



South Platte River Wastewater Treatment Plant (WWTP) Field Study (2012-2015)

- In 2012, caged male and female fathead minnows (15 each) were deployed in the South Platte River **below two WWTPs and in a reference tributary (Clear Creek)**
 - Fish were exposed in the receiving water/reference creek for 5 days
 - Following exposure, livers extracted for **RNA analysis and metabolite profiles by nuclear magnetic resonance (NMR)**
 - **Grab chemistry samples** were collected at deployment and recovery

33

Courtesy Keteles K, Schwindt A, Vajda A, Winkelman D, Ekman D, Lazorchak J

全湖添加試験に関してみてきました。では、実際に標準水系においてはどうか。コロラド地域とか、それ以外の地域でみています。ケージに入れて飼育しているファットヘッドミノーを川の中に設置しています。そして2カ所で下水処理施設の下流のところ計測を行いました。メタボロミクスについても計測を行いました。そして代謝物プロフィールを検討しました。

South Platte River WWTP Field Study

- The study was repeated in 2013 and 2014, (2015) with the addition of two sampling sites
 - Fish were caged **immediately upstream of WWTP2** to distinguish **upstream and downstream effects**
 - Caged fish were **placed on each side of the river** below the outfalls **to monitor any differences between the outfalls** (the outfalls have different treatment trains)

今のは概要ということで、類似したことを2013年にも行いましたが、WWTPよりも上流、下流の影響を区別するために検討を加えたわけです。魚を放流する箇所でGrabサンプリングして内分泌かく乱化学物質を含むいろいろな物質を検出し、そしてビテロゲニン遺伝子発現との相関性をみていこうとしたわけです。

Control

Detection: 0


WWTP 1
Detections: 68 (Day 1)
63 (Day 5)


WWTP 2
Detections: 73 (Day 1)
69 (Day 5)

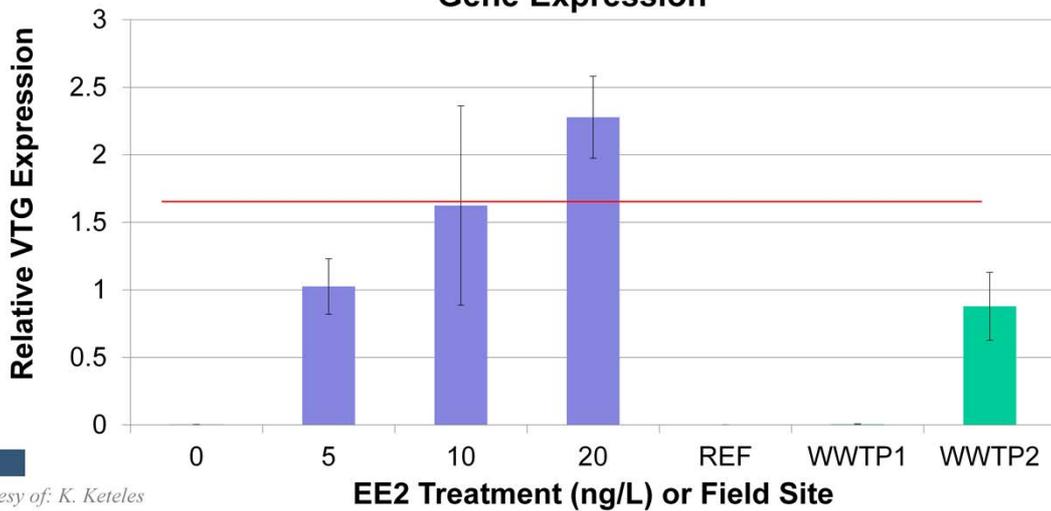
South Platte River WWTP Field Study 2012 Results



こちらが2012年における野外ばく露魚におけるピテロゲニン発現を調べた際の状況です。それからEE2のばく露をみています。この水系(WWTP2)のところで80種近い化学物質が見つかった。こちら(WWTP1)ははじめ何もみつからなかった。しかし2日後にサンプルを入れたところ、検出された。つまり、排水処理施設の下流のところでは高い検出がみられたということです。

