

土木研究所資料

平成21年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2009 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成22年12月

独立行政法人 土木研究所

Incorporated Administrative Agency
Public Works Research Institute

Copyright © (2010) by P.W.R.I.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced by any means, nor transmitted, nor translated into a machine language without the written permission of the Chief Executive of P.W.R.I.

この報告書は、独立行政法人土木研究所理事長の承認を得て刊行したものである。したがって、本報告書の全部又は一部の転載、複製は、独立行政法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

平成21年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料地盤研究グループ リサイクルチーム
水環境研究グループ 水質チーム

概要

本報告書集は、平成21年度に独立行政法人土木研究所において実施された下水道に関する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

目 次

I リサイクルチーム

頁

1	下水道施設におけるバイオガスの完全利用に関する調査	(受託業務費)	1
2	下水道におけるウイルス等の安全性評価に関する調査	(受託業務費)	17
3	流域規模での水・物質循環管理支援モデルに関する研究(3)	(運営費交付金)	31
4	水環境中における病原微生物の消長に関する研究	(運営費交付金)	37
5	余剰有機物と都市排水の共同処理技術に関する研究	(運営費交付金)	43
6	LCA からみた公共緑地等バイオマスの資源利用システムに関する研究	(運営費交付金)	48
7	下水中の栄養塩を活用した資源回収・生産システムに関する研究	(運営費交付金)	52
8	再生水利用の安全リスクに関する研究	(運営費交付金)	57
9	下水処理水等の開放系循環利用に関する研究	(運営費交付金)	69
10	公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と制御に関する研究	(地球環境保全等試験研究費)	73
11	河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究	(地球環境保全等試験研究費)	84

II 水質チーム

12	下水道における生理活性物質の実態把握と制御に関する調査	(受託業務費)	161
13	下水道における微量化学物質の安全性評価に関する調査	(受託業務費)	168
14	生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究	(運営費交付金)	180
15	流域規模での水・物質循環管理支援モデルに関する研究(2)	(運営費交付金)	190
16	都市水環境における水質評価手法に関する調査	(運営費交付金)	198
17	湖水中の藻類生産有機物の性状と挙動に関する研究	(運営費交付金)	207
18	微量金属を対象としたダム湖富栄養化対策技術の開発	(運営費交付金)	216
19	閉鎖性水域の貧酸素化に及ぼす陸域負荷の影響と対策手法に関する研究	(運営費交付金)	218
20	湖沼における難分解性有機物の発生源とその質及び挙動特性に関する研究	(地球環境保全等試験研究費)	227
21	伊勢湾流域圏の自然共生型環境管理技術開発	(科学技術振興調整費)	284
22	メダカの遺伝子解析による河川水質の評価	(河川整備基金助成)	288
23	担体による都市河川の藻類抑制技術	(河川整備基金助成)	289

*受託業務費とは、国土交通省からの受託によるものである。

*流域規模での水・物質循環管理支援モデルに関する研究(1)は、水文チームによって行われており、本報告書には、掲載していない。

I. リサイクルチームによる研究

下水道施設におけるバイオガスの完全利用に関する調査

リサイクルチーム 上席研究員 岡本誠一郎
研究員 桜井 健介
研究員 宮本 豊尚

1. はじめに

下水汚泥の嫌気性消化の工程で発生するバイオガス(メタンガス)を、より効率的に回収し、利用を促進し、処理場のエネルギー自立度を向上させるため、温度、圧力、ガス添加等の様々な条件のもとで、運転方法や運転条件の最適化を図る必要がある。

平成 21 年度調査では季節により発生量が変動する刈草等の草本バイオマスの投入量平準化のための質的变化抑制手法を検討するとともに、それにより得られた草本バイオマスの添加によるバイオガス回収量の変化について検討した。

2. 草本バイオマス投入量平準化のための質的变化を抑制するための前処理手法の検討

2. 1 下水汚泥と草本バイオマスの混合嫌気性消化の可能性について

国土交通省などの省庁や地方自治体などは、所管する道路、河川、公園などの管理のため、毎年定期的に緑地の草木の除草、剪定を行っており、除草、剪定されたそれらの一部を有効利用している。さらに利用の促進および効率化・最適化を行うことにより地球温暖化防止等の目標達成に寄与できる可能性がある。バイオマスは「広く、薄く」存在している上、水分含有量が多い、かさばる等の扱いづらいという特性のために収集が困難であることが、バイオマスが十分に活用されていない原因の一つであるが、道路、河川、公園などの管理により発生する草木は日常的に搬出、集積されており、収集が容易であることから、比較的利用しやすいバイオマスと考えられる。

本調査では、対象とするバイオマスは、刈草(草本)と剪定枝葉に分類するものとした。刈草の利用上の特徴は、木質類などと比較して、微生物による分解がすすみやすいことから、メタン発酵や堆肥化が有効だと考えられる。また、乾燥させ、干草にできれば、保管が可能となり飼料化、敷き草などの利用が可能である。単位容積あたりの熱量は木質系ほど期待できないものの焼却炉の助燃材などの直接燃焼も期待できる。剪定枝葉は、主に、道路事業に由来する。ある程度、乾燥していれば、直接燃焼としての利用が可能である。また、堆肥化やメタン発酵には、強固に木化した枝の微生物分解が困難であるため、前処理などが必要となる。

下水道は、我が国の電力量の約 0.6%を消費し、普及率の向上や処理の高度化に伴い今後も更なる増加が見込まれていることから、省エネルギー対策が強く求められており、さらに、処理場の有する資源を活用し、処理場自らエネルギーを生み出し、その活用を図っていくことが重要と考えられている²⁾。

一方、下水汚泥は、多量の有機物とともに多種多様な微生物群と生物の活動に不可欠なミネラル分を豊富に含むことから微生物資源としての価値は高く、草木類の生物学的な加工・改質に大いに貢献できるものと思われる。現在の下水汚泥の嫌気性消化法は、純粹の精製セルロースパウダーを用いた基礎的な実験^{3),4)}や実際の廃菌床や厨芥を用いた実験^{5),6)}から、セルロース質等の炭水化物を追加的に多量に受け入れられる可能性が高いことが示唆されている。

2. 2 草本バイオマス投入量平準化のための保管時の影響調査

2. 2. 1 調査方法

平成 21 年度調査では、草本バイオマス投入量平準化のための保管時の影響把握のため、刈草を採取し、その幾つかの保管による刈草への影響を調査した。刈草は、土木研究所内（写真 2.2.1 参照）より刈草を採取することとした。保管方法は、表 2.2.1 の 3 ケースとした。また、風による飛散防止のため、5mm 径程度のネットを張った。分析項目は、湿潤重量、含水率、TS、VS とした。各分析方法は、下水試験方法に準拠した。保管期間は、越冬期間を想定して、開始から 21 週間とした。また、主要構成元素の変化をみるために、CHN 計(アムコ FLASH EA1112)を使用し C、H、N の分析を行なった。



写真 2.2.1 刈草採取前の状況



写真 2.2.2 採取された刈草

表 2.2.1 保管条件

RUN-1	室内保管
RUN-2	野外・雨よけ保管
RUN-3	野外保管



写真 2.2.3 RUN-1の保管状況



写真 2.2.4 RUN-2、3の保管状況

2. 2. 2 結果

(1) 重量について

各 RUN の重量の変化を図 2.2.1~3 に示した。経過時間 0 週のデータは、除草から 5 時間程度で採取し、分析した。RUN-2 および RUN-3 は、期間中、降雨等により含水率が大きく変動した。含水率が高い場合には、TS や VS/TS のばらつきが大きくなっている。

RUN-1 は、TS ベースで重量の変化がほとんど見られなかった。RUN-2 は、TS ベースで、15%減少した。RUN-3 は、TS ベースで 28%減少した。RUN2 および RUN3 は、雨や風の影響により風化が進み、径が小さくなり、強風時に防風ネットの隙間からの飛散や、微生物の分解によって、TS が減少していると考えられた。その傾向は、雨を防がなかった RUN-3 において、顕著であった。

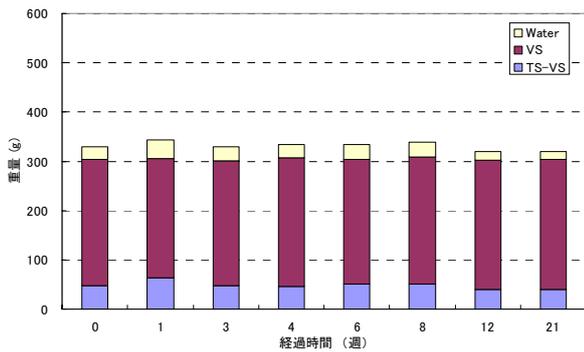


図 2.2.1 RUN-1 の重量の変化

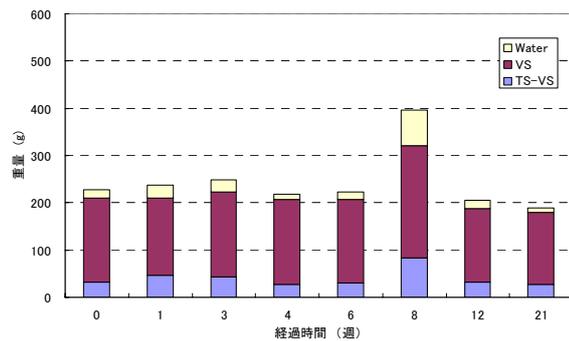


図 2.2.2 RUN-2 の重量の変化

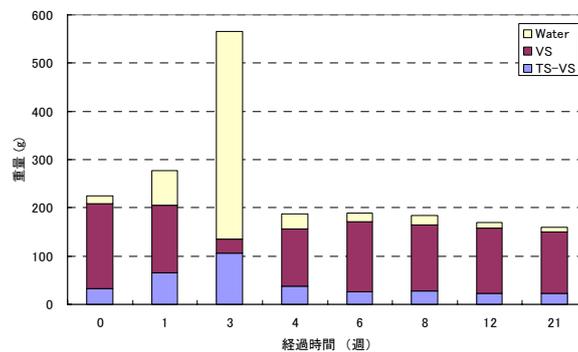


図 2.2.3 RUN-3 の重量の変化

(2) 主要構成元素について

主要構成元素の分析結果を、表 2.2.2~4 に示した。C/N 比は、植物が分解して朽ちていく過程（腐朽、腐植化の過程）の指標として一般的に用いられる⁷⁾。動植物が腐敗すると最終的に 10~12 程度になることが知られている。特に、RUN-3 は C/N 比が最も低下し、腐敗が進行していたと考えられる。

表 2.2.2 RUN-1 の経過時間ごとの主要元素割合

		主要元素割合 (%)				C/N 比
		N	C	H	その他	
経過時間(週)	0	0.2	45.8	6.2	47.8	257
	4	0.6	44.4	6.0	49.1	81
	6	0.6	44.7	6.0	48.7	70
	12	0.6	44.2	6.0	49.2	70
	21	0.6	44.7	6.1	48.5	70

表 2.2.3 RUN-2 の経過時間ごとの主要元素割合

		主要元素割合 (%)				C/N 比
		N	C	H	その他	
経過時間(週)	0	0.2	45.8	6.2	47.8	257
	4	0.6	44.0	5.8	49.6	71
	6	0.6	44.8	5.9	48.7	77
	12	0.8	44.0	6.0	49.2	54
	21	0.6	44.4	6.1	49.0	81

表 2.2.4 RUN-3 の経過時間ごとの重量バランス

		主要元素割合 (%)				C/N 比
		N	C	H	その他	
経過時間(週)	0	0.2	45.8	6.2	47.8	257
	4	0.7	44.0	5.9	49.3	65
	6	0.8	44.9	5.9	48.4	56
	12	0.8	44.9	6.0	48.2	54
	21	1.1	44.7	6.2	48.0	39

本調査結果より、室内で保管した刈草が重量の減少がほとんど見られなかったのに対し、屋外に保管した場合には、雨ざらしのケースで、乾燥重量が 28%減少するとともに、C/N 比の低下も見られ分解が進行していた。メタン発酵によりメタンガスを回収するには、炭素ができるだけ保存されていることが望ましく、刈草の保管時には雨風を凌げる環境が重要であることが示された。

2. 3 草本バイオマス投入量平準化のための質的变化を抑制するための前処理手法の検討

刈草などの草本バイオマスは、保管中に分解されることによって、炭素分が減少したり保管によって乾燥したりすることにより、微生物分解が進みにくくなる可能性があるため、適切に前処理を行なうことで保管後の刈草もメタン発酵によるエネルギー回収量の減少を防ぐことが課題の一つである。

本検討では、保管された刈草などの草本バイオマスを、幾つかの前処理の上、メタン発酵によるエネルギー回収量の変化を調査する。

2. 3. 1 方法

21 週間保管された刈草を用い以下の前処理を行なった上で発酵性を調査する。予備調査の結果、検討された前処理方法は表 2.3.1 のとおりである。実験は、3L フラスコを用いた回分式試験(N=1：各実験条件における試料数)とし、14 日間 35℃にて消化させ、テドラバックによりガス回収を行なった。種汚泥としての消化汚泥に対し、投入汚泥は TS ベースで 25%とし、刈草等はさらにその 25%である 6.3%とした。発生したガスは、CH₄、CO₂、N₂、O₂の含有率を測定した。測定方法は、ガスクロマトグラフ法（下水試験方法）に準拠し、機器は SHIMADZU CORPORATION、GC-2014ATF を用いた。

表 2.3.1 実験条件

	刈草の前処理方法	種汚泥			投入汚泥					
		TS(g)	VS/TS	VS(g)	TS(g)	VS/TS	VS(g)			
RUN-1	無し	0	-	0	消化汚泥 30.73	0.69	21.17	濃縮生汚泥 6.15	0.91	5.57
RUN-2	屋外保管された刈草を1cm程度に破砕したもの	1.54	0.91	1.40						
RUN-3	屋外・雨よけ保管された刈草を1cm程度に破砕したもの	1.54	0.90	1.39						
RUN-4	室内保管された刈草を1cm程度に破砕したもの	1.54	0.92	1.41						
RUN-5	室内保管された刈草を1cm程度に破砕したものを湯煎(50℃)処理したもの	1.54	0.92	1.41						
RUN-6	室内保管された弱爆砕(2.5MPa、15sec)された刈草	1.54	0.91	1.40						
RUN-7	室内保管された強爆砕(2.5MPa、60sec)された刈草	1.54	0.91	1.39						
RUN-8	室内保管された刈草を微粉碎(1mm以下)したもの	1.54	0.92	1.41						

蒸煮爆砕装置は、蒸気発生装置および試験用蒸煮爆砕装置から構成される。蒸気発生装置には、ヒーター容量 40kw の電気ボイラーを使用した。試験用蒸煮爆砕実験装置は、主にステンレス製で反応器 30L のものを使用した。処理は、バッチ式で行われる。蒸煮爆砕処理は、表-2.3.1 の反応条件により行った。



2. 3. 2 結果

消化ガス発生量および成分構成割合を表 2.3.2 および 2.3.3 に示した。メタンガスの発生量で評価すると、強爆砕処理を行なったもの（RUN-7）および微粉砕処理を行なったもの（RUN-8）が最も高かった。次に、室内保管された刈草を 1cm 程度に破砕したもの（RUN-4）であった。RUN-2 や 3 などは、雨風にさらされ、繊維状のものが残り全体が固くなるが、RUN-4 では、その様な現象もみられず、メタン発酵に適していると考えられた。RUN-3 においては、メタンガス発生量が少なく、保管の間に発酵が進んでいる場合や、保管の間に発生したカビなどによる悪影響などが考えられるため、今後検証が必要である。

表 2.3.2 消化ガス発生量

項目	単位	RUN-1	RUN-2	RUN-3	RUN-4	RUN-5	RUN-6	RUN-7	RUN-8
ガス量	NL	4.33	5.33	3.14	7.42	2.86	6.45	8.58	8.72
CH ₄	NL	2.72	3.34	1.96	4.44	1.70	3.59	4.99	5.07
CO ₂	NL	1.33	1.74	1.00	2.60	0.94	2.44	3.19	3.19
N ₂	NL	0.19	0.14	0.09	0.17	0.11	0.19	0.12	0.17
O ₂	NL	0.04	0.04	0.03	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05

表 2.3.3 消化ガス成分構成割合

項目	単位	RUN-1	RUN-2	RUN-3	RUN-4	RUN-5	RUN-6	RUN-7	RUN-8
ガス量	NL	4.33	5.33	3.14	7.42	2.86	6.45	8.58	8.72
CH ₄	%	62.82	62.65	62.46	59.84	59.54	55.59	58.19	58.10
CO ₂	%	30.81	32.59	31.84	35.04	32.92	37.85	37.23	36.54
N ₂	%	4.31	2.63	2.75	2.36	3.85	2.92	1.39	1.90
O ₂	%	0.86	0.76	1.04	0.74	1.40	0.81	0.56	0.59

表 2.3.4 に、汚泥および刈草の VS あたりの消化ガス発生倍率を示した。RUN-2,4,6,7,8 は、RUN-1 を上回っていた。表 2.3.5 に、刈草の VS あたりの消化ガス発生倍率を示した。ここで、全ての系において、投入汚泥からは、RUN-1 の消化ガス発生量と同量が発生するものと仮定し、残りについては、刈草より発生したものと仮定して計算した。刈草の VS あたり消化ガス発生倍率は、投入汚泥を大幅に上回っていた。なお、RUN-1 の消化による投入汚泥の消化率（TS 減少率）は、65%であった。本実験では TS および VS は汚泥のごく一部を分析することから、試料の抽出により差異が大きい。特に、汚泥引き抜き時には、刈草の分布が一様でなく、変動が大きく出てしまうことから、定量的な判断には注意を要する。

表 2.3.4 汚泥および刈草の VS あたりの消化ガス発生倍率

項目	単位	RUN-1	RUN-2	RUN-3	RUN-4	RUN-5	RUN-6	RUN-7	RUN-8
投入する汚泥および刈草重量	VS-g	26.7	28.1	28.1	28.1	28.1	28.1	28.1	28.1
汚泥および刈草の VS あたり消化ガス発生倍率	NL/VS-g	0.16	0.19	0.11	0.26	0.10	0.23	0.30	0.31

表 2.3.5 刈草の VS あたりの消化ガス発生倍率

項目	単位	RUN-1	RUN-2	RUN-3	RUN-4	RUN-5	RUN-6	RUN-7	RUN-8
投入する刈草	VS-g	0.00	1.40	1.39	1.41	1.41	1.40	1.39	1.41
刈草の VS あたり消化ガス発生倍率	NL/VS-g	—	0.72	—	2.19	—	1.51	3.04	3.12

「—」は、消化ガス発生量が RUN-1 を下回ったため、計算不可。

3. 2. で得られた草本バイオマス添加及び温度・圧力等の消化条件の違いによるバイオガス回収量の変化に関する検討

3. 1. 2. で得られた草本バイオマス添加によるバイオガス回収量の変化に関する検討

平成 21 年度調査では、下水汚泥との混合嫌気性消化の対象として、前項で得られた刈草を用い、実用化に向けてのステップとして 100L の実験用嫌気性消化槽を 2 系列用い、I 系は汚泥のみを添加する系とし、II 系は、汚泥の他に刈草を添加する系とし、添加する刈草によるバイオガス回収量の検討を行う。

3. 1. 1 方法

嫌気性消化実験にあたっては、湖北総合実験施設に設置してある 2 つの系列を持つ 100L 嫌気性消化槽を用いた。100L 嫌気性消化槽は、消化槽の容量は 100L であり、消化槽の周囲は電気ヒーターで 35℃に温度調整された恒温水で覆われており、中央部の攪拌機により攪拌される。本実験では、I 系、II 系ともに消化槽内に消化汚泥を 80L 投入し運転した。

嫌気性消化にあたっては、I 系、II 系ともに実下水処理場の消化汚泥を種汚泥に用い、実下水処理場の濃縮混合汚泥を投入し、馴致のため運転した後に、II 系に刈草を投入し始め、3 ヶ月運転を続けた。嫌気性消化槽の運転条件は、I 系、II 系ともに平均汚泥滞留日数は 30 日となるようにし、平日のみ汚泥を投入および引き抜きを行なった。II 系には、投入汚泥に対し、TS ベースで 10%の刈草を投入した。刈草は、実際の現場での運転を想定し、週に 1 度（毎週火曜日）にまとめて投入することとした。期間中の投入汚泥の平均 pH6.09、平均蒸発残留物濃度は、21.9mg/L であり、VS/TS は 0.81 であった。刈草は、室内で保管し、含水率は、10% であった。刈草は、投入する管の径が 20mm と実施設と比較して小さいため、投入時の閉塞が懸念された。そのため、刈草はやや小さめの 5mm 以下程度まで破碎した。破碎された刈草は、投入汚泥と混合の上、消化槽内へポンプで圧送した。汚泥は、下水試験方法に準拠し pH、TS、VS を測定した。また、消化ガスは、ほぼ毎日（週末を除く）、発生容量を測定し、I 系は 118 日目、II 系は 118 日目-121 日目の毎日採取し、ガスの成分を分析した。



写真 3.1.1 投入に用いた破碎された刈草



写真 3.1.2 刈草と汚泥の混合の状況

3. 1. 2 結果

試験期間中の消化ガス発生量を図 3.1.1 に示した。運転が安定してきた 93 日目以後の累積消化ガス発生量を図 3.1.2 に示した。累積消化ガス発生量は、14%増であった。

また、期間中の消化ガス発生量およびガス組成について、表 3.1.1 に分析結果を示した。本期間において、刈草は 118 日目のガスの採取終了後、投入した。刈草の投入した当日から丸 3 日間程度は、消化ガスの発生量が増加していた。ガスの組成は、Ⅱ系（刈草+汚泥）では、Ⅰ系（汚泥）に比べて数パーセント低下する傾向があった。本期間（118-121 日目）の平均メタンガス濃度が全期間（93-143 日目）の平均濃度を代表しているものと仮定すると、累積メタンガス発生量は、10%増となった。ただし、表 3.1.1 では、一般的な下水処理場の消化ガスの窒素濃度 0-3%⁸⁾と比較して窒素が多く検出されていることから、汚泥の投入時などに、空気が混入していることが推測される。一般的な下水処理場の消化槽のように連続的な下水汚泥の投入が行なわれる場合には、メタン濃度は、向上すると考えられる。

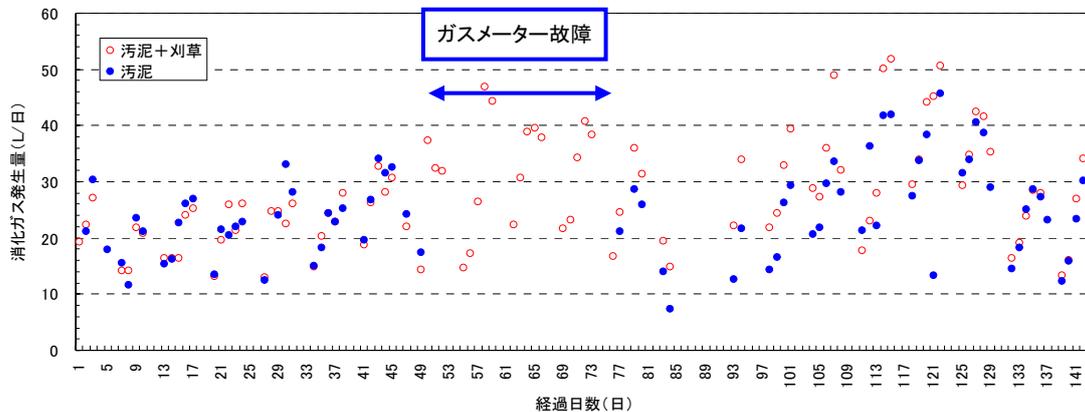


図 3.1.1 試験期間中の消化ガス発生量

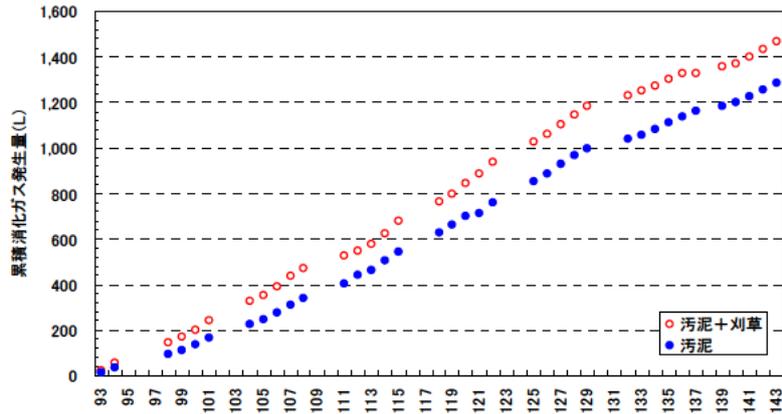


図 3.1.2 93 日目以降の累積消化ガス発生量

表 3.1.1 安定期の消化ガス発生量とガス組成

項目	単位	I 系(汚泥)	II 系(汚泥+刈草)				118-121 日目 累積
		118 日目	118 日目	119 日目	120 日目	121 日目	
発生量	NL/24h	30.4	29.2	43.2	42.2	38.7	153.3
CH ₄	%	54.1	55.9	54.9	53.5	44.6	52.1
CO ₂	%	29.0	28.7	31.7	32.7	30.6	31.1
N ₂	%	12.2	11.0	9.8	10.5	19.2	12.6
O ₂	%	1.9	1.9	1.1	1.2	3.8	1.9

93 日目から 143 日目までの VS 分解率は I 系（汚泥）で 73.5%であり、II 系（汚泥+刈草）で 78.6%であった。消化率（TS 減少率）は、汚泥系で 57.7%であり、汚泥+刈草系で 55.9%であった。

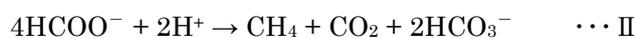
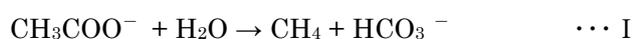
本調査では、過負荷による酸発酵が生じることなく、刈草の投入により消化ガスの増加が確認された。刈草は、消化下水汚泥と同程度の消化ガス発生倍率であったと推察された。本調査結果からは、順調な消化が確認された。今後は、刈草が本実験より大きい場合の影響、比重の違いによるスカムの発生可能性・攪拌機による攪拌効率の検証が必要であると考えられる。

3. 2 消化条件の違いによるバイオガス回収量の変化に関する検討

3. 2. 1 はじめに

嫌気性消化プロセスを制御する因子としては、温度・滞留時間（HRT および SRT）・有機物負荷等が挙げられる⁹⁾。本節では、これまであまり注目されていない、「二酸化炭素分圧の調整」と「消化汚泥の返送」による発酵効率の向上方法に関して検討を行った。

嫌気性消化におけるメタン生成経路は下のⅠ～Ⅲ式が主体であると考えられているが、Ⅲ式についてはこれまであまり検討されてきていない。メタン菌がガス状の水素やある種のアルコール及び脂肪酸の存在下で、CO₂をメタンに還元し、脂肪酸や水を還元または水素供与体として利用することもあると報告されている¹⁰⁾。既往の研究によると、二酸化炭素分圧が消化ガス回収量へ影響を与えているという報告がなされており^{11),12)}、海外でも UASB に二酸化炭素を基質として与えたメタン発酵を試みている事例¹³⁾もあるが、そのメカニズムについては十分解明されていない。



嫌気性消化におけるメタンの生成反応式¹⁴⁾

平成 20 年度の検討¹⁵⁾では、現在多くの処理場で行われている二段嫌気性消化のリアクターに二酸化炭素を吹き込み、二酸化炭素の分圧変化による消化ガスの回収量の変化について検討を行ったところ、二酸化炭素を吹き込んだ系では、対照系よりもガスが多く発生しており、メタンの生成が確認できた。また、消化汚泥の返送を行い、系の安定に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、平成 20 年度の実験期間中の有機酸濃度は高い状態を維持しており定常状態とはいえない。そこで平成 21 年度は、定常状態における二酸化炭素吹き込みや返送の効果について検討を行い、吹き込み方法の違いによる影響についても検討を行った。

3. 2. 2 二段嫌気性消化のリアクターを用いた二酸化炭素吹き込みと返送の効果の検討

(1) 実験目的

二段嫌気性消化のリアクターに二酸化炭素の添加や消化汚泥の返送を行い、定常状態におけるそれぞれの操作効果を確認した。また、ガスの添加方法や返送量を変更することによる影響についても調査を行った。

(2) 実験概要

実験は 35℃恒温室において 5L の反応槽を前段、後段と 2 槽をビニールチューブで連結したものを、A~D の 4 系列作成した。図-3.2.1 に実験装置の実験開始時の外観を、図-3.2.2 に模式図を示す。B 系・C 系については、一部実験系でガス循環を行うため、捕集したガスを再度消化槽内に送る配管及びポンプを接続している。D 系については、ローラーポンプにより後段から前段に汚泥の返送を行っている。

実験の立上げに際して、種汚泥は実際の下処理場の消化汚泥を、投入タンクから各槽前段への投入汚泥には同処理場の余剰汚泥を調整したものをそれぞれ用いた。なお投入汚泥には蒸発残留物(TS)調整のためにセルロースパウダーを添加している。実際の処理場では最初沈殿池で発生する初沈汚泥と余剰汚泥が消化槽へ送られているが、気象等の影響を受け初沈汚泥の性状は変化しており汚泥の性状は必ずしも一定とは限らない。そこで初沈汚泥のうち消化に影響を与えるセルロースのみを性状の比較的安定している余剰汚泥に一定割合で混合し、実験に供する汚泥の性状変化の影響をなるべく小さくするよう工夫を行った。



図 3.2.1 実験装置(実験開始時)

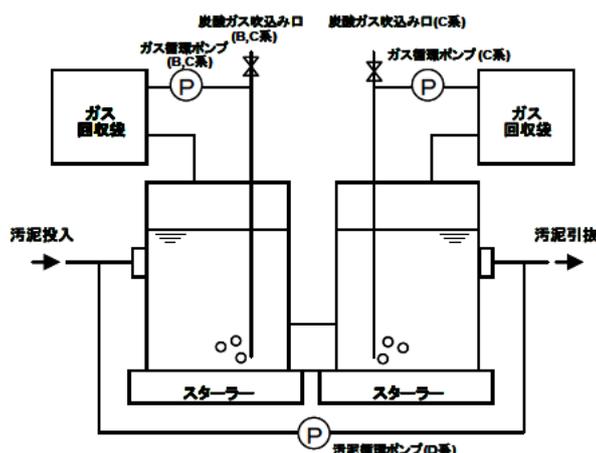


図 3.2.2 実験装置概念図

(3) 実験条件

各槽前段にチューブポンプを用いて余剰汚泥を 240ml/日となるよう調整して投入した。引き抜きは週に 2 度、うち一回は前後段ともに 200ml ずつ引抜いて分析に供し、一回は前段から 50ml、後段からは各系の全体の汚泥容量が 6.6L になるように調整して引抜を行った。その結果、反応槽内の水理的滞留時間(HRT)は概ね前段では 14 日、後段では 16 日となっている。A 系は他の 3 系の対照系とし、B 系は前段のみ、C 系は前後段に二酸化炭素の吹き込みを行った。D 系は返送による効果を観察するためにポンプを用いて後段から前段へと汚泥の返送を行った。

二酸化炭素の投入量と投入方法、汚泥の返送量については表-3.2.1 のとおりである。

表 3.2.1 実験条件

系列		A	B	C	D			
実験系		対照系	RUN1	RUN2	RUN1	RUN2		
条件変更 (経過日数)			~201	202~	~201	202~	~187	188~
汚泥量 (L)	前段	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6		
	後段	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6		
HRT(日)	前段	14	14	14	1 [*]	7 [*]		
	後段	16	16	16	1 [*]	7 [*]		
二酸化炭素投入量 (L/週)	前段		5	10	5	10		
	後段				5	5		
発生ガス循環量 (ml/min)	前段			50	50			
	後段				50			
汚泥返送量 (L/日)					3.6	0.24		

※D 系の HRT については、返送量を加味した HRT であり、系全体の HRT は 30 日である。

(4) 分析項目

本実験では液相、気相分析をそれぞれ行った。

液相では週に 2 度、各槽から消化液の引き抜きを行い、そのつど pH の測定を行った。また 2 週間に 1 度の間隔で、蒸発残留物(TS)・強熱減量(VS)・浮遊物質(SS)・揮発性浮遊物質(VSS)・無機性炭素(IC)・有機性炭素(TOC)・アンモニア態窒素(NH₄-N)・亜硝酸態窒素(NO₂-N)・硝酸態窒素(NO₃-N)・リン酸態リン(PO₄-P)及び揮発性脂肪酸(VFA) (コハク酸・乳酸・ギ酸・酢酸・プロピオン酸・i-酪酸・n-酪酸・i-吉草酸・n-吉草酸) について分析した。また、必要に応じて SS 中の C/H/N の元素分析を行った。

気相は週に一度ガスのサンプリングを行い、ガス発生量及びガス組成(CO₂/CH₄/N₂/O₂)の分析を行った。

(5) 分析方法

消化液及び発生ガス中の各成分は、以下の分析器具・装置・方法を用いて分析した。

pH(YOKOGAWA pH7I)、TS・VS・SS・VSS(下水試験方法(1997))、TOC(TOC-5000A)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ ・ $\text{NO}_2\text{-N}$ ・ $\text{NO}_3\text{-N}$ ・ $\text{PO}_4\text{-P}$ (TRAACS 2000)、ガス組成(O_2 、 N_2 、 CH_4 、 CO_2 (SHIMADZU GC-2014)、有機酸分析(DIONEX IC 20 Ion Chromatograph)、CHN 分析 (AMCO FLASH EA 1112)

(6) 実験結果・考察

1) 馴致期間と安定状態での違いと対象汚泥の特性

対照系(A系)について、馴致期間と、安定状態となった状態の実験結果を比較し、2連のメタン発酵装置並びに今回使用した汚泥の発酵特性について調査した。

メタン発酵の馴致期間中は、酢酸やプロピオン酸等の有機酸が高濃度で存在したため pH が 5~6 程度まで低下しており、メタン発酵としては不安定な状況であった。pH が 6.5 を下回るとメタン生成菌の働きが強く阻害され、酸敗状態となる⁹⁾。

その後、実験開始から 130 日経過した時点で安定状態となった。有機酸濃度も馴致期間の値と比べて大きく低下しており、安定状態ではいずれの系でも pH は 6.8~7.4 となった。

投入汚泥は VS が 35~38g/L 程度であり、安定状態においては、VS の分解率は前段で 55~60%、前後段あわせると 60~63%となっていた。わが国の実際の処理場における消化率の平均が 33~38℃の消化条件下では 61.9%とされていることから⁹⁾、平均的な消化が行われているといえる。

ガスの発生については、おおよそ前後段合わせて 30L/週の消化ガスを得ることができていた。ガス発生倍率は 0.58NL/g-VS であり、一般的な下水汚泥のメタン発酵と比べて若干良い結果であった⁹⁾。メタンガスと二酸化炭素の分圧の比は概ね 3:2 であり、発生しているガスはごく一般的な消化ガスであったといえる。

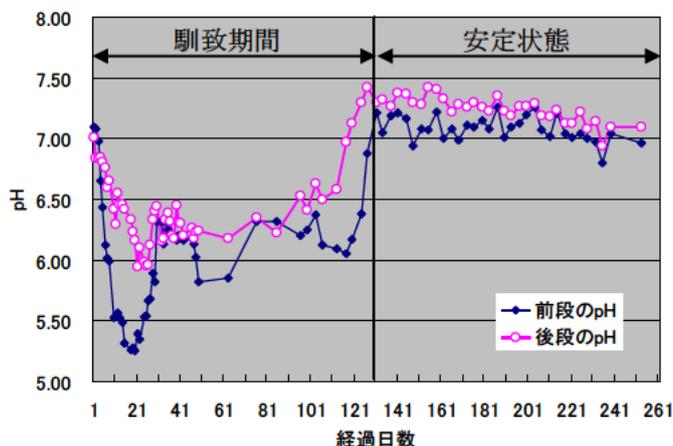


図 3.2.3 実験開始時からの A 系の pH の推移

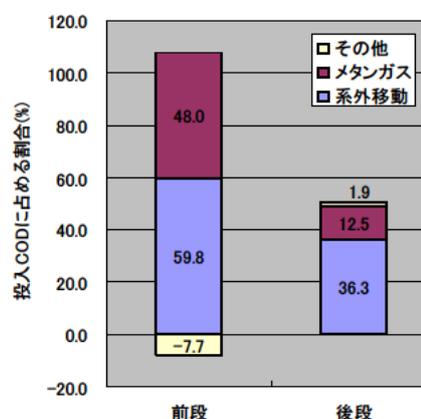


図 3.2.4 COD 物質収支

実験開始後 239 日目の対照系の COD 物質収支を図 3.2.4 に示す。約 50%の COD が前段でメタンガスに転換し、後段に移行した汚泥中の COD のうち約 25%がメタンガスに転換する。なお、pH 測定などの液相分析に必要な汚泥を一定量前段からも引き抜いているが、これを加味すると後段で発生するガス量は 2 割程度増加することになる。

2) 二酸化炭素吹き込みによる影響

対照系(A系)と二酸化炭素を前段にのみ吹き込んだ系(B系)、前後段に二酸化炭素を吹き込んだ系(C系)を比較する。また、表-3.2.1に示すように実験は前半と後半で条件を変更している。

二酸化炭素吹き込みの影響は、回収した消化ガスの発生量(及び二酸化炭素の発生量)と pH と IC に現れていた。表-3.2.2に二酸化炭素吹き込み時のガス収支例を示す。

表 3.2.2 RUN2 の平均ガス発生収支の例 (単位：NL/週)

	A前段	A後段	B前段	B後段	C前段	C後段
ガス発生総量	18.7	4.2	11.9	6.1	12.5	2.7
合計ガス発生総量	22.9		18.0		15.2	
CH4分圧 (%)	55.6	59.2	42.1	55.3	40.7	45.2
CH4発生量	10.4	2.5	9.2	3.3	9.2	3.5
合計CH4発生量	12.9		12.5		12.7	
CO2分圧 (%)	38.7	37.0	52.8	41.0	53.9	48.2
みかけのCO2発生量	7.3	1.5	11.6	2.5	12.1	3.7
吹き込みCO2量			10.0			10.0
正味のCO2発生量	7.3	1.5	1.6	2.5	2.1	-1.3
合計CO2発生量	8.8		4.2		0.8	

B系及びC系では二酸化炭素を吹き込んでいるため得られた消化ガスの中の二酸化炭素分圧はコントロール系よりも高いものであった。しかしメタンガス発生量はいずれの実験系でもほぼ同じであり、外部から投入した二酸化炭素量を差し引いて求めた正味の二酸化炭素発生量では、二酸化炭素を投入した系からはほとんど二酸化炭素が発生していない。これは二酸化炭素分圧が高まることで、ヘンリーの法則により液相への二酸化炭素の溶解が進んだためと考えられる。

二酸化炭素吹き込みが液相に与える影響は、前段の反応槽では明確には現れなかった。これは有機酸濃度が相対的に高く、また消化ガスの発生量が多いために二酸化炭素分圧が低下しやすいことが原因であると予想される。反応が緩やかとなった後段においては、二酸化炭素吹き込みにより液相中の IC 濃度はコントロールと比べて上昇し、pH は低下する傾向が見られる(表 3.2.3、表 3.2.4)。また、二酸化炭素濃度を高め、ガス循環を行った RUN2 の方が、RUN1 よりもガスの溶解が進んでいた。VS 分解率に与える影響については判断ができなかった。

表 3.2.3 平均の pH

		A系	B系	C系
RUN1	投入	5.71	5.71	5.71
	前段	7.10	7.15	7.12
	後段	7.24	7.24	7.04
RUN2	投入	5.58	5.58	5.58
	前段	7.04	7.07	7.07
	後段	7.16	7.20	7.08

表 3.2.4 平均の IC

(単位：mg/L)

		A系	B系	C系
RUN1	投入	17	17	17
	前段	735	816	786
	後段	882	897	899
RUN2	投入	37	31	31
	前段	699	727	740
	後段	786	834	791

※いずれも色つきセル部に炭酸ガスを吹き込んでいる

3) 消化汚泥の返送による影響

H20 年度の実験結果から、返送の効果として安定状態に達するまでの期間を短縮する可能性が示された。H21 年度は、定常状態における効果を確認するとともに、返送量の違いによる効果について確認を行った。図 3.2.5 に示すように、pH は安定しており、先述の対照系（図 3.2.3）と比べても pH が安定するまでの期間が 30 日程度短くなっているといえる。

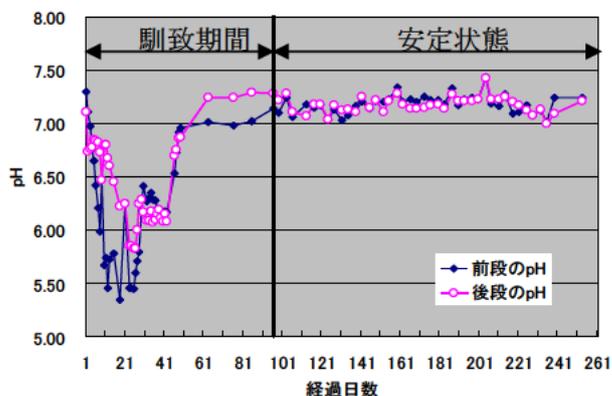


図 3.2.5 実験開始時からの D 系(返送系)の pH の推移

安定状態における返送(循環)の効果として、北條ら¹⁶⁾は初沈汚泥に対して循環式二段階消化を適用すると、一段階消化に比べてガス生成倍率や有機物分解率が 10～15%向上したと報告している。本調査における RUN1 では返送量を過大に増やしており擬似的な一段消化と見ることができる。このとき、対照系と比べて未分解の VS が流出するため VS 分解率は低下する傾向にあった。すなわち擬似一段メタン発酵では対照系とくらべて発酵効率が悪くなっているといえる。RUN2 では文献値¹⁶⁾と同様に返送比を投入汚泥量に対して 1:1 としたところ、VS 分解率が増加している。このことから VS の分解率については、「擬似一段」<「二段返送なし」<「二段返送適量」の順に成績が良くなっていた。今回の実験では、適量の返送を行うと、擬似一相状態と比べて VS 分解率が 8%向上した。投入 VS あたりのガス発生量については、返送の有無による効果は明確には現れなかった。

表 3.2.5 返送量と VS 分解率、ガス生成量の関係

	擬似一段	二段返送無し	二段返送あり
VS分解率(%)	57.4	60.4	61.8
ガス生成量 (L/g-投入VS)	0.45	0.38	0.40

4. まとめ

下水汚泥の嫌気性消化の工程で発生する消化ガス（メタンガス）を、より効率的に回収し、利用を促進し、処理場のエネルギー自立度を向上させることを目的として、季節により発生量が変動する刈草等の草本バイオマスの投入量平準化のための質的变化抑制手法を検討するとともに、それにより得られた草本バイオマスの添加によるバイオガス回収量の変化について検討した。あわせて二酸化炭素分圧の調整と汚泥の返送に着目して消化ガス回収量の向上方法の検討を行った。本検討の結果、以下の事項が明らかとなった。

A. 草本バイオマス投入量平準化のための質的变化を抑制するための保管・前処理手法について

- (1) 刈草の保管方法についての検討の結果、室内で保管した刈草が重量の減少がほとんど見られなかったのに対し、屋外に保管した場合には、雨ざらしのケースで、乾燥重量が 28%減少するとともに、C/N 比の低下も見られ分解が進行していた。メタン発酵によりメタンガスを回収するには、炭素ができるだけ保存されていることが望ましく、刈草の保管時には雨風を凌げる環境が重要であることが示された。
- (2) 刈草をメタン発酵する際の保管後の刈草の前処理について検討した結果、メタンガスの発生量で評価すると、強爆砕処理を行なったものおよび微粉碎処理を行なったものが最も高かった。次に、室内保管された刈草を 1cm 程度に破碎したものであった。雨風にさらされた系は、繊維状のものが残り全体が固くなるが、室内保管された刈草では、その様な現象もみられず、メタン発酵に適していると考えられた。

B. 草本バイオマス添加によるバイオガス回収量の変化に関する検討

- (3) 下水汚泥と刈草の混合嫌気性消化の実用化に向けてのステップとして、下水処理場に設置した 100L 消化槽を用い、刈草を下水汚泥に対し、TS ベースで 10%混合して運転したところ、過負荷による酸発酵が生じることなく、刈草の投入により消化ガス 14%の増加が確認された。期間中の連続した 4 日間において、メタンガス発生量は 10%の増加が確認された。また、刈草は、消化下水汚泥と同程度の消化ガス発生倍率であったと推察された。

C. 消化条件の違いによる消化ガス回収量の変化に関する検討

- (4) 消化条件として、「二酸化炭素分圧の調整」と「返送」に着目して消化ガス回収量の向上方法の検討を行った。二段嫌気性消化のリアクターを用いて二酸化炭素を吹き込んだところ、ガスが液相に溶解し、消化槽内の pH と IC、回収された二酸化炭素量から添加した二酸化炭素量を差し引いた正味の二酸化炭素発生量について影響が認められた。一方で二酸化炭素の吹き込みを行ってもメタンガスの発生量は増加せず、VS 分解率については効果が不明瞭であった。返送を適度に行うと馴致期間を短縮するだけでなく VS 分解率が向上した。実験の結果、VS 分解率は「擬似一段消化」<「二段返送なし」<「二段適量返送」の順で向上した。

参考資料

- 1) バイオマス・ニッポン総合戦略、平成18年3月31日閣議決定
- 2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部、社団法人日本下水道協会：下水道政策研究委員会・下水道中長期ビジョン小委員会報告書 下水道ビジョン2100、平成17年9月、2005.
- 3) 落修一、北村友一：セルロースの可溶化・酸発酵に対する炭酸イオンの効果、第34回下水道研究発表会講演集、pp.809～811、1997.
- 4) 落修一、北村友一、尾崎正明：下水汚泥の循環式嫌気性消化法、第35回下水道研究発表会講演集、pp.846～848、1998.
- 5) 栗栖正憲、桃井清至、落修一：下水汚泥と廃菌床の混合嫌気性消化法、第27回土木学会関東支部技術研究発表会講演概要集、pp.998～999、2000.
- 6) 落修一：下水道への厨芥受け入れが汚泥の嫌気性消化に及ぼす影響、土木技術資料、vol.43、No.5、pp.52-57、2001.
- 7) 社団法人道路緑化保全協会、植物発生材堆肥化の手引き 平成10年6月、1998.
- 8) 社団法人に本下水道協会、下水道施設計画・設計指針と解説 後編 -2009年版、2009.
- 9) 野池達也編著、メタン発酵、技報堂出版株式会社発行、2009.
- 10) 建設省土木研究所下水道部汚泥研究室：二酸化炭素還元型メタン発酵機構の解明に関する共同研究報告書、共同研究報告書、第64号、pp.15-26、1991.
- 11) 落修一：下水汚泥と各種有機性廃棄物との混合嫌気性消化に関する研究、東北大学博士学位論文、2005.
- 12) 坂上正美、奥藤武、春木裕人、吉本聡：二酸化炭素還元型メタン発酵機構の研究、下水道協会誌、vol. 33、No.407、pp.162-172、1996.
- 13) Mahmood Alimahmoodi, Catherine N. Mulligan : Anaerobic Bioconversion of Carbon Dioxide to Biogas in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor, Journal of the Air & Waste management Association, Vol.58, pp.95-103, 2008.
- 14) 建設省土木研究所下水道部汚泥研究室：二酸化炭素還元型メタン発酵機構の解明に関する共同研究報告書、共同研究報告書、第64号、pp.15-26、1991.
- 15) 土木研究所資料「平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集」、pp.1-12、2009.
- 16) 北條俊昌、李玉友、野池達也：循環式二段階消化による初沈汚泥嫌気性消化の効率化、第7回環境技術学会研究発表会公演集、2007.

