

I-21 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 13～平 17

担当チーム：水循環研究グループ（水質）

研究担当者：鈴木稔，小森行也，岡安祐司

【要旨】

水環境中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かく乱が生じる場合があると報告されている。こうした物質について、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。本研究は、界面活性剤の分解物質や人畜由来のホルモンなど都市排水由来の内分泌攪乱物質に関し、河川水・底質中などにおける調査分析手法の開発、また、水環境中での分解・生成といった変化現象の把握を目的としている。エストロゲンとノニルフェノール類の分析方法の開発を行うとともに、環境水中でのこれら物質の挙動を把握するため、流域の汚水処理形態等に着目し、異なる流域（多摩川、大津川）で実態調査を実施した。また、底質については千葉県の手賀沼と福島県の三春ダム前貯水池底質を対象にした実態調査と室内実験を行った。

キーワード：ノニルフェノール類，エストロゲン，抱合体，湖沼，挙動，シミュレーションモデル

1. はじめに

生物の正常なホルモン作用に影響を与えることが疑われている外因性の物質（内分泌攪乱物質）による環境汚染問題が顕在化してきているなか、都市排水を由来とするエストロゲンとして 17β -エストラジオール（女性ホルモン、以下E2）、その代謝生成物であるエストロン（E1）、エストリオール（E3）及び経口避妊薬の主成分であるエチニルエストラジオール（EE2）を挙げることができる。

また、環境中に存在している濃度と内分泌攪乱作用の強さから、エストロゲンに次いで環境に与える影響が大きいと考えられるノニルフェノール（NP）は、都市排水に含まれる非イオン界面活性剤であるノニルフェノールエトキシレート（NPEO）が、下水処理場や河川の中でノニルフェノキシ酢酸（NPEC）等の中間物質を経由して分解されることによって生成しているといわれている。

エストロゲンやノニルフェノール類（NP、NPEO、NPEC、以下NPs）といった物質による環境リスクを正しく評価するためには、これらの物質の測定法を開発するとともに、水環境中における変化、生成、分解、蓄積、移動といったような挙動を把握することが必要である。

本研究では、エストロゲンとノニルフェノール類の分析方法の開発を行うとともに、環境水中でのこれら物質の挙動を把握するため、流域の汚水処理形態等に着目し、異なる流域（多摩川、大津川）で実態調査を実施した。また、底質については千葉県の手賀沼と福島県の三春ダム前貯水池底質を対象にした実態調査と室内実験を行った。

2. ノニルフェノール類，エストロゲンの分析方法の開発

2. 1 エストロゲン遊離体の分析

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

具体的な試料の前処理は、①試料 1,000ml をガラス繊維ろ紙（孔径 $1\mu\text{m}$ ）でろ過する。②ろ紙に残った浮遊物質（SS）をメタノール 10ml を用い 2 回抽出（超音波利用）し、抽出液をろ液に合わせる。③ろ液に内標準物質（E2、E1、EE2 の各 d 体）を添加した後、通水直前にメタノールと精製水でコンディショニングした C18 カートリッジに通水し、E2、E1、EE2 を吸着させる。④通水後の C18 カートリッジは、遠心分離と窒素ガスパージにより脱水する。⑤酢酸エチル/メタノール (5:1) 6ml を通し E2、E1、EE2 を溶出させ、溶出液は、窒素吹き付けにより濃縮乾固する。⑥ヘキサン/ジクロロメタン (1:1) 1ml に溶解（超音波利用）し、この溶解液をフロリジルカートリッジに通しクリーンアップする。⑦溶解液の入っていた容器はヘキサン/ジクロロメタン (1:1) 1ml で洗いフロリジルカートリッジに通す。⑧フロリジルカートリッジにヘキサン/ジクロロメタン (1:1) 10ml を通し不純物を洗い流す。⑨フロリジルカートリッジに吸着した E2、E1、EE2 は、

アセトン/ジクロロメタン (1:9) 6ml で溶出させ、溶出液を窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール 1ml に再溶解する。⑩再溶解した液を NH₂ カートリッジに通しカチオン系の不純物を吸着除去する。⑪再溶解液を通した NH₂ カートリッジにメタノールを 5ml 通し、窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール 1ml を加え再び溶解する、という手順とした。分析は表-1 に示す条件により、LC/MS/MS を用いて行った。

標準溶液の繰り返し測定を行った結果 (表-2) より、バラツキを標準偏差 (σ) で表した場合の 10 σ を検出下限値とすると、実試料を対象とした場合に E2 で 1.3ng/L, E1 で 0.5ng/L, EE2 で 1.6ng/L という結果となり、従来法と同等の精度が得られた。また、河川水試料へのエストロゲン標準物質の添加回収試験を行い、その結果 (表-3)、ほぼ 100% の回収率を得ることができた。

表-1 LC/MS/MS 測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100		
	カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 2.1 ϕ × 150mm, 40°C		
	移動相	アセトニトリル/水 (60:40), 0.15ml/min		
	注入量	10 μ l		
MS/MS	装置	TSQ API-2		
	イオン化	ESI, 負イオン検出		
	コリジョンガス	Arガス		
	測定イオン	E2	271	→ 145
		E1	269	→ 145
		EE2	295	→ 145
		E2-d3	274	→ 145
E1-d2		271	→ 147	
EE2-d4	299	→ 147		

表-2 標準液の繰り返し(n=8)測定結果

	(ng/mL)		
	E2	E1	EE2
平均値	1.91	2.17	1.76
σ	0.125	0.045	0.155

表-3 河川水への添加回収試験結果

	(ng/mL)		
	E2	E1	EE2
無添加濃度	0.0000	0.0001	0.0000
標準物質添加濃度	0.0100	0.0100	0.0100
添加後の濃度	0.0103	0.0106	0.0105
回収率 (%)	103	105	105

2. 2 エストロゲン抱合体の分析

水試料を対象とした調査として下水道におけるエストロゲンの挙動把握についての調査¹⁾が実施されているが、E1, E2 及び合成エストロゲンの EE2 の測定にとどまっ

ている。下水道、河川等におけるエストロゲンの挙動解明の点から、これら遊離体の他、人あるいは動物の体内から排泄されるエストロゲン抱合体の測定は重要であるが、現時点において抱合体を含めた分析方法の報告例^{2) 3)}は少ない。本研究は、河川及び下水試料を対象とした抱合体を含むエストロゲンの分析法について LC/MS/MS による検討を行ったものであり、(独) 土木研究所と帝人エコ・サイエンス (株) が「共同研究」として実施した。

1) 分析方法

(1) 標準物質を用いた検討

本研究では、遊離体のエストロゲンとして E1, E2, EE2 に合わせてエストリオール (E3) 及び E1, E2, E3 の硫酸抱合体 (S), グルクロン酸抱合体 (G) について検討を行った。標準物質のメタノール溶液を用いて表-4 に示す LC/MS/MS の測定条件により測定再現性を確認した。

表-4 LC/MS/MS 測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100			
	カラム	Agilent Zorbax Extend-C18 2.1 ϕ × 150mm, 40°C			
	移動相	アセトニトリル:1mM NH ₄ OH = 6:4 0.14ml/min			
	注入量	10 μ l			
MS/MS	装置	TSQ API-2			
	イオン化	ESI, 負イオン検出			
	コリジョンガス	Arガス			
	測定イオン (コリジョンエネルギー)	E1	269	→ 145	(50eV)
		E2	271	→ 145	(45eV)
		E3	287	→ 171	(45eV)
		EE2	295	→ 145	(45eV)
		E1-S	349	→ 269	(40eV)
		E2-S	351	→ 271	(35eV)
		E3-S	367	→ 287	(35eV)
		E1-G	445	→ 269	(35eV)
		E2-G	447	→ 271	(35eV)
		E3-G	463	→ 287	(35eV)
		E2-S&G	527	→ 351	(35eV)
E2-diS		431	→ 351	(35eV)	

S: 硫酸抱合体 G: グルクロン酸抱合体 diS: 二硫酸抱合体

(2) 精製水、下水試料を用いた検討

精製水、河川水よりも分析条件の悪い二次処理水と流入水を用いて添加回収試験を行った。各試験水に一定量のエストロゲンを添加し以下の分析操作を行った。

試料をガラス繊維ろ紙 (GF/B) を用いてろ過する。残査は、MeOH で抽出し、ろ過試料と合わせる。MeOH 抽出液を合わせたろ過試料を Oasis HLB カートリッジに通水後、MeOH で溶出する。N₂ ガスによる乾固後、ヘキサン/ジクロロメタンで溶解する。これを Florisil カラムに通しクリーンアップする。NH₄OH/アセトンで溶出後、N₂ ガスにより乾固し MeOH に再溶解する。次に NH₂ カラムに通しクリーンアップする。MeOH により溶出し、

乾固後、アセトニトリル/水で溶解しLC/MS/MSで遊離体を測定する。MeOH 溶出済みのNH₂ カラムをNH₄OH/MeOH で溶出し、乾固後、アセトニトリル/水で溶解しLC/MS/MSで抱合体を測定する。

2) 分析結果

(1) 標準物質を用いた検討

各エストロゲン及びその硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体のメタノール標準液 (2µg/l) の繰り返し測定結果から標準偏差 (s) を求めた。3s を検出下限値と定義するとエストロゲン及びその抱合体の検出下限値は、0.07~0.5µg/lであった (表-5 参照)。実試料 (流入水、二次処理水) の分析では、抽出・精製の前処理により流入水で1,000倍、二次処理水で2,000倍濃縮されることから、実試料における検出下限値は、流入水では0.07~0.5ng/l、二次処理水では0.04~0.3ng/lとなる。

表-5 標準液の繰り返し測定結果 (n=7)

	平均値		3s		単位: µg/l	
	平均値	3s	平均値	3s	平均値	3s
E1	2.2	0.19	E1-S	2.1	0.07	
E2	2.0	0.43	E2-S	2.4	0.11	
EE2	1.8	0.50	E3-S	2.1	0.08	
E3	2.5	0.31	E1-G	2.0	0.36	
E2-S&G	2.2	0.35	E2-G	2.1	0.43	
E2-diS	1.9	0.30	E3-G	1.9	0.39	

(2) 精製水、下水試料を用いた検討

精製水 (添加濃度 40ng/l)、二次処理水 (添加濃度 40~100ng/l)、流入水 (添加濃度 70~200ng/l) に対する添加回収試験の結果を図-1 に示した。精製水、二次処理水、流入水とも遊離体の回収率は 94~120% で良好な結果が得られたが、抱合体 (特に E3-S, E1-G, E2-G, E3-G, E2-S&G, E2-diS) については回収率が 50% にも満たず、さらに検討が必要な結果となった。

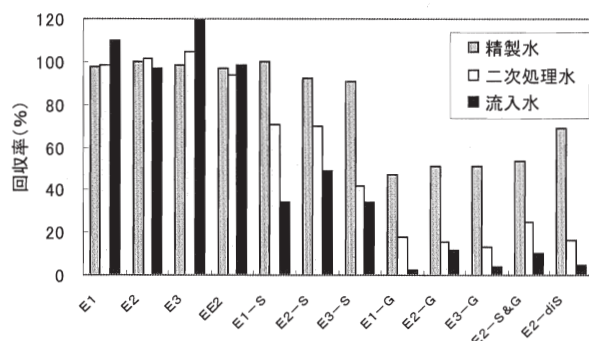


図-1 下水試料中のエストロゲン測定結果 (添加回収試験)

2. 3 エストロゲン抱合体の分析法改良

本研究において、下水試料を対象とし抱合体を含むエストロゲンの分析法についてLC/MS/MSによる検討を行っており前節 (2. 2. エストロゲン抱合体の分析) で報告した。前節では下水試料を用いての添加回収試験結果は、硫酸抱合体では二次処理水 42~71%、流入下水 34~49%であったが、グルクロン酸抱合体では二次処理水 13~18%、流入下水 4~11%であり十分とはいえない状況であった。本研究では回収率向上を目的とし前処理操作の改良を (独) 土木研究所と帝人エコ・サイエンス (株) が「共同研究」として実施した。

1) 検討項目

前処理操作、測定条件の設定に当たり以下の項目について検討を行った。

(1) 固相抽出カートリッジの選択

逆相系の固相抽出カートリッジとして一般にシリカ担体に C18 をコーティングした系が用いられており、エストロゲン遊離体のうち E1, E2 及び EE2 を測定対象とする場合に適用することができる。しかし、抱合体の回収率が低いため Oasis について検討した。

(2) 固相抽出カートリッジの洗浄溶媒

固相抽出以降の精製処理を省略し、その代わりに固相抽出カートリッジに吸着する目的成分以外の物質を洗浄溶媒により除去する方法について検討した。洗浄溶媒は、酢酸エチルと n-ヘキサンとの混合溶媒とし、5 通りの混合比 (100/0, 70/30, 50/50, 30/70, 1/100) について検討した。

(3) 固相抽出カートリッジの溶出溶媒

固相抽出カートリッジからエストロゲン抱合体を溶出させる溶媒の検討を行った。溶出溶媒として酢酸エチルとメタノールの混合液をそれぞれの溶媒の混合比 (0/1~1/0) の範囲で 10~20% の間隔で変化させ、アンモニア (NH₃) : 0.02%、水 : 2.0%(v/v)、液量 6ml でその回収率を求めた。

2) 検討結果

(1) 検量線

E1-S, E2-S, E3-S, E1-G, E2-G, E3-G, E2-S&G の混合標準液を 5, 10, 20, 30, 50, 80, 100µg/l の 7 段階の濃度に調製し、サロゲート (E2-17G-¹³C₄, E2-3S-*d*₄) を 50µg/l 濃度で添加して、測定対象物 (I) とサロゲート (Is) の面積比 (I/Is) と標準液の濃度比の関係から検量線を作成する。0~100µg/l の範囲で一次回帰した直線の相関係数 (r) は 0.9934~0.9997 の範囲であり、良好な直線性が認められた。

(2) 検出下限値

装置の検出下限値は、検量線の最も低い濃度である 5 μ g/L (注入量, 25pg) の標準液を 6 回繰り返し測定した結果から求めた。繰り返し測定結果の標準偏差 (s) の 3 倍値 (3s) を検出下限値とした。その結果、硫酸抱合体では、0.9pg \sim 1.8pg, グルクロン酸抱合体では 4.4pg \sim 5.8pg であった。

(3) 固相抽出カートリッジの選択

遊離体の E3 及び抱合体を測定対象とした場合、C18 系では回収率が劣りポリマー共重合系カートリッジのほうが優れていることを確認した。そこで性能及び回収率が安定している点からジビニルベンゼン/ピロリドン共重合系の Oasis HLB を選択した。

(4) 固相抽出カートリッジの洗浄溶媒

精製水では洗浄液側への溶出はみられなかったが、二次処理水や流入下水では、酢酸エチルが 100%あるいは酢酸エチル/n-ヘキサンが 70/30 と酢酸エチルの比率が高い場合は、E1-S, E2-S が洗浄液側へ溶出することから、洗浄液として酢酸エチル/n-ヘキサン組成 50/50 を選択した。

(5) 固相抽出カートリッジの溶出溶媒

酢酸エチル 100%では、抱合体は溶出されず、回収率は 1%以下であった。また、抱合体の種類により、若干、傾向の差があるものの、酢酸エチルとメタノールの混合比のメタノールの比率が 30 \sim 40%を超えると抱合体の溶出がほぼ同程度になることが判明した。一方、メタノールの比率が高くなるほど、他の夾雑妨害成分の溶出も多くなることから溶出溶媒として弱塩基性の酢酸エチルとメタノール混合比 1:1 を選択した。

(6) 改良した前処理操作及び LC/MS/MS の測定条件

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

る。

表-6 LC/MS/MS の測定条件 (改良法)

HPLC	装置	Agilent 1100		
	分離カラム	Agilent Zorbax Extend-C18, 2.1 ϕ \times 150mm, 40 $^{\circ}$ C		
	溶離液	A: 10mmol/l 酢酸, B: 10mmol/l 酢酸アセトニトリル		
		A/B: 80/20-10min-40/60(20min)-5min-80/20(5min)		
		0.20ml/min		
	注入量	5-10 μ l		
MS/MS	装置	TSQ API-2		
	イオン化	AP-ESI, Negative		
	コリジョンガス	アルゴン		
	測定イオン (コリジョンエネルギー)	E1-S	349, 269	(35eV)
		E2-S	351, 271	(35eV)
		E3-S	367, 287	(35eV)
		E1-G	445, 269	(35eV)
		E2-G	447, 271	(35eV)
		E3-G	463, 287	(35eV)
		E2-S&G	527, 351	(35eV)
		E2-3S-d4	355, 275	(35eV)
E2-17G- ¹³ C4		451, 275	(35eV)	

(7) 添加回収試験

試料として、純水 (500ml), 二次処理水 (300ml), 流入水 (200ml) にそれぞれ抱合体を各 50ng ずつ添加し、回収率を求めた。その結果、図-2 に示すように、精製水の添加回収試験では、ほぼ 100%に近い回収率が得られた。一方、下水試料では、二次処理水は精製水に近い回収率が得られたのに対し、流入下水は 60 \sim 120%の範囲であった。前節の方法に比べグルクロン酸抱合体の回収率が大幅に改善した。

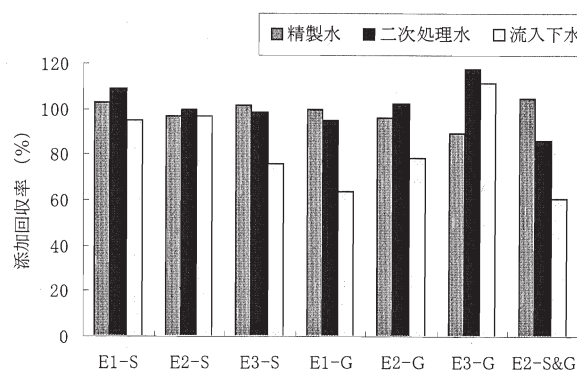


図-2 下水試料中のエストロゲン測定結果 (添加回収試験)

2. 4 底泥中のノニルフェノキシ酢酸類分析法の改良

磯部ら⁴⁾の分析方法を基に検討し、開発した方法⁵⁾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。その分析フローを図-3 に示す。

試料 20 g 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 $^{\circ}$ C 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%BF₃/メタノールを0.5ml加え、90°C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。

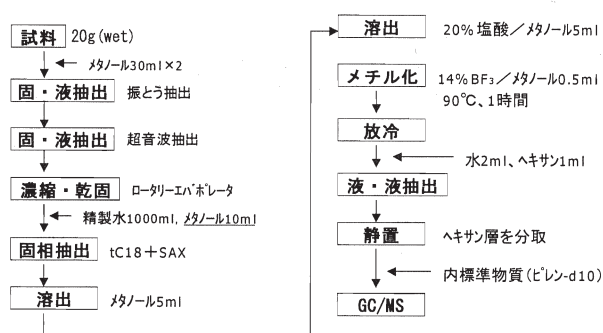


図-3 底泥中のノニルフェノキシ酢酸類の分析方法

この手法を用いたGC/MSの分析条件を表-7、河川底質試料への添加回収試験の結果を表-8に示した。それぞれ3試料を用いた試験の結果、NP1ECは100%、NP2ECは92%、NP3ECは75%の回収率であった。

表-7 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°C (1min)~12°C/min~300°C (1min)
	注入口温度	300°C
	注入法	パルスドスプリットレス
	キャリアガス流量	1.2ml/min
MS条件	インターフェイス温度	300°C
	イオン源温度	230°C
	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-8 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

2. 5 NPs及びエストロゲンの底質・汚泥分析法検討

河川底質および活性汚泥を用いて、これらに含まれるNPs、エストロゲンの分析精度を確認した。具体的には、抽出効率の確認、前処理方法の精度の確認を行った。

1) 検討方法

検討に用いた底質は桜川にて採泥、活性汚泥は湖北実験プラント(屋外施設)より採取した。なお、検討に用いた底質の含水率は52%、活性汚泥のMLSSはNP・NPEO検討用については2,000mg/L、NPEC検討用については2,200mg/L、エストロゲン検討用については1,800mg/Lであった。

河川底質や活性汚泥に含まれるNPsやエストロゲンを分析する際には、水試料と異なり、前処理操作に先立って、目的物質を抽出する必要がある。ここでは、底質と汚泥で別々の抽出方法を用いた場合の前処理を含めた分析精度を確認した。底質と汚泥のNPs、エストロゲンの抽出条件は、以下に示すとおりである。

(1) NPsの抽出条件

ここでは、①試料量、②抽出溶媒量、③抽出回数の違いによる抽出効率の差を把握することを目的に抽出条件を設定した。抽出方法は図-4に示すとおりである。また、抽出条件を表-9、-10、-11、-12に示す。なおA法が、従来の抽出方法である。

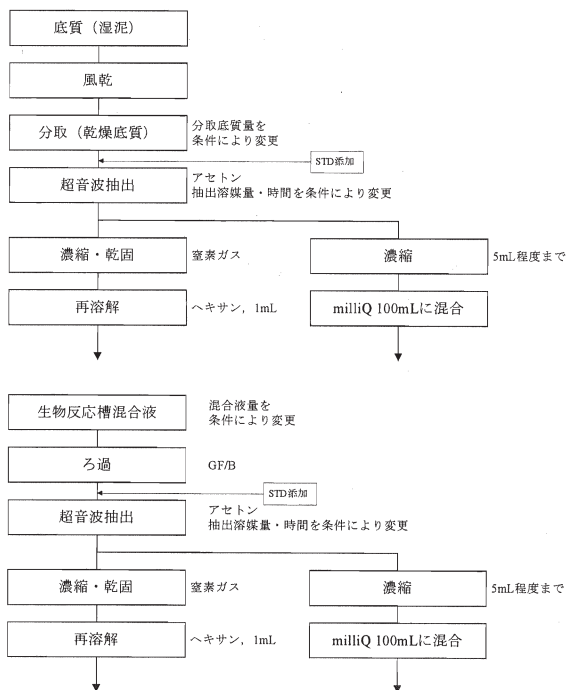


図-4 NPs抽出方法

表-9 底質中 NP 類 (NP, NPEO) 抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量	1g-dry	5g-dry	5g-dry
STD 添加	NP:15μg NPEO:30μg	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン /5mL	アセトン /25mL	アセトン /25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

表-10 底質 NP 類 (NPEC) 抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量*	0.5g-dry	2.5g-dry	2.5g-dry
STD 添加	12.5ng	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン /5mL	アセトン /25mL	アセトン /25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

