

黒瀬川河川水中のノニルフェノールとビスフェノールAの濃度とそれらの植物への蓄積

米丸紫陽子・前田 明子・出口 実歩・桜井 直樹

739 - 8521 東広島市鏡山1 - 7 - 1 広島大学総合科学部自然環境科学講座

Nonylphenol and bisphenol A concentration of Kurose river and their accumulation in plants

Shoko YONEMARU, Akiko MAEDA, Miho DEGUCHI, Naoki SAKURAI

Department of Environmental Sciences, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8521, Japan

Abstract: Nonylphenol and bisphenol A are member of endocrine disrupters. We have measured their concentration in the Kurose river water and two aquatic plants (*Rhizoclonium* sp., *Egeria densa* Planch.). As for nonylphenol, the highest concentration was $1.90 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the river water. It was more than the non-influenced concentration ($0.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) to a freshwater fish reported by the Ministry of Environment, Japan. As for bisphenol A, the highest concentration was $0.75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ only in the tributary river. Nonylphenol concentration in *Rhizoclonium* sp increased from $265.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (September) to $548.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (November). The accumulation rate was over 1000 times at some points, suggesting the possible use of *Rhizoclonium* sp to remove nonylphenol from the river.

1. はじめに

河川の汚染では家庭排水や工場廃水による重金属や有機物汚染が問題視されてきたが、近年ではごく微量で生体内のホルモンの分泌を攪乱する内分泌攪乱物質(環境ホルモン)が河川水中に存在していることが明らかにされていった。環境省は、2001年8月ノニルフェノールがある一定以上の濃度で魚類のメス化に強い影響を与えることを世界で初めて確認した¹⁾。魚類の影響についてノニルフェノールが魚類のメス化に強い影響を与えていることを世界で初めて環境省が確認した。実験は、メダカ60匹を5種類の濃度の水槽に入れたところ、 $11.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ で無作為に抽出した13匹中4匹のオスの精巣に卵のもとになる細胞が発生した。このメダカの試験で精巣卵、ピテロジェニン産生が有意にみられた水中濃度 $11.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ が性分化に関する影響の最小作用濃度とされた。魚類への影響の場合の最大無作用濃度は $6.08 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ となり、また、予測無影響濃度については最大無作用濃度に安全係数 1/10 を乗じた $0.608 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ とされた。これは環境庁及び建設省が実施した平成10年度～11年度の水質検査における検出濃度から定めた一般水域での最高値と推定される予測環境濃度の $0.59 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ に非常に近い値となっている。生態系に深刻な影響を与える内分泌攪乱物質は、湖水や河川、海洋など広い地域に存在している。これらの汚染物質を環境から取り除くには、地

球の生物進化の過程で形成された多様な微生物や動・植物の分解代謝機能に依存する環境修復が有望と考えられる。これまで微生物による汚染物質の分解について多くの研究がされてきた^{2),3)}が、植物を利用した環境修復の研究は少ない。したがって、植物の集積能力を利用した環境修復浄化技術(ファイトレメディエーション)は、現在最も注目されている技術のひとつである。

また、日本では河川水は水道原水として利用されているので、一般河川における内分泌攪乱物質の汚染に対する人々の関心も高まっている。よって河川水における内分泌攪乱物質の動態を探ることで汚染源をつきとめることが国民の健康上必要となるだろう。

そこで本研究では、黒瀬川の河川水中のオクチルフェノール、ノニルフェノール、ビスフェノールAの存在量を正確に測定し、これらの環境ホルモンが植物に蓄積されるかを検討し、ファイトレメディエーションに、河川に生息する藻類や水生植物が利用可能かどうかについて調べることを目的とした。また、藻類はクロロフィルを持っており、太陽光のエネルギーを有機物のエネルギーとして蓄えている。このようにして繁殖した藻類を水生昆虫の幼生が食べ、それらをより上位の捕食者が摂取し生育している。つまり本研究によって同時に環境ホルモンの生物濃縮の危険性を調べることにもなる。

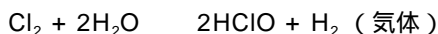
本研究において、調査した内分泌かく乱物質は、*p*-*t*-オクチルフェノール(*p*-*t*-OP)、*p*-*n*-オクチルフェノール(*p*-*n*-OP)、4-ノニルフェノール(4-NP)、4-*n*-ノニルフェノール(4-*n*-NP)、ビスフェノールA(BPA)の5種類である。ノニルフェノールの原料としては、5種類のプロピレン(C_3H_6)3量体の混合物が、オクチルフェノールの原料としては、2種類のイソブテン((C_4H_8))2量体が用いられる。これらアルキルフェノール類は、非イオン界面活性剤であるアルキルフェノールエトキシレートの原料として用いられる。これまで界面活性剤として生産されているのは直鎖アルキルフェノール系ではなくアルキル基が分岐したものである。界面活性剤用にはノニルフェノール系とオクチルフェノール系が4:1の割合で使用されている。国内のノニルフェノール系界面活性剤の生産量は、平成12年の調べで16500トン(経済産業省調べ)である。アルキルフェノール類の自然界での直接的な発生は知られておらず、全て人為発生源からのものである。日本では主に繊維産業、金属加工業、工業洗浄、クリーニング等から排出されたアルキルフェノールエトキシレートの微生物分解によって生じるものと想定されるが、排出量に関するデータはない。アルキルフェノールエトキシレートは下水処理場の好気性汚泥処理等によりエトキシ基の短縮が起こりアルキルフェノールジエトキシレートやアルキルフェノールモノエトキシレート、エトキシ基の末端がカルボキシル化したアルキルフェノールジカルボキシレート、アルキルフェノールモノカルボキシレートといった中間体が生成し、その後嫌気性汚泥処理を経てアルキルフェノールを生成する。アルキル基の炭素数が9の場合がノニルフェノール、8の場合がオクチルフェノールである。アルキル基が直鎖の4-*n*-ノニルフェノールは透明~淡黄色で粘性の高い液体であり、水溶性は $6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (20℃)と低い。また疎水性がある程度高く、オクタノール/水分配係数は $10^{4.48}$ で、堆積物への蓄積や生物濃縮が起こっている。環境省が行った検討によると、底質及び懸濁物質のノニルフェノール濃度は他の媒体(水、生物)よりも $10^2\sim 10^4$ 倍高い傾向が推測されている¹⁾。

