

河床付着生物による水中の 内分泌攪乱化学物質の除去に関する研究

REMOVAL OF ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS IN WATER BY PERIPHYTON ON RIVER BEDS

大澤秀一¹・池田駿介²
Shuichi OSAWA and Syunsuke IKEDA

¹正会員 株式会社建設技術研究所 (〒330-0071 埼玉県さいたま市浦和区上木崎一丁目14-6)

²フェロー会員 工博 東京工業大学 大学院理工学研究科土木工学専攻 (〒152-8552 東京都目黒区大岡山二丁目12-1)

In recent years, endocrine disrupting chemicals (EDCs) were found in river water. There is a possibility that EDCs can damage the health of human and other livings. Hence, EDCs should be removed from river water. In order to remove hazardous chemical substances from environments, it is available to use ability of organisms such as plants or microbes to accumulate, degrade or transform chemical substances. In this study, an ability of periphyton, which consists of algae and microbes on river beds, to remove BPA and E2 from river water was studied by laboratory experiments and field observations in an existing river, and a model was proposed to predeict the ability of removal based on these studies.

Key Words : *Periphyton, Endocrine disrupting chemicals, Bisphenol A, 17 β -estradiol, Laboratory test*

1. はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質（英名：Endocrine Disrupting Chemicals 以下EDCs）が河川水中から検出されている。EDCsは人やその他の生物の内分泌作用を攪乱し、その健康に対して悪影響を及ぼすおそれのある物質である。これまでの調査では、メダカに対して一般環境中の濃度に比較的近い濃度で内分泌かく乱作用を有する事が推察される物質が見つかった¹⁾。このような背景から、河川水中からのEDCsの除去が望まれる。環境中の有害化学物質を除去する方法の一つとして、植物や微生物といった生物が有する、物質を分解したり体内に蓄積したりする能力の利用が挙げられる。この方法を用いた場合、生物を利用するため、費用や環境負荷を低く抑えられる事が期待される。

河川には、藻類や微生物からなる河床付着生物が存在する。この付着生物を構成する生物の中には、EDCsを分解あるいは、蓄積、変換する能力を有するものが存在する事が明らかになっている^{2,3)}。そこで、本研究では、河川水中からのEDCs除去に対する河床付着生物の利用可能性に関する知見を得る事を目的とし、河床付着生物によるEDCs除去効果について調査、検討した。本研究

は、ピーカー実験及び現地調査から成る。ピーカー実験は、付着生物によるEDCs除去に対して、光の有無や付着生物量、水温の変化が与える影響について調査する事を目的とした。現地調査は、実河川における水中のEDCs濃度や付着生物によるEDCs除去効果についてのデータを得る事を目的とした。

2. ピーカー実験

(1) 分析対象物質及び分析方法

本研究において分析対象としたEDCsはBisphenol A (以下BPA) と17 β -estradiol (以下E2) である。

BPAに関しては、メダカに対する内分泌攪乱作用について報告がなされている^{1,4)}。E2は、天然女性ホルモンの1種であり、女性ホルモン作用強度はBPAの200倍以上であるという調査結果が報告されている⁵⁾。

実験では、環境庁が作成したマニュアル^{6,7)}を参考に、これらの物質の水中の濃度を固相抽出、メチル誘導体化をした後、GC/MS法により測定した。測定は、1サンプルにつき2回行い、その平均値を測定値として採用した。測定の際、17 β -estradiol-2,4,16,16-d₄、Bisphenol A-d₁₆をサロゲート物質として使用した。

(2) 実験装置及び実験方法

本実験では、BPA及びE2を溶質とする水溶液が入ったピーカーを用意した。そして、このピーカー内の水溶液に付着生物を添加し、BPAとE2の濃度の時間変化を調べるといふ実験を行った。BPAとE2の初期濃度は、 $100\mu\text{g/L}$ である。水溶液の溶媒としては、現地調査を行った丸子川で採水した河川水を濾過、滅菌して用いた。添加した付着生物は、丸子川で採取したものである。実験中の水温は一定に保ち、照明を使って光の有無の条件を与えた。なお、添加した付着生物には、肉眼でも確認できるほど大型の糸状藻類が含まれていて、その他にも微小な藻類、生物が含まれている事が顕微鏡で観察された。

