

3-2-1-1 採水方法

ガラス瓶に直接採取するか、ハイロート採水器、金属製のロート及びバケツを使用して採取してください。採取に際し、ロート及びバケツは試料水で共洗いを行ってください。但し、ガラス瓶の共洗いは行わないで下さい。

また、ガラス瓶の上部に 1cm 程度空げきが残るよう採取してください。

満水にした場合、輸送途中の温度変化によってガラス瓶が破損するおそれがあります。

その他採水に関する基本的事項は、「上水試験方法」に準じて行って下さい。

試料採取の際、プラスチック等フタル酸エステル類を含む可能性のある素材との接触がないよう注意して下さい。

ガラス容器はふたの部分が透明すりになっています。この部分に傷が付きまると、汚染の原因となることがありますので取り扱いにご注意願います。採取終了後、直ちにフタ付近をアルミホイルで覆って下さい。(容器送付時の状態にして下さい。)

容器に貼付のラベルに採取日時および採取者を記入して下さい。

3-2-1-2 トラベルブランク

トラベルブランクは輸送、採取操作等で汚染の度合いを確認するものです。トラベルブランク用として 1 本容器を用意(2L 透明共栓ガラス瓶)いたしましたが、その取扱いは次の通りお願いします。

トラベルブランク用の容器を、④配水池出口まで持参し、試料採取の際のピンの蓋を開けている時間と同じ時間、トラベルブランク用容器の蓋を開けて下さい(採水はしません)。蓋を閉めた後、試料と同様の扱いで梱包作業をお願いします。

3-2-1 1L 透明ガラス瓶

1L 透明ガラス瓶は SS・TOC・DOC 分析用の容器です。採取までフタを開けないでください。

3-2-1-1 採水方法

採取の際、ガラス瓶内を採取する試料水で 2、3 回共洗いを行ってください。

ガラス瓶に直接採取するか、ハイロート採水器、金属製のロート及びバケツを使用して採取してください。使用に際し、ロート及びバケツは試料水で共洗いを行ってください。

また、ガラス瓶の上部に 1cm 程度空げきが残るよう採取してください。

満水にした場合、輸送途中の温度変化によってガラス瓶が破損するおそれがあります。

その他採水に関する基本的事項は、「上水試験方法」に準じて行って下さい。

容器に貼付のラベルに採取日時および採取者を記入して下さい。

3-3 梱包

中身が動かないようにすき間に新聞紙等を詰め、ダンボール箱に梱包して下さい。

運送中に試料水が漏れぬよう容器のふたは確実に締めて下さい。アルミホイルで覆うことも忘れず
をお願いいたします。

採水容器、ラベル等、梱包漏れがないかもう一度ご確認下さい。

3-4 送付

必ず、試料を採取した当日に財団法人 千葉県薬剤師会検査センターまで送付して下さい。

要冷蔵(4℃)にて送付して下さい。氷点下になるとガラス瓶が破損するおそれがあります。料金は着
払いとなります。(同封した返信用伝票をお使い下さい。)

試料送付当日、返送確認用 FAX 送信票に必要事項を記入して、財団法人 千葉県薬剤師会検査セン
ター宛に送信して下さい。

4.調査箇所、採取容器等(汚泥、浮上物質)

調査箇所毎に必要な容器を以下に示します。

尚、採取箇所の詳細は資料2の浄水場フロー図をご参考にして下さい。

4-1.採取箇所および必要な容器

| 調査箇所 | 採取箇所 | 必要な容器 |
|------|------------------------|--|
| 汚泥 | ⑧沈殿池汚泥出口(上澄水は捨てない状態で) | 1.8L透明広口ガラス瓶4本(7外酸用 アルミ覆い有り) 1.8L透明広口ガラス瓶1本(その他項目用 アルミ覆い無し) |
| | ⑨濃縮槽2の濃縮汚泥(上澄水は捨てた状態で) | 1.8L透明広口ガラス瓶2本(7外酸用 アルミ覆い有り) 1.8L透明広口ガラス瓶1本(その他項目用 アルミ覆い無し) |
| | ⑩脱水機 | 1.8L透明広口ガラス瓶4本(7外酸用 アルミ覆い有り) 1.8L透明広口ガラス瓶1本(その他項目用 アルミ覆い無し) |
| 浮上物質 | ⑪浮上物質(スラム)発生地点 | 1.8L透明広口ガラス瓶4本(7外酸用 アルミ覆い有り) 1.8L透明広口ガラス瓶1本(その他項目用 アルミ覆い無し) |

4-2 採取容器

内分泌攪乱化学物質は、環境汚染物質の中でも社会的関心が高く、また、超微量測定を要求されます。このため、次に示す採取手順に従い、慎重に採取する必要があります。

内容をよくご理解の上、検体採取をお願いいたします。

汚泥・浮上物質分析用の採取容器はすべて 1.8L透明広口ガラス瓶を用います。用途により以下の2種類あります。

(1)フタル酸分析用

内分泌攪乱化学物質の影響がない環境でアセトン・n-ヘキサン洗浄をおこなった後、フタ付近をアルミホイルで覆い梱包してあります。

(2)その他項目分析用

金属の分析がありますので、アルミホイルはかぶせておりません。

4-3 採水方法

4-3-1 汚泥用

金属製のひしゃく等を用い、一旦金属製のバケツ等に採取して下さい。

原則として可能な限り上澄水を捨て、送付しました金属製のジョウゴを用いてガラス瓶の上部に 1cm 程度空げきが残るように採取して下さい。(その際、容器間の濃度差が生じないように採取願います。)
但し、用途により上澄水を捨てないで採取する場合がありますのでご注意ください。

使用に際し、ひしゃく、じょうご、バケツは試料水で共洗いして下さい。

4-3-2 浮上物質用

浮上物質発生地点の浮遊物を金属製のひしゃく等を用い、一旦金属製のバケツ等に採取して下さい。可能な限り浮遊物を多く採り(できるだけ水が少なくなるように)、金属製のジョウゴを用いてガラス瓶の上部に 1cm 程度空げきが残るように採取して下さい。(その際、容器間の濃度差が生じないように採取願います。)