South Platte River WWTP Field Study

EE2 Exposed (Mesocosm) and 2012 Field Exposed Fish Vitellogenin Gene Expression



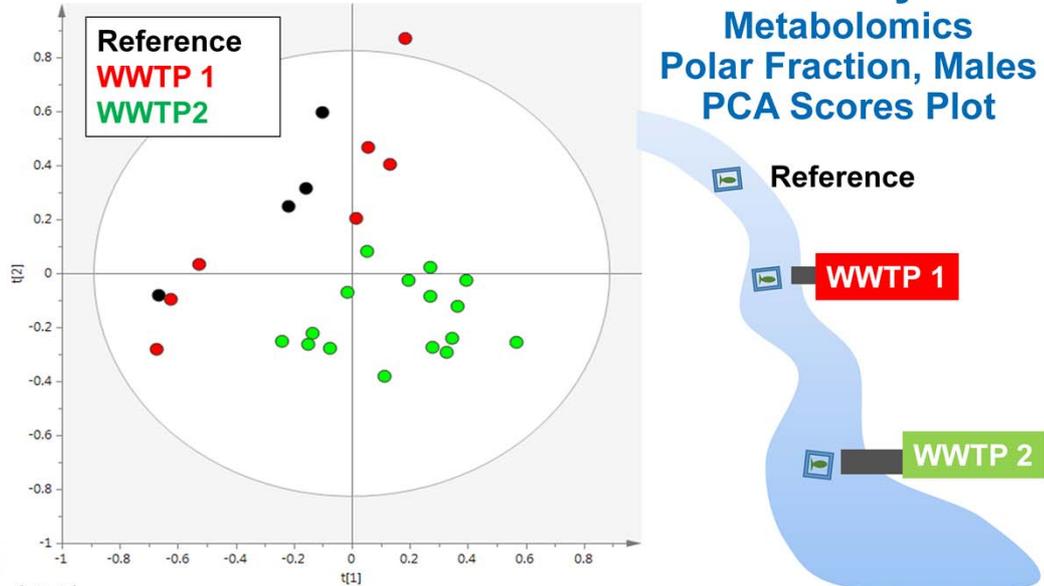
36

Courtesy of: K. Keteles

では、ビテロゲニン遺伝子発現レベルはどうでしょうか。こちらはWWTPの下流のところですが、デンバー市のちょうど境のところ、デンバー市境で高い遺伝子発現レベルがみられています。コロラドのエリアについても同様に測定しています。

