OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	下水処理におけるエストロゲンの挙動と除去に関する研究
Author(s)	橋本, 敏一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1705
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

下水処理におけるエストロゲンの挙動と除去に関する研究

２００８年１２月

橋 本 敏 一

目　次

緒　論 …… 1

第１章　下水処理における内分泌撹乱物質の挙動に関する研究 …… 7

１．１　はじめに …… 7
１．２　対象とする内分泌撹乱物質 …… 10
１．２．１　エストロゲン …… 12
１．２．２　ノニルフェノール …… 14
１．２．３　ビスフェノールＡ …… 15
１．２．４　エストロゲン様活性 …… 16
１．３　調査方法 …… 17
１．３．１　調査対象処理場および調査期間 …… 17
１．３．２　試料採取方法および採取箇所 …… 19
１．３．３　分析項目および分析方法 …… 20
１．４　結果および考察 …… 24
１．４．１　中小規模下水処理場における内分泌撹乱物質の挙動（調査Ⅰ） … 24
１．４．２　下水処理場におけるエストロゲンの挙動（調査Ⅱ） …… 33
１．４．３　嫌気性水処理プロセスにおける内分泌撹乱物質の挙動
（調査Ⅱ追加調査） …… 41
１．４．４　内分泌撹乱物質の長期的な濃度変動（調査Ⅲ） …… 44
１．４．５　内分泌撹乱物質の時間的な濃度変動（調査Ⅳ） …… 49
１．４．６　総合考察 …… 51
１．５　まとめ …… 54
参考文献（第１章） …… 54

第２章　下水処理におけるエストロゲンの除去特性に関する研究 …… 59

２．１　はじめに …… 59
２．２　材料および方法 …… 60
２．２．１　実施設調査 …… 60
２．２．２　パイロットプラント実験 …… 61
２．２．３　回分処理実験 …… 63

２．３　結果および考察 66
２．３．１　実施設におけるエストロゲン負荷量の挙動 66
２．３．２　実施設における反応タンク内でのエストロゲンの消長 70
２．３．３　パイロットプラント実験によるＳＲＴの影響の検討 74
２．３．４　回分処理実験によるエストロゲンの除去特性の検討 77
２．３．５　総合考察 86
２．４　まとめ 89
参考文献（第２章） 89

第３章　エストロゲン分解細菌を利用したエストロゲンの除去向上に関する研究　93

３．１　はじめに 93
３．２　エストロゲン分解細菌 94
３．２．１　エストロゲン分解細菌に関する既往知見 94
３．２．２　対象エストロゲン分解細菌の特性等 96
３．３　材料および方法 99
３．３．１　エストロゲン分解細菌の検出法の検討 99
３．３．２　活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の定量 101
３．３．３　エストロゲン分解細菌の活性汚泥添加実験 102
３．３．４　固定化担体によるエストロゲン処理実験 103
３．４　結果および考察 106
３．４．１　エストロゲン分解細菌の検出法の検討 106
３．４．２　活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の検出および定量 109
３．４．３　分解細菌添加によるエストロゲン除去向上の検討 115
３．４．４　分解細菌固定化担体を用いたエストロゲン除去向上の検討 120
３．４．５　総合考察 124
３．５　まとめ 127
参考文献（第３章） 127

第４章　オゾン処理によるエストロゲンの除去向上に関する研究 131

４．１　はじめに 131
４．２　エストロゲンのオゾン処理に関連する既往知見 132
４．２．１　物理化学的処理によるエストロゲンの除去 132
４．２．２　オゾンの性質と反応性 134
４．２．３　オゾン処理によるエストロゲンの除去 136

４．３　材料および方法 137
４．３．１　実験条件 137
４．３．２　実験原水 137
４．３．３　実験方法 138
４．３．４　分析方法 138
４．４　結果および考察 139
４．４．１　有機物等の除去特性 139
４．４．２　エストロゲンおよびエストロゲン様活性の除去特性 140
４．４．３　オゾンとエストロゲンの反応速度 144
４．４．４　総合考察 146
４．５　まとめ 148
参考文献（第４章） 148

総括並びに結論 151

謝　　辞 156

関連発表論文等一覧 157

付　　録 159

付録Ⅰ．本研究における内分泌撹乱物質等の分析フロー 161
付録Ⅱ．下水中のエストロゲン濃度等の既往調査事例 168
付録Ⅲ．尿中のエストロゲン量の既往調査事例 171
付録Ⅳ．エストロゲンの回分処理実験の既往研究事例 173

第１章　下水処理における内分泌撹乱物質の挙動に関する研究

１．１　はじめに

下水道は、生活汚水や工場排水など、人間の諸活動の結果生じた下水を受け入れ、これを下水処理場で処理した後、その処理水を公共用水域へ放流している。そのため、下水道を経由した内分泌撹乱物質の水環境への排出、生態系への影響が懸念されている。

わが国の下水処理場における内分泌撹乱物質の挙動については、平成 10 年度から 3 年間にわたり、国土交通省（旧建設省）が全国 15 都府県市の 47 処理場における実態調査（以下、国交省調査という）を行っている[1)]。

国交省調査では、環境庁（現環境省）の SPEED'98[2)]に示された内分泌撹乱作用の疑いのある化学物質のうち、生活汚水や工場排水に含まれていると考えられる物質、並びに、ノニルフェノール関連物質（ノニルフェノールエトキシレート、ノニルフェノキシ酢酸）、人畜由来のエストロゲン（17β-エストラジオール（E2）、エストロン（E1）、17α-エチニルエストラジオール（EE2））を選定し、その濃度の実態について調査している。その結果、選定された 25 物質のうち、1 検体以上で定量下限値以上の濃度で検出された物質は、流入下水では 15 物質、処理水でも 8 物質にのぼっており、多数の内分泌撹乱物質が下水道に流入し、水環境に排出されていることが明らかとなっている。しかし、**表 1-1-1** に示すとおり、処理水中の濃度の中央値が定量下限値以上で検出された物質は、ベンゾフェノン（BZP）のほか、ノニルフェノール関連物質およびエストロゲンのみであった。また、**表 1-1-2** に示すとおり、内分泌撹乱物質の下水処理過程における平均的な除去率は、ノニルフェノール（NP）やその関連物質、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、ビスフェノール A（BPA）などの化学物質では 90%以上であったが、BZP や E2 では 70%程度であった。

国交省調査の対象となった下水処理場は、主に大都市部に位置する政令指定都市や流域下水道の大規模な下水処理場であり、全体計画処理水量の平均値は約 28 万 m^3/d（0.6~154 万 m^3/d）[3)]である。また、水処理方式は、標準活性汚泥法（標準法）が、47 ヶ所中 34 ヶ所と大部分を占めており、次いで、循環式硝化脱窒法などの生物学的な窒素除去を目的とする高度処理法が 19 ヶ所、オキシデーションディッチ法（OD 法）やステップエアレーション法などのその他の活性汚泥法が 9 ヶ所である（複数の処理方式を有する処理場があるため、合計は 47 ヶ所よりも多い）。これに対して、平成 17 年度末現在、全体計画処理水量 1 万 m^3/d 未満の下水処理場は全体の約 63%を占めており[4)]、今後、中小都市への下水道の整備普及に伴って、この割合はさらに増加するものと考えられる。また、小規模の下水処理場では、負荷変動に強く、維持管理も容易であるなどの理由から、OD 法が広く採用される傾向にあり、**表 1-1-3** に示すとおり、平成 17 年度末現在、全体計画処理水量 1 万 m^3/d 未満の下水処理場の約 70%で OD 法が採用されており、標準法を採用する処理場は約 8%に過ぎない[4)]。

表 1-1-1　国交省調査における主な内分泌撹乱物質の測定結果 [1)より作成]

[単位：μg/L]

物質名		流入下水		処理水		検出下限値	定量下限値
		濃度範囲	中央値	濃度範囲	中央値		
内分泌撹乱作用の疑いのある化学物質							
ノニルフェノール		0.7～75	**4.4**	n.d.～1.0	tr(0.2)	0.1	0.3
ビスフェノールA		0.04～9.6	**0.53**	n.d.～0.52	tr(0.02)	0.01	0.03
2,4-ジクロロフェノール		n.d.～0.9	**0.07**	n.d.～0.14	n.d	0.02	0.06
フタル酸ジエチル		0.9～8.9	**3.1**	n.d.～tr(0.3)	n.d	0.2	0.6
フタル酸ジ-n-ブチル		n.d.～14	**2.6**	n.d.～0.7	n.d	0.2	0.6
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル		1.4～68	**12**	n.d.～6.2	tr(0.4)	0.2	0.6
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル		n.d.～6.9	**0.09**	n.d.～0.2	n.d	0.01	0.03
ベンゾフェノン		0.03～2.6	**0.17**	n.d.～1.0	**0.05**	0.01	0.03
関連物質							
ノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）	(n=1～4)	6.1～270	**28**	n.d.～23	**0.7**	0.2	0.6
	(n≧5)	tr(0.2)～810	**81**	n.d.～24	tr(0.4)	0.2	0.6
ノニルフェノキシ酢酸（NPnEC）	(n=1)	n.d.～3.4	tr(0.8)	n.d.～11	tr(0.7)	0.5	1.5
	(n=2)	2.5～250	**44**	n.d.～29	**3.1**	0.5	1.5
	(n=3)	5.9～100	**16**	n.d.～48	**3.1**	0.5	1.5
17β-エストラジオール（ELISA法）		0.0091～0.094	**0.042**	n.d.～0.066	**0.01**	0.0002	0.0006
17β-エストラジオール（LC/MS/MS法）		0.0036～0.018	**0.0081**	n.d.～0.0033	n.d.	0.0005	0.0015
エストロン（LC/MS/MS法）		0.015～0.077	**0.043**	n.d.～0.063	**0.0064**	0.0005	0.0015

注1）n.d. は検出下限値未満、tr は検出下限値以上かつ定量下限値未満を示し、括弧内は参考値である。
注2）網掛けは中央値が定量下限値以上であることを示す。

表 1-1-2　国交省調査における主な内分泌撹乱物質の除去率 [1)より作成]

物質名		初沈流入水	初沈流出水	処理水	データ数
ノニルフェノール		82	50	(-)	55
ビスフェノールA		86	40	(-)	55
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル		104	49	(-)	56
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル		93	54	(-)	36
ベンゾフェノン		97	89	29	48
ノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）	(n=1～4)	90	59	3	47
	(n≧5)	82	42	1	47
17β-エストラジオール（ELISA法）		105	105	34	47

注1）値は流入下水濃度（中央値）を100としたときの各工程の濃度（中央値）の割合を示す
注2）処理水の(-)はその中央値が定量下限値未満であるものを示す。

表 1-1-3　処理方式別・規模別の下水処理場の箇所数（平成 17 年度末） [4)より作成]

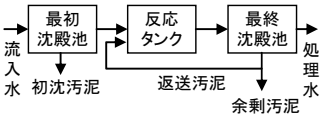
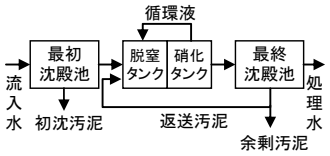
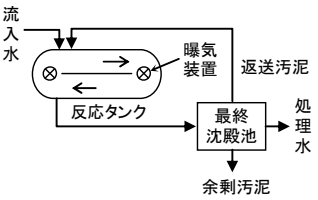
処理方式	計画晴天時日最大処理量（千m^3/d）					
	～5	5～10	10～50	50～100	100～500	500～
標準活性汚泥法	48	57	316	114	113	8
生物学的窒素除去法*	24	8	43	28	61	6
オキシデーションディッチ法	804	92	37	0	0	0
その他	221	28	24	3	4	0
計	1,097	185	420	145	178	14

＊：生物学的窒素・りん同時除去法を含む

流入下水中の内分泌撹乱物質の濃度は、一般家庭から排出される汚水と事業所や工場などから排出される汚水の割合や排除方式の違いなど、処理区域の特性により異なることが予想される。また、OD 法は、**表 1-1-4** に示すとおり、標準法と比較して、反応タンクの水理学的滞留時間（HRT：Hydraulic Retention Time）や固形物滞留時間（SRT：Solids Retention Time）が長く、低負荷であるため、内分泌撹乱物質の処理性能が異なる可能性も考えられる。したがって、内分泌撹乱物質の消長や挙動について、標準法を中心とする大規模な下水処理場における実態に加えて、OD 法を中心とする中小規模の下水処理場における実態を明らかにすることは、下水処理における内分泌撹乱物質の効果的かつ安定的な除去を検討するうえで重要である。

本章では、中小規模を中心とする全国の下水処理場 35 ヶ所において、エストロゲンなどの代表的な内分泌撹乱物質の濃度を調査するとともに、標準法と OD 法の下水処理場各 1 ヶ所において、内分泌撹乱物質の濃度を 1 年以上にわたって調査することにより、下水処理における内分泌撹乱物質の挙動の実態について明らかにした。

表 1-1-4　各種活性汚泥法の比較 [5)より作成]

処理方式	標準活性汚泥法	生物学的窒素除去法	オキシデーションディッチ法
処理フロー例		（例：循環式硝化脱窒法） 	
特　徴	反応タンク内で下水と活性汚泥をエアレーションにより混合後、最終沈殿池内で活性汚泥を沈降分離し、上澄水を処理水として流出させる方法である。	好気条件下でアンモニアを亜硝酸及び硝酸へと生物学的に酸化する硝化工程と、さらに無酸素条件下でそれらを生物学的に窒素ガスに還元する脱窒工程からなる。	最初沈殿池を設けず、機械式エアレーション装置を有する比較的水深の浅い無終端水路を反応タンクとして低負荷条件で活性汚泥処理を行う。下水中の有機物の除去とともに、好気と無酸素の工程を繰返すことにより、硝化・脱窒により窒素除去が可能である。
MLSS濃度	1500～2000 mg/L	2000～4000 mg/L	3000～4000 mg/L
HRT	6～8 hr	14～24 hr	24～48 hr
SRT	3～6 日	15～30日程度	15～30日程度

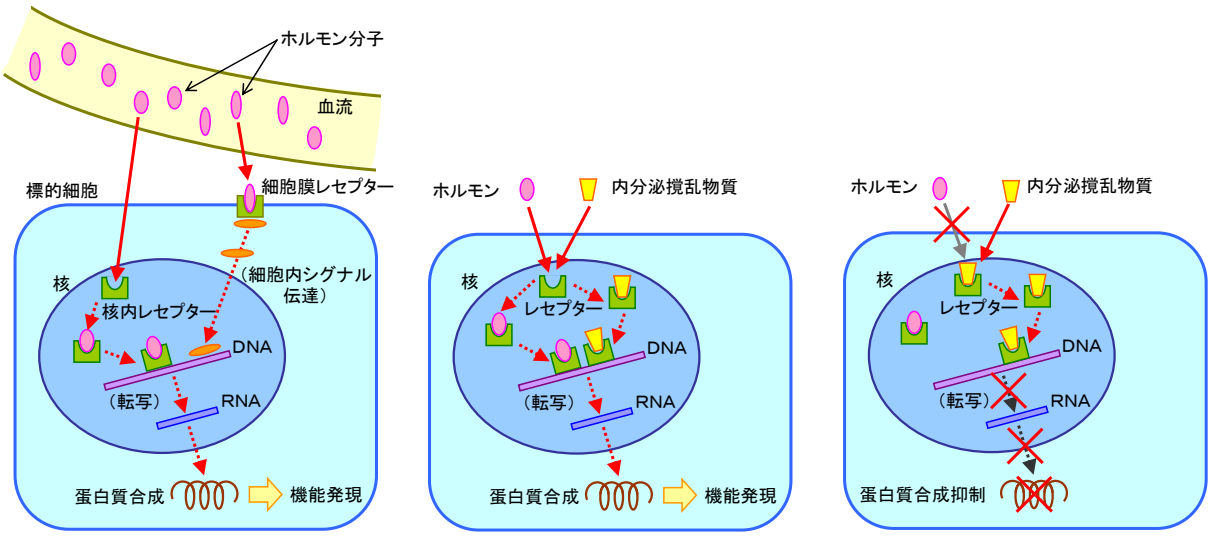
１．２　対象とする内分泌撹乱物質

内分泌撹乱物質について、SPEED'98 では、人を含む生物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常な内分泌（ホルモン）作用を撹乱し、生殖機能の異常や悪性腫瘍の発生などを引き起こす可能性のある外因性の物質と定義している[2)]。

ヒトが生体内で分泌する内分泌物質（ホルモン）は、主にヒトの内部環境のホメオスタシス（恒常性維持）、エネルギー代謝、発育と生長、性の分化と生殖の 4 つの生体機能を調節している[6)]。また、行動、精神活動などの精神機能や生体防御反応にも深く関与している。ホルモンには多数の種類が存在するが、現在、内分泌撹乱物質による影響が問題視されるのは、主に女性ホルモン類（estrogens）であり、その他に男性ホルモン類（androgens）および甲状腺ホルモンがある。

これらの生体内のホルモンは、分泌臓器や組織（例えば、卵巣や精巣など）で微量に分泌され、血液を介して標的臓器に運搬されて、そこで生理活性作用を発現する[6)]。すなわち、標的臓器に到達したホルモンは、**図 1-2-1(a)**に示すとおり、細胞内に取り込まれて細胞質を移動して核に達し、核内に存在するそれぞれのホルモンに特異的なレセプターと結合する。次いで、このホルモンとレセプターの結合体が DNA 上のホルモン応答配列に結合し、その転写反応を活性化することにより mRNA が作られ、さらにこの mRNA に対応するタンパク質が生合成されることにより生理活性作用を発現する。

これに対して、内分泌撹乱物質は、**図 1-2-1(b)**のようにホルモンのレセプターと結合することにより、そのホルモンと類似の作用をもたらしたり（アゴニスト作用）、あるいは、**図 1-2-1(c)**のようにホルモンとレセプターの結合を阻害する結果、そのホルモンの生理活性作用を阻害したりする（アンタゴニスト作用）ことなどにより、正常なホルモンの作用を撹乱する[2),6)]。SPEED'98 では、内分泌撹乱作用の疑いのある化学物質（内分泌撹乱化学物質）として、農薬類や樹脂原料、界面活性剤、非意図的生成物など 65 の物質群（当



(a)ホルモンの作用発現機構　(b)ホルモンと類似の作用をする場合　(c)ホルモンの作用を阻害する場合

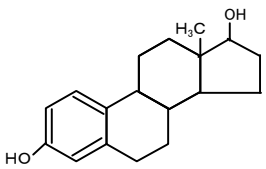
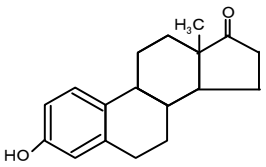
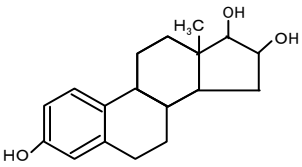
図 1-2-1　ホルモンおよび内分泌撹乱物質の作用発現機構[2)より作成]

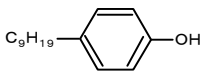
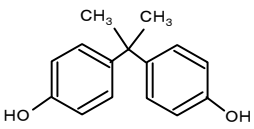
初の 1998 年 5 月版では 67 物質群であったが、2000 年 11 月版で 2 物質を削除）を示している[2]。このうち、これまでに NP[7]、4-オクチルフェノール[8]および BPA[9]の 3 物質については、魚類に対する内分泌撹乱作用を環境省が確認している。また、人や家畜などが排泄する天然および合成のエストロゲン自体も、水環境中に排出されることにより、水生生物の内分泌作用に影響を及ぼすことが指摘されている[10),11),12)]。

本研究では、主要な人畜由来の天然エストロゲンである E2、E1 およびエストリオール（E3）の 3 物質、並びに、下水道における代表的な内分泌撹乱化学物質である NP および BPA の 2 物質を調査対象物質とした。さらに、下水中の内分泌撹乱作用の強さを包括的に評価するため、遺伝子組換え酵母を用いたエストロゲン様活性の測定（以下、遺伝子組換え酵母法という）を行った。

調査対象物質の化学構造と主要な物性値[13),14),15)]を**表 1-2-1** に示す。

表 1-2-1　調査対象物質の化学構造と主要な物性値

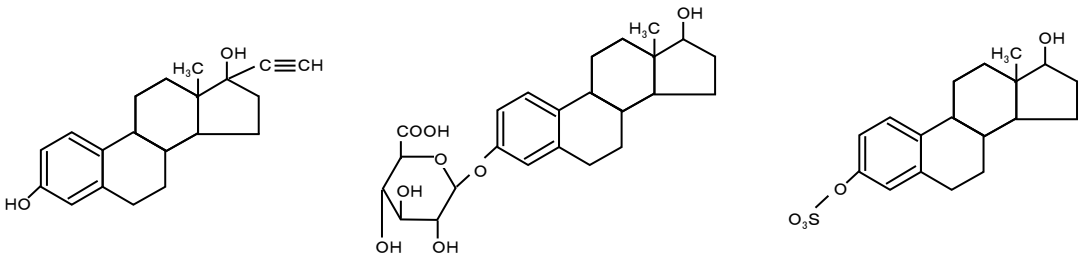
物質名	天然エストロゲン		
	17β-エストラジオール[13)] (E2)	エストロン[13)] (E1)	エストリオール[13)] (E3)
化学構造			
分子量	272.39	270.37	288.39
水溶解性 [mg/L]	12.96	12.42	13
オクタノール/水分配係数 (Log K_{OW})	3.94	3.43	2.81
ヘンリー定数 [Pa･m^3/mol]	6.94×10^{-2}	6.83×10^{-2}	2.20×10^{-6}

物質名	内分泌撹乱化学物質	
	ノニルフェノール[14)] (NP)	ビスフェノールA[15)] (BPA)
化学構造		
分子量	220.35	228.29
水溶解性 [mg/L]	6.35	120
オクタノール/水分配係数 (Log K_{OW})	5.76	3.32
ヘンリー定数 [Pa･m^3/mol]	2.23×10^{-4}	9.28×10^{-7}

１．２．１　エストロゲン

エストロゲン（卵胞ホルモン）は、プロゲステロン（黄体ホルモン）と並ぶ女性ホルモンの一種で、性腺付属器官の発育や第二次性徴の発現の促進、性周期の調整などの作用をする[16]。エストロゲンは、コレステロールから合成され、化学構造にステロイド骨格を有するステロイドホルモンの一種で、E1 や E2、E3 などの種々の形態が存在するが、体内では E2 が主要な分泌産物であり、主に卵巣から分泌される[16]。また、代表的な合成エストロゲンとしては、経口避妊薬（低容量ピル）の主要な成分の一つである EE2（**図 1-2-2(a)** 参照）や、かつて欧米諸国を中心に流産防止剤などとして使用され、人に対する発がん性などのため、現在では使用が禁止されているジエチルスチルベステロールなどがある。

エストロゲンは、その生理作用の後、最終的に肝臓で薬物代謝酵素の働きにより、一部が水酸化された 2-ヒドロキシエストロンや 16-ヒドロキシエストロンなどに代謝された後、さらにグルクロン酸や硫酸などと結合して（抱合化）、より活性の低いグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体などの抱合体（**図 1-2-2(b),(c)**参照）となり、主として尿中に排泄される[16]。尿中のエストロゲンは、ほとんどが抱合体の形態で存在しており、E2 や E1 などの遊離体のエストロゲンはわずかにしか含まれていない[17,)18]。一方、排泄された抱合体の一部は、尿中の代謝酵素や大腸菌などの微生物が産生する酵素などの働きにより、下水管渠中などで遊離体に分解（脱抱合）されるものと考えられている[19]。



17α-ethinylestradiol　(a) 合成エストロゲンの例

17β-estradiol 3-(β-D-glucuronide)　(b) グルクロン酸抱合体の例

17β-estradiol 3-sulfate　(c) 硫酸抱合体の例

図 1-2-2　代表的な合成エストロゲンおよびエストロゲン抱合体の化学構造

エストロゲンを含む代表的な内分泌撹乱物質の遺伝子組換え酵母法によるエストロゲン様活性（1.2.4 参照）の比較を**図 1-2-3** に示す[20]。図に示すように E2 の活性が最も強く、E1 はその 10 分の 3、E3 はその 500 分の 1 である。合成エストロゲンは活性が強く、EE2 の活性は E2 の 2 分の 1 である。一方、エストロゲン抱合体の活性は非常に弱く、17β - エストラジオール - 3 - サルファイトの活性は、E2 の 25,000 分の 1 である。また、NP や BPA などの合成化学物質のエストロゲン様活性は、最も活性の高い NP で E2 の 1,000 分の 1、その他の物質で E2 の 1 万分の 1～100 万分の 1 のオーダーであり、エストロゲンと比較して非常に弱い。そのため、下水処理水中[21]や河川水中[22),23]でエストロゲン様活性を示す主な原因物質は、E1 や E2、あるいは EE2 であると報告されている。

さらに、河川における魚類の雌性化の兆候、すなわち、雄の魚類に雌特有の卵黄前駆タ

ンパク質であるビテロゲニン（VTG：vitellogenin）が上昇する原因物質は、下水処理場放流水中に残留するエストロゲンであると考えられている。Harries ら[10]は、英国のテムズ川の支流リー川でニジマスの雄をカゴに入れて川に沈め、3 週間後に血漿中の VTG を測定した結果、下水処理場放流口の直下では 100 倍から 1 万倍の上昇が見られたと報告している。その後、英国全土において同様な調査が行われ、類似の結果が得られた。Desbrow ら[11]は、英国の 7 ヶ所の下水処理場の放流水を調査した結果、E2 は 1～50ng/L、E1 は 1～80ng/L、EE2 は 0.2～7.0ng/L であったことを報告している。さらに、水槽を用いた曝露試験の結果、ニジマスについては、1～10ng/L 以上の E2、あるいは、25～50ng/L 以上の E1、コイ科のローチについては、10～100ng/L の E2 の暴露を受けることにより、雄の個体に VTG の誘導が認められたことから、下水処理水中の天然エストロゲン濃度は、雄の魚類に VTG の誘導を引き起こすために十分な濃度であると結論している[12]。なお、魚類を用いた試験における VTG の誘導を基にしたエストロゲンの活性の強さは、EE2 は E2 の 30 倍程度、E1 は 0.2～0.5 倍程度である[24]。

英国環境庁[24]は、既往の魚類を用いた試験結果等から、エストロゲンの魚類に対する予測無影響濃度（PNEC：Predicted-No-Effective-Concentration）、すなわち、魚類の内分泌作用に影響を及ぼさないと予測される濃度として、EE2 は 0.1ng/L、E2 は 1ng/L（暫定値）を示しており、また、E1 については、その比活性値から 3～5ng/L と推定している。さらに 3 物質を合わせて、E2 換算で 1ng/L を提示している。また、わが国では、平成 16 年 4 月に施行された新しい水道水質基準において、E2、EE2 の 2 物質が要検討項目（＝水質基準や水質管理目標設定項目に分類できなかった項目で、今後さらに必要な情報、知見の収集を努めていくべきもの）とされ、暫定的な目標値として E2 は 80ng/L、EE2 は 20ng/L が示されている[25]。

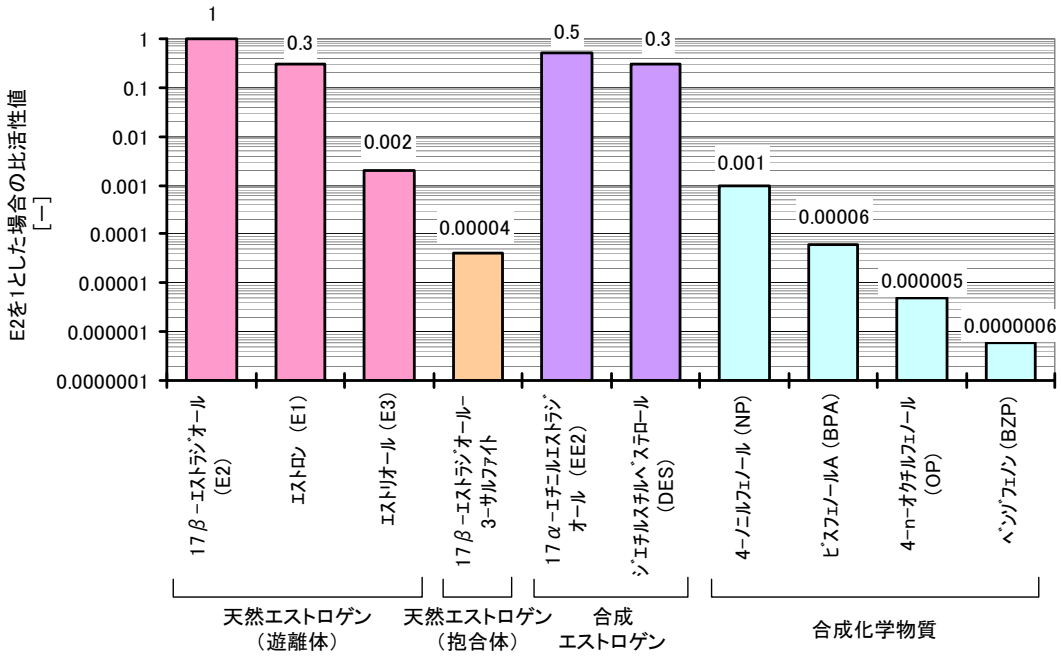


図 1-2-3　遺伝子組換え酵母法によるエストロゲン様活性の比較[20]より作成

１．２．２　ノニルフェノール

NPは、アルキルフェノール類の一種であり、数多くの異性体が存在する。NPの製造量は16,100t、国内供給量は11,692t（2001年）である[14]。使用用途別には、全体の61%が工業用の界面活性剤として用いられるノニルフェノールエトキシレート（NPnEO）の合成原料として使用され、次いで印刷インキの材料（バインダー）が25%、酸化防止剤の合成原料が9%、フェノール樹脂用積層板の合成原料が3%、エポキシ樹脂などの安定剤が2%である[14]。なお、1998年からの業界による自主規制に伴い、NPnEOの使用量は徐々に減少しており、NPの製造量も減少傾向にある[26]。

平成17（2005）年度のPRTR（Pollutant Release and Transfer Register：化学物質排出移動量届出制度）データによれば、わが国では1年間に約0.82tのNPが環境中に排出されたと見積もられ、そのうち99%は事業所から大気中に排出され、残り1%が公共用水域に排出されたと推定されている[26]。一方、NPnEOは、1年間に約800tが環境中に排出され、そのうち27%が公共用水域に排出されたと推定されている[27]。そこで、水環境中で検出されるNPの起源は、NPそのものが水環境中に排出されたものよりも、界面活性剤として使用されたNPnEOが水環境中に排出された後、生分解を受けてNPに変換されたものが主であると考えられている[28]。

NPnEOの水環境中での生分解経路を図1-2-4に示す。水環境中に排出されたNPnEO（n=8～12）は、好気的条件下で生分解を受けて、そのオキシエチレン（EO）基が短くなり、EO基の重合度が1～2になったNPnEO（n=1～2）や、EO基末端がカルボキシル化したノニルフェノキシ酢酸（NPnEC（n=1～2））といった中間体が生成される。さらに、これらの中間体が嫌気的条件下で生分解を受けて、NPを生じる。このNPnEOの分解過程では、生分解が進むほど、生体毒性やエストロゲン様活性が高くなる[7),29)]。

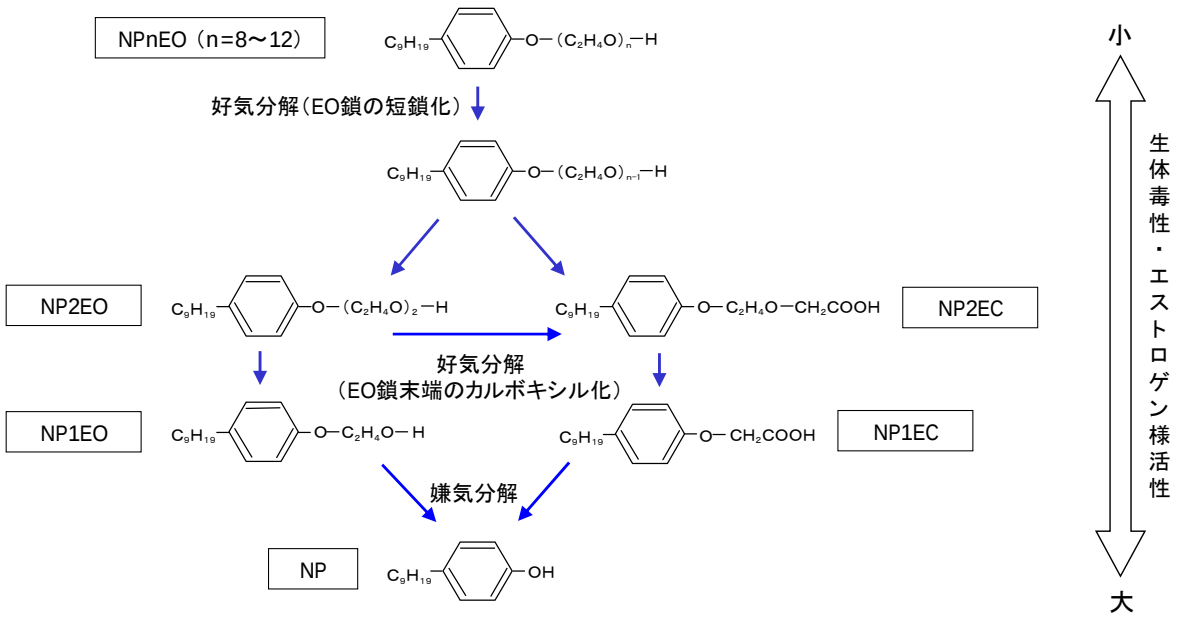


図1-2-4　ノニルフェノールポリエトキシレートの生分解経路[28)より作成]

NPには、直鎖型と分岐型の多数の構造異性体が存在するが、水環境中から主に検出され、内分泌撹乱作用が強いのは、パラ異性体（4（又は*p*）-NP）の分岐型（図1-2-5参照）であるとされる[7)]。NPは、環境省が魚類（メダカ）に対する内分泌撹乱作用を確認した化学物質の一つであり、その予測環境中濃度（＝予測される環境水中の濃度、PEC：Predicted Environmental Concentration）は0.59μg/L、PNECは0.608μg/Lと報告されている[7)]。このように、NPのPNECはPECに近いこと（PEC/PNEC=0.97）や、旧環境庁と旧建設省が実施した環境実態調査で全体の4.5%にあたる地点でPNECの値を超過していたことから、わが国の環境水中に存在するNPは、魚類の内分泌撹乱作用を通じ、生態系に影響を及ぼしている可能性があると評価されている[7)]。また、NPは水道水質基準の要検討項目の一つであり、その暫定的な目標値として0.3mg/Lが示されている[25)]。

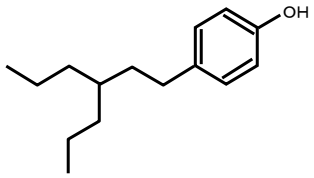


図1-2-5　4(又は*p*)-ノニルフェノール，分岐型の構造式の一例[7)]

１．２．３　ビスフェノールＡ

BPA は、主にポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂などのプラスチックの原材料として広く使用されている。わが国における BPA の生産量は年々増加する傾向にあり、2006 年度の生産量は 53 万 t である [30)]。BPA から生産される樹脂類は、食器やほ乳瓶などの日常用品や、食品包装材や缶の内層材などに使用されており、食器や食品などに溶出した BPA の経口摂取が推定される。そこで、BPA は、内分泌撹乱化学物質の中でも、ヒトが日常的に曝露する可能性が高い物質の一つと考えられ、代表的な環境ホルモン問題として大きく取上げられた [31),32)]。また、BPA については、従来の動物実験で有害な影響がないとされた量（5mg/kg 体重）よりも、極めて低い量（2.4～10μg/kg 体重）で影響がある（これを低容量影響という）とする報告もあり、人の乳幼児に与える影響が懸念されているため、わが国においても、BPA の人の健康への影響評価が始められている [33)] 。

BPA は、**図 1-2-3** に示したとおり、遺伝子組換え酵母法によるエストロゲン様活性が E2 の約 17,000 分の 1 と低く [20)]、天然エストロゲンの抱合体と同レベルである。BPA は、環境省により魚類（メダカ）に対する内分泌撹乱作用が確認されている [9)]。しかし、わが国における BPA の PEC は 0.29μg/L で、その PNEC である 24.7μg/L（ライフサイクル試験結果に基づく値）および 47μg/L（パーシャルライフサイクル試験結果に基づく値）を大きく下回ることから、水環境中に排出された BPA による現実的なリスクはやや低いか低いと考えられている [9)]。また、BPA は水道水質基準の要検討項目の一つであり、その暫定的な目標値として 0.1mg/L が示されている [25)]。

１．２．４　エストロゲン様活性

エストロゲン様活性は、試料中に存在する内分泌撹乱物質を生物に対する内分泌撹乱作用として測定するバイオアッセイの一つである[34]。エストロゲン様活性は、機器分析では測定できない物質や、内分泌撹乱作用を示すか否か明確でない物質も含む試料中の内分泌撹乱物質を包括的に評価することが可能である。エストロゲン様活性の測定には、生物個体を用いる *in vivo* 試験と、生物組織や微生物などを用いて試験管内で行う *in vitro* 試験があるが、迅速かつ安価に多くの試料を測定できるため、*in vitro* 試験が主に利用される。エストロゲン様活性の *in vitro* 試験には、遺伝子組換え酵母を用いた方法やヒト乳がん由来細胞を用いた方法（E-screen）などがある。遺伝子組換え酵母を用いた方法は、酵母に細胞壁があるため化学物質の透過が低く、E-screen 法と比較して感度が低いという欠点もあるが、その操作が比較的簡便であるため、下水試料や環境試料への適用事例が多い。

遺伝子組換え酵母を用いた方法は、エストロゲン受容体（レセプター）を介する作用機構を酵母の細胞内に導入し、これと内分泌撹乱物質が反応して発現した酵素の活性を指標とするもので、Routledge らによる YES（yeast estrogen screen）法[35]や西川らによる酵母 Two-hybrid 法[36]などの複数の方法が開発されている。本研究では、下水試料に含まれる細胞毒性物質による増殖阻害の影響が少なく、下水試料の測定に適していると考えられる[37]YES 法を用いた。

YES 法の測定原理を**図 1-2-6** に示す[34),35)]。YES 法で用いる遺伝子組換え酵母株は、その染色体上にヒトのエストロゲン受容体（ER : estrogen receptor）の産生をコードするヒトエストロゲン受容体遺伝子（hER : human estrogen receptor gene）が、また、プラスミド上にエストロゲン応答配列（ERE : estrogen response element）とレポーターとなるβ-ガラクトシダーゼの産生をコードする lacZ 遺伝子が組み込まれている。エストロゲン様活性を持つ物質は、hER の発現により産生された ER と結合し、活性化する。活性化された ER は、プラスミド上の ERE と結合して、その下流にある lacZ 遺伝子の転写を活性化し、β-ガラクトシダーゼを産生する。このβ-ガラクトシダーゼと培地に加えられた発色試薬 CPRG（chlorophenol red-β-D-galactopyranoside）との反応で生じた色の変化を吸光光度計を用いて測定することにより、エストロゲン様活性を求める（1.3.3(4)参照）。

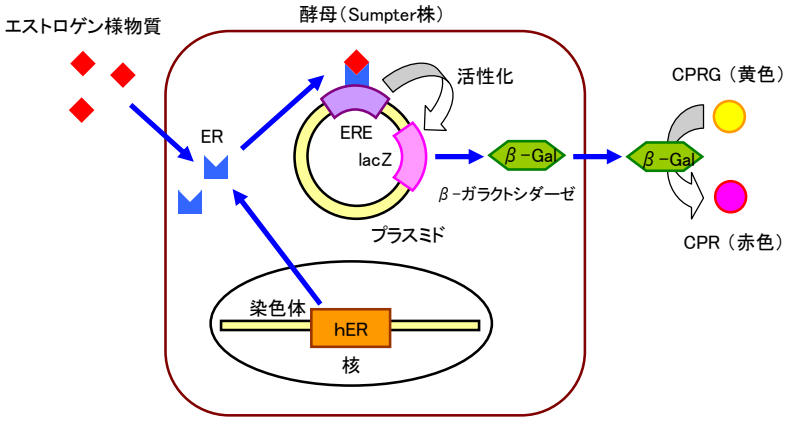


図 1-2-6　Yeast Estrogen Screen (YES) 法の測定原理

１．３　調査方法

本研究で行った各調査の目的や対象処理場、分析項目などを**表 1-3-1** にまとめて示す。

本研究では、（１）全国の中小規模の下水処理場における代表的な内分泌撹乱物質の濃度に関する調査（以下、調査Ⅰという）、（２）全国の下水処理場における天然エストロゲンの濃度に関する調査（以下、調査Ⅱという）、（３）標準法と OD 法の下水処理場各１ヶ所における月１回の通年調査（以下、調査Ⅲという）、並びに、（４）標準法の下水処理場１ヶ所における通日調査（以下、調査Ⅳという）を行った。

１．３．１　調査対象処理場および調査期間

調査対象処理場の位置を**図 1-3-1** に示す。調査対象処理場は、気象条件の違いによる影響を考慮し、関東近郊を中心に北海道から鹿児島県までの全国から選定した。なお、図中に示す各処理場の略号は、本論文全体を通して同一のものを用いた。

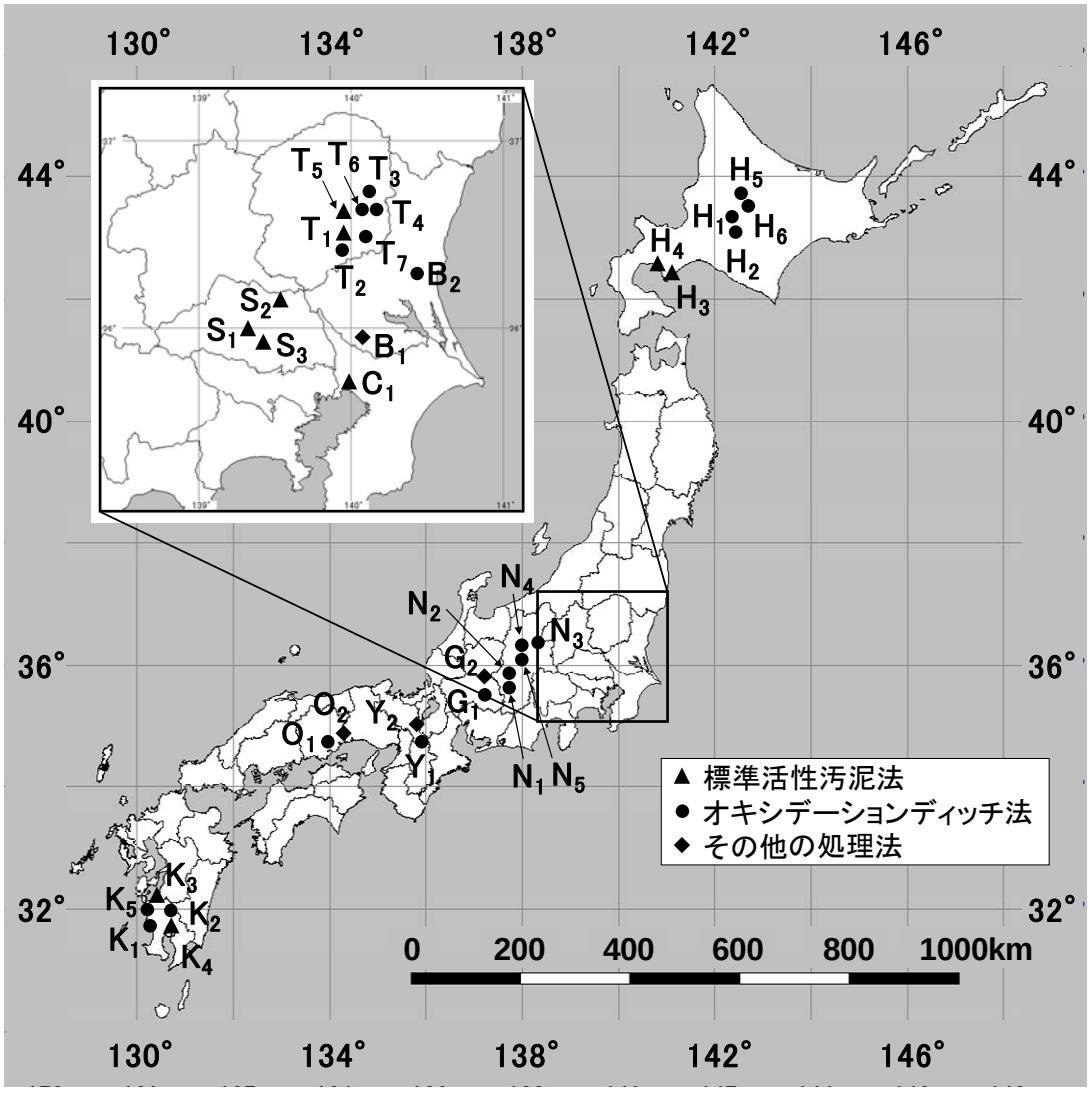


図 1-3-1　調査対象処理場の位置

表1-3-1 調査方法の概要

	調査Ⅰ		調査Ⅱ	調査Ⅲ	調査Ⅳ
	調査Ⅰ－1	調査Ⅰ－2			
目 的	中小規模下水処理場における内分泌撹乱物質の挙動の把握		下水処理場におけるエストロゲンの挙動の把握	内分泌撹乱物質の長期的な濃度変動の把握（通年調査）	内分泌撹乱物質濃度の時間変動の把握（通日調査）
期 間	2000年夏季～ 2001年春季	2001年夏季・冬季	2003年夏季・冬季	2001年10月～2003年3月［標準法］ 2001年10月～2002年9月［OD法］	2003年2月17日～19日
対象処理場	10ヶ所	8ヶ所	2Oヶ所＋1ヶ所（追加調査）	2ヶ所	1ヶ所
処理方式 *	標準法（1），OD法（8）， 回分法（1）	OD法（6），長時間法（1）， 好気性ろ床法（1）	標準法（10），OD法（10）， 追加調査：嫌気好気ろ床法（1）	標準法（1），OD法（1）	標準法（1） ※調査Ⅲの対象処理場と同じ
道府県名 *	栃木県（4），茨城県（2）， 長野県（4）	北海道（2），京都府（2）， 岡山県（2），鹿児島県（2）	北海道（4），栃木県（5），埼玉県（3）， 千葉県（1），長野県（2），岐阜県（2）， 鹿児島県（4）	栃木県（2）	栃木県（1）
採水頻度	四季各1回	夏季・冬季各1回	夏季・冬季各1回	月1回	4時間毎、計12回
採水箇所	流入下水、処理水（消毒前）、放流水（消毒後）		流入下水、処理水 嫌気ろ床流出水（嫌気好気ろ床法のみ）	流入下水、処理水	流入下水、最初沈殿池流出水 処理水
分析項目 （分析方法）	E2（ELISA法） NP（GC/MS法） エストロゲン様活性（YES法）		E1,E2,E3（LC/MS/MS法） NP,BPA（GC/MS法） ※NP、BPAは岐阜県内2ヶ所のみ	E1,E2,E3（LC/MS/MS法） NP,BPA（GC/MS法） エストロゲン様活性（YES法）	E1,E2,E3（LC/MS/MS法） NP,BPA（GC/MS法）

＊：括弧内はヶ所数を示す

調査Ⅰは、2000 年夏季から 2001 年春季に 10 ヶ所（調査Ⅰ－１）、2001 年夏季および冬季に 8 ヶ所（調査Ⅰ－２）の計 18 ヶ所を対象に実施した。処理方式別には、OD 法が 14 ヶ所（調査時の現有処理能力 750～9,200m^3/日、以下同じ）、標準法（13,700m^3/日）、回分式活性汚泥法（5,200m^3/日、以下、回分法という）、長時間エアレーション法（1,750m^3/日、以下、長時間法という）および好気性ろ床法（1,250m^3/日）が各 1 ヶ所である。道府県別には、前期は栃木県 4 ヶ所、茨城県 2 ヶ所および長野県 4 ヶ所、後期は北海道、京都府、岡山県および鹿児島県の各 2 ヶ所である。

調査Ⅱは、2003 年夏季および冬季に 20 ヶ所を対象に実施した。処理方式別には、OD 法が 10 ヶ所（780～4,800 m^3/日）、標準法が 10 ヶ所（7,125～48,000 m^3/日）である。道府県別には、栃木県 5 ヶ所、北海道および鹿児島県の各 4 ヶ所、埼玉県 3 ヶ所、長野県 2 ヶ所、千葉県および岐阜県の各 1 ヶ所である。また、嫌気性水処理プロセスにおける内分泌撹乱物質の挙動を把握するため、岐阜県内の OD 法の G_1 処理場に隣接する都市にある嫌気好気ろ床法の G_2 処理場（2,900m^3/日）も合わせて調査した（以下、追加調査という）。

調査Ⅲは、栃木県内の隣接した 2 都市にある標準法の T_1 処理場（13,700m^3/日）と OD 法の T_2 処理場（900m^3/日）において、T_1 処理場では 2001 年 10 月から 2003 年 3 月の 18 ヶ月間、T_2 処理場では 2001 年 10 月から 2002 年 9 月の 12 ヶ月間にわたって実施した。また、調査Ⅳは、調査Ⅲと同じ標準法の T_1 処理場において、2002 年 2 月 17 日（月）午前 10 時から 19 日（水）午前 6 時までの 2 日間にわたって実施した。

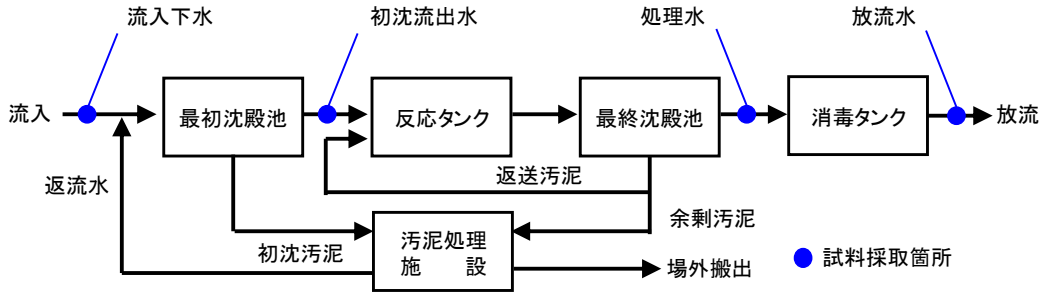
１．３．２　試料採取方法および採取箇所

調査Ⅰおよび調査Ⅱの試料採取は、季節的な濃度変動を考慮して、調査期間中の各季節に 1 回行った。すなわち、調査Ⅰ－１では、夏季（8～9 月）、秋季（10 月）、冬季（12 月）および春季（4～5 月）の計 4 回、調査Ⅰ－２および調査Ⅱ（追加調査を含む）では、夏季（7～9 月）と冬季（12 月）の計 2 回行った。また、調査Ⅲの試料採取は、調査期間中、月に 1 回行った。調査Ⅰ、調査Ⅱおよび調査Ⅲにおける試料採取は、できる限り平均的な濃度を把握するため、降雨の影響（前日および当日）を受けていない、平日の午前（8 時～11 時頃）と午後（1 時～3 時頃）に各 1 回行い、これを直前に等量混合して分析に供した。一方、調査Ⅳの試料採取は、調査期間中、4 時間毎に計 12 回行った。

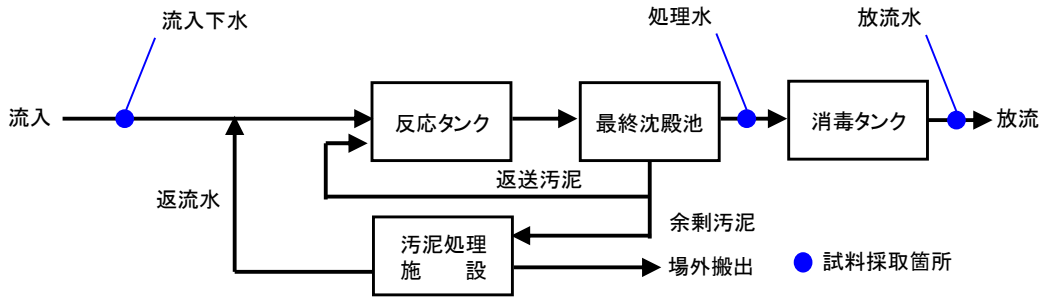
試料採取には、ステンレス製の採水器具、並びに、アセトンで洗浄したガラス製の試料瓶を用いた。なお、NP 分析用の試料は、試料水を満水にした後、試料水 1L あたり 1g の L-アスコルビン酸を加えて固定した。

試料採取箇所の位置を**図 1-3-2** に示す。なお、図では、代表的な処理フローとして、標準法および OD 法の場合を例に示した。調査Ⅰでは、流入下水、処理水（最終沈殿池流出水、回分槽流出水または好気性ろ床流出水、以下本章で同じ）および消毒後の放流水の 3 つの試料を各々図中に示した各箇所から採取した。調査Ⅱおよび調査Ⅲでは、標準法および OD 法では流入下水および処理水の 2 つの試料を各々図中に示した各箇所から、嫌気好気ろ床法では、これらに嫌気性ろ床流出水を加えた 3 試料を採取した（**図 1-4-15** 参照）。

また、調査Ⅳでは、流入下水および処理水に、最初沈殿池流出水（以下、初沈流出水という）を加えた 3 試料を採取した。なお、流入下水は、汚泥処理施設からの返流水の影響を受けない位置で採取した。



(a) 標準活性汚泥法の場合



(b) オキシデーションディッチ法の場合

図 1-3-2　処理フローと試料採取箇所の位置

１．３．３　分析項目および分析方法

調査Ⅰでは、最も代表的な内分泌撹乱物質である E2 と NP の 2 物質、並びに、エストロゲン様活性を分析項目とした。E2 の分析は、調査時における下水試料を対象とした分析方法の確立状況[38]から、ELISA 法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay：酵素標識による固相免疫測定法）で行った。また、NP の分析は、ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法により、エストロゲン様活性は YES 法により行った。

調査Ⅱでは、主要な天然エストロゲンである E1、E2 および E3 の 3 物質について、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析（LC/MS/MS）法により分析した。また、調査Ⅱの追加調査では、嫌気性水処理プロセスにおける内分泌撹乱物質の挙動を把握するため、嫌気好気ろ床法の G_2 処理場とこれに隣接して位置する OD 法の G_1 処理場の 2 ヶ所について、代表的な内分泌撹乱化学物質である NP と BPA の 2 物質を分析項目に加えた。なお、NP および BPA は、GC/MS 法により分析した。

調査Ⅲおよび調査Ⅳでは、エストロゲン 3 物質と NP、BPA の計 5 物質を分析項目とした。調査Ⅲでは、エストロゲン様活性も分析項目に加えた。各分析項目の分析方法は、調査Ⅱと同じとした。

各分析項目の測定については、下水試験方法－追補暫定版－[39]に準じて、操作ブランク試験、精度管理目標値確認試験、トラベルブランク試験および二重測定による精度管理を適宜実施し、所定の分析精度が確保されていることを確認した。

内分泌撹乱物質およびエストロゲン様活性の分析方法を以下に示す。なお、試料の前処理および測定のフローは、巻末の付録Ⅰに示した。下記以外の一般的な水質項目の分析は、下水試験方法[40]に準じて行った。

（１）17β-エストラジオール（ELISA 法）

ELISA 法による E2 の測定は、固相抽出法[38),39)]により測定用試料を調製した後、ELISA 測定キットを用いて行った。本法による E2 の検出下限値は 0.2ng/L であった。なお、E2 は SIGMA 製、その他の試薬類は和光純薬工業製の試薬特級のものを主に用いた。

試料水をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 製）でろ過し、ろ液を予めメタノール、超純水の順にコンディショニングした固相カラム（Sep-Pak tC18 カートリッジ、Waters 製）に通水した。通水後のカラムを超純水で洗浄、脱水した後、メタノールで溶出させた。また、ろ紙上の残さは、ろ紙ごとメタノールで超音波抽出した。これらの溶液を混合し、窒素ガス気流下で濃縮、乾固した後、メタノールに再溶解して測定用試料とした。

測定は、二次処理水を用いた添加回収試験による比較検討の結果[41)]から、環境試料分析用として市販されている武田薬品工業（現･日本エンバイロケミカルズ）製の E2 ELISA キットを使用し、キット添付のプロトコルに従って行った。

（２）エストロゲン（LC/MS/MS 法）

LC/MS/MS 法による E1、E2 および E3 の測定は、主に中村らの方法[21)]に従って行った。本法による E1 の検出下限値は 0.2ng/L または 0.5ng/L、E2 および E3 の検出下限値は 0.5ng/L であった。なお、E2 は和光純薬工業製、E1 および E3 は SIGMA 製、その他の試薬類は和光純薬工業製の残留農薬試験用、高速液体クロマトグラフ用および試薬特級のものを主に用いた。

試料水をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 製）でろ過し、ろ液に内標準物質（E1-16,16-d_2（CDN Isotopes 製）、E2-16,16,17-d_3（Aldrich 製）、E3-2,4-d_2（CDN Isotopes 製））を添加し、予めメタノール、超純水の順にコンディショニングした濃縮用固相カラム（Oasis HLB Plus カートリッジ、Waters 製）に通水した。通水後のカラムを超純水、30%アセトンの順で洗浄、脱水した後、メタノールで溶出させた。この溶出液を窒素ガス気流下で濃縮し、水/ジエチルエーテルで分配後、エーテル相を回収して、窒素ガス気流下で濃縮した。これを無水硫酸ナトリウムで脱水後、予めジエチルエーテルでコンディショニングしたクリーンアップ用の固相カラム（Sep-Pak NH_2 Plus カートリッジ、Waters 製）に通水した。通水後のカラムから、ジエチルエーテルを用いて E1、E2 を溶出させ、次いでメタノールを用いて E3 で溶出させた。これらの溶出液を窒素ガス気流下で濃縮した後、メタノールに再溶解して測定用試料とした。

高速液体クロマトグラフには HP1100 システム（Hewlett Packard 製）を、分離カラム

には L - カラム OSD（2.1×150mm、5.0μm、化学物質評価研究機構製）を主に用いた。移動相はアセトニトリル - 水の混合系を使用し、40%アセトニトリル - 水から 80%アセトニトリル - 水へ 2 分間でリニアにグラジエントをかけ、流量 0.2mL/min で流した。カラムオーブン温度は 40℃、試料注入量は 20μL とした。また、ポストカラム溶液として 0.05%アンモニア - メタノールを 0.03mL/min で添加し、質量分析計へ導入した。

質量分析計には QuattroⅡ（Micromass 製）を主に用いた。イオン化法はエレクトロスプレー法の負イオンモード、イオン源温度 100℃、コーン電圧 50V とした。また、衝突ガスにはアルゴンガスを使用し、衝突電圧は 38eV とした。測定イオンは、E1 は m/z=269→145、E2 は m/z=271→145、E3 は m/z=287→171、E1-d_2 は m/z=271→145、E2-d_3 は m/z=274→145、E3-d_2 は m/z=289→173 とした。

（３）ノニルフェノールおよびビスフェノールＡ

NP および BPA の測定は、下水試験方法－追補暫定版－[39]に従って、溶媒抽出－GC/MS 法で行った。本法による NP の検出下限値は 0.1μg/L、BPA の検出下限値は 0.01μg/L であった。なお、試薬類は全て関東化学製の試薬特級以上のものを用いた。

試料水をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 製）でろ過し、ろ紙上の残さをろ紙ごとアセトンで超音波抽出した後、ろ液に加えた。この溶液を塩酸により酸性にし、ジクロロメタンで溶媒抽出した。この抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮した。これに内標準物質（NP はフェナンスレン-d_{10} 、BPA はピレン-d_{10}）を添加した後、NP はヘキサン、BPA はジクロロメタンで定容して、測定用試料とした。なお、BPA のトリメチルシリル誘導体化は行わなかった。

ガスクロマトグラフ質量分析計には JMS - GCMATEⅡ（日本電子製）、カラムには溶融シリカキャピラリーカラム（30m×0.32mm I.D. df=0.25μm、Agilent Technologies 製 HP－5）を主に用いた。注入口温度 280℃、イオン源温度 250℃で、GC の昇温条件は、初期温度 60℃で 1 分間保持した後、10℃/min で 280℃まで昇温し、260℃で 5 分間保持した。イオン化電圧 70eV、イオン化電流 300μA で、選択イオン検出（SIM）モードにより測定した。測定イオンは、NP は m/z=135、フェナスレン-d_{10} は m/z=188、また、BPA は m/z=213、ピレン-d_{10} は m/z=212 とした。

（４）エストロゲン様活性（YES 法）

エストロゲン様活性の測定は、英国 Brunel 大学 Sumpter 教授から分与された遺伝子組換え酵母株（以下、Sumpter 株という）を用いて、主に Routledge らの方法[35]を一部改変した矢古宇らの方法[20]に準じて行った。なお、E2 は SIGMA 製、CPRG は Roche 製、その他の試薬類は和光純薬工業製および SIGMA 製のものを主に用いた。

エストロゲン様活性の測定用試料は、(1)に示した固相抽出法により調製した。測定用試料または E2 標準液を、96 穴マイクロプレートのウェルに 10～20μL ずつ添加し、これにグロースメディウム（巻末付録Ⅰ参照）を加えて 200μL に定容した。なお、E2 標準液については、溶媒を蒸発させた後、グロースメディウムを加えて、再溶解させた。次いで、

マイクロプレート上でグロースメディウムを用いて 2 倍ずつ段階希釈を行った後、各ウェルに酵母培養液（終濃度 4×10^7cells/mL となるよう添加）および CPRG を含むグロースメディウム（これをアッセイメディウムという）を 100μL ずつ加え（全容 200μL）、28℃で 5 日間静置培養した。培養終了後、マイクロプレートリーダ（主に TECAN 製 SPECTRA CLASSIC を使用）で 550nm（＝発色試薬の発色）と 620nm（＝酵母の増殖量）の吸光度を測定し、各濃縮倍率（濃度）の換算値を下式により求めた。

換算値＝550nm の吸光度－620nm の吸光度　……（式 1-3-1）

E2 標準液の 50%作用濃度（最大活性の 50%の活性が得られる濃度：C_{50}）が得られる状態に相当する試料のエストロゲン様活性は、当該濃度における E2 標準液のエストロゲン様活性と等価と考えられる。そこで、試料のエストロゲン様活性（E2 等価値）は、**図 1-3-3** に示すとおり、E2 標準液および試料の用量反応曲線から求めた C_{50} から**式 1-3-2** により算出した。

$$\text{試料のエストロゲン様活性}\,[\text{ng-E2/L}] = \frac{\text{X}\,[\text{ng/well}]}{\text{Y}[\text{mL/well}]} \times 1000 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \text{（式 1-3-2）}$$

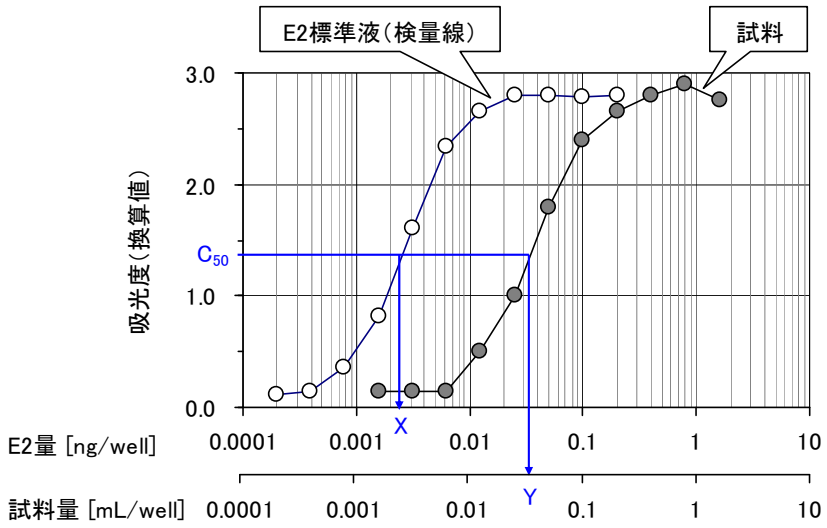


図 1-3-3　エストロゲン様活性の用量反応曲線

１．４　結果および考察

１．４．１　中小規模下水処理場における内分泌撹乱物質の挙動（調査Ⅰ）

調査Ⅰでは、OD 法を中心とする中小規模の下水処理場における内分泌撹乱物質の濃度実態を把握するとともに、主として標準法を中心とする大規模な下水処理場を対象に行われた国交省調査 [1)]の結果と比較することにより、処理方式や規模などによる内分泌撹乱物質の除去効果の違いについて考察を加えた。調査Ⅰは、**表 1-4-1** に示す OD 法を中心とする全国 18 ヶ所の下水処理場を対象に行った。なお、調査対象処理場の消毒方法は、O_2 処理場はオゾン消毒、それ以外は全て塩素消毒であった。

表 1-4-1　調査対象処理場（調査Ⅰ）の概要

県　名	処理場名	処理方式	処理能力（m^3/日）		流入水量	HRT	SRT
			全体	現有	[m^3/日]	[h]	[日]
北　海　道	H_1	OD法	11,800	2,955	2,410	30	28
	H_2		8,100	3,240	2,680	29	21
栃　木　県	T_1	標準法	22,300	13,700	13,000	13	10
	T_2	OD法	3,600	900	570	37	34
	T_3		6,350	3,150	1,570	49	60
	T_4		1,500	750	270	68	63
茨　城　県	B_1	OD法	2,700	1,350	470	69	100
	B_2	回分法	5,200	5,200	2,090	35	19
長　野　県	N_1	OD法	10,100	3,900	2,810	32	26
	N_2		6,200	2,300	1,360	41	25
	N_3		14,000	9,200	4,300	42	25
	N_4		14,700	2,400	1,450	42	38
京　都　府	Y_1	OD法	10,700	5,350	3,030	42	50
	Y_2	好気性ろ床法	10,000	1,250	340	32	－
岡　山　県	O_1	OD法	10,100	5,050	2,440	34	57
	O_2	長時間法	1,750	1,750	1,510	32	44
鹿児島県	K_1	OD法	10,700	3,700	3,350	27	21
	K_2		2,400	1,200	290	99	150

注1）B_2、K_1 は将来標準法に移行する計画であるが、ここでは現在の処理方式の全体能力を示した。
注2）現有処理能力は調査時点における供用施設の能力である。
注3）流入水量、HRTおよびSRTは調査期間中の平均値である。

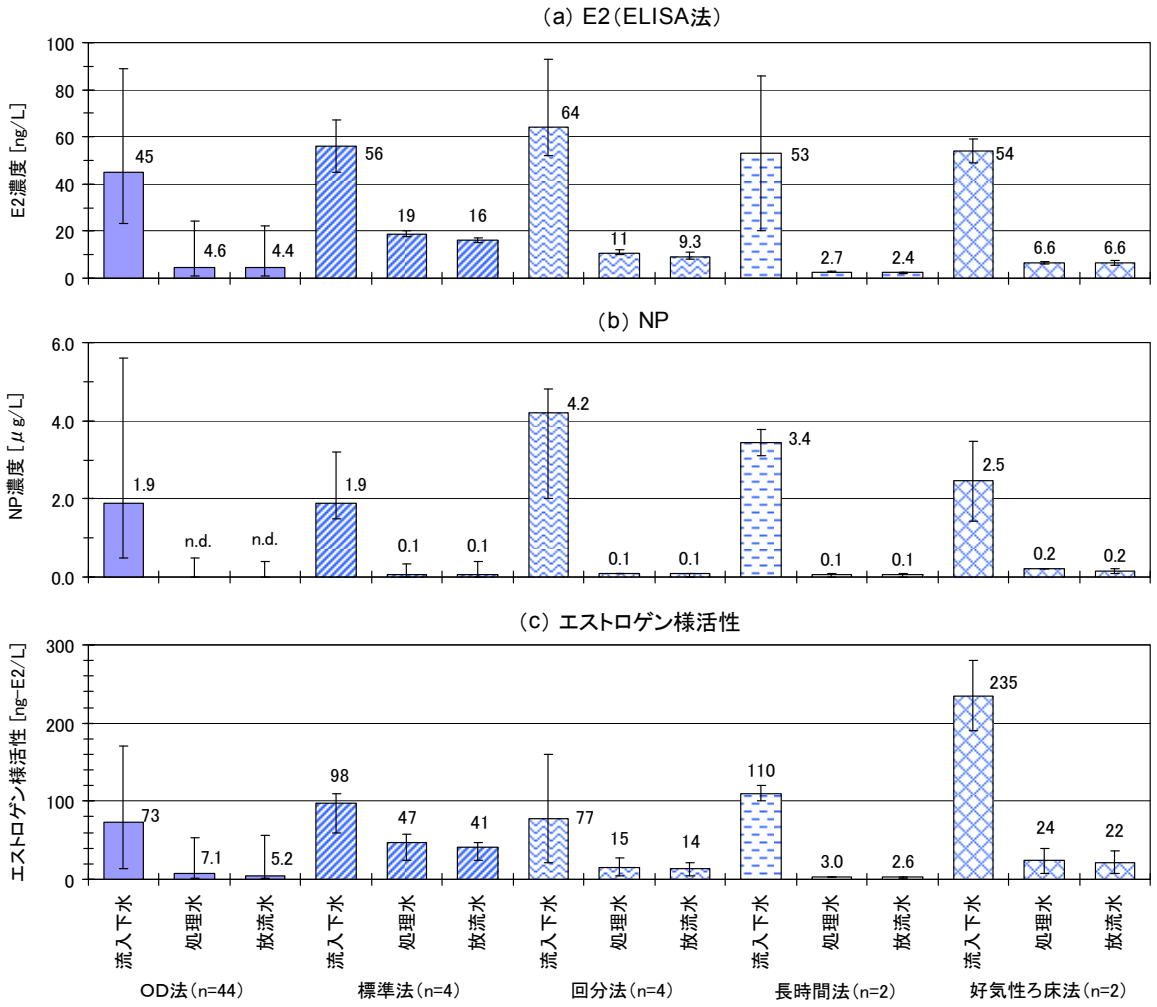
調査Ⅰにおける E2（ELISA 法）、NP およびエストロゲン様活性の濃度範囲および除去率（中央値、最大値および最小値）を**表 1-4-2** に、処理方式別の濃度範囲および中央値を**図 1-4-1** にそれぞれ示す。なお、除去率は、流入下水に対する処理水における除去率で表すものとし、処理水中の濃度が検出下限値未満の場合には、処理水中の濃度は検出下限値として除去率を算出した（以下、本章において同じ）。

