

(41) おが屑担体を用いたし尿のコンポスト化過程 におけるエストロゲン類の挙動

伊藤 竜生*, 船水 尚行

北海道大学大学院工学研究科 (〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目)

* E-mail: ryuusei@eng.hokudai.ac.jp

エストロゲンを始めとする天然ホルモン類は、し尿中に含まれるため排出の規制が難しく、し尿処理で適切に処理されなければならない。し尿を好氣的にコンポスト化するトイレでの、コンポスト化過程におけるエストロゲン類の挙動については検討されていない。コンポスト中のエストロゲン抱合体の定量法を確立し、し尿のコンポスト化過程におけるエストロゲン類の挙動について検討を行なった。その結果、17 β -Estradiol と 17 β -Estradiol-17 β -D-Glucuronide は数日でそれぞれ Estron への酸化および脱抱合が起こった。分解速度が遅いといわれている 17 β -Estradiol-3Sulfatet は 10 日ほどで分解したが、17 β -Estradiol への脱抱合ではなく、別の生成物に変換された。Estron は室内実験において 15 日間では分解が見られなかったが、実機による長期間の使用では蓄積が観察されなかった。

Key Words : composting process, estrogenic compound, conjugate, pre-treatment, LC/MS/MS

1. はじめに

乾式コンポスト型トイレはおが屑槽にし尿を投入し、攪拌、加熱することにより好氣的にコンポスト化する装置である¹⁾。生成したコンポストは、物質循環の観点から、農地に還元することが望ましい。そのため、このコンポストは衛生的で、十分に有機物が安定化されていることが求められる^{2,3,4)}。このトイレは、水分の蒸発によるし尿の減容化⁵⁾、有機物の好氣的な生分解^{6,7)}、病原性微生物の不活性化する機能⁸⁾を備え、それらの機能が有効に稼働していることが実験的に証明されているおり、適切な運転条件が与えられている⁹⁾。

しかしながら、し尿には医薬品やその代謝産物およびホルモン類が含まれていることが知られており、これらの排出規制は不可能である。医薬品についてはコンポスト化過程において分解されるが、一部は分解に時間がかかることがわかっている。一方、ホルモン類については、し尿中にほとんどが抱合体として存在し、その内の 7~8 割がグルクロン酸抱合体で残りが硫酸抱合体であることが知られている¹⁰⁾。下水処理におい

て、Ternes らは活性汚泥中で 17 β -Estradiol-17 β -D-Glucuronide (E2-17G)の添加実験を行い、抱合体は 15 分程度で 17 β -Estradiol (E2)に脱抱合し、E2 は Estron (E1)に酸化され、E1 はこれら以外の別の物質に分解されたことを見いだした¹¹⁾。Zang らは 13C 同位体を用いた添加実験で 35%の C が CO₂まで酸化されたことを報告している¹²⁾。湖沼水においては、グルクロン酸抱合体は速やかに脱抱合し、E2→E1→分解生成物と酸化を受けるが、硫酸抱合体はほとんど脱抱合しないことが示されている。また、滅菌水では脱抱合および酸化が起こらないことから微生物による反応が主であることが報告されている¹³⁾。また、家畜し尿コンポストを農地に使用した場合にも、降雨時に E2 が検出されることが報告されている¹⁴⁾。しかしながら、おが屑単体を用いた好氣的なコンポスト化過程におけるエストロゲン類の挙動に関する報告例はない。また、環境水中での抱合体の定量が行われているが¹⁵⁾、コンポストのような夾雑物の多い系での抱合体の定量法についての知見はない。そこで本研究では、コンポスト中のエストロゲン類の抱合体の定量法を確立し、コンポスト化過程におけるエストロゲン類およびその抱

