

水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質チーム）

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一、
真野浩行

【要旨】

近年、医薬品などの生活に関連した未規制化学物質による水環境の微量汚染や、その生理活性に由来する水生生物への影響が懸念されており、新たな環境問題として注目されている。効果的なリスク削減対策を講じるためには、多様な化学物質について水環境中における挙動、生態系に与える影響などの解明を進めることが必要である。本研究課題では、環境リスクが比較的高いと考えられる未規制化学物質を対象として、河川流域における実態把握と環境中動態の解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に与える影響を評価することを目的とする。本年度では、多摩川中流域における医薬品類の生態影響を把握するため、河川水の藻類生長阻害試験および河川水中の医薬品類濃度に基づいて、藻類生長への河川水の総毒性に対する医薬品類の寄与率を推定した。また、PRTR データ等を用いて、下水処理水中の PRTR 第一種指定化学物質の生態リスク初期評価を実施し、本研究において河川での実態と挙動を調査すべき化学物質を選定した。

キーワード：未規制化学物質、慢性毒性単位、PPCPs、PRTR 制度

1. はじめに

化管法対象物質や医薬品類などの水質規制の対象となっていない化学物質（未規制物質）の中には、水溶性が高い物質や、下水道などを通じて処理場へ運ばれるものの処理しきれずに下水処理水を通して水環境中に排出される物質が含まれている。近年、水環境中に流出する未規制物質による水生生物への影響が懸念されており、水環境における未規制物質の効率的なリスク管理や削減対策が求められている¹⁾。

リスク管理や低減対策を講じる上で、未規制化学物質の水環境中での存在実態の把握や挙動の解明を行うとともに、水生生物への影響の評価を行うことが必要とされる。本研究課題では、水質汚濁防止法などの規制対象外となっている化学物質、特に、生体の特定の生理的調節機能に対して作用する生理活性物質等について、水環境における環境リスクが懸念されるものを検討した上で、それらの物質を対象として水環境中での実態把握と挙動解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に対して与える影響を評価することを目的としている。平成 26 年度は過年度より河川水中の実態挙動を調査している医薬品類の生態影響を把握するため、多摩川流域において、河川水の藻類生長阻害試験および河川水中の

医薬品類濃度に基づいて、藻類生長への河川水の総毒性に対する医薬品類の寄与率を推定した。また、PRTR データ等をもとに、水生生態系への影響を行う必要がある化学物質を選定した。

2. 研究方法

2. 1 河川水の総毒性に対する医薬品類の寄与

2. 1. 1 調査地点および調査時期

多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である（延長 138km、流域面積：1240km²、流域人口：約 380 万人（H17 年）²⁾）。代表的な都市河川であり、高度成長期の急激な流域の都市化の影響を受けて水質が悪化したが、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い改善が進み、近年では中流域（多摩川原橋）の水質は、BOD 2mg/L 程度で推移している（2001 年以降の環境基準は B 類型、BOD 3mg/L）。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては河川流量の 5 割以上を下水処理水が占めることもある。調査地点の概要を図-1 に示す。調査区間では、4 つの下水処理場から放流水が流入し、5 つの支川（谷地川、残堀川、根川、浅川、程久保川）が多摩川に合流している。浅川と根川の上流には下水処理場があり、下水処理場からの放流水が流入している。程

久保川は流量が少ないことから、本研究では調査対象から除いた。多摩川本川3地点 (St. 1-3)、支川4地点 (St. a-d) の計7地点を調査地点とした (図1)。各調査地点でスポット採水により1Lの水試料を採取した。本稿では、2012年1、2月の冬季の調査結果を示す。