除去率［%］＝（流入下水濃度－処理水濃度）/流入下水濃度×100 ……（**式 1-4-1**）

表 1-4-2　濃度および除去率の範囲（調査Ⅰ）

調査対象物質	濃　度 [a),b)]			除去率 [a)]	出典
	流入下水	処理水	放流水		
E2（ELISA法）[ng/L]	48 （20～93）	5.6 （0.8～24）	5.2 （0.9～22）	88 （63～98）	本研究
	42 （9.1～94）	10 （n.d.～66）		77 （15～99）	国交省調査 [c)]
NP［μg/L］	1.9 （0.5～5.6）	n.d （n.d.～0.5）	n.d. （n.d.～0.4）	94 （80～>98）	本研究
	4.4 （0.7～75）	tr (0.2) （n.d.～1.0）		97 （76～>99）	国交省調査 [c)]
エストロゲン様活性 [ng-E2/L]	84 （13～280）	7.7 （0.9～58）	7.0 （0.8～57）	89 （53～99）	本研究

注a）各段の上行は中央値、下行の括弧内は最小値～最大値を示す。
注b）n.d.は検出下限値未満を、trは検出下限値以上かつ定量下限値未満を示す。
　　括弧内書きの数値は、定量下限値未満の参考値である。
注c）E2およびNPの下段は国交省調査結果による。
　　ただし、国交省調査では、流入下水と最終沈殿池流出水あるいは放流水である。



注）図中の数値は中央値を示す。また、n はサンプル数を示す。

図 1-4-1　処理方式別の濃度範囲および中央値（調査Ⅰ）

（１）17β-エストラジオール

流入下水および処理水の E2（ELISA 法）濃度の比較を**図 1-4-2** に、本調査と国交省調査との比較を**図 1-4-3** に示す。ここで、本調査の結果は、**表 1-4-1** に示すとおり、OD 法 14 ヶ所を中心とする 18 ヶ所の中小規模の下水処理場（全体計画処理能力平均値：8.5 千 m^3/日）におけるもので、流入下水、処理水ともに、データ数は 56 である。一方、国交省調査の結果は、標準法 37 ヶ所を中心とする全国 15 都府県市 47 ヶ所の大規模な下水処理場（全体計画処理能力平均値：約 28 万 m^3/日）におけるもので、流入下水のデータ数は 125、処理水のデータ数は 146 である [1)]。なお、**図 1-4-2** 中に示す線は、数値で示した除去率における処理水中の濃度の計算値を表したものである（以下、本章において同じ）。

本調査における流入下水中の E2（ELISA 法）濃度は、全て定量下限値（0.6ng/L）以上で、その濃度範囲は 20～93ng/L、中央値は 48ng/L であった。これに対して、国交省調査における流入下水中の E2（ELISA 法）の濃度範囲は 9.1～94ng/L、中央値は 42ng/L であった [1)]。流入下水中の E2（ELISA 法）は、濃度範囲、中央値のいずれについても、両者の間に顕著な差はなく、下水処理場の規模や地域特性などによらず、概ね同程度の濃度レベルであるといえる。

一方、本調査における処理水中の E2（ELISA 法）濃度は、流入下水と同様、全て定量下限値以上であり、その濃度範囲は 0.8～24ng/L、中央値は 5.6ng/L であった。これに対して、国交省調査における処理水中の E2（ELISA 法）の濃度範囲は検出下限値（0.2ng/L）未満～66ng/L、中央値は 10ng/L であった [1)]。処理水中の E2（ELISA）は、流入下水とは異なり、本調査の方がその濃度範囲が狭く、最大値、中央値ともに低かった。処理方式別の中央値は、OD 法（4.6ng/L）、長時間法（2.7ng/L）および好気性ろ床法（6.6ng/L）では国交省調査よりも低かったが、回分法（11ng/L）、標準法（19ng/L）では高かった。本調査における E2（ELISA 法）の除去率は 63～98%、中央値は 88%であり、国交省調査における除去率（15～99%、中央値 77%）と比べて高い傾向にあった。処理法別の除去

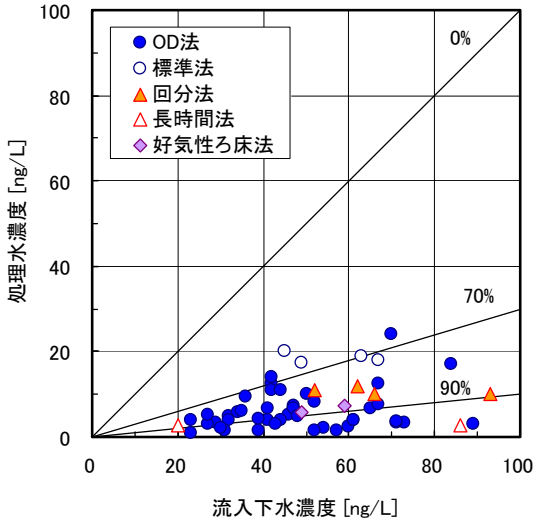


図 1-4-2　流入下水および処理水の E2 濃度の比較

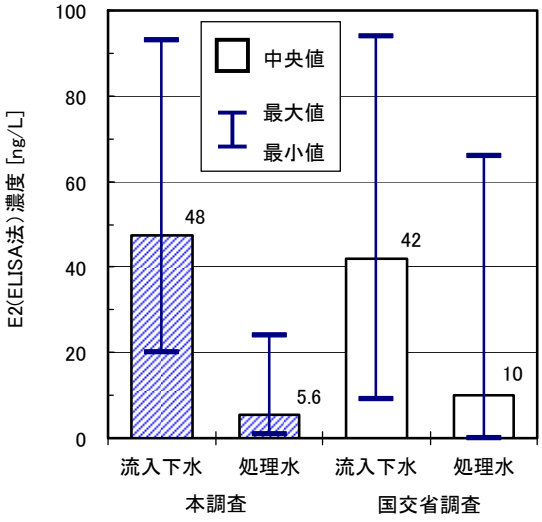


図 1-4-3　本調査と国交省調査の E2 濃度の比較

率の中央値は、OD 法（89%）、回分法（86%）、長時間法（93%）および好気性ろ床法（88%）では高かったが、標準法では 72%にとどまり、国交省調査と同程度であった。以上のとおり、OD 法を中心とする中小規模の下水処理場では、標準法を中心とする大規模な下水処理場と比較して、E2（ELISA 法）の除去効果が高く、処理水中の濃度レベルも低いことが明らかとなった。

消毒後の放流水中の E2（ELISA 法）濃度は、消毒前の処理水中の E2（ELISA 法）濃度と比較して、全体的に若干低くなる傾向が認められた。塩素は、強い酸化剤の一つで非常に反応性が高いため、多くの無機物や有機物と反応し、フェノール化合物は、塩素により酸化されて、塩素置換体を生成する[42]。多くの内分泌撹乱物質は、フェノール構造を有するため、塩素により酸化されるものと考えられる。Alum ら[43]によれば、E2 は塩素により速やかに酸化され、純水中の E2 の半減期は塩素濃度 1mgCl_2/L で 3 分である。また、北中ら[44]は、塩素注入率 20mg/L、接触時間 15 分の塩素消毒により、二次処理水中の E2 が 20%程度減少したと報告している。これらのことから、本研究で認められた塩素消毒前後での E2（ELISA 法）濃度の減少は、塩素の酸化作用による除去効果である可能性が示唆される。しかし、実際の下水処理水の消毒で使用される塩素量は 2～4mg/L 程度であることや[45]、塩素は下水処理水中のアンモニアなどと反応し消費されること、また、塩素消毒過程における E2 の除去効果は、本調査の結果からはわずかであったことから、下水処理における通常の塩素消毒では、E2 の除去効果は余り期待できないものと考えられる。

（２）ノニルフェノール

流入下水および処理水の NP 濃度の比較を**図 1-4-4** に、本調査と国交省調査との比較を**図 1-4-5** に示す。なお、本調査のデータ数は、流入下水、処理水ともに 56、国交省のデータ数は、流入下水が 132、処理水が 155 である。

本調査における流入下水中の NP 濃度は、全て定量下限値（0.3μg/L）以上で、その濃度範囲は 0.5～5.6μg/L、中央値は 1.9μg/L であった。これに対して、国交省調査におけ

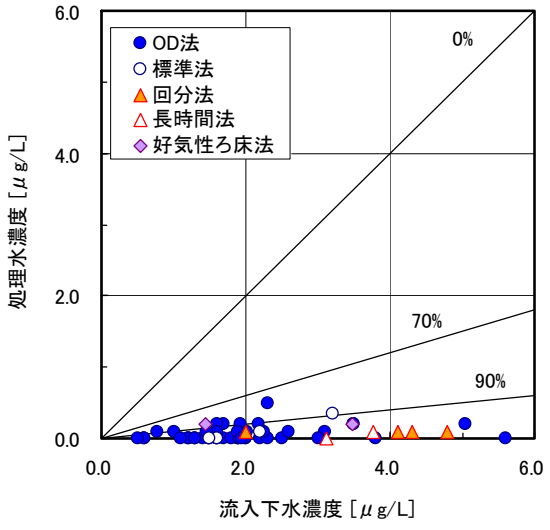


図 1-4-4　流入下水および処理水の NP 濃度の比較

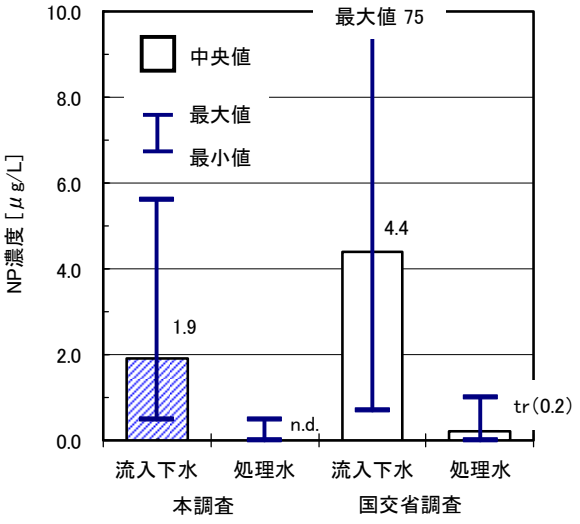


図 1-4-5　本調査と国交省調査の NP 濃度の比較

る流入下水中の NP の濃度範囲は 0.7～75μg/L、中央値は 4.4μg/L であった[1)]。流入下水中の NP 濃度は、国交省調査と比較して、本調査の方が全体的に低い傾向にあった。NP の下水道への流入経路は、主に工場等の事業所排水と考えられるが、流入下水量全体に占める事業所排水の割合は、本調査では平均で約 2%、国交省調査では平均で約 10%であった。また、本調査の中央値は、家庭系汚水のみを受け入れる団地汚水処理場の流入下水中の NP 濃度 1.1μg/L（中央値）[1)]に比較的近かった。したがって、流入下水における NP 濃度の違いは、その主な排出源である事業所排水の流入割合の違いに起因するものと考えられる。

一方、処理水中の NP 濃度の中央値は、本調査では検出下限値（0.1μg/L）未満、国交省調査では検出下限値以上定量下限値未満の 0.2μg/L で、濃度範囲にも大きな違いはなかった。また、本調査における NP の除去率は 94%（中央値）で、国交省調査の除去率（97%、中央値）と大きな違いはなく、処理方式による除去率の明らかな違いも認められなかった。また、NP について、浄水処理過程で塩素処理により速やかに分解され、塩素による置換体が形成されるとの報告がある[46)]。しかし、本調査においては、処理水および放流水のいずれの NP 濃度も、ほぼ全てが定量下限値（0.2μg/L）以下であったことから、塩素処理による NP 濃度の変化の有無は確認できなかった。

NP は、魚類に対する内分泌撹乱作用が確認された物質の一つであり、その予測無影響濃度（PNEC）は 0.608μg/L である[7)]。これに対して、国交省調査では、処理水中の NP 濃度の 90 パーセンタイル値は 0.5μg/L、最大値は 1.0μg/L であり、最大値においては PNEC を超過している。一方、本調査では、定量下限値以上で検出された試料はわずかに 2 試料であり、全ての試料で PNEC を下回っていた。

以上のことから、NP については、地域特性（事業所排水の流入割合）により流入下水中の濃度に差が見られるものの、下水処理過程において効果的に除去され、処理水中の濃度は、内分泌撹乱作用を及ぼさないレベルであると考えられる。

（３）エストロゲン様活性

流入下水および処理水のエストロゲン様活性の比較を**図 1-4-6** に示す。

エストロゲン様活性は、流入下水では 13～280ng-E2/L（中央値 84ng-E2/L）、処理水では 0.9～58ng-E2/L（中央値 7.7ng-E2/L）であった。これに対して、田中ら[37)]は、全国の大規模な下水処理場（処理水量 1 万～100 万 m^3/d 程度）60 ヶ所の下水中のエストロゲン様活性を測定し、流入下水では 67ng-E2/L（中央値）、処理水では 16ng-E2/L（中央値）と報告している。流入下水中のエストロゲン様活性の中央値は、本調査の方が若干高い傾向にあったが、処理水中のエストロゲン様活性の中央値は、田中らの結果と比較しておよそ 2 分の 1 であった。処理法別には、OD 法（7.1ng-E2/L）や長時間法（3.0ng-E2/L）では低く、標準法（47 ng-E2/L）では他と比較して著しく高かった。

エストロゲン様活性の除去率の中央値は 89%と高く、下水処理過程においては、E2 や NP といった個々の内分泌撹乱物質のみならず、エストロゲン様活性も効果的に除去されることが明らかとなった。また、処理方式別の除去率の中央値は、OD 法（90%）、長時間

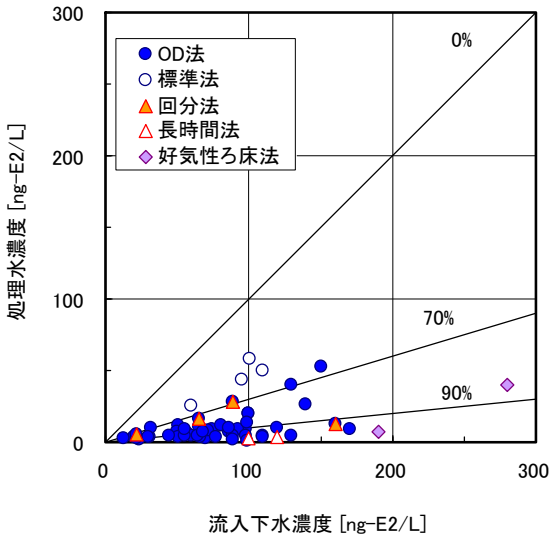


図 1-4-6　流入下水および処理水のエストロゲン様活性の比較

法（98%）および好気性ろ床法（92%）では高かったが、回分法（77%）や標準法（57%）では低く、E2 と同様な処理方式による違いが認められた。

消毒後の放流水中のエストロゲン様活性は、E2 の場合と同様、消毒前の処理水中のエストロゲン様活性と比較して、全体的にわずかに低くなる傾向が認められた。これは、消毒前後での E2 の減少に起因するものと考えられるが、E2 と同様、消毒過程での大きな除去効果は期待できないものと考えられる。また、塩素処理によるエストロゲン活性の変化については、浄水処理過程で塩素処理によりエストロゲン様活性が増大し、その原因として副生成される有機塩素化合物（2,4 - ジクロロフェノール）が考えられるとの報告[47),48)]もあり、今後更なる検討が必要である。

E2 および NP による理論活性値およびエストロゲン様活性に対する寄与率を**表 1-4-3** に、エストロゲン様活性の測定値と E2 による理論活性値の比較を**図 1-4-7** に示す。なお、**図 1-4-7** はエストロゲン様活性の測定値の順に示した。

ここで、各物質の理論活性値は、各物質の化学分析により得られた測定濃度から求まる当該物質に起因するエストロゲン様活性の理論値であり、**式 1-4-2** に示すとおり、各物質

表 1-4-3　E2 および NP による理論活性値とエストロゲン様活性に対する寄与率

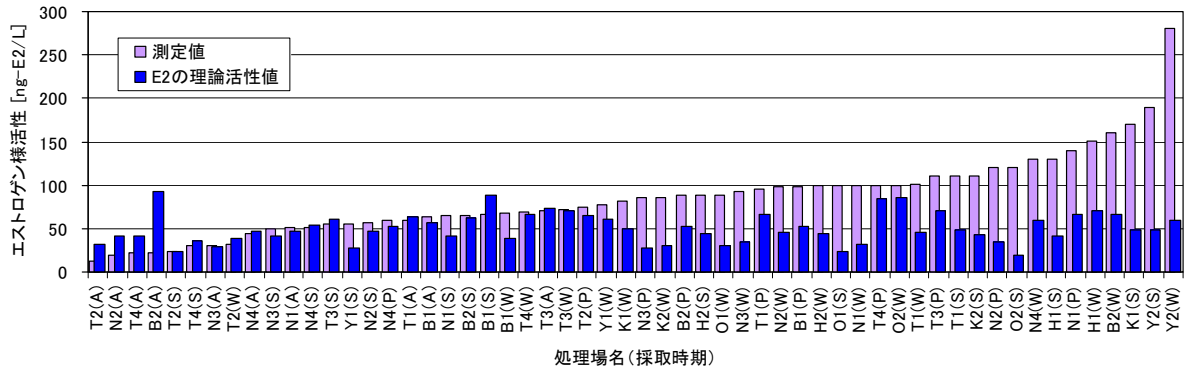
		流入下水		処理水	
		E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]	E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]
理論活性値	E2	48 （20～93）	64.6 （16.6～423）	5.6 （0.8～24）	75.5 （18.0～458）
	NP	1.9 （0.5～5.6）	4.2 （1.1～18.9）	0 （0～0.5）	0 （0～25.0）
測　定　値		84 （13～280）		7.7 （0.9～58）	

注）各段の上行は中央値、下行の括弧内は最小値～最大値を示す。

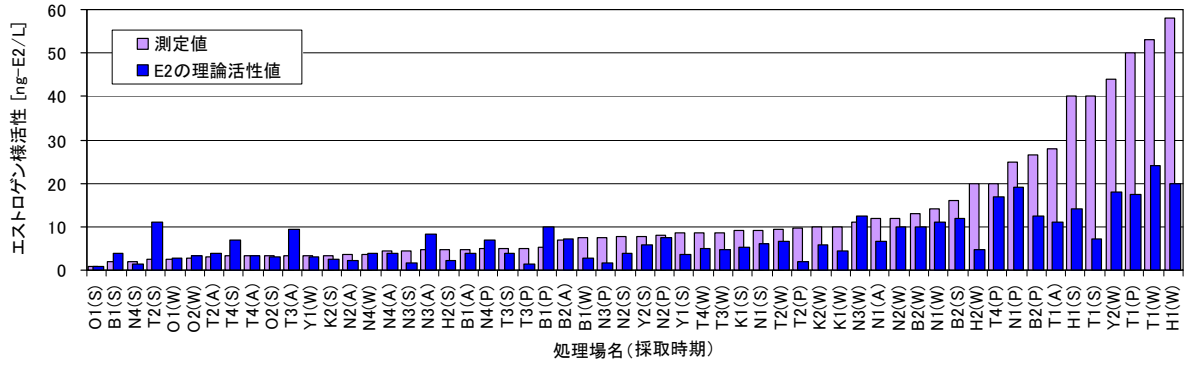
の測定濃度に当該物質の比活性値（＝同じ濃度で測定した E2 のエストロゲン様活性に対する各物質のエストロゲン様活性の比）を乗じて求めた。E2 および NP の比活性値は、矢古宇ら[20]の報告に準じて、それぞれ 1 および 0.001 とし、検出下限値未満の測定値は 0 とした。また、標準物質を組み合わせた試験の結果から、エストロゲン様活性の明瞭な相乗作用や拮抗作用は認められないと報告されていることから[37),49)]、E2 と NP の相互作用は相加的であると仮定した。

各物質の理論活性値［ng-E2/L］＝測定濃度［ng/L］×比活性値 ……（式 1-4-2）

エストロゲン様活性に対する E2 の寄与率の中央値は、流入下水では 64.6%、処理水では 75.5%であった。これに対して、NP の寄与率は低く、流入下水の中央値は 4.3%、処理水の中央値は 0%であった。また、エストロゲン様活性の測定値が高くなるのに伴って、E2 と NP の理論活性値では説明できない活性が多くなる傾向が認められ、E2、NP 以外のエストロゲン様活性を持つ物質の存在が示唆された。



（a）流入下水



（b）処理水

図 1-4-7　エストロゲン様活性の測定値と E2 による理論活性値の比較

（４）反応タンクの運転条件等と除去率の関係

下水処理過程における内分泌撹乱物質の除去効果は、当該物質の物性による影響を受けるほか、有機物除去や窒素除去などと同じように、反応タンクの運転条件である水理学的滞留時間（HRT）や固形物滞留時間（SRT）、反応タンクの環境条件である水温や pH、溶存酸素濃度などの影響を受けるものと考えられる [13]。

本調査における反応タンクの HRT、SRT および水温と E2（ELISA 法）、NP およびエストロゲン様活性の除去率の関係を図 1-4-8 に示す。なお、好気性ろ床法については、SRT がないため、HRT および水温との関係のみを示した。

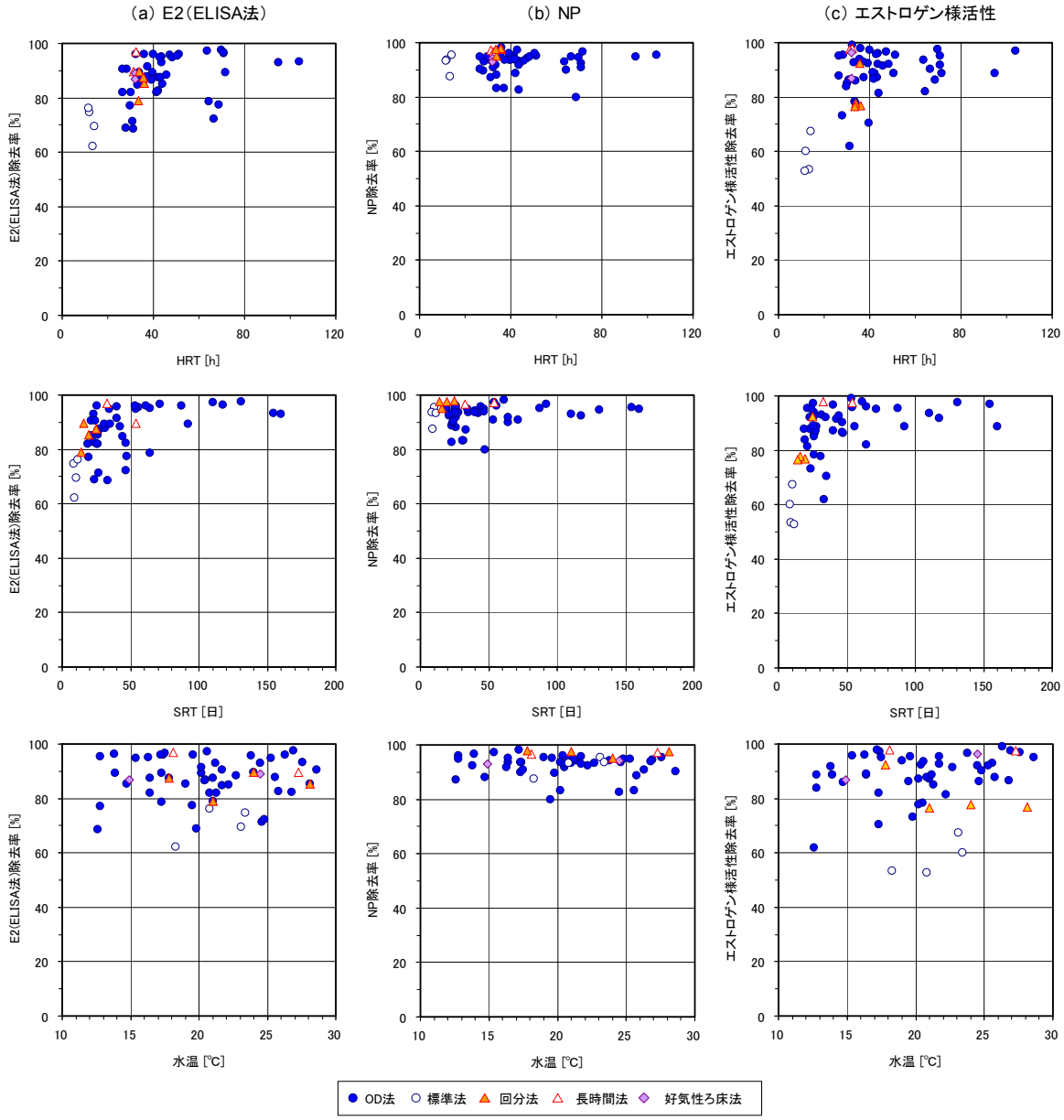


図 1-4-8　HRT、SRT および水温と除去率の関係（調査Ⅰ）

ここで、HRT は、下水が反応タンク内に滞留する平均的な時間を意味し、式 1-4-3 で表される[50)]。

$$\mathrm{HRT\,[h]} = \frac{\text{反応タンク容量}\,[\mathrm{m^3}]}{\text{処理水量}\,[\mathrm{m^3}/\text{日}]} \times 24 \qquad \text{（式 1-4-3）}$$

また、SRT は、反応タンク、あるいは、それと最終沈殿池および返送汚泥系内に存在する活性汚泥が、それらの系内に滞在している期間を意味し、余剰汚泥中の固形物量と比べて、処理水中の活性汚泥量は無視できる程度に小さいため、式 1-4-4 で近似できる[50)]。

$$\mathrm{SRT\,[\text{日}]} = \frac{\text{反応タンク容量}\,[\mathrm{m^3}] \times \mathrm{MLSS}\text{濃度}\,[\mathrm{mg/L}]}{\text{余剰汚泥量}\,[\mathrm{m^3/d}] \times \text{余剰汚泥濃度}\,[\mathrm{mg/L}]} \qquad \text{（式 1-4-4）}$$

国交省調査[1)]では、E2 を含む多くの内分泌撹乱物質は、HRT や好気条件下における SRT（＝ASRT : Aerobic SRT）が長くなると、極端に低い除去率がみられなくなり、比較的高い除去率で安定する傾向がみられると報告している。本調査においても、E2（ELISA 法）の除去率は、全体的に同様な傾向が認められ、HRT や SRT の長い方が高く、バラつきも比較的小さかった。また、エストロゲン様活性についても、E2（ELISA 法）と同様な傾向がみられ、HRT や SRT は、個々の内分泌撹乱物質のみでなく、エストロゲン様活性の除去にも寄与していることが明らかとなった。これに対して、NP の除去率は、全体的に高いため、HRT や SRT との明確な関係は認められなかった。また、OD 法では、全体的に除去率が高く、本調査においてみられた水温 13℃前後まででは、水温による影響は明確ではなかった。一方、標準法の T_1 処理場では、いずれの除去率も水温の高い方が高くなる傾向がみられ、水温による影響が示唆された。

HRT や SRT の長い生物学的窒素除去法において、エストロゲンの除去率が高く安定する傾向がみられることや[1),51),52)]、硝化汚泥を用いた回分処理実験において、高いエストロゲンの除去効果がみられること[53),54)]、さらには、硝化反応に関与するアンモニア酸化細菌の一つである *Nitrosomonas europaea* によるエストロゲンの分解[55)]など、下水処理過程におけるエストロゲンの除去と硝化との関係を示唆する報告が少なくない。

反応タンクにおける硝化の進行との関係が深いケルダール窒素（＝アンモニア性窒素と有機性窒素の総和）の除去率と E2（ELISA 法）の除去率の関係を図 1-4-9 に示す。なお、ケルダール窒素（K_j-N）の除去率は、式 1-4-5 により算出した。

$$K_j\text{-N除去率}\,[\%] = \frac{\text{流入下水}K_j\text{-N濃度}\,[\mathrm{mg/L}] - \text{処理水}K_j\text{-N濃度}\,[\mathrm{mg/L}]}{\text{流入下水}K_j\text{-N濃度}\,[\mathrm{mg/L}]} \times 100 \qquad \text{（式 1-4-5）}$$

ケルダール窒素の除去率は、大部分が 90%以上であり、ケルダール窒素の除去率と E2 除去率の間に有意な関係性は認められなかった。また、ケルダール窒素の除去率が低い場合でも、80%程度の高い E2 除去率がみられた。このように本調査においては、反応タンクにおける硝化と E2 の除去効果の間には、直接的な関係は認められなかった。

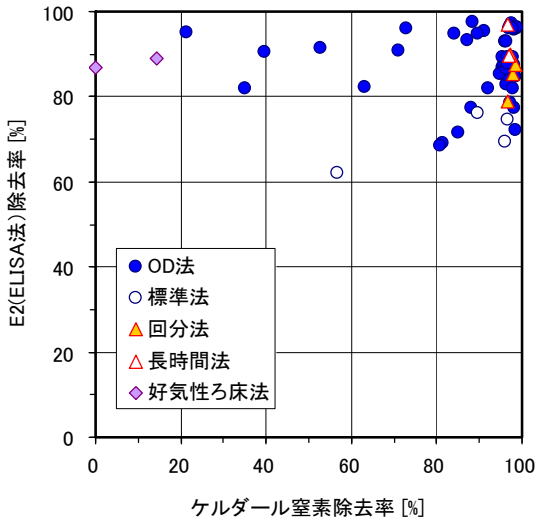


図 1-4-9　ケルダール窒素除去率と E2 除去率の関係

１．４．２　下水処理場におけるエストロゲンの挙動（調査Ⅱ）

調査Ⅰの結果、エストロゲン様活性に占める E2 の割合が高く、E2 などのエストロゲンの挙動の把握が重要と考えられたことや、その後の分析技術の向上により、LC/MS/MS 法によるエストロゲンの同時測定が可能となったこと[21),39)]から、調査Ⅱでは、表 1-4-4 に示

表 1-4-4　調査対象処理場の概要（調査Ⅱ）

都道府県名	処理場名	処理方式	流入水量 [m^3/日]	HRT ［h］		SRT ［日］		処理水水温 ［℃］	
				夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季
北海道	H_3	標準法	37,320	6	7	6	4	20.4	13.9
	H_4	標準法	7,376	9	9	3	5	22.1	18.4
	H_5	OD法	639	66	67	80	101	17.8	12.5
	H_6	OD法	1,455	50	61	118	111	22.0	14.3
栃木県	T_1	標準法	13,379	8	10	9	6	23.4	16.9
	T_2	OD法	702	30	34	19	29	25.1	17.2
	T_5	標準法	34,028	7	8	10	10	24.6	16.1
	T_6	OD法	858	40	27	66	53	26.8	20.0
	T_7	OD法	997	21	27	8	15	25.1	16.6
埼玉県	S_1	標準法	19,693	7	8	2	5	27.2	17.5
	S_2	標準法	5,799	7	9	9	9	26.8	16.4
	S_3	標準法	18,846	8	7	9	7	25.7	18.1
千葉県	C_1	標準法	9,126	26	24	4	4	27.3	17.7
長野県	N_4	OD法	3,237	22	19	19	20	24.6	13.3
	N_5	OD法	1,905	26	28	58	106	26.3	14.9
岐阜県	G_1	OD法	439	44	41	43	38	23.6	17.6
鹿児島県	K_2	OD法	472	65	58	66	63	27.8	23.0
	K_3	標準法	6,740	13	13	6	6	27.8	24.9
	K_4	標準法	5,707	10	11	6	6	28.0	23.3
	K_5	OD法	770	44	46	30	31	28.9	20.9

注）流入下水量は平成14年度の年平均値、HRT、SRTおよび処理水水温は試料採取日のデータ

す全国 20 ヶ所の下水処理場において、LC/MS/MS 法による天然エストロゲン 3 物質（E1、E2 および E3）の濃度を調査した。なお、調査対象処理場は、処理方式による違いを把握するため、標準法が 10 ヶ所、OD 法が 10 ヶ所とした。

調査Ⅱにおけるエストロゲンの濃度範囲および除去率（中央値、最大値および最小値）を**表 1-4-5** に、本調査と LC/MS/MS 法または GC/MS 法を用いた代表的な既往調査[17),19),56),57),58)]とのエストロゲン濃度の比較を**表 1-4-6** にそれぞれ示す。また、調査Ⅱにおける流入下水および処理水のエストロゲン濃度の比較を**図 1-4-10** に示す。

表 1-4-5　エストロゲンの濃度範囲および除去率（第 2 期実態調査）

処理方式	試料採取時期	E1			E2			E3		
		流入下水 [ng/L]	処理水 [ng/L]	除去率 [%]	流入下水 [ng/L]	処理水 [ng/L]	除去率 [%]	流入下水 [ng/L]	処理水 [ng/L]	除去率 [%]
標準法	夏季	24 (13-35)	39 (2.6-122)	-70.7 (-309-83.4)	11 (5.7-23)	1.8 (<0.5-6.0)	85.1 (52.6-92.5)	152 (100-376)	<0.5 (<0.5-12)	99.6 (96.6-99.9)
	冬季	31 (20-42)	43 (13-252)	-41.3 (-501-54.3)	13 (7.6-24)	1.7 (1.0-20)	85.7 (6.6-93.6)	181 (131-308)	1.1 (<0.5-9.9)	99.5 (93.1-99.8)
	全体	29 (13-42)	42 (2.6-252)	-55.9 (-501-83.4)	12 (5.7-24)	1.8 (<0.5-20)	85.7 (6.6-93.6)	164 (100-376)	0.7 (<0.5-12)	99.5 (93.1-99.9)
OD法	夏季	14 (5.9-55)	2.3 (<0.5-31)	75.8 (-73.7-89.1)	9.7 (2.9-24)	<0.5 (<0.5-3.4)	94.6 (75.9-97.9)	90 (31-620)	1.4 (<0.5-21)	98.5 (59.7-99.9)
	冬季	23 (4.8-66)	2.3 (<0.5-20)	86.5 (15.6-98.7)	8.4 (1.2-13)	0.5 (<0.5-1.1)	92.5 (58.3-96.1)	128 (10-474)	0.7 (<0.5-4.0)	99.4 (95.1-99.8)
	全体	20 (4.8-66)	2.3 (<0.5-31)	83.4 (-73.7-98.7)	9.2 (1.2-24)	<0.5 (<0.5-3.4)	94.3 (58.3-97.9)	120 (10-620)	1.0 (<0.5-21)	98.9 (59.7-99.9)

注1）各行の上段は中央値、下段の括弧内は最小値～最大値を示す。
注2）<0.5 は検出下限値（0.5ng/L）未満を示す

表 1-4-6　既往調査のエストロゲン濃度との比較

国名等	E1 [ng/L]		E2 [ng/L]		E3 [ng/L]		分析方法	処理場数（データ数）
	流入水	処理水	流入水	処理水	流入水	処理水		
本研究（標準法）	29 (13-42)	42 (2.6-252)	12 (5.7-24)	1.8 (<0.5-20)	164 (100-376)	0.7 (<0.5-12)	LC/MS/MS	10ヶ所 (N=20)
本研究（OD法）	20 (4.8-66)	2.3 (<0.5-31)	9.2 (1.2-24)	<0.5 (<0.5-3.4)	120 (10-620)	1.0 (<0.5-21)	LC/MS/MS	10ヶ所 (N=20)
日本[56)]	24 (10-57)	12 (<0.8-180)	5.7 (<0.5-21)	<0.5 (<0.5-11)	110 (27-220)	1.5 (<1.4-5.8)	LC/MS/MS	20ヶ所 (N=20)
イタリア[19)]	49 (25-132)	9.2 (2.5-82.1)	11 (4.0-25)	0.9 (0.35-3.5)	65 (24-188)	1.4 (0.44-18)	LC/MS/MS	6ヶ所 (N=30)
イタリア[17)]	44 ---	17 ---	11 ---	1.6 ---	72 ---	2.3 ---	LC/MS/MS	6ヶ所 (N=18)
欧州8ヶ国[57)]	---	3.0 (<0.2-35)	---	3.0 (<0.6-13)	---	---	GC/MS	16ヶ所 (N=16)
カナダ[58)]	49 (19-78)	17 (1-96)	15.6 (2.4-26)	1.8 (0.2-14.7)	---	---	GC/MS	18ヶ所 (N=18)

注1）E1、E2およびE3各列の上段は中央値、下段は最小値～最大値を示す。
注2）< は検出下限値未満を意味し、数値は検出下限値を表す。
注3）---は当該項目のデータが無いことを示す。

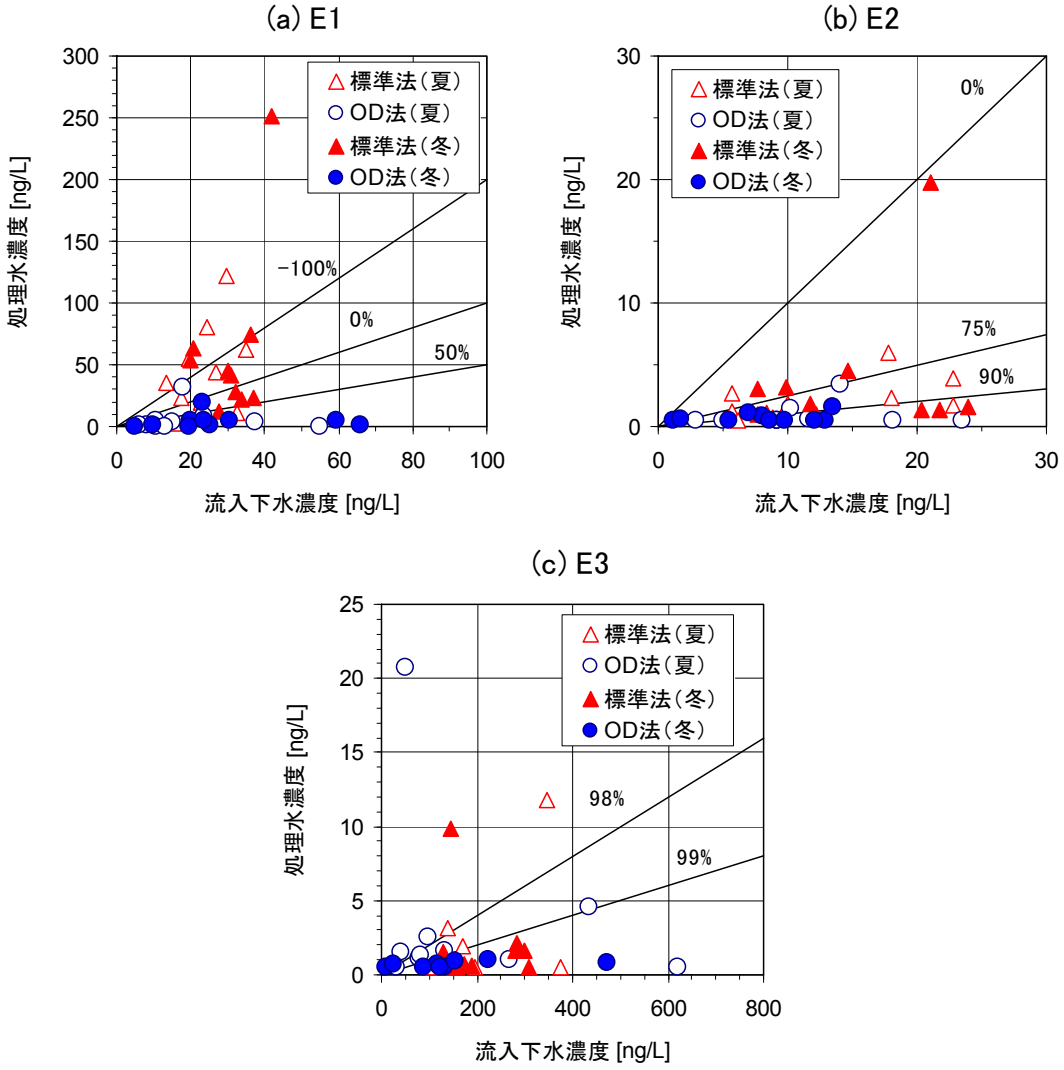


図 1-4-10　流入下水濃度と処理水濃度の関係（調査Ⅱ）

（１）流入下水中のエストロゲン濃度

流入下水中のエストロゲン濃度は、全て定量下限値以上で、濃度範囲は E1 が 4.8～66ng/L（中央値 24ng/L）、E2 が 1.2～24ng/L（中央値 10ng/L）、E3 が 10～620ng/L（中央値 150ng/L）であった。また、数試料の例外を除き、流入下水中のエストロゲン濃度は、E3、E1、E2 の順に高く、E3 は E1、E2 と比較して 1 オーダー高かった。このことは、人が排泄するエストロゲン量は、E3 が最も多く、次いで E1、E2 の順であること [24]に合致していた。

本調査の結果を既往の調査結果と比較すると、流入下水中の E1 濃度は、Komori ら [56] によるわが国の比較的大規模な下水処理場 20 ヶ所での調査結果（中央値 24ng/L）と類似していたが、Baronti ら [19]によるイタリア・ローマの下水処理場 6 ヶ所での調査結果（中央値 49ng/L）や Servos ら [58] によるカナダ国内の下水処理場 18 ヶ所での調査結果（中央値 49ng/L）のおよそ 2 分の 1 程度であった。また、流入下水中の E2 濃度は、既往調査 [19),56),58)]

で報告されている濃度範囲に類似していた。一方、流入下水中の E3 濃度は、既往調査[17),19),56)]と比較して高い傾向にあった。

人が排泄するエストロゲンは、主にグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の形態で尿中に排泄され、遊離体のエストロゲン（E1、E2、E3）はほとんど含まれていない。尿中に排泄される総エストロゲン量は、性別や人種、月経周期や妊娠周期などの種々の要因で異なる[17),24),59)]。妊娠中の女性が排泄する総エストロゲン量は著しく多く、妊娠周期の時期により異なり、妊娠初期では 200～500μg/日、妊娠中期から後期では 1 万～4 万μg/日程度である。次いで、月経周期にある女性が多く、月経周期の時期により異なり、数～60μg/日程度である。また、男性や閉経後の女性では数μg/日程度であり、12 歳以下の子供ではごくわずかである。

これらの総エストロゲン量に関する文献値と人口統計値から、わが国における平均的なエストロゲンの負荷量原単位を試算すると、**表 1-4-7** に示すように 170μg/（人･日）程度と見積もられる。ここで、1 人 1 日あたりの家庭汚水量原単位は 250～350L/（人･日）程度であることから、家庭汚水中には 500～700ng/L 程度の濃度レベル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る。これに対して、本調査の結果、流入下水中には、遊離体のエストロゲン（E1、E2、E3）が合計で 180ng/L 程度含まれていたことから、下水処理場に流入するまでの管渠内などにおいて、抱合体から遊離体への形態変化（脱抱合）が生じているものと考えられる。さらに、流入下水中には、形態変化を生じていない抱合体のエストロゲンが、遊離体のエストロゲンと同等以上の濃度レベルで含まれるものと考えられる。このことは、遊離体のエストロゲンに加えて、数十～数百 ng/L の濃度範囲で各種のエストロゲン抱合体が流入下水中から検出されたとの報告[17),56)]と合致する。

本調査の結果、流入下水中の遊離体のエストロゲン濃度は、標準法の方が若干高い傾向にあった。一方、処理規模の大きい標準法は、OD 法と比較して、一般的に処理区域が広く、管渠延長も長い傾向にある。そこで、標準法の方が下水処理場までの汚水の到達時間が長いため、下水管渠内などでの脱抱合がより進行し、流入下水中の遊離体のエストロゲン濃度が高くなるものと推察される。ここで、処理区域の面積と流入下水中の遊離体のエ

表 1-4-7　エストロゲン負荷量原単位の試算

内　訳	人　口[1)] [万人]	人口比率 [%]	総エストロゲン量 （尿中）[3)] [μg/日]	エストロゲン 負荷量原単位 [μg/（人･日）]
女性（13歳～49歳）	2,879	22.5	－	－
妊娠中の女性[2)]	―	0.8	20,000	160
それ以外の女性	―	21.7	30	7
女性（50歳～）	2,941	23.0	5	1
男性（13歳～）	5,468	42.8	5	2
12歳以下	1,489	11.7	0	0
全　体	12,777	－	－	170

1) 平成19年10月1日現在の人口推計年報による
2) 平成19年の出生数が109万人であることから、対象人口の約3.8%、総人口の約0.8%が妊娠中であったと仮定した
3) 文献値[24)]より仮定

ストロゲン濃度の総和（E1、E2 および E3 の濃度の和）の関係を**図 1-4-11** に示す。全体的には、処理区域面積の大きい方が、流入下水中のエストロゲン濃度（E1、E2 および E3 の合計）が高くなる傾向が認められた。しかし、この傾向から大きく離れるものもみられ、処理区域の面積のほか、汚水の流入率や生活排水の比率など、その他の地域特性が影響している可能性が考えられる。

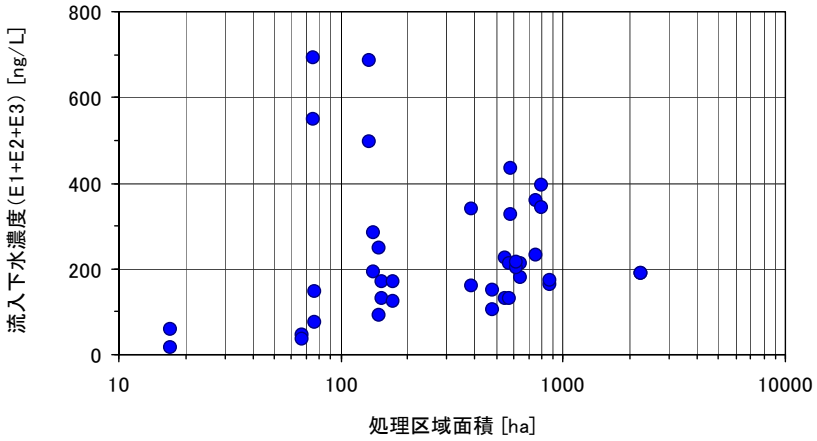


図 1-4-11　処理区域面積と流入下水中のエストロゲン濃度の関係

（２）処理水中のエストロゲン濃度

処理水中の E2 濃度は、処理方式による違いがみられ、標準法と比較して、OD 法の方が低い傾向にあった。すなわち、OD 法における処理水中の E2 濃度は、大部分が 1.0ng/L 以下で、その中央値は検出下限値（0.5ng/L）未満であった。欧米諸国での既往の調査結果（中央値 0.9～3.0ng/L）[17),19),57),58)]と比較して低く、また、Komori ら [56)]の調査結果（中央値：検出下限値未満、濃度範囲：検出下限値未満～11ng/L）と比較すると中央値では同じであったが、濃度範囲（検出下限値未満～3.4ng/L）は狭かった。一方、標準法における処理水中の E2 濃度は、大部分が 1.0ng/L～6.0ng/L の範囲にあり、その中央値は 1.8ng/L で、既往の調査結果と同程度の濃度レベルであった。以上のとおり、OD 法における処理水中の E2 濃度は、標準法や既往の調査結果と比較して低く安定していた。また、本調査における LC/MS/MS 法による E2 濃度の中央値は、流入下水、処理水ともに、第 1 期調査における ELISA 法による E2 濃度の中央値（流入下水 48ng/L、処理水 5.6ng/L）の 5 分の 1 程度であった。これは、ELISA 法では、下水中の共存物質との非特異的結合などにより、測定値が高くなる傾向があるためと考えられた [1)]。そこで、本研究では、以後のエストロゲン濃度の測定は、LC/MS/MS 法または LC/MS 法を用いるものとした。

処理水中の E1 濃度は、E2 よりもさらに明確な処理方式による違いが認められた。すなわち、OD 法における処理水中の E1 の濃度範囲は検出下限値（0.5ng/L）未満～31ng/L、その中央値は 2.3ng/L であった。わが国（中央値：12ng/L、濃度範囲：検出下限値未満～180ng/L）[56)]やイタリア（中央値：17 ng/L[17)]、中央値：9.2ng/L、濃度範囲：2.5ng/L～82.1ng/L [19)]）、カナダ（中央値：17ng/L、濃度範囲：1～96 ng/L）[58)]における既往の調査結果と比

べて、中央値はおよそ 5～7 分の 1 程度で、濃度範囲も狭く、OD 法における処理水中の E1 濃度は、比較的低く安定していた。一方、標準法における処理水中の E1 の濃度範囲は 2.6ng/L～252ng/L、その中央値は 42ng/L であり、流入下水中の最高値（42ng/L）、中央値（29ng/L）を上回っていた。標準法の調査対象処理場 10 ヶ所のうち、夏季調査では 7 ヶ所、冬季調査では 6 ヶ所の処理場において、処理水中の E1 濃度が流入下水中の E1 濃度を上回っており、下水処理過程で E1 濃度が増加する現象が認められた。同様な下水処理過程における E1 濃度の増加は、Baronti ら [19]や Servos ら [58]、Clara ら [52]、Carballa ら [60]が報告している。

処理水中の E3 の濃度範囲は検出下限値（0.5ng/L）未満～21ng/L、その中央値は 0.8ng/L であった。流入下水中の E3 濃度は、E2 や E1 と比較して 1 オーダー高い 100ng/L レベルであるにも関わらず、E3 は処理方式によらず良好に除去されていた。なお、わが国（中央値 1.5ng/L）[56]やイタリア（中央値 1.4ng/L）[19]における既往の調査結果と比較して、本調査の方が低い傾向にあった。

英国環境庁は、先に 1.2.1 に示したとおり、エストロゲンの魚類に対する予測無影響濃度（PNEC）として、E2 について 1ng/L、E1 について 3～5ng/L を提示している [24]。本調査における処理水中の E1 および E2 の濃度と PNEC および LOEC（最小影響濃度：Lowest Observed Effect Concentration、有意な内分泌撹乱作用が観察される最低濃度）の関係を図 1-4-12 に示す。

OD 法では、E2 は全体の 20%、E1 は全体の 20～50%の試料が PNEC を超過していたが、標準法では、E2 は 2 試料、E1 は 1 試料を除く、全ての試料で PNEC を超過していた。ここで、英国環境庁の提示する PNEC は、LOEC に 10 倍の安全係数を見込んで設定されている [24]ことから、E2、E1 の LOEC はそれぞれ 10ng/L、30～50ng/L となる。処理水中

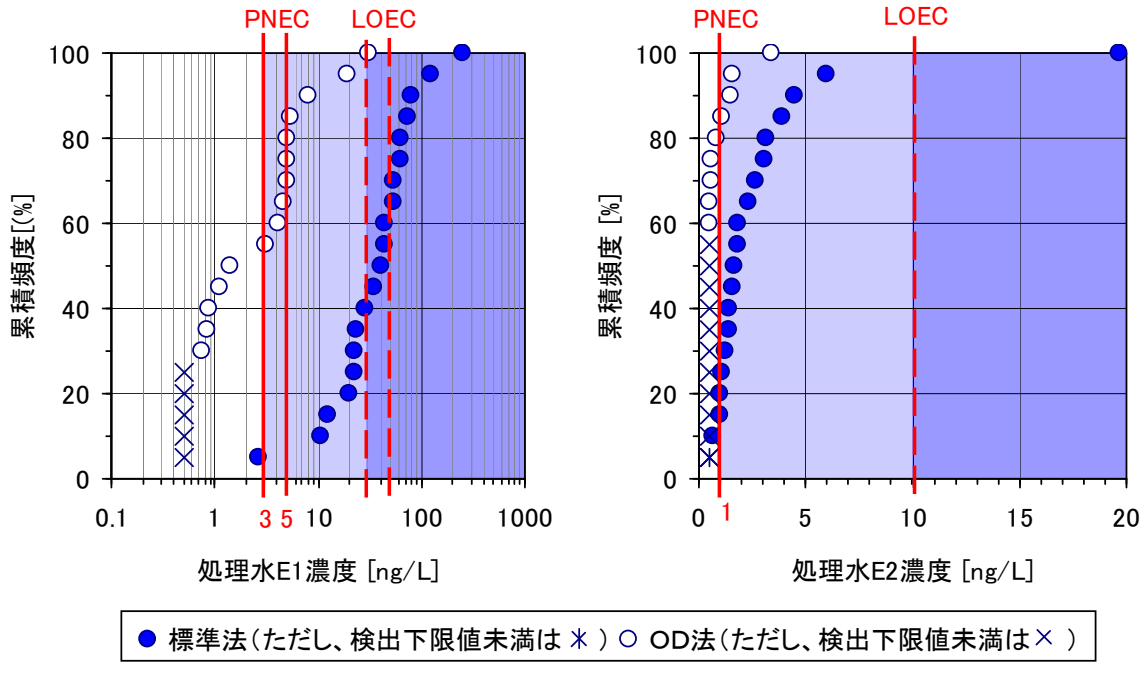


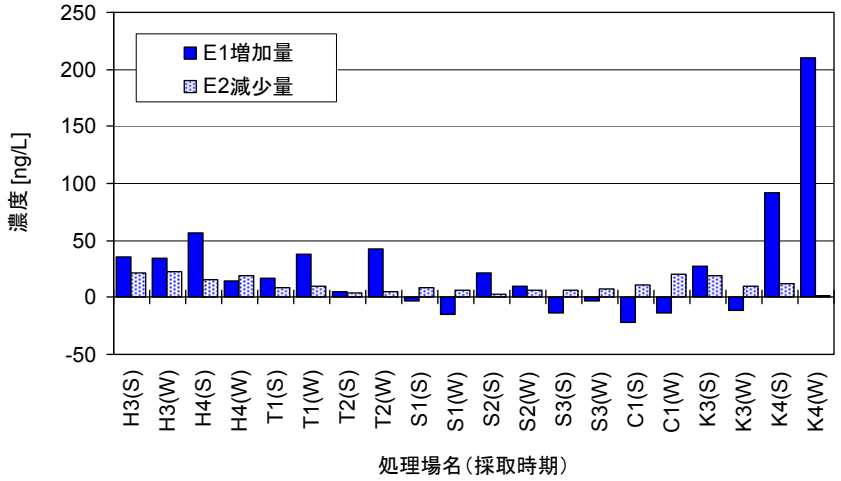
図 1-4-12　処理水中の E1 および E2 濃度と PNEC および LOEC との関係

のエストロゲン濃度を NOEC と比較すると、OD 法では、E2 は全ての試料、E1 は 1 試料を除く全ての試料が LOEC を下回っていた。一方、標準法では、E2 は全ての試料で LOEC を下回っていたが、E1 は全体の 40～60%の試料が LOEC を上回っており、最大値では LOEC を約 5～8 倍も上回っていた。以上のことから、放流先における内分泌撹乱作用のリスクを低減するためには、処理水中のエストロゲン濃度をより低く安定させる必要があり、特に標準法における処理水中の E1 濃度の低減が重要と考えられる。

（３）下水処理過程におけるエストロゲンの除去効果

OD 法におけるエストロゲンの除去効果は、標準法と比較していずれも高かったが、エストロゲン 3 物質の中では、E1 の除去率は 83%（中央値、以下本項で同じ）で他の 2 物質と比較してやや低く、E2 は 94%、E3 は 99%であった。一方、標準法においては、E3 は、その除去率が 99%超であり、OD 法と同様の高い除去効果を示したが、E2 は、OD 法に比べて処理水中の濃度が高い傾向にあり、その除去率は 86%とやや低かった。また、E1 は、前項に示したとおり、全体の 65%にあたる試料で処理水中の濃度が流入下水中の濃度を上回っていたため、全体での E1 の除去率はマイナスの値（－56%）となった。また、流入下水に対して処理水での E1 の除去が認められた試料における除去率は 37%で、OD 法における除去率と比較して著しく低くなった。

E1 の除去効果については、既往の調査においても、本調査における標準法の場合と同様に、E2 や E3 と比較して除去率が低く、処理水濃度が流入下水濃度と同程度以上であるケースが報告されている [1),17),19)]。E1 は、E2 の酸化体であり、E1 と E2 は相互に形態が変化するものと考えられている。また、Ternes ら [53)]は、活性汚泥中での E2 から E1 への酸化は速やかに起こるが、E1 の分解は E2 の酸化よりも遅いと報告している。そこで、Carballa ら [60)]は、下水処理過程において E1 の増加が認められた処理場において、流入下水に対する処理水での E1 の増加量が E2 の減少量にほぼ見合っていたことから、E1 濃度が増加した原因として、E2 から E1 への形態の変換（酸化）を挙げている。しかし、本研究においては、**図 1-4-13** に示すとおり、流入下水に対する処理水での E1 の増加量は E2 の減少量を大きく上回る場合が多く、E2 から E1 への酸化のみでは、E1 の処理水濃度が流入下水濃度を上回る原因を説明できなかった。一方、Ternes ら [53)]は、活性汚泥を用いた室内実験の結果から、E2 のグルクロン酸抱合体である 17β-エストラジオール 3-(β-D-グルクロニド)や 17β-エストラジオール 17-(β-D-グルクロニド)は、活性汚泥中でその一部が脱抱合されて E2 を生じ、生じた E2 は E1 へ酸化され、さらに E1 は他の未知の物質に変換されると報告している。また、(1)で考察したとおり、流入下水中には遊離体のエストロゲンと同等以上の濃度レベルでエストロゲン抱合体が含まれるものと推察され、D'Ascenzo ら [17)]や Komori ら [56)]などは、流入下水と処理水または放流水の双方から、遊離体のエストロゲンに加え、各種のエストロゲン抱合体を検出している。以上のことから、下水処理過程における E1 濃度の増加には、E2 から E1 への変換のほか、エストロゲン抱合体の分解が関与しているものと推察される。



注）(S)は夏季、(W)は冬季の採取試料を表す。

図 1-4-13　標準法処理場における E1 増加量と E2 減少量の比較

（４）反応タンクの運転条件と除去率の関係

反応タンクの HRT、SRT および水温とエストロゲンの除去率の関係を図 1-4-14 に示す。

HRT、SRT および水温と E1 および E2 の除去率の間には、いずれも全体的には相関関係が認められなかった。しかし、E1 および E2 の除去率は、一部の試料を除き、HRT や SRT の長い方は比較的高く安定しているのに対して、HRT や SRT の短い方はバラつきが大きく、低くなる傾向が認められた。ただし、OD 法の標準的な HRT（24～36 時間程度）や SRT（15～30 日程度）を上回る長い HRT や SRT では、この傾向から外れ、低い除去率がみられた。この原因としては、このような施設では、施設能力に対して流入水量が少なく、著しい低負荷条件となっているために、活性汚泥微生物の自己酸化が進み、その生物活性が低いことなどが考えられる。一方、E3 については、全体的に除去率が高いため、HRT や SRT、水温との間に関係性は認められなかった。

HRT や SRT とエストロゲンの除去率の関係については、国交省調査[1)]においても、HRT や ASRT（Aerobic SRT：好気条件下における SRT）が長くなると、極端に低い除去率はみられなくなり、比較的高い除去率で安定していると報告している。また、Kreuzinger ら[51)]や Clara ら[52)]、Johnson ら[57)]、Servos ら[58)]による欧米諸国での調査においても、本調査と同様な傾向が報告されている。

以上のことから、下水処理過程におけるエストロゲンの除去率は、HRT や SRT の影響を受けるものと考えられ、反応タンクの HRT や SRT の長くなると、高く安定する傾向が認められた。

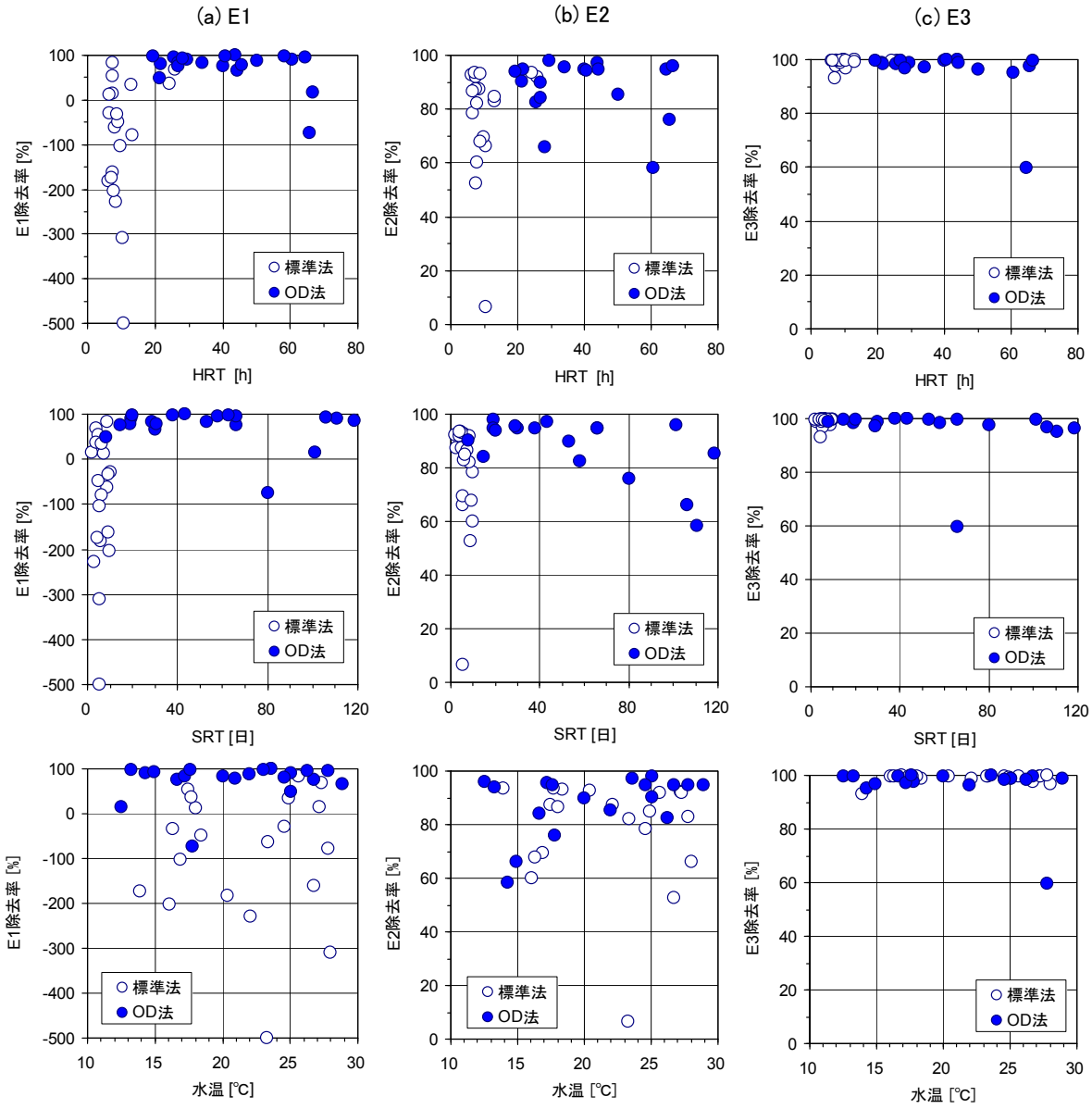


図 1-4-14　HRT、SRT および水温とエストロゲン除去率の関係（調査Ⅱ）

１．４．３　嫌気性水処理プロセスにおける内分泌撹乱物質の挙動（調査Ⅱ追加調査）

わが国では、下水中の有機物を主に好気的に処理する標準活性汚泥法とその変法（OD 法など）が主として採用され、全国の下水処理場の 9 割以上を占めている。これに対して、小規模な下水処理場において、下水中の有機物を主に嫌気的に処理する方式が一部で採用されており、その一つである嫌気好気ろ床法は、全国 37 ヶ所（平成 17 年度末現在）[4]の下水処理場で採用されている。嫌気好気ろ床法 [61]は、**図 1-4-15** に示すとおり、嫌気性処理（嫌気性ろ床）と好気性処理（好気性ろ床）の 2 段階からなり、有機物の除去は主に前段の嫌気性ろ床で行われ、後段の好気性ろ床では、主として処理水中の微細な浮遊性物質の除去と溶存酸素の回復が行われる。また、流入下水中の浮遊性物質は、嫌気性ろ床で固液分離され、ろ材間や槽下部のホッパー部に貯留され、嫌気性消化を受ける。嫌気性ろ床

は、第 1 嫌気槽と第 2 嫌気槽からなり、ろ材の充填率は 65～75%程度で、滞留時間（ろ材充填部）は 23～25 時間である。また、好気性ろ床の滞留時間は 1.6 時間程度である。

調査Ⅱの追加調査では、嫌気性水処理プロセスにおける内分泌撹乱物質の挙動を把握するため、岐阜県内の隣接する 2 都市に位置する OD 法の G_1 処理場（以下、OD 法 G_1 という）と嫌気好気ろ床法の G_2 処理場（以下、嫌気好気ろ床法 G_2 という）において、エストロゲンに加えて、代表的な内分泌撹乱化学物質である NP、BPA の濃度を測定した。嫌気好気ろ床法 G_2 の処理フローおよび試料採取位置を**図 1-4-15** に示す。なお、嫌気好気ろ床法 G_2 の現有処理能力は 2,900m³/日、調査時の流入水量は約 1,500m³/日であった。

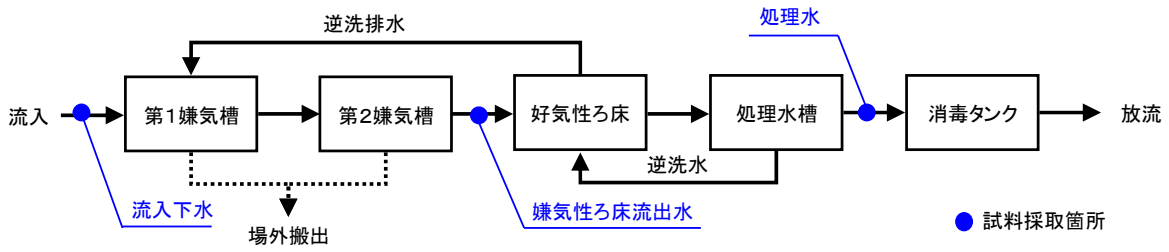


図 1-4-15　嫌気好気ろ床法の処理フローおよび試料採取位置

OD 法 G_1 および嫌気好気ろ床法 G_2 での内分泌撹物質の挙動を**図 1-4-16** に示す。

OD 法 G_1 における流入下水のエストロゲン濃度は、その原因は明らかでないが、前項 1.4.2 に示した調査Ⅱにおける平均的な濃度と比較して、全体的に高い傾向にあった。しかし、下水処理過程における除去効果は高く、処理水のエストロゲン濃度は、検出下限値未満～0.9ng/L であった。これに対して、嫌気好気ろ床法 G_2 では、流入下水のエストロゲン濃度は、調査Ⅱにおける平均的な濃度と同程度であったが、処理水の濃度が高く、OD 法 G_1 と比較して、下水処理過程における除去効果が低かった。特に E1 は、流入下水から処理水の間での濃度の変化がほとんどなく、除去効果が認められなかった。また、E2 と E3 については、嫌気性ろ床流出水の濃度は、流入下水の濃度と比較して、ほとんど変化がないか、逆に高くなっており、後段の好気性ろ床で除去されていた。

