

## II. その他の予算による研究

[水質チーム]

# 1. 河川水質調査方法の体系化に関する調査

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
主任研究員 佐々木 稔  
研究員 岡安 祐司  
専門研究員 李 建華  
交流研究員 和田 順之輔

## 【要旨】

現在、河川の水質調査は河川砂防技術基準（案）等に基づいて実施されているところであるが、調査目的が多様化するなか、河川管理者が実施する水質調査にあった調査計画作成のため、詳細な調査項目、調査地点、調査頻度などについて考え方を整理した河川水質調査要領（案）の作成が求められている。このため、本調査は、水質測定の妥当性を明確にし、河川水質調査の体系化を行うことにより、水質調査の効率化を図ることを目的とし、成果を「河川水質調査要領（案）」としてまとめるため、国土交通省各地方整備局水質担当者、各地方整備局技術事務所と連携し実施している。この中で土木研究所は、主に水質調査の目的、調査計画を含めた総論の考え方の整理と、調査の体系化が遅れている底質調査、特に底質からの溶出量の調査方法を担当し、試験期間等の溶出試験条件の新たな知見を得た。

## 1. はじめに

現在、河川の水質調査は河川砂防技術基準（案）等に基づいて実施されているところであるが、調査目的が多様化するなか、河川管理者が実施する水質調査にあった調査計画作成のため、詳細な調査項目、調査地点、調査頻度などについて考え方を整理した河川水質調査要領（案）の作成が求められている。このため、本調査は、水質測定の妥当性を明確にし、河川水質調査の体系化を行うことにより、水質調査の効率化を図ることを目的とし、成果を「河川水質調査要領（案）」としてまとめるため、国土交通省、地方整備局水質担当者、地方整備局技術事務所と連携し実施した。土木研究者水質チームは総論の作成、調査要領全体の考え方を指導するとともに、体系化が遅れている底泥溶出試験、酸素消費速度試験の体系化を担当した。

## 2. 底泥溶出試験、酸素消費速度試験

既存マニュアルや各地域整備局に対するアンケート調査による実施事例の整理を行い、底泥溶出試験、酸素消費速度試験の現状把握を行った。本調査において、底泥溶出試験、酸素消費速度試験の現状における案を提案するとともに、今後の課題についても整理した。

### 2.1 底泥溶出試験に関するアンケート調査結果と課題の検討

アンケートは平成3～12年度の成果について回答を求めた。底泥溶出試験に関する回答では、平成3～8年度は1～2例であったのに対し、平成9～12年度は4～7例と

実施事例が多かった。

#### 2.1.1 試験の目的

試験の目的については、①水質汚濁要因の把握のため、②浚渫事業の計画策定、③浚渫事業の事業評価、④水質予測モデルの定数算定のため、⑤その他の事例に分けると①が50%以上、次いで②が30%以上を占めていた。

#### 2.1.2 対象水域等

湖での1調査点が定面積当たり調査地点数は0.07～33個/km<sup>2</sup>の範囲にあり、大きく異なっていた。

調査対象水域に配置した調査点の数は、1～150地点と、5地点以下が最も多く12例、次が11～15地点の範囲が2事例、6～10地点の範囲、16～50地点（実数33地点）、101～150地点の範囲（実数150地点）をとっている事例もあった。

1調査地点当たりのカバー面積（対象面積/調査地点数）は0.03～13.8km<sup>2</sup>の範囲であり、0.1以上～0.5km<sup>2</sup>以下が6事例、0.6km<sup>2</sup>以上～5.0km<sup>2</sup>以下が6事例と多く、5.1km<sup>2</sup>以上は1事例であった。目的別の手法の規格化が必要である。

#### 2.1.3 調査地点の選定において配慮した事項

調査地点の選定において配慮した事項は、①浚渫実施域、②底泥の性状（砂質かヘドロか）、③底質平面分布状況（既往の調査結果）、④水質汚濁域、⑤流況、⑥その他であり、浚渫実施域の効果検証や事前調査、既往調査結果を地点選定に配慮していること。将来の浚渫域の事例もあった。

#### 2.1.4 試験方法の出典・根拠の把握

試験方法の典拠・根拠として、既存マニュアルでは①「建設省河川砂防技術基準(案)同解説 調査編、建設省河川局監修、社団法人日本河川協会」<sup>1)</sup>、②「底質の調査・試験マニュアル 改訂版 平成7年3月 底質浄化協会 編」<sup>2)</sup>、③「湖沼環境調査指針、社団法人日本水質汚濁研究会編、公害対策技術同友会」<sup>3)</sup>であることが確認された。特に②を根拠とする例が多かった。

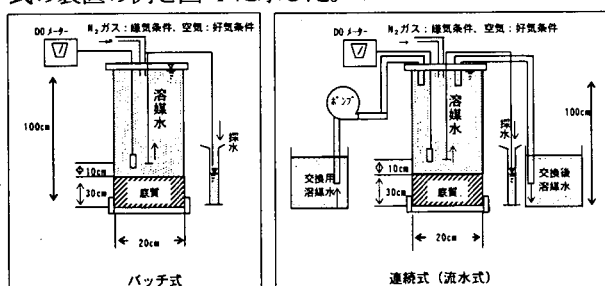
溶出実験は19例、酸素消費速度試験は3例が回答されたが、上記3種のマニュアルに拠らないその他の方法によるとの回答が、半数以上もあった。これは、調査手法が統一されていないことを示しており、手法の規格化が必要である。

### 2.1.5 1地点当たりの調査頻度

1地点当たりの調査頻度は18例中12例が「1回」で最も多く、その他は2~18回であった。2回/年×9年間の例もあった。また4回/年も3例みられた。目的に応じた調査頻度の設定が必要である。

### 2.1.6 試験装置について

試験装置については、①試験実施場所(室内と現地)、②試験方法(バッチ、連続、その他)、③装置内底泥表面積、④溶媒水高さ、⑤底泥厚、⑥試験水量の観点で調査した。①は、室内が殆ど(14/19例)であり、②は、バッチ式14:連続式4:その他1の比率であった。連続式の滞留時間は4日間と20日間であった。バッチ式と連続式の装置の例を図-1に示した。



試験装置

図-1 室内溶出試験装置の例<sup>2),4)</sup>

③は、50cm<sup>2</sup>(直径約8cmφ)以下が7例、51~100cm<sup>2</sup>(直径約8cm~11cmφ)が1例、101cm<sup>2</sup>(直径約11cm)以上が9例であった。現地実験では268.6cm<sup>2</sup>(直径18cmφ)、2,500cm<sup>2</sup>(50×50cm)、10,000cm<sup>2</sup>(100×100cm)の3例であった。④は、1.8~120cmの範囲にあり、50cm以下が42%、50~120cmが53%、100cm以上が5%であった。⑤は50cm未満が74%、50~100cmが21%、無回答5%であった。⑥は、100ml未満~10,000ml以上まで広い範囲で実施されており、試験装置に関する規格の統一性はみられなかった。

### 2.1.7 試験条件

試験条件は、①攪拌の有無、②酸素条件、③温度条件、④試験水の種類、⑤試験期間、⑥サンプリング頻度について調査した。①は、静置溶出が18例、攪拌溶出のみは1例、静置溶出と併せて攪拌溶出を実施した例が3例であった。②は、好気条件が13例、嫌気条件が8例、両方を同時に実施した事例が5例であった。好気条件のDO濃度は4.6~9.2mg/lの範囲で設定されており、現地合わせや飽和等、調査毎に様々であった。③は、1温度のみの設定の事例が16例と最も多く、その他は2温度が1例、4温度が2例であった。設定温度は、18~20℃が最も多く11例、次いで25~30℃が7例であり、試料採取時水温との回答もみられた。④は、現地直上水(ろ過処理9例、未処理3例)12例、蒸留水2例、その他となっており、その他では条件統一のため模擬湖水を作成し実験に供した例もみられた。⑤は、1~30日の範囲であり、16~20日が9例で最も多く、次いで26~30日が5例、5日以下が5例であった。16~20日は関西での湖沼の事例に多く、21日以上は関東の湖沼の事例であった。⑥は、期間中5回以下が14例で多く、6~10回が4例、30回以上が1例であった。また経過日数(経過時間)については、0,1,5,10,20日に実施した事例が各実施日に対して8~14例と多かった。以上の試験条件の調査結果から、①、③、④、⑥は比較的共通点がみられたが、②、⑤はバラツキがみられた。

### 2.1.8 分析項目

合計19項目が回答された。TPが14例、PO<sub>4</sub>-Pが10例、TNが9例と多く、以下COD、NO<sub>3</sub>-Nが6例、DTN、DTP、NO<sub>2</sub>-N、NH<sub>4</sub>-Nが5例と続いた。窒素の溶出現象を把握する観点に立つと、TNの他、無機態窒素を含めた試験項目を調査要領に示す必要がある。

### 2.1.9 同時実施底質調査

①土質試験、②堆積泥の年代測定、③間隙水の分析、④平面分布調査、⑤鉛直分布調査、⑥含有量試験の6種類について調査し、回答結果で同時実施事例が最も多いのは⑥含有量試験であり、次いで⑤鉛直分布調査、④平面分布調査の順で実施事例が多かった。

### 2.1.10 調査結果のとりまとめ

溶出試験結果から16例が溶出速度を算定していた。溶出速度の算定方法は、得られた結果に合わせて、どの期間のデータを選定するかを検討する必要があり、この点について過去のマニュアルでは詳述されていない。従って、とりまとめの考え方や、実際の算出方法を溶出試験方法に反映させる必要がある。

### 2.1.11 調査結果の活用

河川では、水質予測モデルのパラメータ設定、基礎デ

一タ収集、現地溶出量の収集、湖底泥の乾出が溶出現象に及ぼす影響評価等に利用され、湖沼では、浚渫計画、浚渫・覆砂効果検討、水質保全計画に利用されている。

#### 2.1.12 調査実施の課題

調査実施の課題として、①調査地点の選定、②調査頻度の選定、③分析項目の選定、④調査時期の選定、⑤現地での採泥等の調査方法、⑥溶出試験方法、⑦調査結果の取りまとめ方法、⑧結果の信頼性、⑨調査結果の活用方法があげられた。①、②、④は、調査の時空間的な代表性の問題であり、溶出試験に留まらず、底質調査一般として、今後の水質調査要領において考え方を提示する必要がある課題である。③、⑤は、目的に応じた手法の規格化を行い、比較出来るようにする必要がある。⑥については、室内実験のバッチ式と連続式の目的分類や現地試験の隔離水塊、湖底設置型溶出試験装置がどのような目的の時に必要となるのか、巻上げ溶出試験はどのように規格化すべきか等課題は多い。

以上を踏まえ、本調査では、実際の利用頻度が最も高いと目される室内試験の規格化を最優先に考えることとした。中でも⑦は、従来の試験マニュアルでは言及していない、実データの傾向の違いによる溶出速度算定時の対処方法等を水質調査要領へ今後盛り込めるよう検討を行った。これらの事項はアンケート結果におけるマニュアルへの記載希望事項とも重なり合っていた。

### 2.2 酸素消費速度試験に関するアンケート調査結果と課題の検討

溶出実験と同様に、①試験の目的、②対象水域等、③調査地点数、④調査地点の選定において配慮した事項、⑤試験方法の出典・根拠、⑥1地点当たりの調査頻度、⑦試験装置について、⑧試験条件について、⑨分析項目、⑩同時実施底質調査、⑪調査結果のとりまとめ、⑫調査結果の活用、⑬調査実施の課題について調査を行った。回答は3例と少なかった。①は、水質予測モデルの定数算定、水質汚濁要因の把握、底泥表層の酸化による改善効果の評価であった。②、③は、利根川では管理区官長86kmで調査点が2点（但し調査対象区間は明確でなかった）、中海（米子湾）では、湖面積96.9km<sup>2</sup>に対し調査点は1点、同じく中海（米子湾）の別の検討では、湖面積86.2km<sup>2</sup>、対象面積8.3km<sup>2</sup>、調査点は4点であった。④は、底質の平面分布状況、底泥の状況（砂質かヘドロか）であった。⑤は、「河川砂防技術指針」、「底質調査・試験マニュアル」であった。⑥は、1回/年で、1年間と3年間の事例があった。⑦は全てバッチ式、試験水量は、800～1,200mlであった。⑧の内温度条件は、1ケースでは18℃、25℃、3ケースでは10℃、20℃、30℃があった。

試験水は現地直上水で、ろ過処理有と無しがあった。試験期間は1～7日であり、サンプリング頻度は、0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24時間の事例、1, 3, 7日の事例、0, 10, 20, 30分、1～24時間（1時間ピッチ）の3事例があった。⑨はD0で、センサー方式、手分析（全量分析）の両方の事例がみられた。⑩は、TOC、CODの含有量試験や土質試験であった。⑪は、底泥の酸素消費速度の算定であり、酸素消費速度の温度定数を求めている事例もあった。以上の結果から、酸素消費速度試験における調査方法も手法は多様であり、地域を比較するための手法の規格化が必要である。

### 2.3 底泥溶出試験方法の検討

#### 2.3.1 底泥溶出の機構

底泥溶出の機構は、静置溶出、浮上溶出、巻上げ溶出が複合したものと考えられる。静置溶出とは、底泥間隙水中溶解性成分が、拡散により直上水へ回帰する現象を指し、浮上溶出とは、湖底流により表層泥の土粒子が浮き上がって間隙水が直上水へ移動する現象を指す。さらに巻上げ溶出は、底泥が湖水の運動に伴い直上水中に巻上げられ、土粒子そのものが直上水と混合状態になる現象を指す。さらにこれらの現象は、間隙水中の物質濃度、底泥の含水比に負荷量が左右される。また、底泥中の分解には、温度や酸素（酸化還元）条件、対象物質の存在形態（例えばリン化合物の存在形態）が影響を与える。さらに、浮上、巻上げ溶出には、土粒子の密度や粒径、湖水の流動状況が影響する。これら底泥溶出現象の機構について、溶出試験においてどのような実験条件の規格化を行うかが課題となる。

#### 2.3.2 底泥溶出試験とその関連調査

底泥の溶出機構を踏まえた調査として、①底泥平面分布調査、②底泥鉛直分布調査、③底泥溶出速度試験、④底泥浮上状況把握調査、⑤沈降物量調査、⑥底泥の堆積年代調査、⑦堆積量調査が挙げられ、①、②、⑤、⑥、⑦は主に溶出現象の背景把握が目的である。③には模擬浚渫試験や巻上げを想定した完全混合溶出試験が含まれる。④は現地における浮上実態の把握を目的としている。

#### 2.3.3 底泥溶出試験方法の検討

試験方法は、①調査地点の選定、②採泥方法、③試験方法（装置等）、④試験条件、⑤分析項目、⑥溶出速度算定方法について検討を行った。

①調査地点の選定は、既往底質調査結果より底質汚濁水域を把握し、更に実態調査を実施することで、底質の状況（堆積厚や酸化還元状況を含む）を把握し、これらの情報をもとに検討対象とする水域に必要な調査地点数を設定する必要がある。調査地点の選定に関する知見は

現在収集中であり、ケーススタディーによる検討や既往資料の統計解析も実施し、今後の調査要領の改定に反映させる予定である。

②採泥方法は、現地状況の再現の観点からは不攪乱試料の採取となる。不攪乱試料の採取は、ダイバーにより試験装置に直接採取するケースが多いが、i) 試料採取時に装置陥入の影響による微小な攪乱は生じてしまう、ii) 同一地点で複数試料を採取した場合に採取された試料にバラツキが生じる、iii) 装置が大型化するほど現地作業は困難になる等の課題がある。さらに試験に供する泥厚は一定にする必要があることから、採取後の泥厚調整についても今後の調査要領の改定時に反映させる必要がある。

③試験方法（装置等）は、室内実験系に限定すると大型装置によるバッチ式、連続式、小型装置の複数使用が挙げられる。これらには長所、短所が各々ある。大型装置は、経過日数により試験に用いられる底質は変わらない点で、経過日数毎に別の底質となる小型装置より精度が良い。一方小型装置は、多検体への適用性や、直上水の全量を試験に供する点でサンプリング精度では、大型より優れている。さらに大型については、直上水の量が増えるバッチ式に比べ直上水を補給し一定に保つ連続式が優れている点もある。これらの手法を用途を明確にして規格化する必要がある。何れの手法についても現状のマニュアルや実施事例に記載されているものより詳細な注意事項の整理、とりまとめ方法の解説が必要であり、これらを含めて今後の調査要領の改定に反映させる必要がある。

④試験条件は、水温、DO、ORP が上げられ、何れも試験結果を左右する大きな試験条件である。水温は物質の分解速度を支配する微生物の活性を左右するし、DO も好気的環境、嫌気的環境にそれぞれ適用した微生物の活性を左右する。さらに ORP は、特に DO が 0 mg/l の条件下でどの程度の還元状態かを把握するのに欠かせない要素である。図-2 に示されているように、ORP の低下に伴いりん溶出量が増加することも知られている。

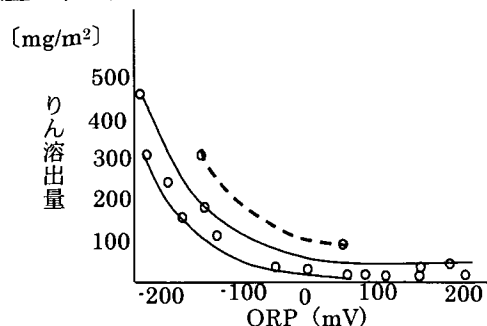


図-2 ORP とりん溶出量の関係<sup>5)</sup>

試験期間については実験を実施した。図-3 に示したように、直上水の濃度は、210 時間以降変化が小さくなっており、従来実施されてきた 10 日間(240 時間)以上の期間を経ずとも溶出速度を求めることが可能な事例を得た。

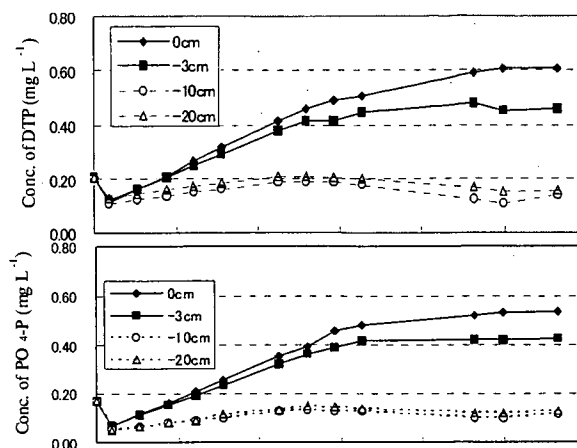


図-3 室内静置溶出試験の経過(模擬浚渫)<sup>6)</sup>

また模擬浚渫試験についても検討を行った。図-3 の 0, 3, 10, 20cm はそれぞれ、模擬浚渫の泥厚を示しており、従来考えられてきた、極表層の除去(本実験では 3cm)では期待された浚渫効果は確認されず、一定量以上の模擬浚渫により溶出の抑制効果が得られることを確認した。

⑤分析項目は、水域の汚濁因子により設定されるが、リンでは溶存態として  $PO_4\text{-P}$ 、と TP、窒素では溶存態として、 $NH_4$ 、 $NO_2$ 、 $NO_3$ 、と TN の分析を推奨する。必要性に応じ、COD や TOC も実施する。

⑥静置溶出速度算定方法は、大型装置のバッチ式、流水式、小型によりそれぞれ異なるので、それぞれの考え方と留意点を整理した。

バッチ式では、想定する溶出現象のモデルにより算定方法が異なる。図-4 に示した「底質調査試験マニュアル」に記載されているモデルは、定常的な溶出を想定しており、初期の不安定期を過ぎると直上水と底泥の濃度勾配の変化に応じた直上水濃度の上昇が生じ、直上水と底泥の関係が安定した期間について直線的な相関関係を設定し、溶出速度を求める方法が示されている。

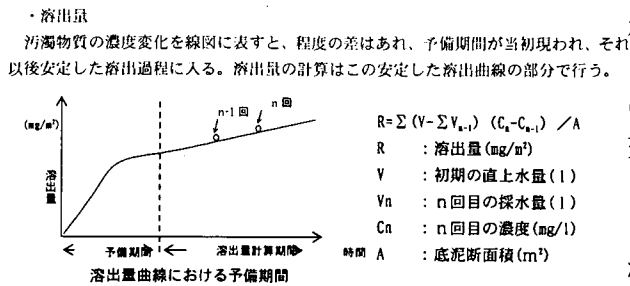


図-4 静置溶出試験における溶出速度の算定方法<sup>2)</sup>

図-5の太線、積算溶出量の変化は、0日から3日の間は安定していないが、3日以降は10日まではほぼ安定している。ここで、3-7日、5-10日、7-15日、3-10日の溶出速度を求め図-6に示した。この例では、3-10日が平均的な溶出速度を与えていることが判る。一方、動的な溶出速度を算定するモデルでは溶出速度の算定に初期の濃度変化部分を含めたデータを用いる。

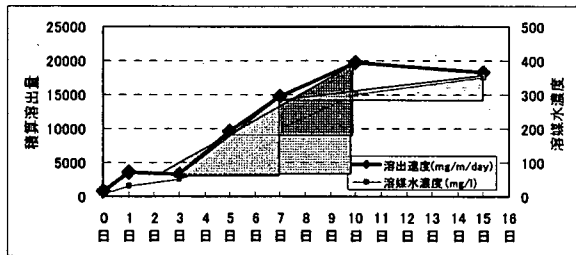


図-5 静置式の実験結果の模式図

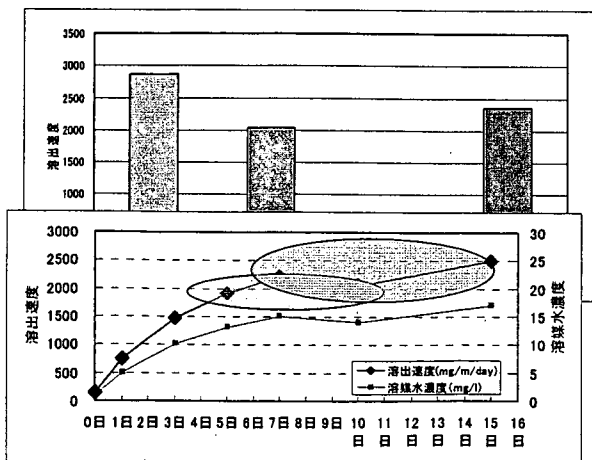


図-6 静置式の計算期間による比較例

流水式では、その直上水の滞留時間（交換速度）を予備実験で調整の上実施する必要があり、初期の不安定期間を除くと、底泥と直上水の濃度勾配が安定化し、結果、直上水濃度が安定化するとモデルを想定し、溶出速度

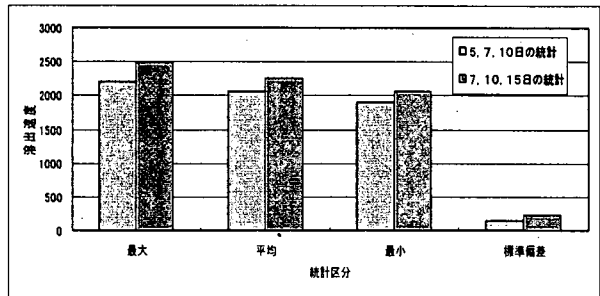
の算定を行う。図-7に示したように、連続式では、直上水濃度の変化は、溶出速度の変化と比例関係にある変化を示す。連続式では、バッチ式のような2点間の積算値の差による算定ではなく、1つの直上水濃度と直上水の交換率を用い、1つの溶出速度が算定可能である。

図-7 連続式の実験結果（溶媒水濃度と溶出速度）

これにより、先述した直上水濃度が安定しているか否かは、直上水濃度のデータ群について統計処理を行い、主に標準偏差を利用して、より安定したデータ群を抽出し、このデータ群により溶出速度を算出することが望ましい。図-8では5, 7, 10日と7, 10, 15日を統計的に比較し、標準偏差の小さい5, 7, 10日の平均値を以て溶出速度とすることとなる。この考え方は、調査結果がブレを生じた時に有効で、この先に示したモデルで考える場合、相互に近隣している3者（ないし2者）の統計値の比較から最適なデータ群を選定することとなる。

図-8 連続式の溶出速度の算定

小型装置の場合、直上水を全量分析に供するため、



想定した日数について、濃度変化が生じたと見なすこととなる。このため、予備実験で必要日数の検討を行っておく必要がある。

試験方法の留意点に関する検討では、バッチ式の室内実験において、採水方法による影響を調査した。調査の結果、採水時に生じる装置内底泥表面の揺らぎにより、直上水の DO、ORP の急速な減少が確認された。採水時の乱れを最小現に抑制する手法の適用が静置溶出実験ではきわめて重要であるとの知見を得た。

### 2.3.4 巻き上げ溶出試験の検討

巻き上げ溶出に関しては、底泥水混合比による室内実験を実施し以下の知見を得た。

底泥試料を5、10、50、100倍（水：底泥比）の希釈率で調整したスラリーを、350rpmの強度で15分間攪拌する巻き上げ操作を行った後、懸濁液中の溶存態リンとSSを分析した。底泥の巻き上げによるDOの低下率はそれぞれの実験系に含む底泥の量に依存し、DOの低下に伴うP04-Pの溶解脱離量は間隙水の側からみたTRPであるモデル計算式(1)と水の側からみたMRAである(2)によって算

定した (図-9)。

TP 溶出量の実測と推定の比較<sup>6)</sup>

$$TRP = \frac{C_s \cdot W_s \cdot \Delta SS \cdot V_w}{\rho_s (1 - W_s)} \quad (1)$$

$C_s$ : concentration of nutrients in the pore water  
 $W_s$ : water content in the sediment (0-3 or 6-9 cm)  
 $\Delta SS$ : SS in the diluted solution  
 $V_w$ : volume of the diluted solution  
 $\rho_s$ : pore water density in the sediment (0-3 or 6-9 cm)

$$MRA = \Delta C_w \cdot V_w = (C_{w2} - C_{w1}) \cdot V_w \quad (2)$$

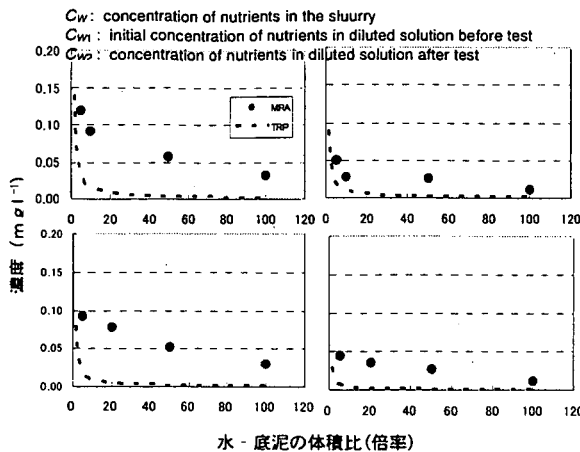


図-9 水-底泥体積比の変化に伴う TP 溶出量の実測と推定の比較<sup>6)</sup>

この結果、底泥-水混合比が溶解脱着量の推定に大きく影響することが確認された。

また、異なる孔径サイズ (1.0, 0.45, 0.20  $\mu\text{m}$ ) のろ紙による分画分析の結果 (図-10) では、P04-P 濃度に違いがほとんどみられないことから、モデル計算値より高く検出されていたリンは懸濁粒子態の浮遊残物ではなく粒子から離脱した溶解性リンであることが推測された。

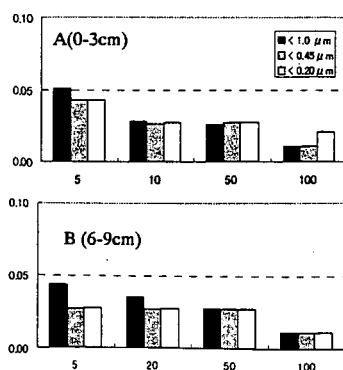


図-10 異なる孔径ろ紙による分画分析結果

この知見より巻上げ溶出試験においては、懸濁態と溶存態を区分して分析し評価する必要性が示唆された。

## 2.4 底泥の酸素消費速度の検討

### 2.4.1 底泥による酸素消費の機構

底泥中の有機物や還元物質は、生物分解や酸化反応により酸素を消費する。この現象は、微生物の活動によるものであり、その活性は水温により左右される。

### 2.4.2 底泥の酸素消費速度試験方法の検討

試験方法は、①調査地点の選定、②採泥方法、③試験方法 (装置等)、④試験条件、⑤分析項目、⑥酸素消費速度算定方法について検討を行った。

①、②については溶出試験と重複するので割愛する。

③試験方法 (装置等) は、大型装置によるモニタリング方式と、小型装置による攪拌方式がある。大型装置によるモニタリング方式が現地状況に近い実験条件を設定できるのに対し、小型装置による攪拌方式は、現地条件の再現とは異なり、一定時間あたりの最大消費速度を求めるものとなる。DO 観測の安定性や、多検体への適用性、密閉条件の安定性は小型装置が優れていると考えられる。

④試験条件は、水温、ORP が挙げられ、試験期間は、酸素の消費が指数関数的な現象であること、試料により酸素消費の時間的変化が大きいため等を踏まえ、初期は頻度を多く測定する必要がある。可能であれば、DO 計の記録をレコーダー等に収録しておくのが良い。当所の実施した巻上げ実験では初期の低下 (5 分以内) が極めて重要である。

⑤分析項目は、水温、DO、ORP 以外では、還元物質 (硫黄化合物) の測定が挙げられる。

⑥酸素消費速度の算定方法は、図-11 に示した「底質調査試験マニュアル」<sup>2)</sup> に記載されているモデルでは、DO の低減が一定傾向を示した時期の変化を元に算出するように示されている。実際の試料では、DO の低減が初期に集中しその後緩慢になる場合もみられることから、酸素消費速度の算定に用いるデータ期間の判断には注意を要する。

$$SOD = \frac{\sum \{(V - \sum V_n - 1) \cdot (C_n - C_{n-1})\}}{A}$$

SOD：第n回目までの底泥酸素消費量 (mg/m<sup>2</sup>)

