤の物理特性

地盤材料	最大密度 ρd_{max} (g/cm³)	最小密度 ρd_{min} (g/cm³)	モデル地盤　（相対密度 80%に調整）		
			乾燥密度 ρ_d (g/cm³)	初期含水比 w (%)	透水係数 k (cm/s)
豊浦砂	１．６５	１．３２	１．５７	１４．０	９．６×10⁻³
山砂	１．５６	１．１８	１．４６	１７．５	５．０×10⁻⁴
シルト*	１．４４	０．９３	１．５５	２１．４	―
豊浦砂＋シルト５％	１．７２	１．３７	１．６４	１３．８	１．３×10⁻³
豊浦砂＋シルト１０％	１．７９	１．４１	１．７０	１３．１	９．２×10⁻⁴
豊浦砂＋シルト２０％	１．９０	１．４９	１．８０	１３．０	１．５×10⁻⁴

*　シルト地盤の乾燥密度、初期含水比、透水係数は、相対密度 114%に調整した時の値

３．４　空洞・ゆるみの形成、及び進展過程とゆるみの定量評価

流入時（開口部からモデル地盤へ水を給水している時）、停止時（給水を停止し開口部を閉じて 1 分間静置している時）、流出時（開口部を開放し排水・排土させる時）のそれぞれの段階を観察した。空洞内部及び周辺が水で満たされると、空洞内部へ周辺の土が落下・崩壊し、ゆるみが進展する。その度合は停止時が最も著しかった。



a）豊浦砂（3 サイクル）　　b）山　砂（13 サイクル）

図－４　空洞およびゆるみ発生状況

図－４に、開口部からモデル地盤への水の流入・流出の繰り返しの結果形成された空洞と周辺地盤のゆるみの典型的パターンを示す。白の実線で囲んだのは目視で確認できる空洞範囲（目視空洞領域）、破線で囲まれているのは色砂の変位から推定した推定全ゆるみ領域（目視空洞部を含む）である。また、推定全ゆるみ領域から目視空洞領域を差し引いた範囲を推定ゆるみ領域と定義する。

ここで、累積排土量とは、当該サイクルまでに排出された土の乾燥重量、排土率とは、モデル地盤全体（ただし、対象領域は幅 25cm、高さ 20cm とする）に対する排出土量の割合を示す。同様に、目視空洞領域及び推定全ゆるみ領域に対しても対象領域に対する割合を示す。各地盤材料の空洞・ゆるみ領域の範囲や、ゆるみの度合を定量的に把握するために設定した指標を表－３に示す。

表－３　空洞・ゆるみの定量評価のための指標

指標	定義	図－４に示す具体例における各指標の値（参考）	
		ａ）豊浦砂 ３サイクル	ｂ）山砂 13サイクル
排土率	対象領域*地盤全体の乾燥重量に対する累積排出土の乾燥重量の割合	３．５％	１６．７％
目視空洞領域（率）	対象領域に対する、空洞領域の割合	１．８％	１０．３％
推定全ゆるみ領域（率）	対象領域に対する、目視から推定したゆるみ領域の範囲（空洞部を含む）の割合	１６．７％	２２．２％
推定ゆるみ領域（率）	対象領域に対する、目視から推定したゆるみ領域の範囲（空洞部を含まない）の割合 【推定全ゆるみ領域－目視空洞領域】	１４．９％	１１．９％
空洞に対するゆるみ領域の割合	空洞領域に対する、ゆるみ領域の拡がり度合 【推定ゆるみ領域／目視空洞領域】 主に空洞上方へのゆるみの到達度合を示す	８．３	１．２
ゆるみ程度	推定ゆるみ領域の地盤部のゆるみ度合 【(排土率－目視空洞率）／推定ゆるみ領域】	１１％	５４％

*　対象領域は、モデル地盤のうち開口部を中心として幅 25cm、高さ 20cm

３．５　まとめ

降雨に伴う下水道破損部周辺の水位上昇、及び管内から地盤へ水が溢れる現象を想定し、平面ひずみ土槽を用いた給排水繰返しに伴う土砂流出実験を行った。空洞・ゆるみの形成過程を詳細に観察した他、ゆるみの定量評価を試み、土砂流出に関する地盤材料の影響を考察した。本検討で得られた主な知見は以下の通りである。

- 開口部からの給排水の繰返しに伴い、開口部から土砂が流出し空洞・ゆるみが進展する。特に、開口部や空洞周辺が飽和している時に土砂流出が起こりやすい。
- 空洞、及びゆるみ範囲（地盤変位が目視により確認できる範囲）の大きさ、及び排土量の測定から、ゆるみ領域の地盤のゆるみの程度（密度の減少量）の評価が可能である。
- 地盤材料によって、ゆるみや空洞の進展速度、およびゆるみ領域の形状やゆるみ程度が異なる。細粒分が少なく粒度の悪い砂では、土砂流出及びゆるみは急速に進展し全体崩壊に至る。また、ゆるみ領域内のゆるみ程度（密度減少）は 15～20%程度であるが、ゆるみ領域は空洞の上部に大きく広がる。軽微なゆるみが鉛直方向に急速に進展して地盤崩壊に至りやすい。また、ゆるみ程度が小さいため、地中レーダー等で地盤のゆるみ調査を行った場合、ゆるみが発見されにくい可能性がある。細粒分を含み粒度のよい地盤材料では、土砂流出及びゆるみ進展速度は比較的遅く、空洞周辺のゆるみ領域は比較的小さいが、ゆるみ程度は 50%程度で、ゆるみ領域内では初期地盤の半分程度しか土が残留していない。
- 給排水サイクルの初期段階から最終段階に至るまで、ゆるみ領域の空洞領域に対する大きさの割合、及びゆるみ程度はほぼ一定である。すなわち、空洞の大きさにかかわらず、周辺のゆるみ程度はほぼ一定で推移する。

４．下水道管渠の作用土圧の評価　－移動床土槽による埋設構造物模型の土圧測定実験－

埋設管の変形に伴う地盤との相互作用による土圧変化とその時間依存性について、平成１３～１５年度に土槽中央部の底版を降下させる移動床実験で検討したところ、埋設後一旦安定した作用土圧は、その後の埋設管周辺地盤に相対変位（乱れ）が生じると変化する可能性があるが、乱れが生じない程度の上載荷重の変化であれば大きな影響を与えないことがわかった。これは、埋設管頂部の変形(陥没)または溝型の埋設形式を模擬しているといえる。

平成１６年度には、移動床土槽中央部に矩形の埋設構造物模型を設置し左右の底版を降下させることにより周辺地盤の沈下、あるいは突出型の埋設形式を模擬し、作用土圧及びその時間経過による変化特性を調べた。今年度は、実験装置や実験方法は昨年度と同様とし、さらに埋設構造物模型に管形模型を用いて土圧測定実験を実施したところ、以下のような知見が得られた。

- 周辺地盤の沈下によって土圧の作用形態が突出型になると、わずかな沈下で埋設構造物に作用する土圧は増大する。
- 一旦発生した土圧増分は、その後の時間経過や上載などによって解消することなく逐次累積する。
- 裏込材によって土圧増分特性は異なる。裏込材自体が良好に施工されていても、埋設構造物の基礎部以深が沈下すると、かえって大きな土圧増分が発生する可能性がある。
- 上記のような土圧の変化割合は、矩形模型よりも管模型の方が大きい。

５．まとめ

長期間にわたる埋設環境において“ゆるみにくい”地盤の埋設条件を明らかにすることを目的として、地盤または土圧に乱れを生じさせる２つの代表的な状態について実験的に検討した。管渠の破損部から周辺土砂が管内に流出する様子を模型実験により再現し、種々の地盤材料の土砂流出特性について調べた。また、移動床土槽による埋設構造物模型の土圧測定実験を行い、周辺地盤の変形に伴う作用土圧の変化について調べた。それぞれの検討から得られた主要な知見は以下の通りである。

- 空洞やゆるみの進展は、地盤が飽和している状態で急速に進展する
- 地盤材料によって、ゆるみや空洞の進展速度、形状、ゆるみの程度などが異なる。細粒分の少ない砂では、１０～１５％程度の密度低下が生じたゆるみ領域が空洞上部に大きく広がり崩壊に至りやすい。細粒分を含み粒度のよい地盤材料では、土砂流出および空洞・ゆるみの進展速度は比較的遅い。
- 周辺地盤のわずかな不同沈下により埋設構造物に作用する土圧は増大する。一旦発生した土圧増分はその後も残留し累積する。このような土圧増分は管頂部で著しい。
- 地盤材料によって不同沈下に伴う土圧増分特性は異なる。

危機管理を考慮した効率的な下水道整備に関する研究

（1）下水道施設の変形量を考慮した液状化対策工の設計法に関する調査

(独)土木研究所　耐震研究グループ(振動)　上席研究員　杉田　秀樹
主任研究員　佐々木哲也
研　究　員　石原　雅規

１．はじめに

2003 年十勝沖地震や 2004 年新潟県中越地震では、埋戻し土の液状化による下水道管路やマンホールの浮上がり、路面沈下等の被害が多発した。下水道管路施設が上記のような被害を受けた場合、下水道の使用が不可能になるほか、道路交通機能にも支障をきたし、汚水の漏洩による水質の悪化等の２次的な被害が生じる恐れがある。また、下水処理施設においては、過去の地震において下水処理施設周辺地盤の液状化に伴う沈下により、下水処理施設本体と取り付け管路等との不同沈下による管のズレ、継ぎ手の破損による被害が生じている。最近の地震による下水道施設の被害をふまえ、下水道施設の「地震対策の現状と既存施設の地震対策への提言」[1)]がまとめられる等、下水道施設の耐震性の向上が求められてきており、これを踏まえて、「下水道施設の耐震対策指針と解説」[2)]、「下水道地震対策マニュアル」[3)]の改訂作業が進められているところである。

管路施設の被害の主な要因は周辺地盤および埋戻し部の液状化であり、その発生には周辺地盤の条件が強く影響していると考えられているが、必ずしも合理的な説明がなされていない。この関係を明確にすることによって、対策区間の合理的な選定が可能となるものと考えられる。そこで 17 年度は、管路施設の被害原因に関して、過去の下水道被害事例をもとに、下水道管路施設の被害の有無と周辺地盤条件について検討するとともに、微地形分類および地盤条件に基づく液状化被害の可能性の判断基準について検討した。また、処理場施設と取り付け管路の不同沈下に関しては、埋戻し部の液状化に伴う沈下量の予測手法について検討を行った。

２．管路施設の被害原因に関する検討

２．１　微地形区分に基づく下水道管路の液状化被害の可能性の判断基準に関する検討

下水道管路施設の液状化被害の可能性を評価するための１次スクリーニングとして、微地形区分に基づく下水道管路施設の液状化被害の可能性の簡易判定基準について検討した。

（1）検討手法

過去の地震における被害路線を土地条件図あるいは治水地形分類図上にプロットし、周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害か生じやすい微地形区分をまとめ、微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準を検討した。

検討対象として、文献 4)～10)を参考に過去の地震において液状化により被害を受けた地域のうち、土地条件図あるいは治水地形分類図が整備されている地域を対象とした。検討対象を**表１**に示す。これらの地震における被害は、主に周辺地盤および埋戻し土の液状化による浮上がりである。

（2）検討結果

図１～３に過去地震における被害路線を土地条件図あるいは治水地形分類図上にプロットしたものの例を示す。

表１　微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準の検討対象

対象地震	対象区域
1965 年新潟地震	新潟市
1983 年日本海中部地震	能代市
1993 年釧路沖地震、1994 年北海道東方沖地震、2003 年十勝沖地震	釧路市
2004 年新潟県中越地震	長岡市、小千谷市

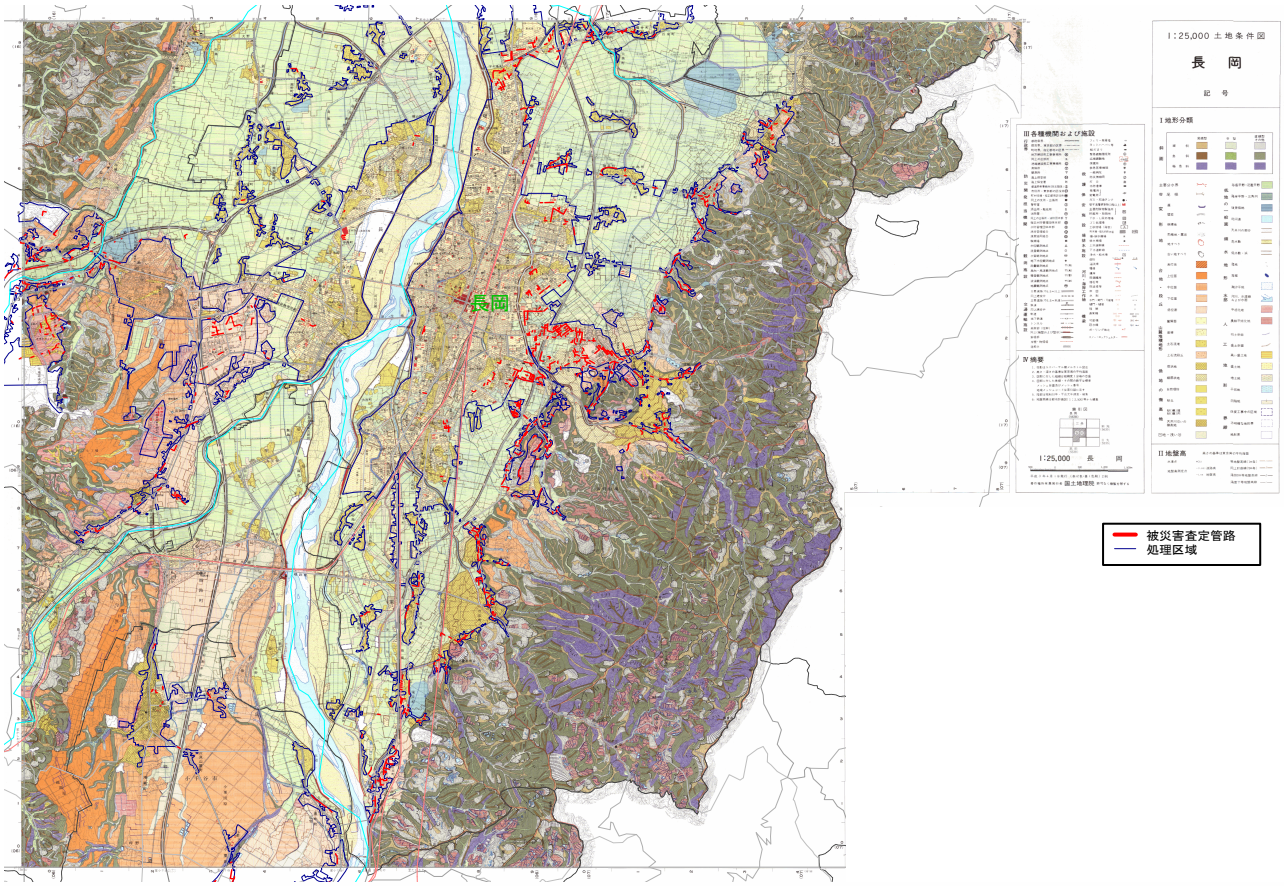


図１　新潟県中越地震（長岡）による被害路線[9)]

これらと、地震被害調査に関する文献など[4)~9)]から、過去の地震における被害･無被害管路の主なの微地形分類と被害形態をまとめると**表２**のようになる。

表２の結果と、文献 10),11)により提案されている「微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準」における液状化の可能性の高い微地形区分と比較すると、液状化の可能性の高い微地形区分においては下水道管路の周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害が多いといえるが、それに加えて緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等においても多数の被害が生じていることが分かる。これらの地形においては、周辺地盤の液状化の可能性は高くはないが、埋戻し土の液状化の可能性が高い微地形区分であるといえる。

これらの結果から、文献 10),11)による「微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準」に加えて、緩勾

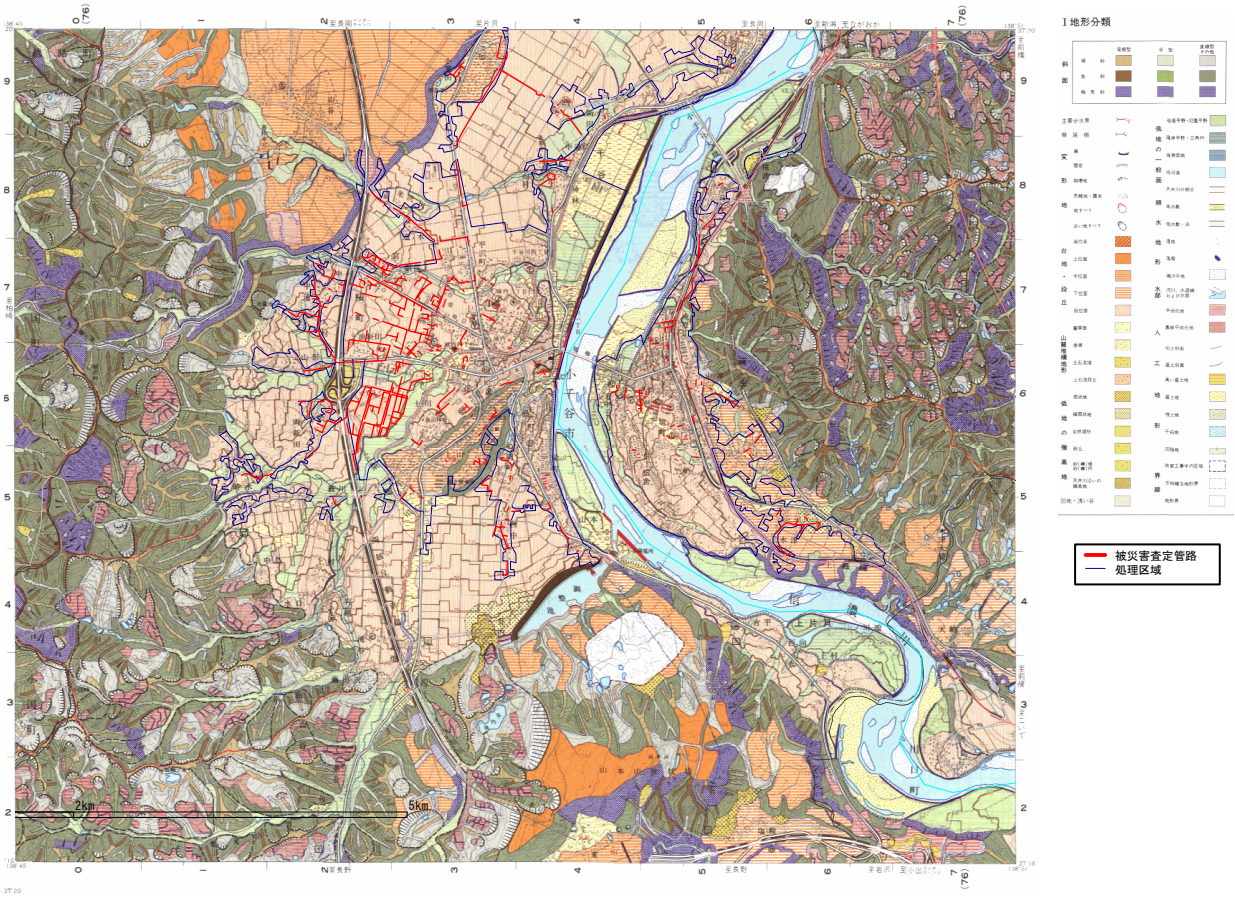


図２　新潟県中越地震（小千谷）による被害路線 [9)]

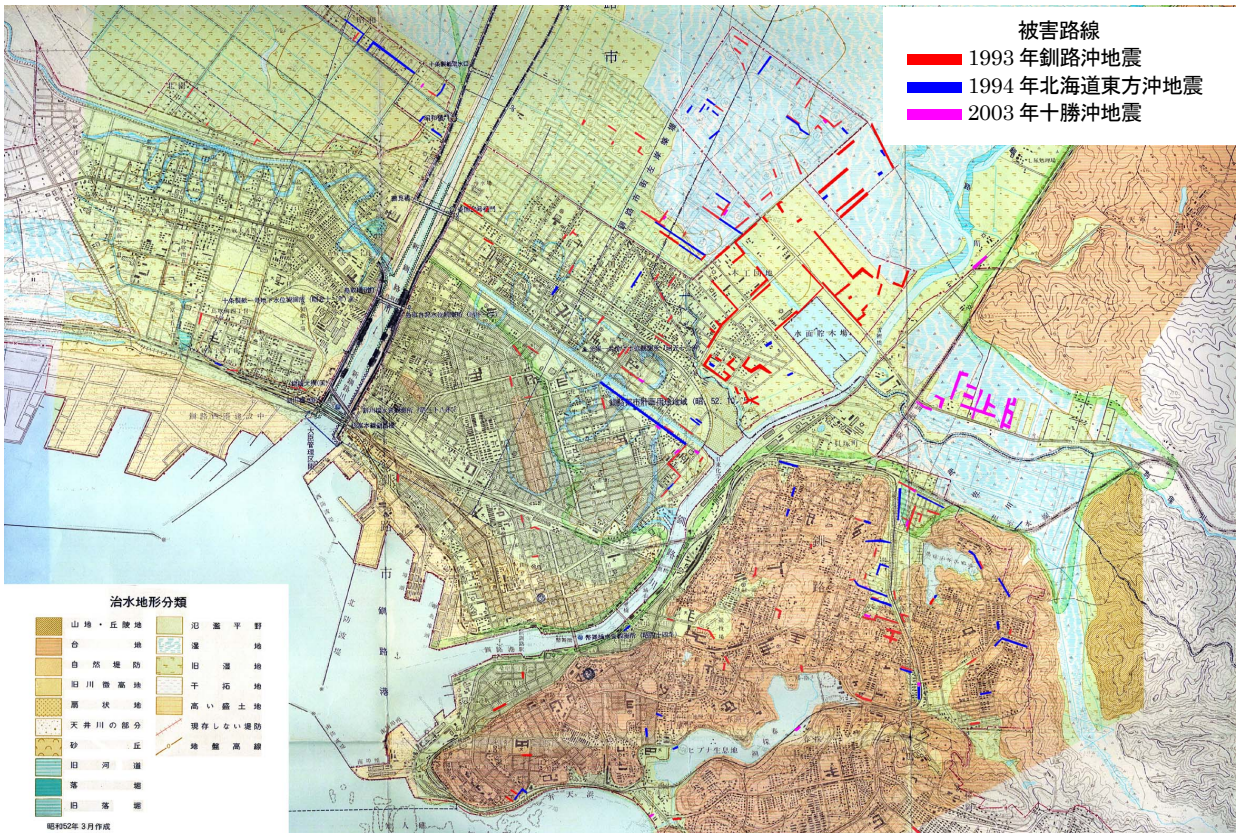


図３　釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震（釧路市）における被害路線

配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等の地形区分における被害の可能性の判定基準に修正を加えることで、周辺地盤および埋め戻し土の液状化による管路被害の可能性の判定が可能になると考えられる。なお、液状化の可能性の高い微地形区分においては、液状化の可能性の高い緩い砂質土地盤に加えて、液状化の可能性の低い粘性土地盤も含まれていると考えられるため、これらの微地形においては周辺地盤の液状化および埋戻し土の液状化の双方の可能性が高い地形である考えられる。以上より、微地形区分に基づく周辺地盤および埋戻し土の液状化の可能性の判定基準をまとめると**表３**のようになる。

この表により、下水道管路施設の周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性を概略推定することが可能となる。

表２　過去の地震による被害･無被害管路の主な微地形分類と被害形態

地　震	箇所	被害管路の微地形	被害形態	無被害管路の主な微地形
新潟地震	新潟市	旧河道、旧湿地、砂丘末端緩斜面、埋立地、砂丘間低地	管渠の折損、屈曲、沈下、浮上り、破断。	砂丘、自然堤防、氾濫平野、盛土地
日本海中部地震	秋田市	埋立地	マンホールの突出、路面の陥没。	
	能代市	砂丘間低地、砂丘末端緩斜面、氾濫平野	管渠の沈下、蛇行。マンホールの突出、破損。	砂丘
釧路沖地震	釧路町	旧湿地、旧河道	管渠の浮上がり、折損、蛇行。マンホールの突出。	
	釧路市	旧湿地、旧河道、砂丘末端緩斜面、盛土造成地	管渠の浮上がり、蛇行。マンホール突出、管渠の破損。	砂丘
北海道東方沖	釧路町	旧湿地、旧河道	管渠の浮上がり、折損、蛇行。マンホールの突出。	
	釧路市	旧湿地、旧河道、砂丘末端緩斜面、盛土造成地	管渠の浮上がり、蛇行。マンホール突出、管渠の破損。	砂丘
	標津町	旧湿地、後背湿地	管渠の浮上がり、マンホール突出	砂丘
兵庫県南部	神戸市	埋立地	管渠のクラック、継ぎ手の離脱、不等沈下、管渠の閉塞。マンホール側塊のずれ、突出。	扇状地
鳥取県西部	境港市、米子市	埋立地、旧河道、旧湖沼	マンホールの突出。管渠の破断。路面の陥没。	砂丘
十勝沖地震	釧路町	旧湿地、旧河道	管渠の浮上がり、折損、蛇行。マンホールの突出。	
	釧路市	旧湿地、旧河道、盛土造成地	管渠の浮上がり、蛇行。マンホール突出、管渠の破損。	砂丘
	鵡川町	旧湿地	路面沈下	氾濫平野
新潟県中越地震	長岡市	自然堤防周辺部、氾濫平野、緩扇状地、盛土造成地	マンホール突出、管路浮上がり、路面沈下、管渠の破損	自然堤防、扇状地、台地
	小千谷市	段丘低位面、緩扇状地	マンホール突出、管路浮上がり、路面沈下	台地

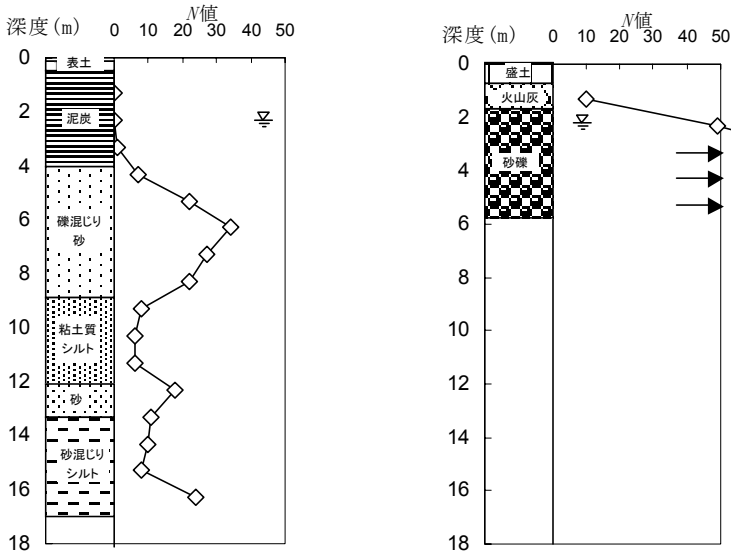
２．２　地盤条件に基づく埋戻し土の液状化の可能性の判定基準の検討

過去に下水道管路施設の被害が生じた地震のうち、比較的地盤柱状図、管路情報が整備されているものを対象として、管路浮上がり量と、地下水位、周辺地盤 N 値、周辺地盤土質等との関係を検討し、周辺地盤条件から埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準を提案する。

図４，５に、十勝沖地震、新潟県中越地震における埋戻し土の液状化による被害路線および無被害路線近傍の地盤柱状図をそれぞれ示す。十勝沖地震の豊頃町の例では、被害箇所の周辺地盤には N 値 0～1 程度の非常に軟弱な泥炭層がみられるが、無被害箇所の周辺地盤は N 値 50 以上の締まった礫質土になっている。また、新潟県中越地震における長岡市、小千谷市の被害箇所の周辺地盤では、N 値 10 以下の粘性土～シルト層が 10m 程度堆積している一方で、無被害箇所の周辺地盤は礫～砂礫層であり、また N 値 50 以上の砂礫層が比較的浅い位置に存在していることが分かる。これらより、埋戻し土の液状化による被害には周辺地盤の条件が密接に関わっていることが推測される。これらを踏まえて、過去の地震による管渠の浮上がり量と、周辺地盤の土質、地下水位、周辺地盤 N 値、周辺地盤土質等との関係を検討した。

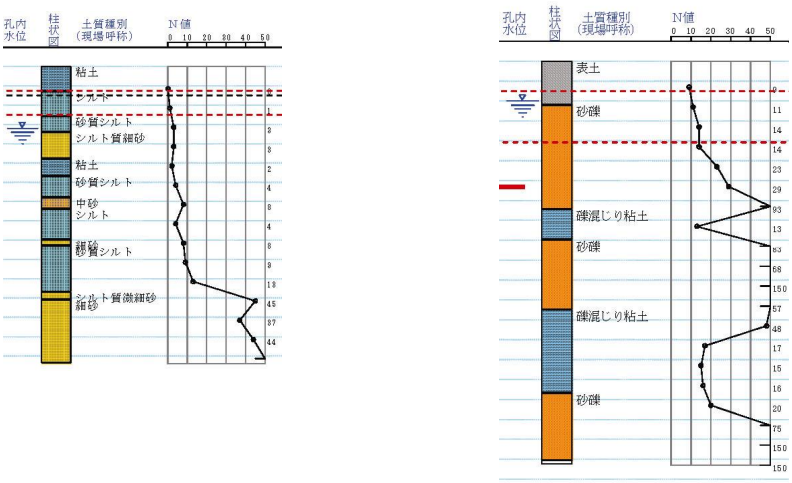
表３　微地形分類に基づく周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準

微地形		液状化被害の可能性	被害地震
区分	細区分		
谷底平野	扇状地型谷底平野	小	－
	デルタ型谷底平野	中	新潟県中越地震
扇状地	急勾配扇状地・沖積錘	小	－
	緩勾配扇状地*	中～大	新潟県中越地震
自然堤防	自然堤防	中	新潟県中越地震
	比高の小さい自然堤防 自然堤防周辺部	大	新潟地震、新潟県中越地震
ポイントバー（蛇行州）	－	大	－
後背湿地*	－	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、新潟県中越地震
旧河道	新しい（明瞭な）旧河道	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
	古い（不明瞭な）旧河道	中～大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
旧池沼	－	大	日本海中部地震、鳥取県西部地震
湿地*	－	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
河原	砂礫質の河原	小	－
	砂泥質の河原	大	－
デルタ（三角州）	－	中	－
砂州	砂州	中	－
	砂礫州	小	－
砂丘	砂丘	小	－
	砂丘末端緩斜面	大	新潟地震、日本海中部地震
海浜	海浜	小	－
	人工海浜	大	兵庫県南部地震、鳥取県西部地震
砂丘間低地・堤間低地	－	大	日本海中部地震
干拓地	－	中	日本海中部地震
埋立地	－	大	兵庫県南部地震、鳥取県西部地震
湧水地点（帯）	－	大	－
盛土地	砂丘と低地の境界付近の盛土地	大	新潟県中越地震
	崖・急斜面に隣接した盛土地	大	新潟県中越地震
	谷底平野上の盛土地	大	－
	低湿地上の盛土地	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震
	干拓地上の盛土地	大	日本海中部地震
	その他の盛土地	元の地形に準ずる	－
台地・段丘	上位面	小	－
	中位面	小	－
	下位面	小	－
	低位面*	中～大	新潟県中越地震



被害　　無被害

図４　十勝沖地震における代表的な被害・無被害箇所の地盤柱状図（豊頃町）



被害　　無被害

図５　新潟県中越地震における被害・無被害箇所周辺の地盤柱状図（長岡市）[9)]

表４　検討対象とした地震と地盤柱状図数

地震名	柱状図数
1993 年釧路沖地震	32
1994 年北海道東方沖地震	56
2000 年鳥取県西部地震	12
2001 年芸予地震	3
2003 年宮城県北部地震	27
2003 年十勝沖地震	84
2004 年新潟県中越地震	79

検討対象とした地震と地盤柱状図数を**表** 4 に示す。これらの地震による被害は埋戻し土の液状化によるものがほとんどである。

管路の浮上がり量と周辺地盤の地下水位から管渠埋設深さまでの平均 *N* 値、地下水位、管渠中心から地下水位までの距離、埋設深さ（土被り厚）の関係を**図６**に示す。また、浮上がり量の平均値とこれらの関係を**図７**示す。

これらの図より以下のことがいえる。

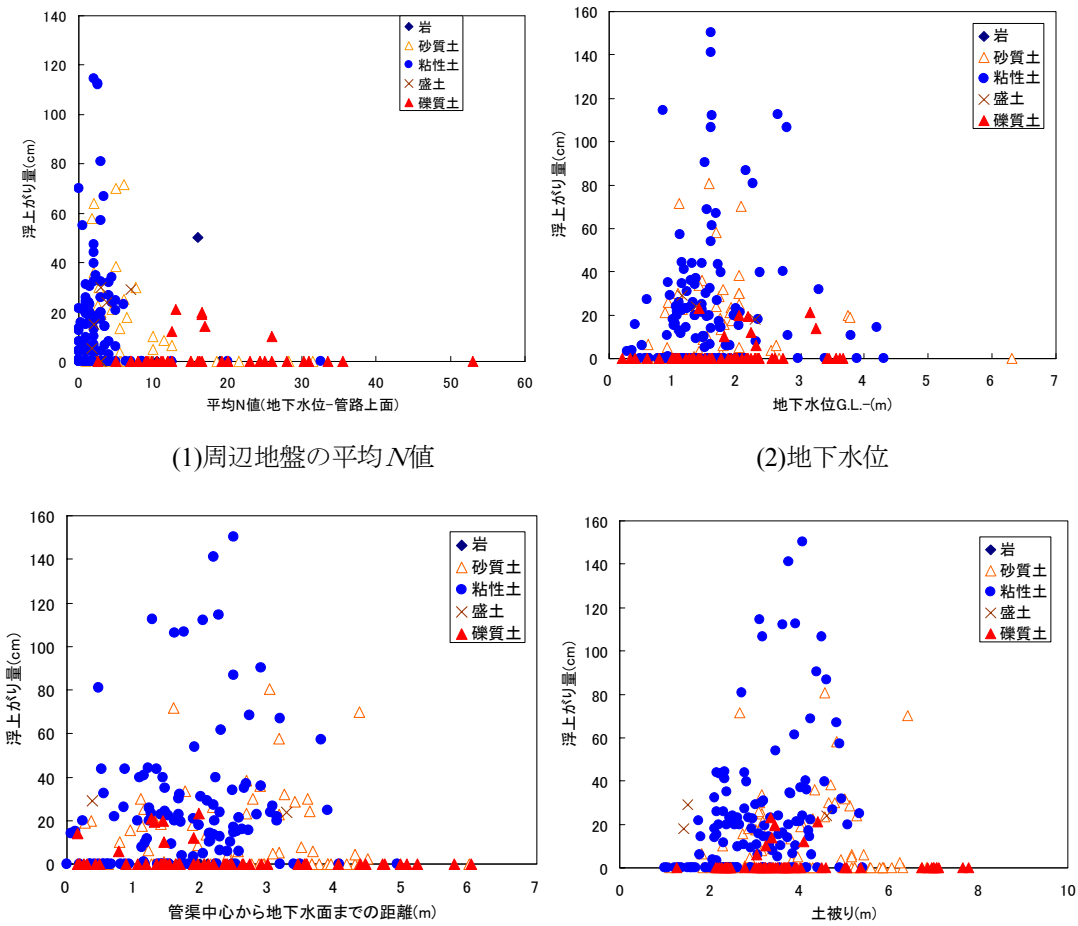
①周辺地盤が礫質土の場合には周辺地盤の*N*値、地下水位、土被り等の大きさに関わらず、ほとんど浮き上がり被害は生じていない。

②周辺地盤が粘性土地盤では周辺地盤の平均 *N* 値が 7 以下で浮き上がりが生じており、*N* 値 3 以下で浮上がり量が大きくなる傾向がある。また、砂質土地盤では平均 *N* 値が 15 以下で浮き上がりが生じており、*N* 値 10 以下で浮上がり量が大きくなる傾向がある。

③周辺地盤が粘性土、砂質土の場合、地下水位が G.L.-3m 以深では、浮上がり量が小さい傾向がある。

④周辺地盤が粘性土、砂質土の場合、土被りが 2m 以下では浮上がり量は小さく、土被り 2m 以上で浮き上がり量が大きくなる傾向がある。

⑤周辺地盤が粘性土、砂質土の場合、管渠中心から地下水位までの距離が長い、すなわち管渠上方の飽和した埋戻し土層厚が厚いほど、浮上がり量が大きくなる傾向がある。



(1)周辺地盤の平均*N*値　　(2)地下水位

(3)管渠中心から地下水位までの距離　　(4)土被り（管渠埋設深度）

図６　浮上がり量と各種地盤条件の関係

以上より、以下の全てに該当する場合に埋戻し土の液状化による被害の可能性が高いと考えられる。

1)地下水位が高い場合（G.L.-3m 以浅）

2)埋設深度が深い場合(管渠布設位置 G.L.-2m 以深かつ地下水位以下)

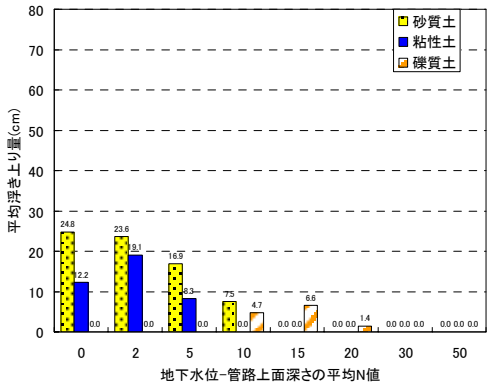
3)周辺地盤が軟弱な場合（緩い砂地盤（*N* 値 15 以下）、軟弱粘性土地盤（*N* 値 7 以下）等）

３．不同沈下予測手法の検討

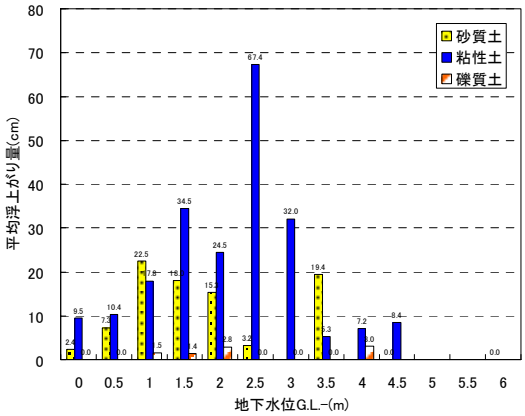
地震時に処理場施設周辺地盤が液状化すると、地盤沈下により杭基礎で支持されている処理場施設と取り付け管路に不同沈下が生じ、管路施設にズレ、クラック等被害が生じる。周辺地盤の液状化に伴う沈下量の予測手法については、「下水道耐震対策指針と解説」[2)]において液状化した層の沈下率は 5%とされているが、これらは埋立地における地震後の地盤沈下量と液状化層厚から求められたものである。しかし、処理場施設周辺は開削後に砂質土で埋め戻されていることが多く、このような場合の沈下量は 5%よりも大きいことが懸念される。そこで、過去の地震における埋戻し部の地表面沈下量と掘削深さの関係を整理し、液状化による埋戻し部の沈下率を検討した。

３．１　検討方法

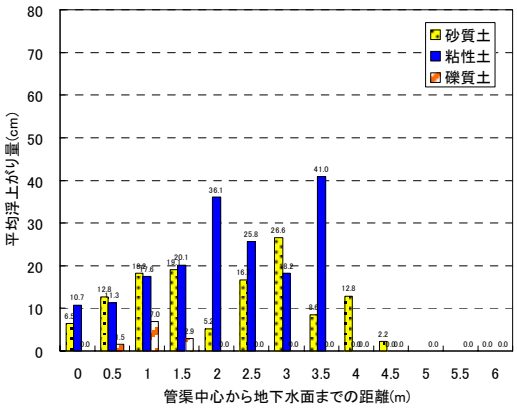
検討対象とした地震および地域は**表５**のとおりである。北海道庁、長岡市から提供頂いた地震後の路面沈



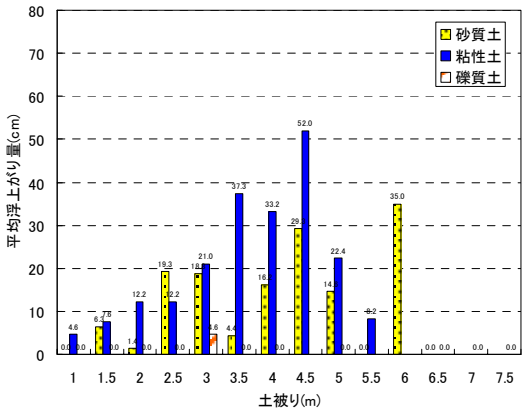
(1)周辺地盤の平均N値



(2)地下水位



(3)管渠中心から地下水位までの距離



(4)土被り（管渠埋設深度）

図７　平均浮上がり量と各種地盤条件の関係

表５　検討対象ととした地震と地域

対象地震	地域
2003 年十勝沖地震	釧路町、音別町、阿寒町
2004 年新潟県中越地震	長岡市

下量と掘削深さのデータから、埋戻し部の沈下率を整理した。

各自治体より提供頂いた路面沈下量（地震前後の地盤高）と掘削深の関係をプロットするとともに、沈下率(=路面沈下量/地下水以下の埋戻し土の層厚)を求めた。ただし、ここでは埋戻し部の液状化による沈下率を算定する目的から、路面沈下量が負のデータ（隆起）および液状化の発生が不明瞭と考えられる路面沈下量が 0 のデータは検討対象から除外した。また、本来埋戻し部の液状化は地下水以下で生じるため、沈下率の算定には地下水位に関する情報が必要である。しかし、いずれのデータにも地下水位に関する情報が無いため、沈下率の検討に当たっては、地下水位を-0.5m と仮定した地下水以下の埋戻し土の層厚を用いた。なお、地下水位を深く設定するほど、沈下率は大きく求まることになる。

３．２　検討結果

図８に路面沈下量と掘削深の関係を示す。ばらつきが多いが、阿寒町を除くと自治体毎の違いは明瞭ではない。

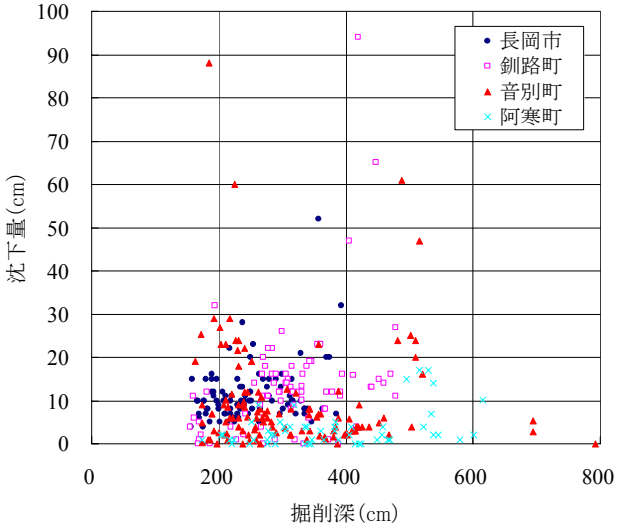


図８　事例に基づく掘削深と路面沈下量の関係

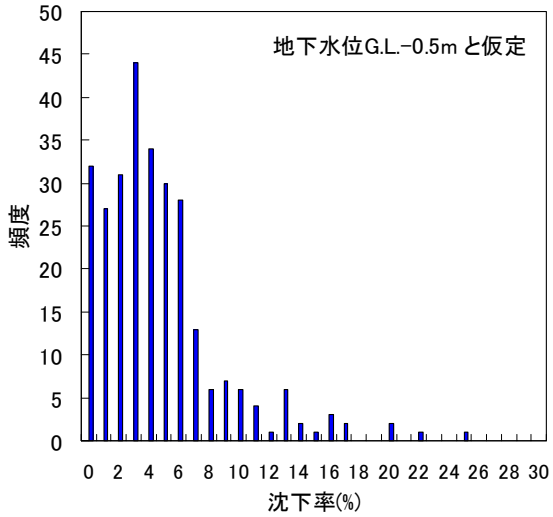


図９　沈下率の頻度分布

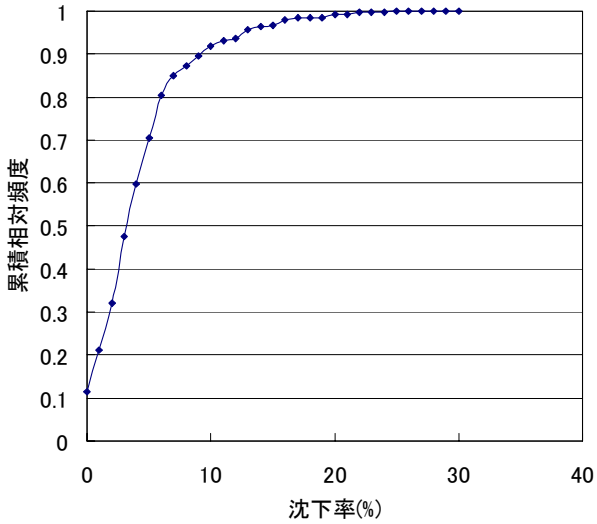


図１０　沈下率の累積相対頻度

これは、阿寒町は 2003 年十勝沖地震の震源から比較的遠いため、被害程度が小さかったことが推測される。したがって、以後の検討では対象から除外した。**図８**より、掘削深が大きくなるほど沈下量が大きくなる傾向がみられるが、データのばらつきが大きい。これは、地震動の大きさ、掘削深、地下水位、埋戻し材料、埋戻し程度が沈下量に大きく影響すると考えられるが、これらのデータが不明であることが影響していると考えられる。

図９，１０に、地下水位を-0.5m と仮定した場合の沈下率の頻度分布および累積相対頻度をそれぞれ示す。これより、液状化による埋戻し部の沈下率は現行指針の 5%より大きい場合が 3 割程度となり、1 割程度が沈下率 10%以上となっている。実際の地下水位が G.L.-0.5m より深かった場合には、さらに大きくなる可能性もある。したがって、埋戻し部の液状化による沈下率としては、現行指針の 5%よりも大きめに設定し、例えば 7～10%程度を目安にするのがよいと考えられる。

４．まとめ

管路施設の被害原因に関する検討および不同沈下予測手法の検討をおこなった。管路施設の被害原因に関する

検討では、過去の地震被害を分析することにより、微地形区分に基づく周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準、および地盤条件等に基づく埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準を検討した。また、不同沈下予測手法の検討では、過去の地震における埋戻し部の地表面沈下量と掘削深さの関係を整理し、液状化による埋戻し部の沈下率を検討した。検討結果をまとめると以下のとおりである。

①過去の地震により、文献 10),11)の「微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準」における液状化被害の可能性の高い微地形に加えて、緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等において、埋戻し土の液状化による管路の被害が生じている。

②文献 10),11)の「微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準」に加えて、緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等の地形区分における判定基準に修正を加えることで、周辺地盤および埋め戻し土の液状化による管路の被害の可能性の判定が可能になると考えられる。

③周辺地盤が礫質土の場合には周辺地盤の*N*値、地下水位、土被り等の大きさに関わらず、ほとんど浮き上がり被害は生じていない。一方で、粘性土地盤では周辺地盤の平均 *N* 値が 7 以下で浮き上がりが生じており、3 以下で浮上がり量が大きくなっている。また、砂質土地盤では平均 *N* 値が 15 以下で浮き上がりが生じており、10 以下で浮上がり量が大きくなっている。

④周辺地盤が粘性土、砂質土の場合、地下水位が G.L.-3m 以深、かつ土被り 2m 以上で浮き上がり量が大きくなる傾向がある。

⑤上記の結果を踏まえて、微地形区分による周辺地盤および埋戻し土の液状化による判定基準、および地盤条件等に基づく埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準を提案した。

⑥地下水位を G.L.-5m と仮定した場合の液状化による埋戻し部の沈下率は、現行指針の 5%より大きい場合が 3 割程度となり、1 割程度が沈下率 10%以上であった。

謝辞：検討に用いたデータは、国土交通省国土政策総合研究所、北海道庁、新潟県、長岡市、小千谷市をはじめとする関係市町等からご提供頂いたものである。ここに感謝の意を表す。

参考文献

1) 下水道地震対策技術検討委員会：新潟県中越地震の総括と地震対策の現状を踏まえた今後の下水道地震対策のあり方、2005.

2) (社)日本下水道協会：下水道施設の耐震対策指針と解説、1997.

3) (社)日本下水道協会：下水道の地震対策マニュアル、1997.

4) 建設省土木研究所：新潟地震調査報告、土木研究所所報第 125 号、1965.

5) 建設省土木研究所：昭和 58 年日本海中部地震による下水道管路施設の被害調査－（その 1）被害の特徴、土木研究所資料第 2244 号、1985.

6) 建設省土木研究所：釧路沖地震により浮上した下水道マンホールの調査、土木研究所資料第 3275 号、1994.

7) 建設省土木研究所：1993 年釧路沖地震･1994 年北海道東方沖地震及び 1994 年三陸はるか沖地震による下水道管路施設の被災調査、土木研究所資料第 3948 号、1998.

8) 建設省土木研究所：平成 7 年(1995 年)兵庫県南部地震災害調査報告書、土木研究所報告第 196 号、1996.

9) 国土交通省国土技術政策総合研究所、独立行政法人土木研究所：平成 16 年(2004 年)新潟県中越地震災害調査報告、国総研研究報告第 27 号、土木研究所報告第 203 号、2006.

10) 若松加寿江：詳細な微地形分類による地盤表層の液状化被害可能性の評価、日本建築学会大会学術講演会梗概集、B 分冊構造Ｉ、pp.1443-1444、1992.

11) 国土庁防災局震災対策課：液状化地域ゾーニングマニュアル（平成 10 年度版）、1999.

Ⅱ　その他の予算による研究
【リサイクルチーム】

病原微生物の同定方法および挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究期間：平 11～平 17
担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）
研究担当者：尾﨑正明、諏訪守、陶山明子

【要旨】
17 年度は、PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出において流入下水からのオーシストの回収率を向上させることを目的に、試料の前処理法を変更し、その回収率の評価を行った。その結果、流入下水からのオーシストの回収では、前処理として 100Ｇの粗遠心処理を行うことで回収率は向上するため、検出感度は従来法よりも若干高くなるものと考えられた。ウイルスに関しては低濃度試料に対応した安定した測定値を得るため、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにするとともに、検出感度を向上させるため濃縮試料中から抽出したウイルス遺伝子の逆転写効率の検討を行った。その結果、逆転写反応に関しては、添加するプライマー濃度を 10μM、鋳型となる遺伝子量を 0.5μg とすることで逆転写効率は向上し、検出感度が従来法よりも高くなった。

キーワード：クリプトスポリジウム、オーシストの回収率、ノロウイルス、リアルタイム PCR 法

１.はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水の病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生学的安全性を評価するためには、下水中の極低濃度の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

本課題では上記の要請を踏まえ、分子生物学的手法（特に PCR (Polymerase Chain Reaction) 法）により、下水中・環境水中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出できる手法を提案し、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を目的としている。本研究で研究対象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り、17 年度は以下の研究を行った。

1）流入下水からのオーシスト回収率を向上させるための試料の前処理法に関し検討を行った。
2）現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにし、測定値に関し信頼性を評価した。
3）低濃度試料に対応したウイルス測定法を確立するために、抽出遺伝子の逆転写効率の向上手法を評価した。

２．研究目的

２．１ 流入下水からのオーシスト回収率の向上実験

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%、精製水 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。

２．２　ウイルス

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。また、細胞培養法で検出ができないノロウイルスは、リアルタイム PCR 法により下水処理過程での消長を含めその実態を明らかにすることが求められている。

本研究の目的は、下水処理水や河川水などの環境水中に低濃度に存在するウイルスの測定法を確立するため、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するものである。

３．研究方法

３．１流入下水からのオーシスト回収率の向上実験

従来の測定法では、オーシストとともに濃縮された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。PCR法においては、凍結融解とDNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を組み合わせた方法により、オーシストDNAを抽出し、Roche社製のReal Time PCR装置(LightCycler)でオーシスト数の定量を行った。顕微鏡観察法においては、免疫磁気ビーズで分離精製したオーシストを染色キットを用いて蛍光染色を行い、顕鏡によりオーシスト数を定量した。

３．２　ウイルス

３．２．１　ウイルス遺伝子の抽出

流入下水500 ml、二次処理水1 L、高度処理水（砂ろ過水）2Lを試料水として用いた。試料水中のウイルスはポリエチレングリコール（PEG）沈殿法により濃縮した。すなわち試料水1Lに対してPEG#6000（終濃度8％）およびNaCl（終濃度0.4M）を添加して撹拌し完全に溶解させた。4℃で一夜静置した後、10,000×g,30分遠心分離して沈殿を回収し、RNase-free水0.5～1 mlに再浮遊させてウイルス濃縮液とした。ウイルス濃縮液からのウイルスのゲノム RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) を使用した。抽出した RNA に微量に含まれているDNAを除去するためDNase Ⅰ処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN) を用いてRNAを精製した。

３．２．２　リアルタイムPCR法

内部蛍光プローブを用いるTaqMan™ PCR法を用いてウイルスのゲノムRNAを定量した。すなわち上記で抽出したウイルスRNA 1μgからランダムプライマー（ヘキサマー）、Omniscript RT Kit (QIAGEN) を用いた逆転写反応によりcDNAを作製し、2μlをリアルタイムPCRに供した。リアルタイムPCRはQuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN) を用いて行った。使用したプライマーおよびプローブを表－１に示す。

ファージQβの検出は、片山らの報告[1)]に準じた。またノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」に準じ、エンテロウイルスの検出はNijhuisらの報告[2)]に準じた。リアルタイムPCR装置はLightCycler（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を使用した。

表－１　使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ファージQβ		Qβ+	Qβ－	Qβ probe
ノロウイルス	GI型	COG1F	COG1R	RING1-TP(a)と RING1-TP (b)を混合
	GII型	COG2F	COG2Rと ALFPを混合	RING2AL-TP
エンテロウイルス		FEV1	REV1	EVP1
		FEV1	REV2	EVP2

３．２．３　定量・検出限界

リアルタイムPCRによるウイルス濃度測定では、低濃度(10コピー/リアルタイムPCR反応溶液)では測定値のばらつきが大きい。下水処理水中のウイルス濃度は低濃度であるため、定量・検出限界を把握し、検出感度の向上を図る必要がある。

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GI型およびGII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

＊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GI型：85塩基、ノロウイルスGII型：98塩基である。

３．２．４　抽出遺伝子の逆転写効率の向上

リアルタイムRT-PCRでは、ランダムプライマー(ヘキサマー、ノナマーなど)またはオリゴdTプライマーを逆転写反応に使用することができる。従来法ではランダムプライマー(ヘキサマー)を１μM(終濃度)添加していたが、①ランダムプライマーの添加量は10μM(終濃度)を推奨する、②ランダムプライマー(ノナマー)あるいはオリゴdTランダムプライマーを使用すると逆転写効率が向上する、という報告[3)]があった。そこで、逆転写効率の向上を目的として、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。

プライマーの検討実験では、Ａ下水処理場二次処理水から抽出したウイルス遺伝子1μgと各プライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN) を用いた逆転写反応を行い、cDNAを作製し、３．２．２のとおりリアルタイムPCR を行い、ノロウイルス濃度を測定し、ノロウイルス濃度が高いものほど逆転写効率が良いと判定した。各プライマーは①ランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度１μM)、②ランダムプライマー（ヘキサマー（終濃度10μM)、③ランダムプライマー（ノナマー）（終濃度10μM)、④ オリゴdTプライマー（終濃度１μM) ⑤ランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度10μM) ＋オリゴ dT プライマー（終濃度１μM) ⑥ランダムプライマー（ノナマー）（終濃度10μM) ＋オリゴ dT プライマー（終濃度１μM) である。

抽出遺伝子最適濃度の検討実験では、Ａ下水処理場二次処理水から抽出したウイルス遺伝子0.05μg、0.1μg、0.5μg、1μg、とランダムプライマー（ヘキサマー）（終濃度１μM)、Omniscript RT Kit を用いた逆転写反応によりcDNAを作製し、３．２．２のとおりリアルタイムPCRを行い、ノロウイルス濃度を測定した。

４．研究結果と考察

４．１　流入下水からのオーシスト回収率の向上実験結果

オーシスト回収率の向上実験結果を表－２に示す。従来法は目開きが20μmのふるいで夾雑物を除去、フィルターでろ過濃縮を行い、超音波剥離させた後、夾雑物とオーシストを免疫磁気ビーズで分離精製させPCR 法あるいは顕微鏡観察により測定を行った。その平均回収率は20%程度であったが、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%向上しており、100Gの前処理の回収率では約1.5倍となり、以前の回収率試験で得られた処理水の回収率とほぼ同等となった。これは、祖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ため、測定プロセス後段の分離、精製に及ぼす影響が少なくなったものと考えられる。

よって、本前処理法を適用することで流入下水からのオーシストの回収率が向上するため、検出感度を高めることができるものと考えられた。

表－２　流入下水からのオーシストの回収率

(%)

検出法＼前処理法	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　ウイルス

４．２．１　定量・検出限界

低濃度試料に対応した安定した測定値を得るために、まず現行法における定量・検出限界を明らかにした。検出限界値は、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）を行い求めた。その結果を表－３に示す。

ノロウイルス GI 型検出用プライマーおよびプローブを使用した場合、20個の測定値のうち5個が0より大きい値（0.7695から2.607）を示した。ノロウイルスGII 型検出用プライマーおよびプローブを使用した場合は、20 個の測定値のうち 15 個が 0 より大きい値（0.2710から2.148）を示した。

表－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GI型検出用	0.375 [0 - 2.607]	0.75
ノロウイルスGII型検出用	0.595 [0 - 2.148]	0.62

検出限界値は下水試験方法[4]を参照して、以下の式から算出した。

$$xL = xb + k\sigma B \quad (k=3)$$

検出限界値xL、平均値xb、標準偏差σB

測定結果から得られた平均値、標準偏差（表－３）を上の式に代入し、ノロウイルスGI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GII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。

よって上記濃度がリアルタイムPCRでの検出限界値である。

次に、定量限界値の検討を行った。2、5、10、20コピー/リアルタイムPCR反応液のノロウイルスGI型およびGII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）を算出することで測定値のばらつきを評価した。評価結果を表－４に示す。ノロウイルスGI型およびGII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した。

検出限界はリアルタイムPCR反応液あたりノロウイルスGI型で2.63コピー、ノロウイルスGII型で2.46コピー、定量限界はリアルタイムPCR反応液あたり10コピーであることから、定性的な評価では2.63コピー、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。

以上の知見から、安定した測定値を得るために必要な遺伝子量を明らかにすることができた。

表－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

４．２．２　抽出遺伝子の逆転写効率の向上

リアルタイムRT-PCRでは、ランダムプライマー(ヘキサマー、ノナマーなど)またはオリゴdTプライマーを逆転写反応に使用することができる。従来法ではランダムプライマー(ヘキサマー)を１μM(終濃度)添加していたが、ランダムプライマーの添加量を増加させることにより逆転写効率が向上する、またランダムプライマー(ノナマー)あるいはオリゴdTランダムプライマーの使用により逆転写効率が向上する、という報告[3]があった。そこで、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。その結果を表－５に示す。

従来法ではノロウイルスGII型が1.48×10^2コピー/L検出されたが、同一試料を用い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、ノロウイルスGII型は3.30×10^2コピー/L検出され、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2.90×10^2コピー/L検出され、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。

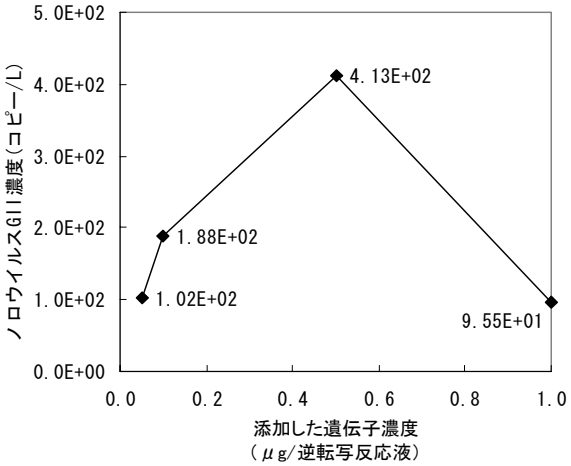
一方、オリゴdTプライマー(終濃度1μM)を使用した場合は2.30×10^1コピー/Lと従来法の16%程度のウイルス量しか検出できなかった。これは、ランダムプライマーを用いた逆転写反応ではRNA分子の数箇所で逆転写反応が開始されるが、オリゴdTプライマーを用いると3'末端のみから逆転写反応が開始されるため、反応効率に差が生じたと考えられる。

よって今回の実験結果から、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が向上することから、検出感度を高めることができた。

表―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

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。その結果を図－１に示す。従来法（抽出遺伝子を1.0μg添加）ではノロウイルスGII型は9.55×10^{1}コピー/L検出されたが、添加する抽出遺伝子の濃度を0.05μg、0.1μg、0.5μgとした場合、それぞれ1.02×10^{2}コピー/L、1.88×10^{2}コピー/L、4.13×10^{2}コピー/L検出された。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、1.0μgでは逆転写効率が低下することが明らかとなった。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。



図－１　逆転写反応に及ぼす鋳型遺伝子濃度の影響

今回の結果から、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が約4.3倍向上させられることを明らかにした。

５．まとめ

17年度は、流入下水からクリプトスポリジウムのオーシストの回収率を向上させることを目的に、試料の前処理法を変更しその回収率の評価を行った。ウイルスに関しては低濃度試料に対応した安定した測定値を得るため、濃縮試料中から抽出したウイルス遺伝子の逆転写効率の向上手法を評価した。さらに、現状のウイルスの定量・検出限界値を明らかにし、その向上手法についても検討を行った。以下に結果を示す。

１）流入下水からのオーシストの回収では、前処理として100Gの粗遠心処理を行うことで回収率は向上するため、検出感度を高めることができるものと考えられた。

２）　リアルタイム PCR によるノロウイルスの現出・定量限界値を求め、安定した定量値を得るためには 10 コピー以上の濃度（反応溶液あたりのコピー数）が必要であることを明らかにした。

３）　逆転写反応において終濃度 10μM となるようランダムヘキサマーまたはランダムノナマーを添加することで抽出遺伝子の逆転写効率を向上できる、また鋳型となるウイルス遺伝子を0.5μg を添加することで抽出遺伝子の逆転写効率を向上できるため、低濃度試料に対応したウイルスの測定法を確立できた。

今後の課題

現在のところノロウイルスに関しては生死判定を行うことができないため、今後はリアルタイムPCR法を適用した消毒による不活化効果の判定手法の構築、さらに、冬季の感染流行期における下水処理場での対策手法の構築などが必要である。

なお、本研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

1）片山浩之他(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.
2）M. Nijhuis, N. van Maarseveen, R. Schuurman, S. Verkuijlen, M. de Vos, K. Hendriksen and A.M. van Loon. (2002) Rapid and Sensitive Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR. J. Clinical. Microbiol, 40(10) ,3666-3670.
3）リアルタイムPCR成功のための重要なファクター，平成14年，(株)キアゲン配布試料.
4）下水試験方法　上巻－1997年度版－p.46～48

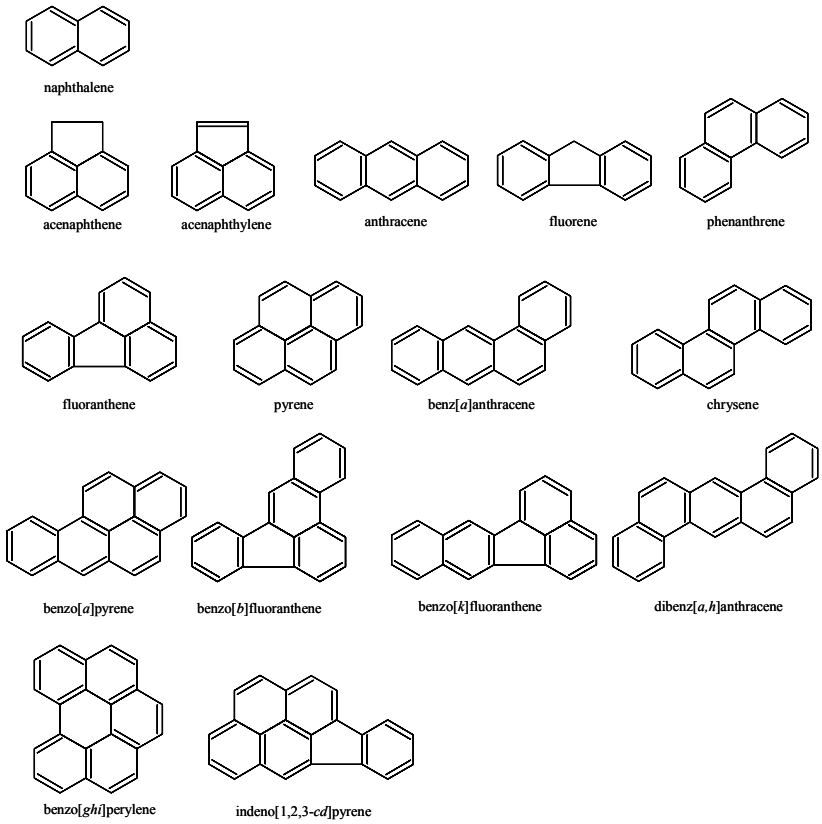
底泥中の有機性有害物質の実態および挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（治水勘定）
研究期間：平 14～平 17
担当チーム：材料地盤研究グループ
（リサイクル）
研究担当者：尾崎正明，山下洋正

【要旨】
近年，有機性有害物質による環境汚染が懸念されている。閉鎖性水域には，その流域内で発生・使用された有機性有害物質が河川等を経由して集まることが予想されるため，それらの物質による汚染が懸念されている。特に，多環芳香族炭化水素類（ＰＡＨｓ）による底泥の汚染が指摘されている。文献調査によると，ＰＡＨｓは水試料での検出頻度は低い一方で底泥試料からの検出頻度が高い。また，ＰＡＨｓの中には閉鎖性水域の河川流入部近傍での局所的な高濃度域の存在が報告されている物質もある。これらのことから，本研究は，閉鎖性水域内の底泥におけるＰＡＨｓの分布状況の把握等，存在実態を明らかにすることを目的としている。17 年度は，閉鎖性水域の底泥中のＰＡＨｓ等の有機性有害物質の存在実態に関する研究および閉鎖性水域の底泥中の有機性有害物質の挙動に関する研究を引き続き行うとともに，最終年度として，全体のとりまとめを行った。その結果，大気降下物による湖面への直接負荷よりも河川等の流入がＰＡＨｓの主要な負荷源と考えられた。
キーワード：多環芳香族炭化水素類，底泥，実態調査

１．はじめに

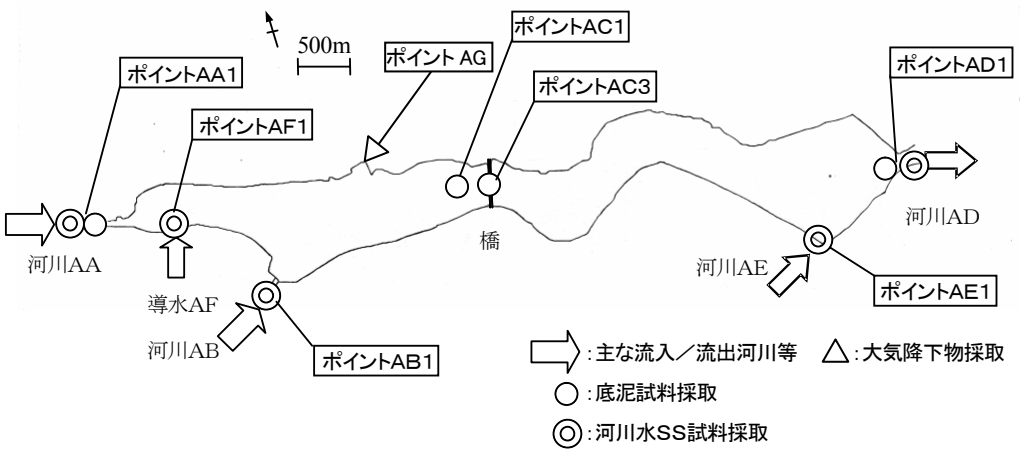
近年，有機性有害物質による環境汚染が懸念されている。閉鎖性水域には，その流域内で発生・使用された有機性有害物質が河川等を経由して集まることが予想されるため，それらの物質による汚染が懸念されている。特に，多環芳香族炭化水素類（Polycyclic aromatic hydrocarbons，以下，ＰＡＨｓ）による底泥の汚染が我が国の湖沼においても指摘されており[1，2]，底泥中でのＰＡＨｓの存在実態の解明が必要である。２～６環の主なＰＡＨｓの構造を図－1 に示す。17 年度は，達成目標①「底泥中の多環芳香族炭化水素の存在実態の解明」のうち，アルキル化 PAHs の存在実態を調査し，発生源の推定を行った。また，達成目標②「底泥中のベンゾ[a]ピレン等の挙動の解明」のうち，ベンゾ[a]ピレン等の大気降下物による負荷，流入・流出河川による移動および底泥浚渫による除去について調査を行った。



図－1　多環芳香族炭化水素類(ＰＡＨｓ)の例

２．底泥中の多環芳香族炭化水素の存在実態の解明

閉鎖性水域の底泥中のＰＡＨｓの存在実態の把握のため，関東地方の比較的人為的な汚染が進んでいる水域である手賀沼の底泥，河川水 SS，大気降下物を採取し，アルキル化ＰＡＨｓの含有量を調査した。



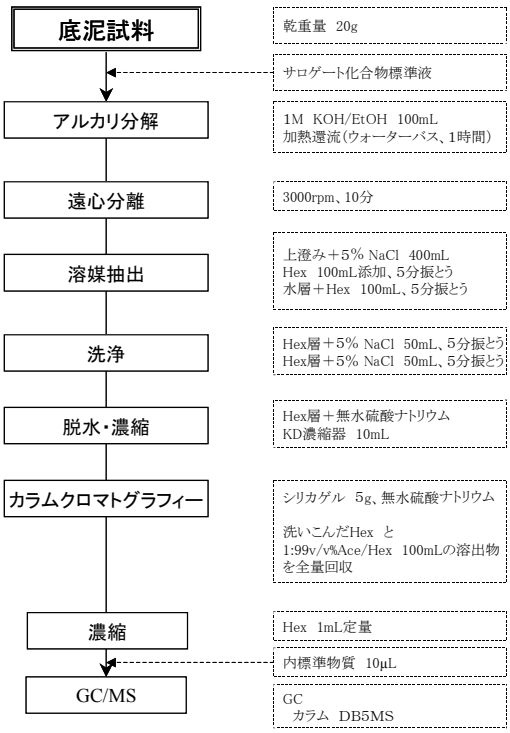
図－2　手賀沼における調査点

2．1　調査方法

調査対象とした手賀沼は 14 年度～16 年度にも調査を行った水域である。

17 年度は，湖沼底泥，河川水 SS，大気降下物を採取し，アルキル化 PAH s の含有量を調査し，アルキル化 PAH s と通常の PAH s の比率を指標として，発生源の分類を試みた。

手賀沼の概略と調査点を**図－2** に示す。調査はいずれも晴天時に行い，河川水試料は夏期および冬期に採取し，底泥試料は冬期に，浚渫底泥試料は秋期に，大気降下物試料は秋期～冬期にそれぞれ採取した。河川水試料は，主要な流入河川３（ＡＡ：大堀川，ＡＢ：大津川，ＡＥ：染井入落）および流出河川１（ＡＤ：手賀川）について，ポイントＡＡ１，ＡＢ１，ＡＤ１，ＡＥ１において，河川水中のＳＳをろ過により収集した。これは，PAH s が疎水性物質であり，主として固形分に吸着した形で水系を移動すると考えられるためである。また，手賀沼では富栄養化による水質悪化を改善するために相当量の河川水を導水しており，PAH s の収支に影響があると考えられることから，この導水（ＡＦ：北千葉導水）についても同様に測定を行った。底泥は○で示した４点で表層試料を採取した。ポイントＡＣ１は，道路橋より約 300m上流の地点，ポイントＡＣ３は道路橋直下，ポイントであり，ポイントＡＡ１は河川流入部地点，ポイントＡＤ１は河川流出部地点である。大気降下物試料は，道路橋に近い湖岸のポイント AG にて２ヶ月に渡り連続採取した。採取装置は，ダイオキシン測定用の SUS 製連続ろ過装置を用いて，固形性及び溶解性の成分は，連続的にろ紙およびウレタンフォームに補足して，光分解による影響を最小限に抑えた。



図－3　ＰＡＨｓの分析フロー

底泥試料中のＰＡＨｓおよびアルキル化 PAH s の分析は，環境庁マニュアル[3]のＢＡＰの分析方法を一部変更して 15 年度に用いた方法を採用した。この方法は，底泥試料を加熱還流アルカリ分解し，液々抽出した後，シリカゲルを用いてクリーンアップし，ガスクロマトグラフ質量分析計（ＧＣ／ＭＳ）で検出する方法である。手賀沼の試料について用いた分析方法の主な流れを図－3 に示す。

定量対象物質は図－1 に示した 16 種のＰＡＨｓおよびベンゾ[*e*]ピレン，ペリレンならびに図－4 に示した８種のアルキル化 PAH s（メチル化フェナントレン，ジメチル化フェナントレン）とした。

2．2　調査結果

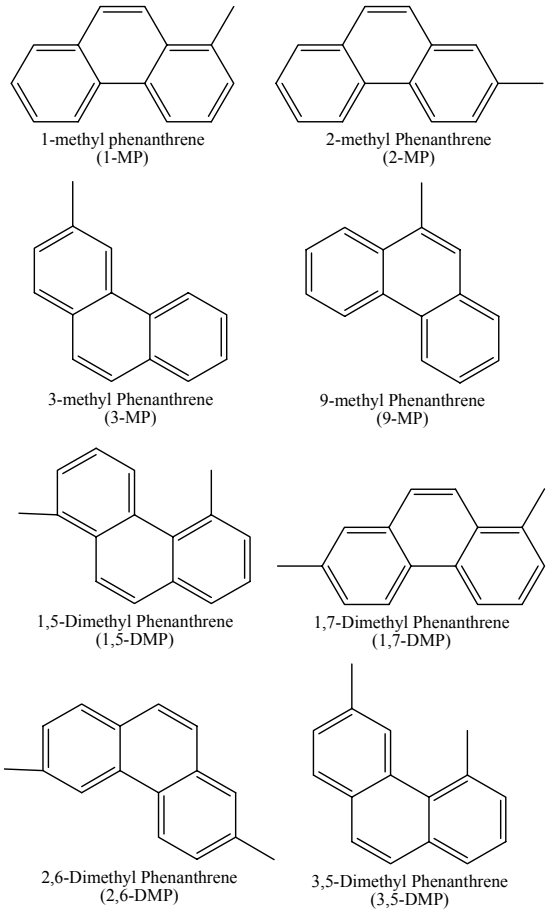
各試料におけるＰＡＨｓおよびアルキル化ＰＡＨｓの測定結果より，メチル化フェナントレンとフェナントレンの比（MP/PHE）およびジメチル化フェナントレンとフルオレンの比（DMP/FLU）を計算して，整理した結果を図－5 に示す。これは，PAHs の発生源の指標として，MP/PHE が有効と報告されており[4)]，燃焼由来では MP/PHE が 0.5～1.0，非燃焼（油流出等）由来では MP/PHE が 2～6 程度とされていること，DMP/FLU も発生源の推定に寄与するとされている[4)]ことから検討したものである。同図より，流入河川（AA, AB, AE）については，AA の夏期データが FLU 欠測により不明であることを除けば，夏期・冬期いずれも MP/PHE が 0.7～1.0，DMP/FLU が 1.4～2.5 の範囲にあり，類似した流域特性を持つ流入負荷源として分類可能であることが分かる。一方，導水（AF）については，流入河川とは全く異なる分類であり，別の流域特性と考えられる。流出河川（AD）については，夏期データは流入河川と同グループであるが，冬期データは大きく異なっていた。これは，夏期と冬期で PHE 濃度に大きな差異が見られたことによるものと考えられる。底泥については，流入河川とは異なるグループに分類された。また，大気降下物試料においては，懸濁態および Total の両方で MP/PHE および DMP/FLU が他の試料より低いことがわかる。MP/PHE が低いことについては，大気降下物は燃焼由来のものがほとんどであることを考えれば説明できる。河川水ＳＳや湖沼底泥においては，油流出等の非燃焼由来のＰＡＨｓも含まれることから，相対的に MP/PHE が高くなると考えられる。DMP/FLU についても同様の理由で，大気降下物において低いものと考えられる。これらの結果より，手賀沼に流入するＰＡＨｓ負荷は，燃焼により発生したＰＡＨｓの大気降下物に加えて，路面等からの雨天時流出で油流出由来等のＰＡＨｓが混在するものと考えられる。

3．底泥中のベンゾ[a]ピレン等の挙動の解明

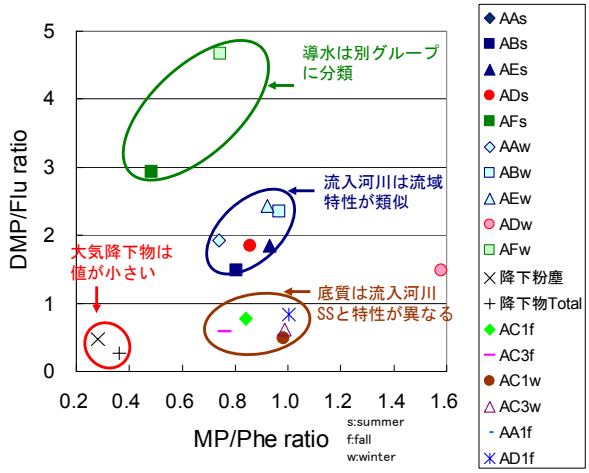
閉鎖性水域の底泥中の有機性有害物質の挙動を解明するために，残留性が高く発ガン性が指摘されているベンゾ[a]ピレン（ＢＡＰ）等の大気降下物による負荷，流入・流出河川による移動および底泥浚渫による除去について調査を行った。

３．１　調査方法

河川水および導水ならびに大気降下物に関する試料採取は，２．１と同様の方法で行った。



図－４　アルキル化 PAH s



図－５　アルキル化 PAH s を指標とした発生源分類

浚渫底泥の試料については，秋期の浚渫事業の際に，浚渫プラントにて採取した。ＢＡＰ等の測定は，前述した図－3 に示すフローに従って行った。

３．２　調査結果

（１）河川水および導水の調査結果

流入河川３地点，導水及び流出河川各１地点の晴天時の水中の懸濁態 PAHs 濃度を夏期及び冬期に測

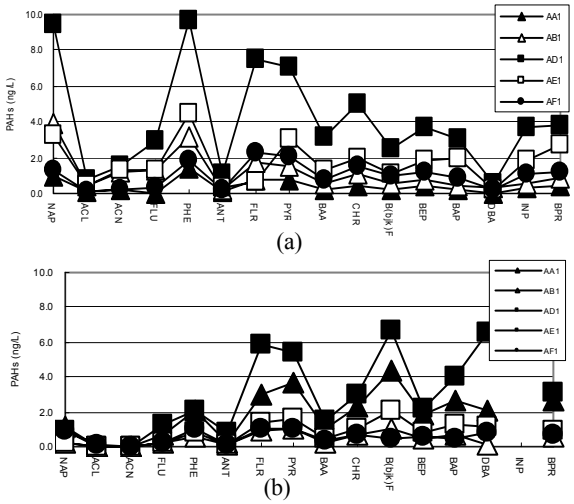
定した結果を図－6 に示す。同図より、晴天時においては,夏期及び冬期で流出河川(AD1)の濃度が流入河川(AA1,AB1,AE1)及び導水(AF1)の濃度を上回っていることが分かる。これは，流入河川及び導水の流量が晴天時に低く SS 濃度も低いため（夏期 2～13mg/L，冬期 0.5～7.3mg/L)，懸濁態 PAHs があまり輸送されない状態であるのに対して，流出河川の SS 濃度は手賀沼の湖水水質を反映して晴天時でも高めであり（夏期 35mg/L，冬期 40mg/L)，懸濁態 PAHs が流出していることによるものと考えられる。冬期で欠測の INP を除いた 15PAHs の総和で比較すると，AA1 は冬期でより高濃度であったが，他の河川及び導水では夏期の方が高濃度であり，全体として明確な季節影響の傾向は見いだせなかった。

（２）大気降下物および浚渫底泥の調査結果

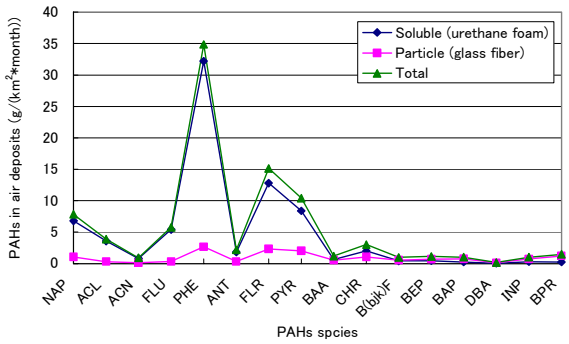
大気降下物の測定結果（図－7）より，４環以下では，溶解性画分の負荷量が多いが，５環以上では粒子性画分の負荷量が多くなっていることがわかる。粒子性画分における PHE と５環以上の PAH s の存在比率は,底泥における同比率よりも高いことから，５環以上の PAH s と比較して PHE の方がより分解されやすいため，底泥において分解が進んだ結果として比率が下がっているものと考えられる。浚渫底泥については，図－8 に示すとおり，これまでの底泥の調査結果とほぼ同様であり，BAP 濃度は約 19 μg/kg であった。

（３）挙動の試算結果

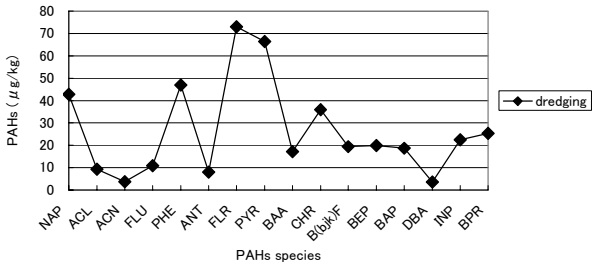
上述の数値より，ベンゼン環数５のＢＡＰについて，前年度に試算した物質収支を再計算することとした。収支計算に当たり考慮した要因を図－9 に示し，試算結果を表－1 に示す。前年度の計算との相違点は，大気降下物および浚渫底泥の実測値を用いたこと，河川水濃度を夏期および冬期の平均値を用いたことである。ここで，(1)流入については河川流量はＨ－Ｑ式により，導水の流量は実績値より設定した（2002 年)。河川水および導水中の濃度については，夏期および冬期の調査結果より，ＳＳあたりのＢＡＰ濃度の平均値を求め，前年度と同様に年間平均ＳＳ濃度を乗じて求めた。表面流出水中ＢＡＰ濃度は未測定であるため，控えめの推定値として，最も低濃度であった河川ＡＥの値を用いた。(2)湖面への大気降下については，秋～冬期における実測値 11.8μg/(m^2･y)を用いた。(3)道路橋からの路面流出は前年度と同様に交通量は年間 11.1 百万台･km，単位発生量を 0.2μg/km として計算し,(4)地下水の影響および(8)水中での内部変化（内部生産等）は微小と



図－６　河川および導水における PAHs 濃度
(a)夏期，(b)冬期



図－７ 大気降下物による PAHs 負荷量



図－８　浚渫底泥の PAH s 濃度

考えて無視した。また，(6)巻き上げは，(5)堆積に含める（相殺）形とした。(7)流出については，河川流量は(1)流入の総計と等しいとみなし，湖面への降雨および蒸発散による水量変化は微小と考えて無視した。(9)底泥浚渫は，前年度と同様に実績値より年間 8 万 m^3 と設定した。(10)底泥での内部変化は，前年度と同様に，水中から湖底へ沈降するＳＳ中のＢＡＰの約 11%が分解され，残り約 89%が底泥化するものとした。(5)堆積については，水中ＢＡＰの増加要因(1)(2)(3)から，減少要因(7)を差し引いた値とし，

水中ＢＡＰの収支が差引ゼロとなるようにした。

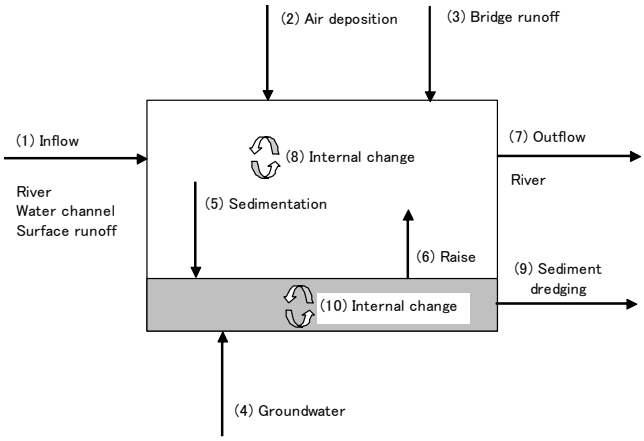
試算結果として，年間に 511.0g のＢＡＰが水域に流入して 453.0g(流入の 88.7%，以下同じ）が河川より流出し，残り 58.0g(11.3%)は湖底へ沈降するが，そのうち 6.1g(1.1%)が湖底で分解され，51.8g(10.1%)が底泥に堆積する。浚渫が行われる場合は，728.2g (142.5%)が水域外へ搬出され，結果として 676.4g(132.3%)が余分に除去されることから，ＢＡＰ収支は大幅にマイナスとなり，底質が改善されたことになる。このことから，十分な量の浚渫が行われる場合は BAP 対策としても有効と考えられた。また，湖内における BAP の分解は，流入量の 1.1%程度であり，除去機構としては期待できないと考えられた。全体の BAP 流入負荷量のうち，大気降下物による湖面への直接流入負荷は 9.9%程度であり，導水による負荷が約 45.4%，流域内からの負荷が約 44.1%であることから，河川・導水による流入負荷が大半であると考えられた。

３．３　考察

河川水の調査結果より晴天時の流入河川より流出河川の BAP 濃度が高いこと，および，湖面への大気降下物による直接負荷の割合は小さいことから，流入河川の河口部や道路橋路面排水の落下部に沈積した BAP が，巻き上がりにより湖水へ再浮遊して，流出河川まで移動していることが推察される。しかし，湖内における底泥中の濃度分布が確認されていることから，完全に均一になるほどの移動量ではないと考えられる。

手賀沼（手賀川より上流側）の流域面積 89.23km^2 への大気降下物による BAP 負荷量は 1054.7g と推定されるが，今回の試算では流域内からの負荷量（３河川流入，表面流出および湖面への大気降下物）は 276.4g であり，流域内への降下負荷量の約 26.2%に過ぎない．今回の流入河川からの BAP 負荷量は，晴天時の調査に基づいて計算しており，雨天時の高濃度の濁質輸送を考慮できておらず，例えば，河川水によるダイオキシン類の輸送量の９割以上が降雨時によるものとの報告[5] もあることから，流入負荷量が過小評価になっている可能性がある。大津川の河口部沖合ポイントＡＢ３におけるコアサンプルの年代測定の結果から推定される近年のＢＡＰの堆積速度は，400～600μg/m^2/年程度であり[6]，そこから

算出される湖内への沈積負荷量は 1720～2580g となるが，これは高負荷流入地点における堆積速度を全湖底面積へ当てはめたため過大な推定値となっていると考えられ，実際には，大気降下物以外の負荷源も含めて雨天時の輸送量も含めた年間の負荷量は，およそ 280g から 2600g までの範囲にあると推定される。



図－９　BAP の収支計算の概要

表－１　BAP の挙動に関する試算結果

(1) Inflow		Flow rate (m^3/y)	Concentration (μg/m^3)	Mass flux (g/y)
Total		2.1.E+08		457.9
	AA	3.0.E+07	2.9	86.7
	AB	1.4.E+07	6.3	86.2
	AE	6.5.E+06	2.7	17.8
	AF	1.5.E+08	1.6	232.3
	Surface runoff	1.3.E+07	2.7	34.9
(2) Lake surface air depositio		Area (km^2)	Deposition (μg/m^2/y)	Mass flux (g/y)
Total				50.8
	Air Deposition	4.3	11.8	50.8
(3) Bridge runoff		Traffic (car km/y)	Emission (μg/km)	Mass flux (g/y)
Total				2.2
	AC	1.E+07	0.2	2.2
(4) Groundwater		Neglected		
(5) Sedimentation		Area (km^2)	Sedimentation rate (μg/m^2/y)	Mass flux (g/y)
Total				58.0
	Net sedimentation	4.3	13.5	58.0
(6) Raise		Included in net sedimentation		
(7) Outflow		Flow rate (m^3/y)	Concentration (μg/m^3)	Mass flux (g/y)
Total				453.0
	AD	2.1E+08	2.15	453.0
(8) Internal change		Neglected		
(9) Sediment dredging		Dredging rate (m^3/y)	Concentration (g/m^3)	Mass flux (g/y)
Total				728.2
	Dredging	8.0E+04	0.00910	728.2
(10) Internal change		Half-life (y)	Degradation rate (1/y)	Mass flux (g/y)
Total				6.1
	Surface layer degradation	6.2	0.106	6.1
Water body balance				0
Sediment balance without sediment dredging				51.8
Sediment balance with sediment dredging				−676.4

国内では底泥中のＰＡＨｓに関する環境基準は定められていないが，海外で提示されている基準および基準案[7] と比較すると，ほぼ無影響とされる閾値（例えばＢＡＰ30μg/kg）を超えた測定値は若干見受けられたものの，高い可能性で影響が予想される閾値（例えばＢＡＰ3600μg/kg）を超えた地点はなかった。また，上述のコアサンプルの年代測定の結果[6] から，大気汚染の著しかった 1960 年代と比較して近年のＰＡＨｓの堆積速度が低下していることも分かっている。

これらのことから，今後も，定期的なモニタリング調査等により，ＰＡＨｓ等の底泥中に堆積しやすい有機性有害物質の実態および挙動に注意を払うことが望ましいと考えられた。

4. 17 年度調査のまとめ

本研究は，閉鎖性水域内の底泥中の有機性有害物質の実態および挙動を把握するために，ＰＡＨｓの存在実態を明らかにするとともに，ベンゾ[a]ピレン等の挙動を解明することを目的としている。

17 年度は，達成目標①「底泥中の多環芳香族炭化水素の存在実態の解明」のうち，アルキル化 PAHs の存在実態を調査して発生源の推定を行い，次の結果を得た。

（１）流入河川，導水，底泥，大気降下物は，それぞれ異なる流域特性または発生源特性を持つ負荷源として分類可能と考えられた。

（２）水域に流入するＰＡＨｓ負荷は，燃焼により発生したＰＡＨｓの大気降下物に加えて，路面等からの雨天時流出で油流出由来等のＰＡＨｓが混在するものと考えられた。

また，達成目標②「底泥中のベンゾ[a]ピレン等の挙動の解明」のうち，ベンゾ[a]ピレン等の大気降下物による負荷，流入・流出河川による移動および底泥浚渫による除去について調査を行った結果，以下のことが明らかとなった。

（３）大気降下物由来の PAHs においては，４環以下では，溶解性画分の負荷量が多いが，５環以上では粒子性画分の負荷量が多いことがわかった。水域への BAP 流入負荷量のうち, 湖面への直接降下によるものは，10%程度と推定された。

（４）晴天時には流入河川より流出河川のＢＡＰが高濃度であることから，流入して堆積したＢＡＰが底泥から巻き上がりにより再浮遊していると考えられたが，湖内の濃度分布を均一にするほどの移動量ではないと考えられた。

５．調査全体のまとめ

１４年度～１７年度までの調査全体で判明したことは以下の通りである。

達成目標①「底泥中の多環芳香族炭化水素の存在実態の解明」については，

（１）流入河川の河口部や道路橋の路面排水流入部において，ＰＡＨｓ負荷が底泥に堆積しており，湖内でも汚染の影響をあまり受けていない部分とで濃度分布が生じていた。特に，４環以上のＰＡＨｓの含有量が高くなっていた。

（２）比較的人為的な汚染が進んでいないと予想された閉鎖性水域の底泥中のＰＡＨｓの定量を行ったところ、山間部の水域であっても底泥のＰＡＨｓ含有量が少ないわけではないことが明らかとなった。

また，達成目標②「底泥中のベンゾ[a]ピレン等の挙動の解明」については，

（３）人工内湖等の設置により、河川河口部近傍での積極的な沈殿除去の可能性が示唆された。

（４）大気降下物由来の PAHs においては，５環以上では粒子性画分の負荷量が多く，水域への BAP 流入負荷量のうち, 湖面への直接降下によるものは, 14%程度と推定された。

（５）湖内に堆積しているＢＡＰが晴天時にも底泥から巻き上がりにより再浮遊しているが，湖内の濃度分布を均一にするほどの移動量ではないと考えられた。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

参考文献

1）環境庁環境保健部保健調査室： 化学物質と環境, 平成２年版, 1990.12.

2）環境省環境保健部環境安全課： 化学物質と環境, 平成１２年度版, 2001.3.

3）環境庁水質保全局水質管理課： 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質，底質，水生生物）, pp.VI-1 - VI-8, 1998.10.

4）熊田英峰，高田秀重，モハマド パウジ ザカリア：中国，日本，マレーシアのエアロゾル中の多環芳香族炭化水素組成，Res. Org. Geochem.,15,13-25,2000

5) 兼松正和，佐藤圭輔，清水芳久：集水域を考慮した河川水中ダイオキシン類の流出特性，第 40 回日本水環境学会年会講演集，p.278, 2006

6) 湖沼底泥中の多環芳香族炭化水素類（PAHs）の存在実態と対策の可能性，南山瑞彦，鈴木穣，環境工学研究論文集，41，pp. 497−506，2004

7) David R. Mount et.al：Approaches to Developing Sediment Quality Guidelines for PAHs, in Peter Douben ed., PAHs: An Ecotoxicological Perspective, Wiley, pp.331-355, 2004

下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究期間：平 14～平 17
担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）
研究担当者：尾崎正明，落修一，牧孝憲，庄司仁

【要旨】
下水処理水の再利用を推進するために，生物膜処理による残存有機物の除去について検討を行った。各種の微生物固定化資材に下水処理水を通水する実験を行ったところ，硝化反応はすべての固定化資材で確認されたが，有機物の低減は化成炭と活性炭のみで見られた。すなわち，固定化資材の表面形状は大きな影響を与えておらず，個々の資材を細かくすることで処理性能の向上が見られた。また，生物膜を構成する細菌は，有機物負荷の低い環境に特徴的な *Acidobacteria* 門や *Bacteroidetes* 門，硝化細菌の一種（*Nitrospira* 属）であった。
キーワード：下水処理水，溶解性有機物，固定化資材，生物膜，細菌群集解析

１．はじめに

下水処理水中に残存する溶解性有機物は，放流先水域や処理水の再利用に悪影響を及ぼすことが指摘されている。このような残存有機物に対しては，現在のところ，オゾン処理や活性炭吸着などの物理化学的な処理手法が適用されている。下水処理水の再利用を積極的に推進するためには，より安価かつ省エネルギーな手法の開発が望まれる。

本課題では，有機物を除去する手法として生物膜処理に注目した。14 年度および 15 年度に行った室内実験から，生物膜処理によって微生物の再増殖につながる残存有機物を低減させられることが示された[1)]。そこで 16 年度より，各種の固定化資材に下水処理水を通水する実験を開始した。その目的は，各資材の特性と処理性能との関係を把握すること，ならびに，有機物除去機構を解明することである。本年度は，1)資材表面に形成された生物膜の様子，2)運転期間中（約 500 日間）の処理性能，3)生物膜を形成する細菌群集，などの調査を行った。

２．研究方法

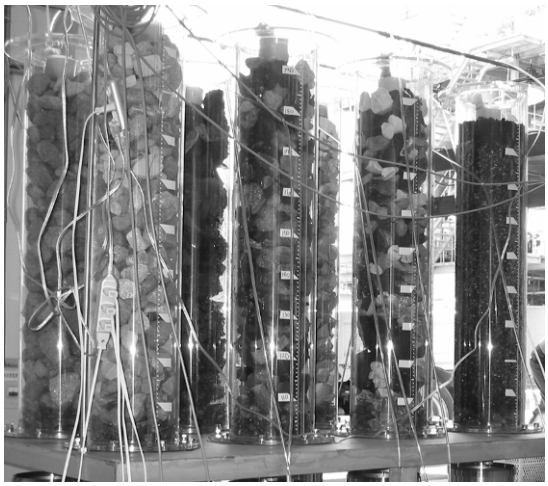
2.1　実験装置の概要

2.1.1　装置の構成

円筒形（内径 20cm×高さ 100cm）のアクリル樹脂製カラムに資材を充填した（**図－１**）。カラムの上部から，二次処理および急速ろ過した高度処理水を毎分 130ml の流量で通水した。カラム内部は散水濾床の形態であり，上部から流入した処理水は，内部に貯留されることなく開口部（直径 30mm）から流出する。開口部は外気の流入口も兼ねている。カラムおよび配水チューブの周囲は，アルミ箔で遮光した。

2.1.2　固定化資材

微生物の固定化資材は，表面積が大きいこと，安価であることといった条件が求められる。本研究では，安価な鉱物であるゼオライトと坑火石，また木質のリサイクル材である木炭（ダム流木原料），化成炭（間伐材と $CaCO_3$ の複合炭），活性炭（市販品）を用いた。資材の詳細と充填量は**表－１**に示した。



図－１　固定化資材を充填した反応装置

表－1：使用した固定化資材

担体	性状概要	充填量
活性炭	粒状（10mm）	12.8kg
坑火石	原石（30～80mm 篩）	3.8kg
ゼオライト	同上	18.5kg
木炭	原料：流木，大きさ：同上	19.2kg
化成炭	間伐材＋$CaCO_3$，数 mm	6.1kg

2.1.3　植種

実験開始時における微生物の植種源は，複数の土壌（畑地，水田，山林，蓮田），底泥（河川，湖沼），活性汚泥の混合物である。カラム最上部に設置した容器にガーゼで包んだ混合物を入れて，高度処理水を通水した後，１週間で容器を取り外した。

2.2　水質測定項目

週１回の頻度で，装置の流入水（高度処理水）と処理水の水質分析を行った。試料は，ガラス繊維ろ紙（GF/B）でろ過した後，ろ液の TOC（TOC-5000，島津製作所），PO_4-P・NH_4-N・NO_2-N（TRAACS オートアナライザー，Bran+Luebbe）を測定した。

2.3　固定化資材の観察

固定化資材の表面に形成された生物膜を，走査型電子顕微鏡（VE7800，キーエンス）によって観察した。生物膜を光学顕微鏡でも観察して，その性状および原生動物や微小後生動物の有無を確認した。

2.4　生物膜の細菌群集解析

化成炭の生物膜を超音波処理によって回収して，FastDNA Spin Kit for Soil（Q-BIOgene）で DNA を抽出した。抽出液を MonoFas（GL サイエンス）で精製して PCR 反応に供した。増幅部位は，真正細菌の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長に相当する 8f から 1492r までである。PCR 産物を再精製した後，Blunting Kination Ligation Kit，*E. coli* JM109 コンピテントセル（タカラバイオ）によるライゲーション反応と形質転換を行った。反応液を LB 培地に塗布して 37℃で一晩の培養後，白色のコロニーを無作為に選び，滅菌爪楊枝で少量を採取した。コロニーと PCR 混合液，ベクター用の M13-M4，M13-Rv プライマーを用いて PCR 反応を行った。得られた PCR 産物は，アガロースゲル電気泳動でインサートのサイズを確認して，約 70 個の適切なクローンを得た。

得られたクローンを MonoFas で精製して，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit でのシーケンシング反応，ABI377 での塩基配列解読を行った（いずれも Applied Biosystems）。全クローンについて，341f を開始位置とする約 600bp の塩基配列を得た。相違が数塩基対までのクローンを同一の OTU（operational taxonomic unit）とみなして，各 OTU に M13-M4，M13-Rv，518r，1099f を開始位置とする解析も行い，対象部位の全塩基配列を解読した。得られた配列に対して，DNA Data Bank of Japan の提供する相同性検索（BLAST）を行った。

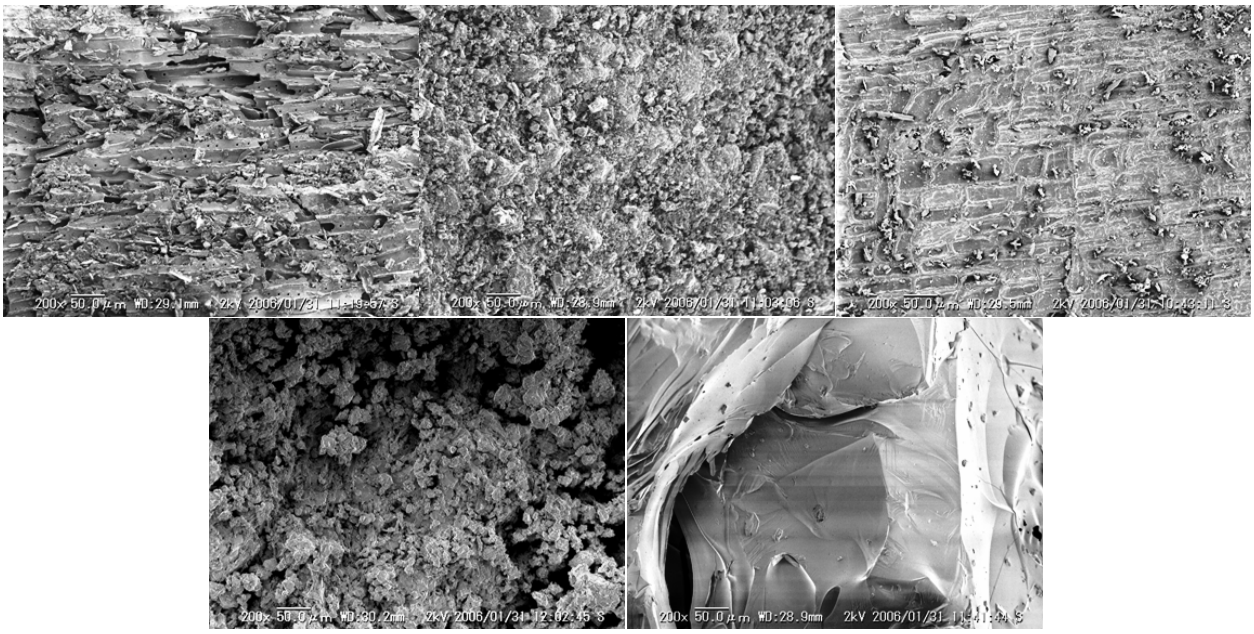
３．研究結果と考察

3.1　顕微鏡による観察結果

3.1.1　走査型電子顕微鏡による観察結果

未使用の固定化資材を電子顕微鏡で観察したところ，**図－２**に示すような表面形状であることが明らかとなった。形状のみに注目すると，

- 粉末状の凹凸が見られる活性炭・ゼオライト
- 滑らかな坑火石
- 細胞の痕跡を残す木炭・化成炭



図－２　使用前の固定化資材表面（操作型電子顕微鏡・200 倍）

上段左：化成炭，中：活性炭，右：木炭，下段左：ゼオライト，右：坑火石

の３種類に分けられる。ただし，固定化資材として重要な表面積は，個々の資材の大きさにも影響される。つまり，表－１に示した「大きさ」と表面形状を組み合わせて考える必要がある。

使用後（開始から 17 ヵ月）の表面は，**図－３**のように変化した。表面の全体を覆うような，何らかの堆積物が存在している。特に「粉末状の凹凸」の見られた固定化資材では，凹凸の埋まっている様子が良く分かる。電子顕微鏡の画像からは，この堆積物が無機物のスケールなのか生物膜なのかを判断することができない。しかしながら，表面に堆積物が見られる傾向は，すべての資材で共通していた。

3.1.2　光学顕微鏡による観察結果

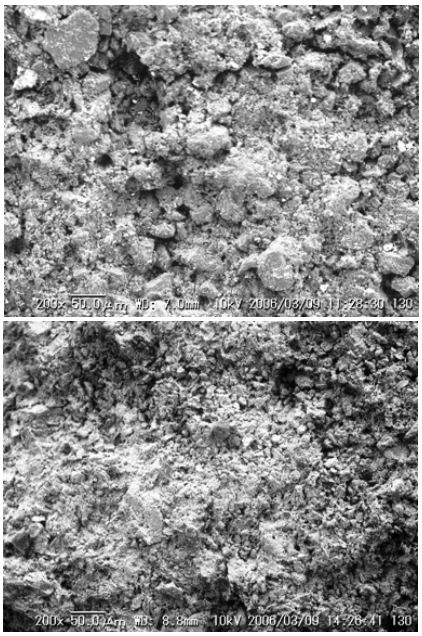
前述の堆積物を詳しく調べるため,圧搾したり（炭化物），表面をかき取ったり（鉱物）して，光学顕微鏡による観察を行った。その結果，**図－４**のようなフロック状・茶褐色の物体や，その近傍に原生動物や微小後生動物が生息する様子などが数多く見られた。この結果と走査型電子顕微鏡での観察結果を合わせて，すべての固定化資材には，一定量の生物膜が形成されていたと考えられる。

なお，観察された原生動物は肉質虫類の *Arcella* 属，微小後生動物は線虫類の *Diplogaster* 属と推定された。前者は，硝化の進行を示す（硝化細菌を捕食する）微生物として知られている [1]。後者は，生物膜の更新が速い状態を示す微生物として知られている [1]。これらの情報も，固定化資材に生物膜が形成されていたことを支持するものである。

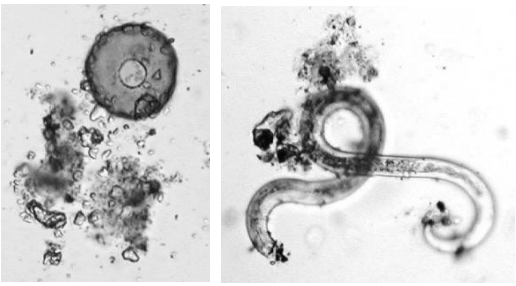
3.2　処理水質の推移

平均的な流入および処理水質は**表－２**のとおりである。また流入水・化成炭・木炭については，経時変化を**図－５**に示した。

処理の主目的である有機物は，化成炭と活性炭で10%程度の低減が見られたものの，その他の資材ではほとんど変化が見られなかった。この数字は決して高いものではないが，通水するだけで一定の効果が得られたという意味では，処理技術としての可能性を示す結果である。



図－３　使用後の固定化資材表面
上：活性炭（湿潤），下：ゼオライト（風乾）



図－４　フロック状生物膜と原生動物（左）
微小後生動物（右）

表－２　流入水および処理水の水質測定結果

	流入水	化成炭	活性炭	木炭	ゼオライト	坑火石
TOC [mg/l]						
平均（標準偏差）	5.47（1.25）	4.78（1.14）	4.92（1.19）	5.42（1.20）	5.39（1.24）	5.41（1.19）
対 流入水	－	13%減	10%減	1%減	2%減	1%減
NO_3-N [mg/l]						
平均（標準偏差）	5.98（1.53）	6.19（1.51）	6.30（1.56）	6.00（1.49）	6.06（1.52）	6.04（1.52）
対 流入水	－	3%増	5%増	0%増	1%増	1%増
NH_4-N [mg/l]						
平均（標準偏差）	0.10（0.28）	0.03（0.06）	0.04（0.03）	0.05（0.11）	0.04（0.06）	0.04（0.06）
対 流入水	－	70%減	61%減	50%減	64%減	62%減
PO_4-P [mg/l]						
平均（標準偏差）	0.17（0.20）	0.17（0.19）	0.21（0.22）	0.18（0.21）	0.19（0.21）	0.19（0.21）
対 流入水	－	1%減	19%増	6%増	7%増	7%増

窒素に関しては，すべての資材でアンモニア性窒素の減少が観察されており，減少率も50%以上の高い値となった。図－５からは，流入水に見られる突発的なアンモニアのピークが，処理水では目立たなくなっていることが分かる。アンモニア性窒素の減少に対応するように，硝酸性窒素も増加傾向を示している。これらの結果は，本装置において硝化反応が活発であった一方，脱窒反応は活発でなかったことを示唆している。

リン酸は，化成炭を除いて増加した。個々の測定値も，実験開始当初から終盤に至るまで定常的にリン酸の増加傾向を示した。したがって，資材からの溶出も否定できないが，流入水からも，オルトリン酸以外の形で定常的に供給された可能性が高い。本装置でリンの収支を正確に評価する場合には，全リンの測定が必要であった。

3.3　細菌群集構造の解析結果

3.3.1　生物膜の細菌群集構造

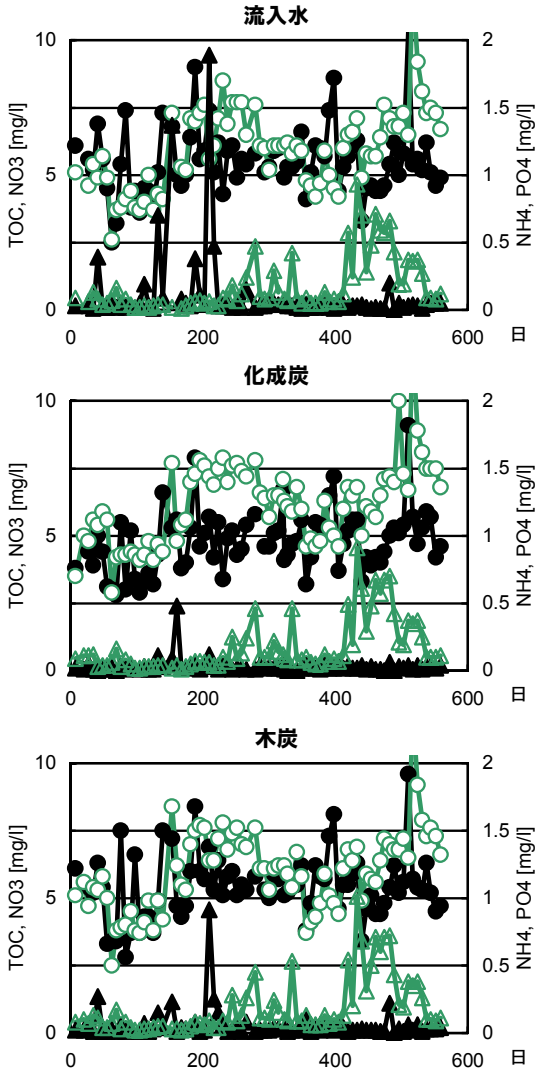
解析に成功した 68 個のクローンを門／綱で分類したところ，**図－６**のようになった。主要な細菌としては，*Acidobacteria* と *Bacteroidetes* が 20%程度，*β*-および *α*-*proteobacteria* と *Nitrospira* が 12～15%などであった。以下では，既存の知見を踏まえて，それぞれの特徴を整理する。

最も多く検出された *Acidobacteria* は，極めて難培養性の細菌であり，単離された菌株はほとんど存在しない。遺伝子の検出例は土壌を中心に豊富であり，土壌において多様な機能を担っていると推定されている [3]。水圏での検出例も見られるが，活性汚泥からの検出例は稀である。

同様に高い比率で検出された *Bacteroidetes* は，土壌や水圏で広く見られる種類である。水処理との関係では，酢酸やアミノ酸といった低分子の有機物よりも，細菌の細胞構成成分のような高分子有機物を利用する傾向が報告されている [4]。

β-および *α*-*proteobacteria* は，いずれも活性汚泥中で標準的に見られる細菌群である。多様な機能を持つ細菌で構成されているが，特に本実験と関連の深いものとして，硝化細菌（アンモニア酸化細菌）である *Nitrosospira* 属に近縁なクローン（1 個）が検出された。

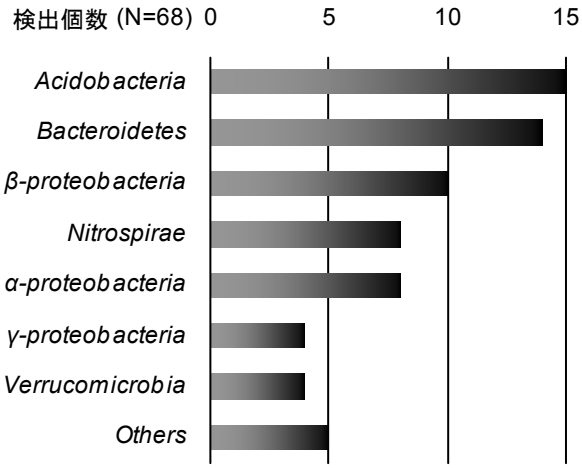
Nitrospirae に属しているものは，いずれも亜硝酸酸化細菌であると推定された。このことと，前述のアンモニア酸化細菌の存在から，硝化能力の高さが微生物学的にも確認できたと言える。



図－５　流入水質および処理水質の経時変化

●：TOC，○：NO_3-N（右軸）

▲：NH_4-N，△：PO_4-P（左軸）



図－６　検出されたクローンの分類

なお，全体的な細菌群集構造が類似していた報告例として，Martiny らの解析結果[5]がある。彼らは，浄水の配水管を模した実験装置に形成された生物膜から *Nitrospira* 属（25%）や *Acidobacteria*（14%）に近縁な遺伝子を多く検出している。

3.3.2　細菌群集構造と有機物の流れ

下水処理水（二次処理水）の溶解性・残存有機物は，その由来によって以下のように分類できる。

- 流入下水に含まれる生分解性の低い有機物
- 基質利用や増殖にともなう代謝産物（UAP：utilisation associated products[6]）
- 死滅や溶菌にともなう有機物（BAP：biomass associated products[6]）

活性汚泥処理の後段である本研究の処理対象は，主に UAP と BAP になる。

前述のとおり，処理性能の比較的良好だった化成炭の生物膜では，*Acidobacteria* と *Bacteroidetes* が優占的な従属栄養細菌であった。Kindaichi ら[4]は，細胞壁の主要成分である N-アセチル D-グルコサミンを，*Bacteroidetes* に属する細菌が優先的に摂取すると述べている。また Martiny ら[5]は，有機物濃度の極めて低い環境で存在した *Acidobacteria* 門の細菌は，硝化細菌の代謝産物を利用している可能性が高いと述べている。これらの知見から，本研究においても，UAP や BAP を利用する細菌を多く含む生物膜が形成されたものと判断できる。

一方，生物膜を有機物の除去装置として考えた場合，硝化細菌の存在が機能の低下につながる可能性もある。たとえば Kindaichi らは，炭酸塩を唯一の炭素源とする生物膜において，培養開始から３ヶ月が経過した後でも，硝化細菌と従属栄養細菌の存在比率が半々であったと報告している[4]。これは，硝化細菌によって，多数の従属栄養細菌が生育できるほどのな有機物（UAP や BAP）が供給されていたことを意味する。したがって，硝化細菌と見られるクローンが多数（13%）を占めていた本実験でも，生物膜における有機物の挙動については，従属栄養細菌による分解だけでなく，硝化細菌や従属栄養細菌による UAP・BAP の生成も考慮する必要がある。

3.4　処理性能と固定化資材との関係

3.4.1　材質の影響

本実験に使用した固定化資材は，大きく分けて炭化物と鉱物である。特に木炭とゼオライト・坑火石は同程度の大きさであるため，材質の影響に特化した検討が可能である。これらの資材では，一定かつ同程度の硝化能力は発揮されるものの，有機物濃度の低減は見られなかった。したがって，本実験で使用した資材については，処理性能への影響は小さいものと結論付けられる。

表－３　実験終了時におけるカラム内平均流下時間

ケース	流量（mL/min）	平均流下時間（min）
化成炭	142	4.00
活性炭	140	3.96
木炭	140	0.92
ゼオライト	145	1.05
坑火石	135	1.14

3.4.2　大きさ・表面形状の影響

３種類の炭化物は，それぞれ大きさと表面形状（粉末状／細胞の痕跡）が異なっている。一方，処理水質については，有機物濃度が低下した化成炭・活性炭と，ほとんど低下しなかった木炭に分けられる。このことから，個々の資材が小さければ，表面形状によらず，ある程度の処理性能を発揮できると考えられる。

表－３は，実験終了時にトレーサ試験を行い，生物膜形成下におけるカラム内の流下時間を測定した結果である。本実験結果は全てこのような流下時間が極めて短いところでの現象であり，この結果は，例えば，水質的に大きな改善が見られなかったとしても，リアクターの流況，形式を工夫することにより，より大きな改善が望める可能性があることを示唆している。

したがって，本研究のように安価な生物膜処理法を目指す場合には，表面の加工を工夫したり特殊な材質を選んだりするよりも，適切な大きさ（砕き方）と，その適用，敷設方法を検討すべきである。

４．まとめ

本研究では，各種の微生物固定化資材に下水処理水を通水する実験から，資材の特性と処理性能との関係，ならびに有機物除去機構について検討を行った。その結果，以下のことが分かった。

1) 実験に用いた固定化資材の表面には，全体を覆う生物膜が形成されていた。その近傍には，生物膜や特定の細菌（硝化細菌）を捕食する，原生動物や微小後生動物が観察された。
2) 化成炭と活性炭を用いた生物膜処理では，溶解性有機物濃度を約 10%低減できた。一方，木炭やゼオライト，坑火石では，有機物の低減が見

られなかった。

3) このような相違は，主に資材の大きさに影響されており，表面形状の影響は小さいものと考えられた。

4) すべての固定化資材には，硝化能力を有する生物膜が形成されていた。

5) 化成炭に形成された生物膜は，*Acidobacteria* と *Bacteroidetes*（約 20%），*Nitrospira* と β-および α-*proteobacteria*（12～15%）などの細菌で構成されていた。

6) 既存の知見との比較から，生物膜を構成する細菌は，硝化（*Nitrospira*）や，代謝産物のような高分子系有機物を利用する（*Acidobacteria* と *Bacteroidetes*）といった特徴を有していた。これらは，活性汚泥法とは異なり，有機物負荷の低い環境で見られるものであった。

本研究の結果からも分かるように，現状の生物膜処理は，安価という利点の一方で，処理能力の上限という問題点も抱えている。この「上限」の理由を解明する，あるいは処理能力向上の可能性を見極めるためには，生物学的な観点から有機物の挙動を明らかにすることが重要だろう。すなわち，流入水に由来する有機物に加えて，独立栄養細菌（硝化細菌）が固定する有機物や，従属栄養細菌の産生／放出する有機物を対象に，化学的な組成と細菌群集との対応，細菌同士の有機物を介した相互作用といった機構の解明が，今後の課題として挙げられる。

謝辞

実験にあたって，霞ヶ浦流域下水道事務所（茨城県）の協力を得た。ここに記して謝意を表する。

参考文献

1) 日本下水道協会：下水試験方法（上巻），1997

2) 鈴木穣，金時浚：“下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究”，平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集，土木研究所資料 No.3917, pp.229-234，2003.

3) Barns S.M. *et al.* : “Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment”, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), pp.1731-1737, 1999.

4) Kindaichi T. *et al.* : “Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography –fluorescence in situ hybridization”, *Applied and Environmental Microbiology,* 70(3), pp.1641-1650, 2004.

5) Martiny A.C. *et al.* : “Identification of bacteria in biofilm and bulk water samples from a nonchlorinated model drinking water distribution system: detection of a large nitrite-oxidizing population associated with *Nitrospira* spp.”, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp.8611-8617, 2005.

6) Barker D.J. *et al.* : “A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems”, *Water Research*, 33(13), pp.3063-3082, 1999.

ADVANCED REMOVAL OF RESIDUAL ORGANIC MATTER IN SECONDARY EFFLUENT FOR WASTEWATER REUSE

In order to promote the reuse of effluent of wastewater treatment plant, the advanced removal of residual organic matter by biofilm was studied. Although nitrification was observed in all the reactor using some kinds of fixed media, the decrease of organic matter (TOC) was occured in the reactor using either chemo-treated or activated carbon as media. This suggests that the treatment ability depends on not the sureface characteristics but the size of media. Moreover, from the PCR-cloning analysis of the biofilm, the proliferation of phylum *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Nitrospirae* was observed. These groups are known to autotrophic bacteria (*Nitrospirae*) or heterotrophic bacteria utilizing soluble microbial products (*Acidobacteria* and *Bacteroidetes*).