一方、NP、BPA については、OD 法 G_1 では、下水処理過程でおおむね除去されているのに対して、嫌気好気ろ床法 G_2 では、夏季調査における BPA 以外は、流入下水と処理水の濃度にほとんど変化がないか、逆に高くなった。嫌気性ろ床処理水中の NP 濃度は、流入下水中の濃度と比較して約 6～16 倍も高く、嫌気性ろ床での NP 濃度の増加がみられた。これは、1.2.2 で述べたとおり、流入下水中の NPnEO の好気的生分解産物が、嫌気条件下（嫌気性ろ床内）で分解され、NP を生じるためと考えられる。一方、好気性ろ床での NP の除去率は 86～96%と高く、処理水中の NP 濃度は、流入下水中の NP 濃度よりも若干低くなった。また、BPA（夏季調査）でも、嫌気性ろ床での除去率が 20%であるのに対して、好気性ろ床での除去率は 75%と高かった。

このように嫌気好気ろ床法における内分泌撹乱物質の除去効果は、標準法や OD 法などの活性汚泥法と比較して著しく低く、また、主要な処理工程である嫌気性ろ床では除去さ

れずに、後段の好気性ろ床で除去されることが明らかとなった。以上のことから、内分泌撹乱物質を効果的に除去するためには、活性汚泥法に代表される好気性処理を主要な処理工程とする水処理プロセスが有効と考えられる。

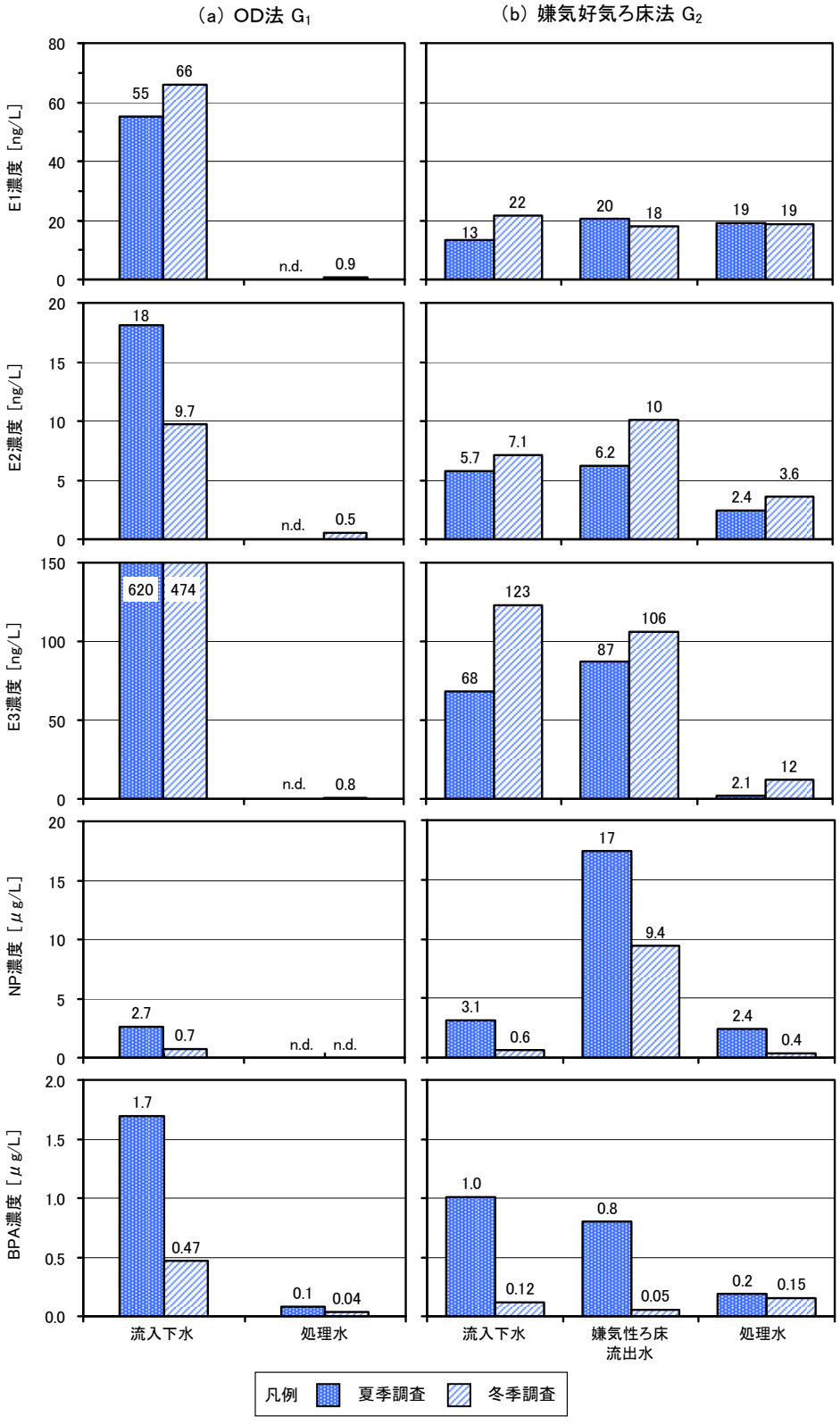


図 1-4-16　OD 法と嫌気好気ろ床法の内分泌撹乱物質の挙動

１．４．４　内分泌撹乱物質の長期的な濃度変動（調査Ⅲ）

調査Ⅲでは、内分泌撹乱物質の年間を通じた長期的な濃度変動を把握するため、**表 1-4-8** に示す標準法の T_1 処理場（以下、標準法 T_1 という）と OD 法の T_2 処理場（以下、OD 法 T_2 という）を対象に 1 年以上にわたる通年調査を行った。

調査Ⅲにおける内分泌撹乱物質の濃度範囲および除去率（中央値、最大値および最小値）を**表 1-4-9** に、調査期間中の内分泌撹乱物質の濃度、並びに、反応タンクの HRT、SRT および水温の変化を**図 1-4-17** に示す。

表 1-4-8　調査対象処理場の概要（調査Ⅲ）

処理場名	T_1	T_2
処理方式	標準活性汚泥法	OD法
調査期間	2001.10～2003.3	2001.10～2002.9
現有処理能力 [m^3/日]	13,700	900
流入水量 [m^3/日]※	11,700	630
HRT [h]※	9.0	34
SRT [日]※	7.3	23

※:調査期間中の平均値

表 1-4-9　エストロゲン等の濃度範囲および除去率（調査Ⅲ）

処理場名	試料名	E1 [ng/L]	E2 [ng/L]	E3 [ng/L]	NP [μg/L]	BPA [μg/L]	エストロゲン様活性 [ng-E2/L]
標準法 T_1	流入下水	36 (25～74)	15 (10～19)	304 (195～423)	3.2 (2.2～4.0)	0.60 (0.15～0.99)	90 (43～123)
	二次処理水	49 (15～140)	2.3 (0.5～12)	<0.5 (<0.5.～3.9)	tr [0.1] (<0.1～0.4)	0.04 (<0.01～0.23)	16 (4～49)
	除去率 [%]	-43.8 (-241～57.3)	87.5 (21.4～96.2)	99.8 (98.4～99.9)	95.8 (88.0～96.9)	91.0 (65.3～98.9)	80.9 (2.3～95.6)
OD法 T_2	流入下水	28 (17～76)	13 (8.6～24)	175 (38～615)	2.0 (1.5～4.4)	0.33 (0.11～0.96)	75 (57～110)
	二次処理水	4.4 (2.4～9.7)	<0.5 (<0.5～5.9)	7.6 (1.4～68)	<0.1 (<0.1～0.18)	tr [0.02] (<0.01～0.13)	3.0 (1～5)
	除去率 [%]	84.6 (52.1～92.9)	94.6 (60.1～97.9)	94.5 (20.6～99.6)	95.0 (89.5～97.7)	91.6 (44.6～99.0)	96.0 (93.1～98.9)

注1）上段は中央値、下段括弧内は最小値～最大値を示す。
注2）tr は検出下限値以上定量下限値未満であることを表し、括弧内は参考値を示す。
注3）<は検出下限値未満を表し、数値は検出下限値を示す。

（１）エストロゲン

流入下水中のエストロゲン濃度は、全て定量下限値以上で、全体的な濃度範囲は 1.4.2 に示した調査Ⅱの結果と同様な傾向にあった。流入下水中のエストロゲン濃度の中央値は、標準法 T_1 では E1 が 36ng/L、E2 が 15ng/L、E3 が 304ng/L、OD 法 T_2 では E1 が 28ng/L、E2 が 13ng/L、E3 が 175ng/L であり、いずれのエストロゲンも OD 法 T_2 の方が低い傾向にあった。また、いずれの処理場においても、流入下水中のエストロゲン濃度には、季節的な変動のパターンは認められなかった。

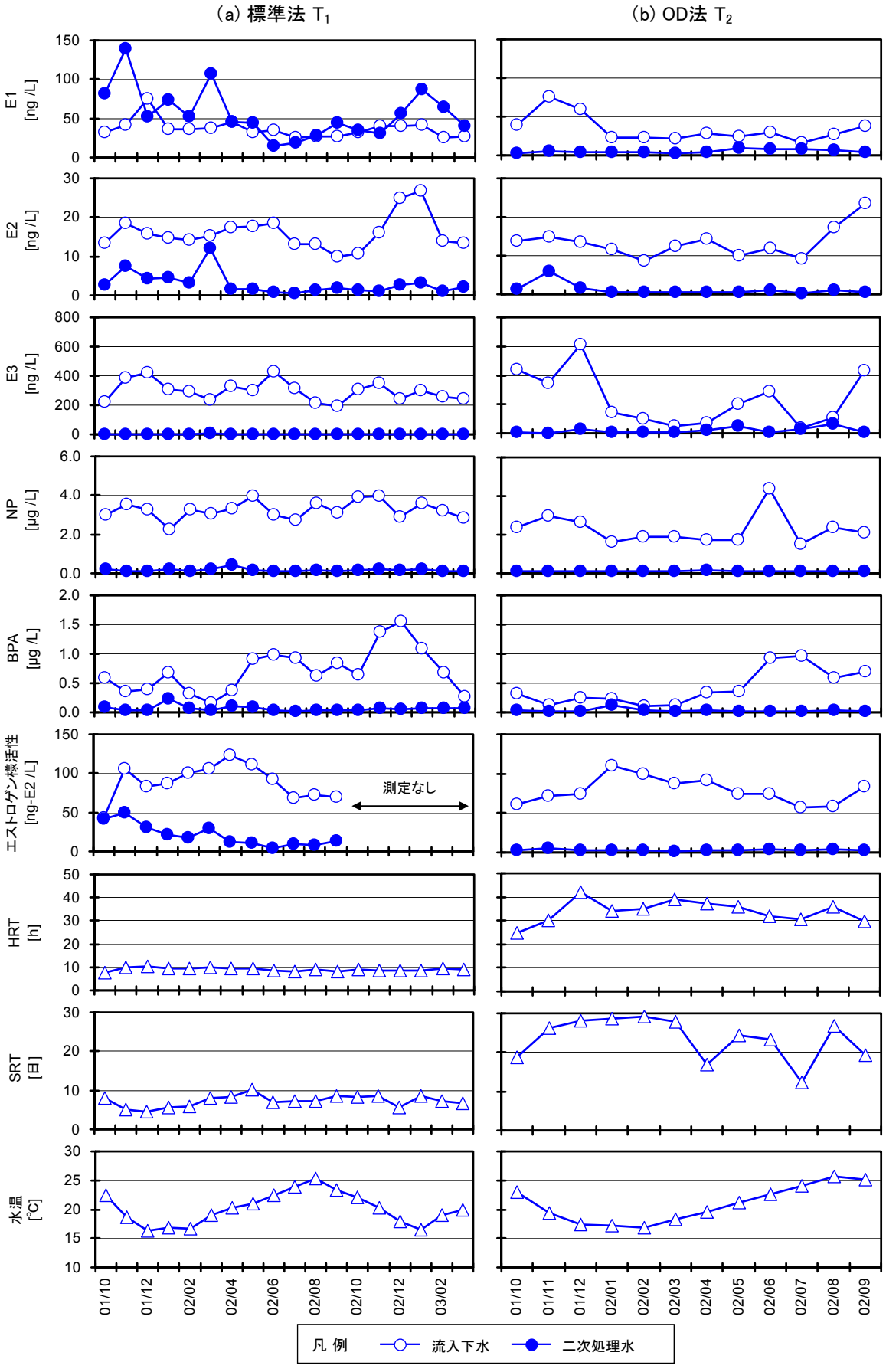


図 1-4-17　エストロゲン濃度等の年間変動（調査Ⅲ）

処理水中のエストロゲン濃度についても、1.4.2 に示した調査Ⅱの結果と同様な傾向を示し、処理方式による違いが顕著に認められた。処理水中のエストロゲン濃度の中央値は、標準法 T_1 では、E1 が 49ng/L、E2 が 2.3ng/L、E3 が検出下限値（0.5ng/L）未満、OD 法 T_2 では、E1 が 4.4ng/L、E2 が検出下限値（0.5ng/L）未満、E3 が 7.6ng/L であった。OD 法 T_2 は、標準法 T_1 と比較して E2 や E1 の除去率が高く、処理水中の濃度は低く安定していた。しかし、OD 法 T_2 の E1 除去率は約 85%で、E2 や E3 の除去率（約 95%）と比べると低かった。また、OD 法 T_2 では、理由は明らかではないが、処理水中の E3 濃度が高く、除去率の低い月があった。一方、標準法 T_1 では、処理水中の E1 濃度が流入下水中の濃度を上回る月が、調査期間中の全 18 ヶ月のうち 13 ヶ月を占め、E1 が有意に除去されていた残りの 5 ヶ月についても、E1 の除去率は平均で約 28%と極めて低かった。また、標準法 T_1 の E2 の除去率は約 88%で、OD 法 T_2 と比べて低かった。OD 法 T_2 の処理水中のエストロゲン濃度は、全体的に低く安定しており、季節的な変動は認められなかった。一方、**図 1-4-18** に示すように、標準法 T_1 の E1 および E2 の処理水中の濃度は、水温の低下に伴って高くなる傾向がみられ、水温による影響が示唆された。なお、標準法 T_1 では、2002 年 3 月に処理水中の濃度が高くなっているが、これは反応タンクの活性汚泥混合液の濃度が、当該月のサンプリング前後の期間において、一時的に 900mg/L 程度（通常は 1,300mg/L 前後）に下がっていたことによる影響と推察される。

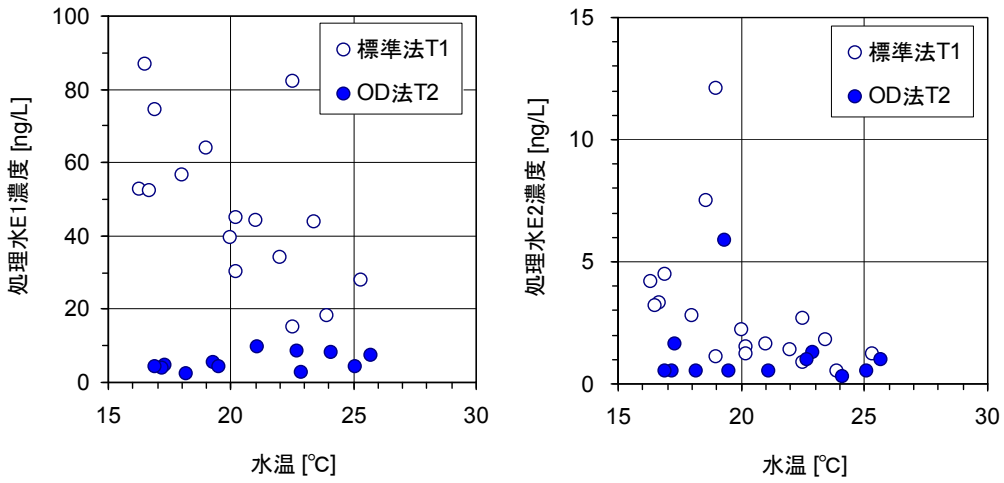


図 1-4-18　水温と処理水中のエストロゲン濃度の関係（調査Ⅲ）

（２）ノニルフェノールおよびビスフェノールＡ

流入下水中の NP および BPA の濃度の中央値は、標準法 T_1 では、NP が 3.2μg/L、BPA が 0.60μg/L、OD 法 T_2 では、NP が 2.0μg/L、BPA が 0.33μg/L であった。これらは、標準法 T_1 の BPA を除き、国交省調査結果 [1)]の中央値（NP：4.4μg/L、BPA：0.53μg/L）を下回っていた。両処理場を比較すると、中央値では標準法 T_1 の方がやや高かったが、濃度範囲はおおむね同じであった。また、流入下水中の NP および BPA の濃度は、不規則な変動を示し、季節的な変動パターンは認められなかった。

処理水中の NP 濃度の中央値は、標準法 T_1 では、検出下限値以上定量下限値未満の 0.1 μg/L、OD 法 T_2 では、検出下限値（0.1μg/L）未満であり、除去率は 95～96%（中央値）で高く安定していた。一方、処理水中の BPA 濃度の中央値は、標準法 T_1 では 0.04μg/L、OD 法 T_2 では検出下限値以上定量下限値未満の 0.02μg/L であり、除去率は 91～92%（中央値）であった。このように、代表的な内分泌撹乱化学物質である NP および BPA は、処理方式の違いに関わらず、年間を通じておおむね効果的に除去されていた。

（３）エストロゲン様活性

調査対象物質による理論活性値、並びに、エストロゲン様活性に対する各物質の寄与率を**表 1-4-10** に示す。各物質の比活性値は、E1 は 0.3、E2 は 1、E3 は 0.002、NP は 0.001、BPA は 0.00006 とし[20]、**表 1-4-3** と同様に、各物質の相互作用は相加的であると仮定した。

表 1-4-10　調査対象物質の理論活性値と寄与率（調査Ⅲ）

物質名	比活性値	標準法 T_1				OD法 T_2			
		流入下水		二次処理水		流入下水		二次処理水	
		E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]	E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]	E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]	E2等価値 [ng-E2/L]	寄与率 [%]
E1	0.3	11 (7.5～23)	11.3 (8.5～26.9)	15 (4.5～42)	97.5 (51.0～120.0)	8.4 (5.0～23)	11.1 (6.2～31.5)	1.3 (0.7～2.9)	61.5 (28.0～97.0)
E2	1	15 (10～27)	17.1 (14.1～31.4)	2.3 (0.5～12)	14.9 (5.0～40.3)	13 (8.6～24)	16.1 (8.7～29.7)	0.5 (0.3～5.9)	25.0 (10.0～118.0)
E3	0.002	0.6 (0.3～0.9)	0.7 (0.4～1.0)	0.001 (0.001～0.008)	0.01 (0.002～0.03)	0.3 (0.08～1.2)	0.5 (0.1～1.6)	0.02 (0.003～0.1)	0.7 (0.1～3.5)
NP	0.001	3.2 (2.2～4.0)	3.5 (2.1～6.9)	0.1 (0.1～0.4)	0.9 (0.2～3.4)	2.0 (1.5～4.4)	2.6 (1.5～5.9)	0.1 (0.1～0.2)	3.8 (2.0～10.0)
BPA	0.00006	0.04 (0.009～0.09)	0.05 (0.01～0.08)	0.003 (0.0006～0.01)	0.02 (0.004～0.06)	0.02 (0.007～0.06)	0.03 (0.01～0.1)	0.001 (0.0006～0.008)	0.05 (0.02～0.4)
エストロゲン様活性（測定値）		90 (43～123)		16 (4.0～49)		75 (57～110)		3.0 (1.0～5.0)	

注）上段は中央値、下段括弧内は最小値～最大値を示す。

流入下水のエストロゲン様活性は、標準法 T_1 では 43～123ng-E2/L（中央値 90ng-E2/L）、OD 法 T_2 では 57～110ng-E2/L（中央値 75ng-E2/L）で、中央値では標準法 T_1 の方がやや高かったが、濃度範囲はおおむね同じであった。また、調査Ⅰの濃度レベル（中央値 84ng-E2/L）と同程度であった。流入下水のエストロゲン様活性に占める各物質の寄与率は、両処理場で同様な傾向を示し、E2 が 16～17%と最も高く、次いで E1 が約 11%であった。しかし、これら 2 物質に E3、NP および BPA の 3 物質の寄与率を加えても、全体の 30%程度に過ぎず、調査対象物質では説明できない活性が全体の 70%程度を占めた。この原因としては、調査対象物質以外の未知のエストロゲン様物質の寄与や、流入下水中の夾雑物質の影響による過大評価などが考えられる[49]。

処理水のエストロゲン様活性は、標準法 T_1 では 4～49ng-E2/L（中央値 16ng-E2/L）、OD 法 T_2 では 1.0～5.0ng-E2/L（中央値 3.0ng-E2/L）であり、エストロゲン様活性の除去率（中央値）は、標準法 T_1 では 81%、OD 法 T_2 が 96%であった。このように、エストロゲン様活性の除去効果は、OD 法 T_2 の方が高く、処理水のエストロゲン様活性は低く安定

していた。これは、標準法 T_1 では、エストロゲン活性の高い E1 が、処理水中に高濃度で残留していたためと考えられる。このように処理水のエストロゲン様活性は、E1、E2 の 2 物質にほぼ由来しており、特に E1 の寄与率が高く、標準法 T_1 では約 98%、OD 法 T_2 では約 62%であった。したがって、下水中のエストロゲン様活性を効果的に低減するためには、処理水中の E1 濃度を低くすることが重要と考えられる。

なお、調査 I では、E2 による平均的な寄与率は、流入下水で 65%、処理水で 76%であり、本調査と比較して 3～5 倍程度高かった。これは、1.4.2 で述べたとおり、下水中の共存物質との非特異的結合などのため、調査 I の ELISA 法による E2 の測定値が、本調査の LC/MS/MS 法による測定値よりも、5 倍程度高かったためと考えられる。

（４）反応タンクの運転条件と除去率の関係

反応タンクの HRT、SRT および水温と E1、E2 およびエストロゲン活性の除去率の関係を図 1-4-19 に示す。なお、E3、NP および BPA は、標準法 T_1、OD 法 T_2 ともに除去率が高く安定していたため省略した。

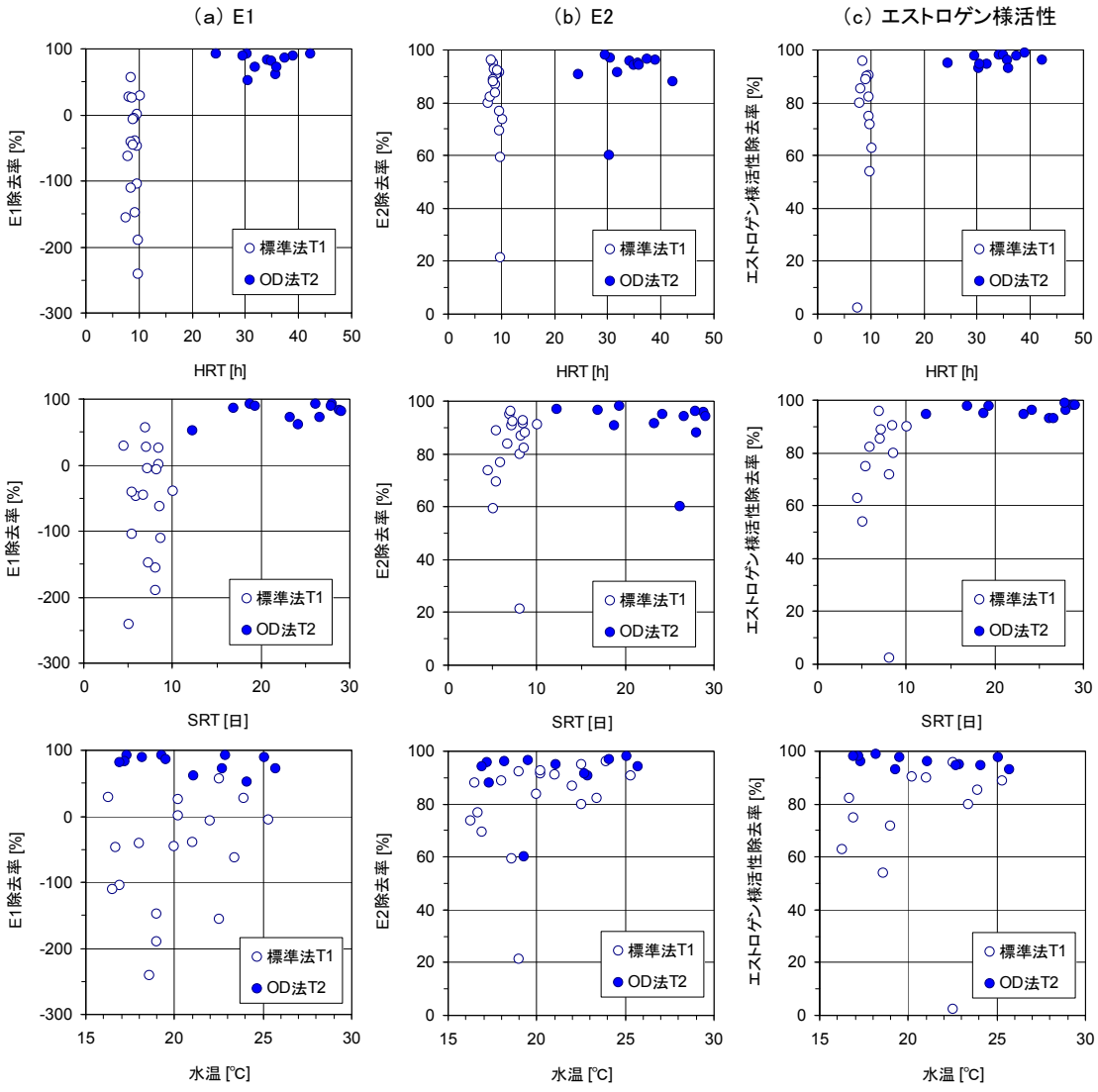


図 1-4-19　HRT、SRT および水温と除去率の関係（調査Ⅲ）

標準法 T_1 の HRT、SRT は、調査期間中 7.6～10 時間（中央値 9.0 時間）、4.5～10 日（中央値 7.3 日）の範囲で変動していた。標準法 T_1 の E2 およびエストロゲン様活性の除去率は、SRT の長い方が高くなる傾向が認められた。これに対して、下水処理過程で濃度の増加がみられた E1 では、SRT と除去率の間に明確な関係は認められなかった。また、水温 20℃以下で低い除去率がみられる傾向にあり、水温による影響が示唆された。なお、HRT と除去率の間には、いずれも明確な関係は認められなかった。

一方、OD 法 T_2 の HRT、SRT は、標準法 T_1 よりも長い 25～42 時間（中央値 35 時間）、12～29 日（中央値 25 日）の範囲で変動していた。OD 法 T_2 の E1、E2 およびエストロゲン様活性の除去率は、全体的に高く安定しており、HRT、SRT および水温のいずれとの間にも関係は認められなかった。

１．４．５　内分泌撹乱物質の時間的な濃度変動（調査Ⅳ）

一般に流入下水の有機物や SS（浮遊性物質）の濃度は、1 日の生活パターンに応じた濃度変動が見られる。そこで、調査Ⅳでは、内分泌撹乱物質の 1 日の時間的な濃度変動の把握を目的として、調査Ⅲと同じ標準法の T_1 処理場において、2 日間にわたる通日調査を行った。調査Ⅳにおけるエストロゲン等の濃度範囲（中央値、最大値および最小値）および変動係数を**表 1-4-11** に、調査期間中の内分泌撹乱物質、COD_{Mn}（過マンガン酸カリウムによる酸素要求量）および SS の濃度の変化を**図 1-4-20** に示す。なお、調査 1 日目（2003 年 2 月 17 日）の 10 時から 17 時にかけて、汚泥脱水作業が実施されており、脱水ろ液の流入があった。また、処理水中の濃度が検出下限値未満の場合には、処理水中の濃度は検出下限値として変動係数を算出した。

表 1-4-11　エストロゲン等の濃度範囲および変動係数（調査Ⅳ）

	E1 [ng/L]	E2 [ng/L]	E3 [ng/L]	NP [μg/L]	BPA [μg/L]	COD_{Mn} [mg/L]	SS [mg/L]
流入下水	28 (20～44) 0.25	12 (8.3～15) 0.22	230 (165～288) 0.20	1.7 (1.2～4.0) 0.43	0.10 (0.06～0.40) 0.78	80 (31～132) 0.40	114 (36.0～228) 0.55
初沈流出水	37.0 (27～67) 0.29	14.0 (12～19) 0.19	246 (197～341) 0.17	1.5 (1.0～4.4) 0.53	0.12 (0.07～0.36) 0.65	68 (44～78) 0.18	76 (42～99) 0.24
処理水	73.0 (64～98) 0.14	2.7 (2.1～4.1) 0.20	<0.5 (<0.5～2.1) 0.71	tr [0.25] (<0.3～0.4) 0.44	0.05 (0.03～0.09) 0.27	10 (9.1～11) 0.07	2.5 (1.7～4.2) 0.28

注1) 上段は中央値、中段かっこ内は最小値～最大値、下段は変動係数を示す。
注2) trは定量下限値未満検出下限値以上を、tr の[ ]は参考値を示す。

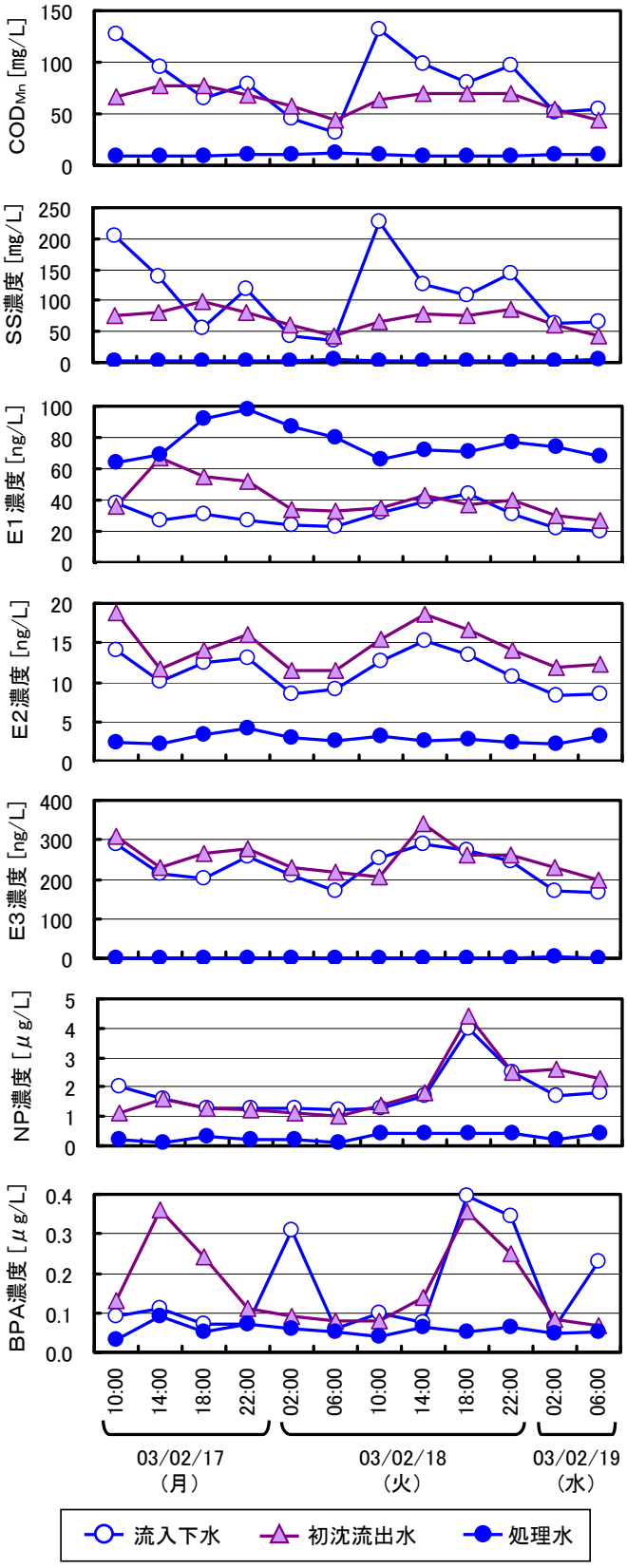


図 1-4-20　エストロゲン濃度等の時間変動（調査Ⅳ）

流入下水の COD_{Mn} や SS 濃度は、規則的な濃度変化を示し、いずれも午前 10 時と午後 10 時にピークが認められた。これに対して、エストロゲン濃度も、日中に高く、深夜早朝に低くなる傾向が認められたが、ピーク時刻の出現にややばらつきが見られた。また、エストロゲン濃度の変動係数（0.20～0.25）は、COD_{Mn}（0.40）や SS 濃度（0.55）と比較して小さく、濃度変動の幅が小さかった。一方、流入下水中の NP、BPA は、COD_{Mn} や SS 濃度のような規則的な濃度変化は認められず、不規則なピークが見られた。このような流入下水濃度の時間変動の違いは、エストロゲンはし尿に由来し主に生活系排水の流入に影響されるのに対して、NP や BPA は生活系排水以外の工場排水などの流入に影響されるためと推察される。

初沈流出水の COD_{Mn} や SS 濃度は、最初沈殿池での固液分離の効果により、流入下水の濃度変化に関わらず、全体的な傾向として、流入下水の濃度よりも低く安定し、変動係数も COD_{Mn} が 0.18、SS が 0.24 と小さかった。一方、エストロゲンや NP、BPA の初沈流出水の濃度は、全体的な傾向として、流入下水の濃度よりも高く、流入下水とほぼ同じ濃度変化が認められ、変動係数も同程度のばらつきがみられた。このことから、調査対象とした内分泌撹乱物質は、下水中の一般的な有機物質や浮遊性物質と比較して、最初沈殿池での固液分離による除去効果が小さいものと考えられる。また、E1 と BPA の初沈流出水の濃度は、汚泥脱水機の運転に伴う返流水の影響が現れる時間帯（2 月 17 日 14 時～22 時）にピークが認められ、返流水による影響が推察された。

内分泌撹乱物質の処理水中の濃度は、流入下水中の濃度を上回った E1 を除き、流入下水や初沈流出水の濃度変化に関わらず、低く安定していた。内分泌撹乱物質の処理水濃度の変動係数は、大部分が検出下限値未満あるいは定量下限値未満であった E3（0.71）と NP（0.44）では見かけ上大きかったが、その他の物質は COD_{Mn}（0.07）や SS 濃度（0.28）と同程度（0.14～0.27）であった。

１．４．６　総合考察

本章では、下水処理における内分泌撹乱物質の挙動を明らかとするため、全国の下水処理場での内分泌撹乱物質の濃度に関する調査や、標準法および OD 法の下水処理場での通年調査、標準法の下水処理場における通日調査を行った。これらの調査より得られた内分泌撹乱物質の濃度や除去効果を概括すると以下のとおりである。

- 調査対象としたエストロゲン 3 物質（E1、E2 および E3）、内分泌撹乱化学物質 2 物質（NP および BPA）は、いずれの調査においても、流入下水中から全て定量下限値以上で検出された。実態調査および通年調査（以下、実態調査等という）における流入下水中の濃度（中央値、以下本項で同じ）は、E1 が 20～36ng/L、E2 が 9.7～15ng/L、E3 が 120～304ng/L、NP が 1.9～3.2μg/L、BPA が 0.33～0.60μg/L であった。また、いずれの物質についても、OD 法の下水処理場と比較して、標準法の下水処理場の方が若干高い傾向にあった。

- 下水処理におけるエストロゲンの除去効果は、エストロゲンの種類や処理方式により異なる傾向を示した。すなわち、E2 は、OD 法では、実態調査等における処理水中の濃度が検出下限値（0.5ng/L）未満であったが、標準法では 1.8～2.3ng/L であり、86～88%程度の除去率であった。E1 は、E2 と比較して除去効果が低く、実態調査等における処理水中の濃度は、標準法が 42～49ng/L、OD 法が 2.3～4.4ng/L であった。OD 法では、83～85%程度の除去率であったが、標準法では、処理水中の濃度が流入下水中の濃度を上回る現象が多数認められ、濃度の減少がみられる場合でも、その除去率は 28～37%と低かった。一方、E3 は、処理方式に関わらず、下水処理でおおむね除去される傾向にあり、実態調査等における処理水中の濃度は、検出下限値（0.5ng/L）未満～7.6ng/L であった。
- 実態調査等における NP および BPA の処理水中の濃度は、NP が検出下限値（0.1μg/L）未満～検出下限値以上定量下限値（0.3μg/L）未満、BPA が検出下限値（0.01μg/L）以上定量下限値（0.03μg/L）未満～0.04μg/L であり、処理方式や運転条件などに関わらず除去効果が高く、年間を通じて効果的かつ安定的に除去されていた。
- 通年調査におけるエストロゲン様活性（中央値）は、流入下水では、標準法が 90ng-E2/L 、OD 法が 75 ng-E2/L であるのに対して、処理水では、標準法が 16ng-E2/L、OD 法が 3.0ng-E2/L であり、下水処理においては、個々の内分泌撹乱物質の除去に加えて、エストロゲン様活性も低減されていることが明らかとなった。また、エストロゲン様活性の除去効果は、E2 や E1 と同様に、標準法と比較して OD 法の方が高く安定する傾向にあった。
- 嫌気好気ろ床法では、嫌気性ろ床での内分泌撹乱物質の除去効果がほとんど認められず、OD 法などの活性汚泥処理と比較して、除去効果が低く、内分泌撹乱物質の効率的な除去の観点からは、好気性処理が有効であると考えられた。
- 流入下水中のエストロゲンは、有機物や SS と同様に規則的な濃度変化が認められたが、NP や BPA は、規則的な濃度変化は認められず、不規則な濃度のピークが出現した。一方、処理水中の濃度は、濃度の増加がみられた E1 を除き、流入下水の濃度変化に関わらず、低く安定する傾向が認められた。

これらの調査結果より、下水処理における内分泌撹乱物質の挙動や除去について、次のことが示唆された。

第一に、内分泌撹乱物質の除去効果は、反応タンクの HRT や SRT の影響を受けることが明らかとなった。すなわち、小規模の下水処理場における代表的な処理方式である OD 法は、中大規模の下水処理場における代表的な処理方式である標準法と比較して、その HRT や SRT が長く、低負荷型の処理方式であるが、その処理水中の内分泌撹乱物質やエストロゲン様活性の濃度レベルが低く、内分泌撹乱物質の除去効果が高かった。流入下水中の内分泌撹乱物質の濃度レベルには、顕著な差はないことから、OD 法と標準法の除去効果の違いは、処理方式の特性によるものと考えられる。また、エストロゲンやエストロゲン様活性の除去率は、全体的にみて HRT や SRT の長い方が、高く安定する傾向が認め

られた。したがって、効果的かつ安定的にエストロゲンなどの除去を行うためには、HRT や SRT の長い方が有利であると考えられる。

第二に、下水道を経由した内分泌撹乱物質のリスクを低減するためには、E1 および E2 の除去が重要であることが明らかとなった。すなわち、処理水中のエストロゲン様活性は、E1 と E2 の 2 物質にほぼ由来しており、特に E1 の寄与率が高く、標準法においてその傾向が顕著であった。また、実態調査における処理水中の濃度を E1 および E2 の PNEC や NOEC と比較すると、標準法では、E1 および E2 のほぼ全てが PNEC を超過し、E1 では全体の 40～60%が NOEC も超過していた。E1 や E2 は、人のし尿に由来し、下水道への排出は不可避であることから、下水処理場における効果的かつ安定的な除去が必要である。したがって、処理水中のエストロゲン様活性を低減させ、放流先での内分泌撹乱作用のリスクを低減するためには、処理水中のエストロゲン濃度、特に標準法の E1 の濃度レベルを下げる必要があると考えられる。

第三に、下水処理水中のエストロゲンの濃度レベルには、エストロゲン抱合体の形態変化が関与することが示唆された。すなわち、人が排泄するエストロゲンは主に抱合体として存在し、下水処理場に流入するまでの管渠内などにおいて、抱合体から遊離体への形態変化（脱抱合）が生じていると考えられるが、流入下水中には遊離体のエストロゲンと同等以上の濃度レベルで抱合体が含まれているものと推察される。また、E2 と E1 は相互に形態が変化するが、標準法での流入下水に対する処理水での E1 の増加量は、E2 の減少量を大きく上回ることが多く、E2 から E1 への酸化のみでは、E1 濃度の増加を説明することができない。したがって、下水処理過程における E1 濃度の増加には、エストロゲン抱合体の脱抱合が関与しているものと推察される。本研究では、調査時の分析方法の確立状況から、エストロゲン抱合体の濃度の測定を行っていないが、今後、エストロゲン抱合体を含む挙動の把握が必要と考えられる。

１．５　まとめ

本章では、下水処理における内分泌撹乱物質の挙動の実態を明らかとするため、全国の下水処理場において、内分泌撹乱物質の濃度に関する調査を行った。その結果、内分泌撹乱化学物質の NP や BPA は、処理方式などに関わらず、下水処理過程における除去効果が高く、下水道を経由した内分泌撹乱物質のリスクを低減するためには、E1 および E2 の除去が重要であることが明らかとなった。特に E1 は、処理水中のエストロゲン様活性に対する寄与率が高いことや、標準法において E1 濃度の増加が多く認められたことなどから、標準法における E1 の除去向上が重要と考えられる。また、HRT や SRT の長い OD 法は、HRT や SRT の短い標準法と比較して、内分泌撹乱物質の除去効果が高く、安定しており、OD 法を中心とする小規模の下水処理場では、標準法を中心とする大規模な下水処理場と比較して、同等以上に内分泌撹乱物質が除去されていることが明らかとなった。エストロゲンやエストロゲン様活性の除去率は、全体的にみて HRT や SRT の長い方が高く安定する傾向が認められ、内分泌撹乱物質の除去効果は、HRT や SRT の影響を受けるものと考えられる。

参考文献（第１章）

1) 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撹乱化学物質に関する調査報告書（案）」
2) 環境庁（1998，2000）「内分泌撹乱化学物質への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPPED'98－」
3) 社団法人日本下水道協会編（2003）「平成 13 年度版 下水道統計 －行政編－」，社団法人日本下水道協会
4) 国土交通省都市・地域整備局下水道部監修（2007）「日本の下水道（平成 18 年）」，社団法人日本下水道協会
5) 建設省都市局下水道部監修（2001）「下水道施設計画・設計指針と解説（後編）」，社団法人日本下水道協会, 81-83.
6) 社団法人日本水環境学会関西支部編（2003）「アプローチ環境ホルモン－その基礎と水環境における最前線－」，技報堂出版，37-42.
7) 環境省総合環境政策局環境保健部（2001）「ノニルフェノールが魚類に与える内分泌撹乱作用の試験結果に関する報告（案）」
8) 環境省総合環境政策局環境保健部（2002）魚類を用いた生態系への内分泌撹乱作用に関する試験結果について（案），平成 14 年度第 1 回内分泌撹乱化学物質問題検討会資料，環境省ホームページ（http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1401/mat/mat05-1.pdf）
9) 環境省総合環境政策局環境保健部（2004）魚類を用いた生態系への内分泌撹乱作用に関する試験結果について（案），平成 16 年度第 1 回内分泌撹乱化学物質問題検討会資料，環境省ホームページ（http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1601/mat/mat05-2.pdf）

10) Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E. J., Rycroft, R., Sumpter, J. P., Tylor, T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters, Environ. Toxicol. Chem., **15**(11), 1993-2002.

11) Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, Environ. Sci. Technol., **32**(11), 1549-1558.

12) Routledge, E. J., Sheahan, D. A., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., Sumpter, J. P. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach, Environ. Sci. Technol., **32**(11), 1559-1565.

13) Langford, K., Lester, J. N. (2003) Fate and behavior of endocrine disrupters in wastewater treatment processes, “Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes”, Birkett, J. W., Lester, J. N. (ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, 103-143.

14) 財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所（2006）「CERI 有害物質評価書　ノニルフェノール」, 財団法人化学物質評価研究機構, 1-2.

15) 財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所（2006）「CERI 有害物質評価書　ビスフェノール A」, 財団法人化学物質評価研究機構, 1-2.

16) 文献 6)の p.160-165

17) D’Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R. (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, Sci. Total. Environ., **302**(1-3), 199-209.

18) 松井三郎, 足立淳, 松田知成, 滝上英孝, 清水芳久（2001）天然および人工エストロゲンの下水道と環境中での挙動, 季刊化学総説－内分泌かく乱物質研究の最前線－, 社団法人日本化学会, 86-92.

19) Baronti, C., Curini, R., D’Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, Environ. Sci, Technol., **34**(24), 5059-5066.

20) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明（1999）組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, 36, 199-208.

21) 中村由美子, 恩田建介, 高東智佳子, 宮晶子（2003）液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による下水試料中の女性ホルモン類定量方法の開発, 分析化学, **52**(2), 107-114.

22) Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish, Environ. Sci, Technol., **32**(17), 2498-2506.

23) Furuichi, T., Kannan, K., Giesy, J. P., Masunaga, S. (2004) Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water sample from Japan using instrumental analysis and in vitro reporter gene assay, Water Res., **38**(20), 4491-4501.

24) Young, W. F., Whitehouse, P., Johnson, I. Sorokin, N. (2004) “Proposed Predicted-No-Effect -Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters”, R&D Technical Report P2-T04/1, Environmental Agency, U.K.

25) 松田和久（2004）水道水質基準の見直し等を踏まえた今後の水道事業体の水質管理について，水環境学会誌, **27**(1), 24-30.

26) 環境省（2006）ノニルフェノール，リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート，環境省ホームページ（http://ceis.sppd.ne.jp/fs2006/factsheet/data/1-242.html#1）

27) 環境省（2006）ポリ（オキシエチレン）ノニルフェニルエーテル，リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート，環境省ホームページ（http://ceis.sppd.ne.jp/fs2006/factsheet/ data /1-309.html#1）

28) 文献 6)の p.155-157.

29) White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, Endocrinology, **135**(1), 175-182.

30) 独立行政法人製品評価技術基盤機構（2003）「ビスフェノール A リスク評価管理研究会中間報告書－要約－」

31) 文献 6)の p.7-10.

32) 立花隆，東京大学教養学部立花隆ゼミ（1998）「環境ホルモン入門」，新潮社, 173-175.

33) 平成 20 年 7 月 8 日付厚生労働省発食安第 0708007 号「食品健康影響評価について」（2008）

34) 池道彦, 鹿角昌平, 小林直樹, 藤田正憲(2002)酵母法による環境ホルモンの測定, 環境技術, **31**(8), 589-593.

35) Routledge, E. J. Sumpter, J. P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environ. Toxicol. Chem., **15**(3), 241-248.

36) Nishikawa, J., Saito, K., Goto, I., Dakeyama, F., Matsuo, M., Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, Toxicol. Appl. Pharmacol., **154**(1), 76-83.

37) 田中宏明, 小森行也, 玉本博之, 宮本宣博（2003）バイオアッセイによるエストロゲン様活物質の指標に関する研究, 平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 国土交通省国土技術政策総合研究所・独立行政法人土木研究所, 341-346.

38) 建設省都市局下水道部監修（1999）「下水道における内分泌撹乱化学物質水質調査マニュアル（案）」, 社団法人日本下水道協会

39) 社団法人日本下水道協会（2002）「下水試験方法（追補暫定版）－内分泌撹乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編－」，社団法人日本下水道協会

40) 建設省都市局下水道部, 厚生省生活衛生局水道環境部監修（1997）「下水試験方法－上巻－」，社団法人日本下水道協会

41) 中沢均，石井実，上田悦子（2000）処理水再利用及び水循環における微量化学物質除去技術に関する調査，技術開発部報 2000，日本下水道事業団技術開発部, 65-70.

42) Gallard, H., von Gunten, U. (2002) Chlorination of phenols; kinetics and formation of chloroform, Environ. Sci. Technol., **36**(5), 884-890.

43) Alum, A., Yoon, Y., Westerhoff, P., Abbaszadegan, M. (2004) Oxidation of bisphenol A, 17ß-estradiol, and 17α-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity, Environ. Toxicol., **19**(3), 257-264.

44) 北中敦, 鈴木穣（2001）下水生物処理水中内分泌撹乱物質の物理化学的手法による除去効果, 環境工学研究論文集, **38**, 275-284.

45) 文献 5)の p.254-264.

46) 相澤貴子（2002）内分泌撹乱化学物質の塩素処理副生成物とそのエストロゲン様活性, 用水と廃水, **44**(1), 21-27.

47) 伊藤禎彦, 長坂俊樹, 中西岳, 野中愛, 百々生勢（2000）水道水のエストロゲン様作用の特性と制御性に関する研究, 環境工学研究論文集, **37**, 333-344.

48) 伊藤禎彦（2005）水道水中のエストロゲン様作用の構造, 月刊水, **47**(1), 17-33.

49) 恩田建介, 宮晶子, 葛甬生, 田中俊博（2001）遺伝子組換え酵母を用いた各種排水中の女性ホルモン様活性の測定, 水環境学会誌, **24**(11), 750-756.

50) 文献 5)の p.15-47.

51) Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B., Kroiss, H. (2004) Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater, Water Sci. Technol., **50**(5), 149-156.

52) Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. (2005) The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants, Water Res., **39**(1), 97-106.

53) Ternes, T. A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -Ⅱ. Aerobic batch experiments with activated sludge, Sci. Total. Environ., **255**(1-2), 91-99.

54) Vader, J. S., van Ginkel, C. G., Sperling, F. M. G. M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J. S., van der Most, M., Stokman, P. G. W. (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge, Chemosphere, **41**(8), 1239-1243.

55) Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M. (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, Water Res., **38**(9), 2323-2329.

56) Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M., Sato, C. (2004) Analysis and occurrence of estrogens in wastewater in Japan, Water Sci. Technol., **50**(5), 93-100.

57) Johnson, A. C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K. Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M. J.-F., Svenson, A., Wettstein, F. E. (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices, Water Res., **39**(1), 47-58

58) Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., Mclnnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A. (2005) Distribution of estrogens, 17 ß-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants, Sci. Total Environ., **336**(1-3), 155-170.

59) 文献 6)の p.160-165.

60) Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004) Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in sewage treatment plants, Water Res., **38**(12), 2918-2926.

61) 日本下水道事業団技術開発部（2001）「嫌気好気ろ床法の事後評価調査報告書」, 日本下水道事業団

第２章　下水処理におけるエストロゲンの除去特性に関する研究

２．１　はじめに

第１章では、下水中の代表的な内分泌撹乱物質の濃度やエストロゲン様活性について、全国の下水処理場において調査を行い、下水処理系に由来する内分泌撹乱能のリスクファクターとして、天然エストロゲンであるエストロン（E1）と 17β－エストラジオール（E2）が重要であることを明らかとした。E1 や E2 は、人のし尿に由来し、下水道への排出が不可避であることから、下水道を経由した内分泌撹乱物質のリスクを低減するためには、下水処理場においてより効果的かつ安定的にエストロゲン（特に E1）の除去を行い、処理水中の濃度を低く安定させることが必要である。そこで、本章では、下水処理におけるエストロゲンの除去特性を把握し、エストロゲンの効果的かつ安定的な除去に適した運転条件を明らかにすることを目的として、実施設における調査や実施設の下水や活性汚泥を用いた実験を行った。

活性汚泥処理では、汚濁物質の活性汚泥への吸着や活性汚泥中の微生物による同化および異化、沈殿池における固液分離などにより、下水中の有機物などの汚濁物質が除去される。エストロゲンの除去についても、これと同様な作用機構で行われるものと考えられるが、E2 と E1 は互いに形態が変化することや、標準活性汚泥法（標準法）の下水処理場でみられる下水処理過程における E1 濃度の増加には、エストロゲン抱合体の形態変化の関与が推察されることなどから、下水処理過程におけるエストロゲン挙動の詳細な把握が必要である。そこで、本章ではまずはじめに、標準法の下水処理場の水処理および汚泥処理の各工程、並びに、反応タンク内各槽のエストロゲン濃度を測定することにより、下水処理工程におけるエストロゲンのマスバランスを取り、その除去機構を明らかにした。

また、第１章では、下水処理過程でのエストロゲンの除去率は、反応タンクの固形物滞留時間（SRT）や水理学的滞留時間（HRT）の長い方が、全体的にみて高く安定する傾向が認められ、SRT や HRT が長いオキシデーションディッチ法（OD 法）の方が、SRT や HRT が短い標準法と比較して、エストロゲンの除去効果が高いことが明らかとなった。特に SRT は、活性汚泥を構成する微生物の比増殖速度と関係を有し、活性汚泥プロセスの設計および管理の最も重要な因子の一つであることから、エストロゲンの除去においても、重要な操作因子となる可能性がある。そこで次に、2 系列からなるパイロットプラント装置を用いて、SRT がエストロゲンの除去性能に及ぼす影響を明らかにした。また、SRT の異なる標準法と OD 法の実施設の活性汚泥を用いて、エストロゲンの回分処理実験を行うことにより、活性汚泥性状の違いによるエストロゲンの除去特性の違いを明らかにするとともに、酸素条件や水温がエストロゲンの除去特性に及ぼす影響を明らかにした。

さらに、第１章の調査結果や本章の調査および実験結果などから、エストロゲンの除去を効果的かつ安定的に行うための反応タンクの運転条件について検討を行った。

２．２　材料および方法

２．２．１　実施設調査

下水処理工程におけるエストロゲンの挙動を詳細に把握するため、水処理および汚泥処理の各工程におけるエストロゲン濃度を調査し、そのマスバランスを明らかにするとともに、反応タンク内におけるエストロゲンの消長についても調べた。

（１）調査対象処理場

実施設調査は、第１章で通年調査および通日調査を行った T_1 処理場で実施した。T_1 処理場の処理フローを図 2-2-1 に示す。T_1 処理場の処理方式は標準活性汚泥法で、その反応タンクは、等容量の４槽に区分されており、第１槽は撹拌のみ、第２槽から第４槽は曝気撹拌を行う無酸素好気運転が行われていた。また、汚泥処理は、重力濃縮、常圧浮上濃縮、嫌気性消化、汚泥脱水（遠心脱水機）のフローで行われていた。

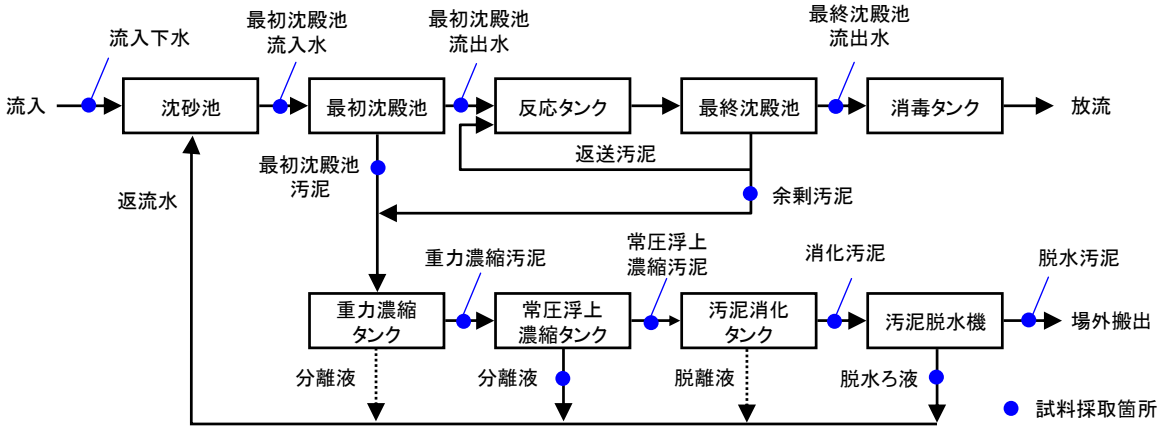


図 2-2-1　調査対象処理場（T_1 処理場）の処理フローと試料採取位置

（２）調査方法

実施設調査では、水温による影響を考慮して、高水温期（2002 年 6 月 26 日）と低水温期（2003 年 1 月 20 日）の各１回、図 2-2-1 に示す水処理および汚泥処理の各工程から試料を採取し、エストロゲン濃度を測定した（以下、詳細調査という）。すなわち、水処理工程では、流入下水、最初沈殿池流入水（以下、初沈流入水という）、最初沈殿池流出水（以下、初沈流出水という）および最終沈殿池流出水（以下、処理水という）の４試料を、午前と午後の各１回採取し、直前に等量混合して分析に供した。なお、流入下水は、汚泥処理施設からの返流水の影響を受けない位置で採取した。また、汚泥処理工程では、最初沈殿池汚泥（以下、初沈汚泥という）、余剰汚泥、重力濃縮汚泥、常圧浮上濃縮汚泥および分離液、消化汚泥、脱水汚泥および脱水ろ液の８試料を、正午前後に１回採取した。なお、2 回の調査ともに、調査前日および当日の降雨はなかった。

さらに、反応タンク内でのエストロゲンの消長を把握するため、反応タンク流入水およ

び返送汚泥、各槽の活性汚泥混合液、並びに、最終沈殿池流出水（処理水）を、反応タンク各槽（約 2.5 時間）および最終沈殿池（約 6 時間）における下水の滞留時間に相当する間隔をあけて順に採取し､エストロゲン濃度を測定した(以下､プロファイル試験という)。返送汚泥および活性汚泥については、遠心分離（1,800×g、15 分）した上澄水と沈殿物に分けて、エストロゲン濃度を測定した。なお、プロファイル試験は、第 1 章に示した通日試験に合わせて、2003 年 2 月 17 日 14 時から翌 2 月 18 日 6 時の間に実施した。

（３）分析方法

エストロゲン濃度は、前章 1.3.3(2)と同様に、固相抽出－液体クロマトグラフ/タンデム質量分析（LC/MS/MS）法により、E1、E2 および E3 を同時に測定した [1]。

汚泥試料は、下水試験方法（追補暫定版）の E2-ELISA 法による汚泥試料の分析方法 [2] に準じて、メタノール：酢酸緩衝液により振とう抽出した後、水試料と同様に固相抽出を行い、分析に供した。すなわち、汚泥試料 50mL を遠心分離（1,800×g、15 分）し、沈殿物にメタノール：酢酸緩衝液（1mol/L、pH5.0）＝9:1（v/v）を 40mL 加えて 30 分間振とう抽出した。その後、遠心分離（1,800×g、15 分）し、上澄液を分取した。次いで、沈殿物にメタノール 40mL を加えて 5 分間振とう抽出し、遠心分離（1,800×g、15 分）した上澄液を、さきの上澄液と合わせてガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 製）でろ過した。このろ液をロータリーエバポレーターを用いて 10mL 以下に濃縮した後、超純水を加えて約 200mL とし、超音波処理で均質化したものを固相抽出に供した。

なお、エストロゲン以外の一般水質項目の分析は、下水試験方法 [3] に準じて行った。

２．２．２　パイロットプラント実験

エストロゲンの除去性能に及ぼす SRT の影響を検討するため、2 系列からなる実験装置を異なる SRT で運転し、処理水や活性汚泥中のエストロゲン濃度を比較した。

（１）実験装置

パイロットプラント実験に用いた実験装置の概略フローを図 2-2-2 に示す。

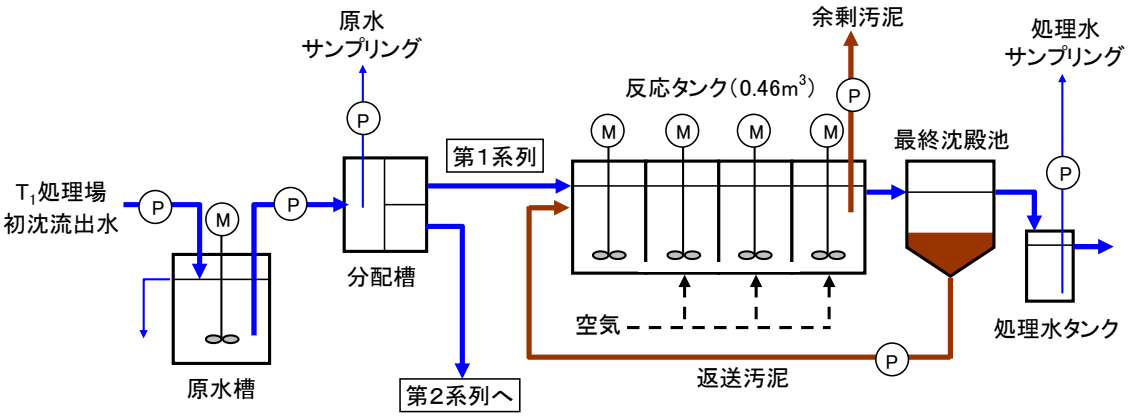


図 2-2-2　パイロットプラント実験装置の概略フロー

実験装置は、標準活性汚泥法 2 系列からなり、反応タンク容量は 0.46m³ である。反応タンクは、T_1 処理場の反応タンクと同様、等容量の 4 槽に区分されており、第 1 槽は撹拌のみ、第 2 槽から第 4 槽は曝気撹拌を行う無酸素好気運転とした。実験装置は、T_1 処理場に隣接する実験施設内に設置した。また、T_1 処理場の初沈流出水を 24 時間連続で送水し実験原水に用いた。

（２）実験方法

実験装置は、2003 年 4 月 2 日に T_1 処理場の返送汚泥を反応タンクに投入し、運転を開始した。その後、2003 年 7 月 2 日に両系列の HRT を 8 時間（流入水量 1.38m³/日）、第 1 系列の SRT を 5 日、第 2 系列の SRT を 10 日となるように、流入水量および余剰汚泥引抜量の設定を変更し、10 月 22 日までの間、当該設定条件で運転を行った。なお、この間の汚泥返送率は 44～47%（平均値）であった。

実験原水および各系列の処理水について、24 時間コンポジット試料を 1 週間に 1 回の頻度で採取し、エストロゲン濃度を測定した。また、反応タンク第 4 槽の活性汚泥混合液を合わせて採取し、エストロゲン濃度および MLSS（mixed liquor suspended solids：活性汚泥浮遊物質）濃度を測定した。

さらに、反応タンクの水温がエストロゲンの除去特性に及ぼす影響を検討するため、実験原水と実験装置の活性汚泥混合液を用いた回分処理実験を行った。実験装置から採取した実験原水と返送汚泥（第 1 系列）を 2:1 の比率で混合し（MLSS 濃度約 2,000mg/L）、ステンレス製タンク（容量 20L）4 槽に分取した。これを**図 2-2-3** に示すとおり、恒温水槽内で汚泥が沈降しないよう緩やかに撹拌しながら、エアポンプと散気球を用いて曝気した。活性汚泥混合液を経時的に採取して、遠心分離（1,900×g、5 分）により得た上澄水のエストロゲン濃度を測定した。なお、水温は 15℃、18℃、21℃および 24℃の 4 段階とし、試料採取は実験開始直後（0 分）、2 時間、4 時間および 8 時間経過後の 4 回とした。

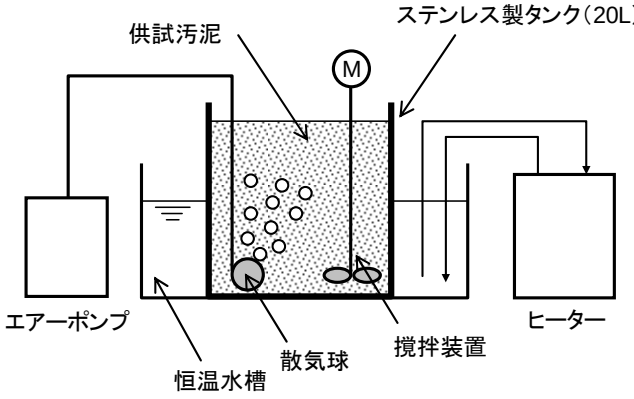


図 2-2-3　回分処理実験装置の概念図

（３）分析方法

エストロゲンなどの水質分析は、前項 2.2.1(3)に示す方法で行った。

２．２．３　回分処理実験

エストロゲンの種類による除去特性の違いや、処理方式などによる活性汚泥性状の違いがエストロゲンの除去特性に及ぼす影響などを検討するため、複数の下水処理場から採取した活性汚泥を用いて、エストロゲンの回分処理実験を行った。

（１）供試汚泥

回分処理実験には、標準法 2 ヶ所、OD 法 2 ヶ所の計 4 ヶ所の下水処理場の活性汚泥を用いた。すなわち、第 1 章で通年調査を行った標準法の T_1 処理場、OD 法の T_2 処理場、並びに、これらの処理場の近隣に位置する標準法の S_2 処理場、OD 法の T_7 処理場の 4 ヶ所の返送汚泥を採取して用いた。採取した返送汚泥は、速やかに実験場所まで運び、直ちに実験に供した。なお、当該処理場におけるエストロゲンの除去性能を確認するため、反応タンク流入水および処理水を合わせて採取し、エストロゲン濃度の分析に供した。

（２）実験条件

回分処理実験の実験条件を**表 2-2-1** に示す。Run 1 では、処理方式および処理場による活性汚泥性状の違いが除去特性に及ぼす影響を検討するため、前項に示した 4 ヶ所の処理場から採取した汚泥を用いて、E2 および E1 の好気条件下での除去特性を比較した。Run 2 では、酸素条件の違いが除去特性に及ぼす影響を検討するため、T_1 処理場から採取した汚泥を用いて、E2 および E1 の好気条件（曝気あり）および無酸素条件（曝気なし、撹拌のみ）での除去特性を比較した。Run 3 では、天然エストロゲンと合成エストロゲンの除去特性の違いを検討するため、T_1 処理場から採取した汚泥を用いて、E2 および 17α－エニチルエストラジオール（EE2）の好気条件下での除去特性を比較した。

表 2-2-1　回分処理実験の実験条件一覧

Run		供試汚泥	添加エストロゲン	曝気の有無
1	1-1-1	T_1（標準法）	E2	あり（好気）
	1-1-2		E1	
	1-2-1	S_2（標準法）	E2	
	1-2-2		E1	
	1-3-1	T_2（OD法）	E2	
	1-3-2		E1	
	1-4-1	T_7（OD法）	E2	
	1-4-2		E1	
2	2-1-1	T_1（標準法）	E2	あり（好気）
	2-1-2			なし（無酸素）
	2-2-1		E1	あり（好気）
	2-2-1			なし（無酸素）
3	3-1	T_1（標準法）	E2	あり（好気）
	3-2		EE2	

（３）実験方法

回分処理実験は、**図 2-2-3** に示した実験装置を用いて行った。

採取した返送汚泥をステンレス製タンク（容量 20L）に適量分取した後、MLSS 濃度がおよそ 2,000mg/L となるように水道水で希釈した。次いで、**表 2-2-2** に示す合成下水（BOD_5 として約 10,000mg/L）[4]、エストロゲン標準溶液（E2、E1 または EE2、100mg/L）を、それぞれ終濃度が約 200mg/L（BOD_5 として）、1μg/L（E2、E1 または EE2）となるよう順に添加した。汚泥が沈降しないよう緩やかに撹拌しながら、エアポンプと散気球を用いて曝気した。実験中、溶存酸素濃度計を用いて溶存酸素（DO：dissolved oxygen）濃度の確認を適宜行い、DO 濃度が 1.0～3.0mg/L 程度となるように曝気量の調整を行った。なお、無酸素条件の実験では、曝気は行わずに、撹拌のみを行った。また、回分処理実験は、全て水温約 20℃で行った。

経時的に採取した活性汚泥混合液の一部を遠心分離（1,900×g、5 分）し、得られた上澄水（処理水）のエストロゲン濃度および TOC（total organic carbon：全有機炭素）濃度を測定した。また、活性汚泥中のエストロゲン含有濃度および MLSS 濃度を測定した。試料採取は、エストロゲン標準溶液の添加直前、並びに、添加後 5 分、30 分、1 時間、2 時間および 4 時間経過後の計 6 回、Run3 では、これらに添加後 8 時間および 24 時間経過後を加えた計 8 回とした。

表 2-2-2　合成下水組成 [4]

ペプトン	6	g
肉エキス	4	g
尿素	1	g
NaCl	0.3	g
KH_2PO_4	1	g
KCl	0.14	g
$CaCl_2$	0.14	g
$MgSO_4$	0.1	g
水道水	1	L
（BOD 約10,000mg/l）		

（４）分析方法

エストロゲン濃度の測定は、下水試験方法（追補暫定版）の固相抽出－LC/MS/MS 法 [2] による測定方法を一部改変し、液体クロマトグラフ質量分析計（LC/MS）を用いて行った。本法による E1、E2 および EE2 の検出下限値は、いずれも 0.5ng/L であった。なお、試薬類は全て関東化学製の試薬特級以上のものを用いた。

試料水をガラス繊維ろ紙（GF/B、Whatman 製）でろ過した後、ろ液に内標準物質（17β-エストラジオール-*d3*）を添加し、あらかじめメタノール、超純水の順でコンディショ

