

◆ 報 文 ◆

下水中の環境ホルモン物質の分析技術

八十島 誠* 小森行也** 田中宏明***

1. はじめに

「奪われし未来 (Our Stolen Future)」で指摘された化学物質の新たな危険性の問題は、近年、内分泌攪乱化学物質 (環境ホルモン) 問題として広く認知され社会問題化している。環境庁 (現環境省) は、「環境ホルモン戦略計画」¹⁾ (SPEED '98) において、67の化学物質を環境ホルモンとして選定している。環境ホルモンは、極低濃度であっても生物に対し影響を及ぼす可能性があるため、人の健康や生態系への影響を未然に防ぐという目的から、関係省庁や研究機関により種々の調査・研究が行われてきている。環境省や国土交通省では、1998年に環境庁が整備した「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」²⁾ (以下、マニュアル) を用いて、河川や底質などを対象に環境調査^{3), 4)}を実施してきた。河川水や底質などの試料に比べて下水試料は、目的物質以外の物質 (夾雑物質) を高濃度に含んでいる。そのため、下水試料には、河川水等を対象としたマニュアルをそのまま適用することが困難であったことから、

下水道における実態把握は、河川水や底質等より遅れることになった。これらの状況から建設省 (現国土交通省) では、(財)下水道新技術推進機構に「下水道における環境ホルモン対策検討委員会」を設置し、下水を対象とした分析方法の開発を行うとともに、下水道における環境ホルモンの実態調査を行った。

分析法の開発及び実態調査では、SPEED'98に提示された環境ホルモンのうち、生活排水・工場排水に含まれると考えられる物質の中から、年間使用量や環境中での検出状況を勘案した25の物質、環境ホルモンとして選定されている

ノニルフェノール (NP) の原因物質であるノニルフェノールエトキシレート (NPEO) 及び人畜由来の女性ホルモン 17β -エストラジオール (E2) を対象とした。全国下水道における環境ホルモンの調査結果⁵⁾ (表-1) によると、調査対象とした多くの物質は下水処理を受けることでその濃度が90%以上減少することが確認された。

一方NPは、流入下水中の濃度が他の調査対象物質より高いレベルにあることが明らかになった。

表-1 下水処理場における内分泌かく乱化学物質の実態調査結果 (平成10～12年度)

	流入下水 ($\mu\text{g/l}$)			二次処理水 ($\mu\text{g/l}$)		
	最小値	中央値	最大値	最小値	中央値	最大値
NP	0.7	4.4	75	N/D/	tr (0.2)	1
NP1～4EO	6.1	28	270	N.D	0.7	23
NPnEO ($n \geq 5$)	tr (0.2)	81	810	N.D.	tr (0.4)	24
NP1EC	N/D/	0.8	3.4	N.D.	tr (0.7)	11
NP2EC	2.5	44	250	N.D.	3.1	29
NP3EC	5.9	16	100	N.D.	3.1	48
E2 < ELISA >	0.0091	0.042	0.094	N.D.	0.010	0.066
E2 < LC/MS/MS >	0.0036	0.0081	0.018	N.D.	N.D.	0.0033
E1 < LC/MS/MS >	0.015	0.043	0.077	N.D.	0.0054	0.063
EE2 < LC/MS/MS >	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 検出下限値未満

tr: 検出下限値以上定量下限値未満 (検出された濃度を () 内に示した)