下水道におけるウイルス等の安全性評価に関する調査

研究予算：受託経費（下水道事業調査費）

研究期間：平 21 年度

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：岡本誠一郎、諏訪 守、桜井健介

1. はじめに

ノロウイルス（NV）による感染症が多発しており、下水処理場における流入や放流実態に関して徐々に知見が集積されつつあるが、その実態については感染流行期・非流行期である季節変動を含め十分に解明されていない。また、放流先や処理水再利用の形態によっては、処理水中のノロウイルスを極力低濃度化する必要があると考えられる。このため、下水処理過程での除去率の解明や処理水中のノロウイルス濃度を極力低濃度化するための手法の開発が望まれている。

本調査では、上記の要請を踏まえ、まず春・夏季における実下水を用いた実験による各種下水処理方法および運転条件の違いによるウイルス除去・不活化特性の把握や、その結果と実際の下水処理施設における挙動との関連性を検証した。また、実際の下水処理施設におけるノロウイルスの挙動調査の一環として、降雨時の合流式下水道越流水の汚染実態を把握した。さらに、消毒方法によるウイルス不活化効果を推定するため、消毒前後におけるノロウイルス遺伝子の減少量を評価した。

本調査結果は、水環境へ大きな影響を及ぼすと考えられる下水処理水などの感染リスク低減に資することができる。

2. 調査の内容および方法

本調査の内容は、(1)春・夏季における実下水を用いた実験による各種下水処理法（標準活性汚泥法、高度処理等）や、運転条件の違い（滞留時間、薬剤の添加等）によるウイルスの除去・不活化特性の把握。(2)上記(1)の実験によるウイルス挙動調査結果と、実際の下水処理施設における挙動との関連性の検証。(3)消毒方法によるウイルス不活化効果の推定。(4)結果とりまとめ、より構成される。

2.1 春・夏季における実下水を用いた実験による各種下水処理法や運転条件の違いによるウイルスの除去・不活化特性の把握

2.1.1 季節変動に伴う流入下水のノロウイルス濃度

実下水を用いた実験による各種下水処理法のウイルス除去特性等の把握にあたり、春・夏季を含めた季節変動に伴う流入下水のノロウイルス濃度を把握した。調査対象は、複数の市町村からの下水を受け入れている流入下水量が約 9 万 m³/日規模の関東圏内にある A 下水処理場の流入下水とした。流入下水の採水にあたっては、採水時間を統一するとともに基本的には晴天時に採水を行った。平成 21 年 5 月から採水を開始したが、徐々に流入濃度レベルの低下に伴って（図-1）、処理水からノロウイルスの安定した定量値が得られない可能性が考えられた。このため、冬季の除去特性の把握も重要と考えられたことから、翌年の 2 月まで実験を実施した。併せて、A 下水処理場のある県内衛生研究所が公表している胃腸炎患者数を整理し、流入下水のノロウイルス濃度との関連性を評価した。

2.1.2 実下水を用いた実験による各種下水処理法や運転条件の違いによるウイルスの除去・不活化特性の把握

ウイルスの除去・不活化特性の把握のため、パイロットプラント（P.P.）を利用したノロウイルスの除去実験を行った。実験ケースを 2 通りとしケース I では MLSS 濃度、ケース II では曝気槽内の HRT が各々異なる条件とした。実験条件を整理したものを表-1 に示す。ケース I では設定 MLSS 濃度を 1,000、2,000、3,000mg/L、曝気槽内の HRT は 8 時間とした。ケース II では設定 MLSS 濃度を 2,000mg/L、曝気槽内の HRT を 8、16、30 時間とした。昨年度の調査では、高度処理法として凝集剤添加活性汚泥法や凝集剤添加砂ろ過法を評価したことから、除去率向上のための高度処理等として、MLSS の高濃度化および曝気槽の HRT を長時間化することで除去率を評価した。

利用した P.P. は曝気槽（容量 100L）、最初・最終沈殿槽（各容量 50L）等より構成されており、A 流域下水処理場の流入下水を連続的に流入させた。流入下水の採水は、毎回同一時刻とし、処理水は P.P. での滞留時間を考慮した。実験は 10 月からケース I の条件で開始したが、各々設定した MLSS 濃度に安定するまでに若干の時間を要したことから、除去率の評価に利用したデータは 11 月下旬から翌 1 月の間のものとした。その後、ケース II の実験条件に移行し 2 月の間にデータを得た。

表-1 P.P.の実験条件

実験ケース		ケースⅠ			ケースⅡ		
流入水量 m^3 /日(1池)		300	300	300	300	240	240
【最初沈殿池】	滞留時間 hr	4	4	4	4	4	5
【反応槽】	反応槽容量 m^3	100	100	100	100	200	300
	反応槽滞留時間 hr	8	8	8	8	16	30
	設定MLSS mg/l	1,000	2,000	3,000	2,000	2,000	2,000
【最終沈殿池】	滞留時間 hr	4	4	4	4	4	5

2.2 2.1の実験によるウイルスの挙動調査結果と、実際の下水処理施設における挙動との関連性の検証

2.2.1 実際の下水処理施設におけるノロウイルス除去率の評価

A 下水処理場を対象として実施における調査を行った。A 下水処理場では凝集剤添加活性汚泥処理法、A²/O 法、修正 Bardenpho 法、循環式硝化脱窒法などの各種高度処理法により水処理(表-2)が行われている。標準活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率については現在調査が行われ解明されつつあるが、りん・窒素の高度処理を導入している下水処理場での除去率は十分解明されておらず、また、積極的に高度処理法を採用している場合には、放流先の公共用水域において様々な水利用形態が予想される。今後、放流先水域のリスク評価を行う上で高度処理法導入施設での除去率を把握する必要があると予想されるため、実施施設を対象に実態調査を行い、実験によるウイルス挙動調査結果との関連性を検証した。実施施設における除去率の実態調査は、10 月から翌 2 月の間において実施した。また、A 下水処理場では下水の排除方式の一部が合流式であることから、降雨時における流入水量の増加がノロウイルスの除去率に及ぼす影響について調査した。

表-2 実施施設の運転条件

対象池		実施施設			
処理方法		凝集剤添加 活性汚泥法	A ² /O法	修正 Bardenpho 法	循環式硝化 脱窒法
流入水量 m^3 /日(1池)		9,200	9,800	10,000	7,500
【最初沈殿池】	滞留時間 hr	4.5	4.2	4.2	1.8
	水面積負荷 m^3/m^2	21	23	23	52
【反応槽】	反応槽容量 m^3	4,250	4,250	4,250	3,870
	反応槽滞留時間 hr	11.0	10.4	10.2	12.4
	嫌気槽滞留時間 hr	—	1.8	1.2	—
	無酸素槽滞留時間 hr	—	2.7	5.9	5.1
	好気槽滞留時間 hr	11.0	5.9	2.4	7.3
	再曝気槽滞留時間 hr	—	—	0.8	—
	平均MLSS mg/l	2,400	2,200	1,800	2,200
【最終沈殿池】	凝集剤添加 mol/mol	1.94	—	—	1.09
	滞留時間 hr	4.6	4.4	4.3	4.9
	水面積負荷 m^3/m^2	20	21	21	19

2.2.2 降雨時の合流式下水道越流水の汚染実態

さらに、実施施設におけるノロウイルスの挙動調査の一環として、降雨時の合流式下水道越流水の汚染実態を把握した。下水道の普及に早くから取り組んできた一部の自治体においては、下水と雨水の排除を同一の管渠で行う合流式下水道を採用している。合流式下水道は降雨時において、雨水量が増加し下水処理場において処理対応が困難になる場合には、未処理下水が合流式下水道越流堰から公共用水域へ排出される可能性がある。越流水が公共用水域の水質へ影響を及ぼす可能性についての報告はあるが、降雨時越流水のノロウイルスの汚染実態については十分把握がなされていない。今後、公共用水域のリスク評価を行う上で降雨時における越流水のノロウイルスの汚染実態を把握する必要があると考えられる。このため、降雨時に公共用水域へ排出された越流水とその越流水放流前後における河川水のノロウイルス濃度の実態調査を行った。調査対象箇所は B 市 B 河川、C 市 C 河川の各越流堰であり、10 月～翌 2 月の間の降雨時において、各河川へ放流された 2 ヶ所の越流水とその放流先河川水を採水しノロウイルスの汚染実態を把握した。

2.3 消毒方法によるウイルス不活化効果の推定

下水処理水放流先の公共用水域の衛生学的安全性を担保するため、多くの下水処理場では次亜塩素酸ナトリウム等により消毒を行っているが、近年、紫外線やオゾン消毒を導入する下水処理場も増加傾向にある。塩素耐性のあるクリプトスポリジウムを除けば、水系感染症の拡大に下水処理水が関与した事例は少ないと推定される。現状では、ノロウイルスは細胞培養法による感染性評価が困難なことから、消毒による不活化評価の実施が不可能である。このため、代替ウイルスを利用し細胞培養法などの評価とリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量から不活化効果を推定する事例もある。本実験では、下水処理水に存在しているノロウイルスを対象に、塩素、紫外線、オゾンによる不活化効果を推定するため、消毒 P.P.を利用してノロウイルス遺伝子の減少量を評価した。塩素消毒では注入濃度を 2、5mg/L、接触時間を 20 分間、紫外線は 60、150、530mWs/cm²、オゾン消毒は注入濃度を 3、6、8mg/L、接触時間を 15 分間

とし、各々消毒前後におけるノロウイルス遺伝子の減少量を把握した。下水道統計¹⁾によれば、塩素消毒を導入している下水処理場での平均注入濃度は、約2mg/L、接触時間は約20分間、紫外線は約30mWs/cm²、オゾンでは6mg-O₃/L、接触時間15分間であり、これらの濃度や時間を基準に実験を行った。

2.4 測定方法等

2.4.1 ノロウイルスの測定法

ノロウイルスの濃縮は、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を基本とした。PEG沈殿法は試料中にPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4M)を添加・攪拌し完全に溶解させた。4℃で1夜静置の後、10,000×Gで30分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣をRNase-free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイムPCR法により定量²⁾を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5μgをランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit(QIAGEN社)を用い全量20μLの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2μLをリアルタイムPCRに供した。ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」³⁾に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティクス社)を使用した。逆転写反応に使用する抽出RNA量はSpectrophotometer(NanoDrop社製)により定量した。

なお、ウイルス濃縮液をウイルス遺伝子抽出カラムに通水しノロウイルス遺伝子を捕捉させる際、抽出カラム1本あたりの濃縮試料の通水量は、SS負荷量を基準とし全ての測定試料で抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した。遺伝子抽出カラムへのSS負荷量が異なることでウイルス検出濃度に大きな影響を及ぼすため、SS負荷量を統一しないと検出濃度にバラツキが生じて精度の高い定量評価ができなくなるためである²⁾。

2.4.2 他の水質測定項目

ノロウイルス以外の水質測定項目は、水温、pH、濁度、SS、MLSS、MLVSS、大腸菌とした。大腸菌の測定法はクロモカルト培地による平板培養法とした。

3. 調査・実験結果

3.1 春・夏季における実下水を用いた実験による各種下水処理法や運転条件の違いによるウイルスの除去・不活化特性の把握

3.1.1 季節変動に伴う流入下水のノロウイルス濃度

平成21年5月から翌年の2月までの調査結果を図-1に示す。春季におけるG2濃度は、10⁷コピー/Lレベルで推移しており、冬季の感染流行期から比較すると若干の濃度低下があるものと考えられたが、高濃度の流入が維持されていた。その後、夏季に低下傾向が見られ秋季には10⁵コピー/Lレベルにまで低下したが、冬季には再び10⁸コピー/Lレベルにまで上昇した。夏季に流入下水のノロウイルス濃度が10⁵コピー/Lレベルにまで低下することで、処理水から安定した定量値が得られないため、冬季を含めた除去特性の把握が重要と考えられた。G1についてはG2と同様な傾向が示されているが、検出濃度はG2と比較して1~2オーダー程度低かった。ほぼ1年を通じた流入下水の濃度変動はG2で3オーダー程度、G1でも2オーダー程度の違いのあることが明らかとなった。併せて、A下水処理場の存在する県の衛生研究所がホームページ上で公表している胃腸炎患者数を整理したものを図-2~3に示す。胃腸炎患者の全てがノロウイルスに起因するものとは限らないが、冬季においてはノロウイルスによる感染事例の増加が報告されており⁴⁾、胃腸炎患者の多くはノロウイルスによるものと推定されることから、流入下水のノロウイルス濃度との関連性を評価した。定点あたりの胃腸炎患者数の推移については、対象地域のデータに若干のバラツキが見られるものの、その変動状況は県内および全国のデータと同じであった。また、定点あたりの胃腸炎患者数については、地域や時期の推移によっても大差がないことから、胃腸炎患者は広範囲かつ一定の割合で存在するものと考えられた。図-3に示した胃腸炎患者の割合は、胃腸炎患者数をその地域内あるいは県内の人口で除した割合であり、初夏から秋にかけては0.01%以下(1万人に1人以下)であったが、冬季から急激に上昇し春季までの間において0.01~0.04%の範囲内で推移している。これら定点あたりの胃腸炎患者数とその割合の変動状況は、流入下水のノロウイルス濃度の推移と酷似しており、密接な関連があるものと考えられた。

それらの関係をより明確にするため、定点あたりの胃腸炎患者数・割合と流入下水のノロウイルス濃度の関係を整理したものを図-4~7に示す。調査対象地域、県内ともにその胃腸炎患者数・割合と流入下水のノロウイルス濃度には相関関係があり、胃腸炎患者数の増加にともないノロウイルス濃度の上昇が認められた。特に、流入下水のG2濃度では

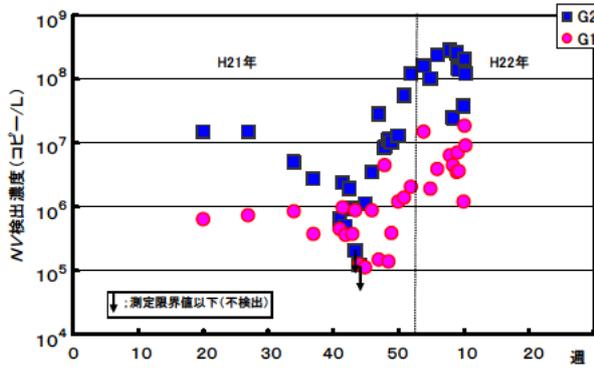


図-1 流入下水のNV濃度の推移

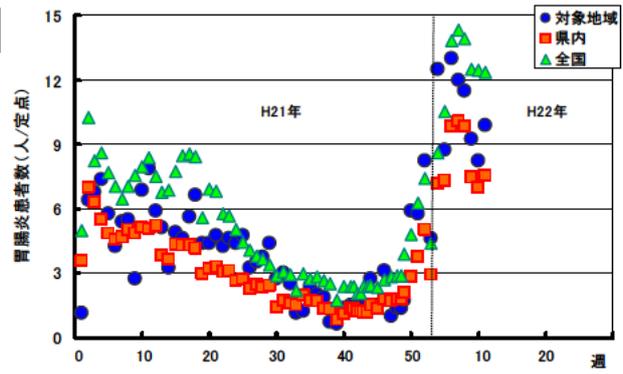


図-2 定点あたりの胃腸炎患者の推移

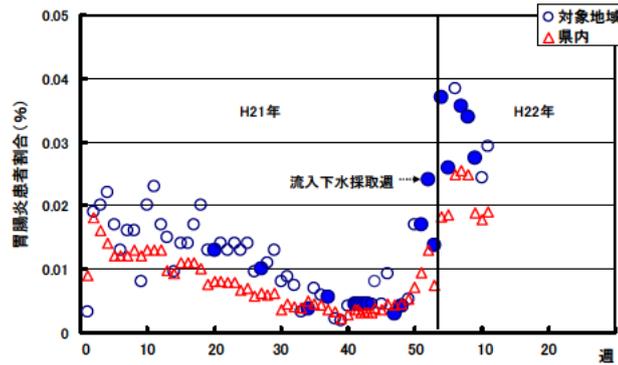


図-3 調査対象地域内での胃腸炎患者割合

高い相関関係が得られており、その検出濃度はG1よりも高濃度であることから、病原微生物検出情報⁴⁾で報告されているSRSVの検出状況の内訳を裏付けたものと考えられる。また、調査対象地域とそれを含む県内の胃腸炎患者数・割合は、ともに調査対象地域内にある下水処理場の流入下水のノロウイルス濃度との相関係数がほぼ同一であることから、胃腸炎患者は広範かつ一定の割合で存在するものと考えられた。一方、秋季における定点あたりの胃腸炎患者数は1人程度であることから、仮にノロウイルス感染者が下水処理区域内に認められなくても流入下水にノロウイルスが流入している可能性があり、不顕性感染者の存在が推定された。

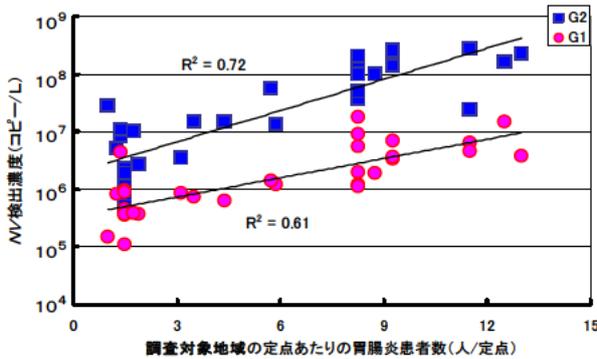


図-4 定点あたりの胃腸炎患者数と流入下水のNV濃度との関係

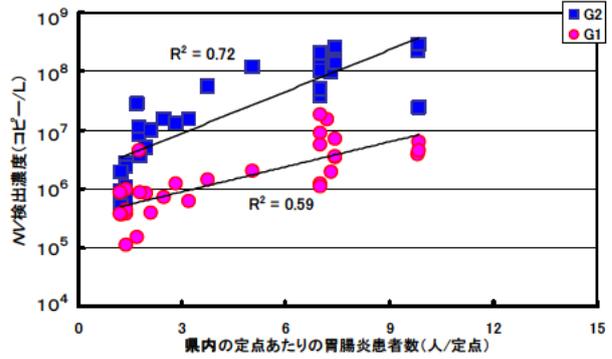


図-5 定点あたりの胃腸炎患者数と流入下水のNV濃度との関係

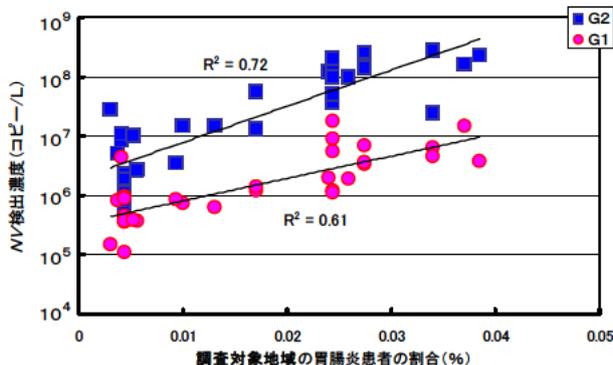


図-6 胃腸炎患者の割合と流入下水のNV濃度との関係

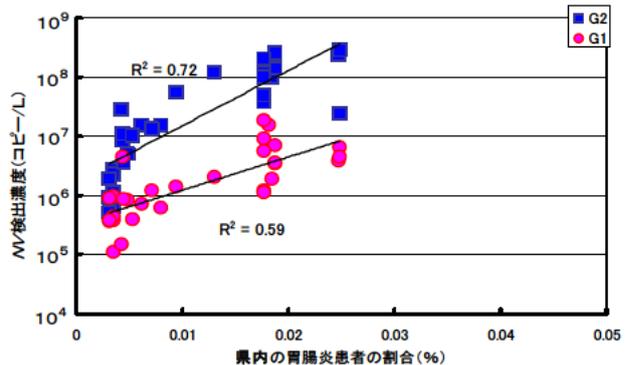


図-7 胃腸炎患者割合と流入下水のNV濃度との関係

3.1.2 実下水を用いた実験による各種下水処理法や運転条件の違いによるウイルスの除去・不活化特性の把握

PPを利用したノロウイルスの除去率の評価結果を図-8～11に示す。10月から翌1月下旬までに行ったケースIでのMLSS濃度の違いが除去率に及ぼす影響を評価した結果である。I系では設定MLSS濃度を1,000mg/L、II系は2,000mg/L、III系は3,000mg/Lとし実験を行った。10月初旬から馴致運転を行ったが、11月下旬にII、III系では設定したMLSS濃度に安定した。また、9、10月の流入下水のノロウイルス濃度は冬季と比較すると3オーダー程度検出レベルが低いため、各系列の処理水からノロウイルスの定量値が得られない状況であった。流入下水からは検出されていることから、処理水のノロウイルス濃度はゼロとは考えられないため、参考までにPCR反応tubeあたり1コピーと仮定し算出した濃度を検出限界値としてプロットした。MLSS濃度の安定域におけるI系の処理水濃度(検出限界値含)はG2が $10^4 \sim 10^6$ コピー/Lレベル、G1が $10^3 \sim 10^6$ コピー/Lレベル、II系ではG2が $10^3 \sim 10^6$ コピー/Lレベル、G1が $10^3 \sim 10^5$ コピー/Lレベル、III系はG2、G1ともに $10^3 \sim 10^5$ コピー/Lレベルとなっており、MLSS濃度が高まることで処理水のノロウイルス最大検出濃度が低くなっていた。また、MLSS濃度の安定域における平均除去率

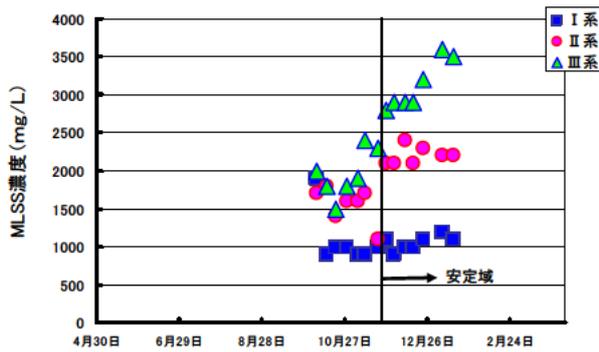


図-8 P.P.でのMLSS濃度の推移

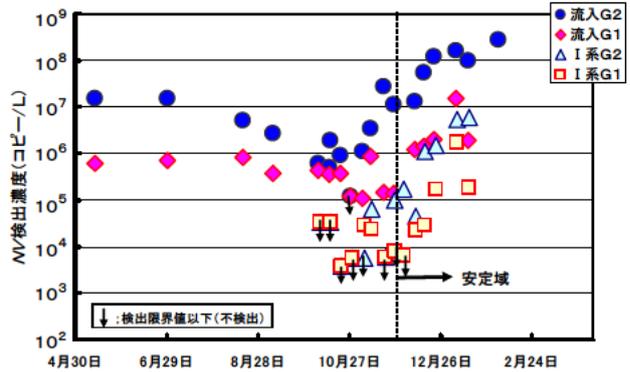


図-9 P.P. I系でのNV濃度の推移

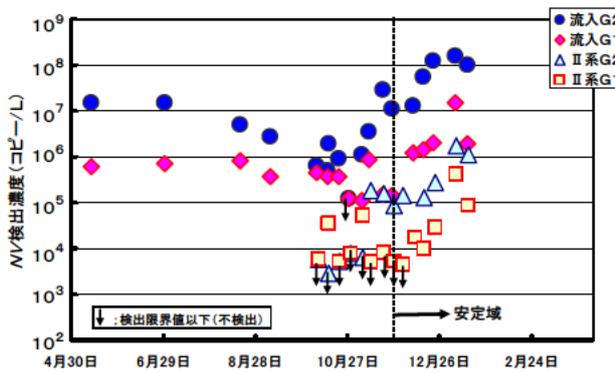


図-10 P.P. II系でのNV濃度の推移

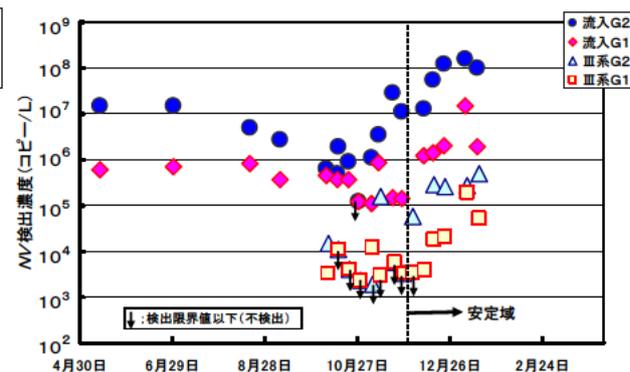


図-11 P.P. III系でのNV濃度の推移

を表-3に示したが、I系ではG2が1.8log、G1が1.3log、II系では同様に2.2log、1.7log、III系では2.5log、2.0logと整理され、MLSS濃度を高めることでノロウイルスの除去率を向上させられることが明らかとなった。また、設定MLSS濃度の安定域におけるMLSS濃度と除去率との関係を図-12に示したが、G2での評価においてはやや高い相関関係が得られた。MLSS濃度が2,000mg/L、曝気槽内のHRTが8時間での活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率はG2で1.9log、G1で1.4～1.6logであり⁵⁾、本実験結果で得られた回帰直線から推定した除去率と比較しても大差がない。なお、I～III系全ての除去率の評価において、活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率はG2がG1に比較して高かった。活性汚泥細菌から分離されたノロウイルス吸着タンパク質の特性を評価した研究事例では、GII.4とGI.1の間で、そのタンパク質に対する吸着能力の差があることが報告されている⁶⁾。G1、G2遺伝子群の違いにより外殻タンパク質のアミノ酸組成が異なると考えられるため、除去率に差が生じたものと推定された。

表-3 MLSS濃度とNV平均除去率

平均MLSS濃度 (mg/L)	G2除去率 (log)	G1除去率 (log)
1,100	1.8	1.3
2,200	2.2	1.7
3,100	2.5	2.0

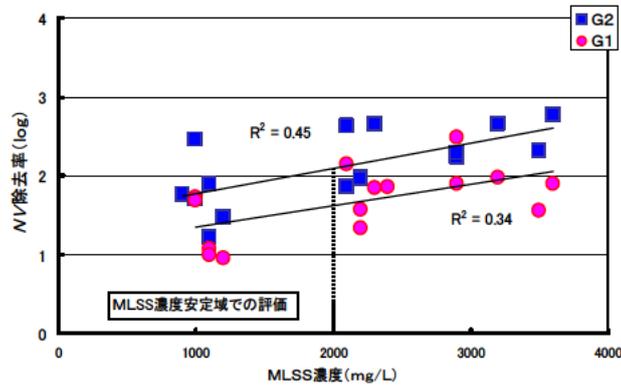


図-12 MLSS濃度とNV除去率との関係

次に、2月に行ったケースIIでのHRTの違いが除去率に及ぼす影響を評価した結果を図-13～16に示す。曝気槽の容量をI系では100L、II系200L、III系300L(流入水量調整含)と変えることでHRTの調整を行い、各々8、16、30時間とした。ケースIIの実験期間における流入下水のG2濃度は $10^7 \sim 10^8$ コピー/Lレベル、G1が $10^6 \sim 10^7$ コピー/Lレベルで各々推移しており、継続して高濃度のノロウイルスが流入していた。各系列の処理水ともG2検出濃度の多くは $10^5 \sim 10^6$ コピー/Lレベル、G1では $10^4 \sim 10^5$ コピー/Lレベルの範囲内で推移していたが、各々の系での平均除去率を表-4、図-16に示し整理するとI系ではG2が2.5log、G1が2.0log、II系は同様に2.6log、2.2log、III系は2.8log、2.3logとなり、HRTを長時間とすることでノロウイルスの除去率が向上した。HRTが長時間であるオキシデーションディッチ法による除去率も標準的な活性汚泥処理法と比較すると高い除去率が得られるという報告⁷⁾もあり、HRTを長時間とすることで活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率を高められるものと考えられた。

上記、パイロットプラントを利用したノロウイルスの除去率の評価では、MLSS濃度を高めることや曝気槽内のHRTを長時間とすることで、標準的な活性汚泥処理法と比較して除去率を向上させられることが明らかとなった。

表-4 曝気槽のHRTとNV平均除去率

曝気槽HRT	G2除去率 (log)	G1除去率 (log)
I系(8H)	2.5	2.0
II系(16H)	2.6	2.2
III系(30H)	2.8	2.3

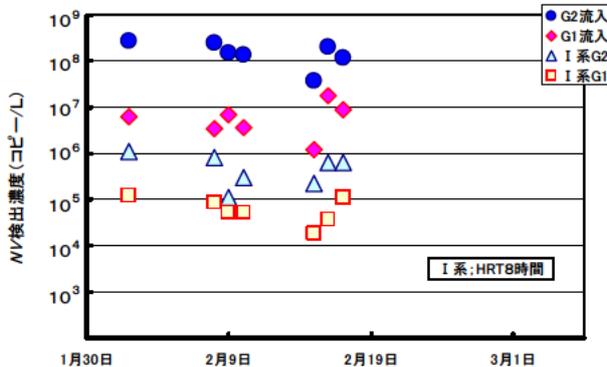


図-13 P. P. I系でのNV濃度の推移

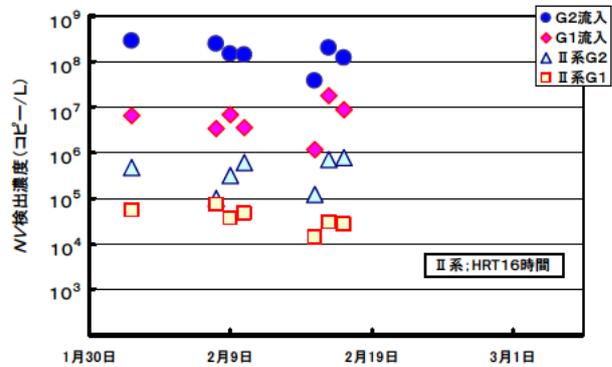


図-14 P. P. II系でのNV濃度の推移

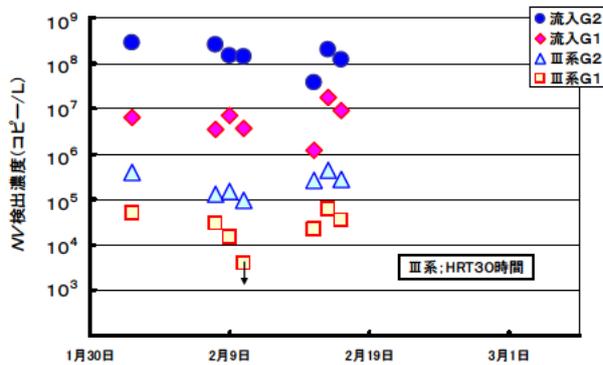


図-15 P. P. III系でのNV濃度の推移

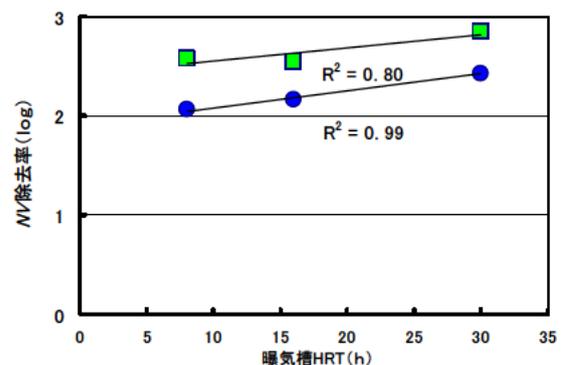


図-16 曝気槽HRTとNV除去率の関係

3.2 3.1の実験によるウイルスの挙動調査結果と、実際の下水処理施設における挙動との関連性の検証

3.2.1 実際の下水処理施設におけるノロウイルス除去率の評価

A下水処理場におけるノロウイルス除去率の評価結果を図-17~20および表-5に示す。A下水処理場では、りん・窒素の高度除去を目的に凝集剤添加活性汚泥処理法、A²/O法、修正Bardenpho法、循環式硝化脱窒法などの各種高度処理法により水処理が行われている。PPでの結果と同様に9~11月の流入下水のノロウイルス濃度は冬季と比較すると、最小の検出濃度レベルは3オーダー程度低いため、各処理系列の処理水からノロウイルスの定量値が得られない状況であった。流入下水からは検出されていることから、処理水のノロウイルス濃度はゼロとは考えられないため、参考までにPCR反応tubeあたり1コピーと仮定し算出した濃度を検出限界値としてプロットした。各処理系列の処理水の検出限界値は10²~10³コピー/Lレベルでありノロウイルスが処理水に存在していても、これらの濃度レベル以下であることが推定された。また、流入下水のノロウイルス濃度が10⁵~10⁶コピー/Lレベルであれば、処理水の濃度は検出限界値以下であることが明らかとなったが、今後、リスク評価をより確実なものとするため、検出限界値の向上手法を開発する必要があると考えられた。

一方、10月8日には降雨時における流入水量の増加がノロウイルスの除去率に及ぼす影響について調査した。最大時間降雨量は5mm、累積降雨量は約22mmであり、この時の流量は晴天時に比較して約1.7倍量と増加し、凝集剤添加活性汚泥法、A²/O法、循環式硝化脱窒法の各系列に水量負荷を高めた運転を行っていたため、各系列における滞留時間の短縮分を考慮し、処理水の採水を行いノロウイルス濃度を測定した。各系列の処理水とも検出限界値以下の評価であり、明確な傾向を把握することができなかった。また、その後の晴天時の調査でも10月における流入下水のノロウイルス濃度は低く、各系列の処理水の濃度は検出限界値以下であった。このため、限られたデータでの評価となるが、降雨による短期的な滞留時間の短縮はノロウイルスの除去率に及ぼす影響が少ないものと推定される。

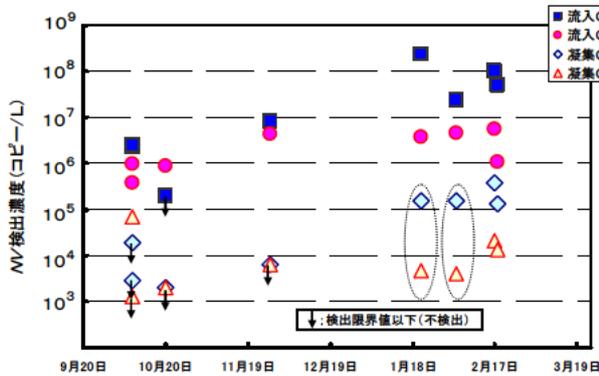


図-17 凝集剤添加活性汚泥のNV濃度の推移

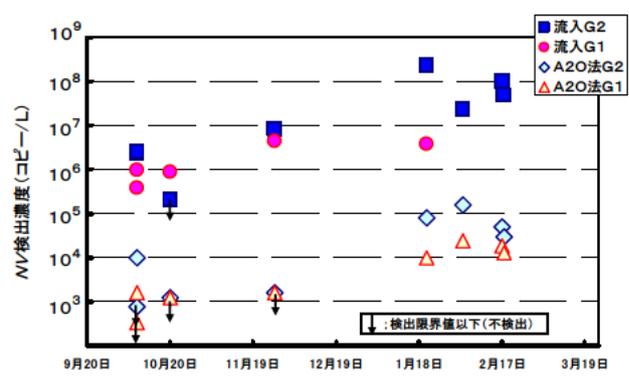


図-18 A2O法のNV濃度の推移

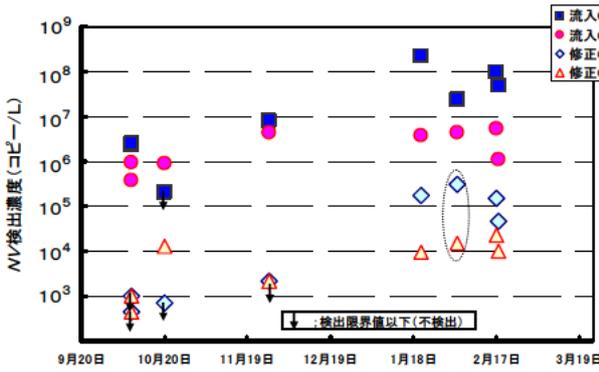


図-19 修正Bard.法のNV濃度の推移

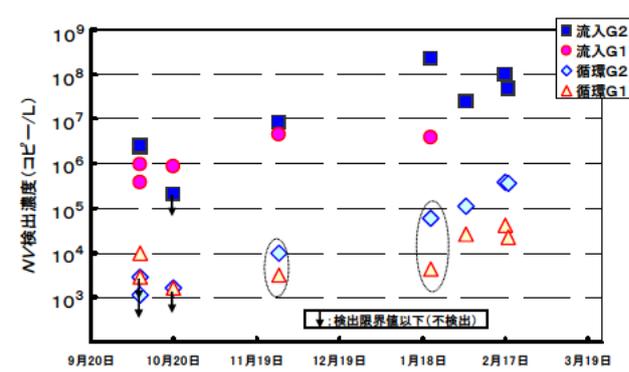


図-20 循環法のNV濃度の推移

表-5 実施設のNV平均除去率

実施設の水処理方式	実測値の評価		検出限界値含む評価	
	G2除去率 (log)	G1除去率 (log)	G2除去率 (log)	G1除去率 (log)
凝集剤添加活性汚泥法	2.5	1.8	2.8	2.1
A ² /O法	3.0	2.4	3.1	2.5
修正Bardenpho法	3.0	2.2	3.2	2.5
循環式硝化脱窒法	2.3	2.0	2.5	2.2

また、図中の点線で囲まれたデータは、流入水量の変動により実滞留時間と採水時間で若干のズレが生じたことから、参考値扱いとした。冬季の1～2月では流入下水のノロウイルス検出濃度はG1、G2で $10^7 \sim 10^8$ コピー/Lレベルであったことから、高濃度域での評価となり流入下水、処理水ともに安定した定量値が得られたものと考えられた。各種高度処理法によるノロウイルスの平均除去率は、凝集剤添加活性汚泥処理法ではG2が2.5log、G1が1.8log、検出限界値を含めた評価では各々2.8log以上、2.1log以上、同様にA²O法は3.0log、2.4log(3.1log以上、2.5log以上)、修正Bardenpho法は3.0log、2.2log(3.2log以上、2.5log以上)、循環式硝化脱窒法は2.3log、2.0log(2.5log以上、2.2log以上)、であり、標準的な活性汚泥処理法に比較して高度処理法の除去率は全体的に高いと考えられた。各処理水の検出濃度は秋季では検出限界値以下であったが、冬季の感染流行期による流入下水の濃度上昇により影響を受け定量値が得られた。凝集剤添加活性汚泥法による検出限界値を含めた除去率を除けば、各高度処理法のノロウイルス除去率は、昨年度の調査で得られた値とほぼ同一であり整合した結果であるものと考えられた。実施設における凝集剤添加活性汚泥法はりん除去を主目的としているため、Alの添加濃度としては4mg/L程度であり、昨年度に実施したP.P.での凝集剤添加活性汚泥法の5mg・Al/Lと実施設で除去率はともに2.5log程度と同一であった。しかし、本調査結果において検出限界値を含めた評価とすると、若干平均除去率が向上しておりG2で2.8log以上となった。昨年度と凝集剤の添加割合に変更はないが、曝気槽のHRTは約8時間から本調査時では約11～12時間となっており、除去率の変動要因としては曝気槽のHRTの長時間化にともなう凝集剤との接触効率が向上したことで除去率に違いが生じたものと推定された。しかし、データ数の少ない評価であることから、今後さらなる検証が必要であろう。各種高度処理法によるノロウイルスの平均の除去率は、活性汚泥処理法と比較して高いが、修正Bardenpho法と循環式硝化脱窒法では、反応槽のHRTがP.P.の8時間と比較すると1.5～2倍程度の長時間となっている。曝気槽内のHRTが長時間となることでノロウイルスの除去率が高くなることは本調査や他の調査結果でも報告されており⁵⁾、これらが1つの要因となり標準法と比較して除去率が高くなるものと推定された。また、A²O法においてもノロウイルスの除去率が高いが、MLSS濃度、反応槽滞留時間などは他の高度処理法と比較して大きく異なっているわけではない。反応槽のプロセスは嫌気・無酸素・好気槽であり、他のプロセスとは構成が異なる。凝集剤添加活性汚泥法を除けば各高度処理法とも昨年度と同様な除去率が得られていることから、これらの構成の違いがノロウイルスの除去効果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後、活性汚泥処理法の変法である高度処理法のプロセスの違いが除去率に及ぼす影響要因の解明が必要であると考えられた。

以上の結果から凝集剤添加活性汚泥処理法、A²O法、修正Bardenpho法などのりん・窒素の高度除去を目的とした高度処理法は、P.P.などを含めた標準活性汚泥処理法に比較して除去率が1～2オーダー高いことが明らかとなった。

Johan Nordgren⁸⁾のスウェーデンの下水処理場における調査例では、下水中のノロウイルス濃度は最大で 10^7 コピー/Lレベル、年間を通じての下水処理場での減少は0.9～2.7logと報告している。M.A.Laverick⁹⁾のイギリスでの調査例では、流入下水の最大検出濃度は、 1.8×10^6 コピー/100mL、下水二次処理プロセスでの減少は1～3logとしている。陶山¹⁰⁾はタイのバンコクにおいて流入下水中のノロウイルスを調査しており、最大濃度は 1.8×10^7 コピー/Lと報告している。原本¹¹⁾が行った都内の下水処理場での調査例では、流入下水中のノロウイルスG2の濃度は1,900PDU/mL、下水処理場での除去率は約2logとしている。これら既存の調査例における流入下水中のノロウイルス濃度は $10^6 \sim 10^7$ コピー/L、また、下水処理場での除去率は約1～3logと整理された。今回のP.P.での除去率は1～2log程度であり、3logには至っておらず若干の違いが見られた。また、感染流行期における流入下水のノロウイルス濃度レベルは若干高かった。

3.2.2 降雨時の合流式下水道越流水の調査結果

降雨時における合流式下水道越流水とその放流先B、C河川での調査結果を図-21～44に示す。各々の図は近郊の雨量観測所における累積降雨量と越流水、河川水のSS濃度・負荷量やノロウイルス濃度の推移を示したものである。ノロウイルス濃度の推移図における検出限界値以下の表記は、20 μ lのPCR反応tube系においてウイルスが定量されなかったデータであり、この場合には反応tubeあたり1コピーと仮定して算出したウイルス濃度をプロットしたものである。10月に実施した調査ではB河川流域の時間最大降雨量は7mm、累積降雨量は約50mmであった。時間最大降雨量の後に河川水のSS濃度・負荷量がピークに達し越流水のノロウイルス濃度も上昇しており、汚濁負荷の上昇過程でノロウイルスの検出濃度が高まるものと考えられた。しかし、越流水の検出濃度レベルは最大でも 10^5 コピー/Lレベルであるとともに、2試料のみの検出にとどまった。また、G1においては全ての試料で検出限界値以下となった。また、越流水が放流された河川水では全ての試料でG2、G1ともに検出限界値以下となっており、ノロウイルスが存在したとしても $10^3 \sim 10^4$ コピー/Lレベル以下であると推定された。次いで、同河川にて感染流行期の2月に実施した調査では、時間最大降雨量は各々4、6mm、累積降雨量は約16mmと42mmであった。ともに越流水のノロウイルス濃度、SS濃度の上昇に伴って河川水のノロウイルス濃度やSS濃度・負荷量が高まった。2月における2回の調査結果と

も降雨前における B 河川の水質は検出限界値の $10^3 \sim 10^4$ コピー/L レベル以下であったが、越流水の影響を受けることで最大検出濃度は G1 で 10^5 コピー/L レベル、G2 は 10^6 コピー/L レベルに達した。B 河川へ放流される合流式下水は、上記の A 下水処理場へ流入する下水の一部である。10 月下旬の流入下水の G2 濃度は $10^5 \sim 10^6$ コピー/L レベルであったが、翌 2 月には G2 濃度で 10^8 コピー/L レベル、G1 は 10^7 コピー/L レベルに上昇していることから、下水処理区域内の胃腸炎患者数の変動状況により流入下水や越流水のノロウイルス濃度が大きく影響を受けることが明らかとなった。

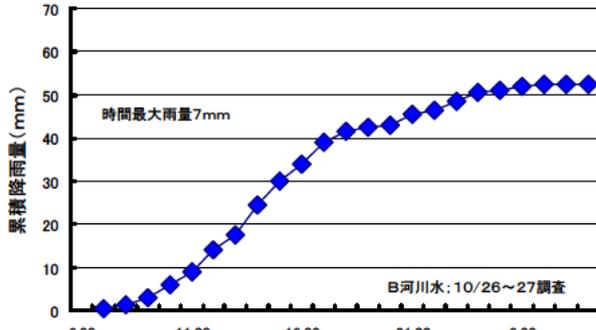


図-21 B河川流域での累積降雨量

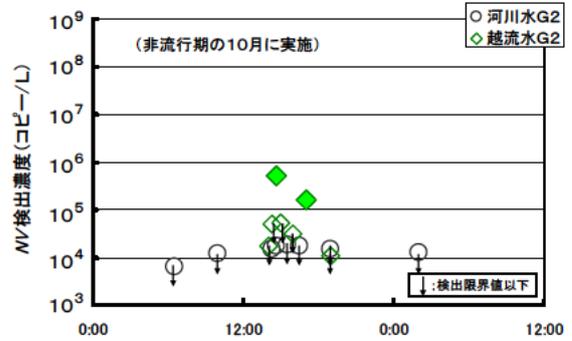


図-22 B河川水と越流水のNV濃度の推移

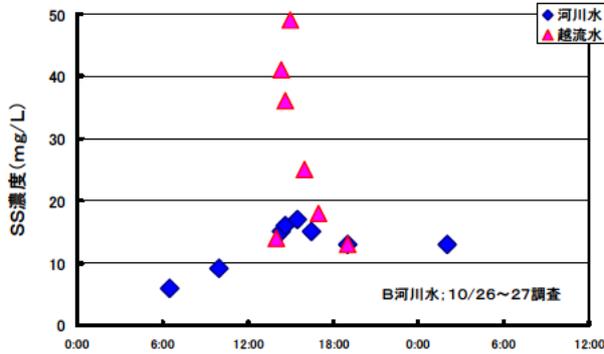


図-23 B河川水と越流水のSS濃度の推移

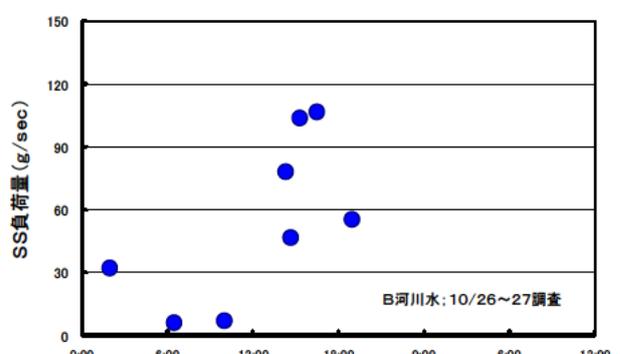


図-24 B河川水のSS負荷量の推移

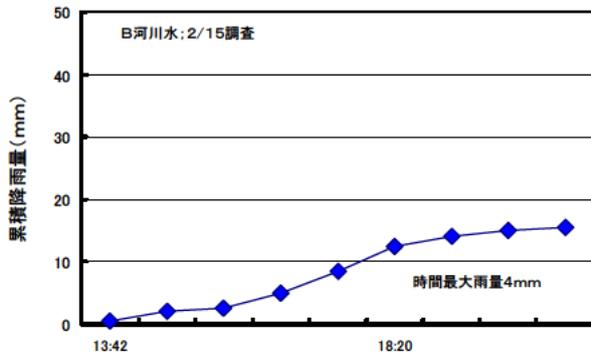


図-25 B河川流域での累積降雨量

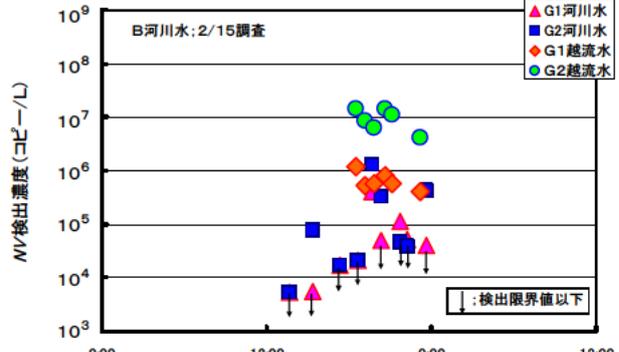


図-26 B河川水と越流水のNV濃度の推移

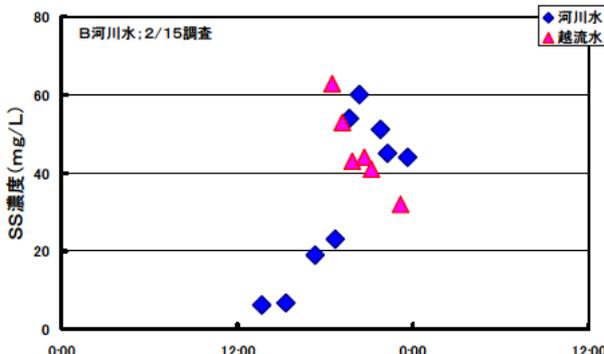


図-27 B河川水と越流水のSS濃度の推移

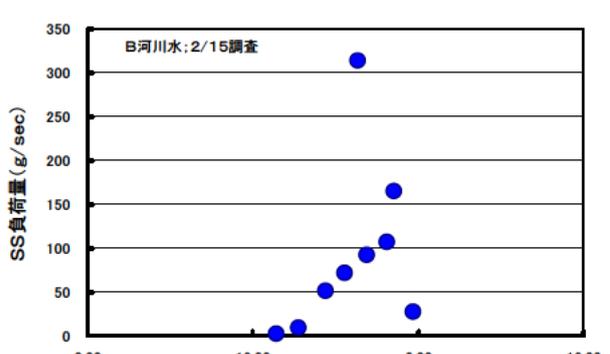


図-28 B河川水のSS負荷量の推移

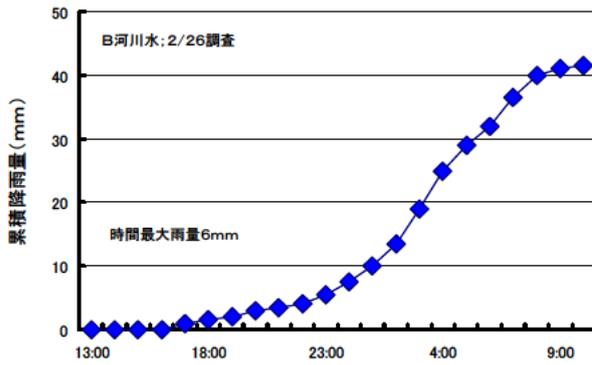


図-29 B河川流域での累積降雨量

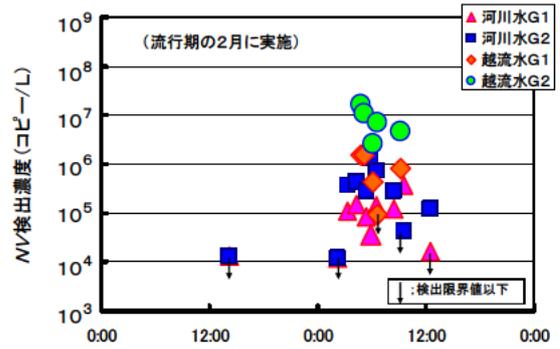


図-30 B河川水と越流水のNV濃度の推移

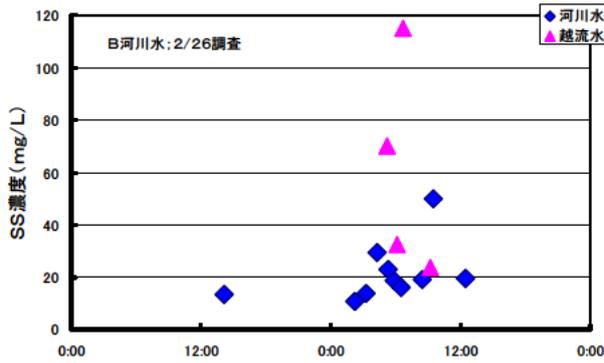


図-31 B河川水と越流水のSS濃度の推移

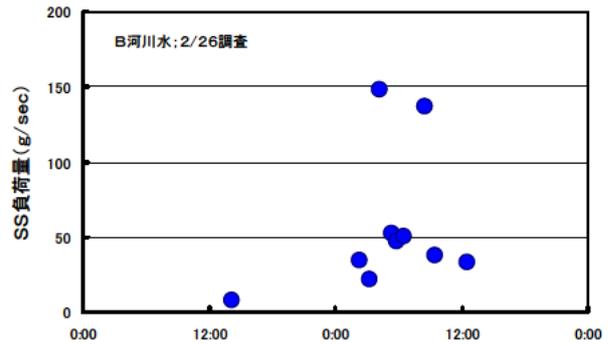


図-32 B河川水のSS負荷量の推移

C 河川での調査結果を図-33～44 に示す。11 月に実施した調査では C 河川流域の時間最大降雨量は 6mm、累積降雨量は約 50mm であった。1～2 時における時間最大降雨量の後に河川水の SS 濃度・負荷量がピークに達し越流水と河川水のノロウイルス濃度も上昇しており、B 河川と同様に汚濁負荷の上昇過程でノロウイルスの検出濃度が高まるものと考えられた。越流水の影響を受けることで河川水の G2 濃度も上昇しており、検出濃度は 10^6 コピー/L レベルにまで上昇した。その後雨水による希釈効果により越流水、河川水ともに検出濃度レベルは低下し、河川水試料は検出限界値以下となった。2 月の調査では、時間最大降雨量は各々 3.5mm、累積降雨量は約 30mm、10mm であった。2 回の調査ともに河川水の最大検出濃度は G2 が 10^7 コピー/L レベル、G1 は 10^6 コピー/L レベルに達し、B 河川での調査結果と同様に感染流行期には河川水に及ぼす越流水の影響が大きくなることが明らかとなった。しかし B 河川での調査結果と異なる傾向が見られ、河川水濃度に比較して越流水のノロウイルス濃度や SS 濃度が低かった。C 河川での採水箇所は、複数の越流堰が設置されている最下流部に位置しており降雨時には越流水の影響を受ける。採水を行った越流堰も最下流部に位置しており、雨水の希釈効果などの影響を受けた可能性も推定される。