Key words: secondary effluent of wastewater, residual organic matters, fixed media, biofilm, microbial community analysis

草木廃材の緑化資材としての有効利用技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究期間：平 15～平 17
担当チーム：材料地盤研究グループ(リサイクル)
研究担当者：尾崎正明、落修一、宮本綾子、牧孝憲

【要旨】

土木工事や公共緑地の管理から発生している草木廃材の資源化・利用に寄与するために、草木の発生量に係わるデータベース化の基礎的知見を得る調査をダムの流木を中心に行うとともに、資源化利用技術として、土木工事から発生する伐採・抜根材の緑化・吹付資材化、園芸資材化技術と、緑地管理由来草材の炭化技術の開発に関する研究を行った。その結果、ダムにおける流木発生現象が明らかとなるとともに、全国レベルの発生量の大要を把握できるようになった。また、木質材に爆砕を施したものは法面吹付資材化が可能であり、更に、それにコンポストを施すとピートモス代替としての園芸資材化も可能であった。草材を用いた基礎的な炭化実験から低温・短時間炭化法が有望となることが示唆された。

キーワード：草木、流木、ダム、緑化、爆砕、ピートモス、コンポスト、炭化

1. はじめに

土木工事をはじめ、道路や河川、海岸、空港、公園、ダム等の緑地管理から伐採木や抜根材、流木、刈草が大量に発生している。しかし、これらの有機質廃材のリサイクル手法は限られており、資源としての利用拡大が求められている。一方、掘削や盛土などの土木工事にともなう法面緑化工や緑地造成のために多くの有機質資材が投入されており、そこでは一部を海外天然材に依存している場合もある。

本研究は、大量に発生する草木廃材を法面緑化、緑地造成・保全のための資材化技術を開発し、地域や流域などにおける広域的な資源化・循環システムの構築に資することを目的とする。

２．研究方法

本研究では､発生する草木廃材を資源として捉え、発生量および発生形態から資源化利用に繋げるデータベース構築の基礎的知見を得るための調査を行うとともに、資源化利用技術として、土木工事から発生する伐採木や抜根材の現地における完全利用・還元を図るための緑化・吹付資材化技術および園芸資材化技術と、公園や緑地などから定期的に、恒常的に発生する除草材を対象とした炭化技術の開発に関する研究を行った。平成 17 年度は、ダム流木発生量調査を継続するとともに、緑化資材化開発のために行っている法面吹付試験フィールドの追跡調査、木質爆砕物の園芸資材化のためのコンポスト化実験および緑地除草材（雑草刈草）を対象とした大量炭化技術を開発するための基礎的な実験を行った。

３．研究結果

3.1 ダム流木発生量調査

3.1.1　調査方法

全国の貯水池に流入する流木量を把握するために、全国196箇所のダムを対象にアンケート調査を行い、平成 15 年度までの実績値に基づき流木の発生量の概略が推測できるようになった[1)]。平成16年度に大型台風の頻繁な上陸を経験したことから、このときの大規模出水時の実態を把握するために、これまでと同様の 196 箇所のダムに、上陸した 10 個の台風による流木発生量を主体としたアンケート調査を行った。また、流木発生量評価や予測の精度向上のために、ダム堆砂量との関係を調べた。

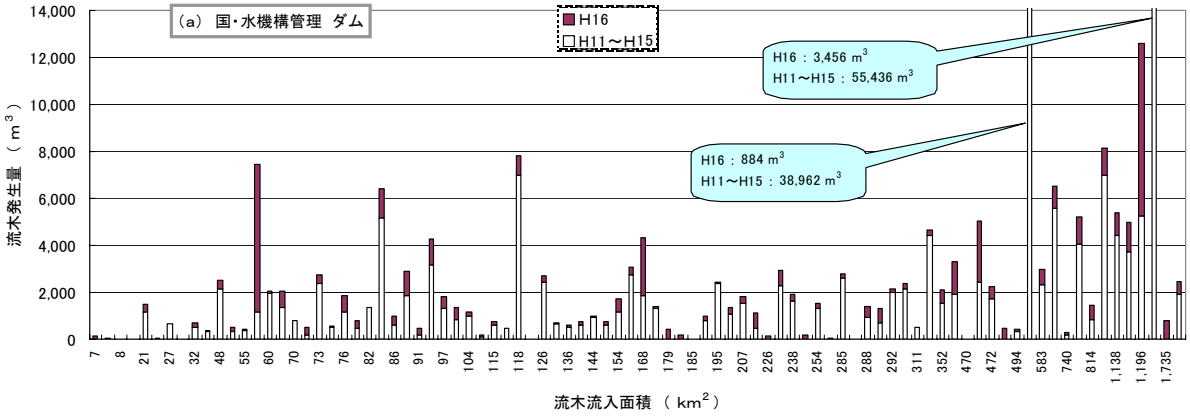
3.1.2　調査結果

1)　流木の発生量

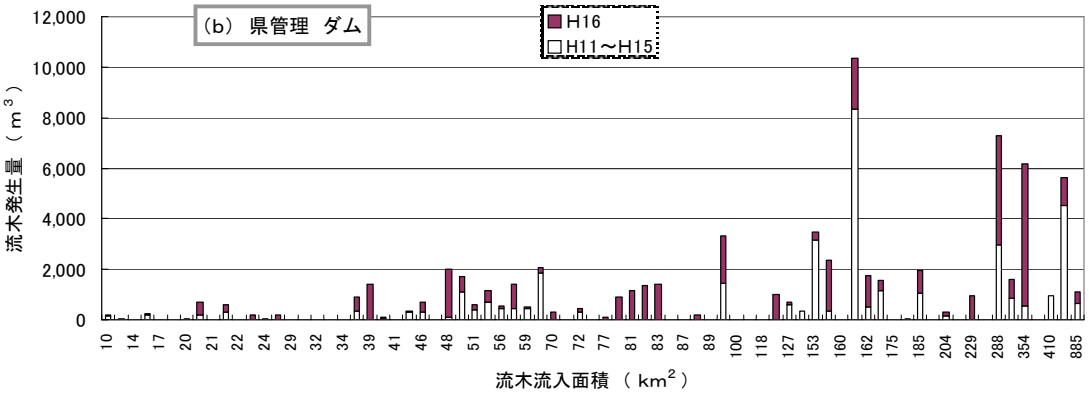
平成 15 年度より過去５年間の年度毎流木発生量と平成16年度における主に10個の台風来襲に起因する流木発生量をアンケート収集した196箇所のデータ集計値として**表－１**に示す。平成 16 年度は特異的に相当量の流木が発生していたものであり、特に台風の通り道に位置した県管理のダムでは例年にない発生量があったものである。

表－１　調査した全国 196 箇所の流木発生量実績

	調査ダム数（箇所）	全・流入面積（km²）	流木発生量（m³）（平成11年度）	（平成12年度）	（平成13年度）	（平成14年度）	（平成15年度）	（平成16年度）
国・水機構管理	99	27,419	28,895	55,796	32,722	28,206	82,954	51,727
県管理	97	10,914	10,899	4,911	9,033	5,870	8,103	36,903



図－１　流木発生量実績（その１）

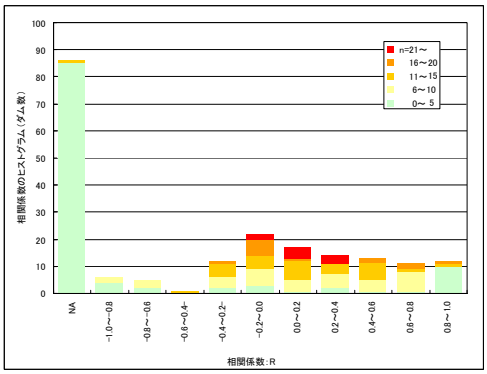


図－２　流木発生量実績（その２）

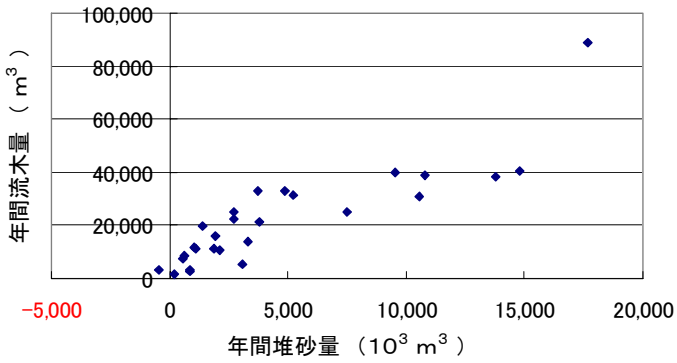
図－１と**図－２**に管理主体別に調査したダム毎の流木量データを流木流入面積基準で示した。これらから共通して言えることは、流木の発生量が流域面積のみに依存している訳ではなく、年毎の流木発生はその地域が見舞われる豪雨の影響を大きく受けていることが伺われる。各ダムにおける年度毎発生量の一律表示はデータ数が多く明瞭表示が困難であったことから過去５カ年の一括表示としたが、特筆する現象として次の２つが読み取れるものであった。１つは、これらの図中で流域・流入面積とは関係なく流木発生量が多くなっているダムの特徴は、或る年度のみの発生量が特異的に多くなってケースが多い。これは地域不特定して起こる台風や梅雨前線等による集中豪雨が大量の流木発生をもたらしていることにある。もう１つの特徴は、毎年度コンスタントな発生が見られるダムが存在することである。流木の発生現象を考えた場合、不法投棄を別として、土壌流亡や斜面崩壊に起因する倒木・流出木が大部分と考えられる。地盤が通常経験しない集中豪雨が起こす斜面崩壊は避けようもない現象であるが、少々の豪雨でも生じている土壌流出に起因して安易に生じる倒・流木現象は森林管理の不備にある。特に、この現象は次項 **2)**で触れる流砂・堆砂と強く関係していると思われ、毎年コンスタントな流木発生があるダムは、流域の地勢調査に基づく植生管理にも関与して行く必要があると思われる。

2)　流木発生量と堆砂量

流木発生とダム堆砂は、風雨や斜面崩壊などといった類似の要因によって引き起こされると考えられることから、双方には高い相関性があるものと推察



図－３　堆砂量と流木発生量における
相関係数のヒストグラム



図－４　全国 196 箇所ダム合計値による
年間堆砂総量と年間流木発生量の関係

される。個々のダム毎に流木発生量とダム堆砂量との相関係数を求めた結果の階級区分を**図－３**に示す。縦軸は各階級に属するダムの数を示し、NA は有効サンプル数の不足などにより相関係数算定ができなかったことを示す。本解析では 80 を超えるダムが算定不能であった。また、相関係数の階級区分のピークが 0 付近にあり、相関性が見出せないケースが多かった。しかし、結果は、有力な相関性を示す事例も相当数存在することを示しており、現象解明に繋がる可能性が高い。

図－４は、昭和 53 年度から平成 16 年度の間の各年度における 196 箇所の全てのダムの堆砂量と流木流入量の合計値を求め、全国総計をベースにした双方の関係を示したものである。結果は、相当に高い相関を示し、全国レベルで見た場合、堆砂量と流木の発生量は一体として捉えるべき事象であることを示している。

これらを踏まえ、今後より精度の高いデータを得るために以下の項目を検討していく必要がある。

ⅰ）　降雨データの収集
ⅱ）　森林施業状況と流木発生量の関連性
ⅲ）　森林の健全性と流木発生量の関連性
ⅳ）　ダム流域に関する GIS データ作成
ⅴ）　流木計測方法の検討
ⅵ）　流木利活用に関するガイドラインの作成
ⅶ）　流木インベントリーの整備
ⅷ）　近接ダムとの連携による効率的な利用の可能性検討
ⅸ）　地域の需要ポテンシャルマップの作成

これらは、ⅰ）～ⅴ）をより詳細に調査、充実することにより流木発生要因を明らかにすることができる。また、ⅵ）とⅶ）によって流木利用者側へ有用な情報を提供することができ、流木利用が促進されると考えられる。更に、ⅷ）とⅸ）により効率的な流木の利用、需要の喚起が期待できる。

表－２　吹付・緑化試験の配合

		広葉樹爆砕物(L)	バーク堆肥(L)	接合剤 (kg)	肥料 (L)	中和資材 (kg)
爆砕試験区	爆3	510	1,190	0.85	170	0.85
	爆3中多	510	1,190	0.85	170	2.55
	爆5	850	850	0.85	170	0.85
	爆7	1,190	510	0.85	170	0.85
対照区		未分解木質チップ 1,700 L		0.85	170	－
標準区		－	1,700	0.85	170	－

仕上がり 1 m³あたり（圧密量は59 %とした）

ダム管理において流木は招かざるものである。しかし、過去の多くの事例が示しているように、ダムが大量の倒木流出から下流域の社会資本はじめ社会活動を守っているのは事実である。これからは、発生する流木の資源化利用を図りつつ、流域の森林管理の在り方までに関与し、その発生抑制策を土砂流亡と合わせて追求して行く必要がある。

3.2 緑化・園芸資材の開発

3.2.1　木質爆砕物を用いた法面緑化の植生追跡調査

これまでの研究[2)、3)]から、木質材は爆砕処理の強度（温度、圧力、蒸煮時間）を調節することによりピートモスと類似した性状に改質できることが示され、平成 16 年 3 月には、当研究所内の盛土法面において広葉樹爆砕物を法面緑化資材とした**表－２**に示す配合による吹付・緑化試験を開始した。この試験フィールドにおいて、木質爆砕物を用いた法面緑化技術を確立するための植生の追跡調査を行った。

各試験区生育基盤の pH およびフェノール性物質量の経時変化を**図－５**および**図－６**に示す。造成初期は、中和資材の添加によってアルカリ性を呈していたが、降雨による溶脱等の影響により pH 7 近傍まで低下した。電気伝導率も同様に中和資材や肥効

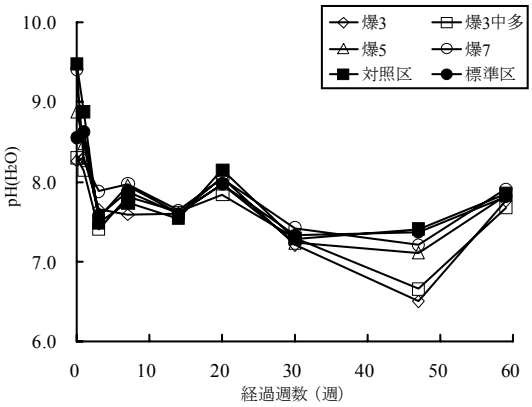
成分などが溶脱したため低下し、同様に発芽・生育阻害物質であるフェノール性物質および有機酸も施工後 20 週までに大きく減少した。これには、微生物による分解も大きく関与しているものと思われる。

施工後20ヵ月の試験区の全景を**写真－１**に示す。爆砕試験区および対照区では、施工直後には導入した緑化草本植物が発芽・生育していたが、徐々に枯死した。これは、造成初期に多量に含有していた発芽･生育阻害物質が影響していたためと考えられる。一方、発芽・生育阻害物質含有量が少ない標準区では、導入した緑化草本植物の生育は良好に推移し、それによって 90 %以上の全体被覆率を示した。

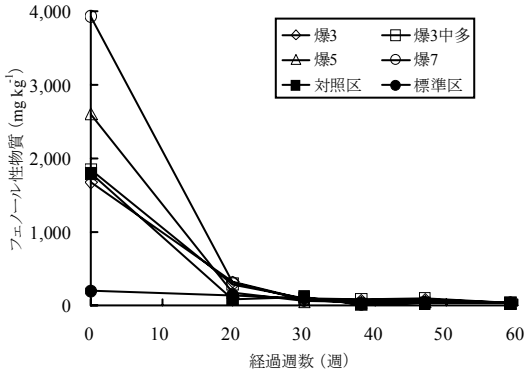
爆砕試験区および対照区では、導入した緑化草本植物の発芽・生育による十分な法面の被覆はみられなかったが、その空間に周辺環境から侵入・定着した植物が観察され、それらによって法面は十分に緑化された。外部から定着した植物は主にイネ科植物やキク科植物の 10 種程度の草本植物であり、それらによる被覆率は全体被覆率の約 9 割を占めていた。一方､標準区では侵入植物は殆ど観察されなかった。本試験でも観察されたように、有機質系植生基材吹付工は、生育の早い緑化草本植物を導入することで急速緑化を可能にしている。一方で、導入した緑化草本植物による植生、すなわち一次植生が持続して植生遷移が停滞する問題が以前から指摘されている。爆砕試験区では、多量の発芽・生育阻害物質が含有されていたために導入した緑化草本植物による十分な緑化は達成できなかったが、それらの物質は造成後のすみやかな分解・溶脱により生育基盤環境が改善されたと評価できる。そこに周辺からの侵入草本植物が定着したことを考えると、爆砕試験区および対照区では今後、遅滞なく適切な植生遷移が進行すると推察される。

図－７は、苗木によって導入したアカメガシワの樹高の経時変化である。爆砕試験区および対照区では良好な生育が観察されたが、標準区では大きな生育はみられなかった。ヤマハギも同様に標準区では生育が劣っていた。これらは、植物種の特性によって最適な生育環境が異なることに起因すると考えられる。一般に、木本植物は緑化草本植物より貧栄養環境に生育すると考えられ、二見ら[4] も未分解木質チップを用いた法面緑化において同様の調査報告をしている。

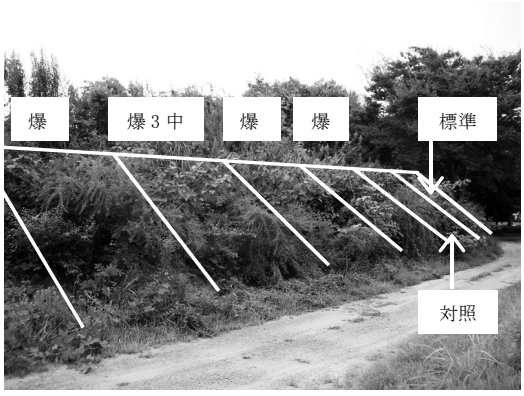
以上の結果から､木質爆砕物を用いた法面緑化は、緑化草本植物による急速緑化は困難であるが、貧栄



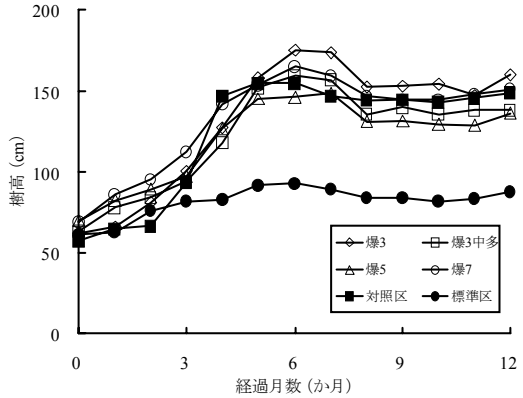
図－５　生育基盤の pH（H_2O）の経時変化



図－６　生育基盤のフェノール性物質量の経時変化



写真－１　施工後２０ヶ月目の全景



図－７　アカメガシワ樹高の経時変化

養であるため木本植物の生育には適しており、山中で多く実施される法面緑化工の特徴を考慮すれば、周辺環境に調和した緑化が期待できると考えられる。また、周辺からの侵入植物および木本植物によって植生が成立するまでには時間を要するが、木質爆砕物によって造成された生育基盤は、十分な耐侵食性能を有していることから造成法面の侵食・流亡は回避できると考えられる。

本研究によって、木質爆砕物の有効利用はピートモスの採取および廃木材の最終処分による環境負荷の軽減、すなわちリサイクルや省資源の面で効果的である可能性が示唆された。今後は、法面緑化工が本来の植物群落の植生となるまでに一般的に最低でも５，６年を必要とするため、さらに継続した追跡調査を行い評価していく必要がある。

3.2.2　木質爆砕物コンポスト化実験

1)　実験方法

本研究により、木質に爆砕処理を施すと爆砕物中に酸性物質や植物の発芽・生育阻害物質が生成されることが分かっている。このために、天然資材であるピートモスの代替品としての木質爆砕物の園芸資材化を目指したコンポスト化実験を行った。

実験は、原料に針葉樹と広葉樹爆砕物を、中和資材に炭酸カルシウムを、また、事前に作製した種コンポストを用いて内径 30 cm、高さ 85 cm の塩化ビニル製発酵カラムに仕込み 35℃の恒温室において行った。実験は、醗酵温度の低下、安定が認められた 14 日間行った。また、そこから得られたコンポストは樹木種子の発芽試験に供した。

発芽試験には、ヤマハギ、コマツナギ、ヌルデ、アキグミ、アカメガシワ、コナラ、ネズミモチ、シャリンバイ、シラカシおよびアラカシを用いた。コンポスト化前後の試料をそれぞれ 30 cm×40 cm のプラスティック製バットに敷き均し、各供試植物を 20 粒ずつ播種、室内に静置した。対照区にはバーク堆肥を用いた。散水は試料の乾燥の程度によって適宜おこなった。試験は平成 16 年 12 月より開始した。

2)　実験結果

シャリンバイの発芽･生育状況を**写真－２**に示す。シャリンバイでは、コンポスト化を実施することで対照区とほぼ同等の発芽・生育が可能となった。一方で、本実験結果は植物種間の差異が大きく、例えば養分要求性の低い植物では対照区と比べコンポスト区の方が発芽・生育率が高く、また、本来発芽率が低い植物ではコンポスト区、対照区ともに発芽率

写真－２　シャリンバイの発芽・生育状況
（左：コンポスト化区、右：対照区）

が低い結果もみられた。しかしながら、概してコンポスト化を実施することで、供試植物の発芽・生育は改善する傾向が認められた。

以上の結果から、木質爆砕物はコンポスト化過程を経ることで植物生育が改善されることが示されたことから、木質爆砕物はコンポスト化を施すことによりピートモスの代替物としての園芸資材化が可能となることが分かった。

3.3 草類炭化技術の開発

緑地管理の除草から発生する雑草刈草の中には、収集前の飛散を回避するために、発生場所での自然乾燥（風乾）ができない現場もある。この場合、収集される刈草は生材であることから、それを利用するにしても、それまでの間に大量に堆積貯蔵することは、腐敗進行や乾燥が中途に進んだものでは醗酵が生じて発酵熱火災の可能性もあることから生草は大量貯蔵に向かない性状である。この生の草材を効果的に資源化利用に繋げるためには、一時的に大量発生する生草を生物学的に短期間に安定化させる必要がある。さらに、その安定化されたものが直ちに利用できる形態であれば最も望ましい資源化技術である。

本研究では生草の望ましい資源化技術は炭化にあると考えている。発生、生産される地域の地勢条件により、得られる炭化物は有用な資材として農地利用初め燃料利用、発電利用、工業利用など様々な利用形態が考えられることから、用途を特別に開発、追究する必要がない。ここで重要なことは、これまでに困難視されてきた草材の炭化、中でも大量炭化技術を開発することである。このために、草材の大

量炭化を目指した基礎的な実験を行った。

3.3.1　実験方法

実験は、幅 500 mm×高さ 1,200 mm×長さ 1,200 mm の容積を有する熱風炉に、内径 400 mm×高さ 400 mm の 50 L 容のステンレス容器内に試料を密封してセットし、間接加熱方式による炭化の実験を行った。熱風には灯油バーナーを用い、炉内空間温度を制御する方式を取った。試料には所内雑草管理から発生した除草干草（含水率：8.3 %）と、つくば市内で発生したモミガラ（含水率：9.2 %）と街路樹管理発生材をチップ化して更に摩砕したもの（含水率：25.1 %）を用いた。干草は 50 L 容器に揺るく 0.4 kg の重量を詰めるケースと密に 1.75 kg の重量を詰めるケースを設定した。実験外観を**写真－３**に示す。

これら４種類の試料の炭化は、**表－３**に示す炭化条件で全 56 ケース行った。表中の炭化時間で〔容器中心到達まで〕とあるのは容器中心部の温度が設定温度に到達するまでの時間を意味している。炭化の排ガスラインは間接水冷により排出液を回収するとともに、排ガスコンポジット試料の成分分析を行った。また、炭化物は元素分析の他に、炭化試料に水を重量比 1:10 で加え撹拌（120 rpm－1 hr(20℃)）した水抽出液の分析も行った。

3.3.2　研究結果

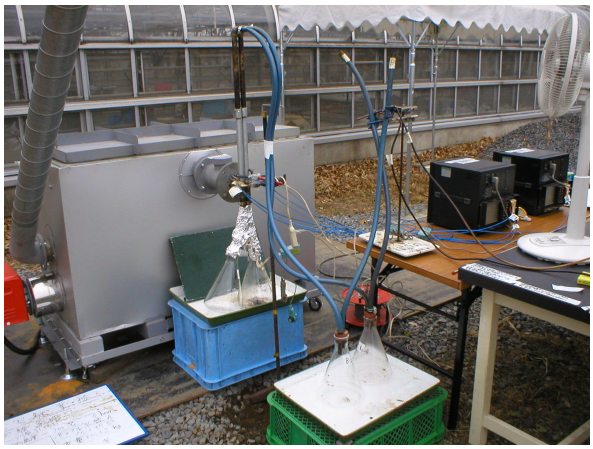
1)　観察

得られた炭化物は、含水率が低かった干草やモミガラのケースは、低温－短時間の処理でも良好に黒色に呈色し、さらに炭化時間が増す毎に形状保持強度（パリパリ感）が増し手揉みにより容易に（心地よくサクサクと）崩れ易くなった。同じ干草の間では密詰めのケースでは中心部まで均一に黒色を呈するまでに熱伝導の関係から揺る詰めのケースよりも時間を要した。摩砕木質のケースでは、他のケースよりも更に時間を要し、その原因は含有水分の排除に多くを要することにあった。

2)　排ガス

炭化の過程で排ガス中から回収された液量の結果を**図－８**に示す。炭化温度や炭化時間と排出液量の間には有意な関係は見出せず、本実験に用いた試料性状では 200～400 mL／kg－原料の範囲にあった。なお、一般的な傾向として高温条件で炭化するほどに排出液中にタール状質が多く含まれるようになった。

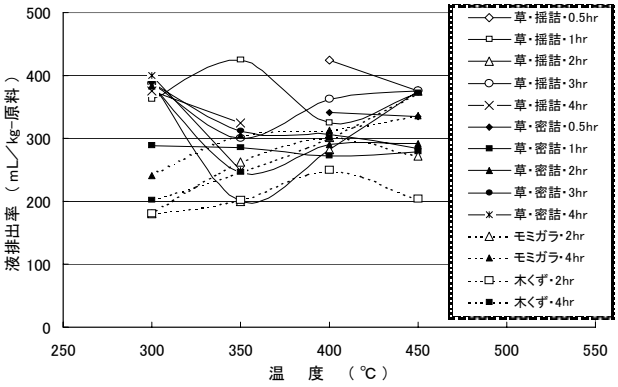
排ガス成分の分析からは可燃性ガスとして水素や



写真－３　炭化実験装置の外観

表－３　炭化実験条件

原　料	炭化条件〔温度〕×〔時間〕
干草・揺詰め 干草・密詰め	〔300℃〕×〔1hr, 2hr, 3hr, 4hr〕 〔350℃〕×〔1hr, 2hr, 3hr, 4hr〕 〔400℃〕×〔0.5hr, 1hr, 2hr, 3hr〕 〔450℃〕×〔0.5hr, 1hr, 2hr, 3hr〕
モミガラ 摩砕木質	〔300℃〕×〔2hr, 4hr, 容器中心到達まで〕 〔350℃〕×〔2hr, 4hr, 容器中心到達まで〕 〔400℃〕×〔2hr, 4hr, 容器中心到達まで〕 〔450℃〕×〔2hr, 4hr, 容器中心到達まで〕



図－８　排ガスから回収された液量の分布

一酸化炭素、メタンが検出された。エタンやプロパンは検出されなかった。水素とメタンの発生は少ないものであったが、一酸化炭素は比較的高濃度に検出された。また、メタンについては摩砕木質を高温炭化したケースで高濃度化する傾向にあった。

3)　炭化物

炭化前後の固形物量変化から固形物の残存率を求めて**図－９**に示した。炭化温度と固形物残存率の関係には原料毎に異なる明瞭な関係が現れた。本研究目的は草材の炭化を資源量回収技術と位置付けることから、固形物残存率は高いほど良い。残存率＝１

は炭化していない状態に近いと言え、炭化の進行があったことを認めるためには、幾分かの固形物減少が生じている必要がある。前 1)項での観察結果をも考慮すると、モミガラ炭化のケースが参考となり、固形物残存率を 0.8 以上、可能ならば 0.9 前後を草材の炭化技術開発の目標に置くのが妥当と思われる。これに基づくと、干草原料のケースは、実験した 300 ℃よりも更に低い炭化温度が実用的との傾向を示しており、炭化時間そのものも低い炭化温度のもとで、１時間以内の短時間炭化が可能となる可能性が高い。

炭化物の水抽出液の分析からは、pH は干草系では 9.1～10.9 と平均的であるのに対して、モミガラと摩砕木質の系では高温炭化となるほどにそれぞれ 4.1～10.9、4.3～10.5 と上昇する傾向を示した。電気伝導度は炭化条件により大きく変わらず、干草系:1.4～2.4 mS/cm、モミガラ系:0.37～0.82 mS/cm、摩砕木質系：0.31～0.93 mS/cm であった。TOC と Mg^{2+}、Ca^{2+}はいずれの原料でも高温炭化となるほど減少した。PO_4^{3-}と NH_4^+および K^+は高温炭化となるほどに干草系では増加し、逆にモミガラ系と摩砕木質系では減少した。

４．まとめ

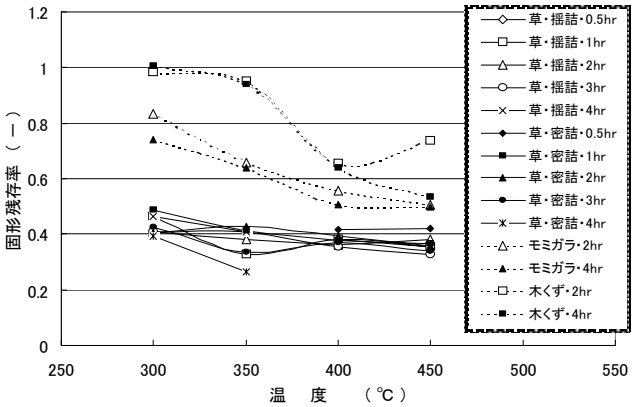
本研究では、全国のダムからの流木発生量を把握するためのアンケート調査、木質爆砕物の法面緑化資材への適用試験、木質爆砕物を園芸資材として利用するためにコンポスト化実験および草類を対象とした炭化実験を行い、以下の結果を得た。

1) 台風が上陸最多記録を更新した平成 16 年における全国のダム流木発生量を調査したところ、平成 15 年までの平年と比較してより多くの流木が発生していた。さらに過去の流木の大量発生も台風や梅雨前線等により起こる地域的、年次的な特異現象と認められた。

2) 過去の流木発生量からは、毎年コンスタントに比較的多くの発生があるダムも存在した。これらは流域の地勢や植生の管理に影響される土壌流亡による倒・流木発生にあると思われた。

3) 流木発生量と堆砂量との関係を調べたところ、各ダムで生じていたそれぞれの総量の間には良好な相関関係が認められ、ダム管理における流域の土砂流出対策と流木発生抑制対策は共通しているものである。

4) 木質爆砕物を法面緑化資材に適用すると、人為的に導入した緑化草本植物の発芽・生育は良好ではなかったが、それらによる土壌表面が被覆されなかったために、その表面空間に周辺環境より自生の草本植物種子の侵入・定着が可能となっていた。また、貧栄養の生育基盤であるために、導入した木本植物の発芽・生育は良好であった。中和資材を一定量添加し、木質爆砕物配合比率が 3～7 割程度であれば周辺環境に調和した緑化が達成できると思われた。



図－９　炭化温度と固形物残存率

5) 発芽・生育阻害物質を生じる木質の爆砕にかんして、その爆砕物にコンポスト化を施した、木本植物の発芽・生育実験をおこなったところ、植物の発芽・生育障害を軽減でき、木質爆砕物はピートモス代替の園芸資材化が可能と思われた。

6) 炭化実験からは原料の含水率が低い場合は短時間での炭化が可能であったが、含水率が高い場合は水分排除に時間を要した。また、炭化過程で排出される液量は 200～400 mL／kg－原料の範囲にあった。

7) 生草材の炭化による資源回収を目指す場合、炭化物の固形残存率：0.9 を目標とすることが妥当と思われ、それを達成する炭化温度は実験で実施した 300℃よりも更に低い領域にあり、且つ炭化時間も１時間以内が可能となる可能性が示された。

謝　辞

本研究では、財団法人ダム水源地環境整備センター初め東興建設株式会社、日本植生株式会社、ライト工業株式会社、つくば市、JA つくば市桜支所並びにつくば市内公園緑地管理企業・団体の協力を得た。ここに記して関係者の皆様に感謝の意を表します。

参考文献

1) 国土交通省国土技術政策総合研究所 独立行政法人土木研究所：国土技術政策総合研究所資料 土木研究所資料 平成 16 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.183-188、2005

2) 宮本綾子、根本健児、舛田智江、高橋徳、牧孝憲、落修一：草木廃材を用いた吹付緑化資材の開発、土木技術資料、Vol.47、No.2、pp.28-33、2005

3) 独立行政法人土木研究所：土木研究所資料 平成 16 年度交流研究員報告書概要版、pp.29-32、2005

4) 二見肇彦ら：未分解チップを有効利用した生育基盤材による自然回復手法について、日本緑化工学会誌、29(1)、pp.185-188、2003

アジア･モンスーン地域の下水処理施設における病原微生物の消長に関する研究

独立行政法人　土木研究所
尾﨑正明、諏訪 守、陶山 明子

１．要約

発展途上国では、一般的にラグーンにより下水処理が行われている。本研究では、アジア・モンスーン地域に属するタイにおいて、下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。タイでの調査は、コンケンおよびバンコクのアジア工科大学（AIT）に隣接するラグーンを対象としたが、16 年度の報告データが限られたものであったため、17 年 3 月までのデータを補完した。また、コンケンではラグーンに流入する都市河川において、降雨時の汚濁負荷上昇時に実態調査を行い病原微生物の汚濁状況を把握した。

コンケンと AIT では下水の排除方式が異なることから、各々流入下水中の病原微生物の濃度に違いが見られた。15 年度に沖縄県で行ったラグーンの調査結果と比較すると、特に AIT の流入下水ではジアルジアのシスト濃度、ノロウイルス濃度は 2～3 オーダー高かった。クリプトスポリジウムは検出割合は比較的高いが、検出濃度はジアルジアに比較して低濃度であった。コンケンの流入下水の病原微生物濃度は AIT と比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県の流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は 2 オーダー高かった。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった。ラグーンによる各々の病原微生物の除去率は 1log 程度から 3log 以上の平均除去率が得られているが、大腸菌群、ジアルジアの除去率に比較してウイルス除去率の変動は比較的大きかった。

コンケンの都市河川における調査結果では、降雨時の汚濁負荷上昇時においてノロウイルスは雨水により希釈され検出濃度・割合は低下したが、ジアルジアはその傾向は明らかでなかった。

２．研究目的

アジア・モンスーン都市部においても都市化の進展、人口集中などに伴いヒトからの排泄物により、病原微生物の汚染による水環境の悪化が懸念されている。水環境の改善、水資源の確保は重要であり、下水道整備によりその対応を講ずることが望まれる。発展途上国では一般的にラグーンなどにより下水処理が行われているが、処理方法や放流水系状況の違いによって病原微生物の消長は変化するものと考えられ、水環境の改善、水資源の確保の観点からその実態を解明する必要がある。

本研究の目的は、病原微生物を細菌、原虫、ウイルスに分類し、各々の分類毎に指標となる微生物の評価を行い実態を把握するとともに、ラグーン施設の運転条件が病原微生物の除去に及ぼす影響を調査し、水系での消長を解明するものである。

３．研究計画

15 年度は、沖縄県のラグーン実験施設において、降雨、流出 SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響を把握するとともに、植生浄化法による病原微生物の消長を調査した。

16 年度は、アジア・モンスーン地域に属するタイのバンコクとコンケンにおいて、流入下水の病原微生物の実態やラグーンにおける消長調査を実施した。

17 年度は、上記調査の 16 年度の報告データが限られたものであったため、17 年 3 月までのデータを補完した。また、コンケンの下水道システムは合流式で雨季に下水の量が増加しラグーンの容量を超えた場合には、その越流水が河川に直接放流されるため、雨季における市街地河川の病原微生物調査は重要であると考えられる。この

ため、コンケンではラグーンに流入する都市河川において、降雨時の汚濁負荷上昇時に実態調査を行い病原微生物の汚濁状況を把握した。

18 年度は、コンケンの各家庭に設置されているセプティクタンクなどが病原微生物の流出抑制に果たす効果などを把握するとともに、各年度に実施した調査結果についてとりまとめる予定である。

４．研究方法および対象微生物

本研究では、アジア・モンスーン地域に属するタイにおける下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。タイでの調査は、コンケンおよびバンコクのアジア工科大学（AIT）に隣接するラグーンを対象とした。コンケンは個々の家庭でセプティプタンクあるいは浸透式トイレが設置されており、その上澄流出水や家庭雑排水がラグーンに流入するものと考えられる。AIT では水洗トイレにより下水はラグーンに排出される。各々のラグーン施設の概要を図－１、2 に示す。コンケンは 3 池の

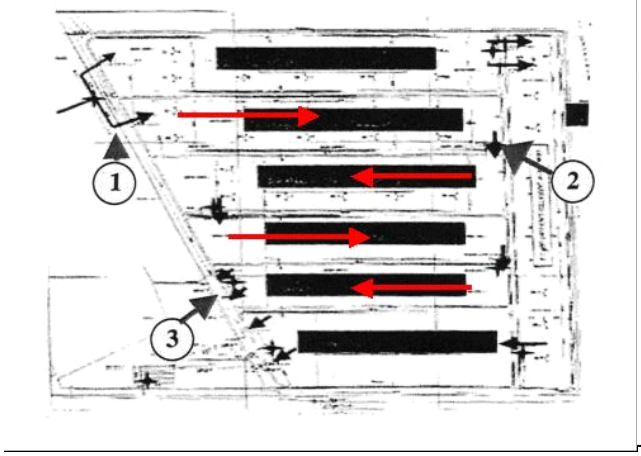


図-1 コンケンのラグーン施設
(1:流入下水，2:第 2 池流出水，3:第 3 池流出水)

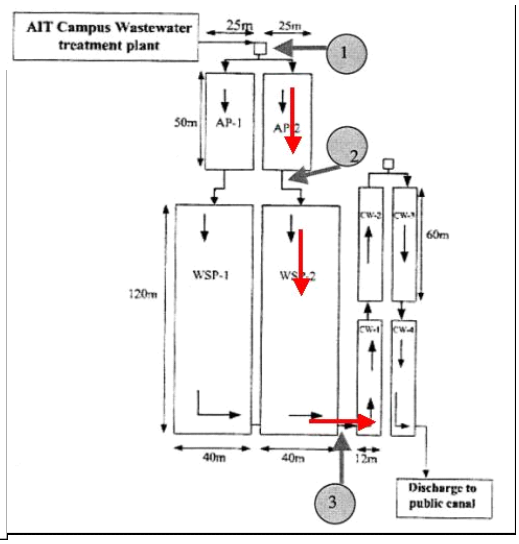
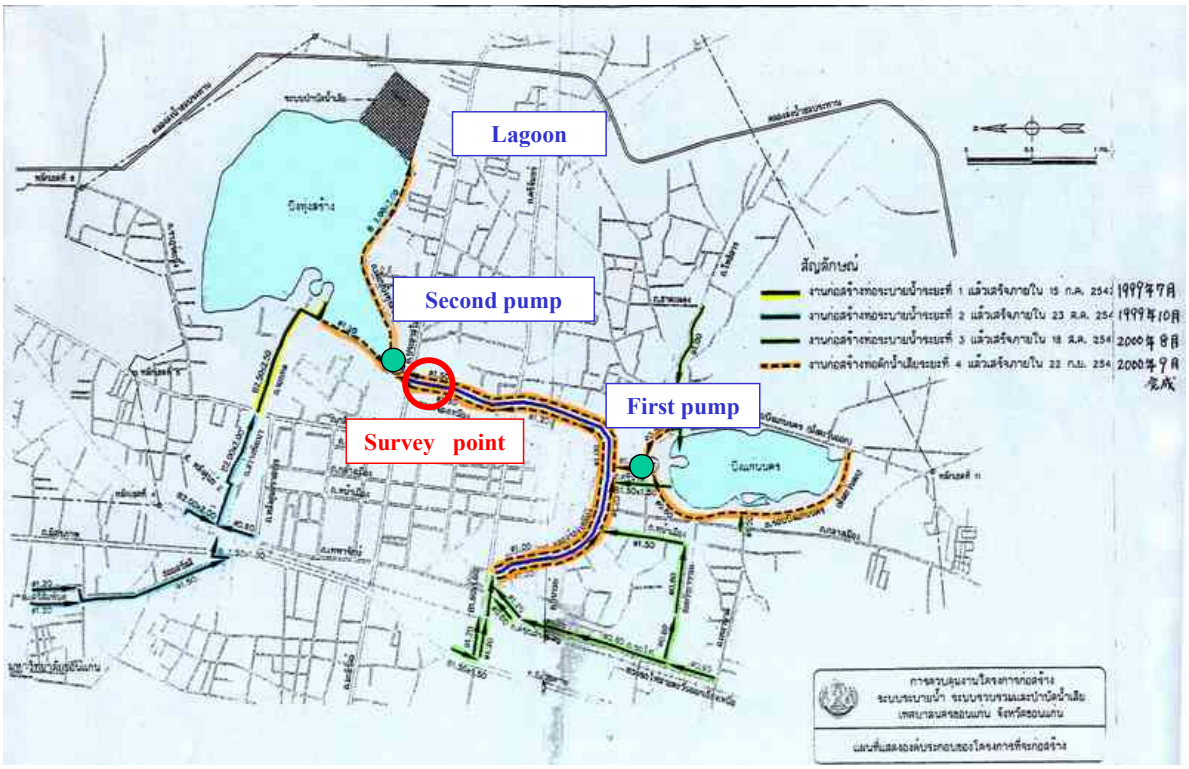


図-2　AIT のラグーン施設
(1:流入下水，2:第 1 池流出水，3:第 2 池流出水)

ラグーンから構成されており、第 2 池で間欠曝気を行い、総容量は 46,000m^3、平均水深は 2m である。AIT は 2 池のラグーンから構成されており、容量は 2,125m^3、3,360m^3、水深は 1.7m、0.7m である。AIT では流入下水、第 1、2 池流出水、コンケンでは流入下水、第 2、3 池流出水の各々3 試料について月 1 回程度の採水を行った。分析対象とした病原微生物は大腸菌群数、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ノロウイルスとした。

コンケンの都市河川における実態調査箇所の概略を図－3 に示す。降雨時の越流水が河川に流入する複数地点の最終位置で採水を行った。降雨時の汚濁負荷上昇時に 4 回、比較対照として晴天時に 3 回の採水を行った。試料の分析検体数は雨天時調査 22 検体、晴天時 15 検体とし、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ノロウイルスの他に濁度、河川流量の測定を行った。

各調査で分析対象とした病原微生物の測定法を以下に示す。大腸菌群数法は、MPN 法あるいは平板培養法とした。原虫類のジアルジア、クリプトスポリジウムは試料を遠心濃縮、免疫磁気ビーズによる分離の後、間接蛍光抗体染色による顕微鏡観察とした。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC－コンボキット、間接



図－３　コンケンの都市河川の調査地点

蛍光抗体染色には HYDORO-FLUOR-Combo キット、ENSYS INC.を用いた。ウイルスの濃縮法は、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によるもので、試料中に PEG6000（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、10,000×ｇ、30 分間遠心分離して沈査を回収した。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。濃縮液中のウイルスは、リアルタイム PCR 法により定量を行った。また、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[1, 2] G２型[1, 2] 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。ウイルス遺伝子の抽出は、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とした。抽出した 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。上記で抽出したウイルス RNA 試料 1μg をランダムプライマー、Omniscript RT Kit（QIAGEN 社）を用い全量 20μl の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2μl をリアルタイム PCR に供した。使用したプライマーおよびプローブを表－1 に示した。

ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」に準じた。リアルタイム PCR は QuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN 社）を用い、リアルタイム PCR 装置は LightCycler（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を使用した。

表－１　使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ノロウイルス	G1 型	COG1F	COG1R	RING1-TP(a) RING1-TP(b)
	G2 型	COG2F	COG2R ALFP	RING2AL-TP

５．研究結果および考察

調査結果を表－2、3 および図－4～6 に示す。各々コンケンと AIT において下水の排除方式が異なることから流入下水の病原微生物の濃度に大きな違いが見られた。特に AIT の流入下水ではジアルジアのシスト濃度の最大検出濃度は 1.8×10^{4}（cysts／L）、ノロウイルス（G1 型）濃度は 1.8×10^{7}（copies／L）となっており、15 年度に行った沖縄県でのラグーンの調査結果との比較となるが、その流入下水と比較すると 2～3 オーダー高い。大

表－２　各病原微生物の検出濃度範囲と除去率

地点＼微生物		大腸菌群 (cfu or MPN/ml)	ノロウイルスG1 (copies/L)	ノロウイルスG2 (copies/L)	ジアルジア (cysts/L)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)
記載データ		H16.6月～H17.2,3月	H16.6月～H17.3月		H16.6月～H17.3月	
コンケン	流入下水	4.4E+2～2.3E+5	8.6E+3～9.7E+5	4.1E+2～1.6E+5	ND～1.5E+2〔13/16〕	ND〔0/16〕
	第2池流出水	4.0E+1～3.0E+4	ND～1.7E+4	ND～1.7E+4	ND～2.2E+1〔4/16〕	ND〔0/16〕
	第3池流出水	3.8E+1～2.2E+4	ND～6.9E+3	ND～1.0E+4	ND～1.0E+0〔1/16〕	ND〔0/16〕
	除去率の範囲(%)	0～99.6	82.4～100	0～100	99.3～100	—
	平均除去率(%)	83.2	95.2	89.0	99.9	—
AIT	流入下水	2.1E+4～9.0E+6	2.7E+4～1.8E+7	1.1E+4～2.0E+6	2.6E+2～1.8E+4〔21/21〕	ND～1.6E+1〔14/21〕
	第1池流出水	4.6E+3～1.6E+6	6.2E+4～2.2E+6	1.3E+4～1.3E+6	1.1E+1～4.1E+2〔13/13〕	ND～2.0E+0〔2/13〕
	第2池流出水	7.0E+1～5.0E+3	3.6E+1～4.2E+5	ND～6.0E+4	ND～5.6E+1〔20/21〕	ND〔0/21〕
	除去率の範囲(%)	98.1～99.9	0～99.9	56.2～100	94.6～100	100
	平均除去率(%)	99.6	74.1	92.1	99.4	100

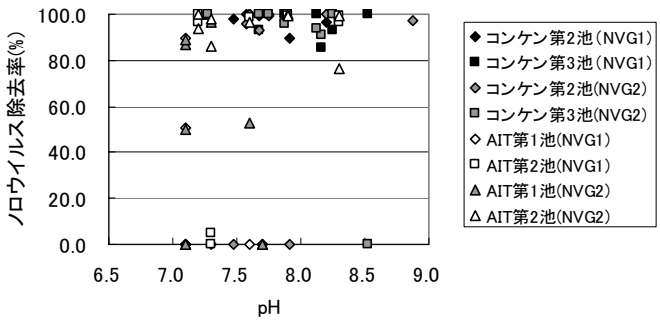
原虫類の欄〔　〕内：下段検体数，上段検出検体数

表－３　コンケンの都市河川の調査結果

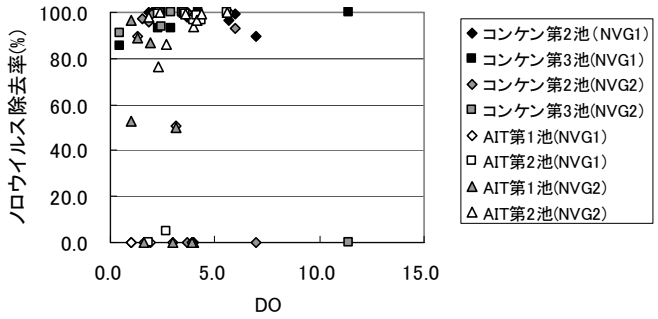
各調査時の平均流量範囲(m³/s)＼項目		大腸菌 (MPN/100 ml)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)	ジアルジア (cysts/L)	ノロウイルス G1 (copies/L)	ノロウイルス G2 (copies/L)
降雨時流量 1.6～12.6	検出濃度範囲	5.1E+3～3.5E+4	ND	5.0E+0～2.0E+2	1.6E+2	5.3E+2
	検出／分析検体数	10/10	0/22	10/22	1/22	1/22
晴天時流量 0.32～1.56	検出濃度範囲	1.2E+3～9.2E+5	ND	2.0E+0～2.6E+1	4.6E+2～9.3E+2	1.3E+2～1.1E+4
	検出／分析検体数	10/10	0/15	11/15	2/15	15/15

腸菌群の濃度レベルは同程度であった。クリプトスポリジウムは我が国の流入下水での調査結果[3)]と比較すると検出割合は比較的高かったが、検出濃度は同レベルであった。コンケンの流入下水の病原微生物濃度は AIT と比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県でのラグーンの流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は 2 オーダー高い。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった。

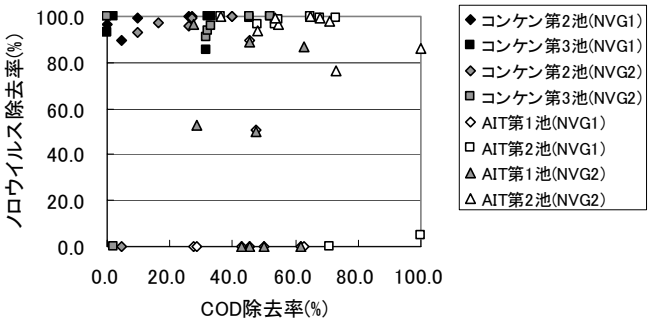
環境水に大きな影響を及ぼすと考えられるラグーン処理水の病原微生物濃度は各々低レベルとなっている。ラグーンによって各病原微生物とも 1log 程度から 3log 以上の平均除去率が得られており、ラグーンの滞留時間が 10 日間での沖縄県で行った調査結果と比較すると大腸菌群、ジアルジアの除去率は高い。除去率が高い要因はラグーンの配置が多段であることや、推定ではあるが滞留時間が異なることに起因するものと考えられる。しかし、ノロウイルスの除去率に関しては比較的大きな変動を示した。ラグーン内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告[4)]があることから、ウイルス除去率と溶存酸素濃度や他の水質項目との関係を整理したが、有意な相関関係は見られなかった（図－4～6）。



図－4　pH とノロウイルス除去率の関係



図－5　DO とノロウイルス除去率の関係



図－6　COD 除去率とノロウイルス除去率の関係

コンケンの都市河川での実態調査結果について表－3 に示す。調査は 17 年 8 月～9 月の間の降雨時に 4 回、晴天時に 3 回実施した。降雨時にノロウイルスの検出濃度・割合は低下しており、雨水により希釈されるものと考えられた。また、大腸菌に関しても降雨時には最大検出濃度は晴天時に比較して低くなっている。しかし、ジアルジアについては検出濃度は、晴天時に比較して最大濃度は 10 倍程度となっており、ノロウイルスとの傾向とは異なるものがあった。今後、これらの違いについてデータの蓄積を図り、解明を行なう必要があろう。

６．おわりに

17 年度は、16 年度にタイのコンケンおよびバンコク（AIT）で行った実態調査の報告データが限られたものであったため、17 年 3 月までのデータを補完した。また、コンケンではラグーンに流入する都市河川において、降雨時の汚濁負荷上昇時に実態調査を行い病原微生物の汚濁状況を把握した。

その結果、各々コンケンと AIT において下水の排除方式が異なることから、流入下水の病原微生物濃度に大きな違いが見られた。ラグーンによる病原微生物の除去では、大腸菌群、原虫類に比較してウイルス除去率の変動は比較的大きかった。放流先の水質リスクを低減させるために、除去率の変動要因を解明するとともに、安定した除去を行うための対策を講じる必要があるものと考えられた。

また、降雨時の汚濁負荷上昇時においてノロウイルスは雨水により希釈され検出濃度・割合は低下したが、ジアルジアはその傾向は明らかでなかった。

本実態調査は、アジア工科大学のシピン博士、コンケン大学のパイラヤ博士と共同で実施した。

なお、本研究は文部科学省による人・自然・地球共生プロジェクト「アジアモンスーン地域における水資源の安全性に関わるリスクマネジメントシステムの構築」により実施されたものである。

参考文献

１）篠原美千代,影山努（2002)蛍光プローブを用いた RT-PCR 法 日本臨床,60(6),1181-1187.
２）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,18 (1) 42-49.
３） M.Suwa,Y.Suzuki(2001)Occurrence of *Cryptosporidium* in Japan and countermeasures in wastewater treatment plants, *Water Science and Technology*, 43(12),183-186.
4）大垣眞一郎,アウラピン・ケラタナク,ウタイパン・プラセソム(1986)　酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響,衛生工学研究論文集,22,163-172.

水環境中における薬剤耐性菌の実態に関する研究

リサイクルチーム　上席研究員　尾崎正明
主任研究員　諏訪　守

１．はじめに

我が国でも抗生物質の多量使用により薬剤耐性菌が発生し、病院内などを中心に感染事例が多く報告されており社会問題となっている。またヒトが服用した抗生物質は最終的には体外へ排出されることから、下水処理場などを経て環境水中に放流される。現在、下水処理場や環境水中において、これら抗生物質や薬剤耐性菌などの調査、研究が徐々に行われてきている[1）2）3）4）5)]。下水道の普及率も向上し環境水中に占める下水処理水の割合も向上しているため、下水処理場はこれらの薬剤耐性菌や抗生物質の新たな汚染源となりうる可能性があることから、その詳細な実態解明を求められることが今後予想される。また、下水処理過程において薬剤耐性菌の選択や耐性遺伝子の伝達の可能性を指摘する報告[6）7)]、下水中の抗生物質濃度と耐性遺伝子との関連性についての報告例[8)]もあるが、調査･研究事例は現在のところ少ない。

本研究では、環境水中における薬剤耐性菌の汚染実態を明らかにするとともに､環境水に大きな影響を及ぼすと考えられる下水処理場を含めた各種排水処理施設などからの耐性菌排出量を把握し、環境水への影響の大きさを検討する。さらに、河川環境を含めた微生物の混在系における耐性遺伝子の伝達特性や、薬剤耐性菌の消長と消毒耐性の解明を目的としている。

17年度は、流域に畜産系汚濁負荷の存在するＡ河川およびその流域内にあるＢ下水処理場において、大腸菌を対象に河川･下水試料の薬剤耐性試験、薬剤感受性試験を行った。また、比較対照として河川流域に人畜由来汚濁負荷の無いＣ河川水試料についても併せて実施し､各試料の薬剤耐性菌濃度､検出株の各種抗生物質に対する耐性割合を明らかにした。

２．研究方法

２．１　薬剤耐性試験

薬剤耐性試験では、薬剤耐性菌の対象を大腸菌とした。大腸菌の測定法は、クロモカルト培地による平板培養法である。対象抗生物質は LVFX（レボフロキサシン)、ABPC（アンピシリン）、TC（テトラサイクリン）の3種類とし LVFX の場合は最終濃度が8mg/L になるようクロモカルト培地に添加、ABPC では32mg/L、TC では16mg/L とし、添加系と無添加系における大腸菌の検出濃度の違いにより耐性割合を把握した。LVFX は我が国における出荷量･額および尿排泄率から推定した体外排出量が多いヒト用の抗生物質の一種であり[1)]、また、ABPC は既存の調査･研究事例で比較的多く報告、TC は畜産系の動物用医薬品で販売量が多い[9)]とともに、腸内細菌科の大腸菌に対して各薬剤とも抗菌作用を有することから薬剤耐性試験の対象抗生物質として選定した。

調査対象としたＢ下水処理場は現在の処理人口が約4万人、処理方式は標準活性汚泥法、放流水は次亜塩素酸ナトリウムによる塩素消毒を行っている。下水処理水放流先の A 河川は、流域面積約37km ^{2}、流域では下水処理水放流口より上流でウシ約1千頭、ブタ約4千頭（推定値）の畜産が行われている。その他、人畜由来の汚濁負荷が無い比較対照 C 河川は流域面積が約3.2km ^{2}、流域のほぼ100％が森林である。

採取試料は流入下水と二次処理水、塩素消毒後の放流水、放流口より上流の河川水、放流水の混合された下流河川水の5種類とし試料の採取は2回、Ｃ河川水試料の採取は1回であ

る。放流水、下流河川水では試料採取後直ちにチオ硫酸ナトリウムを添加し残留塩素の中和処理を行った。なお、C 河川水試料は大腸菌の濃度が極めて低いと想定されたことから分析水量を1L、ABPC 添加培地による薬剤耐性試験では分析水量を1.5L とした。

２．２ 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、上記2.1の抗生物質無添加培地によって検出された大腸菌の典型コロニーを釣菌、トリプトソイブイヨン培地に接種の後35℃で3時間程度培養を行い、培養液を平板に固めたミュラーヒントン S 寒天培地に塗布し、平板上に抗生物質の含有されたディスクを置いた。この平板を35℃で16～18時間培養した後、平板上に形成された阻止円の直径を測定し耐性、中間、感受性の判定を行い、各抗生物質に対する感受性を調査した。対象抗生物質は LVFX（レボフロキサシン：キノロン系）、ABPC（アンピシリン：ペニシリン系）、CFDN（セフジニル：経口セフェム系）、TC（テトラサイクリン：テトラサイクリン系）、KM（カナマイシン：アミノグリコシド系）、ST（スルファメトキサゾール･トリメトプリム：合成抗菌薬）、GM（ゲンタマイシン：アミノグリコシド系）、IPM（イミペネム：カルバペネム系）の8種類とした。これら抗生物質の選定理由は、我が国における出荷量･額および尿排泄率から推定した体外排出量などの報告例[1)]を参考とし、併せて過去の調査･研究事例での報告が多く、腸内細菌科の大腸菌に対して抗菌作用を有するためである。薬剤感受性試験における抗生物質含有ディスクは KB ディスク（栄研化学）を利用し、感受性試験の判定基準などはＫＢディスクの手引き[10)]を参照した。

３．研究結果および考察

３．１ 薬剤耐性試験結果

薬剤耐性試験結果を表－1に示す。B 下水処理場における流入下水の ABPC 耐性大腸菌の割合は平均20％、LVFX1％、TC9％程度、二次処理水では ABPC12％、LVFX0.5％、TC 4％程度であり、大腸菌に占める各々の薬剤耐性大腸菌割合は活性汚泥処理法により若干低下している。放流水では塩素消毒により大腸菌、各々の薬剤耐性大腸菌の濃度は大幅に減少しているが、二次処理水･放流水中の大腸菌に占める薬剤耐性大腸菌の割合は、各々比較して大差はない。ヒト由来の汚染が主となる下水試料では、ABPC ＞ TC ＞ LVFX の順で耐性菌の割合が高かった。16年度に行った処理区域が異なる2ヶ所の下水処理場の調査結果

表－１　薬剤耐性試験結果

抗生物質 / 試料	*E.coli* 濃度 (cfu/mL)	ABPC 耐性 *E.coli* 濃度(cfu/mL,%)	LVFX 耐性 *E.coli* 濃度(cfu/mL,%)	ＴＣ耐性 *E.coli* 濃度(cfu/mL,%)
Ｂ流入下水(11 月)	1.7E+5	2.4E+4 (**14.1**)	1.4E+3 (**0.8**)	9.0E+3 (**5.3**)
Ｂ流入下水(2 月)	5.2E+4	1.3E+4 (**25.0**)	8.0E+2 (**1.5**)	6.9E+3 (**13.3**)
Ｂ二次処理水(11 月)	7.0E+2	1.0E+2 (**14.3**)	3.0E+0 (**0.4**)	2.2E+1 (**3.1**)
Ｂ二次処理水(2 月)	4.0E+2	3.6E+1 (**9.0**)	2.5E+0 (**0.6**)	1.8E+1 (**4.4**)
活性汚泥での除去率(%)	**99.4**	**99.7**	**99.8**	**99.8**
Ｂ放流水(11 月)	5.0E+0	0.7E+0 (**14.0**)	2.5E-2 (**0.5**)	2.5E-1 (**5.0**)
Ｂ放流水(2 月)	4.1E-1	6.7E-2 (**16.3**)	N.D.	1.7E-2 (**4.1**)
消毒での不活化率(%)	**99.6**	**99.6**	**99.6**	**99.4**
Ａ上流河川水(11 月)	2.6E+1	0.7E+0 (**2.8**)	2.0E-1 (**0.8**)	1.8E-1 (**0.7**)
Ａ上流河川水(2 月)	2.2E+1	1.9E+0 (**8.4**)	8.7E-1 (**4.0**)	4.0E-1 (**1.8**)
Ａ下流河川水(11 月)	3.5E+1	1.0E+0 (**2.9**)	1.5E-1 (**0.4**)	2.8E-1 (**0.8**)
Ａ下流河川水(2 月)	1.3E+1	1.7E+0 (**13.1**)	7.3E-1 (**5.6**)	1.5E-1 (**1.2**)
比較対照Ｃ河川水	7.4E-2	不検出　(**0.0**)	－	－

でも同様に ABPC に対する耐性菌は LVFX に比較して高い割合で検出されており、また、他の下水処理場における調査例[6)]でも処理水中の耐性菌は TC や ABPC に耐性示すものが多

いとの報告もある。これらの結果から、下水中には ABPC や TC に対して耐性を持つ大腸菌が広範囲、恒常的かつ高濃度に存在しているものと考えられた。

活性汚泥処理法での大腸菌を含む薬剤耐性大腸菌の平均除去率は99.6%（2.4log）、塩素消毒での平均不活化率は99.5%（2.3log）であり、最終的に塩素消毒を行うことで放流水中の大腸菌･薬剤耐性大腸菌濃度は大幅に減少している。よって、消毒による不活化の徹底により、水環境中におけるこれら薬剤耐性菌汚染の拡大を防ぐことができるものと示唆された。なお、放流水の残留塩素濃度は11月の試料で結合型0.09mg/L、遊離型0.01mg/L、2月は結合型0.15mg/L、遊離型0.02mg/L であった。

流域に家畜由来の汚濁負荷が存在する A 上･下流河川水試料でも ABPC ＞ LVFX、TC の順で耐性菌の割合が高かった。畜産系ふん尿の A 河川への流入実態は不明であるものの、農林水産省の統計資料[9]によれば我が国における動物用医薬品の中で PCs（ペニシリン）系、TCs（テトラサイクリン）系の抗生物質は、その販売量に占める割合が比較的多いことから、それらを反映しているものと考えられる。しかし、TCs 系抗生物質の販売量は PCs 系に比較して4倍以上にも及んでいるが、ABPC 耐性大腸菌濃度は TC のそれよりも高いものとなっており、各薬剤耐性大腸菌濃度と抗生物質販売量との関連性は薄いものと考えられた。A 上･下流河川水の各々の薬剤耐性大腸菌濃度は二次処理水よりも低いが、塩素消毒後の放流水と比較すると若干高かった。金目川、多摩川、鶴見川を対象とした河川水の調査例[2]では畜産由来の汚濁負荷により ABPC、TC に対する耐性大腸菌が高率に分離されるという報告もあり、河川流域にこれらの汚濁負荷が存在することは、普遍的かつ恒常的な薬剤耐性大腸菌汚染を示唆するものである。

C 河川水試料では分析水量を1L とし大腸菌を測定したが、人畜由来の汚濁負荷が無いためその濃度は極めて低くまた、ABPC のみの耐性評価ではあるが、分析水量を1.5L としても薬剤耐性大腸菌は検出されなかった。このため人畜由来の汚濁負荷の影響を受けなければ､水環境中における薬剤耐性大腸菌の汚染の可能性はかなり低くなるものと考えられた。

３．２ 薬剤感受性試験結果

薬剤感受性試験結果について各々の採水毎に整理を行ったものを表－2に示す。流入下水から検出された株の耐性割合は ABPC で20～60%程度、TC で15～30%程度、次いで CFDN が10%程度であり採水毎にその割合は異なるが、この3種類の抗生物質に対して耐性を示す株の割合は高かった。16年度に行った処理区域が異なる2ヶ所の下水処理場の調査結果でも同様な傾向を示した。二次処理水･放流水に関しては若干割合は異なるものの ABPC、TC

表－２　薬剤感受性試験結果

試料	B流入下水	B二次処理水	B放流水	A上流河川水	A下流河川水	C河川水
株数	27, 43	28, 40	22, 44	28, 47	26, 44	45
抗生物質	11, 2月 (平均)	11, 2月 (平均)	11, 2月 (平均)	11, 2月 (平均)	11, 2月 (平均)	2月
ABPC	19, 58 (39)	14, 45 (30)	27, 14 (21)	29, 28 (29)	62, 27 (45)	0
CFDN	11, 12 (12)	4, 5 (5)	5, 5 (5)	7, 13 (10)	0, 11 (6)	2
LVFX	0, 0 (0)	7, 5 (6)	0, 0 (0)	4, 0 (2)	4, 0 (2)	0
ＴＣ	15, 30 (23)	7, 25 (30)	5, 16 (11)	21, 11 (16)	19, 32 (26)	4
ＫＭ	4, 0 (2)	4, 8 (6)	0, 2 (1)	4, 4 (4)	0, 5 (3)	0
ＳＴ	4, 14 (9)	11, 3 (7)	5, 5 (5)	4, 4 (4)	8, 16 (12)	0
ＧＭ	0, 12 (6)	0, 3 (2)	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0
ＩＰＭ	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0, 0 (0)	0

表中の数値（%）：耐性株数の割合＝（耐性株／被検株数）× 100

に耐性を示す株の割合が高かった。しかし､出荷量･額および体外排出量が比較的多いと推定されるヒト用の抗生物質である LVFX、IPM に耐性を示す株の割合は、ABPC、TC に耐

性を示す株の割合と比較してかならずしも高いものではない。特に2月の流入下水･二次処理水試料を除けば IPM、GM 対しては耐性を示す株は検出されなかった。16年度に処理区域の異なる下水処理場で行った調査でも IPM に対して耐性を示す株はほとんど検出されなかった。

A 河川水試料では特に ABPC、TC に対して耐性を示す株の割合は、下水試料と同様に高いものとなっている。先にも述べたが動物用医薬品の中で PCs 系、TCs 系の抗生物質は、その販売量の割合が比較的多いためと考えられる。GM、IPM に関しては全ての株で耐性を示したものは検出されなかった。金目川、多摩川、鶴見川を対象とした河川水の調査結果[2)]では ABPC、TC に対して耐性を示した株の割合は高く、LVFX に関しても感受性試験を行っているが、その割合は ABPC や TC と比較すると低いとの報告もある。都内の下水処理場における調査結果[6)]でも処理水中の耐性株は TC や ABPC に耐性を示すものが多かったとされる。今回の調査結果を含め流域･調査箇所、時期が異なっても同様な結果が得られるということは、広範囲かつ恒常的に ABPC、TC に対して耐性を持つ大腸菌が下水･河川水中に存在しているものと考えられた。しかし、人畜由来の汚濁負荷が存在しない C 河川では、各抗生物質に対して耐性を示した株の検出割合は極めて低かった。特に、ABPC に耐性を示す株は各試料で多く検出されるのに対し、C 河川水では不検出であった。このため、人畜由来の汚濁負荷が無ければ、薬剤耐性菌の汚染の可能性は極めて低くなるものと考えられた。

16年度に行った処理区域が異なる2ヶ所の下水処理場の調査を含め今回の調査結果でも、ヒト用抗生物質の出荷量などと下水中における薬剤耐性大腸菌濃度･検出耐性株の感受性には関連性が薄い可能性が伺えた。また、動物用医薬品の TCs 系の抗生物質は PCs 系に比較して販売量は4倍以上にも及んでいるが、A 上･下流河川水とも PCs 系の抗生物質である ABPC に対して耐性を示した大腸菌濃度･耐性株は最も高率に検出された。

2種類以上の抗生物質に対し耐性を示す株を多剤耐性株と定義し、それらを整理したものを表－3に示す。薬剤耐性･感受性試験の結果を反映して2月のほとんどの試料で多剤耐性株数が増加している。各試料とも2剤に対して耐性を示した株が最も多かった。下水試料では最大で5剤、河川水試料では最大で6剤に耐性を示した株が検出されたが、C 河川水からは多剤耐性株は検出されなかった。

表－３　多剤耐性株の割合

試料＼多剤	2剤	3剤	4剤	5剤	6剤	7剤
Ｂ流入下水(11月)	0	0	1	0	0	0
Ｂ流入下水(２月)	9	1	0	3	0	0
Ｂ二次処理水(11月)	0	1	1	0	0	0
Ｂ二次処理水(２月)	7	0	1	1	0	0
Ｂ放流水(11月)	0	1	0	0	0	0
Ｂ放流水(２月)	4	0	0	0	0	0
Ａ上流河川水(11月)	3	0	0	0	1	0
Ａ上流河川水(２月)	5	1	0	0	0	0
Ａ下流河川水(11月)	4	1	0	0	0	0
Ａ下流河川水(２月)	7	3	1	0	0	0
対照Ｃ河川水	0	0	0	0	0	0

検出された多剤耐性株の感受性について整理したものを表－4に示す。なお、16年度に実施した別の下水処理場の調査結果についても参考までに追記した。耐性株に占める多剤耐性株の割合は流入下水試料で平均37％、二次処理水48％、放流水22％であり活性汚泥処理を経ることで割合は若干高くなっているが、放流水では二次処理水に比較して半減しているため、消毒の徹底を計ることで多剤耐性株を低減できることを示唆している。放流先の河川水試料では、流入下水の薬剤耐性大腸菌濃度と比較して大きな違いはあるが、多剤耐性株の割合は平均35％であり、流入下水と同レベルであった。この内、ABPC と TC にのみ耐性を示した多剤耐性株の割合は河川水試料で平均47％であり、その割合は流入下水の約2倍であった。これは PCs 系、TCs 系の抗生物質は動物用医薬品の中でその使用量の割

合が多いためと推定される。ABPC+TC+その他の抗生物質に対して耐性を示した株の割合は全試料の平均で約70%、ABPC+その他では80～96%（放流水試料を除く）を占めており、下水･河川水試料ともに多剤耐性株の大部分は ABPC に対して耐性を示した株であった。グラム陰性桿菌では ABPC などの耐性遺伝子のほとんどが R プラスミド上にあるとされることから[11] 活性汚泥処理後の多剤耐性株の割合増加や水環境中における多剤耐性株の存在は、R プラスミドによる耐性遺伝子の伝達が一因であるものと考えられる。このため、抗生物質の販売量などとの関連性よりも ABPC 耐性に関わる R プラスミドの伝達特性などが、これらの薬剤耐性大腸菌の消長に大きな影響を及ぼしている可能性があるものと推定された。

表－４　多剤耐性株の感受性

年度	試料 ＼ 感受性	多剤耐性株割合(%)(多剤耐性株／耐性株)	ABPC+TC 耐性のみ(%)	ABPC+TC +その他(%)	ABPC+その他(%)
17	Ｂ流入下水(11月)	9 (1/11)	0	100	100
	Ｂ流入下水(２月)	43 (13/30)	46	69	92
16	Ｄ流入下水(平均)	47 (25/53)	28	60	88
	病院下水(平均)	47 (23/49)	26	48	87
流入下水平均		**37**	**25**	**69**	**92**
17	Ｂ二次処理水(11月)	25 (2/ 8)	0	50	50
	Ｂ二次処理水(２月)	41 (9/22)	44	67	100
16	Ｄ二次処理水(平均)	64 (47/74)	32	64	79
	病院二次処理水(平均)	60 (33/55)	30	73	91
二次処理水平均		**48**	**27**	**64**	**80**
17	Ｂ放流水(11月)	14 (1 /7)	0	100	100
	Ｂ放流水(２月)	29 (4/14)	25	25	25
放流水平均		**22**	**13**	**63**	**63**
17	Ａ上流河川水(11月)	36 (4/11)	50	75	100
	Ａ上流河川水(２月)	30 (6/20)	33	50	100
17	Ａ下流河川水(11月)	28 (5/18)	60	80	100
	Ａ下流河川水(２月)	46 (11/24)	45	73	82
河川水平均		**35**	**47**	**70**	**96**
17	比較対照Ｃ河川水	0 (0/ 3)	－	－	－

４．まとめ

17年度は、流域に畜産系汚濁負荷の存在する河川およびその流域内にある下水処理場において大腸菌を対象に河川･下水試料の薬剤耐性試験、薬剤感受性試験を行った。また、比較対照として河川流域に人畜由来汚濁負荷の無い河川水試料についても併せて実施し、各試料の薬剤耐性菌濃度、検出株の各種抗生物質に対する耐性割合を明らかにした。調査結果を以下に示す。

１）ヒト由来の汚染が主となる下水試料では、ABPC ＞ TC ＞ LVFX の順で大腸菌に占める薬剤耐性大腸菌の割合が高かった。流域に家畜由来の汚濁負荷が存在する河川水試料では ABPC ＞ TC、LVFX の順であった。
２）活性汚泥処理法や塩素消毒により放流水中の大腸菌や薬剤耐性大腸菌は大幅に減少する。
３）下水・河川水試料とも ABPC、TC に対して耐性を示した株が最も多く検出された。
４）人畜由来汚濁負荷の無い河川水では、薬剤耐性菌の汚染の可能性は極めて低くなるものと考えられた。
５）下水･河川水試料から検出された多剤耐性株の大部分は、ABPC に対して耐性を示した株であった。このため、ABPC 耐性に関わる R プラスミドの伝達特性などが、

これらの薬剤耐性大腸菌の消長に大きな影響を及ぼしている可能性があるものと推定された。

＜謝辞＞
本調査を実施するにあたり B 下水処理場の関係各位には多くの便宜を図って頂いた。試料の採取などでは長岡技術科学大学からの実務訓練生の櫻井聡一郎君に協力を得た。ここに記して謝意を表する。

参考文献

１）八十島誠ら(2004)、下水処理水中に含まれるレボフロキサシン、クラリスロマイシンの分　析と藻類生長への影響、水環境学会誌(27) 11,707-714.
２）清野敦子ら(2004)、金目川、鶴見川、多摩川における薬剤耐性菌大腸菌の分布、水環境学会誌(27) 11,693-698.
３）浦瀬太郎、山本和夫、岩根泰蔵(1999)、多摩川を例とした抗生物質耐性と河川の人為汚染指標の比較、土木学会第 54 回年次学術講演会講演集.
４）藤原淳ら(2006)、水道水源等において優先して監視すべき医薬品の選定方法に関する研究、第 40 回日本水環境学会年会講演集,601.
５）小林義和ら(2006)、凝集剤を用いた下水処理での医薬品の除去効果の把握、第 40 回日本水環境学会年会講演集,353.
６）岩根泰蔵、浦瀬太郎、山本和夫(1998)、下水中および河川水中の大腸菌における抗生物質耐性の分布、第 35 回環境工学研究フォーラム講演集,144-146.
７）Reinthaler,F.F. et al.(2003) Antibiotic resistance of *E.coli* in sewage and sludge, *Water Research* (37) 1685-1690.
８）Ohlsen,K. et al. (2003) Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage, *Environmental Microbiology* (5) 8,711-716.
９）農林水産省消費・安全局、抗生物質の使用と薬剤耐性菌の発生についてー家畜用抗生物質の見直しー、http：//www.maff.go.jp/syoku-anzen/20031110/giji.pdf
10）細菌感受性試験用、ＫＢディスク‘栄研’手引き.
11）橋本一、井上松久編、病原菌の薬剤耐性、機構の解明とその対策、学会出版センター.

河川流域における PPCPs（医薬品および日用品等由来化学物質）の挙動の解明に関する研究

国土交通省
（委託先）独立行政法人土木研究所
材料地盤研究グループリサイクルチーム　尾崎正明
山下洋正
亀田　豊

研究期間　平成１７年度～２１年度
平成１７年度当初予算額　２１，４５１千円

Fate of PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) in River Watershed

(FY2005～2009)

Masaaki Ozaki, Hiromasa Yamashita and Yutaka Kameda
Recycling Team, Material and Geotechnical Engineering Research Group

Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute
Ministry of Land, Infrastructure and Transport

In recent years, there have been many reports of the occurrence of PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) in water environments and of concerns about environmental problems they cause. These chemicals such as antibiotics, synthetic antimicrobials, and antipyretics are diverse and consumed in large quantities. They are released from sources such as urban areas and stockbreeding widely distributed in watersheds. Analysis methods are not yet developed for some chemicals and their actual status in water environments is not clarified. The

reports already published include those concerning the occurrence of chemicals in water environments, their impact on ecosystems, emergence of antibiotic resistant bacteria, concerns with their influence on human health, interference with the biological treatment of wastewater and so on. There is a need for urgent research in this field. The object of this research is to perform sequential research from the mid/long term perspective by first listing various important PPCP chemicals then developing analysis methods, and clarifying the quantity of release, transport and change to clarify the fate of PPCPs in the watershed

In FY2005, we carried out the following research.

1. The quantities of released PPCPs were estimated by quantitatively estimating their occurrence according to the production and consumption quantity statistics and by clarifying the excretion ratio of unchanged PPCPs in human and animals according to past research and several databases. Although it was difficult to obtain enough excretion ratio data and toxicity information such as PNEC, predicted non effect concentration, for each chemical, important chemicals assumed to require countermeasures and to be target of research are listed according to the estimated PEC (predicted environmental concentration) and PEC / PNEC ratio.

2. The methods necessary to quantitatively detect PPCPs in water samples by LC/MS/MS (high performance Liquid Chromatograph / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry) and GC/MS (Gas Chromatograph / Mass Spectrometry) such as sample pretreatment and analysis by LC/MS/MS and GC/MS have been developed.

１．　序

近年、医薬品や日用品などに由来する多様な化学物質（PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products）が水環境中に存在することが報告されており、環境影響が懸念されている。これらは、抗生物質、合成抗菌剤、鎮痛解熱剤など多様かつ使用量が膨大であり、また都市域、畜産など流域で広く発生しており、分析方法が未確立の物質もあり、実態の解明が十分ではない。これまでに報告されているだけでも，水環境中での存在，生態系への影響，薬剤耐性菌の出現，ヒト健康影響の懸念，排水の生物処理への影響等が挙げられ、早急な調査を必要としている。

本研究は、多様な PPCPs の中から重要物質をリストアップする作業から始めて、分析方法の開発、環境への放出・移行・変化量の把握により、流域での挙動把握につなげる一連の研究プロセスを中・長期的な視点で実施するものである。

２．　研究方法

２－１．重要物質のリストアップ

（１）　調査方法の概要

重要物質のリストアップについては，各医薬品類の生産量等（生産量，出荷量または消費量）に関する情報により，第一段階のスクリーニングを行い，生産量等が一定量（年間 2,000kg）以上の医薬品類を抽出した。次に，ヒトおよび動物で使用した場合の排泄率等（尿中および糞中の未変化体・活性体の排泄割合）に関する情報により，第二段階のスクリーニングを行い，環境中への放出量が一定量（年間 20,000kg）以上の医薬品類を選定した。最後に，これらの医薬品類について，下水処

理場における除去率，環境毒性に関する情報を収集して，環境影響について検討して，第三段階のスクリーニングを行った。PEC（環境中予測濃度）および PEC／PNEC（予測無影響濃度）に基づいて，環境毒性が疑われる重要物質，環境中の存在量が大と推定される要検討物質などを選定した。

（２）　対象物質

我が国で利用されている主要な PPCPs として，人用医薬品，動物用医薬品および飼料添加物，化粧品その他日用品が考えられる。これらの物質の多くは「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）や「特定化学物質の環境への排出量の把握および管理の改善の促進に関する法律」（PRTR 法）の対象となっておらず，環境影響に関する規制・監視が十分に行われていないものである。人用医薬品は「薬事法」により規制されているものであり，例えば解熱鎮痛消炎剤や血圧降下剤など様々な薬効に分類されている。動物用医薬品は「薬事法」および「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」の対象となっており，人用医薬品と同様に様々な薬効分類がある。動物用の飼料添加物は，「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」により規制されており，飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進の用途で添加される抗生物質 19 種･合成抗菌剤 6 種のうち，抗生物質は特定添加物として肥飼料試験所の検定を受ける必要があるとされている。化粧品その他日用品としては，「薬事法」で規定する化粧品，医薬部外品（薬用化粧品，育毛剤など）などがあり，「化粧品基準」により配合禁止成分リスト（ネガティブリスト）および配合可能成分リスト（ポジティブリスト）が示されている。本報告では，これらの化学物質のうち，物質ごとの生産・販売量などに関する統計情報が整備されている人用医薬品および動物用医薬品ならびに飼料添加物について検討を行った。医薬品類の中で，炭酸水素ナトリウムなどの単純な無機化合物およびビタミン類ならびに遺伝子組み換えによるタンパク質製剤などは環境影響の可能性が低いと考えて除外した。

（３）　生産・販売量に関する調査

統計情報として，行政による各種統計，業界誌・団体などによる集計などを用いた。人用医薬品については，厚生労働省の薬事工業生産動態統計[1)]（以下，「薬事統計」とする）の特掲医薬品出荷金額数量より各医薬品の年間出荷量を算出した。また，業界誌による医薬品売上高の集計情報[2)]（以下，「売上順位」とする）より，2004 年度国内売上高 100 億円以上の医薬品約 100 点について，薬価を用いて年間出荷量を算出した。動物用医薬品および飼料添加物については，社団法人日本動物医薬品協会の「各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量」[3)]（以下，「抗生物質販売高等」とする）および肥飼料試験所の検定結果より，抗生物質などの年間販売量を算出した。

（４）　環境への放出量に関する調査

環境への放出量については，使用された PPCPs がヒトや動物の排泄を経て，あるいは直接に，下水道や水環境へ移行する量として算出した。人用医薬品に関しては，医薬品の添付文書[4)]などより，人体における医薬品の排泄率に関する情報を用いた。動物用医薬品および飼料添加物については，動物用医薬品に関する出版物[5) 6)]に基づいて動物における医薬品および試料添加物の排泄率に関する情報を収集し，人用医薬品としての情報も参考にした。排泄率に関しては十分な情報が得られない医薬品類が多く，それらについては未変化体・活性体が尿中に 80%，糞中に 10%放出されるという仮定で計算した。また，主として糞中に排泄されるという定性的情報のみが得られている場合は排泄率を糞中 80%，尿中 10%とした。

（５）　環境中濃度および環境毒性に関する調査

人用医薬品の PEC（環境中予測濃度）は，下水処理水の量約 140 億 m^3／年，下水道普及率約 70%として，環境中への放出量の 7 割が 140 億 m^3 中に存在し，下水処理場を経て放流され，河川で 10 倍に希釈されるという単純な仮定を行って，環境中への放出量（ここでは尿中排泄量）1000kg が PEC0.005μg/L に相当するとした。本手法は，米国や EU の医薬品の環境影響予測に関するガイドラインの手法 [7) 8)] と同様のものである。下水処理場における除去率については，報告がある一部の物質については反映し，不明の物質については０％と仮定した。オキシテトラサイクリンなど動物用医薬品としての使用割合が多い物質については，下水処理場とは別の経路で環境中に放出されていると考えられるが，放出量の定量的な推定は困難であるため，人用医薬品と並べて統一的に評価できるように，同じ手法で PEC を試算した。PNEC（予測無影響濃度）については，報告 [21) ~ 23)] がある一部の物質については反映し，不明の物質については n.a.とした。

２－２．分析方法の開発

（１） 分析方法の概要

水試料中の PPCPs の分析方法の開発を行った。水試料をろ過して，固形性成分については，高速溶媒抽出により回収を行うものとした。溶解性および固形性成分のそれぞれについて，物質性状に応じて，固相抽出および濃縮・精製を行い，LC/MS/MS または GC/MS により行う方法を開発した。

（２） 分析対象物質

LC/MS/MS による分析方法の開発の対象とした物質は，人用及び動物用医薬品及びその代謝物（141 物質）、紫外線吸収剤（6 物質）、X 線造影剤及び代謝物質（4 物質）、防腐剤（6 物質）、エストロゲン物質（4 物質）の計 161 物質である。分析対象物質の選定にあたっては，海外および国内での報告事例 [9) ~20)] や物質としての重要性などを考慮して，可能な限り多くの物質を効率よく分析できるようにした。

GC/MS による分析方法の開発の対象とした物質は，表－１に示すとおり，主として香料および紫外線吸収剤の 25 物質である。また、これらの物質のサロゲート物質の候補として 7 物質を加え、同時分析手法の開発を行った。分析対象物質の選定条件は、海外での報告例 [9) ~19)] があり測定が容易と考えられる香料（No.1～6、8～10、12～17）および紫外線吸収剤（No.21、23、35）及び国内の使用報告 [20)] があるものの国内外含めて分析事例のない紫外線吸収剤(No.7、18～20、22、24)とした。

表－１　GC/MS による分析対象物質

No.	分析対象物質	使用用途
1	Benzyl acetate	ジャスミン系調合香料、化粧品用調合香料、食品用調合香料
2	Terpineol	合成精油、化粧品、食品
3	Methyl salicylate	消炎鎮痛剤、化粧品、香料
4	isobornyl acetate	森林調調合香料
5	iso methyl ionone	香料
6	DPMI (Cashmeran)	香料
7	Benzophenone(BP)	医薬品中間体、紫外線吸収剤
8	Methyl dihydrojasmonate	ジャスミン系代表的合成香料(シャンプー、リンス、石鹸等)
9	ADBI (Celeostolide)	香料
10	AHMI (Phantolide)	香料
11	caffeine	カフェイン
12	ATII (Traseolide)	香料
13	HHCB (Galaxolide)	香料
14	AHTN (Tonalide)	香料
15	Musk xylene	ニトロムスク
16	Musk ketone	ニトロムスク
17	Benzyl salicylate	香料原料、医薬中間体
18	OS(Octyl salicylate)	紫外線吸収剤(UVA/B)
19	Homosalate(HMS)	紫外線吸収剤(UVB)
20	Benzophenon-3(BP-3)	医薬品中間体、紫外線吸収剤
21	4-MBC (4-Methoxybenzylidene Camphor	紫外線吸収剤(UVB)
22	Menthyl anthranilate	紫外線吸収剤(UVA/B)
23	EHMC(Octyl methoxycinnamate)	紫外線吸収剤(UVA/B)
24	Octyl PABA (Octyl aminobenzoic acid)	紫外線吸収剤(UVA/B)
25	OC(Octocrylene)	紫外線吸収剤(UVA/B)
26	Terpineol-d3	サロゲート物質
27	Benzophenone-d10(BP-d10)	サロゲート物質
28	Caffeine-d9	サロゲート物質
29	Musk xylene-d15	サロゲート物質
30	Metalochlor-d6	サロゲート物質
31	Fluoranthene-d10(Ft-d10)	サロゲート物質
32	Benzyl cinnamate	サロゲート物質

（３） 質量分析条件の検討

１） LC/MS/MS による質量分析条件の検討

質量分析における Q１イオン（precursor ion）、Q3 イオン(product ion)およびイオンモード（negative, positive）を決定するために，内径 4.61mm、容量 1mL のマイクロシリンジを用いて，流速 10μL/min にてインフュージョンを行った。各対象物質はメタノールまたはアセトニトリルに 100～1000μg/L の濃度で溶解させて用いた。次に，決定したイオンモードごとに対象物質の混合溶液を

作成し、表－２に示す操作条件で FIA（Flow Injection Analysis）を行うことでイオン化の条件等の MS/MS のパラメータの最適化を実施した。

表－２　LC/MS/MS の FIA 操作条件

FIA（初期イオンソース条件	Gas1：50
	Gas2：80
	Curtain Gas (CUR)：40
	Ion Spray (IS)：5000(Negativeは-4000)
	Temperature (TEM)：600
	Collision Gas (CAD)：4
	Interface Heater (ihe)：On

２）GC/MS による質量分析条件の検討

質量分析におけるモニタリングイオン及び保持時間の把握を行うために，各物質の標準物質の 1ppm ヘキサン溶液もしくはメタノール溶液を GC/MS のスキャンモードで分析した。これによりフラグメントのマスプロファイルを把握するとともにピークの保持時間を確認した。

（４）　前処理および測定条件の検討

１）LC/MS/MS の条件の検討

各対象物質の保持時間の把握及び定量性の確認のために，イオンモードごとの対象物質混合液について、1、5、10、25、50、100、250、500、1000 ppb の 9 段階の混合液を作成し、LC/MS/MS による分析を繰り返し 3 回行った。

また，検量線について線形性の確認を行った。

２）GC/MS の条件の検討

前処理に用いる最適な固相カートリッジを選択するため、国内で使用頻度が高く入手が容易な Oasis®HLB（200mg, Waters 社製）、inertsep RP-1（250mg, GL science 社製）、Sep-Pak plus NH2（200mg, Waters 社製）、EDS-1（昭和電工社製）、Lichlorut EN（200mg, Merck）の 5 種の汎用固相カートリッジについて，ミリ Q 水からの回収率を簡易的に検討した（n=1）。実験方法はミリ Q 水に上記対象物質及びサロゲート物質をぞれぞれ 1μg 添加し、各固相カートリッジに 10mL/min で通水したのち、ジクロロメタン 10mL で溶出した。その後、加熱せず窒素パージを行って穏やかに濃縮した後、ジクロロメタン 1mL に転溶し、GC/MS で分析した。

次に濃縮方法の最適化を行うため，対象物質の一部を調整した 1ppm ジクロロメタン混合液についてさまざまな条件化で窒素パージを行い、濃縮前後の回収率を検討した。

また，非汎用固相カートリッジ及びタンデム式固相カートリッジの適用可能性を検討するため，ミリ Q 水からの添加回収試験を行った。使用した固相カートリッジは，国内での使用例は少なく入手が困難であるが、海外では使用事例の多い C18 polar Plus(bakerbond 社製、充填量 500mg；以下 polar と記す)、C18 standard(bakerbond 社製、充填量 500mg；以下 Oct と記す)、C18 Light Load(bakerbond 社製、充填量 500mg；以下 light と記す)、Bond Elut ENV(Varian 社製、充填量 200mg；以下 env と記す)の 4 種とした。

３．　研究結果および考察

３－１．重要物質のリストアップ

（１）　生産・販売量に関する調査

各医薬品類の生産量等（生産量または出荷量）に関する情報により，第一段階のスクリーニングを行い，生産量等が一定量（年間 2,000kg）以上の医薬品類を選定した結果を表－３に示す。

上位に位置した医薬品類は，アミノエチルスルホン酸，スクラルファート，アセトアミノフェン，L-カルボシステイン，メフェナム酸，オキシテトラサイクリン，ウルソデオキシコール酸，イオパミドール，イオヘキソール，アロプリノールなどであった。

ここで「売上順位」に基づく集計では剤形の違いにより薬価に幅があるため，最低および最高薬価を用いて，最高および最低出荷量(kg)を推定した。

表－３　生産量等が年間 2,000kg 以上の医薬品類

No.	和名	推定生産・出荷量 (1000kg)	情報源 売	薬	動	飼
1	アミノエチルスルホン酸	2790.1		○		
2	スクラルファート	2465.4		○		
3	アセトアミノフェン	909.0		○		
4	L-カルボシステイン	659.0	○	○		
5	メフェナム酸	407.7		○		
6	オキシテトラサイクリン	317.8			○	○
7	ウルソデオキシコール酸	247.8	○			
8	イオパミドール	180.2	○			
9	イオヘキソール	176.7	○			
10	アロプリノール	172.8	○	○		
11	塩酸クロルテトラサイクリン	167.5			○	
12	イコサペント酸エチル	153.9	○			
13	バルプロ酸ナトリウム	147.1	○	○		
14	硫酸コリスチン	86.0			○	○
15	インドメタシン	83.2		○		
16	イブプロフェン	82.8		○		
17	テオフィリン	81.4	○	○		
18	トラネキサム酸	80.2		○		
19	テプレノン	76.8	○			
20	クラリスロマイシン	76.0	○			
21	塩酸エカラジン	69.8		○		
22	ロキソプロフェンナトリウム	68.1	○			
23	タイロシン	67.9			○	○
24	フェルビナク	61.8	○			
25	アンピシリン	59.3		○	○	
26	スルファメトキサゾール	52.9			○	
27	ケトプロフェン	47.7	○	○		
28	バルサルタン	45.2	○			
29	カルバマゼピン	42.6		○		
30	アモキシシリン	42.6		○	○	
31	スルピリド	42.5		○		
32	塩酸セフカペンピボキシル	42.2	○			
33	エリスロマイシン	41.1		○	○	
34	ベザフィブラート	40.4	○			
35	塩酸チクロピジン	37.7	○			
36	ストレプトマイシン	37.6			○	
37	塩酸セフォチアム　ヘキセチル	37.0	○			
38	アルジオキサ	35.8		○		
39	スルファモノメトキシン	35.4			○	
40	ブランルカスト水和物	33.6	○			
41	サリノマイシンナトリウム	32.1				○
42	塩酸ジルチアゼム	32.0	○			
43	塩酸ラニチジン	31.1	○			
44	スルファジメトキシン	29.2			○	
45	レボフロキサシン	24.0	○			
46	モネンシンナトリウム	22.8				○
47	ファモチジン	22.3	○			
48	塩酸フラボキサート	22.0		○		
49	塩酸ドキシサイクリン	21.5			○	
50	セフジトレン　ピボキシル	20.9	○			
51	ラサロシドナトリウム	20.2				○
52	ベンジルペニシリン	20.1			○	
53	センノシド	19.9		○		
54	セフジニル	19.8	○			
55	セファレキシン	19.1		○		
56	カルバミン酸クロルフェネシン	18.5		○		
57	ロサルタンカリウム	17.6	○			
58	リンコマイシン	17.2			○	
59	スルフイソゾールナトリウム	16.0			○	
60	チアンフェニコール	15.0			○	
61	アビラマイシン	14.4				○
62	塩酸テルビナフィン	14.1	○			
63	トリメトプリム	13.8			○	
64	ナラシン	13.8				○
65	硝酸イソソルビド	13.7	○			
66	メシル酸カモスタット	12.9	○			
67	塩酸パラシクロビル	12.6	○			
68	塩酸ベラパミル	12.4		○		
69	メチルドパ	12.0		○		
70	セファドロキシル	12.0		○		
71	ジメチコン	11.9		○		
72	アシクロビル	11.1	○			
73	ジピリダモール	11.1		○		
74	塩酸ニカルジピン	10.3	○			
75	亜鉛パントラシン	10.2				○
76	トラピジル	10.1		○		
77	ペシル酸アムロジピン	9.8	○			
78	エチルコハク酸エリスロマイシン	9.6		○		
79	フロモキセフナトリウム	9.4	○			
80	クロモグリク酸ナトリウム	9.1	○			
81	塩酸アマンタジン	9.1		○		
82	スルピリン	8.4		○		
83	塩酸サルポグレラート	8.1	○			
84	硝酸イソソルビド	7.9		○		
85	塩酸ジラゼプ錠	7.7		○		
86	リファンピシン	7.6		○		
87	プラジクアンテル	7.6			○	
88	フマル酸チアムリン	7.5			○	
89	フロセミド	7.5		○		
90	デストマイシンＡ	7.5				○
91	フマル酸クエチアピン	7.4	○			
92	ジクロフェナクナトリウム	7.4	○	○		
93	エンラマイシン	7.2				○
94	グリセオフルビン	6.9		○		
95	カルバゾクロムスルホン酸ナトリウム	6.9		○		
96	塩酸ミノサイクリン	6.8		○		
97	リン酸チルミコシン	6.7			○	
98	塩酸アンプロキソール	6.6	○			
99	エパルレスタット	6.6	○			
100	塩酸チアラミド	6.5		○		

情報源　売:「売上順位」，薬:「薬事統計」，動:「抗生物質販売高等」，飼:「肥飼料試験所検定結果」

表－３（続）

No.	和名	推定生産・出荷量 (1000kg)	情報源 売	薬	動	飼
101	ドキシフルリジン	6.4	○			
102	酒石酸イフェンプロジル	6.4		○		
103	ナリジクス酸	6.4		○		
104	局）ブロムワレリル尿素	6.3		○		
105	マレイン酸レボメプロマジン	6.2		○		
106	アスピリン	6.1		○		
107	ニトラゼパム	6.1		○		
108	硫酸カナマイシン	5.9			○	
109	フロルフェニコール	5.9			○	
110	ランソプラゾール	5.8	○			
111	トルブタミド	5.7		○		
112	ジソピラミドカプセル	5.7		○		
113	プラバスタチンナトリウム	5.7	○			
114	テルミサルタン	5.7	○			
115	ニフルスチレン酸ナトリウム	5.5			○	
116	局）塩酸モルヒネ	5.5		○		
117	塩酸クロルプロマジン	5.4		○		
118	アトルバスタチンカルシウム水和物	5.4	○			
119	メシル酸ベタヒスチン	5.2		○		
120	ベンズブロマロン	5.2		○		
121	塩酸ピルジカイニド	5.0	○			
122	フェノバルビタール	4.3		○		
123	カンデサルタン　シレキセチル	4.3	○			
124	スルファジミジン（スルファメサジン）	4.0			○	
125	ピペラジン	3.9			○	
126	ノシヘプタイド	3.9				○
127	ゲファルナート	3.9		○		
128	局）アミノフィリン	3.7		○		
129	イソニアジド	3.6		○		
130	メロペネム　三水和物	3.4	○			
131	塩酸パロキセチン水和物	3.2	○			
132	アセタゾラミド	3.2		○		
133	センデュラマイシンナトリウム	3.2				○
134	クエン酸モサプリド	3.1	○			
135	塩酸スペクチンマイシン	3.1			○	
136	エンロフロキサシン	3.0			○	
137	ナプロキセン	3.0		○		
138	塩酸バンコマイシン	2.9	○			
139	エフロトマイシン	2.8				○
140	イトラコナゾール	2.7	○			
141	フェンベンダゾール	2.6			○	
142	ブフェキサマック	2.5		○		
143	スピロノラクトン	2.5		○		
144	塩酸Ｌ－エチルシステイン	2.5		○		
145	シチコリン	2.5		○		
146	ニコランジル	2.4	○			
147	ニトログリセリン	2.4	○			
148	デキストラン硫酸ナトリウム	2.4		○		
149	オキソリン酸	2.4			○	
150	オフロキサシン	2.3			○	
151	塩酸ピオグリタゾン	2.3	○			
152	フルバスタチンナトリウム	2.2	○			
153	塩酸プホルミン	2.2		○		
154	塩酸プロメタジン	2.1		○		
155	塩酸テトラサイクリン	2.1		○		
156	ノスカピン	2.1		○		
157	セデカマイシン	2.0				○

情報源　売:「売上順位」，薬:「薬事統計」，動:「抗生物質販売高等」，飼:「肥飼料試験所検定結果」

薬価に幅がある医薬品では，最高と最低で１０倍以上開きがある推定値となった。薬事統計にも収録されている医薬品（L-カルボシステイン，アロプリノール，ケトプロフェン，ジクロフェナクナトリウム，テオフィリン，バルプロ酸ナトリウム，フルルビプロフェンおよび塩酸ジルチアゼム）については，出荷量のデータが直接得られたため，より信頼できる推定値としてそちらを用いた。それ以外の医薬品については，安全側の推定値として最高値を用いることとした。動物用医薬品の抗生物質等については，アモキシシリン，アンピシリン（および同ナトリウム），エリスロマイシン，スルファジメトキシン，ナリジクス酸，ホスホマイシン（カルシウムおよび同ナトリウム），塩酸ドキシサイクリンが薬事統計にも収録されていたが，そのデータは重複していないため，別集計として加算した。

「売上順位」および「薬事統計」についてそれぞれの集計結果を比較すると，出荷量上位の医薬品に違いが見られたが，これは用いた情報の特徴の違いによるものと考えられた。「売上順位」による集計では，出荷量が少なくとも薬価の高い医薬品（例えば新規開発の降圧薬など）が売上高上位に入る傾向も見られるため，使用量の多いものをスクリーニングする目的には必ずしも適していな

い面があるが，各薬効分類で最近よく売れて使用されている医薬品を知ることができるため重要である。一方，「薬事統計」では特掲医薬品としてあらかじめ選定された対象について情報収集しているため，大量に使用されているが薬価が安いため売り上げ順位では上位に現れない医薬品（例えば総合感冒薬成分の鎮痛解熱剤など）についても情報を得ることができる上に，薬価による計算なしで出荷量を直接知ることができるので有用であるが，選定されている特掲医薬品は各薬効分類で現在最も使用されているとは限らないので，最新の状況を把握するには必ずしも十分でない面がある。従って，「薬事統計」と「売上順位」による集計の両方の情報を用いて，それぞれの長所を生かして現時点で使用量の多い医薬品を選定することが適切と考えられた。

「抗生物質販売高等」による動物用医薬品の集計結果と肥飼料試験所の検定結果による飼料添加物（抗生物質）の集計結果を比較すると，動物用医薬品の２割程度（総量比較）の抗生物質が飼料添加物として使用されていると推定された。コリスチンやタイロシン，オキシテトラサイクリンのように両方で使用されている物質もあるが，サリノマイシンなど飼料添加物としての使用しか統計がない物質もあった。

人用医薬品および動物用医薬品における抗生物質などの総出荷・販売量を比較すると，人用医薬品が「薬事統計」と「売上順位」の合計で 200～350 t 程度と推定されるのに対して，動物用医薬品では約 1000 t と 3～5 倍程度大であり，抗生物質などに関しては動物用医薬品の挙動の把握も重要と考えられた。

（２）　環境への放出量に関する調査

ヒトおよび動物で使用した場合の排泄率等（尿中および糞中の未変化体・活性体の排泄割合）に関する情報により，第二段階のスクリーニングを行い，環境中への放出量が一定量（年間 20,000kg）以上の医薬品類を抽出した。結果を表－４に示す。

表－４　第二段階スクリーニング（環境放出量）の結果

順位	和名	環境放出量（1000kg）		排泄率（%）		推定生産・出荷量（1000kg）
		尿	糞	尿	糞	
1	アミノエチルスルホン酸	2734	56	98	2	2790.1
2	L-カルボシステイン	646	0	98	0	659.0
3	アセトアミノフェン	619	0	68.1	0	909.0
4	メフェナム酸	326	41	80	10	407.7
5	オキシテトラサイクリン	254	32	80	10	317.8
6	イオパミドール	180	0	100	0	180.2
7	イオヘキソール	175	0	99	0	176.7
8	塩酸クロルテトラサイクリン	134	17	80	10	167.5
9	アロプリノール	110	35	63.8	20	172.8
10	トラネキサム酸	56	0	70	0	80.2
11	塩酸エカラジン	56	7	80	10	69.8
12	スクラルファート	54	1849	2.2	75	2465.4
13	スルファメトキサゾール	43	0	82	0	52.9
14	インドメタシン	40	13	48	16	83.2
15	クラリスロマイシン	38	0	50	0	76.0
16	ロキソプロフェンナトリウム	34	0	50	0	68.1
17	エリスロマイシン	33	4	80	10	41.1
18	アルジオキサ	29	4	80	10	35.8
19	ペザフィブラート	28	0	69.1	0	40.4
20	ストレプトマイシン	28	0	75	0	37.6
21	塩酸ラニチジン	28	0	89.2	0	31.1
22	サリノマイシンナトリウム	26	3	80	10	32.1
23	スルファモノメトキシン	25	3	70	8.5	35.4
24	アンピシリン	23	0	39.4	0	59.3
25	スルファジメトキシン	23	3	80	10	29.2
26	塩酸ジルチアゼム	22	5	69	17	32.0
27	レボフロキサシン	22	1	92	3.9	24.0
28	ファモチジン	22	0	96.4	0	22.3
29	モネンシンナトリウム	18	2	80	10	22.8
30	アモキシシリン	17	0	40	0	42.6
31	塩酸セフカペンピボキシル	17	0	40	0	42.2
32	塩酸セフォチアム　ヘキセチル	17	0	47	0	37.0
33	スルピリド	13	0	30	0	42.5
34	硫酸コリスチン	9	69	10	80	86.0
35	テオフィリン	7	65	8	80	81.4
36	タイロシン	7	54	10	80	67.9
37	バルサルタン	6	32	14	71	45.2
38	イコサペント酸エチル	4	26	2.7	16.7	153.9
39	バルプロ酸ナトリウム	4	0	3	0	147.1
40	フェルビナク	4	0	6.6	0	61.8
41	セフジトレン　ピボキシル	4	0	20	0	20.9
42	ウルソデオキシコール酸	3	69	1.1	27.7	247.8
43	塩酸ドキシサイクリン	2	17	10	80	21.5
44	テプレノン	1	0	0.93	0	76.8
45	ケトプロフェン	1	0	2.7	0	47.7
46	カルバマゼピン	1	0	3	0	42.6
50	イブプロフェン	0	0	0	0	82.8
47	塩酸チクロピジン	0	0	0.02	0	37.7
48	ブランルカスト水和物	0	33	0.24	98.9	33.6
49	塩酸フラボキサート	0	0	0.002	0	22.0

排泄率に関する情報がないものは，尿中80%：糞中10%（または尿中10%：糞中80%）と仮定。

排泄率の情報が得られず尿中に 80%，糞中に 10% 放出されるという仮定で計算したものが多く，推定の精度の点で問題が残るが，医薬品の薬効の観点からは，できるだけ体内では代謝・不活化されず，尿中の未変化体回収率が高い医薬品が好ましいようであるため，排泄率などに関する十分な情報が得られない医薬品については，未変化体の尿中排泄率が高いとみなして安全側の集計を行うのもやむを得ないと考えられる。しかし，このために情報が得られない医薬品については高めの推定値となる傾向があり，排泄率が低いという情報がある医薬品についてのみ放出量の推定値が低くなるという，不統一な結果とならざるを得なかった。従って第二段階のスクリーニングの結果は，順位はあくまでも目安であり，放出量のオーダーを示すものと考える必要がある。また，人用医薬品の

場合，排泄された医薬品は下水処理場等を経て，水環境中に移行すると仮定できるが，動物医薬品および飼料添加物の場合は，排泄物が堆肥化されて土壌に施用される場合が多いため（水産を除く），水環境への移行経路としては，堆肥－土壌施用－浸透・流出または堆肥－直接流出（雨天時など）などが考えられるが，その移行率の推定は難しい。従って排泄物として環境への放出量を推定しても，そこから水環境中の濃度を正確に推定するのは現時点では困難と考えられた。また，人用医薬品についても，尿中および糞中に排泄されたものがそのまま溶解性および固形性画分にとどまるとは限らず，抱合体から遊離体への変化などにより，変動することが考えられる。さらに，未変化体がグルクロン酸または硫酸に抱合されたものなどは，未変化体ではないが，環境中でふたたび遊離体にもどることもありうることから，これらの形態で排泄される医薬品類をどう評価すべきかは一律に決めがたい。これらの不確定要素をふまえて，現時点の第二段階のスクリーニングとしては，生産量等の多い医薬品類の中から，排泄率が低いものを除外して，尿中および糞中にそれぞれ多く排泄される可能性がある物質を把握することが重要と考えられた。

（３） 環境中濃度および環境毒性に関する調査

PEC および環境毒性に関する検討結果を表－５に示す。PEC>0.01μg/L となったものは，アミノエチルスルホン酸(13.7)からドキシサイクリン(0.01)までの 50 物質となった。

PEC/PNEC≧1 と推定されたものは，メフェナム酸，オキシテトラサイクリン，クロルテトラサイクリン，スルファメトキサゾール，エリスロマイシン，ストレプトマイシン，クラリスロマイシン，アモキシシリンであった。

表－５　第三段階スクリーニング（PEC および PEC/PNEC）の結果

順位	和名	PEC (μg/L)	PEC/PNEC (-)	PNEC (μg/L)	下水処理場の除去率(%)	環境放出量 (尿中1000kg)
1	アミノエチルスルホン酸	13.67	n.a.	n.a.	0	2734
2	スクラルファート	12.08	n.a.	n.a.	0	2416
3	アセトアミノフェン	3.10	0.34	9.2	0	619
4	L-カルボシステイン	2.64	n.a.	n.a.	0	527
5	メフェナム酸	1.63	3.8	0.43	0	326
6	オキシテトラサイクリン	1.59	6.9	0.23	0	318
7	ウルソデオキシコール酸	1.23	n.a.	n.a.	0	245
8	イオパミドール	0.72	n.a.	n.a.	0	144
9	塩酸クロルテトラサイクリン	0.54	10.7	0.05	0	107
10	アロプリノール	0.61	0.0075	80.8	0	121
11	バルプロ酸ナトリウム	0.59	n.a.	n.a.	0	118
12	イオヘキソール	0.02	n.a.	n.a.	0	4
13	テオフィリン	0.34	0.0022	155	0	67
14	トラネキサム酸	0.19	n.a.	n.a.	0	38
15	テプレノン	0.19	n.a.	n.a.	0	38
16	ロキソプロフェンナトリウム	0.17	n.a.	n.a.	0	34
17	フェルビナク	0.25	n.a.	n.a.	0	49
18	塩酸ミカラジン	0.28	n.a.	n.a.	0	56
19	タイロシン	0.26	n.a.	n.a.	0	51
20	バルサルタン	0.20	n.a.	n.a.	0	40
21	硫酸コリスチン	0.30	n.a.	n.a.	0	59
22	アモキシシリン	0.17	21.8	0.0078	0	34
23	クラリスロマイシン	0.15	47.0	0.0031	45	53
24	スルファメトキサゾール	0.21	7.0	0.03	0	42
25	カルバマゼピン	0.085	n.a.	n.a.	0	17
26	塩酸チクロピジン	0.13	n.a.	n.a.	0	26
27	ストレプトマイシン	0.18	1.4	0.133	0	36
28	塩酸セフセチアム　ヘキセチル	0.17	n.a.	n.a.	0	34
29	アンピシリン	0.24	n.a.	n.a.	0	47
30	スルピリド	0.19	n.a.	n.a.	0	38
31	塩酸セフカペンピボキシル	0.10	n.a.	n.a.	0	20
32	ベザフィブラート	0.040	n.a.	n.a.	50	16
33	エリスロマイシン	0.080	3.5	0.0227	0	16
34	ケトプロフェン	0.062	n.a.	n.a.	69	40
35	アルジオキサ	0.15	n.a.	n.a.	0	29
36	ブランルカスト水和物	0.14	n.a.	n.a.	0	27
37	インドメタシン	0.057	n.a.	n.a.	83	67
38	スルファモノメトキシン	0.055	n.a.	n.a.	0	11
39	塩酸ラニチジン	0.015	0.000026	582	0	3
40	イコサペント酸エチル	0.26	n.a.	n.a.	0	51
41	サリノマイシンナトリウム	0.015	n.a.	n.a.	0	3
42	塩酸ジルチアゼム	0.015	n.a.	n.a.	0	3
43	レボフロキサシン	0.008	0.0026	3.1	46	3
44	モネンシンナトリウム	0.005	n.a.	n.a.	0	1
45	塩酸ドキシサイクリン	0.020	n.a.	n.a.	0	4

下水処理場の除去率が不明のものについては，0%と仮定した

PEC/PNEC が 0.1～1 と推定されたものはアセトアミノフェン(0.34)のみであった。PEC/PNEC<0.1 と推定されたものは，アロプリノール，ラニチジン，ファモチジン，レボフロキサシン，テオフィリン，ロサルタンで，レボフロキサシン(0.019)以外はいずれも 0.01 以下であった。その他の医薬品類は，PNEC が不明であり PEC/PNEC が算出できなかった。放出量が多い医薬品類の中では，アミノエチルスルホン酸，カルボシステイン，イオパミドール，イオヘキソール，トラネキサム酸，トドララジン，スクラルファートなどがあった。イオパミドールおよびイオヘキソールについては，同じ非イオン性 X 線造影剤のイオプロミドについて PNEC が 137μg/L と報告されており [21]，毒性が同程度と仮定すると PEC/PNEC<0.01 となるため，環境毒性が低い可能性が高いが断定はできない。このように，第三段階のスクリーニングでは，PEC/PNEC により環境毒性の観点からの評価を行ったが，PNEC の値は報告例でも大きく異なっている場合が見受けられた。これは，算出の元となる急性毒性値としてどの値を採用するかの違いによるものと考えられたが，同じ PEC でも PNEC の違いにより，PEC/PNEC が異なり，環境毒性についての評価に影響を与える。例えば，アセトア

ミノフェンについては，英国の調査結果[22),23)]では PNEC として 9.2μg/L を採用しているため PEC/PNEC が約 40 で最大となっているが，別の報告[21)]では PNEC が 500μg/L とされており，こちらを採用すると英国でも PEC/PNEC が約 0.7 とかなり低くなる。本調査結果でも 9.2 の代わりに 500 を採用すると, PEC/PNEC が 0.34 から 0.0062 と大きく低下して，要検討物質から詳細調査不要の対象へと区分が変更されてしまう。このように，PEC の推定の不確実性に加え，PNEC の選択の問題もあり，PEC/PNEC によるリスク評価に基づくスクリーニングも決定的なものではないと言わざるを得ない。従って，重要物質の PEC/PNEC>1 の医薬品類については詳細な調査を行うとともに，0.1≦PEC/PNEC<1 の物質であっても，PEC が大と推定されている物質については，可能な限り調査対象に追加することが望ましいと考えられる。PNEC はあくまでも各物質が単独で作用した場合の毒性を推定しているに過ぎず，現実の極めて多種類の医薬品類およびその他の化学物質が混在している中での毒性については，明らかではない。物質間の相互作用（相加的，相乗的，拮抗的）もありえるため，特に PEC が大である物質については，他の物質の毒性に影響を与える可能性も否定できないことから，調査対象とすることが望ましいであろう。また，PEC が比較的大と推定されているものの PNEC が不明で PEC/PNEC が算出できなかった物質については，引き続き毒性情報の入手につとめ，PEC/PNEC が判明した時点で，あらためて判断するのが適切と考えられた。以上より，現段階のスクリーニング結果として重要物質および要検討物質ならびに保留物質は以下のとおりである。

１．環境毒性が疑われる重要物質（８物質）（PEC/PNEC≧1）

メフェナム酸，オキシテトラサイクリン，クロルテトラサイクリン，スルファメトキサゾール，エリスロマイシン，ストレプトマイシン，クラリスロマイシン，アモキシシリン

２．環境中の存在量が大と推定される要検討物質（１６物質）（PEC ≧ 0.1 μg//L，ただし PEC/PNEC<0.1 は除外）

アセトアミノフェン，アミノエチルスルホン酸，カルボシステイン，イオパミドール，イオヘキソール，トラネキサム酸，トドラジン，スクラルファート，ロキソプロフェン，アルジオキサ，サリノマイシン，スルファモノメトキシン，スルファジメトキシン，アンピシリン，ジルチアゼム，ファモチジン

３．環境中の存在量が比較的大と推定されるが環境毒性が不明である保留物質（２１物質）（0.01≦PEC<0.1μg//L，ただし PEC/PNEC<0.1 は除外）

モネンシン，セファレキシン，セフォチアムヘキシチル，セフカペンピボキシル，カルバミン酸クロルフェネシン，センノシド，ベンジルペニシリン，ラサロシド，ベザフィブラート，スルピリド，コリスチン，セフジニル，タイロシン，インドメタシン，バルサルタン，イコサペント酸エチル，セフジトレンピボキシル，フェルビナク，バルプロ酸，ウルソデオキシコール，ドキシサイクリン

３－２．分析方法の開発

（１） 質量分析条件の検討

１） LC/MS/MS による質量分析条件の検討

インフュージョンの結果より得られた，物質ごとの Q1 イオン、Q3 イオン、イオンモード（ポジティブモードあるいはネガティブモード）及び測定条件（DP、EP、CE、CXP）を表－６に示す。

多くの対象物質について既往の報告と同じ結果となったが一部の対象物質においてイオンが大きく異なる結果となった。これは報告例と本分析機器における使用機器の違いであると考えられた。

表－6　LC/MS/MS のインフュージョン結果

（1）positive モード

No.	物質名	Infusion 溶媒	Infusion 濃度 (μg/L)	流速(μL/min)	分子量	precursor ion 強度(cps)	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	保持時間(分)
1	Amoxicillin trihydrate	M	1000	10	419.45	1.E+06	366.102	113.9	56	10	27	10	1.825 ± 0.28
2	Ciprofloxacin	A	500	10	331.35	5.E+05	332.174	231.2	66	10	53	18	7.555 ± 0.19
3	Lincomycin hydrochloride	A	100	10	443	1.E+06	407.233	126.1	86	10	39	10	6.33 ± 0.27
4	Ofloxacin	A	500	10	361.37	5.E+05	362.147	318.3	81	10	27	16	7.58 ± 0.07
5	Clarithromycin	A	100	10	747.95		748.494	158.1	101	10	37	10	10.485 ± 0.09
6	Erythromycin	A	100	10	733.92	1.E+06	734.468	158.1	106	10	41	8	9.595 ± 0.06
7	Spiramycin	A	500	10	843.05	2.E+06	843.543	174.2	131	10	51	12	8.445 ± 0.11
8	Cyclophosphamide monohydrate	A	100	10		5.E+05	260.991	139.9	91	10	33	10	8.565 ± 0.02
9	Oleandomycin phosphate	A	100	10	785.86	4.E+05	688.439	158.2	81	10	37	12	9.34 ± 0.04
10	Oxitetracyclin hydrochloride	A	100	10	496.89	1.E+05	461.148	426.1	76	10	27	12	7.495 ± 0.08
11	Tilmicosin	A	500	10	869.13	9.E+05	869.632	174.1	176	10	65	14	9.435 ± 0.36
12	Tylosin	A	100	10	916.1	5.E+05	916.574	174.2	121	10	55	14	9.77 ± 0.05
13	Atenolol	A	500	10	266.34	6.E+05	267.168	190.1	86	10	27	14	1.935 ± 0.25
14	Enalapril	A	100	10	376.45	5.E+05	377.173	234.1	71	10	29	14	9.365 ± 0.04
15	Omeprazole	A	100	10	345.42	6.E+05	346.101	198	51	10	19	16	8.48 ± 0.03
16	Ranitidine hydrochloride	A	100	10	350.86	5.E+05	315.103	176	46	10	27	14	2.17 ± 0.44
17	Salbutamol (free base)	A	500	10	239.31	4.E+05	240.1	148.1	66	10	27	28	1.685 ± 0.29
18	Carbamazepine	A	100	10	236.27	2.E+06	237.118	194	96	10	25	16	9.915 ± 0.02
19	Alubuterol-d3	A	500	10	242.33	3.E+05	243.195	151.1	61	10	31	26	1.63 ± 0.25
20	Octooxylene	A	1000	10	361.5	2.E+05	362.202	250.1	136	10	13	8	14.85 ± 0.02
21	Benzophenone-3	A	100	10		1.E+06	229.092	151.1	71	10	31	10	12.645 ± 0.02
22	MBC	A	500	10	254.367	9.E+05	255.176	105.1	121	10	45	6	11.03 ± 0.01
23	EHMC	A	1000	10	290.397	1.E+05	291.257	179	101	10	13	14	15.065 ± 0.03
24	(-)-Nicotine	A	100	10	162.23	8.E+05	163.149	132	71	10	21	10	0.835 ± 0.02
25	Metolachlor-d6	A	100	10	283.8 (289.8)	6.E+05	290.128	258.1	71	10	23	26	12.415 ± 0.02
26	Caffeine-d1	M	100	10	194.19 (195.19)	1.E+06	196.128	139.1	76	10	29	8	6.31 ± 0.24
27	Methyl dihydrojasmonate	M	100	10	226.31	6.E+05	227.159	153.1	66	10	19	12	12.22 ± 0.02
28	Ampicillin	M	1000	10	349.4	1.E+06	350.078	106	66	10	31	6	7.22 ± 0.09
29	Benzophenone	M	100	10	182.22	1.E+06	183.134	105	61	10	23	6	12.145 ± 0.02
30	Benzophenone-d10	M	100	10	192.28	8.E+05	193.166	110	66	10	25	6	12.08 ± 0.01
31	alpha-Isomethyl ionone	M	1000	10	206.33	4.E+05	207.187	111.1	66	10	17	8	13.835 ± 0.01
32	Methotrexate	M	1000	10	454.44	7.E+05	455.151	308	101	10	29	8	7.195 ± 0.09
33	Propranolol hydrochloride	M	100	10	296.81	2.E+06	260.194	116.1	91	10	25	20	9.425 ± 0.04
34	Allopurinol	M	1000	10	136.11	1.5.E+06	137.059	110	76	10	29	6	1.165 ± 0.02
35	Sotalol hydrochloride	M	1000	10	308.3	2.4.E+06	273.103	255.3	71	10	17	48	2.185 ± 0.22
36	Fenofibrate	M	1000	10	360.83	8.0.E+05	361.087	233.1	96	10	25	4	14.025 ± 0.02
37	Acetophenetidine	M	100	10	179.22	1.2.E+06	180.163	110.2	76	10	35	20	9.07 ± 0.02
38	Levofloxacin	M	1000	10	361.36	2.4.E+05	362.127	318.2	71	10	31	10	7.58 ± 0.07
39	Chlortetracyclin	M	1000	10	515.35	6.5.E+05	479.106	444.1	56	10	31	12	8.73 ± 0.03
40	(+-)-Fluoroxetine hydrochloride	M	1000	10	345.79	1.4.E+05	310.11	148.2	36	10	13	12	10.895 ± 0.12
41	Norfluoxetine	M	1000	10	295.3	1.7.E+05	296.127	134.3	36	10	11	4	10.87 ± 0.10
42	Carbamazepine 10,11-epoxide	M	1000	10	252.1		253.028	180.1	66	10	37	4	9.105 ± 0.01
43	Monensin sodium	M	1000	10	692.9	1.1.E+06	693.417	675.4	16	10	45	8	17.42 ± 0.18
44	2-Ethoxy benzamide	M	1000	10	165.2	6.0.E+05	166.051	121.1	66	10	25	10	8.9 ± 0.02
45	HMS(Homosalate)	M	1000	10	262.35	2.5.E+05	263.144	139	26	10	11	22	17.855 ± 0.86
46	Ampicillin-d5	M	1000	10	354.4	1.0.E+06	355.171	111.1	56	10	29	8	7.19 ± 0.09
47	Canamycin A-disulfate dihydrate	M	1000	10	716.67	2.2.E+05	485.214	163.2	91	10	35	14	0.75 ± 0.08
48	Cefazolin sodium	M	1000	10	476.49	4.0.E+05	477.059	406.9	96	10	15	16	7.885 ± 0.08
49	Dihydrostreptomycine 1.5sulfate	M	1000	10	730.75	1.2.E+05	584.216	263.4	196	10	43	42	0.715 ± 0.03
50	OTC hydrochloride-13C1-d3	M	1000	10	500.9	1.2.E+05	465.137	430.2	81	10	29	12	7.41 ± 0.14
51	Penicillin G potassium-d5	M	1000	10	377.5	6.0.E+05	340.101	217.1	111	10	21	10	9.705 ± 0.04
52	Tetracycline hydrochloride	M	1000	10	480.9	3.2.E+05	445.123	410.2	91	10	29	12	7.815 ± 0.06
53	Verapamil hydrochloride	M	1000	10	491.07	7.0.E+06	456.189	164.9	136	10	39	12	10.615 ± 0.11
54	Diltiazem hydrochloride	M	1000	5	450.98	7.5.E+06	415.177	150.2	81	10	55	4	9.925 ± 0.06
55	Metoprolol	M	1000	10	267.36	7.0.E+06	268.155	73.8	81	10	41	2	8.19 ± 0.04
56	Roxithromycin	M	1000	1.75	837.04	4.9.E+06	838.111	680.5	36	10	25	8	10.54 ± 0.09
57	Atenolol-d7(Isopropyl-d7)	M	1000	5	273.38	4.3.E+06	274.153	190.1	91	10	29	18	1.7755 ± 0.35
58	Carbamazepine-d10	M	1000	10	246.33	1.4.E+06	247.109	204.3	106	10	31	34	9.855 ± 0.01
59	Doxycycline hydrochloride	M	1000	10	512.94	1.1.E+06	445.136	428.2	76	10	27	12	8.945 ± 0.03
60	Fenbendazole	M	1000	10	299.35	6.5.E+05	300.066	268	111	10	29	42	10.77 ± 0.04
61	Ketoprofen	M	1000	10	254.28	1.6.E+06	255.086	209.1	86	10	21	20	11.015 ± 0.01
62	Praziquantel	M	1000	10	312.41	5.5.E+05	313.156	203.1	106	10	25	4	10.955 ± 0.02
63	Pyrantel pamoate塩	M	1000	10	594.68	5.0.E+05	207.105	150	86	10	43	28	10.83 ± 0.08
64	Sulfamethoxazole-d4	M	1000	10	257.3	1.4.E+06	258.111	160.1	71	10	23	14	8.835 ± 0.02
65	Sulfamonomethoxine	M	1000	10	298.32	1.1.E+06	281.027	155.9	76	10	25	16	8.32 ± 0.03
66	Ticlopidine hydrochloride	M	1000	10	300.25	6.0.E+05	265.049	125	71	10	45	20	8.87 ± 0.05
67	1,3,9-Trimethylxanthine	M	1000	10	194.19	4.5.E+05	195.035	138.2	86	10	27	4	1.645 ± 0.23
68	Norfloxacin	M	1000	10	319.33	1.5.E+06	320.147	302.2	81	10	27	14	7.555 ± 0.07
69	Norfloxacin-d5	M	1000	10	324.34	5.9.E+05	325.109	307	96	10	33	6	7.49 ± 0.12
70	Antipyrine-d3(N-methyl-d3)	M	1000	10	191.25	3.4.E+06	192.128	59	96	10	53	10	7.645 ± 0.06
71	(-)-Cotinine	M	1000	10	176.22	1.2.E+06	177.081	79.9	76	10	33	6	0.85 ± 0.02
72	Cotinine-d3(N-methyl-d3)	M	1000	10	179.24	1.0.E+06	180.036	80	106	10	33	14	0.86 ± 0.03
73	Famotidine	M	1000	10	337.45	5.0.E+05	338.102	259.3	51	10	17	16	1.875 ± 0.35
74	Orbifloxacin	M	1000	10	395.4	5.0.E+05	396.134	352.1	91	10	29	4	8.02 ± 0.05
75	Triclabendazole	M	1000	10	359.66	7.0.E+05	360.97	346	136	10	37	18	12.58 ± 0.01
76	Betaxolol hydrochloride	M	1000	7	348.89	6.9.E+06	308.336	55.2	86	10	65	8	9.565 ± 0.06
77	CPE(Cefditoren)	M	1000	10	620.73	3.5.E+06	621.07	241	151	10	35	14	10.8 ± 0.02
78	Enrofloxacin	M	1000	10	359.39	1.0.E+06	360.119	316	96	10	27	14	7.94 ± 0.05
79	Famotidine-13C3	M	1000	10	340.43	9.4.E+05	341.027	191.9	61	10	31	12	1.87 ± 0.35
80	Ormetoprim	M	1000	10	274.32	4.5.E+05	275.045	259.2	86	10	37	24	7.62 ± 0.06
81	Spectinomycin hydrochloride	M	1000	10	368.81	1.5.E+06	332.961	98	101	10	39	8	0.78 ± 0.02
82	Terbinafine hydrochloride	M	1000	4.5	327.89	6.9.E+04	292.18	141	31	10	49	8	11.785 ± 0.21
83	Terbinafine hydrochloride-d7	M	1000	10	334.93	3.5.E+05	299.258	148.2	76	10	37	10	11.74 ± 0.21
84	Thiabendazole-13C6	M	1000	10	207.3	3.3.E+05	208.089	181	91	10	39	16	6.5 ± 0.19
85	Trimethoprim	M	1000	10	290.32	9.0.E+05	291.002	274.9	101	10	35	6	7.285 ± 0.09
86	Acetaminophen	M	100	10	151.16		152.149	110.1	31	10	23	18	2.23 ± 0.15
87	Disopyramide	M	100	10	339.47		340.268	239.2	56	10	25	12	8.58 ± 0.04
88	Diazepam	M	1000	10	284.74	1.5.E+06	286.085	194.1	96	10	41	12	11.225 ± 0.01
89	Hexylcinnamaldehyde	M	1000	10	216.32	4.0.E+05	217.149	129	76	10	25	8	14.255 ± 0.02

infusion溶媒　M:メタノール, A:アセトニトリル

また，FIA（フローインジェクションアナリシス）によって得られた各パラメータ（イオンソース条件）の最適値を表－7に示す。

これらの結果より対象物質の一斉同時分析の LC/MS/MS 条件を決定した。

2）　GC/MS による質量分析条件の検討

（2）negative モード

No.	物質名	Infusion 溶媒	Infusion 濃度 (μg/L)	流速(μL/min)	分子量	precursor ion 強度(cps)	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	保持時間(分)
1	Sulfamethoxazole	A	100	10	253.28	2.E+05	251.979	155.9	-65	-10	-22	-25	0.81 ± 0.02
2	Ibuprofen	A	100	10	206.28	2.E+05	205.053	161.1	-55	-10	-10	-9	8.23 ± 0.02
3	Ibuprofen-d3	A	100	10	209.28	2.E+05	208.049	164	-50	-10	-10	-7	8.24 ± 0.03
4	17beta-Estradiol	M	1000	10	272.38	2.E+06	271.044	144.9	-155	-10	-54	-15	10.525 ± 0.02
5	Estron(E1)	M	100	10	270.37	7.E+04	268.975	144.9	-115	-10	-54	-5	11.025 ± 0.02
6	Bezafibrate	A	100	10	361.8	7.E+04	359.919	273.8	-65	-10	-22	-5	7.965 ± 0.03
7	Clofibric acid-d4	A	100	10	218.65		217.077	130.8	-50	-10	-24	-7	6.4 ± 0.04
8	Furosemide	A	100	10	330.74	6.E+05	328.96	284.9	-65	-10	-24	-9	6.885 ± 0.02
9	Hydrochlorothiazide	A	100	10	297.74	6.E+05	295.928	268.8	-95	-10	-28	-7	0.82 ± 0.01
10	17alpha-Ethinylestradiol	M	1000	10	296.41	7.E+05	295.107	144.9	-135	-10	-52	-9	10.945 ± 0.02
11	Propyl paraben	A	100	10	180.2	6.E+05	179.03	91.9	-70	-10	-34	-5	6.85 ± 0.02
12	Buthyl paraben	A	100	10	194.23	6.E+05	193.05	92	-80	-10	-34	-5	7.725 ± 0.02
13	Ethyl paraben	A	100	10	166.17	1.E+05	164.942	91.8	-65	-10	-34	-7	2.705 ± 0.14
14	Methyl paraben	A	100	10	152.15	1.E+05	150.901	91.9	-65	-10	-30	-5	1.34 ± 0.02
15	Triclosan	M	1000	10	289.54	2.E+06	286.847	141.8	-75	-10	-46	-5	9.455 ± 0.07
16	Ivthalamic acid	M	1000	10	613.92	6.E+05	612.8	126.7	-45	-10	-30	-19	0.745 ± 0.05
17	5-Amino-2,4,6-triiodoisophthalic acid	M	1000	10	558.84	2.E+05	557.741	513.6	-30	-10	-8	-13	0.83 ± 0.05
18	Ioproniide	A	1000	10	791.15	9.E+05	789.974	126.8	-110	-10	-60	-9	1.37 ± 0.05
19	Iopamidol	A	1000	10	777.12	1.E+06	775.886	126.7	-115	-10	-46	-21	0.815 ± 0.02
20	Salicylic acid	A	1000	10	138.12	2.E+06	136.945	92.8	-50	-10	-22	-5	1.11 ± 0.06
21	Acetylsalicylic acid	M	1000	10	180.16	5.E+05	178.864	136.9	-45	-10	-10	-7	0.795 ± 0.03
22	Sodium-17beta-Estradiol-2,4,16,16-d4-3-sulfate	M	100	10	378.45	2.E+06	355.126	275.1	-80	-10	-50	-1	8.235 ± 0.02
23	3,4,4-Trichlorocarbanilide	M	100	10	315.59	8.E+05	314.949	161.8	-75	-10	-18	-11	13.1 ± 0.01
24	Clofibric acid	M	1000	10	214.65	8.E+05	212.922	126.9	-45	-10	-22	-7	6.42 ± 0.06
25	Sodium valproate	M	1000	10	166.2	5.4.E+06	142.937	71.2	-55	-10	-52	-1	0.825 ± 0.02
26	Indomethacin	M	1000	10	357.79	2.0.E+06	356.09	311.8	-35	-10	-16	-15	8.645 ± 0.02
27	Indomethacin-d4	M	1000	10	361.79	1.5.E+05	360.007	316.1	-45	-10	-10	-5	8.635 ± 0.02
28	Gemfibrozil	M	1000	10	250.3	2.2.E+06	249.055	120.8	-45	-10	-18	-19	8.655 ± 0.01
29	Phenytoin	M	1000	10	252.27	8.9.E+05	250.978	102	-65	-10	-38	-7	7.005 ± 0.01
30	Ivermectin	M	1000	10	874.5		873.541	229.3	-110	-10	-40	-1	15.83 ± 0.03
31	N-(4-hydroxyphenyl-2,3,5,6-d4)-acetamide	M	1000	10	155.17		153.742	110.9	-30	-10	-18	-19	1.24 ± 0.02
32	Fenoprop(2,4,5-TP)	M	1000	10	269.35	8.4.E+05	268.76	196.8	-45	-10	-24	-11	8.02 ± 0.02
33	Abamectin	M	1000	10	873.1	2.5.E+05	871.468	229.1	-100	-10	-44	-1	14.395 ± 0.02
34	Benzylpenicillin sodium	M	1000	10	356.4	1.0.E+06	332.174	268.2	-70	-10	-38	-47	10.1 ± 0.03
35	Diatrizoic acid	M	1000	10	613.91	4.5.E+05	612.737	126.6	-35	-10	-16	-17	0.745 ± 0.05
36	Ivhexol	M	1000	10	821.1	6.0.E+05	819.908	126.9	-115	-10	-94	-21	1.265 ± 0.03
37	Oxolinic acid	M	1000	10	261.23	1.4.E+05	261.036	79.8	-135	-10	-70	-1	9.775 ± 0.27
38	Piperazinecitrate pentahydrate	M	1000	10	722.74		448.246	286.1	-105	-10	-42	-13	10.35 ± 0.06
39	Thiamphenicol	M	1000	10	356.22	1.5.E+06	354.95	185.9	-65	-10	-28	-13	7.375 ± 0.05
40	Tamulin fumarate	M	1000	10	609.81	1.6.E+05	608.395	114.8	-60	-10	-22	-19	13.26 ± 0.05
41	13C12-Triclosan	M	1000	10	303.97	1.2.E+06	302.923	254.7	-60	-10	-12	-17	3.675 ± 0.31
42	4-Aminobenzoic-2,3,5,6-d4 acid	M	1000	10	141.6	2.1.E+06	139.943	95.9	-40	-10	-18	-5	0.705 ± 0.05
43	Cefalexin monohydrate BP	M	1000	10	365.4	8.0.E+05	345.954	267.8	-50	-10	-18	-19	0.815 ± 0.02
44	Diclofenac sodium	M	1000	10	318.13	4.3.E+05	293.97	250	-40	-10	-10	-13	8.605 ± 0.01
45	Flubiprofen	M	1000	10	244.26	5.0.E+05	242.915	198.9	-20	-10	-8	-13	8.215 ± 0.05
46	(S)-(+)-Naproxen	M	1000	10	230.26	4.0.E+05	228.932	169.9	-75	-10	-22	-5	7.23 ± 0.02
47	Fenoprofen	M	1000	10	242.27	2.5.E+06	241.039	196.7	-40	-10	-10	-27	7.98 ± 0.02
48	Sulfadimethoxine-d4	M	1000	10	314.33	3.0.E+06	312.958	65.8	-125	-10	-76	-9	0.81 ± 0.01
49	Diclofenac-d4	M	1000	10	300.8	2.5.E+06	300.34	255.8	-55	-10	-20	-1	8.59 ± 0.01
50	4-Hydroxybenzoic acid	M	1000	10	138.12	2.1.E+06	136.654	92.8	-70	-10	-20	-3	1.11 ± 0.07
51	N-(4-Hydroxyphe)-acet-2,2,2-d3	M	1000	10	154.18	1.0.E+05	152.906	106.8	-60	-10	-26	-7	0.81 ± 0.01
52	Losartan potassium	M	1000	10	422.91	6.5.E+06	421.983	126.9	-65	-10	-38	-11	8.375 ± 0.02
53	Losartan-d3	M	1000	10	425.93	2.0.E+05	425.171	126.7	-65	-10	-42	-21	8.38 ± 0.02
54	Triclabendazole metabolite	M	1000	10	329.8	3.5.E+05	328.836	181.9	-395	-10	-28	-33	10.855 ± 0.01
55	Ursodeoxycholic acid	M	1000	10	392.57	1.2.E+06	391.246	373.1	-165	-10	-44	-3	8.335 ± 0.04
56	Sulfadimethoxine	M	1000	10	310.33	1.6.E+06	309.081	65.6	-80	-10	-52	-7	1.165 ± 0.01
57	Sulfamethazine	M	1000	10	278.33	2.4.E+06	276.854	122.1	-100	-10	-34	-7	1.19 ± 0.04
58	Benzoic acid	M	1000	10	122.12	1.8.E+06	120.901	77.1	-35	-10	-16	-3	0.76 ± 0.04
59	p-Hydroxybiphenyl	M	1000	10	170.21	2.0.E+06	168.872	141	-65	-10	-32	-15	8.785 ± 0.01
60	4-Hydroxybiphenyl-d9	M	1000	10	179.27	1.0.E+06	178.017	98	-100	-10	-40	-1	8.74 ± 0.01
61	(+-)-Thiopental	M	1000	10	242.3	1.8.E+06	240.994	58.1	-40	-10	-36	-7	8.665 ± 0.03
62	3,4,5-Trichlorophenol	M	1000	10	197.45	1.2.E+06	196.861	160.7	-65	-10	-28	-31	7.985 ± 0.04
63	Ursodeoxy acid -d5	M	1000	10	397.6	1.0.E+06	396.386	378.6	-115	-10	-42	-3	8.35 ± 0.04
64	Valsartan	M	1000	10	435	2.6.E+05	434.235	350.1	-80	-10	-24	-25	7.115 ± 0.02
65	Salinomycin	M	1000	10	751	4.7.E+04	749.536	241.1	-105	-10	-46	-1	9.515 ± 0.01
66	Sodium nifurstyrenate	M	1000	10	281.2	9.0.E+05	258.055	184.1	-35	-10	-20	-29	7.395 ± 0.02
67	Theophylline	M	1000	10	180.16	3.7.E+06	179.044	163.8	-65	-10	-26	-13	1.155 ± 0.04
68	Valsartan-d3	M	1000	10	438.54	2.2.E+06	437.172	349.9	-95	-10	-28	-11	7.115 ± 0.02
69	Theophylline 2-13C	M	1000	10	183.164	2.8.E+06	182.044	167.3	-65	-10	-26	-7	0.785 ± 0.02
70	Mefenamic acid	M	100	10	241.28		239.998	196	-75	-10	-24	-13	8.735 ± 0.02
71	Phenobarbital sodium	M	1000	10	254.22	1.5.E+06	231.972	189.1	-50	-10	-16	-15	0.805 ± 0.02
72	Pyrantel pamoate塩	M	1000	10	594.68	1.5.E+06	387.03	143.2	-55	-10	-54	-9	7.11 ± 0.04
73	17beta-Estradiol	M	1000	10	272.38	2.6.E+06	271.044	144.9	-155	-10	-54	-15	10.525 ± 0.02
74	Estron(E1)	M	100	10	270.37	7.E+04	268.975	144.9	-115	-10	-54	-5	11.025 ± 0.02
75	17alpha-Ethinylestradiol	M	1000	10	296.41	7.E+05	295.107	144.9	-125	-10	-52	-9	10.945 ± 0.02
76	Sodium-17beta-Estradiol-2,4,16,16-d4-3-sulfate	M	100	10	378.45	2.E+06	355.126	275.1	-80	-10	-50	-1	8.235 ± 0.02

infusion溶媒　M:メタノール, A:アセトニトリル

条件の検討結果を表－8および表－9に示す。各物質について，保持時間，測定イオンおよび確認イオンの条件を決定できたため，本条件で 42 分で全対象物質を検出可能と考えられた。

（2）　前処理および測定条件の検討

1）　LC/MS/MS の条件の検討

各対象物質の保持時間は表－6に示した通りである。多くの対象物質において保持時間の変動は 0.1 分以内と小さかったが、例えば Ranitidine hydrochloride のように変動が 0.44 分と大きな物質がいくつかあった。今後この原因を検討する必要がある。オフロキサシン，ジヒドロストレプトマイシン，ドキシサイクリン塩酸塩およびイブプ

ロフェンについて作成した検量線を図－１に示す。

表－７　LC/MS/MS の FIA による最適化結果

（１）positive モード

Positiveモード	
イオンソース条件	Gas1：40
	Gas2：60
	Curtain Gas (CUR)：50
	Ion Spray (IS)：4500
	Temperature (TEM)：500
	Collision Gas (CAD)：6
	Interface Heater (ihe)：Off
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3μm, 2.0mm×50mm)
溶離液	A：アセトニトリル　B：0.1%ぎ酸水
流速	200μL/min
分析時間	20分
	0 min B：100% A：0%
	↓グラディエント通液
	10 min B：0% A：100%
	↓アイソクラティック通液
	12 min B：0% A：100%
	↓グラディエント通液
	14 min B：100% A：0%
	↓アイソクラティック通液
	20 min B：100% A：0%

（２）negative モード

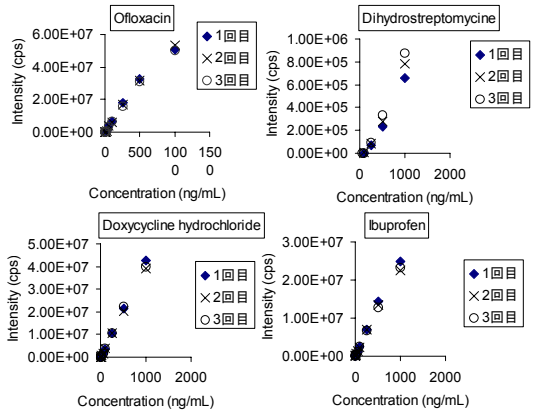
Negativeモード	
イオンソース条件	Gas1：30
	Gas2：80
	Curtain Gas (CUR)：20
	Ion Spray (IS)：-4500
	Temperature (TEM)：400
	Collision Gas (CAD)：6
	Interface Heater (ihe)：Off
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3μm, 2.0mm×50mm)
溶離液	A：アセトニトリル　B：0.05%TEA水
流速	200μL/min
分析時間	20分
	0 min B：100% A：0%
	↓グラディエント通液
	10 min B：0% A：100%
	↓アイソクラティック通液
	12 min B：0% A：100%
	↓グラディエント通液
	14 min B：100% A：0%
	↓アイソクラティック通液
	20 min B：100% A：0%
※Estrogen4物質	
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3μm, 2.0mm×50mm)
溶離液	A：アセトニトリル　B：0.05%TEA水
流速	200μL/min
分析時間	22分
	0 min B：100% A：0%
	↓グラディエント通液
	6 min B：70% A：30%
	↓グラディエント通液
	13 min B：0% A：100%
	↓アイソクラティック通液
	15 min B：0% A：100%
	↓グラディエント通液
	16 min B：100% A：0%
	↓アイソクラティック通液
	22 min B：100% A：0%

表－８　GC/MS 質量分析条件（１）

使用機器	HP5890/HP MSD 5973 (Agilent社製)
使用カラム	30m, 0.25 mm i.d. HP-5MS (J&W)
測定条件	35℃→200℃(5℃/分)→285℃(20℃/分)5分保持 スプリットレス注入(1μL)

表－９　GC/MS 質量分析条件（２）

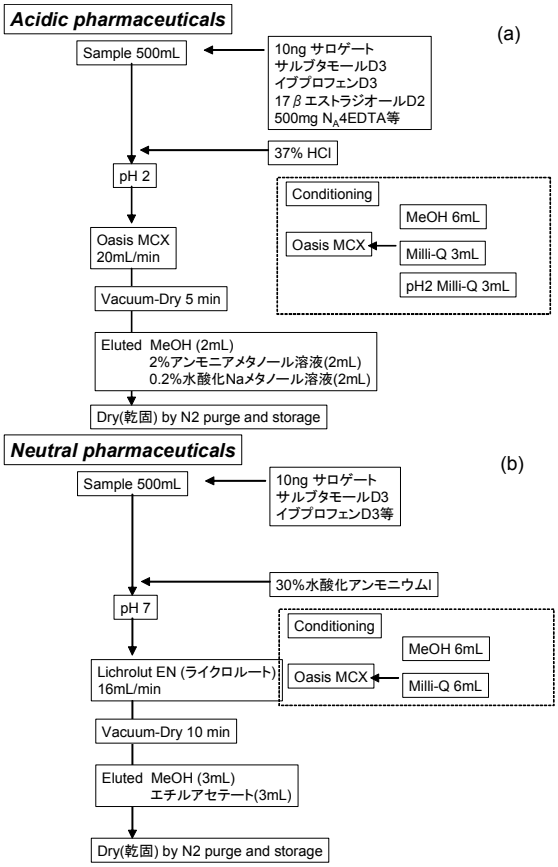
	保持時間(分)	確認イオン(m/z)	定量イオン(m/z)
Benzyl acetate	11.21	150	108
Terpineol-d3	11.7	139	62
Terpineol	11.79	136	59
Methyl salicylate	11.97	152	120
Isobornyl acetate	14.31	136	95
Iso methyl ionone	19.11	206	150
DPMI	19.51	206	191
BP-d10	22.47	192	110
BP	22.55	182	105
Methyl dihydrojasmonate	23.16	156	83
ADBI	24.51	244	229
AHMI	25.36	244	229
OS	26.245	138	120
Caffeine	27.14	–	194
Caffeine-d9	27	115	203
ATII	27.16	–	215
Musk xylene-d15	27.154	–	294
HHCB	27.17	258	243
AHTN	27.43	258	243
Musk xylene	27.42	297	282
HMS	27.74	138	69
Benzyl salicylate	27.54	228	91
Metalochlor-d6	29.642	168	244
Musk ketone	29.77	294	279
4-MBC(Z)	30.359	239	254
BP-3	30.57	227	228
Ft-d10	30.775	–	212
4-MBC(E)	30.994	239	254
Benzyl cinnamate	31.69	131	91
Menthyl anthranilate	32.14	119	137
EHMC(Z)	32.989	290	178
Octyl PABA	34.281	277	165
EHMC(E)	34.758	290	178
OC	36.907	361	249



図－１　オフロキサシン，ジヒドロストレプトマイシン，ドキシサイクリン塩酸塩およびイブプロフェンの検量線

今回対象とした多くの物質については 1000ppb までの濃度範囲で R^2=0.99 以上の線形性が確認された。しかし、ジヒドロストレプトマイシンのような一部の物質については 500ppb や 1000ppb といった高濃度領域でピークのエリア面積の変動が大きくなり再現性が若干低下する傾向（ジヒドロストレプトマイシンにおける 1000ppb でのピークのエリア面積の変動係数が 14%）が見られた。今後、

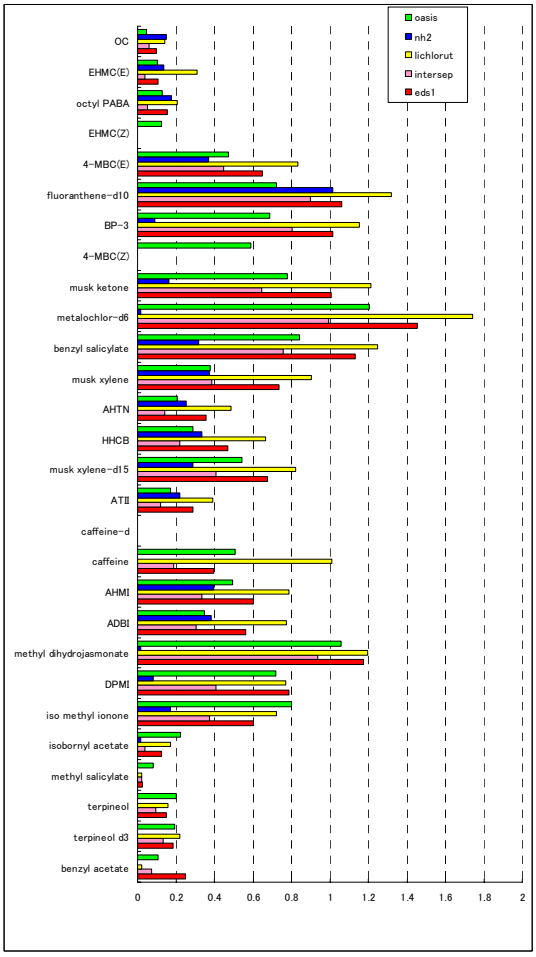
分析対象物質ごとに定量下限値及び検出下限値を把握するとともに一部の分析対象物質について定量可能な濃度範囲を整理していく必要がある。前処理条件については，既往の報告事例 [25]を参考にして，図－２に示す方法を採用することとし，今後検出下限値，定量下限値の確認，固相カートリッジの最適化，回収率の確認を行い，実試料の分析へ適用していくこととする。



図－２　LC/MS/MS による医薬品類分析のための前処理フロー（a:酸性化合物用，b:中性化合物用）

２）　GC/MS の条件の検討

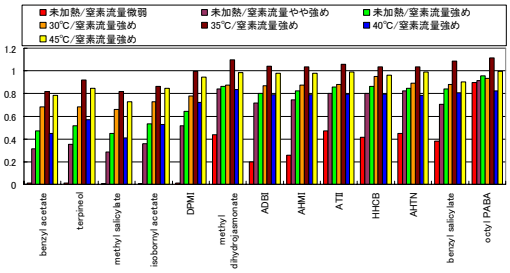
前処理に用いる固相カートリッジについて，ミリ Q 水に各物質を添加して回収率を検討した結果を図－３に示す。ここでいう回収率とはサロゲート物質で補正した濃度を用いて計算した回収率ではなく、未補正の濃度で計算した絶対回収率を指すものとする。この結果より、いずれの固相カートリッジにおいても、対象物質すべてに対し、測定に十分な回収率を得られなかった。



図－３　前処理の固相カートリッジの回収率

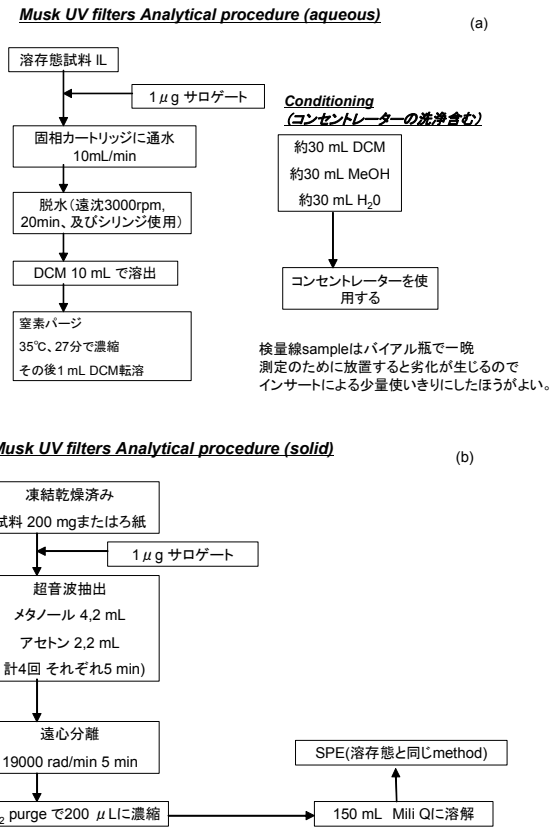
特に、benzyl acetate や terpineol 等の log Kow が 4.5 よりも小さく揮発性の高い香料や Octyl PABA や OC のような log Kow が大きく疎水性の高い紫外線吸収剤で回収率が著しく小さかった。考えられる原因として、充填剤の種類も考えられたが、揮発性の高い香料では充填剤の種類に関係なく低かったことから、窒素パージによる濃縮方法に問題があるのではないかと推測された。

そこで，濃縮方法について検討した結果を図－４に示す。



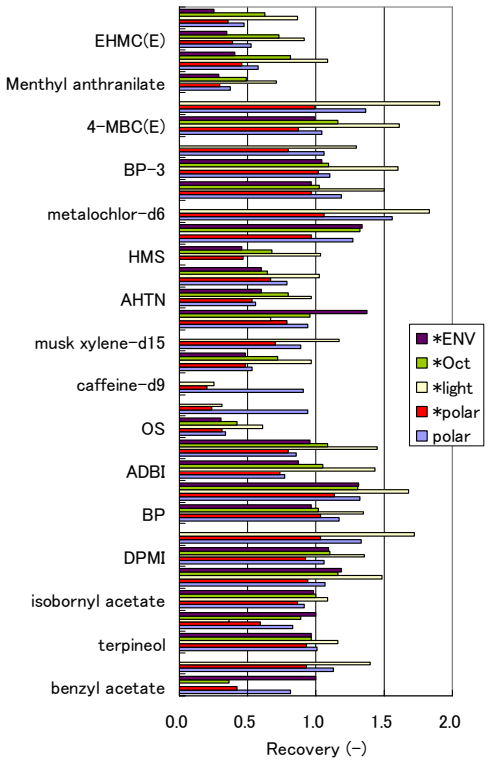
図－４　濃縮方法と回収率

結果として、加熱しながら窒素流量を強め（液面が大きく波立つ程度）で濃縮を行うことで、揮発性の対象物質の回収率が大幅に改善することが明らかとなった。一方、疎水性の強い Octyl PABA は濃縮条件に大きな影響を受けず、いずれの条件においても 80%以上の高い回収率を示した。このことは、揮発性の高い対象物質は緩やかな条件で濃縮するとジクロロメタンと一緒に揮発する一方で、高温で窒素流量が大きい条件では相対的にジクロロメタンの揮発速度が大きくなる結果、対象物質の揮発量が少なくなり、回収率が改善されるものと考えられた。したがって、本研究では最適な濃縮条件として 35℃で窒素流量を大きめで行うことを採用した。なお、このときの濃縮にかかった時間は 27 分程度であったことから、時間も約 27 分で終了するように窒素流量を適宜調整して行った。以上のことから、図－５のような前処理フローチャートが確立された。なお、固相カートリッジからのジクロロメタンによる溶出については 10ml で吸着された対象物質の 98%以上が溶出されることを確認している。一方で疎水性の強い紫外線吸収剤で回収率が低かった原因は充填剤の特性やミリ Q 水中の分散性の低さが原因が大きいと考えられた。

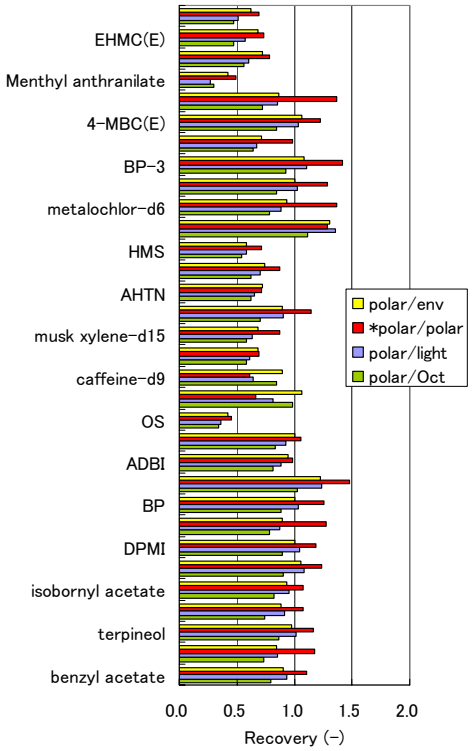


図－５　香料・紫外線吸収剤等の前処理フロー
（a:溶解性試料（ろ液）用，b:固形性試料（SS）用）

次に，非汎用固相カートリッジの検討のため，polar，Oct，light および env の 4 種の固相カートリッジを使った添加回収率試験結果を図－６に示す。なお、疎水性の強い紫外線吸収剤のミリ Q 水中での分散性を高めるため、実験系によってはアセトンで標準物質を溶解しておこなった。しかし、polar についてアセトン添加系と無添加系を比較したところ、全体的にアセトン添加系では回収率が若干低めであり、特に Benzyl acetate や caffeine では著かった。したがって、アセトン添加は回収率改善に有効ではなかった。これはアセトン添加により親水性物質の吸着が抑制されたためと考えられた。



図－６　非汎用固相カートリッジの回収率



図－７　タンデム式固相カートリッジの回収率

一方、固相カートリッジ別に各対象物質の回収率は大きく異なった。その中でも light や Oct は紫外線吸収剤の回収率が高かったが、caffeine や benzyl acetate などの親水性の対象物質の回収率は著しく低い結果となった。逆に polar ではこれらの物質の回収率が高かった。したがって、単一の固相カートリッジではなく、複数の固相カートリッジを直列に連結したタンデム式で分析を行うことが有効であることが示唆された。

そこで、タンデム式で検討を行った結果を図－７に示す。この結果から tandem 式で行うことで多くの対象物質で 80-120%の良好な回収率を得られることが明らかになった。特に polar/polar、polar/env でよい回収率を示したが、OS や Menthyl anthranilate では 40%と依然と回収率が低かった。

以上の結果から図－５のフローチャートに基づき、polar/polar、polar/env といったタンデム式の固相カートリッジを使用することで対象物質の多くを 80-120%の良好な回収率で分析できる可能性が示唆された。

４．　まとめ

４－１．重要物質のリストアップ

我が国における PPCP s の生産量等を調査し，ヒトおよび動物における排泄率や下水処理場での除去率を考慮して，PEC を算出するとともに，毒性情報が得られた物質について PEC/PNEC を求めて，重要物質のスクリーニングを行った。結果として，環境毒性が疑われる重要物質（PEC/PNEC≧1）として，メフェナム酸，オキシテトラサイクリン，クロルテトラサイクリン，スルファメトキサゾール，エリスロマイシン，ストレプトマイシン，クラリ

スロマイシン，アモキシシリンの８物質が選定された。さらに，環境中の存在量が大と推定される要検討物質（PEC ≧ 0.1 μ g//L，ただし PEC/PNEC<0.1 は除外）として，アセトアミノフェンなど１６物質，環境中の存在量が比較的大と推定されるが環境毒性が不明である保留物質（0.01≦PEC<0.1μg//L，ただし PEC/PNEC<0.1 は除外）として，モネンシンなど２１物質をそれぞれ選定し，引き続き情報収集に努めるとともに，１８年度以降の現地調査において存在実態を把握していくこととする。

４－２．分析方法の開発

LC/MS/MS および GC/MS を用いた医薬品類，香料，紫外線吸収剤などの分析方法の開発を行った。LC/MS/MS では，人用および動物用医薬品を中心に約 160 物質を同時分析するための手法を検討し，前処理方法および質量分析方法を開発した。今後は，定量下限値，検出下限値の確認，前処理方法の最適化，回収率の確認などを実施して，現地調査の実試料分析へ適用していくこととする。また，GC/MS を用いた分析方法では，香料・紫外線吸収剤 25 物質を良好な回収率で分析可能な前処理法および質量分析法を開発した。今後は，現地調査試料の分析により，河川流域におけるこれらの物質の挙動の把握に努めることとする。

なお、本調査研究は、国交省からの受託業務費により実施されたものである。

５．　参考文献

1）薬事工業生産動態統計年報（平成１５年版），厚生労働省医政局編集，じほう

2）医薬ランキング 2005 年版，Monthly ミクス 2005 増刊号，エルゼビア・ジャパン

3）各種抗生物質･合成抗菌剤･駆虫剤･抗原虫剤の販売高と販売量，社団法人日本動物医薬品協会，2003

４）医療用医薬品の添付文書情報，独立行政法人医薬品医療機器総合機構，http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html

5）動物用抗菌剤マニュアル，動物用抗菌剤研究会編，Inter Zoo，2004

6）新獣医薬理学（付録 CD-ROM 獣医臨床薬理データ），伊藤勝昭他編，近代出版，2004

7）Guideline on the environmental risk assessment of medical products for human use (draft), Committee for medicinal products for human use, European Medicines Agency, 2005

8）Guidance for industry for the submission of an environmental assessment in human drug applications and supplements, Food and Drug Administration, 1995

9）Marianne E. Balmer, Hans-Rudolf Buser, Markus D. Müller, Thomas Poiger, Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes, Environmental Science & Technology, 2005, 39, 4, 953-962

10）Hans-Rudolf Buser, Marianne E. Balmer, Peter Schmid, Martin Kohler, Occurrence of UV Filters 4-Methylbenzylidene Camphor and Octocrylene in Fish from Various Swiss Rivers with Inputs from Wastewater Treatment Plants, Environmental Science & Technology, 2006, 40, 5, 1427-1431

11）Staci L. Simonich, William M. Begley, Greet Debaere, William S. Eckhoff, Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater, Environmental Science & Technology, 2000, 34, 6, 959-965

12）Thomas A. Ternes, Matthias Bonerz, Nadine

Herrmann, Dirk Löffler, Elvira Keller, Bàrbara Bagó Lacida, Alfredo C. Alder, Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS, Journal of Chromatography A, 2005, 1067, , 213-223

13) Tatsunori Yamagishi, Tomoyuki Miyazaki, Shozo Horii, Seiji Kaneko, Identification of Musk Xylene and Musk Ketone in Freshwater Fish Collected from the Tama River, Tokyo, Bulletin of Environmental contamination and Toxicology, 1981, 26, 5, 656-662

14) Thomas Poiger, Hans- Rudolf Buser, Marianne E. Balmer, Per-Anders Bergqvist, Markus D. Müller, Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, Chemosphere, 2004, 55,951-963

15) Kai Bester, Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant, Chemosphere, 2004, 57, 863-870

16) Hermann Fromme, Thomas Otto, Konstanze Pilz, Polycyclic Musk Fragrances in Different Environmental Compartments in Berlin (Germany), Water Research, 2001, 35, 1, 121-128

17) Haruhiko Nakata, Occurrence of Synthetic Musk Fragrances in Marine Mammals and Sharks from Japanese Coastal Waters, Environmental Science & Technology, 2005, 39, 10, 3430-3434

18) Aaron M. Peck, Keri C. Hornbuckle, Synthetic Musk Fragrances in Lake Michigan, Environmental Science & Technology, 2004, 38, 2, 367-372

19) Elsa Artola-Garicano, Iris Borkent, Kay Damen, Tjalling Jager, Wouter H. J. Vaes, Sorption Kinetics and Microbial Biodegradation Activity of Hydrophobic Chemicals in Sewage Sludge: Model and Measurements Based on Free Concentrations, Environmental Science & Technology, 2003, 37, 1, 116-122

20) 松本比佐志, 足立伸一, 鈴木定彦, 紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用, YAKUGAKU ZASSHI, 2005, 125, 8, 643-652

21) VIRGINIA L. CUNNINGHAM, MARY BUZBY, THOMAS HUTCHINSON, FRANK MASTROCCO, NEIL PARKE, NICHOLAS RODEN, Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps, supporting information, Environmental Science & Technology, 2006, 40, 3456-3462.