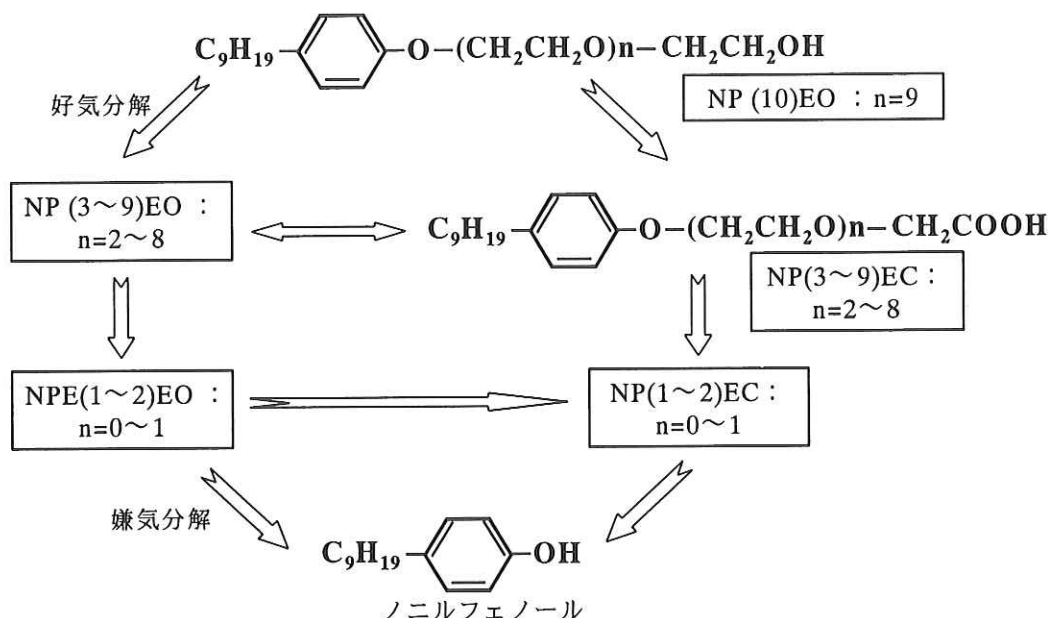


図-1 NPEOの分解過程

NPは、工業用の界面活性剤として広く使用されるノニルフェノールエトキシレート (NPEO) の分解生成物⁶⁾である。NPEOの分解経路は、表-1のように考えられている。現時点では、NPEOのエトキシ (EO : $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) 鎖長毎の分析法^{7), 8)}や、分解時の中間生成物であるノニルフェノキシ酢酸 (NPEC) の分析法の報告例⁹⁾は少ない。そのため、NP関連物質 (NP、NPEO、NPEC) 全体の挙動については不明な点が多い。

さらに、NPEOはEO鎖長が短くなるほど毒性が高くなるとの報告¹⁰⁾があることから、EO鎖長毎の挙動を知ることは重要であると考えられる。内分泌攪乱作用の程度を総合的に評価する手法として生体反応を利用したバイオアッセイによる評価法がある。バイオアッセイによる評価法である遺伝子組み換え酵母を用いたエストロゲン様活性試験^{11), 12)}の結果、エストロゲンは、強いエストロゲン様活性が確認されており環境ホルモン同様に注目すべき物質であることが明らかになっている。エストロゲンについてはこれまでの調査^{4), 5)}では主として、免疫抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA 法) が用いられてきた。しかし、ELISA法では、目的の物質に併せて類似の物質も測定してしまうなどの問題が指摘^{4), 13)}されてきた。そのため、目的物質だけを測

定できる新たな方法の開発が望まれる状況にあった。

これらの状況から我々は、下水試料を対象としたエストロゲン^{14), 15)}、NP関連物質 (NPEO、NPEC) の分析法の開発^{16), 17)}を行ってきた。本稿では、開発したこれらの分析方法を整理するとともに、下水道におけるエストロゲン、NP関連物質の濃度調査を行った結果を報告する。

2. 下水道における環境ホルモンの分析法

2.1 エストロゲン分析法

(1) 測定対象及び前処理方法

本研究では、遊離のエストロゲンであるE2、エストロン (E1) および経口避妊薬 (ピル) の主成分であるエチニルエストラジオール (EE2)、エストリオール (E3) について検討を行った。測定は、液体クロマトグラフに質量分析計をタンデム接続したLC/MS/MSを用いて行った。

試料の前処理は、次のとおりに行った。試料 (流入下水 : 100ml、二次処理水 : 200ml) をガラス繊維ろ紙 (GF/B ; 保持粒径 $1\mu\text{m}$) を用いてろ過した。残渣は、メタノール (MeOH) に浸して超音波抽出し、ろ過試料に合わせた。ろ液とMeOH抽出液の混合液は、Oasis HLBカートリッジに通水後、6mlのMeOHで溶出した。溶出液は窒素気流

