The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	日本の水環境中におけるレチノイン酸受容体アゴニスト汚染の実態解明
Author(s)	澤田, 和子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26200
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

日本の水環境中における
レチノイン酸受容体アゴニスト汚染の実態解明

澤田　和子

2013 年 5 月

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

目次

緒言

第1章　レチノイン酸およびレチノイン酸受容体アゴニストに関する既往研究

1.1　はじめに

1.2　レチノイン酸の過剰摂取による生体影響

1.3　水環境中におけるレチノイン酸受容体アゴニスト汚染と生体影響

1.4　要約

第2章　水環境中におけるレチノイン酸受容体アゴニスト汚染の調査

2.1　はじめに

2.2　実験方法

2.3　結果および考察

2.4　要約

第3章　水環境中に含まれるレチノイン酸受容体アゴニストの同定

3.1　はじめに

3.2　実験方法

3.3　結果および考察

3.4　要約

第4章　下水処理系におけるレチノイン酸類および 4-oxo-レチノイン酸類の挙動の解明

4.1　はじめに

4.2　実験方法

4.3　結果および考察

4.4　要約

総括ならびに結論

参考文献

本論文に関する報告

緒言

人が生活や産業活動において使用する多種多様な化学物質のかなりの部分は、下廃水に含まれる形で排出され、下排水処理等で除去しきれないものは最終的には水環境に放流されることになる。これらの化学物質の中には、極微量でも生体に対して有害な影響を及ぼすものが数多く存在しており、それらによる水環境の汚染は、その水を飲料水源として利用する人々の健康、及びその水域に棲息する生態系の健全性に対して様々な悪影響をもたらす可能性がある。

様々な有害化学物質の中でも、内分泌攪乱化学物質(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)は、極微量でも核内受容体(Nuclear receptor; NR)との結合等を介して生体の内分泌機能を攪乱し、多種多様な悪影響を引き起こすことが指摘されており、EDCs による水環境の汚染は生態系に深刻な悪影響を及ぼし得る重大な環境問題のひとつと認識されている。EDCs は受容体と結合して天然ホルモンと類似の作用をもたらすアゴニスト作用、あるいは天然のホルモンと受容体との結合を阻害し、正常なホルモン作用を低減するアンタゴニスト作用により、人を含めた多様な生物種に悪影響を引き起こす可能性がある(Colborn et al., 1996; 西川ら, 2003)。従来の EDCs に関する研究は、エストロゲン受容体などのステロイドホルモン受容体に結合する物質を中心に進められてきた。しかし、生体内には多様な NR が存在していることが明らかとなっており(ヒトでは 48 種類の NR が存在(Chawla et al., 2001))、ステロイドホルモン受容体以外の NR を作用点にもつ EDCs の存在も認識されるようになってきた(Janošek et al., 2006; Tabb and Blumberg, 2006)。

レチノイン酸(Retinoic acid; RA)受容体(Retinoic acid receptor; RAR)は、ビタミン A の代謝物である all-*trans* RA(atRA)および 9-*cis* RA(9cRA)を内因性リガンドとする NR の 1 つである(Chambon, 1996)。RAR はリガンドの結合を介して、脊椎動物の視覚、形態形成、発生、細胞分化、組織の恒常性など、多様な機能の制御を司っている(Chambon, 1996; Kastner et al., 1995)。一方で、RAR シグナルが過剰に発現されると、魚類(Herrmann, 1995; Haga et al., 2002)、両生類(Degitz et al., 2000, 2003; Alsop et al., 2004)、哺乳類(Mulder et al., 2000; Ritchie et al., 2003)などの様々な脊椎動物種に対して、骨格形成異常や眼球異常などの催奇形性作用をもたらすことが知られている。すなわち、外来の RAR アゴニストによる RAR シグナル伝達系の攪乱は様々な脊椎動物種に重篤な健康影響をもたらす可能性があるといえる。

1990 年代半ば以降、米国北東部およびカナダ南部において、外部形態異常をもつ野生カエルが相次いで発見された(Gardiner and Hoppe, 1999; Vandenlangenberg et al., 2003; 門上ら, 1999)(**Fig. 0-1**)。Gardiner と Hoppe(1999)によって、その原因物質が RAR シグナル伝達系を攪乱する化学物質であることが示唆され、Gardiner ら(2003)によって、この湖沼中の RAR アゴニスト活性が自然由来でないことが明らかにされたが、原因物質は特定されなかった。さらに、中国(Cao et al., 2009; Zhen et al., 2009; Wu et al., 2010)やオーストラリア(Allinson et al., 2011a, 2011b)においても、水環境中や下水処理系において RAR アゴニストの存在が確認されてきている。中国においては、下水中の主要な RAR アゴニストが、天然リガンドである atRA とその異性体 13-*cis* RA(13cRA)の酸化代謝物である 4-oxo-atRA と 4-oxo-13cRA であることが明らかにされ、これらの物質が魚類の卵の孵化率の低下や奇形発生を導き得ることが確認された(Zhen et al., 2009)。このように、RAR アゴニスト作用を示す化学物質は水環境中の生物の内分泌機能を攪乱し、外部形態異常などの重篤な生体影響を引き起こす潜在的なリスクファクターであることが明らかとなってきている。しかし、RAR アゴニストによる水環境汚染に関する知見は、世界的に見ても非常に乏しく、ごく一部を除き原因物質も特定されていないことから、今後さらに RAR アゴニストによる水環境

汚染の実態を解明していくことが重要な課題であると考えられる。

本研究では、日本の水環境における RAR アゴニスト汚染の実態を解明することを目的として、一連の調査研究を行った。第 1 章では、RA の過剰摂取による生体影響に関する既往研究をまとめるとともに、水環境中における RAR アゴニスト汚染の実態と生体影響に関する既往研究を整理した。第 2 章では、大阪府下の複数の河川および下水処理系において、RAR アゴニスト活性を調査し、汚染の現状を把握した。第 3 章では、顕著な活性が確認された試料を用いて、河川および下水中に含まれる RAR アゴニストの同定を試みた。また、第 4 章では、下水処理系において同定した RAR アゴニストの挙動を調査するとともに、活性汚泥処理試験により、これらの RAR アゴニストがどのように除去されるのかについても調べた。総括ならびに結論では、本研究で得られた日本の水環境における RAR アゴニスト汚染の実態に関する知見をまとめ、今後の対策について考察した。

(a) Ectromelia (b) Polydactylia

Fig. 0-1 Environmentally induced limb malformations in frogs. (a) Ectromelia, (b) Polydactylia (University of Minnesota: http://enhs.umn.edu/5200/estrogen/mn.html)

第1章　レチノイン酸およびレチノイン酸受容体アゴニストに関する既往研究

1.5　はじめに

近年の研究から、RAR アゴニストが水環境中に存在する重要なリスクファクターであることが明らかにされつつある(Gardiner and Hoppe, 1999; Gardiner et al., 2003; Vandenlangenberg et al., 2003)。しかし現時点では、RAR アゴニストによる水環境汚染の実態については不明な部分が多く、RAR アゴニスト活性を有する化学物質についても、その一部が明らかにされたに過ぎないことから、RAR アゴニストによる生態リスクを評価するための知見が十分に得られているとはいえない。本章では、RAR アゴニストによりどのような生体影響が生じる可能性があるかを、RA の過剰摂取を取り扱った既往研究から推察するとともに、これまでに知られている、水環境中における RAR アゴニスト汚染に関する調査研究の成果を整理し、本研究の参考とした。

1.6　レチノイン酸の過剰摂取による生体影響

体外から摂取したカロテノイドは、体内でレチノール(ビタミン A)へと代謝され、さらに RA へと代謝される(Barua and Sidell, 2004;Idres et al., 2002; Kraft et al., 1994; Napoli, 1999)。RA には atRA やその異性体である 9cRA、13cRA(RA 類)、RA 類の酸化代謝物である 4-hydroxy-RA 類、4-oxo-RA 類などが存在する(**Fig. 1-1**)。RA は脊椎動物の多様な生体機能を司る一方、その過剰摂取は多種多様な外部形態異常を導くことが知られている(Collins and Mao, 1999)。生物種および曝露の時期・期間によって、同濃度の曝露により発生する奇形の種類と程度は大きくなっており、また、曝露濃度が高くなるにつれ、多様な形態異常が発生し、死亡率も高くなる傾向がある(**Table 1-1**)。atRA および 9cRA のみならず、派生物質である 13cRA、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA によっても同様の生体影響が引き起こされることが知られているが、概して作用濃度は atRA < 4-oxo-atRA < 9cRA < 13cRA < 4-oxo-13cRA である一方、奇形の影響は atRA > 4-oxo-atRA > 9cRA > 13cRA > 4-oxo-13cRA の順で大きくなる。すなわち、RAR の本来のリガンドである atRA の作用が最も大きく、また、4-oxo-RA 類よりも RA 類、*cis* 構造よりも *trans* 構造で生体影響が強い傾向がある。しかし、生物種によっては、RA 類よりも 4-oxo-RA 類で形態異常を生じ易い場合も確認されている(Kahn et al., 1988; Pijnappel et al., 1993; Ritchie et al., 2003)。

1.7　水環境中におけるレチノイン酸受容体アゴニスト汚染と生体影響

1.3.1　北米の水環境中における RAR アゴニスト汚染およびカエルの形態異常

1995 年に、米国ミネソタ州で外部形態異常をもつ野生カエルが多数発見された報告を受け、米国で全国規模の実態調査が行われた結果、カナダを含む北米の広い地域で両生類の外部形態異常が確認された(Gardiner and Hoppe, 1999; Vandenlangenberg et al., 2003; 門上ら, 1999)。この原因究明研究の中で、Burkhart ら(1998)は、奇形カエルが発見された湖水の曝露によって、自然界で観測された奇形が実験的に再現されることを確認し、外部形態異常の原因が湖水中の化学物質にあることを明らかにした。また、Gardiner と Hoppe(1999)の検討により、その原因物質が、RAR を介して RAR シグナル伝達系を攪乱する化学物質であることが示唆された。さらに、Gardiner ら(2003)によって、湖水中の RAR アゴニスト活性が自然由来ではないことが示唆され、RAR アゴニスト活性を示す化学物質の分析が試みられた結果、原因物質の特定には至らなかったものの、複数の幾何異性体を有する候補物質が存在することを見出した。

1.3.2　中国の水環境中における RAR アゴニスト汚染および魚の形態異常

中国北京では、下水処理水に曝露された魚に外部形態異常が生じることが発見された。そこで、その下水処理水をメダカの卵に曝露させたところ、通常の 90 %とされる孵化率が 30～40 %に低下し、さらに、孵化日数が極端に短縮し、孵化したメダカの 80 %に尾の先端が歪曲するなどの異常が生じることが観察された(読売新聞, 2008)。さらに、中国科学院、北京大学、三菱電機、大阪大学の共同研究グループは、北京市内の下水処理場から採取した 2 次処理水を用いて 2 種類の *in vitro* 試験および *in vivo* 試験を行った結果、処理水中から RAR アゴニスト活性を検出し、同時に遺伝毒性、無脊椎動物への急性毒性を有し、メダカの胚発生にも顕著な悪影響を及ぼすことを明らかにした(Cao et al., 2009)。これらの生体影響には RAR アゴニストが関与していることが疑われたため、原因究明を試みた調査の結果、北京市内の 7 箇所の下水処理場の全ての処理水から RAR アゴニスト活性が検出され(Zhen et al., 2009)、魚への悪影響が下水中の RAR アゴニストに起因していることがより強く示唆されることとなった。さらに、下水処理水の放流河川水を調査したところ、全ての採取地点で RAR アゴニスト活性が検出され、下水処理場の直下で上昇する傾向も確認された。また、Zhen ら(2009)によって、下水中に含まれる主要な RAR アゴニストが、atRA および 13cRA の酸化代謝物である 4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA であることを明らかにされた。さらに、Wu ら(2010)は、遼東湾と流入河川水中の RA 類および 4-oxo-RA 類を調査した結果、海水中から RA 類および 4-oxo-RA 類は検出されなかったが、河川水中からは atRA、13cRA、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA が検出されたことから、RA は河川水中に広く存在していることが明らかとなった。しかし、いずれの調査でも、RA 類および 4-oxo-RA 類の検出濃度は既知の生体影響発現レベルに比べて低かったことから、これらの物質と魚に認められた生体影響との関連性は未だ明らかにされていない。

1.3.3　オーストラリアの水環境中における RAR アゴニスト汚染

Allinson ら(2011a)は、オーストラリアのヴィクトリア州内の 39 箇所の下水処理場から採取した下水処理水の RAR アゴニスト活性を調査した結果、全体の 90%以上の試料から有意な活性が検出された。また、同研究グループは、オーストラリアのヴィクトリア州内の河川水を調査し、対象とした 6 地点のうち 1 地点で RAR アゴニスト活性が検出されたと報告している(Allinson et al., 2011b)。しかし、この一連の調査では、RAR アゴニスト活性を示す物質の同定や、関連する生物への悪影響については言及されていない。

1.8　要約

本章では、RA の過剰摂取がもたらす生体影響を概観するとともに、RAR アゴニストによる水環境汚染に関して行われた既往研究を整理した。

atRA および 9cRA は RAR との結合を介して、脊椎動物の視覚や形態形成、発生、細胞分化、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし、RA 類や 4-oxo-RA 類の過剰摂取は、多様な生物種に対して、骨格形成異常をはじめ様々な生体影響を引き起こすことが知られている。近年、北米や中国において、RAR アゴニストが原因と推測される野生生物への悪影響が生じており、北米、中国、オーストラリアといった地理的に離れた地域の水環境で RAR アゴニスト汚染が確認されている。このことは、RAR アゴニスト汚染が世界的な問題であることを示唆している。中国の下水中、あるいは下水処理水中の主要な RAR アゴニストは 4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA であることが明らかとなったが、この事例を除

いては、原因物質は同定されていない。このような現状から、RAR アゴニストによる未知のリスクを正しく理解し、その汚染に対する適切な対策を講じていくために、日本の水環境における RAR アゴニスト汚染の実態を明らかにすることが急務といえる。

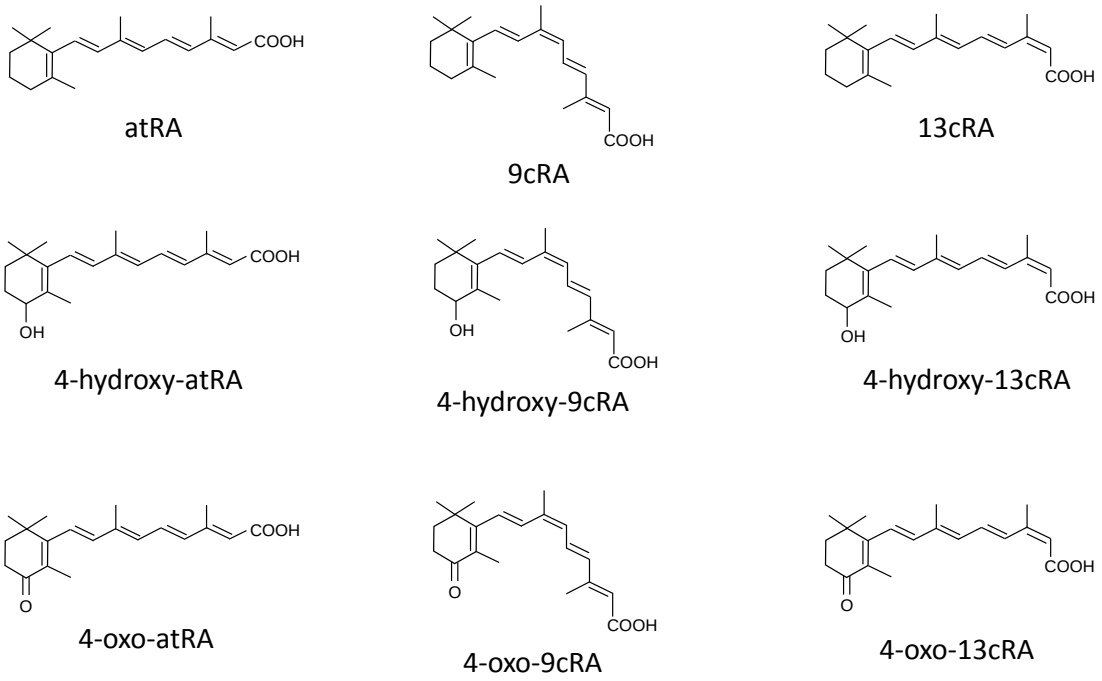

Fig. 1-1 Structural formula of RA.

Table 1-1 Biological effects caused by exposure to retinoic acids and 4-oxo-retinoic acids in various vertebrates.

Chemical	Species	Dose[a] (μg/L)	Exposure time	Observed biological effects	References
atRA	African clawed frog	0.6	3 days from stage 8 to 41	Dysmorphogenesis of the craniofacial region; Micropthalmia; Reduced the prosencephalon and mesencephalon; Edema	Degitz et al., 2003
		2.0		Holoprosencephaly; Anopthalmia; Absence of procephalic tissue	
		0.24	9 days from stage 8 to 65	Increase in mortality; Developmental delay	
		0.14	Stage 8	Mortality	
		0.24		100% mortality	
		2.0	7 days on stage 48	Increase in mortality; Developmental delay	
		0.6	14 days on stage 48	Increase in mortality; Developmental delay	
		0.6	Stage 48	100% mortality	
		100	Stage 12	Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; Development of two small eyes; Axial malformations	Kraft and Juchau, 1995
		250		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally	
		500		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Axial malformations	
		1,000		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; No eye decelopment; Development of two small eyes; Axial malformations	
		150	From stage 10 (early gastrula) to 45 (a late tadpole)	Loss of anterior structure; Microcephaly	Pijnappel et al., 1993
		150	2 hours on stage 9	Reduction of the eye diameter and cement gland length	Martin et al., 2002
		300		Reduction of the head-to-tail length, eye diameter and cement gland length	
		3,000	45 min at last blastula stage	Malformation along the anterior-posterior axis	Minucci et al., 1996
		6.25	24 hours from stage 8 (mid-blastula stage)	Micropthalmia; Prosencephalic reduction	Degitz et al., 2000
		25		Holoprosencephaly; Anopthalmia	
		250	Stage 51 (limb stage)	One segment of hind limb malformation	
		750		Hind limb malformation	
		1,250		Hind limb malformation; Triangular malformation; loss of limb	

Table 1-1 (continued).

Chemical	Species	Dose[a] (μg/l)	Exposure time	Observed biological effects	References
atRA	Wood frog	250	24 hours from stage 28 (limb stage)	One segment of hind limb malformation	Degitz et al., 2000
		750		Hind limb malformation	
		1,000		Hind limb malformation; Triangular malformation; loss of limb	
	Green frog	25	24 hours from stage 8 (mid-blastula stage)	Micropthalmia; Prosencephalic reduction; Posterior dysmorphogenesis	
		50		Holoprosencephaly; Anopthalmia; Posterior dysmorphogenesis	
		1,250	From stage 28 (limb stage) to 45	Hind limb malformatuon	
	Mink frog	6.25	24 hours from stage 8 (mid-blastula stage)	Micropthalmia; Prosencephalic reduction	
		25		Holoprosencephaly; Anopthalmia; Posterior dysmorphogenesis	
	Northern leopard frog	1,250	24 hours from stage 26 (limb stage)	100% mortality	
	Zebrafish	0.9	Stage 14	Oedema	Herrmann, 1995
		3.1		Oedema; Brain deformity; Tail malformation	
		150	1 hour during early gastrula (50% epiboly)	Multiple pectoral fins	Vandersea et al., 1998
		3,000		Pectoral fins absent	
		90	1 hour during late gastrula (90-100% epiboly)	Multiple pectoral fins	
		210		Multiple pectoral fins; Pectoral fins absent	
		7.5	From 80% epiboly to the 2-somite stage	Single or abnormal pectoral fins	
	Flounder	3.0	From day 10 to 21 at premetamorphic larva	Fin deformity	Miwa and Yamano, 1999
		7.5	6 to 9 days post-hatching	Deformities of the lower jaw (growth retardation of the dentary), caudal fin (deformity of caudal bone complex and absence of entire caudal) and vertebra (hypertrophy of the centum, central fusion, and an increase in the number of abdominal vertebrae)	Haga et al., 2002
		30	26-27 hours after fertilization	Extremely high mortality; The absence of the Meckel's cartilage, and forked cartilage	Suzuki et al., 2000
		15	Day 2.5-3.17 (40 hours) from hatching	Malformation of the mandible, hyoid and gill arch; Reduced in size of the Meckel's cartilage; Curved downward at the anterior part of the trabecula cartilage	
		75		Extremely high mortality; Reduced in size of the caetilages of all pharyngeal	

Table 1-1 (continued).

Chemical	Species	Dose[a] (μg/l)	Exposure time	Observed biological effects	References
atRA	Prawn	500	2 days from hatching	Decrease in survival rate	Pakdeenarong and Damrongphol, 2006
	Mummichog	3,000	2 hours during early gastrula (50% epiboly)	Multiple pectoral fins; Pectoral fins absent	Vandersea et al., 1998
	Sea urchin	6,000	1 hour on the fertilization	Delay in embryonic development	Sciarrino and Matranga, 1995
		5,000	8 hours	Dysmorphic development	Kahn et al., 1988
	Rat	7.5	48 hours on day 9.5	Microcephaly; Neural schsis; Redustion of first branchial arch	Menegola et al., 2004
		150		Reduction of first and second branchial arch reduced; Fusion of First and second branchisl arch	
		10	46 hours on 9 days post gestation	Moderate reduction in the second visceral arch	Ritchie et al., 2003
		100		Moderate and severe reduction in the second visceral arch	
		60	6 hours on day 9	Microcephaly; Small first branchial arch; Abnormal eye primordium; Open neural tube	Lee et al., 1995
		60	6 hours on day 9.5	Branchial arch fusion; Open neural tube	
9cRA	Zebrafish	7.5	6 to 9 days post-hatching	Deformities of the lower jaw (growth retardation of the dentary), caudal fin (deformity of caudal bone complex and absence of entire caudal) and vertebra (hypertrophy of the centum, central fusion, and an increase in the number of abdominal vertebrae)	Haga et al., 2002
		3	2.5-3.5 hours after fertilization	Abnormal somite; Abnormal heart	Zhang et al., 1996
		30		No head; No eyes; Microcephalia; Micro-phthalmia; Abnormal somite; Abnormal heart	
		30	Stage 14	Oedema; Brain deformity; Tail malformation	Herrmann, 1995
	Flounder	1.5	From day 10 to 21 at premetamorphic larva	Fin deformity	Miwa and Yamano, 1999
	African clawed frog	100	Stage 12	Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Development of two small eyes	Kraft and Juchau, 1995
		250		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; Development of two small eyes; Axial malformation	
		500		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; No eye decelopment; Development of two small eyes; Axial malformations	

Table 1-1 (continued).

Chemical	Species	Dose[a] (μg/l)	Exposure time	Observed biological effects	References
9cRA	Rat	10	46 hours on 9 days post gestation	Moderate reduction in the second visceral arch	Ritchie et al., 2003
		50		Moderate and severe reduction in the second visceral arch	
		100		Severe reduction in the second visceral arch	
13cRA	Zebrafish	3.0	Stage 14	Tail malformation	Herrmann, 1995
		30		Oedema; Brain deformity; Tail malformation	
	Flounder	7.5	6 to 9 days post-hatching	Deformities of the lower jaw (growth retardation of the dentary), caudal fin (deformity of caudal bone complex and absence of entire caudal) and vertebra (hypertrophy of the centum, central fusion, and an increase in the number of abdominal vertebrae)	Haga et al., 2002
	African clawed frog	1,000	Stage 12	Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally	Kraft and Juchau, 1995
	Sea urchin	20,000	24 hours	Developmental delay	Kahn et al., 1988
4-oxo-atRA	Zebrafish	3.1	Stage 14	Oedema; Brain deformity	Herrmann, 1995
		9.4		Oedema; Brain deformity; Tail malformation	
	African clawed frog	31.4	From stage 10 (early gastrula) to 45 (a late tadpole)	Loss of anterior structure; Microcephalia	Pijnappel, 1993
		100	Stage 12	Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; Development of two small eyes; Axial malformation	Kraft and Juchau, 1995
		2,000		Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Cyclops; No eye development; Axial malformation	
	Sea urchin	5,000	8 hours after fertilization	Dysmorphic development	Kahn et al., 1988
	Rat	10.4	46 hours on 9 days post gestation	Moderate and severe reduction in the second visceral arch	Ritchie et al., 2003
		52		Severe reduction in the second visceral arch	
4-oxo-13cRA	Zebrafish	94.2	Stage 14	Oedema; Brain deformity	Herrmann, 1995
		942		Oedema; Brain deformity; Tail malformation	
	African clawed frog	100	Stage 12	Anterior truncation; Failure of eyes to develop normally; Development of two small eyes; Axial malformation	Kraft and Juchau, 1995
	Sea urchin	15,000	24 hours	Developmental delay	Kahn et al., 1988
		90,000	12 hours and 24 hours	Dysmorphic development	

第2章　水環境中におけるレチノイン酸受容体アゴニスト汚染の調査

2.5　はじめに

第 1 章で述べたように、北米、中国およびオーストラリアの水環境中において、RAR アゴニストの存在が明らかとなっている(Gardiner and Hoppe, 1999; Gardiner et al, 2003; Cao et al., 2009; Zhen et al., 2009; Wu et al., 2010; Allinson et al., 2011a, 2011b)。日本では、水道水源の大半をダム貯留水や河川水等の表流水に依存しており(日本水道協会 HP)、水の安全確保は非常に重要な課題である。しかし、日本の水環境を対象とした RAR アゴニスト汚染の調査はほとんど進められていないことから、その汚染状況を把握することが必要であると考えられる。そこで本章では、大阪府下の 4 下水処理場および近畿地方を流れる 2 河川を選定し、酵母 two-hybrid 法を用いて、下水、下水処理水および河川表層水中の RAR アゴニスト活性を評価した。

2.6　実験方法

2.6.1　化学物質

atRA、メタノール(MeOH)、KCl、Na_2CO_3 は Sigma-Aldrich、ジメチルスルホキシド(Dimethyl sulfoxide; DMSO)は和光工業株式会社、ザイモリアーゼ-20T は MP Biomedicals、2-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(ONPG)は東京化成工業株式会社より購入した。$Na_2HPO_4 \cdot 12H2O$、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ はキシダ化学株式会社より購入した。

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定に使用した標準リガンド atRA は 10^{-2} M となるように DMSO に溶解したものをストック溶液として用いた。

2.6.2　供試試料

本章で用いた下水(最初沈澱池越流水)、下水処理水(最終沈澱池越流水)の各試料を、大阪府下の 4 つの都市下水処理場(Wastewater treatment plants; WWTP)(WWTP-A、C、E、F)より採取した。WWTP-A および WWTP-C は標準活性汚泥(Conventional activated sludge; CAS)法、WWTP-E は嫌気好気(Anaerobic oxic; AO)法、WWTP-F は嫌気無酸素好気(Anaerobic anoxic oxic; A2O)法を採用している(**Fig. 2-1**)。下水処理場における調査は、WWTP-A においては、2008 年 12 月から 2010 年 3 月、WWTP-C、WWTP-E および WWTP-F においては、2008 年 12 月に実施した。

また、河川水試料は、琵琶湖-淀川水系および猪名川水系の **Fig. 2-2** に示す試料採取地点より、表層水として採取した。琵琶湖-淀川水系においては、2007 年 6 月、8 月、10 月、2008 年 1 月に 4 地点(2、4、8、18)、2008 年 10 月に 20 地点から採取した。猪名川水系においては、2007 年 6 月、8 月、10 月、2008 年 1 月に 6 地点(5、8、11、12、17、18)、2008 年 4 月に 20 地点から採取した。

採取した各試料は、水温、pH を測定した後、氷冷下で実験室まで運搬し、固相抽出に供した。また、溶存有機炭素(Dissolved organic carbon; DOC)は、5000A(Shimadzu)を用いて TCIC 法により行い、全窒素(Total nitrogen; T-N)は、下水道試験法(日本下水道協会，1997)に準じて測定を行った。各試料の水質測定結果を **Table 2-1**、**2-2** に示す。

2.6.3　試料の前処理

採取した試料は、Oasis HLB カートリッジ(6 cc/500 mg; Waters)を用いた固相抽出に供し、極性物質を濃縮した。空気ポンプを接続した固相抽出用吸引マニホールド(GL Science)にカートリッジ装着し、マニホールド内を減圧した。ガラス繊維濾紙(GF/B; Whatman)を用いて試料を濾過した後、MeOH 6 mL および超純水 6 mL でコンディショニングした Oasis HLB カートリッジに 5-10 mL/min の流量で通水した。通水後、カートリッジを十分に乾燥させ、6 mL の MeOH でカートリッジに捕捉された化学物質を溶出した。溶出液は、窒素気流下で濃縮・乾固させ、DMSO に転溶し、-20°C で保存した。

2.6.4　酵母 two-hybrid 法

2.6.4.1 原理

酵母 two-hybrid 法は、酵母の転写調節因子である GAL4 遺伝子を利用して、リガンド依存的な NR とコアクチベーター(TIF2)の相互作用を検出する *in vitro* 手法である(Nishikawa *et al*., 1999)。その原理を **Fig. 2-3** に模式的に示している。本手法では、GAL4 の DNA 結合領域(GAL4-DBD)と NR のリガンド結合領域(NR-LBD)の融合遺伝子、および転写活性化領域(GAL4-AD)と TIF2 の融合遺伝子を含む 2 種類のプラスミドを導入した *Saccharomyces cervisiae* Y190 株を使用した。組換えプラスミドの応答遺伝子下流には、レポーター遺伝子として、β-ガラクトシダーゼをコードする *lacZ* 遺伝子が組み込まれており、リガンドが NR-LBD に結合して TIF2 との相互作用が生じると、GAL4 が活性化してβ-ガラクトシダーゼ活性が発現する。即ち、NR と TIF2 の相互作用の強さがβ-ガラクトシダーゼ活性として評価されることになる。

本法は、供試物質によっては酵母の細胞膜に対する透過性や細胞毒性が試験結果に大きく影響する場合があるが(斉藤と住田, 2003)、比較的迅速に NR に対するアゴニスト活性を評価することができ、結果の再現性が高いことから(北本ら, 2005; 西川と西原, 2000)、EDCs 研究のスクリーニング法として世界中で汎用されている。

2.6.4.2 実験方法

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定は、ヒト RAR を導入した組換え酵母を用い、Nishikawa ら(1999)の方法を一部修正した、以下の手順で実施した。供試酵母をアミノ酸制限(－ロイシン、－トリプトファン)SD 培地に植菌して、30°C、120 rpm で 18 時間往復振盪培養した後、培養液の 50 μL を新たな SD 培地 200 μL とともに 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに入れ、標準リガンドあるいは供試試料を 1%(v/v)になるように添加した。これらを 30°C、120 rpm で 4 時間回転振盪培養した後、この培養液 150 μL をマイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーにより 620 nm における酵母の濃度(OD_{620})を測定した。残りの培養液は、遠心分離(21,900×g、4°C、5 分)して上澄み液を除去し、酵母の細胞壁を破砕するためにザイモリアーゼ-20T を 1 mg/mL を含む Z 緩衝液を 200 μL 加えて 30°C、120 rpm で 30 分間回転振盪した。そして、β-ガラクトシダーゼの発色基質である ONPG を 4 mg/mL 含む 0.1 M リン酸緩衝液を 40 μL 添加し、30°C、120 rpm で 20 分間回転振盪して発色させた後、1 M 炭酸ナトリウム溶液を 100 μL 添加して発色反応を停止させた。これを遠心分離(21,900×g、4°C、5 分)に供した後、上澄み液の 150 μL をマイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーにより 414 nm と 540 nm の吸光度(A_{414}、A_{540})を測定し、下式 2-1 に従ってβ-ガラクトシダーゼ活性を算出した。

$$\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性} = 1000 \times \frac{ABS_{414} - 1.75 \times ABS_{540}}{OD_{620}} \quad (2\text{-}1)$$

ここで、活性の測定は全て 3 連で実施した。なお、アッセイ系においては、試料を元の 1～100 倍の濃度となるように逓減希釈した一連の試料を用い、標準リガンドである atRA の終濃度が 10^{-11} M-10^{-6} M となるように添加した陽性コントロール、および標準リガンドと試料を添加しない陰性コントロール(1%DMSO)も用意した。

測定結果に基づき、atRA(陽性コントロール)の最大β-ガラクトシダーゼ活性を 100%、陰性コントロールのβ-ガラクトシダーゼ活性を 0%として(ブランク)、下式 2-2 に従い、各試料の相対 RAR アゴニスト活性(%)を算出した。

$$\text{相対RARアゴニスト活性}(\%) = \frac{\text{試料のβ－ガラクトシダーゼ活性－ブランク}}{\text{atRAの最大β－ガラクトシダーゼ活性－ブランク}} \quad (2\text{-}2)$$

また、atRA および各試料の相対 RAR アゴニスト活性を基に作成した用量反応曲線から、Prism 5.02 for Windows (GraphPad Software) を用いて半数効果濃度(50% effective concentration; EC50)値を算出し(**Fig. 2-4**)、下式 2-3 に従って、試料の EC50 値(濃縮倍率)に対する atRA の EC50 値(濃度)を各試料の atRA 当量値(atRA-EQ_{bio} 値)として算出した。

$$\text{atRA-}EQ_{bio}(\text{ng/L}) = \frac{\text{atRAのEC50値(ng/L)}}{\text{試料のEC50値(濃縮倍率)}} \quad (2\text{-}3)$$

2.6.5　統計処理

酵母 two-hybrid 法により得られた相対 RAR アゴニスト活性から、SPSS ver 15.0 Windows (SPSS)を用いて、試料の RAR アゴニスト活性の有意差検定を行った。検定は、陰性コントロールを対照とし、有意水準 5%として一元配置分散分析を用いた Dunnett’s post-hoc test により実施した。

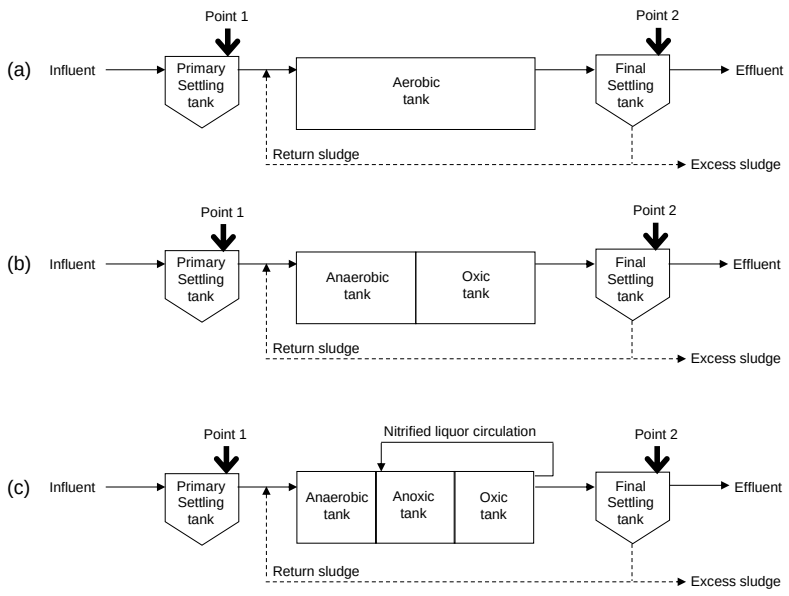

Fig. 2-1 Process schemes in WWTP-A and WWTP-C (a), WWTP-E (b) and WWTP-F (c). Sampling points are indicated with arrows: Point 1, the terminal of the primary settling tank; point 2, the terminal of the final settling tank.