22) N J Ayscough, J Fawell, G Franklin and W Young, Review of human pharmaceuticals in the environment, R&D technical report P390, Environment Agency UK, 2000

23) O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, Aquiatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals, Water Research, 36, 5013-5022, 2002

24) 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類成長への影響, 八十島誠他, 水環境学会誌, 27,11,707-714,2004

25) Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Davide Calamari, Roberto Fanelli, Ettore Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, Journal of Chromatography A, 2005, 1092, 206-215

６． 研究発表

下水道および水環境への PPCPs（医薬品等由来化学物質）負荷量の推定，山下　洋正，亀田　豊，尾崎　正明，第 43 回下水道研究発表会 CD-ROM（発表番号Ⅰ-2-7），2006

Ⅱ　その他の予算による研究

【水質チーム】

水生生態系からみた河川水質の評価に関する調査

水循環研究グループ水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　宮島　潔
CREST 研究員　原田　新

1. はじめに

近年、下水道整備により公共用水域の水質は改善され、水生生物への直接的な汚濁の影響はある程度改善されてきたと考えられる。しかし都市域では人口の集中化に伴い、河川水に占める下水処理水の割合は年々大きくなっており、その割合が 90%を超えるような河川もみられている。このような河川においては、公共用水域の水質保全に加え、多様な生物が生育・生息できるような「生態系に配慮した取り組み」が必要となっている。

また、都市の水循環を考慮し、数少ない自己水源である下水処理水の中に含まれる化学物質が河川に放流された後どのような挙動を示すのかについても知見を深める必要性がある。河川における水生生態系に関する研究は、河床材料、河床構造、及び河川水量等の物理的な要因や水質等の要因との関係について精力的に行われているものの、河川水質との関係については、汚水生物体系 [1)]に代表される有機汚濁との関係等が一部の生物について把握されているものの、未だ十分な知見は得られていない。

そこで、本研究では、水質は改善しているものの、下水処理水の流入により水質が急激に変化する都市河川に着目した。この中では、まず処理水の流入先水域に生育・生息している水生生物と水質についての現地調査によるデータを蓄積し、それらを解析することで両者の実態とその関係を把握することを目的とした。

2. 方法

本研究では下水処理水の流入が河川生態系に与える影響を把握するために、いくつかの下水処理水放流先水域における生物相と水質に関するデータを収集し、それらのデータを整理および解析を行うことで、処理水質と出現する生物種との関係を調べた。

また、処理水が採取に多摩川に多く流入する地点において、下水処理場の放流口付近で横断方向に水質測定を行い、放流水と河川水の混合特性について調査を行った。また、下水処理水の放流地点ならびにその上下流地点に形成される水生生物の調査から、下水処理水中に含まれる化学物質の、底生生物の各栄養段階における蓄積について調査を行った。

また、底生生物のうち食物連鎖の起点となる付着藻類について、化学物質の水中から生物への移行状態の把握についての調査も行った。

2.1. 下水処理水放流先生物相調査

(1) 調査対象水域

この調査では、平成 8 年度から平成 15 年度にかけて実施された、9 つの自治体における 12 箇所の下水処理場放流先河川における水質と生物相の現地調査結果をとりまとめ、解析を行った。

表 1 調査対象水域一覧

調査期間	処理場名	処理方式	調査水域に放流する処理水の消毒方式	調査水域	概算処理水量比(%)
H8～H10	S処理場	標準活性汚泥法 + 急速ろ過	塩素	せせらぎ水路	100
H12～H14	A処理場	標準活性汚泥法	塩素	既存河川	70
H13	H浄化センター	二段式嫌気好気活性汚泥法 +急速ろ過	オゾン	既存河川	70
H8～H10	C処理場	嫌気好気活性汚泥法	塩素	既存河川	80
H8～H9	T下水処理場	嫌気硝化内生脱窒法 + PAC注入 + 急速ろ過	オゾン	せせらぎ水路	100
H9～H10 H14～H15	K下水処理場	標準活性汚泥法 + 急速ろ過	オゾン	せせらぎ水路	100
H12～H13	S下水処理場	標準活性汚泥法	塩素	既存河川	70
H12～H13	O浄化センター	標準活性汚泥法 + 急速ろ過	紫外線	ビオトープ	100
H12～H14	Y浄化センター	凝集剤添加 標準活性汚泥法 + 急速ろ過	無し	せせらぎ水路 (H12のみ)	100
			紫外線	冷却池	100
				植生浄化池	100
H9～H11	N処理場	嫌気好気活性汚泥法 + 急速ろ過 + 礫間接触酸化	紫外線	安定池	100
			塩素	既存河川	70
				既存河川	90
H14～H15	M浄化センター	循環式硝化脱窒法 +急速ろ過	塩素	既存河川	50
H12～H14	G浄化センター	標準活性汚泥法	塩素	ビオトープ	100

対象とした放流先水域は、処理水のみが流れる「せせらぎ水路」や「ビオトープ」、および処理水が合流する「既存河川放流口周辺」である。

表 1 に、調査対象となった水域および調査年度についてまとめた。
ここでみられるように、各水域に放流される下水処理水の処理方法や消毒方法は様々であった。

(2) 調査対象項目

この調査で対象とした項目は以下の通りである。

生物：付着藻類，底生動物，植物プランクトン，
魚類
水質：水温，pH，濁度，透視度，電気伝導度，DO，SS，BOD，TOC，T-N，O-N，NH_4-N，NO_2-N，NO_3-N，
T-P，PO_4-P，Chl-a
付着物：乾燥重量，強熱減量，Chl-a

これらの項目のうち、魚類やプランクトン性の生物は水塊を移動するため局所的な水質の違いを反映していない可能性がある。一方、付着藻類や底生動物は移動性が小さいことから、対象とした水域の水質変化を直接また経時的に反映しているものと考えられる。そこで、今回の解析においては、特に付着藻類と底生動物に注目して実施した。

3. 結果

3.1. 下水処理水放流先生物相調査

(1) 塩素消毒による生物相への影響

処理水は公共用水域等に放流する前には衛生上の観点から消毒が行われる。この消毒は生物である細菌等を殺す（または不活性化する）ことを目的としていることから、放流先の生物に対しても影響を及ぼす可能性があると考えられる。

過去の調査結果より、付着藻類出現種のうち緑藻類の *Chlorolobion* 属は、塩素消毒された処理水において特徴的に出現する種であると考えられている。

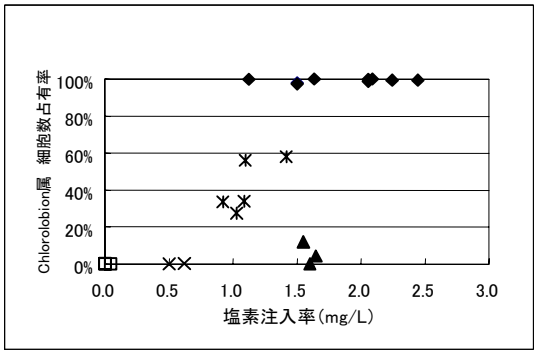


図 1 塩素注入率と *Chlorolobion* 属細胞数占有率の関係

そこで、処理場における塩素の注入率の記録から、調査前 2 ヶ月間の平均塩素注入率と、*Chlorolobion* 属が付着藻類総細胞数に占める割合と比較した結果を図 1 に示す。

ここから、*Chlorolobion* 属の占有率について、塩素注入率が 1.0mg/L 付近から立ち上がるＳ字の曲線が見て取れた。

すなわち、塩素注入率で約 1.0mg/L 以上、処理水中の総残留塩素濃度の実測値で約 0.1～0.2mg/L 以上で *Chlorolobion* 属の占める割合が急激に大きくなる傾向がみられた。

次に、生物の出現種数と塩素消毒との関係を整理した。まずは、現地で測定された残留塩素濃度と当該水域で確認された生物の種数を、付着藻類と底生動物とに分けて整理した結果を図 2 に示した。しかし、前提となる残留塩素が検出されたデータ数が少なく、消毒のレベルと出現種類数の関係をはあくすることはむずかしかった。

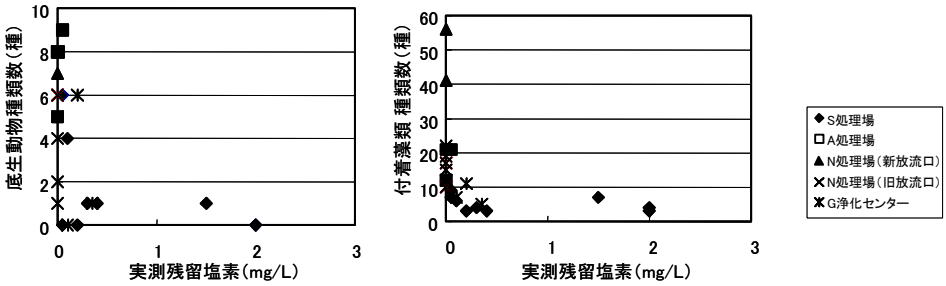


図 2 残留塩素濃度と出現生物の種類数

そこで、前述のように塩素注入率平均値と、当該水域で確認された生物の種数を、付着藻類と底生動物とに分けて整理した結果を図 3 に示す。

付着藻類の N 処理場（新放流口）におけるデータがやや離れているが、これは処理水の放流開始直後のデータであることから、処理水の影響が十分に反映されていなかったことが要因として考えられる。

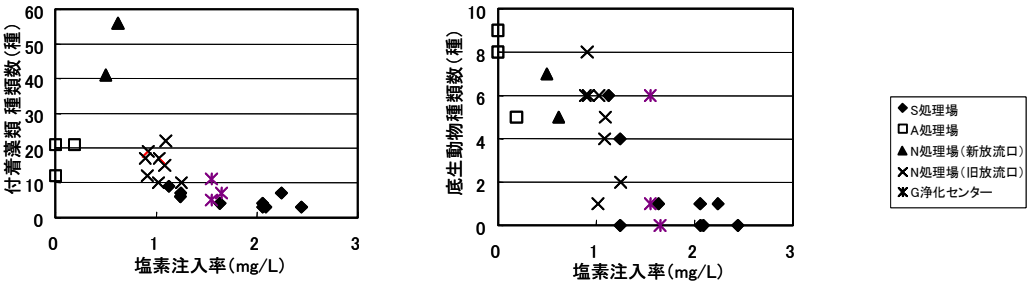


図 3 塩素注入率と出現生物の種類数

この結果から、付着藻類、底生動物ともに塩素注入率が 1.0～1.5mg/L を越えると目立って影響が大きくなり、出現する種類数が極端に少なくなる傾向がうかがわれた。

(2) 栄養塩類濃度と生物相の変化

下水処理水は通常の河川水と比べて 1 桁近く高い栄養塩濃度であることが多い。そこで、栄養塩を用いて生育する付着藻類の変化について、各生物指数と栄養塩濃度の関係から検討した。

ここでは、T 下水処理場と、K 下水処理場の処理水放流先に注目した。これらの放流先は、どちらも処理水 100%の人工せせらぎ水路であり、放流される処理水はどちらもオゾン処理されているが、K 下水処理場は標準活性汚泥法による処理であるのに対して、T 下水処理場では高度処理（嫌気硝化内生脱窒法，PAC 添加）によって栄養塩類の除去を行っている。このため、両処理場の処理水放流先水域を比較することで、消毒方式や河川構造など他の要因に影響されずに、栄養塩濃度の違いを主な要因として把握することができる可能性がある。そこで、この 2 つの水域における栄養塩類濃度と付着藻類の状況についてのデータについて比較を行った。

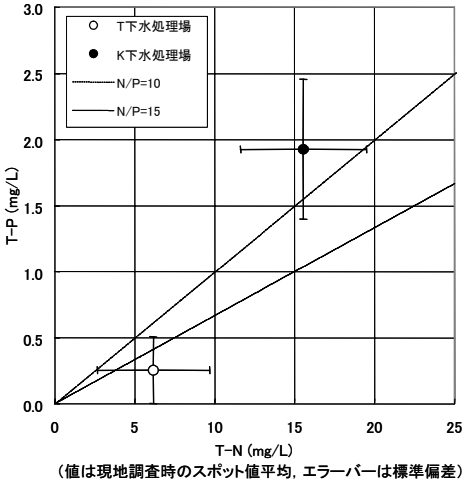


図 4 各放流水の栄養塩濃度の関係

まず、両処理場からの放流水における栄養塩類濃度について、T 処理場 8 回分、K 処理場 7 回分のスポットサンプルによるデータをまとめると図 4 のようになった。ここから、K 下水処理場からの放流水は、T 下水処理場からの放流水と比べて、窒素で約 3 倍、リンでは約 7 倍近く高い濃度であったことがわかる。

そこで、処理場の持つ継続的な定期データなども取り込んで、調査前 2 ヶ月間の処理場定期分析結果の値を平均した数値を栄養塩類濃度として、付着藻類の生物量と多様性について比較を行った。

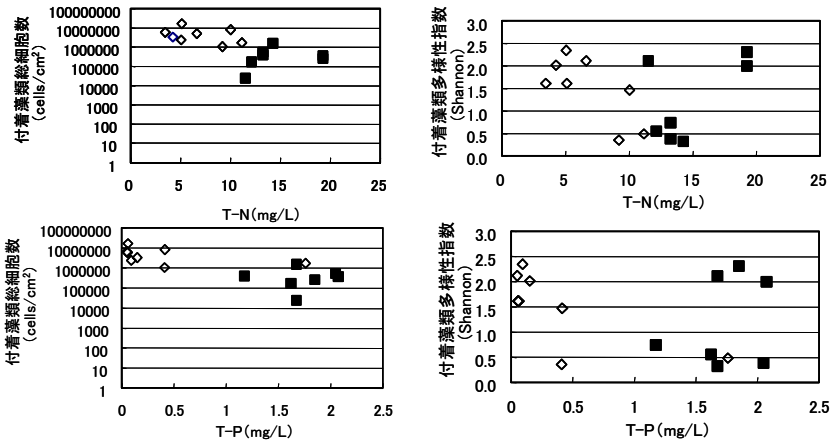


図 5 栄養塩類濃度と付着藻類相の関係

生物量を総細胞数、多様性を Shannon の多様性指数(H')として比較した結果を図 5 に示す。

なお、Shannon の多様性指数は、以下の式によって計算される。

多様性指数は生物種の多様性を評価する指数で、多くの種が出現し、かつ個体数が均等なほど指数は大き

くなり、多様性が高くなることを示している。逆に特定の出現種のみが卓越した場合は、指数は小さくなる傾向を示す。

$$H' = -\sum_{i=1}^{S} P_i \log_2 P_i$$

［S：出現種類数，　Pi：i 番目の種類の個体数が総個体数に占める割合］

この結果から、栄養塩濃度の違いによる付着藻類の各指数生物量と多様性の差は明確にならず、栄養塩濃度の違いが付着藻類相に及ぼす影響について説明することはできなかった。

(3) アンモニア性窒素濃度と底生動物

アンモニアは、藻類などの光合成を行う生物にとっては栄養素ともなるが、底生動物などに対しては逆に毒性を示す物質である。そこで、アンモニア濃度と生息する底生動物の状況とを比較し、その影響を把握する検討を行った。

なお、自然水域中でアンモニアは、イオン化していない$[NH_3]$とイオン化している$[NH_4^+]$の 2 つの形態で存在しており、これらは水温と pH によって平衡関係が維持される。このイオン化していない$[NH_3]$の方がイオン化している$[NH_4^+]$より毒性が高いとされる。このためアンモニアと生態系との関係を考察するには、イオン化アンモニアのみでなく、非イオン化アンモニアとの関係を考慮する必要がある。特に pH がアルカリ側に傾く場合、および水温が高くなる場合に$[NH_3]$の割合が高くなる。

これらの関係は、水温を T（℃）とすると、以下の式で表される。

$$pK = 0.09018 + \frac{2729.92}{273.2 + T}, \qquad \frac{[NH_3]}{[NH_4^+]} = 10^{(pH - pK)}$$

この式を用いて、各調査において測定されたアンモニア性窒素濃度の値と水温、pH の値から非イオン化アンモニアの濃度を計算し、底生動物の出現個体数を分類科別に整理した。なお、使用したデータは S 処理場（9 回），A 処理場（6 回），H 浄化センター（3 回），C 処理場（11 回），T 下水処理場（8 回），K 下水処理場（11 回），S 下水処理場（7 回），O 浄化センター（5 回），Y 浄化センター（6 回），N 処理場（7 回），M 浄化センター（6 回），G 浄化センター（6 回）の調査結果による。

結果を次ページの図 6 に示す。

イトミミズやユスリカ、ミズムシ，シマトビケラなどは低濃度域から高濃度域まで、幅広い濃度範囲で出現が確認されたが、イトトンボ科やエグリトビケラ科などの生物は非イオン化アンモニア濃度の上昇に伴って、出現個体数が減少していった。

そこで、底生動物の分類科ごとに、最も多い個体数の出現が確認された時の非イオン化アンモニア濃度の範囲と出現が確認された時の非イオン化アンモニア濃度を表 2 に整理し、そこから生息可能な濃度範囲を推定した結果を示す。

ここから、確認された地点数が少ないものの、カワゲラ目の生物は、0.5μg/L を超える水域では出現がみられず、アンモニアに対する耐性が弱いことがみてとれた。

一方、イトミミズ科やトビケラ科の一部、ユスリカ科などの生物は、1mg/L を超える濃度の水域においても出現が確認され、アンモニアに対する耐性が大きいことがうかがわれた。

しかし、同じトビケラ科でもエグリトビケラ科は出現のみられた最大濃度は高いレベルにあるものの、最も多く出現がみられた濃度域は 1ng/L 未満であり、ある程度の耐性はあるが、基本的にはアンモニア濃度の低い水域に多く生育するものと考えられる。また、同様の傾向はヒラタカゲロウ科やトンボ目にもみられ、これらの生物も低アンモニア濃度の水域を指標する生物とみられる。

なお、底生動物のうち昆虫類などには成虫期には水中を離れる種もあるため、出現状態の把握には各生物種の生活環に注意する必要がある。ただし、今回の整理に用いたデータは生活環を考慮して集計できる方針の詳細な調査によるものではないため、全ての季節のデータを総合して処理している。

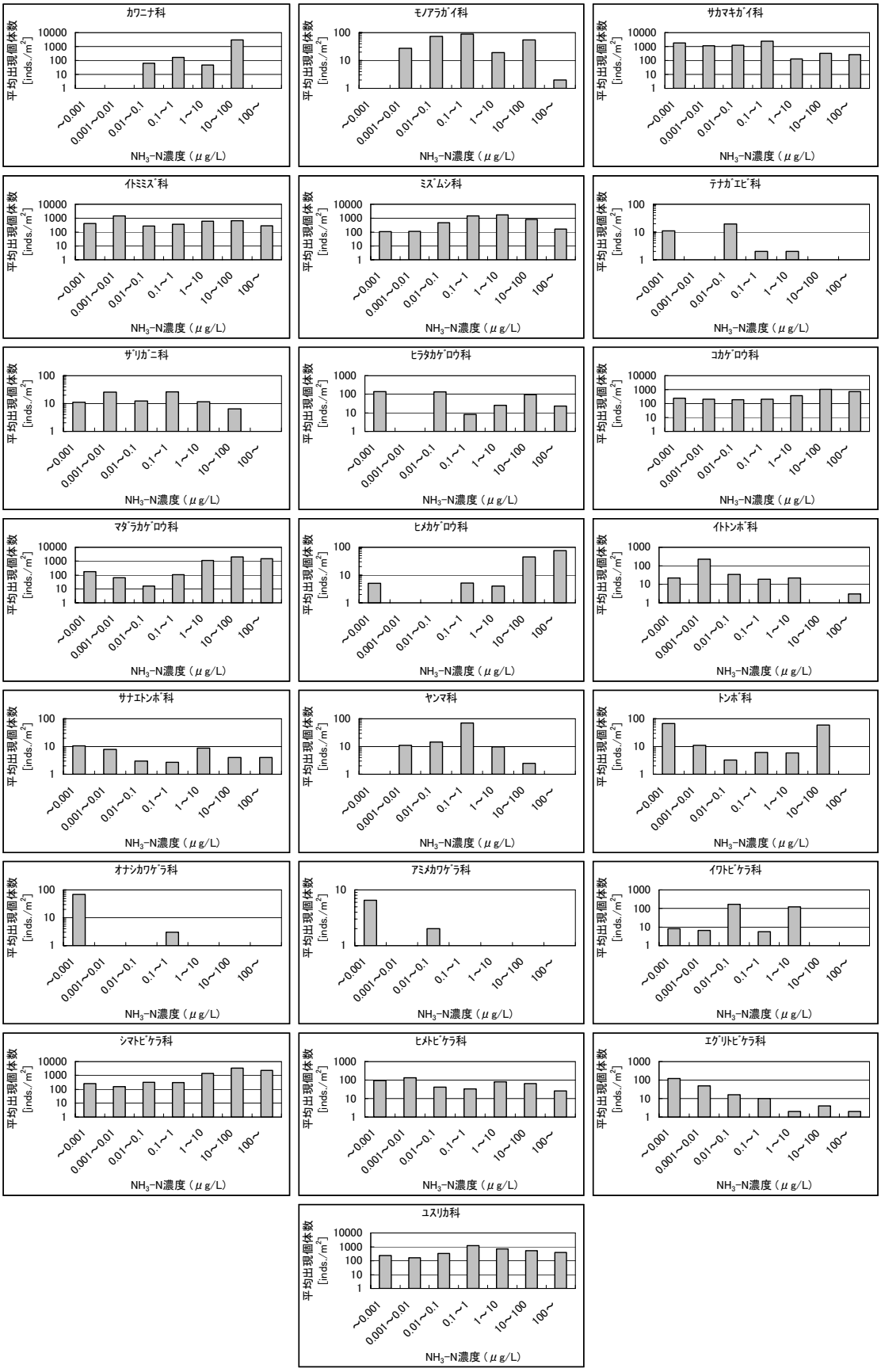


図 6 非イオン化アンモニア濃度と底生動物出現状況

(4) 底生動物の分類による水環境の評価

底生動物は、水中に生息する生物の中では魚類等と比べて移動力が弱く環境の変化に対して逃避行動を取りにくいことや、調査時に偶然通過しただけの個体を採取してしまう可能性が小さい。従って、底生動物の生物相は、対象とする水域の経時的な水質変化の影響を直接または間接的に反映しているものと考えられる。直接的な影響としては、高温や毒性物質などの底生動物そのものの活動に影響するものであり、間接的な影響としては、餌となる藻類やデトリタスなどの生産に影響するものである。

底生動物による水環境の評価方法としては、冒頭で述べたように各生物種の汚濁に対する耐性から整理された「汚水生物体系」などがあるが、ここでは底生動物の餌の食べ方による分類「摂食機能群」と生活形態による分類「生活型」によって分類を行った。また、検討の対象とした水域は、既存の河川に処理水が放流される地点の前後として、処理水の流入による水環境の変化について比較した。

表 2 底生動物出現種と NH_3 濃度範囲

	最も多く出現する NH_3濃度範囲（μg/L）	出現のみられた NH_3最大濃度（μg/L）	出現確認延べ地点数（地点）
カワニナ科	10 ～ 100	11.30	16
モノアラガイ科	0.1 ～ 1	156.11	62
サカマキガイ科	0.1 ～ 1	442.51	156
イトミミズ科	0.001 ～ 0.01	540.32	210
ミズムシ科	1 ～ 10	478.13	226
テナガエビ科	0.01 ～ 0.1	4.18	6
ザリガニ科	0.1 ～ 1	86.00	41
ヒラタカゲロウ科	～ 0.001	433.05	20
コカゲロウ科	10 ～ 100	916.64	160
マダラカゲロウ科	10 ～ 100	478.13	52
ヒメカゲロウ科	100 ～	332.23	15
イトトンボ科	0.001 ～ 0.01	442.51	33
サナエトンボ科	～ 0.001	452.28	19
ヤンマ科	0.1 ～ 1	25.31	15
トンボ科	～ 0.001	20.13	30
オナシカワゲラ科	～ 0.001	0.48	4
アミメカワゲラ科	～ 0.001	0.02	3
イワトビケラ科	0.01 ～ 0.1	2.62	14
シマトビケラ科	10 ～ 100	540.32	127
ヒメトビケラ科	0.001 ～ 0.01	540.32	61
エグリトビケラ科	～ 0.001	916.64	13
ユスリカ科	0.1 ～ 1	540.32	330

底生動物についての摂食機能群および生活型については、表 3 のよう分類を行った。

表 3 摂食機能群と生活型の分類別特徴

摂食機能群	略語	特徴	具体例
濾過食者	濾	網を張ったりして水中の有機物粒子を濾し取って食べる.	二枚貝類, シマトビケラ科, ブユ科など.
堆積物採集者	堆	底質中の有機物粒子を集めて食べる.	イトミミズ類, マダラカゲロウ類, ユスリカ類など.
刈取食者	刈	基質上の付着藻類等を刈り取って食べる.	巻貝類, ヒラタカゲロウ類, ウスバヒメガガンボ亜科など.
破砕食者	破	落葉等をかじって食べる.	オナシカワゲラ科, カクツツトビケラ科など.
寄生者	寄	宿主に寄生する.	ヒル類, ミズバチなど.
捕食者	捕	肉食.	トンボ類, ゲンゴロウ類, 水生半翅類など.

生活型	略語	特徴	具体例
匍匐型	匍	のしのしといった感じで歩いて移動する.	巻貝類, マダラカゲロウ類, トンボ類など.
滑行型	滑	体は偏平で, 石の表面を滑るように移動する.	ヒラタカゲロウ類など.
掘潜型	掘	砂や泥の中に潜っている.	二枚貝類, イトミミズ類, ユスリカ類など.
携巣型	携	石や落葉で巣をつくる.	エグリトビケラ科, カクツツトビケラ科など.
固着型	固	石表面に吸着し, あまり移動しない.	ウスバヒメガガンボ亜科, ブユ科など.
造網型	造	糸を用いて網を張り, 餌をとる.	シマトビケラ科, ヒゲナガカワトビケラ科など.
遊泳型	遊	主に遊泳して移動する.	コカゲロウ科, ゲンゴロウ類, 水生半翅類など.

出典:
・Richard W. Merritt and Kenneth W. Cummins, "An Introduction to the Aquatic Insects of North America", KENDALL/HUNT PUBLISHING COMPANY, (1978)
・谷田一三（監修）, 丸山博紀, 高井幹夫（著）,「原色　川虫図鑑」, 全国農村教育協会, (2000)
からとりまとめ.

①摂食機能群による比較

放流先の河川がコンクリート三面張りである下水処理場（C 処理場，N 処理場）と、河床が礫である通常の河川（H 浄化センター，A 処理場，S 下水処理場，M 浄化センター）における、摂食機能群による分類を個体数に占める割合で整理すると、図 7 のようになった。

摂食機能群による比較において、三面張り河川では処理水の流入前後において出現していた種はいずれも「刈取食者」「堆積物食者」であり、明確な違いはみられなかった。

一方、礫床の河川においては、S 下水処理場では処理水の流入後に「濾過食者」の割合が増加し、「堆積物食者」が減少したのに対して、A 処理場では逆に「濾過食者」が減少し、「堆積物食者」が増加した。

このことは、河床の特性を反映している可能性が考えられる。すなわち、S 下水処理場では放流口上流の河床は堆積が多いものと考えられ、それらを餌とする堆積物食者の割合が増えるが、河床堆積物が少ない場合は堆積物食者が減り、代わって処理水によって増加する藻類等の流下を捕らえて餌とする濾過食者が増加したものと考えられる。一方、A 処理場では、相対的に清冽な水質である河川水の水域では、様々な摂食形態をとる生物が生息していたが、河床堆積物が増加、河床への有機物の沈降が生じ、堆積物食者の割合が高くなったものと考えられる。このように、摂食機能群による比較では、三面張りのような単調な河床の河川においては、摂食機能群のバリエーションが得られず、明確な変化を捕らえることは出来なかったが、礫床の河川においては、河床の特性を表現している可能性が示唆された。

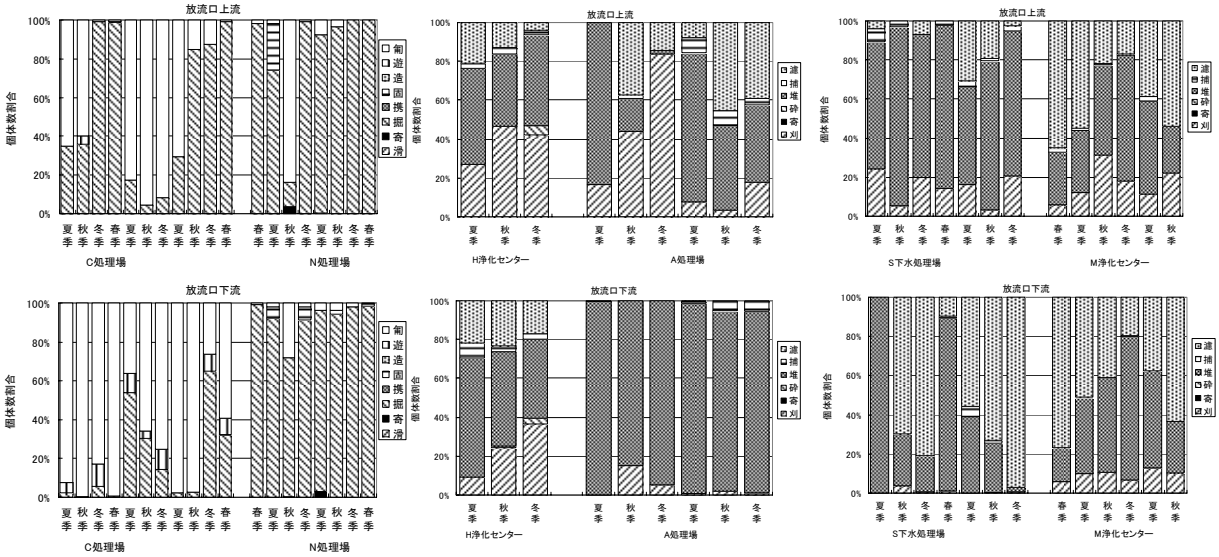


図 7 摂食機能群からみた底生動物相の変化

②生活型による比較

同様に、放流先の河川がコンクリート三面張りである下水処理場（C 処理場，N 処理場）と、河床が礫である通常の河川（H 浄化センター，A 処理場，S 下水処理場，M 浄化センター）における、摂食機能群による分類を個体数に占める割合で整理すると、図 8 のようになった。

ここから、生活型による比較においても、三面張りの都市河川においては、放流口の上下流による目立った違いはみられなかった。

一方、礫河床の河川においては、S 下水処理場では、造網型については放流口下流部で割合が相対的に高くなる傾向がみられたが、A 処理場では造網型は放流口上流部で割合が高くなっていた。

このように、生活型による分類では、河川の構造等の要因によって処理水の流入の影響は一定の傾向を示すことはなかったが、河床が自然に近い礫の河川においては、変化が認められた。

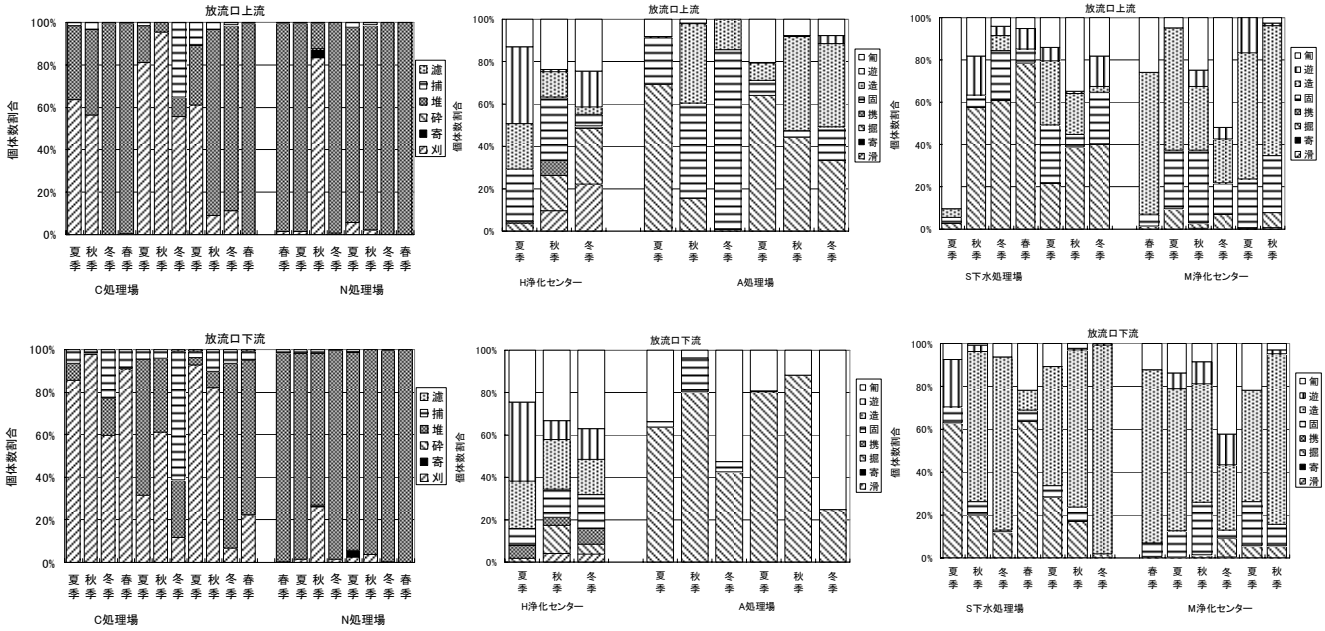


図 8 生活型からみた底生動物相の変化

4. 考察とまとめ

以上の結果をもとに、水生生態系と水質との関係について、以下の視点から検討とまとめを行った。

・水質の違いと水生生物相の変化の実態

・水生生物に影響を及ぼす水質項目
・水生生物相からみた水質評価（バイオロジカルクライテリア）

4.1. 水質の違いと水生生物相の変化の実態

2 つの下水処理場における処理水放流先の調査結果から、栄養塩類濃度と付着藻類の生物量および多様性との間の関係については明確な関係を得ることはできなかった。

このことは、両水域ともに下水処理水が水量の全てを占めているため、栄養塩濃度が T-N : 5～15mg/L、T-P : 0.3～2.0mg/L と幅広い範囲にあったにもかかわらず、通常の河川水（T-N : 0.1～1mg/L，T-P : 0.01～0.1mg/L）と比べた場合には高い範囲に集中していたことが要因の一つと考えられる。

河川における付着藻類量と栄養塩濃度の関係についての報告として、米国 EPA の資料 [2)]に全窒素および全リンと付着藻類中の Chl-a 量との関係を示すデータが紹介されている。このデータからは全窒素濃度で約 1mg/L 以下の範囲で、また全リン濃度で約 0.3mg/L 以下の範囲で濃度依存的に Chl-a 量が増加する傾向がうかがうことができるが、この範囲を超えると栄養塩濃度と Chl-a 量との関係はみられなくなっていた。これは、栄養塩類が一定以上の濃度になると、藻類の生長にとって過剰となり、増殖速度に対して飽和状態になっていることを意味すると考えられる。

下水処理における高度処理は、内湾における栄養塩類の総量規制等に対応して近年整備が進められており、海域等における富栄養化の低減に効果をあげ始めている。しかし、上記の結果から今後において放流先河川の生態系にまで配慮を進めていく際には、現段階における高度処理のレベルから、さらに一段階進んだレベルまで対策を行う必要があるものと考えられる。

4.2. 水生生物に影響を及ぼす水質項目

本研究の中で扱った水質項目の中で、水生生物に影響を及ぼすと考えられる項目として、塩素消毒とアンモニアを取り上げ、その影響について以下に検討を行った。

(1) 塩素消毒

塩素注入率と出現生物種数の関係において、河川（処理場）ごとに注入率の範囲に偏りがあるため、地域差が含まれる可能性もあるが、全体として一定の傾向がみられ、付着藻類、底生動物ともに塩素注入率が 1.0～1.5mg/L を越えると、出現する種類数が極端に少なくなる傾向がみられた。

実際の水域で生物に作用する塩素量の指標は、残留塩素濃度（遊離体およびクロラミン等の結合体）であるが、かなり高濃度で処理水に注入されている場合以外は、現地の水質測定では残留塩素として検出されることはない。これは、処理水中に含まれる有機物等と塩素が反応することで、有効塩素量が低下するためである。

しかし、これまでみたように仮に放流する時に残留塩素が検出されていなくても、消毒時に塩素注入量が一定以上の場合には、出現する生物に何らかの影響が及んでいる可能性がうかがわれる。従って、放流先の生態系への影響を考慮する必要がある場合には、塩素注入量を必要最小限に留めるようコントロールすることや、脱塩素過程の追加、オゾンや紫外線等の代替消毒法への変更などを検討する必要がある。

(2) アンモニア

アンモニアのイオン化は前述のように pH と水温によるを変数とする平衡状態によって決定される。これらの要因を生態系の構成生物との関係から考えると、次のような過程により非イオン化状態のアンモニア濃度に作用する可能性が考えられる。

水中におけるアンモニアは通常はほとんどイオン化している
と考えられるため、比較的高濃度であっても毒性は低い
↓
水温が高温になり、光エネルギーの供給も十分な夏期には、
河床における付着藻類等の光合成生物が高い栄養塩濃度を背景に大量に繁茂する。
↓
光合成が盛んになることで、炭酸同化が進み、水中の pH が上昇する
↓
水温と pH の上昇により、非イオン化アンモニアの割合が上昇し
生物に対する毒性が高くなる

従って、排水等により高アンモニア濃度である水域においては、例えある時点において水生生物への影響が確認されていなくても、夏期の昼間などの特殊な条件下においては、急激にその毒性が高まる可能性もあ

り、注意が必要であると考えられる。

4.3. 水生生物相からみた水質評価（バイオロジカルクライテリア）

生息する生物の状態から当該水域の水環境を評価しようというバイオロジカルクライテリアの考え方は、冒頭で述べた汚水生物体系をはじめ、1980 年代後半にアメリカ合衆国で導入された IBI(Index of Biological Integrity)という魚類に関して総種類数や特定のグループに属する種類数など 10 程度の項目にそれぞれ得点を与えた指数や、ICI(Invertebrate Community Index)という IBI と同様な考え方を底生動物に当てはめた指数[3)]、また、IBI-Japan という IBI における考え方を、日本に適応した底生動物に当てはめて提案された指標[4)]などいくつかのものが提示されてきている。これらは、対象水域の状態の把握に有効である。

そこで、ここでは河川に下水処理水等の大きく水質が異なる水が流入した際の中小都市河川における水環境の“変化”について、生物相から評価する手法について検討を行った。

下水処理水が放流される 6 箇所の水域において、生息する底生動物を「摂食機能群」および「生活型」によって分類し処理水の合流前後で比較した。その結果、いくつかの水域について処理水の流入による水質の変化によると考えられる底生動物相の変化が確認された。

表 4 摂食機能群からみた水環境の評価

分類＼反応	比率の増加	比率の減少
濾過食者	水質変化： 有機物量の増加 物理変化： 流速の上昇	水質変化： 有機物量の減少 物理変化： 河床の泥化
堆積物採集者	水質変化： 有機物量の増加 栄養塩濃度の上昇 物理変化： 流速の低下	水質変化： 有機物量の減少 栄養塩濃度の低下 物理変化： 流速の上昇
刈取食者	水質変化： 有機物量の減少 物理変化： 流速の上昇	水質変化： 有機物量の増加 栄養塩濃度の上昇 （撹乱の少ない河川の場合） 物理変化： 流速の低下 河床の泥化
その他	上述の生物種が変化したことによる間接的影響	

このことは、底生動物相の変化から逆に水質の変化を捉えることができる可能性を示していると考えられる。この結果をもとに、底生動物の摂食機能群及び生活型における各分類群が、水質の変化に対してどのような反応を示すかについての仮説を検討することで、生物相の状態から水質を評価する指標を提示することを試みた。

下水処理水による水質の変化を対象とした場合に、底生動物の「摂食機能群」や「生活型」へ与える影響を考えると、次のような反応が仮説として想定される。

a) 摂食機能群に与える変化

①：濾過食者

処理水中の有機物濃度は、放流先河川水中の有機物濃度とは異なる。また、水中に含まれる藻類の量は、処理水中の栄養塩によって増殖し、下流ほど増加することが想定される。従って、餌となる有機物量や藻類量が多くなるため、濾過食者の割合が高くなると想定される。

また、流速の低い水域では、処理水の流入によって流速が上がることで、水中の有機物の捕捉効率が高まることで、生息数が増加する可能性も考えられる。

②：堆積物採集者

餌となる堆積物に与える処理水の影響は、放流先河川の状態によって大きく異なると考えられる。すなわち、放流先が汚濁した河川であり有機性の堆積物が多く存在する場合には、処理水は堆積物を掃流する方向に作用することから、堆積物採集者は減少すると考えられる。

逆に放流先河川が処理水質と比較して清冽である場合、処理水中に含まれる有機物が沈殿したり、栄養塩の供給によって繁茂した付着藻類が堆積することによって有機性の堆積物が増加する方向に作用することから、堆積物採集者の割合は増加するものと考えられる。

③：刈取食者

処理水に含まれる栄養塩類は、餌となる付着藻類の生育を促進する。しかし、処理水中で生育する付着藻類は、付着の状態が自然な河川水中とは異なり、底生動物の餌として採取しにくい形状になる可能性も考えられるため、小型の生物にとっての餌としては適さなくなることも考えられる。

従って、刈取食者に対する処理水の影響は状況によって異なるものと考えられる。

例えば、流れが速く、河床も礫状で撹乱の多い水域では、付着藻類の生育が良くなり、それらを餌とする刈取食者の割合は増加する。一方、流れが安定して撹乱の少ない水域では、付着藻類相が糸状体となる種が中心となる方向に遷移し、刈取食者の割合が減少する。

④：その他の摂食機能群

破砕食者や寄生者，捕食者などの生物群については、処理水の流入による直接の影響は他の群と比べると小さいと考えられるが、他の生物群が変化することにより間接的に変化することは考えられる。

b) 生活型に与える変化

①：滑行型

これらの生物は表面に移動の障害となるような堆積物や糸状藻類がないような石や岩の所で生息する。従って、処理水によって堆積物が掃流されれば増加し、逆に堆積方向に作用すれば減少すると考えられる。また、処理水中の栄養塩類によって糸状体等が形成される場合には減少する要因となりうる。

②：掘潜型

これらの生物は、河床に潜ることのできる砂や泥が存在する場所に生息する。したがって、前述の a-①堆積物採集者と同様に、処理水の放流による堆積物の状態変化に伴って、生息数も変化するものと考えられる。

③：携巣型

流れがあり、巣を固定させることのできる石などの基盤がある場所に生息することから、汚濁した河川においては処理水による掃流効果で有機物等の堆積が少なくなるために増加し、清冽な河川においては処理水による栄養塩濃度の上昇による付着藻類の繁茂などにより減少する。

表 5 生活型からみた水環境の評価

分類＼反応	比率の増加	比率の減少
滑行型	水質変化： 有機物量の低下 物理変化： 流速の上昇	水質変化： 栄養塩濃度の上昇 （撹乱の少ない河川の場合） 物理変化： 河床の泥化
掘潜型	水質変化： 有機物量の増加 栄養塩濃度の上昇 物理変化： 流速の低下	水質変化： 有機物量の減少 栄養塩濃度の低下 物理変化： 流速の上昇
携巣型	物理変化： 流速の上昇	水質変化： 有機物量の増加 栄養塩濃度の上昇 （撹乱の少ない河川の場合） 物理変化： 流速の低下 河床の泥化
増網型	水質変化： 有機物量の増加 物理変化： 流速の上昇	水質変化： 有機物量の減少 物理変化： 河床の泥化
その他	上述の生物種が変化したことによる間接的影響	

④：造網型

網を張って餌となる有機物等を捕捉することから、処理水の流入に対しては、前述の a-①濾過食者と同様の傾向を示すものと考えられる。

⑤：その他の生活型

前述以外の生物群については、処理水の流入による直接の影響は他の生物群と比べると小さいと考えられるが、堆積物の状況や石礫の存在状況などによって、個別の生物種でみると影響を受ける可能性がある。

以上の仮説をまとめ、生物の変化によって表現される水質の変化をまとめると表 4 及び表 5 のようになる。

なお、表中の変化が示す意味は、絶対的な量を意味するものではない。すなわち、水塊と水塊の間における相対的な量の方向性を示すものである。また、対象生物の変化についても、出現の有無を意味するのではなく、底生動物相全体の中における、相対的な比率の変化の方向性を示すものである。

なお、この解析方法についての課題点としては、以下の点が考えられる。

・現状では、摂食方法や生活様式についての情報が得られている底生動物種は限りがある

・同じ種でも地域性や採取時期によって生活様式等が変化する可能性がある

従って、フィールド調査などにより、底生動物の生態についての知見をさらに収集整理し、精度をあげることが必要である。

参考文献

1) 津田松苗 (1972) 水質汚濁の生態学，公害対策技術同友会

2) USEPA (2000), Nutrient Criteria/Technical Guidance Manual/Rivers and Streams, EPA-822-B-00-002

3) Wayne S. Davis, Thomas P. Simon (1995) Biological assessment and criteria: tools for water resource planning and decision making, Lewis Publishers.

4) 森下依理子 (1996) 水環境カルテ，生物からのメッセージ川と湖の博物館 4，山海堂

底泥－水間の物質移動に関する調査

水環境研究グループ水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　阿部千雅

【要旨】

湖沼等の閉鎖性水域では、流域からの流入及び内部生産によって生じる汚濁物質は、水との界面付近の底泥に蓄積することが多く、また、底層環境の季節変化等によっては底泥から溶出することにより水質に悪影響を及ぼすことがある。このため、底泥と水が存在する環境下における汚濁物質の挙動を解明することは、健全な水環境の保全のために重要な課題である。本調査は、富栄養化対策の観点から底泥－水間の栄養塩類の移動現象を解明することを目的としている。

平成 13 年度から平成 17 年度にかけて富栄養化の現象がみられる湖沼やダム貯水池における現地調査、底層環境改善実験、及び、採取した底泥サンプルを用いた室内実験などを行った。その結果は以下に示す通りである。

1) 底質からの栄養塩溶出機構については、底泥性状と溶出の関係、外力におる底泥表面の変化と溶出の関係、湖水の水質と底泥性状の関係についての新しい知見を得た。

2) 溶出量推定方法の開発については、土木研究所が共同研究で開発した DO、ORP センサー等による連続測定をベースとした水柱及び底泥表層の水質モニタリングシステムを用いることによって溶出速度を推定できることが分かった。

3) 溶出試験方法については、現存マニュアルには記載されていない重要なポイントについて整理し提案した。

キーワード：底泥、栄養塩、溶出、DO、ORP、モニタリング

1.はじめに

流域からの汚濁負荷の他に、底泥からの汚染物質の溶出が水質改善の遅れの原因となっており、また同時に、棲息する生物環境にも悪い影響を与えている。効果的な底泥の対策を立てるため、また、将来の水質を予測するために、底泥に含まれる栄養塩類等の汚染物質の変化機構を解明し、底泥が水質に与える影響を評価する手法の確立が求められている。

このため本調査においては、①底泥からの栄養塩などの溶出機構の解明、②底泥から水への栄養塩等溶出量推定方法の提案、③底泥からの栄養塩等の溶出量推定のための試験方法の提案、を達成目標として平成 13 年度より 17 年度までの期間研究を行った。

2.平成 17 年度調査の内容

2.1　底質性状と溶出の関係

2.1.1　底質の性状の鉛直分布と溶出速度

貯水池底泥性状の季節変動を調査し、以下のことが明らかとなった。

(1)底層水 DO 濃度の低下により、底泥表層において間隙水 TOC 濃度が上昇し、一方 DO 濃度が高まると TOC 濃度は低下する。

(2)間隙水中の PO_4-P 濃度は、ほぼ TOC 濃度と同様の傾向を示す。これは有機物(TOC)生成による還元力によってリン酸の金属塩が還元され、PO_4-P の溶出をもたらすものと考えられる。

(3)間隙水中の NH_4-N 濃度は、水温が上昇すると全体的に増加するが、底泥中から底層水への移動速度は成層期に低下する傾向にあり、これは底層水中 NH_4-N 濃度が増加することの影響であると考えられる。

(4)NO_3-N は底層水に DO が存在する時に底泥表層において生成され、底泥の深部に向かって拡散する。

2.1.2　牛縊前貯水池の底質の金属類分布特性

(1)　流入、湖心、流出地点における金属類の分布（水平、鉛直方向）

閉鎖性水域において金属類の多量の蓄積は、還元的条件下では底泥表面と水界面から鉄やマンガンが 2 価のイオンとして上層に溶出・拡散し赤水や黒水の原因となる可能性もある。更に鉛や亜鉛などの金属は、人体や生物にも悪影響を及ぼしかねないため、底質中における金属類の存在実態と挙動に関するデータの蓄積が望まれている。三春ダムに設けられている牛縊前貯水池において金属類の底質調査を行い、その分布特性について検討を行った。調査は平成 16 年 1 月から平成 16 年 10 月の期間に 2 ヶ月毎（1、3、5、7、10 月）に実施した。調査期間中における本貯水池の水深は 6（夏期）～10m（冬期）であった。調査地点を図 1 に示す。

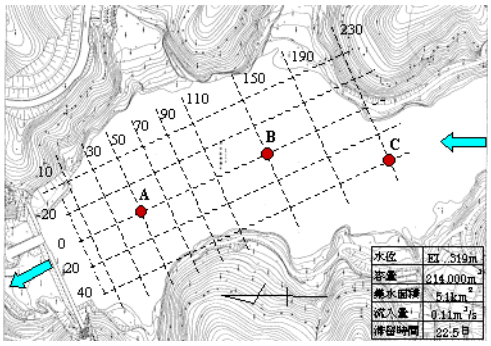


図１　調査地点

底質中の各地点における金属類濃度を表１に示す。地点間における金属類濃度はＣ地点に比べ下流側のＡ地点とＢ地点が高い傾向を示した。各元素の濃度は、土壌の組成で示されている自然に含有する量の平均範囲内であり、その範囲を越える金属類の分布は確認されなかった。調査地点における底質の主組成は、それぞれシルト（Ｃ地点）と粘土（ＡとＢ地点）であり、粒径が小さくなるに従い金属類が増加する傾向が見られ、土砂の流入と新生堆積物が大きく関与していると示唆された。

表１　底質中の金属類濃度（mg/g dry）

地点	A			B			C		
	最小	最大	平均	最小	最大	平均	最小	最大	平均
Fe	36.7	61.5	52.4	45.6	57.4	51.7	28.1	53.5	46.0
Mn	0.93	1.99	1.52	0.90	1.71	1.39	0.46	1.83	1.22
Cr	0.015	0.023	0.020	0.018	0.022	0.020	0.013	0.020	0.017
Ni	0.014	0.017	0.016	0.012	0.021	0.016	0.006	0.016	0.013
Zn	0.08	0.13	0.11	0.10	0.13	0.12	0.06	0.13	0.11
Cu	0.017	0.027	0.023	0.019	0.027	0.023	0.012	0.023	0.020
Pb	0.014	0.021	0.019	0.013	0.019	0.017	0.011	0.015	0.014

(2) 金属類と有機炭素との相関関係

表層、中層、下層における有機炭素（Org.C）の含有量の平均値を図２に示した。表層は2.44%、中層は2.10%および下層は1.80%と新生の堆積物層が高い結果を示した。次に表層、中層、下層における各金属類と有機炭素（Org.C）の含有量の関係について単相関により解析[1)]を行った。その結果を表２～４に示した。

表層においては、Fe と Cr、Ni、Cu および Pb、Cr と Cu および Pb、Ni と Cu および Pb、Cu と Pb においてそれぞれ強い相関が示された。有機炭素（Org.C）との関係については、Fe、Ni、Zn および Pb の元素で相関が示された。中層においては、Fe と Cr、Mn と Pb、Cr と Cu および Pb、Cu と Pb においてそれぞれ強い相関が示された。有機炭素との関係については、Fe、Mn、Cr、Cu および Pb の元素で相関が示された。一方、下層においては、Fe と Mn、Cr、Ni、Zn および Cu、Mn と Zn および Cu、Cr と Ni、Cu および Pb、Ni と Cu、Zn と Cu、Cu と Pb においてそれぞれ強い相関が示されたが、有機炭素とは Pb を除く元素で負の相関が示された。

表層と下層においては Fe と他の金属類とに非常に強い相関が示された。Fe の水和酸化物と酸化物は、水中の金属類の沈積者として役割を果たしていたと推察された。但し、中層における他金属類との相関が低いことより、堆積物層を構成する粘土粒子や有機物と密接な関係があることが示唆された。有機炭素との相関は表層と中層で認められ、これは比較的新生の堆積物では有機物質がイオン交換や錯体形成などを通じて、金属類を固定する役割を果たしていたためと考えられる。

2.1.3　霞ヶ浦底質を用いた静置溶出実験

(1) 西浦と北浦の底質性状と溶出実験

霞ヶ浦の調査地点は図３に示す西浦：湖心（未浚渫区）と牛込沖（平成 16 年度の浚渫区）および北浦：釜谷沖の３地点とし、平成 17 年８月の夏季底泥と 10 月の秋季

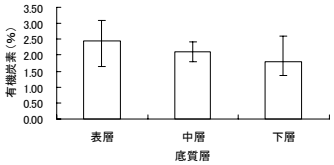


図２　底質層における有機炭素の含有量（平均値）

表２　表層底泥における金属類と有機炭素の相関係数

	Fe	Mn	Cr	Ni	Zn	Cu	Pb	Org.C
Fe	1.000							
Mn	0.361	1.000						
Cr	0.790	0.502	1.000					
Ni	0.718	0.319	0.665	1.000				
Zn	0.133	0.002	0.148	0.324	1.000			
Cu	0.732	0.516	0.935	0.706	0.140	1.000		
Pb	0.881	0.438	0.868	0.777	0.073	0.904	1.000	
Org.C	0.539	-0.173	0.459	0.718	0.664	0.495	0.513	1.000

表３　中層底泥における金属類と有機炭素の相関係数

	Fe	Mn	Cr	Ni	Zn	Cu	Pb	Org.C
Fe	1.000							
Mn	0.629	1.000						
Cr	0.750	0.574	1.000					
Ni	0.151	-0.085	0.584	1.000				
Zn	0.151	-0.196	-0.247	-0.081	1.000			
Cu	0.683	0.556	0.950	0.435	-0.375	1.000		
Pb	0.598	0.734	0.880	0.429	-0.549	0.887	1.000	
Org.C	0.587	0.615	0.640	0.200	-0.092	0.552	0.618	1.000

表４　下層底泥における金属類と有機炭素の相関係数

	Fe	Mn	Cr	Ni	Zn	Cu	Pb	Org.C
Fe	1.000							
Mn	0.866	1.000						
Cr	0.724	0.575	1.000					
Ni	0.771	0.555	0.735	1.000				
Zn	0.878	0.830	0.643	0.608	1.000			
Cu	0.888	0.800	0.927	0.780	0.808	1.000		
Pb	0.537	0.674	0.754	0.464	0.421	0.755	1.000	
Org.C	-0.461	-0.207	-0.284	-0.736	-0.343	-0.398	0.059	1.000

底泥を採取し各供試実験に用いた。なお今回の調査地点の水深は 5～7m の範囲であり、底泥上の直上水の DO は 6mg/L 以上であった。

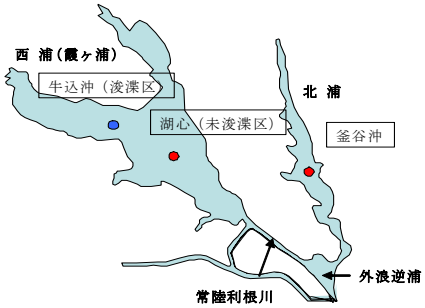


図３　調査対象地点

底泥の性状分析結果を表 5 に示す。泥質はシルト分：50～70%、粘土分：30～50%、砂分：数%であり、表層付近は非常に多くの水分を含んだ底泥であった。また、強熱減量は西浦：湖心・牛込沖に比べ北浦：釜谷沖の方が高い値を示し、全窒素・全リンは西浦：牛込沖が他地点に較べ高いことが確認された。

調査時の底泥を用いた溶出実験の結果を図 4 に示す。PO_4-P の溶出速度は嫌気条件下において、8 月の西浦：湖心は 18.12 mg/m²/day、北浦：釜谷沖は 26.45 mg/m²/day であったが、10 月の湖心は 2.15 mg/m²/day、釜谷沖は 15.86mg/m²/day と西浦・北浦ともに 8 月に比べ 10 月の方が低い値を示した。これらは水温の低下に伴う微生物の活性低下等の影響から夏季底質に比べ秋季底質による溶出量は低い傾向であったと考えられる。なお、西浦に比べ北浦の方が高い値を示したのは底泥中の栄養塩類の堆積状況が原因と考えられる。好気条件下では PO_4-P の溶出が顕著に抑えられていたことより、Fe、Mn 等の酸化状態にあるイオンとの結合によって、溶出しにくい状態であると考えられる。

一方、NH_4-N の溶出速度は好気・嫌気条件による差異よりも、汚濁程度の異なる地点間での差異が大きく、8 月の西浦：湖心は 2.82 mg/m²/day 、北浦：釜谷沖は 12.13 mg/m²/day であったが、10 月の湖心は 1.3 mg/m²/day、釜谷沖は 7.15mg/m²/day と西浦・北浦ともに 8 月に比べ 10 月の方が低い値を示した。

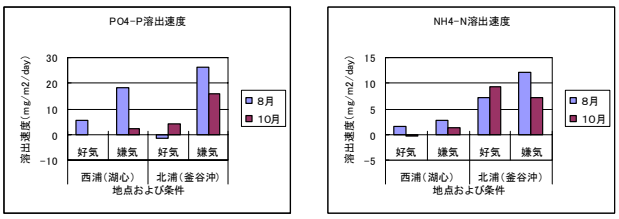


図４　底泥の溶出速度の比較

⑵SOD 試験

底泥の酸素消費速度実験の結果を図 5 に示す。11 月の西浦：湖心は 376mg/m²/day、牛込沖は 350 mg/m²/day と同等であり、SOD 試験における浚渫区と未浚渫区の顕著な差異は確認されなかった。しかしながら、季節による溶出速度の低下は水温の低下に伴う微生物の活性低下等が影響しているものと考えられる。

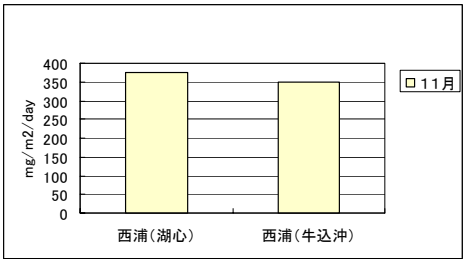


図５　底泥酸素消費速度

2.2　外力による底質表面の変化と溶出の関係

2.2.1　底質表面の巻き上げ

(1) 底質巻き上げ試験による効果の確認

・巻き上げ溶出実験①

巻き上げの実験条件は、連続巻き上げ、間欠巻き上げ（実験期間中に 2 回）とし、比較のために静置系（攪拌無し）の実験も行った。対象試料は、10 月採泥の西浦：湖心と牛込沖水域および北浦：釜谷沖とした。巻き上げの濁度は、図 6 に示すように平成 12～15 年の現地自動観測装置の測定値より平均値を算出し西浦：30、北浦：20 を目安に設定した。実験装

表５　　供試底泥の性状

調査日	調査地点	外観		成分			粒度組成			
		泥質	色	全窒素 (mg/l)	全リン (mg/l)	強熱減量 (%)	砂分	シルト分	粘土分	含水比 (%)
8月23日	西浦(湖心)	シルト・粘土分	黒緑色	2.48	0.27	16.19	0	68	32	763
8月24日	北浦(釜谷沖)	シルト・粘土分	黒緑色	2.03	0.29	17.51	1	59	40	943
10月11日	北浦(釜谷沖)	シルト・粘土分	黒緑色	2.03	0.29	17.51	1	53	46	943
10月27日	西浦(湖心)	シルト・粘土分	黒緑灰色	2.28	0.19	15.52	1	59	40	667
	西浦(牛込沖)	シルト・粘土分	黒緑色	4.00	0.42	14.52	2	57	41	604
11月29日	西浦(湖心)	シルト・粘土分	黄緑灰色	2.28	0.19	14.79	1	73	26	591
	西浦(牛込沖)	シルト・粘土分	黒緑灰色	4.00	0.42	14.21	1	60	39	563

置概略は図 7 に示すよう攪拌装置（Z-1200 型：EYELA 社製）を用い、攪拌速度（rpm）を徐々に上げ 160rpm で行った。なお、底質中の酸化還元電位（ORP）の鉛直測定は土壌 Eh 計（PRN-41：藤原製作所社製）のセンサーを微小 Eh 電極に加工し使用した。

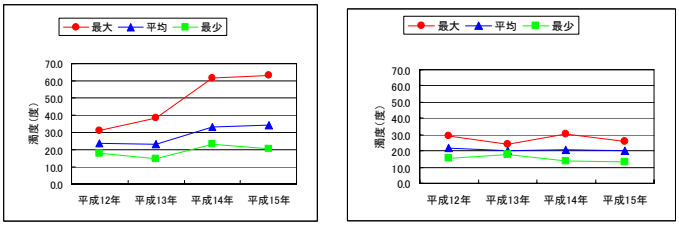


図６　自動観測装置データ（右：湖心濁度，左：釜谷沖濁度）

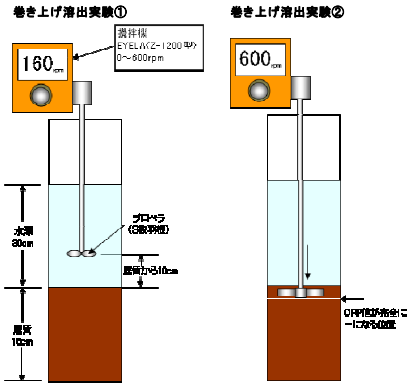


図７　巻き上げ実験装置概略図

・巻き上げ溶出実験②

図７に示すように ORP 値が完全に－値を示す還元層までを攪拌速度 600rpm で一気に巻き上げることでの栄養塩類の溶出挙動について確認を行った。この時の SS 濃度は最大で 1500mg/L であったが、水深 4m に換算すると 110mg/L であり、濁度でも 110 度程度となる。近年霞ヶ浦湖心で観測される最大の濁度が 150～200 度ほどであることから、この実験での底泥巻き上げ強度は、湖心での最大強度に近いものであると考えられる。対象試料は 11 月採泥の西浦：湖心（未浚渫区）と牛込沖水域（H16 年度の浚渫区）を用いた。

(2) 実験供試底質の性状分析

底泥の性状分析結果を図８に示す。泥質はシルト分：50～70%、粘土分：30～50%、砂分：数%であり、表層付近は非常に多くの水分を含んだ底泥であった。

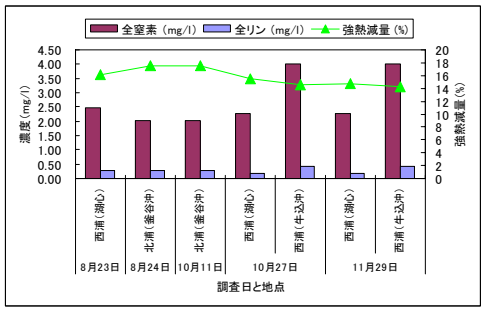


図８　供試底泥の性状

(3) 巻き上げによる栄養塩類溶出影響

巻き上げ溶出実験①、②の湖心：間欠巻き上げ（実験期間中に２回）と静置系の NH_4-N・PO_4-P の溶出結果を図９、pH の経時変化を図 10 に示す。

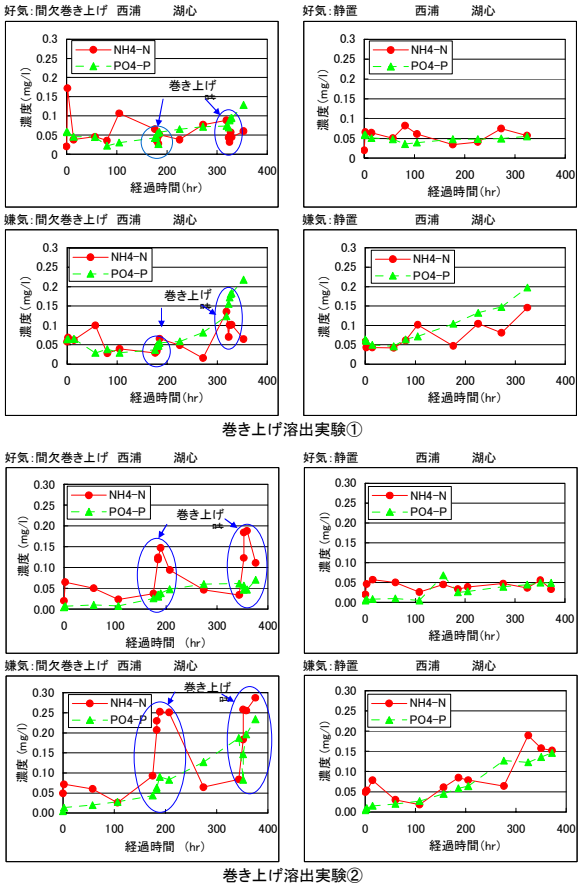


図９　巻き上げによる栄養塩類の溶出挙動（湖心）

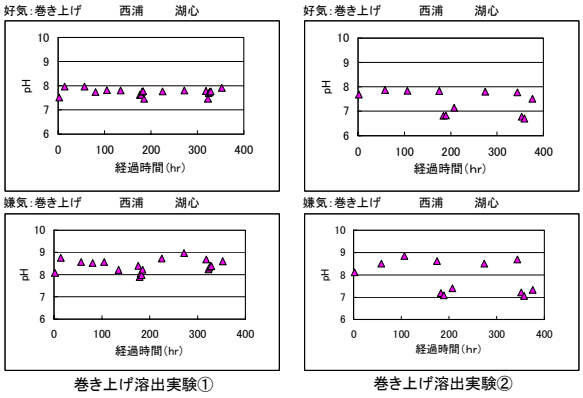


図 10　pH の経時変化（湖心）

実験①における好気条件での NH_4-N 濃度は静置系に比べ 1.5～2.3 倍であり、 PO_4-P 濃度は 1.2～2.1 倍の溶出が確認された。嫌気条件では溶出濃度に差は確認されなかった。実験②における好気条件での NH_4-N 濃度は静置系に比べ 5～6.3 倍であり、 PO_4-P 濃度は 1.4～2 倍の溶出が確認された。嫌気条件では NH_4-N 濃度は静置系に比べ 1.9～3.1 倍であり、PO_4-P 濃度は 1.5 倍の溶出が巻き上げにより確認された。4m 水深に換算した場合の巻き上げによる濁度の増加は、①は風が弱く攪乱が小さい状態、②は強風により底層が大きく攪乱された状態に対応すると考えられ、実際の霞ヶ浦で生じている表層付近での現象における溶出挙動を確認することができた。

富栄養湖では藻類の炭酸同化作用が活発になると炭酸水素イオン（HCO_3^-）の消費に伴い pH が上昇する傾向があるが、嫌気条件においては有機物の嫌気分解に伴うアルカリ度供給により、同様な傾向を示した。また、底泥中では Fe^{2+}により、PO_4^{3-}は溶存しており、それが巻き上げにより直上水中に放出されたものと推察される。

霞ヶ浦の底質においては風浪等により、常にこの現象が生じており、NH_4-N 生成、硝化、脱窒および有機態リンの分解が底質表層 0～1cm に集中していると言われているが、今回の実験より、PO_4-P は表層薄層以上の巻き上げによる溶出速度の増加、NH_4-N は表層底泥の数 cm より下層からの巻き上げによる溶出量の顕著な増加の結果が得られ、風浪や降水時の河川流入等のインパクトが与えられた時に溶出量が増加することが考えられる。

(4) ORP の鉛直分布と巻き上げ後の変化

巻き上げ実験前後の底泥中の ORP 値の鉛直変化を図 11 に示す。

好気条件下においては攪拌前に－100～－150mV 付近の還元状態であったが、攪拌後にはその鉛直方向までは 200mV 付近の酸化状態にまで変化が認められた。なお、それより深い地点での変化は確認されなかった。また、嫌気条件下においては、攪拌前後で－100～－150mV 付近と還元状態に変化は確認されなかった。

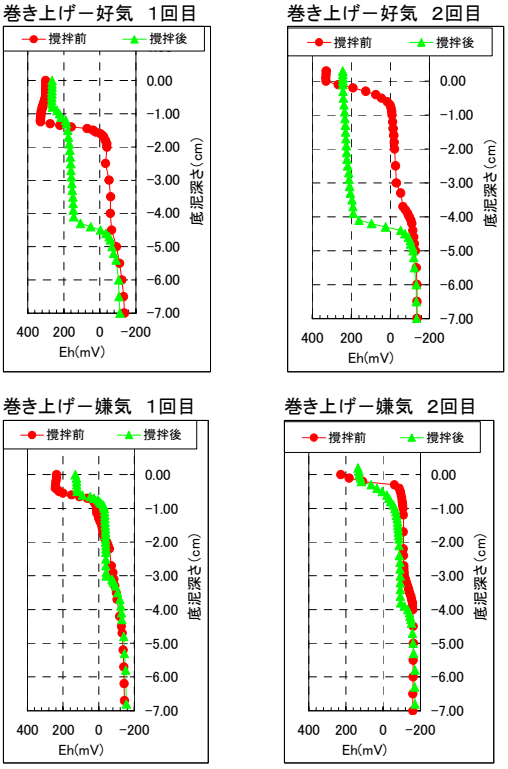


図 11 巻き上げ実験前後の底泥中の ORP の鉛直変化

（西浦：湖心 11 月）

(5) 金属類と栄養塩類との関係

巻き上げ溶出実験②における好気・嫌気条件下における間欠巻き上げ実験と金属類（Fe、Mn）との溶出の関係を図 12、13 に示す。また、表 6 に好気・嫌気条件下における巻き上げと金属類と栄養塩類の相関を示す。好気条件においては、1 回目の Fe・Mn と NH4-N の相関は 0.9 以上と非常に強い相関を示し、２回目においてもある程度の相関を示した。PO4-P においては、1 回目において 0.7 以上と強い相関を示したが、2 回目になると相関は低くなる傾向を示した。嫌気条件においても、Fe・Mn と NH_4-N はある程度の相関を示したが、PO_4-P においては２回目の相関は低下した。これは複数回の巻き上げによって溶出機構が異なってきていることを表している。また、Mn は嫌気条件下で高い溶出を示す傾向が確認された。これは還元的環境においては、４価の Mn が 2 価の Mn に還元されて、溶出していることによる。

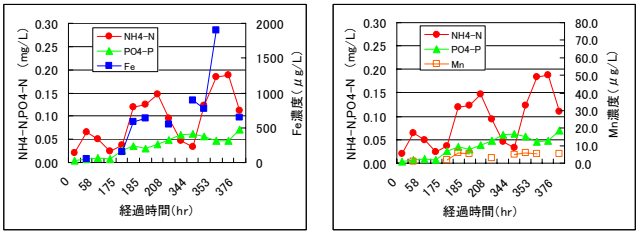


図 12　好気：間欠巻上げによる Fe，Mn の溶出挙動

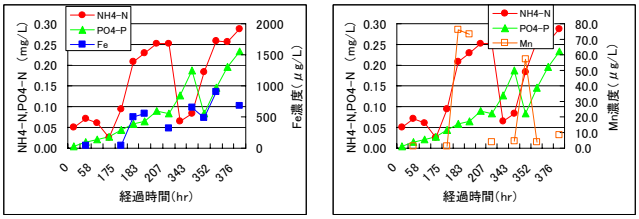


図 13　嫌気：間欠巻上げによる Fe，Mn の溶出挙動

表 6　巻き上げによる金属類と栄養塩類との相関

条件	好気：巻き上げ実験		嫌気：巻き上げ実験	
	NH_4-N	PO_4-P	NH_4-N	PO_4-P
巻き上げ	Fe	Fe	Fe	Fe
一回目	0.999	0.746	0.999	0.992
二回目	0.746	−0.910	0.524	0.514
巻き上げ	Mn	Mn	Mn	Mn
一回目	0.987	0.867	0.983	0.967
二回目	0.532	−0.258	0.524	−0.919

2.2.2 浚渫による底質表面の変化

(1) 静置溶出試験による効果の確認

溶出実験は 10 月（秋季）の西浦：湖心と西浦：牛込沖の底質を用いて行った。底泥の厚さを 15cm 程度にあわせ、1.0μm の GF/B（ﾜｯﾄﾏﾝ社製）にてろ過を行った直上水を嫌気・好気用に調整後、底質表面を乱さないよう底泥上 30cm までサイホンにて注入した。実験は 20℃の恒温室（暗条件）にて Air 曝気による好気条件（DO:8mg/L 以上）と N_2 曝気による嫌気条件（DO:2mg/L 以下）で行った。分析用に採水した試料は、ｵｰﾄｱﾅﾗｲｻﾞ（テクニコン社製）にて NH4-N、NO2-N、NO3-N、T-N、PO_4-P 及び T-P の分析を行った。また採水時には、水温、DO、pH、ORP を測定した。

なお、西浦においては水質浄化対策の一環として大規模な底泥浚渫が行われており、その効果について検討した結果を図 14 に示した。10 月の嫌気状態における溶出速度は湖心：2.72mg/m²/day であるのに対し、牛込沖：1.46 mg/m²/day と浚渫区の底泥が低い結果であり、底質の改善効果と考えられる。

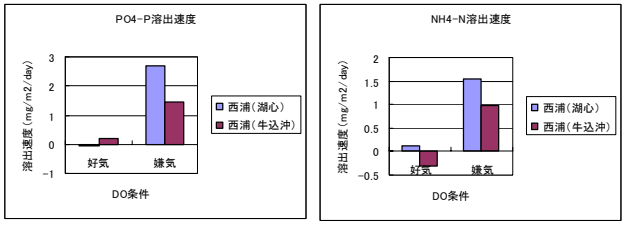


図 14　浚渫区と未浚渫区の溶出速度の比較

2.3　水質と底質性状の関係

2.3.1　牛縊前貯水池高濃度酸素供給実験における底質の改善

(1) 実験前後の現地底泥を用いた溶出実験

貯水池底層への高濃度酸素供給(2.4.1)による底質改善の効果を確認するために、酸素供給前後の現地底質を用いた溶出実験を行った。酸素供給による溶出速度の変化と長期的な好気・嫌気条件下後の底質表面付近における ORP 等の性状変化が確認されたので報告する。

高濃度酸素水の供給による底泥性状の変化を調べるため、平成 16 年 7 月から 9 月にかけて表 7 に示す条件にて現地実験を行った。図 15 に示した牛縊前貯水池の調査地点 A と B において、酸素供給実験（Run1）開始前の平成 16 年 7 月 26 日と酸素供給開始 9 日目の 8 月 5 日および酸素供給停止 17 日目の 8 月 23 日、酸素供給実験(Run2)再開後 25 日目の 9 月 24 日の計 4 回、底泥を採取した。

表 7　高濃度酸素供給の現地実験条件と装置稼働状況

Run No.	期間	日数	吐出流量 (m^3/h)	酸素供給	稼働時間 (h)	稼働時間率 (%)
1	7/28～8/6	10日間	90	有	201	83.6
2(1)	8/30～9/8	10日間	90	有	212	88.2
2(2)	9/9～10/1	23日間	90	有	48	8.7

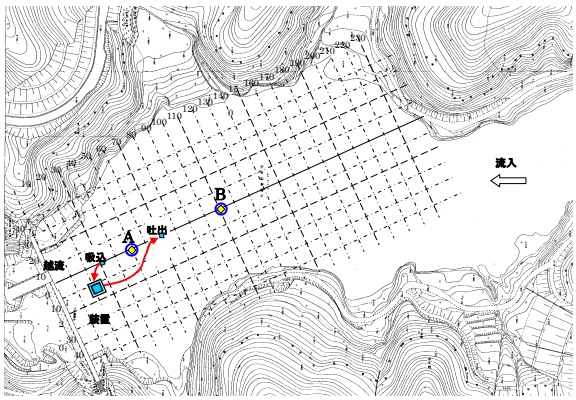


図 15　調査地点の概要

なお、高濃度酸素水の吐出地点および湖水の吸込み地点は図 15 に示すとおりである。

調査地点 A と B における嫌気条件における溶出速度（5 日までの初期および 20 日目までの期間から算出）を表 8 に、PO_4-P 溶出速度を図 16 に示す。

嫌気条件における底泥からの PO_4-P 溶出速度は、初期の値が、20 日目までの平均的な溶出速度に比べて 1.0～1.6 倍のやや大きい値を示した。A、B 地点ともに、酸素供給開始前に比べ、酸素供給開始 9 日目の底泥において溶出速度は低い値となり、高濃度酸素水の供給による底泥表面の改善効果が認められた。また、吐出口に近い A 地点においてその効果は大きく、酸素供給停止 17 日目の底泥においても、PO_4-P の溶出速度は酸素供給開始 9 日目の溶出速度と同等であった。これは酸素供給により酸化状態となった底泥の表面性状が、酸素供給停止後もしばらく維持されていたことによると考えられる。

表 8　溶出実験結果（嫌気条件）

条　件	PO_4-P mg/m^2/day		NH_4-N mg/m^2/day	
	A地点	B地点	A地点	B地点
①酸素供給開始前	14.8(17.5)	13.3(19.3)	53.3(89.9)	76.5(134.6)
②酸素供給開始9日目	7.7(12.5)	8.9(10.6)	9.8(6.5)	46.7(98.5)
③酸素供給停止17日目	7.3(8.6)	13.0(9.9)	30.7(83.1)	71.7(109.2)
④酸素供給再開25日目	14.2(17.1)	10.6(10.0)	21.7(70.3)	23.2(137.4)

＊（　）内は初期溶出速度

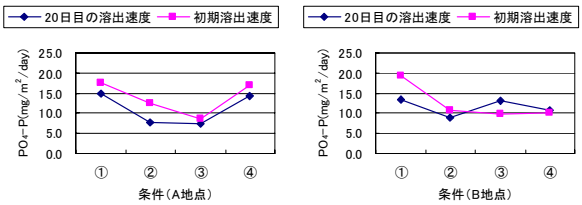


図 16　PO_4-P の溶出速度（地点比較）

(2) 底泥酸素消費速度実験

酸素供給実験開始前後の底泥を用いた酸素消費速度実験の結果を図 17 に示す。DO はそれぞれ初期の 1 日間で急減し、その後は緩やかに低下した。これより、主な酸素消費は初期 1 日間で起こったことが確認された。底泥の初期酸素消費速度を表 9 に示す。酸素供給前後において、A、B 地点とも、初期酸素消費速度に大きな差は見られなかった。

これら高濃度酸素供給前後の底泥を用いた溶出実験と酸素消費速度実験の結果より、 底泥への酸素供給は、底泥の PO_4-P 、NH_4-N 溶出ポテンシャルを低下させることができるが、酸素消費ポテンシャルは低下させることが難しいことが明かになった。また、PO_4-P については、好気条件によって顕著に溶出速度が抑えられる結果が得られた。

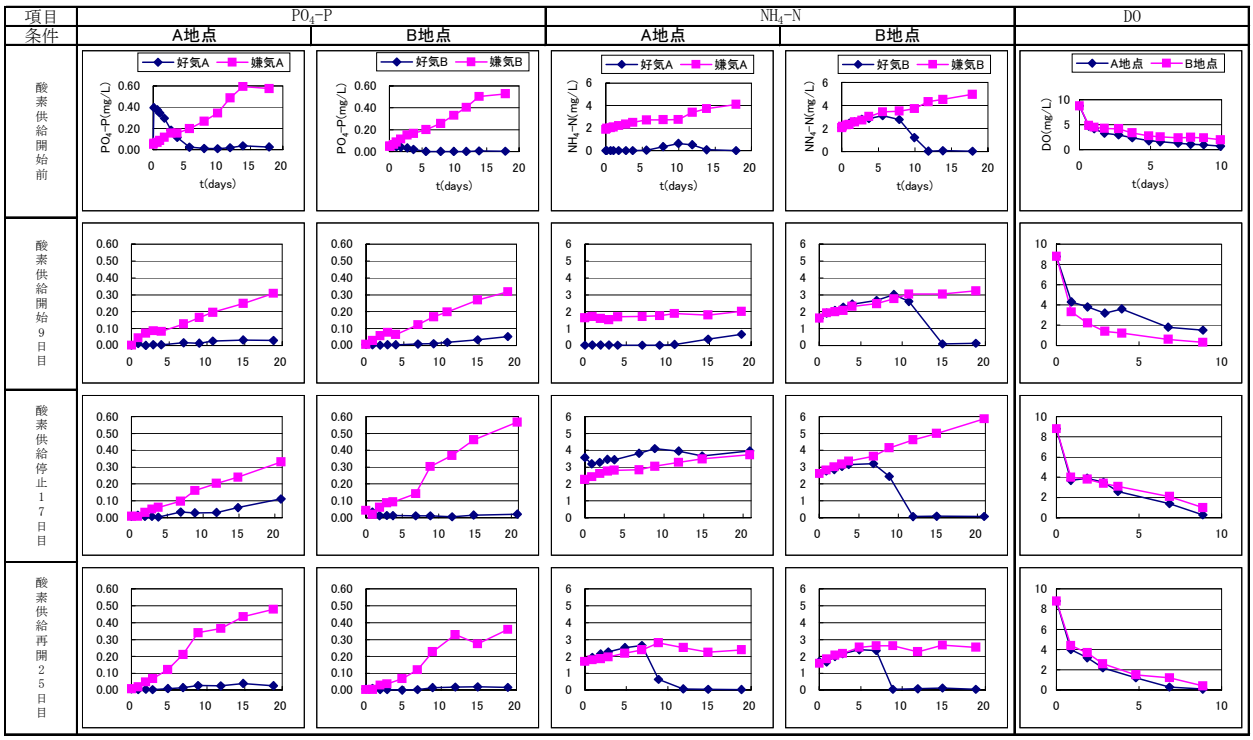


図-17　溶出実験および酸素消費速度実験の結果

表９　底泥の酸素消費速度

条　件	酸素消費速度 mg/m^2/day	
	A地点	B地点
酸素供給開始前	3.7×10^3(237)	3.6×10^3(181)
酸素供給開始から9日目	2.9×10^3(223)	3.7×10^3(202)
酸素供給停止から17日目	3.8×10^3(274)	3.5×10^3(233)
酸素供給再開から25日目	3.5×10^3(314)	3.2×10^3(307)

＊（　）内は2日目以降の酸素消費速度

(3) 間隙水中の栄養塩類濃度分析

高濃度酸素供給実験期間中の牛縊前貯水池 A 地点における底質の各栄養塩類の鉛直分布変化を図 18 に示した。間隙水中の栄養塩の鉛直分布は，NH_4-N，D-N では，底質表面から 10cm までの深さまでは，間隙水中の濃度が徐々に増加し，それ以降は濃度変化が少ない傾向がある。これに対し PO_4-P，DOC では，表面 5cm 程度までの間隙水中の濃度が高く、それ以降はほぼ同じ濃度である。NO_3-N，NO_2-N は，ほとんどの場合表面から底面まで一定の濃度であるが、8 月 5 日の NO_3-N、8 月 23 日の NO_2-N では、表面付近の濃度が高い。

酸素供給実験（Run1）終了直前の 8 月 5 日においては、底質表面付近の NO_3-N 濃度が他の測定日より特に高くなっており、酸素供給により硝化が促進された影響と考えられる。

一方、Run2 の酸素供給実験開始直前の 8 月 23 日では、ほとんどの項目で表面付近の濃度が高く、特に PO_4-P、NO_2-N、DOC の増加が著しい。8 月 5 日に間隙水中の濃度が高かった NO_3-N の濃度が極端に低下していることから、装置の酸素供給の停止により、一度は硝化された NO_3-N が再び NO_2-N に還元されたと考えられる。PO_4-P については、DOC 増加に伴って金属塩が還元され、底質の嫌気化による間隙水への溶出が増加したものと考えられる。

牛縊前貯水池底質においては、日常的に底質表面での酸素が低下していることから、通常は嫌気条件下において底質表面で有機物の分解が行われており、NH_4-N や DOC の間隙水への溶出・蓄積が起こる。これに対して、酸素供給を行うと間隙水中の DOC の分解や PO_4-P の再不溶化が起こったものと考えられる。なお、酸素供給の効果は鉛直変化から考えて最大 5cm 程度と推察される

2.3.2 長期酸素供給における底質表面の性状変化

(1) 底泥中の ORP 鉛直変化

長期連続的な酸素供給とその効果について、溶出実験を終えたコアサンプルを更に約 1 年間、連続 Air／N_2 曝気にて長期的な底質表層の性状変化を確認した。底質の深さ方向に酸化還元電位（ORP）を土壌 Eh 計（型式：PRN-41、藤原製作所）にて測定した。それら底質表層の ORP 鉛直方向の変化を図 19 に示す。嫌気条件下においては、表層数 mm で還元状態に変化したが、好気条件下においては表層約 4cm までが酸化状態と底質の改善が確認された。

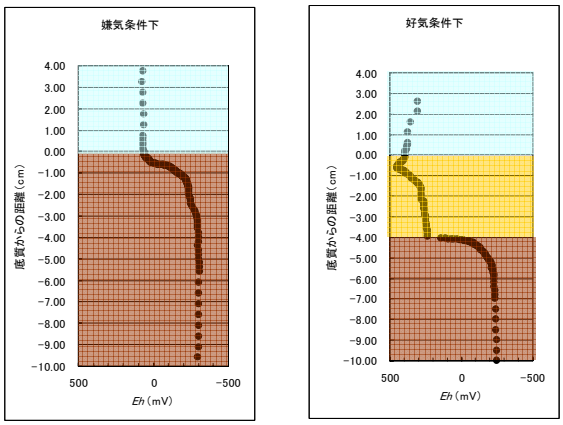


図 19　長期連続実験における底質表層の ORP 鉛直変化

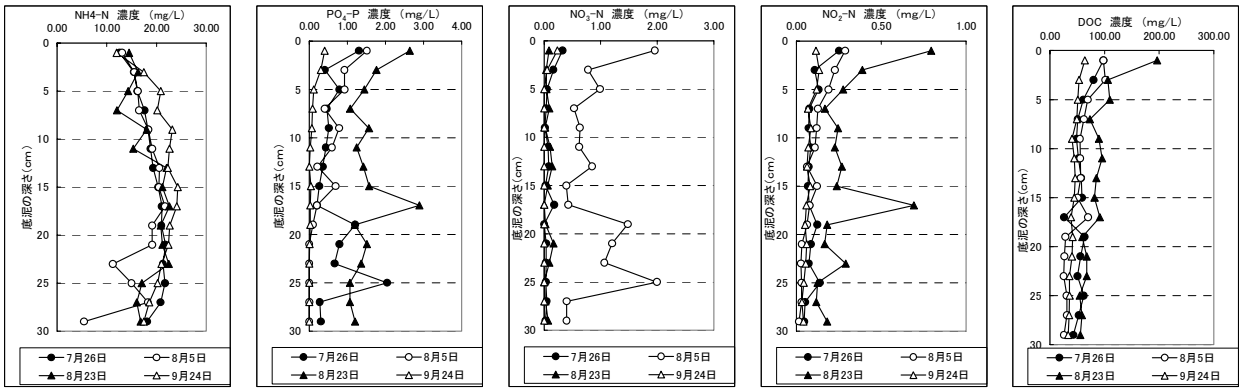


図 18　A 地点における酸素供給試験中の間隙水の濃度変化

(2) 一年経過後の底質性状の変化

好気・嫌気条件下における一年経過後の底質間隙水中の PO_4-P 、NH_4-N 濃度の変化(鉛直方向)を図 20、21 に示す。

PO_4-P 濃度は嫌気条件下の表層において 1.15mg/L と高かったが、下層程、低い値を示した。また、直上水濃度は0.12mg/L と表層底泥間隙水濃度の約 1/10 であり、嫌気条件下における表層 PO_4-P 濃度に比べてかなり小さい値であった。好気条件においては表層で 0.08mg/L と顕著に溶出が抑えられ、直上水濃度は 0mg/L であった。

NH_4-N 濃度は嫌気条件下の表層において 6.67mg/L であり、下層程、高くなる傾向を示した。また、好気条件においても表層で 5.81mg/L と同様の傾向を示した。特に底質表面での減少が大きく、逆に NO_3-N は増加していることより、硝化の影響と考えられる。

以上のことから、直上水を好気状態に保持することは、底泥中の PO_4- P 濃度を低下させることに顕著な効果があることが分かる。

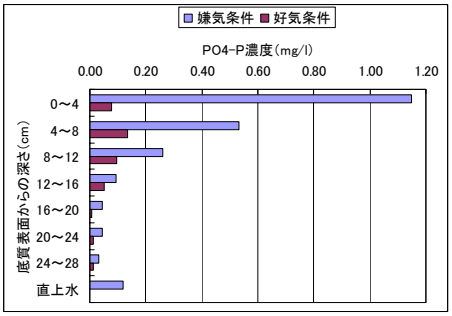


図 20　好気・嫌気条件下における底質間隙水中の PO_4-P

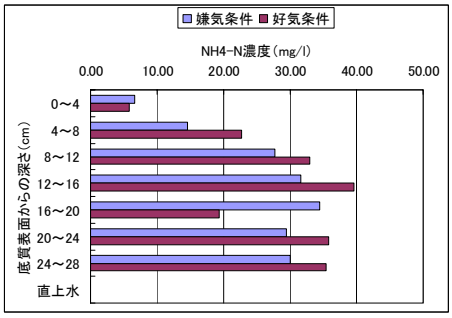


図 21　好気・嫌気条件下における底質間隙水中の NH_4-N

(3) 形態別リンの変化

長期の好気・嫌気条件下における底質中の形態別リンの変化を図 22、23 に示す。

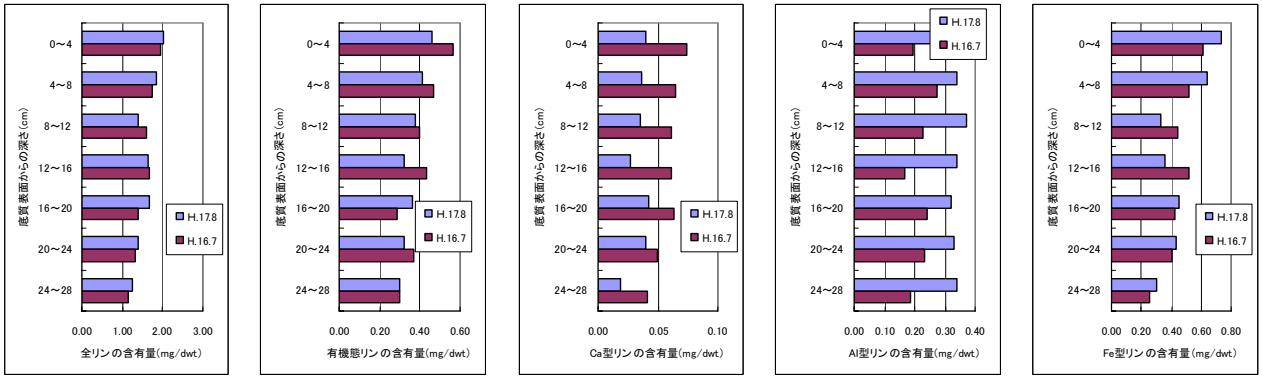


図 22　長期好気条件下における底質中の形態別リンの変化

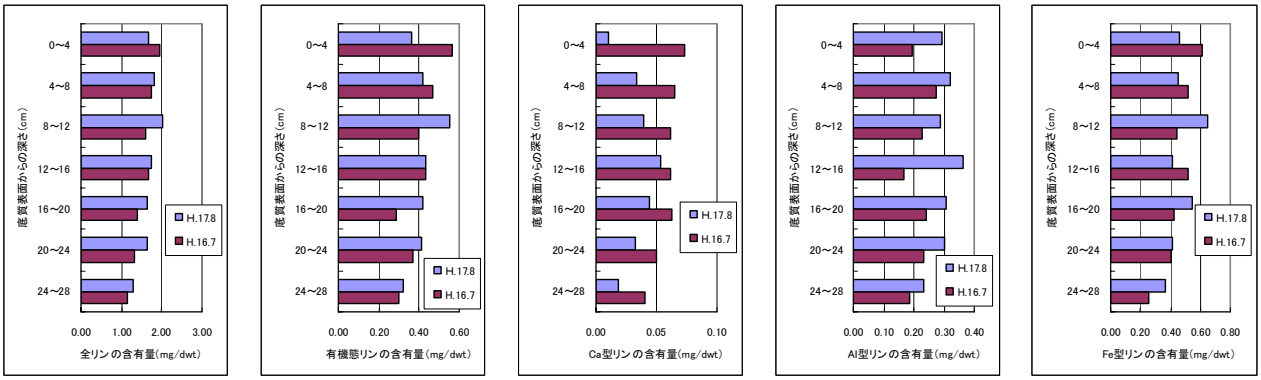


図 23　長期嫌気条件下における底質中の形態別リンの変化

全リンにおいては、大きな変化は見られず、1 年前の含有量と比べてほとんど変化が認められなかった。しかし、深さ方向の変化の傾向をみると、嫌気の場合に有機態リン及び Ca 型リンについて、表面付近で減少していることが特徴的である。また、全体として、有機態のリン、Ca 型のリンが分解され、変わりに Fe、Al と結合してそれぞれの結合型のリンが増加している。

(4) 底質の金属類分析

実験開始前と一年経過後の底質における金属類（Fe、Mn）の濃度変化を図 24 に示す。Fe 濃度は実験開始前のA地点では60.3mg/g、B地点では51.5mg/gであり、一年経過後の好気条件下では A 地点では56.19mg/g、B 地点では 46.1mg/g といずれも低減していたが、嫌気条件下においてはA地点で 58.57mg/g 、B 地点では 57.35mg/g と同等か高い結果であった。Mn 濃度においては実験開始前のA地点では1.49mg/g、B 地点では 1.55mg/g であり、一年経過後の好気条件下ではA地点では 1.45mg/g、B 地点では 1.24mg/g といずれも低減していたが、嫌気条件下においてはA地点で 1.68mg/g 、B 地点では 1.75mg/g と伴に高い値を示した。

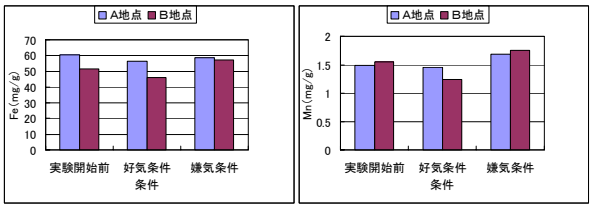


図 24　金属類の濃度変化

2.4.現地連続モニタリングシステムによる溶出量推定方法の検証

2.4.1 現地連続モニタリングシステムと高濃度酸素水供給実験について

底泥からの栄養塩類などの溶出量を推定するため、平成14年度より平成16年度までの３箇年にわたって、湖沼等の現地における水柱及び表層底泥のモニタリングシステムを検討した。これは、水温、DO及びORPセンサ等による連続測定を行うことにより貯水池内環境を把握し、その結果をから栄養塩類の溶出を推定するとともに、測定結果を活用した効率的な運転制御を行いながら、高濃度酸素水を底層部に供給することにより底層環境を改善することを目的としたシステムであり、(独)土木研究所、横河電機(株)と松江土建(株)の共同研究として開発したものである。

従前の深層曝気方式はいずれも湖沼や貯水池の底層部へ空気や酸素を供給して水柱内で溶解させる方式であるのに対し、本システムの特徴は、底層環境の改善を目的として、気体溶解装置により強制的に酸素を溶解させた湖水を底層部へ供給することで水温成層を破壊することなく底層のみに溶存酸素を供給することに加え、底層の水温、溶存酸素（DO）を連続モニタリングし自動制御することにより、効率的な酸素溶解機能を有するということである[2)]。

福島県三春ダム牛縊前貯水池において、温度成層が形成されやすい夏季に高濃度酸素水による底層環境改善システム[2)]の現地実験と水温、DO及びORPセンサーによる連続モニタリングを行い、水質と栄養塩類溶出量との関係について検討を行った。モニタリング装置等の配置を図25に示す。

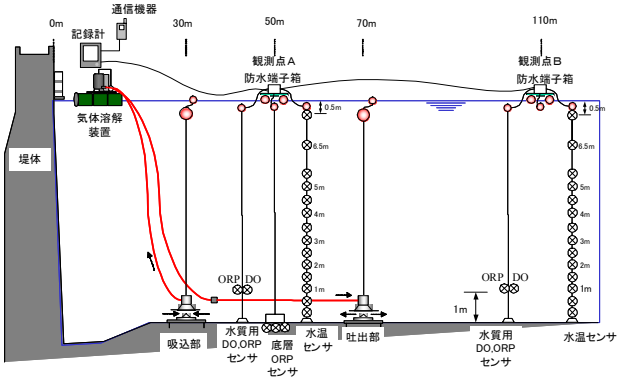


図25　連続測定装置の概要

３箇年にわたる実験と現地観測の結果、水温やDO及びORPセンサー等による連続測定をベースとしたこの水柱と底泥表層のモニタリングシステムは、底層環境条件の観測システムとして有効であることが明らかとなった。

2.4.2 溶出速度の推定

本システムによって観測された底層環境条件から溶出量を推測することの有効性を確認するため、３箇年間の現地実験で得られたデータを用いて貯水池水質予測モデルにより推測した栄養塩類溶出速度を検証した。

(1)水質予測モデルの概要

貯水池の水質予測は、２次元モデルを基にした水質解析モデルを運用し貯水池内の水流・水質を解析するものである。貯水池の富栄養化現象は、水理流動モデルにより計算された流速を用いて生態系モデルにより水温と植物プランクトンの増殖を計算して水質変化を予測した。また現地連続モニタリングシステムで用いた高濃度酸素水注入のシステムもモデル化し組み込んだ。

このモデルを用いた解析により予測した水質項目は次のとおりである。

- 水温
- SS
- 植物プランクトン（Chl-a換算）
- 動物プランクトン（炭素換算）
- COD（P-COD、D-COD）
- 窒素（NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、O-N）
- リン（I-P、O-P）
- DO

※P:Particulate（懸濁態）、D:Dissolved（溶存態）、I:Inorganic（無機態）、O:Organic（有機態）

モデルの中では、栄養塩濃度をより詳細に推定するため、植物プランクトンの無機態窒素の吸収においては硝酸性窒素よりもアンモニア性窒素を優先的に吸収することを表現する係数、及び無機態窒素の硝化・脱窒におけるDO依存性を表現する係数を設定した。また、リンの溶出において、本研究で行った現地実験の観測データから、溶出の境界 NO_3-N 濃度を新たに設定した補正係数を加えたほか、無機態リンに関する生産・消費項の中に鉄との結合による消費の項を加えた。

(2)溶出速度の推定

モデル計算により推定された嫌気条件（DO　2mg/l以下）での溶出速度は表10のとおりである。

表-10　　推定された溶出速度（平均値）

(単位:mg/m²/day)

	PO_4-P	NH_4-N
A地点	12	149
B地点	5	71

(3)室内実験での溶出速度との比較

この実験期間中に採取した底泥試料を用いた室内静置溶出試験で測定された溶出速度と推定値とを比較する。

調査地点Ａと Ｂ（図 26）の底泥サンプルを用いて行った平成 16 年度の溶出速度試験の、嫌気条件における溶出速度（5 日までの初期および 20 日目までの期間から算出）を表 11 に示す。この試験は平成 16 年 7 月から 9 月にかけて表 12 に示す条件にて実験を行った中で実験開始前の平成 16 年 7 月 26 日と酸素供給開始 9 日目の 8 月 5 日および酸素供給停止 17 日目の 8 月 23 日、酸素供給再開後 25 日目の 9 月 24 日に採泥したサンプルを使っている。KB 型柱状採泥器（離合社製）を用いて、アクリル製円筒型カラム（直径 4cm×高さ 100cm）に厚さ 30cm の底泥を採取した。溶出実験と 20℃の恒温室にて行ったが、底泥上に満たした水は、貯水池の湖底上 0.5m から別途採水した現地水を 0.45 μm のﾒﾝﾌﾞﾚﾝﾌｨﾙﾀｰにてろ過したものを用いた。

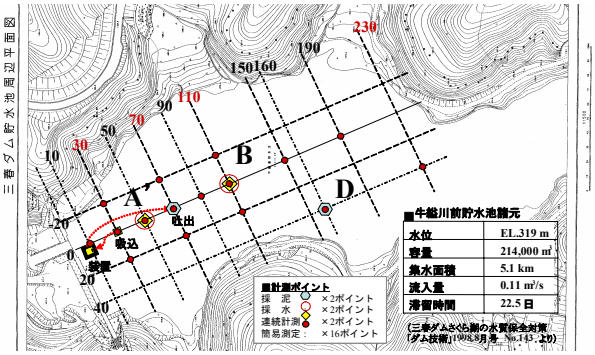


図-26　調査地点図

表-11　溶出実験結果（嫌気条件）

条　件	PO_4-P mg/m²/day		NH_4-N mg/m²/day	
	A地点	B地点	A地点	B地点
①酸素供給開始前	14.8(17.5)	13.3(19.3)	53.3(89.9)	76.5(134.6)
②酸素供給開始9日目	7.7(12.5)	8.9(10.6)	9.8(6.5)	46.7(98.5)
③酸素供給停止17日目	7.3(8.6)	13.0(9.9)	30.7(83.1)	71.7(109.2)
④酸素供給再開25日目	14.2(17.1)	10.6(10.0)	21.7(70.3)	23.2(137.4)

＊（　）内は初期溶出速度

表-12　実験条件と稼働状況

Run No.	期間	日数	吐出流量 (m³/h)	酸素供給	稼働時間 (h)	稼働時間率 (%)
1	7/28～8/6	10日間	90	有	201	83.6
2(1)	8/30～9/8	10日間	90	有	212	88.2
2(2)	9/9～10/1	23日間	90	有	48	8.7

また調査地点ＡとＤで平成 14 年（6 月 17 日、8 月 18 日）と平成 15 年（5 月 7 日、6 月 30 日、7 月 28 日）に採取した底泥サンプルを用いて行った溶出速度試験の嫌気条件（DO2mg/l 以下）における溶出速度を表-13[3] に示す。なおこの試験は平成 16 年度の試験と異なり底泥上に満たした水は湖底上 0.5m から別途採取した現地水をろ過しないで用いている。

表-13　溶出速度、酸素消費速度の結果

（単位:mg/m²/day）

年	月	底泥からの溶出量 PO4-P	底泥からの溶出量 NH4-N	底泥の酸素消費速度 (SOD)	直上水の酸素消費速度
平成14年	6月	2.4	74	860	－
	8月	7.6	159	1240	－
平成15年	5月	3.0	87	1720	－
	7月	8.0	105	1300	524
	8月	7.7	123	1650	－

これらの実験により得られた溶出速度の平均値とモデル計算により推測された溶出速度の平均値とを比較すると、予測計算による溶出速度はだいたい実測と近い値であるといえる。本システムを用いた連続観測データを用いたモデル計算による溶出速度の予測は、閉鎖性水域の底泥からの栄養塩溶出速度の経時変化を推定する手法として有効であると考えられる。

2.5 試験方法の提案

2.5.1　底質試料の分析方法

(1) リン形態別の含有量測定

リンの形態別分析方法の概要について図 27　に示す。図中に示した土壌中のリンの形態は、測定したリンの形態を別な形で示したものである。

底質中のリンの形態の中で、特に溶出現象に関連すると考えられるのは、結合性リンであるが、有機態リン及び難溶性リンについては、長期的な傾向を見る場合にリンの供給源という意味合いを持つため、重要と考えられる。

従って，必要に応じて，T-P，PO_4-P 以外にもリンの形態別分析を行うようにする。

(2)間隙水中の水質の測定

後述する柱状採泥器により底泥試料を採取した後、速やかに実験室にて数 cm 単位で底泥を切り出し、遠心分離とろ過を行って間隙水試料を得る。分析項目としては TOC、NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、PO_4-P を測定することが重要である。また溶出量と金属との関係は大きいことが示唆されるため可能であれば Fe、Mn も分析する。さらに、間隙水と底泥直上水との水質の関係が溶出の重要な要因となることから，採泥の際には底泥直上水の水温、DO、pH、N、P 水質を測定・分析することも極めて重要である。また、採泥試料については、底泥の酸化状態を把握するために深さ方向の ORP を測定する。

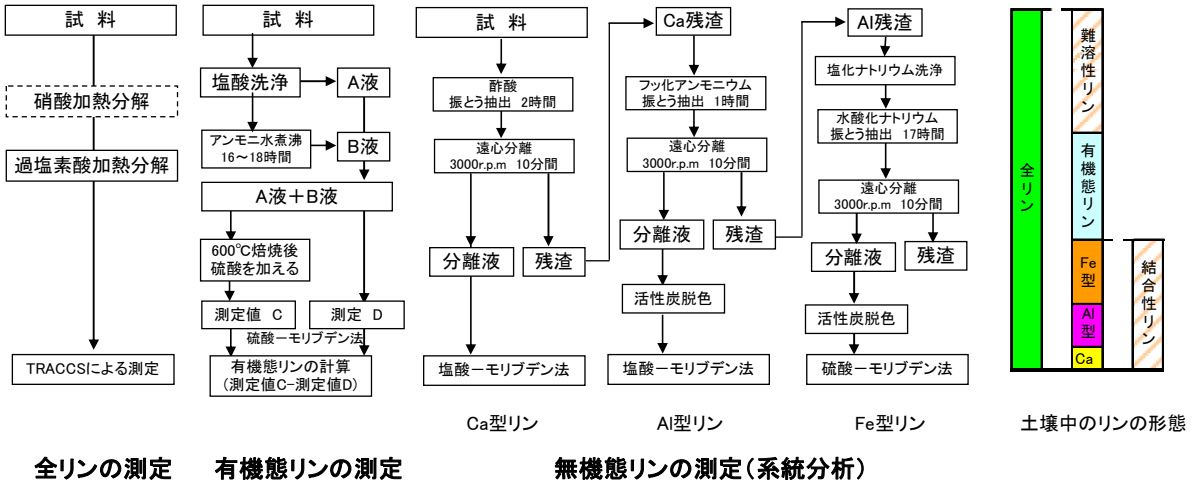


図 27 底質中の各態リンの分析フローと土壌中のリンの形態

2.5.2 静置溶出試験

(1) 試料採取方法の違いによる溶出試験への影響

底質の試料採取方法の違いよる溶出試験への影響を調べるため、平成 17 年 6 月に霞ヶ浦湖心において潜水夫と簡易型柱状採泥器の異なる底質の採取方法で採泥を行い、溶出速度の比較試験を実施した。その条件は表 14 に示す。

この 4 つの試験系を用いて、20 日間溶出試験を行い結果について比較した。使用した簡易型柱状採泥器はアクリル管：直径 4cm と 10cm が適用可能である。しかしながら、直径 4cm のアクリル管では分析に供試する水量が不足するため、長さ 100cm のアクリル管を使用することとした。簡易柱状採泥器を使用した試験系は、底質試料を持ち帰った後、引き抜き及び詰め替え作業を実施した。

図28の結果から溶出量で見ると 10 日目までは採取方法における速度の差異は小さかったが、20 日目になると、NH_4-N では大きな差異は認められなかったが、PO_4-P では K-10 の値が低い結果であった。PO_4-P、NH_4-N の溶出量は 10 日目まではほとんど同様な傾向を示したが、10 日目以降から PO_4-P の K-10 において溶出量に差が生じた。これは図 29 に示すとおり K-10 の初期溶出速度（0～5 日目）が他に比べ高く、底泥のポテンシャルが影響しているものと考えられる。

今回、K-4 では 50cm のアクリル管より、100cm のアクリル管に移し変える作業を伴い、この際、底泥を押し出す形になり多少の変形が生じ初期溶出が大きい結果になった可能性がある。一方、D-4 では 10 日目までの溶出速度が逆に遅い傾向であった。これは表面積が小さく水深が深いため反応性が遅いと考えられる。こうしたことから、採泥は潜水夫を利用してとるのが望ましいが、その場合においても内径が大きい 10cm を使用する。また内径 10cm であれば、簡易柱状採泥器による採泥で調整を行っても、潜水夫を利用した場合とほぼ同じ溶出速度が得られることがわかった。また、直上水は現地採取状態のままで運搬実施することが望ましいとあるが、今回のように試料ろ過、交換を実施した試験とどの程度の差が生じるかについても検討しておく必要がある。溶出試験結果としては、溶出速度だけでは、その区間の決め方により大きな差が生じるため、溶出速度の結果とともに、図 28 のような溶出量変化のグラフの添付および溶出量の算出期間を明確に示すことと酸素消費速度との総合評価が必要と考えられる。これらの結果より，

- 試料採取は簡易柱状採泥器の使用が可能である。
- 直上水試料の交換やろ過の実施について明示すべきである。
- 溶出試験結果は，溶出量の経時変化と速度算出期間の明示が必要である。

等が分かった。

表 14 底質試料採取方法の違い

ケース名	採泥方法	アクリル管内径	アクリル管長さ	底質調整
D-10	潜水夫	10cm	50cm	無し
D-4	潜水夫	4cm	100cm	無し
K-10	簡易型柱状採泥器	10cm	50cm	引き抜き
K-4	簡易型柱状採泥器	4cm	50cm	100cmに移す

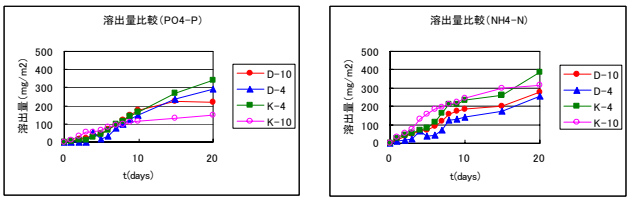


図 28 溶出量の比較（嫌気条件）

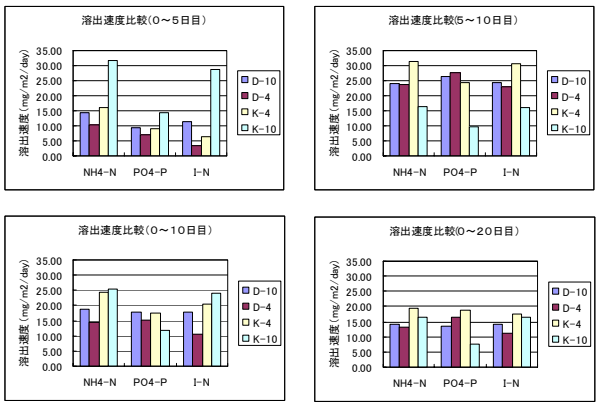


図 29 溶出速度の比較（嫌気条件）

(2) SOD 試験の検討

平成 17 年 8 月と 11 月に SOD 試験を実施した。2 つの試験は試験方法が異なり、8 月の試験においては①DO 測定時に水の攪拌を行わず、②水面とカラム上端の間の空間は窒素ガスを連続して流した。

一方 11 月の試験においては、①DO の測定時に直上水の観測攪拌（50rpm）を行い、②直上水との接触面に窒素ガスを流入させずにゴム栓でほとんど隙間がないように封入した。

図 30 は 2 つの SOD 試験結果を比較したものである。特に直上水のみのデータを注目すると、11 月の DO 減少が緩やかであるのに対して、8 月の場合はほとんど底質と同様であり、150 時間後には、底質の入ったものよりも低い値となっている。このことから、窒素ガスの空間部分への供給が直上水中の溶存酸素の揮散を促進している可能性があると考えられる。

底質の還元力が強く SOD 試験が短期間に終了する場合はこのようなことが問題となることは無いと考えられるが、直上水、底質の酸素消費が緩やかで酸素消費速度が遅い場合には、問題となる。このことから，SOD 試験においては水面とカラム上端の間への窒素ガス注入は行わず，水面に密着するように蓋をすることが望ましい。

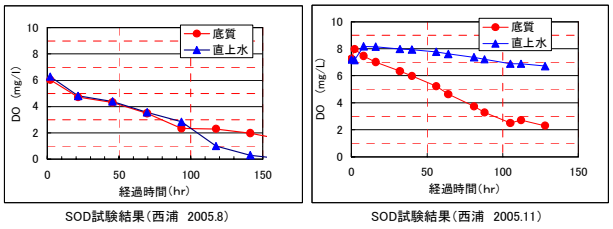


図 30 SOD 試験結果の比較

2.5.3 巻上げ予備試験

2.5.3.1 霞ヶ浦底質を用いた巻上げ予備試験

栄養塩類溶出の視点からの巻き上げ試験については明文化された方法がないが，巻き上げによる栄養塩溶出量が大きい場合もあることから，その試験方法について検討した。

(1) 試験方法

①試験装置

図 31 に示すように、スタンドに攪拌装置（EYELA 製）をプロペラがコアサンプラーの中央になるよう垂直にセットし、さらにプロペラの下部の高さが底質表面から 10cm の位置になるように固定した。攪拌速度を 50rpm 間隔で上昇させていき、同一回転数を 5 分～10 分間保った後、プロペラ上部 5cm の位置から試料を 30ml づつ採取して、水質を測定した。攪拌速度の上限は 400rpm とした。

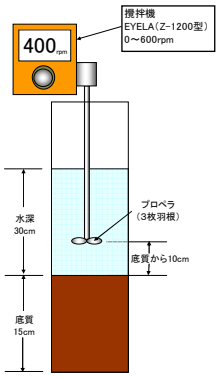


図 31 巻き上げ試験装置

②試料高さの調整

現地採取状態そのままか、コアサンプル底部より底質を引き抜き高さ調整したものを使用した。底質高さを調整した場合は、底質表面の乱れが生じるため、静置してから試験を実施した。

③直上水の交換

現地採取状態そのままで、直接攪拌を実施か、現地より採取してきた直上水をろ過し、（GF/B）空気及び窒素で曝気した直上水に交換して実施した。

④測定項目

試験開始･終了時　ORP、pH

⑤水質分析項目

SS、濁度、DOC、NH_4-N、PO_4-P、NO_3-N、NO_2-N、D-P、D-N

⑥試験環境

室温 21～23℃、明条件、直上水温度（15℃～20℃）、泥温（10℃～20℃）

⑦試験ケース

表 15 に予備試験での試験条件とケースの一覧表を示す。試験ケース 1～3 までは、吸光光度計での吸光度測定を濁度として、カオリン、現地底質（西浦 6/16 採取試料）を用いて、プロペラの形状、巻き上げ試験での回転数と濁度、SS の関係把握、及び各回転数での継続時間と巻き上げた底質の濃度分布等について調べた。試験ケース 4～6 では、攪拌の回転速度

と SS、濁度の関係を調べるとともに、溶出される栄養塩類について調べた。試験ケース 7～12 では、北浦、西浦それぞれの底質を用いて嫌気、嫌気から好気、好気の条件下での巻き上げによる栄養塩の濃度変化について調べた。

⑧予備試験における結果の概要を表 16 に示す。

⑨SS と濁度の関係について

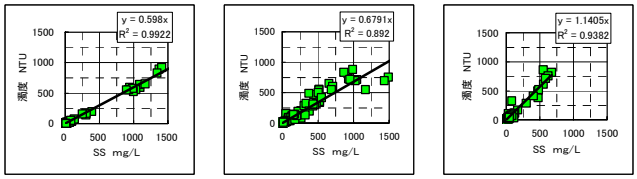
巻き上げ試験では，底泥試料採取地点で実際に起こっている巻き上げ現象を推測し，室内試験での巻き上げ強度との比較の中で巻き上げ試験結果の評価することが必要となる。

巻き上げ試験ではの攪拌の強度の決定は濁度を指標とするが，現地観測データとして SS のみ利用可能である場合が多いため，濁度と SS との関係の確認が必要である。

SS と濁度について、各試験でのデータを地点別、条件別に分けて、相関を調べた。回帰直線の式の傾きが大きくなることは、図 32 に示すように Y 軸に濁度をとった場合、同じ濁度に対して、SS の濃度が低くなっているか、同じ SS 量で濁度が高くなっているかである SS の量が変わらず濁度が増えるということは、SS の粒子が小さく、光を散乱していると考えることができる。

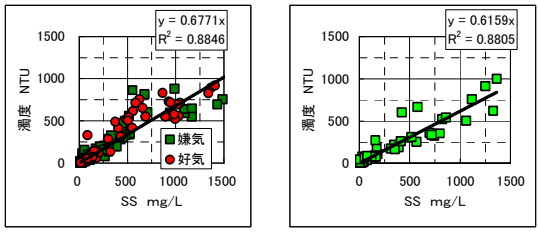
具体的には、プロペラ攪拌による粒子細分化により濁度が上昇したと予想される場合や、初期の SS に対する粒子構成の違いが影響していると考えられる。

図 32 は北浦、西浦湖心、牛込沖の SS と濁度の関係を示したもので、傾きから推定した底質の粒子の大きさは、北浦(0.598)＜西浦湖心(0.679)＜西浦牛込沖(1.141)となる。また図 33 のとおり巻上げ予備試験と全試験の傾きは 0.616 と 0.677 であった。



北浦　　西浦：湖心　　西浦：牛込沖

図 32　各底質を用いた濁度と SS の関係



巻き上げ試験全体　　巻き上げ予備試験

図 33　巻き上げ試験・予備試験の濁度と SS の関係

表 15　予備実験における実験条件一覧表（実測定値を含む）

ケース名	底質採取地点		直上水		直上水のバブリング		直上水高さ	底質高さ	直上水DO	直上水ORP	採水位置	攪拌時間	プロペラ形状	攪拌速度	測定項目		
	西浦	北浦	未交換	交換	嫌気	好気									濁度	SS	CNP
実験ケース 1	カオリン*				－	－	－	－	－	－	上下	15分	大/小	100	吸光度	－	－
実験ケース 2					－	－	－	－	－	－	上	15分	小	100～250	吸光度	－	－
実験ケース 3	6/16	－	－	－	－	－	－	－	1.78	－	上	10分	小	0～400	吸光/濁度	○	○
実験ケース 4	－	8/24	○	－	－	－	11	39.5	－	−197	上	5分	小	0～250	濁度	○	○
実験ケース 5	－		－	○	－	－	28.3	16.5	－	239	上	5分	小	0～400	濁度	○	○
実験ケース 6	－		－	○	－	－	27.5	16.5	－	204	上	5分	小	0～400	濁度	○	○
実験ケース 7	－	8/24	－	○	○	－	30	15	0～0.2	116～−130	上	5分	小	0～400	濁度	○	○
実験ケース 8	－		－	－	－	○	30	15	7.93～7.17	125～−104	上	5分	小	0、200、400	濁度	○	○
実験ケース 9	－		－	○	－	○	29	16＊	7.9～7.62	158～108	上	5分	小	0～400	濁度	○	○
実験ケース 10	8/23	－	－	○	○	－	30	15	0～0.8	176～−20	上	5分	小	0～400	濁度	○	○
実験ケース 11		－	－	－	－	○	30	15	1.13～0.58	141～33	上	5分	小	0、200、400	濁度	○	○
実験ケース 12		－	－	○	－	○	30	15	8.88～7.68	179～147	上	5分	小	0～400	濁度	○	○

＊攪拌位置はすべてのケースで底質より10cm上　　実験ケース9の16＊：底質高さが、同一の底質で実験を繰り返すうちに増加した

表 16 予備実験における実験結果概要一覧表

ケース名	底質の巻上げが生じた攪拌速度	濁度が測定不能になった攪拌速	リンの傾向	アンモニアの傾向	備考
実験ケース 1	－				プロペラ2種類を比較、大きいプロペラの場合は攪拌が強くなりすぎるため、不採用
実験ケース 2					採取位置による濁度の違いを確認、上下大きな差がないため、プロペラの上部で採水。 攪拌時間の長さを目視により確認、15分から10分へさらに以後5分へ短縮
実験ケース 3	150rpm	なし	－	－	
実験ケース 4	100rpm　78	150rpm	大きく減少	ほぼ一定	嫌気～好気への変化時にPO4－Pが大きく減少、NH4-Nは変化なし
実験ケース 5	200rpm　23	なし	やや減少	ほぼ一定	嫌気～好気への変化時にPO4－Pがやや減少、NH4-Nは変化なし
実験ケース 6	300rpm　20	なし	ほぼ一定	ほぼ一定	嫌気～好気への変化時にPO4－P、NH4-Nとも変化なし
実験ケース 7	200rpm　21.8	なし	やや増加	不安定	嫌気～嫌気の場合はPO4－Pが増加、NH4-Nは変化なし
実験ケース 8	200rpm　335	400rpm	やや減少	やや増加	嫌気～好気への変化時にPO4－Pがやや減少、NH4-Nは増加
実験ケース 9	200rpm　17.1	400rpm	減少	増加	好気～好気の場合はPO4－Pがやや減少、NH4-Nは増加
実験ケース 10	200rpm　38.8	なし	やや増加	やや増加	嫌気～嫌気の場合はPO4－Pが増加、北浦と異なりNH4-Nは増加
実験ケース 11	200rpm　260	400rpm	ほぼ一定	増加	嫌気～好気への変化時にPO4－Pがやや減少、NH4-Nは増加
実験ケース 12	300rpm　76	400rpm	やや増加	やや増加	好気～好気の場合はPO4－P、NH4-Nともやや増加

嫌気性及び、直上水を交換せずに攪拌を実施した場合

(2) 巻き上げ試験についてのまとめ

・巻き上げのための攪拌は 5～10 分，直上水中の SS 及び濁度の濃度が一定とるまで実施する

・試験に供与する底泥試料は，採取後すぐのものを用いる。

・攪拌強度と濁度とは供与試料の表面の状態や酸化状態により異なるため，その都度予備試験を実施して確認する必要がある。

・予備試験にて SS と濁度の関係を調べ，その上で底泥採取地点で想定される巻き上げ現象を再現するための攪拌強度を決めることが望ましい。

2.6 平成 17 年度結果まとめ

平成 17 年度は、ダム貯水池底泥に関して、底泥性状の季節変動調査、底層水への高濃度酸素供給が底泥間隙水に与える影響調査、長期酸素供給が底泥性状に与える影響調査、モニタリングデータを用いた溶出速度検討を行うとともに、霞ヶ浦底泥を用いた巻き上げ時の溶出状況調査を行い、以下の結果を得た。

1) ダム貯水池の底泥性状について季節変動を調べることにより、底層水 DO 濃度の間隙水 TOC 濃度への影響、間隙水 TOC 濃度と間隙水 PO_4-P 濃度の関係、間隙水 NH_4-N 濃度分布に影響する因子など、溶出機構を明らかにした。

2) 底層水への高濃度酸素供給が、底泥間隙水中の TOC、NO_3-N、PO_4-P 濃度に与える影響を明らかにし、DO 濃度の上昇により底泥からの PO_4-P 溶出が抑えられる機構を明らかにした。

3) 底泥試料の上相水を長期間好気状態に保つ実験により、好気条件持続が底泥の酸化層厚さと間隙水 PO_4-P・NH_4-N 濃度に与える影響を明らかにした。

4) ダム貯水池における連続的な水質モニタリングデータを用いてモデルシミュレーション計算を行い、貯水池底泥からの溶出速度を算出した。これにより、室内溶出試験における測定値の評価を行った。

5) 霞ヶ浦底泥を用いて、湖水流動時の底泥巻き上げに伴う栄養塩類溶出特性を評価した。

6) 室内で行う溶出試験方法について、現存マニュアルに記載されていないが試験結果に大きな影響を与える可能性のあるポイントについて整理し提案した。

3. 年度別調査概要

各年度の調査の概要は次のとおりである。

平成 13 年は貯水池底泥を用いた室内静置溶出試験を行い、次のような結論が得られた。

1) 嫌気条件で行った試験下での直上水の窒素濃度変動には、溶出だけでなく脱窒も影響を与えている可能性が推察された。

2) 試験容器内の充填泥厚に関しては、15cm と 30cm で溶出速度に明確な差を観測することができなかった。

平成 14 年度の調査では富栄養化がみられる湖沼や貯水池における現地調査、底層環境改善実験及び採取した底泥サンプルを用いた室内試験を行い、次のような結果が得られた。

1）水温や DO 及び ORP センサー等による連続測定をベースとした水柱と底泥表層のモニタリングシステムを試作し、湖内環境と底泥から汚濁物質が溶出する条件の観測を行った。

2）湖沼底泥を用いた室内溶出実験によって擬似浚渫泥厚と溶出量の関係について検討した結果、リン及び窒素の溶出には底泥の表層部の寄与が大きいことが判った。

3）貯水池で行った底層への酸素供給実験では、酸素供給による底泥からの栄養塩溶出抑制効果と深層水中における硝化・脱窒の促進効果を確認した。

平成 15 年度はダム貯水池における現地調査、底層環境改善実験及び採取した底泥サンプルを用いた溶出試験、酸素消費速度試験など室内試験を行い、次のような結果が得られた。

1）平成 14 年度に引き続き貯水池底層への酸素供給実験を行い、水柱の水温、DO 及び ORP をセンサーで連続観測するとともに、酸素供給の有無による水柱の酸化環境と栄養塩濃度の変化を観測した。この結果、好気的環境では存在の見られないリン濃度が酸素供給停止にとともに上昇する傾向が見られたが、14 年度ほど明確ではなかった。

2) 高濃度酸素水の供給前後で底泥試料を採取し、静置下無酸素状況で溶出試験を行った結果、窒素溶出速度の変化は見られなかった。なお、窒素曝気を行ったにも係わらず実験初期に溶存酸素の上昇が見られた。

3) 上層・中層・下層の貯水池底泥を用いた振とう回分溶出試験を行い、栄養塩類の溶出速度と溶出ポテンシャルに及ぼす諸因子の影響を定量的に評価した。この結果から、好気的環境下では深さの違いによるリンの溶出量の差は小さいこと、また、溶出試験後の溶出濃度、溶出速度はどちらも好気より嫌気、低温（5℃）より比較的高温（20℃）の方が大きく、溶

出が促進されることが示された。一方、硝化速度は、好気的な環境では、上層底泥の方が中層、下層よりも著しく大きくなることが示された。

平成16年度はダム貯水池における底層環境改善実験、及び、採取した底泥サンプルを用いた栄養塩溶出試験や酸素消費速度試験などを行い、次のような結果が得られた。

1) 平成15年度に引き続き貯水池底層への酸素供給実験を行い、水柱の水温、DO及びORPをセンサーで連続観測するとともに、酸素供給の有無による水柱の酸化環境と栄養塩濃度の変化を観測した。この結果、好気的環境でのリンの溶出抑制と嫌気的環境でのリン溶出の傾向が確認され、また、指標としてのORPの有効性が示唆された。

2) 高濃度酸素水の供給前後で底泥試料を採取し、静置状態・嫌気条件で溶出試験を行った結果、底泥への酸素供給によって底泥のPO_4-P、NH4-N溶出ポテンシャルが低下する傾向が把握できた。

3) 貯水池底泥を用いた振とう回分溶出試験を行い、栄養塩類の溶出速度と溶出ポテンシャルに及ぼす諸因子の影響を定量的に評価した。その結果、嫌気条件下では初期リン溶出速度が顕著に大きいが、2日間ほどでその溶出は終了すること、溶出リンは底泥中ではFeなどと結合していたと考えられること、好気条件においても緩速ながらリンは溶出し、最終的に嫌気条件における溶出量の25～50%程度まで溶出することが明かになった。

平成17年度は富栄養化の現象が見られる湖沼やダム貯水池における現地調査、底層環境改善実験、採取した底泥試料を用いた室内実験等を行い以下の結果を得た。

1)底泥性状の季節変動から、底層水DO濃度の間隙水TOC濃度への影響、間隙水TOC濃度と間隙水PO_4-P濃度の関係、間隙水NH_4-N濃度分布に影響する因子など、溶出機構を明らかにした。

2)共同研究により開発した新たな底層水への高濃度酸素供給装置と連続水質監視システムにより、底層水DO濃度の上昇により底泥からのPO_4-P溶出が抑えられる機構を明らかにした。

3)底泥試料の上相水を長期間好気状態に保つ実験により、好気条件持続が底泥の酸化層厚さと間隙水に与える影響を明らかにした。

4)ダム貯水池における連続的な水質モニタリングデータを用いてモデルシミュレーション計算を行い、貯水池底泥からの溶出速度を算出し、室内溶出試験における測定値の評価を行った。

5)霞ヶ浦底泥を用いて、湖水流動時の底泥巻き上げに伴う栄養塩類溶出特性を評価した。

6)溶出試験方法について現存マニュアルに記載がないが重要なポイントを整理し提案した。

4. 全体成果

4.1 底泥からの栄養塩等の溶出機構の解明

富栄養化がみられる湖沼や貯水池における現地調査、底層環境改善実験及び採取した底泥サンプルを用いた室内試験を行い、底泥からの栄養塩等の溶出機構に関する次のような知見を得た。

ダム貯水池底泥に関して、底泥性状の季節変動調査、底層水への高濃度酸素供給が底泥間隙水に与える影響調査、長期酸素供給が底泥性状に与える影響調査を行うとともに、霞ヶ浦底泥を用いた巻き上げ時の溶出状況調査を行い、次のような成果を得た。

(1)底泥性状と溶出の関係では,

・ダム貯水池の底泥性状について季節変動を調べ，底層水DO濃度の間隙水TOC濃度への影響、間隙水TOC濃度と間隙水PO4-P濃度の関係、間隙水NH4-N濃度分布に影響する因子など、溶出機構について未解明であった部分を明らかにした。

・底層水への高濃度酸素供給実験を行い，底層水のDOが底泥間隙水中のTOC、NO3-N、PO4-P濃度に与える影響を明らかにし、DOの供給によりPO4-P溶出が抑えられる機構を明らかにした。

(2)外力による底質表面の変化と溶出との関係では,

・霞ヶ浦底泥を用いた巻き上げ溶出試験を行い，湖水流動時の底泥巻き上げに伴う栄養塩類溶出特性を明らかにした。

(3)湖水の水質と底泥性状の関係では,

・底泥試料の上相水を長期間好気状態に保つ実験を行い、好気条件を持続させることが底泥性状を改善すること，間隙水PO4-P・NH4-N濃度に与える影響を明らかにした。

4.2 底泥からの水への栄養塩等溶出量推定方法の提案

底層水への高濃度酸素供給装置と連続水質監視システムを開発し，ダム貯水池における底層水のDO条件変化による水質変化を連続的にモニタリングするとともに，この水質モニタリングデータを用いてモデルシミュレーション計算を行い、次のような成果が得た。

1)底泥からの栄養塩溶出状況の監視にあたってはORPが指標として有効であることを明らかにした。

2)溶出量に影響を与えるいくつかの新しい項目を同定し，その影響を把握した。

3)貯水池底泥からの溶出速度を算出し，室内溶出試験における測定値に近い推定値を得た。

4.3 底泥からの栄養塩等の溶出量推定のための試験法の提案

現在底質調査に広く活用されている「底質の調査・試験マニュアル」（社団法人　底質浄化協会）について，特に記述がないが試験結果に大きな違いを生じるなど重要なポイントを整理した。

※この研究には当チームの交流研究員　中薗孝裕氏も従事した。また，科学研究費補助金において共同して研究を行っている岐阜大学工学部土木工学科水質安全研究室の李助教授及び学生の水田幸弘氏の研究成果のうち，土木研究所も担当した部分を使用している。

※なお、本調査は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

参考文献

1)Ihenyen,A.E.(2003):A Study of Vertical Distribution of Heavy Metals and Organic Content in Recent Sediment Cores from the Eastern Niger Delta, Nigeria. Environmental Sciences,10:303-311.