実験は、Sample 1～12までの12個のサンプルについて行われた。各サンプルの水溶液量は0.5Lである。Sample 1～6の溶媒に用いた河川水は、Sample 7～12で用いたものと採水した日が異なる。付着生物についても、Sample 1～6で用いたものとSample 7～12で用いたものとは、採取日・採取地点が異なる。Sample 1～12の実験条件はTable 1に示す通りである。なお、溶媒（河川水）の滅菌処理は、オートクレーブ処理（ 120°C で30分間）を用いて行われた。光を与える際に用いた照明の照度は、約15kluxである。日中の直射日光下の照度を測定したところ、20kluxを超えていたため、本実験で用いた照明は、日中の実河川での照度よりも小さい。一方で、既往の研究では、2種類の付着藻類について水温 20°C の条件下における増殖限界照度について調査されており、それぞれの付着藻類の増殖限界照度は283lux、881luxと報告されている⁸⁾。これらの値は、本実験で与えられた光の照度の10分の1以下である。この事より、本実験で与えられた光は、付着生物中の藻類がその活動を活性化させるには十分な照度を有していたと考えられる。

(3) 結果及び考察

実験の結果をFig 1及びFig 2に示す。

a) 付着生物によるBPA及びE2の除去

Fig 1及びFig 2より、付着生物が添加されたSample 1～3及びSample 7～9に関しては、BPAとE2の濃度が時間の経過とともに減少している事がわかる。一方、付着生物が添加されなかったSample 5及びSample 10～12に関しては、ほとんど減少していない。また、Sample 1～3について着目すると、添加された付着生物の量が多いほど、BPAとE2の濃度減少量が大きい事がわかる。これらの事より、本実験で使用した付着生物によって、水溶液中のBPAとE2が除去されたと考えられる。

b) 光の有無の違いによる影響

Fig 1及びFig 2において、光が与えられたSample 3と与えられなかったSample 4についての結果を比較すると、BPAとE2の減少率それぞれについて大きな違いが見られない事がわかる。この2サンプルについての24時間での濃度減少率の違いは、BPAについては約10%、E2に

Table 1 Experimental conditions

Sample No.	Wet biomass of periphyton	Light-dark conditiodn	Water temperature
1	2g	light	25°C
2	5g	light	25°C
3	10g	light	25°C
4	10g	dark	25°C
5	blank	light	25°C
6	blank	dark	25°C
7	10g	light	15°C
8	10g	light	20°C
9	10g	light	25°C
10	blank	light	15°C
11	blank	light	20°C
12	blank	light	25°C

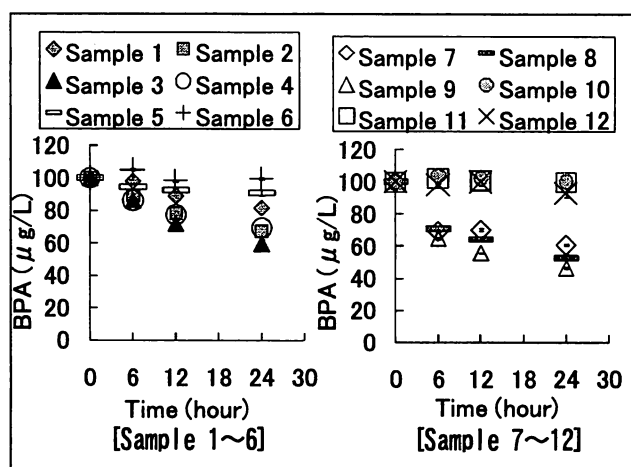


Fig. 1 Temporal change in BPA

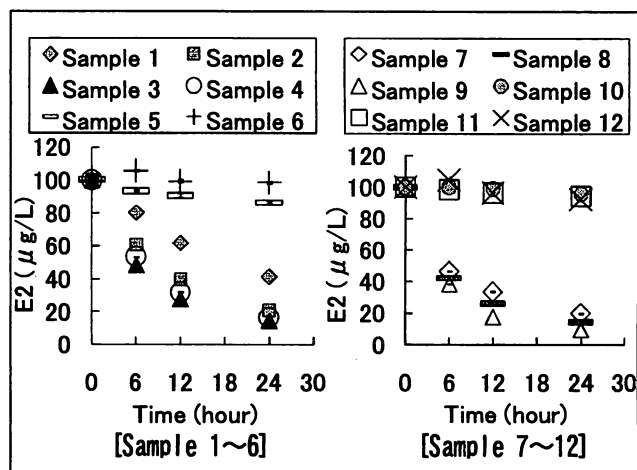


Fig. 2 Temporal change in E2

ついては約2%である。付着生物の生命活動の中で、光の有無の違いによる影響を受けるものとして、主に藻類の光合成活動が考えられる。仮に付着生物によるBPAやE2の除去作用に光合成活動の有無が主に関与しているとすると、光がある場合と無い場合では、除去量に明確な違いが確認されるはずである。しかし、上述のように実験では、光がある場合と無い場合で、除去量に大きな差は

