

# 学位論文の要約

氏名 澤井 淳

学位論文題目 質量分析による下水中の生態毒性物質の探索に関する研究

## 第1章 緒論

現在、欧米諸国で実施されている排水等の毒性削減および毒性同定の手法について整理し、既存の手法の課題を明確にした。

### (1.1) 排水等の毒性削減・毒性同定手法

米国では毒性削減評価 (TRE: Toxicity Reduction Evaluation) および毒性同定評価 (TIE: Toxicity Identification Evaluation、図 1-1)、欧州では EDA (Effects-directed analysis) が実施されている<sup>1-8)</sup>。米国で実施された TRE の成功率調査によると、77 事例のうち、排水の毒性が削減または消失した事例の割合は工場排水で 60%、下水処理水で 35%であり、下水処理水の TRE の成功率が低い(表 1-1)<sup>6)</sup>。下水処理場で TRE が成功した 11 事例のうち、9 事例で毒性原因物質 (群) を同定しており、原因が同定できれば TRE の成功率が上がると考えられた (表 1-2)<sup>6)</sup>。

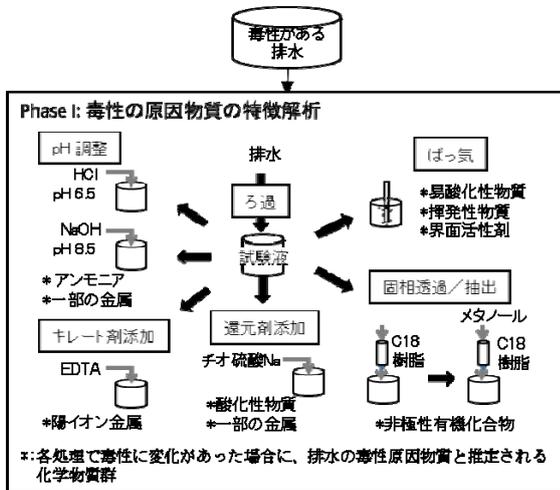


図 1-1 毒性同定評価 (TIE) の流れ<sup>1-5)</sup>

表 1-1 米国における毒性削減評価 (TRE) の実績<sup>6)</sup>

	TRE事例 総数	毒性が 削減された	毒性が 消失した	毒性が完全に 削減されて いないまたは 作業中	毒性が削減 されたか 不明
工場	20	9 (45%)	4 (20%)	3 (15%)	4 (20%)
下水処理場	57	11 (19%)	24 (42%)	9 (16%)	13 (23%)
合計	77	20 (26%)	28 (36%)	12 (16%)	17 (22%)

表 1-2 米国における下水処理場での毒性削減成功事例<sup>6)</sup>

州	下水処理場名	TRE 実施期間	毒性同定	毒性原因	毒性制御方法または毒性 低減の要因
カリフォルニア	Inland Empire Utilities Agency	1996-1998	可	農薬類	施設運転方法の改善
ノースカロライナ	Durham, City of	1989-1994	TIE未実施	-	-
ノースカロライナ	Raidsville, City of	1992-1998	否	-	処理法改善、排出先の移動
オクラホマ	Lawton, City of	1991	可	ダイアジン	家庭/公衆への教育
サウスカロライナ	Blacksburg, Town of	2004-2007	可	聖硝酸	下水処理場工程の変更
ウィスコンシン	Grantsburg, Village of	2003-2005	可	アンモニア、銅、亜鉛および有機化合物	-
ウィスコンシン	Mayville, City of	2003-2005	可	チーズ製造工場の洗浄剤	洗浄剤使用量の削減
ウィスコンシン	Monroe, City of	1987-1990	可	インク製品	工場閉鎖
ウィスコンシン	Oconomowoc, City of	2002-2005	可	製造業	製造業工程の変更
ウィスコンシン	Ripon, City of	2004-2005	一部可	塩素	塩素の基準設定、毒性原因削減計画の要求
ウィスコンシン	Watertown, City of	1998-2001	可	界面活性剤	下水処理場改修

## (1.2) 毒性削減・毒性同定手法の課題

下水道のように多種多様な化学物質が流入する場合、その処理水の毒性原因同定は、米国のTRE、TIE手法だけでは困難であると考えられる。また、EDAでは、膨大な数の化学物質の中から毒性と関係のある有機化合物を絞り込むため、図1-2のように分画した試料の毒性試験および化学分析を行う<sup>8)</sup>。非常に時間とコストを要する手法である。また、SOLUTIONSプロジェクトでは図1-3のように、網羅分析によるスクリーニングと多変量解析を組み合わせることで生態影響の原因物質の探索が行われた<sup>19, 20)</sup>が、主成分分析(PCA)やクラスターリングなど、毒性と個別化学物質の関連性から原因物質を探索する手法であるため、例えば下水試料のような非常に多くの化学物質が含まれる試料から、原因物質を絞り込むのは難しいと考えられる。

以上のように、有機物質が原因となるケースにおいて、既存の手法を補完するため、網羅的な質量分析技術が必要である。本論文ではさらに、国内での毒性削減・毒性同定事例<sup>9-18)</sup>、網羅的な質量分析技術の活用事例を整理し、生態毒性試験、網羅的な質量分析および多変量解析を組み合わせる手法の新規性、適用可能性について述べた。

