



沿岸都市域におけるエストロゲンの環境動態の追跡  
と削減技術の開発に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2013-07-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 祥広 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/4566">http://hdl.handle.net/10458/4566</a>

沿岸都市域におけるエストロゲンの環境動態の追跡と  
削減技術の開発に関する研究

研究課題番号：16510062

平成16年度～平成18年度科学研究補助金  
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成19年5月

研究代表者 鈴木 祥広  
宮崎大学工学部助教授

## 〈はしがき〉

エストロゲンは人間の生理的作用により排泄され、し尿に普遍的に存在する物質であり、生活排水すなわち下水に存在する。しかしながら、現行の下水処理場の機能は有機物・懸濁物の除去と消毒であり、 $17\beta$ -エストラジオールをはじめとするエストロゲン様物質の完全な分解・除去は不可能である。沿岸都市域の下水処理水は沿岸域あるいは河口域に絶えず放流されている。また、浄化槽処理水も都市排水路を経由して河口・沿岸域に排除されている場合が少なくない。したがって、エストロゲンが河口・沿岸域に負荷されている可能性は極めて高いと推察される。しかしながら、エストロゲンの水環境における動態に関する知見は少なく、特に淡水と海水の混合する沿岸環境における知見はほとんど得られていないのが現状である。沿岸環境の保全は、我々にとっての責務であり、人間活動によるエストロゲンの沿岸環境へのインパクトの実態把握が必要である。一方、人間が生活していく限り、エストロゲンを排出し続けていくことになるので、この物質の除去法の開発も不可欠な課題である。

本研究では、沿岸都市域を研究対象とし、エストロゲンの河口・沿岸域における環境動態を追跡するとともに、下水の生物処理プロセスにおけるエストロゲンの消長についても検討した。

## 研究組織

研究代表者：鈴木 祥広（宮崎大学工学部助教授）

## 交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,100,000	0	2,100,000
平成17年度	900,000	0	900,000
平成18年度	800,000	0	800,000
総計	3,800,000	0	3,800,000

## 研究発表

### (1)学会誌等

Suzuki, Y., and Maruyama, T. (2006) Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge, *Water Research*, 40, 1061-1069.

鈴木祥広, 安藤康弘, 丸山俊朗, 満山宗人, 下津義博, 五味謙之, 森宏和, and 国包章一 (2006) 分散気泡を利用した河川水からのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の除去, *水環境学会誌*, 29, 29-35.

鈴木祥広, 中村孝洋, 小山久男, 関戸知雄, 土手裕, 増田純雄 (2006) 畜舎排水処理施設におけるエストロゲンの実態調査, *水処理技術*, 47, 17-22.

鈴木祥広, 原村優子, 中村孝洋, 丸山俊朗 (2005) 沿岸環境調査における底質CODの測定, *用水と廃水*, 47, 1073-1077.

鈴木祥広, 平良浩保, 丸山俊朗 (2005) 都市下水の高速高度処理システムにおけるエストロゲンの挙動, *環境工学研究論文集*, 42, 245-252.

鈴木祥広, 平良浩保, 満山宗人, 下津義博, 丸山俊朗 (2005) 浄化槽におけるエストロゲンの実態調査, *用水と廃水*, 47, 237-243.

### (2)口頭発表

古川隼士, 鈴木祥広 (2007年3月) 河口域における河川水中の懸濁物のエストロゲンの挙動に与える影響, *土木学会西部支部研究発表会講演概要集*, 957-958.

古川隼士, 鈴木祥広 (2007年3月, 大阪産業大学) 河口域における河川水中の懸濁物のエストロゲンの挙動に与える影響, *第41回日本水環境学会年会講演集*, 496.

古川隼士, 鈴木祥広 (2006年9月, 立命館大学) 海水混合域における河川水中のエストロゲンの挙動, *土木学会第61回年次学術講演会講演概要集(CD-ROM)*, 第VII部門, 67-68.

中村孝洋, 鈴木祥広 (2006年3月, 宮崎大学) 都市河川河口域における17 $\beta$ -エストラジオールの実態調査, *土木学会西部支部研究発表会講演概要集*, 1047-1048.

古川隼士, 中村孝洋, 鈴木祥広 (2006年3月, 九州共立大学) 海水混合による都市河川水中のフルボ酸鉄の凝集とエストロゲンの動態との関係, 土木学会西部支部研究発表会講演概要集, 1043-4044.

鈴木祥広, 原村優子 (2006年3月, 東北学院大学) 河川・河口域の環境調査における溶存酸素測定の留意点, 第40回水環境学会年会講演集, 181.

中村孝洋, 鈴木祥広, 土手裕, 増田純雄, 小山久男 (2005年9月, 早稲田大学) 畜産排水におけるエストロゲンの実態調査, 土木学会第60回年次学術講演会講演概要集(CD-ROM), 第VII部門, 163-164.

## 目次

第1章 序論	1
第2章 E2の各種分析方法の概説	3
第3章 本研究におけるE2分析方法	5
第4章 下水処理水放流口付近の調査	7
第5章 宮崎県の都市河川・河口域における予備調査と考察	11
第6章 八重川河川・河口域における調査	12
第7章 八重川河川底質におけるE2濃度と堆積有機物濃度との関係	18
第8章 河口域調査のまとめ	21
第9章 河口・沿岸域での海水混合による溶存態のフルボ酸鉄の凝集プロセスにおけるE2の動態	24

# 第1章 序論

## 1.1 はじめに

今日の水環境における問題として、外因性内分泌攪乱物質の微量汚染による生態系さらには人体への影響が危惧されている。外因性内分泌攪乱物質と称される化学物質は極低濃度であっても生物の内分泌作用に影響を及ぼす可能性がある。我が国においても、平成10年度から各省庁と研究機関の協力のもと、河川・湖沼の環境水<sup>1-3)</sup>、水道<sup>4)</sup> および下水道<sup>5)</sup> について、外因性内分泌攪乱物質と疑われる数十種類の化学物質の実態調査が実施されている。その調査結果をみると、各種の生物やヒトに対する毒性や影響濃度に関しては議論・検討が必要なものの、調査・研究対象として重要な物質は、樹脂原料のビスフェノール A、非界面活性剤の分解物のノニルフェノール、および人畜由来の17β-エストラジオール (E2) が挙げられる。このような物質のなかで、エストロゲンの一つである E2 は非常に活性度が高く、内分泌攪乱作用が示唆されている代表的な化学物質に比べて約 1,000~10,000 倍のエストロゲン活性を有している。ビスフェノール A とノニルフェノールは使用目的、用途、および使用場所が明確に特定できるため、仮に現行の使用状況による極微量の汚染で生態系あるいはヒトに及ぼす影響が明らかに認められた場合、使用制限・禁止、安全な代替物質への変換、あるいは使用事業所からの排出規制によって、環境への排出は大幅に制御できると考えられる。一方、E2 は人間の生理的作用により排泄されるし尿に含まれている天然物質であり、下水に絶えず存在していることから最も重要な外因性内分泌攪乱物質に位置づけられる。

E2 がし尿中へ排泄されるときは、水溶性のグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体であると報告<sup>6)</sup> されている。環境水中において E2 が抱合体のままであれば生態系への直接的な影響はほとんど無いものと思われるが、環境水中や生体内に取り込まれた際に抱合体が脱抱合し、遊離体の E2 となった場合には、E2 がもつ高い活性を取り戻すことが予想される<sup>7)</sup>。しかしながら、下水中の遊離体の E2 は下水処理場によって大部分が除去され河川あるいは海域へと放流される。わが国の下水処理場における内分泌攪乱物質の実態については、国土交通省が全国 15 都府県市 47 処理場で実態調査を行なった<sup>8)</sup>。この報告によると、水処理工程での E2 の平均的な除去率は 70%程度であり、除去率だけをみると効果的に除去されているようである。しかし、E2 の環境への影響濃度が未だ明確に提示されていないことを考えると、放流されるとき E2 濃度についての程度のレベルまで下げればよいかといった課題等が残っている。また、地方によっては下水道の未整備の地区が未だ多く存在し、生活排水中の E2 は浄化槽単独の処理だけで近隣河川に放流されているのが実態である。浄化槽の E2 除去率は低く、約 14%と報告<sup>9)</sup> されている。この浄化槽で除去できなかった E2 が常に河川に放流されていることを考えると、生態系への影響は下水道整備地区に比べ大きいと予想される。さらには、人間の尿からのみ排出されているのではなく、豚や牛などの家畜動物の尿からも排出されている。

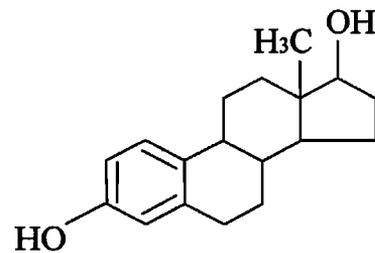
前述のように、生活排水中に存在する E2 や家畜動物の尿からの E2 が環境水中に放出され、遊離体の E2 として多く存在している場合、生態系への影響が危惧される。そこで、生活排水の最終的な放流先である河川や沿岸域といった環境水中での E2 の実態を調査することが重要になってくる。特に、沿岸・河口域は河川水と海水の混合が激しい場所であり、栄養塩や有機物などの溶存物質が凝集し底質に堆積するといわれている。そのため、底質に堆積した有機物等をエサとする魚介類も多く生息していると考えられる。また、沿岸・河口域は下水処理水や浄化槽処理水が最終的にたどり着く場所であるため、栄養塩や有機物などの溶存物質に加え E2 もまた、凝集作用によって単独あるいは溶存物質に付着して底質へと堆積する可能性が考えられる。そのため、沿岸・河口域は水環境の中でも生態系への E2 の影響が顕著に現れる領域であると考え

られる。このようなことから、沿岸・河口域における E2 の実態を調査する必要がある。しかしながら、沿岸・河口域における E2 の実態については極めて情報が乏しく、底質についての挙動については全くといってよいほど情報が乏しい。

そこで本研究では、宮崎県内を流れる都市河川・河口域における遊離体の E2 について調査し、河川における挙動や底質への堆積状況といった河川内の地点間における遊離体の E2 の相対的な実態を把握することを目的とした。

## 1.2 17β-エストラジオール (E2) について

E2 は、前述したとおりエストロゲンの一つであり、内分泌攪乱作用が示唆されている物質の中でも、合成エストロゲンのジエチルステルベストロール (DES) に並んで、エストロゲン活性が非常に強い物質である<sup>10)</sup>。エストロゲンとは、女性ホルモン的一种であり、卵巣や精巣で分泌される卵胞ホルモンである。E2 の他に、エストロン、エストリオールなどがある。エストロゲンは、ヒトに対しては主に女性化 (月経・乳腺)、卵子の発育、排卵を調整する作用を持つが、分泌過剰になると子宮内膜症、膣がん、乳がん、不正出血等の疾患を引き起し、分泌不足になると女性器の発育異常、月経不順の疾患を引き起こす<sup>11)</sup>。尿中の総エストロゲン量は、月経周期にある女性で数~60μg/d 程度、妊娠中の女性で 200~400μg/d、男性で数 μg/d 程度と報告されている。したがって、家庭汚水中には、数百 ng/L オーダーのエストロゲンが、主に抱合体として含まれるものと推定されている<sup>12)</sup>。



## 1.3 エストロゲン作用のメカニズム<sup>11)</sup>

人間や無脊椎動物等の細胞内にはエストロゲン受容体が存在する。通常は、卵巣等で分泌されるエストロゲンが血中を通過して、細胞内のエストロゲン受容体 (ER) と結合し、遺伝子を活性化させる。しかし、エストロゲンと類似の内分泌攪乱化学物質 (ビスフェノール A, ノニルフェノール, フタル酸エステル, DDT など) がエストロゲン受容体と結合することによって、エストロゲンがエストロゲン受容体と結合した場合と同様に遺伝子を活性化させてしまう。そのため、自身が体内で作出すエストロゲン以外に、体外からエストロゲン類似の物質が取り込まれた場合には、己の意志とは異なる作用が体内で生じてしまう恐れがある。

## 1.4 野生生物に対する内分泌攪乱物質の影響

魚類等において、雌の卵黄形成の際に特異的に出現する蛋白質のヒドロジェニン (VTG) が雄からも検出された例がイギリスで報告されており<sup>13)</sup>、この原因は下水処理水である可能性が高い。魚類の卵巣で分泌されたエストロゲンは、血中に入って標的器官に運ばれ、標的細胞の受容体に

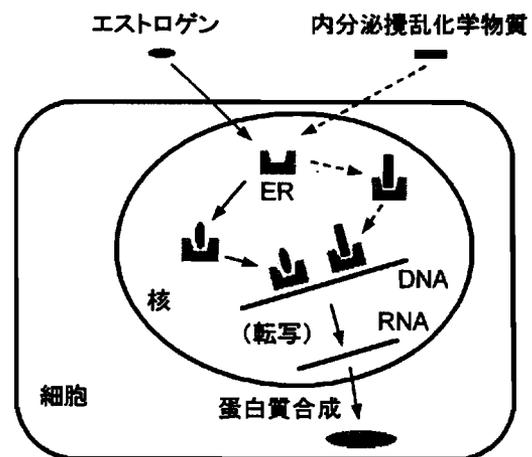


図-1 エストロゲン作用のメカニズム<sup>11)</sup>

結合する。卵巣等で十分なエストロゲンが分泌され受容体と結合した場合に限り VTG は作られるため、通常は雌のみが作り出す特異的な蛋白質である。しかし、エストロゲンの受容体は雄にも雌にも存在するため、外部からエストロゲンと類似の物質あるいは下水処理水に残存する E2 が雄の体内に取り込まれ、受容体と結合した場合には、雄であっても雌と同様に VTG を作る事となる。田畑らは、雄ヒメダカを用いた E2 の曝露試験を行い、雄ヒメダカ血清中の VTG 濃度を指標としてエストロゲン作用の検討を行った。その結果、雄ヒメダカが VTG を誘導する E2 の最小作用濃度を 5ng/L と結論付けている<sup>14)</sup>。しかし、最大無作用濃度を 1ng/L と報告<sup>14)</sup>していることから E2 は微量な濃度であっても生物に影響を与える物質であるといえる。

## 1.5 沿岸・河口域で予測される水生生物への E2 の影響

沿岸・河口域は、人間活動からの下水処理水や浄化槽処理水が海域へと流れ込む場所であり、その中に含む栄養塩や有機物などをエサとする魚介類が多く集まる場所である。前述した通り、栄養塩や有機物とともに E2 も含まれている。そのため、沿岸・河口域は環境水中において、生物が E2 の影響を最も受けやすい場所であると予想される。沿岸・河口域にはアサリ、シジミなどの貝類、コイをはじめとする魚類が生息しており、E2 がそれらの生物の内分泌を攪乱して雄の精巣に卵細胞を生み出したり、血中 VTG を引き起こしたりする恐れがある。また、内分泌攪乱物質の多くは水溶性に乏しいため、E2 が沿岸・河口域の底質へと蓄積する可能性がある。底質に生息する底生生物が E2 の影響を受けると、食物連鎖によって魚類へ、最終的には魚類を食べる鳥類へと E2 の影響が確認される可能性も考えられる。そのため、多くの生物が生息する沿岸・河口域における E2 の実態を調査する必要がある。

## 第2章 E2 の各種分析方法の概説

### 2.1 ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS)

GC/MS は、有機化合物（特に低分子量成分）の定性・定量を目的とした分析装置で、ガスクロマトグラフ (GC) と質量分析装置 (MS) を結合した複合装置である。GC で分離した単一成分について MS スペクトルを測定することにより成分の定性を行い、MS によって検出されたイオンの強度により定量を行う。E2 分析の際には、測定試料の誘導体化やクリーンアップなど煩雑な前処理を必要とし、分析に高価な機器や熟練した技術が必要となる。環境庁の「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」におけるエストラジオール分析法には、この GC/MS と後に紹介する ELISA 法による分析方法が提示されており、E2 を測定する一般的な方法である。しかし、検出限界の目標値が 2.8ng/L であるとされ、微量な E2 を検出できないといった課題がある。

### 2.2 液体クロマトグラフ/タンデム質量分析 (LC-MS/MS)

LC-MS/MS は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と質量分析計 (MS) を結合させた複合システムである。試料溶液を HPLC で分離し、溶出成分をイオン化室に導入しイオン化して MS スペクトルを得て定量を行う方法である。E2 分析の際には、GC/MS とは異なり誘導体化を行う必要がなく、GC/MS よりも微量な E2 を

測定可能である。E2の分析方法としては最も優れた装置であるといわれている。しかしながら、LC-MS/MSの普及はまだ十分ではない。また、GC/MSと同様に、測定試料のクリーンアップなど煩雑な前処理を必要とし、分析に高価な機器や熟練した技術が必要となる。

## 2.3 *in vitro*アッセイ<sup>1)</sup>

*in vitro*アッセイは試験管内での試験方法といわれ、幾つかの方法が存在する。組み換え酵母を用いる YESアッセイ、ヒト乳がん由来細胞を用いる E-Screenアッセイ、ヒト子宮内膜がん由来細胞を用いる Ishikawa cell 3H-12 ALPアッセイ、ELISA法（酵素免疫測定法）等である。*in vitro*アッセイは、種類によってはE2以外の物質もE2として測定してしまうという欠点があるが、機器分析よりも検出下限値を低く設定でき微量なE2を測定することができるという利点もある。

### (1) YESアッセイ<sup>1)</sup>

YESアッセイでは、ヒトエストロゲンレセプターが組み込まれ、エストロゲンが結合するとβ-ガラクトシダーゼを産出する組み換え酵母が用いられる。測定試料をマイクロプレートに入れる。増殖培地に前培養した酵母と CPRG（クロロフェノールレッドβ-D ガラクトピラノシド）を添加したアッセイ培地を調整し、測定試料が入ったマイクロプレートに入れる。吸光度を測定した後培養し、再び吸光度を測定する。アッセイ培地にE2標準物質を供して得られたジグモイド曲線より試料中のE2を算出する方法である。

