

環境ホルモンを中心とする環境化学物質の循環・変換過程と ヒト・生態系への影響及びその対策に関する研究

藤井恒男¹・藤縄克之¹・花里孝幸²・白石寛明⁶・国本 学⁷・鈴木富雄⁸・笹井春雄⁸・福島和夫³・赤羽貞幸⁴・青山俊文⁵・富所五郎¹・小野武彦¹・藤居良夫¹・田中申明¹・宮原裕一²・豊田政史¹・錦織広昌¹

¹：信州大学工学部、²：信州大学山地水環境教育研究センター、³：信州大学理学部、⁴：信州大学教育学部、⁵：信州大学医学部、⁶：国立環境研究所、⁷：北里大学薬学部、⁸：長野県衛生公害研究所

An Integrated Study on Endocrine Disruptor Chemicals and Environmental Pollutants
— Circulation and Chemical Reactions of Environmental Pollutants and its influence
on the Human Body and Ecosystem —

1：序

地球生態系に悪影響を及ぼす環境化学物質のうち、いわゆる環境ホルモン（外因性内分泌かく乱物質）は非常に低濃度で生体調節機能の神経系、内分泌系、免疫系に悪影響を及ぼす。これらの環境化学物質の中には、未だヒトや生態系へ与える影響、自然界における循環過程や循環過程における化学変化が不明な物質が多く、また、水道源水の浄化手段や下水処理方法などが確立されていない物が多い。本プロジェクトでは、主として下に示す3つの研究課題を追求し、得られた結果を総合化することにより環境化学物質の簡易分析法の確立とその浄化法の開発も検討課題とする。

本プロジェクトは次の研究課題をもつ3つの研究班による総合研究である。

1-1：地表及び地下における物質循環の解明（責任者：藤縄克之。班員：赤羽貞幸、富所五郎、藤居良夫、豊田政史）：土木工学的手法を中心として、環境化学物質の地表水と地下水汚染過程の解明とその汚染防止法を追求する。

1-2：循環における吸着・化学変化の解明（責任者：藤井恒男。班員：鈴木富雄、笹井春雄、福島和夫、小野武彦、田中申明、錦織広昌）：化学的手法を中心として、環境化学物質の化学反応による無害化

経路の探索を主として行う。

1-3：ヒト・生態系への影響の解明（責任者：花里孝幸。班員：白石寛明、国本学、福島和夫、青山俊文、宮原裕一）：生物学的・医学的手法を中心とする。汚染環境物質が魚類やミジンコなど水生生物の生殖機能に与える影響に対する総合毒性の評価を行う。

2：各研究班の研究成果

2-1：地表及び地下における物質循環の解明 本研究の背景

ヒトおよび生態系に悪影響を与える環境化学物質には、ダイオキシンやPCBの他、重金属、石油系炭化水素、有機ハロゲン化合物、放射性物質などがある。従来、これらの物質はその毒性や発ガン性などが問題となってきたが、近年、生態系の生殖機能や免疫機能あるいは脳神経機能に傷害をもたらす可能性が指摘される内分泌攪乱化学物質が広く環境中から検出されている。これらの環境化学物質には自然界における循環過程が未解明なものが多く、対策を立てるためにも早急にその動態を解明する必要がある。

2-1-1 研究の目的

ダイオキシン類は水に極めて溶けにくい、疎水性の液体には良く溶けることが分かっている。たとえば、2,3,7,8-TCDDの水への溶解度は19.3 ng/Lと極めて小さいが、クロロホルムへの溶解度は370 mg/L、ベンゼンへの溶解度は570 mg/L、クロロベンゼンへの溶解度は720 mg/L、と非常に高い値を示す。

わが国におけるダイオキシン汚染において油類と共にダイオキシン類が検出された例が2例ある。そのうちの1例は39万 pg/gのダイオキシン類がクロロベンゼン類の油玉と共に底質から検出されたものであり、もう1例は高濃度のダイオキシン類がベンゼン、トルエン、キシレンを含む油層中から検出されたものである。このように、ダイオキシン類が高濃度に溶解している疎水性の液体が環境中に漏出した場合、ダイオキシン類は予想以上に遠方に、また予想以上に速い速度で移動する可能性がある。

しかしながら、ダイオキシン類の地中における移動メカニズムについての研究は極めて不十分である。そこで、本研究では土壌カラムを用いた室内実験によって地中におけるダイオキシン類の移動メカニズムを明らかにする。

2-1-2 研究の方法

本研究では、土壌カラムを用いた室内実験によって疎水性液体に溶解したダイオキシン類の土壌中における移動メカニズムを明らかにする。なお、実験ではダイオキシン類と構造および挙動が類似しているがハロゲン元素を含まないキサンテンをダイオキシン類に見立て、キサンテンを石油系炭化水素であるリグロインに溶解させた模擬溶液を使用する。実験装置の概要を図1および写真1、2に示す。実験の手順は次の通りである。

1. 粒径0.8mmのガラスビーズを均一に詰めた土壌模擬カラムを脱気水で飽和させ、ついでマリOTT給水装置とカラムからの流出孔の水頭を一定に保ち、カラム内に水を流す。このとき、装置本体に取り付けてあるピエゾメータでカラム内の水頭値を計測する。なお、土壌カラムは

