

(27) 受容体結合試験による都市下水処理施設のエストロゲン類似物質の挙動

Evaluation of xenoestrogens in sewage treatment facilities by the estrogen receptor binding assay

貫上佳則*, 中川直樹*

Yoshinori KANJO and Naoki KAKAGAWA

ABSTRACT; In this paper, we tried to clarify the fate of xenoestrogens in the sewage treatment facility with the estrogen receptor binding assay. The results were summarized as follows; the equivalent values of xenoestrogens(EVX) to the 17β -estradiol of the influent and effluent were 15 to 54g/day and 1.8 to 7.7 g/day, respectively, and the removed ratios in the facility were 86 to 88%. The EVX removed as the excess sludge was only 5.7 to 10% of the loadings into the aeration tank. Therefore, 71 to 92% of the EVX into the aeration tank was degraded biologically or evaporated in the aeration tank. The EVX circulated through the activated sludge process as a return sludge were 190 to 650 g/day, and these values were 31 to 170 times as much as the loading from the primary sedimentation tank. It was expected that most of xenoestrogens in the sewer were antagonist.

KEYWORDS; xenoestrogen, estrogen receptor binding assay, sewage treatment

1. はじめに

ヒトを含めた生物の体内でホルモンバランスを乱している可能性があると思われる外因性内分泌攪乱化学物質は、多くの領域で問題視されており、特に女性ホルモン(エストロゲン)の作用をかく乱する「エストロゲン類似物質」への関心が高い¹⁾。特に下水道の関連施設では、都市活動によって不要となった排水の多くを受け入れているために、エストロゲン類似物質も当然流入してきていると考えられ、全国一斉調査²⁾も実施されている。また、エストロゲン類似物質には bisphenol A(以下、BPAと略す)や nonylphenol(以下、NPと略す)などのようにエストロゲンと全く同じように作用する Agonist だけでなく、受容体に結合するものの DNA に作用してタンパク合成を引き起こさない Antagonist も存在し、その代表として 4-hydroxy-tamoxifen や tetra-bromo-bisphenol A などが知られている³⁾。Antagonist はホルモン作用を引き起こさないために重要視されていなかったが、受容体に結合することで胎児や乳児のように本来のホルモンが作用すべき時期にホルモンの作用を妨害して機能しないようにするため、Agonist と同様に Antagonist についても環境中での挙動について解明されるべきである。

しかし、これらの作用の有無を確認すべき物質の種類は非常に多く、また、自然界における微生物などによる代謝分解で生じる中間産物もふくめると、対象となる物質の数は膨大となり、1つ1つの物質を測定し管理していくことには自ずと限界がある。個別の物質濃度を測定するのではなく、エストロゲン類似物質の測定も総括的な測定方法が望まれ^{4), 5)}、*in vitro*の方法としてその作用メカニズムに特徴をもたせた E-Screen 法や YES 法⁶⁾、Two-Hybrid 法⁷⁾、受容体結合試験による方法⁸⁾などが開発されてきている。特に受容体結合試験による方法では、Agonist だけでなく Antagonist も測定できる利点がある。

* 大阪市立大学大学院工学研究科 (Graduate school of engineering, Osaka City University)

そこで、本研究では、アゴニストとアンタゴニストをともに測定できる受容体結合試験によって、下水処理施設内におけるエストロゲン類似物質の挙動を把握することを目的とした。

2. 調査方法

2-1 調査内容

調査は、2004 年 10 月 7～8 日、12 月 7～8 日、1 月 19～20 日の計 3 回、A 市の B 下水処理場にて行った。この処理場は合流式の流域下水処理場であり、工場排水を一部受け入れている。1 日の処理水量は約 7 万 m³ であり、月曜以外の平日に採水した。採水地点は図-1 に示す地点であり、試料名をそれぞれ流入原水、最初沈殿池流入水（以下、初沈流入水）、最初沈殿池流出水（以下、初沈流出水）、最終沈殿池流出水（以下、終沈流出水）、引き抜き生污泥（以下、生污泥）、余剰污泥とした。