合体の挙動について検討を行った。

2. 実験方法

(1) コンポスト中のエストロゲン類の定量

エストロゲン類はLC/MS/MSを用いて内標準法により定量した。対象物質はフリー体のE1, E2および硫酸抱合体の17 β -Estradiol-3Sulfate (E2-3S)とした。内標準物質として各エストロゲンの重水素置換物質, E1-d4, E2-d3, E2-d4およびE2-d4-3Sを用いた。コンポスト中のエストロゲン類の定量は次のように行った。コンポストを1g採り、メタノール40mLで超音波抽出を行った。1500rpm, 10分遠心分離した後、上澄みを回収した。もう一度同様の抽出操作を行い、回収液を100mLにメスアップし抽出液とした。抽出液中には多くの夾雑物が含まれているため、固相抽出による前処理を行った。ここで、フリー体と抱合体は疎水性などの性質が異なるため、同一のサンプルについて2つの前処理を行った。それぞれの前処理を行ったサンプルをLC/MS/MSで定量した。それぞれの定量条件を表1, 2に示す。

表1 フリー体の測定条件

LC カラム	Agilent Extend-C183.5 μ m 4.6 $\times$ 150mm
カラム温度	30 $^{\circ}$ C
流速	0.2mL/min
移動相	AcCN:H ₂ O=4:1
グラジエント	なし
試料注入量	10 μ L
検出イオン	E2: 271.2/144.9 E2-d3: 274.0/146.8 E2-d4: 275.1/146.8 E1-d4: 273.0/144.8 E1: 269.1/144.9

表2 抱合体の測定条件

LC カラム	Agilent Extend-C183.5 μ m 4.6 $\times$ 150mm
カラム温度	30 $^{\circ}$ C
流速	0.2mL/min
移動相	100mM TEA/AcCN:H ₂ O=1:1
グラジエント	なし
試料注入量	10 μ L
検出イオン	E2-3S: 351.1/271.3 E2-d4-3S: 355.0/274.9 E2-d4: 275.1/146.8

a)フリー体の前処理

抽出液5mLを超純水で約500mLとし、内標準物質としてE1-d4, E2-d3をそれぞれ20ng投入し、ODS-C18カートリッジ(Agilent Technologies社製, AccuBOND II ODS C-18)に20mL/minで通水した。通水後、4:1酢酸エチル・メタノール液7mLで抽出し、溶媒を除去した後、残渣を酢酸エチル2mLで再溶解した。5%NaCl水溶液1mLを加え良く攪拌し、これを2度繰り返した。酢酸エチル層を無水硫酸カルシウムカートリッジに通し、水分を除去した後、溶媒を除去し、1:1ヘキサン・ジクロロメタン1mLに再溶解した。ケイ酸マグネシウムカートリッジ(Waters社製, Florisil)に通した後、1:1ヘキサン・ジクロロメタン10mLで洗浄し、5:95アセトン・ジクロロメタン7mLで抽出した。溶媒を除去し、100 μ g/LのE2-d4を含む1:1水・アセトニトリル200 μ Lで再溶解し、LC用サンプルとした。

b)抱合体の前処理

環境水中の抱合体前処理法¹⁵⁾を、pH3の100mM酢酸緩衝溶液を用いるよう改良した。具体的には、抽出液5mLをpH3の100mM酢酸緩衝溶液で約500mLとし、内標準物質としてE2-d4-3Sを20ng投入し、EDSカートリッジ(昭和電工社製, Autoprep EDS-1)に20mL/minで通水した。酢酸エチル10mLで洗浄した後、5mMトリエチルアミンメタノール溶液で抽出した。溶媒を除去し、100 μ g/LのE2-d4を含む1:1水・アセトニトリル200 μ Lで再溶解し、LC用サンプルとした。

(2) コンポスト化過程におけるエストロゲン類の分解実験

a)室内実験

コンポストは使用中のコンポスト型トイレから採取した。100g-dry(乾量基準)のコンポストに10g-dryの糞便を加えて攪拌し、含水率を50%に調整するための水とともに350~400 μ g/kg-dry compostとなるようエストロゲン類を加えよく攪拌した。これを円筒形反応容器に入れ、50mL/minの流量で空気を流して好氣的状態にし、所定の温度に保った。サンプリングした試料内のエストロゲン類の定量を行った。

b)実機による長期実験

実際に使用されているコンポスト型トイレでのエストロゲン類の挙動を調べるため、埼玉県秩父市の実証試験で用いているトイレ¹⁶⁾におけるコンポスト中のエストロゲン類を定量した。

3. 実験結果と考察

(1) エストロゲン類の定量

図1にLC/MS/MSにより得られた20 μ g/Lのエストロゲン類のチャートを示す. どのピークについても十分なS/N比が得られた. また, コンポストからの抽出液についてのチャートにも夾雑物と思われるピークが現れなかった. 図2に示す検量線から, 1 μ g/L程度の濃度までは濃度とピーク面積比の間に良好な直線関係が得られ, 定量限界はE1,E2においては0.5 μ g/L, E2-3Sについては1 μ g/Lであった. 今回確立した前処理により夾雑物を取り除くことでコンポストから抽出したサンプルでも定量が可能なが示された. なお, 今回の測定では回収率は80%以上であった.