均一に充填されているので、カラム内の水頭は線形的に減少していることを確認する。

2. ついで一旦水の供給を止め、少量の模擬溶液をカラム下端より注入し、全量を浮力によりカラム内へ浸入させる。
3. 模擬溶液がすべてカラム内へ浸透した時点で、最初の水頭差で再び水を浸透させる。
4. カラム末端からの流出液をサンプリングし、流量および流出水中のキサンテン濃度の経時変化を調べる。
5. カラム内の水頭の経時変化をモニターする。

2-1-3 結果

図3は水頭値の経時変化（時間の単位は秒）を示したものである。リグロイン浸入前の時間ゼロの水頭分布はほぼ一直線となっているが、リグロイン浸入後は間隙の一部がリグロインに占有され通水断面が減少するためカラム内の透水係数がリグロインのトラップ量に応じて減少する。流体は非圧縮性と考えることができるから、断面を通過する流量は一定である。したがって、水頭勾配が大きい部分は小さい部分より小さな透水係数を持っていることになる。すなわち、水頭勾配が大きい部分は小さい部分より多くのリグロインがトラップされていることを意味している。なお、流れがカラム下端から上端に向かうためには勾配は負になる必要があり、正の勾配は流れが逆転していることを意味している。したがって、勾配が正の部分は実験のミスによるものである。

図3より、125秒後の相対リグロイントラップ量はカラム下端より上端の方が大きいことがわかる。カラム上端からのリグロイン流出の大部分は実験初期に発生していることを考えると、この計測結果は妥当なものであることが分かる。時間が経過するにつれて、水頭分布は初期分布に近づいてくる。すなわち、トラップされたリグロインが浸透水に溶解し、液滴により阻害されていた通水断面が徐々に元に戻ってきていることを意味している。20万秒（2.3148日）後、相対リグロイントラップ量はカラム下端よ