使用に際し、ひしゃく、じょうご、バケツは試料水で共洗いして下さい。

採取後、フタをする前に送付しましたアルミホイルでピンの口を覆い、ふたをして下さい。(ふたはプラスチック製ですので必ずアルミホイルをかませして下さい。)更にふたをアルミホイルで覆って下さい。(容器送付時の状態にして下さい。ただし、その他項目分析用の容器にはアルミホイルで覆わないで下さい。)

試料採取の際、プラスチック等フタル酸エステル類を含む可能性のある素材との接触がないよう注意して下さい。

容器に貼付のラベルに採取日時および採取者を記入して下さい。

4-4 梱包

中身が動かないようにすき間に新聞紙等を詰め、ダンボール箱に梱包して下さい。

運送中に試料水が漏れぬよう容器のふたは確実に締めて下さい。アルミホイルで覆うことも忘れずをお願いいたします。ただし、その他項目分析用の容器にはアルミホイルで覆わないで下さい。

採水容器、ラベル等、梱包漏れがないかもう一度ご確認下さい。

4-5 送付

必ず、試料を採取した当日に財団法人 千葉県薬剤師会検査センターまで送付して下さい。

要冷蔵(4℃)にて送付して下さい。氷点下になるとガラス瓶が破損するおそれがあります。料金は着払いとなります。(同封した返信用伝票をお使い下さい。)

試料送付当日、返送確認用 FAX 送信票に必要事項を記入して、財団法人 千葉県薬剤師会検査センター宛に送信して下さい。

6.資料

6-1 一般試験項目の測定

採水時の水質について、可能であれば採水日の水温、pH値、色度、濁度、過マンガン酸カリウム消費量などの水質検査結果及び天候、降水量のデータがあれば、一般試験項目測定結果FAX用紙に記入又は添付し、財団法人 千葉県薬剤師会検査センター宛に送信していただけますようお願いいたします。

7.送付先及び問い合わせ先

ご不明な点がございましたら「財団法人千葉県薬剤師会検査センター」までご連絡下さい。

| |
|---|
| 財団法人千葉県薬剤師会検査センター 技術検査部 山崎雅之 五味謙之 〒260-0024 千葉県千葉市中央区中央港1-12-11 TEL 043-242-5940 FAX 043-242-3850 |
|---|

以上

平成16年 月 日

返送連絡用 F A X 用紙

| | |
|-------|-------------------------|
| F A X | 0 4 3 - 2 4 2 - 3 8 5 0 |
|-------|-------------------------|

| | |
|-----|------------------|
| 送信先 | (財)千葉県薬剤師会検査センター |
| | 技術検査部 業務情報室 |

「水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究」

浄水場を対象としたフタル酸エステル類挙動実態調査(○月)

試 料 送 付 通 知

| | | | | |
|-------|---------|-----|-------|--|
| 送信元 | 試料送付日 | 月 日 | | |
| | 個 数 | 個口 | | |
| | 事 業 体 名 | 浄水場 | | |
| | 担 当 者 名 | | | |
| | T E L | | F A X | |
| 連絡事項等 | | | | |

一般試験項目 測定結果 FAX用紙

| | | |
|----|---------------------------------|------------------|
| 送先 | (財)千葉県薬剤師会検査センター 技術検査部 業務情報室 | FAX 043-242-3850 |
|----|---------------------------------|------------------|

「水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究」
浄水場を対象としたフタル酸エステル類挙動実態調査(○月)

| | | | |
|-----|------|------|-------|
| 送信元 | 専業体名 | | |
| | 浄水場名 | | |
| | 担当者名 | 電話番号 | FAX番号 |

| | 前々日 | 前日 | 当日 |
|-----|-----|----|----|
| 天候 | | | |
| 降水量 | mm | mm | mm |
| 気温 | ℃ | ℃ | ℃ |

以下は採取日のデータを記載して下さい。(可能な限りお願いいたします。)

| | 接合井 | 原水 | ろ過池 | 送水 | 返送水 |
|-----------------------------|-----|----|-----|----|-----|
| 水温(℃) | | | | | |
| pH値 | | | | | |
| 色度(度) | | | | | |
| 濁度(度) | | | | | |
| 残留塩素(mg/L) | | | | | |
| KMnO ₄ 消費量(mg/L) | | | | | |
| 塩素イオン(mg/L) | | | | | |
| TOC(mg/L) | | | | | |

分担研究報告書 2

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の浮上物質の再現と
モデル化 ～スカム生成機構に着目して～

分担研究者 古米弘明
協力研究者 中島典之

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の浮上濃縮の再現とモデル化 ～スカム生成機構に着目して～

分担研究者 古米 弘明 東京大学教授
研究協力者 中島 典之 東京大学講師

研究要旨

浄水場におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の有害物質の濃縮機構を理解するためには、当該化学物質だけでなく、濃縮される媒体となるスカムや浮遊物質、排泥等の物理化学的特性を知ること重要となる。本年度は浄水過程で生じる微細気泡に着目し、微細気泡の生成に伴うスカム（浮上物質）発生の実験室での再現や、スカムへの DEHP 濃縮の機構解明を目指した。その結果、凝集剤が多いほど、またフロック成長が進むほど、微細気泡による浮上が多くなることが示された。また、「DEHP」「凝集剤」「濁質（カオリン）」「微細気泡」「溶存有機物（フミン）」の五者の様々な組み合わせの下での DEHP 濃縮現象を確認するための実験条件の検討を行った。

A. 研究目的

浄水場におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル（以下、DEHP）等の有害物質の濃縮機構を理解するためには、当該化学物質だけでなく、濃縮される媒体となるスカムや浮遊物質、排泥等の物理化学的特性を知ること重要となる。特に DEHP 等の疎水性の高い化学物質の挙動においては、付着する粒子表面や気液界面の特性が重要な因子となると考えられる。昨年度は粒子中に含まれる有機物の構造・組成に着目したが、本年度は浄水過程で生じる微細気泡に着目し、微細気泡の生成に伴うスカム（浮上物質）発生の実験室での再現や、スカムへの DEHP 濃縮の機構解明を目指した（図 1）。具体的には、凝集沈殿ジャーテストの過程で加圧水を注入することにより微細気泡を発生させ、その注入のタイミングや凝集剤添加量の差異によりスカム発生に差異があるかどうかを検討した。また、DEHP を添加した際に、どのような場合にどのような部位に濃縮されるのかを明らかにするために、「DEHP」「凝集剤」「濁質（カオリン）」「微細気泡」「溶存有機物（フミン）」の五者の様々な組み合わせの下での凝集沈殿操作を行い、表層・中層・底層それぞれの固相・液相の DEHP 濃度を測定する実験に着手した。

