

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19404004

研究課題名（和文） 日英の河川環境におけるエストロゲン汚染と対策の比較研究

研究課題名（英文） Comparative study between Japan and the UK on pollution due to estrogens in the river environment and its countermeasures

研究代表者

田中 宏明（TANAKA HIROAKI）

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70344017

研究成果の概要：

遊離体と抱合体のエストロゲンの前処理を簡易化し、回収率を大幅に改善させる分析法を開発した。2008 年 1 月と 9 月の降雨時期に 英国テムズ川流域で調査を行った結果、E2 やグルクロン酸抱合体のエストロゲンが放流水や河川水で検出され、合流式下水道越流水の影響が無視できないことが明らかとなった。また我国で検出されない EE2 が流入下水や下水処理水で検出された。グルクロン酸抱合体よりも硫酸抱合体が、また E2 や E1 よりも EE2 は分解が遅いことが実験で明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：環境工学

科研費の分科・細目：工学・環境影響評価・環境政策

キーワード：エストロゲン、下水処理場、魚類雌性化、河川、流域管理、遊離体、抱合体、合流式下水道

1. 研究開始当初の背景

内分泌かく乱問題がわが国で問題となり始めたきっかけの一つに、英国での河川での魚類の雌性化がある。下水処理場下流でコイ科の Roach の雄の生殖器である精巣に卵母細胞が見出されるいわゆる精巣卵が高い割合で見出され、河川での女性ホルモン(エストロゲン)様汚染が深刻な問題を持っていること、その原因として下水処理場放流水があり、女性ホルモン様物質として当初ノニルフェ

ノールが、その後、天然および人工のエストロゲンが主な作用物質とされてきた。わが国では 1998 年、建設省は一級河川での内分泌かく乱を疑われる化学物質濃度を全国調査するとともに、10 河川での野生コイの捕獲調査を行った。この結果、ノニルフェノール、ビスフェノール A が低濃度ながら見出されたがその検出頻度が低く、むしろ低濃度ながらエストロゲンが全国河川から広く検出された。また捕獲された野生の雄コイの精巣は

外見、組織から検査されたが、外見上の奇形が17%程度見出されたものの、明らかな間性化を起こしている精巣卵はわずか2%程度しか見出されなかった。また、河川水のバイオアッセイによるエストロゲン様作用の測定と化学分析結果の比較から、一級河川のエストロゲン様作用の原因物質として、主にエストロゲンであることが確認された。

一方、英国ではその後、河川でのRoachの奇形の発生状況が現地調査され、下水処理場の上下流での統計的な明らかな差、その精巣卵発生にともなう受精卵からの孵化率の低下、加齢とともに精巣卵の影響拡大が確認され、英国河川に普遍的に生息するRoachの数の減少が懸念される事態となった。原因が下水処理水に含まれる17βエストラジオール、エストロン、さらに避妊薬であるエチニルエストラジオールであることが明らかになってきたことから、下水処理場でのエストロゲンの削減が検討される事態となった。この結果、2005年度から世界で初めて本格的なエストロゲン削減を義務付けるための技術開発と環境改善効果の実証を行うデモンストラクションプログラムが実施されている。

2. 研究の目的

日英での魚類の間性化には大きな相違が生じているが、どのような原因に基づくのかが大きな関心であり、1) 下水処理方式と位置、2) エストロゲン排出量、3) 希釈率(河川流域の降水量と河川勾配の相違による水文状況)、4) 河川での分解性(流下時間、水温、DOなどの相違)、5) 魚類の感受性(コイとRoachの感受性)が想定される。相違の原因を客観的に明らかにすることを最終目的とし、本研究の研究期間では、想定される相違のうち、物理的環境、具体的には、下水処理方式や位置の相違、エストロゲン排出量の相違、希釈率など河川特性の相違を明らかにする。この報告書では、1) エストロゲンの分析方法の開発、2) 下水処理場と河川でのエストロゲン濃度、3) 遊離体および抱合体エストロゲン類の挙動について述べる。