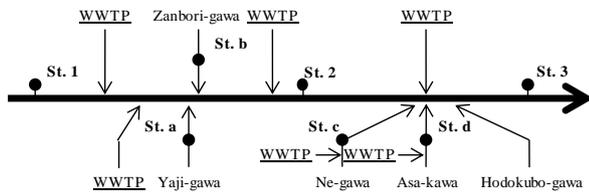


図1 調査地点図

2. 1. 2 藻類生長阻害試験

本試験は藻類を河川水試料に一定期間曝露し、指数増殖期における生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の増殖に対する下水試料の毒性を調査した。本調査では、Harada らの方法³⁾を参考に、96穴マイクロプレートを用いて実施した。この方法は、試料量が少量で済み、一度に多くの試料を試験できるなどの利点を有する。被験生物には、単細胞緑藻ムレミカツキモ (*Pseudokirchneriella subcapitata*) (NIES-35株) を、試験培地にはAAP培地を用いた。

本研究では、河川水試料ごとに、固相抽出により分画濃縮した試料 (以降、濃縮試料) を試験した。藻類生長阻害試験においては、河川水中に存在する窒素やリンなどの栄養塩類の濃度が試験結果に影響することが知られており、毒性がマスキングされてしまう可能性があるため、固相抽出による分画濃縮を行った。これにより、評価対象が固相に吸着、脱離される物質群に限定されるものの、原水よりも濃縮された状態での曝露が可能になり、通常では明確にならない毒性を検出することが可能になる。固相カードリッジには OASIS® HLB Plus Extraction Cartridge (Waters) を使用し、1 μ m ポアサイズのフィルター (Whatman) でろ過した1000mLの下水試料を通水した後にメタノールで溶出し、溶出液を乾固後に100 μ LのDMSOに再溶解させることで、原水の10000倍濃度の濃縮試料を作成した。下水試料ごとに96穴ウェルマイクロプレート1枚を用いて、濃度区に応じて希釈された濃縮試料200 μ L、藻類細胞液20 μ L、AAP培地20 μ Lを投入し、2倍希釈10段階 (50倍、25倍、12.5倍、6.3倍、3.1倍、

1.6倍、0.8倍、0.4倍、0.2倍、0.1倍) 5連の試験系列を作成した。最大濃度区の曝露溶液中のDMSO濃度は0.5%となる。曝露溶液中のDMSO濃度の違いによる藻類生長への影響を排除するため、全ての濃度区で曝露溶液中のDMSO濃度が0.5%となるように調整した。また、比較対照のため、ろ過滅菌した超純水を用いた0.5%DMSO溶液の対照区5連を作成した。

その他の試験条件は、初期生物量 1×10^4 cells/mL、温度24°C、照度3000 Lux、振とう速度120 rpmとした。24時間毎にマイクロプレートリーダーを用いて、各ウェルの吸光度 (波長: 450 nm) を測定し、吸光度の増加量と細胞数濃度の検量線を用いて細胞濃度 (cells/mL) に換算した。

0-72時間の生長速度とばく露濃度の関係から、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い濃縮倍率を、無影響濃度 (NOEC, No Observed Effect Concentration) として求めた。すべての試験濃度区で対照区と生長速度に有意な違いが認められない場合、もっとも高い濃縮倍率である50倍をNOECとした。NOECの算出にはEcoTox-Statics version 2.6d (日本環境毒性学会) を用いた。

NOECの逆数から慢性毒性単位 (chronic Toxicity Unit, TUc) を推定した⁴⁾。濃縮試料のTUcが1.25よりも高い値を示した場合、つまり、濃縮試料のNOECが0.8倍 (河川水試料の80%希釈水と同等) よりも低倍率であった場合、その河川水は藻類生長に対して毒性を示すと判定した。

2. 1. 3 寄与率の推定

河川水の藻類生長への毒性に対する医薬品類の寄与率を推定した。過年度の研究から生態リスク初期評価により多摩川中流域において詳細な検討が必要とされた医薬品類5物質 (azithromycin、clarithromycin、ketoprofen、levofloxacin、triclosan) を対象とした。Azithromycin、clarithromycinは抗生物質、ketoprofenは抗炎症剤、levofloxacin、triclosanは抗菌剤として使用されている。

河川水の毒性に対する医薬品類の寄与率は以下の

$$\text{寄与率 (\%)} = 100 \times \text{TU}_{\text{医薬品類}} / \text{TU}_{\text{河川水}}$$