2)佐々木稔、田中宏明、李建華、和田順之輔、中村圭吾、柴田省三、田中克知、福井真司：底層環境改善のためのモニタリング技術と活用、環境システム計測制御学会誌、第7巻、第2号、pp.237-240，2002

3)和田順之輔，津森ジュン，田中宏明，李建華、田中克知，柴田省三，福井真司：貯水池底泥からの栄養塩の溶出について、第40回環境工学研究フォーラム講演集、（社）土木学会環境工学委員会、 pp.135-137、2003

都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究

研究予算：運営交付金（一般勘定）
研究期間：平 13～平 17
担当チーム：水循環研究グループ（水質）
研究担当者：鈴木穣，小森行也，岡安祐司

【要旨】
本研究は，界面活性剤の分解物質や人畜由来のホルモンなど都市排水由来の内分泌攪乱物質に関し，河川水・底質中などにおける調査分析手法の開発，また水環境中での分解・生成といった変化現象の把握を目的としている。
平成 17 年度は，ノニルフェノール類及びエストロゲンの底質・汚泥分析法の検討とノニルフェノール類の底泥への吸着，底泥からの溶出などの現象の解明について検討を行い，次のことが明らかになった。
1) NP・NPEO は底質では 1g-dry 以上，汚泥では 200mg-dry 以上用いることにより，概ね，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が確認された。しかしながら，NPEC は抽出方法についての検討が必要であることが分った。また，エストロゲンは底質，汚泥とも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が可能であるが，抱合体については引き続き検討が必要である。
2) NP 類の手賀沼の浮遊物への吸着平衡は線形的である。NPs のうち，NP の吸着係数が最も高い値であるが，NPEO（NP1～15EO）の吸着係数はその 60～50%程度であった。NPEC（NP1～10EC）の吸着係数は NP の 10～30%程度であった。エトキシ基が増えることによって，NP1～15EO の吸着係数が若干減少するが、NP1～10EC はその逆の傾向を示し，それぞれの物質は同一の値に接近する。これはエトキシ基の数が増えることによって物性が似たようになるためであると考えられる。低濃度(数 ppb)の濃度範囲であれば，NPs の混合液からの吸着における相互作用は無視できる程度であり，線形的な吸着平衡を考慮すればよいと考えられる。
キーワード：ノニルフェノール類，エストロゲン，抱合体，湖沼，挙動，シミュレーションモデル

１．はじめに

生物の正常なホルモン作用に影響を与えることが疑われている外因性の物質（内分泌攪乱物質）による環境汚染問題が顕在化してきているなか，都市排水を由来とするエストロゲンとして 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攪乱作用の強さから，エストロゲンに次いで環境に与える影響が大きいと考えられるノニルフェノール（NP）は，都市排水に含まれる非イオン界面活性剤であるノニルフェノールエトキシレート（NPEO）が，下水処理場や河川の中でノニルフェノキシ酢酸（NPEC）等の中間物質を経由して分解されることによって生成しているといわれている。

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

本研究では，環境水中でのこれら物質の挙動を把握するため，流域の汚水処理形態等に着目し，異なる流域（多摩川，大津川）で実態調査を実施するとともに，底質については千葉県の手賀沼と福島県に近年建設された三春ダムの前貯水池底質を対象にした実態調査と室内実験を行った。また，エストロゲンとノニルフェノール類の分析方法の開発を行った。

２．研究の内容

２．１　ノニルフェノール類（NPs）およびエストロゲンの底質・汚泥分析法検討

河川底質および活性汚泥を用いて，これらに含まれる NPs，エストロゲンの分析精度を確認した。具体的には，抽出効率の確認，前処理方法の精度の確認を行った。

２．１．１　検討方法

検討に用いた底質は桜川にて採泥，活性汚泥は湖北実験プラント（屋外施設）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 NPs 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，底質と汚泥で別々の抽出方法を用いた場合の前処理を含めた分析精度を確認した。底質と汚泥の NPs，エストロゲンの抽出条件は，以下に示すとおりである。

1）NPs の抽出条件

ここでは，①試料量，②抽出溶媒量，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。抽出方法は図-1 に示すとおりである。また，抽出条件を表-1，-2，-3，-4 に示す。なお A 法が，従来の抽出方法である。

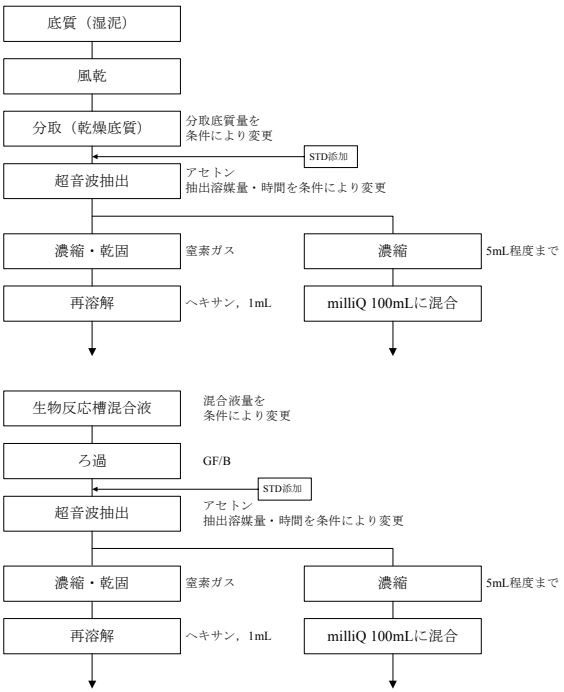


図-1　NPs 抽出方法

表-1　底質中 NP 類（NP，NPEO）抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量*	1g-dry	5g-dry	5g-dry
STD 添加	NP:15μg NPEO:30μg	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン/5mL	アセトン/25mL	アセトン/25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

＊底質試料は、風乾後、1mm のふるいを通過したものを用いて検討した

表-2 底質 NP 類（NPEC）抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量*	0.5g-dry	2.5g-dry	2.5g-dry
STD 添加	12.5ng	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン/5mL	アセトン/25mL	アセトン/25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

表-3　汚泥中 NP 類（NP，NPEO）抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量	200mg	1,000mg	1,000mg
STD 添加	NP:10μg NPEO:20μg	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン/10mL	アセトン/50mL	アセトン/50mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

表-4　汚泥中 NP 類（NPEC）抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量	220mg	1,100mg	1,100mg
STD 添加	5ng	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン/5mL	アセトン/25mL	アセトン/25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

2）エストロゲンの抽出条件

エストロゲン類については，以下のフローに従って抽出した（図-2）。B 法は，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）に記載された方法である。一方 A 法は，当研究チームにてこれまで実施してきた方法である。ここでは主に，凍結乾燥法によって抽出した場合と，従来の方法での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。

3）分析方法

NPs，エストロゲンの分析は，当研究チームにて従来用いてきた方法を基本に一部をモディファイして行った（表-5）。NP・NPEO の前処理方法は図-3，NPEC の前処理方法は図-4，エストロゲンの前処理方法は図-5 に示すとおりである。

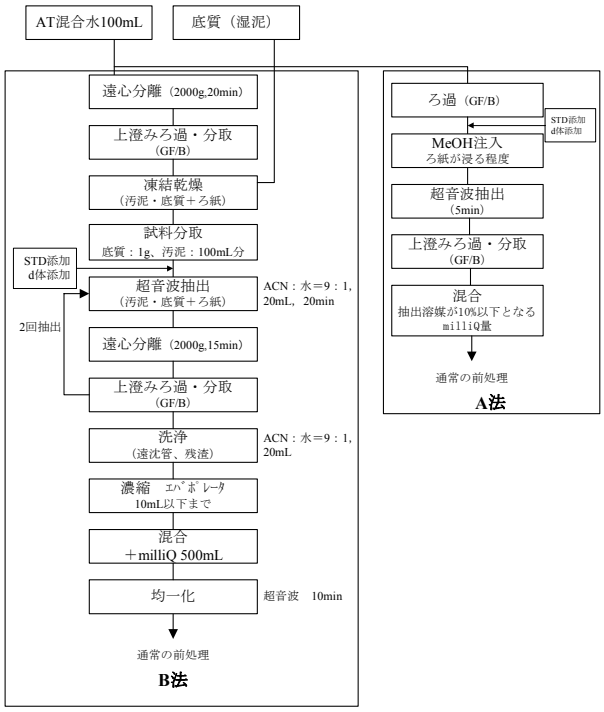


図-2　エストロゲン抽出フロー

表-5　分析方法とその概要

	前処理方法出典	概　要
NP NPEO	日本下水道協会、下水試験法（追補暫定版）－内分泌撹乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編－，pp.307-310（2002）	抽出液をシリカゲルカラムにて精製
NPEC	八十島他、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集、p.526（2002）	GCB で固相抽出後、25mM ギ酸含ジクロロメタン：メタノール=9：1 で溶出
エストロゲン	小森他、下水試料を対象としたエストロゲンの測定、第5回日本水環境学会シンポジウム講演集、p.186（2002）	HLB で固相抽出後、フロリジル、アミンカラムにて精製

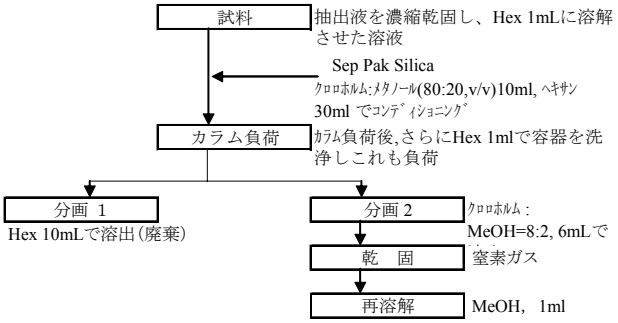


図-3　NP，NPEO 前処理方法

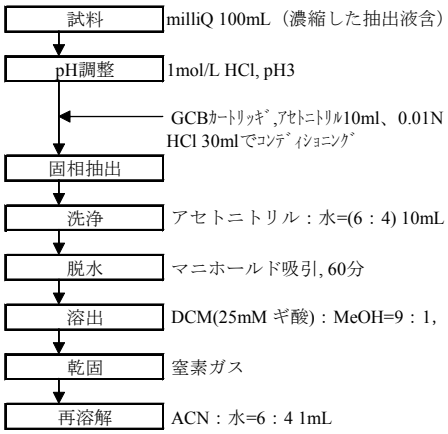


図-4　NPEC 前処理方法

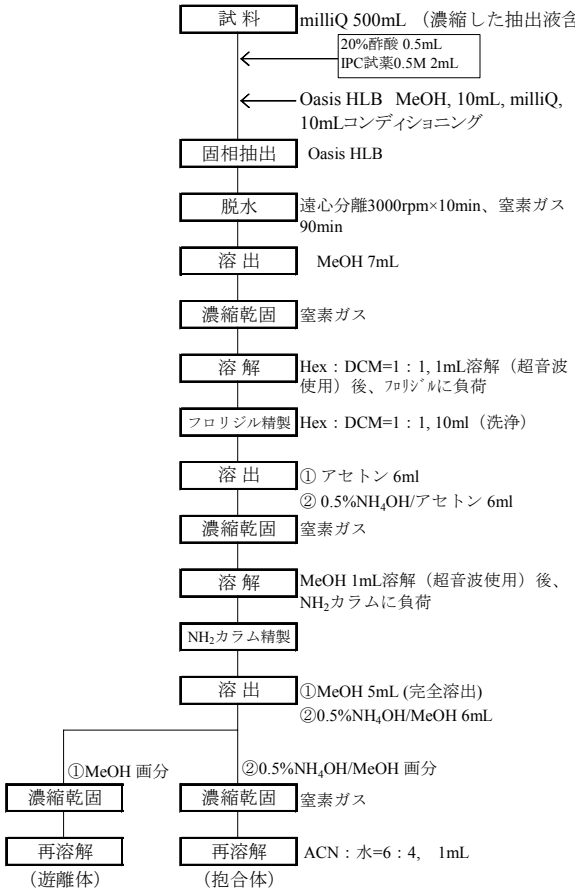


図-5　エストロゲン前処理方法

２．１．２　検討結果

1）NP，NPEO

(1)　底質

測定結果を図-6 に示す。従来法である A 法では，EO 鎖数 5 以上の NPEO では定量下限値以下であった。また，NP および比較的短鎖の NPEO（NP1EO～10EO）の回収率は 60%～90%と良好であったが，NPEO は EO 鎖が長くなるに連れて回収率が低下する傾向にあった。また，

この時の測定値のばらつき（CV 値）は最大で 7%程度と小さかった。一方，抽出に用いた汚泥量をＡ法の 5 倍としたＢ法，C 法では，濃度がＡ法の 5 倍程度に増加したものが見られた。抽出の傾向はＢ法，C 法とも似通っており，検出される EO 鎖長に大きな違いは認められなかった。

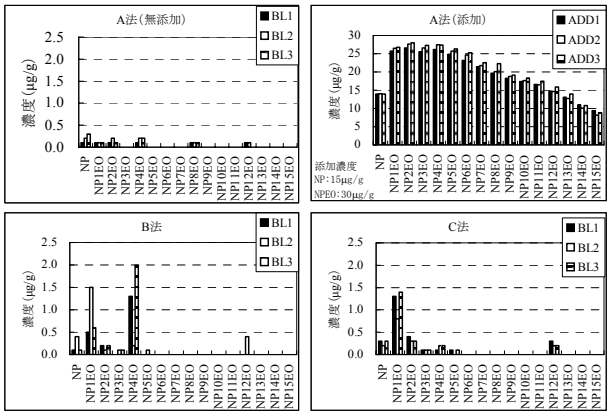


図-6　底質中 NP・NPEO 測定結果

⑵　汚泥

測定結果を図-7 に示す。EO 鎖が長い NPEO は試料量をＡ法の 5 倍にしたＢ法，C 法の 1g においても検出できるレベルになかった。また，添加回収試験での回収率は 80～90%と良好であった。

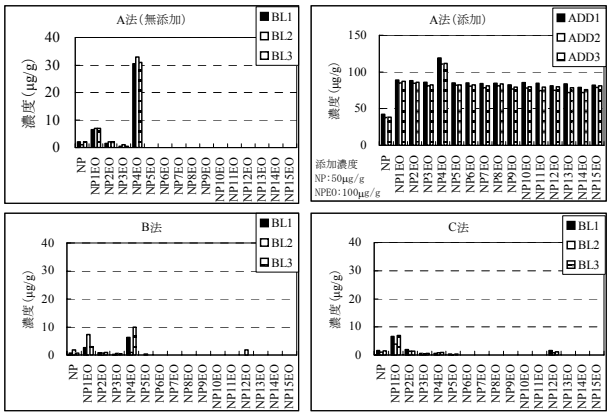


図-7　汚泥中 NP・NPEO 測定結果

２）NPEC

⑴　底質

底質試料を分析したクロマトグラムにおいては，定量出来るピークはほとんど認められなかった。わずかに目的物質と認められるピークについても，その面積値は極めて小さく，定量の結果，全てが定量下限値未満，つまり，N.D.であった。また，標準溶液を添加した試料においても，ほとんどの場合，目的物質のピークは認められず，定量の結果，全てが定量下限値未満であった。

⑵　汚泥

測定結果を図-8 に示す。A 法，B 法，C 法とも短鎖（NP1EC～NP4EC）の NPEC は検出されているが NP5EC より長鎖ではほとんど検出されなかった。長鎖の NPEC が検出されなかったのは，抽出効率が悪いというよりも，長鎖の NPEC は生分解を受けやすいことから試験に用いた汚泥中に存在していなかったとみられる。また，A 法の添加回収試験では，添加前濃度に対し添加濃度が低く回収率を算出できなかった。添加濃度を添加前濃度の 2～3 倍にした再試験を行う必要がある。

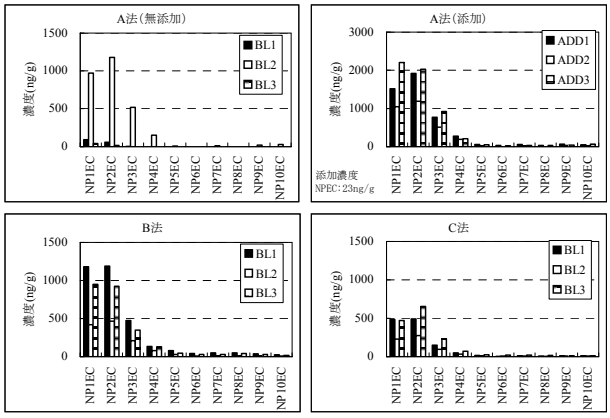


図-8　汚泥中 NPEC 測定結果

３）エストロゲン

⑴　底質

測定結果を図-9 に示す。無添加の試験では，A 法，B 法とも同様のパターンを示した。遊離体では EE2 が，抱合体では E3-S と E1-G が検出されていない。添加回収試験の結果では，E1，E2，EE2，E3，E1-S，E2-S，E3-S の回収率はほぼ 100%であり、E2-diS は 30～50%であった。また，他のグルクロン酸抱合体の回収率は数%以下でありほとんど抽出できないことが分かった。

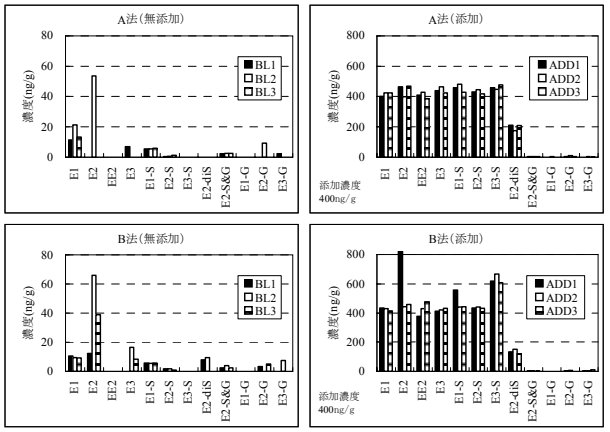


図-9　底質中エストロゲン類測定結果

(2) 汚泥

測定結果を図-10 に示す。無添加の試験では，A 法，B 法とも同様のパターンを示し，E2-diS が他のエストロゲンに比べ多く抽出された。添加回収試験の結果では，底質試料と同様の結果を示し，E1，E2，EE2，E3，E1-S，E2-S, E3-S の回収率はほぼ 100%であった。また, E2-diS は底質の回収率 30～50%に比べ大きく 60～80%であった。グルクロン酸抱合体については，底質同様ほとんど抽出できていない。

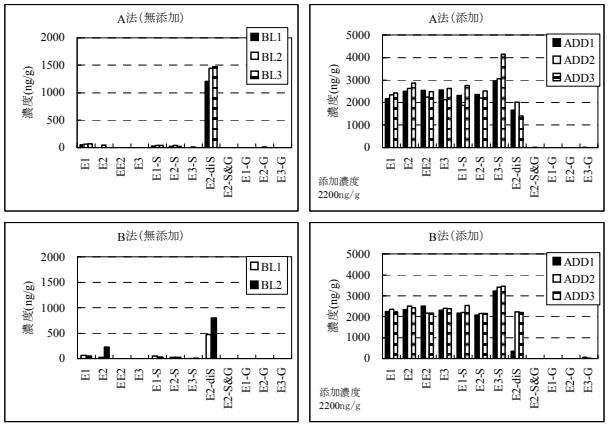


図-10　汚泥中エストロゲン類測定結果

4）分析精度

(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，標準溶液を添加した場合でも目的物質のピークが認められなかった。標準溶液の添加は，12.5ng/g となるように行っており，定量下限値より十分に高いことから容易に検出できるレベルにあったと考えられる。しかし，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すら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示唆される。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。これらの情報から，底質や汚泥中のエストロゲン類の分析は，従来用いてきた超音波抽出法で一定の精度を維持して行うことができると考えられた。しかしながら，抱合体については，理論値を大きく下回る回収率である他，そもそも検出されないケースが続出した。抱合体については，水試料においても十分な精度を維持して分析することが未だ困難な状況にあることから，まずは水試料における分析精度の向上，確認が必要であると考えられる。

２．１．３　まとめ

底質，活性汚泥を対象に，これらに含まれる NP 類，エストロゲンの抽出および前処理を含む分析法の精度を確認し表-6 に示した。

本検討による確認の結果，一部で依然として解決していない課題もあるものの，底質や活性汚泥は，概ね，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が確認された。

表-6　分析精度

項目	種別	分析精度確認結果
NP・NPEO	底質	従来法で精度担保可能、抽出量 1g-dry 以上
	汚泥	従来法で精度担保可能、抽出量 200mg 以上
NPEC	底質	抽出方法について検討を要する
	汚泥	
エストロゲン	底質	従来法で精度担保可能、但し抱合体は要検討
	汚泥	

1) 底質，汚泥の NP 及び NPEO の回収率は 60～90%で

あった。

2) 底質，汚泥のエストロゲン分析では，遊離体の回収率は，ほぼ100%に近い値が得られたが，E2-diS以外の抱合体では，回収率が非常に低い結果となり引き続き検討が必要である。

２．２　ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出などの現象の解明

水環境中のノニルフェノール類は，環境水中の浮遊物質や底泥に吸着しやすいことが知られているが，吸着平衡に関する実測データが現状では十分に得られていないのが実情である。平成17年度は，ノニルフェノール類の浮遊物質や底泥への吸着特性を把握するために，実環境水試料へのノニルフェノール類の添加，吸着実験を実施し、吸着等温線を求め，ノニルフェノール類の吸着および溶出特性を把握した。

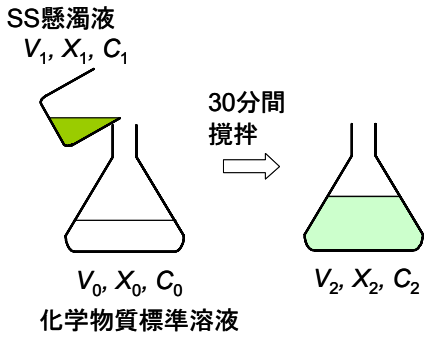
２．２．１　実験方法

１）SS懸濁液の調製

まず，吸着実験に使用するSS懸濁液を調製した。SS懸濁液の元となる試料の採水は平成17年8月11日,「手賀沼中央」の水質観測地点で行い，試料容器を遮光，冷蔵保存した。採水時の気温は28℃，水温は26℃，風速は1～2mであった。なお，採水日の約2週間前から採水日までの間，降水はなかった。試料中SS及びVSS濃度は22.5mg/L，7.4mg/Lでやや低かったため，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。

２）吸着平衡実験

実験方法の概要を図-11に示す。500mLのガラス製三角フラスコに，表-7に示す対象化学物質溶液200mLを入れた後, 100mLの１）で得られたSS懸濁液を添加し，フラスコの栓を閉めた後，フラスコをシェーカー（振とう機）に入れ, 30分間撹拌した。その後, 溶液全体を1μmのガラス繊維濾紙でろ過し，ろ過液のノニルフェノール類の分析を行った。対象化学物質は，NPのみを添加する実験，NP2EOのみを添加する実験，NP2ECのみを添加する実験およびNP，NP1～15EO，NP1～10EC，の26化合物全てを含む混合物質を添加する実験の4種類とした。なお，NP類混合物質溶液におけるNP：全NPEO：全NPECの濃度比は1：12.5：7.5とした。吸着実験は，採水日の翌日, 水温 22.4℃, pH=8.8の条件下で行い，吸着実験後溶液の浮遊物質（SS）濃度，有機性浮遊物質（VSS）濃度 はそれぞれ, 15mg/L, 4.9mg/Lであった。試料の分析はLC-MS/MSで行った。比較的に高濃度（数10μg/L ）の試料において，定量下限値は 0.5μg/L で，その他の試料においては 0.05μg/Lであった。



V: 容量，X: 有機性浮遊物質（VSS）濃度,
C: 溶解性対象化学物質濃度

図-11 吸着平衡実験の概要

表-7 対象化学物質溶液の濃度 C_0（単位 g/L）

実験No.	対象化学物質	フラスコ0	フラスコ1	フラスコ2	フラスコ3	フラスコ4
1	NPのみ	0	1	5	20	50
2	NP2EOのみ	0	1	5	20	50
3	NP2ECのみ	0	1	5	20	50
4	NP類混合	0	1	5	20	50

２．２．２　実験結果

ノニルフェノール類の分析結果を表-8に示す。手賀沼水質中にはノニルフェノール類が元々含まれていたので，各試験系においてブランク実験（対象物質濃度＝0）も合わせて実施した。

２．２．３　考察

吸着平衡実験前の化学物質標準溶液濃度 C_0 と吸着実験後の対象化学物質濃度 C_2 の関係は，吸着量が溶液濃度に比例するとの仮定のもとに吸着定数 K_{ads}［L/mgVSS］を使って以下のように表すことができる。

$$C_2 = A \cdot C_0 + B$$

$$A = (V_0 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_0)) / (V_2 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_2))$$

$$B = (V_1 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_1)) / (V_2 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_2)) \cdot C_1$$

２）３）の C_0 と C_2 の値から近似直線を求め，得られた傾き A の値から，吸着定数 K_{ads} は以下の式により求められる。

$$K_{ads} = (V_0 - A \cdot V_2) / (A \cdot V_2 \cdot X_2 - V_0 \cdot X_0)$$

表-8 吸着実験後の対象化学物質の濃度 C_2 （単位μg/L）

実験No.	対象化学物質	フラスコ0	フラスコ1	フラスコ2	フラスコ3	フラスコ4
1	NP	3.18	3.58	5.50	10.92	23.00
2	NP2EO	0.02	0.29	1.04	5.69	14.39
3	NP2EC	0.22	0.81	3.44	13.79	33.19
4	NP類（混合）					
	NP	0.23	0.33	0.96	1.74	2.96
	NP1EO	0.02	0.16	0.87	1.75	3.10
	NP2EO	0.01	0.23	0.94	1.83	2.99
	NP3EO	0.01	0.17	0.90	1.83	2.92
	NP4EO	0.01	0.17	0.88	1.86	2.96
	NP5EO	0.01	0.17	0.90	1.91	3.05
	NP6EO	0.01	0.17	0.89	1.93	3.06
	NP7EO	0.00	0.16	0.87	1.92	3.13
	NP8EO	0.00	0.17	0.88	1.90	3.13
	NP9EO	0.00	0.16	0.92	1.88	2.93
	NP10EO	0.00	0.15	0.86	1.88	3.16
	NP11EO	0.00	0.15	0.85	1.95	3.34
	NP12EO	0.00	0.17	0.87	1.96	3.18
	NP13EO	0.00	0.17	0.89	1.96	3.33
	NP14EO	0.00	0.17	0.90	1.95	3.29
	NP15EO	0.00	0.17	0.88	1.90	3.24
	NP1EC	0.22	0.47	1.52	2.79	4.87
	NP2EC	0.17	0.41	1.47	2.77	5.04
	NP3EC	0.08	0.31	1.28	2.50	4.57
	NP4EC	0.03	0.24	1.13	2.29	4.02
	NP5EC	0.02	0.21	1.05	2.08	3.75
	NP6EC	0.01	0.20	1.02	2.17	3.80
	NP7EC	0.01	0.18	0.97	2.05	3.67
	NP8EC	0.01	0.18	0.96	2.12	3.57
	NP9EC	0.00	0.16	0.93	2.04	3.55
	NP10EC	0.00	0.17	0.90	2.02	3.51

図 12，13 に，例として，実験 No. 1，2 の結果より得られた C_0 と C_2 の関係を示す。表-9 に得られた各対象物質の吸着定数を示す。これらの値及び単一化合物の吸着定数はほぼ一致することがわかる。

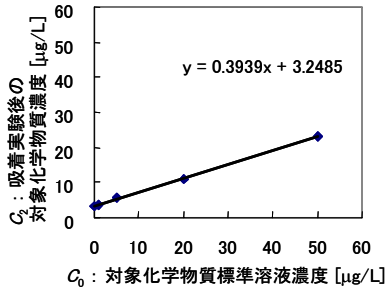


図-12 ノニルフェノール（NP）の吸着実験結果

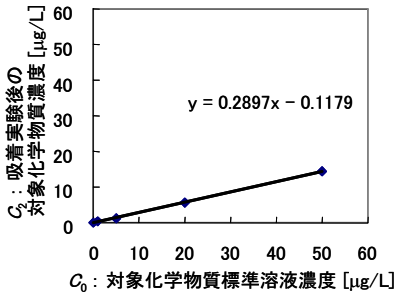


図-13 NP2EO の吸着実験結果

表-9 各対象物質の吸着定数，C_0 と C_2 の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	33.19
NP2EC	0.021	0.755	14.39
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

２．２．４　まとめ

1) 検討を行った濃度範囲で，NP 類の手賀沼の浮遊物への吸着平衡は線形的である。
2) 検討の対象とした物質のうち，ノニルフェノールの吸着係数が最も高い値であるが，ノニルフェノールエトキシレート類（NP1～15EO）の吸着係数はその 60～50%程度であった。ノニルフェノールエトキシ酢酸類（NP1～10EC）の吸着係数は NP の 10～30%程度であった。
3) エトキシ基が増えることによって，NP1～15EO の吸着係数が若干減少するが，NP1～10EC はその逆の傾向を示し，それぞれの物質は同一の値に接近する。これはエトキシ基の数が増えることによって物性が似たようになるためであると考えられる。
4) 低濃度（数 ppb）の濃度範囲であれば，NP 類の混合液からの吸着における相互作用は無視できる程度であり，線形的な吸着平衡を考慮すればよいと考えられる。

３．まとめ

過年度の成果を含む本研究の成果は，以下のとおりである。

３．１　ノニルフェノール類、エストロゲン類の分析方法の開発

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、前処理の簡易化を行った方法を提案した。

２）エストロゲンが尿中へ排泄されるときの形態は，グ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分析法の検討を行い，LC/MS/MS によるエストロゲン抱合体の分析法を開発した。

３）ノニルフェノール類のノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）は HPLC を用い NP1EO～NP15EO を測定し、ノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）は LC/MS/MS を用い NP1EC～NP10EC を測定する方法を提案した。

４）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 は底質では 1g-dry 以上，汚泥では 200mg-dry 以上用いることにより，概ね，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。

また，エストロゲンは底質，汚泥とも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が可能であるが，抱合体については引き続き検討が必要であることが分かった。

３．２　水中でのノニルフェノール類、エストロゲン類の分解、生成などの現象の解明

１）水環境中での挙動を把握するため，湖沼及び河川における実態調査を行い，都市排水由来の流入状況，河道における変化や底泥への蓄積状況を明らかにした。
河川におけるエストロゲン，NPs は，河道内における分解あるいは変化、一部底泥への吸着の可能性が示唆された。

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

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

４）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。これにより，湖水における NP 類濃度の構成および分布の傾向が再現できた。

また，三春ダム前貯水池から水・底泥試料を採取し，17βエストラジオールの分解速度を調査した。その結果，分解速度は，表層底泥の方が中層や下層底泥よりも大きく，また，好気条件下の方が嫌気条件下よりも大きかった。SS 量当たりの分解速度で見ると，水相は底泥相の 2 倍の大きさであった。

３．２　ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出などの現象の解明

１）検討を行った濃度範囲で，NP 類の手賀沼の浮遊物への吸着平衡は線形的である。

２）検討の対象とした物質のうち，ノニルフェノールの吸着係数が最も高い値であるが，ノニルフェノールエトキシレート類（NP1～15EO）の吸着係数はその 60～50%程度であった。ノニルフェノールエトキシ酢酸類（NP1～10EC）の吸着係数は NP の 10～30%程度であった。

３）エトキシ基が増えることによって，NP1～15EO の吸着係数が若干減少するが、NP1～10EC はその逆の傾向を示し，それぞれの物質は同一の値に接近する。これはエトキシ基の数が増えることによって物性が似たようになるためであると考えられる。

４）低濃度(数 ppb)の濃度範囲であれば，NP 類の混合液からの吸着における相互作用は無視できる程度であり，線形的な吸着平衡を考慮すればよいと考えられる。

５）都市排水で汚染した湖沼の底泥中にはエストロゲン，NPs が高い濃度で蓄積されており，好気的な条件で分解されるよりもきわめて長期に底泥中に高濃度で存在している可能性があることが示唆された。

底泥年代測定の結果から，流域の人口，下水道などの排出機構の変化は E1，ノニルフェノール類の底泥中鉛直分布に大きく影響を与えていることが推察された。

［参考文献］

１）磯部友彦，高田秀重（2000）環境試料中のノニルフェノールエトキシカルボン酸（NPEC）の分析，第 9 回環境化学討論会，pp.48-49

バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する調査

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

1.　はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質による人や生態系への影響が懸念されており、下水道においても多くの内分泌攪乱化学物質について実態調査[1]が行われてきた。下水や環境水中ではこれらの実態調査の対象物質に加えて、分解生成物などの非意図生成物の存在についても考慮する必要があり、我々の研究チームではこれらエストロゲン様の作用を示す物質（以後、エストロゲン様物質）の包括的な試験法として遺伝子組み換え酵母法を導入し、多くの下水中にエストロゲン様活性が存在していることを明らかにしてきた[2]。しかしこれらのエストロゲン様活性の由来についてはいまだ不明な点も多く、下水中のエストロゲン様活性が、これまで測定してきた物質によって表現できているのかという事については、まだ充分な情報は得られていない。

2.　研究の方向性

本研究では、本研究では、*in vitro*と*in vivo*のバイオアッセイを用いてその影響把握と、原因を推定することを目的としている。平成17年度は、下水処理水や河川水中に存在するエストロゲン物質であるエストロン（E1）を被験物質として、雄メダカを用いた室内暴露試験において誘導されるビテロジェニン（VTG）生産に係る水温の影響と、餌を通して影響について検討を行った。

3. 分析方法

3.1 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

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

遺伝子組み換え酵母は、イギリス Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いた。遺伝子組み換え酵母はエストロゲンやエストロゲン様物質がエストロゲンレセプター（ER）に結合するとβ-ガラクトシダーゼが発現するように組み込まれている[3]。

遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定法については Routledge らの方法を改良した矢古宇らの方法に従った[4]。

3.2　化学分析

エストロゲン様物質の分析項目は、エストロン(E1)，17β-エストラジオール（E2），ノニルフェノール（NP）を対象とした。またノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)，ノニルフェノールフェノキシ酢酸(NPnEC)（以後、ノニルフェノール関連物質）についても測定を行った。

E1 及び E2 については、小森らの方法に従い LC-MS/MS を用いて測定を行った[5]。また、NP、NPnEO については、下水試験法追補暫定版に従い HPLC を用いて測定を行った[6]。NPnEC については八十島らの方法に従い LC-MS/MS を用いて測定を行った[7]。

4 エストロゲンの作用におよぼす水温の影響

E1 を添加した飼育水（設定濃度 50ng/L）により、月齢 5 カ月の雄メダカを水温 16℃、20℃、24℃および 28℃の各

条件下、月齢2カ月の雄メダカを水温24℃下で曝露した（最長14日間）。曝露前（曝露0日）および曝露開始から2、7および14日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中のVTG濃度を測定した。
各水温条件での肝臓中VTG濃度からE1曝露における雄メダカのVTG生成について、経時的変化および水温の影響を検討した。また、5カ月齢と2カ月齢の雄メダカでの肝臓中VTG濃度から雄メダカの成長段階とVTG生成の関係について検討した。

4.1　供試前の飼育方法および条件

試験に供した雄メダカのふ化後から各曝露試験に供するまでの飼育方法および条件は以下のとおりであった。

1）ふ化直後からふ化後2週齢まで

ふ化直後から2週齢までは、脱塩素水道水（水道水を活性炭に通して脱塩素処理したもの）を飼育水とした半止水方式（飼育水の換水：2～3 日ごとに約半量を換水）により飼育した。飼育水温は 24±2℃、照明は蛍光灯光による明期16時間/暗期8時間周期とした。餌料は、シオミズツボワムシおよびアルテミアふ化幼生を混合で3～4回/日の頻度で給餌した。

2）ふ化後2週齢から供試まで

ふ化後2週齢以降は、脱塩素水道水を飼育水とした流水方式（換水率；5～6換水/日）により飼育した。飼育水温は24±2℃、照明は蛍光灯光による明期16時間/暗期8時間周期とした。餌料は、アルテミアふ化幼生を1～2回/日の頻度で給餌した。

4.2　雄メダカの選別

水温影響調査および餌の影響調査の曝露試験に供した5カ月齢の雄メダカは、約3カ月齢の時点で二次性徴（臀鰭の形状等）により雌雄を選別し、以降、雌個体の排泄するエストロゲンの影響を受けないように、飼育水槽に雄個体のみを収容し前項に示す条件下で飼育した。水温影響調査の曝露試験に供した2カ月齢の雄メダカは、試験に供する約5～7日前に雌雄を選別し、以降は雄個体のみで飼育した。

4.3　水温影響調査の曝露試験

5カ月齢および2カ月齢の雄メダカを50ng/L（設定濃度）のE1を含む試験液で曝露した。曝露における水温条件は、5カ月齢の雄メダカで16、20、24および28℃の4条件、2カ月の雄メダカで24℃の1条件とした。5カ月齢の雄メダカにおける16、20、24および28℃での曝露をそれぞれ16℃区、20℃区、24℃区および28℃区、2カ月齢の雄メダカの24℃での曝露を24℃_2カ月齢区と表記する。曝露条件を表-1に示す。

1）試験に用いた曝露装置の仕様

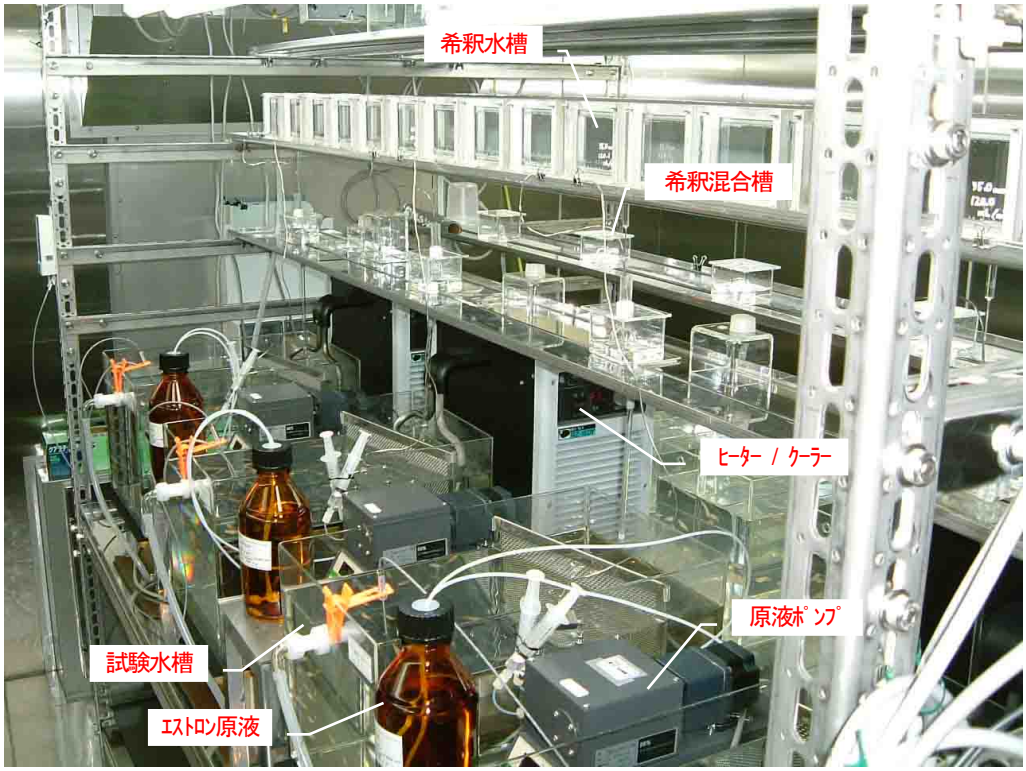
本試験に用いた曝露装置は、ステンレス鋼製の希釈水タンク（装置の下部と上部に2つ設置）、希釈水の水温調整器（東京理化株式会社、クーリングサーモポンプ CTP-102）、被験物質原液用の送液ポンプ（日本精密株式会社、ケミカルポンプ NP-KX-110）、硬質ガラス製の希釈水槽（ガラス接着にシリコンを使用）、硬質ガラス製の希釈混合および試験水槽で構成される。本装置は、希釈水、被験物質原液および試験液との接液部に内分泌かく乱作用を持つ化学物質を溶出しない素材（ガラス、ステンレス鋼、PTFEおよびPFEのテフロン、シリコン）のみが使用されている（図-1）。

表-1　水温影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	：	E1を添加した試験液による流水式曝露
試験液の換水率	：	5換水／日以上
設定曝露濃度	：	E150ng/L（設定濃度）
水温	：	各水温条件（16、20、24および28℃）±2℃
曝露期間	：	2、7および14日間
供試生物	：	雄メダカ（ヒメダカ系）
供試生物の月齢		5カ月齢および2カ月齢
供試生物数	：	5カ月齢の雄メダカ；86個体／曝露区
		2カ月齢の雄メダカ；50個体／曝露区
照明	：	昼光用蛍光灯光、明期16時間／暗期8時間
給餌	：	アルテミアふ化幼生を1回／日

2）曝露装置における試験液の調製および供給方法

本試験では、以下に示すように各曝露区の試験液を調製、各試験水槽に一定の流量で供給した。試験液の調製に用い



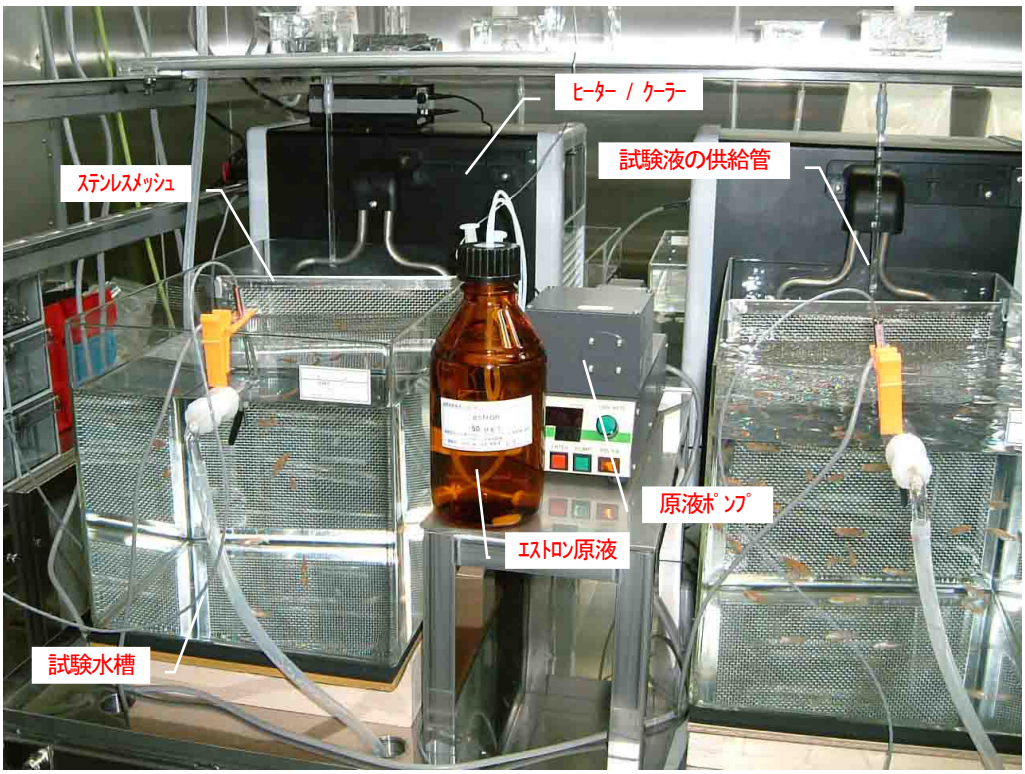


図-1　水温影響調査の曝露試験に用いた流水式曝露装置

る希釈水（脱塩素水道水）は、装置下部の希釈水タンクに貯留および補給される。希釈水の水温は、装置の下部と上部の希釈水タンク間を循環しながら水温調整器により調整および維持されている（本試験では、希釈水の水温を24℃設定とした）。

試験液調製のために、希釈水は上部の希釈水タンクからテフロン管を通して希釈水槽に供給、さらに希釈水槽下面のガラス製キャピラリー管を通して希釈混合槽内に一定の流量で供給される。希釈混合槽には、原液ポンプにより被験物質原液（本試験ではE1原液、詳細は後述）が一定の流量で添加され、希釈水と混合し一定濃度の被験物質を含む試験液が調製される。試験液は、ガラス管を通して試験水槽に供給される。

3）試験水槽

本試験では、5カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が30Lとなる位置に排水口（テフロン製）を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。2カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が10Lとなる位置に排水口を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。各試験水槽の排水口には、供試魚が逸脱しないようにステンレス鋼製メッシュを設置した。

4）試験水槽内の水温調整

本試験では、水温24℃の希釈水で調製した試験液を各試験水槽に供給したため、16℃区、20℃区および28℃区の各曝露区については、水槽内の試験液が供給される箇所に設置した投げ込み式クーラー／ヒーター（REI SEA、RZ-150Y）により水槽内の試験液水温を調整および維持した。また、水槽内の水温を均一にするため水槽壁面にスターラーを設置し、試験液を緩やかに撹拌した。クーラー／ヒーターおよびスターラーは、ステンレス鋼製メッシュで仕切られた一画に設置した。16℃区、20℃区、24℃区および28℃区の試験水槽には、磁気記録式温度計（T AND D、Thermo Recorder TR-81）を設置し、水温を10分間ごとに測定、記録した。

4.4　供試雄メダカの馴化

16℃区、20℃区、24℃区および28℃区での曝露に供する雄メダカは、曝露開始の14日前に各曝露区の試験水槽に収容し、水温24℃下で馴化を開始した。その後、16℃区、20℃区および28℃区については、水槽内に設置したクーラー／ヒーターにより飼育水温を1日あたり0.5～1℃低下（16℃区および20℃区）または上昇（28℃区）していき、曝露開始の3日前までに各曝露区の水温条件に馴化させた。馴化期間中の水温以外の環境は、前項3.1に示す試験における曝露条件と同じにした。24℃_2カ月齢区については、曝露開始前の17日前から試験と同じ環境下で飼育して試験環境に馴化させた。

4.5　試験液の調製

1）希釈水

試験液の調製に用いる希釈水は、活性炭濾過器に通水して残留塩素等を除去した水道水（脱塩素水道水）とした。希釈水は、前述のとおり流水式曝露装置の希釈水タンク内で水温を24℃に調整するとともに、エアレーションにより十分に通気した。

2）E1原液

正確に秤量した50mgのE1をアセトン（残留農薬・PCB試験用、和光純薬工業株式会社）に溶解、100mLに定容した（E1濃度500mg/L-アセトン）。さらにこの溶液10mLをアセトンで100mLに希釈、定容してE1濃度50mg/Lのアセトン溶液を調製した（以下、この溶液をE1の一次原液とする）。

E1の一次原液1mLを1Lデュラン瓶に分取、窒素ガスを穏やかに吹き付けアセトンを完全に留去した。ここにイオン交換水1Lを加え、翌日までスターラーで緩やかに撹拌してE1を完全に溶解させ、E1濃度50μg/Lの水溶液を調製した。これを流水式曝露装置上での試験液調製に用いるE1原液とした。E1原液は、曝露区ごとに調製した。

曝露期間中、各曝露区のE1原液は、3日ごとに新調して交換した。

3）試験液の調製濃度および流量

各曝露区の試験水槽に供給する試験液のE1濃度は、水槽内での吸着や分解、供試魚への移行等による濃度低下を考慮して、曝露条件である50ng/Lの110%に相当する55ng/Lとなるように調製した。

16℃区、20℃区、24℃区および28℃区（5カ月齢の雄メダカの曝露区）の各曝露区では、曝露装置の希釈混合槽への希釈水の流量（設定流量）を120mL/min、E1原液の流量を132μL/minとした（試験液の換水率：約6換水／日）。24℃_2カ月齢区については、希釈水の流量を70mL/min、E1原液の流量を78μL/minとした（試験液の換水率：約10換水／日）。

4.6　曝露操作および曝露中の管理

1）曝露開始時の操作

E1 での曝露（試験液への E1 添加）を開始する直前に、曝露 0 日（曝露前）における VTG 濃度分析および遺伝子解析用の肝臓採取に供するため、各曝露区の試験水槽内の雄メダカ（86 個体／曝露区）から 19 個体ずつを取り上げた。その後、各試験水槽への希釈水の供給を止め、水槽内の飼育水に E1 濃度が 50ng/L となるように E1 原液を添加した。また、この時点から前項 3.5 に示す方法による流水式による E1 が添加された試験液の供給を開始した。

2）曝露期間中の管理

曝露期間中は、毎日、各曝露区について死亡個体の有無、行動および外観異常の有無を肉眼的に観察した。死亡個体がみられた場合は、直ちにタモ網で掬い取り水槽内から除去した。餌料は、アルテミアふ化幼生を 1 回／日の頻度で給餌した（曝露終了日の曝露 14 日後は無給餌）。給餌量は 15 分間程度で食べきる量を目安とした。また、給餌から数時間後にサイフォンを用いて水槽内の糞および残餌等を除去した。

3）曝露期間中の環境測定

各曝露区について、試験液の水温を毎日、pH および溶存酸素濃度を週 3 回の頻度で測定した。水温は検定済みの水銀棒状温度計、pH はガラス電極式水素イオン濃度計（METTLER TOLEDO、MP125）、溶存酸素濃度はポーラログラフ式溶存酸素濃度計（METTLER TOLEDO、MO128）を用いて、それぞれ試験水槽の中央部で測定した。希釈水および E1 原液の流量は毎日測定し、設定流量から少なくとも±1%以上の変動がみられた場合には、流量が設定値になるように再調整した。

4）E1 濃度分析試料の採取

曝露 0 日目（曝露開始日）、曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区の試験水槽から E1 濃度分析に供するための試料（試験液）を採取した。曝露 0 日目の試料は、前述の曝露開始時における試験水槽への E1 原液の添加および試験水槽への試験液の供給を開始した時点から約 4 時間後に各試験水槽から採取した。曝露 2、7 および 14 日後の試料は、当日の給餌前に採取した。

試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器（500mL 容）に採取した。採取量は約 1000mL とし、約 500mL を直ちに前処理（抽出）に供し、残りは予備としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

5）遺伝子解析および VTG 分析用肝臓採取に供する個体の取り上げ

曝露 0 日（曝露前）、曝露 2、7 および 14 日後に、各曝露区から表-2 に示す個体数の雄メダカを取り上げ、遺伝子解析用および VTG 分析用の肝臓採取に供した。曝露 0 日目は試験水槽に E1 を添加する直前（E1 での曝露開始の直前）に、曝露 2、7 および 14 日後は当日の給餌前に取り上げた。

表-2　水温影響調査の曝露試験における遺伝子解析および VTG 分析用雄メダカの供試個体数

曝露区		曝露期間			
		0 日	2 日	7 日	14 日
16℃区	VTG 分析用	10	10	10	10
20℃区	VTG 分析用	10	10	10	10
24℃区	VTG 分析用	10	10	10	10
28℃区	VTG 分析用	10	10	10	10
24℃_2 カ月齢区	VTG 分析用	10	10	10	10

供試個体は、小型のネットを用いて試験水槽内の雄メダカから無作為に掬いあげ、曝露区ごとに試験水槽から分取した試験液（約 1.5L）を入れた手付きビーカーに収容して解剖作業を行う実験室に搬入した。

4.7　E1 濃度分析

水温影響調査および餌の影響調査の曝露試験で採取した各曝露区の試験液および飼育水中の E1 濃度は、「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS で測定した。

4.8　肝臓中の VTG 濃度分析

VTG 濃度分析に供するための肝臓を採取した。肝臓の採取は、試験区ごとに行い、1 個体ずつ氷冷水中で麻酔してから、全長、体長および体重を測定した後、肝臓を摘出し秤量した。

その後、以下の手順でVTGの濃度を測定した。

① 肝臓の入った1.5mLマイクロチューブに氷冷したELISAキット付属のAssay bufferを肝臓重量1mg あたり25μL添加する。

② 1.5mLマイクロチューブ用のマイクロホモジナイザーを用いてAssay buffer中で肝臓をホモジナイズする。

③ 冷却遠心機で遠心分離する（4℃、13,000ｇ×10分間）。

④ マイクロピペットを用いて、上層に分離した脂肪を混入させないように中層から上清（肝臓抽出液）を0.5mLマイクロチューブ3本に分取する。

マイクロチューブに採取した肝臓抽出液は、直ちに超低温冷凍庫に入れ、ELISAによるVTG濃度測定に供するまで-70℃下で凍結保存した。

肝臓抽出液中のVTG濃度は、メダカのVTG測定用ELISAキット（Enbio Madaka vitellogenin ELISA system、株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ）を用いた。ELISA測定における条件および手順、濃度算出方法は、同キットの説明書に従った。ただし、標準曲線の作成に用いるVTG標準溶液の濃度は100、50、25、12.5、6.25、3.13および1.56ng/mLの7濃度系列にした（説明書記載の調製濃度は、100、50、20および10ng/mLの4濃度系列）。

ELISA測定における定量下限は、標準曲線の作成に用いたVTG標準溶液の最低濃度である3.16ng/mLとした。したがって、肝臓中VTG濃度の定量下限は、3.16ng/mLに肝臓抽出液の最低希釈倍率（20倍）および肝臓のホモジナイズに用いたAssay buffer量0.025mL/mg-liverを乗じて算出される1.56ng/mg-liverとした。

4.9　試験液中のE1濃度

曝露0日目および曝露2、7および14日後に各曝露区から採取した試験液中のE1濃度の測定結果を表-3に示す。

16℃区、20℃区および24℃_2カ月齢区の試験液中のE1濃度は、曝露期間を通して50～56ng/Lの範囲にあり、設定濃度（50ng/L）の100～111%、試験液調製におけるE1添加濃度（55ng/L）の91～101%を維持していた。また、各測定日間のばらつきも小さかった。24℃区は、曝露7日後まで50ng/L以上を維持していたが、14日後の濃度は48.7ng/Lとやや低かった。一方、28℃区のE1濃度には経時的な漸減傾向がみられ、曝露7日後および14日後の濃度（42.8および29.7ng/L）は、他の曝露区の80%および55%程度と低かった。28℃区の曝露7日後および14日後については、予備試料（採水直後にアスコルビン酸を添加、冷蔵保存したもの）として保存した試験液を用いた再測定を行ったが、再測定値も43.0ng/Lおよび30.9ng/Lとほぼ同じ濃度であった。

表-3　水温影響調査の曝露試験における試験液中のE1濃度

曝露区	E1濃度（ng/L）			
	曝露0日目	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
16℃区	54.0	55.5	52.5	54.6
20℃区	54.6	54.0	50.2	51.1
24℃区	52.9	55.3	51.0	48.7
28℃区	52.3	50.8	42.8	29.7
24℃_2カ月齢区	53.8	53.6	55.1	54.7

曝露期間中に測定した28℃区における希釈水およびE1原液の実測流量は、曝露期間を通して設定流量の±3%以内の変動で維持されていたことから、E1原液添加量の低下が、試験水での濃度低下の原因ではないと考えられる。前述のように24℃区においても曝露7日後から14日後にかけて若干の濃度低下がみられたことから、試験水の水温に依存的に試験水槽内でのバクテリア等によるE1の分解が促進され、結果として最も水温が高い28℃区で顕著な濃度低下が生じた可能性が考えられる。なお、24℃区と同じ水温条件の24℃_2カ月齢区では、試験液の換水率が10換水／日と24℃区（6換水／日）よりも大きかったため、濃度低下がみられなかったと推察される。

各曝露区における曝露0日目から曝露2、7または14日後までの試験液中の平均E1濃度、すなわち曝露2、7または14日後に各曝露区から取り上げた雄メダカの曝露開始から取り上げ日までの試験液中のE1による平均曝露濃度を表-4に示す。曝露0日目～2日後の平均E1濃度は、28℃区でやや低かったものの、曝露区間の差は最大で3.2ng/Lと比較的小さかった。曝露0日目～7日後および14日後の平均濃度は、28℃区を除く曝露区間では最大差は1.3ng/Lおよび

表-4　各曝露期間における試験液の平均E1濃度

曝露区	平均E1濃度（ng/L）		
	0日目～2日後	0日目～7日後	0日目～14日後
16℃区	54.8	54.0	54.2
20℃区	54.3	52.9	52.5
24℃区	54.1	53.1	52.0
28℃区	51.6	48.6	43.9
24℃_2カ月齢区	53.7	54.2	54.3

2.3ng/Lと小さかった。28℃区の曝露0日目～7日後および14日後の平均濃度は48.6および43.9ng/Lと、他の曝露区より10～20%程度低い濃度であった。

4.10　曝露期間中の生育環境の変化

曝露期間中の各曝露区における水温の範囲（最低～最高）および平均を表-5に示す。曝露期間中の平均水温は、各曝露区とも水温条件の±0.5℃以内であった。曝露期間中の変動範囲も、16℃区が15.0～16.4℃、20℃区が19.1～21.0℃、24℃区が23.6～24.8℃、28℃区が27.7～28.6℃、24℃_2カ月齢区が23.6～23.8℃と、いずれの曝露区においても水温

表-5　水温影響調査の曝露試験における曝露期間中の水温

曝露区	曝露期間中の最低～最高水温および平均水温（℃）	
	水銀温度計での測定	磁気記録式水温計での測定
16℃区	15.1 ～ 16.3（15.8）	15.0 ～ 16.4（15.8）
20℃区	19.3 ～ 20.8（20.2）	19.1 ～ 21.0（20.4）
24℃区	24.3 ～ 24.8（24.5）	23.6 ～ 24.8（24.2）
28℃区	27.8 ～ 28.4（28.1）	27.7 ～ 28.6（28.1）
24℃_2カ月齢区	23.6 ～ 23.8（23.7）	－

注）括弧内の数値は平均水温を示す。24℃_2カ月齢区は、磁気記録式水温計による測定を行わなかった。

条件の±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区における pH、溶存酸素濃度（DO）および溶存酸素飽和度の曝露期間中の範囲（最低～最高）を表-6に示す。各曝露区のpHおよび溶存酸素濃度は、曝露0、1、6、9、12および14日目に測定した。各曝露区のpHは7.1～7.9の範囲にあった。溶存酸素濃度は、5.8mg/L以上（飽和度として70%以上）であった。pHおよび溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通してOECD化学品テストガイドライン TG203 6）（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH；6.0～8.5、溶存酸素飽和度；60%以上）を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pH および溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件または一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

表-6　水温影響調査の曝露試験における曝露期間中のpHおよび溶存酸素濃度

曝露区	最低～最高		
	pH	DO（mg/L）	DO飽和度（%）
16℃区	7.1 ～ 7.6	6.8 ～ 7.9	70 ～ 82
20℃区	7.3 ～ 7.7	6.5 ～ 7.9	73 ～ 87
24℃区	7.3 ～ 7.9	6.4 ～ 7.4	78 ～ 87
28℃区	7.3 ～ 7.9	5.8 ～ 7.0	75 ～ 86
24℃_2カ月齢区	7.4 ～ 7.7	6.2 ～ 7.1	75 ～ 86

曝露期間中、28℃区で曝露6日後に1個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

4.11　供試個体の全長および体重

曝露0日（曝露前）および曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中VTG濃度分析に供した10個体の平均全長および体重を表-7に示す。

5カ月齢の雄メダカを曝露に供した16℃区、20℃区、24℃区および28℃区の平均体重には、相対的に水温の低い条件区が大きく、水温の高い条件区ほど小さい傾向がみられた。

4.12　肝指数

曝露0日および曝露2、7および14日後に各試験水槽から取り上げ、肝臓中VTG濃度分析に供した雄メダカの肝指数（10個体／曝露区の平均）を図-2に示す。

各曝露区の肝指数は、曝露0日（曝露前）から曝露14日後にかけて低下する傾向がみられた。また、曝露0日および曝露2、7および14日後とも、水温が低い条件区で肝指数が大きく、水温が高い条件区ほど肝指数が小さい傾向がみられた。肝臓採取の観察では、水温が低い条件区において色調がクリーム色の脂肪を多く蓄積した肝臓を持つ個体が多くみられた。これはより低い水温条件下で飼育された個体ほど、基礎代謝量が小さく餌料から吸収した脂肪の肝臓への蓄積量が多かったためと考えられる。

4.13　肝臓中のVTG濃度

曝露0日（曝露前）、曝露2，7および14日後に取り上げた雄メダカ（10個体／曝露区）の肝臓中VTG濃度（各曝露

表-7　水温影響調査の曝露試験でVTG濃度分析に供した雄メダカの全長および体重

曝露区	平均全長（mm）			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
16℃区	32.9 ± 1.5	33.5 ± 1.6	33.7 ± 2.1	35.5 ± 1.1
20℃区	35.0 ± 1.0	33.6 ± 1.9	35.1 ± 1.0	34.7 ± 1.3
24℃区	32.3 ± 1.1	34.4 ± 1.6	34.1 ± 2.0	33.7 ± 1.8
28℃区	33.9 ± 2.0	32.5 ± 2.0	31.7 ± 1.4	33.7 ± 1.4
24℃_2カ月齢区	27.6 ± 1.3	28.4 ± 1.0	28.4 ± 0.9	29.7 ± 1.1
曝露区	平均体重（mg）			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
16℃区	474 ± 95	453 ± 94	505 ± 91	502 ± 64
20℃区	515 ± 48	439 ± 67	503 ± 61	481 ± 54
24℃区	413 ± 48	437 ± 77	470 ± 80	428 ± 63
28℃区	432 ± 84	348 ± 60	361 ± 34	412 ± 64
24℃_2カ月齢区	263 ± 27	249 ± 37	263 ± 30	280 ± 34

注）データは、10個体の平均±標準偏差を示す。

区10個体の平均濃度）を図-3、10個体のうちVTG濃度が定量下限以上であった個体数を図-4に示す。

5カ月齢の雄メダカ（16℃区、20℃区24℃区および28℃区）では、曝露前のVTG濃度（VTG）は、16℃区および20℃区は全個体、24℃区は8個体、28℃区は4個体が定量下限未満（<1.56ng/mg）であった。また、定量下限以上の個体（24℃区の2個体および28℃区の6個体）のVTGも1.6～1.7ng/mgと低い濃度であった。曝露2日後も、16℃区は全個体が定量下限未満であった。20℃区、24℃区および28℃区では、VTGが定量下限以上の個体が2、2および7個体みられ、このうちVTG 2ng/mg以上の個体は、1、2および3個体と僅かではあるが水温に依存して増加する傾向にあった。曝露7日後には、16℃区の1個体を除く各曝露区の全個体でVTGは定量下限以上となり、16℃区、20℃区および24℃区の平均VTGは2.3±1.5ng/mg、5.7±7.6ng/mgおよび10.4±7.7ng/mgと水温に依存した漸増傾向がみられた。しかし、28℃区

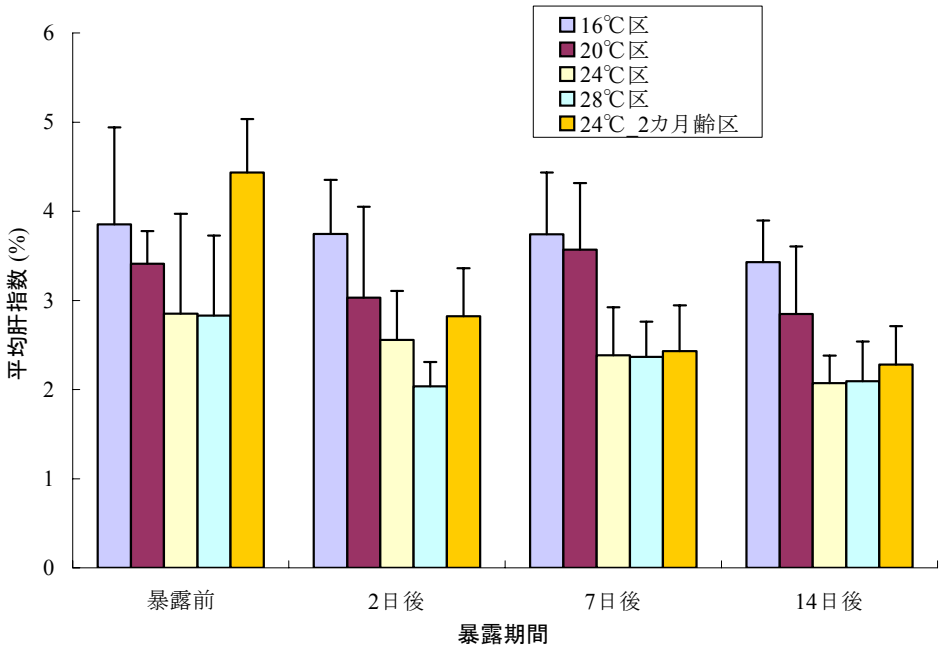


図-2　水温影響調査の曝露試験における雄メダカの肝指数
（グラフに付したバーは標準偏差を示す。）

については、全個体の VTG が定量下限以上であったが、平均 VTG は 3.5±2.0ng/mg と 24℃区および 20℃区よりも低かった。曝露 14 日後は、16℃区の 4 個体、20℃区の 2 個体、24℃区および 28℃区の 1 個体は、VTG が定量下限未満であった。しかし、16℃区および 20℃区では、平均 VTG は 7 日後よりも高かった。24℃区および 28℃区では、14 日後の平均 VTG は 7 日後より低くなった。以上のように、5 カ月齢の雄メダカの各曝露区では、総体的にみると、各曝露区とも曝露 7 日後から比較的明瞭な VTG 生成がみられたが、VTG が定量下限未満または定量下限付近の個体もみられるなど個体間のばらつきも大きかった。

2 カ月齢の雄メダカを曝露に供した 24℃_2 カ月齢区は、曝露前は全個体の VTG が定量下限以上であり、このうち 2

表-8　各曝露区における曝露日数間の VTG 濃度の検定結果

	16℃区	20℃区	24℃区	28℃区	24℃_ 2ヵ月齢区
0 日 vs 2 日後	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
0 日 vs 7 日後	0 日<7 日 (p<0.01)	0 日<7 日 (p<0.01)	0 日<7 日 (p<0.01)	0 日<7 日 (p<0.01)	N.S.
0 日 vs 14 日後	0 日<14 日 (p<0.05)	0 日<14 日 (p<0.01)	0 日<14 日 (p<0.01)	0 日<14 日 (p<0.05)	N.S.
2 日後 vs 7 日後	2 日<7 日 (p<0.01)	2 日<7 日 (p<0.01)	2 日<7 日 (p<0.01)	N.S.	N.S.
2 日後 vs 14 日後	2 日<14 日 (p<0.05)	2 日<14 日 (p<0.05)	2 日<14 日 (p<0.01)	N.S.	N.S.
7 日後 vs 14 日後	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

注) N.S. は比較した曝露日間の VTG に統計学的な有意差が認められなかったことを示す。(p<0.05) および (p<0.01) は、有意水準 0.05 または 0.01 で比較した曝露日間の VTG に上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

個体はVTGが2ng/mg以上であった。曝露2日後も7個体が定量下限以上であったが、いずれもVTGは2ng/mg未満であった。曝露7日後は7個体、14日後は全個体のVTGが定量下限以上であり、ともに6個体のVTGは2ng/mg以上であった。また平均VTGは、曝露7日後から14日後にかけて増加傾向がみられたが、14日後でも2.8±1.3ng/mgと低く、5カ月齢の雄メダカを供した24℃区のような曝露期間に依存した明瞭な増加傾向はみられなかった。

各曝露区における曝露日間（曝露0日、曝露2、7および14日後）のVTG濃度について行った有意差検定の結果を表-8に示す。16℃区、20℃区、24℃区および28℃区の各曝露区とも、曝露2日後と曝露0日（曝露前）のVTGに統計学的な有意差は認められなかったが、曝露7日後および14日後のVTGは、曝露0日のVTGと比べて有意に高かった。16℃区、20℃区および24℃区については、曝露7日後および14日後のVTGは2日後と比べても有意に高かったが、28℃区では7日後および14日後のVTGと2日後のVTGに有意差は認められなかった。また、各曝露区とも、7日後と14日後のVTGに有意差は認められなかった。24℃_2カ月齢区については、すべての曝露日間についてVTGに統計学的な有意差は認められなかった。

曝露0日（曝露前）および曝露2、7および14日後における各曝露区間のVTG濃度について行った有意差検定の結果

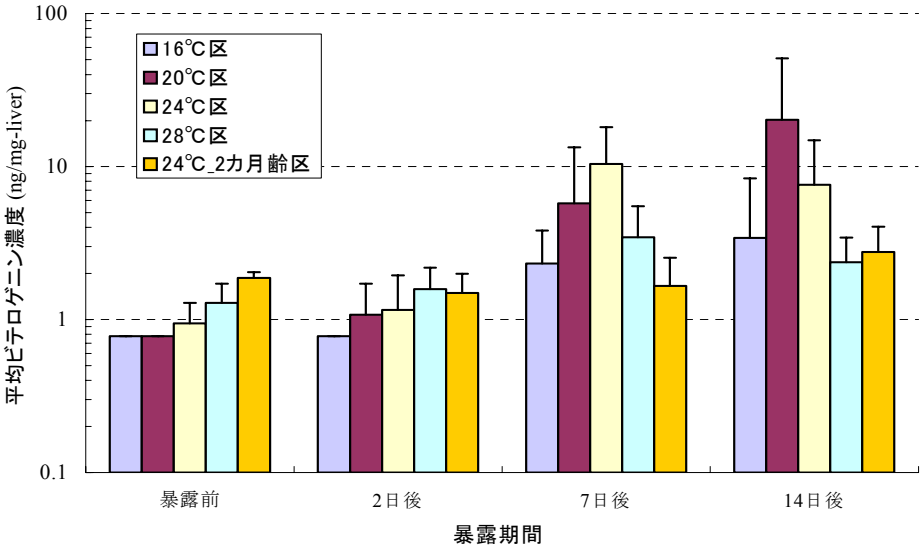


図-3　水温影響調査の曝露試験における雄メダカの肝臓中
VTG濃度（グラフに付したバーは標準偏差を示す。）

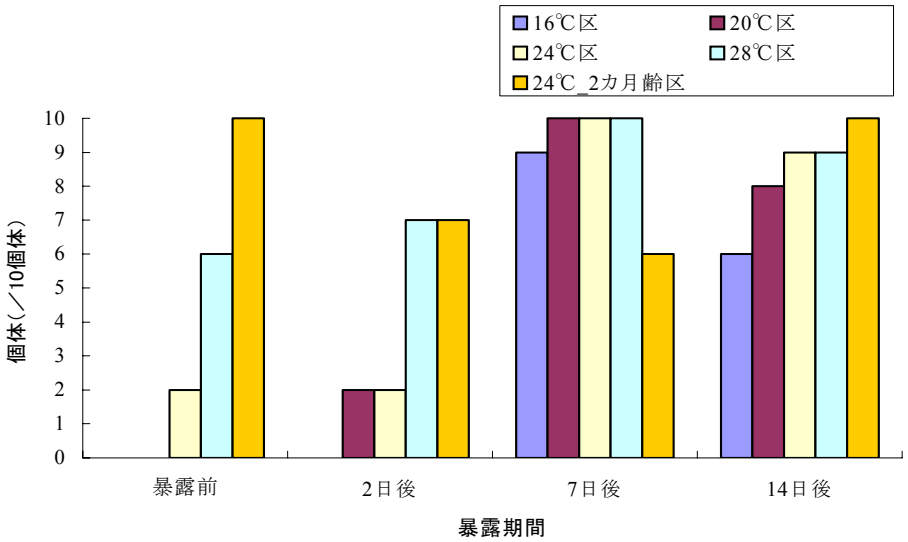


図-4　VTG濃度が定量下限以上の個体数

を表-9 に示す。
曝露前は、28℃区の VTG が 16℃区および 20℃区に比べて有意に高かったが、16℃区、20℃区および 24℃区の各曝露区間には有意差は認められなかった。曝露 2 日後の VTG も、28℃区と 16℃区には有意差が認められたが、他の曝露区間に有意差は認められなかった。曝露 7 日後の VTG は、24℃区が 16℃区、20℃区および 28℃区に比べて有意に高く、24℃区以外の曝露区間に有意差は認められなかった。曝露 14 日後は、各曝露区間の VTG に有意差は認められなかった。

同一水温条件で曝露した 5 カ月齢の雄メダカ（24℃区）と 2 カ月齢の雄メダカ（24℃_2 カ月齢区）について、曝露前および曝露 2、7 および 14 日後における VTG の有意差検定を行った結果、曝露 2 日後および 14 日後は両曝露区の VTG に統計学的な有意差は認められなかった。曝露前および曝露 7 日後は両曝露区の VTG に有意差（p<0.01）が認められたが、曝露前は 24℃_2 カ月齢区の VTG が 24℃区より高く、曝露 7 日後は、逆に、24℃区の VTG が 24℃_2 カ月齢区よりも高かった。

表-9　各曝露期間における各曝露区の VTG 濃度の検定結果

	曝露前	曝露 2 日後	曝露 7 日後	曝露 14 日後
16℃区 vs 20℃区	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
16℃区 vs 24℃区	N.S.	N.S.	16℃<24℃ (p<0.01)	N.S.
16℃区 vs 28℃区	16℃<28℃ (p<0.05)	16℃<28℃ (p<0.05)	N.S.	N.S.
20℃区 vs 24℃区	N.S.	N.S.	20℃<24℃ (p<0.05)	N.S.
20℃区 vs 28℃区	20℃<28℃ (p<0.05)	N.S.	N.S.	N.S.
24℃区 vs 28℃区	N.S.	N.S.	24℃>28℃ (p<0.05)	N.S.

注）N.S.は比較した曝露区間の VTG に統計学的な有意差が認められなかったことを示す。(p<0.05)および(p<0.01)は、有意水準 0.05 または 0.01 で比較した曝露区間の VTG に上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

4.14　メダカへの E1 曝露による水温および餌の影響

水温影響調査の曝露試験に供した 5 カ月齢の雄メダカでは、曝露 0 日（曝露前）の VTG は最も高い個体でも 1.7ng/mg と各曝露区とも総体的に低かった。しかし、VTG が定量下限以上であった個体数でみると、16℃区および 20℃区が 0 個体、24℃区が 2 個体、28℃区が 6 個体と、水温に依存した増加傾向がみられた。また、統計学的にも 16℃区および 20℃区と 28℃区の VTG には有意差が認められた。これらの結果は、馴化期間中の水温条件の差が、雄メダカの VTG の差を生じさせた要因となったことを示唆している。より高い水温での飼育（馴化）において雄メダカの VTG 生成量が多くなった可能性も考えられるが、本試験の場合は、各曝露区間の肝指数の差が VTG に僅かな差異を生じさせたと推察される。曝露前に取り上げた雄メダカの平均肝指数は、16℃区の 3.9±1.1%、20℃区の 3.4±0.4%に対して、28℃区は 2.8±0.9%と相対的に小さかった。また、個体ごとにみると、28℃区の 10 個体のうち、VTG が定量下限未満であった 4 個体の平均肝指数は 3.4±1.2%と 16℃区および 20℃区と同程度であったのに対して、VTG が定量下限以上であった 6 個体の平均肝指数は 2.4±0.4%と相対的に小さかった。馴化期間中に飼育水の水温を 24℃から 28℃に上昇させた 28℃区では雄メダカの基礎代謝量が大きくなり、逆に水温を低下させた 16℃区や 20℃区に比べて肝指数（肝臓重量）が小さくなったと考えられる。VTG は肝臓 1mg あたりの VTG 量として算出されるため、馴化飼育の開始から終了（曝露前の雄メダカの取り上げ時）まで VTG の生成状況（肝臓中の VTG 量）が変化しなくても、この間に肝臓重量が低下すると VTG は相対的に大きくなる。28℃区では、馴化期間中に肝臓重量が比較的大きく低下した一部の個体で、結果的に曝露前の VTG が高くなったと考えられる。

これらのことから、16～28℃の範囲であれば水温条件の差異は、エストロゲン様物質を含まない飼育水（脱塩素水道

水）中で飼育された雄メダカのVTG生成に影響を及ぼさなかったことが示唆された。しかし一方で、馴化あるいは曝露期間中の水温変化は肝指数（肝臓重量）を変動させる要因となり、結果として、僅かではあるもののVTGを変動させる場合があることも示唆された。下水水処理水や河川水など環境水を試水とした曝露試験では、曝露に供した雄メダカのVTGの変化（増加）は比較的小さいと考えられることから、エストロゲン様作用の有無や強さを正確に評価するためには、供試する雄メダカを曝露前に曝露期間と同じ水温条件下で飼育しておくこと、また、曝露期間中に水温が大きく変動しない条件下で試験を実施することが必要と考えられる。

また、Tatarazako et al.[8]は、日本国内で市販されている2種のELISAキットについて、複数の試験機関で同一試料を測定する比較検証を行い、VTG濃度が定量下限付近の試料において、測定値のばらつきやキット間の差異が大きくなることを報告している。前述のような曝露試験から得られた結果については、とくに曝露した雄メダカのVTGの増加が定量下限を僅かに超える程度であった場合、ELISA測定における誤差に起因する変化である可能性も念頭に置いて評価することが必要と考えられる。

4.15　E1曝露における雄メダカのVTG生成への影響

水温影響調査の曝露試験では、16℃区、20℃区、24℃区および28℃区における曝露2日後のVTGは、曝露前のVTGと統計学的に有意差は認められなかった。また、VTGが定量下限以上の個体数にも明瞭な増加傾向はみられなかった。これらの結果から、50ng/L前後のE1による2日間の曝露は、水温によらず雄メダカに有意なVTG生成を誘導しないことが示唆された。一方、曝露7日後および14日後のVTGは、各曝露区とも曝露前と統計学的な有意差が認められ、水温が16～28℃の範囲にあれば、水温によらず少なくとも7日間の曝露で雄メダカに有意なVTG生成を誘導することが示唆された。

また、曝露7日後の平均VTGには、16℃区から24℃区まで水温に依存した漸増傾向がみられ、統計学的にも20℃区のVTGは16℃区よりも有意に高く、24℃区のVTGは16℃区および20℃区よりも有意に高くなった。各曝露区とも9個体以上のVTGが定量下限以上であったが（図-4）、このうちVTGが定量下限の2倍以上であった個体に着目すると、その個体数には16℃区から24℃区まで水温に依存した明瞭な増加傾向がみられた（図-5）。前述のように、曝露前における各曝露区間のVTGの差異は、肝指数に依存して生じたものと推察された。曝露7日後においても、16℃区および20℃区の平均肝指数（3.7±0.7%および3.6±0.7%）に比べて24℃区の平均肝指数（2.4±0.5%）は小さく（図-5）、VTGが16℃区あるいは20℃区よりも相対的に高い値を示した可能性も考えられる。しかし、肝指数が同程度であった16℃区と20℃区間のVTGに比較的明瞭な差異がみられることから、7日後にみられた各曝露区間のVTGの差は、水温条件の

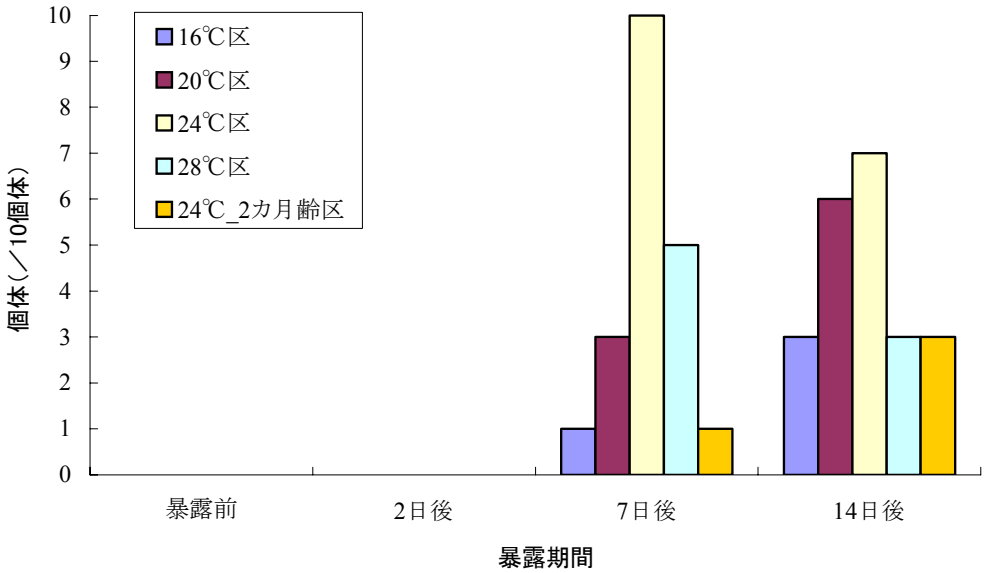


図-5　　ビテロゲニン濃度が定量下限の２倍以上の個体数
（水温影響調査の暴露試験）

差異によって生じたものと考えられる。Ishibashi et al.（2001）は、10℃と 30℃の各水温条件下でキンギョを17β-estradiol（100μg/L）に曝露した場合に、10℃よりも30℃において血漿中のVTGに急激な増加がみられ、曝露1、5あるいは10日後の血漿中濃度も30℃での曝露で高くなったこと報告している[9]。本調査の結果もこれと一致するものであった。これらのことから、エストロゲン物質で曝露された雄メダカのVTG生成は、水温の影響を受け、16～24℃の水温条件下では、水温の上昇に依存してVTGを生成する個体数が増加し、肝臓中の濃度も相対的に高くなることが示唆された。

一方、曝露14日後においても、VTGが定量下限の2倍以上であった個体数には、7日後と同様に16℃区から24℃区にかけて水温に依存した増加傾向がみられた。しかし、各曝露区のVTGには統計学的な有意差は認められなかった。また、24℃区については、平均VTGおよびVTGが定量下限の2倍以上であった個体数は7日後よりも少なかった。これらの結果から、比較的低い水温条件下（例えば20℃以下）では、VTGを生成する個体は曝露期間に依存して増加し、VTGを生成している個体のVTGも相対的に増加するものの、水温が相対的に高い条件では、これらが必ずしも曝露期間に依存して増加しない場合もあることが示唆された。

雄メダカのVTG生成を指標として環境水のエストロゲン作用を評価する場合、試水の水温が20℃程度あるいはそれ以下であれば、曝露試験の期間（雄メダカの曝露期間）を相対的に長くすること（例えば、14日間またはそれ以上）が、適正な評価のために必要と考えられる。しかし、試水の水温が24℃程度あるいはそれ以上であれば、曝露期間を長くすることは必ずしも適正な評価のためには必要ではなく、逆に曝露試験の結果あるいはその解釈を曖昧にする要因になることもあると考えられる。

なお、水温影響調査の曝露試験では、28℃区の曝露7日後のVTGは、16℃区および20℃区と統計学的な有意差はみられず、また24℃区よりも有意に低かった。28℃区については、曝露7日後および14日後に測定した試験液中のE1濃度は、16℃区から24℃区の平均濃度の84%および58%と低く、曝露2日後以降、14日後まで漸減していたと考えられる。当施設で実施した試験から得られた曝露7日後または14日後の雄メダカにおけるVTG生成に対するE1の最小作用濃度は79.5ng/L、最大無作用濃度は31.6ng/Lであった。また、17β-estradiolで曝露した雄メダカを清浄な飼育水に戻して飼育すると、血清中のVTGは経時的に低下することが報告され[10]、本試験の結果では、肝臓中VTG（17β-estradiolで曝露直後の濃度は約200ng/mg）の半減期は約5日と見積もられた。水温影響調査の曝露試験における曝露濃度（50ng/L）は最小作用濃度（閾値）に近い濃度であり、28℃区における曝露14日後のE1濃度は、無作用濃度付近もしくはそれ以下であると考えられる。28℃区については、試験液中のE1濃度が無作用濃度付近まで低下したために、VTGを生成した個体も少なく、またVTGを生成した個体も代謝の増大によるVTGの低下速度が相対的に大きかった結果、曝露14日後あるいは7日後におけるVTGが相対的に低くなったと推察される。

4.16　雄メダカの月齢とVTG生成の関連性

水温影響調査の曝露試験に供した2カ月齢の雄メダカ（24℃_2カ月齢区）では、曝露前のVTGは全個体が定量下限以上であり、統計学的にも同じ水温条件である5カ月齢の雄メダカ（24℃区）より有意に高かった。24℃_2カ月齢区の平均肝指数は24℃区よりも大きかったことから、両曝露区間のVTGの差は肝指数の差に起因したものではないことが示唆される。すなわち、試験に供した2カ月齢と5カ月齢の雄メダカでは、曝露前のVTG生成量が異なっていたと考えられる。曝露前のVTG生成量に差を生じさせた要因として、曝露試験に供するまでの飼育条件の違いが考えられる。5カ月齢の雄メダカは、曝露試験に供する約2カ月前から雄個体のみで飼育されていたのに対して、2カ月齢の雄メダカは試験に供する5～7日前まで雌雄一緒に飼育されていた。このため2カ月齢の雄メダカでは、雌個体（雌メダカ）が排泄したエストロゲンの影響でVTGが生成され、5カ月齢の雄メダカよりも曝露前のVTGが高くなっていた可能性が考えられる。水温影響調査の曝露試験では、24℃_2カ月齢区におけるVTGが定量下限以上であった個体数は曝露前から曝露7日後まで漸減し、5カ月齢の雄メダカ（24℃区）とは異なる傾向を示した。また、曝露7日後および14日後とも、24℃_2カ月齢区でVTGが定量下限の2倍以上であった個体数は24℃区より少なく、これらの個体のVTGも24℃区より相対的に低かった。すなわち、水温影響調査の曝露試験に供した2カ月齢の雄メダカについては、E1（エストロゲン物質）に対する感受性が5カ月齢の雄メダカよりも相対的に低かったことが示唆される。このようなエストロゲン物質に対する感受性の差がどのような要因で生じたか特定することはできないが、前述のような供試前の飼育環境と関連している可能性も考えられる。したがって、環境水のエストロゲン作用を評価するための曝露試験に供する雄メダカは、供試前の十分な期間（例えば少なくとも1カ月以上）、雄個体のみで飼育しておくことが望ましいと考えられる。

5　餌を通してのエストロゲンの曝露

E1 を添加した配合飼料（0、15、150 および 1500 ng/g-餌料の 4 条件）を月齢 5 カ月の雄メダカに 2 回／日の頻度で給餌して曝露した（最長 14 日間）。曝露前および曝露開始から 2、7 および 14 日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中の VTG 濃度を測定した。

各条件での肝臓中 VTG 濃度から、餌料を通した E1 曝露（経口曝露）における雄メダカの VTG 生成について、餌料中 E1 濃度との関係やその経時的変化など餌料の及ぼす影響について検討した。

5.1　曝露濃度および曝露区の設定

餌の影響調査の曝露試験では、飼料中濃度が 0、15、150 および 1500ng/g 程度となるように E1 を添加した配合飼料を調製し、これらを 5 カ月齢の雄メダカに与えて E1 で曝露した。E1 濃度 0、15、150 および 1500ng/g の飼料を給餌する条件をそれぞれ 0ng/g 区、15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区と表記する。

表 10　餌の影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	:	E1 添加飼料の給餌による曝露
設定曝露濃度	:	飼料中 E1 濃度として、0、15、150 および 1500ng/g
E1 添加飼料の給餌	:	2 回／日、飽食を目安に給餌
飼育水	:	脱塩素水道水による流水式
飼育水の換水率	:	5 換水／日以上
水温	:	24±2℃
曝露期間	:	2、7、14 日間
供試生物	:	雄メダカ（ヒメダカ系）
供試生物の月齢	:	5 カ月齢
供試生物数	:	84 個体（0ng/g 区） 65 個体（15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区）
照明	:	昼光用蛍光灯光、明期 16 時間／暗期 8 時間

曝露条件を表-10 に示す。本試験における雄メダカの曝露は、以下に示す室温を 24℃に設定した大気循環型安定性試験室（タバイエスペック株式会社）に設置された流水式曝露装置（図-6）を用いて実施した。本試験では、曝露装置の下部と上部の希釈水タンクを循環させ水温調整器（東京理化株式会社、クーリングサーモポンプ CTP-102）で水温を 24±1℃に調節した脱塩素水道水を飼育水として試験水槽に供給した。飼育水は、装置上部の希釈水タンクから希釈水槽の供給、さらに下面のガラス製キャピラリー管を通して各試験水槽に一定流量で供給した。試験水槽は、各曝露区とも水量が 20L となる位置に排水口（ガラス製）を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。各試験水槽への飼育水の供給量（流量）は 100mL/min（7.2 換水／日）とした。なお、本試験に用いた曝露装置および試験水槽は、試験水槽に供給する飼育水との接液部には内分泌かく乱作用を持つ化学物質を溶出しない素材（ガラス、ステンレス鋼、PTFE および PFE のテフロン、シリコン）のみが使用されている。

本試験に供した雄メダカは、曝露開始の 14 日以上前か

ら試験と同じ環境下で飼育した。曝露開始の 14 日前からそれまでのアルテミアふ化幼生から配合飼料（おとひめ B-2、日清飼料）に切り替え、曝露期間中に給餌する配合飼料に馴化させた。

5.2　E1 添加飼料の調製

曝露期間中に各曝露区の雄メダカに給餌するE1 添加飼料は、以下に示す方法を用いて顆粒状の配合飼料にE1 を添加、吸着させて調製した。

1）配合飼料

E1 添加飼料の調製には、海産魚類用配合飼料「おとひめB-2（日清飼料）」を用いた。

2）E1 の添加濃度

1500ng/g 区、150ng/g 区および15ng/g 区用の飼料は、配合飼料にE1 をアセトンに溶解して添加し、アセトンを窒素ガスの吹き付けで留去する方法を用いて調製した。調製に際して飼料に添加するE1 量は、アセトン留去においてE1 の一部が調製容器等に残留する可能性を勘案して、設定飼料中濃度（1500、150 および15ng/g）の110%相当量とした。

3）調製方法

E116.7mg を100mL のアセトン（農薬分析用、和光純薬工業株式会社）に溶解してE1 濃度167μg/mL のアセトン溶液を調製し、これをアセトンで段階的に希釈にして、1670、167 および16.7ng/mL のアセトン溶液を調製した。

1500ng/g 区のE1 添加飼料は、ガラスビーカーに分取した配合飼料50g にE1 濃度1670ng/mL のアセトン溶液50mL を添加、よく混合した後、窒素ガスを穏やかに吹き付けてアセトンを留去して調製した。150ng/g 区および15ng/g 区のE1 添加飼料も同様の手順で167 および16.7ng/mL のアセトン溶液を用いて各50 g を調製した。0ng/g 区の飼料は、無処理の配合飼料とした。

4）飼料中のE1 濃度測定

調製した各E1 添加飼料から約5g を分取して、E1 濃度分析に供した。

5.3　曝露中の操作および管理

1）E1 添加飼料の給餌

表-11 に示した個体数を水槽に入れ試験を行った。曝露期間中は、1 日に2 回（午前9 時頃および午後3 時頃）、各曝露区の雄メダカにE1 添加飼料を給餌した。給餌では、食べ残しがでないように供試魚の摂餌状態をみながら10～15 分間かけて飼料を少量ずつ与えた。給餌量は飽食量としたが、水槽内の雄メダカの概ね半数以上が飼料に対して積極的な

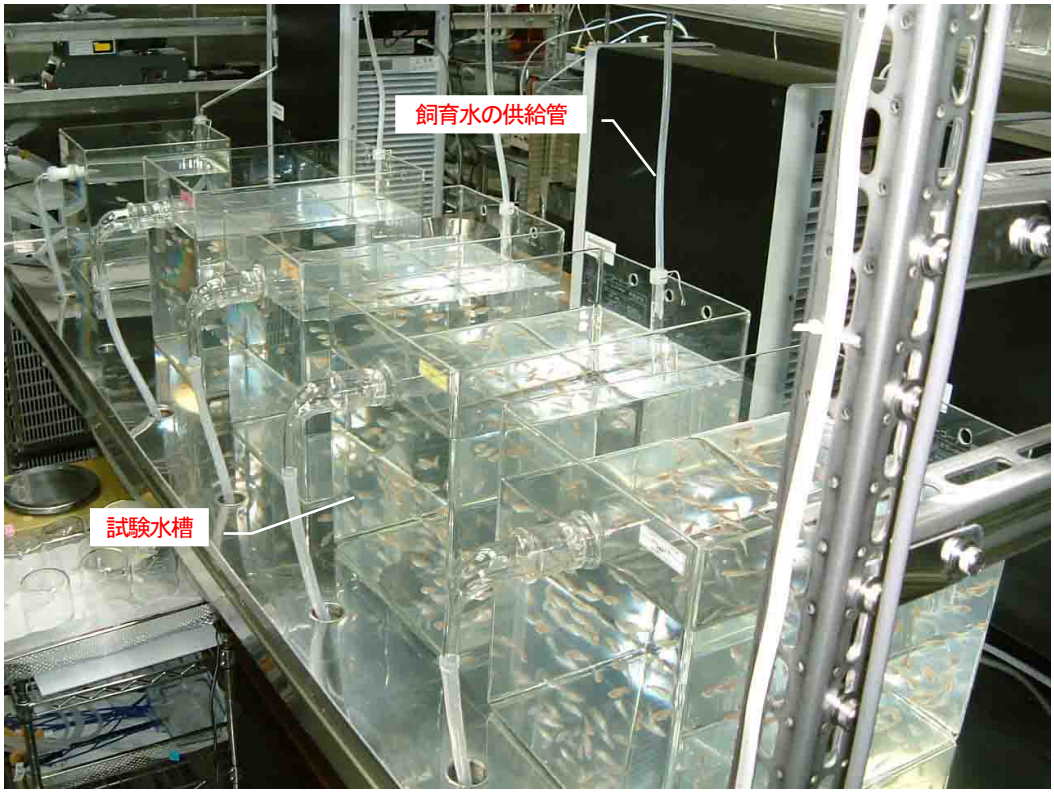


図-6　餌の影響調査の曝露試験に用いた流水式曝露装置

摂餌行動を示さなくなった時点で給餌を終了した。曝露 14 日後（曝露終了日）は無給餌とした。

表-11　餌の影響調査の曝露試験における
雄メダカの供試個体数

曝露区	曝露期間			
	0 日	2 日	7 日	14 日
0 ng/g 区	10	10	10	10
15 ng/g 区	－	10	10	10
150 ng/g 区	－	10	10	10
1500 ng/g 区	－	10	10	10

2）曝露期間中の管理

曝露期間中は、毎日、各曝露区について死亡個体の有無、行動および外観異常の有無を肉眼的に観察した。死亡個体がみられた場合は、直ちにタモ網で掬い取り水槽内から除去した。また、午後の給餌から約 3 時間後にサイフォンを用いて水槽内の糞および残餌等を除去した。

3）曝露期間中の環境測定

各曝露区について、試験液の水温を毎日、pH および溶存酸素濃度を週 3 回の頻度で測定した。水温は検定済みの水銀棒状温度計、pH はガラス電極式水素イオン濃度計（METTLER TOLEDO、MP125）、溶存酸素濃度はポーラログラフ式溶存酸素濃度計（METTLER TOLEDO、MO128）を用いて、それぞれ試験水槽の中央部で測定した。飼育水の流量は、1 回／日の頻度で測定した。

4）E1 濃度分析試料の採取

曝露 2、7 および 14 日目に各曝露区の試験水槽から E1 濃度分析に供するための試料（試験液）を採取した。曝露 2 および 7 日目の試料は、当日午前の給餌から約 4 時間後に採取した。曝露 14 日目の試料は、当日の遺伝子解析用の肝臓採取および肝臓中の VTG 濃度分析に供する雄メダカの取り上げ時（前日午後の給餌から約 17 時間後）に採取した。

試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器（1000mL 容）に採取した。採取量は 2000mL 以上とし、うち 1000mL を直ちに前処理（抽出）に供し、残りは予備試料としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

供試個体は、小型のネットを用いて試験水槽内の雄メダカから無作為に掬いあげ、曝露区ごとに水温 24±2℃の脱塩素水道水（約 1.5L）を入れた手付きビーカーに収容して解剖作業を行う実験室に搬入した。

5.4　飼料中の E1 濃度測定

餌の影響調査の曝露試験に用いた E1 添加飼料中の E1 濃度は、「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS で測定した。

表-12　飼料中の E1 濃度

飼料	E1 濃度（ng/g）	
	実測濃度	添加濃度
0 ng/g 区用	ND	0
15 ng/g 区用	30.0	16.7
150 ng/g 区用	355	167
1500 ng/g 区用	2330	1670

注）ND は定量下限未満（0.3ng/g 未満）を示す。

0ng/g 区、15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区用に調製した E1 添加飼料中の E1 濃度の測定結果を表-12 に示す。0ng/g 区用飼料（E1 無添加）中の E1 濃度は、定量下限未満であった。15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区用に調製した各飼料中 E1 の実測濃度は、30.0、355 および 2330ng/g であった。これは添加濃度の 1.5～2.3 倍に相当する濃度であった。飼料中の E1 濃度が添加濃度以上になることは考えにくいことから、実測濃度と添加濃度の解離は、飼料中

のE1濃度が均一でなかった等によって生じた誤差の可能性が考えられる。

5.5 試験環境

曝露期間中の各曝露区における水温の範囲（最低～最高）および平均を表-13に示す。曝露期間中の平均水温は、各曝露区とも24±0.3℃以内であった。また、曝露期間中の変動範囲も、各曝露区とも24±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区における pH、溶存酸素濃度（DO）および溶存酸素飽和度の曝露期間中の範囲（最低～最高）を表-14に示す。各曝露区のpHおよび溶存酸素濃度は、曝露0、3、6、9、12および14日目に測定した。各曝露区のpHは7.0～8.0の範囲にあった。溶存酸素濃度は、飼育個体数の多かった曝露開始日が5.0～5.3mg/L（飽和度として61～64%）とやや低かったが、曝露3日目以降の飽和度は65%以上であった。pHおよび溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通してOECD化学品テストガイドライン TG203 6)（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH；6.0～8.5、溶存酸素飽和度；60%以上）を維持していた。

各曝露区の試験水槽への飼育水の供給量（実測流量）は、曝露期間を通して設定流量（100mL/min、換水率として7.2換水／日）の99～101%の範囲を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pH および溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件また

表-13　餌の影響調査の曝露試験における曝露期間中の水温

曝露区	曝露期間中の最低～最高水温 および平均水温（℃）
0 ng/g区	23.9 ～ 24.6（24.3）
15 ng/g区	23.9 ～ 24.4（24.1）
150 ng/g区	23.7 ～ 24.1（23.9）
1500 ng/g区	23.6 ～ 24.0（23.9）

注）括弧内の数値は平均水温を示す。

表-14　曝露期間中のpHおよび溶存酸素濃度

曝露区	最低～最高		
	pH	DO (mg/L)	DO飽和度 (%)
0 ng/g区	7.0～7.7	5.0～7.6	61～77
15 ng/g区	7.0～7.7	5.3～7.6	64～79
150 ng/g区	7.0～7.8	5.3～8.0	64～77
1500 ng/g区	7.1～8.0	5.2～8.2	63～78

は一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

5.6 E1添加飼料の給餌量

曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げた雄メダカの曝露開始日（曝露0日目）から取り上げ日までの総給餌量を表-15に示す。各曝露日における1個体あたりの給餌量は、各曝露区の総給餌量を飼育個体数で除して算出した。曝露期間中に雄メダカ1個体に給餌した1日あたりの給餌量は7.9～8.7mg/day/indであった。曝露期間中に各曝露区から取り上げた雄メダカの平均体重（約580mg）であり、1日あたりの給餌量は体重の1.4%前後であった。

5.7 飼育水中のE1濃度

曝露2、7および14日後に各曝露区の試験水槽から採取した飼育水中のE1濃度の測定結果を表-16に示す。1500ng/g区を除く各曝露区では、曝露期間を通して採取した飼育水中のE1濃度は0.4ng/L以下であった。1500ng/g区では、曝露14日目（曝露終了時）に採取した飼育水のE1濃度は0.2ng/Lと他の曝露区と同様に低かったが、曝露2および7日目に採取した飼育水のE1濃度（1.7および1.1ng/L）は、他の曝露区や14日目の飼育水に比べて1ng/L程度高かった。曝露2および7日目は、飼育水を午前と午後の給餌の間（午前の給餌から約4時間後）に採取したことから、給餌した飼料から飼育水に溶出し

表-15　曝露試験におけるE1添加飼料の給餌量

曝露区	給餌量（mg/個体）		
	曝露期間		
	0～1日目	0～7日目	0～14日目
0 ng/g区	16.4	59.3	117.4
15 ng/g区	16.5	51.8	110.1
150 ng/g区	18.8	60.4	122.2
1500 ng/g区	17.0	57.3	121.6

注）給餌量は、各曝露期間中における雄メダカ1個体あたりの給餌量を示す。

表-16　餌の影響調査の曝露試験における飼育水中のE1濃度

曝露区	E1濃度（ng/L）		
	曝露2日目	曝露7日目	曝露14日目
0 ng/g区	0.3	0.3	0.3
15 ng/g区	0.2	0.1	0.1
150 ng/g区	0.4	0.3	0.2
1500 ng/g区	1.7	1.1	0.2

たE1の影響等により相対的に濃度が高くなったと考えられる。一方、14日目のE1濃度は、前日の給餌から約17時間後に採取した飼育水で測定しており（14日目は曝露終了日で無給餌のため）、前日午後の給餌以降、飼育水が換水されたことによりE1濃度が低くなったと考えられる。なお、1500ng/g区における曝露期間中の飼育水中E1の平均濃度は、最も高濃度になると思われる午前と午後の給餌間における濃度（曝露2および7日後の算術平均濃度；1.4ng/L）と最も低濃度になると思われる前日午後の給餌から18時間後の濃度（曝露14日後の濃度；0.2ng/L）の幾何平均として算出される0.5ng/L程度であったと見積もられる。

以上の結果から、各曝露区における曝露期間中の飼育水中のE1濃度は低く、雄メダカのVTG生成に影響を与えないレベルにあったと推察される。

5.8　曝露期間中の死亡

曝露1日後に150ng/g区、8日後に1500ng/g区でそれぞれ1個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

5.9　供試個体の全長および体重

曝露0日（曝露前）および曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中VTG濃度分析に供した10個体の平均全長および平均体重を表-17に示すとおりであった。

5.10　肝指数

曝露0日および曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中VTG濃度分析に供した個体の肝指数（10個体／曝露区の平均）を図-7に示す。各曝露区の平均肝指数は2.1～3.0%の範囲にあった。曝露2、7および14日後とも各曝露区の肝指数に明確な差異や傾向等はみられなかった。

5.11　肝臓中のVTG濃度

曝露0日（曝露前）、曝露2，7および14日後に各曝露区から取り上げた雄メダカ（10個体／曝露区）の肝臓中VTG濃度（10個体の平均）を表-18、VTG濃度が定量下限

表-17　餌の影響調査の曝露試験でVTG濃度分析に供した雄メダカの全長および体重

曝露区	平均全長（mm）			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	36.5 ± 3.3	36.0 ± 1.3	36.1 ± 1.6	37.0 ± 1.4
15ng/g区	-	35.7 ± 1.9	36.7 ± 1.6	37.0 ± 1.2
150ng/g区	-	35.6 ± 1.3	37.1 ± 1.5	36.5 ± 1.5
1500ng/g区	-	35.0 ± 1.4	37.2 ± 1.8	37.4 ± 1.3
曝露区	平均体重（mg）			
	曝露0日	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	536 ± 102	599 ± 63	561 ± 90	585 ± 86
15ng/g区	-	560 ± 73	563 ± 65	611 ± 73
150ng/g区	-	557 ± 71	611 ± 97	577 ± 79
1500ng/g区	-	513 ± 60	601 ± 99	666 ± 82

注）データは、10個体の平均±標準偏差を示す。

以上であった個体数を表-19に示す。曝露前に0ng/g区から取り上げた10個体のVTG濃度（VTG）は、8個体が定量下限未満（<1.56ng/mg）であり、他の2個体も1.7および1.9ng/mgと低かった。曝露2、7および14日後のVTGは、0ng/g区、15ng/g区および150ng/g区の各曝露区では、全個体が定量下限未満であった。1500ng/g区では、曝露2日後

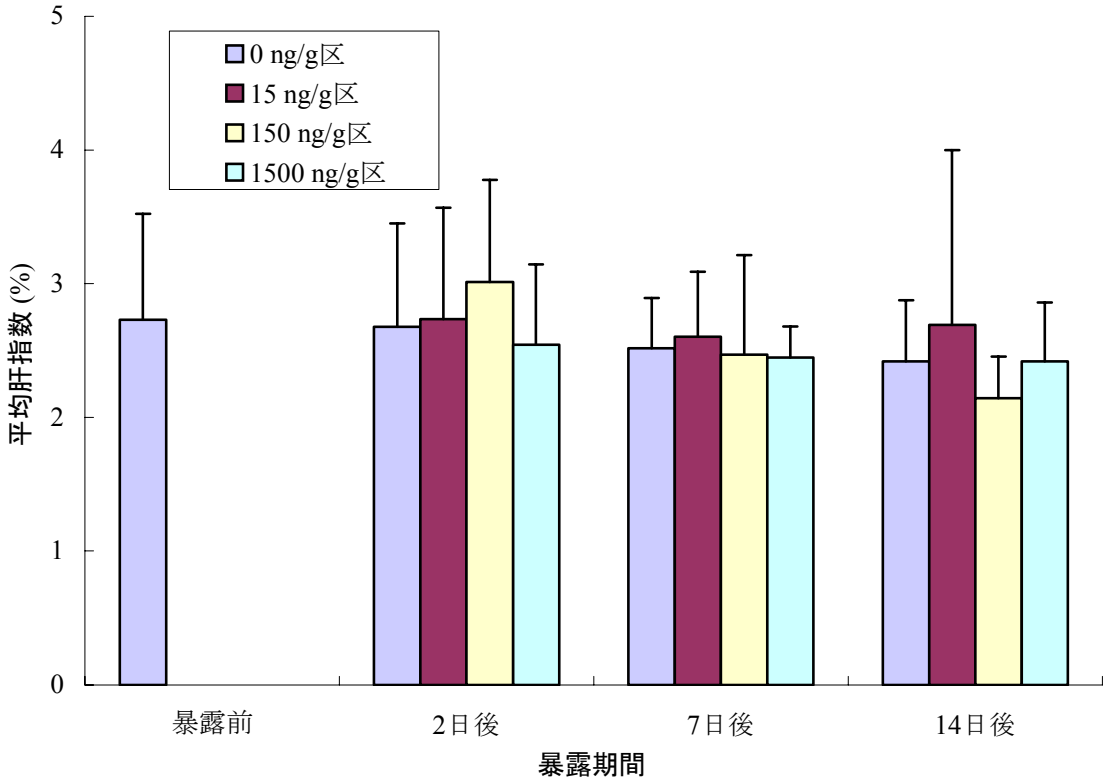


図-7　餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの肝指数
（グラフに付したバーは標準偏差を示す。）

および7日後は定量下限以上の個体が1個体ずつ（VTGは9.4および13.5ng/mg）であったが、14日後は6個体（VTGは1.6～6.4ng/mg）と増加した。しかし、平均VTGには明瞭な増加傾向はみられなかった。

表-18　餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの肝臓中VTG濃度

曝露区	VTG濃度（ng/mg）			
	曝露前	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	1.0±0.4	ND	ND	ND
15ng/g区	－	ND	ND	ND
150ng/g区	－	ND	ND	ND
1500ng/g区	－	1.6±2.7	2.1±4.0	2.3±1.9

注）データは、10個体の平均±標準偏差を示す。NDは全個体のVTG濃度が定量下限未満（1.56ng/mg未満）であったことを示す。VTG濃度が定量下限未満については、平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

表-19　肝臓中VTG濃度が定量下限以上の個体数

曝露区	曝露前	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	2	0	0	0
15ng/g区	－	0	0	0
150ng/g区	－	0	0	0
1500ng/g区	－	1	1	6

各曝露区における曝露日間（曝露0日、曝露2、7および14日後）のVTG濃度について有意差検定を行った結果、各曝露区ともすべての曝露日間のVTGに統計学的な有意差は認められなかった。

曝露2、7および14日後における各曝露区間のVTG濃度について行った有意差検定の結果を表-20に示す。曝露前および曝露2日後は、各曝露区間のVTGに統計学的な有意差は認められなかった。曝露14日後も、0ng/g区、15ng/g区および150ng/g区の各曝露区間のVTGに有意差は認められなかったが、1500ng/g区のVTGは、これら3曝露区のVTG

表-20　各曝露期間における各曝露区のVTG濃度の検定結果

	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区 vs 15ng/g区	N.S.	N.S.	N.S.
0ng/g区 vs 150ng/g区	N.S.	N.S.	N.S.
0ng/g区 vs 1500ng/g区	N.S.	N.S.	0ng/g<1500ng/g ($p<0.05$)
15ng/g区 vs 150ng/g区	N.S.	N.S.	N.S.
15ng/g区 vs 1500ng/g区	N.S.	N.S.	0ng/g<1500ng/g ($p<0.05$)
150ng/g区 vs 1500ng/g区	N.S.	N.S.	0ng/g<1500ng/g ($p<0.05$)

注）N.S.は比較した曝露区間のVTGに統計学的な有意差が認められなかったことを示す。（$p<0.05$）は、有意水準0.05で比較した曝露区間のVTGに上段に示す関係が有意に認められたことを示す。

よりも有意に高かった。

5.12　雄メダカの VTG 生成に及ぼす餌の影響

餌の影響調査の曝露試験では、0 ng/g 区、15 ng/g 区および 150 ng/g 区は曝露 2 日後から 14 日後まですべて個体の VTG が定量下限未満であり、VTG を生成した個体はみられなかった。1500 ng/g 区については、曝露 2 日後および 7 日後は VTG が定量下限以上であった個体は 1 個体のみであったが、14 日後には 6 個体に増加した。14 日後の VTG は、曝露前あるいは他の曝露区と統計学的に有意差が認められた。しかし、14 日後の平均 VTG は 2.3±1.9ng/mg とかなり低いものであった。

1500 ng/g 区の雄メダカには、曝露開始から 14 日後まで 1 日に 1 個体あたり平均 8.7mg の E1 添加飼料を給餌した。したがって、調製時の添加濃度（1670ng/g）を飼料中の E1 濃度とすると、雄メダカ 1 個体が飼料とともに体内に取り込んだ E1 量は、1 日あたり 14.5ng と見積もられる。これらの結果から、雄メダカの VTG 生成を誘導する餌料中の E1 濃度は 1500ng/g 以上であり、1 日あたり 15ng 程度の E1 が体内に取り込まれた場合に VTG 生成が誘導されることが示唆された。

6.　本研究のまとめ

本研究を通し、以下のことが明らかとなった。

① 水温影響調査の暴露試験では、16°C、20 °C、24 °C および 28 °C の各水温条件とも暴露 7 日後および 14 日後に雄メダカの肝臓中 VTG 濃度に統計学的に有意な増加がみられ、VTG 生成がみられた個体数や VTG に水温に依存した増加傾向がみられた。これらの結果から、E1 に暴露された雄メダカの VTG 生成は、水温の影響を受け、16～24 °C の水温条件下では、水温の上昇に依存して VTG を生成する個体数が増加し、肝臓中の濃度も相対的に高くなることが示唆された。

② 餌の影響調査の暴露試験では、E1 濃度が最も高い 1500 ng/g の飼料を給餌した雄メダカの暴露 14 日後のみ VTG の有意な増加がみられた。この結果から、雄メダカの VTG 生成を誘導する飼料中の E1 濃度は 1500ng/g 以上であり、1 日あたり 15ng 程度の E1 が餌を通して体内に取り込まれた場合に雄メダカの VTG 生成が誘導されることが示唆された。

〈参考文献〉

1) 国土交通省，下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査結果（2001）.

2) H.Tanaka, Y.Yakou,A.Takahashi,T.Higashitani and K.Komori;Comparison Between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, Water Science & Technology,Vol.43(2),pp125-132(2001).

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

4) 矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明：組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定，環境工学研究論文集，Vol.36，pp199-204，(1999).

5) 小森行也，八十島誠，高橋明宏，矢古宇靖子，田中宏明；下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析，土木技術資料，Vol.43(11)，pp44-49(2001）.

6) 社団法人日本下水道協会編：下水試験方法 追補暫定版（内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編)，(2002).

7) 八十島誠，小森行也，田中宏明；LC/MS によるノニルフェノキシ酢酸類の分析，第４回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会要旨集，pp171(2001).

8) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., and Iguchi, T.; Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka., Journal of health science, 50(3), p.301-308, 2004.

9) Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Ishibashi, T., Nagae, M., Kohra, S., Takao, Y.,

Tominaga, N. and Arizono, K.; *In vivo* testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in Goldfish (*Carassius auratus*)., Journal of health science, 47(2), p.213-218, 2001.

10) 田畑彰久, 亀井翼, 眞柄泰基, 渡辺哲理, 宮本信一, 大西悠太, 伊藤光明; ヒメダカビテロジェニンを指標としたノニルフェノール, ビスフェノールA, 17β-エストラジオールおよびこれらの混合曝露の影響., 日本水環境学会誌, 26, 10, p. 59-64, 2003.