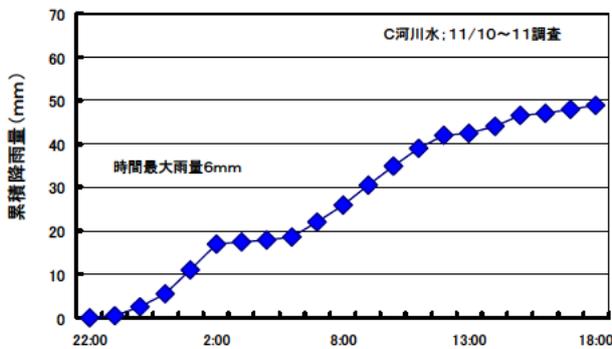


図-33 C河川流域での累積降雨量

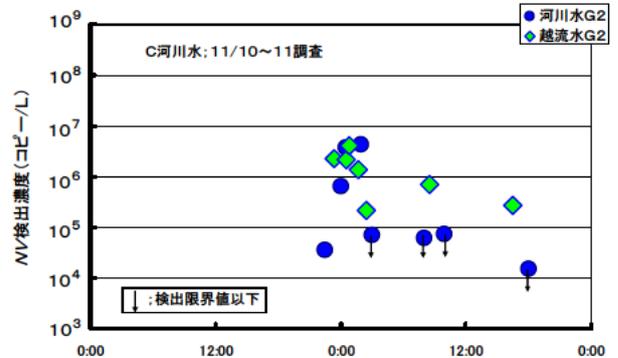


図-34 C河川水と越流水のNV濃度の推移

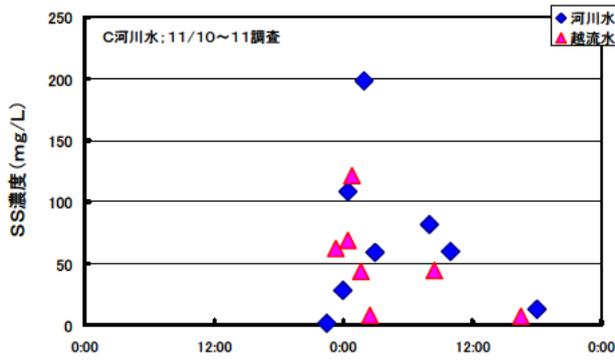


図-35 C河川水と越流水のSS濃度の推移

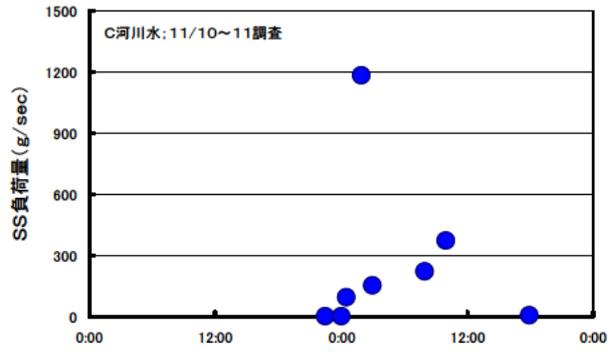


図-36 C河川水のSS負荷量の推移

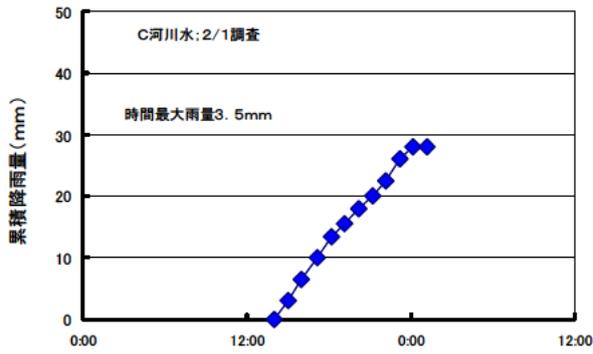


図-37 C河川流域での累積降雨量

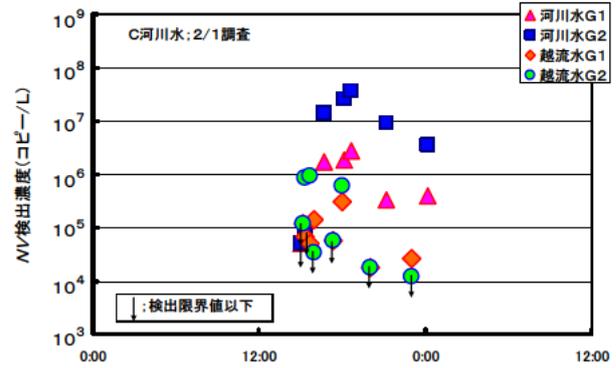


図-38 C河川水と越流水のNV濃度の推移

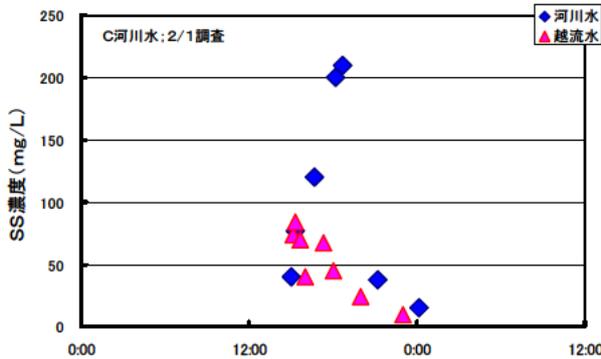


図-39 C河川水と越流水のSS濃度の推移

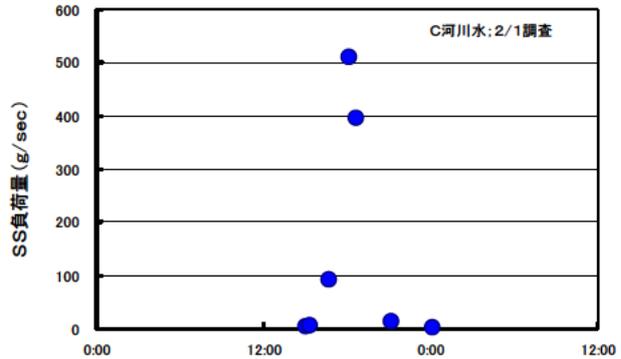


図-40 C河川水のSS負荷量の推移

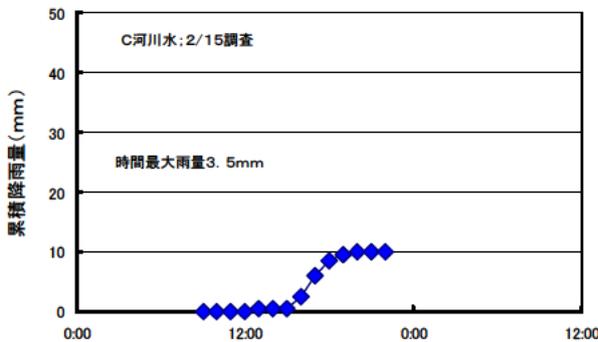


図-41 C河川流域での累積降雨量

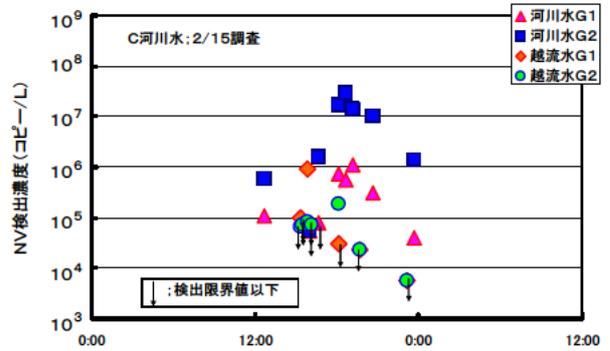


図-42 C河川と越流水のNV濃度の推移

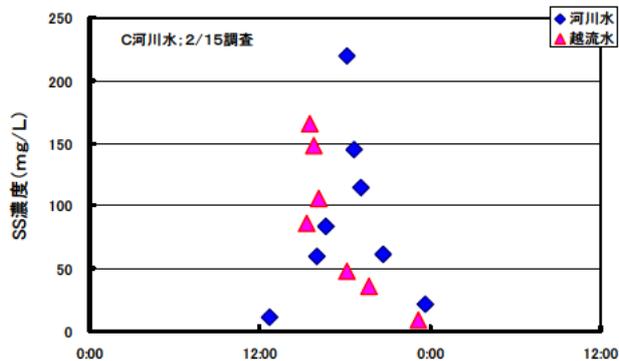


図-43 C河川水と越流水のSS濃度の推移

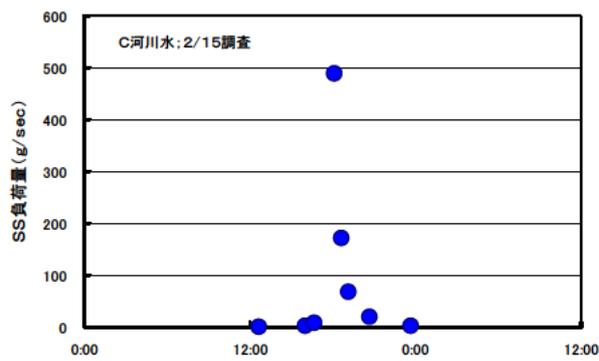


図-44 C河川水のSS負荷量の推移

本調査結果から合流式下水道の越流水には、ノロウイルスが存在していることが明らかとなったが、秋季の検出濃度は冬季の感染流行期と比較すると1~3オーダー程度低く、G1に関しては検出限界値以下の濃度であった。上記3.1の調査結果から、胃腸炎患者の流行状況により流入下水のノロウイルス濃度は変動すると考えられたが、合流式下水道越流水もその影響を受けることが明らかとなった。しかし、秋季と冬季で越流水のノロウイルス検出濃度に違いはあるが、河川水へ影響を及ぼしていることから、公共用水域におけるウイルス汚染の拡大を防止する上で、越流水対策は急務であると考えられた。

3.3 消毒方法によるウイルス不活化効果の推定

各種消毒によるノロウイルスの不活化効果を推定するための実験結果を図-45~47に示す。オゾン消毒では設定注入濃度を3、6、8mg/Lとし実験を行ったが、実際には3.2、6.4、8.0mg/Lとなった。実験には二時処理水を原水として利用し、高さ約4.5m、直径約0.2mの反応塔での接触時間が15分間となるよう原水を連続通水させた。この時の原水のSS濃度は1.4~2.5mg/Lの範囲であった。注入濃度が3.2mg-O₃/Lでは、ノロウイルス遺伝子減少量は0.2~0.4log程度であったが、注入濃度を高めることで減少量が大きくなった。図中の検出限界値データは、定量値が得られず不検出となったものであるが、PCR反応tubeあたり1コピーと仮定し算出した換算濃度をプロットしたものである。換算濃度から推定した遺伝子減少量は、注入濃度が8.0mg-O₃/Lの場合でG1が1.8log以上、G2で2.8log以上となった。

塩素消毒では注入濃度を2、5mg/L、接触時間を20分間とし、この時の原水のSS濃度は1.4~2.0mg/Lの範囲であった。G2濃度は不検出となり換算濃度から検出限界値をプロットした。G1、G2とも注入濃度を高めることで遺伝量の減少効果が見られたことから、一定の消毒効果があるものと考えられた。

紫外線消毒では原水のSS濃度は1.2~1.8mg/Lの範囲であった。約60mWs/cm²の照射線量ではウイルス遺伝子の減少量は認められなかったが、照射線量の増加とともにウイルス遺伝子減少量は大きくなる傾向が見られた。上記の各消毒法において、消毒強度を高めることでウイルス遺伝子の減少傾向が認められたことから、一定の不活化効果が得られているものと考えられた。

一方、消毒対象試料の有機物やSSの影響を極力回避した回分実験による塩素消毒と紫外線照射でのノロウイルス遺伝子減少量評価では、塩素消毒の場合Ct値が150mg・min/Lで0.1log程度、紫外線は50mWs/cm²で0.3logであることから¹²⁾、消毒方式が異なることにより遺伝子減少量に大きな違いがあるものと考えられた。しかし、上記の本実

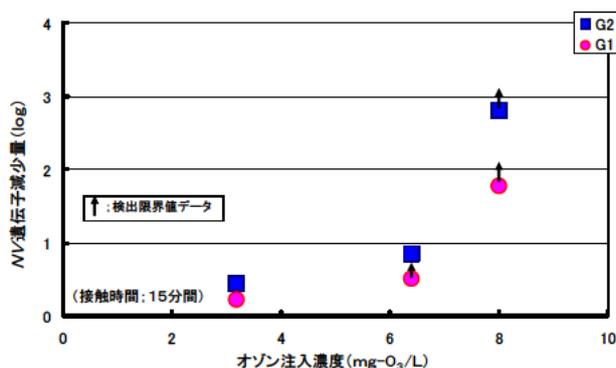


図-45 オゾン注入濃度とNV遺伝子減少量の関係

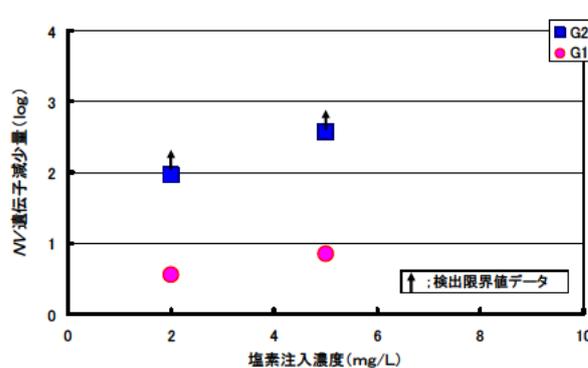


図-46 塩素注入濃度とNV遺伝子減少量の関係

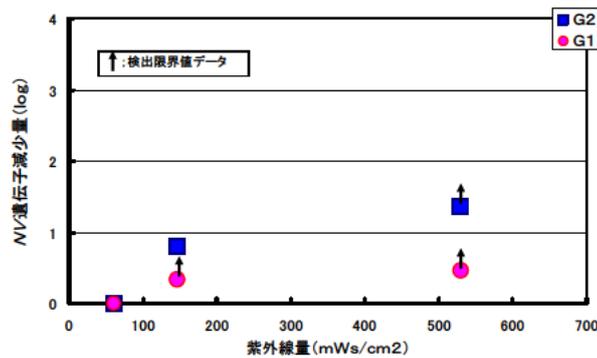


図-47 紫外線照射量とNV遺伝子減少量の関係

験結果とは乖離した結果であることから、データを蓄積し評価を行う必要があると考えられた。また、代替ウイルスとしてネコカリシウイルスを利用した同様な回分実験による評価では、塩素消毒の場合 Ct 値が 36~46mg・min/L で 3log、紫外線では 12~20mJ/cm² で 2~3log の不活化効果が得られており^{12) 13)}、ノロウイルスでも一定の不活化効果があるものと推定された。

4. まとめ

本調査では、まず春・夏季における実下水を用いた実験による各種下水処理方法および運転条件の違いによるウイルス除去・不活化特性の把握や、その結果と実際の下水処理施設における挙動との関連性を検証した。また、実際の下水処理施設におけるノロウイルスの挙動調査の一環として、降雨時の合流式下水道越流水の汚染実態を把握した。さらに、消毒方法によるウイルス不活化効果を推定するため、消毒前後におけるノロウイルス遺伝子の減少量を評価した。以下に得られた結果を示す。

- 1) 春・夏季においては、流入下水のノロウイルス濃度が冬季に比較して低下するため、下水処理による除去率の解明には冬季の感染流行期を含めた評価が必要であると考えられた。
- 2) ほぼ1年を通じた流入下水の濃度変動は G2 で 3 オーダー程度、G1 でも 2 オーダー程度の違いのあることが明らかとなった。最大検出濃度は G2 で 10⁸コピー/L レベル、G1 で 10⁷コピー/L レベルであった。
- 3) 定点あたりの胃腸炎患者数とその割合の変動状況は、流入下水のノロウイルス濃度の推移と酷似しており密接な関連があった。特に、定点あたりの胃腸炎患者数・割合と流入下水の G2 濃度には高い相関関係があることが明らかとなった。
- 4) MLSS 濃度を高めることや曝気槽の HRT を長時間とすることで、活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率を向上させられることが明らかとなった。
- 5) 標準的な活性汚泥処理法に比較して、りん・窒素の高度除去を目的とした各種高度処理法のノロウイルス除去率は、全体的に高いと考えられた。
- 6) 凝集剤添加活性汚泥法では曝気槽の HRT を長くすることで、凝集剤の添加効果が向上する可能性が示唆された。
- 7) 秋季における合流式下水道越流水の G2 検出濃度は冬季の感染流行期と比較すると 1~3 オーダー程度低く、胃腸炎患者の流行状況の影響を受けるものと考えられた。
- 8) 消毒強度を高めることでウイルス遺伝子の減少傾向が認められたことから、一定の不活化効果が得られているものと考えられた。

参考文献

- 1) (社) 日本下水道協会, 平成 16、18、19 年度下水道統計。
- 2) 諏訪守, 岡本誠一郎, 尾崎正明, 陶山明子 (2009) 下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響, 下水道協会誌論文集, 46(561), 91-101.
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課(2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター病原微生物検出情報。
- 5) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介 (2009) 各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題, 第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 239-240.
- 6) 和田圭史, 今井崇博, 佐野大輔, 大村達夫 (2007) 活性汚泥細菌から分離されたノロウイルス吸着タンパク質 (Norovirus-Binding Proteines : NoVBPs) の特性評価, 水環境学会誌, Vol.30, No.12, pp.731-736.

- 7) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介, ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子, 下水道協会誌論文集, 47(571),103-111.
- 8) Johan Nordgren et al.(2007) Norovirus in the wastewater treatment process, 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology.
- 9) M.A.Laverick et al. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage, Letters in Applied Microbiology, 39,127-136.
- 10) 陶山明子、諏訪守、尾崎正明 (2006)、タイにおける病原微生物の定量とラグーンによる除去特性、第 43 回下水道研究発表会講演集,896-898.
- 11) 原本英司、片山浩之 他 (2005)、下水処理場におけるノロウイルスの季節変動の調査、日本ウイルス学会学術集会講演集、311.
- 12) 土木研究所資料 (2008)、平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集.
- 13) 土木研究所資料 (2007)、平成 19 年度下水道関係調査研究年次報告書集.

流域規模での水・物質循環管理支援モデルに関する研究（3）

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：岡本誠一郎、山下洋正

【要旨】

流域開発で必須元素の河川への供給が減少し水生生態系へ影響しているとの懸念があることから、都市雨水・排水由来の必須元素の負荷量の解明および河川への影響把握と対策の可能性の検討を目標として、溶解性の鉄およびケイ素の化学種分析法の検討を行った。溶解性鉄については、非イオン性樹脂およびメンブレンフィルターにより分画して誘導結合プラズマ質量分析を行う方法を検討し、溶解性鉄の存在形態を把握した。フミン標準試料を用いた検討では、溶解性鉄は主として疎水性酸および親水性物質に存在し、分子量 10 万以下の形態で存在していた。pH7 で吸着する疎水性酸では有機物あたりの鉄濃度が大であった。溶解性ケイ素については、イオン交換樹脂で分離濃縮し、さらに蒸発濃縮してから高速原子衝突質量分析を行う方法を採用し、シリカイオンの質量スペクトルを把握した。

キーワード：溶解性鉄、溶解性ケイ素、シリカ、河川、都市排水、都市雨水

1. はじめに

近年、流域での開発により溶解性の鉄（フミン鉄）やケイ素（シリカ）等の必須元素の河川への供給が減少して、河川や海の生態系に影響を及ぼしているとの報告¹⁾～³⁾が見られる。都市化した流域では、都市雨水・排水が必須元素の挙動に大きな影響を与えている可能性があるため、その影響を明らかにすることが求められている。

そこで、研究の達成目標を次の通り設定し、都市河川流域における溶解性の鉄およびケイ素の挙動を把握するため、溶解性の鉄およびケイ素の化学種分析法の開発を行うとともに、関東地方の都市影響河川の流域において都市雨水の水質を調査した。

- (1) 都市雨水・排水由来の必須元素の負荷量の解明
- (2) 河川への影響把握と対策の可能性の検討

2. 調査方法

2.1 調査対象物質

調査対象物質は、前年度と同様に溶解性の鉄およびケイ素（イオン状シリカ）とした。

溶解性の鉄は、表流水中では主にフミン物質等の有機物と錯体を形成してコロイド状で存在する（フミン鉄）と考えられているが⁴⁾、フミン物質は不定形の高分子物質であり分子量も一定ではないため、溶解性鉄と結合している有機物の分子量その他の特性および生物利用性との関連性については知見が少ない。

また、溶解性のケイ素は、表流水中では主にイオン状シリカとして存在しており、 $\text{Si}(\text{OH})_4^-$ の多量体であると考えられているが、その組成および生物利用性との関連については知見が少ない。

そこで、これらの不明な点を明らかにし、水生生態系への影響を把握するために調査を行った。

2.2 化学種分析法の開発

水試料中の溶解性鉄および溶解性ケイ素の化学種分析法を開発するため、次の通り検討を行った。

(1) 溶解性鉄

溶解性鉄について、前年度は、GPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）による分画を用いた分析方法を開発した。

本方法の利点としては、前処理がろ過のみであり鉄の存在形態に及ぼす影響が少ないこと、連続的なクロマトデータが得られて詳細な分子量分布が把握できること等が挙げられた。

一方、課題としては、RI（示差屈折率）やUV（紫外線吸光度）のピークとDOC濃度（フミン物質等の有機物の指標）、Fe濃度が対応しないことが多く、ピーク位置の物質の性状が不明であったこと、また、GPC分画後にICP-MSによるFe測定（ICP-MS）を行うためには、10回程度分取を行う必要があり、時間・労力がかかったこと等が挙げられた。

これらの課題への対応方策として、今年度は、フミン

物質の化学的特性（疎水性酸）を利用したイオン交換樹脂による分画と、フミン物質の物理的特性（分子量サイズ）を利用したメンブレンフィルターによる分画について検討した。

具体的には、フミン標準物質（Aldrich 社製）について、非イオン性樹脂を用いた分画を行い、疎水性・親水性、酸性・塩基性の化学的特性に応じて分離した。また、メンブレンフィルターを用いた分画を行い、分子量に応じて分離した。

分画した試料は、紫外線吸光度（UV）および溶解性有機炭素濃度（DOC）を測定するとともに、鉄濃度を誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）により測定した。

詳細な分析手順は次の通りである。

1) 非イオン性樹脂による分画

非イオン性樹脂（DAX-8, Supelco 社製）を用いて溶解性有機物の分画を行った。DAX-8 はアクリル系でマクロ構造を有する樹脂であり、予備洗浄を行って使用した。

(a) 洗浄

洗浄方法として、約 20mL の樹脂を 100mL の PP 製容器に移し、0.1M NaOH に一晩浸漬した。この操作を連続 5 日間行った。その後、さらに、超純水、0.1M HCl、超純水、メタノール、アセトニトリル、メタノール、超純水の順に各 50mL×2 回の浸漬洗浄を行った。

(b) 分画

このように洗浄した非イオン性樹脂を用いて図-1 に示す手順で分析を行った。

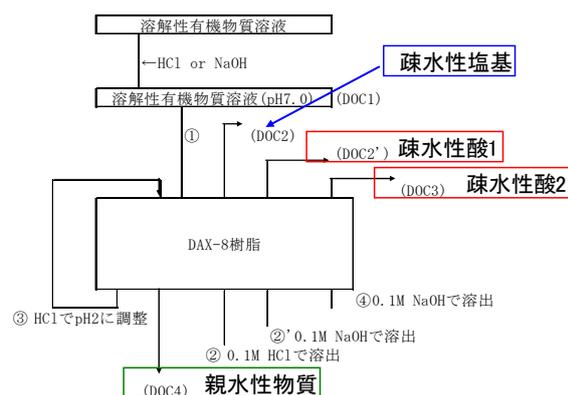


図-1 非イオン性樹脂による溶解性有機物の分画

①あらかじめ pH7 に調整した溶解性有機物質溶液（DOC1）を通液した。通液後の樹脂に対し、②0.1M HCl で溶出して分取（DOC2：疎水性塩基）、②' 0.1M NaOH で溶出して分取した（DOC2'：疎水性酸1）。③樹脂通過液（①）を HCl で pH2 に調整してから、再び樹脂に通

液して通過液を分取した（DOC4：親水性物質）。④通液後の樹脂に対して、0.1M NaOH で溶出して溶出液を分取した（DOC3：疎水性酸2）。

本方法は、文献例を参考に一部改変したものである。使用する樹脂を XAD-7 から DAX-8 に変更し（製造中止のため）、操作手順に②' を追加している（疎水性酸を2種類に区別するため）。

2) メンブレンフィルターによる分画

分画分子量（MWC0）100,000 のメンブレンフィルター（Vivaspin 20, Sartorius 社製）を用いて、溶解性有機物の分画を行った。メンブレンフィルターは予備洗浄を行って使用した。

(a) 洗浄

メンブレンフィルターに希硝酸溶液 20mL を通水し、さらにミリ Q 水（超純水）20mL を通水して洗浄した。

(b) 分画

溶解性有機物質溶液 20mL をメンブレンフィルターに通水し、通過液を分取した。

3) ICP-MS による測定

分取した試料について、高周波誘導結合プラズマ質量分析計（ICP/MS, X7CCCT サーモフィッシャーサイエンティフィック製）により鉄濃度を分析した。

(2) 溶解性ケイ素

溶解性ケイ素について、前年度は、非シリカベースのイオン交換樹脂カラムを用いた固相抽出によるシリカイオンの分離濃縮の前処理と FAB-MS（高速原子衝突質量分析）を組み合わせた、溶解性ケイ素分析方法を開発した。

本方法の利点としては、前処理でシリカイオン（溶解性無機ケイ素の主体）の濃度を高めるとともに、妨害イオン（他の陽イオン・陰イオン）を低減できることが挙げられた。

一方、課題としては、FAB-MS 測定において、イオン交換樹脂からの溶出に用いる NaOH 由来のピークが、シリカイオンのピーク出現位置にかぶるため妨害となることが挙げられた。また、イオン交換樹脂の交換容量の制約により、溶出液のシリカイオン濃度に上限があり、FAB-MS 測定に適したシリカイオン濃度まで濃縮できない場合があること、シリカイオン/NaOH 濃度比を高くできないこと等が挙げられた。

これらの課題への対応方策として、今年度は、イオン交換樹脂によるシリカイオンの分離濃縮後に、さらにエバポレーターで蒸発濃縮して、シリカイオン濃度を高める方法を検討することとした。しかしこの場合、蒸発濃

縮により NaOH 濃度も同様に高まってしまうことから、イオン交換樹脂からの溶出に用いる NaOH 溶液濃度を低くして、シリカイオン/NaOH 濃度比を高める方法についても検討した。

具体的には、溶解性ケイ素の標準試料（試薬）を用いて、高速原子衝突質量分析法（FAB-MS）により、 $\text{Si}(\text{OH})_4^-$ の多量体の質量スペクトルの分析を行った。

詳細な分析手順は次の通りである。

1) イオン交換樹脂による精製・濃縮

イオン交換樹脂（MC-1, MA-1, MA-2, GL サイエンス製）を用いて溶解性有機物の分画を行った。イオン交換樹脂は予備洗浄を行って使用した。

(a) 洗浄

イオン交換樹脂カラムは、メタノール 10mL×2 回、0.1mol/L HCl（陽イオンカラムの場合）または 0.1mol/L NaOH（陰イオンカラムの場合）10mL の順番で洗浄し、超純水で置換した。非シリカベースの樹脂であるため、樹脂由来の溶解性ケイ素の溶出は問題とならなかった。

(b) 精製・濃縮

イオン交換樹脂カラムを用いた固相抽出では、5 種 C ろ紙（孔径 1 μm 相当）でろ過した試料を次の通り 3 種類のカラムで処理して、溶解性ケイ素の精製・濃縮を行った。

実際の濃縮倍率は約 40 倍であったが、低濃度の試料の場合は通液量を増やすことで濃縮倍率を高くすることが原理的には可能であった。イオン交換樹脂の単位体積あたりで吸着可能な最大のイオン量（飽和量）は決まっており、保持されたイオンを効果的に溶出するためには樹脂体積の 2 倍程度の溶出液量が必要であることから、溶出液の溶解性ケイ素濃度には上限が存在した。

(i) 強陽イオン交換樹脂カラム（MC-1）に通過させ、陽イオンの除去を行い、通過液を得た。

(ii) 弱陰イオン交換樹脂カラム（MA-2）に通過させ、強陰イオン（Cl⁻ 等）の除去を行い、通過液を得た。

(iii) 強陰イオン交換樹脂カラム（MA-1）に通過させ、溶解性ケイ素をカラムに吸着させ、水酸化ナトリウム（NaOH）水溶液で溶出した。この溶出に用いる NaOH 溶液の濃度（通常は 1M）を変化させて最適な条件を検討した。

2) ロータリーエバポレーターによる蒸発濃縮

イオン交換樹脂からの溶出液約 4mL をロータリーエバポレーターにて蒸発濃縮させ、約 1mL の濃縮液を得た（濃縮倍率 4 倍程度）。濃縮しない試料も別途作成して、比較を行った。

3) FAB-MS による質量分析

精製・濃縮した溶解性ケイ素試料を、Tanaka ら⁶⁾の方法に準じて、FAB-MS により分析した。試料の導入は、直接導入ポートより行った。ステンレス製の測定ターゲットに試料及びマトリクス（グリセリン）をよく混合して塗布し、Xe の中性原子を高速で衝突させることにより、試料中の $\text{Si}(\text{OH})_4^-$ の多量体イオンを放出させた。これを逆配置二重収束型の質量分析部へ導入し、質量スペクトルを得た。

4) 検討条件

精製・濃縮に影響を及ぼす制御因子について検討するために、表-1 に示した通り、精製・濃縮方法については 2 水準（イオン交換樹脂による分離濃縮、同左+エバポレーター蒸発濃縮）、イオン交換樹脂に保持した溶解性ケイ素の溶出に用いる NaOH 溶液濃度については 3 水準（低濃度：0.1M、中濃度：0.25M、高濃度：1M）を設定し、操作ブランク（バックグラウンド）との比較のために Si 濃度も 2 水準（0mg/L：超純水、15mg/L：標準試料）を設定して、合計 3 因子について実験を行った。

表-1 溶解性ケイ素の精製・濃縮の制御因子

No.	因子	A	B	C
1	精製・濃縮方法	イオン交換樹脂のみ	イオン交換樹脂→ロータリーエバポレーター濃縮	
2	イオン交換溶出の NaOH 濃度	0.1M	0.25M	1M
3	Si 濃度	0 mg/L	15 mg/L	

これらの条件を、表-2 に示す通り実験に割り付けて検討を行った。

表-2 溶解性ケイ素の精製・濃縮の制御因子

Run No.	因子		
	濃縮精製方法	NaOH 濃度	Si 濃度
1	A	A	A
2	A	A	B
3	A	B	A
4	A	B	B
5	A	C	A
6	A	C	B
7	B	A	A
8	B	A	B
9	B	B	A
10	B	B	B
11	B	C	A
12	B	C	B
13	G + 0.1M NaOH blank		
14	G + 0.25M NaOH blank		
15	G + 1M NaOH blank		
16	G blank		

G: グリセリン, blank: ブランク試料, 測定溶液/グリセリン体積比=1/5

(3) 元素分析その他

化学種分析の他に、ICP-MS により試料全体の溶解性鉄（D-Fe）および全鉄（T-Fe）を測定し、ICP-AES（誘導結合ブ

ラズマ発光分光分析) により溶解性ケイ素(D-Si)を測定した。溶解性の定義は、5種Cろ紙(孔径1 μ m相当)を通過するものとした。

3. 結果および考察

結果および考察は調査対象物質ごとに記述した。

3.1 溶解性鉄について

(1) 化学種の分析

溶解性鉄の分画方法の検討のため、フミン標準物質を用いて、非イオン性樹脂を用いた2通りの分画を行い、疎水性・親水性、酸性・塩基性の化学的特性に応じて分離した。

各分画の溶解性鉄濃度を図-2に示し、DOC濃度を図-3に示した。

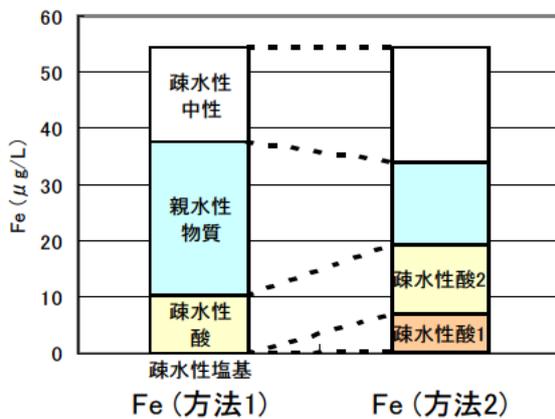


図-2 溶解性鉄の非イオン性樹脂による分画
(試料はフミン標準物質、)

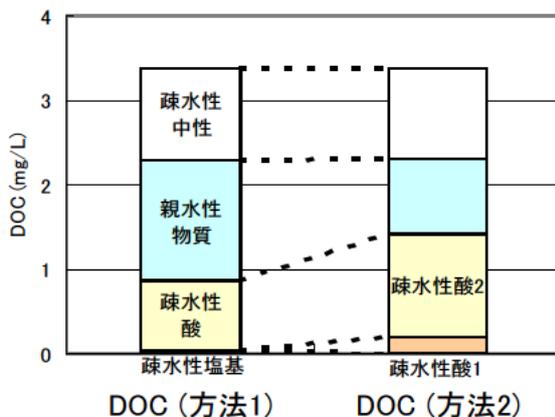


図-3 溶解性有機炭素の非イオン性樹脂による分画
(試料はフミン標準物質)

結果、溶解性の鉄・有機炭素の存在割合が、方法1(pH2で通液・NaOH溶出)と方法2(pH7で通液・NaOH溶出+方法1)とは異なっていた。鉄・有機炭素ともに、方法1では疎水性塩基<疎水性酸<親水性物質であったが、方法2では疎水性塩基<親水性物質<疎水性酸1+2であり、方法2では親水性物質がより少なく、疎水性酸が多くなっていた。疎水性塩基がきわめて少ないことは共通した傾向であった。

方法2では疎水性酸を2通りに区別している点が、方法1と異なる。pH7で通液後にNaOHで溶出した疎水性酸1と、その後にpH2で再度通液してからNaOHで溶出した疎水性酸2をあわせると、方法1で得られた疎水性酸と一致すると想定したが、溶解性の鉄および有機炭素のどちらの場合も一致せず、疎水性酸(方法1)<疎水性酸(1+2)であった。方法2では疎水性酸の割合が増えた分、親水性物質の割合が減っている傾向が見られた。

その理由としては、pH7で通液して吸着された物質がNaOHで一度溶出されることで、樹脂の吸着能力が回復し、pH2で通液した際に、より多くの物質を吸着することが可能となったためと考えられた。その結果、最後まで樹脂に吸着されずに親水性物質とみなされる成分が減少したものと推測された。

各分画の溶解性の鉄と有機炭素の濃度比(Fe/DOC)の比較を図-4に示した。ここで、疎水性塩基については存在量がきわめて小さいため誤差の影響が大きいため計算対象としなかった。

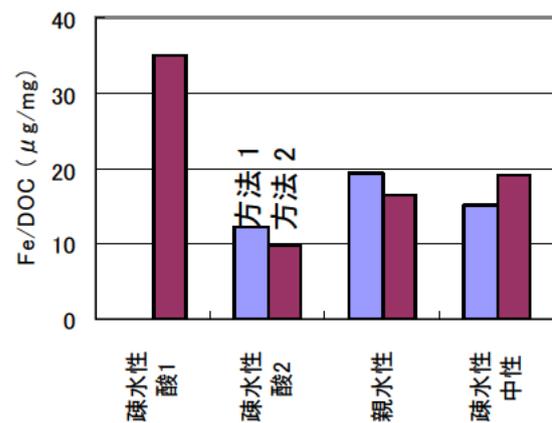


図-4 溶解性鉄/有機炭素比の分画による違い
(方法1の疎水性酸2は疎水性酸全体を指す)

同図より、疎水性酸2、親水性物質および疎水性中性物質の分画では、Fe/DOCはほぼ同等であり、方法1と方法2では類似の物質が分画されているものと考えられた。

疎水性酸1は疎水性酸2よりもFe/DOCが約3倍高くなっており、pH7で吸着してNaOHで溶出する疎水性酸1は、有機物あたりの鉄の存在量が大きかった。

pH7で吸着する物質は、pH2でも吸着するはずであり、方法1の疎水性酸(図では疎水性酸2の位置)にも疎水性酸1に相当する物質が含まれているはずであるが、疎水性酸1の存在量が疎水性酸2よりかなり小さいため、全体としては疎水性酸2に近い特性が見られていた。

以上より、溶解性鉄が溶解性有機物質と結合した複合体について、主として次の3種類に分類することができた。

- (i) 疎水性酸1-pH7でDAX-8に吸着し、NaOHで溶出(弱酸性物質か)
- (ii) 疎水性酸2-pH7では吸着しないがpH2でDAX-8に吸着し、NaOHで溶出(強酸性物質か)
- (iii) 親水性物質-pH条件によらずDAX-8に吸着しない

溶解性鉄の存在比率では(ii) > (iii) > (i)であったが、溶解性鉄/DOC比では(i)が最大であったことから、有機物あたりの鉄含有量は疎水性酸1が最大ということになる。

またメンブレンフィルターによる分子量分画では、分画分子量(MWCO)100,000を用いた場合、溶解性の鉄および有機炭素のほとんどが通過液中に存在していた。従って、分子量で分画するためには、より分画分子量が小さいフィルターを使用する必要があると考えられた。

今後は、河川水試料等の環境試料について、同様の分画を行ってその特性を把握するとともに、生物利用可能性についても検討を行う必要がある。

3.2 溶解性ケイ素について

(1) 化学種の分析について

溶解性ケイ素のFAB-MS分析における前処理方法の改良のため、溶解性ケイ素の標準試料(試薬)を用いて、濃縮・精製方法(イオン交換樹脂による分離濃縮、同左+エバポレーター蒸発濃縮、の2水準)およびイオン交換樹脂に保持した溶解性ケイ素の溶出に用いるNaOH溶液濃度(低濃度:0.1M、中濃度:0.25M、高濃度:1M、の3水準)の2種類の制御因子について最適化検討を行った。

それぞれの条件で前処理した試料のFAB-MSによる測定結果の例として、 $m/z=299$ ($\text{Si}_3(\text{OH})_2\text{O}_7\text{Na}_3^-$)付近を図-5に、 $m/z=321$ ($\text{Si}_3(\text{OH})\text{O}_8\text{Na}_4^-$)付近を図-6にそれぞれ示した。

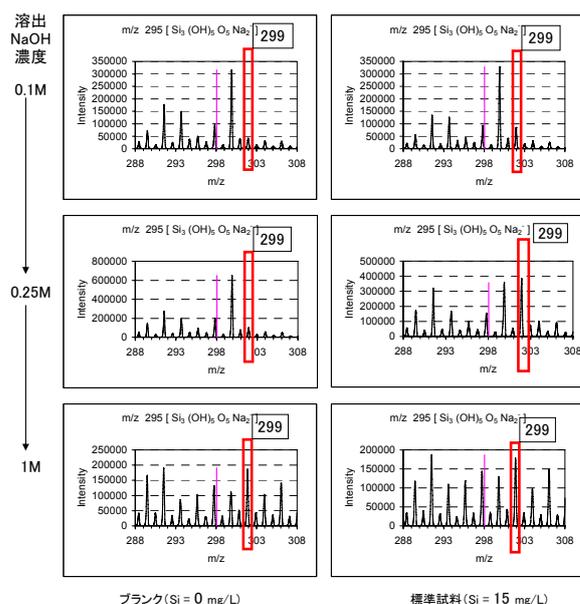


図-5 溶解性ケイ素のFAB-MS測定の前処理方法検討結果 ($m/z=299$ 付近、試料はシリカ標準試料)

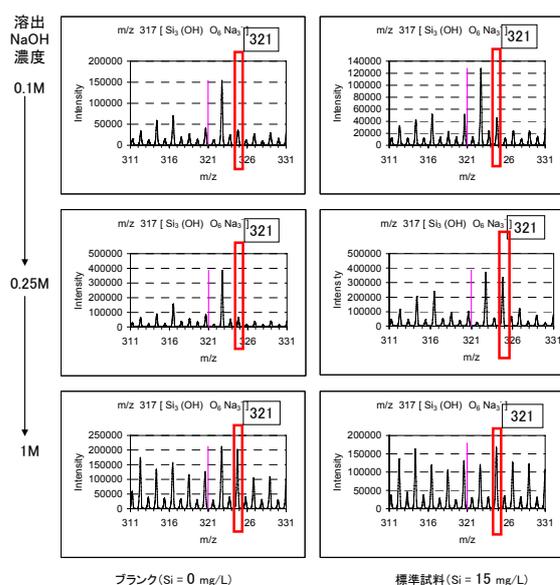


図-6 溶解性ケイ素のFAB-MS測定の前処理方法検討結果 ($m/z=321$ 付近、試料はシリカ標準試料)

濃縮・精製方法については、イオン交換樹脂のみによる場合よりも、エバポレーター蒸発濃縮を組み合わせた方が、強度が大で明瞭なピークが得られる傾向であった。これは、蒸発濃縮の追加により、試料中の溶解性ケイ素が十分に濃縮されて、FAB-MS測定に適した濃度(ターゲット上のグリセリンとの混合溶液状態で0.4g/L程度)になっているためと考えられた。

イオン交換樹脂に保持した溶解性ケイ素の溶出に用いるNaOH溶液濃度については、低濃度(0.1M)ではピーク

強度が低すぎる場合が多く、溶解性ケイ素の溶出が不十分と考えられた。高濃度（1M）では、溶解性ケイ素のピーク強度は十分大であったが、超純水のブランク試料（Si濃度 0mg/L）の場合でも NaOH 由来のピークが強く、試料由来の溶解性ケイ素のピークとの分別が困難な場合があった。特に蒸発濃縮との組み合わせでは、NaOH が高濃度となりすぎて、試料由来のピークが見いだせなかった。

中濃度（0.25M）では、溶解性ケイ素のピーク強度が十分に大であり、蒸発濃縮と組み合わせた場合でも、NaOH が高濃度となり過ぎず、試料由来の溶解性ケイ素のピークをとらえることができた。

以上より、溶解性ケイ素の FAB-MS 測定の前処理方法としては、濃縮・精製方法として、イオン交換樹脂による分離濃縮+エバポレーター蒸発濃縮を用い、イオン交換樹脂に保持した溶解性ケイ素の溶出に用いる NaOH 溶液濃度は 0.25M 程度が適切であると考えられた。

今後は、河川試料等の実試料の分析を行い、生物利用性の把握、水生生態系への影響および対策可能性の検討を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) Humborg et al. : Effect of Danube River dam on Black Sea biogeochemistry and ecosystem structure, *Nature*, Vol. 386, No. 27, pp. 385-388, 1997.
- 2) 原島省、陸水域のシリカ欠損と海域生態系の変質、*水環境学会誌*、26、pp. 621-625、2003
- 3) Matsunaga et al. : Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesenuma Bay (Japan), *Water Research*, Vol. 32, 1998, pp. 3436-3442.
- 4) Hutchins et al. : Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species, *Nature*, 400, pp. 858-861, 1999
- 5) 今井他、琵琶湖湖水および流入河川水中の溶存有機物の分画、*陸水学雑誌*、59(1)、pp. 53-68、1998
- 6) Tanaka and Takahashi: The Identification of Chemical Species of Silica in Sodium Hydroxide, Potassium Hydroxide and Sodium Chloride Solutions by FAB-MS, *Analytical Sciences*, 1999, 15(12), pp. 1241-1250.

水環境中における病原微生物の消長に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：岡本誠一郎、諏訪守、桜井健介

【要旨】

21 年度は、水試料中のノロウイルスをリアルタイム RT-PCR 法により定量するにあたり、低濃度域試料を対象として検出濃度の精度向上を目的に、ウイルス検出精度に及ぼす分析水量とウイルス濃度の影響を評価した。また、ノロウイルスの不活化効果を推定するためにノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルスを選定し、塩素、紫外線消毒実験を行って、消毒レベルの違いによる遺伝子量の減少割合を評価した。クリプトスポリジウムに関しては、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量との比較評価を行うため、オーシストの不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。

その結果、分析水量を増加させることで PCR 実測値が高まり、多重測定による変動係数は小さくなることから、ウイルス濃度が低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には、分析水量を増加させて PCR 実測値の安定化を図ることが必要であることを明らかにした。また、試料中のウイルス濃度が極めて低い場合には、多重測定を行うことで分析水量が増加して検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上すると考えられた。塩素、紫外線消毒によりネコカリシウイルス遺伝子減少量を評価したが、各消毒法ともに両ウイルスの遺伝子の定量値に影響を及ぼすことが確認されたことや、類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。

キーワード：ノロウイルス、リアルタイム RT-PCR 法、不活化効果

1. はじめに

クリプトスポリジウム、ノロウイルス（NV）、薬剤耐性菌などによる感染症が多発しており、大きな社会問題となっている。感染者などから排出されるこれらの病原微生物は様々な経路を経て最終的には公共用水域へ排出される。公共用水域の衛生学的安全性確保のため、病原微生物の消長を把握し汚染源を明らかにするとともに、対策手法の適正な評価にあたっては、迅速・簡便・安全に病原微生物の感染能力などを測定できる方法の開発が望まれている。

本課題では上記の要請を踏まえ、水環境中での薬剤耐性菌の汚染実態や耐性遺伝子の伝播特性を評価するとともに、分子生物学的手法（PCR：Polymerase Chain Reaction）を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の開発を目的としている。特にノロウイルスに関しては、現在のところ培養法による不活化判定を行うことができない課題がある。このため、代替指標の利用を含め、唯一の検出法であるリアルタイム PCR 法を活用した不活化判定手法を検討する。

本研究で研究対象としている病原微生物は薬剤耐性大

腸菌、クリプトスポリジウムであり、ウイルスはノロウイルスである。21 年度はノロウイルスやクリプトスポリジウムを対象とし以下の研究を行った。

- 1) 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価
- 2) ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量の評価と不活化効果の推定
- 3) クリプトスポリジウムの不活化実験

2. 研究目的

2.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルスの定量では、コントロール DNA を検量線として利用することで試料中のウイルス濃度の算定を行う。コントロール DNA による検量線の評価¹⁾や実試料を用いた多重測定による PCR 実測値の評価では、低濃度域における実測値の変動係数が大きくなるという課題がある²⁾。非流行期における試料や高度処理水あるいは消毒後処理水を測定対象と

する場合には、安定した定量値を得るとともにリスク評価の観点から検出下限値を向上させる必要がある。このため、試料の分析水量増加や多重測定を行うことでPCR実測値の安定性と向上手法を評価した。

2.2 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

ノロウイルスは、現在のところ培養細胞などにより増殖させられないため、感染能力の有無を判定できない課題がある。衛生学的安全性確保の観点から下水処理水の再利用水質基準等マニュアルが策定³⁾され水質基準等が提示されているが、上記課題もあり、ノロウイルス濃度の基準値の設定には至っていない。ここでは、唯一の検出法であるリアルタイム RT-PCR 法を活用してノロウイルス不活化判定手法を検討する。検討にあたっては、ノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルス (FCV) の適用に関しての提案⁴⁾があることから、ノロウイルスの不活化効果を推定するための基礎データを得ることを目的に、FCV の塩素、紫外線実験による遺伝子減少量を評価した。

2.3 クリプトスポリジウムの不活化実験

消毒によるクリプトスポリジウムの不活化効果を判定するためには、マウスや細胞培養法による評価手法が用いられている。これらの手法により評価が進展しているが、実験動物や細胞培養の利用は操作の煩雑性や検出感度等の課題もあり、その適用は限定されたものとなっている。ここでは、分子生物学的手法の適用による不活化判定手法の検討を目的としており、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量との比較評価を行うため、オーシストの塩素消毒による不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。

3. 研究方法

3.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

実験対象とした試料は流入下水、下水処理水、河川水であり、20 μ l の PCR 反応系における当初の PCR 実測値が tube あたり不検出から 1,000 コピー程度のものを 10 試料選定した。試料の濃縮は PEG 沈殿法とし、試料中に PEG #6000 (終濃度 8%) および NaCl (終濃度 0.4M) を添加・攪拌し完全に溶解させた。4 $^{\circ}$ C で 1 夜静置の後、10,000 \times G、30 分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣を RNase-free 水 (遺伝子分解酵素を除去した水) に再

浮遊させてウイルス濃縮液とした。

濃縮液中のウイルスは、リアルタイム RT-PCR 法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、試料の濃縮水量と SS 濃度から SS 負荷量を算出し、SS 負荷量が 0.05mgSS/カラムになるよう統一した。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN 社) でウイルス RNA を精製した。

精製したウイルス RNA 試料 0.5 μ g をランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 20 μ L の系で逆転写反応を行い cDNA を作製した。PCR の反応系は 20 μ L と 100 μ L とすることで、cDNA の 2 μ L と 10 μ L を各々リアルタイム PCR に供した。PCR の反応系を 20 μ L と 100 μ L とすることで分析水量を変動させ、各々 10 試料を 20 回の多重測定を行うことで PCR 実測値の安定性の評価とともに、検出感度の向上を目指した。精製 RNA 量は Spectrophotometer (NanoDrop 社製) により定量した。ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」⁵⁾ に準じた。リアルタイム PCR 反応のための試薬は QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN 社) を用い、リアルタイム PCR 装置は LightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス社) を使用した。

3.2 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

消毒による遺伝子減少量の評価では、ネコ腎臓細胞 (CRFK : Crandell-Reese feline kidney) により増殖させたネコカリシウイルス (FCV : Feline Calicivirus F-9 株) を用いた。細胞培養液の影響を取り除くため、ウイルス増殖液を限外ろ過膜により濃縮・精製した。精製した濃縮液を蔗糖液に重層して超高速遠心処理 (141,000 \times G、3 時間) にてさらに純度の高いウイルス精製液を作成した。このウイルス精製液に次亜塩素酸ナトリウムを添加、また、紫外線照射により遺伝子減少量の評価を行った。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 0~10mg/L とし、接触時間は 20 分間とした。各々混合接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和を行った。紫外線照射ではウイルス精製液 0.4mL をシャーレに分注し、1mW/cm² にて 0~300 秒の照射を行った。各試料中のウイルスは、ウイルス遺伝子の抽出、精製、逆転写反応の後、リアルタイム

RT-PCR 法により定量を行った。カリシウイルスの検出に用いたプライマーは、Erwin Duizer らの方法⁶⁾に準じた。

3.3 クリプトスポリジウムの不活化実験

不活化実験では、*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。免疫不全マウスのふん便から回収したオーシストをシヨ糖密度勾配遠心法により精製を行った。精製を行ったオーシストに有効塩素濃度が 20mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、1~2 時間接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和した。中和した試料は感染性評価のため、Intestine407 細胞に接種した。接種後 24 時間培養を行った後、オーシストの増加が認められたものを陽性とし MPN 表にあてはめ、オーシスト数を求め不活化割合を算出した。

4. 研究結果と考察

4.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

評価結果を表-1、2 および図-1、2 に示す。n=20 (同一試料の同時・多重測定) における PCR の平均実測値は 20 μ l から 100 μ l 系とすることで高まった。また、今回の実験範囲内における PCR 実測平均値から求めた換算濃度と変動係数には相関関係が見られ、20 μ l 系と 100 μ l 系では同一試料での換算濃度に大差はないものの、全体的に 100 μ l 系では変動係数が低下する傾向が明らかとなった。

PCR の実測値の大部分が 0 (N.D.) となった試料では、PCR の反応系が 20 μ l と 100 μ l でともに変動係数は 200%程度であった。20 μ l 系で得られた N.D.を含む実測値の平均値は 2~3 コピー/キャピラリーカラム (tube) であり、100 μ l 系では実測値の平均値が 6~23 コピー/tube に上昇したものの変動係数や N.D.の数は 20 μ l 系の定量結果と大差が見られなかった。20 μ l 系の実測値の平均値が 4 コピー/tube 程度となることで、100 μ l 系では実測値の N.D.の数が少なくなるとともに変動係数は低下した。20 μ l と 100 μ l でともに実測値の上昇とともに N.D.の数や変動係数は減少傾向が顕著となり、PCR の実測値が 1,000 コピー/tube 以上であれば変動係数は 3.7~7.7%までに収束した。

同一試料を 20 μ l と 100 μ l 系で同時・多重測定を行うことで、変動係数などに及ぼす影響を評価したが、20 μ l を 100 μ l 系に変更することで PCR の実測値は高まるため、変動係数の低下に一定の効果があり、安定した定量

値が得られることが明らかとなった。

本評価結果から 20 μ l 系での平均実測値が 4 コピー/tube 程度の試料であれば、100 μ l 系での測定とすることで PCR の実測値に含まれる N.D.値が少なくなり、変動係数も大幅に低下した。しかし、20 μ l の反応系において実測値が 2 コピー/tube 程度では、100 μ l の反応系としても、変動係数等に改善効果が見られなかったことから、極低濃度試料に対しては、何らかの改善策を考慮しなければならない。図-3 には tube 中に含まれる cDNA 量の違いが実測値に与える影響として、遺伝子分析量の比較概念図を示した。今回の評価結果では PCR 実測値の平均値 (n=20) が約 8 コピー/20 μ l tube であれば N.D.値の数が減少していることから、20 μ l の反応系に 100 コピー程度存在すれば、PCR 反応に供する 1 回分 (n=1) の分析水量が 2 μ l であることから、PCR 実測値は 10 コピー程度となり、実測値に大きな影響は及ぼさないと考えられた。それ以下の低濃度においては PCR の実測値の変動係数が大きくなり、特に、極低濃度試料では PCR の実測値において N.D.の評価となる可能性が高まるため、極低濃度試料の測定においては、極力分析水量を多くするための多重測定等の概念を取り入れることが必要と考えられた。また、多重測定を行うことで分析水量が増加するため検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上する。

表-2 は得られた実測値から分析に利用した水量・遺伝子量から換算した各試料の検出濃度を算出したものである。PCR 実測値の変動係数が高い試料では、20 μ l と 100 μ l 系の検出濃度に 2 倍程度の違いが見られたが、変動係数が低くなることで 20 μ l と 100 μ l 系の検出濃度の

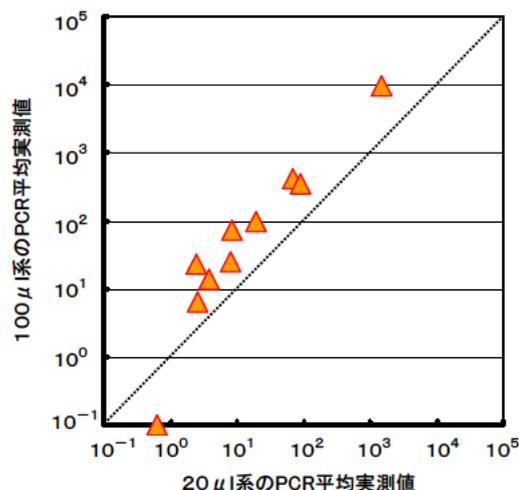


図-1 20 μ l と 100 μ l 系の実測値の比較

表-1 異なる分析水量における多重測定の結果

Sample	20 μ l系での多重測定				100 μ l系での多重測定			
	実測値範囲と平均・中央値 (コピー/20 μ l tube)	n=20の 個数	標準 偏差	変動係数 (%)	実測値範囲と平均・中央値 (コピー/100 μ l tube)	n=20の 個数	標準 偏差	変動係数 (%)
Sample A	0 - 12.7, (0.63), (0)	19	2.83	447	0, (0), (0)	20	-	-
Sample B	0 - 14.9, (2.41), (0)	16	5.05	210	0-152, (23.1), (0)	15	45.1	196
Sample C	0 - 17.3, (2.61), (0)	15	4.98	191	0-63.5, (6.46), (0)	15	15.3	237
Sample D	0 - 17.68, (3.83), (0.61)	10	5.43	142	0 - 55.7, (14.0), (7.71) ※	2	15.3	109
Sample E	0 - 39.4, (7.97), (0)	11	10.8	136	0-68.1, (25.1), (23.6)	3	18.5	74
Sample F	0 - 26.6, (8.38), (8.07)	6	7.88	94	6.9-163, (72.0), (62.1)	0	47.0	65
Sample G	0-53.3, (19.0), (15.8)	4	16.3	86.2	54.2-157, (98.8), (91.2)	0	28.4	28.7
Sample H	17.3-124, (67.5), (63.7)	0	28.8	42.7	255-672, (417), (436)	0	102	24.5
Sample I	36.4-161, (90.9), (79.7)	0	36.2	39.8	238-523, (351), (337)	0	73.6	20.9
Sample J	1,279-1,761, (1,499), (1,475)	0	115	7.7	8,860-10,200, (9,505), (9,480)	0	354	3.7