B. 研究方法

①スカム生成に及ぼす微細気泡の影響

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル（DEHP）を添加

せずに、フロック自体の挙動を追うことを目的として、通常の凝集沈殿ジャーテストにおいて、異なるタイミングで微細気泡を注入し、ピーカーの上層、中層、下層への SS 分の配分の差異を調べた。具体的には、図 2 のような実験装置を用い、カオリン 25mg/L の溶液 400mL に凝集剤（硫酸アルミニウム）を添加し、凝集沈殿操作を行った。5 つのピーカーに対し、図 3 に示した異なるタイミングで加圧水を注入し、微細気泡を発生させた。操作終了後、表層 50mL、底層 100mL と中層の三層に分け、それぞれの固形物を回収、秤量した。この実験を、凝集剤濃度（0.4～1.6 mgAl/L）と、加圧水調整時の加圧圧力（0.1～0.3 MPa）を変えて行った。なお加圧圧力により気泡数が変化するが、気泡径分布はあまり変化しないという報告事例がある。

②DEHP の濃縮機構の解明

DEHP を添加した際に、どのような場合にどのような部位に濃縮されるのかを明らかにするために、「DEHP」「凝集剤」「濁質（カオリン）」「微細気泡」「溶存有機物（フミン）」の五者の様々な組み合わせの下での凝集沈殿操作を行い、表層・中層・底層それぞれの固相・液相の DEHP 濃度を測定した。1L の Milli Q 水に濁質、凝集剤、有機物を入れて pH を調整後、急速攪拌、緩速攪拌を行う。その後、微細気泡と DEHP（0～360 μg/L）を注入し、再び緩速攪拌した後、静置した。表層・中層・底層それぞれを回収し、固相・液相の DEHP、Al、TOC 濃度等を測定した。この実験は様々な実

験状況が想定しうるが、本年度は、予備的実験として DEHP のみのバックグラウンド試験と、DEHP と微細気泡のみの試験を行い、試験条件の確認を行った。

C. 研究結果

①スカム生成に及ぼす微細気泡の影響

結果を図4の三つのグラフに示した。それぞれ微細気泡注入のタイミング、凝集剤注入率、加圧水圧力（気泡数）を横軸に取った場合の、カオリンの表層・中層・底層への分配を示している。今回の範囲では加圧水圧力の影響は大きくないが、凝集剤が多いほど、またフロック成長が進むほど、微細気泡による浮上が多くなることが示された。

②DEHP の濃縮機構の解明

これまでに、DEHP の回収・分析方法の検討、空実験による揮発・汚染の確認、実験操作を容易にするための器具類の選定を行った。

図5に濁質および凝集剤の存在しない条件での実験結果を示した。図5 a) は微細気泡も存在せず、単純に純水中に DEHP を添加し、急速攪拌、緩速攪拌、静置した後の、表層・中層・底層の DEHP 濃度を示している。各層の水量から重み付け計算をすると、6~20%程度不明分があった。実験後に容器を溶媒洗浄し DEHP を回収することにより、ビーカーや攪拌装置への付着量を評価したところ 2%程度であったことから、この不明分は蒸気または飛沫として揮散したものと考えられる。図5 b) は、微細気泡を添加した系であり、この場合にはさらに不明分が増加した (19~33%)。このことから通常の凝集沈殿実験に用いるジャーテスターでは DEHP の濃縮機構を評価することは困難であり、密閉系においてマグネティックスターラー等で攪拌して、凝集操作を行う必要があることが分かった。

D. 考察

図4で示したように、微細気泡注入のタイミングと凝集剤注入率がスカム形成量に影響を与えることが示唆された。スカム生成を抑制すべき問題点と捉える場合には、気泡生成の制御や凝集剤注入率の最適化といったことが解決策になるが、逆にそのようなスカムが DEHP のような微量汚染物質の吸着（水中からの除去）を促進するのであれば、意図的に気泡を生成させるということも考えられるべきであろう。今後は、新たに設計する実験容器を用いて、諸条件下での DEHP の分配を実験的に求め、動態の把握（モデル化）と除去手法の開発を行う必要がある。

E. 結論

凝集過程における浮上物質（スカム）形成量の違いについて、特に微細気泡に着目し、微細気泡注入のタイミングと量および凝集剤の量を変化させて、浮上濃縮を想定したジャーテストを行った。その結果、凝集剤が多いほど、またフロック成長が進むほど、微細気泡による浮上が多くなることが示された。DEHP の濃縮機構を解明するための実験条件を検討し、特に微細気泡注入系においては、通常のジャーテスターでは DEHP の逸散が大きく、密閉系の凝集沈殿装置を設計する必要があることが示された。

F. 健康危険情報

本研究成果は特に該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

小松一弘、中島典之、古米弘明 (2003) 凝集フロックへの吸着原理に基づいた水道原水中の溶存有機物の特性評価、環境工学研究論文集、Vol.40、pp.237-245.

2. 学会発表

中島典之、Yongyod Thaveemaitree、古米弘明、国包章一：浄水汚泥、スカム等の熱分解GC/MSによる有機物組成解析結果と DEHP 含量との関係、第55回全国水道研究発表会講演集、pp. (京都、2004.6) (発表予定).