(2) 添加実験

コンポスト化過程におけるE1の挙動を図3に示す. 反応温度に関わらずE1の分解速度は遅く, 15日間ではほとんど減少は見られなかった. 次にE2の挙動を図4に示す. どの反応温度においてもE2はほとんどが5日以内にE1に酸化されたが, E1の分解はほとんど見られなかった. そこで, E2の分解速度を次の式で示される一次反応モデルと仮定して反応初期における反応速度係数 k_{E2} (hour⁻¹)を求めた.

$$\frac{dC_{E2}}{dt} = -k_{E2}C_{E2} \quad (1)$$

ここで, C はコンポスト中におけるエストロゲン類の濃度(μ g/kg), t は反応時間(hour)である.

図4の実線で示すように, 全ての反応温度における反応初期でのE2濃度の減少は1次反応モデルで表されることがわかった. また, この反応系におけるアレニウスプロットを図5に示す. 反応温度が30~60 $^{\circ}$ Cの範囲において反応温度の逆数と反応速度反応定数の対数はほぼ直線関係を示した. このことから, 中温菌がE2の酸化に関与していると考えられる.

次に, エストロゲン活性の高い E2 の抱合体で排出量の多い E2-17G を添加した分解実験を反応温度 60 $^{\circ}$ Cで行なった結果を図6に示す. 反応初期にE2が増加し, ついで E1 が増加する傾向が見られた. E1 の濃度は最大で1日後の300 μ g/kg-dry 近くまで上昇しており, これは E2-17G の初期添加量 300 μ g/kg-dry に近い値である. 従って, 物質収支の観点から E2-17G が E1 に変換されていると考えられる. このことから, コンポスト化反応においてグルクロン酸抱合体は, 脱抱合に次いで E2 $\rightarrow$ E1 $\rightarrow$ 分解生成物という反応経路を辿ること

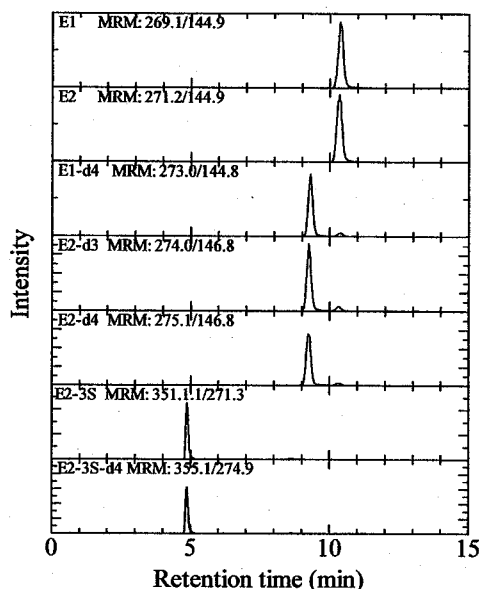


図1 エストロゲン類のクロマトグラム

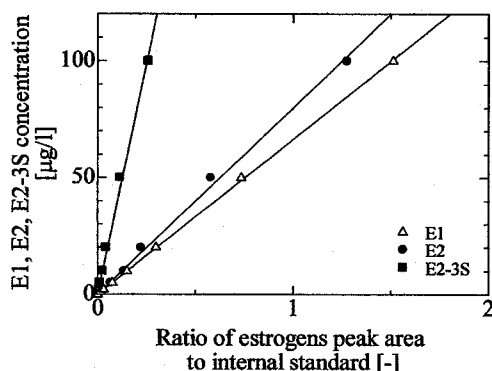
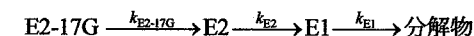


