〈調査報告〉

播磨灘におけるノニルフェノールの分布

加藤 康伸* 熊谷 哲**
西岡 洋* 杉江 他曾宏*

The Distribution of Nonylphenol in the Water Environments of Harimanada in the Seto Inland Sea, Japan

Yasunobu KATO*, Tetsu KUMAGAI**
Hiroshi NISHIOKA* and Yosohiro SUGIE*

* The Faculty of Engineering, Himeji Institute of Technology, 2167 Shosha Himeji-shi, Hyogo 670-2201 Japan

** School of Humanities for Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology, 1-1-12 Shinzaike-honcho Himeji-shi, Hyogo 670-0092 Japan

Abstract

Alkylphenols are used as raw material of alkylphenol polyethoxylate-type non-ionic surfactant and these substances exist most widely in environmental water. Recently, these substances are known as endocrine disruptors. We collected water, sediment, blue mussel and plankton samples in Harimanada which is located in the Seto Inland Sea, Hyogo, Japan. Nonylphenol(NP) in the all samples were determined by gas chromatography/mass spectrometry. The behavior of nonylphenol in water environments was discussed.

Key words : nonylphenol, endocrine disruptors, mussel, gas chromatography/mass spectrometry

1. はじめに

アルキルフェノール類は非イオン系界面活性剤の原料として広く使われ、環境水中に広く存在が認められている。そのなかでノニルフェノールエトキシレート(NPEO)は下水処理場の好気性汚泥処理によってエトキシ基の短縮が起こり、ノニルフェノールジエトキシレート(NP2EO)やノニルフェノールモノエトキシレート(NP1EO)、エトキシレート基の末端がカルボキシル化したノニルフェノキシカルボン酸といった中間生成物に変化し、その後嫌気性汚泥処理を経てノニルフェノール(NP)が生成することが報告されている¹⁾。ノニルフェノールエトキシレートはそのエトキシ基が短くなるにつれて毒性が高まることが報告されており²⁾、1986年よりスイスやドイツでは家庭向け商品へのNPEOの配合を規制している。アルキルフェノールの使用量は世界全体で年間50万トンと言われ、日本でのアルキルフェノールの年間生産量は約6万5000トン(1999年)である³⁾。そのうち界面活性剤としてのアルキルフェノールエトキシレート中でNPEOの占める割合が80%、オクチルフェノールエトキシレートの占める割合が20%と報告されている⁴⁾。NPEOをふくむ非イオン系界面活性剤は家庭

用洗剤等には国内メーカーの自主規制により使用されていないが、工場などでの機器の洗浄用にまだ多くの使用が見られる。ノニルフェノールは広範囲に使われているがNP2EO、NP1EO、NPの汚染調査の報告は少ない。また近年、外因性内分泌攪乱物質としても興味が持たれている⁵⁾。NPの内分泌攪乱作用については1990年代に入ってから報告され、例として人の乳ガン細胞であるMCF7の培養の際に用いたポリスチレン製の遠沈管から溶出したNPが女性ホルモンを添加したときと同じようにガン細胞の異常増殖が引き起こしていること⁶⁾やニジマスがNPをはじめとするアルキルフェノールエトキシレートの分解生成物中に暴露された場合、血漿中のビテロジェニン濃度の増加と精巢の成長阻害が報告されている⁷⁾。Wahlbergらは下水処理廃水のNPEOの分解産物であるNPをペンタフルオロ安息香酸誘導体化した後、GC/ECDまたはGC/MSで分析し汚泥中に26~1100mg・kg⁻¹、工場排水口付近のイガイに0.20~0.40μg・g⁻¹蓄積が見られたと報告している⁸⁾。NPについて日本では国土交通省をはじめとして内分泌攪乱物質としての全国調査が行なわれている⁹⁾。しかし、その環境水中での挙動や分布、動態予測などの報告は少ない。また環境水中では環境ホルモン物質をはじめとして、その濃度は非

* 姫路工業大学工学部 〒671-2201 兵庫県姫路市書写 2167

** 姫路工業大学環境人間学部 (〒671-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12)

常に低いため、環境水中での汚染の指標としてムラサキガイなどが用いられる。ムラサキガイは世界的にも広く分布し、指標生物としての評価が高い。1975年にE.D.Goldbergのmussel watchの提言によって世界的な生物モニタリングが提唱されている¹⁰⁾。PCB,DDTの取り込みに関しても汚染地域に深度別に非汚染地域から採取したムラサキガイを設置した結果、その地域の汚染を示す有意な結果が報告され、相対的に生物監視システムとして使えることが明らかにされている^{11)・12)}。

