

## B-39 下水中のPPCPsを対象とした バイオアッセイによる水質評価に関する研究

○村山 康樹<sup>1\*</sup>・原田 新<sup>2</sup>・小森 行也<sup>1</sup>・鈴木 穰<sup>3</sup>・南山 瑞彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>独立行政法人土木研究所水環境研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6）

<sup>2</sup>元 独立行政法人土木研究所水環境研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6）

<sup>3</sup>独立行政法人土木研究所材料地盤研究グループ（〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6）

\* E-mail: murayama@pwri.go.jp

### 1. はじめに

近年、医薬品類や化粧品などの日常的に利用される化学物質（Pharmaceuticals and Personal Care Products；PPCPs）による水環境汚染が懸念されている。水環境におけるPPCPsの存在実態や環境中挙動については、分析技術の進歩と共に研究が進められてきた。これまでに、国内、海外において100種類以上のPPCPsの検出が報告されており、また、水環境に対する主要な排出経路である下水処理場での挙動についても情報が蓄積されつつある。一方で、PPCPsは様々な生理活性を有することから、水生生物に対する影響が懸念されるが、その生態リスクに関する知見は、これまで十分に得られていない。

本研究では、流入下水及び下水処理水を対象に、バイオアッセイに基づく生態毒性評価と併せて、PPCPsの定量分析に基づくハザード比の算出を行なうことで、水生生態系に対するPPCPsのリスク評価と、下水処理によるリスク低減に関する検討を試みた。

### 2. 方法

#### (1) 調査概要

本研究では、標準活性汚泥法のパイロットプラント（反応槽容量10m<sup>3</sup>）を用いて、調査を実施した。プラントの流入水と処理水について、平成21年6月～11月の各月に1回、計6回の採水を行った。試料の採水は、スポット採水によった。試料は、採水後直ちにアスコルビン酸とEDTA-2Naをそれぞれ1g/Lとなる様添加した後、試験室に持ち帰り、4℃で保管した。

#### (2) 一般水質項目の分析

調査時の水質、水処理状況を把握するため、溶解性有機炭素（DOC）、全窒素（T-N）、アンモニア態窒素（NH<sub>4</sub>-N）、硝酸態窒素（NO<sub>3</sub>-N）、全りん（T-P）などの項目について、下水試験方法に記載の方法、又はそれに準じた方法により測定を行った。

#### (3) バイオアッセイによる生態毒性試験

##### a) 前処理

わが国の環境水では、急性毒性が比較的小さい場合が多く、そのままの状態では生態毒性を検出、評価することが困難である。本研究で用いた試料についても、濃縮操作を行わない場合、明確な影響が見られなかった。

そこで本研究では、PPCPsなどの有機物質に由来する毒性に注目し、吸着樹脂を用いた固相抽出・濃縮法により試料中の有機物質などを濃縮した後、バイオアッセイに供する手法を適用した。ガラス繊維ろ紙（Whatman GF/B）で濾過した試料（流入水500mL、処理水1000mL）を、固相カートリッジ（Waters OASIS-HLB 6cc/200mg）に通水した後、メタノールで溶出した画分を乾固し、100μLのジメチルスルホキシド（DMSO）に転溶することで、分画、濃縮試料（濃縮倍率10,000倍）を得た。

##### b) 藻類生長阻害試験

本研究では、生態毒性試験として、淡水性の単細胞緑藻*Pseudokirchneriella subcapitata*（NIES-35株）を供試生物とする藻類生長阻害試験を実施した。試験操作を簡便化するため、既存の報告<sup>1)</sup>を参考に、96ウェルマイクロプレート培養容器とする手法を適用した。

最大ばく露濃度を、流入水では4.2倍（DMSO濃度0.042%）、処理水では4.2倍（DMSO濃度0.42%）にそれぞ

れ設定した段階希釈系列（公比2）中で、初期細胞濃度10,000cells/mL、温度24℃、照度4000Lux、24時間明周期、振とう速度120rpmの条件下、96時間ばく露を行った。ばく露期間中は、24時間毎にマイクロプレートリーダー（Perkin Elmer社、ARVO SX-1420）を用いて吸光度（450nm）を測定し、検量線を用いて細胞濃度に換算した。日本環境毒性学会が公開しているEcoTox-Statics Ver.2.6dを用い、72時間の生長速度とばく露濃度の関係から、半数影響濃度（EC<sub>50</sub>）を求めた。さらに、EC<sub>50</sub>の逆数を取り、毒性単位TU<sub>algae</sub>を算出した（TU<sub>algae</sub>=1/EC<sub>50</sub>）。