見られず、明確な違いは確認されなかった。この事より、付着生物によるBPA及びE2の除去作用に対して、光合成活動の有無はあまり関与していないと考えられる。

上述の結果及び考察より、24時間程度の間では、付着生物によるBPAやE2の除去作用には、光の有無の違いによる影響はほとんど無いといえる。

c) 水温の変化による影響

Fig. 1及びFig. 2に示されたSample 7～9についての結果より、水温が高いほど、BPAとE2の濃度減少量が大きくなっている。このことから、付着生物がBPAとE2を除去する作用は、水温の上昇によって活性化されると考える事ができる。

(4) モデル化

a) BPA 及び E2 に対する付着生物の除去能力の定式化

実験結果に基づいて、付着生物のBPA及びE2を除去する能力の定式化を以下のように行った。

実験で見られたBPA及びE2の除去過程は一次反応であると仮定し、以下の式 (2a) を導入した。

$$V \frac{dC}{dt} = -kC \quad (2a)$$

ここで、 C ($\mu\text{g/L}$)は水溶液中のBPAあるいはE2の濃度、 V (L)は水溶液量、 k (L/hr)は除去速度定数、 t (hr)は時間である。

式(2a)より、

$$C = C_0 \exp\left(-\frac{k}{V}t\right) \quad (2b)$$

が導かれる。ここで、 C_0 ($\mu\text{g/L}$)はBPAあるいはE2の初期濃度である。

実験では、初期濃度 C_0 は $100\mu\text{g/L}$ 、水溶液量 V は 0.5L である。これらの値を式(2b)に代入し、残差二乗和が最小になるように実験結果に対してフィッティングした。そして、各サンプルについて除去速度定数 k を算定した。Table 2に各サンプルについての k の算定結果を示す。ここで、24時間で明確な濃度減少が確認されず、フィッティングの結果、 k が負の値となったSample 10と11のBPAについては、 $k=0$ としている。

フィッティングにより得られた値と実験値の相関係数を算出したところ、Sample 10と11のBPA及びSample 6の両物質について以外は 0.8 以上であった。このため、式(2b)と実験結果はよく適合していると考えられる。

ここで、付着生物が添加されていないサンプルを「ブランクサンプル」と表記する。また、付着生物が添加されたサンプルを「テストサンプル」と表記する。Table 1からわかるように、テストサンプルであるSample 1～3と「付着生物の添加の有無」以外の実験条件が一致するブランクサンプルは、Sample 5である。同様に、テストサンプルであるSample 4、Sample 7～9各々と一致するブ

ランクサンプルは、順にSample 6、Sample 10～12である。Table 2に示した除去速度定数 k の内、ブランクサンプルについての k は、付着生物以外のものに起因する除去速度定数といえる。よって、式(2c)のように、「付着生物の添加の有無」以外の実験条件が一致するテストサンプルとブランクサンプル各々についての k の差で表わされる k_p (L/hr)は、テストサンプル中の付着生物のみに起因する除去速度定数であると考えられる。

$$k_p = k_{\text{test sample}} - k_{\text{blank sample}} \quad (2c)$$

ここで、 $k_{\text{test sample}}$ (L/hr)はテストサンプルについての除去速度定数 k 、 $k_{\text{blank sample}}$ (L/hr)はブランクサンプルについての除去速度定数 k である。

Table 2の k の値と式(2c)を用いて、Sample 1～4及びSample 7～9について k_p を算出した。その結果がTable 2に示されている k_p である。

Sample 1～3についての k_p と付着生物の湿潤重量 M_p (g)の関係をFig. 3に示す。Fig. 3において、 k_p と M_p がおよそ線形の関係にある事がわかる。

Table 2 Result of calculation of k (L/hr) and k_p (L/hr)