A：底泥断面積 (m<sup>2</sup>)

V：初期頂上水量 (l) (リットル)

V<sub>n</sub>：n回目の採水量 (l) (リットル)

C<sub>n</sub>：n回目までの純酸素消費量 (mg/l)

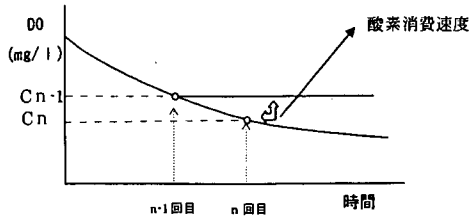


図-11 酸素消費速度の算定方法<sup>2)</sup>

## 2.5 溶出試験・酸素消費速度試験方法の比較検討

### 2.5.1 溶出試験

①「建設省河川砂防技術基準(案)同解説 調査編、建設省河川局監修、社団法人日本河川協会」、②「底質の調査・試験マニュアル 改訂版 平成7年3月 底質浄化協会 編」、③「湖沼環境調査指針、社団法人日本水質汚濁研究会編、公害対策技術同友会」の各マニュアルを比較検討したところ、大きな相違点は直上水の入れ換えに関する事項であった。①河川砂防技術基準は連続注入・押し出し排水であり、流量は直上水が完全に混合するよう設定するようになっているが、②底質の調査・試験マニュアルは入れ換え、補充を行わない。③湖沼環境調査指針は、採取した分を補充する方式となっている。①河川砂防技術基準は底泥表面の流速も実験上の測定対象となっており、明確に河床泥での溶出現象に特化している。

底泥溶出試験に関する文献を28件収集した。溶出機構(静置溶出、巻き上げ溶出)の検討、現地測定装置に開発検討等多岐に渡っており、今後詳細な検討をさらに加える必要がある。

### 2.5.2 酸素消費速度

①「建設省河川砂防技術基準(案)同解説 調査編、建設省河川局監修、社団法人日本河川協会」<sup>1)</sup>、②「底質の調査・試験マニュアル 改訂版 平成7年3月 底質浄化協会編」<sup>2)</sup>の各マニュアルを比較検討したところ、溶出試験同様に大きな相違点は直上水の入れ換えに関する事項であった。①河川砂防技術基準は連続注入・押し出し排水であり、流量は直上水が完全に混合するよう設定するようになっているが、②底質の調査・試験マニュアルは入れ換え、補充を行わずサイホンで採水する方式を採っている。①河川砂防技術基準は底泥表面の流速も実

験上の測定対象となっており、明確に河床泥での酸素消費現象に特化している。

底泥溶出試験に関する文献を4件収集した。酸素消費を静置状態、巻き上げ状態で検討したもの、現地測定装置による検討等であった。今後詳細な検討をさらに加える必要がある。

## 2.6 溶出試験の規格化に当たっての主な課題への対応

主な課題と対応を表-1に整理した。

表-1 溶出試験の規格化に当たっての主な課題と対応

1. サンプルング手法
特に試験供試料の対象水域に対する代表性をケーススタディーや統計処理により検討する。
2. 試験方法の比較
同一供試泥による、異なる試験方法間の比較を行う。
3. 試験方法別留意点整理
①底泥に関する実験結果から、バッチ式室内実験における試験期間の検討を行った結果、これまで15~20日間が必要と思われていた実験期間は、10日間程度でも安定する場合があるとの知見を得た。
②巻き上げ溶出を検討する試験からは、水と底泥の割合が重要であること、現象評価の観点から溶存態と懸濁態の分析結果が必要であるとの知見を得た。
③試験操作の詳細について留意点の整理を行ったため、今後項目ごとの検討を行う必要がある。
4. 溶出現象、酸素消費現象の機構解明
底泥中のりん化合物の存在形態を検討することで、溶出機構を検討する。
5. 試験結果の評価
①バッチ式、連続式の室内実験について試験結果から溶出速度を算定する考え方を本調査で示した。
②現地実験装置による評価に関して検討が必要である。

## 3. 河川水質調査方法の体系化

### 3.1 河川水質調査方法の体系化の考え方

河川管理者が行う河川水質調査等の項目、頻度の増加に伴い、調査結果の利用、測定項目の選定が必ずしも十分検討されていない場合もある現状を踏まえ、河川管理者の調査目的の明確化、目的に沿った合理的な調査計画の立案を念頭に要領の作成を行った。

#### 3.1.1 対象範囲

対象とする水域は、河川、湖沼及びこれらの周辺の地下水を対象とし、ダム、堰については既存要領(「ダム貯水池水質調査要領」、「堰水質調査要領」)によるものとした。また、水質事故についても調査対象から除いた。

#### 3.1.2 対象とする目的

対象とする目的を①河川管理上必要な水質調査、②利水のための水質調査、③公共用水域監視のための水質調



査、④河川底質調査、⑤汚濁解析に必要な水質調査、⑥事業実施・事業評価のための水質調査に整理し、これらの目的に応じた水質調査の考え方を取りまとめた。

### 3.1.3 水質調査計画の策定・見直し

調査計画の策定・見直しについて、①河川と流域の特徴把握、②他機関との連携、協力、③水質問題の抽出、④事前調査(基礎調査)、⑤水質保全(改善)目標の検討、⑥水質調査内容の検討、⑦水質調査計画書の作成、⑧水質調査の実施、⑨結果のとりまとめと利用、⑩水質問題に対する水質保全対策の検討、⑪水質調査計画の見直し。の11点に整理し、これらに沿って水質調査要領のとりまとめを行った。

### 3.1.4 水質調査計画書の策定

体系的、継続的な水質調査が行われるよう、水質調査計画書を現場で策定することとし、これに基づき水質調査を行う体系とした。

## 3.2 河川水質調査要領(案)

河川水質調査要領(案)を表-2のようにとりまとめた。

1. 総説
2. 調査対象水域の空間特性を踏まえた調査点・調査項目・調査頻度の考え方
3. 調査対象時の時間特性を踏まえた調査点・調査項目・調査頻度の考え方
4. 河川管理上必要な水質調査
5. 利水のための水質調査
6. 公共用水域監視のための水質調査
7. 河川底質調査
8. 汚濁解析に必要な水質調査
9. 事業実施・事業評価のための水質調査
10. 試料の採取及び現地調査
11. 調査結果の整理方法

### 3.3 河川底質調査

河川管理者にとって、河床泥や、ダム、湖沼の底泥からの有機物や窒素、リンの溶出量を把握することは、水域の管理の観点から重要である。溶出量を把握する底泥溶出実験は、従来は各々の河川管理者が既往の知見のなかから、自ら手法を選択し、実施してきたため、各調査結果の比較を行う場合、手法の違いが常に課題となって

いた。

今回、試験期間の設定新たに得られた知見および、既往知見の整理・検討、各地方整備局の検討結果、「底質の調査・試験マニュアル」<sup>2)</sup>等を基に、体系化の遅れていると考えられる底泥溶出速度試験と底泥の酸素消費速度試験について底泥溶出試験方法の規格化を表-3のように行った。今後も底泥に関する調査検討は重点研究プロジェクトとして継続する。

7. 河川底質調査
7.1 調査の目的
7.1.1 底質調査の目的
7.1.2 底質の定義
7.1.3 底質調査計画立案に当たっての留意点
7.2 関係法及び基準
7.2.1 関係法令・通知
7.2.2 基準
7.3 調査対象の特性を踏まえた調査地点、調査項目、頻度の考え方
7.3.1 河川管理上必要な調査
7.3.2 公共用水域の水質調査に伴う調査
7.3.3 事業実施のための調査
7.3.4 底質調査結果の評価と活用
7.4 底質試験方法
7.4.1 底泥溶出速度試験
7.4.2 酸素消費速度試験

## 4. まとめ

- 1) 国土交通省、地方整備局水質担当者、地方整備局技術事務所と連携し、河川管理者が実施する水質調査に合った調査計画作成のための、調査項目、調査地点、調査頻度などについて考え方を整理した。
- 2) これらを体系的に河川水質調査要領(案)として初めてまとめた。
- 3) 河川砂防技術基準(案)では具体の記述が少ない溶出試験方法について、既存溶出試験方法、国土交通省が実施した溶出試験の結果を整理検討の上、河川底質調査における試験方法を具体的に水質調査要領に(案)にまとめた。
- 4) 課題として、比較が十分できなかった試験方法の検討や改良を検討する必要がある。今後、重点プロジェクト研究である底泥水間の研究において、本要領(案)の課題や諸外国の技術開発情報などを参考に調査計画方法、調査試験方法の改良・開発など現場技術の改善を行う。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

## 5. 参考文献

- 1) 建設省河川局監修、社団法人日本河川協会「建設省河川砂防技術基準（案）同解説 調査編、」1997
- 2) 底質浄化協会編：「底質の調査・試験マニュアル」1993
- 3)、社団法人日本水質汚濁研究会編、公害対策技術同友会「湖沼環境調査指針」1982
- 4) 建設省土木研究所下水道部水質研究室：「河川および湖沼の底泥からの栄養塩類の溶出」（土木研究所資料第1165号）1976
- 5) 向田隆史他：「中海底泥（米子湾）について」建設省出雲工事事務所報告書 1979
- 6) Jianhua Li, Junnosuke Wada, Minoru Sasaki and Hiroaki Tanaka (2002.10) Simulated Dredging for Evaluation of Release of Phosphorus from lake Sediments. 5TH International Symposium on Sediment Quality p32, Chicago, USA.



## 2. ダイオキシン類の存在形態とモニタリング ・分析手法に関する研究（水質）

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

### 1. はじめに

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

本研究では、抗原抗体法（ELISA法）やAhレセプターバインディングアッセイ法などを用いた簡易な分析技術の開発と分析精度管理手法の簡易化について検討を行った。

### 2. 研究方法

#### 2.1 簡易分析技術の開発

河川底質のダイオキシン類対策を実施することを想定した場合、公定法での監視の他に①調査段階では汚染範囲の確認調査、②工事段階では工事境界での底質の巻き上げ状況把握、上下流への輸送状況の監視、工事区域外の水質、底質への影響、中間処理・処分施設等の監視を行う必要がある。また、③工事終了後においては汚染現場の改善効果の把握、底質処分場の環境影響を監視する目的でモニタリングを実施する必要がある<sup>1)</sup>。

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

簡易分析技術に関する既往の報告<sup>2)~10)</sup>から底質への応用の可能性のある技術をまとめ表-1に示した。

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

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

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

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

⑤の方法は、ダイオキシン類の生物への毒性発現メカニズムを用いた方法である。Ahレセプターに結合する物質があるとルシフェラーゼを誘導する遺

表-1 簡易分析技術

簡易分析技術	文献
① 四重極GC/MSによる方法	2)3)
② 四重極イオンラップ型GC/MS/MSによる方法	4)5)
③ 免疫測定（ELISA）による方法	6)
④ Ahレセプターバインディングアッセイによる方法	7)
⑤ 生物検定による方法	8)9)
⑥ 半・難揮発性有機ハロゲン化合物（SNVOX）を測定する方法	10)

伝子を組み込んだヒト肝細胞を用いている。

⑥の方法は、半・難揮発性有機ハロゲン化合物 (SNVOX) を測定するものである。ダイオキシン類は、難揮発性有機ハロゲン化合物であることからダイオキシン類の代替指標として検討されている。測定に用いる全有機ハロゲン (TOX) 計は比較的安価で操作も簡便なことから容易に結果を得ることができる。

以上、これらの方法は、分析精度に課題はあるものの、公定法に比べ前処理の簡易化も行っていることから分析結果を得るまでの時間も短縮でき、また、分析費用も安価となる可能性のある技術である。

## 2. 2 免疫抗体による簡易分析法の河川底質の測定利用性の検討

本研究では、平成 12 年度より積水化学工業 (株)・(株) 矢内原研究所・大塚製薬 (株)・東洋建設 (株) と、また、平成 13 年度より (株) クボタ、第一ファインケミカル (株) と簡易分析技術に関する共同研究を実施した。

積水化学工業 (株)・(株) 矢内原研究所・大塚製薬 (株)・東洋建設 (株) は、ウサギ抗ダイオキシンポリクロナール抗体を用いた ELISA 法 (以下、ELISA<sub>Eco</sub> 法)、(株) クボタは、ダイオキシン類の識別にアリアル炭化水素 (Ah) レセプターバインディング法、そしてその検出過程に免疫測定法を利用した方法 (以下、Ah-IR 法)、第一ファインケミカル (株) は、マウス抗ダイオキシンモノクロナール抗体を用いた ELISA 法 (以下、ELISA<sub>D12</sub> 法) による簡易分析手法である。

以下の手順でこれらの簡易分析法の検討を行った。

### 1) ダイオキシン類標準物質に対する交差性と検出下限値

### 2) 国土交通省ダイオキシン類実態調査における河川底質試料を用いた適用性の比較

ここで、測定前処理の底質からの抽出については、風乾した試料を高速溶媒抽出法により行い、精製については、硫酸処理と多層シリカゲルカラムクロマトグラフあるいは多層クロマトグラフィーとアルミナカラムによる精製方法を適用した。抽出条件はトルエンを抽出溶媒として、抽出時間 10 ないし 15 分、圧力 2000psi、オープン温度 150℃、サイクル数は 1 ないし 2 回である。抽出溶媒は揮散させ、最終的にジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解させた。また、検討に使用した河川底質は平成 12 年度および 13 年度の国土交通省が実施した全国一級河川ダイオキシン類調査において同一地点で採取され、保存されていた底質試料を用いた。

## 2. 3 同一試料を用いたダイオキシン類簡易検出手法の比較検討

簡易分析手法の検討・評価にあたり、乾燥法、抽出法、精製法、測定法を組み合わせた分析手法で行うことは重要である。このため、図-1 に示すように、抽出条件としてソックスレー抽出、高速溶媒抽出、加熱流下法を増やし、精製方法として多層シリカと三層シリカ、さらに活性アルミナと活性炭吸着を適宜組み合わせ合わせた場合を検討した。また、簡易分析は、前述した免疫測定法その他、四重極 GC/MS、SNVOX を用いた場合と HRGC/HRMS を用いる場合とを比較した。本研究では、比較的汚染濃度が高い地域で採取した同一試料を用いて乾燥・抽出・精製と種々の検出手法との組み合わせ技術について、リサイクルチームと連携して研究を進めた。

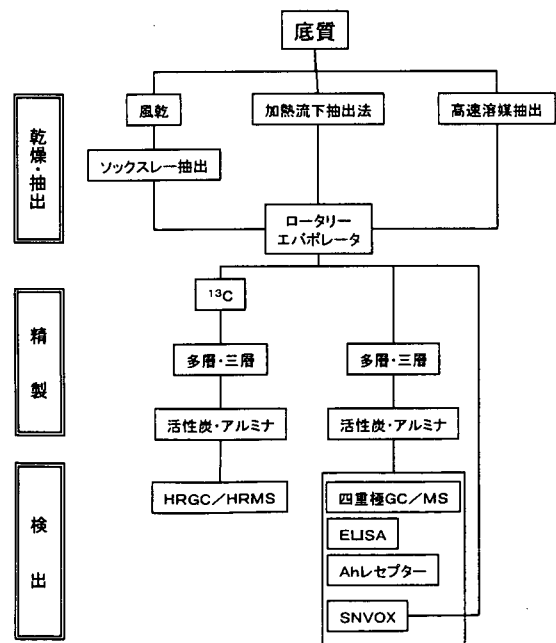


図-1 ダイオキシン類簡易分析技術の比較検討

## 2. 4 ダイオキシン類簡易分析技術の適用性の評価方法

ダイオキシン類簡易分析技術の現場への適用性の評価方法について検討するため具体的な現場での活用方法についてイメージし、模擬的な適用を試みた。一例として、汚染範囲の推定に当たり汚染区域をメッシュ状に切り調査する場合を想定し、公定法の値を推定するために必要となる公定法と簡易法の関係(回帰式)を求める時の試料検体数の検討を行った。

## 2. 5 精度管理手法の検討

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

## 3. 研究結果

### 3. 1 簡易分析技術の開発要件の整理

河川底質のダイオキシン類対策にあたって必要となる簡易モニタリング技術の要件を、表-2 に示し、整理した。対策実施前の調査(調査段階)では、汚染範囲確認調査と工事の影響範囲調査がある。特に底質対策の範囲を確定するためには、公定法に基づかねばならないが、最終的に公定法で測定する範囲に絞り込むために時間がかからず、費用が安い方法が期待される。また、対策実施中の調査(工事段階)や中間処理・処分施設では、水中のダイオキシン類の工事境界と工事区域外での濃度が短時間で得られる方法が望まれる。連続モニタリングが可能或いは短時間で結果が得られる方法が望まれる。施工中、底質処分場からの漏出の有無を監視する目的で行うモニタリングは、水中のダイオキシン類が短時間で結果が得られる方法が望まれる。対策実施後の調査(工事終了後)については、汚染現場の改善効果を確認するため、公定法を用いるための補助手段として低コストの底質分析方法が望まれる。また、底質処分場は、工事終了後に底質処分場の環境影響を把握するため短時間で結果が得られる水質分析方法が望まれる。本研究では、主に汚染範囲を確定の補助として用いる底質の簡易測定法を検討する。水中のダイオキシン類の連続的モニタリングについては、河川生態チームの濁質による方法を主に用いることになる。

表-2 河川底質のダイオキシン類対策にあたって必要となる簡易モニタリング技術の要件

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

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

### 3. 2 免疫抗体による簡易分析法の河川底質の測定利用性の検討

#### 3. 2. 1 ダイオキシン類標準物質に対する交差性と検出下限値

共同研究で用いた簡易測定キット(ELISA<sub>Eco</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>)の特徴の一つにダイオキシン類に対する交差反応性が挙げられる。特に、Ah-IRは、多くの多環芳香族炭化水素に対しても交差反応性を有している。ここでは、ダイオキシン類に対する交差反応性のうち毒性等価係数(TEF)を有するダイオキシン類に

対する交差反応性を表-3に示した。ダイオキシン類は、その濃度を表す際に各異性体にそれぞれ固有のTEFを乗じた後、総量を毒性等量 (TEQ) として表す。一方、ダイオキシン類の異性体 (以下、異性体) 毎に交差率の異なる簡易測定キットで検出した値 (濃度) は、2,3,7,8-TCDD 相当量 (DEQ) として表している。TEF と交差率が全く同じ異性体に対して公定法と簡易測定キットによる測定値 (以下、測定値) は TEQ と DEQ が同じ数値となる。TEF に比べ交差率が小さい場合、公定法より測定値が小さく、逆に TEF に比べ交差率が大きい場合、公定法より測定値が大きくなる。このように TEF に対する交差率の値はキットの特徴を表す重要なファクターである。ELISA<sub>Eco</sub> の交差率は、TEF を有する 29 異性体のうち 15 異性体は 1 以上、14 異性体は 1 より小さくなっている。Ah-IR の交差率は、26 異性体が 1 以上、3 異性体は 1 より小さい。ELISA<sub>Dt2</sub> の交差率は、3 異性体は 1 以上、26 異性体は 1 より小さい。

ELISA<sub>Eco</sub> は、ほとんどのポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン(PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)に対して TEF より交差率の方が小さく、Co-PCB に対しては逆に交差率の方が大きい。PCDD、PCDF の存在量の少ない試料に対しては、公定法より測定値が小さくなり、コプラナーポリ塩化ビフェニル(Co-PCB)の存在量が多い試料に対しては、公定法より測定値が大きくなる特徴を有している。

ELISA<sub>Dt2</sub> は、2,3,7,8-TCDD、2,3,7,8-TCDF、2,3,4,7,8-PCDF、Co-PCB の#77 にのみ交差率を持つキットであるが、2,3,4,7,8-PCDF の交差率は TEF より小さい値であり、2,3,4,7,8-PCDF の存在量が多い試料では公定法より測定値が小さくなる。また、2,3,7,8-TCDF、Co-PCB の#77 の交差率は TEF より大きな値となっており、これらの存在量が多い試料では公定法より測定値が大きくなるという特徴を持っている。しかし、実試料の測定においては前処理により 2,3,7,8-TCDD 以外の異性体を除去する方法を採用している。

Ah-IR は、1,2,3,7,8-PCDD、2,3,7,8-TCDF、1,2,3,4,7,8-HCDF の交差率は TEF より小さいが、この他はすべて大きい。これら 3 化合物の存在量が多い試料では公定法より測定値は小さくなるが、これら 3 異性体以外の異性体の存在量が多い試料では公定法より測定値が大きくなるという特徴を有している。

表-3 異性体のTEFと測定キットの交差反応性及び実測濃度(中央値)に占める各異性体の割合

異性体	TEF	交差反応性			実測濃度に占める割合 (%)
		ELISA <sub>Eco</sub>	ELISA <sub>Dt2</sub>	Ah-IR	
P C D D	2,3,7,8-TCDD	1	1	1	0
	1,2,3,7,8-PCDD	1	0.1	<0.001	0.023
	1,2,3,4,7,8-HCDD	0.1	0.003	<0.001	0
	1,2,3,6,7,8-HCDD	0.1	0.001	<0.001	0.11
	1,2,3,7,8,9-HCDD	0.1	0.003	<0.001	0.13
	1,2,3,4,6,7,8-HCDD	0.01	0.002	<0.001	3.3
	OCDD	0.0001	<0.001	<0.001	58
P C D F	2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1	0.33	0.028
	1,2,3,7,8-PCDF	0.05	0.006	<0.001	0.032
	2,3,4,7,8-PCDF	0.5	0.6	0.002	0.042
	1,2,3,4,7,8-HCDF	0.1	0.005	<0.001	0.067
	1,2,3,6,7,8-HCDF	0.1	0.004	<0.001	0.035
	1,2,3,7,8,9-HCDF	0.1	0.002	<0.001	0
	2,3,4,6,7,8-HCDF	0.1	0.002	<0.001	0.074
	1,2,3,4,6,7,8-HCDF	0.01	<0.001	<0.001	0.80
	1,2,3,4,7,8,9-HCDF	0.01	<0.001	<0.001	0
	OCDF	0.0001	<0.001	<0.001	1.4
C o - P C B	3,4,4',5'-TeCB (#81)	0.0001	0.01	<0.001	0
	3,3',4,4'-TeCB (#77)	0.0001	0.02	0.05	1.9
	3,3',4,4',5'-PeCB (#126)	0.1	0.01	<0.001	0
	3,3',4,4',5,5'-HxCB (#169)	0.01	<0.001	<0.001	0
	2',3,4,4',5'-PeCB (#123)	0.0001	<0.001	<0.001	0.16
	2,3',4,4',5'-PeCB (#118)	0.0001	0.01	<0.001	19
	2,3,3',4,4'-PeCB (#105)	0.0001	0.007	<0.001	8.0
	2,3,4,4',5'-PeCB (#114)	0.0005	0.004	<0.001	0.27
	2,3',4,4',5,5'-HxCB (#167)	0.00001	0.002	<0.001	0.86
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#156)	0.0005	0.005	<0.001	2.3
	2,3,3',4,4',5'-HxCB (#157)	0.0005	<0.001	<0.001	0.48
	2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (#189)	0.0001	0.002	<0.001	0

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

次に、底質の異性体構成の概略を知る目的で平成13年度、国土交通省が実施した河川底質ダイオキシン類実態調査のデータを用い、底質のダイオキシン類異性体構成比を整理し図-2に示した。なお、整理に用いたデータ数は238、ダイオキシン類濃度は0.24~63 pg-TEQ/g (中央値0.57 pg-TEQ/g)である。TEQ換算する前の実測濃度で計算すると全体濃度に対する各異性体の割合は、1,2,3,4,6,7,8-H7CDDが3.3%、O8CDDが58%、O8CDFが1.4%、Co-PCBの#77が1.9%、#118が19%、#105が8%、#156が2.3%であった。しかし、各異性体の実測濃度にTEFを乗じ、TEQ濃度で示すと実測濃度で整理した異性体構成パターンと大きく異なっており、1,2,3,7,8-P5CDD、1,2,3,6,7,8-H6CDD、1,2,3,7,8,9-H6CDD、1,2,3,4,6,7,8-H7CDD、O8CDD、2,3,7,8-T4CDF、2,3,4,7,8-P5CDF、1,2,3,4,7,8-H6CDF、1,2,3,6,7,8-H6CDF、2,3,4,6,7,8-H6CDF、1,2,3,4,6,7,8-H7CDFが全体の1%以上で存在している。

図-2に示す代表的なダイオキシン類異性体構成比のダイオキシン類からなる底質に対して、理論換算DEQは、ELISA<sub>Eco</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>を用いて測定すると、その値は公定法のTEQに比べ3倍、8倍、0.7倍となる。従って、全国平均的な底質に対しては理論的には、公定法によるTEQに比べ、理論換算DEQは、ELISA<sub>Eco</sub>、Ah-IRが過大、ELISA<sub>DT2</sub>が過小となることが予想される。ダイオキシン類の底質対策としてもっとも利用性が高いと考えられる汚染範囲の確定の補助としての利用では、すでに代表的なダイオキシン類の異性体の構成がわかっているため、各キットの交差反応性を考慮した理論的DEQを算定し、もっともTEQに近いものを選択することが考えられる。ただ、現実の底質には、TEFを持たないダイオキシン類が存在すると考えられるが、キットの中には、TEFを持たない異性体との交差率を持つ場合があり、さらにダイオキシン類以外にも交差反応性を持つ物質が存在している可能性がある。現在のところ測定を妨害する主要な物質との交差反応性は十分にはわかっていない。従って、妨害性のある物質のクリーンアップによる精製を行うなどの方法を経験的に組み合わせることが重要と考えられる。

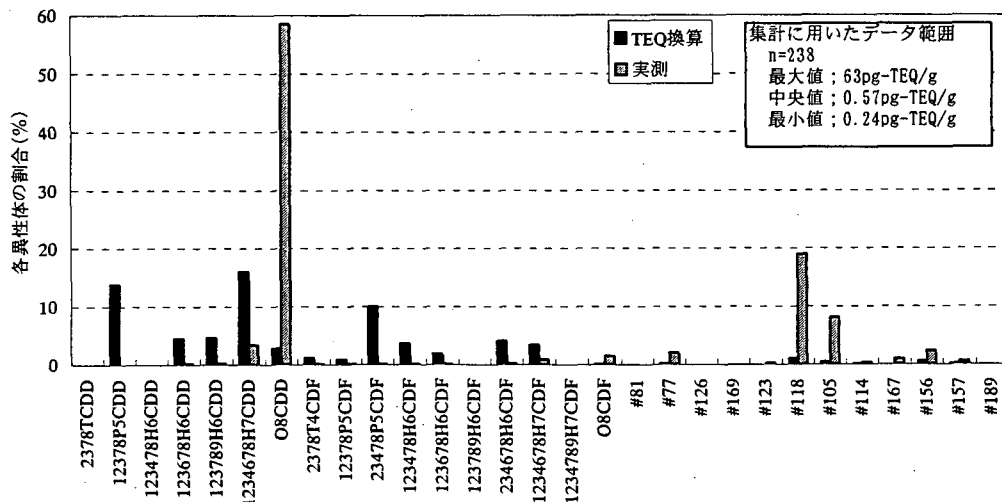


図-2 total TEQ/総実測濃度に占める各異性体の割合

また、各キットの検出下限値、定量下限値を表-4に示した。キットごとに検出性や定量性の定義が異なるため、本研究では各キットとも定量下限値付近の濃度で標準液を繰り返し測定した結果から標準偏差(σ)を求め、その3倍を検出下限値、10倍を定量下限値として比較した。

定量に必要な2,3,7,8-TCDDの絶対量は、ELISA<sub>Eco</sub>法が265pg、Ah-IRが0.4pg、ELISA<sub>DT2</sub>法が140pgであり、Ah-IRの感度が高い。

それぞれの測定法で推奨されている乾燥底質の量が5~100gまでと大きく異なるので、結果的には底質の定量下限は2,3,7,8-TCDD換算で、ELISA<sub>Eco</sub>法が26.5pg/g、Ah-IRが0.08pg/g、ELISA<sub>DT2</sub>法が1.4pg/gとなる。



表-4 各キットの検出下限値と定量下限値

キット名	検出下限値			定量下限値		
	下限濃度 (pg/g)	試料使用量 (g)	絶対必要量 (pg)	下限濃度 (pg/g)	試料使用量 (g)	絶対必要量 (pg)
ELISA <sub>Eco</sub>	8	10	80	26.5	10	265
ELISA <sub>DT2</sub>	0.43	100	43	1.4	100	140
Ah-IR	0.024	5	0.12	0.08	5	0.4

### 3. 2. 2 国土交通省ダイオキシン類実態調査における河川底質試料を用いた比較

#### ELISA<sub>Eco</sub>

底質 7 サンプルについて公定法及び ELISA 法でそれぞれ測定した結果を図-3 に示した。ELISA 法の測定値は公定法と比較して高値を示し、公定法と ELISA 法の間には良好な相関は認められなかった。また、回帰式の傾きが 18.87 で公定法に比べ ELISA<sub>Eco</sub> は 20 倍程度大きな値を示し、また切片も 395pg/g と大きい。