図2 各物質の検量線

が示唆された. 本実験では E2-17G 濃度の直接測定はできなかったため, 次式で表される反応経路において 1 次反応モデルで全ての反応が記述されると仮定して, 各成分の濃度変化シミュレーションを行った.



$$\begin{aligned} \frac{dC_{E2-17G}}{dt} &= -k_{E2-17G}C_{E2-17G} \\ \frac{dC_{E2}}{dt} &= -k_{E2}C_{E2} + k_{E2-17G}C_{E2-17G} \\ \frac{dC_{E1}}{dt} &= -k_{E1}C_{E1} + k_{E2}C_{E2} \end{aligned} \quad (2)$$

計算で求められた E1,E2 の濃度変化は実験結果を良く再現した. このことから, 本シミュレーションによりこの反応系は, 式(2)で記述される反応経路で E2-17G が分解されていくと推察される. その結果, 図 6-b に示さ

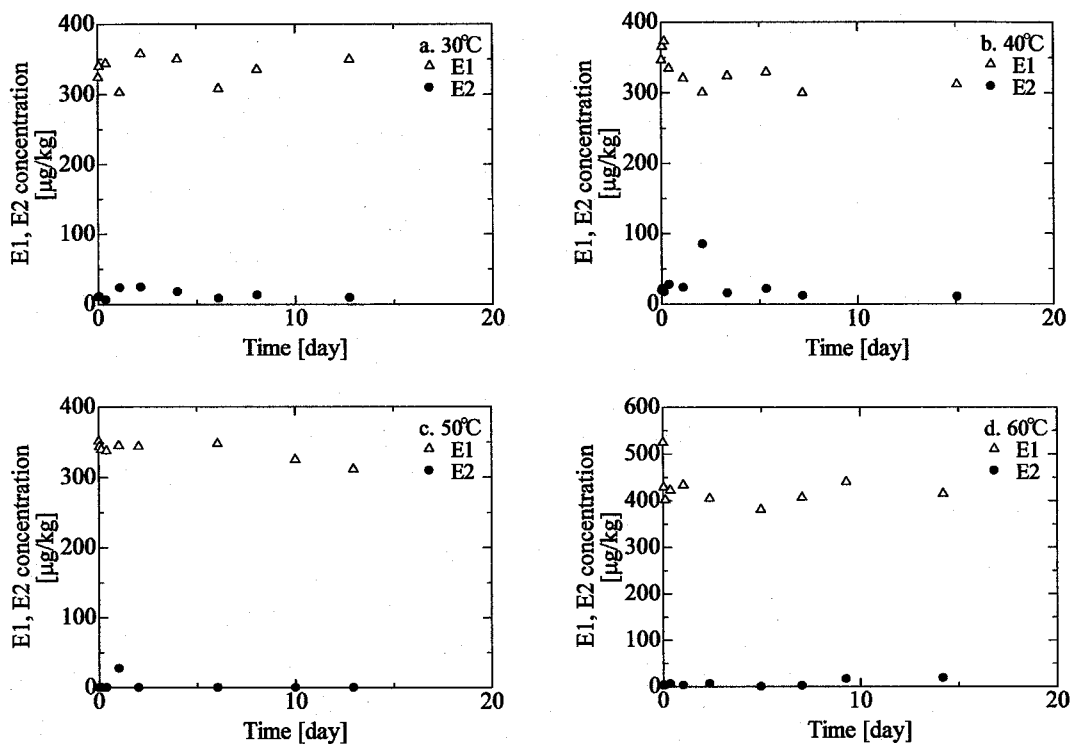


図 3 E1 添加実験

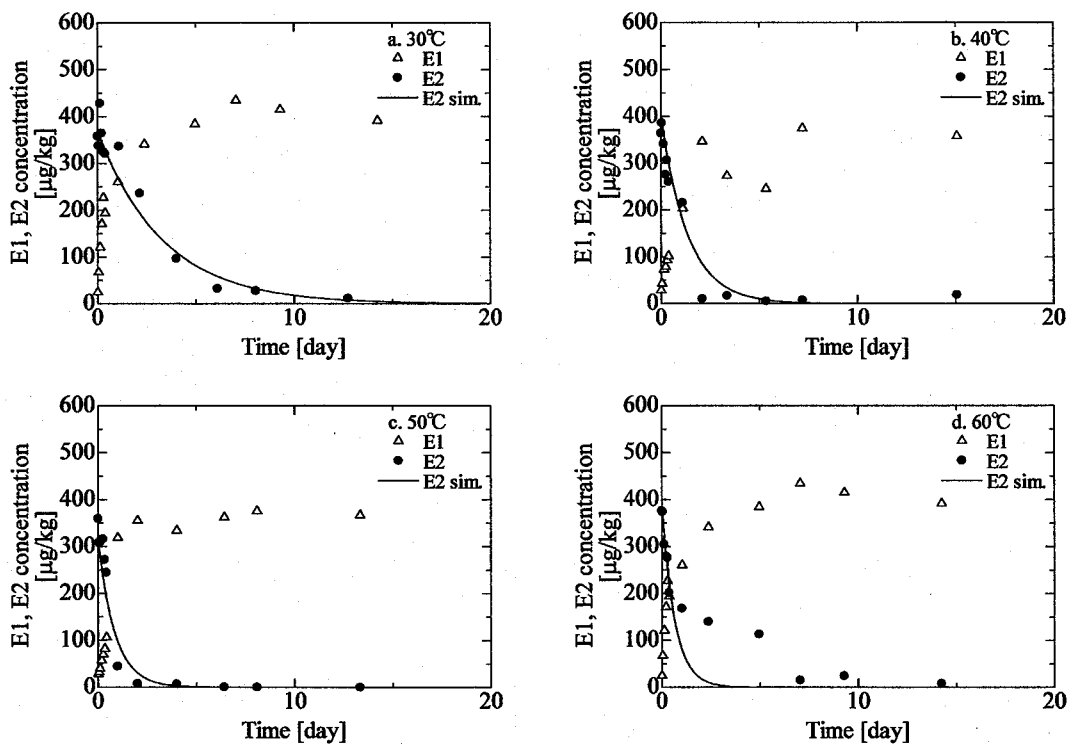


図 4 E2 添加実験

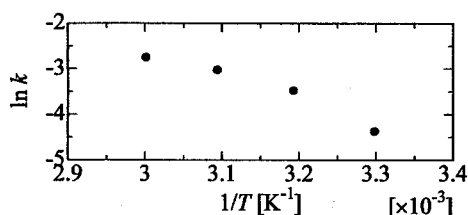


図5 E2の分解におけるアレニウスプロット

れるように E2-17G は 1 日程度で速やかに分解され、それに伴い E2 が生成し、また分解され E1 になっていくことがわかった。しかし、この系については図 4 に示す反応速度より 10 倍程度速く、E1 の分解が見られたことから、反応に関わる菌が異なっていることが推察されるが、原因は検討中である。