ニングした濃縮用固相カラム（SepPack plus C18 カートリッジ、Waters 製）に通水した。通水後のカラムを脱水した後、酢酸エチル/メタノール（5:1）で溶出させた。この溶出液を窒素ガス気流下で濃縮し、乾固した。これをヘキサン/ジクロロメタン（1:1）に溶解して、クリーンアップ用の固相カラム（SepPack plus フロリジルカートリッジ、Waters 製）に通水した。このフロリジルカラムにヘキサン/ジクロロメタン（1:1）を流して、その溶出液を廃棄した。次に、フロリジルカラムにアセトン/ジクロロメタン（1:9）を流して、その溶出液を窒素ガス気流下で濃縮乾固した後、メタノールに溶解した。この溶液をさらに NH_2 カラム（SepPack plus NH_2 カートリッジ、Waters 製）に通水した後、メタノールで溶出した。この溶出液を窒素ガス気流下で濃縮乾固し、メタノールに再溶解して、測定用試料とした。なお、活性汚泥中の含有濃度は、2.2.1(3)に示した方法で抽出した後、水試料と同様に測定した。

高速液体クロマトグラフには Alliance 2690 型（Waters 製）を、分離カラムには SYMMETRY C18（2.1×150mm、3.5μm、Waters 製）を 2 本連結して用いた。移動相はアセトニトリル - 水の混合系を使用し、40%アセトニトリル - 水から 60%アセトニトリル - 水へ 1 分間でリニアにグラジエントをかけ、その後 9 分間保持した後、40%アセトニトリル - 水へ 10 分間でリニアにグラジェントをかけた。移動相の流量は 0.2mL/min、カラムオーブン温度は 40℃、試料注入量は 20μL とした。

質量分析計には Platform LCZ（Micromass 製）を用いた。イオン化法はエレクトロスプレー法の負イオンモード、コーン電圧 50V とし、衝突ガスには窒素ガスを使用した。測定イオンは、E1 は m/z=269.4、E2 は m/z=271.4、EE2 は m/z=274.4、E2-d_3 は m/z=295.4 を選択した。

なお、TOC および MLSS 濃度の分析は、下水試験方法[3)]に準じて行った

２．３　結果および考察

２．３．１　実施設におけるエストロゲン負荷量の挙動

標準法実施設の詳細調査における各処理工程のエストロゲン濃度の測定結果を**表 2-3-1** に示す。また、E1 および E2 の負荷量の挙動を**図 2-3-1** に、処理工程別の負荷量の変化を**図 2-3-2** にそれぞれ示す。なお、E1 と E2 は互いに形態が変化することから、**図 2-3-1** および**図 2-3-2** では、E1 と E2 を同じ図に合わせて示した。

ここで、水中および汚泥中の E1、E2 の負荷量は、エストロゲン濃度および汚泥の固形物濃度の測定結果、並びに、調査当日の水量および汚泥量より、以下の式により算出した。

負荷量（水）[mg/d]＝濃度[ng/L]×水量[m^3/d] ……（**式 2-3-1**）

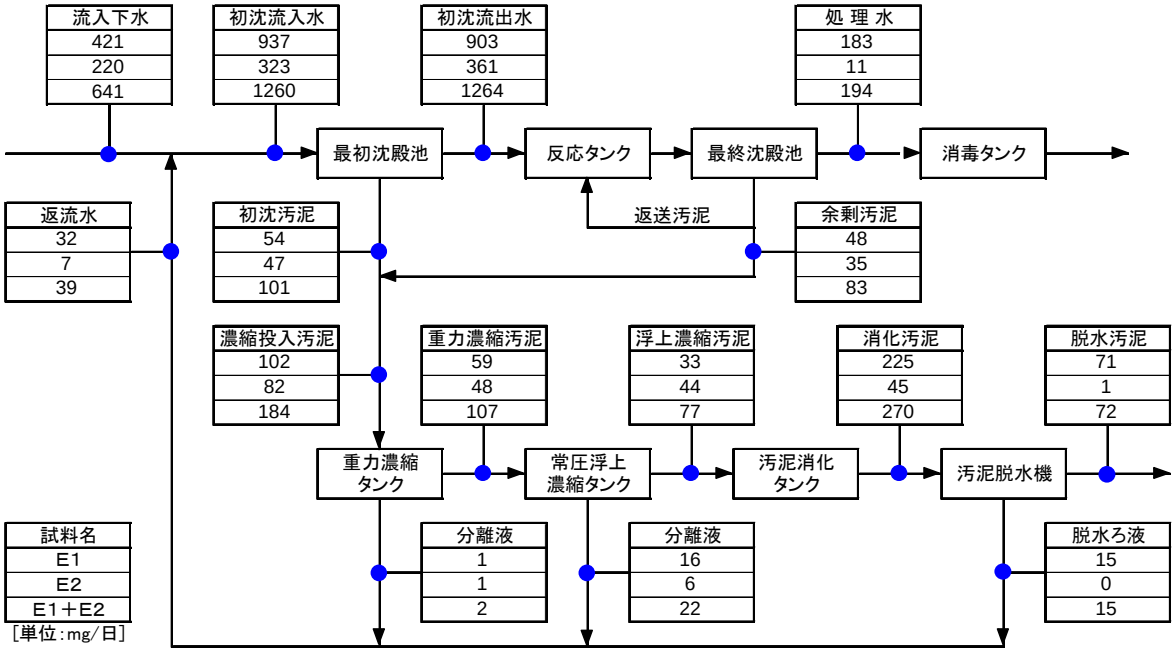
負荷量（泥）[mg/d]＝濃度[ng/L]×汚泥量[m^3/d]（脱水汚泥以外）
＝濃度[ng/g]×汚泥量[t/d]（脱水汚泥）……（**式 2-3-2**）

なお、返流水の負荷量は、重力濃縮分離液、並びに、常圧浮上濃縮分離液、脱水ろ液の濃度および水量から、それぞれの負荷量を算出した後、合算して求めた。ただし、重力濃縮分離液は現地で採取できなかったため、重力濃縮汚泥の遠心分離上澄液の濃度とした。また、汚泥消化タンクの脱離液は、調査当日の水量がゼロであったため、考慮しなかった。

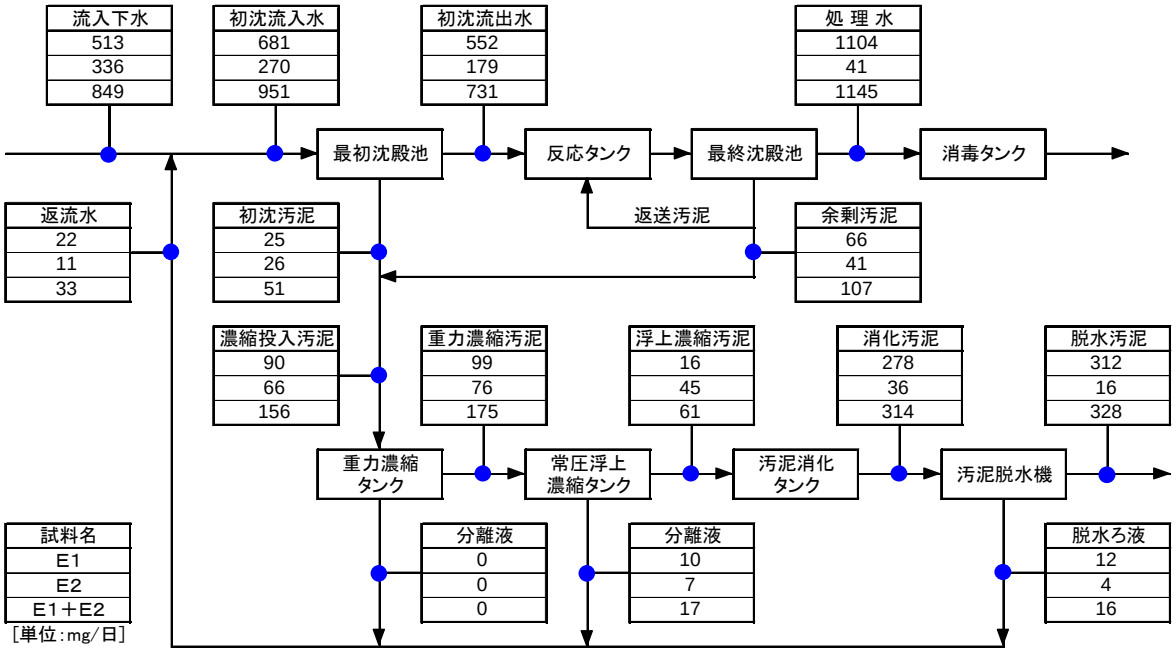
表 2-3-1　各処理工程におけるエストロゲン濃度の測定結果

試料名		E1	E2	E3
水処理工程	流入下水	35	19	427
	[ng/L]	41	27	303
	初沈流入水	74	26	336
	[ng/L]	52	21	307
	初沈流出水	73	29	440
	[ng/L]	43	14	256
	処理水	15	0.9	＜0.5
	[ng/L]	87	3.2	＜0.5
汚泥処理工程	初沈汚泥	255	223	351
	[ng/L]	102	107	111
	余剰汚泥	204	148	149
	[ng/L]	311	192	＜0.5
	重力濃縮汚泥	136	111	964
	[ng/L]	217	168	128
	浮上濃縮汚泥	779	1,027	3,044
	[ng/L]	368	1,004	390
	嫌気性消化汚泥	2,467	495	4,702
	[ng/L]	2,558	326	420
	脱水汚泥	6.2	0.1	18
	[ng/g]	25	1.3	不検出
返流水	浮上濃縮分離液	42	15	354
	[ng/L]	25	17	200
	脱水ろ液	164	1.2	954
	[ng/L]	112	32	181

注1）上段は高水温期、下段は低水温期の調査結果
注2）脱水汚泥は、湿重量1gあたりの含有濃度[ng/g]である。



(a) 高水温期調査



(b) 低水温期調査

図 2-3-1　E1 および E2 の負荷量の挙動

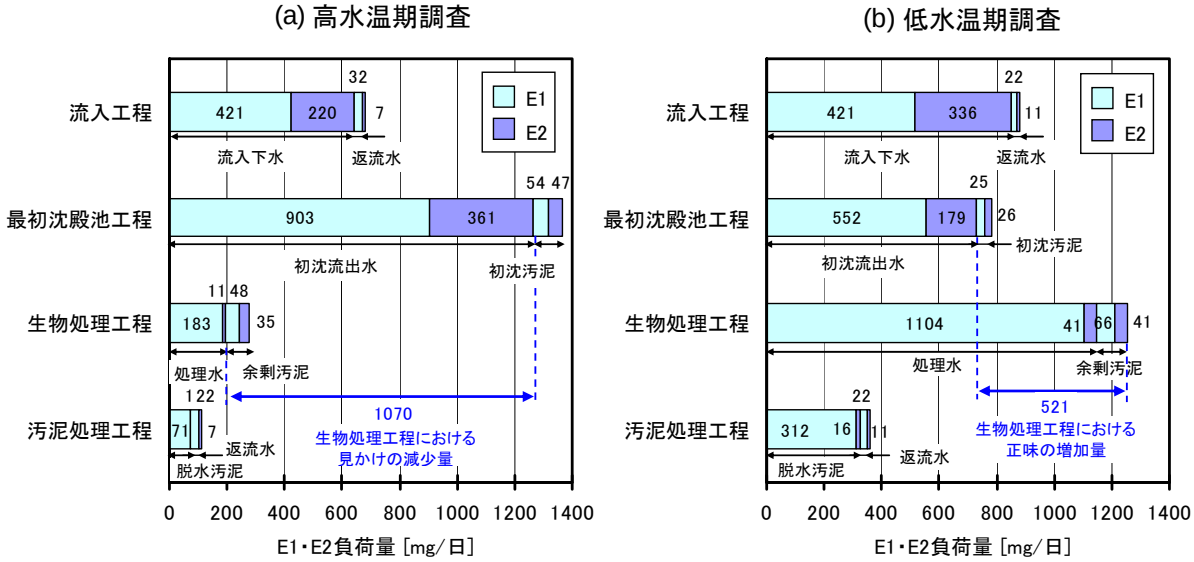


図 2-3-2　E1 および E2 の処理工程別の負荷量の変化

（１）水処理工程における挙動

高水温期（反応タンク水温 22.5℃）の調査では、E1 の処理水濃度（15ng/L）は、流入下水濃度（35ng/L）や初沈流出水濃度（74ng/L）よりも低く、流入下水に対する処理水における除去率（以下、総合除去率という）は 57%、初沈流出水に対する処理水における除去率、すなわち、反応タンクから最終沈殿池までの生物処理工程における除去率（以下、生物処理工程除去率という）は 79%であった。また、E2 の総合除去率は 95%、生物処理工程除去率は 97%と高く、E2 は水処理工程でほぼ除去されていた。生物処理工程で除去された見かけの負荷量、すなわち、初沈流出水と処理水の負荷量の差は、図 2-3-2(a)に示すとおり、E1 が 720mg/日、E2 が 350mg /日で、E1 と E2 を合わせた負荷量（以下、ES 負荷量という）の差は 1070mg/日であった。一方、余剰汚泥として水処理工程から除去され、汚泥処理工程に移行した負荷量は、E1 が 48mg/日、E2 が 35mg/日であり、ES 負荷量は 83mg/日であった。すなわち、汚泥処理工程に移行した ES 負荷量は、生物処理工程で除去された見かけの ES 負荷量の約 8%に過ぎなかった。反応タンクにおける有機物質の除去過程として、生物学的な分解や余剰汚泥による系外除去のほか、エアレーションによる大気中への揮発・放散がある。しかし、一般的にヘンリー定数が 10^2 Pa･m^3/mol 以上の物質は揮発・放散により除去され得ると考えられるのに対して、E1 および E2 のヘンリー定数は、それぞれ 6.83×10^{-2}、6.94×10^{-2} Pa･m^3/mol と非常に小さく、揮発・放散による大気への移行はほとんどないと考えてよい [5]。以上のことから、下水処理過程における E1 や E2 の除去は、主に生物学的な分解によるものといえる。

低水温期（反応タンク水温 16.5℃）の調査では、E1 の処理水濃度（87ng/L）は、流入下水濃度（41ng/L）や初沈流出水濃度（43ng/L）と比べて 2 倍以上高く、生物処理工程において、E1 濃度の上昇が認められた。また、E2 は、総合除去率が 88%、生物処理工程除去率が 77%であり、高水温期の調査と比較して低かった。ここで、E1 は E2 の酸化体で

あり、E1 と E2 は相互に形態が変化すると考えられるため、生物処理工程における E1 の増加の理由の一つとして、E2 からの E1 への変換が挙げられる [6),7)]。しかし、図 2-3-2(b)から分かるように、生物処理工程の前後で増加した正味の E1 の負荷量、すなわち、処理水と余剰汚泥の負荷量から初沈流出水の負荷量を差し引いた量は 618mg/日であるのに対して、生物処理工程の前後で減少した正味の E2 の負荷量は 97mg/日であり、増加した E1 の負荷量は、減少した E2 の負荷量を大きく上回っていた。したがって、生物処理工程における E1 の増加は、E2 から E1 への形態の変化のみでは説明ができず、E2 以外の物質から E1 への変換が生じているものと考えられる。すなわち、人が排泄するエストロゲンの大部分は抱合体の形態で存在し、その一部は下水管渠中などで脱抱合を受け、遊離体に分解されるが、流入下水中には各種のエストロゲン抱合体が数十～数百 ng/L のオーダーで存在している [8),9)]。また、エストロゲン抱合体は、活性汚泥処理により脱抱合を受けて、遊離体に分解されることが報告されている [6),10)]。そこで、図 2-3-3 に示すとおり、生物処理工程における E1 の増加は、E2 から E1 への形態変化に加えて、E1 抱合体から E1 への形態変化や、E2 抱合体から E2 への形態変化とそれに続く E2 から E1 への形態変化が関与しているものと考えられる。一方、E1 の分解速度は、E2 から E1 への分解速度よりも遅く、例えば、Joss ら [11)] は、標準活性汚泥法を用いた回分処理実験の結果から、式 2-3-3 において、E1 の分解速度定数 k_1 は 162±25L/(g-SS･日)、E2 の分解速度定数 k_2 は 350±42L/(g-SS･日)と報告している。以上のことから、生物処理工程における E1 の増加は、E1 の分解速度が E2 の酸化や抱合体からの形態変化の速度よりも遅いためと推察される。

$$r = -k \cdot X \cdot C \qquad \text{（式 2-3-3）}$$

ここで、r　：分解速度［ng/(L･日)］
k　：反応速度定数［L/(g-SS･日)］
X　：活性汚泥濃度［g-SS/L］
C　：エストロゲン濃度［ng/L］

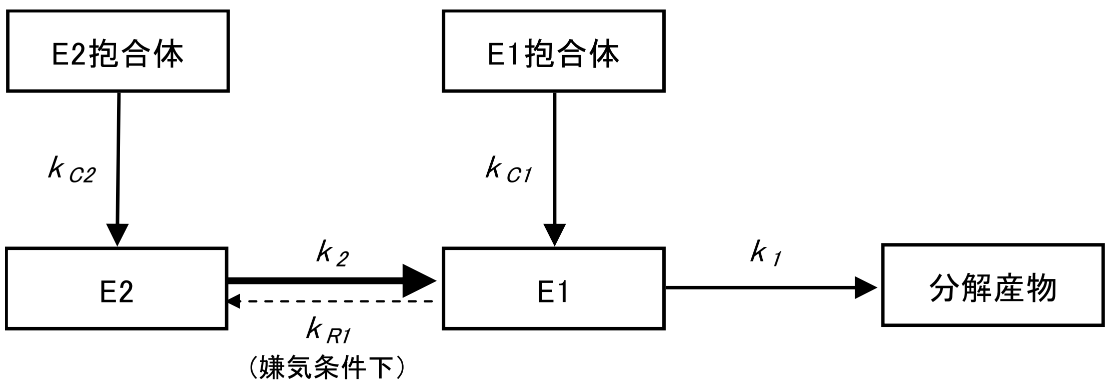


図 2-3-3　活性汚泥処理におけるエストロゲンの分解経路の概念図

一方、生物処理工程の前段、すなわち、下水処理場への流入より最初沈殿池からの流出までの工程においても、低水温期調査での E2 を除いて、エストロゲンの負荷量が増加する傾向が認められた。最初沈殿池におけるエストロゲンの増加は、Ternes ら [12]も同様に報告をしており、ポンプ井や最初沈殿池などで下水が滞留する間にも、流入下水中のエストロゲンの形態の変化が生じているものと考えられる。なお、最初沈殿池におけるエストロゲンの増加には、汚泥処理施設からの返流水による影響も考えられるが、次に示すとおり、その影響は小さいものと考えられる。

（２）汚泥処理工程における挙動

汚泥中の E2 の負荷量は、汚泥処理の各工程で減少する傾向にあり、汚泥処理工程全体、すなわち、初沈汚泥および余剰汚泥として流入した負荷量と脱水汚泥および返流水として排出された負荷量を比較すると、高水温期の調査では約 99%、低水温期の調査では約 70%の減少が見られた。一方、汚泥中の E1 の負荷量は、重力濃縮工程、常圧浮上濃縮工程では減少する傾向にあったが、嫌気性消化工程で大幅な増加が見られた。すなわち、常圧浮上濃縮汚泥中の負荷量は、高水温期調査では 33mg/日、低水温期調査では 16mg/日であるのに対して、消化汚泥中の負荷量は、前者では 225mg/日、後者では 278mg/日と増加した。このような嫌気性消化工程における E1 の増加も、水処理工程における E1 の増加と同様に、E2 から E1 への変換に加え、E1 や E2 の抱合体からの変換が関与しているものと考えられる。

汚泥処理施設から水処理施設への返流水量（500～522m^3/日）は、流入下水量（11,890～12,500m^3/日）の 4.2%、また、返流水の有機物（COD_{Mn}）負荷量（124～143kg/日）は、流入下水の有機物負荷量（1,156～1,375kg/日）の 2.6～2.9%であった。これに対して、エストロゲンの流入下水の負荷量に対する返流水の負荷量は、E1 が 5.5～7.6%、E2 が 3.2～3.3%であり、下水量や有機物負荷量と比較して、E1 は 2～3 倍程度、E2 はほぼ同程度の負荷割合であった。また、汚泥脱水工程では、E1、E2 の負荷量の大部分が脱水汚泥へ移行し、脱水ろ液に移行する負荷量は、脱水汚泥に移行する負荷量の約 5～20 分の 1 であった。以上のことから、汚泥処理工程においては、E1 や E2 は主に固形物（汚泥）側へ移行しており、返流水による水処理工程への影響は小さいものと考えられる。

２．３．２　実施設における反応タンク内でのエストロゲンの消長

反応タンクのプロファイル試験におけるエストロゲン濃度の測定結果を**表 2-3-2** に、エストロゲンの負荷量の挙動を**図 2-3-4** に示す。**表 2-3-2** では、汚泥試料のエストロゲン濃度について、遠心分離上澄液と沈殿物の測定結果をそれぞれの容積で補正して、汚泥試料 1L あたりの水（液相）中および汚泥（固相）中の濃度で表した。また、**図 2-3-4** では、中央より右側に水中、左側に汚泥中の負荷量を示した。負荷量は、前述した**式 2-3-1** および**式 2-3-2** により求めた。なお、エストロゲン濃度が検出下限値未満の場合の負荷量は 0 とした。

表 2-3-2　プロファイル試験の測定結果

試料名	E1 [ng/L]		E2 [ng/L]		E3 [ng/L]	
	水（液相）	汚泥（固相）	水（液相）	汚泥（固相）	水（液相）	汚泥（固相）
初沈流出水	67	---	12	---	230	---
返送汚泥	61	181	3.2	202	<0.5	<0.5
反応タンク第１槽	137	49	37	34	92	<0.5
反応タンク第２槽	28	85	3.7	89	<0.5	<0.5
反応タンク第３槽	40	63	2.2	69	<0.5	<0.5
反応タンク第４槽	36	52	1.0	45	<0.5	<0.5
処理水	80	---	2.7	---	<0.5	---

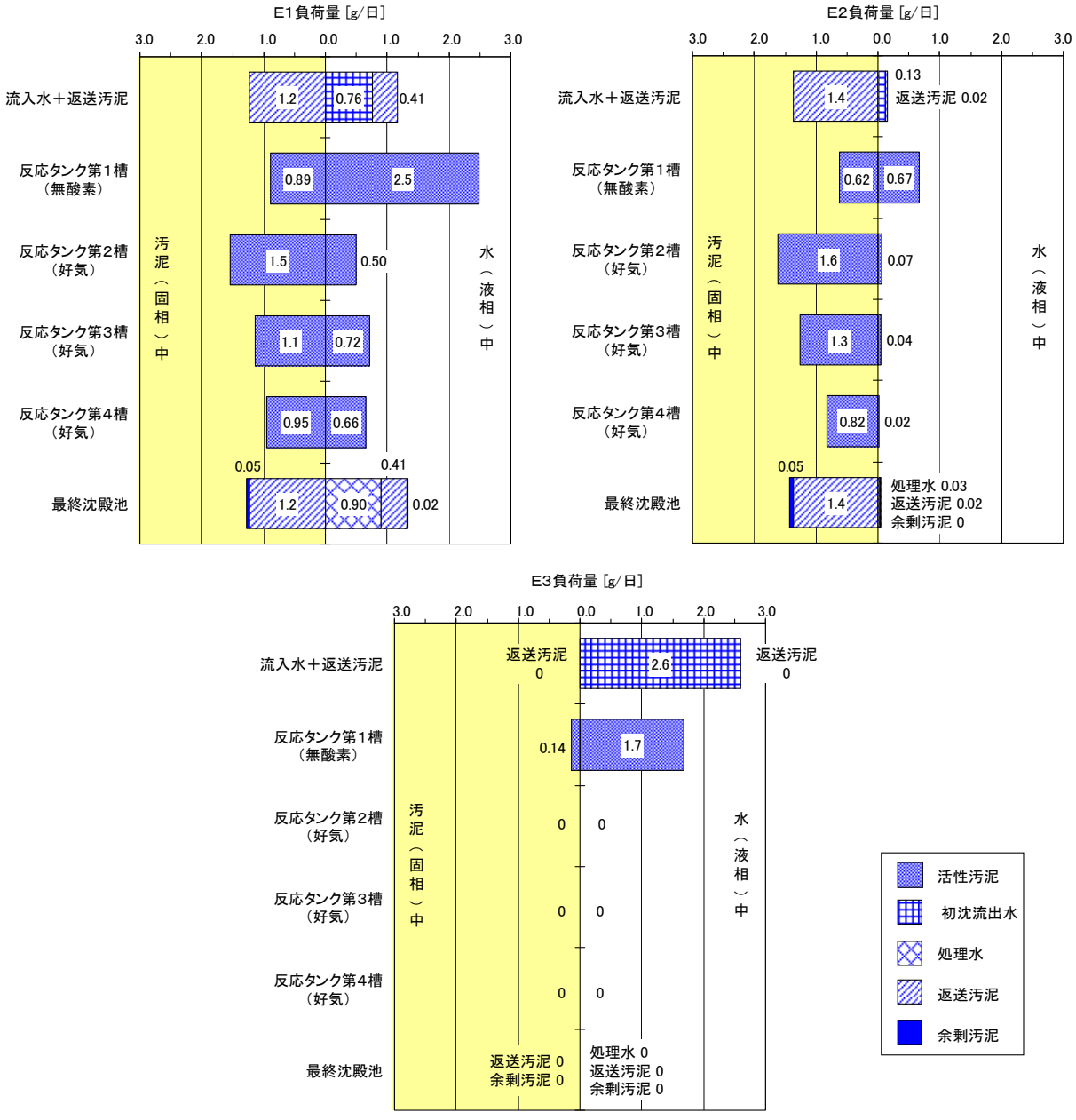


図 2-3-4　反応タンクにおけるエストロゲンの負荷量の挙動

反応タンク第１槽に流入する負荷量のうち、返送汚泥に起因する負荷量は、E1では68%、E2 では 91%を占めていた。E1、E2 ともに、最終沈殿池において、余剰汚泥として系外に引き抜かれ、除去される量はごくわずかであり、反応タンクと最終沈殿池の間で系内を循環する量の占める割合が大きかった。

反応タンク第 1 槽では、E1、E2 ともに、第 1 槽に流入する負荷量に対して、水中の負荷量が増加し、汚泥中の負荷量が減少した。一方、続く反応タンク第 2 槽では、逆に水中の負荷量が減少し、汚泥中の負荷量が増加した。反応タンク第 1 槽での水中の E1 の増加量（1.3g/日）は、汚泥中の E1 の減少量（0.34g/日）や水中および汚泥中の E2 の減少量（0.25g/日）の 4～5 倍程度大きく、E1 の固液間の移動や E1・E2 相互の形態変化のみでは説明できなかった。また、反応タンク第 2 槽における汚泥中の E2 の増加量（1.0g/日）は、水中の減少量（0.60g/日）を上回っており、E2 の固液間の移動のみでは説明できなかった。したがって、反応タンク第 1 槽や第 2 槽で認められた E1 や E2 の増加は、前項で考察したように、下水中に存在するエストロゲン抱合体からの形態変化（脱抱合）が主な原因と考えられる。また、反応タンク前段の第 1 槽や第 2 槽で E1 や E2 の増加が生じていたことから、エストロゲン抱合体の形態変化は、下水と活性汚泥の接触後、比較的速やかに進行するものと推察される。このことは、17β－エストラジオール－17(β－D－グルクロニド) 1.65μg/L（＝E2 として 1μg/L に相当）を活性汚泥に添加した回分処理実験において、5 分後に約 30%が E2、約 50%が E1 として検出され、24 時間後には E1、E2 ともに検出下限値以下となったとの報告[6)]からも首肯される。

反応タンク第 2 槽から第 4 槽では、E2 の水中の負荷量はごくわずかで、E2 は主に汚泥中に存在していた。また、水中および汚泥中の負荷量ともに、第 2 槽から第 4 槽へと処理が進むのに伴って減少し、第 2 槽から第 4 槽の間で、水中と汚泥中を合わせて約 50%の負荷量の減少が認められた。一方、E1 は、水中および汚泥中の両方に存在し、E2 と比較して、水中に高く残存する傾向にあった。また、第 2 槽から第 4 槽の間での E1 負荷量の減少は、水中と汚泥中を合わせて約 14%に過ぎず、E2 と比較して減少量が少なかった。

反応タンク各槽における E1 および E2 の水相と汚泥相の間の分配係数（以下、水－汚泥分配係数という）を**図 2-3-5** に示す。ここで、水－汚泥分配係数 K_d は、**式 2-3-4** のとおり定義される[13)]。

$$K_d = \mathrm{Cs} / \mathrm{Cw} \quad \cdots\cdots \quad (\text{式 2-3-4})$$

ここで、K_d　：水－汚泥分配係数［L/g-MLSS］
　　　　Cw　：水中のエストロゲン濃度［ng/L］
　　　　Cs　：汚泥中のエストロゲン濃度［ng/g-MLSS］

第 1 槽では、上述したとおり、E1、E2 ともに、エストロゲン抱合体からの形態変化により水中の濃度が高くなったため、E1、E2 の K_d は、それぞれ 0.02L/g-MLSS、0.06 L/g-MLSS といずれも低い値となった。これに対して、第 2 槽の K_d は、第 1 槽と比較して E1、E2 ともに高くなったが、E1 の K_d は 0.21 L/g-MLSS であるのに対して、E2 の K_d

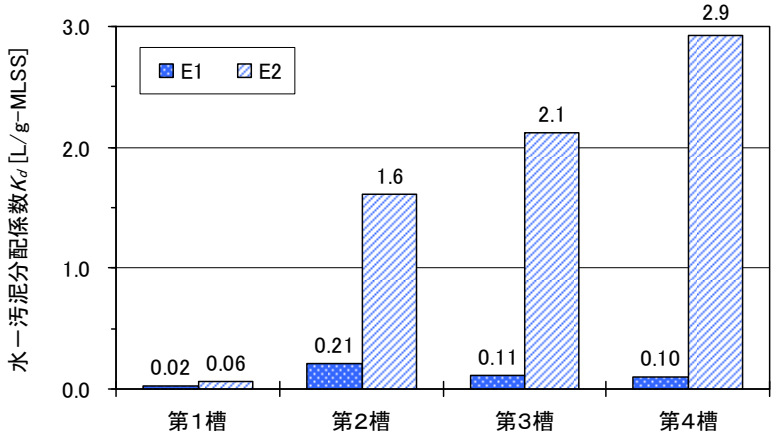


図 2-3-5　反応タンク各槽におけるエストロゲンの水－汚泥分配係数

は 1.6 L/g-MLSS であり 1 桁の違いがみられた。第 2 槽の K_d は、Urase ら[14]が活性汚泥を用いた回分処理実験（水温 20℃、MLSS 濃度 2663mg/L、溶解性 TOC 濃度 144mg/L、初発 pH6.7）より求めた E1、E2 の K_d の値（E1：0.170L/g-MLSS、E2：1.506L/g-MLSS）に近かった。第 3 槽、第 4 槽では、E1 の K_d はいずれも第 2 槽の 2 分の 1 程度の値（0.10～0.11 L/g-MLSS）であったが、E2 の K_d は、第 3 槽では 2.1 L/g-MLSS、第 4 槽では 2.9 L/g-MLSS と増加する傾向にあった。

このように本調査の結果から、下水処理工程における E1、E2 の挙動には、前項に示したエストロゲン抱合体からの形態変化やエストロゲンの分解速度の違いに加えて、E1、E2 の水相から汚泥相への移行性（汚泥相への吸着性）が大きく影響することが明らかとなった。すなわち、E1 は、E2 と比較して K_d が小さく、汚泥相に吸着、移行し難いため、水中に残留され易く、水中の濃度が高いのに対して、E2 は、E1 と比較して K_d が大きく、汚泥相に吸着、移行し易いため、水中から除去され易く、水中の濃度が低くなるものと考えられる。このことは、化学物質の疎水性を表す物理化学的指標であるオクタノール/水分配係数（Log K_{ow}）が、E1 は 3.43、E2 は 3.94 であり[5]、E1 よりも E2 の方が疎水性が高いこととも合致している。

また、反応タンクに続く最終沈殿池では、E1、E2 ともに、水中および汚泥中の負荷量が増加した。上述したとおり、エストロゲン抱合体の脱抱合反応は、反応タンク前段で比較的速やかに進行するものと推察されるが、下水中には分解速度の異なる各種の形態のエストロゲン抱合体が存在し[8),9)]、その活性汚泥中の半減期として、グルグロン酸抱合体では 6 時間程度、硫酸抱合体では 2.5 日程度との報告もある[6]。そこで、反応タンクで分解されず水中に残留するエストロゲン抱合体が、最終沈殿池で滞留する間（約 6 時間）に脱抱合され、負荷量が増加したものと推察される。

一方、水中の E3 は、反応タンク第 1 槽で約 40%減少し、第 2 槽以降では検出されなかった。また、汚泥中では、第 1 槽でのみ検出され、第 2 槽以降では全く検出されなかった。E3 は、反応タンクへの流入後、速やかに分解・除去され、汚泥中にも残留しないことが明らかとなった。

２．３．３　パイロットプラント実験によるＳＲＴの影響の検討

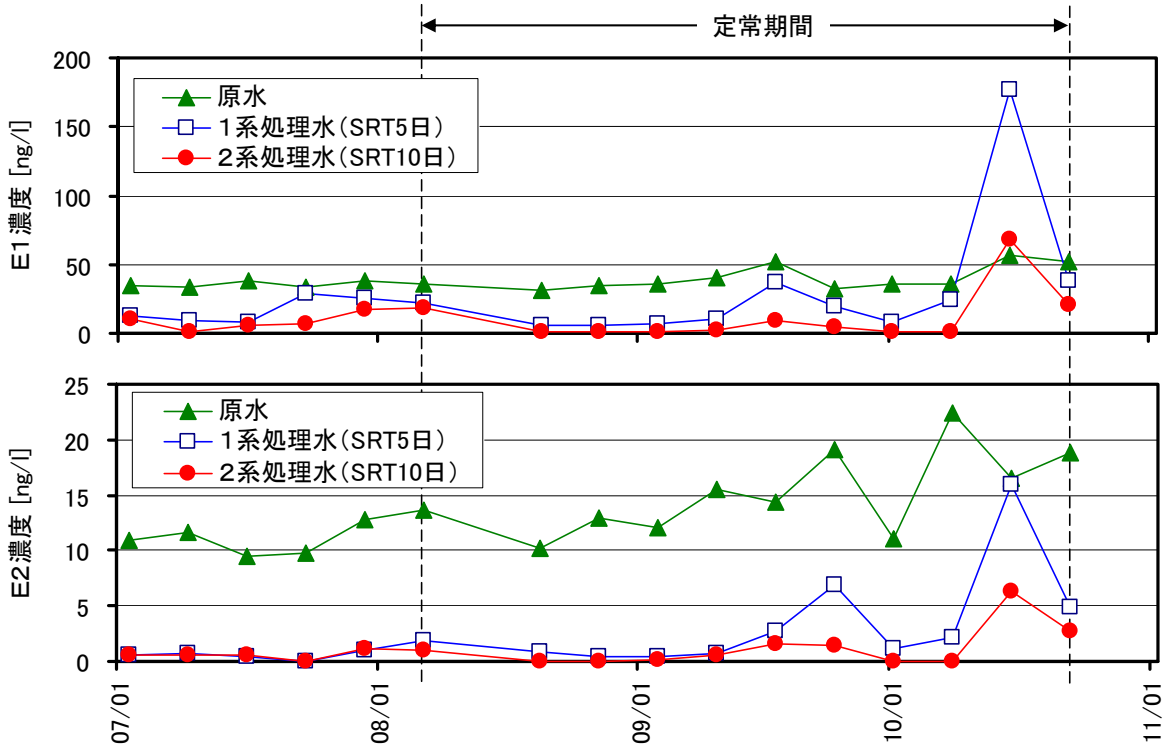
パイロットプラント実験における実験原水および処理水のエストロゲン濃度の推移を**図 2-3-6 (a)**に、反応タンク第 4 槽の活性汚泥中のエストロゲン含有濃度の推移を**図 2-3-6 (b)**に、エストロゲン濃度および除去率の中央値および範囲（最小値～最大値）を**表 2-3-3** にそれぞれ示す。なお、**表 2-3-3** は、第 1 系列（SRT：5 日）、第 2 系列（SRT：10 日）ともに、設定した SRT でおおむね定常状態に達したと考えられる、第 2 系列の SRT の約 3 倍[4)]（＝30 日）の運転期間が経過した 8 月 6 日から実験終了の 10 月 22 日までの間（以下、定常期間という）の数値を示した。また、定常期間中の流入原水中の水温は 19.5℃～25.5℃（中央値 22.8℃）、MLSS 濃度は、第 1 系列が 580～1,820mg/L（中央値 935 mg/L）、第 2 系列が 1,265～2,515mg/L（中央値 1,565mg/L）であった。

表 2-3-3　エストロゲン濃度および除去率の範囲

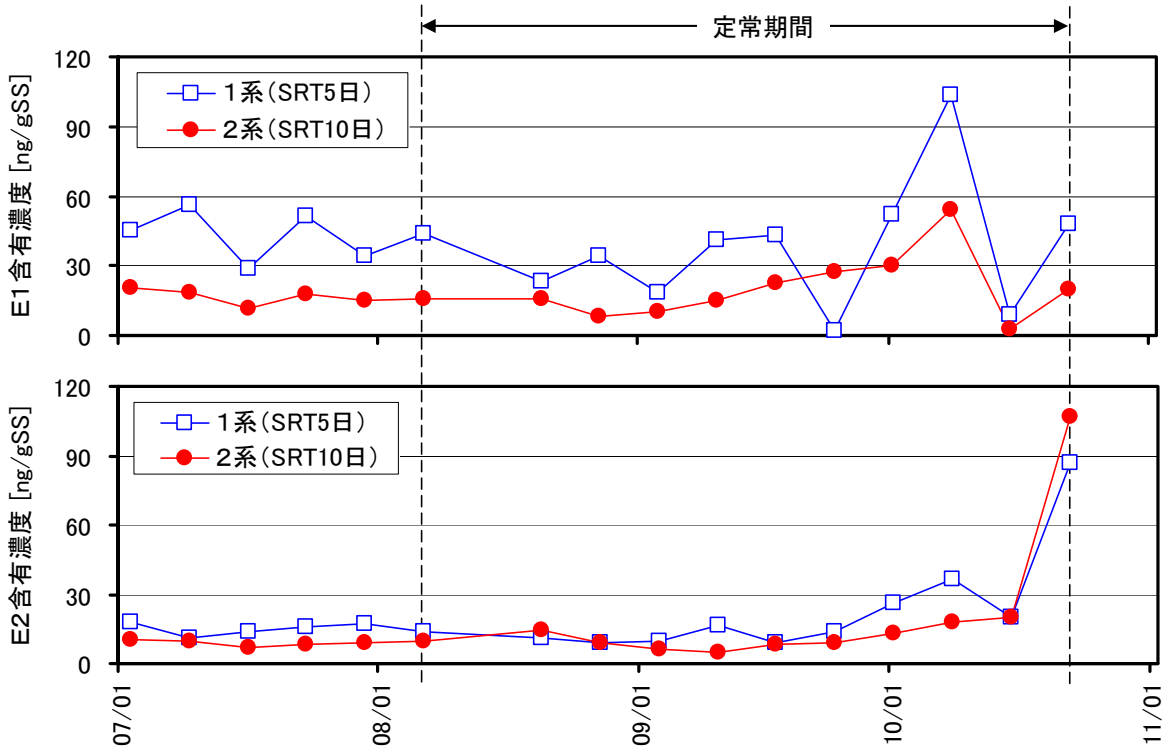
	実験原水濃度	処理水濃度		活性汚泥含有濃度		除去率	
		第1系列（SRT5日）	第2系列（SRT10日）	第1系列（SRT5日）	第2系列（SRT10日）	第1系列（SRT5日）	第2系列（SRT10日）
	[ng/L]	[ng/L]	[ng/L]	[ng/g-SS]	[ng/g-SS]	[%]	[%]
E1	36（31～56）	20（5.2～177）	1.9（0.8～68）	41（2.3～103）	16（2.4～55）	40（-215～85）	95（-21～98）
E2	14（10～22）	1.9（<0.5～16）	0.6（<0.5～6.4）	14（9.0～87）	9.7（5.1～107）	89（4～96<）	95（62～98<）

SRT の長い第 2 系列は、SRT の短い第 1 系列と比較して、処理水中のエストロゲン濃度が低く、エストロゲンの除去率は高く安定する傾向がみられ、特に E1 で顕著な差が認められた。すなわち、第 2 系列では、定常期間後半の一部を除き、E2、E1 ともにおおむね安定して除去され、処理水中のエストロゲンの濃度（中央値、以下同じ）は、E2 が 0.6ng/L、E1 が 1.9ng/L と低く、E2、E1 の除去率は、ともに 95%と高かった。一方、第 1 系列では、E2 の処理水中の濃度は 1.9 ng/L、除去率は 89%で、第 2 系列と比較すると若干劣るものの、比較的良好に除去されていた。しかし、E1 の処理水中の濃度は 20ng/L、除去率は 40%であり、第 2 系列と比較して、濃度は約 10 倍、除去率は 2 分の 1 以下であった。

また、活性汚泥中のエストロゲンの含有濃度も、処理水中のエストロゲン濃度と同様に、SRT の長い第 2 系列の方が低く、安定する傾向にあり、第 1 系列では、E2 が 16ng/g-SS（中央値、以下同じ）、E1 が 41ng/g-SS であるのに対して、第 2 系列では、E2 が 9.7ng/g-SS、E1 が 14ng/g-SS であった。なお、両系列とも、定常期間後半の 10 月 15 日に処理水中のエストロゲン濃度が急に上昇し、その後 10 月 22 日の活性汚泥中のエストロゲン含有濃度が高くなっていた。これは、この時期に T_1 処理場での沈砂池洗浄作業に伴う有機物濃度の高い排水が一時的に流入した影響と考えられるが、SRT の長い第 2 系列の方が影響は小さかった。



(a) 実験原水及び処理水



(b) 反応タンク第4槽活性汚泥

図 2-3-6　パイロットプラント実験におけるエストロゲン濃度の推移

本実験では、同一の実下水を用いたパイロットプラントによる比較実験により、SRT とエストロゲンの除去効果について、第 1 章に示した実施設における実態調査と同様な傾向が確認された。すなわち、E2 や E1 の除去効果は、SRT の長い方が高く安定する傾向があり、特に E1 の除去効果に及ぼす影響が大きかった。このように、本実験や実態調査の結果から、下水処理において効率的かつ安定的なエストロゲンの除去を図るためには、反応タンクの SRT が重要な運転条件であることが明らかとなった。

SRT とは、活性汚泥が余剰汚泥および処理水中の浮遊性物質（SS：Suspended Solids）として処理系外に排出されるまでの反応タンク内での平均滞留時間を示すものである。そこで、SRT は、**図 2-3-7** に示す反応タンクおよび最終沈殿池周りの浮遊性物質の物質収支より、**式 2-3-5** の第 2 辺のとおり表される。さらに、処理水中の SS 濃度は低く、その SS 量は、余剰汚泥固形物量と比べて無視できる程度に小さいため、第 3 辺のように近似することができる[15]。

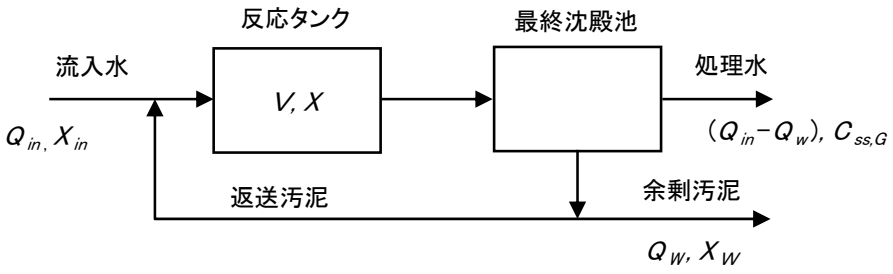


図 2-3-7　反応タンクおよび最終沈殿池周りの物質収支の概念図

$$SRT = \frac{V \cdot X}{Q_w \cdot X_W + (Q_{in} - Q_w) \cdot C_{SS,G}} \cong \frac{V \cdot X}{Q_w \cdot X_w} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \text{（式 2-3-5）}$$

ここで、SRT　：固形物滞留時間［日］
V　：反応タンク容量［m³］
X　：反応タンクの MLSS 濃度［mg/L］
X_w　：余剰汚泥濃度［mg/L］
$C_{SS,G}$　：処理水中の SS 濃度［mg/L］
Q_{in}　：反応タンクの流入水量［m³/日］
Q_w　：余剰汚泥量［m³/日］

また、反応タンク内に活性汚泥中の微生物が保持されるためには、**図 2-3-7** に示す反応タンクおよび最終沈殿池周りの微生物の物質収支より、**式 2-3-6** が成り立つ必要がある。

$$\frac{dX}{dt} \cdot V = Q_{in} \cdot X_{in} - \left[Q_w \cdot X_w + (Q_{in} - Q_W) \cdot C_{SS,G} \right] + V \cdot \mu' \cdot X > 0 \quad \cdots\cdots\cdots\cdots \text{（式 2-3-6）}$$

ここで、X_{in}　：流入水中の微生物濃度［mg/L］
μ'　：微生物の自己分解を考慮した見かけの比増殖速度［1/日］

さらに、流入水中の微生物濃度は 0（X_{in}=0）に近似できるため、式 2-3-6 は式 2-3-7 のように変形できる。

$$\mu' > \frac{Q_w \cdot X_W + (Q_{in} - Q_w) \cdot C_{SS,G}}{V \cdot X} \quad \cdots\cdots（式 2\text{-}3\text{-}7）$$

ここで、式 2-3-7 の左辺は式 2-3-5 の第 2 辺の逆数であることや、一般に微生物の自己分解係数（k_d）は比増殖速度（μ）と比較して小さく、見かけの比増殖速度（$\mu' = \mu - k_d$）は比増殖速度に近似できることから、式 2-3-7 は式 2-3-8 のように変形できる。反応タンク内に特定の微生物が保持され、増殖するためには、SRT と当該微生物の比増殖速度の間に式 2-3-8 の関係が満足されなければならない。

$$\mu > 1/SRT \quad \cdots\cdots（式 2\text{-}3\text{-}8）$$

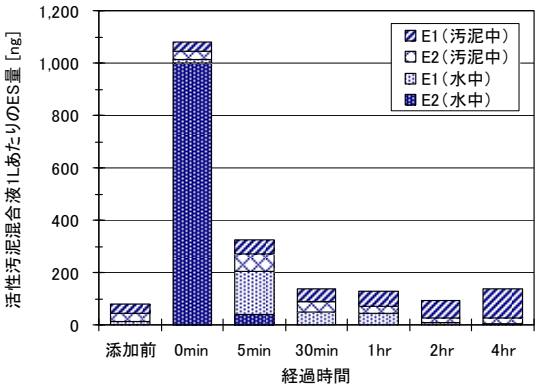
このような SRT の定義あるいは比増殖速度との関係から、SRT がエストロゲンの除去効果に及ぼす影響について、次に示す可能性が示唆される。一つには、式 2-3-5 より、SRT が長いほど、反応タンクの MLSS 濃度は高くなるため、活性汚泥中のエストロゲン分解が可能な微生物の濃度が増加し、エストロゲンの除去効果が高くなる可能性が考えられる。二つには、式 2-3-8 より、SRT が長いほど、より比増殖速度が小さい微生物も反応タンク内に保持することが可能であり、活性汚泥中の微生物叢の多様性が増加し得るため、活性汚泥中のエストロゲン分解が可能な微生物種が増加し、エストロゲンの除去効果が高くなる可能性が考えられる。

２．３．４　回分処理実験によるエストロゲンの除去特性の検討

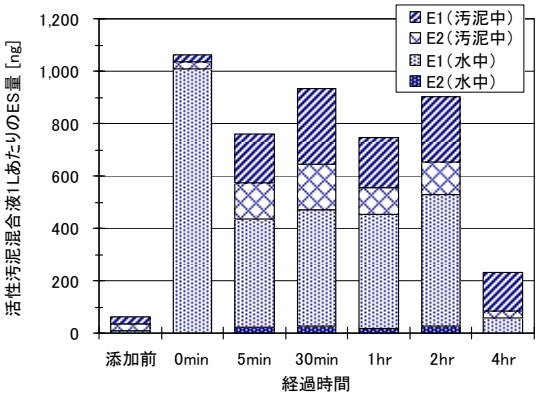
（１）活性汚泥性状による影響

標準法（T_1、S_1）および OD 法（T_2、T_7）の実施設各 2 ヶ所から採取した汚泥を用いた E2 および E1 の回分処理実験（Runs 1）の結果を図 2-3-8 に、供試汚泥採取時の実施設での運転条件、並びに、反応タンク流入水および処理水のエストロゲン濃度等を表 2-3-4 に示す。図 2-3-8 では、遠心分離上澄液と沈殿物の測定結果を沈殿物の容積で補正して、活性汚泥混合液 1L あたりの水（液相）中および汚泥（固相）中のエストロゲン（ES）量で表した。なお、添加直後（0 分）のエストロゲン量は、実験に用いた合成下水中のエストロゲン濃度が検出下限値未満であったことから、添加前（供試汚泥）の水中のエストロゲン量に添加したエストロゲン量（1μg＝1,000ng）を加えた値とした。

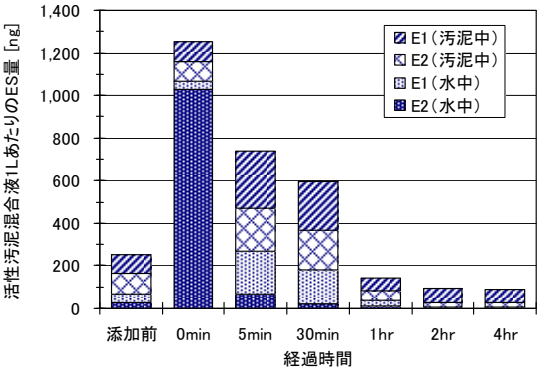
回分処理実験における E2 の挙動は、供試汚泥の種類に関わらず、概ね同じ傾向を示した。すなわち、E2 は、添加後急速に水中から除去され、添加 5 分後には、添加した E2 の 94%～98%が水中から除去された。また、添加 5 分後には、水中および汚泥中の E1 の増加が見られ、E2 から E1 への変換が生じていることが確認された。しかし、添加 5 分後の水中および汚泥中の E2 および E1 の総量は、添加した E2 の量を下回っており、E2 から E1 への変換後直ちに E1 の分解も進行することが明らかとなった。



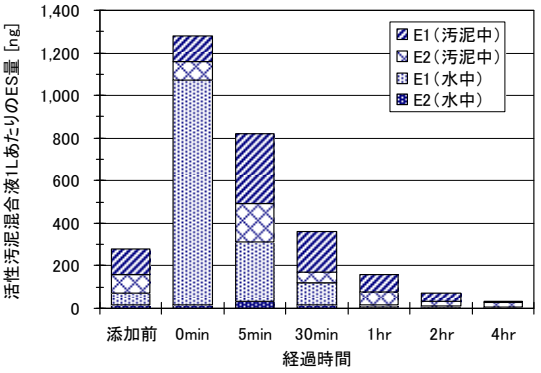
(a) Run1-1-1　T_1（標準法）　E2添加



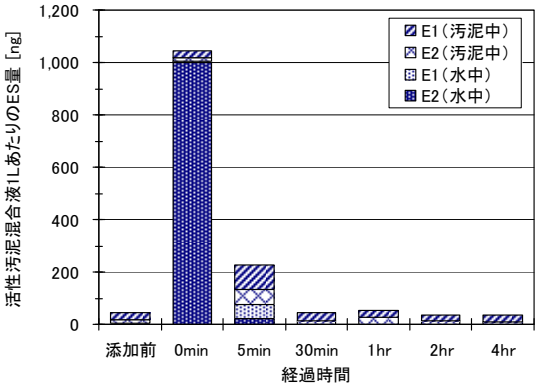
(b) Run1-1-2　T_1（標準法）　E1添加



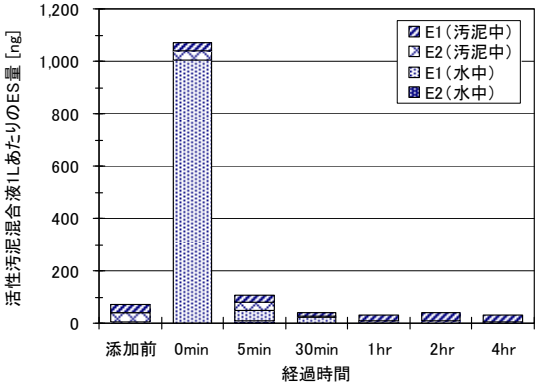
(c) Run1-2-1　S_2（標準法）　E2添加



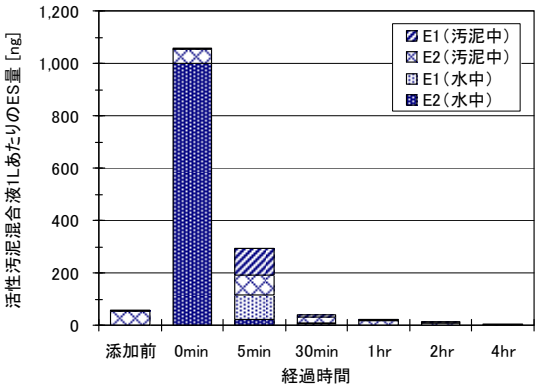
(d) Run1-2-2　S_2（標準法）　E1添加



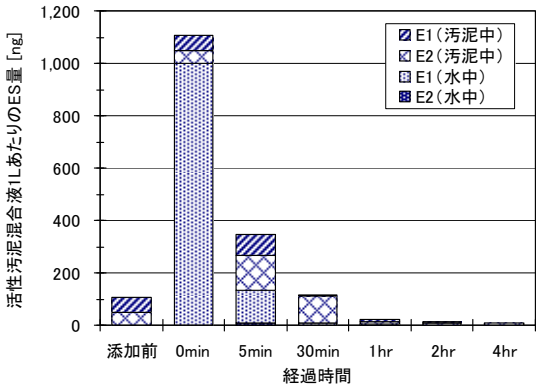
(e) Run1-3-1　T_2（OD法）　E2添加



(f) Run1-3-2　T_2（OD法）　E1添加



(g) Run1-4-1　T_7（OD法）　E2添加



(h) Run1-4-2　T_7（OD法）　E1添加

図 2-3-8　回分処理実験（Runs1）におけるエストロゲン量の挙動

表 2-3-4　供試汚泥採取時の運転条件およびエストロゲン濃度

Run	処理場名	処理方式	HRT [h]	SRT [日]	流入水濃度 [ng/L]		処理水濃度 [ng/L]		除去率 [%]	
					E2	E1	E2	E1	E2	E1
1-1-1	T_1	標準法	8.5	5.5	11	66	1.9	80	83	-21
1-1-2										
1-2-1	S_2	標準法	8.9	9.2	12	68	<0.5	22	98	68
1-2-2										
1-3-1	T_2	OD法	42	28	8.9	21	<0.5	9.0	97	57
1-3-2										
1-4-1	T_7	OD法	27	15	5.8	40	<0.5	0.6	95	99
1-4-2										

注）流入水濃度は、標準法では初沈流出水、OD法では流入下水の濃度

一方、回分処理実験における E1 の挙動は、供試汚泥による違いが認められた。OD 法の汚泥では、回分処理実験における E2 の挙動と同様な傾向を示し、添加した E1 は、添加後急速に水中から除去され、5 分後には 84～96%が、1 時間後には 99%以上が除去された。これに対して、処理水中の E1 濃度（80ng/L）が流入水中の濃度（66ng/L）を上回っていた標準法 T_1 の汚泥では、添加 5 分後には、添加した E1 の約 40%が水中に、約 20%が汚泥中に残存していた。その後 30 分～2 時間の間では E1 の減少は認められず、4 時間経過後にも、添加した E1 の約 6%が水中に、約 15%が汚泥中に残存していた。また、標準法 S_1 の汚泥では、添加 1 時間後には、OD 法の汚泥と同様、添加した E1 の 99%以上が水中から除去されていたが、5 分後には約 60%、30 分後には約 30%が水中および汚泥中に残存しており、OD 法の汚泥と比較して、E1 の除去が遅い傾向にあった。このように E1 の回分処理実験では、実施設での E1 の除去性能と合致した E1 の挙動の違いが認められた。すなわち、処理水中の E1 濃度が高い標準法の汚泥は、処理水中の E1 濃度が低い OD 法の汚泥と比較して、E1 の水中からの除去（汚泥中への移行）、汚泥中での分解のいずれも遅く、E1 が残留する傾向が認められた。

活性汚泥処理によるエストロゲンの除去は、流入するエストロゲン濃度や共存する有機物の濃度、反応タンクの活性汚泥濃度や温度、溶存酸素濃度など、種々の条件の影響を受ける [5]。これに対して、本研究では、供試汚泥以外は全て同一の条件下で実験を行ったことから、標準法と OD 法の汚泥の間でみられたエストロゲンの除去特性の違いは、主に両法の活性汚泥性状の違いに起因すると考えられる。ここで、活性汚泥処理によるエストロゲンの除去は、活性汚泥フロックへの吸着と活性汚泥微生物による分解の 2 つの過程を経るが、このいずれも SRT の影響を受けるものと考えられる。後者については、さきに前項 2.3.3 で考察したとおり、活性汚泥に保持されるエストロゲン分解微生物の存在量や多様性の観点から、SRT の長い方が有利といえる。一方、前者に大きな影響を及ぼす活性汚泥フロックの物理化学的な性質も、SRT の影響を受けるものと考えられる。例えば、SRT の増加に伴って、活性汚泥フロックの粒子径が小さくなることや [16]、活性汚泥フロック表面に細胞外高分子物質（EPS：Extracellular Polymeric Substances）が堅固に結合すること

[17]などが報告されている。これに対して、活性汚泥フロックの粒子径の小さい方が、水相との接触面積が増大し、エストロゲンの水－汚泥分配係数が大きくなる（汚泥への吸着が高まる）ことが明らかとなっており[18),19)]、また、エストロゲンなどの物質はEPSと結合することにより、活性汚泥フロックに捕捉されるものと推察される[19)]。したがって、エストロゲンの活性汚泥への吸着の面からも、SRTの長い方が有利であることが示唆される。

活性汚泥処理における有機物の除去については、一般的に**式 2-3-9** に示す1次反応に従うことが知られており、エストロゲンの除去についても、**式 2-3-9** に従うとの報告が多く見られる[20),21),22)]。

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C \quad \cdots\cdots (式\ 2\text{-}3\text{-}9)$$

ここで、C　：水中の有機物濃度またはエストロゲン濃度［mg/L］
k　：反応速度定数［1/h］
t　：時間［h］

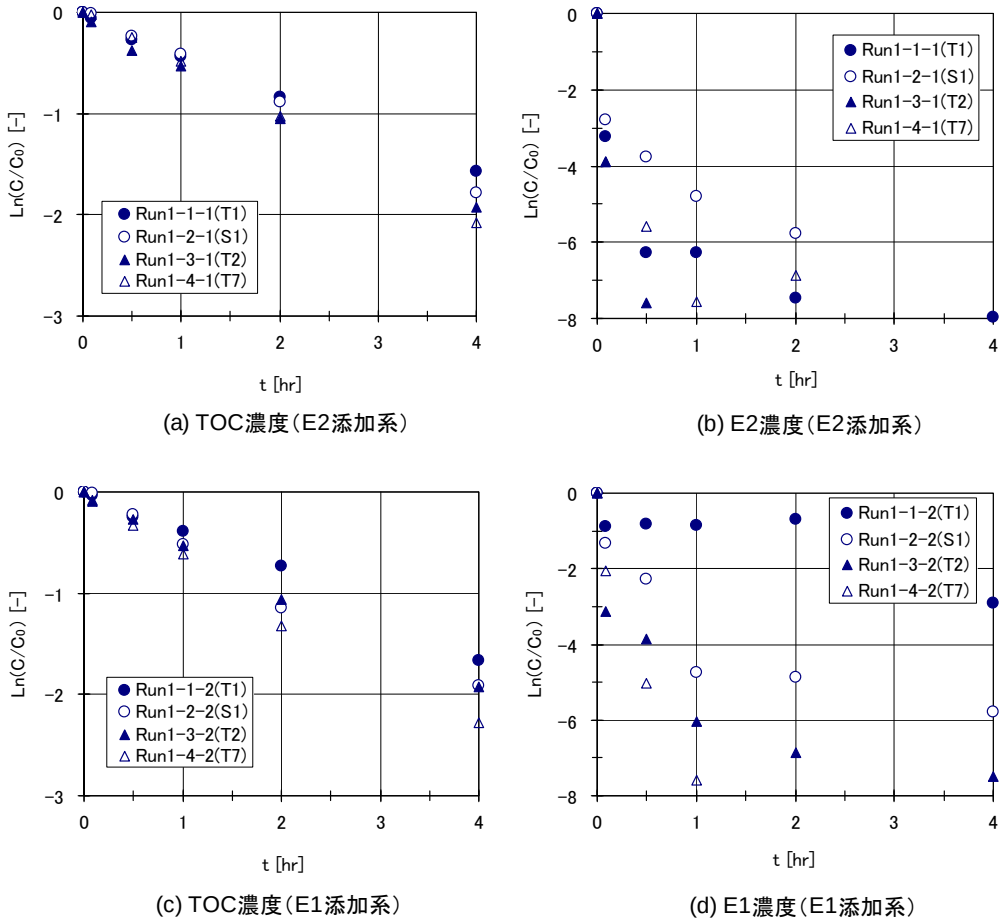
また、**式 2-3-9** は、**式 2-3-10** のように変形できるため、水中の有機物等の除去が1次反応に従うものであれば、その初発濃度（C_0）に関わり無く、Ln（C/C_0）対tのプロットは直線関係で表される。

$$Ln(C/C_0) = -k \cdot t \quad \cdots\cdots (式\ 2\text{-}3\text{-}10)$$

ここで、C_0　：水中の初発有機物濃度または初発エストロゲン濃度［mg/L］

本研究における水中の有機物（TOC）およびエストロゲンの濃度変化について、Ln（C/C_0）対tのプロットを**図 2-3-9** に示す。

有機物については、**図 2-3-9(a)**および(c)に示すように、供試汚泥によって直線の傾き、すなわち、反応速度定数に違いがみられるものの、いずれの実験条件においても、tとLn（C/C_0）の間に直線関係が認められ、本研究においても、有機物の除去は1次反応に従っていることがわかる。一方、エストロゲンについては、**図 2-3-9(b)**および(d)に示すように、処理開始（0分）から5分までの間の傾きが、5分以降の傾きと比較して著しく大きく、tとLn（C/C_0）の間には直線関係が認められず、エストロゲンの除去は1次反応で表すことができなかった。このような本研究と既往研究におけるエストロゲンの除去に関する違いは、その実験条件の違いによるものと考えられる。すなわち、既往研究の多くは、初発濃度として数十μg/L～数十mg/Lのエストロゲンを、唯一の炭素源およびエネルギー源として添加しており、エストロゲン自体を炭素源およびエネルギー源として利用した場合の除去であることから、有機物除去の場合と同じ1次反応に従ったものと考えられる。これに対して、本研究では、既往研究と比較して下水中の濃度により近い初発濃度 1000ng/L（1μg/L）のエストロゲンを、下水中と同程度の濃度の有機物（BOD_5で約200mg/L）とともに添加している。そこで、本研究の実験条件は、きわめて低濃度（ng/Lレベル）のエストロゲンがより高濃度（mg/Lレベル）の有機物などと共存する実際の下水処理過程に



(a) TOC濃度（E2添加系）　(b) E2濃度（E2添加系）

(c) TOC濃度（E1添加系）　(d) E1濃度（E1添加系）

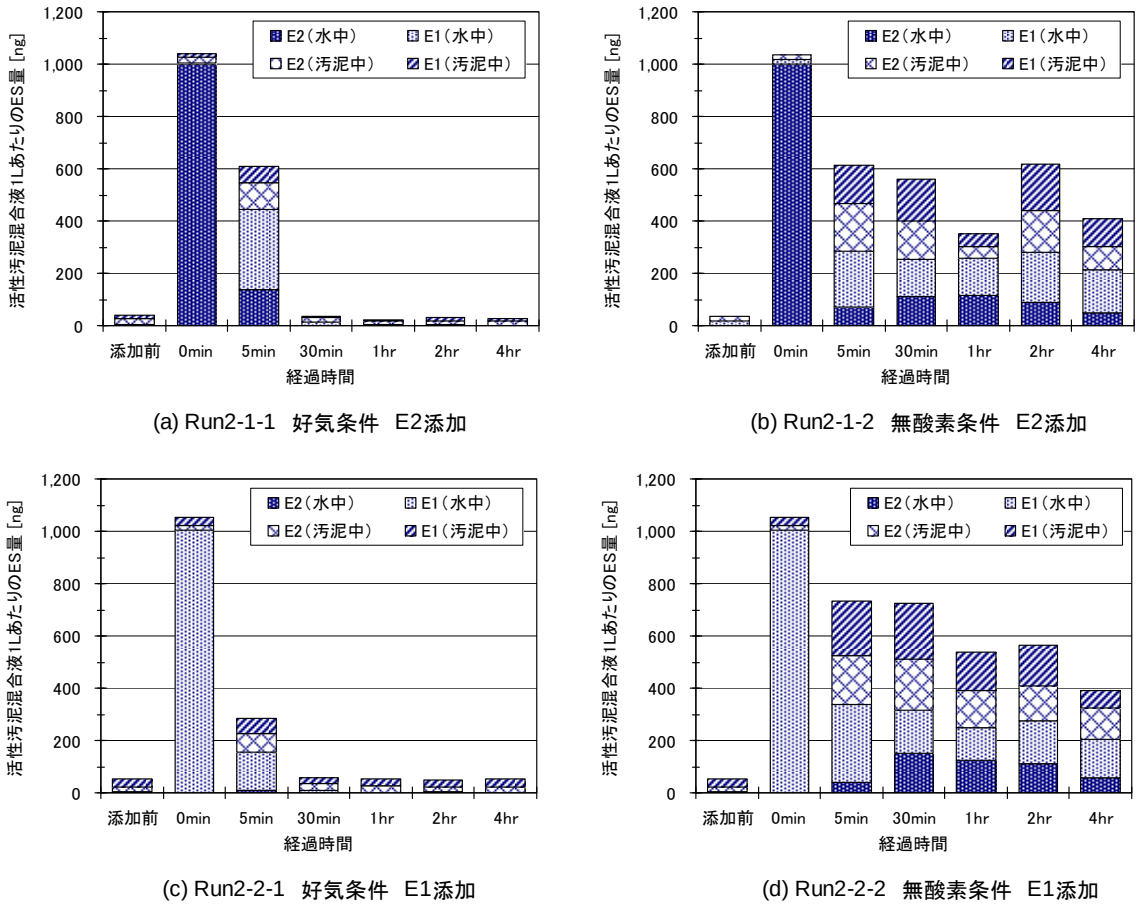
図 2-3-9　水中の TOC およびエストロゲンの濃度変化

る条件に比較的近いものと考えられる。以上のことから、実際の下水処理過程におけるエストロゲンの除去は、本研究の結果示されたとおり、1 次反応で進むのではなく、活性汚泥との接触後、速やかにその大部分が水中から除去されるものと考えられる。

（２）酸素条件による影響

好気条件および無酸素条件における E2 および E1 の回分処理実験（Runs 2）の結果を図 2-3-10 に示す。なお、図の縦軸および添加後 0 分の表示は、図 2-3-8 と同じとした。

好気条件では、(1)と同様に、E2（Run 2-1-1）、E1（Run 2-2-1）ともに、添加後急速に水中から除去され、添加 30 分後には、添加した E2 または E1 の 99%以上が水中から除去されるとともに、汚泥中のエストロゲン量も添加前と同程度にまで減少した。これに対して、無酸素条件では、E2（Run 2-1-2）、E1（Run 2-2-2）ともに、添加 4 時間後においても、添加した E2 または E1 の約 20%相当のエストロゲンが水中および汚泥中のそれぞれに残存していた。このように無酸素条件では、水中、汚泥中ともにエストロゲンが残留する傾向がみられ、好気条件と比較して、エストロゲンの水中からの除去、汚泥中での分解がいずれも遅く、エストロゲンの除去効果が劣ることが明らかとなった。



(a) Run2-1-1　好気条件　E2添加

(b) Run2-1-2　無酸素条件　E2添加

(c) Run2-2-1　好気条件　E1添加

(d) Run2-2-2　無酸素条件　E1添加

図 2-3-10　回分処理実験（Runs2）におけるエストロゲン量の挙動

Joss ら [11]は、標準法の実施設および膜分離活性汚泥法のパイロットプラントの活性汚泥を用いて、E2 および E1 の回分処理実験を行っている。その結果、好気条件や無酸素条件では、E2 から E1 への変換と E1 の分解が生じ、これらの反応速度は好気条件よりも無酸素条件の方が遅いことや、硝酸塩の存在しない嫌気条件下では、これらに加えて E1 から E2 への還元反応が生じ、この還元反応の速度は E1 の分解速度を上回ることを報告している。また、Czajka ら [23]は、湖水と湖底の泥を用いた E2 の回分処理実験を行い、メタン発酵、硫酸塩還元、鉄還元および硝酸塩還元のいずれの条件においても、E2 から E1 への変換が生じることを報告している。本研究においても、無酸素条件で E2 を添加した実験（Run 2-1-2）では、水中および汚泥中の E1 が増加しており、無酸素条件における E2 から E1 への変換が認められた。一方、無酸素条件で E1 添加した実験（Run2-2-2）において、水中および汚泥中の E2 の増加が認められたことから、E1 から E2 への変換を生じている可能性が示唆された。以上のことから、無酸素条件下では、E2 と E1 相互の形態変化が繰り返されるとともに、E1 の分解が生じて、全体として徐々に除去されるものと推察されるが、詳細については今後さらなる解明が必要である。