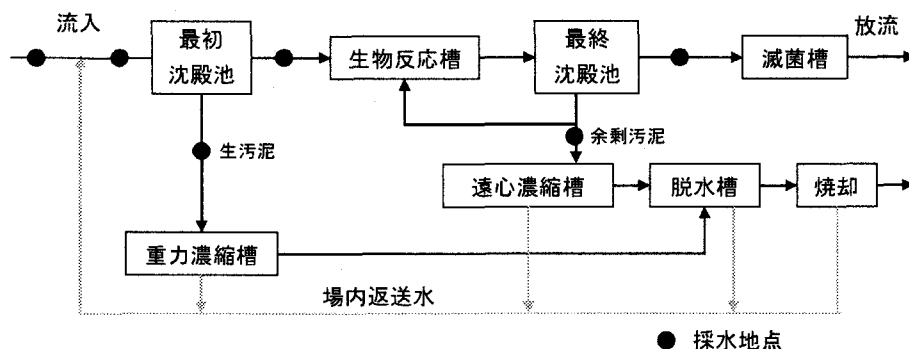


図-1 処理フローと採水地点

2-2 採水方法

下水試料はオートサンプラーを用いて、午前 10 時から翌日の午前 9 時までの間、1 時間ごとに同量ずつ採水して混合し、コンポジット試料を得た。污泥試料は自動的に採泥することができず、オートサンプラー設置時（採水 1 日目）および回収時（採水 2 日目）にそれぞれスポット採取した。いずれの試料もステンレス製容器に入れ、密封をしたのち持ち帰り、以下の処理を行った。

2-3 測定方法

測定項目を表-1 に示す。水温、pH、DO は採水直後に現地にて測定し、その他の項目については、採水後、実験室に戻り直ちに測定した。また、bisphenol A（以下、BPA と略す）、nonylphenol（以下、NP と略す）、17β エストラジオール（以下、E2 と略す）、エストロン（以下、E1 と略す）、エストロゲン受容体結合試験、および Yeast estrogen screen 法については、以下の濃縮処理を行ってから表-1 の方法で測定した。受容体結合試験には、ヒト由来のエストロゲン受容体（hER-α）を用い、蛍光偏光度の測定によって得られた競合結合試験結果から、劉ら⁸⁾によって考案された評価方法に従ってエストロゲン換算濃度を算出した。

2-4 試料の濃縮方法

(1) 水試料

下水試験方法¹¹⁾と環境庁の調査マニュアル¹³⁾を参考にして、固相カラムを用いて水試料を濃縮した。下水試料の濃縮量は、流入原水 1L、初沈流入水 1L、初沈流出水 2L、終沈流出水 4L とした。これらの試料はまずガラス繊維ろ紙（GS-25、東洋アドバンティック社製）で吸引ろ過し、ろ液のみを図-2 に示す手順で固相抽出法にて濃縮した（溶存態試料）。別途、試料をろ過後、ろ紙に残った残渣（SS 成分）をアセトン 20mL 中で

表-1 測定項目と測定方法

項目	測定方法
水温	下水試験方法(アルコール温度計による) ⁹⁾
DO	下水試験方法(ガラス電極法) ⁹⁾
pH	下水試験方法(ガラス電極法) ⁹⁾
COD _{Cr}	Standard Methods (Closed reflex, titrimetric methods) ¹⁰⁾
浮遊物質	下水試験方法(ガラス繊維ろ紙法) ⁹⁾
bisphenol A(BPA)	下水試験方法(固相抽出-GC/MS 法) ¹¹⁾
4- <i>n</i> -nonylphenol(NP)	下水試験方法(固相抽出-GC/MS 法) ¹¹⁾
17βエストラジオール(E2)	下水試験方法(固相抽出-ELISA 法、日本エンバイロケミカルズ(株)製キット) ¹¹⁾
エストロン(E1)	固相抽出-ELISA 法(日本エンバイロケミカルズ(株)製キット)
E2 換算濃度1	Yeast estrogen screen 法 ¹²⁾
E2 換算濃度2	受容体結合試験(PanVera 社製 Full-Range Beacon2000 による) ⁸⁾

10 分間超音波処理して抽出し、ろ液と混合した試料(全試料)も作成し、同様に濃縮した。この全試料と溶存態試料との差を懸濁態とした。

これらの試料は HCl を用いて pH3.0 に調節し、あらかじめジクロロメタン溶液(v/v,7:3) 10mL、メタノール 10mL、超純水 10mL の順でコンディショニングした固相カラム(Nexus, VARIAN 社製)に上向流で通水し吸着させた。Nexus カラムは、製薬・環境分析用の固相カラムであり、親水基と疎水基を兼ね備えたコンビネーションポリマーが充填されているので、水試料の濃縮に適している。通水後、固相カラムを 30 分間空気乾燥させ、次に N₂ パージ下で 15 分間吸引乾燥させた。乾燥後、ジクロロメタン・アセトン溶液(v/v,7:3) 6mL を用い