ビスフェノールAはプラスチックのポリカーボネートとエポキシ樹脂の合成原料である。ビスフェノールAの生産量の70%がポリカーボネートに、25%がエポキシ樹脂に用いられている。ビスフェノールAは分解性があり、野外の水(下水、排水)のなかでの分解は $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度の負荷の場合、3~4日で大部分が分解し、中でも化学プラント排水中では最も早く分解されたと報告されている⁴⁾。平成12年度の国土交通省の調べでは河川を流下中に、分解等によりビスフェノールAが減少している可能性があることを示唆している。しかし、生協連合会グリーンコープ連合の調べによると、ビス

フェノール A が水道水中から検出されたことが報告されている⁵⁾。濃度は $0.02 \sim 0.14 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ である。原因に水道原水の河川汚染のほか、家庭用給水用の硬質塩化ビニル管からの溶出が挙げられている。

藻類への影響に関して欧州委員会は、植物プランクトン3種、オオウキクサ類を試験生物とした急性毒性試験を行った結果、72時間または96時間でノニルフェノールの半数影響濃度 EC_{50} は $27 \sim 1300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ の範囲にあると報告している¹⁾。カナダの環境省及び厚生省は、藻類の半数致死濃度 LC_{50} として $27 \sim 2500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ を報告している。

水道水には消毒剤として、塩素が使われている。このとき、塩素は水と反応して次亜塩素酸・次亜塩素酸イオンを発生する。それらを総称して残留塩素と言われる。



近年、次亜塩素酸による環境ホルモンの化学的分解が研究され始めている⁶⁾。本研究では黒瀬川河川水に環境ホルモンを添加し、次亜塩素酸処理によって、どのような影響を受けるかについても研究を行った。

2. 実験方法および材料

2-1 試料採取

水質試料は、並滝寺池、地点6、5、4、3、2、1、1a、1b、樋ノ詰橋、吾妻子取水口(図1)から採水した。植物試料は、ネダシグサ (*Rhizoclonium sp.*) とオオカナダモ (*Egeria densa* Planch.) の2種類(図2)を各地点で採取した。



図1 サンプルング地点

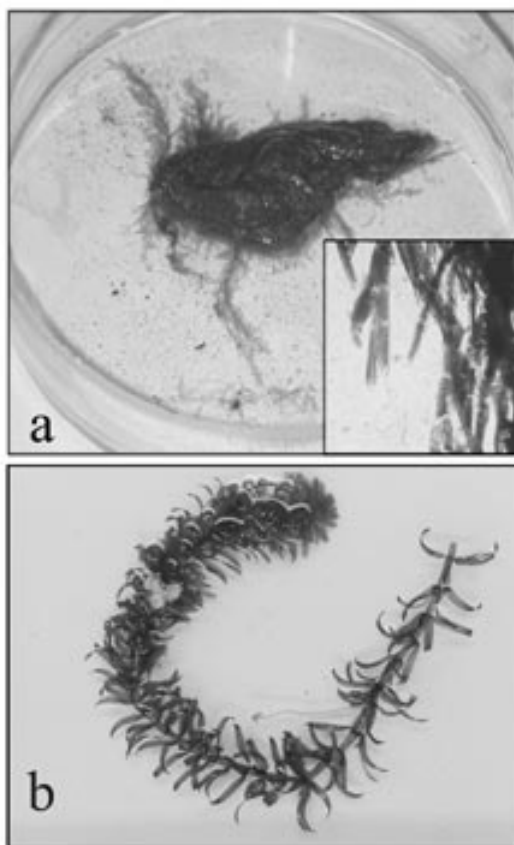


図2 a, ネダシグサ b, オオカナダモ

水質試料のサンプリングは、1 L のガラス瓶をあらかじめヘキサンで洗浄し、ふたをせず、アルミホイルを口にかぶせ、各地点でまず河川水でガラス瓶を3度洗浄し、その後河川水約1 L を採取した。採取日は、雨天時を除き、降雨のあった日から3日後以降に行った。

採水後、水1 L に対してアスコルビン酸（試薬特級 片山化学工業株式会社）1g と塩酸（試薬特級 35% 片山化学工業株式会社）1mL を添加し、4 で保存した。サンプリングして1週間以内に分析を終えた。