3. 研究の方法

1) エストロゲンの分析方法の開発

従来のエストロゲン抱合体分析法は、精製工程が極めて煩雑で、有機溶媒や固相を多用するため、分析精度に加えて費用面でも問題があり、抱合体エストロゲンの回収率は十分ではなかった。このため、抱合体エストロゲンについても高い回収が得られる新たな前処理方法の開発が必要である。したがって本研究では、短い前処理工程で遊離体および抱合体のエストロゲンが十分に回収できる新たな前処理方法を開発した。UPLC-MS/MSを用いて、8種のエストロゲン抱合体と4種のエ

ストロゲン遊離体の同時測定を図った。

2) 下水処理場と河川でのエストロゲン濃度

英国と日本のエストロゲン汚染の比較を行うため、英国テムズ川水系と淀川水系の中流域を対象として、同区域の下水処理場と河川の実態調査を行った。

①英国テムズ川流域での調査

テムズ川は、Cotswold 丘を起源に都市化された Reading、Slough、そして London を経由して北海へと注ぐ、UK 最長の河川(346km)で、流域人口も1300万人であり、下流域の Kingston では、流域面積は9,948km²、平均流量は66m³/secである。開発した分析法で遊離体および抱合体エストロゲンを測定した。2008年に2回の調査を実施し、1回目は1月21日から24日、2回目は9月8日から11日である。1回目は、7つのWWTPsから下水処理放流水を採取し、2回目は8つのWWTPsと2つの河川流域(Whitewater川とBlackwater川)を対象に調査を行った。

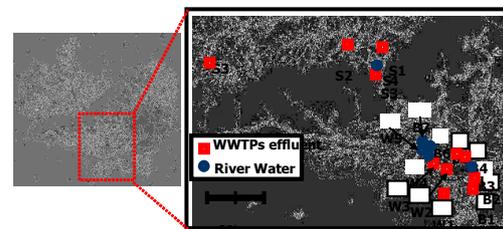


図-1 テムズ川(UK)における調査対象地域

②淀川流域での調査

淀川は、日本で最も大きい河川の一つであり、流域面積は8,240km²、流域人口は1200万人である。上流の京都市や下流の大阪府は都市化されており、下流では上流の下水処理水の影響を強く受けている。枚方における平均流量は193m³/secである。7つのWWTPsでの8つの放流口と河川の21地点でグラブ試料を採取した。調査は2007年11月、2008年12月に実施した。過年度に行った2005年の3月と11月、2006年9月の調査結果も含めて整理した。また、下水処理場内の挙動を把握するため、下水と下水処理水をコンポジットもしくはグラブ試料として、滋賀県と京都府の9つの下水処理場で採取し、流入下水と放流水の濃度から下水処理場の除去率を算出した。

3) 遊離体および抱合体エストロゲン類の挙動

抱合体エストロゲンの脱抱合の複雑さと遊離体エストロゲンの総負荷量への高い寄与を考慮し、生分解実験を実施した。2つの遊離エストロゲン(E1とE2)、2つのグルクロン酸抱合体エストロゲン(E1-3GとE2-3G)、2つの硫酸抱合体エストロゲン(E1-3SとE2-3S)を下水あるいは河川水に添加し、回分式で分解実験を行った。

4. 研究成果

1) エストロゲンの分析方法の開発

下水試料は、多量のマトリックスを含有するため、イオン化の阻害等が引き起こされる。このため、前処理方法の開発においては、マトリックス成分と対象物質の分離は極めて重要である。本研究における前処理方法開発の着眼点は、遊離体および抱合体エストロゲンの最適な分画条件と精製工程の見直しである。これらの工程の見直しにより、測定試料中のマトリックスの低減が期待される。開発した新しい前処理方法は、従来法と比較して、簡便で高い回収が得られるものであった。開発した新しい前処理方法の詳細は、図1に示すとおりである。