Yongyod Thaveemaitree, Fumiyuki Nakajima, Hiroaki Furumai, Shoichi Kunikane : Relationship between di-(2-ethylhexyl) phthalate concentration and chemical structure of organic matter on solids in drinking water treatment processes, the Proceedings of 4th IWA World Water Congress, (Marrakech, Sep 2004) (発表予定).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

集塊化したコロイド粒子や成長したフロックに微細気泡が付着過程とスカム形成の仮想メカニズム

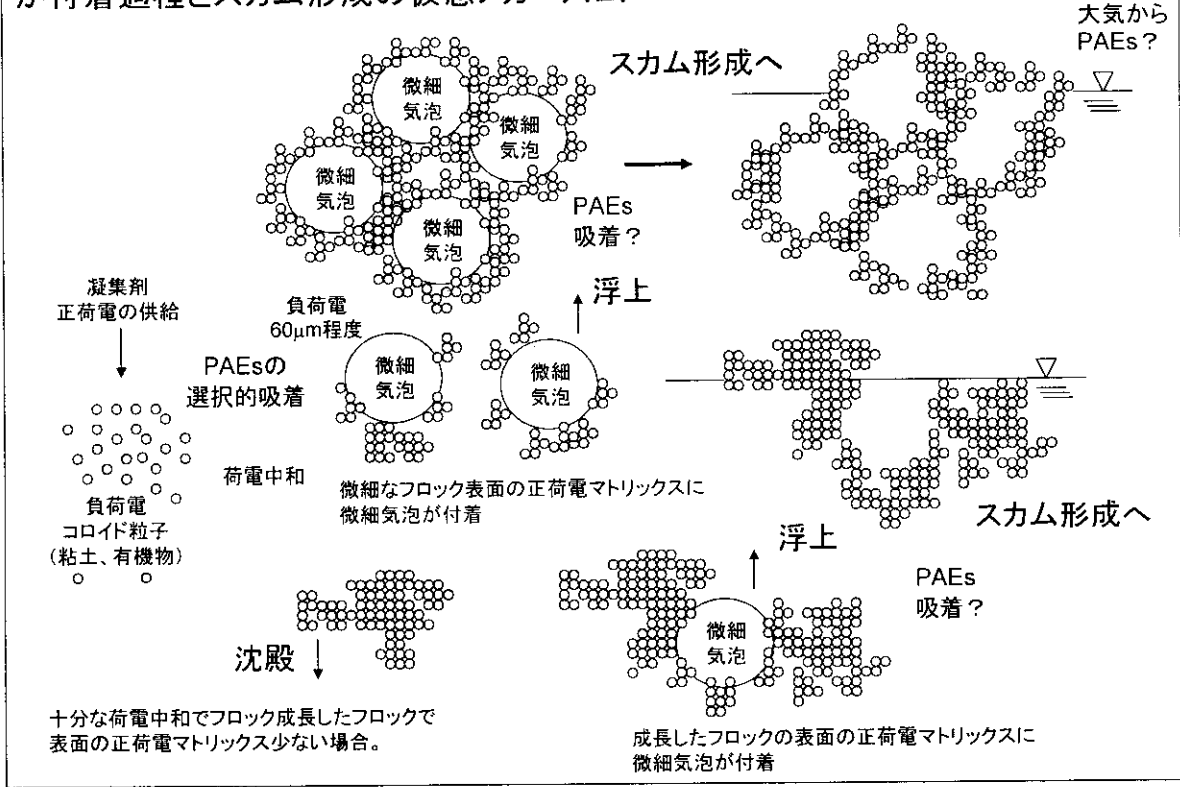


図1 フタル酸ジ-2-エチルヘキシル等の濃縮機構 (仮想)