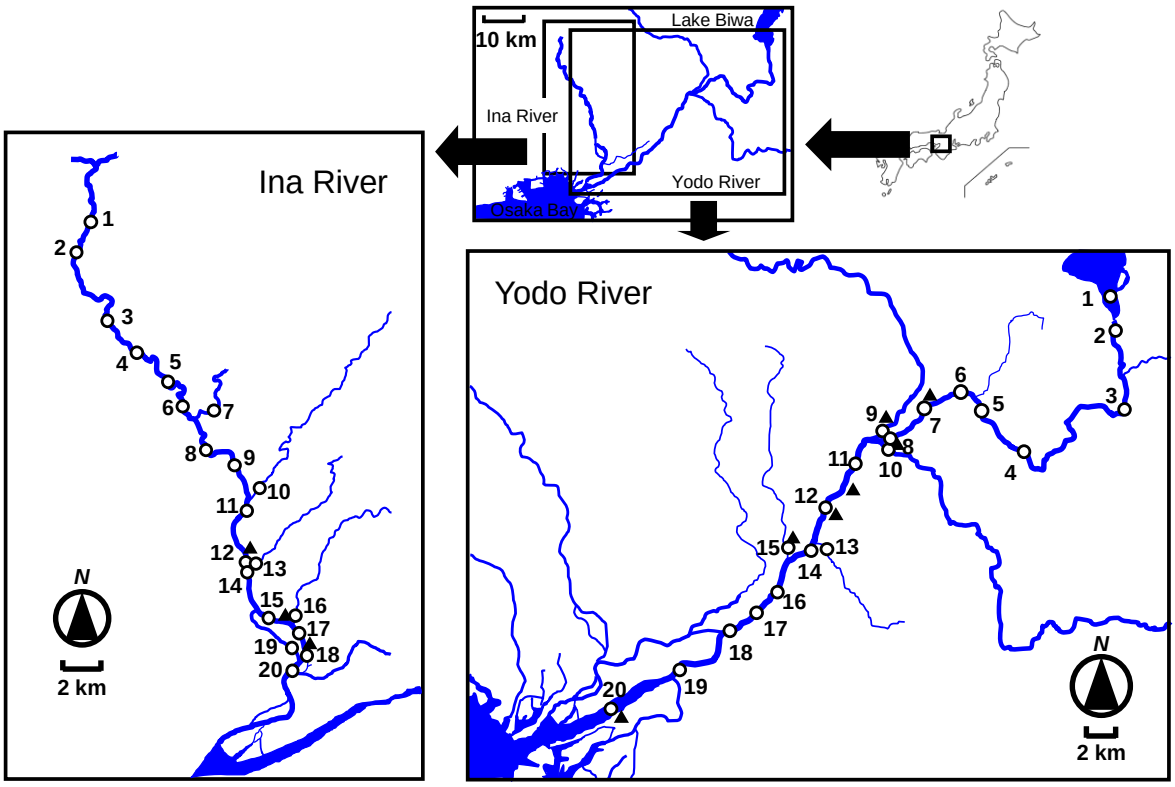

Fig. 2-2 Location of sampling station (open circle) and relevant municipal wastewater treatment plants (closed triangle) in Lake Biwa-Yodo River and Ina River. Sampling stations in each river are numbered from 1 to 20.

Table 2-1 Characteristics of wastewater samples used in this study.

WWTP [a]	Biological treatment [b]	Sampling date	Station	Temperature (°C)	pH	DOC [c] (mg/L)	T-N [d] (mg/L)	atRA-EQ_{bio} (ng/L)
A	CAS	December 12, 2008	Point 1	21.8	7.7	38.3	39.0	64.6
			Point 2	22.5	6.7	11.1	17.9	7.1
		December 16, 2008	Point 1	21.1	7.3	51.0	40.3	59.8
			Point 2	22.4	6.8	14.4	19.9	12.5
		December 25, 2008	Point 1	21.3	6.9	46.1	43.7	319.2
			Point 2	21.7	6.8	12.0	21.6	158.5
		March 3, 2009	Point 1	18.9	7.6	25.0	34.8	19.2
			Point 2	19.8	7.1	8.3	20.3	1.6
		April 17, 2009	Point 1	23.1	7.0	33.2	32.5	17.9
			Point 2	23.1	7.1	15.8	14.4	2.5
		October 28, 2009	Point 1	25.6	7.0	40.4	32.9	12.2
			Point 2	26.2	6.9	8.2	14.6	0.4
		November 20, 2009	Point 1	22.6	7.3	17.5	27.9	21.3
			Point 2	23.7	6.8	15.7	13.1	0.3
		December 22, 2009	Point 1	NA [e]	NA	19.9	30.6	24.3
			Point 2	NA	NA	5.7	17.7	3.3
		February 25, 2010	Point 1	18.8	7.0	NA	NA	40.6
			Point 2	19.2	6.8	NA	NA	2.2
		March 12, 2010	Point 1	19.8	6.8	31.3	28.5	19.2
			Point 2	20.9	6.7	8.7	15.9	1.6
C	CAS	December 12, 2008	Point 1	19.9	7.7	25.1	35.6	50.4
			Point 2	20.8	6.7	4.9	11.3	9.4
		December 16, 2008	Point 1	19.5	NA	32.7	35.4	284.9
			Point 2	20.2	6.7	6.8	9.4	10.1
		December 25, 2008	Point 1	18.8	7.6	25.5	31.4	177.2
			Point 2	NA	7.1	5.7	8.0	4.6
E	AO	December 12, 2008	Point 1	20.4	7.3	25.0	25.8	49.2
			Point 2	20.9	6.4	4.6	12.5	0.7
		December 16, 2008	Point 1	19.8	7.0	38.8	26.7	163.5
			Point 2	20.5	6.4	8.6	10.7	1.5
		December 25, 2008	Point 1	19.5	7.4	27.8	28.0	163.5
			Point 2	19.9	6.4	6.6	11.2	0.2
F	A2O	December 12, 2008	Point 1	20.1	7.3	20.0	38.2	119.8
			Point 2	20.8	6.3	3.7	10.8	2.3
		December 16, 2008	Point 1	19.5	7.4	21.4	34.7	85.3
			Point 2	20.3	6.5	5.9	9.8	1.9
		December 25, 2008	Point 1	19.5	7.7	19.7	41.0	263.7
			Point 2	20.2	6.4	4.3	12.2	2.1

[a] Wastewater treatment plant

[b] CAS, conventional activated sludge process; AO, anoxic-oxic process; A2O, anaerobic-anoxic-oxic process.

[c] Dissolved organic carbon.

[d] Total nitrogen.

[e] Not analyzed.

Table 2-2 Characteristics of river water samples used in this study.

River	Sampling date	Station	Temperature (°C)	pH	DOC [a] (mg/L)	T-N [b] (mg/L)
Lake Biwa-Yodo River	June 28, 2007	1	24.5	7.5	4.8	0.66
		3	24.2	7.2	4.0	1.55
		4	24.6	7.1	3.2	1.04
	August 20, 2007	1	30.6	8.8	2.2	0.56
		2	29.2	7.6	1.6	0.47
		3	30.2	7.3	1.9	2.9
		4	31.8	8.5	1.3	1.0
	October 23, 2007	1	18.1	7.3	2.1	0.09
		2	19.3	7.1	3.0	0.23
		3	19.5	7.0	4.7	0.92
		4	19.0	7.1	4.5	0.43
	January 16, 2008	1	7.1	8.2	5.5	0.51
		2	6.8	7.1	4.6	0.77
		3	10.5	7.0	6.7	3.9
		4	8.1	7.1	5.6	3.5
	October 28, 2008	1	17.0	7.4	2.2	2.5
		2	18.3	8.0	2.1	3.3
		3	17.3	7.3	2.5	1.5
		4	17.4	7.0	2.4	2.2
		5	19.5	6.9	2.9	1.8
		6	19.5	6.9	2.5	2.6
		7	20.2	6.7	3.2	1.9
		8	20.7	6.5	3.6	4.4
		9	17.1	7.6	2.9	1.3
		10	16.7	7.2	2.6	2.8
		11	19.1	6.5	3.2	3.9
		12	17.1	7.2	2.9	5.8
		13	14.4	7.4	6.4	3.5
		14	17.9	7.1	5.4	5.3
		15	15.1	7.5	4.5	2.2
		16	18.0	7.3	5.8	2.6
		17	18.8	7.3	5.2	2.9
		18	18.8	7.2	5.5	2.9
		19	19.3	7.1	4.7	2.9
		20	20.0	7.4	6.4	2.4
Ina River	June 13, 2007	5	21.3	6.6	2.8	0.5
		8	16.6	7.3	1.6	0.6
		11	20.9	7.7	1.8	0.7
		12	21.0	7.3	1.9	0.9
		17	24.1	6.4	3.9	8.0
		18	23.9	6.5	4.2	8.1
	August 17, 2007	5	27.2	7.2	2.6	0.4
		8	24.5	7.8	2.7	0.8
		11	28.6	8.7	5.5	0.5
		12	27.3	7.7	3.4	0.5
		17	28.9	6.5	5.6	10.8
		18	29.4	6.9	4.0	9.0
	October 30, 2007	5	16.4	7.3	3.5	2.7
		8	16.9	7.2	3.5	1.6
		11	17.1	7.4	3.2	1.6
		12	18.6	7.2	2.8	1.4
		17	24.4	7.3	6.7	13.6
		18	23.2	7.3	10.5	7.2

Table 2-2 (continued).

River	Sampling date	Station	Temperature (°C)	pH	DOC (mg/L)	T-N (mg/L)
Ina River	January 16, 2008	5	4.8	8.4	5.7	0.4
		8	6.3	8.0	4.6	0.6
		11	6.0	8.1	5.4	1.3
		12	6.4	8.5	5.9	0.9
		17	14.8	7.3	11.7	14.5
		18	12.4	7.4	10.8	12.1
	April 21, 2008	1	10.5	7.0	2.5	0.9
		2	10.5	7.1	2.4	0.5
		3	10.6	6.9	3.0	0.5
		4	11.0	7.3	2.8	0.53
		5	11.9	7.1	2.6	0.65
		6	12.9	7.1	3.2	0.68
		7	11.3	6.8	3.0	1.0
		8	11.6	7.2	3.4	0.93
		9	12.7	7.4	3.4	1.1
		10	11.7	7.2	3.0	1.4
		11	12.5	6.5	3.2	1.3
		12	14.6	7.8	3.0	1.5
		13	18.0	7.7	3.6	3.8
		14	14.5	7.5	3.4	2.5
		15	15.7	7.4	3.6	2.4
		16	NA [c]	7.8	5.1	2.9
		17	18.5	6.9	6.3	8.1
		18	20.5	6.4	6.0	9.8
		19	18.3	6.7	4.1	3.6
		20	19.5	6.5	5.8	8.5

[a] Dissolved organic carbon.

[b] Total nitrogen.

[c] Not analyzed.

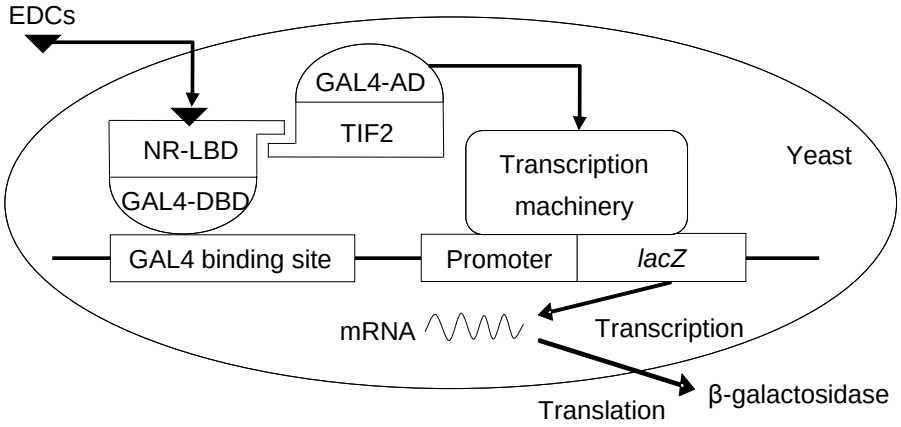

Fig. 2-3 Schematic diagram of the yeast two-hybrid assay.

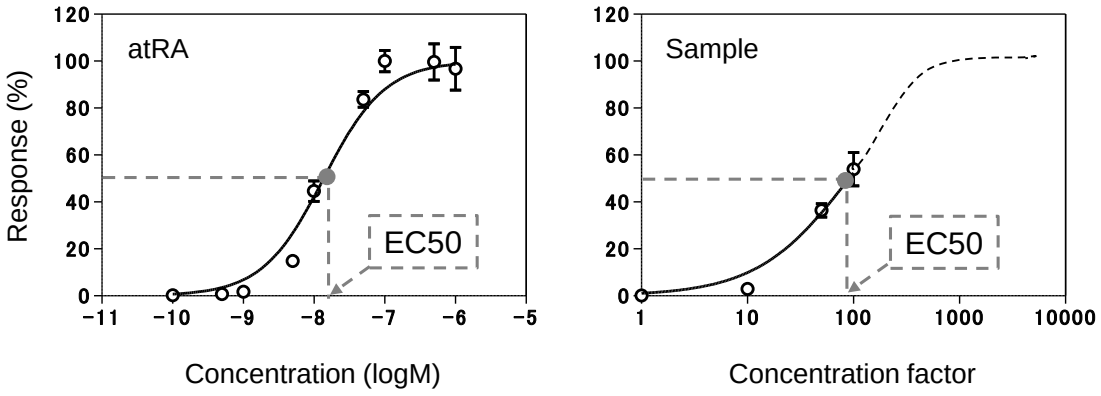

Fig. 2-4 Dose-response curves of atRA and sample from station 2 of Lake Biwa-Yodo River in August 2007.

2.7　結果および考察

2.3.1　下水処理系における RAR アゴニスト汚染の調査

2.3.1.1　様々な活性汚泥処理を用いた下水処理場における RAR アゴニスト活性の調査

下水処理系における RAR アゴニスト汚染を調査するために、2008 年 12 月に 4 つの下水処理場(WWTP-A、C、E、F)の最初沈澱池越流水および最終沈澱池越流水から試料を採取し、RAR アゴニスト活性を測定した。活性測定に用いた試料の濃縮倍率は、元試料の 1、10、100 倍とし、それぞれ試料の相対 RAR アゴニスト活性を求めた(**Fig. 2-5)**。

最初沈澱池越流水においては、濃縮倍率 100 倍試料の OD_{620} 値は低濃縮倍率の試料に比べて顕著に低い値を示し、試料中の化学物質による酵母細胞への毒性が生じていることが観察されたことから、低濃縮倍率の試料の測定値に基づいて RAR アゴニスト活性を評価すべきであることが明らかになった。ここで、濃縮倍率 10 倍の試料においては、2008 年 12 月 12 日の WWTP-C を除く全ての試料から 7.6～18.2%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出され、濃縮しなかった試料(濃縮倍率 1 倍)でも 2008 年 12 月 12，25 日の WWTP-A、2008 年 12 月 25 日の WWTP-C、2008 年 12 月 12 日の WWTP-E を除く全ての試料から 3.1～9.1%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。また、これらの計測値から、有意な活性が検出された試料の atRA-EQ_{bio} 値を算出すると、49.2～319.2 ng/L となった(**Table 2-1**)。以上の結果から、処理場によらず下水中には常に RAR アゴニストが存在することが明らかとなった。

一方、最終沈澱池越流水の濃縮倍率 100 倍において、2008 年 12 月 12、25 日の WWTP-E および 2008 年 12 月 25 日の WWTP-F を除く全ての試料から、1.0～33.2%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。また、濃縮倍率 10 倍においても、WWTP-A の 2008 年 12 月 16、25 日の試料で、それぞれ 2.1%、14.1%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出されたが、濃縮しなかった試料(濃縮倍率 1 倍)では有意な活性は検出されず、最初沈澱池越流水に比べて低い活性を有することが明らかとなった。また、計測値から atRA-EQ_{bio} 値を算出すると、0.2～158.5 ng/L となった(**Table 2-1**)。この結果から、下水処理場から放流される処理水中の RAR アゴニスト活性は、一般的にさほど高いものではないが、活性が処理水中に残存する場合があり、比較的高い汚染レベルのまま放流される場合もあり得ることが示唆された。

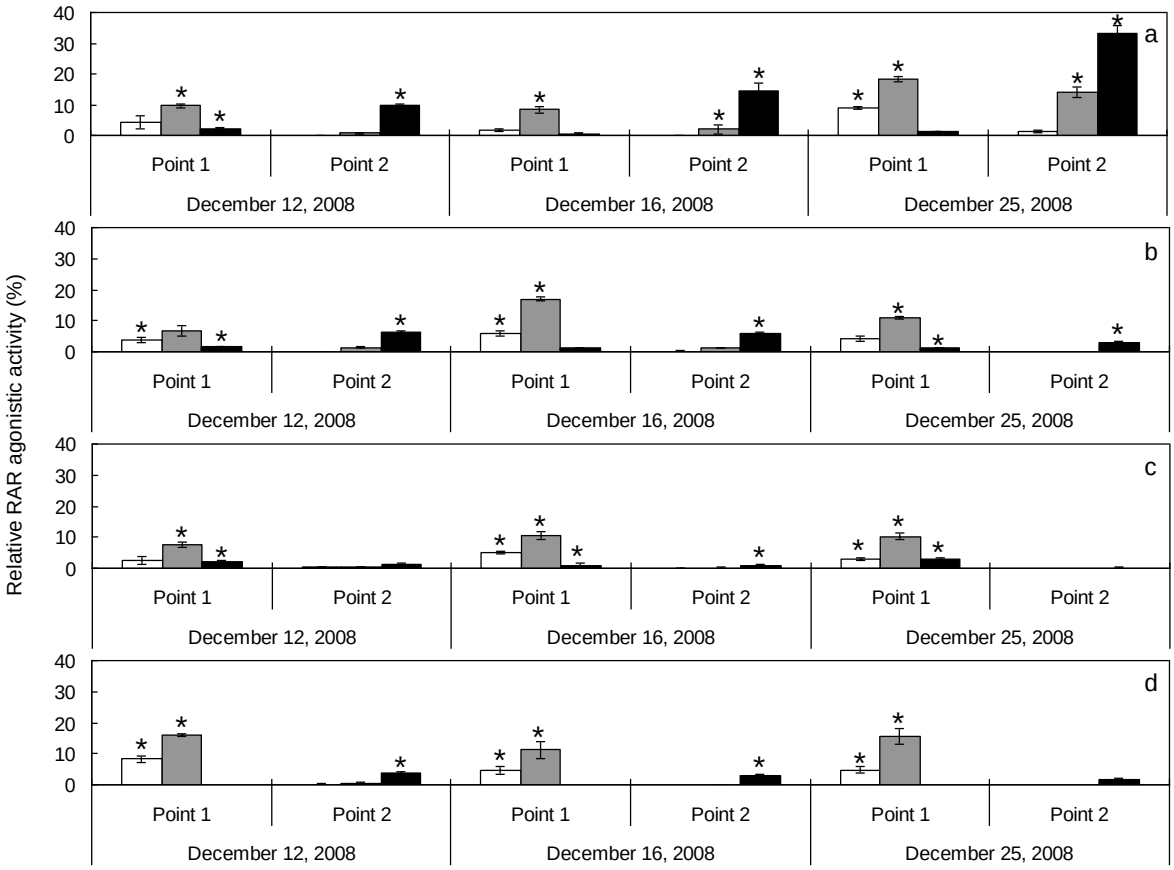

Fig. 2-5 RAR agonistic activity of water samples collected at point 1 and point 2 in WWTPs-A (a), -C (b), -E (c), and –F (d) in December 2008. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Open, light-colored, and filled bars indicate the data at concentration factor of 1, 10, and 100, respectively. *p<0.05 versus the negative control.

2.3.1.2　下水処理場における RAR アゴニスト活性の季節変動

下水処理系における RAR アゴニスト汚染の季節による変動を調査するために、2008 年 12 月から 2010 年 3 月に WWTP-A の最初沈澱池越流水および最終沈澱池越流水から採取し、RAR アゴニスト活性を測定した。活性測定に用いた試料の濃縮倍率は、元試料の 1、10、100 倍とし、それぞれの試料の相対 RAR アゴニスト活性を求めた(**Fig. 2-6**)。

最初沈澱池越流水においては、2.3.1.1 と同様に、濃縮倍率 100 倍において酵母細胞への毒性影響が見られたが、2009 年 11 月を除く全ての濃縮倍率 10 倍試料から 8.1～18.2%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出され、濃縮していない試料(濃縮倍率 1 倍)でも、10 試料中 7 試料で 0.5～9.5%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。また、最終沈澱池越流水においても、全ての濃縮倍率 100 倍試料から 3.3～33.2%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出され、濃縮倍率 10 倍試料についても、2009 年 12 月 12 日、2009 年 10 月、11 月を除く全ての試料から 2.1～14.1%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。また、atRA-EQ_{bio} 値を算出した結果、最初沈澱池越流水では 12.2～319.2 ng/L、最終沈澱池越流水では 0.3～158.5 ng/L となった(**Table 2-1**)。以上の結果から、時期

によらず下水中には常に RAR アゴニストは存在しており、また、下水処理によって RAR アゴニスト活性は完全には除去されておらず、河川水中に放流されていることが明らかとなった。

2.3.2　河川における RAR アゴニスト汚染の調査

2.3.2.1　琵琶湖-淀川水系および猪名川水系における RAR アゴニスト活性の地点変動

河川水中に存在する RAR アゴニストの分布状況を調査するために、琵琶湖-淀川水系および猪名川水系の上流から下流にかけて各 20 地点(支流を含む)から、それぞれ 2008 年 10 月、2008 年 4 月に表層水試料を採取し、RAR アゴニスト活性を測定した。活性測定に用いた試料の濃縮倍率は、元試料の 1、10、100 倍とした。各濃縮試料について求めた相対 RAR アゴニスト活性を **Fig. 2-7** に示す。

濃縮倍率 100 倍の全ての試料において、琵琶湖-淀川水系では 5.6～26.2%、猪名川水系では 2.4～26.6%の有意な相対 RAR アゴニスト活性($p<0.05$)が検出された。濃縮倍率 1、10 倍においても、琵琶湖-淀川水系では 20 試料中それぞれ 4 試料、11 試料、猪名川水系では 20 試料中それぞれ 2 試料、12 試料から有意な RAR アゴニスト活性($p<0.05$)が検出された。1～100 倍と濃縮するに従って濃度依存的な活性の上昇が認められたことから、各試料についてこれらの値を用いて、atRA-EQ_{bio} 値を求めたところ、琵琶湖-淀川水系では 0.5～4.4 ng/L、猪名川水系では 0.9～32.1 ng/L と算出された。この結果に基づき、各採取地点の atRA-EQ_{bio} 値を **Fig. 2-8** に RAR アゴニスト汚染度マップとして図示している。いずれの河川においても、概ね、上流部に比べて下流部で汚染レベルが高くなる傾向が認められ、一部で非常に高い活性が示された(例えば、猪名川地点 18)。以上の結果から、RAR アゴニストは河川水中に普遍的に存在していることが明らかとなった。

淀川では中流域に複数の下水処理場が立地しているが、その範囲の汚染レベルは概ね低かった。また、猪名川では地点 12、17、18 の上流部に下水処理場が立地しているが、地点 12、17 では上流の地点よりも活性レベルは低かった。以上の結果から、従来のステロイドホルモン受容体に作用する EDCs による環境汚染の主な汚染源として知られている下水処理場(Kolodziej et al., 2003; Vajda et al., 2008)は、RAR アゴニストについては、必ずしも汚染の主要な汚染源にはなっておらず、河川においては別の重要な汚染源が存在していることが示唆された。

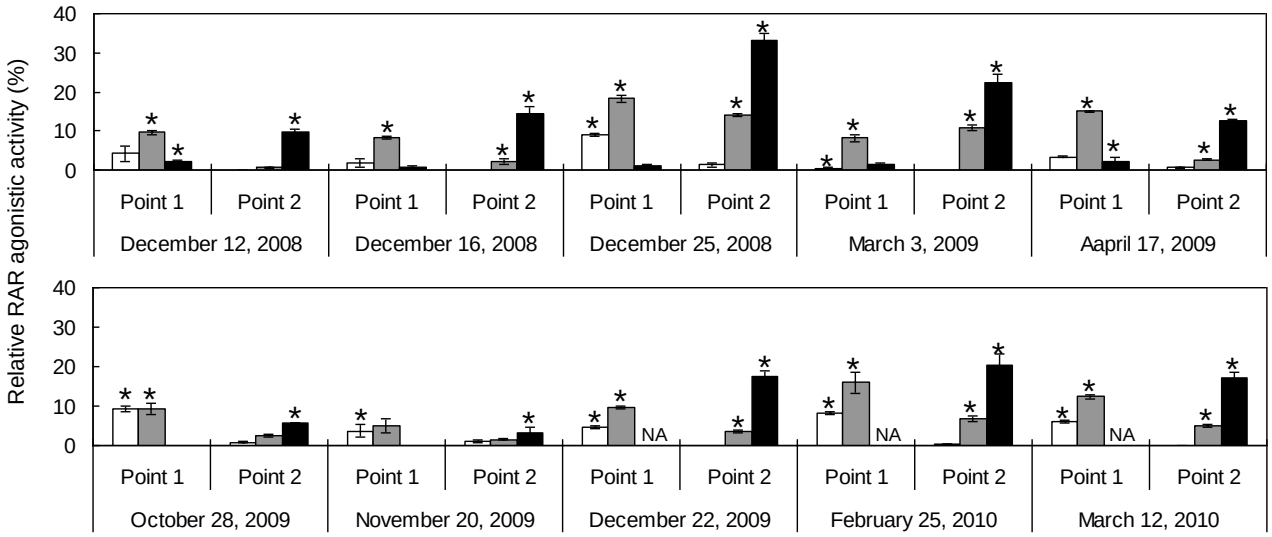

Fig. 2-6 Temporal variations of RAR agonistic activity of water samples collected from WWTP-A. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Open, light-colored, and filled bars indicate the data at concentration factor of 1, 10, and 100, respectively. *p<0.05 versus the negative control. NA = not analyzed.