このように、活性汚泥によるエストロゲンの除去は、酸素条件による影響を受け、効果的かつ安定的な除去のためには、好気性処理が有効であるといえる。下水処理におけるエアレーションは、活性汚泥微生物による有機物の酸化および同化と硝化に必要な酸素の供

給を目的にしており、活性汚泥混合液中の DO 濃度は処理性能に影響を及ぼす。例えば、硝化速度については、DO 濃度が 1mg/L 以下になると低下することが知られている[15]。また、エストロゲンの除去と DO 濃度の関係について、岡安ら[24]は、実験終了時の DO 濃度を 0.5mg/L と 3.0mg/L にそれぞれ制御した回分処理実験を行っている。その結果、E2 は DO 濃度 0.5mg/L 以下でも速やかに除去されるが、E1 は DO 濃度が上昇し 3.0mg/L 程度に達した時点で急激に除去されたと報告している。これに対して、本研究では、DO 濃度を 1.0～3.0mg/L 程度に維持して実験を行ったが、好気条件下では E2、E1 ともに速やかな除去が認められた。また、第 1 章に示した調査Ⅱにおける反応タンク内の平均的な DO 濃度は、標準法では 1.7mg/L、OD 法では 0.4mg/L であり、平均的な DO 濃度の低い OD 法の方が良好なエストロゲンの除去が認められている。以上のことから、活性汚泥処理における通常の DO 濃度の運転条件では、DO 濃度よりも SRT などのその他の条件による影響が卓越しているものと考えられる。

（３）反応タンク水温による影響

本章 2.3.3 項に示したパイロットプラント実験の活性汚泥と実下水（実験原水）を用いた回分処理実験の結果を**図 2-3-11** に示す。なお、図は、活性汚泥混合液の水（液相）中のエストロゲン濃度を示しており、また、図中の矢印は、次のプロットが検出下限値未満であることを意味する。

E2 は、処理開始 2 時間後には、水温 24℃では初発濃度の約 50%に除去されたが、それ以外の水温では濃度の上昇が認められ、水温が低いほど濃度が高くなった。これは、水温の低下に伴って E2 の除去速度が低下し、下水中の E2 抱合体から形態変化で生じる E2 の増加量が E2 の除去量を上回ったためと考えられる。その後、いずれの水温においても、E2 は急速に水中から除去され、処理開始 4 時間後には、初発濃度に対して、水温 21℃および 24℃では 10%以下、水温 15℃および 18℃では 30%程度にまで低下し、処理開始 6 時間後には、全ての水温で検出下限値未満となった。

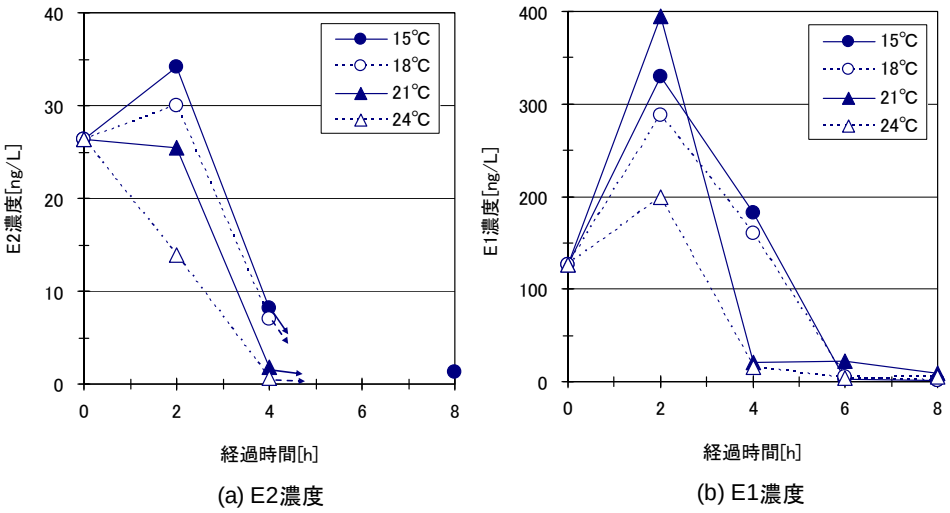


図 2-3-11　回分処理実験における水中のエストロゲン濃度の挙動

E1 は、処理開始 2 時間後には、全ての水温で濃度の上昇が認められ、水温 21℃の濃度が最も高く、次いで 15℃、18℃、24℃の順となった。ここで、E2 とは異なり、処理開始 2 時間後の濃度が水温の順にならなかった理由としては、E1 の除去速度と E1 抱合体や E2 から形態変化で E1 を生じる速度の間で水温による影響が異なるためと推察される。処理開始 2 時間以降、水温 21℃および 24℃では、E1 は急速に水中から除去され、処理開始 4 時間後には、初発濃度に対して 15%程度に低下した。一方、水温 15℃および 18℃では、水温 21℃および 24℃と比較して除去速度が遅く、処理開始 4 時間後には、初発濃度を上回っていたが、処理開始 6 時間後には、初発濃度に対して 5%以下に低下し、水温 21℃および 24℃と同程度の濃度となった。

このように、エストロゲンの水中からの除去速度は、水温による影響を受けたが、反応時間が長くなると、水中のエストロゲン濃度には差が認められなくなった。したがって、反応時間が短い場合、すなわち、反応タンクの HRT が短い場合には、水温がエストロゲンの除去効果に影響を及ぼす可能性が示唆される。例えば、第 1 章の調査Ⅲでは、**図 1-4-18** に示したとおり、HRT の長い OD 法 T_2 では、水温とエストロゲンの除去率の間に関係は認められなかったが、HRT の短い標準法 T_1 では、水温 20℃以下で低い除去率がみられ、ばらつきが大きくなる傾向が認められている。また、微生物の増殖速度は水温に影響され、低水温になるほど遅くなるため、エストロゲン分解微生物の保持の観点からも、SRT の長い方が水温に対しては有利である。以上のことから、水温の変動に関わらず、年間を通じてエストロゲンを効果的かつ安定的に除去するためには、HRT や SRT の長い処理プロセスが有効であると考えられる。

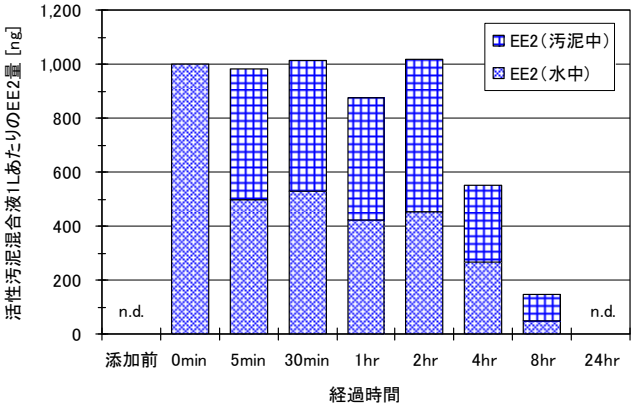
（４）合成エストロゲンの除去特性

合成エストロゲンの EE2 は、エストロゲン様活性が高く、魚類に対する予測無影響濃度（PNEC）として、E2 の 1.0ng/L よりも低い 0.1ng/L が示されている [25]。わが国では、下水中の EE2 の主な由来である経口避妊薬の使用量が少なく、これまでに報告されている下水中の EE2 濃度は検出下限値未満であるが [8),26]、経口避妊薬が普及している欧米諸国では、処理水中から PNEC を超過する濃度で EE2 が検出されている。例えば、Baronti ら [10]は、イタリア国内 6 ヶ所の下水処理場で調査を行い、流入下水および処理水中の EE2 濃度（平均値）を、それぞれ 3ng/L、0.4ng/L と報告している。

活性汚泥処理による EE2 の除去については、活性汚泥を用いた回分処理実験の結果から、天然エストロゲンの E2 や E1 と比較して、除去速度が遅く、除去され難いことが報告されている [6),14),27]。例えば、Ternes ら [6]は、初発濃度 1mg/L では処理開始 48 時間後、初発濃度 1μg/L では処理開始 24 時間後に、それぞれ初発濃度の約 20%が除去されたが、それ以後はほとんど除去が認められなかったと報告している。一方、欧州諸国の下水処理場での調査の結果から、実施設では比較的良好な EE2 の除去が報告されており [10),28]、例えば、上述した Baronti ら [10]の調査では、下水処理過程で 85％の EE2 が除去されている。ここで、回分処理実験による EE2 の除去特性に関する既往の研究も、(1)で検討した E2 や E1 と同様、実際の下水中の濃度よりも高い濃度の EE2 を唯一の炭素源やエネルギー源

として添加しており、活性汚泥中での実際の除去特性とは異なる可能性もある。そこで、本研究では、低濃度かつ有機物共存下での EE2 の除去特性について検討を行った。

好気条件における EE2 の回分処理実験の結果（Run 3-2）を**図 2-3-12** に示す。なお、図の縦軸の表示は、**図 2-3-8** と同じとした。また、実験に用いた活性汚泥、人工下水ともに、EE2 が検出されなかったことから、添加直後（0 分）の EE2 量は、水中は添加した EE2 量（1000ng)、汚泥中は 0ng とした。



注）図中の n.d.は水中、汚泥中ともに検出下限値未満を表す

図 2-3-12　回分処理実験（Run3-2）における EE2 量の挙動

回分処理実験における EE2 の挙動は、E2 や E1 とは異なる挙動を示した。すなわち、E2 や E1 では、**図 2-3-8** に示したとおり、添加後急速に水中から除去され、かつ、汚泥中での分解の進行が認められた。一方、EE2 では、添加 5 分後に添加した量の約 50%が水中から除去され、汚泥中に移行したが、水中と汚泥中を合わせた量は添加した量とほぼ同じで、EE2 の有意な分解は認められなかった。添加 2 時間後までは、添加 1 時間後を除き、水中および汚泥中の EE2 量にほとんど変化が無く、EE2 の分解は認められなかったが、その後、水中および汚泥中ともに EE2 量が減少し、添加した EE2 の量に対して、添加 4 時間後には約 45%、8 時間後には約 85%の分解が認められた。さらに、添加 24 時間後には、水中および汚泥中ともに、検出下限値（0.5ng/L）未満となった。このように、実際の下水処理過程と同じ有機物共存下では、EE2 の除去過程において、E2 や E1 にはない遅滞期（lag phase）が認められたが、反応時間が十分長くなると E2 や E1 と同様に除去されることが明らかとなった。したがって、EE2 の効果的かつ安定的な除去を図る観点からも、反応タンクの HRT や SRT を長くすることが有利であると考えられる。

ここで、活性汚泥微生物による E2 の分解は、初めに E2 の D リングの C-17 位の OH 基が酸化されて E1 に変換され、さらに D リングが開裂して分解が進むものと考えられており[29]、また、(1)に示したとおり、E2 から E1 への変換は速やかに生じる。一方、Haiyan ら[30]は、中国にある経口避妊薬製造工場の廃水処理施設の活性汚泥から単離した EE2 分解細菌について、EE2 が E1 に酸化された後、さらに分解されることを報告している。**図 2-3-13** に示すとおり、EE2 の C-17 位には、E2 と同じ水酸基に加えて、エチニル基が結

合している。そこで、EE2 では、このエチニル基が水酸基からケトン基への変換を阻害しており[31]、エチニル基の分解が律速となるため、分解速度が遅いものと推察される。しかし、Yi ら[32]は、硝化汚泥を用いた回分処理実験の結果から、最初に EE2 の A リングが分解されたと報告しており、EE2 の分解経路については、今後さらなる検討が必要である。

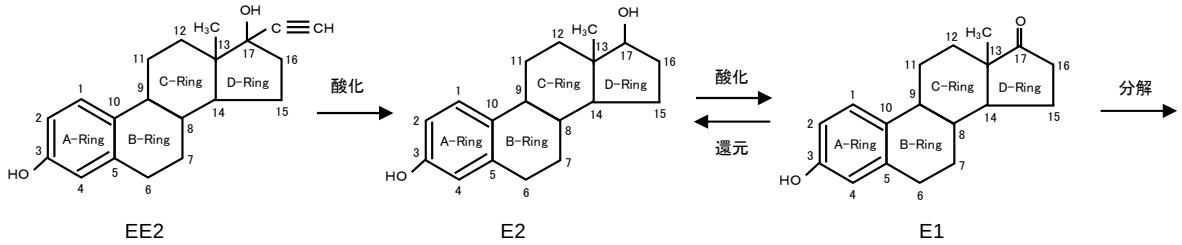


図 2-3-13　活性汚泥による EE2 の推定分解経路

２．３．５　総合考察

本章では、下水処理におけるエストロゲンの除去特性を把握し、エストロゲンの効果的かつ安定的な除去に適した運転条件を明らかにするため、標準法の下水処理場におけるエストロゲンの挙動の詳細な調査や実下水を用いたパイロットプラント実験、並びに、標準法と OD 法の活性汚泥を用いた回分処理実験を行った。これらの調査および実験の結果より、下水処理におけるエストロゲンの除去特性を概括すると以下のとおりである。

- 生物処理工程で除去されたエストロゲンの負荷量は、沈殿池を経て汚泥処理工程に移行した負荷量を大きく上回ることから、下水処理過程でのエストロゲンの除去は、生物処理工程での生物学的な分解によるものと考えられた。また、反応タンク前後での E1 の増加量は、E1 の固液間での移動や E2 からの形態変換で説明できる量を上回ることから、流入下水中に存在するエストロゲン抱合体から遊離体への分解（脱抱合）が主な原因と考えられた。
- 汚泥処理工程では、E2 は全体を通じて減少がみられたが、E1 は嫌気性消化工程で大幅な増加がみられた。しかし、E2、E1 ともに主に固形物（汚泥）側に移行する傾向があり、返流水による水処理工程への影響は小さいものと考えられた。
- E2 は、反応タンク内の水中でほとんど検出されず、主に汚泥中で検出されるのに対して、E1 は、水中、汚泥中ともに検出され、水中に残存する傾向にあることがわかった。これは、E1、E2 の水－汚泥分配係数の違いによるものと考えられ、エストロゲンの除去効果に、水相から汚泥相への移行性（汚泥相への吸着性）が影響していることが明らかとなった。
- 実下水を用いたパイロットプラントによる比較対照実験の結果、SRT を 10 日で運転した系列は、SRT を 5 日で運転した系列と比較して、処理水中のエストロゲン濃度が低く、除去率も高く安定する傾向が認められた。また、活性汚泥中のエストロゲン

濃度も、SRT を 10 日で運転した系列の方が低く、安定する傾向にあった。

- E2 は、活性汚泥処理により急速に水中から除去され、供試汚泥の違いによらず、30 分～1 時間後にはほぼ完全に除去された。また、E2 は E1 に変換されるとともに、変換後直ちに E1 の分解も進行した。一方、E1 は、OD 法の活性汚泥では、E2 と同様な挙動を示し、水中から急速に除去され、１時間後にはほぼ完全に除去されたが、標準法の活性汚泥では、E1 の分解速度が遅く、水中および汚泥中に残留する傾向が認められた。
- 実際の下水処理過程における E2 や E1 の除去は、その濃度が ng/L レベルの極低濃度であり、かつ、多量の有機物が共存するため、有機物除去のような 1 次反応には従わず、活性汚泥との接触後速やかに水中から除去されるものと考えられた。
- 無酸素条件では、水中、汚泥中ともに残留する傾向がみられ、好気条件と比較してエストロゲンの分解速度が遅く、除去効果は低かった。また、水中からのエストロゲンの除去は、反応時間が短い間は水温による影響を受けたが、反応時間が長くなるとエストロゲン濃度に差は認められなくなった。
- 合成エストロゲンの EE2 の除去過程には、E2 や E1 にはない遅滞期が認められたが、反応時間が十分に長くなると E2 や E1 と同様に良好に除去された。

本章および第 1 章の結果、並びに、既往の知見から、エストロゲンの効果的かつ安定的な除去を行うための反応タンクの運転条件について、次のことが示唆された。

本章に示した反応タンクのプロファイル試験や E1 の回分処理実験の結果から、E1 は、水中から汚泥中への移行が遅く、かつ、分解速度も遅いため、水中での反応時間が長い方、すなわち、反応タンクの HRT の長い方が高い除去効果を期待できるものと考えられる。また、エストロゲンの除去は、水温による影響を受けたが、反応時間が長くなるとエストロゲン濃度に差が認められなくなったことから、水温の変動に対して安定して除去するためにも、HRT の長い方が有利と考えられる。さらに、第 1 章に示したとおり、エストロゲンやエストロゲン様活性の除去率は、全体的にみて HRT の長い方が高く安定する傾向が認められた。同様に Johnson ら [33]は、ヨーロッパ 8 ヶ国の 17 処理場での調査結果から、E1 の除去と HRT の間に弱いが有意な相関関係（E1 残存率[%対流入水]＝46.5×HRT[h]$^{-1.38}$、r^2＝0.39、p<5%）が認められると報告している。

以上のことから、効果的かつ安定的なエストロゲンの除去のためには、反応タンクの HRT は長い方が有利であり、標準的な HRT が 6～8 時間程度 [15]の標準法と比較して、HRT の長い OD 法（HRT：24～48 時間程度 [15]）や生物学的窒素除去法（HRT：14～24 時間程度 [15]）の方がエストロゲンの除去に有利であると考えられる。

標準法と OD 法の活性汚泥を用いた回分処理実験の結果から、標準法と OD 法の間でみられたエストロゲンの除去性能の違いは、SRT の違いに起因する活性汚泥性状の違いによるものと考えられた。また、第 1 章の調査や本項のパイロットプラント実験の結果から、SRT が 10 日程度以上において、E2 や E1 の除去率は高く、安定する傾向が認められた。

SRT とエストロゲンの除去の関係については、国交省調査[26]、ヨーロッパ各国[33),34),35)]やカナダ[36)]での実態調査でも、同様な傾向が報告されている。すなわち、国交省調査[26)]では、好気的条件下における SRT（ASRT）が 10～15 日程度以上の生物学的窒素除去法や OD 法では、E2（ELISA 法）の除去率が 80%程度以上の高い除去率で安定している傾向がみられた。Johnson ら[33)]は、HRT と同様に E1 の除去と SRT の間に弱いが有意な相関関係（E1 残存率[%対流入水]＝113×SRT[日]$^{-1.12}$、r^2＝0.28、p<5%）が認められると報告している。また、Servos ら[37)]は、E1、E2 の除去率と SRT の間には有意な相関関係は認められなかったが、SRT の長い処理場の方が高い除去率を示し、硝化を行っている処理場は、硝化を行っていない処理場と比較して、E1、E2 の除去率が高いことを報告している。一方、斎野ら[37)]は、実下水を用いた標準法のパイロットプラントにおいて、SRT を 8.3 日、10 日、12.5 日と順次変えて、エストロゲンの除去効果に及ぼす影響を調査している。その結果、SRT による E2、E1 の除去速度の違いから、E2 や E1 を分解する微生物を十分に増殖させ、汚泥中も含めた確実な除去のためには、E2 では 10 日以上、E1 では 12.5 日以上の SRT が必要であると推定している。また、ドイツの Wiesbaden 処理場において、有機物除去のみを目的とした施設（SRT <4 日）を、窒素除去を目的とした施設（SRT 12 日）に改良した結果、改良前の施設では、処理水中の E2、E1 および EE2 の平均濃度はそれぞれ 5ng/L、20ng/L、2ng/L であったのに対して、改良後の施設では、いずれも定量下限値（1ng/L）未満となったと報告されている[28),38)]。

以上のことから判断して、SRT が 概ね 10～15 日程度以上において、エストロゲンの効果的かつ安定的な除去が期待できるものと考えられる。これに対して、わが国における標準的な SRT の設計値は、標準活性汚泥法では 3～6 日、循環式硝化脱窒法などの生物学的窒素除去法やオキシデーションディッチ法では 15～30 日程度であることから[15)]、エストロゲン除去の観点からは、標準活性汚泥法では安定的な除去は困難であり、生物学的窒素除去法やオキシデーションディッチ法などの処理方式が有効であるといえる。

２．４　まとめ

本章では、下水処理におけるエストロゲンの除去特性を把握し、その除去に適した運転条件を明らかにするため、実施設における調査や実施設の下水や活性汚泥を用いた実験を行った。実施設でのエストロゲンの負荷量の挙動から、下水処理過程におけるエストロゲンの除去は、主に生物処理工程における生物学的な分解によることや、標準法でみられる下水処理過程での E1 の増加は、エストロゲン抱合体の分解に起因することが明らかとなった。次に反応タンク内でのエストロゲンの消長から、エストロゲンの除去効果は、汚泥相への吸着性の影響を受け、吸着性の高い E2 は、汚泥中に移行して水中から除去される傾向を示すのに対して、吸着性の低い E1 は、水中と汚泥中に分配され、水中に残留する傾向を示すことがわかった。さらに、回分処理実験の結果から、処理方式によるエストロゲンの除去性能の違いは、SRT に起因する活性汚泥性状の違いによると考えられることや、反応時間が長くなると水温の影響が認められなくなったことなどから、効果的かつ安定的なエストロゲンの除去を行うためには、HRT や SRT の長い方が有利であると考えられた。また、パイロットプラント実験や第１章の実態調査の結果などから、SRT が概ね 10～15 日程度以上で効果的かつ安定的なエストロゲンの除去を期待することが可能であると考えられることから、標準法では安定的な除去は困難であり、生物学的窒素除去法や OD 法が有効であると考えられた。

参考文献（第２章）

1) 中村由美子, 恩田建介, 高東智佳子, 宮晶子（2003）液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による下水試料中の女性ホルモン類定量方法の開発, 分析化学, **52**(2), 107-114.

2) 社団法人日本下水道協会（2002）「下水試験方法（追補暫定版）－内分泌撹乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編－」, 社団法人日本下水道協会

3) 建設省都市局下水道部, 厚生省生活衛生局水道環境部監修（1997）「下水試験方法－上巻－」, 社団法人日本下水道協会

4) 稲森悠平, 国安祐子（1988）排水処理の微生物実験法, 「環境微生物学実験法」, 須藤隆一･編, 講談社サイエンティフィク, 156-159.

5) Langford, K., Lester, J. N. (2003) Fate and behavior of endocrine disrupters in wastewater treatment processes, “Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes”, Birkett, J. W., Lester, J. N. (ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, 103-143.

6) Ternes, T. A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -Ⅱ. Aerobic batch experiments with activated sludge, Sci. Total. Environ., **255**(1-2), 91-99.

7) Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004) Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in sewage treatment plants. Water Res. **38**(12), 2918-2926.

8) Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M., Sato, C. (2004) Analysis and occurrence of estrogens in wastewater in Japan, Water Sci. Technol. **50**(5), 93-100.

9) D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R. (2003) Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, Sci. Total. Environ., **302**(1-3), 199-209.

10) Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, Environ. Sci, Technol., **34**(24), 5059-5066.

11) Joss, A., Andersen, H., Ternes, T., Richle, P. R., Siegrist, H. (2004) Removal of estrogens in municipal wastewater treatment under aerobic and anaerobic conditions: consequences for plant optimization, Environ. Sci. Technol., **38** (11), 3047-3055.

12) Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., Servos, M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, Sci. Total Technol., **225** (1-2), 81-90.

13) 浦瀬太郎（2008）医薬品類の下水処理プロセスにおける除去特性, 用水と廃水, **50**(7), 65-71.

14) Urase, T., Kikuta, T. (2005) Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge, Water Res., **39**(7), 1289-1300.

15) 建設省都市局下水道部監修（2001）「下水道施設計画・設計指針と解説（後編）」, 社団法人日本下水道協会

16) Massé, A., Spérandio, M., Cabassud, C. (2006) Comparison of sludge characteristics and performance of a submerged membrane bioreactor and an activated sludge process at high solid retention time, Water Res., **40**(12), 2405-2415.

17) Li, X. Y., Yang, S. F. (2006) Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge, Water Res., **41**(5), 1022-1030.

18) Yi, T., Harper Jr., H. F., Holbrook, R. D., Love, N. G. (2006) Role of particle size and ammonium oxidation in removal of 17α-ethinyl estradiol in bioreactors, J. Environ. Eng., **132**(11), 1527-1529.

19) Yi, T., Harper Jr., W. F. (2007) The effect of biomass characteristics on the partitioning and sorption hysteresis of 17α-ethinylestradiol, Water Res., **41**(7), 1543-1553.

20) Li, F., Yuasa, A., Obara, A., Mathews, A. P. (2005) Aerobic batch degradation of 17-β estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures, Water Res., **39**(10), 2065-2075.

21) Shi, J. H., Suzuki, Y., Nakai, S., Hosomi, M. (2004) Microbial degradation of estrogens using activated sludge and night soil-composting microorganisms, Water Sci. Technol., **50**(8), 153-159.

22) Poseidon (2005) POSEIDON - Final Report, http://ec.europa.eu/research/endocrine

23) Czajka, C. P., Londry, K. L. (2006) Anaerobic biotransformation of estrogens, Sci. Total Environ., **367**(2-3), 932-941.

24) 岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣（2005）下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化に与えるDO 濃度の影響, 第 42 回下水道研究発表会講演集, 64-66.

25) Young, W. F., Whitehouse, P., Johnson, I., Sorokin, N. (2004) "Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters", R&D Technical Report P2-T04/1, Environmental Agency, U.K.

26) 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撹乱化学物質に関する調査報告書（案）」

27) Vader, J. S., van Ginkel, C. G., Sperling, F. M. G. M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J. S., van der Most, M., Stokman, P. G. W. (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge, Chemosphere, **41**(8), 1239-1243.

28) Johnson, A. C., Belfroid, A., Di Corcia, A. (2000) Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent, Sci. Total. Environ., **256**(2-3), 163-173.

29) Lee, H. B., Liu, D. (2002) Degradation of 17ß-estradiol and its metabolites by sewage bacteria, Water Air Soil Pollution, **134**(1-4), 353-368.

30) Haiyan, R., Shulan, J., un din Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C. (2007) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α-ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5, Chemosphere, **66**(2), 340-346.

31) Bolt, H. M. (1979) Metabolism of estrogens – natural and synthetic, Pharmacol. Ther., **4**(1), 155-181.

32) Yi, T., Harper Jr., W. F. (2007) The link between nitrification and biotransformation of 17α-ethynylestradiol, Environ. Sci. Technol., **41**(12), 4311-4316.

33) Johnson, A. C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K. Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M. J.-F., Svenson, A., Wettstein, F. E. (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices. Water Res. **39**(1), 47-58

34) Kreuzinger, N., Clara, M., Strenn, B., Kroiss, H. (2004) Relevance of the sludge retention time (SRT) as design criteria for wastewater treatment plants for the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from wastewater. Water Sci. Technol. **50**(5), 149-156.

35) Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. (2005) The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. Water Res. **39**(1), 97-106.

36) Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., Mclnnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A. (2005) Distribution of estrogens, 17 ß-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. Sci. Total Environ. **336**(1-3), 155-160.

37) 斎野秀幸, 山縣弘樹, 中島英一郎, 重村浩之, 鈴木穣（2004）SRT 制御による下水中内分泌かく乱物質の除去, 水環境学会誌, **27**(1), 61-67.

38) Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., Ternes, T. A. (2003) Fate of estrogens in municipal sewage treatment plant, Environ. Sci. Technol., **37**(18) 4021-4026.

第３章　エストロゲン分解細菌を利用したエストロゲンの除去向上に関する研究

３．１　はじめに

前章までの結果から、下水中のエストロゲンは、主として反応タンクでの活性汚泥への吸着と活性汚泥微生物の生物学的な分解により除去され、その除去効果は、反応タンクの水理学的滞留時間（HRT）や固形物滞留時間（SRT）の長い方が高く安定することが明らかとなった。また、標準活性汚泥法（標準法）とオキシデーションディッチ法（OD 法）におけるエストロゲンの除去効果の違いは、SRT に起因する活性汚泥性状の違い、すなわち、活性汚泥の物理化学的性質の違いに起因するエストロゲンの吸着性能や、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の存在量の違いに起因するエストロゲンの分解性能が異なるためと考えられた。そこで、特に後者に着目して、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の挙動とエストロゲンの除去効果の関係を解明し、運転条件の最適化や処理プロセスの変更などにより、エストロゲン分解細菌の存在量を制御することができれば、エストロゲンのより効果的かつ安定的な除去を図ることも可能になると考えられる。

しかし、これまでのところ、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌に関する報告は少なく、また、その知見は、単離されたエストロゲン分解細菌のエストロゲンの分解特性、しかも、下水中の濃度レベル（ng/L オーダー）の 10^5～10^9 倍にもなる高濃度（mg/L～g/L オーダー）のエストロゲンに対する分解特性に限られており[1)~5)]、下水中の通常の濃度レベルにおける分解特性や、単離されたエストロゲン分解細菌の活性汚泥中での挙動や消長などについては、全く知見が示されていない。そのため、単離されたエストロゲン分解細菌が活性汚泥によるエストロゲンの除去に実際に寄与しているか否かも明らかではない。

本章では、著者ら[6)]が実施設の活性汚泥中から単離したエストロゲン分解細菌について、活性汚泥中での挙動を明らかにするとともに、これを利用したエストロゲンの除去向上について検討した。はじめに、単離したエストロゲン分解細菌を特異的に検出するプライマーを用いたリアルタイム PCR（polymerase chain reaction：ポリメラーゼ連鎖反応）法により、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の定量的な検出を行って、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の存在量とエストロゲンの除去性能の関係について検討した。次いで、実下水を用いた実験装置の活性汚泥にエストロゲン分解細菌を添加し、処理水中のエストロゲンの濃度と添加したエストロゲン分解細菌の消長を把握することにより、エストロゲン分解細菌を用いた活性汚泥処理における除去性能向上について検討を行った。さらに、実二次処理水を用いたベンチスケールの実験装置にエストロゲン分解細菌を固定化した担体を充填し、処理水中のエストロゲンの濃度を把握することにより、エストロゲン分解細菌を用いたエストロゲンの除去性能向上について検討を行った。

３．２　エストロゲン分解細菌

本節では、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌に関する既往研究の知見を整理するとともに、本研究で対象とした著者らが単離したエストロゲン分解細菌について、その単離や遺伝子解析の結果、エストロゲンの分解特性などを示す。

３．２．１　エストロゲン分解細菌に関する既往知見

活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の単離、並びに、そのエストロゲンの分解特性については、近年いくつかの報告があるが、Fuji ら[1)]による E2 分解細菌 ARI-1 株が最初の報告である。東京都内にある標準法の下水処理場の活性汚泥から単離された ARI-1 株は、1.0g/L の 17β－エストラジオール（E2）を 50 日間、0.3g/L の E2 を 25 日間で完全に分解し、また、0.3g/L のエストロン（E1）を 20 日間で 40%、0.3g/L のエストリオール（E3）を 10 日間で完全に分解したが、17α－エチニルエストラジオール（EE2）は分解できなかった。分解後の培養液をガスクロマトグラフで解析した結果、基質としたエストロゲンのみが検出され、さらに NMR（nuclear magnetic resonance : 核磁気共鳴）解析の結果、分子内のほとんどの構造部位が分解されていたことから、二酸化炭素や有機酸などの低分子化合物にまで代謝されていることが示唆された。ARI-1 株は、生理・生化学的性質、遺伝学的性質の解析結果から、*Novosphingobium* 属の新種と認められ、*Novosphingobium tardaugens* と命名されている[7)]。

Yoshimoto ら[2)]は、東京都内にある標準法の下水処理場の活性汚泥から、2 種 4 株のエストロゲン分解細菌を単離している。4 株のうち 3 株（Y50155 株、Y50156 株、Y50157 株）は、*Rhodococcus equi* と同定され、100mg/L の E2 および E1 を 24 時間で 99%、100mg/L の E3 を 24 時間で 95%以上、100mg/L の EE2 を 24 時間で 80 以上分解した。また、残り 1 株（Y50158 株）は、*Rhodococcus zopfii* と同定され、100mg/L の E2、E1、E3 および EE2 をいずれも 24 時間でほぼ完全に分解した。4 株はいずれも、エストロゲンの分解に伴って、エストロゲン様活性も 24 時間でおよそ 100 分の 1 に低減させたことから、エストロゲン様活性を有する代謝産物を生成することなく、エストロゲンを分解するものと考えられた。

趙ら[3)]は、東京都内の下水処理場の活性汚泥から 10 株の E2 分解細菌を単離し、このうち E2 の分解能力が最も高い D12 株は、200mg/L の E2 を 8 日間でほぼ完全に分解し、遺伝子系統解析の結果、*Sphingomonas* 属の近縁種であったと報告している。また、^{14}C 標識した E2 を用いた実験結果から、D12 株は E2 を完全に無機化するものと考えられた。

Haiyan ら[4)]は、中華人民共和国の北京にある経口避妊薬製造工場の排水処理施設の活性汚泥から、EE2 の分解細菌 *Sphigobacterium* sp. JCR15 株を単離している。JCR15 株は、30mg/L の EE2 を 10 日間で 87%分解し、また、EE2 の他に E2 や E1、E3 などでも増殖可能であった。マススペクトル解析の結果から、JCR15 株は、始めに EE2 を E1 に酸化した後、芳香環を開裂し分解するものと考えられた。

Yu ら[5)]は、活性汚泥から 14 株の E2 分解細菌を単離し、それらは *Aminobacter* 属（KC6、

KC7 株)、*Brevundimonas* 属（KC12 株)、*Escherichia* 属（KC13 株)、*Flavobacterium* 属（KC1 株)、*Microbacterium* 属（KC5 株)、*Nocardioides* 属（KC3 株)、*Rhodococcus* 属（KC4 株)、*Sphingomonas* 属（KC8～KC11 株、KC14 株）の 3 門 8 属に分類されたと報告している。これらの 14 株は全て、E2 を E1 に分解したが、さらに E1 を分解できるものは 3 株（KC6、KC7、KC8 株）のみで、特に *Sphingomonas* 属に属する KC8 株は、E2、E1 ともに速やかな分解を示し、30mg/L の E2 およびその分解で生じた E1 を 3 日間で完全に分解した。

また、著者ら [6]は、次項 3.2.2 に示すとおり、栃木県内にある標準法の下水処理場の活性汚泥から 6 株のエストロゲン分解細菌を単離している。これらの単離株は、いずれも 10 μg/L の E2 および E1 を 3 時間以内でほぼ完全に分解する能力を有していた。また、16S-リボゾーム遺伝子（rDNA : ribosomal DNA）による系統解析の結果から、いずれの単離株も *Sphingomonas* の近縁種と考えられた。

一方、アンモニウム塩を含む無機塩培地で馴養された硝化活性の高い活性汚泥（硝化汚泥）は、硝化活性の低い活性汚泥と比べて高いエストロゲンの除去効果を示すことや [8),9)]、生物学的窒素除去を目的とした高度処理法は、標準法と比べてエストロゲンの除去効果が高い傾向にあること [10),11)]などから、エストロゲンの除去における硝化細菌の関与が着目されている。

アンモニア酸化細菌の *Nitrosomonas europaea* は、絶対独立栄養細菌でアンモニアを亜硝酸に酸化することにより増殖のためのエネルギーを獲得しているが、フェノールやベンゼンなどの炭化水素化合物やトリクロロエチレンのようなハロゲン炭化水素も酸化することが知られている [12),13)]。Shi ら [9)]は、アンモニアを含む無機塩液体培地にエストロゲンを添加した回分処理実験の結果、*N. europaea* は 0.4mg/L の E2、E1 および EE2 を 187 時間でほぼ完全に分解したと報告している。しかし、硝化汚泥に硝化阻害剤であるアリルチオ尿素を添加した結果、硝化反応は抑制されたが、E2 や E1 の除去には変化が無く良好に除去されたことや、E2 の分解過程において、硝化汚泥では E1 の生成が認められたが、*N. europaea* では E1 の生成が認められなかったことから、硝化汚泥におけるエストロゲンの分解は、*N. europaea* 以外の従属栄養細菌の関与が考えられるとしている。

以上のとおり、活性汚泥中にはエストロゲンを分解する能力を有する細菌が広く存在していると考えられるが、これまでに活性汚泥中から単離されたエストロゲン分解細菌の多くは、*Sphingomonas* の近縁種である。*Sphingomonas* は、絶対好気性、化学合成従属栄養性の *Alphaproteobacteria* 網に属するグラム陰性細菌で、外膜にリポ多糖の代わりにスフィンゴ糖脂質を含むことを特徴とする [14)]。現在では、遺伝学的性質や生理・生化学的性質などに基づき、*Sphingomonas* 属、*Sphingobium* 属、*Novosphingobium* 属および *Sphingopyxis* 属の 4 属に分類されている [15)]。*Sphingomonas* は、水環境中や土壌環境中に広く分布しており、例えば汚染された河川の河川水や底泥、上水配水施設の生物膜など、様々な環境から分離されている [16)]。また、*Sphingomonas* は、ノニルフェノール [17),18)] やビスフェノール A[19),20)]、ダイオキシン類 [21)]、トルエンやナフタレン等の芳香族化合物 [14,15)] などの様々な化学物質を分解する株が多数報告されており、他属の細菌と比較して、新た

な化学物質の分解に対する適合能力が高いと考えられている[16]。*Sphingomonas* は、50～500kb 程度のサイズのプラスミドを複数有しており、このプラスミドが *Sphingomonas* による様々な化学物質の分解に重要な役割を果たしていると考えられている[16]。

３．２．２　対象エストロゲン分解細菌の特性等

本研究では、著者ら[6]が単離したエストロゲン分解細菌のうち、*Novosphingobium* sp. JEM-1 株に着目して、活性汚泥中での挙動の把握やエストロゲンの除去性能向上を検討した。本項では、本菌株の特性を明示することを目的として、その単離、単離株の遺伝子系統解析、エストロゲン分解特性について、著者らの既往の報告[6),22),23)]より概括する。

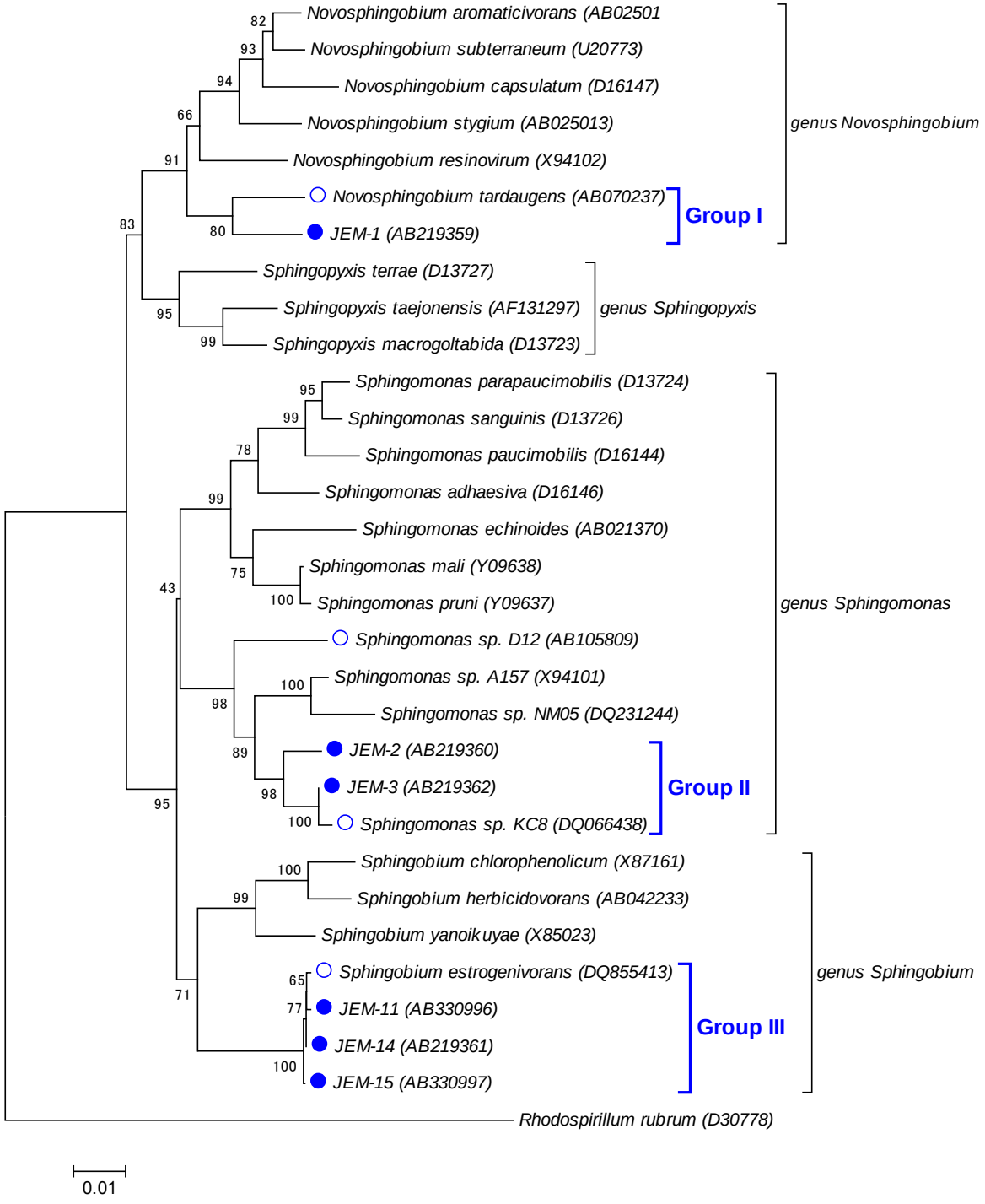
（１）エストロゲン分解細菌の単離および遺伝子系統解析

第 1 章で通年調査を行った栃木県内にある標準法の T_1 処理場の活性汚泥を分離源とし、1000mg/L の E2 または E1 を含む液体培地を用いて、エストロゲン分解細菌の集積培養を行った。この集積培養体から、寒天平板培養法により集積された細菌を分離し、最終的に 28 株の単離株を得た。

これらの単離株を、1mg/L の E2 を含む液体培地で 7 日間培養し、E2 および E1 の残存濃度を測定して、その E2 の分解能を評価した。単離した 28 株はすべて、E2 を E1 に酸化する能力を有していたが、大部分の単離株は、E2 の酸化で生じた E1 を全く分解しないか、E1 の分解能が低く、高濃度の E1 が残留した。単離株のうち、E2、E1 ともに高い分解能を有し、E2 の初発濃度に対する E2 と E1 を合わせた残存率が 10%以下となったものは、JEM-1 株、JEM-2 株、JEM-3 株、JEM-11 株、JEM-14 株および JEM-15 株の 6 株のみであった。このうち、JEM-1 株は、EE2 の分解能も有しており、1mg/L の EE2 を 7 日間で 93%分解したが、他の 5 株は EE2 を分解できなかった。

選択された 6 株の 16S-rDNA の V3 領域の塩基配列、並びに、集積培養体の PCR-DGGE（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis：変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）解析で得られたバンドの塩基配列を決定し、16S-rDNA による系統解析を行った結果、6 株のエストロゲン分解細菌は、全て *Sphingomonas* の近縁種であると考えられた。また、JEM-1 株の V3 領域の塩基配列は、集積培養体のバンドの塩基配列と完全に一致したことから、JEM-1 株は集積培養体中の優占種と考えられた。

次いで、単離株の 16S-rDNA のほぼ全長の塩基配列を決定し、DNA Data Bank Japan（DDBJ）[24)]から取得した近縁種の 16S-rDNA の塩基配列との間で系統解析を行った結果、**図 3-2-1** に示すとおり、単離した 6 株のエストロゲン分解細菌は、3 つのグループに分かれた。すなわち、JEM-1 株は、*Novosphingobium* 属に属するものと考えられ、Fujii ら[1)]が単離した E2 分解細菌 *N. tardaugens* ARI-1 株とクラスターを形成した（Group Ⅰ）。JEM-2 株および JEM-3 株は、*Sphingomonas* 属に属するものと考えられ、Yu ら[5)]が単離した E2 分解細菌 KC-8 株とクラスターを形成し（GroupⅡ）、趙ら[3)]が単離したエストロゲン分解細菌 D-12 株と近縁であった。また、JEM-11 株、JEM-14 株および JEM-15 株



注1）系統樹は、単離株および DDBJ から取得した近縁種のほぼ全長の 16S-rDNA の塩基配列より、MEGA version3.1[25)]を用いて近隣結合法により作成した。

注2）系統樹上の数値は、500 回のランダムサンプリングによるブートストラップ検定の結果をパーセントで示したものである。また、図左下のスケールバーは、100 塩基あたり 1 塩基の違いを示す。

注3）●は著者らが単離したエストロゲン分解細菌、○は DDBJ に登録されているその他のエストロゲン分解細菌を表す。

注4）種名および株名の後の括弧書きは、DDBJ の accession number を表す。

図 3-2-1　エストロゲン分解細菌および近縁種の 16S-rDNA 塩基配列による系統樹

は、*Sphingobium* 属に属するものと考えられ、Ke ら[26]が海砂と限外ろ過した二次処理水を用いて構築したマイクロコズムから単離したエストロゲン分解細菌 *Sphingobium estrogenivorans* と一つのクラスターを形成した（GroupⅢ）。

（２）単離株のエストロゲン分解特性

単離したエストロゲン分解細菌の E2 および E1 の分解特性の例を**図 3-2-2** に示す。図は、単離株の人工下水懸濁液（乾燥菌体重量 5mg/L、BOD 約 7.5mg/L）に E2 または E1 を終濃度 10μg/L となるように添加し、25℃、好気条件下でのエストロゲン濃度の変化を測定した結果である。

いずれの単離株も、10μg/L の E2 および E1 を 3 時間以内にほぼ完全に分解したが、単離株により異なる傾向を示した。JEM-1 株は、E2 の分解が最も早く、1 時間後にはほぼ完全に分解したが、E1 の分解は遅く、30 分後には分解された E2 の約 50%が E1 として残留したが、1 時間後にはその E1 もほぼ完全に分解された。一方、JEM-2 株は、JEM-1 株と比較して E2 の分解は遅かったが、E1 の分解は早く、E2 の分解過程での E1 の残留が少なかった。また、JEM-14 株は、他の 2 株と比較して E2 の分解が遅かったが、E1 の分解は JEM-1 株と同程度であった。このような単離株によるエストロゲンの除去特性の違いは、そのグループ毎に同じ傾向を示した。

JEM-1 株は、単離株の中でエストロゲン分解能が最も優れていることや、集積培養体中の優占種と考えられたことから、本研究では、JEM-1 株に着目して、活性汚泥中での存在状況の把握や、これを利用したエストロゲンの除去向上に関する検討を行うものとした。

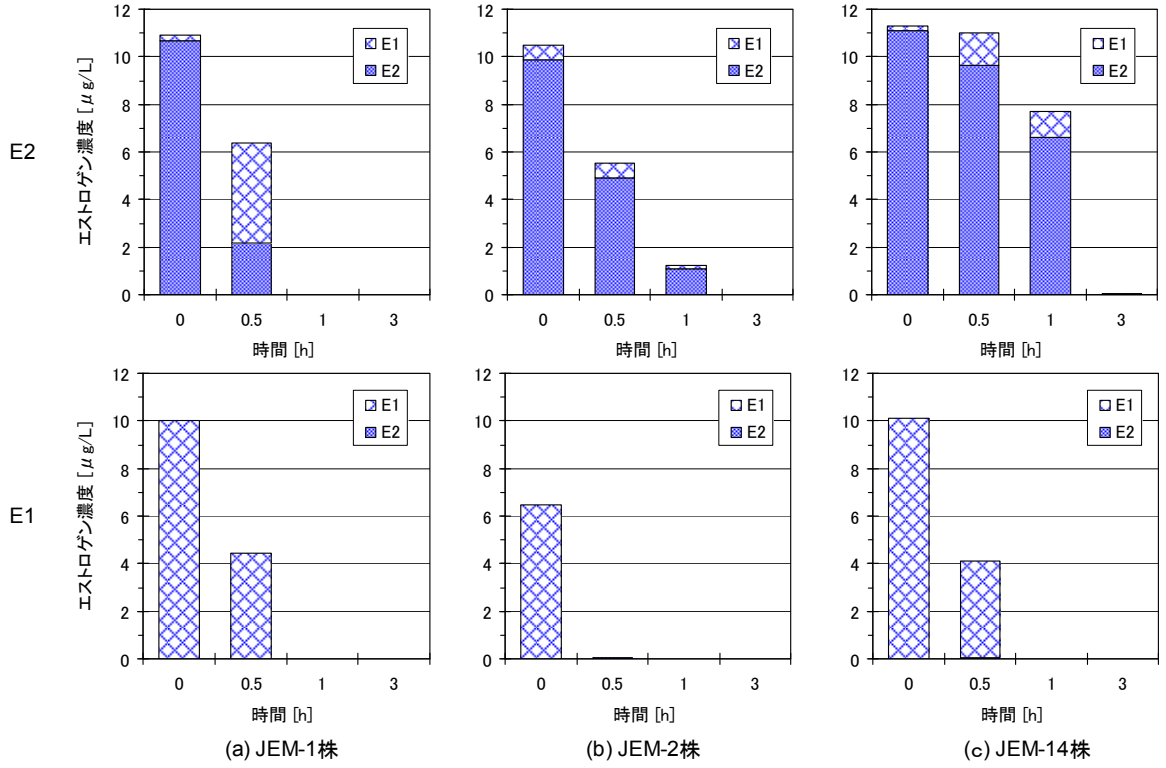


図 3-2-2　分離菌株のエストロゲンの分解特性[6]

３．３　材料および方法

３．３．１　エストロゲン分解細菌の検出法の検討

PCR 法は、2 つのプライマーに挟まれた特定の DNA 配列を、DNA ポリメラーゼを用いて増幅する方法で、目的とする微生物に特異的なプライマーを用いて、目的とする微生物だけが持つ特定の DNA 配列を増幅させることにより、目的の微生物を検出することが可能である。PCR 法を基にした各種の分子生物学的手法は、微生物の単離や培養を必要としないことや、極めて高い感度で特異的に検出が可能であることなどから、環境中の微生物の検出における非常に有用な技術となっている [27),28)]。

PCR 法を用いて定量的に検出を行う方法として、これまで内部標準法 [29)]や競合 PCR 法 [30)]、MPN-PCR 法 [31)]などが開発されてきた。これらの従来の方法では、PCR 増幅産物が指数関数的に増加し一定でないため、プラトー（横ばい状態）に達した最終的な DNA 量しか測定できないことや [32),33)]、得られた PCR 増幅産物を電気泳動して解析する必要があることなどから、多数の試料の定量は困難であった。これに対して、リアルタイム PCR 法 [32)~34)]は、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した専用装置を用いて、PCR 反応過程で PCR 増幅産物をリアルタイムに測定し解析する方法で、比較的容易かつ迅速に定量分析を行うことが可能である。そのため、リアルタイム PCR 法は、従来の定量的な PCR 法に替わって、下水処理に関与する微生物、例えば、硝化細菌 [35),36)]や脱窒細菌 [36)]、糸状性細菌 [37)]などの検出・定量への適用が近年増加しつつある。

リアルタイム PCR 法の測定原理 [34)]を**図 3-3-1** に示す。図は、3 段階に希釈した既知量の DNA をスタンダードに用いて PCR を行った場合を表している。(a)に示すとおり、PCR 増幅産物が指数関数的に増幅している領域で、一定の増幅産物量になるサイクル数（threshold cycle; Ct）と初発の DNA 量をプロットすると、(b)に示すとおり、相関性のある検量線を作成することができる。そこで、DNA 量が未知の試料について、Ct 値を測定することにより、この検量線を用いて試料中の DNA 量を求めることが可能である。

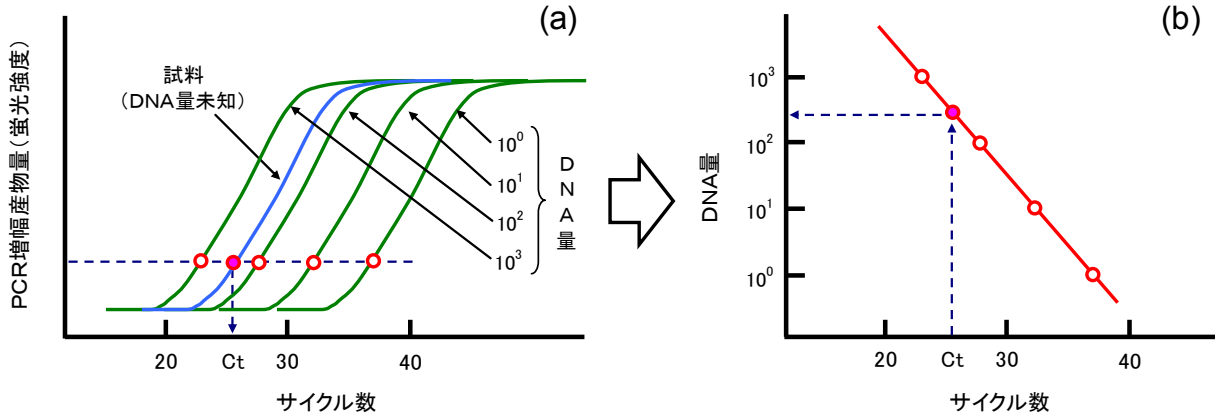


図 3-3-1　リアルタイム PCR 法の測定原理 [34)]

本研究では、著者らが活性汚泥中から単離したエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* JEM-1 株を特異的に検出するプライマーを設計し、これを用いたリアルタイム PCR 法により、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の定量的な検出を行った。

（１）プライマー設計

JEM-1 株に特異的なプライマーの設計は、初めに Mac Vector (Accelrys Software Inc., USA) の PCR プライマーペア設計プログラムを用いて、JEM-1 株の 16Sr-DNA 塩基配列上のプライマー設計領域を検索した。次いで、当該プライマー設計領域について、DDBJ に登録されている 16S-rDNA 塩基配列に対する相同性を BLAST[38]を用いて検索して、その特異性を確認した。さらに、上述の Mac Vector のプライマー適正テストを用いて、プライマーペアとしての適正を確認し、最終的なプライマーペアを決定した。

また、単離したエストロゲン分解細菌の 4 株（JEM-1 株、JEM-2 株、JEM-3 株および JEM-14 株）とその近縁種の *Sphingobium yanoikuya*e (NBRC15102^T)、*Sphingomonas paucimobilis* (NBRC13935^T)、*Novosphingobium capsulatum* (NBRC12533^T)、*Novosphingobium resinovorum* (NBRC16058) および *Novosphingobium. tardaugens* ARI-1 (NBRC16725^T)の 5 株、並びに、T_1 処理場から採取した活性汚泥試料について、設計されたプライマーペアを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅産物の生成の有無を確認した。

（２）ＤＮＡ抽出

活性汚泥試料などからの DNA の抽出は、活性汚泥を用いた予備的な検討の結果 [22),39)] に基づいて、Zhu ら [40)]による塩化ベンジル抽出法を一部改変した方法で行った。

容量 2mL のチューブに 1mL の試料を取り、これに等量の Tris-EDTA（TE）緩衝液（pH8.0）を加えて撹拌した後、遠心分離（9,300×g、4 分）した。上清を除去した後、沈殿物に 250μL の抽出用緩衝液（pH9.0、100mM Tris-HCl 緩衝液、40mM EDTA)、50μL の 10%ドデシル硫酸ナトリウム、150μL の塩化ベンジルを加えて、5 分毎に撹拌しながら、50℃で 30 分間インキュベートした。次いで、150μL の 3M 酢酸ナトリウムを加えて、氷上に 15 分間置いた。混合物を遠心分離（20,900×g、4℃、15 分）した後、その上清を新しいチューブに採取した。これに等量のイソプロパノールを加えて DNA を沈殿させ、遠心分離（20,900×g、4℃、15 分）で上清を除去した。得られた DNA の沈殿に 70%エタノールを加えて洗浄した。遠心分離（20,900×g、4℃、2 分）で上清を除去した後、真空遠心機で乾燥させた。この DNA を 100μL の TE 緩衝液に溶解させ、－20℃で保存した。

（３）リアルタイムＰＣＲ法

リアルタイム PCR 法で PCR 増幅産物を定量する方法には、インターカレター法、ハイブリプローブ法、TaqMan プローブ法、Molecular Beacon 法などがあるが [34)]、本研究では、対象 DNA 配列に特異的な蛍光標識プローブの設計および合成が不要で簡便に測定可

能なインターカレター法を用いた。このインターカレター法とは、SYBR Green I などの 2 本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレター）を PCR 反応系に加える方法で、生成した 2 本鎖の量に比例した蛍光を測定することにより、PCR 増幅産物量を定量する方法である。

リアルタイム PCR 法による検出および定量は、Roche Diagnostics 社製の LightCycler system、並びに、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit を用いて、付属のプロトコルに従って行った。PCR 反応条件は、95℃で 10 分のプレインキュベーションの後、95℃で 15 秒の変性、62℃で 15 秒のアニーリング、72℃で 30 秒の伸張のサイクルを 45 回とした。蛍光強度の測定は、プライマーダイマーを除外するため、84℃で行った。また、PCR 増幅産物の融解曲線解析は、70℃から 95℃の範囲で行った。プライマーには、本研究で設計した JEM-1 株に特異的なプライマーペアである ES-1F/1R（**表 3-4-1** 参照）を用いた。Mg^{+2} 濃度は 4mM、プライマー濃度は、フォワードプライマー、リバースプライマーともに 0.5μM とした。なお、リアルタイム PCR 法による検出および定量は、試料およびスタンダードともに、1 つにつき 2 回行った。

検量線を作成するためのスタンダードの DNA 溶液の調製は、次のとおり行った。JEM-1 株を NB（nutrient broth）培地で対数増殖期後期まで培養を行った。培養液中の菌体を遠心分離で集菌し、滅菌水で洗浄した後、菌体濃度が波長 660nm の吸光度（OD_{660}）で 10 となるように滅菌水に再懸濁した。懸濁液中の細菌数をアクリジンオレンジ染色による直接計数法 [41]で求めた。既知の細菌数の懸濁液を活性汚泥に添加し、DNA を抽出した。この DNA の 10 倍希釈列を調製し、スタンダードの DNA 溶液として用いた。

３．３．２　活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の定量

実施設の活性汚泥中のエストロゲン分解細菌を定量的に把握し、エストロゲン分解細菌の菌数とエストロゲンの除去性能の関係について検討した。

（１）試料採取

エストロゲン分解細菌の存在状況を把握するため、第 1 章に示した調査Ⅱの調査対象処理場のうち、JEM-1 株を分離した栃木県内の T_1 処理場を含む標準法 7 ヶ所、OD 法 6 ヶ所において、水試料の採取に合わせて、反応タンクの活性汚泥混合液の採取を行った。なお、処理場の道県別の内訳は、北海道（H_3, H_4, H_5, H_6）および鹿児島県（K_2, K_3, K_4, K_5）が 4 ヶ所、栃木県（T_1, T_2, T_7）が 3 ヶ所、埼玉県（S_2）および千葉県（C_1）が 1 ヶ所である。試料採取は、夏季（7～9 月）と冬季（12 月）の計 2 回、午前中に 1 回行った。

次いで、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の消長を把握するため、標準法の T_1 処理場および OD 法の T_2 処理場において、第 1 章に示した調査Ⅲの水試料の採取に合わせて、反応タンクの活性汚泥混合液の採取を行った。試料採取は、T_1 処理場では 18 ヶ月間、T_2 処理場では 12 ヶ月間にわたって、月に 1 回、午前中に行った。

（２）分析方法

エストロゲン分解細菌の定量は、前項 3.3.1 に示すリアルタイム PCR 法で行った。なお、エストロゲン分解細菌の定量用試料は、分析までの間、－20℃で凍結保存した。また、MLSS 濃度および MLVSS 濃度は、下水試験方法[41]準じて測定した。

３．３．３　エストロゲン分解細菌の活性汚泥添加実験

実下水を用いたベンチスケール並びにパイロットスケールの実験装置の反応タンクにエストロゲン分解細菌を添加し、エストロゲン分解細菌を用いた活性汚泥処理における除去性能の向上について検討を行った。また同時に、エストロゲン分解細菌の消長を調べ、処理性能と関連付けた。

（１）ベンチスケール実験

ベンチスケール実験では、**図 3-3-2** に示す 2 基の標準法の小型実験装置（反応タンク容量 5L）を用いた。T_1 処理場の最初沈殿池流出水を実験原水として、2 基（実験系列、対照系列）の実験装置を同一の運転条件、すなわち、HRT を 8 時間（流入水量 15L/日）、SRT を 5 日（MLSS 濃度 1,200mg/L）として運転を行った。馴養運転後、実験系列の反応タンクに JEM-1 株の培養菌体を添加し、添加後の処理水中のエストロゲン濃度、および、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の消長を比較した。添加する菌体は、JEM-1 株を NB 培地で対数増殖後期まで培養した後、遠心分離（7,600×g、4℃、15 分間）で回収した菌体を滅菌水に懸濁して調製した。なお、実験原水および処理水は、24 時間のコンポジットサンプルとした。

実験原水および処理水中のエストロゲン濃度の測定は、第 1 章 1.3.3(2)に示した固相抽出－液体クロマトグラフ/タンデム質量分析（LC/MS/MS）法により行った。エストロゲン分解細菌 JEM-1 株の定量、MLSS 濃度の測定は、前項 3.3.2(2)に示す方法で行った。

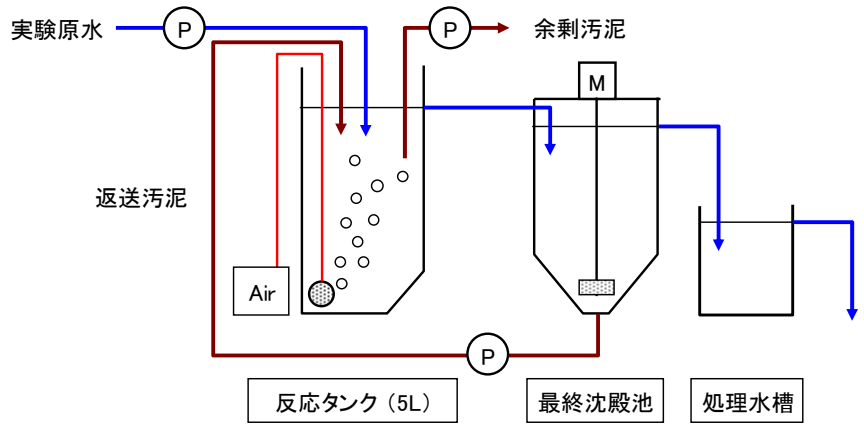


図 3-3-2　ベンチスケール実験装置

（２）パイロットプラント実験

パイロットプラント実験では、第 2 章 2.2.2 と同じ 2 系列の標準活性汚泥法の実験装置（図 2-2-2 参照）を用いた。T_1 処理場の最初沈殿池流出水を実験原水として、2 系列（実験系列、対照系列）の実験装置を同一の運転条件、すなわち、HRT を 8 時間、SRT を 5 日として運転を行った。馴養運転後、実験系列の反応タンクに JEM-1 株の培養菌体を添加し、添加後の処理水中のエストロゲン濃度、および、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の消長を比較した。

JEM-1 株の培養菌体の添加は、28 日間の実験期間中に 2 回行った。第 1 回目の添加（Run1）は、実験開始 0 日目に添加後の活性汚泥中の菌体濃度がおよそ 10^7 個/mL となるように行った。第 2 回目（Run2）の添加は、実験開始 14 日目に行い、添加後の活性汚泥中の菌体濃度がおよそ 10^8 個/mL となるように行った。添加する菌体の調製、試料の採取および分析方法は、(1)と同じとした。

３．３．４　固定化担体を用いたエストロゲン処理実験

エストロゲン分解細菌を固定化した担体を充填したベンチスケールの実験装置を用いて、実下水の二次処理水中に残留するエストロゲンの処理を行い、エストロゲン分解細菌を用いたエストロゲンの除去性能向上について検討を行った。

前章までの結果から、処理水中には E1 が残留する傾向にあり、エストロゲン活性に対する E1 の寄与が高いことや、標準法では生物処理工程の前後で E1 濃度が増加する現象が認められたことから、本項では、特に二次処理水中に残留する E1 の除去を目的とする実験を行った。

（１）エストロゲン分解細菌の固定化

下水処理に用いられる微生物の固定化方法には、結合固定化方法と包括固定化方法があるが、本研究では、調製の容易さから結合固定化方法を用いて検討を行った。また、結合固定化に用いる担体には、種々の形状、材質のものが開発されているが、本研究では、弱塩基性アニオン交換不織布 EPIX-A 膜（株式会社イー・シー・イー製）を使用した。この不織布は、ポリエチレン不織布に放射線グラフト重合法により 3 級アミンを導入したもので、各種担体を用いた予備実験の結果から、初期吸着性に優れる点を考慮して選定した。

エストロゲン分解細菌の担体への固定化は、200mL の NB 培地で対数増殖後期まで培養した培養液に、7.5mm 角に切断した不織布（1 枚 15cm 角）を浸漬させ、一晩振とう培養を行うことにより行った。固定化した担体は、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、実験に供した。なお、エストロゲン分解細菌を固定化しない対照実験用には、分解菌を含まない NB 培地に担体を一晩浸漬し、同様に洗浄したものを用いた。

また、固定化されたエストロゲン分解細菌の定量は、3.3.2 に示すリアルタイム PCR 法で行った。なお、固定化担体からの DNA の抽出は、担体をハサミで細かく切断した後、市販の DNA 抽出キット（QIAGEN 社製 Dneasy）を用いて、キット付属の説明書に記載

されたグラム陰性細菌からの DNA 抽出方法に準拠して行った。

（２）回分処理実験

回分処理実験では、撹拌機付きの反応容器を用いて、これに**表 3-3-1** に示す合成下水 1.25L を入れ、さらに終濃度が 10μg/L となるように E1 標準溶液を添加した。ここに前項(1)に示す担体を不織布 1 枚分（反応容器の容積当りの担体投入量として 18m²/m³）投入し、撹拌しながら 20℃で反応させた。反応開始時（0 時間）、反応開始後 1 時間、3 時間および 5 時間経過時に反応容器中の反応液を適量採取し、そのエストロゲン濃度を測定した。実験は、エストロゲン分解細菌 JEM-1 株、JEM-2 株および JEM-3 株のそれぞれを固定化した担体、並びに、エストロゲン分解細菌を固定化していない対照用の担体の 4 つについて行った。

また、JEM-1 株を固定化した担体について、上記の回分処理実験終了後も反応を続け、7 日目、14 日目および 18 日目に反応液を全量交換した。反応液交換直後（0 時間）、交換後 1 時間、3 時間および 5 時間経過時に反応液を適量採取し、反応液中のエストロゲン濃度を測定した。

実験原水および処理水中のエストロゲン濃度の測定は、第 1 章 1.3.3(2)に示した固相抽出－LC/MS/MS 法により行った。

表 3-3-1　合成下水組成 [22)]

CH_3COONa	279.0mg/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	45.0mg/L
NaCl	45.0mg/L
KH_2PO_4	18.0mg/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	13.8mg/L
NH_4Cl	30.0mg/L
ポリペプトン	90.0mg/L
酵母エキス	9.0mg/L

（３）連続処理実験

連続処理実験では、**図 3-3-3** に示すとおり、3 基のウォータージャケット（水温 20℃）付の完全混合型反応槽(有効容積 0.9L)を用いた。第 1 系列および第 2 系列の反応槽には、エストロゲン分解細菌 JEM-1 株を固定化した担体を、第 3 系列の反応槽には、エストロゲン分解細菌を固定化していない対照用の担体を、反応槽の有効容積当りの担体投入量が 25m²/m³（7.5mm 角の担体 400 枚分に相当）となるようにそれぞれ投入した。なお、第 2 系列については、1 週間に 1 回、全ての担体を新しいものに交換した。この実験装置に反応槽での滞留時間が 30 分間となるように実験原水を通水（43L/日）して、1 週間に 2 回の頻度で実験原水および処理後の処理水のエストロゲン濃度を測定した。

実験原水には、T_1 処理場の最初沈殿池流出水を原水に用いた標準法のパイロットプラントの二次処理水に、添加濃度が 50ng/L となるように E1 溶液を連続的に添加したものを用いた。なお、実験原水および処理水は、24 時間のコンポジットサンプルとし、エストロゲン濃度の測定は、(2)と同じとした。