り上端の方が大きいものの、トラップ量が減少して いる。
 いるため、水頭分布はかなり初期分布に近づいてい

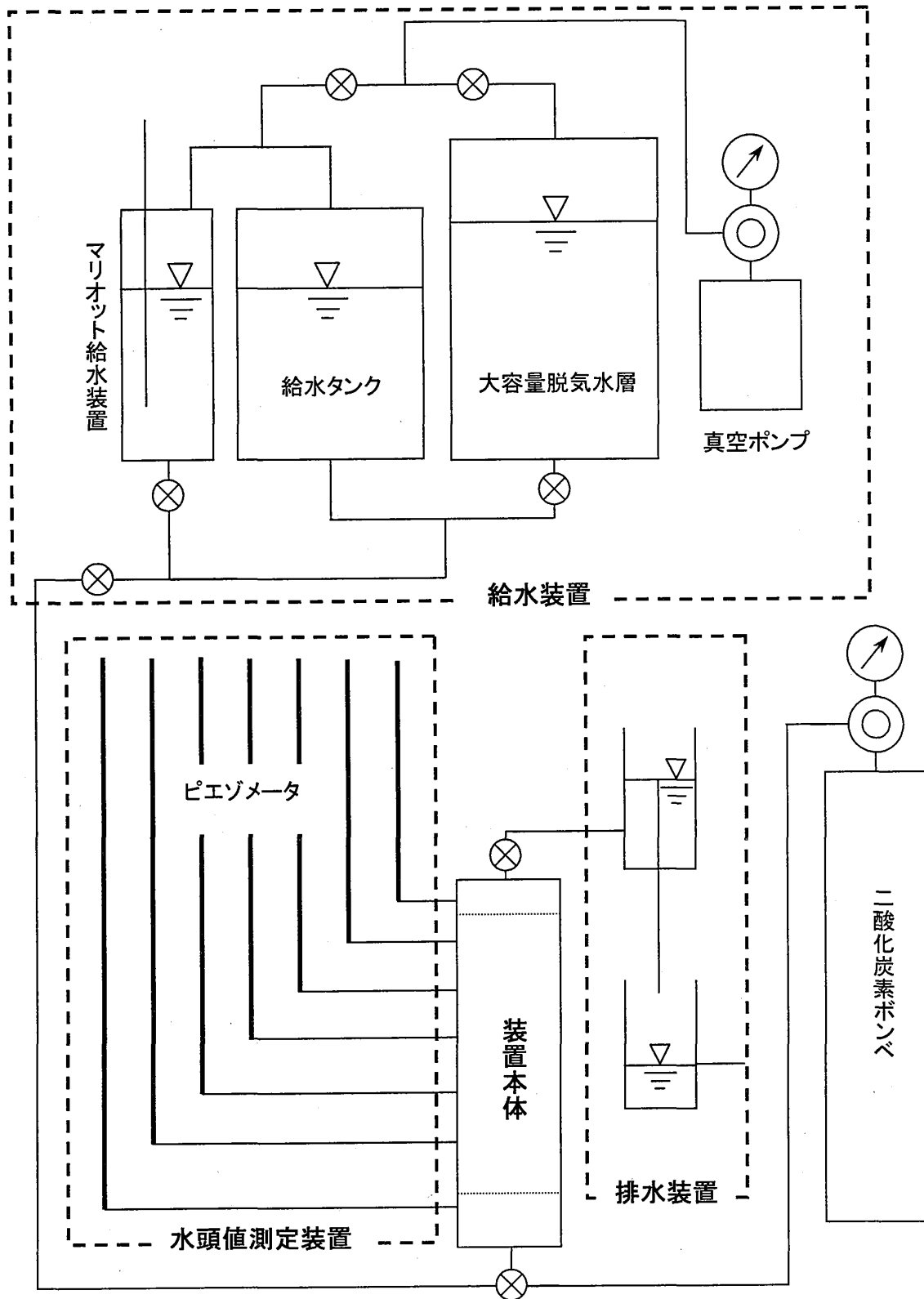


図1 実験装置概要図