### (2) E-Screenアッセイ<sup>1)</sup>

E-Screenアッセイでは、ヒトエストロゲンレセプターを保有し、エストロゲンが存在すると増殖する MCF-7 や T-47D などのヒト乳がん由来細胞が用いられる。ヒト乳がん由来細胞を塗布させたマイクロプレートに測定試料を含む試験用培地を入れ、培養した後染色を行い、吸光度によって細胞の増殖率を求める。E2標準物質を培地中に適当な濃度で添加し、細胞の増殖率から検量線を作成し、試料中のE2を算出する方法である。

### (3) Ishikawa cell 3H-12 ALPアッセイ<sup>1)</sup>

Ishikawa cell 3H-12 はヒト子宮内膜がん由来細胞であり、ヒトエストロゲンレセプターを保有しているが、エストロゲンが存在するとアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性が上昇する特性を利用する。Ishikawa cell を塗布させたマイクロプレートに測定試料を含む試験用培地を入れ培養する。マイクロプレート内の培地を捨て洗浄後、アルカリフォスファターゼの基質溶液を分注し、振とう培養した後、吸光度を測定する。E-Screenと同様に検量線を作成し、試料中のE2を算出する方法である。

### (4) ELISA法（酵素免疫測定法）<sup>2)</sup>

ELISA法の測定原理は、競合反応、発色反応および濃度の定量から成る。特異的にE2と結合する抗体がマイクロプレート内面に塗布（固定化）されており、前処理した試料水とE2に発色用酵素を結合させた抗原酵素複合体（酵素標識抗原）をマイクロプレートに加え、競合反応させる。競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質を加える。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色する。この発色基質による発色の程度でE2濃度を定量する方法である。ELISAキットは、現在10種類近く存在するが、E2以外の物質に反応するキットも多く存在することからGC/MSでの測定値に比べ数倍～数

十倍高い値になるといわれている。そのため、ELISA 法で E2 の分析を行う際には、ELISA キットの販売元などを明示し、GC/MS との測定値の差などを把握しておくことが望ましい。

### 第 3 章 本研究における E2 分析方法

#### 3.1 本研究で用いた E2-ELISA キット

本研究における E2 の測定には、抗原抗体反応を利用した酵素免疫定量法の分析キット (ELISA キット, 日本エンバイロケミカルズ (株) 製) を用いた。E2 の実態を把握するには、遊離体に抱合体も含めた測定が必要となるが、抱合体の測定ができる研究機関は少ない。本研究で用いる E2-ELISA キットにおいても抱合体の測定はできない。そこで、遊離体の E2 のみについて分析した。E2-ELISA キットは、酵素免疫測定法によって遊離体の E2 を測定するものである。環境分析用に開発された ELISA キットはなく、これまでは臨床用キットが転用されてきた。臨床用の ELISA キットは感度が悪く、LC-MS/MS の測定値と比較して大幅に異なるものであった。しかし、日本エンバイロケミカルズ (株) 製の E2-ELISA キットは、環境分析用として開発され、試料中の E2 を高感度かつ簡便に測定できるキットである。測定値の変動係数は 10%以下で、ばらつきが少なく高精度であるといわれている。この E2-ELISA キットの E2 との交差反応性は 100%であり、エストロン (E1) とは 1.3%, エストリオール (E3) とは 0.6%である。また、抱合体である E2-17-glucuronide との交差反応性は<0.4%, E2-3-glucuronide とは 16%, E2-3-sulfate-17-glucuronide とは<0.4%である。このように、日本エンバイロケミカルズ (株) 製の E2-ELISA キットは、他社の ELISA キット比べ、E2 への特異性が高く、他の代表的なステロイドホルモンにもほとんど反応しないことが確認されている。E2-ELISA キットと機器分析手法 (LC-MS/MS 法) との測定値を比較すると、本研究で用いた ELISA キットを用いた場合、1.5 倍高くなることが報告されているが、両分析法による測定値の相関は高いとされる。また、本研究で用いた E2-ELISA キット使用説明書によると、解説資料には E2-ELISA キットと他社品の ELISA キット、および LC-MS/MS との測定値の比較が行われているが、他社品と比べ、本 ELISA キットの測定値は LC-MS/MS との相関が高い。ELISA 法は、交差反応性や反応阻害物質の共存によって影響を受けるため、厳密な定量評価は困難であるとされる。しかしながら、本研究で用いた E2-ELISA キットは、感度と精度が高く、操作が簡便であり、本抗体がエストロゲンのうち E2 への特異性が高いということから、自然界における E2 の動態を把握する測定手法としては有効であると判断した。

#### 3.2 E2-ELISA キットによる水試料の E2 分析法

E2-ELISA キットによる水試料の E2 分析フローを図-3.1 に示した。キットの定量範囲と測定水試料の E2 濃度から、測定に要する試料水の容量を決定した。その結果、河川水および下水処理水の E2 濃度を測定するために要する試料水の容量は 300mL で十分であることがわかった。そこで、試料水 300mL をガラス繊維濾紙 (GF/C, Whatman 製) で濾過した。しかし、懸濁物質中にも E2 が存在すると考えられる。そこで、濾紙上の懸濁物質をメタノール 4mL で超音波抽出し、抽出液を濾液に加えた。濾液とメタノール抽出液の混合液は、固相カートリッジを用いて濃縮・精製した後、抗原抗体反応を利用した酵素免疫定量法の分析キット (E2-ELISA キット, 日本エンバイロケミカルズ製) を用いて E2 を測定した。E2-ELISA キット測定の前処

理法は、メタノール（HPLC 用，和光純薬工業製）5mL と蒸留水 10mL でコンディショニング済みの C18 固相カートリッジ（SPE カラム，J. T. Baker 社製）に濾液とメタノール抽出液の混合液を通水し，蒸留水 10mL，ヘキサン（HPLC 用，和光純薬工業製）5mL で洗浄後，5mL のジクロロメタン（エストラジオール分析用，和光純薬工業製）で溶出した。溶出液は，窒素ガス気流により溶媒を揮発させ濃縮乾固させた。残留物は，ジメチルスルホキシド（DMSO）とメタノールを 1:10 で溶解し，溶解液が 1%DMSO，10%メタノールとなるように蒸留水で調整（最終容量 2mL）した。この溶解液中の E2 を E2-ELISA キットで測定した。この E2-ELISA キットの使用方法は使用説明書に従った。E2 の定量範囲上限すなわち検量線の最高濃度は 1.0 $\mu$ g/L とし，上限を超えた試料については，1%DMSO:10%メタノール水溶液で希釈して測定した。試料水の検出下限値は，E2-ELISA キットの定量下限値 0.05 $\mu$ g/L を希釈して 0.025 $\mu$ g/L としたものと濃縮倍率の 150 倍から，0.16ng/L とした。

### 3.3 E2-ELISA キットによる底質試料の E2 分析法

#### 3.3.1 底質の前処理<sup>1)</sup>

河川から採取した底質の前処理は，以下の方法によって行った。まず，ステンレスバット上で底質を 2mm 目のふるいに通し，3000rpm で 20 分間遠心分離した。遠心分離後の上澄み液をピペットを用いて除去し，残渣を十分混ぜ合わせて E2 分析のための湿試料とした。また，この湿試料は E2 分析の他に，有機物量分析のための湿試料としても用いた。

#### 3.3.2 E2-ELISA キットによる底質試料の E2 分析法

E2-ELISA キットによる底質試料の E2 分析フローを図-3.2 に示した。底質試料中の E2 を抽出するため，50mL 遠心管に底質試料 10g-wet とメタノール（HPLC 用，和光純薬製）30mL を入れ混合し，10 分間超音波分解した。その後，上澄みを 3000rpm で 10 分間遠心分離した。さらに残渣にメタノール 20mL を入れ混ぜ合わせた後，再び上澄みを遠心分離し先の抽出液に足し合わせた。この 50mL の抽出液をエバポレーター（40 $^{\circ}$ C）で蒸発乾固させ，メタノール 4mL と蒸留水 100mL に再溶解させた。この溶解液を，メタノール（HPLC 用，和光純薬工業製）5mL と蒸留水 10mL でコンディショニング済みの C18 固相カートリッジ（SPE カラム，J. T. Baker 社製）に通水し，蒸留水 10mL，ヘキサン（HPLC 用，和光純薬工業製）5mL で洗浄後，5mL のジクロロメタン（エストラジオール分析用，和光純薬工業製）で溶出した。この後の操作は，水試料の操作と同様であるので省略する。底質試料の検出下限値は，ELISA キットの定量下限値（0.025 $\mu$ g/L）と底質試料量 10g から，0.005ng/g-wet とした。ELISA 法の測定においては，湿底質試料を用いて測定したが，測定後底質試料を 110 $^{\circ}$ C で乾燥させ，乾燥減量から乾燥底質試料当たりの E2 に換算した。

#### 3.2.3 添加回収試験

実試料の底質について，上記で示した分析法を評価するため，E2 標準物質を用いて添加回収試験を実施した。E2 標準物質を添加した試料と無添加の試料を分析し，その差から回収率を求めた。まず，底質試料約 100g-wet をピーカーに取り，均一になるように十分に混ぜ合わせた。その中から 10g-wet ずつ 50mL 遠心管

に分取し、分取した試料を計6つ用意した。その後、上記に示したメタノール抽出を行い、計6つのメタノール抽出液のうち3つにE2標準溶液(10 $\mu$ g/L)を100 $\mu$ L添加し、残り3つのメタノール抽出液は無添加の状態で行った。絶対量としては、1ngのE2を添加したことになる。底質試料10g-wet当たりのE2濃度を算出し、E2標準物質を添加した底質試料と無添加の底質試料のE2濃度の差からE2の回収率を求めた。その結果を表-3.1に示した。底質試料を用いた本分析法におけるE2の回収率は59.2%であった。そのため、他の研究や論文との比較は難しいが、一河川における底質中のE2濃度の挙動を把握することはできると判断した。本研究におけるE2測定値は、回収率による補正を行わず、実際の測定値を掲載した。

表-3.1 底質試料の分析におけるE2回収率 (n=3)

E2標準	平均値(ng/100g-wet)	標準偏差	変動係数(%)	回収率(%)
添加	0.721	0.013	1.81	59.2
無添加	0.129	0.017	13.1	

#### 第4章 下水処理水放流口付近の調査

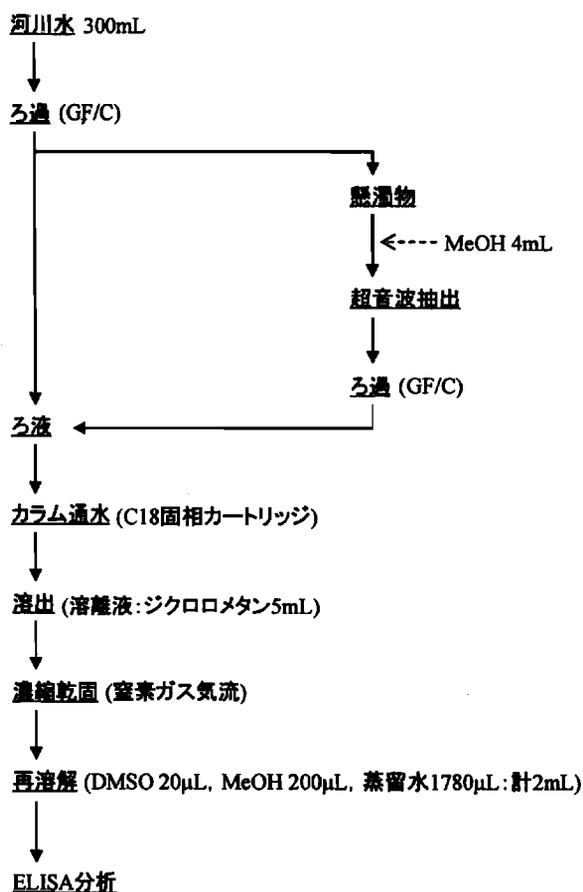


図-3.1 水試料のE2分析フロー

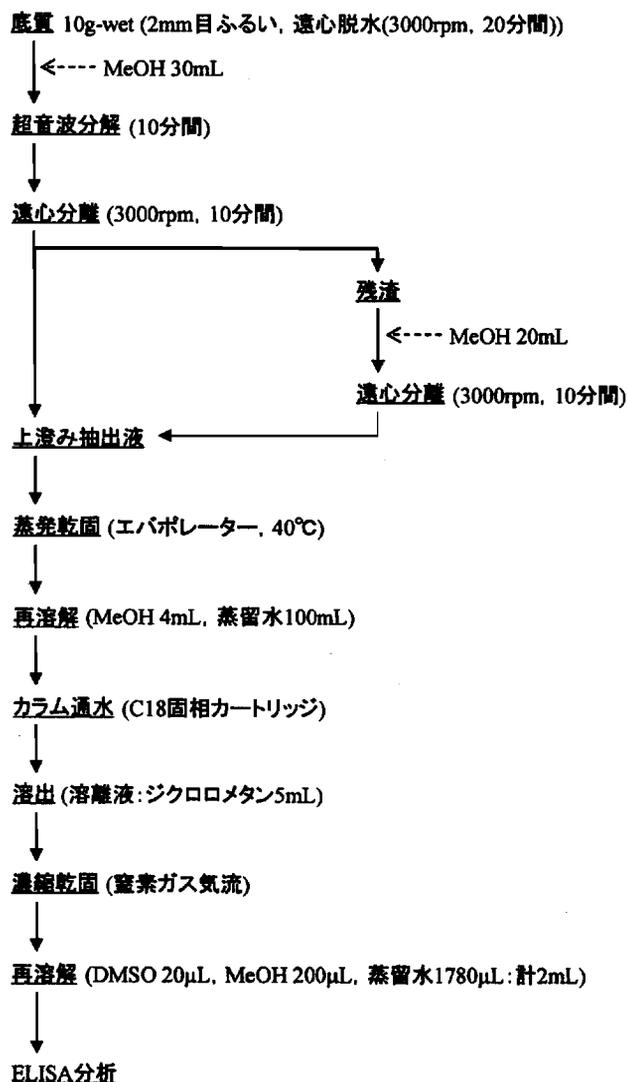


図-3.2 底質試料のE2分析フロー

これまでの研究・報告において、多数の都市下水処理場における流入水と放流水のモニタリングの結果、生物プロセスにおいて E2 は効果的に除去され、流入水の大部分の E2 が除去されていることが報告されている。現在のところは、はっきりとした生物への影響濃度は未だ明らかになっていないため、下水処理場における E2 除去率のみを考えると効果的に除去されているように思われる。しかしながら、放流水中には除去されなかった E2 も幾らか残存しており、長期にわたる放流と E2 の持つ強いエストロゲン活性によって微量な濃度であっても生物に影響を及ぼしている可能性が考えられる。諸外国においては、下水処理水が原因で放流口付近に生息する魚類への影響が認められたという報告もある。このように放流口付近は、放流水に含まれる残存有機物等をエサとする魚類が集まりやすいため、E2 を体内に取り込みやすい場所だといえる。また、放流水中に残存する E2 が放流口付近の河川底質へと蓄積している可能性も考えられる。これまでの報告では、下水処理水中の E2 濃度のみに着目され、放流口付近の河川底質における実態については乏しいのが現状である。河川底質に E2 が蓄積している場合には、底生生物やそれを捕食する魚介類に悪影響を与えることも考えられる。そこで、下水処理水が放流されている放流口付近の底質を調査し、底質中への E2 の堆積状態を把握することを目的とした。

#### 4.1 調査概要

##### 4.1.1 調査地点

宮崎県内を流れる河川のうち最も大きな河川である大淀川には、河口左岸部に下水処理場が隣接しており、左岸部に位置する宮崎市の家庭からの下水が処理され、大淀川へと放流されている。この下水処理場の敷地面積は 67,350m<sup>2</sup> であり、処理水量は 80,767m<sup>3</sup>/日（平成 14 年度処理水量）である。処理プロセスは、沈砂池→最初沈殿地→エアレーションタンク→最終沈殿地→塩素混和池→放流の標準活性汚泥法である。本調査における調査地点を図-4.1 に示した。下水処理水放流口からの放流水および放流口から 5m（地点①）、10m（地点②）（上流側、下流側を含む）、30m（地点③）（上流側、下流側を含む）離れた地点の河川底質について調査した。

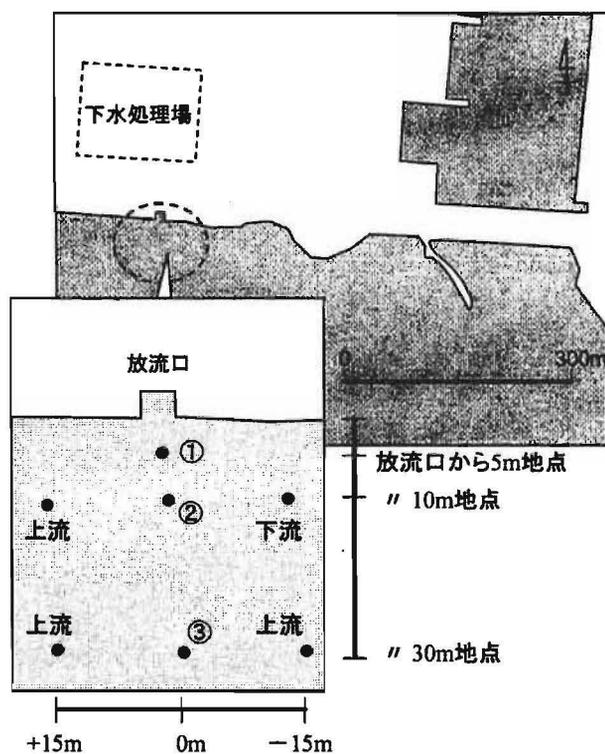


図-4.1 放流口付近河川底質の調査地点

表-4.1 採泥時における天候および前1週間の天候

調査日	調査時刻	調査日の天候	前1週間の天候					
			1日前	2日前	3日前	4日前	5日前	6日前
2004/11/11	11:00~13:00	晴時々曇一時雨雪	雨	曇一時雨	晴	快晴	快晴	晴後曇
2005/5/9	13:00~15:00	晴後曇	曇一時晴	晴	曇一時雨	曇一時晴	晴一時曇	晴一時曇