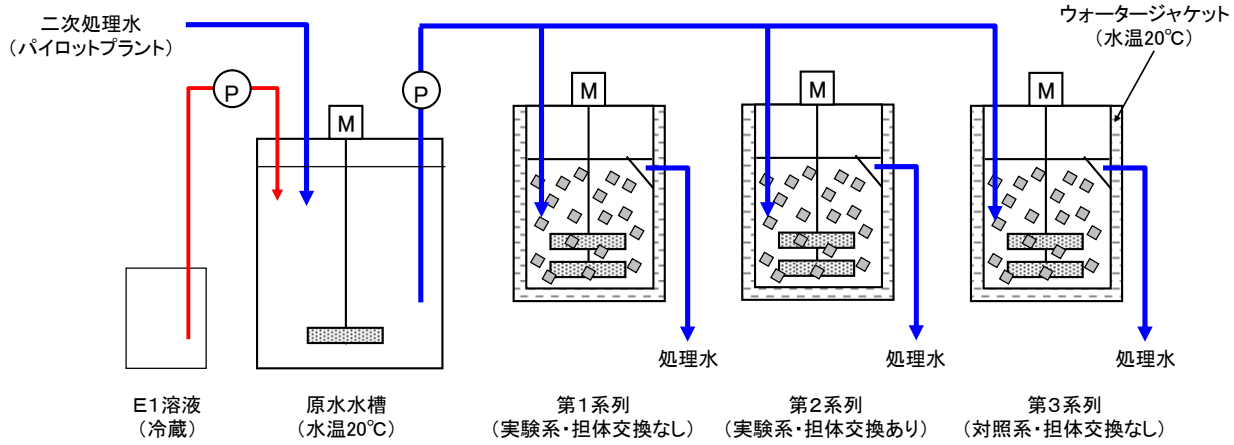


図 3-3-3　固定化担体連続処理実験装置

３．４　結果および考察

３．４．１　エストロゲン分解細菌の検出法の検討

（１）プライマーの設計およびその特異性

設計したエストロゲン分解細菌 JEM-1 株に特異的なプライマーペア（ES-1F/1R）の塩基配列などを**表 3-4-1** に示す。

フォワードプライマー（ES-1F）、リバースプライマー（ES-1R）の大きさはいずれも 25 塩基で、設計したプライマーペアにより増幅される DNA 断片の大きさは 509 塩基対であった。BLAST 検索の結果、設計したプライマーペアと完全に相補的な DDBJ 上の 16S-rDNA 塩基配列は、検出対象である JEM-1 株のみであった。

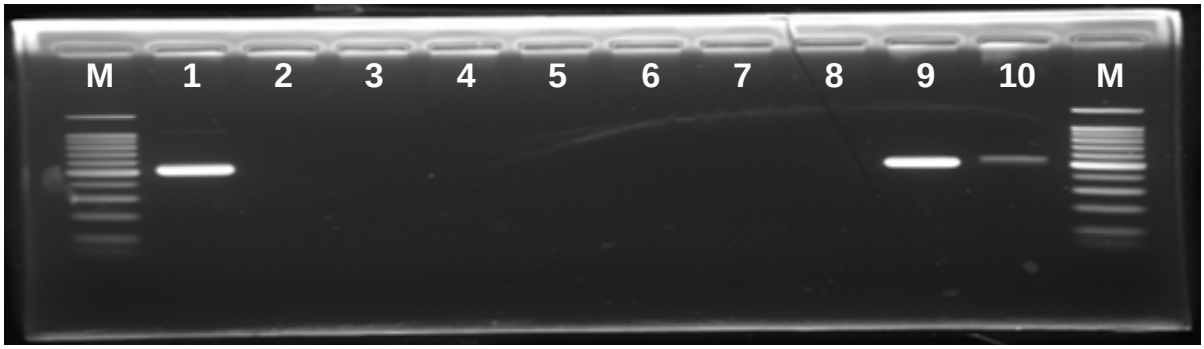
次に、設計したプライマーペア ES-1F/1R による PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動の結果を**図 3-4-1** に示す。

検出対象の JEM-1 株（レーン 1）は、上述した DNA 断片の大きさの位置に PCR 増幅産物によるバンドが認められ、設計したプライマーペアで検出できることが確認された。

表 3-4-1　プライマー塩基配列

プライマー名	塩基配列 (5'-3')	Position※	塩基長 [bp]	GC含有率 [%]	PCR増幅産物の塩基長 [bp]	Tm [℃]
ES-1F	TTGAAACTGGGTAGCTAGAATCCTG	575	25	44	509	62
ES-1R	CAACTGAATGATGGCAACTAAGGAC	1083	25	44		63

※ *Eshelichia coli* (accession No. V00348)の塩基配列を基準にした標的位置



1: JEM-1 (Group I) 2: JEM-2 (Group II) 3: JEM-3 (Group II) 4: JEM-14 (Group III)

5: *Sphingobium yanoikuyae* (NRBC15102^T) 6: *Sphingomonas paucimobilis* (NRBC13935^T)

7: *Novosphingobium capsulatum* (NRBC12533^T) 8: *Novosphingobium resinovorum* (NRBC16058)

9: *Novosphingobium tardaugens* ARI-1 (NBRC16725^T) 10: 活性汚泥（標準法T_1）

M: 100bp DNA Ladder

図 3-4-1　プライマーペア ES-1F/1R の PCR 増幅産物の電気泳動結果

また、活性汚泥試料（レーン 10）でも、同じ位置に PCR 増幅産物によるバンドが認められたことから、設計したプライマーペアは、活性汚泥試料中の JEM-1 株の検出が可能であると考えられた。

検出対象以外の単離株（レーン 2～4）や *N. tardaugens* 以外の近縁種の細菌株（レーン 5～8）では、PCR 増幅産物によるバンドが認められなかったが、*N. tardaugens*（レーン 9）では、JEM-1 株と同じ位置に PCR 増幅産物によるバンドが確認された。JEM-1 株と *N. tardaugens* の 16S-rDNA 塩基配列の相同性は 96.6%と比較的高く、**図 3-2-1** に示したとおり、遺伝子系統解析の結果、2 株で一つのクラスターを形成している。設計したプライマーの塩基配列と *N. tardaugens* の対象領域の 16S-rDNA 塩基配列の間では、**表 3-4-2** に示すとおり、フォワードプライマー（ES-1F）で 2 ヶ所、リバースプライマー（ES-1R）で 1 ヶ所のミスマッチがあった。これに対して、BLAST による相同性検索の結果、*N. tardaugens* 以外の 3 つの標準株が *N. tardaugens* と同じ数のミスマッチしかなく、設計したプライマーペアで検出される可能性が考えられた。しかし、3 株はいずれも海洋性であることから [42),43),44)]、これらの細菌が活性汚泥中に存在し、検出されることはほとんど無いものと考えられる。一方、JEM-1 株以外の単離株（JEM-2 株、JEM-3 株および JEM-14 株）や、淡水性や土壌性の *Sphingomonas* は、対象領域の 16S-rDNA 塩基配列に多数のミスマッチがあり、**図 3-4-1** に示すとおり、設計したプライマーペアによる PCR 増幅産物の生成は認められなかった。

以上のことから、設計したプライマーペアは、*Novosphingobium* 属に属するエストロゲン分解細菌である JEM-1 株および *N. tardaugens* ARI-1 株を検出し、活性汚泥中のこれらのエストロゲン分解細菌の特異的な検出について、実用的な問題はないものと判断した。なお、これらの 2 株は、前節 3.2 に示したとおり、エストロゲンの分解特性において、E2 および E1 を分解し、E2 と比較して E1 の分解が遅い点で共通するが、JEM-1 株は EE2 を分解するのに対して、*N. tardaugens* ARI-1 株は EE2 を分解できない点で異なる。また、16S-rDNA 塩基配列の相同性が 97.0%未満の場合には、DNA-DNA 相同性は 70%以上を示さず、別種であると考えられているが [45)]、両株の 16S-rDNA 塩基配列の相同性は 96.6 %であることから、両株はきわめて近縁であるものと考えられる。

表 3-4-2　プライマー塩基配列の相同性検索の結果

プライマー	細菌名	Accession No.	ミスマッチ数	16S-rDNA塩基配列
ES-1F	*Novosphingobium* sp. JEM-1	AB219359	0	T T G A A A C T G G G T A G C T A G A A T C C T G
	Novosphingobium tardaugens ARI-1^T	AB070237	2	* * * * * * * * * A * * * * * * * * * * T * *
	Erythrobacter litoralis DSM8509^T	AB013354	2	* * * * * * * * * * A * G * * * * * * * * * * *
	Porphyrobacter donghaensis SW-132^T	AY559428	2	* * * * * * * * * * * A * * * * * * * * * T * *
	Agrobacterium sanguineum IAM 12620^T	AB021493	2	* * * * * * * * * * * A * * * * * * * * * T * *
ES-1R	*Novosphingobium* sp. JEM-1	AB219359	0	G T C C T T A G T T G C C A T C A T T C A G T T G
	Novosphingobium tardaugens ARI-1^T	AB070237	1	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * A * * * * *
	Erythrobacter litoralis DSM8509^T	AB013354	1	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * T * * * * *
	Porphyrobacter donghaensis SW-132^T	AY559428	1	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * A * * * * *
	Porphyrobacter sanguineus IAM 12620^T	AB021493	1	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * A * * * * *

注）*は当該塩基が最上段に示した*Novosphingobium* sp. JEM-1の塩基と同じであることを表す。

（２）リアルタイムＰＣＲ法による検出・定量

ここでは、先に(1)で示したプライマーペア ES-F1/R1PCR 法について、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の検出および定量に適用が可能か、内部標準法による定量を行って検討した。すなわち、3.3.1(3)に示す方法で調製した JEM-1 株の菌体懸濁液（菌体濃度 3.75×10^{10} 個/mL）を、T_1 処理場の活性汚泥を用いて段階希釈して、JEM-1 株の添加菌体濃度を 3.75×10^{4} 個/mL～3.75×10^{8} 個/mL の範囲で 5 段階の 10 倍希釈列をした。この JEM-1 株の添加菌体を含む活性汚泥と菌体を添加していない（菌体無添加）活性汚泥からそれぞれ DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法に供した。試料から抽出された DNA 濃度およびリアルタイム PCR 法の結果（サイクル数）を**表 3-4-3** に、JEM-1 株の添加菌体濃度と平均サイクル数（Ct 値）のプロットを**図 3-4-2** に示す。

表 3-4-3　リアルタイム PCR の結果

菌体濃度 [個/mL]	サイクル数 [-]		全DNA濃度 [μg/mL]	A_{260}/A_{280} [-]
3.75×10^{4}	28.5	28.9	357	1.82
	29.2		350	1.82
3.75×10^{5}	28.6	28.1	347	1.83
	27.6		356	1.82
3.75×10^{6}	27.3	26.7	303	1.84
	26.2		376	1.82
3.75×10^{7}	23.1	23.3	315	1.84
	23.5		357	1.82
3.75×10^{8}	19.8	19.9	375	1.83
	20.0		381	1.83
無添加	29.0	28.8	350	1.82
	28.6		375	1.81

注）サイクル数の右欄は2回の測定結果の平均値

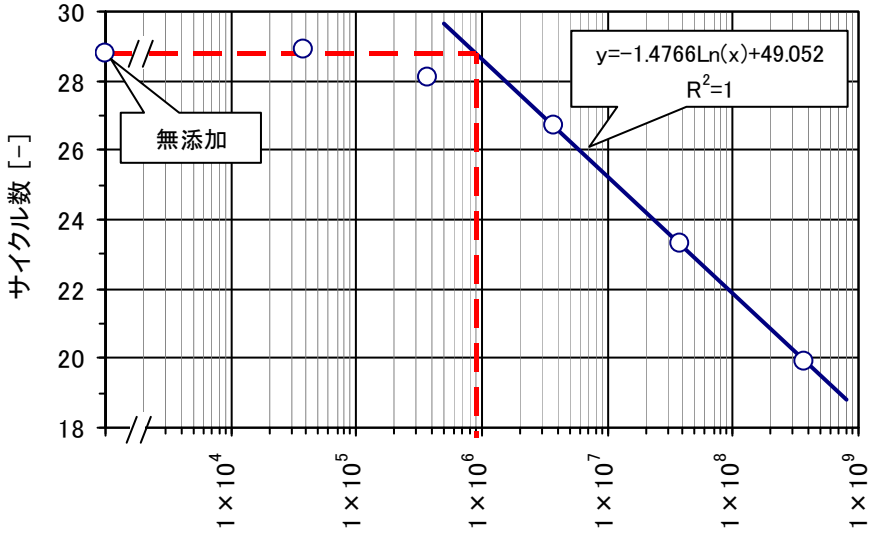


図 3-4-2　添加菌体濃度とサイクル数の関係

各試料から抽出されたDNA濃度には著しいばらつきは無く、また、DNAの純度の目安となる260nmと280nmの吸光度の比（A_{260}/A_{280}）は、精製DNAの目安である1.8[46]を上回っていることから、DNA抽出過程における問題は特にないと判断された。

内部標準法では、試料に添加した菌体の濃度が高い場合には、元の試料中に存在する対象微生物の菌体濃度は、添加した菌体濃度に対して無視できる程度であり、サイクル数は添加した菌体濃度に応じて変化する。一方、添加した菌体濃度が低くなるに従って、元の試料中に存在する対象微生物の菌体濃度が、添加した菌体濃度に対して無視できない割合となって、サイクル数に影響を及ぼすようになり、最終的には元の試料中に存在する対象微生物の菌体濃度に対応したサイクル数となる。本検討においても、**図 3-4-2** に示すとおり、JEM-1株の添加菌体濃度とサイクル数の間にこのような関係が認められ、JEM-1株の添加菌体濃度が3.75×10^6個/mL以上では、添加菌体濃度に応じてサイクル数が減少したが、3.75×10^4個/mL以下では、サイクル数は横ばいとなった。この結果から、添加菌体濃度に応じてサイクル数が変化した範囲で近似式を求め、菌体無添加の場合のサイクル数を外挿することにより､元の活性汚泥中に存在する菌体濃度は9.1×10^5個/mLと求められた。また、PCR増幅産物の融解試験において、単一の融解曲線が得られ、目的とするDNA塩基配列のみが増幅されていることが確認された。

以上の検討結果から、設計したプライマーペアは、リアルタイムPCR法を用いた活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の検出および定量に適用可能であると判断した。

３．４．２　活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の検出および定量

（１）エストロゲン分解細菌の存在状況

全国13ヶ所の下水処理場の活性汚泥中からプライマーペアES-F1/R1で検出された*Novosphingobium*属に属するエストロゲン分解細菌（以下、エストロゲン分解細菌*Novosphingobium* sp.またはエストロゲン分解細菌という）の細菌数および処理水中のエストロゲン濃度の測定結果を**図 3-4-3** に、その中央値、最大値および最小値を**表 3-4-4** に示す。

エストロゲン分解細菌*Novosphingobium* sp.は、JEM-1株が分離されたT_1処理場を含めて調査したすべての活性汚泥から検出された。活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の細菌数は､標準法では2.2×10^5～7.7×10^6個/mg-MLVSS（中央値1.3×10^6個/mg-MLVSS)、OD法では3.5×10^5～9.7×10^6個/mg-MLVSS（中央値1.2×10^6個/mg-MLVSS）であり、処理方式による大きな差は認められなかった。また、夏季調査では7.2×10^5～9.7×10^6個/mg-MLVSS（中央値1.6×10^6個/mg-MLVSS)、冬季調査では2.2×10^5～7.7×10^6個/mg-MLVSS（中央値1.1×10^6個/mg-MLVSS）で、全体的にみて夏季調査の方が高い傾向にあった。

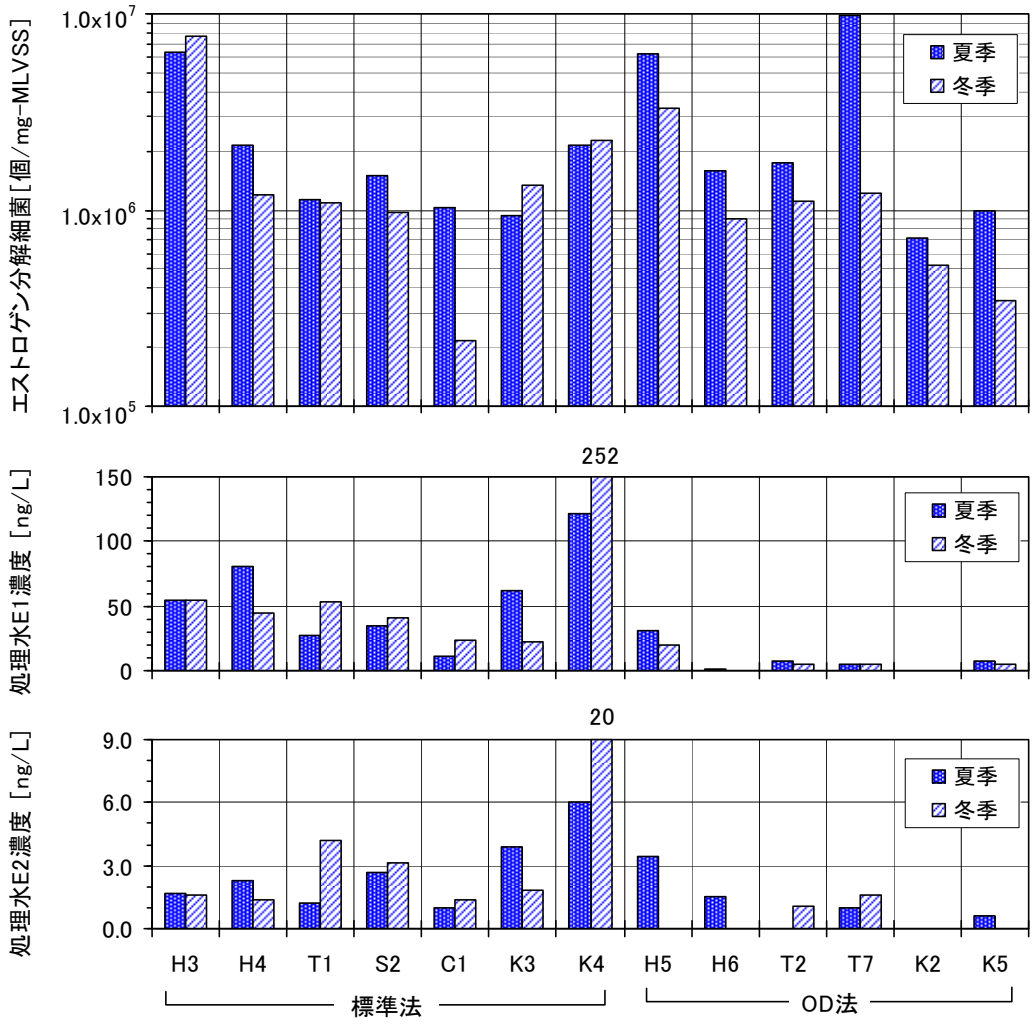


図 3-4-3　エストロゲン分解細菌数および処理水中のエストロゲン濃度の測定結果

表 3-4-4　エストロゲン分解細菌数およびエストロゲン濃度の測定結果

処理方式	調査時期	エストロゲン分解細菌数 [個/mg-MLVSS]	エストロゲン濃度 E1 流入下水 [ng/L]	E1 処理水 [ng/L]	E1 除去率 [%]	E2 流入下水 [ng/L]	E2 処理水 [ng/L]	E2 除去率 [%]
標準法	夏季	$1.5x10^6$ ($9.4x10^5$-$6.4x10^6$)	27 (13-35)	55 (11-122)	-162 (-309-67.3)	18 (5.7-23)	2.3 (1.0-6.0)	87.2 (52.6-92.5)
	冬季	$1.2x10^6$ ($2.2x10^5$-$7.7x10^6$)	34 (20-74)	45 (22-252)	-33.4 (-501-36.9)	20 (10-24)	9.5 (1.2-20)	89.5 (6.6-93.6)
	全体	$1.3x10^6$ ($2.2x10^5$-$7.7x10^6$)	30 (13-74)	49 (11-252)	-64.0 (-501-67.3)	18 (5.7-24)	2.1 (1.0-20)	86.0 (6.6-93.6)
OD法	夏季	$1.7x10^6$ ($7.2x10^5$-$9.7x10^6$)	15 (8.2-27)	6.4 (<0.5-31)	69.5 (-73.7->96.2)	11 (5.0-17)	0.8 (<0.5-3.4)	92.1 (75.9-94.8)
	冬季	$1.0x10^6$ ($3.5x10^5$-$3.3x10^6$)	21 (4.8-59)	4.8 (<0.5-20)	84.1 (15.6->97.4)	9.5 (1.2-14)	<0.5 (<0.5-1.6)	89.5 (58.3->96.1)
	全体	$1.2x10^6$ ($3.5x10^5$-$9.7x10^6$)	20 (4.8-59)	5.0 (<0.5-31)	76.9 (-73.7->97.4)	11 (1.2-17)	0.6 (<0.5-3.4)	90.5 (58.3->96.1)

注）上段は中央値、下段括弧内は最小値～最大値を示す。

次に、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度およびエストロゲン除去率との関係を**図 3-4-4** に示す。処理水中のエストロゲン濃度は、標準法の方が高い傾向にあったが、上述したとおり、エストロゲン分解細菌の細菌数は、処理方式による違いが無く、同レベルであったことから、両者の間に関係性は認められなかった。また、**図 3-4-3** に示したように、処理場毎のエストロゲン分解細菌の細菌数の増減と処理水中のエストロゲン濃度の増減の間にも、明確な関係性は認められなかった。

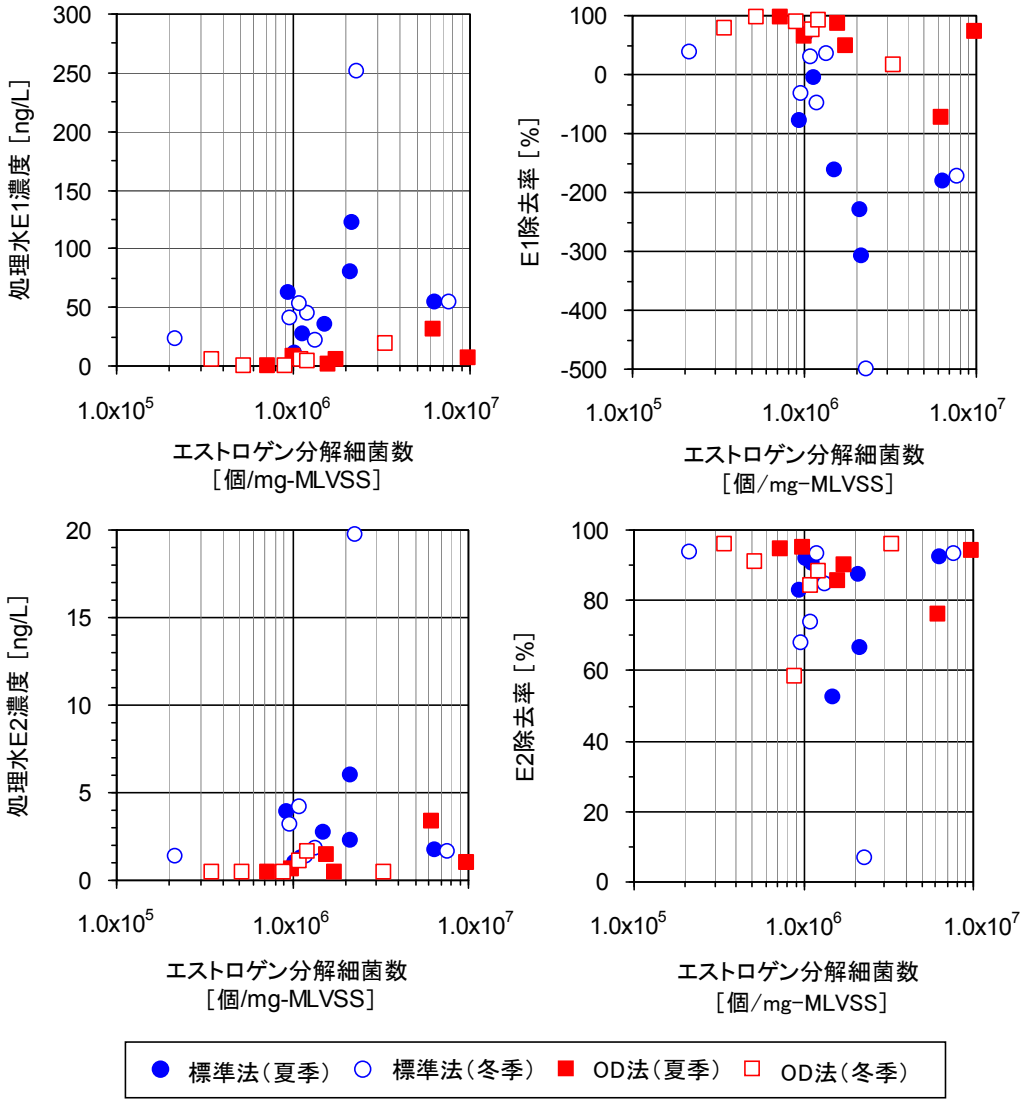


図 3-4-4　エストロゲン分解細菌数と処理水エストロゲン濃度および除去率との関係

このように、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、調査した全ての処理場の活性汚泥から検出され、その細菌数も同レベルであったことから、活性汚泥中に一般的に存在しているものと考えられる。しかし、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数により、異なる下水処理場間のエストロゲンの除去性能を比較することはできなかった。これは、3.2 節に示したとおり、活性汚泥中にはエストロゲンを分解する能力を有

する細菌が多種存在しており、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.がエストロゲン除去の主要な役割を果たしていると限られないことや、前章に示したとおり、処理水中のエストロゲン濃度は、流入下水中のエストロゲン抱合体の濃度やエストロゲン抱合体からの形態変化などの影響を受けるためと考えられる。

（２）エストロゲン分解細菌の消長

標準法の T_1 処理場（以下、標準法 T_1 という）と OD 法の T_2 処理場（以下、OD 法 T_2 という）での通年調査における活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. の細菌数、並びに、流入下水および処理水中のエストロゲン濃度の変動を**図 3-4-5** に、その中央値、最大値および最小値を**表 3-4-5** に示す。

表 3-4-5　エストロゲン分解細菌の細菌数およびエストロゲン濃度の測定結果（通年調査）

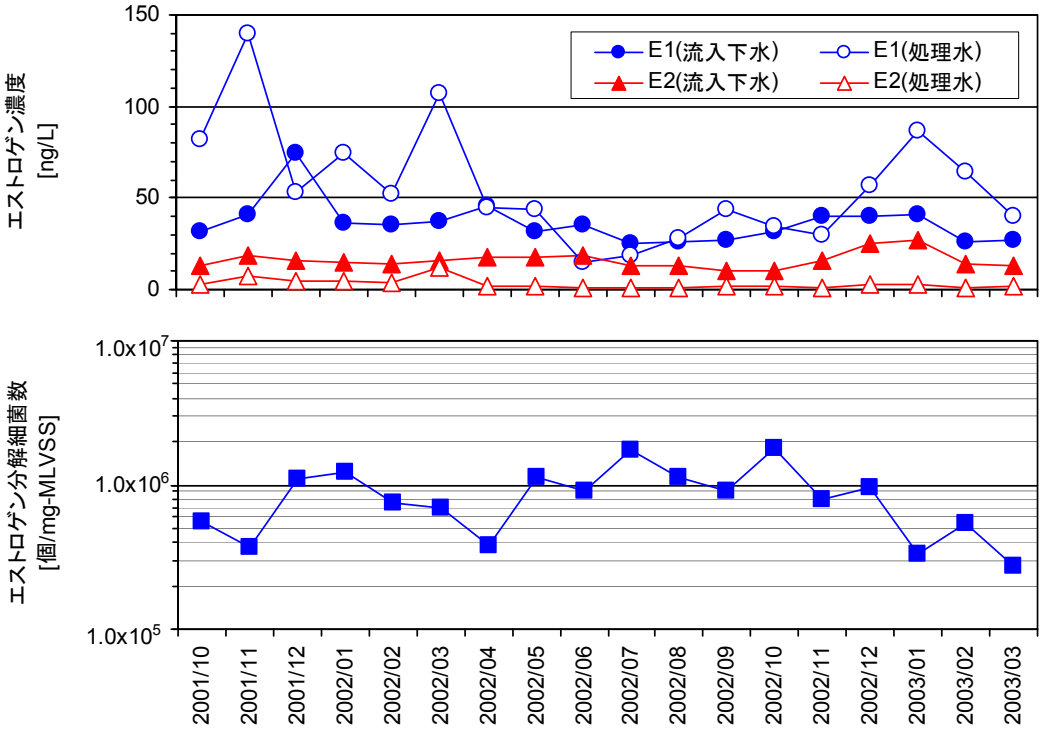
処理場名	エストロゲン分解細菌数	エストロゲン濃度					
		E1			E2		
	[個/mg-MLVSS]	流入下水 [ng/L]	処理水 [ng/L]	除去率 [%]	流入下水 [ng/L]	処理水 [ng/L]	除去率 [%]
標準法T_1	8.5×10^5 (2.7×10^5-1.8×10^6)	36 (25-74)	49 (14-140)	-43.8 (-241-57.3)	15 (10-27)	2.0 (0.5-12)	87.5 (21.4-96.2)
OD法T_2	2.3×10^6 (1.1×10^6-9.7×10^6)	28 (17-76)	4.4 (2.4-9.7)	84.6 (52.1-92.9)	13 (8.6-24)	<0.5 (<0.5-5.9)	94.6< (60.1-97.9<)

注）上段は中央値、下段括弧内は最小値～最大値を示す。

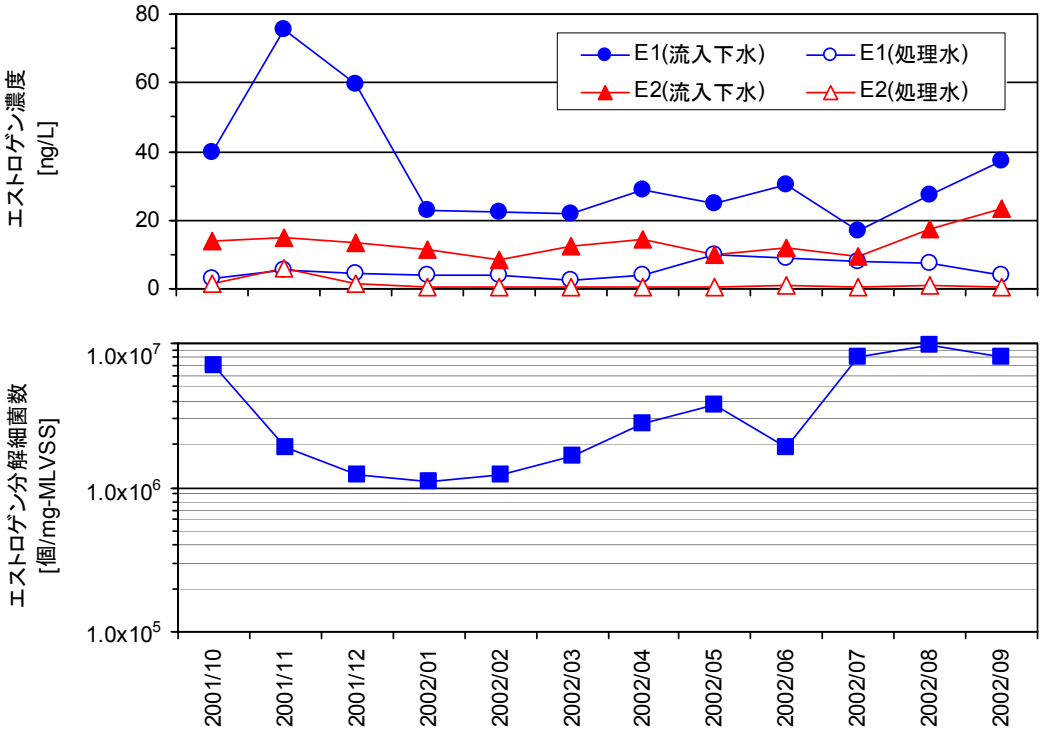
第 1 章 **1.4.4** にも示したとおり、OD 法 T_2 では、処理水中のエストロゲン濃度は低く安定し、処理水中のエストロゲン濃度の中央値は、E1 は 4.4ng/L、E2 は検出下限値（0.5ng/L）未満であった。一方、標準法 T_1 では、処理水中の E1 濃度が流入下水中の濃度を上回る現象が多数認められ、処理水中の E1 濃度の中央値は 49ng/L と高かった。また、E2 は除去効果が認められたが、OD 法 T_2 と比較して除去率が低く、処理水中の E2 濃度の中央値は 2.0ng/L であった。

エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、標準法 T_1、OD 法 T_2 の全ての活性汚泥試料から検出された。エストロゲン分解細菌の細菌数は、標準法 T_1 では、2.7×10^5～1.8×10^6 個/mg-MLVSS（中央値 8.5×10^5 個/mg-MLVSS）、OD 法 T_2 では、1.1×10^6～9.7×10^6 個/mg-MLVSS（中央値 2.3×10^6 個/mg-MLVSS）で、OD 法 T_2 の方が標準法 T_1 よりも高い傾向にあった。この理由の一つとして、JEM-1 株の最大比増殖速度は $0.03h^{-1}$（NB 培地，35℃）で、他の分離菌株の最大比増殖速度（0.29～$0.38h^{-1}$、同前）と比べて遅いため[6]、SRT の大きい OD 法の方がその細菌数の維持に有利であることが考えられる。また、処理場毎の水温とエストロゲン分解細菌の細菌数の間には、**図 3-4-6** に示すとおり、明確な相関関係が認められ、細菌数の維持に及ぼす水温の影響が大きいことが明らかとなった。

次に、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度およびエストロゲン除去率の関係を**図 3-4-7** に示す。



(a) 標準法 T_1



(b) OD 法 T_2

図 3-4-5　エストロゲン濃度とエストロゲン分解細菌数の変動（通年調査）

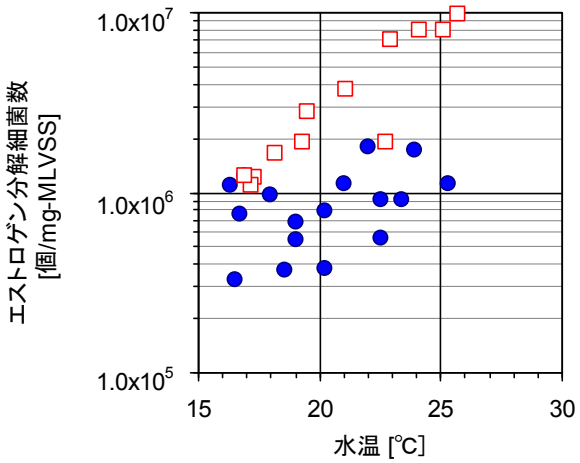


図 3-4-6　水温とエストロゲン分解細菌数の関係（通年調査）

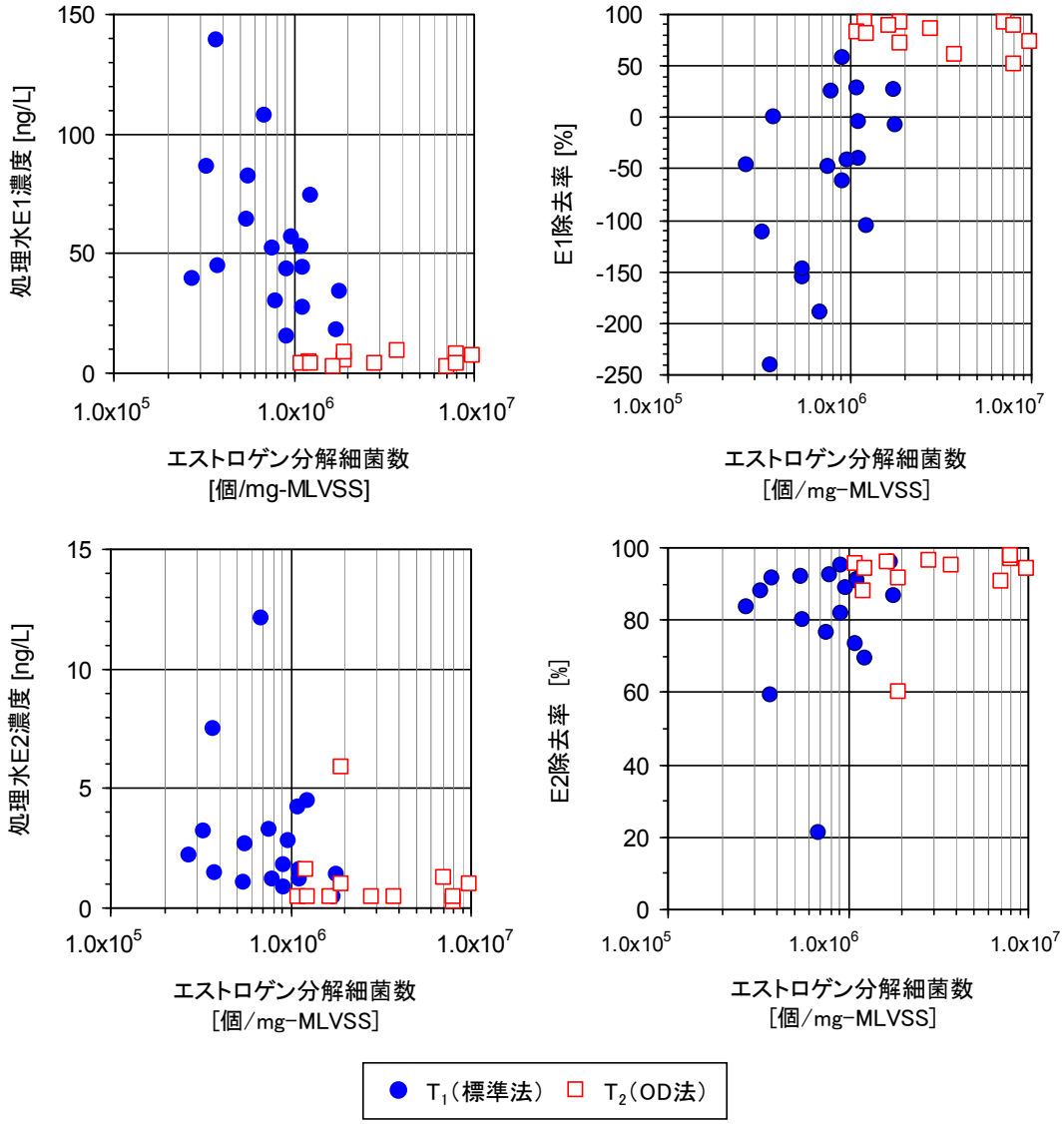


図 3-4-7　エストロゲン分解細菌数と処理水エストロゲン濃度および除去率との関係（通年調査）

OD 法 T_2においては、処理水中のエストロゲン濃度が全体的に低いため、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数とエストロゲン濃度や除去率の間に関係性は認められなかった。一方、標準法 T_1においては、E2 では、これらの間に明確な関係性は認められなかったが、E1 では、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数が高いほど、処理水中の濃度は低い傾向が認められ、E1 の除去にはエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が関与していることが示唆された。3.2 節に述べたとおり、活性汚泥中には E2 を E1 に変換できる細菌は多数存在するため、E2 の除去過程では、特定の分解細菌のみの役割が処理性能に反映される可能性が低いのに対して、E1 までを分解できる細菌は比較的限られていることから[5),6)]、E1 の除去過程では、E1 の分解能力を有する特定の分解細菌の存在が良好な処理を行ううえで重要であると考えられる。

３．４．３　分解細菌添加によるエストロゲン除去向上の検討

（１）ベンチスケール実験

ベンチスケールでのエストロゲン分解細菌の添加実験における活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数、並びに、実験原水および処理水中のエストロゲン濃度の変化を**図 3-4-8** に、また、処理水中のエストロゲン濃度に有意な差が認められたエストロゲン分解細菌の添加後１日目から５日目までの間の測定結果を**表 3-4-6** に示す。

表 3-4-6　エストロゲン濃度およびエストロゲン分解細菌数の測定結果（ベンチスケール実験）

項　目		実験系	対照系
エストロゲン分解細菌 [個/mL]		1.4×10^7 (4.7×10^6～4.7×10^7)	1.6×10^6 (3.0×10^5～4.7×10^6)
E1	実験原水 [ng/L]	46 (40～53)	
	処理水 [ng/L]	8.8 (3.4～16)	22 (11～30)
	除去率 [%]	81 (70～93)	53 (43～74)
E2	実験原水 [ng/L]	20 (17～24)	
	処理水 [ng/L]	1.0 (<0.5～2.2)	2.9 (1.0～4.3)
	除去率 [%]	94 (90～98<)	85 (78～96)

注）上段は平均値、下段は最小値～最大値を示す

エストロゲン分解細菌の添加後１日目から５日目までの処理水中のエストロゲン濃度は、エストロゲン分解細菌を添加した実験系では、E1 が 8.8ng/L（中央値、以下同じ）、E2 が 1.0ng/L であるのに対して、エストロゲン分解細菌を添加しなかった対照系では、E1 が 22ng/L、E2 が 2.9ng/L であり、実験系の処理水中のエストロゲン濃度は、対照系と比較して有意に低く、エストロゲン分解細菌の添加による効果が明確に認められた。

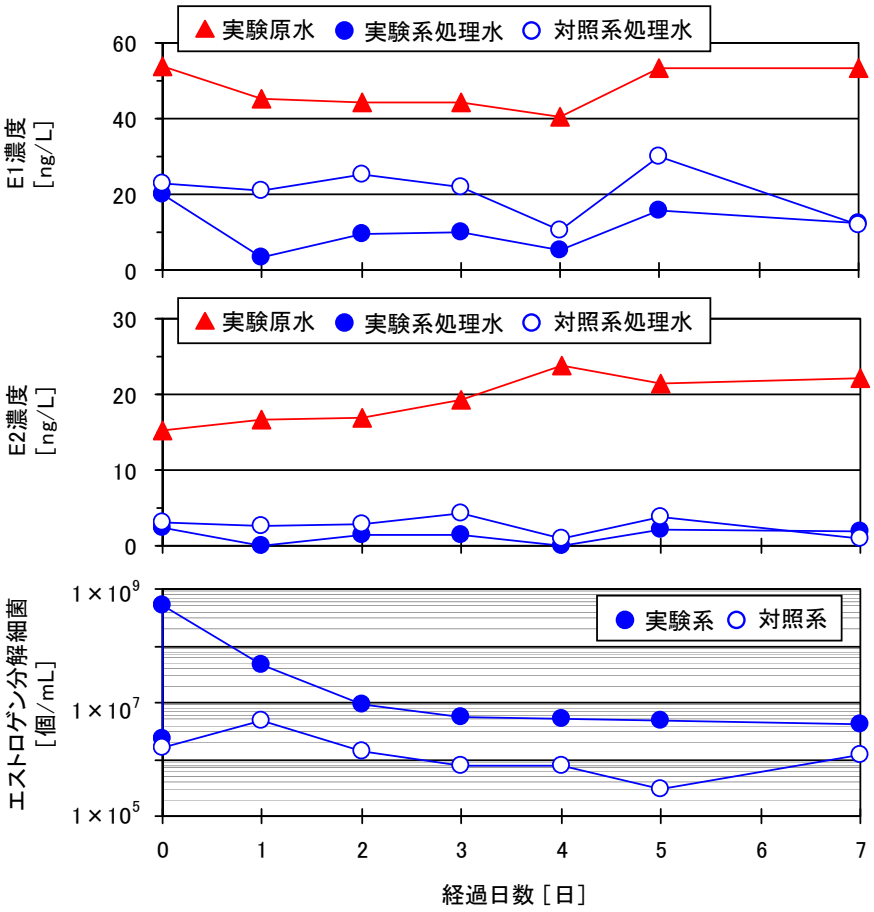


図 3-4-8　エストロゲン濃度およびエストロゲン分解細菌数の挙動（ベンチスケール実験）

実験系のエストロゲン分解細菌の細菌数は、添加直後 2.4×10^6 個/mL から 5.1×10^8 個/mL に増加したが、添加後 2 日目には 9.6×10^6 個/mL にまで減少し、添加されたエストロゲン分解細菌の大部分は、添加後すぐに処理水中にウォッシュアウトされたことが明らかとなった。しかし、添加後 3 日目以降、実験系の細菌数は 5.0×10^6 個/mL 程度でほぼ横ばいとなり、対照系と比較して有意に高いレベルで維持された。

ベンチスケール実験におけるエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度およびエストロゲン除去率の関係を図 3-4-9 に示す。図に示すとおり、エストロゲン分解細菌の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度やエストロゲン除去率の間には明確な関係性が認められ、エストロゲン分解細菌の細菌数が高いほど、エストロゲン除去率は高くなる傾向が認められた。このことから、活性汚泥処理プロセスの運転条件の変更やエストロゲン分解細菌の添加などの方法により、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数を高くすることにより、エストロゲンの除去性能を向上できることが明らかとなった。また、このことは、実際の活性汚泥処理プロセスにおいて、活性汚泥中に存在するエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.がエストロゲンの除去に貢献していることを示唆するものと考えられる。

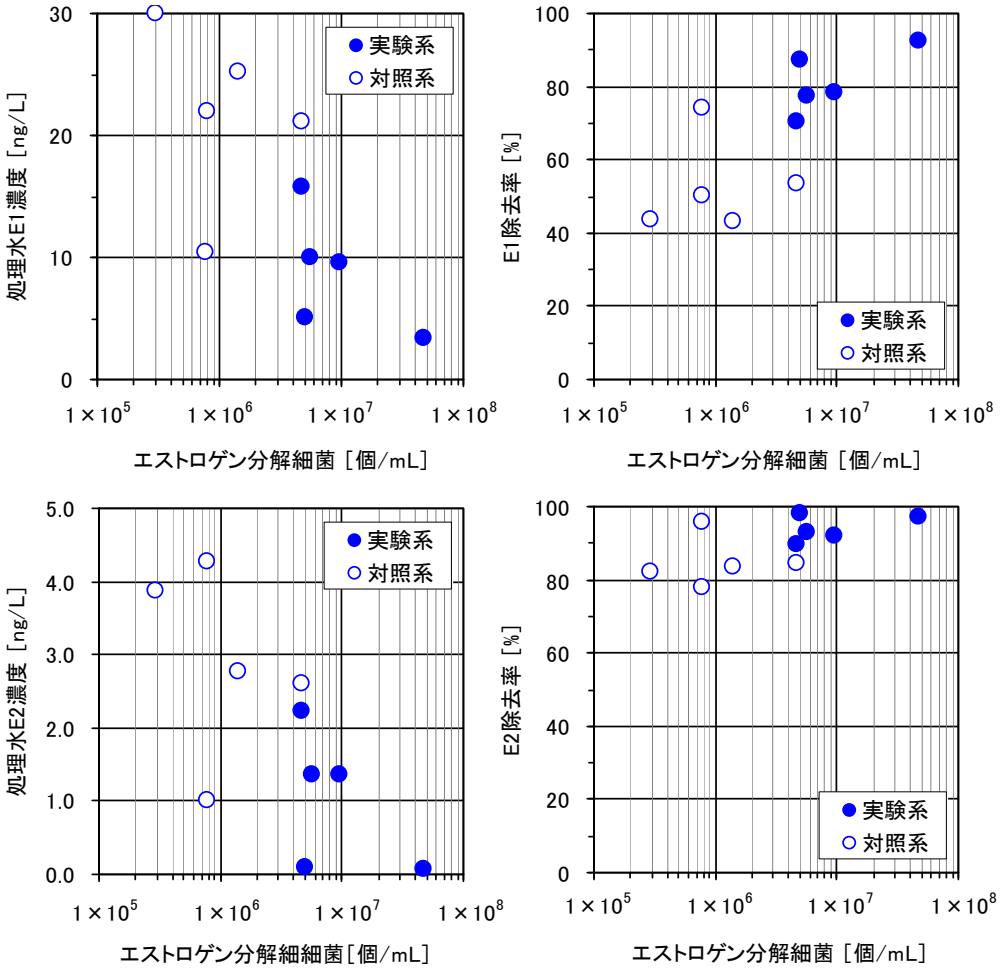


図 3-4-9　エストロゲン分解細菌数と処理水エストロゲン濃度および除去率との関係
（ベンチスケール実験）

（２）パイロットプラント実験

パイロットスケールでのエストロゲン分解細菌の添加実験における活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数、並びに、実験原水および処理水中のエストロゲン濃度の変化を**図 3-4-10** に、また、各 Run のエストロゲン分解細菌の添加後 1 日目から 14 日目までの間の測定結果を**表 3-4-7** に示す。

エストロゲン分解細菌の添加濃度を 10^7 個/mL 程度とした Run1 では、実験系のエストロゲン分解細菌の細菌数は、添加直後 3.8×10^6 個/mg-MLVSS から 2.3×10^7 個 mg-MLVSS に増加したが、添加後 1 日目には添加前と同程度にまで減少し、添加後 5 日目以降は対照系との差は認められなくなった。また、処理水中のエストロゲン濃度は、対照系ではばらつきが大きく、実験系と比較して中央値は高くなったが、著しく濃度が高い 1 日目と 5 日目以外の差は小さく、また、添加前（0 日目）も対照系の方がやや高かったことから、エストロゲン分解細菌の添加による有意な差であるかの判断が困難であった。

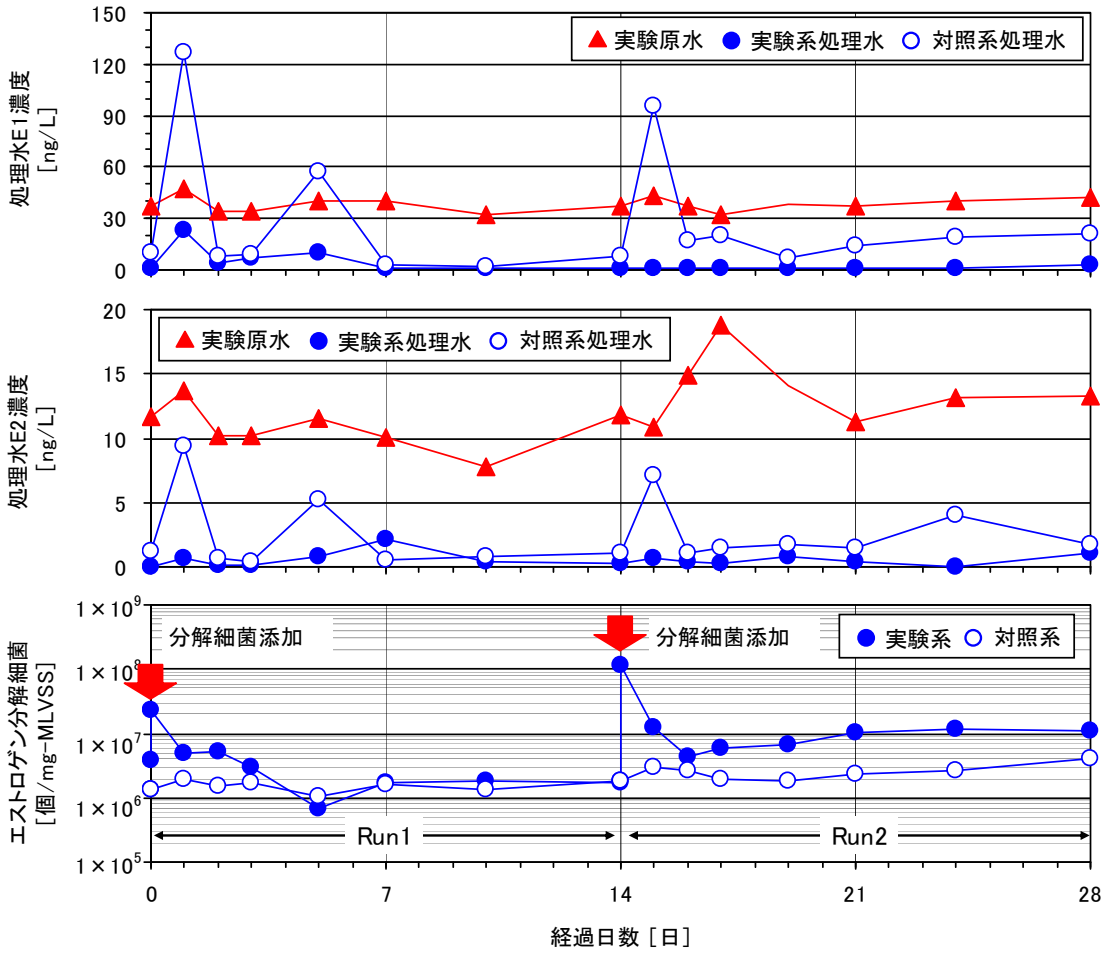


図 3-4-10　エストロゲン濃度およびエストロゲン分解細菌数の挙動（パイロットプラント実験）

表 3-4-7　エストロゲン濃度およびエストロゲン分解細菌数の測定結果（パイロットプラント実験）

項　目		Run1（1～14日目）		Run2（15～28日目）	
		実験系	対照系	実験系	対照系
エストロゲン分解細菌 [個/mg-MLVSS]		1.9×10^{6} (6.7×10^{5}～5.2×10^{6})	1.6×10^{6} (1.0×10^{6}～2.0×10^{6})	1.0×10^{7} (4.3×10^{6}～1.2×10^{7})	2.6×10^{6} (1.8×10^{6}～4.0×10^{6})
E1	実験原水 [ng/L]	37 (33～47)		39 (32～43)	
	処理水 [ng/L]	4.4 (0.9～23)	8.2 (2.2～127)	0.7 (0.5～3.0)	9.4 (6.9～95)
	除去率 [%]	87 (51～98)	76 (-169～93)	98 (93～99)	51 (-119～82)
E2	実験原水 [ng/L]	10 (7.7～14)		13 (11～19)	
	処理水 [ng/L]	n.d. (<0.5～2.2)	0.8 (<0.5～9.5)	<0.5 (<0.5～1.1)	1.7 (1.1～7.1)
	除去率 [%]	95 (78～97<)	90 (31～95<)	95 (92～97<)	87 (35～92)

注）上段は中央値、下段は最小値～最大値を示す

一方、添加濃度を 10^8 個/mL 程度とした Run2 では、添加されたエストロゲン分解細菌の大部分は、添加後すぐに処理水中にウォッシュアウトされ、実験系のエストロゲン分解細菌の細菌数は、添加後 2 日目には 4.3×10^6 個/mg-MLVSS まで減少した。しかし、添加後 3 日目以降、実験系のエストロゲン分解細菌の細菌数は増加して、添加後 7 日目以降には、対照系（2.6×10^6 個/mg-MLVSS 程度）よりも有意に高い 1.0×10^7 個/mg-MLVSS 程度でほぼ横ばいとなった。処理水中のエストロゲン濃度は、対照系では Run1 よりもやや高く、E1 濃度は 9.4ng/L（中央値、以下同じ）、E2 濃度は 1.7ng/L であったが、実験系では低く安定し、E1 濃度は 0.7ng/L、E2 濃度は検出下限値未満であり、両者の間に有意な差が認められた。このように、エストロゲン分解細菌の添加濃度を高く設定した Run2 では、前項で示したベンチスケール実験と同様な傾向が得られた。

パイロットプラント実験におけるエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度およびエストロゲン除去率の関係を図 3-4-11 に示す。

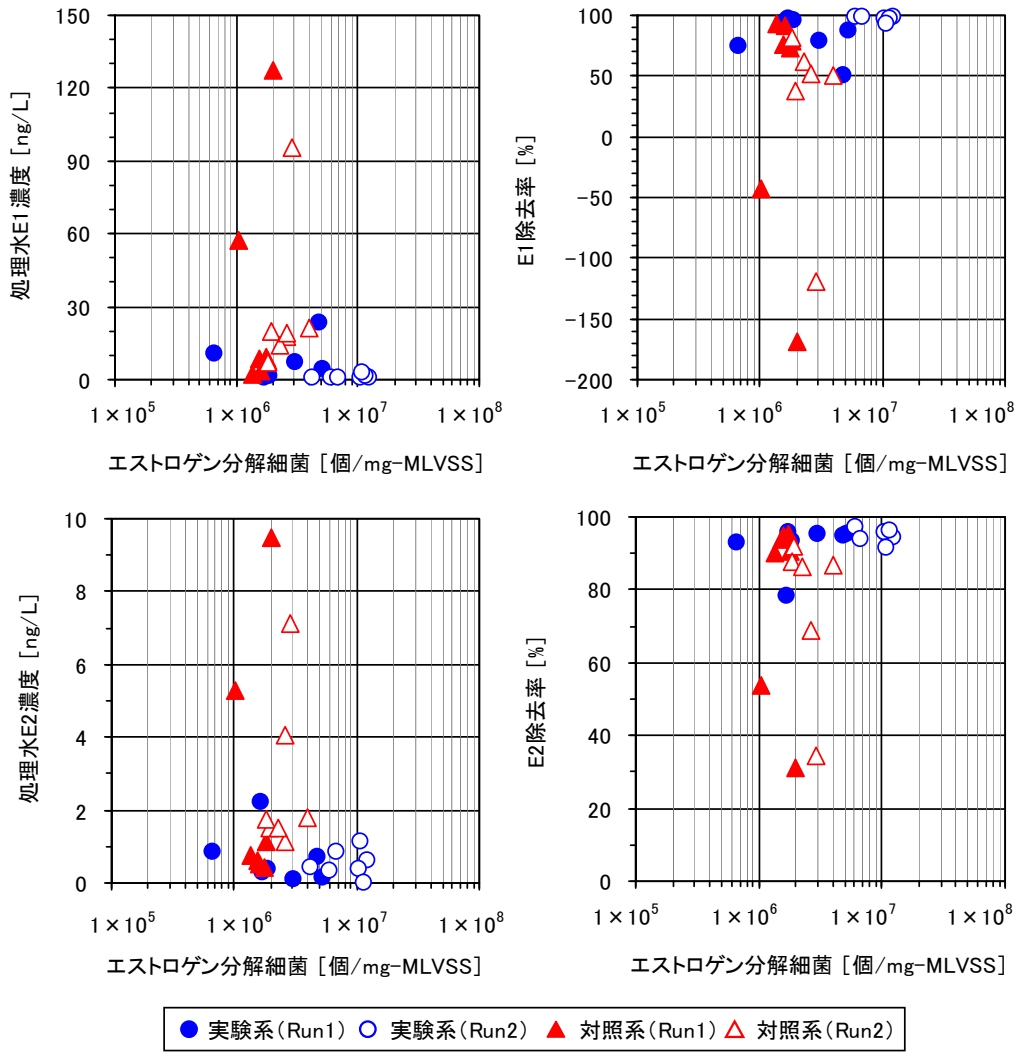


図 3-4-11　エストロゲン分解細菌数と処理水エストロゲン濃度および除去率との関係
（パイロットプラント実験）

パイロットプラント実験においては、エストロゲン分解細菌の細菌数と処理水中のエストロゲン濃度やエストロゲン除去率の間には、ベンチスケール実験で得られたような明確な関係は認められなかったが、エストロゲン分解細菌の細菌数が 5×10^6 個/mg-MLVSS 程度以上では、E1、E2 ともに処理水中の濃度が低く、除去率は高く安定する傾向が認められ、処理水中の濃度は、E1、E2 ともに魚類に対する予測無影響濃度（E1：3～5ng/L、E2：1ng/L）[47]を概ね下回った。

３．４．４　分解細菌固定化担体を用いたエストロゲン除去向上の検討

（１）分解細菌の担体への固定化

エストロゲン分解細菌の培養液に担体となる不織布片を投入し、振とう培養したところ、菌体に由来する培養液の濁度が減少し、菌体の担体への付着が認められた。振とう培養前後での培養液の吸光度（OD660nm）の減少量から、担体への付着菌体量を求めた結果を**表 3-4-8** に示す。比較した 3 つの単離株のうち、担体面積あたりの付着量は JEM-1 株が最も多く（1.9×10^9 個/cm^2）、培養液中の菌体の担体への付着率も JEM-1 株が最も高かった（5.5%）。また、走査型電子顕微鏡により固定化後の担体表面の観察を行った結果、**図 3-4-12** に示すとおり、エストロゲン分解細菌は担体の不織布繊維の表面に均一に付着していることがわかった。

表 3-4-8　エストロゲン分解細菌の担体付着量

菌株名		JEM-1	JEM-2	JEM-3
培養液中の菌数（培養液 1.25L）	[個/mL]	6.2×10^9	5.6×10^9	7.9×10^9
	[個]	7.8×10^{12}	7.0×10^{12}	9.9×10^{12}
担体に付着した菌数（担体面積 225cm^2）	[個/cm^2]	1.9×10^9	5.3×10^8	3.1×10^8
	[個]	4.3×10^{11}	1.2×10^{11}	7.0×10^{10}
担体への付着率	[%]	5.5	1.7	0.7

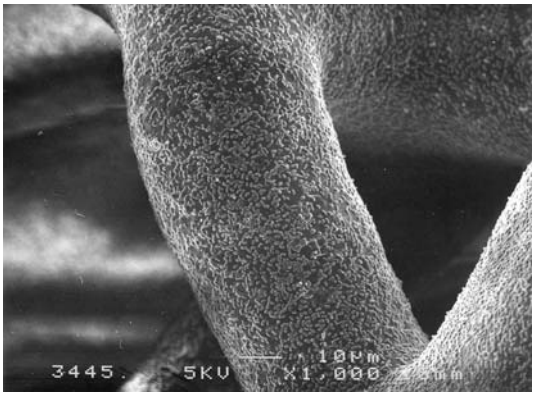


図 3-4-12 エストロゲン分解細菌固定化後の担体表面の電子顕微鏡像の例（JEM-1 株）

（２）回分処理実験

固定化担体のエストロゲン分解能力を評価するため、10μg/L の E1 を含む合成下水を用いて回分処理実験を行った。回分処理実験における E1 の濃度変化を図 3-4-13 に示す。エストロゲン分解細菌を固定化していない対照用の担体（以下、非固定化担体という）においても、処理開始 1 時間後に初発濃度に対して約 50%の E1 濃度の減少が認められ、処理開始 3 時間以降はほぼ横ばいとなった。このように本研究で使用した不織布担体は E1 の吸着が認められ、3 時間後には平衡に達したものと考えられた。これに対して、エストロゲン分解細菌を固定化した担体は、処理開始 1 時間以降も E1 濃度が減少し、処理開始 5 時間後には、JEM-1 株および JEM-3 株を固定化した担体では約 99.9%、JEM-2 株を固定化した担体では約 95%の E1 濃度の除去が認められた。このことから、エストロゲン分解細菌を固定化した担体では、非固定化担体で認められた E1 の担体への吸着に加えて、固定化されたエストロゲン分解細菌による E1 の分解除去が生じているものと考えられた。特に JEM-1 株を固定化した担体（以下、JEM-1 株固定化担体という）は、他の 2 株と比較して初期の除去速度が大きく、処理開始 1 時間後には初発濃度に対して約 95%の E1 濃度の減少が認められた。固定化担体の初期の除去速度が大きいほど、反応タンクの容量および担体添加量を小さくすることが可能であることから、次項に示す連続処理実験では、JEM-1 株固定化担体を用いるものとした。

次に、固定化担体の E1 の除去性能の安定性を確認するため、回分処理実験後の JEM-1 株固定化担体を継続して反応を続け、定期的に反応液全量を交換して、交換後の E1 濃度の変化を測定した。処理開始 1 時間後の除去率は、1 日目は実験開始時と変化がなく約 95%であったが、7 日目および 14 日目には約 90%、18 日目には約 85%となり、日数の経過に伴って徐々に遅くなる傾向が認められた。しかし、18 日目においても、JEM-2 株や JEM-3

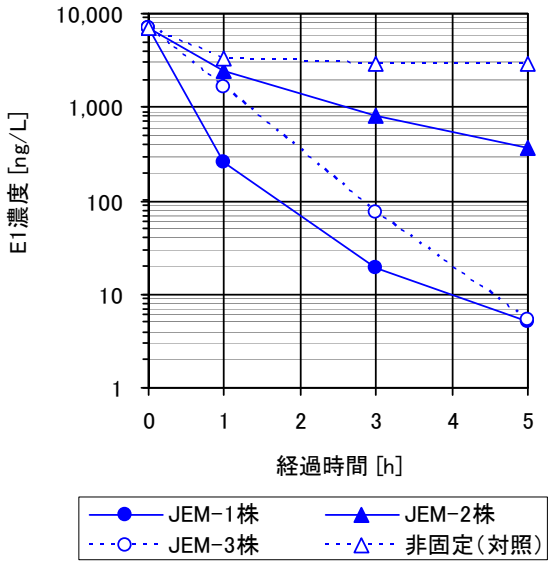


図 3-4-13　E1 濃度の経時変化の比較
（固定化担体回分処理実験）

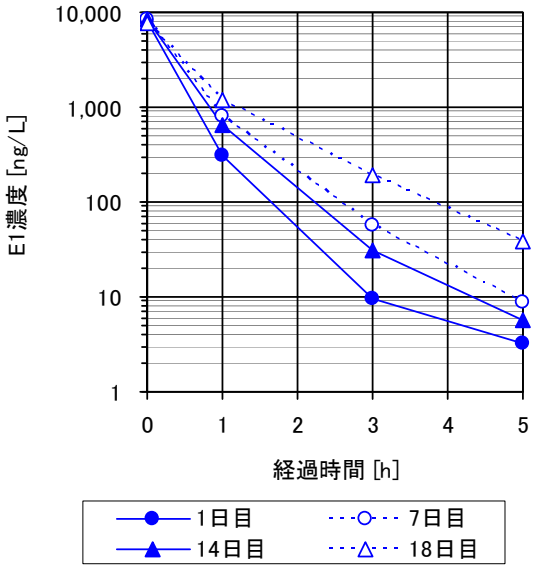


図 3-4-14　E1 除去性能の経日変化
（JEM-1 株固定化担体）

株を固定化した担体よりも処理開始 1 時間後の除去率が高く、JEM-1 株固定化担体は、処理開始 18 日後においても、十分な除去性能を維持することが確認された。

（３）連続処理実験

JEM-1 株固定化担体を用いた二次処理水の連続処理実験における実験原水および処理水中のエストロゲン濃度、並びに、エストロゲンの除去率の変化を**図 3-4-15** に、濃度および除去率の中央値および範囲を**表 3-4-9** に示す。なお、**図 3-4-15** 中のエストロゲン除去率は、E1 と E2 を合わせた除去率で表した。

非固定化担体を投入した対照系の第 3 系列においても、40%程度のエストロゲンの除去が実験期間中を通じて認められた。回分処理実験では、処理開始から 3 時間程度で E1 の吸着は平衡状態に達したことから、非固定化担体でのエストロゲンの除去は、担体への吸着に加え、処理日数の経過とともに担体表面に付着した微生物による分解が寄与しているものと考えられる。

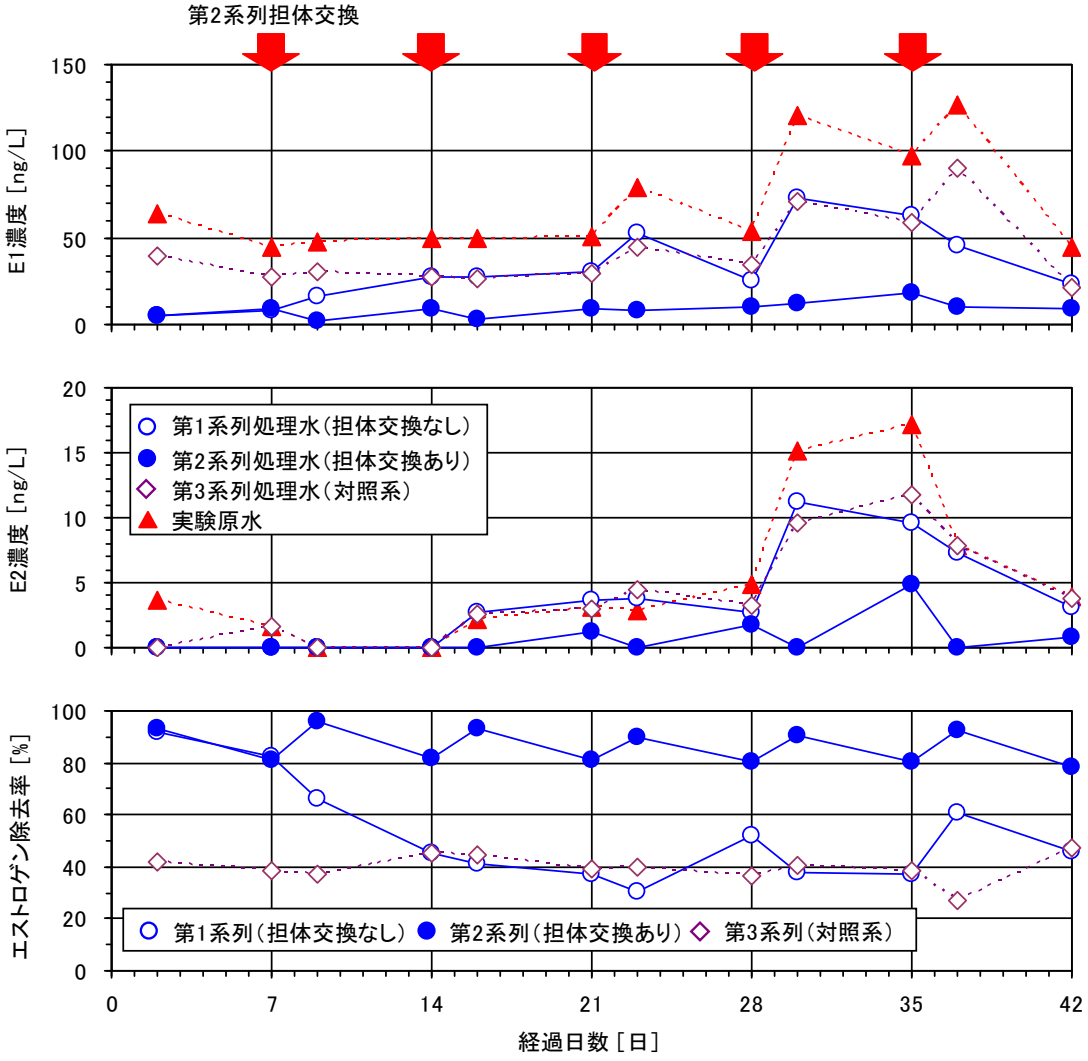


図 3-4-15　エストロゲン濃度およびエストロゲン除去率の変化
（固定化担体連続処理実験）

表 3-4-9　エストロゲン濃度の測定結果（固定化担体連続処理実験）

系　列		第1系列	第2系列	第3系列
担体	JEM-1株固定化	あり	あり	なし
	定期交換	なし	あり	なし
E1	原　水 [ng/L]	52 （44～127）		
	処理水 [ng/L]	28 （5.3～73）	9.0 （2.0～18）	32 （22～91）
	除去率 [%]	47 （33～92）	86 （79～96）	41 （29～51）
E2	原　水 [ng/L]	3.4 （<0.5～17）		
	処理水 [ng/L]	2.9 （<0.5～11）	<0.5 （<0.5～4.9）	3.2 （<0.5～12）
	除去率 [%]	23 （-33～86<）	76 （63～97<）	2.8 （-55～86<）
E1+E2	除去率 [%]	46 （30～92）	86 （79～96）	40 （27～47）