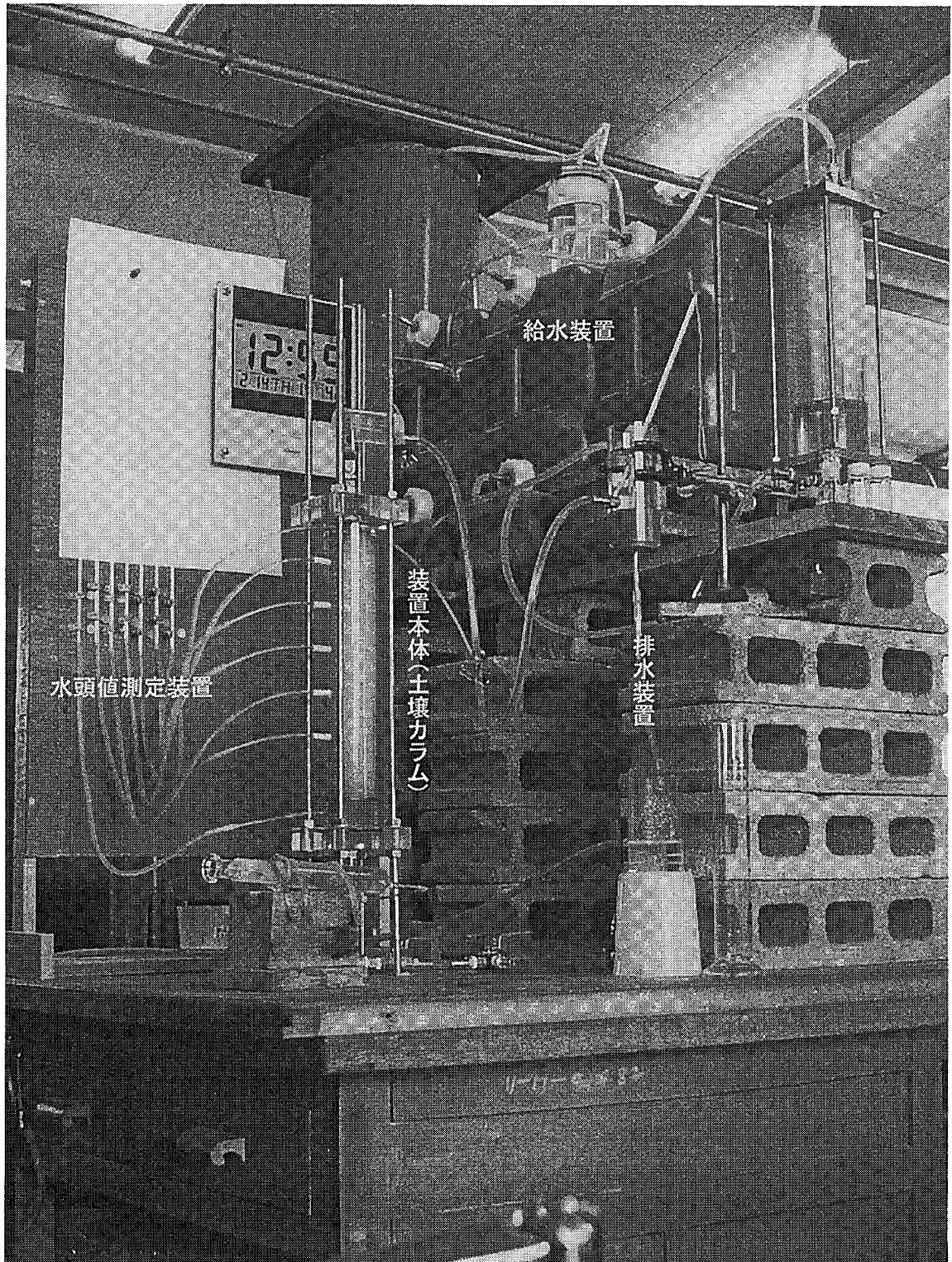


写真1 実験装置本体1

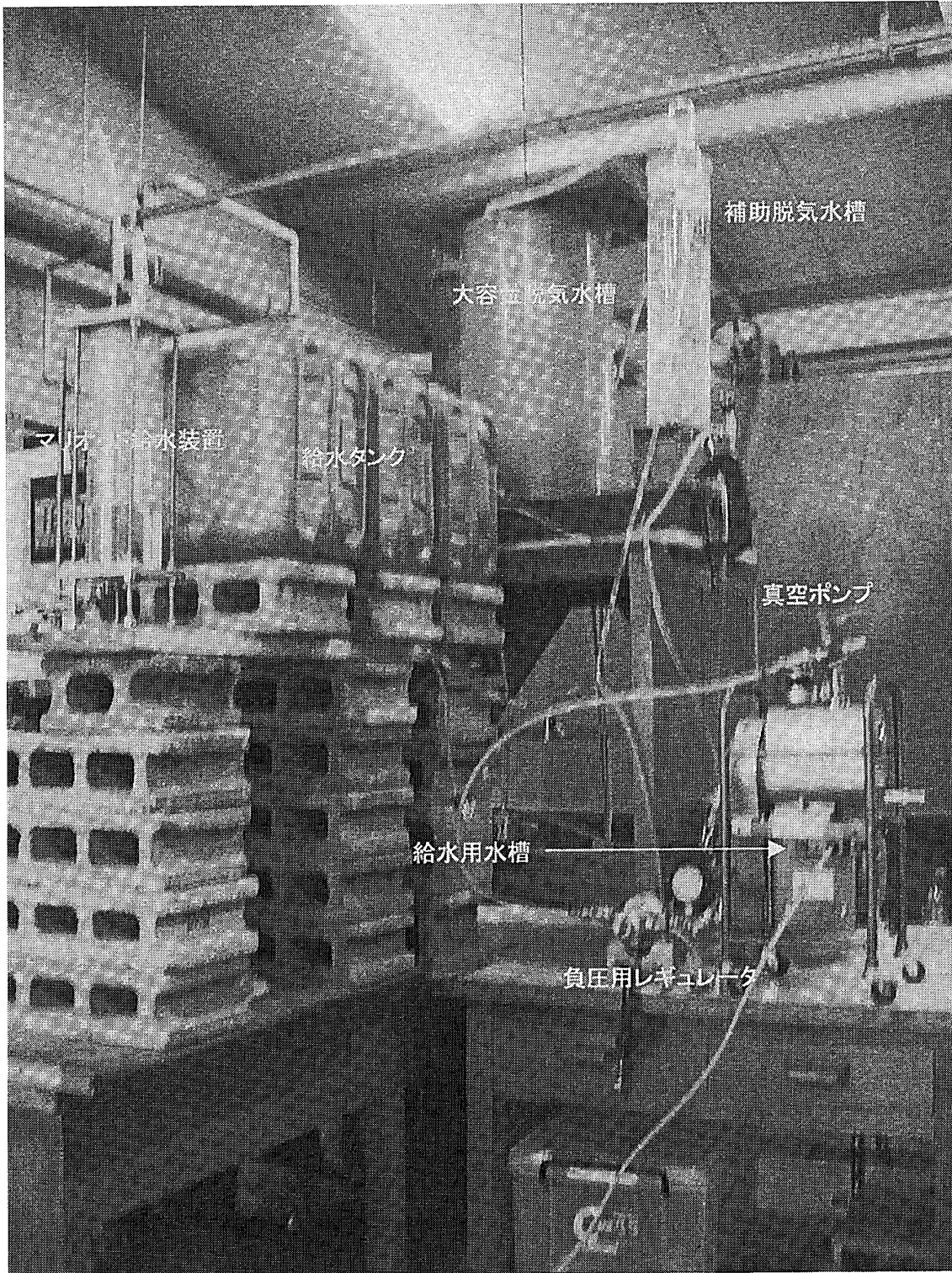


写真2 実験装置本体2

排出水中に含まれるキサンテン濃度および流速
(実験番号2)