により乾固し、ヘキサン (Hex) /ジクロロメタン (DCM) = 1/1, 1ml に溶解した。得られた Hex/DCM 溶液を Florisil カラムに通しクリーンアップした。これを 0.5% NH₄OH/アセトン 6ml で溶出し、窒素気流により乾固し MeOH に再溶解した。次に NH₂ カラムに通し MeOH で溶出した。窒素気流により乾固後、アセトニトリル/水 = 6/4 で 1ml となるように溶解し、測定試料とした。

各エストロゲンの標準液 (2μg/l) の繰り返し測定結果から求めた検出下限値は、流入下水では 0.7 ~ 5ng/l、二次処理水では 0.35 ~ 2.5ng/l であった。

(2) 下水試料を用いた検討

二次処理水、流入下水を用いて添加回収試験を行った。二次処理水 (添加濃度; 40 ~ 100ng/l)、流入下水 (添加濃度; 70 ~ 200ng/l) の回収率は 94 ~ 120% と良好な結果が得られた。したがって本法は、下水試料中のエストロゲン測定に適用可能と考えられる。

2.2 ノニルフェノール関連物質分析法

2.2.1 NPEO 分析法

(1) 測定対象及び前処理方法

本研究では、EO 付加モル数が 1 ~ 15 の NPEO (NP1 ~ NP15EO) について検討を行った。測定は、LC/MS を用いて行った。試料の前処理は、次のとおりに行った。試料 (二次処理水: 2,000ml) をガラス繊維ろ紙 (GF/B) を用いてろ過した。残渣は、アセトンに浸して超音波抽出し、ろ液にあわせた。ろ液とアセトン抽出液の混合液は、EDS-1 カートリッジに通水後、DCM, 10ml で溶出した。得られた DCM 溶出液を窒素気流により乾固し、Hex/DCM = 1:1 溶液 1ml に溶解した。溶解液から目的物質以外の夾雑成分を除去するために、クリーンアップを行った。具体的には、Bond Elut LRC シリカゲルカラムに溶解液を通水し、7種類の溶媒各 10ml で溶出した (F1: Hex/DCM = 1/1、F2: Hex/DCM = 1/2、F3: DCM、F4: DCM/アセトン = 2/1、F5: DCM/アセトン = 1/2、F6: アセトン、F7: アセトン/MeOH = 2/1)。F1 及び F2 は廃棄し、F3 から F7 までの溶出試料を混合したのち窒素気流で乾固し、MeOH で 1ml となるように溶解し、測定試料とした。

混合標準液 (25μg/l 又は 50μg/l) の繰り返し測定結果から求めた検出下限値は、二次処理水では

0.0005 ~ 0.01μg/l であった。

(2) 下水試料を用いた検討

二次処理水 (添加濃度; 0.25μg/l) では約 80% の回収率と良好な結果が得られた。したがって本法は、下水試料中の NPEO 測定に適用可能と考えられる。

2.2.2 NPEC 分析法

(1) 測定対象と測定条件

本研究では、EO 付加モル数が 1 ~ 10 (NP1 ~ NP10EC) の NPEC について検討を行った。測定は、LC/MS/MS を用いて行った。試料の前処理は、次のとおりに行った。試料 (流入下水・二次処理水: 100ml) を 1N 塩酸により pH3 に調整し、ガラス繊維ろ紙 (GF/B) を用いてろ過した。残渣は、アセトンに浸して超音波抽出し、ろ液にあわせた。ろ液とアセトン抽出液の混合液は、GCB カートリッジに通水後、アセトニトリル/水 = 6/4 溶液 10ml でカートリッジを洗浄した。次に、25mM ギ酸を含む DCM/メタノール = 9/1 溶液 7ml で溶出し、溶出液は窒素気流により乾固した。乾固した試料は、アセトニトリル/水 = 6/4 溶液で 1ml となるように溶解し、測定試料とした。

混合標準液 (1μg/l) の繰り返し測定結果から求めた検出下限値は、0.00055 ~ 0.002μg/l であった。

(2) 下水試料を用いた検討

流入下水、二次処理水 (添加濃度; 0.5μg/l) を用いて添加回収試験を行った結果、流入下水では約 70%、二次処理水では約 90% の回収率と良好な結果が得られた。したがって本法は、下水試料中の NPEC 測定に適用可能と考えられる。