※n=18

表-2 PCR平均実測値からの換算濃度

Sample	換算濃度(コピー/L)		濃度比 (2)/(1)
	20 μ l系①	100 μ l系②	
Sample A	3.7E+03	-	-
Sample B	1.2E+04	2.3E+04	1.92
Sample C	4.0E+05	2.0E+05	2.00
Sample D	7.1E+05	5.2E+05	0.73
Sample E	4.1E+05	2.6E+05	0.63
Sample F	2.9E+05	5.1E+05	1.76
Sample G	3.5E+04	3.7E+04	1.06
Sample H	1.7E+05	2.1E+05	1.24
Sample I	2.4E+05	1.8E+05	0.75
Sample J	1.3E+08	1.7E+08	1.31

(実測値はn=20の平均値、E~Jの濃度比平均値1.1)

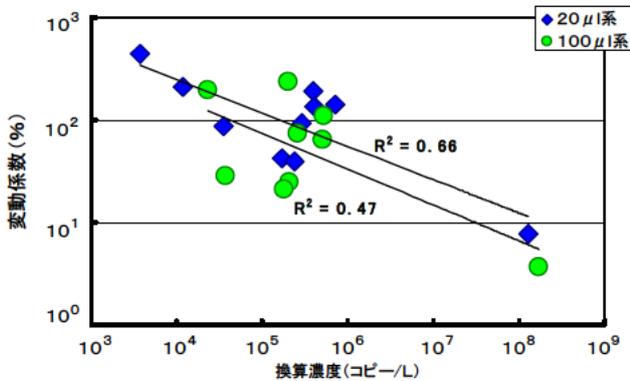


図-2 換算濃度と変動係数の関係

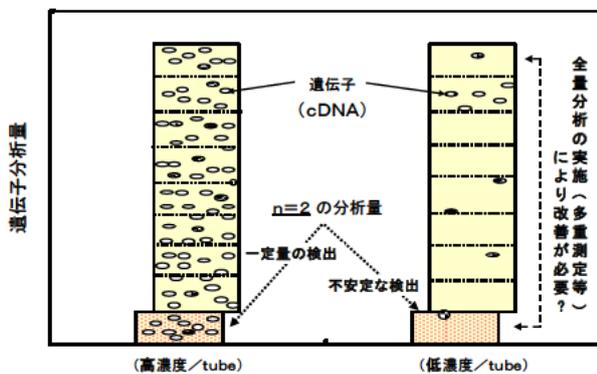


図-3 遺伝子分析量の比較概念図

違いは平均で 1.1 倍程度となり、大差が無いことが明らかとなった。

以上のことから、試料中のウイルス濃度が極めて低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には多重測定により分析水量を増加させ、安定した PCR 実測値を得る必要がある。

4.2 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

塩素、紫外線消毒によるネコカリシウイルス遺伝子の減少量の評価結果を図-4、5に示す。過年度までに得られたノロウイルスの結果についても併せてプロットした。塩素消毒による Ct 値や紫外線量を高めることで、ネコカリシウイルスの遺伝子量は減少傾向を示しており、Ct 値や紫外線量と遺伝子減少量には相関関係が見られ、消毒によりノロウイルスとネコカリシウイルスの遺伝子の定量値が減少することが確認された。さらに、ネコカリシウイルスの遺伝子減少量と生残率の関係について整理したものを図-8、9に示すが、塩素消毒での Ct 値は 0~200mg・min/L、紫外線消毒では 0~60mWs/cm²の範囲内のものである。減少量と生残率の評価においては Ct 値や線量に若干の違いがあるとともに、データ数は限定されるが、ともに相関関係が示されており、1log 程度の遺伝子減少量が得られれば生残率は 5~7log 程度低下することが明らかとなった。

ネコカリシウイルスの不活化実験⁷⁾では、3log の不活化に必要な塩素消毒の Ct 値は 40~50mg・min/L、紫外線照射量においては 20mWs/cm²程度である(図-6、7)。同様の実験例でもほぼ同じ結果が得られている^{8) 9)}。塩素消毒の Ct 値や紫外線量を高めることでネコカリシウイルスの不活化効果が確認されたが、同じく代替指標としてのマウスノロウイルスを用いた塩素消毒の不活化評価結果では、Ct 値が 2mg・min/L 程度で 4log 以上との

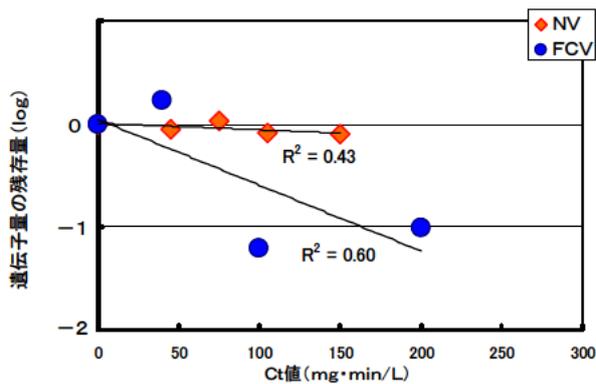


図-4 塩素消毒のCt値と遺伝子減少量の関係

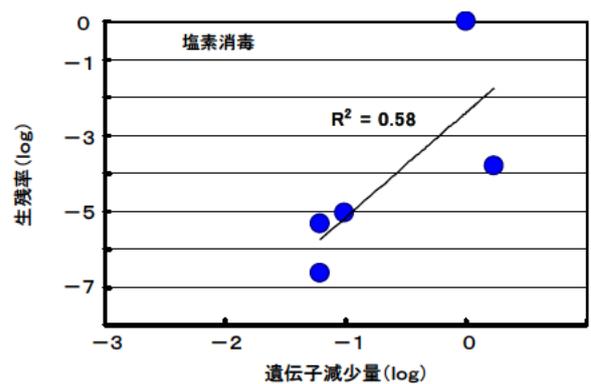


図-8 FCVの遺伝子残存量と生残率の関係

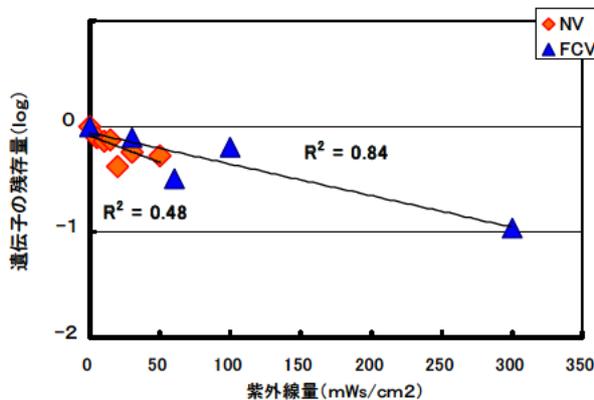


図-5 紫外線照射量と遺伝子残存量の関係

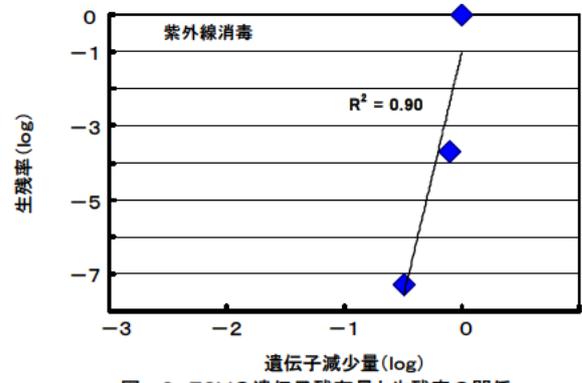


図-9 FCVの遺伝子残存量と生残率の関係

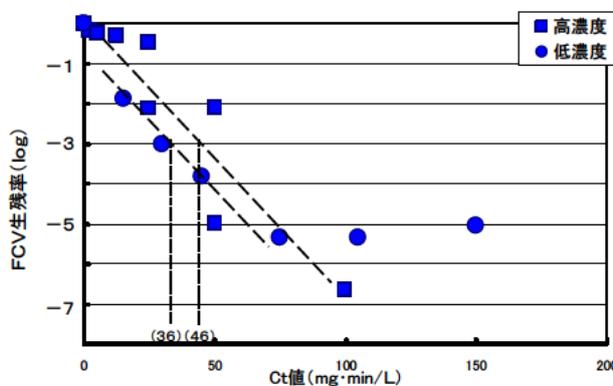


図-6 塩素消毒のCt値とFCVの生残率

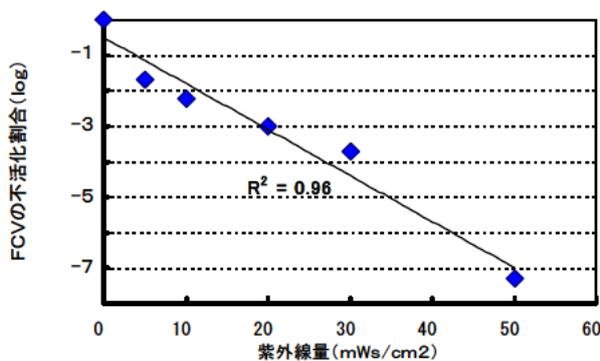


図-7 紫外線照射によるFCVの生残割合

報告例がある¹⁰⁾。また、他の腸管系ウイルスとしてエコーウイルス、コクサッキーウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスを3log不活化させるための紫外線量は20.5~27mWs/cm²、アデノウイルスは119mWs/cm²と報告されている¹¹⁾。このため、これらネコカリシウイルスや腸管系ウイルスの紫外線耐性はアデノウイルスを除けばほぼ同レベルであると推定される。

以上のことから、塩素、紫外線消毒によりノロウイルスとネコカリシウイルスの遺伝子の定量値に影響を及ぼすことが確認されたことや、類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。一方、ネコカリシウイルスや腸管系ウイルスの不活化効果を把握するためには、細胞培養法による評価となるため、大腸菌により培養が容易なファージを利用した評価手法についても検討する必要がある。

4.3 クリプトスポリジウムの不活化実験結果

塩素消毒後のオーシストを10²~10⁴オーシスト数に調整しIntestine407細胞に接種、24時間培養後のオーシスト数の増加が見られたものを陽性としMPN表にあてはめ、オーシスト数を求めた。対照でのオーシスト数は

150000 個に比較して、20mg/L・1 時間消毒でのオーシスト数は9200 個と算出されたことから、不活化率は約94%と見積もられた。また、2 時間作用後の不活化率は約92%であったことから既存の報告値¹⁾²⁾¹³⁾とほぼ一致するものであった。しかし、細胞培養により感染性の有無を評価する場合、培養操作の煩雑性やオーシスト数が低濃度であると顕微鏡観察の作業性から、高効率な手法の検討が必要となると考えられた。今後、mRNA を指標とした感染性評価を検討する予定である。

5. まとめ

21 年度は、水試料中のノロウイルスをリアルタイム RT-PCR 法により定量するにあたり、低濃度域試料を対象として検出濃度の精度向上を目的に、ウイルス検出濃度に及ぼす分析水量とウイルス濃度の影響を評価した。また、ノロウイルスの不活化効果を推定するためにノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルスを対象として塩素、紫外線消毒実験を行い、消毒レベルの違いによる遺伝子量の減少割合を評価した。クリプトスポリジウムに関しては、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量を比較評価するため、オーシストの不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。以下に得られた結果を示す。

- 1) ウイルス濃度が極めて低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には、20 μ L から 100 μ L 系へ変更することや多重測定により分析水量を増加させ、安定した PCR 実測値を得ることが必要である。
- 2) 多重測定を行うことで分析水量が増加するため検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上する。
- 3) 塩素、紫外線消毒によりネコカリシウイルス遺伝子減少量を評価したが、各消毒法ともに遺伝子の定量値を減少させることが確認され、遺伝子減少量と生残率との間には相関が見られた。
- 4) 類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。
- 5) 塩素消毒によるクリプトスポリジウムの不活化効果を細胞培養法で評価したが、Ct 値が 1,200～2,400mg・min/L の範囲において約 1log と見積もられた。

参考文献

- 1) 陶山明子、諏訪守、鈴木穰、尾崎正明 (2006) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討、環境工学研究論文集 43,255-261.
- 2) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2009)、各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題、第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集,239-240.
- 3) 国土交通省地域整備局下水道部・国土交通省国土技術政策総合研究所 (2005)、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル.
- 4) Antimicrobials Division U.S.EPA, CONFIRMATORY VIRUCIDAL EFFECTIVENESS TEST, Using Feline Calicivirus As Surrogate for Norovirus.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について.
- 6) Duizer E, et al. (2004) Inactivation of caliciviruses, Applied and Environmental Microbiology, 70(8), 4538-4543.
- 7) 土木研究所資料第 4157 号(2009)、平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集.
- 8) 笠井久会、吉永守 (2007) ネコカリシウイルスを指標としたカキのノロウイルス浄化法について、第 55 回日本ウイルス学会学術集会抄録集, 390.
- 9) T.Iwasaki, et al. (2007) Inactivation Effect of Ultraviolet Radiation on Norovirus (NV), 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 392.
- 10) 北島正章、松原康一、他 (2008) 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価および遺伝子数の消長、第 42 回日本水環境学会年会講演集、(社)日本水環境学会.
- 11) Charles P. Gerba, et al. (2002) Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light, Applied and Environmental Microbiology, 68(10), 5167-5169.
- 12) (社)日本水道協会、クリプトスポリジウム—解説と試験方法—
- 13) (社)日本水環境学会、第 51 回日本水環境学会セミナー (2000)、病原性微生物による水系感染症の現状と対策、講演要旨集.

余剰有機物と都市排水の共同処理技術に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：材料地盤研究グループ(リサイクル)

研究担当者：岡本誠一郎、山下洋正

【要旨】

近年、都市の余剰有機物の有効利用および発酵廃水の効率的処理が求められおり、下水道施設を活用して余剰有機物と都市排水とを共同処理して資源・エネルギー回収を行う技術の開発が必要である。UASB と嫌気性消化槽を組み合わせ、下水生汚泥と食品廃棄物を混合発酵して、発酵廃水と下水一次処理水を UASB で共同嫌気処理する UASB-AD システムおよび同システムの後段に好気活性汚泥処理を追加した UASB-AD-AS システムについて、実下水を用いた連続運転を行い処理性能を評価した。

キーワード：余剰有機物、都市排水、共同処理、メタン発酵、嫌気処理

1. はじめに

バイオマス・ニッポン総合戦略¹⁾の推進など、都市で発生する余剰有機物の有効利用が求められているが、発酵処理に伴い発生する廃水の処理に技術的課題が残されている。従って、都市の資産であり、有機物および廃水の処理に優れた能力を有する下水道施設を活用して、これら余剰有機物と都市排水とを合わせて処理して資源・エネルギー回収を行う、新たな複合処理技術の開発が求められている。本研究では、都市排水と地域社会で発生する余剰有機物を合わせて処理することにより、資源・エネルギー回収を行い、その際に発生する発酵廃水を下水処理施設で効率的に共同処理する基礎技術を開発する。

2. 研究方法

2.1 発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発

発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発のため、UASB 法 (Upflow Anaerobic Sludge Blanket、上向流嫌気性汚泥床法) を用いて、無加温で嫌気処理を行う技術について次に述べる通り実験的検討を行った。

2.1.1 方法

流入下水を最初沈殿池で一次処理し、発生した下水生汚泥に食品廃棄物を添加して嫌気性消化槽で混合発酵を行い、その嫌気性消化汚泥を UASB へ投入するとともに、下水一次処理水を UASB で嫌気処理する処理方法

(UASB-AD システム) の開発を行った。

なお、当初は、流入下水を UASB に直接流入させて嫌気処理を行い、UASB から引き抜いた汚泥と外部から添

加した余剰有機物 (食品廃棄物) を混合して嫌気性消化槽で混合発酵を行い、その嫌気性消化汚泥を再び UASB へ投入する処理方法の開発として実験を開始したが、流入下水の有機物負荷が低すぎて目的の実験ができなかったため、上述の処理方法の開発に変更したものである。この点は実験経過の部分で再度説明する。

実験プラント (UASB 容量約 230L、嫌気性消化槽容量は UASB の 20% の約 46L) を下水処理場に設置し、UASB に実下水 460L/d (HRT12 時間) を流入させて温度制御なし (流入水温は 14.4℃～23.2℃で平均 17.9℃) で 8 週間運転した。実験プラントの概要は図-1 に示すとおりである。

嫌気性消化槽に投入する余剰有機物として、家庭厨芥を模擬して既報²⁾を参考に調製した食品廃棄物の混合スラリーを用いた。食品廃棄物の組成は、湿重ベースで、果物の皮 30% (リンゴ・グレープフルーツ・バナナを各 10%)、野菜 36% (にんじん・キャベツを各 18%)、炭水化物 20% (うどん・パンを各 5%、米飯を 10%)、タンパク質等 14% (魚の骨皮・豚肉を各 7%) として、ミキサーで混合した。

実験開始後の 2 週間は、UASB から引き抜いた汚泥と外部から供給した食品廃棄物を混合して嫌気性消化槽に投入し、嫌気性消化槽から引き抜いた嫌気性消化汚泥を UASB に投入する形で、嫌気性消化槽と UASB の間で汚泥の循環を行った。

実験 3 週間目以降は、UASB 汚泥の減少が著しくなり UASB における水処理に支障が生じるようになったため、UASB 汚泥の引き抜きを中止し、代わりに実下水の

生汚泥を沈降濃縮させた汚泥を別途用意して、外部から供給した食品廃棄物と混合して消化槽に投入し、その嫌気性消化汚泥を UASB に投入することとした。

ここで、実験当初は流入下水を直接 UASB に流入させるシステムとして実験を行っていたが、流入下水が低濃度であり有機物負荷量が不十分であったため、これを初沈での固液分離後の一次処理水とみなし、初沈からの生汚泥の AD への供給には、別途生汚泥を用意することで、初沈を含むシステムとして実験を継続した。

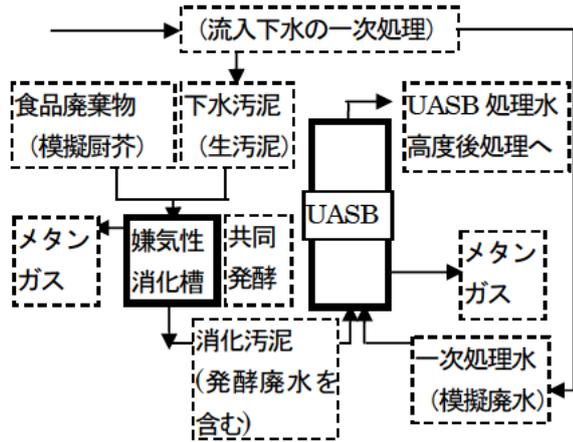


図-1 UASB-AD システムの概要

2.1.2 分析

実験装置より必要な汚泥・水・ガス試料を週に 1 回程度採取して、温度、pH、BOD、COD_{Cr}、TS、VS、SS、VSS、N・P、ガス量および CH₄ 濃度等の分析を、下水試験方法に則って行った。

2.2 嫌気処理水の高度後処理の基礎技術の開発

2.2.1 方法

嫌気処理水の高度後処理方法として、UASB-AD システムの後段に好気処理の活性汚泥法を組み合わせる UASB-AD-AS システムの開発を行った。

実験は、実験系列 (UASB-AD-AS) および対照系列 (標準活性汚泥法、AS) を各 1 系列ずつ用いて行った。対照系列では、標準活性汚泥法として最初沈殿池、エアレーションタンク、最終沈殿池を設置した。

実験系列では、最初沈殿池を設置せず、「2.1 発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発」で開発した UASB-AD システムの UASB に下水を流入させ、UASB 処理水をエアレーションタンクに流入させた。最終沈殿池の余剰汚泥は消化槽に投入した。

流入下水の有機物濃度が低すぎたため、別途用意した生汚泥を連続的に混合して、実験に適した流入下水濃度

に調整してから、実験系列および対照系列に流入させた。UASB-AD の運転は、「2.1 発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発」と同様に行った。

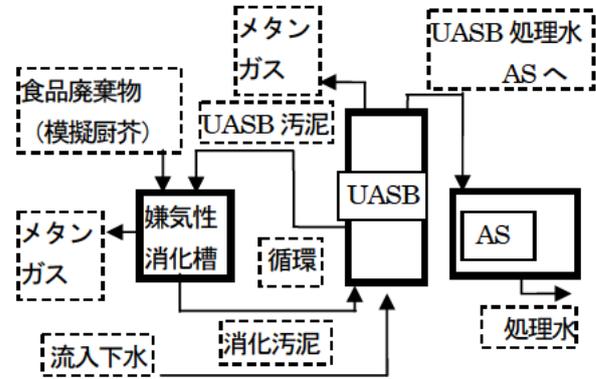


図-2 UASB-AD-AS システムの概要

2.2.2 分析

実験装置より必要な汚泥・水・ガス試料を週に 1 回程度採取して、温度、pH、BOD、COD_{Cr}、TS、VS、SS、VSS、N・P、ガス量および CH₄ 濃度等の分析を、下水試験方法に則って行った。

3. 結果および考察

3.1 発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発

UASB を用いて、無加温で嫌気処理を行う技術として、下水生汚泥・食品廃棄物の混合発酵および発酵廃水・下水一次処理水の共同嫌気処理する UASB-AD システムについて検討した結果を以下に示す。

UASB での水処理について、BOD 等の経時変化を図-3 に示した。また、嫌気性消化槽での汚泥処理について、COD 等の経時変化を図-4 に示した。

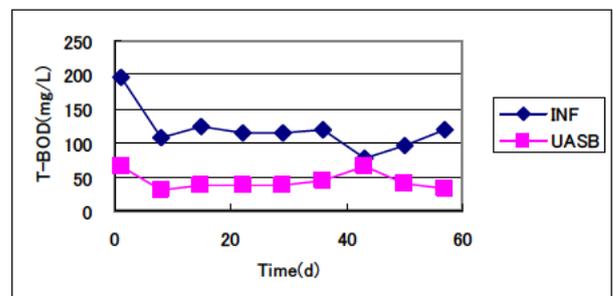


図-3 UASB-AD システムの UASB での T-BOD 処理特性 (Inf: 流入下水、UASB: UASB 処理水)

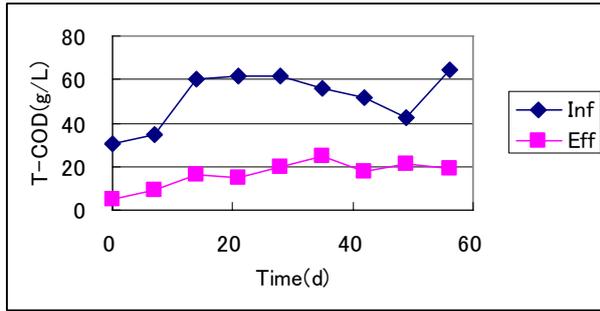


図4 UASB-AD システムの嫌気性消化槽での T-COD 処理特性 (Inf : 投入汚泥、Eff : 消化汚泥)

実験開始後 3~8 週間目 (UASB 汚泥の引き抜きを中止した期間)における有機物 (COD) の収支については、次の通りである。

(1) COD 投入の 47%が流入下水 (一次処理水とみなす) 由来、18%が食品廃棄物由来、35%が生汚泥由来であった。

(2) 初沈で流入有機物負荷の 43%を生汚泥として分離し、消化槽へ食品廃棄物とともに投入した計算となる。負荷の比率は、COD 比で生汚泥 : 食品廃棄物=2:1 であった。

(3) 食品廃棄物の COD 負荷比率は、流入下水 (一次処理水みなし+生汚泥) 負荷の 22%であった。

(4) COD 排出は投入の 40%であり、その内訳は、UASB から流出した処理水中の有機物として 20%、嫌気性消化槽で発生した消化ガス中の CH₄ として 18%、同じく UASB での消化ガスとして 2%であった。

(5) 以上より、外部より供給した食品廃棄物による有機物負荷は、全負荷量の約 2 割に相当、流入下水のみの場合と比較し有機物負荷量を約 1.3 倍に増大させたことになる。この条件下において、嫌気性消化は良好に行われ、UASB の水処理も安定して行われていたことから、本実験で開発した UASB-AD システムは、この程度の負荷量増大は許容範囲であると考えられた。

UASB と嫌気性消化槽を組み合わせた水処理について、Mahmoud ら³⁾は、水温 15°C の都市下水を UASB で嫌気処理する際に、AD を追加した方が COD 除去と汚泥分解に効果的であったと報告している。本研究は、食品廃棄物を AD に投入して混合発酵を行い、発酵廃水と都市下水を共同処理している点で、水処理のみを主眼とした既往の研究と大きく異なっており、独自の UASB-AD システムとして検討する意義が高いと考えられた。

3. 2 嫌気処理水の高度後処理の基礎技術の開発

嫌気処理水の高度後処理方法として、UASB-AD システムの後段に好気処理の活性汚泥法を組み合わせる UASB-AD-AS システムの検討を行った結果を以下に示す。

UASB での水処理について、T-BOD、T-COD および SS の経時変化を図-5~7 に示した。

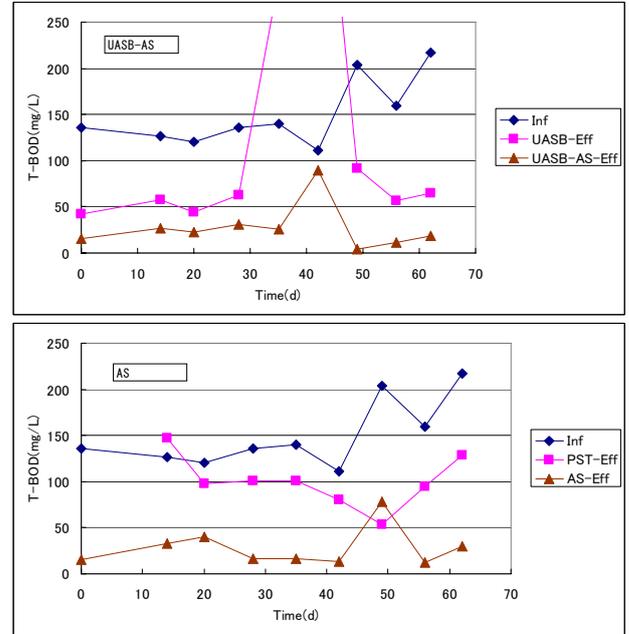


図5 UASB-AD-AS システムの T-BOD 処理特性

(上図 : 実験系列 (UASB-AD-AS)、Inf : 流入下水、UASB-Eff : UASB 処理水、UASB-AS-Eff : AS 処理水、

下図 : 対照系列 (AS)、Inf : 流入下水、PST-Eff : 最初沈殿池処理水、AS-Eff : AS 処理水、

上図の day35、day42 の UASB 処理水の値はそれぞれ 300mg/L、520mg/L)

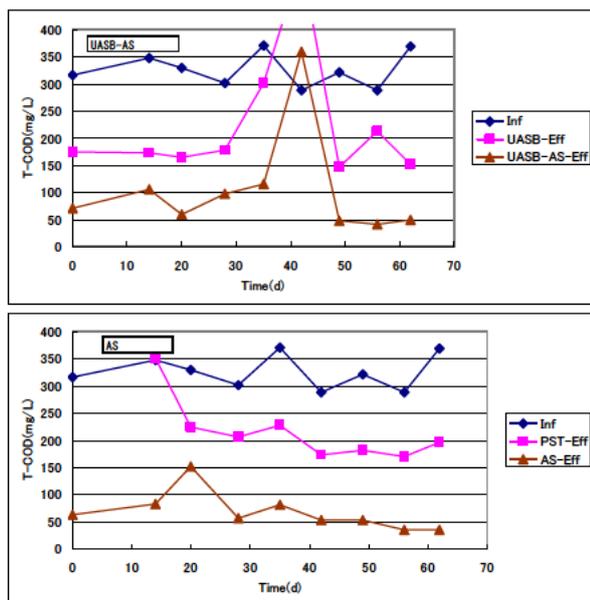


図6 UASB-AD-AS システムの T-COD 処理特性
(図の凡例等については図-1 と同様、
上図の day42 の UASB 処理水の値は 530mg/L)

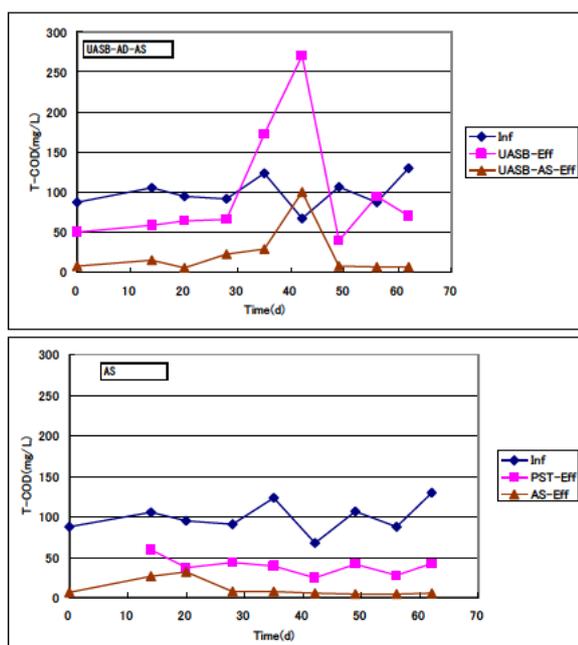


図7 UASB-AD-AS システムの SS 処理特性(図の凡
例等については図-1 と同様)

主要な結果は次の通りである。

(1) 実験開始初期 (day7~day14) には、実験系列 (UASB-AD-AS) で、前段 UASB の流出汚泥 (流入下水 SS のうち UASB で捕捉されなかったものおよび UASB の汚泥層から流出したもの) が後段 AS のエアレーションタンクで沈降して嫌氣的性状を呈していた。沈降していた汚泥は、曝気強度を上げることにより、再度

浮遊状態とすることができた。本実験のエアレーションタンクは、曝気攪拌方式であり、好気処理と同等の曝気強度では活性汚泥が沈降してしまっていたことから、UASB 流出汚泥は好気処理の活性汚泥と比較して沈降しやすいものと考えられた。

(2) UASB からの汚泥流出量が一時的に増えて、AS に過大な負荷を与えて処理水質が悪化する場合が見られた。UASB の汚泥量が多く汚泥界面が上昇していたため、突発的な流出が起きていた可能性が考えられた。従って、UASB 汚泥量を適正に制御して AS への汚泥流出を抑制することにより、処理水質を安定化できる可能性が考えられた。

(3) また、これにより、実験系列 (UASB-AD-AS) のエアレーションタンクに流入して沈降する UASB 汚泥を抑制し、活性汚泥の浮遊状態を保つのに必要な曝気量を対照系列 (AS) よりも削減することで、本来の目的である消費エネルギーの削減ができ、UASB 導入のメリットが発揮できる可能性が考えられた。

(4) 実験装置の不具合 (最終沈殿池の動作不良) により、対照系列 (AS) で TBO が 15mg/L を超えることが多く、標準活性汚泥法の一般的な水質とならなかったことから、実験系列 (UASB-AD-AS) の処理水質を対照系列と比較して処理性能を検証することはできなかったが、実験装置の性能の範囲内では、実験系列

(UASB-AD-AS) と対照系列 (AS) の処理水質は大きな差は見られなかった。ただし、UASB からの汚泥の流出が大となった際には UASB-AD-AS システムの処理水質も悪化したため、UASB 汚泥の適正な制御が必要と考えられた。Huang ら⁴⁾は、UASB と好気活性汚泥法を組み合わせた水処理法を養豚スラリーに適用し、30°Cでの運転で有機物および窒素除去に有効であったと報告している。本研究では、食品廃棄物と下水汚泥の混合発酵を行うとともに、発酵排水と都市下水を嫌気処理する UASB-AD-AS システムを開発しているため、既往の報告とは処理対象もシステムも異なっている。特に養豚スラリーは都市下水と発酵廃水の混合液よりも有機物および窒素が高濃度であり、30°Cで嫌気処理することにより、むしろ従来型の UASB に適した運転条件となっていることから、都市下水を対象とした処理については、本研究で新たに知見を得ることが不可欠と考えられた。

4. まとめ

本研究の主要な結果は次の通りである。

(1) 流入下水を最初沈殿池で一次処理し、発生した下水

生汚泥に食品廃棄物を添加して嫌気性消化槽で混合発酵を行い、その嫌気性消化汚泥を UASB へ投入するとともに、下水一次処理水を UASB で嫌気処理する処理方法 (UASB-AD システム) の開発を行った。

(2) UASB-AD システムの許容範囲として、外部より供給する食品廃棄物による有機物負荷が、全負荷量の約 2 割に相当し、流入下水のみの場合と比較し有機物負荷量が約 1.3 倍に増大するまでは、対応可能と確認できた。

(3) 嫌気処理水の高度後処理方法として、UASB-AD システムの後段に好気処理の活性汚泥法を組み合わせる UASB-AD-AS システムの開発を行った。

(4) 実験装置の性能の範囲内では、UASB-AD-AS システムと標準活性汚泥法装置の処理水質は大きな差は見られなかった。ただし、UASB からの汚泥の流出が大となつ

た際には UASB-AD-AS システムの処理水質も悪化したため、UASB 汚泥の適正な制御が必要と考えられた。

参考文献

- 1) バイオマス・ニッポン総合戦略：2006.3.31 閣議決定
- 2) 竹崎義則他、「ディスポーザ排水の負荷原単位設定」、廃棄物学会誌、Vol.12、No.5、pp.312-321、2001
- 3) Anaerobic sewage treatment in a one-stage UASB reactor and a combined UASB-Digester system, Nidal Mahmoud, et.al., Water Res, 38, pp.2348-2358, 2004
- 4) Microbial activity in a combined UASB-activated sludge reactor system, J. S. Huang et.al., Chemosphere, 61, pp.1032-1041, 2005

LCA からみた公共緑地等バイオマスの資源利用システムに関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 21～平 25

担当チーム：材料地盤研究グループ(リサイクル)

研究担当者：岡本誠一郎、宮本豊尚、桜井健介

【要旨】

地球温暖化対策等の観点から河川敷や道路植栽等の公共緑地等バイオマス利用の LCCO₂ による評価手法を確立し、それを踏まえ持続可能な保全・管理技術やシステムを開発する必要がある。LCCO₂ 評価手法の試行のため、公共緑地の草木廃材の発生及び利用・処分の現状を把握し、調査すべきシステムと評価範囲を定めた。また、当所等の開発した建設発生木材を用いた木質爆砕物による法面緑化工法の温室効果ガス排出抑制効果を評価し、木質爆砕物 1t-dry をピートモス代替基盤材として利用した時には 0.42t-CO₂ の温室効果ガス抑制効果と推算した。
キーワード：LCA、公共緑地、バイオマス、法面緑化、温室効果ガス

1. はじめに

「京都議定書目標達成計画」¹⁾では、2008 年から 2012 年の第 1 約束期間において、京都議定書の 6%削減約束を確実に達成することが求められている。加えて、平成 21 年 12 月には、2013 年以降の地球温暖化対策の国際枠組み（ポスト京都議定書）が協議された国連気候変動枠組み条約締約国会議（COP15）が開催され、「コペンハーゲン合意」²⁾に留意することが決定された³⁾。同合意では、世界全体としての長期目標として産業化以前からの気温上昇を 2 度以内に抑えることその他、附属書 I 国（先進国）は 2020 年の削減目標を、2010 年 1 月 31 日までに記載事項を提出すること等を含んでおり、日本は、削減目標を、「90 年比で言えば 25%削減、ただし、すべての主要国による公平かつ実効性のある国際枠組みの構築及び意欲的な目標の合意を前提とする」⁴⁾⁵⁾としている。

また、「バイオマス・ニッポン総合戦略」⁶⁾において、地球温暖化の防止、循環型社会の形成、競争力のある新たな戦略点産業の育成などの観点からエネルギーや製品としてバイオマスを総合的に最大限利活用し、持続的に発展可能な社会をできる限り早期に実現することが強く求められている。

一方で、道路、河川、公園、ダムなどの管理のため、毎年定期的に広大な緑地の雑草の除草や多くの樹木の剪定、流木の回収などが行われている。例えば、全国の道路緑化樹木の本数は、2007 年時点で、高木 667 万本、中低木 16,153 万本が存在している⁷⁾。国土交通省の 109 国道事務所、102 河川事務所、17 公園事務所、25 ダム事務所に対して実施したアンケート結果によればこれら

の刈草は、熱量換算すると 3.1PJ/年、剪定枝葉は 0.17PJ/年相当と推算されている⁸⁾。また、国内の 199 ダムからは、概算で 230TJ/年相当の流木が発生している⁹⁾。一般に、バイオマスは広く、薄く存在している上、水分含有量が多い、かさばる等の扱いづらいという特性のために収集が困難であることが、十分に活用されていない原因の一つである¹⁰⁾。しかし、道路、河川、公園、ダムなどの管理で発生するバイオマス（以下、公共緑地等バイオマスと呼ぶ）は、日ごろより草木が除草・剪定され、収集されており、比較的利用しやすいバイオマスと考えられ、有効利用が期待される。

そこで、本研究では、公共緑地等バイオマスを資源として位置づけ、恒久的に利用していくための保全・管理技術やシステムを提示することを目的とする。提示にあたっては、LCCO₂による公共緑地等バイオマス利用の評価手法を確立し、それを踏まえ、公共緑地等バイオマスの資源管理手法の提案することを目標とする。

2. 建設発生木材を用いた木質爆砕物による法面緑化工法の温室効果ガス排出抑制効果の評価

木質チップを爆砕処理した木質爆砕物は、繊維化するためにピートモスとよく似た性状の物性に改質されることに着目し、これまでに土木研究所、日本植生株式会社、ライト工業株式会社、東興建設株式会社は共同研究により、伐木や抜根材などの建設発生木材や剪定枝葉の木質爆砕物をピートモスの代替材料として法面緑化資材へ利用する工法（以下、「本工法」という）を開発した¹⁰⁾。これまでの研究では、本工法は導入木本植物の発芽・生

育は良好で、周辺環境より草本植物が侵入・定着することが確認されており、周辺環境に調和した緑化が期待できる結果となっている。本工法の環境への影響として温室効果ガス排出抑制効果について評価を実施した。

2. 1 評価方法

本工法の適用による温室効果ガス排出抑制効果の評価するため、木質爆砕物あるいはピートモスを吹き付け材として利用する2通りのシナリオを設定し、温室効果ガス排出量を推算し、両者を比較した。なお、両シナリオに共通の施工法面切土工、金網設置、吹き付け作業による温室効果ガスの排出は評価の対象としなかった。また、機材の製造や破棄による排出は計上しなかった。

(1) シナリオ1：木質爆砕物吹き付けシナリオ

切土等によって発生した抜根材を、100mm程度以下に破碎した後に、蒸煮爆砕処理の工場まで搬送し、蒸煮爆砕処理の後、抜根材の発生元まで搬送し、現地にて生育基盤材として吹き付け、基盤中で分解するまでとした。抜根材が基盤中で分解して生じる温室効果ガスは、処分時に生じていた温室効果ガスと相殺されるものと考え、有効利用時の分解による温室効果ガス排出量はゼロとした。蒸煮爆砕処理による温室効果ガスの排出は、試験機より使用電気を求め、製品化時に、排熱利用及び放熱ロス対策等により20%程度改善が見込めるものと仮定した。運搬にあたっては、抜根材の発生元から蒸煮爆砕処理の工場までの往復が主と思われ、工場は各地方に建設される場合を想定し、往復200kmの走行を計上した。設定条件は表-1のとおりとし、軽油、ガソリン、電力は文献¹¹⁾に基づいた。

表-1 シナリオ1における設定条件

項目	値	単位	参考文献
木材の含水率	38.6	%	実測
破碎処理に要する軽油量	9.44	L/t-wet	12)
運搬に要するガソリン量	0.100	L/t-wet/km	13)
蒸煮爆砕に要する電力量**	792	kWh/t-wet	

* 最大積載量2000kgの業務用貨物車に2000kg積載した場合

** 試験機の実測値(2.7MPa、3分)の20%の改善を想定した場合

(2) シナリオ2：ピートモス吹き付けシナリオ

ピートモスの利用シナリオの設定は、文献¹⁴⁾に基づいた。すなわち、主要な採掘源のひとつであるカナダで採掘されたピートモスが、市場に流通し、生育基盤材として吹き付けられ、基盤中で分解するまでであり、土地利用変化、掘削・加工、運搬、分解に区分されている。土

地利用変化は、主にピートの掘削面以下の残存したピートの分解によっている。運搬は、大部分が北米内で利用されることを想定して計算された値をそのまま用いたため、日本への運搬時よりも少ない値となっている。分解は、ピートが炭素貯蔵庫として復元に成功しても2000年程度かかると推測される¹⁴⁾ことから、短期的には大気中の炭素量を増やすと考えられるため、基盤中での分解を計上している。

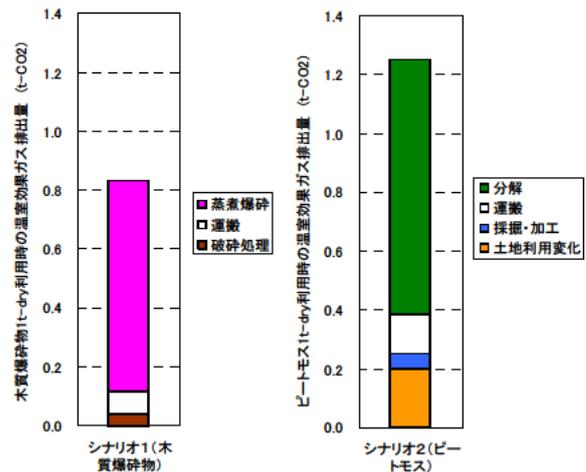


図-1シナリオ1 (木質爆砕物利用) 及びシナリオ2 (文獻¹⁴⁾に基づいたピートモス利用) の乾燥重量1t利用時の温室効果ガス排出量

2. 2 評価結果

シナリオ1 (木質爆砕物) およびシナリオ2 (ピートモス) の乾燥重量1tあたりの温室効果ガス排出量の推算結果を図-1に示した。木質爆砕物1t-dryをピートモス代替基盤材として利用した時には0.42t-CO₂の温室効果ガス抑制効果が得られると推算された。シナリオ1においては、蒸煮爆砕処理に伴う温室効果ガス排出が大部分を占めることから、さらなる改善が期待される。評価の精度向上のためには、機材の製造や破棄による排出の算出と蒸煮爆砕処理の製品化による改善の検証が必要である。

3. 公共緑地等バイオマスの有効利用および処分時のLCCO₂評価の試行

LCCO₂による公共緑地等バイオマス利用の評価手法の確立のため、公共緑地等バイオマスの有効利用または処分方法の各種シナリオについてLCCO₂を試算する。本年度は、発生及び利用・処分の現状を把握し、さらに既報より各プロセスのインプットおよびアウトプットに関する情報を収集し、試算すべきシステムの評価範囲を決定する。

3.1 公共緑地の草木廃材の発生及び利用・処分の現状

当所の昨年度の調査⁹⁾では、国土交通省管轄の緑地・樹木管理から発生する除草物および剪定物のエネルギー賦存量が明らかとなっている。また、一部の河川においては、人的利用の変化により河川高水敷の樹林面積が拡大していることが報告されている¹⁵⁾。

一般に、河川およびダムの維持管理においては、巡視・点検を行なう前に、損傷や劣化箇所を発見しやすいように、施設周りの除草を行なっている。除草は施設の周囲幅 5m 程度を対象に梅雨期前と台風期前を含めて 2 回以上行なう¹⁶⁾。また、除草回数が少ない場合、例えば芝はチガヤ等のイネ科植物を経て雑草に遷移して、堤防の耐侵食強度が低下することも報告されている¹⁷⁾。除草された刈草は、清掃工場で焼却されたり、中間処理施設で破碎後に有効利用されたり、堆肥化されたりするほか、河川敷地内に存置し、土に還す場合がある。また、昨今、有効利用の推進の観点から、刈草や伐木の提供^{18), 19)}等の取り組みがみられる他、提供情報をとりまとめウェブサイト上で周知する試みが行なわれている^{20), 21)}。

一方、道路緑化における管理では、道路植栽の良好な活着及び生育並びに機能の維持向上を図るとともに、道路交通の安全及び快適性確保を目的に行なわれている²²⁾。街路樹・公園樹の剪定枝の発生量は、一般廃棄物排出量のうち、約 1~3% となることが報告されている²³⁾。利用・処分においては、刈草同様、焼却されたり、堆肥化されたり²⁴⁾している。一方で、道路緑地の管理水準を低下させた場合に、苦情の増加等の弊害が生じているケース²⁵⁾が報告されている。

3.2 目的および調査範囲の設定

最終的な LCCO₂ 評価の目的は、異なるバイオマス利用システムの優劣の判断の一助とすることである。なお、本試行の目的は、各バイオマス利用システムの LCCO₂ の概算の把握と今後の高精度化時に精査すべき箇所を明らかにすることである。

分析する機能単位は、ある対象地域における 1 年に発生する草木廃材の処分とした。処分に際し、有用物が発生する場合には、有用物の利用による化石資源の代替効果も含むものとした。

対象とするシステムは、除草される時点の刈草が安定的に処分されるまでとした。このシステムを「除草・剪定」、「集草・収集」、「積込・運搬」、「利用及び処分」の 4 つのプロセスに区切ることとした。「利用及び処分」は、表-2 とした。現状で使われている清掃工場および堆肥化施設、バイオマスボイラー保有施設に加え、今後利用される可能性のある開発中の方法 2 種（石炭火力発電

所^{26), 27), 28)}、下水処理場^{29), 30)}）とした。各システムの境界は、図-2~6 のとおり設定した。

表-2 設定した利用及び処分方法

記号	搬送先	バイオマス変換方法	発生する有用物
A	清掃工場	燃焼	(無し)
B	ボイラー保有施設	燃焼	熱
C	石炭火力発電所	燃焼	電気
D	下水処理場	メタン発酵	メタンガス
E	堆肥化施設	堆肥化	堆肥

* 清掃工場は、発電および熱利用施設を持つ場合を想定し、それらは場内での必要エネルギーを補うのみに使われ、場外で利用可能なエネルギーは無いことから、発生する有用物は無しとした。

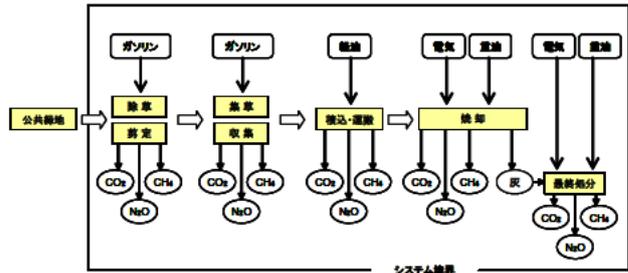


図-2 システム A (清掃工場) の境界

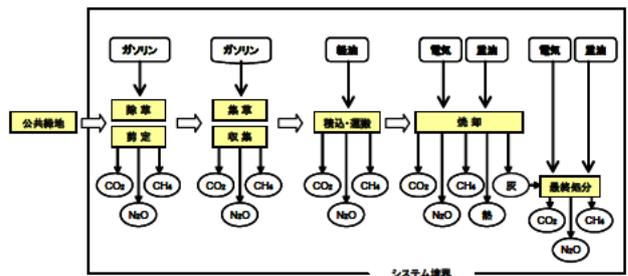


図-3 システム B (ボイラー保有施設) の境界

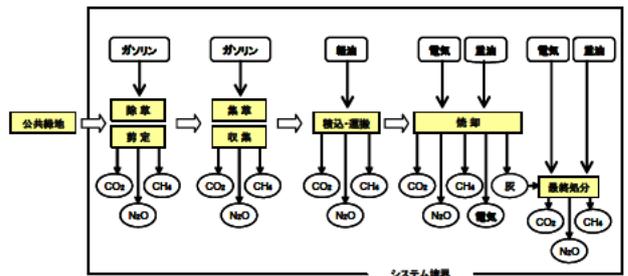


図-4 システム C (石炭火力発電所) の境界

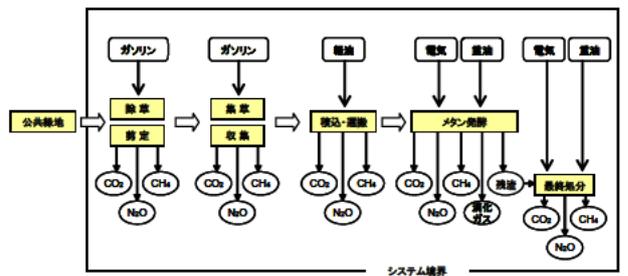


図-5 システム D (下水処理場) の境界

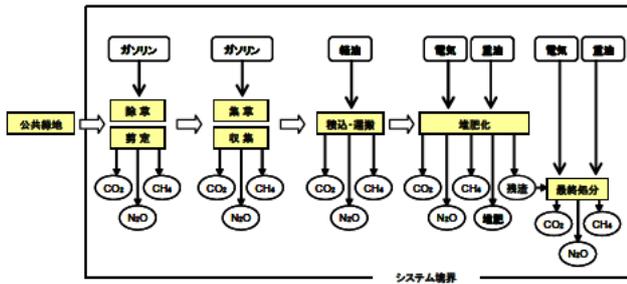


図-6 システム E (堆肥化施設) の境界

4. まとめ

本研究の成果は以下のとおりであった。

- 1) 当所等の開発した建設発生木材を用いた木質爆砕物による法面緑化工法の温室効果ガス排出抑制効果を評価したところ、木質爆砕物 1t-dry をピートモス代替基盤材として利用した時には 0.42t-CO₂ の温室効果ガス抑制効果が得られると推算された。
- 2) 公共緑地等バイオマスの有効利用および処分時の LCCO₂ 評価のため、公共緑地の草木廃材の発生及び利用・処分の現状を把握し、調査すべきシステムと評価範囲を設定した。

参考文献

- 1) 京都市議定書目標達成計画、閣議決定、平成 17 年 4 月 28 日 策定、平成 20 年 3 月 28 日全部改定
- 2) UNFCCC, Copenhagen Accord, <http://unfccc.int/resource/docs/2009/cop15/eng/l07.pdf>
- 3) 環境省、報道発表資料「気候変動枠組条約第 15 回締約国会議 (COP15) 及び京都議定書第 5 回締約国会合 (COP/MOP5) の結果について (お知らせ)」、平成 21 年 12 月 21 日、<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=11933>
- 4) UNFCCC, Appendix I - Quantified economy wide emissions targets for 2020, http://unfccc.int/files/meetings/application/pdf/japanphaccord_app1.pdf
- 5) 環境省、報道発表資料「コペンハーゲン合意への賛同・排出削減目標の提出について (お知らせ)」、平成 22 年 1 月 26 日、<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=12036>
- 6) バイオマス・ニッポン総合戦略、平成 18 年 3 月 31 日閣議決定
- 7) 国土交通省国土技術政策総合研究所：わが国の街路樹 IV、国土技術政策総合研究所資料 No.506、2009。
- 8) 独立行政法人土木研究所：公共事業由来バイオマスの資源化・利用技術に関する研究、平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 4157 号、2009。
- 9) 牧孝憲、高橋正人、落修一、三宅且仁、尾崎正明：全国のダム流木発生量調査、土木学会論文集 G、Vol.63 No.1、22-29、2007.1。

- 10) 牧孝憲、高橋徳、舛田智江、根本健児、落修一：“木質爆砕物の法面緑化資材としての利用”、土木学会論文集 G、Vol. 62、No. 2、pp.220-228、2006
- 11) 環境省・経済産業省：算定・報告・公表制度における算定方法・排出係数一覧
- 12) 高知県：高知県木質資源エネルギー活用事業 A (国内排出削減プロジェクトからの V E R 認証・管理試行事業) モニタリング計画書、http://www.4cj.org/document/jver/kochiA_MPprev.pdf
- 13) 経済産業省告示第六十六号、貨物輸送事業者に行わせる貨物の輸送に係るエネルギーの使用量の算定の方法、2006
- 14) Jullan Cleary, Nigel T. Roulet, Tim R. Moore : Greenhouse Gas Emissions from Canadian Peat Extraction, 1990-2000: A Life-cycle Analysis. J. Hum. Env.: 34(6) 456-461, 2005
- 15) 大石哲也、天野邦彦、人的利用が河川高水敷の地盤状態変化に及ぼす影響の定量的把握方法とその考察、水工学論文集、Vol.52, No.115, 2008.
- 16) 末次忠司編集、現場技術者のための河川構造物維持管理の実践、山海堂発行、2005。
- 17) 建設省土木研究所河川部河川研究室、洪水流を受けた時の多自然型河岸防衛工・粘性土・植生の挙動、土木研究所資料第 3489 号、1997.
- 18) 菅原崇之、本田英則、郡山出張所における有機物有効利用のとりくみ、平成 20 年度国土交通省国土技術研究会、2008.
- 19) 中田茂、コスト構造改革の取り組み堤防除草の刈草リサイクル、河川、701 号、pp.59-61, 2004.
- 20) 北海道開発局、刈草バンク、http://www.hkd.mlit.go.jp/zigyoka/z_jigyou/gijyutu/karikusa.html
- 21) 社団法人中央畜産会、河川敷資源活用 WEB <http://jlia.lin.gr.jp/river/>
- 22) 社団法人日本道路協会、道路緑化技術基準・同解説、1988.
- 23) 川畑朋子、吉田登、金子泰純、日下正基、都市におけるせん定枝バイオマスの賦存量とそのリサイクル方策に関する調査分析、環境システム研究論文発表会講演集、第 32 巻、pp.243-247, 2004.
- 24) 社団法人道路緑化保全協会編著、植物発生材堆肥化の手引き、1998.
- 25) 沖縄電力、報道発表「具志川火力発電所における木質バイオマス混焼の本格運用開始について」、平成 22 年 3 月 25
- 26) 関肖、一般国道 298 号 (東京外かく環状道路) 環境施設帯緑地の維持管理について、平成 21 年度国土交通省国土技術研究会、2009.
- 27) 杉谷敏夫、吉良雅治、大木良典、RPS 法 (新エネ利用促進法) への当社の取り組み、三菱重工技報 Vol.40, No.4, 2003.
- 28) 財団法人地球環境産業技術研究機構東京中央研究室、木質系バイオマスの石炭火力発電所への混燃技術の開発、2005.
- 29) 落修一、尾崎正明、干草と下水汚泥の中温・混合嫌気性消化法、土木学会論文集、Vol.2005, No. 804, VII-37, 2005.
- 30) 落修一、南山瑞彦、鈴木穰、越智崇：木質に蒸煮・爆砕を施すことによる木質と下水汚泥との混合・嫌気性消化法に関する研究、下水道協会誌、vol.41、No.498、pp.97-107、2004.