注）上段は中央値、下段は最小値～最大値を示す

JEM-1 株固定化担体を投入した第 1 系列は、実験開始直後は 90%以上の高いエストロゲン除去率を示したが、実験開始 1 週間後には除去率 83%に低下し、2 週間後には非固定化担体を投入した対照系の第 3 系列と同じ 40%程度まで低下した。第 1 系列の担体に付着しているエストロゲン分解細菌の菌体数の変化を図 3-4-16 に示す。付着菌体数は、処理日数の経過に伴って減少を続け、1 週間後には実験開始時の約 50%、2 週間後には約 30%に減少し、実験終了時（6 週間後）には約 10%まで減少した。この原因としては、担体の撹拌によって担体表面からエストロゲン分解細菌の菌体が剥離することや、担体表面に付着した微生物との競合により、固定化したエストロゲン分解細菌が淘汰されることなどが考えられた。

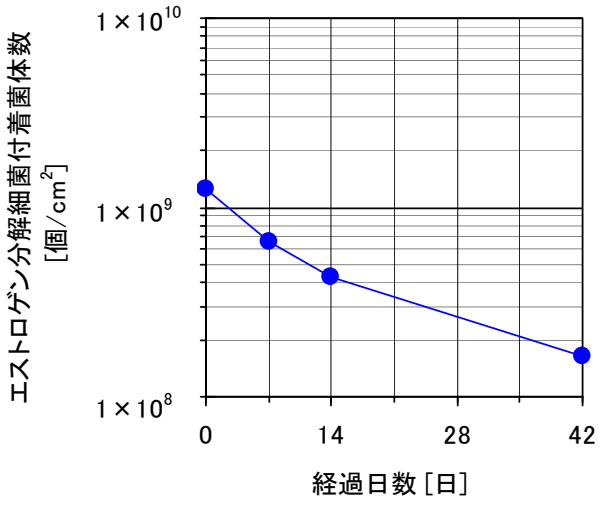


図 3-4-16　担体付着菌体数の変化（第 1 系列）

一方、1 週間毎に JEM-1 固定化担体を交換した第 2 系列では、実験開始 1 週間後には第 1 系列と同様にエストロゲン除去率が 81%まで低下したが、担体交換により除去率が回復し、担体交換 2 日後（実験開始 9 日後）の除去率は 96%となった。その後、担体交換の都度、同様な挙動を示し、エストロゲン除去率の平均値（最小値～最大値）は、担体交換 2 日後は 93%（89～96%）、担体交換 7 日後は 80%（79～82%）であった。このように 1 週間毎に担体を交換することにより、80%以上のエストロゲン除去率で連続して安定的に処理することが可能であった。

次に、第 1 系列における担体単位面積あたりの付着菌体数と E1 の除去速度の関係を**図 3-4-17** に示す。なお、担体付着菌体数は**図 3-4-16** に示す値を用い、実験開始 2 日後の付着菌体数は実験開始 0 日目と同じと仮定した。図に示すとおり、担体単位面積あたりの付着菌体数と E1 の除去速度の間には高い相関関係が認められた。また、第 2 系列の担体交換 1 週間後の担体に吸着している E1 量を測定した結果、担体に吸着、残存していた E1 量は除去された E1 量の 0.1%程度に過ぎなかった。これらのことから、水中のエストロゲン（E1）は、担体に固定化されたエストロゲン分解細菌により、生物学的に分解除去されているものと考えられた。

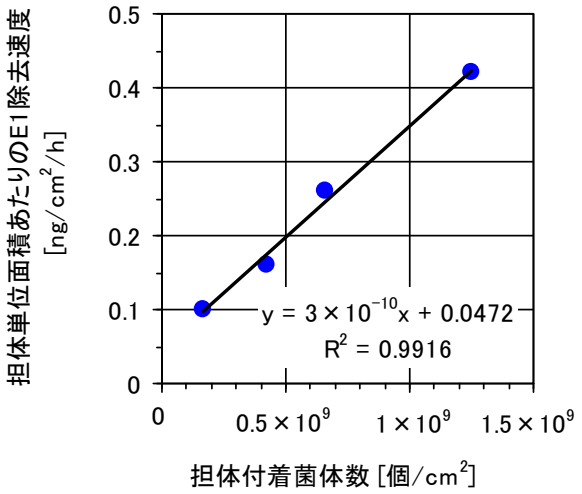


図 3-4-17　担体単位面積あたりの付着菌体数と E1 除去量の関係

３．４．５　総合考察

本章では、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌について、リアルタイム PCR 法を用いて定量的に検出する方法を検討し、これを用いてエストロゲン分解細菌の消長とエストロゲンの除去性能の関係について検討した。さらに、エストロゲン分解細菌の活性汚泥への添加実験や、エストロゲン分解細菌を固定化した担体を用いた二次処理水の処理実験を行って、エストロゲン分解細菌を利用したエストロゲンの除去性能向上について検討を行った。本章における検討の結果を概括すると以下のとおりである。

- 著者らが活性汚泥中から単離したエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株に特異的なプライマーペア ES-F1/R1 を設計した。このプライマーペアは、JEM-1 株に近縁な既知のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium tardaugens* ARI-1 株と結合し検出するが、他の近縁種とは結合しないことから、活性汚泥中に存在する *Novosphingobium* 属に属するエストロゲン分解細菌を検出できるものと考えられた。さらに、このプライマーペアを用いたリアルタイム PCR 法により、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の検出および定量が可能であることが確認された。
- エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、調査した標準法 7 ヶ所および OD 法 6 ヶ所の計 13 ヶ所の全ての活性汚泥から検出され、活性汚泥中に一般的に存在していることが明らかとなった。また、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp の細菌数（中央値）は、標準法が 1.3×10^6 個/mg-MLVSS（1.7×10^6 個/mL-MLSS）、OD 法が 1.2×10^6 個/mg-MLVSS（2.2×10^6 個/mL-MLSS）であり、処理方式による違いは認められなかった。
- エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の消長について、標準法および OD 法各 1 ヶ所で調査した結果、エストロゲンの除去効果が高く安定していた OD 法（2.3×10^6 個/mg-MLVSS）の方が、標準法（8.5×10^5 個/mg-MLVSS）よりも高い傾向が認められた。また、標準法の下水処理場では、処理水中の E1 濃度とエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数との間に関係性が認められ、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が当該下水処理場における E1 の除去に貢献していることが示唆された。
- 活性汚泥中にエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株の培養菌体を添加し、その細菌数を $0.5\sim1.0\times10^7$ 個/mg-MLVSS（$5.0\sim9.9\times10^6$ 個/mL-MLSS）程度以上に増加させることにより、培養菌体を添加しない場合と比較して、エストロゲンの除去効果に有意な差が認められ、処理水中のエストロゲン濃度は低く安定する傾向を示した。
- エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株を不織布片に固定化した担体を用いて、二次処理水中のエストロゲンを 30 分の処理時間で連続して処理することが可能であった。また、固定化担体によるエストロゲンの分解性能は、処理開始後 2 週間でほぼ認められなくなったが、1 週間毎に担体を交換することにより、80%以上の高い除去率で安定的に処理することが可能であった。

活性汚泥中のエストロゲン分解細菌に関するこれまでの報告[1)~5)]は、いずれも単離した分解細菌の純粋培養系におけるエストロゲンの除去特性が示されるにとどまっており、実際の活性汚泥中での挙動やエストロゲン除去への関与の有無は、全く明らかにされていない。これに対して、本研究では、単離したエストロゲン分解細菌をリアルタイム PCR 法で定量的に把握することにより、エストロゲン分解細菌が活性汚泥中に一般的に存在していると考えられることや、実際の下水処理場において、E1 の除去性能と活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数の間に関係性が認められる例を明ら

かにした。また、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株の培養菌体を活性汚泥に添加することにより、エストロゲンの除去効果に有意な向上が認められることや、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株を固定化した担体により、二次処理水中の E1 の処理が可能であることを示した。これらのことから、本研究で着目したエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が、実際の下水処理過程において、エストロゲンの除去に関与していることを初めて明らかにすることができた。

エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、調査した全ての活性汚泥から検出され、活性汚泥中に一般的に存在しているものと考えられた。また、エストロゲン分解細菌の培養菌体を添加し、活性汚泥中の細菌数を増加させることにより、エストロゲンの除去効果の向上が認められた。そこで、反応タンクの運転条件を変更することにより、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌の細菌数を増加させ、エストロゲンの除去を向上できれば理想的であるといえる。しかし、反応タンクの運転条件やエストロゲンの除去効果の異なる標準法と OD 法のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数は同レベルであり、エストロゲン分解細菌の細菌数と運転条件やエストロゲンの除去効果の関係性は全体的には明確でなく、反応タンクの運転でエストロゲン分解細菌の存在量を制御し、エストロゲンの除去効果を向上することは困難であると考えられた。一方、第 2 章に示したとおり、SRT や HRT の長い方が、エストロゲンの除去効果は高く安定する傾向が認められた。したがって、実際の下水処理過程においては、第 2 章に示した活性汚泥へのエストロゲンの吸着やエストロゲン抱合体の消長などのエストロゲン分解細菌の存在量以外の要因の影響が大きく、エストロゲン分解細菌によるエストロゲンの分解は律速ではない可能性もあり、今後さらなる検討が必要である。

本研究では、エストロゲン分解細菌の培養菌体の活性汚泥中への添加や、エストロゲン分解細菌を固定化した担体を用いることにより、エストロゲンの除去性能向上について一定の効果が得られた。しかし、本研究においては、添加した菌体の活性汚泥からの流出や担体表面からの菌体の剥離などのため、長期間にわたり効果を維持することは困難であった。したがって、エストロゲンの除去効果を安定的に維持し、向上させるためには、エストロゲン分解細菌を高濃度にかつ安定的に維持することが必要と考えられる。本研究で検討したような結合固定化担体は、その調製が比較的容易であるが、活性汚泥中などでは他の微生物が付着は避けられないため、エストロゲン分解細菌のみを保持することは難しい。そこで、目的とする微生物のみを担体内部に固定化する包括固定化担体[48)]がより適しているものと考えられ、今後その適用性を検討する必要がある。

３．５　まとめ

本章では、実施設の活性汚泥中から単離したエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.に着目して、リアルタイム PCR 法を用いて定量的に検出することにより、活性汚泥中での挙動を明らかにするとともに、これを利用したエストロゲンの除去向上について検討を行った。エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、全ての活性汚泥から検出され、活性汚泥中に一般的に存在しているものと考えられた。また、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の平均的な細菌数は、1.0×10^6 個/mg-MLVSS 程度前後であり、全体的な傾向としては、運転条件（処理方式）やエストロゲンの除去効果との関係は明確ではなかった。しかし、通年にわたる標準法の下水処理場における調査では、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中の E1 濃度の間に関係性が認められ、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が当該下水処理場における E1 の除去に関与している可能性が示唆された。一方、活性汚泥中にエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の培養菌体を添加し、活性汚泥中の細菌数を $0.5\sim1.0\times10^7$ 個/mg-MLVSS 程度以上の増加させることにより、エストロゲンの除去性能を向上させることが可能であった。また、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.を固定化した担体を用いることにより、二次処理水中のエストロゲンを 30 分間の処理時間で 80%程度除去することが可能であった。これらの結果から、実際の下水処理過程におけるエストロゲンの除去において、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が寄与している可能性が示唆された。

参考文献（第３章）

1) Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N., Morita, N. (2002) Degradation of 17ß-estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan, Appl. Environ. Microbiol., **68**(4), 2057-2060.

2) Yoshimoto, T., Nagai, F., Fujimoto, J., Watanabe, K., Mizukoshi, H., Makino, T., Kimura, K., Saino, H., Sawada, H., Omura, H. (2004) Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants, Appl. Environ. Microbiol., **70**(9), 5283-5289.

3) 趙雅蘋, 栗栖太, 矢木修身, 斉藤智（2003）エストロゲン分解菌の単離および分解能力の評価, 第 37 回日本水環境学会年会講演集, 309.

4) Haiyan, R., Shulan, J., un din Ahmad, N., Dao, W., Chengwu, C. (2007) Degradation characteristics and metabolic pathway of 17α-ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5, Chemosphere, **66**(2), 340-346.

5) Yu, C.-P., Roh, H., Chu, K.-H. (2007) 17ß-estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge, Environ. Sci. Technol., **41**(2), 486-492.

6) 恩田健介，森田智之，宮晶子，多田啓太郎，橋本敏一，三品文雄（2003）活性汚泥中の女性ホルモン分解微生物とその分解特性，第 40 回下水道研究発表会講演集，90-92.

7) Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T., Kikuchi, S. (2003) *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo, Int. J. Sys. Evol. Microbiol., **53**(1), 47-52.

8) Vader, J. S., van Ginkel, C. G., Sperling, F. M. G. M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J. S., van der Most, M., Stokman, P. G. W. (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge, Chemosphere, **41**(8), 1239-1243.

9) Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M. (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, Water Res., **38**(9), 2323-2329.

10) 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撹乱化学物質に関する調査報告書（案）」

11) Poseidon (2005) POSEIDON - Final Report, http://ec.europa.eu/research/endocrine

12) Hyman, M. R., Murton Ian, B., Arp, D. J. (1988) Interaction of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* with alkanes, alkenes and alkynes, Appl. Environ. Microbiol., **54**(12), 3187-3190.

13) Rasche, M. E., Hyman, M. R., Arp, D. J. (1991) Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity, Appl. Environ. Microbiol., **57**(10), 2986-2994.

14) Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Yamamoto, H. (1990) Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*., Microbiol. Immunol., **34**(2), 99-119.

15) Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A. (2001) Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses., Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**(4), 1405-1417.

16) Basta, T., Keck, A., Klein, J., Stolz, A. (2004) Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains, J. Bacteriol., **186**(12), 3862-3872.

17) Tanghe, T., Dhooge, W., Verstraete, W. (1999) Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol, Appl. Environ. Microbiol., **65**(2), 746-751.

18) Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Kimura, S. (2001) *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo, Int. J. Sys. Evol. Microbiol., **51**(2), 603-610.

19) Ike, M., Jin, C.-S., Fujita, M. (1995) Isolation and characterization of a novel bisphenol A-degrading bacterium *Pseudomonas paucimobilis* strain FJ-4, 日本水処理生物学会誌, **31**(3), 203-212.

20) Oshiman, K., Tsutsumi, Y., Nishida, T., Matsumura, Y. (2007) Isolation and characterization of a novel bacterium, *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, that degrades bisphenol A, Biodegradation, **18**(2), 247-255.

21) Wittich, R. M., Wilkes, H., Sinnwell, V., Francke, W., Fortnagel, P. (1992) Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1, Appl. Environ. Microbiol., **58**(3), 1005-1010.

22) 日本下水道事業団，株式会社荏原製作所（2005）「共同研究報告書 58-01　活性汚泥処理に関与する微生物（群）の新たな解析手法の実務的利用－内分泌攪乱物質（環境ホルモン）除去特性把握への応用」，19-39.

23) 橋本敏一（2006）活性汚泥処理における内分泌攪乱物質の挙動と微生物分解，用水と廃水，**48**(1), 95-101.

24) DNA Data Bank Japan (DDBJ) http://www.ddbj.nig.ac.jp/

25) Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, Brief. Bioinform., **5**(2), 150-163.

26) Ke, J., Zhuang, W., Gin, K. Y.-H., Reinhard, M., Hoon, L. T., Tay, J.-H. (2007) Characterization of estrogen-degrading bacteria isolated from an artificial sandy aquifer with ultrafiltered secondary effluent as the medium, Appl Microbiol Biotechnol., **75**(5), 1163-1171.

27) 清和成，森一博，河野哲郎（2002）PCR 法を用いた環境微生物のモニタリング，水，44(6), 63-72.

28) Wang, A. M., Doyle, M. V., Mark, D. F. (1989) Quantification of mRNA by polymerase chain reaction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**(24), 9717-9721.

29) Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., Bunn, H. F. (1990) Analysis of cytokine m RNA an DNA: detection and quantification by competitive polymerase chain reaction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**(7), 2725-2729.

30) Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X., Simonet, P. (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction, Appl. Environ. Microbiol.,**58**(9), 2717-2722.

31) Sharkey, F. H., Banat, I. M., Marchant., R. (2004) Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology, Appl. Environ. Microbiol.,**70**(7), 3795-3806.

32) Zhang, T., Fang, H. H. P. (2006) Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples, Appl. Microbiol. Biotechnol., **70**(3), 281-289.

33) Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR, Genome Res., **6**(10), 986-994.

34) 川向誠（2002）リアルタイム PCR, 「PCR 実験マニュアル　原理から応用まで」（駒野徹・編著）, 学会出版センター，178-187.

35) Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Sayler, G.S. (2003) Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant, Environ Sci. Tech. **37**(2), 343-351.

36) Geets, J., de Cooman, M., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., De Vos, P., Verstraete, W., Boon, N. (2007) Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge, Appl. Microbiol. Biotechnol. **75**(1), 211-221.

37) Vervaeren, H., De Wilde, K., Matthys, J., Boon, N., Raskin, L., Verstraete, W. (2005) Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence in situ hybridization and real-time PCR, Appl. Microbiol. Biotech. **68**(5), 695-704.

38) Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. **25**(17), 3389-3402.

39) 橋本敏一，市川栄治，中沢均（2002）微生物の迅速同定技術の開発，「技術開発部報 2002」，日本下水道事業団

40) Zhu, H., Qu, F., Zhu, L.-H. (1993) Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride, Nucleic Acids Res., **21**(22), 5279-5280.

41) 建設省都市局下水道部，厚生省生活衛生局水道環境部監修（1997）「下水試験方法－上巻－」，社団法人日本下水道協会

42) Yurkov, V., Stackebrandt, E., Holmes, A., Fuerst, J. A., Hugenholtz, P., Golecki, J., Gad'on, N., Gorlenko, V. M., Kompantseva, E. I., Drews, G. (1994) Phylogenetic positions of novel aerobic, bacteriochlorophyll a-containing bacteria and description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov., Int J Syst Bacteriol., **44**(3), 427-434.

43) Yoon, J.-H., Lee, M.-H., Oh, T.-K. (2004) *Porphyrobacter donghaensis* sp. nov., isolated from sea water of the East Sea in Korea, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **54** (6), 2231-2235.

44) Hiraishi, A., Yonemitsu, Y., Matsushita, M., Shin, Y. K., Kuraishi, H., Kawahara,K. (2002) Characterization of *Porphyrobacter sanguineus* sp. nov., an aerobic bacteriochlorophyll-containing bacterium capable of degrading biphenyl and dibenzofuran, Arch Microbiol., **178**(1), 45-52.

45) Estackerandi, E., Goebel, M. (1994) Taxnomic note: A place of DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology, Int J Syst Bacteriol., **44**(4), 846-849.

46) 大藤道衛（2001）「バイオ実験超基本 Q&A」，羊土社，100-101.

47) Young, W. F., Whitehouse, P., Johnson, I. Sorokin, N. (2004) "Proposed Predicted-No-Effect -Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters", R&D Technical Report P2-T04/1, Environmental Agency, U.K.

48) 日本下水道事業団技術評価委員会（1993）「包括固定化担体を用いた硝化促進型循環変法「ペガサス」について　報告書」，日本下水道事業団

第４章　オゾン処理によるエストロゲンの除去向上に関する研究

４．１　はじめに

前章までの結果、下水中のエストロゲンは、主に二次処理（生物処理）工程において、活性汚泥中に存在するエストロゲン分解細菌の生物学的な分解により除去されるため、反応タンクの SRT や HRT を長くすることにより、その除去効果は高く安定する傾向となることが明らかとなった。そこで、反応タンクの運転条件を変更することによって、二次処理工程でのエストロゲンの除去効果を向上させることも可能と考えられる。しかし、エストロゲンの除去効果は、エストロゲン抱合体を含む下水中のエストロゲン濃度や水温など、SRT や HRT 以外の様々な要因の影響を受けることや、施設の構造や設備の能力などの施設上の制約により、運転条件の変更が容易でない場合も少なくない。また、エストロゲン分解細菌の培養菌体の活性汚泥中への添加や、エストロゲン分解細菌を固定化した担体を用いることにより、エストロゲンの除去を向上することが可能であった。しかし、添加した菌体の活性汚泥からの流出や担体表面からの菌体の剥離などのため、長期間にわたって効果を維持することが困難であることや、大量の菌体を調製する必要があることなどから、実規模の下水処理施設に適用することは、現時点では困難である。以上のことから、下水処理施設において、生物学的二次処理を補完し、より高度かつ安定的なエストロゲンの除去を行うためには、付加的な高度処理工程の追加が有効な方法と考えられる。

二次処理工程の後段に付加される高度処理工程には、砂ろ過や膜ろ過、活性炭吸着、オゾン処理などの物理化学的な処理方法が主に用いられる。これらの物理化学的な高度処理法は、放流先水域の水質保全や処理水の再利用のため、有機物や溶解塩類のさらなる除去や脱色、消毒などを目的としているが、その副次的な効果として、内分泌撹乱物質の除去も期待できることが報告されている[1)]。

オゾン処理は、空気または酸素を原料に無声放電などによりオゾンガスを発生させ、これを下水処理水に注入し、反応させることにより、オゾンの持つ強力な酸化力を利用して、消毒や脱色、脱臭、有機物の酸化分解などを行う方法であり、平成 17 年度末現在、全国 51 ヶ所[2)]の下水処理施設で稼動している。オゾンは、エストロゲンなどの微量汚染物質との反応性が高く、強力な酸化力によりこれらを酸化分解するため、微量汚染物質に対する有効な高度処理技術の一つと考えられている[3)-7)]

本章では、下水処理水中のエストロゲンの除去に効果的と考えられるオゾン処理に着目し、有機物などが共存する下水処理水中におけるエストロゲンのオゾン処理特性を明らかにするとともに、エストロゲンの除去を目的としたオゾン処理の処理条件について検討を加えた。

４．２　エストロゲンのオゾン処理に関する既往知見

本節では、物理化学的な高度処理によるエストロゲンの除去、並びに、オゾンの性質と反応性、オゾン処理による下水中のエストロゲンの除去について、既往の知見を概括する。

４．２．１　物理化学的処理によるエストロゲンの除去

Snyder ら[3]は、各種の物理化学的な高度処理による内分泌撹乱物質や医薬品および日用生活品（PPCPs：Pharmaceuticals and Personal Care Products）の除去効果について、表 4-2-1 のとおり示している。また、国土交通省（旧建設省）が行った実態調査（以下、

表 4-2-1 物理化学的な高度処理による内分泌撹乱物質および PPCPs の除去効果[3),4)]

分類	種類	オゾン処理 促進酸化処理	膜ろ過		活性炭吸着	凝集沈殿	塩素処理	紫外線照射
			ナノろ過	逆浸透				
内分泌撹乱物質	農薬	△～☆	◎	☆	☆	●	●～☆	☆
	合成化学物質	○～◎	☆	☆	☆	●～△	●	☆
	エストロゲン	☆	◎	☆	☆	●	☆	☆
	金属	●	◎	☆	◎	○～◎	●	●
	無機物質	●	◎	☆	●～△	●	●	●
	有機金属	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
人用医薬品	抗生物質	△～☆	☆	☆	○～◎	●～△	●～◎	○～◎
	抗うつ剤	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
	抗炎症剤	☆	◎～☆	☆	☆	●	●～○	☆
	脂質抑制剤	☆	◎～☆	☆	☆	●	●～○	○～◎
	X線造影剤	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
	精神安定剤	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
日用生活品	合成香水	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	☆
	日焼止め	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
	抗菌剤	△～☆	◎～☆	☆	◎～☆	●～△	●～○	○～◎
	界面活性剤	○～◎	☆	☆	☆	●～△	●	○～◎

☆：きわめて除去されやすい（90%以上）、◎：除去されやすい（70～90%）、○：除去される（40～70%）、△：除去されにくい（20～40%）、
●きわめて除去されにくい（20%以下）

表 4-2-2　高度処理施設における内分泌撹乱物質の除去効果[1)]

処理方法	NP		BPA		E2(ELISA法)	
	処理前	処理後	処理前	処理後	処理前	処理後
砂ろ過	n.d.～0.3 [1/30]	n.d.～tr(0.2) [0/30]	n.d.～0.33 [13/30]	n.d.～0.21 [8/30]	0.0012～0.064 [24/24]	n.d.～0.044 [22/24]
オゾン処理	n.d.～0.6 [2/15]	n.d.～tr(0.2) [0/15]	n.d.～0.21 [6/15]	n.d.～0.13 [1/15]	n.d.～0.029 [12/13]	n.d.～0.019 [4/13]
活性炭吸着	n.d～tr(0.2) [0/6]	n.d.～tr(0.1) [0/6]	n.d.～0.11 [3/6]	n.d.～0.05 [2/6]	n.d.～0.023 [4/6]	n.d.～0.0082 [2/6]
膜処理(MF)	n.d. [0/1]	n.d. [0/1]	n.d. [0/1]	n.d. [0/1]	0.026 [1/1]	0.021 [1/1]
膜処理(RO)	n.d.～tr(0.1) [0/4]	n.d.～tr(0.1) [0/4]	tr(0.01)～0.09 [1/4]	n.d.～0.04 [1/4]	0.0012～0.021 [4/4]	n.d.～n.d. [0/4]

注1）上段は濃度範囲、下段の[　]内は定量下限値以上の検体数/調査検体数を示す
注2）n.d.は検出下限値未満、trは検出下限値以上定量下限値未満を表し、続く(　)内は参考値を示す

国交省調査という）では、高度処理施設における内分泌撹乱物質の除去効果について、**表 4-2-2** に示すとおり報告されている[1)]。これらのことから、全体的な傾向として、エストロゲンは、物理化学的な高度処理により容易に除去されることが明らかであり、特にオゾン処理は、金属や無機物質を除き、内分泌撹乱物質や PPCPs に対する除去効果が高いことがわかる。

以下では、オゾン処理以外の物理化学的処理によるエストロゲンなどの除去特性について、概括して示す。

（１）ろ過処理

砂ろ過は、7.5～10μm 程度以上の浮遊性物質を[8)]、精密ろ過（MF：MicroFiltration）は、0.05～10μm 程度の懸濁物質や細菌のような微粒子を、限外ろ過（UF：UltraFiltration）は、分子量 1,000～300,000 程度のコロイドや溶存高分子物質などを主なろ過対象物質として分離除去する方法である[9), 10)]。これに対して、多くの内分泌撹乱物質や PPCPs は、分子量が 150～500 程度であるため、砂ろ過や精密ろ過、限外ろ過では、懸濁物質やコロイドに吸着しているもの以外は除去が期待できない[3)]。そのため、**表 4-2-2** に示したとおり、国交省調査でも、砂ろ過法や精密ろ過法については、17β-エストラジオール（E2）を含む内分泌撹乱物質の除去効果は明確でなかった[1)]。

一方、逆浸透（RO：Reverse Osmosis）は、膜両側の溶液間で浸透圧以上の圧力を濃厚溶液側に加え、溶媒（水）を浸透現象とは逆に希薄溶液側に移行させることにより、溶媒と溶質を分離する方法で、海水の淡水化や超純水の製造などに利用される[10)]。また、ナノろ過（NF：NanoFiltration）は、限界ろ過と逆浸透の中間に位置付けられ、分子量数百以下の低分子物質を分離対象とするものである[9)]。したがって、逆浸透法やナノろ過法は、分子量が低く荷電されていない物質を除き、大部分の内分泌撹乱物質や PPCPs の除去に対して、除去効果が高いものと考えられる[3)]。**表 4-2-2** に示したとおり、国交省調査でも、逆浸透は E2 に対する除去効果が報告されている[1)]。

（２）凝集沈殿処理

凝集沈澱は、極性が高く疎水性が高い、一部の内分泌撹乱物質や PPCPs については、除去効果が期待できるが、大部分の内分泌撹乱物質などに対して、効果的ではないと考えられている[3)]。例えば、ノニルフェノール（NP）やノニルフェノールエトキシレート（NPEO）については、凝集剤（ポリ塩化アルミニウム）の添加濃度が高くなるほど、下水処理水中の濃度は低くなり、凝集沈殿処理による除去効果が認められたが、エストロゲンについては、凝集剤の添加濃度を高くしても、下水処理水中の濃度はほとんど変化がなく、除去効果は認められなかったとの報告がある[7)]。

（３）活性炭吸着

活性炭吸着は、凝集沈殿や生物処理などによる除去が期待できない物質、特に溶解性の成分を除去するために利用されており[9)]、溶解性の有機物（COD）のほか、多くの農薬や

殺虫剤、内分泌撹乱物質、PPCPs の除去に効果が期待できる[3]。北中ら[7]は、三次処理水（活性汚泥処理+砂ろ過）を原水とした活性炭吸着の連続実験において、E2 は COD と同程度以上の除去効果が得られたと報告している。また、**表 4-2-2** に示すとおり、国交省調査でも、E2 を含む内分泌撹乱物質の活性炭吸着による除去効果が報告されている[1]。

（４）塩素処理

塩素処理では、塩素が有機物と反応して塩素化反応や酸化反応を起こすことから、内分泌撹乱物質とも反応して、その形態が変化する。しかし、北中ら[7]によれば、塩素処理による内分泌撹乱物質の除去効果は、塩素接触時間や塩素注入率、アンモニアや有機物などの共存物質の影響を受け、塩素注入率 10～20mg/L では比較的高い除去効果が認められるものの、通常の消毒に用いられる塩素注入率のレベルでは、高い除去効果は期待できないことを報告している。本研究でも、第 1 章 1.4.1 に示したとおり、塩素消毒後の放流水では、塩素消毒前の二次処理水と比較して、E2 や NP、エストロゲン様活性がわずかに低くなったが、顕著な除去効果は認められなかった。塩素処理では、トリハロメタンなどの有害な有機塩素化合物が副生成され、塩素注入率が高いほどその生成量が増加することや、副生成される有機塩素化合物によりエストロゲン様活性が増加するとの報告もあり[11]、エストロゲンの除去を目的とした高度処理には適していないものと考えられる。

（５）紫外線照射

紫外線は、有機物の不飽和結合を開裂するため、不飽和二重結合を有するアゾ基（－N=N－）やカルボニル基（＞C=O）、エチレン基（＞C=C＜）などを有する物質は、紫外線照射によりその形態に変化が生じる[3]。しかし、内分泌撹乱物質や PPCPs などの微量汚染物質の処理に必要な紫外線照射量（数 1000mJ/cm^2 オーダー）は、下水処理水の消毒に用いられる一般的な紫外線照射量（30～50mJ/cm^2 程度）と比較して著しく高く、必要な紫外線ランプの本数が著しく多くなるため、微量汚染物質の処理を目的とした紫外線照射の適用は、経済的に困難と考えられる[3]。

４．２．２　オゾンの性質と反応性[12]

オゾン（O_3）は、酸素原子 3 個からなる酸素の不安定な同位体で、その分子量は 48 である。オゾンは、微青色の気体で生臭い刺激臭を有し、通常、空気または酸素と混ざって希薄な状態で存在している。水中でのオゾンは、酸性溶液中では比較的安定であるが、pH や温度の上昇に伴って急速に分解する。**表 4-2-3**[13]に示すとおり、オゾンは他の酸化剤と比較して高い酸化力を有し、多くの有機物を酸化する。

オゾンは、水中で複雑な連鎖反応により分解されるが、その過程でヒドロキシルラジカル（HO･）やヒドロペルオキシラジカル（HO_2･）などのフリーラジカルを生じる。このうち、ヒドロキシルラジカルは、**表 4-2-3** に示すとおり、分子オゾンそのものより高い酸化力を有する。

表 4-2-3　代表的な酸化剤の標準酸化還元電位 [13)]

酸 化 剤		標準酸化還元電位［V］
ふっ素	(F_2)	2.89
ヒドロキシルラジカル	(HO・)	2.80
オゾン	(O_3)	2.07
過酸化水素	(H_2O_2)	1.76
過マンガン酸イオン	(MnO_4^-)	1.68
次亜塩素酸	(HOCl)	1.49
塩素	(Cl_2)	1.36
酸素	(O_2)	1.23

水中での溶解性有機物とオゾンとの反応は、分子オゾンによる直接反応と分子オゾンの分解により生成されたヒドロキシルラジカルによる間接反応の 2 つがある。分子オゾンによる直接反応には選択性があり、分子オゾンは不飽和結合と選択的に反応するため、炭素の 2 重結合を有する有機物が最も反応性が高いが、炭素・窒素 2 重結合や求核類の中にはこれと同程度以上の反応性の高いものもある。また、このような反応性の高い有機物が存在しなくなると、炭素・水素結合も酸化される。一方、ヒドロキシルラジカルによる反応は、反応速度は大きいが非選択的であり、分子オゾンが反応しない飽和有機化合物をも酸化する。また、炭酸イオンや重炭酸イオン、フミン質などの水中に共存するラジカル消費物質（スカベンジャー）とも反応し、無効に消費される。そこで、多くのラジカル消費物質が共存する下水中において、特にオゾン消費量が低い場合には、分子オゾンによる反応が卓越していると考えられている [6)]。

オゾンおよびヒドロキシルラジカルと内分泌撹乱物質や PPCPs との反応速度定数の例を**表 4-2-4** [6),14),15)]に示す。これらの物質のうち、フェノール様の環構造や二重結合を持つ化合物は、オゾンとの反応性が高い傾向にあり、合成エストロゲンである 17α-エチニルエストラジオール（EE2）のオゾンとの反応速度定数は $3\times10^6(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ と高い。一方、ヒドロキシルラジカルとの反応定数は、いずれの物質も $10^9(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ オーダーと高く、ほとんどの内分泌撹乱物質等はヒドロキシルラジカルにより酸化分解されると考えられる。そこで、オゾンとの反応性が低い内分泌撹乱物質や PPCPs に対しては、オゾン処理に過酸化水素の添加や紫外線の照射などを併用することにより、ヒドロキシルラジカルの生成を促進し、その酸化力を利用する促進酸化処理（AOPs：Advanced Oxidation Processes）が有効であると考えられている [3),14),15)]。

表 4-2-4　オゾンおよびヒドロキシルラジカルとの反応速度定数

種　類	物　質　名	反応速度定数 [(mol/L)$^{-1}$・sec^{-1}]	
		O_3	HO・
エストロゲン	17α-エチニルエストラジオール[6]	3×10^{6}	9.8×10^{9}
内分泌撹乱化学物質	フタル酸ジエチル[14]	0.1	4×10^{9}
	ベンゾ(a)ピレン[14]	6×10^{3}	1×10^{10}
	ベンゾフェノン[14]	-	8.8×10^{9}
	ペンタクロロフェノール[14]	$>3\times10^{5}$	4×10^{9}
	2,3,3',5,6-PCB[14]	<0.05	5×10^{9}
PPCPs	イブプロフェン(消炎鎮痛剤)[15]	9.1	7.4×10^{9}
	カルバマゼピン(抗てんかん剤)[6]	3×10^{5}	8.8×10^{9}
	スルファメトキゾール(合成抗菌剤)[6]	2.5×10^{6}	5.5×10^{9}
	イオプロミド(X線造影剤)[6]	<0.8	3.3×10^{9}
その他	フェノール[14]	1×10^{4}	$7\sim10\times10^{9}$

４．２．３　オゾン処理によるエストロゲンの除去

エストロゲンを含む下水中の内分泌撹乱物質のオゾン処理による除去については、実験室規模やパイロットプラント規模での実験結果が多く報告されている。例えば、北中ら[7]は、高度処理水（活性汚泥処理＋砂ろ過）を原水として、パイロットプラントを用いた連続処理実験を行い、オゾン注入率 2～5mg/L 程度で、原水中の E2 および NP は、ほぼ定量下限値程度にまで減少したと報告している。また、Huber ら[6]は、スイスにある標準活性汚泥法（標準法）の下水処理場の二次処理水を原水として、パイロットプラントを用いた連続処理実験を行い、原水中の E2、エストロン（E1）および EE2 は、オゾン注入率 0.5mg/L では約 60%、1mg/L では約 80%が除去され、オゾン注入率 2～5mg/L では、EE2 および E2 はほぼ完全に、E1 は約 90%以上が除去されたと報告している。

一方、実規模のオゾン処理施設における知見は多くないが、実験室規模やパイロットプラント規模での知見と同様､オゾン処理によるエストロゲンの除去効果が認められている。国交省調査[1]では、**表 4-2-2** に示したとおり、定量下限値以上の濃度で検出された試料の割合や検出された濃度は、いずれもオゾン処理後には低くなっており、オゾン処理による E2 の除去効果が認められた。また、オゾン処理工程における E2 の除去率は、オゾン注入率 5mg/L 未満の施設では 67%、オゾン注入率 5mg/L の施設では 98%で、オゾン注入率の高い方が高く安定する傾向にあることが報告されている。一方、Nakada ら[16]は、東京都内の下水処理場にある実規模の高度処理施設(砂ろ過＋オゾン処理)で調査を行った結果、オゾン処理工程では、NP（除去率 6 ～67%）やオクチルフェノール（-65～33%）の除去効果は低かったが、E1 や E2、ビスフェノール A（BPA）は 80%以上が除去されていたと報告している。

４．３　材料および方法

４．３．１　実験条件

オゾン処理実験の実験条件の一覧を**表 4-3-1** に示す。

処理対象物質は、天然エストロゲンの E2 および E1、合成エストロゲンの EE2 の 3 物質とした。また、オゾン処理開始時のエストロゲン濃度（以下、初発濃度という）は、本研究や既往研究における下水処理水中でのエストロゲンの検出濃度を考慮して、200ng/L と 20ng/L の 2 条件とした。オゾン注入率は、下水処理場における実用的なオゾン注入率を考慮して、0.5mg/L から 10mg/L までの間の 6 条件（0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 10.0）とした。また、反応時間は、下水処理場における平均的な反応時間を考慮して、15 分間とした。なお、実験は全て室温（約 20℃）で行った。

表 4-3-1　オゾン処理実験条件一覧

Run	処理対象物質（添加物質）	初発濃度	オゾン注入率	反応時間
1-1	E2	200ng/L	0.5mg/L	15min
1-2		20ng/L	1.0mg/L	
2-1	E1	200ng/L	3.0mg/L	
2-2		20ng/L	5.0mg/L	
3-1	EE2	200ng/L	7.0mg/L	
3-2		20ng/L	10.0mg/L	

４．３．２　実験原水

実験原水には、標準法の T_1 処理場（1.3.1 参照）の二次処理水に、添加後の濃度が設定した初発濃度となるようにエストロゲン溶液（100mg/L）を添加して用いた。二次処理水は、Run 毎に異なる日に採取したが、**表 4-3-2** に示すとおり、有機物や浮遊性物質、亜硝酸性窒素などの濃度には大きな違いは無かった。したがって、二次処理水中の共存物質による影響は、各 Run でほぼ同一の条件であったと判断した。また、実験原水に用いた二次処理水は、全国の平均的な水質と比較して、COD_{Mn} や SS 濃度はやや低かったが、およそ平均的な水質であると考えられた。一方、添加前の二次処理水の E 1 および E2 の濃度は、

表 4-3-2　実験原水の水質測定結果

水質項目	二次処理水質[a)] [mg/L]	全国データ[b)] [mg/L]
BOD	3.1 (2.5～4.0)	3.1
COD_{Mn}	6.6 (6.2～6.9)	8.4
TOC	4.4 (4.1～4.8)	データなし
SS	1.9 (1.2～2.4)	3.6
NO_2-N	<0.1 (<0.1～<0.1)	データなし
E1	5.5 (3.4～24)	データなし
E2	3.1 (<0.7～9.2)	
EE2	<0.7 (<0.7～<0.7)	

a)上段は平均値、下段括弧内は最小値～最大値
b)下水道統計(平成17年度版)記載の放流水質の中央値

若干のバラつきがみられたが、実験に際して支障となる程ではなかった、また、EE2 は、いずれの二次処理水からも検出されなかった。

４．３．３　実験方法

実験は、**図 4-3-1** に示す実験装置を用いた回分処理実験とし、**表 4-3-1** に示した Run 毎にオゾン注入率を順次変えて行った。回分処理実験の具体的な手順を以下に示す。

初めに原水槽に入れた実験原水を、よく撹拌しながら、反応塔（内径 79mm、有効水深 1.8m、有効容量 8.8L）の半分程度の高さまで注水した。いったん注水を停止し、所要量のエストロゲン溶液を反応塔上部から添加した後、反応塔の有効水深まで実験原水を注水した。次いで、設定したオゾン注入率に応じた濃度のオゾンガスを、オゾン発生装置（OZSD-3000SA、荏原実業株式会社製）を用いて空気を原料に発生させて、反応塔下部から一定流量（0.5L/分）で送気した。なお、実験中の発生オゾン濃度および排オゾン濃度の変化を、紫外線吸収式オゾン濃度計（EG-600、荏原実業株式会社製）で連続測定した。送気開始から 15 分後、オゾンガスの送気を停止し、反応塔下部の採水バルブを開けて、オゾン処理後の試料（以下、オゾン処理水という）を採取した。試料採取後、直ちに溶存オゾン濃度を簡易測定器（検たろう CX-100、荏原実業株式会社製）を用いて測定するとともに、空気曝気により試料中の残存するオゾンを除去した後、分析に供した。

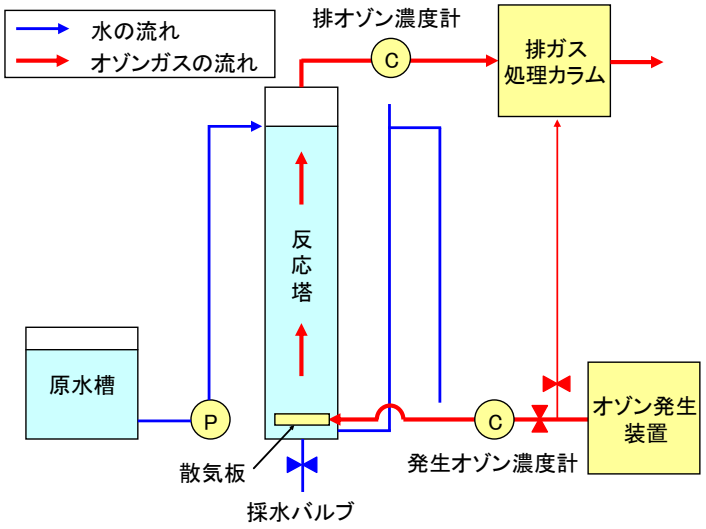


図 4-3-1　オゾン処理実験装置

４．３．４　分析方法

処理対象物質の E2、E1 および EE2 の濃度、および、遺伝子組換え酵母を用いたエストロゲン様活性を測定した。エストロゲン濃度は、2.2.3 に示した固相抽出－LC/MS 法、エストロゲン様活性は、1.3.3(4)に示した YES 法により行った。なお、本実験でのエストロゲン濃度、エストロゲン様活性の検出下限値は、それぞれ 0.7ng/L、1.0ng-E2/L であった。その他、一般的な水質項目として、BOD、COD_{Mn}、全有機態窒素（TOC）、SS 濃度、並びに、波長 260nm における吸光度（E_{260}）を、下水試験方法[17]に準拠して分析した。

４．４　結果および考察

４．４．１　有機物等の除去特性

オゾン消費率とオゾン処理水中の有機物等の関係について、一例として Run1-1（対象処理物質：E2、初発濃度：200ng/L）の場合を**図 4-4-1** に示す。ここで、オゾン消費率とは、被処理水に注入したオゾン量のうち、実際に被処理水との反応に供されたオゾン量を意味し、各種のオゾン濃度の測定結果から次式により求めた。

オゾン消費率[mg/L]＝（オゾン注入量[mg]－排オゾン量[mg]－残留オゾン量[mg]）
÷反応タンク容量[L] ……（**式 4-4-1**）

オゾン処理による有機物等の除去特性は、いずれの Run においても、**図 4-4-1** と同じ傾向を示した。すなわち、オゾン処理水中の COD_{Mn} や SS 濃度は、オゾン消費率が高くなるのに伴い低くなる傾向が認められ、オゾン注入率 10mg/L（オゾン消費率 7.0～8.3mg/L、以下同じ）での除去率は、COD_{Mn} は 30%（全 Run の平均値、以下同じ）、SS 濃度は 83%であった。これに対して BOD は、オゾン注入率 1.0mg/L までは、ほとんど変化が無いか、オゾン処理による有機物の易生分解化により、若干増加する傾向が認められたが、オゾン注入率 3mg/L 以上では、COD_{Mn} や SS 濃度と同様、オゾン消費率が高くなるのに伴って低くなる傾向が認められ、オゾン注入率 10mg/L での除去率は 22%であった。一方、有機炭素の指標である TOC は、オゾン注入率が高くなっても、除去効果はほとんど認められなかったが、不飽和結合を有する有機物の指標である E_{260} は、オゾン注入率の増加に伴って減少する傾向が認められた。このことから、下水処理水のオゾン処理では、下水処理水中に存在する有機物の二重結合などの酸化分解は生じているが、有機物の無機化にまでは至っていないことが示唆された。

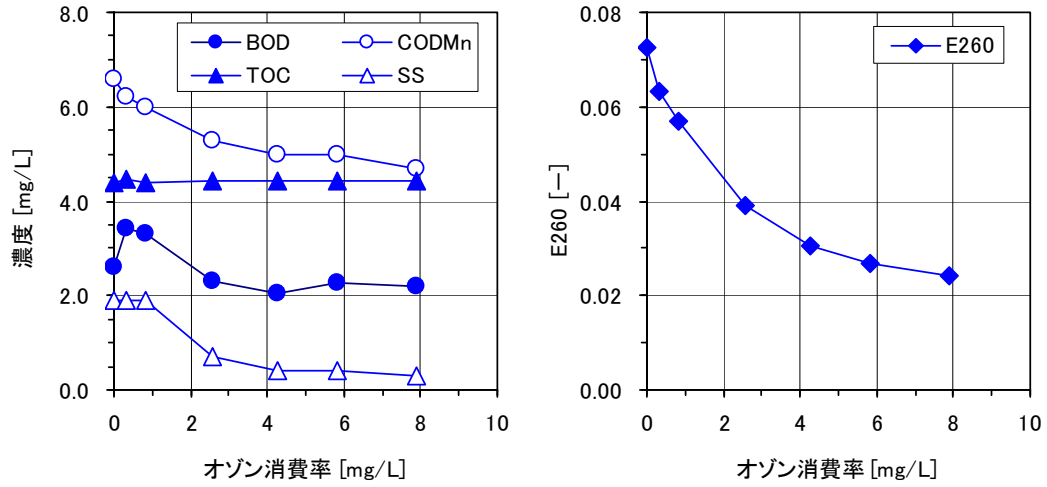


図 4-4-1　オゾン消費率と処理水中の有機物濃度等の関係の例（Run1-1）

４．４．２　エストロゲンおよびエストロゲン様活性の除去特性

各 Run におけるオゾン消費率とエストロゲン濃度およびエストロゲン様活性の関係を**図 4-4-2(1)**および(2)にそれぞれ示す。なお、エストロゲン濃度（各 Run の左図）は、E2 を添加した Run1 および E1 を添加した Run2 では EE2、EE2 を添加した Run3 では E2 は全て検出下限値未満であったことから、Run1 および Run2 では E1 および E2、Run3 では EE2 および E1 をそれぞれ示した。また、図中の破線は、検出下限値（エストロゲン濃度は 0.7ng/L、エストロゲン様活性は 1.0ng-E2/L）を、下向きの矢印は、次のプロットが検出下限値未満であることを表している。

いずれのエストロゲンについても、オゾン消費率 1mg/L 程度において、添加したエストロゲン自体の濃度、エストロゲン様活性ともに、初発濃度に対して 90%以上の除去率を示した。E1 を添加した Run２、並びに、EE2 を添加した Run3 では、オゾン消費率 3mg/L 程度以上では、添加したエストロゲン自体の濃度、エストロゲン様活性ともに、検出下限値未満となった。一方、E2 を添加した Run1 では、オゾン消費率 3mg/L 程度以上では、エストロゲン様活性は検出下限値未満となったが、E2 濃度はほぼ横ばいとなった。また、E1 を添加した Run2 における E2 濃度も、同様な傾向を示した。ここで、1ng/L の E2 は、理論上 1ng-E2/L のエストロゲン様活性に相当するが、上述したとおり、エストロゲン様活性はいずれも検出下限値未満であった。また、**図 4-4-3** に示すとおり、精製水に E2 を添加した実験では、E2 濃度、エストロゲン様活性ともに、オゾン消費率 0.7mg/L で検出下限値未満となった。以上のことから、E2 自体は、E1 や EE2 と同様に、エストロゲン様活性が消失したオゾン消費率 1～3mg/L 程度において、ほぼ完全に分解されたものと考えられる。さらには、本研究で用いた試料の前処理方法では、E2 または二次処理水中の共存物質の分解により生じたエストロゲン様活性を持たない分解産物と E2 を分離できなかったものと推察される。

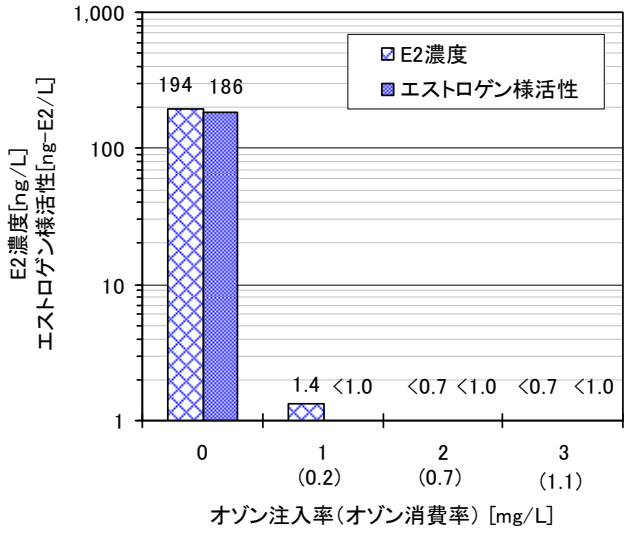
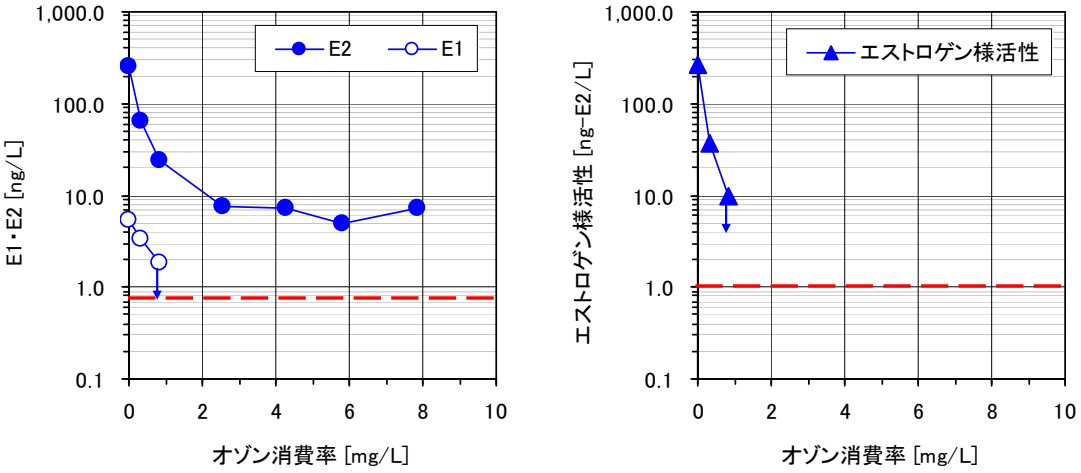
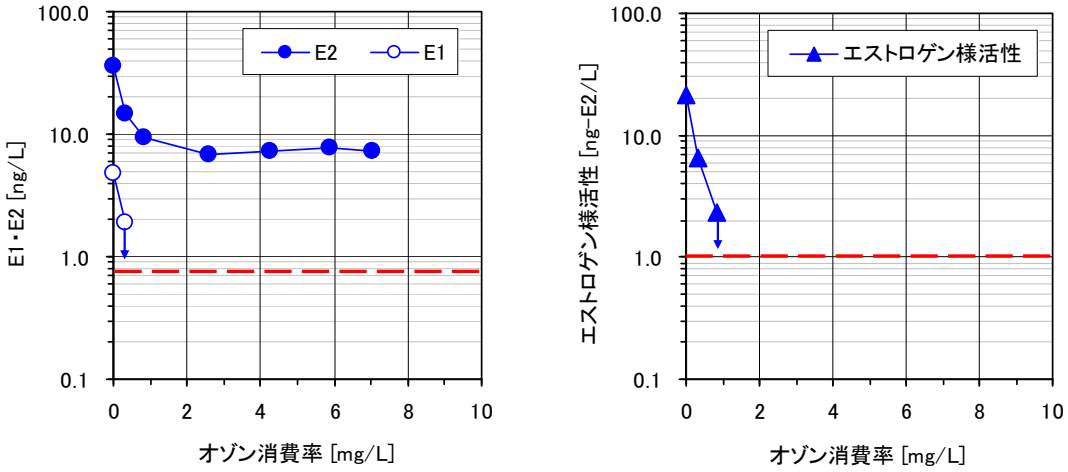


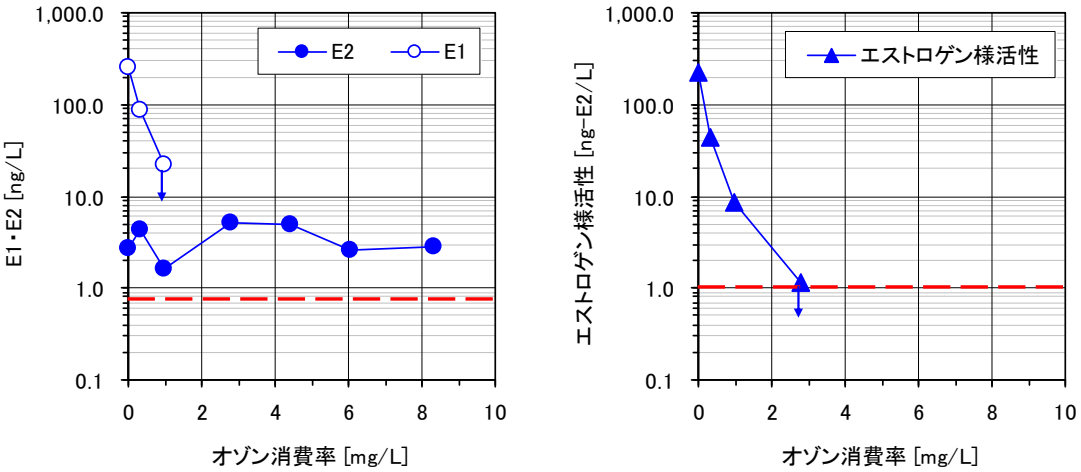
図 4-4-3　精製水を用いたオゾン処理実験結果（E2：200ng/L 添加）



(a) Run1-1 (E2：200ng/L 添加)

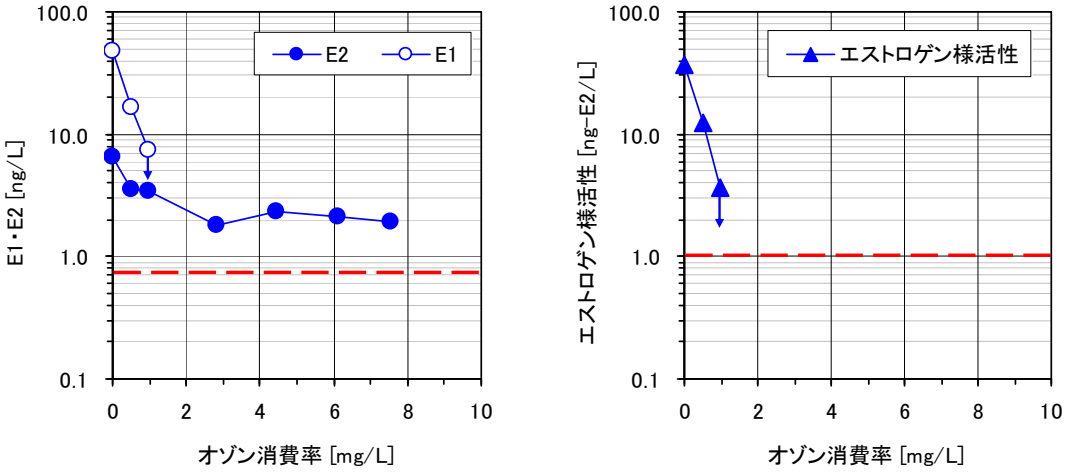


(b) Run1-2 (E2：20ng/L 添加)

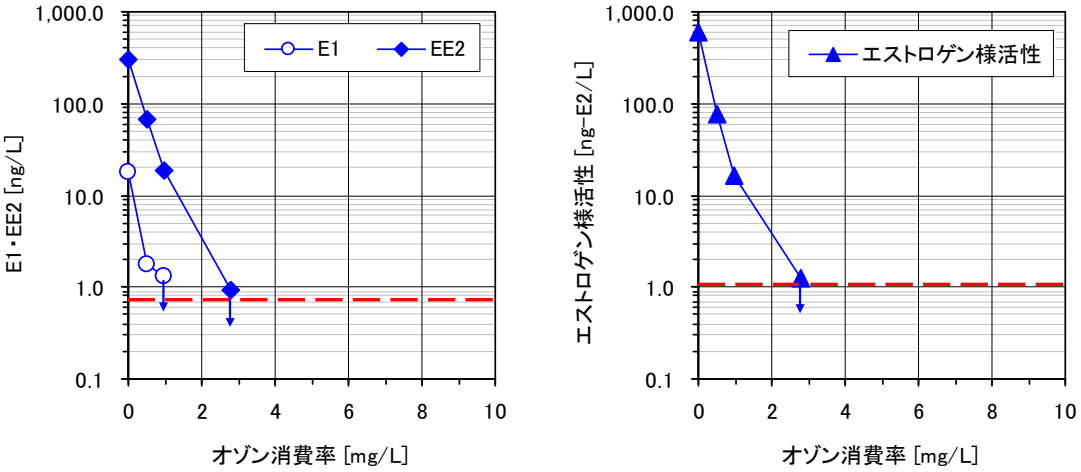


(c) Run2-1 (E1：200ng/L 添加)

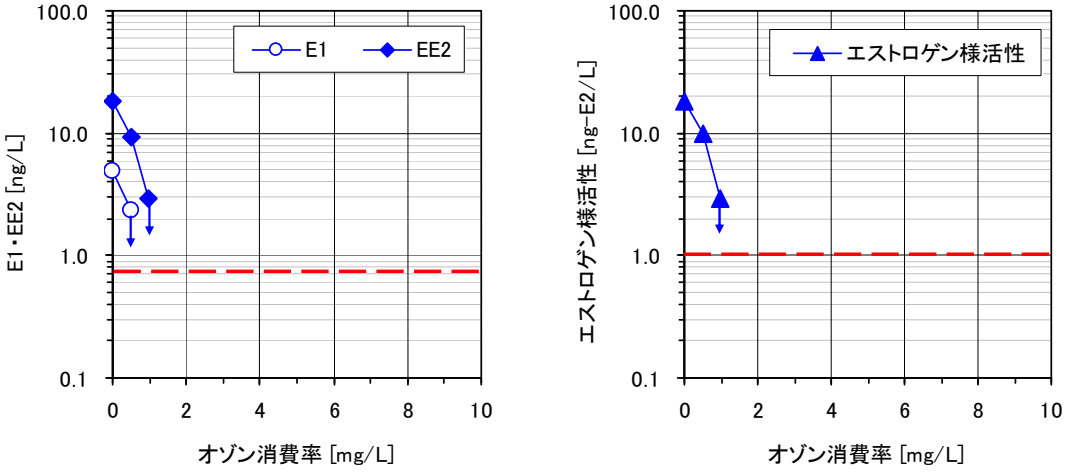
図 4-4-2(1)　オゾン消費率とエストロゲン濃度およびエストロゲン様活性の関係



(d) Run2-2 (E1：20ng/L 添加)



(e) Run3-1 (EE2：200ng/L 添加)



(f) Run3-2 (EE2：20ng/L 添加)

図 4-4-2(2)　オゾン消費率とエストロゲン濃度およびエストロゲン様活性の関係

活性汚泥処理では、E2 が酸化されて E1 を生じるため、第 2 章 2.3.4 に示した E2 の回分処理実験では、E2 濃度の減少に伴って E1 濃度が増加する傾向が認められた。しかし、**図 4-4-2** (a)および(b)に示すとおり、オゾン処理においては、E2 濃度の減少に伴う E1 濃度の増加は認められなかった。したがって、オゾンによる E2 の分解過程では、E1 は生成されないものと考えられる。一方、**図 4-4-2** (e)および(f)に示すとおり、EE2 のオゾン処理による分解過程においては、E1 や E2 は生じないものと考えられる。さらに、いずれのエストロゲンについても、その濃度の減少とともに、エストロゲン様活性も減少し、オゾン消費率が高くなると、エストロゲン様活性も検出下限値未満になったことから、エストロゲンのオゾン処理による分解過程では、エストロゲン様活性を有する分解産物は生成されないものと考えられる。

オゾンは、芳香族化合物や複素環式化合物、不飽和結合を有する有機物と選択的に反応し、特に炭素の二重結合との反応性が高い[12]。また、エストロゲンは、そのフェノール様の環状構造部位（A リングの 3 位の水酸基、**図 4-4-4** 参照）がエストロゲンレセプターと結合すると考えられているため[18]、この環状構造部位が分解されれば、エストロゲン様活性を失うものと考えられる。**図 4-4-5** に示すとおり、添加した処理対象のエストロゲン濃度の減少に比例してエストロゲン様活性も減少し、エストロゲンの分解に伴って直ちにエストロゲン様活性が消失していることがわかる。したがって、オゾンとエストロゲンの反応過程では、エストロゲンのフェノール様の環状構造部位が優先的に分解を受け、速やかにエストロゲン様活性を消失するものと推察される。

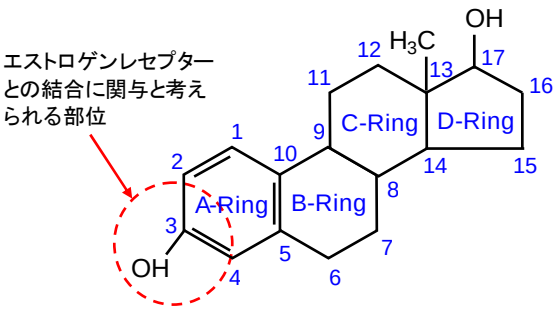


図 4-4-4　エストロゲンの化学構造の例（E2）

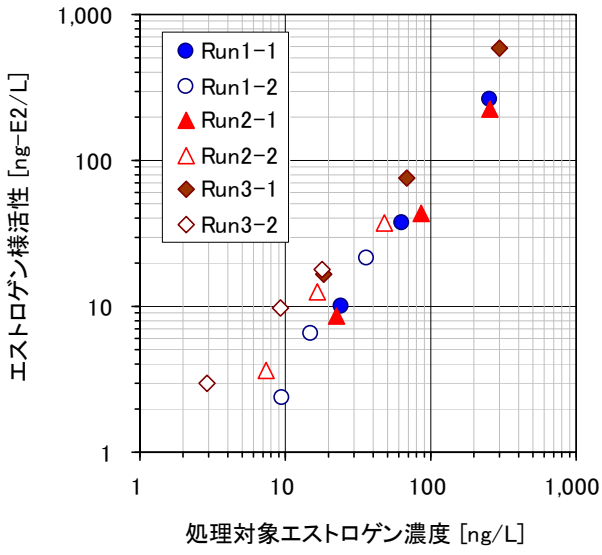


図 4-4-5　エストロゲン濃度とエストロゲン様活性の関係

４．４．３　オゾンとエストロゲンの反応速度

オゾンと処理対象物質 P の反応は、多くの場合、**式 4-4-2** の反応式で進行する[19]。

$$P + O_3 \rightarrow R \quad \cdots\cdots (式\ 4\text{-}4\text{-}2)$$

そこで、処理対象物質 P の除去速度は、処理対象物質の濃度を[P]、オゾン濃度を[O_3]、処理対象物質とオゾンの反応速度定数を k で表すと、**式 4-4-3** のとおり表される。

$$-d[P]/dt = k \times [O_3] \times [P] \quad \cdots\cdots (式\ 4\text{-}4\text{-}3)$$

ここで、オゾン濃度[O_3]は一定と仮定すると、処理対象物質 P の時間 0 から t における除去率は、処理対象物質 P の時間 0 での濃度（初発濃度）を[P_0]で表すと、**式 4-4-4** のとおり表される。

$$[P]/[P_0] = \exp(-k \times [O_3] \times t) \quad \cdots\cdots (式\ 4\text{-}4\text{-}4)$$

以上のことから、処理対象物質 P の除去率は、オゾン濃度と反応時間の積（[O_3]×t ）で決まり、これを CT 値という。反応速度定数 k は、**式 4-4-4** を変形した**式 4-4-5** により求めることができる。

$$k = -\mathrm{Ln}([P]/[P_0]) / ([O_3] \times t) \quad \cdots\cdots (式\ 4\text{-}4\text{-}5)$$

本研究における CT 値とエストロゲン濃度、エストロゲン様活性の対数残存比の関係を**図 4-4-6** に、反応速度定数の算出結果を**表 4-4-1** に示す。ここで、図の縦軸は、初発濃度に対する時刻 t における濃度の比 Ln（[P]/ [P_0]）（以下、対数残存比という）で表したため、図の直線の傾きは反応速度定数 k を表す。なお、**表 4-4-1** の反応速度定数は、既往の文献値との比較のため、オゾン濃度 1mol/L、反応時間 1 秒あたりに換算して示した。

CT 値とエストロゲン濃度、エストロゲン様活性の対数残存比は、**図 4-4-6** に示すとおり相関性が認められ、エストロゲン濃度、エストロゲン様活性はいずれも、オゾンとの反応速度を**式 4-4-3** で表すことが可能であった。

オゾンとエストロゲンの反応速度定数は、エストロゲンの添加濃度 200ng/L では 2.5×10^5～3.0×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$、20ng/L では 1.7×10^5～1.9×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ であり、エストロゲンの違いによる差は小さかった。オゾンとエストロゲン様活性の反応速度定数は、エストロゲンの添加濃度 200ng/L では 3.4×10^5～4.1×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$、20ng/L では 1.6×10^5～2.7×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ であり、エストロゲンとの反応速度定数と同程度となった。オゾンとエストロゲンの反応速度定数について、純水を用いた実験の結果から、Huber ら[15]は 10^6 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$（E2、EE2）、神谷ら[20]は 2.0×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$（E2）と報告している。本研究では、共存物質を含む下水処理水を用いて実験を行ったが、オゾンとエストロゲンの反応速度定数は、神谷ら[20]の報告とほぼ同程度であった。このことから、共存物質が存在する下水処理水中であっても、オゾンとエストロゲンは速やかに反応し、エストロゲンの分解が生じるものと考えられる。また、本研究で用いた下水処理水の