植物試料は、採取してすぐに水気を切ってから、10g ずつに分けてアルミホイルに包み、- 80 で保存した。

2 - 2 試料の前処理

a . 水質試料の前処理

試料水はフィルターホルダー（MILLIPORE 社）を用いてグラスファイバーろ紙（直径47mm、Whatman GF/C Cat No 1822 047）でろ過した。フィルター上に残った物質はアセトン（残留農薬分析用 関東化学株式会社）10mL をフィルターに通して洗浄し、ろ液に合わせた。あらかじめ酢酸メチル（試薬特級 片山化学工業株式会社）、アセトン、精製水（脱イオン交換水：ジクロロメタン = 4 : 1 を10分間分液ロートで振ったもの）各10mL を順に通水して洗浄、コンディショニングしたエムポアディスク（47mm、3M Empore™ 2215、ジーエルサイエンス株式会社）に上記のろ過水をおよそ100mL・min⁻¹の流速でアスピレーターを用いて通水した。通水終了後、酢酸メチル10mL でエムポアディスクに吸着された物質を試験管に溶出した。酢酸メチル溶液を窒素気流で1mL まで濃縮した。次にヘキサン（残留農薬分析用 関東化学株式会社）5mL を加えて栓をして激しく振り混ぜた。ガラス製ロートに、あらかじめヘキサンで洗浄した綿栓を詰め、その上に無水硫酸ナトリウム（試薬特級 片山化学工業株式会社）7g を乗せ、ガラス栓付き10mL 容標線付試験管にセットした。このロート上にヘキサン層を注いだ。試験管内壁をさらに3mL のヘキサンで洗浄し、これも無水硫酸ナトリウム上に注いだ。ガラス栓付き10mL 容標線付試験管内に得られた溶液に窒素ガスを吹き付けて約0.2mL まで濃縮した。

b . 植物試料の前処理

生重量10gの植物試料を100mL 容ビーカーにいれ、メタノール（残留農薬分析用 関東化学株式会社）90mL を加え、あらかじめヘキサンで洗浄したはさみで細断した。ホモジナイザー（AM-8 日本精機）でさらに細かくした後（10000回転・min⁻¹、5分間）、ポリトロン（T25-S3 funkentst. rt W. Germany）で破碎（9500回転・min⁻¹、5分間）し、10分間超音波洗浄器（1015J-MT, BRANSON ULTRASONIC, Co., Danbury, USA）で超音波処理を行った。3000rpm で10分間遠心分離（KUBOTA, MODEL 5220）を行い、上澄み液を500mL 容分液ロートにとった。これにメタノール飽和ヘキサン30mL を加えて振とうし静置した。上層のヘキサンを除いた後、メタノール層を、あらかじめ5%塩化ナトリウム水溶液（塩化ナトリウム 試薬特級 片山化学工業株式会社）300mL を入れた500mL 容分液ロートに入れて、ジクロロメタン（残留農薬分析用 片山化学工業株式会社）80mL を加えて振とうすることを2回くり返した。ジクロロメタン層を500mL 容分液ロートに移し、精製水50mL を加えて振とうし、ジクロロメタンを洗浄した。ジクロロメタン層をロータリーエバポレーター（RE111, 柴田科学機械株式会社）で5mL 程度に濃縮し、パストゥールピペットでガラス栓付き10mL 容標線付試験管にとり、窒素気流で約0.2mL まで濃縮した。

2 - 3 誘導体化 (エチル化)

a . 水質試料

約0.2mLまでに濃縮した試料に1M-KOH(95%エタノール溶液)(水酸化カリウム 試薬特級 片山化学工業株式会社)を0.5mL、ジエチル硫酸(Aldrich Chem. Co.)を0.2mL加え栓をして激しく振とうし、白く固化したのを確認した後、室温で30分間放置した。反応終了後、1M-KOH(95%エタノール溶液)を5mLの標栓まで加えて振り、精製水を8mLの標線まで加えて栓をして激しく振とうした。これに外部標準物質として重水素ラベルしたフェナンスレン-d₁₀(Aldrich Chem. Co.)が0.5mg・L⁻¹の濃度で溶けたヘキサン溶液1.0mLを正確に加えて栓をして激しく振とうし、室温に放置した。ヘキサン層をパスツールピペットでテフロンで裏張りをしたキャップ付き15mL容ねじ付き試験管にとり、試料液とした。精製水10mLに塩酸1mL、アスコルビン酸1gを溶解させたものをエムポアディスクに通水し、以下「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 - 3 誘導体化」に従って処理したものをブランク試料液とした。