表-11 汚泥中 NP 類 (NP, NPEO) 抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量	200mg	1,000mg	1,000mg
STD 添加	NP:10μg NPEO:20μg	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン /10mL	アセトン /50mL	アセトン /50mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

表-12 汚泥中 NP 類 (NPEC) 抽出条件

	A 法	B 法	C 法
試料量	220mg	1,100mg	1,100mg
STD 添加	5ng	なし	
抽出方法	超音波		
抽出溶媒/量	アセトン /5mL	アセトン /25mL	アセトン /25mL
抽出条件	15min×2	15min×2	15min×6

(2) エストロゲンの抽出条件

エストロゲン類については、以下のフローに従って抽出した (図-5)。B 法は、要調査項目等調査マニュアル (環境省環境管理局水環境部企画課, H15.3 : 以下, 提案法) に記載された方法である。一方 A 法は、当研究チームに

てこれまで実施してきた方法である。ここでは主に、凍結乾燥法によって抽出した場合と、従来の方法での抽出効率の差を把握することを目的に抽出条件を設定した。

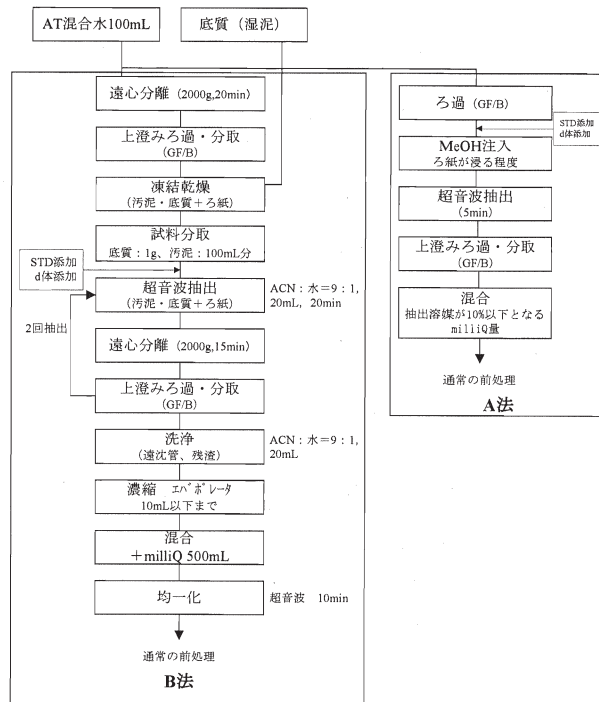


図-5 エストロゲン抽出フロー

(3) 分析方法

NP, エストロゲンの分析は、当研究チームにて従来用いていた方法を基本に一部をモディファイして行った (表-13)。NP・NPEO の前処理方法は図-6, NPEC の前処理方法は図-7, エストロゲンの前処理方法は図-8 に示すとおりである。

表-13 分析方法とその概要

	前処理方法出典	概要
NP	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およびクリプトスポリジウム編 - , pp.307-310 (2002)	抽出液をシリカゲルカラムにて精製
NPEO		
NPEC	八十島他, 下水試料中のノニルフェノキシ酢酸類の分析, 第36回日本水環境学会年会講演集, p.526 (2002)	GCB で固相抽出後, 25mM ギ酸含ジクロロメタン: メタノール=9:1 で溶出
エストロゲン	小森他, 下水試料を対象としたエストロゲンの測定, 第5回日本水環境学会シンポジウム講演集, p.186 (2002)	HLB で固相抽出後, フロリジル, アミンカラムにて精製

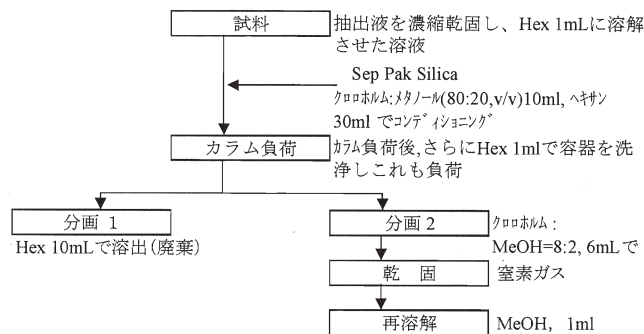


図-6 NP, NPEO 前処理方法

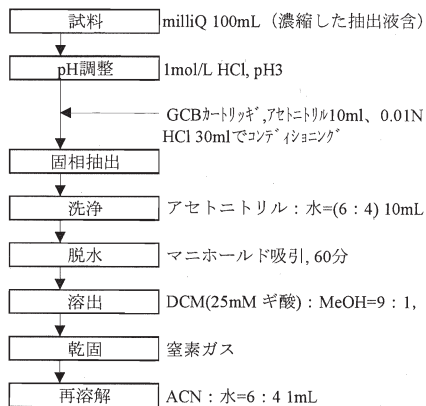


図-7 NPEC 前処理方法

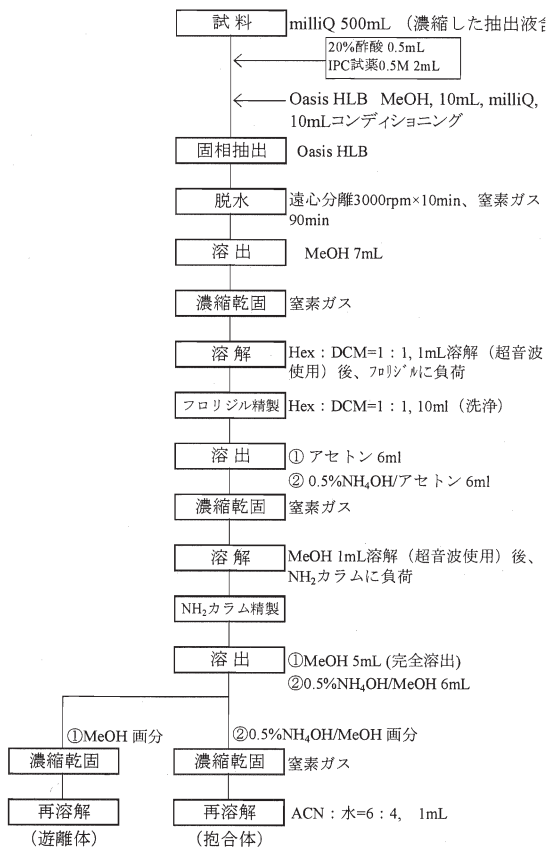


図-8 エストロゲン前処理方法

2) 検討結果

(1) NP, NPEO

① 底質

測定結果を図-9 に示す。従来法である A 法では、EO 鎖数5以上のNPEOでは定量下限値以下であった。また、NP および比較的短鎖の NPEO (NP1EO~10EO) の回収率は60%~90%と良好であったが、NPEOはEO鎖が長くなるに連れて回収率が低下する傾向にあった。また、この時の測定値のばらつき(CV値)は最大で7%程度と小さかった。一方、抽出に用いた汚泥量をA法の5倍としたB法、C法では、濃度がA法の5倍程度に増加したのが見られた。抽出の傾向はB法、C法とも似通っており、検出されるEO鎖長に大きな違いは認められなかった。

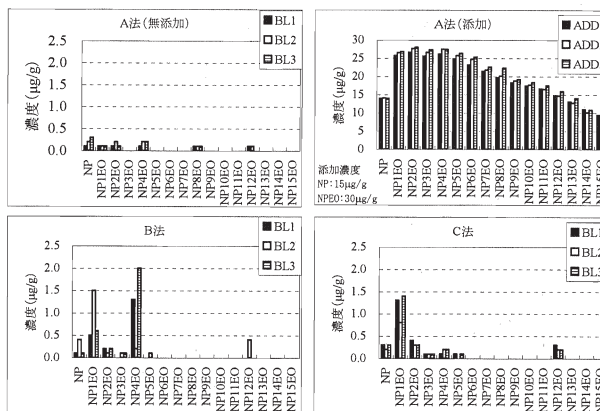


図-9 底質中 NP・NPEO 測定結果

② 汚泥

測定結果を図-10 に示す。EO 鎖が長い NPEO は試料量を A 法の 5 倍にした B 法、C 法の 1g においても検出できるレベルになかった。また、添加回収試験での回収率は80~90%と良好であった。

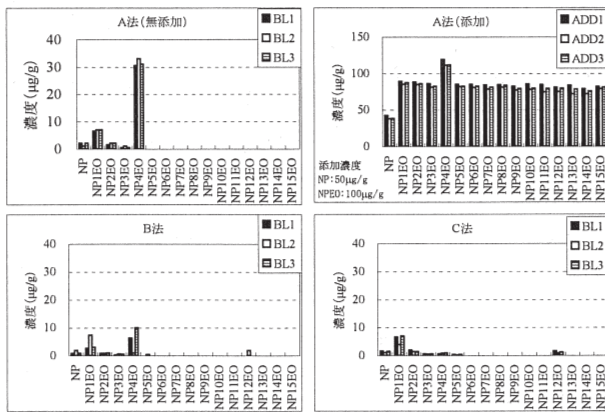


図-10 汚泥中 NP・NPEO 測定結果

(2) NPEC

① 底質

底質試料を分析したクロマトグラムにおいては、定量出来るピークはほとんど認められなかった。わずかに目的物質と認められるピークについても、その面積値は極めて小さく、定量の結果、全てが定量下限値未満、つまり、N.D.であった。また、標準溶液を添加した試料においても、ほとんどの場合、目的物質のピークは認められず、定量の結果、全てが定量下限値未満であった。

② 汚泥

測定結果を図-11 に示す。A 法、B 法、C 法とも短鎖 (NP1EC~NP4EC) の NPEC は検出されているが NP5EC より長鎖ではほとんど検出されなかった。長鎖の NPEC が検出されなかったのは、抽出効率が悪いというよりも、長鎖の NPEC は生分解を受けやすいことから試験に用いた汚泥中に存在していなかったとみられる。また、A 法の添加回収試験では、添加前濃度に対し添加濃度が低く回収率を算出できなかった。添加濃度を添加前濃度の 2~3 倍にした再試験を行う必要がある。

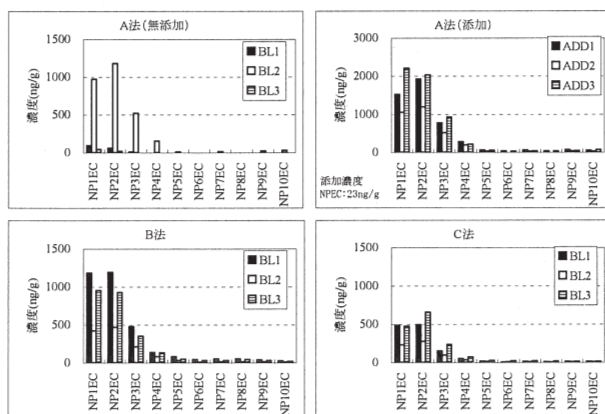


図-11 汚泥中 NPEC 測定結果

(3) エストロゲン

① 底質

測定結果を図-12 に示す。無添加の試験では、A 法、B 法とも同様のパターンを示した。遊離体では EE2 が、抱合体では E3-S と E1-G が検出されていない。添加回収試験の結果では、E1, E2, EE2, E3, E1-S, E2-S, E3-S の回収率はほぼ 100%であり、E2-diS は 30~50%であった。また、他のグルクロン酸抱合体の回収率は数%以下でありほとんど抽出できないことが分かった。

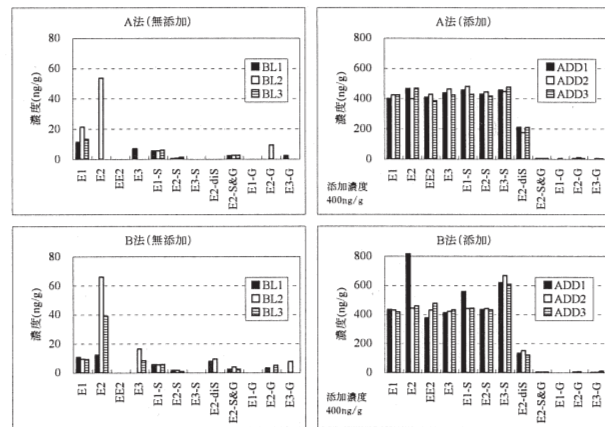


図-12 底質中エストロゲン類測定結果

② 汚泥

測定結果を図-13 に示す。無添加の試験では、A 法、B 法とも同様のパターンを示し、E2-diS が他のエストロゲンに比べ多く抽出された。添加回収試験の結果では、底質試料と同様の結果を示し、E1, E2, EE2, E3, E1-S, E2-S, E3-S の回収率はほぼ 100%であった。また、E2-diS は底質の回収率 30~50%に比べ大きく 60~80%であった。グルクロン酸抱合体については、底質同様ほとんど抽出できていない。

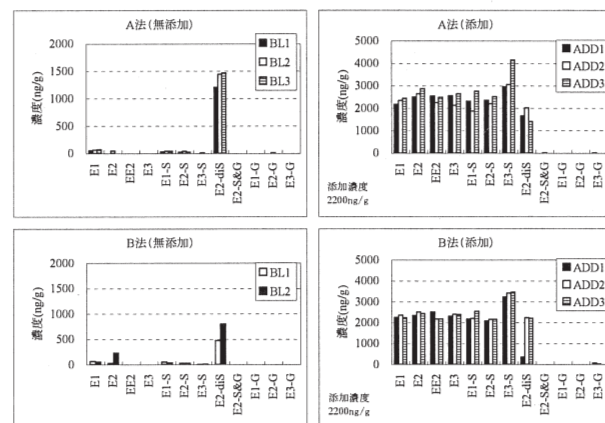


図-13 汚泥中エストロゲン類測定結果

(4) 分析精度

① NP・NPEO

NP・NPEOの添加回収試験では、底質・汚泥のいずれにおいても良好な回収率と安定して低いばらつき(CV値10%以下)を示した。また、抽出に用いる試料量は底質で1g-dry、汚泥量で200mg-dryで十分であることが確認された。これらのことから、底質・汚泥中の分析方法は、従来行ってきた方法で十分な精度を確保していたと考えられる。

② NPEC

底質では、標準溶液を添加した場合でも目的物質のピークが認められなかった。標準溶液の添加は、12.5ng/gとなるように行っており、定量下限値より十分に高いことから容易に検出できるレベルにあったと考えられる。しかし、活性汚泥では同一の抽出・前処理法でその濃度が確認されていることから考えると、底質においてピークすら確認されなかった要因は、機械的問題や前処理方法の問題ではなく、抽出操作において全く回収されなかったことが示唆される。このため、底質に適用可能なNPECの抽出方法については、更なる検討が必要であると考えられる。

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

③ エストロゲン類

底質・汚泥中のエストロゲン類の分析については、従来法、提案法のどちらも遊離体については良好な回収率と低いばらつき(CV値10%以下)であった。このため、これまで蓄積されてきた底質や汚泥の遊離体の分析データは一定の精度を保有していたものと推測される。これらの情報から、底質や汚泥中のエストロゲン類の分析は、従来用いていた超音波抽出法で一定の精度を維持して行うことができると考えられた。しかしながら、抱合体については、理論値を大きく下回る回収率である他、そもそも検出されないケースが続出した。抱合体については、水試料においても十分な精度を維持して分析することが未だ困難な状況にあることから、まずは水試料における分析精度の向上、確認が必要であると考えられる。

3. 水中でのノニルフェノール類、エストロゲン類の分解、生成などの現象解明

3. 1 日本の主要河川におけるエストロゲン様活性の検出状況

日本の主要河川におけるエストロゲン様活性の濃度レベルを明らかにするとともに、流域情報との比較を行いエストロゲン様活性の由来について検討した。

1) 検討試料

試料の採取は、国土交通省河川局の協力を得て、1999年から2001年にかけて水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査(以後、全国河川実態調査)に併せて採水を行った。遺伝子組み換え酵母法の測定を行った地点は、図-14に示す全国一級河川94水系132地点である。

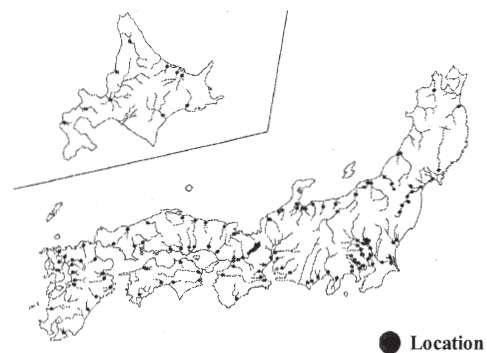


図-14 試料採取地点(全国河川実態調査)

2) 分析方法

標準物質のエストロゲン様活性の相対的強度である比活性値は、Tanakaら⁶⁾の報告に従いE2の用量反応曲線の最大発色50%濃度を1とし、各物質の用量反応曲線から求めた発色50%濃度との比較により換算し、比活性値を算出した。比活性値を表-14に示す。また、化学分析結果については、国土交通省が行った全国河川実態調査の結果を用いた。

表-14 各物質のE2に対する比活性値

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

3) 流域情報の整理

流域面積は、国土交通省の各工事事務所が作成した河川図及び流域図を利用した。流域情報を整理した地点は、88水系である。これらの流域図を参考として、各流域に含まれる市町村を調べるとともに、プランメータを用い

て流域内に該当している市町村面積を計測した。この情報をもとに、エストロゲン様活性を測定した地点の流域面積を計測した。各市町村人口は、住民基本台帳（2001年1月1日現在）を利用した。また、汚濁処理形態別人口（平成13年現在）は、国土交通省から資料提供を受けた。各流域に該当する人口は、人口の偏りをここでは考慮せず、流域に該当する面積の比から流域人口を算出した。ただし林野部のみが流域に該当する市町村については、ここでは流域外として扱い、人口の割り当てをしないこととした。これらの計測結果を基に、以下の項目を算出した

- ・流域人口密度（人/km²）＝流域人口（人）／流域面積（km²）
- ・污水处理施設整備人口（人）＝下水道人口＋合併浄槽人口＋コミュニティプラント処理人口＋農業集落排水人口
- ・污水处理施設整備率（％）＝污水处理施設整備人口（人）／流域人口（人）×100

なお、取排水を通じた流域内外の水の移動は、本検討では考慮していない。

4) 結果

平成13年に国土交通省と連携して秋に全国一斉の調査を行い、エストロゲン様活性とエストロゲン様物質及びエストロゲンを比較した。各物質が検出されないにも関わらずエストロゲン様活性が検出された地点は全体の79%であり、実態調査で測定した物質以外に、不明なエストロゲン様物質が存在している可能性が示唆された。

そこで遺伝子組み換え酵母法、化学分析ともに値が検出された17地点を抽出し、エストロゲン様活性の寄与物質とその寄与率を推定した。ここでは各物質に比活性値を乗じてE2換算濃度の換算した値と、遺伝子組み換え酵母法のエストロゲン様活性値を比較した。その結果を図-15に示すが、エストロゲン様活性の主要な寄与物質としてE1が占めるケースが多いことが確認された。またエストロゲン様活性の上昇要因を探るため、BOD5やSSなどのコンベンショナルな水質項目6項目（SS, DO, pH, BOD5, 塩素イオン, 硫酸イオン）との関係について検討したところ、BOD5との間に有意な相関（ $r=0.75$ ）を確認した。

各河川の生活系排水に関する流域情報を整理し、両者の関係を比較した。その結果を図-16に示す。流域人口密度とエストロゲン様活性には正の相関が確認され、人口の集中がエストロゲン様活性に大きく寄与していることが確認された。

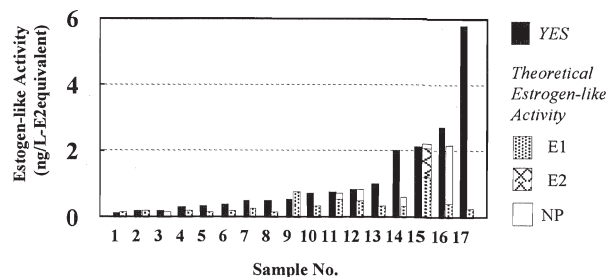


図-15 エストロゲン様活性値と各物質のE2に対する比活性値

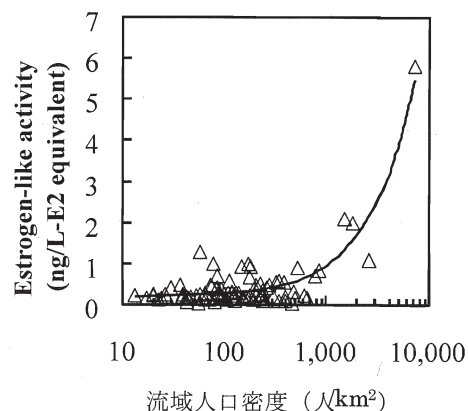


図-16 流域人口密度とエストロゲン様活性の関係

5) 考察

日本国内で検出されるエストロゲン様活性の主要な寄与物質としては、エストロゲン（特にエストロン）の寄与が大きいものと推定される。また、先に示したようにエストロゲン様活性はBOD5と相関との相関を持ち、人口密度と有意な相関を持っていることを確認した。これらの結果は、生活系の排水とエストロゲン様活性の関係が大きいことを示す結果として理解できる。そこで污水处理施設整備人口とエストロゲン様活性の関係についても検討を行った。その結果を図-17に示す。その結果、污水处理施設整備率とエストロゲン様活性に明瞭な傾向は確認できなかったが、流域人口密度の高い地点（1000人/km²以上）に注目すると、污水处理施設整備率が高いにも関わらず、エストロゲン様活性が高くなった。都市部に位置する河川では、水資源の複雑な運用に伴い、下水処理水などの再生水が河川に占める割合は非常に高まっており、河川流量に占める污水处理水量の占める割合高まっていることが原因と考えられる。

そこで全国河川と日本国内での下水中のエストロゲン様活性の濃度分布を図-18に示す。下水処理場ではその処理工程でエストロゲン様活性が約80%の減少することを確認しているが、下水処理水として16ng/l-E2活性等量