ここではWWTP 2のところ、ポジティブコントロールに相当するメソコズムの5 ng/LのEE2とおおよそ同等であるということです。

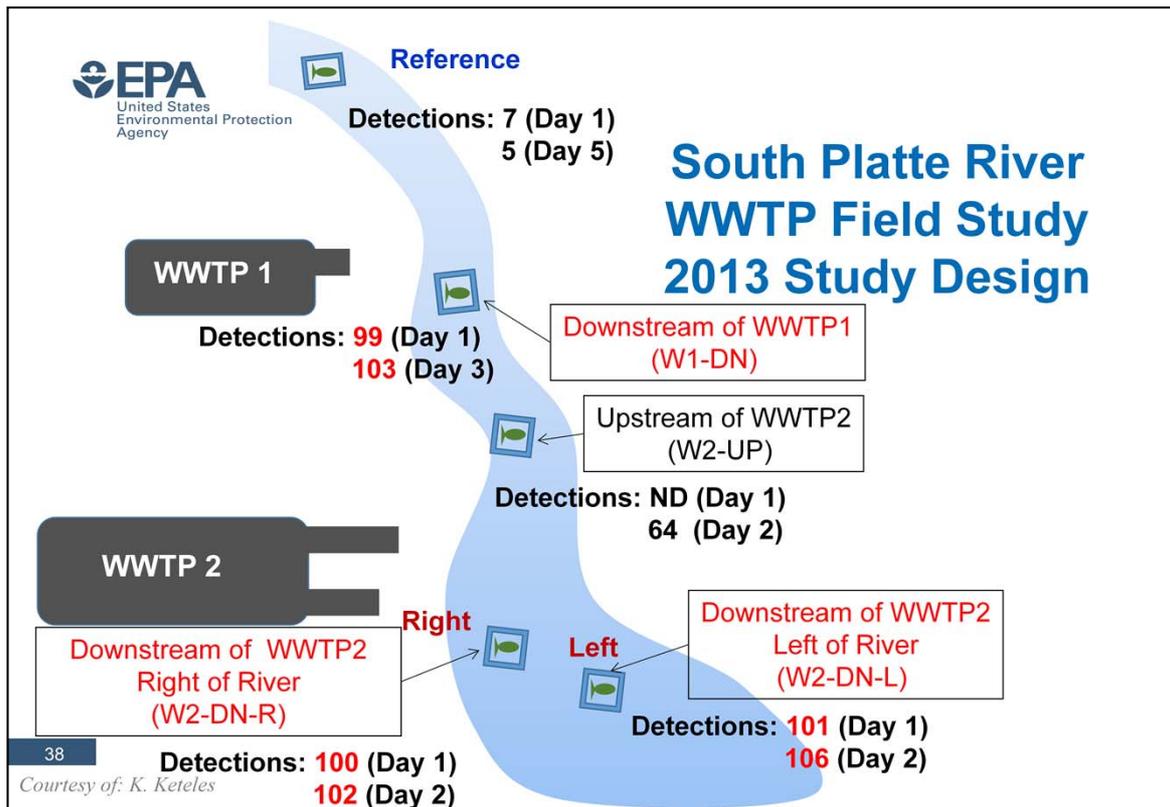
South Platte River WWTP Field Study



37

Courtesy of: D. Ekman

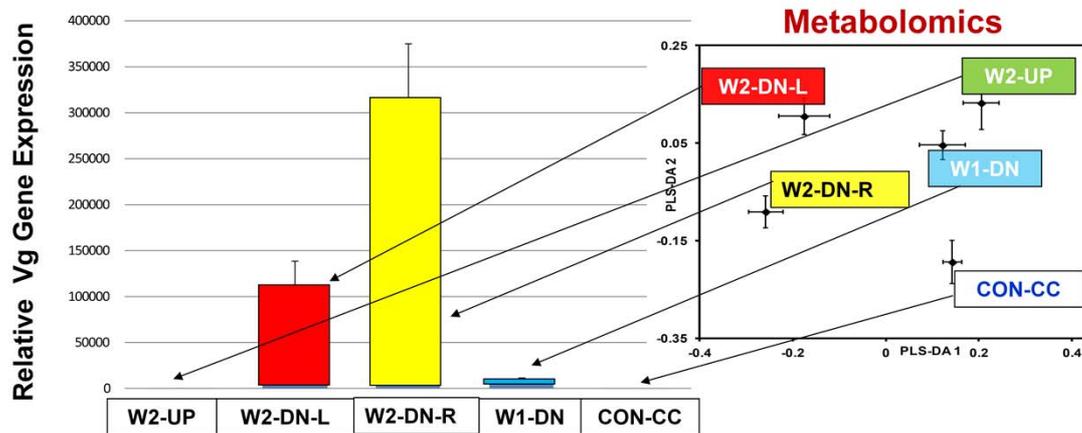
メタボロミクスプロフィールをここでみています。極性分画についてみています。緑がWWTP 2、赤がWWTP 1ですが全然発現が違うことがわかります。メタボロミクスについても極性分画が違っていることがわかります。PCAでみていますが、スコアで違いがあるということがわかります。つまり、この排水地点では代謝異常が起きていることがわかります。



2013年にも同じことをやりました。14年にも同様の検討をし、今年も実はやっております。今月末に向けてやっているわけです。魚をまたそこに入れて、デンバー周辺地域において検討しています。そこには排水処理施設がある。こちらにも排水処理施設がある。その下流と上流で比較しています。2つの排水地点があるわけです。この2つの排水の中身が違っている。その違いによって結果は異なってくるのか。検出量、そしてこの分析対象物の検出結果は違ってくるのかをみていきたいと思っています。そしてサンプルの1日目、2日目での結果をみていきたいと思っています。排水処理施設の2の上流においては、1日目は全然検出がなかったのが、2日目には64の検出が得られたということで、大きな変化がそこには起きたということがわかります。

South Platte River WWTP Field Study

Vg mRNA Measurements for Males



39

Courtesy of: K. Keteles, D. Ekman

- Results suggest feminization occurring in males exposed to WWTP2

こちらはメタボロミクスをみています。プロフィールの差をみていますが、メタボロミクスがいかに変わってきているのか、遺伝子発現についてもみる事ができるわけです。こちらは排水処理施設の下流のところ、こちらがコントロールです。かなりの差があることがわかります。メタボロミクスが変わっているということがわかります。コントロールのほうは上流のほうということで、そちらには変化がありません。

Summary

- Chemistry data for most analytes vary among location and time.
- Genomic biomarkers may be a useful tool to predict cumulative exposure.
- Possibly more useful when a suite of biomarkers are used (metabolomics, thyroid disruption and neurotransmitter biomarkers).
- In 2013,2014, collaborators conducted a similar study at two large metropolitan Denver waste water treatment plants examining chemistry, vtg and other biomarkers (cyp11a, cyp19a1a, cyp3, and fshr), and metabolomics as indicators of exposure to CECs.