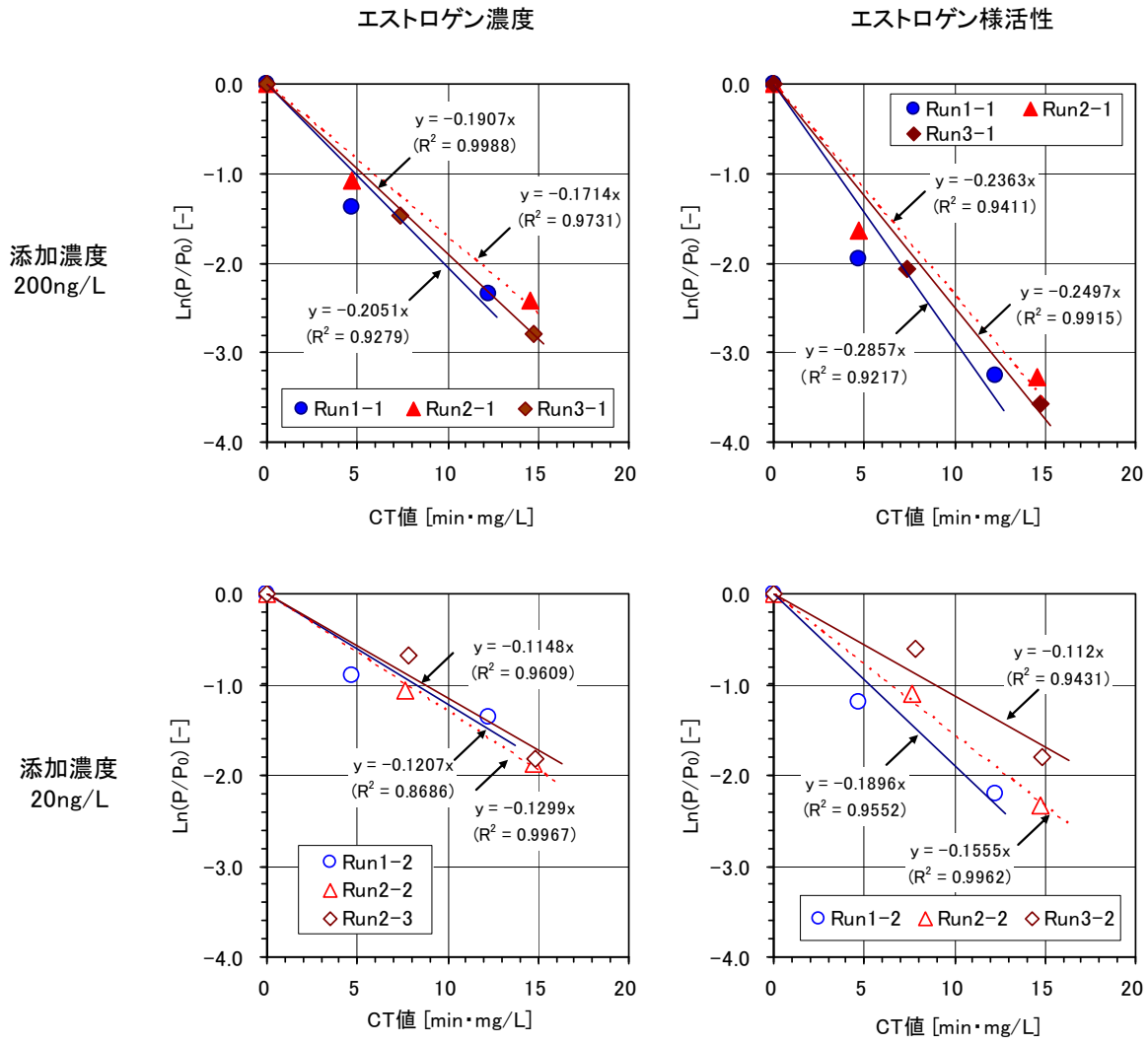


図 4-4-6　CT 値とエストロゲン濃度・エストロゲン様活性の対数残存比の関係

表 4-4-1　反応速度定数の算出結果

Run	処理対象物質	添加濃度 [ng/L]	初発濃度 P_0		反応速度定数 k $[(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}]$	
			エストロゲン [ng/L]	エストロゲン様活性[ng-E2/L]	エストロゲン	エストロゲン様活性
1−1	E2	200	252	261	3.0×10^5	4.1×10^5
1−2		20	36	21	1.7×10^5	2.7×10^5
2−1	E1	200	253	226	2.5×10^5	3.4×10^5
2−2		20	48	37	1.9×10^5	2.2×10^5
3−1	EE2	200	299	589	2.8×10^5	3.6×10^5
3−2		20	18	18	1.7×10^5	1.6×10^5

有機物濃度等は、4.3.2 に示したとおり、下水処理水のおおむね平均的な処理水質と考えられることから、下水処理水中における平均的なオゾンとエストロゲンの反応速度定数は、本実験の結果得られた 2×10^5 ～3×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ 程度であるものと考えられる。また、オゾンとエストロゲン、オゾンとエストロゲン様活性の反応速度定数は、いずれも処理対象とするエストロゲンの初発濃度が高い方（添加濃度 200ng/L）が大きく、初発濃度の低い方（添加濃度 20ng/L）と比較して 1.3～2.2 倍であった。これは、下水処理水中の共存物質は、エストロゲン濃度（ng/L オーダー）と比較して、著しく高濃度（mg/L オーダー）であるため、エストロゲンの初発濃度が高いほど、オゾンとエストロゲンが反応する機会が増えるためと推察される。

４．４．４　総合考察

本章では、下水処理水中でのエストロゲンのオゾン処理特性を明らかにするため、実際の下水処理水を用いたエストロゲンのオゾン処理実験を行った。本章の実験結果を概括すると以下のとおりである。

- 天然エストロゲンの E2 および E1、合成エストロゲンの EE2 のいずれについても、エストロゲン濃度およびエストロゲン様活性ともに、1mg/L 程度のオゾン消費率で初発濃度に対して 90%以上の除去率を示し、3mg/L 程度のオゾン消費率でほぼ検出下限値（エストロゲン濃度は 0.7ng/L、エストロゲン様活性は 1.0ng-E2/L）未満となった。
- オゾン処理による E2 の分解過程では、E2 濃度の減少に伴う E1 濃度の増加は認められなかった。また、EE2 のオゾン処理による分解過程では、E1 や E2 の生成はなかった。さらに、オゾン処理によるエストロゲンの分解過程では、エストロゲン様活性を有する分解産物は生成されないと考えられた。
- エストロゲン様活性は、エストロゲン濃度に比例して低減する傾向が認められ、エストロゲンの分解除去に伴って、エストロゲン様活性は速やかに低減するものと考えられた。
- オゾンとエストロゲンとの反応速度定数は、2×10^5 ～3×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ 程度であり、オゾンとエストロゲンは、共存物質が存在する下水処理水中においても、速やかに反応するものと考えられた。一方、エストロゲン様活性の反応速度定数は、2×10^5 ～4×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ 程度であり、オゾンとエストロゲンの反応速度定数と同程度であった。また、オゾンとエストロゲンおよびエストロゲン様活性との反応速度定数は、エストロゲン種による差は比較的小さかったが、エストロゲンの初発濃度が高いほど、大きくなる傾向が認められた。

本実験の結果より、下水処理水中のエストロゲン濃度を検出下限値未満にするために必要なオゾン濃度と反応時間の関係を**式 4-4-4** により求めた結果を**図 4-4-7** に示す。なお、エストロゲンの初発濃度は、第 1 章に示した下水処理水中の E1 濃度および E2 濃度の最大値がそれぞれ 252ng/L、20ng/L であったことから、E1 は 250ng/L、E2 は 20ng/L とし

た。また、オゾンとエストロゲンの反応速度定数は、**表 4-4-1** に示した数値を用いた。

下水処理場において消毒や脱色などの目的で導入されているオゾン処理施設でのオゾン注入率は、計画値では 9.0mg/L 程度、実績値では 5.0mg/L 程度である [21]。したがって、下水処理場における実用的なオゾン注入率である 5～10mg/L 程度では、E1 は 6～12 秒程度以上、E2 は 15～30 秒程度以上の反応時間で検出下限値未満に分解除去できるものと考えられる。これに対して、実際のオゾン処理施設でのオゾン反応槽の反応時間は 15 分（＝900 秒）程度であり [21]、上述したエストロゲンの分解除去に必要な反応時間を大きく上回ることから、消毒などを目的としたオゾン処理施設では、下水処理水中のエストロゲンをほぼ完全に分解除去し、エストロゲン様活性も低減できるものと考えられる。一方、実際のオゾン処理施設では、エストロゲンの分解除去に必要な反応時間よりも十分に長いことから、エストロゲンの除去を目的とした場合には、オゾン注入率をより低くすることが可能とも考えられる。これに対して、本研究では、オゾン消費率が 3mg/L 程度以上でほぼ検出下限値未満となった。また、4.2.3 に示したとおり、パイロットプラントや実施設における既往の調査においても、2～5mg/L 程度以上のオゾン注入率で高い除去効果があったことが報告されている。これは、オゾン注入率が低い場合には、下水処理水中に共存する還元性物質との反応にオゾンが消費され、エストロゲンの分解除去の効果が低下することを示唆しており、確実なエストロゲンの除去のためには、5mg/L 程度以上のオゾン注入率が必要であると考えられる。

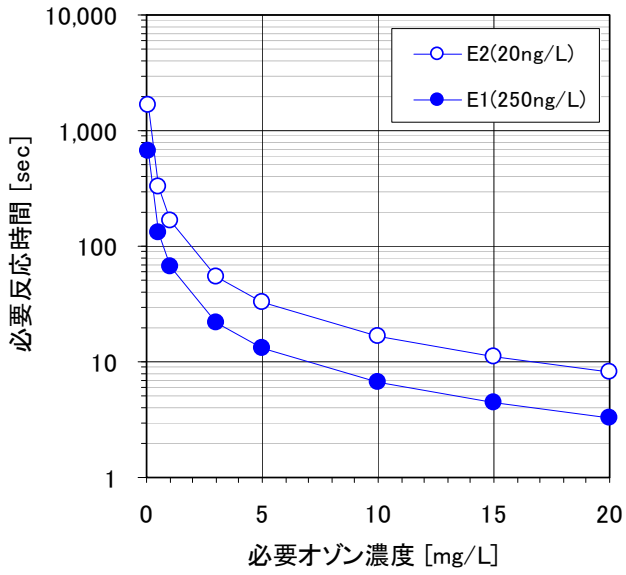


図 4-4-7　検出下限値未満に除去するために必要なオゾン濃度と反応時間の関係

４．５　まとめ

本章では、有機物などが共存する下水処理水中におけるエストロゲンのオゾン処理特性を明らかにするため、標準法の実施設の二次処理水を用いたエストロゲンのオゾン処理実験を行った。E2、E1 および EE2 はいずれも、エストロゲン濃度およびエストロゲン様活性ともに、1mg/L 程度のオゾン消費率で初発濃度に対して 90%以上の除去率を示し、3mg/L 程度のオゾン消費率でほぼ検出下限値未満となった。また、エストロゲンのオゾン処理では、E2 から E1 への形態変化やエストロゲン様活性を有する分解産物の生成は認められなかった。オゾンとエストロゲンの反応速度定数は、2×10^5～3×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ 程度であり、オゾンとエストロゲンは、共存物質が存在する下水処理水中においても、速やかに反応するものと考えられた。以上の結果から、消毒などを目的とした実用的なオゾン注入率（5～10mg/L 程度）と反応時間（15 分程度）により、下水処理水中のエストロゲンをほぼ完全に分解除去し、エストロゲン様活性も低減できることが可能であり、オゾン処理は、下水処理水中に残存するエストロゲンの高度処理に有効であることが明らかとなった。

参考文献（第４章）

1) 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撹乱化学物質に関する調査報告書（案）」

2) 日本下水道事業団技術開発部調べ（2008）

3) Snyder, S. A., Westerhoff, P. Yoon, Y., Sedlak, D. L. (2003) Pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disruptors in water: implications for the water industry, Environ. Eng, Sci., **20**(5), 449-469.

4) 田中宏明, 岡安祐司, 中田典秀, 八十島誠（2004）新たに登場してきた下水道の微量汚染物質問題, 下水道協会誌, **41**(489), 27-30.

5) Ternes, T. A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. (2003) Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?, Water Res., **37**(8), 1976-1982.

6) Huber, M. M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T. A., von Gunten, U. (2005) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents; a pilot study, Environ. Sci. Technol., **39**(11), 4290-4299.

7) 北中敦, 鈴木穣（2001）下水生物処理水中内分泌撹乱物質の物理化学的手法による除去効果, 環境工学研究論文集, **38**, 275-284.

8) 村田恒夫･編著（1992）急速ろ過法, 「下水の高度処理技術」, 理工図書, 43-66.

9) 今野弘（1996）吸着, 「水質衛生学」（金子光美・編著）, 技報堂出版,195-200.

10) 社団法人日本下水道協会（2000）「下水道用語集－2000 年版」, 社団法人日本下水道協会

11) 伊藤禎彦, 長坂俊樹, 中西岳, 野中愛, 百々生勢（2000）水道水のエストロゲン様作用の特性と制御性に関する研究, 環境工学研究論文集, **37**, 333-344

12) 宗宮功･編著, 特定非営利活動法人日本オゾン協会オゾンハンドブック編集委員会（2004）オゾンの反応特性,「オゾンハンドブック」, 特定非営利活動法人日本オゾン協会, 67-80.

13) 金子光美（1996）オゾンによる消毒,「水質衛生学」（金子光美・編著）, 技報堂出版, 327-340.

14) 山田春美（2000）AOP と環境ホルモン対策, 水, **42**(8), 17-27.

15) Huber, M. M., Canonica, S., Park, G.-Y., von Gunten, U. (2003) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes, Environ. Sci. Technol., **37** (5), 1016 -1024.

16) Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato, N., Takada, H. (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant, Water Res., **41**(19), 4373-4382.

17) 建設省都市局下水道部, 厚生省生活衛生局水道環境部監修（1997）「下水試験方法－上巻－」, 社団法人日本下水道協会

18) Brikett, J. W. (2003) Properties of EDCs, “Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes”, Birkett, J. W., Lester, J. N. (ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, 12-14.

19) 特定非営利活動法人日本オゾン協会（2000）オゾン及び促進酸化処理に適合する反応設定の調査, 工業用水, **504**, 32-43.

20) 神谷俊行, 山内登起子, 広辻淳二, 藤田正憲（2002）内分泌攪乱化学物質に対するオゾン処理の基礎特性, 下水道協会誌, **39**(475), 105-118.

21) 国土交通省都市・地域整備局下水道部（2005）消毒技術の性能実態調査,「平成 16 年度安全性確保のための下水処理技術開発に関する調査 報告書」, 81-103.

総括並びに結論

下水道は、公衆衛生の向上を図り、良好な生活環境を確保するとともに、公共用水域の水質保全を図るために、欠くことのできない最も基本的な社会資本（ナショナルミニマム）であり、平成 19 年度末における全国の下水道処理人口普及率は 72%に達する。下水道の普及拡大により、下水道が流域の自然環境や社会活動に及ぼす影響が大きくなるのに伴って、生活環境の改善や浸水防除、公共用水域の水質汚濁の防止という従来からの役割に加えて、病原性微生物や微量化学物質などに関する水循環系へのリスクの低減と管理に果たす下水道の役割が重要となっている。

内分泌撹乱物質は、人を含む生物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常な内分泌（ホルモン）作用を撹乱し、生殖機能の異常や悪性腫瘍の発生などを引き起こす可能性があり、世代を越えた深刻な影響をもたらすおそれがある。下水道は、人間の諸活動の結果生じた下水を受け入れ、これを下水処理場で処理した後、その処理水を公共用水域へ放流するため、下水道を経由した内分泌撹乱物質の水環境への排出、生態系への影響が懸念されている。特に人畜由来の天然エストロゲンは、生体内で合成されるエストロゲンそのものであるため、内分泌撹乱作用の疑われる合成化学物質と比較して、水環境中に放出された場合、非常に高い内分泌撹乱作用を及ぼすものと考えられ、放流先の水生生物に生殖異常などの影響を及ぼす可能性も示唆されている。そこで、下水処理場におけるエストロゲンの挙動の実態を詳細に把握するとともに、エストロゲンの効率的かつ安定的な除去に適した運転方法や新たな除去技術の確立が求められている。

本研究論文は、下水中の代表的な内分泌撹乱物質のうち、特にエストロゲンに着目し、下水処理における挙動の解明と除去の向上を目的として、下水処理場における内分泌撹乱物質の挙動の実態に関する調査、実際の下水や活性汚泥を用いたエストロゲンの処理実験、エストロゲン分解細菌やオゾン処理を用いたエストロゲンの除去向上に関する検討を行った一連の結果をまとめたものである。

第 1 章では、下水処理における内分泌撹乱物質の濃度レベルや挙動の実態を明らかにするため、全国の中小規模の下水処理場での調査、並びに、標準活性汚泥法（標準法）およびオキシデーションディッチ法（OD 法）の下水処理場での通年調査などを行った。

流入下水中からは、調査対象とした多様な内分泌撹乱物質が全ての試料から検出されたが、合成化学物質であるノニルフェノール（NP）やビスフェノール A（BPA）は、下水処理過程での除去効果が高く、処理水中のエストロゲン様活性は、天然エストロゲンであるエストロン（E1）と 17β－エストラジオール（E2）の 2 物質にほぼ由来することが明らかとなった。したがって、下水道を経由した内分泌撹乱物質のリスク低減の観点からは、E1 と E2 が重要であると考えられた。特に E1 は、処理水中のエストロゲン様活性における寄与率が高く、また、標準法の下水処理場では、下水処理過程で E1 の濃度が増加する場合が見られることから、標準法における E1 の除去向上が必要と考えられた。

また、反応タンクの水理学的滞留時間（HRT）や固形物滞留時間（SRT）の長い OD 法は、HRT や SRT の短い標準法と比較して、内分泌撹乱物質の除去効果が高く、安定しており、内分泌撹乱物質が効率的に除去されていることが明らかとなった。また、エストロゲンやエストロゲン様活性の除去率は、標準法を含めて HRT や SRT の長い方が高く安定する傾向が認められたことから、内分泌撹乱物質の除去効果は、HRT や SRT の影響を受けるものと考えられた。

第 2 章では、第 1 章の結果よりエストロゲンに着目して、下水処理におけるエストロゲンの除去特性を把握し、その除去に適した運転条件を明らかにするため、標準法の下水処理場におけるエストロゲンの挙動の詳細な調査、実下水を用いたパイロットプラント処理実験、並びに、実施設の活性汚泥を用いた回分処理実験を行った。

実施設におけるエストロゲンの負荷量の挙動から、下水処理過程におけるエストロゲンの除去は、主に生物処理工程での生物学的な分解によることや、標準法でみられる下水処理過程での E1 の増加は、下水中のエストロゲン抱合体の分解に起因することが明らかとなった。また、反応タンク内でのエストロゲンの消長から、エストロゲンの除去効果は、汚泥相への吸着性の影響を受け、吸着性の高い E2 は、汚泥中に移行して水中から除去されるのに対して、吸着性の低い E1 は、水中と汚泥中に分配され、水中に残留することがわかった。

さらに、回分処理実験の結果から、標準法と OD 法の間でのエストロゲンの除去性能の違いは、SRT に起因する活性汚泥性状の違いによることが示唆された。また、エストロゲンの除去は水温の影響を受けるが、反応時間が長くなるとその影響が認められなくなったことなどから、効果的かつ安定的なエストロゲンの除去を行うためには、SRT や HRT の長い方が有利であることが確認された。

本章および第 1 章の結果、並びに、既往の知見から、SRT が概ね 10～15 日程度以上では、効果的かつ安定的なエストロゲンの除去を期待することが可能であると考えられることから、標準法ではエストロゲンの安定的な除去は困難であり、生物学的窒素除去法や OD 法などの処理方式が有効であると考えられた。

第 3 章では、著者らが実施設の活性汚泥中から単離したエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.に着目して、リアルタイム PCR 法を用いて定量的に検出することにより、活性汚泥中でのエストロゲン分解細菌の挙動を明らかにした。また、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株の培養菌体の活性汚泥への添加実験や、JEM-1 株の培養菌体を固定化した担体を用いた二次処理水の処理実験を行って、エストロゲン分解細菌を利用したエストロゲンの除去向上についても検討した。

エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、調査した全ての活性汚泥から検出され、活性汚泥中に一般的に存在しているものと考えられた。また、活性汚泥中のエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の平均的な細菌数は、1.0×10^{6} 個/mg-MLVSS 程度前後であり、全体的な傾向としては、運転条件（処理方式）やエストロゲンの除去効果との関係は明確ではなかった。しかし、通年にわたる標準法の下水処理場における調査では、エス

トロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.の細菌数と処理水中の E1 濃度の間に関係性が認められ、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.が当該下水処理場における E1 の除去に関与している可能性が示唆された。

活性汚泥中にエストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp. JEM-1 株の培養菌体を添加し、活性汚泥中の細菌数を 0.5～1.0×10^7 個/mg-MLVSS 程度以上に増加させることにより、エストロゲンの除去効果を向上させることが可能であった。また、JEM-1 株の菌体を固定化した担体を用いることにより、二次処理水中のエストロゲンを 30 分間の処理時間で 80%程度除去することが可能であった。

このように本章の検討結果より、エストロゲン分解細菌 *Novosphingobium* sp.は、下水処理過程でのエストロゲン除去に実際に関与していると考えられることや、これを利用したエストロゲンの除去向上が可能であることが明らかとなった。

第 4 章では、下水処理水中のエストロゲンの補完的な高度処理方法として、オゾン処理に着目し、有機物などが共存する下水処理水中におけるエストロゲン処理特性を明らかにした。

E2、E1 および合成エストロゲンの 17α－エチニルエストラジオール（EE2）はいずれも、1mg/L 程度のオゾン消費率で初発濃度に対して 90%以上の除去率を示し、3mg/L 程度のオゾン消費率でほぼ検出下限値未満となった。ここで、エストロゲン様活性も有意に低減できることが確認され、内分泌撹乱性を有する分解物が生じないことも確認した。また、エストロゲンのオゾン処理では、E2 から E1 への形態変化は認められなかった。オゾンとエストロゲンの反応速度定数は、2×10^5～3×10^5 $(mol/L)^{-1}\cdot sec^{-1}$ 程度と推察され、オゾンとエストロゲンは、共存物質が存在する下水処理水中においても、速やかに反応するものと考えられた。

本章の結果より、消毒などを目的とした実用的なオゾン注入率（5～10mg/L 程度）と反応時間（15 分程度）により、下水処理水中のエストロゲンをほぼ完全に分解除去し、エストロゲン様活性も低減することが可能であり、オゾン処理は、下水処理水中に残存するエストロゲンの高度処理に有効であることが明らかとなった。

下水道の役割が、生活環境の改善から公共用水域の水質汚濁防止、処理水の再利用などへと広がるのに伴って、下水処理で除去すべき対象も、浮遊性物質や有機物から窒素やりん、難分解性物質や色度などに広がり、下水処理技術も、これに対応するため、標準法から生物学的窒素・りん除去法や物理化学的な高度処理法へと進歩してきた。さらに近年では、健全な水循環の確保における下水道の役割の重要性が増すのに伴って、原虫やウイルスなどの病原性微生物や内分泌撹乱物質などの微量化学物質などの除去による人の健康や生態系へのリスクの低減が新たに求められつつある。

下水処理水中のエストロゲンについては、それが人や生物に与える影響は未だ調査研究の途上にあり、その関連性を明らかにし得る知見が十分ではないことや、水質環境基準や排水基準の対象物質ではないことなどから、現時点では目標とすべき下水処理水中の濃度

レベルも明らかではない。そこで、現時点においては、エストロゲンの除去のみを目的とした高度処理の導入などの対策は現実的には困難である。しかし、健全な水循環の確保に果たす下水道の役割の大きさに鑑み、現時点で実施可能な対策によりエストロゲンの除去効果を維持し、向上することが必要であり、かつ、重要であると考えられる。

本研究で得られた知見から、SRT や HRT が長い OD 法や生物学的な窒素除去法などを採用する下水処理場では、有機物や窒素に対する適切な運転管理を行うことにより、高いエストロゲン除去効果が期待できるものと考えられる。一方、SRT や HRT が短い標準法の下水処理場では、施設能力に余裕があるような場合には、極力 SRT や HRT を長くとることにより､エストロゲンの除去効果を現状よりも向上させることが可能と考えられるが、その一般的な運転条件では安定的な除去を確保することは困難と言える。そこで、エストロゲンの効果的かつ安定的な除去を図るためには、放流先水域の水質保全や処理水の有効利用などの観点から必要性がある下水処理場では、生物学的な窒素除去法への転換や、オゾン処理などの物理化学的な高度処理の導入を進めることが有効と考えられる。

第 1 章に示したとおり、英国におけるエストロゲン 3 物質の環境基準導入に向けての検討や、わが国におけるエストロゲン 2 物質の水道水質基準の要検討項目への追加など、水環境におけるエストロゲン濃度の規制に向けた動向も見られる。そこで、今後、下水処理場において、エストロゲンに対するより高度なリスクの低減および管理が求められることも考えられる。したがって、次に示すような課題について、継続的な調査および研究が必要と考えられる。

1） 排出源（一般家庭等）から水環境中への排出に至るまでの下水管渠や下水処理場の全ての工程において、エストロゲン抱合体を含むエストロゲン全体の挙動を調査し、下水処理過程におけるエストロゲンの消長を的確に予測し、管理できる手法を探求する。

2） 活性汚泥処理におけるエストロゲンの除去に関与する微生物（群）を特定し、活性汚泥中での挙動やエストロゲンの除去機構を明らかにすることにより、さらに効率的かつ安定的な運転方法や処理プロセスを探求する。

3） 効率的かつ経済的なオゾン発生装置やオゾン反応装置などを開発することにより、中小規模の下水処理場にも適用可能な低コストで維持管理も容易なオゾン処理システムを探求する。

4） 水環境中に存在するエストロゲンが水生生物に対する影響を明らかにするとともに、下水処理場を経由して排出されるエストロゲンの水環境での変化や、生態系に与える影響の度合いについて評価を行い、下水処理において達成すべきエストロゲンの除去レベルを明らかにする。

本研究の成果に加えて、これらの課題が解明されることにより、下水処理場におけるより効率的かつ安定的なエストロゲンの除去が可能になるものと考えられる。

以上、本研究で得られた知見は、エストロゲンのみに限らず、その他の内分泌撹乱物質や、今後注目される PPCPs（Pharmaceuticals and Personal Care Products : 医薬品及び日用生活品）などの微量化学物質の除去に対しても応用しうるものと考えられ、下水道における水循環系へのリスク低減と管理に広範に貢献できるものといえる。したがって、本研究は、下水道工学上極めて価値あるものと信ずる。

謝　　辞

本研究の実施および本論文の執筆にあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授　池道彦博士に深く感謝の意を表します。

また、本論文の査読およびご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻教授　加賀昭和博士、同准教授　惣田訓博士に感謝の意を表します。

さらに、著者に本論文の執筆を奨めてくださいますとともに、ご指導を賜りました大阪大学大学院名誉教授 藤田正憲博士に感謝の意を表します。

本研究の調査および実験の実施にあたり、有益なご指導、ご助言を頂きました日本下水道事業団技術開発部長　村上孝雄博士、同技術開発部先端研究役　中沢均博士、同部元総括主任研究員（現・エースコンサルタント株式会社）三品文雄博士、また、調査・実験に直接ご協力頂きました同部元主任研究員（現・東京都下水道局）市川栄治氏、および、株式会社荏原製作所環境事業カンパニー　恩田建介氏、株式会社荏原総合研究所　宮晶子博士を始めとする株式会社荏原製作所の共同研究者各氏、ならびに、LC/MS によるエストロゲンの分析等に携わって頂いた日本ヘルス工業株式会社　奥野浩介氏、実務訓練生として実験の一部に携わって頂いた長岡技術科学大学(当時)高橋梢さんに感謝の意を表します。

また、本研究の調査および実験にあたり、試料採取にご協力を頂きました自治体および下水処理場の関係者各位に感謝いたします。

最後に、本論文の執筆にあたり、叱咤激励を頂きました日本下水道事業団の諸兄、ならびに、常に惜しみない協力をしてくれた家族に感謝します。

関連発表論文等一覧

【論文】

橋本敏一，市川栄治，中沢均（2003）中小規模の下水処理場におけるエストロゲン様物質の挙動，下水道協会誌，**40**(490)，172-185.

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撹乱物質の消長と挙動，水環境学会誌，**27**(12)，797-802.

Hashimoto, T., Onda, K., Nakamura, Y., Tada, K., Miya, A., Murakami, T. (2007) Comparison of natural estrogen removal efficiency in the conventional activated sludge process and the oxidation ditch process, Water Research, **41**(10), 2117-2126.

Hashimoto, T., Murakami, T. (2009) Removal and degradation characteristics of natural and synthetic estrogens by activated sludge in batch experiments, Water Research, **43**(3), 573-582.

Hashimoto, T., Onda, K., Morita, T., Luxmy, B. S., Tada, K., Miya, A., Murakami, T. (2008) Contribution of estrogen-degrading bacteria *Novosphingobium* sp. strain JEM-1 to estrogen removal in wastewater treatment process, Journal of Environmental Engineering (in submission)

Hashimoto, T., Takahashi, K., Murakami, T. (2006) Characteristics of estrogen decomposition by ozonation, Water Science & Technology, **54**(10), 87-93.

【総説】

橋本敏一（2002）中小規模の処理場における内分泌撹乱物質の挙動について，下水道協会誌，**39**(482)，9-13.

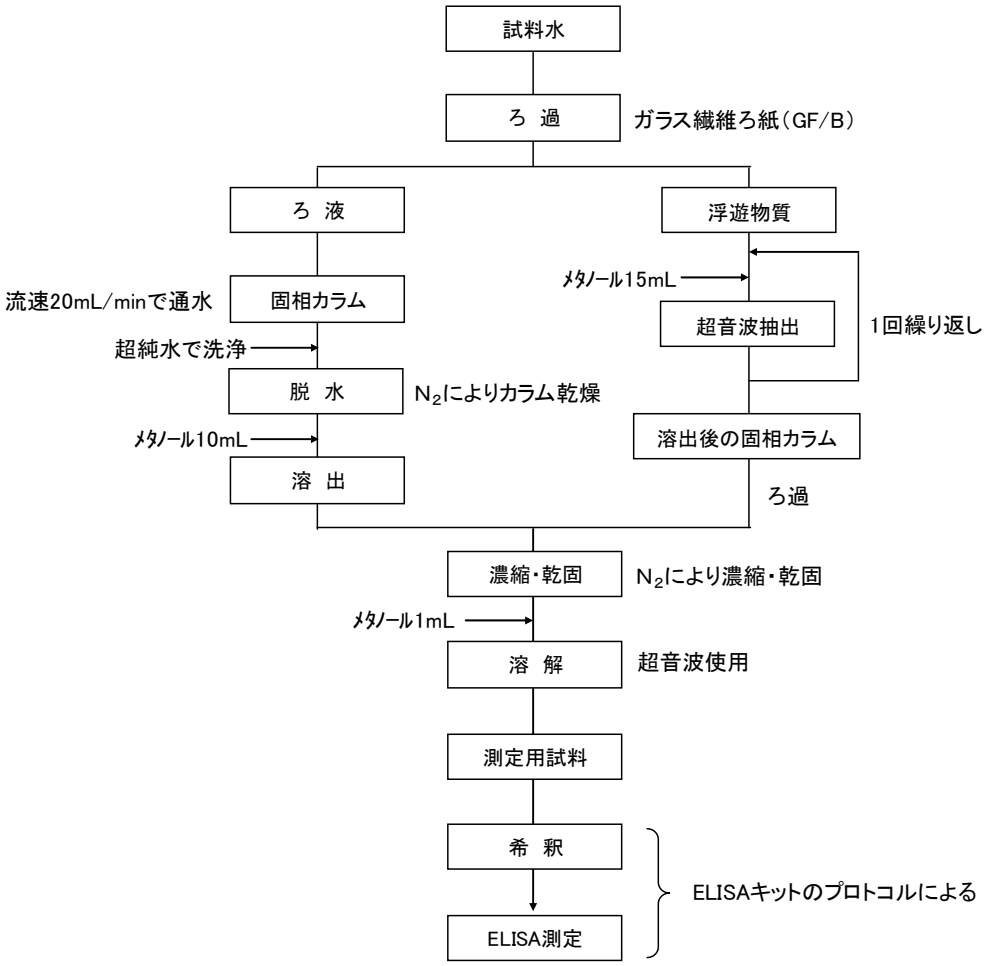
橋本敏一（2006）活性汚泥処理における内分泌攪乱物質の挙動と微生物分解，用水と廃水，**48**(1)，95-101.

付　録

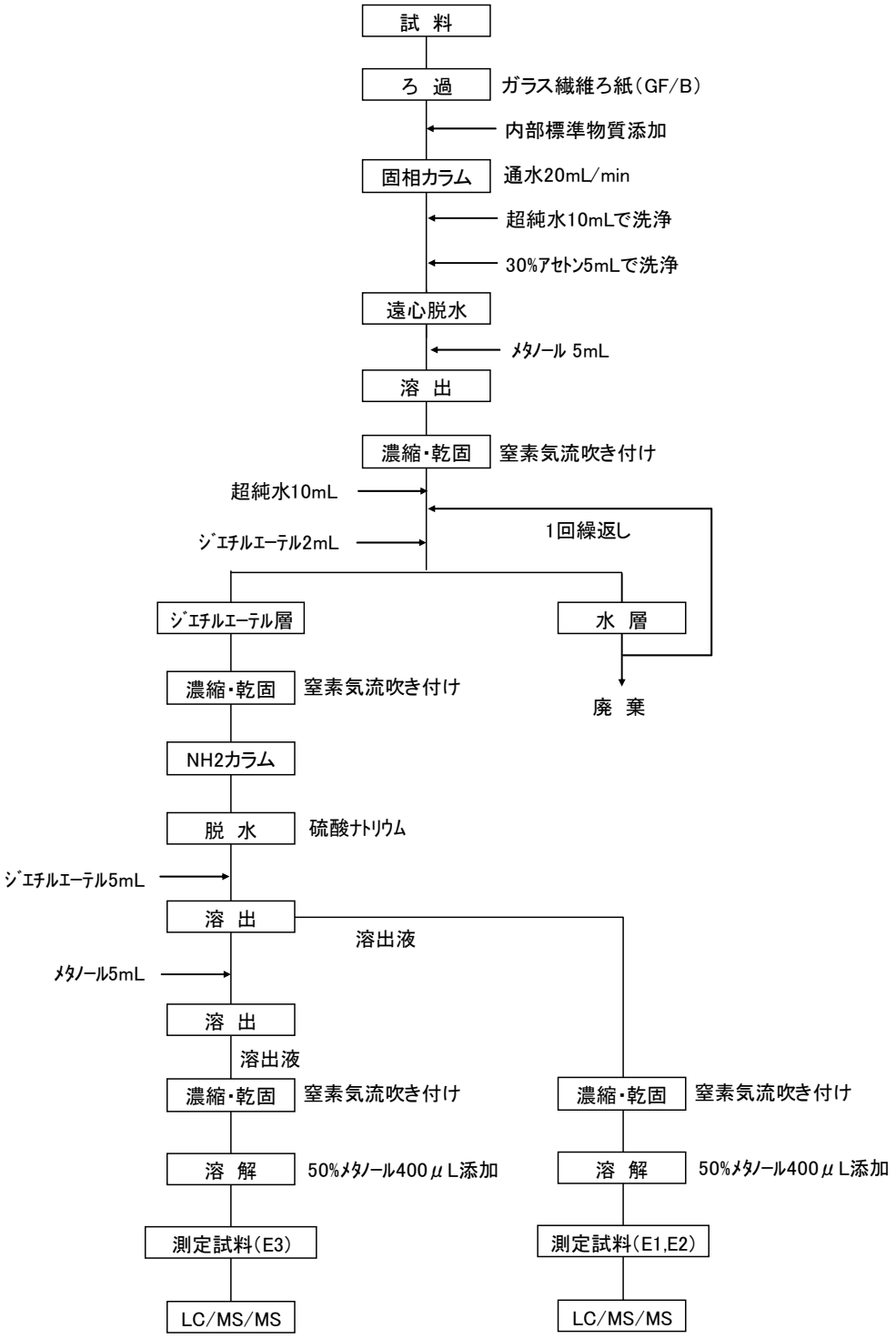
付録Ⅰ．本研究における内分泌撹乱物質等の分析フロー

付録Ⅰでは、本編に示した内分泌撹乱物質およびエストロゲン様活性の分析について、その詳細な分析フローを示すとともに、エストロゲン様活性の分析で用いた培地組成を示した。

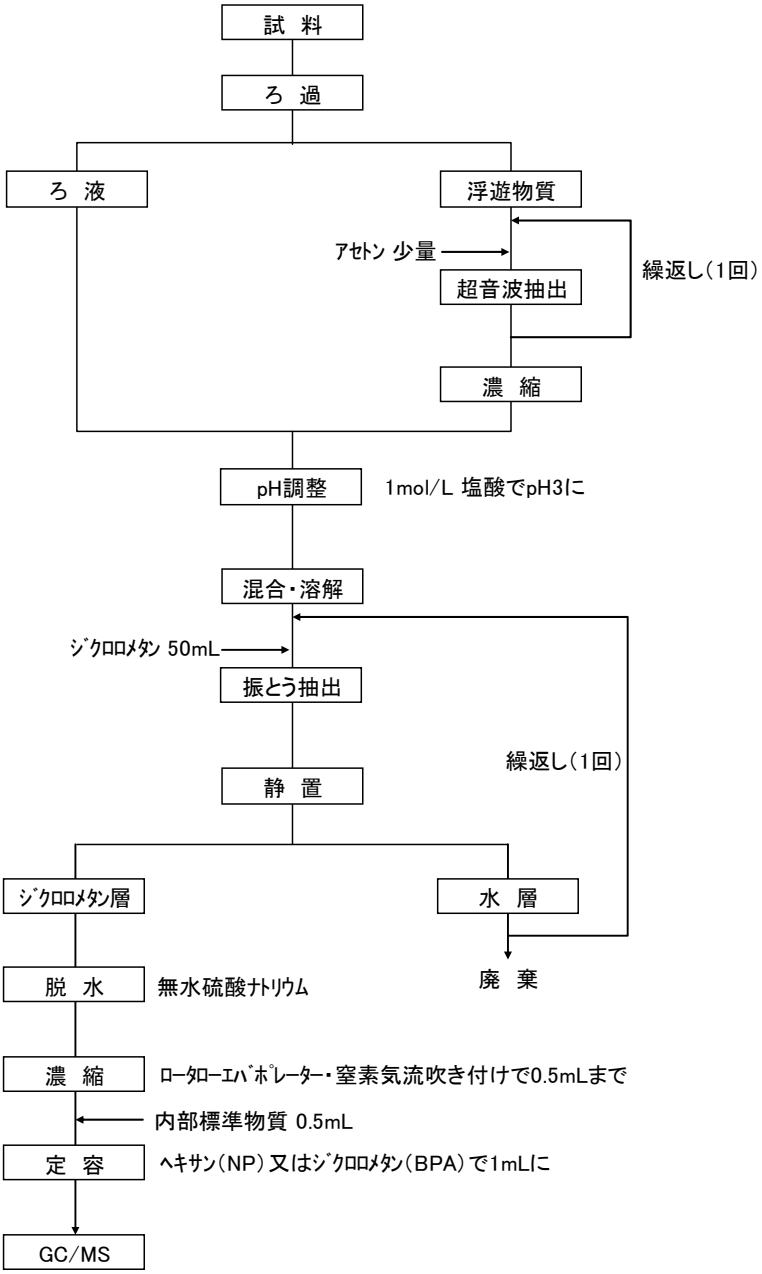
１．17β - エストラジオール（ELISA 法）分析フロー



２．エストロゲン（LC/MS/MS 法） 分析フロー

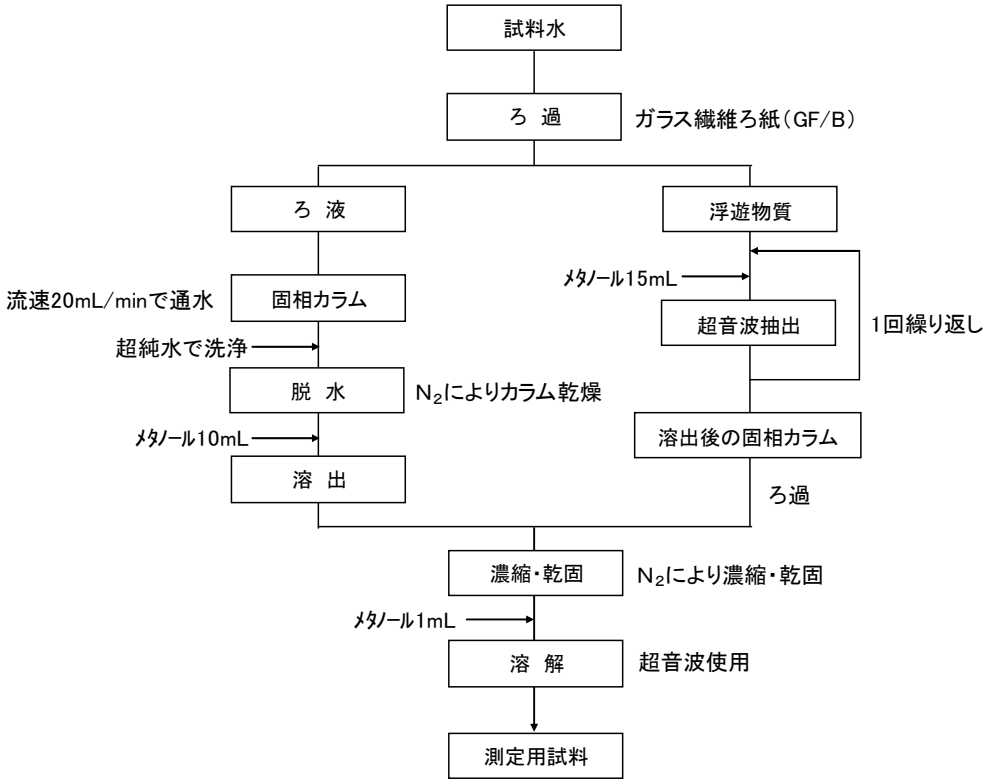


３．ノニルフェノール・ビスフェノールＡ 分析フロー

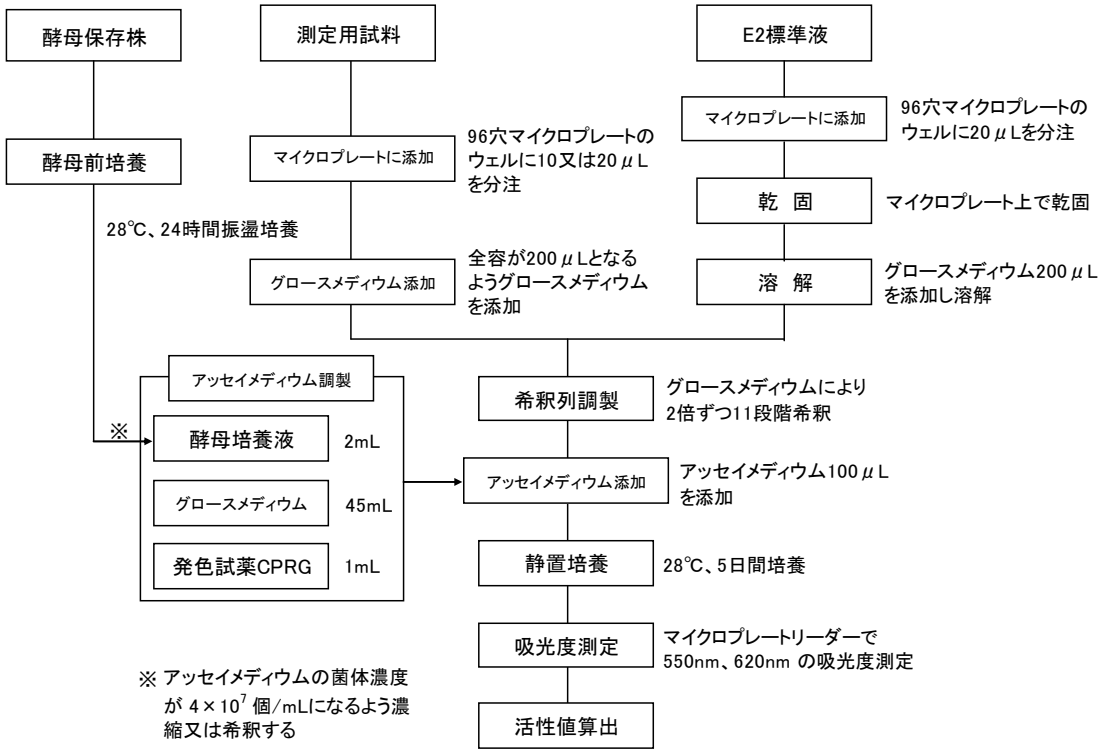


４．エストロゲン様活性（YES 法） 分析フロー

４．１　前処理フロー



４．２　エストロゲン様活性測定フロー



４．３　培地組成

（1）グロースメディウム

ミニマルメディウム	45	mL	下記（2）
20%グルコース	5	mL	下記（6）
L-アスパラギン酸	25	mL	下記（7）
ビタミン溶液	100	μL	下記（5）
L-スレオニン	400	μL	下記（8）
20mM　硫酸銅（Ⅱ）	125	μL	下記（9）

（2）ミニマルメディウム　45mL分注　→　オートクレーブ滅菌（121℃、10分）

りん酸二水素カリウム	13.61	g	
硫酸アンモニウム	1.98	g	
水酸化カリウム（粒状）	4.2	g	
硫酸マグネシウム・七水和物	10	mL	2000mg/100mL 溶液
硫酸第二鉄	1	mL	40mg/50mL 溶液
アミノ酸溶液	100	mL	下記（4）
蒸留水			全容1L とする

（3）アッセイメディウム

グロースメディウム	45	mL	上記（1）
発色試薬CPRG	1	mL	下記（10）
酵母培養液	2	mL	最終菌体濃度 4×10^{7} 個/mL

（4）アミノ酸溶液　→　オートクレーブ滅菌（121℃、10分）、4℃ストック

L-ロイシン	500	mg
L-ヒスチジン	500	mg
L-アデニン	500	mg
L-アルギニン塩酸塩	200	mg
L-メチオニン	200	mg
L-チロシン	300	mg
L-イソロイシン	300	mg
L-リシン塩酸塩	300	mg
L-フェニルアラニン	250	mg
L-グルタミン酸	1,000	mg
L-バリン	1,500	mg
L-セリン	3,750	mg
蒸留水	1	L

（5）ビタミン溶液 → フィルターろ過、4℃ストック

チアミン塩酸塩	20	mg	
ピリドキシン塩酸塩	20	mg	
D-パンテノンナトリウム塩	20	mg	
myo-イノシトール	100	mg	
D-ビオチン	5	mL	20mg/100mL 溶液
蒸留水	100	mL	

（6）20%グルコース → オートクレーブ滅菌（121℃、10分）

D-グルコース	100	g	
蒸留水	500	mL	

（7）L-アスパラギン酸 → オートクレーブ滅菌（121℃、10分）

L-アスパラギン酸	400	mg	
蒸留水	100	mL	

（8）L-スレオニン → オートクレーブ滅菌（121℃、10分）、4℃ストック

L-スレオニン	2,400	mg	
蒸留水	100	mL	

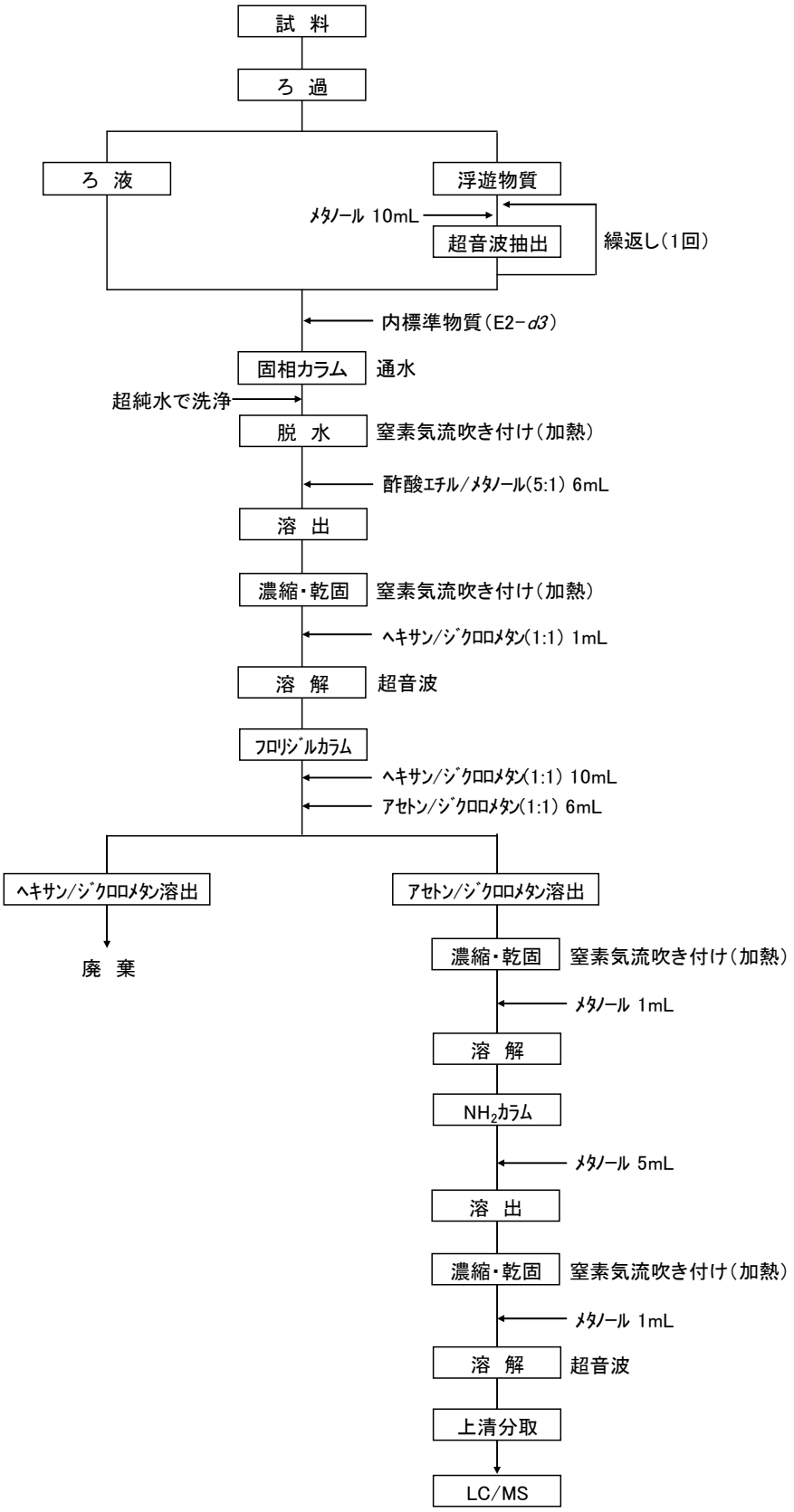
（9）20mM 硫酸銅（Ⅱ）→ フィルターろ過

硫酸銅(Ⅱ)五水和物	499	mg	
蒸留水	100	mL	

（10）発色試薬CPRG → フィルターろ過、4℃ストック

クロロフェノールレッド-β-D-ガラクトピラノシドナトリウム(CPRG)	10	mg	
蒸留水	1	mL	

５．エストロゲン（LC/MS 法） 分析フロー



付録Ⅱ．下水中のエストロゲン濃度等の既往調査事例

付録Ⅱでは、本研究におけるエストロゲン濃度およびエストロゲン様活性の調査結果との比較のため、下水中のエストロゲン濃度およびエストロゲン様活性の既往調査事例について、その調査対象の国名等、処理場数、濃度範囲および分析方法をまとめた。

１．エストロゲン濃度

国名 （都市名等）	処理場数	濃度範囲（平均値又は中央値）[ng/L]		分析方法	出典
		流入下水	処理水		
England (London)	7	---	E1:2.5-41.7 (19.8) E2:4.9-39.7 (11.0) EE2:nd-2.3 (0.7)	GC/MS	1
Germany (Frankfurt)	16	---	E1:<1-70 (9) E2:<1-3 (<1) EE2:<1-15 (4)	GC/MS/MS	2
Canada (Ontario)	10	---	E1:<1-48 (3) E2:<1-64 (6) EE2:<1-42 (9)	GC/MS/MS	2
Netherland （主要都市）	5	---	都市下水(3 施設) E1:<0.4-47 (4.5) E2:<0.6-12 (0.9) EE2:<0.2-7.5 (nd) 工場排水(2 施設) E1:<0.1-11 (0.4) E2:<0.4-1.8 (nd) EE2:<0.2-2.6 (nd)	GC/MS/MS	3
Italy (Roma)	6	E1:25-132 (52) E2:4.0-25 (12) E3:24-188 (80) EE2:0.4-13 (3.0)	E1:2.5-82.1 (2.6) E2:0.35-3.5 (1.6) E3:0.44 -18 (12) EE2:<0.3-1.7 (<0.3)	LC/MS/MS	4
Germany (Koblenz)	1	E1:54.9-76.6 (65.7) E2:12.2-19.5 (15.8) EE2:6.2-10.1 (8.2)	E1:<1 E2:<1 EE2:<1	GC/MS/MS	5
日本 （主要都市）	20	E1:10-57 (24) E2:<0.5-21 (5.7) E3:27-220 (110) EE2:<1.2	E1:<0.8-180 (12) E2:<0.5-11 (<0.5) E3:<1.4-5.8 (1.5) EE2:<1.2	LC/MS/MS	6
欧州 8 ヶ国	16	---	E1:<0.2-35 (3.0) E2:<0.6-13 (3.0)	GC/MS	7
Canada （主要都市）	18	E1:19-78 (49) E2:2.4-26 (15.6)	E1:1-96 (17) E2:0.2-14.7 (1.8)	GC/MS	8
Austria （主要都市）	5	E1:29-670 (70) E2:14-125 (67) E3:23-660 (327) EE2:3-70 (3.5)	E1:<1-72 (2) E2:<5-30 (3) E3:<1-275 (<1) EE2:<1-5 (2)	LC/MS/MS	9

国名（都市名等）	処理場数	濃度範囲（平均値又は中央値）[ng/L]		分析方法	出典
		流入下水	処理水		
Australia (Sydney)	1	E1:54.8 E2:22.0 EE2:<5.0	E1:8.1 E2:0.95 EE2:<0.1	GC/MS	10
大韓民国（全羅南道、済州島）	7	---	E1:2.2-36 (14) E2:<1.0 E3:8.9-25 (16) EE2:<1.0-1.3 (<1.0)	LC/MS/MS	11

２．エストロゲン様活性

国名（都市名等）	処理場数	濃度範囲 [ng-E2/L]		分析方法	出典
		流入下水	処理水		
Germany (Tübingen)	1	32-66	5.6-6.4	E-screen 法	12
USA (Virginia)	1	15-80	3.9-34.4	YES 法	13
Sweden（主要都市）	20	1.6-30	<0.15-15	YES 法	14
日本（主要都市）	60	平均値 113 中央値 67	平均値 36 中央値 16	YES 法	15
Canada（主要都市）	18	nd-145 （中央値 79）	nd-106 （中央値 50）	YES 法	8

【出典】

1) Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening, Environ. Sci. Technol., **32**(11), 1549-1558.

2) Ternes, T. A., Stumpf, M., Muller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, Sci. Total Environ., **225**(1-2), 81-90.

3) Belfroid, A. C., der Horst, V., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegener, J., Cofino, W. P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucronides in surface water and waste water in The Netherland, Sci. Total Environ., **225**(1-2), 101-108.

4) Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water, Environ. Sci, Technol., **34**(24), 5059-5066.

5) Andersen, H., Siegrist, H., Halling-Sørensen, B., Ternes, T. A. (2003) Fate of estrogens in municipal sewage treatment plant, Environ. Sci. Technol., **37**(18) 4021-4026.

6) Komori, K., Tanaka, H., Okayasu, Y., Yasojima, M., Sato, C. (2004) Analysis and occurrence of estrogens in wastewater in Japan, Water Sci. Technol., **50**(5), 93-100.

7) Johnson, A. C., Aerni, H.-R., Gerritsen, A., Gibert, M., Giger, W., Hylland, K. Jürgens, M., Nakari, T., Pickering, A., Suter, M. J.-F., Svenson, A., Wettstein, F. E. (2005) Comparing steroid estrogen, and nonylphenol content across a range of European sewage plants with different treatment and management practices, Water Res., **39**(1), 47-58

8) Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., Mclnnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A. (2005) Distribution of estrogens, 17 ß-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants, Sci. Total Environ., **336**(1-3), 155-160.

9) Clara, M., Kreuzinger, N., Strenn, B., Gans, O., Kroiss, H. (2005) The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants, Water Res., **39**(1), 97-106.

10) Braga, O., Smythe, G. A., Schäfer, A. I., Feitz, A. J. (2005) Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants, Environ. Sci. Technol., **39**(9), 3351-3358.

11) Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., Snyder, S. A. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, Water Res., **41**(5), 1013-1021.

12) Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H. (2000) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany, Chemosphere, **40**(9-11), 1131-1142.

13) Holbrook, R. D., Novak, J. T., Grizzard, T. J., Love, N. G. (2002) Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: a mass balance analysis, Environ. Sci. Technol., **36**(21),4533-4539.

14) Svenson, A., Allard, A.-S., Ek, M. (2003) Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants, Water Res., **37**(18), 4433-4443.

15) 田中宏明, 小森行也, 玉本博之, 宮本宣博（2003）バイオアッセイによるエストロゲン様活物質の指標に関する研究, 平成 14 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 国土交通省国土技術政策総合研究所・独立行政法人土木研究所, 341-346.

付録Ⅲ．尿中のエストロゲン量の既往調査事例

付録Ⅲでは、本編第１章に示したエストロゲン負荷量原単位の試算において、１日あたりに排泄する総エストロゲン量の設定の際に参考とした尿中のエストロゲン量の既往調査事例[1)]をまとめた。

区分	尿による１日の排泄量［μg/日］				備考	出典
	総エストロゲン	E1	E2	E3		
女性（閉経前）	9.43	2.66	1.09	5.68	東洋人	2
	15.4	7.79	2.88	4.7	コーカサス人	2
	19.25	7	3.52	8.73		3
	15-60	---	---	---		4
	37	---	---	---		5
	---	4-23	0-14	0-72		6
女性（閉経後）	3.64	---	---	---		3
	6.4	---	---	---		5
	7	---	---	---		4
女性（妊婦）	2700	---	---	---	E1+E2	7
	550-9360	209-1460	127-900	215-7000	最小値は妊娠２ヶ月、最大値は妊娠８ヶ月	8
	15000	---	---	---		5
	15710-42529	695-2585	210-615	14806-39329	最小値は妊娠 27 週、最大値は妊娠 37 週	9
	26040	670	170	25200	妊娠 36 週～40 週	10
	30000	---	---	---	妊娠後期	4
	40260	1600	660	38000	妊娠最終週	11
男性	8.8	---	---	---	E1+E2	12
	10.4	---	---	---		5
	15	---	---	---		4
子供	0.09-0.5	---	---	---	８歳未満	4
	0.5-3	---	---	---	８歳～12 歳	4

【出典】

1) Young, W. F., Whitehouse, P., Johnson, I. Sorokin, N. (2004) “Proposed Predicted-No-Effect-Concentrations (PNECs) for Natural and Synthetic Steroid Oestrogens in Surface Waters”, R&D Technical Report P2-T04/1, Environmental Agency, U.K., 118.
2) Aldercreutz, H., Gorbach, S. I., Goldin, B. R., Woods, M. N., Dwyer, J. T., Hämäläinen, E. (1994) Estrogen metabolism and excretion in oriental and caucasian women, J. Natl. Cancer Inst., **86**, 1076-1082.
3) Key, T. J. A., Pike, M. C., Brown, J. B., Hermon, C., Allen, D. S., Wang, D. Y. (1996) Cigarette smoking and urinary oestrogen excretion in premenopausal and post-menopausal women, Br. J. Cancer, **74**, 1313-1316.
4) International Agency for Research on Cancer (IARC) (1979) Sex Hormones (II), “IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals for humans”, **21**, Lyon, France.
5) Kilshaw, D. (1990) “Steroids; principals and techniques”, Butterworths, London.
6) Eastham, R. D. (1978) “Biochemical values in clinical medicine. Sixth edition”, Wright, Bristol.
7) Shore, L. S., Gurevitz, M., Shemesh, M. (1993) Estrogens as an environmental pollutants, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **51**, 361-366.
8) Altman, P. L. (1961) “Blood and other body fluids”, Federal Accounting Standards Advisory Board, Washington.
9) Fostis, T. (1987) The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-II. Fractionation and quantitation of the main groups of estrogen conjugates, J. Steroid Biochem., **28**, 215-226.
10) Aldercreutz, H, Luukkainen, T. (1970) Identification and determination of oestrogens in various biological materials in pregnancy, Ann. Clin. Res., **2**, 365-380.
11) Brown, J. B. (1957) The relationship between urinary oestrogens and oestriogens produced in the body, J. Endocrinol., **16**, 202-212.
12) Banger, M., Hiemke, C., Haupt, M., Knuppen, R. (1996) Excretion on 2- and 3- monomethyl ethers of 2-hydroxyestrogens in healthy male volunteers, Eur. J. Endocrinol., **135**, 193-197.

付録Ⅳ．エストロゲンの回分処理実験の既往研究事例

付録Ⅳでは、本編第２章に示したエストロゲンの回分処理実験の結果との比較のため、活性汚泥を用いたエストロゲンの回分処理実験に関する既往研究事例について、その実験方法およびエストロゲンの除去特性などに関する実験結果の概要をまとめた。

研究者名	実験方法および結果（除去特性等）の概要		出典
Ternes et al.（1999）	方法	ドイツ・フランクフルトの下水処理場の活性汚泥（MLSS 濃度 2600mg/L）を水道水で 10 倍希釈したものにエストロゲンを添加	1
	結果	E2：C_0（初発濃度）=1mg/L、1μg/L ともに同一の挙動、1～3 時間で添加した E2 は 95%以上除去、E2 の除去に伴って E1 を生じた。 E1：C_0=1mg/L、E2 と同様速やかに除去され、48 時間でほぼ完全に除去された。 EE2：C_0=1mg/L の場合は 48 時間後、C_0=1μg/L の場合は 24 時間後に 20%除去されたが、その後は除去が認められなかった。	
Layton et al.（2000）	方法	アメリカ・ミネソタ州の 4 箇所の下水処理場から活性汚泥を採取し、これらに ^{14}C 標識したエストロゲンを添加 低水温（5～10℃）と高水温（22～25℃）の 2 条件で実施	2
	結果	実験開始 24 時間後に E2（C_0=58μg/L）は 75%、EE2（C_0=72μg/L）は 20%が分解され CO_2 ガスに変換（無機化）された。 分解および無機化の速度は、低水温よりも高水温の方が大きかった。	
Vader et al.（2000）	方法	実験室内で無機塩培地を用いて馴致した硝化汚泥（MLSS 濃度 1000mg/L）に EE2（C_0=50μg/L）を添加 エネルギー源としてヒドラジンを 10mg/L 添加	3
	結果	馴致期間を経ずに 24 時間後には 46%、6 日後には 98%が分解。 初期の EE2 分解速度は、乾燥汚泥重量 1g あたり 1μg/h であった。	
Lee et al.（2002）	方法	アメリカ・オンタリオ州の下水処理場から採取した活性汚泥の上澄液（細菌数 1.9～4.7×10^8 個/mL）に E2 を添加 好気条件と嫌気条件で実験を実施	4
	結果	好気条件では、1 時間後には添加した E2（C_0=200μg/L）の 88%が分解され、分解産物として E1 が検出された。 嫌気条件では、7 日間で約 50%が分解され、同様に E1 が検出された。	
Shi et al.（2004）	方法	韓国・釜山市のホテル排水処理施設の活性汚泥（1g）に無機塩液体培地（100mL）とエストロゲンを添加	5
	結果	E1（C_0=25mg/L）は 8 日間、E2（C_0=25mg/L）は 5 日間、E3（C_0=20mg/L）は 10 日間で 100%除去されたが、EE2（C_0=20mg/L）は 10 日間で 25%しか除去されなかった。	

研究者名	実験方法および結果（除去特性等）の概要		出典
Shi et al. (2004)	方法	ゴミ埋立処分場の浸出水処理施設の硝化タンクから採取した活性汚泥（硝化汚泥）を種汚泥として無機塩液体培地で馴致したもの（MLSS 濃度 2700mg/L）に無機塩液体培地とエストロゲン（C_0=1mg/L）を添加	6
	結果	エストロゲンの分解は 1 次反応式に従い、E1、E2、E3、EE2 の分解速度定数はそれぞれ 0.056h^{-1}、1.3h^{-1}、0.030h^{-1}、0.035h^{-1} であった。 アンモニアモノオキシゲナーゼを阻害するアリルチオ尿素を添加した実験では、無添加の場合と比較して、E1、E2、EE2 の除去に大きな変化が認められなかったことから、エストロゲンの分解には化学合成従属栄養細菌が関与しているものと推定された。	
Li et al. (2005)	方法	岐阜県内の農業集落排水施設から採取した活性汚泥に E2 を添加 E2 の初発濃度（C_0=10, 30, 50μg/L）、活性汚泥濃度（MLVSS=435, 850, 1750mg/L）、水温（5, 20, 35℃）について各 3 条件の組合せで実施	7
	結果	E2 初発濃度、活性汚泥濃度、水温のいずれについても、高い条件の方が 1 次反応速度定数は大きくなった。 活性汚泥濃度の低い方が水温の影響は大きくなった。	
Suzuki et al. (2006)	方法	オキシデーションディッチ法の下水処理場から採取した活性汚泥を用いて、これにろ過した流入下水を添加 ELISA 法で水中および汚泥中の E2 および E1 を測定	8
	結果	流入下水中のエストロゲンは、1 時間以内に汚泥中に吸着され、速やかに分解された。 水温の違い（5℃、20℃）や負荷条件（活性汚泥を低負荷条件または高負荷条件で馴致後に実験）の違いによる影響は大きくなかった。	
Ren et al. (2007)	方法	豚舎排水を原水に 1 年以上運転した回分式実験装置の硝化汚泥に E1（C_0=300 又は 100μg/L）を添加 グルコースおよび塩化アンモニウムの添加の有無、有機物負荷の違いによる影響、リアルタイム PCR 法によるアンモニア酸化細菌数との関係などを検討	9
	結果	従属栄養細菌は E1 よりもグルコースを利用した。 E1、E2 および EE2 の分解は、アンモニア酸化細菌の共代謝による分解が優占的であったが、E3 の分解は、従属栄養細菌による分解が優占的であった。	

【出典】

1) Ternes, T. A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -Ⅱ. Aerobic batch experiments with activated sludge, Sci. Total. Environ., **255**(1-2), 91-99.

2) Layton, A. C., Gregory, B. W., Seward, J. R., Schultz, T. W., Sayler, G. S. (2000) Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee U.S.A., Environ. Sci. Technol., **34** (18), 3925 -3931.

3) Vader, J. S., van Ginkel, C. G., Sperling, F. M., de Jong, J., de Boer, W., de Graaf, J. S., van der Most, M., Stokman, P. G. (2000) Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge, Chemosphere, **41**(8), 1239-1243.

4) Lee, H. B., Liu, D. (2002) Degradation of 17ß-estradiol and its metabolites by sewage bacteria, Water Air Soil Pollution, **134**(1-4), 353-368.

5) Shi, J. H., Suzuki, Y., Nakai, S., Hosomi, M. (2004) Microbial degradation of estrogens using activated sludge and night soil-composting microorganisms, Water Sci. Technol., **50**(8), 153-159.

6) Shi, J., Fujisawa, S., Nakai, S., Hosomi, M. (2004) Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, Water Res., **38**(9), 2322-2329.

7) Li, F., Yuasa, A., Obara, A., Mathews, A. P. (2005) Aerobic batch degradation of 17-ß estradiol (E2) by activated sludge: effects of spiking E2 concentration, MLVSS and temperatures, Water Res., **39**(10), 2065-2075.

8) Suzuki, Y., Maruyama, T. (2006) Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge, **40**(5), 1061-1069.

9) Ren, Y.-X., Nakano, K., Nomura, M., Chiba, N., Nishimura, O. (2007) Effects of bacterial activity on estrogen removal in nitrifying activated sludge, Water Res., **41**(14), 3089-3096.