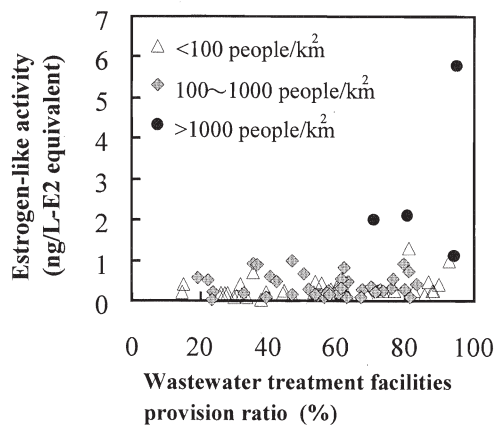


図-17 汚水処理施設整備率とエストロゲン様活性の関係 (流域人口密度で区分)

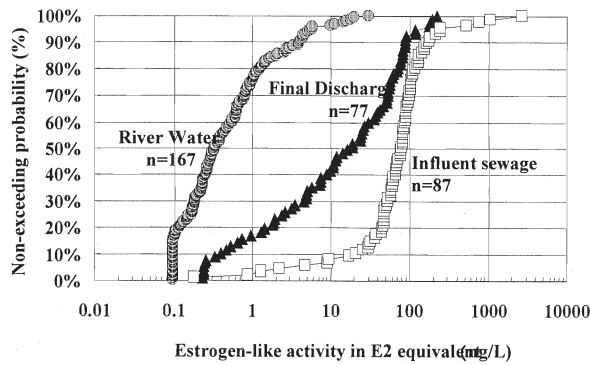


図-18 全国河川と日本国内での下水中のエストロゲン様活性の濃度分布

(中央値)の濃度で環境水中に放出されることになる。この濃度は河川濃度(中央値)より2桁も高い値であり、放流先の河川に占める下水処理水の割合によっては、エストロゲン様活性が上昇することを意味するものである。これらの結果を考慮すると、汚水処理整備の普及だけでは、河川中のエストロゲン様活性の低減は期待できない。特にエストロゲンは、し尿に由来するため、厨房排水のような発生源対策も講じづらい。このためエストロゲン様活性の削減には、水再利用を含めた水資源計画について検討していくことが重要であると考えられる。

3. 2 河川における NPs, エストロゲンの挙動

3. 2. 1 NPs, エストロゲンの負荷量実態調査(手賀沼流入河川)

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-19)。

採水地点は、大津川本川及び支川を含め6地点(記号: OT①~OT⑥)、名戸ヶ谷排水路流末(同: NT)、増尾排水路流末(同: MS)とした。大津川流域のフレームの変化を表-15に示す。

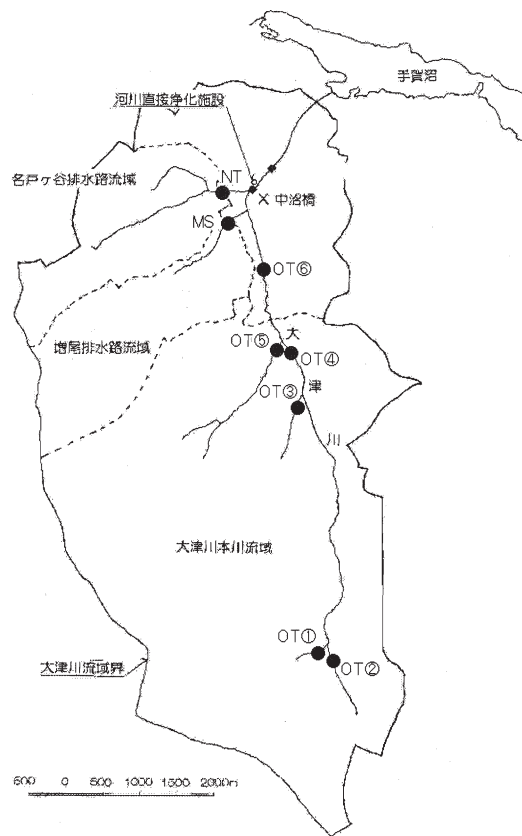


図-19 対象河川と調査地点

表-15 大津川流域フレーム

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

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。

3. 2. 2 NPs, エストロゲンの流下変化 (多摩川)

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4kmの区間(以後、多摩大橋地区)で行った。調査地点は図-22に示す9地点(①~⑨)である。

本地区は、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る。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。また、調査で確認された挙動を解明するため、分解実験を実施した。

2) 調査方法

分析項目のうち、NP、NPEO、NPEC、エストロゲンの分析は3.1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¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾

各地点における負荷量調査結果を図-22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、平成14年8月~平成16年8月まで、定期的に調査を行った。

その結果、初年度の夏期(8月)はノニルフェノール関連物質及び、エストロゲンは流下に伴い減少する傾向が確認され、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(図-23)。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(図-23)。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(図-24)。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。

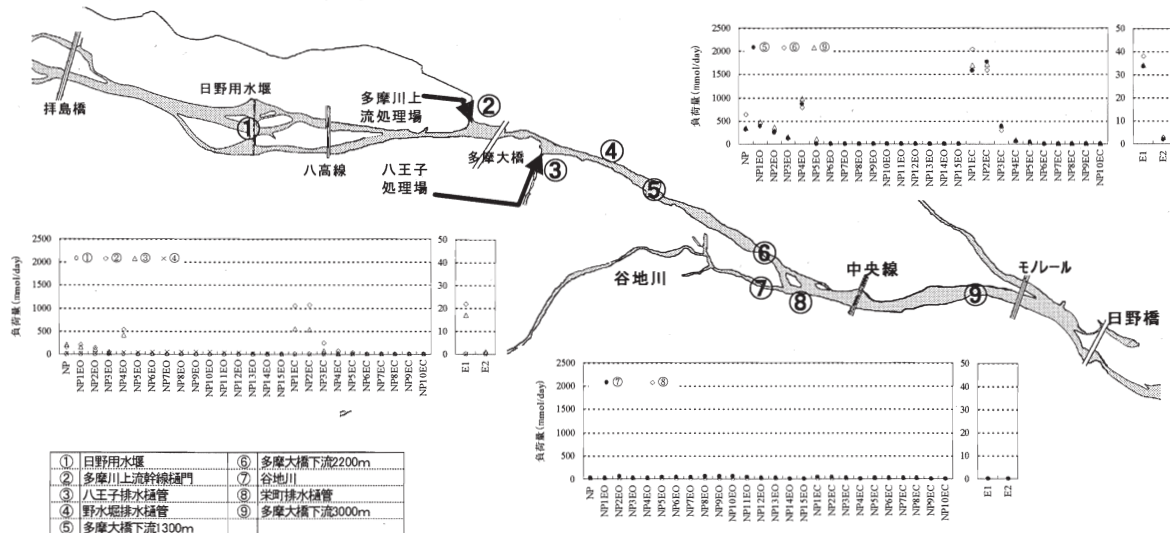


図-22 多摩川地区におけるノニルフェノール類及びエストロゲンの負荷量(2月)

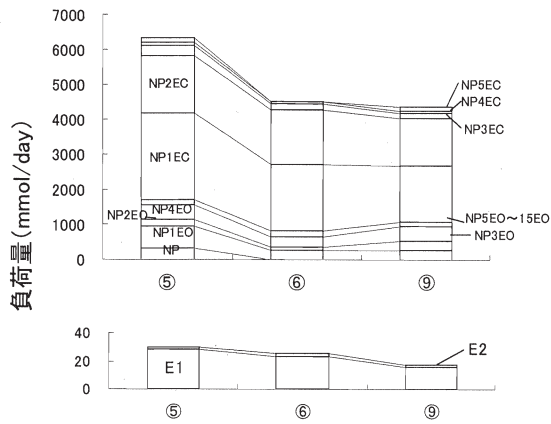


図-23 ノニルフェノール類及びエストロゲンの流下過程における変化（8月）

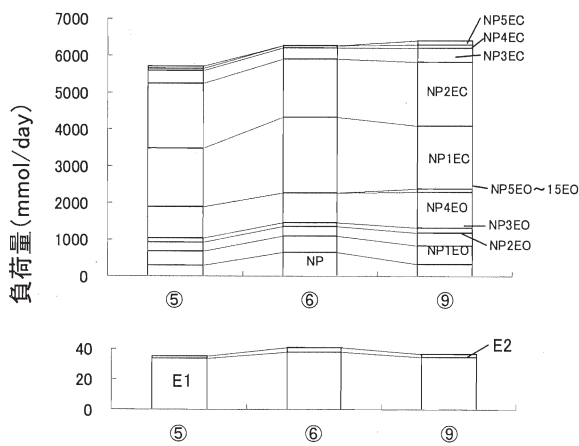


図-24 ノニルフェノール類及びエストロゲンの流下過程における変化（2月）

平成14年8月以降に実施した、多摩大橋下流1300m地点か3000m地点間での追試結果について、窒素およびリンの負荷量とともに図-25に示した。いずれの調査においても窒素化合物については硝酸態窒素の占める割合が高く、下水処理行程で硝化が充分行われてから放流されていることが確認された。過去に報告した夏期の調査（平成14年8月実施）を除くと、今回新たに行った夏期の調査（平成16年8月）においても、各態窒素化合物の負荷量は流下距離3km、流下時間およそ90分では減少することなく流下することが明らかになった。一方、リン化合物についても過年度夏期の調査（平成14年8月）において若干の減少傾向が確認されたが、今回新たに行った夏期の調査（平成16年8月）においては、窒素化合物同様流下に伴う顕著な濃度の低下は確認されず、同区間、流下時間では分解されにくいことが確認された。過去の調査において、両

物質の減少が確認された原因としては、調査地点数が少なかったこと、採水順序、採水時間の間隔などが考慮されていなかった点が挙げられる。

NP関連物質の大部分はNPnECであり（図-25）、その中でもNP1ECおよびNP2ECの存在割合が高かった。今回実施した夏期の調査においては、3000m地点の濃度が、相対的に減少していたが、同調査全体としては、減少傾向は確認されなかった。

各調査地点で検出されるエストロゲンの大部分はE1であった（図-25）。過去の夏期の調査（平成14年8月）においては、流下に伴う濃度減少が確認されたが、NP関連物質同様に、平成15年8月の調査では、流下に伴う濃度減少は見られず、保存的な傾向を示した。

上述したように、ノニルフェノール関連物質やエストロゲン類が流下に伴い減少し、特にエストロン(E1)が40%以上も減少する可能性があることが確認された。しかし、流下に伴う水質変化についての再現性は確認されなかった。これまでの調査はいずれも実際の河川内で流下方向に調査地点を設置して実施したものであることから、流量や温度、水深、河床材料といった物理的要因や、対象とする水塊の同一性といった観点においてコントロール不能な部分も多く、必ずしも結論として確定することができていない。

そこで、コントロール可能な環境要因を一定の範囲に保つよう、実験的な手法を導入して、環境ホルモン関連物質に関する流下に伴う水中濃度の変化についてさらに詳細な検討を行った。

3. 2. 3 NPs, エストロゲンの河川水中での分解（多摩川）

1) 対象河川及び調査地点

流下に伴う環境ホルモン関連物質水中濃度の減少に係わる環境要因としては、以下の点が考えられる。

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

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

これらの容器を多摩川の河川中に設置し、さらに同じ水塊から採取した水を一定量(3.5L)分注することで、水温（約29℃）、水質、日照の条件を統一した。

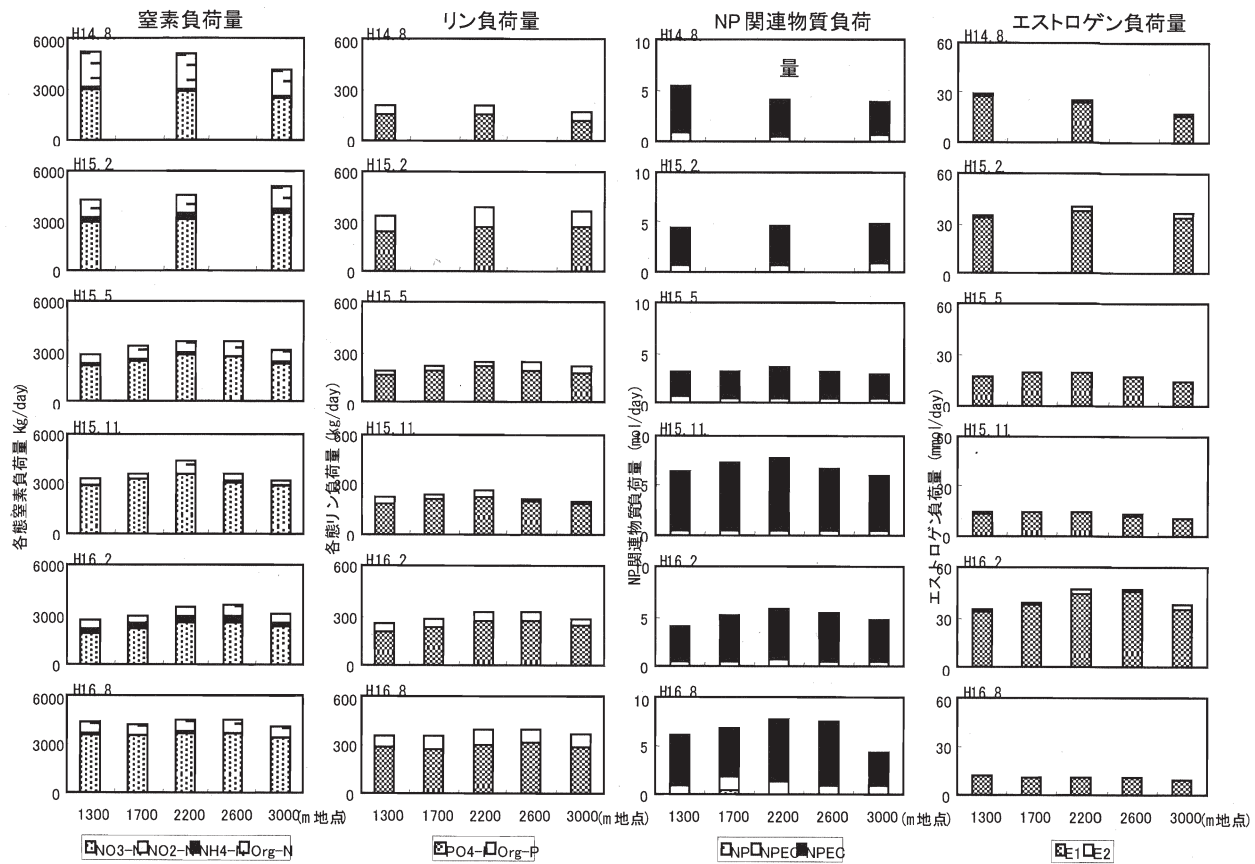


図-25 窒素、リン、NP関連物質、エストロゲンの流下に伴う付加量変化

過去の研究より、地点⑤から地点⑨の流下時間は約90分と報告されている。そこで、開始直後(0時間)、2時間後、4時間後、6時間後の各時間において、水質分析用のサンプルを採取した。

2) 分解実験の結果

分解実験に供した河川水からは、NPEC、E1が有意に検出された。流下過程における挙動変化に関する前項の調査の結果(図-25)、NPECは夏期調査において、流下に伴い濃度の減少が確認された。しかし、現場での分解実験の結果、NPECは、いずれの条件においても、明瞭な濃度の減少は確認されなかった(図-26)。一方、E1については、流下過程での調査においてほとんどの場合、減少傾向が確認されなかったものの、分解実験においては、時間の経過とともに若干の濃度の減少が確認された(図-26)。しかし、明条件における光分解の効果はほとんど観察されなかった。

そこで、多摩川における現場分解実験に続いて、水温、照度をコントロールし、さらに、図-22の地点⑤で採取し

た生物膜を加え、分解実験を行った。

3. 2. 4 河川水中 NPs, エストロゲンの室内分解実験

1) 実験方法

光透過性のあるガラス円形水槽と遮光性のステンレス容器の2種類の容器を、照度11,000luxの培養器(28℃)に設置した。そこへ、図-22の地点⑤で採取した河川水を3.5Lずつ分注した。さらに、表-16に示すような条件のもと、一部の容器に、同地点周辺で採取した付着藻類等の生物を含む底質表層(生物膜)を各容器に沈殿量で50mLを投入した。いずれの容器においても、実験期間中連続的に攪拌を行った。開始直後(0時間)、2時間後、4時間後、6時間後の各時間において、水質分析用のサンプルを採取し、それぞれの水中におけるエストロゲン関連物質の経時変化を測定した。

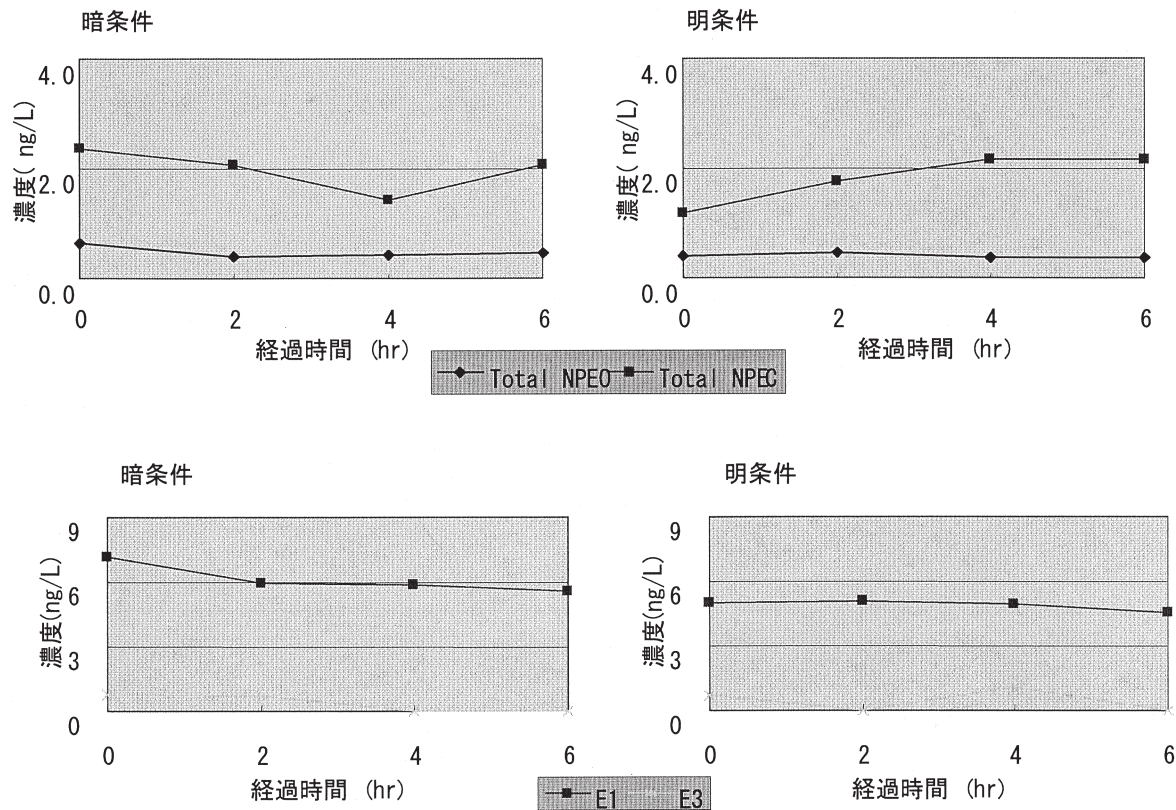


図-26 エストロゲン関連物質の現場分解実験におけるNPEOおよびNPECの濃度変化(上段)とE1およびE3の濃度変化(下段)

表-16 エストロゲン関連物質の室内分解実験条件

ケース	光	生物膜	生物膜の由来	分解要因
①	明	無	地点⑤	光分解
②	暗	無	地点⑤	時間経過
③	明	有	地点⑤	光・生分解、吸着
④	暗	有	地点⑤	生分解・吸着

2) 分解実験の結果

供試河川水からは、NPEO、NPEC、E1が有意に検出され、一部の試料についてE3が検出された。その結果、前項の現場調査同様、NPECおよびNPEOについては、試験の進行に伴う明瞭な濃度の増減の傾向は確認されなかった(図-27)。

一方、E1については、生物膜が存在する条件、特に明条件において、時間の経過に伴う濃度の減少傾向が確認され(図-28)、6時間の実験期間において3.6ng/Lが減少した。この分解量について、供試河川水量(3.5L)、供試験生物膜剥離面積(約0.025m²)より単位時間、単位面積

あたりの濃度低減速度は、84ng/h/m²と見積もられた。

さらに、3.2.2で示した流下に伴うエストロゲン関連物質の除去について検討を行った、多摩川の調査区間(図-22、地点⑤から地点⑨)における河床面積の概算値より、1日当たりの同区間における分解量は680μmol/dayと見積もられる。この数字を、図-25に示した、地点⑤における負荷量(13~34mmol/day)と比べると、およそ2~5%と見積もられ、同区間におけるE1の流下に伴う濃度の低減に対し、河床生物による除去の寄与は小さいことが示唆された。ここで、流下に伴う化学物質の除去は、流下時の河床(生物)への吸着・分解のほか、水中での分解が考えられる。E1の場合、現場および室内実験における生物膜無しで実施した試験結果より、水中での分解は少ないと見積もられる(図-26, 28)。