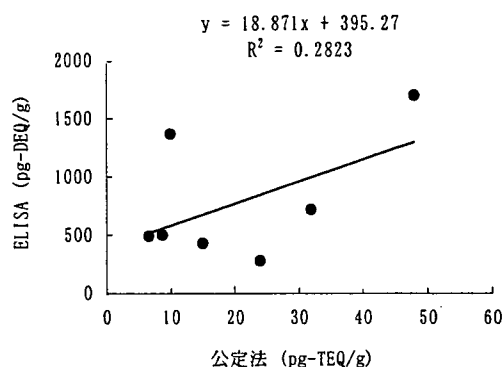


図-3 7 地点の河川底質を用いた公定法と ELISA<sub>Eco</sub> の比較

#### Ah-IR

底質 75 サンプルについて公定法及び ELISA 法でそれぞれ測定した結果を図-4 に示した。Ah-IR 法の測定値は、公定法との間にやや低いながら相関が認められたが、多くの試料で十数倍高い値を示した。これは、前述したように Ah-IR の交差率は多くの異性体について TEF より大きな値となっており公定法より測定値が大きくなる特徴を有していることが原因と考えられる。

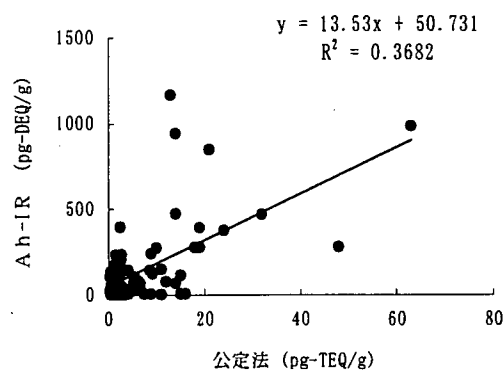


図-4 75 地点の河川底質を用いた公定法と Ah-IR の比較

#### ELISA<sub>DT2</sub>

底質 101 サンプルについて公定法及び ELISA 法でそれぞれ測定した結果を図-5 に示した。両者の相関はやや低いながら認められ、傾きが 0.3368 と公定法より ELISA 法の測定値の方が 0.3 倍と小さくなっている。これは、交差率が限られた異性体にしか存在しないことが原因と考えられる。

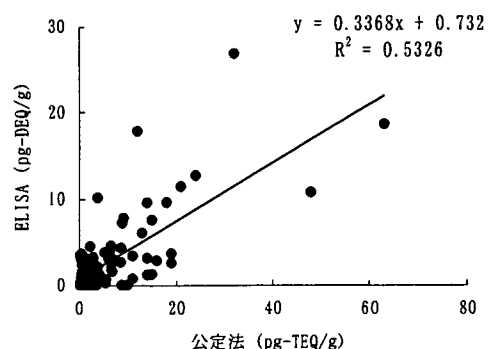


図-5 101 地点の河川底質を用いた公定法と ELISA<sub>DT2</sub> の比較

次に、これらのデータについてダイオキシン類異性体実測濃度に交差率を乗じた理論換算 DEQ 濃度 (pg-DEQ/g) と実測濃度 (pg-DEQ/g) を比較検討した。その関係を図-6、図-7、図-8 に示した。

ELISA<sub>Eco</sub> は、理論換算 DEQ に対し実測 DEQ が大きいものが多いが、小さくなる場合もある。精製過程での交差反応物質の除去等、前処理の改良が必要である。

Ah-IR は、ほとんどの試料において理論換算 DEQ に対し実測 DEQ が数倍大きな値となっており、多くの TEF をもつ異性体や TEF を持たない多くの物質との反応が示唆される。

ELISA<sub>DT2</sub>は、Ah-IR同様、ほとんどの試料において理論換算DEQに対し実測DEQが大きい。精製過程での交差反応物質の除去等、前処理の改良が必要である。

ただし、これらの比較に当たって、注意すべきことは、ここで使用した試料数は同じではなく、環境基準を下回る低濃度の試料であること、異なる河川、地点での試料を基にしていること、使用した試料量は同じでなく、抽出と精製の方法もなどの前処理法が少し異なっていることである。このため、次に述べる同一の試料での比較を行う必要があり、免疫抗体による方法以外の方法も検討対象とする必要がある。

これまでの結果から、対象とした免疫測定系はきわめて高感度のものが含まれるが、各キットともTEFと交差率が同じではなく、またTEFを持たない多くの物質に交差するため、測定値が過小となる場合、逆に過大となる場合が生じる。

### 3.3 同一試料を用いたダイオキシン類簡易分析技術の比較検討

ダイオキシン類の簡易分析は乾燥、抽出、精製の前処理との組み合わせにより可能となる。ここでは、リサイクルチームと連携し、前処理と測定との組み合わせ技術による検討を行った結果のなかから、前処理が同じ試料を用いて検出法の比較検討を行った結果を報告する。

本検討は、出来るだけ類似の底質を用いて行うため同一河川で採取した試料を用いることとした。本検討に用いた底質試料は、関西地方のK河川で採取した。13検体の採取試料から、強熱減量、四重極GC/MSによるOCDD、TOXの測定結果からダイオキシン類が比較的高濃度で存在すると思われる9試料を選定した。更に、選定した9試料の公定法による測定結果から異性体構成がほぼ同じ8試料を検討試料とした。選定した8試料のダイオキシン類濃度は、140~330pg-TEQ/gである。Total TEQに占める各異性体の割合を図-9に示した。

2,3,7,8-TCDD、1,2,3,7,8-PCDD、2,3,4,7,8-PCDF、2,3,4,6,7,8-HCDF、3,3',4,4',5-PeCB(#126)の割合が比較的大きい試料である。ここでは、公定法による乾燥・抽出・精製を行った試料を用い、前述したELISA<sub>ECCO</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>に四重極GC/MSによる方法を加えた4検出法について比較検討を行った結果を述べる。

四重極GC/MS法は多くの異性体の中から特定の異性体だけを選択し、その異性体の存在濃度を測定し、公定法によって測定されたTEQとの相関をとって、四重極GC/MSで測定された特定の異性体の濃度をもとに未知試料のTEQを推定する方法である。本検討ではPCDD、PCDFの各異性体のうちTEFを有する17異性体の測定を試みた。

公定法で求めたダイオキシン類濃度 (pg-TEQ/g) とそれぞれの簡易検出法で求めた値との関係を図-10、図-11、図-12、図-13に示した。四重極GC/MSによる方法では2,3,7,8-TCDDを一例とした。

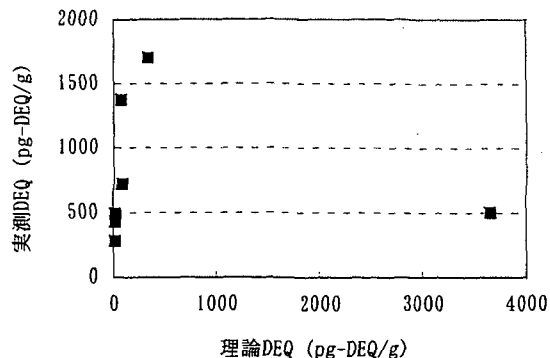


図-6 ELISA<sub>ECCO</sub>の理論換算DEQ濃度と実測DEQ濃度の比較

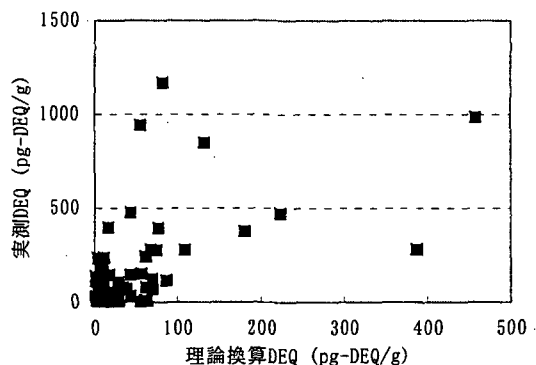


図-7 Ah-IRの理論換算DEQ濃度と実測DEQ濃度の比較

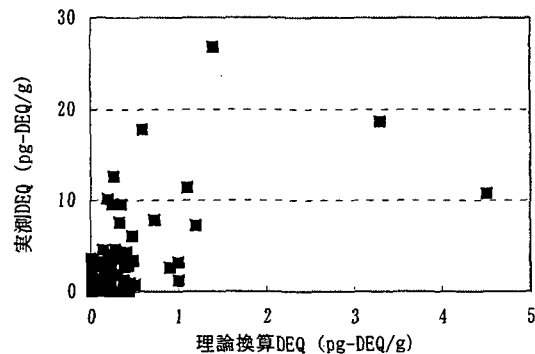


図-8 ELISA<sub>DT2</sub>の理論換算DEQ濃度と実測DEQ濃度の比較

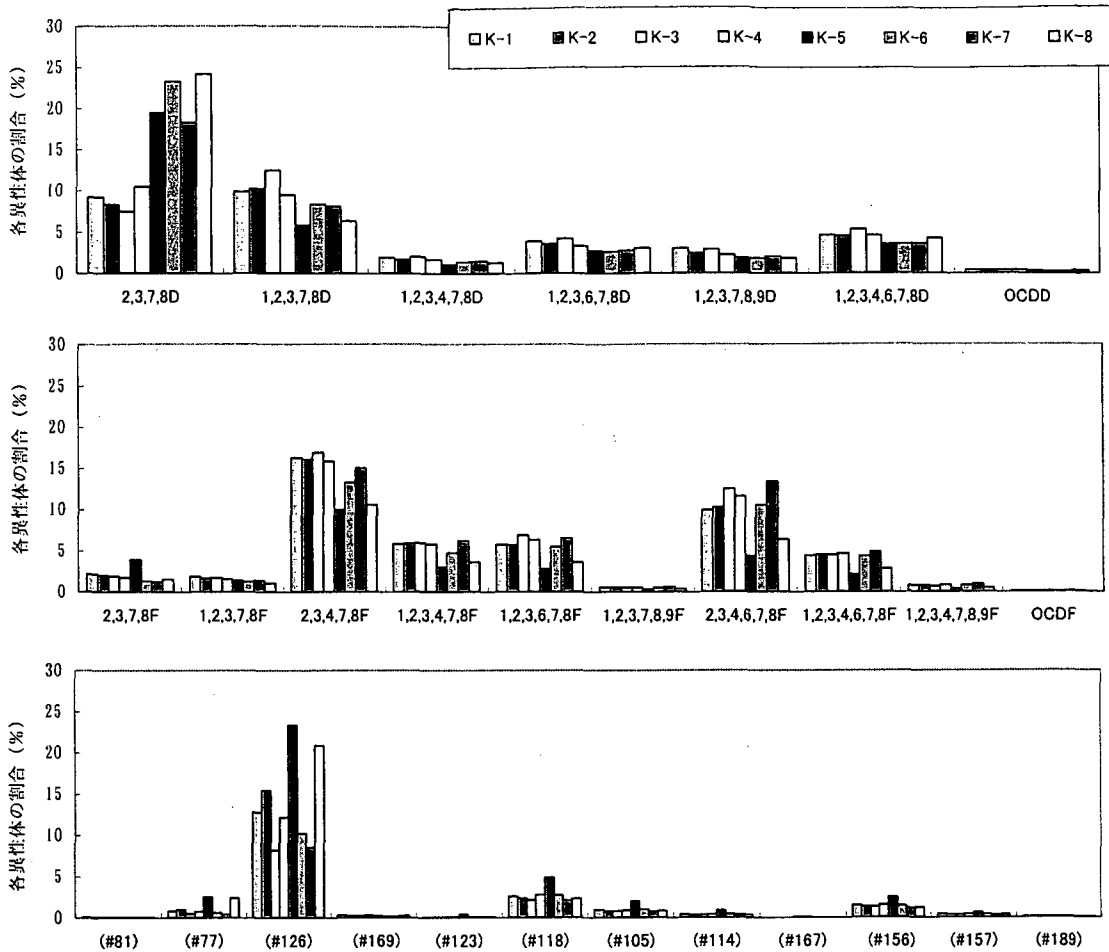


図-9 total TEQに占める各異性体の割合

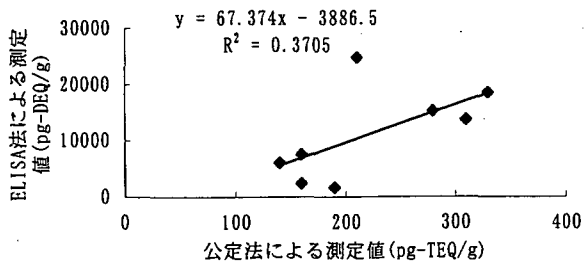


図-10 公定法のTEQとELISA<sub>Eco</sub>法でのDEQとの比較

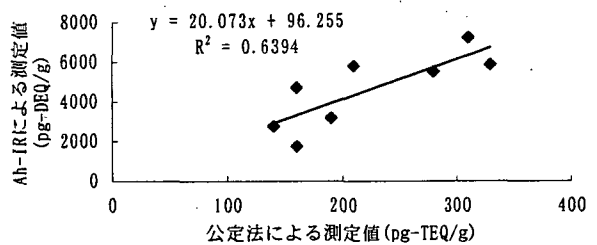


図-11 公定法のTEQとAh-IR法でのDEQとの比較

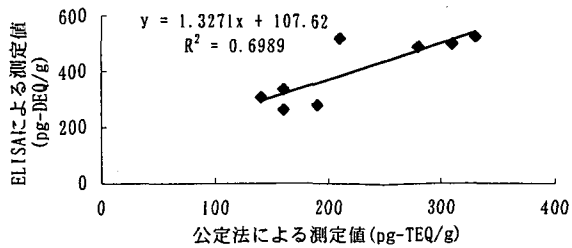


図-12 公定法のTEQとELISA<sub>DT2</sub>法でのDEQとの比較

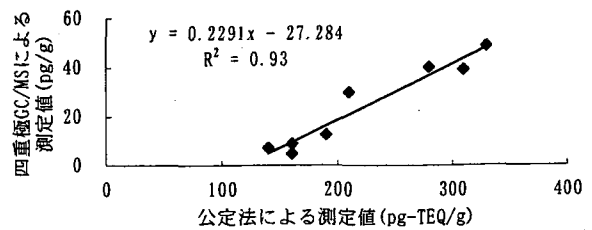


図-13 公定法のTEQと四重極GC/MS法による2,3,7,8-TCDD測定値の比較

ELISA<sub>ECO</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>については、試料数が少ないものの図-3、図-4、図-5に示した異なる河川・地点での底質を用いた結果と比べると相関が良くなっている。

四重極 GC/MS による方法では 2,3,7,8-TCDD を含め 17 異性体について相関を評価した。その結果を表-5 に示した。total TEQ に占める割合が高い異性体が比較的高い相関を示す傾向が見られる。このことは、四重極 GC/MS による方法を用いる場合は、total TEQ に占める割合が高い異性体を選択することが望ましいことを示唆している。

表-5 公定法のTEQ(x)と四重極GC/MSによる各異性体の測定値(y)の関係

異性体	回帰式	R <sup>2</sup>	異性体	回帰式	R <sup>2</sup>
2,3,7,8-TCDD	y=0.2291x-27.284	0.930	2,3,4,7,8-PCDF	y=0.0881x+10.177	0.413
1,2,3,7,8-PCDD	y=0.0645x-1.1043	0.710	1,2,3,4,7,8-HCDF	y=0.0722x-5.2844	0.760
1,2,3,4,7,8-HCDD	y=-0.0058x+2.9531	0.076	1,2,3,6,7,8-HCDF	y=0.2285x-17.936	0.687
1,2,3,6,7,8-HCDD	y=0.0061x-0.0502	0.306	1,2,3,7,8,9-HCDF	y=0.0049x+0.115	0.058
1,2,3,7,8,9-HCDD	y=0.0042x-0.0505	0.370	2,3,4,6,7,8-HCDF	y=0.1185x-8.653	0.629
1,2,3,4,6,7,8-HCDD	y=1.8514x-115.02	0.585	1,2,3,4,6,7,8-HCDF	y=1.1174x+3.0191	0.324
OCDD	y=7.1842x-358.09	0.523	1,2,3,4,7,8,9-HCDF	y=0.2637x-8.8752	0.327
2,3,7,8-TCDF	y=0.0433x+10.772	0.076	OCDF	y=2.3639x-232.69	0.345
1,2,3,7,8-PCDF	y=0.0886x+7.4737	0.505			

### 3. 4 ダイオキシン類簡易分析技術の適用性の評価方法

簡易分析技術は、ダイオキシン類による汚染が確認された場合その汚染範囲を迅速により安価に測定する手段として期待されている。前述の「同一試料を用いたダイオキシン類簡易測定技術の比較検討」で用いた底質 8 試料は、異性体構成が類似のものであり汚染範囲の確認調査の模擬試料として使用することができる。と判断しこの試料を用い簡易測定技術の現場への適用を試みた。

汚染範囲の推定に当たっては、汚染地域をメッシュに切って多くの試料の測定を行い、その結果から同等濃度のコンターラインを引く。この場合、いくつかの試料については公定法と簡易法で測定を行い、両者の関係から公定法の値を推定する方法をとる。公定法と簡易法の間関係を求めるにはより多くの試料について測定することが望ましいが、時間と費用がかかることから実際には少ない限られた試料数で求めることになる。

実際の調査では数多くの試料が対象となるが、ここでは、仮定の検討として先の 8 試料を汚染地域の全試料と仮定した。このなかからどれ位の試料数を選んで相関を求めるかが問題となる。

- ① 先ず、8 試料から 3 試料を選び公定法と簡易法の間関係を求め、この関係式から全 8 試料の値 (TEQ) を推定した。8 試料から 3 試料を選び出す場合、その組み合わせは 56 通りとなるが全ての組み合わせについて計算を行った。
- ② 次に、8 試料から 4 試料を選ぶ場合の 70 通り、5 試料を選ぶ場合の 56 通り、6 試料を選ぶ場合の 28 通り、7 試料を選ぶ場合の 8 通り、8 試料全てを選ぶ場合について計算した。

具体的には、ELISA<sub>ECO</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>と四重極 GC/MS の 2,3,7,8-TCDD について推定値を計算し、公定法実測値と簡易法推定値との乖離 (絶対値) を求めた。この乖離の全ての値から、その最小値、平均値、最大値をまとめて表-6 に示すとともに表中の平均値の値を図-14 に示した。当然のことながら試料数が多くなるに従い、公定法と簡易法推定値の乖離が小さくなる傾向が見られる。8 試料の公定法による実測濃度は、140~330pg-TEQ/g (平均値: 220pg-TEQ/g) である。公定法と簡易法の間関係を 3 試料で求めたケースでは、公定法との乖離の絶対値の平均は、49~237pg-TEQ/g であった。しかしながら、公定法との乖離の絶対値の最大は、670~19000 pg-TEQ/g であり公定法の値と大きく異なることがあった。公定法と簡易法の間関係を求める試料数が増えると乖離の絶対値は小さくなり、実際にはあり得ないと思われるが、全 8 試料で求めたケ

表-6 公定法と簡易法の関係式から推定した値と公定法実測値との乖離の絶対値 (pg-TEQ/g)

回帰式を求めたサンプル数	ELISA <sub>ECO</sub>			Ah-IR		
	公定法との乖離			公定法との乖離		
	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値
3	0	91	670	0	223	19518
4	0	87	797	0	60	630
5	1	76	576	0	51	312
6	0	67	262	0	48	147
7	0	61	235	3	46	96
8	0	57	214	14	46	72

回帰式を求めたサンプル数	ELISA <sub>DT2</sub>			四重極GC/MS(2,3,7,8-TCDD)		
	公定法との乖離			公定法との乖離		
	最小値	平均値	最大値	最小値	平均値	最大値
3	0	237	11681	0	49	3299
4	0	156	17429	0	20	171
5	0	37	163	0	17	57
6	0	34	120	0	16	48
7	2	33	112	0	16	43
8	9	33	101	2	16	38

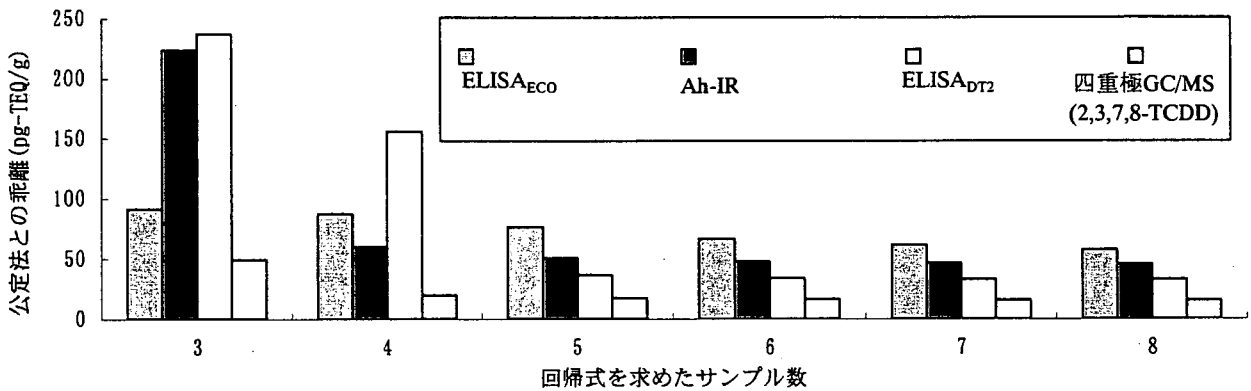


図-1 4 回帰式を用いた推定値と公定法実測値との乖離の絶対値の平均 (pg-TEQ/g)

ースで見ると、公定法との乖離の絶対値の平均は、16~57pg-TEQ/g、最大でも38~214pg-TEQ/gの乖離に収まった。

また、公定法との乖離を平均値で評価すると3試料の関係式から推定したケースでは、四重極GC/MS(2,3,7,8-TCDD)、ELISA<sub>ECO</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>の順に乖離が小さいが、4試料の関係式から推定したケースでは、四重極GC/MS(2,3,7,8-TCDD)、Ah-IR、ELISA<sub>ECO</sub>、ELISA<sub>DT2</sub>の順に、5試料以上関係式から推定したケースでは、四重極GC/MS(2,3,7,8-TCDD)、ELISA<sub>DT2</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>ECO</sub>の順であった。5試料以上の関係式から推定したケースでは、前述の図-10、11、12、13に示す全8試料の相関係数の順(四重極GC/MS(2,3,7,8-TCDD)、ELISA<sub>DT2</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>ECO</sub>)と同じであったが、4試料、3試料と試料数が少ない場合は異なった順番となっている。

以上のことから、実際の現場に簡易分析技術を適用する場合においては、単に公定法との相関関係から選定するのではなく、このようにいくつかの限られた試料での関係式から推定した値と公定法との乖離について事前に評価しておくことが望ましい。実際の調査においては数十、或いはそれ以上の試料について測定することになると考えられるが、これらのケースについても検討し公定法と簡易法の関係式を求める上において適切な試料数を見極めておく必要がある。

### 3. 5 精度管理手法の検討

ダイオキシン類の測定分析に関しては『測定値の信頼性確保』のために、公定法（JIS K 0312）では種々の品質管理項目が定められている。品質管理項目のデータは測定分析機関に記録として保管され、依頼業務の場合、その一部は測定値と共に依頼元へ報告される。しかしながら、ダイオキシン類の測定分析結果の妥当性を、品質管理項目をも含めて確認するためには極めて高い専門知識が必要である。これまで専門家が行ってきたダイオキシン類測定データの精査作業の一部をパターン化、システム化することで、報告された測定値が公定法で定められた品質管理規格を満足する状態で得られたものであるかを確認するソフトウェアを作成した。本システムでの判定項目の1例を表-7に示す。本ソフトウェアの使用方法は、ソフトウェアを測定分析機関等の依頼先へ配布し、測定分析機関は測定分析終了後、数値等をソフトウェアに入力する。本ソフトウェアでは入力されたデータの内容に矛盾や規格逸脱があれば指摘し、また公定法で定められた規格を満足する状態でなければ出力（印刷等）が不可能とすることで判定が分かりやすい。依頼元は本ソフトウェアの出力結果の提出を要求することにより、定められた品質管理規格を満足しているダイオキシン類測定分析値を得ることが可能となる。本ソフトウェアは、土木研究所ホームページ等で公開し広く活用できるようにする予定である。

表-7 精度管理のための判定項目と判定基準（例）

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

### 4. まとめ

本研究では、ELISA等による簡易分析法と精度管理手法について以下の結果を得た。

- 1) 共同研究を実施しているELISA<sub>Eco</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>の異性体ごとの検出と検出下限の特徴を整理し、実試料に適用した場合の結果と比較した。この結果、全国河川底質の実測DEQはTEQより、ELISA<sub>Eco</sub>とAh-IRは常に過大、ELISA<sub>DT2</sub>は過大あるいは過小となった。理論換算DEQと実測DEQの比較からは、TEFを持たない物質との交差反応の可能性が示唆され、精製法の検討が重要と分かった。
- 2) 同じ乾燥、抽出、精製の前処理を行った試料を用い、ELISA<sub>Eco</sub>、Ah-IR、ELISA<sub>DT2</sub>と四重極GC/MSによる簡易検出手法について比較検討した。試料数が少ないながらも比較的良好な相関性が認められた。
- 3) 簡易分析技術の現場への適用に当たっては、単に公定法との相関関係から選定するのではなく、いくつかの限られた試料での関係式から推定した値と公定法との乖離を求める等の評価方法も重要であることが分かった。
- 4) 測定値の信頼性確保のため専門家が行ってた測定データの精査作業の一部をパターン化、システム化し、報告された測定値が公定法で定められた品質管理規格を満足する状態で得られたものであるかを確認するソフトウェアを作成した。
- 5) 今後、より多くの試料を基に検討を進めるとともに、ダイオキシン類の対策がとられる現場での検討を行う必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

## 5. 参考文献

- 1) 小森行也、八十島誠、田中宏明、南山瑞彦、鈴木穂、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」、環境システム計測制御学会誌、Vol. 7、No. 2、pp. 255-258、2002. 9
- 2) 永柳、4重極GC/MSによるダイオキシン類の簡易測定技術、資源環境対策、Vol. 37, pp. 921-925 (2001)
- 3) 上東浩、ダイオキシン類測定分析の迅速化・簡易化、資源環境対策、Vo. 37, pp. 942-947 (2001)
- 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、Vo. 37, pp. 932-935 (2001)
- 5) 中村朋之 他、大容量注入装置を用いたイオントラップ型GC/MS/MSによるダイオキシン類分析法の検討、第9回環境化学討論会、pp. 248-249 (2000)
- 6) 坂田一登 他、高速溶媒抽出法と免疫測定法を組み合わせた迅速ダイオキシン分析技術、資源環境対策、Vol. 37, pp. 87-91 (2001)
- 7) 小林康男 他、Ah イムノアッセイによる環境サンプルのダイオキシン類測定の実例、造水技術、Vol. 27, pp. 3-8 (2002)
- 8) 橋場常雄、リポータージーンアッセイ法によるダイオキシン類の分析について、造水技術、Vol. 27, pp. 14-19 (2002)
- 9) 村田弘司、ジーン・バイオアッセイによるダイオキシン類の測定、資源環境対策、Vol. 37, pp. 970-974 (2001)
- 10) 加藤みか、ダイオキシン類の測定を正確かつ大幅に効率化できる方法、第2回効率的な環境管理のための最新の簡易測定技術、エコケミストリー研究会(2002)

### 3. 水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
研究員 玉本 博之  
交流研究員 宮本 宣博

#### 1. はじめに

下水道整備によって公共用水域の水質汚濁は改善され、生物環境への影響はある程度改善してきたものと考えられる。しかし生態系の保全といった観点からは、まだ課題が多く残されているのが現状であり、公共用水域の水質保全に加え多様な生物が棲めるような、「生態系に配慮した取り組み」が必要となっている。このような背景から生息空間の確保を目的として、多自然型川づくりへの取り組みが近年活発になされているが、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年々大きくなっており、再利用比率が 90% を超えるような河川もみられている。このため、環境保全を目的とした下水道事業や河川整備を検討していく上で、水質が生態系へ与える影響について十分な検討を行なっていく必要があるものと思われる。

しかしこれら生物の多様性が維持できる健全な生態系を確保するために必要な水質レベルについては、まだ情報量が少ないのも現状である。そこで都市部の河川を調査対象河川に選定し、そこに生息している水生生物と水質との関係について調査を行なった。

#### 2. 調査地区の概況

今回の調査の対象とした地区（多摩大橋地区）は、多摩大橋を中心とした約 2600m の区間である（図-1）。この地区の上流には羽村取水堰があり、多摩川から水道原水として東京都東村山浄水場などに取水している他、下流域については約 2m<sup>3</sup>/s の流量を水質浄化対策として放流しており、さらに秋川の加わった流量が多摩川本川となりこの地区に到達している。

多摩大橋地区の特徴は、この地区の上流域には大規模な下水処理施設がなく、この地区で初めて下水処理場からの放流水が排水樋管を經由して多摩川本川に流入し、河川流量だけでなく栄養塩類等の河川水質も大きく変化している地点であることがあげられる。調査は平成 13 年 12 月に実施し、各水質項目及び底生生物の採取を行なった。なお底生生物の採取は上流地点 (St.1) では瀬の任意の地点、5 地点で採取し同時に各水質項目の測定を行なった。またその他の地点 (St.2, St.3) については、横断方向に 5~7 地点を選び底生生物の採取を行なった。

#### 3. 結果と考察

下水処理水の河川への混合状況を確認するため、導電率を指標として用いた。調査結果を図-1 に示すが、A 処理場の下水処理水は幹線樋管を經由して多摩川本川に流入しているが、排水は多摩川本川に流入後直ちに混合しているわけではなく、合流後 100m 下流の St.2 では余り混合されない状態であることが、確認されている。

