

12. 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、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、内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質が含まれている可能性が指摘されており、これらの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：内分泌かく乱物質、エストロゲン、ノニルフェノール類、ELISA 法

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は、下水道法に基づき水質汚濁防止法で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が懸念される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、法により内分泌かく乱作用が懸念される微量化学物質の排出を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、評価することも必要となるであろう。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. 研究方法

2. 1. 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発

本研究では、下水中の 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。

E1 などのエストロゲン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 キットについては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。

本研究では、水中のE1を測定するELISAキットを開発するとともに、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、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14～16年度の期間で、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. 2. 微量化学物質の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攪乱化学物質（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と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。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¹⁾ことが知られており注目されている物質である。また、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、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）、エチルエストラジオール（EE2）と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^{2)～5)}により測定し下

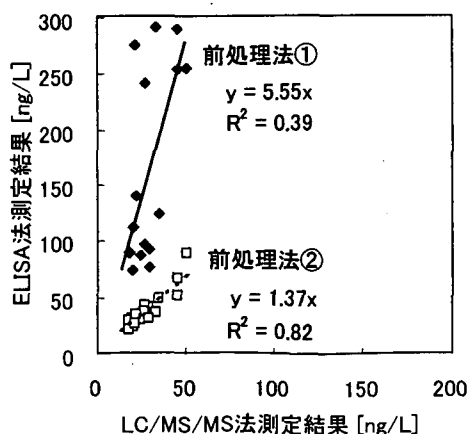


図-1 流入下水中のエストロン(E1)の前処理法間の測定結果の比較

水処理場での挙動把握を行った。

また、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。

3. 研究結果

3. 1. 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発

下水試料中のエストロンの前処理として、

1) 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）

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 C18固相抽出+フロリジル固相抽出+アミノプロピル固相抽出

の2つの設定方法を比較した。両手法とも、エストロンの回収率は確保されていた。結果を図1～2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。

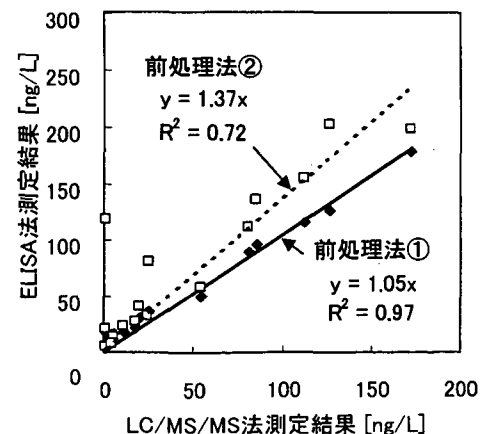


図-2 二次処理水中のエストロン(E1)の前処理法間の測定結果の比較

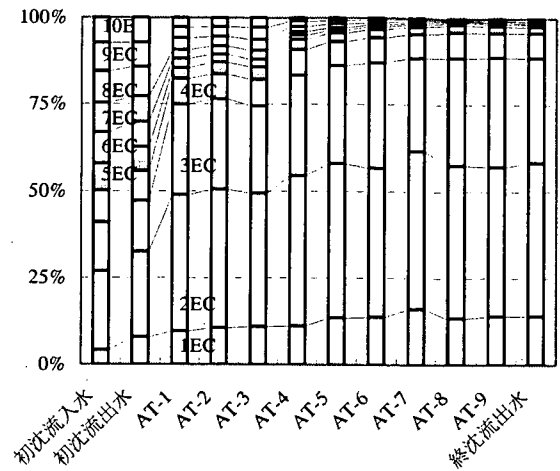
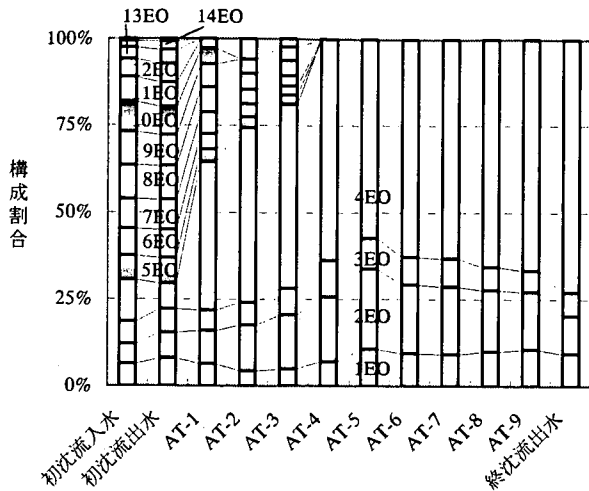


図-3 下水処理過程でのNPEO、NPECのEO鎖分布図

3. 2. 微量化学物質の下水道での挙動把握^{6) 7)}

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。

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-3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。

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⁹⁾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-4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¹⁰⁾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^{11)~13)}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。

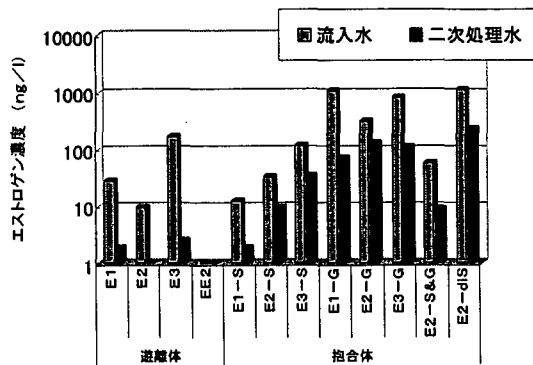


図-4 エストロゲン測定結果 (回収率補正済み)

4. まとめ

1) 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発

- ・水中の E1 を定量する ELISA キットを開発した。
- ・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。

2) 微量化学物質の下水道での挙動把握

- ・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。
- ・NPnEO は、活性汚泥処理では 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。

・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。

参考文献

- 1) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明「組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定」環境工学研究論文集、第 36 巻、pp.199-208、1999
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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、pp.713-715、2000
- 5) 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、p.526、2002
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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)
- 9) 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 回日本水環境学術シンポジウム講演集、p.186、2002.9
- 10) 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
- 11) 辻村和也、田嶋晴彦、LC/MS/MS による環境中エストロ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
- 12) 石井善昭、沖田智、伊順子、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
- 13) 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