そこで本研究では閉鎖性水域における環境汚染有機物の分布と動態解明の一環として、ムラサキガイを指標生物として瀬戸内海の播磨灘においてNPのモニタリングを行なった。同時にNPについて播磨灘に流れ込む代表的河川水、海水、汚染源の1つと考えられている下水処理場の流入水、放流水、海底底質、プランクトン等についても測定を行なったので報告する。

2. 方 法

2.1 試料の採取

ムラサキガイ (Blue mussel) のサンプリングは1999年12月から2000年1月にかけての冬季にFig.1に示す播磨灘の1から10番の地点において行なった。サンプルはすべて全長2cmから3cm、幅1cm大のものを10地点でサンプリングし、アセトン洗浄済の容器に入れ持ち帰った。直ちにステンレス製器具で軟体部をとりだし、メタノール30mlを加えてホモジナイザーを用いて約2万回転前後でホモジナイズした。これを1地点でそれぞれ10gずつ3つに分け試料とした。水試料は播磨灘北部の1地点において深度0m, 5m, 10mにおいて採水器を用いて採水し、河川水については播磨灘に流入する代表的河川である加古川の河口付近で採水した。また播磨灘北部の下水処理場の流入下水と排水口付近においても採水した。採水した試料は1lにつきアスコルビン酸1gを加え、1lメジュームびんに保管した。試料は各地点1l×3サンプルとした。底質試料に関しては下水処理場排水口付近の底質と加古川河口付近、鳴門付近の底質をアセトン洗浄済みの容器に入れ持ち帰り、-20℃で保管した。これも1サンプルにつき10gずつ3つに分け分析を行なった。プランクトンは北原式プランクトンネットを用いて1ノット30分間姫路沖で曳航し採取した。採取した試料は容器に入れ持ち帰り、-20℃で保管した。1試料10gで3試料の分析を行なった。底質試料と生物試料は湿重量で分析を行ない、乾燥させた後、乾燥重量と湿重量の比から乾燥重量1gあたりのNPの量を算出した。

2.2 試薬類

NPは関東化学(株)製p-ノニルフェノールを用いた。ジクロロメタン、アセトン、メタノール、エタノール、ヘキサン、塩酸、無水硫酸ナトリウム、ジエチルエーテルは和光純薬(株)製PCB分析用、残留農薬試験用を用いた。内標準物質としてフェナントレン d-10を使用した。アスコルビン酸、水酸化カリウム、硫酸ジエチル、酢酸メチルは和光純薬(株)製試薬特級のものを使用した。水試料の固相抽出にはWaters Sep-Pak PS-2を用い、水試料のろ過には0.45μm Milliporeフィルターを用いた。クリーンアップのためのフロリジルカラムはWaters Sep-Pak

Frolisil(内径1 cm、長さ5 cm)を用いた。また実験に用いた精製水はイオン交換したのちの蒸留水をさらにMilli-Q超純水装置を用いて精製した。

Fig.1 Sampling points of Blue mussel in Harimanada (1~10)

2.3 分析手法

2.3.1 試料の前処理¹³⁾

海水試料については0.45μm Milliporeフィルターを用いてろ過し、フィルター上の残留成分をアセトン5mlで洗浄し、ろ液と混合した。その試料に濃塩酸 1mlとアスコルビン酸1gを加えて、あらかじめアセトンで10ml・min⁻¹で1分間通水し、次に超純水で10ml・min⁻¹で1分間通水しコンディショニングしたWaters Sep-Pak PS-2に20ml・min⁻¹で1lのろ液を通水し抽出した。ついで酢酸メチルで溶出し、少量のヘキサンを加え硫酸ナトリウムで脱水した後、窒素を吹き付けて蒸発乾燥させた。これに硫酸ジエチル0.2mlと1mol・l⁻¹-KOH/エタノール溶液0.5mlを加えて室温で40分静止してエチル誘導体化した。これに内標準物質としてフェナントレン d-10 1ml/(0.1μg・l⁻¹)を加えたヘキサン1mlと超純水3 mlを加えて抽出し、ヘキサン層を硫酸ナトリウムで脱水した後、0.5ml/まで濃縮しGC/MSで測定した。