下水中の栄養塩を活用した資源回収・生産システムに関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 21～平 25

担当チーム：材料地盤研究グループ(リサイクル)

研究担当者：岡本誠一郎、宮本豊尚、山下洋正

【要旨】

下水処理場の環境を利用した様々な資源回収・生産手法のうち、電解処理法による栄養塩類の回収、下水汚泥焼却灰の高付加価値化、下水処理水等を用いた藻類培養による資源生産について可能性の検討を行った。下水汚泥消化液の上澄みに対して電解処理を施したところ、リンが概ね 3～4 割程度除去され、MAP 及び HAp の形成が示唆された。バイオマスと汚泥の混焼により焼却灰中の成分調整ができた。焼却灰自身も肥料成分が認められ、試験栽培では施肥の効果が確認でき、灰の肥効成分を直接的に利用できる可能性が見出せた。下水の二次処理水を用いて *Botryococcus* を培養することができたが、他の藻類の増殖に伴い生育が妨げられた。

キーワード：下水処理、栄養塩、電解処理法、肥料化、藻類培養

1. はじめに

世界的な食料増産・バイオマス生産のため、肥料用鉱石が戦略物資と産出国で位置づけられ¹⁾、安定的な肥料の確保が食料安全保障と関連して国家的な課題となってきた。下水汚泥中には食品残渣並びにその代謝物として高濃度の栄養塩が存在しており、これらを回収して資源利用する手法を検討する必要がある。また下水処理水中の低濃度の栄養塩についても、除去することで放流先の公共水域の水質改善につながることから、極力有効利用することが望ましいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では下水処理場の環境を利用して上記課題を解決するため、高濃度の栄養塩類を有効活用する手法として①電解処理法による栄養塩類の回収と②下水汚泥焼却灰の高付加価値化に関する検討を行った。また低濃度栄養塩を活用する手法として、③下水処理水等を用いた藻類培養による資源生産の可能性について検討を行った。

3. 結果

3. 1 電解処理法による栄養塩類の回収

電解処理法とは、水溶液中に電極版を設置し、電気分解を行うことで起きる酸化作用等の効果によって処理を行う手法である²⁾。晶析法等の他のリン等の回収技術と異なり、薬品を必要としない、副産物として水素を得ることができる、電力を多く消費するといった特徴がある。

これまでに電極に鉄やアルミニウムを使用した手法は

検討されてきているが^{3),4)}、これらは廃水中の栄養塩類や有機溶存物を除去することを第一の目的としている。このとき得られるリン含有物は、リン酸鉄やリン酸アルミニウムとなり、これらは植物にとって利用し難い形態となる。他方、資源回収に力点を置いた電解処理法として白金電極を使用する手法がある。田中らは白金電極を用いて畜産排水処理液からのリン等有用資源回収を試み、植物が比較的利用しやすい MAP および HAp の形態で回収している⁵⁾。本研究では資源回収を第一の目的とすることから、田中らの方法に準じて実験を行った。資源回収の対象とした液体は、消化汚泥の上澄みとした。

H21 年度は電解処理の基礎的な反応特性を把握するため、処理液中のリン等の除去率や、得られる回収物の組成の把握を行った。図-1 に装置の写真と概略を、表-1、に実験条件を示す。なお、実験に用いた極板は 8 枚で、

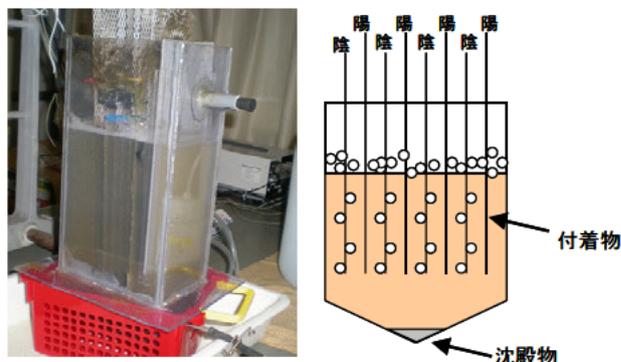


図-1 実験装置の写真(左)と概略図(右)

表-1 実験条件

実験系	処理対象汚泥			電極枚数	通電時間	印加電流	印加電圧		液面下の極板長さ
	汚泥種類	前処理	対象処理量				(初期)	(実験終了時)	
Case1	A市 消化汚泥の上澄み	3000rpm 20min	2.5L	8枚	16h	1A	3.0V	4.00V	150mm
Case1'	A市 消化汚泥の上澄み	3000rpm 20min	4L	8枚	16h	0.72A	2.71V	3.24V	200mm
Case2	A市 消化汚泥の上澄み	Case1処理前にMg添加	2.5L	8枚	16h	1A	2.8V	3.52V	150mm
Case3	A市消化汚泥+爆砕物の混合消化後の上澄み	3000rpm 40min	3L	8枚	16h	1A	3.0V	3.76V	150mm

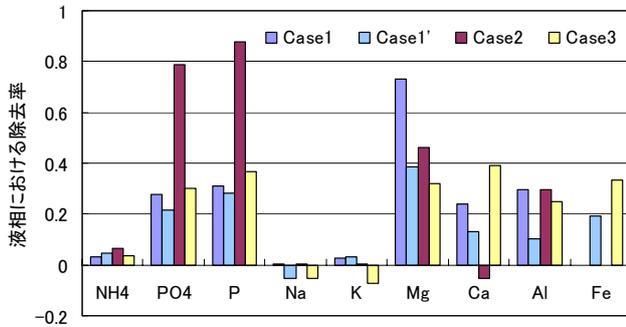


図-2 各成分の液相からの除去特性

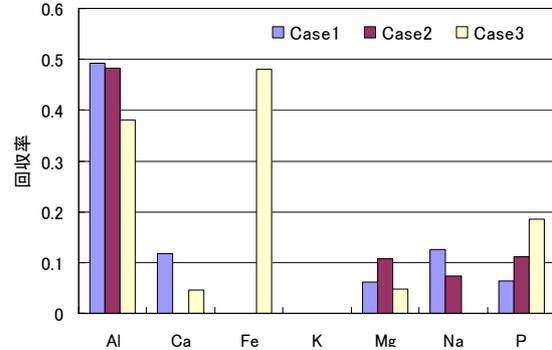


図-3 各成分の回収特性

電極間隔は10mmとし、チタン母材に白金めっきを施したメッシュ状の電極板を用いて実験を行った。

①液相からの金属等の除去性能

図-2に示すように、消化汚泥の上澄み液を用いた場合には電解処理を行うことで、リンが概ね3~4割程度、マグネシウムが5~7割、カルシウムが1~3割程度液相から除去された。除去された成分から推測すると、MAP及びHapの形態で析出していると考えられる。MAP法と同様にマグネシウム塩を添加したCASE2では液相からのリンの除去量が増加し、処理液中の9割が除去された。また、爆砕物を混合嫌気性消化した後の消化汚泥中にはカルシウムが多く含まれており、その結果リンの除去率が高まっている。

一方で、アルカリ金属であるナトリウム、カリウムは液相に残存しており、NH₄⁺についてはほとんど除去されなかった。畜産排水を対象とした田中の行った連続式の実験結果では⁵⁾、NH₄⁺が除去されていると報告されている。畜産排水中にはマグネシウムイオンが高濃度で存在しているためMAPが形成されるが、下水汚泥消化液中には比較的少ないため、NH₄⁺の除去に貢献できなかったと考えられる。

②付着物の特性

通常の消化汚泥の上澄みを用いたCase1、Case1'では、単位処理量あたり0.08g/L程度の固形物が電極板に付着した。また、マグネシウム塩を添加した系だけでなく爆砕物を混合消化した汚泥を用いた場合には収率が上がっ

ており、薬品添加ではなくマグネシウムやカルシウムを含む資材を混合メタン発酵することにより回収量を向上させる可能性が見出せた。また、いずれの実験系においても、実験装置下部に沈殿物は得られなかった。

電極板に付着した回収物を分析した結果、液相から除去された元素から推測される回収物の組成と、今回実験で得られた回収物の組成には差異があった。アルミニウムや鉄では50%弱が回収されていたが、リンやマグネシウム・カルシウムについては回収率が10%程度と非常に悪くなっていた(図-3)。水素の発生に伴う泡によって系外に除去された可能性や網状の電極を使用したことで、結晶として析出する上で必要となる表面積がなく結晶化が十分進まなかったことが原因として考えられる。結晶化が進めばカリウムを捕捉できる可能性があり⁵⁾、電極板の形状を考慮した検討が必要である。また金属種によって析出するまでの時間に違いがあることから、時系列での元素挙動に関する検討を行い、最適な処理液の滞留時間を求める必要がある。

3.2 下水汚泥焼却灰の高付加価値化に関する検討

下水汚泥には、食品由来のリンが大量に含まれており、リン輸入量の14%相当が下水システム中に存在するといわれている⁶⁾。下水汚泥焼却灰は、下水汚泥から水分と有機分を除いた無機物であり、リンの含有量はリン鉱石と同等であった⁷⁾。リン鉱石粉末自体にも肥料としての効果があることから⁸⁾、焼却灰の肥料としての性質について把握するための検討を行った。

また、既往の分析結果では一方でリン以外の主要な肥

表-2 バイオマスの混合燃焼条件

バイオマス	供給量[kg/h]		混合DS比 汚泥:バイオマス	焼却 時間
	汚泥	バイオマス		
チップ	154.4	53.3~63.6	0.6~0.7:1	5h
牧草	176.8	20.2	1.4:1	5h

表-3 リン酸・カリの形態

	専焼灰	汚泥+チップ	汚泥+牧草
T-P ₂ O ₅	26%	26%	27%
C-P ₂ O ₅	5.5%	7.8%	5.8%
W-P ₂ O ₅	0.020%	0.024%	0.046%
T-K ₂ O	2.4%	4.7%	4.2%
C-K ₂ O	1.2%	2.3%	1.6%
W-K ₂ O	0.15%	0.29%	0.40%

※ T:含有量、C:ク溶性、W:水溶性

料成分である窒素とカリウムについては焼却灰中には乏しい。窒素は焼却時にNO_xガスとして失われてしまうが、カリウムは焼却により失われにくいと考えられる。そこでH21年度は、長万部に設置している過給式流動燃焼炉⁹⁾を用いて、カリウムを多く含んでいる草木系バイオマスを下水汚泥と混合燃焼し、焼却灰中のカリウム濃度等の変化特性を調べた。得られた灰については肥料取締法に準拠した試験を行い肥料としての性質を把握するとともにコマツナを用いた試験栽培を行った。

表-2に示す割合で汚泥と草木灰を混合燃焼し、含有量(マイクロウェーブ分解法)・ク溶性・水溶性の資源量を肥料分析法¹⁰⁾に準拠して測定した。分析結果を表-3に示す。焼却灰中のT-P₂O₅濃度は混燃の有無に係らず25%以上あった。カリウムについては、混燃を行った系ではT-K₂Oとして5%弱まで高まっており、混燃により濃度を調整する可能性が見出せた。

実際に肥料として利用可能なク溶性ならびに水溶性の形態は、単体では焼成リン肥や化成肥料等の規格を満たしていない¹¹⁾。一方予備実験で用いた別の焼却灰ではク溶性リン酸の割合が13%程度と高く、化成肥料等の規格を満足していた。肥料取締法に基づく肥料ないし肥料原料としての利用を行うためには成分保証が必要になることから、今後は原料汚泥や焼却炉の形式による違いや、日々の変動についても把握する必要があると考えられる。

また、長万部で製作した焼却灰を用い、コマツナを用いた試験栽培を行った。播種は冬季に行い、温室(温度制御なし)で試験を行った。実験期間中の室温は日中でも10℃程度となることもあった。実験には市販の赤玉土を



(1) 無リン



(2) 過リン酸石灰施肥



(3) 汚泥専焼灰施肥



(4) チップ混焼灰施肥

図-4 播種65日後のコマツナの生育状況(冬季)

用い、元肥としてリン肥料(各焼却灰と過リン酸石灰)をP₂O₅として0.8mg与えた。窒素肥料はほとんど与えず、播種15日後に塩化アンモニウムを0.25mg追肥したのみである。休日を除く毎日、水を5~10ccほど与えていたが、土の表面は乾燥していることが多かった。

焼却灰を施肥した場合、発芽率が若干低下する傾向が見られたが、65日後には図-4に示すように無リン系と比べて生育がよく、化学肥料と比べても葉の大きさや枚数等を比べても遜色がなかった。植物は焼却灰中の栄養塩を吸収しているといえ、焼却灰の肥効成分を直接的に利用できる可能性が見出せた。

3.3 藻類培養による資源生産の可能性検討

下水中には大量の栄養塩が含まれており、下水処理プロセスの中で多くは除去され、清浄な処理水として公共用水域に放流されている。しかしながら処理水中には、依然として相当の栄養塩類が含まれており、最終沈殿地や放流水路で藻類が繁茂している事例がある¹²⁾。そこで、これらの栄養塩類を用いて有用な藻類の培養を試み、資源回収の可能性について検討を行った。

緑藻の一種である*Botryococcus*(図-5)は、重油相当の炭化水素を作る能力を有しており、単位面積当たりの油収量では、パームや菜種などのバイオ燃料の原料植物と比べても多く、食糧生産

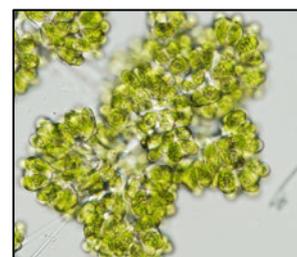


図-5 *Botryococcus braunii*

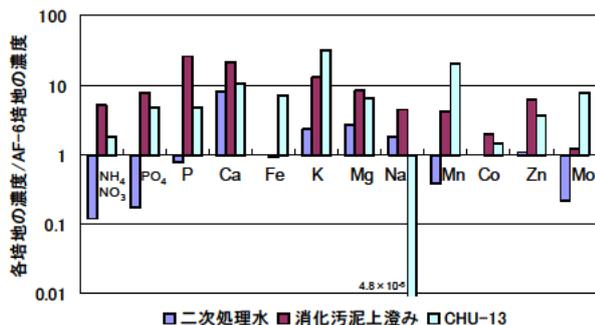


図-6 各培地の成分比較

表-5 *Botryococcus* の培養条件

培地	温度	照度	明暗時間	振とう
AF-6/ 二次処理水	24°C	4000~5000Lux	各12時間	有/無

と競合しないため将来の有望なエネルギー資源として注目されている¹³⁾。そこで本研究では、下水処理水及び高濃度に栄養塩を含んだ消化液の上澄みを用いて、*Botryococcus* の培養可能性に関する基礎検討を行った。

使用した株は、(独) 国立環境研究所微生物系統保存施設より委譲された NIES-836 を利用した。同施設が推奨する培地は AF-6 であるが¹⁴⁾、他文献では CHU-13 培地を利用した実験が行われている¹⁵⁾。これらの培地と二次処理水・消化液の上澄みの成分を比較した。図-6 はそれぞれの成分量を AF-6 培地の成分値で除したものであり、CHU-13 培地の値と 1 の間に二次処理水・消化汚泥上澄み液の成分が収まっていれば栄養塩類・金属に関しては培養に問題がないと考えられる。栄養塩類は二次処理水で不足、消化汚泥で過剰であり、金属では Na が過剰となっていた。

成分を把握した上で表-5 の条件で培養試験を行ったところ、いずれの培地でも *Botryococcus* の増殖がみられたが、二次処理水を用いた場合には AF-6 培地に比べると増殖速度は遅い傾向にあった。この原因の一つとして栄養塩濃度が薄いことが考えられる。若干の振とう (rpm=30) を行うといずれも増殖速度が速くなる傾向が確認された。

また、二次処理水を用いた場合には滅菌を行っていないため他の藻類が発生しており、培地に色がつき始めると急激に数が減る傾向が確認された。

4. まとめ

下水処理場の環境を利用した資源回収・生産は多種多様な方法が考えられるが、このうち有効な手法と考えられる電解処理法による栄養塩類の回収、下水汚泥焼却灰

の高付加価値化、下水処理水等を用いた藻類培養についての可能性を検討した。

下水汚泥消化液の上澄みに対して電解処理を施したところ、リンが概ね 3~4 割程度除去され、MAP 及び HAp の形成が示唆された。また、マグネシウムやカルシウムを供給することにより、リンの回収率を高められた。

過給式流動燃焼炉を用いてバイオマスと汚泥を混焼することで、焼却灰中のカリウムを増やすことができた。コマツナを用いた試験栽培を行ったところ焼却灰単独でもリン肥料としての効果が認められた。

下水の二次処理水を用いて炭化水素を作る能力を有する *Botryococcus* を培養することができたが AF-6 培地に比べると増殖速度は遅い傾向にあった。他の藻類の増殖に伴い生育が妨げられた。

参考文献

- 1) 農林水産省 HP: 肥料原料の安定確保に関する論点整理 <http://www.maff.go.jp/j/press/seisan/kankyo/100226.html>
- 2) 前川孝明、馮伝平: 電気化学的プロセスによる窒素リンの削減と資源化技術、資源環境対策、Vol.37、No.2、pp.147-151、2001
- 3) 宮本彰彦、中林昭、鈴木晴彦、澄田康光、井関正博、安田昌司: 鉄電解を用いた下水汚泥脱離液からのりん回収、第 43 回下水道研究発表会講演集、pp.25-27、2006
- 4) 伊与亨、島村匡、青木正治、稲盛悠平、佐藤八郎: アルミニウム電解脱リン法を用いた小規模合併浄化槽のリン除去効率、第 33 回水環境学会講演集、p.72、1998
- 5) 田中恒夫、小池範幸、佐藤孝志、新井忠男、平靖之: 電解法による畜産排水からのリン酸塩の回収、水環境学会誌、Vol.32、No.2、pp.79-85、2009
- 6) 国土交通省資料
- 7) 宮本豊尚、岡本誠一郎、落修一: 安定的リン資源確保のための下水道における資源化モデル、環境システム計測制御学会、Vol.13、No.2/3、pp.199-202、2008
- 8) 吉田: 粉碎した生磷鉱石の肥効について、日本土壤肥料学会誌、Vol.25、No.1、pp.48、1954
- 9) 宮本豊尚、岡本誠一郎、落修一、長沢英和、小関多賀美、鈴木善三: 過給式流動炉を用いた草木バイオマスと下水汚泥の混合燃焼、土木技術資料、vol.52、No.4、pp.22-25
- 10) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法、http://www.famic.go.jp/ffis/fert/sub6_data/bunsekihou.html
- 11) 農林水産省: 肥料取締法に基づき普通肥料の公定規格を定める等の件、<http://www.famic.go.jp/ffis/fert/kokuji/60k0284.htm>
- 12) 岡安祐司、南山瑞彦、鈴木稔: 微生物固定化担体を用いた、

下水再生水放流水路における付着藻類の増殖を抑制する技術の開発、第46回環境工学研究フォーラム講演集、pp.16-18、2009
13) 渡邊信：農林畜産業からみたバイオマス利用の課題と展望
藻類によるバイオ燃料生産の展望、環境技術、Vol.38、No.3、
pp.160-164、2009
14) 独立行政法人国立環境研究所 微生物系統保存施設 HP

<http://mcc.nies.go.jp/top.jsp>

15) K.YAMAGUCHI, H.NAKANO, M.MURAKAMI, S.KONOSU, O.NAKAYAMA, M.KANDA, A.NAKAMURA, H.IWAMOTO : Lipid composition of a green alga , *Botryococcus braunii*, Agric. Biol. Chem., Vol.51, No.2, pp.493-498, 1987

再生水利用の安全リスクに関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 岡本誠一郎
主任研究員 山下 洋正
主任研究員 諏訪 守
研究員 桜井 健介

1. はじめに

平成 18 年度における全国の下水处理場の処理水量は年間 142.9 億 m^3 に達している。下水処理水は、都市内における貴重な水資源であり、下水処理場の場外に送水され、工業用水、修景揚水等として年間 1.94 億 m^3 の利用があるが、その割合は、処理水量全体の 1.4% に過ぎない¹⁾。一方、内閣府が行なった世論調査²⁾では、水の有効利用を図るため、一度使った水を処理した水や雨水など、水道水と比較して低水質の水が、さまざまな施設の水洗トイレや散水などに活用されているが、このような水を使うことについてどう思うか聞いたところ、「使いたい」とする者の割合が 86.4% となっている。同調査で「行政に力を入れてほしいこと」では、「水辺環境の整備」や「水の再利用の促進」が平成 13 年の前回調査に比べ増加するなど、水辺環境や水の再利用に対する要請が強くなっている。また、下水処理水の利用の促進に向けて、再生水の安全性の評価と制御方法の開発などが求められている³⁾。本研究では、平成 21～24 年度において、再生水利用促進のための要因分析の上、水質基準を設定するための課題抽出および再生処理技術の評価を行うものとし、本年度は再生水利用促進のための要因分析および再生処理技術の評価を実施した。なお、本調査における再生水の利用とは、下水処理水の利用と同義である。

2. 再生水利用促進のための要因分析

平成 20 年度の研究⁴⁾において、再生水利用の主要な促進・阻害要因の分類が示された。特に、近年および将来予想される外的環境の変化の幾つか（気候変動や食料自給率向上政策、都市の潤い・水辺創出のニーズなど）は、内部要因に対して再生水利用の促進側に影響することが示された。一方、利用者のイメージを含む安全性や利用にあたっての経済性などが再生水利用促進について脅威や弱みとなりうることが示された。従って、脅威や弱みは、今後、外的要因が変化し再利用の導入を検討する際に、導入の制限となる可能性がある。本研究においては、それら要因の構成要素の同定と対策について先行事例の取り組みを抽出の後、再生水利用促進のための要因分析を行なった。

その構成要素のひとつに市民の了承がある。再生水利用の市民認知に関する研究⁵⁾では、既往の下水処理水の再利用プロジェクトについてレビューした上で、幾つかの再生水利用プロジェクトは住民の反対によって実施が保留されるなどしており、全ての再生水利用プロジェクトの導入の成功は、市民の承諾次第であるとしている。また、海外での大規模な再利用プロジェクトの場合では、建設債発行のための住民投票が求められる場合などがあり⁶⁾、市民の了承は特に重要である。

市民の嗜好について、過去の調査をとりまとめた文献⁶⁾によると、米国や豪州の事例で「反対」する回答者の割合は、ゴルフ場散水は 2-7%、家庭水洗利用は 3-13%、野菜への畑地灌漑は 7-31%、洗濯用水利用は 22-30%、シャワー用水利用は 37-52%、調理への利用は 55-62%、飲用利用は 56-74% である。イスラエルの事例⁷⁾では、「支持」する回答者の割合は、修景利用 95%、水洗利用 85%、消火用水利用 96%、洗濯用水利用 38%、飲用利用のための地下浸透 11% であった。国内^{8) 9)}では、5 箇所の調査において、「支持」する回答者の割合は、水洗用水利用で約 93%、・修景用水で約 86%、親水用水で約 60% であった。各国の利用用途と容認度の関係を図 1 に示した。修景用水や水洗用水は、いずれの地域においても、支持の割合が高く、各国間での差は小さかった。また、用途

毎の接触可能性の高低と支持率の間には、相関が見られ、接触に対する不安感の寄与が伺われる。しかしながら、地域の特定の課題に取り組むための提案となると、接触の程度ではなく、その目的が大きく寄与する事例も報告されている¹⁰⁾。

文献⁵⁾によると、市民の了承に与える影響因子として、「生理的嫌悪感(yuck factor)」や「個人のリスク認知」などがあり、「生理的嫌悪感」については、多くのケースで心理的な障壁が発生することが報告されており、“recycled water”という言葉は、人々に強く汚物のイメージを残すので、“repurified water”などの他の言葉の方がより好まれるなど、呼称が配慮される場合もある。「個人のリスク認知」については、大多数の市民が再利用における健康影響に関心があり、導入の賛成への条件となっていること、専門家と市民の間にリスクの認知に差異があること、下水処理水の再利用計画に対する賛否により同程度のリスクに対する受け取り方が異なることが示されている⁵⁾。下水処理水の再利用計画における地域住民の許容/拒否の意思決定の主要要因の分析のため、文献¹⁰⁾では、オーストラリアでの下水処理水の帯水層再注入による間接飲用利用計画などのような、人との接触が密接な事例において応用行動分析に基づく意思決定モデルを作成し、主要要因を定量的に解析した。その結果、「生理的嫌悪感」は、中庸な寄与があるが、固まっていて変化させるのが困難であり、「官公庁への信頼」および「個人のリスク認知」は弱い寄与であるが、意思決定を変化させるのにより受容性が高いことが示された。なお、「官公庁への信頼」は、再利用への市民の了承の因子のひとつであり、特に、知見に限界があるような場合に重要であるとされている⁵⁾。

文献¹²⁾では、水の再利用にあたっての最大の障壁である市民の承諾を得る戦略について、7つの要素をとりまとめ、その一つとして「リスクコミュニケーションの方法の学習」が提示されている。そのためには、市民への疑問に対し、説得力があり、事実に基づく応答が不可欠であり、(交通事故の発生確率などとの)相対的なリスク評価が有効としている。

以上より、再生水利用促進のためには、「個人のリスク認知」を進めることは市民の承諾を得る上で有効であり、今後の外的環境の変化により再生水利用の必要性が高まり、その必要性が行政の努力により市民へ理解が進んだ場合に、リスクコミュニケーションなどにより可能な限り正確でわかりやすい安全性の保証が有効となると考えられる。

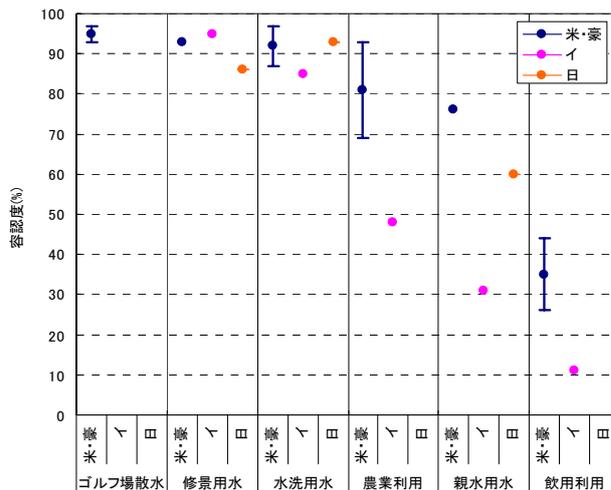


図1 各国の利用用途と容認度の関係

注)「米・豪」は、米国および豪州の事例⁶⁾、「イ」はイスラエルの事例⁷⁾、「日」は日本の事例⁸⁾を表す。また、「米・豪」は、100より反対度(%)を減じた値を容認度とした。

3. 再生処理技術の評価

3. 1 下水処理水中のウイルスの存在実態

下水処理水中のウイルスは、しばしば粒子に付着している場合がある^{13),14)}。粒子の種類によっては、化学消毒や紫外線消毒において、消毒効果を低下させることが知られている¹⁵⁾。また、MF膜やUF膜のろ過処理は、粒子の補足能力が極めて高い一方、微粒子などによる膜の目詰まりが起りやすく、膜ろ過装置の運転方法や膜の物理的洗浄や薬品洗浄等のノウハウが重要であることが知られている¹⁶⁾。従って、粒子とウイルスの関係は、再生処理技術の評価する上で、重要な知見であると考えられる。挿入

下水処理水中の粒子は、一般的に1-200 μm の範囲で見られると報告されている⁶⁾。例えば、二次処理水の全固形物のうち、78%が1-100 μm の粒子で有り、その85%が有機物であった¹³⁾。20 μm 以上の微粒子の動態は最終沈殿池の設計に依存し、10-20 μm 以下の粒子は標準活性汚泥法のタイプやSRTに大きく影響を受けるとされている⁶⁾。また、コロイド(0.01-1.0 μm)の粒子数は、 10^8 - 10^{12} 個/mLとされている⁶⁾。

ウイルスについては、二次処理水中のコリファージのうち懸濁物質(直径0.45 μm 以上)に付着しているものが1%以下から24%の範囲であり、8 μm 以上および0.65 μm 以下の粒子に多く検出されている¹³⁾。文献¹⁷⁾では、二次処理水(未消毒)中のエンテロウイルスのうち0.3 μm 以上の粒子に付着しているものが3.4%と報告している。文献¹⁸⁾では、流入下水中のノロウイルスは、単独で存在しているか、1.2 μm 以下の懸濁物質に付着している可能性が示唆されたとしている。流入下水中のNorovirus genogroup 1 (G1) および genogroup 2 (G2) において、180 μm 以下の懸濁物質に付着しているものが優勢であり、Waste Stabilization Pond(滞留時間は数週間)の処理水では、0.45 μm と180 μm の間の懸濁物質に付着しているNorovirus G1 および G2 が主(それぞれ平均で47%と67%)であったことが報告されている¹⁹⁾。

3. 2 下水中の懸濁物質径の測定

粒子とウイルスの関係の解明に向け、下水中の懸濁物質の粒径の分布を全体と微小な懸濁物質に分けて把握することとした。

3. 2. 1 下水中の懸濁物質の概況把握

下水中の懸濁物質の概況把握のため、レーザー散乱法(LS13320, Beckman Coulter, Inc.)により下水中の懸濁物質の粒子径毎の体積分布を測定した。測定の対象とした試料は、平均処理水量10万 m^3 /日程度の異なるAおよびB下水処理場の流入下水と二次処理水とした。流入水の浮遊物質は、A処理場:196mg/L、B処理場:115mg/Lであった。また、二次処理水の浮遊物質は、A処理場:2.8mg/L、B処理場:3.2mg/Lであった。測定結果の例を図2-5に示した。図中のエラーバーは、併行条件(同一試料の測定において、人、日時、装置のすべてが同一とみなされる繰り返し操作する条件²⁰⁾)の3回の繰り返し測定時の標準偏差を示した。流入下水中の懸濁物質は、1-900 μm の範囲で見られ、10-50 μm の範囲に体積のピークが見られた。下水処理水は、文献⁶⁾と同様に、懸濁物質が1-200 μm の範囲で見られた他、さらに大きな粒子も見られた。しかしながら、下水処理水は懸濁物質量が少ないために測定が不能である場合がたびたびあった。

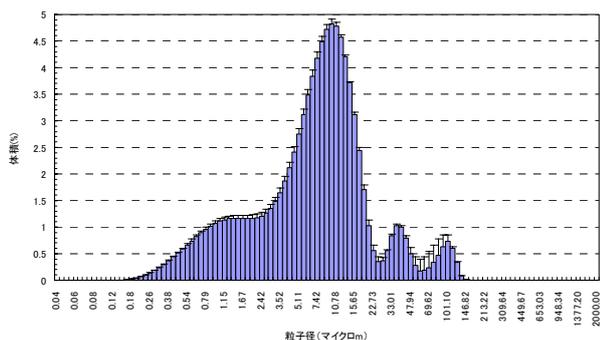


図 2 A 処理場の流入下水中の粒子径毎の体積の分布

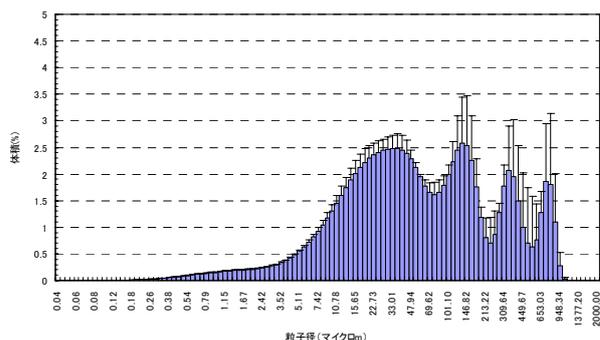


図 3 B 処理場の流入下水中の粒子径毎の体積の分布

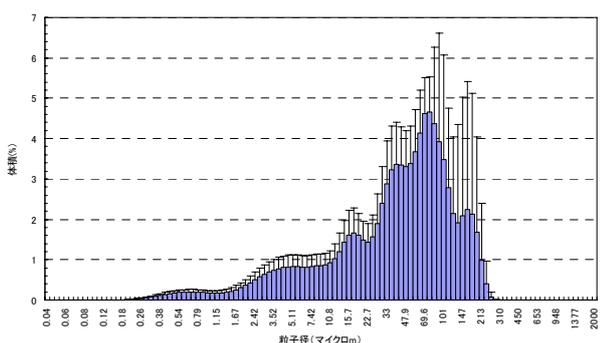


図 4 A 処理場の二次処理水中の粒子径毎の体積の分布

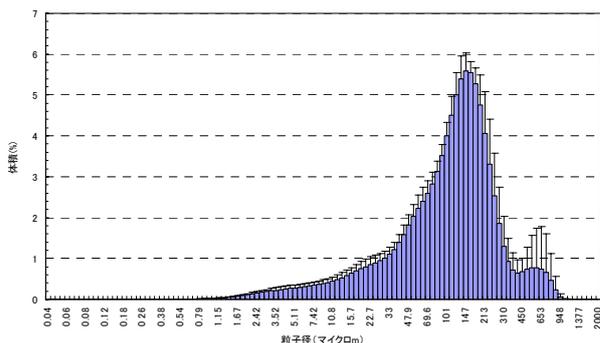


図 5 B 処理場の二次処理水中の粒子径毎の体積の分布

3. 2. 2 下水中の微小懸濁物質径の分布の測定方法の検討

微小懸濁物質径の分布の把握には、電気的検知帯法(Electrical sensing zone method, ISO 13319, Multisizer 4.0, Beckman Coulter, Inc.)を用いた。本法は、懸濁物質の電気抵抗を利用し、分析試料中の粒子 1 個ずつの体積を測定し、球形に換算した粒子径ごとの粒子数を出力する方法である。本報告において、微小懸濁物質とは、前述のとおり生物処理に大きく影響を受けるとされている $10\text{-}20\mu\text{m}$ 以下の粒子⁶⁾を指すこととし、分析機の細孔は $20\mu\text{m}$ (標準測定範囲: $0.4\text{-}12\mu\text{m}$) を用いることとした。

(1) 定量範囲の検討

1) 方法

下水中の微小懸濁物質径の分布の測定における定量範囲の検討のため、併行条件における粒子径ごとの粒子数の変動係数を求めた。分析には、前項と同様に、流入下水と下水処理水を対象とし、原則として流入下水 $0.1\mu\text{L}$ 、二次処理水 $1\mu\text{L}$ を分析に供した。

2) 結果

流入下水および二次処理水中の粒子径分布の測定時における粒子径毎の平均粒子数と変動係数の関係を図 6、7 に示した。図 8、9 に流入下水および二次処理水中の粒子径分布の測定時における粒子径と平均粒子数の関係の測定例を示した。これらの図の示すように、分析試料は全般的に、分析試料あたりの平均粒子数が多い場合には、変動係数が低くなる傾向が見られ、定量下限の確認が必要と考えられた。文献²⁰⁾にならい、変動係数(y)と粒子数(x)を双曲線($y=a+b/x$)で近似した際に変動係数が 0.1 以下となるのは、分析試料あたりの平均粒子数が、流入下水は $14.8\text{-}17.2$ 個以上の試料、二次処理水は $11.3\text{-}35.5$ 個以上の試料であった。また、本調査における分析試料は、大きな粒子径ほど粒子数が少ない傾向にあり、それら平均粒子数を満たすのは、流入下水においては、粒子径が $1.237\text{-}1.376\mu\text{m}$ 以下の時であり、二次処理水においては、粒子径が $0.798\text{-}1.271\mu\text{m}$ 以下の時であった。それ以上の粒子径の測定には、細孔や分析試料量の変化により対応できる可能性があり、今後検討が必要である。

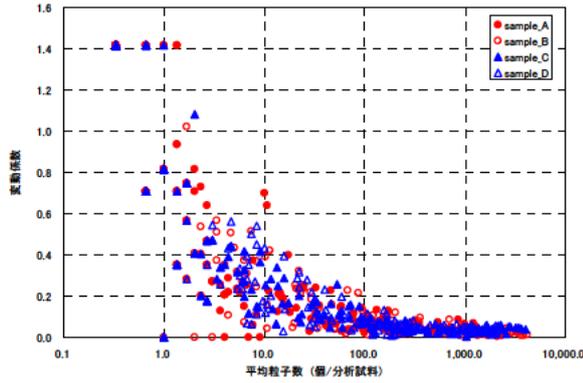


図 6 流入下水中の粒子径分布の測定時における粒子径ごとの平均粒子数と変動係数の関係

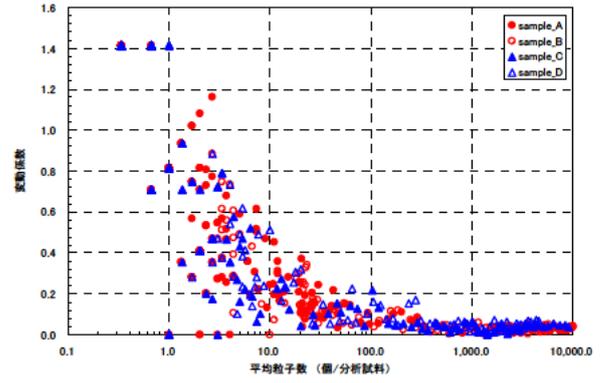


図 7 二次処理水中の粒子径分布の測定時における粒子径ごとの平均粒子数と変動係数の関係

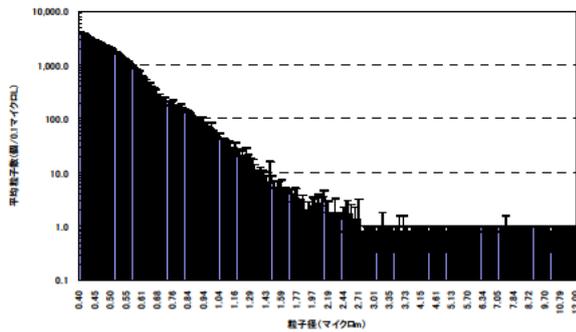


図 8 流入下水中の粒子径分布の測定時における粒子径と平均粒子数の関係の測定例

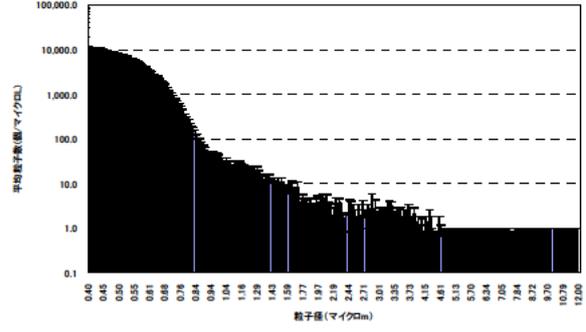


図 9 二次処理水中の粒子径分布の測定時における粒子と平均粒子数の関係の測定例

(2) 保管による影響

1) 方法

下水中の微小懸濁物質径の分布の測定において、分析までに時間を要する場合は想定し、保管による影響を調査した。分析対象試料は、下水処理水を用いた。保管条件は、4℃で7日間とした。

2) 結果

測定結果を図 10 に示した。なお、検出されなかった粒子径は表記していない。保管によって、各々の粒子径において減少する傾向が見られた。定量範囲内全体の変化率は、 $-40.0 \pm 14.7\%$ (平均±標準偏差)であった。今後は、試料による差異および保管期間の短縮による改善について調査する必要がある。ここで、変化率は、式(1)によって計算した。定量範囲は、変動係数が 0.1 以下の場合と設定し、保管前は $0.4-0.888 \mu\text{m}$ 、保管後は $0.4-0.912 \mu\text{m}$ であり、変化率の計算には $0.4-0.888 \mu\text{m}$ の粒子数を用いた。

$$\text{変化率(\%)} = (\text{保管後粒子濃度} - \text{保管前粒子濃度}) / \text{保管前粒子濃度} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{式(1)}$$

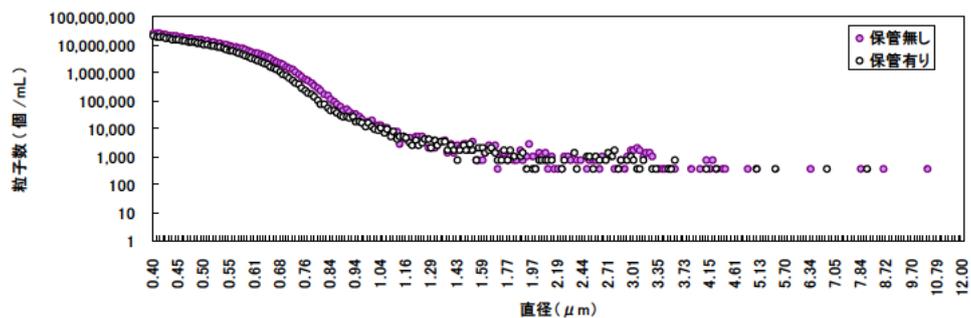


図 10 下水処理水の保管 (4℃、7日間) 前後の粒子径ごとの粒子数

3. 3 下水処理場における微小懸濁物質とウイルスの除去

下水処理場における微小懸濁物質の除去に関する実態とウイルスの除去の実態を把握することにより、下水処理場における効果的なウイルスの除去方法の開発に資することが期待される。そこで、本年度は、2 下水処理場(A、B)における微小懸濁物質とウイルスの除去の実態について調査した。

3. 3. 1 標準活性汚泥法および嫌気好気活性汚泥法を併用した A 下水処理場

(1) 方法

表 1 の A 下水処理場において、2010 年 2 月上旬に、有機物負荷の高い時間帯（午前 11 時）の流入下水について滞留時間を考慮し下水処理水を採取し、対象物質を分析した。対象下水処理場は、標準活性汚泥(AS)法および嫌気好気活性汚泥(AO)法を併用している。採取した試料は、表 1 および図 11 および 12 のとおりとし、いずれも 1 時間静置後の上澄みを測定試料とした。従って、下水処理場の実際の処理水質とは異なる。対象物質は、浮遊物質、微小懸濁物質分布、ノロウイルス濃度とした。浮遊物質は下水試験方法に従った。微小懸濁物質分布は、3. 2. 2 で実施した方法を採用した。微小懸濁物質分布の測定までには冷蔵状態で 3 日間要した。ノロウイルスは、Norovirus genogroup 1 (NoV G1)、genogroup 2 (NoV G2)を対象とし、分析方法は、文献²¹⁾に従った。すなわち、試料にポリエチレングリコール及び塩化ナトリウムを加え、一晚静置後、10,000g にて遠心し、沈さより RNA を抽出し、精製の後、リアルタイム RT-PCR 法により定量した。いずれの試料も、安定した定量値を得られると報告されているリアルタイム PCR 反応チューブあたり 10 コピー²²⁾以上検出された。

表 1 対象とした A 下水処理場

水処理方式	採取試料	反応槽滞留時間
A 処理場	標準活性汚泥法(AS) 反応タンク先端(IN_AS)、 反応タンク中央(MID_AS)、 反応タンク末端(OUT_AS)	6.3時間
	嫌気好気活性汚泥法(AO) 反応タンク先端(IN_AO)、 反応タンク中央1(MID1_AO)、 反応タンク中央2(MID2_AO)、 反応タンク末端(OUT_AO)	9.3時間

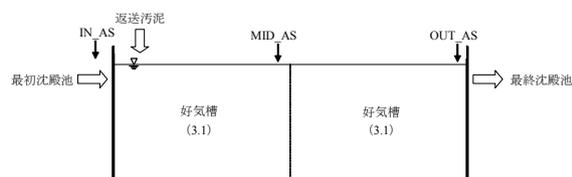


図 11 A 処理場の AS 法系列での採水箇所（括弧内は滞留時間を表す。）

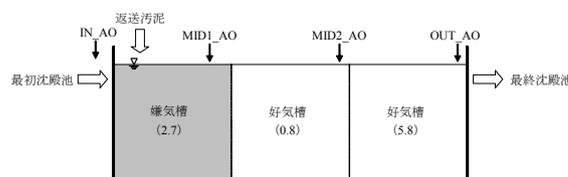


図 12 A 処理場の AO 法系列での採水箇所（括弧内は滞留時間を表す。）

(2) 結果

図 13-15 に、懸濁物質の粒度分布（粒子の直径と粒子個数）の測定結果を示す。定量範囲（変動係数 0.1 以下）は、AS 法処理水(OUT_AS)が粒子径 0.4-0.788 μm 、AO 法処理水(OUT_AO)が粒子径 0.4-0.820 μm であった。また、A 処理場の AS 法の処理水(OUT_AS)と AO 法処理水(OUT_AO)の懸濁物質の粒度分布（粒子の直径と粒子個数）の違いを図 15 に示した。OUT_AO は 0.4-0.451 μm の間で OUT_AS より濃度が高く、それ以上の径では差はあまり見られなかった。表 2、4 に各試料の NoV と浮遊物質の測定結果を示した。NoV 濃度は、文献²¹⁾と同等であった。また、式(1)と同様に流入水に対する各試料の変化率を表 3、5 に示した。おおよそ 0.511 μm より大きな粒子において低減しており、粒径が大きいほど変化率は小さかった。AS 法の中央(MID_AS)と末端(OUT_AS)では、好気槽滞留時間 3.1 時間分の差異があるが、微小懸濁物質や浮遊物質に差異は見られなかった。また、最初沈殿池の前後の微小懸濁物質の粒度分布には、差はほとんど見られなかった。

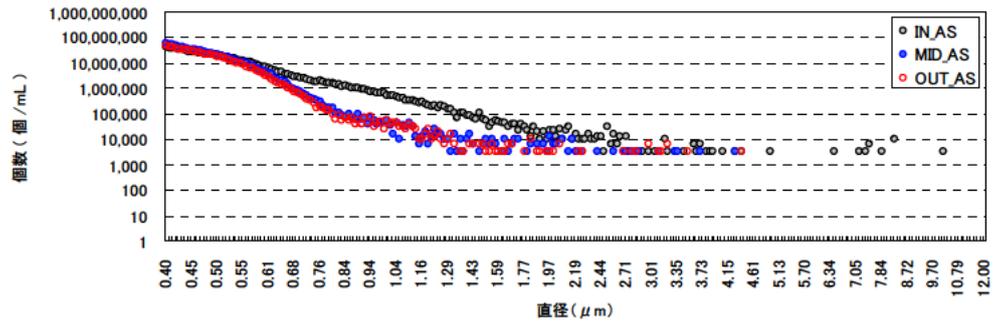


図 13 A 処理場の AS 法系列における懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

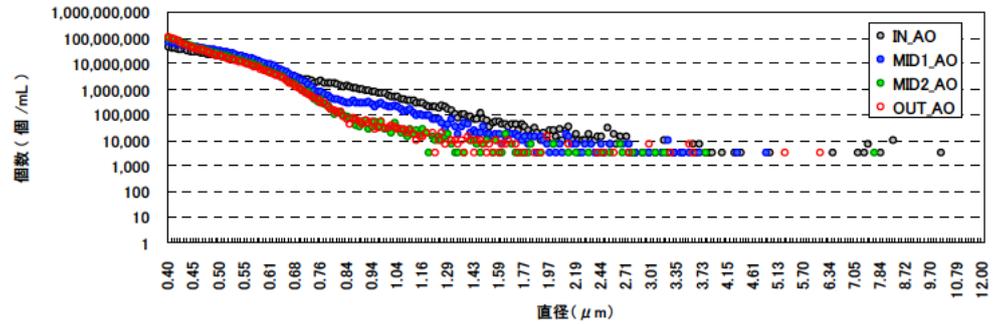


図 14 A 処理場の AO 法系列における懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

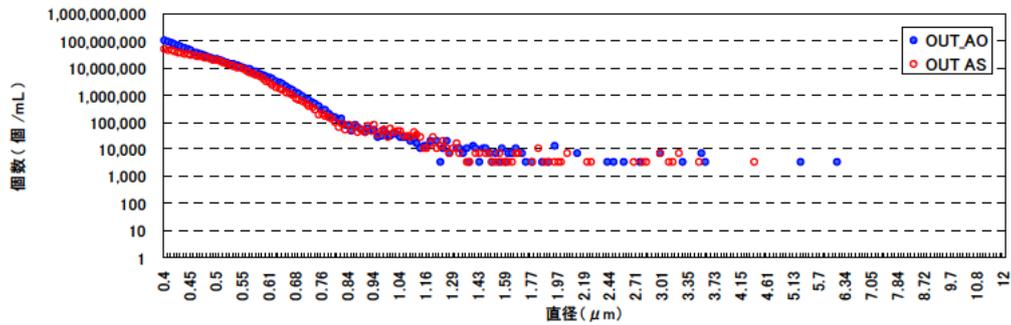


図 15 A 処理場の AS 法処理水と AO 法処理水中の懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

表 2 A 処理場の AS 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の測定結果

項目	粒子径の幅 (μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
単位	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	コピー/L	コピー/L	mg/L
IN_AS	3.3×10^8	2.1×10^8	1.2×10^8	5.1×10^7	2.2×10^7	1.4×10^7	6.7×10^6	9.4×10^7	75.0
MID_AS	4.4×10^8	2.3×10^8	1.0×10^8	2.8×10^7	5.2×10^6	1.1×10^6	1.3×10^6	9.9×10^6	2.9
OUT_AS	3.6×10^8	2.0×10^8	8.2×10^7	2.0×10^7	3.9×10^6	8.1×10^5	8.7×10^5	4.5×10^6	2.8

表 3 A 処理場の AS 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の反応タンク先端(IN_AS)に対する変化率

項目	粒子径の幅 (μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
	変化率(%)								
MID_AS	31	11	-12	-44	-77	-92	-81	-90	-96
OUT_AS	7	-6	-30	-60	-82	-94	-87	-95	-96

表 4 A 処理場の AO 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の測定結果

項目	粒子径の幅 (μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
単位	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	コピー/L	コピー/L	mg/L
IN_AO	3.3×10^8	2.1×10^8	1.2×10^8	5.1×10^7	2.2×10^7	1.4×10^7	6.7×10^6	5.7×10^7	65.5
MID1_AO	5.3×10^8	3.2×10^8	1.8×10^8	6.6×10^7	1.5×10^7	3.6×10^6	1.9×10^6	2.5×10^7	23.3
MID2_AO	6.4×10^8	2.6×10^8	1.1×10^8	3.6×10^7	7.0×10^6	1.1×10^6	1.4×10^6	1.1×10^7	9.4
OUT_AO	6.4×10^8	2.3×10^8	9.7×10^7	3.2×10^7	6.3×10^6	1.1×10^6	4.1×10^5	5.6×10^6	7.6