#### (4) PPCPsの定量分析とハザード比の算出

##### a) PPCPsの分析

本研究では、水生生物に対する急性毒性に基づくリスク評価を行うこととし、試料中のPPCPsの溶存態成分を分析対象とした。GC-MS法（宝輪ら<sup>3</sup>の方法を参考に一部改変）によりthymol、triclosanの2物質、LC-MS/MS法（小西ら<sup>3</sup>の方法を参考に一部改変）により92物質<sup>4</sup>、計94物質を定量分析した。これらは、これまで検出例が報告されているPPCPsを中心に選定したもので、鎮痛消炎剤、神経系用剤、抗生物質などが含まれている。

##### b) ハザード比の算出

上記のPPCPs 94物質中65物質については、(3)のb)と同様にマイクロプレート培養容器とした藻類生長阻害試験により、*P. subcapitata*に対する毒性値が報告されている<sup>5,6</sup>。本研究では、EC<sub>50</sub>の値を毒性値として用いてハザード比を算出し、各試料中の医薬品類による生態リスクの指標とした。EC<sub>50</sub>が報告されているPPCPsについて、各試料中の濃度（MEC）とEC<sub>50</sub>の比から、藻類に対する生態毒性のハザード比HQ<sub>algae</sub>（HQ<sub>algae</sub>=MEC/EC<sub>50</sub>）を算出した。試料中の濃度が定量下限値未満であった場合には定量下限値をMECとみなした。また、同一物質について複数の報告がある場合はその最小値を、EC<sub>50</sub>値が範囲で報告されている場合はその下限値を用いて、計算した。

さらに、個々の物質について算出したHQ<sub>algae</sub>をもとに、各試料中におけるPPCPs全体としての藻類に対する生態リスクについて検討した。PPCPsの藻類に対する複合影響の機構は明らかでないことから、本研究では毒性の相加性を仮定し、対象物質全体としての生態リスクの指標として、各物質のHQ<sub>algae</sub>の合計（Σ(HQ<sub>algae</sub>））を算出した。

### 3. 結果と考察

#### (1) 水質一般項目の分析結果

水質一般項目の分析結果を表-1に示す。流入水では、前日に約50mmの降雨があった10月調査時に、窒素、りん等の濃度低下があった以外は大きな変動は見られなかった。これに対して処理水では、7月、9月の2回とその

表-1 水質一般項目の分析結果 (mg/L)

|      |       | DOC | T-N | NH <sub>4</sub> -N | NO <sub>3</sub> -N | T-P |
|------|-------|-----|-----|--------------------|--------------------|-----|
| Jun. | Inf.  | 33  | 38  | 22                 | <0.1               | 4.6 |
|      | Effl. | 4.8 | 11  | 0.2                | 11                 | 1.4 |
| Jul. | Inf.  | -   | 35  | 20                 | <0.1               | 4.1 |
|      | Effl. | -   | 24  | 21                 | <0.1               | 1.2 |
| Aug. | Inf.  | 43  | 41  | 23                 | <0.1               | 4.4 |
|      | Effl. | 5.9 | 14  | 1.0                | 11.0               | 1.6 |
| Sep. | Inf.  | 41  | 52  | 35                 | <0.1               | 4.9 |
|      | Effl. | 8.5 | 23  | 18                 | 3.3                | 0.9 |
| Oct. | Inf.  | 46  | 24  | 11                 | <0.1               | 2.6 |
|      | Effl. | 5.5 | 12  | 0.1                | 11                 | 1.5 |
| Nov. | Inf.  | 29  | 38  | 23                 | <0.1               | 4.2 |
|      | Effl. | 4.9 | 11  | 0.1                | 8.6                | 1.5 |
| Ave. | Inf.  | 38  | 38  | 22                 | <0.1               | 4.1 |
|      | Effl. | 5.9 | 16  | 6.7                | 7.5                | 1.4 |

\* DOC of Jul. sample was not analysed.