Sample No.	k		k_p	
	BPA	E2	BPA	E2
1	4.16×10^{-3}	1.90×10^{-2}	1.77×10^{-3}	1.56×10^{-2}
2	8.82×10^{-3}	3.76×10^{-2}	6.43×10^{-3}	3.42×10^{-2}
3	1.17×10^{-2}	5.37×10^{-2}	9.33×10^{-3}	5.04×10^{-2}
4	8.66×10^{-3}	4.68×10^{-2}	8.65×10^{-3}	4.68×10^{-2}
5	2.40×10^{-3}	3.35×10^{-3}		
6	1.08×10^{-5}	5.29×10^{-6}		
7	1.34×10^{-2}	4.76×10^{-2}	1.34×10^{-2}	4.69×10^{-2}
8	1.65×10^{-2}	6.00×10^{-2}	1.65×10^{-2}	5.88×10^{-2}
9	2.12×10^{-2}	7.42×10^{-2}	2.00×10^{-2}	7.28×10^{-2}
10	0	7.11×10^{-4}		
11	0	1.25×10^{-3}		
12	1.17×10^{-3}	1.33×10^{-3}		

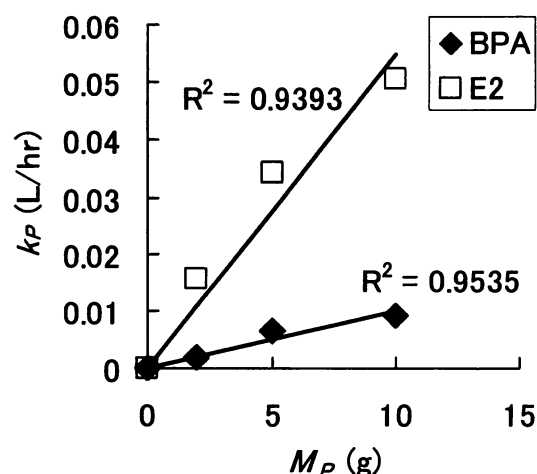


Fig. 3 Relation between k_p and M_p

Sample 7～9について、 k_p と水温 $T(^{\circ}\text{C})$ の関係をFig. 4に示す。Fig. 4において k_p と T がおおよそ線形にある事がわかる。

上述のような k_p と M_p や T との関係より、以下の式(2d)を導入した。

$$k_p = (\alpha T + \beta)M_p \tag{2d}$$

ここで、 $\alpha(\text{L/hr/g}^{\circ}\text{C})$ と $\beta(\text{L/hr/g})$ は定数である。

式(2a)と式(2d)より、実験に用いられた付着生物の除去能力は、以下の式(2e)で表わされる。

$$Rr = -(\alpha T + \beta)M_p C \tag{2e}$$

ここで、 $Rr(\mu\text{g/hr})$ は付着生物が水溶液中のBPAまたはE2を除去する速度である。

b) α 及び β の算定

Sample 7～9についての実験条件とTable 2の値を用いて算出した k_p を式(2d)に代入し、最小二乗法によって α 及び β の値を算定した。その結果をTable 3に示す。

Table 3の α 及び β の値は、上記のようにSample 7～9の実験結果を基に算定された値である。この値をSample 7～9とは付着生物の採取日・採取地点が異なるSample 1～3にも適用するとTable 4に示す k_p が得られる。Table 4の k_p の値は、Sample 1～3についての値で、Table 3の α 及び β の値とSample 1～3の実験条件を式(2d)に代入して算出したものである。一方、Sample 1～3

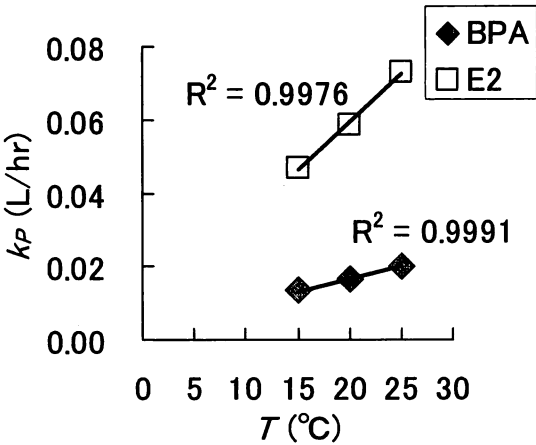


Fig. 4 Relation between k_p and T

Table 3 Calculated value of α and β		
	α (L/hr/g $^{\circ}\text{C}$)	β (L/hr/g)
BPA	6.59×10^{-5}	3.45×10^{-4}
E2	2.60×10^{-4}	7.54×10^{-4}