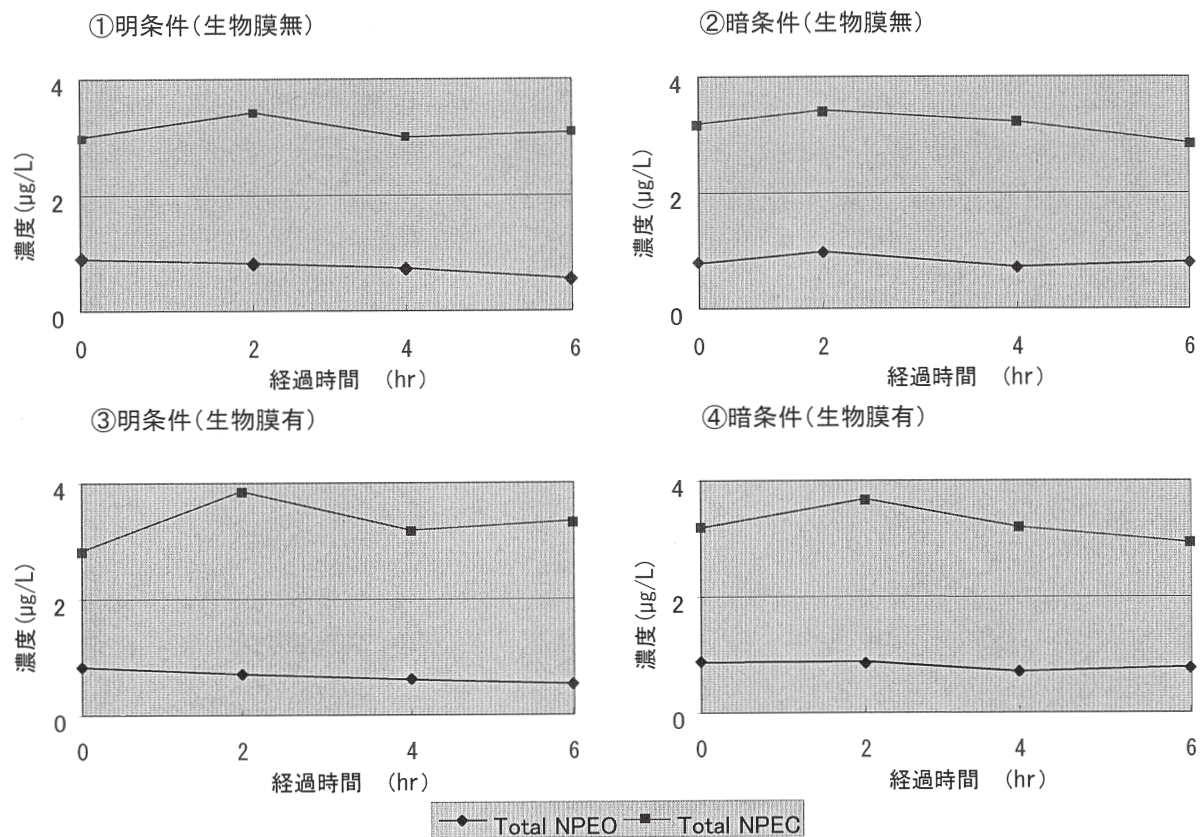


図-27 室内分解実験におけるNPEOおよびNPECの濃度変化

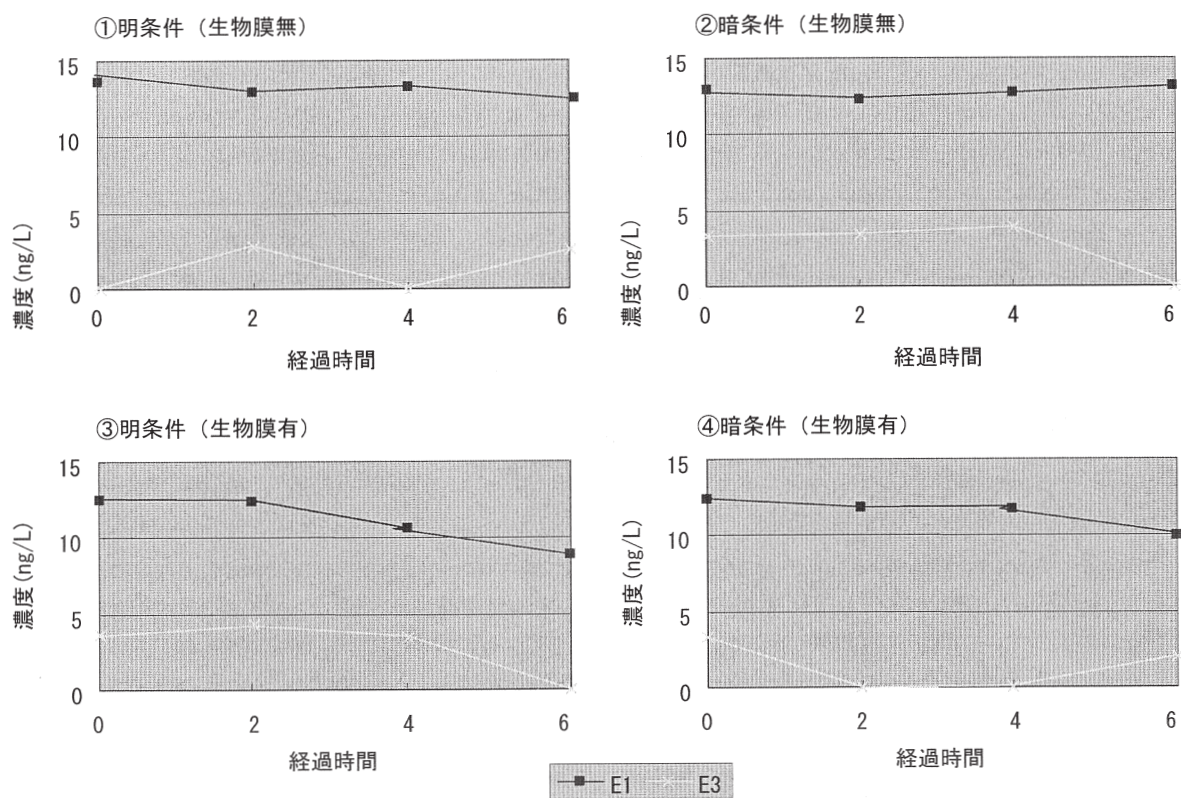


図-28 室内分解実験におけるE1およびE3の濃度変化

3. 2. 5 水生生物へのエストロゲン関連物質の蓄積 (1)目的

河川環境中でエストロゲン様物質やエストロゲンがどの程度生物に蓄積されているかという情報については、アルキルフェノールを中心に報告¹³⁻¹⁶⁾があるが、エストロゲンについては魚類の体内に女性ホルモンが存在していることもあり、その濃縮性については調査した事例が殆ど見られない。また河川生態系を構成するその他の生物(付着藻類、底生生物)については、AheI らの報告¹⁷⁾や Takahashi らの報告¹⁸⁾などを数えるに過ぎない。

そこで、ここでは下水処理水が放流される河川において、処理水中のエストロゲン関連物質の生物への移行について、現地調査による試料の分析結果から検討を行い、生物への蓄積の実態について把握することを目的とした。

(2)調査方法

a) 調査地点および時期

調査地点は、図-29 に示すように、多摩川中流の多摩大橋地区および多摩川上流域の奥多摩橋下流で行った。多摩大橋地区の上流地点として日野用水堰 (St. 2) を下水処理水の合流後の調査地点として、多摩大橋下流地点 (St. 3)、日野橋地点 (St. 4) を設定した。また人為的な汚染の殆どない地点として、奥多摩橋地点 (St. 1) を設定した。調査は2002年9月～2003年4月にかけて実施した。

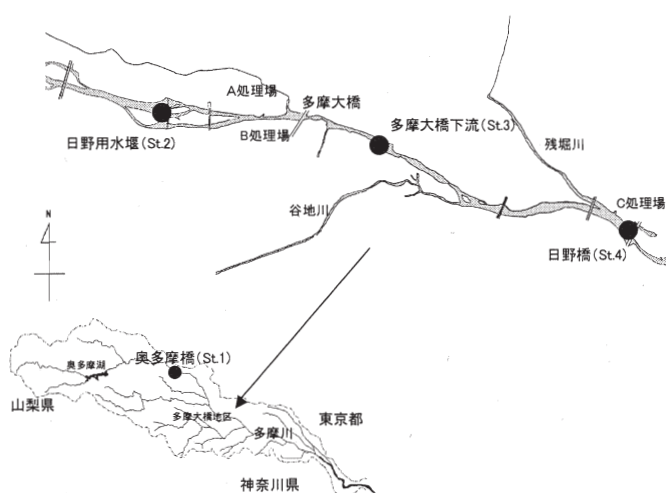


図-29 調査地点位置図

b) 調査項目

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

付着藻類はハブラシを用いて河床の礫石から刮ぎ取り、実験室に持ち帰った。この試料を遠沈管に入れ遠心分離 (2500ppm, 20 分間) し、水層と分離させた。この際、ユスリカやブユ等の底生生物が上層に分離されるため、これらを目視にて取り除いた。また下部にはシルトが分離されるため、目視で下層部のシルトを採取しないように注意しながら中層部の試料のみを採取し、この試料を分析試料とした。

・マクロベントス

底生生物はサーバーネット (方形枠 50×50cm, オープニングメッシュ 475 μ m) を用いて採取した。ここで大型種については、現地でソーティングをし、分析に供した。残りの生物種は実験室に持ち帰り、速やかにソーティングを行うとともに種の同定を行い、分析を行える試料量 (湿重量で 10g 以上) が確保できた種については、種毎に分析を行った。

・粒子状有機物 (POM)

有機物はプランクトンネット (オープニングメッシュ 63 μ m) を河床置き、その直上の礫を静かに持ち上げ河床の礫間の有機物を捕集した。この集めた有機物を 16mm, 1mm のステンレスのフルイに順次通過させた。16mm のフルイに補足された落ち葉および小枝取り除き、各フルイを通過した 16~1mm 分画を CPOM, 1~0.063mm 分画を FPOM とした。またこれら全て試料には水生生物が含まれているため、ピンセットを用いて全ての水生生物を取り除くとともに、超純水中にデカントして砂質やシルトを可能な限り分離して、遠心分離 (2500ppm, 20 分間) を行い、水層と分離して分析に供した。

(3)調査結果

a) 採取試料

底生動物の試料としては、ヒゲナガカワトビケラについては全地点で試料確保が行えたが、シマトビケラ科、カワゲラ亜科の数種については、試料量が十分に確保できなかったため、科もしくは亜科にまとめた。なおシマトビケラ科、カワゲラ亜科の種の内訳は表-17 に示すようであった。またこれらの種以外の種については、種別に分析に可能な試料量が確保できなかったため、コンポジットとして分析に供した。

b) 分析結果

まず、図-30 に各調査地点における水質調査結果を示す。下水処理水が合流していない奥多摩橋 St. 1、日野用水堰地点 St. 2 では調査期間を通じて E1, E2 は検出されなかったが、下水処理水の合流した後の多摩大橋下流 1300m 地点 St. 3, 日野橋 St. 4 では E1, E2 が検出された。また

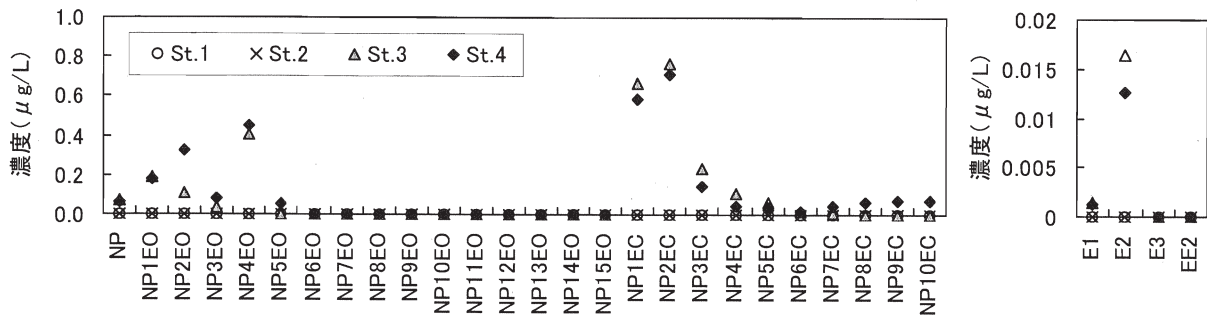


図-30 女性ホルモン、女性ホルモン様物質及びその関連物質の濃度（水質）

EE2 は調査期間を通じて検出されなかった。NP 及びその関連物質である NpnEO, NPhEC は、最上流地点の St. 1 では、調査期間を通じて不検出であったが、St. 2 では NP1EC がわずかに検出された。また St. 3, St. 4 では、NP, NpnEO, NPhEC が検出され、下水処理水の合流に対応した変化が確認された。

縮を示す係数として用いられる。しかし野外調査ベースとした場合、これらの生物の摂食量とその内容物に関する情報を厳密に把握することは困難である。そこでここでは、付着藻類、底生生物の検出濃度を水中濃度で割ることによって示したが、この値を生物蓄積係数として用いている場合も多い。また付着藻類、底生生物と比較するために POM や底質についても同様の計算方法で算出し、図中に示した。

表-17 分析用底生動物の分類群別内訳

地点	シマトビケラ科	カワケラ亜科
St.1	コガタシマトビケラ属, ウルマーシマトビケラ ナハラシマトビケラ, シマトビケラ属	カミムカワケラ, ウエノミムカワケラ フツムカワケラ属, クカカワケラ属
St.2	コガタシマトビケラ属, ウルマーシマトビケラ ナハラシマトビケラ	フツムカワケラ属
St.3	ナミコガタシマトビケラ, ウルマーシマトビケラ ナハラシマトビケラ, シマトビケラ属	フツムカワケラ属, オオヤマカワケラ
St.4	コガタシマトビケラ属, オオヤマシマトビケラ ウルマーシマトビケラ, ナハラシマトビケラ	フツムカワケラ属, オオヤマカワケラ

底質、POM、付着藻類、底生生物に付いての分析結果を図-31 に示す。

下水処理水の合流後に特徴的に検出される項目として、E1, E2, NP2EO, NP3EO, NP2EC が挙げられる。

一方、NP や NP1EO, NP1EC は、下水処理水の合流前の対照地点である地点 St. 1 および St. 2 おいても検出された。NPhEO は工業用洗剤として事業場を中心に使用されている他、再生紙のトイレトーパー内にも微量ながら含まれており、下水処理水や浄化槽排水などを通じて環境中へ放出されていることが知られている¹⁹⁾。またこれらの物質は水質調査では、殆ど検出されていないが、機器検出下限値未満の値で河川中に存在し、生物への蓄積が起きている可能性がある。

次に、エストロゲン類、ノニルフェノール及びその関連物質の水生生物への濃縮係数を図-32 に示す。ここで生物濃縮係数は水からの曝露だけでなく、餌を通じた生物濃

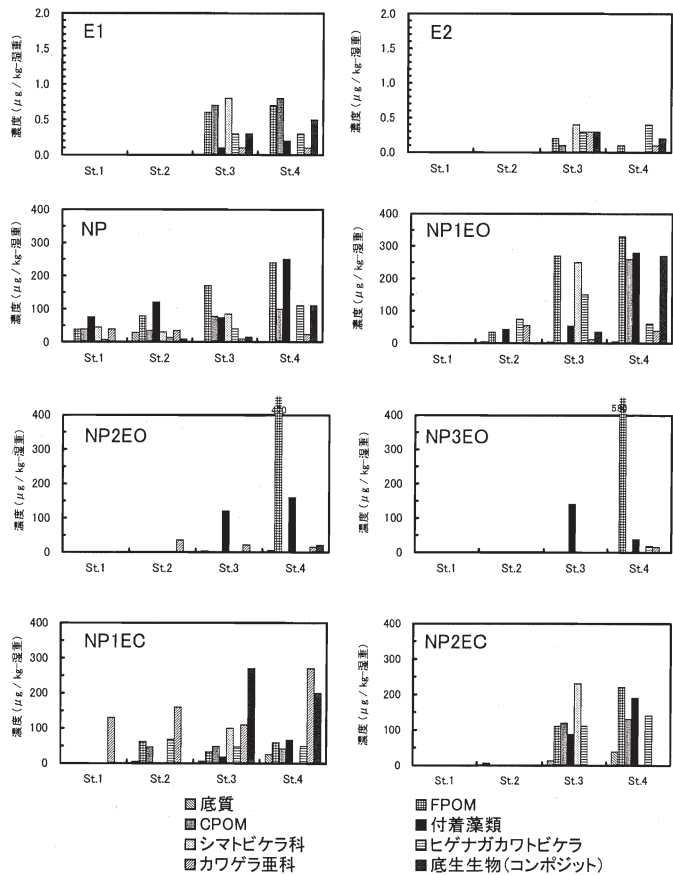


図-31 エストロゲン関連物質の検出濃度

この結果から付着藻類及び底生生物の生物蓄積係数は $10^1 \sim 10^3$ 程度であり、その蓄積性は高くなかった。また各

項目間の違いについて着目すると、NP1EC 除く各項目は、付着藻類に比べて底生生物の生物蓄積係数が低くなっていた。

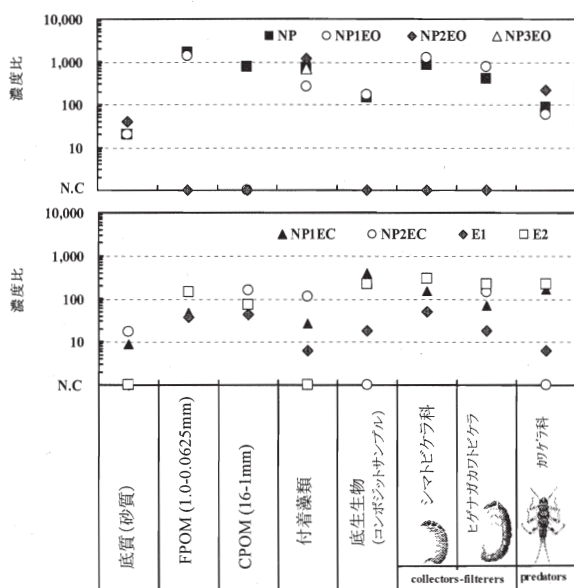


図-32 付着藻類、底質、POMにおける蓄積濃度と水質濃度の比

(4)まとめと考察

分析を行った底生生物の摂食様式毎の蓄積係数について注目すると、E1 及び NP については、ヒゲナガカワトビケラやシマトビケラ科、コンポジットサンプルの濃度に比べ、カワゲラ科の濃度が低いことが確認できる。ヒゲナガカワトビケラの摂食機能群は collectors-filterers に区分され、主に流下藻類を中心として食べているが、デトリタスやユスリカなども消化管内に含まれており、その食性は雑食である。シマトビケラ科の摂食機能群も collectors-filterers で、今回採取された種の中では、オオヤマシマトビケラがデトリタス食性であるのを除くと、他の種はヒゲナガカワトビケラ同様、雑食である。またカワゲラ科は肉食者で、底生生物内では上位栄養段階に位置する生物である。NP1EC を除く各項目の特徴をまとめると、以下ようになる。

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

このことから、底生生物への食物網を通じた蓄積が起きている可能性は低いものと考えられた。

しかし NP1EC はその傾向が異なり、付着藻類に比べ底生生物の蓄積係数が高い値を示すことが多く、カワゲラ科

科が最も高くなった。NP1EC はノニルフェノールより水溶性が高く、環境水中での検出頻度が高いことが報告されているが、付着藻類や底生生物への影響について報告はない。また、今回得られた濃縮係数は高くないものの、他の物質と異なって上位栄養段階へ蓄積している可能性もあり、環境中での挙動についてさらに検討を行う必要があるものと思われる。

ところで、下水処理水の合流前の対照地点では、POM や付着藻類、底生生物から E1, E2, NP3EO, NP2EC は検出されなかった。しかし、処理水の影響のないこれらの地点においても、生物体内から NP, NP1EO, NP1EC は検出された。一方、これらの項目は水自体からは検出されていないことから、水質調査で検出限界以下の非常に微量な混入によっても、生物へのこれらの物質の蓄積が起きている可能性は除外できない。

3.3 湖沼等における NPs, エストロゲンの水域での挙動

3.3.1 NPs, エストロゲンの水域実態調査(手賀沼)

流域から水域に排出される内分泌攪乱化学物質が水域でどのように挙動するのか検討するため、湖沼及びその底泥中における物質の蓄積状況を調査した。湖沼に関する報告事例は少なく、その実態は不明な点が多い。調査は、人間活動の影響を強く受けている手賀沼においてエストロゲン (E2, E1, E3, EE2), ノニルフェノール類 (NP, NPnEO, NPnEC) について表層底泥、湖水の流下方向の分布状況を測定した。

1) 調査方法

試料採取は 2003 年 3 月に、図-33 に示す St.1 から St.7 の 7 地点において行った。調査地点は大津川の流入河口から手賀沼流出河川である手賀川まで、公共用水域水質調査地点を含み、流下方向を考慮して選定した。

表層底泥試料は潜水作業によりアクリル製パイプ (直径 10cm×高さ 100cm) を用いて不攪乱状態で採取したもののうち表層 10cm を用いた。

底質分析²⁰⁾は、一般項目 (密度, 含水率, 強熱減量 IL, 全有機炭素 TOC, 全窒素 TN, 全リン TP, 硫化物 T-S),

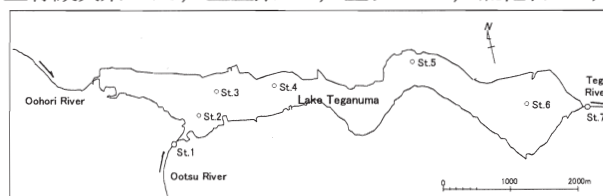


図-33 調査地点

エストロゲン (E2, E1, E3, EE2), ノニルフェノール類 (NP, NPnEO, NPnEC) とした。エストロゲンの分析は

LC/MS/MS を用いて行い、NP、NPhEO 及び NPhEC の分析はそれぞれ固相抽出 GC/MS 法を用いた。

湖水試料は、水深 10cm~30cm 程度の表層で採取し、分析²⁰⁾は、一般項目 (SS, VSS, CODMn, TOC, TP, TN, クロロフィル a (Chl-a), 糞便性大腸菌, 塩素イオン, pH, DO, 水温, 電気伝導率) と底質と同じエストロゲン, ノニルフェノール類とした。エストロゲンの分析は LC/MS/MS を用いて行った。NP, NPhEO の分析は HPLC を用いて行い, NPhEC の分析は LC/MS/MS を用いて行った。なお, 湖水試料のエストロゲン, ノニルフェノール類の分析にあたっては, ガラス繊維ろ紙 (GF/B) により試料をろ過し, 残渣を超音波抽出したものとろ液とを

別々に測定し, 各物質を懸濁態成分と溶存態成分とに分けて検討した。

2) 調査結果

(1) エストロゲン, ノニルフェノール類の水平分布

表層底泥中及び湖水中のエストロゲン, ノニルフェノール類の調査結果を図-34 に示す。

E3 及び EE2 は全ての表層底泥と湖水で検出されず, E2 は St.1 と St.2 のみ検出下限値程度で検出された。

表層底泥中の E1, NPnEO, NPnEC 濃度は, いずれも St.2 で最も高く, E1 が 2.57 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$, NPnEO ($1 \leq n \leq 4$) が 2,457 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$, NPnEO ($5 \leq n \leq 15$) が 409 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$, NPnEC ($1 \leq n \leq 3$) が 208 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ であった。