底質試料については100ml/ビーカーに10g(湿重量)を分取して、メタノール30mlにアスコルビン酸1gと濃塩酸1mlを加え超音波抽出した。この操作を2回行ない、遠心分離の後、合わせた試料60mlを分液ロートに入れメタノール飽和ヘキサン10ml/で脂質の除去を行なった。ジクロロメタンと5%塩化ナトリウム水溶液200mlを加えて溶媒抽出を行ない、0.1ml/まで濃縮した後、エチル誘導体化し、1mol・l⁻¹-KOH/エタノール溶液4mlを加えて60℃で1時間加水分解を行なった後、水試料と同じように内標準物質フェナントレン d-10を添加したヘキサン1mlと超純水3ml/で抽出した。ヘキサン層を脱水した後、4%エーテル/ヘキサン10ml/を用いてSep-Pak Frolisilで脂質などの夾雑物の除去を行なった。この溶液を0.5ml/まで濃縮しGC/MSで測定した。

生物試料については1回の測定に10gずつメタノール30ml/中でホモジナイズしたものを遠沈管に移し遠心分離した後、上澄み液を分液ロートに入れメタノール飽和ヘ

キサン10m/で脂質の除去を行ない、ジクロロメタン50m/と5%塩化ナトリウム水溶液200m/で溶媒抽出を2回行なった。ジクロロメタン層を合わせ0.1m/まで濃縮した後、エチル誘導体化し、上記に示す底質と同じ操作を行なった。

2.3.2 GC/MSによる定量

分析に用いたGC/MSはFinnigan GCQを用いた。試料はスプリットレスモードで2 μ lを注入した。GC/MSによる測定条件はTable 1に示す。

Table 1 The operational conditions for GC/MS and calculations by Xcalibur

Sr=Internal Injection Standard (Phenanthren d-10)

Injection amount	2 μ l
Injection temp	250 $^{\circ}$ C
Column	Rtx-5MS Length=30m 0.25mm i.d.
Column temp	60 $^{\circ}$ C(10min)—10 $^{\circ}$ C $\cdot$ min $^{-1}$ —300 $^{\circ}$ C (min)
Ionization	250 $^{\circ}$ C
Scan	Full scan
Monitor Ion	107,121,135,150,163,177,188(Sr), 220

NPは $m/z=107, 121, 135, 149, 150, 163, 177, 220$ のフラグメントイオンを持つ¹⁴⁾、そのためFull scanモードで測定したデータをデータ処理ソフトFinnigan Xcaliburを用いて処理し、上記フラグメントイオンをモニターすることで定量計算を行なった。エチル誘導体化物は分子イオンピーク248を持つが強いフラグメントピークがNPと同じであるため、NPのフラグメントイオンをモニターイオンとした。そのクロマトグラムとマスペクトルをFig.2-Fig.5に表示する。

Fig.2 NP chromatograms and Spectra of NP Standard

Fig.3 NP chromatograms and Spectra in Blue mussel

Fig.4 NP chromatograms and Spectra of sediment sample

Fig.5 NP chromatograms and Spectra in water sample

またそれら9つのピーク面積の合計を計算し、標準品と内標準物質のピーク面積の比を基にして定量計算した。NPはノニル基に起因する20以上の構造異性体を持ち、特有のクロマトグラムを明瞭に確認することができるが、異性体ピークの中には強度の弱いもの強いもの、またピークが重なるものなどがある。今回、NPの標準品の各ピーク組成と環境試料の組成をGC/MS-SIMで確認したところほぼ同じであったため、同じと仮定して計算を行なっている。本実験ではそのうちの強度の特に強いピーク9本に関してピーク面積を合計し定量を行なった。またすべての底質と生物試料はwetで測定を行なったので含水重量を計算した後、dry換算を行なった。

2.3.3 検量線と検出限界

NPの0.05 μ gから0.20 μ gまでの標準溶液の検量線を作成した。一次回帰した直線の相関係数(r^2)は0.99以上であった。IUPACの勧告¹⁵⁾による検量線から算出した検出限界濃度は水試料に対して0.16 μ g $\cdot$ l $^{-1}$ であり、底質、生物試料の検出限界濃度は0.015 μ g $\cdot$ g $^{-1}$ であった。また本実験手法による装置および器具からの汚染を調べるために超純水を用いてブランク試験を行なった結果、NPは検出下限値以下であり器具からの汚染はないものと判断した。また堆積物、生物試料についてもブランク試験を行なったがNPの汚染は確認されなかった。NPは水道水を始めとして蒸留水中にも含まれるが超純水には含まれないため検出されないものと判断した。

2.3.4 添加回収実験

添加回収実験は比較的NPの汚染の少ない地域のムラサキイガイ10gに対して10 μ gのNPを添加した。その結果、添加回収率はサンプルの平均が90%であった。また水質試料や底質試料に関して100%を超える回収率がみられ本分析法における損失は見られなかった。