固相抽出には、逆相-親水性/疎水性バランスの Oasis HLB (200mg/6cc, 30 μm Waters 製) を使用した。まず、Oasis HLB を 6mL の MeOH および MilliQ 水でコンディショニングした。試料は 20%酢酸を加えた後、それぞれのサロゲートを添加した。この試料液を Oasis HLB に 10mL/min の速度で通水した。通水後、Oasis HLB を 5mL の MilliQ 水で洗浄し、その後 1 時間吸引脱水した。脱水後 Oasis HLB を Sep-pak NH2 に連結し、8mL のメタノールで遊離体を、6mL の 0.05% NH₄OH で抱合体をそれぞれ溶出した。溶出液は、37°C 条件下で N₂ 気流によって濃縮した。濃縮残渣は 1ml のアセトニトリル: MilliQ 水=1:9 溶液で再溶解し、これを測定試料とした。

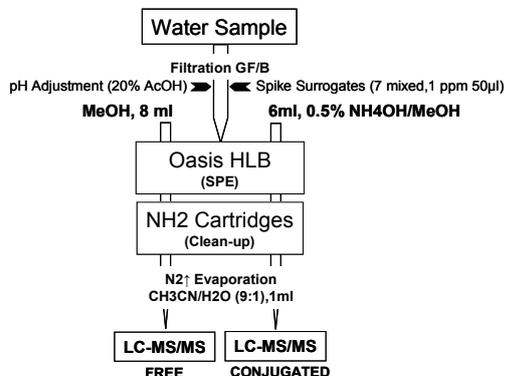


図-1 新しい分析法に対する前処理

2) 下水処理場と河川でのエストロゲン濃度

①下水処理場での調査 (英国)

UK の WWTPs での流入下水、放流水、河川の遊離体エストロゲン分析結果を図-2 に、抱合体の結果を図-3 に、また遊離体エストロゲンの除去率を表-1 に示した。処理場への流入下水中 E1 濃度は 37 から 84ng/L で、除去率は 93 から 97%と算出された。E2 については、流入水中濃度が 37 から 68ng/L、除去率はほぼ 100%であった。E2 の除去率は日本の WWTPs とほぼ同程度であった。しかし、E2 に比べエストロゲン様活性が高い EE2 は、UK で

のみ検出され、その濃度は 2.1 から 11ng/L の範囲、除去率は 52 から 100%の範囲であった。この実測濃度は、既報の Johnson らのモデルで推測された値 (10ng/L) に近かった。硫酸抱合体は頻繁に検出されたが、グルクロン酸抱合体は検出されなかった。これらの知見は Belfroid や Sumpter らによるものと同様であった。E2-3S は放流水中で 3.5 から 8.3ng/L、E1-3S は 2.8 から 12ng/L であった。

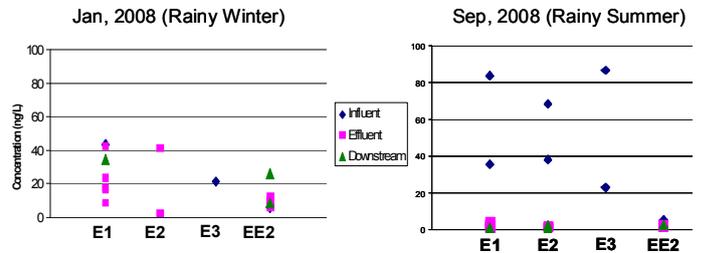


図-2 英国の下水処理場と放流先河川における遊離体エストロゲン濃度 (左:冬、右:夏)

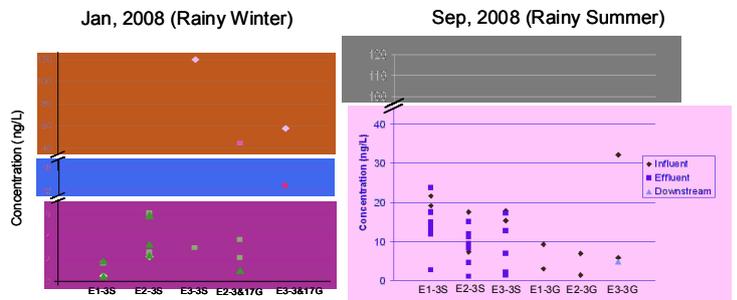


図-3 英国の下水処理場と放流先河川における抱合体エストロゲン濃度 (左:冬、右:夏)