式から算出した。

TU_{医薬品類}は医薬品類の慢性毒性値、TU_{河川水}は河川

水の慢性毒性値である。医薬品類の慢性毒性値は河川水中の医薬品類濃度を文献から収集した藻類生長に対する医薬品類の NOEC で割ることにより算出した。各調査地点の医薬品類濃度は、2011 年度の調査結果を使用した⁵⁾。藻類生長に対する医薬品類の NOEC について複数の値が公表されている場合、幾何平均値を算出し、医薬品類の慢性毒性値の算出に使用した。

2. 2 新規の調査対象化学物質の選定

PRTR 制度において第一種指定化学物質とされている化学物質を対象に生態リスク初期評価を実施することで、詳細な評価が必要な化学物質のスクリーニングを行った。PRTR 制度では、事業者は化学物質の排出量と移動量を年 1 回、国に届け出る義務を負い、国はこれを集計するとともに、届出外も含めた排出量・移動量の推計を行っている。この情報を活用して、下水道への化学物質流入量の情報を得ることが可能であり、水生生物への曝露を評価するためのデータとして利用することができる。

評価対象とする PRTR 第一種指定化学物質の下水処理水中濃度は、「PRTR 届出外排出量の推計方法等の概要」（以下、「届出外推計」という）における『全国の下水処理施設から公共用水域への年間排出量の推計値』を『全国の年間処理水量』で除することで推計した。その際に、『全国の年間処理水量』として、「下水道統計」の“水処理施設・年間処理水量[m³/year]”の全国合計を適用した。求められた値を全国における年間の平均的な下水処理水中濃度の推計値として初期リスク評価に使用した。本研究では、平成 22、23、24 年度の届出データを基に推計された年間排出量^{6,7,8)}と全国の年間処理水量^{9,10,11)}から、各年度における化学物質の下水処理水中濃度を推計した。

評価対象とした化学物質について、公表されている資料¹²⁻¹⁶⁾から、生態リスクの初期評価に用いる毒性値の情報（以下、毒性情報等という）を収集した。収集した水生生物に対する毒性情報等を予測無影響濃度としてリスク評価に使用した。複数の資料から化学物質の毒性情報等が得られた場合、原則として最も強い毒性値をリスク評価に採用した。

対象とした化学物質に対する初期リスク評価として、「環境リスク初期評価」などで用いられているハザード比（Hazard Quotient : HQ）を用いた評価を実施した¹⁷⁾。この手法では、HQ が一定の基準値

（例えば 1）を上回っているかどうかで、各物質のリスクの有無を明確化できるという利点がある。水生生物が無希釈の下水処理水に曝露される高リスクのシナリオを想定し、安全側の生態リスクの初期評価を行った。式(2)に従い、推定下水処理水中濃度を予測無影響濃度で除することにより HQ_{生態}を算出した。

$$HQ_{生態} = \frac{\text{推定下水処理水中濃度} [\mu\text{g/L}]}{\text{予測無影響濃度} [\mu\text{g/L}]}$$

本研究では、HQ が 1 を超えた物質を詳細な評価が必要とされる物質として評価した。

3. 研究結果

3. 1 河川水の総毒性に対する医薬品類の寄与

3. 1. 1 藻類生長阻害試験

図 2 に試験結果から求めた慢性毒性単位を示す。全ての調査地点で慢性毒性単位は 1.25 よりも小さい値を示したことから、調査地点の河川水は藻類生長への毒性を示さないことが示唆された。