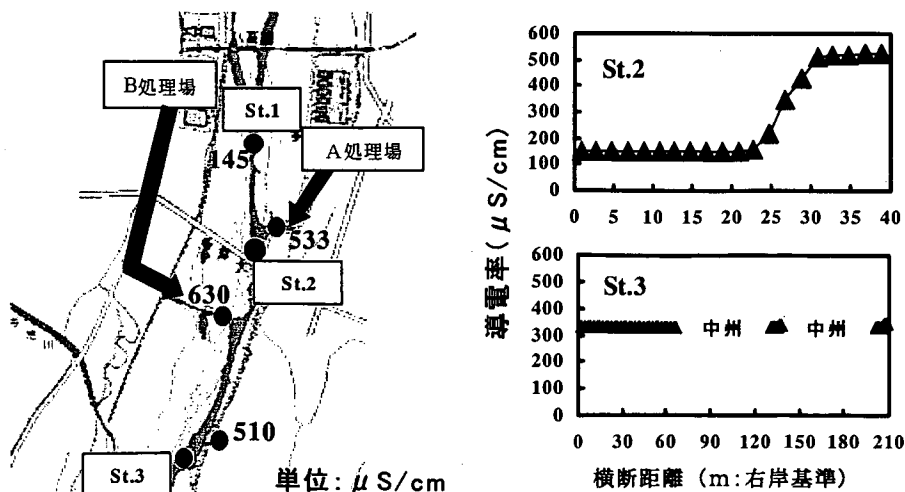


図-1 調査地域及び多摩大橋地区における導電率の分布



この St.2 よりもさらに約 1400m 下流の St.3 では、栄養塩類、電気伝導度は概ね横断方向に見ても左右岸に差はなく均一に混合していることが確認できた。このことから、多摩大橋付近にある2つの下水処理場（A、B 処理場）の放流水はこの St.3 地点で多摩川本川と十分混合しているものと判断できた。

そこでこれらの縦横断方向の濃度変化を利用して、下水処理水の合流に伴う底生物の変化について検討を行なった。また以下に示す式から多様性指数（H'）（Shannon 指数）についても算出した。

### 多様性指数（Shannon 指数）

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \log_2 P_i$$

S : 種類数

p<sub>i</sub> : i 番目の種類の個体数が総個体数に占める割合

多様性指数は生物種の多様性を評価する指数で、各出現種の個体数が均等なほど多様性指数は大きくなり、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、多様性指数は小さくなる。

底生物の調査結果を図-2 に示すが、底生物の生物量（乾燥重量）は St.2 では下水処理水の影響が見られる左岸から横断方向に、次第に生物量が減少する傾向が確認され、多様性指数が低下する傾向が確認された。また種の構成を見ると、下水処理水の影響が見られる地点ではカゲロウ目の出現量が減少する傾向が明瞭に確認された。最下流の St.3 地点ではミミズ目の出現量が多く見られ、ミミズ目の出現量によって乾燥重量や多様性指数が大きく変動した。またカゲロウ目の出現量が殆ど見られなくなるなど、St.2、St.3 地点で共通して見られる傾向も確認された。これら底生物の変化と水質の関係について検討を行なったが、今回調査を行なった導電率、窒素、リン、TOC、DO、pH の各項目の間には、互いに有意な相関関係が確認されており、これらの水質項目のどの成分がこれらの生物群集変化に影響を与えたかについては明瞭に出来なかった。

また、各調査地点では物理要因（流速、水深、河床構造等）が異なっていたことから、今後は、各水質項目のどの成分が底生物群集の変化を明らかにしていく研究を進めていくとともに、物理的要因を考慮した評価手法についても検討を行なっていく必要があるものと考えられた。

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。

### 〈謝辞〉

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

### 〈参考文献〉

- 1) 田中宏明他（2002）水生生態系から見た河川水質の評価に関する研究，平成 13 年度下水道関係調査研究年次報告書集

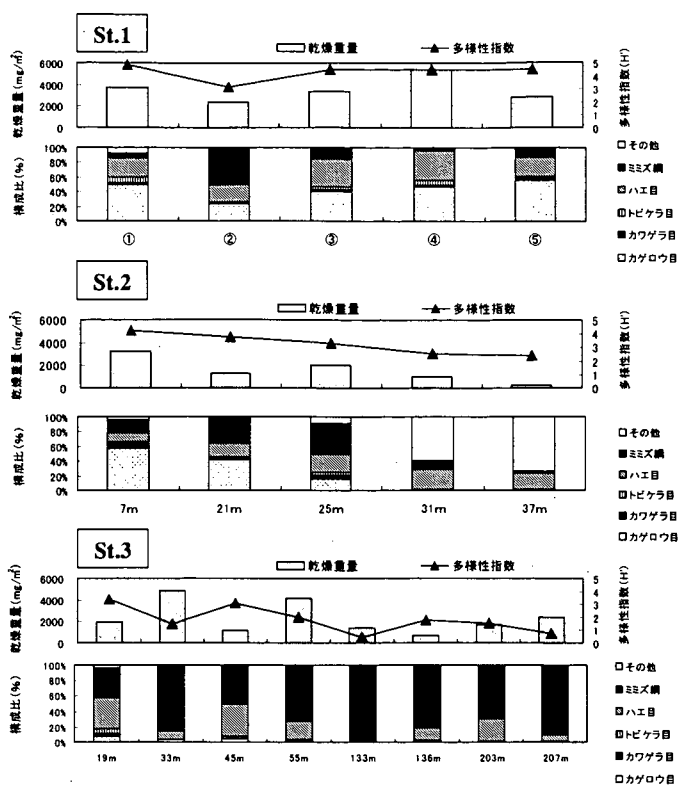


図-2 各調査地点における底生物の乾燥重量、多様性指数、構成比の分布

## 4. 底泥－水間の物質移動に関する調査

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
 主任研究員 小森 行也  
 主任研究員 佐々木 稔  
 専門研究員 李 建華  
 交流研究員 和田 順之輔

### 【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は重要な課題となっている。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 14 年度は、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った。その結果は以下に示す通りである。

- 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。

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

### 2. 調査の内容

#### 2.1 溶出量推定のためのモニタリングシステムの開発

底泥－水間の沈降、吸着及び溶出といった物質移動現象の把握を目的に、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の構築することを目標とし、水温や DO 及び ORP センサー等による連続測定を行うことによって、栄養塩の溶出量との関係についての検討を行った。

現地実験は、平成 14 年 7 月から 9 月にかけて、三春ダムの牛糞前貯水池における高濃度酸素水供給実験の開始

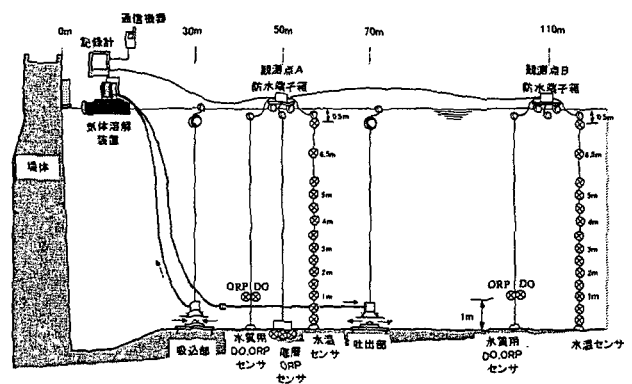


図-1 連続測定装置配置図

前から終了後までの期間を通じて、水温、DO 及び ORP センサーによる連続モニタリングを行った。モニタリングに使った測定装置及び装置の配置は図-1 に示す。堤体から上流方向へ 50m の地点（観測点 A）と 110m の地点（観測点 B）のフロートにセンサの変換器を設置し、フロートから湖底のアンカーまでのケーブル上に各センサを設置、得られた信号は、記録計によってするとともに、通信機器を介した遠隔監視が可能なシステムとした。

観測点 A と B の 2 箇所に設置した DO 計では、溶存酸素濃度に差がみられ、酸素供給装置の稼動による酸素濃度上昇と停止後の酸素消費の状況を詳細に捕えることができた（図-2）。

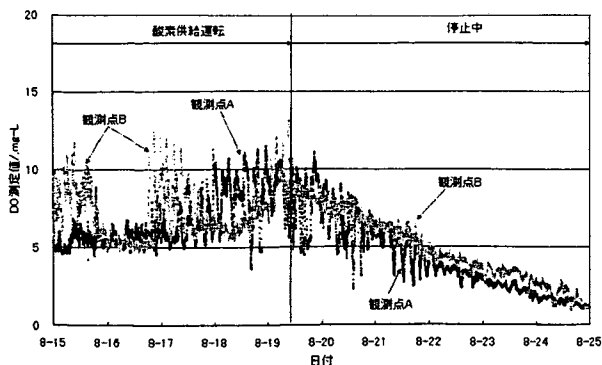


図-2 酸素供給装置稼働時の酸素濃度上昇と停止後の酸素消費の状況

底層水中の酸素の消長に伴う栄養塩濃度の変化については湖上からの採水による確認を行い、酸素供給期間には底層水中酸素濃度の上昇とそれに伴う栄養塩 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ) 濃度の低下が、酸素供給停止後の底層水中の残存酸素が無くなった後には  $\text{NH}_4\text{-N}$  と  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度の顕著な上昇がそれぞれ観測された (図-3)。

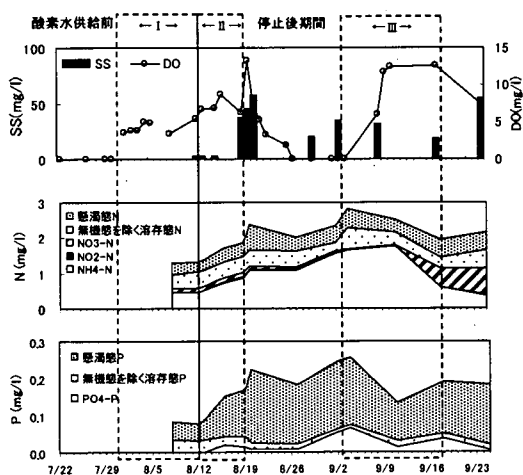


図-3 底層水中酸素濃度の変化に伴う栄養塩濃度の変化

また、底泥中の DO が消費された後の酸化還元環境の変化を確認するための指標として、水中および表層底泥中における ORP の変化について、試作した現地連続測定可能なセンサーシステムを用いた測定を行った。酸素供給停止後、特に DO が 0 に低下した後は、底泥直上水と表層底泥中の ORP 値が急激に低下する傾向が確認できた。

計測期間末期の ORP 値の上昇は、秋季に起こった全層循環の影響を受けたものと推測される (図-4)。

今年度実施した底泥-水境界層の ORP の連続測定は、試作したセンサーを用いた湖沼等の現場における初めての測定試験であったため、長期連続測定時のデータの信頼性には疑問があり、特に底泥表層の ORP 測定に用いたセンサーの精度の維持手法や定点連続観測のための設置方法について、さらなる検討が必要と思われた。

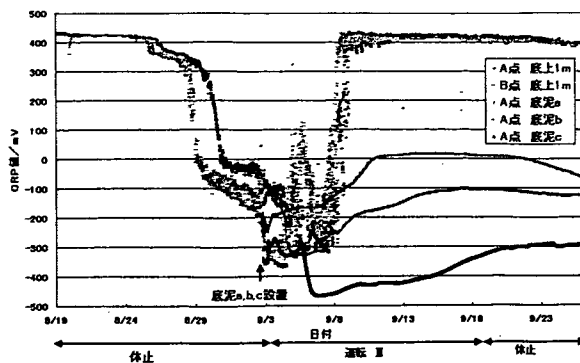


図-4 底層水並びに底泥中の酸化還元電位の変化

## 2.2 直上水に列ガを併用した室内底泥溶出試験

底泥実験装置 (李ら, 2000) を用いて静置溶出試験及び底泥巻き上げシミュレーション試験を行った。同装置による試験の特徴は、不攪乱採取した底泥コアが入っているサンプリング管をそのまま試験チャンバーに利用できること、底泥直上水中の水温、DO 及び ORP の連続計測-オンライン記録ができることである。

試験に使用した底泥コアは、平成 14 年 5 月に福島県の三春ダムの蛇沢川前貯水池と蛇石川前貯水池で各 1 地点、6 月に同じく三春ダムの牛糞川前貯水池の 2 地点において採取した。以下、試験に供した底泥コアサンプルを採取地点の名称を用い蛇沢、蛇石、牛糞 A、牛糞 B と表記する。現場での採泥時に底泥の採取厚を 25cm 前後に調整、O-リング付きネジ蓋で密閉、コアサンプルを封入し、保冷材を用い低温で実験室に運搬し、試験に供した。静置溶出試験は 4 試料全てを対象に実施したが、巻き上げ試験は蛇沢、蛇石の 2 試料のみを対象として実施した。酸素消費速度試験及び静置溶出試験はコア疑似現場法の原理を適用し、湖水のみのチャンバーをコントロールとして用いた。巻き上げ試験では底泥界面上 10cm の位置で直上水を攪拌 (350 rpm, 10 分) することにより底泥巻き上げをシミュレートした。各試験において直上水の温度、DO、ORP、pH の変化は 1 分間隔でモニタリングし、水質分析のための直上水試料はサイフォンを用いて底泥界面の約 5cm 上の位置から採取した。両試験とも直上水試料の水質分析にはオートアナライザー (TRACCS) と TOC 計 (島津 5000A) を使用し、底泥分析は元素分析計 (FlashEA1112) を用いて行った。

底泥の酸素消費速度 (SOD) 及びリン (DTP,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ) の溶出速度の試験結果は図-5 に示すように、蛇石の SOD が最も高く (1, 108 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$ )、溶出速度も高い値を示し、TP と  $\text{PO}_4\text{-P}$  がそれぞれ 35. 1 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$  と 8. 23 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$  であった。底泥の巻き上げ試験について蛇石と蛇沢を比較した結果は表-1 に示している。巻き上げ操作後の酸素消費速度も蛇沢が約 8, 500 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{h}$  に対し、蛇石は約

11, 300mg/m<sup>2</sup>/h と高く、ORP 測定値も蛇石は巻き上げ操作の前後で 209mv から -201mv と急激な減少が観測された。また、DO と ORP の減少に伴って直上水中の TN と TP の濃度が上昇し、蛇沢は巻き上げ前と比較して TN で 3 倍、TP で 12 倍となっていたのに対し、蛇石では TN で 26 倍、TP で 63 倍へとそれぞれ濃度が上昇していた。

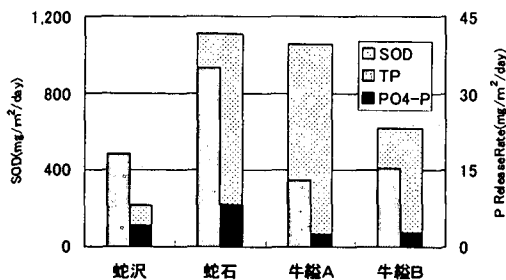


図-5 底泥の酸素消費速度(SOD)と溶出速度

表-1 底泥巻き上げ実験結果

調査地点名	巻上前	TN/SS (mg/g dw)	TP/SS (mg/g dw)	ΔDO (mg/m <sup>2</sup> /h)	ORP (mv)	TN (mg/L)	NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	TP (mg/L)	PO <sub>4</sub> -P (mg/L)
蛇沢	巻上前	298	15	8,488	184	6.25	4.17	0.32	0.05
	巻上後				-62	18.27	6.02	3.86	0.04
蛇石	巻上前	880	140	11,281	209	11.44	5.57	1.82	0.05
	巻上後				-202	293.86	8.03	114.41	0.06

今回の試験結果から、栄養塩の溶出速度は静置試験系において SOD と正の相関がみられ、また、巻き上げ試験系においては DO の変化の影響に加え、SS と栄養塩濃度との相関を示唆するデータが得られた(図-6)。今回の室内試験に用いた底泥では、蛇石前貯水池の底泥は蛇沢前貯水池の底泥と比較した場合、風などの外力による攪拌によって生じる巻き上げの影響を受け易く、また、巻き上げに伴う栄養塩の水中への回帰率も高い性状の底泥であったと考えられた。

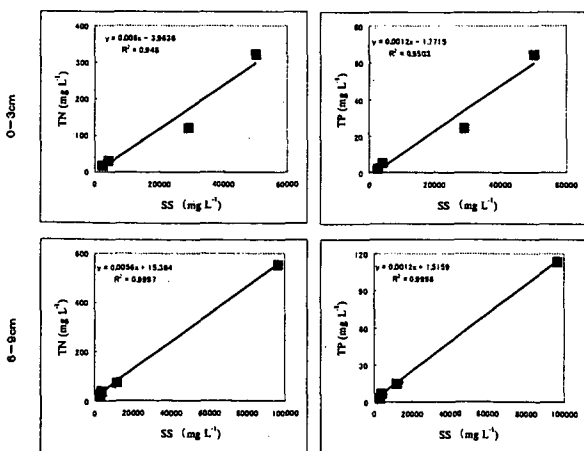


図-6 巻き上げ試験系における SS と栄養塩濃度との相関

### 2.3 擬似浚渫によるリン溶出速度の変化に関する調査

底泥からの栄養塩の溶出速度に浚渫が及ぼす影響を調査するため、底泥表層から深さ方向に 3、10、20 cm 分をカット(除去)したコアサンプルを用いた静置溶出試験、及び巻き上げ後の水への栄養塩の回帰速度を比較するための、異なった深さに位置する底泥サンプルを用いた巻き上げ溶出試験を実施した。試験には平成 14 年 4 月に手賀沼より採取した底泥コアサンプルを用いた。

静置溶出試験中における DTP と PO<sub>4</sub>-P の経時変化を図-7 に示す。コントロール底泥コアサンプル(ノーカットのコア)と比較した場合、表面から 3cm、10cm とカットした底泥の厚さに伴いリンの溶出量が次第に減少する傾向が見られたが、10cm と 20 cm カットのコアからの溶出試験結果には有意な差が見られなかった。リンの経時変化に基づいて算出した溶出速度(図-8)は、ノーカットの底泥コアの PO<sub>4</sub>-P 溶出速度で 8.4mg/m<sup>2</sup>/day となっており、10cm カット後の底泥コアでは 2.0mg/m<sup>2</sup>/day まで低下していたことが判明した。3 cm、10 cm と 20 cm カットサンプルからの PO<sub>4</sub>-P の溶出速度は、それぞれノーカットの 83.8、22.7 と 27.7% であったことから、今回調査の擬似浚渫操作でリンの溶出が抑制されたことが明らかになった。

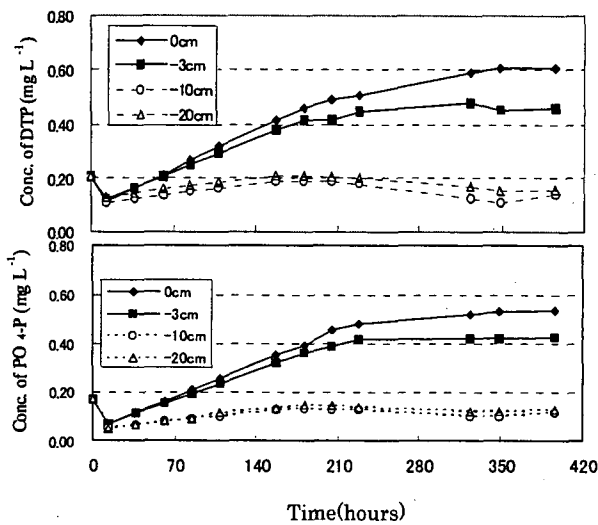


図-7 室内擬似浚渫試験(静置溶出試験の経過)

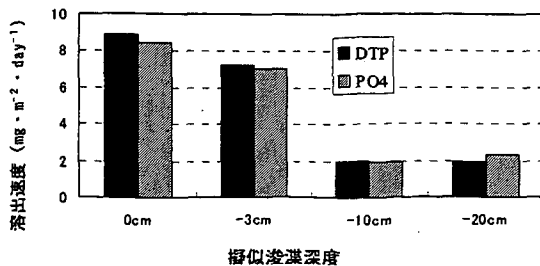


図-8 室内擬似浚渫試験による溶出量

同じ調査地点で採取した別の底泥コアサンプルで測定したTP含有量の鉛直プロファイルから、0~45cmの深さまでリンの含有量はほぼ均等(約0.7mg/g)であることが確認されていることから(図-9)、10cmカットによるリン溶出速度の大幅な低下の理由は、リンが溶出しやすい底泥の表層部分が取り除かれたことであると推定された。また、擬似浚渫後溶出試験に用いた試験容器中に残った底泥の量が減ったことも、溶出速度の低下に寄与していたことも考えられた。

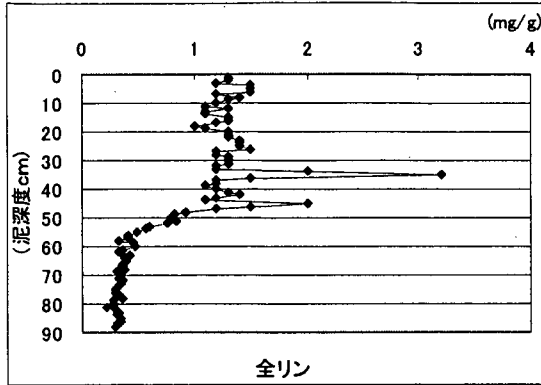


図-9 底泥中の全リン含有量の鉛直分布

同一のコアサンプルを用いて異なる深さ(底泥界面から0-3cm、同6-9cm)に位置していた底泥を用いて擬似巻き上げ試験を行い、浚渫前後の底泥からのリンの水中への回帰速度がどのように変化するかについて調査を行った。試験条件は表-2に示している。

表-2 底泥巻き上げ実験条件

採取層	試料番号	水(V <sub>w</sub> ) (mL)	泥(V <sub>s</sub> ) (mL)	体積比 (v/v)
0-3cm	1-1	800	200	5
	1-2	900	100	10
	1-3	980	20	50
	1-4	990	10	100
6-9cm	2-1	800	200	5
	2-2	950	50	20
	2-3	980	20	50
	2-4	990	10	100

\* 体積比は、底泥のボリュームに対する希釈率をさす  
 \* 装置容積は 2,000ml、装置回転数は700rpm、回転は15分間。

底泥試料を5、10、50、100倍(水:底泥比)の希釈率で調整したスラリーを、350rpmの強度で15分間攪拌する巻き上げ操作を行った後、懸濁液中の溶存態リンとSSを分析した。底泥の巻き上げによるDOの低下率はそれぞれの実験系に含む底泥の量に(図-10)依存し、DOの低下に伴うPO<sub>4</sub>-Pの溶解脱離量は図-11に示すモデル計算式(1)と(2)によって算定した(図-12)。

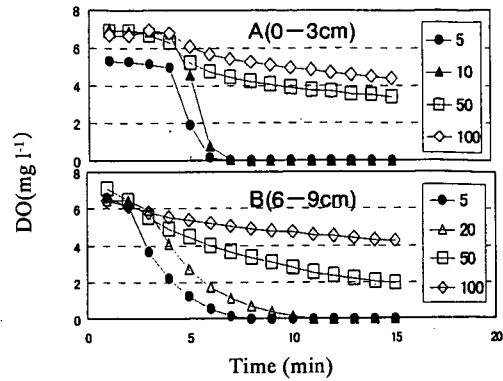


図-10 巻き上げ実験中のDOの低下

$$TRP = \frac{C_s \cdot W_s \cdot \Delta SS \cdot V_w}{\rho_s (1 - W_s)} \quad (1)$$

C<sub>s</sub>: concentration of nutrients in the pore water  
 W<sub>s</sub>: water content in the sediment (0-3 or 6-9 cm)  
 ΔSS: SS in the diluted solution  
 V<sub>w</sub>: volume of the diluted solution  
 ρ<sub>s</sub>: pore water density in the sediment (0-3 or 6-9 cm)

$$MRA = \Delta C_w \cdot V_w = (C_{w2} - C_{w1}) \cdot V_w \quad (2)$$

C<sub>w</sub>: concentration of nutrients in the slurry  
 C<sub>w1</sub>: initial concentration of nutrients in diluted solution before test  
 C<sub>w2</sub>: concentration of nutrients in diluted solution after test

図-11 DOの低下に伴うPO<sub>4</sub>-Pの溶解脱着量を推定するモデル式

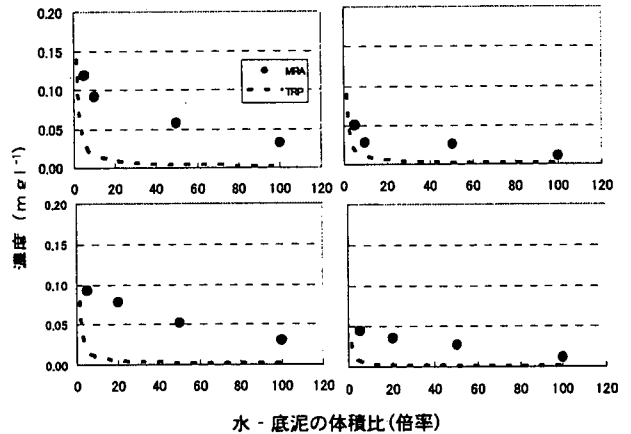


図-12 水-底泥体積比の変化に伴うTP溶出量の実測と推定の比較

また、異なる孔径サイズ(1.0、0.45、0.20μm)のろ紙による分画分析の結果(図-13)では、PO<sub>4</sub>-P濃度に違いがほとんどみられないことから、モデル計算値より高く検出されていたリンは懸濁粒子態の浮遊残物ではなく粒子から離脱した溶解性リンであることが推測された。

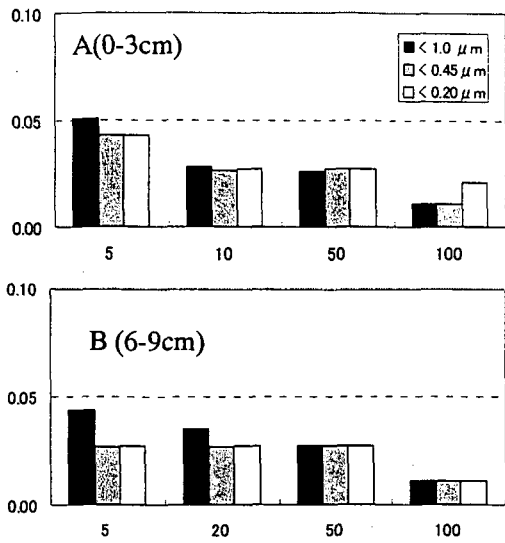


図-13 異なる口径ろ紙による分画分析結果

#### 2.4 貯水池底層への酸素供給による栄養塩溶出抑制効果に関する検討

富栄養化した閉鎖性水域において底泥からの栄養塩溶出を抑制するための、高濃度酸素水の供給による底層環境の改善を目的としたDO制御システムの開発を、平成14年度より共同研究により開始した。同システムの実証実験を、平成14年7月から9月にかけて福島県三春ダムの牛絵前貯水池において行った。同システムの特徴は、温度センサーによって高濃度酸素水の供給を細かくオン・オフ制御することにより、夏季に湖沼等で形成されている温度成層を破壊せずに底層部にみに酸素の供給が可能とした点である。

酸素供給による底層環境改善効果を評価するため、高濃度酸素水供給実験の前後を含めた7/22~9/25の期間で合計17回の採水調査を実施した。高濃度酸素水を供給した期間は、期間Ⅰ(7/31~8/12:期間内採水3回)、期間Ⅱ(8/13~19:採水3回)、期間Ⅲ(9/3~18:採水3回)とし、供給装置からの酸素水の吐出速度は期間Ⅰは90m<sup>3</sup>/h、期間Ⅱ・Ⅲは30m<sup>3</sup>/hに設定した。装置運転時に供給した高濃度酸素水のDOは約50mg/Lであった。酸素水供給前(7/22~30:期間内採水4回)、期間Ⅱ終了から期間Ⅲ運転開始まで(8/20~9/2:採水3回)、及び期間Ⅲ終了後(9/19~25:採水1回)は酸素供給停止期間とした。採水調査位置は酸素水供給装置の吸入口と吐出口の直近を避け、機器連続観測点A(吸入口と吐出口の間)、B(吐出口から上流に40mの地点)を選定した。水質分析用サンプルはA、B地点においてバンドーン採水器にて湖面から鉛直方向に0.5m、1m、2m、3m、4m、5m、6mの各水深で採取し、

栄養塩(NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>x</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NH<sub>4</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、TN、DTN、TP、DTP)とDOCについてそれぞれオートアナライザー(TRACECS)とTOC計(島津5000A)を用いて分析を行った。また、測定項目以外はそれぞれ[PTN]=[TN]-[DTN]、[DON]=[DTN]-[DIN]、[DIN]=[NH<sub>4</sub>-N]+[NO<sub>x</sub>-N]、[PTP]=[TP]-[DTP]、[DOP]=[DTP]-[PO<sub>4</sub>-P]として計算により求めた。

図-14に観測点Aにおける酸素水供給前と期間Ⅰの水質鉛直分布の比較を示す。深層水中(5~6m)のDO濃度が高くなっており(図-14A)、これに連動したNH<sub>4</sub>-NとPO<sub>4</sub>-Pの濃度低下も確認され(図-14BとC)、栄養塩の溶出が酸素供給による底層環境の改善によって抑制されたと考えられた。

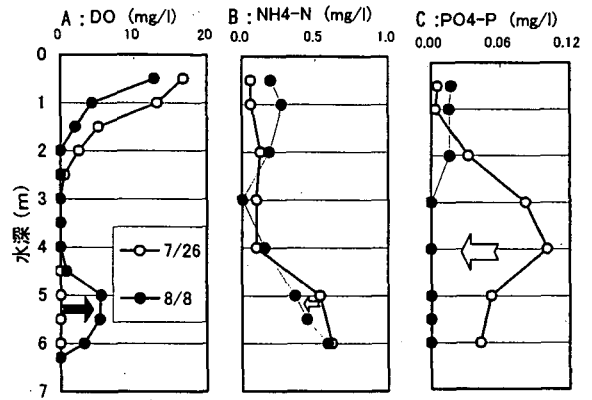


図-14 酸素水供給前と期間Ⅰの水質鉛直分布の比較

また、酸素供給1日前と供給9日後の水質結果を比較したところ(図-13、図-14)、深層水中(5~6m)のDO濃度の上昇(図13A、14A)に伴うNH<sub>4</sub>-N濃度の低減だけでなくNO<sub>3</sub>-N濃度の上昇も確認され、深層水中の硝化過程を促進したものと考えられた(図-13B、14B)。水深3~4m層に観測されたNO<sub>3</sub>-N濃度の顕著な減少は脱窒を促進した結果と推測され、同水深で計測されたTN、DTN及びDOC濃度の減少(図-14B、14C)もこの推測によって説明できた。B地点でも同様に水柱中の硝化・脱窒が生じており、主に底泥から溶出したと考えられるアンモニア態窒素が効率的に除去されていたことが推測された。

湖面から順に好気層-嫌気層の二層に形成されていた湖水の鉛直成層構造を好気-嫌気-好気の三層構造に変えることによって、底層ではDO上昇に伴うNH<sub>4</sub>-N濃度低下とNO<sub>x</sub>-N濃度上昇する硝化促進が起り、その上に位置する中間嫌気ゾーンでは脱窒による硝酸イオンの顕著な減少が生じていることが推測された。また、中間嫌気ゾーンにおけるDOCの濃度低下も、脱窒によってカーボンソースとして溶解性の有機物が消費させた結果と考え

られた。

前ダム貯水池の水柱中における硝化・脱窒現象は、酸素水供給装置の運転・停止制御によって水温躍層を維持したことにより、深層水の底部から好気ゾーンと嫌気ゾーンを独立的に形成させたことによって生じたものと考えられ、特に脱窒現象は好気ゾーンで硝化された  $\text{NO}_3\text{-N}$  が濃度勾配の影響によって徐々に上部の嫌気ゾーンに移行拡散していく過程で生じたものと推察された。底泥からの栄養塩溶出を抑制する効果がのみではなく、効率的に硝化・脱窒を促進する底層環境制御手法として高濃度酸素水供給システムが利用できる可能性が今年度の調査により明らかになった。

よる水質及び底質の分析結果と併せ、栄養塩溶出量推定に必要な現地観測法の確立を目指す予定である。また、室内試験に関しては、DO と ORP のオンラインモニタリングに加え、濁度のモニタリングシステムも組みこむことによって、室内溶出試験（静置溶出・巻き上げ溶出）結果から栄養塩の溶出量推定を可能とするための試験法の確立に向け、溶出試験系の体系化を図っていく予定としている。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 佐々木稔<sup>1</sup>、田中宏明<sup>1</sup>、李建華<sup>1</sup>、和田順之輔<sup>1</sup>、中村圭吾<sup>1</sup>、柴田省三<sup>2</sup>、田中克知<sup>2</sup>、福井真司 (2002.11) 底層環境改善のためのモニタリング技術と活用。第14回環境システム計測制御学会 (EICA) 研究発表会 発表論文 滋賀大津 Vol.7 No.2 pp237-240.
- 2) 柴田省三、田中克知、田中宏明、佐々木稔 (2003.3)、底質改善への気体溶解装置の適用 (II) 「底質改善のモニタリングと今後の課題」。第37回日本水環境学会年会研究発表会、p120.
- 3) 和田順之輔、李建華、佐々木稔、田中宏明 (2003.3)、底質改善への気体溶解装置の適用 (III) 「DO制御に伴う水質変化に関する検討」。第37回日本水環境学会年会研究発表会、p120.
- 4) 李建華、和田順之輔、佐々木稔、田中宏明 (2003.3)、底質改善への気体溶解装置の適用 (IV) 「深水層に見られる消化・脱窒への促進効果」。第37回日本水環境学会年会研究発表会、p120.
- 5) 李建華、和田順之輔、佐々木稔、田中宏明 (2002.9) 三春ダムにおける異なる前貯水池の底泥から栄養塩類の溶出特性。日本陸水学会第67回大会、P110.
- 6) Jianhua Li, Junnosuke Wada, Minoru Sasaki and Hiroaki Tanaka (2002.10) Simulated Dredging for Evaluation of Release of Phosphorus from lake Sediments. 5TH International Symposium on Sediment Quality p32, Chicago, USA.