b . 植物試料

約0.2mLまで濃縮した試料に1M-KOH(95%エタノール溶液)を0.5mL、ジエチル硫酸を0.2mL加え栓をして激しく振とうし、白く固化したのを確認した後、室温で30分間放置した。反応終了後、1M-KOH(95%エタノール溶液)を5mLの標栓まで加えてアルミホイルでふたをして70℃の湯浴に1時間放置した。1時間後、精製水を8mLの標栓まで加えて栓をして激しく振とうした。これに外部標準物質として重水素ラベルしたフェナンスレン-d₁₀が0.5mg・L⁻¹の濃度で溶けたヘキサン溶液1.0mLを正確に加えて栓をして激しく振とうし、室温に放置した。ヘキサン層をパスツールピペットでとり、別に用意した10mL容試験管(小口口に綿栓をして無水硫酸ナトリウム3gを乗せたもの)の無水硫酸ナトリウム上にしみ込ませ、さらにヘキサン3mLで溶出させた。これを窒素ガスで約0.2mLまで濃縮した後、4%エーテル/ヘキサン(ジエチルエーテル 試薬特級 片山化学工業株式会社)1mLを加えて溶解させた。この溶液をあらかじめ4%エーテル/ヘキサン10mLで洗浄したフロリジルカートリッジカラム(フロリジル, ジーエルサイエンス株式会社)に負荷し、4%エーテル/ヘキサン8mLで溶出し、窒素気流で0.5mLまで濃縮し試料液とした。

メタノール90mLに精製水5mLを加えたものに対して、「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 - 3 誘導体化」に従って処理したものをブランク試料液とした。

2 - 4 標準液の調製

各標準物質(*p*-t-OP、BPA(片山化学工業株式会社)、*p*-n-OP、4-NP(関東化学株式会社)、4-n-NP(Dr. Ehrenstorefer GmbH))を2~5mgの範囲で正確に測り取り、アセトンに2~5mL加えて1g/Lの標準原液を調製した。これらをアセトンで希釈または混合して標準液及び標準混合溶液を調製した。

2 - 5 添加回収実験

水1L、植物試料10gをそれぞれ2つ用意し、一方に調整しておいた標準液(4-NP 100mg・L⁻¹、他4種10mg・L⁻¹)を10μL添加した。十分に混合した後、「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 -

3 誘導体化」に従って処理したものを添加回収試料液とした。回収率は添加試料の測定値から未添加試料の値を差し引いて計算した。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{添加試料の測定値} - \text{未添加試料の測定値}}{\text{各標準物質の添加量}} \times 100$$

2 - 6 次亜塩素酸イオン添加実験

次亜塩素酸ナトリウム溶液（鹿 1 級 有効塩素濃度 5 % 関東化学株式会社）を用いて脱イオン水、河川水における環境ホルモン濃度の推移を調べた。河川水は黒瀬川の吾妻子取水口でサンプリングした。

脱イオン水 500 mL に次亜塩素酸ナトリウム溶液 0.1 mL を加えて塩素濃度 10 ppm の脱イオン水を調製した。次に、これから 5 mL とり、495 mL の脱イオン水で 1/100 希釈し、0.1 ppm の塩素濃度の脱イオン水を調製した。これにあらかじめ調製しておいた標準液（4-NP 100 mg · L⁻¹、他 4 種 10 mg · L⁻¹ の濃度）を 10 μ L 添加した。添加直後、30 分間、1 時間、2 時間暗室（25 °C）で静置したものをエムポアディスクに通水し、「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 - 3 誘導体化」に従って処理したものを試料液とした。

対照実験として、次亜塩素酸イオンを加えていない脱イオン水に標準物質を同濃度添加したものを、添加直後と 2 時間暗室で静置したものを同様に処理し、試料液とした。

また、脱イオン水 500 mL をエムポアディスクに通水し、「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 - 3 誘導体化」に従って処理したものをブランク試料液とした。

脱イオン水実験と同様にして塩素濃度 10 ppm と 0.1 ppm を含むの河川水 500 mL を調製した。他に 1 ppm、100 ppm の河川水 500 mL を調製し、計 4 種類の異なる塩素濃度の河川水を準備した。それに標準物質を、4-NP は 10 μ g、他 4 種は 1 μ g ずつ添加し、1 時間あるいは 1.5 時間暗室で静置したものをエムポアディスクに通水し、「2 - 2 試料の前処理」、及び「2 - 3 誘導体化」に従って処理したものを試料液とした。

対照実験として、次亜塩素酸イオンを加えていない河川水 500 mL に標準物質を同濃度添加したものを、添加直後と 1 時間暗室に静置したものを処理し試料液とした。

これら次亜塩素酸イオン添加実験では、酸化防止剤であるアルコールビン酸を入れると塩素の働きが抑えられるので、この実験ではアスコルビン酸は用いなかった。

2 - 7 GC/MS 分析

GC/MS は、SHIMADZU GC/MS QP5000 を使用した。キャピラリカラムは DB-5 (J&W SCIENTIFIC, 30m, 0.25mm i.d., 膜厚 0.25 μ m、液相 5%ジフェニル 95%ジメチルポリシロキサン)を用いた。キャリアガスは高純度ヘリウムガスを流量 0.7 mL/min で用いた。注入量はスプリットレス法 (1.5 分) で 1 μ L 注入した。注入口圧力は 35 kPa、注入口温度 280 °C、昇温は、初期温度 60 °C で 1 分保持、その後 15 °C/分で 280 度まで昇温した後、280 °C で 5 分間保持した。EI 電圧は 70 eV、イオン源温度は 280 度に設定し、SIM モードで検出した。

また、定量イオン及び物質同定のための参考イオンは表 1 のとおりである。4-NP は種々の分岐した混合物なので、代表ピーク (保持時間, 13.17 分) を決めて測定した。