表 5 A 処理場の AO 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の反応タンク先端(IN_AO)に対する変化率

項目	粒子径の幅 (μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
	変化率(%)								
MID1_AO	59	54	50	30	-34	-73	-71	-56	-64
MID2_AO	93	23	-5	-30	-69	-92	-79	-81	-86
OUT_AO	93	7	-17	-37	-72	-92	-94	-90	-88

3. 3. 2 標準活性汚泥法および嫌気無酸素好気法を併用した B 下水処理場

(1) 方法

表 6 の B 下水処理場において、2010 年 1 月中旬に、有機物負荷の高い時間帯（午前 9 時）の流入下水について滞留時間を考慮し下水処理水を採取し、3. 3. 1 と同様の調査を実施した。微小懸濁物質分布の測定までには冷蔵状態で 2 日間要した。対象下水処理場は、標準活性汚泥(AS)法（一部擬似嫌気運転を行なっている）および嫌気無酸素好気(A2O)法を併用している。採取した試料は、表 6 および図 16 および 17 のとおりである。NoV G1 および G2 については、A2O 法の反応タンク末端試料(OUT_A2O)を除くいずれの試料も、リアルタイム PCR 反応チューブあたり 10 コピー以上検出された。

表 6 対象とした B 下水処理場

	水処理方式	採取試料	反応槽滞留時間
B 処理場	標準活性汚泥法(AS) (擬似嫌気槽を含む)	流入下水(IN)、 反応タンク中央(MID_AS)、 反応タンク末端(OUT_AS)	12.9時間
	嫌気無酸素好気法(A2O)	流入下水(IN)、 反応タンク中央(MID_A2O)、 反応タンク末端(OUT_A2O)	14.1時間

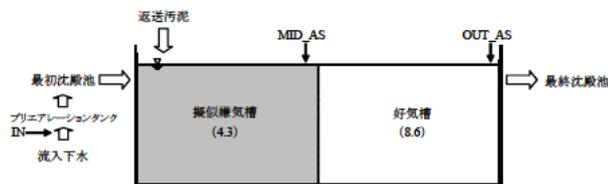


図 16 B 処理場の AS 法系列での採水箇所（括弧内は滞留時間を表す。）



図 17 B 処理場の A2O 法系列での採水箇所（括弧内は滞留時間を表す。）

(2) 結果

図 18-20 に、懸濁物質の粒度分布（粒子の直径と粒子個数）の測定結果を示す。定量範囲（変動係数 0.1 以下）は、AS 法処理水(OUT_AS)が粒子径 0.4-1.000 μm、A2O 法処理水(OUT_A2O)が粒子径 0.4-1.288 μm であった。また、B 処理場の AS 法の処理水(OUT_AS)と A2O 法処理水(OUT_A2O)の懸濁物質の粒度分布（粒子の直径と粒子個数）の違いは、あまり見られなかった。表 7、9 に各試料の NoV と浮遊物質の測定結果を示した。NoV 濃度は、文献²¹⁾と同等であった。また、各試料の変化率を表 8、10 に示した。A 処理場と異なりほとんどの粒径で減

少がみられ、特に、 $0.672\mu\text{m}$ より大きな粒子ほど変化率は小さかった。

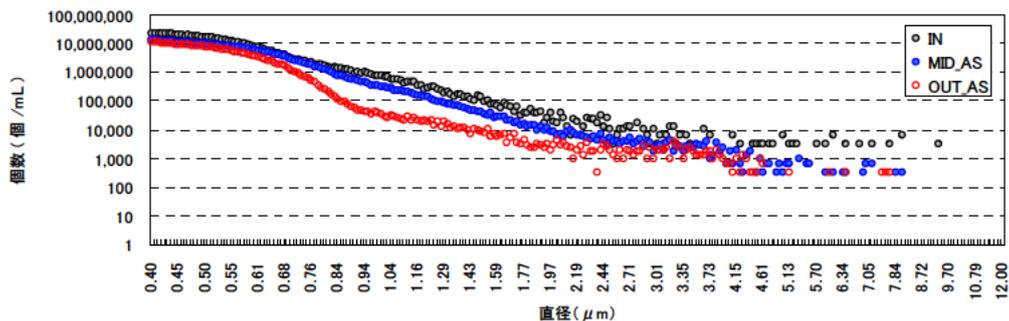


図 18 B 処理場の AS 法系列における懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

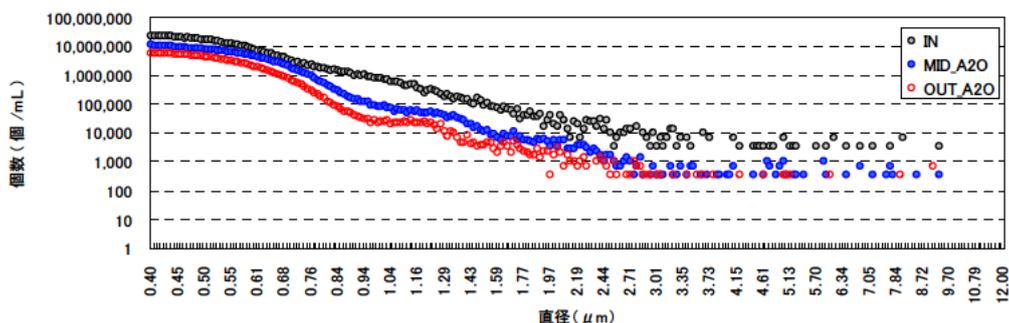


図 19 B 処理場の A2O 法系列における懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

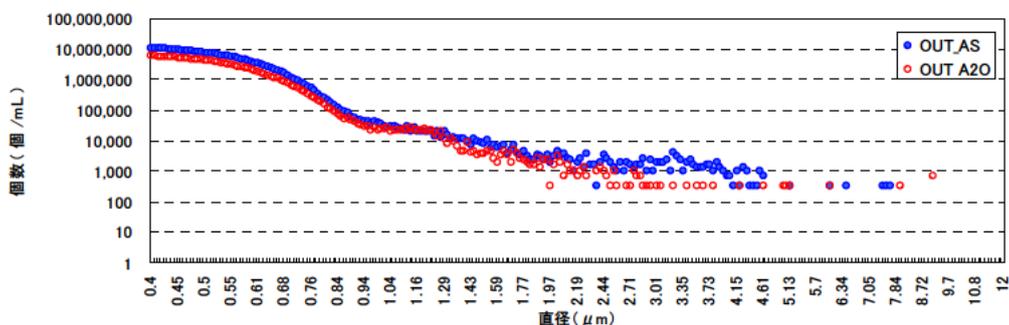


図 20 B 処理場の AS 法処理水と A2O 法処理水中の懸濁物質の粒度分布 (粒子の直径と粒子個数)

表 7 B 処理場の AS 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の測定結果

項目	粒子径の幅(μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
単位	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	コピー/L	コピー/L	mg/L
IN	2.2×10^8	1.8×10^8	1.2×10^8	6.0×10^7	2.7×10^7	1.5×10^7	6.1×10^6	3.2×10^8	115.0
MID AS	1.2×10^8	1.0×10^8	7.8×10^7	5.0×10^7	2.4×10^7	9.7×10^6	2.4×10^6	4.8×10^7	23.6
OUT AS	1.0×10^8	8.0×10^7	5.4×10^7	2.7×10^7	9.1×10^6	1.8×10^6	4.7×10^5	4.7×10^6	8.6

表 8 B 処理場の AS 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の流入下水(IN)に対する変化率

項目	粒子径の幅(μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
	変化率(%)								
MID AS	-45	-43	-34	-17	-11	-35	-60	-85	-79
OUT AS	-54	-55	-54	-54	-67	-88	-92	-98.6	-93

表 9 B 処理場の A2O 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の測定結果

項目	粒子径の幅(μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
単位	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	個/mL	コピー/L	コピー/L	mg/L
IN	2.2×10 ⁸	1.8×10 ⁸	1.2×10 ⁸	6.0×10 ⁷	2.7×10 ⁷	1.5×10 ⁷	6.1×10 ⁶	3.2×10 ⁸	115.0
MID A2O	1.0×10 ⁸	8.2×10 ⁷	6.1×10 ⁷	3.6×10 ⁷	1.4×10 ⁷	3.8×10 ⁶	4.2×10 ⁵	5.5×10 ⁶	16.8
OUT A2O	5.5×10 ⁷	4.5×10 ⁷	3.0×10 ⁷	1.5×10 ⁷	5.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	3.3×10 ⁴	2.6×10 ⁵	4.0

表 10 B 処理場の A2O 法系列の粒子数と NoV 濃度、浮遊物質の流入下水(IN)に対する変化率

項目	粒子径の幅(μm)						NoV G1	NoV G2	浮遊物質
	0.4-0.451	0.451-0.515	0.511-0.588	0.588-0.672	0.672-0.767	0.767-0.876			
	変化率(%)								
MID A2O	-55	-54	-49	-41	-48	-74	-93	-98	-85
OUT A2O	-75	-75	-75	-75	-81	-93	-99	-99	-97

3. 3. 3 下水処理場における微小懸濁物質とウイルスの除去のまとめ

A、B 処理場の結果から、いずれの処理場および処理方法でも 0.672-0.876 μm の微小懸濁物質は、67%以上の減少が見られるなど共通して大きく減少していたが、それ以下の径については、処理場および処理方法間で差異が見られた。例えば 0.4-0.451 μm の粒子の変化率は、「A 処理場 AO 法」>「A 処理場 AS 法」>「B 処理場 AO 法」>「B 処理場 A2O 法」であり、「A 処理場 AO 法」および「A 処理場 AS 法」処理水中の懸濁物質は、流入水の懸濁物質に対して同程度が増加し、「B 処理場 AO 法」および「B 処理場 A2O 法」は減少していた。

NoV G1 および G2 は、いずれの処理場および処理方法でも、87%より大きく減少していた。特に、A2O 法の処理水の NoV G1 および G2 は大きく減少していた。また、0.672 μm 以下の微小懸濁物質も大きく減少していた。既往の文献では、NoV と微小懸濁物質の付着の関係について、十分な知見が得られていないことから、今後、試料を孔径の異なるろ紙によるろ過を行って NoV 濃度を分析することなどにより、NoV と微小懸濁物質の知見を深めることが、今後、効果的な除去方法の解明につながる可能性がある。また、各種嫌気槽(AO 法の嫌気槽、AS 法の擬似嫌気槽、A2O 法の嫌気無酸素槽)において、NoV G1 および G2 の変化率は、それぞれ、-60~-93%および-56~-98%であり、減少が確認された。

4. まとめ

本調査の結果、以下の事項が明らかとなった。

- 1) 再生水利用促進における阻害要因の検討のため、既往の調査から、各国の利用用途と容認度の関係をまとめたところ、用途毎の接触可能性の高低と容認度の間には、相関が見られ、利用者の接触に対する不安感の寄与が伺われた。
- 2) 既往の文献から、再生水利用促進においては市民の承諾が重要な要素であり、再生水利用促進のためには、「個人のリスク認知」を進めることは市民の承諾を得る上で有効であることが確認され、今後の外的環境の変化により再生水利用の必要性が高まり、その必要性が行政の努力により市民へ理解が進んだ場合に、リスクコミュニケーションなどにより可能な限り正確でわかりやすい安全性の保証が有効となると考えられた。
- 3) 流入下水および下水処理水の懸濁物質をレーザー散乱法で測定したところ、流入下水中の懸濁物質は、1-900 μm の範囲で見られ、10-50 μm の範囲に体積のピークが見られた。下水処理水は、懸濁物質が 1-200 μm の範囲で見られた他、さらに大きな粒子も見られた。しかしながら、下水処理水は懸濁物質量が少ないために測定が不能である場合がたびたびあった。
- 4) 流入下水および下水処理水中の微小懸濁物質を電気的検知帯法で測定したところ、分析した各 4 試料において、定量下限（併行条件において変動係数が 0.1 以下）となるのは、各粒子径において流入下水は 14.8-17.2 個以上、

二次処理水は 11.3-35.5 個以上の試料であった。

5) 流入下水および下水処理水中の微小懸濁物質の冷蔵保管(4℃、7 日間)による変化を電氣的検知帯法で測定したところ、保管により、各々の粒子径が減少する傾向が見られ、定量範囲内全体の変化率は、 $-40.0 \pm 14.7\%$ (平均±標準偏差)であった。今後は、試料による差異および保管期間の短縮による改善について調査する必要がある。

6) 下水処理場における水処理による微小懸濁物質の変化について調査し、いずれの処理場および処理方法でも 0.672-0.876 μm の微小懸濁物質は、67%以上の減少が見られるなど共通して大きく減少していたが、それ以下の径については、処理場および処理方法間で差異が見られた。

7) 下水処理場における水処理による NoV の変化について調査し、いずれの処理場および処理方法でも、NoV G1 および G2 の反応槽全体で 87%より大きく減少した。特に、A2O 法の処理水の NoV G1 および G2 は大きく減少した。

8) 下水処理場における水処理による NoV の変化について調査し、各種嫌気槽(AO 法の嫌気槽、AS 法の擬似嫌気槽、A2O 法の嫌気無酸素槽)での NoV G1 および G2 の変化率は、それぞれ、-60~-93%および-56~-98%であり、減少が確認された。

なお、NoV と微小懸濁物質の付着の関係について、十分な知見が得られておらず、現時点では、NoV の微小懸濁物質の相関関係について解析するのは困難であるが、今後、試料を孔径の異なるろ紙によるろ過を行って NoV 濃度を分析することなどにより、NoV と微小懸濁物質の知見を深めることが、今後、効果的な除去方法の解明につながる可能性がある。

参考文献

- 1) 社団法人日本下水道協会、平成 20 年下水道白書 日本下水道、2008.
- 2) 内閣府大臣官房政府広報室、水に関する世論調査、2008.
- 3) 下水処理水の再利用のあり方を考える懇談会報告書、新たな社会的異議を踏まえた再生水利用の促進に向けて、2009.
- 4) 岡本誠一郎、再生水利用を考慮した水再生システムに関する研究、平成 20 年度 土木研究所成果報告書、2009.
- 5) Murni Po, Juliane D. Kaercher and Blair E. Nancarrow, LITERATURE REVIEW OF FACTORS INFLUENCING PUBLIC PERCEPTIONS OF WATER REUSE, CSIRO Land and Water, Technical Report 54/03, 2003.
- 6) Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications, Metcalf & Eddy, Inc. an AECOM Company, 2007.
- 7) Eran Friedlera, Ori Lahava, Hagar Jizhakib, Tali Lahavc, Study of urban population attitudes towards various wastewater reuse options: Israel as a case study, Journal of Environmental Management 81 pp.360-370, 2006.
- 8) 桜井健介、田嶋淳、南山瑞彦、吉澤正宏、下水処理水の再利用における利用者意識及び水質の実態調査、第 39 回日本水環境学会年会講演集、p.421、2005.
- 9) 田中修司、白崎亮、飯田和輝、下水処理水の再利用に関わる水質基準等に関する調査研究、下水道新技術推進機構年報、2003.
- 10) William H. Bruvold, Public opinion on water reuse options, Journal WPCF, 60(1), 45-49, 1988.
- 11) B. E. Nancarrow, Z. Leviston, M. Po, N. B. Porter and D. I. Tucker, What drives communities' decisions and behaviours in the reuse of wastewater, Water Science and Technology, 57(4), 485-491, 2008.
- 12) G. Wade Miller, Public Acceptance: The Greatest Barrier to Widespread Water Reuse, Water Practice and Technology, 3(2), 2008.

- 13) Charles P. Gerba, Charles H. Stagg and Marc G. Abadie, Characterization of sewage solid-associated viruses and behavior in natural waters, *Water Research*, 12(10), 805-812, 1978,
- 14) Qinglong Wu and Wen-Tso Liu, Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 43(4), 1101-1109, 2009.
- 15) Michael R. Templeton, Robert C. Andrews, Ron Hofmanna, Particle-Associated Viruses in Water: Impacts on Disinfection Processes, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(3), 137-164, 2008.
- 16) 膜分離技術振興協会・膜浄水委員会監修、浄水膜（第2版）、技報堂出版、2008.
- 17) T. W. Hejkal, F. M. Wellings, A. L. Lewis and P. A. LaRock, Distribution of viruses associated with particles in waste water, *Appl Environ Microbiol.*, 41(3), 628-634, 1981.
- 18) 成松将吾、米加田徹、伊丹利明、岩切章、山本正悟、片山浩之、鈴木祥広、リアルタイム LAMP 法とリアルタイム PCR 法によるノロウイルスの検出、第 45 回環境工学研究フォーラム講演集、pp.154-156、2008.
- 19) Allegra K. da Silva, Franoise S. Le Guyader, Jean-Claude Le Saux, Monique Pommeypuy, Maggie A. Montgomery and Menachem Elimelech, Norovirus Removal and Particle Association in a Waste Stabilization Pond, *Environ. Sci. Technol.*, 42, 9151-9157, 2008.
- 20) 社団法人日本水道協会発行、上水試験方法 解説編 2001 年版.
- 21) 諏訪守、尾崎正明、岡本誠一郎、陶山明子、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌、46(561)、91-101、2009.
- 22) 陶山明子、諏訪守、鈴木穰、尾崎正明、下水試料からのノロウイルス定量法の検討、環境工学研究論文集、第 43 巻、pp.255-261、2006.

下水処理水等の開放系循環利用に関する研究

研究予算： ー
研究期間： 平 21
担当チーム：リサイクルチーム
研究担当者：岡本 誠一郎

【要旨】

近年、地球温暖化に伴う水循環系への影響が懸念される中で、世界的に下水処理水等の再利用が注目されている。本研究では、これまで実態が十分に把握されていない下水処理水等の開放系循環利用について、現地調査をもとにその利用用途や利用形態を把握し、農業用水利用を中心に利用形態の類型化を行った。さらに、適正な利用の推進に向けて取り組むべき研究の方向性について検討し、農業用水、親水用水への利用の病原微生物によるリスク評価や、HACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point)の活用等による地域要件を反映しうる安全性評価手法の確立について、今後の研究の必要性が高いことを示した。

キーワード：下水処理水、開放系循環利用、農業用水、リスク要因、HACCP

1. 研究の背景と目的

わが国の下水道整備は着実に進展しつつあり、年間の下水処理水量は、約 139.3 億 m^3 /年に上っているが、一方で、下水処理水の処理場外利用は全処理水量の 1.5%の約 2.03 億 m^3 /年に止まっている¹⁾。一方で、下水処理水を一旦河川や水路等に放流してから、下流で何らかの用途に利用される間接的な水利用（以下、「開放系循環利用」という）は、都市部を中心に行われているが、実態は統計資料等でも明らかにはなっておらず、その特性や課題等についても体系的な検討は行われていない。

これまでに、下水処理場において再生処理された水を直接供給する形態の「閉鎖系循環利用」については、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル²⁾が制定され、用途別の水質基準とともに、再生水処理から利用までの工程ごとの留意事項、対応策等がまとめられている。しかし、本マニュアルでは、開放系循環利用については適用対象外とされている。一般に国内の開放系循環利用では、放流先河川等での十分な希釈を前提としており、放流先河川下流の利水者等との特段の調整が行われていないケースや、下水道部局において処理水質に特段の配慮を行っていないケースが多いと考えられる。しかし近年は、河川の自流量の減少と河川水の処理水比率の増加や、下流での利用用途の多様化などの変化に応じた対応方策（安全性の評価手法、必要な処理レベルの決定方策、管理責任のあり方等）の検討が必要なケース

も増加していると思われる。

このため、本研究では、国内の下水処理水の開放系循環に関する事例調査をもとに、その利用形態と利用用途を把握するとともに、健康リスクの観点も含めた水質面の課題を明らかにし、下水処理水の適正な循環利用促進に向けて今後取り組むべき研究の方向性を明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

2. 1 開放系循環利用の分類とリスク要因の整理

文献調査、関係者ヒアリング等により、国内で下水処理水の開放系循環利用が行われている地区を把握し、これらの地区のうち利用状況の異なると考えられた数箇所の現地調査を行い、その利用形態、利用用途等を把握した。さらに、これらの結果をもとに、開放系循環利用の利用形態別の分類を行い、分類別に想定されるリスク特性を整理した。

2. 2 独法土研の研究の方向性に関する考察

2. 1 の結果をもとに、今後、再生水利用の促進を図る上で必要となる研究の視点と内容について整理するとともに、独法土研が再生水利用の分野で行うべき研究の方向性について考察を行った。

3. 研究結果

3. 1 開放系循環利用の分類

1) 現地調査

昨年度研究における文献調査・現地調査の結果³⁾より、国内における下水処理水の農業用水利用は、

今後利用ニーズが高くなることが期待される用途であり、さらにその多くは河川、ため池、水路等に一旦処理水を放流して利用する形態の開放系利用が多いこと、渇水時に利用転換（環境用水→農業用水等）が行われていることが明らかとなっている。また、農業集落排水施設の処理水も、農業用排水路や貯水池に放流後希釈され、農業用水として再利用されるケースが多い⁴⁾。このため、開放系循環利用の調査として、農業用水の取水源上流などに下水道終末処理場や農業集落排水施設などが設置されている地域を中心に現地調査を行い、そのなかで修景用水などとしても利用されている場合にはその利用実態を把握することとした。主な現地調査箇所を表-1に示すとともに、以下にその概要を示す。

i) A用水、B用水

これらの用水は、江戸時代に農業用水路として整備されたものだが、その後、高度経済成長期には河川の著しい水質汚濁に伴って水質が悪化、さらに灌漑区域内の市街化が急速に進み、特にB用水では、現在は農業用水としての機能は停止状態となってい

表-1 現地調査実施箇所

水系名	地区	概要
多摩川	A用水	都市化の進展で河川水の処理水量比率が増加。農業用水から修景用水へと役割が変化、市街地では暗渠化も進んでいる。
多摩川	B用水	都市化の進展で河川水の処理水量比率が増加。流域の都市化が著しく、農業用水利用は廃止。修景・親水利用用途に。
鶴見川	C地区	放流直後の下水処理水の取水が可能な構造の施設を設置。農業用水として利用。
大和川	D地区	高度処理水をため池、農業用水路に放水放流。流域では稲作、畑作あり。
(香川県)	E地区	高度処理水をため池に放流。用途は稲作中心。その他、河川・水路の修景用水等にも利用
白川	F地区	処理水と河川水を混合水して農業用水に通水。用途は稲作中心



写真-1 水路の親水利用施設整備の例 (B用水)

る。その後の下水道整備によりA、B用水ともに水質が向上し、市の事業として水路の環境整備や一部親水護岸化などが進められ、市民の憩いの場としてのアメニティ機能が期待される水辺空間となっている(写真-1参照)。こうした傾向は全国の他の地域でも報告されている⁵⁾。また、多摩川流域の下水道普及率が向上するとともに、流域内の市街化が進んだ結果、各用水の取水口付近の河川水量に占める下水処理水の割合は約50%に達している⁶⁾。

ii) C地区

典型的な都市河川の中流部であるC地区では、下水処理場放流口の対岸に取水口を設置し、小型の転倒堰を設けて、放流後の処理水を含んだ河川水の取水を可能にしている。都市化が進んだ結果、晴天時は放流口上流の自流量は極めて少なく、河川水量の大部分は下水処理水となっている。

iii) D地区

もともと周辺地区は農業水利が不足していたこともあり、処理場内のせせらぎ用水に使用している高度処理水の一部が農業用水に利用されている。ため池の湛水位や渇水等の状況に応じた利用が行われている。

iv) E地区

従前より水不足に悩まされていた本地区では、下水処理水の本格的な利活用事業が行われ、高度処理水を上流部に還元して、各種用途に利用している。農業用水利用は、高度処理水を一旦ため池に送水して、他の用水と混合して利用される。利用にあたって、有識者、農業関係者、下水道管理者による調査が行われ、供用後も水質面での問題がないことを確認するためのモニタリング等も実施されている。

v) F地区

下水処理水の農業用水利用量としては国内最多の地区である。農業関係者との数年間にわたる各種調査・試験結果を経て、農業利用に影響がないことを検証して、利用が開始された。栄養塩類濃度などを勘案して、処理水と河川水の混合比率を決定し、農業用水路に通水している。当該処理場は水処理の状態が良好であり、二次処理水を特に高度処理せずに利用している。また近年、さらに別の下水処理場からの水の農業用水利用も開始されている。

2) 利用形態別の分類

これまでの調査結果をもとに、農業用水に下水処理水等を利用する場合の分類を行った。利用形態により分類した4つのケースを図-1に示す。ケース

①は下水処理施設等からの処理水を、河川、ため池、水路などの自然の水循環系を経由せずに再利用する閉鎖系の利用である。

日本では、一定の降雨があり、農業用水施設の整備も進んでいることから、農業利用用途でケース①の形態を取るのは、事業化が検討された沖縄県島尻地区⁷⁾など限定的であり、むしろケース②～④の開放系の利用形態が主流であると判断された。表-1に示した現地調査個所では、A用水、B用水、C地区がケース②の間接利用、D地区、E地区、F地区がケース③の混合利用の形態を取っていた。また、D地区、E地区では、渇水時などに再利用量を増加させたり、通常と利用用途を転換させたりするなど、ケース④の緊急利用的な利用も行っていた。

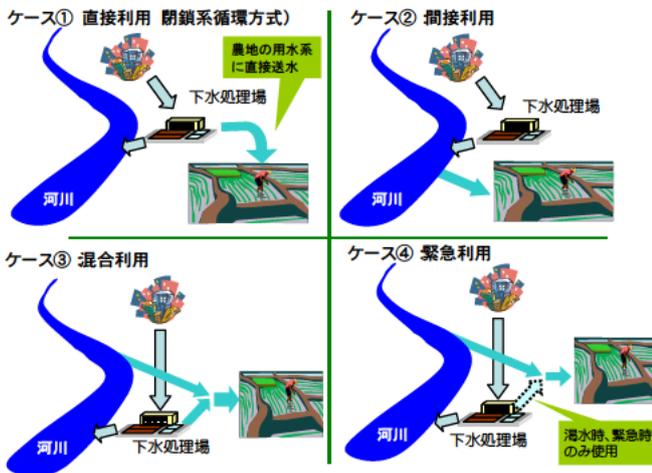


図-1 循環利用の形態別分類(農業用水)

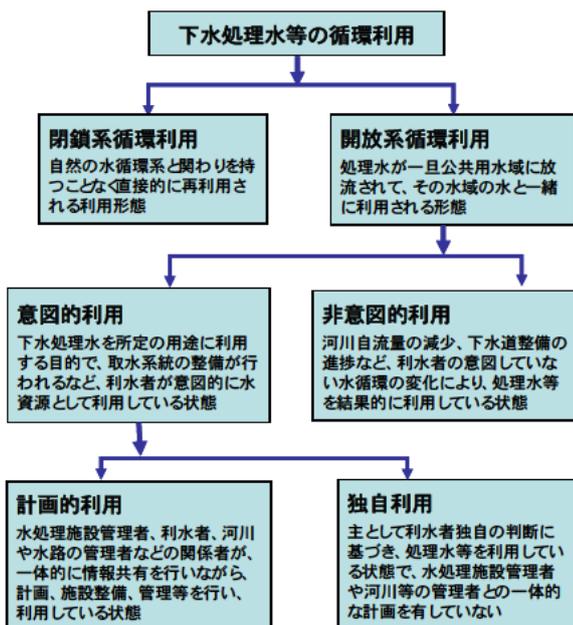


図-2 循環利用の計画面からの分類

3) 計画面からの分類

図-2は、下水処理水等の循環利用の計画面の特性から分類したものである。開放系利用の中でも、利水者が意図しない条件の変化により、結果的に下水処理水等を相当量循環利用している場合がある。現地調査個所ではA用水、B用水がこれに該当する。

その他の現地調査箇所は、いずれも意図的利用に該当すると考えられるが、これらのうち、D～F地区では、下水道管理者と利水者である農業関係者との間で、再生水利用に関する調査や協議が行われた上で利用を進めており、水質面での影響などを踏まえて再生水処理のレベルや、河川水との混合割合などを定めるなど、計画的な利用が進められていた。

このような処理側と利用側の情報共有に基づく計画的な利用以外のケースもあると考えられ、利水者側の独自の計画・取り組みにより循環利用が行われるものを「独自利用」の分類とした。

3.2 リスク特性の整理

1) 水質面のリスク特性

開放系循環利用では、下水処理水等が一旦公共用水域の他の原水と混合されるため、利用の安全性評価の際には、希釈混合の影響に留意する必要がある。現地調査、ヒアリング結果をもとに、開放系循環利用の各工程において発生が予想されるリスク要因をリストアップし、その結果を図-3にまとめた。

水質面のリスクとしては、作物障害の要因となる有機汚濁や窒素過多⁵⁾、再生水利用におけるリスクとして、亜鉛、マンガン等の土壌蓄積⁵⁾、さらに作業者の誤飲・誤摂取や作物に付着した病原微生物による感染症などが主要なリスクと判断された。

2) 利用形態によるリスク特性

ヒアリング等の結果から、工程別のリスク要因に対するリスクの度合いやリスク要因への対策は、循環利用の形態や、計画面の利用実態(図-2)によって異なることが示唆された。即ち、形態別では、図-3の「流量調整」の工程では、図-1のケース③、④の場合には処理水または河川水の水質悪化の際に、流量調整により農業用水の水質悪化を回避または低減できる可能性があるが、ケース②では混合割合の調整は困難であり、取水量の調整のみが可能となる。

計画面では、図-2の計画的利用と比較すれば、独自利用の場合は処理水質の情報を利水者が十分理解していないケースも想定され、利水障害のリスクは計画的利用と比較して高いと考えられる。特に、

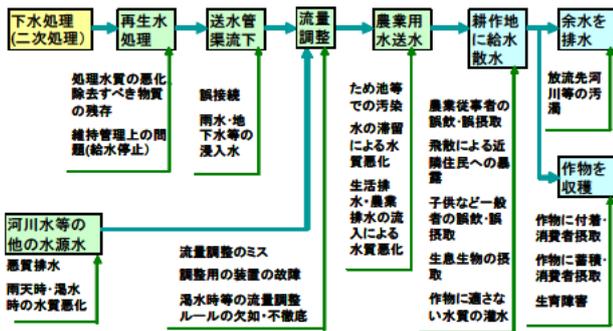


図-3 各プロセスのリスク要因

処理区域内の感染症流行による処理水中の病原微生物濃度の爆発的増加など、異常時への対応が遅れることが懸念される。

非意図的利用の場合は、さらに情報共有や関係者による一体的な対応が困難であり、利水者側に水の安全性や流域の水循環系の変化に関する情報が欠如している可能性が高く、顕在化するリスク要因に気づかないことも考えられる。流域での協議会的な組織による情報交換が重要であると思われる。

3. 3 独法土研の研究の方向性に関する考察

昨年度研究³⁾及び本研究における分析をもとに、今後、独法土研が重点的に取り組むべき研究項目を以下に整理した。

- 1) 本研究により明らかにしたリスクシナリオ(図-3参照)や既往研究における病原微生物の用量-反応モデルの知見等をもとに、農業用水や親水利用など、誤飲・誤摂取による病原微生物のリスク評価の試算を行い、対策の要否についての一定の見通しを明らかにすることが重要である。
- 2) 下水処理水等の開放系循環利用では、放流先水域の水量、水質、水域の形態等による影響が大きく、下水等の処理施設側での水質基準の設定は困難である。このため、食品、水道水などのリスク管理手法として推奨されている HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point)^{8),9)}などの手法を参考に、地域要件に応じた再生水のリスク管理が可能な標準的なプロトコルの確立に向けた研究を進める必要がある。

4. まとめ

本研究では、実態が把握されていなかった下水処理水等の開放系循環利用の現地調査をもとに、水利

用途や利用形態を把握し、農業用水利用を中心にその類型化を行った。さらに、適正な利用のために今後取り組むべき研究の方向性について検討し、農業用水、親水用水への利用の病原微生物によるリスク評価や、HACCP などによる地域要件の反映が可能な安全性評価法のプロトコルの確立について、研究の必要性が高いことを示した。

参考文献

- 1) 国土交通省下水道部：「我が国における下水処理水の再利用状況」、第1回下水処理水のバラスト水活用検討会資料、下水道グローバルセンター (GCUS) ホームページ
<http://gcus.jp/report/groupReport/pdf/ballast03.pdf>, 2009年12月
- 2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部・国土交通省国土技術政策総合研究所：「下水処理水の再利用水質基準等マニュアル」、発行2005年4月
- 3) 岡本誠一郎、尾崎正明：「再生水利用を考慮した水再生システムに関する研究」、研究方針研究成果報告、土木研究所、2008年
- 4) 国土交通省水資源部：「平成21年版 日本の水資源」、国土交通省ホームページ、
<http://www.mlit.go.jp/tochimizushigen/mizsei/hakusyo/H21/2-8.pdf>, 第8章 p.134、公表2009年8月
- 5) 白谷栄作：「農業用水の水質基準に関する課題と提案」、平成21年度農地・水資源部研究会、(独)農業・食品産業技術総合研究機構農村工学研究所、pp.15-21、2010年3月
- 6) 勝山志津子、柴田直俊、山田正：「河川水質の年々変動に与える影響因子に関する研究」、第32回関東支部技術研究発表会、II-1-21、2005年3月
- 7) 田中宏明、浅野孝：「農業灌漑への下水処理水再利用—沖縄でのわが国初の本格的な計画—」、再生と利用、Vol.29, No.114、6-13頁、2006年12月
- 8) 小久保弥太郎他：「改訂 食品の安全を創る HACCP」、(社)日本食品衛生協会、2003.8
- 9) 厚生労働省健康局水道課：「水安全計画策定ガイドライン」、厚生労働省ホームページ、
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/hourei/jimuren/dl/080530-5.pdf>, 2006.5

平成 21 年度 公共用水域の人畜由来汚染による

健康影響リスクの解明と制御に関する研究

独立行政法人土木研究所

鈴木 穰

岡本 誠一郎

南山 瑞彦

小森 行也

諏訪 守

桜井 健介

1. はじめに

我が国では、下水処理および合併浄化槽等の普及が進みつつあるが、依然として水源河川において人畜由来に起因する大腸菌群数等の公共用水域汚染は高いレベルにある。地域や季節などによる変動はあるが、塩素に耐性をもつクリプトスポリジウムやノロウイルスなどの病原微生物の検出例なども報告されている。浄水処理においては、人畜由来汚染の恐れのあるところではろ過処理または紫外線処理の導入などが進められているが、一方で排水施設の処理条件向上や取水位置の調整など、その他の方策との連携が求められている。

人畜由来汚染指標のグループ化により、微生物学的方法と化学的方法を併用して水源汚染の機構を解明するとともに、環境および処理における病原微生物のリスクの構造解明とその対策についてリスク削減効果を最大とする手法の開発が求められている。

2. 研究目的

本研究は、人畜由来汚染指標のグループ化により、水道水源等の公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの特性を把握し、それらによるリスクを削減するための規制や技術上の方策の効果を最大とするための施策を提案することを目的としている。

なお、本研究は国立保健医療科学院、国立感染症研究所、独立行政法人土木研究所の 3 機関共同で、また、静岡県立大学環境科学研究所、山梨大学大学院、東京都水道局、埼玉県企業局、相模川・酒匂川水質協議会の協力を得て実施している。

3. 研究計画

3. 1 公共用水域の人畜由来汚染指標の選定と測定

大腸菌、原虫、ウイルス等微生物、排泄物由来化学物質等からマーカーとなる項目の情報収集を行うとともに、国内の水源等を対象に汚染指標項目の実態調査により汚染状況を把握し、代表性、特異性、安定性、操作性等を考慮し、水道水源を中心とする公共用水域の人畜由来汚染指標グループを確立する。

3. 2 各水源の汚染源の調査

汚染源となりうる特定施設等の負荷を推測する。また、当該指標のパターンにより水源の汚染プロファイルを作成するとともに、下水処理水、畜産排水、未処理水等の寄与率を推定する。

3. 3 浄水処理、排水処理によるリスク削減効果の推定

代表的な感染微生物を例として、DALY 等の健康影響リスクの推定を行い、リスク削減効果の把握を行う。

3. 4 病原微生物管理の観点から見た流域リスク管理手法の提案

実態調査、汚染源調査、処理等によるリスク削減効果の推定を踏まえ、病原微生物管理の観点から見た効率的な流域管理手法の提案を行う。

4. 研究内容

4. 1 土木研究所が行う研究

土木研究所では、公共用水域における人畜由来汚染の実態の把握とともに、これらの負荷の寄与率を把

握するため下水処理場等での削減効果について評価を行うものである。併せて、消毒除去効果等によるリスク削減効果についても把握する。すなわち、水道水源ともなる公共用水域に対するポイント型およびノンポイント型汚染のうち、特に人畜由来汚染による健康影響リスクの最小化を目的とする調査研究を行うものである。本研究の達成目標は、「効率的なリスク削減手法・施策の提案」であり、その達成目標の柱の1つが下水道におけるリスクの削減手法の評価である。活性汚泥処理、高度処理、消毒などのプロセスにおいて指標病原微生物、化学物質マーカーの実態や消長把握となる。

21年度は、20年度に引き続き公共用水域において下水処理水の流入による微生物マーカー、化学物質マーカーの変化と相互関係を把握するため、1河川を対象に下水処理水の流入前後で実態調査を行った。また、調査対象流域における各マーカーの特性との関係を把握するため、河川流域内にある下水処理場で流入下水、放流水を対象に各マーカーの除去特性についても調査を行った。調査は北関東を流れるA川とその流域内にあるH下水処理場を対象とした。下水処理水放流先のA川の上流では、ウシ、ブタなどの畜産が行われており河川流域には畜産系の負荷とともに、ヒト由来の生活系排水の負荷が存在すると考えられる。H下水処理場の下水処理方式は活性汚泥処理法であり、処理水量は約11,000m³/日、消毒方式は次亜塩素酸ナトリウムによる塩素消毒法である。調査は平成21年11月16~17日、22年1月26~28日の晴天時（平水位時）に行った。1月の調査では4時間毎の24時間採水を行うことで、各試料の濃度と浄化センターにおける除去率の日間変動を把握した。採水試料は流入下水、放流水に加え、放流先河川の放流口上流河川水、放流水の混合された下流河川水である。

4. 2 調査対象とした微生物マーカー、化学物質マーカーとその測定法

4. 2. 1 微生物マーカー

本研究で対象とした微生物マーカーは大腸菌、クリプトスポリジウム、ジアルジア、ノロウイルスG1群（G1）、G2群（G2）である。各々の微生物マーカーの測定法を以下に示す。

大腸菌はクロモカルト培地による平板培養法（37℃）とした。

原虫類のクリプトスポリジウム、ジアルジアは試料をポリカーボネート製メンブランフィルターによるろ過濃縮後、超音波処理によりフィルターからオーシスト（シスト）を剥離させ免疫磁気ビーズ法で回収し、蛍光抗体染色による顕微鏡観察とした。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズGC-コンボキット、蛍光抗体染色にはイーグステインを用いた。濃縮に用いた試料量は11月の試料で流入下水200mL、その他の試料は20L、翌1月では流入下水2L、その他の試料は100Lとした。

ウイルスの濃縮はPEG沈殿法によるもので、試料中にPEG#6000（終濃度8%）およびNaCl（終濃度0.4M）を添加・攪拌し完全に溶解させた。4℃で1夜静置の後、10,000×G、30分間遠心分離し沈渣を回収し、沈渣をRNase-free水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。この濃縮液をウイルス遺伝子抽出カラムへ通水させウイルス遺伝子の抽出を行うが、遺伝子抽出カラムへのSS負荷量を低減させることにより、ウイルス遺伝子の抽出効率が向上することが予想され検出濃度が高まることが報告されている¹⁾。このため、試料のSS濃度と濃縮水量からSS負荷量を算出し、ウイルス遺伝子抽出カラムへの濃縮液の通水量を調整することで、カラムへのSS負荷量を0.05mg/カラムに統一した。

濃縮液中のウイルスは、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Cleanup Kit（QIAGEN社）でウイルスRNAを精製した。精製したウイルスRNA試料0.5μgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit（QIAGEN社）を用い全量20μLの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2μLをリアルタイムPCRに供した。ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」²⁾に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN社）を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler[®]（ロシュ・ダイアグノスティクス社）を使用した。抽出RNA量はSpectrophotometer（NanoDrop社製）により定量した。

4. 2. 2 化学物質マーカー

本研究で対象とした化学物質マーカーは10種のステロール類およびカフェインである。

ステロール類の測定は、Nakada *et al.*,³⁾、Isobe *et al.*,⁴⁾を参考に行った。具体的な方法を以下に示す。試料(100-500 mL)をガラス繊維ろ紙(GF/B)で吸引ろ過した。以後、ろ液を溶存態試料、ろ紙上の残渣を懸濁態試料とし、それぞれ個別に前処理操作を行った。ろ過後のろ紙は分析直前まで-30℃にて凍結保存

した。分析操作における回収率補正のため、ろ液に Surrogate 物質としてステロール Label 化体(コレステロール-*d6*)のメタノール溶液を添加した後、固相カートリッジ Oasis HLB Plus を用い固相抽出を行った。通水後、遠心分離機等を用い脱水し、次いで窒素吹き付けにより乾燥した。カートリッジからの対象物質の溶出は、メタノール 10 mL を加え、自然滴下にて溶出した。次に、Sep-PaK Plus Silica を用い分画精製を行った。分画精製画分は次の 3 通りとした。第 1 画分；ヘキサン：ジクロロメタン(3：1), 5 mL、第 2 画分；ジクロロメタン, 5 mL、第 3 画分；ジクロロメタン：アセトン(7：3), 10 mL である。ステロール類は第 3 画分に溶出するため、第 1、第 2 画分溶出液は廃棄した。また、懸濁態試料は-30°Cにて凍結保存したろ紙を凍結乾燥機で乾燥した後、ビーカーに入れ、溶存試料と同じ Surrogate を添加した。ろ紙が浸るまでメタノールを加え、超音波抽出し、抽出液をビーカーに移し入れた。同様にメタノール：ジクロロメタン 1：1 とジクロロメタンで超音波抽出し、抽出液をさきのビーカーに集めた。抽出液にはろ紙繊維等の残渣が含まれるため、ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過した。ろ過した抽出液はロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、以後、溶存態試料の分画精製と同様な操作を行った。次に、溶存態試料、懸濁態試料の抽出・精製液をアセチル誘導体化処理した。窒素気流下で乾固直前まで穏やかに濃縮し、ピリジン 100 μ L と無水酢酸 100 μ L を添加し、室温にて 20 時間静置した。アセチル誘導体化物は無水硫酸ナトリウムにより精製・脱水した後、窒素気流下で濃縮乾固し、50 μ g/L ペリレン-*d*₁₂ イソオクタン溶液を加え、GC/MS の測定用試料とした。GC/MS の測定条件は、Nakada *et al.*,³⁾、Isobe *et al.*,⁴⁾ を参考に設定した。

カフェインの測定は小西他⁵⁾および小森他⁶⁾を参考に行った。具体的な方法を以下に示す。試料(50-200 mL)をガラス繊維ろ紙(GF/B)で吸引ろ過した。以後、ろ液を溶存態試料、ろ紙上の残渣を懸濁態試料とし、それぞれ個別に前処理操作を行った。ろ過後のろ紙は分析直前まで-30°Cにて凍結保存した。ろ液は、1 mol/L 塩酸を用いて pH3.5 ~ 4.5 の間となるように pH 調整を行った後、固相カートリッジ Oasis HLB Plus を用いて固相抽出した。固相カートリッジは、遠心分離機等により脱水した後、窒素吹き付けにより乾燥した。カートリッジからの対象物質の溶出には、メタノールを用いた。また、懸濁態試料は-30°Cにて凍結保存したろ紙を凍結乾燥機で乾燥した後、ビーカーに入れ、メタノールを加えて超音波抽出を行った。抽出液はガラス繊維ろ紙(GF/F)にてろ過した後、ロータリーエバポレーターで約 10mL まで濃縮した。次に、溶存態試料、懸濁態試料のメタノール溶液を窒素気流下で濃縮乾固し、アセトニトリル：0.1%ギ酸 MilliQ 水 = 7：93 溶液を加え超音波抽出装置にかけた後、遠心分離機に浮遊物質を沈降させ、上澄み液を LC/MS/MS の測定用試料とした。LC/MS/MS の測定条件は、小西他⁵⁾、小森他⁶⁾を参考に設定した。

5. 調査結果と考察

5. 1 流量観測結果

放流水および放流先上下流河川の流量観測結果を図-1 に示す。11 月では河川水に占める放流水の割合は 14%、1 月の 24 時間調査では上流地点と下流地点における流量の時間変動、調査を行った処理場の放流水量の時間変動はともに小さく、下流地点の流量に占める下水処理放流水の割合は 8~28%程度 (平均

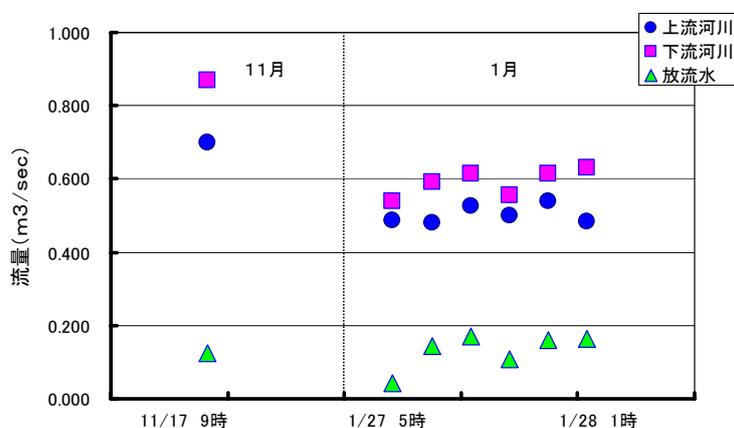


図-1 放流水と放流先上下流河川流量の推移

22%) であった。11 月の河川流量は 1 月と比較すると若干多くなっており、その分放流水の割合が低下

していた。上流地点の流量に放流量を加算した値と下流地点の流量はほぼ同じ値を示し、流量観測は精度よく測定されていた。

5. 2 微生物マーカー

5. 2. 1 下水試料と河川水試料の実態

微生物マーカーの調査結果を表-1~4に示す。病原微生物については11月の調査では各試料で1検体(計4検体)、1月では各試料で4時間毎の24時間採水の6検体(計24試料、原虫用試料を除く)の採水分析を行った。大腸菌は活性汚泥処理法、塩素消毒法により下水処理場でその多くは除去・不活化されており、放流水の大腸菌の濃度は放流先河川水と比較して低かった。クリプトスポリジウムは1月の上下流河川水から0.42~0.46oocysts/L検出されたため、上流域においてヒトあるいは家畜からの負荷が存在していることが明らかとなった。流入下水、放流水はともに不検出であり11月の試料の検出限界値(分析試料中に1oocystsが存在した時の濃度)は流入下水で5.0oocysts/L、その他の試料では0.05oocysts/L、1月の調査では検出限界値を向上させるため分析水量を増加させ、検出限界値を流入下水では0.5oocysts/L、放流水では0.01oocysts/Lとしたが検出には至らなかった。試料中にオーシストが存在していてもこれらの濃度レベル以下と推定され、平常時における下水試料の汚染レベルは低いものと考えられた。我が国の下水処理場や関東圏内の河川水におけるクリプトスポリジウムの調査例⁷⁾でも平常時において検出濃度・割合は海外との調査例と比較して低いとの報告もあるが、放流先河川水からはクリプトスポリジウムが最大で0.46oocysts/L検出されたことから、排出負荷源を究明し対策を講ずる必要があると

表-1 秋季のノロウイルスの実態 (11/16-17 試料)

PEG沈殿法での濃縮	SS負荷量 (mg)/7分	PCR実測値 G2(コピー)	G2濃度(コピー/L)	除去率 (log)	PCR実測値 G1(コピー)	G1濃度(コピー/L)	除去率(log)	定量限界値 (コピー/L)	検出限界値 (コピー/L)	SS濃度 (mg/l)
流入下水	0.05	21.6	2.1E+06		ND	N.D.		9.9E+05	9.9E+04	84
放流水	0.05	2.82	8.6E+03	2.39	ND	N.D.	-	3.1E+04	3.1E+03	2.3
上流河川	0.05	9.39	6.4E+04		ND	N.D.		6.8E+04	6.8E+03	5.3
下流河川	0.05	6.87	4.2E+04		ND	N.D.		6.1E+04	6.1E+03	4.5

表-2 冬季のノロウイルスの24時間変動調査 (1/26-28 試料)

PEG沈殿法での濃縮	SS負荷量 (mg)/7分	PCR実測値 G2(コピー)	G2濃度(コピー/L)	変動比	PCR実測値 G1(コピー)	G1濃度(コピー/L)	変動比	定量限界値 (コピー/L)	検出限界値 (コピー/L)	SS濃度 (mg/l)
流入下水9時	0.05	1006	3.1E+08	0.60	11.4	3.5E+06	0.23	3.1E+06	3.1E+05	163
13時	0.05	763	2.3E+08	0.44	50.8	1.5E+07	1	3.0E+06	3.0E+05	152
17時	0.05	1670	3.5E+08	0.67	21.1	4.4E+06	0.29	2.1E+06	2.1E+05	114
21時	0.05	1120	3.2E+08	0.62	13.2	3.7E+06	0.25	2.8E+06	2.8E+05	145
1時	0.05	339	6.9E+07	0.13	4.26	8.7E+05	0.06	2.0E+06	2.0E+05	93
5時	0.05	3497	5.2E+08	1	7.91	1.2E+06	0.08	1.5E+06	1.5E+05	83
平均	-	-	3.0E+08	0.58	-	4.8E+06	0.32	-	-	-
放流水5時	0.05	191	2.8E+06	0.53	7.80	1.2E+05	0.57	1.5E+05	1.5E+04	7.8
9時	0.05	173	1.6E+06	0.30	9.53	8.7E+04	0.41	9.2E+04	9.2E+03	4.5
13時	0.05	211	2.0E+06	0.38	12.6	1.2E+05	0.57	9.4E+04	9.4E+03	4.5
17時	0.05	572	5.3E+06	1	21.2	2.0E+05	0.95	9.2E+04	9.2E+03	5.8
21時	0.05	351	3.6E+06	0.68	20.4	2.1E+05	1	1.0E+05	1.0E+04	5.6
1時	0.05	504	5.1E+06	0.96	20.3	2.0E+05	0.95	1.0E+05	1.0E+04	6.3
平均	-	-	3.4E+06	0.64	-	1.6E+05	0.74	-	-	-
上流河川水5時	0.05	69.1	1.0E+06	0.71	1.47	2.1E+04	0.14	1.4E+05	1.4E+04	7.0
9時	0.05	33.7	5.6E+05	0.40	6.67	1.1E+05	0.92	1.7E+05	1.7E+04	10.3
13時	0.05	22.3	1.4E+06	1	1.85	1.2E+05	1	6.2E+05	6.2E+04	32.4
17時	0.05	ND	N.D.	-	ND	N.D.	-	1.4E+06	1.4E+05	92
21時	0.05	ND	N.D.	-	ND	N.D.	-	1.6E+06	1.6E+05	74
1時	0.05	6.42	7.1E+05	0.51	ND	N.D.	-	1.1E+06	1.1E+05	69
平均	-	-	9.2E+05	0.66	-	8.4E+04	0.69	-	-	-
下流河川水5時	0.05	95.6	1.2E+06	0.63	1.66	2.2E+04	0.08	1.2E+05	1.3E+04	7.2
9時	0.05	91.1	1.4E+06	0.74	2.03	3.1E+04	0.11	1.5E+05	1.5E+04	8.3
13時	0.05	32.3	1.1E+06	0.58	ND	N.D.	-	4.8E+05	4.8E+04	28
17時	0.05	16.7	1.1E+06	0.58	ND	N.D.	-	6.7E+05	6.7E+04	43
21時	0.05	ND	N.D.	-	ND	N.D.	-	2.4E+06	2.4E+05	153
1時	0.05	20.6	1.9E+06	1	3.02	2.9E+05	1	9.4E+05	9.4E+04	54
平均	-	-	1.3E+06	0.71	-	1.1E+05	0.40	-	-	-

表-3 秋季の原虫類等の実態 (11/16-17 試料)