表-2 藻類生長阻害試験結果 (TU<sub>algae</sub>)

|       | Jun.  | Jul.  | Aug.  | Sep.  | Oct.  | Nov.  | Ave.  |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Inf.  | 1.22  | 0.56  | 1.35  | 0.77  | 0.77  | 0.59  | 0.88  |
| Effl. | 0.056 | 0.032 | 0.050 | 0.022 | 0.043 | 0.042 | 0.041 |

他の回とで、水質に大きな差が見られた。7月、9月は、T-N、NH<sub>4</sub>-Nの濃度が高い一方でNO<sub>3</sub>-Nの濃度が低く、硝化が進行していない状況であった。

#### (2) 藻類生長阻害試験の結果

流入水、処理水について、藻類生長阻害試験により毒性単位TU<sub>algae</sub>を算出した結果を、表-2に示す。各試料のTU<sub>algae</sub>は、流入水では0.56～1.35（平均0.88）、処理水では0.02～0.06（平均0.04）であった。スポット採水による試料であることに留意が必要であるが、得られた結果を用いて簡易的に除去率を計算すると、93～97%（平均95%）となる。流入下水による藻類への生態毒性のうち、本研究で使用した固相抽出法により回収される成分（主に有機物質）に由来する毒性は、活性汚泥処理によって低減されていたことが確認された。

#### (3) 試料中のPPCPsに由来する生態リスク

本調査で分析対象としたPPCPs類94物質のうち72物質（流入水からは59物質、処理水からは65物質）が、以上の試料において定量下限値濃度で検出され、その濃度は、概ね0.1ng/L～10μg/Lの範囲であった。この中には、EC<sub>50</sub>が報告されている65物質中、58物質が含まれている。

この58物質を対象に、試料中濃度を基に算出した各試料のΣ(HQ<sub>algae</sub>)、及びΣ(HQ<sub>algae</sub>)に対する寄与が大きいPPCPsの上位3物質を、表-3、図-1に示す。各試料のΣ(HQ<sub>algae</sub>)は、流入水で0.061～0.090（平均値0.070）、処理水で0.033～0.052（平均値0.044）であった。(2)と同様に除去率を計算すると、17～51%（平均36%）となり、PPCPsによる藻類への生態リスクは活性汚泥処理により低減されていた。

表-3  $\Sigma(HQ_{alga})$ と寄与率の上位3物質

|      |       | $\Sigma(HQ_{alga})$ | 寄与率 |     |      |
|------|-------|---------------------|-----|-----|------|
|      |       |                     | 1位  | 2位  | 3位   |
| Jun. | Inf.  | 0.061               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.033               | TCS | CAM | AZM  |
| Jul. | Inf.  | 0.062               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.049               | CAM | TCS | KPF  |
| Aug. | Inf.  | 0.090               | TCS | CAM | LVFX |
|      | Effl. | 0.044               | CAM | TCS | AZM  |
| Sep. | Inf.  | 0.065               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.038               | CAM | TCS | KPF  |
| Oct. | Inf.  | 0.083               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.048               | TCS | CAM | AZM  |
| Nov. | Inf.  | 0.062               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.052               | TCS | CAM | AZM  |
| Ave. | Inf.  | 0.070               | TCS | CAM | AZM  |
|      | Effl. | 0.044               | TCS | CAM | AZM  |

\* LVFXはlevofloxacin, KPFはketoprofen

一方、 $\Sigma(HQ_{alga})$ に対する各PPCPsの寄与率では、12試料全てにおいて、殺菌剤triclosan (TCS)と抗生物質clarithromycin (CAM)の2物質が上位2位となっており、この2物質で $\Sigma(HQ_{alga})$ の約95%を占めていた。12試料中9試料において3位の抗生物質Azithromycin (AZM)も含め、下水による藻類への生態毒性の観点からは、抗菌、殺菌作用を有する物質の重要度が高いと考えられる。