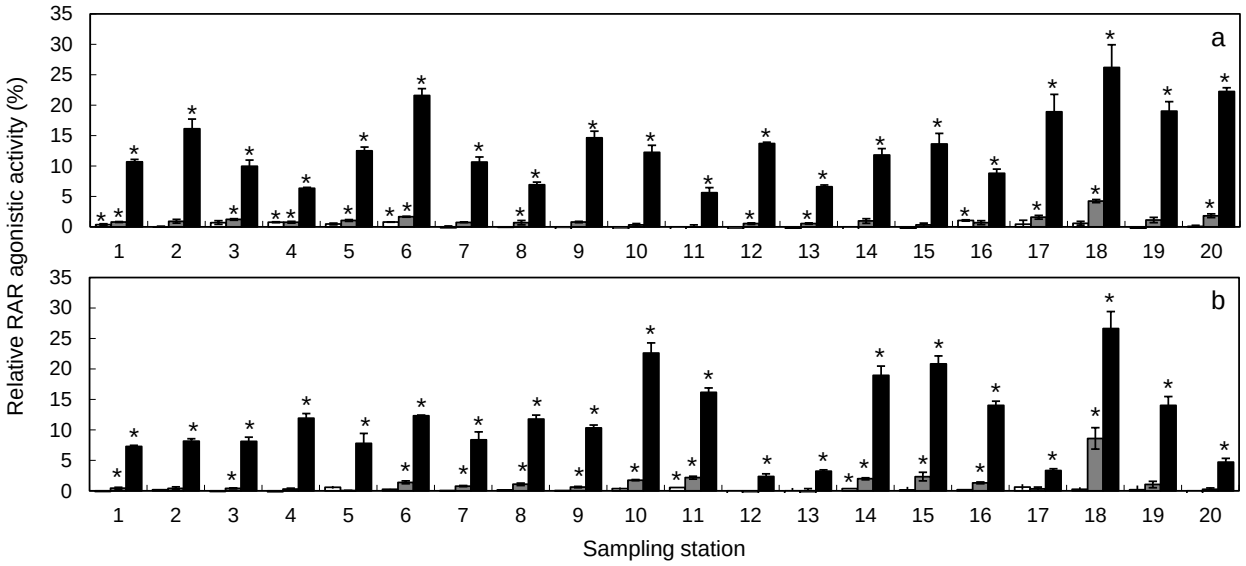

Fig. 2-7 RAR agonistic activities at 20 stations of Lake Biwa-Yodo River in October 2008 (a) and Ina River in April 2008 (b). Stations 9, 10, 13 and 15 of Lake Biwa-Yodo River and stations 7, 10, 13, 16 and 19 of Ina River are the tributaries. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Open, light-colored, and filled bars indicate the data at concentration factor of 1, 10, and 100, respectively. *p<0.05 versus the negative control.

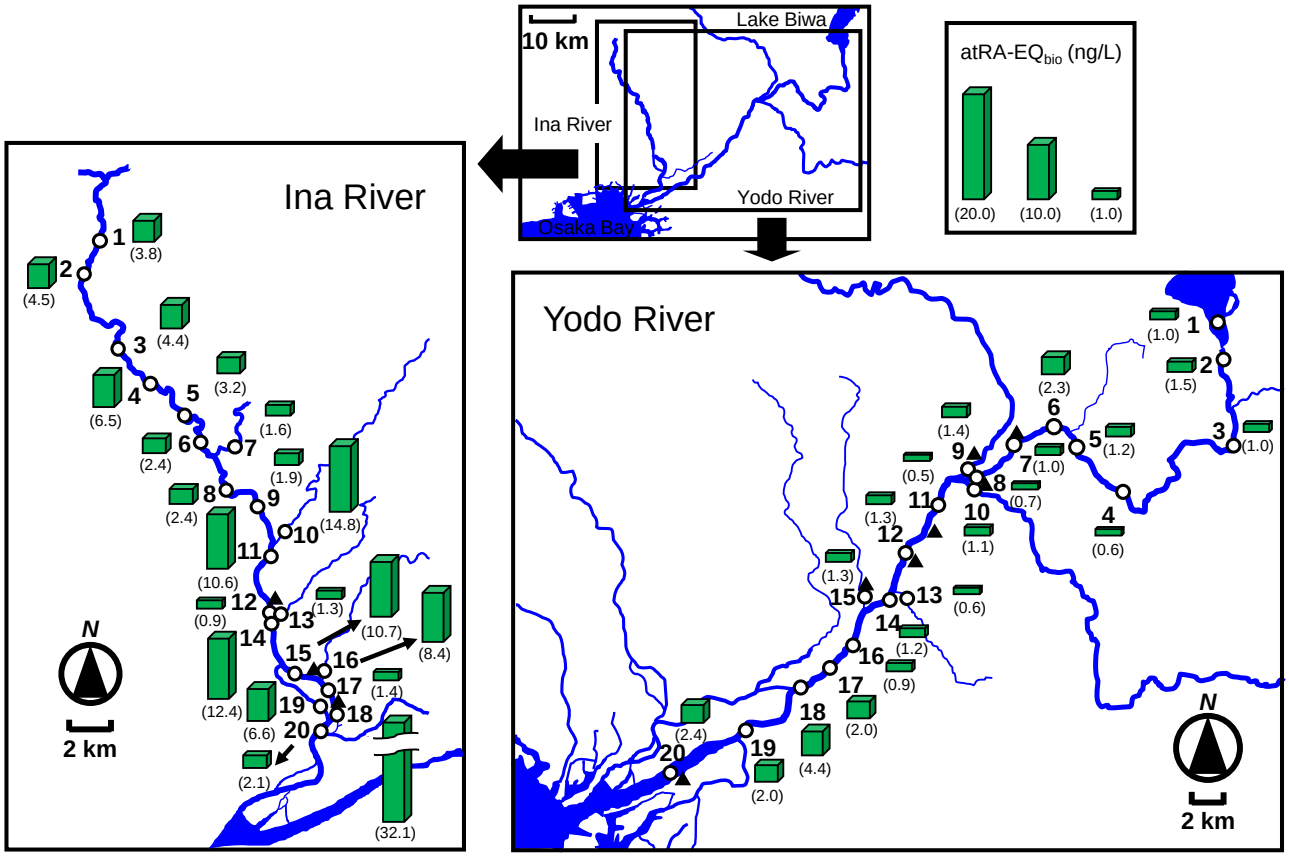

Fig. 2-8 Contamination levels of RAR agonists in Lake Biwa-Yodo River and Ina River.

2.3.2.2　琵琶湖-淀川水系および猪名川水系における RAR アゴニスト活性の季節変動

河川水中における RAR アゴニスト汚染の季節による変動を調査するために、2007 年 6 月から 2008 年 1 月の異なる季節において、琵琶湖-淀川水系の地点 2、4、8、18、および猪名川水系の地点 5、8、11、12、17、18 から表層水試料を採取し、RAR アゴニスト活性を測定した。活性測定に用いた試料の濃縮倍率は、元試料の 1、10、100 倍とした。各濃縮試料について求めた相対 RAR アゴニスト活性を **Fig. 2-9** に示す。

濃縮倍率 100 倍の試料において、琵琶湖-淀川水系の 2007 年 6 月の地点 18 を除く全ての試料から、琵琶湖-淀川水系では 0.3～53.9%、猪名川水系では 1.5～24.2%の有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。濃縮倍率 1、10 倍においても、琵琶湖-淀川水系では 15 試料中それぞれ 3 試料、7 試料、猪名川水系では 24 試料中それぞれ 6 試料、15 試料から有意な相対 RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出された。ここで、濃縮倍率 100 倍において、ほぼ全ての試料の活性は 25%以下を示したが、2007 年 8 月の琵琶湖-淀川水系の地点 2 および地点 18 ではそれぞれ 53.9%および 52.3%の顕著に高い活性を示した。また、atRA-EQ_{bio} 値は、琵琶湖-淀川水系では 0.5～9.3 ng/L、猪名川水系では 0.3～6.7 ng/L と算出され、河川においても時期を問わず、ある程度の RAR アゴニストが存在していることが明らかとなった。

図よりわかるように、琵琶湖-淀川水系では概して 2007 年 8 月に活性が高くなり、2008 年 1 月もやや高い活性が検出されたのに対し、猪名川水系では、2007 年 6 月に活性がやや高くなり、2007 年 8 月には活性がやや低くなる傾向が認められ、活性が高くなる採水時期は地点ごとで異なっていた。また、時

期によらず猪名川水系の地点 17 と地点 18 の間では活性が高くなる現象が確認された。これらのことは、河川における RAR アゴニストの発生源は複数存在しており、発生特性が季節に依存するものとしないものの両者があることを示唆している。

2.3.3　水環境中の RAR アゴニストによる生体影響の可能性

河川水および下水処理水から検出された RAR アゴニスト汚染レベルと既知の文献において検出された RAR アゴニスト汚染レベルを **Table 2-3** に比較した。本章で得られた下水処理水および河川水中の atRA-EQ_{bio} 値の検出濃度はそれぞれ 0.2～158.5 ng/L、0.3～32.1 ng/L であったのに対し、中国の下水処理水より検出された atRA-EQ_{bio} 値は、Cao ら(2009)の報告では 13.4±2.7 ng/L、Zhen ら(2009)の報告では 0.9-3.2 ng/L であり、オーストラリアの下水処理水から検出された atRA-EQ_{bio} 値は、ND-198 ng/L であった(Allinson et al., 2011a)。他方、Zhen ら(2009)は、中国北京の下水処理水が放流されている 2 河川を調査したところ、検出された atRA-EQ_{bio} 値は 0.7～10.0 ng/L となり、下水処理場の直下で atRA-EQ_{bio} 値が上昇する傾向を確認している。Allinson ら(2011b)は、オーストラリアの河川水中の RAR アゴニスト汚染を調査した結果、検出された atRA-EQ_{bio} 値は 0.88 ng/L であったと報告している。以上のことから、本研究で日本の水環境中で検出された RAR アゴニストのレベルは、他国の検出濃度と同程度であるといえる。

本章で得られた下水処理水および河川水の atRA-EQ_{bio} 値の最大濃度(それぞれ 158.5 ng/L および 32.1 ng/L)と水生生物に対する RA 類および 4-oxo-RA 類曝露の生体影響を調査した既往研究(**Table 1-1**)における影響濃度を比較することで、水環境における RAR アゴニストによる生体リスクをおよそ評価することができる。Degitz ら(2000)は、数種類のカエルの胚を用いて、0～50,000 ng/L の atRA を stage 8 の 24 時間曝露した調査において、アフリカツメガエルおよびミンクガエルの胚では 6,250 ng/L で小眼症、前脳縮小、アオガエルの胚では 25,000 ng/L で小眼症、前脳縮小、後部形態異常が生じたと報告している。さらに、Degitz ら(2003)は、アフリカツメガエルの胚を用いて、0～2,000 ng/L の atRA を stage 8 から 41 の 3 日間曝露した結果、600 ng/L で頭顔形態異常、小眼症、前脳および中脳縮小、浮腫が生じたと報告している。また、ゼブラフィッシュの胚の様々な成長段階において RA 類および 4-oxo-RA 類を曝露させた際に脳や尾の奇形や浮腫を生じた最小作用濃度は、atRA は 900 ng/L(stage 4)、9cRA は 30,000 ng/L(stage 4)、13cRA は 3,000 ng/L(stage 14)、4-oxo-atRA は 3,100 ng/L(stage 14)、4-oxo-13cRA は 94,200 ng/L(stage 14)と報告されている(Herrmann, 1995)。これら整理した文献の中で、水生生物に対して生体影響を及ぼすことが報告された最小作用濃度は atRA で 600 ng/L であったが、この値は、本章で明らかにした下水処理水および河川水の最大濃度に比べると、それぞれ 3.8 倍、18.7 倍高い値であり、単純に考えれば、本研究で見出された RAR アゴニスト汚染のレベルは、直ちに水生生物に多大な影響を与えるレベルであるとは言えない。しかし、エストロゲン受容体に作用する EDCs の 1 つであるビスフェノール A の毒性評価における安全係数は、本来のリガンドである E2 の 1000 分の 1(von Saal and Welshons, 2006)、ノニルフェノールの安全係数は 10 分の 1 とされていることを考えれば(石橋ら, 2002)、RAR アゴニストの原因物質の物性によっては、天然リガンドより低い活性レベルであっても、生体内に蓄積されるなどして生体影響を引き起こす可能性があるため、適正なリスク評価のためには、原因物質の特定が急務と考えられる。

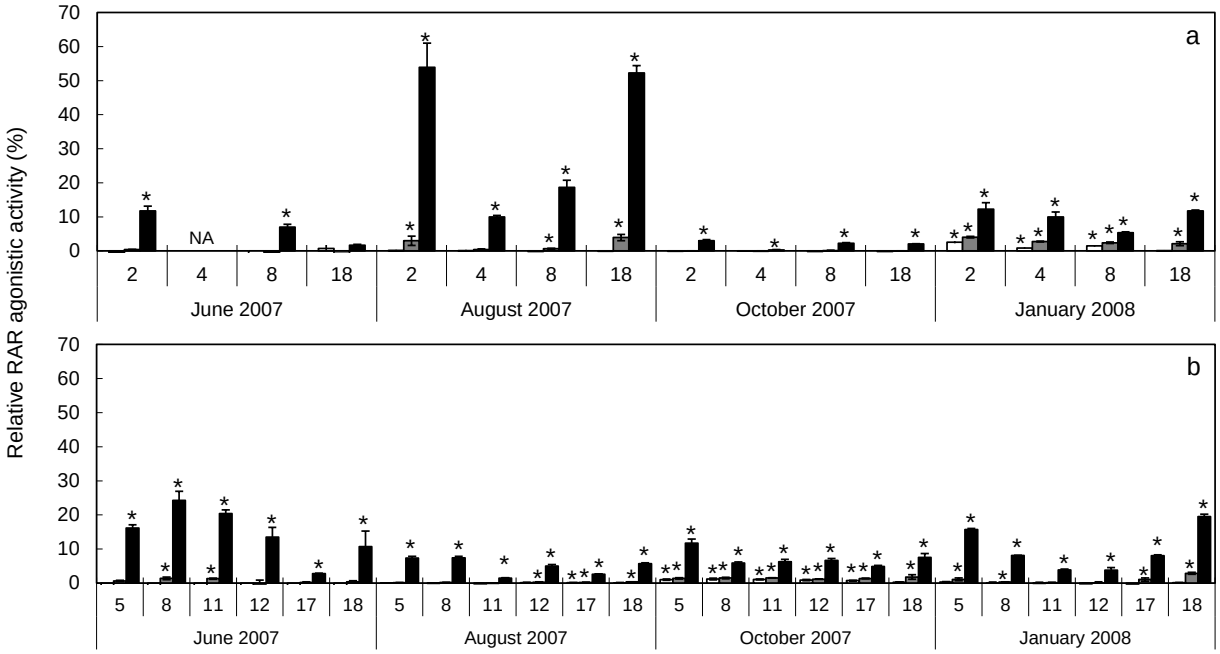

Fig. 2-9 Temporal variation of RAR agonistic activity at stations 2, 4, 8 and 18 of Lake Biwa-Yodo River (a) and stations 5, 8, 11, 12, 17 and 18 of Ina River (b). Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Open, light-colored, and filled bars indicate the data at concentration factor of 1, 10, and 100, respectively. *p<0.05 versus the negative control. NA = not analyzed.

Table 2-3 Comparison of RAR agonist contamination levels detected in this study and previous studies.

Sample	Country	atRA-EQ_{bio} (ng/L)[a]	References
Effluent	Japan [n=19][b]	0.2-158.5 (2.2)	This study[c]
	China [n=13]	13.4±2.7	Cao et al., 2009
	China [n=7]	0.9-3.2 (1.1)	Zhen et al., 2009
	Australia [n=39]	ND-198	Allinson et al., 2011a
River water	Japan [n=79]	0.3-32.1 (1.4)	This study
	China [n=21]	0.7-10.0 (2.9)	Zhen et al., 2009
	Australia [n=6]	0.88	Allinson et al., 2011b

[a] ND, not detected. The number in parenthesis indicates the median value.

[b] The number in square bracket indicates the sample number.

[c] Data obtained at point 2 (after the final settling tank).

2.8　要約

本章では、複数の下水処理場および河川において、酵母 two-hybrid 法を用いたバイオアッセイにより RAR アゴニスト汚染の調査を実施し、日本の水環境中における汚染の実態を活性ベースで把握した。

大阪府下の 4 つの下水処理場における調査から、処理場や時期によらず、下水中には普遍的に RAR アゴニストが存在していることが明らかとなった。また、下水処理水中からも RAR アゴニストが検出されたが、多くは高いレベルではなかった。しかし、活性が処理水中から完全に除去されずに残存する

場合があり、時として比較的高いレベルであったことから、RAR アゴニストが下水処理場から河川水中に放流されている可能性が示された。

一方、琵琶湖-淀川水系および猪名川水系における調査から、場所や時期によらず、河川水中にも普遍的に RAR アゴニストが存在していることが明らかとなり、いずれの河川でも、下流部の特定の地点で比較的高い活性が確認された。また、従来のステロイドホルモン受容体に作用する EDCs の主な汚染源として知られている下水処理場は、必ずしも RAR アゴニスト汚染の主要な汚染源でないことが示唆され、他に異なる排出源が存在するものと考えられた。さらに、河川における RAR アゴニストの排出源は複数存在し、発生特性が季節に依存するものとしないものがあると示唆された。

本章で検出された RAR アゴニストは、中国やオーストラリアの事例と同程度の汚染レベルであることが明らかとなった。また、水生生物に生体影響を及ぼす atRA の最小作用濃度は、ここで検出された下水処理水および河川水中の最大濃度(相当活性)に比べて、それぞれ 3.8 倍、18.7 倍高い値であることから、直ちに生体に影響を及ぼす可能性は低いものと考えられる。

第3章　水環境中に含まれるレチノイン酸受容体アゴニストの同定

3.5　はじめに

第 2 章で述べたように、日本の水環境中においても RAR アゴニストが存在していることが明らかとなった。下水中には処理場や時期によらず常に RAR アゴニストが存在しており、その大部分は活性汚泥処理によって除去されるが、完全には除去されない場合もあり、下水処理水に含まれて河川に放流されている可能性があるものと考えられた。また、河川水中においても場所や時期によらず普遍的に RAR アゴニストは存在しているが、これらは必ずしも下水処理場由来ではないことが推察された。日本の水環境中で検出された RAR アゴニストレベルは、直ちに水生生物に生体影響を及ぼす汚染レベルではないことが示唆されたが、原因物質の物性によっては生体影響を引き起こす可能性が考えられるため、その特定は重要な課題である。そこで本章では、下水および河川表層水中に含まれる RAR アゴニストを分取・精製し、RAR アゴニストの化学構造を推定した。

3.6　実験方法

3.6.1　化学物質

atRA、9cRA、13cRA、DMSO、アセトニトリル(CH_3CN)、MeOH は Sigma-Aldrich から購入した。4-oxo-atRA、4-oxo-9cRA、4-oxo-13cRA、4-hydroxy-RA は Toronto Research Chemicals、ギ酸および酢酸アンモニウムは和光純薬工業株式会社より購入した。また、β-カロテンは東京化成工業株式会社、アスタキサンチン、β-クリプトキサンチン、カンサキサンチン、ルテイン、リコペン、ゼアキサンチンはコスモ・バイオ株式会社より購入した。

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニストの測定に使用する標準リガンドは第 2 章 2.2.1 に準じてストック溶液を作成した。他方、高速液体クロマトグラフ(High performance liquid chromatography; HPLC)、液体クロマトグラフ質量分析計(Liquid chromatography mass spectrometry; LC/MS)、液体クロマトグラフ-イオントラップ-飛行時間型質量分析計(Liquid chromatography mass spectrometry-Ion trap-Time of Flight; LC/MS-IT-TOF)による分析に使用した標準物質は 1,000 mg/L になるように MeOH に溶解したものを -20ºC で保存し、使用前に MeOH で適宜希釈した。

3.6.2　供試試料

本章で用いた下水(最初沈澱池越流水)の各試料は、大阪府下の 4 つの下水処理場(WWTP-A、C、E、F)より採取した。各処理場の処理方式は、**Fig. 2-1** に示している。下水処理場における試料の採取は、WWTP-A においては 2009 年 3 月、4 月、6 月および 7 月、WWTP-C、WWTP-E および WWTP-F においては、2009 年 6 月に実施した。

また、河川水試料は、琵琶湖-淀川水系の地点 2、猪名川水系の地点 5 および地点 18 より表層水を採取した(**Fig. 2-2**)。琵琶湖-淀川水系においては、2007 年 8 月に、猪名川水系においては、2007 年 8 月に地点 5、2007 年 8 月、2009 年 4 月、8 月、10 月、12 月、2010 年 1 月に地点 18 から採取した。

採取した各試料は、水温、pH を測定した後、氷冷下で実験室まで運搬し、DOC、T-N の測定、ならびに固相抽出に供した。各試料の水質測定結果を **Table 3-1**、および **Table 3-2** に示す。

3.6.3　試料の前処理

各試料は、第 2 章 2.2.3 に示した方法に準じて、前処理を行った。カートリッジに捕捉された化学物質の溶出液を濃縮・乾固させた後、酵母 two-hybrid 法による活性測定の際には DMSO、機器分析の際には MeOH に転溶した。

3.6.4　酵母 two-hybrid 法

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定は、第 2 章 2.2.4 に示した方法に準じて行い、測定結果を基に相対 RAR アゴニスト活性を算出した。

Table 3-1 Characteristics of wastewater samples used in this study.

WWTP [a]	Biological treatment [b]	Sampling date	Station [c]	Temperature (°C)	pH	DOC [d] (mg/L)	T-N [e] (mg/L)
A	CAS	March 3,2009	Point 1	18.7	7.6	25.0	34.8
		April 17, 2009	Point 1	23.1	7.0	33.2	32.5
		June 25, 2009	Point 1	26.5	7.6	86.1	24.5
		July 30, 2009	Point 1	27.8	7.3	21.7	26.7
C	CAS	June 25, 2009	Point 1	25.3	7.6	76.1	23.4
E	AO	June 25, 2009	Point 1	26.3	7.6	88.0	32.1
F	A2O	June 25, 2009	Point 1	26.3	7.0	48.3	25.1

[a] Wastewater treatment plant

[b] CAS, conventional activated sludge process; AO, anoxic-oxic process; A2O, anaerobic-anoxic-oxic process.

[c] Sampling point was shown in Fig. 2-1.

[d] Dissolved organic carbon.

[e] Total nitrogen.

Table 3-2 Characteristics of river water samples used in this study.

River	Sampling date	Station [a]	Temperature (°C)	pH	DOC [b] (mg/L)	T-N [c] (mg/L)
Lake Biwa-Yodo River	August 20, 2007	2	30.6	8.8	2.2	0.6
Ina River	August 17, 2007	5	27.2	7.2	2.6	0.4
		18	29.4	6.9	4.0	9.0
	April 7, 2009	18	17.1	6.8	0.4	2.7
	August 3, 2009	18	24.9	7.0	7.1	0.8
	October 20, 2009	18	NA [d]	NA	2.9	4.0
	December 9, 2009	18	17.7	7.1	3.2	2.9
	January 7, 2010	18	12.2	7.1	2.9	4.2

[a] Station numbers were shown in Fig. 2-2.

[b] Dissolved organic carbon.

[c] Total nitrogen.

[d] Not analyzed.

3.6.5　高速液体クロマトグラフによる RAR アゴニスト活性画分の分取および精製

HPLC を用いた下水中および河川水中に含まれる RAR アゴニストの分画・精製は、**Fig. 3-1** および **Fig. 3-2** に示す手順で行った。各試料は、**Table 3-3**(精製 1)に示す条件で分取・精製後、酵母 two-hybrid 法によって RAR アゴニスト活性を示す画分を特定した。下水試料では、精製 1 で得られた活性画分を、**Table 3-4**(精製 2-1)に示す条件で分取・精製を行い、RAR アゴニスト活性を示す画分を特定した。さらに、精製 2-1 で得られた活性画分を、**Table 3-5**(精製 3-1)に示す条件で LC クロマトグラムによって得られたピークごとに分取・精製し、RAR アゴニスト活性を有するピークの特定を行った。一方、河川水試料では、精製 1 で得られた活性画分を、**Table 3-6**(精製 2-2)に示す条件で分取・精製を行い、RAR アゴニスト活性を示す画分を特定した。さらに精製 2-2 で得られた活性画分を、**Table 3-7**(精製 3-2)に示す条件で LC クロマトグラムによって得られたピークごとに分取・精製し、RAR アゴニスト活性を有するピークの特定を行った。各分画試料は、濃縮・乾固させた後、酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定を行う場合は DMSO、精製 2、精製 3 またはマススペクトロメトリー(MS)分析に供する試料は MeOH に転溶した。

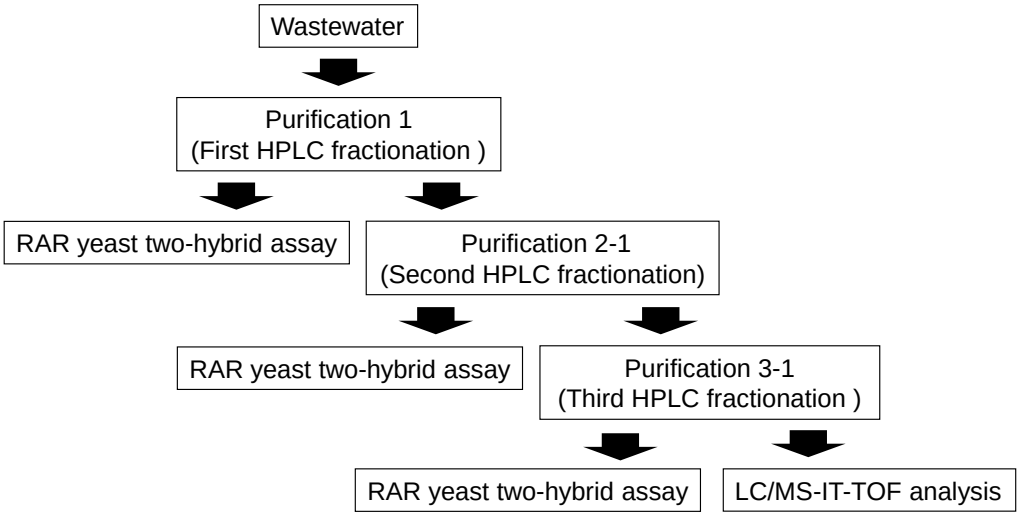

Fig. 3-1 Sample purification procedure for the determination of RAR agonists and measurement of RAR agonistic activity in wastewater.

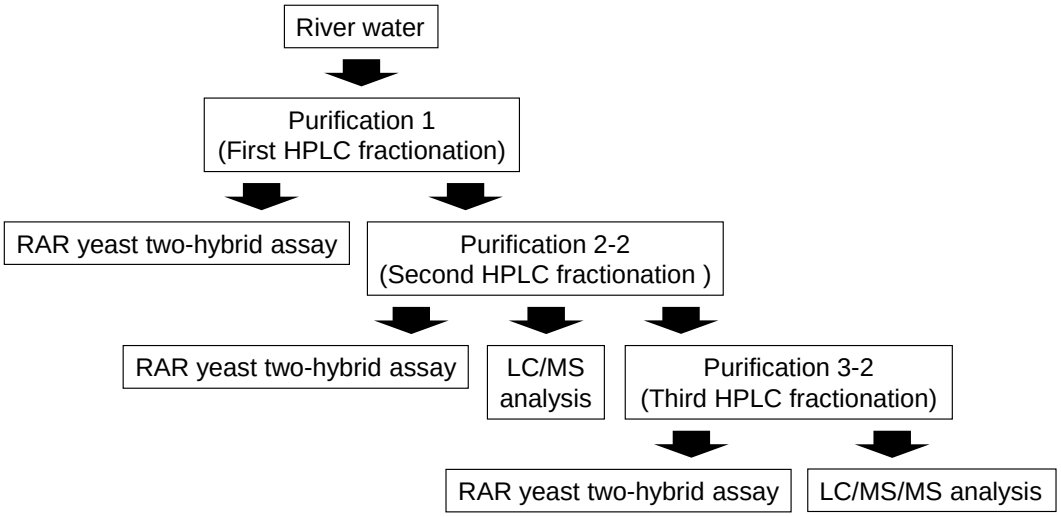

Fig. 3-2 Sample purification procedure for the determination of RAR agonists and measurement of RAR agonistic activity in river water.

Table 3-3 Analytical conditions for first HPLC fractionation.

System Controller	SCL-10A*vp* (Shimadzu)
Auto Injector	SIL-10AF (Shimadzu)
Column Oven	CTO-10A*vp* (Shimadzu)
UV-VIS Detector	SPD-10A*vp* (Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-10AD*vp* (Shimadzu)
Degasser	DGU-14A (Shimadzu)
Mobile phase	H_2O/CH_3CN
Gradient condition	CH_3CN conc.:0-3 min, 20 %; 3-30 min, 20-100 %; 30-40 min, 100%; 40-45 min, 20 %
Column temperature	40ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mmϕ)
Detection wavelength	254 nm
Flow rate	1.0 mL/min

Table 3-4 Analytical conditions for second HPLC fractionation of wastewater sample.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
UV/VIS Detector	SPD-20A (Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-20A (Shimadzu)
Degasser	DGU-20A_3 (Shimadzu)
Fraction Collector	FRC-10A (Shimadzu)
Mobile phase	1 % Formic acid/CH_3CN
Gradient condition	CH_3CN conc.:0-3 min, 20 %; 3-30 min, 20-100 %; 30-40 min, 100%; 40-45 min, 20 %
Column temperature	40ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mmϕ)
Detection wavelength	360 nm
Flow rate	1.0 mL/min

Table 3-5 Analytical conditions for third HPLC fractionation of wastewater sample.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
UV/VIS Detector	SPD-20A (Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-20A (Shimadzu)
Degasser	DGU-20A$_3$ (Shimadzu)
Fraction Collector	FRC-10A (Shimadzu)
Mobile phase	100 mM Ammonium acetate/MeOH
Gradient condition	MeOH conc.:0-5 min, 70 %; 5-26 min, 70-97 %; 26-28 min, 97%; 28-30 min, 70 %
Column temperature	40 ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mmϕ)
Detection wavelength	360 nm
Flow rate	1.0 mL/min

Table 3-6 Analytical conditions for second HPLC fractionation of river water sample.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
UV/VIS Detector	SPD-20A (Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-20A (Shimadzu)
Degasser	DGU-20A$_3$ (Shimadzu)
Fraction Collector	FRC-10A (Shimadzu)
Mobile phase	100 mM Ammonium acetate/MeOH
Isocratic condition	100 mM Ammonium acetate conc. (%):MeOH conc. (%)=30:70
Column temperature	40 ºC
Column	phenomenex (150 mm×4.6 mmϕ)
Detection wavelength	230 nm
Flow rate	1.0 mL/min

Table 3-7 Analytical conditions for third HPLC fractionation of river water sample.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
Mass Spectrometer	LCMS-2010EV (Shimadzu)
Mobile phase	100 mM Ammonium acetate/MeOH
Isocratic condition	100 mM Ammonium acetate conc. (%):MeOH conc. (%)=30:70
Column temperature	40 ºC
Column	phenomenex (150 mm×4.6 mmϕ)
Flow rate	1.0 mL/min
Interface	ESI (Positive and Negative ion mode)
Nebulizing gas flow	1.5 L/min
Probe voltage	-3.5 kV
Curved desolvation line temperature	250 ºC
Block temperature	200 ºC
Detector voltage	-1.50 kV
Curved desolvation line voltage	20.0 V
Scan range	m/z = 100-500

3.6.6　液体クロマトグラフ-イオントラップ-飛行時間型質量計を用いた RAR アゴニストの構造推定

3.2.5 で精製した下水中の RAR アゴニストの化学構造を明らかにするため、**Table 3-8** に示す分析条件で LC/MS-IT-TOF 分析を行い、得られたデータを標準物質のデータと比較することにより、下水中の RAR アゴニストを同定した。なお、分析は株式会社島津製作所に委託した。

3.6.7　液体クロマトグラフ質量分析計を用いた 4-oxo-RA 類および河川水試料の分析

河川水中の RAR アゴニストが 4-oxo-RA 類であるか否かを検証するため、**Table 3-9** に示す条件を用いて、LC/MS 分析を行った。

3.6.8　液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いた河川水試料の分析

河川水中の RAR アゴニストの構造を推定するために、**Table 3-10**、**Table 3-11** に示す分析条件を用いて、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)分析を行った。

Table 3-8 Conditions for identification of RAR agonists in wastewater sample using LC/MS-IT-TOF.