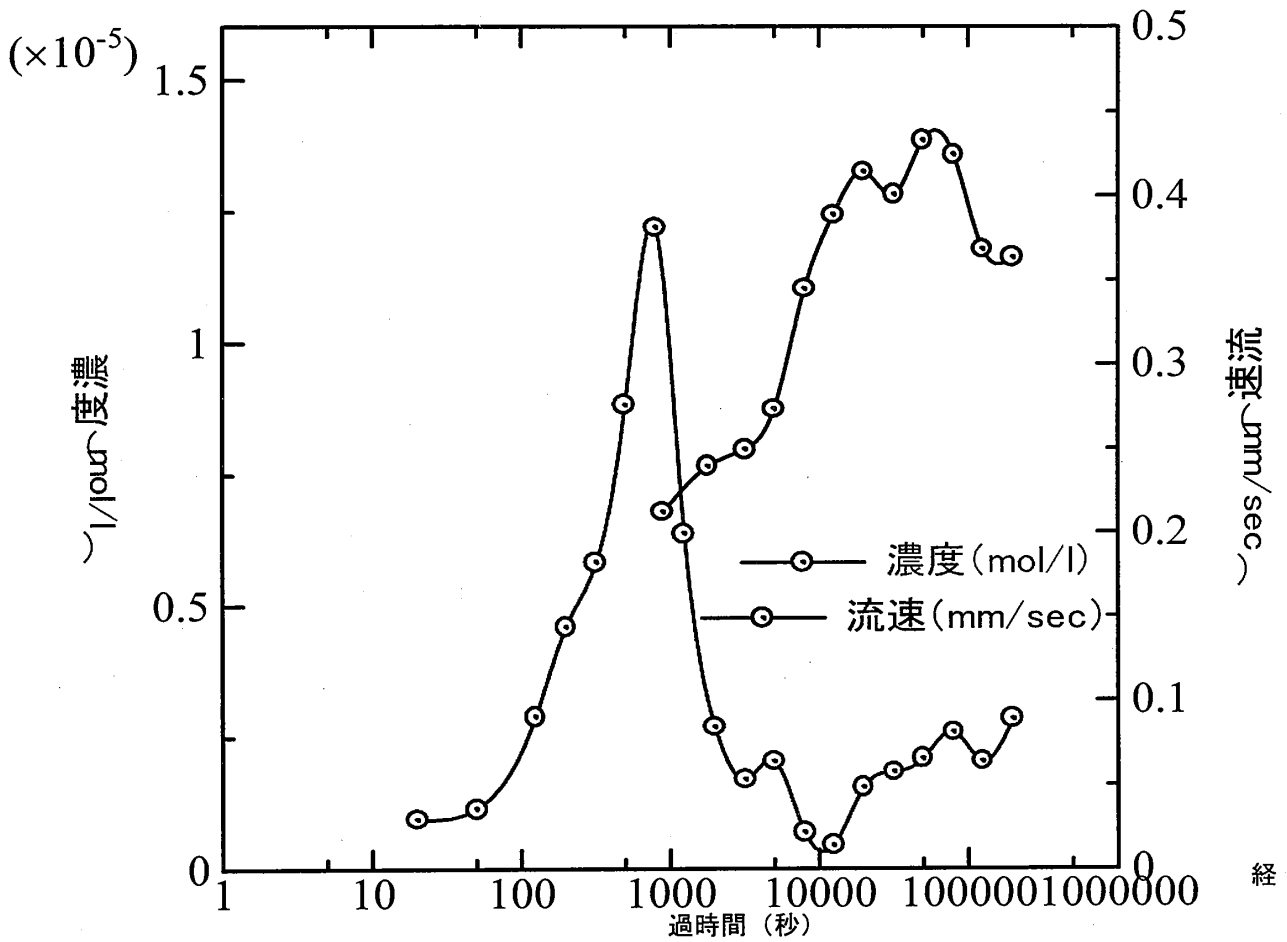


図2 流出水中に含まれるキサンテン濃度および流速 (実験番号2)

水頭値の変化(実験番号2)