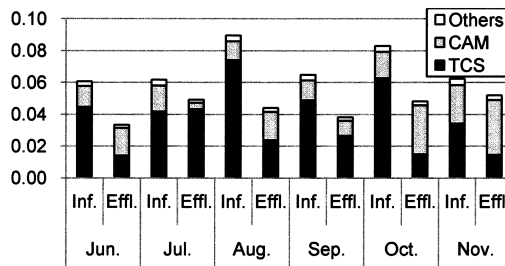
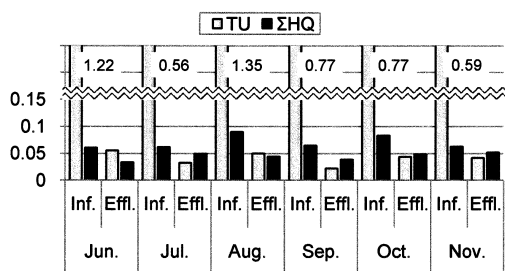
なお、TCS、CAMの処理前後での濃度変化は、TCSは7月(除去率4%)を除くと、46~76%と比較的高い除去率を示したのに対し、CAMは逆に、7月(除去率76%)を除くと除去率-86~24%とほとんど除去されないか、あるいは処理水中の濃度の方が高かった。このため、7月以外の調査回における $\Sigma(HQ_{alga})$ の減少は、その殆どがTCSの除去によるものとなっている。7月の挙動が他の調査回と異なった要因は把握できていないが、硝化の状況と何らかの関連がある可能性も考えられる。

#### (4) 毒性単位 $TU_{alga}$ とハザード比の和 $\Sigma(HQ_{alga})$ の比較

藻類に対する毒性単位 $TU_{alga}$ と、PPCPs 58物質のハザード比の和 $\Sigma(HQ_{alga})$ との比較を、図-2に示す。(2)及び(3)で述べた様に、 $TU_{alga}$ と $\Sigma(HQ_{alga})$ は、ともに流入水に比べて処理水の値が低くなっているが、 $TU_{alga}$ に比べて、 $\Sigma(HQ_{alga})$ の除去率は小さかった。その結果、 $TU_{alga}$ に対する $\Sigma(HQ_{alga})$ の比率は、流入水では5~11% (平均9%)であるのに対し、処理水では60~172% (平均118%)と、大きくなっている。このことから、標準活性汚泥法による処理水においては、藻類に対する生態毒性に占めるPPCPsの影響の寄与が大きい可能性が示された。

#### 4. まとめ

本研究では、藻類に対する影響に注目し、パイロットプラントの流入水及び処理水を対象として、パイオアッセイに基づく生態毒性評価と、定量分析に基づくハザード比の算出を併せて行い、それらを比較することで、

図-1 各試料の $\Sigma(HQ_{alga})$ とTCS及びCAMの寄与図-2 毒性単位 $TU_{alga}$ とハザード比の和 $\Sigma(HQ_{alga})$ の比較

PPCPsのリスクに関する検討を行った。その結果、標準活性汚泥法により流入水の藻類に対する生態毒性は低減されるが、PPCPsによるリスクの低減率は相対的に小さく、処理水においてはPPCPsによる影響の寄与が高くなっている可能性が示された。特に、TriclosanやClarithromycinなど、抗菌、殺菌作用を有するPPCPsの重要性が高いと考えられることから、今後、これらの物質の下水道や水環境中における実態、挙動に関する知見の、より一層の充実が必要である。また、藻類以外の種も含め、水生生物に対するPPCPsの作用機序の解明や、複合影響の評価手法に関する検討が望まれる。

#### 参考文献

- 1) Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H.: Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms, *Wat. Sci. Technol.*, **53**(11), pp.65-72, 2006.
- 2) 宝輪勲, 宮崎沙頼, 中田典秀, 小森行也, 田中宏明: GC-MSによる環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討, 第16回環境化学討論会講演要旨集, pp.774-775, 2007
- 3) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 環境工学研究論文集, Vol. **43**, pp.73-82, 2006.
- 4) 独立行政法人土木研究所: 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.101-114, 土木研究所資料No.4157, 2009.
- 5) 福永彩, 山下尚之, 田中宏明: 藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価, 環境工学研究論文集, Vol. **43**, 57-63, 2006.
- 6) 独立行政法人土木研究所: 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp.131-143, 土木研究所資料No.4157, 2009.