System	LC/MS-IT-TOF (Shimadzu)
Mobile phase	10 mM Ammonium acetate/MeOH
Isocratic condition	10 mM Ammonium acetate conc. (%):MeOH conc. (%)=20:80
Column temperature	40 ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (150 mm×2.0 mmϕ)
Flow rate	0.2 mL/min
Interface	ESI (Positive ion mode)
Nebulizing gas flow	1.5 L/min
Drying Gas	0.1 MPa
Probe voltage	4.5 kV
Curved desolvation line temperature	200 ºC
Block temperature	200 ºC
Scan range	m/z = 150-500
Selective Ion Mode	RAs: m/z=315.20, 4-oxo-RAs: m/z=301.22

Table 3-9 Conditions for analysis of RAR agonists in river water sample and 4-oxo-RAs using LC/MS.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-20A (Shimadzu)
Degasser	DGU-20A$_3$ (Shimadzu)
Mass Spectrometer	LCMS-2010EV (Shimadzu)
Mobile phase	100 mM Ammonium acetate/MeOH
Gradient condition	MeOH conc.:0-5 min, 70%; 5-26 min, 70-97%; 26-28 min, 97%; 28-30 min, 70%
Column temperature	40 ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mmϕ)
Flow rate	1.0 mL/min
Interface	ESI (Negative ion mode)
Nebulizing gas flow	1.5 L/min
Probe voltage	-3.5 kV
Curved desolvation line temperature	250 ºC
Block temperature	200 ºC
Detector voltage	-1.50 kV
Curved desolvation line voltage	20.0 V
Selective Ion Mode	m/z = 313

Table 3-10 Conditions for analysis of RAR agonists in river water sample using LC/MS/MS.

System	ACQUITY UPLC (Waters)
Mobile phase	50 mM Ammonium acetate/MeOH
Isocratic condition	50 mM Ammonium acetate conc. (%):MeOH conc. (%)=30:70
Column temperature	40 ºC
Column	BEH C18 (100 mm×2.1 mmϕ)
Flow rate	0.2 mL/min

Table 3-11 Conditions for analysis of RAR agonists in river water sample using LC/MS/MS.

System	ACQUITY UPLC (Waters)
Mobile phase	50 mM Ammonium acetate/ CH_3CN
Isocratic condition	50 mM Ammonium acetate conc. (%):CH_3CN conc. (%)=30:70
Column temperature	40 ºC
Column	BEH C18 (100 mm×2.1 mmϕ)
Flow rate	0.2 mL/min

3.7　結果および考察

3.7.1　下水中に含まれる RAR アゴニストの同定

3.7.1.1 HPLC 分画による活性画分の特定

下水中の RAR アゴニストを特定するために、2009 年 6 月に WWTP-A、C、E、F から採取した最初沈澱池越流水を **Table 3-3** に示す条件で HPLC に供し、2 分間隔で画分を分取した。各画分の相対 RAR アゴニスト活性を測定したところ、いずれの試料においても保持時間(Retention time; RT)24-26 分および 26-28 分の連続する画分に最も高い相対 RAR アゴニスト活性が確認された(**Fig. 3-3**)。また、RT 34-36 分の画分においても、相対 RAR アゴニスト活性が認められた(**Fig. 3-3**)。さらに、WWTP-A において、2009 年 3 月、4 月、7 月に調査したところ、同様に RT 24-26 分、26-28 分の連続した画分および RT 34-36 分の画分において、相対 RAR アゴニスト活性が確認された(**Fig. 3-4**)。このことから、下水中に存在する主要な RAR アゴニストは服す存在しているが、処理場や時期によらず同一の物質である可能性が示唆された。

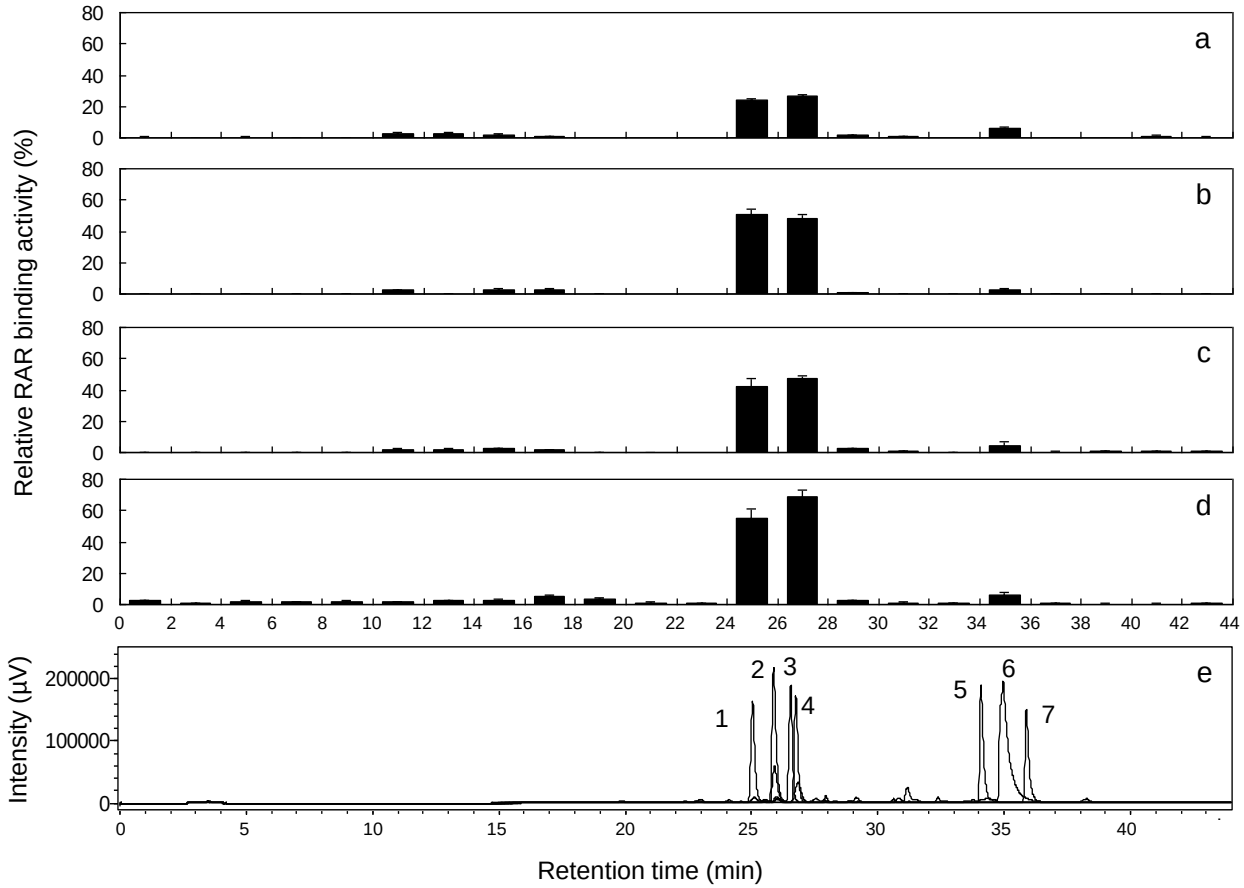

Fig. 3-3 RAR agonistic activity in the first HPLC fractionation of influent samples collected from WWTPs-A (a), -C (b), -E (c), and –F (d) in June 2009. Results at a concentration factor of 100 are presented. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Bottom panel (e) shows the HPLC chromatograms of 4-hydroxy-atRA (peak 1), 4-oxo-atRA (peak 2), 4-oxo-13cRA (peak 3), 4-oxo-9cRA (peak 4), 13cRA (peak 5), atRA (peak 6), and 9cRA (peak 7). The detection wavelength was 360 nm.

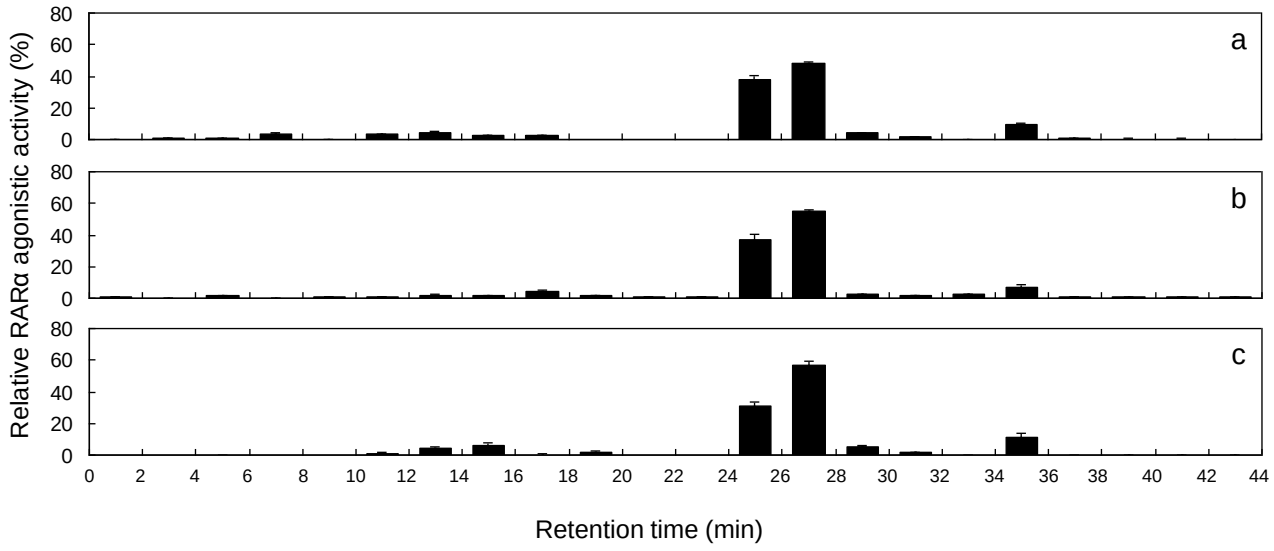

Fig. 3-4 RAR agonistic activity in the first HPLC fractionation of influent samples collected from WWTP-A in March (a), April (b) and July (c), 2009. Results at a concentration factor of 100 are presented. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

3.7.1.2 HPLC 分画による活性画分の精製

3.3.1.1 で顕著な RAR アゴニスト活性が確認された画分について、RT 24-28 分の画分を活性画分 I、RT 34-36 分の画分を活性画分 II と命名し、2009 年 7 月に採取した WWTP-A の最初沈澱池越流水を用いて、活性画分 I、II に含まれる RAR アゴニスト精製を行った。活性画分 I、II を **Table 3-4** に示す条件で HPLC に供したところ、活性画分 I は RT 21-27 分、活性画分 II は RT 31-34 分にピークが検出された(**Fig. 3-5 (a, c)**)。これらの範囲を 0.5 分間隔で分画し、分画試料の RAR アゴニスト活性を測定したところ、活性画分 I では RT 22.5-25 分(活性画分 I’)、活性画分 II では RT 31.5-33 分(活性画分 II’)に顕著な活性が検出された(**Fig. 3-5 (b, d)**)。そこで、活性画分 I’、活性画分 II’を **Table 3-5** に示す条件で HPLC 分析に供したところ、LC クロマトグラムにおいて、活性画分 I’では 4 つ(A～D)、活性画分 II’では 5 つ(E～I)のピークが検出された(**Fig. 3-6 (a, c)**)ため、さらにこれらのピークを分取し、RAR アゴニスト活性を測定したところ、ピーク A(RT 5.9 分)、B(RT 7.0 分)、C(RT 8.4 分)、E(RT 18.9 分)、F(RT 19.9 分)において顕著な RAR アゴニスト活性が検出された(**Fig. 3-6 (b, d)**)。これらの活性ピークのうち、ピーク A、B、E、F は別の日に採取した下水試料においても検出されたことから、ピーク A、B、E、F の 4 つが都市下水中に普遍的に存在する主要な RAR アゴニストであると考えられた。

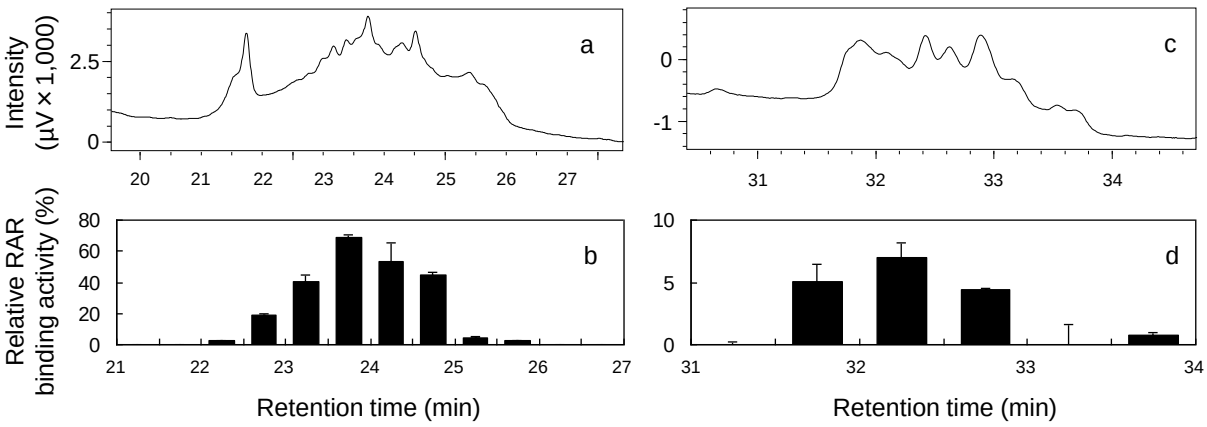

Fig. 3-5 HPLC chromatograms (a, c) and RAR agonistic activity (b, d) in the second HPLC fractionation. Results of bioactive fraction I (a, b) and II (c, d) obtained in the first HPLC fraction of influent sample collected from WWTP-A in July 2009 are shown. Concentration factors of the samples in HPLC analyses and RAR agonistic activity measurements were 5,000 and 100, respectively. The detection wavelength was 360 nm. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

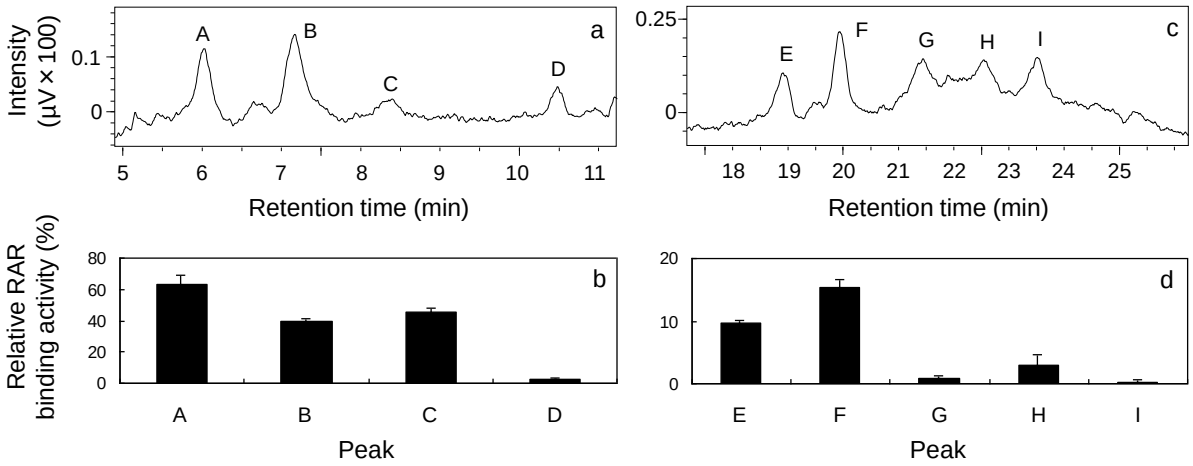

Fig. 3-6 HPLC chromatograms (a, c) and RAR agonistic activity (b, d) of bioactive fraction I' (a) and II' (c), which were obtained in the second HPLC fractionation of influent sample collected from WWTP-A in July 2009, in the third HPLC fraction and RAR agonistic activity of peaks isolated from bioactive fractions I' (b) and II' (d). Concentration factors of the samples in HPLC analyses and RAR agonistic activity measurements were 5,000 and 100, respectively. The detection wavelength was 360 nm. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

3.7.1.3 MS 分析による下水中の RAR アゴニストの同定

活性ピーク A、B、E、F の化学物質を同定するために、候補物質の絞り込みを行った。本研究で調査した下水処理場には主に家庭排水が流入しており、また、第 2 章に示したように RAR アゴニストは下水中に常に存在していることから、下水中の主要な RAR アゴニストは天然由来であると想定された。そこで、天然の RAR アゴニストである RA 類、4-oxo-RA 類および 4-hydroxy-atRA を **Table 3-3** に示す条件で HPLC 分析に供したところ、各物質の RT が活性画分 I および活性画分 II と重なっていたため(**Fig. 3-3**)、これらの天然物質が下水中の RAR アゴニストの原因物質の候補であると考えられた。このことを検証するために、**Table 3-8** に示す条件で、LC/MS-IT-TOF 分析を用いた精密 MS 分析により、RAR アゴニスト活性を示したピークを解析したところ、ピーク A では、4-oxo-atRA と同様に、*m/z* 315.20 のフラグメントイオンが RT 5.0 分に検出された(**Fig. 3-7 (a, b)**)、ピーク B では、4-oxo-13cRA と同様に、*m/z* 315.20 のフラグメントイオンが RT 5.7 分に検出され(**Fig. 3-7 (c, d)**)、ピーク E では、13cRA と同様に、*m/z* 301.22 のフラグメントイオンが RT 17.9 分に検出された(**Fig. 3-7 (e, f)**)。また、ピーク F においては、atRA と同様に、*m/z* 301.22 のフラグメントイオンが RT 17.1 分に検出された(**Fig. 3-7 (g, h)**)。以上の結果から、ピーク A、B、E、F はそれぞれ 4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA、13cRA、atRA であることを、ほぼ確認することができ、これらの天然の RA 類(atRA、13cRA)およびその酸化代謝物(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)が、日本の下水中の主要な RAR アゴニストであることが示唆された。中国の下水で RAR アゴニストの推定を試みた Zhen ら(2009)の研究では、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA の存在が明らかにされており、本章の結果と一致しているが、ここではそれらに加えて、親物質である atRA および 13cRA も存在していることが明らかとなった。

3.7.1.4 RA 類および 4-oxo-RA 類の発生経路

3.3.1.3 で下水中の主要な RAR アゴニストとして同定された atRA、13cRA、4-oxo-atRA、および 4-oxo-13cRA の発生経路について検討した。推定された 4 物質の発生経路を **Fig. 3-8** に示す。3.3.1.3 に述べた通り、WWTP-A を含め、本研究で調査した下水処理場の流入の大部分が生活排水であることから、同定した RAR アゴニストは主に人の排泄物由来であると推察される。RA 類は、食物由来の β-カロテンが人の体内で代謝されて生じ、さらに代謝をされて 4-oxo-RA 類などの代謝物を生成する。その後、RA 類とその代謝物は RAR アゴニスト活性のないグルクロン酸抱合体の形で体外に排泄されるが(Li et al., 1996; Marill et al., 2003)、グルクロン酸抱合体は微生物作用によって容易に脱抱合化されることが知られている(Ternes *et al*., 1999; Gomes et al., 2009)。このことから、抱合体化された RA 類および 4-oxo-RA 類が人から排泄された後、下水処理場に流入するまでに脱抱合化され、活性を有する元の物質に変換されたものと推察された。

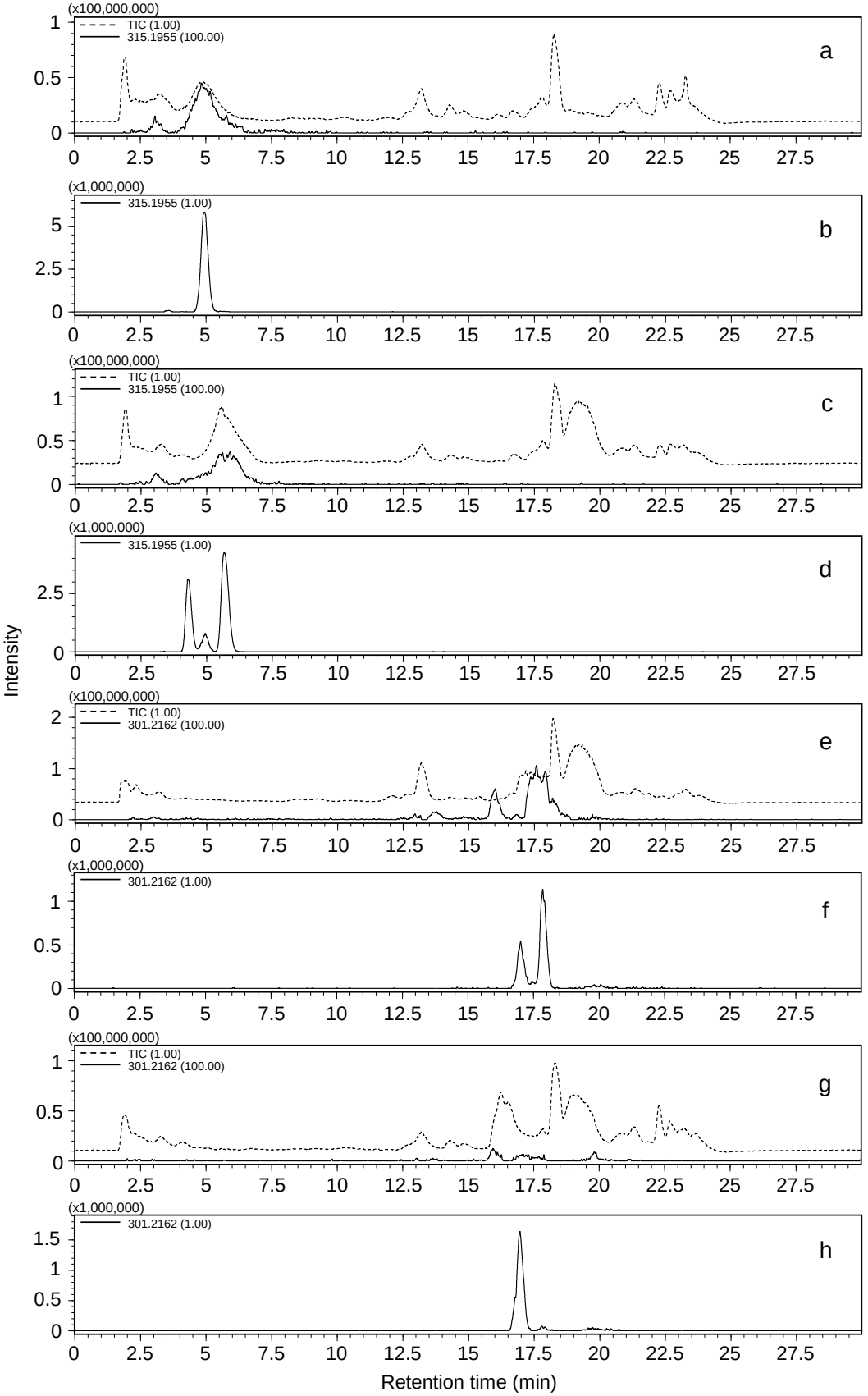

Fig. 3-7 Mass chromatograms of peak A (a), B (c), E (e), and F (g) obtained from third HPLC fractionation and 4-oxo-atRA (b), 4-oxo-13cRA (d), 13cRA (f) and atRA (h) analyzed by LC/MS-IT-TOF system.

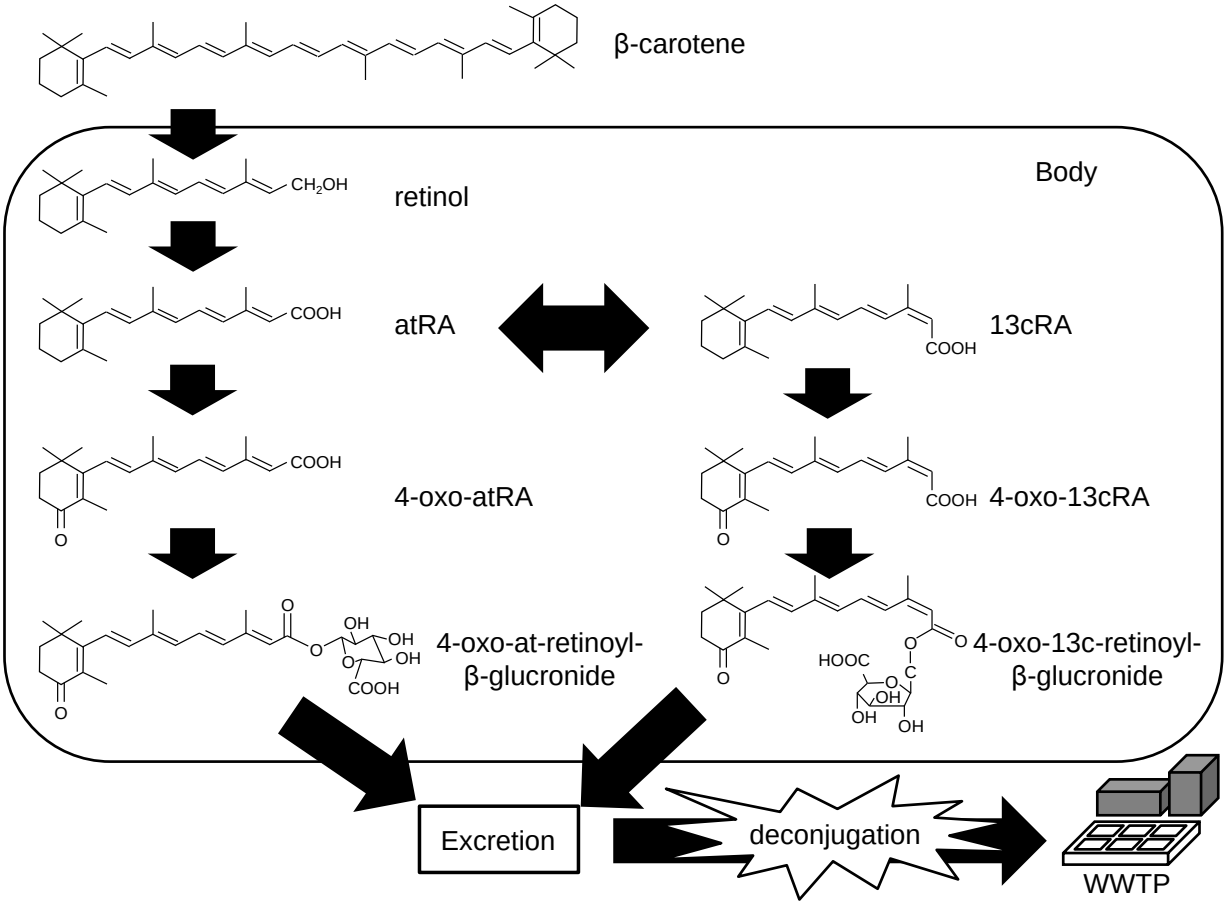

Fig. 3-8 Developmental pathway of RAs and 4-oxo-RAs.