都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究

研究予算：競争的資金（地球環境保全等調査研究費）
研究期間：平 14 ～ 平 17
担当チーム：水循環研究グループ（水質）
研究担当者： 鈴木　穣、宮島　潔

1. はじめに

1.1　研究の背景

近年、世界各地で野生生物の生殖器官や生殖行動の異常が報告されている。これらの原因として、人間活動により放出される化学物質による内分泌系の攪乱によるものだと考えられ、そのような一群の化学物質は、内分泌かく乱化学物質（以下EDCs：Endocrine Disrupting Chemicals）と分類された。その中でも特に、雌性化を引き起こす物質は、生体内でエストロゲンの作用により生じる現象と同様の影響を及ぼす事から、エストロゲン様物質と呼ばれる。

1.2　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）[1]とエストロン（E1）[1]、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）[2]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）[3,4]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。

1.3　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、平成10年（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、同省により平成10年から平成13年（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、つまり血中ビテロジェニン（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。

国土交通省や環境省等の実態調査により、環境水中のEDCsの汚染レベル、下水処理場における処理実態、そして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た野生魚の存在が明らかとなった。しかし、測定されたエストロゲンもしくはエストロゲン様物質の水中濃度と魚類内分泌系の応答との関係、これらの複合曝露による影響、曝露を受けた野生魚の繁殖もしくは繁殖行動や次世代への影響は明らかとなっていない。これらの影響を確認するためには、魚を用い、環境水の曝露試験を行うとともに、魚類内分泌系の応答の観測、曝露水質の測定を実施する必要がある。

1.4　土木研究所水質チームにおける既往研究

上記のような課題を踏まえ、土木研究所水循環研究グループでは、2000～2001年にコイに対し、下水の二次処理水やオゾン処理水の曝露試験を実施した[5]。その結果、多くの場合、曝露条件や曝露水中のエストロゲン作用（遺伝子組み換え酵母を用いて測定されるエストロゲン活性）との間に明瞭な関係が見られず、雄コイの血中ビテロジェニン生成に関わる要因は、曝露水のエストロゲン作用だけに起因するのではなく、水温の季節変化やコイの約1年周期の生殖サイクル等、水質以外の環境要因が影響している可能性が示唆された。

1.5　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り、状況によって下水道や都市排水の対策をとる必要がある。

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

2. 平成 17 年度の研究成果

平成 17 年度は、曝露試験装置を用い、下水処理水の割合が高い多摩川において、メダカへの曝露試験を継続するとともに、下水処理水そのものについても同様の調査を行った。さらに、下水処理水の暴露により生じるメダカ内分泌系の反応について予備的な検討を行った。

2.1 河川水質監視所におけるメダカを用いた曝露試験

過年度の研究結果より、河川における魚類影響は、河川水のエストロゲン作用の変動に伴い変動する可能性が示された。そこで、長期的な現地曝露試験を実施して、雄メダカの VTG 生成の変動状況を明らかにすることとした。また、成魚の VTG 生成量から判断して、外部環境に対し感受性の高い稚魚や若魚ではさらに大きな影響が表れることが想定されたため、稚魚を用いた曝露試験を実施して、魚類の生活に即した影響を検出することとした。

2.1.1 調査地点

調査対象河川は、下水処理水の流入する上下流に水質自動監視所が設置されている多摩川とした。多摩川本川に設置されている監視所のうち、最上流に位置する拝島橋監視所は下水処理水の流入していない地点として、日野橋監視所は、3 つの下水処理場からの排水を受け入れた後の地点、石原監視所は、8 つの下水処理場からの排水を受けたもっとも下水処理水の割合が高い地点として選定した。

2.1.2 魚類曝露試験方法

過年度までに開発した魚類曝露装置を用い、メダカ（*Oryzias latipes*）への河川水の曝露試験を行った。メダカは、成熟に要する時間が 3 ヶ月と短く、さらに、次世代を得ることが容易なため、わが国における魚類研究の中心となっている魚種である。エストロゲン作用による魚類影響の試験対象魚として、環境省や OECD で確立が急がれている標準試験法としても採用が考えられており、データの蓄積が図られている。日長時間、エサ、流量、水温などの試験条件は、実験室内で行われる一般的な室内曝露試験と同条件に調節した。

日長時間はプログラムタイマーを用いて照明の点灯時間を 16 時間明－8 時間暗に調節し、エサは自動給餌器を用いて 1 日に 4 回、市販の粉末餌を給餌した。また、流量および水温はそれぞれ 30L/hour、26℃に設定した。なお、今回の試験では、曝露水槽の水温を一定に保つことを確実にするため、鑑賞魚用のサーモスタット付投げ込みヒーターを使用した（写真-1）。

写真-1　魚類曝露試験装置

表-1　多摩川メダカ曝露試験実施状況（平成14～17年度）

曝露試験		曝露期間	実施期間		メダカ	
					個体数	開始月齢
Test 1	拝島橋	2週間	平成15年	2月27日～3月13日	20	7
	日野橋	2週間		1月17日～31日	20	7
Test 2	石原	2週間	平成15年	8月14日～28日	20	7
Test 3	拝島橋	2週間	平成16年	3月16日～29日	8	3
		4週間		3月16日～4月13日	7	3
	石原	2週間		3月16日～29日	9	3
		4週間		3月16日～4月13日	10	3
Test 4	拝島橋	2週間	平成17年	1月26日～2月8日	10	4
		4週間		1月26日～2月22日	10	4
		6週間		1月26日～3月8日	10	4
		8週間		1月26日～3月22日	10	4
	日野橋	2週間		1月26日～2月8日	10	4
		4週間		1月26日～2月22日	10	4
		6週間		1月26日～3月8日	10	4
		8週間		1月26日～3月22日	10	4
	石原	2週間		1月26日～2月8日	10	4
		4週間		1月26日～2月22日	10	4
		6週間		1月26日～3月8日	10	4
		8週間		1月26日～3月22日	10	4
Test 5	拝島橋	2週間	平成17年	9月20日～10月4日	20	4
		4週間		9月20日～10月18日	20	4
		6週間		9月20日～11月1日	20	4
	日野橋	2週間		9月20日～10月4日	20	4
		4週間		9月20日～10月18日	20	4
		6週間		9月20日～11月1日	20	4
	石原	2週間		10月18日～11月1日	20	4
		4週間		10月18日～11月15日	20	4
		6週間		10月18日～11月29日	20	4
Test 6	拝島橋	6週間	平成17年	11月1日～12月13日	10	0.5
	日野橋	6週間		11月1日～12月13日	10	0.5

過年度までの試験（Test 1～3）に引き続き、Test 4 として、過年度と同様に成魚を対象とした曝露試験を実施した。Test 4 は下水処理水のエストロゲン作用が比較的高く残存すると考えられる冬期の試験とした。いずれの水質自動監視所においても、4 ヶ月齢の雄メダカ 40 匹を投入し、8 週間の長期曝露試験をおこなった。

Test 5 は、夏期の比較試験として 4 ヶ月齢の雄メダカ 60 匹を投入し、6 週間の曝露試験をおこなった。続いて、Test 6 として、化学物質に対し感受性の高いと考えられる孵化後 2 週間の稚魚 60 匹を用いて、稚魚-若魚期の曝露試験をおこなった。

過年度分の調査状況も含め、本年度の試験実施状況を表-1 に示した。

2.1.3　魚類影響指標および水質の分析

雌性化の指標として、雄メダカの個体ごとに曝露後の体重、全長、体長、VTG 濃度を測定した。測定は、肝臓抽出液を用いるメダカ VTG-ELISA キットを用いた。河川水に曝露したメダカは、体重、全長、体長を測定し、開腹して肝臓を取り出した。肝臓の重量を測定してサンプルバッファー内ですりつぶし、遠心分離によって肝臓抽出液を作製した。肝臓抽出サンプルは測定に供するまで、-30℃で保管した。

河川水のエストロゲン作用を調べるため、ブルーネル大学から分与された遺伝子組み換え酵母を用いてエストロゲン活性を測定した[6]。また、E1、E2 および EE2 は、LC/MS/MS により測定した[7]。

2.1.4　冬期曝露試験（Test 4）の結果

河川に残存するエストロゲン活性が高いと考えられる冬期に実施した Test4 では、対照地点である拝島橋監視所に加え、日野橋および石原監視所において、VTG を生成した雄メダカは検出されなかった（表-2）。2 週間ごとにメダカを回収して推移を確認することとしたが、2 週から 8 週にかけて、いずれの監視所、回収時においても VTG を生産した雄メダカはいなかった（表-2）。

Test 4 での河川水のエストロゲン活性は、石原監視所では 10 ng/L-E2 を超える状態で推移していた。これらの値は、

表-2　多摩川におけるメダカ曝露試験結果

曝露試験	曝露期間	実施年月日		メダカ 個体数	ビテロジェニン 陽性個体	ビテロジェニン 平均値 (ng/mg-liver)	エストロゲン活性 範囲 (ng/L-E2)	E2 範囲 (ng/L)	E1 範囲 (ng/L)
Test 1									
拝島橋	2週間	平成15年	2月27日～3月13日	20	0	-	ND	ND	ND
日野橋	2週間		1月17日～31日	20	0	-	6.59 - 12.5	Tr(1.0) - 1.7	12.2 - 21.9
Test 2									
石原	2週間	平成15年	8月14日～28日	20	2	2.6	6.31 - 8.29	Tr(1.0) - 1.7	4.4 - 8.1
Test 3									
拝島橋	2週間	平成16年	3月16日～29日	8	0	-	0.24 - 0.35	ND	ND
	4週間		3月16日～4月13日	7	0	-	ND - 0.35	ND	ND
石原	2週間		3月16日～29日	9	9	19.1 ± 11.4	5.34 - 27.9	Tr(0.8) - 4.6	6.7 - 33.1
	4週間		3月16日～4月13日	10	10	11.3 ± 6.0	5.34 - 27.9	ND - 4.6	6.7 - 33.1
Test 4									
拝島橋	2週間	平成17年	1月26日～2月8日	10	0	-	0.17 - 0.20	ND	ND
	4週間		1月26日～2月22日	10	0	-	0.17 - 0.24	ND	ND
	6週間		1月26日～3月8日	10	0	-	0.17 - 0.24	ND	ND
	8週間		1月26日～3月22日	9	0	-	0.17 - 0.35	ND	ND
日野橋	2週間		1月26日～2月8日	10	0	-	2.98 - 3.86	ND	1.4 - 4.9
	4週間		1月26日～2月22日	10	0	-	1.91 - 3.86	ND	1.4 - 13.3
	6週間		1月26日～3月8日	10	0	-	1.84 - 3.86	ND	1.4 - 13.3
	8週間		1月26日～3月22日	10	0	-	1.85 - 3.86	ND	1.4 - 13.3
石原	2週間		1月26日～2月8日	10	0	-	8.38 - 14.8	ND - Tr(2.3)	9.3 - 14.8
	4週間		1月26日～2月22日	10	0	-	8.38 - 14.8	ND - Tr(2.3)	1.9 - 14.8
	6週間		1月26日～3月8日	10	0	-	8.38 - 14.8	ND - Tr(2.3)	1.9 - 14.8
	8週間		1月26日～3月22日	10	0	-	5.49 - 14.8	ND - Tr(2.3)	1.9 - 14.8
Test 5									
拝島橋	2週間	平成17年	9月20日～10月4日	20	0	-	0.17 - 0.60	ND	ND
	4週間		9月20日～10月18日	20	0	-	0.17 - 0.60	ND	ND
	6週間		9月20日～11月1日	20	6	1.08 ± 0.49	0.12 - 0.60	ND	ND
日野橋	2週間		9月20日～10月4日	20	0	-	0.74 - 0.78	ND	ND
	4週間		9月20日～10月18日	20	0	-	0.74 - 0.78	ND	ND - Tr(0.36)
	6週間		9月20日～11月1日	20	4	0.97 ± 0.39	0.74 - 0.98	ND	ND - Tr(0.56)
石原	2週間		10月18日～11月1日	20	6	1.08 ± 0.48	2.50 - 3.12	ND	1.61 - 3.68
	4週間		10月18日～11月15日	20	0	-	2.50 - 3.12	ND	1.61 - 3.68
	6週間		10月18日～11月29日	20	0	-	2.50 - 3.12	ND	1.61 - 3.68
Test 6									
拝島橋	6週間	平成17年	11月1日～12月13日	20	0	-	0.12 - 0.31	ND	ND
日野橋	6週間		11月1日～12月13日	20	0	-	0.98 - 31.8	ND - 4.53	Tr(0.80) - 29.5

ND ： 検出下限値未満
Tr ： 検出下限値以上，定量下限値未満

昨年度の結果から考えて、雄メダカにビテロジェンを生成させる可能性のあるレベルと考えられた。

2.1.4　夏期曝露試験（Test 5, Test 6）

夏期の比較試験としておこなったTest 5では、拝島橋および日野橋監視所において、6週後に雄メダカのVTG陽性個体が確認された（表5-2）。また、石原監視所では試験開始から2週後に陽性個体が確認された。しかしながら、いずれの陽性個体もVTG生成量はごくわずかであった。Test 5での河川水のエストロゲン作用は、冬期（Test 4）に比べ低い値であった。

Test 5に続きTest 6として稚魚-若魚期の曝露試験（水質測定結果表における第6週から第12週）を拝島橋および日野橋監視所でおこなった。稚魚の曝露を開始して6週経過後（第12週）にメダカを回収したところ、雄メダカにVTGを生成しているものは検出されなかった（表-2）。この試験においても河川水のエストロゲン作用は低いレベルであった。ただし、日野橋監視所付近では、第12週時の直前から河道の工事が開始されたため、監視所にはその直上流の下水処理水が流入することとなった。このため、エストロゲン活性およびE1の高い値が検出された。

2.1.5　雄メダカのVTG生成に関わるエストロゲン類の濃度

平成16年度に石原監視所で実施したTest 3では、第2週および第4週に回収したすべての雄メダカにVTG生成が確認された（図-1）。この試験では、試験開始時のエストロゲン活性は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

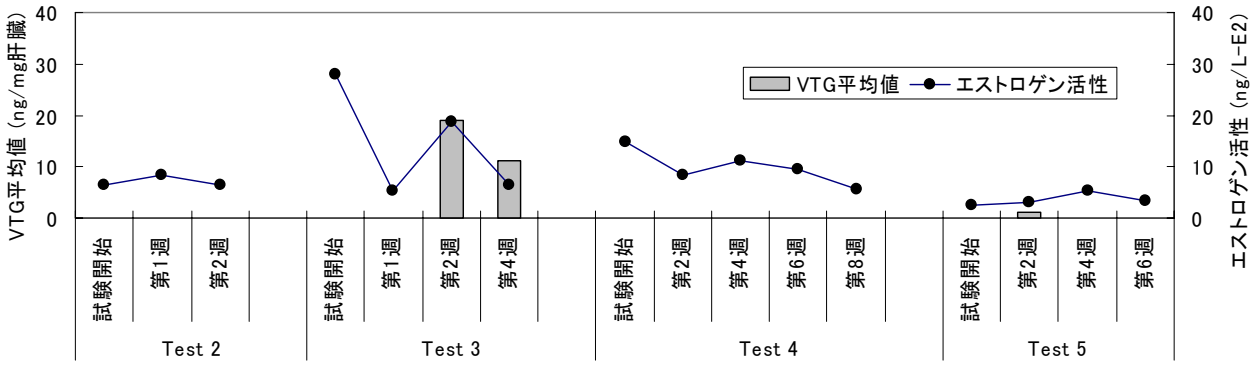


図-1　石原監視所における雄メダカを用いた曝露試験

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。

過年度までに、雄メダカの VTG 生成に関与するエストロゲン類の濃度として、E2 の最小作用濃度は 12.6 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）、最大無作用濃度は 5.0 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）と報告した。このことから、10ng/L を超える 17β-エストラジオールに曝露されると、遅くとも 2 日後にはビテロジェニンを生成している可能性があると考えられる。しかしながら、作用濃度を超えない範囲では、たとえ水のエストロゲン作用があるとしても雄メダカに作用しないことが考えられる。

2.2　下水処理場におけるメダカを用いた長期曝露試験

2.2.1　試験実施地点

メダカに対する下水処理水の曝露試験は、コイ曝露試験を行った下水処理場にて実施した。この下水処理場は、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。なお、水質チームの既往研究として、同処理場にて成魚を用いた 2 週間および 8 週間の曝露試験を行っている（それぞれ Test A と Test B）。

2.2.2　試験魚と現地魚類曝露試験システム

試験対象魚は、過年度試験に継続してメダカを選定した。メダカ曝露試験に用いる装置は、過年度に水質チームで開発されたものを用いた（写真-1）。メダカ曝露試験における試験条件は 5.1 同様である。これは、環境省の室内試験に整合させたものであり、現地試験としての変更点は、餌を市販の粉末餌とし、自動給餌器を用いて与えることとした。

2.2.3　曝露試験（Test C、Test D）

Test C として、成魚を対象とした曝露試験を実施した。今回は、二次処理水試験区および砂ろ過水試験区ともに、雄メダカ 60 匹と雌メダカ 10 匹を投入し、6 週間の曝露試験を行うこととした。続いて、6 週後にその水槽内で得られた卵を用いて Test D を行うこととした。Test D では、孵化仔魚の初期減耗を考慮し、およそ 300 卵を試験開始時に準

表-3　下水処理場におけるメダカ曝露試験の実施状況

曝露試験		曝露期間	実施期間		メダカ	
					個体数	開始月齢
Test C	二次処理水	2週間	平成17年	8月3日～8月17日	20	3
		4週間		8月3日～8月31日	20	3
		6週間		8月3日～9月14日	20	3
	砂ろ過水	2週間		8月3日～8月17日	20	3
		4週間		8月3日～8月31日	20	3
		6週間		8月3日～9月14日	20	3
Test D	二次処理水	8週間	平成17年	9月28日～11月9日	20	0.5
	砂ろ過水	8週間		9月14日～11月9日	20	0

備することを目標とした。Test CおよびTest Dの試験実施状況を表-3に示した。

2.2.4 魚類影響指標と水質分析項目

魚類の雌性化の指標として、VTGをELISAキットを用いて測定した。また、メダカ曝露試験水のエストロゲン作用を明らかにするため、エストロゲンおよびエストロゲン様物質の濃度を2週間ごとに測定した。エストロゲンの測定項目は、遺伝子組換え酵母によるエストロゲン活性、E2、E1、E3、EE2、さらにエストロゲン抱合体を対象とした。また、エストロゲン様物質の測定項目は、ノニルフェノール（NP）およびノニルフェノールエトキシレート（NPnEO,1≦n≦15）とした。水試料の前処理および測定は、既報の調査研究と同様の方法を採用した。

2.2.5 成魚曝露試験（Test C）結果

6週間のメダカ成魚曝露試験において、2週ごとに雄メダカのVTG生成状況を観察した結果、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。しかしながら、これを生成していない個体も多くみられた（表-4）。

二次処理水曝露試験区では、曝露開始から2週後に2匹（10%）、6週後に4匹（20%）の雄メダカでVTGが確認された。陽性個体のVTG生成最大値は、2週後および6週後で、それぞれ3.9および2.4ng/mg-liverであった。

この試験区でのエストロゲン活性は、試験開始時に23.9ng/L-E2であったが、その後徐々に低下し、6週後では1.5ng/L-E2であった（表-5）。一方、砂ろ過水曝露試験区では、曝露開始から2週後に8匹（40%）、4週後に1匹（10%）、6週後に5匹（25%）の雄メダカにビテロジェニンが確認された。陽性個体のビテロジェニン生成最大値は、2週後、4週後および6週後で、それぞれ99.0、3.5、および3.8 ng/mg-liverであった。

この試験区でのエストロゲン活性は、試験開始時に32.3ng/L-E2であったが、二次処理水と同様にその後徐々に低下し、6週後では1.0ng/L-E2であった。

2.2.6 稚魚―若魚曝露試験（Test D）結果

稚魚期から若魚期まで8週間曝露した雄メダカでは、二次処理水曝露試験区の生残雄7匹中2匹（29%）にビテロジェニン生成が認められた。一方、砂ろ過水曝露試験区の生残雄13匹ではこれを生成している個体は検出されなかった。

二次処理水のエストロゲン活性を2週間ごとに測定した結果、0.3～24.0 ng/L-E2であった。砂ろ過水試験区では0.3～6.1 ng/L-E2であった。

2.2.7 雄メダカのVTG生成に関わるエストロゲン類の濃度

成魚を曝露したTest Cでは、両試験区で雄メダカのVTG生成が確認されたが、その生成状況に大きな差異は認められなかった。この理由として、両試験区の処理水のエストロゲン活性およびE1は、いずれもほぼ同様の傾向を示しながら推移したことによると考えられた（図-2）。また、両試験区とも試験開始時のエストロゲン活性は20 ng/mL-E2を越えていたが、その後はTest Cが終了するまでエストロゲン活性が10 ng/mL-E2を超えることはみられなかった。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ビテロジェニン生成に関与したと推定され、一度生成されたビテロジェニンは、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た。Test Dでは、第6週に20ng/mL-E2を超えるエストロゲン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ジェニン生成がみられた。

表-4　下水処理場におけるメダカ曝露試験結果

曝露試験	曝露期間	メダカ				ビテロジェニン			
		個体数	体長 (mm)	湿重量 (mg)	肝重量 (mg)	陽性個体	出現比 (%)	平均値 (ng/mg-liver)	最小－最大 (ng/mg-liver)
Test C									
二次処理水	2週間	20	23.5 ± 1.6	161.3 ± 37.8	2.7 ± 1.1	2	10.0	1.02 ± 0.76	ND - 3.85
	4週間	10	23.1 ± 0.9	165.9 ± 16.2	2.6 ± 0.5	0	0.0	-	-
	6週間	20	24.4 ± 1.2	246.1 ± 33.1	6.8 ± 2.4	4	20.0	1.03 ± 0.54	ND - 2.40
砂ろ過水	2週間	20	23.2 ± 1.8	160.0 ± 46.3	1.8 ± 0.9	8	40.0	6.99 ± 21.78	ND - 99.01
	4週間	10	24.7 ± 1.3	222.1 ± 30.1	4.5 ± 1.1	1	10.0	1.06 ± 0.87	<1.56 - 3.53
	6週間	20	24.4 ± 1.3	341.4 ± 42.2	5.6 ± 1.9	5	25.0	1.33 ± 1.05	ND - 3.78
Test D									
二次処理水	8週間	7	19.6 ± 2.4	127.8 ± 42.7	4.6 ± 0.6	2	28.6	2.51 ± 3.80	ND - 10.98
砂ろ過水	8週間	13	21.2 ± 1.8	160.2 ± 41.3	4.7 ± 1.9	0	0.0	-	-

表-5　曝露試験水の水質分析結果　（抜粋）

Test C		試験開始	第2週	第4週	第6週					下限値	
Test D					試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週	検出限界	定量限界
二次処理水											
エストロゲン活性	(ng/L-E2)	23.8	5.32	5.41	1.51	0.30	8.22	24.0	12.9	0.05	0.08
E2	(ng/L)	1.18	0.66	0.49	Tr(0.08)	Tr(0.14)	ND	2.80	1.48	0.05	0.16
E1	(ng/L)	27.5	5.44	4.20	1.79	0.34	12.4	21.3	11.7	0.02	0.08
EE2	(ng/L)	1.58	0.91	ND	0.88	ND	ND	2.70	0.26	0.04	0.12
E3	(ng/L)	ND	Tr(0.20)	ND	0.46	ND	ND	2.52	0.36	0.07	0.25
NP	(μg/L)	0.140	0.040	0.022	0.350	0.092	0.160	0.590	0.370	0.0029	0.0096
砂ろ過水											
エストロゲン活性	(ng/L-E2)	32.29	4.24	2.32	1.01	0.55	0.25	2.10	6.10	0.05	0.08
E2	(ng/L)	2.60	0.33	0.50	ND	ND	ND	1.18	0.79	0.05	0.16
E1	(ng/L)	32.60	3.26	1.57	0.70	Tr(0.07)	ND	2.08	4.88	0.02	0.08
EE2	(ng/L)	ND	1.53	ND	Tr(0.07)	ND	ND	1.06	ND	0.04	0.12
E3	(ng/L)	ND	ND	1.73	ND	ND	ND	2.25	ND	0.07	0.25
NP	(μg/L)	0.160	0.072	0.012	0.430	0.130	0.073	0.540	0.440	0.0029	0.0096

ND ： 検出下限値未満
Tr ： 検出下限値以上，定量下限値未満

雄メダカのビテロジェニン生成に関与するエストロゲン類の濃度として、われわれ水質チームは、E2 の最小作用濃度は 12.6 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）、最大無作用濃度は 5.0 ng/L（曝露 2 日後および 7 日後）と報告した。こ

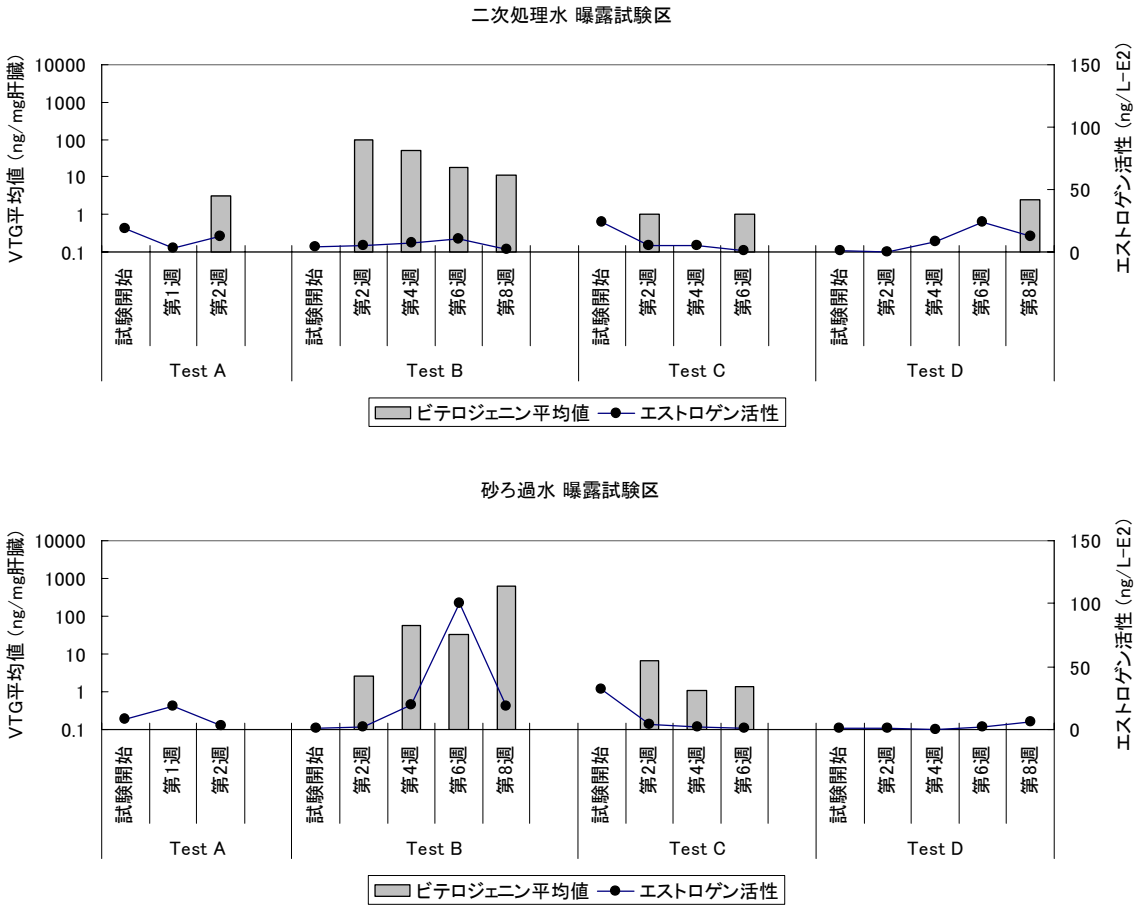


図-2　下水処理場におけるメダカ曝露試験結果（Test A～D）
（上：二次処理水曝露試験区、下：砂ろ過水曝露試験区）

のことから、10ng/L を超える E2 に曝露されると、2 日後には VTG を生成している可能性があり、これは、今回下水処理場での試験で得られた Test C および D の結果と整合するものと考えられる。

2.2.8　雄メダカの VTG 生成に必要な曝露期間

本研究では、試験水のエストロゲン作用を 2 週間ごとに追跡することとした。しかし、過年度の Test B での二次処理水試験区でみられたように、雄メダカが高濃度のビテロジェニンを生成しているにも関わらず、水質の影響要因は把握できないことがある。

われわれは、14 日間曝露における E2 の最小作用濃度は 5.0ng/L と報告した。このことから、試験水のエストロゲン作用とメダカの反応との関係は、エストロゲン濃度が高いほど短時間に影響が出現することや、たとえ低濃度でも長時間曝されることによって影響が表れてくることは明らかである。

Test B の二次処理水試験区での試験開始時および 2 週間後のエストロゲン類の濃度は、雄メダカに高濃度 VTG を生成させるような要因はみあたらない。この現象を生じさせた要因として、エストロゲン類の濃度が短時間に上昇・下降したものと考えられる。このため、水質の影響要因を追跡するためには、より短時間での水質変動を把握する必要があると考えられる。

2.3　下水処理場におけるメダカを用いた短期曝露試験の結果

2.3.1　試験実施地点

5.2 とは異なる下水処理場において、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、5.2 に比べ採水とメダカの観測頻度の高い調査を行った。

2.3.2　曝露試験条件

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 10m³，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、

表-6　湖北処理場二次処理プラントにおけるメダカのビテロジェニン生成（平成17年冬期）

曝露試験	曝露期間	メダカ 個体数	体長 (mm)	湿重量 (mg)	肝重量 (mg)	ビテロジェニン 陽性個体	平均値 (ng/mg-liver)	エストロゲン活性 範囲 (ng/L-E2)	E2範囲 範囲 (ng/L)	E1範囲 範囲 (ng/L)
曝気第２槽	2日	5	24.0 ± 2.4	228.6 ± 67.6	3.5 ± 0.7	5	342.7 ± 349.2	51.8 - 128	3.68 - 12.6	37.1 - 99.1
	1週間	5	22.4 ± 1.2	162.4 ± 34.3	2.1 ± 1.1	5	2936.4 ± 2071.9	15.1 - 128	ND - 12.55	8.85 - 99.1
	2週間	10	23.9 ± 1.9	210.1 ± 47.0	2.7 ± 0.9	10	3394.4 ± 2669.1	8.94 - 128	ND - 12.55	8.85 - 99.1
	4週間	10	25.6 ± 1.5	258.5 ± 46.7	4.3 ± 1.5	10	1555.0 ± 856.7	3.55 - 128	ND - 12.55	3.13 - 99.1
最終沈殿池	2日	5	25.3 ± 1.1	241.1 ± 41.0	2.9 ± 1.4	5	26.6 ± 13.0	24.0 - 149	ND - 3.67	24.2 - 115
	1週間	5	25.7 ± 2.0	272.3 ± 68.5	2.9 ± 1.7	5	56.9 ± 67.6	23.7 - 149	ND - 3.67	17.6 - 115
	2週間	10	23.9 ± 1.8	209.4 ± 40.3	2.9 ± 0.7	10	46.3 ± 47.3	1.94 - 149	ND - 3.67	Tr(0.82) - 115
	4週間	10	25.2 ± 1.8	248.3 ± 58.5	3.9 ± 1.8	10	139.6 ± 87.3	1.94 - 149	ND - 3.67	Tr(0.82) - 115

ND：検出下限値未満
Tr：検出下限値以上、定量下限値未満

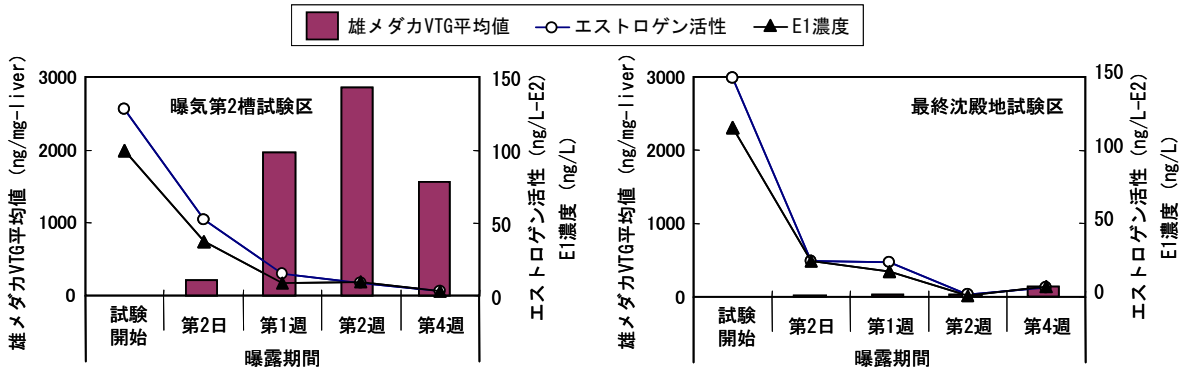


図-3　メダカを用いた下水処理水の短期曝露試験における雄メダカVTG生産量とE1濃度、エストロゲン活性の推移

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。

2.3.3　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 日後より高い VYG 生産が確認された（表-6）。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 濃度が観察された。

YES アッセイ、機器分析の結果、曝気第 2 槽試験区では、エストロゲン活性が 3.55～128ng/L-E2、E1 濃度が 3.13～99.1ng/L、最終沈殿池試験区では、1.94～149ng/L-E2、E1 濃度が 0.82～115ng/L と、試験開始時に高い値が観察された。また、どちらの試験区でも、エストロゲン活性と E1 濃度は同じ濃度変動が確認された（図-3）。

メダカの肝臓中 VTG 濃度と、エストロゲン活性を比較すると、どちらの試験区においても、実験初期に高いエストロゲン（活性）の曝露を受け、2 日以内に生体反応（VTG の産出）が始まり、エストロゲン（活性）が低下しても、その生体反応が長期間継続することを示唆している。曝気第 2 槽試験区では、エストロゲン活性や E1 濃度が同程度であるにも係らず、最終沈殿池試験区に比べ高い VTG 濃度が確認された。この原因として、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（2 および 7 日間の曝露期間で 12.6ng/L、14 日間で 5.0ng/L）を超えていることによるものかも知れない。

過年度に実施した、極性分画手法と遺伝子組換え酵母法を用いた、曝露水中のエストロゲン様物質の検索結果では、いずれの試料においても E1 の寄与が高いことを示した。しかし、同様に過年度に実施したメダカへの E1 および E2 の曝露実験においては、E1 のメダカに VTG 生産を誘導する作用は、E2 のそれに対し 0.18～0.26 倍と見積もられた。そのため、遺伝子組換え酵母により測定したエストロゲン様活性値と、雄メダカ肝臓中の VTG 生産量との間に差が生じたものと考えられる。

2.4　曝露水のエストロゲン活性とメダカ肝臓中 VTG 産出量の関係

2.4.1　メダカへの河川水曝露試験結果

平成 17 年度までに実施した多摩川の水質試験監視所内での雄メダカ成魚を用い行った曝露試験の結果（表-2）、ほぼすべての試験において、石原監視所における試験以外では、雄メダカに VTG の生産は確認できなかった。また、石原監視所の試験においても、曝露水のエストロゲン活性と雄メダカの VTG 生産量との間には明確な関係は確認されなかった（図-1）。しかし、曝露期間 2 週目以降において、エストロゲン活性の平均値（2 週間の移動平均））と雄メダカに肝臓中 VTG 濃度を比較すると、エストロゲン活性が 10ng/L-E2 を超えると、VTG の生産が示唆された（図-4）。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）と雄メダカに肝臓中 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 の生産が確認された（図-4）。

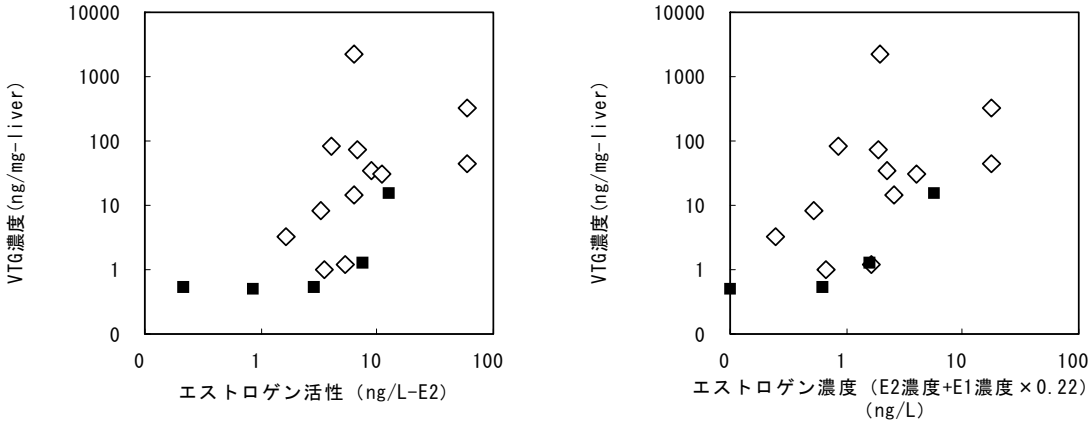


図-4　メダカを用いた曝露試験における雄メダカ陽性個体の肝臓中VTG濃度と、エストロゲン活性（左）、エストロゲン濃度（E2濃度+E1濃度×0.22、左）との関係（いずれも試験開始より2週間後の、移動平均値）
（◇：下水処理水曝露試験、■：河川水曝露試験）

5.4.2　メダカへの下水処理水曝露試験結果

図-2 で示した結果のうち、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活性と肝臓中 VTG 濃度の比較を行った。この際、長期影響を明らかにするため、Test B および C における第 4 週以降の観測結果を用いた。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）と雄メダカに肝臓中 VTG 濃度との比較も行った（図-4）。その結果、弱いながら、両者には正の相関関係が確認され、曝露水中のエストロゲン活性の上昇とともに、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。

環境省の報告では、ノニルフェノールおよび 4-t オクチルフェノールがメダカの内分泌を撹乱すると物質であると認められており、20μg/L の NP の曝露により 10～20ng/mg-liver の肝臓 VTG の誘導が確認されている。また、同濃度で孵化後のメダカを 60 日間曝露すると、雄から雌への性転換が起こると報告されている。本研究で用いたメダカに対するエストロゲン様物質の影響のエンドポイントを性転換とすると、図-4 より、エストロゲン様活性の閾値は約 10ng/L-E2 と見積もられる。

2.5　平成 17 年度の成果まとめ

平成 17 年度の研究成果として、以下のことが明らかとなった。

(1)　河川水の雄メダカに対する曝露試験の結果から、曝露水が 10ng/L-E2 のエストロゲン活性を有するとき、遅くとも 2 日後までには雄メダカ体内で VTG が産出され、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。

(2)　下水処理水の雄メダカに対する曝露試験の結果から、河川水を曝露水に用いた実験同様、10ng/L-E2 を超えるレベルになると、雄メダカに VTG が産出される可能性が示唆された。

参考文献

1) 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 Roach. Environmental Science and Technology, 32(11), pp.1559-1565, 1998.

2) Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. and Sumpter J.P.：Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. Chemistry and Ecology, 8, pp.275-285, 1994.

3) Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T. and Zaman N.：Estrogenic Activity in Five United Kingdom Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout. Environmental Toxicology and Chemistry, 16(3), pp.534-542, 1997.

4) Blackburn M.A. and Waldock M.J.:Consentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales. Water Research, 29(7), pp.1623-1629, 1995.

5) 東谷忠,玉本博之, 田中宏明：下水処理水が魚類の雌性化に及ぼす影響. 土木技術資料, 44(7), pp.28-33, 2002.

遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究

水循環研究グループ水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　宮島　潔
主任研究員　岡安祐司
研　究　員　北村友一
専門研究員　中田典秀

１．はじめに

ヒトをはじめ様々な生物の遺伝子情報が解読され、大量の遺伝子情報が蓄積されつつある。こうした中、生物体内での多数の遺伝子の発現を一度に検出するためにマイクロアレイ技術が発展してきた。マイクロアレイは、多数の検出したい遺伝子断片(DNA鎖)をスライドグラス上に配置(array)したものである。このマイクロアレイを用いることにより、核酸(DNA)からメッセンジャーRNA (mRNA)に情報が写し取られる転写をmRNAの存在から検出することが可能となる。

マイクロアレイによるmRNAの検出は、概ね以下のとおりである。組織より抽出したmRNAをDNA鎖（またはRNA鎖）に変換し蛍光色素を標識する。DNA鎖は相補的配列を持つDNA鎖またはRNA鎖と特異的に結合する現象(ハイブリダイゼーション）を利用し、マイクロアレイ上に配置されているDNAと蛍光標識したDNA(またはRNA)を結合させる。蛍光標識したDNA(またはRNA)が、マイクロアレイ上のどのDNA断片と結合しているかを、専用のスキャナーを用いて読み取る。

このマイクロアレイ技術は、主に医学の分野で疾病遺伝子の発現解析などに利用されてきたが、近年、このマイクロアレイ技術を環境分野に応用し、生物個体へのストレスを遺伝子レベルで検出しようとする試みが進められている[1) 2)]。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析は、目視では観察できないレベルで生物への影響をいち早く検出できること考えられることから、著者らも水生生物（主にメダカ）の遺伝子発現解析から水質を評価する研究を始めている。

本報告は、下水にメダカを暴露する実験を行い、暴露したメダカの遺伝子発現解析から水質の評価が可能かどうか検討したものである。

２．実験材料と実験方法

2.1　供試メダカ

本実験に使用したメダカは、名古屋大学若松教授から分与されたd-rR系統である。d-rR系統の体色は、雄が橙色、雌が白色に遺伝的に固定されており、雄と雌の判別が体色で可能である。

2.2　メダカマイクロアレイ

メダカ用マイクロアレイは、ＥＧ７５０(Ecogenomics社製)を使用した。このマイクロアレイには約750種類のメダカの遺伝子断片(約300～350塩基のDNA）が配置されている。

2.3　RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出部位は肝臓とし、肝臓からのRNAの抽出は、RNeasy mini Kit(Qiagen社製)を使用した。抽出したＲＮＡは、Amino　Allyl MessageAmp II Kit(Ambion社製)を用い、RNAを増幅した後Cy5で標識した。Cy5で標識したRNAは、メダカマイクロアレイEG750に展開し、一晩60℃でハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイと結合しなかったRNAを洗い流した後、スキャナーで各遺伝子が配置されている各スポットの蛍光強度を読みとった。

2.4　雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析

下水処理水に雄メダカを曝露したとき、メダカの肝臓中で卵形成に関わるビテロゲニンという蛋白質を誘導することが報告[3)]されている。これは主に下水中の女性ホルモンによるものと考えられるが、この雄メダカの雌性化現状も遺伝子レベルで検出するため、下水への暴露実験

では雄メダカを使用することとした。雄メダカの下水への暴露実験の前に雄メダカと雌メダカの遺伝子の発現の違いを確認しておく必要があると考え、脱塩素水で飼育している約3ヶ月齢の雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析を行った。

本実験では雄、雌それぞれ3匹を1検体とし2.3に記した方法でマイクロアレイの処理を行った。

2.5　下水への雄メダカ暴露実験

下水への暴露実験では、実下水で運転（好気的固形物滞留時間7日、活性汚泥浮遊物質濃度約1300mg/L、処理水中溶存有機炭素濃度約10mg/L）している活性汚泥処理パイロットプラントの処理水とエアレーションタンク（以下AT）の上澄水にメダカを暴露した。実験装置の概要を図-1に、メダカの曝露条件を表-1に記す。RNAの抽出およびマイクロアレイの前処理は2.3に示した方法で行った。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は半定量的であることから、マイクロアレイで遺伝子発現が高いと判定された遺伝子については、より定量能の高いリアルタイムPCR法で遺伝子発現の定量化も試みた。さらに、遺伝子発現と蛋白質発現の関係を把握するため、遺伝子発現解析用メダカとは別の個体ではあるが、各条件につき5または10匹のメダカの肝臓中ビテロゲニン蛋白質の測定を行った。

また、曝露開始後0、2、7、14日後に両曝露水槽中の女性ホルモンであるエストロン(E1)と17β－エストラジオール(E2)濃度および遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン活性の測定も行った。

表-1　メダカ曝露実験の条件

暴露方式：流水式
換水率：約1換水／日以上
試験区：処理水とエアレーションタンク2槽目
暴露期間：2、7、14日
暴露雄メダカ数：各水槽約100匹（約3カ月齢）
試験水温：26℃
照明：16時間明／8時間暗
給餌：3回/1日
RNA抽出部位：肝臓
遺伝子解析検体数：3サンプル（3匹分の肝臓を1サンプル）
肝臓中ビテロゲニン蛋白質測定：5または10匹(ELISA法:Medaka Vitellogenin ELISA Systemを使用)

3．実験結果

3.1　雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析結果

雄メダカと雌メダカのマイクロアレイ画像から蛍光強度を読みとり数値化し、この数値化

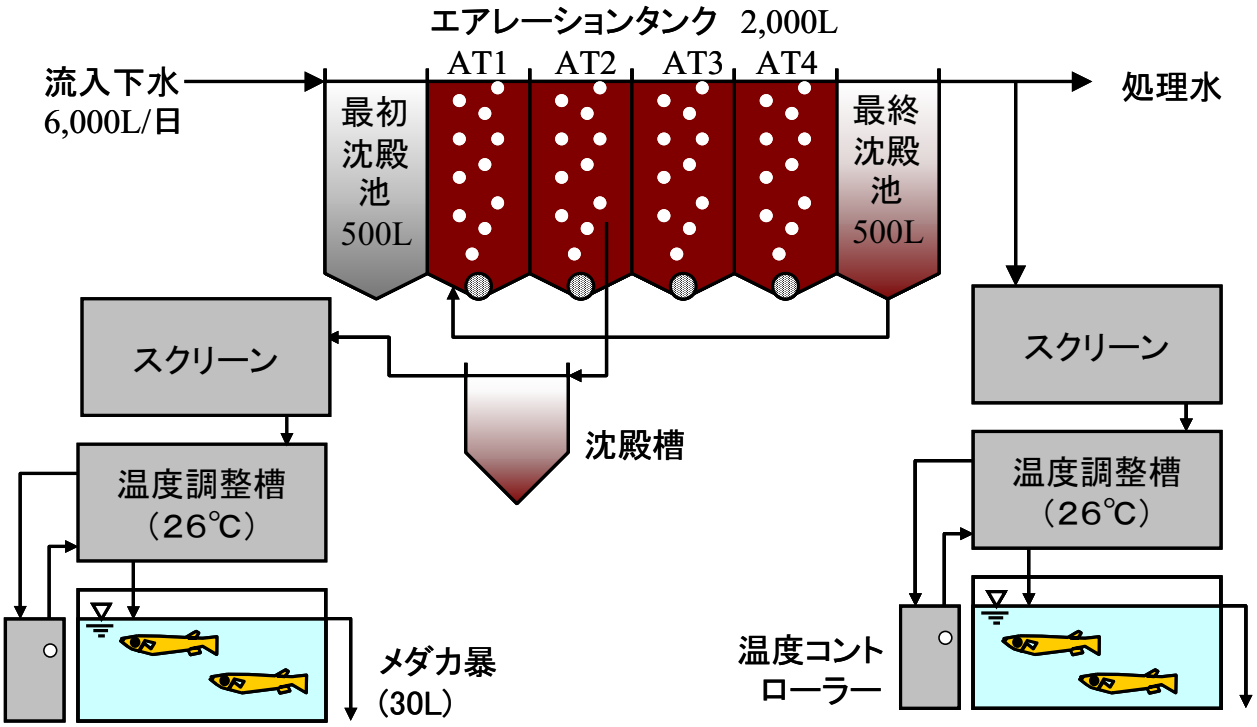


図-1　活性汚泥処理装置とメダカ曝露装置の概要

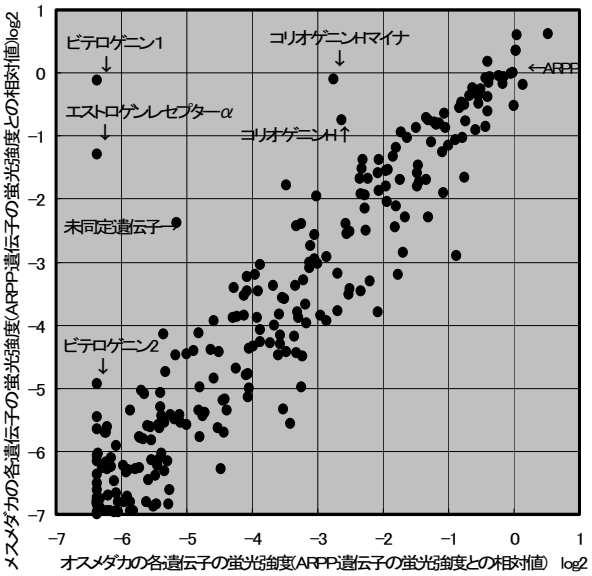


図-2　雄メダカと雌メダカの発現遺伝子の散布図

データを元に雄メダカと雌メダカで散布図を作成すると図-2が得られる。図-2は、雄雌共通の遺伝子で遺伝子発現の変動が少ないと考えられているAcidic Ribosomal PhosphoProtein (ARPP)遺伝子の発現を1とする相対強度で整理している。横軸と縦軸は$\log_2$スケールで示しており、すなわち、0,-1,-2,-3は1,1/2,1/4,1/8となる。なお、蛍光強度がバックグラウンド以下となる低発現遺伝子は、倍率を算出するため、蛍光強度がバックグラウンドを若干超える程度の蛍光強度のかさ上げ処理を行った。

雌メダカ肝臓中で、雄メダカの2倍以上発現している遺伝子を表-2に示す。その結果、卵黄前駆物質の形成に関わる遺伝子であるビテロゲニン1,2、卵膜前駆物質の形成に関わる遺伝子であるコリオゲニンH,Hマイナ,L,エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高いことが確認できる。雌特有の遺伝子は、主に卵形成に関わる遺伝子であることがわかる。

3.2　下水への雄メダカ暴露実験の結果

図-3は、0日目をコントロールとし処理水とAT上澄水にそれぞれに1週間暴露したときの雄メダカの各遺伝子発現の散布図である(7日間暴露のみ掲載)。本図は3.1と同様にARPP遺伝子での補正とバックグラウンド以下の低発現遺伝子のかさ上げ処理を行っている。表-3は、処理水とAT上澄水に2日,7日,14日間暴露したとき、0日目より遺伝子発現量が3倍以上、1/3以下になった遺伝子でかつ統計的有意(ANOVA検定で$p<0.001$)であったものを列挙したものである。

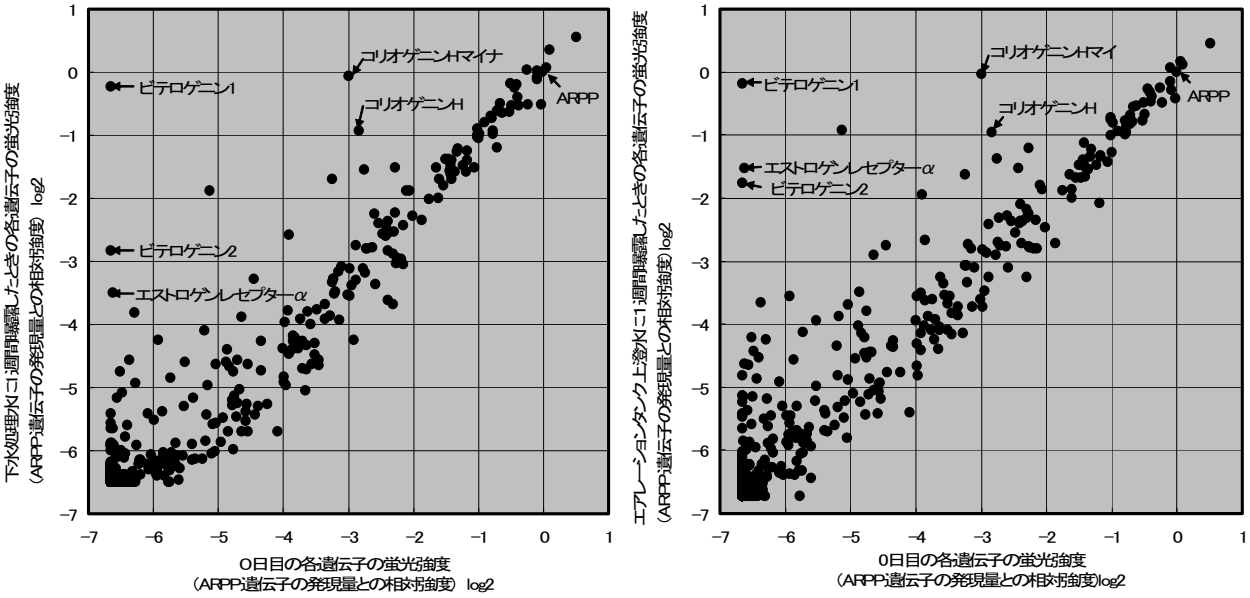
表-2　メスメダカ肝臓中でオスメダカの2倍以上発現している遺伝子

遺伝子名	倍率(雌/雄)
ビテロゲニン 1	75.9
エストロゲンレセプターα	33.6
コリオゲニンH　マイナ	6.27
コリオゲニンH	3.69
partial cold-shock domain protein	3.26
ビテロゲニン2	2.70
HOXA9B	2.30
コリオゲニンL	2.07

処理水とAT上澄水に暴露したいずれの場合でも雌特有の遺伝子であるビテロゲニン1,2,コリオゲニンH,Hマイナ,エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高くなることがわかる。ただし、処理水に14日間暴露した場合では、これらの遺伝子の発現量は低下していた。

処理水とAT上澄水に暴露したときの発現が増加する遺伝子数を比較すると、曝露期間7日間以上で、AT上澄水に暴露した方が、処理水に暴露した場合よりも発現量が増加する遺伝子数が多いことが確認できた。その中には、卵形成に関わる遺伝子の他に未同定の遺伝子も多く含まれていた。

図-4,5に各暴露水槽中のE1,E2濃度とエストロゲン活性およびビテロゲニン1,2,コリオオゲニンH,Hマイナ,エストロゲンレセプター遺伝子のリアルタイムPCRの結果を示す。表-4は、リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブの塩基配列である。リアルタイムPCRによる各遺伝子の定量においてもARPP遺伝子の発現量との相対値を求めた後、0日目コントロールとの倍率を算出した。なお、ビテロゲニン1および2は、0日目コントロールの発現量が検出限界以下であった。ここでは倍率を算出するため、0日目コントロールのビテロゲニン1および2遺伝子発現量を0.00001とした。



下水処理水１週間曝露　　AT 上澄水１週間曝露

図-3　0日目の発現遺伝子と処理水およびエアレーションタンク上澄水に1週間曝露したときの雄メダカの発現遺伝子の散布図

表-3　コントロールの３倍以上、0.3以下でANOVA検定により p<0.001 と判定された遺伝子

曝露日数	処理水			エアレーションタンク		
	遺伝子名	アクセション番号	倍率	遺伝子名	アクセション番号	倍率
2日	ビテロゲニン1	AB064320	92.3	ビテロゲニン1	AB064320	109.2
	ビテロゲニン2	AB074891	14.8	ビテロゲニン2	AB074891	32.3
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.6	エストロゲンレセプターα	AB033491	28.0
	エストロゲンレセプターα	AB033491	4.3	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.8
	コリオゲニンH	D89609	4.2	コリオゲニンH	D89609	3.9
	コリオゲニンL	AF5000194	3.2	コリオゲニンL	AF500194	3.1
7日	ビテロゲニン1	AB064320	85.3	ビテロゲニン1	AB064320	88.3
	ビテロゲニン2	AB074891	14.1	エストロゲンレセプターα	AB033491	33.9
	エストロゲンレセプターα	AB033491	8.7	ビテロゲニン2	AB074891	29.5
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.5	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
	コリオゲニンH	D89609	3.7	*cDNA similar to aspartate transaminase precursor, mitochondrial - pig*	AU177265	6.5
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	5.2
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	4.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.9
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AU177788	3.2
				コリオゲニンL	AF500194	3.0
14日	ビテロゲニン1	AB064320	37.0	ビテロゲニン1	AB064320	93.2
	cDNA to similar to cytochrome P450 2D10 - mouse	AU176875	4.2	エストロゲンレセプターα	AB033491	36.8
	cDNA similar to Brain cDNA library Ictalurus punctatus cDNA 5	AU180750	3.0	ビテロゲニン2	AB074891	31.7
	transposon Tol2 transposase	AB031079	0.2	*cDNA similar to aspartate transaminase, mitochondrial - pig*	AU177265	7.9
				コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	5.3
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	4.9
				cDNA clone MF01FSA032M17 5	BJ704342	4.2
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AV670601	4.0
				cDNA similar to cytochrome P450 2C4 - rabbit	AU176982	3.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.6
				cDNA clone MF01SSA123H06 3	BJ022493	0.3

注）斜体は未同定遺伝子

処理水とAT暴露水槽中のE1濃度は、暴露期間中一定ではなく、それぞれ、0日目115、99.1ng/L、2日目24.1、37.1ng/L、7日目17.6、8.85ng/L、14日目0.82、9.57ng/Lとなり、低下傾向であった。このときのエストロゲン活性の値はE1濃度と同じ傾向を示していた。卵形成に関わる遺伝子の発現量をみると、処理水に14日間暴露したメダカで、ビテロゲニン1,2, コリオゲニンH, Hマイナ，エストロゲンレセプター遺伝子の発現が低下しており、E1濃度と同じ傾向を示している。AT上澄水に暴露した方では、14日目に遺伝子発現量の低下は見られなかった。E1濃度10ng/L以上で卵形成遺伝子が発現していた。曝露日数2,7日で処理水とAT上澄水に曝露したメダカの遺伝子発現量を比較すると、遺伝子の種類により倍率は異なるが、AT上澄水に曝露した方が高くなっている。例えば、AT上澄水に7日間曝露したメダカ

表-4　リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブの塩基配列

遺伝子名(アクセション番号)	フォワードプライマー	リバースプライマー	TaqManプローブ	参考文献
エストロゲンレセプターα	aatcgctcccggttctatatca	cgaccctccatactgaaggaca	FAM-atctcgaggcagaatcgagagtccga-BHQ	4)
ビテロゲニン1	tctgttgttgccaagaccaaag	tccatcagttctcactccaatctc	FAM-cttctttgttggagctgctgctgatgttct-BHQ	4)
ビテロゲニン2(AB074891)	gggctgattcttgctctttctct	ggctgaattctggggtgaag	FAM-cccttgtggctgccaaccaactg-BHQ	今回設計
コリオゲニンH	cggatagtcctctttccattgc	tttgacactgcccattggc	FAM-agcttggacccctcaagtgtacttgca-BHQ	4)
コリオゲニンHマイナ(AB025967)	tgttcctcagtgggatttgct	agggatccactggaactaacgtt	FAM-attaatggctgtccaaacatcgacgatcg-BHQ	今回設計
ARPP(AU179751)	ctttgtcttcaccaaggaggatct	cgagctgctgcaggtacct	FAM-actgaagtcagggatctgctgctggc-BHQ	今回設計

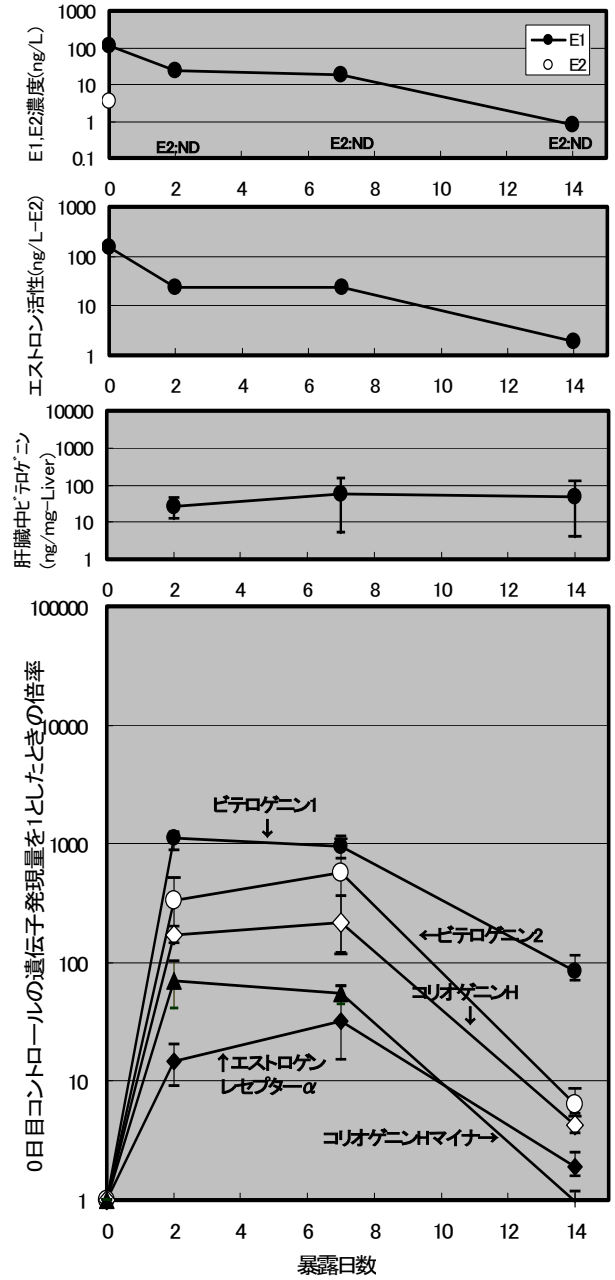


図-4　処理水暴露水槽中のE1, E2, エストロゲン活性値, 肝臓中ビテロゲニン濃度, リアルタイムPCRで測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化(barは最大, 最小値)

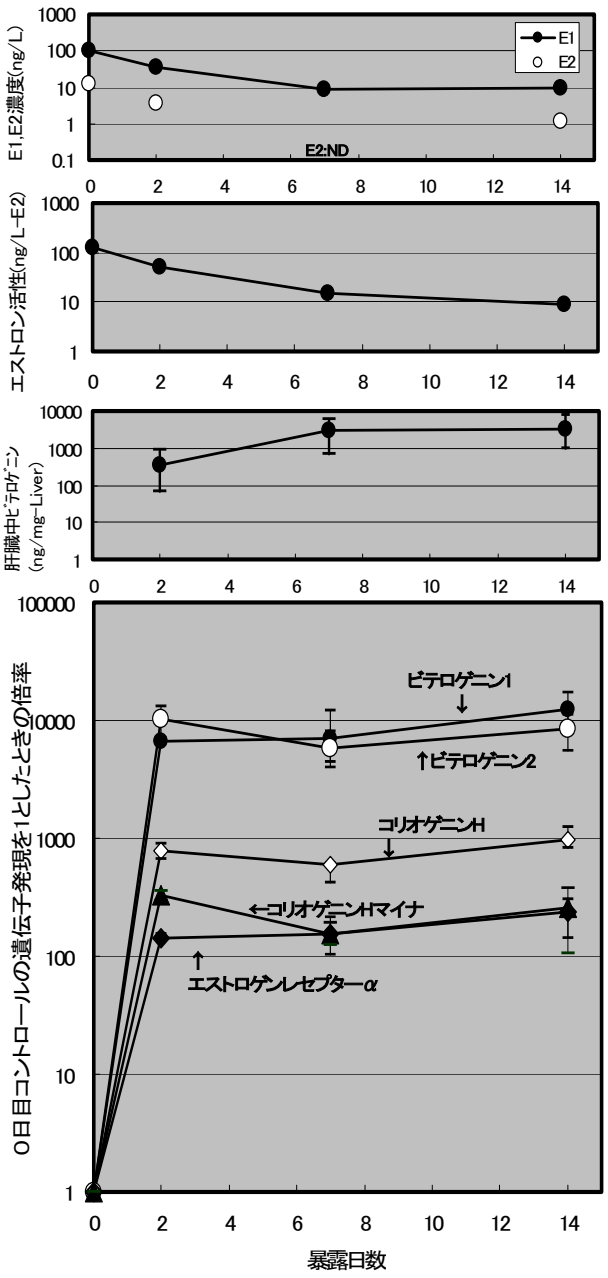


図-5　AT暴露水槽中のE1, E2, エストロゲン活性値, 肝臓中ビテロゲニン濃度, リアルタイムPCRで測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化(barは最大, 最小値)

のビテロゲニン1遺伝子の発現は、同条件で処理水に曝露したものの7倍となっている。このとき、肝臓中のビテロゲニン蛋白質もAT上澄水に曝露した方が、処理水に曝露したものより50倍程度高い値を示した。図-4より、肝臓中ビテロゲニン蛋白質濃度は、E1濃度、エストロ

ゲン活性値と連動しないことがわかる。

4. 考察

雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析から雌メダカ特有の遺伝子は卵形性に関わる遺伝子であることがわかった。今回の実験では、雄メダカの雌性化の検出も試みたため、雄メダカを使用したが、雌メダカを使用した方がより高感度に水質を評価できる場合もあると考えられることから、様々な物質で雄メダカと雌メダカの感受性の違いを明らかにしていく必要がある。

また、遺伝子発現解析から水質を評価する場合、曝露時間も重要な因子であると考えられる。体内にゆっくり蓄積する物質の生物影響は、長期間の曝露実験を行う必要がある。

今回の下水に雄メダカを曝露した実験から雄メダカ肝臓中で卵形性に関わる遺伝子の発現が高くなることがわかったが、AT 上澄水ではE2が検出されているものの、7日目までの両曝露水槽中のエストロゲン活性値は、ほぼ同じであったにもかかわらず、AT 上澄水中に曝露した場合の方が発現が高くなる傾向が得られた。これは、メダカ体内に取り込まれる女性ホルモン量が多かった、または、雌性化作用の強い物質が取り込まれためと考えられるが、その理由には、以下が推測されるものの明らかではない。曝露水中の溶存酸素濃度を測定していなかったが、AT上澄水は、処理水よりも溶存酸素濃度は低くなっていたと考えられる。AT 上澄水中のメダカはより多くの酸素を取り込むため、エラを通る水量が増加したため、結果として体内に取り込まれる女性ホルモン量が多くなった。あるいは、AT上澄水には女性ホルモンの取り込みを促進する物質が含まれている。

今回の肝臓中のビテロゲニン蛋白質の測定結果から、蛋白質の発現では、週間単位での大凡の水質の履歴が判断でき、遺伝子の発現からは、数日単位で水質を評価できるものと考えられる。今後は、水質と遺伝子の応答速度についても明らかにしていく必要がある。

AT 上澄水に暴露したメダカは、処理水に暴露したものより、発現量が増加する遺伝子の数が多くなったが、化学物質の影響か溶存酸素の影響かは明らかでない。今後、溶存酸素の高い条件と低い条件での遺伝子発現解析を行う必要がある。

今回の処理水と AT 上澄水中のエストロン濃度と卵形成に関わる遺伝子の発現の関係から、エストゲン活性約10ng/L-E2が卵形成に関わる遺伝子発現の閾値であるとと考えられる。

5. まとめ

以下に本実験結果をまとめる。

１. エアレーションタンク上澄水に曝露したメダカは、処理水に曝露したものよりも発現量が高くなる遺伝子の数は増加した。

２. エアレーションタンク上澄水および処理水に雄メダカを暴露すると卵形成に関わるビテロゲニン1,2,コリオゲニンH,Hマイナ,エストロゲンレセプターα遺伝子の発現が増加する。これらの遺伝子は曝露後２日目から検出できた。また、これらの遺伝子は、水中のエストロン濃度と連動して動いている可能性がある。

３. エストロゲン活性値約 10ng/L-E2 が卵形成に関わる遺伝子発現の閾値であると考えられる。

今後は、溶存酸素濃度や給餌の頻度と発現遺伝子の種類についての知見を収集し、信頼性の高い試験条件を確立する必要がある。さらに、純物質でのメダカの暴露試験から、発現または抑制される遺伝子データを収集し、現場での水質モニタリングに反映させて行きたいと考えている。

参考文献

1)Sirisattha,S., Momose,Y., Kitagawa,E., Iwahashi,H.:Toxicity of anionic detergents determined by Saccharomyces cerevisae microarray analysis, Water Res.,38,61-70,2004

2)Momose,Y., Iwahashi,H.,:Bioassay of cadmium using a DNA microarray:genome-wide expression patterns of Saccharomyces cerevisae responcse to cadmium, Environ. Toxicol.chem.,76,6548-6554,2004

3)国土技術政策総合研究所, 土木研究所:平成16年度下水道関係調査研究年次報告書集,国土技術政策総合研究所資料, 土木研究所資料,pp.243-252, 平成17年

4)国立環境研究所:環境ホルモンの新たな計測手法の開発と環境動態に関する研究(内分泌撹乱化学物質総合対策研究) 国立環境研究所特別研究報告,p48-52, 平成14年

河川水質浄化事業の評価と改善に関する調査

水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　小森行也

１．はじめに

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

本調査は、土木研究所が河川浄化事業に関する評価と改善を国土交通省水質連絡会の共通テーマとし指導するとともに、河川直接浄化施設での微量汚染物質（エストロゲン様活性等）の除去およびアンモニア除去（水道原水と生-態系保全に削減が重要）に焦点を当て、除去機構の理解を深めるとともに、設計や維持管理の改善の提言を行うことを目標としている。

平成 17 年度は、河川浄化施設の持続的・効果的な浄化機能を発揮するうえで、有益となる考え方、維持管理や施設運用方法、問題解決方法などに関する情報を提供し、維持管理の参考資料として利用することを目的とした河川浄化施設の事例集を整理した。また、河川浄化施設の運用および維持管理の現況を点検し、施設の問題や課題を整理するための手順を示す河川浄化施設自己点検マニュアル（案）を整理した。国土交通省河川局河川環境課、国土技術政策総合研究所河川環境部、北海道開発局建設部、各地方整備局河川部・技術事務所をメンバーとする水質連絡会で議論しまとめたものであり、河川浄化施設の事例集は関東技術事務所、河川浄化施設自己点検マニュアル（案）は九州技術事務所が中心となってまとめた。

２．河川浄化施設の事例集

河川浄化施設は流入支川等の汚濁負荷削減のため、当該支川等の汚濁状況に応じて「河川直接浄化の手引き」（平成 13 年 7 月国土交通省河川局河川環境課）に基づき、計画・調査・設計されている。現在、直轄の浄化施設として約 70 施設が稼働している状況にある。直轄河川の水質は、近年 10 年間をもても着実に改善傾向を示している一方で、親水面や河川生態系の保全・再生の観点から河川水質に求められるニーズも高くなっており、さらには環境ホルモンなどの微量有害物質など新たな水質問題も生じている。こうした状況下にあって、河川浄化施設の役割、位置づけにも変化が求められるようになってきた。また、急速な人口減少に転じつつあるわが国では、大量にストックされた社会資本の更新、維持管理をいかに効率的にかつ適切に実施していくかが大きな課題となっている。河川浄化施設においても、既存施設の持続的な機能発揮を図るための適切な管理・運用あるいは施設改造など課題として注目されてきている。

こうした課題に対し、河川管理者や浄化施設の計画・設計者が課題解決の手段として「他の浄化施設では、どのような課題があり、どのように解決したか」を知ることは非常に有益であると考える。本事例集は直轄の浄化施設について、施設の管理・運用においての課題に対し、解決・工夫した事例を収集し、今後の課題解決の参考となる事例集を作成したものである。今後、生じるであろう同様な課題解決の参考となる情報集の作成を目指したものである。

今後、河川浄化施設の課題は維持管理に関する事項が多くなることが予想されることから、事例集においても、汚泥処理・処分などの維持管理に関する内容に重点をおいた。本事例集は、浄化施設の課題解決のヒントを提供することを主目的としている。従って、「課題解決事例の解説書」というよりも、「課題解決のトピック集」の作成を目指し、利用者が手軽に手にとって眺められる資料作成を心がけた。本事例集は、管理者、設計者にとって関心のあるテーマを設定し、そのテーマについて、有効な情報、データを有する浄化施設の事例（成功例も失敗例も）を示すスタイルとしている。掲載する事例の内容は、結果だけでなく、どうしてそうなったか経緯や検討した内容が分かるように心がけた。このため、必要に応じて、計画・設計・管理に携わった担当者等にヒアリングを行い、関連情報の収集を実施した。本事例集は、「全国水質連絡会」における成果に基づき作成している。事例のひとつとして、国土交通省の各地方整備局技術事務所における検討結果についても掲載している。

河川浄化施設の事例集の目次を図-1 に示す。

第 1 章は、本事例集の利用方法について記述している。本事例集の目的、作成方針、構成について記載した。

第 2 章では、全国における浄化施設の設置状況について記述している。河川直接浄化技術としては、礫、種々のプラスチック材、木炭、植生等の材質を浄化施設内、または、河床及び水面に充填した充填部に河川水を通すことによって汚濁物が浄化される。現在、礫、プラスチック接触材を使用した河川直接浄化施設が多いのが特徴である。

第 3 章は、注目される水質項目の浄化特性について記述している。近年の河川水質は、有機汚濁が解消されつつある一方で、窒素・リンの富栄養化問題、降雨時汚濁物質の影響、微量有害物質や病原性微生物などの水系リスクなどの水質問題も多様化している。本章では、こうした注目される水質項目が既存の浄化施設でどの程度浄化可能であるのか、調査データを紹介する。

目　次

第1章　本事例集の利用方法
　第1節　本事例集の目的
　第2節　本事例集の作成にあたって
　第3節　本事例集の構成
第2章　全国における浄化施設の設置状況
　第1節　直轄の河川浄化施設一覧
　第2節　河川浄化施設の設置目的
　第3節　河川浄化施設の分類と件数
第3章　注目される水質項目の浄化特性
第4章　新たな浄化技術の開発
第5章　維持管理に関する問題の対応事例
　第1節　流量管理
　第2節　水処理プロセス管理
　第3節　汚泥管理
　第4節　エネルギー・コスト
　第5節　維持管理における住民との協議
第6章　施設の有効活用検討事例
第7章　河川浄化施設の費用対効果検討事例
資料編　直轄河川浄化施設台帳

図-1　河川浄化施設の事例集　目次

第 4 章は、新たな浄化技術の開発について記述している。多様化する水質問題への対応や建設コストや管理コスト抑制に対する要請から、新たな浄化技術の開発は現在も進められている。しかも、開発の方向性は、最新技術を導入したものがある一方で、河川浄化の原点にある河川の特性、自浄作用を生かした浄化手法の開発も進められている。本章ではこうした浄化技術の開発の一端について紹介している。

第 5 章は、維持管理に関する問題の対応事例について記述している。河川浄化施設の水質浄化機能を維持するために維持管理は必要不可欠である。しかし、流入河川においては、流域の対策や環境の変化など特有の問題が生じている。河川浄化施設の維持管理における問題とその対応は施設個々に行われているのが現状である。河川浄化施設をどのように維持管理していくかが重要になってくる中で、本章は、本事例集のメインパートとして位置づけ、こうした維持管理のノウハウ蓄積・体系化の一助となることを意図してまとめている。

第 6 章は、施設の有効活用検討事例について記述している。現在、河川浄化施設は、流域対策の進展に伴い浄化対象河川の水質が計画値を大きく下回った、あるいは浄化対象水量が大きく減少したなどの要因により、計画当初の運用を見直さざるを得ない状況にある。この様な環境の変化に伴い、更なる有効活用の方策が求められている。すでに検討されている事例の一部を本章では紹介している。

第 7 章は、河川浄化施設の費用対効果検討事例について記述している。河川管理者が事業計画の立案や事業評価に取り組む際に、費用対効果の検討があげられる。河川浄化対策を行う上で、水環境改善に伴う経済効果の把握が必要と考えられる。近年、事業評価において費用対効果分析が必要とされる中で、河川浄化施設における検討事例の一部を紹介している。

また、資料編として、直轄河川浄化施設台帳を整理した。直轄管理の 70 施設について統一記述様式で整理している。記述内容は、浄化対象河川、水系河川名、事業主体、事業名、所在地、施設設置場所、浄化手法名、建設費、供用開始年月の他、①計画目的、②浄化フロー、③施設諸元（計画諸元、施設設計諸元）④施設概要（図面、写真）⑤稼働実績（水量・水質の状況、浄化条件の状況、汚泥処理の状況）、⑥浄化施設の維持管理、⑦浄化施設の問題・改善等（施設履歴、施設稼働状況の評価、維持管理上の問題点、施設や維持管理の工夫・改善）、⑧その他（施設担当部局、連絡先、参考資料、作成年月日）である。

３．河川浄化施設自己点検マニュアル（案）

自己点検の目的は、河川浄化施設を適正に運用していく上で必要な施設の基本事項や運用状況を理解するとともに、維持管理の現況を認識し問題点、課題を自ら抽出することである。本マニュアル（案）は、自己点検の手順、点検項目、問題点の整理方法を示すものである。自己点検により明らかになった問題点や課題については、改善に向けて調査、検討を行い、適切な措置を講ずることが重要である。

河川浄化施設自己点検マニュアル（案）の目次を図-2 に示す。

第 1 章は、自己点検マニュアルの活用について記述している。自己点検マニュアルの目的、自己点検の時期、実施者、内容、実施フロー、チェック様式について記載した。

第 2 章は、河川浄化施設の概要把握（基礎編）について記述している。河川浄化施設の概要把握とは、管理している浄化

目　次

第1章　自己点検マニュアルの活用にあたって
　第1節　自己点検マニュアルの目的
　第2節　自己点検の時期
　第3節　自己点検の実施者
　第4節　自己点検の内容
　第5節　自己点検実施フロー
　第6節　自己点検チェック様式
第2章　河川浄化施設の概要把握（基礎編）
　第1節　既往資料の確認
　第2節　浄化施設の基本事項の確認
　第3節　点検結果の整理
第3章　維持管理現況の把握（管理編）
　第1節　維持管理体制及び計画の確認
　第2節　管理記録の確認
　第3節　設計条件（計画値）、維持管理計画と実績値（時速値）との比較・確認
　第4節　点検結果の確認・整理
第4章　現場施設の確認（点検編）
　第1節　接触酸化（礫・接触材）浄化施設
　第2節　植生浄化施設
　第3節　凝集沈殿施設
　第4節　点検結果の確認・整理
第5章　その他
　第1節　苦情対応
　第2節　緊急時、水質事故時対応
　第3節　その他
第6章　点検結果のとりまとめ
　第1節　問題点・課題の整理
　第2節　改善・見直し行動計画
チェックシート一式
資料編

図-2　河川浄化施設自己点検マニュアル（案）目次

施設の設計条件、設計諸元、施設構造、浄化手法、運用計画などについて管理実務者が把握するために、既往報告書、各種計画書について存在の有無、保管状況を確認するとともに、その概要を理解するものである。

第 3 章は、維持管理現況の把握（管理編）について記述している。現在実施されている維持管理の体制、管理計画、緊急時対応などの維持管理体制と個々の管理記録を確認し、現状での維持管理実態を明らかにするとともに、問題点や課題を抽出するための現状把握である。

第 4 章は、現場施設の確認（現場編）について記述している。現場施設の確認は、第 2 章の河川浄化施設の概要把握（基礎編）で示した施設の構造や浄化手法などの基本事項の理解、第 3 章の維持管理現況の把握（管理編）で示した維持管理の実情の確認により、施設の維持管理上の問題点、課題の現状を把握した上で、実際の施設において問題点および課題を確認するものである。点検にあたっては、実際に日常管理や定期点検を行っている担当者（河川巡視者あるいは委託者）、水質観測を行っている担当者（委託を含む）といっしょに廻り、詳しい説明を聞くとともに、現場サイドでしか分からないような細かな問題点などについてもヒアリングなどにより確認することが重要である。なお、この章では、各施設でのポイント点検に重点を置いた上で、施設全体の状況も確認できる手順で整理している。従って、管理記録のチェックで十分と判断された事項についての現場確認は省略する場合もあるものと考える。

第 5 章は、その他として、苦情対応、緊急時・水質事故時対応と施設の特殊性に関して当該施設に特有な事情がある場合は整理して記載することとした。

また、チェックシート一式と河川浄化施設の自己点検にあたって必要となる整理表、維持管理体制図表、維持管理計画書、各種管理記録書の書式を資料編として整理した。

４．まとめ

平成 17 年度は、国土交通省河川局河川環境課、国土技術政策総合研究所河川環境部、北海道開発局建設部、各地方整備局河川部・技術事務所をメンバーとする水質連絡会で河川浄化施設の設計・運用について議論してきた内容をもとに「河川浄化施設の事例集」及び「河川浄化施設自己点検マニュアル（案）」を整理し、まとめた。

これらは、既存施設の持続的な機能発揮を図るための適切な管理・運用に有効利用されるとともに今後の施設設計の参考になるものと期待する。

河川底質のダイオキシン類対策におけるモニタリング技術の実用化研究

研究予算：運営交付金（一般勘定）
研究期間：平 15～平 17
担当チーム：水循環研究グループ（水質）
研究担当者：鈴木穣，小森行也

【要旨】　(200-300 字)
平成 12 年の「ダイオキシン類対策特別措置法」の制定により、ダイオキシン類に対して適切な対応を取ることが必要となった。14 年 7 月 22 日にはダイオキシン類の底質環境基準が告示され、基準値（150 pg-TQE/g）超過の場合にあっては、水への溶出及び巻き上げ等を低減するための何らかの対策をとる必要がある。ダイオキシン類対策において、汚染範囲の特定、対策施工中の管理など調査対象となる試料数が多くなることが予想されることから、簡易測定手法と連続監視装置の利用が現場で必要である。本研究は、河川底質のダイオキシン類対策における簡易測定手法の開発とダイオキシン類の連続監視装置の開発を目標として実施した。

キーワード：ダイオキシン類、簡易測定、モニタリング、濁度、浚渫工事

１．はじめに

平成 12 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、平成 14 年 7 月 22 日に環境省告示第 46 号によりダイオキシン類（DXNs）に関する「水底の底質」の環境基準（基準値:150 pg-TEQ/g 以下）が示された。DXNs の定期モニタリング調査等により基準値を超える高濃度汚染が判明したところにあっては対策の実施が必要である。「ダイオキシン類対策特別措置法に基づく底質環境基準の施行について（通知）」[1]（以下、通知）によると底質において環境基準値を超える汚染が判明した場合は、対策を講じることとされているが、まず、どこが最も汚染されていて優先的に対策を講じる必要があるかを見極める必要がある。現在、底質の DXNs 分析は、「ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル」[2]（以下、公定法）に準拠して行われている。公定法では高度な前処理技術と高分解能 GC/MS という高価な分析装置を要し、分析結果を得るまでに 1 ヶ月程度の期間を要する場合が多い。高濃度汚染の汚染範囲を詳細に調査する場合、公定法では、より正確な結果が得られる反面、結果を得るまでに時間が掛かる等課題も多い。そこで、迅速に DXNs 濃度を知る方法（以下、簡易分析手法）があれば、これらの方法を用いて高濃度汚染範囲を容易に知ることも可能になる。そのため、対策実施のためにも簡易分析手法の開発が望まれている。

DXNs の簡易分析手法については、これまでにも多くの報告があり、DXNs そのものを測定する方法[3),4),5),6),7)]と、DXNs と相関があるとされる代替指標を測定する方法[8),9)]に大別される。これらの方法は、土壌や排ガス、焼却灰等に適用した例は多いが、底質を対象とした例は少ない。

河川底質の DXNs 対策実施を想定すると、調査段階、工事段階、工事終了後において DXNs の測定が必要となる[10)]。「調査段階」では汚染範囲の確認調査及び工事の影響範囲調査、「工事段階」では工事境界での底泥の巻き上げ状況把握、上下流への輸送状況の監視、工事区域外の水質、底質への影響及び中間処理・処分施設等の監視を行う。「工事終了後」では汚染現場の改善効果の把握、底質処分場の環境影響を監視する目的でモニタリングを実施する。モニタリングでは多数の試料の迅速な測定、対策中の監視とフィードバックが必要となることから、迅速で低コストの方法であることが望ましい。通知において、簡易分析手法の適用は「汚染範囲確定のための詳細調査範囲を絞り込む場合に用いることは差し支えない」とされている。従って、調査段階における汚染範囲確認調査においては簡易分析手法の適用が可能である。他の工事段階では、簡易分析手法の適用は明確化されてはいないが、公定法を用いて DXNs 濃度をモニターした場合、分析結果が得られるまで工事が進捗しないなど課題も多い。このため、他の工事段階においても簡易分析手法を適用できる可能性が高いと考えられる。しかし、簡易分析手法であっても分析信頼性の確認は重要であり、その方法の特徴を十分把握した上で目的にあった利用が必要である。

２．簡易分析手法による DXNs の測定

本研究の目的は、これまで提案されている DXNs の簡易分析手法が底質汚染の見られる現場において汚染範囲の確認に利用できる可能性があるか、また、利用の際の信頼性の評価方法について、実際の汚染現場の底質試料を用いて検討することにある。ここでの利用シナリオとしては、汚染現場の底質汚染の範囲確認を目的とする場合に絞り込む。対象とした簡易分析手法は、土木研究所が公募した「底質ダイオキシン類の簡易測定技術の開発に関する共同研究」に対し応募のあった、抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイによる方法、抗 Ah レセ

プター複合体抗体を用いたイムノアッセイによる方法と四重極 GC/MS による方法、半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定する方法とした。また、測定方法と並んで重要な要素として、乾燥･抽出･精製の前処理のプロセスがある。この方法として、時間の掛かる乾燥（風乾）を行わずに抽出が可能な高速溶媒抽出法 [11]、加熱流下抽出法 [12] について検討を行った。精製については、公定法の多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーを簡略化した 5 層シリカゲルカラムクロマトグラフィーついて検討した。

２．１　方法

２．１．１　測定方法

抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイによる方法､抗 Ah レセプター複合体抗体を用いたイムノアッセイによる方法では、共同研究を実施した第一ファインケミカル（株）の ELISA キット（DELFIA TCDD Test Kit：以下 ELISA(DT2)）、積水化学工業（株）・（株）矢内原研究所・大塚製薬（株）・東洋建設（株）グループの ELISA キット（エコアッセイ®ダイオキシン ELISA キット：以下 ELISA(ECO)）及び（株）クボタの Ah レセプターバインディングアッセイ（Ah-イムノアッセイ TM：以下 Ah-IA）を用いた。それぞれの測定方法についてはメーカーの説明書に従って実施した。

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

半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定する方法は、燃焼－電量滴定装置により全有機ハロゲンを測定する方法（以下、SNVOX）と燃焼－イオンクロマトグラフ装置により塩素イオンを測定する方法（以下、SNVOCl）について検討した。試験方法については文献 9 に従った。

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

２．１．２　前処理方法

風乾・ソックスレー抽出を用いた公定法のほか、乾燥・抽出を簡易化した高速溶媒抽出法 [11]、加熱流下抽出法 [12] について検討した。高速溶媒抽出法は、湿泥をアセトン(120℃、10.3MPa、20 分)で抽出した後、トルエン(160℃、10.3MPa、20 分）で抽出し、各抽出液を合わせて次の精製操作を行った。加熱流下抽出方法は、湿泥をエタノール脱水法を用いて水分を除去した後、抽出カラムに充填し常圧下においてカラム上部から加熱したトルエンを一定速度の押し出し流れで通液し抽出する方法である。抽出時間は、高速溶媒抽出で約 40 分、加熱流下抽出で約 2 時間であり、約 1 週間の風乾、ソックスレー抽出の 16 時間に比べ大幅に短縮できる。

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

２．１．３　前処理法と測定方法の組み合わせ

本研究で実施した前処理と測定の組み合わせを図-1 に示した。ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS（2378D）と SNVOX、SNVOCl では前処理の組み合わせは異なるものの、いずれも 5 つの前処理である。本検討では大量の底質を一括抽出した後、抽出液を分割し種々の精製を行いそれぞれ異なる測定方法により測定した。

２．１．４　測定試料

検討試料は、表-1 に示す 5 河川の汚染された底質 20 検体である。A 河川では 5 地点、B 河川では 9 地点、C 河川では 1 地点、D 河川では 4 地点、E 河川では 1 地点で、エクマンバージ型採泥器を用いて表層 10～20cm を採取した。

A 河川の A-①から A-④の底質は、total TEQ に占める PCDDs の割合は 50.3～59.1%、PCDFs が 35.8～43.2%、Co-PCBs が 4.5～6.5%であり異性体構成も同様であったが、A-⑤は、PCDDs が 23.9%、PCDFs が 35.0%、Co-PCBs が 41.1%と A-①から A-④の底質に比べ Co-PCBs の割合が高い異性体構成であった。B 河川の B-①から B-⑧の底質は、PCDDs が 31.0～41.2%、PCDFs が 30.5～51.6%、Co-PCBs が 13.4～37.2%であり A 河川の底質と比べると PCDDs が低く PCDFs、Co-PCBs の割合が高い異性体構成であった。B-⑨の底質は、PCDDs が 78.1%、PCDFs が 11.6%、Co-PCBs が 10.3%であり他の底質とは異なり PCDDs の占める割合が高い異性体構成であった。

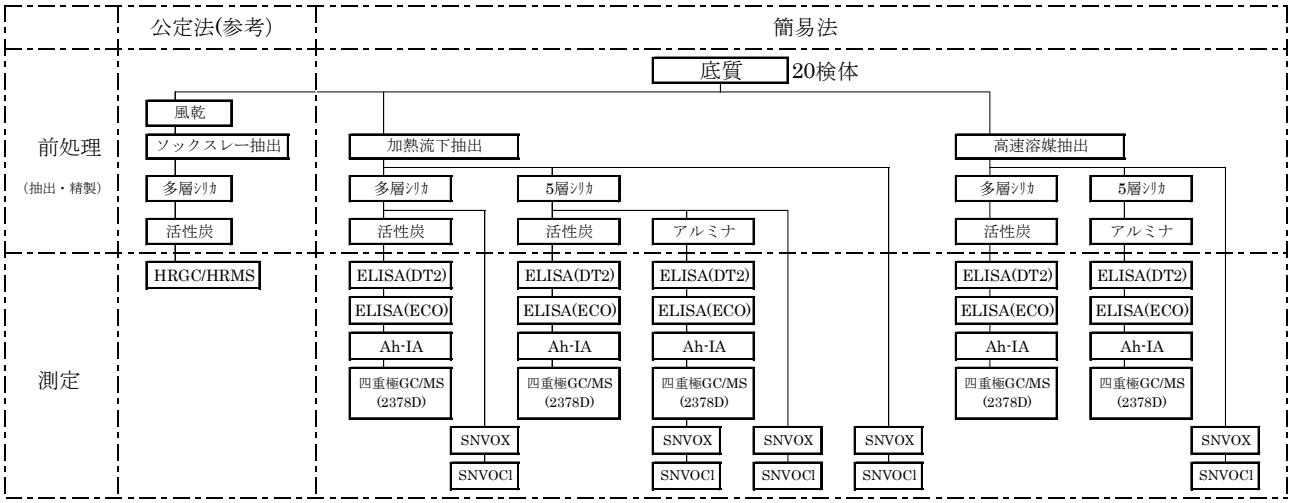


図-1　簡易分析手法による DXN s 測定検討フロー

表-1　検討試料一覧

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

C 河川、D 河川、E 河川の底質は、D-②の底質が PCDDs が 13.2%、PCDFs が 76.2%、Co-PCBs が 10.6%であり PCDFs の占める割合が高い底質であったが、他は PCDDs が 29.1～36.0%、PCDFs が 42.4～47.6%、Co-PCBs が 18.2～26.9%であり B 河川の B-①から B-⑧と似通った異性体構成であった。

２．２　結果

測定結果は、ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA は、標準物質である 2,3,7,8-TCDD 換算の DEQ 値（Dioxin Equivalent Quantity）として、四重極 GC/MS 法は、測定対象とした異性体量として、また SNVOX および SNVOCl は、ハロゲン総量あるいは塩素換算量として表示される。

簡易分析手法の測定結果は、そのまま DXNs 量として表示されるわけではなく、公定法に基づき毒性等量（TEQ: Toxic Equivalent Quantity）値を別途測定、その結果と簡易分析手法での前述した測定値との相関関係を把握し回帰式を求め、それに基づき濃度未知の試料を簡易分析手法の測定値から DXNs の TEQ を推定することになる。一般に、簡易分析手法と公定法との相関をとる場合、X 軸を簡易法の測定値（ｘ）、Y 軸を公定法の TEQ（ｙ）とし、回帰線を線形、べき乗等とする。ここでは、回帰線をべき乗とした場合の結果で以下議論する。つまり $y = a \times b$（$\log y = b \cdot \log x + \log a$）とし、a、b は定数である。また相関係数は、両対数を取って線形化した場合の値である。

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

２．２．１　公定法と簡易分析手法の相関性

簡易分析技術による測定値と公定法による DXNs 測定値（pg-TEQ/g）の相関を表－２に示した。測定方法から整理すると、ELISA(DT2)は、加熱流下抽出＋5 層シリカ＋アルミナの組み合わせを除きどの前処理との組み合わせにおいても相関係数(r)が 0.5～0.6 であった。ELISA(ECO)は、加熱流下抽出＋多層シリカ＋活性炭、高速溶媒抽出＋5 層シリカ＋アルミナの組み合わせ以外で r が 0.6～0.7 であった。Ah-IA は、加熱流下抽出＋多層シリカ＋活性炭、高速溶媒抽出＋多層シリカ＋活性炭の組み合わせで r が 0.6 であった。四重極 GC/MS(2378D)は、加熱流下抽出＋5 層シリカ＋アルミナの組み合わせを除いて、どの前処理との組み合わせにおいても r が 0.7 を超えていた。なかでも高速溶媒抽出＋多層シリカ＋活性炭の組み合わせは r が 0.891 であった。2,3,7,8-TCDD が四重極 GC/MS で測定可能な濃度であったこと、TEF（Toxicity Equivalent Factor: 毒性等価係数）を持つ異性体構成が類似していたことが要因として考えられる。

表-2　公定法と簡易分析手法の関係

検出方法	抽出方法	精製方法		logy=b･logx+a　(n=20)		
				b	a	r
ELISA(DT2)	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	0.46	15.5	0.535
		5層シリカ	活性炭	0.56	5.30	0.594
			アルミナ	0.39	15.4	0.365
	高速溶媒抽出	多層シリカ	活性炭	0.47	12.8	0.592
		5層シリカ	アルミナ	0.46	11.6	0.565
ELISA(ECO)	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	0.32	19.6	0.368
		5層シリカ	活性炭	0.66	1.26	0.614
			アルミナ	0.61	2.51	0.711
	高速溶媒抽出	多層シリカ	活性炭	0.41	6.74	0.672
		5層シリカ	アルミナ	0.75	0.65	0.382
Ah-IA	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	0.56	5.61	0.610
		5層シリカ	活性炭	-0.14	447	0.225
			アルミナ	0.21	35.7	0.298
	高速溶媒抽出	多層シリカ	活性炭	0.38	11.6	0.608
		5層シリカ	アルミナ	-0.03	202	0.036
四重極GC/MS (2378D)	加熱流下抽出	多層シリカ	活性炭	0.30	100	0.710
		5層シリカ	活性炭	0.27	105	0.773
			アルミナ	0.25	119	0.612
	高速溶媒抽出	多層シリカ	活性炭	0.37	79.7	0.891
		5層シリカ	アルミナ	0.29	93.0	0.789
SNVOX	加熱流下抽出	多層シリカ		0.43	249	0.614
		5層シリカ	アルミナ	0.63	239	0.650
		5層シリカ		0.57	140	0.433
		精製なし		0.50	32.5	0.589
	高速溶媒抽出	精製なし		0.58	22.3	0.632
SNVOCl	加熱流下抽出	多層シリカ		0.44	254	0.624
		5層シリカ	アルミナ	0.63	239	0.645
		5層シリカ		0.72	165	0.604
		精製なし		0.51	32.9	0.600
	高速溶媒抽出	精製なし		0.56	24.2	0.627

（注）y: 公定法測定値、　x: 簡易測定手法測定値

SNVOX は、加熱流下抽出＋5 層シリカを除きどの前処理との組み合わせにおいても r は 0.6 程度であった。SNVOCl は、どの組み合わせにおいても r は 0.6 程度であった。r が 0.7 を超えた組み合わせについて回帰式の傾きを比較すると四重極 GC/MS(2378D)で測定したケースで傾きが小さく(0.27～0.37)、TEQ 濃度差が小さい試料間の区別判定の観点からも優れている結果となった。

２．３　考察

２．３．１　簡易分析手手法の現場への適用

簡易分析法の現場へ適用する場合として、次の2つのケースが考えられる。

⑴ 高濃度汚染分布の推定

公定法と簡易分析手法の関係（回帰式）から底質中の DXNs 濃度を求め、高濃度汚染範囲を推定する場合であり、公定法と簡易分析手法の相関の強さによって、推定の誤差が大きく影響する。誤差を含むことを前提として大まかな汚染濃度分布を予測し、範囲確定のためには公定法によって最終的な測定を行い汚染範囲を確定することが必要である。

(2) 基準値（150 pg-TEQ/g）の超過の判定

簡易分析手法による推定値を基準値超過の有無の判定に適用する場合であり、推定する値が低めに見積もられるよう回帰式の信頼区間の上限値を用いてTEQを推定することが考えられる。信頼区間の上限値としては、一般に 90%、95%、99%などが考えられるが、判断の重要性によって信頼度を決定する必要がある。

２．３．２　公定法と簡易分析手法の回帰式選択の妥当性

２．２では、公定法と簡易分析手法の相関を回帰線がべき乗となる場合で議論したが、直線回帰とべき乗回帰それぞれで関係式を求め、両者の違いを議論するため、ELISA(DT2)の関係を例として図-2 に示した。

公定法と簡易分析手法の相関を相関係数で比較すると大きく異なることはなく、両者に大きな違いはみられない。ここには示していないが、このほかの場合においても同様な傾向にあった。したがって、公定法と簡易分析手法の関係式を用い高濃度汚染の範囲を推定する場合には、いずれの回帰式を用いても大きな違いはないと考えられる。しかし、底質環境基準値（150 pg-TEQ/g）を超過しているか否かの判定に使用する場合では、簡易分析手法のデータの信頼性を考慮し･%（例えば 95%）信頼区間の上限値を用いて TEQ を推定する方法が考えられる。この場合、図-2 からも明らかなように直線回帰では 95%信頼区間の上限曲線のy切片は基準値（150 pg-TEQ/g）を超えており、簡易分析値が仮に 0

pg/g であった場合でも許容されない結果となる。一方、べき乗回帰を用いた場合、低濃度側において信頼区間の幅が収れんされるためそのようなことが起こりにくい。
以上のことから公定法と簡易分析法との関係式から TEQ を推定する場合にあってはべき乗回帰を用いる方が実用的であると考えられる。

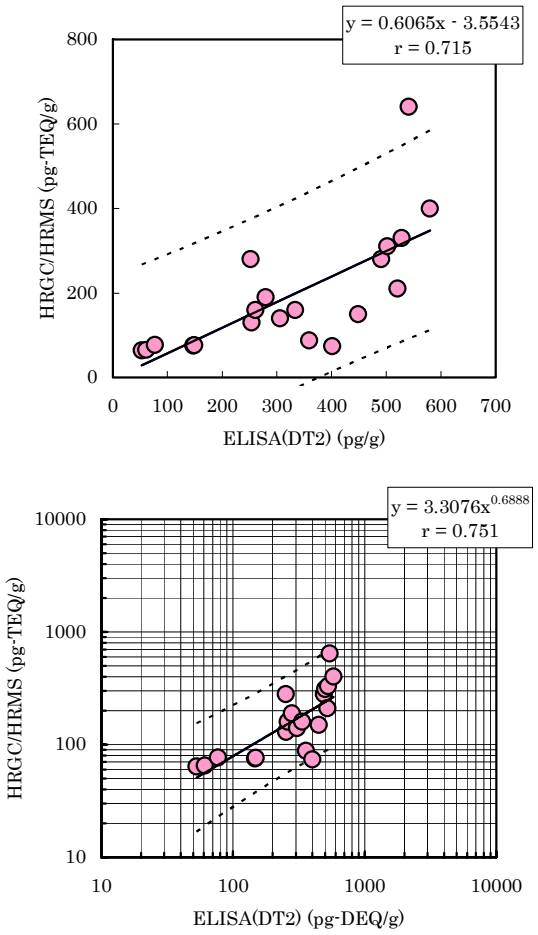


図-2　公定法測定値（pg-TEQ/g）と ELISA(DT2)の関係
（点線は95%信頼区間）

２．３．３　回帰線の信頼区間の取り方

簡易分析手法によってある基準値を超過しているか否かの判定等に適用する場合、測定値の信頼性を考慮する必要がある。例えば、図-3 のように ELISA(DT2)を例にすると、環境基準値 150 pg-TEQ/g に相当する ELISA(DT2)の測定値は、回帰線上の値である 254 pg-DEQ/g の可能性が最も高い。この値(254 pg-DEQ/g)をもって基準値超過を判定しようとすると、基準値を超える可能性もあることから、安全サイドとなるようにα％の信頼度をもつ回帰線の信頼区間の上限値を用いることが必要となる。・としては、90%、95%、99%などが通常取られる。α＝ 90%が取られたとすれば、y ＝ 150 pg-TEQ/g に相当する 90%の信頼区間上限値の ELISA(DT2)による推定値は 71 pg-DEQ/g となるが、その値に対して最も可能性が高い公定法による値は 62 pg-TEQ/g に相当する。従って、環境基準値 150 pg-TEQ/g を 90%信頼区間上限値で推定すると最確値に対し 2.4 倍程度の安全サイドの判定をすることになる。回帰式から推定する値の信頼区間を大きくすると、その推定幅も当然大きくなるため、信頼区間をいくつにとるかについては目的に応じて判断する必要がある。

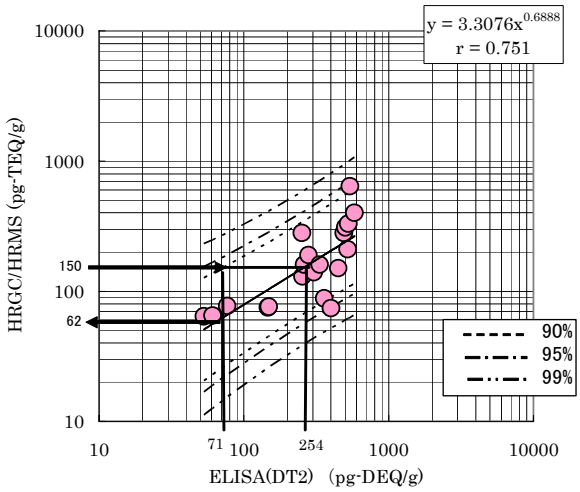


図-3　回帰式の 90%, 95%, 99%信頼区間

２．４　まとめ

本研究で ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS(2378D)、SNVOX、SNVOCl の 6 つの検出方法と抽出方法・精製方法の簡易化について 30 の組み合わせを対象に、20 試料の底質を用いて、簡易分析手法と公定法での底質 DXNs 濃度との関係を比較検討した結果以下の結論を得た。

（１）簡易分析手法と公定法との相関性は、四重極 GC/MS(2378D)がどの前処理との組み合わせでも比較的高い相関関係にあり、なかでも高速溶媒抽出＋多層シリカ＋活性炭の組み合わせの相関性が最も良好であった。

（２）公定法と簡易分析手法の相関で使用する回帰式は、直線回帰とべき乗回帰でも決定係数は大きく異なることはないが、基準値（150 pg-TEQ/g）を超過しているか否かの判定に使用する場合にあっては、直線回帰では信頼区間を考慮した判定が不可能な場合があることから、べき乗回帰を用いる方が実用的である。

３．四重極 GC/MS による簡易測定手法を用いた小河川の DXNs 汚染調査

平成 16 年 7 月に「河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（案）」[13]が示された。マニュアルで示されている測定方法のうち GC/MS 法は、試料前処理後、

四重極GC/MS等を用い毒性等価係数(TEF)を持つDXNs異性体（29化合物）を個別に定量し、それぞれの定量値にTEFを乗じ毒性等量（TEQ）を求める方法である。高価な高分解能GC/MSを使用することなくDXNsの定量が可能となったものの、その分析操作は未だかなり繁雑である。本研究は、より簡易な測定方法として特定の1異性体を汎用的なGC/MSである四重極GC/MSにより定量し、その定量値からTEQを求める方法の現場適用可能性について検討した。

３．１　方法

３．１．１　検討試料

検討試料は、都市域の小河川（川幅約36m）の約1,000mの区間において、等間隔を基本としながら、過去の調査により高濃度汚染が明らかな地点にあっては密に25試料を採取した。エクマンバージ型採泥器を用いて表層10～20cmを採泥した。採取した25試料について公定法による測定を行った。25試料のDXNs濃度は、81～19,000 pg-TEQ/g（中央値：210 pg-TEQ/g）、total TEQに占めるPCDDsの割合は0.5～34.4%、PCDFsが34.4～99.2%、Co-PCBsが0.3～34.6%であり、PCDFsの割合が高い試料であった。

３．１．２　測定方法

四重極GC/MSによる方法は、高速溶媒抽出法11）により抽出し、濃縮・精製した試料をガスクロマトグラフ（6890N series GC system, Hewlett Packard）を用い、TEFを有するPCDDsの7異性体とPCDFsの10異性体を同一の分離カラム（BPX-DXN(SGE)）により分析、Co-PCBsの12異性体を分離カラムRH-12ms（INVENTX）により分析する方法とした。前処理試料1μlをスプリットレス方式により導入し、昇温（130□(1min) → 15□/min → 210□(0min) → 3□/min → 290□(0min) → 10□/min → 330□(hold)）分析した。各異性体の定量は、質量分析計（5973N MSD, Hewlett Packard）を用い、SIMにより行った。

３．１．３　特定異性体の定量値によるTEQの推定

2. 簡易分析法によるDXNsの測定の四重極GC/MSによる方法では2,3,7,8-TCDDの測定値と公定法のTEQの関係について検討を行ったが、ここでは再度以下の手順に従い特定異性体の選定を行った。

（１）簡易測定に用いる特定異性体の選定手順

公定法による測定を行った25試料の分析結果を用い以下の手順で特定異性体の選定を行った。

1）TEQとの相関が高い異性体を選定。公定法で測定する全異性体32化合物について、各異性体とTEQの相関を求め、べき乗回帰の相関係数(r)が高い異性体を選定。

2）四重極GC/MSで測定する異性体を選定。TEFを持たない異性体1,2,7,8-TeCDFを除いた。

3）四重極GC/MSにより安定して測定が可能な高濃度に存在する異性体を選定。25試料の測定において検出下限値以下の定量結果があった異性体2,3,4,7,8-PeCDF、1,2,3,7,8-PeCDFを除いた。

4）以上の結果、2,3,7,8-TeCDF、2,3,4,6,7,8-HxCDFを簡易測定に用いる特定異性体候補とし、以下の検討では2,3,7,8-TeCDFを特定異性体とした。

（２）特定異性体（2378-TeCDF）の定量値によるTEQの推定

実際に四重極GC/MSによる2,3,7,8-TeCDFの定量値(以下、四重極GC/MS(2378F)）からTEQを推定する場合は、複数の試料について公定法での測定も行い、四重極GC/MS(2378F)と公定法によるTEQの関係式からTEQを推定することになる。本検討では、25試料の中から四重極GC/MS（2378F）の定量値を基に、最大値、最小値、中央値及びまたその中間値から5試料を選出した。選出した5試料の公定法と四重極GC/MS(2378F)の関係（5点検量線）を用い25試料のTEQを推定した。

３．２　結果と考察

本検討に供した試料を採取した小河川（川幅約36m、調査区間約1,000m）の底質DXNsの濃度分布を図-4に示した。また、各測定法による結果を基に推定した濃度分布から調査区間の濃度分布割合を求め図-5に示した。公定法と四重極GC/MS(2378F)の結果を比較すると、150 pg-TEQ/g以下の占める割合が大きく、150-300 pg-TEQ/gの占める割合が小さい結果となったが、300 pg-TEQ/g以上の占める割合は同等であった。公定法の結果と異なる結果となったものの、容易に濃度分布の傾向を知ることが可能であり、DXNsの高濃度汚染範囲の予測に用いる簡易分析手法として現場への適用可能性が確認された。

３．３　まとめ

四重極GC/MS(2378F)の方法により小河川のDXNs汚染調査を行った結果、公定法の値と比較し150 pg-TEQ/g以下の占める割合が大きく、150-300 pg-TEQ/gの占める割合が小さい結果となったが、300 pg-TEQ/g以上の占める割合は同等でありDXNsの高濃度汚染範囲予測に用いる簡易分析手法としての適用可能性が確認された。

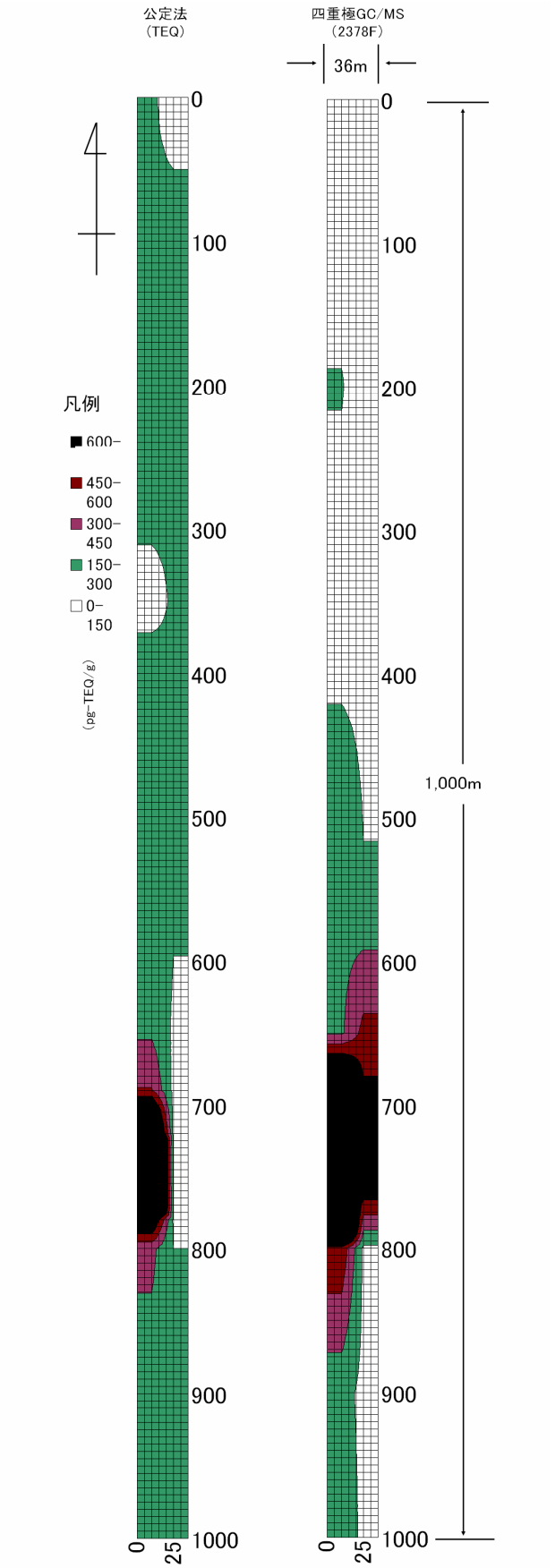


図-4　小河川における DXNs 汚染調査結果

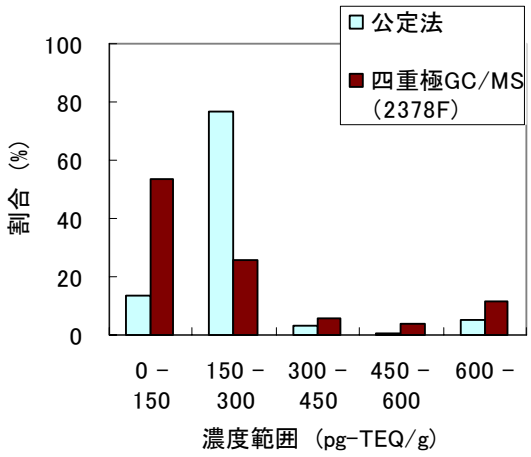


図-5　調査区間の DXNs 濃度分布

４．浚渫工事中の濁度の連続モニタリング

汚濁した河川環境改善の一つとして浚渫等、河川底質の掘削除去による方法がある。浚渫工事では、掘削による底泥の巻き上げが十分予想されるが、巻き上げられた底泥にはダイオキシン類等有害物質が含まれている可能性があり、これらによる下流への二次汚染が懸念される。本研究は、浚渫工事中の濁度を連続モニタリングし、底泥巻き上げによる下流側への二次汚染の影響を監視するための安価で操作・メンテナンス性がよい連続濁度モニタリングシステムの開発を目的とし、(株) 鶴見精機と「共同研究」を実施した。

４．１　濁度モニタリングシステム

濁度センサ及びデータロガーは市販されているもので、データロガーは 8 チャンネルの電圧入力値をコンパクトフラッシュカードに記録できる。濁度センサの濁度測定方式は後方散乱光方式で、センサの光源から赤外線を照射し、水中の粒子に当たって散乱する散乱光の強さを受光部で受け、電圧に変換して出力する。濁度センサから出力された電圧はデータロガーに入力され、電圧値として記録される。本濁度計のシステム概念図を図-6 に示す。

４．２　調査実施地点

調査は、埼玉県草加市綾瀬川蒲生大橋付近において国土交通省江戸川工事事務所が河川環境整備事業として実施している河川底泥の浚渫現場で行った。試験現場の周囲は住宅街となっており、通常時の濁度は 5〜15ppm、平均で 10ppm である。綾瀬川では川の底に溜まった土砂やヘドロを取り除き、洪水時の流量確保と、水質環境改善を目的として浚渫工事を行っており、その間に試験を実施した。

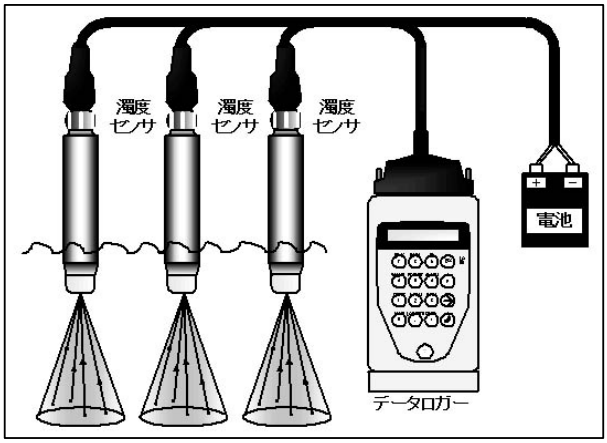


図-6　濁度モニタリングシステム概念図

４．３　調査方法

４．３．１　汚濁防止枠の効果（調査 1）

浚渫船に取付けられた汚濁防止枠には、バックホーによる浚渫で巻き上げられた底泥が枠の外側へ流出するのを防ぐため、長さ 1m 程度の膜が取付けられている。膜により汚濁防止枠の内側と外側で濁度がどのように変化するかを確認するため、内側と外側の水深 50cm 位置に濁度計を設置し、連続モニタリングを行った。なお、河川の濁度監視の為、浚渫の影響がない上流にも濁度計を設置しモニタリングを行った。

４．３．２　鉛直方向の濁度変化（調査 2）

浚渫により巻き上がった底泥による浚渫位置より下流側での変化を確認するため、また水深の違いによる濁度の変化を確認するため、浚渫船下流側後方 1m 付近に濁度計 3 台を水深 40cm、90cm、140cm の位置に設置し、連続モニタリングを行った。また、浚渫位置から下流側へ約 50m 離れた地点に濁度計を設置しモニタリングを行った。

４．３．３　下流方向の濁度変化（調査 3）

浚渫工事位置より下流側に離れるほど底泥が沈降していくため、濁度は低下していくと考えられる。そこで、浚渫工事位置から離れたときの濁度の変化を確認するため、また水深による濁度の変化を確認するため、ボートに調査 2 で用いた濁度計を水深 40cm、90cm、140cm の位置に設置し、下流側へ移動しながらモニタリングを行った。調査の概念図を図-7、図-8、調査の様子を写真-1 に示した。

４．４　調査結果

４．４．１　調査 1 の結果

試験 1 の結果を図-9 に示す。図-9 は 1 秒の瞬時値を表したものであるが、モニタリング結果は、枠外側濁度で 3000ppm 以上、枠内側濁度で 2000ppm 以上の値を計測した。瞬間的な高濃度の値は、モニタリング中に、巻き上げられた底泥やゴミ等が濁度センサの計測面に触れたことが原因と考えられる。ここでは 10 分間の平均的な濁度

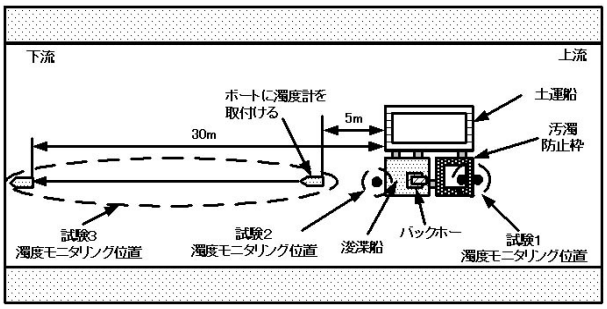


図-7　調査の概念図（その 1）

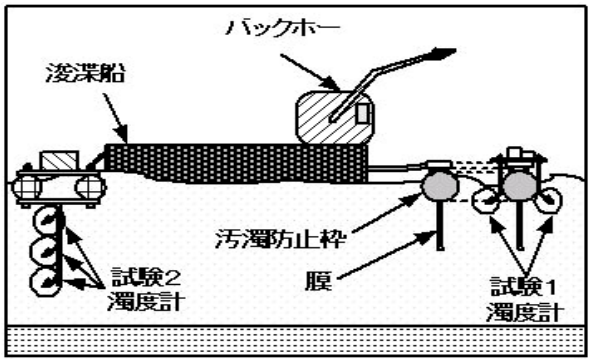


図-8　調査の概念図（その 2）

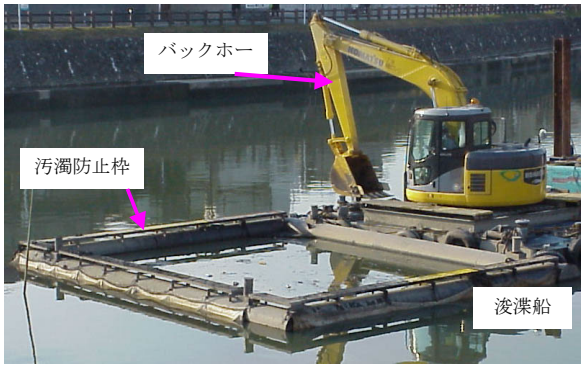


写真-1　調査の様子

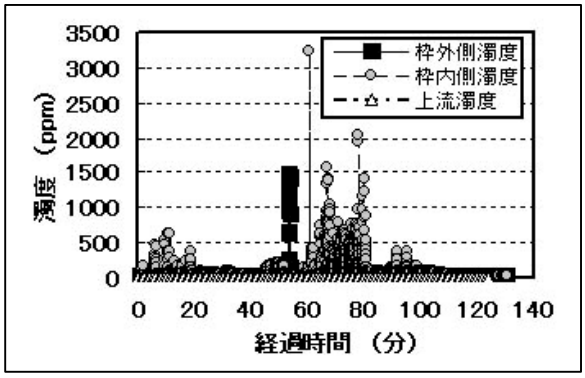


図-9　瞬時濁度のモニタリング結果（調査 1）

変化を用いて評価することとした。10 分平均値の結果を図-10 に示す。

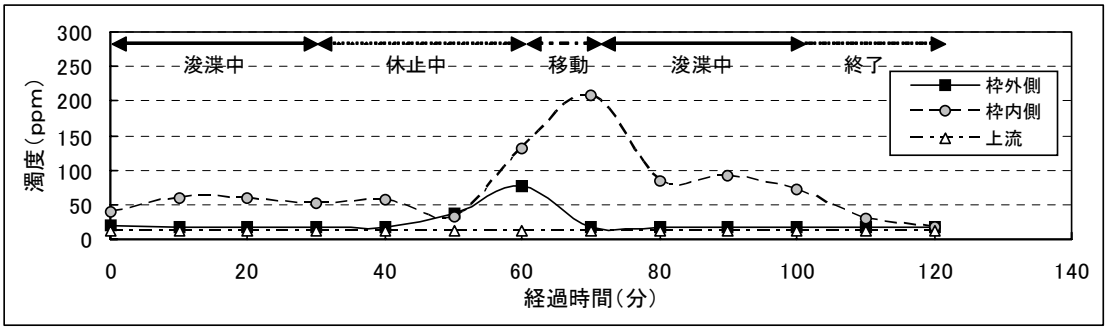


図-10　調査 1 の結果（10 分平均値）

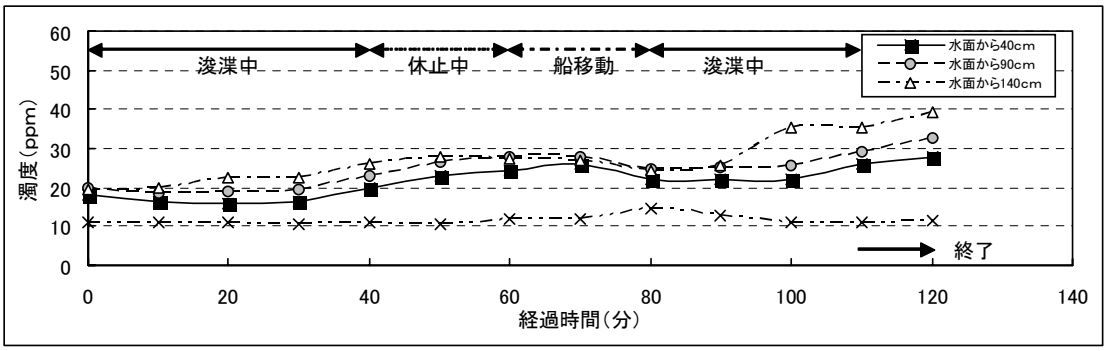


図-11　調査 2 の結果（10 分平均値）

浚渫工事の流れは図-10 に示しているように浚渫、休止、移動を行っていた。濁度のモニタリングは浚渫開始から 120 分継続した。浚渫工事中は汚濁防止枠の内側と外側で濁度の差が大きいが、浚渫休止、浚渫終了後は内側の濁度が下がり、外側の値に近くなり、経過時間 120 分では枠内外、上流の値がほぼ同じとなっている。
経過時間 50 分から 70 分の濁度が高くなっているが、この原因として、浚渫船の移動、上流から流れてきたゴミ等の影響を受けたことが考えられる。
上流に設置した濁度計は浚渫工事中、終了後も全く変化がなく、常に 12ppm 前後であった。

４．４．２　調査２の結果

試験 2 の結果を図-11 に示す。
試験 2 も試験 1 と同様に 1 秒サンプリングで 10 分平均した値を表している。
浚渫工事の流れは図-11 に示しているように浚渫、休止、移動を行っていた。
水深が深いほうの濁度が高いことから、汚濁防止枠内で巻き上げられた底泥は膜から流出し、下流へ沈降しながら移動していることが推測される。
また、試験 1 とは異なり、浚渫休止中、終了後でも、濁度が高くなっている。これは、浚渫を止めても流れ等の影響により巻き上げられた底泥がしばらく下流に流れるためと考えられる。

４．４．３　調査３の結果

試験 3 の結果を図-12 に示す。
濁度は 1 秒サンプリングで 7 秒平均した値を 1m としている（ボートが 7 秒で 1m 進むため）。
浚渫工事の流れは図-12 に示しているように枠外側を浚渫していた。
距離が離れるにつれ、徐々に濁度は低くなっているようだが、通常時濁度 10ppm を考慮すると、30m 程度離れても浚渫の影響があることがわかる。
また、浚渫船から 25m 付近までは、水深により濁度に差があるが、30m 付近になると差がなくなっており、ほぼ均一になっている。

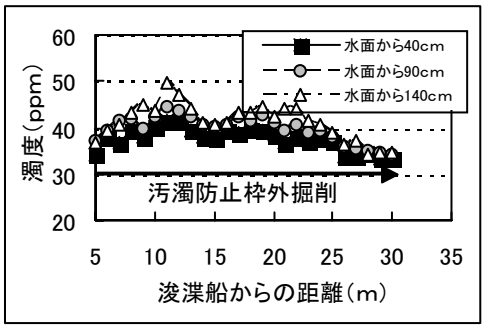


図-12　調査 3 の結果

４．５　まとめ

調査結果により、浚渫工事中の濁度は汚濁防止枠内外で差があること、汚濁防止枠内を浚渫しても環境条件(流速、風、雨等)により底泥が膜の外部に流出し下流に影響を与えることを確認した。

また、開発した連続濁度モニタリングシステムは、比較的低濃度の濁度でも確実に記録すること、1 台のデータロガーに複数の濁度計を接続できること、小型でいかなる場所でも設置が可能な装置であることを確認した。

５．まとめ

５．１　河川底質のダイオキシン類対策における簡易測定手法の開発

本研究で ELISA(DT2)、ELISA(ECO)、Ah-IA、四重極 GC/MS(2378D)、SNVOX、SNVOCl の 6 つの検出方法と抽出方法・精製方法の簡易化について 30 の組み合わせを対象に、20 試料の底質を用いて、簡易分析手法と公定法での底質 DXNs 濃度との関係を比較検討した結果以下の結論を得た。

1) 簡易分析手法と公定法との相関性は、四重極 GC/MS(2378D)がどの前処理との組み合わせでも比較的高い相関関係にあり、なかでも高速溶媒抽出＋多層シリカ＋活性炭の組み合わせの相関性が最も良好であった。

2) 公定法と簡易分析手法の相関で使用する回帰式は、直線回帰とべき乗回帰でも決定係数は大きく異なることはないが、基準値（150 pg-TEQ/g）を超過しているか否かの判定に使用する場合にあっては、直線回帰では信頼区間を考慮した判定が不可能な場合があることから、べき乗回帰を用いる方が実用的である。

また、四重極 GC/MS(2378F)の方法により小河川の DXNs 汚染調査を行った結果、公定法の値と比較し 150 pg-TEQ/g 以下の占める割合が大きく、150-300 pg-TEQ/g の占める割合が小さい結果となったが、300 pg-TEQ/g 以上の占める割合は同等であり DXNs の高濃度汚染範囲予測に用いる簡易分析手法としての適用可能性が確認された。

５．２　ダイオキシン類連続監視装置の開発

ダイオキシン類対策を想定した浚渫工事中の濁度の連続モニタリングについて、実際の浚渫工事現場において調査した結果、浚渫工事中の濁度は汚濁防止枠内外で差があること、汚濁防止枠内を浚渫しても環境条件(流速、風、雨等)により底泥が膜の外部に流出し下流に影響を与えることが確認できた。

また、開発した濁度モニタリング装置が比較的薄い濃度の濁度でも確実に記録し、1 台のデータロガーに複数の濁度計を接続でき、いかなる場所でも設置が可能といった安価な簡易モニタリング装置としての実用性とその効果についても確認できた。

［参考文献］

1) 環境省環境管理局水環境部長「ダイオキシン類対策特別措置法に基づく底質環境基準の施行について（通知）」(2002)

2) 環境庁「ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル」(2000)

3) 永柳衍「４重極 GC/MS によるダイオキシン類の簡易測定技術」資源環境対策，37, 921-925 (2001)

4) 大川真「GC/MS/MS によるダイオキシン類の簡易分析」資源環境対策，37, 932-935 (2001)

5) 坂田一登，松本宏和，岡本巧誠，谷岡洋平，藤本昇「高速溶媒抽出法と免疫測定法を組み合わせた迅速ダイオキシン分析技術」資源環境対策，37, 979-983 (2001)

6) 小林康男，中西俊夫「Ah イムノアッセイ TM による環境サンプルのダイオキシン類測定の実例」造水技術，27 (4), 3-8 (2002)

7) 村田弘司「ジーン・バイオアッセイによるダイオキシン類の測定」資源環境対策，37, 970-974 (2001)

8) 前田恒昭「クロロベンゼン・クロロフェノール測定による焼却炉煙道でのダイオキシンの連続測定」資源環境対策，37, 936-941 (2001)

9) 加藤みか「ダイオキシン類の測定を正確かつ大幅に効率化できる方法」第２回効率的な環境管理のための最新の簡易測定技術，エコケミストリー研究会 (2001)

10) 小森行也，八十島誠，田中宏明，南山瑞彦，鈴木穣，伊藤弘之「河川底質のダイオキシン類対策に必要な簡易測定技術」学会誌「EICA」，7(2), 255-258 (2002)

11) 南山瑞彦，落修一，鈴木穣「底質中のダイオキシン類の抽出手法」土木技術資料，44 (7), 40-45 (2002)

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

13) 国土交通省「河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル（案）」 (2004)

水環境中の化学物質が及ぼす生態影響に関する研究

水循環研究グループ水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　宮島　潔
CREST 研究員　原田　新

1. はじめに

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

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

一方、近年において河川水や下水道等の水環境中における、PPCP（Pharmaceuticals and Personal Care Products）の存在に国内外で関心が集まりつつあり、河川表流水や下水処理水中から抗生物質等の医薬品が実際に検出される報告がなされてきている。医薬品等の物質は、その本来の目的において生体作用を持つため、環境中に存在するこれらの物質が水域の生態系にも何らかの影響を及ぼすことが懸念される。しかし、化審法による生態影響試験を課せられている化学物質と異なり、医薬品はそのような評価対象とはなっていないため、これらの物質の持つ生態影響に関するデータは未だ十分とはいえない状況にある。

そこで、本研究においては環境中に存在する化学物質が水生生態系に及ぼす影響について、バイオアッセイ手法を用いて評価するための試験系の検討を目的とした。

なお、ここでは平成 17 年度の成果をとりまとめて報告する。

2. 研究方法

2.1. バイオアッセイに適用する生物種

この研究におけるバイオアッセイに適用する生物は、以下のものを用いることとした。

(1)甲殻類

水圏生態系における甲殻類としては、エビやカニ、カイアシ類やミジンコなど様々な種が存在する。このうち「ミジンコ」は特に生態学的にも特徴的な生物である。湖等の水界において、ミジンコは一次生産者である植物プランクトンを食べ、自らはより高次な魚などに補食される。このことから、植物によって作られた有機物を高次の生物に受け渡すため、食物連鎖における重要な部分を担っている。

また、メダカと同様に毒性試験対象生物として試験方法の標準化も進んでいる。

そこで、広く試験生物として利用されている「オオミジンコ(*Daphnia magna*)」を対象生物種として選定す

ることとした。

(2)藻類

藻類は水圏生態系における主な一次生産者である。そのため、多くの水生動物の餌となり、水中における食物連鎖の起点となる重要な生物群である。

また、上記二種と同様に、毒性試験対象生物として試験方法の標準化も進んでいる。

そこで、広く試験生物として利用されている「緑藻(*Pseudokirchneriella subcapitata* [旧学名：*Selenastrum capricornutum*])」を対象生物種として選定することとした。

2.2. バイオアッセイ手法

2.2.1. 甲殻類

ミジンコ（**写真 1**）を用いたバイオアッセイ手法としては、OECD や JIS[11)]によって標準化された手法があり、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」による届出における生態影響試験法としても規定されている。

試験の内容は、遊泳阻害を視点とする急性毒性物質、繁殖阻害を視点とする慢性毒性試験など、様々なものがあるが、いずれも供試生物を試験前から飼育・順化し、齢数を揃える等の準備が必要となる。この事前準備には飼育装置や飼育水の交換作業、発生仔個体の隔離等に多大な費用と労力が掛かり、限られた施設と人員によって安定した試験を行うことは困難である。

そこで、事前の大掛かりな準備を必要としない手法として、ミジンコを用いた毒性試験のキットを用いることとした。このキットはベルギーの MicroBioTests 社から供給されている、急性毒性試験システム (DAPHTOXKIT F MAGNA™)である。

試験は冷蔵状態で保存したキット附属のミジンコの卵（耐久卵）を試験開始直前に孵化させ、孵った個体を試験に供する。

ミジンコは、試験対象物質の濃度を段階的に変化させた試水中で 24 及び 48 時間曝露した後に、水中で泳いで動き回ることができるかどうかによって、遊泳阻害を判定し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

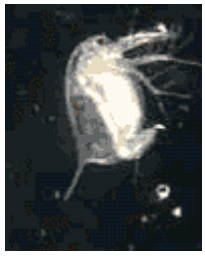


写真 1 ﾐｼﾞﾝｺ

2.2.2. 藻類

藻類を用いたバイオアッセイについても OECD や EPA によって標準化された手法があり、「化審法」における生態影響試験法としても規定されている。

これらの試験法はいずれもフラスコを用いた培養方法を採用しているが、フラスコを用いると 1 検体あたりの培養容量が大きくなるため、結果の誤差を小さくすることができる利点がある反面、大量の試料が必要となるうえ、培養装置の容量面からの制限があることから、一度に処理できる試料数に限界が生じる。

そこで、本研究では Blaise らの方法[12,13)]を参考にして、96 孔のマイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験（**写真 2**）を適用することとした。

試験における培養温度は 24℃，照度 4000Lux，120rpm の振とう条件で培養を行い、培養期間中マイクロプレートリーダー（Wallac 社製，ARVO SX-1420：**写真 3**）を用いて藻類増殖量の変化をモニタリングし、吸光度から細胞数を換算する方法で、96 時間曝露した後に藻類の増殖量から生長阻害率を計算し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。また、一部の物質については最小影響濃度(LOEC)と無影響濃度(NOEC)についても計算を行った。

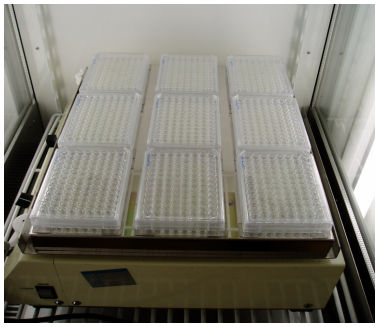


写真 2 ﾏｲｸﾛﾌﾟﾚｰﾄによる培養

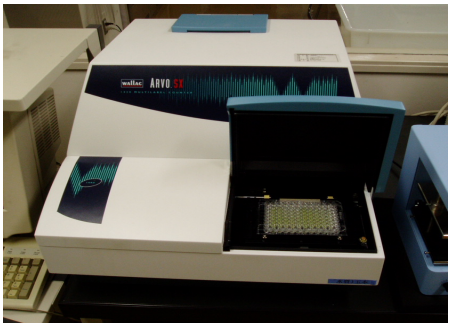


写真 3 ﾏｲｸﾛﾌﾟﾚｰﾄﾘｰﾀﾞｰ

2.3. 対象とする試水及び物質

対象とする試験水（試験物質）は、下記の通りとした。

2.3.1. 甲殻類

甲殻類の試験における対象物質は、近年、河川水や下水道等の水環境中における PPCP（Pharmaceuticals and Personal Care Products）の存在として国内外で関心が集まりつつある医薬品とした。医薬品は河川表流水や下水処理水中から抗生物質等の医薬品が実際に検出される報告がなされてきている。これらの物質は、その本来の目的において生体作用を持つため、環境中に存在するこれらの物質が水域の生態系にも何らかの影響を及ぼすことが懸念される。しかし、化審法による生態影響試験を義務づけられている化学物質と異なり、医薬品はそのような評価対象とはなっていないため、これらの物質の持つ生態影響に関するデータは未だ十分とはいえない状況にある。

表 1 対象医薬品と検出濃度例

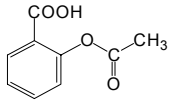
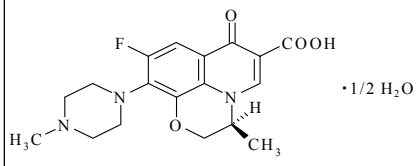
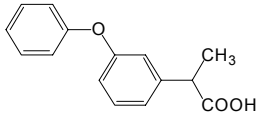
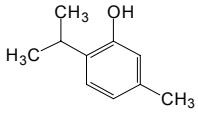
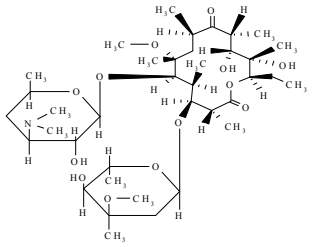
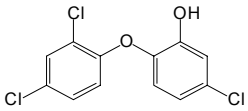
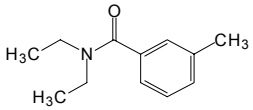
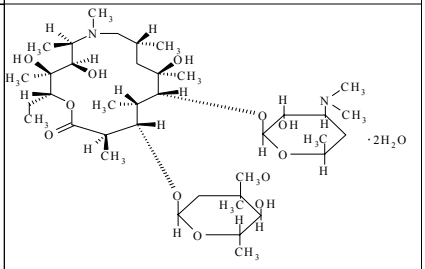
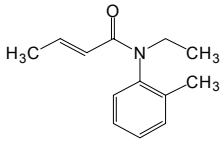
医薬品名	用途	下水処理水中濃度例（ng/L）	参考文献
ｱｽﾋﾟﾘﾝ	解熱鎮痛剤	194～290	14)
ﾌｪﾉﾌﾟﾛﾌｪﾝ	解熱鎮痛剤	1.5～7.7	14)
ﾁﾓｰﾙ	殺菌剤	0.3～2.4	14)
ﾄﾘｸﾛｻﾝ	殺菌剤	63～301	14),15)
ｼﾞｴﾁﾙﾄﾙｱﾐﾄﾞ	昆虫忌避薬	52～935	14),15)
ｸﾛﾀﾐﾄﾝ	鎮痒剤	502～1569	14),15)
ﾚﾎﾞﾌﾛｷｻｼﾝ	抗生物質	189～400	16)
ｸﾗﾘｽﾛﾏｲｼﾝ	抗生物質	266～444	16)
ｱｼﾞｽﾛﾏｲｼﾝ	抗生物質	88～219	16)

そこで、試験に用いる医薬品は、下水処理水等の環境中で検出された物を中心に選定し、**表** 1 に示す 9 物質とした。これらの医薬品の環境水中の存在量の例として、下水処理水中に確認された濃度を併せて示した。物質ごとに存在濃度に幅があるが、いずれも ng/L のレベルであった。

なお、これらの物質の構造については、**表** 2 に示す通りである。

また、曝露濃度については、次節の**表** 3 に示す。

表 2 対象医薬品の化学構造

医薬品名	構造	医薬品名	構造
Aspirin		Levofloxacin (LVFX)	
Fenoprofen			
Thymol		Clarithromycin (CAM)	
Triclosan			
Diethyltoluamide		Azythromysin (AZM)	
Crotamiton			

2.3.2. 藻類

(1)河川水

a) 多摩川における調査

多摩川におけるサンプリングは 2003 年 2 月に実施した。調査地点を**図 1** に示す。サンプリングでは、多摩川河川水，多摩川へ流入する下水処理水および支川の水についてサンプル採取を行った。採取したサンプルは、直ちに実験室に持ち帰り、ガラスファイバーフィルター（GF/B，Whatman）およびメンブレンフィルター（孔径 0.2μm，Advantec）によりろ過を行った後、試験に供するまでの間-30℃にて凍結保存を行った。試験は、凍結保存しているサンプルを融解した後、希釈系列を作成して行った。

b) 固相抽出カートリッジを用いた試料の分画濃縮

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

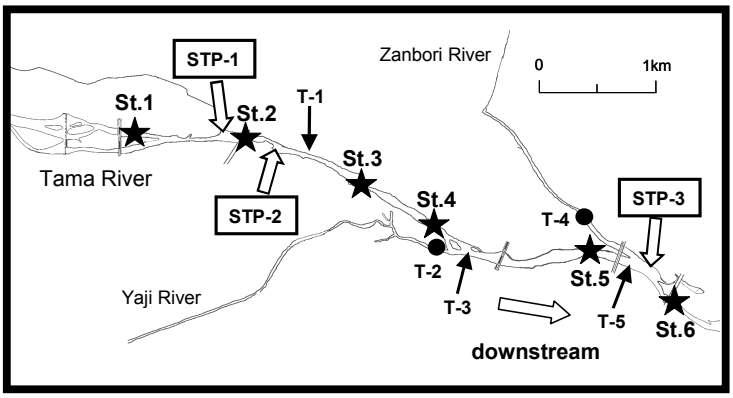


図 1　多摩川調査地点

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

(2)化学物質

試験対象とする物質はミジンコと同様の医薬品に加えて、水生生物への標準毒性物質として頻繁に用いられ、近年において環境基準にもなった亜鉛を用いた。

亜鉛については、硫酸亜鉛（$ZnSO_4$）を亜鉛濃度換算で 3.1～800μg/L となるよう藻類培養液で希釈した。

また、医薬品を試験に供する際には、まず DMSO を溶媒として 10,000mg/L の溶液を調製してから、各試験の飼育溶液や培養液に希釈溶解させた。

試験曝露濃度は**表 3** のように設定した。なお、前述のミジンコの試験における曝露濃度範囲も併せて示す。

なお、いずれの生物種、試験濃度区においても溶媒の DMSO 濃度が 0.1%(v/v)を超えない範囲で設定を行った。

表 3 試験濃度範囲

医薬品名	藻類 生長阻害	ミジンコ 遊泳阻害
アスピリン	10～0.0195	10～0.625
フェノプロフェン	10～0.0195	10～0.625
チモール	10～0.0195	10～0.625
トリクロサン	10～0.0195	10～0.0315
ジエチルトルアミド	10～0.0195	10～0.625
クロタミトン	10～0.0195	10～0.625
レボフロキサシン	10～0.0195	10～0.625
クラリスロマイシン	0.1～0.000195	10～0.625
アジスロマイシン	0.625～0.00122	10～0.625

(mg/L)

3.研究結果

3.1. 甲殻類

ミジンコに対する医薬品の影響については、ほとんどの物質で急性毒性は確認できなかったが、殺菌剤であるチモールとトリクロサンでのみ急性毒性が確認された。図- 8 に曝露濃度と阻害率の関係を示す。

ここから、チモールについての EC50 値は 24 時間で 5.1(mg/L)、48 時間で 4.4(mg/L)となり、トリクロサンについての EC50 値は 24 時間で 0.50(mg/L)、48 時間で 0.42(mg/L)となった。他の生物種と同様にチモールと比べてトリクロサンの方が毒性は高くなったが、曝露時間による差はみられなかった。

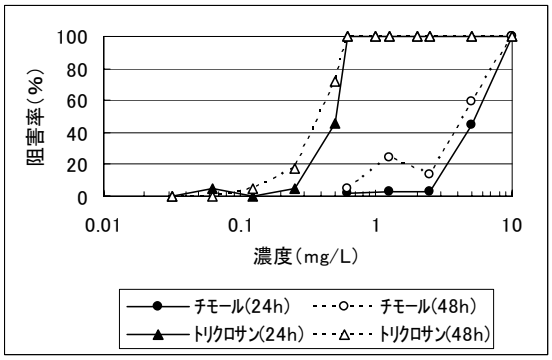


図 2 ミジンコに対する医薬品の影響

3.2. 藻類

3.3.1. 河川水

(1) 多摩川河川水

多摩川から採取したサンプルについて、藻類生長阻害試験を実施した。**表 4** に藻類生長阻害試験を行った結果を示す。試験の結果、多摩川河川水および下水処理水について、コントロールと比較と比較した場合に藻類増殖量の低下は見られず、藻類の生長阻害は観察されなかった。一方、多摩川へ流入する支川に関しては、ほとんどの支川について藻類の生長阻害は観察されなかったが、T-1 の排水樋管から採取した水についてのみ、藻類への生長阻害が見られた。その毒性は、コントロールと比較した場合、約 20%の阻害率であり、強い毒性は見られなかったが、この結果は何らかの毒性物質が含有されていることを示している。T-1 の排水樋管の水は、多摩川本川に流入しているが、流入後の多摩川河川水については、藻類への生長阻害は観察されなかった。藻類の生長阻害を引き起こした原因物質については、今後検討が必要である。

表 4 多摩川試料に対する藻類生長阻害

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

−:阻害なし

(2) 河川水分画濃縮試料

図 3 に下水処理水の STP-1 サンプルに関する濃縮倍率と阻害率との関係を示す。濃縮倍率が 1.6 以下ではほとんど阻害が見られないが、3.1 以上の値になると阻害が観察されはじめ、25 以上の濃縮倍率では、ほぼ 100%の阻害率であった。この濃縮倍率-阻害率の関係より EC50 を計算すると、EC50=6.6 となった。同様に、他のサンプルについて EC50 値を計算した結果を表-2 に示す。EC50 の値は、河川水については 14～17、下水処理水については 5.4～9.1 となり、下水処理水のほうが河川水と比較して EC50 の値が低い傾向にあった。

次に、EC50 の逆数である毒性単位（TU＝100／EC50）を計算した結果を**表 5** に示す。毒性単位の値は、河川水については 0.06～0.07、下水処理水については 0.11～0.18 となり、下水処理水の方が河川水と比較して高い傾向にあった。毒性単位は、その値が高いほど毒性が強いことを意味することから、下水処理水の方が河川水と比較して数倍強い毒性を持つことが示された。

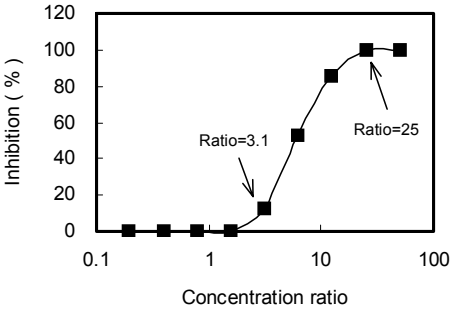


図 3 濃縮試料に対する藻類の成長阻害

表 5 多摩川河川水および下水処理放流水の毒性値

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

3.3.2. 化学物質

(1) 医薬品

藻類に対する医薬品の影響は、チモール等の殺菌剤に加えて、抗生物質についても生長阻害が確認された。他の医薬品について

は生長阻害は確認されなかった。**図** 4 に生長阻害がみられた医薬品についての曝露濃度と生長阻害率の関係を示す。

ここから、各物質について計算された EC50 値は、クラリスロマイシン：0.011(mg/L)、アジスロマイシン：0.034(mg/L)、レボフロキサシン：1.435(mg/L)、チモール：6.56(mg/L)［外挿値］、トリクロサン：0.0195 未満(mg/L)となった。トリクロサンについては、設定した濃度範囲では最低濃度でも阻害率が大きく EC50 値が計算できず、さらに濃度範囲を下げる必要が確認された。

また、抗生物質については同じマクロライド系のクラリスロマイシンとアジスロマイシンが同程度の阻害を示し、キノロン系のレボフロキサシンはマクロライド系と比較して毒性は弱かった。

次に、医薬品が藻類の生長に影響を及ぼす最低濃度(LOEC)および生長阻害がみられなくなる濃度(NOEC)を求める試験を行った。

その結果、**表** 6 に示すように、LVFX の EC50、LOEC および NOEC は、それぞれ 1,200μg/L，630μg/L，310μg/L であった。同様に CAM の EC50、LOEC および NOEC は、それぞれ 11 μg/L，6.3μg/L，3.1μg/L であった。