表1 各環境ホルモン物質の定量用イオンと確認のための参考イオン

物質名	定量イオン	参考イオン
<i>p</i> -t-オクチルフェノール	163	135
<i>p</i> -n-オクチルフェノール	234	135
4-ノニルフェノール	177	163
ビスフェノールA	269	284
4-n-ノニルフェノール	135	
フェナンスレン-d ₁₀	188	

2 - 8 検量線作成および定量法

各標準物質が10 μg・mL⁻¹の濃度(4-NPは100 μg・mL⁻¹)で溶けている混合アセトン溶液を10mL容試験管に0、1、5、10 μL取り、「2 - 3誘導体化(エチル化)」を行ったものを検量線用標準液とした。この検量線用標準液を1 μL、GC/MSに注入し、標準物質と外部標準物質の濃度比とピーク面積比(表2)から検量線を作成した。

試料液1 μLをGC/MSに注入し得られた目的物質と外部標準物質のピーク面積から検量線により濃度比を求め、次の計算式により試料中の濃度を算出した。

$$\text{試料中の濃度} (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \text{または} \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}) = \frac{\text{検量線から求めた濃度比}}{\text{試料量} (\text{L} \text{または} \text{kg})}$$

さらにこの値を2 - 5で述べた回収率で割り、試料中の濃度とした。

表2 外部標準物質フェナンスレンに対する各環境ホルモンの定量ピークの比

	傾き	切片	r
<i>p</i> -t-OP	4.077	-0.086	0.999
<i>p</i> -n-OP	0.666	-0.012	0.998
4-NP	2.273	-0.049	0.994
4-n-NP	0.19	-0.033	0.999
BPA	4.317	-0.082	0.997

一定のフェナンスレンに対して、4種の異なる濃度の各物質を定量し、回帰直線から求めた。

3 結果

3 - 1 検出限界および定量限界

4-NP (0.5 μg) および他の物質 (0.05 μg) を混合したアセトン溶液を誘導体化し、得られた試料液を GC/MS で 5 回分析し、その測定値の標準偏差 (SD) を出した。検出限界値は 3 SD、定量限界は 10SD の値を取った (表 3)。また、実験操作中に試料に外部から混入する環境ホルモンの量を見積もるため、水質試料及び植物試料を分析する手順を試料なしで行い、ブランク値を求めた。

表 3 各測定物質の検出限界値

	検出限界値 ($\mu\text{g/L}$ または kg)		定量限界値 ($\mu\text{g/L}$ または kg)		ブランク値 ($\mu\text{g/L}$ または kg)	
	水質試料	植物試料	水質試料	植物試料	水質試料	植物試料
p-t-オクチルフェノール	0.0007	0.0700	0.0030	0.3000	0.0000	0.0000
p-n-オクチルフェノール	0.0030	0.3000	0.0080	0.8000	0.0000	0.0000
4-ノニルフェノール	0.0060	0.6000	0.0200	2.0000	0.0000	0.0435
ビスフェノールA	0.0020	0.2000	0.0040	0.4000	0.0015	0.0025
4-n-ノニルフェノール	0.0005	0.0500	0.0020	0.2000	0.0000	0.0008

3 - 2 各地点の河川水中の環境ホルモンについて

平成 12 年度に測定した黒瀬川の河川水中の環境ホルモン濃度を図 3 にまとめた。地点 2, 3 で環境省の生物に関する無影響濃度〔予測無影響濃度〕 $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ を超えていることがわかった。そして、下流に行くにつれ濃度は下降した。また、ビスフェノール A は地点 1 のみで突出して高かった。地点 1 は、黒瀬川の支流の古河川が合流した地点である。したがって、古河川に汚染源がある可能性を示唆している。

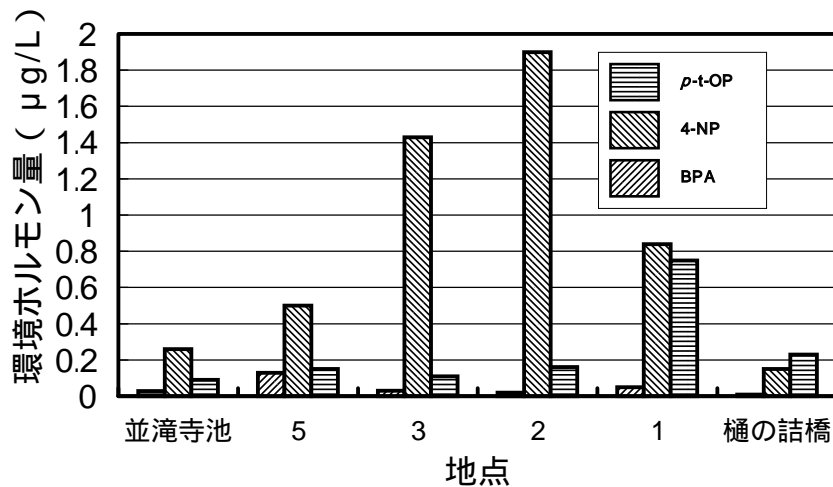


図 3 各地点の河川水中の環境ホルモン濃度 ($\mu\text{g/L}$)