3.7.1.5 下水中の RAR アゴニストの RAR アゴニスト活性の評価

3.3.1.3 で下水中から特定した atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA の RAR アゴニスト活性を評価するため、酵母 two-hybrid 法を用いて用量反応性を調査した。各物質における最大活性値を 100%とした時の用量反応曲線を **Fig. 3-9** に示す。この用量反応曲線を基に atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA の EC50 値を求めたところ、それぞれ 1.6×10^{-9} M、2.4×10^{-7} M、5.8×10^{-10} M、4.2×10^{-10} M となり、atRA 等価係数はそれぞれ 1、0.0066、2.7、0.39 となった。このことから、これら 4 物質の RAR アゴニスト活性は 4-oxo-atRA > atRA > 4-oxo-13cRA > 13cRA の順に強いことが明らかとなった。Zhen ら(2009)は、atRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA の RAR アゴニスト活性の関係は 4-oxo-atRA > atRA > 4-oxo-13cRA であると報告し、Wu ら(2010)の報告でも、atRA > 4-oxo-9cRA > 9cRA > 13cRA の関係が示されており、本研究の結果は妥当であるといえる。

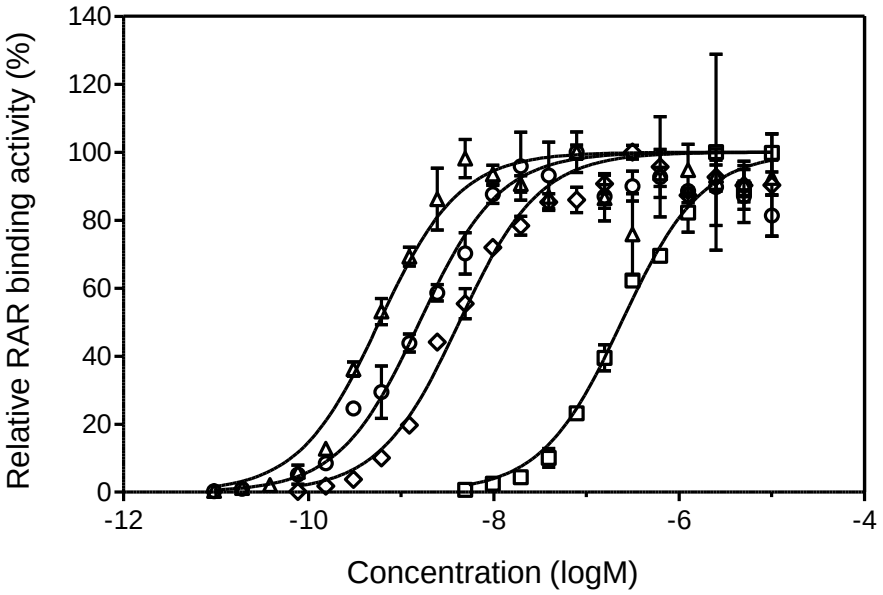

Fig. 3-9 Dose-response curves of RAR agonistic activity of atRA (circle), 13cRA (square), 4-oxo-atRA (triangle), and 4-oxo-13cRA (diamond). Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

3.7.2　河川水中に含まれる RAR アゴニストの同定の試み

3.7.2.1 HPLC 分画による活性画分の特定

河川水中に存在する RAR アゴニスト活性を特定するため、下水系における RAR アゴニストの特定と同様に、まず、2007 年 8 月の琵琶湖-淀川水系の地点 2、および猪名川水系の地点 5、地点 18 より採取した河川表層水試料を **Table 3-3** に示す HPLC に供し、2 分間隔で画分を分取した。各画分の RAR アゴニスト活性を測定したところ、いずれの試料においても RT 24-26 分の画分(活性画分 III)に最も高い相対 RAR アゴニスト活性が確認された(**Fig. 3-10**)。また、一部の試料においては、活性画分 III に加えて、RT 20-22 分の画分(活性画分 VI)においても、顕著な相対 RAR アゴニスト活性が認められた(**Fig. 3-10**)。さらに、2009 年 4 月、8 月、10 月、12 月、2010 年 1 月に猪名川水系の地点 18 について調査したところ、RT 24-26 分の画分(活性画分 III)において、相対 RAR アゴニスト活性が確認された(**Fig. 3-11**)。また、一部の試料において、同様に RT 20-22 分の画分(活性画分 VI)で RAR アゴニスト活性が認められたが、活性画分 III と比べて、活性画分 VI は活性が低く、必ずしも全ての試料から検出されなかったため、3.3.2.2 以降の同定の対象としなかった。これらの結果から、本研究の調査対象河川水中に存在する RAR アゴニストは、場所や時期によらず同一の物質であり、少なくとも 2 種類が存在していることが示唆された。

3.7.2.2 活性画分 III における 4-oxo-RA 類の寄与に関する検討

河川水試料において、特定された RAR アゴニスト活性画分のうち、活性画分 III(RT 24-26 分)の HPLC 分析での RT は、下水中の主要な RAR アゴニストとして同定された 4-oxo-RA 類のもの(4-oxo-atRA: 26.0 分、4-oxo-13cRA: 26.6 分)と類似していたことから、活性画分 III に含まれる RAR アゴニストが 4-oxo-RA 類であるか否かを確認した。**Table 3-9** に示した条件の LC/MS 分析によって、2009 年 10 月に猪名川地

点 18 より採取した河川水試料中に含まれる 4-oxo-RA 類の検出を試みた結果、同試料から分取した活性画分 III 中の 4-oxo-atRA は検出限界値以下(<0.01 ng/L)であったが、4-oxo-13cRA は 0.20 ng/L 含まれていることが明らかとなった(**Fig. 3-12**)。しかし、3.3.1.5 の検討結果を考慮すると、本研究で RAR アゴニスト活性の測定に用いている酵母 two-hybrid 法において、4-oxo-13cRA が有意な RAR アゴニスト活性を示すためには、河川水中に最低でも 0.48 ng/L 含まれていなければならないことから、4-oxo-13cRA は活性画分 III で示された RAR アゴニスト活性を説明し得ないことが明らかとなった。以上のことから、活性画分 III に含まれる RAR アゴニストは、下水中の主要な RAR アゴニストとは異なる物質であることが示唆された。

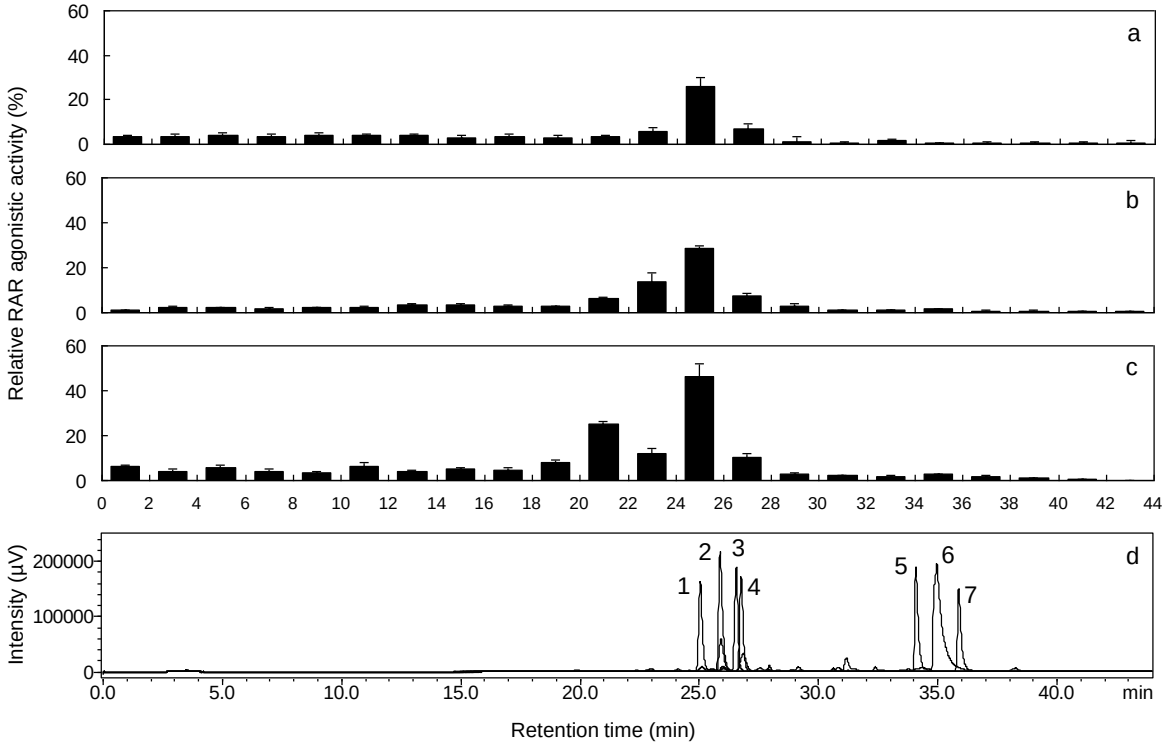

Fig. 3-10 RAR agonistic activity in the first HPLC fractionation of river water samples collected from station 2 of Yodo River (a), and stations 5 (b) and 18 (c) of Ina River in August 2007. Results at a concentration factor of 100 are presented. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements. Bottom panel (d) shows the HPLC chromatograms of 4-hydroxy-atRA (peak 1), 4-oxo-atRA (peak 2), 4-oxo-13cRA (peak 3), 4-oxo-9cRA (peak 4), 13cRA (peak 5), atRA (peak 6), and 9cRA (peak 7). The detection wavelength was 360 nm.

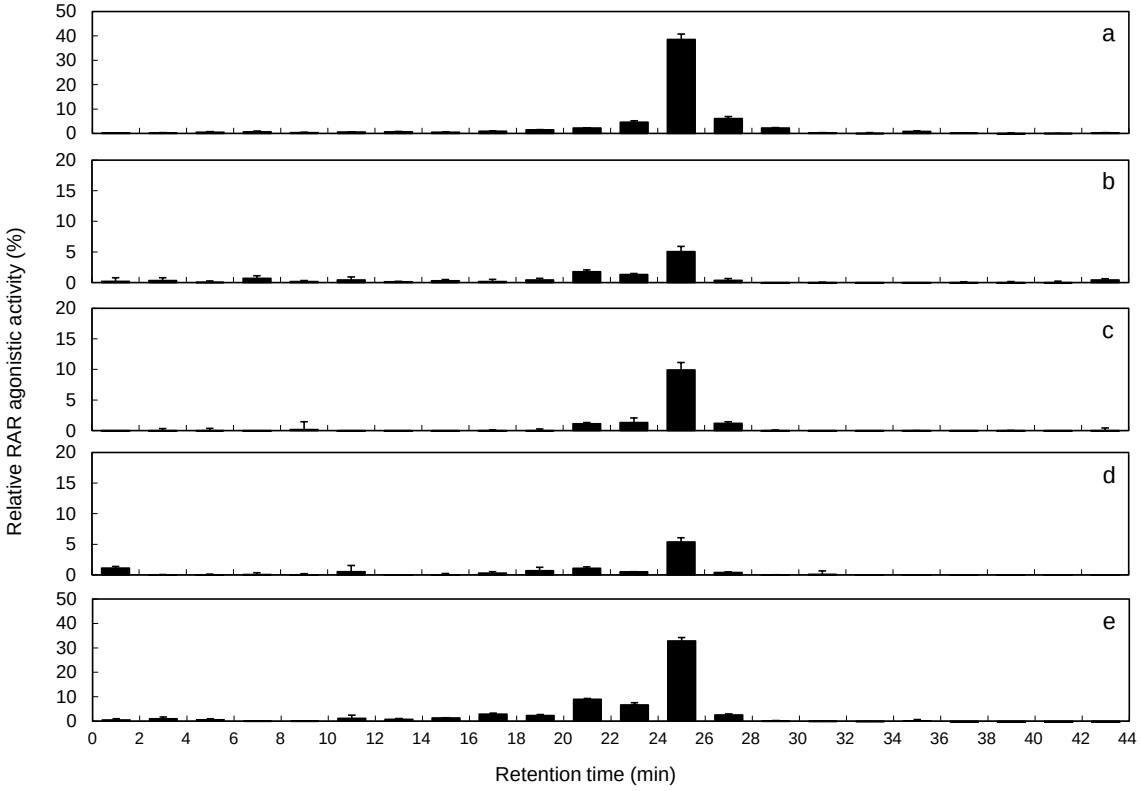

Fig. 3-11 RAR agonistic activity in the first HPLC fractionation of river water samples collected from station 18 of Ina River in April (a), August (b), October (c), December (d), 2009 and January (e), 2010. Results at a concentration factor of 100 are presented. Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

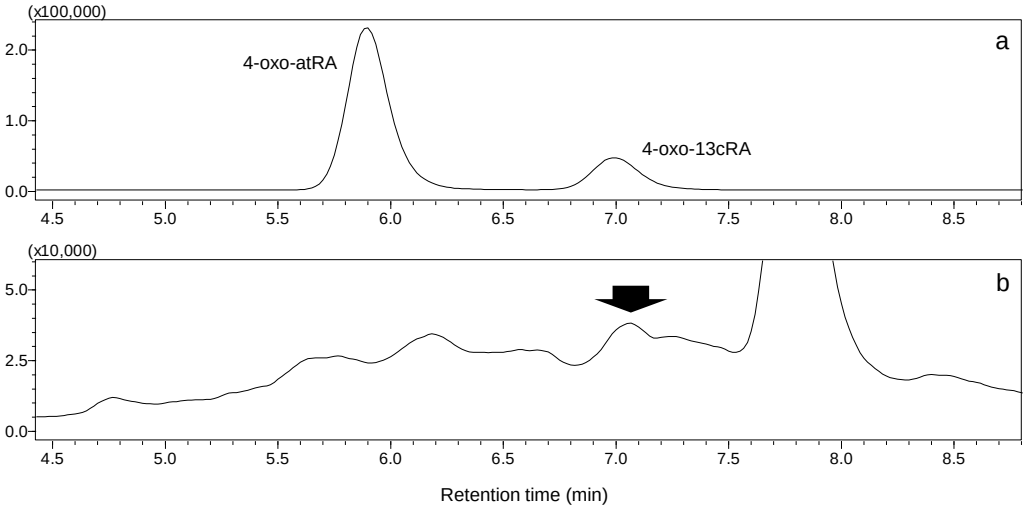

Fig. 3-12 MS chromatograms of authetic standards of 4-oxo-atRA and 4-oxo-13cRA (a) and 4-oxo-13cRA in a river water sample collected in January 2010 detected at a concentration factor of 100,000 (b) analyzed by LC/MS system. Arrow indicates the peak of that 4-oxo-13cRA was detected in river water sample.

3.7.2.3 HPLC 分画による活性画分の精製

RA 類および 4-oxo-RA 類以外の未知の RAR アゴニストが含まれることが明らかになった活性画分 III に含まれる RAR アゴニストを同定するため、その精製を試みた。活性画分 III を **Table 3-6** に示す条件で HPLC 分析に供したところ、RT 2-8 分にピークが検出された(**Fig. 3-13 (a)**)。この RT 間を 1 分間隔で分画し、RAR アゴニスト活性を測定したところ、RT 3-4 分(活性画分 III')に顕著な活性が確認された(**Fig. 3-13 (b)**)。そこで、この活性画分 III'を **Table 3-7** に示す条件で HPLC に供したところ、LC クロマトグラムにおいて、6 つのピーク(J～O)のピークが検出された(**Fig. 3-14 (a)**)。これらのピークの RAR アゴニスト活性を測定したところ、ピーク M に顕著な活性が確認されたことから(**Fig. 3-14 (b)**)、このピークを示す化学物質が河川水中の主要な RAR アゴニストであることが強く示唆された。

3.7.2.4 活性ピーク M の MS 分析

HPLC 分画で特定した活性ピーク M が示す化学物質を特定するために、活性画分 III'の LC/MS 分析から得られた MS クロマトグラムおよび MS スペクトルを解析したところ、ピーク M が検出された RT 4.0-4.4 分において、ポジティブイオンモードでは *m/z* 442、ネガティブイオンモードでは *m/z* 101 のフラグメントイオンが特異的に検出されることが確認されたが(**Fig. 3-15**)、物質の化学構造推定までには至らなかった。

そこで、さらに詳細な MS データを取得するため、活性ピーク M の LC/MS/MS 分析を実施した。**Table 3-10** に示す条件で LC/MS/MS 分析した結果、RT 1 分付近に顕著なピークが検出され(data not shown)、その MS パターンからカロテノイド類の可能性が考えられた。そこで、7 種類のカロテノイド類(アスタキサンチン、β-カロテン、β-クリプトキサンチン、カンサキサンチン、ルテイン、リコペン、ゼアキサンチン)の RAR 結合活性を測定したところ、多くの物質が微弱ながら RAR アゴニスト活性を有することが明らかとなった(**Fig. 3-16**)。既往研究でも同様に、いくつかのカロテノイド類が RAR アゴニスト活性を示すことが報告されている(Matsumoto et al., 2007)。しかし、これらカロテノイド類は、固相抽出で使用した MeOH には不溶であったことから、本研究で検出された河川水中における RAR アゴニスト汚染の原因物質ではないものいえる。また、**Table 3-11** に示す条件による活性ピーク M の LC/MS/MS 分析の結果、RT 3.0 分および 4.5 分に顕著なピークが検出され、MS/MS 分析によって各々のピークの親 MS の *m/z* が 424 および 279 であることが明らかとなった(data not shown)。これらのいずれか、あるいは両方が河川水中の主要な RAR アゴニストであると考えられたが、物質特定には至らなかった。

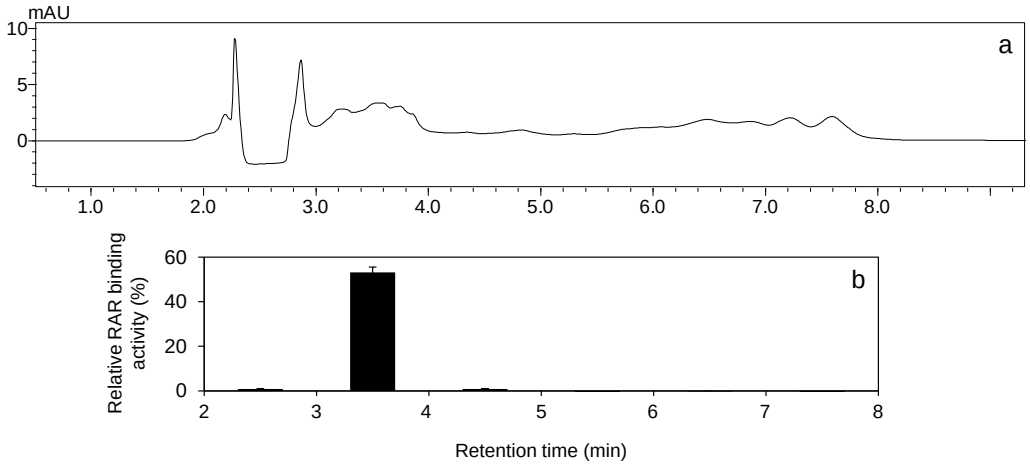

Fig. 3-13 HPLC chromatogram (a) and RAR agonistic activity (b) of HPLC fractions obtained in the second HPLC fractionation. Results of the bioactive HPLC fraction at RT of 24 to 26 min obtained from the first HPLC fractionation of a river water sample collected in January 2010 are shown. Concentration factors of the sample in HPLC analysis and measurement of RARα agonistic activity are 10,000 and 500, respectively. Data for RARα agonistic activity are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

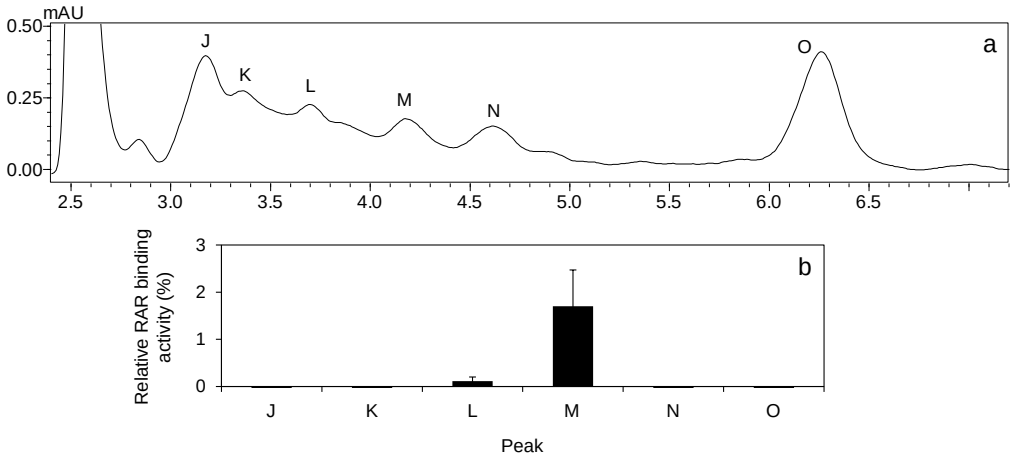

Fig. 3-14 LC chromatograms (a) and RARα agonistic activity (b) of HPLC fraction in the third HPLC fractionation. Results of the bioactive HPLC fraction at RT of 3 to 4 min obtained from the second HPLC fractionation of a river water sample collected in January 2010 are shown. Concentration factors of the sample in HPLC and MS analyses, and measurement of RARα agonistic activity are 10,000 and 500, respectively. Data for RARα agonistic activity are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

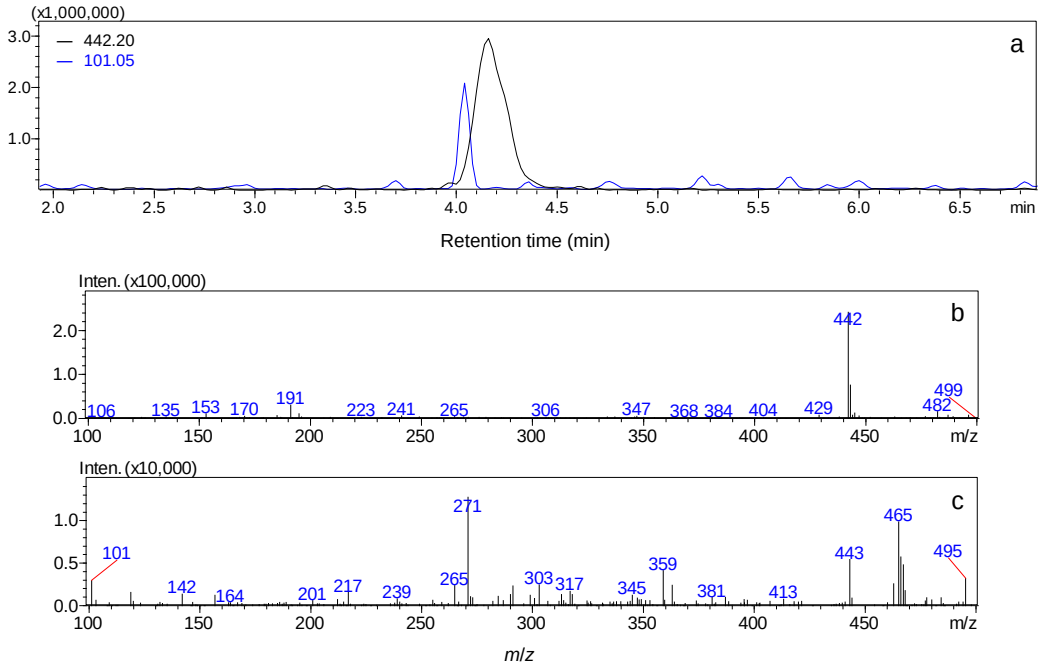

Fig. 3-15 MS chromatograms obtained from selected ion monitoring of fragment ions (*m/z* 101 in the negative ion mode and *m/z* 442 in the positive ion mode) specifically detected peak M in the third HPLC fractionation of a river water sample collected in January 2010 (a) and MS spectra of *m/z* 101 in the negative ion mode (c) and *m/z* 442 in the positive ion mode (b). Concentration factor of the sample in MS analysis is 10,000. Retention time of MS spectra is RT 4.0 to 4.4 min.

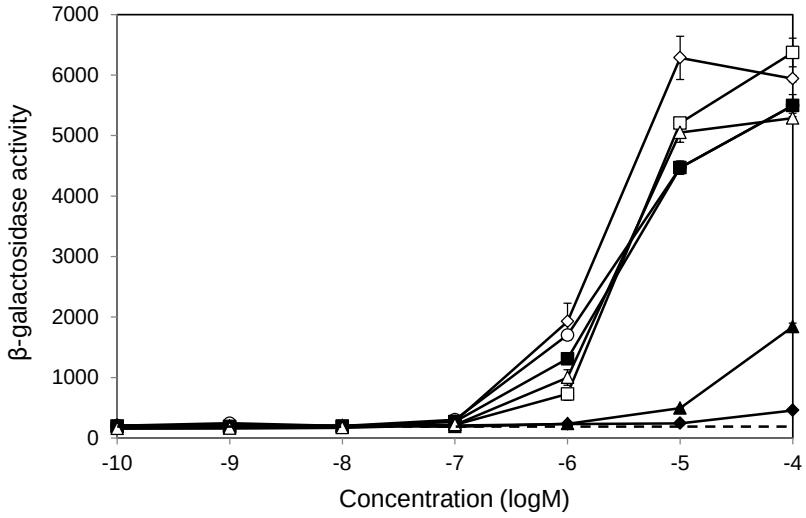

Fig. 3-16 Dose-response curves of β-galactosidase activity of DMSO (dotted line), astaxanthin (open circle), β-carotene (closed triangle), β-cryptoxanthin (open triangle), canthaxanthin (closed square), lutein (open square), lycopene (closed diamond), and zeaxanthin (open diamond). Data are shown as mean ± standard derivation in triplicate measurements.

3.8　要約

本章では、第 2 章で顕著な相対 RAR アゴニスト活性を示した下水、および河川水中に含まれる RAR アゴニストを HPLC による分画・精製し、LC/MS-IT-TOF や LC/MS/MS 分析により、同定することを試みた。

下水中に存在する RAR アゴニストは、処理場や時期によらず同一のものと考えられ、その主要なものは RA 類(atRA、13cRA)およびその酸化代謝物(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)であることが明らかとなった。これら 4 物質は、食物由来の β-カロテンが人の体内で代謝され生じ、グルクロン酸抱合体の形で体外に排泄されて下水中に混入し、微生物作用によって脱抱合化されて生成したものと考えられた。

一方、河川水中の主要な RAR アゴニストも複数存在し、場所や時期によらず同一の物質であると考えられたが、この研究の範囲では活性を有するピークを特定することはできたものの、物質を同定するまでには至らなかった。ただし、下水中で特定された 4 物質(atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)とは異なる物質であることが確認され、親 MS の *m*/*z* が 424 および／あるいは 279 であることが示唆された。

第5章　下水処理系におけるレチノイン酸類および 4-oxo-レチノイン酸類の挙動の解明

4.5　はじめに

第 3 章で述べたように、下水中の主要な RAR アゴニストは、人の排泄物由来と考えられる天然の RA 類(atRA、13cRA)およびその酸化代謝物(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)であり、処理場や季節によらず普遍的に存在していることが明らかとなった。これら特定された RA 類および 4-oxo-RA 類が下水処理系において、どの程度除去され、どのようなプロセスによって除去が行われるのか明らかにするために、都市下水中に含まれる RA 類および 4-oxo-RA 類の下水処理過程での挙動の詳細について調査する必要がある。そこで本章では、下水中の主要な RAR アゴニストとして同定された 4 物質の下水処理プロセスにおける挙動を明らかにすることを目的として、LC/MS を用いた RA 類および 4-oxo-RA 類の定量分析手法を確立したうえで、様々な活性汚泥処理方式を採用している 6 つの都市下水処理場において、処理過程における 4 物質の挙動および RAR アゴニスト活性の推移を調査した。また、回分式活性汚泥リアクターを用いて、ラボでの 4 物質の処理試験を実施し、活性汚泥処理における 4 物質の除去機構の解明を試みた。

4.6　実験方法

4.6.1　化学物質

atRA、13cRA、DMSO、CH_3CN、MeOH、アセトン、尿素、NaCl、KCl は Sigma-Aldrich から購入した。4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA は Toronto Research Chemicals、ペプトンは Becton, Dickinson and Company、Na_2HPO_4・$12H_2O$、KH_2PO_4、$CaCl_2$・$2H_2O$、$MgSO_4$・$7H_2O$、酢酸、トリポリリン酸ナトリウムはキシダ化学株式会社から購入した。また、カツオエキスは極東製薬工業株式会社、酢酸アンモニウムは和光純薬工業株式会社より購入した。なお、本研究で用いた合成下水の組成は、カツオエキス 200 mg/L、ペプトン 300 mg/L、尿素 50 mg/L、Na_2HPO_4・$12H_2O$ 41.8 mg/L、KH_2PO_4 6.8 mg/L、NaCl 15 mg/L、KCl 7.0 mg/L、$CaCl_2$・$2H_2O$ 9.27 mg/L、$MgSO_4$・$7H_2O$ 10.25 mg/L である。

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定に使用する標準リガンドは、第 2 章 2.2.1 に準じ、LC/MS 分析に使用する標準物質は、第 3 章 3.2.1 に準じてストック溶液を作成した。

4.6.2　供試試料

本章では、下水(最初沈澱池越流水)、下水処理水(最終沈澱池越流水、塩素処理後放流水)の各試料を、大阪府下の 6 つの都市下水処理場(WWTP-A、B、C、D、E および F)より採取し、各試料中の RA 類および 4-oxo-RA 類の消長を調査した。WWTP-A および WWTP-B は CAS 法, WWTP-C は CAS 法および A2O 法，WWTP-D は CAS 法およびステップ流入式多段硝化脱窒(STEP)法，WWTP-E は AO 法，WWTP-F は CAS 法および A2O 法を採用している(**Fig. 4-1**)。WWTP-A, WWTP-C, WWTP-D, WWTP-E および WWTP-F の CAS 法は合流式であり(WWTP-A，WWTP-C，WWTP-D は一部分流を含む)，WWTP-B，WWTP-F の A2O 法は分流式である。各処理場の流入水における生活排水の割合は，WWTP-A，WWTP-B，WWTP-C および WWTP-F は 9 割以上，WWTP-D は 7 割以上、WWTP-E は 6 割以上であった。これら下水処理場における RA 類および 4-oxo-RA 類の定量調査は、2010 年 3 月(春季)および 7-8 月(夏季)の晴天日に 10-14 時の間に採取した試料を用いて行った。採取した各試料は、水温、pH を測定した後、氷冷下で実験室まで運搬し、DOC は TOC-V_{CSH}(Shimadzu)を用いた TCIC 法により測定し、T-N の測定、ならびに固相抽

出に供した。各試料の水質測定結果を **Table 4-1** に示す。

なお、RA 類および 4-oxo-RA 類の分析手法の確立に使用した試料には、WWTP-A において、2009 年 7 月から 2010 年 2 月にかけて採取したものを使用した(最初沈澱池越流水 3 試料、最終沈澱池越流水 4 試料)。

4.6.3　活性汚泥による RA 類および 4-oxo-RA 類の回分処理試験

ラボにおける RA 類および 4-oxo-RA 類の回分処理試験には、合成下水で長期間馴養した活性汚泥(A 汚泥)ならびに WWTP-A より採取した返送汚泥(B 汚泥)を用いた。実験は **Table 4-2** に示すように、活性汚泥、ホルマリンで不活性化させた汚泥を添加した系を、それぞれ実験系 I、実験系 II とした。各実験系の除去機構は、実験系 I では、生分解、汚泥吸着、化学分解、実験系 II では、汚泥吸着、化学分解によって、各物質が除去されるものと考える。なお、活性汚泥の不活性化は、A 汚泥は 10%ホルマリン、B 汚泥は 100%ホルマリンに一晩浸漬して行い、滅菌した 5 mg/L トリポリリン酸ナトリウム水溶液で 2 回洗浄して試験に用いた。1L 容ビーカーに、滅菌した合成下水を入れ、そこに活性汚泥(実験系 I)、あるいは不活性化させた汚泥(実験系 II)をそれぞれ 1,000 mg-SS/L の濃度となるよう添加した系を作製した(**Table 4-2**)。作製した各実験系は、25°C に保ったインキュベーター内に入れ、散気球で空気曝気を行うとともに、スターラーバーにて 500 rpm で撹拌し、atRA、13cRA、4-oxo-atRA、および 4-oxo-13cRA をそれぞれ 10 μg/L となるように全て添加、あるいは 4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA をそれぞれ 10 μg/L となるように単独で添加して、処理試験を行った。処理試験は 10 時間で実施し、試験中は、適宜試料の一部を採取して、固相抽出あるいは汚泥抽出に供した。

4.6.4　試料の前処理

下水および下水処理水中の RA 類および 4-oxo-RA 類の LC/MS による定量分析方法を確立するため、試料に 4 物質を添加して、固相抽出後に分析する添加回収試験を行った。ここでの各試料は、第 2 章 2.2.3 に示した方法に準じて、**Table 4-3** に示す条件により固相抽出を行い、カートリッジに捕捉された化学物質の溶出液を濃縮・乾固させた後、MeOH に転溶して LC/MS 分析に供した。

一方、下水処理系における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動調査、および活性汚泥による RA 類および 4-oxo-RA 類の回分処理試験においては、各試料は第 2 章 2.2.3 に示した方法に準じて固相抽出を行い、分析に供した。固相抽出は各試料につき 2 本ずつ行い、その内 1 本は RAR アゴニスト活性測定用として、超純水 6 mL で洗浄した。残りの 1 本は RA 類および 4-oxo-RA 類の定量分析用として 40% CH_3CN 6 mL を用いて洗浄した。洗浄後のカートリッジは、十分に乾燥させた後、MeOH 6 mL で捕捉された物質を溶出した。溶出液を窒素気流下で濃縮・乾固させた後、活性測定用の試料は DMSO に転溶し、定量分析用の試料は MeOH に転溶した。転溶後の各試料は-20°C で保存し、分析前に同溶媒を用いて適宜希釈した。

4.6.5　酵母 two-hybrid 法

酵母 two-hybrid 法による RAR アゴニスト活性の測定は、第 2 章 2.2.4 に示した方法に準じて行い、測定結果を基に相対 RAR アゴニスト活性を算出した。さらに、式(2-3)に従って、atRA-EQ_{bio} 値を算出した。

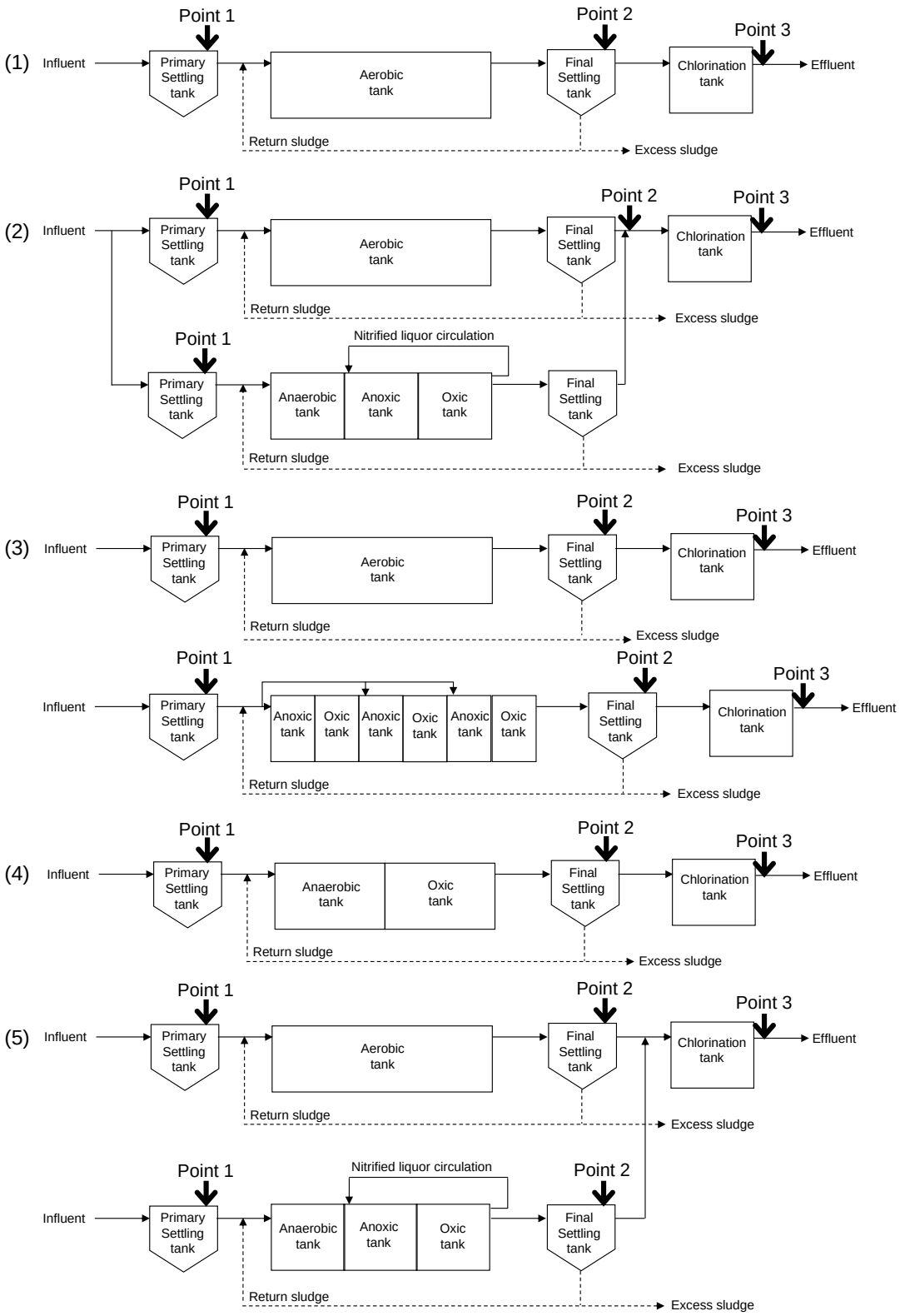

Fig. 4-1 Process schemes in WWTP-A and WWTP-B (1), WWTP-C (2), WWTP-D (3), WWTP-E (4) and WWTP-F (5). Sampling points are indicated with arrows: Point 1, the terminal of the primary settling tank; point 2, the terminal of the final settling tank (after mixing the effluents from two final settling tank effluents in WWTP-C); point 3, after the chlorination tank.