#### 4.1.2 調査時期

下水処理水放流口からの放流水については、2005年4月と12月に調査を行なった。下水処理水放流口付近の河川底質については、2004年11月と2005年の5月に調査を行なった。この下水処理水放流口付近の水深は、満潮時には河川水あるいは海水によって底質が見えない状態であるが、干潮時には容易に採泥が可能となる。そこで、底質調査においては上記に示した時期の干潮時に採泥を行った。表-4.1には、採泥時における天候および採泥前1週間の天候を示した。

#### 4.1.3 採水方法

下水処理水放流口からの放流水は、L-アスコルビン酸を1g/L加えた1Lポリ瓶に採水した。採水した放流水は、実験室に持ち帰り分析に供した。直ちに分析できない場合には-30℃で凍結保存し、後日分析した。

#### 4.1.4 採泥方法

下水処理水放流口付近の河川底質を採泥するため、透明の塩化ビニール管（内径6.5cm、長さ100cm）を用意した。胴長を履き河川に入り、塩化ビニール管を底質に差し込んで上部・下部をふさぎ、表層5cmの底質をステンレス製のバットに採取した。この作業を同じ付近（約30cm間隔）の底質で3度繰り返し、ステンレスバットに採取した河川底質をよく混合し、ビニール袋に入れて実験室に持ち帰り分析に供した。直ちに分析できない場合には-30℃で凍結保存し、後日分析した。

#### 4.1.5 粒度分析法

本調査では、採取した河川底質は2mm目のふるいにかけて遠心脱水後に分析に供した。JIS法のふるい分け試験法を参考にして粒度分析を行った。本調査では1000、500、250、100、75 $\mu$ mのふるいを用いて粒度分析を行った。ふるい分けを行う前に底質試料の湿重量約10gを110℃で乾燥させ、乾燥後の重量を測定した。乾燥させた底質試料は、上記に示した一連のふるいを用いてふるい分けし、各ふるいに残った土粒子の重量を測定した。土粒子の全重量に対する各ふるいに残った土粒子の量および通過した量の割合から粒径加積曲線を求めた。

### 4.2 結果と考察

#### 4.2.1 放流水中のE2濃度

下水処理水放流口からの放流水中のE2濃度は、2005年4月においては約2.5ng/L、12月においては約1.6ng/Lであった。他の論文によると、下水処理場の放流口付近の河川水のE2濃度が1.3ng/Lという報告<sup>1)</sup>がある。また、平成10年度に堀江らが関東および近畿地方の都市を中心に、27処理場における実態調査を行なった結果、放流水のE2濃度が0.6ng/L以上となった割合は43/47であった<sup>2)</sup>。このような報告から、宮崎下水処理場から放流されている処理水のE2濃度は一般的な下水処理場と同程度であり、1.6~2.5ng/Lの処理水が大

淀川に放流されていた。雄ヒメダカにおいて VTG を誘導する E2 の最小作用濃度が 5ng/L, 最大無作用濃度が 1ng/L という報告も存在することから, 放流口付近に生息する生物によっては放流水中の E2 の影響を受けている可能性も考えられる。しかしながら, 放流口より下流側での河川水中の E2 濃度を別の調査で測定した際に, その E2 濃度が検出下限値 (0.06ng/L) ~0.20ng/L であったことから, 放流口から河川へと放流された後は希釈されて大幅に E2 濃度が減少するため問題はないと予測される。

#### 4.2.2 放流口付近河川底質の粒度

2005 年 5 月に採取した下水処理水放流口付近の河川底質の粒径加積曲線を図-4.2 に示した。下水処理水放流口から 5m 離れた地点①の底質も 30m 離れた地点③の底質も粒度はほとんど同じであることがわかる。しかし, 下水処理水放流口から 10m 離れた地点②の下流側の底質の粒度に関しては, 他の地点と異なる粒度であった。この地点②の下流側の底質には, 250 $\mu$ m 未満の粒子が他の地点の底質に比べて多く存在していることがわかった。

#### 4.2.3 放流口付近河川底質中の E2 濃度

下水処理水放流口付近の底質中の E2 濃度を図-4.3 に示した。2004 年 11 月に採取した底質中の E2 濃度は 0.006 ~0.011ng/g-dry の範囲であった。一方, 2005 年 5 月に採取した底質中の E2 濃度は 0.013 ~0.025ng/g-dry の範囲であり, 2004 年 11 月に比べわずかであるが高くなっていることがわかった。また, 下水処理水放流口から 10m 離れた地点②の下流側の底質のみは, 他の地点に比べ E2 濃度が高いことがわかる。この理由として, 河川における放流口の下流側がよどみを生じている可能性が考えられる。この地点の底質においては E2 濃度が高いだけでなく, 250 $\mu$ m 未満の粒子についても他の地点に比べ多く存在していた。このことから, 250 $\mu$ m 未満の粒子を多く含む底質は, E2 を多く含んでいる可能性が示唆された。

#### 4.3 小括

本章では, 下水処理水放流口からの放流水中の E2 濃度と, 放流口付近の河川底質における E2 の堆積程度を把握する目的で調査を実施した。得られた知見を以下に示した。

- (1) 放流水中の E2 濃度は, 調査時期によって異なるものの 1.6~2.5ng/L であった。
- (2) 放流口付近の河川底質中の E2 濃度は, 0.006~

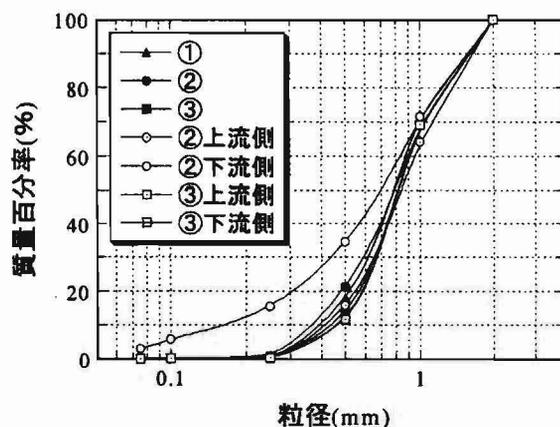


図-4.2 放流口付近底質の粒径加積曲線

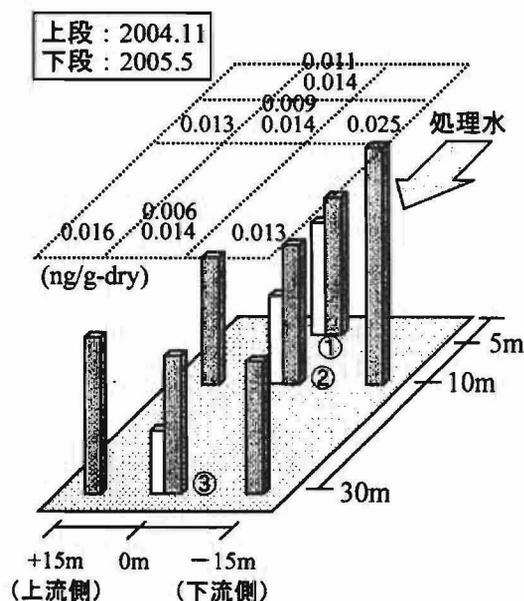


図-4.3 放流口付近底質中の E2 濃度(ng/g-dry)

0.025ng/g-dryであった。また、250 $\mu$ m未満の粒子を多く含む底質は、他と比べE2濃度が高かった。

## 第5章 宮崎県の都市河川・河口域における予備調査

E2の環境水での実態を把握するためには、河川流域を通じた調査が必要となる。河川の長さや面積および場所によってもE2の実態は異なってくると思われるが、複数の河川を一つずつ詳しく調査することは困難である。そこで、都市河川のE2に関する情報を得ることを目的として、宮崎県内を流れる5つの河川について予備調査を行ない、5河川の河川水におけるE2濃度の比較を行った。

### 5.1 調査概要

#### 5.1.1 調査河川

本調査における調査河川を図-5.1に示した。一ツ瀬川は、宮崎県の中央部を流れる長さ約86km、流域面積852km<sup>2</sup>の二級河川である。調査した地点である河川の右岸部は佐土原町であり、下水道未整備の地区がほとんどである。石崎川は、佐土原町の中心部を流れる河川長約7kmの二級河川である。調査した地点は佐土原町の中心部であり、その左岸部は下水道の処理区域であるが右岸部は未だ下水道未整備の地区が多く存在する。大淀川は、宮崎県の河川の中で最も大きな河川であり、河川長地点は大淀大橋付近であり、この地点の周囲は下107km、流域面積2,230km<sup>2</sup>の一級河川である。調査した水道の処理区域である。八重川は大淀川の河口につながる河川であり、河川長約9kmの一級河川である。調査した地点は恒久南であり、下水道整備地区と未整備地区が存在している。清武川は、宮崎市と清武町を流れる河川長約22kmの二級河川である。調査した地点は中流部の清武町役場付近であり、下水道未整備地区がほとんどである。各河川における調査は、それぞれ塩分の影響がない地点の河川水について行った。

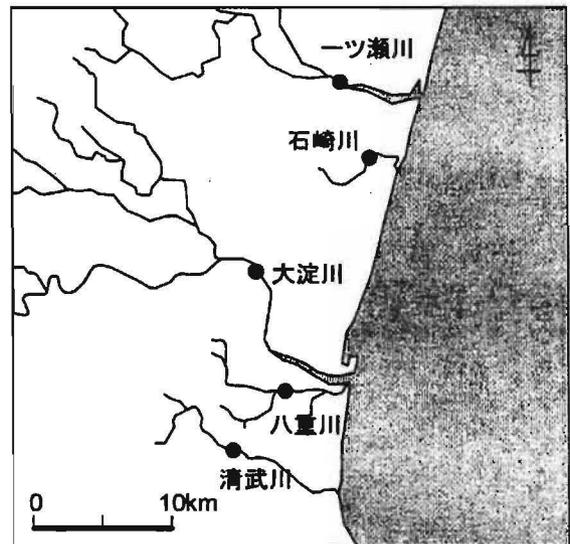


図-5.1 予備調査における調査河川

#### 5.1.2 調査時期

宮崎県内を流れる5つの河川について、2005年8月および12月の2回行った。調査は干潮時に実施した。5河川の河川水中のE2濃度を比較するため、5河川いずれも同じ日に調査した。表-5.1には、調査時における天候および調査

表-5.1 調査時における天候および調査前1週間の天候

調査日	調査時刻	調査日の天候	前1週間の天候					
			1日前	2日前	3日前	4日前	5日前	6日前
2005/8/17	10:00~16:00	晴一時薄雲	晴一時薄雲	晴	薄雲	曇時々晴	晴	薄雲一時晴
2005/12/20	8:00~13:00	晴	晴	快晴	晴	晴	晴一時曇	晴

前1週間の天候を示した。

### 5.1.3 採水方法

各河川の河川水は、L-アスコルビン酸を1g/L加えた1Lポリ瓶に採水した。手付きビーカーを用いて河川水を採取し、ポリ瓶に入れて実験室に持ち帰り分析に供した。直ちに分析できない場合には-30℃で凍結保存し、後日分析した。

## 5.2 結果と考察

### 5.2.1 各河川における河川水中のE2濃度

各河川における河川水中のE2濃度を図-5.2に示した。2005年8月の調査結果では、全ての河川において検出下限値(0.16ng/L)以上のE2が検出された。特に、5河川のうち比較的小河川である石崎川と八重川においては1ng/Lに近い濃度でE2が検出された。この2河川は、他の3河川に比べ河川幅も小さく水量が少ないために、E2に対する河川水の希釈効果が小さいと推測される。12月の調査結果では、一ツ瀬川、大淀川、清武川においてE2濃度が検出下限値以下であり、石崎川においても8月の調査結果に比べ低いE2濃度であった。しかしながら、八重川におけるE2濃度は8月、12月ともに0.9ng/L以上であり、5河川のうち最もE2濃度が高かった。ここで、環境庁が行った全国一斉調査の結果では、河川において0.1~11ng/Lの範囲でE2が検出された調査地点数は124地点数のうち80地点と65%の地点で検出されている<sup>1)</sup>。この報告はGC/MS法を用いて分析した結果であり、ELISA法を用いて分析した八重川河川水のE2濃度をこの報告と比較するのはふさわしくないと考えられるが、おおまかに比較するとオーダーは同程度であった。

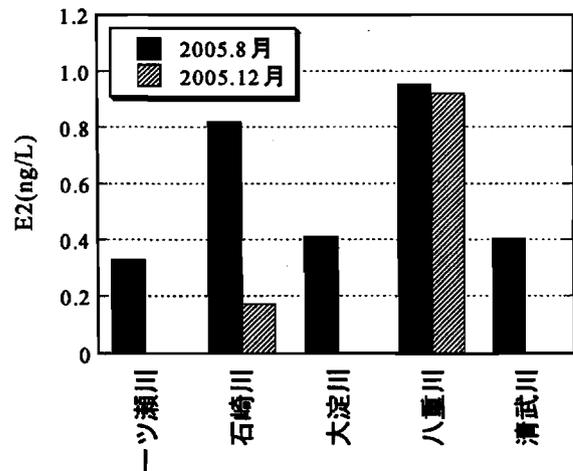


図-5.2 各河川における河川水中のE2濃度

## 第6章 八重川河川・河口域における調査

第5章において、都市河川のE2に関する情報を得ることを目的として、宮崎県内を流れる5河川について予備調査を行なった。その結果、八重川河川水中のE2濃度が最も高く、E2汚染の影響を受けやすい河川であると予想される。そこで、八重川に着目して河川水と河川底質のE2の調査をすることにした。本章では、八重川河川およびその河口域について、河川水中におけるE2の挙動や河川底質における挙動といった河川流域を通した詳しい調査を実施し、河川底質におけるE2の蓄積程度および蓄積箇所を把握することを目的とした。

## 6.1 調査概要

### 6.1.1 調査区間

八重川における調査地点を図-6.1に示した。八重川は宮崎市南部と清武町を流れる一級河川である。河川長が約9kmと小さな河川であるため、汚染の影響を受けやすいと考えられる。また、八重川の上流部には下水道未整備の地区が存在する（中流部にも存在する）。

八重川における調査を実施する前に、干潮時・満潮時における河川水中の塩分濃度を把握した。塩分濃度の測定には、HORIBA製の電極 WATER QUALITY MONITORを用い、河口から上流にかけて測定した。各地点における塩分濃度の変化を図-6.2に示した。河口から地点④にかけては、干潮時であっても海水の存在が認められる区間である。満潮時においては、地点⑩付近にまで海水の存在が認められた。本調査の調査区間として、河川水については分析の際の塩分影響を避けるため塩分影響の無い地点⑫から上流部の地点⑬までとし、河川底質については河口から塩分濃度が0‰となる地点⑯までの区間を調査した。

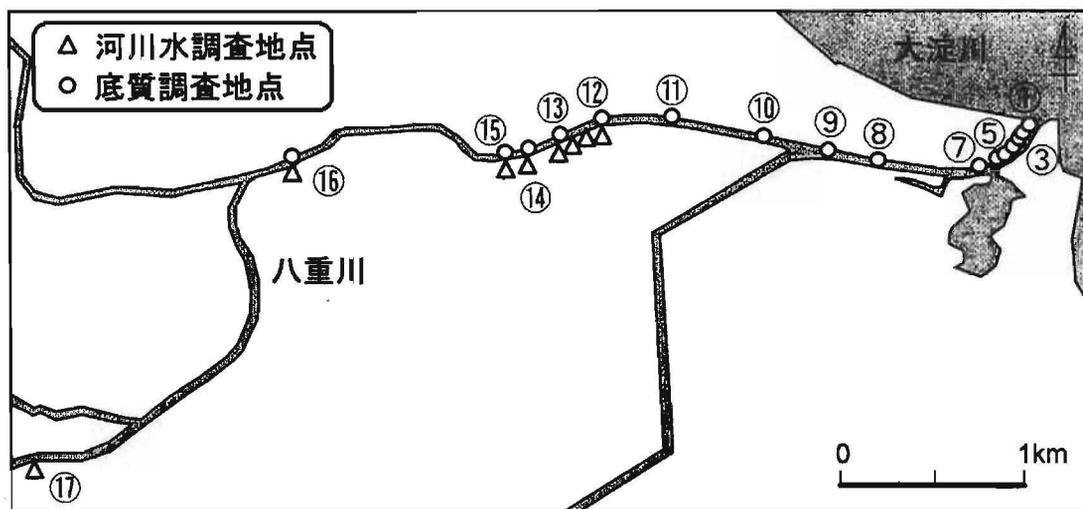


図-6.1 八重川における河川水および河川底質調査地点

表-6.1 調査時における天候および調査前1週間の天候

河川水								
調査日	調査時刻	調査日の天候	前1週間の天候					
			1日前	2日前	3日前	4日前	5日前	6日前
2005/4/26	13:00~14:00	曇時々晴	曇時々雨	晴	曇	快晴	晴	雨後曇一時晴
2005/8/17	10:00~11:00	晴一時薄曇	晴一時薄曇	晴	薄曇	曇時々晴	晴	薄曇一時晴
2005/12/28	10:00~11:00	晴後曇	晴一時曇	晴	晴一時曇	晴後薄曇	晴	晴

底質								
調査日	調査時刻	調査日の天候	前1週間の天候					
			1日前	2日前	3日前	4日前	5日前	6日前
2004/8/3	14:00~	晴時々曇	曇時々雨雷	曇一時雨	晴後曇一時雨	快晴	晴	晴
2004/12/9	10:00~	曇	快晴	晴時々曇一時雨	快晴	晴大風	大雨	曇一時晴
2005/4/28	14:00~	快晴	晴後時々薄曇	曇時々晴	曇時々雨	晴	曇	快晴
2005/8/16	9:00~	晴一時薄曇	晴	薄曇	曇時々晴	晴	薄曇一時晴	晴時々曇
2005/10/6	13:00~	曇一時雨	曇時々雨雷	曇雷	曇後一時雷	晴一時曇	曇一時晴	曇一時雨
2005/12/28	10:00~	晴後曇	晴一時曇	晴	晴一時曇	晴後薄曇	晴	晴

### 6.1.2 調査時期

河川水における調査は2005年4月、8月および12月の計3回実施した。底質における調査は2004年8月、12月、2005年4月、8月、10月、12月の計6回実施した。いずれの調査も干潮時に実施した。表-6.1には、調査時における天候および調査前1週間の天候を示した。