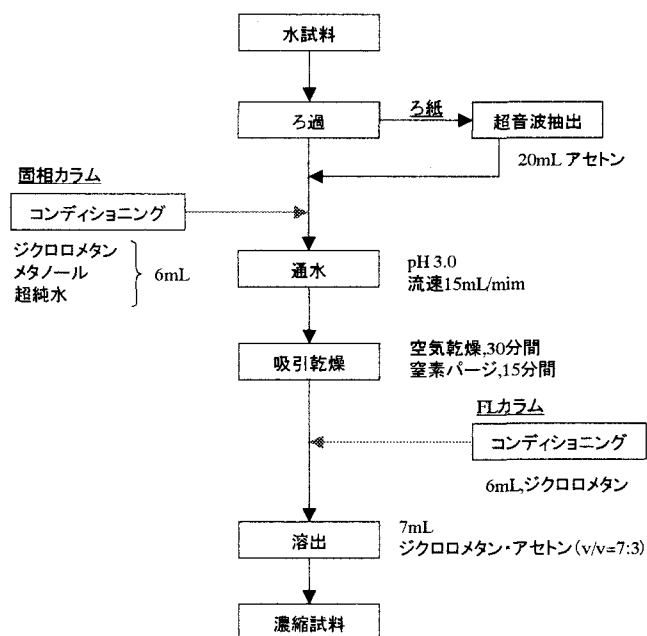


図-2 水試料の濃縮方法

て下向流で溶出した。その際、測定妨害物質を取り除くためにフロリジルカラム(FL, VARIAN 社製)を Nexus カラムに連結させて溶出し、N₂ ガスでパージして溶液を 1mL まで減圧濃縮した。FL カラムは極性の強い物質やイオン性物質の吸着に優れた固相であり、これらの夾雑物質の除去に適している。1mL まで濃縮した試料を 500 μL ずつ2つに分け、一方を GC/MS 分析用の検液とした。もう一方は、窒素ガスで乾固して 200 μL の DMSO に再溶解し、受容体結合試験、YES 試験、および ELISA 法の検液とした。

(2) 汚泥試料の濃縮方法

汚泥試料についても下水試験方法¹¹⁾とに準して超音波抽出後、固相カラムを用いて濃縮した。図-3 にそのフローを示す。まず汚泥試料を 3000rpm、15min で遠心分離し、汚泥成分と上澄み成分に分離した。上澄み液はそのまま上述の水試料と同様に濃縮した。残さに対しては 10g を計りとり、メタノール・1M 酢酸緩衝液 (pH5) (v/v,9:1) を 40mL 加えて 30 分間振とうし、その後 20 分間遠心分離の後、上澄みと残さに分離した。さらにこの残さにメタノール 40mL を加え、5 分間振とうし、吸引ろ過した。このろ紙を洗浄後、ろ液を上澄み液と混合し、超純水 100mL 加えて濃縮を行い、水試料と同様に濃縮試料を作成した。