Table 4-1 Characteristics of samples in WWTPs used in this study

WWTP	Biological treatment [a]	Sample	Sampling data	Temperature (°C)	pH	DOC (mg/L)[b]	T-N (mg/L)[c]
A	CAS	Point 2	July 30, 2009	28.3	NA [d]	5.6	3.3
		Point 1	October 28, 2009	25.6	7.0	40.4	13.7
		Point 2	November 20, 2009	23.7	6.8	16.7	5.4
		Point 1	December 2, 2009	22.4	7.4	60.4	14.2
		Point 2	December 22, 2009	20.9	6.7	5.8	17.7
		Point 2	January 19, 2010	19.5	6.7	10.8	19.3
		Point 1	February 25, 2010	19.8	6.8	47.2	32.2
		Point 1	March 12, 2010	19.8	6.8	31.3	28.5
		Point 2		20.9	6.7	8.7	15.9
		Point 3		20.9	6.8	14.9	11.5
		Point 1	August 3, 2010	30.0	7.2	33.2	27.2
		Point 2		30.5	7.1	8.1	11.9
		Point 3		30.5	7.1	3.7	9.7
B	CAS	Point 1	March 11, 2010	16.9	7.8	21.6	23.6
		Point 2		18.0	6.2	6.1	12.9
		Point 3		17.9	6.4	3.0	13.2
		Point 1	July 27, 2010	29.7	7.6	24.2	31.2
		Point 2		30.4	7.2	4.7	10.5
		Point 3		30.3	7.3	5.3	12.0
C	CAS	Point 1	March 11, 2010	16.2	6.8	13.2	22.5
	A2O	Point 1		16.4	6.7	18.0	18.1
	CAS+A2O	Point 2		16.0	6.7	3.9	6.2
		Point 3		16.4	6.5	6.2	6.5
	CAS	Point 1	July 27, 2010	28.0	7.3	25.9	22.1
	A2O	Point 1		27.8	7.2	26.3	19.0
	CAS+A2O	Point 2		29.2	6.8	6.4	3.3
		Point 3		28.7	6.8	2.0	3.0
D	CAS	Point 1	March 19, 2010	17.7	7.5	17.6	23.1
		Point 2		18.3	7.1	13.7	15.5
		Point 3		18.5	6.0	9.9	14.7
	STEP	Point 1		18.7	7.1	12.3	18.3
		Point 2		18.7	6.4	2.2	3.2
		Point 3		18.5	6.6	6.0	7.1
	CAS	Point 1	August 9, 2010	28.3	7.2	16.7	20.7
		Point 2		28.8	6.8	3.1	7.8
		Point 3		28.9	6.9	1.7	7.6
	STEP	Point 1		28.0	7.1	15.1	15.6
		Point 2		28.6	6.8	0.9	3.2
		Point 3		28.6	7.2	1.6	4.4
E	AO	Point 1	March 12, 2010	18.3	6.9	29.5	22.9
		Point 2		19.3	6.3	3.5	8.7
		Point 3		19.3	6.2	3.9	9.4
		Point 1	August 3, 2010	29.0	7.4	23.8	24.0
		Point 2		29.5	6.8	5.0	5.1
		Point 3		29.4	6.9	9.7	7.0
F	CAS	Point 1	March 18, 2010	18.4	6.5	7.4	23.4
		Point 2-1		19.1	6.3	3.2	7.2
		Point 2-2		19.0	6.4	2.6	5.9
	A2O	Point 1		18.4	7.3	17.8	33.4
		Point 2		19.0	6.3	3.2	7.2
	CAS+A2O	Point 3		19.0	6.2	5.4	6.2

Table 4-1 (continued).

WWTP	Biological treatment	Sample	Sampling data	Temperature (°C)	pH	DOC (mg/L)	T-N (mg/L)
F	CAS	Point 1	August 5, 2010	29.5	6.9	17.9	15.2
		Point 2-1		29.7	6.5	2.1	5.4
		Point 2-2		29.8	6.6	4.7	6.4
	A2O	Point 1		29.4	7.0	13.2	15.4
		Point 2		29.4	6.5	NA	9.1
	CAS+A2O	Point 3		29.7	6.8	3.5	7.5

[a] CAS, conventional activated sludge process; AO, anoxic-oxic process; A2O, anaerobic-anoxic-oxic process; STEP, step-feed multi-stage nitrification-denitrification process.

[b] Dissolved organic carbon.

[c] Total nitrogen.

[d] Not analyzed.

Table 4-2 Conditions of experimental systems.

System	Activated sludge	Inactivated sludge	Synthetic wastewater	RAs and/or 4-oxo-RAs	Stirring	Aerattion	Removal mechanism
I	+	-	+	+	+	+	B+A+C
II	-	+	+	+	+	+	A+C

[a] B, biodegradation; A, adsorption; C, chemical degradation.

4.6.6　高速液体クロマトグラフによる RAR アゴニストの分取

Table 3-4 に示す条件で HPLC を用いて、下水中の RAR アゴニストが含まれる画分、および 4-oxo-RA 類を単独添加した回分処理試験で得られた試料の分取を行った。

4.6.7　液体クロマトグラフ質量分析計を用いた RA 類および 4-oxo-RA 類の定量分析

各試料中に含まれる RA 類および 4-oxo-RA 類を定量するため、**Table 4-4** に示す分析条件を用いて、LC/MS 分析を行った。下水処理系における挙動調査の際には、LC/MS 分析で得られた定量値と後述する回収率に基づき、試料中の RA 類および 4-oxo-RA 類の濃度を求めた。また、下式(4-1)に従って、第 3 章 3.3.1.5 において評価した 4 物質の atRA 等価係数(atRA:1、13cRA:0.0067、4-oxo-atRA:2.8、4-oxo-13cRA:0.38)を各物質の濃度に乗じ、これらの総和を、4 物質の濃度に依存する atRA 当量値(atRA-EQ_{chem} 値)として算出した。

$$\begin{aligned} \mathrm{atRA\text{-}EQ_{chem}}(\mathrm{ng/L}) &= 1\times \mathrm{atRA}\text{の濃度}(\mathrm{ng/L}) + 0.0067\times \mathrm{13cRA}\text{の濃度}(\mathrm{ng/L}) \\ &+ 2.8\times 4\text{-oxo-atRA}\text{の濃度}(\mathrm{ng/L}) + 0.38\times 4\text{-oxo-13cRA}\text{の濃度}(\mathrm{ng/L}) \end{aligned} \quad (4\text{-}1)$$

4.6.8　統計処理

試料の RAR アゴニスト活性の有意差検定は、第 2 章 2.2.5 に示した方法に準じて行った。

Table 4-3 Conditions of solid phase extraction

Condition	Sample preparation	Cartridge preconditioned	Washing cartridge	Elution
A	-	MeOH 6 mL; UPW [a] 6 mL	UPW 6 mL	MeOH 6 mL
B	-	MeOH 6 mL; UPW 6 mL	40% CH_3CN 6 mL	MeOH 6 mL
C	-	MeOH 6 mL; UPW 6 mL	Acetone-1M acetic acid 6mL	MeOH 6 mL
D	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; UPW 6 mL	UPW 6 mL	MeOH 6 mL
E	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; UPW 6 mL	40% CH_3CN 6 mL	MeOH 6 mL
F	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; UPW 6 mL	Acetone-1M acetic acid 6mL	MeOH 6 mL
G	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	UPW 6 mL	MeOH 6 mL
H	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	40% CH_3CN 6 mL	MeOH 6 mL
I	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	Acetone-1M acetic acid 6mL	MeOH 6 mL
J	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	UPW 6 mL	CH_3CN 6 mL
K	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	40% CH_3CN 6 mL	CH_3CN 6 mL
L	pH 3.0 (1M acetic acid)	MeOH 6 mL; 1M acetic acid 6 mL	Acetone-1M acetic acid 6mL	CH_3CN 6 mL

[a] UPW, ultra pure water.

Table 4-4 Conditions for analysis of RAs and 4-oxo-RAs using LC/MS.

Communications Bus Module	CBM-20A (Shimadzu)
Auto Sampler	SIL-20A(Shimadzu)
Column Oven	CTO-20A(Shimadzu)
Liquid Chromatograph	LC-20A (Shimadzu)
Degasser	DGU-20A$_3$ (Shimadzu)
Mass Spectrometer	LCMS-2010EV (Shimadzu)
Mobile phase	100 mM Ammonium acetate/MeOH
Gradient condition	MeOH conc (%):0-5 min, 70%; 5-26 min, 70-97%; 26-28 min, 97%; 28-30 min, 70%
Column temperature	40 ºC
Column	Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mmϕ)
Flow rate	1.0 mL/min
Interface	ESI (Negative ion mode)
Nebulizing gas flow	1.5 L/min
Probe voltage	-3.5 kV
Curved desolvation line temperature	250 ºC
Block temperature	200 ºC
Detector voltage	-1.50 kV
Curved desolvation line voltage	20.0 V
Selective Ion Mode	m/z = 299 (RAs), 313(4-oxo-RAs)

4.7　結果および考察

4.7.1　下水および下水処理水中の RA 類および 4-oxo-RA 類の定量分析方法の確立

下水処理系における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動を明らかにするため、固相抽出法と LC/MS 分析を組み合わせた定量分析手法の確立を試みた。これまでの調査で用いた固相抽出では、カートリッジのコンディショニングと溶出に MeOH を用い、通水後のカートリッジ洗浄に超純水を用いていた。この固相抽出の条件は広範な極性物質の回収には非常に有利である。しかし、RA 類および 4-oxo-RA 類の定量分析を行う際には、それらの目的物質とともに回収される多種多様な夾雑物が LC/MS 分析において障害となる可能性があるため、夾雑物をなるべく除去しておくことが望ましい。そこで、まず、RA 類および 4-oxo-RA 類のロスを抑え、かつ夾雑物を最大限除去するための固相抽出条件について検討した。

まず、固相抽出条件を検討するため、超純水に RA 類および 4-oxo-RA 類をそれぞれ 1 μg/L の濃度で添加し、**Table 4-3** に示す 12 種類の条件で固相抽出を行った。その結果、通水後に 40%CH_3CN でカートリッジを洗浄する条件 B、E、H、K で回収率が高かったことから、これらの条件を用い、合成下水に添加した RA 類、4-oxo-RA 類の回収率を求めた。その結果、条件 B で最も高い回収率が得られたことから(**Table 4-3**)、本条件にて固相抽出を行うこととした。

次に、下水および下水処理水における RA 類、4-oxo-RA 類の回収率を明らかにするため、WWTP-A より採取した最初沈澱池越流水および最終沈澱池越流水試料に RA 類、4-oxo-RA 類を 200 ng/L の濃度で添加し、添加回収実験を行った。なお、予備検討から、下水中には多くの夾雑物が含まれ、固相抽出時の洗浄のみでは夾雑物除去が不十分であり、MS 分析が困難であることが明らかとなったため、下水試料については、固相抽出後に **Table 3-4** に示す条件で HPLC 分画に供し、4-oxo-RA 類が含まれる RT 24-28 分、RA 類が含まれる RT 34-36 分の画分を分取し、それらを LC/MS 分析に供することとした。その結果、atRA、13cRA、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA の回収率(相対標準偏差)は、下水(n=3)でそれぞれ 23.3±3.3%(14.0%)、36.8±10.2%(27.6%)、77.2±4.7%(6.1%)、74.4±2.2%(2.9%)、下水処理水(n=4)でそれぞれ 36.0±9.4%(26.2%)、55.0±18.9%(34.4%)、61.7±14.3%(23.1%)、68.8±20.5%(29.8%)となった。4-oxo-RA 類では、試料によらず 60%以上が回収でき、良好な回収率を示した。一方、atRA は、処理水中からは 3 割以上を回収できたが、下水中からの回収率は 2 割強にとどまった。また、13cRA は、処理水中から 50%以上が回収でき、下水中からは 3 割強を回収できた。RA 類の回収率が他の物質に比べて低くなった原因は明らかにできていないが、これまでの検討から、下水中の RAR アゴニスト活性に対する寄与率は 4-oxo-RA 類が RA 類に比べて大きいことが示唆されているため、RA 類の回収率が低いことは重大な問題にはならないと考えられた。

以上の検討から、**Fig. 4-2** に示す手順で実下水処理場における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動解析を行うこととした。なお、固相抽出における濃縮倍率と **Table 4-4** に示す条件を用いた LC/MS 分析における検出下限値から、ここで開発した手法による atRA、13cRA、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA の定量下限値は、下水ではそれぞれ 1.0 ng/L、5.0 ng/L、0.5 ng/L、1.0 ng/L、下水処理水ではそれぞれ 0.5 ng/L、2.5 ng/L、0.25 ng/L、0.5 ng/L と推算された。

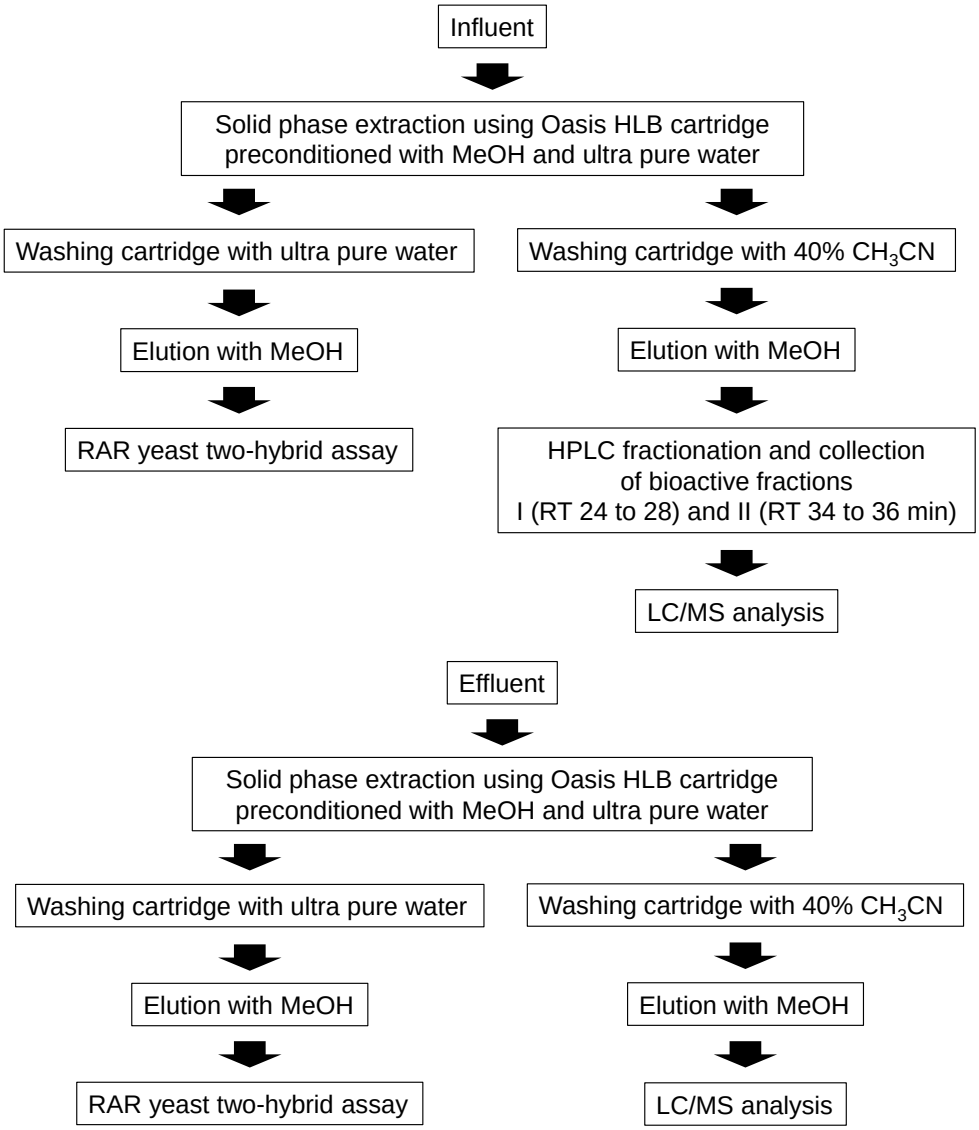

Fig. 4-2 Sample preparation procedure for the determination of RAs and 4-oxo-RAs and measurement of RAR agonistic activity in wastewater treatment plant influents and effluents.

4.7.2　下水処理系における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動調査

4.7.2.1　下水処理の成績

調査した下水処理場における水温、pH、DOC および T-N を **Table 4-1** に示す。水温は、春季よりも夏季の方が 10°C 程高かったが、pH は時期によらず中性付近の同程度の値を示した。また、DOC については、最初沈澱池越流水および最終沈澱池越流水では、春季が夏季よりも低く、塩素処理後放流水では、春季が夏季よりも高い値を示した。T-N については、最初沈澱池越流水および塩素処理後放流水では、春季が夏季よりも高い値を示し、最終沈澱池越流水では時期によらず同程度の値を示した。

活性汚泥処理による DOC 除去率は、春季の WWTP-D(CAS 法; 22%)を除き、時季によらず 61-94%

であり(夏季の WWTP-F の A2O 法は未測定)、全体として比較的良好な処理が行われていたものと考えられた。また、T-N 除去率は、春季の WWTP-A(44%)、WWTP-B(45%)、WWTP-D(CAS 法；33%)および季の WWTP-F(A2O 法 ; 41%)を除き、61～85%の比較的高い値を示したが、春季の CAS 法では概して T-N 除去率が低いことが確認された。

4.7.2.2 都市下水中の RA 類および 4-oxo-RA 類

都市下水中の RA 類および 4-oxo-RA 類の存在量とその RAR アゴニスト活性への寄与を把握するため、下水試料中の 4 物質の定量分析を行い、RAR アゴニスト活性測定値と比較した(**Table 4-5**)。

全ての試料において有意な RAR アゴニスト活性(p<0.05)が検出され、atRA-EQ_{bio} 値は、春季は 12.0～38.7 ng/L、夏季は 13.7～100.6 ng/L となった。WWTP-C および WWTP-F の atRA-EQ_{bio} 値は春季の方が高かったのに対して、WWTP-A、WWTP-B、WWTP-D および WWTP-E の atRA-EQ_{bio} 値は夏季の方が高い値を示した。

一方、LC/MS 分析の結果、atRA は、WWTP-C および WWTP-F の A2O 法では春季の方が高かったのに対して、WWTP-A、WWTP-B、WWTP-D および WWTP-E では夏季の方が高かった。4-oxo-atRA は、WWTP-B、WWTP-D、WWTP-F では春季の方が高く、WWTP-A、WWTP-C および WWTP-E では夏季の方が高かった。4-oxo-13cRA は、WWTP-D の STEP 法および WWTP-F では春季の方が高く、WWTP-A、WWTP-B、WWTP-C、WWTP-D の CAS 法および WWTP-E では夏季の方が高かった。これら 4 物質の定量値から算出した atRA-EQ_{chem} 値は、WWTP-D の STEP 法を除いて、atRA-EQ_{bio} 値と同様の傾向を示した。また、13cRA は春季の WWTP-A(7.3 ng/L)および WWTP-E(4.1 ng/L)において、定量下限値未満(<13.6 ng/L)の低濃度で検出された以外は，他のいずれの試料からも検出されなかった。13cRA の atRA 等価係数は他の 3 物質の 1/57～1/420 であることから、13cRA は atRA-EQ_{chem} 値に大きく反映されるほどの濃度では下水中に含まれていないことが示された。

以上の結果から、下水処理場に流入する RA 類および 4-oxo-RA 類濃度の季節変動は処理場ごとに異なることが示された。これら 4 物質は主にヒトの排泄物に由来していることから、流入水のこれら RAR アゴニストの濃度レベルはヒトの活動量に関係していると考えられる。既往研究では、ヒトの排泄物に由来する物質は夏季に高い値で検出される可能性があると報告されている(Zhou et al., 2012)。一方、夏季は他の季節と比べて高水温により微生物が活性化し、排泄物由来の物質が分解され易くなる可能性のあることも報告されており(Jin et al., 2008)、実際に夏季よりも春季に排泄物由来物質の流入濃度が高くなる場合もあることが確認されている(Zhou et al., 2012; Jin et al., 2008)。これらの要因が組み合わさることで処理場ごとの季節変動に差異が生じたものと考えられた。

RA 類および 4-oxo-RA 類の分析値から、atRA-EQ_{chem} 値を求めたところ、春季には 9.1～66.0 ng/L、夏季には 6.9～60.7 ng/L と算定された(**Table 4-5**)。atRA-EQ_{bio} 値が下水中の RAR アゴニストの総量を包括的に表現しているものとし、それに対する atRA-EQ_{chem} 値の比率を RA 類および 4-oxo-RA 類の寄与率として求めたところ(**Table 4-5**)、夏季の WWTP-A(24%)を除くと、概ね RAR アゴニスト活性の半分以上の寄与率を示した(夏季の WWTP-C の A2O 法で 44%、春季の WWTP-A と夏季

Table 4-5 RAR agonist contamination in the influents discharging from primary settling tanks

WWTP	Biological treatment	Sampling date	Concentration (ng/L)				atRA-EQ_{chem} (ng/L)[a]	atRA-EQ_{bio} (ng/L)
			atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA		
A	CAS	March 12, 2010	7.3±1.0	ND[b] [7.3±2.0][c]	ND	2.3±0.1	9.1±1.0 (47%)[d]	19.2
		August 3, 2010	10.3±1.5	ND	1.5±0.1	24.3±0.7	23.7±1.5 (24%)	100.6
B	CAS	March 11, 2010	9.0±1.3	ND	3.3±0.2	94.3±2.8	54.1±1.7 (419%)	12.9
		July 27, 2010	17.3±2.5	ND	1.2±0.1	104.9±3.1	60.7±2.7 (82%)	74.3
C	CAS	March 11, 2010	21.5±3.0	ND	ND	11.6±0.3	26.9±3.1 (93%)	29.0
	A2O		18.3±2.6	ND	ND	6.7±0.2	21.8±2.6 (91%)	24.0
	CAS	July 27, 2010	ND	ND	1.0±0.1	30.8±0.9	16.6±0.5 (74%)	22.6
	A2O		ND	ND	0.9±0.1	22.4±0.7	7.7±0.4 (44%)	17.7
D	CAS	March 19, 2010	ND	ND	2.1±0.1	42.9±1.3	24.4±0.7 (137%)	17.8
	STEP		ND	ND	3.1±0.2	23.8±0.7	19.9±0.7 (166%)	12.0
	CAS	August 9, 2010	10.0±1.4	ND	ND	55.3±1.6	32.0±1.5 (124%)	25.8
	STEP		12.7±1.8	ND	ND	11.1±0.3	17.9±1.8 (101%)	17.8
E	AO	March 12, 2010	11.4±1.6	ND [4.1±1.1]	ND	16.1±0.5	18.4±1.6 (133%)	13.9
		August 3, 2010	12.8±1.8	ND	0.7±0.04	38.2±1.1	29.4±1.9 (82%)	35.7
F	CAS	March 18, 2010	ND	ND	6.8±0.4	10.7±0.3	25.4±1.3 (83%)	30.4
	A2O		10.8±1.5	ND	6.9±0.4	94.1±2.8	66.0±2.2 (170%)	38.7
	CAS	August 5, 2010	ND	ND	ND	9.9±0.3	6.9±0.3 (47%)	14.6
	A2O		ND	ND	ND	13.8±0.4	8.3±0.3 (61%)	13.7

[a] Concentrations of RAs and 4-oxo-RAs less than their respective quantification limit (QL) in our analytical method were assigned a proxy value of QL/2 to estimate the atRA-EQ_{chem} value.

[b] Not detected.

[c] Assumed concentration of a compound detected under QL is provided in square bracket.

[d] The percentage of atRA-EQ_{chem} value to the atRA-EQ_{bio} value is shown in parenthesis.

の WWTP-F の CAS 法で 47%、その他は 61%以上)。一部の試料では寄与率が 100%を上回ったが、この原因としては、バイオアッセイによる RAR アゴニスト活性の測定において、試料を高濃縮した系で阻害影響が生じたため、atRA-EQ_{bio} 値を低濃縮倍率で得られた活性値のみを用いて推定したことによるものと考えられる。すなわち、このような試料においては、atRA-EQ_{bio} 値が実際よりも低く見積もられたものと考えられる。このような高濃縮倍率でバイオアッセイへの阻害が認められた試料以外の、大部分の試料のバイオアッセイにおいては典型的な用量反応曲線を描くことができたことから、ここで得られた結果は概ね妥当なものといえ、RA 類および 4-oxo-RA 類、特に atRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA が下水中の主要な RAR アゴニストであることが確認された。

一方、幾つかの試料で、atRA-EQ_{bio} 値に対する RA 類および 4-oxo-RA 類の寄与率が低かった原因としては、本研究で分析対象とした 4 物質以外の RAR アゴニストの存在、下水中の夾雑物による RA 類、4-oxo-RA 類の LC/MS 分析の妨害や複数の RAR アゴニストによる相乗効果によりバイオアッセイ値が高く計測されたことなどが考えられた。採水時季によらず寄与率の低かった WWTP-A については、第 3 章 3.3.1.2 において、同処理場の下水中に atRA、13cRA、4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA 以外の RAR アゴニストが存在することが確認されており、本調査でも未知の RAR アゴニストが下水中に存在していた可能性が高い。

Table 4-6 に、本研究および既往研究における下水中の RAR アゴニストの検出レベルを比較・整理した。Zhen ら(2009)の中国での調査と本調査の検出濃度と比較すると、4-oxo-atRA 濃度と atRA-EQ_{chem} 値は同程度であったが、4-oxo-13cRA 濃度と atRA-EQ_{bio} 値は本調査の方が高い値を示したことが分かる。同様に中国における Wu ら(2010)の調査との比較では、atRA および 4-oxo-13cRA の濃度は同程度であったが、4-oxo-atRA の濃度は本研究の方が低いなど、異なる傾向が示された。下水中の RA 類および 4-oxo-RA 類は、主に動物の排泄物に由来すると考えられるため、ここで明らかとなった地域による差は、ヒトの食生活や、ヒト以外の動物由来の畜産系排水の混入などに依存するものと考えられる。

4.7.2.3 活性汚泥処理系における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動

活性汚泥処理系における RA 類および 4-oxo-RA 類の消長を明らかにするため、最終沈殿池越流水における RAR アゴニスト活性と RA 類および 4-oxo-RA 類の濃度を測定した(**Table 4-7**)。また、最初沈殿池越流水と最終沈殿池越流水の結果から、活性汚泥処理による RA 類および 4-oxo-RA 類の処理状況を評価した。

最終沈殿池越流水において、RA 類および 4-oxo-RA 類の濃度は、概して検出下限値未満、または検出はされたが定量限界値未満の低濃度となっており、4 物質は活性汚泥処理によって十分に除去されることが明らかとなった。また、これを反映して atRA-EQ_{bio} 値も概ね低い値を示した。しかし、春季の WWTP-D の CAS 法で 4-oxo-13cRA が 0.8 ng/L、夏季の WWTP-D の STEP 法および WWTP-E(AO 法)で atRA がそれぞれ 11.5 ng/L、5.4 ng/L の濃度で検出され、この結果から、atRA-EQ_{chem} 値は春季の WWTP-D の CAS 法で 1.6 ng/L、夏季の WWTP-D の STEP 法および WWTP-E でそれぞれ 12.2 ng/L、6.1 ng/L と算出された。なお、夏季の WWTP-D の STEP 法および WWTP-E

Table 4-6 Comparison of RAR agonist contamination levels detected in this study and previous studies

Sample	Country	Contamination level (ng/L)[a]						References
		atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA	atRA-EQ_{chem}	atRA-EQ_{bio}	
Influent	Japan [n=18][b]	ND-21.5 (9.5)	ND	ND-6.9 (0.8)	2.3-104.9 (23.1)	6.9-66.0 (22.8)	12.0-100.6 (20.9)	This study[c]
	China [n=7]	NA	NA	4.7-10.4 (4.9)	2.3-7.1 (2.7)	18-41 (19)	6.6-13.4	Zhen et al., 2009
	China [n=1]	2.41	0.74	17.01	12.45	NA	NA	Wu et al., 2010

[a] ND, not detected; NA, not analyzed. The number in parenthesis indicates the median value.
[b] The number in square bracket indicates the sample number.
[c] Data obtained at point 1 (after the primary settling tank).