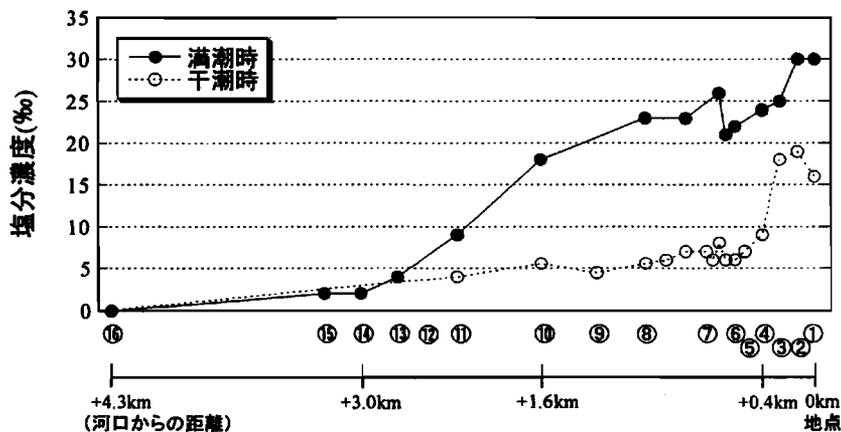


図-6.2 八重川各地点における干潮時・満潮時の塩分濃度

### 6.1.3 採水方法

河川水は、L-アスコルビン酸を1g/L加えた1Lポリ瓶に採水した。地点⑫から地点⑰へと上流に移動しながら各地点の表層河川水を手付きビーカーを用いて採水し、ポリ瓶に入れ実験室に持ち帰り分析に供した。直ちに分析できない場合には-30℃で凍結保存し、後日分析した。

### 6.1.4 採泥方法

底質を採泥するため、透明の塩化ビニール管（内径6.5cm、長さ1m）を用意した。河口地点①から上流部の地点⑰へと上流に移動し、各地点の河川底質に塩化ビニール管を差し込んで上部・下部をふさぎ、表層5cmの底質をステンレス製のバットに採取した。この作業を同じ付近（約30cm間隔）の底質で3度繰り返し、ステンレスバット中の底質をよく混合させた後、ビニール袋に入れ実験室に持ち帰り分析に供した。直ちに分析できない場合には-30℃で凍結保存し、後日分析した。

### 6.1.5 粒度分析法

第4章の4.1.5で記した方法と同様に分析した。

## 6.2 結果と考察

### 6.2.1 河川水中のE2濃度

八重川における河川水中のE2濃度の挙動を図-6.3に示した。図-6.3の横軸には、河口から各地点までの距離を示した。八重川中流部の地点⑫から地点⑰にかけての河川水中のE2濃度は、2005年4月において0.64~2.65ng/L、8月において0.76~2.26ng/L、12月において0.43~2.71ng/Lで、3回の調査ともほとんど同じようなE2濃度であり、調査時期の違いによる河川水中のE2濃度には大きな違いが認められなかった。また、いずれの調査時期においても上流から下流にかけて減少している傾向がみられた。地点⑰における河川水中

の E2 濃度が下流部よりも高いのは、この付近が下水道未整備地区であるためと推測され、地点⑰から地点⑯にかけては他河川の合流のために希釈されて大幅に E2 濃度が減少したと推測される。

### 6.2.2 河川底質の粒度分布

2004 年 12 月に採取した八重川底質の粒度加積曲線を図-6.4(a)に、2005 年 12 月に採取した底質の粒径加積曲線を図-6.4(b)に示した。八重川底質の粒度は、大淀川の下処理水放流口付近の底質の粒度と比較して、0.5 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多かった。2005 年 12 月における地点①の粒度は、河口直下であることから粗い粒子が大部分であった。また、2004 年 4 月から 1 年経過しても粒度の変化がほとんど無い地点は③, ④, ⑤, ⑥, ⑧, ⑨, ⑩, ⑫, ⑬, ⑯であり、ほとんどの地点で粒度は変化していないことがわかる。地点①, ②の粒度が 2004 年 12 月と 2005 年 12 月で異なる理由として、この地点が海波の影響を受ける地点であり、河川底質表層が洗い流されたことによって粒度が変化したと考えられる。また、地点⑭については干潮時あるいは満潮時においても水深が常に浅く、表層水の流れの影響を受けやすい地点であるために粒度が変化したと考えられる。

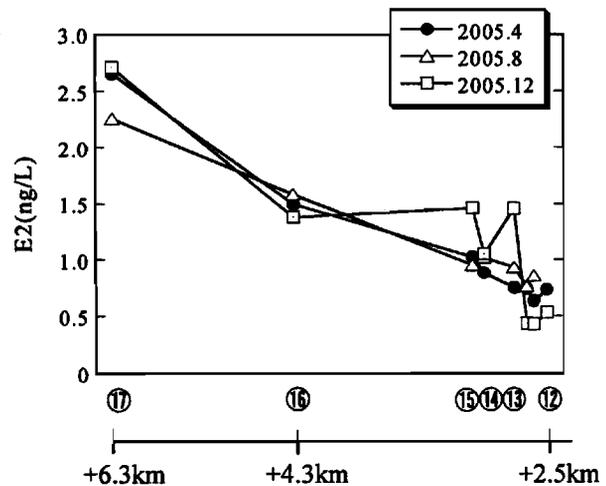


図-6.3 八重川河川水中における E2 濃度の挙動

### 6.2.3 河川底質中の E2 濃度

八重川の各地点における河川底質への E2 堆積状況を図-6.5 に示した。図-6.5 の横軸には、河口から各地点までの距離を示した。八重川河川底質中の E2 濃度は全地点を通して、2004 年 8 月においては 0.010~0.330ng/g-dry, 12 月においては 0.009~0.073ng/g-dry, 2005 年 4 月においては 0.012~0.205ng/g-dry, 8 月においては 0.021~0.176ng/g-dry, 10 月においては検出下限値 (0.005) ~0.135ng/g-dry, 12 月においては検出下限値 (0.005) ~0.146ng/g-dry であった。2005 年 10 月は台風 14 号 (9 月発生) 通過後の翌月であるにもかか

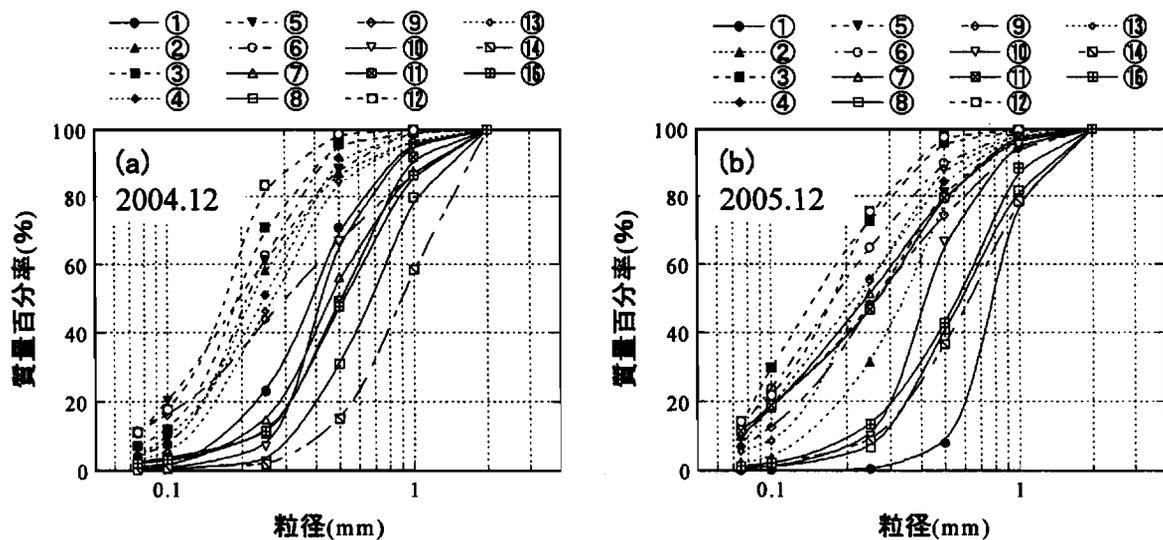


図-6.4 八重川河川底質の粒径加積曲線

ならず、8月調査結果と比較してE2濃度の大きな減少は認められなかった。ここで、八重川河川底質についてE2が多く堆積している地点を大きく三つに分けることができる。一つ目は地点②から地点⑥にかけての河口付近(0.017~0.218ng/g-dry)、二つ目は、地点⑨(0.031~0.256ng/g-dry)、三つ目が地点⑪、⑫(0.025~0.330ng/g-dry)である。これらの地点はどの調査時期においても他の地点に比べ河川底質にE2が多く蓄積していた。地点⑨の河川底質でE2が多く堆積している理由については、地点⑩と地点⑨の間において下水道未整備田地区を流れる山内川が合流しているためであると推測される。

八重川河川底質におけるE2濃度を他の論文等でみられる底質のE2濃度と比較してみると、同程度あるいは若干低いように思われる。環境庁が行った全国一斉調査の結果、河川底質で0.01~0.55ng/gの範囲でE2が検出された調査地点数は32地点のうち24地点であり、75%の河川底質で検出されている<sup>1)</sup>。本調査における八重川河川底質のE2濃度も、全国一斉調査結果と同程度のE2濃度であったといえる。一方で、全国15水系(石狩川、阿武隈川、利根川、荒川、久慈川、那珂川、多摩川、鶴見川、相模川、富士川、信濃川、庄内川、淀川、重信川、筑後川)20地点の河川底質調査結果で、0.3~1.4ng/gの範囲でE2が検出された地点数は20地点のうち11地点であったという報告もある<sup>2)</sup>。このように、調査対象河川あるいは調査地点によって底質におけるE2濃度はさまざまであり、分析方法もさまざま存在する。河川の違いにおけるE2濃度の違いが、河川の性質によるものかあるいは分析方法の違いによるものか把握するためにも、底質における調査・研究はますます必要になってくると考えられる。

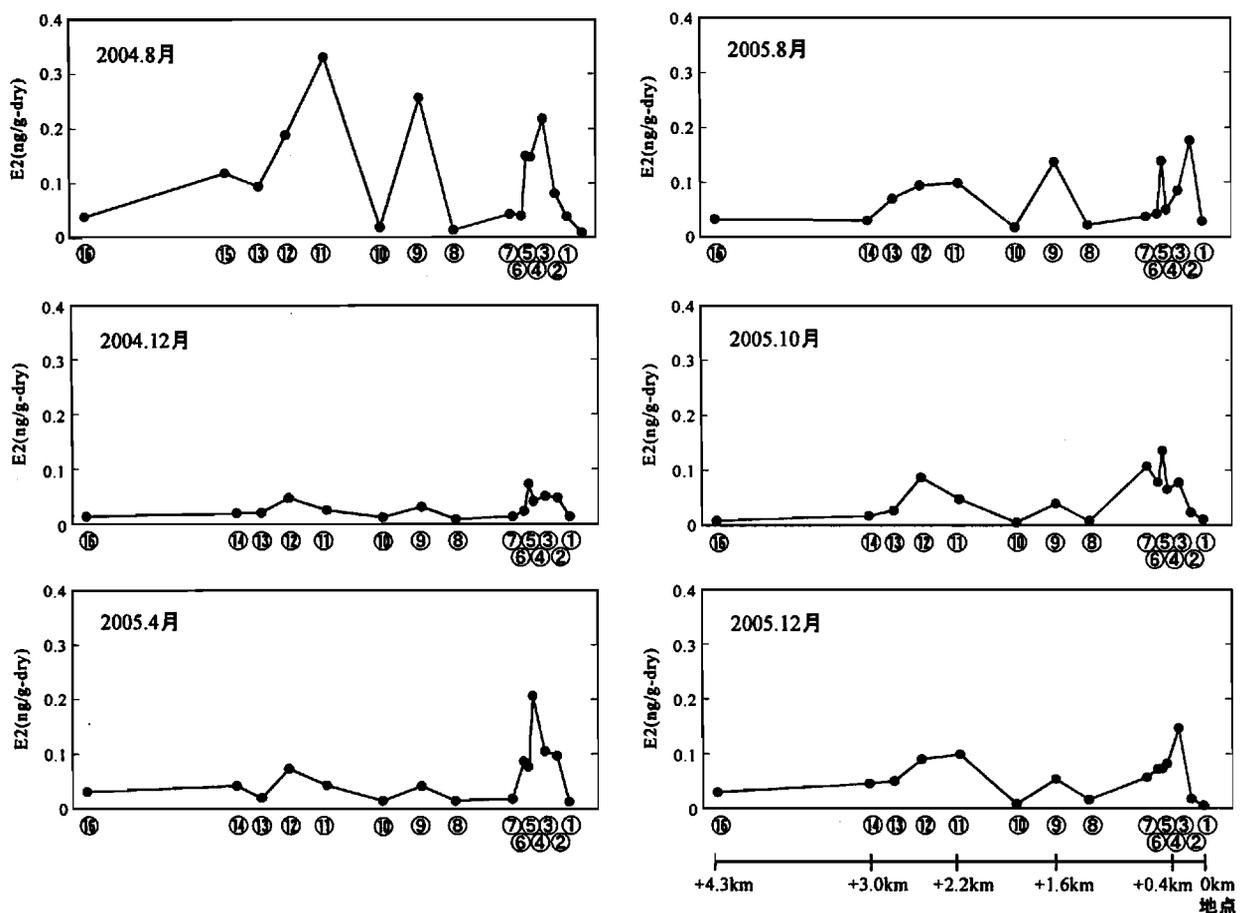


図-6.5 八重川河川底質中のE2濃度

## 6.2.4 河川底質における粒度と E2 濃度との関係

第4章において、下水処理水放流口付近の底質中の E2 濃度と粒度を調査した。その結果、全7地点の内1地点のみが他の6地点に比べ底質中の E2 濃度が高く、この地点の底質の 250 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多かった。このことから、底質の粒度と E2 濃度の間には関係があるのではないかと考えられた。そこで、2004年12月および2005年12月に採取した八重川底質について、粒度と E2 濃度の相関を調べてみた。図-6.6(a)に、底質における 75 $\mu$ m 未満、75 $\mu$ m 以上 100 $\mu$ m 未満、100 $\mu$ m 以上 250 $\mu$ m 未満の粒子の割合と底質中の E2 濃度との関係を示した。75 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多い底質は E2 濃度も高く ( $R=0.818$ )、また 75 $\mu$ m 以上 100 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多い底質も E2 濃度に比例して高くなった ( $R=0.916$ )。100 $\mu$ m 以上 250 $\mu$ m 未満の粒子の割合と E2 濃度との相関は中程度であった ( $R=0.517$ )。100 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多い底質ほど E2 が蓄積し易いということがわかった。図-6.6(b)に、底質における 250 $\mu$ m 以上 500 $\mu$ m 未満、500 $\mu$ m 以上 1000 $\mu$ m 未満、1000 $\mu$ m 以上 2000 $\mu$ m 未満の粒子の割合と底質中の E2 濃度との関係を示した。250 $\mu$ m 以上の粒子の割合が多い底質は E2 濃度が低い関係がみられた。以上の結果から、250 $\mu$ m 未満の粒子の割合が多い底質は底質中の E2 濃度と正の相関があり、250 $\mu$ m 以上の粒子の割合が多い底質は底質中の負の相関があった。

そこで、2005年12月において八重川河口付近の地点④の底質の微細な粒子のみについて E2 濃度を測定してみた。まず地点④において、採取した底質と河川水をステンレスバットに入れ懸濁させた。ステンレスバット内の混合液中において、すぐに底に沈殿しないような微細な粒子のみを採取し実験室に持ち帰った。さらに、実験室において 250 $\mu$ m 未満の粒子に選別した。本章では、地点④で採取した 250 $\mu$ m 未満の粒子を浮泥物と称する。この底質表層の浮泥物中の E2 濃度を2回測定したところ、0.162ng/g-dry と 0.114ng/g-dry であり、同一調査日の地点④における底質 (2000 $\mu$ m 未満の粒子全てを含む) の E2 濃度 (0.081ng/g-dry) に比べ約2倍高かった。

## 6.2.5 河川底質における粒度とクロロフィル a 濃度との関係

6.2.4において、地点④における底質表層の浮泥物から E2 をメタノール抽出した際のメタノール抽出液は緑色を呈していた。通常、河川底質 (2000 $\mu$ m 未満の粒子全てを含む) から E2 を抽出した場合のメタノール

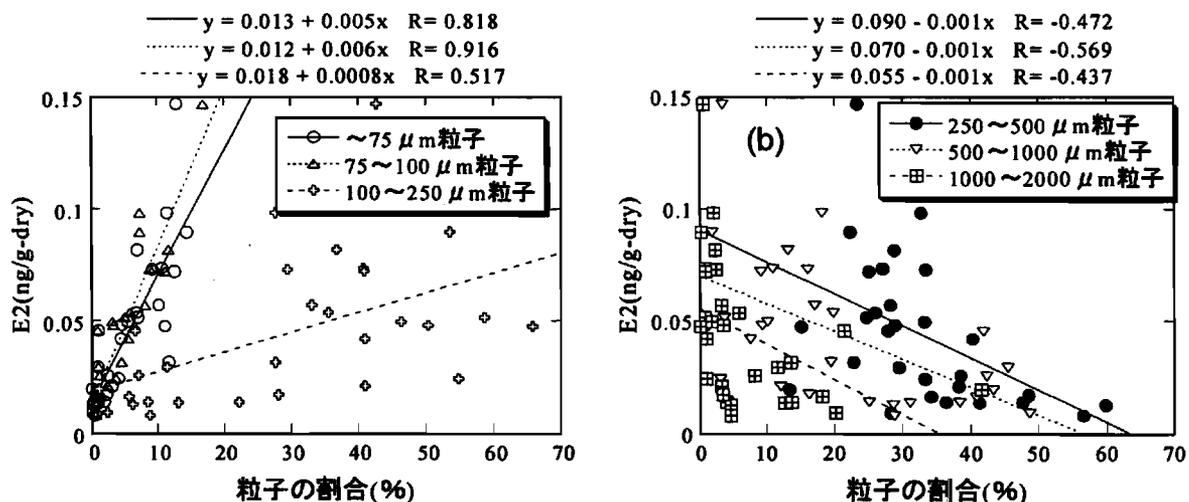


図-6.6 河川底質の粒度と E2 濃度の比較

抽出液は黄色であるため、地点④における底質表層の浮泥物には植物プランクトンを多く含んでいると推測された。そこで、2005年12月における地点④の底質中の粒度とクロロフィルa濃度の関係について検討した。クロロフィルa濃度は、アセトン抽出法に従って算出した。2000 $\mu\text{m}$ 未満の粒子全てを含む河川底質と、底質表層の浮泥物のクロロフィルa濃度をそれぞれ2回ずつ分析したところ、前者が18.1 $\mu\text{g/g-dry}$ と19.5 $\mu\text{g/g-dry}$ であり、後者が56.5 $\mu\text{g/g-dry}$ と52.6 $\mu\text{g/g-dry}$ であった。一般に底質は、層位が深くなるほど粒度が粗く、浅いほど細かくなると考えることができる。このようなことから、底質表層に薄く存在している微細な粒子には植物プランクトンが多く付着している、あるいは微細な粒子自体が植物プランクトンではないかと推測される。しかしながら、E2が植物プランクトンに付着しやすいのかといったことは過去の報告にもなく、本調査の結果からも判断することはできない。図-6.7は、河川底質(2000 $\mu\text{m}$ 未満の粒子全てを含む)および浮泥物中のE2濃度、クロロフィルa濃度を示している。