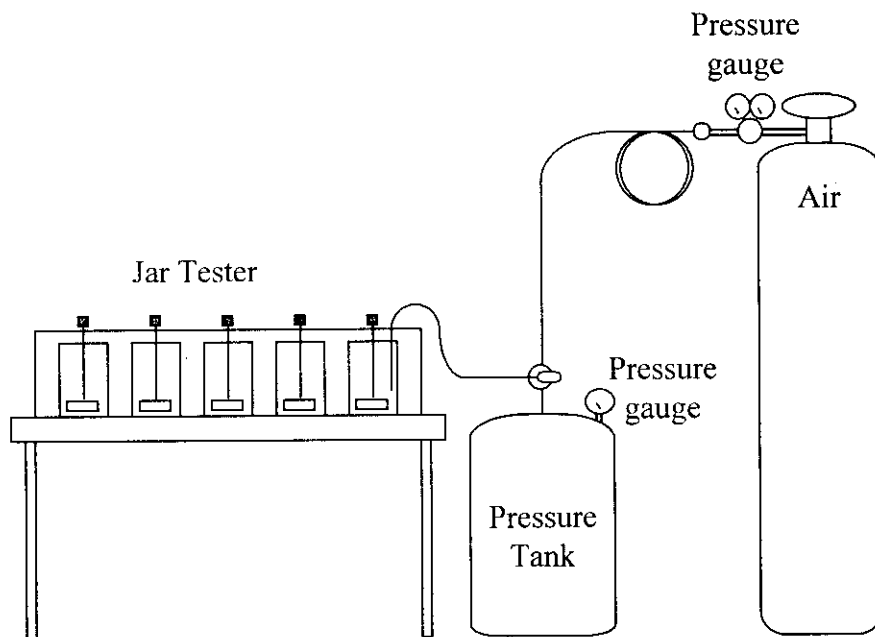


図2 スカム生成実験装置

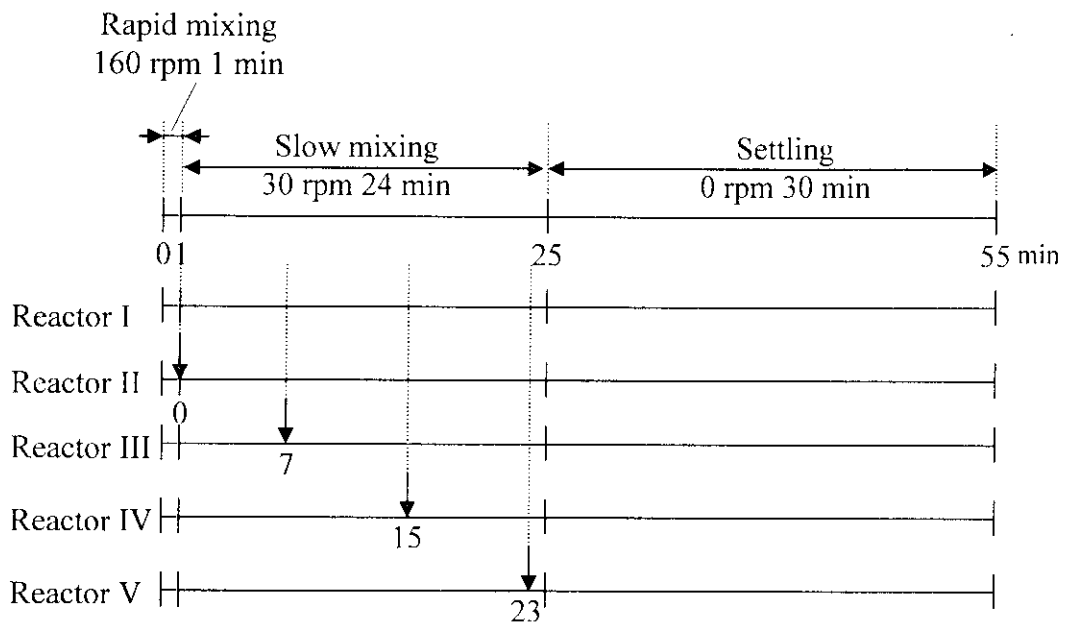


図3 微細気泡添加のタイミング

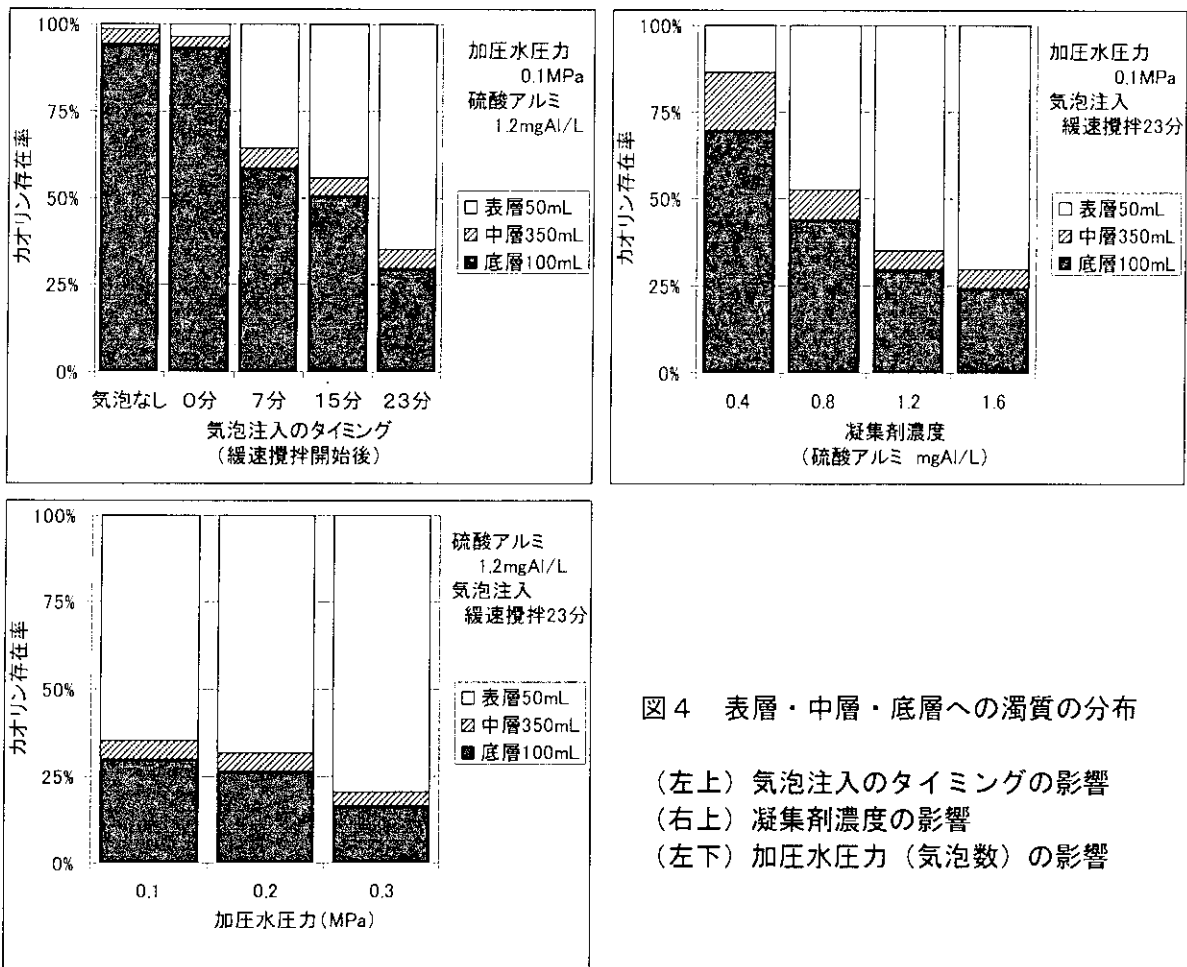


図4 表層・中層・底層への濁質の分布

- (左上) 気泡注入のタイミングの影響
- (右上) 凝集剤濃度の影響
- (左下) 加圧水圧力（気泡数）の影響

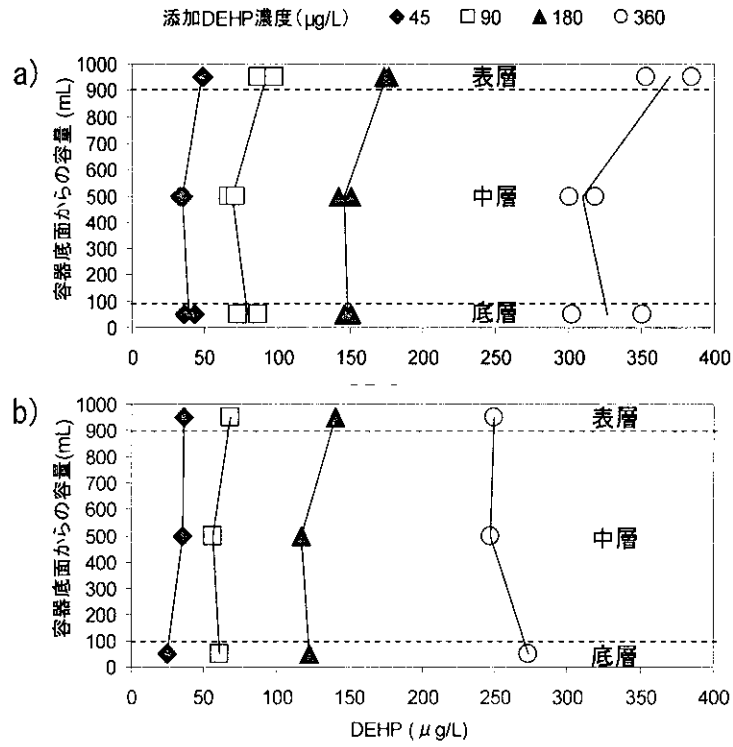


図5 凝集剤・濁質非存在下での微細気泡添加によるDEHPの表層・中層・底層への分配
 a) 微細気泡なし、b) 微細気泡あり

分担研究報告書 3

浄水場内におけるエストロゲン様作用の挙動評価

分担研究者 伊藤禎彦

浄水場内におけるエストロゲン様作用の挙動評価

分担研究者 伊藤 禎彦 京都大学教授

研究要旨

浄水場内水質試料および汚泥試料について、ヒト乳がん細胞を用いる MVLN アッセイによるエストロゲン様作用試験を行った。いずれの試料にもエストロゲン様作用を示す場合があったが、汚泥試料の方が陽性検出率は高かった。前年度までの結果と合わせて判断すると、浄水場内に存在する汚泥やスカム、および SS には広くエストロゲン様作用が見いだされると考えておく必要があることを指摘した。

コールタールエナメル塗装板からの溶出液についてエストロゲン様作用試験を行ったところ、塗装板から何らかのエストロゲン様作用物質が溶出していることが推定された。また、残留塩素の有無は塗装板からの溶出そのものには影響を与えないこと、および溶出物質が残留塩素と反応してそのエストロゲン様作用を失うことも少ないものと推察された。

A. 研究目的

表面浮上物質等にフタル酸ジ-2-エチルヘキシルが濃縮・蓄積されていることが明らかとなったが、分析対象となっていない他のさまざまな微量化学物質も同時に濃縮されている可能性が高い。特に、昨年までの研究で、検出されるエストロゲン様作用とはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル以外の物質によるものと考えられた。

本調査研究では、分析的方法で濃縮物質を明らかにするのではなく、バイオアッセイによってエストロゲン様作用を示す物質が全体としてどの程度濃縮されているかを把握する。バイオアッセイとしては、ヒト乳がん細胞を用いる MVLN アッセイを行った。

B. 研究方法

1. バイオアッセイ用試料の抽出調製

1-1 浄水場内水質試料および汚泥試料

(1) 水質試料

水質試料の内容を表 1 に示す。試料水 1L を 2L 分液ロートにとり、塩酸で pH を 3 前後に調整後、塩化ナトリウム 30g を加え十分混合して溶解後、ジクロロメタン 50mL による振とう抽出（10 分間）を 2 回行い、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮する。さらに濃縮液を 10mL の共栓付遠沈管に移し変え、窒素ガスを吹きつけ約 0.5mL まで濃縮して前処理液とする。前処理液は、 -20°C で冷凍保存する。なお、ブランク水 1L を試料水と同様に操作を行い空試験液とする。

このようにして調製された試料の3分の1が各試験機関に冷凍送付された。