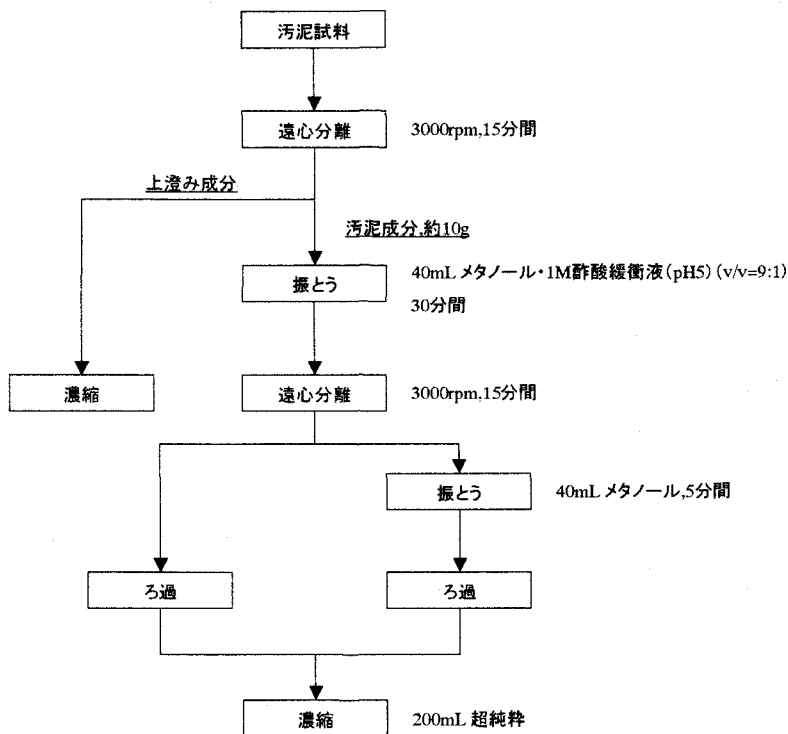


図-3 汚泥試料の濃縮方法

3. 実験結果および考察

3-1 水質測定結果

表-2 に、3回の調査で得られたエストロゲン様物質以外の項目の水質を示す。pH は、下水試料では 6.6～7.4 であり、ほぼ中性であった。汚泥試料では、5.4～6.8 とやや酸性側であった。SS は、下水試料では各処理工程を経るにつれ減少した。生汚泥の値はばらつきが大きく、3 倍以上変化した。この理由は、生汚泥が最初沈殿地から間欠的に引き抜かれていたため、引き抜き当初であれば濃度の高い汚泥が採泥できるが、引き抜き終了に近い時点で採泥すると上澄水も含まれた試料が引き抜かれることになり、引き抜き操作中の汚泥濃度が大きく変動していたためである。そのため、平均的な濃度の採泥することは非常に困難であった。COD_{Cr} は、SS と同様に各処理工程を経るにつれ減少した。1 月の値が他の月の値より高くなっており、有機物の流入負荷が大きく、終沈流出水の COD_{Cr} 値も高くなった。

表-2 3回の調査の水質

試料名	pH [-]	SS [mg/L]	T-COD _{Cr} [mgO ₂ /L]	S-COD _{Cr} [mgO ₂ /L]
流入原水	7.1~7.4	95.3~122	223~379	125~221
初沈流入水	7.1~7.2	95.3~153	238~456	126~245
初沈流出水	7.0~7.4	40.5~49.5	164~289	105~118
終沈流出水	6.6~6.9	6.1~7.3	16.3~44.9	7.0~21.3
生汚泥	5.4~6.8	3840~11400	-	-
余剰汚泥	6.4~6.8	4260~7120	-	-

3-2 下水処理過程でのエストロゲン類似物質の測定結果

図-4に下水処理場の

のエストロゲン類似物質の測定結果を示す。流入原水のBPAとNPの濃度は、それぞれ1600~3600ng/Lと2400~9000ng/Lであり、特に1月で濃度が高かった。E1とE2の濃度はそれぞれ77~120ng/Lと10~20ng/Lであり、E1はE2の6~8倍の濃度であった。各測定値ともに最初沈殿池通過後の濃度の低下は少なくむしろ増加しているデータもみられた。ただ、活性汚泥処理を経て最終沈殿池通過後に濃度が大きく低下した。この結果から、エストロゲン類似物質は主として2次処理系で除去されたと判断できる。なお、1月のYES試験結果と終沈流出水のE1とE2測定値は、測定データに不備があり、測定できていない。