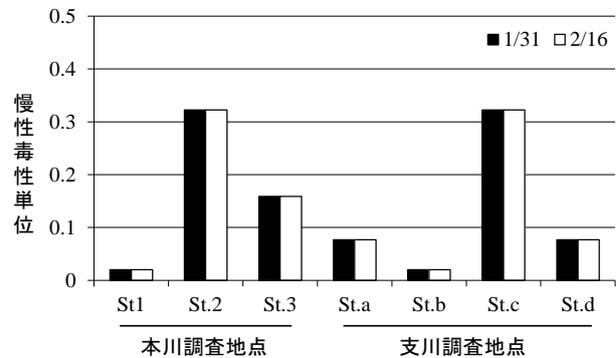


図 2 河川水の藻類生長阻害結果

3. 1. 2 寄与率

表 1 に本研究で使用した藻類生長に対する医薬品類 5 物質の NOEC 値を示す。NOEC の値は Triclosan、azithromycin、clarithromycin、ketoprofen、levofloxacin の順であった。

図 3 に河川水の藻類生長への毒性に対する各医薬品類の寄与率を示す。azithromycin、clarithromycin と triclosan は ketoprofen と levofloxacin よりも寄与率が高かった。Azithromycin、clarithromycin と

表 1 ムレミカヅキモの成長阻害に対する医薬品類 5 物質の NOEC

化学物質名	幾何平均値 (µg/L)	毒性値 (µg/L)	参考文献
Azithromycin	7.0	4.2	18
		5.2	19
		16	20
Clarithromycin	10.1	3.1	21
		5.2	19
		10	18
		16	20
		<40	22
Ketoprofen	126	16	20
		1000	19
Levofloxacin	370	260	19
		310	21
		630	20
Triclosan	1.3	0.2	22
		0.5	23
		1	16
		1	18
		6.3	20
		8.3	19

triclosan の 3 物質では、triclosan、clarithromycin、azithromycin の順に高い寄与率を示した。

比較的高い河川水の毒性単位を示した本川調査地点 St. 2 と支川調査地点 St. c において、河川水の毒性単位に対する医薬品類の寄与率が大きく異なっていた。調査地点 St. 2 では、azithromycin、clarithromycin と triclosan の寄与率はそれぞれ 10%程度であった。一方で、調査地点 St. c において、各医薬品類は 20 から 40%と高い寄与率を示した。

調査地点 St. 2 では医薬品類の分解や底質への吸着が進み、他の物質による毒性への寄与が大きかったことが考えられる。一方で、調査地点 St. c は下水処理場放流口の直下流に位置するため、医薬品類の分解や底質への吸着が進んでいなかったため、医薬品類の寄与が大きかったことが考えられる。

3. 2 新規の調査対象化学物質の選定

平成 22 年度のデータから 146 物質、平成 23 年度のデータから 145 物質、平成 24 年度のデータから 145 物質の生態リスク初期評価を実施した。図 4 に平成 22 年度から 24 年度の評価において HQ が 1 よりも大きい値を示した PRTR 第一種指定化学物質 15 物質の HQ 値を示す。平成 22 年度から平成 24 年度にわたってハザード比が 1 を上回った物質は 11 物質であった。ピリジン、N,N-ジシクロヘキシルアミンは平成 24 年度において HQ が 1 を下回った。グルタルアルデヒドは平成 23 年度にハザード比が 1 を上回ったものの、平成 24 年度でハザード比が 1 を下回った。ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド (HDTMAC) は平成 23 年度において 1 を下回る HQ を示したが、その値は 0.94 と 1 に近く、平成 22 年度と 24 年度では 1 よりも高い HQ 値を示した。これらの物質は河川における実態と挙動の調査を実施する必要のある候補物質として考えられる。