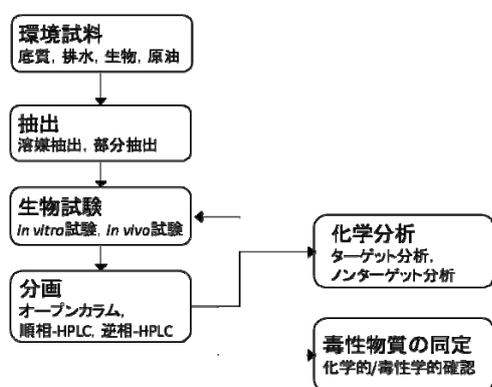


図1-2 EDAの流れ<sup>8)</sup>

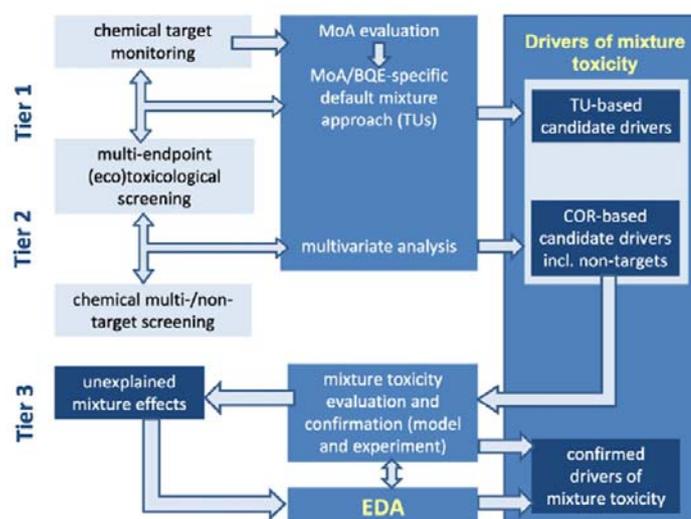


図1-3 SOLUTIONSプロジェクトにおいて検討された生態毒性物質の探索フロー<sup>20)</sup>

## 参考文献

- 1) US EPA, 1989. Generalized methodology for conducting industrial toxicity reduction evaluations (TREs), EPA/600/2-88/070. URL. [https://www3.epa.gov/npdes/pubs/wet\\_industrial\\_tre\\_manual.pdf](https://www3.epa.gov/npdes/pubs/wet_industrial_tre_manual.pdf).
- 2) US EPA, 1999. Toxicity reduction evaluation guidance for municipal wastewater treatment plants, EPA/833B-99/002. URL. <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/tre.pdf>.
- 3) US EPA, 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations Phase I toxicity characterization procedures second edition, EPA/600/6-91/003. URL. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/300011NY.PDF?Dockey=300011NY.PDF>.
- 4) US EPA, 1993. Methods for aquatic toxicity identification evaluations Phase II Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity, EPA/600/R-92/080. URL. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/owm0343.pdf>.
- 5) US EPA, 1993. Methods for aquatic toxicity identification evaluations Phase III Toxicity confirmation procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity, EPA/600/R-92/081. URL. <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/owm0341.pdf>.
- 6) Texas Association of Clean Water Agencies, Texas Water Conservation Association, Water Environment Association of Texas, 2010. Report on freedom of information act request to U. S. Environmental

Protection Agency by Texas coalition of publicly owned treatment works regarding sublethal toxicity reduction evaluations. URL.

[http://www.tacwa.org/agendaandpresentations/presentation/FOIA\\_Report\\_0210.pdf](http://www.tacwa.org/agendaandpresentations/presentation/FOIA_Report_0210.pdf).

- 7) A.S., Wernersson, M., Carere, C., Maggi, P., Tusil, P., Soldan, A., James, W., Sanchez, V., Dulio, K., Broeg, G., Reifferscheid, S., Buchinger, H., Maas, E., Van Der Grinten, S., O'Toole, A., Ausili, L., Manfra, L., Marziali, S., Polesello, I., Lacchetti, L., Mancini, K., Lilja, M., Linderoth, T., Lundeberg, B., Fjällborg, T., Porsbring, D.G.J., Larsson, J., Bengtsson-Palme, L., Förlin, C., Kienle, P., Kunz, E., Vermeirssen, I., Werner, C.D., Robinson, B., Lyons, I., Katsiadaki, C., Whalley, K., den Haan, M., Messiaen, H., Clayton, T., Lettieri, R.N., Carvalho, B.M., Gawlik, H., Hollert, C., Di Paolo, W., Brack, U., Kammann, R., Kase, 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 27, Article 7.
- 8) S. ,Hong, J.P., Giesy, J.S., Lee, J.H., Lee, J.S., Khim, 2016. Effect directed analysis: current status and future challenges. *Ocean Science Journal* 51(3), 413-433.
- 9) 板津靖之, 高野智弘, 金俊, 福富真実子, 楠井隆史, 2015. 事業所排水の生態毒性学的評価: 毒性原因物質の特徴化と放流先河川への影響. *環境化学* 25(1), 19-26.
- 10) 山本裕史, 池幡佳織, 安田侑右, 田村生弥, 鑪迫典久, 2012. 徳島県内事業所排水のTRE/TIE 事例. *EICA: 環境システム計測制御学会誌* 17(2・3), 180-183.
- 11) 藤原尚美, 野中真一, 豊久志郎, 鑪迫典久, 2015. 金属製品製造工場のWET を用いた排水中毒性要因の推定とその改善例. *環境化学* 25(1), 35-42.
- 12) 新野竜大, 2012. メタボロームを活用した化学物質評価・管理～ WET への適用可能性について, 第15 回日本水環境学会シンポジウム講演集, p. 34.
- 13) 上田明弘, 2016. 積水化学グループにおけるWET 手法を用いた排水評価の取り組み, 環境省「第2 回生物を用いた水環境の評価・管理手法に関する検討会」資料1-1. URL. [http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf/02/mat01\\_1.pdf](http://www.env.go.jp/water/seibutsu/conf/02/mat01_1.pdf).
- 14) 富川恵子, 入江俊行, 内田弘美, 渡部春奈, 鑪迫典久, 2015. WET 法を活用した工場排水管理: 化学工業における排水改善の取り組み. *環境化学* 25(1), 27-33.
- 15) 山本裕史, 矢野陽子, 森田隼平, 西家早紀, 安田侑右, 田村生弥, 鑪迫典久, 2013. 下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価. *土木学会論文集G(環境)* 69(7), III\_375-III\_384.
- 16) 真野浩行, 武田文彦, 南山瑞彦, 2016. 溶存態金属の濃度が高い下水処理水を対象としたミジンコ2 種への影響の調査と毒性同定評価試験の適用. *土木学会論文集G (環境)* 72(7), III\_107-III\_115.
- 17) Takeda, F., Minamiyama, M., Okamoto, S., 2017. Seasonal variation ability of wastewater treatment for reduction in biological effects evaluation based on algal growth. *Journal of Water and Environmental Technology* 15(3), 96-105.
- 18) 岡本誠一郎, 武田文彦, 真野浩行, 2015. 下水道分野におけるWET の適用とその課題. *EICA: 環境システム計測制御学会誌*20(1), 15-19.
- 19) 家田曜世. (2016). EUを中心とした水環境に関する大規模プロジェクト「SOLUTIONS」. *ぶんせき*, 11, 11-12.
- 20) Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Paolo, C.D., Escher, B.I., Hewitt, L.M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Krauss, M. (2016). Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Science of The Total Environment*, 544, 1073-1118.

## 第2章ノンターゲットスクリーニング分析を用いた毒性同定手法の検討 - 負イオン化モード

PRTR データ等から様々な生態毒性物質が下水処理場に流入していることが報告されている<sup>1-5)</sup>。米国では WET (Whole Effluent Toxicity) 手法が実施され<sup>6-9, 17, 18)</sup>、毒性削減<sup>10-11)</sup>、毒性同定<sup>12-15)</sup>が実施されているが、下水処理場での成功率が低い<sup>16)</sup>。近年の機器分析技術の進展により、精密質量分析による未知物質の探索、解明、同定事例も報告されている<sup>19-31)</sup>。また、精密質量分析で得られた測定結果を多変量解析する研究が数多く行われている<sup>32)</sup>。そこで、負イオン化モードでのノンターゲットスクリーニング分析による未知物質の探索・同定能力を実証した。

下水処理水に既知の毒性物質 5 物質<sup>33-37)</sup>を添加して模擬試料を調製し、その藻類生長阻害試験<sup>38-41)</sup>結果、高分解能 LC/MS を用いた分析結果を得た。なお、用いた下水処理水には固相抽出で回収される毒性物質を有意な濃度で含まない試料であった<sup>43-45)</sup>。また、模擬試料の藻類試験結果 (図 2-1) は、藻類毒性の文献値からの計算値より数倍低い値となったが、共存する化学物質に起因する可能性が考えられた<sup>46)</sup>。ノンターゲットスクリーニング分析により得られた結果に対して多変量解析<sup>42)</sup>を適用した結果、藻類毒性と関連のあるものが、1つのコンポーネントに絞り込まれ、分子式推定<sup>47)</sup>の結果 (図 2-2)、トリクロサンであると推定され、クロマトグラフィーによりトリクロサンであると同定した (図 2-3)。試料の毒性強度が試料中のトリクロサンのピーク面積により説明可能とのモデルが構築され、毒性物質の添加条件と一致した。以上により、負イオン化モードでのノンターゲットスクリーニング分析の有効性を確認した。