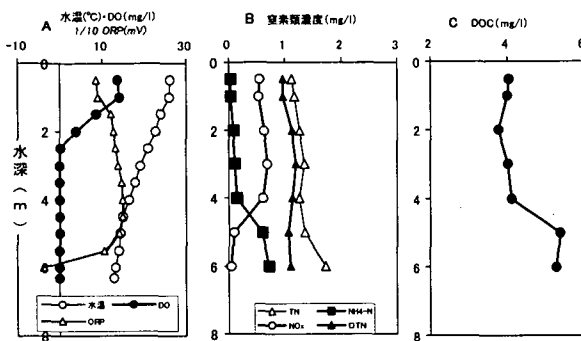


図-15 観測点A、酸素水供給1日前の水質鉛直分布

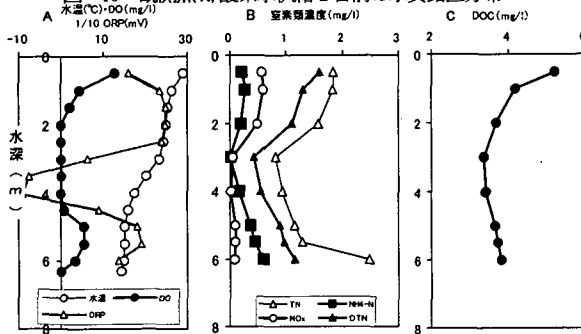


図-16 観測点A、脳水小酸素水供給前と90日後の水質鉛直分布

### 3. まとめ

本研究は、底泥が水質に与える影響の推定方法を提案するため、現地調査と室内実験を通じて共同研究で開発したモニタリングシステムを検証し、底泥からの溶出量推定のための試験法と底泥からの溶出機構を検討した。その結果、DO と ORP の連続測定システムは栄養塩の溶出量推定のための試験法への有効性を示唆され、表層底泥の存在状態の違いは、疑似浚渫の結果から栄養塩の溶出量を左右することがうかがわれた。

今後は、現場観測に関してはORP センサを用いて底層水や底泥そのものの酸化還元状態の確認を行い、水温・DO 等も含めたセンサによる測定データにサンプリングに

## 5. 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
主任研究員 佐々木 稔  
研究員 岡安 祐司  
交流研究員 宮本 博  
交流研究員 壬生 勝泰

### 【要旨】

近年、水環境中での界面活性剤の分解物質や人畜由来のホルモンなどによって野生生物の内分泌攪乱が生じる場合があると報告されている。こうした内分泌攪乱物質について、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じるためには、これら物質の水、底泥などの水環境での挙動を把握し、水域に与える影響を把握することが必要である。本プロジェクトでは、都市排水由来のこれら内分泌攪乱物質の、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。

14年度は、底泥試料を対象としたノニルフェノキシ酢酸の分析法に関する検討を行い、GC/MSによる分析法を改良することで回収率を向上させた。また、内分泌攪乱物質の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。

キーワード：NP、NPEO、NPEC、エストロゲン、内分泌攪乱物質、河川水、底泥、挙動

### 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、人畜由来のエストロゲンそのものによる環境影響についても、その内分泌攪乱作用の強さから注目が集まり始めている。都市排水を由来とするエストロゲンとしては、 $17\beta$ -エストラジオール（女性ホルモン、以下 E2）、その代謝生成物であるエストロン（E1）、エストリオール（E3）及び経口避妊薬の主成分であるエチニルエストラジオール（EE2）を挙げることができる。

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）等の中間物質を經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の物質の挙動を把握するため、まず流域の汚水処理形態に着目し、異なる流域（多摩川、大津川）で実態調査を実施した。特に多摩川では下水処理水が本川に合流後、支川、樋管の流入が殆どない区間を有するため、河道内での消長についても併せて検討を行った。また、これらの都市排水に由来する物質が水域に流入した後、付着藻類、底生動物及び底質にこれらの物質が蓄積している可能性があるため、その蓄積状況について検討を行った。さらに、適切な前処理、抽出法を用いたエストロゲン関連物質の機器分析法を開発した。

### 2. 研究の内容

#### 2. 1 環境水中の NPs、エストロゲンの流出

##### 2. 1. 1 手賀沼流入河川における負荷量実態調査

##### 1) 対象河川及び調査地点

対象河川は、手賀沼の主要な流入河川であり、手賀沼流域のうち、面積で約 23%、人口で約 41% を占める流域をもつ大津川及びその支川である名戸ヶ谷排水路、増尾排水路である（図-1）。

採水地点は、大津川本川及び支川を含め 6 地点（記号：0T①～0T⑥）、名戸ヶ谷排水路流末（同：NT）、増



尾排水路流末（同：MS）とした。大津川流域のフレームの変化を表-1に示す。

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

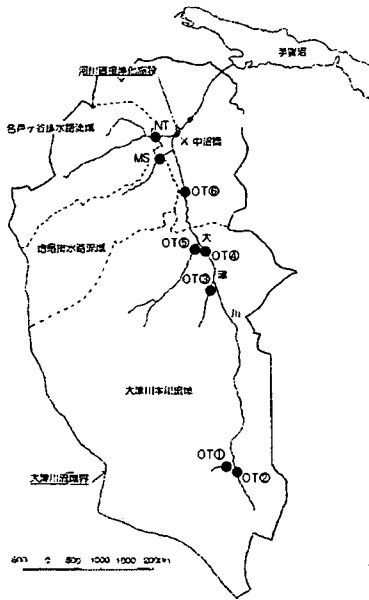


図-1 対象河川と調査地点

表-1 大津川流域フレーム

調査年	流域面積 (ha)	土地利用 (%)				流域人口 (人)	処理形態別人口割合 (%)			
		市街地	水田	畑地	林地		下水道	合併処理浄化槽	単独処理浄化槽	汲み取り等
1980	3,669	35.6	9.1	25.2	30.1	146,650	0.0	23.3	37.7	39.0
1986	3,669	42.6	7.8	23.2	26.3	169,060	14.5	17.9	45.0	22.6
1990	3,669	48.0	6.5	22.9	22.6	191,030	23.1	16.5	44.4	16.0
1995	3,698	55.7	6.2	28.3	9.8	196,123	38.2	11.1	39.9	10.8
本調査での対象流域	3,261	54.9	4.3	30.8	10.2	171,451	31.0	12.6	44.2	12.1
大津川本川	2,400	48.1	5.7	36.5	9.7	109,537	20.1	12.5	50.8	16.6
名戸ヶ谷排水路	437	79.4	0.0	11.9	8.8	36,493	75.1	1.6	19.4	3.9
増尾排水路	424	67.9	0.8	16.5	14.9	25,421	15.1	29.0	51.4	4.5

## 2) 調査方法

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

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

## 3) 水質分析

分析項目は、NP、NPEO、NPEC、エストロゲンとした。

NP、NPEO の分析は「下水試験方法（追補暫定版）内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編」<sup>1)</sup>に概ね準拠し、HPLC を用いて行った。また、NPEC<sup>2)</sup>、エストロゲン<sup>3)</sup>の分析は、LC/MS/MS を用いて行った。

## 4) 調査結果

大津川本川 OT⑥、名戸ヶ谷排水路流末 NT、増尾排水路流末 MS の各地点におけるエストロゲン、NPs の測定結果を図-2 に示す。

E2 は、2002 年 11 月の調査では、OT⑥で 2 回検出された以外は検出下限値未満であったのに対し、2003 年 2 月調査では、ほとんどの地点で通日検出され、その範囲は <math>0.3 \sim 4.1 \text{ ng/l}</math> であった。また、E1 については、2002 年 11 月調査では、採水の時間帯によっては検出下限値未満の場合もあったものの、いずれの地点においても検出された。その範囲は、OT⑥が  $7.5 \sim 11.8 \text{ ng/l}$ 、NT が  $<math>0.2 \sim 0.8 \text{ ng/l}</math>、MS が  $<math>0.2 \sim 2.9 \text{ ng/l}</math> であった。これに対し、2003 年 2 月調査では、OT⑥においては通日検出されたもののその濃度範囲は  $4.5 \sim 8.3 \text{ ng/l}</math> であり、全般的に 11 月の測定結果よりも低い値であり、NT、MS においては、いずれの時間帯でも検出されなかった。$$$

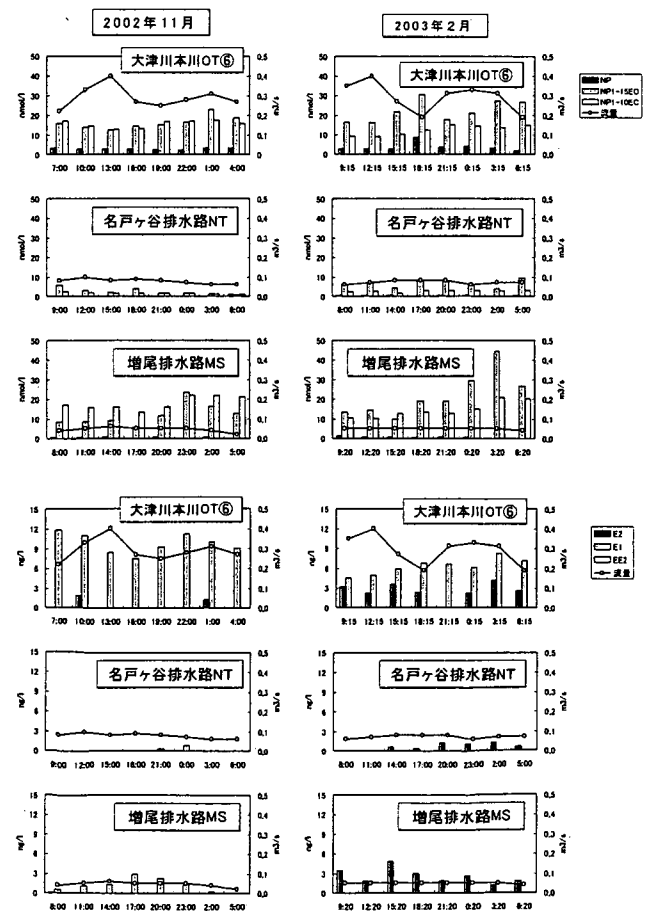


図-2 大津川流域におけるエストロゲン、NPs の経時変化

EE2 については、すべての地点において検出されなかった。

NP については、2 回の調査で顕著な差異は見られないものの、OT⑥の濃度範囲は 1.82~8.64 nmol/l であり、NT、MS はこれより低い値であった。

NPEO、NPEC については、下水道整備率が高い名戸ヶ谷排水路 NT では、他の 2 地点に比べ低い濃度であった。

図-3 に NP の濃度分布、NPEO、NPEC についてはエストキシ鎖長別の濃度分布を示す。

OT⑥、MS における NPEO は、NP1~15EO まで分布しており、いずれの地点においても NP1~4EO と NP8~10EO の間にそれぞれピークを持つ分布であるのに対し、NPEC は NP2EC にピークを持つ NP1~10EC までの分布である。

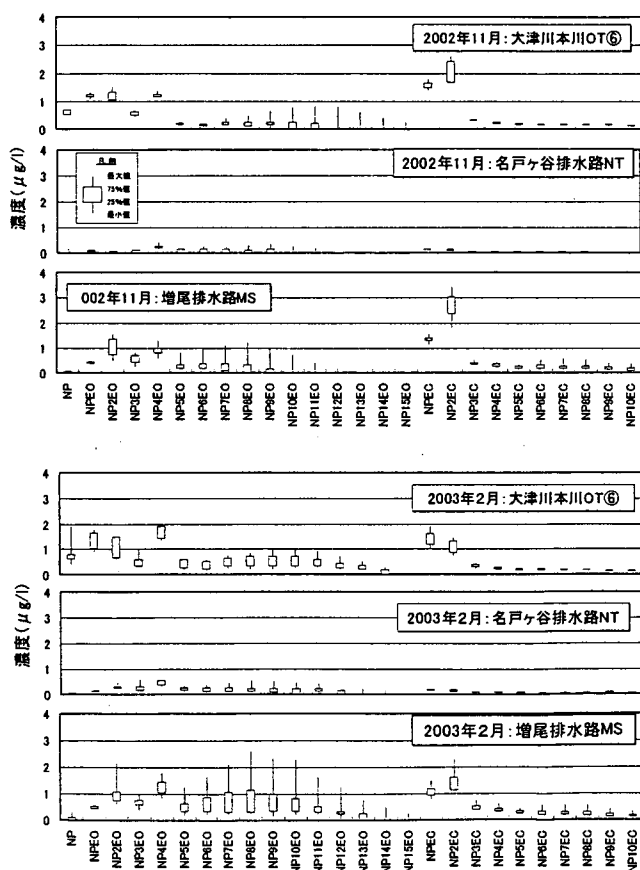


図-3 NP、NPEO、NPEC の濃度分布

## 2. 1. 2 多摩川における河道内変化

### 1) 対象河川及び調査地点

調査は多摩川の中流部の多摩大橋を基準とし約 4 km の区間 (以後、多摩大橋地区) で行った。調査地点は図-4 に示す 9 地点 (①~⑨) である。

本地区の特徴は、これより上流域には大規模な下水

処理施設がなく、ここで初めて下水処理場の処理水が流入し、河川水質が大きく変化する地点であり、ここでエストロゲン及びノニルフェノール類の負荷量収支を調査し、河道内でのそれらの挙動を推定した。

### 2) 調査方法

分析項目のうち、NP、NPEO、NPEC、エストロゲンの分析は 2.1.1 と同様の方法で行った。また、エストロゲン様作用をもつ物質の包括的試験法であるエストロゲン様活性は矢古宇らの方法に従い遺伝子組み換え酵母法によって測定を行った。

### 3) 調査結果<sup>4)5)6)</sup>

各地点における負荷量調査結果を図-4 に示す。エストロゲンについては、下水処理場を主な由来とする樋管 (樋門) の影響が大きく、地点②、④の負荷量で、地点⑥を通過する負荷量の殆どを説明できた。その構成としては、エストロゲンは E2 に比べ E1 の濃度が高く、この傾向は夏期、冬期ともに同じ傾向であった。ノニルフェノール関連物質についてもエストロゲンと同様に、両樋管 (地点②、③) における影響が大きく、その分布パターンは、NP1EC、NP2EC に占める割合が高い特徴が確認された。また、両樋管が合流した多摩大橋下流 1、300m 地点の NPEO、NPEC の分布は、両樋管の分布パターンと非常に似た分布が確認された。

また、この地点から多摩大橋下流 3、000m の区間には大きな樋管や支川が殆どなく (地点⑦、⑧)、その負荷量は本川負荷量に比べ非常に少ない。そこで、この区間を利用して、ノニルフェノール関連物質、エストロゲンの流下過程における変化について検討を行った (図-5)。

その結果、夏期 (8 月) はノニルフェノール関連物質及び、エストロゲンは流下に伴い減少する傾向が確認され、特に E1 は流下に伴い 44% 減少する特徴的な傾向が確認された。ノニルフェノール関連物質も全体では減少傾向が確認されたが、その分布パターンに大きな変化は確認されなかった。一方、冬期 (2 月) の調査では、エストロゲン、ノニルフェノール関連物質については、流下過程での減少傾向は確認されず、夏期調査とは異なった傾向が確認された。これらの要因として流下過程での分解や底質への蓄積等が要因として考えられた。河床においては、河床に付着した藻類について過去に調査を行っており、ノニルフェノールでは水の濃度に比べ、150~300 倍程度高い検出濃度であった。

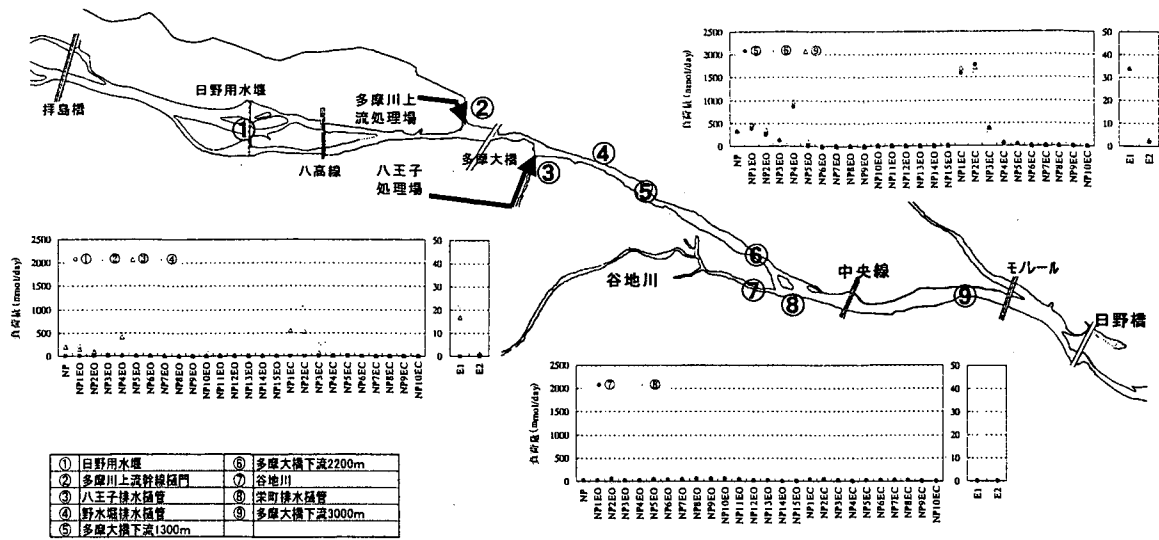


図-4 多摩川地区におけるノニルフェノール類及びエストロゲンの負荷量（2月）

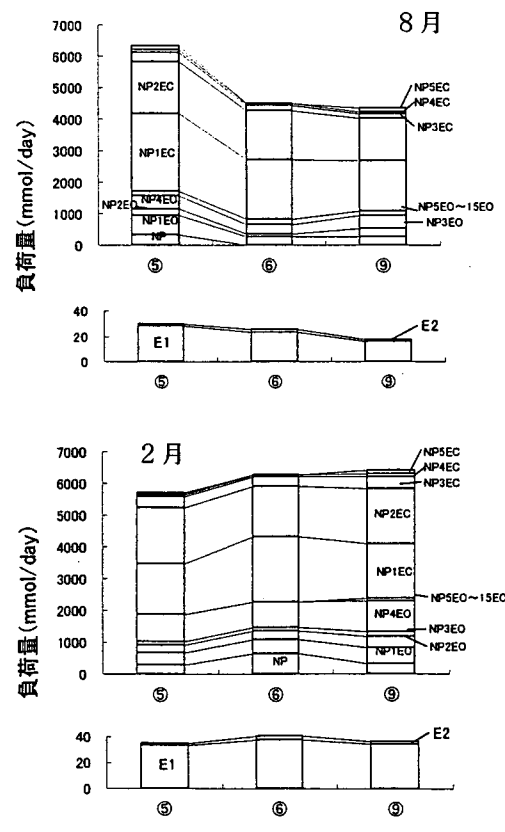


図-5 ノニルフェノール類及びエストロゲンの流下過程における変化

2.2 底生生物中のエストロゲン関連物質蓄積状況

下水処理水が流入する多摩川において、NP、E2及びビスフェノールA（以下、BPA）の付着藻類と底生動物に対する蓄積状況を調査した結果を表-2に示す<sup>7)</sup>。NPの生物濃縮係数（BAF）は付着藻類が160~650で

あるのに対し、底生動物は63~990であった。また、BPAの付着藻類、底生動物に対する濃縮係数はそれぞれ18~650、8~170であった。

E2の付着藻類に対する濃縮係数は64~1200、底生動物に対しては100~160である。したがって、付着藻類や底生動物に含まれる、E2、NPは水中の濃度に比べ高い割合で濃縮されることが明らかとなった。

表-2 内分泌攪乱物質及びエストロゲンの生物濃縮係数

	NP		BPA		E <sub>2</sub>	
	periphytons	benthos	periphytons	benthos	periphytons	benthos
St.1	-	-	-	-	1200	-
St.2	290	700	86	170	840	-
St.3	310	990	84	120	330	-
St.4	160	63	63	12	220	-
St.5	300	310	45	8	730	100
St.6	470	70	18	57	230	-
St.7	340	-	67	13	68	-
St.8	650	-	650	15	64	160
Average	360	430	140	56	460	130

2.3 NPs、エストロゲンの湖沼底泥への蓄積状況

湖沼に関する類似の報告事例は少なく、その実態は不明な点が多いため、湖沼底泥中のエストロゲン様物質の蓄積状況に関する調査を行った。調査は、手賀沼の底泥を採取し、エストロゲン（E1、E2、EE2、E3）とノニルフェノール類（NP、NPEO、NPEC、以下、NPs）の鉛直分布を測定するとともに底泥の年代測定を行った。

2.3.1 調査方法

調査は2002年4月に、環境基準点である手賀沼中央付近において実施した。調査地点を図-6に示す。

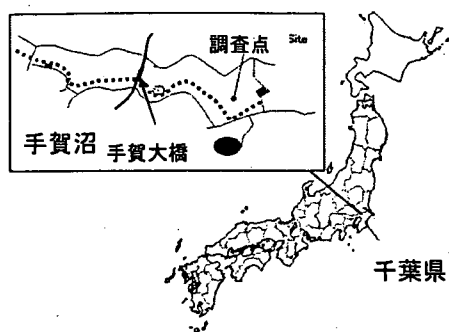


図-6 調査範囲・調査位置

底泥試料は、ダイバーが潜水により水中作業でアクリル製パイプ（10cmφ×100cm）を用いて不攪乱状態で採取し、深さ方向に1cm毎に分割した。分析項目は、一般項目（密度、含水率、強熱減量 IL、全有機炭素 TOC、全窒素 TN、全リン TP、硫化物 T-S）、エストロゲン（E1、E2、EE2）、NPs（NP、NPEO、NPEC）と、年代推定（Pb210）とした。分析方法は、一般項目については、密度、含水率、IL、TN、TP、T-S は、環境庁の底質調査方法、TOC は CHN コーダー法を用いた。エストロゲン（E2、E1、EE2）については、小森他<sup>8)</sup>に従い LC/MS/MS 法、NP は環境庁（1998）<sup>9)</sup>に従い固相抽出-GC-MS 法を用いた。NPEO は、下水道における内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル案<sup>10)</sup>に従い固相抽出-GC-MS 法を用い、NP1E0~NP15E0 までを定量した。NPEC は、小森他<sup>11)</sup>に従い固相抽出-GC-MS 法を用いて、NP1EC、NP2EC、NP3EC を定量した。年代推定は Pb210 法を用いた。

エストロゲン、NPs については、泥深 50cm 以浅は 1cm ピッチ、泥深 50cm 以深の層は概ね 10cm ピッチ（60cm、70cm、80cm、87cm）で分析し、その他の項目は 1cm ピッチで分析した。なお、Pb210 は 10cm ピッチで分析した結果から推定を行った。

### 2. 3. 2 調査結果

#### 1) 一般項目

一般項目の鉛直分布の代表例として含水率、TOC、T-S を図-7 に示す。含水率は 87cm 層の 75% から 60cm 層の 60% まで減少し、60cm 層以浅は一部の減少を除き、1cm 層の 90% まで増加傾向を示している。IL、TOC、TN の鉛直分布パターンは類似しており、87cm 層から 63cm 層まで減少し、63cm 層で最も低い値を示した。これと比べて 63cm 層から 50cm 層にかけては増加し、1cm 層に向けて緩やかに増加する傾向がみられた。T-S は、87cm 層から 32cm 層まで定量下限値（0.01mg/g）未満であり、30 から 20cm 層で <0.01 から 0.3mg/g へ増

加し、以降 1cm 層まで T-S に類似した分布を示した。

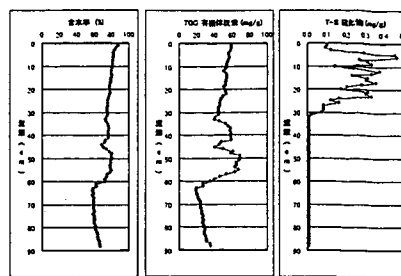


図-7 一般項目の鉛直分布（含水比、TOC、T-S）<sup>12)</sup>

#### 2) エストロゲン、NPs

表層底泥中の E1 及び NPs の濃度は、流入している大津川の河川水中の濃度に比べ、かなり高い結果であった。このことは、国土交通省での河川実態調査<sup>13)</sup>の結果と同様である。また、表層以外でも高い汚染が認められた。エストロゲンについては、E2 が殆ど検出されず、EE2 は全く検出されなかった。検出された E1 の蓄積状況をみると、泥深 47~30cm で上方へ微増し、泥深 30~20cm の間で急速な増加がみられ、20~10cm では急速に減少している（図-8 A）。NPs については、NP、NPEO とともに泥深 50~35cm で下層から上層への急激な増加がみられるが、35cm 以浅では変動はあるものの比較的高いままでも推移している（図-8 B、C）。NPEC は NP、NPEO に比べ含有率が低い（図-8 C）。

E1 の鉛直分布をみると、20cm 以浅で減少傾向がみられており、後述する手賀沼への流入負荷の低減によることを示している可能性と、底泥中での分解等、物理化学的な変化の時間的経過を示している 2 つの可能性が考えられる。一方、NPs は、40cm 以浅で減少する傾向がみられない。これについては、負荷量や形態の変化を解明する必要がある。