両者の各指標値を比較すると、CAM は LVFX の 1／100 程度の値を示しており、CAM は LVFX に比べて毒性が高かいことが示された。

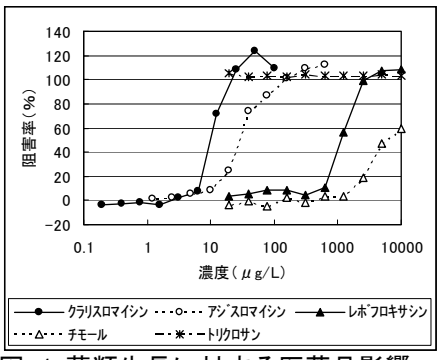


図 4 **藻類生長に対する医薬品影響**

表 6 LVFX と CAM の藻類生長阻害

(μg/L)

Substance	EC50	LOEC	NOEC
Levofloxacin	1,200	630	310
Clarithromycin	11.0	6.3	3.1

(2)藻類生長阻害試験に対する亜鉛の影響

図 5 に亜鉛標準液に関する藻類生長阻害試験の結果について示す。亜鉛濃度を 3.1～800μg /L の間で変化させ、藻類生長阻害試験を行った結果、亜鉛濃度が 50μg/L 以上になると影響が見られはじめ、200μg/L 以上の濃度では、阻害率はほぼ 100%となった。また、この結果から亜鉛に関する 50%影響濃度（EC50）を求めた結果、その値は 67μg/L となり、他の文献値 [13]に近い値となった。このことから、マイクロプレートを用いて少量の試料で実施した試験手法によって、当研究室においても同様の精度で毒性を検出解析することが可能なことが示された。

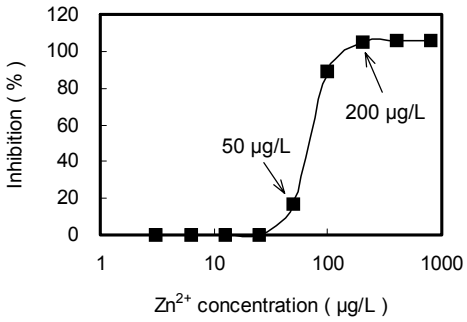


図 5 **亜鉛濃度と藻類生長阻害率**

4. 考察

4.1. 甲殻類

今回用いた、キットによるミジンコの試験手法は、耐久卵を用いる手法であったが、安定してデータを得ることができ、事前の培養に必要となる労力と時間を大幅に節約できた。従って、今回は標準化学物質による試験のみであったが、採水時期が不定期で、再試験が困難な環境水を対象とする試験としても、適した方法と考えられる。

また、藻類生長阻害の結果と比較すると、殺菌剤のチモールはミジンコと藻類で同程度の阻害率を示したが、同じく殺菌剤のトリクロサンはミジンコよりも藻類の方が強い阻害を受け、抗生物質については藻類でのみ阻害がみられた。このように、生物種によって各化学物質に対する感受性が異なることから、多様な化学物質に対応した評価を行うためには、複数の生物種を組み合わせた試験を行うことが必要である。

4.2. 藻類

試験の結果、河川水の分画濃縮を行わない原水においては、多摩川河川水および下水処理水について藻類への毒性は検出されなかった。一方、固相抽出による分画濃縮を行ったところ、原水では毒性が検出できないサンプルについても毒性が検出できるようなり、分画濃縮を行うことによって、毒性値を基準にサンプル間の相互比較を行うことが可能であるということが示された。

一方、医薬品の試験において、CAM などのマクロライド系抗生物質と、LVFX などのキノロン系抗生物質との間で毒性に差がみられたことには、次のような要因が考えられる。

すなわち、オクタノール－水分配係数と EC50 の間には関連があり、両者の間には負の相関があることが知られている[17]。即ち、オクタノール－水分配係数の値が大きいものほど、その毒性が高くなる傾向がある。これは、化学物質の細胞膜への透過性が毒性の発現に大きく関わっていることを示している。LVFX、CAM のオクタノール－水分配係数はそれぞれ 0.553、7.18 であり[18]、この性質の違いから、物質の細胞膜への透過性が大きく異なってくることになり、両者の毒性に差が出た可能性が考えられる。

一方、LVFX および CAM については、NOEC と LOEC の値を得た。そこで、これらの抗生物質による水生生物への影響評価を以下に試みた。

さて、下水道には、生活排水が流れ込むことから、各家庭から排出された抗生物質が流入すると推察される。流入した抗生物質が下水道で十分に処理しきれずに河川等に放流された場合、水環境の汚染が懸念される。そこで、日本国内にある 5 ヶ所の下水処理場を対象として 2 次処理水の分析を行ったところ、処理水から LVFX および CAM が検出された[19]。**図 6** にその分析結果を示す。分析の結果、LVFX は 152～323 ng/L、CAM は 303～567 ng/L の濃度範囲で検出された。

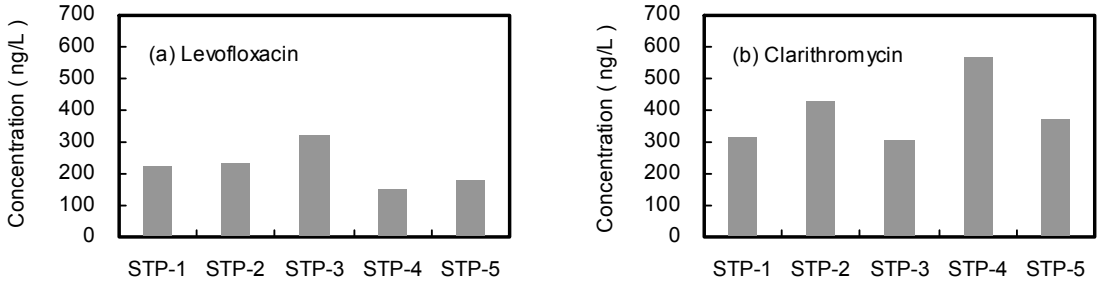


図 6 下水 2 次処理水中の LVFX および CAM 濃度

検出された LVFX および CAM の濃度レベルが、放流先河川の水生生態系に与える影響について、藻類生長阻害試験の結果より評価を行った。まず、*P. subcapitata* に対する 2 次処理水で検出された LVFX、CAM の影響を把握するために、 NOEC と LOEC の幾何平均により求めた無影響濃度（No-Effect Concentration: NEC）と検出濃度を比較した。LVFX、CAM の NOEC はそれぞれ 440 μg/L、4.4 μg/L であり、検出濃度に比べて十分に高いことから LVFX、CAM ともに影響無しと判断される。また、NOEC を藻類の種間の安全係数 10 で除して藻類への影響を評価すると、LVFX は影響無し、CAM は希釈倍率 2 倍以下で影響有りと判断される。

さらに、生態リスクの初期評価[20]を行った。予測無影響濃度（Predicted No-Effect Concentration: PNEC）については、藻類、甲殻類、魚類のうち 1 種の生物群の結果しか得られていないため、安全係数は 100[17]を用いた。安全係数 100 で NOEC を除すると LVFX、CAM の PNEC はそれぞれ 3,100 ng/L，31 ng/L となる。予測環境中濃度（Predicted Environmental Concentration: PEC）については、実測値をあてはめることができないため、調査した下水処理場の放流先での希釈倍率を考慮した PEC を考えた。その結果、最大濃度の LVFX（323 ng/L）については希釈倍率に関わらず PEC は PNEC より小さくなった。また、最大濃度の CAM（567 ng/L）については、希釈倍率 20 倍以上でなければ PEC が PNEC より大きくなる。ハザード比 PEC/PNEC を考えると、LVFX についてはリスク無し、CAM については放流先河川での希釈倍率によってはリスク有りと判定される。一方、CAM のオクタノール－水分配係数は 7.18 であり、生物濃縮の可能性もあることから、水生生物への影響を考慮した場合、CAM は注目すべき物質であると考えられた。

5.まとめと課題

以下に、本研究の主な結果をまとめた。

- 甲殻類や藻類への毒性について、サンプリングの頻度や採取量に制限のある環境水に対応した試験手法を取り入れることで、少量の試料水で迅速に試験が可能となった
- 水環境中に存在する個別の化学物質についての毒性試験を行い、藻類生長阻害の試験結果からは抗生物質 2 種についてリスク評価を行うことができた
- 固相抽出手法の導入によって、多様な物質を含む環境水の成分を分画、濃縮することができ、原水の

ままでは検出できなかった毒性を検出できるようになった

また、今後は以下のような点が課題となると考えられる。

- 実際のサンプルに多く適用してデータを集め、それぞれの試験手法の精度を高める
- 生物種間の感受性の違いを考慮し、対象生物種の幅を拡げる
- 個別の化学物質の毒性データを多く集めるとともに、複合作用についてのデータを検討する
- 個別の化学物質に対して、より低い濃度で反応を確認できる別のエンドポイントを検討する

参考文献：

1) 田中宏明：水環境における内分泌攪乱化学物質の実態調査，水環境学会誌，22，629-632，1999
2) 田中宏明，小森行也，岡安祐司：下水道における微量化学物質の評価に関する調査，平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集，129-132，2002
3) 若林明子：化学物質と生態影響，p.1，丸善，2003
4) 畠山成久，白石寛明，浜田篤信：霞ヶ浦水系河川のヌカエビ（*Paratya compressa improvisa*）生物試験による農薬毒性の季節変動，水質汚濁研究，14，460-468，1991
5) 畠山成久，福嶋悟，笠井文絵，白石寛明：河川の藻類生産に及ぼす除草剤の影響評価，陸水学雑誌，53，327-340，1992
6) Okamura, H., Omori, M., Luo, R., Aoyama, I., Liu, D. : Application of short-term bioassay guided chemical analysis for water quality of agricultural land runoff, Sci. Total Environ., 234, 223-231, 1999
7) 松原正明，原田新，田中宏明 ： 藻類増殖阻害試験およびカエル胚催奇形性試験の基礎的検討と下水試料への適用，水環境学会誌，20，768-775，1997
8) 岡村秀雄，青山勲，羅栄, D. Liu，G. Persoone：産業廃棄物埋立地浸出水の生態毒性評価および毒性のキャラクタリゼーション，環境毒性学会誌，1，43-50，1998
9) 岡村芙美，豊田智子，市川大介，吉本祥子，岡村秀雄，井上雄三，毛利紫乃，山田正人，国本学：藻類増殖阻害試験の簡易化と埋立処分場浸出水の有害性評価への適用，水環境学会誌，765-768，26，2003
10)日本工業標準調査会，工場排水試験方法，JIS K 0102,
11)日本工業標準調査会，化学物質などによるミジンコ類の遊泳阻害試験方法，JIS K 0229，1992
12)Blaise,C., Legault,R., Bermingham,N., VanCoillie,R., Vasseur,P. :A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, Toxicity Assessment, 1, 261-281, 1986
13)St-laurent,D., Blaise,C., Macquarrie,P., Scroggins,R., Trottier,B. :Comparative assessment of herbicide phyto toxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedure, Environ.Toxicol.Wat.Qual., 7, 35-48, 1992
14)谷島利勝，高田秀重：下水処理法流水中の医薬品起源化学物質の分析，第 11 回環境化学討論会講演要旨集，pp130-131，2002
15)中田典秀，小森行也，鈴木穣，八十島誠，田中宏明：下水処理過程における解熱鎮痛剤､抗てんかん薬等医薬品の動態，第 39 回日本水環境学会年会講演集，p57，2005
16)八十島誠，小林義和，中田典秀，小森行也，鈴木穣，田中宏明：下水処理場における人用抗生物質の挙動，環境工学研究論文集･第 42 巻，pp.357-368，2005
17)菊池幹夫：藻類生長阻害試験によるいくつかのゴルフ場農薬の毒性評価，水環境学会誌，16，704-710，1993
18)医療薬学研究会：2004 年版薬剤師のための常用医薬品情報集,1253pp，廣川書店，東京，2003
19)八十島誠，山下尚之，中田典秀，小森行也，鈴木穣，田中宏明：下水処理水中に含まれるレボフロキサシン，クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響，水環境学会誌，11，707-714，2004
20)日本環境毒性学会：生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー，朝倉書店，pp.318，2003

難分解性溶存有機物の由来と水域挙動に関する研究

水循環研究グループ　水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
研究員　北村友一

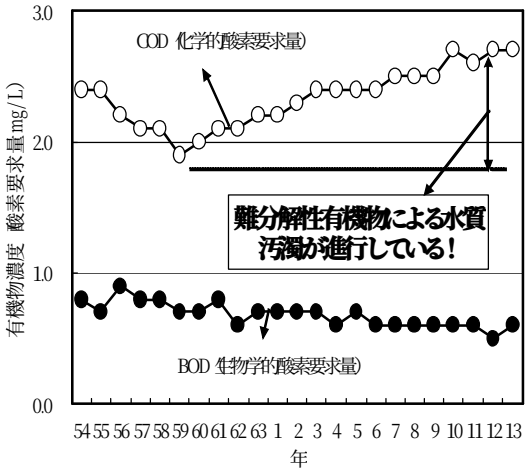
１．はじめに

流域から湖沼への汚濁負荷は下水道整備などの発生源対策により減少傾向にあるものの、湖沼中の有機物濃度は横ばいあるいは増加傾向が観察されている。琵琶湖では、難分解性溶存有機物が増加していることが明らか（図 -1）となっており、湖沼において新たな水質汚染が進みつつある。

湖水中に蓄積される難分解性溶存有機物は、フミン物質などの溶存有機物と考えられているものの、精密な定性分析は行われておらず、その発生源についても不明である。また、湖水は水道水源として利用されているところも多く、湖水中の難分解性溶存有機物が水道水を介してヒトの健康に影響を及ぼすことも懸念される。

本研究では、湖沼に流入する河川水や下水などに含まれる難分解性溶存有機物の質的・量的な特性を把握する手法を確立し、湖沼に蓄積する難分解性溶存有機物の発生源を明らかにする。また、発生源から水域への到達過程および湖沼内での挙動を明らかにする。

難分解性溶存有機物の発生源や由来を調査するためには、難分解性溶存有機物を定性し、これを測定する必要があるが、難分解性溶存有機物の定性定量分析方法は確立されていない。そこで、17年度は、水中の難分解性溶存有機物の簡易分析法の検討を行った。



図－１ 琵琶湖北湖のCODとBODの経年変化
滋賀県H14環境白書(http//www.pref.shiga.jp/biwako/kosai/hakusyo14/shiryo14/)より作成

２．簡易分析方法

水中の難分解性溶存有機物の簡易分析には、三次元蛍光分光光度計による三次元励起･蛍光スペクトル測定を適用することとした。三次元励起･蛍光スペクトルは、励起波長、蛍光波長を変化させながら蛍光強度を測定し、横軸を蛍光波長、縦軸を励起波長とするグラフに蛍光強度を等高線として表示するものであり、三次元スペクトルの形状やピーク位置から、簡易に水中の溶存有機物の定性と定量が可能と考えられる。そこで、霞ヶ浦流入河川、湖水、底泥間隙水および下水放流水を試験水とし、三次元励起･蛍光スペクトルを測定し、水中の溶存有機物の定性・定量が可能かどうか調査した。

３．水試料

霞ヶ浦流入河川、湖水、底泥間隙水および下水放流水の採水位置は、図 -2のとおりであり、採水時期は、平成17年10～11月の晴天時である。

４．前処理および装置条件

水試料は、GF/Fグラスファイバーフィルターでろ過し、底泥間隙水は、底泥を3000rpmで20分間遠心分離し、その上澄水をGF/Fでろ過し、ろ液を蛍光分光光度計（日立製F-4500）で測定した。測定条件は、励起波長、蛍光波長とも200～600nmで、その間隔は5nmとした。蛍光強度は、10μg/Lの硫酸キニーネ水溶液の励起波長350nm、蛍光波長450nmの蛍光強度を1QSUとし、その相対値とした。なお、ブランクには、ミリQ水を用い、全ての測定結果から差し引いた。

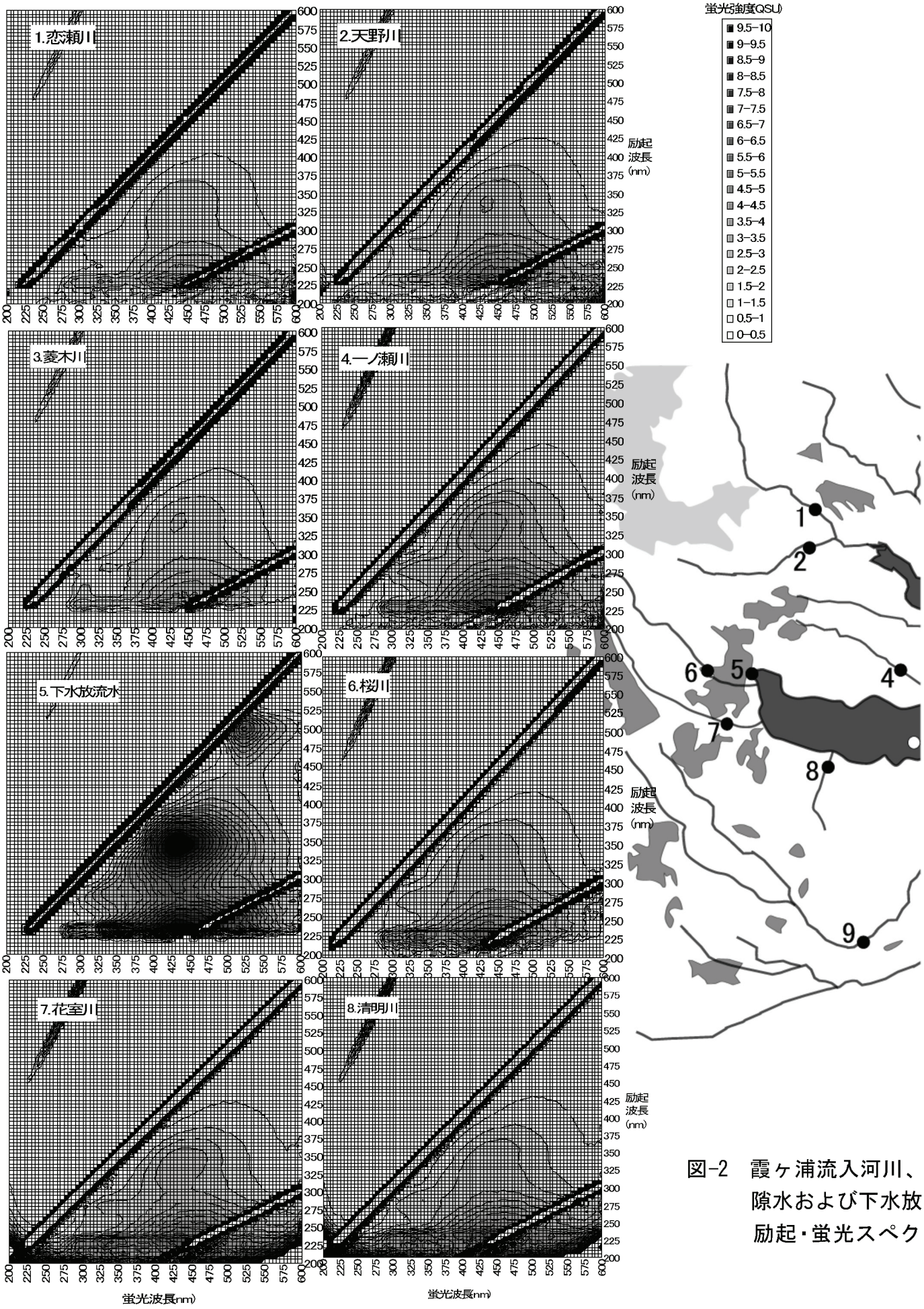
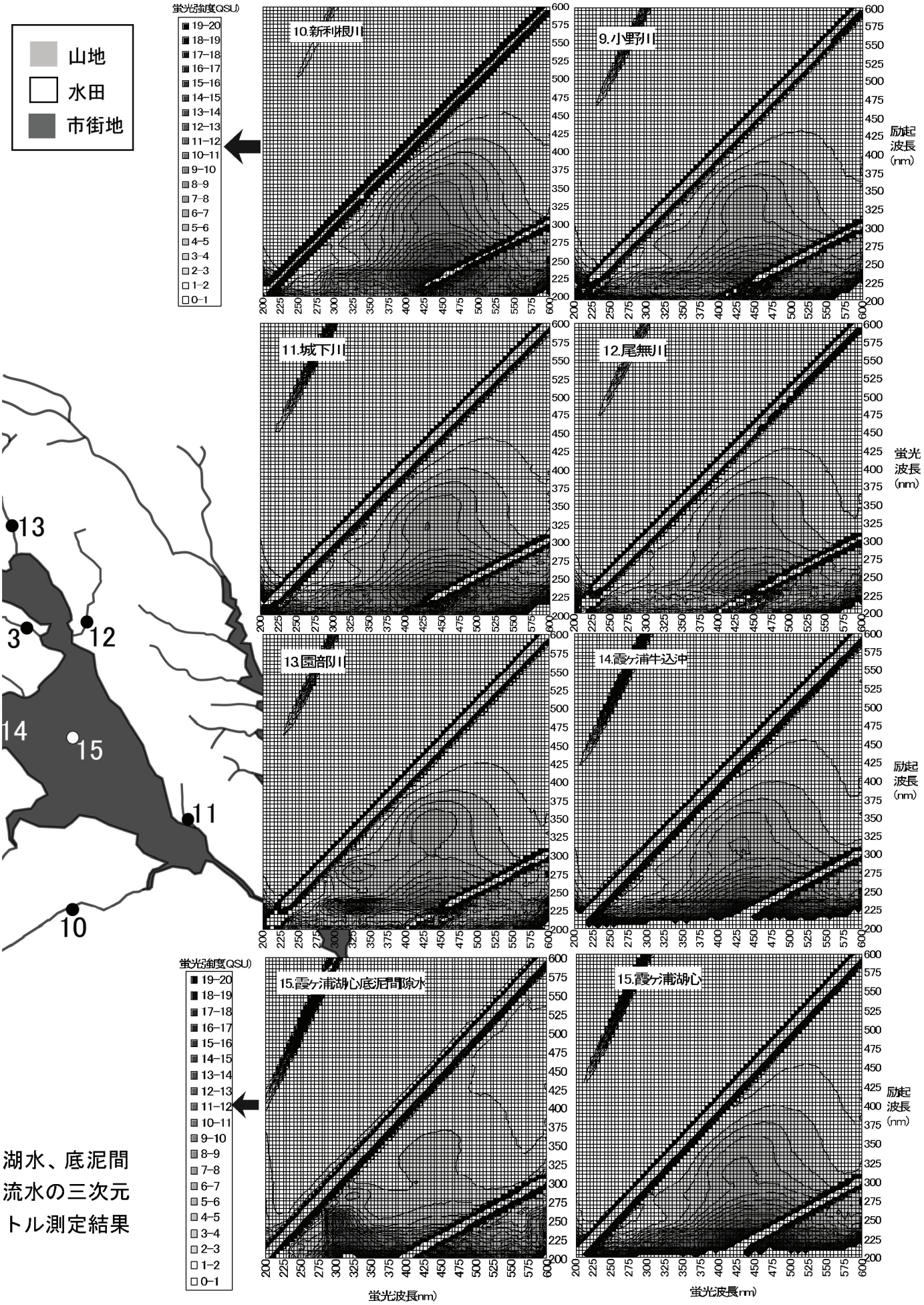


図-2　霞ヶ浦流入河川、隙水および下水放励起・蛍光スペク



湖水、底泥間流水の三次元トル測定結果

５．分析結果

霞ヶ浦流入河川、湖水、底泥間隙水および下水放流水の三次元励起蛍光スペクトルを図-2に示す。河川、底泥間隙水、下水放流水によって三次元励起･蛍光スペクトルは異なっていることがわかる。

６．ピーク位置

三次元励起･蛍光スペクトル上でピークが現れた位置を表-1に示す。Peak6は、下水放流水のみで観られ、Peak3は底泥間隙水で他の試料より高い値を示している。現時点では、難分解性溶存有機物に由来するピーク位置は明らかでないが、三次元励起･蛍光スペクトル測定により、水中の溶存有機物の定性と定量を簡易に把握することは可能であると考えられる。

表-1　霞ヶ浦流入河川､湖水､底泥間隙水および下水放流水のピーク位置の励起波長と蛍光波長

	励起波長(nm)	蛍光波長(nm)
Peak1	225	290
Peak2	225	425
Peak3	250	305
Peak4	305	415
Peak5	345	435
Peak6	500	525

７．グルーピング解析

各試料のpeak１～６の蛍光強度の値を用いてクラスター解析を行った。解析結果を図-3に示す。新利根川以外の河川と湖水、下水処理水と新利根川、底泥間隙水の３グループに概ね分類できる。

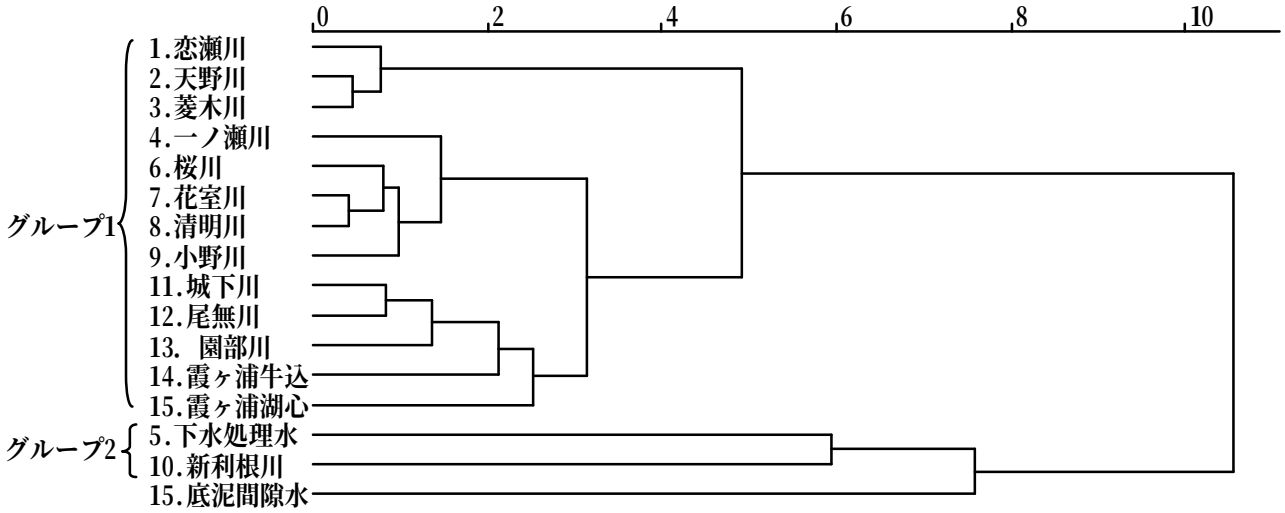


図-3　霞ヶ浦流入河川､湖水､底泥間隙水および下水放流水のクラスター解析結果

8. まとめ

三次元励起・蛍光スペクトル測定により、湖水中の溶存有機物の大凡の分類と特性把握は可能である。

今後、三次元励起･蛍光スペクトル上で現れる各ピークを反映する物質を明らかにし、三次元励起蛍光スペクトル測定で湖沼に蓄積する難分解性溶存有機物を測定できるのか、また、そのピークを位置および物質を追求していく必要がある。

Ⅲ　複数年にわたる研究成果のとりまとめ

下水道における微量化学物質の評価に関する調査

研究予算：受託経費（下水道事業調査費）
研究期間：平 13～平 17
担当チーム：水循環研究グループ（水質）
研究担当者：田中宏明、鈴木穣、小森行也、岡安祐司

【要旨】

下水道は、生活排水や一部の事業場排水を受け入れ、処理を行い環境中に排出しているが、現在、下水中には、人や生物に対して、内分泌かく乱作用を示す微量化学物質が含まれている可能性が指摘されているが、これら微量化学物質の環境への排出量の削減および下水処理水の環境安全性を確保することが求められている。

本調査は、下水道に流入する可能性のある内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質の評価手法の開発を目的とし、①微量化学物質の検出方法の簡易化、迅速化、②微量化学物質の下水道での挙動把握を行う。

キーワード：内分泌攪乱物質、エストロゲン、ノニルフェノール、ELISA 法、LC/MS/MS 法

Ⅰ　はじめに

下水道施設へ流入する有害な化学物質は、下水道法に基づき規制されている一部を除いて大部分が未規制であり、下水道に流入する可能性があるが、下水処理施設での挙動・運命についての知見は不十分な状況である。これらの化学物質の中には、微量でも、人や生物に対して、内分泌かく乱作用や毒性作用を示す化学物質が含まれている可能性が指摘されている。

現状では、下水中の内分泌かく乱作用を示す化学物質のうち一部は、機器分析に基づく手法により測定されるが、高価な機器、熟練した技術等が必要であり、幅広く下水中での挙動を把握できる状況ではない。そのため、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、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。

将来的に、内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質の排出が法により規制されるような事態が発生する場合、または未規制であっても、より積極的に微量化学物質対策に下水道が取り組む場合には、下水処理場における運転条件が化学物質の環境媒体への排出に及ぼす影響を予測、評価することが必要となる。本研究では、以上のような背景を受け、以下の課題を目的とする。

- 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法を確立する。
- 下水道に流入している内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質（エストロゲンおよびノニルフェノール類）の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。

Ⅱ　下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発

１．はじめに

本研究では、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。具体的には、実下水処理場における下水試料を用いて、機器分析手法での測定結果と、武田薬品工業製の ELISA キット、Assay Design 社製の ELISA キット（建設省が実施した「水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査」、「下水道における内分泌撹乱化学物質 (環境ホルモン)に関する調査」で使用された）について、設定した各抽出手法による ELISA 法の結果の比較を実施した[2) 3)]。

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。具体的には、E2 と同様に、全国の実下水処理場における下水試料を用いて、機器分析手法での測定結果と、開発した ELISA キットについて、設定した各抽出手法による ELISA 法の結果の比較を実施した。

なお、本研究は、平成 13 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「水中の微量化学物質の新しい検出技術（その２）の開発」で、平成 14～16 年度の期間では、武田薬品工業株式会社との共同研究「都市排水におけるエストロゲンおよびその関連物質の新しい検出技術の開発」で実施されたものである。

２．17β-エストラジオール（E2）測定 ELISA 法

2.1.　固相抽出溶出溶媒に関する検討

下水試料中の 17β-エストラジオールの抽出方法として、

１）C18 固相抽出＋メタノール溶出

２）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、武田薬品工業製の ELISA キット、Assay Design 社製の ELISA キットとも、

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

となり、ジクロロメタン溶出の場合の方が、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。武田薬品工業製 ELISA キットと Assay Design 社製の ELISA キットを比較すると、武田薬品工業製 ELISA キットの測定結果の方が、機器分析による測定結果に近い傾向がみられた。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、さらに一層のクリーンナップ等を実施する必要があると考えられた。

2.2.　クリーンナップ手法に関する検討

全国 22 箇所の実下水処理場における下水試料を用いて、機器分析手法（LC/MS/MS 法）での測定結果と、開発した ELISA キットについて、以下に設定した 2 種の前処理手法による ELISA 法の結果の比較を実施した。

1)　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）

2)　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

両手法とも、前処理工程前後の試料の LC/MS/MS 法による測定結果では、E2 の回収率は 90%以上確保されていた。結果を図-1～2 に示す。流入下水試料では、前処理法①、②とも 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 倍程度以内となっており、明確な差は見られなかった。二次処理水試料では、前処理法①、②とも、ELISA 法による測定結果は、LC/MS/MS 法による

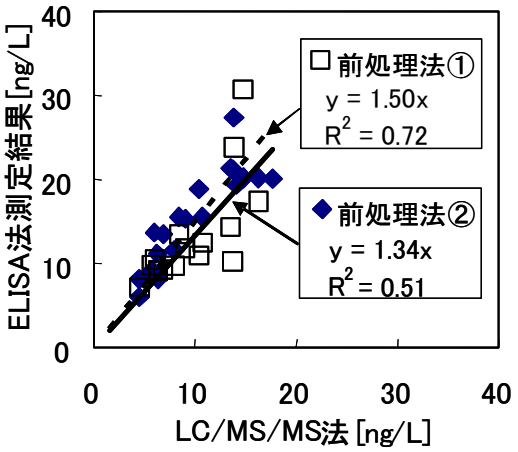


図-1 流入下水中の17β-エストラジオール（E2）の前処理法間の測定結果の比較

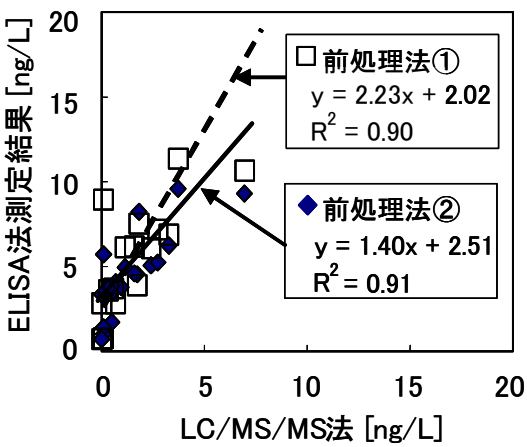


図-2 二次処理水中の17β-エストラジオール（E2）の前処理法間の測定結果の比較

測定結果に比べて約 2 倍以上であり、前処理法①、②間の明確な差は見られなかった。

なお、前処理法①では、採水時にアスコルビン酸による固定化を行っていないため、流入下水、二次処理水とも、交差反応や妨害による過大評価以外に試料保存中にエストロゲン抱合体からE2が生成された可能性等の性状変化が考えられる。一方、前処理法②では、アスコルビン酸がELISA法に及ぼす妨害などの影響について、追加で検討する必要があると考えられる。

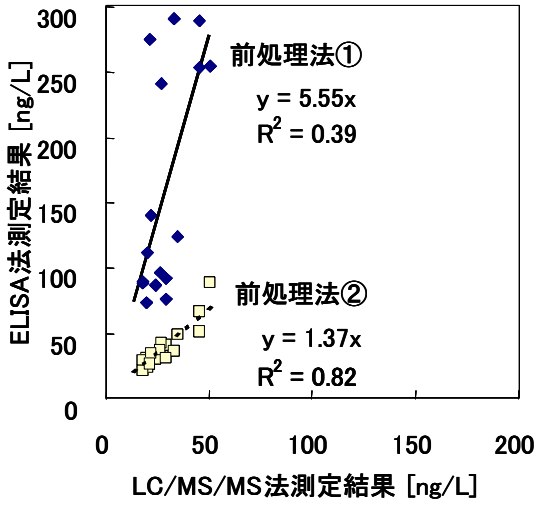
3　E1 測定 ELISA 法

3.1.　クリーンナップ手法に関する検討

下水試料中のエストロンの前処理として、

3)　前処理法①

：採水、冷蔵保存、C18 固相抽出（ジクロロメタン溶出）



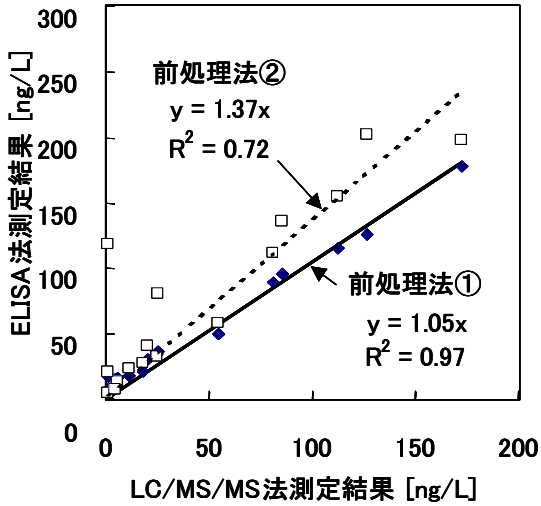
図－3　流入下水中のエストロン（E1）の前処理法間の測定結果の比較

4)　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 C18 固相抽出（ジクロロメタン溶出）＋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-3～4 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。

前処理法①では、採水時にアスコルビン酸による固定化を行っていないため、流入下水試料では、交差反応や妨害による過大評価以外に試料保存中にエ



図－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

ストロゲン抱合体から E1 が生成された可能性が考えられる。一方、二次処理水試料では、試料保存中に E1 が分解した可能性が考えられる。

前処理法②では、アスコルビン酸が ELISA 法に及ぼす妨害などの影響について、追加で検討する必要があると考えられる。

４．追加検討

これまでの検討で日本エンバイロケミカルズ製 ELISA キットに対して、「採水時後直ちに冷蔵保存、C18 固相抽出＋フロリジルカラムによるクリンナップ＋アミノプロピルカラム」による手法からなる前処理を実施することにより、ELISA 法による測定結果は LC/MS/MS 法による測定結果に対して 1.5 倍程度以内となることが判明し、概ね簡易測定法としての精度を確保できたと考えられる。

本稿では、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。

① SS 除去

同一の 2 つの下水試料 500mL をガラス繊維ろ紙（GF/B）によりろ過し、ガラス繊維ろ紙を、ろ紙が浸る量のメタノール中に置き、5 分間超音波抽出した。一方の抽出液を GF/B ろ紙でろ過し、ろ液を N_2 ガスパージにより乾固した後、再度 1mL のメタノールに溶解して 500 倍濃縮試料として、ELISA 法の測定に供した。他方の抽出液は、500mL の超純水に溶解し、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法[34] により測定を実施した。

② ヒューミン分画の分離

同一の 2 つの下水試料 500mL へ 0.1N NaOH 溶液を添加し、溶液の pH を 10 に調整し、一晩（約 18 時間）冷蔵保存した。発生する沈殿物をガラス繊維ろ紙（GF/B）によりろ過し、ガラス繊維ろ紙を、ろ紙が浸る量のメタノール中に置き、5 分間超音波抽出した。一方の抽出液を GF/B ろ紙でろ過し、ろ液を N_2 ガスパージにより乾固し、1mL のメタノールに溶解し 500 倍濃縮試料として、ELISA 法の測定に供した。他方の抽出液は、500mL の超純水に溶解し、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法[34] により測定を実施した。

③ フミン酸分画の分離

同一の 2 つの下水試料 500mL へ 0.1N NaOH 溶液を添加し、溶液の pH を 10 に調整し、一晩（約 18 時間）冷蔵保存した。発生する沈殿物をガラス繊維ろ紙（GF/B）によりろ過して得たろ液に 1N HCl 溶液を添加し、溶液の pH を 2 に調整し、一晩（約 18 時間）冷蔵保存した。発生する沈殿物をガラス繊維ろ紙（GF/B）によりろ過し、ガラス繊維ろ紙を、ろ紙が浸る量のメタノール中に置き、5 分間超音波抽出した。一方の抽出液を GF/B ろ紙でろ過し、ろ液を N_2 ガスパージにより乾固し、1mL のメタノールに溶解し、500 倍濃縮試料として ELISA 法の測定に供した。他方の抽出液は、500mL の超純水に溶解し、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法[34] により測定を実施した。

①から③の手法とも、遊離体エストロゲンの標準溶液を用いた検討においては、対象の遊離体エストロゲンは検出されず、残渣への移行は起こらないことを確認した。

① SS 除去

表-1 に、ELISA 法による測定結果と LC/MS/MS 法による測定結果を示す。LC/MS/MS 法の測定結果はいずれも検出下限値以下（nd）であり、測定対象の遊離体エストロゲンは SS には移行していないことが確認された。ELISA 法による測定では、流入下水と一次処理水では有意に定量される結果となり、こ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、流入下水、一次処理水に関しては、SS 除去により交差反応・妨害物質を除去できる可能性が考えられた。

表-1 SS除去による交差反応・妨害物質の分離の効果

		E1	E2	EE2
流入下水①	ELISA法	2.18	0.20	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
流入下水②	ELISA法	1.44	0.16	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水①	ELISA法	2.17	0.15	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水②	ELISA法	0.55	0.11	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水①	ELISA法	n.d.	n.d.	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水②	ELISA法	n.d.	n.d.	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.

（単位 ng/L）

② ヒューミン分画の分離

表-2 に、ELISA 法による測定結果と LC/MS/MS 法による測定結果を示す。LC/MS/MS 法の測定結果はいずれも検出下限値以下（nd）であり、測定対象の遊離体エストロゲンはヒューミン分画には移行していないことが確認された。ELISA 法による測定では、流入下水、一次処理水および二次処理水で有意に定量される結果となり、こ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、流入下水、一次処理水および二次処理水に関しては、ヒューミン分画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た。

表-2 ヒューミン分画の分離による交差反応・妨害物質の分離の効果

		E1	E2	EE2
流入下水①	ELISA法	0.67	0.11	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
流入下水②	ELISA法	2.83	0.20	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水①	ELISA法	2.87	0.33	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水②	ELISA法	2.59	0.28	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水①	ELISA法	0.10	0.09	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水②	ELISA法	0.19	0.13	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.

（単位 ng/L）

③ フミン酸分画の分離

表-3 に、ELISA 法による測定結果と LC/MS/MS 法による測定結果を示す。LC/MS/MS 法の測定結果はいずれも検出下限値以下（nd）であり、測定対象の遊離体エストロゲンはフミン酸分画には移行していないことが確認された。ELISA 法による測定では、流入下水、一次処理水および二次処理水で有意に定量される結果となり、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た。

表-3 フミン酸分画の分離による交差反応・妨害物質の分離の効果

		E1	E2	EE2
流入下水①	ELISA法	72.3	2.13	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
流入下水②	ELISA法	71.4	2.13	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水①	ELISA法	70.8	1.95	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
一次処理水②	ELISA法	37.9	1.34	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水①	ELISA法	0.27	0.23	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.
二次処理水②	ELISA法	0.27	0.18	n.d.
	LC/MS/MS法	n.d.	n.d.	n.d.

（単位 ng/L）

５．まとめ

本研究の達成目標と、それに対応する主な研究成果は、以下のとおりである。

１）下水中のエストロゲンの迅速測定法の提案

① ELISA 法による 17β-エストラジオールの測定

下水試料中の 17β-エストラジオール（E2）の抽出方法として、

１）C18 固相抽出＋メタノール溶出

２）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、E2 の回収率は確保されていた。結果は、武田薬品工業製の ELISA キット、Assay Design 社製の ELISA キットとも、

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

となり、ジクロロメタン溶出の場合の方が、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。武田薬品工業製 ELISA キットと Assay Design 社製の ELISA キットを比較すると、武田薬品工業製 ELISA キットの測定結果の方が、機器分析による測定結果に近い傾向がみられた。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、さらに一層のクリーンナップ等を実施する必要があると考えられた。

② ELISA 法によるエストロンの測定

水中のエストロン（E1）を定量する ELISA キットを開発し、下水試料の前処理法として、①冷蔵保存、C18 固相抽出（ジクロロメタン溶出）②採水時にアスコルビン酸による固定化、冷蔵保存、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つの設定方法について、ELISA 法による測定結果と LC/MS/MS 法による測定結果を比較した。

二次処理水では、①、②のいずれの方法でも、ELISA 法による測定結果は、LC/MS/MS 法による測定結果の 1.5 倍程度以内であった。

③ 下水試料中の ELISA 法測定妨害物質除去に関する検討

下水試料中の E2、E1 測定用 ELISA 法における、交差反応及び妨害物質を除去する簡易な前処理法として、SS 除去、ヒューミン分画の分離およびフミン酸分画の分離について検討し、特に生物処理を受ける前の段階の下水試料に関しては、フミン酸分画の分離が効果的であることが推察された。

Ⅲ　微量化学物質の下水道での挙動把握

Ⅲ―１．　人畜由来エストロゲン

本研究では、近年社会問題となっている内分泌撹乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）に関する物質のうち人畜由来のエストロゲンの挙動について調査を行った。エストロゲンのホルモン作用は、環境ホルモンのエストロゲン活性に比べ非常に強い[5]ことが知られており注目されている物質である。

1.1.　全国一級河川調査

1.1.1　調査概要

下水処理水のエストロゲン活性の相対的なポテンシャルを判断するために、全国の一級河川におけるエストロゲンの実態調査を実施した。試料の採取は、国土交通省が実施した「水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査」（以後、全国河川実態調査）に併せて実施した。平成 11 年から平成 13 年にかけて 94 水系 132 地点で調査を行い、251 試料のエストロゲン様活性を測定した。

1.1.2　流域情報の整理

国土交通省が作製した河川流域地図を元に、88 河川の流域データを用いた。各流域内の市町村を流域地図より参照した。参照した市町村面積を面積計(MT-500V, MT precision)を用いて測定した。各市町村の人口は住民台帳（平成 14 年 1 月 1 日現在）より得た。下水処理整備人口（都市下水事業、合併浄化槽、農業集落排水処理、コミュニティープラントなど）は国土交通省より得た。得られた情報を計算に用いた。

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

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

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

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

1.1.3　全国一級河川調査と流域情報との比較結果

国土交通省による 2001 年の調査の結果、エストロゲン様活性は 79%の主要河川で検出された。エストロゲン様活性の中央値は 0.8ng/L-E2 等量であった。

我々は各河川流域内の人口密度を集積し、エストロゲン様活性との比較を行った。その結果、河川水中では人口密度とエストロゲン様活性との間に正の相関関係が見られた。河川水中での R_{PWR} とエストロゲン様活性の関係の間には明瞭な関係は見られないが、高い R_{PWR} （> 1,000 人/km^2）の時、エストロゲン様活性は低下しないことを示していることは確かである。これらの結果は、河川水中でのエストロゲン様活性の減少は、下水道の整備だけでは成し得ないということを示している。これらのことは、活性汚泥処理を採用している STP 内でのエストロゲン様活性の削減は、日本の中でも地方で採用されている硝化-脱窒処理やオキシデーションデッチを採用している STP より低いということがすでに報告されている。それゆえ、河川においてエストロゲン様活性を低下もしくは削減するためには、下水処理工程レベルの改善および STP が河川へ放流しているのと同じように河川からの取水量を減らすことが重要であろう。

1.2.　全国の下水処理場調査

1.2.1　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，平成 10 年～14 年にかけて全国 60 処理場で調査を行った。また平成 14 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-5 に示す。

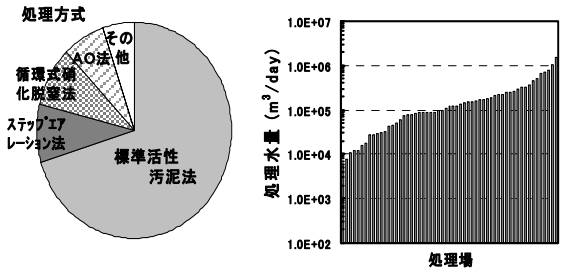


図-5　調査対象処理場の処理方式

1.2.2　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

これまで平成 10 年～14 年にかけて全国 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から、下水中のエストロゲン様活性の濃度レベルの把握を行なった。その結果を図-6 に示すが、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

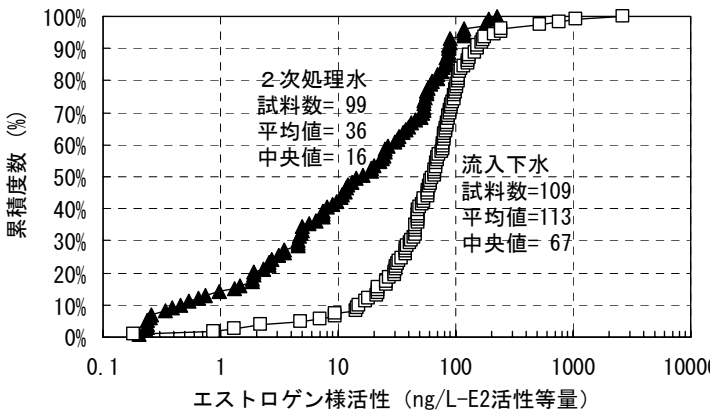


図-6　流入下水及び２次処理水のエストロゲン様活性の濃度分布

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ることが確認できる。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%が含まれる。しかし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。

化学分析から得られた E1、E2、NP の濃度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検討した。なお事前に行なった、E1、E2、NP の標準物質を組み合わせた試験では、明瞭な相乗もしくは拮抗作用が確認できなかったため、ここではこれらの物質の相互作用は相加的であるとし、各物質の理論活性値を積み上げることによって示した。各処理場におけるエストロゲン様活性と E1、E2、NP の理論活性値を図-7 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

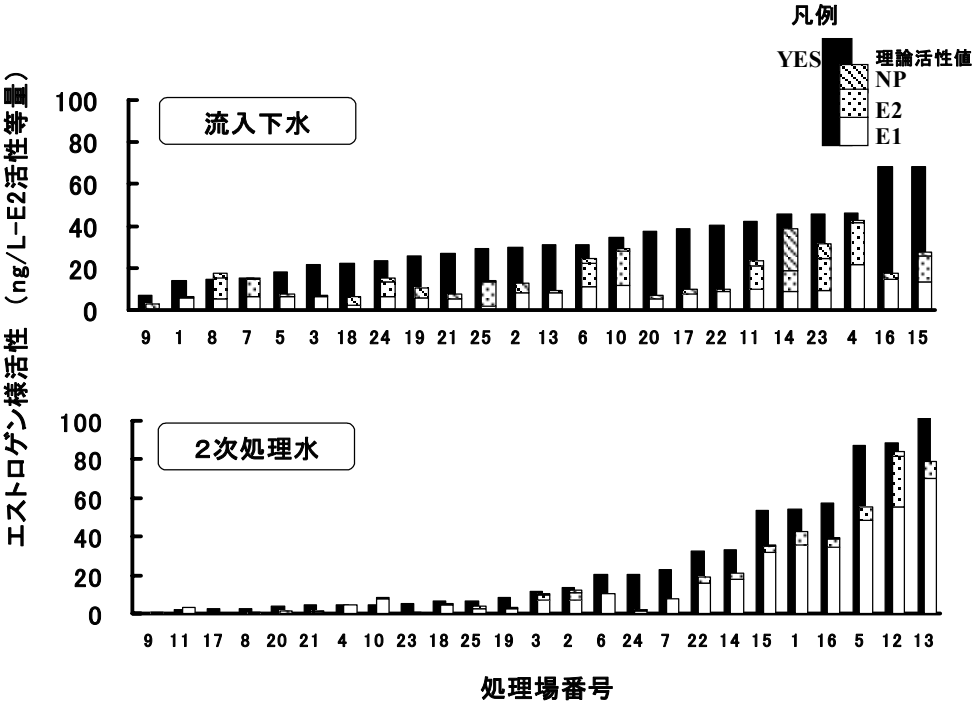


図-7　エストロゲン様活性への各物質の寄与

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把握

近年社会問題となっている内分泌かく乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）に関する物質のうち人畜由来のエストロゲン（女性ホルモン）と合成エストロゲンについての、下水道におけるエストロゲンについての報告[16)～18) 20)～31)]は、表-4 に示すとおり数多く見られるものの、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。本研究ではエストロゲン抱合体の分析法開発を行うとともに実下水への適用を試みた。

帝人エコ・サイエンス株式会社との共同研究「人畜由来エストロゲン及びその抱合体の LC-MS/MS による分析方法の開発および HR･GC/MS による検討並びに開発に関する共同研究」を実施し、LC/MS/MS 法によるエストロゲン抱合体分析法を開発[13)]するとともに、実下水への適用を行った。測定対象としたエストロゲンの硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体は、estrone-3-sulfate (E1-S), β-estradiol 3-sulfate (E2-S), estriol 3-sulfate (E3-S), estrone β-D-glucuronide (E1-G), β-estradiol 17-(β-D)-glucuronide (E2-G), estriol 3-(β-D-glucuronide) (E3-G), β-estradiol 3-sulfate 17-glucuronide (E2-S&G) and estradiol 3,17-disulfate (E2-di-S) である。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-8 に示した。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%なのに対し、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[15)]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。

また、これまでに国内で報告[16)～18)]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。

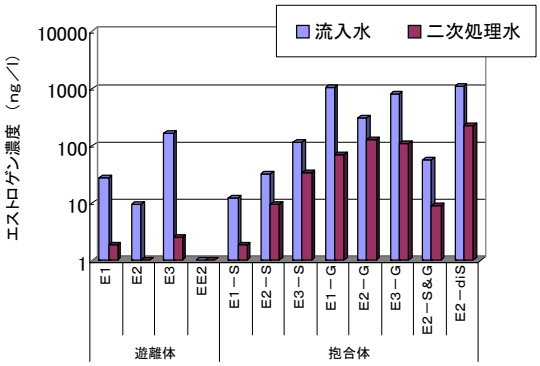


図-8　エストロゲン測定結果（回収率補正済み）

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

表－4　下水試料中のエストロゲン濃度(ng/l) 文献レビュー

	E1	E2	E3	EE2	E1-S	E2-S	E3-S	E1-G	E2-G	E3-G	国名	文献
流入水	＜0.5 - 75	＜0.5 - 17	2 - 120	＜0.5 - 10							イタリア	20)
	42.2	19.3	244.6			22.1			＜0.8		日本	16)
		7 - 15									日本	21)
	18	6.3									日本	22)
	19.9 - 106.7	14.9 - 50.0	88.8 - 754.4								日本	23)
	51.1	36.6	582.3								日本	24)
	17.6	6.3				62.9			1.4 - 12.7		日本	18)
	23 - 99										日本	25)
	41.3 - 101.6	29 - 35	171.4 - 548.2								日本	26)
	156	20.4	ND		6.4	2.7	4.5				日本	17)
	15 - 77	3.6 - 18		ND							日本	27)
	44	11	72		25	3.3	14	4.3	ND - 5.2	ND - 19	イタリア	32)
処理水	ND - 54	ND - 7	ND - 28	ND - 2.2							イタリア	20)
	12.5	1.6	3.1			0.5			＜0.8		日本	16)
		＜1									日本	21)
	0.2 - 42.5	ND - 2.8	3.0 - 30.9								日本	23)
	16.3	0.8	3.6								日本	24)
	1.4 - 21										日本	25)
	8.6 - 42.5	ND - 2.9	3.4 - 5.4								日本	26)
	ND - 63	ND - 3.3		ND							日本	27)
	1.4 - 76	2.7 - 48		ND - 7							イギリス	28)
	9	ND		1							ドイツ	14)
	3	6		9							カナダ	14)
	＜0.1 - 47	＜0.4 - 12		＜0.2 - 7.5							オランダ	29)
	13 - 89	0.9 - 5.8	ND - 0.9	ND							日本	30)
		0.2 - 4.05		ND - 2.42							アメリカ	31)
	17	1.6	2.3		9	ND	2.2	0.7	ND	ND	イタリア	32)

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。なお、本研究で測定対象としたエストロゲンは、遊離体のエストロゲンが estrone (E1)、17β-estradiol (E2)、estriol (E3)、合成エストロゲンの 17α-ethinylestradiol (EE2)、E1、E2、E3 の硫酸又はグルクロン酸の抱合体が estrone-3-sulfate (E1-S)、β-estradiol 3-sulfate (E2-S)、estriol 3-sulfate (E3-S)、Estrone β-D-glucuronide (E1-G), β-estradiol 17- (β-D)-glucuronide (E2-G)、estriol 3-(β-D-glucuronide) (E3-G)、β-estradiol 3-sulfate 17-glucuronide (E2-S&G)、estradiol 3,17-disulfate (E2-diS) の 12 化合物である。

試料測定にあたっては、採取時に、酸化防止剤としてアスコルビン酸を試料1Lあたりに1g添加した後、冷蔵保存し、分析所へ送付後、直ちに分析を実施した。

本分析法における各エストロゲンの回収率は、流入下水、二次処理水、精製水とも遊離のエストロゲンでは 90%以上なのに対し、硫酸抱合体では精製水の場合 90%以上であるが、二次処理水で 42〜71%、流入下水で 34〜49%であった。グルクロン酸抱合体では精製水においても 48〜51%、二次処理水で 13〜18%、流入下水で 4〜11%であり、その他のエストロゲンに比べ流入下水、二次処理水での回収率はかなり低かった。

20 処理場の流入下水及び二次処理水の測定結果を表-5 に示した。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[16)〜18) 20) 21)]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[16) 17) 18) 32)]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[20) 32)]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。

エストロゲン抱合体分析の一例として E2-G のクロマトグラムを図-9 に示した。この図は E2-G をイオン化した質量数 447 のイオンを選択し、更に再度イオン化した際に生じる質量数 271 の Daughter イオンのクロマトグラムを横軸に保持時間として表したものである。流入水、二次処理水中に E2-G（保持時間約 2 分）のピークを確認することが出来るため、流入水、二次処理水に E2-G が残留しているのは確かである。

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。

本調査で用いた分析法[13)]を開発した際に行ったＺ処理場での調査結果では、抱合体でも流入下水中の 58%〜93%の範囲で除去されていた。また、活性汚泥を用いたバッチ試験では、E2-G は容易に分解するとの報告[15)]もあり、下水処理によって減少すると考えられるが、本調査結果では多くの処理場において下水処理により増加している結果となった。

本調査に用いた分析法は、グルクロン酸抱合体については特に回収率が低く、更に検討が必要な方法ではある。また、スポットサンプリングであり流入水と処理水の代表性についても検討が必要である。しかし多くの下水処理場で、下水処理を受けることによってエストロゲン抱合体が増加している結果が得られていることから、測定対象以外の形態でエストロゲンが存在し、測定対象となった抱合体が生成している可能性もあることとが考えられる。

表－５　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

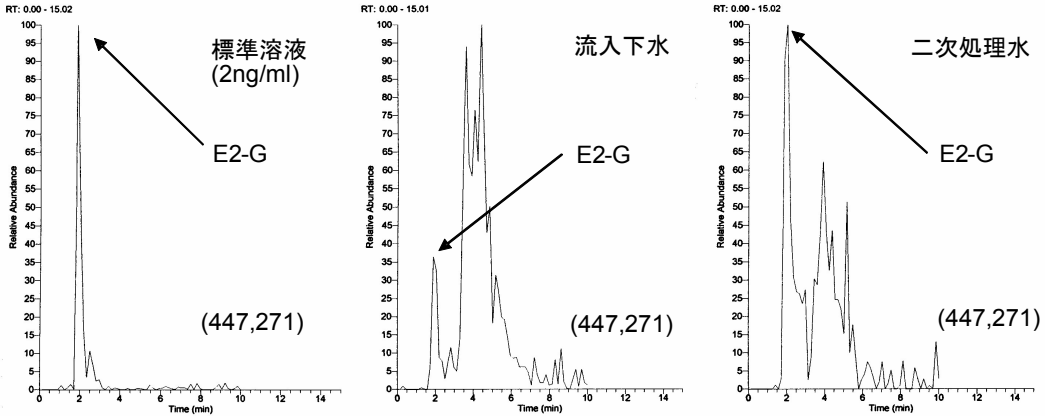


図-9　下水試料中のE2-G質量クロマトグラム（Daughterイオン）

３．下水処理場における EE2 の実態把握

内分泌撹乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）に関する物質のうち、人畜由来のエストロゲン（女性ホルモン）と合成エストロゲンの下水道における実態に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[28) 14) 29) 20) 36) 30) 37)]（表-6）。

表－6 下水処理場におけるEE2の実態調査結果（ng/l）

処理場名	流入水		処理水		国名	文献
	機器分析*	ELISA	機器分析*	ELISA		
Southend STW			ND－7.0		イギリス	28)
Harpenden STW			ND			
Rye Meads STW			ND			
Deephams STW			ND			
Naburn STW			0.6－4.3			
Horsham STW			0.2－0.8			
Billing STW			ND			
16 STP			ND－15		ドイツ	14)
10 STP			ND－42		カナダ	
WWTP A			＜1.4		オランダ	29)
WWTP B			＜1.8			
WWTP C			＜0.3－7.5			
WWTP D			＜1.8－2.6			
WWTP E			＜0.3			
Cobis	＜0.5－10		ND－0.6		イタリア	20)
Fregene	＜0.5－5.4		ND－2.2			
Nord	＜0.5－3.2		ND－＜0.5			
Sud	＜0.5－4.8		ND－＜0.5			
A		5.3		1.8	日本	36)
B		4.5		1.9		
C		9.5		0.9		
D		10.0		1.2		
DSP-1			ND		日本	30)
DSP-2			ND			
DSP-3			ND			
DSP-4			ND			
DSP-5			ND			
DSP-6			ND			
DSP-7			ND			
20処理場			ND		日本	37)

*：GC/MS, LC/MS/MS

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、平成 11 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。土木研究所では平成 11 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[7)]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、平成 17 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[37)]（HR-GC/MS）を用いることで、従来より一桁低い濃度レベルでの測定を行った。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[38)]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[7)]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 ヶ所の処理場は平成 11 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。（表-7）

表-7 調査対象とした処理場の概要

処理場名	主な処理方式	日平均処理水量 (m3/day)
A	標準活性汚泥法	233,500
B	標準活性汚泥法	186,650
C	標準活性汚泥法	73,452
D	標準活性汚泥法	65,131
E	ｽﾃｯﾌﾟｴｱﾚｰｼｮﾝ法	3,274
F	標準活性汚泥法	16,087
G	標準活性汚泥法	35,574
H	標準活性汚泥法	120,630
I	標準活性汚泥法	349,134
J	標準活性汚泥法	620,937

10 処理場における EE2 の測定結果を表-8 に示した。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、LC/MS/MS、ELISA の各測定方法は、測定原理、検出方法が異なっており、それぞれ各方法の検出下限値は 0.05ng/l、0.13ng/l、0.6ng/l である。検出下限値は、各測定法における検出下限値付近の濃度の標準試料を繰り返し測定し標準偏差（S）を求め、その 3 倍（3S）とした。

HR-GC/MS の測定結果をみると、流入水では検出下限値以下であるのに対し処理水では検出されているケースが見られる。流入水では処理水より夾雑成分が多く、前処理による精製が不十分となり EE2

表-8 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	－	－
G	nd	nd	nd	nd	－	－
H	nd	0.12	nd	nd	－	－
I	nd	0.07	nd	nd	－	－
J	nd	0.28	nd	nd	－	－

注：ndはnot detectable(検出下限値以下）、－は未測定

のピークがベースラインのノイズに埋もれてしまったことが原因と考えられる。夾雑成分の多い試料で目的成分を検出しようとする場合、ベースラインのノイズが大きいことから、結果として、標準試料の繰り返し測定から求めた検出下限値に比べ検出下限値が高くなることがある。

HR-GC/MS、LC/MS/MS による機器分析と ELISA による測定を行った 5 ヶ所の調査結果のうち両測定方法で検出された B、D 処理場の処理水の測定値を比較すると、ELISA による測定値が 70～160 倍高い値であった。ELISA による測定は抗原抗体反応と酵素反応を組み合わせた測定方法であり、目的成分（EE2）以外の類似化学物質の影響を受け測定値が高くなることがある。本調査では機器分析、ELISA の両測定方法で検出されたケースは 2 データのみであることから断定はできないが、ELISA による方法は機器分析に比べ 100 倍程度高い値を示す可能性があることが示唆された。

A、B、C、D の 4 ヶ所の処理場は ELISA による測定方法を用い平成 11 年 7、8、9 月に土木研究所が調査している。本調査結果の ELISA による測定値と比較し図-10 に示した。流入水中の EE2 濃度は平成 11 年の調査時と比べると、ほぼ同等あるいは 6 倍程度高い値であった。処理水中の濃度でも 3～6 倍の値を示した。EE2 はピルの主成分であることから、平成 11 年当時に比べその使用量が増えている可能性が示唆された。しかしながら、前述したように下水処理水中の EE2 濃度は極微量であり、生物影響が懸念される女性ホルモンのエストラジオール（E2）濃度の 1/10 程度である。また、EE2 のエストロゲン活性[5] は E2 の 0.4 であることから EE2 そのものの生物影響の可能性は小さい。

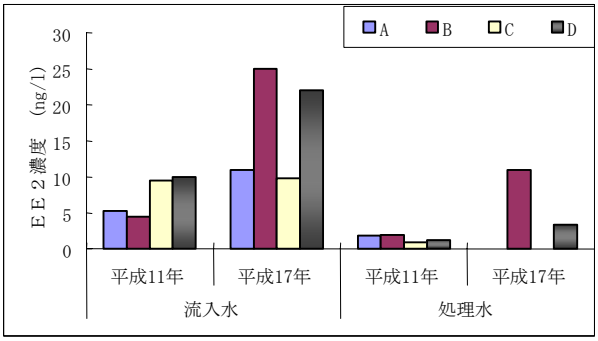


図-10 EE2濃度の平成 11年（7,8,9月）調査と平成17年（1,2月）調査の比較

４．下水処理工程での運転条件と除去率の関係

4.1.　下水処理場におけるE2, E1の実態把握

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、エストロゲンのうち17β-エストラジオール（E2）、エストロン（E1）、17α-エチニルエストラジオール（EE2）をこれまでに報告してきた方法[6)~9)]により測定し下水処理場での挙動把握を行った。

E2、E1は、最初沈殿池流入水（初沈流入水）と最初沈殿池流出水（初沈流出水）の値を比べるとほぼ同じ値を示しており最初沈殿池内での分解はほとんど見られないが、曝気槽内に入るとE2は徐々に減少し、曝気槽のほぼ中間で検出下限値(0.5ng/L)未満となった。一方、E1は曝気槽内に入りいったん初沈流出水の1.8倍程度に増加した後、徐々に減少した。E2は活性汚泥により容易に分解しE1に変化するとの報告[8)]があり、本調査結果も曝気槽内でE2がE1に変化したものと考えられる。また、曝気槽内にE1が残存しているが、E2の分解速度に比べE1の分解速度が遅いことが原因の一つとして考えられる。

4.2.　下水処理場におけるエストロゲンの挙動詳細調査

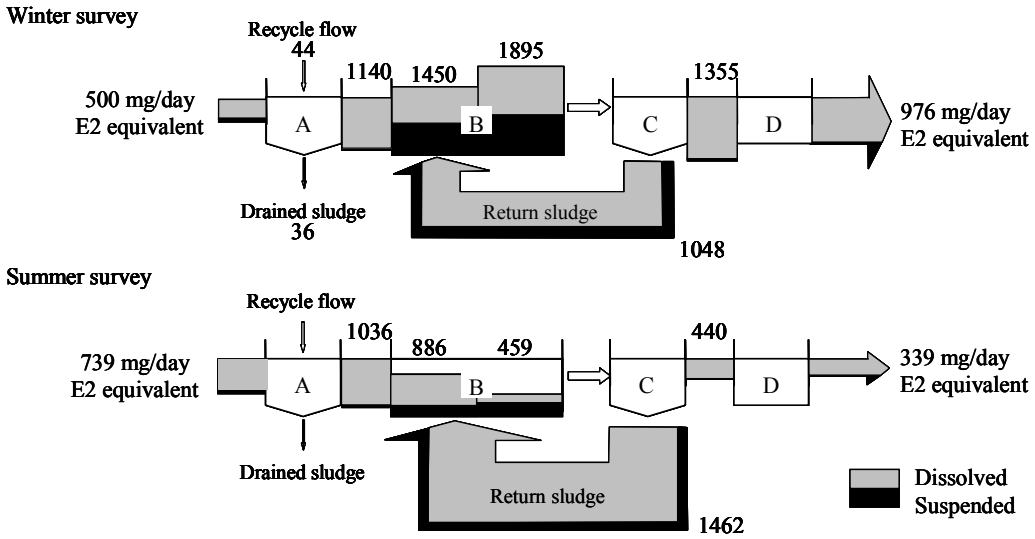
4.2.1　調査方法

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

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

4.2.2　調査結果

本調査により、E2、E1、エストロゲン様活性（図-11）ともに、冬期に比べ夏期に高い除去率が確認された。同時に測定を行ったSS、BOD、CODについては、両調査ともに良好な除去率（90%以上）が確認された



Water temperature of the plant influent and removal efficiencies of conventional water quality parameters.

	Plant influent temp. (°C)	BOD (%)	COD_{Mn} (%)	SS (%)	NH_4^+-N (%)
Winter survey	16.4	99	93	98	26
Summer survey	26.7	99	91	98	60

Figure11. Mass balance of estrogenic activity (in mg/day, E2 equivalent) through physicochemical treatment (A and C), biological treatment (B),and chlorination process (D) during winter and summer in a municipal sewage treatment plant in Japan.
A: Primary settling tank; B: Aeration tank; C: Final sedimentation tank ; D: Chlorination tank

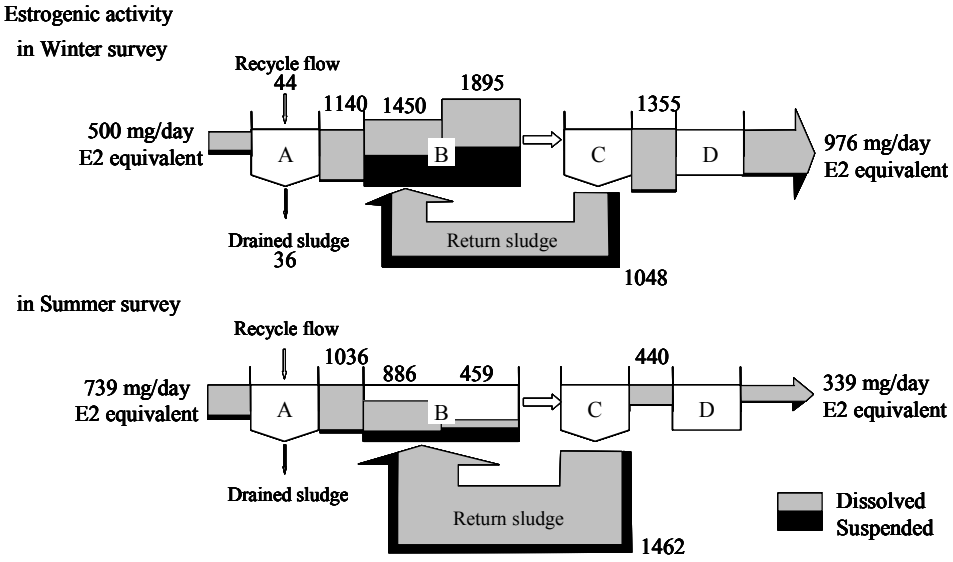


Fig.12 . Mass balance of estrogenic activity (a, in mg/day, E2 equivalent) through physicochemical treatment (A and C), biological treatment (B), and chlorination process (D) during winter and summer in a municipal sewage treatment plant in Japan.
A: Primary settling tank; B: Aeration tank; C: Final sedimentation tank; D: Chlorination tank

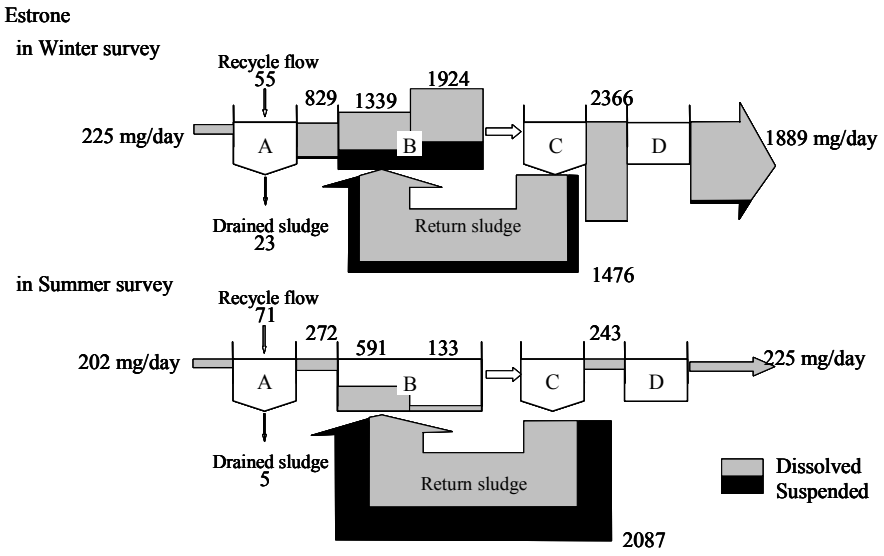


Fig.13 . Mass balance of estrone (in mg/day) through physicochemical treatment (A and C), biological treatment (B), and chlorination process (D) during winter and summer in a municipal sewage treatment plant in Japan.
A: Primary settling tank; B: Aeration tank; C: Final sedimentation tank; D: Chlorination tank

が、T-N については冬期に低い除去率が確認された（冬期：16%、夏期：41%）。

E2 は両調査において高い除去率が確認された（冬期：70%、夏期：87%）のに対し、E1 については処理工程が進むにつれ濃度が増加（冬期：740%増加、夏期：50%増加）し、その傾向は特に冬期に顕著であった。

エストロゲン様活性についても E1 同様に、冬期の調査においては処理工程が進むにつれ活性値の増加が確認された（図-11：除去率として冬期：-97%、夏期：39%）。機器分析により定量した E1、E2、ノニルフェノール濃度より、下水処理過程の各水試料中で検出されたエストロゲン様活性値の大部分は E1 の寄与によることが確認された。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、硝化が抑制されるため、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。

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、エストロゲンのうち E2、E1、17α-エチニルエストラジオール（EE2））をこれまでに報告してきた方法[6)～9)]により測定し下水処理場での挙動把握を行った。E2、E1 は、最初沈殿池流入水（初沈流入水）と最初沈殿池流出水（初沈流出水）の値を比べるとほぼ同じ値を示しており最初沈殿池内での分解はほとんど見られないが、曝気槽内に入ると E2 は徐々に減少し、曝気槽のほぼ中間で検出下限値(0.5ng/L)未満となった。一方、E1 は曝気槽内に入りいったん初沈流出水の 1.8 倍程度に増加した後、徐々に減少した。E2 は活性汚泥により容易に分解し E1 に変化するとの報告[12)]があり、本調査結果も曝気槽内で E2 が E1 に変化したものと考えられる。また、曝気槽内に E1 が残存しているが、E2 の分解速度に比べ E1 の分解速度が遅いことが原因の一つとして考えられる。

4.3. 高DO，長SRT条件下でのエストロゲンの除去特性

英国の下水処理場下流の河川におけるローチの雌性化が社会問題化して以来、国内外で下水道におけるエストロゲン様物質に関する様々な調査が行われており、その水環境中の濃度とエストロゲン様活性から、遊離体エストロゲン（E2、E1）や合成エストロゲン（17α-エチニルエストラジオール（EE2））が主に注目されている。しかし、人畜の体内から排出されるエストロゲンは、その大部分が抱合体の形態として排出され、水環境中では脱抱合し、遊離体に変化する可能性があることを考慮すると、エストロゲン抱合体を含めた調査の必要があると考えられる。

15 年度には、土木研究所が開発した分析手法を用いて、遊離体エストロゲン E2, E1, E3）と合成エストロゲン（EE2）に加えて、E1、E2、E3 の硫酸又はグルクロン酸の抱合体の estrone-3-sulfate (E1-S)、β-estradiol 3-sulfate (E2-S)、estriol 3-sulfate (E3-S)、Estrone β-D-glucuronide (E1-G), β-estradiol 17- (β-D)-glucuronide (E2-G)、estriol 3-(β-D-glucuronide) (E3-G)、β-estradiol 3-sulfate 17-glucuronide (E2-S&G)、estradiol 3,17-disulfate (E2-diS) の 12 化合物について、下水処理場の流入下水および二次処理水中の濃度の実態を把握した。

16 年度は、下水処理で主に用いられている活性汚泥法における遊離体エストロゲンとエストロゲン硫酸抱合体の変化の特性を把握するために、実下水により好気条件で馴養した活性汚泥を用いた検討を行った。ここでは、既存の下水処理場の好気工程でのこれらの物質の除去を想定し、好気工程で設定可能な条件（曝気風量調整、汚泥の引き抜き調整）のうち最も除去のために有利と考えられる条件を設定した。なお、エストロゲングルクロン酸抱合体については、分析における添加回収率のバラツキが大きいため、今回の検討対象からは除外した。

１）連続実験装置

連続実験装置の概略を図 14 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、本報告の実験条件で 3 か月間馴致した。なお、本報告の連続実験は、冬期に行われたものであり、期間中、水温は 10℃程度にまで低下した。反応槽は、茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場内の国土交通省国土技術政策総合研究所湖北総合実験施設室内に設置し、好気部分を 7.2L に設定した。

好気槽および固液分離槽では、エアストーンを通じて曝気を行った。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 の反応槽混合溶液を採

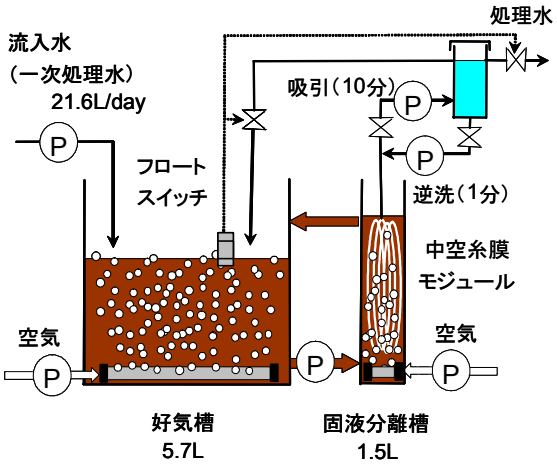


図14 連続実験装置の概要

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。

２）測定方法

測定対象物質は、遊離体エストロゲンの E2、E1、E3、合成エストロゲンの EE2、エストロゲン硫酸抱合体の、β-estradiol-3-sulfate（E2-S）、estradiol 3,17-disulfate（E2-diS）、estron-3-sulfate（E1-S）、estriol 3-sulfate（E3-S）の計 8 化合物である。これらの物質の分析計量は週 1 回、流入水および処理水をスポット採取し実施した。分析方法は、下水試験方法 [34] によった。一般項目（DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N）の分析計量は、基本的には週 2 回、流入水および処理水をスポットサンプリングして実施した。

３）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 15 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、好気工程における分解性が小さいと考えられる。

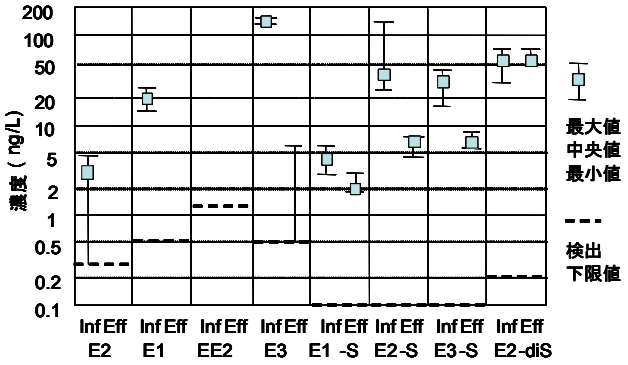


図15 流入水および処理水中のエストロゲン濃度

図-16, -17 に、連続運転期間中に、反応槽の活性汚泥に、8 時間分の流入下水を添加して実施した回分実験の結果を示す。遊離体エストロゲンは実験開始後 4 時間程度で水中からは検出されなくなったが、エストロゲン硫酸抱合体は、実験開始後 10 時間を経過しても検出され続け、一定濃度に漸近する挙動を示した。この結果は、連続実験結果を裏付けるものとなった。

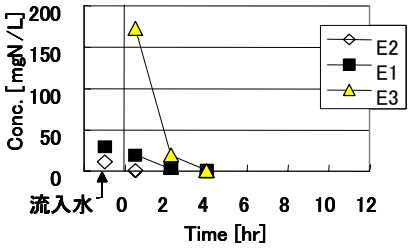


図-16 回分実験における、反応槽の遊離体エストロゲンの変化

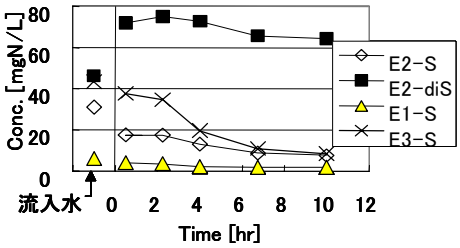


図-17 回分実験における、反応槽のエストロゲン硫酸抱合体の変化

4.4. DO濃度の条件とエストロゲンの除去特性の関係

本研究では、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、下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化の特性を把握することを目的とした。なお、日本の下水処理場の大部分は標準活性汚泥法で運転されているため、本法における DO 濃度の条件とエストロゲン関連物質の除去との関係を把握することとした。

4.4.1 エアレーションタンク流下過程を再現した回分実験

１）分析対象物質の分析方法

本調査で測定対象としたエストロゲンは、女性ホルモンの E2、その代謝生成物である E1、エストリオール（E3）、合成エストロゲンの EE2、(以上の 4 物質を総して遊離体エストロゲンと呼ぶこととする)、また、E2、E1、E3 それぞれの硫酸抱合体である、estrone-3-sulfate（E1-S）、β-estradiol-3-sulfate（E2-S）、estriol-3-sulfate（E3-S）、estradiol 3,17-disulfate（E2-diS）の 8 化合物である。これらの対象物質は、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS/MS）により測定した。測定条件、検出下限値、標準物質の

添加回収率などの詳細は文献[38]のとおりである。

２）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、攪拌機を備えた容量 150L のステンレス製容器を 3 系列準備し、各系列に均等となるように、最初沈殿池流出水 55L と返送汚泥 25L を注入し攪拌した。3 系列のうち 1 系列は攪拌のみを実施する嫌気系とした。また、他の 2 系列では、エアストーンを通じてエアポンプにより曝気し、併設した溶存酸素計の指示値と連動して曝気風量を調整することにより、1 系列を溶存酸素濃度が最終的にほぼ 0.5mg/L 以下になるように、また、残りの 1 系列を溶存酸素濃度が最終的にほぼ 3.0mg/L 以下になるように制御した。

各系列において、実験前後の MLSS および MLVSS（ガラス繊維ろ紙法）を測定するとともに、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 ろ紙によりろ過した。ろ液は、エストロゲン関連物質を測定するための試料として 1L 分取し、酸化防止のために 1g のアスコルビン酸を添加後直ちに冷蔵・保存した。分析は 2 日以内に固相抽出までを実施した。また、ろ液の一部は回分実験の進行状況を観察するため、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N および、NO_3^--N を併せて測定した。なお、本検討は 8 月に実施した。実験実施時の反応水槽の水温は 27-29℃であった。また、実験日以前の 3 日間は、降雨は無かった。

３）結果と考察

①　嫌気系

図Ⅰ-1 に反応槽溶液の pH、MLDO の変化を、図Ⅱ-1 に反応槽溶液の DOC および溶解性窒素の形態の変化を示す。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-1）は、実験開始時に E2（6.2ng/L）、E1、E3 が検出され、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。活性汚泥への吸着態の再溶解や、抱合体の脱抱合、それ以外の要因などの可能性が考えられる。なお、EE2（検出下限値 0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-1）については、いずれも大きな変化は見られなかった。

②　曝気工程終了時の MLDO を 0.5mg/L に制御した系

図Ⅰ-2 に反応槽溶液の pH、MLDO の変化を示す。本系列では攪拌に加えて曝気を実施したが、曝気開始当初は供給した溶存酸素が直ちに消費され、見かけ上嫌気状態となった。1 時間経過後以降 MLDO が上昇し始め、曝気開始後 6 時間後には、設定値である 0.5mg/L に到達した。以降はほぼ 0.5mg/L となるよう風量を制御した。

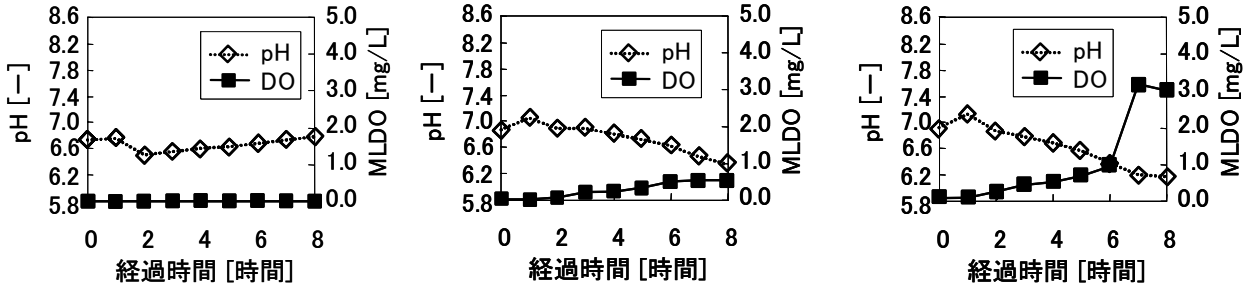
図Ⅱ-2 に反応槽溶液中の DOC および溶解性窒素の形態の変化を示す。MLDO が 0.5mg/L 以下であったが硝化は進行した。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-2）は、E2、E3 が疑似嫌気条件下においても減少し、2 時間後には検出下限値（E2：2.2ng/L、E3：0.4ng/L）以下になった。一方 E1 は、実験期間中を通じて大きな変化は見られなかった。なお、EE2（検出下限値 0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-2）は、E1-S、E3-S は遊離体エストロゲンのレベルより低く、E2-S はほぼ同等、E2-diS は高い濃度で検出され、E1-S、E2-S、E3-S 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。

③　曝気工程終了時の MLDO を 3.0mg/L に制御した系列

図Ⅰ-3 に反応槽溶液の pH、MLDO の変化を示す。本系列でも２）と同様に曝気開始当初は供給した溶存酸素が直ちに消費され、疑似的な嫌気状態となったが、1 時間経過後以降 MLDO が観測され始め、曝気開始後 7 時間後には、設定値である 3.0mg/L に到達し、以降はほぼ 3.0mg/L となるよう風量を制御した。

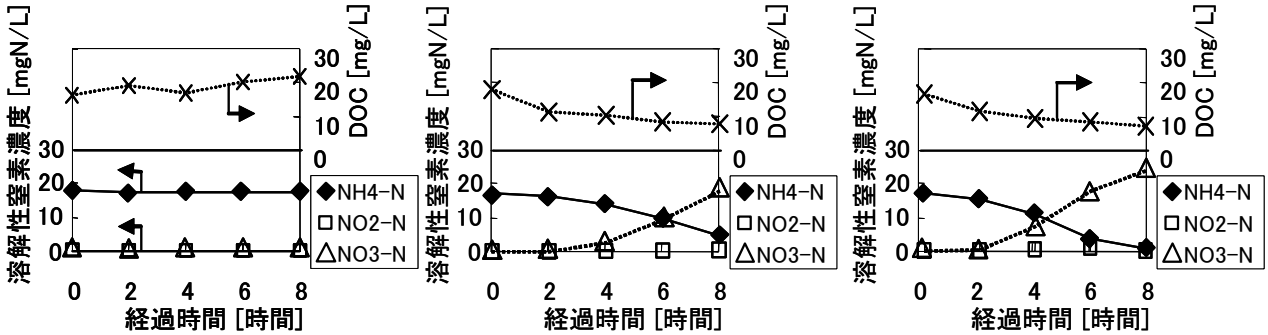
図Ⅱ-3 に反応槽溶液中の DOC および溶解性窒素の形態の変化を示す。２）に比べてやや早く硝化は進行した。遊離体エストロゲン（図Ⅲ-3）については、E2 は疑似嫌気条件下においても減少し、2 時間後には検出下限値以下になった。一方 E1 濃度は、実験開始後 6 時間後までは大きな変化が見られなかったが、MLDO が上昇した時点で急激な低下が観測された。以上より、E1 の減少速度は、硝化の進行の有無にかかわらず、溶存酸素濃度に大きく依存する

と推定された。EE2（検出下限値 0.5ng/L）はいずれの試料においても検出されなかった。エストロゲン硫酸抱合体（図Ⅳ-3）は、②と同様の傾向を示した。



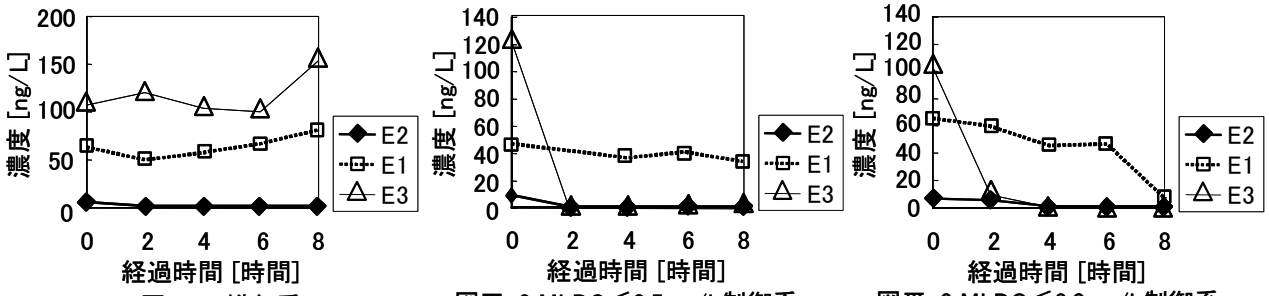
図Ⅰ−1 嫌気系　図Ⅰ−2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅰ−3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅰ−1, 2, 3 pH, MLDOの時間変化



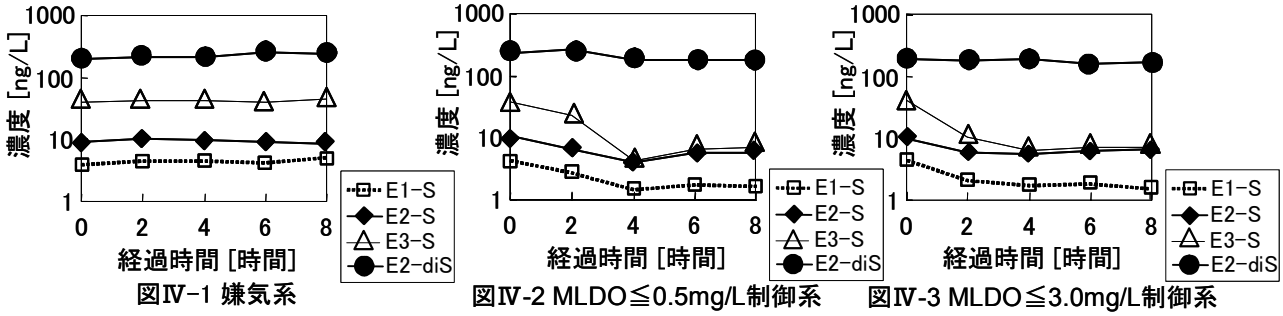
図Ⅱ−1 嫌気系　図Ⅱ−2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅱ−3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅱ−1, 2, 3 DOC, 溶解性窒素濃度の時間変化



図Ⅲ−1 嫌気系　図Ⅲ−2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅲ−3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅲ−1, 2, 3 遊離体エストロゲン（E2, E1, E3）の時間変化



図Ⅳ-1 嫌気系　図Ⅳ-2 MLDO≦0.5mg/L制御系　図Ⅳ-3 MLDO≦3.0mg/L制御系

図Ⅳ−1, 2, 3 エストロゲン硫酸抱合体（E1−S, E2−S, E3−S, E2−diS）の時間変化

4.4.2　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

これまでの検討において、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 が大きく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標準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、本報告の連続実験は、夏季の 3 週間に行われたものであり、期間中の水温は 25～27℃程度であった。また、本実験では、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絞り、擬似的な無酸素状態とした。

２）　測定方法

測定対象物質は、遊離体エストロゲンの E2、E1、E3（エストリオール）、合成エストロゲンの EE2 の計 4 化合物である。これらの物質の分析計量は週 1 回、反応槽の 4 箇所および二次処理水でスポット採取した試料のろ液について実施した。分析方法は、下水試験方法 [34] によった。一般項目（MLSS/VSS、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N）の分析計量は、週 2 回、エストロゲン分析用試料と流入水および最初沈殿池流出水試料をそれぞれスポットサンプリングして実施した。

３）　実験結果と考察

実験期間中の反応槽の平均汚泥濃度は MLSS/VSS＝1575/1230mg/L であった。図-18 に示すように、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、反応槽末部の無酸素条件（図-19）下では、わずかに内生脱窒が観察された。

遊離体エストロゲンは、E2 および EE2 は、いずれの試料においても検出されなかった。E3 は好気槽前段では検出されたが、後段および二次処理水では検出されなかった。E1 は、図 20 に示すように、好気条件下では流下方向に沿って減少する傾向が見られたが、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、E1 が増加する何らかの機構が存在する可能性が考えられた。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。今後は、循環式硝化脱窒法も含めて、脱窒条件下において E1 が増加する機構の詳細について検討を行っていく予定である。

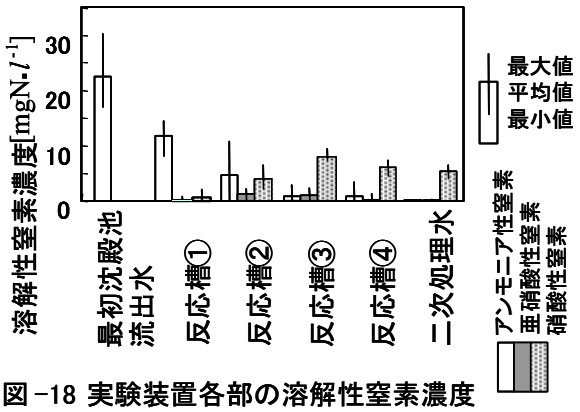


図 -18 実験装置各部の溶解性窒素濃度

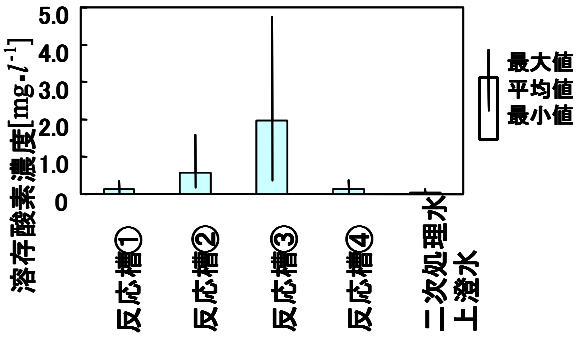


図 -19 実験装置各部の溶存酸素濃度

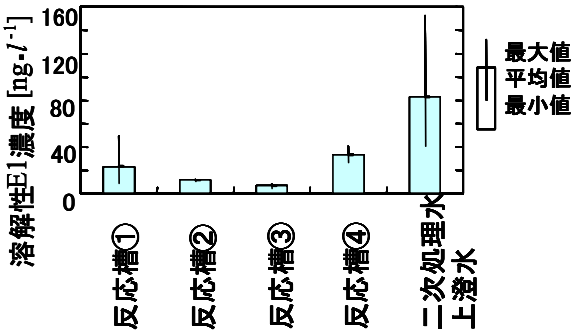


図-20 実験装置各部の溶解性エストロンの濃度

５．まとめ

① エストロゲンの下水処理過程での挙動の解明

・下水処理プロセスでのE2、E1は、初沈での減少はなく曝気槽内で減少しており活性汚泥により容易に分解された。

・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。

・20箇所の下水処理場においてエストロゲン及びエストロゲンの遊離体及び抱合体の実態調査を実施した。この結果、E2、E3は、下水処理で高い除去が認められたが、E1は50%程度の除去であった。また、これまで報告例が少ないエストロゲン抱合体の流入下水、二次処理水中の存在濃度を明らかにし、これらにはエストロゲン抱合体として存在するエストロゲンがかなり多いことが明らかになった。従って、遊離体だけではなく抱合体を含めたエストロゲンの挙動解析が必要と考えられる。また、エストロゲン抱合体の一部は下水処理を受けることにより増加する場合が見られ、流入下水中には測定対象以外の形態のエストロゲンが存在していることも考えられる。しかし、エストロゲン抱合体の分析においては、回収率が低いため、改善が必要である。

・下水処理の好気工程におけるエストロゲンの遊離体及び抱合体の挙動特性をラボスケールの実下水を用いた連続実験装置において検討した。MLDO>5mg/L、SRT=60日という好気的生分解に有利な処理条件においては、遊離体エストロゲンの除去は完全に行われ、エストロゲン硫酸抱合体も減少を示したが、依然、抱合体は二次処理水に残留する結果となった。好気条件下では、エストロゲン硫酸抱合体の難分解性が強いことが明らかになった。

・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、エアレーションタンクにおける流下過程を再現したMLDO制御の好気回分実験を実施した。① 嫌気条件下では、E1はやや増加する傾向が見られたが、吸着態の再溶解、E2からの生成、硫酸抱合体の脱抱合やそれ以外の要因により生成が生じていると推定された。② 曝気工程終了時のMLDOを0.5mg/Lに制御した系列では、硝化が進行し、E2の減少は観察されたが、E1については実験期間中を通じて大きな変化は見られなかった。③ 曝気工程終了時のMLDOを3.0mg/Lに制御した系列では、硝化が進行し、E2の減少は見られたが、MLDOが低い段階ではE1については変化が見られなかった。しかし、MLDOが3mg/L程度に達した時点で急激に減少した。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ことが明らかとなった。

・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では、硝化が進行し、無酸素条件下ではわずかながら内生脱窒が観察された。溶解性E1の濃度は、無酸素条件下および最終沈殿池での増加が観察された。

以上から、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。E1は、E2やエストロゲン抱合体の代謝生成物であると考えられ、これらの物質からの生成速度と、E1の減少速度との差によってE1濃度が決まると考えられるため、これらの点に配慮した検討も進めていく必要があると考えられる。

・10ヶ所の下水処理場において合成エストロゲンのエチニルエストラジオール（EE2）の実態を調査した。HR-GC/MS、LC/MS/MSの機器分析とELISAにより測定したところ、流入水、処理水中のEE2濃度は極微量であることが分かった。最も高感度で検出可能なHR-GC/MSによれば、流入水ではすべてnd、処理水ではndから0.28ng/lであった。

Ⅲ―２．ノニルフェノール類

１．下水道での挙動把握

本研究では、近年社会問題となっている内分泌撹乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）に関する物質のうち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。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注目されている。

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、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）をこれまでに報告してきた方法[8) 9)]により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。下水処理過程でのNPEO、NPECのEO鎖分布を図-21に示した。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。下水処理が進むに連れてNPnEC濃度が増加する理由の一つとしては、NPnEOとNPnECの分解速度の違いが考えられる。また、NPnECのEO付加モル数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。終沈流出水はNP1EO～4EO、NP1EC～4ECで構成されていること、NP濃度の顕著な増加は認められなかったことから、活性汚泥処理では、NPnEOはNPまでは分解されずNPnEO, NPnECのどちらの形態においてもEO付加モル数1～4までの分解にとどまる可能性が示唆された。

２．実験装置による挙動把握

ノニルフェノールポリエトキシレート（以下NPnEO）は、工業用洗剤などに幅広く利用されている。NPnEO は、好気条件下での生物分解により、より短い鎖長の NPnEO やノニルフェノキシ酢酸（以下 NPnEC）に変化し、その後、嫌気条件下において、生物反応により内分泌攪乱物質であるノニルフェノール（以下 NP）に変化するといわれている。

我が国の下水処理場の流入下水には NPnEO が存在しており、それらの物質の下水処理場での挙動、変化について注視する必要があると考えられる。また、我が国下水処理場では主に好気的な活性汚泥処理による水処理工程を行っている。

そこで、本研究では、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、基礎的な検討を行った。

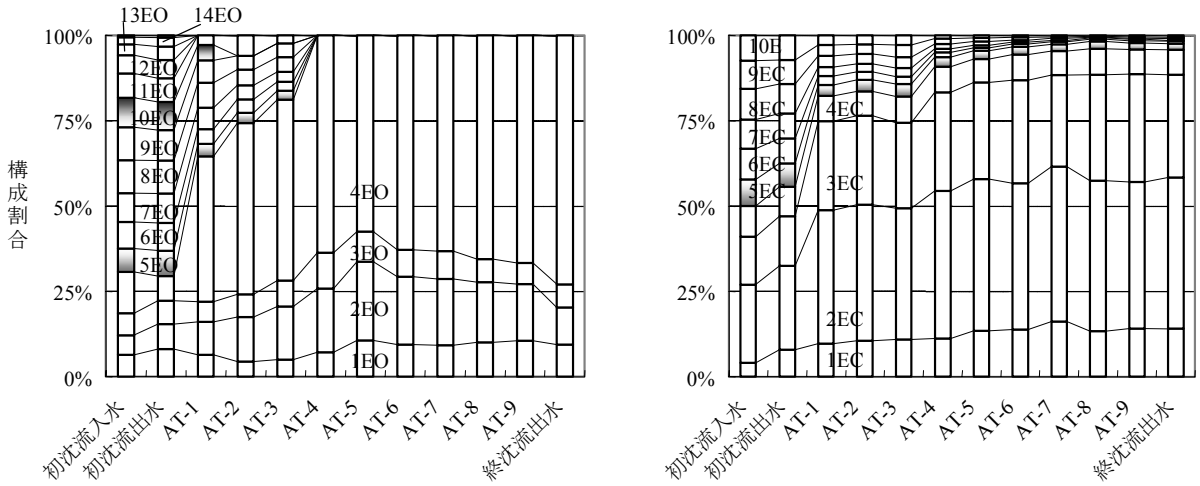


図- 21 下水処理過程でのNPEO、NPECのEO鎖分布図

下水処理場のエアレーション工程で実施されている運転条件を再現した、実験室規模の活性汚泥処理実験装置を準備した。室温25℃の実験室内に設置した、10L 容量のエアレーションタンクに対して水理学的滞留時間（HRT）を 24 時間に設定した。流入水は、無機基質と唯一の有機基質を NPnEO（average n=10）として活性汚泥を馴致した。そして、各水質項目の指標が安定した後、流入水、エアレーションタンク混合液、処理水中の溶解性 NPnEO、吸着態 NPnEO、溶解性 NPnEC、吸着態 NPnEC、溶解性 NP、吸着態 NP の測定を実施した。ここで、溶解性とは、試料を保持粒子径 1μm のガラス繊維濾紙（GF/B）でろ過したろ液中に含まれる成分とし、残渣中に含まれる成分を吸着態とした。各項目の測定は、下水試験方法[34] によった。なお、運転期間中のエアレーションタンクの溶存酸素濃度は、1.0mg/L 以下、固形物滞留時間（SRT）は、7 日～14 日程度であった。

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-22 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。

結果に示すように、エアレーション工程において、鎖長が短い NPnEO や NPnEC を経て NP が生成したように考えられた。この現象を再現するために、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として多量の鎖長が短い 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。この実験における、水と活性汚泥に含まれる NPnEO、NPnEC、NP の時間変化を図-23～24 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。また、初期 MLVSS 濃度を、90、180、370（mgVSS/L）として

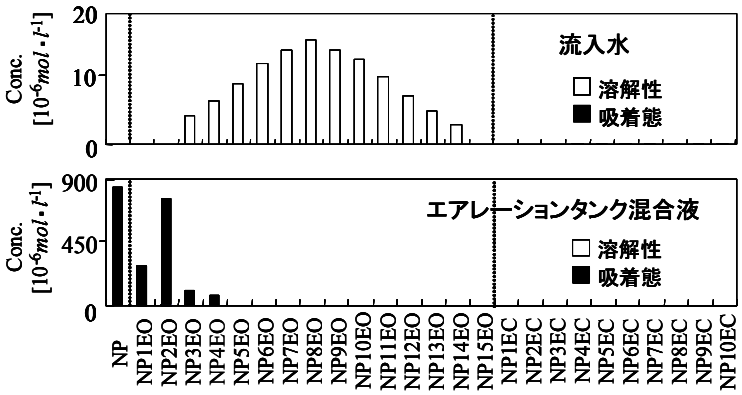


図-22 流入下水、エアレーションタンク混合液における NP、NPnEOs および NPnECs の濃度

行った実験においても同様の傾向を示した。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が短い NPnEO や NPnEC からの NP 生成は再現できなかった。原因のひとつは、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た。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と考えられた。

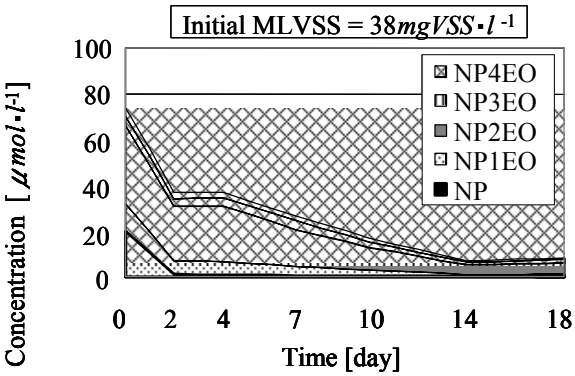


図23 NP（溶解性＋吸着態）および NPnEOs(n=1～15)（溶解性＋吸着態）の濃度

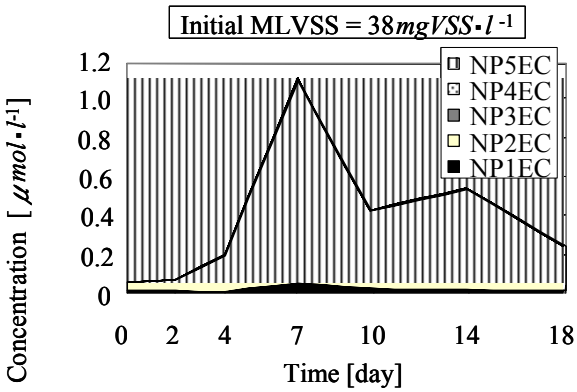


図24 NPnECs(n=1～10)（溶解性＋吸着態）の濃度

３．まとめ

・ノニルフェノールポリエトキシレート（NPnEO）は、活性汚泥処理ではNPまでは分解されず、NPnEO, ノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）のどちらの形態においてもEO付加モル数1～4までの分解にとどまる傾向が見られた。

・NPnEO を、唯一の炭素源として、DO を 1mg/L 程度の下水処理のエアレーションタンクと同様な条件の下で、好気的に連続系で処理した際に、鎖長 n=1～4 の NPnEO の活性汚泥への蓄積と NP の生成が観察された。この活性汚泥を用いて、飽和溶存酸素濃度の条件下で、短鎖長の NPnEO の好気回分分解試験を実施したところ、ノニルフェノール（NP）の生成は見られなかった。このため、短鎖長の NPnEO から NP の生成反応には、高濃度の溶存酸素濃度は阻害的に働き、低 DO 濃度が必要であると考えられた。

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) 郷田泰弘、廣部将人、小林綾子、藤本　茂、池　道彦、藤田正憲、岡安祐司、田中宏明：「女性ホルモン用ELISA試料の前処理法検討」、第３８回下水道研究発表会講演要旨集、pp903-905、2001.7.

3) Y. Goda, M. Hirobe, A. Kobayashi, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, Y. Okayasu, H. Tanaka：「Development of the ELISA for Detection of Estrogenic Hormones in Environment」、Preprints of the IWA 2nd World Water Congress P0013、2001.10

4) 郷田泰弘、藤本　茂、藤田正憲、田中宏明：「エストロン定量用ELISAの開発」、第３６回日本水環境学会年会講演集、433、2002.3.

5) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明「組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定」環境工学研究論文集、第36巻、pp.199-208、1999

6) 小森行也、高橋明宏、矢古宇靖子、田中宏明、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳによる下水試料中のエストロゲンの測定、第９回世界湖沼会議、発表文集第３分科会、pp.225-228、2001.11

7) 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

8) 小森行也、田中宏明、竹歳健治、活性汚泥処理プロセスにおける NP、NPEO の挙動、第 37 回下水道研究発表会講演集、pp713-715、2000

9) 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集、p526、2002

10) 小森行也、八十島誠、田中宏明、下水処理プロセスにおけるエストロゲンの挙動、第39回下水道研究発表会講演集、（社）日本下水道協会、pp.47-49、2002.07.

11) 八十島誠、小森行也、田中宏明、下水処理過程におけるノニルフェノール関連物質の挙動、第39回下水道研究発表会講演集、（社）日本下水道協会、pp.95-97、2002.07.

12) T.A.Ternes, P.Kreckel, J.Mueller, Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants, The Science of the Total Environment, 225,pp.91-99(1999)

13)小森行也、八十島誠、田中宏明、末岡峯数、大石俊雄、久野正、下水試料を対象としたエストロゲンの測定、第５回日本水環境学界シンポジウム講演集、p.186、2002.9

14) 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

15)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

16)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

17)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

18)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

19) 八十島誠他，下水中の環境ホルモン物質の分析技術,土木技術資料 Vol.45, No. 6, pp.68-73., 2003

20) 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

21) 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

22) 国土交通省都市・地域整備局下水道部,都市代謝ｼｽﾃﾑの再構築における下水道のあり方に関する調査，2001

23) 中村由美子 他,下水試料中ｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙ類の定量分析，第 10 回環境化学討論会講演要旨集，pp.134-135, 2001

24) 恩田健介 他,生物処理工程における女性ﾎﾙﾓﾝ様物質の挙動，第 38 回下水道研究発表会講演集，pp.160-162, 2001

25) 中沢均 他,中小規模 10 処理場における 17β-ｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙ及びﾉﾆﾙﾌｪﾉｰﾙの実態調査，第 38 回下水道研究発表会講演集，pp.166-168, 2001

26) 中村由美子 他,LC-MS/MS を用いたｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙ類の定量分析ー下水試料への応用ー，第 35 回日本水環境学会年会講演集，p.504, 2001

27) 国土交通省都市地域整備局下水道部,平成 12 年度下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告書,2001.3

28) 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

29) 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

30) 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

31) 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

32) 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

33) Y. Okayasu et al, Degradation of nonylpheol ethoxylate in aerobic

wastewater treatment process, Proceedings of IWA ECOHAZARD 2003 Conference, 13/1-13/7, 2003

34) 社団法人下水道協会編（2002）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.285-299

35) 岡安祐司他（2005）エストロゲン関連物質の好気条件下での分解特性について, 第 39 回日本水環境学会年会講演集, pp.52

36) 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

37) 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

38) K. Komori et al., Analysis and Occurrence of Estrogen in Wastewater in Japan, Water Science and Technology, (50)5, pp93-100, 2004

39) Yuji Okayasu, Yutaka Suzuki, Koya Komori, Makoto Yasojima, Occurrence of estrogeni-like substances in wastewater in Japan, Proceedings of International workshop on rainwater and reclaimed water for urban sustainable water use, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), pp.103-120, (2005.06.)

40) Koya Komori, Yuji Okayasu, Yutaka Suzuki, Occurrence of nonylphenol, nonylphenol ethoxylate surfactants and nonylphenol carboxylic acids in wastewater in Japan, PROGRAM and ABSTRACTS of IWA International Conference Sustainable Development of Chemical Industries with the Environment ～Waste and Wastewater Management～, International Water Association, pp.190-192 (2005.07.)

41) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穣, 下水試料中の合成エストロゲンの測定, 第42回下水道研究発表会講演集、(社) 日本下水道協会、pp.61-63 (2005.07.)

42) 岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣, 下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化に与える DO 濃度の影響, 第 42 回下水道研究発表会講演集、(社) 日本下水道協会、pp.64-66 (2005.07.)

43) Yuji Okayasu, Koya Komori, Makoto Yasojima Yutaka Suzuki, Degradation of Free Estrogens and their Conjugates in Wastewater Treatment Process, Technology 2005 2nd Joint Specialty Conference for Sustainable Management of Water Quality Systems for the 21st Century: Working to Project Public Health, Water Environment Federation, CD-ROM 05C pp.291-297 (2005.08)

44) Koya Komori, Yuji Okayasu, Makoto Yasojima, Yutaka Suzuki, Hiroaki Tanaka, Occurrence of Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylate Surfactants and Nonylphenol Carboxylic Acids in Wastewater in Japan , Technology 2005 2nd Joint Specialty Conference for Sustainable Management of Water Quality Systems for the 21st Century: Working to Project Public Health, Water Environment Federation, CD-ROM 05E pp.305-310 (2005.08)

45) 小森行也、岡安祐司、鈴木穣, 下水処理場におけるエチニルエストラジオールの実態, 環境ホルモン学会 第8回研究発表会要旨集、pp.71 (2005.09)

46) 岡安祐司、小森行也、鈴木穣、田中宏明、八 十島誠, 活性汚泥処理における、ノニルフェノールエトキシレートからのノニルフェノールの生成, 水環境学会誌、(社) 日本水環境学会、Vol.28、No.11、pp.671- 676 (2005.11.)

47) 岡安祐司、小森行也、鈴木穣, 活性汚泥処理におけるエストロゲンの挙動について, 第 40 回日本水環境学会年会講演集、日本水環境学会、pp.247 (2006.3.)

都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究

国土交通省
（委託先）独立行政法人土木研究所
水環境研究グループ水質チーム　鈴木　穣
小森行也
宮島　潔
東谷　忠
中田典秀
八十島誠

研究期間　平成１４年度～１７年度
平成１７年度当初予算　２８，６７４千円
（研究予算総額　１１３，０６１千円）

Effect of Estrogen-like Substances in Urban Wastewater on Fish and Their Indication

(FY2002-2005)

Yutaka Suzuki, Koya Komori, Kiyoshi Miyajima,
Tadashi Higashitani, Norihide Nakada and Makoto Yasojima
Water Quality Research Team, Water Environment Research Group

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

The phenomenon of feminization of fish and the existence of estrogen-like substances in the water environment in Japan have been reported in river surveys conducted since endocrine disrupter chemicals became an issue of public concern. However, there is no direct evidence of feminization caused by such substances so far.

This study set out to estimate the level of estrogen-like substances that affects fish through exposure tests using killifish, and to clarify the relationship between estrogenic activity in treated wastewater or in urban river water and the degree of feminization detected by the production of vitellogenin in the liver of male species. The study also examined the dominant substances contributing to estrogenic activity by comparing estrogenic activity measured by recombinant yeast assay and concentrations of each estrogen-like substance.

The results of the study were as follows:

(1) The dominant substance contributing to estrogenic activity was estrone (E1), followed by 17β-estradiol (E2) both in treated wastewater and in urban river water.

(2) The LOEC of E1 and E2 to produce vitellogenin in male killifish were 79.5ng/L and 5ng/L, respectively.
(3) The production of vitellogenin in male killifish was observed when it was bred in treated wastewater and in river water with the concentration of estrogenic activity more than around LOEC.
(4) Estrogenic activity can be used as an index of the feminization detected by the production of vitellogenin in male killifish.

１　はじめに

１－１　研究の背景

近年、世界各地で野生生物の生殖器官や生殖行動の異常が報告されている。これらの原因としては、人類の活動により放出される化学物質による内分泌系のかく乱が有力であると考えられており、そのような一群の化学物質は、内分泌かく乱化学物質（以下EDCs：Endocrine Disrupting Chemicals）と分類された。この問題は、1996年に出版された”Our Stolen Future”により、多くの人々の関心を集めることとなった。わが国においても、1997年の”Our Stolen Future”の邦訳『奪われし未来』の出版と、いわゆる「環境ホルモン」という言葉の流行により、社会問題にまでなった。

これまで報告されている野生生物の生殖行動等の異常には、ワニのペニスの矮小化、イボニシのインポセックス化等が知られているが、なかでも、魚類の雌性化についてはイギリスで以前から問題となっているとともに、わが国においても都市河川におけるコイの雌性化等が懸念されている。このような雌性化は、生体内におけるエストロゲン（女性ホルモン）の作用による現象と同様であることから、雌性化を引き起こす原因物質はエストロゲン様物質と呼ばれている。

エストロゲン様物質による魚類の雌性化については、イギリスにおいて、下水処理水が放流されている多くの河川で起きていることが多方面にわたる系統立てた研究から明らかにされてきた。このため、英国では下水道や都市排水の影響を低減化させる対策がとられ始めている。一方、我が国はイギリスに比べて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ため、我が国においても魚類の雌性化が今後問題となる可能性がある。

我が国におけるこれまでの調査等により、下水処理水や河川水にエストロゲン様物質が存在することや雄のコイに雌性化が見られることは明らかになってきたが、実際にエストロゲン様物質がコイの雌性化を引き起こしたのか、その場合エストロゲン様物質のうちどのような物質が雌性化に関与しているのか、といった点については明らかにされてこなかった。

この様な状況から、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を明確にする必要が生じてきている。そして、実際に影響が見られる場合には、下水道や都市排水に対する雌性化を抑制するため方策を考案するための材料として、エストロゲン様物質の由来の推定やエストロゲン作用を評価するための指標の設定が必要となってくるのである。

１－２　イギリスでの先行研究

イギリスでは魚類の生殖器官に異常が見られることが以前から知られており、その現象に対して先駆的な研究がなされてきたため、エストロゲン様物質が魚類にどのような影響を与えるのかについて、一定の知見が得られている。

まず、1980年代前半に実施された英国環境庁の生物調査において、Lea川の野生ローチ（*Rutilus rutilus*）に雌雄同体（精巣に卵母細胞をもつ個体）が発見された[1)]。その場所は下水処理場の下流部であったため、下水処理水に雌化の原因となるエストロゲン様の物質が含まれているとの仮説がたてられ、これを解明するための詳細な研究がこれ以降実施された[1-9)]。

下水処理水の魚類への影響を調べるため、まずフィールドでのケージ試験法が確立された。この方法[2)]は、鉄製ケージに養殖ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）を入れて、処理場放流口や放流先河川に設置するものであり、雌性化の有無は、雄の血中ビテロゲニン生成量を指標として判定された。ビテロゲニンはエストロゲンのはたらきによって肝臓で生成される雌に特異的な卵黄タンパク前駆物質であるため、エストロゲン作用の指標とされている。また、ケージの大きさは1.24×0.5×0.5mであり、これに入

れるニジマス個体数は、未成熟魚の場合8～20匹[2)]、雄成熟魚の場合10匹[3,4)]とされた。養殖ニジマスを用いたのは、年齢の均一な個体を多数確保できること、さらに、ニジマスビテロゲニンの測定法がすでに確立されていたことによる。曝露期間は、予備調査結果をもとに、ビテロゲニンの上昇を確実に把握できる3週間と設定された。

このケージ試験法を用いる下水処理場の放流口や放流先河川を対象としたフィールド調査は、予備調査を経て、1988年夏期[2)]、冬期[2)]、1989年春期[2)]、夏期[2)]、1992年夏期[3)]、冬期[3)]、1994年春期～夏期[4)]に実施された。これらの調査の結果、対照雄ニジマスの血中ビテロゲニン生成量は0.05～1.80μg/mL[2)]であったのに対し、下水処理水で飼育した場合には最大約10万倍（147,000μg/mL）[2)]にまで増加することが判明した。また、ニジマスビテロゲニンの生成は処理水や河川水のエストロゲン作用の強度に関連している傾向が得られ、放流口のみで影響のみられる場合[4)]や、Aire川のように放流口から下流5km地点までmg/mLレベルの影響が確認される場合[4)]があった。さらに、ビテロゲニン生成は下流最大15km[3)]まで続くことも明らかとなったが、降雨により増水した河川では、処理水が希釈されて魚類への影響が軽減される可能性も示唆された[3)]。

一方、フィールド調査と並行して、魚類に影響を及ぼすと考えられるエストロゲン様物質を用いた室内曝露試験も実施された。その結果、経口避妊薬であるエチニルエストラジオール（EE2）のニジマスへの最小作用濃度は0.1～0.5ng/Lの範囲にあり[2)]、非イオン界面活性剤（工業用洗剤の一つ）の分解産物であるノニルフェノール（NP）とオクチルフェノール（OP）の最小作用濃度はそれぞれ20.3μg/Lおよび4.8μg/Lという結果が得られた[5)]。

また、河川水質調査[6)]の結果、フィールド調査でニジマスの顕著なビテロゲニン生成を示したAire川では、羊毛洗浄工場の排水を受け入れているMarley処理場からの放流水のNPは330μg/Lであり、その下流でも180μg/Lの高濃度であった。その他の河川や処理場でのNPの濃度は<0.2～12μg/Lであった。なお、OPの濃度はMarley処理場の放流水で0.5μg/Lであったほか、河川の全地点で1μg/L未満であった。

以上のように、Aire川でニジマスに影響を及ぼしたのは、フィールド調査、室内曝露試験そして水質調査の結果から判断してNPであると考えられた[4,6)]。

その他の地点で確認されたニジマスへの影響については、処理水のエストロゲン作用の本質を見極める新たなアプローチがとられた。これは、水サンプルを極性の異なる複数の溶媒を用いて分画し、それぞれの画分についてエストロゲン様活性を調べ、さらに、活性をもつ画分においてエストロゲン様物質を同定するものである[7)]。この方法を処理水に適用した結果、エストロゲン様活性をもつ物質として、天然エストロゲンであるエストロン（E1）、17β-エストラジオール（E2）、さらに合成エストロゲンであるEE2が同定された。処理水中のこれらの濃度は、E1が1～80ng-E2/Lが1～50ng/Lであり、EE2は検出されない処理場が多いものの3処理場では0.2～7.0ng/Lであった[7)]。これらの濃度は、下水処理水放流先の河川に生息する魚類にビテロゲニン生成を引き起こすに十分な濃度と考えられたため、ニジマスおよびローチを用いてE1およびE2の室内曝露試験が実施された[8)]。この結果、E2の最小作用濃度はニジマスでは1～10ng/Lの範囲にあり、ローチでは10～100ng/Lの範囲にあると考えられた。また、ニジマスに対するE1の最小作用濃度は25～50ng/Lと考えられた。

養殖ニジマスを用いて確認された影響は、自然状態ではどの程度生じているのかを調べるため、1995～1996年に野生ローチを対象とした調査が実施された[9)]。8河川18地点および対照5地点から60～100匹の野生ローチが採集され、生殖腺の観察とビテロゲニンの測定が実施された。その結果、対照地点では10%、処理場上流では25%、処理場下流では60%のローチに雌雄同体が確認された。また、ビテロゲニンの濃度は雌雄同体魚の出現状況と同じく対照、上流、下流の順に高くなったことから、野生魚におけるビテロゲニンの上昇は、雌雄同体魚の出現状況の目安となることが示された。

英国の研究過程をまとめると、一連の研究は下記の通り進められたことがわかる。

(1) 下水処理水放流先河川での魚類曝露試験法を確立する[1,2)]。
(2) 魚類曝露試験を実施し、下水処理水の影響の有無を確認する[2-4)]。
(3) 雌化を引き起こした水試料を詳細に調べ、影響物質を特定する[6,7)]。
(4) 影響物質を用いた室内曝露試験によって、ニジマスへの最小作用濃度を明らかにする[5,8)]。
(5) 野生魚を対象に、自然環境での影響を把握する[9)]。

１－３　日本における既往フィールド調査

わが国では、多摩川のコイ（*Cyprinus carpio*）を対象とした調査[10,11]において、精巣の異常および雄コイのビテロゲニン生成が確認され、英国と同様の問題が提起された。そこで、魚類に生じている雌化について調査するため、国土交通省（旧建設省）は1998年度からコイを対象とした魚類実態調査[12-15]に着手した。

コイは、北海道を除き全国的に分布しており、成長の段階で雌雄の転換が起こりにくく、また、既往の研究例があるようにビテロゲニンの測定が可能であるため、調査対象魚に選定された。採捕するコイの大きさは、全長30cm以上を原則として、生殖腺の外観から雌雄の判定がおこなわれた。また、ビテロゲニンの測定はコイVTG-ELISAキットを用いておこなわれた。第1回調査は、1998年11月から12月にかけておこなわれ、8河川25地点で雄コイ111匹が採捕された。第2回調査は、綾瀬川および荒川（北陸）を追加して、10河川27地点を対象に1999年5月から8月にかけて実施された。荒川（北陸）は都市排水がほとんど流入しておらず、化学物質の影響が表れにくいと想定して追加された地点であった。第3回調査は、過去2回の調査から継続して実施すべき地点を選定し、2000年10月から11月にかけて5河川10地点で、また第4回調査も同様に地点を選定し、2001年10月から11月に４河川９地点で実施した。4回の調査で採捕した雄コイは合計551匹であった。

フィールド調査の結果、季節に関わらずビテロゲニンを生成している雄コイが29河川69地点で確認され、エストロゲン様物質により雌化が引き起こされている可能性が示唆された。また、国土交通省が、平成10年（1998年）から、全国の一級河川を対象とした内分泌かく乱化学物質の水質、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結果、下水処理場で高率に内分泌かく乱化学物質が除去されているが、完全に除去されなかった物質は水環境へ排出されていることが明らかとなった。このような水質調査によってエストロゲン様物質に関する水質データも得られたが、測定されたエストロゲンもしくはエストロゲン様物質の水中濃度と魚類内分泌系の応答との関係、これらの複合曝露による影響、曝露を受けた野生魚の繁殖もしくは繁殖行動や次世代への影響は明らかとなっていない。

英国の研究に対しわが国で実施されたフィールド調査を比較してみると、魚類に影響を及ぼすと考えられる下水処理水が実際に魚類の雌化を引き起こしているのか否か、これを明らかにすることが第一に必要な試験と考えられる。しかし、そのような曝露試験は実施されていないため、処理水による魚類影響の有無は不明なまま残されている。これらの影響を確認するためには、魚を用い、環境水の曝露試験を行うとともに、魚類内分泌系の応答の観測、曝露水質の測定を実施する必要がある。

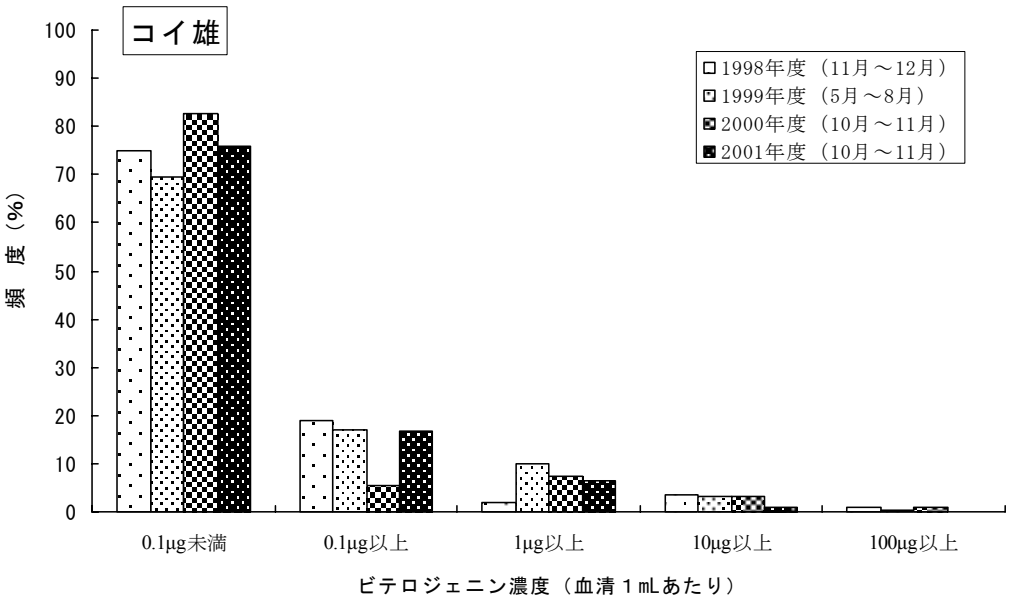


図 1-1　雄コイのビテロゲニン濃度測定結果

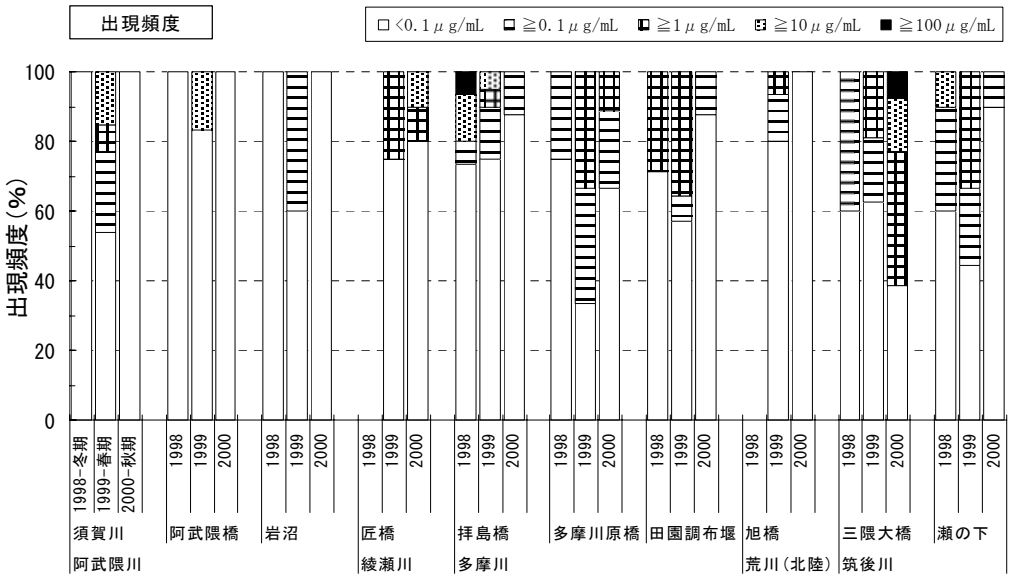


図 1-2　コイのビテロゲニン地点別調査結果（国土交通省魚類実態調査　1998-2000 年）

１－４　土木研究所水質チームにおける既往研究（下水処理水へのコイ曝露実験）

上記のような課題を踏まえ、土木研究所水循環研究グループでは、2000～2001年に魚類に対し、下水の二次処理水やオゾン処理水の曝露試験を実施した[16-17]。

(1) 試験の方法

英国で行われた研究では、多数の地点で魚類の雌化を引き起こす物質として17β-エストラジオール（E2）およびエストロン（E1）が報告されているため、本研究においても魚類曝露試験には家庭系排水を処理している下水処理場が適していると考えられた。さらに、処理方式および消毒方式として、代表的な標準活性汚泥処理および塩素消毒を採用している処理場が適していると考えられた。そこで、上記選定理由に適合した1処理場において、魚類曝露試験を実施することとした。

下水処理水を対象とする試験魚としてコイを選定した。コイは、わが国で初めてエストロゲン作用による問題が提起された魚種[10,11]であり、魚類実態調査[12-15]の対象となった魚種である。比較すべき知見が徐々に蓄積されるものと期待され、さらに、わが国で最初に提起された問題に対し、その影響の有無や要因を探る必要があると考えられた。雌性化の指標はビテロゲニンとし、フィールド調査と同じコイVTG-ELISAキットを用いた。

曝露試験の概要を表1-1に示す。第1回曝露試験（Run1）は、下水処理水によって雄コイのビテロゲニン生成は誘導されるのか否かを明らかにすることを目的として実施された。次にRun2では、雄のビテロゲニン生成を抑制する対策を探るため、処理水のエストロゲン作用を弱めるオゾン添加試験区および希釈試験区が採用された。また、Run3では脱塩素水道水を用いて雌から雄への作用を確認する試験が実施され、さらにRun4では、Run1と同じ季節に雄のみを用いて試験が実施された。Run1およびRun2では、試験開始時にコイの雌雄は区別せず、終了後に生殖腺を観察して判定した。Run3およびRun4では、精液を放出する個体を雄として、さらに購入時のビテロゲニン値を参考に雌雄が判定された。

ここでは、第1回および第4回曝露試験の結果について詳述する。第2回曝露試験（Run2）では、5つの試験区すべてにおいて雄ビテロゲニンの生成はみられず、また第3回曝露試験（Run3）では、雌から雄への影響はみられなかった。

(2) 第1回曝露試験（Run1）

2000年2月に着手されたRun1では、下水処理水試験区および対照試験区の2つの試験区にて、下水処理水によって雄コイのビテロゲニン生成は誘導されるのか否かを明らかにすることを目的に試験を実施した。さらに、雄にビテロゲニン生成が誘導される場合、時間経過による上昇の様子や到達濃度を把握するとともに、対照試験において雄の血中ビテロゲニンの正常値を明らかにすることとした。試験は、経時的変化を詳しく調べるため、試験期間を8週間と設定し、1週間ごとに血清サンプルを得た。コイは、各試験区に9匹を曝露した。試験終了後に雌雄を判定し

表 1-1　下水処理水でのコイ曝露試験概要（以前調査）

曝露試験	試験区	コイ 試験個体数（雄 / 雌）	体長（mm）	体重（g）	曝露期間
Run1	100%処理水	5 / 4	351.3 ± 16.3	1129.0 ± 98.7	8 週間
	対照	7 / 3	335.5 ± 18.0	1151.0 ± 93.2	2000年 2月 - 4月
Run2	100%処理水	7 / 5	338.9 ± 13.9	798.3 ± 53.2	8 週間
	10%処理水	7 / 6	326.3 ± 16.8	753.1 ± 65.8	2000年 7月 - 9月
	1%処理水	4 / 9	327.5 ± 15.8	758.5 ± 84.7	
	$O_3$10mg/L処理水	6 / 6	331.1 ± 15.4	776.7 ± 68.2	
	対照	6 / 7	338.1 ± 15.1	816.9 ± 51.4	
Run3	混合飼育①	5 / 10	352.2 ± 11.5	1170.0 ± 122.9	6 週間
	混合飼育②	5 / 10	343.4 ± 15.9	1025.3 ± 126.4	2000年 12月 - 2001年 2月
	対照（雄単独飼育）	15 / ー	332.1 ± 15.9	920.0 ± 113.0	
Run4	100%処理水	10 / ー	349.1 ± 14.6	1163.0 ± 129.2	8 週間
	10%処理水	10 / ー	343.3 ± 19.6	1087.5 ± 140.0	2001年 2月 - 4月
	$O_3$10mg/L処理水	11 / ー	330.6 ± 12.2	984.6 ± 73.7	
	O_3 2mg/L処理水	10 / ー	345.5 ± 14.0	1181.3 ± 139.8	
	対照	10 / ー	343.8 ± 12.9	1037.8 ± 104.8	

た結果、処理水試験区では雄5匹、雌4匹、対照区では雄7匹、雌2匹であった。なお、対照区の雌2匹は試験途中に死亡した。

処理水試験区のビテロゲニン測定結果を図1-3に示す。下水処理水に曝露された雄のうち4匹では、時間の経過にともないビテロゲニンが上昇し、4週目には1,000μg/mLほどに達する個体が現れた。その後変動はあるものの1μg/mL以上のレベルで推移し、8週経過した時点で脱塩素水道水に戻したところ、11週目（水道水3週目）には雄のビテロゲニンは低下した。曝露中のコイビテロゲニン最高値は1,400μg/mLであった。なお、1個体では試験開始時にビテロゲニンが生成していたが、曝露開始後一度ビテロゲニンが減少し再び上昇した。また、処理水試験区の雄1匹では、曝露によるビテロゲニン生成は認められなかった。試験終了後に精巣を観察した結果、ビテロゲニンを生成した雄4匹のGSI（生殖腺指数：体重あたりの生殖腺の重さ）は4.5～12.0%であり、成熟途中であると考えられた。ビテロゲニンを生成しなかった雄のGSIは8.3%であった。また、対照区では雄7匹すべてにおいてビテロゲニンは定量下限値0.039μg/mL未満のまま経過し、ビテロゲニンの生成は認めら