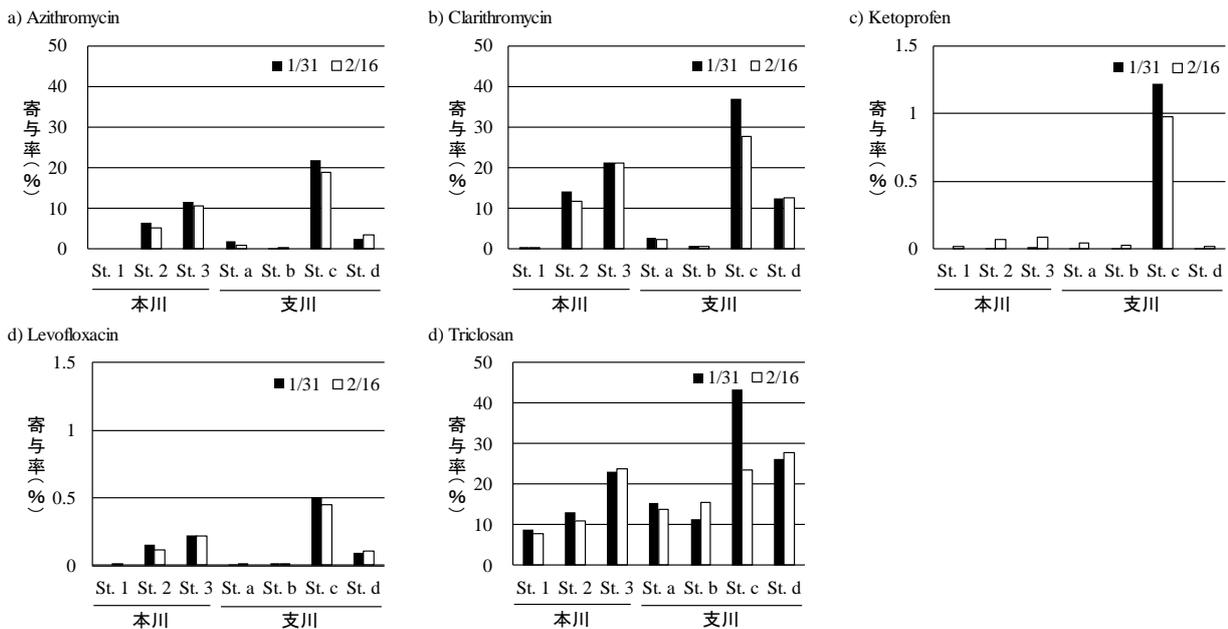


図 3 河川水の毒性に対する医薬品類 5 物質の寄与率

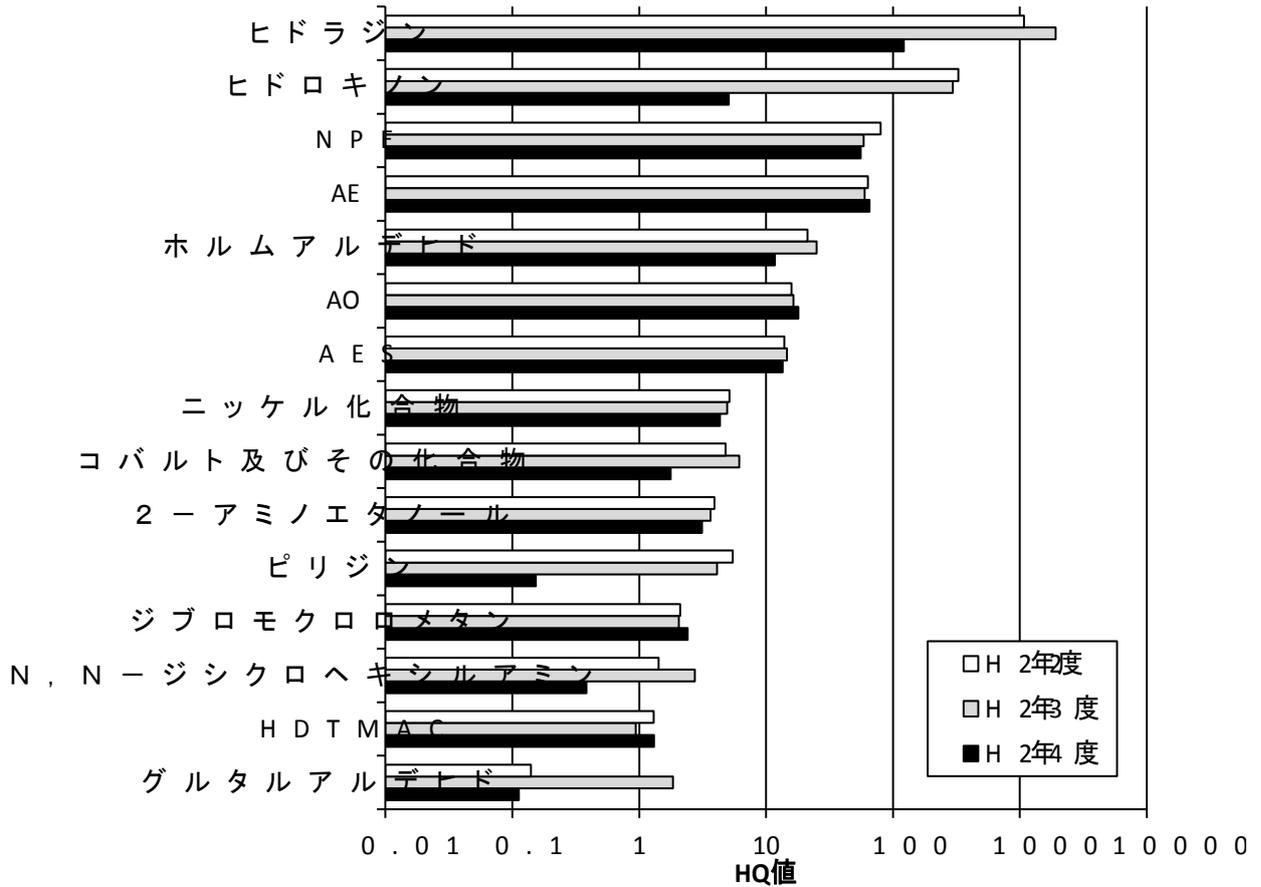


図 4 下水処理水中の PRTR 第一種指定化学物質のハザード比 (Hazard Quotient、HQ)。平成 22 年度から 24 年度において HQ が 1 よりも大きい値を示した化学物質の HQ 値を示す。NPE はポリ (オキシエチレン) =ノニルフェニルエーテル、AE はポリ (オキシエチレン) =アルキルエーテル、AO は N, N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド、AS はドデシル硫酸ナトリウム、AES はポリ (オキシエチレン) =ドデシルエーテル硫酸エステルナトリウム、HDTMAC はヘキサデシルトリメチルアンモニウム=クロリドを示す。

4. まとめ

本研究では、多摩川流域を対象として、藻類を用いた生物試験により、藻類生長に対する河川水の毒性を調査するとともに、河川水の毒性に対する河川水中の医薬品類の寄与率を推定した。また、下水処理水中に含まれる PRTR 第一種指定化学物質を対象に生態リスク初期評価を実施し、新規に調査対象とする化学物質を選定した。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1) 多摩川中流域において、河川水による藻類生長への毒性は検出されなかった。
- 2) Azithromycin、clarithromycin、ketoprofen、levofloxacin、triclosan について、河川水の藻類生長に対する寄与率を調査したところ、azithromycin、clarithromycin、triclosan が比較的高い寄与率を示

した。

- 3) 生態リスク初期評価により、河川における実態と挙動の調査を実施する必要のある候補物質として 15 物質を抽出した。

今後、医薬品類の生態影響について詳細に調査するとともに、抽出した候補物質について、実河川での実態や挙動の調査を行っていく予定である。

参考文献

- 1) 国土交通省地域整備局下水道部：「下水道における化学物質排出量の把握と化学物質管理計画の策定等に関するガイドライン (案)」、2005
- 2) 国土交通省：「一級水系における流域等の面積、総人口、一般資産額等について」、