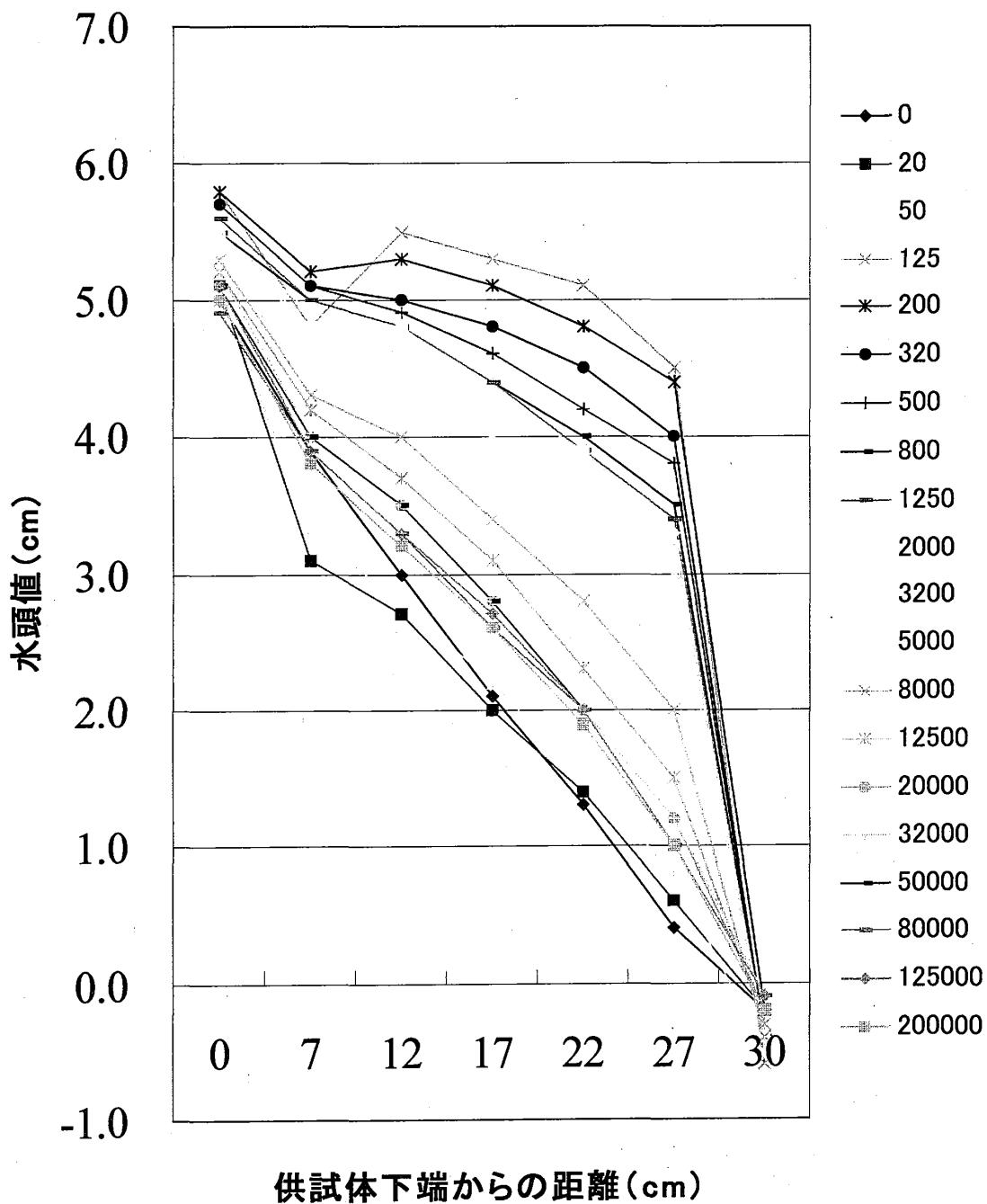


図3 水頭値の経時変化 (時間: 秒)

2 : 循環における吸着・化学変化の解明

2-2 : 循環における吸着・化学変化の解明

2-2-1 : 環境汚染物質、特に塩化エチレン類の光触媒分解無害化 (藤井 : 信州大学工学部)

今年度は塩化エチレン類の光分解機構の解明を主目的にした。酸化チタン光触媒をゾルーゲル法により作製し、ブラックライトによる塩化エチレン類の光分解反応生成物の時間変化を赤外線吸収スペクトルと GC を用いて調べた。塩化エチレン類は光触媒によりすばやく分解した。反応生成物として、ジクロロアセチルクロライド(DCAC)、ホスゲン(COCl_2)、二酸化炭素、塩化水素、等が検出され、特に乾燥条件ではホスゲンの生成濃度が高いことが明らかになった。例を図4に示す。反応は LH 機構で説明できた。来年度は購入予定のガスクロマトグラフ質量分析による実験結果による検討も含め、今年度の続きと共に、対象物質をフタル酸エステル類も扱う予定である。

2-2-2 : 気相におけるハロゲン化炭化水素の光反応 (田中 : 信州大学工学部)

Trichloroethylene (TCE) の光分解を IR 測定によって生成物を同定し、反応機構の解明を目指した。試料にキセノンランプを直接照射した時の生成物は、DCAC、 CClO_2 、CO、HCl であった。この条件では有害物質 CClO_2 がそれ以上分解せず残ってしまった。よって現在、 CClO_2 を無害化するため、条件を変えて実験を行っている。酸素混合系では O₂ が 242 nm 以下の波長で光分解する事を利用して分光器によって 266, 230, 200nm に分光し照射した。次に NO₂ 混合系では試料と NO₂ の割合を 1:1、1:5、5:1 と変えて照射した。同定した生成物は、DCAC、 CClO_2 、CO、HCl、NO である。試料と NO₂ の割合を変えて実験したところ生成物と反応速度に違いが確認できた。来年度は光源にレーザーを用い、NO₂ の 2 光子吸収を利用した O(1D) の反応を試みる。

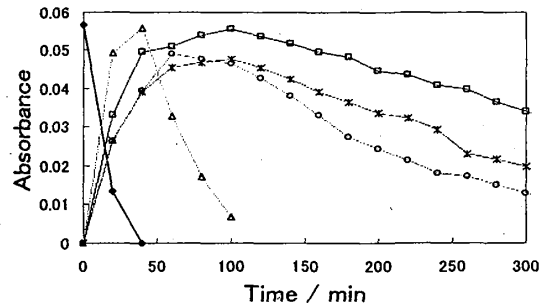


図4 光照射にともなうトリクロロエチレン(TCE)とその分解生成物の IR 吸収バンド強度の変化 : (◆) TCE, (△) DCAC, (□) COCl_2 , (○) HCl, (*) CO_2

2-2-3 : 環境ホルモン物質の土壌への吸着と光分解に関する研究 (錦織 : 信州大学工学部)

まず、土壌汚染のモデルとしてモンモリロナイト粘土へのフタル酸エステルの吸着挙動を調べた。図5はフタル酸ジエチルの 1.0×10^{-4} mol/l 水溶液にモンモリロナイト 0.010 g を添加した試料の 276 nm