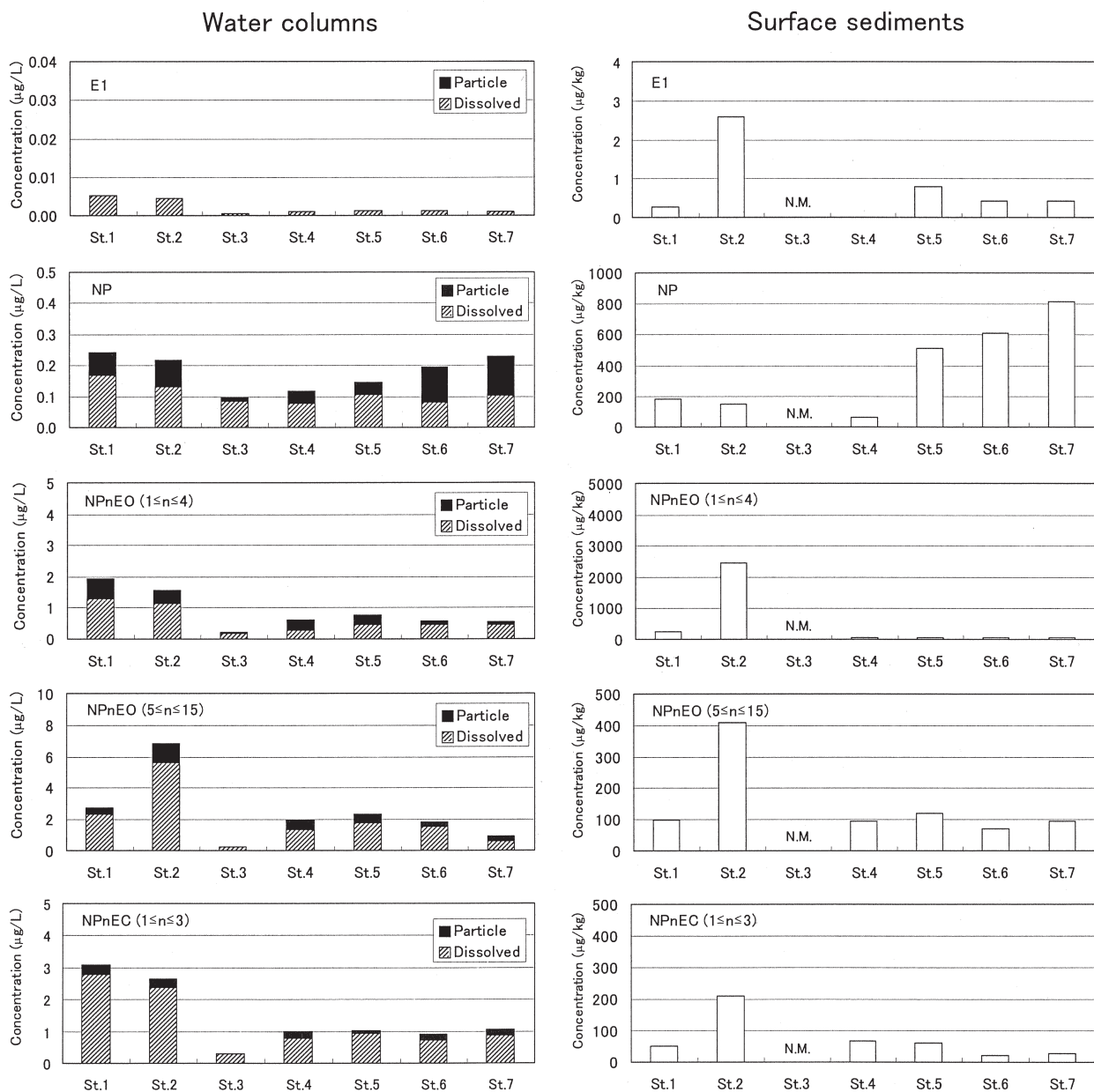


図-34 表層底泥中及び湖水中のエストロゲン, ノニルフェノール類の流下方向の分布

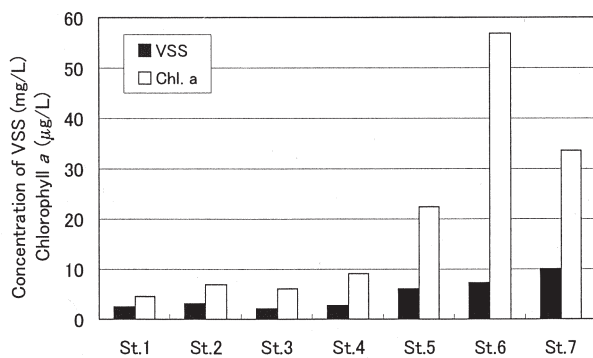


図-35 湖水中のVSS, SSの流下方向の分布

NPは大津川河口付近のSt.1で179 µg/kg-dry, 手賀大橋直上のSt.4では62 µg/kg-dryと一旦減少するが、それから下流に向かい徐々に増加し、手賀川へ流出する直前のSt.7で最も高い812 µg/kg-dryであった。

一方、湖水中のE1については、ほとんどが溶存態成分であり、溶存態成分と懸濁態成分を合わせた濃度は0.5(検出下限値)~5.1 ng/lの範囲であった。また、NPが0.10~0.24 µg/l (14~59%), NPnEO (1≤n≤4)が0.2~1.9 µg/l (16~56%), NPnEO (5≤n≤15)が0.3~6.8 µg/l (0~32%), NPnEC (1≤n≤3)が0.3~3.1 µg/l (4~22%)の範囲であり、括弧内は懸濁態成分の割合を示す。

NP, NPnEO (1≤n≤4)は、E1, NPnEO (5≤n≤15), NPnEC (1≤n≤3)と比較して懸濁態成分の割合が高かった。

物質ごとに表層底泥、湖水における分布が異なる理由は、それぞれ懸濁物質への吸着性が異なること、また、場所により懸濁物質の存在量と由来が異なることで吸着特性も変化するためと考えられた。例えば図-35に示す湖水中のVSS, Chl-aを見ると、手賀沼下流部ほど値が高く、内部生産による藻類を主体とする有機物の濃度が下流ほど増加することが分かる。

今回の表層底泥中の物質の空間分布は以下のようなシナリオで形成されると考えられる²⁰⁾。晴天時には生活系や産業系等の陸域由来の懸濁物質の流入に加え、内部生産による流下方向への藻類由来の懸濁物質の増加が見られる。湖水中のNPは、流入した陸域からの懸濁物質の沈降が一旦起こるが、その後、藻類の増殖により形成された有機物に吸着し下流方向に運ばれ、その一部は沈降し、湖の表層底泥に再び堆積する。これにより、表層底泥中のNPは手賀沼の流下方向に向かって次第に高くなる分布を形成すると推測される。

NPはE1, NPnEO, NPnECに比べオクタノール水分分配係数が大きいことから、藻類由来の懸濁物質に吸着しやすいと考えられ、これは観測された現象と一致している

と考えられた。

また、降雨時には初期流出によって、流域から大量のSSが湖内に流出する²¹⁾が、湖内への流入で流速が急落し河口付近にSSが多量に沈降する。E1, NP, NPnEO, NPnECはSSに吸着・沈降し、流入河川河口付近に比較的高い濃度分布を形成するものと考えられる。

こうしたことから、今後、水環境中でのSSを始めとする微細粒子などが微量化学物質の動態にどのように関与するのか検討する必要がある。

3. 3. 2 水相と底泥相微生物によるE2の分解特性

都市下水処理場や浄化槽などの排水処理施設から自然水域に排出されるエストロゲン様物質のうち、17βエストラジオール(E2)はエストロゲン活性が著しく強いと報告されている。同物質の自然水域における運命を把握するためには、水相と底泥相で生起する物理化学的・生物学的諸反応によるE2の移動・変換・分解などの諸挙動を的確に評価することが重要である。昨年度の報告では、実際の貯水池の底泥によるE2の分解経路と水温の影響について得た結果を示した。本報では、貯水池の水相と底泥の両相によるE2の分解特性の季節的依存性について、好気と嫌気の両条件下で得た結果を報告するとともに、異なる水域の底泥による分解速度の違いについて比較検討した結果を報告する。

1) 実験 I

(1) 方法

国土交通省東北地方整備局三春ダム牛糞前貯水池をフィールドとし、本ダムとの分離堰からそれぞれ50m, 150m, 230m離れたA,B,Cの3地点を対象に、2003/12, 2004/1, 2004/3, 2004/5, 2004/7及び2004/10に採水と直径4cmのコアサンプラーによる採泥をそれぞれ行った。採取した底泥を窒素雰囲気なかで2cmずつ切り出し、その表層(SL, 0~2cm), 中層(ML, 14~16cm)および下層(BL, 28~30)の遠心分離後に沈降した底泥(遠沈泥と称す)を回分式実験に供した。また、水中浮遊微生物による分解挙動を評価するため、採取した水相の表層水(SW), 中層水(MW), 底泥直上の下層水(BW)についても回分式実験を行った。

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

実験は振盪培養器により、嫌気と好気/20℃の条件下で行った。底泥を用いた実験の場合には、遠沈泥2gを300ml

の pH 調整済みの Milli-Q 水 (嫌気の場合には脱酸素も行った) を入れた反応器 (500ml の三角フラスコ) に加えたのち、E2 濃度が約 $30 \mu\text{g/l}$ になるように、一定量の E2 原液 (有機溶媒を使用せずに Milli-Q 水に溶かしたもの) を素早く添加し、反応器を 10 秒程度激しく振り混ぜたのちに振盪培養器にセットし、光遮断下で回転培養 (120rpm) を開始した。嫌気条件は反応器の混合液中に湿潤窒素を連続的に導入することにより維持した。一方、水相実験の場合には、曝気処理後の試料水 300ml (好気実験の場合)、又は、脱酸素処理後の試料水 300ml (嫌気実験の場合) に、E2 を直接に添加する形で実験を行った。

嫌気条件は上述の底泥実験の場合と同様に、湿潤窒素

を連続的に導入することにより維持した。

E2 とその副次生成物と考えられる E1 及び E3 は内部標準 LC/MS/MS 分析法により定量した。

(2) 結果

① E2 の経時変化の動き

E2 の分解挙動を牛糞貯水池の A 地点における底泥直上水 (BW) と上層の底泥 (SL) の場合を例にして図-36 に示す。水相と底泥相ともに、E2 の分解は主に副次生成物 E1 の分解を経由して行われている。E2 の分解過程における E3 の形成は認められなかった。

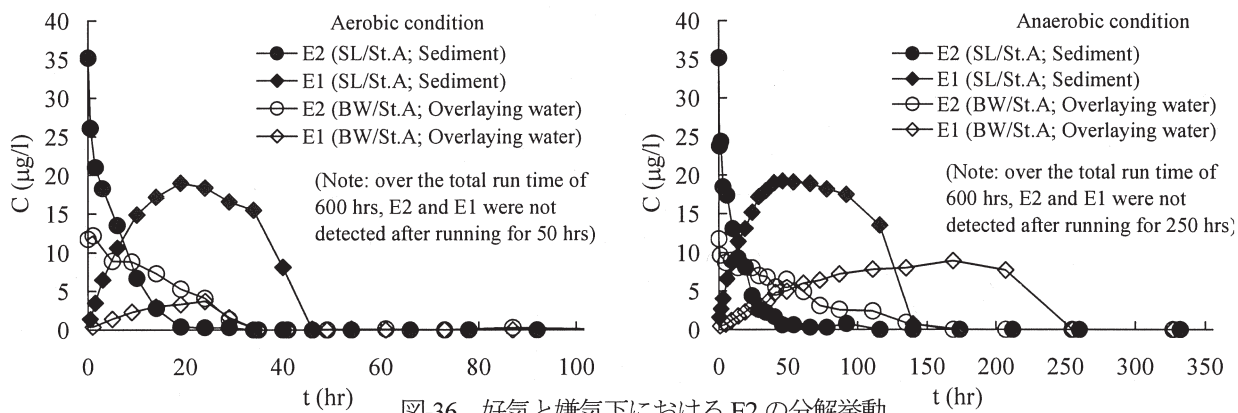


図-36 好気と嫌気下における E2 の分解挙動

(20°C, 三春ダム牛糞貯水池地点 A の直上水と底泥を使用)

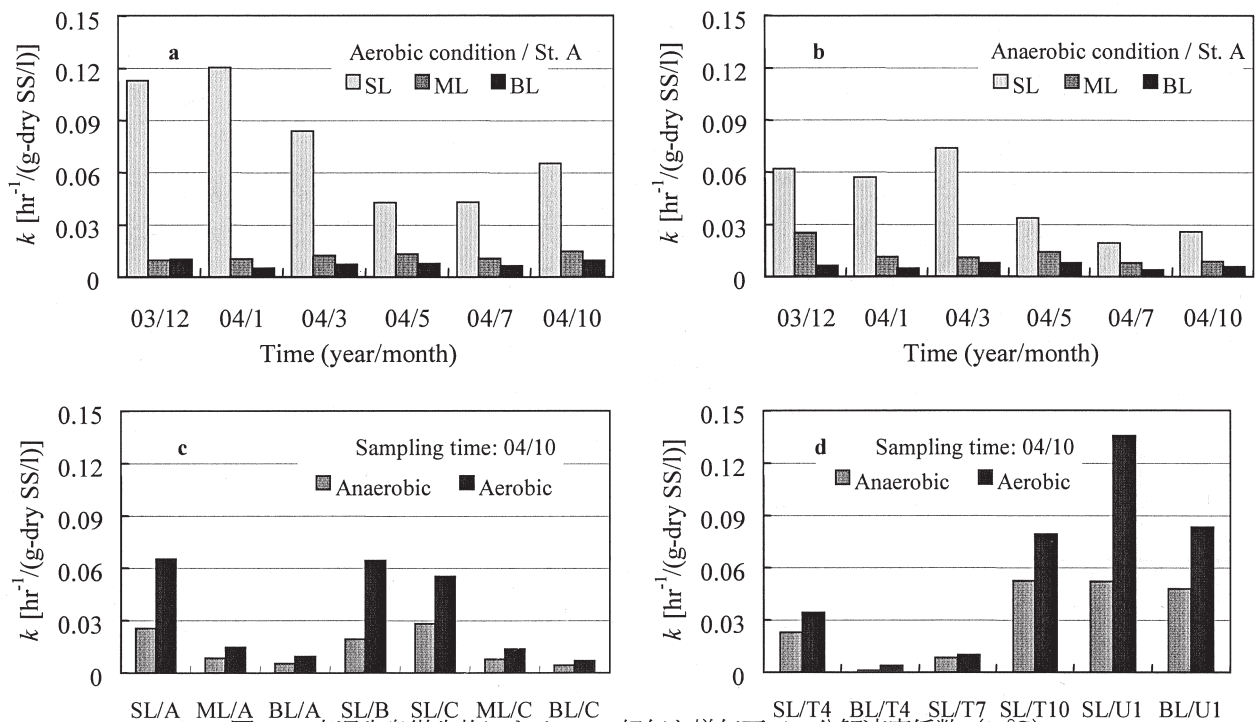


図-37 底泥生息微生物による E2 の好気と嫌気下での分解速度係数 (20°C)

(使用底泥: a&b は三春ダム牛糞貯水池地点 A; c は手賀沼上流 T4, 中流 T7, 下流 T10, 牛久沼中央 U1)

② E2 の分解速度

生分解の一次反応式に基づいて推定した底泥による E2 の消失速度係数 (k) を図-37 に示す。k の値は好気下では 5 月、嫌気下では 5、7 及び 10 月の場合の方が小さく、E2 の分解速度は底泥の季節によって変化することが明らかになった (図-37a と図-37b)。また、いずれの採泥時期の場合も、k の値は上層の方が大きく、中層と下層の間では差が小さかった。また、全ての底泥層において、嫌気に比べて好気条件の方で大きな k 値を示している。

生物の全体的密度は下層にいくほど低く、また、上層と下層ではそれぞれ好気性と嫌気性の微生物群集が多数を占めることが考えられる。こうした推測を考慮すれば、好気と嫌気下による E2 の分解速度の相違は、微生物そのものに帰着されるのみではなく、実際の底泥相内における好気性と嫌気性微生物の分布密度の違いが一因と考えられる。これを解明するためには、下水処理上の好気性の活性汚泥²⁾と嫌気性の消化汚泥を用いた対照実験や、長期にわたって直上水に酸素と窒素をそれぞれ連続的に供給することにより形成してきたほぼ完全な好気層と嫌気層からなる静止カラム実験が有効と考えられ、今後の対応が望まれる。

牛糞前貯水池の流下方向における分解速度を比較すると、図-37c のように、いずれの底泥層の場合にも、上流・中流・下流の間における k 値の差が小さく、E2 に対する分解速度は類似している。また、今回検討した 3 つの水域については、砂質が多く、VSS の含有量が少ない手賀沼の上流と中流の 2 地点 (T4 と T7) の方で分解速度が著しく遅いことが図-37c と図-37d からわかる。

底泥相に比べて、水相における微生物の個数が少ないので、E2 の分解は図-32 のように遅いが、SS 当たりの分解速度は 2 倍以上に速いことが明らかである (図-38 と図-39)。また、水相微生物群には底泥相の場合と同様に、好気性と嫌気性の微生物が共存し、それを反映するように、嫌気下においても E2 は分解されている。

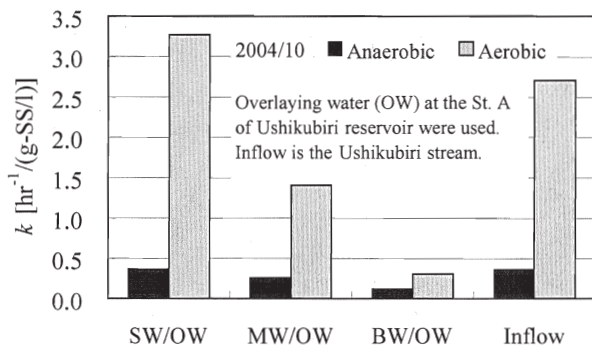


図-38 水相浮遊微生物による E2 の分解速度係数 (20°C)

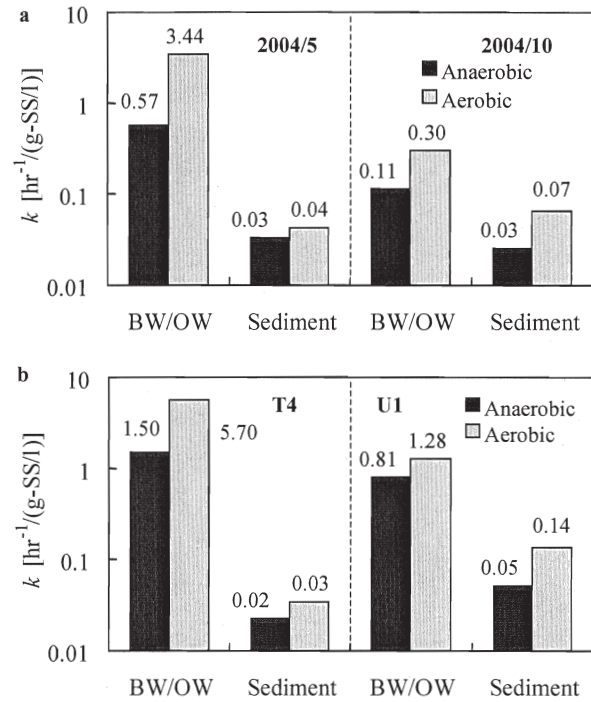


図-39 E2 の水相と底泥相での分解速度の比較 (20°C, a は牛糞前貯水池地点 A, b は手賀沼と牛久沼の場合)

2) 実験 II

エストロゲンの底泥中での移動・拡散・変換などの挙動の解明を目的とし、底泥微生物による E2 の分解特性を実際の貯水池の底泥を用いて回分式実験により検討した。

(1) 実験用底泥と E2 原液の調整

三春ダム牛糞前貯水池の水質・底泥調査地点 A²³⁾を対象に、平成 15 年 12 月 20 日と平成 16 年 1 月 17 日にコア採泥器にて採取した底泥 (厚さ約 35cm) を窒素雰囲気なかで 2cm ずつ切り出し、その表層 (SL, 0~2cm)、中層 (ML, 14~16cm) 及び下層 (BL, 28~30cm) を試料に用いた。試料はそれぞれ遠心分離 (3,000rpm で 5 分) した後、上澄み液を捨てた残りを「遠沈泥」として実験に供した。また、底泥粒子への E2 の付着性を調べるため、中層遠沈泥の一部をオートクレーブにて滅菌処理 (120°C で 30 分間) した。本実験では E2 を唯一の炭素源として添加しており、市販 E2 標準物質約 20mg を Milli-Q 水 1l に計り取り、室温 10°C の恒温室で 24 時間攪拌した後、0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過し、得られたろ液を添加用原液とした。なお、その濃度は 0.6mg/l と定量した。

(2) 回分式分解実験

回分式分解実験は、それぞれ平成 15 年 12 月 20 日と 16 年 1 月 17 日に採取した遠沈泥を用いて振とう培養器にて行った。二回の実験とも Run 1~Run 20 とし、嫌気と好気、

20°Cと5°Cの条件下における上・中・下層の3つの底泥層によるE2分解挙動を比較した。

一回目(12月20日試料)の実験では、底泥微生物の活性の有無による違いを評価するため、滅菌処理した底泥試料を用いた実験系を、二回目の実験(1月17日試料)では底泥微生物による硝化反応を促進させるため、NH₄-Nを添加した。E2分解に伴って生成するE1の挙動を追跡するため、2回目実験では上層の遠沈泥を用いた20°Cの4つの実験系(好気と嫌気)について、後半の運転開始約290時間後にE2を再添加するとともに、NO₃-N(嫌気の場合)又はNH₄-N(好気の場合)の添加を行った。

いずれの実験も遠沈泥2gを200ml(一回目の実験の場合)と300ml(二回目の実験の場合)のpH調整済みのMilli-Q水(嫌気の場合では脱酸素済みのMilli-Q水)を入れた容器(500mlの三角フラスコ)に加え、その後E2が30μg/lになるようにE2原液を素早く添加し、反応器を10秒程度激しく振り混ぜたのち振とう培養器にセットした。振とう培養は、光を遮断した条件下で120rpmの回転速度で開始した。一定時間後に反応器から混合溶液を採取し、遠心分離後(3000rpmで3分間)、ろ過(0.45μmのPTFEフィルター)の後に、ろ液中のE2、E1およびE3の濃度を内部標準LC/MS/MS分析法から定量した。