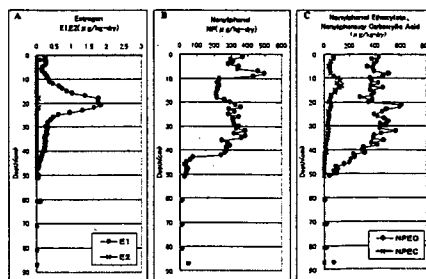


図-8 底泥中のエストロゲンよ NPs 鉛直分布<sup>12)</sup>

以上の結果から、E1、NP、NPEO は、好気的な条件にある水中に比べ、底泥に蓄積されてからはかなり安定的に存在しているように見える。

次に、底泥中の NP と NPEO、NPEC の存在比を mol ベースにとり、図-9 に示した。汚染の進行が顕著に始まった 40cm 以浅では、NP と NPEO の存在比はそれぞれ 50%程度とふれはあるもののほぼ同じ程度の存在比である。一方、NPEC は 40cm 以浅では概ね数%程度しか存在していない。しかし、詳しく見ると泥深 40cm 以浅 12cm まではわずかではあるが NP の存在比は減少するが、NPEC の存在比は増加しているように見える。また、12cm から数 cm の深さでは、NP の存在比が増加しているのに対して、NPEC の存在比は減少し、さらに浅い層では NP の存在比が減少するのに対して NPEC の存在比が増加する傾向が見られた。今後、これらが有意な変化かさらに検討が必要である。

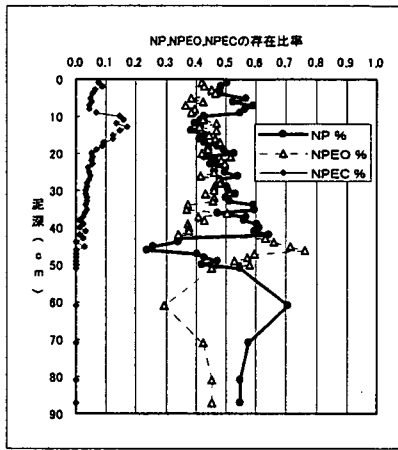


図-9 底泥中の NP、NPEO、NPEC の mol ベースでの存在比

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

### 3) 年代推定 (Pb21)

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

堆積重量  $W_z$  ( $g/cm^2$ ) は、単位面積の柱を想定し、ある深さ  $Z$  (cm) の面より上にある堆積物の積算重量であり、堆積時間で除したものが堆積重量速度  $Sw$  ( $g/y/cm^2$ ) となる。堆積重量速度は一定と仮定するが、堆積重量を用いることで、圧密が考慮される。

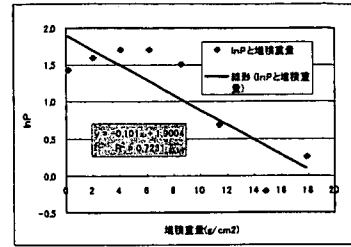


図-10 Pb210 の壊変数と積算重量

堆積重量速度を  $Sw$  ( $g/年/cm^2$ ) とすると、

深さ  $Z$  まで堆積するのに要する期間は次式で示される。 $t = W_z / Sw$  (式-1)

ここで、 $t$ : 堆積年数(年)、 $Z$ : 堆積層の深さ(cm)、 $W_z$ : 深さ  $Z$  までの積算重量 ( $g/cm^2$ ) である。

一方、鉛 210 の含量 ( $P$ ) の鉛直分布から、

$$P_z / P_1 = (1/2)^{t/T} \quad \text{(式-2)}$$

が計算できる。ここで、 $P_z$ : 深さ  $Z$  における鉛 210 の含量の機器計数值 (dpm/g)、 $P_1$ :  $Z$  より上層の鉛 210 の含量の機器計数值 (dpm/g)、dpm: 放射性物質の壊変する絶対的な計数值の単位 (disintegration per minute)、 $T$ : 鉛 210 の半減期 (22.3 年) である。

式-2 の式両辺の対数をとると、

$$\ln P_z = \ln P_1 - 0.311 (W_z / Sw) \quad \text{(式-3)}$$

となる。したがって、鉛 210 の含量の対数を  $y$  軸、積算重量を  $x$  軸にとったグラフから勾配を求めると、堆積重量速度を算出することができる。年代推定の結果、10cm 層が 1995 年、20cm 層が 1989 年、30cm 層が 1982 年、40cm が 1975 年、87cm 層は、1922 年と推定された。

### 4) エストロゲン、NP-s の蓄積年代の推定

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

図-11 に示す手賀沼の流域人口は、1970 年から 1980 年までの 10 年間で約 60 万人から約 100 万人にほぼ倍増している。

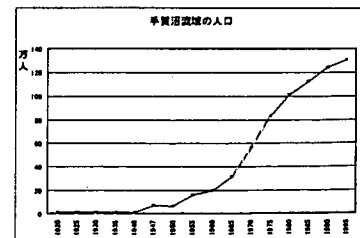


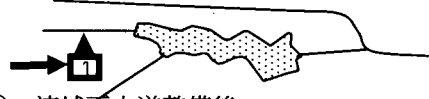
図-11 手賀沼流域の人口の推移

EI の顕著な増加は、図-12 に示す手賀沼流域の下水道整備状況の変化から、流域の人口の急増、手賀沼に放流する終末処理場、浄化槽等の水洗化人口の増加とともに手賀沼へ排出されるエストロゲン量が増加したためと考えられる。その後、新たに流域下水道が整備されると、この流域での排水が手賀沼をバイパスされたこと、さらに流域内にあった終末処理場も廃止されたこと等により、エストロゲンの負荷量が顕著に減少してきたものと考えられる。また、主に工業由来と考えられるNPの増加が顕著となったのは1963年～1978年頃（泥深50～35cm）と推定された。NP、NPEOは現在に至っても減少の傾向がみられないことから、下水道に取り込まれていない排水の存在が示唆され、手賀沼への流入は継続していると考えられる。

① 下水道整備前



② 柏終末処理場



③ 流域下水道整備後

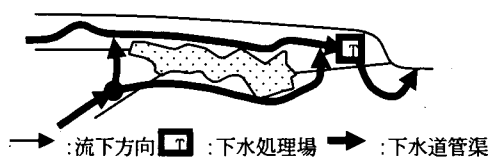


図-12 手賀沼流域の下水道整備状況の変化

2.4 底泥中のノニルフェノキシ酢酸類分析手法の改良

今年度は、磯部ら<sup>14)</sup>の分析方法を基に検討し、開発した方法<sup>15)</sup>に底泥中のノニルフェノキシ酢酸類分析手法の改良を行った。その方法を以下に示す(図-13)。

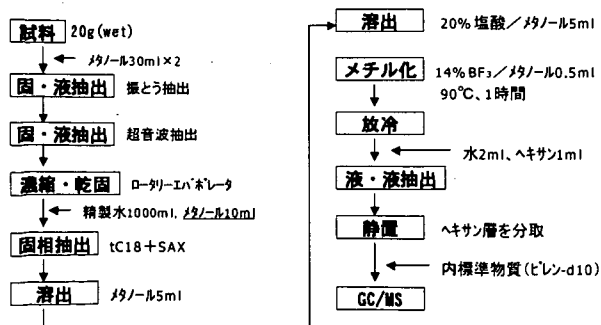


図-13 底泥中のノニルフェノキシ酢酸類の分析方法

試料 20g にメタノール 30ml を加え固・液振とう抽出を行う。次に固・液超音波抽出を行う。この2つの操作は3回繰り返す。遠心分離後、メタノール層をナス型フラスコに移しロータリーエバポレータを用いて40℃の条件下で濃縮・乾固する。乾固した後、精製水1000ml とメタノール 10ml で溶解し、三角フラスコに移す。予めメタノール、精製水でコンディショニングした固相カラム (Sep-Pak tC18) に20ml/min の流速で通水する。通水後、カラムを乾燥させないように注意しながら、予めメタノール、精製水でコンディショニングした強陰イオン交換樹脂カラム (Varian SAX) を tC18 の下に連結する。次に、メタノールを 1ml/min の流速で 5ml 通過させ、tC18 より目的成分を溶出させると同時に、SAX に陰イオン性の物質を捕集する。tC18 を取り除き、SAX に 20% 塩酸/メタノールを 1ml/min の流速で 5ml 通過させ、目的成分を溶出する。溶出液に 14% BF<sub>3</sub>/メタノールを 0.5ml 加え、90℃ で 1 時間加熱してメチル化を行う。放冷後、水 2ml、ヘキサン 1ml を加えて液・液抽出を行う。ヘキサン層を分取、内部標準物質 (ピレン-d10) を加えた後、GC/MS による測定を行う。

この手法を用いた GC/MS の分析条件を表-3、河川底質試料への添加回収試験の結果を表-4 に示した。それぞれ 3 試料を用いての試験の結果、NP1EC は 100%、NP2EC は 92%、NP3EC は 75% の回収率であり、前年の報告値 (80%、63%、45%) に比べ、回収率を向上させることができた。

表-3 GC/MS 分析条件

GC条件	カラム	HP-5MS 30m×0.25mm df=0.25μm
	カラム温度	100℃ (1min) ~ 12℃/min ~ 300℃ (1min)
	注入口温度	300℃
	注入法	パルスドスプリットレス
MS条件	キャリアガス流量	1.2ml/min
	インターフェイス温度	300℃
	イオン源温度	230℃
	イオン化法	EI
	イオン化電圧	70eV
	検出モード	SIM (定量イオン; 221.2, 265.2, 309.2)

表-4 添加回収試験結果

	NP1EC	NP2EC	NP3EC
無添加試料濃度 (μg/kg-wet)	15	163	46
標準物質添加濃度 (μg/kg-wet)	250	250	250
添加後の試料濃度 (μg/kg-wet)	266	392	233
回収率 (%)	100	92	75

### 3. まとめ

本研究では、内分泌攪乱物質について底泥における測定法及び水環境中での挙動について検討を行い、以下の結果を得ることができた。

- 1) 河川におけるエストロゲン、NPs の実態調査から、それらの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) 付着生物、ベントスに対するエストロゲン関連物質 (NP, BPA, E2) 蓄積状況を調査し、付着藻類や底生動物に含まれる E2 や NP は、水中より高い割合で濃縮されていることが判明した。
- 3) 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。
- 4) エストロゲン、NPs の流域の変化は E1、NPs の底泥中の鉛直分布に大きく影響を与えている。
- 5) 底泥中の NPs はモル比では NP と NPEO は同程度、NPEC はそれらよりも 1 桁小さい量しか存在しておらず、これらの存在比は比較的安定していた。これは河川水での存在比よりも NP が大きく、NPEC が小さい傾向にあった。
- 6) 底泥や底生動物、付着藻類でのエストロゲン、NPs が水中よりも大きいことは、都市排水由来の内分泌攪乱物質による水域の汚染が水生生物へ及び曝露経路として、水だけでなくこれらの食物網の経路も考える必要があることを示唆している。
- 7) 今後は、エストロゲン、NPs について、河川内での分解、変化の要因について検討を進めるとともに底泥、生物への移行についても検討を進める。
- 8) 新しい前処理法による底泥試料中の NPEC 類の分析で、従来法と比較して NPEC 類の回収率の向上が可能であることを確認した。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 社団法人日本下水道協会：「下水試験方法（追補暫定版）内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編」、pp. 250-262、2002
- 2) 八十島誠、小森行也、田中宏明：「下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析」、第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集、p. 256、2002
- 3) 小森行也、八十島誠、田中宏明他：「LC/MS/MS によるエストロゲンの分析」、第 36 回日本水環境学会年会講演要旨集、p. 431、2002
- 4) 玉本博之、宮本宣博、八十島誠、小森行也、東谷忠、田中宏明：「河川水中に存在するエストロゲン様活性の消長と寄与物質の挙動」、第 5 回環境ホルモン学会講演要旨集、p. 170、2002
- 5) 八十島誠、小森行也、田中宏明：「水環境におけるノニルフェノールエトキシレートおよびその分解生成物の存在状態」、第 11 回環境化学討論会講演要旨集、pp. 224-225、2002
- 6) 宮本宣博、玉本博之、八十島誠、小森行也、田中宏明：「環境水中のエストロゲン活性の由来検討」、第 11 回環境化学討論会講演要旨集、pp. 104-105、2002
- 7) Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Periphytons and Benthos in the Tama River Akihiro Takahashi, Tadashi Higashitani, Yasuko Yakou, Hiroaki Tanaka: CDRom of Proceedings of 3rd IWA World Water Congress International Water Association, e21209a, 2002. 4
- 8) 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論文集(2001)の方法
- 9) 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、固相抽出-GC-MS法、1998. 10
- 10) 下水道における内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(案) (日本下水道協会(2001)) 固相抽出 GC-MS 法
- 11) 小森他、GC/MS によるノニルフェノキシ酢酸類の分析、環境ホルモン学会第 4 回研究発表会(2001)の方法 (固相抽出-GC-MS 法)
- 12) 和田順之輔、李建華、佐々木稔、小森行也、田中宏明、Chikashi Sato、「手賀沼底泥中における内分泌攪乱物質の鉛直分布に関する検討」、第 5 回環境ホルモン学会講演要旨集、p. 452、2002
- 13) 国土交通省、河川局 平成 13 年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果、2002. 12
- 14) 磯部友彦、高田秀重：「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、2000. 6
- 15) 小森行也、八十島誠、田中宏明：「GC/MS によるノニルフェノキシ酢酸類の分析」、第 4 回環境ホルモン学会、p. 95、2001

## 6. バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する研究

水質チーム	上 席 研 究 員	田中 宏明
	主 任 研 究 員	小森 行也
	研 究 員	玉本 博之
	交 流 研 究 員	宮本 宣博

### 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<sup>1)</sup>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る、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<sup>2)</sup>。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、まだ十分な情報は得られていない。そこで ①下水中のエストロゲン様活性の濃度レベルを明らかにする、②化学分析結果と比較することによって、現在測定を行なっているエストロゲンやエストロゲン様物質のエストロゲン様活性への寄与を明らかとする、③化学分析と遺伝子組み換え酵母法の比較から見られる由来の不明なエストロゲン様活性の性状把握を行なう、という3点を明らかにするために検討を行なった。

### 2. 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～<sup>2)</sup>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-1 に示す。

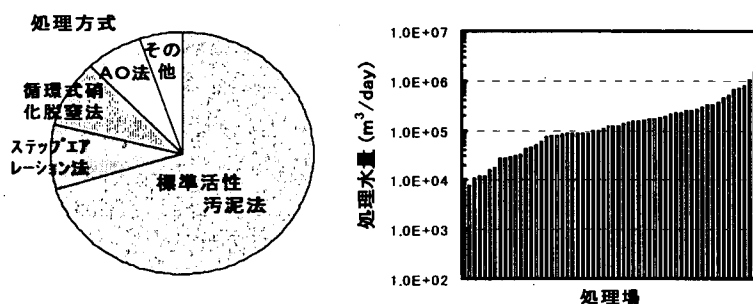


図-1 調査対象処理場の処理方式と処理水

### 3. 試験方法

#### 3.1 組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定

##### 1) 下水試料の固相抽出法による濃縮

下水試料 1L を GF/B（保持粒径  $1\mu\text{m}$ ）フィルターによってろ過して得たる液を、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）100 $\mu\text{L}$  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)

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

遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定法については Routledge ら<sup>3)</sup>の方法を改良した矢古宇ら<sup>4)</sup>の方法に従った。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  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド(CPRG)を含む Growth Medium) に  $4 \times 10^7$  cell/ml となるように添加した。この Assay Medium を 96 穴マイクロプレート(FALCON 社製)の各ウェル内に、180  $\mu$ l ずつ添加し、標準物質 (n=8) および濃縮操作を行なった河川試料(n=3)の希釈系列を作成し、これらを 20  $\mu$ L ずつ添加し、マイクロプレートリーダー(Wallac 社 ARVO SX1420)を用いて吸光度(550nm,600nm)を測定した。その後、28℃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。

$$\text{「換算値} = \text{培養後の OD550 値} - (\text{培養後の OD600 値} - \text{Blank の OD600 値)} \text{」}$$

化学物質のエストロゲン様活性の算出には  $17\beta$ -エストラジオール濃度と  $\beta$ -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  $\beta$ -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なった。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。

## 3.2 化学分析

エストロゲン様物質の分析項目は全国実態調査の結果<sup>1)</sup>と、各物質のエストロゲン様活性のポテンシャルを考慮して、エストロン(E1)、 $17\beta$ -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<sup>5)</sup>の方法に従いLC/MS/MSを用いて測定を行った。またNP、NPnEOについては下水試験法追補暫定版<sup>6)</sup>に従いHPLCを用いて測定を行った。NPnECについては八十島ら<sup>7)</sup>の方法に従いLC/MS/MSを用いて測定を行った。

## 3.3 理論活性値

上記3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の理論活性値を算出した。理論活性値は各物質濃度に比活性値を乗じることによって算出した。比活性値については矢古宇らの文献<sup>4)</sup>に従いE1=0.3、E2=1.0、NP=0.001とした。また矢古宇らの文献に記載のないNPnEOやNPnECについては、文献に示された試験方法に従って試験を行い、比活性値を算出した。

### 3.4 極性の違いによる分画方法の検討

試料は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シクロロメタン=1:1 溶液 1000  $\mu$ L に転溶した。極性分画操作については図-2 に示すようにアセトン 10ml/min、ヘキサシクロロメタン (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。これをヘキサシクロロメタン、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、溶出液 9 分画を得た。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。

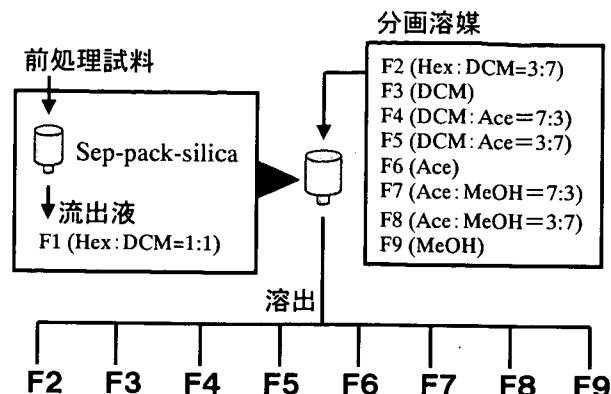


図-2 固相カートリッジを用いた極性分画方法

## 4. 結果及び考察

### 4.1 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-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。

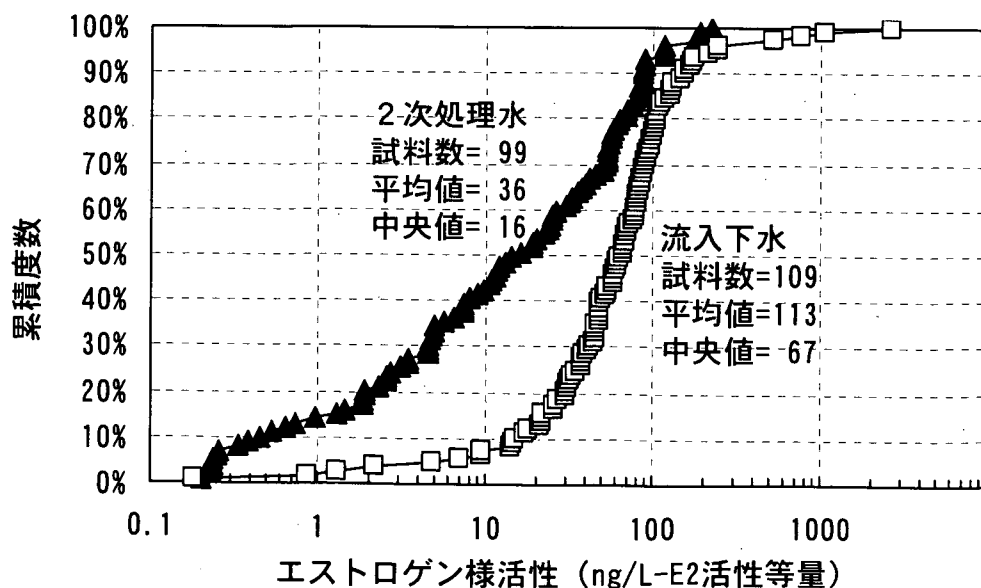


図-3 流入下水及び2次処理水のエストロゲン様活性の濃度分布

## 4.2 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

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-4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

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。

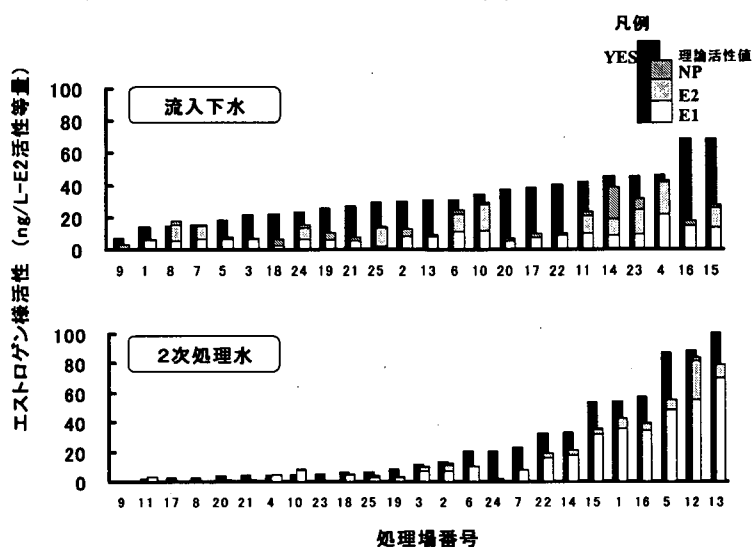


図-4 エストロゲン様活性への各物質の寄与

## 4.3 固相カラムを用いた極性分画によるエストロゲン様活性の性状把握

### 4.3.1 標準物質の極性分布

図-5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。

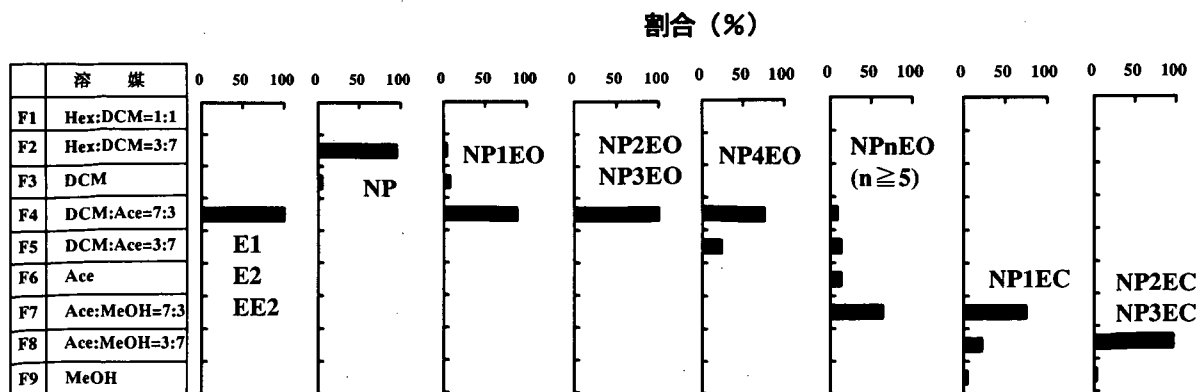


図-5 固相カートリッジを用いた極性分画による化学物質の分画結果

### 4.3.2 下水中のエストロゲン様活性の極性分布

E1, E2, NPの理論活性値によってエストロゲン様活性が説明できるケースとできないケースを示したが、これらの3物質では説明できない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行い、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なった。平成14年に行なった全国23処理場におけるエストロゲン様活性の極性分布を図-6に示す。

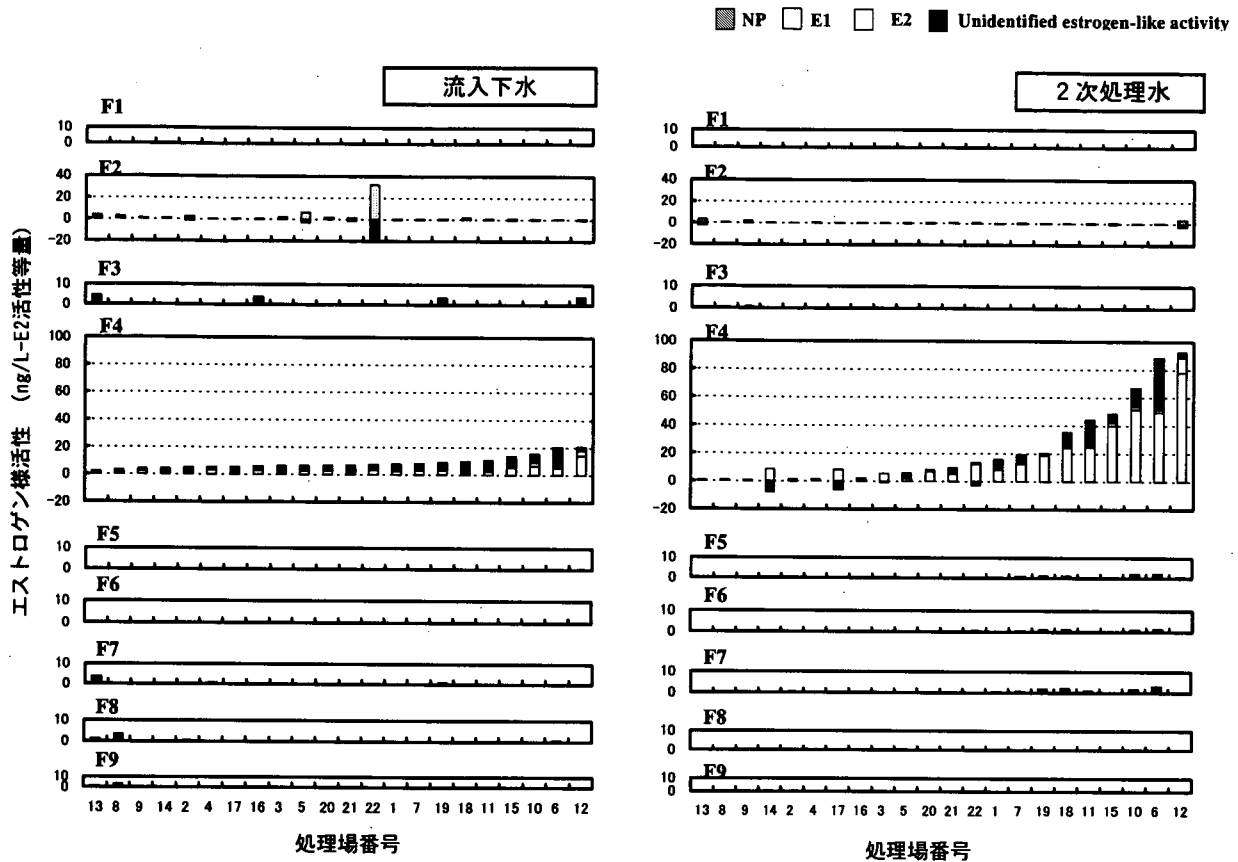


図-6 下水中のエストロゲン様活性の極性分画結果と各物質の寄与

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のは危険であり注意が必要である。

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エストロゲン及び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

表-1 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
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	-
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。

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なった。その結果を表-1に示すが、NP n E O, NP n E Cのエストロゲン様活性は殆ど確認されず、これら各物質の理論活性値を算出してその寄与を推定したが、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。今後はこれらの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分画等を含めた検討を行っていく必要があるものと考えられた。

#### 4. まとめ

下水中のエストロゲン様活性について検討を行い以下の結論を得た。

- 1) 流入下水に比べ2次処理水の方が中央値を基準とすると約76%程度低い値であり、下水処理によってエストロゲン様活性が低減されていることが確認された。また流入下水の濃度レベルとしては概ね30~110ng/Lの間にある試料が多くこの区間に全体の72%が含まれたが、2次処理水については非常に広い濃度分布が見られ、処理方法や運転条件等の多くの要因によって低減率が大きく変化していることが推測された。
- 2) 流入下水中のエストロゲン様活性の主要な由来物質はE1, E2であったが、2次処理水はE1の占める割合が高い結果であった。また今回対象とした3物質(E1, E2, NP)の理論活性値で説明できないエストロゲン様活性の全体に占める割合は、処理場によって大きく異なったが、流入下水の方が不明なエストロゲン様活性の占める割合が高いことが確認された。
- 3) 固相カートリッジを用いた極性分画手法によって、エストロゲン様活性の性状把握を試みた。その結果、流入下水中のエストロゲン様活性は低極性~高極性まで広く検出されたが、代表的なエストロゲン様物質が分画されるF2~F4でほとんどエストロゲン様活性が説明できた。また2次処理水はF4分画で殆ど説明できることが明らかとなった。また、E1, E2, NPで説明できないエストロゲン様活性も、F2~F4を中心として存在していることが確認された。