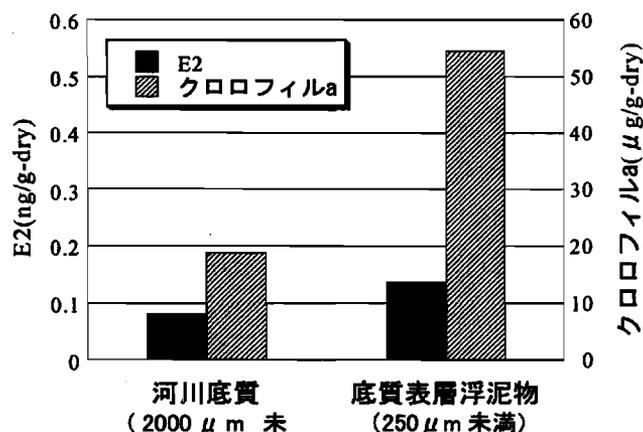


図-6.7 河川底質および浮泥物中のE2、クロロフィルa濃度の比較。

### 6.3 小括

本章では、八重川河川における河川水と河川底質のE2濃度を把握する目的で調査を実施した。得られた知見を以下に示す。

- (1) 河川水中のE2濃度は0.43~2.71ng/Lであり、調査時期による変動はほとんど認められなかった。また、上流から下流にかけてE2濃度の減少がみられた。
- (2) 河川底質中のE2濃度は調査時期によって異なったが、検出下限値(0.005)~0.330ng/g-dryであった。いずれの調査時期においても、河口付近の底質には他の地点に比べE2が多く堆積していた(0.017~0.218ng/g-dry)。
- (3) 河川底質における250 $\mu\text{m}$ 未満の粒子が多い底質は、E2濃度が高いことがわかった。地点④における底質表層の浮泥物は、2000 $\mu\text{m}$ 未満の粒子全てを含む河川底質と比べ、E2濃度が約2倍高く、クロロフィルa濃度も約2.5倍高かった。

## 第7章 八重川河川底質におけるE2濃度と堆積有機物濃度との関係

八重川におけるE2調査の結果、河川水中のE2濃度は河川を流下するにしたがって減少傾向がみられ、底質においては河口付近にE2が多く堆積していることがわかった。河口付近は、河川水と海水の混合が激しい場所であり、有機物等の負に帯電した官能価と海水の陽イオンとの間の電解相互作用によって凝集が引き起こされ<sup>1)</sup>、有機物等の溶存物質が底質へと堆積するといわれている。実際に、八重川河口付近の底質表層と考えられる微細な粒子(浮泥物)中には植物プランクトンが多く存在し、河川水と海水の混合によって河

川水中の植物プランクトンが凝集堆積した可能性が考えられる。このように河川水中の有機物等が凝集する際に、河川水中の E2 も何らかの影響を受けて河川底質へと堆積したと推測される。そこで本章では、八重川河川底質における有機物の存在状態について調査し、底質中に含まれる E2 との関係について検討することを目的とした。

## 7.1 堆積有機物の分析方法

底質中の有機物は、タンパク質、炭水化物、脂質、および腐植物質のフルボ酸、フミン酸、ケローゲンとこれらの前駆物質に分類することができる<sup>2)</sup>。そこで、本研究では酸加水分解およびアルカリ加水分解によって底質中の有機物の分類を行った。すなわち、おおまかに微生物等の生体成分のような塩酸加水分解によって抽出されやすい有機物であるタンパク質、炭水化物、脂質等を酸分解性有機物として分析し、酸分解で抽出されにくい有機物のうち、水酸化ナトリウム溶液で抽出され、酸に戻した場合でも溶液中で安定な有機物をフルボ酸として分析した。フルボ酸は河川水中の溶存有機物の大部分を占める有機物でもある。

### 7.1.1 酸分解性有機物<sup>3)</sup>

酸分解性有機物の分析フローを図-7.1 に示した。河川底質から酸分解性有機物を抽出するため、6M HCl で抽出を行った。底質試料 4g-wet を 100mL ポリ瓶に入れ、6M HCl 40mL を加えて密閉した。70℃のウォーターバス中で 18 時間反応させ、底質中の酸分解性有機物を塩酸溶液に抽出した。放冷後、ポリ瓶内の全量を遠心管に移し、2000rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みは 100mL の分解瓶に移し、残渣は 1M HCl 40mL を加えて再び遠心分離し、上澄みは先の分解瓶に足し合わせ、蒸留水で 100mL にメスアップした。この塩酸溶液を 5 倍希釈し、塩酸溶液中の有機炭素量を TOC 分析装置（島津製作所製 TOC-5000 型）で定量し、底質中の酸分解性有機物濃度を算出した。

### 7.1.2 フルボ酸<sup>3)</sup>

フルボ酸の分析フローを図-7.2 に示した。酸分解処理後の残渣 4g-wet を 100mL ポリ瓶に入れ、1M NaOH 40mL を加えて密閉した。70℃のウォーターバス中で 18 時間反応させた。放冷後、ポリ瓶の全量を遠心管に移し、2000rpm で 10 分間遠心分離した。上澄みは別の遠心管に入れ、これに蒸留水 100mL と濃塩酸 5mL を加えた。この濃塩酸を加えた溶液は、pH<1 となるためフミン酸が沈殿する。このフミン酸は 2000rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを 100mL の分解瓶に移し、蒸留水で 100mL にメスアップした。この溶液をフルボ酸溶液とし、有機炭素量を TOC 分析装置（島津製作所製 TOC-5000 型）で定量し、底質中のフルボ酸濃度を算出した。

## 7.2 結果と考察

### 7.2.1 八重川河川底質中の堆積有機物濃度

図-7.3 に、八重川河川底質中の酸分解性有機物濃度およびフルボ酸濃度を示した。底質において、フルボ

酸が占める割合は酸分解性有機物の 1/2 程度であった。酸分解性有機物濃度が高い地点はフルボ酸濃度も高い傾向がみられた。また第 6 章において、E2 が多く堆積していた地点は河口付近（地点②から地点⑥）、地点⑨、地点⑩⑪の三つに大別できた。酸分解性有機物およびフルボ酸についても E2 が高く検出された地点と同じ地点で多く存在しており、E2 の挙動と似た挙動がみられた。八重川河川底質における堆積有機物濃度は、分析方法を参考にした他の底質と比較して同程度の結果であった。

## 7.2.2 八重川河川底質における E2 濃度と堆積有機物濃度の関係

八重川河川底質中の E2 濃度と酸分解性有機物濃度、フルボ酸濃度との関係を図-7.4 に示した。八重川河川底質の全地点を通して、E2 は酸分解性有機物、フルボ酸ともに中程度の相関であった。しかしながら、八重川底質においてフルボ酸の存在状態は、酸分解性有機物の 1/3~1/2 程度であった。第 6 章において、いずれの調査時期においても八重川河口付近の河川底質に E2 が多く堆積していたことから、河口付近の地点②から地点⑥までの底質のみに着目して E2 濃度と堆積有機物濃度との関係を調べた。その結果を図-7.5 に示した。この場合、E2 濃度と酸分解性有機物濃度の相関係数は  $R=0.781$  と全地点を対象にした場合に比べわずかに高くなったほどであった。また、E2 濃度とフルボ酸濃度との相関もやはり中程度であった。

以上のことから、八重川河口付近や地点⑫付近の河川底質において E2 が多く堆積していた要因として、植物プランクトンおよび微生物等の生体成分であると思われる酸分解性有機物（タンパク質、炭水化物、脂質等）、およびフルボ酸が寄与しているのではないかと示唆された。河川水中において、これらの有機物と E2 が結合あるいは付着しているのか、および河口付近で有機物と E2 の凝集が起こっているのかといった点は不明であるが、E2 が底質へ堆積するにはこれらの有機物の寄与が大きいことが示唆された。

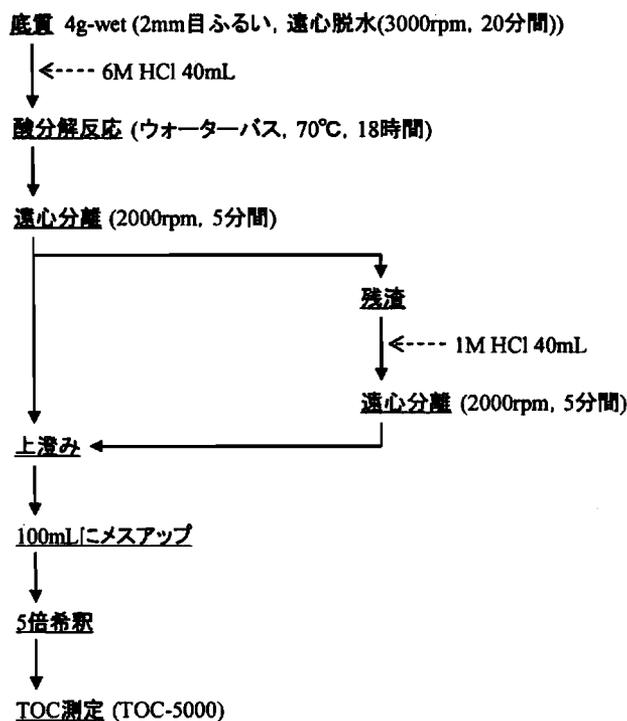


図-7.1 酸分解性有機物分析フロー

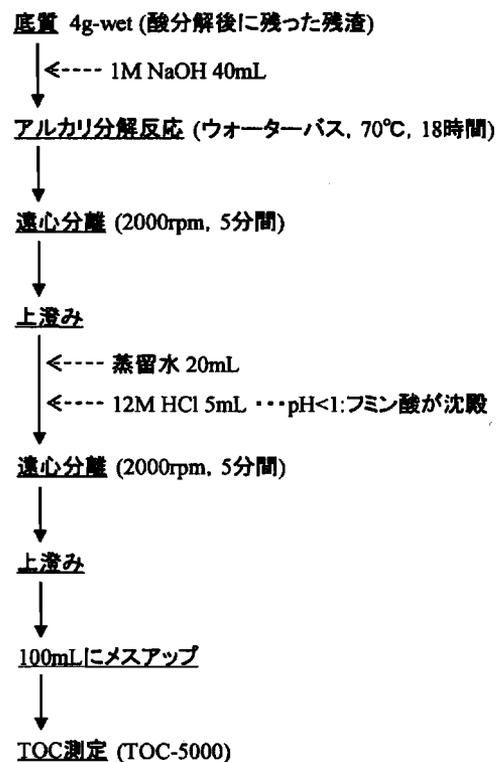


図-7.2 フルボ酸分析フロー

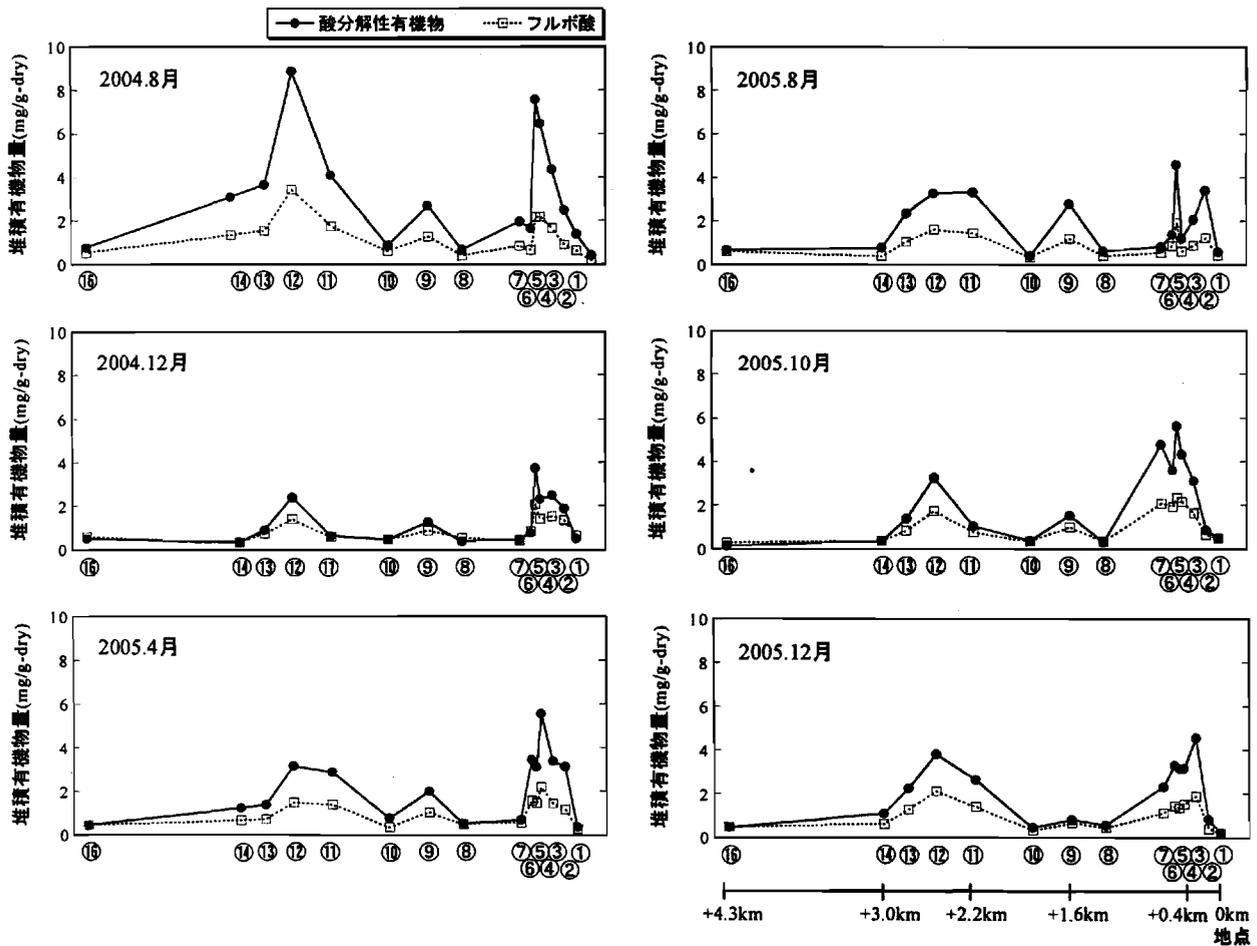


図-7.3 八重川河川底質中の堆積有機物濃度

## 第8章 河口域調査のまとめ

本研究では、ELISA 法を用いた環境水中の E2 の実態調査を行なった。

第4章において、下水処理水放流口付近における調査を実施した。標準活性汚泥法を採用している下水処理場の放流水から 1.6~2.5ng/L の濃度の E2 が検出された。標準活性汚泥法での E2 除去率は高いといわれているものの、本調査における放流水中の E2 濃度は雄メダカが雌化すると報告された最小影響濃度 (5ng/L) の 1/3~1/2, 最大無作用濃度 (1ng/L) を超える濃度であった。放流水中の E2 濃度をいかに軽減させていくかということが今後課題になると思われる。放流口付近の底質調査に関しては、放流口の下流側において E2 が他の地点に比べ多く堆積していた。蓄積した理由としては、放流口の下流側の河川水がよどみ易いためと考える。この底質に蓄積している E2 が生物に与えるほどの濃度であるかは不明であるが、河川のよどみが生じている所というのは魚類が多く生息する場所であり、今後底質中の E2 に関して生物への影響濃度が明らかになった場合、調査に重点を置くべき場所であると考えられる。

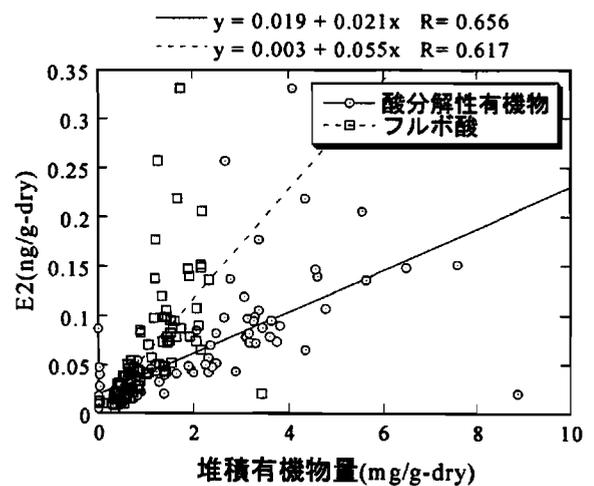


図-7.4 八重川河川底質における堆積有機物濃度と E2 濃度の関係

第6章において、八重川河川・河口域における河川水中および底質中の E2 の実態について調査を行った。八重川河川水中の E2 濃度 (0.43~2.71ng/L) は、他の論文でみられる河川水中の E2 濃度と同様あるいは若干低い濃度であった。調査時期による E2 濃度の変動はみられず、上流から下流に流下するにしたがって河川水中の E2 濃度は減少した。八重川河川底質中の E2 濃度は、調査地点あるは調査時期によって異なる E2 濃度であり、検出下限値 (0.005) ~0.330ng/g-dry であった。また、下水処理水放流口付近の河川底質に比べ 1~2 オーダー高い E2 濃度の地点が存在した。いずれの調査時期においても河口付近に多く堆積していた (0.017~0.218ng/g-dry)。