試料 項目	濃縮水量	クリプトス ポリジウム 検出濃度(個 /L)	除去率 (log)	ジアルジア 検出濃度(個 /L)	除去率 (log)	検出限界値(個 /L)	大腸菌検出濃度 (pfu/mL)
流入下水	200mL	N.D.	/	N.D.	/	50	2.1×10^5
放流水	20L	N.D.	—	N.D.	—	0.05	9.0×10^0
上流河川	20L	N.D.	/	N.D.	/	0.05	2.0×10^1
下流河川	20L	N.D.	/	N.D.	/	0.05	2.2×10^1

表-4 冬季の原虫類等の実態 (1/26-28 試料)

試料 項目	濃縮水量	クリプトス ポリジウム 検出濃度(個 /L)	除去率 (log)	ジアルジア 検出濃度(個 /L)	除去率 (log)	検出限界値(個 /L)	大腸菌検出濃度 範囲(pfu/mL)
流入下水	2L	N.D.	/	0.5	/	0.5	$2.2 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$
放流水	100L	N.D.	—	N.D.	—	0.01	$4.0 \times 10^0 \sim 7.0 \times 10^0$
上流河川	100L	0.42	/	N.D.	/	0.01	$7.0 \times 10^0 \sim 2.0 \times 10^2$
下流河川	100L	0.46	/	N.D.	/	0.01	$1.0 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^2$

考えられた。また、集団感染症発生時には感染者から多量のクリプトスポリジウムのオーシストが排出されることから、流入下水の検出濃度・割合が高まると報告されている⁸⁾。ジアルジアは流入下水の1試料から検出され、その濃度は0.5 cysts/Lであったが、活性汚泥処理法により除去が行われ放流水の検出濃度は不検出であった。その他の河川水試料では全て不検出であり、ジアルジアの汚染レベルは低いものと考えられた。

一方、ノロウイルスについては11月の試料ではG2のみ検出されたが、1月の試料では全ての試料でG1、G2がともに検出された。11月の流入下水のノロウイルス濃度は 2.1×10^6 copies/L、放流水では 8.6×10^3 copies/Lであり、下水処理場での除去率は約2.4logと見積もられた。G1は不検出であったが、その時の検出限界値は流入下水で 9.9×10^4 copies/L、放流水では 3.1×10^3 copies/Lと計算されノロウイルスが存在していても、それらの濃度以下であるものと推定された。表中には検出・定量限界値を併せて記したが、検出限界値は20μLのPCR反応tubeあたり1コピー、定量限界値は10コピーと仮定し各々換算濃度を算出しており、ほぼ全ての試料でG2の実測値は10コピーよりも高かった。10コピー以下の実測値においては多重測定での変動係数が100%を超え、測定値のバラツキが大きくなる結果⁹⁾が得られているため、定量限界値をtubeあたり10コピーと仮定した。11月の放流先河川では、上下流試料とも放流水の濃度よりも高い結果が得られていることから、河川上流域においても浄化槽などからのヒト由来の負荷があるものと推定された。

1月の調査結果ではG1、G2ともに検出されており、G2の検出濃度は流入下水で 10^8 copies/Lレベル、G1では 10^7 copies/Lレベルに達した。11月のG1の検出・定量限界値は $10^4 \sim 10^5$ copies/Lレベル、G2の検出濃度は 10^6 copies/Lレベルであることから、冬季の1月では秋季と比較すると流入下水のノロウイルスの検出濃度は2～3オーダー程度上昇することが明らかとなった。放流水でも流入下水のノロウイルス濃度の上昇に伴って検出濃度が高くなっており、その濃度はG2で 10^6 copies/Lレベル、G1で 10^5 copies/Lレベルとなった。同様に放流先上下流河川水の検出濃度も上昇しており、検出濃度レベルは放流水と大差がないと考えられた。なお、一部河川水試料においてノロウイルスの定量結果がN.D.(不検出)となっているが、これは試料のSSが高濃度なことから分析に供した試料量が極少量となったため、検出限界値が高くなったことに起因するものである。SS濃度の上昇は、河川上流域における堤防の改修作業によるものである。

5. 2. 2 ノロウイルス濃度と胃腸炎患者との関連

毎冬季にはノロウイルスの検出報告数が増加する傾向が見られる¹⁰⁾。それに伴い胃腸炎患者数が冬季には増加しており、その全てがノロウイルスに起因するものとは限らないが、大多数を占めるものと推定される。このため、本調査対象市内(下水処理区域外も含む)とその県内の当該衛生研究所がホームページ上で公表している胃腸炎患者数データを基に、各定点あたりの胃腸炎患者数と調査対象地域内での胃腸炎患者割合の推移を整理し図-2、3に示す。胃腸炎患者の割合は、胃腸炎患者数をその市内あるいは県内の人口で除して算出した値である。定点あたりの胃腸炎患者数の動向は、対象市内、県内、全国で同様な傾向が示されているが、対象市内については他と比較して低く推移していた。対象市内の胃腸炎患者割

合の推移についてもバラツキが見られるが、県内の値と比較すると若干低く推移していた。全体的には、初夏から初冬にかけ胃腸炎患者数とその割合が低く、冬季から春季に高くなる傾向が見られた。11月の調査時点における対象市内での胃腸炎患者数は1人以下/定点、その胃腸炎患者の割合は0.005%以下と低い状態で推移していたが、流入下水のG2濃度は 10^6 copies/Lであった。胃腸炎患者が極少数であっても流入下水からノロウイルスが検出されることは、感染しても発症していない不顕性感染者からの排出があるものと推定された。しかし、1月では対象市内の胃腸炎患者数が上昇傾向に転じ、定点あたりの患者

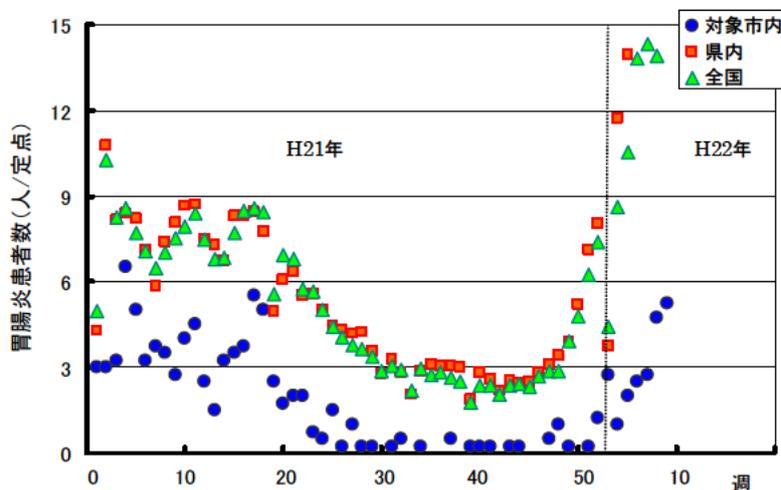


図-2 定点あたりの胃腸炎患者数の推移

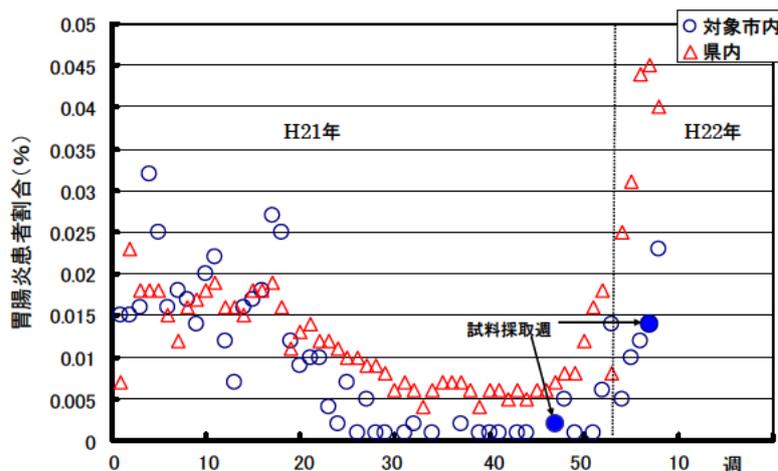


図-3 調査対象地域内での胃腸炎患者割合

数は数人、胃腸炎患者の割合も0.01%を超えていた。この時の流入下水のG2濃度は 10^8 copies/Lレベルに上昇していることから、胃腸炎患者数と流入下水のノロウイルス濃度には密接な関係があることが明らかとなった。また、上流河川水でも11月に比較して1月では、G2、G1ともに検出濃度が上昇していることから、河川上流域における人為的汚染の可能性が示唆された。下水道の普及割合や普及地域内の胃腸炎患者の存在状況によっても異なるが、胃腸炎患者の割合が冬季において上昇傾向に転じると流入下水のノロウイルス濃度が上昇するものと考えられた。

5. 2. 3 日間変動調査

ノロウイルス濃度の日間変動調査結果を図-4に示す。下水試料のノロウイルス濃度は流入下水でG1、G2ともに1オーダー程度の変動が見られた。放流水は流入下水と比較すると若干変動幅は小さくなり、最大検出濃度に対する最小濃度の割合は30~40%程度であった。最大検出濃度に対する平均濃度の割合は流入下水で30~60%程度、放流水では60~70%であった。昨年度の調査結果では、流入下水で30~60%、放流水では50~60%程度であり大差が見られないことから、流入下水の平均濃度は最大検出濃度の50%程度、放流水では同様に60%程度であることが明らかとなった。

活性汚泥処理法によるノロウイルスの除去率は G2 が 1.3～2.2log 程度、G1 は 0.6～2.2log 程度であり、最大で 1 オーダー以上の日間変動が見られた (表-5)。しかし、最小の除去率が算出された時に利用した流入下水の検出濃度は、日間変動の中で G1、G2 とともに最小の値であった。このため、低い除去率が得られた要因の 1 つは、流入下水の濃度変動により見かけ上低くなる可能性のあることが推定される。平均除去率は G2 が 1.9log、G1 が 1.3log であり、G2 に比較して G1 の除去率が低かった。活性汚泥処理パイロットプラントを利用した除去率の評価でも、G1 は 0.6～1.6log、G2 が 1.1～2.1log 程度であり G1 の除去率が低いとの報告¹⁾もある。活性汚泥細菌から分離されたノロウイルス吸着タンパク質の特性を評価した研究事例では、GII.4 と GI.1 の間で、そのタンパク質に対する吸着能力の差があることが報告され

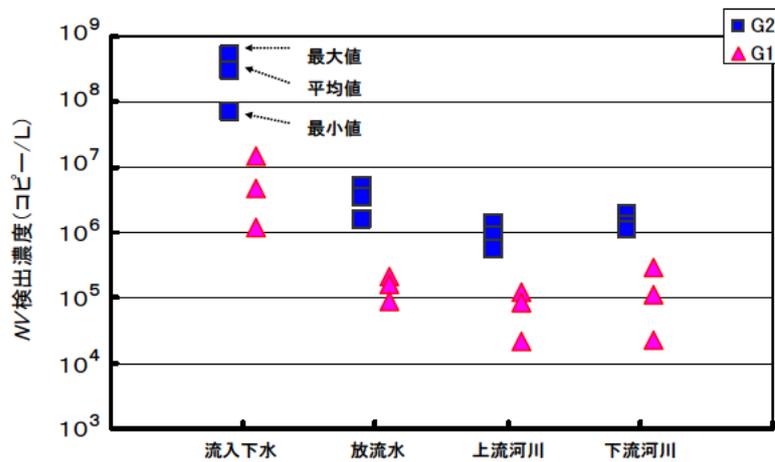


図-4 ノロウイルス濃度の日間変動状況

表-5 ノロウイルスの除去率

	G2除去率 (log)	G1除去率 (log)
11月(13時-翌9時)	2.39	—
1月(9時-翌5時)	2.05	1.46
1月(13-翌9)	2.15	2.24
1月(17-翌13)	2.24	1.56
1月(21-翌17)	1.78	1.27
1月(1-9)	1.28	0.62
1月(5-翌1)	2.01	0.77

1月；26-28日データ

ている¹¹⁾。遺伝子群の違いにより外殻タンパク質のアミノ酸組成が異なると考えられるため、除去率に差が生じたものと推定された。下水処理場におけるノロウイルスの除去率は、既往の研究結果^{12) 13) 14)}によると 1～3log 程度という報告があるが、同一の濃縮法およびカラムへの SS 負荷量を考慮した測定による調査では、標準活性汚泥法での除去率が G2 で 1.9log、G1 が 1.4～1.6log であり本調査の結果と一致した値であった⁹⁾。

放流先河川水のノロウイルスの検出濃度は上流、下流試料とも G2 で $10^5 \sim 10^6$ copies/L レベル、G1 で $10^4 \sim 10^5$ copies/L レベルであり、放流水の流入により下流河川水試料の大幅な濃度上昇は見られなかった。河川水試料では最大検出濃度に対する最小検出濃度の割合は G2 で 40～60%程度、G1 で 10%程度であり、上流河川水でも濃度変動が見られた。また、上流河川水と放流水の各水量と濃度からノロウイルス負荷量を各々算出し図-5 に示した。11月のデータは 1 試料のみの評価であることや、1月では一部の河川水試料で SS 濃度の上昇のため定量結果が得られなかったことから、時間あたりの負荷量として各々比較を行った。なお、1月の調査時の負荷量の算出にあたっては、定量値の得られた 12～16 時間分のデータを用い、併せて放流水の負荷量の算出も同時間分のデータのみを利用し比較を行った。11月、1月ともに放流先上流河川水のノロウイルス負荷量は放流水に比較して高かった。11月ではデータ数が少

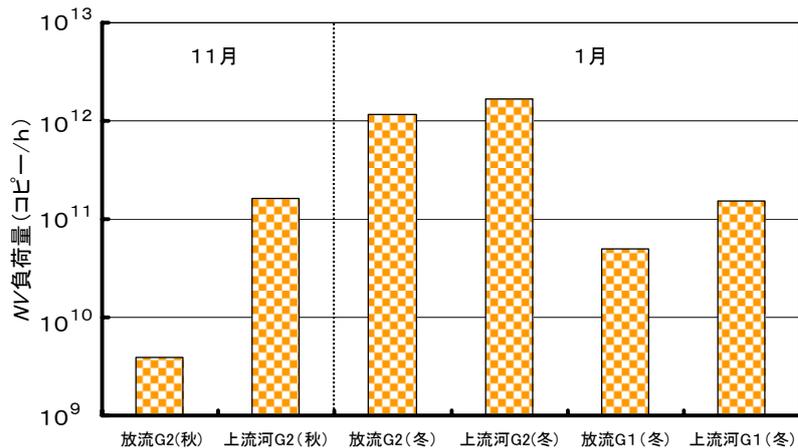


図-5 放流水と上流河川水のMV負荷量

ないことや PCR の実測値が 10 コピー/tube 以下であったことから、1 月のみの評価でも上流河川水のノロウイルス負荷量は放流水と比較して G2 が 1.4 倍、G1 で 3.1 倍であったことから、浄化槽などからのヒト由来の負荷がある可能性が示唆された。このため、下水・河川水から検出されたノロウイルスは、分子系統解析により遺伝子型判別を行い、流域内における存在状況の相互関係を評価する必要があると考えられた。さらに、公共用水域における感染リスクの低減には、下水道のみならず他の施策との連携が必要であることが明らかとなった。

本調査において下水試料からジアルジア、ノロウイルスが検出されたが、ともに下水処理場で除去されることにより、放流先河川水の検出濃度や負荷量と同レベルあるいはそれ以下となるため、本調査対象流域河川水への放流水の影響は小さいものと考えられた。下水処理場でのノロウイルスの除去率は、24 時間の間で 1log 以上の違いが見られ、同様に流入下水のノロウイルス濃度も最大で 1 オーダー以上の変動が見られた。また、流入下水や河川水のノロウイルス濃度は胃腸炎患者数の影響を受けるため、下水処理場における流入・流出濃度や放流水が河川水へ及ぼす影響など、適切な評価を行う上で季節・時間・流量などの変動要因の考慮が重要である。さらに、クリプトスポリジウムについては上(下)流河川水から最大で 0.46 oocysts/L 検出されたことから、排出負荷源を究明し対策を講ずる必要があり、公共用水域における感染リスクの低減には下水道のみならず他の施策との連携が必要であることが本実態調査結果から各々明らかとなった。

5. 3 化学物質マーカー

化学物質マーカー測定用試料の採取は、H 下水処理場の滞留時間(約 20 時間)を考慮して行った。11 月調査、1 月調査とも流入水を 9 時に採取した。その約 20 時間後に放流水、放流先河川の放流口上流河川水(上流河川水)、放流水の混合された下流河川水(下流河川水)を採取した。

化学物質マーカーのステロール類(10 種)の測定結果を図-6、7 に示した。測定したステロール類は、Coprostanone、Coprostanol、Epicoprostanol、Cholesterol、Cholestanol、Campesterol、Stigmasterol、Sitosterol、Fucosterol、Stigmastanol の 10 種とし、溶存態と懸濁態の合計で示した。図-6 に示すとおり流入水の総ステロール類濃度は、11 月と 1 月で 1.5 倍ほど異なっているが、昨年度の調査で示した日間変動の 3.2 倍に比べ小さいことから、これらの違いは通常の濃度変動の範囲と考えられる。流入水の総ステロール類濃度は 490,000ng/L(11 月)、750,000ng/L(1 月)、放流水は 12,000ng/L(11 月)、20,000ng/L(1 月)であり、下水処理によるステロール類の除去率は 97.6%(11 月)、97.3%(1 月)となり昨年度の調査結果(98%)とほぼ同じ値を示した。また、図-7 に示す各試料のステロール類組成から、流入水と放流水のステロール類組成は Cholesterol、Coprostanol、Sitosterol の 3 物質が主体であり、総ステロール類の 67~78%を占めていた。

上流河川水のステロール類濃度は、9,000ng/L(11 月)、15,000ng/L(1 月)であった。国包他¹⁵⁾の調査結果と比較すると、下水道普及率が約 30%の区域の小河川の濃度(1,900~3,500ng/L)より高く下水道が普及していない区域の小河川の濃度(14,000~57,000ng/L)より低いことから、上流河川水の集水区域の下水道普及率はそれほど高くない(30%以下)ことが推察される。また、ステロール類組成は放

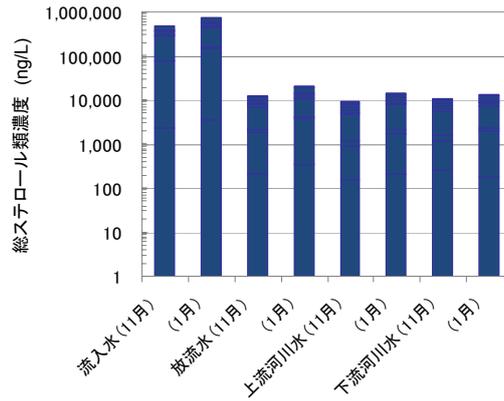


図-6 各試料の総ステロール類の濃度

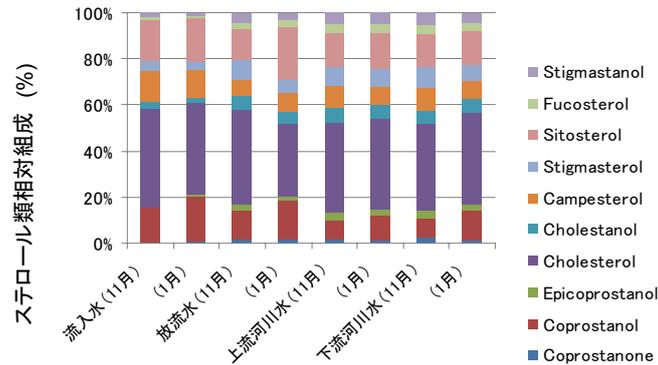


図-7 各試料のステロール組成

表-6 各試料の b/baCOP と e/baCOP

		b/baCOP	e/baCOP
流入水	11月	0.84	0.028
	1月	0.89	0.019
放流水	11月	0.69	0.13
	1月	0.77	0.081
上流河川水	11月	0.55	0.21
	1月	0.63	0.17
下流河川水	11月	0.57	0.23
	1月	0.68	0.15

流水の組成に類似していた。上流河川水に放流水が合流した後の下流河川水のステロール類濃度は 11,000ng/L (11月)、14,000ng/L (1月) で上流河川水とほぼ同レベルであり、その組成もまた放流水と類似していた。

糞便汚染指標として提案されている Coprostanol /Cholesterol 比^{16) 17) 18)} について整理し表-6 に示す。水域における生活排水の負荷を示す指標:b/baCOP [coprostanol/(coprostanol+cholestanol)]は、流入水では 0.84 (11月)、0.89 (1月) と高い値を示し、水域における畜産排水の負荷を示す指標:e/baCOP [epicoprostanol/(coprostanol+cholestanol)]は、0.028 (11月)、0.019 (1月) と低い値を示した。放流水では b/baCOP は 0.69 (11月)、0.77 (1月)、e/baCOP は 0.13 (11月)、0.081 (1月) を示した。上流河川水の b/baCOP は 0.55 (11月)、0.63 (1月)、e/baCOP は 0.21 (11月)、0.17 (1月) を示し、放流水に比較的近い値を示していることから処理を受けた生活排水が流れているものと考えられるが、放流水に比べ b/baCOP が低く、e/baCOP が高いことから、畜産排水の混入が推察される。

化学物質マーカーの Caffeine の測定結果を図-8 に示す。Caffeine の流入水濃度は 26,000ng/L(11月)、23,000ng/L (1月) と昨年度とほぼ同じ値を示した。放流水では 19ng/L (11月)、4,200ng/L (1月) で

あり下水処理場における除去率は99%以上(11月)、82%(1月)と高い値を示した。Caffeineはステロール類同様、未処理の流入水に高濃度に含まれているが下水処理によりほとんど除去される。このことから人為汚染のマーカーとして提案¹⁹⁾されているとおり、未処理排水混入の有無を定性的に判断することが可能となる。上流河川水のCaffeine濃度は380ng/L(11月)、1,200ng/L(1月)と11月の放流水、また、昨年度の放流水(150~390ng/L)に比べ高い値を示しており、未処理排水の混入が推察される。1月の放流水(4,200ng/L)は、これまでの調査に比べ高い値を示しているが原因は不明である。

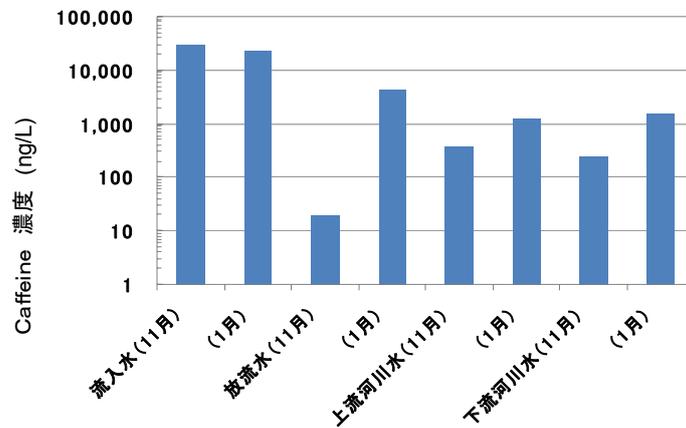


図-8 各試料のCaffeine濃度

6. まとめ

21年度は、昨年度に引き続き公共用水域への下水処理水の流入による微生物マーカー、化学物質マーカーの変化と相互関係を把握するため、1河川を対象に放流水の流入前後で実態調査を行った。また、調査対象流域における各マーカーの特性との関係を把握するため、河川流域内にある下水処理場で流入下水、放流水を対象に各マーカーの除去特性についても調査を行った。調査結果を以下に示す。

- 1) 下水試料からのクリプトスポリジウム、ジアルジアの検出割合・濃度は低かった。
- 2) 上(下)流河川水からクリプトスポリジウムが最大で0.460ocysts/L検出されたことから、排出負荷源を究明し対策を講ずる必要があると考えられた。
- 3) 冬季の1月では秋季の11月と比較すると下水、河川水試料のノロウイルス検出濃度は2~3オーダー程度上昇することが明らかとなった。
- 4) 調査対象流域内における胃腸炎患者数と流入下水のノロウイルス濃度には密接な関係があることが明らかとなった。また、胃腸炎患者数の増加に伴い放流水放流先上流河川水でもG2、G1ともに検出濃度が上昇していることから、河川上流域における人為的汚染の可能性が示唆された。
- 5) 下水処理場におけるノロウイルスの除去率は24時間の間で1log以上の違いが見られ、同様に流入下水のノロウイルス濃度も1オーダー以上の変動が見られた。
- 6) 下水処理場での除去により放流水のノロウイルス負荷量は、放流先河川水よりも低くなるため、今回調査対象とした流域における評価では、公共用水域へ及ぼす放流水の影響は小さいものであると考えられた。
- 7) 公共用水域における感染リスクの低減には、下水道のみならず他の施策との連携が必要であることが明らかとなった。
- 8) 流入下水や河川水のノロウイルス濃度は胃腸炎患者数の影響を受けるため、下水処理場における流入・流出濃度や放流水が河川水へ及ぼす影響など、適切な評価を行う上で季節・時間・流量などの変動要因の考慮が重要であることが明らかとなった。
- 9) ステロール類の測定結果を用いた水域における生活排水の負荷を示す指標(b/baCOP)と水域における畜産排水の負荷を示す指標(e/baCOP)から、上流河川水は処理を受けた生活排水に畜産排水の混入があることが示唆された。
- 10) 人為汚染のマーカーとして提案されているCaffeineの測定結果から上流河川水には未処理排水の混入があることが示唆された。

謝辞

本調査を遂行するにあたり、H 下水処理場の関係各位には多くの便宜をはかって頂いた。ここに記して謝意を表する。

なお、本調査研究は、地球環境保全等試験研究費により実施されたものである。

参考文献

- 1) 諏訪守, 岡本誠一郎, 尾崎正明, 陶山明子(2009) 下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響, 下水道協会誌論文集,46(561),91-101.
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課(2007), ノロウイルスの検出法について.
- 3) Nakada et al., (2006) Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, *Water research*, (40)3297-3303
- 4) Isobe et al., (2002) Quantitative application of fecal sterols using as chromatography mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam, (36)4497-4507
- 5) 小西千恵他 (2006), 水環境中医薬品の LC-MS/MS による一斉分析法の検討, 環境工学研究論文集, pp.73-82.
- 6) 小森行也他 (2007), 下水道未整備地域の小河川における医薬品の実態調査, 学会誌「EICA」, 第 12 巻 2/3 合併号, pp.37-44.
- 7) M.Suwa and Y.Suzuki(2001) Occurrence of Cryptosporidium in Japan and countermeasures in wastewater treatment plant, *Water Science and Technology*. 43(12), 183-186.
- 8) 諏訪守, 鈴木穰, 尾崎正明(2007) 「クリプトスポリジウム集団感染発生地域の下水処理場におけるオーシストの実態」、下水道協会誌論文集,44(538),151-160.
- 9) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介 (2009) 各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題, 第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 239-240.
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター病原微生物検出情報.
- 11) 和田圭史, 今井崇博, 佐野大輔, 大村達夫 (2007) 活性汚泥細菌から分離されたノロウイルス吸着タンパク質 (Norovirus-Binding Protein : NoVBPs) の特性評価, 水環境学会誌, Vol.30, No.12, pp.731-736.
- 12) 原本英司, 片山浩之 他 (2005), 下水処理場におけるノロウイルスの季節変動の調査, 第 53 回日本ウイルス学会学術集会抄録集, 311.
- 13) Johan Nordgren et al.(2007) Norovirus in the wastewater treatment process, 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology.
- 14) M.A.Laverick et al. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage, *Letters in Applied Microbiology*, 39,127-136.
- 15) 国包章一他, 公共用水域の人畜由来汚染による健康影響リスクの解明と規制影響分析に関する研究, 平成 18 年度環境保全研究成果集, 総合環境政策局総務課環境研究技術室編, 環境省, pp.61-1~61-31(2006)
- 16) Gilpin B. et al., The use of chemical and molecular microbial indicator for faecal source identification, *Water Sci. Technol.* 47(3), 39-43 (2003)
- 17) Gilpin B. et al., Identification of the source of faecal pollution in contaminated rivers, *Water Sci. Technol.* 46(3)9-15 (2002)
- 18) Laurel J. Standley et al., Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources. *Environ. Sci. and Tech.*, 34, 3124-3130 (2000)
- 19) Ignaz J. Buerge et al., Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ. Sci. and Tech.*, 37, 691-700 (2003)

河川流域における PPCPs (医薬品および日用品等由来化学物質) の挙動の解明に関する研究

国土交通省

(委託先)

独立行政法人土木研究所

材料地盤研究グループリサイクルチーム 岡本誠一郎

山下 洋正

研究期間 平成 17 年度～21 年度

平成 21 年度当初予算額 17,552 千円

(研究予算総額 95,484 千円)

Fate of PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) in River Watershed

(FY2005～2009)

Seiichirou OKAMOTO and Hiromasa YAMASHITA

Recycling Team, Material and Geotechnical Engineering Research Group

Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute

Ministry of Land, Infrastructure and Transport

In recent years, there have been many reports of the occurrence of PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) in water environments and of concerns about environmental problems they cause. These chemicals such as antibiotics, synthetic antimicrobials, and antipyretics are diverse and consumed in large quantities. They are released from sources such as urban areas and stockbreeding widely distributed in watersheds. Analysis methods are not yet developed for some chemicals and their actual status in water environments is not clarified. The reports already published include those concerning the occurrence of chemicals in water environments, their impact on ecosystems, emergence of antibiotic resistant bacteria, concerns with their influence on human health, interference with the biological treatment of wastewater and so on. There is a need for urgent research in this field. The object of this research is to perform sequential research from the mid/long term perspective by first listing various important PPCP chemicals then developing analysis methods, and clarifying the quantity of release, transport and change to clarify the fate of PPCPs in the watershed.

The main results are as follows;

1. PPCPs of 68 human and/or veterinary drugs and preservatives, 16 synthetic fragrance materials and 9 organic

UV filters in surface water samples in several rivers, lakes and urban stormwater runoff were successfully determined.

2. The fate of selected PPCPs in urban and rural watershed was studied. Their sources, transports and changes were discussed.

1 序

近年、医薬品や日用品などに由来する多様な化学物質（PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products）が水環境中に存在することが報告されており、環境影響が懸念されている。これらは、抗生物質、合成抗菌剤、鎮痛解熱剤など多様かつ使用量が膨大であり、また都市域、畜産など流域で広く発生しており、分析方法が未確立の物質もあり、実態の解明が十分ではない。これまでに報告されているだけでも、水環境中での存在、生態系への影響、薬剤耐性菌の出現、ヒト健康影響の懸念、排水の生物処理への影響等が挙げられ、早急な調査を必要としている。

本研究は、多様な PPCPs の中から重要物質をリストアップする作業から始めて、分析方法の開発、環境への放出・移行・変化量の把握により、流域での挙動把握につなげる一連の研究プロセスを中・長期的な視点で実施するものである。

平成 17～19 年度においては、重要物質のリストアップおよび分析方法の開発を行うとともに、現地調査により、主として下水処理場由来の環境への放出・移行・変化量の把握を行い、流域における挙動の解明を行った。

これらの結果をふまえて、平成 20～21 年度においては、雨天時における都市からの表面流出水および畜産・浄化槽排水等の下水処理場以外の排出源からの環境への放出・移行・変化量の把握および流域における挙動の解明を行った。

2 研究方法

2-1 重要物質のリストアップ

2-1-1 調査方法の概要

重要物質のリストアップについては、各医薬品類の生産量等（生産量、出荷量または消費量）に関する情報により、第一段階のスクリーニングを行い、生産量等が一定量（年間 2,000kg）以上の医薬品類を抽出した。次に、ヒトおよび動物で使用した場合の排泄率等（尿中および糞中の未変化体・活性体の排泄割合）に関する情報により、第二段階のスクリーニングを行い、環境中への放出量が一定量（年間 20,000kg）以上の医薬品類を選定した。最後に、これらの医薬品類について、下水処理場における除去率、環境毒性に関する情報を収集して、環境影響について検討して、第三段階のスクリーニングを行った。PEC（環境中予測濃度）および PEC/PNEC（予測無影響濃度）に基づいて、環境毒性が疑われる重要物質、環境中の存在量がたとえ推定される要検討物質などを選定した。

2-1-2 調査対象物質

我が国で利用されている主要な PPCPs として、人用医薬品、動物用医薬品および飼料添加物、化粧品その他日用品が考えられる。これらの物質の多くは「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）や「特定化学物質の環境への排出量の把握および管理の改善の促進に関する法律」（PRTR 法）の対象となっておらず、環境影響に関する規制・監視が十分に行われていないものである。人用医薬品は「薬事法」により規制されているものであり、例えば解熱鎮痛消炎剤や血圧降下剤など様々な薬効に分類されている。動物用医薬品は「薬事法」および「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」の対象となっており、人用医薬品と同様に様々な薬効分類がある。動物用の飼料添加物は、「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」により規制されており、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進の用途で添

加される抗生物質 19 種・合成抗菌剤 6 種のうち、抗生物質は特定添加物として肥飼料試験所の検定を受ける必要があるとされている。化粧品その他日用品としては、「薬事法」で規定する化粧品、医薬部外品（薬用化粧品、育毛剤など）などがあり、「化粧品基準」により配合禁止成分リスト（ネガティブリスト）および配合可能成分リスト（ポジティブリスト）が示されている。本報告では、これらの化学物質のうち、物質ごとの生産・販売量などに関する統計情報が整備されている人用医薬品および動物用医薬品ならびに飼料添加物について検討を行った。医薬品類の中で、炭酸水素ナトリウムなどの単純な無機化合物およびビタミン類ならびに遺伝子組み換えによるタンパク質製剤などは環境影響の可能性が低いと考えて除外した。

2-1-3 生産・販売量に関する調査

統計情報として、行政による各種統計、業界誌・団体などによる集計などを用いた。人用医薬品については、厚生労働省の薬事工業生産動態統計^{H17-1)}（以下、「薬事統計」とする）の特掲医薬品出荷金額数量より各医薬品の年間出荷量を算出した。また、業界誌による医薬品売上高の集計情報^{H17-2)}（以下、「売上順位」とする）より、2004 年度国内売上高 100 億円以上の医薬品約 100 点について、薬価を用いて年間出荷量を算出した。動物用医薬品および飼料添加物については、社団法人日本動物医薬品協会の「各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗寄生虫剤の販売高と販売量」^{H17-3)}（以下、「抗生物質販売高等」とする）および肥飼料試験所の検定結果より、抗生物質などの年間販売量を算出した。

2-1-4 環境への放出量に関する調査

環境への放出量については、使用された PPCPs がヒトや動物の排泄を経て、あるいは直接に、下水道や水環境へ移行する量として算出した。人用医薬品に関しては、医薬品の添付文書^{H17-4)}などより、人体における医薬品の排泄率に関する情報を用いた。動物用医薬品および飼料添加物については、動物用医薬品に関する出版物^{H17-5,6)}に基づいて動物における医薬品および飼料添加物の排泄率に関する情報を収集し、人用医薬品としての情報も参考にした。排泄率に関しては十分な情報が得られない医薬品類が多く、それらについては未変化体・活性体が尿中に 80%、糞中に 10% 放出されるという仮定で計算した。また、主として糞中に排泄されるという定性的情報のみが得られている場合は排泄率を糞中 80%、尿中 10% とした。

2-1-5 環境中濃度および環境毒性に関する調査

人用医薬品の PEC（環境中予測濃度）は、下水処理水の量約 140 億 m³/年、下水道普及率約 70% として、環境中への放出量の 7 割が 140 億 m³ 中に存在し、下水処理場を経て放流され、河川で 10 倍に希釈されるという単純な仮定を行って、環境中への放出量（ここでは尿中排泄量）1000kg が PEC0.005 μg/L に相当するとした。本手法は、米国や EU の医薬品の環境影響予測に関するガイドラインの手法^{H17-7,8)}と同様のものである。下水処理場における除去率については、報告がある一部の物質については反映し、不明の物質については 0% と仮定した。オキシテトラサイクリンなど動物用医薬品としての使用割合が多い物質については、下水処理場とは別の経路で環境中に放出されていると考えられるが、放出量の定量的な推定は困難であるため、人用医薬品と並べて統一的に評価できるように、同じ手法で PEC を試算した。PNEC（予測無影響濃度）については、報告^{H17-21~23)}がある一部の物質については反映し、不明の物質については n.a. とした。

2-2 分析方法の開発

2-2-1 分析方法の概要

溶解性試料および固形性試料中の PPCPs の分析方法の開発を行った。溶解性試料は、河川水、湖沼水、流入下水、下

水処理水、都市の雨天時表面流出水および畜産排水である。固形性試料は、河川底泥、湖沼底泥、下水汚泥、付着藻類、底生生物、魚の体組織および溶解性試料の SS である。固形性試料については、超音波抽出または高速溶媒抽出により目的成分を抽出し、溶解性試料と同様の方法で分析を行った。溶解性および固形性試料のそれぞれについて、物質性状に応じて、固相抽出および濃縮・精製を行い、LC/MS/MS または GC/MS により行う方法を開発した。

2-2-2 分析対象物質

(1) LC/MS/MS

LC/MS/MS による分析方法の開発の対象として検討した物質は、人用及び動物用医薬品及びその代謝物 (141 物質)、紫外線吸収剤 (6 物質)、X 線造影剤及び代謝物質 (4 物質)、防腐剤 (6 物質)、エストロゲン物質 (4 物質) の計 161 物質である。分析対象物質の選定にあたっては、海外および国内での報告事例^{H17-9~20)}や物質としての重要性などを考慮して、可能な限り多くの物質を効率よく分析できるようにした。

(2) GC/MS

GC/MS による分析方法の開発の対象とした物質は、表 2-1 に示すとおり、主として香料および紫外線吸収剤の 25 物質である。また、これらの物質のサロゲート物質の候補として 7 物質を加え、同時分析手法の開発を行った。分析対象物質の選定条件は、海外での報告例^{H17-9~19)}があり測定が容易と考えられる香料 (No.1~6、8~10、12~17) および紫外線吸収剤 (No.21、23、35) 及び国内の使用報告^{H17-20)}があるものの国内外含めて分析事例のない紫外線吸収剤(No.7、18~20、22、24)とした。

表 2-1 GC/MS による分析対象物質

No	分析対象物質	使用用途
1	Benzyl acetate	ジャスミン系調合香料、化粧品用調合香料、食品用調合香料
2	Terpineol	合成精油、化粧品、食品
3	Methyl salicylate	消炎鎮痛剤、化粧品、香料
4	Isobornyl acetate	森林調合香料
5	iso methyl ionone	香料
6	DPMI (Cashmeran)	香料
7	Benzophenone (BP)	医薬品中間体、紫外線吸収剤
8	Methyl dihydrojasmonate	ジャスミン系代表的合成香料(シャンプー、リンス、石鹸等)
9	ADBI (Celestolide)	香料
10	AHMI (Phantolide)	香料
11	caffeine	カフェイン
12	ATII (Traseolide)	香料
13	HHCB (Galaxolide)	香料
14	AHTN (Tonalide)	香料
15	Musk xylene	ニトロムスク
16	Musk ketone	ニトロムスク
17	Benzyl salicylate	香料原料、医薬中間体
18	OS(Octyl salicylate)	紫外線吸収剤(UVA/B)
19	Homosalate (HMS)	紫外線吸収剤(UVB)
20	Benzophenone-3(BP-3)	医薬品中間体、紫外線吸収剤
21	4-MBC (4-Methoxybenzylidene Camphor)	紫外線吸収剤(UVB)
22	Menthyl anthranilate	紫外線吸収剤(UVA/B)
23	EHMC (Octyl methoxycinnamate)	紫外線吸収剤(UVA/B)
24	Octyl PABA (Octyl aminobenzoic acid)	紫外線吸収剤(UVA/B)
25	OC(Octocrylene)	紫外線吸収剤(UVA/B)
26	Terpineol-d3	サロゲート物質
27	Benzophenone-d10(BP-d10)	サロゲート物質
28	Caffeine-d9	サロゲート物質
29	Musk xylene-d15	サロゲート物質
30	Metalochlor-d6	サロゲート物質
31	Fluoranthene-d10(Ft-d10)	サロゲート物質
32	Benzyl cinnamate	サロゲート物質

2-2-3 質量分析条件の検討

(1) LC/MS/MS

質量分析における Q1 イオン (precursor ion)、Q3 イオン(product ion)およびイオンモード (negative, positive) を決定するために、内径 4.61mm、容量 1mL のマイクロシリンジを用いて、流速 10 μ L/min にてインフュージョンを行った。各対象物質はメタノールまたはアセトニトリルに 100~1000 μ g/L の濃度で溶解させて用いた。次に、決定したイオンモードごとに対象物質の混合溶液を作成し、表 2-2 に示す操作条件で FIA (Flow Injection Analysis) を行うことでイオン化の条件等の MS/MS のパラメータの最適化を実施した。

表 2-2 LC/MS/MS の FIA 操作条件

FIA(初期イオンソース条件)	Gas1: 50
	Gas2: 80
	Curtain Gas (CUR): 40
	Ion Spray (IS): 5000(Negative は-4000)
	Temperature (TEM): 600
	Collision Gas (CAD): 4
	Interface Heater (IHe): On

(2) GC/MS

質量分析におけるモニタリングイオン及び保持時間の把握を行うために、各物質の標準物質の 1ppm ヘキサン溶液もしくはメタノール溶液を GC/MS のスキャンモードで分析した。これによりフラグメントのマスペロファイルを把握するとともにピークの保持時間を確認した。

2-2-4 前処理および測定条件の検討

(1) LC/MS/MS

各対象物質の保持時間の把握及び定量性の確認のために、イオンモードごとの対象物質混合液について、1、5、10、25、50、100、250、500、1000 ppb の 9 段階の混合液を作成し、LC/MS/MS による分析を繰り返し 3 回行った。また、検量線について線形性の確認を行った。

また、汚泥等の固形物試料中の PPCPs の抽出方法として、高速溶媒抽出法および超音波抽出法を検討した。河川試料 500mL を GF/B でろ過して得た懸濁態試料を用いて比較実験を行った。高速溶媒抽出法は、表 2-3 に示す条件で機器の使用説明書に従って実施した。

表 2-3 高速溶媒抽出条件

装置	日本ダイオネクス ASE-200
使用溶媒	メタノール 5min×2回
圧力	2000psi
温度	100℃

超音波抽出は以下のとおりに行った。試料 0.02g を 50mL 遠沈管(ポリプロピレン製)に取り、1mg/L のサロゲート物質混合溶液 10 μL をマイクロピペットで添加した。次に試料が浸る程度に溶媒 (3~4mL) を加え、超音波洗浄器 (28,45,100kHz の 3 周波を順次切り換え発振させ、設定時間をそれぞれ 10,15,5 秒とした)で 10 分間抽出したものを、3000rpm で 10 分間遠心分離し、その上澄み液を 20mL ねじ蓋付き試験管(ガラス製)に分取した。この操作を 4 回(溶媒:メタノール 2 回とアセトン 2 回)行い、各操作で得た上澄み液を合わせて、抽出液とした。

両抽出法で得た抽出液は、恒温槽温度 36℃下の窒素気流で 500 μL 程度(約 2 時間)になるまで濃縮した。濃縮液を純水で約 200mL に希釈し、これを固相抽出および LC/MS/MS 分析して抽出効率を検討した。

また、実試料(流入下水、処理水、下水汚泥)に分析対象物質を添加して溶解性試料および固形性試料からの添加回収試験を行った。濃度は、添加後に定量下限値濃度付近となるように調整した。添加および無添加の試料を分析して、回収率を算出した。

(2) GC/MS

前処理に用いる最適な固相カートリッジを選択するため、国内で使用頻度が高く入手が容易な Oasis®HLB (200mg, Waters 社製)、inertsep RP-1 (250mg, GL science 社製)、Sep-Pak plus NH2 (200mg, Waters 社製)、EDS-1 (昭和電工社製)、Lichlorut EN (200mg, Merck) の5種の汎用固相カートリッジについて、ミリQ水からの回収率を簡易的に検討した (n=1)。実験方法はミリQ水に上記対象物質及びサロゲート物質をそれぞれ1 μ g添加し、各固相カートリッジに10mL/minで通水したのち、ジクロロメタン10mLで溶出した。その後、加熱せず窒素パーズを行って穏やかに濃縮した後、ジクロロメタン1mLに転溶し、GC/MSで分析した。

次に濃縮方法の最適化を行うため、対象物質の一部を調整した1ppmジクロロメタン混合液についてさまざまな条件化で窒素パーズを行い、濃縮前後の回収率を検討した。

また、非汎用固相カートリッジ及びタンデム式固相カートリッジの適用可能性を検討するため、ミリQ水からの添加回収試験を行った。使用した固相カートリッジは、国内での使用例は少なく入手が困難であるが、海外では使用事例の多いC18 polar Plus(bakerbond 社製、充填量500mg；以下polarと記す)、C18 standard(bakerbond 社製、充填量500mg；以下Octと記す)、C18 Light Load(bakerbond 社製、充填量500mg；以下lightと記す)、Bond Elut ENV(Varian 社製、充填量200mg；以下envと記す)の4種とした。

さらに、実試料(下水処理場の余剰汚泥および河川底泥)に1 μ gの標準物質を添加し、添加したサンプルの濃度と標準物質未添加のサンプル濃度と比較することで回収率を求めた。

2-3 環境への放出・移行・変化量の把握

2-3-1 下水処理場調査

(1) 調査対象物質

我が国で利用されている主要なPPCPsとして、人用医薬品、動物用医薬品および飼料添加物、化粧品その他日用品由来の化学物質が考えられる。このうち人用医薬品、動物用医薬品、日用品防腐剤等(以下、医薬品類という)については、生産量が大きく頻用されていると推定されるものを中心に、分析可能性等を考慮して、表2-4に示す74物質を調査対象に選定した。

対象物質は、非ステロイド系抗炎症薬12種、抗生物質17種、サルファ剤3種、抗寄生虫薬・抗真菌薬9種、抗菌・防腐剤等7種、高脂血症治療薬および代謝物等4種、降圧薬等9種、抗てんかん薬および代謝物等5種、抗うつ剤・麻酔剤等・抗悪性腫瘍薬4種、気管支拡張薬他4種である。

また、化粧品その他日用品由来の化学物質としては、香料および紫外線吸収剤(以下香料等という)について、国内外での使用実態や検出の報告事例を参考に、表2-5に示す25物質を調査対象に選定した。対象物質は、香料16種、紫外線吸収剤9種である。

(2) 調査対象の下水処理場および試料

全国の下水処理場を、調査準備時点での最新の下水道統計に基づいて処理人口規模別に6区分(10,000人未満, 10,000~50,000人, 50,000~100,000人, 100,000~500,000人, 500,000~1,000,000人, 1,000,000人以上)して、各区分より季節ごとに5処理場を無作為に抽出し、5処理場×6区分×4季節により、合計120処理場を対象とした。なお、調査日時における実際の処理人口について、調査後にヒアリング等により把握して処理人口区分を修正したため、各区分の最終的な処理場数は3~8となった。下水処理方式は、標準活性汚泥法が72処理場(全体の60%)で最も多く、次いで嫌気好気法などの高度処理法28(23%)、OD法12(10%)、回分式活性汚泥法などの変法5(4%)、ろ床法3(3%)であった。また、対象処理場の位置は図2-1に示す通りであり、全国の約83%である39都道府県にまたがり、1県あたり平均3処理場(1~15処理場)を調査したことになる。

対象試料として、流入下水・処理水の24時間コンポジット試料および下水汚泥(余剰返送汚泥)を採取してPPCPsの分析を行った。調査期間は2006年10月から2007年9月までの1年間であり、3ヶ月ずつ秋・冬・春・夏の4季節に分けて実施した。測定可能な調査対象物質数は、秋期の流入下水は60、処理水は60、下水汚泥は53であり、冬期以降はそれぞれ48、49、44であった。

(3) 分析方法

2-3-2の河川・湖沼調査の試料の分析方法も同様であるため、ここでまとめて記述する。下水処理場の流入水、放流水および河川水は、アセトン洗浄したGF/Bによるろ過により、液体試料と固体試料に分離された後、液体試料は固相抽出カートリッジにより抽出した。固体試料については、下水処理場の流入水、下水処理水、河川水中の懸濁物質はろ紙ごと、底質は孔径2mmのふるいで粒径をある程度均一化したのち、凍結乾燥して抽出まで-80℃で保管した。抽出は、メタノール等の溶媒にて超音波抽出法にて行った。

抽出した試料は、医薬品類についてはLC/MS/MS(Agilent 1100シリーズHPLC, Agilent Technologies製および4000Q TRAP LC/MS/MSシステム, Applied Biosystems製)により、MRMモードにて分析した。

香料等についてはおよびGC/MS(Agilent 6890 PlusガスクロマトグラフおよびAgilent 5973 Network MSD, Agilent Technologies製)により、SIMモードにて分析した。以下に医薬品類、香料等のそれぞれの分析法を説明する。

(1) 医薬品類

医薬品類の分析方法の概要は図2-2に示す通りである。

本法はCastiglioniらの方法^{H19-3)}を参考に開発したものであり、図2-2に示すMethod1~9のうち、Method1~6は2006年の秋期調査試料の分析に用いたものであり、酸性PPCPsにはOasis MCXとSep-Pak Plus Florisilを連結した固相抽出カートリッジ、中性PPCPsにはLiChrolut ENとAutoprep EDS-1を連結した固相抽出カートリッジを用いて前処理を行い、アセトニトリル(ACN)と0.05%トリエチルアミン水(TEA)またはACNと0.1%ギ酸水(FA)を移動相として、PositiveモードまたはNegativeモードで合計6通りの方法で実施した。

2007年の冬期・春期・夏期調査試料の分析にはMethod7~9を用いた。これは、Oasis HLBとEDS-1 250-6を連結した固相カートリッジを用いて次に述べる3通りの方法で実施したものである。試料水100~500mLをGF/Bでろ過して得たろ液(溶存態)ならびにろ紙上のSSおよび活性汚泥(懸濁態)を対象とした。懸濁態については、凍結乾燥試料にサロゲート混合物質を添加した後に、メタノール等により超音波抽出を行い、ろ液と同様の手法で測定を行った。ろ液にサロゲート物質混合溶液とEDTA(1Lに対し1g添加)を順に添加し、1mol/L塩酸でpH5に調整した後に、Oasis HLBとEDS-1 250-6を連結した固相カートリッジに通水(20mL/min)した。水を除去しN₂気流下で乾燥させた後、6mLのメタノールで溶出し、溶出液を窒素気流で乾固寸前まで乾燥したものに、酢酸水(pH3.5)250μLとメタノール250μLを加えて溶解した計500μLをLC/MS/MS測定試料とした。Method7,8ではACNと0.1%FAを移動相としたグラジエント溶離法を行いMethod1はPositiveモード、Method2はNegativeモードで分析した。Method9ではACNと0.05%TEAを移動相

としたグラジエント溶離法を行い Negative モードで分析した。

(2) 香料等

香料等の分析方法の概要は図2-3および図2-4の通りである。

溶存態試料については、試料水 100~500mL を GF/B でろ過して得たるろ液に表2-6に示すサロゲート混合物質を添加した後に、10 mL/min で固相カートリッジに通水した。懸濁態試料については、凍結乾燥試料にサロゲート混合物質を添加した後に、ジクロロメタン等により超音波抽出を行い、ろ液と同様の手法で測定を行った。固相カートリッジは、J.T.Barkerbond PolarPlus C18 と Octadecyl C18 を連結したものであり、通水後に脱水した後に、15mL のジクロロメタンで溶出し、溶出液を窒素気流で濃縮し、500 μ L の GC/MS 測定試料とした。試料はスプリットレスで HP-5MS GC カラムに注入して測定を行った。