(3) 実験結果

① E2の経時変化の動き

嫌気及び20°Cの場合におけるE2濃度の経時変化を例にして図-40に示す。E2濃度は時間の増加に伴って低下し、その割合は運転初期において大きく、中層と下層の遠沈泥に比べて上層の底泥の方が大きくなっている。

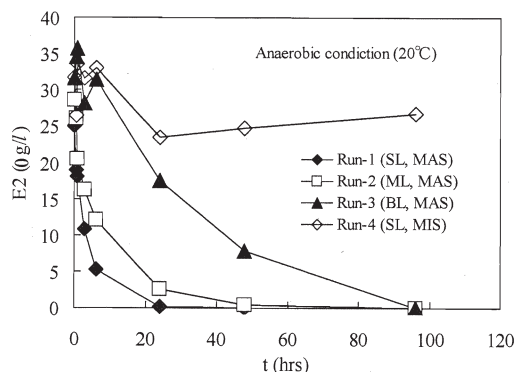


図-40 嫌気及び20°CにおけるE2の経時変化

オートクレーブにて不活化処理した底質(Microbe Inactivated Sediment, MIS)を用いた実験Run4では、E2は残留率として約80%の濃度レベルに収束した。不活化処理をしていない底質(Microbe Activated Sediment, MAS)を用いたRun1~3との比較から、底泥中におけるE2の挙動

は物理作用・化学的付着・吸着反応によるよりも生物学的反応によって制御されていることが示された。図-41に示す温度の影響をみると、5°Cの場合に比べて20°Cの場合の方がE2濃度の低下が速く、その影響は上層に比べて中層・下層の底泥の方で大きくなっている。上・下層底泥の鉛直方向の深さの違いは30cmであり、かつVSS、N、P、Cなどの底質性状指標値に大差はなかったため、E2分解性の底泥位置での違いは主に底泥の生息微生物密度や種類に起因するものと推察された。

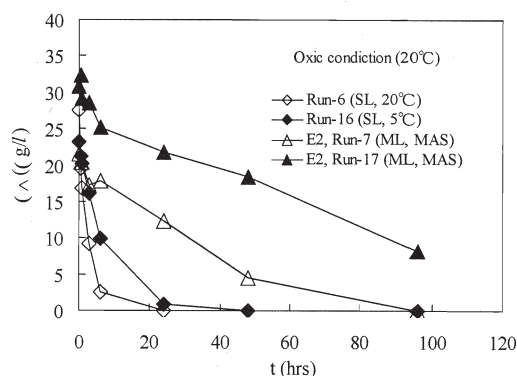


図-41 E2の挙動に及ぼす温度の影響(好気)

E2が分解されるとE1が形成されるが、形成されたE1は好気条件の場合では活性汚泥の場合²²⁾のように、検出下限値以下になり、そのまま低下した。しかし、嫌気条件の場合では、図-42のように、E1の生成・消失が繰り返されたことから、分解のほかに底泥中微生物によるE1の吸着、脱着や蓄積、放出などの機構の関与が示唆された。E2再添加の場合にも、添加したE2は速やかに分解されたが、その分解速度は嫌気の場合ではNO₃-Nを添加した方が、好気の場合ではNH₄-Nを添加した方が大きくなった。E3はどの実験においても検出されなかった。

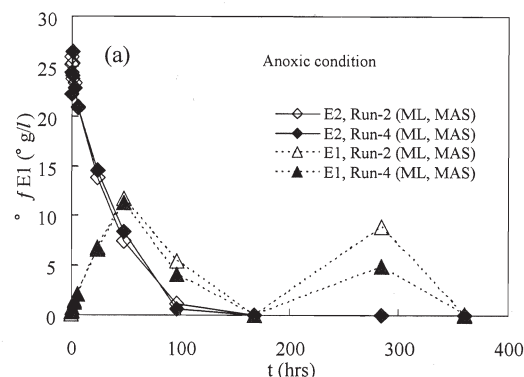


図-42 E2とE1の経時変化及び実験の再現性

② E2の分解速度係数

E2濃度の経時変化を生分解の一次反応と仮定した場合

(図-43) の分解速度係数 (k) は図-44 のように推定された。

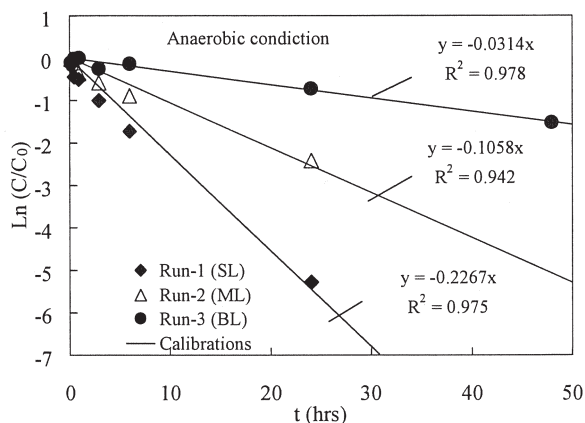


図-43 生分解一次反応式による解析

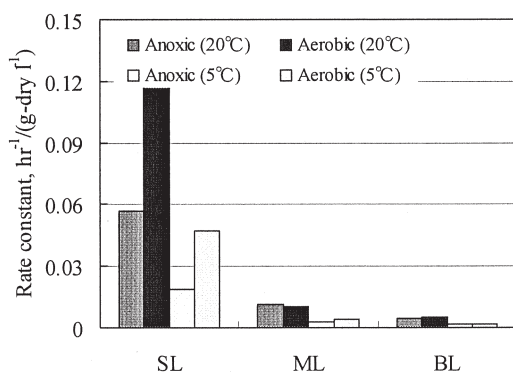


図-44(a) 分解速度係数 (二回目試料の E2 当初添加)

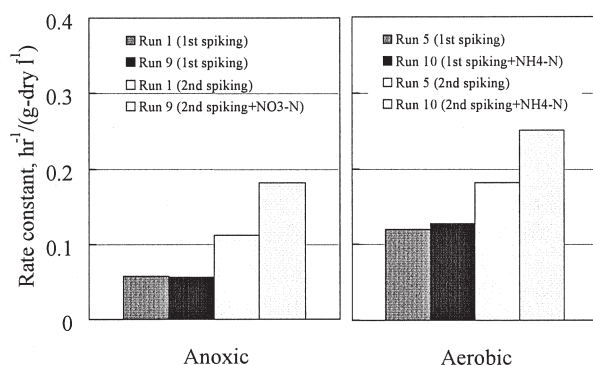


図-44(b) 分解速度係数 (二回目試料の E2 再添加)

E2 の分解速度係数 (k) の値は上層に比べて中層・下層の底泥の方が、また 20°C に比べて 5°C の場合の方が小さくなっている (図-44a)。また、上層の底泥を用いた場合、k の値は好気の場合が嫌気の場合により 2 倍ほど大きくなっている。実験開始 287.5 時間後に E2 を再度添加した実験系では、嫌気と好気とも、k の値は E2 を最初に添加

した場合を上回った (図-44b)。

また、底泥微生物の脱窒・硝化効果に随伴するように、嫌気の場合では NO₃-N、好気の場合では NH₄-N を E2 と同時に添加するに従い、分解速度係数が大きくなった。

今後は、異なる性状を持つ底質を用いて同様の実験を行い微生物に着目した底泥中の内分泌攪乱物質の変化機構について検討を進める。

3. 3. 3 手賀沼における NP 類の挙動予測

都市排水・事業所排水に含まれている NP 類 (界面活性剤のノニルフェノールポリエトキシレート (NPEO) 及びその分解中間物質であるノニルフェノールエトキシ酢酸類 (NPEC)、ノニルフェノール (NP)) が国際的に注目されている^{20)24)~29)}。NP 類の中、ノニルフェノールが最も高いエストロゲン活性を示すが、NP1EO, NP2EO, NP1EC, NP2EC にも多少のエストロゲン活性が認められる他、NPEC 類の生態毒性が知られている³⁰⁾。これらの物質の環境リスクを正確に評価するため、及び、水質対策計画を確立するためには、NP 類の環境水、底質中における挙動に関するプロセス (反応、分解、吸着、揮発など) の定量的な把握が必要である³¹⁾。

本研究では、手賀沼の実態調査 (流入、流出河川、湖内) を行い、NP 類の水、底泥中濃度を測定し、空間及び時間的な変化の特徴を把握するとともに、実態調査結果及び観測データに基づいて、NP 類の挙動シミュレーションモデルを構築し、予測シミュレーションを行った。

1) 方法

(1) 実態調査及び分析方法

水質及び底質調査は手賀沼の図-45 に示す調査地点において、今年度の 10 月に 2 回行った。比較のため、以下昨年度 3 月に行った調査結果の一部も示す。手賀沼は極端に浅いため (平均水深約 90cm) 採水は水深約 20cm において行った。表層底泥の採泥は直径 10cm のコアサンプラで行い、表層の厚さ 10cm の試料を均一化し、試料の前処理及び分析を行った。各 NP 類の分析方法及び定量下限値を表-18 に示す。

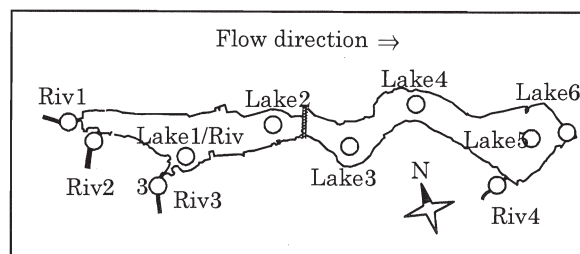


図-45 手賀沼の採水地点

調査地点の記号の説明: Riv1 大堀川ふるさと橋; Riv2 北千葉導水注入口; Riv3 大津川ひどり橋; Riv4 染井入落河口; Lake1/Riv3 大津川河口から約400m 湖内。Lake2~Lake6 湖内地点 (図-45 参照)。

表-18 NP類の分析方法及び定量下限値

Chemicals	Method	Water μg/L	Sediment μg/kg d.w.
NP	GC-MS	0.05	1
NP ₁ EO	LC-MS	0.1	1
NP ₂ EO~ NP ₁₅ EO	LC- MS/MS (HPLC)	0.01	1
NP ₁ EC~ NP ₁₀ EC	GC-MS	0.005	0.05

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

(2) 室内実験

①NP類の生分解実験

NP類の好気性生分解試験の目的は, NP類の図-46に示す反応経路の反応速度係数の推定である。生分解試験は手賀沼水に規定のNP物質を添加し, 室温, 好気状態でを行い, 各NP化合物濃度の経時変化を求めた。

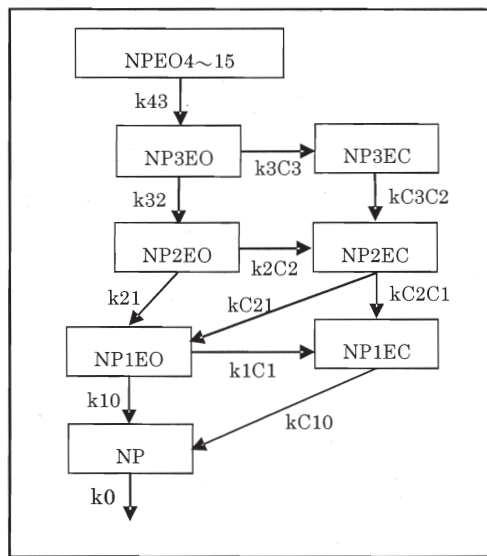


図-46 NP類の反応経路と反応速度係数

②NP類の吸着実験

NP類の吸着実験の目的は, NP類の手賀沼の浮遊物及び底泥粒子への吸着における吸着平衡定数 (以下, 吸

着係数) の固/液分配実験による測定である。

方法: 手賀沼湖内調査地点の水質試料を室温で30分攪拌し, 浮遊物を1μmのガラスろ紙によつてろ過分離し, 各NP化合物の溶解性及び浮遊性濃度を測定した。NP類の吸着係数について, 物性からの推定, 及び本プロジェクトでの過去のデータ解析からの推定を行った。物性からの推定はオクタノール/水分解係数を利用して, Namkungら²⁸⁾の方法で, 以下の計算式によつて行った。

$$K_{ads} (L/mg) = 6.3 \times 10^{-7} f_{TOC} K_{OW} \dots (1)$$

ここで, f_{TOC} はVSSの有機炭素比率 (g/g) であり, 微生物の場合一般的な値は0.53である。

③モデル開発

化学物質挙動シミュレーションモデル開発の目的は, これらの物質の水環境における挙動の理解を深めることと共に, 水質改善対策に活用可能なツールの構築である。

数値モデルの構造およびプロセスの特徴は以下の通りである。

- ・ 空間的に1次元 (流下方向, 完全混合槽列);
- ・ 水柱と底泥間の物質移動を支配する要因は底泥の波による巻上げである (浅い湖沼);
- ・ 生化学反応の速度は溶解性化学物質濃度及び有機性浮遊物濃度 (VSS) に依存する;
- ・ 化学物質はVSS及び底泥の有機性固形物 (強熱減分量) に吸着する。吸着平衡は線形的である。

モデルの水柱における一般的な物質収支式は以下の通りである。

$$V(dC/dt) = \text{流入} - \text{流出} + \text{生成} - \text{分解} + \text{溶出} - \text{吸着} + \text{吸収} - \text{揮発}$$

このモデルで, 各対象物質の図-46に示す生成及び分解反応を考慮し, 例としてNPの生化学反応を以下の式に示す。この式によると, NPはNP1EO及びNP1ECの分解により生成されるが, 同時に分解もする。左側の変化の符号及び絶対値は各反応速度係数 k (L/mg/day), 物質全濃度 $[XX]$ (nmol/L), 吸着係数 K_{ads} (L/mgVSS) 及びバイオマス濃度 X_{bio} (mg/L) に依存する。本研究では, $X_{bio} = VSS$ とした。

$$\frac{d[NP]}{dt} = k_{10} [NP1EO] \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads1} X_{bio}} + k_{1C0} [NP1EC] \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads1C} X_{bio}} - k_0 [NP] \times \frac{X_{bio}}{1 + K_{ads0} X_{bio}} \dots (2)$$

以上の式(2)に示す様に、NP類の反応速度は溶解性濃度(=[全濃度]/(1+KadsXbio))に依存するので、吸着しやすいものの反応速度が低減される。

本モデルは120本の連立微分方程式からなるもので、設定パラメータ(定数、係数、初期値、物性など)の数は251である。数理モデルの計算プログラムは動的システム解析言語のStella Research Ver.7.0.2(HPS Inc.)で作成した。

2) 研究結果

(1) 実態調査結果

昨年度、NPEO類のHPLC(蛍光)による分析において、水質試料の一部で、NP4EO, NP6EO, NP9EO, 底質試料の一部で、NP6EO, NP14EOの濃度が予想より高かったため、分析に対する妨害物質の存在が疑われたので、河川調査地点Riv4(染井入落)において採水を行い、LC-MS/MS及びHPLC法の分析結果を比較した。採水時のNP類濃度が低かったため、物質の一部はHPLC法の定量下限値以下となっていたが、図-47に示す様に、NP4EO分析に妨害する物質の存在を確認した(プラスエラー)。この結果、以降の分析は妨害問題のないLC-MS/MS法で行った。調査時の主な環境状況などを表-19に示す。

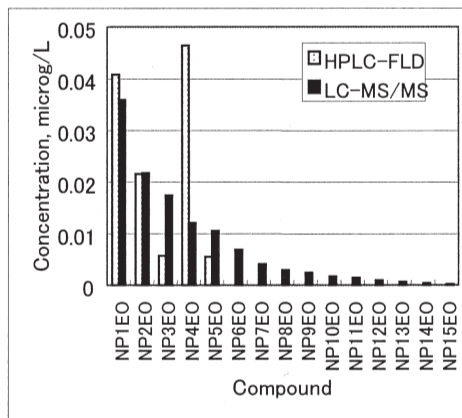


図-47 NP類の分析方法間での比較

Twは手賀沼下流における水温, Rainは調査日1週間前の期間の合計雨量(我孫子气象台), Inflowは流入水量の合計である。Riv2調査地点である北千葉導水第二機場注入口における流量は, Survey1及び2においてほぼゼロであったが, Survey3においては9.5 m3/sであり, 流入量の大半を占めた。Windは風速の1日平均値(我孫子气象台), SS Rivは流入河川の浮遊物濃度の調査平均値, SS Lakeは湖内浮遊物濃度の調査平均値である。(備考: SS Riv

及びSS Lakeの平成10年~14年の平均値はそれぞれ9.2及び40 mg/Lであった。)

表-19 主な調査状況

Conditions	Survey 1	Survey 2	Survey 3
Month	October	October	March
Tw, °C	19.4	17	10.8
Rain, mm	227	175	8
Inflow, m3/s	10.2	3.1	11.5
Wind, m/s	0.7	0.4	1.5
SS Riv, mg/L	30	2	8
SS Lake, mg/L	20	23	20

Survey1 ~ Survey3のNP類の水質調査結果を図-48a~図-48cに示す, また, Survey1及びSurvey3のNP類の底質調査結果を図-49a~図-49bに示す。図-48a~図-49bの右縦軸に示すA/All, %の意味は以下の通りである。
 $A/All, \% = (NP + NP1\sim3EO + NP1\sim3EC \text{ 濃度}) / (\text{全てのNP類の濃度}) \times 100$ 。

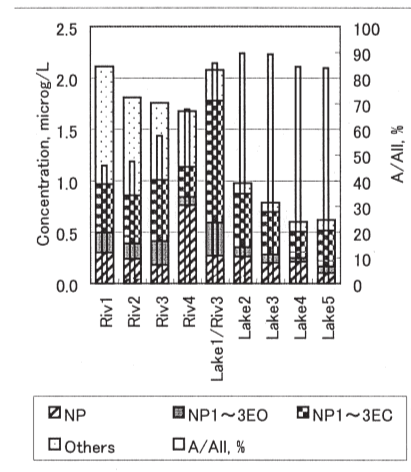


図-48a 手賀沼の流入河川および湖内におけるNP類の濃度分布 (Survey 1)

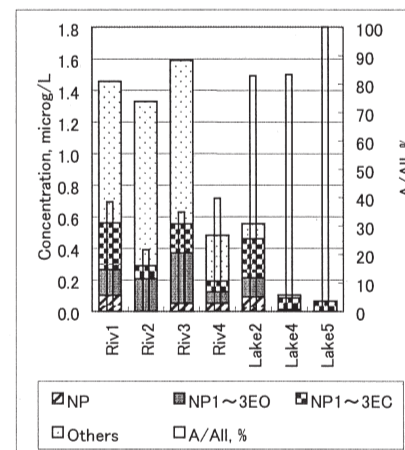


図-48b 手賀沼の流入河川および湖内におけるNP類の濃度分布 (Survey 2)

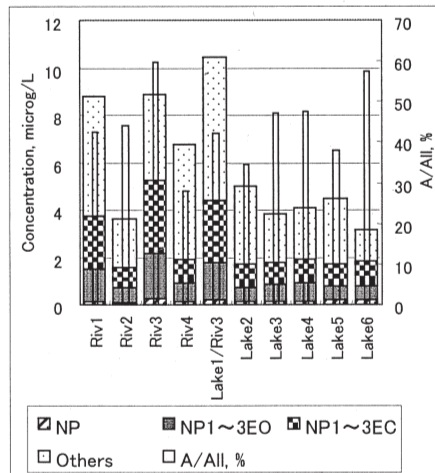


図-48c 手賀沼の流入河川および湖内におけるNP類の濃度分布 (Survey 3)

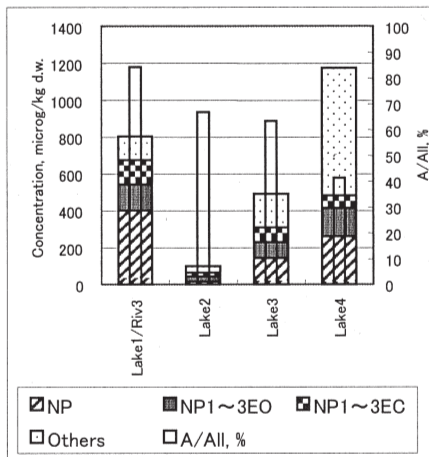


図-49a 手賀沼底質中のNP類の濃度分布 (Survey 1)

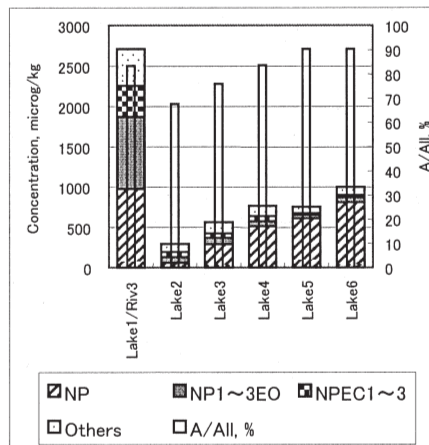


図-49b 手賀沼底質中のNP類の濃度分布 (Survey 3)

(2) 室内実験の結果

生分解実験結果から推定したNP類の生化学反応速度係数 (k) を図-50 に示す。

(3) 吸着実験の結果

吸着実験の結果から求めた吸着係数 (K) 及びその他の方法で推定した吸着係数を表-20 に示す。

表-20 に示すNP 4~15EOの値は平均値である。推定方法で利用したKOW値はNPにおいて文献実測値であるが、その他の化合物については、分子構造をもとにした推定値である³²⁾。Act. Sludge Experiment は下水処理場活性汚泥における実測値である (2002年)。

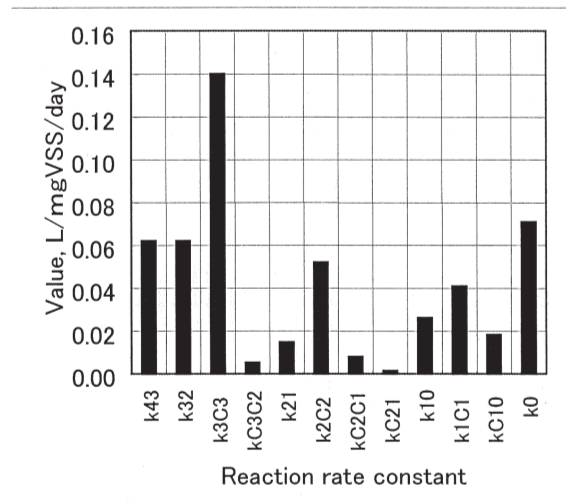


図-50 室内実験から求めたNP類の分解速度係数

表-20 各NP化合物の吸着係数 (L/mg VSS)