なお、本調査研究は、運営費交付金(一般勘定)により実施されたものである。

#### 〈参考文献〉

- 1) 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)。

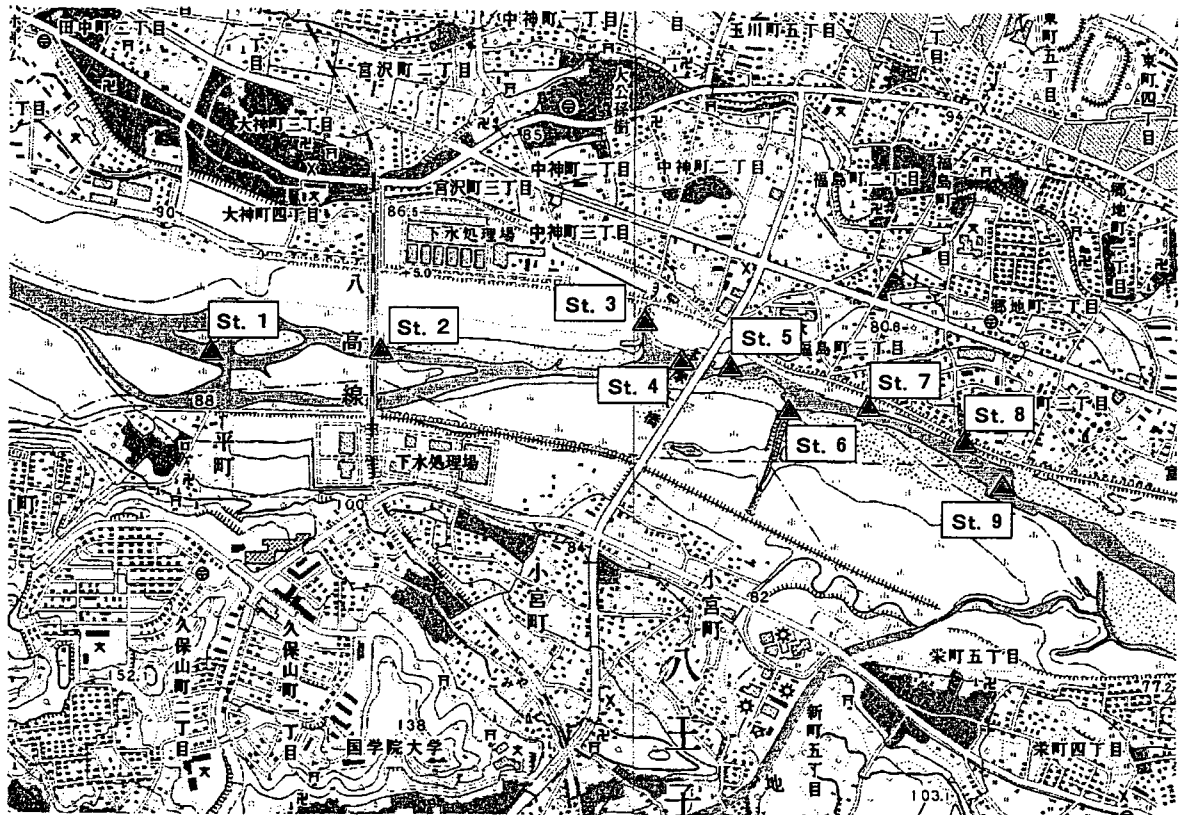
## 7. 水環境の評価に関する調査

水質チーム   首席研究員  田中  宏明  
                   研究員  玉本  博之  
                   専門研究員  東谷  忠  
                   専門研究員  山下  尚之  
                   交流研究員  宮本  宣博

### 1. はじめに

都市排水等の河川への流入に伴い、排水中の栄養塩類や内分泌攪乱物質によるヒトや生態系への影響が懸念されている。特に河川水中に存在するこれらの化学物質が魚類等の水生生物に及ぼす影響の把握が求められている。そこで本調査では多摩川等の河川を対象に人の活動に伴う排水中の栄養塩類や内分泌攪乱物質等の流入状況を把握するとともに、生態系への影響を評価することを目的としている。

本年度は、多摩川流域を対象に下水処理水等を中心とした都市排水の流入影響に対する水質等の実態調査を実施するとともに、窒素、リン等の栄養塩類が藻類へ与える影響について藻類生長能力試験（AGP試験）を用いて検討を行うとともに、さらに、河川水中に含まれる微量化学物質が魚類に与える影響に関する検討も行い、都市排水が水環境に与える影響に関し総合的な検討を行った。



▲ 調査地点

図-1 調査対象地区と調査地点

### 2. 調査地点の概要

多摩川を挟んで右岸側の八王子市、左岸側の昭島市に接した約 2600m の区間である多摩大橋地区（図-1）において調査を行った。本地区上流域には大規模な下水処理施設がなく、この地区で初めて下水処理場からの放流

水が流入し河川水質が大きく変化する地点であるという特徴を有する。この地区の上下流点で水質のレベルが大きく変化している特性を利用して、都市排水が流入した場合の生物及び生態系の変化を把握するため、この区域を選定した。

### 3. 水・物質循環機構解明のための実態把握

#### 3. 1 調査項目および試験方法

本地区の一般的な水質特性を把握するため、平成14年8月及び平成15年2月に調査を行い、全リン、溶解性オルトリン酸態リン、全窒素、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、アンモニア性窒素を測定した。試験方法は原則として河川水質試験方法（案）1997年版に従った。

#### 3. 2 調査結果

多摩川への各樋管、支川からの流入濃度、流量を調査することによって、河川への栄養塩の流入状況の把握を行った。その結果を図-2に示す。本地区の上流地点では、下水道整備が充実しており本地点で初めて下水処理水が合流している。このため下水処理水を主な由来とする多摩川上流幹線樋管、八王子排水樋管の負荷量が非常に大きい結果となった。両樋管、樋管からの水質濃度は下水処理の基準以下であるが河川流量に占める割合が高いことが大きな要因となっている。また窒素構成比を見ると、2月調査時にアンモニア性窒素の占める割合が高い樋管が多く確認された。

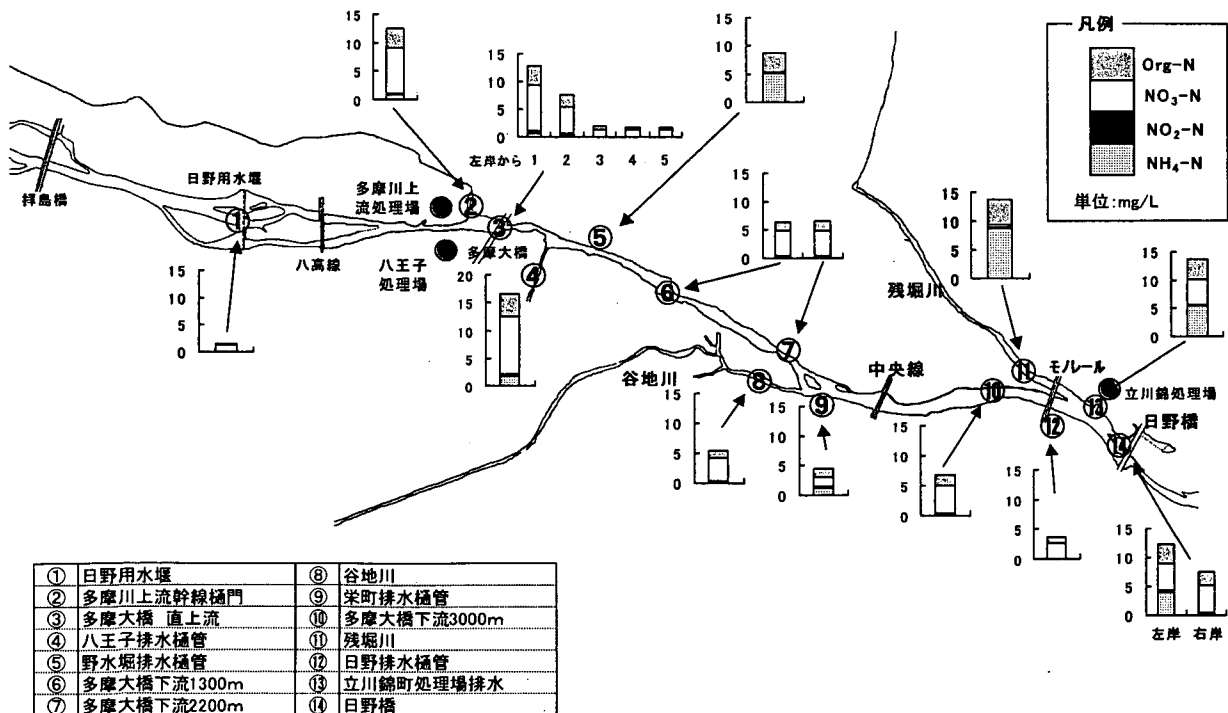


図-2 多摩川調査における各態窒素の分布（平成15年2月採水）

### 4. 生態系への影響要因に関する検討

#### 4. 1 藻類を用いたAGP試験

都市排水流入による藻類増殖への影響を検討するため、従来法に比べ多数のサンプルを迅速に処理することを

可能にするマイクロプレートを用いた藻類増殖試験（AGP試験）により、多摩川における藻類増殖に関する評価を行った。

### 1) 試験方法

藻類増殖試験に用いる供試藻類は、緑藻類の *Selenastrum capricornutum* を使い、培養温度 24℃、照度 4000lux、12 時間明暗周期の条件で培養を行い、培養期間中にマイクロプレートリーダーを用いて藻類増殖量の変化を吸光度 (450nm) により測定し、藻類量がほぼ定常状態になった時の細胞濃度を AGP 値とした。

調査サンプルは採水後直ちに実験室に持ち帰り、メンブレンフィルター (0.45 μm, Millipore) によりろ過を行った後、試験に供するまでの間、-30℃にて冷凍保存を行った。

### 2) 多摩川における AGP 試験結果

多摩川における AGP 試験の結果を図-3 に示す。AGP 値とともに無機態の窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$ ) およびリン ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) 濃度もあわせて示す。下水処理水流入前の St.1 の河川水では窒素・リンといった栄養塩類濃度も低く、ほとんど藻類の増殖は見られなかったが、下水処理水合流後の St.3 では、栄養塩類濃度の上昇とともに AGP 値は高くなり、藻類の活発な増殖が確認された。また、調査地点において下流側に位置する St.5~St.7 においても、AGP 値の低下は見られず、窒素・リンなどの栄養塩類はこの区間においてあまり低減せず、AGP 値は高い値を維持することが確認された。St.8 立川錦処理場排水は、窒素・リンといった栄養塩類濃度は高い値が示されたが、AGP 値は St.2 多摩川上流処理場のサンプルなどと比較して低い値が示された。これは、窒素・リン以外の物質が藻類増殖の制限物質になっている可能性が考えられ、今後は藻類増殖の制限物質についても検討を行っていく必要がある。

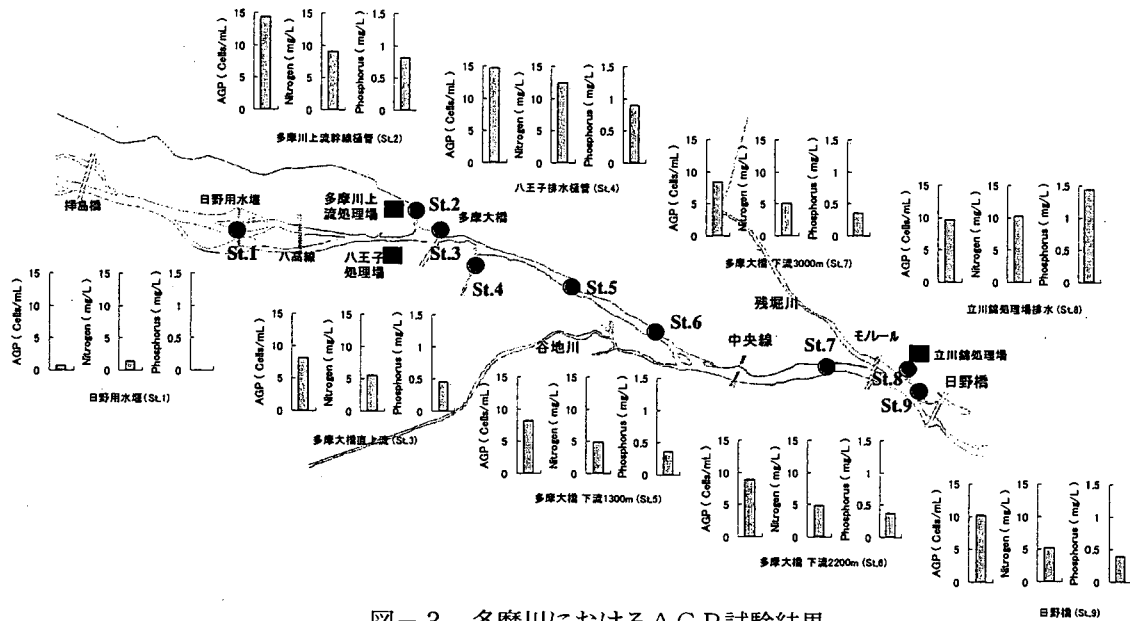


図-3 多摩川における AGP 試験結果

本調査の結果より、下水処理水の流入によって、河川における 1 次生産者である藻類の増殖が促進されることが確認された。今後は、下水処理水と河川水との混合比率が変化した場合の影響や藻類増殖の制限物質の検討等、下水処理水が放流先河川の水質に与える影響について、さらに情報を蓄積する必要があるものと考えられる。



#### 4. 2 メダカを用いた化学物質影響評価試験

河川水中の微量化学物質が魚類に与える影響を検討するため、土木研究所において開発中の改良型メダカ曝露試験装置（図-4）を河川水質自動監視所に設置して、魚類曝露試験を実施するとともに、この装置の改良点を抽出することとした。

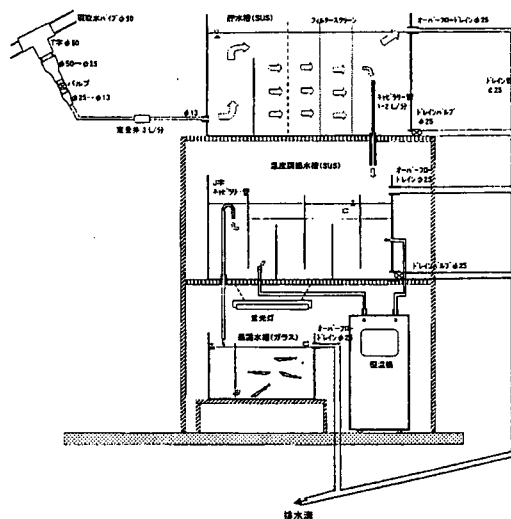


図-4 改良型メダカ曝露試験装置

##### 1) 試験実施場所

本試験では、多摩川地区のうち下水処理水が流入しない拝島橋監視所、および複数の下水処理場の下流に位置する日野橋監視所を試験実施地点とした。

##### 2) 試験対象魚及び生物指標

試験対象魚としてメダカ (*Oryzias latipes*) を選定した。環境省ではメダカを用いた室内試験の結果、ノニルフェノールおよびオクチルフェノールが内分泌攪乱作用を有していることが報告されており、環境省が用いたものと同様のメダカによる試験を現地にて実施することとした。

魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）として、雄メダカのVTGを影響指標とした。なお、この測定はメダカVTG-ELISAキットを用いることとした。

##### 3) 河川水のエストロゲン濃度

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・合成エストロゲンおよびエストロゲン様物質があげられる。本試験では、前者のうち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明らかにすることとした。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、組換え酵母法によるエストロゲン活性 (E2活性) を測定した。

##### 4) 試験装置

一般に、魚類曝露試験では水温、流量、光周期（日長）、餌などの試験条件を制御することによって、水質による魚類への影響を判断することが可能となる。そこで、平成13年度に考案した改良型メダカ曝露試験装置を製作

し、試験を実施した。メダカ曝露水槽の容積は30Lとした。

### 5) 試験条件

本試験における試験条件は、環境省の実施した室内試験に合わせ設定した。現場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。

試験条件を表-1に示す。

表-1 河川水質自動監視所でのメダカ曝露試験 条件一覧

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

### 6) 試験結果

拝島橋および日野橋監視所にて実施した本試験では、メダカへの影響を検出することはできなかった。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活性、エストロゲンおよびエストロゲン様物質の濃度は低濃度であった。(表-2, 3)

表-2 拝島橋水質測定結果 (単位: ng/L)

	試験開始	第1週	第2週
E2 活性 (ng/L)	ND	ND	ND
E2 (ng/L)	ND	ND	ND
E1 (ng/L)	ND	ND	ND
EE2 (ng/L)	ND	ND	ND
NPnEO (n=1-15) (μg/L)	ND	ND	ND

表-3 日野橋水質測定結果 (単位: ng/L)

	試験開始	第1週	第2週
E2 活性 (ng/L)	12.54	6.59	10.62
E2 (ng/L)	1.5	Tr(1.0)	1.7
E1 (ng/L)	21.9	12.2	15.2
EE2 (ng/L)	ND	ND	ND
NP1EO (μg/L)	0.17	0.18	0.14
NP2EO	0.17	0.18	Tr(0.12)
NP3EO	Tr(0.08)	Tr(0.09)	Tr(0.06)
NP4EO	0.21	0.39	0.20
NP5EO	Tr(0.05)	Tr(0.05)	ND
NPnEO (n=6-15)	ND	ND	ND

## 7) 考察

拝島橋および日野橋水質自動監視所2ヶ所で魚類影響試験を実施した結果、監視所ごとの課題が下記のとおり抽出された。

- (ア) 拝島橋監視所では、土丹から供給される細かな土の粒子がメダカ曝露水槽に蓄積した。このような細かな粒子を除去する必要があるのかを調べ、必要であれば第1槽に膜等のスリットを設ける工夫が必要である。
- (イ) 拝島橋監視所では、水質自動測定機の排水はパイプで河川に戻される構造であるため、魚類試験装置の排水はパイプの隙間に接続する必要があった。
- (ウ) 日野橋監視所では、時間の経過に伴い温度調節槽にバクテリアの繁殖がみられた。
- (エ) 水質自動監視所の電力にはあまり余裕がないため、省電力型の試験装置を考案する必要があると考えられた。

## 5. 結論と課題

平成14年度は、多摩川における藻類増殖試験などの実態把握、現地でのメダカを用いた化学物質影響評価試験の改良及び汚濁負荷原単位の算定根拠に関する整理などを行った。

本研究の成果として、以下のことが明らかになった。

- ①藻類増殖試験においては、河川への下水処理水流入による藻類増殖への影響が確認された。
- ②水温、流量、光周期及び餌などの試験条件を制御することの可能な魚類曝露装置を作成し、試験を実施した。この結果、バクテリアの繁殖を抑制する必要性など、新たな課題を抽出した。

今後は、これまで得られた情報を基に水物質循環機構の解明を試みるとともに、生物学的な基礎データの効率的な収集方法等の検討、流域情報の収集を行い、流域管理や汚濁解析に有用なデータの収集を行う。

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

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

国土交通省

(委託先) 独立行政法人土木研究所

水循環研究グループ水質チーム

田 中 宏 明

小 森 行 也

玉 本 博 之

東 谷 忠

宮 本 宣 博

八十島 誠

研究期間

平成 14 年度～ 17 年度

平成 14 年度当初予算額

26,840 千円

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

(FY2002 ~ 2005)

Hiroaki Tanaka, Koya Komori, Hiroyuki Tamamoto, Tadashi Higashitani, Norihiro Miyamoto, Makoto Yasojima  
Water Quality Research Team, Water Environment Research Group

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

Many wild carp caught in many Japanese rivers had serum vitellogenin that is a biomarker of fish feminization. However, the cause of this syndrome is not clearly understood so far. PWRI conducted three flow-through experiments using adult carp exposed to effluent discharge from a sewage treatment plant (STP) whose estrogenic activity is considered typical level. Clear vitellogenin (VTG) induction in male carp was observed at the first run which was conducted at the early spring, but no VTG induction was observed in the other runs. Male and female carp were bred in the first run, while only male carp were bred in the other runs. This result suggests that endogenous aromatase that is induced in male carp in the early spring as well as exogenous estrogen-like substances in the effluent relates this discrepancy. This also suggests that noble flow-through experiment system using more suitable fish whose proliferation cycle is clearly understood and whose strain and origin are well controlled should be developed.

In this study, firstly, we conducted the abovementioned flow-through experiment at the same STP. Two groups were set to clarify effect of the existence of female carp: only male carp were bred in the same tank; male and female carp were bred in the other tank. Their VTG were regularly measured after start of exposure to the effluent. Any VTG induction was observed in all the male carp in both the group. Ethoxy resorfin-o-

deethylase (EROD) activity of measured to know aromatase level in their livers at the end of the experiment. We observed that higher EROD was raised in the carp exposed to the effluent than those to dechlorinated tap water. Therefore, the existence of female did not affect VTG induction in male carp, but the STP effluent induces EROD, which suggests that it increases aromatase in male.

Secondly, we developed a new test system. In this system, we use Japanese medaka (*Oryzias latipes*) as the test fish, and the experiments were carried out in a test tank with controllable experimental conditions, installed at sewage treatment plants and automatic river water quality monitoring stations. Flow rate of water had been controlled at 0.6L/min for two weeks after hatching, and then was increased up to 2.4L/min. Medaka were maintained under the condition that a light: dark cycle was 16: 8 hours and a commercial diet free from phytoestrogens was fed. After maturation, VTG of each medaka was measured.

## 1. はじめに

英国では、下水処理水が放流されている多くの河川でエストロゲン様物質による魚類の雌性化が起きていることが明確にされた。このため、現在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、わが国においても下水処理水や河川水にエストロゲン様物質が存在することが明らかにされてきたが、これらが魚類の雌性化を起こしているのかは依然として明らかになっていない。

英国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、水試料の分析法と遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン活性を組み合わせることによって、水試料のエストロゲン作用について評価し、このエストロゲン活性を魚類の雌性化を表すことのできる簡便な評価指標へと完成させることをめざすものである。加えて、下水処理水と放流先河川に存在するエストロゲン様物質の由来を推定し、雌性化を抑制するために必要な都市排水由来の要因を明らかにすることをめざすものである。

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

## 2. 研究の背景

### 2.1 英国の研究過程

英国では、1980年代前半に実施された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<sup>1)</sup>。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実施された<sup>1-9)</sup>。

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<sup>2)</sup>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、雌化の影響は、雄の血中ピテロジェニン (VTG) 生成量を指標として判定された。VTG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<sup>2)</sup>、雄成熟魚の場合10匹<sup>3,4)</sup>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VTG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、VTGの上昇を確実に把握できる3週間と設定された。

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<sup>2)</sup>、冬期<sup>2)</sup>、1989年春期<sup>2)</sup>、夏期<sup>2)</sup>、1992年夏期<sup>3)</sup>、冬期<sup>3)</sup>、1994年春期～夏期<sup>4)</sup>に実施された。これらの調査の結果、雄ニジマスの血中VTG生成量は通常 $0.05\sim 1.80\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>2)</sup>であるのに対し、放流水にエストロゲン様物質が含まれる場合には最大10万倍 ( $147,000\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>2)</sup>ほどに増加することが判明した。また、ニジマスVTG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らしく、放流口のみで影響のみられる場合<sup>4)</sup>や、Aire川のように放流口から下流5km地点まで $\text{mg}/\text{mL}$ レベルの影響が確認される場合<sup>4)</sup>があった。さらに、VTG生成は下流最大15km<sup>3)</sup>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<sup>3)</sup>。

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 $0.1\sim 0.5\text{ng}/\text{L}$ の範囲にあり<sup>2)</sup>、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 $20.3\mu\text{g}/\text{L}$ および $4.8\mu\text{g}/\text{L}$ という結果が得られた<sup>5)</sup>。

また、河川水質調査<sup>6)</sup>の結果、フィールド調査でニジマスの顕著なVTG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処理場の放流水のNPは $330\mu\text{g}/\text{L}$ であり、その下流では $180\mu\text{g}/\text{L}$ の高濃度であった。なお、その他の河川や処理場でのNPの濃度は $<0.2\sim 12\mu\text{g}/\text{L}$ であり、OPの濃度はMarley処理場で $0.5\mu\text{g}/\text{L}$ であったほか、河川の全地点で $1\mu\text{g}/\text{L}$ 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<sup>4,6)</sup>。

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<sup>7)</sup>。この方法を処理水に適用した結果、エストロゲン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)、17 $\beta$ 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 $1\sim 80\text{ng}/\text{L}$ 、E2が $1\sim 50\text{ng}/\text{L}$ 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 $0.2\sim 7.0\text{ng}/\text{L}$ であった<sup>7)</sup>。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VTG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<sup>8)</sup>。この結果、E2の最小作用濃度はニジマスでは $1\sim 10\text{ng}/\text{L}$ の範囲にあり、ローチでは $10\sim 100\text{ng}/\text{L}$ 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 $25\sim 50\text{ng}/\text{L}$ 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<sup>9)</sup>。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VTG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、VTG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VTG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<sup>1,2)</sup>。
- (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<sup>2,4)</sup>。
- (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<sup>6,7)</sup>。

- (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<sup>5,8)</sup>。
- (5) 野生魚を対象に、自然環境での影響を把握する<sup>9)</sup>。

## 2.2 わが国のフィールド調査

わが国では、多摩川のコイ (*Cyprinus carpio*) を対象とした調査<sup>10,11)</sup>において、精巢の異常および雄コイのVTG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<sup>12-15)</sup>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ジェ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、VTGの測定はコイVTG-ELISAキット（株式会社トランスジェニック）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VTGを生成している雄コイが確認され、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、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、魚類に及ぼす影響の把握には至っていない。

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。

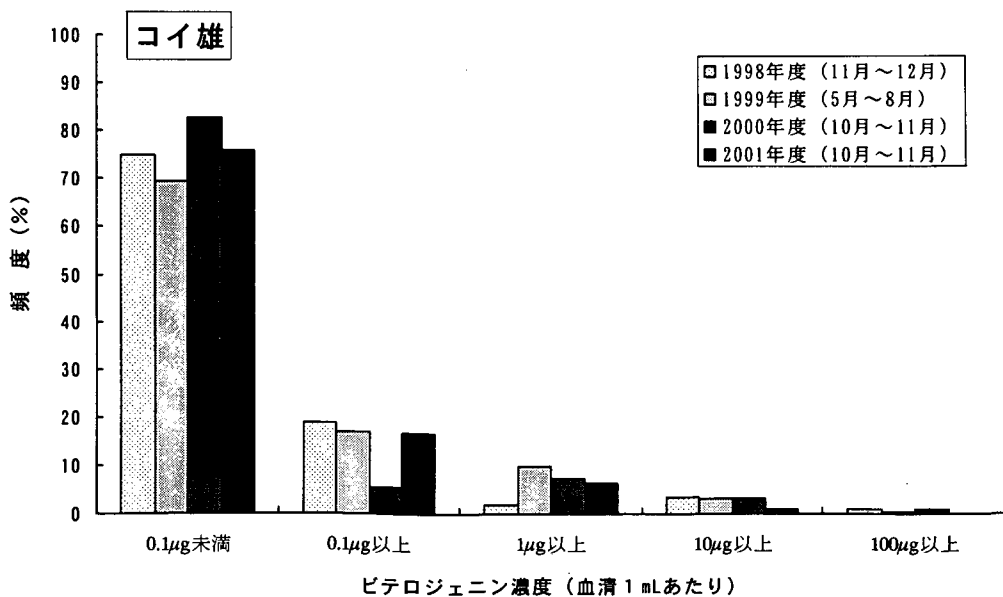


図1 雄コイでのビテロジェニン濃度測定結果

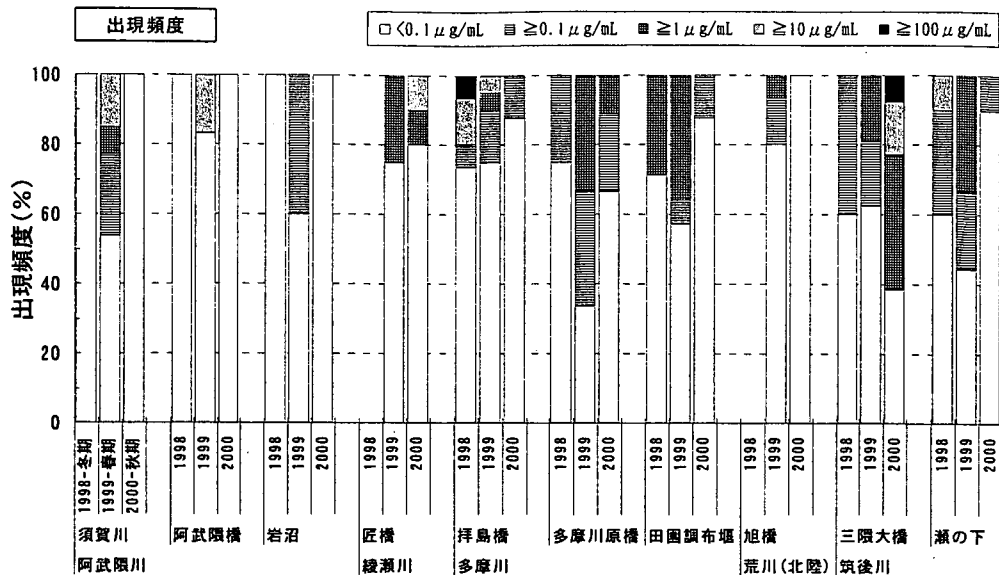


図2 コイ VTG 地点別調査結果 (国土交通省魚類実態調査 1998-2000年)

### 2.3 下水処理水へのコイ曝露試験

土木研究所水質チームでは、1999年度から下水処理水への魚類曝露試験を実施して、処理水による魚類影響の有無を明らかにすることとした<sup>19,20)</sup>。さらに、魚類の雌化を引き起こす要因を探るため、曝露試験に必要な魚類の生理学的知見を明らかにすることとした。

英国では、多数の地点で魚類の雌化を引き起こす物質としてE2およびE1が報告されているため、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<sup>10,11)</sup>であり、魚類実態調査<sup>12-15)</sup>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

表1 下水処理水へのコイ曝露試験概要 (過年度)

曝露試験	試験区	コイ			曝露期間
		試験個体数 (雄 / 雌)	体長 (mm)	体重 (g)	
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 2000年7月 - 9月
	10%処理水	7 / 6	326.3 ± 16.8	753.1 ± 65.8	
	1%処理水	4 / 9	327.5 ± 15.8	758.5 ± 84.7	
	O <sub>3</sub> 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 2000年12月 - 2001年2月
	混合飼育②	5 / 10	343.4 ± 15.9	1025.3 ± 126.4	
	対照(雄単独飼育)	15 / -	332.1 ± 15.9	920.0 ± 113.0	
Run4	100%処理水	10 / -	349.1 ± 14.6	1163.0 ± 129.2	8週間 2001年2月 - 4月
	10%処理水	10 / -	343.3 ± 19.6	1087.5 ± 140.0	
	O <sub>3</sub> 10mg/L処理水	11 / -	330.6 ± 12.2	984.6 ± 73.7	
	O <sub>3</sub> 2mg/L処理水	10 / -	345.5 ± 14.0	1181.3 ± 139.8	
	対照	10 / -	343.8 ± 12.9	1037.8 ± 104.8	