まとめとしては、様々な検体において化学的データは場所と時間によって変動することがわかります。

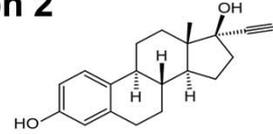
このようなビテロゲニンの遺伝子発現というのは、遺伝子バイオマーカーとして有効であるということがわかります。分子的なアプローチをとるということ。そこでメタボロミクスをみる。そして魚を入れて、排水にばく露されている水質がおっているところで検討する。そして、分子レベルでの検討をすることができます。このように混ざっている混合物質のところで検討することが肝要であるかと思えます。バイオマーカーもミックスしたものでみていくことがいいでしょう。

National Municipal Effluent CEC Study Sampling

- **24-hour composite samples** - 50 very large WWTPs (15 to >500 MGD – 46M people)
- **Collected by WWTPs, except in EPA Region 2 (n= 13) and Region 7 (n= 1)**

119 Analytes Measured

- **56 Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) + 7 Metabolites**
Kostich, Batt, and Lazorchak. 2014. Env Pol 184:354.
- **8 Hormones (4 estrogens, 3 androgens, and 1 progestin)**
- **32 Alkylphenols (APs, NP, Ops, APEOs, NPEOs, and OPEOs)**
- **Bisphenol A**
- **15 Perfluorinated Chemicals (PFCs)**



41

ということで、現在我々が次に進めておりますのは、米国での最大規模プラントということになりますと、15～500メガGDというような排水処理施設があります。それが50カ所あるわけです。希釈能力というものは存在しません。ということで、ここではサーベイを行っています。データベースを使ってすべての排水処理施設、アメリカを対象として、50カ所の施設を実際に拾い出して、そして協力することを説得しまして、つまり瓶を送って、24時間コンポジットの形での採取した検体を送り返してもらおう。その検体を分析します。

そして、119の物質を測定しました。その結果として、いわゆる活性物質として医薬品のものが56、ホルモンとして8物質が検出された。32種類のアルキルフェノール及びビスフェノールA(BPA)も見つかりました。PFCは15種類見つかりました。中山先生がこのプロジェクトで協力してくれて、PFCに関する分析を担当して下さいました。

National Municipal Effluent CEC Study Findings

	Mean	Max	Min
Total Detected Analytes (116)	40 (34%)	67 (58%)	22 (19%)
Total Mass of All COCs (ng/L)	25,849	294,367	1,233
MOA			
EDCs (Hormones, NPs, PFAAs)	16,699	278,854	2.9
Antihypertensives (12)	4,787	15,658	378
Neurotransmitter Modulators (19)	1,559	4,716	182
Anti-inflammatories (10)	1,039	8,097	0
Antibacterial (8)	1,116	3,295	2.6
Gastric Anti acid (2)	234	1,352	13
Bronchodilator (1)	--	121	121
Anticoagulant (1)	--	3,193	3,193

こちらは全検出物に関してまとめたものです。採取した下水処理水試料に基づくものです。個別の濃度ということではなく、これは全体の質量としてみようじゃないかということを考えてみました。化学者はこういう切り口は嫌がるわけですが、モード・オブ・アクションということでみていくわけですが。これらの化学物質がどのようなリスクをもたらすものであるかを検討していこうということです。それを作用機序の観点からみていこうと。どうやってやったらいいのでしょうか。アクティビティモデルをすることが必要である。そして総重量をみています。EDCについてみています。総重量としてEDCはどれくらいなのか。また、50の排水についてはどうなのか。最大の重量はどれくらいなのかということを見て、また、最小重量についても検討しています。

ここで興味深いこととしては、58%のプラントにおいて67の異なった種類の化学物質が観測されています。

National Municipal Effluent CEC Study Sampling

Hormones By Analyte

Weighted by Detects



Weighted by Total Mass



私の若い仲間たちがこのような計測をしてくれたということです。ワールドクラウドといわれるものです。どういうことかといいますと、大きな字であるということは、検出レベルが高かったということの意味です。字の大きさを示しているのです。EDCを検討しているわけですので、ここではホルモンを主に検討対象としています。ワールドクラウド、これだけの総重量としてホルモン類について検体で見つかったものです。50の排水検体においてこれだけ検出されたということです。それらを標的とすることができます。とうとうEE2が出たと、データで裏付けを得ることができたということの意味しています。ただ、他のエストロゲンもここでは見つかっています。アンドロゲンもレベルは低いが見つかっている。