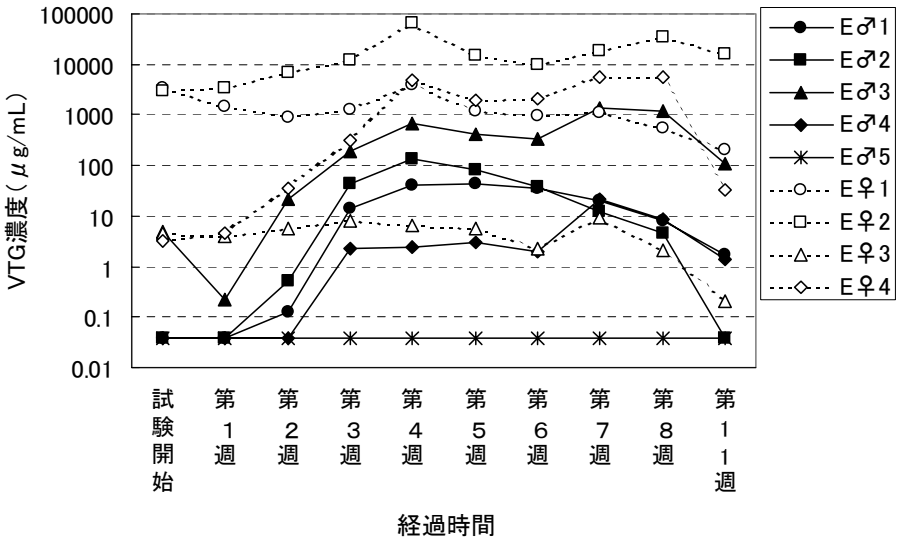


図 1-3　下水処理水に曝露したコイのビテロゲニン経時変化（Run1）

れなかった。これらのGSIは1.7～7.1%であった。

水質測定の結果、処理水のエストロゲン様活性は0.0036～0.0094μg/Lの範囲にあり、E2（ELISA法）は0.0246～0.0843μg/Lであった（表1-2参照）。なお、NPやノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）は検出されなかった。

なお、対照試験区の雄コイビテロゲニンはすべて定量下限値0.039μg/mL未満であったため、雄の正常値は定量できないレベルにあると考えられた。

(3) 第4回曝露試験（Run4）

下水処理水に雄コイを曝露したRun1およびRun2の結果、Run1では雄のビテロゲニンは上昇し処理水の影響があるものと考えられた。しかし、Run2ではそのような影響は再現されなかった。処理水のエストロゲン様活性はほぼ同レベルであると考えられたことから、この理由として季節によりコイの反応が異なることが考えられた。そこで、Run1と同じ季節に雄のみを用いてRun4として試験を実施した。なお、オゾン添加試験区として、10mg/Lと2mg/L（接触時間10分）の2つを設け、希釈試験区は10%とした。

しかし、2001年2月～4月に実施されたRun4では、試験の結果いずれの試験区においても雄ビテロゲニンの上昇はみられなかった。

(4) 水質測定結果

Run1およびRun4のエストロゲン様活性およびE2測定結果を表1-2に示す。

処理水のエストロゲン様活性は、いずれの試験でもほぼ同じレベルにあると考えられた。また、オゾン添加によるエストロゲン作用の低下が確認された。

Run4では、ELISAおよびLC/MS/MSの2つの方法で試験水のE2を測定したところ、これらの数値に大きな差がみられた。ELISA法による結合反応では、E2に形態のよく似た物質を合わせて測定している可能性が指摘されており、E2濃度が実際よりも高く表されたと考えられた。

(5) コイ曝露試験結果のまとめ

下水処理水にコイを直接曝露したRun1において、時間の経過とともに雄コイのビテロゲニンが上昇することが確認された。この結果、下水処理水に雄コイの雌化を引き起こす原因物質が含まれているものと考えられた。しかし、その後の試験では雄のビテロゲニン生成は再現されず、下水処理水に曝露した雄コイにビテロゲニン生成が確認されたのは、Run1において早春に雄と雌が混在していた場合に限られた。

表1-3に曝露試験でのエストロゲン様活性およびE2（ELISA）測定結果と、河川[12-15]および下水道[18-20]の実態調査におけるE2（ELISA）測定結果、さらに実態調査の際に同時に採水して測定したエストロゲン様活性[21,22]について示した。Run1での下処理水のエストロゲン様活性およびE2（ELISA）の平均値は、それぞれ0.0058μg/Lおよび0.0541μg/Lであった。Run2とRun4でのエストロゲン様活性およびE2（ELISA）の平均値は、それぞれ0.0054μg/Lおよび0.0353μg/Lであり、Run1に比べほぼ同等のエストロゲン作用であると考えられた。よって、雄コイのビテロゲニン生成に関わる要因は、処理水のエストロゲン作用だけではないと考えられた。

表 1-2　エストロゲン様活性及び 17β-エストラジオールの測定結果

水質項目	曝露試験	試験区	試験開始	第2週	第4週	第6週	第8週
エストロゲン活性	Run1	100%処理水	−	5.2	3.6	5.9	4.8
(ng/L)		100%処理水（流入）	9.4	4.8	5.5	7.3	6.0
0.02≦Tr<0.07		対照	1.5	ND	ND	ND	ND
ND<0.02		対照（流入）	1.3	ND	ND	ND	ND
	Run4	100%処理水	8.7	8.1	6.2	7.4	4.7
		$O_3$10mg/L処理水	1.0	ND	ND	0.07	0.3
		O_3 2mg/L処理水	9.5	8.6	0.8	0.3	5.5
		対照	0.07	ND	0.14	ND	ND
E2（ELISA）	Run1	100%処理水	−	58.0	52.7	57.5	44.0
(ng/L)		100%処理水（流入）	24.6	84.3	58.7	67.4	40.1
0.1≦Tr<0.3		対照	ND	ND	ND	ND	2.9
ND<0.1		対照（流入）	ND	ND	ND	ND	ND
	Run4	100%処理水	45.3	38.9	24.3	32.6	32.0
		$O_3$10mg/L処理水	ND	ND	ND	ND	ND
		O_3 2mg/L処理水	38.8	41.4	7.7	4.3	31.2
		対照	ND	ND	ND	ND	ND
E2（LC/MS/MS）	Run4	100%処理水	−	8.6	−	3.0	1.2
(ng/L)		$O_3$10mg/L処理水	−	9.9	−	ND	Tr(0.21)
0.4≦Tr<1.0		O_3 2mg/L処理水	−	16.5	−	Tr(0.78)	3.1
ND<0.4		対照	−	Tr(0.70)	−	Tr(0.45)	ND

ND：検出下限値未満

Tr：検出下限値以上，定量下限値未満

表 1-3　エストロゲン様活性と 17β-エストラジオール測定結果一覧表

水質項目	対象	中央値	平均値	最小値	最大値	検体数
				（単位：μg/L）		
エストロゲン活性	下水処理水[21]	4.7*	23.9*	ND	78.0	100
(ng/L)	河川[22]	2.2*	1.6	ND	31.0	150
0.02≦Tr<0.07	Run1-下水処理水	5.5	5.8	3.6	9.4	5
ND<0.02	Run2,4-下水処理水	4.6	5.4	3.1	8.7	10
E2(ELISA)	下水処理水[20]	10.0	―	ND	66.0	138
(ng/L)	河川[15]	―	―	ND	27.0	532
0.1≦Tr<0.3	Run1-下水処理水	57.5	54.1	24.6	84.3	5
ND<0.1	Run2,4-下水処理水	33.7	35.3	24.3	45.8	10

＊：元の文献に記載されていないが、算出することが可能であった数値

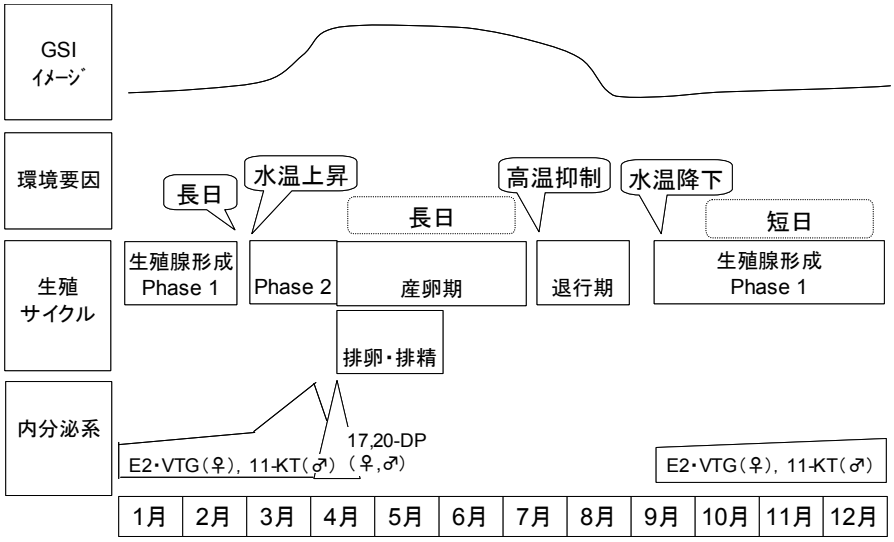
一方、Run1の水質測定結果と実態調査結果およびエストロゲン様活性測定結果を比較すると、調査対象となった処理場の放流先や河川ではエストロゲン様活性は比較的高いと考えられ、コイの雌化が発生する可能性があると考えられた。

魚類実態調査の結果では、すべての河川で雄コイのビテロゲニン生成が確認されており、また、季節に関わらずビテロゲニンを生成している雄が存在することが明らかとなった。しかし、地点別および季節別にこれらのデータをみると（図1-2参照）、阿武隈川の3地点および北陸の荒川では春期調査でのみ雄ビテロゲニンの生成がみられており、曝露試験結果と同様の傾向を示していると考えられた。

春に雄ビテロゲニンが生成される可能性について、コイの内分泌や生殖周期などの生理学的知見をもとに考察した。図1-4に過去の報告[23)24)]を参考に作成したコイ科魚類の生殖サイクル模式図を示す。

春の産卵期を迎えるために、コイの体内では秋から性ホルモンの分泌が始まっている。早春に長日条件への変化および水温上昇というシグナルを受けると、雌の体内ではエストロゲンが、またオスではアンドロゲン（男性ホルモン）が多量に分泌される。その後、盛夏に水温が25℃を超えるようになると、性ホルモンの分泌は抑制され、生殖腺は急激に退行する。なお、エストロゲンはアンドロゲンにアロマターゼ（薬物代謝酵素の一つ）が作用して合成されることが知られている。薬物代謝酵素は外来の化学物質を代謝するため、体内で合成される酵素である。

コイの生理学的観点からみると、早春に実施したRun1では、下水処理水のエストロゲン作用が直接ビテロゲニン生成に関与した可能性のほか、この時期に雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲンをもとに、アロマターゼの働きによってエストロゲンを合成し、その結果としてビテロゲニン生成が誘導された可能性が考えられる。この場合の内分泌かく乱作用はエストロゲン作用ではなく、アロマターゼ生成



E2:17βエストラジオール, VTG:ビテロジェニン, 11-KT:11-ケトテストステロン
17,20-DP:17α20βジヒドロキシプロゲステロン

図 1-4　コイ科魚類の生殖サイクル模式図

を誘導する作用と考えられる。

また、夏期に実施したRun2では、水温が30℃前後の高水温であったため、コイの生殖腺は退行を始めており、たとえアロマターゼが生成されたとしてもアンドロゲンからエストロゲンへの合成は進まなかったと考えられる。

さらに、Run1と同じ季節にもかかわらず、Run4ではビテロゲニン生成はみられなかった。この現象は、同じ水槽に雌が存在しなかったため生殖活動にともなうアンドロゲンの合成が活発化されず、その結果アンドロゲンからエストロゲンへの合成が進まなかったからと考えられる。なお、これらを明らかにするには、コイが産卵活動を行えるような生態学的視点をもとに曝露試験を組み立てる必要がある。

さらに、今後の魚類影響試験では、ビテロゲニンだけを指標とするのではなく、体内でのエストロゲン、アンドロゲンおよびアロマターゼの生成状況を明らかにする必要があると考えられた。

１－５　本研究の目的

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り、状況によって下水道や都市排水の対策をとる必要がある。

本研究の目的は以下の通りである。

①水試料の分画法と遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定を組み合わせることによって、水試料のエストロゲン作用について評価し、エストロゲン作用に寄与している物質を明らかにする。また、エストロゲン様活性を魚類の雌性化を表すことのできる簡便な評価指標としての検討を行う。

②実験室においてエストロゲン様物質に曝露させて魚類を飼育することにより影響が発現する濃度や条件を把握する。

③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することによって、エストロゲン様物質を含む河川水や下水処理水が魚類の雌性化に及ぼす影響を評価する。

２　研究方法

２－１　バイオアッセイによる水試料のエストロゲン作用評価と寄与物質の把握

２－１－１　組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定

試験水の総合的なエストロゲン作用を表すエストロゲン様活性を測定するため、Brunel 大学から分与された遺伝子組換え酵母を用い、測定法の検討を行った。

(1) 水試料の固相抽出法による濃縮

試料の前処理は、谷古宇らの方法を改良した方法で行った。すなわち、水試料 1L を GF/B（保持粒径 1μm）フィルターでろ過し、得たろ液をあらかじめ脱イオン水、メタノールでコンディショニングを行った Sep-Pak C18 カートリッジ(Waters 社製、充填量：360mg)に上向流で通水（10ml/min）した。このカートリッジを窒素気流下で乾燥させた後、メタノール 10ml で吸着物質を溶出し、溶存態の試料として抽出液を得た。一方、フィルター上の残渣はメタノールに浸し超音波抽出（10 分）を２回行った後、GF/B フィルターに通液し、懸濁態の試料を得た。これらの抽出液をロータリーエバポレーターによって濃縮し、約 1mL に調整した後、この試料を窒素気流下で乾固し、100μL の DMSO に転溶した。そして遺伝子組み換え酵母法の測定前に滅菌蒸留水によって５倍に希釈し、最終的な試料濃縮倍率を 2000 倍とした。

(2) 遺伝子組み換え酵母法（Sumpter 株）

Brunel 大学から分与された遺伝子組み換え酵母には、エストロゲン受容体が組み込まれており、エストロゲンやエストロゲン様物質が結合すると、その濃度に応じて β-ガラクトシダーゼが発現するように組み込まれている。この β-ガラクトシダーゼの量を計ることにより、エストロゲン様活性を定量する。この活性は 17β-エストラジオール換算量（単位：ng-E2/L）として表される。

遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定法については Routledge らの方法[25]を改良した矢古宇らの方法[26]に従った。すなわち凍結保存の組み換え酵母菌株を三角フラスコ中の Growth Medium に植菌し、28℃で 24 時間旋回培養した。培養液は、Assay Medium（発色試薬：クロロフェノールレッド β-D-ガラクトピラノシド(CPRG)を含む Growth Medium）に 4×10^7cell/ml となるように添加した。この Assay Medium を 96 穴マイクロプレート(FALCON 社製)の各ウェル内に、180μl ずつ添加し、標準物質（n=8）および濃縮操作を行った河川試料(n=3)の希釈系列を作成し、これらを 20

μLずつ添加し、マイクロプレートリーダー(Wallac社 ARVO SX1420) を用いて吸光度(550nm,600nm)を測定した。その後、28℃で7日間静置培養し、再度マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。換算値は、以下の換算式に測定値を挿入して算出した。「換算値＝培養後のOD550値－(培養後のOD600値－BlankのOD600値) 」

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

２－１－２　エストロゲン様物質等の化学分析

水試料のエストロゲン様活性に寄与する物質を推定するため、化学分析によるエストロゲン様物質の濃度測定を行い、各物質のエストロゲン理論活性値を用いてエストロゲン様活性を算出した。

(1) 分析項目と分析方法

溶存態試料および懸濁態試料について、以下の分析を行った。エストロゲン様物質の分析項目は、全国実態調査の結果 [20] と、各物質のエストロゲン様活性のポテンシャルを考慮して、エストロン (E1) 、17β-エストラジオール(E2)、エストリオール(E3)、硫酸抱合体化 E1(E1-S)、グルクロン酸抱合体化 E1 (E1-G)、硫酸抱合体化E2(E2-monoSおよびE2-diS)、グルクロン酸抱合体化E2 (E2-monoG) 、硫酸およびグルクロン酸抱合体化E2 (E2-S&G) 、硫酸抱合体化E3(E3-monoS)、グルクロン酸抱合体化E3(E3-monoG)、経口避妊薬に含まれる人工エストロゲンであるエチニルエストラジオール(EE2)、ノニルフェノール(NP)とした。またノニルフェノールエトキシレート(NPnEO), ノニルフェノールフェノキシ酢酸(NPnEC)についても測定を行った。

E1、E2、E3、EE2、E1-S、E1-G、E2-monoS、E2-diS、E2-monoG、E2-S&G、E3-monoS、E3-monoG、EE2 については、小森らの方法 [27] に従い LC/MS/MS を用いて測定を行った。また NP、NPnEO については下水試験法追補暫定版 [28] に従いHPLCを用いて測定を行った。NPnECについては八十島らの方法 [29] に従いLC/MS/MSを用いて測定を行った。

上述の微量物質の分析とともに、各試料について、浮遊粒子状物質量(SSおよびVSS)、溶存炭素量(DOC)、各態無機窒素濃度、生物化学的酸素要求量 (BOD) 、化学的酸素要求量(COD)といった一般項目の分析を、下水試験方法に従い行った。

(2) エストロゲン理論活性値

エストロゲン作用を有する物質のエストロゲン様活性への寄与を算出するため、各物質によるエストロゲン理論活性値を算出した。理論活性値は各物質濃度に比活性値を乗じることによって算出した。比活性値については矢古宇らの文献 [26] に従い E1=0.3、E2=1.0, NP=0.001 とした。また矢古宇らの文献に記載のない NPnEO や NPnEC については、文献に記載された試験方法に従って試験を行い、比活性値を算出することとした。

２－１－３　エストロゲン様物質の分画方法

水試料のエストロゲン様活性の原因物質を特定するため、エストロゲンやノニルフェノール等の分画が可能な手法の検討を行った。

(1) HPLCを用いた分画分取方法（3分画）

分画、分取は、Giesyらの方法を修正した方法 [30] で行った。まず、ガラス繊維ろ紙、架橋ポリスチレンを組み合わせた固相ディスクに試料 5L を通水し、対象物質を吸着させた。アセトン 15mL、ジクロロメタン 25mL、ヘキサン 10mL をディスクに順次加え、乾燥、濃縮後、HPLCに供した。

HPLCによる分画は、シリカゲルカラムに 30%ジクロロメタンのヘキサン溶液、ジクロロメタン、メタノールを順次溶出液として用いて順相で行った。

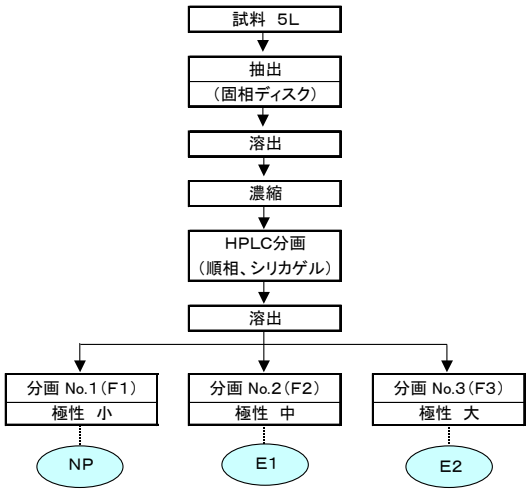


図 2-1　HPLCを用いた分画分取（3分画）手順

(2) 固相カートリッジを用いた分画分取方法（9 分画）

まず、組み換え酵母法の濃縮方法に従って固相抽出を行なった試料を、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図 2-2 に示すようにアセトン 10ml/min、ヘキサン(Hex)：ジクロロメタン(DCM)=1：1 溶液 10mL/min でコンディショニングを行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、ジクロロメタン、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、9 分画の溶出液を得た。これらの試料を窒素気流下で乾固した後、MeOH に転溶し酵母法の試料とした。

(3) HPLC を用いた分画方法（多分画）

さらに、より分離能が高い HPLC を用いた分画手法の検討を行った。分析条件を表 2-1 に示した。

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

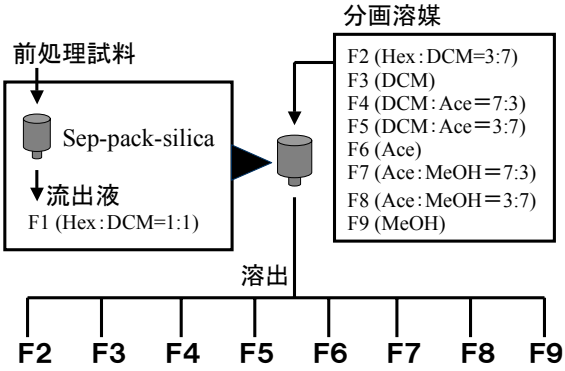


図 2-2　固相カートリッジを用いた極性分画（9 分画）

２－１－４　調査対象

下水や河川水のエストロゲン様活性の実態とその寄与物質を把握するため、以下の下水処理場、河川の調査において試料採取および水質分析を行った。

(1) 全国下水処理場流入処理実態

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、以前の研究も含め、全国 60 処理場で調査を行った。また、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が、その際調査対象とした下水処理場の処理方式と処理水量を図 2-3 に示す。

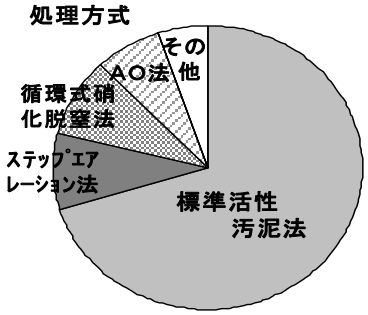
(2) 下水処理場詳細調査

神奈川県内にある下水処理場にて、2004 年 1 月と 7 月に、処理場の定期調査日に合わせて調査を行った。同処理場は、標準活性汚泥法を採用しており、計画処理人口、処理能力はそれぞれ 28,000 人、30,600m^3/日であり、現行処理人口、処理能力はそれぞれ 30,500 人、20,400m^3/日である。

各調査日において、2 時間毎 24 時間、図 2-4 に示した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。得られた試料は、最初沈殿池へ流入する流入下水（スクリーン通過済み)、最初沈殿池流出水、汚泥脱水排水である返流水、最初沈殿池汚泥、エアレーションタンク前段の表層水、同後段の表層水、最終沈殿池流出水、返送汚泥、塩

表 2-1　HPLC を用いた分画（多分画）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						



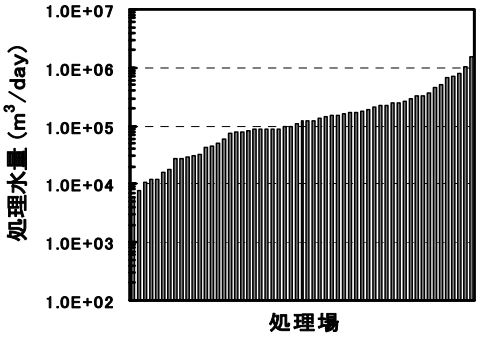


図 2-3　調査対象処理場の処理方式と処理水量

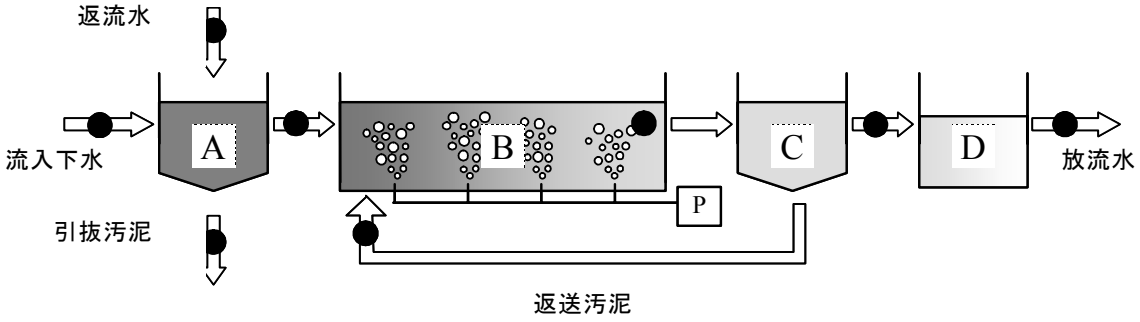


図 2-4　下水処理場における調査の採水地点（黒丸）
A:最初沈殿池　B:生物反応タンク　C:最終沈殿池　D:塩素接触槽　P:送風機

素消毒後の放流水である。分析対象成分の分解を抑えるため、得られた試料にアスコルビン酸を添加し（1g/L）、氷冷しながら研究室に持ち帰った。

(3) 全国一級河川調査

試料の採取は、国土交通省が実施した「水環境における内分泌撹乱物質に関する実態調査」（以後、全国河川実態調査）に併せて実施した。調査地点を図 2-5 に示した。94 水系 132 地点で調査を行い、エストロゲン様活性を測定した。

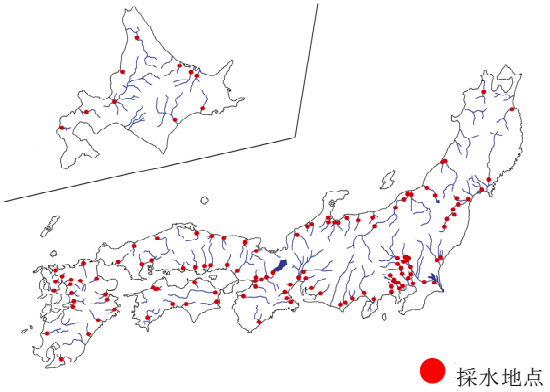


図2-5　全国実態調査における採水地点

また、河川水質と流域条件との関係を調べるため、国土交通省が作製した河川流域地図を元に、88河川の流域データを用い、流域情報を整理した。各流域内の市町村面積は、面積計(MT-500V, MT precision)を用いて測定した。各市町村の人口は住民台帳（平成14年1月1日現在）より得た。汚水処理人口（都市下水事業、合併浄化槽、農業集落排水処理、コミュニティープラントなど）は各々の人口を国土交通省より得て、個々の人口合計として得た。これを流域内の総人口で割ると汚水処理人口普及率が得られ、この指標を流域情報の整理に用いた。なお、単独浄化槽を利用している人口情報が得られなかったため、単独浄化槽利用者人口は今回用いた汚水処理人口には含まれていない。

２－２　エストロゲン様物質の魚類への影響把握

２－２－１　エストロゲン様物質のメダカ曝露試験による影響濃度の把握

エストロゲンを対象として、メダカ曝露試験を行い、エストロゲンの影響濃度について検討した。

(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）（ともに和光純薬製）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) 試験液の調整

1) 希釈水

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

2) 試験原液の調製

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

試験原液は、曝露期間中に 2 回／週の頻度で新調した。

3) 試験液の調製

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

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

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

(3) 供試魚

本研究では、試験対象魚としてメダカのうちヒメダカ（*Oryzias latipes*）を選定した。環境省がヒメダカを用いた室内試験の結果から、ノニルフェノールおよびオクチルフェノール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ように、内分泌かく乱作用を検出するための実験魚として多く用いられているため、既存の試験データと比較するうえで好都合と考えられるためである。そこで、環境省の試験を実施した研究機関から本試験のためにメダカを供給してもらい、同様の試験を現地にて実施することとした。メダカはまた、生理学、生態学など、一般的な生物学の情報も多い魚種である。成熟に要する時間が 3 ヶ月と短く、さらに、次世代を得ることが容易なため、わが国における魚類研究の中心となっている魚種でもある。

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。

試験に供した雄メダカのふ化後から各曝露試験に供するまでの飼育方法および条件は以下のとおりであった。

1) ふ化直後からふ化後 2 週齢まで

ふ化直後から 2 週齢までは、脱塩素水道水（水道水を活性炭に通して脱塩素処理したもの）を飼育水とした半止水方式（飼育水の換水：2～3 日ごとに約半量を換水）により飼育した。飼育水温は 24±2℃、照明は蛍光灯光による明期 16 時間/暗期 8 時間周期とした。餌料は、シオミズツボワムシおよびアルテミアふ化幼生を混合で 3～4 回/日の頻度で給餌した。

2) ふ化後 2 週齢から供試まで

ふ化後 2 週齢以降は、脱塩素水道水を飼育水とした流水方式（換水率；5～6 換水/日）により飼育した。飼育水温は 24±2℃、照明は蛍光灯光による明期 16 時間/暗期 8 時間周期とした。餌料は、アルテミアふ化幼生を 1～2 回/日の頻度で給餌した。

約 3 カ月齢の時点で二次性徴（臀鰭の形状等）により雌雄を選別し、以降、雌個体の排泄するエストロゲンの影響を受けないように、飼育水槽に雄個体のみを収容し前項に示す条件下で飼育した。

(4) 曝露方式および装置

曝露には、内装ステンレス張りの恒温室に設置したミニダイリューター式の流水式曝露装置を用いた。試験水槽は硬質ガラス製水槽（有効量 10L）とした。なお、曝露装置および試験水槽において、試験液との接する箇所に用いられている材料は、ガラス、テフロン、ステンレスのみである。試験装置の写真を写真 2-1 に示す。

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

(5) 試験条件

曝露試験は表 2-2 に示した条件で実施した。

(6) 曝露方法

曝露装置は曝露開始日の 3 日前から稼動させ、各試験区の被験物質濃度が設定濃度になっていることを確認した。各曝露区について、試験液の水温を毎日、pH および溶存酸素濃度を週 3 回の頻度で測定した。水温は検定済みの水銀棒状温度計、pH はガラス電極式水素イオン濃度計、溶存酸素濃度はポーラログラフ式溶存酸素濃度計を用いて、それぞれ試験水槽の中央部で測定した。希釈水および原液の流量は毎日測定し、設定流量から少なくとも±1%以上の変

写真 2-1　エストロゲンのメダカ曝露試験装置

動がみられた場合には、流量が設定値になるように再調整した。

曝露開始日に曝露試験用の雄ヒメダカ群（約 500 個体）から無作為に 60 個体ずつ 6 試験区の供試魚を取り上げ各試験水槽に投入して曝露試験を開始した。曝露期間は 14 日間とした。曝露期間中は、1 日 1 回、アルテミアふ化幼生を 15 分程で食べる飽食量を目安として給餌した。また、給餌時に死亡の有無、一般症状（外見、行動、摂餌活動の異常）を観察した。死亡がみられた場合は、直ちに除去した。水槽内に残餌や糞がみられた場合は、適宜、サイフォンを用いて除去した。

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

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

表 2-2　エストロゲン様物質の
メダカ曝露試験における条件

曝露方式	:	流水式
試験区数	:	被験物質 5 濃度区および助剤区
連数	:	1 連／試験区
供試生物	:	雄ヒメダカ（成魚）
供試生物数	:	60 個体／試験区
曝露期間	:	最長 14 日間
試験液量		10L
換水率	:	約 10 換水／日
試験水温	:	24±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

(7) 試験液中の被験物質濃度

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

1) 試験液の採取

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

2) 前処理

試験液はガラス繊維フィルターでろ過し、得られたろ液を分析用試料とした。

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

3) ELISA 測定および定量

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

(8) メダカ肝臓中のビテロゲニン濃度分析

1) 肝臓の採取

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

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

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

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

肝指数（%）= 肝臓重量 ／ 体重 × 100

2) 肝臓の前処理

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

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

3) ELISA によるビテロゲニン濃度測定

肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度は、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。肝臓抽出液は、キットの検体希釈液でさらに 10 倍以上に希釈して ELISA に供した。ELISA の手順および条件等は、キットの説明書に従った。測定はすべて二重測定で行った。

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

(9) 統計処理

曝露試験における肝臓中のビテロゲニン濃度について、ノンパラメトリック検定により有意差検定した。２－２－２の水温影響調査、２－２－３の餌を通しての曝露試験についても同様である。

なお、肝臓中のビテロゲニン濃度が定量下限未満

であった個体については、上記の検定および平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

2－2－2　エストロゲン様物質のメダカ曝露試験における水温の影響

(1) 概要

E1 を添加した飼育水（設定濃度 50ng/L）により、月齢 5 カ月の雄メダカを水温 16℃、20℃、24℃および 28℃の各条件下、月齢 2 カ月の雄メダカを水温 24℃下で曝露した（最長 14 日間）。曝露前（曝露 0 日）および曝露開始から 2、7 および 14 日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中のビテロゲニン濃度を測定した。

各水温条件での肝臓中ビテロゲニン濃度から E1 曝露における雄メダカのビテロゲニン生成について、経時的変化および水温の影響を検討した。また、5 カ月齢と 2 カ月齢の雄メダカでの肝臓中ビテロゲニン濃度から雄メダカの成長段階とビテロゲニン生成の関係について検討した。

(2) 試験液の調製

1) 希釈水

試験液の調製に用いる希釈水は２－２－１(2)に示した方法と同様の方法で調整した。

2) E1 原液

正確に秤量した 50mg の E1 をアセトン（残留農薬・PCB 試験用、和光純薬工業株式会社製）に溶解し、100mL に定容した（E1 濃度 500mg/L-アセトン）。さらにこの溶液 10mL をアセトンで 100mL に希釈、定容して E1 濃度 50mg/L のアセトン溶液を調製した。この E1 溶液 1mL を 1L デュラン瓶に分取、窒素ガスを穏やかに吹き付けアセトンを完全に留去した。ここにイオン交換水 1L を加え、翌日までスターラーで緩やかに撹拌して E1 を完全に溶解させ、E1 濃度 50μg/L の水溶液を調製した。これを流水式曝露装置上での試験液調製に用いる E1 原液とした。E1 原液は、曝露区ごとに調製した。

曝露期間中、各曝露区の E1 原液は、3 日ごとに新調して交換した。

3) 試験液の調製濃度および流量

各曝露区の試験水槽に供給する試験液の E1 濃度は、水槽内での吸着や分解、供試魚への移行等による濃度低下を考慮して、曝露条件である 50ng/L の 110%に相当する 55ng/L となるように調製した。

16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区（5 カ月齢の雄メダカの曝露区）の各曝露区では、曝露装置の希釈混合槽への希釈水の流量(設定流量)を 120mL/min、E1 原液の流量を 132μL/min とした（試験液の換水率：約 6 換水／日）。24℃_2 カ月齢区については、希釈水の流量を 70mL/min、E1 原液の流量を 78μL/min とした（試験液の換水率：約 10 換水／日）。

(3) 供試雄メダカの馴化

供試雄メダカは２－２－１(3)に示した方法で飼育したが、水温影響調査の曝露試験に供した 2 カ月齢の雄メダカは、試験に供する約 5～7 日前に雌雄を選別し、以降は雄個体のみで飼育した。

16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区での曝露に供する雄メダカは、曝露開始の 14 日前に各曝露区の試験水槽に収容し、水温 24℃下で馴化を開始した。その後、16℃区、20℃区および 28℃区については、水槽内に設置したクーラー／ヒーターにより飼育水温を 1 日あたり 0.5～1℃低下(16℃区および 20℃区)または上昇（28℃区）していき、曝露開始の 3 日前までに各曝露区の水温条件に馴化させた。馴化期間中の水温以外の環境は、前項 3.1 に示す試験における曝露条件と同じにした。24℃_2 カ月齢区については、曝露開始前の 17 日前から試験と同じ環境下で飼育して試験環境に馴化させた。

(4) 水温影響調査の曝露試験方式および装置

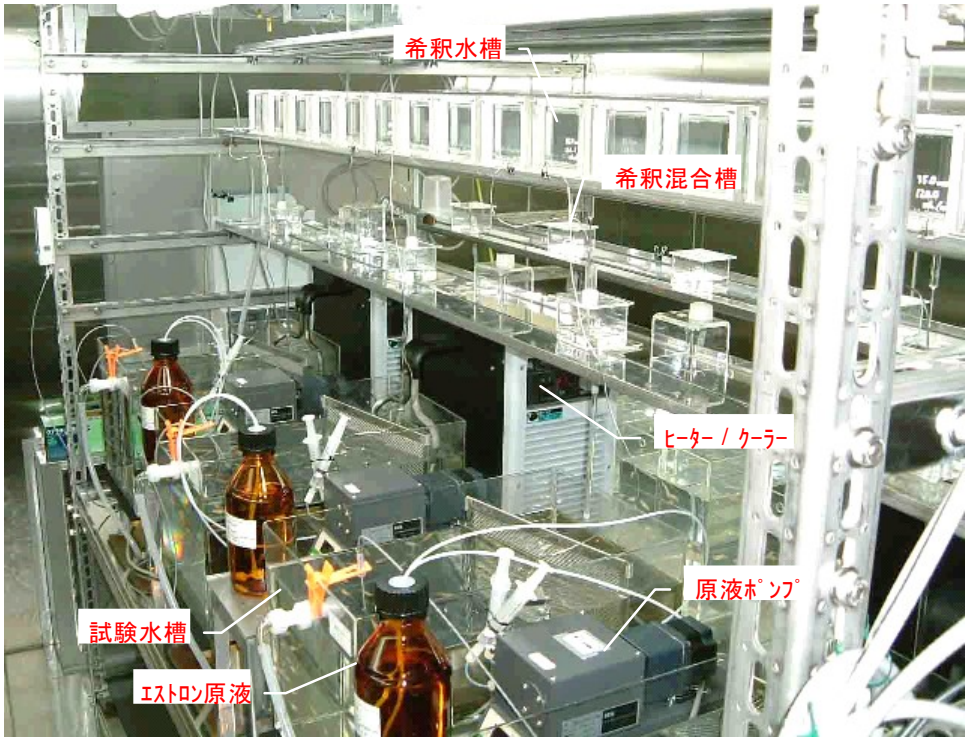
1) 試験に用いた曝露装置の仕様

本試験に用いた曝露装置は、ステンレス鋼製の希釈水タンク（装置の下部と上部に 2 つ設置）、希釈水の水温調整器、被験物質原液用の送液ポンプ、ガラス製の希釈水槽（ガラス接着にシリコンを使用）、硬質ガラス製の希釈混合および試験水槽で構成される。本装置は、希釈水、被験物質原液および試験液との接液部に内分泌かく乱作用を持つ化学物質を溶出しない素材（ガラス、ステンレス鋼、PTFE および PFE のテフロン、シリコン）のみを使用している（写真 2-2）。

2) 曝露装置における試験液の調製および供給方法

本試験では、以下に示すように各曝露区の試験液を調製、各試験水槽に一定の流量で供給した。試験液の調製に用いる希釈水（脱塩素水道水）は、装置下部の希釈水タンクに貯留および補給される。希釈水の水温は、装置の下部と上部の希釈水タンク間を循環しながら水温調整器により調整および維持されている（本試験では、希釈水の水温を 24℃設定とした）。希釈混合槽には、原液ポンプにより被験物質原液が一定の流量で添加され、希釈水と混合し一定濃度の被験物質を含む試験液が調製される。試験液は、ガラス管を通して試験水槽に供給される。

3) 試験水槽



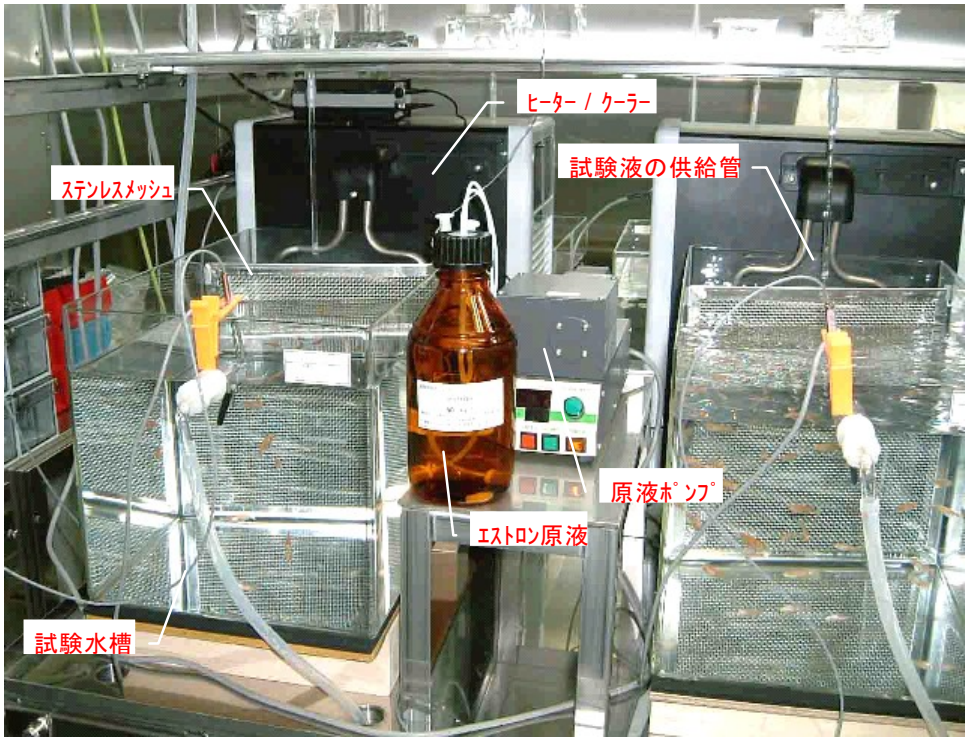


写真 2-2　水温影響調査の曝露試験に用いた流水式曝露装置

本試験では、5 カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が 30L となる位置に排水口（テフロン製）を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。2 カ月齢の雄メダカの曝露には、水量が 10L となる位置に排水口を付けた硬質ガラス製水槽を用いた。各試験水槽の排水口には、供試魚が逸脱しないようにステンレス鋼製メ

ッシュを設置した。

4) 試験水槽内の水温調整

本試験では、水温 24℃の希釈水で調製した試験液を各試験水槽に供給したため、16℃区、20℃区および 28℃区の各曝露区については、水槽内の試験液が供給される箇所に設置した投げ込み式クーラー／ヒーターにより水槽内の試験液水温を調整および維持した。また、水槽内の水温を均一にするため水槽壁面にスターラーを設置し、試験液を緩やかに撹拌した。クーラー／ヒーターおよびスターラーは、ステンレス鋼製メッシュで仕切られた一画に設置した。16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区の試験水槽には、磁気記録式温度計を設置し、水温を 10 分間ごとに測定、記録した。

(5) 水温影響調査の試験条件

5 カ月齢および 2 カ月齢の雄メダカを 50ng/L（設定濃度）の E1 を含む試験液で曝露した。曝露における水温条件は、5 カ月齢の雄メダカで 16、20、24 および 28℃の 4 条件、2 カ月の雄メダカで 24℃の 1 条件とした。5 カ月齢の雄メダカにおける 16、20、24 および 28℃での曝露をそれぞれ 16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区、2 カ月齢の雄メダカの 24℃での曝露を 24℃_2 カ月齢区と表記する。曝露条件を表 2-3 に示す。

表 2-3　水温影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	:	E1 を添加した試験液による流水式曝露
試験液の換水率	:	5 換水／日以上
設定曝露濃度	:	E150ng/L（設定濃度）
水温	:	各水温条件（16、20、24 および 28℃）±2℃
曝露期間	:	2、7 および 14 日間
供試生物	:	雄メダカ（ヒメダカ系）
供試生物の月齢		5 カ月齢および 2 カ月齢
供試生物数	:	5 カ月齢の雄メダカ；86 個体／曝露区 2 カ月齢の雄メダカ；50 個体／曝露区
照明	:	昼光用蛍光灯光、明期 16 時間／暗期 8 時間
給餌	:	アルテミアふ化幼生を 1 回／日

(6) 曝露操作および曝露中の管理

E1 での曝露（試験液への E1 添加）を開始する直前に、曝露 0 日（曝露前）におけるビテロゲニン濃度分析および遺伝子解析用の肝臓採取に供するため、各曝露区の試験水槽内の雄メダカ(86 個体／曝露区)から 19 個体ずつを取り上げた。その後、各試験水槽への希釈水の供給を止め、水槽内の飼育水に E1 濃度が 50ng/L となるように E1 原液を添加した。また、この時点から前項 3.5 に示す方法による流水式による E1 が添加された試験液の供給を開始した。

曝露期間中の管理や環境測定は、２－２－２－６に示した方法と同様に行った。

(7) E1 濃度分析

曝露 0 日目（曝露開始日）、曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区の試験水槽から E1 濃度分析に供するための試料（試験液）を採取した。曝露 0 日目の試料は、前述の曝露開始時における試験水槽への E1 原液の添加および試験水槽への試験液の供給を開始した時点から約 4 時間後に各試験水槽から採取した。曝露 2、7 および 14 日後の試料は、当日の給餌前に採取した。

試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器（500mL 容）に採取した。採取量は約 1000mL とし、約 500mL を直ちに前処理（抽出）に供し、残りは予備としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

E1 の分析は、「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS を用いて行った。

(8) 肝臓中のビテロゲニン濃度分析

曝露 0 日（曝露前）、曝露 2、7 および 14 日後に、各曝露区から 10 個体ずつ雄メダカを取り上げ、ビテロゲニン分析用の肝臓採取に供した。曝露 0 日目は試験水槽に E1 を添加する直前（E1 での曝露開始の直前）に、曝露 2、7 および 14 日後は当日の給餌前に取り上げた。

供試個体は、小型のネットを用いて試験水槽内の雄メダカから無作為に掬いあげ、曝露区ごとに試験水槽から分取した試験液（約 1.5L）を入れた手付きビーカーに収容して解剖作業を行う実験室に搬入した。

前処理については２－２－１(8)に示した方法で行った。

肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度は、メダカのビテロゲニン測定用 ELISA キット（Enbio Madaka vitellogenin ELISA system、株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ）を用いた。ELISA 測定における条件および手順、濃度算出方法は、同キットの説明書に従った。ただし、標準曲線の作成に用いるビテロゲニン標準溶液の濃度は 100、50、25、12.5、6.25、3.13 および 1.56ng/mL の 7 濃度系列にした(説

明書記載の調製濃度は、100、50、20 および 10ng/mL の 4 濃度系列)。ELISA 測定における定量下限は、標準曲線の作成に用いたビテロゲニン標準溶液の最低濃度である 3.16ng/mL とした。したがって、肝臓中ビテロゲニン濃度の定量下限は、3.16ng/mL に肝臓抽出液の最低希釈倍率（20 倍）および肝臓のホモジナイズに用いた Assay buffer 量 0.025mL/mg-liver を乗じて算出される 1.56ng/mg-liver とした。

２－２－３　餌を通してのエストロゲンの曝露

E1 を添加した配合飼料（0、15、150 および 1500 ng/g-餌料の 4 条件）を月齢 5 カ月の雄メダカに 2 回／日の頻度で給餌して曝露した（最長 14 日間）。曝露前および曝露開始から 2、7 および 14 日後に各条件区から雄メダカを取り上げ、肝臓中のビテロゲニン濃度を測定した。

各条件での肝臓中ビテロゲニン濃度から、餌料を通した E1 曝露（経口曝露）における雄メダカのビテロゲニン生成について、餌料中 E1 濃度との関係やその経時的変化など餌料の及ぼす影響について検討した。

(1) 曝露濃度および曝露区の設定

餌の影響調査の曝露試験では、飼料中濃度が 0、15、150 および 1500ng/g 程度となるように E1 を添加した配合飼料を調製し、これらを 5 カ月齢の雄メダカに与えて E1 で曝露した。E1 濃度 0、15、150 および 1500ng/g の飼料を給餌する条件をそれぞれ 0ng/g 区、15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区と表記する。

(2) E1 添加飼料の調製

曝露期間中に各曝露区の雄メダカに給餌する E1 添加飼料は、以下に示す方法を用いて顆粒状の配合飼料に E1 を添加、吸着させて調製した。

1) 配合飼料

E1 添加飼料の調製には、海産魚類用配合飼料「おとひめ B-2（日清飼料)」を用いた。

2) E1 の添加濃度

1500ng/g 区、150ng/g 区および 15ng/g 区用の飼料は、配合飼料に E1 をアセトンに溶解して添加し、アセトンを窒素ガスの吹き付けで留去する方法を用いて調製した。調製に際して飼料に添加する E1 量は、アセトン留去において E1 の一部が調製容器等に残留する可能性を勘案して、設定飼料中濃度（1500、150 および 15ng/g）の 110%相当量とした。

3) 調製方法

16.7mg の E1 を 100mL のアセトン（農薬分析用、和光純薬工業株式会社製）に溶解して E1 濃度 167μg/mL のアセトン溶液を調製し、これをアセトンで段階的に希釈にして、1670、167 および 16.7ng/mL のアセトン溶液を調製した。1500ng/g 区の E1 添加飼料は、ガラスビーカーに分取した配合飼料 50g に E1 濃度 1670ng/mL のアセトン溶液 50mL を添加、よく混合した後、窒素ガスを穏やかに吹き付けてアセトンを留去して調製した。150ng/g 区および 15ng/g 区の E1 添加飼料も同様の手順で 167 および 16.7ng/mL のアセトン溶液を用いて各 50ｇを調製した。0ng/g 区の飼料は、無処理の配合飼料とした。

(3) 供試魚

本試験に供した雄メダカは、２－２－１(3)に示した方法で飼育した。

曝露開始の 14 日以上前から試験と同じ環境下で飼育した。曝露開始の 14 日前からそれまでのアルテミアふ化幼生から配合飼料（おとひめ B-2、日清飼料）に切り替え、曝露期間中に給餌する配合飼料に馴化させた。

(4) 試験装置

装置は２－２－２(4)に示したものと同じものを使用した。

(5) 試験条件

餌を通してのエストロゲンの曝露実験の試験条件を表 2-4 に示す。

表 2-4　餌の影響調査の曝露試験における条件

曝露方式	:	E1 添加飼料の給餌による曝露
設定曝露濃度	:	飼料中 E1 濃度として、0、15、150 および 1500ng/g
E1 添加飼料の給餌	:	2 回／日、飽食を目安に給餌
飼育水	:	脱塩素水道水による流水式
飼育水の換水率	:	5 換水／日以上
水温	:	24±2℃
曝露期間	:	2、7、14 日間
供試生物	:	雄メダカ（ヒメダカ系）
供試生物の月齢	:	5 カ月齢
供試生物数	:	84 個体（0ng/g 区） 65 個体（15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区）
照明	:	昼光用蛍光灯光、明期 16 時間／暗期 8 時間

(6) 曝露中の操作および管理

曝露期間中は、1 日に 2 回（午前 9 時頃および午後 3 時頃)、各曝露区の雄メダカに E1 添加飼料を給餌した。給餌では、食べ残しがでないように供試魚

の摂餌状態をみながら 10～15 分間かけて飼料を少量ずつ与えた。給餌量は飽食量とし、水槽内の雄メダカの概ね半数以上が飼料に対して積極的な摂餌行動を示さなくなった時点で給餌を終了した。曝露 14 日後（曝露終了日）は無給餌とした。

曝露期間中の管理や環境測定は、２－２－１(6)に示した方法と同様に行った。

(7) 飼料中および試験液の E1 濃度測定

飼料中の E1 濃度については、調製した各 E1 添加飼料から約 5g を分取して、E1 濃度分析に供した。

試験液の E1 濃度分析については、曝露 2、7 および 14 日目に各曝露区の試験水槽から E1 濃度分析に供するための試料（試験液）を採取した。曝露 2 および 7 日目の試料は、当日午前の給餌から約 4 時間後に採取した。曝露 14 日目の試料は、当日の遺伝子解析用の肝臓採取および肝臓中のビテロゲニン濃度分析に供する雄メダカの取り上げ時（前日午後の給餌から約 17 時間後）に採取した。試料は、試験水槽中央部の中層からサイフォンを用いてガラス容器（1000mL 容）に採取した。採取量は 2000mL 以上とし、うち 1000mL を直ちに前処理（抽出）に供し、残りは予備試料としてアスコルビン酸を添加して冷蔵保存した。

E1 濃度は、「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、日本下水道協会」に準じた方法により LC/MS/MS で測定した。

(8) 肝臓中のビテロゲニン濃度分析

メダカの肝臓中のビテロゲニン濃度分析は２－２－１(8)に示した方法で行った。

２－３　河川水のメダカ曝露試験

２－３－１　メダカ現地曝露試験法の開発

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

水質に起因する魚類への影響を検出するためには、影響要因である水質を除いて、その他の試験条件を一定に保つ曝露試験装置が必要である。さらに、用いる試験水は新鮮であることが望ましい。そこで、河川での試験では、国土交通省が河川水質をモニタリングしている水質自動監視所にて流水式魚類曝露試験を実施することとした。

(1) 試料水の導入

水質自動監視所では、河川から水をポンプアップして、一時間ごとに水温、pH、溶存酸素、電気伝導度、濁度を自動測定している。この測定では、河川水は 30 分間大量にポンプアップされ、ヘッドタンクを経て自動測定機へと導水されており、余剰水はヘッドタンクの上部から直接排水される仕組みとなっている。そこで、この余剰水を魚類曝露試験に適用することとした。

(2) 試験対象魚と生物指標

曝露試験は、土木研究所の実験室で継体飼育しているメダカ（d-rR 系統）の雄を用いた。この系統は遺伝的に雄が緋色、雌が白色であるため、雌雄の識別が容易である。また、性転換が生じた場合、成魚では体色と成熟形態の相違からその影響を外見から判定することができる。

また、一部の実験においては２－２－１(3)で用いたヒメダカを使用した。

(3) 現地魚類曝露試験装置

試験装置の仕様について表2-5に、装置の写真を写真2-3に示す。メダカ曝露水槽の容積は30Ｌと設定した。

写真 2-3　現場型メダカ曝露試験水槽

魚類試験装置への導水は、監視所のヘッドタンクにフロートセンサーを取り付け、水がタンクに流入してきたら魚類試験装置へ吸引する自吸式ポンプが作動する仕組みとした。この仕組みによって、監視

表 2-5　現場型メダカ曝露試験システムの仕様

貯水槽	
材質	SUS304
外寸法 (mm)	600W×300D×330H
貯水容量 (L)	約44 L
その他	・ｺﾞﾐ除去用ｽｸﾘｰﾝﾒｯｼｭ（φ1×4.mesh, φ1×80mesh, φ0.55×16mesh 各 ・排水ﾊﾟｲﾌﾟ φ5×1.2t, 40 cm (SUS304)
温度調節水槽	
材質	SUS304
外寸法 (mm)	600W×300D×330H
貯水容量 (L)	約 44 L
その他	・排水ﾊﾟｲﾌﾟ φ8×1.2t, 50 cm (SUS304)
曝露水槽	
材質	硬質ｶﾞﾗｽ製
外寸法 (mm)	450W×300D×300H, 板厚3 mm
貯水容量 (L)	約30 L
恒温装置	
製品名 (ﾒｰｶｰ)	ｸｰﾘﾝｸﾞｻｰﾓﾎﾟﾝﾌﾟ CTP-201（EYELA）
外寸法 (mm)	250W×510D×805H
水槽容量 (L)	1.3 L
温度調節範囲	−20.0～80.0℃
冷却能力	350W（300kcal/h）at 液温10℃（冷却ｺｲﾙSUS304）
ヒーター能力	750W（SUS316）
ポンプ能力	最大流量12.5/14.5 L/min (50/60Hz)
その他	・水循環用SUSﾌﾚｷｼﾌﾞﾙﾎｰｽ (SUS304)もしくはﾃﾌﾛﾝ製柔軟ﾎｰｽ
導水ポンプ	
製品名 (ﾒｰｶｰ)	自吸水式ﾀﾞｲｱﾌﾗﾑﾎﾟﾝﾌﾟ JND300KTS（ｹｲ･ｴﾇ･ｴﾌ ｼﾞｬﾊﾟﾝ）
外寸法 (mm)	208W×117D×108H
最大流量	3.0 L/min
その他	・SUS304製ﾌﾛｰﾄｾﾝｻｰ（自作） ・ﾃﾌﾛﾝ製柔軟導水ﾎｰｽ
その他	
	①ｼｽﾃﾑﾗｯｸ：外寸 900W×450D×1400H, SUS304製 ②照明装置：直管型15形蛍光灯, ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑﾀｲﾏｰ ③自動給餌機：ｵｰﾄﾌｨｰﾀﾞｰ（ｴｰﾊｲﾑ） ④排水用配管一式（塩ﾋﾞ製）

所ヘッドタンクが空の時間帯には自吸式ポンプは停止している。自吸式ポンプで導水した河川水は、曝露試験装置の最上部に設けたステンレス製第 1 槽に送られる。

魚類試験装置の第 1 槽は、貯水およびごみや砂泥の除去を目的とするとともに、第 2 槽へ滴下させるキャピラリーの内径と水位を調整することによって、システム全体の単位時間当たりの流量を制御することとした。

ステンレス製第 2 槽は水温調節機に接続しており、河川水はこれらを循環して温度が保たれる仕組みとした。このようにして水温を一定にした河川水は、サイフォンによって魚類曝露水槽へと滴下させる。サイフォンを用いたのは、ガラス製の魚類曝露水槽で生じる排泄物や食べ残された餌が、第 2 槽から勢いよく流れ落ちてくる河川水で巻き上げられ、排水口から押し流されることを期待した構造である。

なお、第 1 槽および第 2 槽の余剰水、および曝露水槽の排水は、排水管にまとめて排出した。

さらに、曝露水槽の水温を一定に保つことを確実にするため、鑑賞魚用のサーモスタット付投げ込みヒーターを使用した。

(4) 試験条件

水温、流量、日長周期、エサなどの試験条件は、環境省の化学物質影響試験 [31] に準じて表 2-6 のように設定した。試験期間は、環境省試験が 14 日間曝露とされており、今回も同様としたが、4 週間、6 週間、8 週間の曝露試験も行った。水温および流量はそれぞれ 25℃および 30L/hour とした。日長周期に相当する照明の点灯時間はプログラムタイマーで 16 時間明－8 時間暗に調節した。

表 2-6　メダカ現地曝露試験条件一覧

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

(5) 曝露中の操作および管理

現場試験の変更点として、餌を植物性エストロゲンの含まれていない市販の粉末餌とし、自動給餌器を用いて与えることとした。エサは自動給餌器を用いて 1 日に 4 回、市販の粉末餌を給餌した。なお、このエサは植物エストロゲンを含まない製品を選択した。

２－３－２　卵－成魚期曝露試験

卵に曝露させる試験では、胚の発生を常時観察することは不可能であるため、死亡卵の水カビが他の正常な卵に移ることやアカムシなどの水生生物が曝露中の卵を餌にすることを防ぐ必要がある。

そこで、卵を一つ一つ隔離して曝露する曝露器を考案して、現地試験に適用した。曝露器およびその曝露状況を写真 2-4 に示す。

曝露器は､内径 16mm のガラス管を長さ 10mm に切って、これを小部屋とする仕組みとした。上下をステンレスメッシュで圧迫するように閉じることによって、水の通過する小部屋ができあがる。この小部屋は卵 1 個には十分大きな容積であるが、孵化仔魚が遊泳可能なスペースであり、現地試験において孵化後の数日を過ごすスペースとしてこの大きさを選定した。

曝露器は積み重ね可能な構造とし（写真参照)、曝露水槽には可能な限りの曝露器を投入することとした。今回、曝露水槽には 30 部屋のある曝露器を 10 個投入することができたため、一水槽での卵曝露は 300 個とした。

２－３－３　水質等の測定

(1) エストロゲン様物質の水質測定

メダカの雌性化を引き起こす可能性のある物質として、天然・合成エストロゲンやノニルフェノール等の人工化学物質を含むエストロゲン様物質があげられる。本試験では、これまでの水質チームの研究等から、水環境のエストロゲン様作用として重要な 17β-エストラジオール（E2)、エストロン（E1)、エチニルエストラジオール（EE2）を、後者のうちノニルフェノール（NP)、ノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）を対象として、河川水に含まれるこれらの濃度を調べることとした。さらに、エストロゲン作用の総合的な強度を確認するため、遺伝子組換え酵母法によるエストロゲン様活性（E2活性）[26]を測定することとした。

(2) 肝臓中ビテロゲニンの分析

魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）としては、２－２－１等と同様、この分野の研究では一般的な指標であるビテロゲニンを用いることとした。操作は２－２－１(8)に示した方法で行った。測定にはメダカ VTG－ELISA キット（国土環境株式会社または株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ）を用いた。肝臓中ビテロゲニン濃度の定量下限は、それぞれ 1ng/mg-liver weight と 1.56 ng/mg-liver weight である。

２－３－４　試験実施場所

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

試験実施地点の模式図を図 2-6 に示す。試験実施範囲の最上流部に位置する拝島橋監視所は、これより上流に下水処理水が流入していないため、本研究での対照地点と位置づけた。日野橋監視所は 3 ヶ所の下水処理水を受け入れた後の測定地点であり、さ

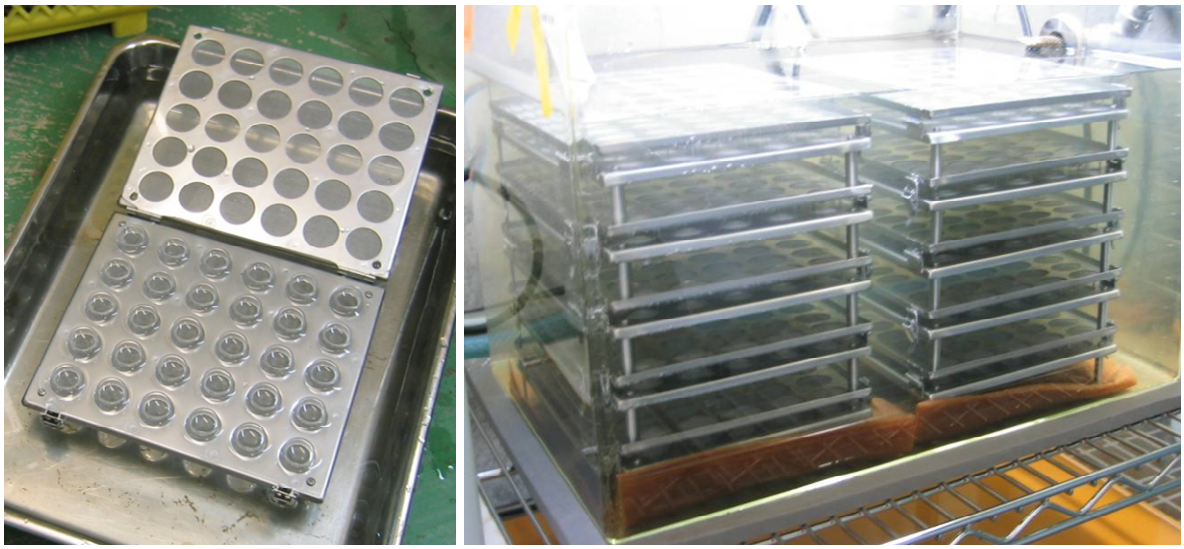


写真 2-4　卵曝露試験装置

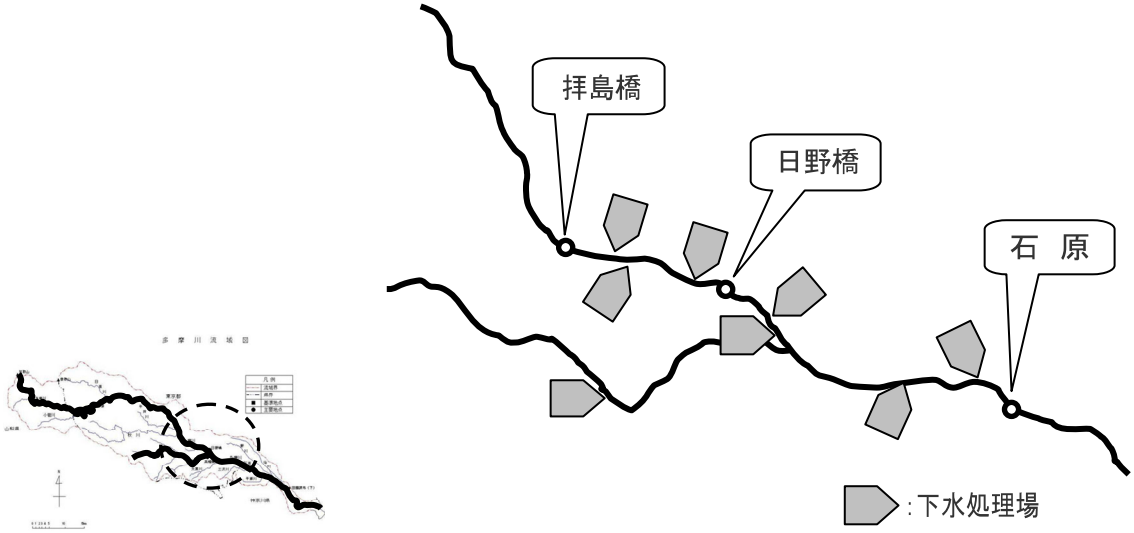


図 2-6　多摩川調査地点位置図

らにその下流に位置する石原監視所は、支川の 2 つの処理場を含め、合計 8 ヶ所の下水処理水を受け入れた地点である。

２－４　下水処理場におけるコイ・メダカ曝露試験

下水処理場におけるコイ・メダカ曝露試験は、生活排水を主体とする下水を受ける下水処理場において、生物処理後の二次処理水、および二次処理水を塩素消毒後さらに砂ろ過処理した放流水等を対象に実施した。この下水処理場の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である。

２－４－１　下水処理水のコイ曝露試験

(1) 試験水槽

コイの曝露試験水槽は、処理場敷地内に設置した流水式の野外試験水槽を用いた。試験水槽はコンクリート製で、コイ曝露槽と調整槽から成り立っている。コイ曝露槽の大きさは、長さ4m、幅2mであり、水深は、掃除のために設けた傾斜によって0.5mから0.7mへと深くなる。容積は4,800Lである。

すべての調整槽（2×2×0.7m）にエアポンプを取り付け、毎分60Lのエアレーションによって処理水および水道水（対照試験）の脱塩素処理を行った。また、処理水と水道水の水温を等しくすることが求められるが、調整槽での滞留中にほぼ同一になることを期待した。

コイ曝露槽では、水質を除いてその他の曝露条件がすべての水槽で均一になるよう設定した。

流量は、4,800Lのコイ曝露槽で2回転／日に設定した。よって流速は6.7L/minとなった。また、日長条件や水温は、野外であることを活用し日射による変化をそのまま採用した。コイの試験個体数は、水槽あたり雄10匹と設定した。

それぞれのコイには、個体ごとの経時的なビテロゲニン生成を追跡するため、識別用のタグを取り付けた。

また、餌は、植物性エストロゲンとして魚類に作用する可能性のある大豆を含んでいない市販の餌（おとひめ8号、日清飼料株式会社）を週に1回適量与えた。

試験開始時にコイの全長、体長、体重を測定し、終了後、生殖腺を観察して雌雄を決定するとともに、その重量から生殖腺体指数（GSI；体重あたりの生殖腺重量比率）を求め成熟状況を把握した。

(2) コイビテロゲニンの測定

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

ビテロゲニンの測定には、コイVTG－ELISAキット（株式会社トランスジェニック）を用い、添付のプロトコールに従い測定した。結合反応は、5倍およびそれ以上の倍率で希釈した血清をマイクロプレートのウェルに滴下し、2時間の反応の後、HRP標識抗コイビテロゲニン抗体を1時間反応させた。この操作によって、抗コイビテロゲニン抗体－コイビテロゲニンHRP標識抗コイビテロゲニン抗体のサンドイッチ型複合体が形成される。続いて発色基質（OPD）を含む発色液を滴下すると、酵素HRPの触媒作用によって濃度依存的にOPDが発色する。プレートリーダーで波長490nmの吸光度を測定し、検量線をもとにコイビテロゲニン濃度を算出した。

検量線は、1μg/mLコイビテロゲニン標準品を用いて作成した。希釈によって0.5μg/mLから0.0078μg/mLまで7段階の標準品を調製した。これらを血清と同様に結合反応させた後、吸光度を測定して検量線を作成した。このとき、常に0.0078μg/mLの吸光度を基点として検量線を作成することによって、5倍希釈された血清の定量下限値は、0.0078μg/mLの5倍である0.039μg/mLと決定した。また、血清試料の吸光度がブランク（検体希釈液；0μg/mL）以下の場合、不検出（ND）とした。

なお、血清試料およびビテロゲニン標準試料はすべて二重測定をおこない、変動係数が10%以内であるデータをもとに濃度を算出した。

(3) 曝露試験の概要

本研究では、下水処理水および脱塩素水道水を対象に、それぞれ雄単独曝露試験区および雌雄混合曝露試験区を設けた。曝露期間は８週間とし、その間2週間ごとに血液を採取してビテロゲニンを測定することとした。

２－４－２　下水処理水のメダカ曝露試験

メダカ曝露試験に用いる装置、試験条件等については、２－３に示した方法と同様である。試験対象水は、処理工程の配管から分岐することによって、魚類試験装置の第１槽へ定常的に導水した。

２－４－３　下水処理パイロットプラントを用いたメダカ曝露試験

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、下水処理パイロットプラントを用いた採水とメダカの観測頻度の高い調査を行った。

(1) 試験条件

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、水理学的滞留時間8時間、好気的固形物滞留時間7日、活性汚泥浮遊物質濃度約1300mg/L、処理水中溶存有機炭素濃度約10mg/L）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。実験装置の概要を図2-7に、メダカの曝露条件を表2-7に記す。

本実験に使用したメダカは、名古屋大学若松教授から分与されたd-rR系統である。d-rR系統の体色は、雄が橙色、雌が白色に遺伝的に固定されており、雄と雌の判別が体色で可能である。

曝露開始後 0、2、7、14 日後に両曝露水槽中の女性ホルモンであるエストロン(E1)と 17β-エストラジオール(E2)濃度および遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン様活性の測定を行った。さらに、各条件につき５または10匹のメダカの肝臓中ビテロゲニンの測定を行った。

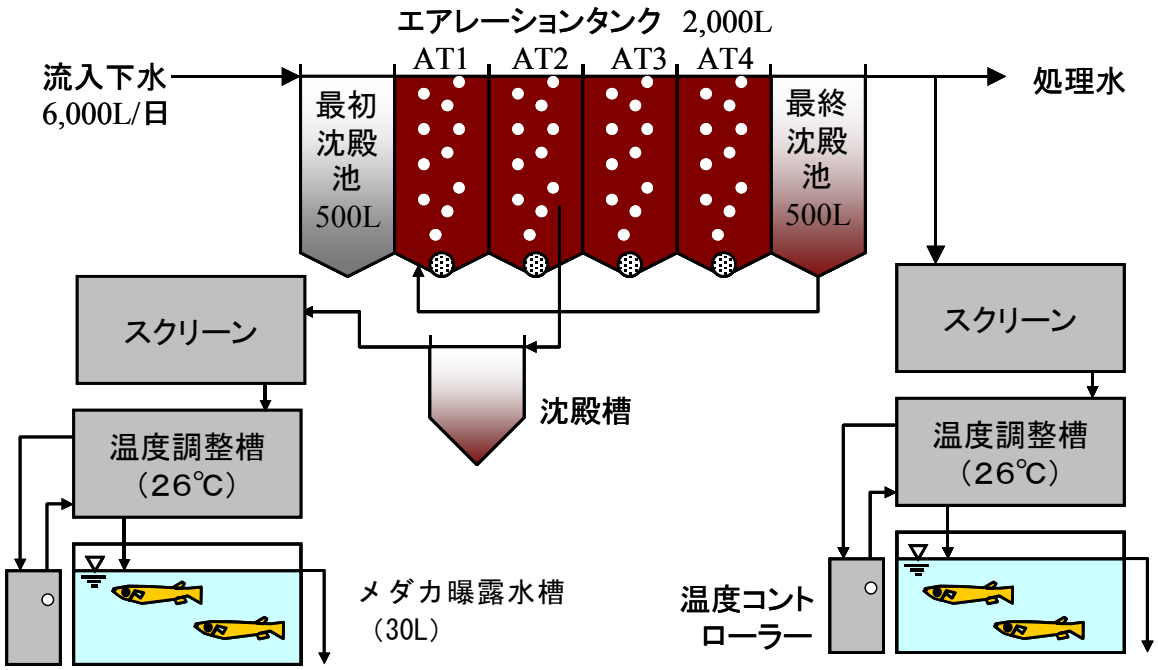


図 2-7　メダカ曝露システムフロー

表2-7　メダカ曝露実験条件
（マイクロアレイ）

曝露方式：流水式
換 水 率：約１換水／日以上
試 験 区：処理水とエアレーションタンク2槽目
曝露期間：2、7、14日
曝露雄メダカ数：各水槽約100匹（約3カ月齢）
試験水温：26℃
照　　明：16時間明／８時間暗
給　　餌：3回/1日
RNA抽出部位：肝臓
遺伝子解析検体数：3サンプル
（3匹分の肝臓を1サンプル）
肝臓中ビテロゲニン蛋白質測定：5または10匹
（ELISA法:Medaka Vitellogenin ELISA System）

(2) マイクロアレイによるメダカ曝露時の遺伝子発現解析

1) メダカマイクロアレイ

メダカ用マイクロアレイは、EG750(Ecogenomics社製)を使用した。このマイクロアレイには約750種類のメダカの遺伝子断片（約300～350塩基のDNA）が配置されている。

2) RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出部位は肝臓とし、肝臓からのRNAの抽出にはRNeasy mini Kit(Qiagen社製)を使用した。抽出したRNAは、Amino Allyl MessageAmpⅡ Kit(Ambion社製)を用い、RNAを増幅した後Cy5で標識した。Cy5で標識したRNAは、メダカマイクロアレイEG750に展開し、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイと結合しなかったRNAを洗い流した後、スキャナーで各遺伝子が配置されている各スポットの蛍光強度を読みとった。

(3) リアルタイムPCRによる定量化

マイクロアレイによる遺伝子発現解析は半定量的であることから、マイクロアレイで遺伝子発現が高いと判定された遺伝子については、より定量能の高いリアルタイムPCR法で遺伝子発現の定量化も試みた。

３　研究結果及び考察

３－１　バイオアッセイによる水試料のエストロゲン作用活性と寄与物質の把握

既に述べたように、イギリスでの研究では、魚類の内分泌かく乱を引き起こしているのは、下水処理水由来のノニルフェノール（NP）あるいは天然エストロゲンであるエストロン（E1）や 17β-エストラジオール（E2）および合成エストロゲンであるエチニルエストラジオール（EE2）であることが推定された。我が国においては、多くの河川で雄のコイに雌性化が見られること、これら河川に上記エストロゲン様物質が存在していることはわかったが、これらの間の関連はわかっていない。

ここでは、魚類へのエストロゲン様物質の影響を把握するための前提として、下水処理水や河川水のエストロゲン作用にはどのようなエストロゲン様物質がどの程度寄与しているのかを調べることとした。その手法としては、試料水のエストロゲン作用を総体として把握するための遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性を測定する方法と、個々のエストロゲン様物質のエストロゲン作用の寄与を比較する方法を採用した。また、試料水の分画により、さらに詳細な検討を試みた。

なお、イギリスにおける研究で明らかにされたように、エストロゲン様物質の作用濃度は物質によって異なる。したがって、エストロゲン作用を有する物質の寄与を把握するためには、個々の物質の濃度に応じた作用の強さを把握する必要がある。

そのためには、天然エストロゲンである E2 と比較した比活性値が用いられている。比活性値については矢古宇ら[26]により E1=0.3、NP=0.001 と求められている。また同様の方法で文献に記載のない NPnEO や NPnEC について比活性値を求めたところ、表 3-1 に示すような値が得られた。エストロゲン様物質の寄与については、これらの比活性値を用いて把握することとした。なお事前に行なった、E1、E2、NP の標準物質を組み合わせた試験では、明瞭な相乗もしくは拮抗作用が確認できなかったため、ここではこれらの物質の相互作用は相加的であると仮定し、各物質の理論活性値を積み上げることによって示した。

表 3-1　ﾉﾆﾙﾌｪﾉｰﾙ関連物質の比活性値

化学物質名		略号	比活性値
ﾉﾆﾙﾌｪﾉｰﾙｴﾄｷｼﾚｰﾄ(NPnEO)	(n=1)	NP1EO	0.000005
	(n=2)	NP2EO	0.000002
	(n=3)	NP3EO	-
	(n=4)	NP4EO	-
	(n=5)	NP5EO	-
ﾉﾆﾙﾌｪﾉｰﾙﾌｪﾉｷｼ酢酸(NPnEC)	(n=1)	NP1EC	-
	(n=2)	NP2EC	-
	(n=3)	NP3EC	-
	(n=4)	NP4EC	-

備考:表中の[－]は、2g/Lで有効な活性が認められなかったことを示す。

３－１－１　全国下水処理場を対象としたエストロゲン様活性と各物質の理論活性値の比較

(1) 予備調査結果

下水処理工程におけるエストロゲン様活性と各物質の寄与について、まず予備的に３処理場において調査した結果を図 3-1 に示す。

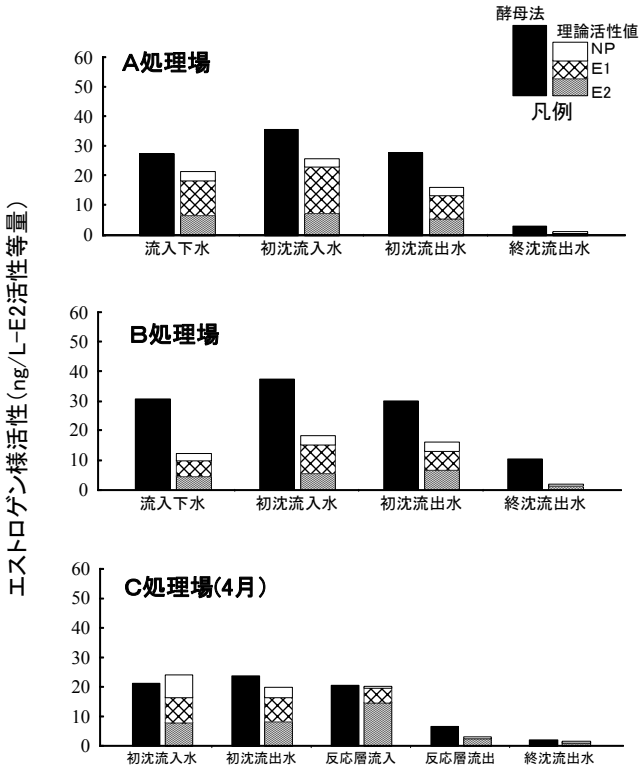


図 3-1　下水処理工程における
エストロゲン様活性の変化

ここで対象とした物質は NP、E1、E2 であり、図中には各処理場におけるエストロゲン様活性と E1､E2、NP の理論活性値を示している。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っていたが、Ｃ処理場４月調査時のように E1、E2、NP３物質の理論活性値によってほぼ説明できるケースも確認された。また、処理工程が進むにつれて、エストロゲン様活性は低減し、最終沈殿池流出水では、E1 のみが検出された。しかし E1 のエストロゲン様活性への寄与は処理場によって大きく異なり、Ａ，Ｂ処理場では E1 の理論活性値では殆ど説明できなかった。

(2) 全国処理場調査結果

60 処理場での流入下水と二次処理水の調査結果の一部を図 3-2 に示す。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だけでなく、E1、E2、NP 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が含まれているケースもあった。その割合は処理場によって異なり、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試料中に含まれてい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。

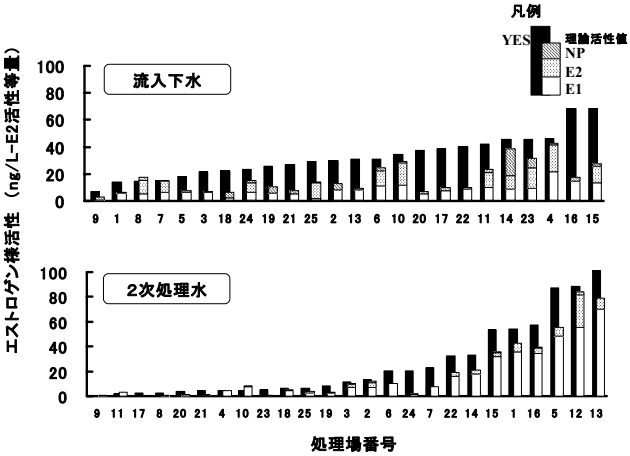


図 3-2　各処理場における
エストロゲン様活性への各物質の寄与

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。

(3) 流入下水及び２次処理水のエストロゲン様活性の濃度分布

上記のように、下水処理工程におけるエストロゲン様活性とエストロゲン様物質の寄与をある程度把握することができた。この調査結果からは、下水処理によるエストロゲン様活性の挙動を把握することができる。その結果を図 3-3 に示すが、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％程度エストロゲン様活性は低い値であり、下水処理によってエストロゲン様活性が低減されていることが確認できる。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％が含まれる。しかし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。

３－１－２　下水処理場における詳細調査結果

(1) 処理状況とエストロゲン様物質の濃度

下水処理場においてエストロゲン様活性とエストロゲン様物質がどのように処理されているかをさらに詳細に検討するため、冬季（2004 年１月）および夏季（2004 年 8 月）に 24 時間調査を実施した。一般項目の分析結果を表 3-2 に示す。両調査における処理、および処理水の水質の大きな違いは、流入水

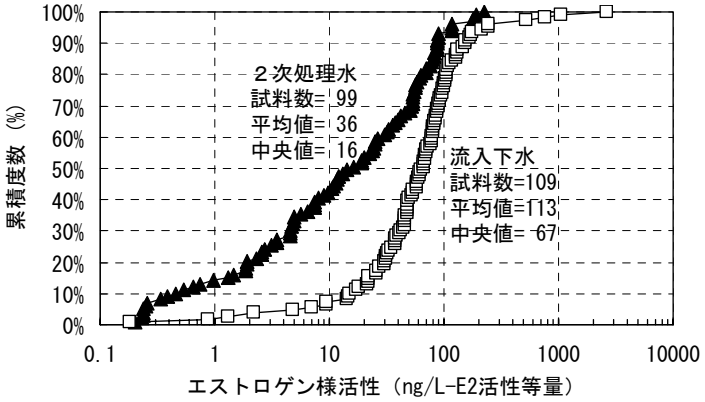


図 3-3　流入下水及び２次処理水のエストロゲン様活性の濃度分布

温および硝化の進行程度である。夏季の流入水温は、冬季に比べて約 10℃高かった。また、夏季においては、処理の進行とともにアンモニア態窒素濃度が減少し、それに伴い若干の亜硝酸態窒素、硝酸態窒素濃度の増加が確認された。一方、冬季においては、アンモニア態窒素濃度の減少は小さく、また、亜硝酸および硝酸態窒素濃度の増加も確認されなかった。つまり、冬季においては硝化抑制的な運転が結果として行われたことが推察される。なお、SS、BOD および COD の除去率は、両調査ともに 90%以上であった。

NP 関連物質を含むエストロゲン様物質の分析結果（溶存態と懸濁態の合計）を、各成分の定量下限値とともに表 3-3 に示した。NP、NPnEO については、両調査において処理による高い除去率が確認された。しかし、NPnEC については、特に冬季において、処理の進行とともに濃度が増加していた。この理由としては、処理の進行に伴い、NPnEO の微生物による酸化で NPnEC が生成されることが考えられる。一方、E1 については、処理の進行、特に最初沈殿池の前後で濃度の増加が確認され、その傾向は冬期に強かった。返流水、最初沈殿池汚泥、返送汚泥中でも高濃度で検出されていた。EE2 については、いずれの調査、試料中からも検出されなかった。1999 年 9 月に一般での使用が解禁されたが、同処理場では検出に至るほどの流入水中濃度ではなかった。E3 については、妨害物質の影響により、流入水中濃度が定量されなかったが、処理の進行に伴い、濃度の減少が伺われた。E1、E2 の硫酸抱合体化物については、処理の進行により濃度が変わらないか、夏期においては増加が確認された。この傾向は、冬期、処理の進行に伴い濃度が上昇する E1 とは異なっているため、E1 の処理による濃度上昇

表 3-2　各処理工程における一般項目の分析結果

調査時期	試料	水温 (℃)	SS (mg/L)	VSS (mg/L)	DOC (mg/L)	NH_4-N (mg/L)	NO_2-N (mg/L)	NO_3-N (mg/L)	BOD (mg/L)	COD_{Mn} (mg/L)
冬季調査	流入水	16.4	80.0	71.1	35.7	20.2	0.20	0.19	172	144
	返流水	-	307	273	30.2	18.7	0.67	0.39	-	-
	初沈処理水	-	72.0	64.0	30.3	21.6	0.00	0.00	121	69.6
	引抜汚泥	-	5225	4650	98.9	28.2	0.00	0.00	-	-
	返送汚泥	-	3980	3280	6.76	17.9	0.02	0.02	-	-
	曝気槽前段表層水	-	1440	1200	6.98	19.2	0.13	0.07	-	-
	曝気槽後段表層水	-	1340	1120	6.32	16.9	0.32	0.41	-	-
	二次処理水	-	4.5	3.7	6.79	17.2	0.46	0.45	8.7	8.6
	放流水	-	2.0	2.0	5.98	15.0	1.09	1.25	1.8	10.3
夏季調査	流入水	26.7	160	138	34.1	18.7	0.00	0.00	169	112
	返流水	-	200	172	31.6	11.6	0.89	0.86	-	-
	初沈処理水	-	68	59	31.8	15.7	0.18	0.00	114	61.8
	引抜汚泥	-	3980	3480	91.8	23.9	0.03	0.00	-	-
	返送汚泥	-	3280	2700	8.58	6.37	0.02	0.05	-	-
	曝気槽前段表層水	-	1160	965	8.33	10.8	0.38	0.42	-	-
	曝気槽後段表層水	-	1260	1030	7.96	4.43	0.05	3.23	-	-
	二次処理水	-	3	2	7.07	4.72	0.33	5.88	9.0	10.7
	砂ろ過水	-	3	3	6.40	7.31	1.38	3.12	-	-
	放流水	-	3	2	7.38	7.53	0.83	2.69	0.9	9.6

表 3-3　各処理工程におけるエストロゲン様物質の分析結果

調査時期	試料	NP (μg/L)	ΣNPnEO (μg/L)	ΣNPnEC (μg/L)	E2 (ng/L)	E1 (ng/L)	EE2 (ng/L)	E3 (ng/L)	E1-S (ng/L)	E2-monoS (ng/L)
冬季調査	流入水	3.4	106	11	23.4	18.2	N.D.	n.a.	2.9	6.4
	返流水	2.2	14.6	15	17.2	133	N.D.	11.4	1.8	4.1
	初沈処理水	2.6	68.9	10	5.5	65.3	N.D.	72.5	2.8	5.6
	引抜汚泥	66.9	435	19	59.4	85.6	N.D.	80.2	2.1	4.5
	返送汚泥	13	97.6	50	17.4	180.5	N.D.	4.4	2.1	4.4
	曝気槽前段表層水	7.5	55.8	29	13.8	65.4	N.D.	5.2	2.4	3.8
	曝気槽後段表層水	8.2	58.8	32	13.3	94	N.D.	N.D.	1.7	2.9
	二次処理水	0.4	3.65	12	11.5	192.2	N.D.	N.D.	1.9	3.5
	放流水	0.4	2.98	13	7.0	153.5	N.D.	5.5	2.1	3.3
夏季調査	流入水	1.7	48.3	19	3.9	15.1	N.D.	n.a.	1.1	2.5
	返流水	0.5	4.30	11	2.7	49.1	N.D.	8.4	2.8	5.8
	初沈処理水	1.0	36.7	18	3.8	19.3	N.D.	n.a.	1.8	4.5
	引抜汚泥	24	197	33	17.2	20.3	N.D.	43.7	7.9	10.4
	返送汚泥	4.2	56.1	46	31.1	257	N.D.	24.8	15	16.5
	曝気槽前段表層水	2.4	37.8	25	8.1	26.6	N.D.	6.8	9.5	13.9
	曝気槽後段表層水	1.2	27.5	25	N.D.	6.0	N.D.	N.D.	7.9	18
	二次処理水	N.D.	1.56	11	N.D.	15.3	N.D.	5.8	2.6	6.8
	放流水	N.D.	1.25	13	N.D.	N.D.	N.D.	1.5	3.4	7.4
	放流水	0.2	1.37	12	N.D.	22.2	N.D.	5.6	2.6	6.6
	定量下限値	0.1	1	0.01	1	2	4	2	0.1	0.4

は硫酸抱合体の脱抱合のみでは説明できない。グルクロン酸の抱合体の脱抱合や E2 から E1 への転換等、下水処理過程における E1 生成に至る様々な反応の可能性があるため、E1 の挙動を把握するためには、より詳細な検討が必要となる。

(2) エストロゲンの収支

各調査におけるエストロゲン様活性値､E1 濃度と、処理場において計測された流量より、それぞれの各成分のフラックスを算出し、その結果を図 3-4、3-5 に示した。図 3-4 に示したエストロゲン様活性値は、冬期においては最初沈殿池で負荷量が増加し、エアレーションタンクに流入した。その際、返流水、最初沈殿池汚泥の引き抜きによる負荷量増加、負荷量減少は無視できるほど小さいことが示唆された。エアレーションタンクでは、最終沈殿池からの返送汚泥によりさらに負荷量が増加し、除去されることなく最終沈殿池、塩素処理過程を経て放流されていることが明らかとなった。夏期においては、同様に返送汚泥としての負荷が確認されたが、エアレーションタンク内での低減により、エストロゲン様活性は低下していた。その結果、最終沈殿池、塩素処理過程ではエストロゲン様活性が低下しないが、放流水中の値としては、冬期に比べ低い値で放流されていることが明らかとなった。一方、図 3-5 に示したように、E1 についても同様の挙動が確認された。E1 が処理により増加していることは既に述べたとおりであるが、エストロゲン様活性についても同傾向であったことから、エストロゲン様活性に占める E1 の寄与は大きいものであることが推察される。

(3) 放流水中のエストロゲン様活性に対する各分析対象成分の寄与

放流水中に含まれるエストロゲン様活性に対し、本調査で分析対象成分とした各物質が、どの程度寄与しているのかについて考察を行った。E1、E2、NP の分析結果と比活性値から、冬期、夏期ともに、放流水中で検出されるエストロゲン様活性の約 85%が E1 によるものであり、約 10%が E2 であると算出された。今回調査を行った処理場のように、冬期に処理効率が低下する場合、放流先の河川水量が減少する冬期には、処理水中のエストロゲン様活性の希釈が不十分となり、魚類への影響の増加が懸念される。このことより、水生生物保護のために放流水中のエストロゲン様活性を低減するためには、下水処理過程において効果的に E1 を除去することが必要であることが明らかとなった。

３－１－３　河川水におけるエストロゲン様活性とその由来

(1) 河川水におけるエストロゲン様活性

平成 11～13 年度に、全国 94 水系 132 地点でエストロゲン様活性を測定した結果を表 3-4 に示す。各年度でサンプル数が異なるものの中央値で評価した場合､経年的な変化は少ないと推測される。ただし、最大値には年度によって差が見られた。

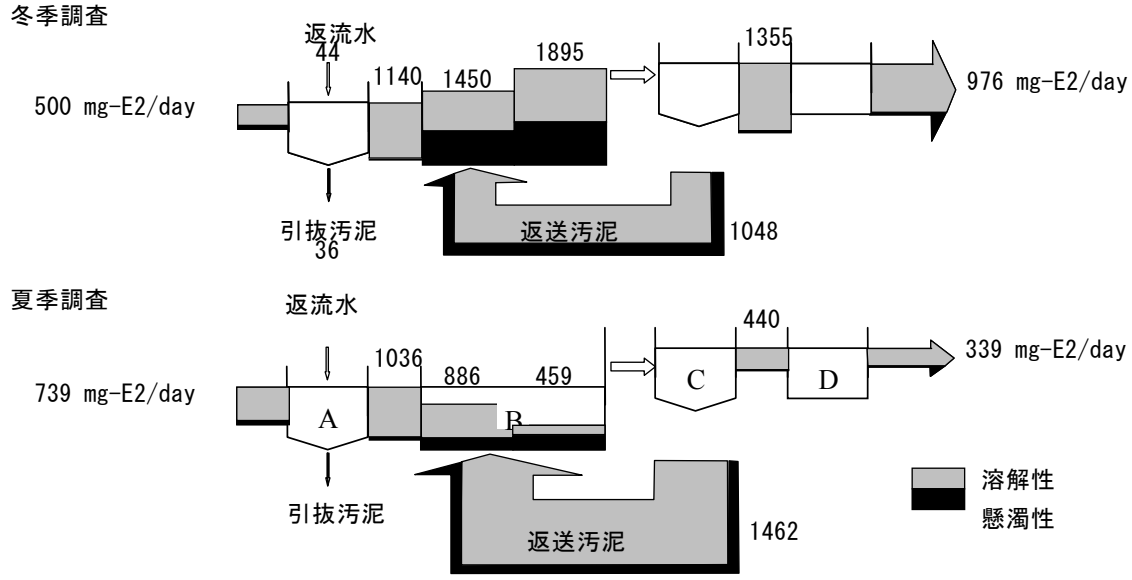


図 3-4　下水処理工程におけるエストロゲン様活性のマスバランス測定結果
A:最初沈殿池　B:曝気槽　C:最終沈殿池　D:塩素接触槽

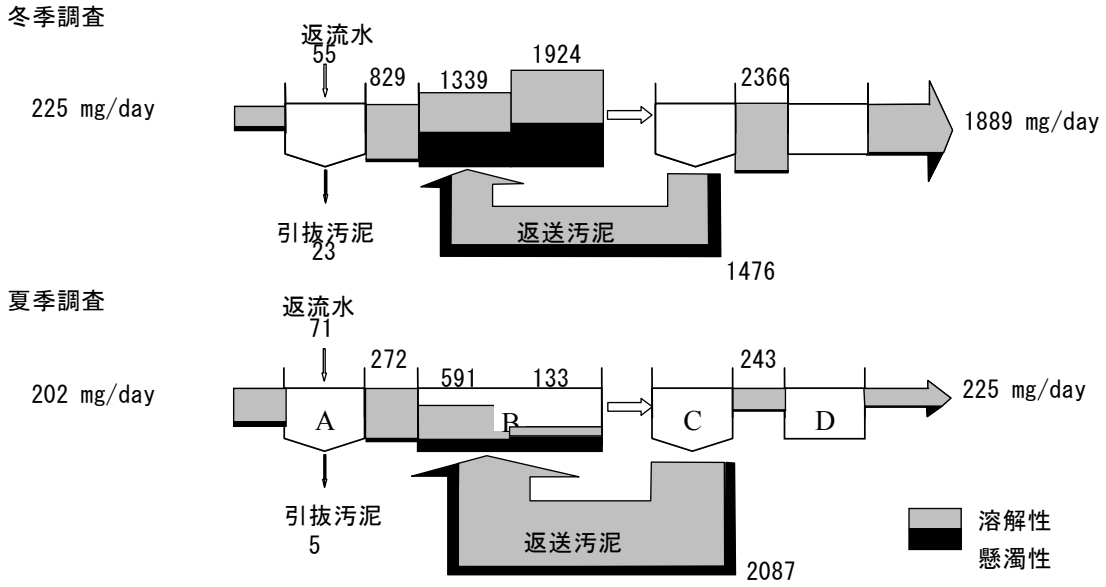


図 3-5　下水処理工程におけるエストロン（E1）のマスバランス測定結果
A:最初沈殿池　B:曝気槽　C:最終沈殿池　D:塩素接触槽

エストロゲン様活性が高い地点について各調査地点の周辺状況を確認したところ、都市部を通過する地点が多かった。また、エストロゲン様活性の寄与物質とその寄与率を推定するため、遺伝子組み換え酵母法，化学分析ともに値が検出された17地点について、各物質に比活性値を乗じてE2換算濃度に換算した値と、遺伝子組み換え酵母法のエストロゲン様活性値を比較した。その結果、図3-6に示すように、エストロゲン様活性の主要な寄与物質としてE1が占める場合が多かった。このため、生活系排水の寄与が大きいと考えられるとともに、処理場の放流水と同様の傾向であることから、下水放流水由来のエストロゲン様活性が河川水において大きな割合を占めていることも推測される。

(2) 全国一級河川調査結果と流域情報との比較

上記のように、河川水への生活排水の影響が推測されることから、エストロゲンの排出源と考えられる生活系排水に関する各河川の流域情報を整理し、エストロゲン様活性との関係を調べた。その結果を図3-7に示す。流域人口密度とエストロゲン様活性に

表 3-4　全国１級河川におけるエストロゲン様活性の調査結果（単位：ng-E2/L）

年度	水系	地点	最小値	25%値	中央値	75%値	最大値
11	19	114	ND	0.3	0.3	0.9	20
12	8	15	ND	0.3	0.5	0.8	4.4
13	94	112	ND	0.2	0.3	0.5	5.8
合計	94	132	ND	0.2	0.3	0.5	20

ND:不検出

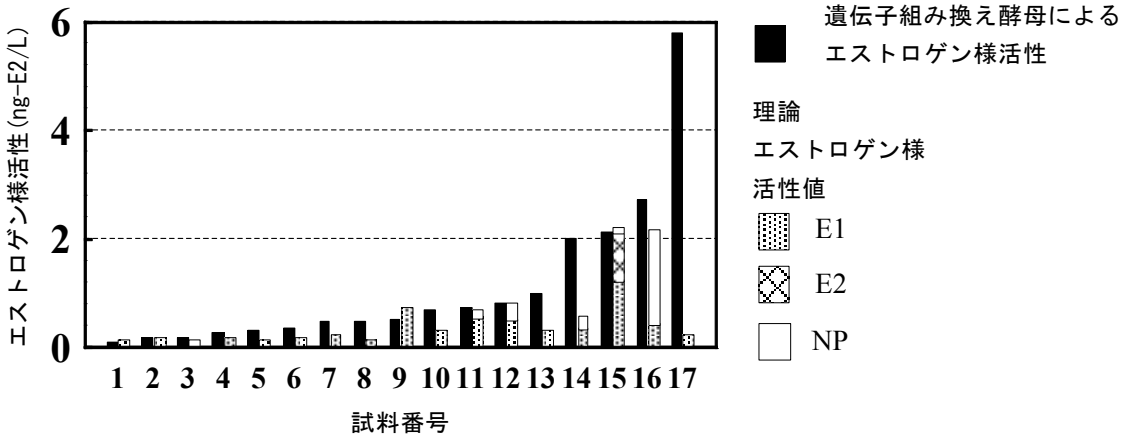


図 3-6　河川水試料におけるエストロゲン様活性と化学分析による
エストロゲン様物質(E1、E2、NP)を理論活性値（E2 換算）との比較

は正の相関がみられ、人口の集中がエストロゲン様活性に大きく寄与していることがわかった。この結果は、生活系の排水とエストロゲン様活性の関係が大きいことを示すものと考えられる。

次に、生活系排水が処理されることによる効果を調べるため、汚水処理施設整備人口とエストロゲン様活性の関係についても検討を行った。その結果、図3-8に示すように汚水処理施設整備率とエストロゲン様活性との間に明瞭な傾向は確認できなった。しかしながら、流域人口密度の高い地点（1000人/km²以上）に注目すると、汚水処理施設整備率が90%以上と高い場合でもエストロゲン様活性は必ずしも小さくならないということがわかった。下水処理場の処理工程では、エストロゲン様活性が中央値で約80%減少することを３－１－１(3)で述べたが、下水処理水に含まれる濃度は、河川のそれより1～2桁も高い値であり、放流先の河川に占める下水処理水の割合によっては、エストロゲン様活性が上昇すると推測される。都市部に位置する河川では、水資源の複雑な運用に伴い、下水処理水などの再生水が河川

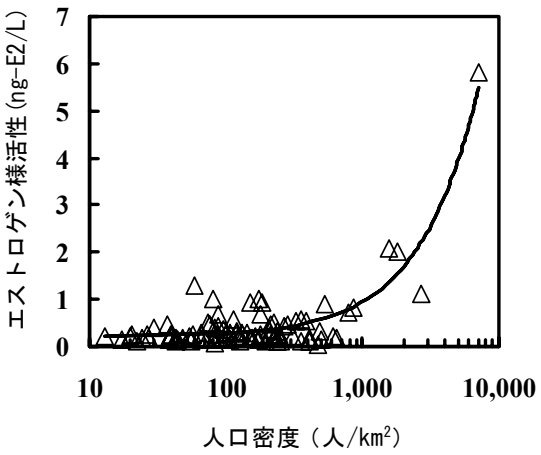


図 3-7　河川流域の人口密度と河川水中の
エストロゲン様活性との関係

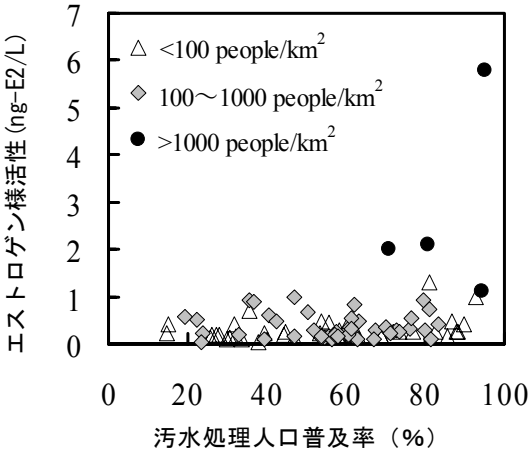


図 3-8　河川流域の汚水処理人口普及率と
河川水中のエストロゲン様活性との関係

に占める割合は非常に高くなっており、河川流量に占める汚水処理水量の割合が高まっていることが人口集中地域における河川水のエストロゲン様活性が高くなる原因として考えられる。

３－１－４　分画手法を用いたエストロゲン様活性への寄与物質の同定

以上述べてきたように、下水処理水がエストロゲン様活性を有していることを明らかにしてきたが、エストロゲン様活性の由来についてはいまだ不明な点も多く残されている。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うこととした。さらに、エストロゲン作用をもつ成分の特定を試みることとした。

(1) HPLC を用いた分画分取（３分画）

今回検討、改良を加えた HPLC 分画方法は、Giesy[30]らの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と順相・逆相カラムとを組み合わせて、内分泌かく乱化学物質を抽出・分画し各物質濃度を測定する手法である。本検討ではエストロゲン様活性を主要な物質にグループ分けをして、試料中のエストロゲン様活性の性状把握とこれらのグループ間での相互作用の有無を確認することを目的とした。このため、Giesy らの方法とは異なり、逆相カラムを用いず順相カラムと HPLC の組み合わせによりエストロゲン様活性を大きく３つのグループ分けを行う手法とした。未分画及び分画試料について、遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定、及び LC/MS/MS（E1 及び E2）、GC/MS（NP）を用いた化学分析を行った。試料としては、図 3-9 に示したように、下水処理水およびその上流と下流の河川水とした。

図 3-10 に示したように、分画操作によりエストロゲン様活性は３つの分画に分離でき、このうち下水

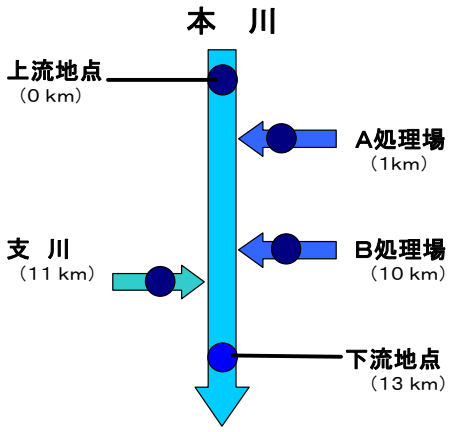


図 3-9　採水地点の概略図

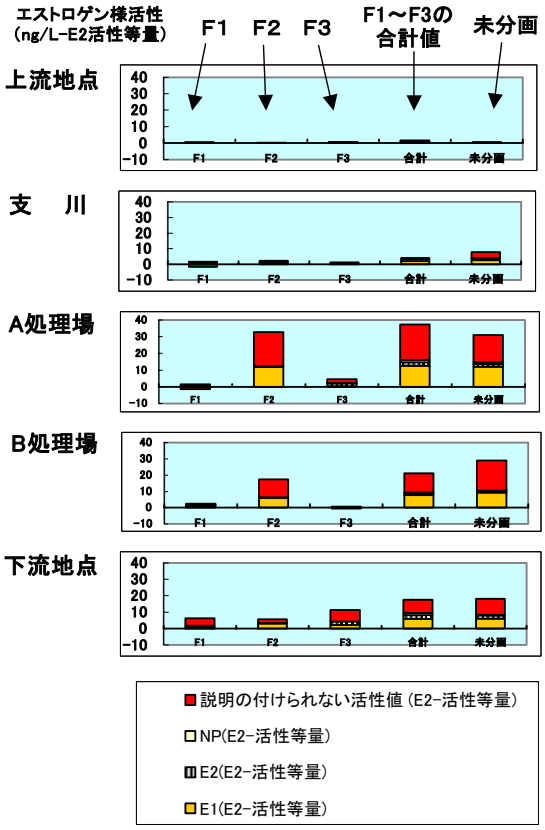


図 3-10　未分画及び分画試料における
エストロゲン様活性と理論活性値

処理場放流水（Ａ、Ｂ処理場）のエストロゲン様活性はＦ２分画にその多くのエストロゲン様活性が分離されていた。ただし、このうちＦ２分画のエストロゲン様活性はその半量以上が測定した NP、E1 及び E2 濃度からの理論活性値では説明できないエストロゲン様活性で占められていた。また、Ｆ２フラクションの結果から、下水処理放流水には E1 の他に、E1 と類似した極性のエストロゲン様活性が多量に存在していることも推定できた。

そこで、NP、E1 及び E2 に基づいた理論活性値では説明の出来ないエストロゲン様活性が分画前後でどの様に変化しているかを確認するため、エストロゲン様活性値と理論活性値の差を、図 3-11 のように、各試料、各分画ごとに表記した。

この結果、各分画に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値（Ｆ１～Ｆ３の合計値）と未分画の値には明瞭な差は見られなかった。このことは、説明のできないエストロゲン様活性を主要３物質のグループに分離をしても、エストロゲン様活性には変化が見られなかったことを表している。仮に、試料中にこの３グループ間での相乗作用が存

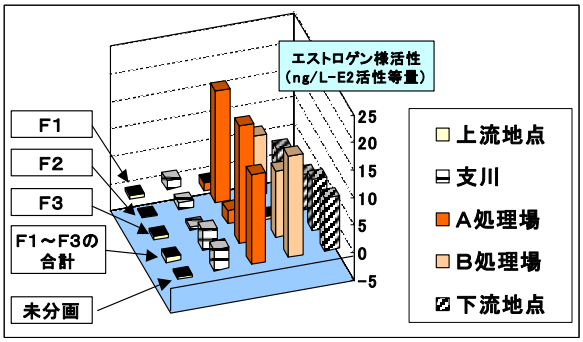


図 3-11　未分画及び分画試料における未同定エストロゲン様活性の分布

在するのであれば、各分画試料中に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値は未分画の値よりも低くなることが予想される。しかし、今回の調査では分画の前後でこれらの活性値に明瞭な差が見られなかったことから、３グループ間ではそのような顕著な相互作用が説明の出来ないエストロゲン様活性を生じさせている可能性は小さいと考えられる。ただし、今後多様な試料について同様の調査を行うとともにデータの収集を行ない、確認する必要があるものと思われる。また、下水処理水に存在していた説明の出来ないエストロゲン様活性の由来把握については、より詳細な分画を行い、その性状の把握を行う必要があると考えられる。

(2) 固相カートリッジを用いた分画分取（９分画）

さらに詳細にエストロゲン様活性の由来を把握するため、固相カートリッジによる分画を試みた。まず、図 3-12 に固相カラムを用いた極性分画手法によって分画された化学物質の分画結果を示す。NP はＦ２に殆どが分画されたが、Ｆ３でも僅かに検出された。またエストロゲン（E1、E2）や合成エストロゲン（EE2）はＦ４分画のみで検出された。また NPnEO や NPnEC は鎖長が多くなるにつれて極性の高い分画に見られ、NPnEO はＦ２～Ｆ７、NPnEC はＦ７～Ｆ９で確認された。

次に、下水中に含まれるエストロゲン様活性の性状について検討を行った結果として、流入下水と放流水の分画を行った各分画のエストロゲン様活性を図 3-13 に示す。流入下水及び放流水におけるエストロゲン様活性はＦ２～Ｆ４分画でその殆どが占められおり、Ｆ５分画より極性の高い分画のエストロゲン様活性は殆ど確認できなかった。しかし過去に同処理場の実験プラントで流入下水の分画を行った図 3-14 の結果では、Ｆ８～Ｆ９分画でもエストロゲン様活性が確認されたケースも見られた。この結果からは、図 3-13 の調査時のエストロゲン様活性の極性分布が、前日の降雨の影響により晴天時と異なったことが要因として考えられた。このため今後は、晴天時や降雨時についてのデータの蓄積を行い、エストロゲン様活性の極性分布の特性把握を進める必要がある。また図 3-13 の各分画におけるエストロゲン様活性と E1、E2、NP の理論活性値について比較を行なった結果、最も高い活性が確認されたＦ４分画は、流入下水については E2、処理水については E1 の寄与が大きかった。しかし NP が分画されているＦ２分画については、NP の理論活性値ではほとんど説明できなかった。このような傾向は図 3-14 の調査を行った処理場の実験プラントの結果についても同様であった。また E1，E2，NP の３物質の理論活性値で説明できないエストロゲン様活性はＦ２～Ｆ４分画で大半を占めていることが確認された。

ところで、３－１－４(1)において、下水中の主要３物質の間ではエストロゲン様活性に関してこれらの相互作用は相加的であることを示した。しかし、これは下水中の全ての物質間で行なった結果ではな

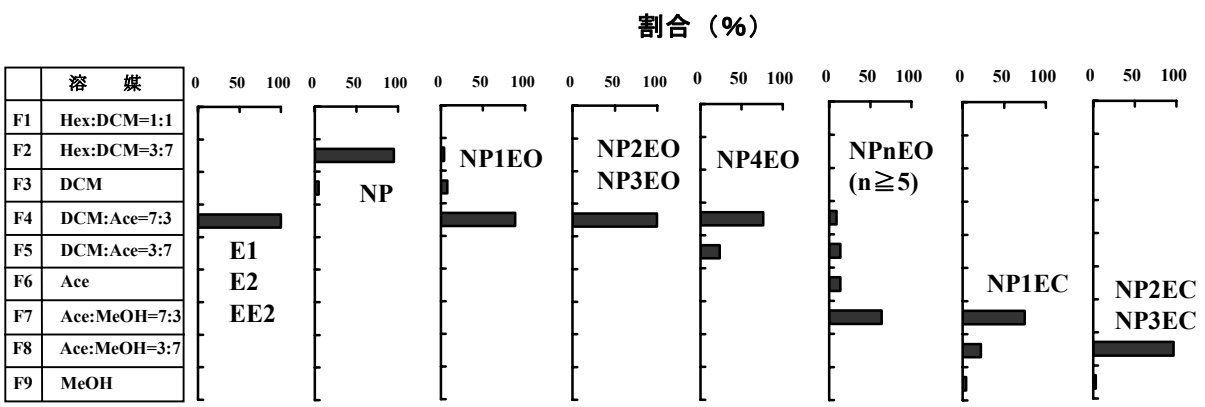


図 3-12　固相カートリッジを用いた極性分画による化学物質の分画結果

いため、実際の試料においては、必ずしも相加的な関係であるという確証にはならない。今回、実際に下水中に存在する主要３物質以外の物質の影響も考慮するため、極性分画を行なった分画試料間での相互作用の有無を確認することで、複数の物質間での相互作用・複合作用について検証を行った。

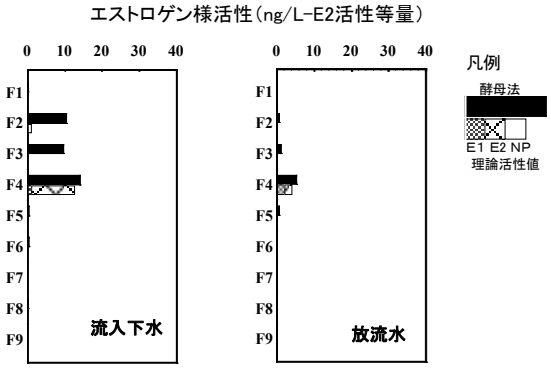


図 3-13　流入下水と放流水の
各分画エストロゲン様活性

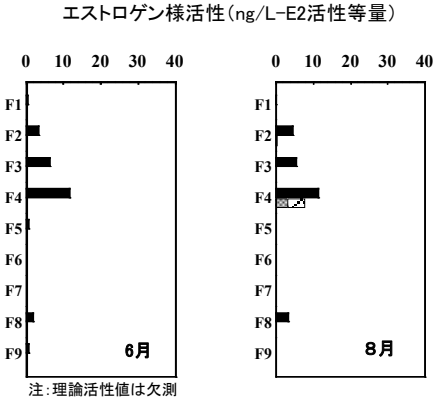


図 3-14　実験プラント流入下水の
各分画エストロゲン様活性

分画試料Ｆ１～Ｆ９の試料を等量ずつ混合し、全ての組み合わせ（36 通り）の試料を調整した。この試料を組み換え酵母法で分析し、相加期待値（各分画試料のエストロゲン様活性値の合計値）と比較した。その結果を図 3-15 に示すが、Ｆ７を加えたケースでは組み換え酵母法で測定した値の方が高くなる傾向が見られ、Ｆ６を加えた系についても若干高くなる傾向が確認された。その他の組み合わせにおいては、概ね理論活性値と測定値の間に差は確認できなかった。

次に、エストロゲン様活性の性状把握を目的として、全国 23 処理場を対象として極性の違いを利用した分画を行った結果を図 3-16 に示す。

夾雑物の多い流入下水の方が分画操作に伴う回収率が低く、結果として両者を比較した際、２次処理水の方が全体として高くなる傾向となった。このため流入下水の極性分画結果と２次処理水の分画結果から両者の濃度レベルを比較するには注意が必要である。

流入下水におけるエストロゲン様活性はＦ２～Ｆ９にかけて広く検出されたが、その殆どがＦ２～Ｆ４分画で占められていた。また２次処理水については、Ｆ４分画によって殆ど説明できる結果となった。またこれらの各分画のエストロゲン様活性とその E1、E2 及び NP の寄与を推定したが、Ｆ４では E1 の理論活性値の寄与が高く、流入下水では E2 の寄与が大きい地点も確認された。またこれらの E1、E2、NP で説明できない不明なエストロゲン様活性について検討するため、ノニルフェノール関連物質の比活性値について検討を行ったが、NPnEO、NPnEC のエストロゲ

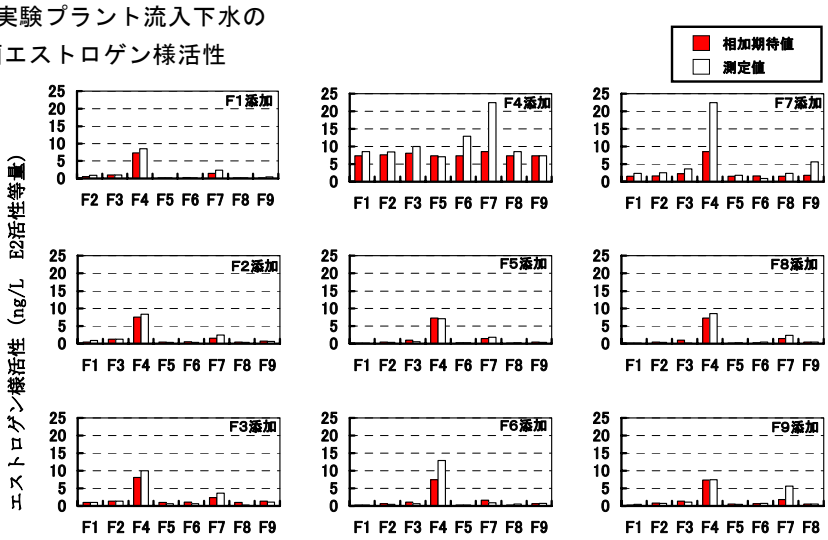


図 3-15　分画試料間の相互作用

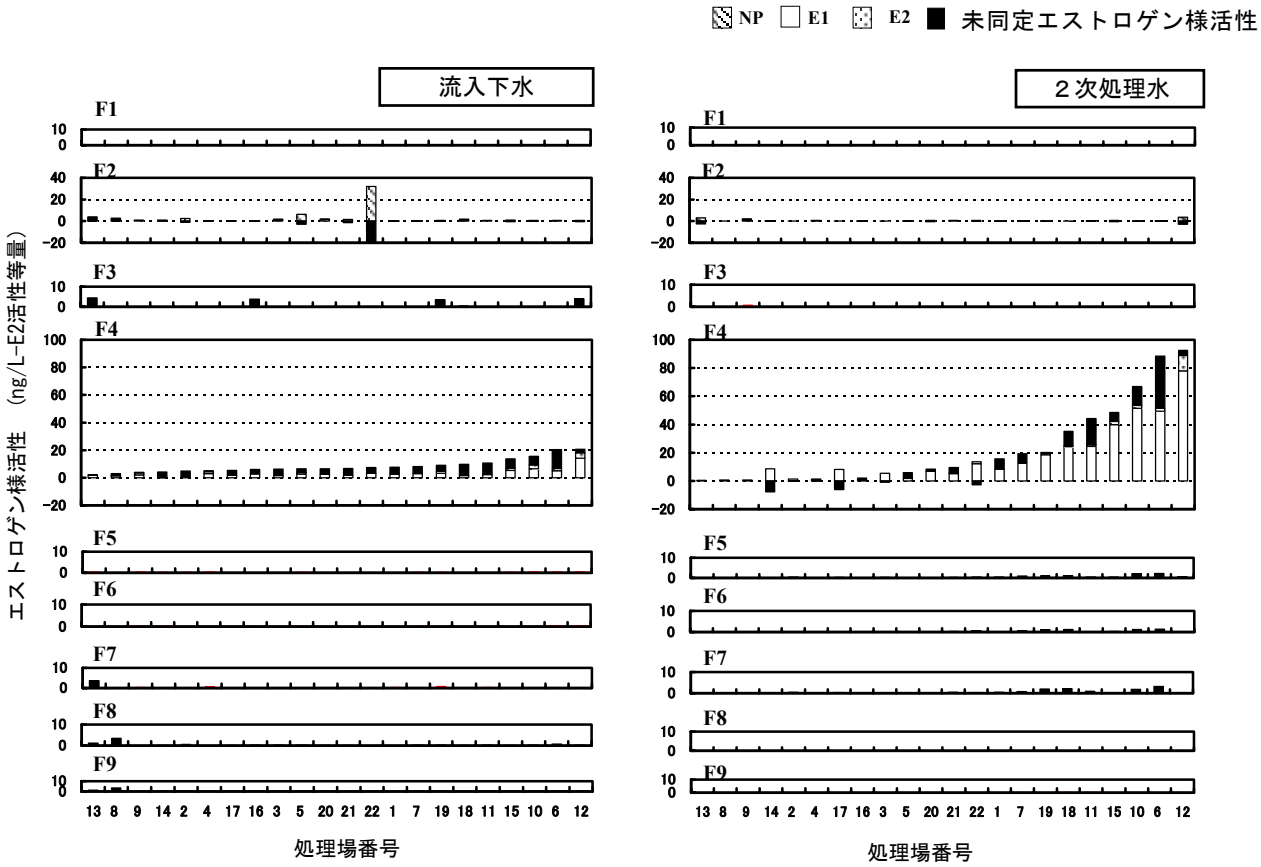


図 3-16　下水中のエストロゲン様活性の極性分画結果と各物質の寄与

ン様活性はほとんど確認されず、これらの物質の理論活性値ではまったく説明はできなかった。今後は不明なエストロゲン様活性を明らかにするため、エストロゲン抱合体などの未測定物質の寄与について検討を行なうとともに、HPLC 分画によるさらに詳細な検討を行っていく必要があるものと考えられた。

ところで、Ｆ７分画は酵母に対して強い毒性を示しており、エストロゲン様物質以外に、酵母に対して毒性を与える物質の影響が考えられた。またこのＦ７分画は発泡性も確認されたことから、Ｆ７分画に含まれる物質として界面活性剤に焦点を絞り検討を行なった。界面活性剤は国内生産量を考慮し、陰イオン界面活性剤の代表物質として LAS を、非イオン界面活性剤の代表物質としてノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）を選び、これらの標準物質について極性分画を行なった。その結果、LAS 及び NPnEO(n≧5)がＦ６～Ｆ７の分画に含まれることが確認された。そこでこれらの両物質による影響を確認するため、標準物質（Ｅ２）20ng/L に界面活性剤（LAS、NPnEO）を濃度別に添加し、エストロゲン様活性への影響を調べた。その結果を図 3-17 に結果を示すが、NPnEO については、エストロゲン様活性に変化がなく、酵母測定系への影響は殆ど確認されなかったが、LAS については添加量の増加に伴いエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。LAS は流入下水では N.D～9.8mg/L 程度含まれている報告[32]があり、この報告を合わせて考えると LAS の共存下ではエストロゲン様活性は最大 2.5 倍程度高く見積もられる可能性が示唆された。

LAS や NPnEO(n≧5)はエストロゲン様活性がない

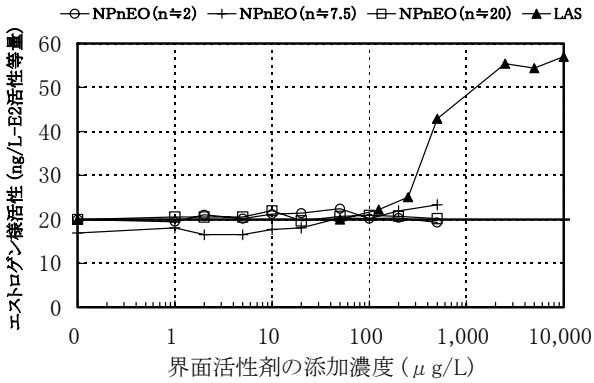


図 3-17　界面活性剤の添加の
エストロゲン様活性測定値への影響

ため、酵母測定系への誤差要因として働いているものと考えられた。このため組み換え酵母法の測定にあたって下水等を高濃度に濃縮する場合、LAS の分離除去を検討する必要が生じてくる可能性がある。

(3) HPLC を用いた分画（多分画）

これまで述べてきたように、遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性と化学物質のエストロゲン作用の比較に分画手法を組み合わせることにより、河川水や下水処理水中に含まれるエストロゲン様活性の原因物質として、天然のエストロゲンであるエストロン（E1）の寄与が高いことが明らかになった。しかし、検出された活性の一部は機器分析を行った成分だけでは説明がつかず、更なる原因物質解明のための検討が課題となった。このため、エストロゲン作用を有する標準物質を用いてこれらを分画できる HPLC 条件の最適化を行った。今回の検討では逆相系での分離を検討したため、カラムに導入された化学物質は極性の高いものから溶出し、極性の低い化学物質ほど溶出位置が遅くなる。

検討の結果、図 3-18 に示すようにほぼすべての成分について分離を行うことができた。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。

この条件を用い、下水処理場の流入下水および二次処理水の分画を行い、得られた画分のエストロゲン様活性を測定した。その結果、図 3-19 に示すように、いずれの試料においても E1 および E2 の溶出位置に高いエストロゲン様活性が検出され、特に E1 の寄与が高いことが実証された。

また、流入下水においては E1 や E2 より早い保持時間に活性が検出された。溶出位置から判断すると E1-S の保持時間に近いため、同物質の寄与が考えられる。

さらに、河川水についてこの分画を適用した結果を表 3-5 に示す。標準溶液を用いた HPLC 分画手法では、19 画分（フラクション 19；F19）に E2、21 画分（F21）に EE2、22 画分（F22）に E1、27 画分（F27）に NP が分取されるのに対し、河川水の結果では、エストロン（E1）の作用が最も大きいことが明らかとなった。しかし、エストロゲン作用を有するその他の画分も多数みられることから、不明な物質が多数あることも判明した。

３－１－５　環境水中エストロゲン作用への寄与物質についてのまとめ

遺伝子組み換え酵母を用いて測定するエストロゲン様活性と、各種エストロゲン様物質の理論活性値と濃度から算出されるエストロゲン様活性を比較するとともに、分画手法を組み合わせて、環境水中のエストロゲン作用への寄与が大きい物質を探索した。その結果、河川水、下水処理水のいずれにおいても、エストロン（E1）の寄与が最も大きく、次いで17β-エストラジオール（E2）の寄与が大きいことがわかった。したがって、環境水中のエストロゲン様活性を低減するためには、下水処理工程においてE1を低減させる処理が必要となる。

３－２　エストロゲン様物質の魚類への影響の把握

３－２－１　エストロゲン様物質のメダカ曝露試験による影響濃度の把握

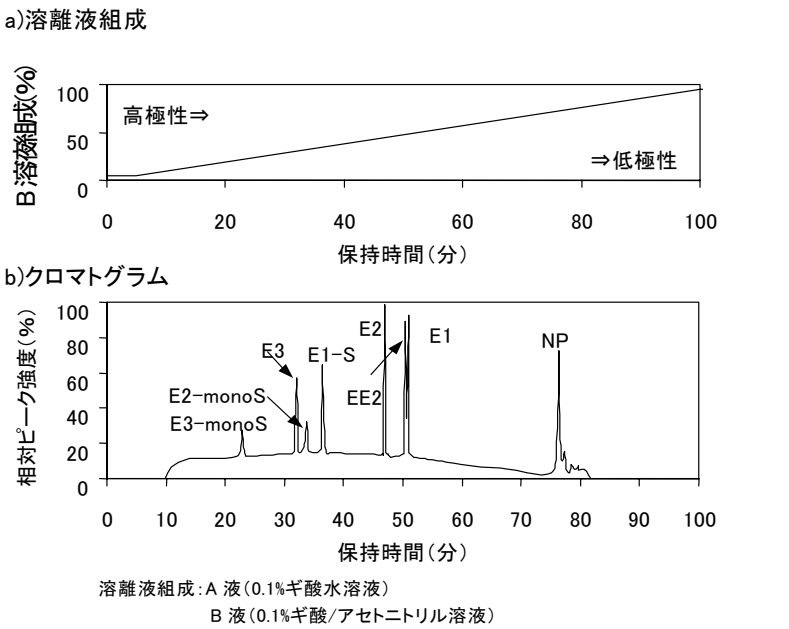
(1) 研究の位置付け

これまで下水処理水や河川水などについて、国土交通省によってエストロゲン様物質の実態把握に関する調査が行われてきた結果、一部にノニルフェノールなどエストロゲン様作用をもつ化学物質の寄与が比較的大きいと考えられる水域があるものの、多くの水域では天然エストロゲンであるエストロン（E1）、17β-エストラジオール（E2）の寄与が相対的に大きいことが示された。また、本研究においても、３－１で述べてきたように、河川水や下水処理水中のエストロゲン作用への寄与は、E1 や E2 が大きいことを示してきた。

そこで次に、これら天然エストロゲンのように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が、魚類にどのような影響を与えているかを把握する必要がある。そのための方法の一つとして、河川水質自動監視所を活用してメダカなど試験魚を実際に河川水に曝露する試験法を開発したが、その試験結果は３－３以降で述べる。これに先立ち、天然エストロゲンの E1 や E2 は実際にどの程度の濃度で試験魚に影響を与えるのかを把握しておくことにより、河川水や下水処理水中での試験魚に対する影響におけるこれらエストロゲン様物質の寄与を把握することが可能となる。

供試魚としてはメダカを用いた。２－２－１(3)で述べたように、メダカは内分泌かく乱作用を検出するための実験魚としてしばしば用いられているとともに、コイと比較すると生態を考慮した厳密な条件を設定する必要もなく、明確な知見を得やすいと考えられる。

影響指標としては、本研究では雌性化の指標とし



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-S:E1 硫酸抱合体化物、
E2-monoS:E2 硫酸抱合態化物、E3-monoS:E3 硫酸抱合態化物、NP:ノニルフェノール

図 3-18　HPLC を利用した標準物質の分画結果

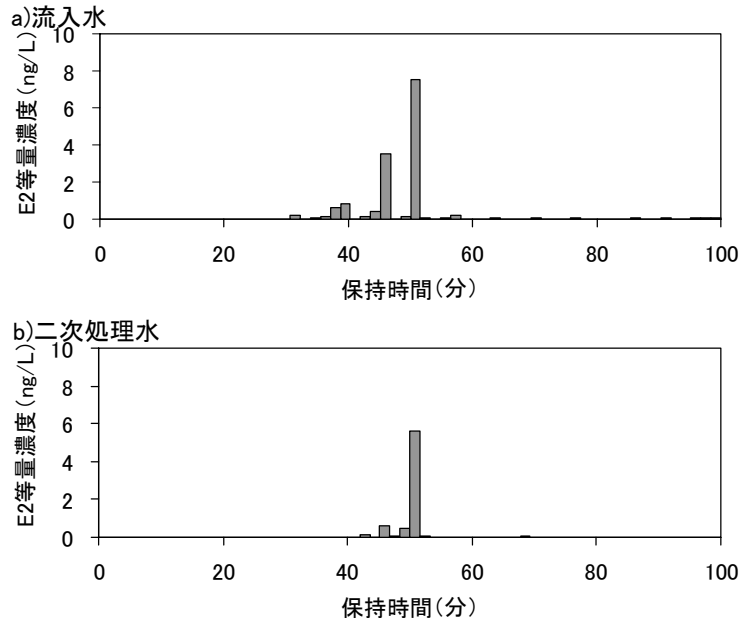


図 3-19　HPLC を利用した下水試料の分画とエストロゲン様活性の測定結果

て一般に採用されている雄魚のビテロゲニンを採用することとした。ビテロゲニンは、肝臓の受容体にエストロゲンが結合することによって生成される雌に特有の卵黄タンパク前駆物質である。本来雄には不要と想定され、通常は生成されないと考えられるタンパクであるが、エストロゲン投与によって雄魚もビテロゲニンを生成することから、エストロゲン作用の影響指標とされている。

なお、E2 は、ノニルフェノールやビスフェノールAなどエストロゲン様作用が疑われる化学物質でのビテロゲニン・アッセイにおいて陽性対照物質として用いられるため、曝露濃度が実際の環境水中の濃度よりもかなり高い場合が多い[33]。そのため、ビテロゲニン誘導の最小作用濃度や最大無作用濃度の把握を目的として実施された試験（例えば、公比 3 以下の 5 濃度区以上での曝露試験）の報告例は少ない。

表 3-5　HPLC により分画した河川水のエストロゲン様活性

		試験開始	第2週
Test 4			
石原			
エストロゲン活性	(ng/L-E2)	14.77	8.38
E2	(ng/L)	ND	Tr(2.3)
E1		14.8	9.3
EE2		ND	ND
E3		3.1	Tr(1.1)
E1-S	(ng/L)	0.2	Tr(0.1)
E2-S		2	2.2
E3-S		3.1	3.7
E2-diS		93.7	77.7
E2-S&G		ND	ND
E1-G		1.6	0.8
E2-G		Tr(1.6)	Tr(1.5)
E3-G		2.8	ND
NP	(μg/L)	0.1	ND
NP1EO	(μg/L)	0.2	0.16
NP2EO		0.19	Tr(0.10)
NP3EO		ND	ND
NP4EO		1.6	1.09
NP5EO		Tr(0.05)	Tr(0.05)
NP6EO		ND	ND
NP7EO		ND	ND
NP8EO		ND	ND
NP9EO		ND	ND
NP10EO		ND	ND
NP11EO		ND	0.31
NP12EO		ND	ND
NP13EO		ND	ND
NP14EO		ND	ND
NP15EO		ND	ND
NP1EC	(μg/L)	0.506	0.49
NP2EC		0.484	0.519
NP3EC		0.511	0.519
NP4EC		0.239	0.215
NP5EC		0.108	0.89
NP6EC		0.04	0.027
NP7EC		0.015	0.012
NP8EC		0.016	Tr(0.009)
NP9EC		0.015	Tr(0.005)
NP10EC		0.01	Tr(0.004)

ND：検出下限値未満
Tr：検出下限値以上，定量下限値未満

		試験開始	第2週	分離物質
Test 4				
石原				
F1	(ng/L-E2)	ND	ND	
F2		ND	ND	
F3		ND	ND	
F4		ND	ND	
F5		ND	ND	
F6		ND	Tr(0.12)	
F7		ND	ND	
F8		ND	ND	
F9		ND	ND	
F10		ND	ND	
F11		ND	Tr(0.09)	
F12		ND	ND	
F13		ND	Tr(0.10)	
F14		ND	ND	
F15		ND	ND	
F16		ND	ND	
F17		ND	ND	
F18		ND	ND	
F19		0.645	Tr(0.89)	E2
F20		0.148	Tr(0.10)	
F21		ND	ND	EE2
F22		7.375	4.760	E1
F23		0.305	Tr(0.18)	
F24		ND	ND	
F25		ND	Tr(0.09)	
F26		ND	Tr(0.07)	
F27		ND	ND	NP
F28		ND	ND	
F29		ND	ND	
F30		ND	ND	
F31		ND	ND	
F32		ND	ND	
F33		ND	ND	
F34		ND	ND	
F35		ND	ND	
F36		ND	ND	
F37		ND	−	
F38		ND	−	
F39		ND	−	

ND：検出下限値(0.1 ng/L-E2)未満
Tr：検出下限値以上定量下限値(0.2 ng/L-E3)未満

また E1 については、陽性対照物質としての使用を含めて、雄メダカを用いたビテロゲニン・アッセイの報告例はほとんど無いのが実情である。

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

(2) 試験環境

試験液中の E2 濃度の測定結果を表 3-6 に示した。設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均 E2 濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は<0.5ng/L であった。各試験区の平均実測濃度は設定濃度の 96～111％であったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。

また、試験液中の E1 濃度の測定結果を表 3-7 に示した。設定濃度 5.0、12.6、31.6、79.5 および 200ng/L の各試験液中の平均エストロン濃度は、5.0、13.6、34.5、87.9 および 191ng/L であった。助剤区の濃度は<0.2ng/L であった。各試験区の平均実測濃度は設定濃度の 97～109％であったことから、試験結果の解析には設定濃度を用いた。

曝露期間中の各曝露区における水温は、水温条件の 24±1℃以内の範囲にあった。また、pH や DO にも異常はなかった。このように、曝露期間を通して設定条件における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

(3) 曝露メダカの性状

表 3-6　試験液中の 17β-エストラジオール（E2）濃度

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

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

表 3-7　試験液中のエストロン（E1）濃度

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

曝露期間を通して死亡個体は見られなかった。また、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体は見られなかった。

曝露前および一定曝露期間後に肝臓中ビテロゲニン分析に供した個体の平均全長は 24.7～28.8mm、平均体重は 281～450mg であった。肝指数の平均値は 1.4～2.7%の範囲にあった。

(4) 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を図 3-18 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 3-19 に示す。なお、定量下限値未満のデータは、定量下限値の 1/2 の 0.5ng/mg として記載した。

対照系である助剤区のビテロゲニンは、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、各曝露期間とも、E2 濃度に依存して肝臓中ビテロゲニン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ビテロゲニンが高くなる傾向がみられた。E2 濃度が最も低い 5.0ng/L では、各曝露期間においてビテロゲニンが定量下限（1ng/mg）未満の個体もみられたが、ビテロゲニンが 1ng/mg 以上の個体数は、曝露 2 日後が 1 個体、7 日後が 3 個体、14 日後が 8 個体と曝露期間に依存して増加する傾向にあった。

表 3-8、表 3-9、および表 3-10 には統計学的な検定の結果を示す。曝露期間毎に見ると、対照試験区に対しては 12.6ng/L 以上の E2 の曝露により、曝露 2 日後以降で有意差が見られた。曝露 14 日後には、5.0ng/L 区でも有意差が認められた。曝露濃度間の検定結果でも多くの濃度間で有意差が見られたことから、発現するビテロゲニン濃度は E2 曝露濃度に依存することが示唆される。ただし、隣接濃度間では有意差は見られず、図 3-18 からは 79.5ng/L と 200ng/L の曝露によるビテロゲニン生成量はあまり変わらないようである。曝露濃度毎に見ると曝露日数間にも有意差が見られた。特に、曝露 2 日後と曝露 14 日後との間には全曝露濃度で有意差が見られ、曝露期間が長くなるとビテロゲニンの生成が増加することが示唆される。ただし、図 3-19 からもわかるように、その増加割合は減少しているようである。