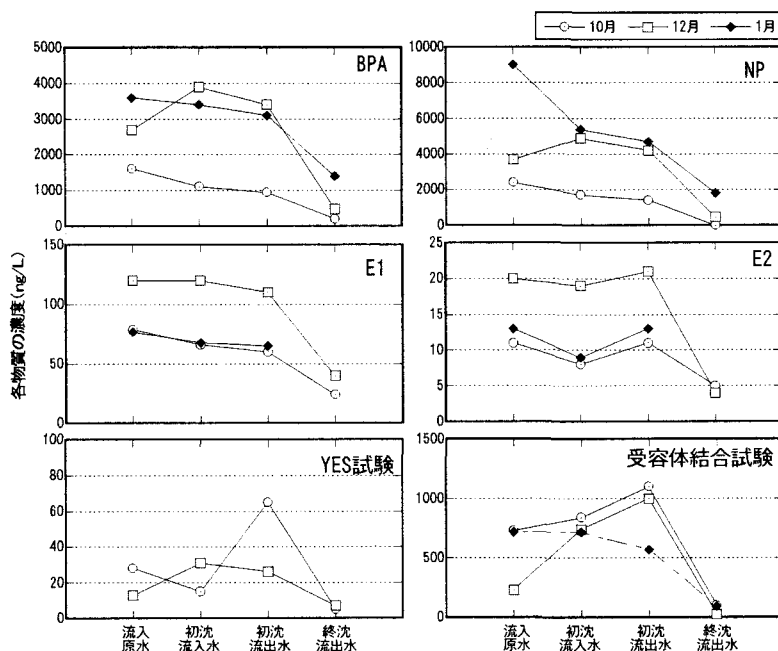


図-4 下水処理場におけるエストロゲン類似物質の測定結果

図-4に下水処理場の

3-3 エストロゲン受容体結合試験から求めたエストロゲン(E2)換算濃度の変化

図-5に受容体結合試験から求めた水試料中のE2換算濃度の測定結果を懸濁態と溶存態に分けて示す。水試料中のE2換算濃度の処理過程ごとの変化は図-4に示したとおりであるが、図-5に示したように受容体結合試験から求めたE2換算濃度は、懸濁態(1μm以上)に占める割合が試料と採水時期によって大きく異なり、0~70%であった。逆に汚泥試料では、99%以上が懸濁態に含まれていた。

表-3 に受容体結合試験から求めた E2 換算濃度の下水処理過程における負荷量を示す。上述のように、この下水処理場では約 7 万 m³/日の下水を処理しているが、3 回の調査では 15～54g/日のエストロゲン類似物質が流入していた。また、この処理場では濃縮と脱水による污泥処理施設を有しているが、污泥処理系からの返流水（濃縮槽上澄水や脱水ろ液など）の負荷と考えられる、流入原水と初沈流入水の負荷量の差は、2～37 g/日となり、流入原水としての負荷の 4～250% を占めることがわかった。また、初沈での除去率は負の値になることが多く、正確なデータを把握することができなかった。また、表-3 では表示していないが、生污泥として引き抜かれるエストロゲン類似物質量を計算すると、最初沈殿池に流入した値よりも遙かに高い値が得られた。これは前述したように、間欠的に引き抜かれている生污泥の濃度変化が大きく、それぞれの調査で 2 回ずつ測定したものの、引き抜き量を代表する値が得られなかったためであると考えられる。

また、活性污泥処理後の最終沈殿池から流出するエストロゲン類似物質量は 1.8～7.7 g/日となり、上述のように 2 次処理系で大きく除去された。2 次処理系での除去率は 81～98% と高く、最初沈殿池をあわせた処理プロセス全体の除去率は 86～88% であった。2 次処理系から余剰污泥として引き抜かれるエストロゲン類似物質量は、3.7～10 g/日であり、曝気槽に流入する負荷量の 5.7～10% とわずかであった。したがって、曝気槽に流入したエストロゲン類似物質のうち、71～92% が曝気槽で除去された。さらに、最終沈殿池から返