Table 4 k_p (L/hr) calculated from equation (2d)		
Sample No.	BPA	E2
1	0.00398	0.0145
2	0.0100	0.0362
3	0.0199	0.0725

についての実験結果に式(2b)をフィッティングして算出した k_p の値はTable 2に示した通りである。Table 2及びTable 4のBPAについての k_p の値を比較すると、Table 4の k_p は、Table 2の k_p の2.1～2.3倍程度の値となっている。同様にE2についての k_p を比較すると、Table 4の k_p は、Table 2の k_p の0.9～1.5倍程度の値となっている。

Sample 1～3で使用した付着生物は、Sample 7～9で使
用した付着生物と採取日・採取地点が異なり、構成する微生物・藻類の種類やその割合も異なっていた。これらのサンプルについての実験結果の比較より、同じ河川内であっても、季節や地点が異なれば、付着生物のBPAやE2の除去能力も異なってくる事が予想される。その一方で、上述のTable 2とTable 4の k_p についての比較は、式(2d)を用いれば、季節や地点が異なっても1オーダー程度の誤差精度で k_p の値を推定できる可能性を示していると言える。ただし、この事は、水温 T が $15^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ の範囲内であるという条件の下で言える事である。

3. 現地調査

(1) 概要

現地調査の対象河川は、東京都の世田谷区や大田区を流れる丸子川である。Fig. 5に示すように、調査地点としてSt.1～St.4の4地点を設けた。調査は、2007年の8月、10月、12月の各月に1回ずつ、計3回行われた。調査では、各調査地点において、河川水中のBPA及びE2の濃度、水深、川幅、流速、水温の測定を行った。また、St.2とSt.3においては、河床上の付着生物の量を把握するため、河床から採取した付着生物中に含まれているクロロフィルaの量を測定した。

BPA及びE2の濃度の測定は、水路実験やピーカー実験と同様の方法で行った。流速は、プロペラ流速計を用いて、流芯付近の流速を測定した。クロロフィルa量に関しては、調査対象地点の河床の代表的であると見られる5cm×5cm程度の部分2～3箇所に着着している付着生物を採取し、その付着生物中のクロロフィルa量を吸光光度法によって測定した。なお、クロロフィルa量の調査は、調査作業の都合上、それ以外の調査項目であるBPA及びE2の濃度や水深等についての調査とは別の日に実施した。

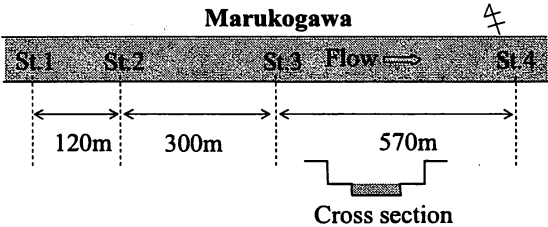


Fig. 5 Observation points

Table 5 Measured items

	Aug.17th				Oct.5th				Dec.4th			
	St.1	St.2	St.3	St.4	St.1	St.2	St.3	St.4	St.1	St.2	St.3	St.4
Water depth (cm)	10	9	10	16	7	13	13	18	6	9	10	17
River width (cm)	200	190	170	187	187	160	160	180	180	190	170	190
Flow velocity (cm/sec)	25	30	30	15	37	25	27	15	43	28	25	15
Water temperature (°C)	28	28	28	29	22	22	23	23	13	13	13	12
Concentration of BPA (μg/L)	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.07	0.07	0.07	0.07
Concentration of E2 (μg/L)	0.11	0.10	0.10	0.09	<0.01	<0.01	<0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02

(2) 結果

Table 5に水深、川幅、流速、水中のBPA及びE2の濃度についての調査結果を示す。Table 5の水深、川幅、流速の測定値より、丸子川の調査地点の流量は0.04～0.06 m³/secであったと算定される。また、Table 5に示されているように、河川水中から検出されたBPA及びE2の濃度は、3回の調査を通して、それぞれ0.02～0.07μg/L、0.01未満～0.11μg/L程度であった。これらの値はピーカー実験で扱ったBPA及びE2の初期濃度値の1000分の1程度のオーダーであるが、以下ではピーカー実験で得られた知見が、このような低濃度の場合においても適用できると仮定して、考察を進めていく。