- http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/ryuiki.pdf (2014年4月確認)
- 3) Harada A, Komori K, Nakada N, Kitamura K and Suzuki Y: Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels. *Water Sci. Technol.*, 58, 8, 1541-1546, 2008
 - 4) USEPA: *Technical support document for water quality-based toxics control*, EPA/440/4-85/032. National Technical Information Service, Springfield, VA, 1985
 - 5) 南山瑞彦、小森行也、北村友一、村山康樹：水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明、平成23年度下水道関係調査研究年次報告集、土木研究所資料 4241、95-100、2012
 - 6) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課：平成23年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2013
 - 7) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課：平成24年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2014
 - 8) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課：平成25年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2015
 - 9) (社)日本下水道協会：下水道統計(平成22年度版)、2012年
 - 10) (社)日本下水道協会：下水道統計(平成23年度版)、2013年
 - 11) (社)日本下水道協会：下水道統計(平成24年度版)、2014年
 - 12) 中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会：水生生物の保全に係る水質環境基準の設定について(第一次報告)、2003
 - 13) 環境省：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料、2007
 - 14) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク初期評価、
<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html> (2012年12月確認)
 - 15) (独)製品評価技術基盤機構：初期リスク評価書、
http://www.safe.nite.go.jp/japan/sougou/view/SelectingListsList_jp.faces?child_flg=child&service_id=APDisplayFirstList_jp&tb_form=S_41_SHO (2015年3月確認)
 - 16) 環境省：生態毒性試験結果(平成27年3月版)、2015、
<https://www.env.go.jp/chemi/sesaku/02e.pdf>
 - 17) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン(平成26年度12月版)、2014、
<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html>
 - 18) 清水大吾、田中宏明、鈴木穰、山下尚之：土木学会年次学術講演会講演概要集、60、7、165-166、2005
 - 19) 鈴木穰、小森行也、北村清明、北村友一：平成20年度下水道関係調査研究年次報告集、土木研究所資料、4157、131-143、2009
 - 20) 福永彩、山下尚之、田中宏明：藻類生長阻害試験を用いた医薬品類の毒性評価、環境工学研究論文集、43、57-63、2006
 - 21) Yamashita N, Yasojima M, Miyajima K, Komori K and Suzuki Y: Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms. *Water Sci. Technol.*, 53(11), 65-72, 2006
 - 22) Yang LH, Ying GG, Su HC, Stauber JL, Adams MS, Binet MT: Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 5, 1201-1208, 2008
 - 23) Tamura I, Kagota K, Yasuda Y, Yoneda S, Morita J, Nakada N, Kameda Y, Kimura K, Tatarazako N and Yamamoto H: Ecotoxicity and screening level ecotoxicological risk assessment of five antimicrobial agents: triclosan, triclocarban, resorcinol, phenoxyethanol and p-thymol. *J. Appl. Toxicol.*, 33, 11, 1222-1229, 2013

RESEARCH FOR ELUCIDATING THE FATE AND ECOLOGICAL EFFECT OF UNREGULATED SUBSTANCES IN AQUATIC ENVIRONMENT

Budget: Grants for operating expenses
General account

Research Period: FY2011-2015

Research Team: Water Environment Research
Group (Water Quality)

Author: OKAMOTO, Seiichiro
KOMORI, Koya
KITAMURA, Tomokazu
MANO, Hiroyuki

Abstract: In recent years, micro pollution of aquatic environment by unregulated chemical substances and their ecological risks have become an emerging public concern. To effectively control the risks, it is needed that occurrence, fate and ecological effect of various chemicals in aquatic environment are elucidated. The objectives of this research were 1) to initially assess the risk of various chemicals without regulated by the Water Pollution Control Act, especially physiological active substances, 2) to elucidate the occurrence and fate of priority substances in aquatic environment, and 3) to evaluate the ecological effect on aquatic organisms in detail. In FY2014, we conducted an algal growth inhibition test of water samples of the Tama River and its tributaries using *Pseudokirchneriella subcapitata* to evaluate the toxicity of each sample and contributions of PPCPs on the toxicity of the water sample to the algal species. To extract chemicals whose occurrence and fate in Japanese rivers should be examined in our study, we conducted initial ecological initial risk assessments for Class 1 substances under the Japanese Pollutant Release and Transfer Register (PRTR) system by using Japanese PRTR data and Japanese sewage statistics..

Key words: unregulated chemical substances, chronic toxicity, PPCPs, PRTR system