Table 4-7 RAR agonist contamination in the effluents discharging from the final settling tanks

WWTP	Biological treatment	Sampling date	Concentration (ng/L)				atRA-EQ_{chem} (ng/L)[a]	atRA-EQ_{bio} (ng/L)
			atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA		
A	CAS	March 12, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	1.6
		August 3, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	2.7
B	CAS	March 11, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.5
		July 27, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.8
C	CAS+A2O	March 11, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	1.4
	CAS+A2O	July 27, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.3
D	CAS	March 19, 2010	ND	ND	ND	0.8±0.2	1.6±0.2 (8%)[b]	19.5
	STEP		ND	ND	ND	ND	ND	1.4
	CAS	August 9, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	1.5
	STEP		11.5±3.0	ND	ND	ND	12.2±3.0 (1111%)	1.1
E	AO	March 12, 2010	ND [0.2±0.1][c]	ND	ND	ND	ND	0.2
		August 3, 2010	5.4±1.4	ND	ND	ND	6.1±1.4 (2029%)	0.3
F	CAS-1	March 18, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.4
	CAS-2		ND	ND	ND	ND	ND	0.5
	A2O		ND	ND	ND	ND	ND	0.5
	CAS-1	August 5, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.2
	CAS-2		ND	ND	ND	ND	ND	0.2
	A2O		ND	ND	ND	ND	ND	0.2

[a] When at least one compound was quantifiable in a sample, the concentrations of the other RAs and 4-oxo-RAs less than their respective quantification limit (QL) in the same sample were assigned a proxy value of QL/2 to estimate the atRA-EQ_{chem} value. If all of the four compounds were unquantified in a sample, 'ND (not detected)' was provided for its atRA-EQ_{chem} value.
[b] The same as the footnote d in Table 4-5.
[c] The same as the footnote c in Table 4-5.

では、atRA の検出濃度(11.5 ng/L および 5.4 ng/L)に比べ、RAR アゴニストの総量を評価しているはずの atRA-EQ_{bio} 値が低く測定されたが、この 2 つの試料では、バイオアッセイにおける高濃縮倍率での阻害が認められており、RA 類および 4-oxo-RA 類を含めた RAR アゴニスト活性の測定が正確にはできていなかったものと考えられる。

最初沈殿池越流水(**Table 4-5**)と最終沈殿池越流水(**Table 4-7**)における RA 類、4-oxo-RA 類の濃度を比較し、活性汚泥処理による各物質の除去率を求めたところ、夏季の WWTP-D の STEP 法および WWTP-E では、atRA の除去率がそれぞれ 9.4%および 58%であったが、これら以外ではほぼ 100%の除去が行われ、atRA-EQ_{chem} 値としてもこの 2 試料を除いてほぼ完全に除去されていた(**Fig. 4-3**)。以上の結果から、4 種の RA 類、4-oxo-RA 類は処理方式によらず活性汚泥処理によって良好に処理されるが、一部の処理場では夏季に atRA が残留する可能性のあることが推察された。WWTP-D では CAS 法と STEP 法で処理が行われていたが、CAS 法では夏季に atRA が残留していなかったことから、STEP 法は atRA が残留しやすくなる可能性があると考えられた。

atRA-EQ_{bio} の除去率も、春季の WWTP-D の CAS 法を除き 88%以上の高い値を示し(**Fig. 4-3**)、バイオアッセイ値で評価した場合でも、RAR アゴニストは活性汚泥処理によって良好に除去されることが確認された。一方、春季の WWTP-D の CAS 法においては、atRA-EQ_{chem} 値(RA 類および 4-oxo-RA 類)は生物処理でほぼ完全に除去されていたのに対して、最終沈殿池越流水における atRA-EQ_{bio} 値は最初沈殿池越流水の値よりも高くなり、除去率としてはマイナスとなった(**Fig. 4-3**)。この結果から、既知の 4 物質以外の未知の RAR アゴニストが活性汚泥処理によって生成した可能性が考えられた。そこで、同処理システムで、別の時期に行った 3 回の調査結果を加えて合計 5 回の調査を行った結果、2010 年 3 月以外に、2009 年 12 月でも同様の現象が確認された(**Table 4-8**)。このことから、通常は下水中の主要な RAR アゴニストである RA 類、4-oxo-RA 類は活性汚泥処理によって良好に処理され、全体としての活性も十分に除去されるが、場合によっては処理に伴って未知の RAR アゴニストが生成し、atRA-EQ_{bio} 値が上昇してしまう可能性のあることが確認された。このような現象が認められたときの、atRA-EQ_{bio} の残存(未知の RAR アゴニストの生成)と有機物や窒素の除去成績については明確な因果関係はなく、未知の RAR アゴニストが生じ易い条件については明確にすることはできていない。

4.7.2.4 塩素処理工程における RA 類および 4-oxo-RA 類の挙動

塩素処理が RA 類および 4-oxo-RA 類の消長に及ぼす影響を把握するため、塩素処理後の放流水における RAR アゴニスト活性と RA 類および 4-oxo-RA 類の定量を行い(**Table 4-9**)、その結果と最終沈殿池越流水の結果(**Table 4-7**)と比較した。

放流水における RA 類および 4-oxo-RA 類の定量結果は、概して検出下限値未満、または検出はされたが定量限界値未満であったが、atRA が春季の WWTP-A、WWTP-D の STEP 法および WWTP-E、夏季の WWTP-E の 4 試料で、また、4-oxo-13cRA が夏季の WWTP-D の STEP 法の 1 試料で検出された。atRA-EQ_{bio} 値は、春季の WWTP-D の CAS 法で 10.0 ng/L の高値を示した以外は、全て低い値を示した。atRA または 4-oxo-13cRA が検出された 5 試料では atRA-EQ_{chem} 値に比べて atRA-EQ_{bio} 値が低くなったが、これらはバイオアッセイの阻害が認められた結果である。既往研究によっても、塩素処理によって有機塩素化合物が生成すること(宗宮ら, 1980)、また、有機

塩素化合物がバイオアッセイに阻害影響を及ぼす可能性のあることが報告されている(国本ら, 1997)。

夏季に WWTP-D の STEP 法の最終沈殿池越流水で検出された atRA は、塩素処理後の試料からは検出されなかった。一方、同様に最終沈殿池越流水で atRA が検出された夏季の WWTP-E では、塩素処理後の放流水でその濃度が約 3 倍の 14.6 ng/L に上昇した。また、最終沈殿池越流水では atRA が検出されていなかった 3 試料で塩素処理後に atRA が検出されるようになった。一方、WWTP-D の CAS 法(春季)の最終沈殿池越流水で検出された 4-oxo-13cRA は塩素処理後には検出されなくなったが、逆に、夏季の WWTP-D の STEP 法においては最終沈殿池越流水では検出されていなかった 4-oxo-13cRA が塩素処理後に検出されるようになった。ここで、最終沈殿池越流水と塩素処理後の試料の採取時間は若干異なっているが、塩素処理槽における滞留時間が短時間であることを考慮すると、その間に RAR アゴニストの流入量や組成が大幅に変化し、本研究の結果に影響したとは考え難い。これらのことから、RA 類および 4-oxo-RA 類は、塩素処理により分解されて消失したり、また逆に、何らかの前駆体からの化学的変換が生じることによって生成したりする可能性のあることが推察された。

4.3.2.3 で述べたように、春季の WWTP-D の CAS 法においては、活性汚泥処理によって RA 類および 4-oxo-RA 類の 4 物質ではない未知の RAR アゴニストが生成していたものと考えられたが、最終沈殿池越流水の atRA-EQ_{bio} 値が 19.5 ng/L であったのに対し、塩素処理後には 10.0 ng/L にやや低下した。従って、活性汚泥処理で生成した未知の RAR アゴニストは、塩素処理によりある程度は分解される可能性があるが、完全には除去されずに自然界に放流される可能性のあることが示唆された。

Table 4-8 RAR agonist contamination in the CAS system in WWTP-D on different sampling dates

Sampling date	Sample	Concentration (ng/L)				$atRA\text{-}EQ_{chem}$ (ng/L)[a]	$atRA\text{-}EQ_{bio}$ (ng/L)	DOC Removal (%)
		atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA			
December 24, 2009	Point 1	14.2±2.0	ND[b] [5.1±1.4][c]	4.1±0.3	56.7±1.7	47.4±2.2	35.3	73
	Point 2	ND	ND	0.6±0.1	3.5±1.0	3.7±0.6	43.0	
	Point 3	ND	ND	0.6±0.1	2.0±0.6	3.2±0.5	35.2	
March 19, 2010	Point 1	ND	ND	2.1±0.1	42.9±1.3	24.4±0.6	17.8	22
	Point 2	ND	ND	ND	0.8±0.2	1.6±0.1	19.5	
	Point 3	ND	ND	ND	ND	ND	10.0	
May 13, 2010	Point 1	3.1±0.4	ND	ND	20.6±0.6	11.8±0.5	21.6	71
	Point 2	ND	ND	ND	ND	ND	0.9	
	Point 3	ND	ND	ND	ND	ND	0.9	
June 2, 2010	Point 1	3.2±0.4	ND	15.7±1.0	9.1±0.3	50.7±2.7	24.3	62
	Point 2	ND	ND	1.1±0.3	ND	3.6±0.7	4.1	
August 9, 2010	Point 1	10.0±1.4	ND	ND	55.3±1.6	32.0±1.5	25.8	82
	Point 2	ND	ND	ND	ND	ND	1.5	
	Point 3	ND	ND	ND	ND	ND	0.7	

[a] $atRA\text{-}EQ_{chem}$ value was estimated with the method shown in Table 4-6.
[b] Not detected.
[c] The same as the footnote c in Table 4-5.

Table 4-9 RAR agonist contamination in the final effluents after the chlorination

WWTP	Biological treatment	Sampling date	Concentration (ng/L)				atRA-EQ_{chem} (ng/L)[a]	atRA-EQ_{bio} (ng/L)
			atRA	13cRA	4-oxo-atRA	4-oxo-13cRA		
A	CAS	March 12, 2010	3.9±1.0	ND[b]	ND	ND	4.6±1.0 (166%)[c]	2.8
		August 3, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	2.4
B	CAS	March 11, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.6
		July 27, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.7
C	CAS+A2O	March 11, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.4
	CAS+A2O	July 27, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.1
D	CAS	March 19, 2010	ND [1.2±0.3][d]	ND	ND	ND	ND	10.0
	STEP		5.7±1.5	ND	ND	ND	6.5±1.5 (403%)	1.6
	CAS	August 9, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.7
	STEP		ND	ND	ND	1.6±0.5	1.9±0.3 (2377%)	0.1
E	AO	March 12, 2010	2.3±0.6	ND	ND	ND	3.1±0.6 (1528%)	0.2
		August 3, 2010	14.6±3.8	ND	ND	ND	15.3±3.8 (15337%)	0.1
F	CAS+A2O	March 18, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.2
	CAS+A2O	August 5, 2010	ND	ND	ND	ND	ND	0.1

[a] AtRA-EQ_{chem} value was estimated with the method shown in Table 4.
[b] Not detected.
[c] The same as the footnote d in Table 4-5.
[d] The same as the footnote c in Table 4-5.

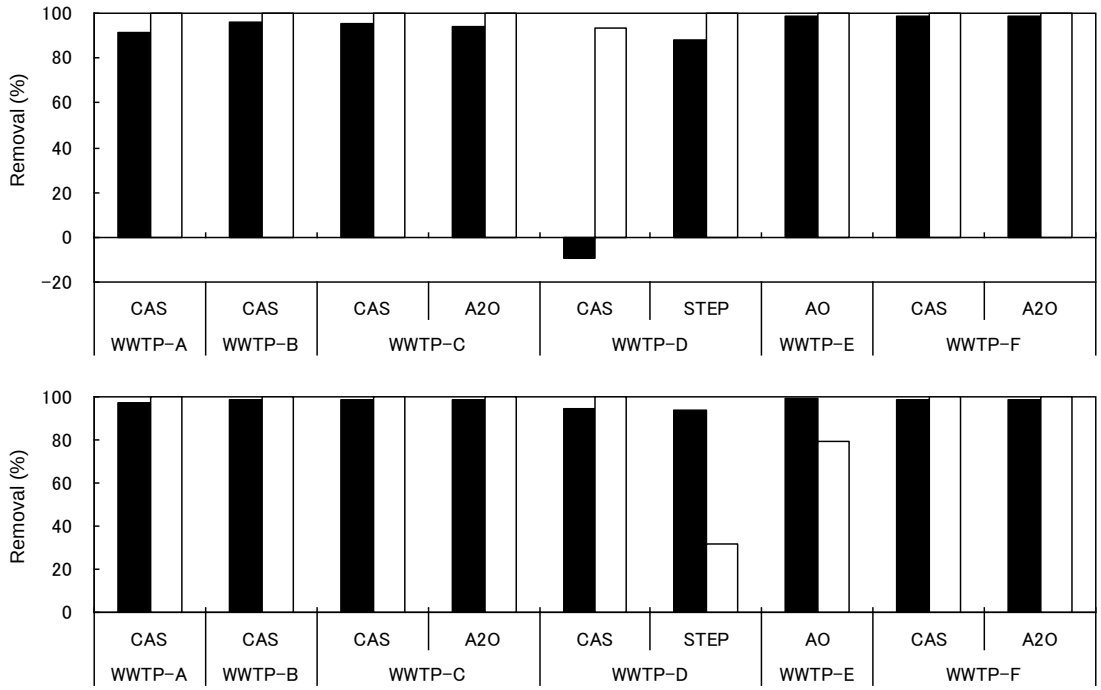

Fig. 4-3 Removal of atRA-EQ_{bio} (filled bar) and atRA-EQ_{chem} (open bar) in March (above) and July to August (below), 2010.

4.7.3　活性汚泥処理による RA 類および 4-oxo-RA 類の除去機構

4.7.3.1　2 種類の汚泥を用いた RA 類および 4-oxo-RA 類の回分処理試験

4.3.2 で、活性汚泥処理によって RA 類および 4-oxo-RA 類は概ね良好に除去されることが明らかとなったが、これが、生分解によるものか、汚泥への吸着等による除去かを明らかにし、また、4 物質の変化によって未知の RAR アゴニストが生じ得るかを明らかにするため、2 種類の汚泥(A 汚泥、B 汚泥)を用いて、atRA、13cRA、4-oxo-atRA、および 4-oxo-13cRA の混合物の回分処理試験を実施した。A 汚泥および B 汚泥を用いた実験系 I、実験系 II における RA 類、4-oxo-RA 類、atRA-EQ_{chem}、および atRA-EQ_{bio} の残存率の変化を **Fig. 4-4**、および **Fig. 4-5** に示す。

atRA と 13cRA は、A 汚泥、B 汚泥の何れを用いた場合にも、実験系 I、II ともに 0.5 時間後までに 60%以上が除去され、その後は緩やかに減少した(**Fig. 4-4 (a, c), Fig. 4-5 (a, c)**)。他方、4-oxo-atRA と 4-oxo-13cRA の減少傾向は汚泥によって異なった。すなわち、A 汚泥を用いた処理試験の実験系 II では、2 時間後までに 50%程度が除去され、それ以降は殆ど減少しなかったのに対し(**Fig. 4-4 (c)**)、実験系 I では、0.5 時間後までに 30～40%減少した後、2 時間後から 5 時間後までに定量下限値以下に達した(**Fig. 4-4 (a)**)。一方、B 汚泥を用いた処理実験では、実験系 II においては緩やかな減少が認められたのに対し(**Fig. 4-5 (c)**)、実験系 I では非常に速やかな減少が見られた(**Fig. 4-5 (a)**)。以上の結果から、活性汚泥処理においては、RA 類は汚泥の種類によらず、速やかに汚泥に吸着し水中から除去されるのに対し、4-oxo-RA 類は、汚泥の種類によって汚泥吸着性が異なっており、汚泥吸着に加えて微生物による生分解なども水中からの除去に大きく寄与することが示唆された。また、A 汚泥を用いた実験系 II において、0.5 時間以降に大きな減少が確認されなかったことから、化学分解の寄与は大きくないことが推察された。

次に、これらの処理試験における atRA-EQ$_{bio}$ と atRA-EQ$_{chem}$ の残存率の変化を比較すると、実験系 II においては、汚泥の種類によらず atRA-EQ$_{bio}$ と atRA-EQ$_{chem}$ が同様の経時変化を示すことが明らかとなった(**Fig. 4-4 (d), Fig. 4-5 (d)**)。実験系 I においては、B 汚泥を用いた場合、atRA-EQ$_{bio}$ は atRA-EQ$_{chem}$ に比べて若干緩やかではあるが類似の減少傾向を示し、10 時間後にはほぼ完全に除去されたのに対し(**Fig. 4-5 (b)**)、A 汚泥を用いた場合には、atRA-EQ$_{bio}$ の残存率の経時変化は atRA-EQ$_{chem}$ の残存率とは大きく異なり、atRA-EQ$_{chem}$ は 5 時間後までにほぼ完全に除去されたのに対して、atRA-EQ$_{bio}$ の減少は非常に緩やかであり、10 時間後でも 50%以上が残存した(**Fig. 4-4 (b)**)。以上の結果から、A 汚泥を用いた実験系 I では、未知の RAR アゴニストの生成が明らかとなった。

A 汚泥を用いた処理試験において、4 物質の水中からの除去は、RA 類は汚泥吸着の寄与が大きいことに対して、4-oxo-RA 類は汚泥吸着に加えて生分解による寄与も大きいことから、未知の RAR アゴニストは 4-oxo-RA 類の生分解に伴って生成した可能性が考えられた。

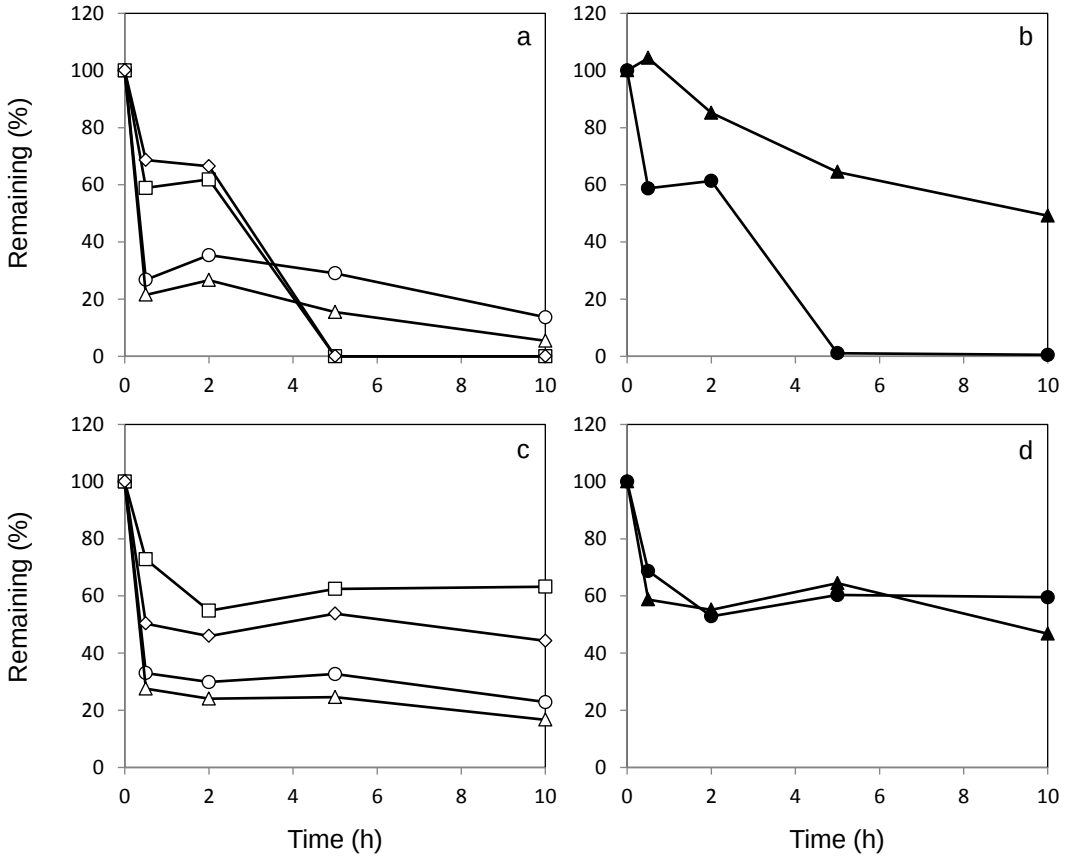

Fig. 4-4 Fate of atRA (open circle), 13cRA (open triangle), 4-oxo-atRA (open square), 4-oxo-13cRA (open diamond) (a, c), and atRA-EQ$_{chem}$ (closed circle) and atRA-EQ$_{bio}$ (closed triangle) (b, d) during system I (a, b) and system II (c, d) using sludge-A when all of RAs and 4-oxo-RAs were simultaneously added.

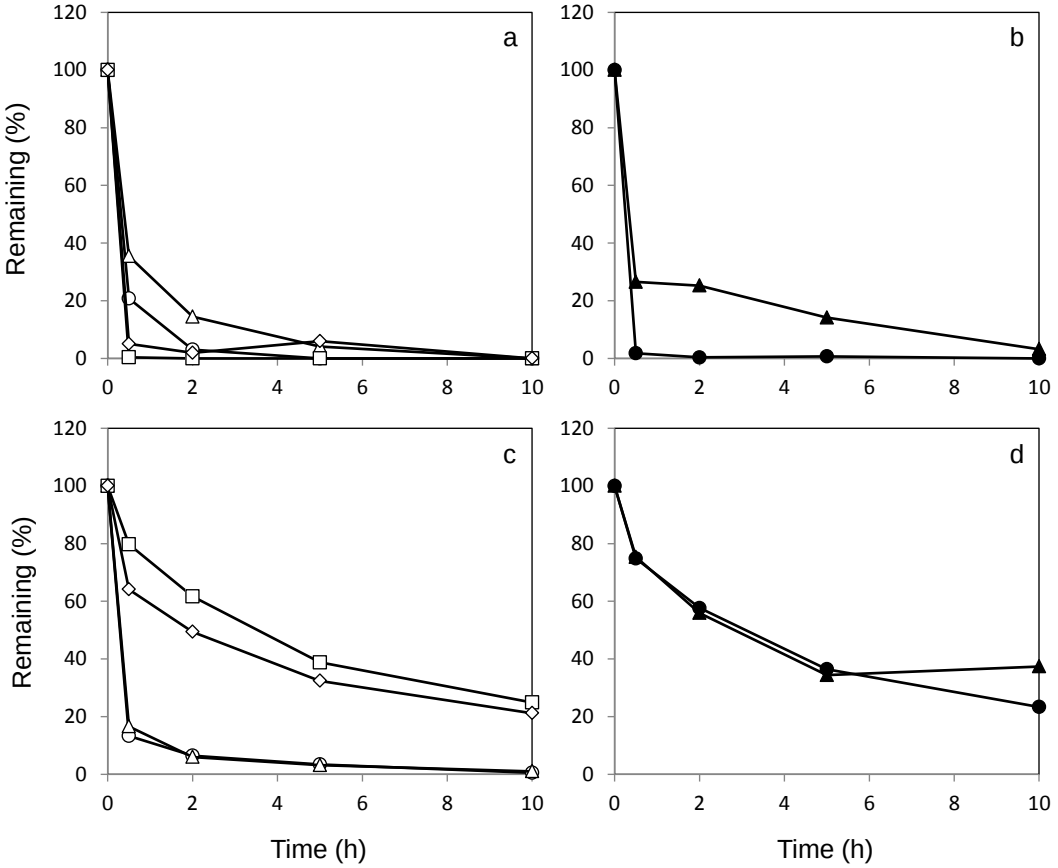

Fig. 4-5 Fate of atRA (open circle), 13cRA (open triangle), 4-oxo-atRA (open square), 4-oxo-13cRA (open diamond) (a, c), and atRA-EQ_{chem} (closed circle) and atRA-EQ_{bio} (closed triangle) (b, d) during system I (a, b) and system II (c, d) using sludge-B when all of RAs and 4-oxo-RAs were simultaneously added.

4.7.3.2 活性汚泥による 4-oxo-RA 類の分解に伴う未知の RAR アゴニスト生成の検証

4.3.3.1 より、4-oxo-RA 類の生分解の過程で未知の RAR アゴニスト生成の可能性が推察されたことから、活性汚泥処理における未知の RAR アゴニスト生成の詳細に明確にするため、A 汚泥を用いて、4-oxo-atRA あるいは 4-oxo-13cRA を単独で添加した回分処理試験を実施した。

4-oxo-atRA 処理試験における 4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA、atRA-EQ_{bio}、および atRA-EQ_{chem} の残存率の変化を **Fig. 4-6** に示す。4-oxo-atRA は 2 時間後までに 99.5%減少し、4-oxo-13cRA が僅かに生成したが、その後定量下限値以下まで減少した(**Fig. 4-6 (a)**)。また、atRA-EQ_{chem} は、4-oxo-RA 類の減少に伴って低下し、2 時間後までには残存率が 0.8%となったのに対し、atRA-EQ_{bio} は 0.5 時間後までに 132.6%まで上昇し、その後緩やかに減少したものの、10 時間後でも 73.8%が残存していた(**Fig. 4-6 (b)**)。他方、4-oxo-13cRA 処理試験における 4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA、atRA-EQ_{bio}、および atRA-EQ_{chem} の残存率の変化を **Fig. 4-7** に示す。4-oxo-13cRA は、0.5 時間後までに 30.8%減少し、その後はさらに減少を続け、5 時間後には残存率が 3.3%になった(**Fig. 4-7 (a)**)。この間、4-oxo-atRA が実験初期に僅かに生成したが、その後は 5 時間後までに定量下限値程度にまで減少した(**Fig. 4-7 (a)**)。また、atRA-EQ_{chem} は、4-oxo-RA 類の減少に伴って低下し、10 時間後までには残存率が 0.5%となったのに対し、atRA-EQ_{bio} は、0.5 時間

後までに僅かに低下したが(除去率 12.1%)、その後 5 時間後までは顕著に上昇し、ほぼ元の値と同じになった(**Fig. 4-7 (b)**)。以上の結果から、4-oxo-RA 類の分解の過程で 4-oxo-RA 類とは異なる RAR アゴニストが生成するものと考えられ、それらは水中から除去されずに残存するため、10 時間後でも RAR アゴニスト活性(atRA-EQ_{bio})が残存することになる。

次に、4-oxo-RA 類を単独で添加・処理した回分処理試験において、0 時間および 10 時間後の試料を **Table 3-4** に示す条件で HPLC 分画に供し､2 分間隔で分取した画分の RAR アゴニスト活性を測定した。4-oxo-atRA 処理試験および 4-oxo-13cRA 処理試験における結果をそれぞれ **Fig. 4-8** および **Fig. 4-9** に示す。HPLC 分析の結果､0 時間においては､添加した 4-oxo-RA 類のピークが検出され(**Fig. 4-8 (a), Fig. 4-9 (a)**)、RT 24-28 分に顕著な RAR アゴニスト活性が検出された(**Fig. 4-8 (b), Fig. 4-9 (b)**)。一方、10 時間後の試料においては、4-oxo-RA 類のピークは消失し、代わりに RT 22-26 分あたりに複数の顕著なピークが出現した(**Fig. 4-8 (a), Fig. 4-9 (a)**)。この 10 時間後の試料の RAR アゴニスト活性を測定したところ、新たに出現したピークが含まれる RT 20-26 分の 3 画分に顕著な RAR アゴニスト活性が検出された(**Fig. 4-8 (c), Fig. 4-9 (c)**)。この実験の限りでは、新たに出現したこれらの物質がどのような物質であるかは明らかにできていないが、4-oxo-RA 類の分解により、複数の未知の RAR アゴニストが生成することが明らかになったものといえる。

以上の検討より､4-oxo-RA 類は活性汚泥処理によって良好に除去されるものの､必ずしも生分解などにより完全に無機化されているわけではなく、一部は RAR アゴニスト活性を持つ他の物質に転換されて処理水として放流されている可能性があることが明らかとなった。

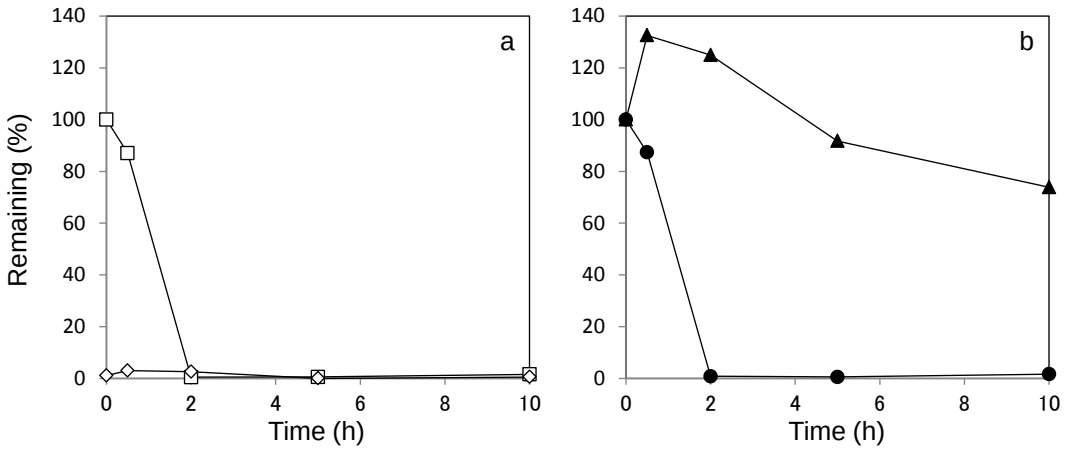

Fig. 4-6 Fate of 4-oxo-atRA (open square), 4-oxo-13cRA (open diamond) (a), and atRA-EQ_{chem} (closed circle) and atRA-EQ_{bio} (closed triangle) (b) during system I using sludge-A when 4-oxo-atRA was added.

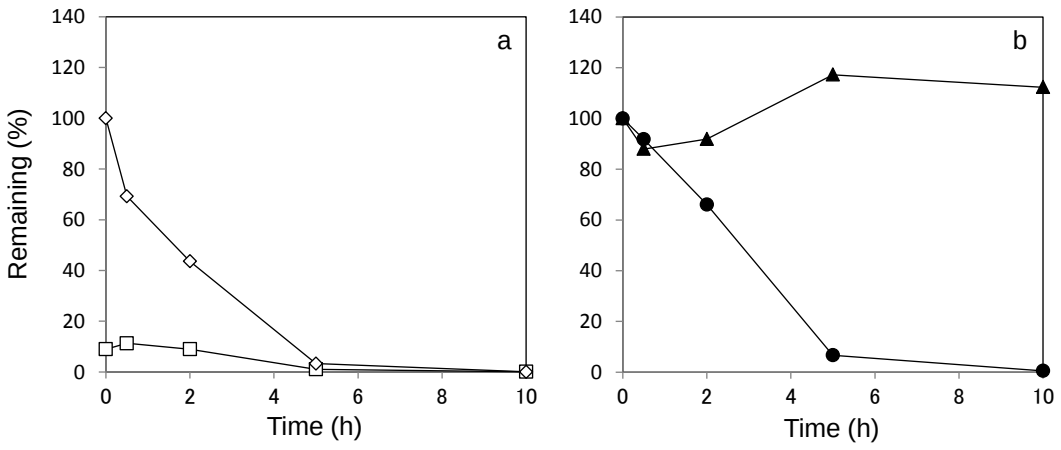

Fig. 4-7 Fate of 4-oxo-atRA (open square), 4-oxo-13cRA (open diamond) (a), and atRA-EQ_{chem} (closed circle) and atRA-EQ_{bio} (closed triangle) (b) during system I using sludge-A when 4-oxo-13cRA was added.