3 - 3 植物試料中の環境ホルモン

表 4 にツルヨシ地上部に含まれる 4-NP と BPA 量を示した。4-NP は平成 12 年 12 月 26 日の値 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) と平成 13 年 4 月 4 日 (A) の値 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) が変わらず、冬と春で差は見られなかった。4 月 4 日 (B) に最も高い $26 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ が検出されたが、濃縮率 32.5 倍という低い値であった。BPA は全体に低い値であった。

表 4 ツルヨシ地上部に含まれる 4-NP と BPA

	$\mu\text{g}/\text{kg}$			
	12月26日	4月4日(A)	4月4日(B)	5月3日
4-NP	10 ^a	10 ^b	26 ^b	4 ^b
BPA	4 ^a	1 ^b	2 ^b	0 ^b

a , 検出限界 (4-NP, $0.4 \mu\text{g}/\text{kg}$; BPA, $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$)

b , 検出限界 (4-NP, $1.8 \mu\text{g}/\text{kg}$; BPA, $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$)

ネダシグサの藻体は肉眼的には綿毛状で、顕微鏡で観察すると糸状体である。ほとんどの糸状体は分枝がなく一列の細胞であるが、ごく稀に分枝する。栄養細胞の幅は $28 \sim 30 \mu\text{m}$ 、長さ $92 \sim 213 \mu\text{m}$ である。

藻類の判別は非常に難しいため、島根大学、大谷修司先生依頼したところ、黒瀬川の一部の試料からネダシグサ、カワシオグサ、サヤミドロの 3 種が見つかった。サンプリングのたびに試料を顕微鏡で調べたところ、分枝はほとんど見られず、全体的に緑色を呈していたのでネダシグサとみなした。

オオカナダモの葉は茎に密に付き $3 \sim 5$ (~ 8) 輪生、広線形である。長さ $1.5 \sim 4\text{cm}$ 、幅 $2 \sim 4.5\text{mm}$ 、葉縁には細鋸歯がある。植物体は冬季も枯れず、そのまま越冬する (図 2)。

平成 13 年度 11 月の各地点のネダシグサに含まれる環境ホルモン含量を図 4 に示した。*p*-n-OP、4-n-NP は検出限界以下 ($0.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) だったので省略した。4-NP、BPA の試料ブランク値はそれぞれ $0.0435 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.0025 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ であった。図に示した値は測定値からブランク値を差し引いた値である。4-NP は上流 (地点 5) で最も高く、下流 (地点 1 a、1 b) で低かったが、樋の詰橋で若干高かった。BPA は古河川の地点 1 a で最も高かった。*p*-t-OP は、地点 5 のみで検出された。図 5 にオオカナダモに含まれる環境ホルモン濃度をまとめた。オオカナダモは地点 6 と 2 のみ採取でき他の地点には生息していなかった。4-NP は地点 6 より 2 に多く検出された。BPA は両地点とも微量であった。

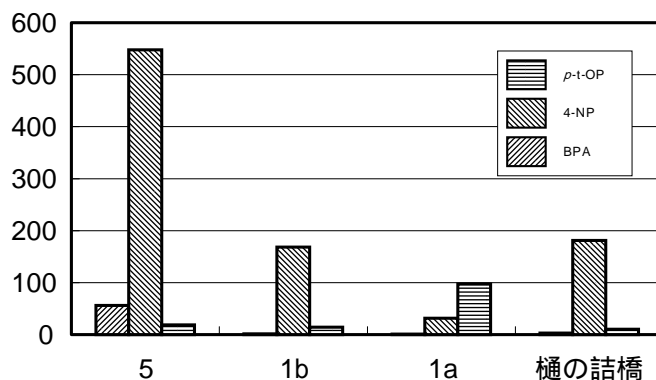


図 4 ネダシグサに含まれる環境ホルモン量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

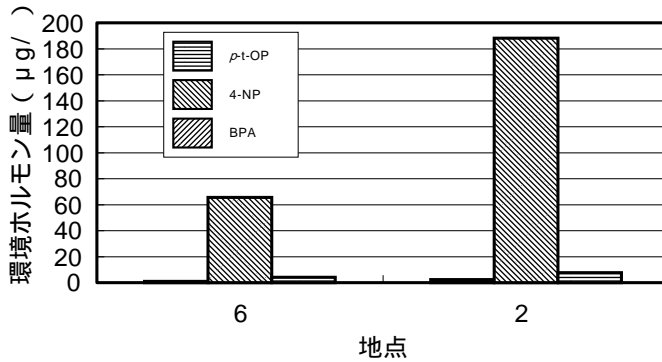


図5 オオカナダモに含まれる環境ホルモン量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

図6 にネダシグサの地点5における環境ホルモン濃縮度の月別変化を示した。これらの値は植物中の環境ホルモン濃度を同じ日の河川水中の環境ホルモン濃度で割ったものである。4-NPは月を追うごとに濃縮度が増加していきことがわかった。p-t-OPも濃縮度は増加していたが、常に4-NPよりも低かった。BPAは、最初は検出限界以下であったが、11月には100倍を超えていた。地点1a付近で採取した水中に根のみが浸かっているツルヨシ ($26 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、濃縮率31.3倍)より、全体が浸かっている藻類のほうが4-NPおよびBPAの濃縮率が高かった。