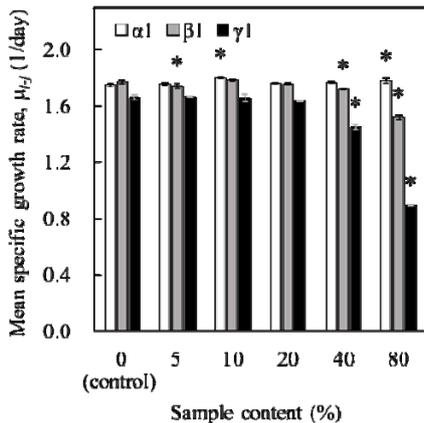


図2-1 藻類試験結果

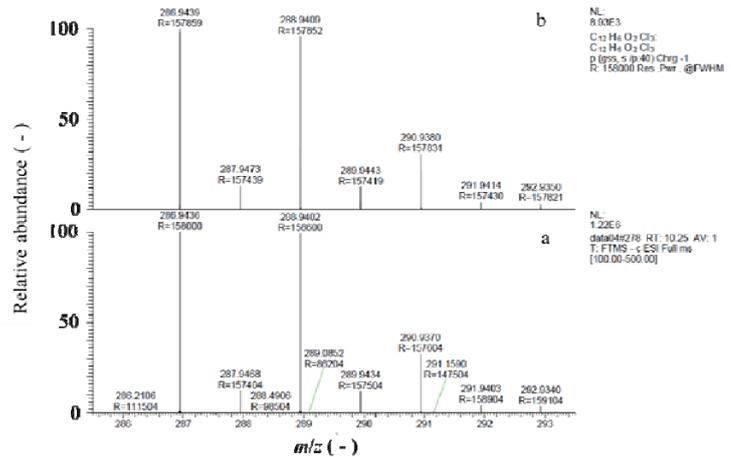


図2-2 コンポーネント1の分子式推定 (a: 実測スペクトル、b:  $C_{12}H_6C_{13}O_2$ のシミュレートスペクトル)

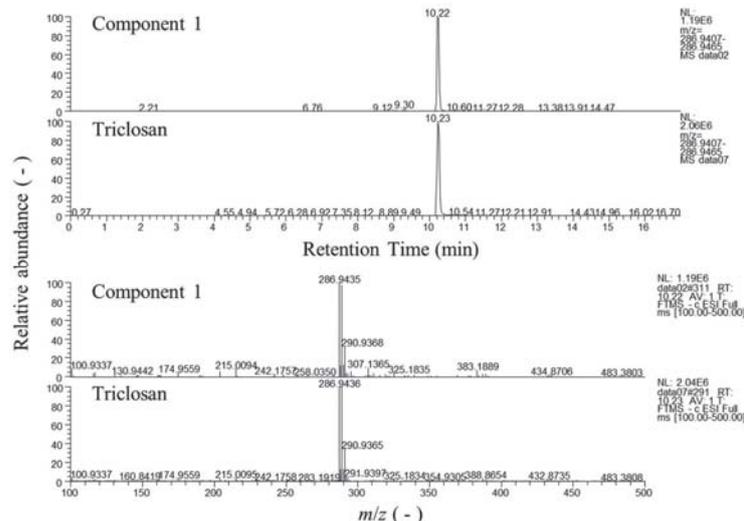


図2-3 コンポーネント1とトリクロサンの認証標準物質のクロマトグラフィー

## 参考文献

- 1) Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism Japan (MLIT): A Guideline for Estimating Discharged Amount of Chemicals and Developing a Chemical Management Procedure in Sewer Systems, draft, 2005. <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/info/prtr/guide01.pdf>
- 2) Ministry of the Environment Japan (MOEJ): Pollutant Release and Transfer Register (PRTR), PRTR Data Page, Compiled Data. <http://www2.env.go.jp/chemi/prtr/prtrinfo/contents/e-table.jsp>
- 3) Isozaki Y, Nakajima F, Furumai H: Speciation of zinc, copper and nickel in domestic wastewater treatment process and in receiving river water. *Environ. Sci.*, 19(5), 445–452, 2006.
- 4) National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chemicals Evaluation and Research Institute Japan (CERI), New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO): Initial Risk Assessment Report No. 131 Zinc compounds (water-soluble), 2008. [http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip\\_search/dt/pdf/CI\\_02\\_001/risk/pdf\\_hyoukasyo/001riskdoc.pdf](http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/001riskdoc.pdf)
- 5) Harada A, Komori K, Nakada N, Kitamura K, 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.
- 6) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Method Guidance and Recommendations for Whole Effluent Toxicity (WET) Testing (40 CFR Part 136), EPA 821-B-00-004, 2000. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/5000165C.PDF?Dockey=5000165C.PDF>
- 7) OSPAR: Whole Effluent Assessment Report, 2005. <https://www.ospar.org/documents?v=7018>
- 8) Power EA, Boumphrey RS: International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13(5), 377–398, 2004.
- 9) Ministry of Environment Japan (MOEJ): An Application of Bioassay to Effluent Management, 2017. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/28556.pdf>
- 10) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Generalized Methodology for Conducting Industrial Toxicity Reduction Evaluations, EPA-600-2-88-070, 1989. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30000H2L.PDF?Dockey=30000H2L.PDF>
- 11) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Toxicity Reduction Evaluation Protocol for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA-600-2-88-062, 1989. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30000H09.PDF?Dockey=30000H09.PDF>
- 12) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Toxicity Identification Evaluations: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA-600-6-91-005F, 1992. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/300011TY.PDF?Dockey=300011TY.PDF>
- 13) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase II Toxicity Identification Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity, EPA-600-R-92-080, 1993. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30002MZL.PDF?Dockey=30002MZL.PDF>
- 14) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase III Toxicity Confirmation Procedures for Samples Exhibiting Acute and Chronic Toxicity, EPA-600-R-92-081, 1993. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/30002N1J.PDF?Dockey=30002N1J.PDF>
- 15) Norberg-King TJ, Ausley LW, Burton D, Goodfellow WL, Miller J, Waller WT: Toxicity Reduction and Toxicity Identification Evaluation for Effluents, Ambient Waters, and Other Aqueous Media. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, USA, pp. 127–402, 2005.
- 16) Water Environment Association of Texas (WEAT), Texas Water Conservation Association (TWCA), Texas Association of Clean Water Agencies (TACWA): Report on Freedom of Information Act Request to U.S. Environmental Protection Agency by Texas Coalition of Publicly Owned Treatment Works Regarding Sublethal Toxicity Reduction Evaluations, 2010. [http://www.tacwa.org/agendaandpresentations/presentation/FOIA\\_Report\\_0210.pdf](http://www.tacwa.org/agendaandpresentations/presentation/FOIA_Report_0210.pdf)