Table 6には、クロロフィルa量についての調査結果を示す。Table 6に示されたクロロフィルa量の値は、クロロフィルa量の測定値を付着生物の採取箇所の総表面積で除した値である。これらの値は、調査対象地点の河床上の代表的であると見られる部分についての測定値を用いて得られた値であり、調査対象地点の河床上の平均的なクロロフィルa量を示していると考えられる。また、Table 6には、これらのクロロフィルa量の値を付着生物の湿潤量に換算した値も示している。これらの換算値は、ピーカー実験で使用した付着生物の単位湿潤重量当たりのクロロフィルa量の平均値532 μg/gを用いて算出した。

(3) 付着生物による河川水中のBPA 及び E2 の除去効果についての考察

本現地調査とピーカー実験の結果を基に、河川水中のBPA及びE2が丸子川のような河川を流下する間に、河床上の付着生物によって、どの程度除去されるかについて以下のような考察を行った。

ここでは、Fig 6に示すような水深、水温等の水理条件や河床上の付着生物量が流下方向に一定であるモデル河川について考える。ピーカー実験の結果より、付着生物によるBPA及びE2の除去速度は、式(2a)のように、水中のそれらの物質の濃度に比例するとする。よって、このモデル河川のΔxの区間のコントロールボリュームについて考えると、そこでの物質収支は以下の式(3a)によって表わされる。

$$h \frac{\partial C}{\partial t} = -hu \frac{\partial C}{\partial x} + hD \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} - rC \quad (3a)$$

Table 6 Measured value of chlorophyll-a (μg/cm²) and wet biomass of periphyton (g/cm²)

		Chlorophyll a	Wet biomass
Aug. 27th	St.2	25.1	0.0472
	St.3	69.1	0.130
Oct. 6th	St.2	10.5	0.0197
	St.3	15.4	0.0290
Dec. 5th	St.2	11.4	0.0215
	St.3	10.5	0.0197

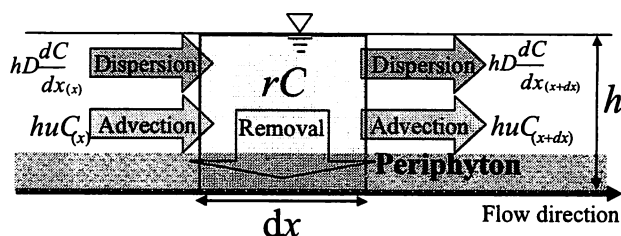


Fig. 6 Model river

ここで、 C (mg/m³)はBPAまたはE2の濃度、 t (sec)は時間、 x (m)は流下方向の距離、 D (m²/sec)は縦分散係数、 r (m/sec)は単位河床面積当たり存在する付着生物による除去速度定数である。 r は、式(2d)において M_p に単位河床面積当たり存在する付着生物の湿潤重量 P_D (g/m²)を代入し、単位換算する事で以下の式(3b)のように表わされる。

$$r = (\alpha T + \beta) P_D \times \frac{10^{-3}}{3600} \quad (3b)$$

ここで、 T (°C)は水温で、 α 及び β はTable 3に示された値を用いた。

式(3a)において、縦分散係数 D が十分小さく無視でき、かつ定常状態であると仮定すると、以下の式(3c)が得られる。

$$C(x) = C_0 \exp\left(-\frac{r}{hu} x\right) \quad (3c)$$

ここで、 C_0 (mg/m³)は $x=0$ におけるBPAまたはE2の濃度である。

Table 7 Conditions of case 1~3

	P_D (g/m ²)	T (°C)	h (m)	u (m/sec)
Case 1	200	13	0.1	0.3
Case 2	1300	28	0.1	0.3
Case 3	400	28	0.1	0.3