2.3.5 結果と考察

Table 2に示すように播磨灘に面する下水処理場の排水溝の試料からは3検体の平均値として $1.44 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ が得られた。平成10年度に建設省が発表した東京の下水放流水のNP濃度前期 $0.2\text{--}0.7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、後期 $0.1\text{--}0.9 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ と比較してもほぼ同程度の値であった。播磨灘に面する代表的河川水中のNP測定値が $0.95 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ であることから、下水処理場の放流水の濃度と同程度であった。下水処理場におけるNPの除去については下水処理場の流入下水からは $11.33 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ が測定されたことから減少率約91%と東京の下水処理場の流入下水が $1.9\text{--}45 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $1.7\text{--}75 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ でNPの減少率は中央値94%とほぼ同程度の値であった。NPに関しては日本の下水処理施設では大きな減少が見られている⁸⁾。好気性汚泥処中のNP濃度としてはスイスの下水処理場では $1010 \pm 520 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ のNPが検出されたとの報告があり¹⁾。東京の下水処理場における報告では嫌気性汚泥から $59 \pm 25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (wet dry換算)が報告されている¹⁶⁾。本報告では下水処理場排水溝の付近の底質を測定し、平均 $30 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ の値が得られた (Table 3)。これは懸濁粒子の表面に吸着したNPが流れ出た後に堆積したと考えられる。またNPEOの状態で環境水中に放流され、その後にNPが生成された可能性も考えられる。下水処理場の排水溝が合流している河川底質のNP濃度は $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ であり、下水処理場排水溝付近の値とは明らかな差異が見られた。

Table 2 NP concentration in natural water

Water sample	NP concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
Himeji port (0m,5m,10m)	0.26
The mouth of Kakogawa river	0.95
Inflow of sewage treatment plant	11.33
Discharge of sewage treatment plant	1.44

Table 3 NP concentration in sediments and plankton

Samples (sediment and plankton)	NP concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Himeji port	0.28
The mouth of River	0.06
Drainage of sewage treatment plant	30
Naruto canal	0.12
Plankton	0.05

次に播磨灘を囲む地域でのムラサキイガイ中のNP濃度を調査した。疎水性の比較的高いNPや短いエトキシ基をもつNPEOの一部は下水処理場から流れ出た懸濁粒子とともに表面に吸着しながら河川に流れ込み、海へと移動するものと溶存状態で移動するものがある。海で一部は海底へと堆積し、そこからNPが水中で生成される過程が存在する可能性がある。水中に溶存するものもあれば溶存状態のものがプランクトンの表面に吸着し、直接吸収と食物連鎖の2つの経路をたどりムラサキイガイに取り込まれる。赤穂付近から姫路、明石また淡路島の播磨灘側と大阪湾側、鳴門から四国の播磨灘に面する地域でムラサキイガイを採取し測定した。その結果をTable 4に示す。

地域別に(2) $0.14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、(3) $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、(4) $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、(5) $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ と播磨灘北部の人口密集地では比較的高い濃

縮が見られた。

Table 4 NP concentration in Blue mussel in Harimanada

Point No	Sampling point (city)	NP concentration in Blue mussel ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dry)
1	Mitsu	0.06
2	Himeji	0.14
3	Ooshio	0.08
4	Takasago	0.08
5	Akashi	0.12
6	Hokutan	0.11
7	Seitan	0.04
8	Naruto	0.08
9	Aji	0.07
10	Sumoto	0.09

これは播磨灘北部に下水処理場が密集していることにも関係している。また鳴門付近と明石付近でのNP濃度は(5) $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 、(8) $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ であり人口密集地と同程度の値を示した。有機塩素化合物の1つであるPCBにおいても同様に鳴門付近と明石付近では値が高いことが報告されている¹⁷⁾。

また同時期に採取したプランクトンに関してはTable 3に示すように $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ と高い濃縮が確認された。播磨灘の冬季優先種である植物性プランクトン*Coscinodiscus*などは大きな表面積を持つため、NPのような疎水性のある物質は表面に吸着していると考えられる。NPの内分泌攪乱作用は $10 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ で魚類に影響が出ると報告されている¹⁸⁾が、播磨灘の海水中濃度は人口密集地である姫路港沖で $0.26 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ とははるかに低い値であった。