- 17) United States Environmental Protection Agency (USEPA): National Whole Effluent Toxicity (WET) Implementation Guidance under the NPDES Program, Draft, EPA-832-B-04-003, 2004. [https://www3.epa.gov/npdes/pubs/wet\\_draft\\_guidance.pdf](https://www3.epa.gov/npdes/pubs/wet_draft_guidance.pdf)
- 18) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms (4th Edition), EPA-821-R-02-013, 2002. [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/short-term-chronic-freshwater-wet-manual\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/short-term-chronic-freshwater-wet-manual_2002.pdf)
- 19) Yamashita M, Fenn JB: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.*, 88(20), 4451–4459, 1984.
- 20) Hug C, Ulrich N, Schulze T, Brack W, Krauss M: Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ. Pollut.*, 184, 25–32, 2014.
- 21) Hogenboom AC, van Leerdam JA, de Voogt P: Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216(3), 510–519, 2009.
- 22) Takanashi H, Abiru K, Tanaka H, Kishida M, Nakajima T, Ohki A, Kondo T, Kameya T, Matsushita T: Production of chloro-5-hydroxy-2-nitrobenzoic acid through chlorination of 3-methyl-4-nitrophenol, a typical hydrolysate of fenitrothion. *J. Water Environ. Technol.*, 10(4), 437–447, 2012.
- 23) Matsushita T, Kobayashi N, Hashizuka M, Sakuma H, Kondo T, Matsui Y, Shirasaki N: Changes in mutagenicity and acute toxicity of solutions of iodinated X-ray contrast media during chlorination. *Chemosphere*, 135, 101–107, 2015.
- 24) Hosono S, Ohtsuka N, Minomo K, Nojiri K, Sugisaki M, Kohata K, Kawamura K, Wang Q: Characteristic congener profiles of polychlorinated terphenyls (PCTs) in sediments from Furuayase River. *J. Water Environ. Technol.*, 14(4), 218–227, 2016.
- 25) Medana C, Santoro V, Bello FD, Sala C, Pazzi M, Sarro M, Calza P: Mass spectrometric fragmentation and photocatalytic transformation of nicotine and cotinine. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 30(24), 2617–2627, 2016.
- 26) Phungsai P, Kurisu F, Kasuga I, Furumai H: Molecular characterization of low molecular weight dissolved organic matter in water reclamation processes using Orbitrap mass spectrometry. *Water Res.*, 100, 526–536, 2016.
- 27) Wang Q, Miyake Y, Amagai T, Suzuki G, Matsukami H, Tue NM, Takahashi S, Tanabe S, Tuyen LH, Viet PH, Takigami H: Halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and river sediment from E-waste recycling sites in Vietnam. *J. Water Environ. Technol.*, 14(3), 166–176, 2016.
- 28) Matsushita T, Honda S, Kuriyama T, Fujita Y, Kondo T, Matsui Y, Shirasaki N, Takanashi H, Kameya T: Identification of mutagenic transformation products generated during oxidation of 3-methyl-4-nitrophenol solutions by orbitrap tandem mass spectrometry and quantitative structure–activity relationship analyses. *Water Res.*, 129, 347–356, 2018.
- 29) Yuthawong V, Kasuga I, Kurisu F, Furumai H: Comparison of low molecular weight dissolved organic matter compositions in Lake Inba and Kashima River by Orbitrap mass spectrometry. *J. Water Environ. Technol.*, 15(1), 12–21, 2017.
- 30) Matsushita T, Morimoto A, Kuriyama T, Matsumoto E, Matsui Y, Shirasaki N, Kondo T, Takanashi H, Kameya T: Removals of pesticides and pesticide transformation products during drinking water treatment processes and their impact on mutagen formation potential after chlorination. *Water Res.*, 138, 67–76, 2018.
- 31) Roberts J, McNaughtan ML, MacLachlan J, Hunter C, Pahl O: Identification of the acid-induced degradation products of omeprazole and 5-hydroxyomeprazole by high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 32(12), 929–941, 2018.
- 32) Pongsuwan W, Bamba T, Harada K, Yonetani T, Kobayashi A, Fukusaki E: High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF MS). *J. Agric. Food Chem.*, 56(22),

10705–10708, 2008.

- 33) Ministry of Environment Japan (MOEJ): Profiles of the Initial Environmental Risk Assessment of Chemicals, Vol. 7, Result of the Initial Ecological Risk Assessment of Chemicals (10 Substances) [3] 5-Chloro-2-(2',4'-dichlorophenoxy)phenol, 2009.  
[https://www.env.go.jp/en/chemi/chemicals/profile\\_erac/profile7/pf2-03.pdf](https://www.env.go.jp/en/chemi/chemicals/profile_erac/profile7/pf2-03.pdf)
- 34) Ministry of Environment Japan (MOEJ): Profiles of the Initial Environmental Risk Assessment of Chemicals, Vol. 3, Result of the Initial Ecological Risk Assessment of Chemicals (21 Substances) [15] Bisphenol A, 2004. [https://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02\\_2\\_15.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/report/h16-01/pdf/chap01/02_2_15.pdf)
- 35) Colombo I, de Wolf W, Thompson RS, Farrar DG, Hoke RA, L'Haridon J: Acute and chronic aquatic toxicity of ammonium perfluorooctanoate (APFO) to freshwater organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71(3), 749–756, 2008.
- 36) National Institute of Technology and Evaluation (NITE), Chemicals Evaluation and Research Institute Japan (CERI), New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO): Initial Risk Assessment Report, No. 5, Linear alkyl benzenesulfonic acid and its salts, 2005.  
[http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip\\_search/dt/pdf/CI\\_02\\_001/risk/pdf\\_hyoukasyo/024riskdoc.pdf](http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/024riskdoc.pdf)
- 37) Caldwell DJ, Mastrocco F, Hutchinson TH, Länge R, Heijerick D, Janssen C, Anderson PD, Sumpter JP: Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 $\alpha$ -Ethinyl Estradiol. *Environ. Sci. Technol.*, 42(19), 7046–7054, 2008.  
<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es800633q> PMID:18939525 doi:10.1021/es800633q
- 38) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, 2011.  
<https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264069923-en.pdf?expires=1528338699&id=id&accname=guest&checksum=E1BC30CCE86C511A41CCE4BE3755EA08>
- 39) International Organization for Standardization (ISO): Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae, ISO 8692:2012, 2012.  
<https://www.iso.org/standard/54150.html>
- 40) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Method 1003.0: Green Alga, *Selenastrum capricornutum*, Growth Test; Chronic Toxicity, EPA-821-R-02-013, 2002.  
[https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method\\_1003\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/method_1003_2002.pdf)
- 41) United States Environmental Protection Agency (USEPA): Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.5400, Algal Toxicity, Tiers I and II, EPA-712-C-96-164, 1996.  
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1005IZ9.PDF?Dockey=P1005IZ9.PDF>
- 42) de Jong S: SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 18(3), 251–263, 1993. doi:10.1016/0169-7439(93)85002-X
- 43) Smital T, Terzic S, Zaja R, Senta I, Pivcevic B, Popovic M, Mikac I, Tollefsen KE, Thomas KV, Ahel M: Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74(4), 844–851, 2011.
- 44) Pignata C, Fea E, Rovere R, Degan R, Lorenzi E, de Ceglia M, Schilirò T, Gilli G: Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. *Environ. Monit. Assess.*, 184(4), 2091–2103, 2012.
- 45) Takeda F, Minamiyama M, Okamoto S: Seasonal variation in ability of wastewater treatment for reduction in biological effects evaluated based on algal growth. *J. Water Environ. Technol.*, 15(3), 96–105, 2017.
- 46) Boltes K, Rosal R, García-Calvo E: Toxicity of mixtures of perfluorooctane sulphonic acid with chlorinated chemicals and lipid regulators. *Chemosphere*, 86(1), 24–29, 2012.
- 47) National Institute of Standards and Technology (NIST), Physical Meas. Laboratory: Atomic Weights and Isotopic Compositions for all elements.  
[https://physics.nist.gov/cgi-bin/Compositions/stand\\_alone.pl?ele=S&ascii=html&isotype=all](https://physics.nist.gov/cgi-bin/Compositions/stand_alone.pl?ele=S&ascii=html&isotype=all)