Chemical	Teganuma Experiment	Calculated from K _{OW}	Act. Sludge Experiment
NP4~15EO	0.0257	0.0034	0.0026
NP3EO	0.0253	0.0358	0.0082
NP2EO	0.0109	0.0667	0.0112
NP1EO	0.0098	0.1272	0.0194
NP3EC	0.0064	0.0609	0.0134
NP2EC	0.0065	0.1133	0.0201
NP1EC	0.0063	0.2111	0.0112
NP	0.0890	0.1925	0.0185

(4) シミュレーション結果

各NP化合物濃度の実測値 (Survey3) 及びシミュレーション値を図-51 に示す (定常状態)。「Reach」は手賀沼の区間、「meas」は実測値、「sim」はシミュレーション値を表す。

また、Survey3 の条件での定常状態シミュレーションにおける各NP化合物の手賀沼全体における運命予測結果を図-52 に示す。

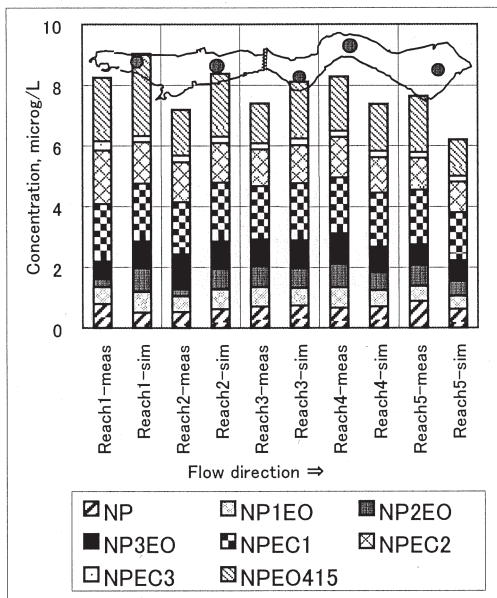


図-51 手賀沼湖水のNP類濃度についての実測値とシミュレーション値の比較

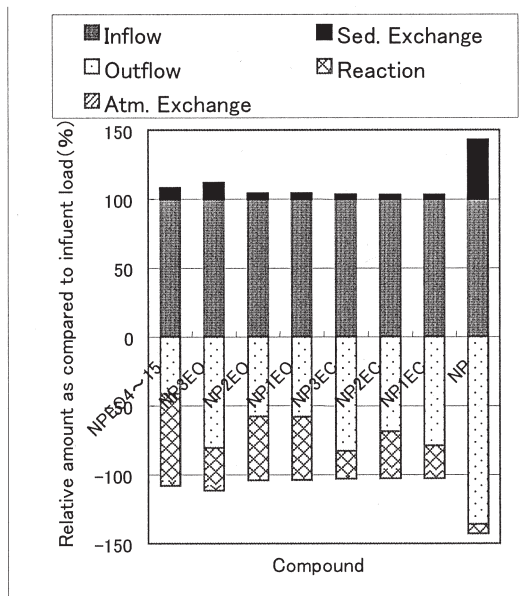


図-52 手賀沼の水柱におけるNP類挙動運命の計算結果

3) 考察

(1) 実態調査結果について

NP類の水中濃度(図-48a~図-48c)が示す様に、流入河川水中のNP類濃度の合計値は湖内水中濃度より約2~3倍高い。これは、河川での滞留時間が短いため分解が進んでいないこと及び河川での浮遊物の沈殿は少ないことからであると思われる。(備考:図-48cに示すRiv2調査地点は例外である。手賀沼浄化水として水質の比較

的良好的な利根川の水を大量に注入していたためと考えられる。)

湖内傾向として、流下方向に従って、NP類の濃度が減少する。その減少の程度はSurvey 2において最も著しい。その理由は、流入量が最も少ないため滞留時間が長くなり、分解反応及び沈降(物質の底質への移動)が進んだことによると考えられる。

内分泌かく乱物質として活性の最も高いNPについて、Survey 1(図-48a)における濃度が最も高かった。NPの浮遊物への吸着性が高いので、浮遊物濃度のやや高いSurvey 1において濃度が高くなったものと考えられる。

図-48a~図-48cに示す様に、NP+NP1~3EO+NP1~3ECの濃度の合計は全てのNP類濃度の合計の約7~8割を占め、これらの物質の挙動を把握することにより、NP類の全体的な挙動も把握できると考えられる。

底質調査は、湖内調査地点において行った。図-49a及び図-49bに示す様に、湖内流下方向に従って、表層底質のNP類含有量が増加する。一方、大津川河口付近のNP類含有量は、湖内のその他の調査地点と比較して著しく高い。この二つの現象について、以下の仮説が考えられる。河口付近の高い値は、直径が比較的大きく沈降しやすいSSへの吸着NP類による。一方、湖内流下方向で増加傾向を示すのは、流入する細かい粒子および藻類への吸着NP類による。手賀沼の内部生産の下流方向での増大傾向は過去から知られていて、下流側の生産量及び植物プランクトン濃度が高いといわれている²⁹⁾。

(2) 生分解実験

反応速度係数の値を求めるため、図-46に示す反応経路に類似する経路を仮定し、動的反応数理モデルを作成した。そのモデルによって、バッチ生分解実験のシミュレーションを行い、実測値と計算値の誤差の最小化によって分解経路を決め、各k値を求めた。図-50に示す様に、NPEO類 → NPEC類の反応、NP4-15EO → NP3EO → NP2EO、及びNPの分解反応速度が比較的大きい。反応速度の相対的な大きさから、NP1EO、NP2EO、NP1EC、NP2ECの環境中の長期間の存在及び蓄積の説明は可能であるが、NPについて他の要因、例えば溶解性濃度の吸着による低減も考慮する必要がある。NP類の反応経路について様々な研究^{33)~36)}が行われたが、そのメカニズムは十分に解明されていないので、図-46に示す経路とした。

(3) NP類の吸着

極性の低い有機化合物は水中・底泥中粒状有機物に吸着しやすい。吸着した物質については溶解性濃度が減少するため、生化学反応速度が低下する。

線形的な吸着平衡を仮定すると、ある化合物の溶解性濃度 (CW) / 全濃度 (CT) の比率は以下通り計算される。

(式3：水柱；式4：底泥。)

$$\frac{C_W}{C_T} = \frac{1}{1 + K_{ads} VSS} \quad \dots\dots (3)$$

$$\frac{C_W}{C_T} = \frac{\varepsilon}{\varepsilon + (1 - \varepsilon) K_{ads} \rho_{sed}} \quad \dots\dots (4)$$

ここで、Kads は吸着係数 L/mg、VSS は有機性浮遊物濃度 (mg/L)、ε は空隙率、ρsed は底泥固形分の比重 (mg/L) である。吸着実験及び推定結果を表3に示す。手賀沼実験結果とKowから推定した結果を比べると、NP、NP3EO及びNP2EOについては満足できる程度一致しているが、他のNP類については大きく異なっている。手賀沼のVSSと活性汚泥VSSへの吸着結果を比較すると、オーダー的に近いものが多いがNPについては約5倍の相違が見られている。この結果から、各化合物のKOWの実測値及び吸着係数の信頼性について更に研究する必要があると思われる。

本研究のシミュレーションにおいては、手賀沼実験によって得られた吸着係数値を使用した。

NP化合物の水柱及び底泥における吸着の影響を論証するために、表-20に示した「Teganuma Experiment」欄の最小値 (NP1EC) と最大値 (NP) 及び手賀沼の平均的なVSS濃度 (8 mg/L) 及び平均的な底質空隙率 (0.81) と比重 (2.33×106) を考慮し、式 (3) 及び式 (4) によって溶解性物質濃度の全濃度に対する比 (CW/CT×100) を算出した。その結果を以下の表-21に示す。

表-21 NP類化合物の水中浮遊物及び底泥固形物への吸着の溶解状比率への影響

Medium	Compound	C _w /C _T (%)
Water column	NP1EC	95.2
	NP	58.4
Sediment surface	NP1EC	2.9
	NP	0.21

表-20に示す値から、吸着がない場合と比較して、水中溶解性濃度は水溶性の比較的大きいNP1ECで5%、疎水性の強いNPで40%低下することが分かる。底泥においては、その低下程度は97~99.8%である。以上の値はNP

類の底泥における蓄積を説明するものとなっている。

(4) 実測値とシミュレーション結果の比較

図-51に示す様に、手賀沼の各区間において、NP類濃度の合計の実測値とシミュレーション値の一致は良好である (平均誤差は13.1%)。更に、各区間において、NP類の濃度分布パターンの実測値及びシミュレーション値が類似している。流下方向の濃度低下は小さいが、これは低水温及び大量の導水注入 (自然流量の約4倍) に伴う滞留時間の減少による。

シミュレーションモデルを用いて Survey3 条件下でのNP類の手賀沼全体における挙動、運命の予測を行った (図-52)。各NP類の大気との交換は無視できる程度である。底質との交換はいずれの物質においても底泥→水柱の方向となっているが、特にNPの場合に著しく、その「内部負荷」は流入負荷の約30%を占める。この現象は、それまでに底質に蓄積した高い濃度のNP及び大きい導水量に伴う水相の低NP濃度が原因であると考えられる。各NP類の反応による変化においては、分解は生成を上回っている。その程度はNPの場合最も少ないが、この原因としてNPの溶解性濃度が低いことが挙げられる。

4. ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出などの現象の解明

4.1 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。

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-53に示す。

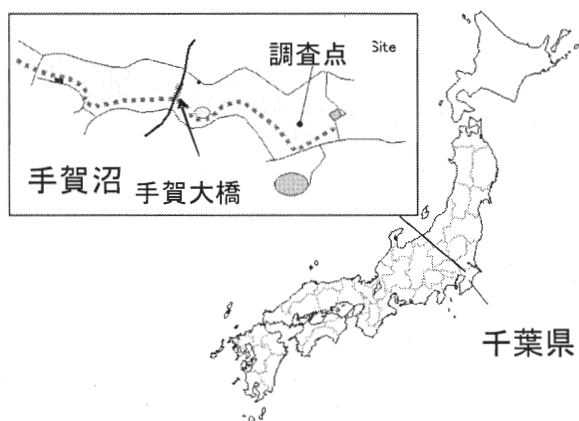


図-53 調査範囲・調査位置

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 (10cm φ × 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³⁷⁾に従い LC/MS/MS 法, NP は環境庁 (1998)³⁸⁾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³⁹⁾に従い固相抽出-GC-MS 法を用い、NP1EO~NP15EO までを定量した。NPEC は、小森他³⁾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) 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-50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。

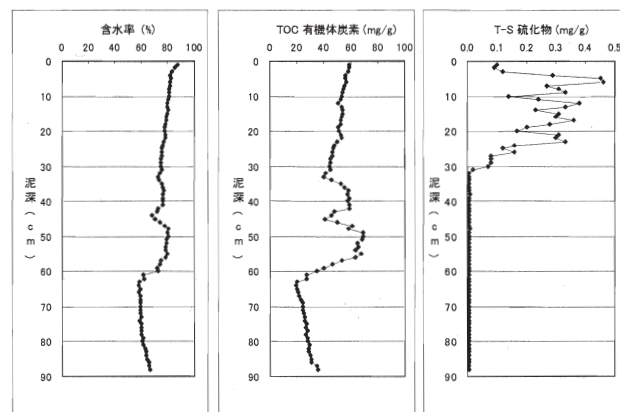


図-54 一般項目の鉛直分布(含水比, TOC, T-S)³⁴⁾

(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⁴⁰⁾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-46A)。NPs については、NP, NPEO 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まで推移している (図-55B, C)。NPEC は NP, NPEO に比べ含有率が低い (図-55C)。

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。

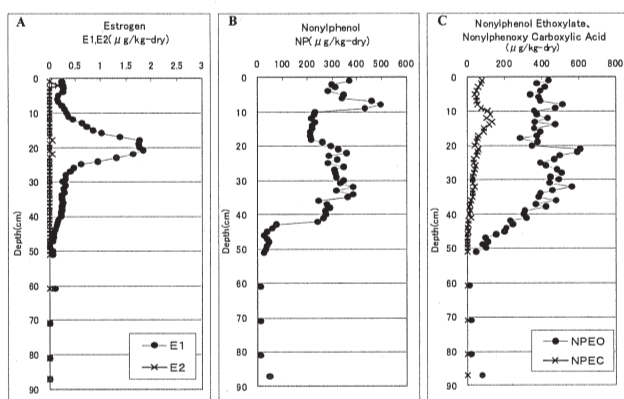


図-55 底泥中のエストロゲンと NPs の鉛直分布⁴⁰⁾

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-56 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らさらに検討が必要である。

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。

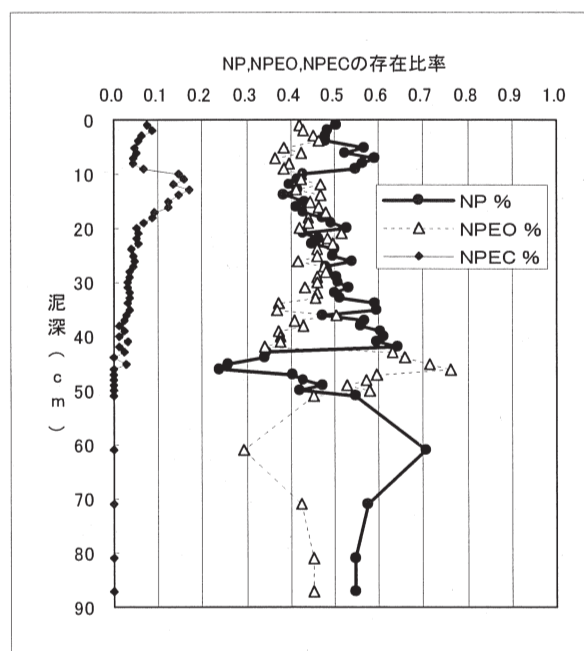


図-56 底泥中の NP、NPEO、NPEC の mol ベースでの存在比

(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-57)。堆積重量 W_z (g/cm²) 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/cm²) 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。

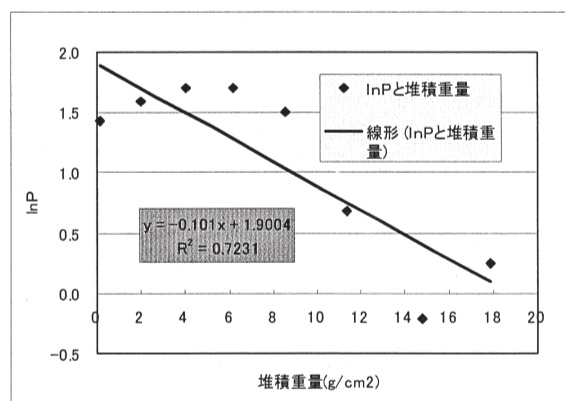


図-57 Pb210 の壊変数と積算重量

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。

$$t = Wz / Sw \quad \dots\dots (5)$$

ここで、 t : 堆積年数(年)、 Z : 堆積層の深さ(cm)、 Wz :
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、

$$Pz/P1 = (1/2) t/T \quad \dots\dots (6)$$

が計算できる。ここで、 Pz : 深さ Z における鉛 210 の含
量の機器計数値(dpm/g)、 $P1$: Z より上層の鉛 210 の含
量の機器計数値(dpm/g)、 dpm : 放射性物質の壊変する絶対
的な計数値の単位(disintegration per minute)、 T : 鉛 210 の
半減期 (22.3 年) である。

式(6)の式両辺の対数をとると、

$$\ln Pz = \ln P1 - 0.311(Wz/Sw) \quad \dots\dots (7)$$

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
層が 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-58 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。

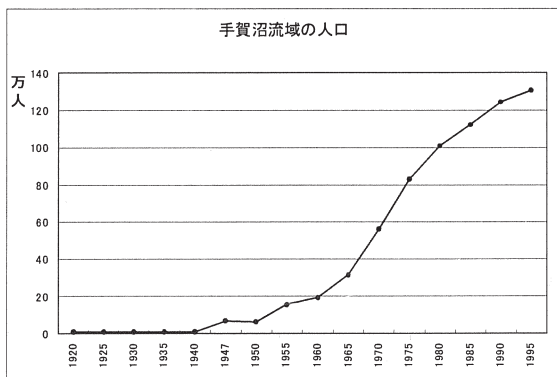


図-58 手賀沼流域の人口の推移

E1 の顕著な増加は、図-59 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 s 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。

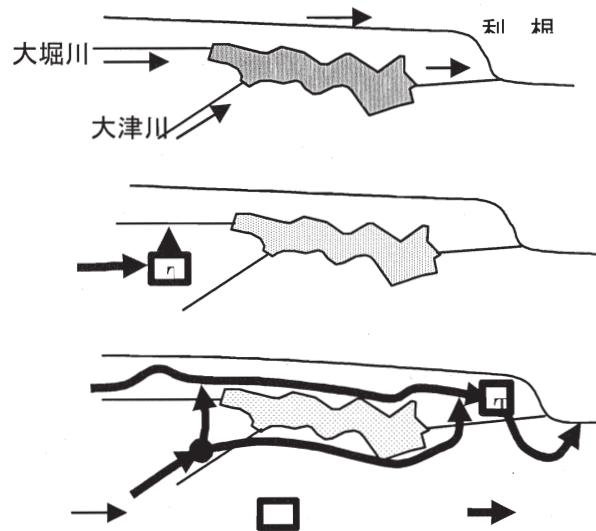


図-59 手賀沼流域の下水道整備状況の変化

4. 2 エストロゲン、ノニルフェノール類の底泥中の挙動に関する調査

流域から排出される生活排水中に存在する E2 や E1 などのエストロゲン様物質の多くは下水処理場内において除去されるが、処理プロセスの管理や運転条件によっては、その一部が放流水に残存したまま河川や湖沼などの水域に排出される。これら排出された物質は水や底泥への移行のほか、水中及び底泥中での物理的、化学的、生物的な因子により、その挙動が決まると考えられる。

これまでにエストロゲン様物質の水域における実態調査は幾つか行なわれているが⁴¹⁾、様々な微生物が多量に生息する底泥における挙動に関しては未だに検討されていない。そこで、エストロゲン、ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出や底泥での分解など底泥に係わる現象の解明のため実態調査と室内実験を行った。調査は都市化による流域の変化が激しい手賀沼と、都市化の影響を受けず社会的な変化も小さい、かつ最近のダム建設により新たに堆積が始まった三春ダムの牛糞前貯水池を対象に、手賀沼の底泥はエストロゲン、ノニルフェノール類の鉛直分布を調査し、牛糞前貯水池の底泥は回分式実験により E2 の分解特性を検討した。

1) 手賀沼底泥中の鉛直分布

エストロゲンとノニルフェノール類の底泥中の鉛直分布を調べるため、3.3 で述べた表層の堆積濃度が高い大津川河口付近の調査地点 St.2 において、潜水作業によりアクリル製パイプ（直径 10cm×高さ 100cm）を用いて底泥柱状試料を不攪乱状態で採取した。分析は表層から深さ 50cm までは 1cm 毎に分割し、50cm 以深 87cm までは 10cm 毎に分割した。また、底泥の堆積履歴を検討するため底泥の年代測定を行った。底泥の堆積年代測定は、底泥柱状試料を 5cm に切り乾燥した後、Pb-210 法と Cs-137 法により行なった。

エストロゲンの鉛直分布を図-60 に示す。また、併せて、14 年度に調査した St.6 の鉛直分布を示す。

E2 はほとんど検出されず、また E3 及び EE2 は全く検出されなかった。E1 については、大津川河口付近の St.2 では、深さ 27cm、55cm で濃度ピークが存在し、14 年度調査の手賀沼流出付近の St.6 では、深さ 20cm のみにピークが存在した。底泥中にこの様な濃度ピークが存在することは、堆積底泥中では E1 が分解を受けにくい物質であることを強く示唆している。同じ深さ同士で E1 濃度を比較した場合、20cm の深さを除いては、St.6 に比べ St.2 の方が高かった。最も高い E1 濃度は St.2 で 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ （深さ 27cm）、St.6 で 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ （深さ 30cm）であった。

これは、中田ら⁴²⁾が東京湾で行った調査で測定した E1 より一桁小さい値であった。

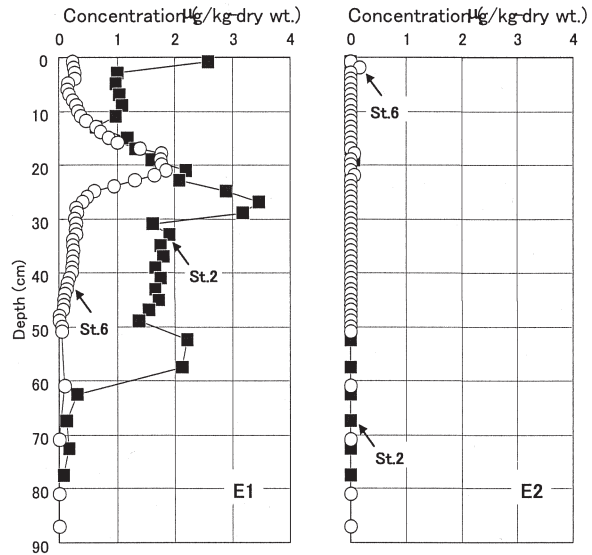


図-60 手賀沼底泥中の E1 及び E2 の鉛直分布

次に、底泥中のノニルフェノール類の鉛直分布を図-57 に示す。エストロゲンと同様に、14 年度に調査した St.6 の鉛直分布を併せて示す。

St.2 における NP 濃度は、36 $\mu\text{g}/\text{kg-dry}$ から 21 $\text{mg}/\text{kg-dry}$ の範囲であった。20cm 以深では、St.2 の NP 濃度の方が St.6 より高く、20cm 以浅では逆に St.6 の方が高かった。また、St.2 における NPhEO の底泥中濃度は最大 2.5 $\text{mg}/\text{kg-dry}$ 、NPhEC の底泥中濃度は最大で 1.4 $\text{mg}/\text{kg-dry}$ であった。St.6 における NPhEO と NPhEC の底泥中濃度は、どの深さにおいても St.2 に比べ低い濃度であった。