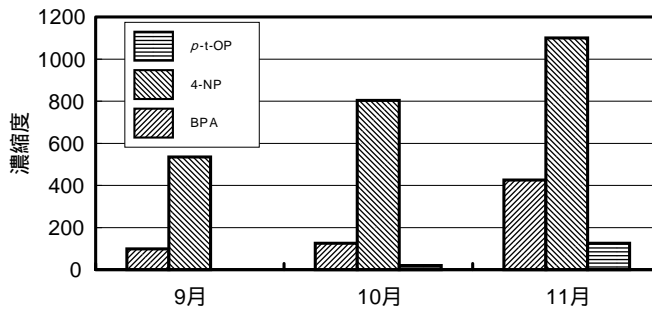


図6 地点5におけるネダシグサの環境ホルモン濃縮度の月変化

3 - 4 次亜塩素酸イオン添加実験

a. 脱イオン水実験

表5に脱イオン水を使った次亜塩素酸イオン添加による環境ホルモン量の時間変化を示した。次亜塩素酸イオンを入れない場合、各環境ホルモンはほぼ100%残存していた。次亜塩素酸イオンを0.1ppm加えると0.1時間後(6分後)にはほぼ全ての環境ホルモンが消失していた。残存率は0.5~20.8%であった。最も消失したのは、BPAであった。4-n-NPは他の環境ホルモンに比べて次亜塩素酸イオンに対してやや抵抗性が高かった。2時間処理するとさらに残存率が減少した。

b. 河川水実験

表5と同様な実験を、黒瀬川の河川水を用いて実験した結果を表6に示す。どの環境ホルモンも次亜塩素酸イオンを加えない場合、ほぼ100%残存していた。脱イオン水実験のときとは異なり、0.1ppmの次亜塩素酸イオンを加えて1時間経過しても、BPAを除き、どの環境ホルモンもほとん

ど残存していた。BPAでも残存率は75%であった。1ppmの次亜塩素酸イオンを加えた場合でも、1.5時間後に残存率は21～37%であった。10ppmの次亜塩素酸イオンを加えて1.5時間後に残存率は0.3～3%となり、この値は表5の脱イオン水を用いたときの次亜塩素酸イオン0.1ppmと同程度であった。

表5 脱イオン水を用いた次亜塩素酸イオン添加実験

環境ホルモン	ClO ⁻	時間	環境ホルモン量 (μg)				
			<i>p</i> -t-OP	<i>p</i> -n-OP	4-NP	4-n-NP	BPA
+	-	0	0.70(100)	0.70(100)	7.31(100)	0.60(100)	0.80(100)
+	-	2	0.58 (83)	0.70 (100)	7.73(106)	0.72(120)	0.99(124)
+	+	0.1	0.009(1.3)	0.10(15.1)	0.33(4.5)	0.122(20.8)	0.004(0.5)
+	+	0.5	0.004(0.6)	0.09(13.6)	0.08(1.2)	0.095(16.1)	0.003(0.4)
+	+	1	0.004(0.6)	0.07(10.4)	0.07(1.0)	0.076(12.9)	0.03 (0.4)
+	+	2	0.002(0.3)	0.05 (7.7)	0.04(0.6)	0.058 (9.9)	0.006(0.8)
-	-	0	ND	ND	0.06	ND	0.009

()内は環境ホルモンの残存率 (%表示)

NDは検出限界以下

表6 河川水を用いた次亜塩素酸イオン添加実験

環境ホルモン	ClO ⁻ (ppm)	時間	環境ホルモン量 (μg)				
			<i>p</i> -t-OP	<i>p</i> -n-OP	4-NP	4-n-NP	BPA
+	-	0	0.91(100)	0.80(100)	9.02(100)	0.66(100)	1.07(100)
+	-	1	0.94(103)	0.81(100)	9.27(103)	0.73(111)	1.02(95)
+	0.1	1	1.029(113)	0.78 (98)	10.4(115)	0.742(112)	0.80(75)
+	1	1.5	0.258 (28)	0.18 (23)	2.14 (21)	0.137 (21)	0.40(37)
+	10	1.5	0.028 (3)	0.005(0.6)	0.09 (1)	0.005 (0.7)	0.003(0.3)
+	100	1	ND	ND	0.03 (0.3)	0.005 (0.7)	ND
-	-	0	0.008	ND	0.19	ND	0.05

()内は環境ホルモンの残存率 (%表示)

NDは検出限界以下

4 考察

4 - 1 各地点の植物試料中の環境ホルモンについて

図3と図4、5の比較から環境ホルモンの河川水中の植物への吸収、もしくは蓄積が起こっている可能性が考えられる。各地点の河川水中の環境ホルモン濃度と、植物中の環境ホルモン濃度を比較すると、いずれの環境ホルモンとも河川水中の濃度と植物体内の濃度が相関しているとは言いがたい。特にノニルフェノールの場合は相関がない。河川の汚染濃度が高い地点2、3ではネダシグサ中の環境ホルモン濃度は低く、河川水中に比較的低濃度で検出された地点5のネダシグサ中の濃度の方がはるかに高くなっている。この結果から、疎水性の高い環境ホルモンが植物の表面に単に付着しているというよりは、体内にとり込まれて蓄積していると考えられる。地点5のネダシグサは他の地点と比べて藻類が非常に繁茂していた。条件のよいところで繁茂していたネダシグサ中に環境ホルモンがより多く蓄積していたと考えられる。逆に地点2、3では河川水中のノニルフェノールが多く検出されたが、何らかの理由でネダシグサの生育が悪いために、河川水中の環境ホルモンを十分吸収できなかったと考えられる。