第7章において、八重川河川底質における E2 濃度と堆積有機物の関係について調べた。酸分解性有機物、フルボ酸ともに E2 と中程度の相関が認められた。すなわち、E2 の河川底質への堆積には、微生物等の生体成分であると思われるタンパク質、炭水化物、脂質等の有機物や河川水中の溶存物質のうち大部分を占めるフルボ酸が寄与している可能性が示唆された。

本研究は河川における E2 の実態を調査したものであるため、河川水中の溶存有機物が E2 の堆積に寄与しているとはっきり言い切ることはできない。しかしながら、生物に対する E2 の影響濃度が将来明らかになった場合あるいは基準等が制定された場合に、本データが参考になれば幸いである。

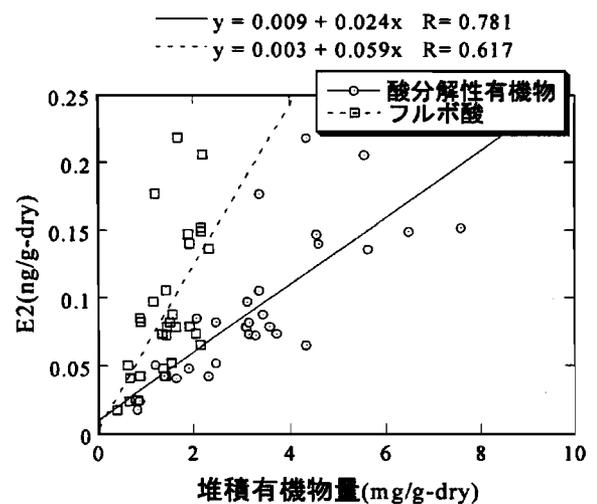


図-7.5 八重川河口付近の底質に着目した場合の堆積有機物濃度と E2 濃度の関係

## 参考文献

### 第1章

- 1) 是澤裕二 (1999) 河川における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査の概要, 下水道協会誌, 36, 8-11.
- 2) 藤塚哲朗 (1999) 中小河川における環境ホルモン実態調査の概要, 下水道協会誌, 36, 12-20.
- 3) 田中宏明 (1999) 水環境における内分泌化学物質の実態調査, 水環境学会誌, 22, 629-632.
- 4) 国包章一 (1999) 内分泌攪乱作用を疑われている化学物質の水道における実態調査, 水環境学会誌 22, 633-635.
- 5) 栗林栄, 二階堂悦生, 杉本東 (2002) 下水処理場における環境ホルモンの実態調査, 用水と廃水, 44, 39-45.
- 6) 五十嵐正雄 (1978) 内分泌婦人科学-生殖内分泌の基礎と臨床-, 南山堂.
- 7) 環境庁水質保全局 水質管理課 (1998) 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).
- 8) 国土交通省都市・地域整備局下水道部 (2001) 平成 12 年度下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告書 (案).
- 9) 鈴木祥広, 平良浩保, 満山宗人, 下津義博, 丸山俊朗 (2005) 浄化槽におけるエストロゲンの実態調査, 用水と廃水, 47 (3), 237-243.
- 10) 化学物質安全情報研究会 (1999) 環境ホルモンの問題とその対策.

- 11) Ternes TA. Et al (1999) Behavior and occurrence estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *Sci Total Environ*, 225, 91-99.
- 12) 橋本敏一, 恩田建介, 中村由美子, 多田啓太郎, 宮晶子, 三品文雄 (2004) 下水処理場における内分泌攪乱物質の消長と挙動, *水環境学会誌*, 27 (12), 797-802.
- 13) 川合真一郎 (2004) 環境ホルモンと水生生物, 成山堂書店.
- 14) 田畑彰久, 亀井翼, 眞柄泰基, 渡辺哲理, 宮本信一, 大西悠太, 伊藤光明 (2003) ヒメダカビデロジェニンを指標としたノニルフェノール, ビスフェノール A, 17 $\beta$ -エストラジオールおよびこれらの混合曝露の影響, *水環境学会誌*, 26 (10), 671-676.

## 第2章

- 1) 松岡須美子, 黒川優子, 中造真衣子, 川合真一郎, 山田久, 藤井一則, 大久保信幸, 松原孝博, 西村定一, 橋本伸哉, 坂本達也 (2004) 数種の *in vitro* アッセイを用いた我国沿岸海水および河川水中のエストロゲン様物質の測定, *水環境学会誌*, 27 (12), 811-816.
- 2) 日本エンバイロケミカルズ (株), 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) ELISA キット使用説明書.
- 3) 環境庁水質保全局水質管理課 (1996) 改訂版 底質調査方法とその解説.

## 第3章

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課 (1996) 改訂版 底質調査方法とその解説.

## 第4章

- 1) 松岡須美子, 黒川優子, 中造真衣子, 川合真一郎, 山田久, 藤井一則, 大久保信幸, 松原孝博, 西村定一, 橋本伸哉, 坂本達也 (2004) 数種の *in vitro* アッセイを用いた我国沿岸海水および河川水中のエストロゲン様物質の測定, *水環境学会誌*, 27 (12), 811-816.
- 2) 堀江信之 (1999) 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*, 36 (445), 21-25.

## 第5章

- 1) 平成 11 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) 実態調査結果, 環境庁水質保全局水質管理課.

## 第6章

- 1) 平成 11 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質 (いわゆる環境ホルモン) 実態調査結果, 環境庁水質保全局水質管理課.
- 2) 田中宏明 (1999) 水環境における内分泌化学物質の実態調査, *水環境学会誌*, 22, 629-632.

## 第7章

- 1) Carlos E. Del Castillo, Fernando Gilbes, Paula G. Coble and Frank E. Muller-Karger (2000) On the dispersal of riverine colored dissolved organic matter over the West Florida Shelf, *Limnol. Oceanogr.*, 45 (6), 1425-1432.
- 2) 松原英隆, 木村健, 浦野紘平 (2004) 有明海と博多湾の干潟底質中の有機物に関する研究, *水環境学会誌*, 27 (5), 337-342.
- 3) 松原英隆, 上田英弘, 木下誠, 浦野紘平 (2002) 底質中の有機物の分類方法に関する研究, *水環境学会誌*, 25 (2), 104-111.
- 4) 福島正巳 (2004) 有害化学物質キャリアーおよびプールとしての腐植物質の機能, *水環境学会誌*, 27 (2), 82-85.

## 第9章 河口・沿岸域での海水混合による溶存態のフルボ酸鉄の凝集プロセスにおける E2 の動態

### 1. はじめに

一般に、河川水中の溶存有機物は、河口・沿岸域などの海水混合域において、懸濁粒子や鉄などの凝集・沈降に重要な役割を果たしていると考えられている。河川水中の溶存物質の大部分は、腐食物質であるフミン物質であると報告されている。腐食物質であるフミン物質である。フミン物質は、動植物の死骸が分解されていく過程で最終的に生成される安定した有機物質であり、酸やアルカリへの溶解性によって、フミン酸（酸不溶、アルカリ溶解）、フルボ酸（酸とアルカリに溶解）およびヒューミン（酸とアルカリに不溶）に分類される<sup>1)</sup>。フミン酸は、河川水中の溶存物質の約 50%に相当し、そのフミン酸の 90%以上がフルボ酸 (FA) であると言われている<sup>1)</sup>。河川水中で FA は、鉄と錯体を形成してフルボ酸鉄として存在しており、河川水中の溶存鉄の大部分がフルボ酸鉄であると言われている。フルボ酸鉄は、海水混合域まで運搬され、凝集・沈降に大きく関与するとされている<sup>2)</sup>。

一方、今日の水環境における問題として、外因性内分泌攪乱物質と称される化学物質の微量汚染による生態系さらには人体への影響が危惧されている。わが国では、「環境ホルモン戦略計画 SPEED98」以降の調査研究によって、水環境の湖沼・河川等および下水や下水処理プロセスについて、環境ホルモンと疑われる数十種類の化学物質の実態調査が実施された。その調査結果から、調査・研究対象として重要な物質として、樹脂原料のビスフェノール A、非界面活性剤の分解物のノニフェノール、および人畜由来の 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) がリストアップされている。ビスフェノール A およびノニフェノールについては、使用目的・場所が限定されているため、明らかな有害性が認められた場合には使用制限・禁止が可能であるが、E2 は、下水に普遍的に存在する。また、E2 は、外因性内分泌攪乱物質のなかでもエストロゲン活性が最も高く、最重要物質に位置づけられている<sup>3)</sup>。しかしながら、河口・沿岸域などの海水混合域における E2 の挙動に関する知見・情報は極めて少ないのが現状である。海水混合域において、E2 の凝集・沈降による底質への蓄積過程があるとすれば、海水混合域の生態系に及ぼす影響も否定できない。

そこで本研究では、河口・沿岸域での海水混合による溶存態のフルボ酸鉄の凝集プロセスにおける E2 の動態との関係を検討した。

### 2. 実験方法および材料

河川の溶存物質は、海水と混合することで凝集・沈降するといわれている。本章では、まず土壌からフルボ酸を抽出し、人工河川水と混合させて作成した模擬河川水に E2 標準物質を添加し、人工海水を混合させて、全有機炭素 (TOC) と溶存有機炭素 (DOC)、全鉄濃度 (T-Fe) と溶存鉄濃度 (D-Fe)、および E2 濃度を測定して、有機炭素濃度変化、鉄濃度変化、および E2 濃度変化を検討した。

次に、濾過した実河川水と濾過した実海水を混合させ、模擬河川水を用いた海水混合実験と同様に有機炭素濃度変化、鉄濃度変化、および E2 濃度変化を検討した。

## 2.1 実験材料

### (1) 人工河川水<sup>4)</sup>

表-2.1 に示す分量で試薬（全て和光純薬製）を蒸留水に溶かして人工河川水を作成した。

表-2.1 人工河川水の組成

溶質	溶解量 (mg/L)
NaHCO <sub>3</sub>	48
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30
MgSO <sub>4</sub>	30
KCl	2.0

### (2) 塩分 2 倍濃度の人工海水<sup>4)</sup>

表-2.2 に示す分量の 2 倍の量の試薬（全て和光純薬製）を蒸留水に溶かし、人工海水（70%）を作成した。

表-2.2 人工海水の組成

溶質	溶解量 (mg/L)
KBr	100
KCl	700
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1470
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4000
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10780
NaCl	23500
NaHCO <sub>3</sub>	200

## 2.2 模擬河川水を用いた海水混合実験方法

### 2.2.1 フルボ酸抽出方法

フルボ酸の抽出方法は、渡辺<sup>5)</sup>が示した方法に従い、一部改変した。手順をフローシートに示す(図-2.1)。採取してきた土壌（河口底泥、森林土壌、湖沼底泥、水田土壌）を 2mm のふるいにかけた。ふるいを通過したサンプルを固液分離するために、遠心分離機（国産遠心機株式会社製）を用いて、3000rpm で 20 分間遠心分離を行った。固液分離により得られたサンプル 500g と 0.1N の NaOH 水溶液 5L を約 1 分間攪拌させ、24 時間静置させた。その後、3000rpm で 20 分間遠心分離を行い、吸引濾過機（日本ミリポアリミテッド製）を用いて、濾紙 GF/F（Whatman 社製、ガラス繊維濾紙）で濾過を行った。なお、濾紙は濾紙上の不純物を取り除くために 450℃で 4 時間熱処理したものを使用した。実験過程

土壌:500g + 0.1N NaOH水溶液:5L



図-2.1 フルボ酸抽出方法

で使用する濾紙はすべて同じ処理をして使用した。その濾液を HCl 水溶液で、pH を 1.0 以下に調節し、3000rpm で 20 分間遠心分離後、濾過 (GF/F) して得られた濾液をフルボ酸抽出液とした。

### 2.2.2 模擬河川水作成方法

河川水に溶存態のフルボ酸鉄が存在する河川水を想定し、人工河川水とフルボ酸抽出液を混合した模擬河川水を作成した。手順をフローシートに示す(図-2.2)。人工河川水 800mL とフルボ酸抽出液 200mL (ロータリーエバポレーター (40°C) を用いて有機炭素濃度 300mg/L に調整) を混合して NaOH 水溶液で pH を 7.0 に調節し、攪拌機 (藤製作所製、藻類培養試験器 AGP-50R) を用いて 50rpm で 24 時間攪拌した。攪拌後、GF/F で濾過して凝析・凝集したフルボ酸鉄を除去し、この濾過模擬河川水を用いて海水混合実験を行った。



図-2.2 模擬河川水作成方法

### 2.2.3 海水混合実験方法

海水混合実験の手順をフローシートに示す(図-2.3)。濾過模擬河川水 500mL に E2 標準物質を最終濃度が 10ng-E2/L となるように添加し、続いて人工海水 500mL (70%) と混合し、攪拌機を用いて 100rpm で 6 時間攪拌した。混合液の塩分は 35‰ となる。攪拌後、GF/F で濾過を行い 2.2.4 に示す項目について測定した。また、フルボ酸鉄凝集が E2 の動態に与える影響について、フルボ酸が存在しない場合における E2 濃度変化を検討するため、フルボ酸非添加である、人工河川水 400ml, イオン交換蒸留水 100ml, および人口海水 500ml の混合液についても調べた。

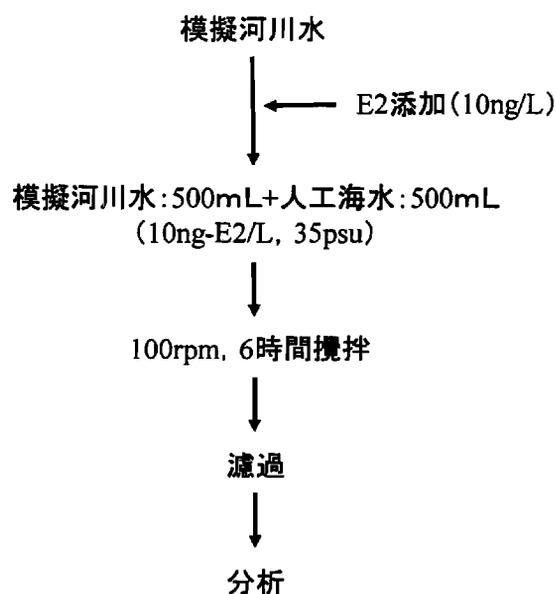


図-2.3 海水混合実験方法

### 2.2.4 測定項目および測定方法

本研究では一般測定項目として、pH (TOA Electronics 社製, HM-30G), 電気伝導度 (TOA Electronics 社製, HM-30G), 濁度 (三菱化学株式会社製, SEP-PT-706D), 全有機炭素 (TOC) と溶存有機炭素 (DOC) について調べた。全有機炭素 (TOC) 濃度と溶存有機炭素 (DOC) の濃度は全有機炭素濃度計 (島津製作所製, TOC-5000) で測定した。なお, DOC はサンプルをガラス繊維濾紙 (GF/F) で濾過して測定した。また, 有機炭素濃度測定の際にサンプルを入れるバイアルは 450°C で 4 時間熱処理したものを使用した。

## 2.2.5 鉄濃度の測定方法

### (1) 試薬

発光試薬 Ferrozine 溶液：0.514g の Ferrozine (和光純薬工業株式会社製, PDTS) と 10g の塩化ヒドロキシアニモニウムを少量のイオン交換蒸留水に溶かし, 50mL の濃塩酸 (12N) を加え, イオン交換蒸留水で 100mL に希釈した。

Buffer 溶液：40g の酢酸アンモニウムを少量のイオン交換蒸留水に溶かし, 25%アンモニア水を 35mL 加え, イオン交換蒸留水で 100mL に希釈した。

### (2) 測定方法

はじめに実験で使用するすべてのガラス器具, サンプルを保存するポリエチレンビンを洗浄用

の塩酸に一晩浸けておき, 実験の前に蒸留水でよく濯いだ。サンプルをメスシリンダーで 40mL ずつ正確にとり, コニカルビーカーに入れた。各サンプルに Ferrozine 溶液を 1mL ずつ加え, あらかじめ塩酸に浸けておいた沸騰石を 1 粒ずつサンプルに入れた。140°C に設定したホットプレートで, サンプルの入ったコニカルビーカーを温め, 沸騰し始めてから 10 分間待った。その後, サンプルが常温に冷めてから, Buffer 溶液を 1mL ずつ加え混合させた。混合させたサンプルを比色管に移し, 蒸留水で 50mL に希釈した後, 10cm のガラスセルで 562nm の吸光度を測定した (島津製作所製, UV-2200)。上記の方法により鉄濃度の検量線を作成した (図-2.4)。検量線の測定下限値は, 5 $\mu$ g-Fe/L である。

同様の方法でサンプルの全鉄濃度 (T-Fe) と溶存鉄濃度 (D-Fe) の吸光度を測定し, 作成した検量線を用いて濃度に換算した。なお, D-Fe は, サンプルをガラス繊維濾紙 (GF/F) で濾過し測定した。