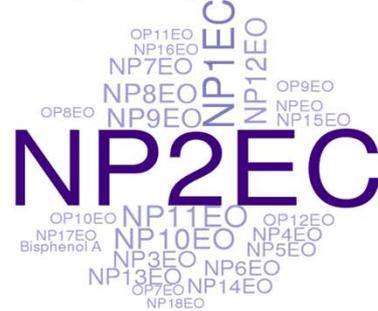
National Municipal Effluent CEC Study Sampling

NonylPhenols By Analyte

Weighted by Detects



Weighted by Total Mass

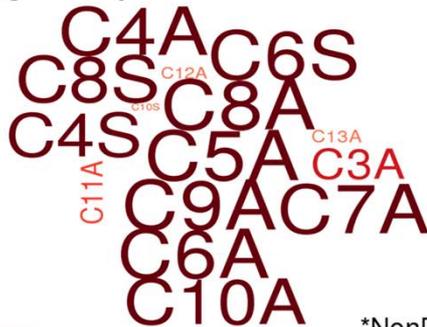


こちらがノニルフェノール類に関して、大きく示しているNP2ECというのが、これは検出頻度と総重量、両方で高い重み付けがなされています。この物質に一層注目して検討する必要性を示唆しています。

National Municipal Effluent CEC Study Sampling

Perfluorinated Compounds By Analyte

Weighted by Detects



Weighted by Total Mass



*NonDetects Dropped

Perfluoroalkyl Acids (PFAA)

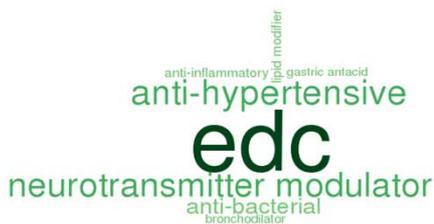
- C3A = PFPA
- C4A = PFBA
- C5A = PFPeA
- C6A = PFHxA
- C7A = PFHpA
- C8A = PFOA**
- C9A = PFNA
- C10A = PFDA
- C11A = PFUdA
- C12A = PFDoA
- C13A = PFTrDA
- C4S = PFBS
- C6S = PFHxS
- C8S = PFOS**

ペルフルオロ化合物についても同様のことが言えます。総重量と検出による重み付けをみています。PFOA、PFOS、PFOがかなり排水の中に含まれていることがわかります。C8、C4、これは何年も前にアメリカでは禁止になっているのですが、まだ含まれている。

National Municipal Effluent CEC Study Sampling

Mode Of Action

Weighted by Detects



Weighted by Mean



*NonDetects Dropped

そして、このようにモード・オブ・アクションで、作用機構を使って、今までいろいろな医薬品をみてきたけれども、最もキーとなるのは何なのか。特にばく露の問題を考えたときには、やはりEDCであると。ホルモンだけではありません。EE2だけではありません。PSCとか、ENPとか、それ以外も含めて、エストロゲン、内分泌かく乱化学物質というのは、リンダも言いましたように重要であるということがわかります。これは検出による重み付けと、平均値による重み付けの両方においてです。

また、抗うつ剤というのが重要であることがわかります。データにも示しておりますが、これは低用量であっても行動上の変化をもたらすという問題があります。

また、高血圧の降圧剤ですが、年をとりますと血圧の薬を飲みますよね。若い人でも飲んでる人もいますけれども、そうすると、全体として降圧剤を服用している人の数は増えています。そういった意味でこの河川においてもそれが出てきているということを意味しています。排水にも含まれている。

National Municipal Effluent CEC Study Sampling – Take Home Messages

- There are **new contaminants** we should be thinking about that are increasing in the environment, although at **low concentrations** – **Pharmaceuticals, Personal Care Products, Toxic Algae, Nano Materials**
- The future is the use of genomic tools – such as gene expression (single and arrays), proteins (single and arrays), and metabolomics – to assess exposure and effects of stressors
- **It's about mixtures** – We can no longer do single chemical or single stressor risk assessments – there are multiple compounds with similar modes of action (MOAs)

47

これが覚えておいていただきたいことでもあります。この下水排水CEC調査において、やはり我々としては混合物影響をみていかななくてはならない。複数のリスクを検討対象とすることが必要である。単一の化学物質のリスクだけに焦点を置いていたのではだめだということです。

**Remember what is good for the fish
is good for us too!**



For more information:

Jim Lazorchak

lazorchak.james@epa.gov

48

右側がうちの娘です。このスライドをまとめるのに協力してくれたということで、この魚は私たちの子供たちを守ってくれるということにつながればと思っています。

ということで、ご清聴感謝いたします。