### 第3章ノンターゲットスクリーニング分析を用いた毒性同定手法の検討 - 正イオン化モード

第2章で示した通り、下水処理水に既知毒性物質を添加した模擬試料を用いて、負イオン化モードのノンターゲットスクリーニング分析により、毒性原因物質を同定できることが確認された<sup>1)</sup>。本章では、第2章で対象としなかった正イオン化モードで測定可能な有機物質の探索・同定能力を実証した。

下水処理水に既知の毒性物質5物質（表3-1）を添加して模擬試料を調製し、その藻類毒性推算値、高分解能LC/MSを用いた分析結果を得た。多変量解析により模擬試料中の毒性物質を推定した結果、 $C_nH_{2n}$ や $C_nH_{2n+2}$ の違いの同族体が11物質発見され界面活性剤の混合物と推定された。11物質のうちピーク面積最大の物質を主成分と仮定し、分子式を $C_{14}H_{31}NO$ と推定した<sup>7)</sup>。データベースマッチング<sup>8,9)</sup>により、*N,N*-ジメチルドデシルアミン=*N*-オキシド (DDAO) と推定され、毒性物質の添加条件と一致した。以上により、ノンターゲットスクリーニング分析結果および多変量解析を用いた網羅的探索が正負の両イオン化モードで可能なことを実証した。

表3-1 化学物質の添加濃度と各試料の毒性強度 (TU) の計算値

STP ID	Sample name	Concentration of added chemical (µg/L)					Calculated TU <sup>a</sup>
		CAM	CPA	DDAO	PLE	DCOIT	
δ	δ <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1.25
	δ <sub>2</sub>	3.2	5	350	10	90	7.86
ε	ε <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1.25
	ε <sub>2</sub>	0.8	10	175	20	40	3.70
ζ	ζ <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	1.25
	ζ <sub>2</sub>	1.6	20	87.5	5	30	2.29
NOEC <sup>b</sup> or EC <sub>50</sub> <sup>c</sup> (µg/L)		16 <sup>d</sup>	100,000 <sup>e</sup>	81 <sup>f</sup>	2,000 <sup>g</sup>	27 <sup>h</sup>	-

Abbreviation; CAM: Clarithromycin, CPA: Cyclophosphamide, DDAO: *N,N*-dimethyldodecylamine=*N*-oxide, PLE: Polyoxyethylene (23) lauryl ether, DCOIT: 4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one. a denotes summed TU value of that of each added chemical. b denotes NOEC of CAM, CPA and DCOIT. c denotes EC50 of DDAO and PLE. d福永ら<sup>2)</sup>, e M. Grung et al.<sup>3)</sup>, f CERI et. al.<sup>4)</sup>, g A.N. Yamane et al.<sup>5)</sup>, h A Arrhenius et al.<sup>6)</sup>

#### 参考文献

- 1) Sawai, A., Okamura, T., Miyamoto, N., Kameya, T., Shinfuku, Y., Nakajima, T., Takanashi, H. (2019). A Demonstration of Mass-spectrometric Exploration of Organic Ecotoxicants from Simulated Sewage-treatment-plant Effluents. *Journal of Water and Environment Technology*, 17(4), 251–261. <https://doi.org/10.2965/jwet.18-083>
- 2) 福永彩, 山下尚之, 田中弘明. (2006). 藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価. *環境工学研究論文集*, 43, 57-63. <https://doi.org/10.11532/proes1992.43.57>
- 3) Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V. (2008). Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 328-340. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.015>
- 4) 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 財団法人化学物質評価研究機構, 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構. (2007). 化学物質の初期リスク評価書 Ver. 1.0, No.21, *N,N*-ジメチルドデシルアミン*N*-オキシド. [https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip\\_search/dt/pdf/CI\\_02\\_001/risk/pdf\\_hyoukasyo/166riskdoc.pdf](https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/166riskdoc.pdf)
- 5) Yamane, A.N., Okada, M., Sudo R. (1984). The growth inhibition of planktonic algae due to surfactants used in washing agents. *Water Research*, 18(9), 1101-1105. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90224-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90224-0)

- 6) Arrhenius, Å., Backhaus, T., Grönvall, F., Junghans, M., Scholze, M., Blanck, H. (2006). Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: Mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 50(3), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-1057-9>
- 7) 高梨啓和, 上田岳彦. (2016). 精密質量分析計を用いた未知物質の分子式推定. 水環境学会誌, 39(10), 360-364.
- 8) HighChem LLC. Advanced Mass Spectral Database, mzCloud. <https://www.mzcloud.org/>
- 9) National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health and Human Services. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

#### 第4章ターゲットスクリーニング分析を用いた流入下水の毒性原因物質の推定

下水処理場には規制当局がモニタリングしている化学物質だけではなく、生態影響が懸念される多種多様な化学物質が流入していると考えられる<sup>1-8)</sup>。一方で、流入下水の生態影響を、生物試験を用いて調べた報告事例<sup>9-15)</sup>があるが、その毒性の原因を網羅的に調査した事例はない。また、下水処理場では、活性汚泥への吸着および微生物による生分解を利用して化学物質を水中から分解、除去しており<sup>16)</sup>、低水温や降雨時に十分に処理されずに環境中に放出される可能性がある<sup>17-22)</sup>にも関わらず、流入下水の生態影響の原因物質の特定に関する調査事例は少ない。また、近年、質量分析計を用いた分析により試料中の化学物質を把握する手法として、ターゲットスクリーニング分析やノンターゲットスクリーニング分析が環境分析で用いられている<sup>23-26)</sup>。そこで本章では、一次生産者である藻類に着目し、流入下水に含まれる主要な藻類生長阻害物質を、GC/EI/QMSを用いたターゲットスクリーニング分析により探索、推定した。

国内の2,134か所<sup>27)</sup>の下水処理場のうち、設置地域、処理水量などが異なる17か所の下水処理場から採取した流入下水を対象に、藻類生長阻害試験<sup>30)</sup>およびGC/EI/QMSを用いたターゲットスクリーニング分析<sup>28-29)</sup>を実施した。本分析における同定は、電子イオン化 (EI) により得られるマススペクトルおよびリテンションインデックスの一致に基づいて行われた。さらに、予め取得された各物質の検量線情報に基づいた定量分析が行われた。検出された阻害物質は濃度加算モデル<sup>31)</sup>に基づいた評価を行い、藻類の毒性値は初期リスク評価書<sup>32)</sup>の値を用いた。

149物質を対象としてターゲットスクリーニング分析を行った結果、37物質が検出された。これらの物質の主な用途は、樹脂等原料・可塑剤・難燃剤が12物質、界面活性剤およびその原料が7物質、染料等の原料が7物質、医薬品等の原料が6物質、農薬、食品添加物、写真現像薬、重合触媒が各1物質であった。37物質すべてが日本国内で工業的に取り扱われており<sup>34)</sup>、さらに16物質は日本のPRTRデータで下水道への移動登録量が報告されていた<sup>33)</sup>。藻類の毒性評価は (4-1) 式および (4-2) 式で算出される毒性単位TU、TU<sub>m</sub>を用いて行った。

$$TU = MEC/EC_{20} \quad \dots\dots (4-1)$$

$$TU_m = \sum_{i=1}^n \left( \frac{MEC_i}{EC_{50i}} \right) \quad \dots\dots (4-2)$$