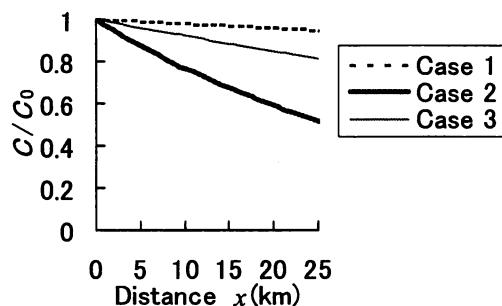


Fig. 7 Distribution of BPA in the model river

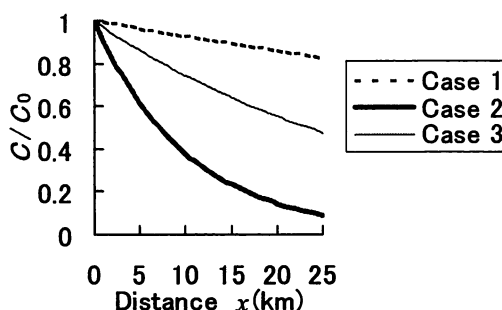


Fig. 8 Distribution of E2 in the model river

次に、Table 5及びTable 6に示された調査結果に基づき、Table 7に示すようにCase 1~3の3ケースについて条件設定を行った。Case 1の条件値は、12月のSt.2及びSt.3での調査結果を基に設定した。Case 2及びCase 3の条件値は、8月のSt.2及びSt.3での調査結果を基に設定した。

上述の3ケースを式(3c)に適用して得られた結果をFig. 7及びFig. 8に示す。Fig. 7及びFig. 8において、10km流下する間にBPAは2~23%程度、E2は7~62%程度減少している事がわかる。ケース間でBPA及びE2の除去率に差が見られるが、この差はTable 8に示されているケース間の付着生物量 P_D 及び水温 T の違いに起因するものである。この結果は、丸子川のSt.2やSt.3と同様の環境を持つ河川では、10km流下する間に河川水中のBPAとE2が、水温や付着生物量の違いに左右されつつ、それぞれ2~23%、7~62%程度、付着生物によって除去されるという可能性を示唆している。この結果は、二ヶ領用水での植物による分解の測定結果⁹⁾と定性的に一致する。

4. 結論

本研究では、室内実験及び実河川での現地調査を通し

て、河床上の藻類や微生物等から成る付着生物が有する、水中のBPA及びE2に対する除去能力について調査・検討した。その結果得られた主たる結論を以下に示す。

- 付着生物によるBPAやE2の除去作用に対して、光の有無の違いが与える影響は、24時間程度の間では、ほとんど無いと考えられる。
- 付着生物がBPAとE2を除去する作用は、水温の上昇によって活性化されると考えられる。
- 丸子川のSt.2やSt.3と同様の環境を持つ河川では、10km流下する間に河川水中のBPAとE2が、水温や付着生物量の違いに左右されつつ、それぞれ2~23%、7~62%程度、付着生物によって除去される可能性がある。

謝辞：本研究を行うにあたり、分析装置を使わせていただいた東京工業大学の浦瀬太郎准教授（現 東京工科大学教授）に謝意を表する。

参考文献

- 環境省：化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—, 2005.
- K.M.Lai, M.D.Scrimshaw, and J.N.Lester : Biotransformation and Bioconcentration of Steroid Estrogens by *Chlorella vulgaris*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.68, No.2, pp.859-864, 2002.
- N.Nakajima, T.Teramoto, F.Kasai, T.Sano, M.Tamaoki, M.Aono, A.Kubo, H.Kamada, Y.Azumi, H.Saji : Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae, Chemosphere, Vol.69, Issue 6, pp.934-941, 2007.
- 畠山仁, 原田隆彦：ビスフェノールAのメダカ (*Oryzias latipes*) への影響の病理組織学的検討, 日本獣医畜産大学研究報告, Vol.53, pp.7-12, 2004.
- 嶋津暉之, 和波一夫, 杉江あゆみ, 加田誠, 高橋憲一, 加地弘一：多摩川等の環境ホルモン問題に関する研究（その3）-エストロゲン様物質の総量測定法-, 東京都環境科学研究所年報, pp.165-175, 2000.
- 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（水質, 底質, 水生生物）, 1998.
- 環境庁水質保全局水質管理課：要調査項目等調査マニュアル（水質, 底質, 水生生物）, 1999.
- 林文慶, 新保裕美, 田中昌宏：濁水の光量制限が河川付着藻類増殖に及ぼす影響に関する室内実験, 鹿島技術研究所年報, 第53号, pp.133-138, 2005.
- 古賀智之, 池田駿介, 大澤和敏, 金井康一：沈水植物による水中の環境ホルモン浄化に関する基礎的研究, 水工学論文集, 第50巻, pp.1093-1098, 2006.

(2009. 4 9受付)