また、比較的分解が遅いといわれている硫酸抱合体として E2-3S を添加した実験の結果を図 7 に示す。いずれの反応温度でも抱合体の濃度は 10 日ほどで減少したが、E1, E2 の濃度は増加しなかった。E2-3S の分解を 1 次反応と仮定すると、E2-3G の濃度変化は図 7 の実線のように表され、それらの反応速度定数は、40℃で 0.105 hour^{-1} 、60℃で 0.103 hour^{-1} と E2 の分解に比べて温度の影響をあまり受けていないことがわかった。から E2 や E2-17G とは異なった反応経路である

ことが推測される。このことから、硫酸抱合体は脱抱合せずに直接別の物質に変換されたことが示唆されるが、その生成物の特定には至っていない。

(3) 実機におけるエストロゲン類の挙動

実際に使用しているコンポスト型トイレにおけるエストロゲン類の挙動を図 9 に示す。その結果、E1, E2 および E2-3S の蓄積は見られなかった。したがって、E2 および E2-3S は良好に分解されたと考えられる。E1 についても 2 人の男女が毎日使用したとすると、E1, E2 の排泄量はそれぞれ男性で $1.6 \mu\text{g/day}$ および $3.9 \mu\text{g/day}$ 、女性で $2.3 \mu\text{g/day}$ および $4 \mu\text{g/day}$ である結果が報告されており¹⁷⁻¹⁹、この 80% がグルクロン酸抱合体であるとして²⁰、図 9 の破線のように長期間の運転では E1 の蓄積が見られるはずであるが、実際には見られない。長期間における運転では E1 も分解されると考えられるが、その理由については今後の検討課題である。