ここでTU [-]は各化学物質の毒性単位、MEC [ppb]は測定された下水試料中の濃度、EC<sub>50</sub>[ppb]は半数影響濃度、TU<sub>m</sub> [-]は流入下水試料の毒性単位、MEC<sub>i</sub> [ppb] ; i=1, 2, 3,,,,,nはi番目の物質のMEC、EC<sub>50i</sub> [ppb] ; i=1, 2, 3,,,,,nはi番目の物質のEC<sub>50</sub>である。

流入下水試料の毒性単位TU<sub>m</sub>は0.84~15.0であり、17検体中15検体で1を超えていた。それぞれの流入下水のTU<sub>m</sub>に対する各物質の毒性単位TUが占める割合を求めたものを、図4-1に示す。すべての流入下水の藻類生長阻害に着目したTU<sub>m</sub>を90%以上説明可能な物質が発見され、2種類の界面活性剤であった。これらのうちSurfactant Bについては、下水からの検出例やリスク評価事例を発見することができなかった。

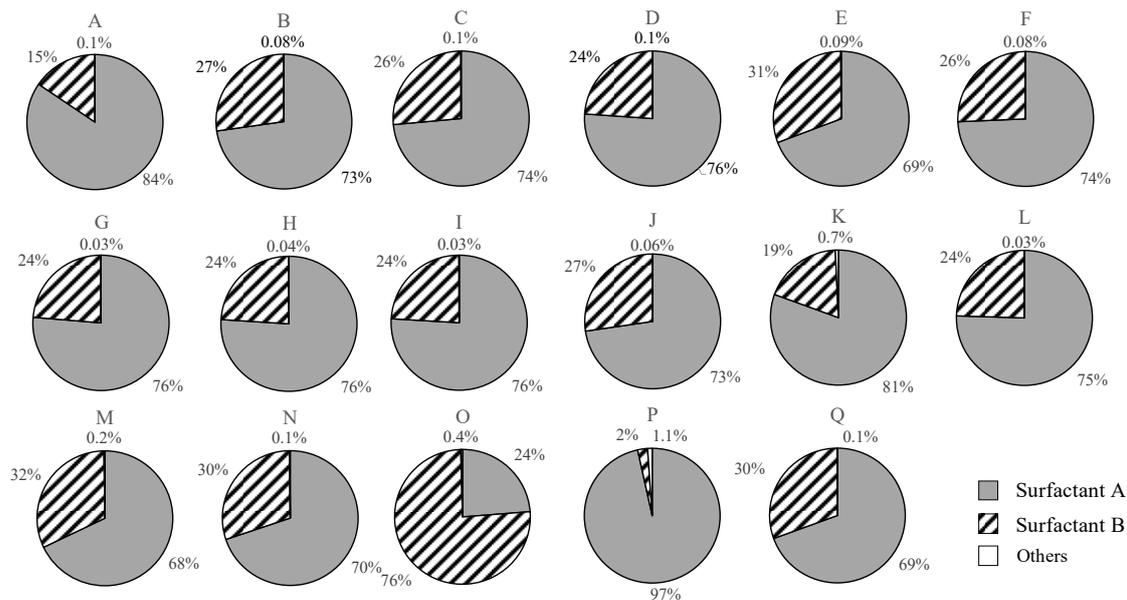


図4-1 流入下水で検出された化学物質のハザード比

#### 参考文献

- 1) Ministry of Land, Infrastructure, Transport and Tourism Japan (MLIT): A Guideline for Estimating Discharged Amount of Chemicals and Developing a Chemical Management Procedure in Sewer Systems, draft, 2005. <http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/info/prtr/guide01.pdf>
- 2) Takeda, F., Mano, H., Suzuki, Y., Okamoto, S. (2015). Initial environmental risk assessment of Japanese PRTR substances in treated wastewater. *Journal of Water and Environmental Technology*, 13(4), 301-312. <https://doi.org/10.2965/jwet.2015.301>
- 3) Nakada, N., Shinohara, H., Murata, A., Kiri, K., Managaki, S., Sato N., Takada, H. (2007) Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant. *Water Research*, 41(19), 4373-4382. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.038>
- 4) Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment International*, 36(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>
- 5) Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P, (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002>
- 6) Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment, *Science of The Total Environment*, 473-474(1), 619-641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- 7) Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72(0), 3-27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>
- 8) Kumar, R., Sarmah, A. K., Padhye, L. P. (2019). Fate of pharmaceuticals and personal care products in a wastewater treatment plant with parallel secondary wastewater treatment train. *Journal of Environmental Management*, 233(December 2018), 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.062>
- 9) Castillo, G. C., Vila, I. C., Neild, E. (2000). Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using

- multitrophic assays. *Environmental Toxicology*, 15(5), 370–375.  
[https://doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:5<370::AID-TOX3>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:5<370::AID-TOX3>3.0.CO;2-S)
- 10) Farré, M., Barceló, D. (2003). Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 299–310.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1)
- 11) 武田文彦, 真野浩行, 北村友一, 小森行也, 岡本誠一郎. (2015). 下水による水生生物影響に及ぼす下水処理プロセスの効果に関する基礎的研究. *日本水処理生物学会誌*, 51(4), 95-103.  
<https://doi.org/10.2521/jswtb.51.95>
- 12) Plahuta, M., Tišler, T., Toman, M. J., Pintar, A. (2017). Toxic and endocrine disrupting effects of wastewater treatment plant influents and effluents on a freshwater isopod *Asellus aquaticus* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 174, 342–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.137>
- 13) Väitalo, P., Massei, R., Heiskanen, I., Behnisch, P., Brack, W., Tindall, A. J., Pasquier, D. D., Küster, E., Mikola, A., Schulze, T., Sillanpää, M. (2017). Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment. *Water Research*, 126, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.09.014>
- 14) Han, X., Zuo, Y. T., Hu, Y., Zhang, J., Zhou, M. X., Chen, M., Tang, F., Lu, W. Q., Liu, A. L. (2018). Investigating the performance of three modified activated sludge processes treating municipal wastewater in organic pollutants removal and toxicity reduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148(November 2017), 729–737.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.042>
- 15) Yu, Y., Wu, B., Jiang, L., Zhang, X. X., Ren, H. Q., Li, M. (2019). Comparative analysis of toxicity reduction of wastewater in twelve industrial park wastewater treatment plants based on battery of toxicity assays. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40154-z>
- 16) Blair, B., Nikolaus, A., Hedman, C., Klaper, R., Grundl, T. (2015). Evaluating the degradation, sorption, and negative mass balances of pharmaceuticals and personal care products during wastewater treatment. *Chemosphere*, 134, 395–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.078>
- 17) Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S. A. (1990). Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Research*, 24(1), 97–101. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90070-M](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90070-M)
- 18) 公益社団法人日本下水道協会. (2009). 活性汚泥法の設計因子と操作因子, 下水道施設計画・設計指針と解説 後編-2009年版-, 24-41.
- 19) Takeda, F., Minamiyama, M., Okamoto, S. (2017). Seasonal variation in ability of wastewater treatment for reduction in biological effects evaluated based on algal growth. *Journal of Water and Environment Technology*, 15(3), 96-105. <https://doi.org/10.2965/jwet.16-051>
- 20) Miho, S., Kameya, T., Kobayashi, T., Fujie, K. (2015). Detection of Japanese PRTR chemicals in a river affected by effluent from industrial and sewage facilities. *Journal of Water and Environment Technology*, 13(1), 25-35. <https://doi.org/10.2965/jwet.2015.25>
- 21) Launay, M. A., Dittmer, U., Steinmetz, H. (2016). Organic micropollutants discharged by combined sewer overflows – Characterisation of pollutant sources and stormwater-related processes. *Water Research*, 104, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.068>
- 22) Jin, J., Zhang, X., Kusui, T. (2018). Preliminary toxicity assessment of combined sewer overflows in Toyama, Japan. *Journal of Water and Environment Technology*, 16(5), 185–198.  
<https://doi.org/10.2965/jwet.17-041>
- 23) Sawai, A., Okamura, T., Miyamoto, N., Kameya, T., Shinfuku, Y., Nakajima, T., Takanashi, H. (2019). A Demonstration of Mass-spectrometric Exploration of Organic Ecotoxicants from Simulated Sewage-treatment-plant Effluents. *Journal of Water and Environment Technology*, 17(4), 251–261.  
<https://doi.org/10.2965/jwet.18-083>
- 24) Vitharuch Yuthawong, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai, Molecular-Level Changes in