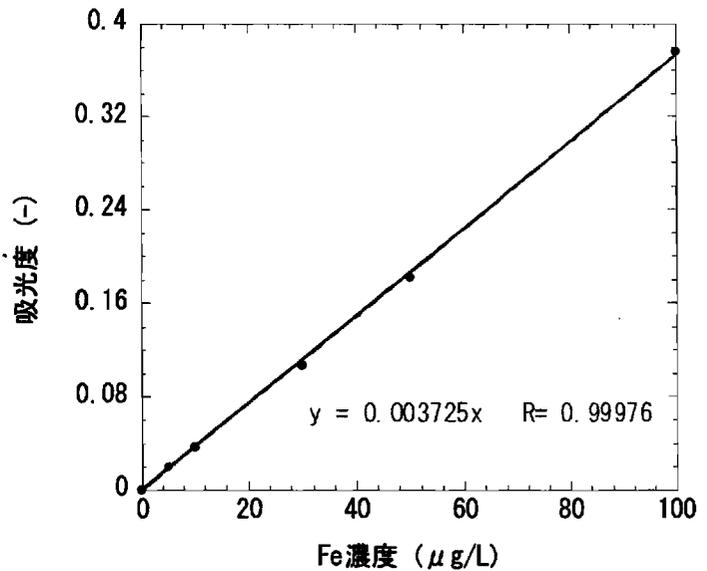


図-2.4 鉄濃度検量線

## 2.2.6 17 $\beta$ -エストラジオール (E2) の測定方法

E2 は, 抗原抗体反応を利用した酵素免疫定量法の分析キット (日本エンバイロケミカルズ製, ELISA キット) を用いて測定した。ELISA キット測定のサンプル前処理法<sup>3)</sup>は, フローチャートに示すとおりである (図-2.6)。メタノールと蒸留水で, コンディショニングした C18 固相カートリッジに通水し, 蒸留水, ヘキサン (和光純薬製, HPLC 用) で洗浄後, 5mL のジクロロメタン (和光純薬製, エストラジオール分析用) で溶出した。溶出液は窒素ガス気流により溶媒を揮発させ, 濃縮乾固させた。残留物はジメチルスルホキシド (DMSO) とメタノール (1/10) で溶解し, 溶解液が 1%DMSO, 10%メタノールとなるように蒸留水で調製 (最終容量 2mL) した。この溶解液中の E2 を ELISA 法で測定した。ELISA キットの使用方法は使用説明書に従った。

## 2.3 実河川水および実海水を用いた海水混合実験

### 2.3.1 実河川の基本水質

実河川水の基本水質として、pH (TOA Electronics 社製, HM-30G), 電気伝導度 (TOA Electronics 社製, HM-30G), 濁度 (三菱化学株式会社製, SEP-PT-706D), アンモニア性窒素 ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) をネスラー法 (HACK 社製, DR-2000), 硝酸性窒素 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) をカドミウム還元法 (HACK 社製, DR-2000), 亜硝酸性窒素 ( $\text{NH}_2\text{-N}$ ) をジアゾ化法 (HACK 社製, DR-2000), リン酸態リン ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) をアミノ酸法 (HACK 社製, DR-2000) でそれぞれ測定した。

### 2.3.2 海水混合実験方法

河川水は2006年2月9日に八重川で採取し、海水は宮崎県水産試験場で使用されている砂濾過海水を採取し、GF/Fで濾過して実験に用いた。濾過実河川水500mLと濾過実海水500mL (34%)を混合させ、攪拌機を用いて100rpmで6時間攪拌した。混合液の塩分は17%となる。攪拌後、濾過し模擬河川水を用いた海水混合実験と同様の項目について測定した。

当初は、模擬河川水を用いた混合実験と同様に人工海水を用いて実河川水を混合させる予定であったが、人工海水を作成する際に、混合した試薬に含まれる不純物が原因で、人工海水の有機炭素濃度が30~40mg-C/Lであったため、もともと有機炭素濃度が低濃度である実河川水の分析に誤差が出ると考えられる。そのため模擬河川水と人工海水の混合実験とは、混合後の塩分濃度が異なってしまうが、実河川水と実海水の混合実験を行った。予備実験で塩分濃度17.5%と35%では同一の挙動を示すことが分かっているので、比較・検討に問題はないと考える。

### 2.3.3 17 $\beta$ -エストラジオールの測定方法

実河川水を用いた海水混合実験では、6時間の攪拌後GF/F濾紙で濾過し、濾液と濾紙上に残った懸濁物について、それぞれ分別してE2濃度を測定した。濾液については、模擬河川水を用いた海水混合実験と同様の方法で

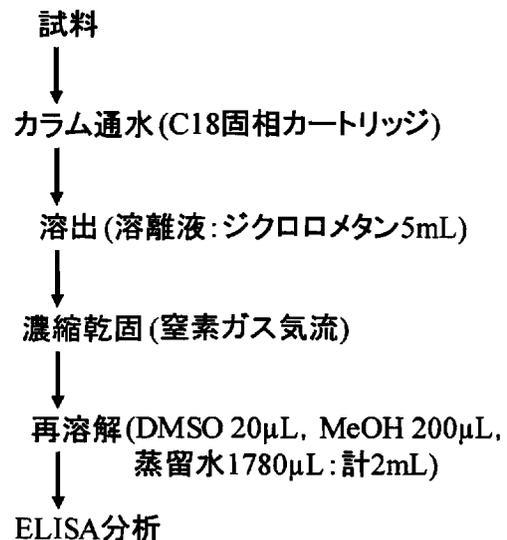


図-2.6 サンプル前処理法

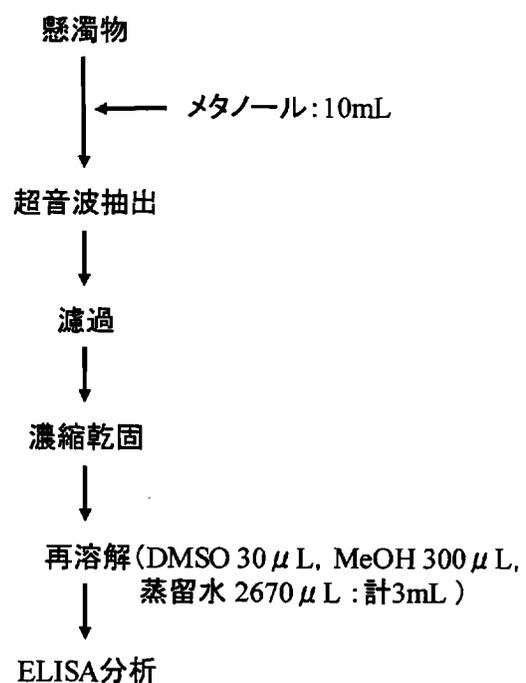


図-2.7 サンプル前処理法

E2 濃度の測定を行った。懸濁物については、フローチャートに示す方法で前処理を行った (図-2.7)。濾紙をメタノール (10mL) に浸漬させ、超音波で破砕してから1時間抽出し、再度、濾過した。濾液 (抽出メタノール) はロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固させた。残留物は DMSO とメタノール (1/10) で溶解し、溶解液が 1%DMSO, 10%メタノールとなるように蒸留水で調整した<sup>7)</sup>。この溶解液中の E2 を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 フルボ酸鉄を混合した河川水の安定化

模擬河川水作成の際に、土壌から抽出したフルボ酸と濾過人工河川水を混合して pH を 7.0 に調節して、攪拌するとフルボ酸の一部が凝集し懸濁態となった。凝集によって有機炭素濃度の約 20~50%, 鉄濃度の大部分が低下した。この懸濁態となったフルボ酸を含む模擬河川水を実験に用いると海水混合による凝集の分析が困難であると考えられた。そこで 24 時間攪拌させて濾過し、模擬河川水中にフルボ酸を溶存態として安定化させた。安定化前後の有機炭素濃度の変化を図-3.1 に示す。なお、各種のフルボ酸抽出液を用いて模擬河川水を作成した結果、河口底泥 FA と森林土壌 FA を用いた場合において、濾過模擬河川水には、溶存態のフルボ酸鉄が 37.6~47.2mg-C/L の高濃度で存在した。したがって、下記の海水混合実験では河口底泥 FA と森林土壌 FA を用いた。

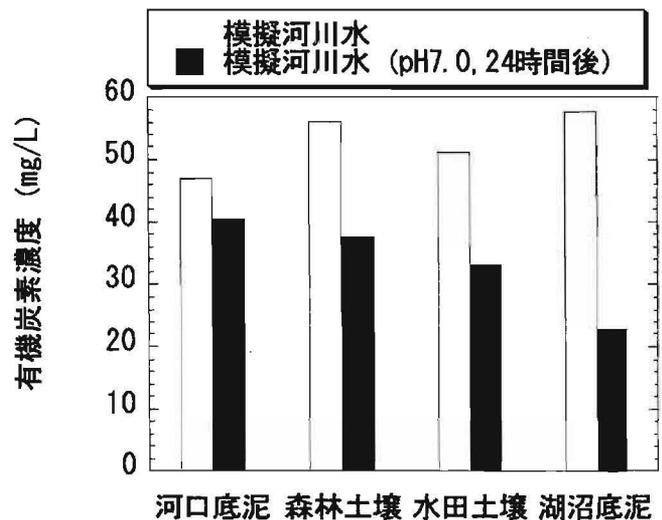


図-3.1 模擬河川水の安定化前後の有機炭素濃度変化

#### 3.2 模擬河川水を用いた海水混合実験の結果

##### 3.2.1 有機炭素濃度変化

模擬河川水と人工海水を用いた混合実験の結果を以下に示す。なお、3 回の繰り返し実験を行うことで、挙動を明確にできると考え、それぞれの実験を混合実験① (河口底泥 FA : 採取日 5 月 17 日, FA 抽出日 11 月 12 日, 実験日 12 月 13 日, 森林土壌 FA : 採取日 5 月 17 日, FA 抽出日 7 月 5 日, 実験日 12 月 13 日), 混合実験② (河口底泥 FA : 採取日 12 月

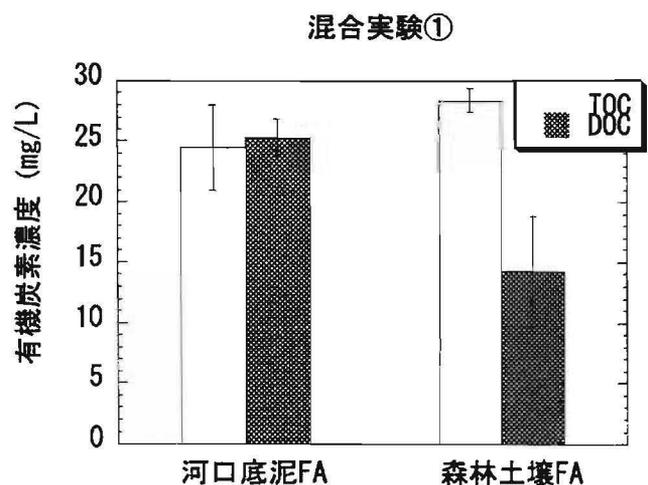


図-3.2 有機炭素濃度変化 (平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

28日, FA抽出日1月7日, 実験日1月23日, 森林土壌FA:採取日5月17日, FA抽出日7月5日, 実験日1月23日), 混合実験③(河口底泥FA:採取日12月28日, FA抽出日1月31日, 実験日2月4日, 森林土壌FA:採取日5月17日, FA抽出日7月5日, 実験日2月4日)とし, それぞれについての実験結果を示す。

混合実験①の攪拌後の混合液におけるTOCとDOCの濃度変化を図-3.2に示す。河口底泥FAでは, TOCとDOCで, それぞれ24.5mg-C/Lと25.3mg-C/Lとなり, DOCの方が若干高い値を示したものの平均値と標準偏差から分析誤差であると考えられる。森林土壌FAでは, TOCとDOCでそれぞれ28.4mg-C/Lと14.3mg-C/Lとなり, 若干の濃度低下が認められた。いずれのフルボ酸抽出液を用いた場合においても, 濾過による濃度低下は小さく, フルボ酸の凝集は森林土壌FAで若干認められたものの, ほぼTOCとDOCは同等であったと推測される。混合実験②では, 河口底泥FAにおいてTOCとDOCで, それぞれ22.2mg-C/Lと19.8mg-C/Lとなり, 森林土壌FAでは, それぞれ12.7mg-C/Lと10.1mg-C/Lとなった(図-3.3)。実験②は, 河口底泥FAにおいて, TOCとDOCに明確な差は認められず, 森林土壌FAにおいて, 実験①とは異なり河口底泥FA同様ほぼTOCとDOCは同等であった。混合実験③では, 河口底泥FAにおいてTOCとDOCでそれぞれ33.0mg-C/Lと32.6mg-C/Lとなり, 森林土壌FAでは, それぞれ11.0mg-C/Lと9.4mg-C/Lとなった(図-3.4)。実験③においても実験②の結果と同じく, いずれのフルボ酸抽出液を用いた場合でもTOCとDOCの値に明確な差は認められず, 濃度低下はほとんどなかったと考えられる。

3回の海水混合実験の結果, いずれのFA抽出液を用いた場合においても, フルボ酸の凝集は混合実験①での森林土壌FAで若干認められたものの, 他の結果からはTOCとDOCに明確な濃度変化を認めることができず, 凝集するフルボ酸は少なかったと考えられる。実際に攪拌後, 目視で確認できるような懸濁物は生成しなかった。

これまでの多くの研究において, フミン物質をはじめとする溶存有機物は海水と混合することによって凝集し, 沈降すると考えられてきた。しかしながら, 鈴村ら<sup>8)</sup>が示した河川水中の溶存有機物濃度(DOC)と塩分濃度の関係では, 一部の陸起源有機物(タンパク・腐植様物質)は海水混合域で水中から化学的に除去される機構(フロキュレーションなど)が明らかになっているが, 一方でDOC全体としては保存的な挙動を示しているとしている。このことから, 本実験での模擬河川水で用いたフルボ酸抽出液(陸起源有機物)は, 溶存態としてフルボ酸を安定化させた際に易凝集性成

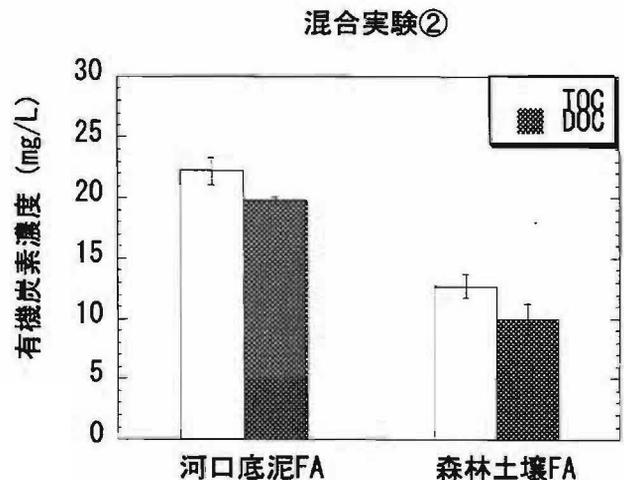


図-3.3 有機炭素濃度変化  
(平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

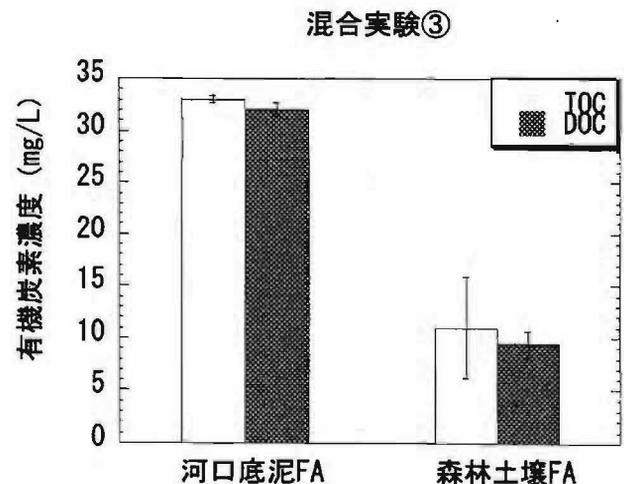


図-3.4 有機炭素濃度変化  
(平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

分の大部分が消失し、海水混合実験の際には難凝集性成分がほとんどであったために、海水と混合させても凝集することはなく保存的な挙動を示したと考えられる。

### 3.2.2 鉄濃度変化

混合実験①の攪拌後の混合液における T-Fe と D-Fe の濃度変化を図-3.5 に示す。河口底泥 FA では、T-Fe と D-Fe で、それぞれ  $161.3\mu\text{g-Fe/L}$  と  $80.3\mu\text{g-Fe/L}$  となり、森林土壌 FA では、 $98.8\mu\text{g-Fe/L}$  と  $5.4\mu\text{g-Fe/L}$  となった。河口底泥 FA の鉄は海水混合によって凝析し、T-Fe の約 50% が懸濁態として除去された。また森林土壌 FA においても大部分の鉄は溶存態から懸濁態に変化し、濾過によって除去された。混合実験②では、河口底泥 FA において T-Fe と D-Fe で、それぞれ  $8.6\mu\text{g-Fe/L}$  と  $9.7\mu\text{g-Fe/L}$  となり、森林土壌 FA では、いずれの濃度も検出下限値以下となった (図-3.6)。河口底泥 FA では実験①のようは急激な鉄濃度の低下は見られなかった。しかし、実験②に用いた模擬河川水の鉄濃度が河口底泥 FA および森林土壌 FA で、それぞれ  $23.6\mu\text{g-Fe/L}$  と  $5.4\mu\text{g-Fe/L}$  であり、非常に低濃度であったため明確な挙動を比較・検討するには難しかったと考えられる。この理由は、フルボ酸抽出に用いた河口底泥の採取日が異なったためであると考え (実験①: 採取日 7 月, 実験②: 採取日 12 月)。森林土壌 FA においては、抽出した土壌は同じであるが、5L のポリエチレンビンで抽出し 1L のポリエチレンビンに小分けして保存する際に、よく攪拌しなかったために抽出液の上層と下層で鉄濃度に違いが出たと考える。実際に、上層と下層で有機炭素濃度に大きな差があったので、フルボ酸と鉄とが錯体を形成しているフルボ酸鉄の濃度も上層のほうが低かったと推測される。このため、実験①と②では異なる有機炭素濃度のフルボ酸抽出液を用いたことになる。混合実験③では、河口底泥 FA において T-Fe と D-Fe で、それぞれ  $18.8\mu\text{g-Fe/L}$  と  $14.5\mu\text{g-Fe/L}$  となり、T-Fe の 30% が凝集による濃度低下が認められた。森林土壌 FA ではいずれも検出下限値以下となり、実験②と同様に模擬河川水の鉄濃度が