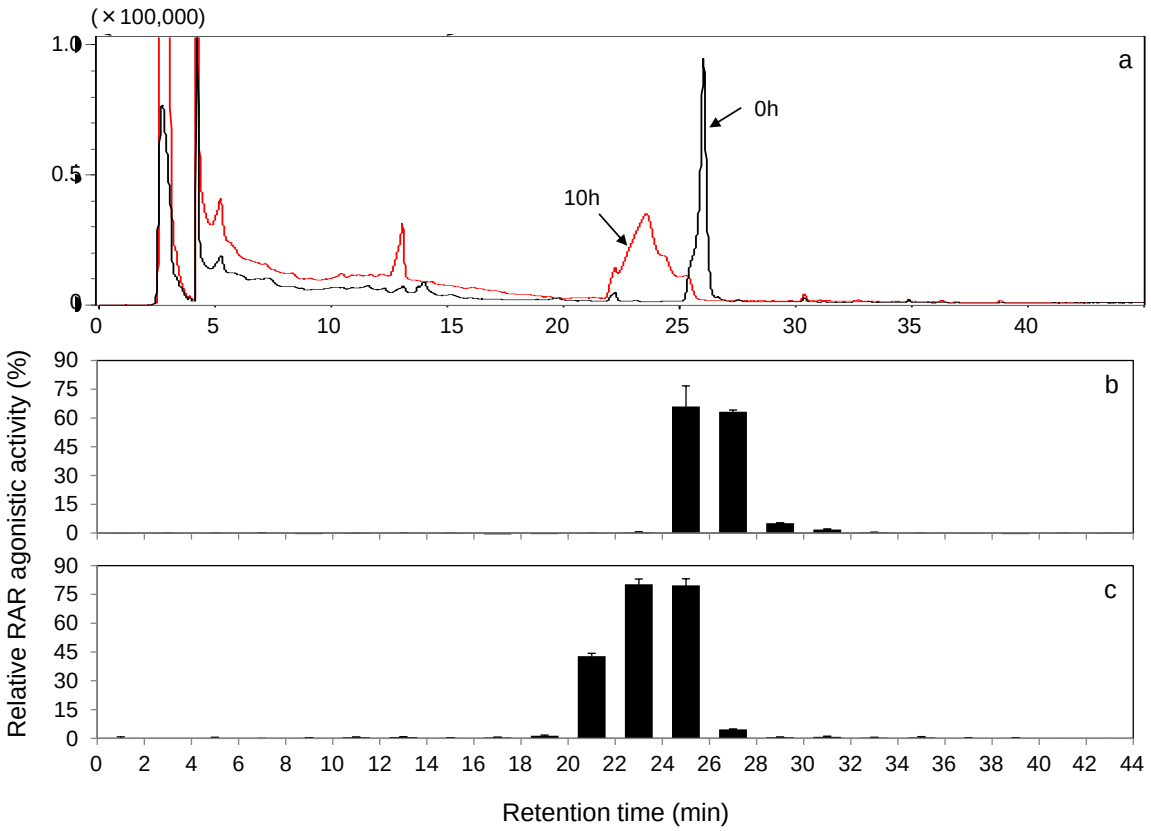

Fig. 4-8 HPLC chromatograms of the samples after 0 and 10 h treatment of 4-oxo-atRA by intact sludge-A (a). The detection wavelength was 360 nm. RAR agonistic activity of the HPLC fractions collected at 2-min intervals from 0 to 44 min for samples at 0 h (b) and 10 h (c). Relative RAR agonistic activity was calculated by setting the maximal activity of atRA to 100% and the activity of the negative control to 0%. Data shown are the means ± SD (n=3).

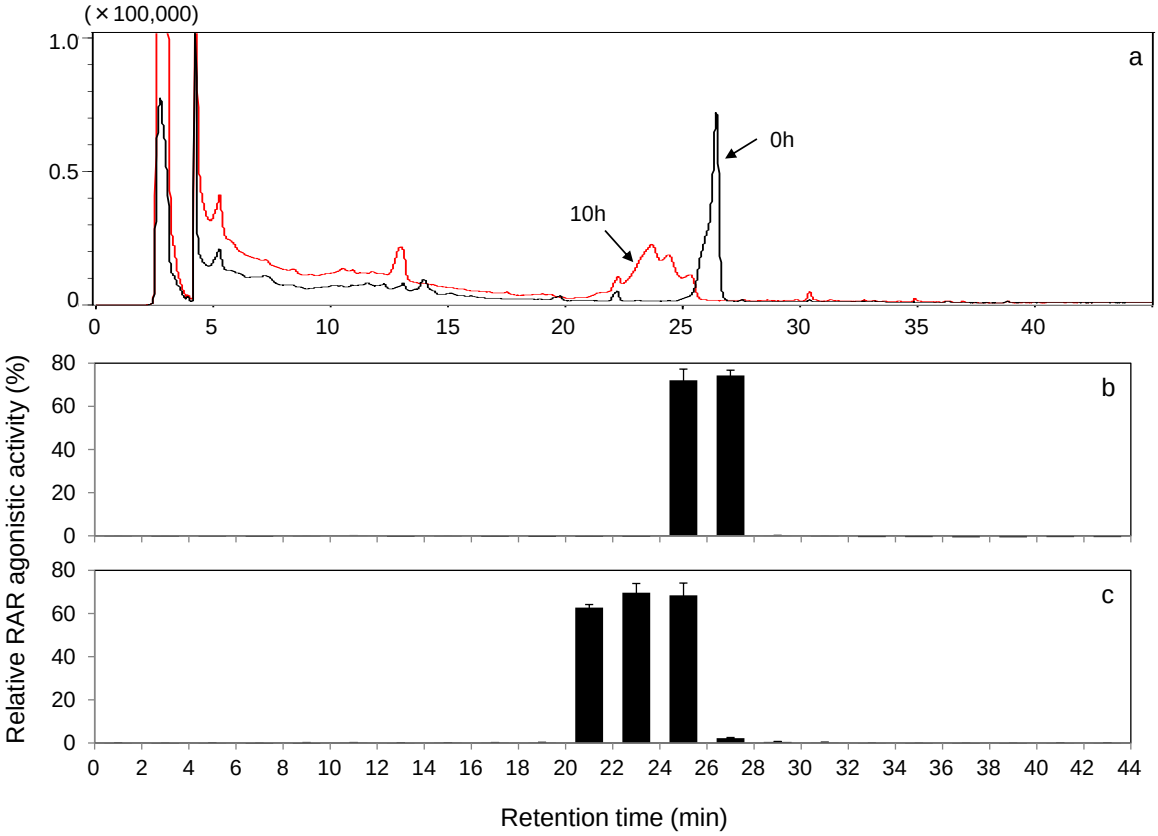

Fig. 4-9 HPLC chromatograms of the samples after 0 and 10 h treatment of 4-oxo-13cRA by intact sludge-A (a). The detection wavelength was 360 nm. RAR agonistic activity of the HPLC fractions collected at 2-min intervals from 0 to 44 min for samples at 0 h (b) and 10 h (c). Relative RAR agonistic activity was calculated by setting the maximal activity of atRA to 100% and the activity of the negative control to 0%. Data shown are the means ± SD (n=3).

4.8　要約

本章では、下水中の RAR アゴニストとして特定された RA 類(atRA、13cRA)および 4-oxo-RA 類(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)の下水処理系における挙動を明らかにするため、固相抽出法と LC/MS 分析を組み合わせた定量分析手法を開発し、様々な活性汚泥処理法を採用している 6 つの都市下水処理場における 4 物質の挙動と RAR アゴニスト活性の推移を調査した。さらに、4 物質の回分処理実験を実施し、活性汚泥処理における 4 物質の除去特性の解明を試みた。

定量分析手法に関する検討の結果、最適化した固相抽出(試料 pH：調整せず、カラムコンディショニング：MeOH と超純水、通水後の洗浄：40%CH_3CN)、HPLC 分画による精製(下水試料のみ)、および **Table 4-4** に示す条件における LC/MS 分析を組み合わせることで、下水、下水処理水中の RA 類および 4-oxo-RA 類をある程度定量的に分析できることが明らかとなった。

確立した定量分析手法を用いた実下水処理場における調査において、同定した 4 物質が都市下水中の主要な RAR アゴニストであり、時季や処理方式によらず活性汚泥処理によって概して良好に除去されることが明らかとなった。しかし、一部の処理場において、4 物質が除去されたのにもかかわらず、RAR

アゴニストが残存することがあり、場合によっては活性汚泥処理によって未知の RAR アゴニストが生成する可能性のあることが推察された。また、活性汚泥処理や塩素処理によって atRA や 4-oxo-13cRA が新たに生成し得ることも確認された。

活性汚泥を用いた 4 物質の回分処理試験において、4 物質を同時に添加した処理試験では、RA 類は速やかに汚泥に吸着し、水中から除去されることが示唆された。一方、4-oxo-RA 類の水中からの除去は、汚泥吸着に加えて、活性汚泥微生物による生分解もある程度大きく寄与することが示唆された。また、4-oxo-RA 類の分解過程で新たな RAR アゴニストが生成・残存することも明らかとなった。

総括ならびに結論

RAR アゴニスト作用を示す化学物質は、様々な生物種の内分泌機能を攪乱し、水生生物に外部形態異常などの重篤な生体影響を引き起こし得る水環境中の潜在的なリスクファクターであることが明らかにされつつある。しかし、RAR アゴニストによる水環境汚染に関する知見は、世界的に見ても乏しく、ごく一部を除き原因物質も特定されないのが現状である。特に、我が国においてはこれまで、RAR アゴニストによる水環境汚染に関する知見は全く得られていない。そこで本研究では、日本の水環境における RAR アゴニスト汚染の実態を解明することを目的として、各種の調査研究を行った。

第 1 章では、RA の過剰摂取がもたらす生体影響に関する既知の知見を概観して RAR アゴニストがもたらす影響を把握するとともに、RAR アゴニストによる水環境汚染に関して行われた既往研究を整理し、本研究の参考とした。

atRA および 9cRA は RAR との結合を介して、脊椎動物の視覚や形態形成、発生、細胞分化、恒常性の維持に重要な役割を果たしているが、その過剰摂取は、多様な生物種に対して、骨格形成異常をはじめ様々な生体影響を引き起こすことが知られている。文献調査より、近年、北米や中国の水環境において、RA 類と同様の作用を引き起こす未知の RAR アゴニストが原因と推測される野生生物への悪影響が生じていることが明らかとなった。これらの報告は地理的に離れた地域の水環境で RAR アゴニスト汚染が生じていることを示しており、RAR アゴニスト汚染が世界的な問題であることを示唆している。また、中国の下水中、あるいは下水処理水中の主要な RAR アゴニストは 4-oxo-atRA および 4-oxo-13cRA であることが明らかとなったが、この事例を除いては、原因物質は同定されていないことが明らかとなった。このような現状から、RAR アゴニストによる未知のリスクを正しく理解し、その汚染に対する適切な対策を講じていくために、日本の水環境における RAR アゴニスト汚染の実態を明らかにすることが急務であると考えられた。

第 2 章では、複数の下水処理場および河川において、酵母 two-hybrid 法を用いたバイオアッセイにより RAR アゴニスト汚染の調査を実施し、日本の水環境中における汚染の実態を RAR へリガンドへの結合活性ベースで把握した。

大阪府下の 4 つの下水処理場における調査から、時期によらず、下水中には普遍的に RAR アゴニスト活性が存在していることが明らかとなった。また、下水処理水中からも RAR アゴニスト活性が検出されたが、多くは高いレベルではなかった。しかし、活性が処理水中から完全に除去されずに比較的高いレベルで残存する場合もあったことから、RAR アゴニストが下水処理場から河川水中に放流される可能性が示された。一方、琵琶湖-淀川水系および猪名川水系における調査から、場所や時期によらず、河川水中にも普遍的に RAR アゴニスト活性が存在しており、いずれの河川でも、下流部の特定の地点で比較的高い活性が示されることが明らかとなった。また、従来のステロイドホルモン受容体に作用する従来の EDCs(ER アゴニスト等)の主な汚染源として知られている下水処理場は、必ずしも RAR アゴニスト汚染の主要な汚染源でないことが示唆され、他に異なる排出源が複数存在していることが推察された。また、本章で検出された RAR アゴニスト活性は、中国やオーストラリアで検出された RAR アゴニストレベルと同程度の汚染レベルであることが明らかとなったが、水生生物に生体影響を及ぼす atRA の最小作用濃度は、ここで検出された下水処理水および河川水中の最大濃度(atRA 相当活性)に比べて、それ

ぞれ 3.8 倍、18.7 倍高い値であることから、直ちに生体に影響を及ぼす可能性は低いものと考えられた。

第 3 章では、下水および河川表層水中に含まれる RAR アゴニストを HPLC により分画・精製し、精密機器分析によって同定する試みを行った。

下水中に存在する RAR アゴニストは、処理場や時期によらず同一のものと考えられ、主要なものは RA 類(atRA、13cRA)およびその酸化代謝物(4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)であることが明らかとなった。これら 4 物質は、食物由来の β-カロテンが人の体内で代謝されて生じたものが、グルクロン酸抱合体の形で体外に排泄されて下水中に混入し、微生物作用によって脱抱合化されて生成したものと考えられた。一方、河川水中に存在する主要な RAR アゴニストも複数存在し、場所や時期によらず同一の物質であることが示されたが、この研究の範囲では物質を同定するまでには至らなかった。ただし、下水中で特定された 4 物質(atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)とは異なる物質であることが明らかとなり、親 MS の *m/z* が 424 および／あるいは 279 であることが示された。

第 4 章では、下水中の主要な RAR アゴニストとして特定された 4 物質(atRA、13cRA、4-oxo-atRA、4-oxo-13cRA)の下水処理系における挙動を明らかにするため、固相抽出法と LC/MS 分析を組み合わせた定量分析手法を開発し、様々な活性汚泥処理法を採用している 6 つの都市下水処理場における挙動と RAR アゴニスト活性の推移を調査した。さらに、活性汚泥による 4 物質の回分処理実験を実施し、4 物質の除去特性を調べた。

定量分析手法に関する検討の結果、最適化した固相抽出(MeOH と超純水によるカラムコンディショニング、通水後の 40%CH_3CN 洗浄)、HPLC による分画・精製、および LC/MS 分析を組み合わせることで、下水、下水処理水中の RA 類および 4-oxo-RA 類をある程度定量的に分析できることが明らかとなった。また、確立した定量分析手法を用いた実下水処理場における調査においては、4 物質が都市下水中の主要な RAR アゴニストであり、時季や処理方式によらず活性汚泥処理によって良好に除去されることが確認された。しかし、一部の処理場において、4 物質が除去されたのにもかかわらず、RAR アゴニスト活性が残存することがあったことから、活性汚泥処理によって未知の RAR アゴニストが生成する可能性のあることが示された。また、活性汚泥処理や塩素処理によって atRA や 4-oxo-13cRA が新たに生成し得ることも確認された。さらに、活性汚泥を用いた 4 物質の回分処理試験において、RA 類は速やかに汚泥に吸着し、水中から除去されることが明らかになったが、4-oxo-RA 類の水中からの除去には、汚泥吸着のみでなく、活性汚泥微生物による生分解もある程度寄与することが示された。また、4-oxo-RA 類の分解過程で新たな RAR アゴニストが生成・残存することが確認された。

本研究によって、日本における RAR アゴニストによる水環境汚染の実態の一部が解明され、下水由来の RAR アゴニストのリスク評価と対策の立案に貢献する基本的な知見を提供することができた。今後は、活性汚泥処理によって生成する未知の活性物質を特定し、河川等に放流された後に、どのような消長を示すかを明確にすることが、下水由来の RAR アゴニストによるリスクを予測、管理していくうえで重要な課題である。また、下水またはその処理に由来しない水環境中の RAR アゴニストについては、主要物質とその排出源を特定することにより、その環境内および水生生物の生体内挙動を考慮したリスクの評価と汚染対策を立案することが課題である。

参考文献

Allinson, M., Shiraishi, F., Salzman, S. A. and Allinson, G. (2011a) In vitro assessment of retinoic acid and aryl hydrocarbon receptor activity of treated effluent from 39 wastewater-treatment plants in Victoria, Australia, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **61**, 539-546

Allinson, M., Shiraishi, F., Kamata, R., Kageyama, S., Nakajima, D., Goto, S. and Allinson, G. (2011b) A pilot study of the water quality of the Yarra River, Victoria, Australia, using in vitro techniques, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **87**, 591-596

Barua, A.B. and Sidell, N. (2004) Retinoyl β-glucuronide: A biologically active interesting retinoid, *J. Nutri.*, **134**, 286S-289S.

Burkhart, J. G., Helgen, J. C., Fort, D. J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T. L., Gernes, M., Magner, J., Shelby, M. D. and Lucier, G. (1998) Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities, *Environmental Health Perspectives*, **106**, 841-848.

Cao, N., Yang, M., Zhang, Y., Hu, J., Ike, M., Hirotsuji, J., Matsui. H., Inoue, D. and Sei, K. (2009) Evaluation of wastewater reclamation technologies based on in vitro and in vivo bioassays, *Sci. Total Environ.*, **407**, 1588-1597

Colborn, T., vom Saal, F. S. and Soto, A. M. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ. Health Perspect.*, **101**, 373-384.

Collins, M. D. and Mao, G. E. (1999) Teratology of retinoids, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 399-430.

Degitz, S. J., Kosian, P. A., Makynen, E. A., Jensen, K. M. and Ankley, G. T. (2000) Stage- and species-specific developmental toxicity of all-*trans* retinoic acid in for negative North American Ranids and *Xenopus laevis*, *Toxicol. Sci.*, **57**, 264-274.

Degitz, S. J., Holcombe, G., Kosian, P. A., Tietge, J., Durhan, E. and Ankley, G. T. (2003) Comparing the effects of stage and duration of retinoic acid exposure on amphibian limb development: chronic exposure results in mortality not limb malformations, *Toxicol. Sci.*, **74**, 139-146.

Gardiner, D. M. and Hoppe, D. M. (1999) Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*), *J. Exp. Zool.*, **284**, 207-216.

Gardiner, D. M., Ndayibagira, A., Grün, F. and Blumberg, B. (2003) Deformed frogs and environmental retinoids, *Pure. Appl. Chem.*, **75**, 2263-2273.

Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN. 2009. Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sludge batch studies. *Environ Sci Technol* 43: 3612-3618

Haga, Y., Suzuki, T. and Takeuchi, T. (2002) Retinoic acid isomers produce malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, *Zoolog. Sci.*, **19**, 1105-1112.

Herrmann, K. (1995) Teratogenic effects of retinoic acid and related substances on the early development of the zebrafish (*Brachydanio rerio*) as assessed by a novel scoring system, *Toxicol. in Vitro*, **9**, 267-283.

Idres, N., Marill, J., Flexor, M. A. and Chabot, G. G. (2002) Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-*trans*-retinoic acid metabolites and isomers, *J. Biol. Chem.*, **227**, 31491-31498.

Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L. and Holoubek, I. (2006) Environmental xenobiotics and nuclear receptors-Interactions, effects and in vitro assessment, *Toxicol. in Vitro*, **20**, 18-37.

Jin, S., Yang, F., Liao, T., Hui, Y. and Xu, Y. (2008) Seasonal variations of estrogenic compounds and their estrogenicities in influent and effluent from a municipal sewage treatment plant in China, *Environ. Toxicol. Chem.*, **27**, 146-153

Kahn, T. A., Blumer, J., Silverman, R. A. and Bickers, D. R. (1988) Screening for the developmental toxicity of retinoids: use of the sea urchin model, *Fundamental and Applied Toxicology*, **11**, 511-518.

Kolodziej, D. P., Gray J. L. and Sedlak, D. L. (2003) Quantification of steroid hormones with pheromonal properties in municipal wastewater effluent, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 2622-2629.

Kraft, J. C., Schuh, T., Juchau, M. R. and Kimelman, D. (1994) Temporal distribution, localization and metabolism of all-*trans*-retinol, didehydroretinol and all-*trans*-retinal during *Xenopus* development, *Biochem. J.*, **301**, 111-119.

Kraft, J. C. and Juchau, M. R. (1995) *Xenopus laevis*: a model system for the study of embryonic retinoid metabolism Ⅲ. Isomerization and metabolism of all-*trans*-retinoic acid and 9-*cis*-retinoic acid and their dysmorphogenic effects in embryos during neurulation, *Drug Metabolism and Disposition*, **23**, 1058-1071.

Lee, Y. M., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Moon, C. K., Eriksson, U. and Eto, K. (1995) Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells, *Development*, **121**, 825-837.

Li S, Barua AB, Huselton CA. 1996. Quantification of retinoyl-β-glucuronides in rat urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 683: 155-162

Marill J., Idres N., Capron C. C., Nguyen E. and Chabot G. G. (2003) Retinonic acid metabolism and mechanism of action: a review, *Current Drug Metabolism*, **4**, 1-10.

Martin, G., Goh, E. and Neff, A. W. (2002) Evaluation of the developmental toxicity of crocetin on *Xenopus*, *Food and Chemical Toxicology*, **40**, 959-964.

Matsumoto, A., Mizukami, H., Mizuno, S., Umegaki, K., Nishikawa, J., Shudo, K., Kagechika, H. and Inoue M. (2007) β-Cryptoxanthin, a novel natural RAR ligand, induces ATP-binding cassette transporters in macrophages, *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 256-264

Menegola, E., Broccia, M. L., Di Renzo, F., Massa, V., and Giavini, E. (2004) Relationship between hindbrain segmentation, neural crest cell migration and branchial arch abnormalities in rat embryos exposed to fluconazole and retinoic acid in vitro, *Reproductive Toxicology*, **18**, 121-130.

Minucci, S., Saint-Jeannet, J. P., Toyama, R., Scita, G., Deluca, L. M., Taira, M., Levin, A. A., Ozato, K. and Dawid, I. B. (1996) Retinoid X receptor-selective ligands produce malformations in *Xenopus* embryos, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1803-1807.

Miwa S. and Yamano K. (1999) Retinoic acid stimulates development of adult-type chromatophores in the flounder, *Journal of Experimental Zoology*, **284**, 317-324.

Napoli, J. L. (1999) Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism, *Biochim. Biophys. Acta*, **1440**, 139-162.

Nishikawa, J., Saito, K., Goto, J., Dakeyama, F., Matsuo, M. and Nishihara, T. (1999) New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **154**, 76-83.

Pakdeenarong, N. and Damrongphol, P. (2006) Effects of all-trans retinoic acid on germ cell development of embryos and larvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, *Biologia*, **61**, 621-625.

Pijnappel, W. W. M., Hendriks, H. F. J., Folkers, G. E., van den Brink, C. E., Dekler, E. J., Edelenbosch, C., van der Saag, P. T. and Durston, A. J. (1993) The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification, *Nature*, **366**, 340-344.

Ritchie, H. E., Brown-Woodman, P. D. and Korabelnikoff, A. (2003) Effect of co-administration of retinoids on rat embryo development in vitro, *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, **67**, 444-451.

Sciarrino, S. and Matranga, V. (1995) Effects of retinoic acid and dimethylsulfoxide on the morphogenesis of the sea urchin embryo, *Cell Biology International*, **19**, 675-680.

Suzuki, T., Srivastava, A. S. and Kurokawa, T. (2000) Experimental induction of jaw, gill and pectoral fin malformations in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, larvae, *Aquaculture*, **185**, 175-187.

Tabb, M. M. and Blumberg, B. (2006) New modes of action for endocrine-disrupting chemicals, *Mol. Endocrinol.*, **20**, 475-482.

Ternes, T. A., Kreckel, P. and Mueller, J. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants –II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total. Environ.* 225, 91-99.

Vandenlangenberg, S. M., Canfield, J. T. and Magner, J. A. (2003) A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs), *Environ. Monit. Assess.*, **82**, 45-61.

Vandersea, M. W., Fleming, P., McCarthy, R. A. and Smith, D. G. (1998) Fin duplications and deletions induced by disruption of retinoic acid signaling, *Development Genes and Evolution*, **208**, 61-68.

Vajda, A. M., Barber, L. B., Gray, J. L., Lopez, E. M., Woodling, J. and Norris, D. O. (2008) Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent, *Environ. Sci. Technol.*, **42**, 3407-3414.

Wu, X., Hu, J., Jia, A., Peng, H., Wu, S. and Dong, Z. (2010) Determination and occurrence of retinoic acids and their 4-oxo metabolites in Liaodong Bay, China, and its adjacent rivers. *Environ Toxicol. Chem.* **29**, 2491-2497.

Zhen, H., Wu, X., Hu, J., Xiao, Y., Yang, M., Hirotsuji, J., Nishikawa, J., Nakanishi, T. and Ike, M. (2009) Identification of retinoic acid receptor agonists in sewage treatment plans, *Environ. Sci. Technol.*, **66**, 6611-6616.

Zhou, Y., Zha, J. and Wang, Z. (2012) Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China, *Environ. Monit. Assess.*, **184**, 6799-6813

門上希和夫 (1999) 奇形ガエルの原因解明に関する海外研修, *環境研究*, **114**, 102-107.

北本寛明, 古武家善成, 中野武 (2005) 河川水中のエストロゲン様活性測定における酵母ツーハイブリッド・アッセイ法とレセプターバインディングアッセイキットの比較, *兵庫県立健康環境科学研究センター紀要*, **2**, 37-45.

国本学, 米元純三, 相馬悠子, 中杉修身 (1997) ヒト由来細胞培養系を用いた水環境試料中の有機塩素化合物の毒性評価, 水環境学会誌, **20**, 752-756

斎藤幸一, 住田佳代 (2003) 核内受容体を利用したバイオ技術による内分泌攪乱化学物質の分析と生物影響評価(特集総説 環境ホルモン汚染のバイオ浄化研究の新展開), *環境バイオテクノロジー学会誌*, **3**, 3-13.

宗宮功, 遠藤伸一, 藤井滋穂 (1980) 塩素処理に関する基礎的研究(III)—有機塩素化合物の生成について—, 下水道協会誌, **188**, 2-13

西川淳一, 西原力 (2000) 「酵母を用いたツーハイブリッド試験」内分泌撹乱化学物質の生物試験研究法, *シュプリンガー・フェアラーク東京*, 20-27.

西川淳一, 間宮聡, 金山知彦, 西原力 (2003) 内分泌攪乱物質の核内受容体ファミリーを介する作用発現, *環境バイオテクノロジー学会誌*, **3**, 37-42.

日本水道協会 HP 水道資料室：日本の水道の現状 (http://www.jwwa.or.jp/shiryou/water/water.html)

日本下水道協会, (1997) 下水道試験法

読売新聞 2008 年 1 月 4 日朝刊第 37 面

本論文に関する報告

学術論文

1. Inoue, D., Nakama, K., Sawada, K., Watanabe, T., Takagi, M., Sei, K., Yang, M., Hirotsuji, J., Hu, J., Nishikawa, J., Nakanishi, T. and Ike, M. (2010) Contamination with retinoic acid receptor agonists in two rivers in the Kinki region of Japan. *Water Research.*, **44**, 2409-2418.

Fig. 2-2 was cited from Fig. 1 in this research paper.
Fig. 2-8 was adopted from Fig. 2 in this research paper.
Fig. 2-6 was adopted from Fig. 3 and Fig. 4 in this research paper.
Fig. 3-11 was adopted from Fig. 5 in this research paper.
Fig. 3-13 was cited from Fig. S4 in this research paper.

2. Sawada, K., Inoue, D., Wada, Y., Sei, K., Nakanishi, T. and Ike, M. (2012) Detection of retinoic acid receptor agonistic activity and identification of causative compounds in municipal wastewater treatment plants in Japan, *Environ. Toxicol. Chem.*, **31**, 307-315

Fig. 2-4 was cited from Fig. 1 in this research paper.
Fig. 2-5 was cited from Fig. 2 in this research paper.
Fig. 3-3 was cited from Fig. 3 in this research paper.
Fig. 3-4 was adopted from Fig. S2 in this research paper.
Fig. 3-5 was adopted from Fig. S3 in this research paper.
Fig. 3-6 was cited from Fig. 4 in this research paper.
Fig. 3-7 was cited from Fig. 5 in this research paper.
Fig. 4-2 was cited from Fig. S4 in this research paper.

3. 澤田和子, 井上大介, 清和成, 池道彦　(2013)　都市下水処理場におけるレチノイン酸類および4-oxo-レチノイン酸類の挙動の解析. *水環境学会誌*,　**36**, 57-65.

Fig. 4-1は、本学術論文のFig. 1を引用した。
Fig. 4-3は、本学術論文のFig. 2を引用した。
Table 4-5は、本学術論文のTable 2を引用した。
Table 4-7は、本学術論文のTable 4を引用した。
Table 4-8は、本学術論文のTable 5を引用した。
Table 4-9は、本学術論文のTable 6を引用した。

4. Inoue, D., Sawada, K., Wada, Y., Sei, K. and Ike, M. (2013) Removal characteristics of retinoic acid and 4-oxo-retinoic acids in wastewater by activated sludge treatment. *Water Sci. Technol.*, in press.

Fig. 4-4 and Fig. 4-5 were adopted from Fig. 1 in this research paper.
Fig. 4-6 and Fig. 4-7 were adopted from Fig. 2 in this research paper.
Fig. 4-8 was cited from Fig. 3 in this research paper.

国際会議録

1. Inoue, D., Nakama, K., Watanabe, T., Sawada, K., Matsui, H., Sei, K., Nakanishi, T., and Ike, M. (2009) Screening of multiple nuclear receptor agonistic activities in wastewater treatment plants in Japan using yeast two-hybrid assay, The 2nd IWA Asia-Pacific Regional Young Water Professionals Conference, November 4-6, Beijing, China, Oral presentation.

2. Inoue, D., Sawada, K., Nakama, K., Watanabe, T., Sei K., Nakanishi, T., and Ike, M. (2010) Identification of retinoic acid receptor agonists in municipal wastewater treatment plants in Japan, Water and Environment Technology Conference 2010 (WET2010), June 25-26, Kanagawa, Japan, Oral presentation.

3. Inoue, D., Sawada, K., Wada, Y., Sei, K., Ike, M. (2012) Removal characteristics of retinoic acids and 4-oxo-retinoic acids in wastewater by activated sludge treatment. Proceedings of World Water Congress 2012, in USB (IWA-8884), September 16-21, 2012, Busan, Korea, Oral presentation.

4. Sawada, K., Inoue, D., Wada, Y., Sei, K., Ike, M. (2012) Identification and fate of major retinoic acid receptor agonists in municipal wastewater treatment plant in Japan. SETAC Asia/Pacific 2012 Annual Meeting (Learning from History and Applying Advancing Science to Build a Safer and Sustainable Environment), September 24-27, 2012, Kumamoto, Japan, Oral presentation.