送付資料に対し、窒素ガスを吹き付けて乾固した後、超音波を照射しつつエタノール 0.5ml に転溶した。この試料液を培養液 1ml に対して 5 または 10 μ L 投与した。この投与量は、細胞毒性がみられず、エストロゲン様作用が正しく検出できる範囲として選定したものである。この場合、試料水量 333ml 分がエタノール 0.5ml 溶液中に濃縮されているので、投与量 1 μ l とは試料水 0.667ml 中に含まれている物質を投与したことに相当する。

表1 水質試料の内容

| サンプル No. | 浄水場名 及び採取箇所 | 調査箇所 | 処理日 | 検査センター 検体番号 | 水質試料 採取(ml) |
|----------|--|-------------|------------------|----------------|----------------|
| 水 BI | 水質試料用サンプルブランク | | 平成 16 年 2 月 10 日 | | 1000ml |
| 水 1 | A 水道局 B 浄水場 排水池出口 | 送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9004 | 1000ml |
| 水 2 | A 水道局 B 浄水場 受水井流入前 | 返送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9005 | 1000ml |
| 水 3 | A 水道局 B 浄水場 濃縮槽 2、調整槽 2 の上澄水、脱水ろ 液混合後、接合井流入前 | 上澄水 2 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9007 | 1000ml |
| 水 4 | C 市上下水道局 D 浄水場 配水池入口（緩速系と混じる前） | 送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9103 | 1000ml |
| 水 5 | C 市上下水道局 D 浄水場 着水井流入前 | 返送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9104 | 1000ml |
| 水 6 | C 市上下水道局 D 浄水場 脱水機出口 | 脱水ろ過 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9105 | 1000ml |
| 水 7 | E 市水道局 F 浄水場 配水池出口 | 送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9203 | 1000ml |
| 水 8 | E 市水道局 F 浄水場 着水井流入前 | 返送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9205 | 1000ml |
| 水 9 | E 市水道局 F 浄水場 洗浄排水出口 | ろ過池 洗浄排水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9205 | 1000ml |

| | | | | | |
|------|------------------------|---------------|------------------|------------|--------|
| 水 10 | G 市水道局 H 浄水場 配水池出口 | 送水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9303 | 1000ml |
| 水 11 | G 市水道局 H 浄水場 排泥池流入前 | 濃縮層から の上澄水 | 平成 16 年 2 月 10 日 | D0401-9307 | 1000ml |