3. 下水処理場における調査結果

3.1 調査方法

調査対象は、我が国の下水処理場で最も多く採用されている処理方式である標準活性汚泥法による運転を行っている 12 処理場とした。これらの処理場の処理水量は、17,300 ~ 168,000m³/day であり、中規模の処理場である。本調査では、各処理場の流入下水及び二次処理水を採水した。なお、採水は処理時間等を考慮せず、各調査地点で 1 回だけ採水するスポット採水した。本調査の調査対象項目は E2, E1, EE2, NP, NP1 ~ 15EO, NP1 ~ 10EC とした。

3.2 調査結果

本調査における下水処理場でのエストロゲン及びNP関連物質の測定結果は、表-2、図-2、図-3に示すとおりである。

エストロゲンについては、流入下水中のE1は16~46ng/l、E2はN.D.~16ng/l、EE2はN.D.であった。二次処理水中のE1は、N.D.~228ng/l、E2はN.D.~9.1ng/lであった。下水処理を受けることによりE2は減少し、E1は増加していた。中央値でみると、E2除去率は68%であった。E2は好気条件下での微生物分解によりE1に変化することが報告¹⁸⁾されている。E2の分解速度に比べE1の分解速度が遅いことから、二次処理水中の

E2濃度に比べE1濃度が高いことは理解できるが、E2の減少量とE1の増加量は一致していない。エストロゲンは、そのほとんどがホルモン作用の弱いグルクロン酸(G)や硫酸(S)抱合体として体内から排泄され、E2はE2-3-G、E1はE1-3-Sとしてその大部分が検出されるとの報告^{18),19),20)}がある。本調査結果でE2、E1の収支が一致しない原因としては、スポットサンプリングのデータであることその他、これら抱合体の分解が関わっている可能性が示唆される。従って今後は、遊離体に併せて抱合体の挙動についても把握する必要がある。

ノニルフェノール関連物質については、流入下

表-2 エストロゲン及びNP関連物質測定結果

単位: µg/l

	流入下水 (µg/l)			二次処理水 (µg/l)		
	最小値	中央値	最大値	最小値	中央値	最大値
E2	N.D.	0.009	0.016	N.D.	0.003	0.009
E1	0.016	0.027	0.046	N.D.	0.082	0.228
EE2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
NP	0.50	1.7	20	0.10	0.20	1.0
NP1EO	0.82	2.1	17	0.04	0.26	0.49
NP2EO	0.54	2.9	11	0.16	0.30	1.5
NP3EO	1.2	4.5	14	0.07	0.14	0.81
NP4EO	3.5	9.8	21	0.60	0.98	1.7
NP5EO	2.0	7.3	23	N.D.	N.D.	0.08
NP6EO	2.4	7.8	24	N.D.	N.D.	0.14
NP7EO	2.4	7.9	23	N.D.	N.D.	0.14
NP8EO	2.8	7.5	24	N.D.	N.D.	N.D.
NP9EO	2.6	6.2	20	N.D.	N.D.	N.D.
NP10EO	2.0	5.2	18	N.D.	N.D.	N.D.
NP11EO	1.1	3.9	15	N.D.	N.D.	N.D.
NP12EO	0.73	2.7	12	N.D.	N.D.	N.D.
NP13EO	0.23	1.7	11	N.D.	N.D.	N.D.
NP14EO	0.35	1.2	6.7	N.D.	N.D.	N.D.
NP15EO	0.34	1.5	3.4	N.D.	N.D.	N.D.
NP1EC	0.085	0.15	0.78	0.35	1.2	3.4
NP2EC	0.11	0.36	4.7	1.1	3.5	10
NP3EC	0.098	0.20	2.5	0.51	1.2	4.4
NP4EC	0.086	0.14	0.99	0.13	0.52	2.5
NP5EC	0.088	0.14	0.88	0.065	0.24	1.2
NP6EC	0.11	0.14	0.48	0.009	0.049	0.62
NP7EC	0.054	0.13	0.50	0.006	0.019	0.31
NP8EC	0.052	0.12	0.53	0.005	0.028	0.27
NP9EC	0.055	0.11	0.46	N.D.	0.028	0.13
NP10EC	0.057	0.11	0.45	N.D.	0.023	0.069