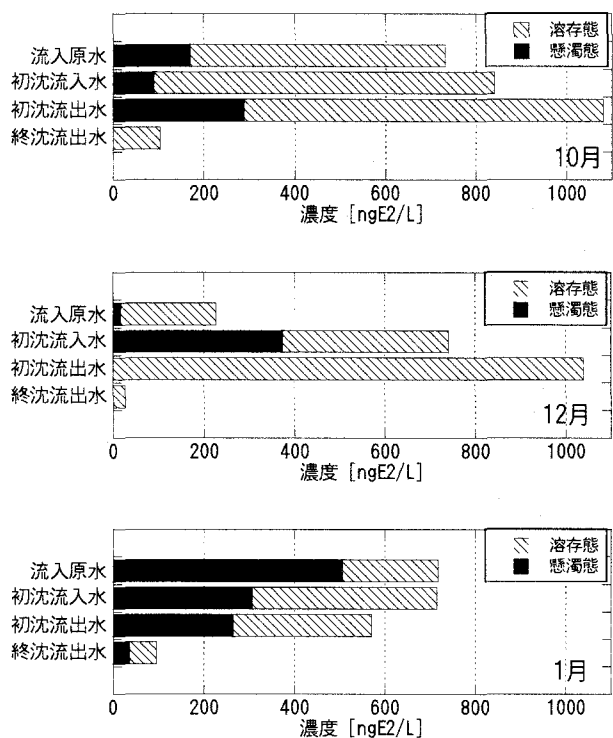


図-5 受容体結合試験による E2 換算濃度の測定結果

表-3 受容体結合試験から求めた E2 換算濃度の下水処理過程における負荷量

調査月日	10/7～8	12/7～8	1/19～20	備考
流入原水(g/日)	54	15	45	
初沈流入水(g/日)	64	52	47	
返流水(g/日)	10	37	2	初沈流入水と流入下水の差として算出
初沈流出水(g/日)	80	72	36	
初沈除去率(%)	-25	-38	23	初沈流入水を 100 とする
終沈流出水(g/日)	7.7	1.8	6.1	
2 次処理系除去率(%)	90	98	81	初沈流出水を 100 とする
余剰污泥(g/日)	10	41	3.7	
余剰污泥引抜率(%)	12	5.7	10	初沈流出水を 100 とする
返送污泥による循環量(g/日)	650	300	190	
全体の除去率(%)	86	88	86	流入原水を 100 とする

送汚泥として 2 次処理系を循環しているエストロゲン類似物質量は 190～650 g/日と多く、31～170 倍であることもわかった。

3-4 各分析方法による測定値の比較

図-6 に受容体結合試験と YES 試験から求めた E2 換算濃度を示す。図中では、BPA、NP、E1 の各々の測定値に、YES 試験により求めた各物質の E2 相対強度 (E2 の値を1とした際の各物質の相対強度) を掛け合わせ、各物質濃度を E2 換算濃度に換算して合計した値 (以下、積算値と略す) も表示した。ただし、既に述べたように 1 月の YES 試験の値は不備によって測定できなかったため、図-6 には表示していない。

YES 試験によって求められた E2 換算濃度を基準にしてデータを比較すると、YES 試験結果に対する BPA の割合は 0.03～0.43%と低く、NP の割合も BPA より高いものの 0.65～8.8%と全体的に低い値となった。この理由は、各試料とも BPA と NP は高い濃度で検出されたが、E2 相対強度が小さいために、各々の E2 換算濃度は小さくなったためと判断できる。

一方、YES 試験によって求められた E2 換算濃度に対する E1、E2 の割合は、それぞれ 11%～100%、17%～150%となり、YES 試験によって求められた E2 換算濃度の大半を E1 と E2 で占めることがわかった。特に 12 月の積算値は YES 試験の測定値を上回り、YES 試験によって求められた E2 換算濃度の 110～260%となった。

また、YES 試験結果の受容体結合試験結果に対する割合は 1.1～34%の範囲であり、1～2オーダーの違いがみられた。

4. まとめ

都市下水処理施設におけるエストロゲン類似物質の挙動を解明するため、下水処理施設における計 3 回の調査を実施し、受容体結合試験等を実施した。得られた結果を以下にまとめる。