(2) 汚泥試料

汚泥試料の内容を表 2 に示す。脱水ケーキ及び遠心分離により脱水を行った沈澱池汚泥を乾燥重量あたり約 5 g 程度となるように、試料（湿泥）の適量を 100mL の共栓付遠沈管にとり、塩酸 5 mL を加えて混合し、アセトン 50mL を加えて 10 分間振とう抽出する。さらに、10 分間超音波抽出を行った後、3000rpm で 10 分間遠心分離し、アセトン抽出液をとる。この操作を 2 回繰り返す、それぞれの抽出液を合わせてロータリーエバポレーターで約 5 mL 濃縮する。抽出液を 5 %塩化ナトリウム水溶液を入れた分液ロートに加え、ジクロロメタン 50mL による振とう抽出を 2 回行い、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで約 5 mL まで濃縮する。さらに濃縮液を 10mL の共栓付遠沈管に移し変え、窒素ガスを吹きつけ約 0.5mL まで濃縮して前処理液とする。前処理液は、 -20°C で冷凍保存する。また、試料と同量の精製水を用いて、試料と同様の操作を行い、空試験液を調製する。

このようにして調製された試料の 3 分の 1 が各試験機関に冷凍送付された。

送付資料に対し、窒素ガスを吹き付けて乾固した後、超音波を照射しつつエタノール 0.5mL に転溶した。この試料液を培養液 1mL に対して 2 または $4\mu\text{L}$ 投与した。この場合、表 2 の乾燥重量 (a g) の 1/3 分に含まれている物質がエタノール 0.5mL 溶液中に存在するので、投与量 $1\mu\text{L}$ とは $0.667a\text{ mg}$ 分に含まれている物質を投与したことに相当する。

表 2 汚泥試料の内容

| サンプル No. | 浄水場名 及び採取箇所 | 調査箇所 | 処理日 | 検査センター 検体番号 | 汚泥試料 採取量(g) | 含水率 (%) | 乾燥重量 換算量 (a g) |
|----------|-------------------------|-------|------------------|----------------|----------------|------------|----------------------|
| 泥 B1 | 汚泥試料用サンプル ブランク | | 平成 16 年 2 月 12 日 | | | | |
| 泥 1 | A 水道局 B 浄水場 脱水機 | 脱水ケーキ | 平成 16 年 2 月 12 日 | D0401-9010 | 13.79 | 62.9 | 5.11 |
| 泥 2 | C 市上下水道局 D 浄水場 脱水機 | 脱水ケーキ | 平成 16 年 2 月 12 日 | D0401-9109 | 14.77 | 58.3 | 6.15 |
| 泥 3 | E 市水道局 F 浄水場 沈澱池汚泥出口 | 沈澱池汚泥 | 平成 16 年 2 月 12 日 | D0401-9206 | 192.94 | 97.4 | 5.01 |

| | | | | | | | |
|-----|-------------------|-------|------------|------------|-------|------|------|
| 泥 4 | G市水道局 H浄水場 脱水機 | 脱水ケーキ | 平成16年2月12日 | D0401-9310 | 20.15 | 71.0 | 5.84 |
|-----|-------------------|-------|------------|------------|-------|------|------|

※ E市水道局沈澱池汚泥試料については、遠心分離処理したものについて採取及び含水率を求めた。

※ 乾燥重量換算量計算式を下記に示す。

$$\text{乾燥重量換算量(g)} = (100 - \text{含水率}) / 100 \times \text{汚泥試料採取量(g)}$$

1-2 コールタールエナメル塗装板からの溶出液

(1) バイオアッセイ用試料液の調製の概要

塗料メーカーより提供されたコールタールエナメル塗装ガラス板について JWVA K 135 に準じて溶出試験を行い、溶出試験液について溶媒抽出または固相抽出法によりバイオアッセイ用試験液を調製した。

(2) 溶出条件

| | 溶出方法 | 溶出に用いた水 | 溶出割合 | 溶出後の処理 |
|---|----------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| ① | JWVA K 135 に準拠 | ミネラルウォーター | 500 cm ³ /L | なし |
| ② | JWVA K 135 に準拠 | 残留塩素 1 mg/L に調整した精製水 | 500 cm ³ /L | チオ硫酸ナトリウムで残留塩素を中和した。 |

(3) バイオアッセイ用試験液の調製

・溶媒抽出

溶出試験液 1 L に対し塩化ナトリウム 50g 及びジクロロメタン 50mL を加え 10 分間振とう及び静置後ジクロロメタン層を分取する操作を 2 回繰り返した。抽出操作は 2 回を行いジクロロメタン層を合わせ(溶出試験液 2 L 相当分)、ロータリーエバポレーターを用いて約 10mL まで圧縮濃縮した後、試験管(10mL)に移し窒素ガスで約 1 mL まで濃縮した。

・固相抽出

溶出抽出液 1 L をあらかじめジクロロメタン 5mL、メタノール 5mL 及び精製水 5mL でコンデューションを行った固相カラム(Sep-Pak PS-2)に溶出液 1 L を 20mL/min で通水後、固相カラムを精製水 10mL で洗浄し、30 分間通気乾燥後ジクロロメタン 5mL で溶出した。操作は 2 回を行いジクロロメタン溶出液を合わせ(溶出試験液 2 L 相当分)、ロータリーエバポレーターを用いて約 10mL まで圧縮濃縮後、試験管(10mL)に移し窒素ガスで約 1mL まで濃縮した。なお、対照として溶出に用いた水を用いて同様の操作を行った。

溶出試料の内容を表 3 にまとめて示す。

表 3 コールタールエナメル塗装板溶出試料の内容

| 番号 | 試験管のラベル表示 | 内容 |
|----|----------------|------------------------------|
| ① | 溶媒抽出 R-CL 有 | 残留塩素 1 ml/L の液で溶出し溶媒抽出して得た検液 |
| ② | 溶媒抽出 R-CL 有 対照 | ①の操作ブランク |
| ③ | 溶媒抽出 R-CL 無 | ミネラルウォーターで溶出し溶媒抽出して得た検液 |
| ④ | 溶媒抽出 R-CL 無 対照 | ③の操作ブランク |
| ⑤ | 固相抽出 R-CL 有 | 残留塩素 1 ml/L の液で溶出し固相抽出して得た検液 |
| ⑥ | 固相抽出 R-CL 有 対照 | ⑤の操作ブランク |

| | | |
|---|----------------|-------------------------|
| ⑦ | 固相抽出 R-CL 無 | ミネラルウォーターで溶出し固相抽出して得た検液 |
| ⑧ | 固相抽出 R-CL 無 対照 | ⑦の操作ブランク |