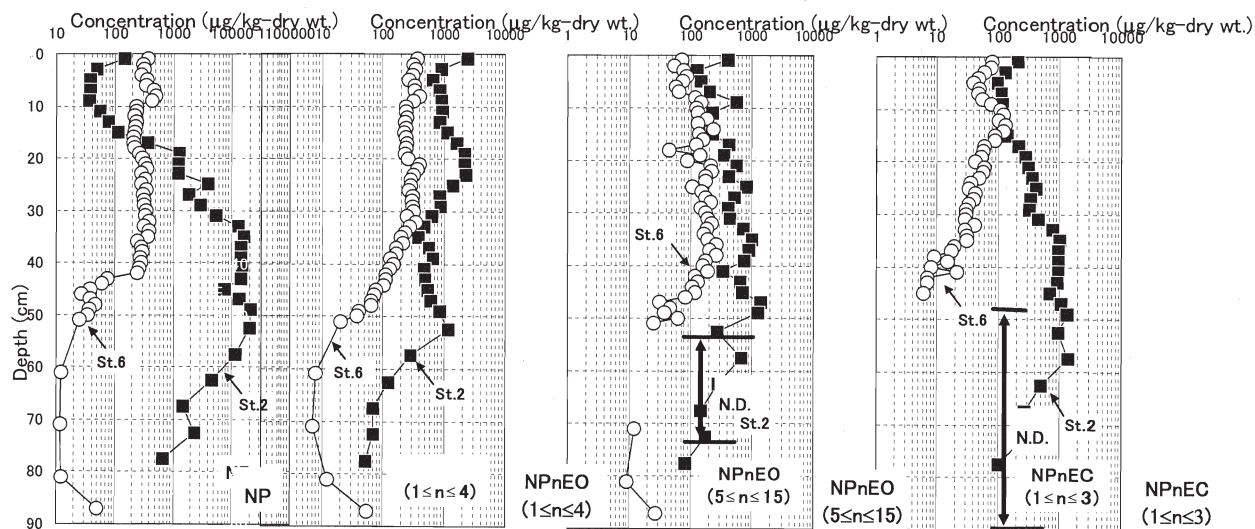


図-61 手賀沼底泥中のNP, NPnEO, NPnECの鉛直分布

2) 手賀沼底泥の堆積年代測定

図-62にSt. 2の底泥柱状試料の年代測定結果を示す。

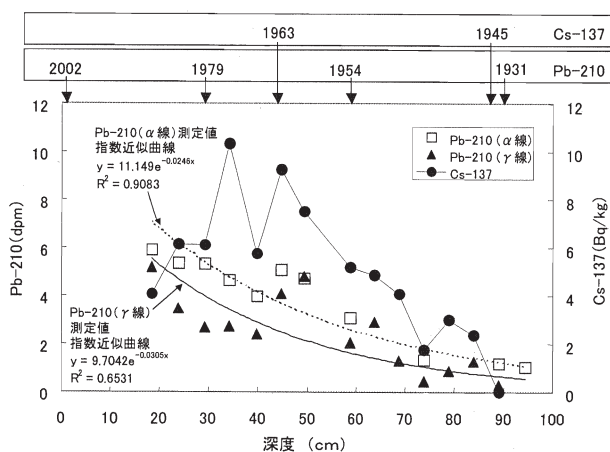


図-62 手賀沼底泥中の堆積年代測定結果

年代測定は、Pb-210法とCs-137法により行った。なお、Pb-210については、 α 線放射と γ 線放射の両方の測定を行い、Cs-137については、 γ 線放射の測定を行った。表層付近(深さ0~15cm)は、ばらつきが大きいので、この3点の測定結果を除いて、堆積速度を求めた⁴³⁾。

この結果、Pb-210の α 線測定値の指数近似曲線の相関が高く($R^2=0.9083$)、また、 γ 線測定値による推定結果と比べCs-137による堆積年度の推定結果と近いので、このPb-210の α 線測定値から堆積速度を求めたところ1.27cm/年であった。これは、14年度に土木研究所が測定したSt.6の堆積速度や濱田の報告⁴⁴⁾に近い結果であった。これより、St.2の底泥中のE1濃度が急激に増加している

深さ60cmは1950年代半ばとなり、流域人口が増加し始めた時期に対応していると考えられた。また、E1濃度のピークである27cmは1980年となり、手賀沼流域で1981年に流域下水道が供用開始した前年に相当する。このため、この層より浅い層での濃度低下は、下水道整備により下水が手賀沼をバイパスした効果と考えられた。

4. 3 ノニルフェノール類の底泥への吸着特性

水環境中のノニルフェノール類は、環境水中の浮遊物質や底泥に吸着しやすいことが知られているが、吸着平衡に関する実測データが現状では十分に得られていないのが実情である。平成17年度は、ノニルフェノール類の浮遊物質や底泥への吸着特性を把握するために、実環境水試料へのノニルフェノール類の添加、吸着実験を実施し、吸着等温線を求め、ノニルフェノール類の吸着および溶出特性を把握した。

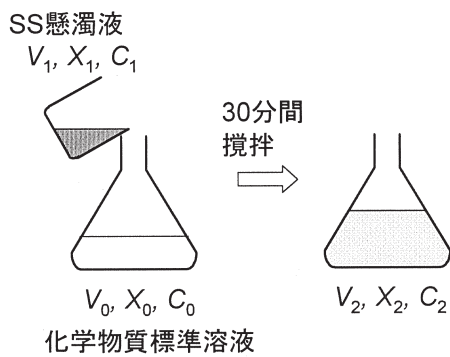
1) 実験方法

(1) SS懸濁液の調製

まず、吸着実験に使用するSS懸濁液を調製した。SS懸濁液の元となる試料の採水は平成17年8月11日、「手賀沼中央」の水質観測地点で行い、試料容器を遮光、冷蔵保存した。採水時の気温は28℃、水温は26℃、風速は1~2mであった。なお、採水日の約2週間前から採水日までの間、降水はなかった。試料中SS及びVSS濃度は22.5mg/L、7.4mg/Lでやや低かったため、ろ過によって2倍に濃縮した。この操作により、SS懸濁液のSS濃度は45mg/L、VSS濃度は14.7mg/L程度となった。

(2) 吸着平衡実験

実験方法の概要を図-63 に示す。500mL のガラス製三角フラスコに、表-22 に示す対象化学物質溶液 200mL を入れた後、100mL の(1)で得られた SS 懸濁液を添加し、フラスコの栓を閉めた後、フラスコをシェーカー (振とう機) に入れ、30 分間攪拌した。その後、溶液全体を 1 μ m のガラス繊維濾紙でろ過し、ろ過液のノニルフェノール類の分析を行った。対象化学物質は、NP のみを添加する実験、NP2EO のみを添加する実験、NP2EC のみを添加する実験および NP、NP1~15EO、NP1~10EC、の 26 化合物全てを含む混合物質を添加する実験の 4 種類とした。なお、NP 類混合物質溶液における NP : 全 NPEO : 全 NPEC の濃度比は 1 : 12.5 : 7.5 とした。吸着実験は、採水日の翌日、水温 22.4 $^{\circ}$ C、pH=8.8 の条件下で行い、吸着実験後溶液の浮遊物質 (SS) 濃度、有機性浮遊物質 (VSS) 濃度はそれぞれ、15mg/L、4.9mg/L であった。



V: 容量, X: 有機性浮遊物質 (VSS) 濃度,
C: 溶解性対象化学物質濃度

図-63 吸着平衡実験の概要

表-22 対象化学物質溶液の濃度 C₀ (単位 g/L)

実験 No.	対象化学物質	フラスコ 0	フラスコ 1	フラスコ 2	フラスコ 3	フラスコ 4
1	NPのみ	0	1	5	20	50
2	NP2EOのみ	0	1	5	20	50
3	NP2ECのみ	0	1	5	20	50
4	NP類混合	0	1	5	20	50

2) 実験結果と考察

ノニルフェノール類の分析結果を表-23 に示す。手賀沼水質中にはノニルフェノール類が元々含まれていたもので、各試験系においてブランク実験 (対象物質濃度=0) も合わせて実施した。

吸着平衡実験前の化学物質標準溶液濃度 C₀ と吸着実験後の対象化学物質濃度 C₂ の関係は、吸着量が溶液濃度に比例するとの仮定のもとに吸着定数 K_{ads} [L/mgVSS] を使って以下のように表すことができる。

$$C_2 = A \cdot C_0 + B$$

$$A = (V_0 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_0)) / (V_2 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_2))$$

$$B = (V_1 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_1)) / (V_2 \cdot (1 + K_{ads} \cdot X_2)) \cdot C_1$$

表-22、-23 の C₀ と C₂ の値から近似直線を求め、得られた傾き A の値から、吸着定数 K_{ads} は以下の式により求められる。

$$K_{ads} = (V_0 - A \cdot V_2) / (A \cdot V_2 \cdot X_2 - V_0 \cdot X_0)$$

表-23 吸着実験後の対象化学物質の濃度 C₂ (単位 μ g/L)

実験 No.	対象化学物質	フラスコ 0	フラスコ 1	フラスコ 2	フラスコ 3	フラスコ 4
1	NP	3.18	3.58	5.50	10.92	23.00
2	NP2EO	0.02	0.29	1.04	5.69	14.39
3	NP2EC	0.22	0.81	3.44	13.79	33.19
4	NP類(混合)					
	NP	0.23	0.33	0.96	1.74	2.96
	NP1EO	0.02	0.16	0.87	1.75	3.10
	NP2EO	0.01	0.23	0.94	1.83	2.99
	NP3EO	0.01	0.17	0.90	1.83	2.92
	NP4EO	0.01	0.17	0.88	1.86	2.96
	NP5EO	0.01	0.17	0.90	1.91	3.05
	NP6EO	0.01	0.17	0.89	1.93	3.06
	NP7EO	0.00	0.16	0.87	1.92	3.13
	NP8EO	0.00	0.17	0.88	1.90	3.13
	NP9EO	0.00	0.16	0.92	1.88	2.93
	NP10EO	0.00	0.15	0.86	1.88	3.16
	NP11EO	0.00	0.15	0.85	1.95	3.34
	NP12EO	0.00	0.17	0.87	1.96	3.18
	NP13EO	0.00	0.17	0.89	1.96	3.33
	NP14EO	0.00	0.17	0.90	1.95	3.29
	NP15EO	0.00	0.17	0.88	1.90	3.24
	NP1EC	0.22	0.47	1.52	2.79	4.87
	NP2EC	0.17	0.41	1.47	2.77	5.04
	NP3EC	0.08	0.31	1.28	2.50	4.57
	NP4EC	0.03	0.24	1.13	2.29	4.02
	NP5EC	0.02	0.21	1.05	2.08	3.75
	NP6EC	0.01	0.20	1.02	2.17	3.80
	NP7EC	0.01	0.18	0.97	2.05	3.67
	NP8EC	0.01	0.18	0.96	2.12	3.57
	NP9EC	0.00	0.16	0.93	2.04	3.55
	NP10EC	0.00	0.17	0.90	2.02	3.51

図-64、65 に、例として、実験 No.1、2 の結果より得られた C₀ と C₂ の関係を示す。表-24 に得られた各対象物質の吸着定数を示す。これらの値及び単一化合物の吸着定数はほぼ一致することがわかる。

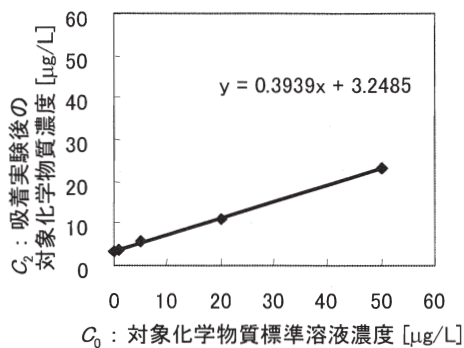


図-64 ノニルフェノール (NP) の吸着実験結果

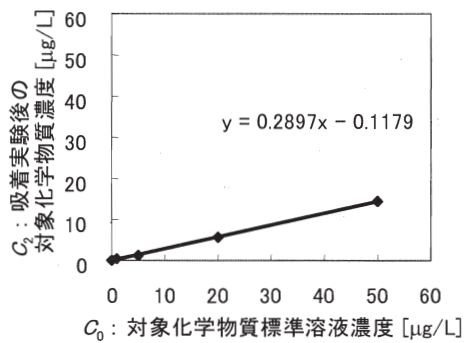


図-65 NP2EO の吸着実験結果

表-24 各対象物質の吸着定数, C0 と C2 の線形近似における相関係数および最大平衡濃度

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

5. まとめ

過年度の成果を含む本研究の成果は、以下のとおりである。

5.1 ノニルフェノール類, エストロゲン類の分析方法の開発

1) エストロゲン分析の前処理として従来用いられていた薄層クロマトグラフを用いる方法をフロリジルカートリッジとNH2カートリッジを用いる方法に変更することにより、前処理の簡易化を行った方法を提案した。

2) エストロゲンが尿中へ排泄されるときにの形態は、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体となっているとされている。エストロゲン挙動解明において抱合体の把握も重要であることから分析法の検討を行い、LC/MS/MSによるエストロゲン抱合体の分析法を開発した。

3) ノニルフェノール類のノニルフェノールエトキシレート (NPhEO) はHPLCを用いNP1EO~NP15EOを測定し、ノニルフェノキシ酢酸 (NPhEC) はLC/MS/MSを用いNP1EC~NP10ECを測定する方法を提案した。

4) ノニルフェノール類 (NPs) およびエストロゲンの底質・汚泥分析法の検討を行い、NP・NPEOは底質では1g-dry以上、汚泥では200mg-dry以上用いることにより、概ね、従来の方法で一定の精度を維持して分析可能であることを確認した。

また、エストロゲンは底質、汚泥とも遊離体については従来の方法で一定の精度を維持して分析が可能であるが、抱合体については引き続き検討が必要であることが分かった。

5.2 水中でのノニルフェノール類, エストロゲン類の分解, 生成などの現象の解明

1) 水環境中での挙動を把握するため、湖沼及び河川における実態調査を行い、都市排水由来の流入状況、河道における変化や底泥への蓄積状況を明らかにした。河川におけるエストロゲン、NPsは、河道内における分解あるいは変化、一部底泥への吸着の可能性が示唆された。

2) 手賀沼を対象に平面的な底質への蓄積状況を調査した結果、エストロゲン、NPhEO及びNPhECについては、大津川河口地点で最も高濃度になっていたが、流下方向に従って低下していった。しかし、NPはそれら物質とは異なり、湖沼の流下方向に従って濃度が高くなっていった。この理由として流下方向で増殖した藻類などの有機物にNPが吸着しやすいことが関連しているものと考えられた。

3) 三春ダム前貯水池の底泥試料にE2を添加した振とう生物分解試験の結果より、底泥位置、水温及び好気・嫌気などの条件によりE2の分解挙動が変化することを確認した。この結果、E2の分解には底泥中に生息する微生物の作用が大きいことが示唆され、その分解速度は中

層・下層の底泥に比べて上層の底泥の方が、また5□に比べて20□の方が著しく早かった。また、E2の分解過程においてE1が形成され、形成されたE1が嫌気的条件下では生成と消失が繰り返され、底泥中に生息する微生物による吸着、蓄積、脱着や放出などの機構の関与が示唆された。

4) 実態調査結果及び観測データに基づいて、NP類の挙動シミュレーションモデルを構築し、予測シミュレーションを行った。これにより、湖水におけるNP類濃度の構成および分布の傾向が再現できた。

また、三春ダム前貯水池から水・底泥試料を採取し、17βエストラジオールの分解速度を調査した。その結果、分解速度は、表層底泥の方が中層や下層底泥よりも大きく、また、好気条件下の方が嫌気条件下よりも大きかった。SS量当たりの分解速度で見ると、水相は底泥相の2倍の大きさであった。

5.3 ノニルフェノール類の底泥への吸着、底泥からの溶出などの現象の解明

1) 検討を行った濃度範囲で、NP類の手賀沼の浮遊物への吸着平衡は線形的である。

2) 検討の対象とした物質のうち、ノニルフェノールの吸着係数が最も高い値であるが、ノニルフェノールエトキシレート類(NP1~15EO)の吸着係数はその60~50%程度であった。ノニルフェノールエトキシ酢酸類(NP1~10EC)の吸着係数はNPの10~30%程度であった。

3) エトキシ基が増えることによって、NP1~15EOの吸着係数が若干減少するが、NP1~10ECはその逆の傾向を示し、それぞれの物質は同一の値に接近する。これはエトキシ基の数が増えることによって物性が似たようになるためであると考えられる。

4) 低濃度(数ppb)の濃度範囲であれば、NP類の混合液からの吸着における相互作用は無視できる程度であり、線形的な吸着平衡を考慮すればよいと考えられる。

5) 都市排水で汚染した湖沼の底泥中にはエストロゲン、NPsが高い濃度で蓄積されており、好気的な条件下で分解されるよりもきわめて長期に底泥中に高濃度で存在している可能性があることが示唆された。

底泥年代測定の結果から、流域の人口、下水道などの排出機構の変化はE1、ノニルフェノール類の底泥中鉛直分布に大きく影響を与えていることが推察された。

[参考文献]

- 1) 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)に関する調査報告，国土交通省都市・地方整備局水道部，2001
- 2) 辻村 他：LC/MS/MSによる環境中エストラジオール及び類縁物質の同時分析法の開発，第9回環境化学討論会講演要旨集，pp.58-59，2000

3) 石井 他：LC/MS/MSによるエストロゲン抱合体の分析法について，第11回環境化学討論会講演要旨集，pp.514-515，2002

4) 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

5) 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) Tanaka, H. et al. (2001). Comparison between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast Assay And from Chemical analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, Water Science & Technology, Vol.43, No.2, pp.125-132, IWA.

7) 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

8) 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

9) 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

10) 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

11) 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

12) 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

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

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

15) Rice et.al, "Alkylphenol and Alkylphenol- Ethoxylates in carp, Water, and Sediments from the Cuyahoga River, Ohio." Environ.Sci. Technol.(37), pp.3747-3754, 2003

16) Kannan, K.; Keith, T.L.; Naylar, C.G.; Staples C.A.; Snyder, S.A.; Giesy, J.P, Arch.Environ. Contam. Toxicol,44, pp.77-82. 2003

- 17) Ahel M, McEvoy J, Giger W., "Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms." *Environmental Pollution* 79(3), pp.243-248, 1993
- 18) Takahashi, A.; Higashitani, T.; Yakou Y.; Tanaka H., "Evaluating Bioaccumulation of Suspected Endocrine Disruptors into Periphytons and Benthos in the Tama River", CD-ROM of Proceedings of 3rd IWA World Water Congress E21209a, 2002
- 19) 八十島誠, 小森行也, 田中宏明: トイレトペーパー等に含まれるNPおよびその関連物質, 第38回水環境学会講演集, 2004
- 20) Mibu K. et al.: Distribution of estrogen, nonylphenol and its derivatives in the sediments of a shallow lake, *Wat. Sci. Technol* 50(5), pp.173-179, 2004.
- 21) 壬生勝泰 他: 下水道整備途上の流域での汚濁負荷流出の変遷に関する研究, 土木技術資料, 第45巻, 10号, pp.46-51, 2003
- 22) Ternes TA, Kreckel P, Mueller J: Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants- II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *Sci. Total. Environ.*, 225, 91-99, 1999.
- 23) 佐々木稔 他: 底層環境改善のためのモニタリング技術と活用, 学会誌「EICA」, Vol.7, No.2, pp237-240, 2002
- 24) Fauser P. et al: Phthalates, Nonylphenols and LAS in Roskilde Wastewater Treatment Plant, NERI Technical Report, No. 354, Denmark, 2001.
- 25) Bennie, D.T.: Review of the Environmental Occurrence of Alkylphenols and Alkylphenol Ethoxylates, *Water Qual. Res. J. Canada*, 34 (1), pp. 79-122, 1999.
- 26) Birkett, J.W. & Leste, J.N.: Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes, CRC Press, Boca Raton, 2003.
- 27) 磯部友彦 他: 水環境中におけるノニルフェノールの挙動と環境影響, 水環境学会誌, 21(4), 1998.
- 28) Namkung, E. and Rittmann, B.E.: Estimating volatile organic compound emission from publicly owned treatment works. *Journal of WPCF*, 59(7), 1987.
- 29) 小林節子 他: 内部生産からみた印旛沼, 手賀沼のCOD, 窒素, りんの水質特性, 千葉県水質保全研究所, 水保研資料 No.51, pp. 87, 1989.
- 30) Argese E. et al.: Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradative derivatives. *Environ. Toxicol. and Chem.* 13(5), pp.737-742, 1994.
- 31) Yamamoto, H. et al.: Estimated Fate of the Selected Estrogenic Compounds in the Activated Sludge Process: Effects of Natural Organic Matter, Proc. IWA World Water Congress and Exhibition, Marrakech (Morocco), Sept. 19-24, poster paper No. 26539, 2004.
- 32) US-EPA: Estimations Programs Interface, EpiWin Ver.3.1, 2001.
- 33) John, D.M. & White, G.F.: Mechanism for Biotransformation of Nonylphenol Polyethoxylates to Xenoestrogens in *Pseudomonas putida*, *Journal of Bacteriology*, Sept. pp. 4332-4338, 1998.
- 34) Ahel, M. et al.: Aerobic Transformation of Short-Chain Alkylphenol Polyethoxylates by Mixed Bacterial Cultures, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, pp. 540-548, 1994.
- 35) Quiroga, J.M. et al.: Biodegradation of a Nonylphenol Polyethoxylate (NPEO) in River Water, Proc. 4th World Surfactant Congress, pp. 417-425, 1996.
- 36) 藤井克彦 他: ノニルフェノール分解微生物, *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 87, pp.1-12, 2001.
- 37) 小森他, 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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, 2002.125)
- 42) 中田典秀 他: 「東京湾堆積物中の女性ホルモン, 環境ホルモン, 女性ホルモン活性の平面および鉛直分布」, 第10回環境化学討論会講演要旨集, pp.132-133, 2001
- 43) Robbins, J. A et al.: Determination of recent sedimentation rates in Lake Michigan using Pb-210 and Cs-137, *Geochim. Gosmchim. Acta.*, Vol. 39, pp.285-304, 1975
- 44) 濱田崇臣: 「湖沼堆積物を用いた手賀沼の環境変遷の検討(その2) - 鉛-210法・セシウム-137法による年代測定と珪藻化石による手賀沼の環境変化-」, 電力中央研究所報告書, 1998