- 1) 受容体結合試験から求めた E2 換算濃度は、最初沈殿池ではあまり低下せず、活性汚泥処理過程で大きく低下した。

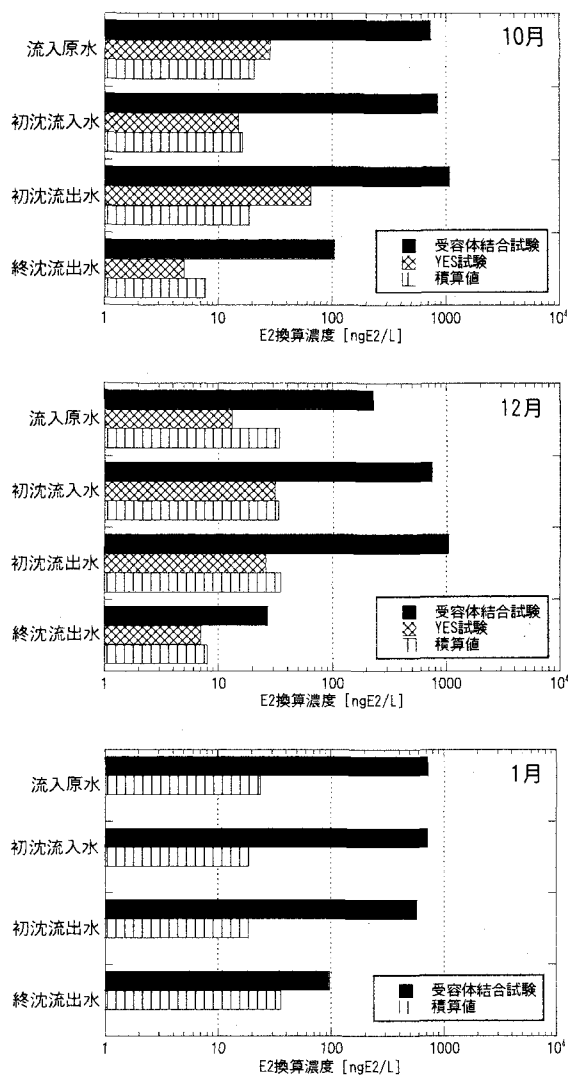


図-6 受容体結合試験、YES 試験による E2 換算濃度と積算値との比較

- 2) 受容体結合試験から求めた E2 換算濃度は、懸濁態(1 μ m 以上)に占める割合が 0~70%であり、試料と採水時期によって大きく異なった。汚泥試料では 99%以上が懸濁態として含まれていた。
- 3) 約 7 万 m³/日の下水処理施設では 15~54g/日のエストロゲン類似物質が流入していた。また、汚泥処理系からの返流水の負荷は、2~37 g/日で流入原水としての負荷の 4~250%を占めることがわかった。
- 4) 最終沈澱池から流出するエストロゲン類似物質量は 1.8~7.7 g/日で、処理プロセス全体の除去率は 86~88%であった。
- 5) 余剰汚泥として引き抜かれるエストロゲン類似物質量は 3.7~10 g/日であり、曝気槽に流入する負荷量の 5.7~10%とわずかであった。したがって、曝気槽に流入したエストロゲン類似物質のうち、71~92%が曝気槽で除去された。
- 6) 最終沈澱池から返送汚泥として 2 次処理系を循環しているエストロゲン類似物質量は 190~650 g/日と多く、最初沈澱池流出水としての負荷量の 31~170 倍であった。
- 7) YES 試験によって求められた E2 換算濃度の大半は E1 と E2であり、YES 試験結果の受容体結合試験結果に対する割合は 1.1~34%の範囲であった。

謝辞: 本研究を進めるにあたり、YES 試験の実施において大阪市立環境科学研究所の芳倉太郎氏と、大阪市立大学大学院生の辻本暁子氏にご協力いただいた。ここに記して謝意を表する。

【参考文献】

- 1) 井口泰泉:水環境と水生動物への内分泌攪乱物質の影響、水環境学会誌、Vol.22, No.8, pp.636-642, 1999.
- 2) 堀江信之:下水道における内分泌攪乱化学物質実態調査の概要、下水道協会誌、Vol.36, No.445, pp.21-25 1999.
- 3) 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、曾家義博、佐野友春、彼谷邦光、西原力、森田昌敏:酵母を用いたエストロゲン・アンタゴニストアッセイ系の開発と有機スズへの応用、環境化学、Vol.11, No.1, pp.65-73, 2001.
- 4) Joachim Payne, Nissanka Rajapakse, Megan Wilkins, and Andreas Kortenkamp: Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens, Environmental Health Perspectives, Vol.108, No.10, pp.983-987, 2000.
- 5) 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エストロゲンの測定、環境工学研究論文集、Vol.36, pp.199-208, 1999.
- 6) E. J. Routledge and J. P. Sumpter: Estrogenic Activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., Vol.15, pp.241-248 1996.
- 7) 白石不二雄、白石寛明、西川淳一、西原力、森田昌敏:酵母 Two-Hybrid System による簡便なエストロゲンアッセイ系の開発、環境化学、Vol.10, No.1, pp.57-64, 2000.
- 8) 劉 乃瑞、中西啓輔、中川直樹、貫上佳則:受容体結合試験による複合試料の総エストロゲン活性の評価、環境工学研究論文集、40, pp.617-625, 2003.
- 9) 下水試験方法—1997 年版—:(社)日本下水道協会、東京、1997.
- 10) Standard Methods 16th Edition : APHA, AWWA, WPCF, USA, 1985.
- 11) 下水試験方法(追補暫定版)—2002 年版—:(社)日本下水道協会、東京、2002.
- 12) Routledge EJ and Sumpter JP: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., 15, pp.241-248, 1996.
- 13) 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、1998.