4 - 2 ファイトレメディエーションの可能性について

9月から11月にかけてネダシグサ中の環境ホルモン含量が増加していた。また、12月には藻類のほとんどは枯死していた。以上より11月のデータが藻類の濃縮度の最高値であると考えられる。

ファイトレメディエーションの利用には1000倍以上の濃縮が望ましいとされる。図6より、11月のNPの濃度が1000倍を超えているので可能性があるといえる。本研究において、地点2、3以降でNPの濃度が下降しているのはこの河川域に生息する生物相によってファイトレメディエーションが起こっていたと考えられる。ネダシグサのように完全に水中に使った状態の植物は、土壌や水中に根を伸ばして吸い上げる植物などよりもはるかに環境ホルモンを濃縮している⁷⁾。河川に生息する藻類や水草はある程度河川の環境ホルモンによる汚染を防ぐ働きをしている。しかし、淡水中の魚は藻類を餌としているため、同時に生物濃縮の危険性をはらんでいる。一定の間隔で藻類を川から除去することも必要と考えられる。

4 - 3 次亜塩素酸イオン添加実験について

脱イオン水の場合は塩素濃度0.1ppmですぐに環境ホルモンが消失するのに対し、河川水では塩素濃度0.1ppmでは全く消失しなかった。これは河川水の方が脱イオン水よりも様々な有機物質を含んでいるためと考えられる。しかし、塩素濃度を1ppmに上昇させると、1.5時間で60%近く消失していた。10、100ppmでは添加した環境ホルモンがほぼなくなっているが、河川水が淡黄色を示した。環境ホルモン以外の有機物の分解が次亜塩素酸添加で生じている可能性を示している。次亜塩素酸による環境ホルモンからの生成物は全くわからないが、水道の消毒に用いられる次亜塩素酸イオンが環境ホルモンを分解あるいは変化させていることがわかった。

水道水中の残留塩素は地域によって異なるが、1ppm未満の濃度が目標とされている。1992年に改正された水道法水質基準および環境基本法環境基準の快適水質項目で残留塩素は目標値 $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度とされている。水道原水である河川水中で次亜塩素酸0.1~1ppmの濃度で環境ホルモンが消失

しているが、分解が起こっているのなら、水道原水の塩素処理による環境ホルモンの除去が期待される。しかし、同時にこの反応により、さらに強力な環境ホルモン活性をもつ化合物に変化する可能性も考えられる。今後、どのような過程で環境ホルモンが消失しているのか解明していくことが必要である。

謝辞

本研究は、平成 12 年度、13 年度前期地球規模・食糧問題プロジェクト「広島大学研究支援金」及び平成 13 年度、14 年度学園都市づくり交流会議地域課題研究事業（東広島市）「地域課題研究補助金」の補助を受けました。また、本研究の実験試料である藻類の同定にご協力いただきました島根大学の太谷修司先生に謝意を示します。

参考文献

- 1) 環境省総合環境政策局環境保健部（平成 13 年 8 月）
ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告（案）
- 2) Fujita, M., M. Ike, K. Mori, H. Kaku, Y. Sakaguchi, M. Asano, H. Maki, and T. Nishikawa (2000) Behavior of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plants in Japan - biotransformation and ecotoxicity. *Water Science and Technology* 42: 23-30.
- 3) Lsasser, T. H., and S. Kahl (2002) Adrenomedullin has multiple roles in disease stress: Development and remission of the inflammatory response. *Microscopy Research Technique* 57: 120-129.
- 4) 内分泌かく乱物質研究の最前線（2001）化学総説 No. 50, 学会出版センター
- 5) 中地 重晴他（2002）河川、水道水からの農薬の検出が問題に - 2002 年度グリーンコープ連合環境ホルモン水質調査結果から - 環境監視 88 号 環境監視研究所
- 6) Hu, J. T. Aizawa and S. Ookubo (2002) Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity. *Environmental Science Technology* 36: 1980-1987.
- 7) Ahel, M., J. McEvoy and W. Giger (1993) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environmental Pollution* 79: 243-248.
- 8) 筏 義人（1998）環境ホルモン 講談社
- 9) 廣瀬 弘幸（1997）日本淡水藻図鑑 内田老鶴園新社
- 10) 角野 康郎（1994）日本水草図鑑 文一総合出版
- 11) Bokern, M., M. Nimtz and H. H. Harms (1996) Metabolites of 4-n-nonylphenol in wheat cell suspension cultures. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1123-1127.
- 12) Bokern, M., and H. H. Harms (1997) Toxicity and metabolism of 4-n-nonylphenol in cell suspension cultures of different plant species. *Environmental Science and Technology*, 31: 1849-1854
- 13) 鈴木 静雄（1994）水辺の科学 - 湖・川・湿原から環境を考える - 内田老鶴園
- 14) 鈴木 基之・内海 秀雄（1998）バイオアッセイ 水環境のリスク管理 講談社
- 15) ジョン W. ムーア 著, 岩本 振武 訳（1980）環境理解のための基礎化学 東京化学同人
- 16) 五百井 正樹（1988）水汚染の構造 北斗出版