表-1 英国下水処理場の遊離体エストロゲンの除去率

WWTP	Removal Efficiency (%)		
	E1	E2	EE2
Northampton	94	98	52
Swindon	98	100	75
Ilkeston	96	100	100

②下水処理場での調査 (日本)

調査結果では、WWTPs の放流水中からは E2 は検出されなかったが、流入下水からは 5.8 から 88ng/L で検出された。E2 の除去率は、2つの WWTPs (94%) を除くと、概ね 100%であった。一方、E1 については、処理過程での濃度増加が確認され、好気処理を行っているいくつかの WWTPs では、E2 は急激に E1 に変換された。さらに、脱抱合による E1 の増加も考えられる。E1 の濃度増加を考慮すると、WWTPs における抱合体エストロゲンの挙動解明が重要であろう。E1 の濃度は、流入下水中では 11 から 40ng/L、放流水中では 0.8 から 36ng/L であった。EE2 は検出されなかった。硫酸抱合体エストロゲンは下水試料から頻繁に検出され、極めて高い濃度の E2-3S が下水から検出されている (1.8-97.4 ng/L)。し

かしながら、二次処理水中の E2-3S 濃度 (0.4-2.1ng/L) は、エストロゲン様活性の観点からは閾値を越えておらず、これらが脱抱合するまでは水生生物に対するリスクはそれほど高くはないと考えられる。E1-3S は、いくつかの二次処理水中から 5.6-11.8ng/L の濃度で検出された。E1-3S は、定量下限値に近いが、Isobe らが報告した濃度は我々の研究にほぼ等しい値である。

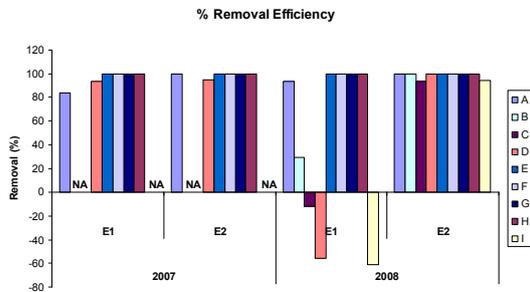


図-4 日本の下水処理場の遊離体エストロゲンの除去率

③河川調査 (英国)

英国で現地調査した下水処理場の放流水は、日本の下水処理場で主に残留する E1 に加え、日本ではほとんど検出されない E2、さらに日本ではほとんど検出されない、あるいは検出されても 0.1ng/L 程度の EE2 が、ng/L 以上の濃度で検出されることが明らかとなった。また、英国の下水処理水には、我が国の下水処理場にも残留する硫酸抱合体に加えて、我が国ではほとんど残留しないグルクロン酸抱合体も検出すること、また英国の放流先の河川では、E1 に加えて、E2、EE2 が検出されることが明らかになった。英国内では下水処理場内での調査がほとんど行えないため、原因の詳細は不明であるが、調査対象の流域のほとんどは合流式下水道であり、調査時期に降雨が観測されたことから、降雨頻度が高い英国では、合流式下水道の越流水に由来するエストロゲン汚染が関与していると考えられる。

④河川調査 (日本)

7つのWWTPsからの8つの放流口と河川の21地点でグラブ試料を採取した。調査は2005年の3月と11月、2006年9月、2007年11月、そして2008年12月に実施した。E1は下水処理水から頻繁に検出され、2005年から2008年に行ったすべての調査で検出された。これらの結果はKomoriらの既報とも同様で、下水処理場が河川水中におけるエストロゲン汚染の主な起源であることを示唆している。抱合体エストロゲンは、河川水中で最終的には脱抱合によりE1の負荷を増加させているものと思われる。しかしながら、UKと異なり日本では抱合体エストロゲンは河川では検出されることはまれである。最も関心が

高いE2は、0.6から11ng/Lの範囲で検出された。しかしながらEE2は淀川およびその流域のWWTPsの試料からは検出されなかった。E3はわずかな試料から最高3ng/Lで検出された。