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VTG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VTG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VTG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されず、終了後に生殖腺を観察して判定された。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VTG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VTG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。

### 2.3.1 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VTG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が実施された。さらに、雄VTG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VTGの正常値を明らかにすることとされた。試験は、経時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が得られた。コイは、各試験区に9匹が曝露された。試験終了後に雌雄を判定した結果、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匹は試験途中で死亡した。

処理水試験区のVTG測定結果を図2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VTGが上昇し、4週目には1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ほどに達する個体が現れた。その後変動はあるものの1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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VTGは低下した。曝露中のコイVTG最高値は1,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。なお、1個体では試験開始時にVTGが生成していたが、曝露

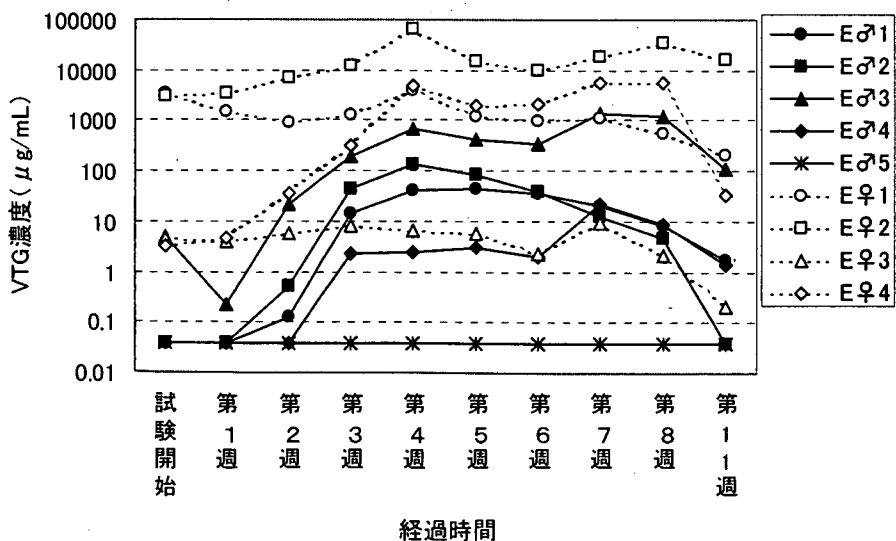


図3 下水処理水に曝露したコイのVTG経時変化 (Run1)

開始後一度VTG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VTG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、VTGを生成した雄4匹のGSIは4.5～12.0%であり、成熟途中であると考えられた。VTG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匹すべてが定量下限値0.039 $\mu$ g/mL未満のまま経過し、VTGの生成は認められなかった。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活性は0.0036～0.0094 $\mu$ g/Lの範囲にあり、E2 (ELISA) では0.0246～0.0843 $\mu$ g/Lであった (表2 参照)。なお、NPやNPnEOは検出されなかった。

さらに、対照試験区の雄コイVTGはすべて定量下限値0.039 $\mu$ g/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。

### 2.3.2 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VTG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試験が実施された。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つが設けられ、希釈試験区は10%とされた。

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VTGの上昇はみられなかった。

### 2.3.3 水質測定結果

Run1およびRun4のエストロゲン活性およびE2測定結果を表に示す。

処理水のエストロゲン活性は、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。

表2 エストロゲン活性および17 $\beta$  エストラジオール測定結果

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 (ng/L) 0.02 $\leq$ Tr<0.07 ND<0.02	Run1	100%処理水	-	5.2	3.6	5.9	4.8
		100%処理水(流入)	9.4	4.8	5.5	7.3	6.0
		対照	1.5	ND	ND	ND	ND
		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 <sub>3</sub> 10mg/L処理水	1.0	ND	ND	0.07	0.3
		O <sub>3</sub> 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) (ng/L) 0.1 $\leq$ Tr<0.3 ND<0.1	Run1	100%処理水	-	58.0	52.7	57.5	44.0
		100%処理水(流入)	24.6	84.3	58.7	67.4	40.1
		対照	ND	ND	ND	ND	2.9
		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 <sub>3</sub> 10mg/L処理水	ND	ND	ND	ND	ND
		O <sub>3</sub> 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) (ng/L) 0.4 $\leq$ Tr<1.0 ND<0.4	Run4	100%処理水	-	8.6	-	3.0	1.2
		O <sub>3</sub> 10mg/L処理水	-	9.9	-	ND	Tr(0.21)
		O <sub>3</sub> 2mg/L処理水	-	16.5	-	Tr(0.78)	3.1
		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3 水質比較一覧表

水質項目	対象	中央値	平均値	最小値	最大値	検体数
						(単位: $\mu\text{g/L}$ )
エストロゲン活性	下水処理水 <sup>21)</sup>	4.7*	23.9*	ND	78.0	100
	(ng/L) 河川 <sup>22)</sup>	2.2*	1.6	ND	31.0	150
	0.02 $\leq$ 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 <sup>20)</sup>	10.0	—	ND	66.0	138
	(ng/L) 河川 <sup>15)</sup>	—	—	ND	27.0	532
	0.1 $\leq$ 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

### 2.3.4 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VTG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VTG生成は再現されず、下水処理水に曝露した雄コイにVTG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3に曝露試験でのエストロゲン活性およびE2 (ELISA) 測定結果と、河川<sup>12-15)</sup>および下水道<sup>18-20)</sup>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活性<sup>21,22)</sup>について示した。Run1での下水処理水のエストロゲン活性およびE2 (ELISA) の平均値は、それぞれ0.0058 $\mu\text{g/L}$ および0.0541 $\mu\text{g/L}$ であった。Run2とRun4でのエストロゲン活性およびE2 (ELISA) の平均値は、それぞれ0.0054 $\mu\text{g/L}$ および0.0353 $\mu\text{g/L}$ 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VTG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。

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。

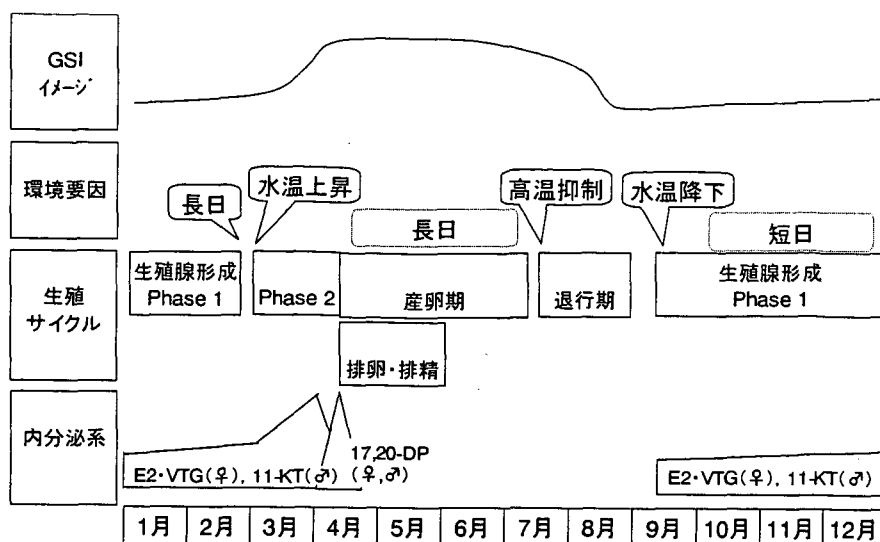
魚類実態調査の結果では、すべての河川で雄コイのVTG生成が確認されており、また、季節に関わらずVTGを生成している雄が存在することが明らかとなった。しかし、地点別および季節別にこれらのデータをみると(図2参照)、阿武隈川の3地点および北陸の荒川では春期調査でのみ雄VTGの生成がみられており、曝露試験結果と同様の傾向を示していると考えられた。

春に雄VTG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されている。図4に羽生<sup>23)</sup>および長浜<sup>24)</sup>を参考に作成され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 $^{\circ}\text{C}$ 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VTG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VTG生成が誘導された可能性が考えられる。この場合の内分泌攪乱作用はエストロゲン作用ではなく、アロマターゼ生成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 $^{\circ}\text{C}$ 前後の高水温であったため、コイの生殖腺は退行を始



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4 コイ科魚類の生殖サイクル模式図

めており、たとえアロマトラ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VTG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、VTG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トラ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。

### 3. 2002年度コイ曝露試験

#### 3.1 目的

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VTG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VTG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、アロマトラ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VTG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した。さらに、薬物代謝酵素の働きを明らかにするため、その活性のひとつであるERODについて測定を試みた。

#### 3.2 方法

##### 3.2.1 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。コイ曝露槽の容積は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が期待された。

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VTG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<sup>11)</sup>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。

### 3.2.2 コイVTGの測定

コイの血中VTG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。

VTG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。

ELISA法（酵素免疫測定法）は、測定対象物質の抗体を用いて、その物質との結合反応を利用する濃度測定法である。コイピテロジェニンELISAキットには、抗コイピテロジェニン抗体をコーティングした96穴マイクロプレート、検体希釈液、HRP標識抗コイピテロジェニン抗体、発色液、1 $\mu$ g/mLコイピテロジェニン標準品などがキット化されている。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標識抗コイピテロジェニン抗体を1時間反応させた。この操作によって、抗コイピテロジェニン抗体-コイピテロジェニン-HRP標識抗コイピテロジェ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ピテロジェニン濃度を算出した。

検量線は、1 $\mu$ g/mLコイピテロジェニン標準品を用いて作成した。この2倍希釈によって0.5 $\mu$ g/mLから0.0078 $\mu$ g/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、つねに0.0078 $\mu$ g/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、0.0078 $\mu$ g/mLの5倍である0.039 $\mu$ g/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；0 $\mu$ g/mL）以下の場合、不検出（ND）とした。

なお、血清試料およびピテロジェ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。

### 3.2.3 EROD測定

EROD（Ethoxy resorufin-o-deethylase）は、薬物代謝酵素P4501A1依存性のエトキシレゾルフィンO-脱エチル化活性であり、化学物質によって引き起こされる肝臓でのP4501A1遺伝子の発現の指標となる。

この測定は、肝臓サンプルから調製されたマイクロソームに蛍光物質を添加することによって、蛍光分光とHPLCを組み合わせて測定検出感度を上げたTatarazakoらの方法<sup>25)</sup>にしたがい実施した。

### 3.2.4 エストロゲン様物質の水質測定

試験水のエストロゲン作用を明らかにするため、遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン活性について2週間ごとに測定した。さらに、LC/MS/MSによるエストロゲン類E2、E1およびEE2の同時測定、お

よびエストロゲン様物質のNPおよびその前駆物質であるノニルフェノールエトキシレート (NPnEO) についても測定することとした。

エストロゲン活性の測定は矢古宇らの方法<sup>26)</sup>に従い実施した。この活性はE2換算量として表され、E2測定結果との比較が可能となる。LC/MS/MSによるE2、E1およびEE2の同時測定は、土木研究所水質チームにて検討中の方法<sup>27)</sup>に従い測定した。また、NPおよびNPnEOの測定は、調査マニュアル<sup>28)</sup>に従い前処理および測定を実施した。

### 3.2.5 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VTGを測定することとした。

### 3.3 結果および考察

2002年春季に実施した試験結果を図5に示す。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VTG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VTG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、図では試験途中で死亡した個体のデータは掲載していないが、死亡した雄でもVTGの生成はみられなかった。

EROD活性について、8週経過個体からサンプルを抽出して測定を試みた。この結果、対照区（水道水♂♀混合試験区）3個体に比べ、下水処理水に曝露した試験区では、EROD活性が上昇している傾向がうかがえた。

なお、曝露試験水の水質測定結果は、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VTG生成が認められた過年度調査のRun1に比べ、本研究で雄のVTG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。

また、下水処理水に曝露した試験区でEROD活性が上昇している傾向であったことは、下水処理水によって薬物代謝酵素が誘導されている可能性を示すものと考えられる。

試験区	個体番号	性別	第0週	第2週	第4週	第6週	第8週
下水処理水 ♂単独試験区	E♂01	♂					
	E♂02	♂					
	E♂03	♂					
	E♂04	♂					
下水処理水 ♂♀混合試験区	E♂♀01	♂					
	E♂♀02	♂					
	E♂♀03	♂					
	E♂♀04	♂					
	E♂♀05	♂					
	E♂♀06	♂					
	E♂♀07	♀					
	E♂♀08	♀					
	E♂♀09	♀					
	E♂♀10	♀					
	E♂♀11	♀					
	E♂♀12	♀					
水道水 ♂単独試験区	C♂01	♂					
	C♂02	♂					
	C♂03	♂					
	C♂04	♂					
	C♂05	♂					
	C♂06	♂					
	C♂07	♂					
水道水 ♂♀混合試験区	C♂♀01	♂					
	C♂♀02	♂					
	C♂♀03	♂					
	C♂♀04	♀					
	C♂♀05	♀					
	C♂♀06	♀					
	C♂♀07	♀					
	C♂♀08	♀					

図5 コイ VTG 測定結果 (2002 年度)

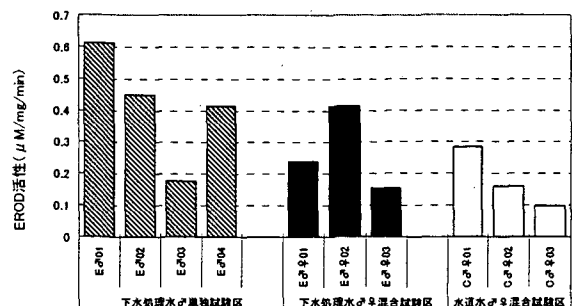
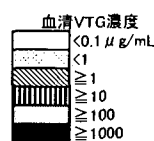


図6 雄コイの EROD 活性測定結果 (2002 年度)

表4 コイ曝露試験（2002年度）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 0.02 ≤ Tr < 0.07 ND < 0.02	下水処理水♂	12.88	4.88	4.68	3.19	4.87
	下水処理水♂♀	12.69	9.61	4.86	2.81	1.53
	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 0.2 ≤ Tr < 0.5 ND < 0.2	下水処理水♂	28.0	10.9	12.0	7.6	12.7
	下水処理水♂♀	27.4	12.3	13.7	7.0	8.0
	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 0.4 ≤ Tr < 1.0 ND < 0.4	下水処理水♂	2.2	Tr(1.0)	Tr(0.9)	1.2	Tr(0.8)
	下水処理水♂♀	3.0	1.5	Tr(1.0)	1.2	Tr(0.7)
	水道水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
EE2 ng/L 1.3 ≤ Tr < 4.4 ND < 1.3	下水処理水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	下水処理水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂	ND	ND	ND	ND	ND
	水道水♂♀	ND	ND	ND	ND	ND
NP μg/L 0.1 ≤ Tr < 0.3 ND < 0.1	下水処理水♂	ND	ND	Tr(0.20)	Tr(0.12)	Tr(0.12)
	下水処理水♂♀	ND	ND	Tr(0.20)	Tr(0.13)	ND
	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

#### 4 メダカ現地曝露試験法の開発

エストロゲン様物質による魚類の雌性化について、その影響要因を特定するには、①河川において魚類曝露試験をおこない雌性化が発生するか否かを判定する、②雌性化を発生させた河川水を詳細に調べて原因物質を特定する、さらに③その疑わしい物質を用いた室内での魚類曝露試験を実施して最小作用濃度を明らかにすることが必要である。とくに河川での魚類曝露試験では、性状変化のない新鮮な河川水を用いることが必要となる。

本研究に先立ち、水津チームでは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。

#### 4.1 方法

##### 4.1.1 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。

本試験では、下水処理水の流入しない拜島橋監視所、および複数の下水処理場の下流に位置する日野橋監視所を試験実施地点とした。

#### 4.1.2 試験対象魚と生物指標

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

また、魚類の雌性化を判定する指標（バイオマーカー）として、コイの試験と同じく、この分野の研究では一般的な指標であるVTGを用いることとした。なお、この測定はメダカVTG-ELISAキット（国土環境株式会社）を用いることとした。

#### 4.1.3 河川水のエストロゲン濃度

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明らかにすることとした。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、組換え酵母法<sup>26)</sup>によるエストロゲン活性（E2

表5 メダカ現地曝露試験 試験条件一覧

試験魚	ヒメダカ <i>Oryzias latipes</i>
試験個体数	雄成魚 30個体/水槽
試験期間	2週間
試験水	流水式
流量	0.5 L/min (30 L/h)
試験温度	水温 25°C
日長条件	16時間一明、8時間一暗
餌	粉末餌、一日あたり3回の給餌

表6 現場型メダカ曝露試験システム

貯水槽	
材質	SUS304
外寸法 (mm)	600W × 300D × 330H
貯水容量 (L)	約44 L
その他	・ゴミ除去用スクリーンメッシュ (φ1 × 4, mesh, φ1 × 80, mesh, φ0.55 × 16, mesh 各) ・排水パイプ 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	・排水パイプ φ8 × 1.2t, 50 cm (SUS304)
曝露水槽	
材質	硬質ガラス製
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)	クーリングサーモポンプ 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°C
冷却能力	350W (300kcal/h) at 液温10°C (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フレキシブルホース (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)	自吸水式ダイアフラムポンプ JND300KTS (ケイ・エヌ・エフジャパン)
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, プログラムタイマー	
③自動給餌機: オートフィーダー (エーハイム)	
④排水用配管一式 (塩ビ製)	



活性)を測定することとした。

#### 4.1.4 試験装置

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

試験装置の仕様について表6に示す。メダカ曝露水槽の容積は30Lと設定した。なお、この試験装置は3つの水槽から成り立っており、第1槽で砂泥の除去、第2槽で水温調節を行い、第3槽のメダカ曝露槽へと導水するものである(写真1参照)。

#### 4.1.5 試験条件

本試験における試験条件は、環境省の実施した室内試験に合わせ設定した。現場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。試験条件を表5に示す。

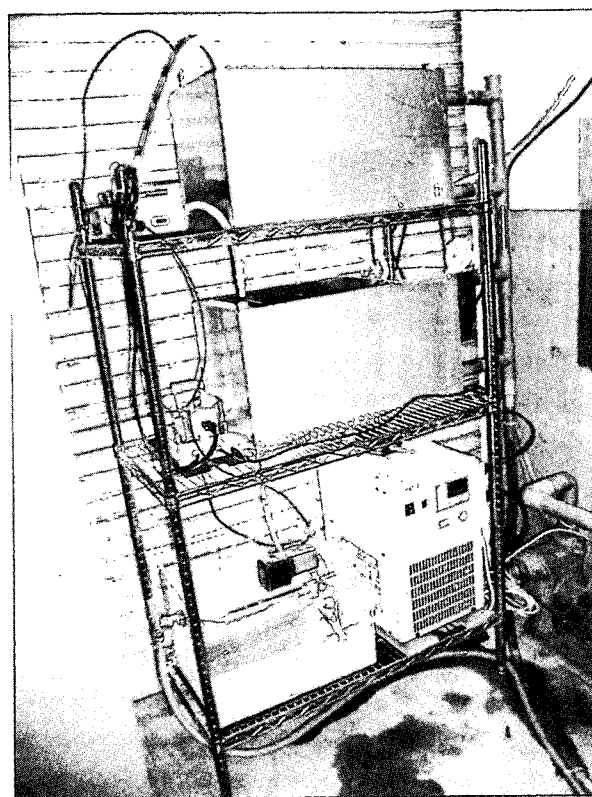


写真1 現場型メダカ曝露試験水槽

#### 4.2 結果および考察

拜島橋および日野橋監視所にて実施した今回の予備試験では、雄ヒメダカのVTG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。また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。

エストロゲン活性やエストロゲン様物質が低濃度であったことから、雄ヒメダカのVTG誘導が認められなかったと考えられる。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が、エストロゲン様物質は低濃度であった。このため、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る。

また、今回は成魚を2週間曝露する試験であったため、今後は感受性の高い胚から曝露を開始し、次世代までの影響をみる必要があると考えられる。

#### 5 分画方法の検討

土木研究所水質チームでは、下水処理水がエストロゲン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。

##### 5.1 方法

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

た。なお、表8では極性が高くなるにつれてフラクション番号は大きくなるよう表示している。

本年度は、全国の23処理場からサンプルを集め、これらのエストロゲン活性の極性分布を調査した。試験結果を図7に示す。

流入下水におけるエストロゲン活性はフラクションF2～F9にかけて広く検出されたが、そのほとんどがF2～F4分画で占められていた。また、二次処理水については、F4分画に集中していることが明らかとなった。

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

そこで、各分画のエストロゲン活性に対し、エストロゲンおよび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いと考えられた。また、流入下水ではE2の寄与が大きい地点も確認された。さらに、これらのE1、E2、NPで説明できない不明なエストロゲン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おこなった。その結果、NPnEO、NPnECのエストロゲン活性はほとんど確認されず、これら各物質の理論活性値を算出してその寄与を推定したが、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。

## 6 まとめ

本年度の研究は、下記の通り成果を得た。

- (1) わが国の河川でエストロゲン様物質による魚類影響が生じているのかは明確ではない。このため、河川等の環境中で生じている魚類影響を確かめその原因を突き止めるためには、問題となる試料を対象として曝露試験をおこなう必要がある。
- (2) 下水処理水へコイを曝露した結果、雄魚類に表れる影響は、魚類本来の生理学的反応に左右される可能性が考えられた。
- (3) 現地にて実施する魚類曝露試験においては、魚類の生理的反応を考慮できるように、試験条件を制御できる試験水槽システムが必要である。本年度は、この条件を満たす現場型魚類曝露試験システムを開発することができた。
- (4) この装置を用いて多摩川の下水処理場からの放流水が入る前の拜島橋および後の日野橋で雄メダカを用いた実験をおこなったが、VTGの誘導は認められなかった。
- (5) 固相カートリッジを用いた極性分画手法によって、エストロゲン活性の性状把握を試みた。その結果、流入下水中のエストロゲン活性は低極性から高極性まで広く検出されたが、17β-エストラオール（E2）、エストロン（E1）、ノニルフェノール（NP）が分画されるF2～F4でほとんどエストロゲン活性が説明できた。また二次処理水はF4分画でほとんど説明できることが明らかとなった。また、E1、E2、NPで説明できないエストロゲン活性もF2～F4を中心が存在していることが確認された。

なお、本調査研究は、環境省からの受託業務費により実施されたものである。

## 7 参考文献

- 1) Environment Agency, The Identification and Assessment of Oestrogenic Substances in Sewage Treatment Works Effluents (1997)
- 2) Purdom, C.E. et al., Chemistry and Ecology, 8, 275-285 (1994)
- 3) Harries, J.E. et al., Environ. Toxicol. Chem., 15, 1993-2202 (1996)
- 4) Harries, J.E. et al., Environ. Toxicol. Chem., 16, 534-542 (1997)
- 5) Jobling, S. et al., Environ. Toxicol. Chem., 15, 194-202 (1996)

- 6) Blackburn, M.A. et al., Water Research, 29, 1623-1629 (1995)
- 7) Desbrow, C. et al., Environ. Sci. Tech., 32, 1549-1558 (1998)
- 8) Routledge, E.J. et al., Environ. Sci. Tech., 32, 1559-1565 (1998)
- 9) Jobling, S. et al., Environ. Sci. Tech., 32, 2498-2506 (1998)
- 10) 中村將ほか, 科学, 68, 515-517 (1998)
- 11) 原彰彦, 廃棄物学会誌, 10, 278-287(1999)
- 12) 建設省, 「平成10年度水環境における内分泌攪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](http://www.mlit.go.jp/river/press/9901_06/990330.html) (1999)
- 13) 建設省, 平成11年度水環境における内分泌攪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](http://www.mlit.go.jp/river/press/9907_12/991119part2.html) (1999)
- 14) 建設省, 平成11年度水環境における内分泌かく乱物質及びダイオキシン類に関する実態調査結果に  
ついて,  
[http://www.mlit.go.jp/river/press/200007\\_12/000721bindex.html](http://www.mlit.go.jp/river/press/200007_12/000721bindex.html) (2000)
- 15) 国土交通省, 平成12年度水環境における内分泌攪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](http://www.mlit.go.jp/river/press/200107_12/010724b/010724.html) (2001)
- 16) 東谷忠ほか, 環境工学研究論文集, 39, 97-108 (2002)
- 17) Higashitani, T. et al., CDROM of Proc. 3<sup>rd</sup> IWA Water Congress (2002)
- 18) 建設省, 下水道における内分泌攪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/sewage/information/naibunpi990823.html> (1999)
- 19) 建設省, 平成11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について,  
<http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewage/information/naibunpi000419.html> (2000)
- 20) 国土交通省, 平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) に関する調査の結果  
について,  
<http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewage/kisha/naibun010509.html> (2001)
- 21) 矢古宇靖子ほか, 第9回世界湖沼会議発表文集, 第3分科会, 237-240 (2001)
- 22) 高橋明宏ほか, 第9回世界湖沼会議発表文集, 第3分科会, 241-244 (2001)
- 23) 羽生功, 魚類生理学, 恒星社厚生閣, 287-325 (1991)
- 24) 長浜嘉孝, 魚類生理学, 恒星社厚生閣, 243-286 (1991)
- 25) Tatarazako N. et al., Environ. Sciences, 9, 451-462 (2002)
- 26) 矢古宇靖子ほか, 環境工学研究, 36, 199-208 (1999)
- 27) 小森行也ほか, 第9回世界湖沼会議発表文集, 第3分科会, 225-228 (2001)
- 28) 社団法人日本下水道協会; 下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル (1999)

## 8 研究発表

- 1) Tanaka, H. et al., CDROM of Proceedings of WEFTEC'2001 (2001)
- 2) Higashitani, T. et al., The 3<sup>rd</sup> Japan-UK Joint Workshop on Endocrine Disrupting Chemicals, 18-19(2001)
- 3) 田中宏明, 日本内分泌攪乱化学物質学会第8回講演会, 27-38 (2001)
- 4) 宮本宣博ほか, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, 217 (2001)
- 5) 東谷忠ほか, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, 237 (2001)
- 6) Miyamoto, N. et al., CDROM of Proceedings of WEFTEC'2002 (2002)
- 7) Higashitani, T. et al., CDROM of Proceedings of 3<sup>rd</sup> IWA Water Congress (2002)
- 8) 東谷忠ほか, 環境工学研究論文集, 39, 97-108 (2002)
- 9) 玉本博之ほか, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, 170 (2002)
- 10) Tanaka, H. et al., WEFTEC' 2003 (in press)

## 9. 遺伝子解析手法を用いた環境ストレス検出技術 に関する基礎的研究

水質チーム 首席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
研究員 玉本 博之  
専門研究員 東谷 忠

### 1. 目的

世界規模でのヒトゲノム研究が進展しており、今後、遺伝子レベルで作用する医薬品の開発が爆発的に行われ、これらが多量に使用されることが予想される。このため、新たな化学物質が下水道に集中し、放流先河川に生息する生物への環境ストレスの増大、水利用によるヒトへの影響等が危惧される。

このような、生物に対する新たなストレスの評価については、従来のバイオアッセイの検査方法では微妙な変化の検出は不可能である。しかしながら、医学分野で用いられる手法を環境評価に応用して化学物質の影響を遺伝子レベルで解析・評価する手法が開発され、ヒトや生物への影響を予測することが可能となりつつある。本研究は、河川、下水道における生物への影響について遺伝子レベルでの評価・解析手法の開発、及びこの適用に関して基礎的検討を行うことを目的とする。

### 2. 結果

初年度である平成 14 年度は、医学分野で注目されている技術のうち、DNA チップを用いた遺伝子診断技術に着目し、この手法が環境評価手法として実際に応用可能か否かについて検討を行った。

DNA チップは、多数の遺伝子の発現を同時に調べることができる技術である。チップの上には、調べたい遺伝子を cDNA などの形で固定し、これに試料から抽出した mRNA を蛍光色素で標識して、ハイブリダイゼーションを行うことにより発現を測定するものである。ストレスを与えた試料と対照試料の間で、発現の有無あるいは発現量の違いを相対的に知ることが可能になるため、評価手法になると期待される。

本調査の成果として、以下の結果が得られた。

①DNA チップによる評価手法を導入する場合、スライドガラスなどの基板上に生物の遺伝子を一つ一つプロットした専用の DNA チップを作製する必要がある。生物の遺伝子すべてを対象とすると、遺伝子情報が膨大になるため解析に長時間を要し、DNA チップ作製に必要な費用が増大するという課題があることがわかった。このため、環境評価を目的とする場合、事前に評価対象となる遺伝子をスクリーニング等により選定しておくことが実用化への打開策であると考えられた。

②遺伝子スクリーニングには、DNA 塩基配列の情報を必要とせず、比較したい組織や細胞から調製した mRNA だけで試験を行うことができる蛍光ビーズを用いたスクリーニングが有効であると考えられた。ストレスを与えた試料と対照試料の 2 種類について、生物組織から抽出した mRNA をもとに異なる蛍光色素で標識したプローブを調製し、同じ mRNA から作製したビーズライブラリー上で競合ハイブリダイゼーションを行った後、発現量に差のある遺伝子を選別するという手順でスクリーニングを行うこととした。

その前処理方法となる遺伝子の抽出については、一般に電気泳動や PCR 法に用いるものよりも、抽出状態、保存状態などを厳密に管理する必要がある、管理が十分でないとその後の遺伝子診断で誤反応が出てしまうとされている。今回、メダカについて検討を行い、マイクロチップ型電気泳動試験により、遺伝子の抽出、保存が適切であることを確認した。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。