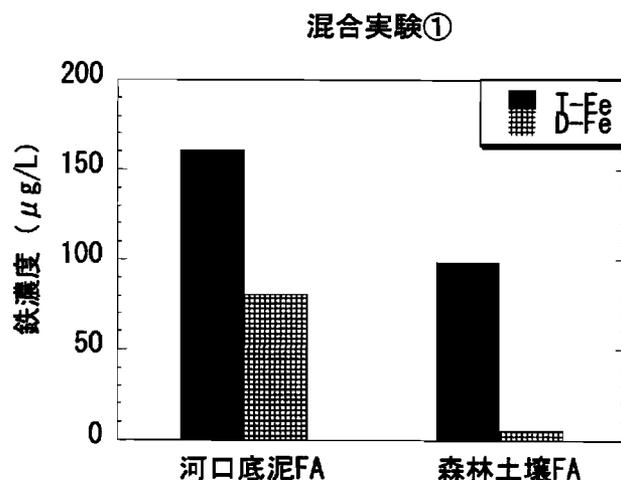


図-3.5 鉄濃度変化

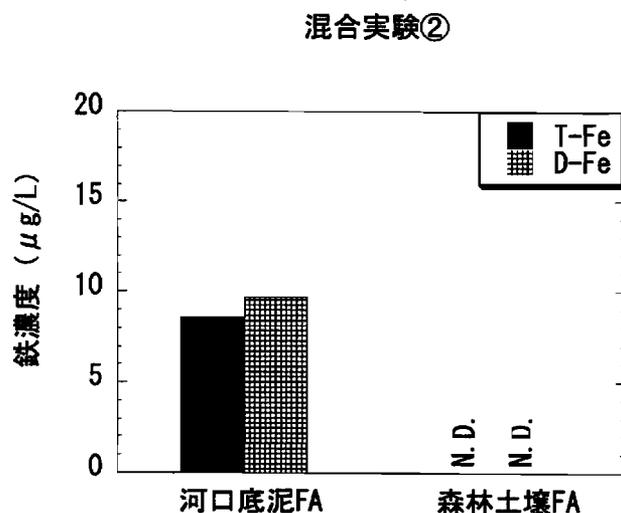


図-3.6 鉄濃度変化 (N.D. : 検出下限値以下)

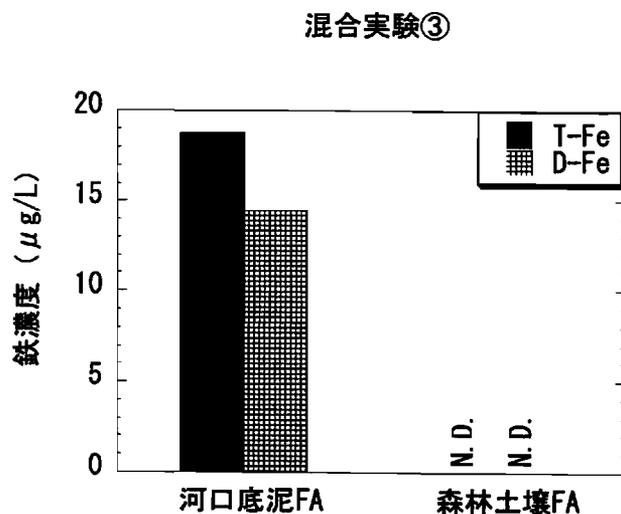


図-3.7 鉄濃度変化 (N.D. : 検出下限値以下)

低く、比較・検討ができなかった（図-3.7）。実験③に用いたフルボ酸は、森林土壌 FA は実験②と同じもので、河口底泥 FA は実験②と同じ土壌から新たに抽出したものである。

3 回の海水混合実験の結果、河川水中の溶存フルボ酸鉄は、海水と混合することによって、フルボ酸から遊離し、水酸化されて粒子状態の水酸化鉄フロックを形成したと考えられる。フルボ酸の抽出液に若干の違いがあり、濃度変化を比較することができなかった場合もあるが、これまでの研究でも海水と混合することで鉄濃度が急激に低下するという報告が多数ある<sup>2),9)</sup>。それを考慮すると模擬河川水の鉄濃度が高濃度であれば、同様の挙動を示すと推測される。

### 3.2.3 E2 濃度変化

混合実験①の攪拌後の混合液におけるフルボ酸無添加のコントロールの E2 濃度と河口底泥 FA および森林土壌 FA を用いた場合の溶存 E2 濃度を比較した（図-3.8）。コントロールと各 FA の溶存 E2 濃度は一致し、その検出された E2 濃度も、コントロール、河口底泥 FA および森林土壌 FA それぞれ、9.6ng-E2/L、12.0ng-E2/L および 10.7ng-E2/L であり所定の設定濃度の 10ng-E2/L とほぼ同一の値を示した。混合実験①においてフルボ酸鉄は、海水混合によって鉄が水酸化鉄フロックとして凝集し、濾過によって除去されたにもかかわらず、E2 は溶存態として存在した。また、混合実験②および③においても実験①と同様に E2 の除去による明確な濃度低下は認められなかった（図-3.9、3.10）。このことから、海水混合によるフルボ酸鉄の凝集プロセスにおいて、E2 が水酸化鉄フロックへの共沈あるいは吸着によって除去されないことが強く示唆された。

### 3.3 実河川水および実海水を用いた混合実験

実験に用いた河川水の基本的な水質について測定した結果を表-3.1 に示す。本河川は、下水道未整備地区を流れる河川であり、ほかの一般的な河川に比べ、ア

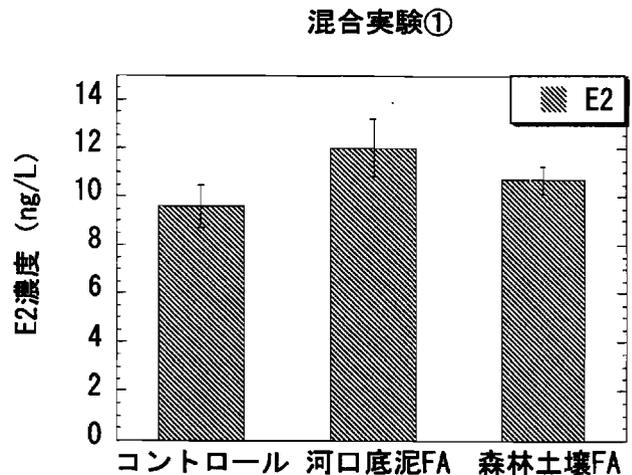


図-3.8 E2 濃度変化  
(平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

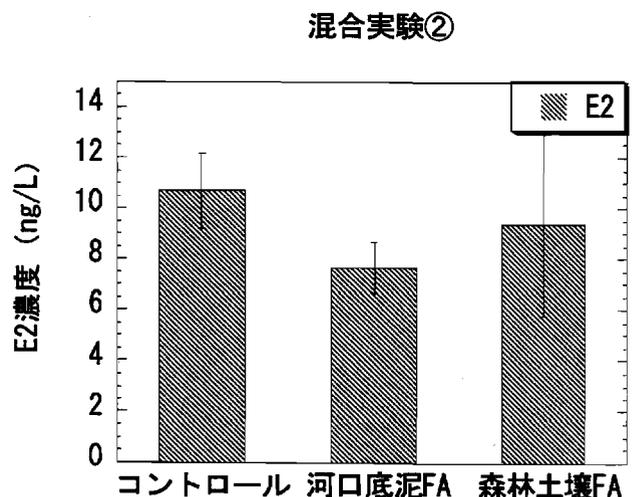


図-3.9 E2 濃度変化  
(平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

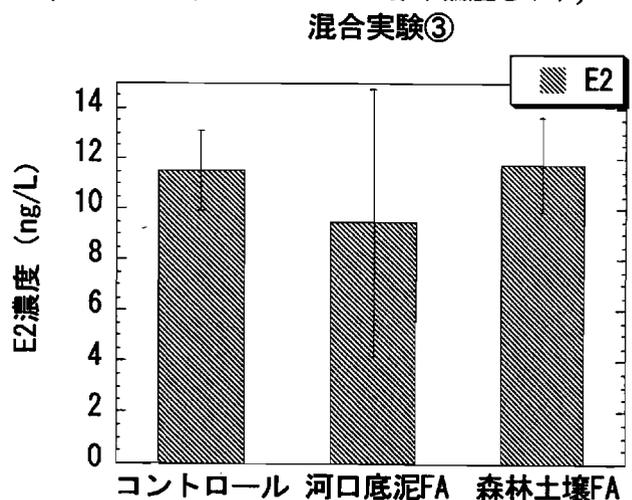


図-3.10 E2 濃度変化

表-3.1 河川水の基本水質

pH	EC (μS/cm)	濁度 (度)	NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	PO <sub>4</sub> -P (mg/L)
7.4	417.9	7.9	3.15	3.8	0.12	0.44

ンモニア性窒素、硝酸性窒素が高かった。これは、家庭からの生活雑排水が流れ込んでいるためであり、人畜由来である17β-エストラジオールも比較的高濃度で存在している河川であることが推測された。

### 3.3.1 有機炭素濃度変化

攪拌後の混合液におけるTOCとDOCの濃度変化を図-3.11に示す。TOCとDOCはそれぞれ9.6mg-C/Lと8.4mg-C/Lであり、いく分、DOCの方が低くなったが大幅に濃度が低下する傾向は見られなかった。実河川水を用いた混合実験も模擬河川水を用いた混合実験と同様に、DOCは、海水と混合しても安定的に存在した。このことから実河川水でもフルボ酸は海水と混合することによる凝集・沈降は認められず、保存的な挙動を示したことが分かった。

### 3.3.2 鉄濃度変化

攪拌後の混合液におけるT-FeとD-Feの濃度変化を図-3.12に示す。T-FeとD-Feはそれぞれ14.4μg-Fe/Lと8.3μg-Fe/Lであった。実海水では、海水と混合することで凝析し、濾過によってT-Feの約40%が除去された。このことから実河川水でも模擬河川水と同様に、河川水中の溶存フルボ酸鉄が、海水と混合することによって、フルボ酸から遊離し、水酸化されて粒子状態の水酸化鉄フロックを形成し、凝集・沈殿したと考えられる。

### 3.2.3 E2濃度変化

攪拌後の混合液を濾過し、その濾液と濾紙から抽出したE2の濃度を図-3.13に示す。濾液についてのE2濃度は、3回の実験でそれぞれ1.0ng-E2/L、1.2ng-E2/L、1.3ng-E2/Lであった。濾紙についてのE2濃度は、3回の実験でいずれも検量線の検出下限値以下であり、E2は濾紙上に存在していなかったことが示唆された。フルボ酸と錯体を形成している鉄は凝集し、水酸化鉄フロックを形成して濾過によって除去されたにも関わ

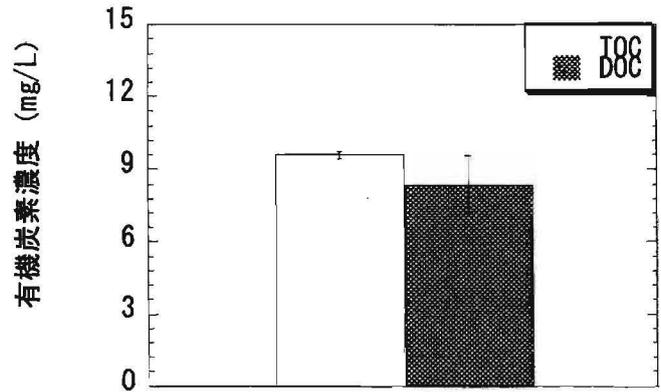


図-3.11 有機炭素濃度変化  
(平均 (n=3), エラーバーは標準偏差を示す)

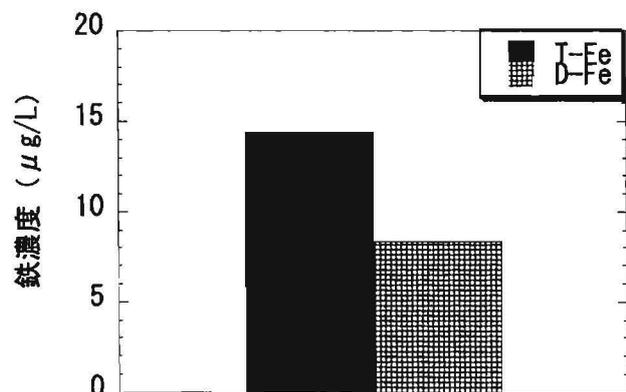


図-3.12 鉄濃度変化

らず、E2は除去されなかった。このことから、実河川水の場合でも海水混合によるフルボ酸鉄の凝集プロセスにおいて、E2が水酸化鉄フロックへの共沈あるいは吸着によって除去されず、海水混合域におけるフルボ酸鉄の凝集とE2との関連性はないことが明らかにされた。

#### 4. 総括

本研究では、人畜由来の外因性内分泌攪乱物質である17 $\beta$ -エストラジオール(E2)の河口・沿岸域における挙動に関して、フルボ酸鉄の凝集・沈降との関連性を明らかにすることを目的とした。模擬河川水と実河川水を用いた海水混合実験の結果は、それぞれ以下のとおりである。

土壌から抽出したフルボ酸抽出液と人工河川水を混合させた模擬河川水を用いた海水混合実験において、攪拌後の混合液の有機炭素濃度は、TOCとDOCを比較した結果、凝集による濃度の差が認められず保存的な挙動を示した。鉄はT-FeとD-Feを比較した結果、海水と混合することで濃度が低下した。このことから河川水中のフルボ酸鉄の鉄は、海水と混合することでフルボ酸から遊離し、水酸化鉄フロックを形成し濾過によって除去されることがわかった。また、E2濃度は、フルボ酸鉄が凝集したにも関わらず、所定の10ng/Lとほぼ同一の値を示した。

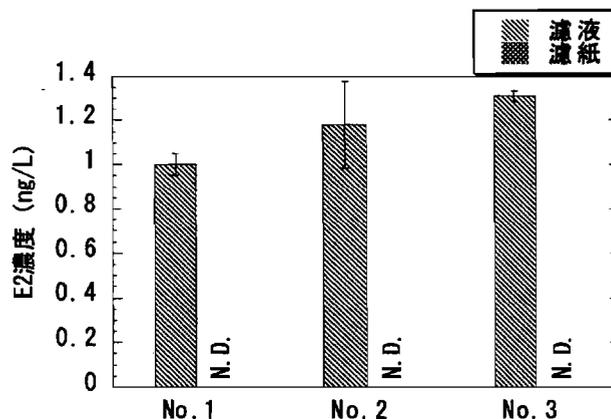
実河川水を用いた海水混合実験において、攪拌後の混合液の有機炭素濃度は、模擬河川水を用いた混合実験と同様に濃度が低下することなく保存的な挙動を示した。鉄は海水と混合することによって、溶存態の鉄濃度が低下した。混合液を濾過した濾紙からはE2濃度が検出されなかったことから、E2は懸濁態として除去されなかったと考えられる。

以上の結果から海水混合によるフルボ酸鉄凝集・沈降とE2の動態との関係について、E2はフルボ酸鉄の鉄が水酸化鉄フロックを形成する過程において、水酸化鉄フロックに付着し共沈せず拡散していくと推測される。フルボ酸鉄の鉄凝集プロセスとE2の挙動は関係がないことが強く示唆された。

本研究において、フルボ酸鉄凝集とE2との関連性はないことが示唆された。しかしながら、河川水中にはほかにも多くの有機物質(タンパク質など)が存在しており、それらの物質の海水混合域における凝集・沈降とE2との関係を明らかにする必要があると考える。

#### 参考文献

- 1) 今井章雄：水環境におけるフミン物質の特徴と役割，水環境学会誌，Vol. 27，No. 2，pp.76-81，2004.
- 2) 藤井学，佐々木陽，渡部徹，大村達夫：河口・沿岸域におけるフミン鉄の錯体平衡と凝集特性，環境工学研究論文集，Vol. 41，pp.389-400，2004.
- 3) 鈴木祥広，平良浩保，増田純雄，高橋伸幸，満山宗人，下津義博，丸山俊朗：都市排水路およびその合



Replicate-1 Replicate-2 Replicate-3  
(3回の繰り返し実験，E2値は平均)

N.D：検出下限値以下

流先河川におけるエストロゲンの実態調査, 水環境学会誌, Vol. 26, No.11, pp.791-795, 2003.

- 4) APHA, AWWA and WEF: Standard Method., pp.8-11, 1998.
- 5) 渡辺彰:我が国の腐植物質研究とその展望, 2. 腐植物質の抽出および分画, 日本土壌肥料学会誌, Vol. 73, No.6, pp.797-796, 2002.
- 6) Stooky, L.L.: Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron, Analatical Chemistry., Vol. 42, No.7, 1979.
- 7) 鈴木祥広, 丸山俊朗: 粉末活性炭注入を利用した凝集・泡沫分離法による都市下水からのエストロゲンの除去, 水環境学会誌, Vol. 26, No. 11, pp.753-763, 2003.
- 8) 鈴木昌弘, 小川浩史: 東京湾における夏季表層水中の有機態炭素・窒素・リンの分布, 沿岸海洋研究, Vol. 38, No. 2, pp.119-129, 2001.
- 9) 嶋津陽子, 丸山俊朗, 鈴木祥広: 下水処理水と海水の混合時における溶存物質と懸濁物質の挙動, 平成16年度宮崎大学卒業論文, 2005.

## 研究発表

### (1)学会誌等

Suzuki, Y., and Maruyama, T. (2006) Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge, *Water Research*, 40, 1061-1069.

鈴木祥広, 安藤康弘, 丸山俊朗, 満山宗人, 下津義博, 五味謙之, 森宏和, and 国包章一 (2006) 分散気泡を利用した河川水からのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の除去, *水環境学会誌*, 29, 29-35.

鈴木祥広, 中村孝洋, 小山久男, 関戸知雄, 土手裕, 増田純雄 (2006) 畜舎排水処理施設におけるエストロゲンの実態調査, *水処理技術*, 47, 17-22.

鈴木祥広, 原村優子, 中村孝洋, 丸山俊朗 (2005) 沿岸環境調査における底質CODの測定, *用水と廃水*, 47, 1073-1077.

鈴木祥広, 平良浩保, 丸山俊朗 (2005) 都市下水の高速高度処理システムにおけるエストロゲンの挙動, *環境工学研究論文集*, 42, 245-252.

鈴木祥広, 平良浩保, 満山宗人, 下津義博, 丸山俊朗 (2005) 浄化槽におけるエストロゲンの実態調査, *用水と廃水*, 47, 237-243.