抱合体エストロゲンの検出頻度は、すべての調査において2つの抱合体間で傾向が大きく異なった。すべての硫酸抱合体は、WWTPs放流水でも数ng/L以下であった。これは、ほぼすべての調査が冬に行われており、冬季は微生物活性が低いためであろう。E1-3Sは2008年採取の9つの試料から最高1.57ng/Lで検出された。Rodriguez-Mozazらは、下水処理水の受水域におけるE1とE1-3Sの濃度はそれぞれ4-22ng/L、4-7ng/Lと報告している。水溶性の高さから、硫酸抱合体は水相に残留しやすく、グルクロン酸抱合体の脱抱合よりも速度は遅いが、水中のエストロゲン負荷量増加に寄与するであろう。

3) 下水処理場および河川における遊離体および抱合体エストロゲン類の挙動

①分解試験におけるE1とE2の挙動

下水もしくは河川水を用いて行った分解試験におけるE1とE2濃度の時間変動を図-5に示した。どちらの分解試験においても、E1とE2両方が別々に添加されている。E1はE2に比べ安定であり、これはE1のカルボニル基に起因するものと思われる。E2は試験開始後1時間以内に50%(5nmol/L)が減少し、4時間後には検出下限値以下となった。河川水を用いた試験では、24時間後には0.52nmol/L(58%)となった。どちらの試験においても、E2の減少とともにその酸化生成物のE1の濃度が上昇した。下水を用いた試験ではさらに、E1は24時間後には消滅していた。同様の傾向がE1を添加した試験で確認された。活性汚泥を用いた同様の試験においてもE2は速やかにE1へ変換し、E1の除去率はE2の除去率よりも低いことがTernesらによって報告されている。Ze-huaらは、活性汚泥によるE1とE2の除去は、家庭排水中の一般的な溶存有機物の分解や消化とは無関係であると報告している。

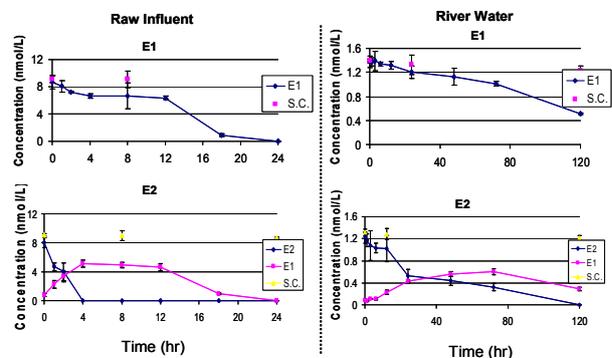


図-5 下水 (左) もしくは河川水 (右) を用いた E1, E2 の分解実験

②分解試験における E2-3G と E1-3G の挙動

WWTP へ流入するまでの間に生じる下水中の遊離体エストロゲンの増加に対するグルクロン酸抱合体の寄与を評価するため、E2-3G と E1-3G をそれぞれ 2.5 μg/L、0.37 μg/L となるように流入下水もしくは河川水へと添加し、分解試験を行った。その結果、90 分後には E2-3G と E1-3G とともに脱抱合し遊離体へと変化していた (図-6)。どちらの抱合体も最終的には E1 へと酸化されていた。したがって、グルクロン酸抱合体の大部分は、各家庭から WWTPs への中のパイプの中で分解されている。しかしながら、どちらも河川水を用いた実験では安定であり、同量の遊離体を生成する可能性がある。Ternes らは、遊離体および抱合体エストロゲンは好気性活性汚泥との接触により速やかに脱抱合すると報告している。