- Dissolved Organic Matter Compositions in Lake Inba Water during KMnO<sub>4</sub> Oxidation: Assessment by Orbitrap Mass Spectrometry, *J Water Environ. Technol.*, 17(1) (2019) 27-39. <https://doi.org/10.2965/jwet.18-043>.
- 25) Gago-Ferrero, P., Krettek, A., Fischer, S., Wiberg, K., Ahrens, L. (2018). Suspect Screening and Regulatory Databases: A Powerful Combination to Identify Emerging Micropollutants. *Environmental Science and Technology*, 52(12), 6881–6894. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06598>
- 26) Diamanti, K., Aalizadeh, R., Alygizakis, N., Galani, A., Mardal, M., Thomaidis, N. S. (2019). Wide-scope target and suspect screening methodologies to investigate the occurrence of new psychoactive substances in influent wastewater from Athens. *Science of the Total Environment*, 685, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.173>
- 27) 公益社団法人日本下水道協会. (2018). 下水道統計 平成27年度版 第72号CD-ROM
- 28) Kadokami, K., Tanada, K., Taneda, K., Nakagawa, K. (2004). Development of a novel GC/MS database for simultaneous determination of hazardous chemicals. *Bunseki Kagaku*, 53(6), 581–588. <https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.53.581>
- 29) Kadokami, K., Tanada, K., Taneda, K., Nakagawa, K. (2005). Novel gas chromatography-mass spectrometry database for automatic identification and quantification of micropollutants. *Journal of Chromatography A*, 1089(1–2), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.052>
- 30) Ministry of Environment Japan (MOEJ): An Application of Bioassay to Effluent Management, 2017. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/28556.pdf>
- 31) Kienzler, A., Berggren, E., Bessems, J., Bopp, S., van der Linden, S., Worth, A. (2014). Mathematical approaches used in the component-based approach, Assessment of mixtures - review of regulatory requirements and guidance. European Commission Joint Research Centre science and policy reports, 6-11. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC90601/lb1a26675enn.pdf>
- 32) 環境省. 化学物質の環境リスク初期評価. <http://www.env.go.jp/chemi/risk/>
- 33) Ministry of the Environment Japan (MOEJ): Pollutant Release and Transfer Register (PRTR), PRTR Data Page, Compiled Data. <http://www2.env.go.jp/chemi/prtr/prtrinfo/contents/e-table.jsp>
- 34) 経済産業省. 化学物質の製造輸入量. [https://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/kasinhou/information/volume\\_index.html](https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/volume_index.html)

## 第5章 ノンターゲットスクリーニング分析を用いた流入下水の毒性原因物質の推定

第4章で述べたように、行政においてモニタリングまたはリスク評価が実施されており、水生生物に対する有害性が既知の物質については、ターゲットスクリーニングにより効率的に藻類生長阻害物質を探索することができたが、有害性が把握されていない化学物質が原因となる可能性もある。そのような場合に、第2章および第3章において模擬試料を用いて有効性を実証した、ノンターゲットスクリーニング分析と多変量解析を用いた方法が有効となると考えられる。

日本国内には計画晴天時日最大処理水量<5,000 m<sup>3</sup>/日の下水処理場が1,227か所あり、全処理場の57.5%を占める<sup>1)</sup>。地方を中心に非常に多くの小規模下水処理場がある。そこで、ノンターゲットスクリーニング分析および多変量解析を用いて、実際に小規模下水処理場の流入下水に共通して存在する生態影響の原因物質を探索し、本技術を実証することとした。

5か所の小規模下水処理場の流入下水を対象とした。固相抽出した流入下水試料およびブランク試料について、高速液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計LC/HRMSを用いたプリカーサーイオンスキャンにより、生態影響原因物質を網羅的に分析した。また、抽出されたコンポーネントを対象に、OPLS回帰分析および相関分析を行い、実測<sup>1)</sup>した各試料の生長阻害率との相関関係を相関分析により解析した。

各試料の藻類生長阻害率とピアソンの相関係数 $r > 0.9$ となったコンポーネントは、正イオン化モードについて6個のコンポーネント、負イオン化モードについて3個のコンポーネントが発見され

た。これらは5か所の流入下水に共通して検出されたが、国内の毒性データベース等<sup>2,9)</sup>には掲載、収録されておらず、PRTR制度における生態毒性物質、水濁法の要調査項目などの対象となっていない生態影響原因物質である可能性が示された。また、流入下水から発見されたこれらの物質は、用途に応じてアルキル鎖およびエトキシ鎖の異なる物質の混合物として使用、排出されたもの<sup>10)</sup>と仮定すると5物質に絞り込まれた。

このうち1物質を対象に、精密質量および安定同位体パターンから分子式を推定し、さらに衝突誘起解離により得られたプロダクトイオンから構造を推定した。推定結果に基づいて標準物質とのクロマトグラフィーを実施したところ、両性界面活性剤Surfactant Cであると同定できた。Surfactant Cの藻類生長阻害試験を実施したところ、無影響濃度NOECは3.9 mg/Lであった(図5-1)。Surfactant Cが下水から検出された例およびSurfactant Cの藻類生長阻害の検討例は発見することができなかった。