N.D.: 検出下限値未満

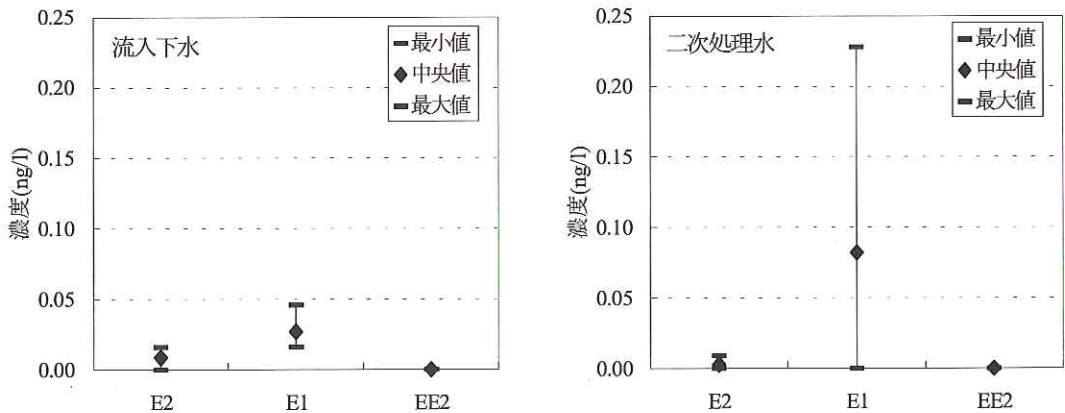


図-2 エストロゲン測定結果

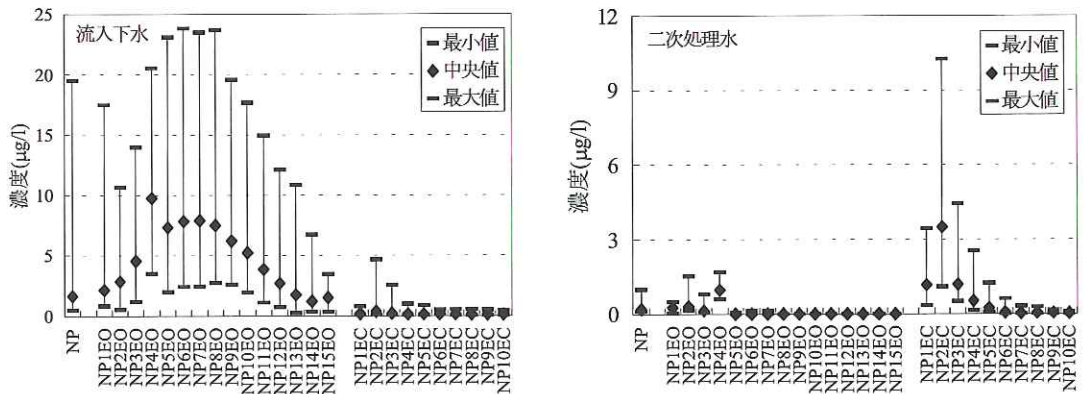


図-3 NP関連物質測定結果

水中のNPは0.50～20 $\mu\text{g/l}$ 、二次処理水中のNPは0.10～1.0 $\mu\text{g/l}$ であった。NPEO, NPECについては、流入下水では、NP6～8EOを中心としてNP1～15EOまで分布しており、NPECは低濃度で検出された。二次処理水では、NPEOは低い濃度でしか検出されず、NPECはNP2ECを中心にNP1～4ECまで分布していた。このことから、NPEOは容易に生分解される物質であることが示唆される。またNPECは、EO付加モル数5以上のものはほとんど検出されていないことから、EO付加モル数5以上では生分解性は高いものの、EO付加モル数3以下のNPECは比較的分解性が低いと考えられる。

4. まとめ

我々は、下水道における環境ホルモンの実態及び挙動把握のために、まず、下水試料を対象としたエストロゲン及びNP関連物質の分析法を開発した。エストロゲンは、E1, E2, E3, EE2を対象とした。NPEOはNP1～15EO, NPECはNP1～10ECを対象とした。いずれも固相抽出後、LC/MS/MS (又はMS) を用いて測定したところ、良好な回収率が得られたため下水試料に適用可能と考えられた。