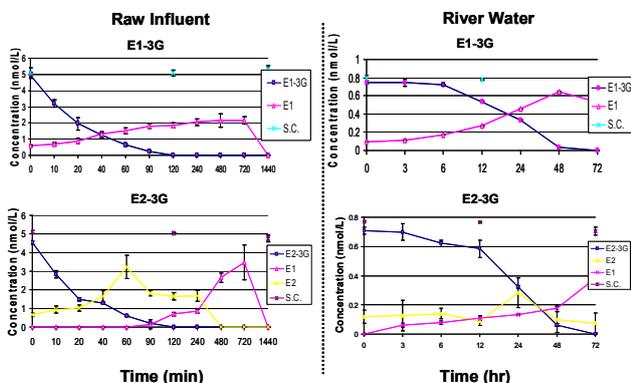


図-6 下水 (左) もしくは河川水 (右) を用いた E2-3G と E1-3G の分解実験

③分解試験における E2-3S と E1-3S の挙動

硫酸抱合体エストロゲンは、グルクロン酸抱合体エストロゲンとは異なる挙動を示した (図-7)。両硫酸抱合体エストロゲン (E2-3S と E1-3S) は、グルクロン酸抱合体エストロゲンと同様に遊離体を生成したが、その速度は極めて遅かった。12 時間の培養後、下水中では E2-3S と E1-3S の分解がスタートする。さらに、これらの下水中の濃度は 24 時間後にはそれらの濃度は検出下限値以下となった。これらの硫酸抱合体エストロゲンについて、加水分解反応は河川水中ではおよそ 5 日後までに失活する。E1-3S は 50%減少するが、E2-3S は 20%しか減少しない。グルクロン酸抱合体エストロゲンも硫酸抱合体エストロゲンの分解挙動は、Johnson らの予測とおおむね等しい結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

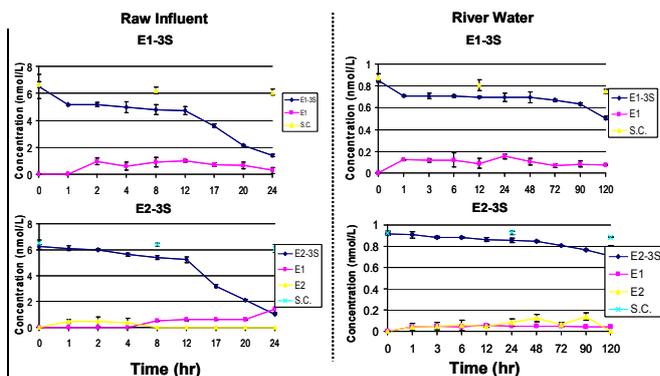


図-7 下水 (左) と河川水 (右) を用いた分解実験における E1-3S と E2-3S の挙動

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① A. Johnson, H. Tanaka, Y. Okayasu and Y. Suzuki, Estrogen Content and Relative Performance of Japanese and British Sewage Treatment Plants and their Potential Impact on Endocrine Disruption, *Environment Sciences*, **14**(5-6), 319-329, 2007. 【査読有】

[学会発表] (計 14 件)

- ① V. K. Hatwal, A. Johnson, N. Nakada, N. Yamashita, M. Yasojima, H. Tanaka, Free and Conjugated Estrogens: An analytical approach for quantification and their fate in the wastewater treatment plants, Proceedings of 2nd Symposium on Study on Monitoring, Assessment and Treatment Technologies for Reduction of Risk Caused by Water Reuse, Kyoto, pp 96, Jan. 13, 2009.
- ② V. K. Hatwal, N. Nakada, N. Yamashita, M. Yasojima, H. Tanaka, A. Johnson, Free and Conjugated Estrogen Concentrations in UK and Japan: A comparative study, The 11th Annual Meeting of Japan Society of Endocrine Disruptors, Ohmiya (Japan), pp 82, Dec. 13, 2008.
- ③ Hiroaki TANAKA, Yutaka SUZUKI, Andrew JOHNSON, Evaluation on Effects of Reducing Estrogenic Activity in Sewage, *Proceedings of the 9th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals*, Bovey Castle (UK), Oct. 5, 2008.
- ④ V. K. Hatwal, M. Yasojima, T. Okuda, N. Yamashita, H. Tanaka. Analysis method development for conjugated estrogen and their natural concentration in wastewater treatment plants (WWTPs), *Environmental &*