このようにして調製された試料の3分の1が各試験機関に冷凍送付された。

送付資料に対し、窒素ガスを吹き付けて乾固した後、超音波を照射しつつエタノール 0.5mL に転溶した。この試料液を培養液1mLに対して2~8 μ L投与した。この場合、エタノール溶液0.5mL中に試料水 333mL分の成分が溶解しているとみなすことができ、投与量 1 μ Lとはもとの試料水で0.667mL分を投与していることに相当する。

1-3 浄水場内調査に関する追加試料

採取した試料は以下の通りである。

採取浄水場：I市 J浄水場

採取月日：2004年2月18日

採取場所：①フロック形成池浮上物質

②沈殿池汚泥

③急速ろ過池洗浄排水

このうち、フロック形成池浮上物質については、2004年1月26日から採取日までの約3週間、消泡措置を行わず自然放置した結果、水面に蓄積した集積物を採取したものである。

試料は、「環境庁、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」に従い、洗剤、水、アセトン、ヘキサンの順に洗浄した後、200 $^{\circ}$ Cで2時間加熱し放冷した3Lの摺り合わせの褐色広口ガラス瓶に採取し、密栓した。各試料のpHおよび試料水中SS(mg/L)を試料採取後すみやかに測定した。

採取試料について、まず遠心分離操作で脱水を行った。脱水した汚泥試料20gと濃塩酸5mLを100mL共栓遠沈管に入れてよく混合し、アセトン50mLを加えて10分間振とう抽出、さらに超音波洗浄機を用いて10分間超音波抽出を行った。その後、3000rpmで10分間遠心分離して上澄み液を採取した。この振とう抽出以下の操作をさらに2回繰り返し、得られた上澄み液を回収した。次に、回収した上澄み液を、5%塩化ナトリウム水溶液500mLを入れた分液ロート(1L)に加え、ジクロロメタン50mLで10分間2回振とう抽出した。合わせたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、10mLの共栓遠心管に移し、窒素吹きつけにより全量約5mLになるまで濃縮した。濃縮液を別の10mLの共栓遠心管に入れ、再度窒素を吹きつけ乾固した。最後に濃縮液を入れた10mL共栓遠心管は、前もって一晩デシケーター中に放置した後、重量を測定したものを使用した。そして、乾固した試料と共に重量を測定し、先に測定した空重量を差し引き、試料の残さ重量を求めた。

以上の操作によって得られた、残さ試料は、-20 $^{\circ}$ Cで保存し、使用直前に1.0mLのエタノールで10分間超音波溶解し、バイオアッセイ用の試料とした。

2. MVLNアッセイ法

参考文献1) 参照

C. 研究結果

1. 浄水場内水質試料および汚泥試料に関する結果

浄水場内水質試料の試験結果を図1に示す。 blanks 試料 (水 B1) の酵素活性相対値は約 3.7% となっている。このように、MVLN アッセイにおいては、 blanks またはコントロール試料でもこの程度の数値が得られるのが通常であり、エストロゲン様作用が陽性であると判定できるのは、おおむね酵素活性相対値が 10% 前後以上となった場合である。

したがって、酵素活性相対値 (%) の値から、ほぼ陽性と判定できるのは水 6、水 10、水 11 の各試料である。これらの試料中には、エストロゲン様作用を示す物質が含まれているといえることができる。ただし、酵素活性相対値の値は小さく、そのエストロゲン様作用は弱いと考えられる。

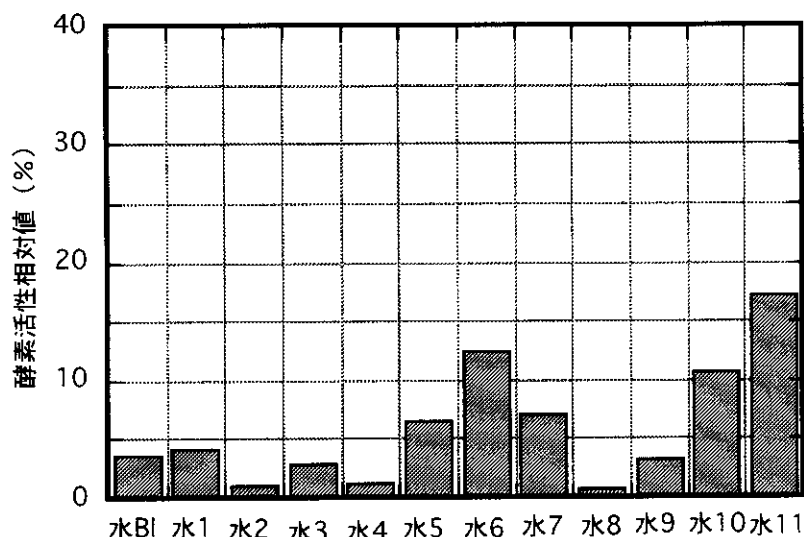


図1 水質試料の試験結果

汚泥試料の結果を図2に示す。水質試料の場合と同様に、酵素活性相対値 (%) の値から判定すると、泥3の試料は擬陽性と判断され、陽性と判定できるのは泥1、泥4の各試料である。これらの試料中には、エストロゲン様作用を示す物質が含まれているといえることができる。

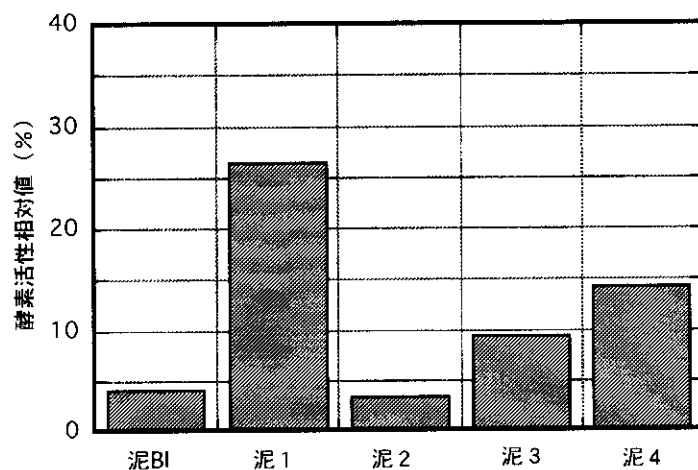


図2 汚泥試料試験結果