(5) E2 による曝露後の清水飼育期間中のビテロゲニン濃度

31.6ng/L および 200ng/L の E2 で 14 日間曝露した後に希釈水で飼育した場合の肝臓中のビテロゲニン濃度の経時変化（E2 での曝露 2 日後から曝露後の飼育 14 日後まで）を図 3-20 に示す。

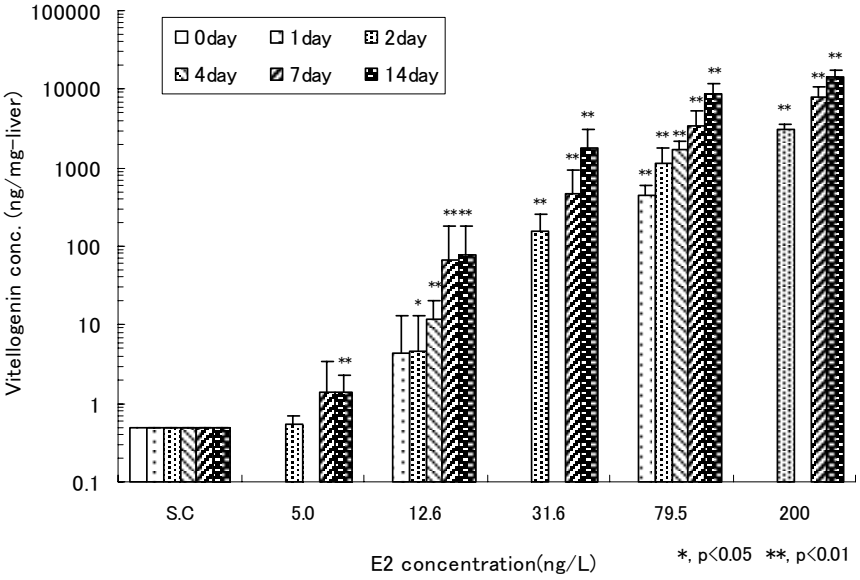


図 3-18　E2 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度

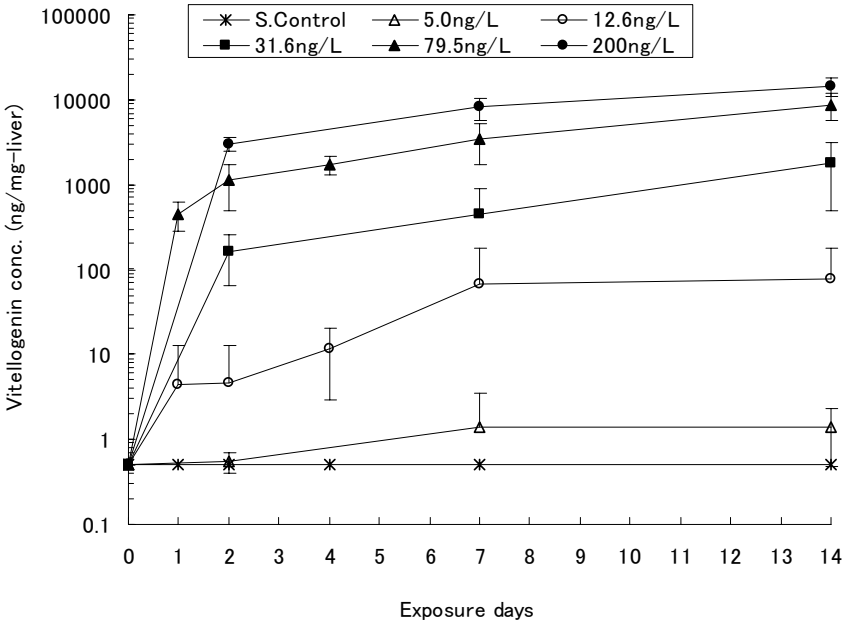


図 3-19　E2 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度の経時変化

前述のように E2 での曝露により曝露期間にビテロゲニンは上昇し、曝露 14 日後（曝露後の飼育 0 日目）のビテロゲニンは 31.6ng/L 曝露群で平均 1810ng/mg、200ng/L 曝露群で 14400ng/mg となった。この E2 での曝露後に E2 を含まない希釈水（脱塩素水道水）に移行したことにより、31.6ng/L 曝露群ではビテロゲニンが飼育 7 日後には 378ng/mg、14 日後には 167ng/mg と E2 での曝露 2 日後と同程度まで低下した。200ng/L 曝露群でも、E2 曝露後の飼育 7 日後には 6170ng/mg、14 日後は 4080ng/mg となり、31.6 ng/L 曝露群と同様に肝臓中のビテロゲニンは、E2 での曝露 2 日後と同程度まで低下した。ただし、このレベルは曝露開始時（助剤区の 0day）よりは高いレベルであった。このように、ビテロゲニンの生成濃度は曝露期間により増加するもののその増加割合は減少していくこと、79.5ng/L 区と 200ng/L 区でのビテロゲニン生成濃度があまり変わらなかったこと、曝露をやめるとビテロゲニンの生成は徐々に収まっていくことを併せて考えると、エストロゲンの曝露によってメダカの肝臓中にビテロゲニンは蓄積し、その生成濃度はある程度の曝露濃度までは曝露濃度に比例する（おそらくは最高速度

表 3-8　E2 曝露によるビテロゲニン濃度の対照区に対する検定結果

	曝露1日後	曝露2日後	曝露4日後	曝露7日後	曝露14日後
5.0ng/L	−		−		**
12.6ng/L		*	**	**	**
31.6ng/L	−	**	−	**	**
79.5ng/L	**	**	**	**	**
200ng/L	−	**	−	**	**

※スティールの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

表 3-9　E2 曝露によるビテロゲニン濃度の E2 曝露濃度間の検定結果

	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
5.0ng/L vs 12.6ng/L			
5.0ng/L vs 31.6ng/L			*
5.0ng/L vs 79.5ng/L	**	**	**
5.0ng/L vs 200ng/L	**	**	**
12.6ng/L vs 31.6ng/L			
12.6ng/L vs 79.5ng/L	**	*	*
12.6ng/L vs 200ng/L	**	**	**
31.6ng/L vs 79.5ng/L			
31.6ng/L vs 200ng/L	*	*	*
79.5ng/L vs 200ng/L			

※シェッフェの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

表 3-10　E2 曝露濃度ごとのビテロゲニン濃度の E2 曝露日数間の検定結果

	曝露濃度				
	5.0ng/L	12.6ng/L	31.6ng/L	79.5ng/L	200ng/L
曝露1日後 vs 曝露2日後	−		−		−
曝露1日後 vs 曝露4日後	−		−		−
曝露1日後 vs 曝露7日後	−		−	*	−
曝露1日後 vs 曝露14日後	−	*	−	**	−
曝露2日後 vs 曝露4日後	−		−		−
曝露2日後 vs 曝露7日後					*
曝露2日後 vs 曝露14日後	**	**	**	**	**
曝露4日後 vs 曝露7日後	−		−		−
曝露4日後 vs 曝露14日後	−		−		−
曝露7日後 vs 曝露14日後			*		*

※シェッフェの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

が存在する）こと、エストロゲンの曝露をやめると蓄積していたビテロゲニンが代謝によって減少していく（おそらくはビテロゲニン残存量に比例した速度で）ことが推定される。これは生物学における一般的な反応速度論とも矛盾しない。

(6) 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を図 3-21 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 3-22 に示す。なお、定量下限値未満のデータは、定量下限値の 1/2 の 0.5ng/mg として記載した。

助剤区のビテロゲニンは、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ビテロゲニンは定量下限未満であった。31.6ng/L 区では、曝露 3 日後は 10 個体がすべて定量下限未満であったが、曝露 7 日後および 14 日後は 10 個体のうち各 4 個体が 1.0ng/mg 以上のビテロゲニンを示し、平均値でみると曝露 14 日後がやや高かった。79.5ng/L 区および 200ng/L 区では曝露期間に依存して肝臓中ビテロゲニンが高くなる傾向がみられた。経時的にみると、31.6ng/L 以上の濃度区では、曝露時間に依存して肝

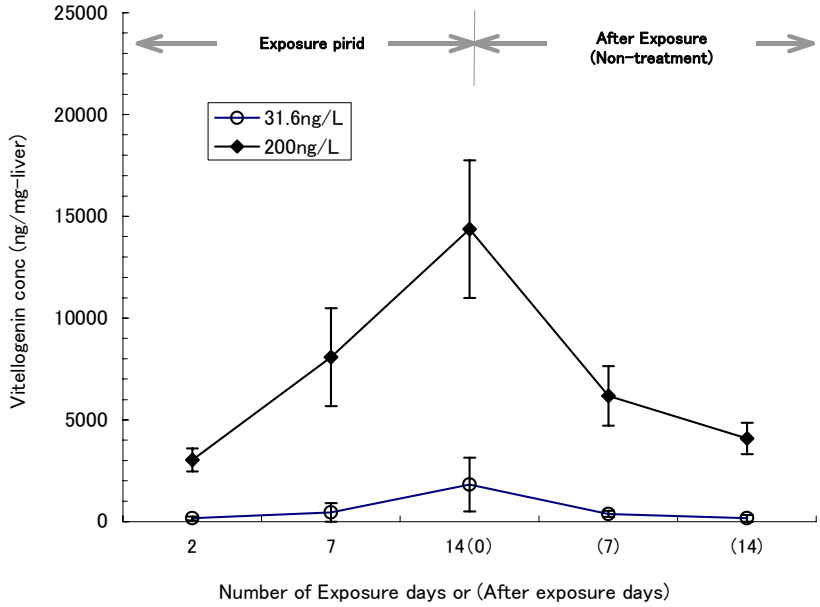


図 3-20　E2 での曝露期間およびその後の希釈水での飼育期間のビテロゲニン濃度

臓中のビテロゲニンも増加する傾向がみられた。このような傾向は E2 を曝露した場合とほぼ同様である。

表 3-11、表 3-12、および表 3-13 には統計学的な検定の結果を示す。曝露期間毎に見ると、対照試験区に対しては 79.5ng/L 以上の E1 の曝露により、曝露 3 日後以降で有意差が見られた。31.6ng/L 以下の濃度区では各曝露期間とも対照試験区との間に有意差は認められなかった。また、有意差が認められる曝露濃度は曝露期間による違いはなかった。ビテロゲニンの生成が見られた曝露濃度間の検定結果では曝露 14 日後では全ての濃度間で有意差が見られたことから、図 3-21 で見られる傾向同様、ビテロゲニンの生成量は曝露濃度に依存すると考えられる。曝露濃度毎に見ると 200ng/L の曝露濃度の場合のみ曝露日数間に有意差が見られた。統計的には有意ではないが、図 3-22 からは 31.6ng/L 以上の曝露濃度で曝露期間が長くなるとビテロゲニンの生成が増加する傾向が見られた。

このように、E1 曝露によるビテロゲニンの生成は E2 曝露の場合と傾向が似ており、曝露濃度が高くなり曝露期間が長くなるとビテロゲニンの生成量が増加する傾向にあることがわかった。

(7) E2 および E1 の作用濃度

室内曝露試験から得られた 17β-エストラジオール（E2）およびエストロン（E1）における雄ヒメダカ成魚でのビテロゲニン誘導の最小作用濃度および最大無作用濃度を表 3-14 に示す。ここで、曝露期間ごとに肝臓中のビテロゲニン濃度に助剤区と有意差が認められた最も低い濃度（設定濃度）を最小作用濃度、有意差が認められなかった最も高い濃度を最大無作用濃度とした。

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

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

なお、E2 については曝露日数により最大無作用濃度、最小作用濃度が異なっていたことから、ビテロゲニンの生成には濃度だけではなく、曝露期間や合計曝露量が関連している可能性がある。河川水のようにエストロゲン様物質の濃度が変動する環境においては、この点に留意して魚類への影響を考慮する必要があると考えられる。

(8) 肝臓中ビテロゲニン測定の環境水での曝露試験

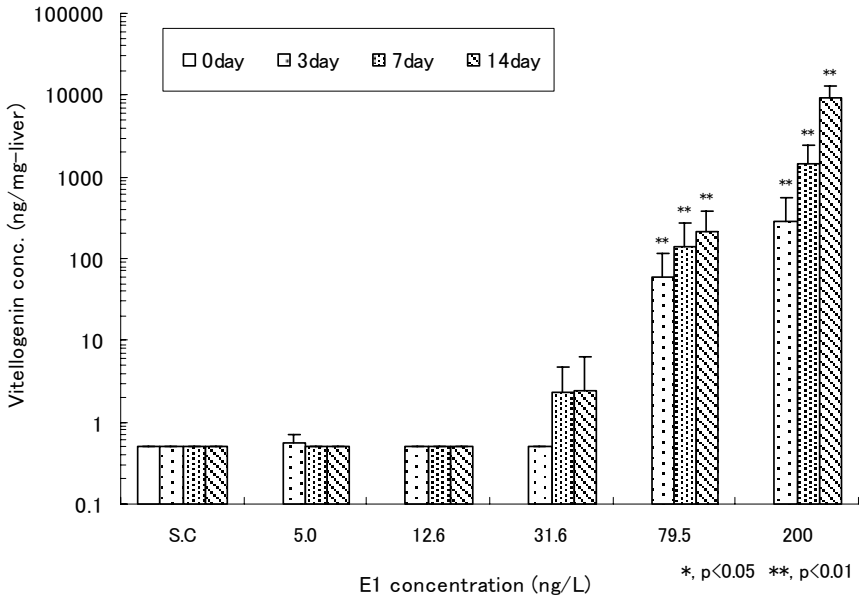


図 3-21　E1 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度

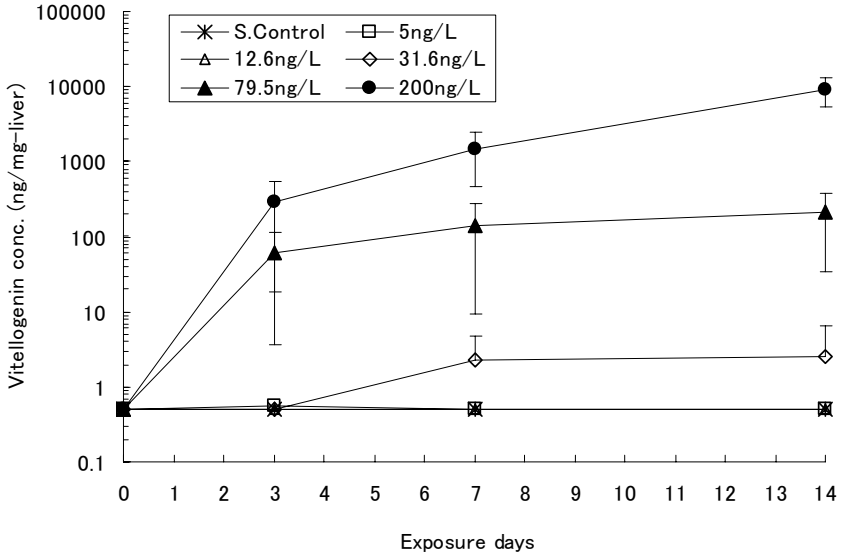


図 3-22　E1 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度の経時変化

への適用可能性

表 3-14 に示した E2 の最小作用濃度は、人為的に濃度設定された曝露試験における一定の段階的な設定濃度から推定されたものである。現地での曝露試験においても、一定期間（例えば 14 日間）の曝露後に供試した雄メダカのビテロゲニンを測定して、コントロール群（ネガティブ・コントロール又はイニシャル・コントロール）と有意差検定することによって、試験対象とした環境水中のエストロゲン様活性がビテロゲニンを上昇させたか否かを推定できる。もちろん、環境水のエストロゲン様物質は多く存在し、濃度範囲やその時間変動に関する知見はないために、この方法で特定の物質による影響を把握することは困難であるが、環境水総体としてのエストロゲン様活性は E2 換算で示すことができることから、雄の魚類からビテロゲニンが生成している際の最低エストロゲン様物質の濃度レベルを推定することができると考えられる。加えて、曝露レベルと応答ビテロゲニンのレベルとの関連が見られれば、ビテロゲニンの測定により、環境水中のエストロゲン様物質の濃度を見積もることができると考えられる。

そこで、E2 濃度と肝臓中ビテロゲニン濃度の関係

表 3-11　E1 曝露によるビテロゲニン濃度の対照区に対する検定結果

	曝露3日後	曝露7日後	曝露14日後
5.0ng/L			
12.6ng/L			
31.6ng/L			
79.5ng/L	**	**	**
200ng/L	**	**	**

※スティールの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

表 3-12　E1 曝露によるビテロゲニン濃度の E1 曝露濃度間の検定結果

	曝露3日後	曝露7日後	曝露14日後
31.6ng/L vs 79.5ng/L	*	*	*
31.6ng/L vs 200ng/L	**	**	**
79.5ng/L vs 200ng/L			*

※シェッフェの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

表 3-13　E1 曝露濃度ごとのビテロゲニン濃度の E1 曝露日数間の検定結果

	曝露濃度				
	5.0ng/L	12.6ng/L	31.6ng/L	79.5ng/L	200ng/L
曝露3日後 vs 曝露7日後					
曝露3日後 vs 曝露14日後					**
曝露7日後 vs 曝露14日後					*

※シェッフェの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

を定量的に比較することをおこなった。E2 曝露における E2 濃度と曝露 14 日後における肝臓中ビテロゲニンの関係を図 3-23 に示す。肝臓中のビテロゲニンと環境水中の 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）とビテロゲニン（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、肝臓中のビテロゲニン（y）と E2 の曝露濃度（x）の関係は次式により近似した。なお、肝臓中のビテロゲニンには上限濃度レベルがあり、定量下限も存在することから、今回の試験における最高濃度である 200ng/L の E2 濃度に対応するビテロゲニンの濃度データは除外し、残りの 5.0～79.5ng/L の範囲での近似式を求めることとした。

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

すなわち、

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

このように得られた近似式（$y = 0.000827\,x^{3.26}$）からは、曝露 14 日後に雄ヒメダカにある濃度のビテロゲニンを誘導させる 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 のビテロゲニンを誘導させる E2 濃度は、それぞれ 7.1ng/L、8.8ng/L、17.9ng/L と算出することができる。

なお、E2 のメダカに対する影響濃度に関する既往知見は少ないが、フルライフサイクル試験（受精卵から 2 世代に渡る曝露試験）の結果、受精卵から連続的に曝露した F0 世代において、ふ化後 60 日齢で

表 3-14　17β-エストラジオール（E2）とエストロン（E1）によるメダカビテロゲニン誘導の作用濃度

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

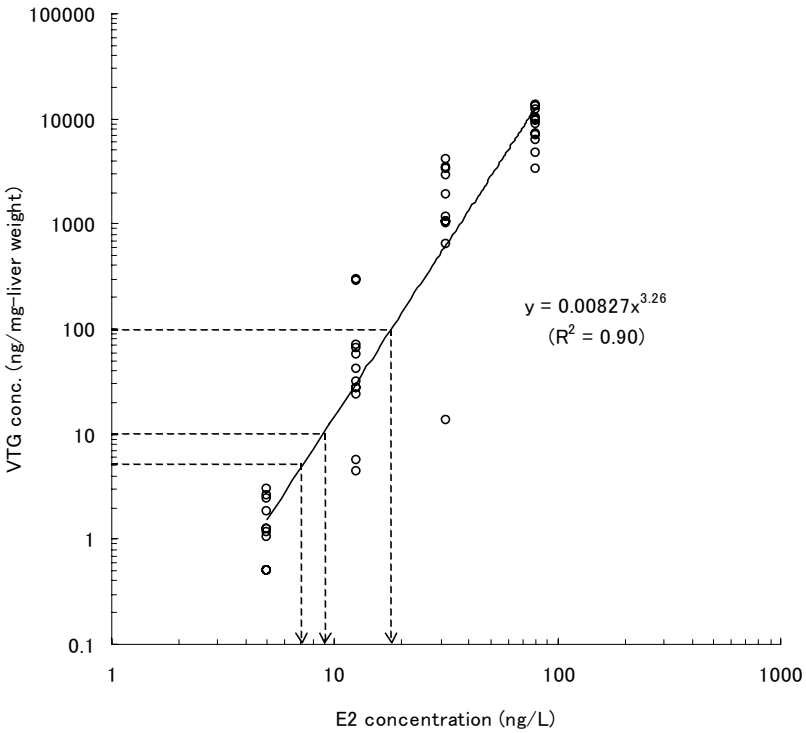


図 3-23　曝露 14 日後の E2 濃度と肝臓中ビテロゲニンの関係

雄の生殖腺（精巣）に精巣卵を生じさせた E2 の最小作用濃度は 27.9ng/L（最大無作用濃度は 8.66ng/L）、また統計学的に有意とは言えないが 8.66ng/L でも 1 個体で精巣卵がみられたとの報告[34)]がある。本研究の E2 曝露試験の結果から推定した曝露 14 日後に 5ng/mg または 10ng/mg のビテロゲニンを誘導させる E2 濃度は、フルライフサイクル試験において雄メダカの生殖腺に精巣卵を生じさせた濃度[34)]と同程度であったことから、現地での曝露試験において曝露 14 日後の肝臓中ビテロゲニンが 5ng/mg を超えたか否かを指標とすることによって、間接的かつ平均的な曝露状況の評価になるものの、試験対象とした環境水中のエストロゲン様物質が魚類（メダカ）の生殖腺に影響を与えるレベルであったか否かも評価可能であることを示唆している。

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

(9) エストロゲン様物質のエストロゲン作用強度

３－２－１(8)での E2 での手法と同様の方法で、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（ビテロゲニンが定量下限以上であった 31.6～200ng/L）と肝臓中ビテロゲニンの関係を近似式（$y = b \cdot x^{a}$）として求めた。また、17β-エストラジオール（E2）についても、曝露 14 日後のデータに加え、曝露 2、7 日後における曝露濃度（5～72.9ng/L）とビテロゲニンの関係の近似式を求めた。その結果を図 3-24 と図 3-25 に示す。ここで得られた E1 濃度および E2 濃度とのビテロゲニンの関係近似式により、各直線の中央付近にある 10、50 および 100ng/mg のビテロゲニンを誘導する E1 および E2 濃度をそれぞれ算出し、表 3-15 に示した。

各曝露期間において各ビテロゲニンを誘導する E2 濃度に対する E1 濃度の比（E2 濃度／E1 濃度）を表 3-16 に示す。E2 濃度に対する E1 濃度の比は、E2 に対する E1 のビテロゲニン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ビテロゲニン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。これら近似式の傾きが一定ではないことからこのような比較には場合分けが必要な可能性もあるが、この手法は他の物質にも適用できると考えられる。このため、環境水中の魚類にビテロゲニン

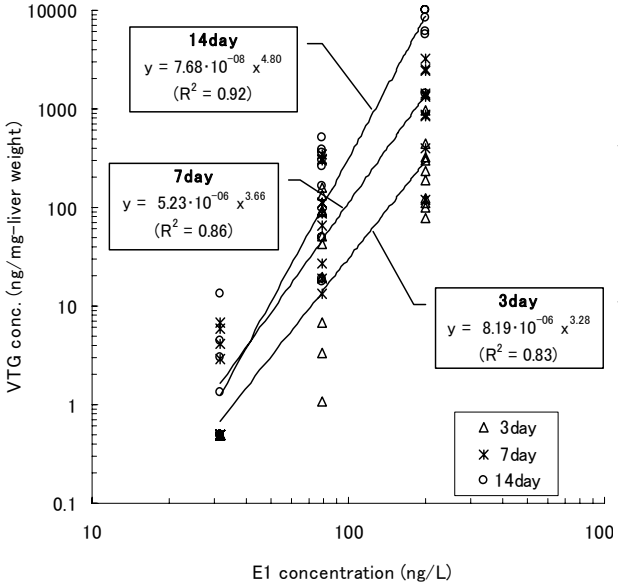


図 3-24　各曝露期間における
肝臓中ビテロゲニンと E1 濃度の関係

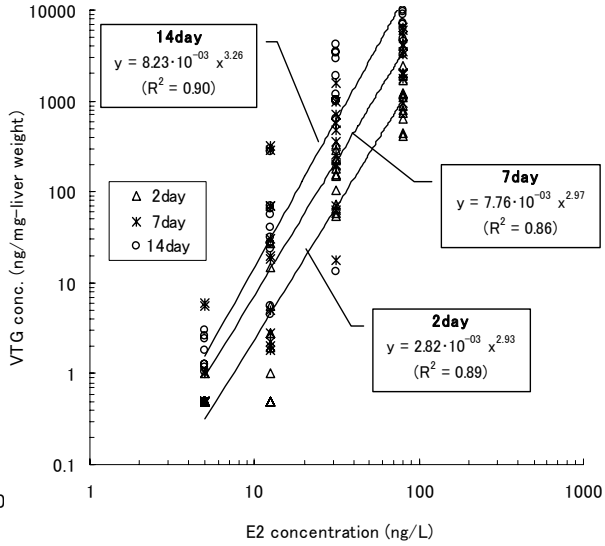


図 3-25　各曝露期間における
肝臓中ビテロゲニンと E2 濃度の関係

表 3-15　メダカビテロゲニンを誘導する E1、E2 曝露濃度

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 3-16　E1 の E2 に対する相対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

の生成が見られた場合、エストロゲン様活性を有する個々の物質の濃度と対 E2 エストロゲン作用強度を把握できれば、環境水においてエストロゲン作用を発現させる個々の物質の寄与度がわかるために、エストロゲン作用を低減させるための対策を考案することも容易になると考えられる。

３－２－２　エストロゲン様物質のメダカ曝露試験における水温の影響

(1) 研究の位置付け

１－４で述べたように、コイの曝露試験においては、コイの生態を理解した上での試験が重要であった。メダカの曝露試験においても同様に生態を理解した上での条件設定は重要であるが、メダカの場合には生殖活動に関するサイクルがコイよりはるかに短いこと、また、人為的にある程度生殖状況をコン

トロールすることも可能であるために、曝露試験においてはメダカの月齢を揃える等の条件整理がしてあればよい。むしろ、ビテロゲニンの生成に関し、影響が大きい因子があれば、その影響を把握しておくことが望ましい。メダカの曝露試験においては、水温がビテロゲニンの生成に影響を与えると考えられるため、曝露温度を変えた場合のビテロゲニンの生成状況についても確認を行うこととした。

(2) 試験環境

曝露 0 日目および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から採取した試験液中の E1 濃度の測定結果としては、16～24℃区の試験液中の E1 濃度は、曝露期間を通して 49～56ng/L の範囲にあり、設定濃度（50ng/L）の 97～111%、試験液調製における E1 添加濃度（55ng/L）の 89～101%を維持していた。一方、28℃区の E1 濃度には経時的な漸減傾向がみられ、曝露 7 日後および 14 日後の濃度（42.8 および 29.7ng/L）は、他の曝露区の 80%および 55%程度と低かった。再測定により分析誤差ではないことを確認していることから、試験水の水温に依存的に試験水槽内でのバクテリア等による E1 の分解が促進され、結果として最も水温が高い 28℃区で顕著な濃度低下が生じた可能性が考えられる。

曝露期間中の各曝露区における平均水温は、各曝露区とも水温条件の±0.5℃以内であった。曝露期間中の変動範囲も、16℃区が 15.0～16.4℃、20℃区が 19.1～21.0℃、24℃区が 23.6～24.8℃、28℃区が 27.7～28.6℃、24℃_2 カ月齢区が 23.6～23.8℃と、いずれの曝露区においても水温条件の±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区における pH は 7.1～7.9 の範囲にあった。溶存酸素濃度は、5.8mg/L 以上（飽和度として 70%以上）であった。pH および溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通して OECD 化学品テストガイドライン TG203 6)（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH；6.0～8.5、溶存酸素飽和度；60%以上）を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pH および溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件または一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

(3) 曝露メダカの性状

曝露期間中、28℃区で曝露 6 日後に 1 個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

曝露 0 日（曝露前）および曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中ビテロゲニン濃度分析に供した 10 個体の平均全長は、5ヵ月齢のメダカについては 31.7～35.5mm、2ヵ月齢のメダカについては 27.6～29.7mm、平均体重は 5ヵ月齢のメダカについては 348～515mg、2ヵ月齢のメダカについては 249～280mg であった。5 カ月齢の雄メダカを曝露に供した 16℃区、20℃区、24℃区および 28℃区の平均体重には、相対的に水温の低い条件区が大きく、水温の高い条件区ほど小さい傾向がみられた。

曝露 0 日および曝露 2、7 および 14 日後に各試験水槽から取り上げ、肝臓中ビテロゲニン濃度分析に供した雄メダカの肝指数（10 個体／曝露区の平均）は 2.0～4.5%の範囲にあった。各曝露区の肝指数は曝露 0 日（曝露前）から曝露 14 日後にかけてやや低下する傾向がみられた。また、曝露 0 日および曝露 2、7 および 14 日後とも、水温が低い条件区で肝指数が大きく、水温が高い条件区ほど肝指数が小さい傾向がみられた。肝臓採取の観察では、水温が低い条件区において色調がクリーム色の脂肪を多く蓄積した肝臓を持つ個体が多くみられた。これはより低い水温条件下で飼育された個体ほど、基礎代謝量が小さく餌料から吸収した脂肪の肝臓への蓄積量が多かったためと考えられる。

(4) 肝臓中のビテロゲニン濃度

曝露 0 日（曝露前）、曝露 2, 7 および 14 日後に取り上げた雄メダカ（10 個体／曝露区）の肝臓中ビテロゲニン濃度（各曝露区 10 個体の平均濃度）を図 3-26 に、その経時変化を図 3-27 に示す。

曝露前のビテロゲニン濃度は、全試験区とも平均値で 2ng/mg 以下と、低い濃度であった。曝露 2 日後には平均値の増加が見られた試験区もあったが、依然として全試験区で 2ng/mg 以下であった。しかし、曝露 7 日後には平均値で 1.7～10.4ng/mg、曝露 14 日後には 2.4～20.2ng/mg と、ビテロゲニン濃度の増加が見られた。試験区毎に見ると、16℃区と 20℃区においては曝露時間とともにビテロゲニン濃度の増加が見られたが、24℃区と 28℃区では曝露 14 日後にややビテロゲニン濃度の減少が見られ、24℃_2 カ月齢区の場合には曝露期間による増加傾向は明確ではなかった。

水温の違いによるビテロゲニン濃度については、図 3-26 や図 3-27 では、３－２－２の E1 や E2 の曝露濃度による違いのような明確な傾向は見られない。

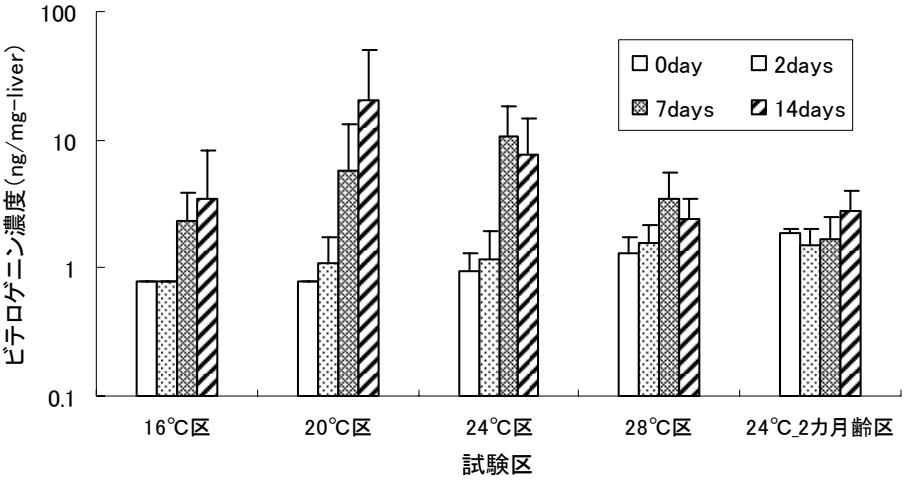


図 3-26　各温度区の E1 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度

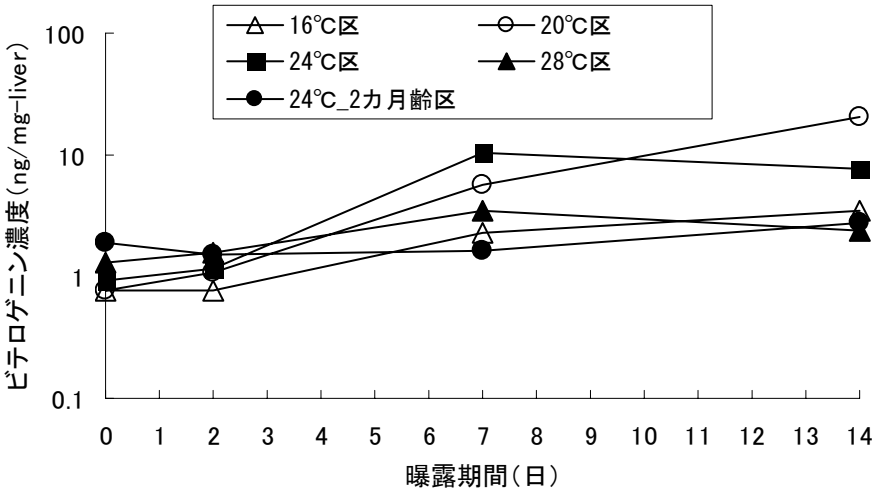


図 3-27　各温度区の E1 曝露による肝臓中ビテロゲニン濃度の経時変化

そこで、それぞれの曝露期間において、水温によるビテロゲニン濃度について有意差検定を行った。その結果を表 3-17 に示す。曝露前は、16℃区、20℃区および 24℃区の各曝露区間には有意差は認められなかったが、28℃区のビテロゲニンが 16℃区および 20℃区に比べて有意に高かった。曝露 2 日後のビテロゲニンも、28℃区と 16℃区の間には有意差が認められた。曝露 7 日後のビテロゲニンは、24℃区が 16℃区、20℃区および 28℃区に比べて有意に高かった。曝露 14 日後は、各曝露区間のビテロゲニンに有意差は認められなかった。このように曝露期間にかかわらず飼育水温によるビテロゲニン濃度に差が見られたことから、エストロゲン物質で曝露された雄メダカのビテロゲニン生成は水温の影響を受けると考えられる。

なお、Ishibashi らは、10℃と 30℃の各水温条件下でキンギョを 17β-エストラジオール（100μg/L）に曝露した場合に、10℃よりも 30℃において血漿中のビテロゲニンに急激な増加がみられ、曝露 1、5 あるいは 10 日後の血漿中濃度も 30℃での曝露で高くなったこと報告している[35]。このような水温によるビテロゲニン濃度の違いは本調査の結果と一致するものであった。

今回の試験においては、水温によるビテロゲニンの生成に統計的には有意差が見られたものの、明確な傾向は得られなかった。これは、E1 の曝露濃度が 50ng/L と、最小作用濃度は 79.5ng/L と最大無作用濃度は 31.6ng/L の間の濃度であったことにも理由があると思われる。そのために、ビテロゲニン濃度が定量下限値付近の個体も多く見られ、平均値としては大きな差が出なかったと考えられる。

24℃_2 カ月齢区では、曝露前からビテロゲニンの

表 3-17　各曝露期間における水温によるビテロゲニン濃度の検定結果

	曝露前	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
16℃区 vs 20℃区				
16℃区 vs 24℃区			**	
16℃区 vs 28℃区	*	*		
20℃区 vs 24℃区			*	
20℃区 vs 28℃区	*			
24℃区 vs 28℃区			*	

※スティール・ドゥワスの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

生成が見られたものの、曝露後にはビテロゲニンの増加は見られなかった。これは24℃区とは異なる傾向であった。このことから、試験に用いるメダカの月齢の選択は重要であることが示唆される。

以上のように、エストロゲン様物質のメダカ曝露試験において、水温や月齢がビテロゲニンの生成に影響を与えることが示唆された。したがって、下水処理水や河川水など環境水を試験水とした曝露試験においてエストロゲン様作用の有無や強さを正確に評価するためには、供試する雄メダカの月齢を慎重に選択し、曝露前に適切な飼育条件を設定し、曝露期間中に水温が大きく変動しないように管理した条件下で試験を実施することが必要と考えられる。

３－２－３　餌を通してのエストロゲンのメダカへの曝露

(1) 研究の位置付け

魚類が生活空間においてエストロゲン様物質を摂取するのは、河川水等に溶存している形態が主であると考えられる。しかし、物質によっては餌経由の摂取も考えられ、エストロゲン様物質についてもその可能性を否定することはできない。そこで、飼育の際の飼料にエストロゲン様物質を混入させた場合のエストロゲン作用についても確認試験を行うこととした。

(2) 飼料中および飼育水中の E1 濃度

0ng/g 区、15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区用に調製した E1 添加飼料中の E1 濃度の測定結果を表 3-18 に示す。0ng/g 区用飼料（E1 無添加）中の E1 濃度は定量下限未満であった。15ng/g 区、150ng/g 区および 1500ng/g 区用に調製した各飼料中 E1 の実測濃度は、30.0、355 および 2330ng/g であった。これは添加濃度の 1.5～2.3 倍に相当する濃度であった。これは、飼料が固体であることに起因する分析上の誤差であると考えられる。

曝露期間中に雄メダカ 1 個体に給餌した 1 日あたりの給餌量は 7.9～8.7mg/day/ind であり、体重の 1.4%前後であった。

曝露 2、7 および 14 日後に各曝露区の試験水槽から採取した飼育水中の E1 濃度の測定結果としては、1500ng/g 区を除く各曝露区では、曝露期間を通して採取した飼育水中の E1 濃度は 0.4ng/L 以下であった。1500ng/g 区では、最大で曝露 2 日目に 1.7ng/L であったが、３－２－１で求めた最大無作用濃度である 31.6ng/L よりもはるかに低い濃度であったため、各曝露区における曝露期間中の飼育水中の E1 濃度は低く、雄メダカのビテロゲニン生成に影響を与えないレベルにあったと推察される。このため、本試験における給餌した飼料から飼育水への溶出は無視していいと考えられる。

(3) 試験環境

曝露期間中の各曝露区における平均水温は、各曝露区とも 24±0.3℃以内であった。また、曝露期間中の変動範囲も、各曝露区とも 24±1℃以内を維持していた。

曝露期間中の各曝露区の pH は 7.0～8.0 の範囲にあった。溶存酸素濃度は、飼育個体数の多かった曝露開始日が 5.0～5.3mg/L（飽和度として 61～64%）とやや低かったが、曝露 3 日目以降の飽和度は 65%以上であった。pH および溶存酸素飽和度とも、曝露期間を通して OECD 化学品テストガイドライン TG203 6)（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH;6.0～8.5、溶存酸素飽和度;60%以上）を維持していた。

表 3-18　飼料中の E1 濃度

飼料	E1 濃度（ng/g）	
	実測濃度	添加濃度
0 ng/g 区用	ND	0
15 ng/g 区用	30.0	16.7
150 ng/g 区用	355	167
1500 ng/g 区用	2330	1670

注）ND は定量下限未満（0.3ng/g 未満）を示す。

各曝露区の試験水槽への飼育水の供給量（実測流量）は、曝露期間を通して設定流量（100mL/min、換水率として7.2換水／日）の99～101%の範囲を維持していた。

以上の結果から、本曝露試験における各曝露区の水温、pHおよび溶存酸素濃度は、曝露期間を通して設定条件または一般的な試験環境における適正範囲を維持しており、試験結果に影響を及ぼす要因はなかったと考えられる。

(4) 曝露メダカの性状

曝露1日後に150ng/g区、8日後に1500ng/g区でそれぞれ1個体の死亡がみられた。他の曝露区では、曝露期間を通して死亡はみられなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体はみられなかった。

曝露0日（曝露前）および曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中ビテロゲニン濃度分析に供した10個体の平均全長は35.0～37.4mmの範囲にあった。また、平均体重は513～666mgの範囲にあった。

曝露0日および曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げ、肝臓中ビテロゲニン濃度分析に供した個体の肝指数（10個体／曝露区の平均）は2.1～3.0%の範囲にあった。曝露2、7および14日後とも各曝露区の肝指数に明確な差異や傾向等はみられなかった。

(5) 肝臓中のビテロゲニン濃度

曝露0日（曝露前）、曝露2、7および14日後に各曝露区から取り上げた雄メダカ（10個体／曝露区）の肝臓中ビテロゲニン濃度（10個体の平均）を表3-19に示す。0ng/g区、15ng/g区および150ng/g区の各曝露区においては、曝露開始後のビテロゲニンは、全個体が定量下限未満であった。1500ng/g区では、曝露2日後以降定量下限以上の個体が出現したが、平均ビテロゲニンには明瞭な増加傾向はみられなかった。

曝露2、7および14日後における各曝露区間のビテロゲニン濃度について行った有意差検定の結果を表3-20に示す。曝露2日後および曝露7日後には、各曝露区間のビテロゲニンに統計学的な有意差は認められなかった。曝露14日後も、0ng/g区、15ng/g区および150ng/g区の各曝露区間のビテロゲニンに有意差は認められなかったが、1500ng/g区のビテロゲニンは、これら3曝露区のビテロゲニンよりも有意に高かった。

ビテロゲニンの生成が見られた1500ng/g区においてもその生成濃度は曝露14日後の平均で2.3ng/mgと低かったが、他の曝露区とは統計学的に有意差が認められた。したがって、食物からのエストロゲン様物質の摂取によるメダカのビテロゲニン生成はこの濃度レベル以上で発現すると示唆される。

実際の環境中における魚類がエストロゲン様物質を摂取する由来を考えると、餌中のエストロゲン様物質がこの濃度レベルにあるかどうかがわかればよ

表3-19　餌の影響調査の曝露試験における雄メダカの肝臓中ビテロゲニン濃度

曝露区	VTG濃度（ng/mg）			
	曝露前	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区	1.0±0.4	ND	ND	ND
15ng/g区	—	ND	ND	ND
150ng/g区	—	ND	ND	ND
1500ng/g区	—	1.6±2.7	2.1±4.0	2.3±1.9

注）データは、10個体の平均±標準偏差を示す。NDは全個体のVTG濃度が定量下限未満（1.56ng/mg未満）であったことを示す。VTG濃度が定量下限未満については、平均値の算出に定量下限の半数値を用いた。

表3-20　各曝露期間における各曝露間のビテロゲニン濃度の検定結果

	曝露2日後	曝露7日後	曝露14日後
0ng/g区 vs 15ng/g区			
0ng/g区 vs 150ng/g区			
0ng/g区 vs 1500ng/g区			*
15ng/g区 vs 150ng/g区			
15ng/g区 vs 1500ng/g区			*
150ng/g区 vs 1500ng/g区			*

※スティール・ドゥワスの多重比較検定を用いた。(*:p<0.05,**:p<0.01)

い。過去の研究[36]において、メダカを含め魚類の餌になると考えられる藻類中のエストロゲン様活性が最大で66.8μg/kg-wet(66.8ng/g-wet)であることが報告されている。この濃度は本研究で影響が見られた1500ng/gよりはるかに低い濃度であるため、環境中での餌由来のエストロゲン様物質の摂取は無視できると考えられる。したがって、３－３および３－４で述べる河川水や下水処理水でメダカを飼育してエストロゲン様物質によるビテロゲニンの生成を調べる試験においては、餌からの摂取を考慮する必要はなく、試験水中に溶存しているエストロゲン様物質とビテロゲニンの生成との関係について考察すればよいことになる。

３－２－４　メダカのビテロゲニン生成を促すエストロゲン濃度についてのまとめ

メダカをエストロン（E1）や17β-エストラジオール（E2）に曝露させてビテロゲニンが生成する濃度を調査したところ、E1やE2が雄メダカのビテロゲニン生成を引き起こす作用濃度は、14日間の曝露での最小作用濃度がそれぞれ79.5ng/Lと5.0ng/L、最大無作用濃度がそれぞれ31.6ng/Lと<5.0ng/Lであった。また、これらエストロゲンの濃度の対数と生成したビテロゲニンの濃度の対数には直線関係があった。このため、環境水中においても同様の関係が得られれば、エストロゲンの濃度やエストロゲン様活性を魚類の雌性化の兆候であるビテロゲニンの生成を推測する指標として用いることができる。

ビテロゲニンの生成における水温の影響を調査したところ、飼育する水温によりビテロゲニンの生成には統計的な有意差が見られたため、環境水中の調査においては水温の制御が重要であることが示唆された。エストロゲンを含む餌を用いた調査ではビテロゲニンの生成に大きな影響が見られなかったため、魚類がエストロゲンを摂取する経路としては、水中に溶存しているエストロゲンがほぼ唯一の経路であると考えられる。

３－３　河川水のメダカ曝露試験

３－３－１　メダカ現地曝露試験法の開発

(1) 研究の位置付け

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、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、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。室内実験で最小作用濃度は既に明らかにしてきたので、実際の環境水においてのエストロゲン様物質の濃度レベルとビテロゲニン生成との関係を明らかにするステップが次に必要となる。

河川での魚類曝露試験では、性状変化の少ない新鮮な河川水を用いることが必要となる。そこで、本研究に先立ち、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)予備通水では藻類の過剰供給が確認されたため、試験では、この流入を抑えつつ餌にすることとした。しかし、試験開始後はまったく藻類が供給されなかったため、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。

ところで、河川における魚類影響は、河川水のエストロゲン作用の変動に伴い変動する可能性が考えられる。そこで、長期的な現地曝露試験を実施して、雄メダカのビテロゲニン生成の変動状況を明らかにすることとした。また、成魚のビテロゲニン生成量から判断して、外部環境に対し感受性の高い稚魚や若魚ではさらに大きな影響が表れることが想定されたため、稚魚を用いた曝露試験も実施して、魚類の生活に即した影響を検出することとした。

(2) 試験環境

拝島橋および日野橋での予備試験（Test1）は、冬期に実施したため、曝露試験装置に組み込まれている外部循環式水温調節機のみで河川水を 26℃に保つことができなかった。当初のこの試験システム（Test1,2）での曝露水槽の水温は、夏季に行った石原監視所での試験では 24～26℃、日野橋では 20～22℃であった。22℃前後ではメダカの生理的反応が低下する [37] ことが知られているため、水温を制御することは曝露試験にとって重要である。そこで、水温を維持する機能の改善が必要であると考えられ、水温調節機に加え、サーモスタット付き投げ込みヒーターを使用することによって、水温の制御を正確に行うこととした。

なお、室内曝露試験の成果として、エストロゲン物質の濃度が低くても長期の曝露によって影響が表れる可能性が示されたことから、以降は曝露期間を 4 週間以上と設定した。

春期に実施した曝露試験(通算第 3 回試験;Test 3)では、拝島橋および石原の 2 ヶ所の水質自動監視所を試験実施地点とした。これは、日野橋監視所の電源工事に伴い、水質自動測定自体を休止することになり、メダカ曝露試験が実施できなかったためである。

Test 3 の結果からは、後ほど述べるように、河川水のエストロゲン作用の推移に合わせて、雄メダカのビテロゲニン生成が変動する可能性が示された。そこで、Test 4 ではさらに長期間の曝露を行い、メダカへの影響を 2 週間ごとにモニタリングする 8 週間曝露試験を行った。また、日野橋監視所の電源工事が終了したため、3 地点での魚類曝露試験を実施することとした。

Test 4 は３－１－２でも述べたように下水処理水のエストロゲン作用が比較的高く残存すると考えられる冬期の試験とした。いずれの水質自動監視所においても、4 ヶ月齢の雄メダカ 40 匹を投入し、8 週間の長期曝露試験をおこなった。

Test 5 は、夏期の比較試験として 4 ヶ月齢の雄メダカ 60 匹を投入し､6 週間の曝露試験をおこなった。続いて、Test 6 として、化学物質に対し感受性の高いと考えられる孵化後 2 週間の稚魚 60 匹を用いて、稚魚-若魚期の曝露試験をおこなった。

ヒーター設置後の曝露水槽の水温は、いずれの監視所においても約26℃を保っていた。

各試験の曝露期間等については、表3-21にまとめた。

３－３－２　河川水質とメダカへの影響

(1) メダカの性状

全ての試験において曝露期間を通して死亡個体は見られなかった。また、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体は見られなかった。

一定曝露期間後に肝臓中ビテロゲニン分析に供した個体の平均全長、平均体重、肝指数の平均値は表 3-21 に示したとおりであった。

表 3-21　河川水曝露実験概要

曝露試験		曝露期間	メダカ 個体数	メダカ 月齢	体長 (mm)	体重 (mg)	肝指数 (%)
Test 1	拝島橋	2週間	20	7	29.3	479.8	2.9
	日野橋	2週間	20	7	27.5	356.5	1.6
Test 2	石原	2週間	20	7	32.7	468.6	1.9
Test 3	拝島橋	2週間	8	3	22.0	220.5	3.0
		4週間	7	3	24.6	230.6	1.6
	石原	2週間	9	3	22.3	219.9	3.2
		4週間	10	3	24.7	234.5	1.8
Test 4	拝島橋	2週間	10	4	21.5	192.1	1.7
		4週間	10	4	24.2	303.1	1.9
		6週間	10	4	26.7	401.3	3.2
		8週間	10	4	28.1	453.6	2.1
	日野橋	2週間	10	4	23.0	220.8	1.6
		4週間	10	4	24.2	304.4	2.1
		6週間	10	4	27.9	428.4	2.5
		8週間	10	4	27.2	373.0	1.8
	石原	2週間	10	4	23.2	227.3	1.5
		4週間	10	4	23.6	256.2	1.5
		6週間	10	4	26.7	443.1	3.5
		8週間	10	4	27.6	437.3	2.1
Test5	拝島橋	2週間	20	4	24.7	253.3	2.6
		4週間	20	4	27.9	397.3	2.5
		6週間	20	4	27.2	378.5	2.3
	日野橋	2週間	20	4	24.2	208.8	1.4
		4週間	20	4	25.2	291.8	2.9
		6週間	20	4	25.3	296.4	2.3
	石原	2週間	20	4	24.8	275.2	3.1
		4週間	20	4	25.5	305.4	2.6
		6週間	20	4	25.8	290.0	2.0
Test6	拝島橋	6週間	20	0.5	15.4	59.2	2.4
	日野橋	6週間	20	0.5	15.1	52.8	1.9

(2) 水質測定結果

全ての試験における水質測定結果は表3-22にまとめた。

拝島橋および日野橋監視所にて実施した今回の予備試験（Test1）では、その水質測定の結果、いずれの監視所においてもエストロゲン様活性、測定したエストロゲン様物質の濃度は低濃度であった。日野橋監視所は複数の下水処理場の下流に位置している

表 3-22　各試験期間における水質とビテロゲニン濃度

曝露試験		曝露期間	エストロゲン活性 範囲 (ng-E2/L)	E2 範囲 (ng/L)	E1 範囲 (ng/L)	メダカ 個体数	ビテロゲニン 陽性 個体数	ビテロゲニン 平均値 (ng/mg-liver)
Test 1	拝島橋	2週間	ND	ND	ND	20	0	-
	日野橋	2週間	6.59-12.5	Tr(1.0)-1.7	12.2-21.9	20	0	-
Test 2	石原	2週間	6.31-8.29	Tr(1.0)-1.7	4.4-8.1	20	2	0.71 ± 0.71
Test 3	拝島橋	2週間	0.25-0.35	ND	ND	8	0	-
		4週間	ND-0.35	ND	ND	7	0	-
	石原	2週間	5.34-27.9	Tr(0.8)-4.6	6.7-33.1	9	9	19.1 ± 11.4
		4週間	5.34-27.9	ND-4.6	6.7-33.1	10	10	11.3 ± 6.0
Test 4	拝島橋	2週間	0.17-0.20	ND	ND	10	0	-
		4週間	0.17-0.24	ND	ND	10	0	-
		6週間	0.17-0.24	ND	ND	10	0	-
		8週間	0.17-0.35	ND	ND	10	0	-
	日野橋	2週間	2.98-3.86	ND	1.4-4.9	10	0	-
		4週間	1.91-3.86	ND	1.4-13.3	10	0	-
		6週間	1.84-3.86	ND	1.4-13.3	10	0	-
		8週間	1.85-3.86	ND	1.4-13.3	10	0	-
	石原	2週間	8.38-14.8	ND-Tr(2.3)	9.3-14.8	10	0	-
		4週間	8.38-14.8	ND-Tr(2.3)	1.9-14.8	10	0	-
		6週間	8.38-14.8	ND-Tr(2.3)	1.9-14.8	10	0	-
		8週間	5.49-14.8	ND-Tr(2.3)	1.9-14.8	10	0	-
Test5	拝島橋	2週間	0.17-0.60	ND	ND	20	0	-
		4週間	0.17-0.60	ND	ND	20	0	-
		6週間	0.12-0.60	ND	ND	20	6	1.08 ± 0.49
	日野橋	2週間	0.74-0.78	ND	ND	20	0	-
		4週間	0.74-0.78	ND	ND-Tr(0.36)	20	0	-
		6週間	0.74-0.98	ND	ND-Tr(0.56)	20	4	0.97 ± 0.39
	石原	2週間	2.50-3.12	ND	1.61-3.68	20	6	1.08 ± 0.48
		4週間	2.50-3.12	ND	1.61-3.68	20	0	-
		6週間	2.50-3.12	ND	1.61-3.68	20	0	-
Test6	拝島橋	6週間	0.12-0.31	ND	ND	20	0	-
	日野橋	6週間	0.98-31.8	ND-4.53	Tr(0.80)-29.5	20	0	-

ND:検出下限値以下
Tr:検出下限値以上、定量下限値未満

が、さらに下流の監視所での試験を実施する必要があると考えられた。

一方、石原監視所での曝露試験（Test2）の際には、試験開始後に上陸した台風によって、河川水が大幅に希釈され、エストロゲン作用が低下し、また大きく変動する状態であった。

雄メダカのビテロゲニン生成が検出された試験（Test3）では、石原監視所河川水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-E2/L と比較的高い濃度であった。4 度の分析値には大きなばらつきがあり、河川水中のエストロゲン様物質の濃度の変動が大きかったことを示唆している。なお、石原監視所河川水のエストロゲン作用の主成分は、エストロゲン様活性に比例して推移したエストロン（E1）であると考えられた。

Test 3で雄メダカのビテロゲニン生成が検出された石原監視所では、Test 4での試験水のエストロゲ

ン様活性は5.5～14.8 ng-E2/L（平均9.9 ng-E2/L）であり、Test 3の4.2～27.9 ng-E2/Lに比べ少し低い傾向がみられた。これに対し、日野橋監視所におけるエストロゲン様活性は1.8～3.9 ng-E2/Lであり、下水処理場3ヶ所の処理水を受け入れていながらも低い濃度であった。

Test5では、石原監視所でエストロゲン様活性が最大3.12ng-E2/L、E2は非検出、E1は最大3.68ng/Lと、比較的低い濃度で推移した。

Test6では日野橋において濃度の変動が大きかった。これは、当時行われていた工事により上流の下水処理場の処理水が流入したことに起因すると思われる。

(3) メダカ肝臓中ビテロゲニン濃度

メダカ肝臓中ビテロゲニン濃度については表3-23にまとめた。

拝島橋および日野橋監視所にて実施した今回の予備試験（Test1）では、雄メダカのビテロゲニンはすべて定量下限値以下であり、影響を検出することはできなかった。エストロゲン様活性やエストロゲン様物質が低濃度であったことから、雄メダカのビテロゲニン誘導が認められなかったと考えられる。

石原監視所での試験（Test2）においては、雄メダカ２個体（10%）で肝臓中でのビテロゲニン生成が検出された。これらのビテロゲニン濃度は、それぞれ 1.7 および 3.5ng/mg-liver weight であった。この地点のエストロゲン様活性は E2 換算値で 6.3～8.3ng-E2/L であった。室内試験結果で得られた E2 の 14 日間最小作用濃度 5.0ng/mL を超えており、雄メダカにエストロゲン作用が及んだものと考えられるが、メダカ全数でみるとビテロゲニンのレベルは室内試験よりも低いものであった。

日野橋監視所での 14 日間曝露試験（Test1）では、エストロゲン様活性の E2 換算値は 6.6～12.5ng-E2/L であり、石原監視所（Test2）より高い値であった。しかしながら、雄メダカのビテロゲニン生成は認められず、影響を検出することはできなかった。エストロゲン様活性が高いにもかかわらずビテロゲニン生成が認められなかった点については、理由が明確ではない。室内試験の結果と比較すると十分ビテロゲニンの誘導がみられるレベルのエストロゲン様活性である河川水であった。このようにビテロゲニン生成が見られなかった理由として、日野橋では、石原に比べ水温が低かったことが影響している可能性があると考えられる。水温と化学物質の影響については、農薬を対象とした試験が行われている。DDT の毒性は、15～30℃の範囲において、低温ほど作用が強い。一方、殺虫剤サイメットの毒性は、高温ほど作用が強い[37]。また、本研究においてもビテロゲニンの発現に室温が影響を与えることは３－２－２で明らかにした。このように、水温によって化学物質に対するメダカの感受性が異なるため、両監視所での試験結果にも矛盾が生じたとも考えられる。このほか、河川水には、試験水に含まれている助剤（DMSO など）は存在していないと考えられる。一方、フミン質やフルボ酸等の他の有機物が大量に存在している。これらの複合作用としての相違も理由として考えられる。このように、メダカを環境水に曝露させる試験においては、水温制御を行うことが重要であることが改めて裏付けられた。また、それまでは成魚を 2 週間曝露する試験であったため、以降は感受性の高い胚から曝露を開始し、次世代までの影響をみる必要があると考えた。

春期に実施した試験（Test3）では、本研究の試験実施範囲の最下流に位置する石原監視所において、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ゲニンが検出された。その生成状況は、曝露開始から 2 週間後および 4 週間後において、それぞれ平均で 19.1 および 11.3 ng/mg-liver であった。石原監視所河川水のエストロゲン様活性は試験開始時 27.9ng-E2/L、第 2 週で 18.7ng-E2/L と高く、このエストロゲン作用が雄メダカのビテロゲニン生成に作用したもの考えられた。さらに、曝露 4 週後では、雄メダカのビテロゲニン生成は、河川水のエストロゲン作用の低下にともない減少したと考えられた。なお、この際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-E2/L であり、石原監視所河川水のエストロゲン作用の主成分は、エストロゲン様活性と同様の傾向で推移したエストロンであると考えられた。

ここで、Test3での拝島橋および石原監視所でのエストロゲン様活性、電気伝導度の推移を図3-28に示す。石原監視所では水位の観測も行われているので合わせて図示した。

石原監視所でのエストロゲン様活性の推移は電気伝導度の推移にある程度似ている傾向にあると思われる。電気伝導度は河川水に占める下水処理水の割合を反映するものであるため、石原監視所河川水のエストロゲン作用は、河川に占める下水処理水の比率が変化したことによって変動したものと考えられ、このエストロゲン作用つまりエストロンの発生原因は下水処理水であると考えられた。

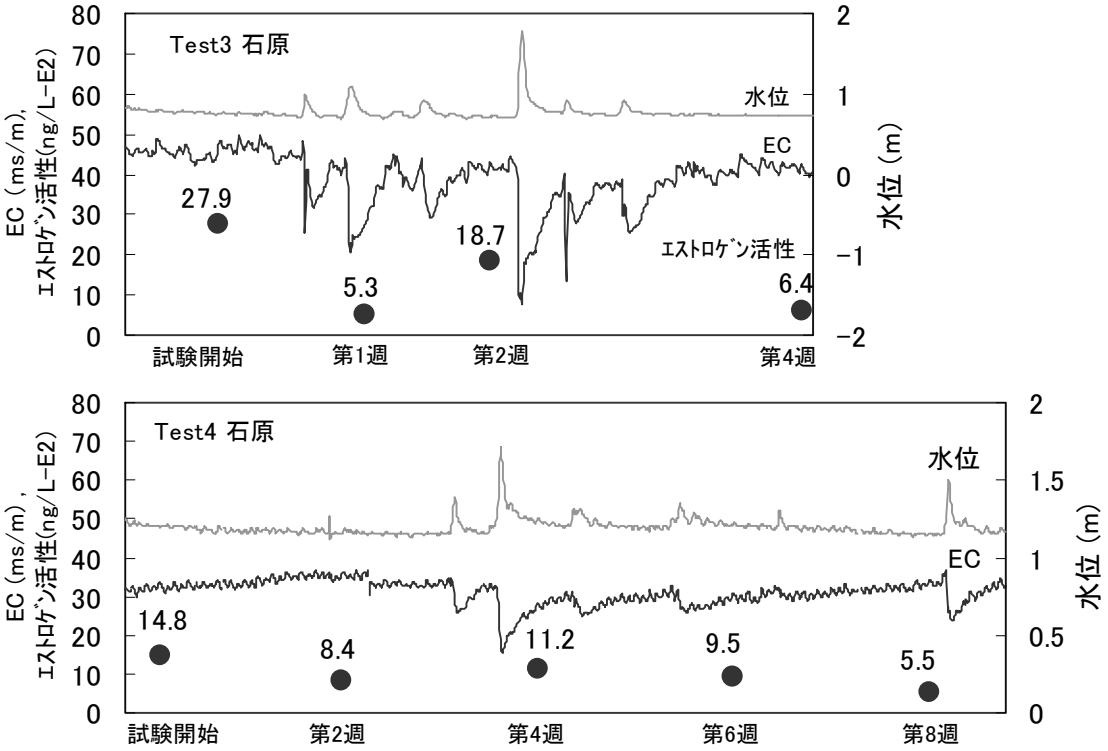


図 3-28　多摩川石原監視所における河川水の状況（上：Test3、下：Test4）

これらのことから、Test 3 の石原監視所では、河川水のエストロゲン作用による魚類影響が検出されたものと考えられる。さらに、そのエストロゲン作用の主な要因は、試験期間を通じて 6.7～33.1 ng/L の濃度が検出されたエストロンと考えられる。

河川に残存するエストロゲン様活性が高いと考えられる冬期に実施した試験（Test4）では、対照地点である拝島橋監視所に加え、日野橋および石原監視所において、ビテロゲニンを生成した雄メダカは検出されなかった。2 週間ごとにメダカを回収して推移を確認することとしたが､2 週から 8 週にかけて、いずれの監視所、回収時においてもビテロゲニンを生産した雄メダカはいなかった。

Test 3 で雄メダカのビテロゲニン生成が検出された石原監視所では、Test 4 での試験水のエストロゲン様活性は 5.5～14.8 ng-E2/L であり、Test 3 の 4.2～27.9 ng-E2/L に比べ少し低い傾向がみられたが、雄メダカにビテロジェンを生成させる可能性のあるレベルと考えられた。しかしながら、雄メダカのビテロゲニン生成は検出されなかった。日野橋監視所におけるエストロゲン様活性は 1.8～3.9 ng-E2/L であり、下水処理場 3 ヶ所の処理水を受け入れていながらもかなり低い濃度と考えられた。

３－２－１で述べたように、17β-エストラジオール（E2）の 14 日間曝露試験において、E2 の最小作用濃度は 5.0 ng/L という結果が得られている。石原監視所で行った試験では、Test 3 および Test 4 のいずれにおいても E2 換算で表わすエストロゲン様活性は､平均値で 5.0 ng-E2/L を超えていたことから、Test 4 においても雄メダカへの影響が現れる可能性があったと考えられる。流水式で行われた室内試験では、被験物質を設定濃度に保って実施することが可能であったが、現地試験では影響要因物質の濃度は常に変動している。Test 3 および Test 4 において石原監視所で雄メダカのビテロゲニン生成に異なる結果が得られたことは、曝露期間を通じて雄メダカに働いたエストロゲン作用の強度が異なっていたものと考えられる。曝露期間を通じてのエストロゲン作用の強度を把握することは現地試験では現在のところ困難であると考えられるが、自動計測装置のような時間推移を把握できる方法を開発することができれば、これら両試験での結果の差のような、エストロゲン作用とビテロゲニン生成の関係をより明確に把握することができると考えられる。

夏期の比較試験としておこなった Test5 では、拝島橋および日野橋監視所において、6 週後に雄メダカのビテロゲニン陽性個体が確認された。また、石原監視所では試験開始から 2 週後に陽性個体が確認

された。しかしながら、いずれの陽性個体もビテロゲニン生成量はごくわずかであった。Test5 での河川水のエストロゲン作用は、冬期（Test4）に比べ低い値であった。

なお、環境省の調査において、ノニルフェノールおよび 4-t オクチルフェノールが雄メダカの内分泌を撹乱すると報告された [31)]。雄メダカが 10～20ng/mg-liver のビテロゲニンを生成した石原監視所での Test 3 の結果は、環境省調査におけるノニルフェノール 20 μg/L 程度の曝露の結果に相当する。の濃度においては、孵化後のメダカを 60 日間曝露することによって雄から雌への性転換が起こることも報告されている。よって、Test 3 の石原監視所で観察されたエストロゲン作用の影響は、孵化後の稚魚であれば性転換を引き起こす可能性があるのかもしれない。

そこで、Test 5 に続き Test 6 として稚魚-若魚期の曝露試験を拝島橋および日野橋監視所でおこなった。稚魚の曝露を開始して 6 週経過後にメダカを回収したところ、雄メダカにビテロゲニンを生成しているものは検出されなかった。なお、この試験における河川水のエストロゲン作用は概ね低いレベルで推移したが、日野橋監視所付近では、第 12 週時の直前から河道の工事が開始されたため、監視所にはその直上流の下水処理水が流入することとなった。このため、エストロゲン様活性および E1 の高い値が検出された。

ビテロゲニンが生成した最も多くの個体が出現した石原監視所での結果を図 3-29 にまとめた。Test3 では、第 2 週および第 4 週に回収したすべての雄メダカにビテロゲニン生成が確認された。この試験では、試験開始時のエストロゲン様活性は 20ng-E2/L 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ビテロゲニン生成に関与したと推定され、３－２－２－５でも述べたように、一度生成されたビテロゲニンは、体内に蓄積されて徐々に代謝されるのではないかと考えられる。

３－３－３　卵－成魚期曝露試験の結果

都市排水の流入する河川環境においても魚類は生活を営んでおり、子孫を作っている。低レベルのエストロゲン作用によっても長期的には影響が生じると考えられることや、稚魚や若魚が外部環境の変化に感受性が高く影響を受けやすいことを考慮すると、都市河川における稚魚等への影響は、成魚の場合に比べ大きな影響として表れると考えられる。それゆえ、魚類試験方法を検討している環境省や OECD では、次世代への化学物質の影響を明らかにする試験方法として、フルライフサイクルテストを提唱 [31)] している。このテストは、被験物質に曝露したまま次世代を得て、それら次世代が成熟するまでを試験期間とするものである。

本研究では、河川環境における魚類影響をターゲットとしていることから、胚や稚魚等への影響を無視することはできない。そこで、卵の時期からの曝露手法を確立するため、化学物質影響試験で行われているフルライフサイクルテストを参考に、受精卵から曝露を開始する試験を試行した。

平成 16 年夏期、卵曝露試験を多摩川の拝島橋および石原監視所にて実施した。曝露した卵は、実験室内で飼育しているメダカ d-rR 系統の卵で、曝露開始の前日に受精した卵のうち、24 時間を経過して胚体形成が確認できた卵を用いた。

これら両監視所で実施した卵曝露試験の結果、孵化率は室内試験と同様の約 85%であったが、その後、仔稚魚の死亡あるいは消失が増加し、生存する個体はごく少数となった。この原因として、排水とともに押し流される個体があったと考えられるほか、河

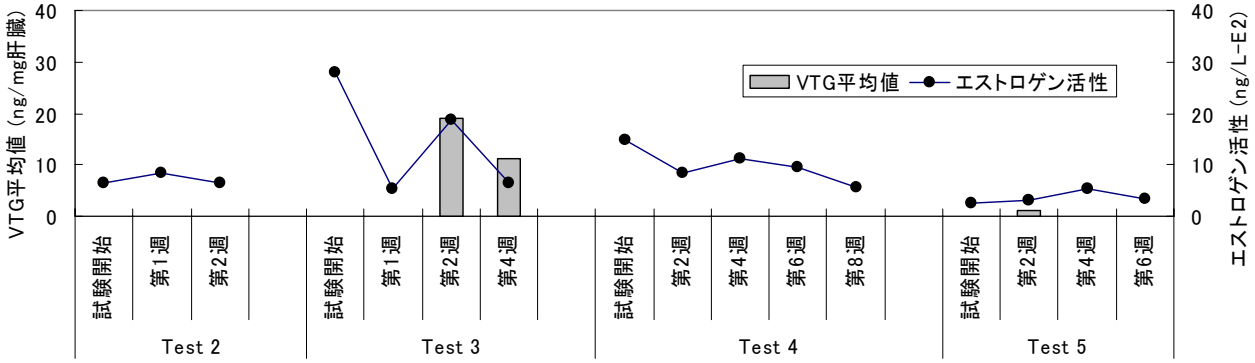


図 3-29　石原監視所におけるエストロゲン様活性とビテロゲニン濃度

川水とともに供給される何らかの原因によって、室内飼育に比べ仔稚魚の初期減耗が大きくなったものと考えられた。曝露終了時のメダカの性状を表 3-23 に示した。

表 3-24 には曝露期間中の水質とビテロゲニン濃度を示した。水質に関しては試験開始時のエストロゲン様活性や E1 濃度がやや高い、という結果であった。なお表には示していないが、E2 の硫酸抱合体（E1-diS）に関しては、測定期間中継続して高い濃度であった。ビテロゲニン測定結果については、石原監視所では試験開始（受精の翌日）から 8 週間後の雄成魚（5 匹）ではビテロゲニン生成は確認されなかったが、10 週後では 7 匹のうち 6 匹で観察された。これらのビテロゲニン濃度はごく微量であるが、長期的な曝露によって雄メダカに影響が現れた可能性が考えられた。河川曝露試験 Test3 実施時のようにエストロゲン作用を有する河川水であれば、性転換が引き起こされた可能性がある。

一方、拝島橋監視所では、ほとんどのメダカが成熟する前に死亡した。しかしながら、14 週後に回収した雄 1 個体ではビテロゲニン生成が確認された。

３－３－４　河川水によるメダカ曝露試験におけるビテロゲニン発現についてのまとめ

メダカ現地曝露試験法を開発し、河川水の試験を行ったところ、エストロゲン様活性の変動を明確に把握することは困難であったものの、高濃度のエストロゲン様活性が見られた場合にやや遅れてビテロゲニンの生成が見られた。このことから、エストロゲン様活性がある程度の濃度になるとビテロゲニンの生成が促され、一度生成したビテロゲニンは体内に蓄積されて徐々に代謝されるものと推測される。

３－４　下水処理水のコイ・メダカ曝露試験

３－４－１　コイ曝露試験

(1) 研究の位置付け

１－４で述べたように、以前行った下水処理水へのコイ曝露試験の結果、早春に雌雄のコイを同所的に曝露した場合に限り、雄コイのビテロゲニン合成が認められた。この現象は、下水処理水のエストロゲン作用が直接ビテロゲニン生成に関わった可能性のほか、この時期に生殖活動にともなって雄の体内で多量に分泌されるアンドロゲンをもとに、アロマターゼの働きによってエストロゲンが合成され、その結果としてビテロゲニン生成が誘導された可能性が考えられた。

そこで本研究では、この仮説を検証するため、春期に雌雄を同所的に曝露する試験を実施することと

表 3-24　各試験期間における水質とビテロゲニン濃度

曝露試験	曝露期間	エストロゲン活性 範囲 (ng-E2/L)	E2 範囲 (ng/L)	E1 範囲 (ng/L)	メダカ 個体数	メダカ 性別	ビテロゲニン 陽性個体数	ビテロゲニン 平均値 (ng/mg-liver)
拝島橋	14週間	0.15-0.42	ND	ND-0.9	1	オス	1	2.3
	14週間	0.15-0.42	ND	ND-0.9	11	メス	1	3.2 ± 8.0
石原	8週間	0.85-20.8	ND-Tr(2.5)	2.3-19.6	5	オス	0	-
	10週間	0.85-20.8	ND-Tr(2.5)	2.3-19.6	7	オス	6	2.2 ± 0.5
	8週間	0.85-20.8	ND-Tr(2.5)	2.3-19.6	11	メス	11	2054.6 ± 1870.2
	14週間	0.85-20.8	ND-Tr(2.5)	2.2-19.6	5	メス	0	-

ND:検出下限値以下
Tr:検出下限値以上、定量下限値未満

表 3-23　卵曝露実験概要

曝露試験	曝露期間	メダカ 個体数	メダカ 性別	体長 (mm)	体重 (mg)	肝指数 (%)
拝島橋	14週間	1	オス	23.6	212.1	2.2
	14週間	11	メス	12.8	33.3	0.2
石原	8週間	5	オス	24.6	296.0	3.3
	10週間	7	オス	22.2	210.1	3.3
	8週間	11	メス	24.0	327.7	2.4
	14週間	5	メス	15.1	71.8	1.0

した。

(2) 結果および考察

今回の試験では、下水処理水に曝露した雄コイは、雄単独試験区、雌雄混合試験区いずれにおいてもビテロゲニンの生成は認められなかった。また、脱塩素水道水を用いた対照試験区においても同様に、雄コイのビテロゲニン生成はみられなかった。なお、曝露開始時に全水槽で複数のコイが死亡したため、第2週から試験個体を追加した。また、死亡した雄でもビテロゲニンの生成はみられなかった。

なお、曝露試験水の水質測定結果は、表3-25に示したように過年度に実施した実験に比べ大きな差異は認められなかった。このため、雄コイのビテロゲニン生成が認められた過年度調査のRun1に比べ、本研究で雄のビテロゲニン誘導がみられなかった理由は、試験開始が4月であったことから、生理的活動が活発になる早春を過ぎていたためと考えられる。このため、コイを用いた曝露試験には、コイの生態活動に合わせたより厳密な条件設定が必要であると考えられる。

３－４－２　メダカ曝露試験

(1) 研究の位置付け

これまで、メダカにエストロゲン様物質を曝露する試験を行い、E1やE2には最小作用濃度があること、河川水中の濃度がこのレベルになるとビテロゲニンが生成することを明らかにしてきた。このような河川水中のエストロゲン様物質の由来は大部分が下水処理場であることから、下水処理水に曝露させる試験を行うことにより、その影響をより明確に把握することができ、対策のための知見を得ることにもなる。そこで、下水処理水中でのメダカの飼育を行い、エストロゲン様物質の分析を行うとともに、ビテロゲニンの生成状況を調べることとした。

ところで、下水処理水による影響は、処理状況の変動に伴って現れる可能性がある。そこで、曝露試験は河川水曝露と同様、長期的な現地曝露試験により雄メダカのビテロゲニン生成の変動状況を明らかにすることとした。

また、成魚のビテロゲニン生成量から判断して、外部環境に対し感受性の高い稚魚や若魚ではさらに大きな影響が表れることが想定されたため、河川水曝露試験同様、稚魚を用いた曝露試験を実施して、魚類の生活に即した影響を検出することとした。

なお、３－４－１で述べたように、下水処理場の放流水を用いたコイ曝露試験の結果、魚類影響は明確ではなかった。このコイ曝露試験に用いた放流水は次亜塩素酸ソーダによる消毒の後に砂ろ過処理が行われたものであり、エストロゲンは二次処理水に比べると低減されていることが判明している。そこで、放流水と二次処理水の 2 種類を用いて魚類影響試験を実施することによって、下水に含まれるエストロゲン様物質による魚類影響と下水処理過程における低減効果とを捉えることが可能になると考えた。

(2) 試験環境

試験は基本的に河川中での曝露と同様に行った。曝露試験のための装置は、河川水曝露試験で用いたものと同じものを使用し、水温を26℃に制御して管理した。

第 1 回のメダカ曝露試験（Test A）は、二次処理水でのメダカ飼育の可能性を探るため、予備試験と位置づけて 2 週間の曝露試験を実施した。2 週間の

表 3-25　コイ曝露試験水質測定結果

項目	試験区	第0週	第2週	第4週	第6週	第8週
E2活性　ng/L	下水処理水♂	12.88	4.88	4.68	3.19	4.87
0.02≦Tr<0.07	下水処理水♂♀	12.69	9.61	4.86	2.81	1.53
ND<0.02	水道水♂	Tr(0.04)	0.44	0.18	0.17	0.16
	水道水♂♀	Tr(0.04)	0.47	0.51	0.25	0.11
E1　ng/L	下水処理水♂	28.0	10.9	12.0	7.6	12.7
0.2≦Tr<0.5	下水処理水♂♀	27.4	12.3	13.7	7.0	8.0
ND<0.2	水道水♂	ND	Tr(0.2)	Tr(0.2)	ND	ND
	水道水♂♀	ND	Tr(0.2)	Tr(0.3)	ND	ND
E2　ng/L	下水処理水♂	2.2	Tr(1.0)	Tr(0.9)	1.2	Tr(0.8)
0.4≦Tr<1.0	下水処理水♂♀	3.0	1.5	Tr(1.0)	1.2	Tr(0.7)
ND<0.4	水道水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
EE2　ng/L	下水処理水♂	ND	ND	ND	ND	ND
1.3≦Tr<4.4	下水処理水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
ND<1.3	水道水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
NP　μg/L	下水処理水♂	ND	ND	Tr(0.20)	Tr(0.12)	Tr(0.12)
0.1≦Tr<0.3	下水処理水♂♀	ND	ND	Tr(0.20)	Tr(0.13)	ND
ND<0.1	水道水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂♀	ND	ND	Tr(0.11)	ND	ND

ND：検出下限値未満
Tr：検出下限値以上，定量下限値未満

メダカ曝露試験よって雄メダカのビテロゲニン生成が検出されるか否か、また、処理水のエストロゲン様物質としてどのような物質が存在しているのかを明らかにすることとした。

この試験（TestA）により、二次処理水でのメダカ飼育が可能であり、ビテロゲニンの生成を確認できたため、第2回試験（Test B）においては、河川での試験と同じく8週間の曝露試験を実施し、2週間ごとにエストロゲンの存在状況およびメダカへの影響を検出することとした。なお、長期曝露することによって、放流水試験区においても影響を検出できることが期待できると考えた。第3回試験（TestC）では、二次処理水試験区および砂ろ過水試験区ともに、雄メダカ60匹と雌メダカ10匹を投入し、6週間の曝露試験を行うこととした。続いて、6週後にその水槽内で得られた卵を用いて第4回試験（TestD）を行うこととした。この試験では、孵化仔魚の初期減耗を考慮し、およそ300卵を試験開始時に準備することを目標とした。

また、第5回試験（TestE ）では、ビテロゲニンの生成への影響は短期に発現する可能性もあると考え、別の処理場で頻度を増やして水質分析とビテロゲニン生成状況の把握を行った。なお、この試験における曝露水の採取箇所は、曝気第2槽と最終沈殿池である。

各試験の曝露期間等については、表3-26にまとめた。

(3) メダカの性状

全ての試験において曝露期間を通して死亡個体は見られなかった。また、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体は見られなかった。

一定曝露期間後に肝臓中ビテロゲニン分析に供した個体の平均全長、平均体重、肝指数の平均値は表3-26に示したとおりであった。

(4) 水質測定結果

全ての試験における水質測定結果は表3-27にまとめた。

第1回試験の（TestA）では二次処理水のエストロゲン様活性は2.7～18.7 ng/-E2（平均値11.4 ng-E2/L）であり、放流水試験区におけるエストロゲン様活性は2.6～18.9 ng-E2/L（平均値9.9 ng-E2/L）であった。エストロゲン作用は採水時により異なり、下水処理の状況によって変動することが伺われた。なお、二次処理水と放流水のエストロゲン様活性には関連が見られなかった。しかし、エストロゲン様活性とE1の濃度にはある程度相関が見られ、エストロゲン様活性に占めるE1の寄与が高いことが改めてわかる。表に示していない他の項目では、E2の硫酸抱合体（E2-diS:3,17-disulfate）の濃度が高かったが、これについては採水時による変動は少なかった。

表 3-26　下水処理水曝露実験概要

曝露試験		曝露期間	メダカ 個体数	メダカ 月齢	体長 (mm)	体重 (mg)	肝指数 (%)
Test A	二次処理水	2週間	29	3	26.6	370.0	1.6
	放流水	2週間	29	3	27.2	401.6	1.5
Test B	二次処理水	2週間	10	3	30.0	467.7	1.5
		4週間	10	3	30.2	584.0	2.7
		6週間	10	3	29.9	574.9	1.8
		8週間	10	3	30.4	580.3	1.6
	放流水	2週間	10	3	29.4	452.9	1.8
		4週間	10	3	28.8	451.7	2.1
		6週間	10	3	30.5	570.1	2.0
		8週間	10	3	29.2	505.7	1.9
Test C	二次処理水	2週間	20	3	23.5	161.3	1.7
		4週間	10	3	23.1	165.9	1.6
		6週間	20	3	24.4	246.1	2.8
	放流水	2週間	20	3	23.2	160.0	1.1
		4週間	10	3	24.7	222.1	2.0
		6週間	20	3	24.4	341.4	1.6
Test D	二次処理水	8週間	7	0.5	19.6	127.8	3.6
	放流水	8週間	13	0	21.1	160.2	2.9
Test E	曝気槽	2日	5	3	24.0	228.6	1.5
		1週間	5	3	22.4	162.4	1.3
		2週間	10	3	23.9	210.1	1.3
		4週間	10	3	25.6	258.5	1.7
	二次処理水	2日	5	3	25.3	241.1	1.2
		1週間	5	3	25.7	272.3	1.1
		2週間	10	3	23.9	209.4	1.4
		4週間	10	3	25.2	248.3	1.6

第2回試験（TestB）では、二次処理水試験区では、測定されたエストロゲン様活性は2.6～9.9 ng-E2/L（平均5.9 ng-E2/L）であり、雄メダカにビテロゲニン生成が検出された第1回試験（Test A）あるいは河川水での試験（Test 3 石原監視所）に比べ、エストロゲン作用は小さかったと考えられる。一方、放流水のエストロゲン様活性およびエストロンの濃度は、それぞれ0.63～99.9ng-E2/Lおよび0.7～77.7 ng/Lであった。特に放流水試験区の第6週では、エストロゲン様活性およびエストロンの濃度は、それぞれ99.9ng-E2/Lおよび77.7ng/Lにまで上昇した。この放流水での濃度の上昇は、当時行われていた工事の影響であると考えられる。

第3回試験（TestC）の二次処理水試験区でのエストロゲン様活性は、試験開始時に23.8ng-E2/Lであったが、その後徐々に低下し、6週後では1.5ng-E2/L

表 3-27　各試験期間における水質とビテロゲニン濃度

曝露試験		曝露期間	エストロゲン活性 範囲 (ng-E2/L)	E2 範囲 (ng/L)	E1 範囲 (ng/L)	メダカ 個体数	ビテロゲニン 陽性 個体数	ビテロゲニン 平均値 (ng/mg-liver)
Test A	二次処理水	2週間	2.66-18.72	ND-Tr(2.7)	2.4-25.3	29	7	1.4 ± 1.9
	放流水	2週間	2.6-18.9	ND-Tr(3.1)	2.5-33.9	29	0	-
Test B	二次処理水	2週間	3.70-5.52	ND	5.4-5.7	10	10	94.6 ± 59.0
		4週間	3.70-7.81	ND	5.4-11.2	10	10	50.7 ± 34.0
		6週間	3.70-9.90	ND	5.4-11.2	10	10	18.3 ± 14.9
		8週間	2.55-9.90	ND-Tr(2.7)	2.2-11.2	10	8	9.4 ± 10.6
	放流水	2週間	0.63-2.09	ND	Tr(0.7)-6.9	10	3	1.3 ± 0.9
		4週間	0.63-19.54	ND-Tr(0.7)	Tr(0.7)-21.0	10	9	51.6 ± 45.9
		6週間	0.63-99.89	ND-10.8	Tr(0.7)-77.7	10	10	33.7 ± 35.8
		8週間	0.63-99.89	ND-10.8	Tr(0.7)-77.7	10	10	620.3 ± 258.6
Test C	二次処理水	2週間	5.32-23.8	0.66-1.18	5.44-27.5	20	2	1.02 ± 0.76
		4週間	5.32-23.8	0.49-1.18	4.20-27.5	10	0	-
		6週間	1.51-23.8	Tr(0.08)-1.18	1.79-27.5	20	4	1.03 ± 0.54
	放流水	2週間	4.24-32.29	0.33-2.60	3.26-32.60	20	8	6.99 ± 21.78
		4週間	2.32-32.29	0.33-2.60	1.57-32.60	10	1	1.06 ± 0.87
		6週間	1.01-32.29	ND-2.60	0.70-32.60	20	5	1.33 ± 1.05
Test D	二次処理水	8週間	0.30-24.0	ND-2.80	0.34-21.3	7	2	2.51 ± 3.80
	放流水	8週間	0.25-6.10	ND-1.18	ND-4.88	13	0	-
Test E	曝気槽	2日	51.8-128	3.68-12.6	37.1-99.1	5	5	342.7 ± 349.2
		1週間	15.1-128	ND-12.55	8.85-99.1	5	5	2936.4 ± 2071.9
		2週間	8.94-128	ND-12.55	8.85-99.1	10	10	3394.4 ± 2669.1
		4週間	3.55-128	ND-12.55	3.13-99.1	10	10	1555.0 ± 856.7
	二次処理水	2日	24.0-149	ND-3.67	24.2-115	5	5	26.6 ± 13.0
		1週間	23.7-149	ND-3.67	17.6-115	5	5	56.9 ± 67.6
		2週間	1.94-149	ND-3.67	Tr(0.82)-115	10	10	46.3 ± 47.3
		4週間	1.94-149	ND-3.67	Tr(0.82)-115	10	10	139.6 ± 87.3

ND:検出下限値以下
Tr:検出下限値以上、定量下限値未満

であった。放流水試験区でのエストロゲン様活性は、試験開始時に 32.3ng-E2/L であったが、二次処理水と同様にその後徐々に低下し、6 週後では 1.0ng-E2/L であった。

第 3 回試験に引き続いて実施した第 4 回試験（TestD）において二次処理水のエストロゲン様活性を 2 週間ごとに測定した結果、0.3～24.0 ng-E2/L であった。放流水試験区では 0.3～6.1 ng-E2/L であった。

第 5 回試験（TestE）の曝気槽試験区では、エストロゲン様活性が 3.55～128ng-E2/L、E1 濃度が 3.13～99.1ng/L、二次処理水試験区では、1.94～149ng-E2/L、E1 濃度が 0.82～115ng/L であり、試験開始時に高い値が観察された。

このように、エストロゲン作用と E1 濃度の間には全試験を通じて関連が見られ、エストロゲン作用における E1 の寄与が改めて裏付けられた。なお、二次処理水から放流水までの過程で明確にエストロゲンが低減しているという現象は見られなかった。

(5) メダカ肝臓中ビテロゲニン濃度

表 3-27 に示したように、予備試験と位置づけて実施した第 1 回試験（TestA）の 2 週間曝露試験では、二次処理水に曝露した雄メダカ 29 匹のうち、7 匹でビテロゲニンの生成が確認された。この試験では、放流水に曝露したメダカではビテロゲニンの生成は認められなかったため、二次処理水のエストロゲン作用がメダカに影響を及ぼしたものと考えられた。検出された雄メダカのビテロゲニン濃度は 1.4～10.8 ng/mg-liver であり、河川水曝露試験の Test 3 において石原監視所で確認された雄メダカのビテロゲニン生成に比べ低い傾向がみられた。エストロゲン様活性については、二次処理水、放流水ともに変動が大きかったため、高い濃度のエストロゲン作用によって、雄メダカのビテロゲニン生成も高レベル

となる可能性もあると考えられたが、ビテロゲニン生成は全個体では見られず、生成量も少なかった。このTest Aでの2つの試験区におけるエストロゲン様活性の差および雄メダカビテロゲニン生成の有無は、河川水曝露試験でのTest3およびTest 4において石原監視所での試験で得られた結果と同様に、エストロゲン様活性がビテロゲニンの生成を引き起こす境界のレベルでの変動であったために現れた差であると考えられる。なお、メダカに影響を及ぼしたエストロゲン作用の主な要因は河川と同じくエストロン（E1）であると考えられる。

第2回試験（TestB）曝露試験を実施して、二次処理水および放流水の2つの試験区で2週間ごとに雄メダカのビテロゲニン生成を追跡した結果、両試験区ともすべての時期でビテロゲニン生成が確認された。特に放流水試験区では、第6週のエストロゲン様活性およびエストロンの濃度がそれぞれ99.9ng-E2/Lおよび77.7ng/Lであったように、非常に高濃度のエストロゲンが認められ、この影響で雄メダカのビテロゲニンも最高値1000ng/mg-liverを超えるような高濃度に生成していることが確認された。

二次処理水試験区では、測定されたエストロゲン様活性は2.6～9.9 ng-E2/L（平均5.9 ng-E2/L）であり、雄メダカにビテロゲニン生成が検出されたTest Aあるいは河川での試験Test 3石原監視所に比べ、エストロゲン作用は小さいと考えられる。しかしながら、この試験では最大で200ng/mg-liverを超える高濃度のビテロゲニン生成が観察された。表には示していないが、測定対象であったノニルフェノール類やエストロゲン抱合体の結果をみると、メダカに作用するような顕著に高濃度の物質は見当たらなかった。また、雄メダカのビテロゲニンは曝露2週後から高濃度で検出されたことから、曝露開始から2週間の間に急激なエストロゲン作用の上昇があったと考えられるほか、測定対象としたエストロゲン様物質のほかに、他の物質が関与している可能性が考えられる。また、エストロゲン様活性では捉えられない何らかの要因で、ビテロゲニンが生成した可能性も考えられる。

第3回試験（TestC）では、6週間のメダカ成魚曝露試験において、2週ごとに雄メダカのビテロゲニン生成状況を観察した結果、二次処理水曝露試験区および放流水曝露試験区のいずれにおいてもビテロゲニンを生成した雄メダカを確認した。しかしながら、これを生成していない個体も多くみられた。二次処理水曝露試験区では、曝露開始から2週後に2匹（10%）、6週後に4匹（20%）の雄メダカでビテロゲニンが確認された。陽性個体のビテロゲニン生成最大値は、2週後および6週後で、それぞれ3.9および2.4ng/mg-liverであった。この試験区でのエストロゲン様活性は、試験開始時に23.9ng-E2/Lであったが、その後徐々に低下し、6週後では1.5ng-E2/Lであった。一方、放流水曝露試験区では、曝露開始から2週後に8匹（40%）、4週後に1匹（10%）、6週後に5匹（25%）の雄メダカにビテロゲニンが確認された。陽性個体のビテロゲニン生成最大値は、2週後、4週後および6週後で、それぞれ99.0、3.5、および3.8 ng/mg-liverであった。この試験区でのエストロゲン様活性は、試験開始時に32.3ng-E2/Lであったが、二次処理水と同様にその後徐々に低下し、6週後では1.0ng-E2/Lであった。このように、第3回試験（TestC）においては、高いエストロゲン様活性が観測されたのは試験開始時のみであったにも関わらず、曝露後しばらくビテロゲニンが見られたことから、３－３で述べたように、生成したビテロゲニンが体内に蓄積され、エストロゲン様物質の曝露が低レベルとなっても徐々に代謝されるしくみになっていると推測される。

第4回試験（TestD）では、稚魚期から若魚期まで8週間曝露した雄メダカでは、二次処理水曝露試験区の生残雄7匹中2匹（29%）にビテロゲニン生成が認められた。一方、放流水曝露試験区の生残雄13匹ではこれを生成している個体は検出されなかった。エストロゲン様活性とビテロゲニン生成との関連を見ると、エストロゲン様活性が最も高かったのが、二次処理水試験区6週目の24.0ng-E2/Lであり、ビテロゲニンの生成が見られたのが8週目であったため、第3回試験（TestC）と同様に、第6週付近の曝露によるビテロゲニンの生成により体内へ蓄積し、これが第8週に検出されたものと思われる。

雄メダカのビテロゲニン生成が引き起こされるエストロゲン類の濃度として、E2の最小作用濃度は12.6 ng/L（曝露2日後および7日後）、最大無作用濃度は5.0 ng/L（曝露2日後および7日後）であることを３－２－１で既に述べた。このことから、10ng/Lを超えるE2に曝露されると、2日後にはビテロゲニンを生成している可能性があり、これは、今回下水処理場での試験で得られたTest CおよびDの結果と整合するものと考えられる。また、このことをより明確にするためには、エストロゲン作用とビテロゲニンの生成をより高い頻度で観測する必要が

ある。そこで、より短期間での影響を把握する試験を次に行った。

第5回試験（TestE）においては、曝気槽試験区と二次処理水試験区の両方において、2 日後には全てのメダカにビテロゲニンの生成が見られた。特に、曝気槽試験区では高いビテロゲニン濃度が観察された。観測された濃度範囲は、曝気槽試験区ではエストロゲン様活性が 3.55～128ng-E2/L､E1 濃度が 3.13～99.1ng/L、最終沈殿池試験区ではエストロゲン様活性が 1.94～149ng-E2/L、E1 濃度が 0.82～115ng/L であり、いずれも試験開始時に最も高い値が観察された。また、どちらの試験区でも、エストロゲン様活性と E1 濃度は同じような濃度変動が確認された。

メダカの肝臓中ビテロゲニン濃度と、エストロゲン様活性を比較すると、どちらの試験区においても、実験初期に高いエストロゲン（活性）の曝露を受け、2 日以内に生体反応（ビテロゲニンの産出）が始まり、エストロゲン様活性が低下しても、その生体反応が長期間継続することが示唆された。これは、第3回試験（TestC）、第4回試験（TestD）の結果と同様である。なお、曝気槽試験区では、二次処理水試験区とエストロゲン様活性や E1 濃度が同程度であるにも関わらず、比較的高いビテロゲニン濃度が確認された。この原因は明確ではないが、曝気槽試験区での E2 濃度が最大 12.6ng/L であり、二次処理水試験区の 3.67ng/L より大幅に高かったことが関連している可能性がある。遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン様活性では E1 の E2 に対する比活性値が 0.3 であり、３－２－２で述べたように E1 のメダカにビテロゲニン生産を誘導する作用は、E2 のそれに対し 0.18～0.26 倍と求められたので、メダカはより E2 に対する感受性が高いと考えられ、このことと E2 濃度が高かったことにより、曝気槽試験区と二次処理水試験区とのビテロゲニンの濃度の差が現れた可能性がある。

以上の下水処理水曝露試験におけるエストロゲン様活性とビテロゲニンの推移を図 3-30～32 にまとめた。これらの図よりわかるように、エストロゲン様活性とビテロゲニンの発現は対応していないように見える。例えば、TestE の曝気槽区と二次処理水区、TestB の放流水区では、エストロゲン様活性が低下してからもビテロゲニンの発現が見られる。このような結果から、見かけ上はエストロゲン様活性の上昇に対してビテロゲニンはやや遅れて生成され、その影響はエストロゲン様活性が低下してもしばらくは残ることが推測される。そこで、さらに検証するために河川水への曝露試験の結果を含め、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ビテロゲニン濃度を比較することとした。図 3-33 に示すように、エストロゲン様活性が 10ng-E2/L を超えると、ビテロゲニンの生産が示唆された。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ビテロゲニン濃度とを比較すると、エストロゲン濃度が 10ng/L より低い濃度でビテロゲニンの生産が確認されたとともに、エストロゲン様活性とビテロゲニンの濃度にほぼ直線的な関係が得られた。また、雄メダカの雌性化の指標となるビテロゲニンの生成を引き起こすエストロゲン様活性の閾値は約 10ng-E2/L と見積もられる。これは３－２－２で得た結論と同様であり、E1、E2 といったエストロゲン単物質による室内曝露実験で得た知見が下水処理水や河川水のような環境水で適用できることになる。

このように、エストロゲン様活性とビテロゲニンの発現には直線関係があること、ビテロゲニンの発現には閾値があることがわかった。したがって、河川水や下水処理水のような環境水において、エストロゲン様活性は魚類の雌性化の指標として用いることができるのである。

３－４－３　マイクロアレイによるメダカ曝露時の遺伝子発現解析

(1) メダカへのエストロゲン様物質曝露時のマイクロアレイの適用性

マイクロアレイは、遺伝子の発現を確認する簡易な手法として応用が広がっている。メダカにエストロゲン様物質を曝露するとビテロゲニンの生成が引き起こされることをこれまで明らかにしてきたが、その応答にはタイムラグがあること、曝露濃度の変動の把握が必要であることから、ビテロゲニンの生成状況が必ずしも明確でない結果も得られている。そこで、ビテロゲニンの生成に先立ち、何らかの遺伝子が発現するのであれば、それを検知することにより、より明確にエストロゲン様物質の魚類への影響を把握することができる。そこで、マイクロアレイによるメダカのメダカ曝露時の遺伝子発現解析を試みることとした。

(2) 雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析

雄メダカの雌性化現象を遺伝子レベルで検出できるかどうか調査する際、雄メダカと雌メダカの遺伝

子の発現の違いを確認しておく必要がある。そこで、脱塩素水で飼育している約3ヶ月齢の雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析を行った。本実験では雄、雌それぞれ3匹を１検体としてマイクロアレイの処理を行った。

雄メダカと雌メダカのマイクロアレイ画像から蛍光強度を読みとり数値化し、この数値化データを元に雄メダカと雌メダカで散布図を作成したものを図3-34に示した。図3-34は、雄雌共通の遺伝子で遺伝子発現の変動が少ないと考えられているAcidic Ribosomal PhosphoProtein(ARPP)遺伝子の発現を1とする相対強度で整理している。横軸と縦軸は$\log_2$スケールで示しており、すなわち、0,-1,-2,-3は1,1/2,1/4,1/8となる。なお、蛍光強度がバックグラウンド以下となる低発現遺伝子は、倍率を算出するため、バックグラウンドの標準偏差の約2倍のかさ上げ処理を行った。

雌メダカ肝臓中で、雄メダカの2倍以上発現している遺伝子を表3-28に示す。卵黄前駆物質の形成に関わる遺伝子であるビテロゲニン1,2、卵膜前駆物

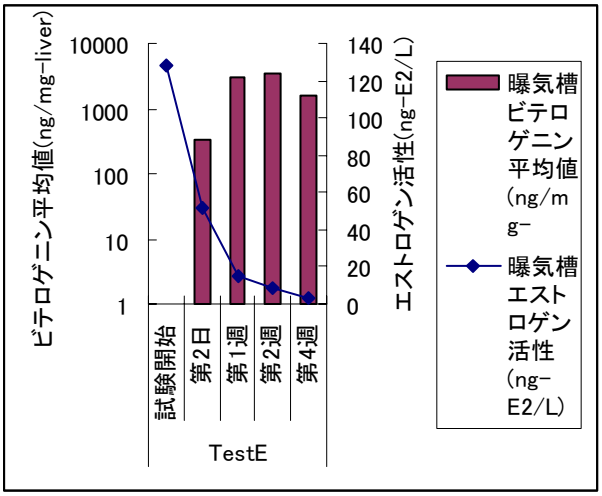


図 3-30　下水処理水曝露試験における
エストロゲン様活性とビテロゲニンの推移
（曝気槽）

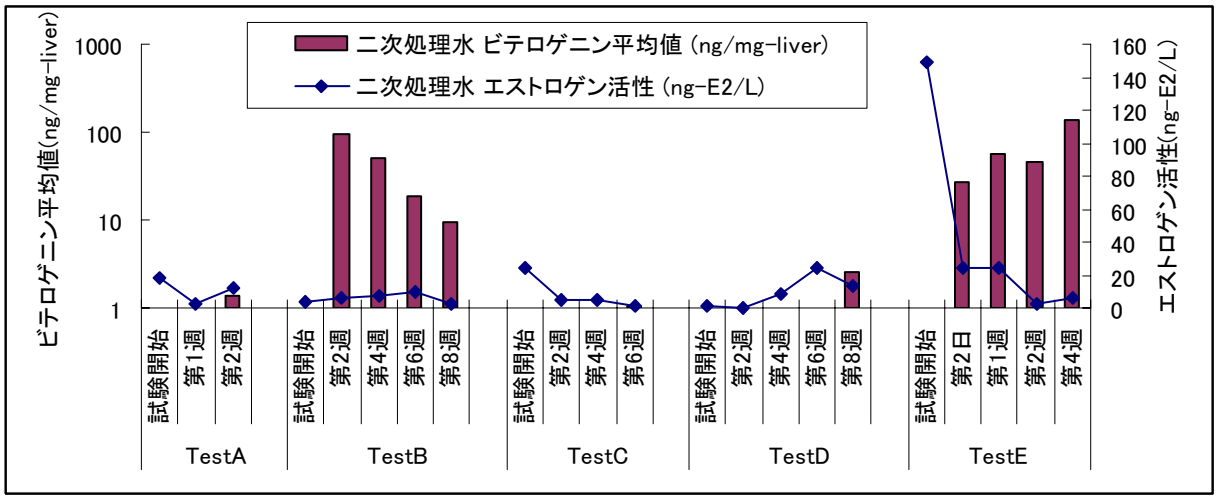


図 3-31　下水処理水曝露試験におけるエストロゲン様活性とビテロゲニンの推移（二次処理水）

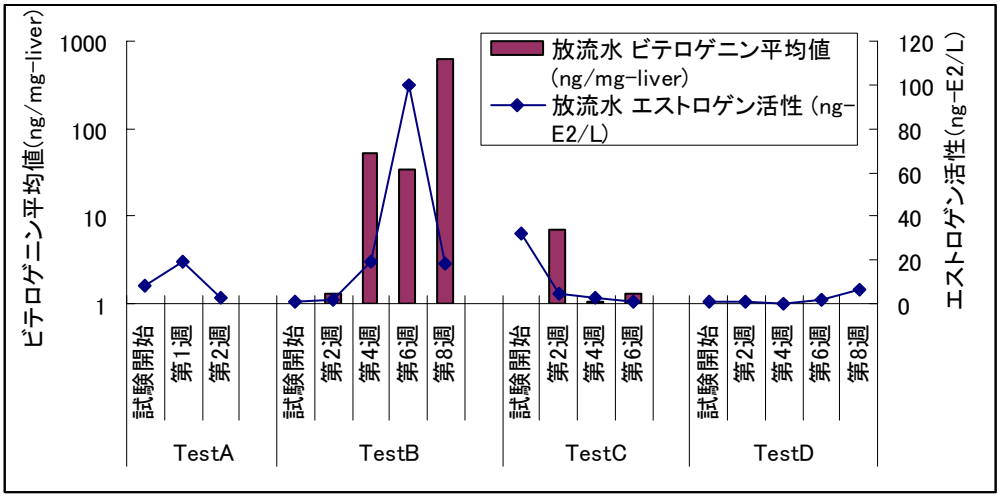


図 3-32　下水処理水曝露試験におけるエストロゲン様活性とビテロゲニンの推移（放流水）

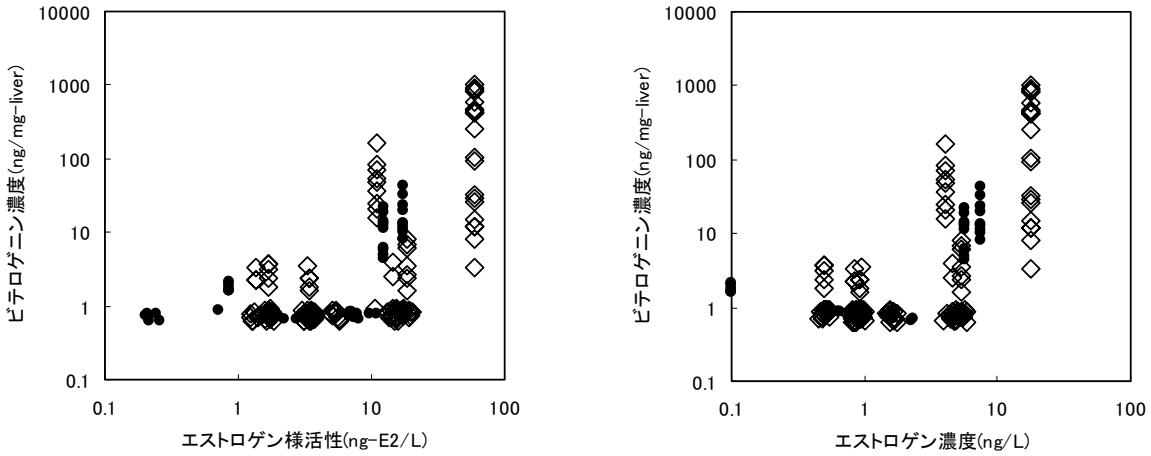


図 3-33　メダカを用いた曝露試験における雄メダカ個体の肝臓中 VTG 濃度と
エストロゲン様活性（左図）、エストロゲン濃度（E2 濃度+E1 濃度×0.22、右図）との関係
（いずれも試験開始より 2 週間後の、移動平均値）
（◇：下水処理水曝露試験、●：河川水曝露試験）

質の形成に関わる遺伝子であるコリオゲニンH,Hマイナ,L、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高いことが確認できる。このように、雌特有の遺伝子は、主に卵形成に関わる遺伝子であることがわかる。

(3) 下水処理水に曝露した雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析

0日目をコントロールとして処理水と曝気槽上澄水にそれぞれに曝露したときの雄メダカの各遺伝子発現の散布図を図3-35(7日曝露の結果のみ)に示す。本図は３－４－３(2)と同様にARPP遺伝子での補正とバックグラウンド以下の低発現遺伝子のかさ上げ処理を行っている。表3-29は、処理水と曝気槽上澄水に2日,7日,14日間曝露したとき、0日目より遺伝子発現量が3倍以上、1/3以下になった遺伝子でかつ統計的有意(ANOVA検定で$p<0.001$)であったものを列挙したものである。処理水と曝気槽上澄水に曝露したいずれの場合でも雌特有の遺伝子であるビテロゲニン1,2、コリオゲニンH,Hマイナ、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高くなることがわかる。ただし、処理水に14日間曝露した場合では、これらの遺伝子の発現量は低下していた。

処理水と曝気槽上澄水に曝露したときの発現が増加する遺伝子数を比較すると、曝露期間7日間以上で、曝気槽上澄水に曝露した方が、処理水に曝露した場合よりも発現量が増加する遺伝子数が多いことが確認できた。その中には、卵形成に関わる遺伝子の他

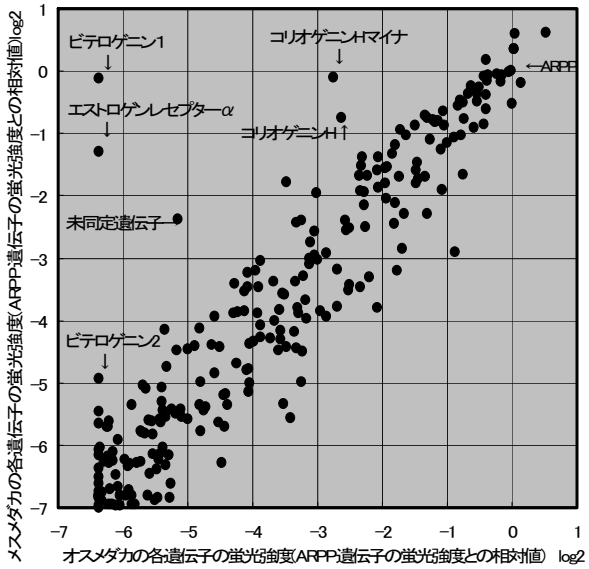
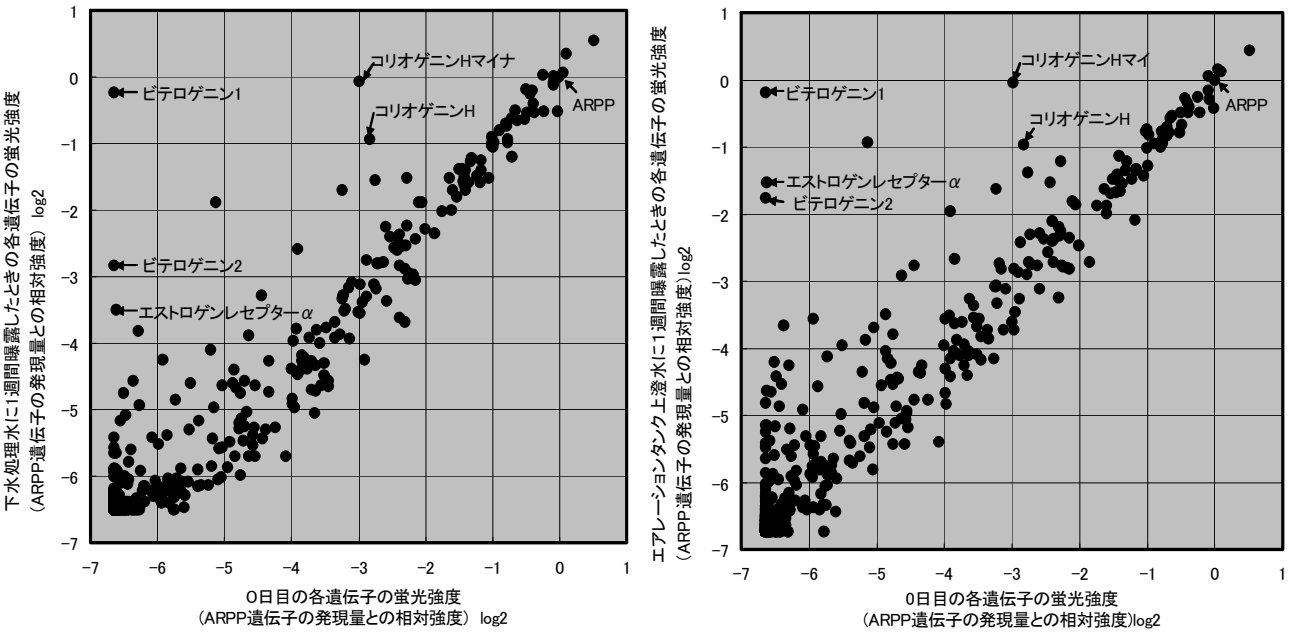


図 3-34　雄メダカと雌メダカの発現遺伝子の散布図

表 3-28　メスメダカ肝臓中でオスメダカの 2 倍以上発現している遺伝子

遺伝子名	倍率(雌/雄)
ビテロゲニン 1	75.9
エストロゲンレセプターα	33.6
コリオゲニンH　マイナ	6.27
コリオゲニンH	3.69
partial cold-shock domain protein	3.26
ビテロゲニン2	2.70
HOXA9B	2.30
コリオゲニンL	2.07



（下水処理水１週間曝露）　　（AT 上澄水１週間曝露）

図 3-35　0 日目の発現遺伝子と処理水およびエアレーションタンク上澄水に 1 週間曝露したときの雄メダカの発現遺伝子の散布図

に未同定の遺伝子も多く含まれていた。

図3-36、図3-37には各曝露水槽中のE1,E2濃度とエストロゲン様活性およびビテロゲニン1,2、コリオオゲニンH,Hマイナ、エストロゲンレセプター遺伝子のリアルタイムPCRの結果を示す。表3-30は、リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブの塩基配列である。リアルタイムPCRによる各遺伝子の定量においてもARPP遺伝子の発現量との相対値を求めた後、0日目コントロールとの倍率を算出した。なお、ビテロゲニン１および２は、0日目コントロールの発現量が検出限界以下であった。ここでは倍率を算出するため、0日目コントロールのビテロゲニン１および２遺伝子発現量を、リアルタイムPCRで35サイクル（検出限界付近のサイクル数）で遺伝子が検出されたと仮定し算出した。

処理水と曝気槽上澄水中のE1濃度は、曝露期間中一定ではなく、それぞれ、0日目115,99.1ng/L、2日目24.1,37.1ng/L、7日目17.6,8.85ng/L、14日目0.82、9.57ng/Lとなり、低下傾向であった。このときのエストロゲン様活性の値はE1濃度と同じ傾向を示していた。卵形成に関わる遺伝子の発現量をみると、処理水に14日間曝露したメダカで、ビテロゲニン1,2、コリオゲニンH,Hマイナ、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が低下しており、エストロゲン様活性やE1と同じ傾向を示している。曝気槽上澄水に曝露した方では、エストロゲン様活性やE1の濃度があまり低下せずに推移したのと同様、14日目に遺伝子発現量の低下は見られなかった。このように、卵形成に関わる遺伝子は、エストロゲン様活性やE1に連動して発現し、その発現が生じる濃度はエストロゲン様活性10ng-E2/L以上であることがわかった。一方、３－２－５や３－２－６で述べてきたのと同様に、肝臓中ビテロゲニン濃度は、エストロゲン様活性値やE1とは連動しなかった。

処理水と曝気槽上澄水の曝露を比較すると、メダカの遺伝子発現量では、遺伝子の種類により倍率は異なるが、曝露日数2,7日で曝気槽上澄水に曝露した方が高くなっている。例えば、曝気槽上澄水に7日間曝露したメダカのビテロゲニン1遺伝子の発現は、同条件で処理水に曝露したものの7倍となっている。このとき、肝臓中のビテロゲニンも曝気槽上澄水に曝露した方が、処理水に曝露したものより50倍程度高い値を示した。なお、水質としては、曝気槽上澄水ではE2が検出されているものの、7日目までの両曝露水槽中のエストロゲン様活性値は、ほぼ同じであった。このような処理水と曝気槽上澄水の曝露での結果の違いは、直接的には、メダカ体内に取り込まれる女性ホルモン量が多かった、または、曝気槽上澄槽中にE1,E2以外の雌性化作用の強い物質が存在していたためと考えられる。その理由としては、曝気

表 3-29　コントロールの 3 倍以上、0.3 以下で ANOVA 検定により p<0.001 と判定された遺伝子

曝露日数	処理水			エアレーションタンク		
	遺伝子名	アクセション番号	倍率	遺伝子名	アクセション番号	倍率
2日	ビテロゲニン1	AB064320	92.3	ビテロゲニン1	AB064320	109.2
	ビテロゲニン2	AB074891	14.8	ビテロゲニン2	AB074891	32.3
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.6	エストロゲンレセプターα	AB033491	28.0
	エストロゲンレセプターα	AB033491	4.3	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.8
	コリオゲニンH	D89609	4.2	コリオゲニンH	D89609	3.9
	コリオゲニンL	AF5000194	3.2	コリオゲニンL	AF500194	3.1
7日	ビテロゲニン1	AB064320	85.3	ビテロゲニン1	AB064320	88.3
	ビテロゲニン2	AB074891	14.1	エストロゲンレセプターα	AB033491	33.9
	エストロゲンレセプターα	AB033491	8.7	ビテロゲニン2	AB074891	29.5
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.5	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
	コリオゲニンH	D89609	3.7	*cDNA similar to aspartate transaminase precursor, mitochondrial - pig*	AU177265	6.5
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	5.2
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	4.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.9
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AU177788	3.2
				コリオゲニンL	AF500194	3.0
14日	ビテロゲニン1	AB064320	37.0	ビテロゲニン1	AB064320	93.2
	cDNA to similar to cytochrome P450 2D10 − mouse	AU176875	4.2	エストロゲンレセプターα	AB033491	36.8
	cDNA similar to Brain cDNA library Ictalurus punctatus cDNA 5	AU180750	3.0	ビテロゲニン2	AB074891	31.7
	transposon Tol2 transposase	AB031079	0.2	*cDNA similar to aspartate transaminase, mitochondrial - pig*	AU177265	7.9
				コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	5.3
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	4.9
				cDNA clone MF01FSA032M17 5	BJ704342	4.2
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AV670601	4.0
				cDNA similar to cytochrome P450 2C4 - rabbit	AU176982	3.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.6
				cDNA clone MF01SSA123H06 3	BJ022493	0.3

注）斜体は未同定遺伝子

槽上澄水は処理水よりも溶存酸素濃度は低くなっており、曝気槽上澄水中のメダカはより多くの酸素を取り込むため、エラを通る水量が増加したため、結果として体内に取り込まれる女性ホルモン量が多くなった、あるいは、曝気槽上澄水には女性ホルモンの取り込みを促進する物質が含まれている、といったことが考えられる。

雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析から雌メダカ特有の遺伝子は卵形成に関わる遺伝子であることがわかった。今回の実験では、雄メダカの雌性化の検出も試みたため、雄メダカを使用したが、雌メダカを使用した方がより高感度に水質を評価できる場合もあると考えられることから、様々な物質で雄メダカと雌メダカの感受性の違いを明らかにしていく必要がある。

(4) エストロゲン様物質の曝露によるビテロゲニンの生成と遺伝子の発現の関係

これまで述べてきたように、マイクロアレイによる遺伝子の発現はエストロゲン様活性と連動して変化し、一方、ビテロゲニンの発現はエストロゲン様活性にやや遅れて引き起こされる。このようなビテロゲニンの発現がエストロゲン様活性には追随せずにやや遅れて引き起こされることは、河川水や下水処理水を用いた試験に一貫して生じていた。これらの知見から、メダカがエストロゲン様物質に曝露されると卵形成等雌性化に関する遺伝子が発現し、これによりビテロゲニンが生成される等、実際に雌性化の兆候が現れ、エストロゲン様物質の曝露が収まっても体内にはビテロゲニンは代謝されるまでしばらく体内に留まっている、という一連の魚類へのエストロゲン様物質による雌性化のメカニズムが示唆された。

３－４－４　下水処理水のコイ・メダカ曝露試験に

表 3-30　リアルタイム PCR で使用したプライマーとプローブの塩基配列

遺伝子名（アクセション番号）	フォワードプライマー	リバースプライマー	TaqManプローブ	参考文献
エストロゲンレセプターα	aatcgctcccggttctatatca	cgaccctccatactgaaggaca	FAM-atctcgaggcagaatcgagagtccga-BHQ	4)
ビテロゲニン1	tctgttgttgccaagaccaaag	tccatcagttctcactccaatctc	FAM-cttctttgttggagctgctgctgatgttct-BHQ	4)
ビテロゲニン2(AB074891)	gggctgattcttgctctttctct	ggctgaattctggggtgaag	FAM-cccttgtggctgccaaccaactg-BHQ	今回設計
コリオゲニンH	cggatagtcctctttccattgc	tttgacactgcccattggc	FAM-agcttggacccctcaagtgtacttgca-BHQ	4)
コリオゲニンHマイナ(AB025967)	tgttcctcagtgggatttgct	agggatccactggaactaacgtt	FAM-attaatggctgtccaaacatcgacgatcg-BHQ	今回設計
ARPP(AU179751)	ctttgtcttcaccaaggaggatct	cgagctgctgcaggtacct	FAM-actgaagtcagggatctgctgctggc-BHQ	今回設計

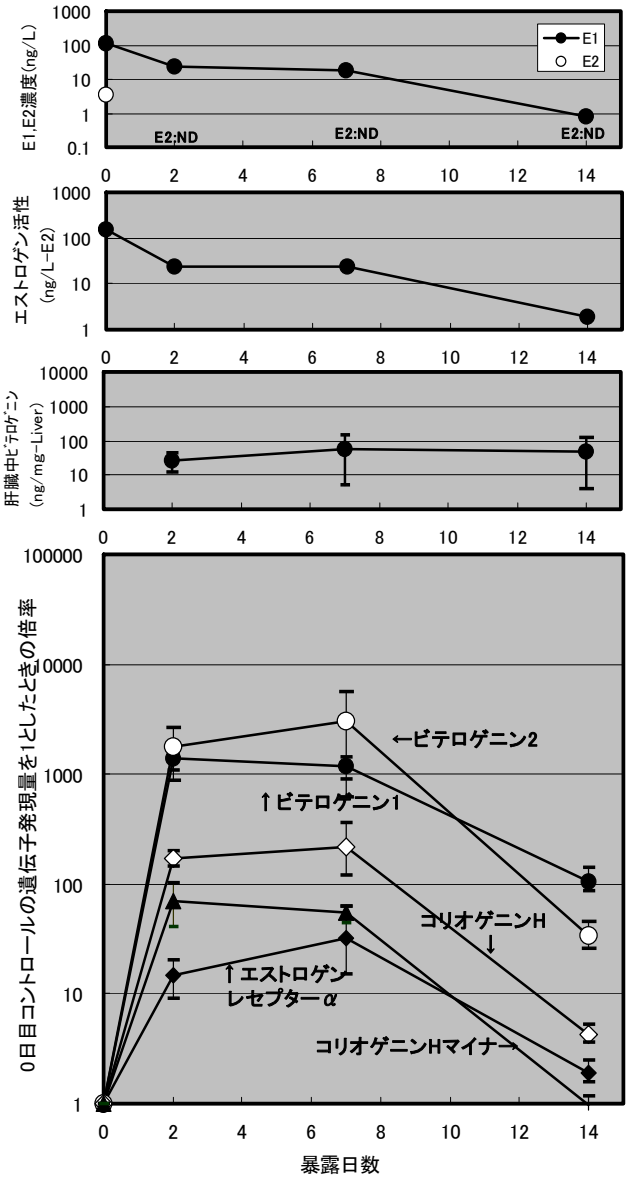


図 3-36　処理水曝露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン様活性値、肝臓中ビテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化
(bar は最大、最小値)

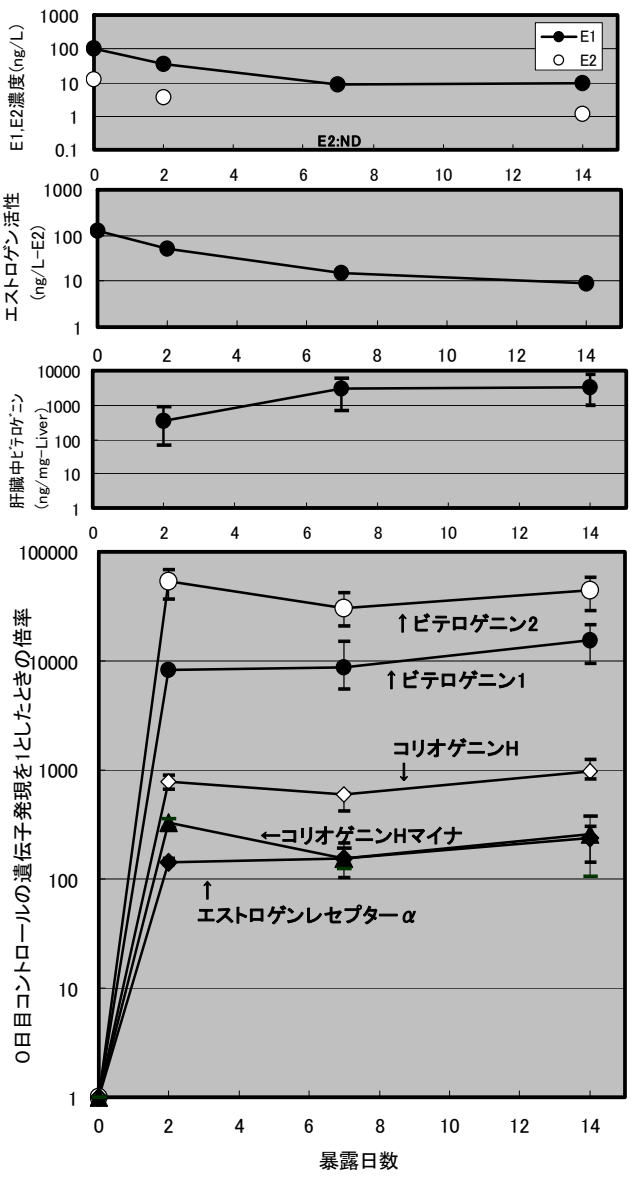


図 3-37　ＡＴ曝露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン様活性値、肝臓中ビテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化
(bar は最大、最小値)

おけるビテロゲニン発現のまとめ

コイとメダカを下水処理水に曝露してエストロゲン様物質によるビテロゲニンの生成を調査したところ、コイの場合には明確な影響は見られなかったが、メダカの場合には高濃度のエストロゲン様活性が観測された後にビテロゲニンの発現が見られた。その生成はエストロゲン様活性にやや遅れて現れ、エストロゲン様活性が低下した後にもビテロゲニンは検出された。これは河川水曝露の場合とも同様の傾向であり、エストロゲン様活性がある程度の濃度になるとビテロゲニンの生成が促され、一度生成したビテロゲニンは体内に蓄積されて徐々に代謝されることが改めて推測された。試験全体の結果より、エストロゲン様活性が 10ng-E2/L を超えるとビテロゲニン濃度が上昇する傾向にあることが明らかになった。

このような、メダカがエストロゲン様物質に曝露されてビテロゲニンが生成する際の発現遺伝子をマイクロアレイにより調べたところ、卵形成等雌性化に関する遺伝子が直ちに発現し、曝露濃度が低下すると発現も停止していた。このことから、ビテロゲニンの生成を促すエストロゲン様活性の濃度には閾値があり、遺伝子の発現よりやや遅れてビテロゲニ

ンが生成されること、曝露終了後には遺伝子の発現は収まるもののも、代謝は徐々に進行するためにしばらくはビテロゲニンが体内に留まっている、といったメカニズムにより雌性化が引き起こされることが明らかになった。

4　まとめ

本研究では、環境水中のエストロゲン様物質が魚類にどのような影響をどの程度与えるのかを明らかにするために、室内実験によりエストロゲン様物質の影響濃度を明らかにするとともに、都市河川水と下水処理水中で魚類を飼育することによりエストロゲン様物質の実態と雌性化との関連を検討した。また、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と各エストロゲン様物質の作用の比較から、環境水中のエストロゲン様活性における寄与物質を明らかにすることを検討した。

その結果、環境水中のエストロゲン様活性における寄与はエストロン（E1）が最も大きく、次いで 17β-エストラジオール（E2）が大きいことがわかった。そして、エストロゲン様活性と E1 の濃度の推移はほぼ連動していた。

また、E1 や E2 が雄メダカのビテロゲニン生成を引き起こす作用濃度は、14 日間の曝露での最小作用濃度がそれぞれ 79.5ng/L と 5.0ng/L、最大無作用濃度がそれぞれ 31.6ng/L と<5.0ng/L であった。そして、エストロゲン濃度とビテロゲニンの生成には直線関係があった。

下水処理水をメダカに曝露させた場合、エストロゲン様活性では約 10ng-E2/L がビテロゲニン生成の閾値と考えられた。エストロゲン様活性はエストロゲンによる作用強度を的確に表していると考えられることから、環境水中のエストロゲン様活性は魚類の雌性化の指標として用いることができると考えられる。

なお、雄メダカがエストロゲン様物質に曝露されると卵形成等雌性化に関する遺伝子が直ちに発現し、曝露濃度が低下すると発現も停止するが、ビテロゲニンの生成は遺伝子の発現よりやや遅れて検出されるとともに、曝露終了後にも代謝は徐々に進行して、しばらくはビテロゲニンが体内に留まっていることも明らかになった。

5　参考文献

1) Environment Agency (1997) The identification and assessment of oestrogenic substances in sewage treatment works effluents

2) Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, Y.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. and Sumpter, J.P. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chemistry and Ecology*, **8**, 275-285

3) Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P. and Tylor, T. (1996) A survey of estrogenic activity in united kingdom inland waters, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 1993-2202

4) Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, Sumpter, J.P., Tylor, T. and Zaman, N. (1997) Estrogenic activity in five united kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout, *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 534-542

5) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P., *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 194-202

6) Blackburn, M.A. and Waldocket, M. J. (1995) Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales, *Water Research*, **29**, 1623-1629

7) Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in stw effluent. 1. chemical fractionation and in vitro biological screening, *Environ. Sci. Tech.*, **32**, 1549-1558

8) Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Routledge, E.J. and Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in stw effluent. 2. in vivo responses in trout and roach, *Environ. Sci. Tech.*, **32**, 1559-1565

9) Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. and Sumpter, J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Tech.*, **32**, 2498-2506

10) 中村將，井口泰泉 (1998) 多摩川にみる魚類の異変，科学, **68**, 515-517

11) 原彰彦（1999），内分泌攪乱物質の生態影響――魚類への影響――，廃棄物学会誌，**10**, 278-287

12) 建設省 (1999)「平成10年度水環境における内分泌撹乱化学物質に関する実態調査結果」について，
http://www.mlit.go.jp/river/press/9901_06/990330.html

13) 建設省 (1999) 平成11年度水環境における内分泌撹乱化学物質に関する実態調査結果（春期・夏期調査）について，
http://www.mlit.go.jp/river/press/9907_12/991119part2.html

14) 建設省 (2000) 平成11年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果について，
http://www.mlit.go.jp/river/press/200007_12/000721bindex.html

15) 国土交通省 (2001) 平成12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について, http://www.mlit.go.jp/river/press/200107_12/010724b/010724.html
16）東谷忠, 玉本博之, 宮本宣博, 八十島誠, 田中宏明 (2002) 下水処理水に曝露した雄コイのビテロジェニン誘導に関する研究, 環境工学研究論文集, **39**, 97-108
17）Higashitani, T., Tamamoto, H., Takahashi, A. and Tanaka, H. (2002) Study of estrogenic effects on carp (*cyprinus carpio*) exposed to sewage treatment plant effluents, CDROM of Proc. 3rd IWA Water Congress
18）建設省 (1999) 下水道における内分泌撹乱化学物質に関する調査・中間報告について, http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/information/naibunpi990823.html
19）建設省 (2000) 平成11年度下水道における内分泌撹乱化学物質に関する調査報告について, http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/information/naibunpi000419.html
20）国土交通省（2001）平成12年度下水道における内分泌撹乱化学物質（環境ホルモン）に関する調査の結果について, http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/kisha/naibun010509.html
21）矢古宇靖子, 高橋明宏, 斎藤正義, 東谷忠, 田中宏明 (2001) 下水処理場でのエストロゲン様活性の低減, 第9回世界湖沼会議発表文集, 第3分科会, 237-240
22）高橋明宏, 矢古宇靖子, 斎藤正義, 東谷忠, 田中宏明 (2001) 河川水中のエストロゲン様活性の評価, 第9回世界湖沼会議発表文集, 第3分科会, 241-244
23）羽生功 (1991) 生殖周期, 「魚類生理学」（板沢靖男, 羽生功編）, pp. 287-325, 恒星社厚生閣, 東京
24）長浜嘉孝 (1991) 生殖：配偶子形成の制御機構, 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生功編), pp.243-286, 恒星社厚生閣, 東京
25）Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environ. Toxicol. Chem.*, **15**, 241-248
26）矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明（1999）組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定，環境工学研究論文集，**36**, 199−204
27）小森行也, 八十島誠, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明 (2001) 下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析, 土木技術資料, **43**, 44-49
28）社団法人日本下水道協会編 (2002) 下水試験方法 追補暫定版（内分泌撹乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編）
29）八十島誠, 小森行也, 田中宏明 (2001) LC/MSによるノニルフェノキシ酢酸類の分析, 第４回日本内分泌撹乱化学物質学会研究発表会要旨集, 171
30）Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K. and Giesy, J.P. (1999) Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures, *Environ.Sci.Technol.*, **33**, 2814-2820
31）環境省 (2003) Medaka Oryzias latipes: Development of test methods and suitability of medaka as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals., http://www.env.go.jp/chemi/end/medaka.html
32）小森行也, 田中宏明, 竹歳健治 (1999) 活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動, 第36回下水道研究発表会講演集, 700-702
33）Higashitani, T. and Tanaka, H. (2001) Study of the estrogenic effects on fish exposed to sewage treatment plant effluents, The 3rd Japan-UK Joint Workshop on Endocrine Disrupting Chemicals, pp.18-19.
34）財団法人化学物質評価研究機構 (2003) 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
35）Ishibashi, H., Tachibana, K., Tsuchimoto, M., Soyano, K., Ishibashi, T., Nagae, M., Kohra, S., Takao, Y., Tominaga, N. and Arizono, K. (2001) In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in Goldfish (*Carassius auratus*)., *J. Health Sci.*, **47**, 213-218
36）Takahashi, A., Higashitani, T., Yakou, Y.,. Saitou, M., Tamamoto, H. and Tanaka, H. (2003) Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disruptors into periphytons and benthos in the Tama River, *Water Sci. Tech.*, **47**, 71-76
37）岩松鷹司 (1997) メダカ学全書, 大学教育出版, 岡山

６　研究発表

（誌上発表）

1) Saito, M., Tanaka, H., Takahashi, A. and Yakou, Y. (2002) Comparison of yeast-based estrogen receptor assay, *Water Sci. Tech.*, **46**, 349-354
2) 東谷忠, 玉本博之, 宮本宣博, 八十島誠, 田中宏明 (2002) 下水処理水に曝露した雄コイのビテロジェニン誘導に関する研究,環境工学研究論文集, **39**, 97-108
3) Higashitani, T., Tamamoto, H., Takahashi, A. and Tanaka, H. (2003) Study of estrogenic effects on carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sewate treatment effluent, *Water Sci. Tech.*, **47**, 93-100
4) Higashitani, T., Miyajima, K., Nakada, N., Yasojima, M., Tanaka, H. and Suzuki, Y. (2005) Development of on-site fish exposure system placed in water

quality monitoring stations along a river, *Water Sci. Tech.*, **52**, 275-282

5) Nakada, N., Yasojima, M., Okayasu, Y., Komori, K. Tanaka, H. and Suzuki, Y. (2006) Fate of oestrpgenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment plants, *Water Sci. Tech.*, **53**, 51-63

6) 中田典秀, 東谷忠, 宮島潔, 鈴木穣 (2006) メダカを用いた下水処理水の内分泌かく乱作用の評価,土木技術資料, **48**(6), 34-39

（口頭発表）

7) Miyamoto, N., Tanaka, H., Tamamoto, H. and Komori, K. (2002) Fractionation Method for Estimating the Cause of Estrogen-like Activity in Sewage, WEFTEC 2002, Water Environment Federartion

8) Higashitani, T., Tamamoto, H., Miyamoto, N., Yasojima, M. and Tanaka, H. (2003) Feminization of wild carp and carp exposure tests using sewage treatment plant effluents, 4th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water

9) Okayasu, Y., Suzuki, Y., Komori, K. and Yasojima, M. (2004) Occurrence of Estrogen-like Substances in wastewater in Japan, Japan- U.S. Joint Conference on Drinking Water Quality Management and Watewater Control, U.S. EPA

10) Nakada, N., Okayasu, Y., Yasojima, M., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y. and Tanaka, H. (2005) Fate of estrogenic compounds and estrogenic activity in wastewater treatment process, Technology 2005, Water Environment Federation, 298-304

11) 宮島潔, 東谷忠, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穣 (2005) 下水処理場における現地魚類曝露試験, 第 8 回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 168

12) 宮島潔, 東谷忠, 中田典秀, 鈴木穣 (2006) メダカを用いた流水式曝露試験装置による下水処理水の内分泌かく乱作用の検出, 第 40 回日本水環境学会年会講演集, 546

13) 澤井淳, 北村友一, 鈴木穣 (2006) 雄メダカのビテロゲニン誘導に及ぼす水温の影響, 第 9 回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 投稿中

14) 北村友一, 岡安祐司, 小森行也, 中田典秀, 鈴木穣 (2006) 下水に曝露した雄メダカのエストロゲン応答遺伝子の発現変動, 第 9 回環境ホルモン学会研究発表会要旨集, 投稿中

土　木　研　究　所　資　料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4021　　July 2006

編集・発行　© 独立行政法人　土木研究所

本資料の転載・複写の問い合わせは

独立行政法人　土木研究所　企画部　業務課
〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6　電話 029-879-6754