4. 結論

おが屑単体を用いたコンポスト型トイレ中でのコンポスト化過程におけるエストロゲン類の挙動について

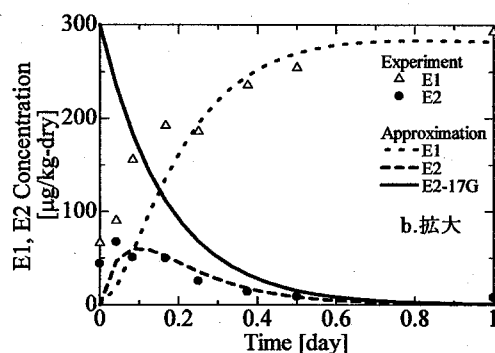
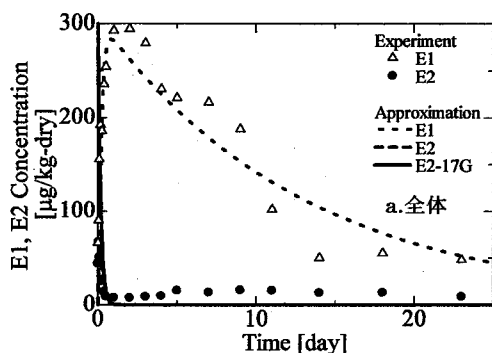


図6 E2-17G 添加実験

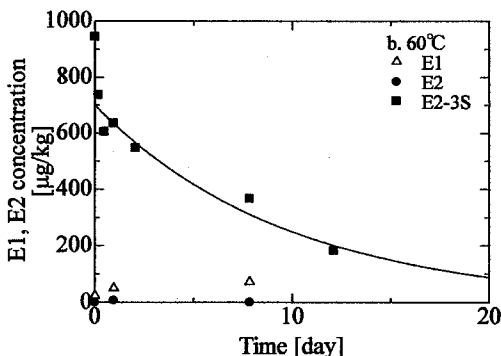
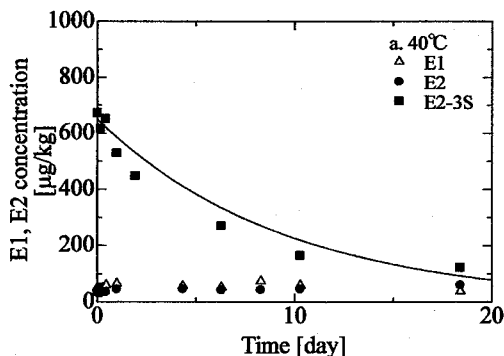


図7 E2-3S 添加実験

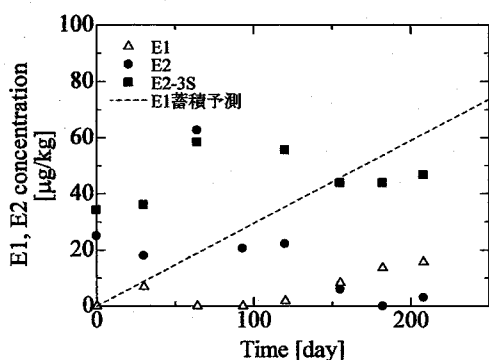


図8 実機におけるエストロゲン類の挙動

検討を行った。その結果、コンポスト中のエストロゲン類の定量を行うための前処理方法を確立できた。E2およびそのグルクロン酸抱合体は数日で酸化または脱抱合することがわかった。硫酸抱合体は10日程度でほとんどが酸化され、脱抱合せずに別の物質に変換されていることが示唆された。E1は分解速度が遅いが、実機における長期間の運転では蓄積は見られなかった。