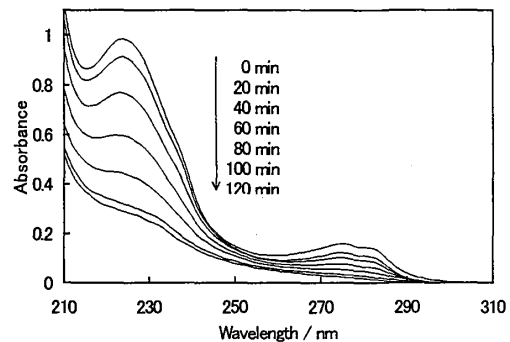


図5 シクロヘキサン中におけるフタル酸ジエチルの光照射にともなう紫外吸収スペクトルの変化

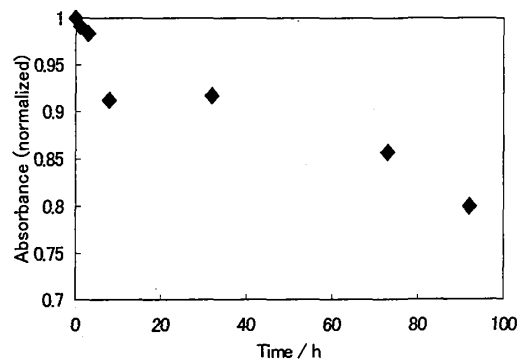


図6 モンモリロナイトを浸漬したフタル酸ジエチル水溶液の吸光度(276 nm)の相対的時間変化

における吸光度の相対的時間変化である。フタル酸ジエチルの吸光度は時間とともに徐々に減少し、92時間後には20.0%減少した。フタル酸エステルは非イオン性の化合物であるが、モンモリロナイトにわずかに吸着することがわかった。しかしながら吸着量の変化は図6に示すように複雑であるため、来年度は様々な条件において吸着実験を行うなどさらに研究を進め、この挙動を解明する予定である。

次にフタル酸エステルの無害化の方法として有効である光分解についての検討を行った。図2はフタル酸ジエチルの 1.0×10^{-3} mol/l シクロヘキサン溶液に150 W Xe ランプを用いて光照射を行った際の紫外吸収スペクトルの時間変化である。光照射前のスペクトルは224 nmと276 nmにピークおよび285 nm付近に肩を示したが、光照射とともにこれらすべての吸収バンドが減少した。吸収強度の減少よりフタル酸ジエチルは光により分解することがわかった。来年度はフタル酸ジエチルの分解生成物についてガスクロマトグラフ質量分析等により検討する予定である。

2-2-4：有害揮発性有機化合物（VOC）の触媒燃焼による除去（小野：信州大学工学部）

今年度は有機化合物トルエン、イソプロパノールをCO₂へ完全酸化する高活性な遷移金属酸化物触媒を探索した。Co、Mnの酸化物が200-300°Cで高い燃焼活性を持つことが分かった。Co酸化物を各種担体に担持してより良い触媒を得ようとした。NaOClにより酸化処理を施したCo/SiO₂が高い活性を示したが、これはCo³⁺が触媒表面に増えるためと考えられた。Mn酸化物はMnO₂が高い活性を示した。酸化還元モデルにより還元—再酸化の反応速度定数を算出し触媒間のを比較したところ、MnO₂触媒は還元、再酸化ともに速いために高い酸化活性を維持すると考えられた。来年度はさらに環境ホルモン類似物質について酸化実験を行うと伴に、Co、Mn酸化物触媒の改良にとりくむ。

2-2-5：土壌を用いた生物学的脱窒素処理に関

する調査研究（鈴木：長野県衛生公害研究所）

平成11年2月22日付け環境庁告示第16号において、地下水の水質汚濁に係わる環境基準の一部が改正され、硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素の基準が加わった。地下水の窒素汚染を引き起こす原因として、生活排水等の土壌浸透や農地に散布された肥料等が考えられる。本研究は、生活排水等の土壌浸透に伴う地下水の窒素汚染防止対策として、土壌の持つ自然浄化能力を利用した生物学的脱窒素処理技術の開発を目的とする。これまでは、水素供与体として固体脂肪酸を用いた脱窒素効果について検討してきた。来年度は、他の有機物を含めより効率的な脱窒素条件について検討を行う。

2-2-6 環境中におけるビスフェノールA等の挙動に関する研究（笹井：長野県衛生公害研究所）

廃棄物処分場の浸出水からはフタル酸エステルやビスフェノールA等の環境ホルモンが多く検出され、特にビスフェノールAはppmレベルの検出例が報告されている。また、浸出水処理施設を持つ処分場では、活性炭等の高度処理によりその濃度は大きく減少すると云われている。一方、埋め立て処分場で未処理の浸出水が漏れた場合、地下浸透して地下水を汚染することが懸念される。そこで、環境ホルモンの土壌中での挙動を把握することは重要であると考えられる。来年度は信州大学との共同研究で、土壌を充填したカラム実験等により、土壌中における環境ホルモンの動態、特に土壌によるビスフェノールA等の処理効果（吸着も含めた）を検討したい。

2-3: ヒト・生態系への影響の解明

2-3-1: 環境水中の有害性の総合評価

環境水中の有害性を総合的に評価するために、霞ヶ浦、諏訪湖、琵琶湖湖水試料について基礎細胞毒性試験を行っている。霞ヶ浦湖水試料では1999年、2000年ともに夏季に毒性がピークを示し、北部水域である高浜入で他の水域に比べ強い細胞毒性が確認されるという、毒性の季節変動性および水域間での相違が確認された。諏訪湖および琵琶湖について同様の試験を行った結果、霞ヶ浦に比べて弱いものの、夏季に一部の水域で有意な細胞毒性が認められた。

また、霞ヶ浦湖水試料で確認された毒性について解析を行った結果、pH、浸透圧の影響は認められず、フィコシアニンを除く多くの水質データと細胞毒性との関連は見られなかった。なお、毒性因子の多くは、疎水性で分子量3000以下の物質であることが示唆されたが、農薬、重金属などの個別有害物質単独での影響では説明できず、それらの複合作用であると考えられた。