次に下水処理でのエストロゲン及びNP関連物質の挙動を把握するために標準活性汚泥法による運転を行っている12の処理場を対象に調査を行った。

E2は流入下水より二次処理水の濃度が減少、E1は増加する場合が見られた。二次処理水では、E2の減少量とE1の増加量が一致しておらず、原因としてスポットサンプリングのデータであることその他、抱合体の分解が関与している可能性が示唆された。

NPEOは、下水処理によりその濃度が減少し、また、検出されたEO付加モル数の分布は、6～8(流入下水)から1～4(二次処理水)へと変化した。NPECは、流入下水ではほとんど検出されなかったが、二次処理水ではEO付加モル数1～4までが顕著に検出された。これらの結果から、NPEO、NPECは、EO付加モル数5以上では容易に生分解を受ける可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 環境庁：外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画SPEED'98－, 1998.
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物), 1998.
- 3) 環境庁水質保全局：水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態調査, 1999.
- 4) 国土交通省河川局：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, 2001.
- 5) 国土交通省都市・地域整備局：平成12年度下水道における内分泌攪乱物質(環境ホルモン)に関する調査の結果, 2001.
- 6) Ahel M., Giger W. and Koch M.: Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - II. Occurrence and transformation in rivers, Water Research, Vol. 28, No. 5, pp. 1131-1142, 1994.
- 7) 小島節子、渡辺正敏：名古屋市内の水環境中のアルキルフェノールポリエトキシレート(APE)および分解生成物の分布, 水環境学会誌, Vol. 21, No. 5, pp. 302-309, 1998.
- 8) 社団法人日本下水道協会：下水試験法(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.
- 9) 丸山章代、富岡淳、伊藤安紀、浅見真理、相澤貴子：群馬県の下水処理場と河川における非イオン界面活性剤およびその分解生成物の挙動について, 水環境学会誌, Vol. 24, No. 11, pp. 778-784, 2001.
- 10) M. H. I. Comber, T. D. Williams and K. M. Stewart: The effects of nonylphenol on DAPHNIA MAGNA, Water Research, Vol. 27, No. 2, pp. 273-276, 1993.
- 11) 矢古宇靖子、高橋明宏、東谷忠、田中宏明：組み替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, pp. 199-208, 1999.
- 12) 宮本宣博、高橋明宏、玉本博之、田中宏明：河川水中の環境エストロゲンの評価, 土木技術資料, Vol. 43, No. 9, pp. 34-39, 2001.
- 13) 小森行也、高橋明宏、矢古宇靖子、田中宏明：LC/MS/MSによる下水試料中のエストロゲンの測定, 第9回世界湖沼会議発表文集, pp. 225-228, 2001.
- 14) 小森行也、八十島誠、田中宏明：LC/MS/MSによるエストロゲンの分析, 第36回日本水環境学会年会講演集, p. 431, 2002.
- 15) 小森行也、八十島誠、田中宏明：下水試料を対象としたエストロゲンの測定, 第5回日本水環境学会シンポジウム講演集, p. 186, 2002.
- 16) 八十島誠、小森行也、田中宏明：下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析, 第36回日本水環境学会年会講演集, p. 526, 2002.
- 17) 八十島誠、小森行也、田中宏明：下水試料を対象としたノニルフェノール関連物質の測定, 第5回日本水環境学会シンポジウム講演集, p. 187, 2002.
- 18) T. A. Ternes, P. Kreckel and J. Mueller: Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plant - II. Aerobic batch experiments with activated sludge, The Science of the Total Environment, 225, pp. 91-99, 1999.
- 19) 五十嵐正雄：内分泌婦人科学－生殖内分泌の基礎と臨床－, 南山堂, p. 17, 1978.
- 20) 松井三郎、足立淳、松田知成、滝上英孝、清水芳久：天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動, 季刊化学総説－内分泌かく乱物質研究の最前線－, pp. 86-92, 日本化学会, 2001.

八十島 誠*



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交流研
究員
Makoto YASOJIMA

小森行也**



同 水質チーム主任研究員
Koya KOMORI

田中宏明***



同 水質チーム首席研究員, 工博
Dr. Hiroaki TANAKA