参考文献

- 1) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T. 2002b. Onsite wastewater deffential treatment system: modeling approach. Water Science and Technology. 46, 317-324.
- 2) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T. 2002a. Characterization of faeces for describing the aerobic biodgradation of faeces. J. Environ. Syst. and Eng., JSCE. 720, 99-105.
- 3) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T. 2005a. Biological activity in the composting reactor of the bio-toilet system. Bioresource Technology. 96, 805-812
- 4) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T. 2005b. Effect of moisture on the composting process in the bio-toilet system. Compost Science & Utilization. 13, 208-216.
- 5) 伊藤竜生, 小川慎吾, 船水尚行, 2006, おがくずマトリックスの乾式コンポスト型トイレにおける乾燥特性, 環境工学研究論文集, 43, 437-442
- 6) Narita, H., Lopez Zavala, M.A., Iwai, K., Ito, R., Funamizu, N. 2005. Transformation and characterization of dissolved organic matter during the thermophilic aerobic biodegradation of faeces. Water Research. 39, 4693-4794.
- 7) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., Takakuwa, T.

2004. Temperature effect on aerobic biodegradation of faeces using sawdust as a matrix. Water Research. 38, 2406-2416.

8) Nakata, S., Lopez, M.A., Funamizu, N., Otaki, M., Takakuwa, T. 2002. Temperature effect on pathogens decline in the Bio-toilet system. Proceedings of 1st International Dry toilet conference Tampere.

9) Lopez Zavala, M.A., Funamizu, N., 2006. Design and operation of the bio-toilet system. Water Science and Technology. 53, 55-61.

10) Guang-Guo Ying, Rai S. Kookana, Ying-Jun Ru : Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. Environmental International 28 (2001) 545-551

11) T.A.Ternes : Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II. Aerobic batch experiments with activated sludge. The Science of the Total Environment(1999)91-99.

12) K.Zang, F.Kurusu, H.Furumai and O.Yagi: In situ phylogenetic diversity study of estrone degrading microbial community in activated sludge using microautoradiography-fluorescent in situ hybridization, Proceedings of the 4th International Symposium on Southeast Asian Water Environment, pp.67-74.

13) 独立行政法人国立環境研究所:環境ホルモンの新たな計測手法の開発と環境動態に関する研究(平成11年~13年)

14) A. R. Dyer et al: Determination of 17 β -estradiol Concentrations in Runoff from Plots Receiving Dairy Manure. An ASAE Meeting Presentation Paper Number: 01-2107.

15) T. Isobe et al. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 984; 2003: 195-202

16) Ito, R., Fukuda, M., Itayama, T., Kiji, M., Yokota, M., Funamizu, N. 2005. A pilot plant of the onsite wastewater differentiable treatment system in Chichibu city, Japan. Proceedings of the 9th International Conference ECOSAN INDIA, 214-220.

17) Fotsis, T. and Adlercreutz, H.: The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GCMS-I. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates. J Steroid Biochem 28;1987: 203-213.

18) Dao, T.L., Morreal, C. and Nemoto, T., 1973. Urinary estrogen excretion in men with breast cancer.

New Engl J Med 289, pp. 138-140

19) Key, T.J.A., Pike, M.C., Brown, J.B., Hermon, C., Allen, D.S. and Wang, D.Y., 1996. Cigarette smoking and urinary oestrogen excretion in premenopausal and post-menopausal women. Br J Cancer 74, pp. 1313-1316

20) D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage

transport and treatment facilities (2003) Science of the Total Environment, 302(1-3), pp.199-209.

(2007. 5. 25 受付)

Fate of Estrogenic Compounds during Composting Process of Feces with Sawdust Matrix

Ryusei Ito, Naoyuki Funamizu

Graduate school of engineering, Hokkaido university

Natural hormones, such as estrogenic compounds, are too hard to control, because they are contained in human waste, resulting in requirement of appropriate treatment. However, there is less information about fate of them in composting process of human feces with sawdust matrix. On the other hand, there is no experience to measure the conjugate form of estrogenic compounds, which is discharged from human, in compost containing much contaminant. The aims of this paper are to establish the method to evaluate estrogenic compounds including conjugate in compost and to investigate the fate of estrogenic compounds during composting process. As a result, 17β -Estradiol, this has highest estrogenic activities, and 17β -Estradiol- 17β -D-Glucuronide, this is a kind of glucuronic conjugate, were oxidized to Estron and deconjugated to 17β -Estradiol in few days. 17β -Estradiol-3Sulfate was degraded unknown substance. Estron was biodegraded little, because of no accumulation in long term operation.