- Sanitary Engineering Research, Kyoto*, Vol. 22, No 3, pp 104-107, Jul. 31, 2008.
- ⑤ V. K. Hatwal, M. Yasojima, T. Okuda, N. Yamashita and H. Tanaka, Development of new analytical method for free and conjugated estrogen, *17th Symposium on Environmental Chemistry*, Kobe, pp. 202-203, Jun. 11, 2008
- ⑥ V. K. Hatwal, 田中宏明、八十島誠、大井悦雅、高菅卓三、水試料に含まれるエストロゲン抱合体の安定性、第 17 回環境化学討論会、神戸、p.204-205、2008 年 6 月 11 日。
- ⑦ A. Johnson, H. Tanaka, Y. Okayasu and Y. Suzuki, The Estrogenic Content and Relative Performance of Japanese and British Sewage Treatment Plants and Their Potential Impact on Endocrine Disruption, *Proceedings of the 9th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Hayama (Japan)*, Oct. 24, 2007.
- ⑧ H. Tanaka, V. K. Hatwal, H. Sugishita and N. Yamashita, Estrogenic Pollution in the Yodo River System, Japan, *Proceedings of the 9th UK-Japan Annual Scientific Workshop on Research into Environmental Endocrine Disrupting Chemicals, Hayama (Japan)*, Oct. 24, 2007.
- ⑨ Y. Suzuki, A. Harada, N. Nakada, K. Kitamura, N. Yamashita, H. Tanaka, N. Sato, M. Ito, T. Komatsu, H. Shinohara, M. Murakami, H. Takada and H. Furumai, Multiple evaluation of urban water quality in comparison with nationwide distribution of river water qualities, *Proceedings of 2nd International Workshop on Rainwater and Reclaimed Water for Sustainable Water Use, Kyoto*, 69-74, 2007.
- ⑩ A. Harada, N. Nakada, K. Kitamura, Y. Suzuki, N. Sato, M. Ito, N. Yamashita and H. Tanaka, Evaluation of reclaimed water in comparison with nationwide distribution of river water qualities, *Proceedings of 2nd International Workshop on Rainwater and Reclaimed Water for Sustainable Water Use, Kyoto*, 157-158, Jun. 12, 2007.
- ⑪ A. Harada, N. Nakada, K. Kitamura, Y. Suzuki, N. Sato, M. Ito, N. Yamashita, H. Tanaka, Evaluation of reclaimed water in terms of biological effects with multiple bioassay methods, *Proceedings of 2nd International Workshop on Rainwater and Reclaimed Water for Sustainable Water Use, Kyoto*, 159-160, Jun. 12, 2007.
- ⑫ 田中宏明、山下尚之、鈴木穰、原田新、中田典秀、北村清明、佐藤修之、伊藤光明、小松俊哉、篠原裕之、村上道夫、高田秀重、古米弘明、都市水循環システム構築のための水質リスクの多面的評価、第 2 回持続可能な都市水利用のための雨水と再生水に関する国際ワークショップ講演要旨集、京都、243-244、2007 年 6 月 12 日。
- ⑬ H. Tanaka, R. Nagao, N. Yamashita, T. Miyazaki, M. Sueoka and T. Ohiwa, Estrogenic Pollution in the Yodo River System, Japan, *Proceedings of Micropol & Ecohazard 2007, Proceedings of the 5th IWA Specialized Conference on Assessment and Control of Micropollutants /Hazardous Substances in Water, Frankfurt (Germany)*, 443, Jun. 17, 2007.
- ⑭ H. Tanaka, New Challenge of Municipal Wastewater Treatment for Supporting Sound Water Cycle, *Proceedings of The 2007 Environmental Societies Joint Conference, Korea-Japan Special Symposium, Bussan (Korea)*, 60-71, May 3, 2007.
- 〔図書〕(計 1 件)
- ① 田中宏明、バイオアッセイ・内分泌攪乱物質と河川生態、川の技術のフロント、河川環境管理財団編、技報堂出版、62-63、2007。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏明 (TANAKA HIROAKI)
 京都大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：70344017

(2) 研究分担者

山下 尚之 (YAMASHITA NAUYUKI)
 京都大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号：90391614
 吉谷 純一 (YOSHITANI JUNICHI)
 独立行政法人土木研究所・ユネスコセンター・上席研究員
 研究者番号：90355834

(3) 連携研究者

中田 典秀 (NAKADA NORIHIDE)
 京都大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：00391615
 八十島 誠 (YASOJIMA MAKOTO)
 京都大学・大学院工学研究科・特定准教授
 研究者番号：10541021