3. まとめ

本研究では、冬季におけるムラサキイガイを用いて播磨灘におけるNPの生物モニタリングを行なった結果、播磨灘全域でのNPのムラサキイガイへの濃縮が確認された。そのことから水生生物への影響が懸念される。食物連鎖による濃縮に関しては報告が少ないので、栄養段階の上部での濃縮を播磨灘においても今後、調査する必要がある。播磨灘のような閉鎖性水域ではPCBやDDTのような比較的疎水性の高い物質は水中のプランクトンや懸濁物とともに移動し、外洋に容易には排出されない。NPは比較的水に溶存する¹⁹⁾ため外洋への排出も考えられるが、今回の調査では全域でNPの濃縮が観察された。この調査をもとにした今後の対策が望まれる。またムラサキイガイを指標生物としたNPのモニタリングは有効であると考えられる。しかし、環境試料は季節における変動なども大きいと考えられ、NPのような物質はPCBなどと同じように一度ムラサキイガイの体内に取り込まれても海水との物理化学的平衡によって海水に再分配されたり代謝される可能性もある。そのため今後数年を通してのモニタリングも必要とされる。しかし今回の調査では地域による差異が見られ、ムラサキイガイを相対的な評価として、その地域のNP汚染の評価に用いることは可能であろう。

謝辞

本分析法の前処理に関しては大阪公害センターの奥村為雄先生に多大な助言をいただいた。また今回の研究に関しては兵庫県公害研究所第3研究部の中野武先生また他の方々に協力いただいた。ここに謝意を表す。

(原稿受付 2001年5月14日)

(原稿受理 2001年12月12日)

参考文献

- 1) Giger, W., Brunner, Paul H., and Shaffner, C., (1984) 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants, *Science*, **225**, 623-625.
- 2) Renner, R., (1997) European Bans on surfactant trigger transatlantic debate, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 361A-320A.
- 3) 化学工業統計年報 (1999) (通産産業大臣官房調査統計部編), 108, 財団法人通産産業調査会, 東京.
- 4) 中村好伸 (1998) 非イオン界面活性剤の最近の動向 水環境学会誌, **21** (4), 2-6.
- 5) 環境庁 (1998) 外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について, 環境ホルモン戦略計画, SPEED98.
- 6) Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., and Sonnenschein, C. (1991) p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene, *Environ. Health Perspect.*, **92**, 167-173
- 7) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne J. A., (1993) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicology*, **27**, 361-372.
- 8) Wahlberg, C., Renberg, L., and Wideqvist, U., (1990) Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, swage and biota, *Chemosphere*, **20**, Nos, 1-2, 179-195.
- 9) 国土交通省 (1999) 水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果.
- 10) 清水誠 (1980) 11. モニタリングと指標生物 「生物濃縮 環境科学特論」 (山根 登), 268-278 産業図書 東京.
- 11) 上野大介, 高橋真, 田辺信介, 池田久美子, 小山次朗 (1999), イガイ移植実験における有機塩素化合物の蓄積挙動 環境化学, **9**, No.2, 369-378.
- 12) 山口友加, 佐藤太, 秋山賢一朗, 河野恵里子, 堤史薫, 高田秀重 (2000) ムラサキイガイを用いた沿岸海域の微量有機物質汚染のモニタリング 地球化学 **34**, 41-57.
- 13) 奥村為雄 アルキルフェノール類とビスフェノールAの分析法, 第7回 環境化学討論会 講演要旨集 32-33.
- 14) Bhatt B.D., Prasad J.V., Kalpana G., and Ali S., (1992) Separation and Characterization of isomers of p- nonylphenols by capillary GC/GC-MS/ GC- FTIR Techniques, *Journal of Chromatographic Science*, **30**, June, 203-210.
- 15) IUPAC: (1976) *Pure Appl Chem.*, **45**, 99.
- 16) 磯部友彦, 佐藤正章, 小倉紀雄, 高田秀重 (1999) GC/MSを用いたノニルフェノールの分析と東京湾周辺の水環境における分布 水環境学会誌, **22**, 118-126.
- 17) 環境庁 (1983) 化学物質と環境 12. 環境保険部 保険調査室編
- 18) Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. and Sumpter, J.P., (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environ.Toxicol.chem.*, **15**,194-202.
- 19) T, Isobe., H, Nishiyama., A, Nakashima., and H, Takada., (2001) Distribution and behavior of Nonylphenol, Octylphenol and Nonylphenol monoethoxylate in Tokyo Metropolitan Area: Their Association with Aquatic Particles and Sedimentary Distributions, *Environ.Science.Technol.*, **35**,1041-1049.