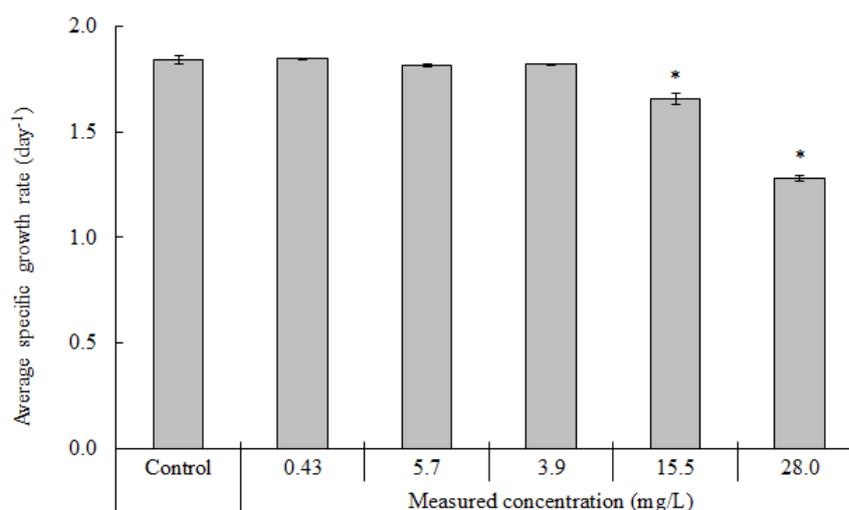


図5-1 各Surfactant C濃度における藻類の平均生長速度

\*: 対照区 (Control) と比較して有意な低下

#### 参考文献

- 1) 公益社団法人日本下水道協会. (2018). 下水道統計 平成27年度版 第72号CD-ROM
- 2) Ministry of Environment Japan (MOEJ): An Application of Bioassay to Effluent Management, 2017. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/28556.pdf>
- 3) Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation (NITE). Substances under the Chemical Substances Control Law, Type III Monitoring Chemical Substances (before amendment in FY 2009). [https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/list2.action?request\\_locale=en&category=123](https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/list2.action?request_locale=en&category=123)
- 4) 環境省. 水産動植物の被害防止に係る農薬登録基準. <http://www.env.go.jp/water/sui-kaitei/kijun.html>
- 5) 環境省. PRTRインフォメーション広場, 対象化学物質情報, 生態毒性. [https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target\\_chemi/14.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/prtr/archive/target_chemi/14.pdf)
- 6) 環境省. 水環境保全に向けた取組のための要調査項目リスト. <https://www.env.go.jp/press/files/jp/24266.pdf>
- 7) Ministry of the Environment in Japan (MOEJ). (2019). Results of aquatic toxicity tests of chemicals conducted by Ministry of the Environment in Japan (- March 2019) [https://www.env.go.jp/chemi/y052-\[24\]/mat2\\_3103e.pdf](https://www.env.go.jp/chemi/y052-[24]/mat2_3103e.pdf)
- 8) Ministry of the Environment in Japan (MOEJ). Profiles of the Initial Environmental Risk Assessment of Chemicals. [https://www.env.go.jp/en/chemi/chemicals/profile\\_erac/index.html](https://www.env.go.jp/en/chemi/chemicals/profile_erac/index.html)
- 9) エコケミストリー研究会. (2019). 環境管理参考濃度と重み付け係数. <http://www.ecochemi.jp/PRTR2017/prtr-index.html>

- 10) Cycleco. Environmental Footprinting with Usetox. <http://efwithusetox.tools4env.com/substances>
- 11) Davies, J.T. (1957). A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. Proceedings of 2nd International Congress Surface Activity, Butterworths, London. 426-439.
- 12) National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine National Institutes of Health Department of Health and Human Services. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 13) European Commission. (2003). Technical guidance document on risk assessment. [https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2\\_2ed\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/16960216/tgdpart2_2ed_en.pdf)

## 第6章 総括

本論文は、下水等の排水中に存在する生態毒性の原因となっている有機化学物質を、網羅的な化学分析の技術を用いて探索する手法を検討した。

第1章では、現在、欧米諸国で実施されている、排水等の毒性削減および毒性同定の手法について整理し、既存の手法の課題を明確にした。また、有機化学物質が原因となるケースにおいて、既存の手法を補完するため、網羅的な質量分析技術が必要であることを述べた。さらに、様々な分野において活用されている、網羅的な質量分析技術の活用事例を整理し、生態毒性試験、網羅的な質量分析および多変量解析を組み合わせる手法の新規性、適用可能性について述べた。

第2章では、ノンターゲットスクリーニング分析による未知物質の探索・同定能力を実証するために、下水処理水に既知の毒性物質5物質を添加して模擬試料を調製し、その藻類生長阻害試験結果、LC/HRMSを用いた負イオン化モードのノンターゲットスクリーニング分析結果および多変量解析を用いて、模擬試料中の毒性物質（添加した物質）の同定を試みた。試料の毒性強度は、ほぼトリクロサンのみで決まることが推測され、毒性原因物質の探索結果と一致した。負イオン化モードのノンターゲットスクリーニング分析と多変量解析を用いた毒性同定技術の有効性を確認した。

第3章では正イオン化モードで測定可能な化学物質の探索・同定能力を実証するために、下水処理水に既知の毒性物質5物質を添加して模擬試料を調製し、その藻類生長阻害データ（文献値）、LC/HRMSを用いた正イオン化モードのノンターゲットスクリーニング分析結果および多変量解析を用いて、模擬試料中の毒性物質（添加した物質）の推定を試みた。多変量解析の結果、 $C_nH_{2n}$ の違いや $C_nH_{2n+2}$ の違いのある11物質が発見された。これは界面活性剤の特徴であり、混合物であることが推定された。11物質のうちピーク面積が最大の物質の分子式は $C_{14}H_{31}NO$ と推定され、データベースマッチングしたところ、*N,N*-ジメチルドデシルアミン=*N*-オキシドと推定できた。これにより、ノンターゲットスクリーニング分析結果および多変量解析を用いた網羅的探索が可能であることが実証された。

第4章は、GC/EI/QMSを用いたターゲットスクリーニング分析を用いて、日本の地域、処理水量の異なる17か所の下水処理場における、流入下水中の藻類生長阻害物質の推定を試みた。149物質のターゲットスクリーニング分析による測定値（MEC）を藻類に対する半数影響濃度（ $EC_{50}$ ）で除して毒性単位TU（= $MEC/EC_{50}$ ）を算出したところ、17か所すべての流入下水について、 $TU_m$ （= $\sum TU$ ）の90%以上が2種類の界面活性剤で占められていた。17か所すべての下水処理場において、これらが藻類生長阻害物質であることが示唆された。

第5章は、第2章および第3章で有効性を確認した技術を実試料に適用した。LC/HRMSを用いたノンターゲットスクリーニング分析結果および多変量解析を用いて、5か所の小規模下水処理場の流入下水に共通して含まれる藻類生長阻害物質の推定および同定を試みた。同技術を用いて、流入下水中に含まれる未知生態影響原因物質を探索した結果、各試料の藻類生長阻害率と相関係数0.9以上で相関関係が認められる物質を5物質発見した。このうち1物質については、データベースマッチングおよびコクロマトグラフィーにより、両性界面活性剤であると同定できた。

以上により、網羅的な化学分析技術であるターゲットスクリーニング分析およびノンターゲットスクリーニング分析を用いた、下水等の排水中に含まれる生態毒性の原因物質を探索する手法を確立するとともに、日本国内の下水試料を用いてその有効性を実証した。本研究で確立したノンターゲット

ットスクリーニング分析による毒性原因物質の探索手法と、ターゲットスクリーニング分析による毒性原因物質の探索手法を組み合わせることで、生態リスクが高い化学物質が検出されない可能性を低減させることができる。また、両スクリーニング分析および1濃度区で多検体同時に毒性を確認するスクリーニング毒性試験を行うことで、試料を分画して毒性試験と化学分析を繰り返すEDAの手法よりも、試験および分析の数、調査期間、調査コストを低減でき、効率的かつ現実的な手法になると考えられる。