以上の結果は、減圧濃縮法と組み合わせた基礎細胞毒性試験は、低毒性環境水試料の有害性総合評価に有用であることを示している。しかし、このような指標を環境管理に利用するためには、各種水質データと比較・検討した環境水試料での試験データを体系的、継続的に蓄積することが必須であり、諏訪湖と流入河川を対象とした細胞毒性試験を引き続き実施する予定である。

2-3-2: 水域における有害化学物質の挙動の解明

これまでいくつかの研究機関で諏訪湖集水域の河川水および底質中に含まれる有害化学物質の分布や季節変動の調査が行われてきている。すでに河川水中の農薬濃度の季節変化や、諏訪湖底質コアにおけるPCBsやDDTの鉛直分布が明らかにされている。これらの化合物は、いわゆる「環境ホルモン」と考えられており、野生生物への影響が懸念されている。

そこで、諏訪湖および周辺河川での環境ホルモン

物質のより詳細な挙動を明らかにすることを目的として研究を開始した。平成13年度購入予定のGC/MSを用いた水環境中の環境ホルモンの一斉分析に備え、あらかじめ残留性有機塩素系農薬類について、その試料精製方法の検討を行った。実際に諏訪湖で採取した試料のうち、水試料は固相抽出カラムを用いた試料の濃縮と精製を行った。既存のGC/ECDを用いて農薬の測定を試みたが、対象とした化合物8種とも検出限界以下で化合物の同定・定量には至らなかった。一方、底質試料はアセトンを用いた超音波抽出を行った後、水との液-液分配とシリカゲルカラムによる分画を行った。得られた画分について、水試料と同様にGC/ECDで分析を行ったところ、底質試料からはDDTの分解物であるDDD、DDEが検出され、その他未同定のピークも数多く検出された。以上から、これら試料の濃縮や精製方法は適当であり、今後GC/MSを用いることで環境ホルモンの一斉分析も可能と考えられた。

今後は、GC/MSによる多成分同時分析のため、そのGC/MSの条件設定を行う。また、環境ホルモンのうち残留性有機塩素系農薬に焦点を当て、その諏訪湖およびその集水域河川における分布を調査する予定である。

2-3-3: 水生生物を用いた毒性試験法の検討

ミジンコ (*Daphnia pulex*) は湖沼生態系の重要種 (Key species) であり、有害化学物質に対し高い感受性を持つことから、毒性試験に広く用いられている。本研究ではミジンコを用い、環境を汚染している化学物質の毒性評価、環境水中の化学物質の総合毒性評価を推進することをめざしている。そこで、より制度の高い毒性評価を行うため、ミジンコの薬剤感受性に影響を及ぼす要因について検討している。その研究の一環として、ミジンコの齢と感受性との関係について調べた。その結果、殺虫剤カルバリルに対し、若齢の個体ほど感受性が高く、高齢の個体ほどそれが低いことがわかった。しかしながら、これにはミジンコの齢よりも体長との関わりが強い事が明らかになった。すなわち、ミジンコの薬剤感受

性は体長に大きく依存していたのである。しかし、生後24時間以内の1齢仔虫の間での比較では、生後12時間以内の個体よりも12~24時間の個体の方が感受性が高かった。すなわち、この場合は高齢の個体の方が感受性が高かったことになる。これにはミジンコの脱皮のタイミングが大きく関わっていたものと考えられた。

今後は、ミジンコの薬剤感受性に与える様々な環境要因の影響の解明、およびミジンコとその他の生物を用いた新たな毒性試験法の開発研究を進めていく。それにより、環境水中の有害化学物質の総合毒性を明らかにすることをめざす。

3：総括

本研究プロジェクトは、環境化学物質の循環、循環過程における化学変化、ヒト・生態系へ与える影響を総合的に調査・研究し、その簡易検出法と浄化法の確立を目指している。上述したように、幸い3研究班とも初年度は準備期間であったにもかかわらず、順調な研究成果をあげ始めることができた。3月17日には本研究プロジェクトの今年度の報告会と来年度に向けた総合検討会を行う。今年度は環境化学物質の分析に最低限必要な GC-MS を1台購入できたが、環境ホルモンの検出のためにはもっと感度のよい機器えなければ検出が困難な物質がほとんどである。従って、来年度にはできれば LC-MS を購入し、本格的に環境ホルモンの分析をできる体制を整え、諏訪地域と長野地域で分析体制を整え、研究体制の向上を図りたい。

4：研究成果

K. Oki, S. Tsuchida, H. Nishikiori, N. Tanaka, and T. Fujii, Photocatalytic Degradation of Chlorinated Ethenes, to be published in Int. J. Photoenergy.

Hanazato, T. and H. Hirokawa (2001) Sensitivity of *Daphnia pulex* of different ages to the insecticide carbaryl. Jpn. J. Environ. Toxicol., 4: 67-72.

福島寿和・藤原朋広・杉浦則夫・本田靖・須戸幹・井上隆信・花里孝幸・大久保卓也・国本学 (2002) ヒト由来培養細胞系を用いた簡易バイオアッセイによる湖水試料中の有害性総合評価の試み. 水環境学会誌 (印刷中).