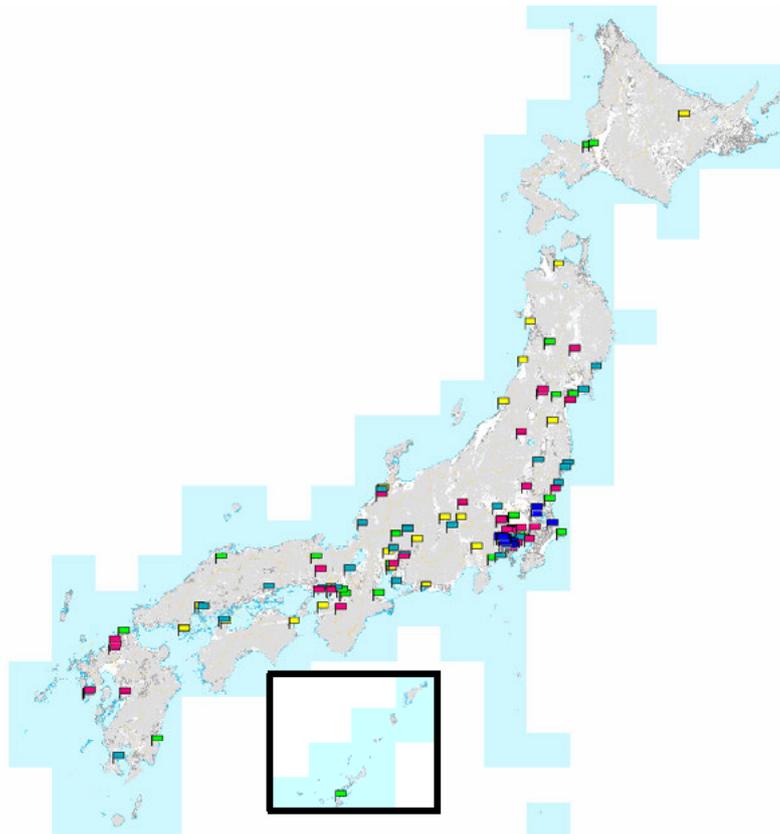


図2-1 下水処理場の調査地点図

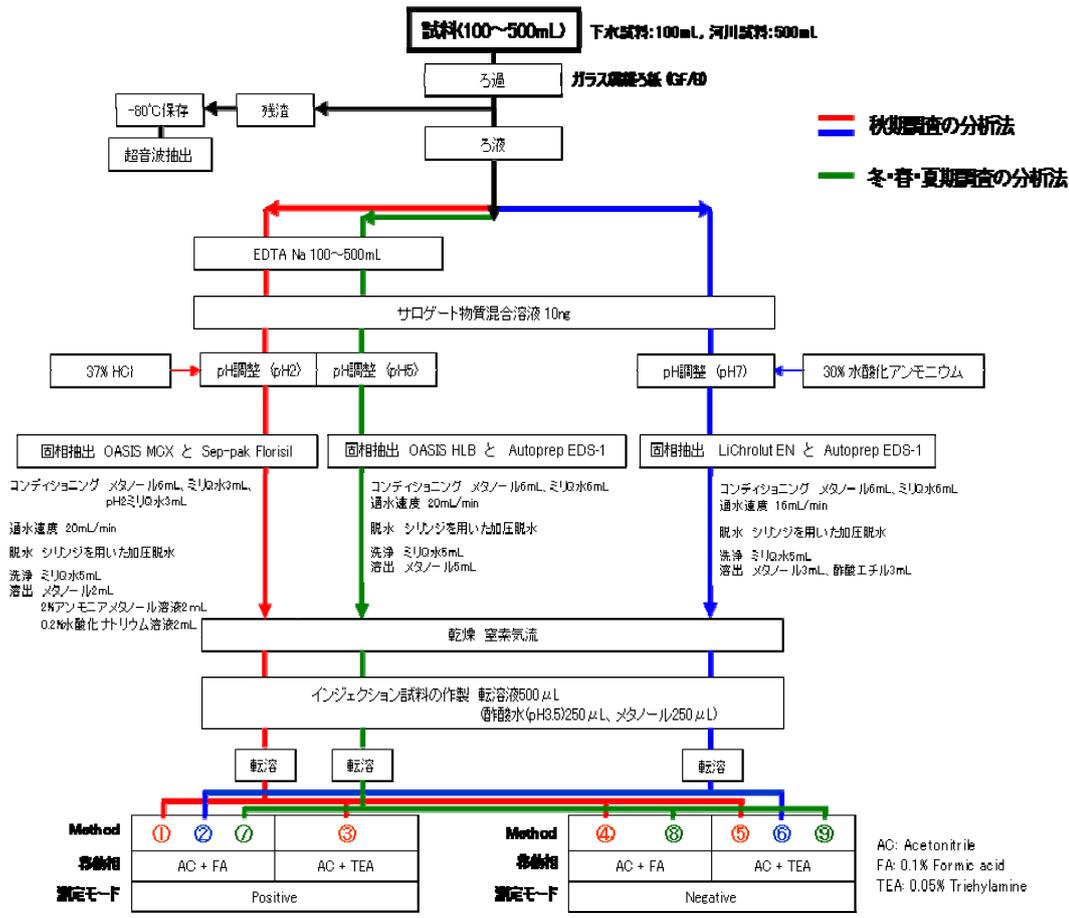


図 2-2 LC/MS/MS による分析方法の概要

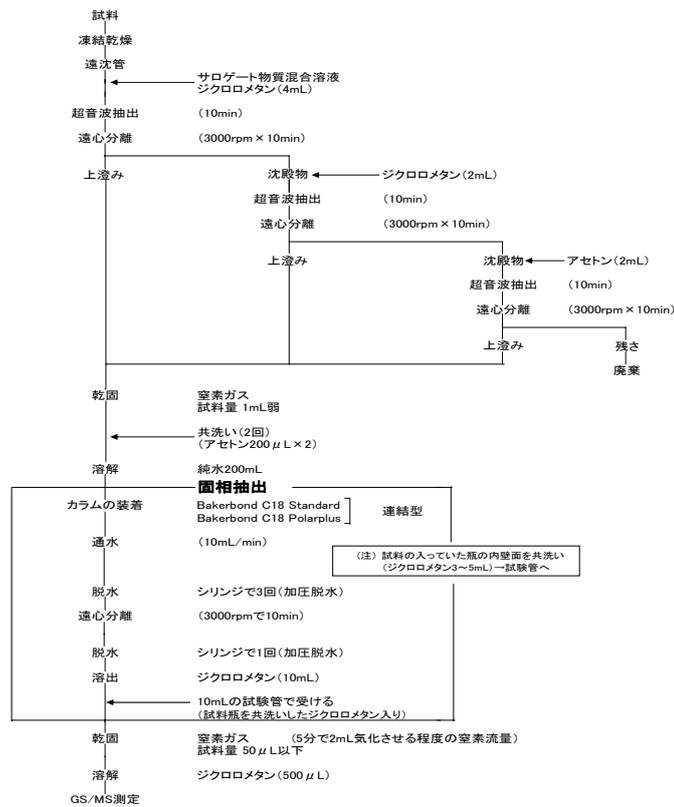


図 2-3 固形性試料の前処理方法 (GC/MS 分析法)

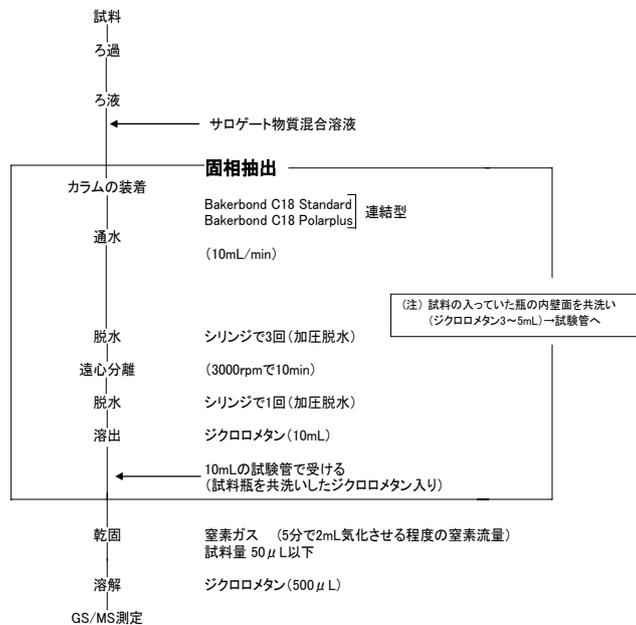


図 2-4 溶解性試料の前処理方法 (GC/MS 分析法)

表2-6 GC/MSによるPPCPs測定条件

ID	物質名	保持時間 (min)	確認イオン (m/z)	定量イオン (m/z)	サロゲート物質名
1	Benzyl acetate	11.22	108	150	α -Terpineol (propyl methyl-d3)
2	Terpineol	11.83	59	136	Benzophenone-d10
3	Methyl salicylate	12	120	152	α -Terpineol (propyl methyl-d3)
4	Isobornyl acetate	14.34	95	136	Musk xylene-d15
5	α -Isomethyl ionone	19.15	150	206	Musk xylene-d15
6	DPMI (Cashmeran)	19.56	191	206	Benzophenone-d10
7	Benzophenone (BP)	22.62	105	182	Benzophenone-d10
8	Methyl dihydrojasmonate (MDJ)	23.22	83	156	Benzophenone-d10
9	ADBI (Celestolide)	24.57	229	244	Musk xylene-d15
10	Hexylcinnamaldehyde	25.17	129	115	Benzophenone-d10
11	AHMI (Phantolide)	25.43	229	244	Musk xylene-d15
12	Octisalate (Octyl salicylate) (OS)	26.34	120	138	α -Terpineol (propyl methyl-d3)
13	ATII (Traseolide)	27.25	215		Musk xylene-d15
14	HHCB (Galaxolide)	27.28	243	258	Musk xylene-d15
15	Musk xylene (MX)	27.48	282	297	Musk xylene-d15
16	AHTN (Tonalide)	27.51	243	258	Musk xylene-d15
17	Benzyl salicylate	27.64	91	228	Benzophenone-d10
18	Homosalate (HMS)	27.84	138	69	Musk xylene-d15
19	Musk ketone (MK)	29.82	279	294	Musk xylene-d15
20	4-Methyl benzyliden camphor (4-MBC)	30.46, 31.09	254	239	Musk xylene-d15
21	Benzophenone-3 (BP-3)	30.68	227	228	Metolachlor-d6
22	Isoamyl-p-methoxy cinnamate	30.83	178	161	Benzyl cinnamate
23	2-Ethylhexyl p-methoxycinnamate (EHMC)	33.10, 36.32	178	290	Benzophenone-d10
24	Octyl PABA	35.08	165	277	α -Terpineol (propyl methyl-d3)
25	Octocrylene (OC)	47.08	249	361	Benzyl cinnamate
サ ロ ゲ ー ト 物 質	Benzophenone-d10	22.54	110	192	
	Benzyl cinnamate	31.8	91	131	
	Metolachlor-d6	29.7	168		
	Musk xylene-d15	27.21	294		
	α -Terpineol (propyl methyl-d3)	11.78	62	139	

2-3-2 河川・湖沼調査

(1) 調査対象物質

調査対象物質は、2-3-1の(1)と同様である。

(2) 調査対象地点および試料

図2-5に示すとおり、鶴見川水系6地点、多摩川水系7地点、利根川水系12地点、荒川水系18地点、園部川・巴川・潤沼川・寛政川(霞ヶ浦および潤沼流域)10地点の合計43地点において流心付近の採水および底泥採取を行い、手賀沼6地点、霞ヶ浦7地点については表層水および底泥を採取して調査を行った。調査期間は2006年10月から2007年9月までの1年間であり、採水は河川で月1回(鶴見川、多摩川、利根川、荒川の最下流地点のみ月2回)、湖沼で各季節1回(11, 2, 5, 8月)に実施した。採泥は河川で各季節1回(11, 2, 5, 8月)、湖沼で11月に1回実施した。



図2-5 河川・湖沼の調査地点図

(3) 分析方法

分析方法は、2-3-1の(3)と同様である。

2-3-3 都市の雨天時表面流出水調査

(1) 調査対象物質

我が国で利用されている主要なPPCPsとして、人用医薬品、動物用医薬品および飼料添加物、化粧品その他日用品由来の化学物質が考えられる。このうち人用医薬品、動物用医薬品、日用品防腐剤等（以下、医薬品類という）については、生産量が大きく頻用されていると推定されるものを中心に、分析可能性等を考慮して、表2-7に示す68物質を調査対象に選定した。

対象物質は、非ステロイド系抗炎症薬11種、抗生物質16種、サルファ剤3種、抗寄生虫薬・抗真菌薬8種、抗菌・防腐剤等7種、高脂血症治療薬および代謝物等4種、降圧薬等7種、抗てんかん薬および代謝物等5種、麻酔剤等・抗悪性腫瘍薬2種、気管支拡張薬他5種である。

また、化粧品その他日用品由来の化学物質としては、香料および紫外線吸収剤（以下香料等という）については、国内外での使用実態や検出の報告事例を参考に、表2-8に示す25物質を調査対象に選定した。対象物質は、香料16種、紫外線吸収剤9種である。

表2-7 都市の雨天時表面流出水の医薬品類の分析対象物質

物質ID	物質名	用途	使用分野	推定生産量(t/年)
C1	Ibuprofen	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	H	82.8
C2	Ketoprofen	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	H	47.7
C3	Naproxen	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	H	3
C4	Flurbiprofen	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	H	0.4
C5	Fenoprofen	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	H	-
C6	Diclofenac	非ステロイド系抗炎症薬(フェニル酢酸系)	H	7.4
C7	Indomethacin	非ステロイド系抗炎症薬(インドール酢酸系)	H	83.2
C8	Mefenamic acid	非ステロイド系抗炎症薬(アントラニル酸系)	H	407.7
C10	Acetophenetidine	非ステロイド系抗炎症薬(アニン系)	H	-
C11	Salicylic acid	非ステロイド系抗炎症薬(代謝物)・防腐剤	HP	3.2
C13	Ethenzamide	非ステロイド系抗炎症薬(サリチル酸誘導体)	H	-
C14	Clarithromycin	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	H	76
C15	Roxithromycin	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	H	-
C16	Oleandomycin phosphate	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	V	-
C17	Tylosin	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	V	67.9
C19	Benzylpenicillin sodium	抗生物質(ペニシリン系)・細胞壁合成阻害薬	HV	20.1
C20	Lincomycin hydrochloride	抗生物質(リンコマイシン系)・蛋白質合成阻害薬	HV	17.2
C21	Chlortetracycline	抗生物質(テトラサイクリン系)・蛋白質合成阻害薬	V	167.5
C22	Doxycycline	抗生物質(テトラサイクリン系)・蛋白質合成阻害薬	HV	21.5
C23	Oxytetracycline	抗生物質(テトラサイクリン系)・蛋白質合成阻害薬	V	317.8
C24	Tetracycline	抗生物質(テトラサイクリン系)・蛋白質合成阻害薬	V	2.1
C25	Erofloxacin	抗生物質(ニューキノロン系)・核酸合成阻害薬	V	3.0
C26	Levofloxacin(+Ofloxacin)	抗生物質(ニューキノロン系)・核酸合成阻害薬	HV	26.3
C27	Orbifloxacin	抗生物質(ニューキノロン系)・核酸合成阻害薬	V	2.31
C28	Salinomycin	抗生物質(イオノフォア)(飼料添加物)	V	32.1
C29	Monensin	抗生物質(イオノフォア)(飼料添加物)	V	22.8
C30	Ceftiofen Pivaloyloxymethyl Ester	抗生物質(セフェム系)・細胞壁合成阻害薬	H	20.9
C31	Sulfamethoxazole	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	HV	52.9
C32	Sulfadimethoxine	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	HV	30.8
C33	Sulfamethazine	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	V	4
C35	Fenbendazole	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)	V	2.6
C36	Triclabendazole	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)	V	0.7
C37	Triclabendazole metabolite	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)代謝物	V	-
C38	Ivermectin	抗寄生虫薬(アベルメクチン系)	HV	0.2
C39	Praziquantel	抗寄生虫薬	V	7.6
C40	Trimethoprim	合成抗菌剤	HV	13.8
C41	Ormetoprim	合成抗菌剤	V	1.2
C42	Sodium rifuristyrenate	合成抗菌剤(ニトロフラン系)	V	5.5
C44	3,4,5-Trichlorophenol	抗菌剤・防腐剤	P	-
C45	3,4,4-Trichlorocarbanilide	抗菌剤・消毒剤	P	-
C46	p-Hydroxybiphenyl	抗菌剤・消毒剤	P	-
C47	Propyl paraben	防腐剤	P	-
C48	Butyl paraben	防腐剤	P	-
C49	Ethyl paraben	防腐剤	P	-
C50	Methyl paraben	防腐剤	P	-
C51	Clofibrate	高脂血症治療薬(代謝物)(フィブラート系)	H	1.4
C52	Fenofibrate	高脂血症治療薬(フィブラート系)	H	-
C53	Bezafibrate	高脂血症治療薬(フィブラート系)	H	40.4
C54	Gemfibrozil	高脂血症治療薬(フィブラート系)	H	-
C56	Furosemide	降圧薬(ループ利尿薬)	H	7.5
C57	Diltiazem hydrochloride	降圧薬(Ca拮抗薬)	H	32
C58	Enalapril	降圧薬(ACE阻害剤)	H	-
C59	Metoprolol	降圧薬(β遮断薬)	H	1.3
C61	Betaxolol hydrochloride	降圧薬(β遮断薬)	H	-
C62	Valsartan	降圧薬(ARB製剤)	H	45.2
C63	Losartan	降圧薬(ARB製剤)	H	17.6
C65	Carbamazepine	抗てんかん薬(イミノステルベン系)	H	42.6
C66	Dihydro-10,11-epoxy carbamazepine	抗てんかん薬(イミノステルベン系)代謝物	H	42.6
C67	Diazepam	抗てんかん薬(ベンゾジアゼピン系)	H	-
C68	Demethyl diazepam	抗てんかん薬(ベンゾジアゼピン系)	H	-
C69	Phenytoin	抗てんかん薬(ヒダントイン系)	H	-
C72	Thiopental	麻酔薬(バルビタール系)	H	-
C73	Cyclophosphamide	抗癌性薬(アルキル化剤)	H	-
C75	Sa budamol	気管支拡張薬(β刺激薬)	H	-
C76	Ursodeoxycholic acid	胆道疾患治療薬(胆汁酸誘導体)	H	247.8
C81	Methyl dihydrojasmonate	香料(ジャスミン系)	P	-
C82	Caffeine	日用品	P	-
C83	Nicotine	日用品	P	-

(使用分野は、H:人用、V:動物用、P:日用品を示す。推定生産量は2003~2004年度の統計値より^{H17-1)}。)

表2-8 都市の雨天時表面流出水の香料等の分析対象物質

物質ID	物質名	用途	推定使用量(t/年)
C101	HHCB(galaxolide)	香料・多環状ムスク	3,568
C102	AHIN(tonalide)	香料・多環状ムスク	1,382
C103	DPMI(cashmeran)	香料・多環状ムスク	-
C104	ADB1(celestolide)	香料・多環状ムスク	-
C105	AHMI(phantolide)	香料・多環状ムスク	-
C106	ATI(traseolide)	香料・多環状ムスク	-
C107	Musk ketone(MK)	香料・ニトロムスク	-
C108	Musk xylene(MX)	香料・ニトロムスク	-
C109	Benzyl acetate	香料・芳香族 アルコールエステル	600
C110	Methyl salicylate	香料・芳香族 カルボン酸エステル	3
C111	Benzyl salicylate	香料・芳香族 アルコール・カルボン酸エステル	10
C112	Jasmonal H	香料・芳香族系アルデヒド	70
C113	α-Isomethyl Ionone	香料・イノン系ケトン	-
C114	M. Dhjasmonate(Hedione)	香料・シクロペンタン(ジャスミン系)	2,500
C115	Isobornyl acetate	香料・脂肪族アルコールエステル	-
C116	Terpineol	香料・環状テルペンアルコール	375
C117	EHMC	紫外線吸収剤・桂皮酸誘導体	-
C118	IAMC	紫外線吸収剤・桂皮酸誘導体	-
C119	Benzophenone(BP)	紫外線吸収剤・ベンゾフェノン誘導体	-
C120	Benzophenone-3(BP-3)	紫外線吸収剤・ベンゾフェノン誘導体	-
C121	Homosalate(HMS)	紫外線吸収剤・サリチル酸誘導体	-
C122	Octyl salicylate	紫外線吸収剤・サリチル酸誘導体	-
C123	octyl PABA	紫外線吸収剤・安息香酸誘導体	-
C124	4-MBC	紫外線吸収剤・カンファール誘導体	-
C125	Octocrylene(OC)	紫外線吸収剤・その他エステル	-

(推定使用量は、2007年度の統計値^{H20-4)}より、国内使用量に生産量+輸入量-輸出量として求めた。)

(2) 調査対象地点および試料

図2-6に示すとおり、鶴見川流域1地点、多摩川流域2地点の合計3地点において都市の雨天時表面流出水の調査を行った。いずれも下水道が整備された区域である。調査期間は2008年10月から2009年3月までであり、その間に降雨に応じて自動採水器により継時的に採取を行った。原則として先行無降雨期間が3日以上続いた後の一定規模以上の降雨を対象として調査を行い、1地点につき4~6降雨の試料を得た。各降雨では30分~数時間の間隔で複数回のサンプリングを行った。

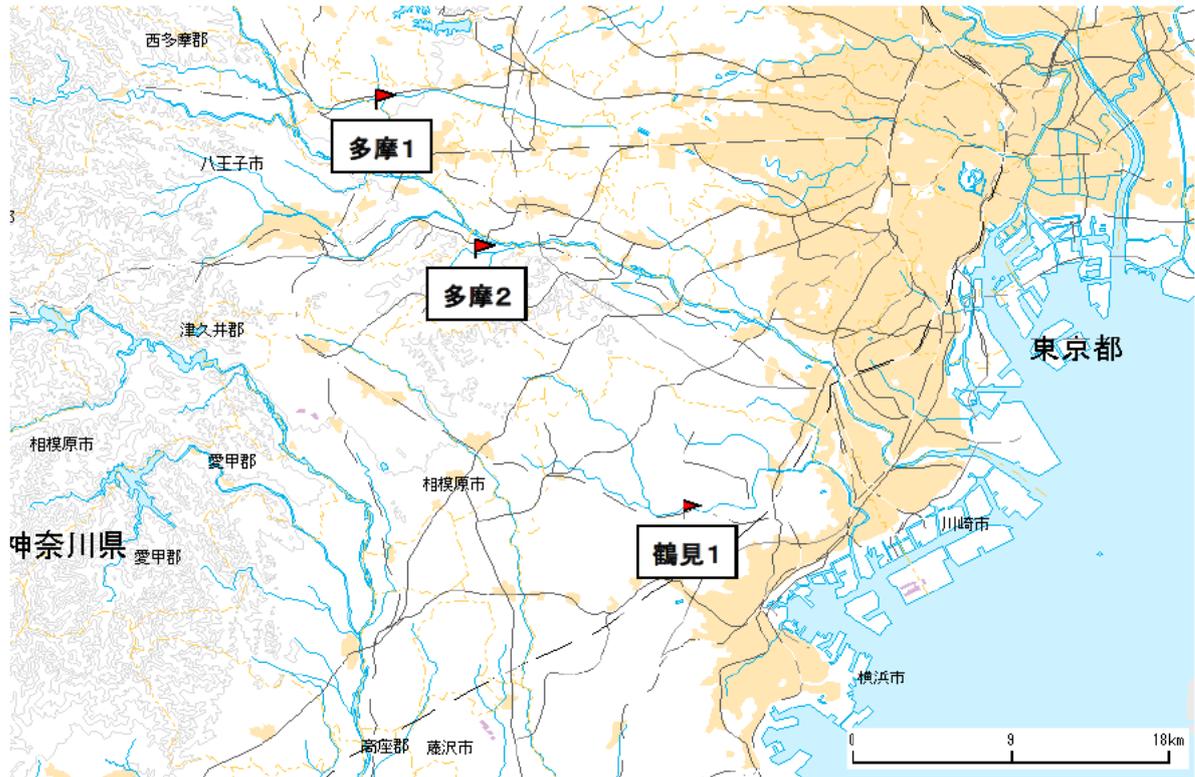


図2-6 調査対象地点（年の雨天時表面流出水）

(3) 分析方法

分析方法は、2-3-1の(3)と同様である。

試料水は、アセトン洗浄したGF/Bによるろ過により、液体試料と固体試料に分離された後、液体試料は固相抽出カートリッジにより抽出した。固体試料については、水中の懸濁物質をろ紙ごと、凍結乾燥して抽出まで-80℃で保管した。抽出は、メタノール等の溶媒にて超音波抽出法にて行った。

抽出した試料は、医薬品類についてはLC/MS/MS (Agilent 1100 シリーズ HPLC, Agilent Technologies 製および4000 Q TRAP LC/MS/MS システム, Applied Biosystems 製) により、MRM モードにて分析した。

香料等についてはおよびGC/MS (Agilent 6890 Plus ガスクロマトグラフおよびAgilent 5973 Network MSD, Agilent Technologies 製) により、SIM モードにて分析した。

2-3-4 畜産・浄化槽排水の影響を受ける河川・湖沼調査

(1) 調査対象物質

調査対象物質は、2-3-3の(1)と同様であり、LC/MS/MSで測定する医薬品・日用品類68物質と、GC/MS

で測定する香料・紫外線吸収剤25物質である。

(2) 調査対象地点および試料

図2-7に示すとおり、霞ヶ浦流域の山王川3地点、園部川2地点、巴川2地点、銚田川3地点、小野川1地点、清明川1地点、桜川1地点、恋瀬川1地点および霞ヶ浦湖内7地点の合計21地点において、流心付近（湖内においては表層）の採水を行った。調査期間は2009年1月から2月までであり、採水は晴天時に全地点で1回、雨天時に山王川、園部川、巴川、銚田川の4河川10地点において約6時間の間隔で2回実施した。

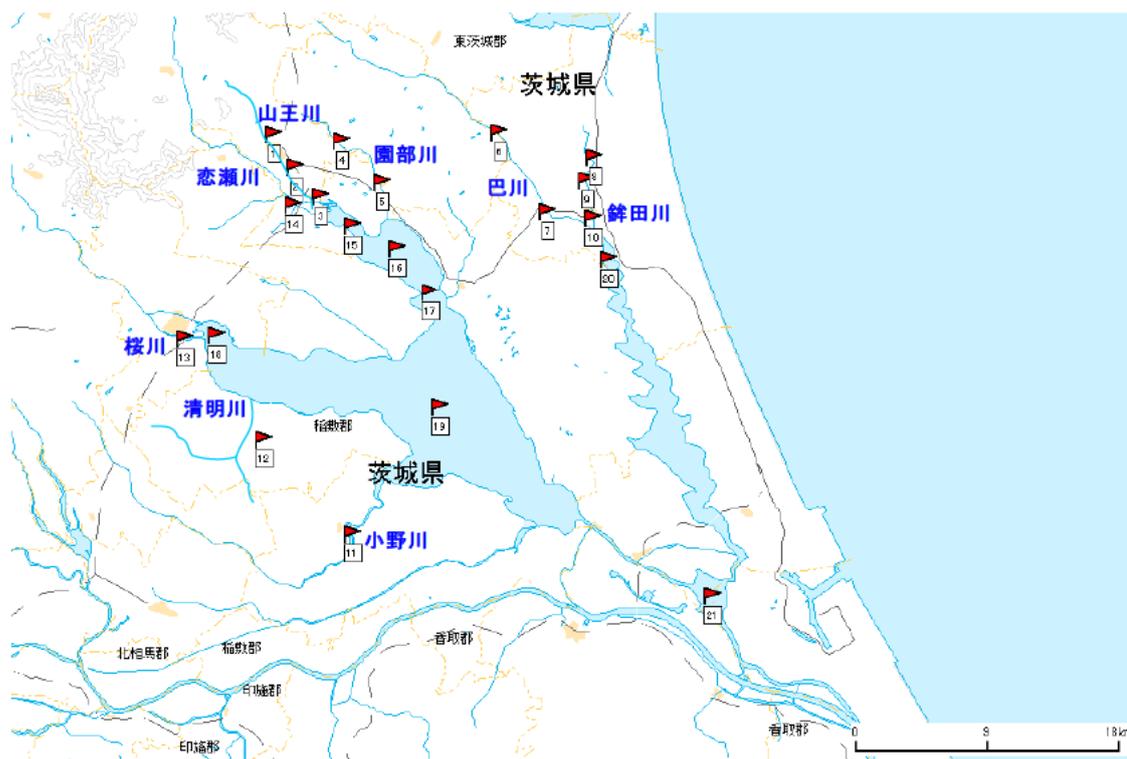


図2-7 調査対象地点（畜産・浄化槽排水等の影響を受ける河川・湖沼）

また、この調査結果により、特に園部川および銚田川流域で畜産排水由来と考えられる動物医薬品が検出されたことから、より詳細に把握するために、銚田川および園部川ならびに霞ヶ浦を調査対象として追加調査を行った。

調査地点の概要を表2-9および図2-8に示す。

表2-9 畜産排水の影響調査地点の概要

地点 No.	地点名	河川・湖沼	位置
H	銚田	銚田川	
S	園部	園部川	
K1	銚田川沖	霞ヶ浦	
K2	園部川沖	霞ヶ浦	
K3	土浦沖	霞ヶ浦	
K4	湖心	霞ヶ浦	



図2-8 畜産排水の影響調査地点

鉾田川および園部川の調査地点は、近傍に畜産施設が存在しており、畜産排水の影響を把握するために選定した。霞ヶ浦の調査地点は、畜産排水の放流を受ける河川が流入することによる湖沼水質への影響を把握するために選定した。

鉾田川沖および園部川沖は、各流入河川の直接的な影響を把握するため、湖心は、流入部から離れた地点への影響を把握するため、土浦沖は、畜産よりも都市的影響が強い地点として比較するために、それぞれ選定した

畜産施設は、鉾田川および園部川流域で、畜産排水が該当河川に流入していると考えられる施設として、各3箇所を選定した。

調査は晴天時4回、雨天時に2回行い、水試料、底泥試料等を採用した。

晴天時調査では、1時間間隔で24時間採水を行い、4時間分の試料をまとめて1コンポジット試料として、計6試料を調製した。

雨天時調査の1回目では、降雨開始時および30分後ならびにそれ以降60分間隔で4回の計6回採水を行い、主として降雨開始に伴う初期流出の影響把握に努めた。

雨天時調査の2回目では、晴天時調査と同様に行い、継続的な降雨に伴う流出の影響の把握に努めた。また、同時に霞ヶ浦の調査は船を用いて行い、4地点の湖水を採取して、雨天時の河川流入による湖沼水質への影響を把握した。

各調査地点において、河川水等の水試料および底泥等の固形性試料を採取した PPCPs 分析用試料は、アセトン洗浄したガラス容器に採取した。

(3) 分析方法

分析方法は、2-3-3の(3)と同様である。

2-3-5 希土類元素を指標物質とした河川調査

水環境が都市排水によりどの程度人為的に汚染されているかを把握するための指標物質（マーカー）として、人為起源ガドリニウム（Gd）の利用可能性が報告されている^{H21-1~H21-5}。Gdは希土類（Rare Earth Elements, REE）元素の一つであり、水環境中で地質由来の希土類の各元素の存在比率は、ほぼ一定である。しかし、Gd錯体がMRI（核磁気共鳴）医療検査において造影剤として使用され、都市排水に含まれて水環境中に放出されることから、希土類の他の元素よりもGdの存在比率が高くなることが知られている。この現象は、Gdアノマリイ（Gd anomaly）と呼ばれている。ここでは、都市排水の影響を受けている河川や湖沼を対象に希土類元素を測定してGdアノマリイを把握し、都市排水汚染の指標としての有効性を検討した。

(1) 調査対象物質

表2-10に示す希土類14元素である。

(2) 調査対象地点および試料

下水道の整備が進んだ都市河川流域として鶴見川および多摩川を夏季および秋季に調査した。比較対象として、畜産および浄化槽排水の影響を受ける河川流域として、銚田川、園部川流域および霞ヶ浦を冬季に調査した。また、畜産排水自体についても、同様に調査した。調査地点は表2に示す通りである。

表2-10 分析対象の希土類元素

No.	元素
1	La
2	Ce
3	Pr
4	Nd
5	Sm
6	Eu
7	Gd
8	Tb
9	Dy
10	Ho
11	Er
12	Tm
13	Yb
14	Lu

表2-11 希土類元素の調査地点

河川・湖沼	地点名	地点No.	調査時期
鶴見川	高田橋	TR-1	夏季1回 秋季1回
	亀の子	TR-2	
多摩川	調布橋	TM-1	
	石原	TM-2	
銚田川	銚田	H	冬季1回
園部川	園部	S	
霞ヶ浦	銚田川沖	K1	
	園部川沖	K2	
	土浦沖	K3	
	湖心	K4	

(3) 分析方法

分析は、高周波誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP/MS, X7CCT, サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて行った。分析の前処理として固相抽出による濃縮する方法^{H21-6)}、直接に硝酸分解して測定する方法^{H21-7)}などが報告されている。予備検討の結果、河川・湖沼水や下水処理水中の希土類濃度であれば、硝酸による加熱濃縮分解で測定可能であることが確認できたため、操作の複雑化による汚染をさけるためにも、固相抽出は行わずに測定した。

具体的には、河川試料等を5種Cろ紙でろ過し、得たる液を1Lテフロン分解容器に500mL分取し、硝酸2mLを加え、ホットプレート上(約180°C)で加熱濃縮分解を行った。放冷後、この濃縮分解液を5種Bろ紙でろ過し、内標準物質を加え、ミリQで25mLにメスアップした後、ICP/MSにて測定を行った。分析方法を図2-9に示す。

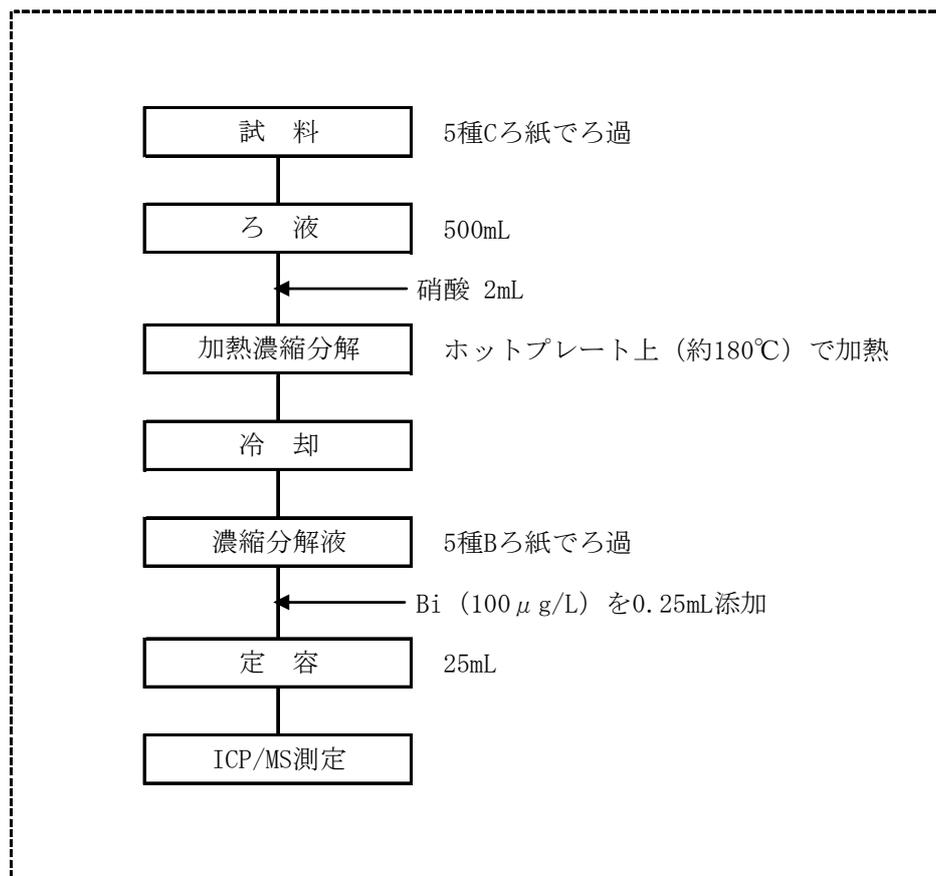


図2-9 希土類元素の分析方法

2-4 流域における挙動の解明

2-4-1 都市排水由来のPPCPsの河川における挙動の解明

鶴見川および多摩川流域の各調査地点におけるPPCPs濃度を比較することにより、河川の流下や都市排水の流入による影響等を検討した。

鶴見川流域は、寺家橋、浅山橋、落合橋、鳥山、高田橋、亀の子橋(最下流地点)の計6地点について検討した。多摩川流域は、調布橋、東秋留橋、日野橋、浅川橋、高幡橋、報恩橋、石原(最下流地点)の計7地点について検討した。

検討対象とするPPCPsは、多くの地点において安定的に高濃度で検出されている代表的物質として、Clarithromycin(マクロライド系抗生物質)、Levofloxacin(ニューキノロン系抗生物質)、Sulfamethoxazole(サルファ剤)を選定した。

冬期および夏期での河川水中の濃度として、それぞれ1～3月、7～9月の平均値を用いて検討した。

2-4-2 浄化槽・畜産排水由来のPPCPsの河川・湖沼における挙動の解明

霞ヶ浦流域の河川・湖沼の各調査地点における晴天時・雨天時のPPCPs濃度および輸送量を比較することにより、降雨によるPPCPs負荷量変化や畜産・浄化槽排水の流入による影響等を検討した。検討対象とするPPCPsは、多くの地点で検出されている代表的物質として、動物用医薬品としてC20 Lincomycin（リンコマイシン系抗生物質）、人用医薬品としてC14 Clarithromycin（マクロライド系抗生物質）、日用品としてC82 Caffeine（カフェイン）を選定した。

2-4-3 都市排水由来のPPCPsの水性生態系における挙動の解明

(1) 調査対象物質

調査対象物質は、2-3-3の(1)と同様であり、LC/MS/MSで測定する医薬品・日用品類73物質と、GC/MSで測定する香料・紫外線吸収剤25物質である。医薬品・日用品類は、17beta-Estradiol, Estron, 17alfa-Ethinylestradiol, Sulfamonomethoxine, Methyl Benzyliden Camphorの5物質を追加で定量している。

(2) 調査対象の流域および試料

都市排水中のPPCPsが水環境に放出された後に、流域において生物に移行する挙動を把握するため、都市化が進んだ流域の鶴見川および多摩川を調査対象とした。鶴見川の亀の子および多摩川の石原の調査地点は、都市排水が多く流入する下流域に存在しており、都市排水の影響を把握するために選定した。鶴見川の高田橋および多摩川の調布橋の調査地点は、下流地点比較して都市排水の影響が少なめであり、比較対象として選定した。

調査地点の概要を表2-12に示す。

表2-12 調査地点の概要

地点No.	地点名	河川
TR-1	高田橋	鶴見川
TR-2	亀の子	
TM-1	調布橋	多摩川
TM-2	石原	

(3) 調査方法

調査はすべて晴天時に行い、水試料、底泥試料、生物試料を同時に採取した。

晴天時調査を各地点1回ずつ、夏季および秋季にそれぞれ行った。

各調査地点において、河川水等の水試料および底泥等の固形性試料を採取した。

PPCPs分析用試料は、アセトン洗浄したガラス容器に採取した。希土類分析用試料は、清浄な樹脂容器に採取した。

生物試料は、魚（コイ）、付着藻類、底生生物を採取した。底生生物は、テナガエビ、ヒゲナガワカトビケラ、サワガニ、スジエビ、ヌカエビ等であった。コイは、魚肉、肝臓、生殖腺、胆汁をそれぞれ分取した。

都市排水の影響を受ける鶴見川・多摩川の各調査地点における生物試料中のPPCPs濃度を比較することにより、環境中に放出されたPPCPsの生物への移行等を把握し、挙動の解明を行った。

3 研究結果および考察

3-1 重要物質のリストアップ

3-1-1 生産・販売量に関する調査

各医薬品類の生産量等（生産量または出荷量）に関する情報により，第一段階のスクリーニングを行い，生産量等が一定量（年間2,000kg）以上の医薬品類を選定した結果を表3-1に示す。

上位に位置した医薬品類は，アミノエチルスルホン酸，スクラルファート，アセトアミノフェン，L-カルボシステイン，メフェナム酸，オキシテトラサイクリン，ウルソデオキシコール酸，イオバミドール，イオヘキソール，アロプリノールなどであった。

表3-1 生産量等が年間2,000 kg 以上の医薬品類

No.	和名	推定生産・出荷量 (1000kg)	情報源	
			赤	動
1	アミノエチルスルホン酸	2790.1	○	
2	スクラルファート	2465.4	○	
3	アセトアミノフェン	909.0	○	
4	L-カルボシステイン	659.0	○	
5	メフェナム酸	407.7	○	
6	オキシテトラサイクリン	317.8	○	○
7	ウルソデオキシコール酸	247.8	○	
8	イオバミドール	180.2	○	
9	イオヘキソール	176.7	○	
10	アロプリノール	172.8	○	○
11	塩酸クロルトラサイクリン	167.5	○	○
12	イコサペント酸エチル	153.9	○	
13	バルプロ酸ナトリウム	147.1	○	○
14	塩酸ニリスチン	86.0	○	○
15	インドメタシン	83.2	○	○
16	イブプロフェン	82.8	○	○
17	テオフィリン	81.4	○	○
18	トリスホキサム酸	80.2	○	○
19	ナリドキシリン	78.8	○	
20	クラリスロマイシン	76.0	○	
21	塩酸エカラジン	69.8	○	
22	ロキソプロフェンナトリウム	68.1	○	
23	メチロキサジン	67.9	○	○
24	フェルピナク	61.8	○	○
25	アンピシリン	59.3	○	○
26	スルファミトキサゾール	52.9	○	○
27	ケトルロフェン	47.7	○	○
28	バルサルタン	45.2	○	
29	カルバマゼピン	42.6	○	
30	アモキシシリン	42.6	○	○
31	スルピリド	42.5	○	
32	塩酸セフカニヒポキシル	42.2	○	○
33	エリスロマイシン	41.1	○	○
34	ベザフィラート	40.4	○	
35	塩酸テクロピジン	37.7	○	
36	ストレプトマイシン	37.6	○	
37	塩酸セフォチアムヘキセチル	37.0	○	
38	アルジオキサ	35.8	○	○
39	スルファミノメトキシシン	35.4	○	○
40	ブランカスト水和物	33.6	○	
41	サリノマイシンナトリウム	32.1	○	○
42	塩酸ジルピロリジン	32.0	○	
43	塩酸ラニチジン	31.1	○	
44	スルファミトキシシン	29.2	○	
45	レボフロキサシン	24.0	○	
46	モネシリンナトリウム	22.8	○	○
47	フェキサジン	22.3	○	
48	塩酸フラボキサート	22.0	○	○
49	塩酸ドキシサイクリン	21.5	○	○
50	セフジトレン ヒポキシル	20.9	○	
51	ラサロシドナトリウム	20.2	○	○
52	ペンジルペンシリン	20.1	○	○
53	センノシド	19.9	○	
54	セフジニル	19.8	○	
55	セフアレキシン	19.1	○	
56	カルバマゼピンのカルボキシシリン	18.5	○	○
57	ロサルタンナトリウム	17.6	○	
58	リンコマイシン	17.2	○	○
59	スルフィソゾルナトリウム	16.0	○	
60	チアソフェニコロール	15.0	○	
61	アピタマイシン	14.4	○	○
62	塩酸テルピナフィン	14.1	○	○
63	トリメトプリム	13.8	○	○
64	ナラシン	13.8	○	○
65	硝酸イソソルビド	13.7	○	
66	メシル酸カモスタット	12.9	○	
67	塩酸バラシクロロビル	12.6	○	
68	塩酸ペラバミル	12.4	○	
69	メチルドパ	12.0	○	
70	セファドロキシリン	12.0	○	
71	ジメチン	11.9	○	
72	アシクロビル	11.1	○	
73	ジビラモール	11.1	○	
74	塩酸ニカルジピン	10.3	○	
75	亜鉛バシラシリン	10.2	○	○
76	トラビジン	10.1	○	○
77	ベンル酸アムロジピン	9.8	○	
78	エチルコハク酸エリスロマイシン	9.6	○	○
79	フロモキセフナトリウム	9.4	○	○
80	クロモグリク酸ナトリウム	9.1	○	○
81	塩酸アマタジン	9.1	○	
82	スルピリド	8.4	○	
83	塩酸サルボグレラート	8.1	○	
84	硝酸イソソルビド	7.9	○	
85	塩酸シネプテラジン	7.7	○	
86	リファンピジン	7.6	○	
87	ブラジクアンテル	7.6	○	
88	フルバチアムリン	7.5	○	
89	フロセミド	7.5	○	
90	デストマイシンA	7.5	○	○
91	フルマ酸クエチアピン	7.4	○	
92	ジクロフェナクナトリウム	7.4	○	○
93	エソラマイシン	7.2	○	○
94	グリセオフルビド	6.9	○	
95	カルバクロムスルホニルナトリウム	6.9	○	
96	塩酸ミノサイクリン	6.8	○	
97	リン酸チロシリン	6.7	○	
98	塩酸アムロキソール	6.6	○	
99	エマルタット	6.6	○	
100	塩酸マアラミド	6.5	○	

No.	和名	推定生産・出荷量 (1000kg)	情報源	
			赤	動
101	ドキシフルリジン	6.4	○	
102	酒石酸イフェンプロジル	6.4	○	
103	ナリジクス酸	6.4	○	
104	局) プロムワレル炭素	6.3	○	
105	マレイン酸ヒメプロマジン	6.2	○	
106	アシピリン	6.1	○	
107	ニトラゼパム	6.1	○	
108	塩酸カナマイシン	5.9	○	○
109	フロムフェニコロール	5.9	○	
110	ランソプラゾール	5.8	○	
111	トルブタミド	5.7	○	○
112	ジシピラミドカプセル	5.7	○	
113	ブラスタチンナトリウム	5.7	○	
114	テルミサルタン	5.7	○	
115	ニコスチレン酸ナトリウム	5.5	○	○
116	局) 塩酸メルヒネ	5.5	○	
117	塩酸クロルプロマジン	5.4	○	
118	アルバスタチンカルシウム水和物	5.4	○	
119	メルシロキサチン	5.2	○	
120	ベズプロロン	5.2	○	
121	塩酸ビルジカニド	5.0	○	
122	フェニバルピタール	4.3	○	○
123	カンデサルタン シルホセチル	4.3	○	
124	スルファミジン (スルファミサジン)	4.0	○	
125	ビベラジン	3.9	○	
126	ノシヘブタイド	3.9	○	○
127	ゲファルナート	3.9	○	
128	局) アミノフィリン	3.7	○	
129	イソニアジド	3.6	○	
130	メロベナム 三水合物	3.4	○	
131	塩酸パロキセチン水和物	3.2	○	
132	アセタゾラミド	3.2	○	
133	センデラマイシンナトリウム	3.2	○	○
134	クエン酸モサプリド	3.1	○	
135	塩酸スベクチンマイシン	3.1	○	
136	エンフロキサシン	3.0	○	
137	ナプロキセン	3.0	○	
138	塩酸パノコマイシン	2.9	○	
139	エフロトマイシン	2.8	○	
140	イトロキサゾール	2.7	○	
141	フェンペンタゾール	2.6	○	
142	ブフェキサマック	2.5	○	
143	スピロラクソン	2.5	○	
144	塩酸L-エチルシステイン	2.5	○	
145	シチコリン	2.5	○	
146	ニコランジル	2.4	○	
147	ニトログリセリン	2.4	○	
148	デキストラン塩酸ナトリウム	2.4	○	
149	オキソリリン	2.4	○	
150	オフロキサシン	2.3	○	
151	塩酸ヒオグリタゾン	2.3	○	
152	フルバチアチンナトリウム	2.2	○	
153	塩酸フルルミン	2.2	○	
154	塩酸プロメタジン	2.1	○	
155	塩酸テトラサイクリン	2.1	○	
156	アスカピン	2.1	○	
157	セチカマイシン	2.0	○	

情報源 赤：「売上順位」、動：「薬事統計」、動：「抗生物質販売高」、動：「肥飼料試験所検定結果」、情報源 赤：「売上順位」、動：「薬事統計」、動：「抗生物質販売高」、動：「肥飼料試験所検定結果」

ここで「売上順位」に基づく集計では剤形の違いにより薬価に幅があるため、最低および最高薬価を用いて、最高および最低出荷量(kg)を推定した。薬価に幅がある医薬品では、最高と最低で10倍以上開きがある推定値となった。

薬事統計にも収録されている医薬品（L-カルボシステイン、アロプリノール、ケトプロフェン、ジクロフェナクナトリウム、テオフィリン、バルプロ酸ナトリウム、フルルビプロフェンおよび塩酸ジルチアゼム）については、出荷量のデータが直接得られたため、より信頼できる推定値としてそちらを用いた。それ以外の医薬品については、安全側の推定値として最高値を用いることとした。

動物用医薬品の抗生物質等については、アモキシシリン、アンピシリン（および同ナトリウム）、エリスロマイシン、スルファジメトキシン、ナリジクス酸、ホスホマイシン（カルシウムおよび同ナトリウム）、塩酸ドキシサイクリンが薬事統計にも収録されていたが、そのデータは重複していないため、別集計として加算した。

「売上順位」および「薬事統計」についてそれぞれの集計結果を比較すると、出荷量上位の医薬品に違いが見られたが、これは用いた情報の特徴の違いによるものと考えられた。「売上順位」による集計では、出荷量が少なくとも薬価の高い医薬品（例えば新規開発の降圧薬など）が売上高上位に入る傾向も見られるため、使用量の多いものをスクリーニングする目的には必ずしも適していない面があるが、各薬効分類で最近よく売れて使用されている医薬品を知ることができるため重要である。

一方、「薬事統計」では特掲医薬品としてあらかじめ選定された対象について情報収集しているため、大量に使用されているが薬価が安いため売り上げ順位では上位に現れない医薬品（例えば総合感冒薬成分の鎮痛解熱剤など）についても情報を得ることができる上に、薬価による計算なしで出荷量を直接知ることができるので有用であるが、選定されている特掲医薬品は各薬効分類で現在最も使用されているとは限らないので、最新の状況を把握するには必ずしも十分でない面がある。従って、「薬事統計」と「売上順位」による集計の両方の情報を用いて、それぞれの長所を生かして現時点で使用量の多い医薬品を選定することが適切と考えられた。

「抗生物質販売高等」による動物用医薬品の集計結果と肥飼料試験所の検定結果による飼料添加物（抗生物質）の集計結果を比較すると、動物用医薬品の2割程度（総量比較）の抗生物質が飼料添加物として使用されていると推定された。コリスチンやタイロシン、オキシテトラサイクリンのように両方で使用されている物質もあるが、サリノマイシンなど飼料添加物としての使用しか統計がない物質もあった。

人用医薬品および動物用医薬品における抗生物質などの総出荷・販売量を比較すると、人用医薬品が「薬事統計」と「売上順位」の合計で200～350t程度と推定されるのに対して、動物用医薬品では約1000tと3～5倍程度大であり、抗生物質などに関しては動物用医薬品の挙動の把握も重要と考えられた。

3-1-2 環境への放出量に関する調査

ヒトおよび動物で使用した場合の排泄率等（尿中および糞中の未変化体・活性体の排泄割合）に関する情報により、第二段階のスクリーニングを行い、環境中への放出量が一定量（年間20,000kg）以上の医薬品類を抽出した。結果を表3-2に示す。

表3-2 第二段階スクリーニング（環境放出量）の結果

順位	和名	環境放出量 (1000kg)		排泄率 (%)		推定生産・出荷量 (1000kg)
		尿	糞	尿	糞	
1	アミノエチルスルホン酸	2734	56	98	2	2790.1
2	L-カルボシステイン	646	0	98	0	659.0
3	アセトアミノフェン	619	0	69	0	909.8
4	メフェナム酸	326	41	80	10	407.7
5	オキシテトラサイクリン	254	32	80	10	317.8
6	イオハミドール	180	0	100	0	180.2
7	イオキシテトラサイクリン	175	0	99	0	176.7
8	塩酸クロルテトラサイクリン	134	17	80	10	167.5
9	アロプリノール	110	35	63.8	20	172.8
10	ト罗纳キサム酸	56	0	70	0	80.2
11	塩酸エカラジン	56	7	90	10	69.8
12	スクラルファート	54	1849	2.2	75	2465.4
13	スルファメトキサゾール	43	0	82	0	52.9
14	インドメタシン	40	13	48	16	83.2
15	クラリスロマイシン	38	0	50	0	76.0
16	ロキソプロフェンナトリウム	34	0	50	0	68.1
17	エリスロマイシン	33	4	80	10	41.1
18	アルジオキサ	29	4	80	10	35.8
19	ベザフィブラート	28	0	69.1	0	40.4
20	ストレプトマイシン	28	0	75	0	37.6
21	塩酸ラニチジン	28	0	89.2	0	31.1
22	サリノマイシンナトリウム	26	3	80	10	32.1
23	スルファモノメトキシシン	25	3	70	8.5	35.4
24	アンピシリン	23	0	39.4	0	59.3
25	スルファジメトキシシン	23	3	80	10	29.2
26	塩酸ジルチアゼム	22	5	69	17	32.0
27	レボフロキサシン	22	1	92	3	24.0
28	ファミチジン	22	0	96.4	0	22.3
29	モネンシンナトリウム	18	2	80	10	22.8
30	アモキシシリン	17	0	40	0	42.6
31	塩酸セフカペンピボキシル	17	0	40	0	42.2
32	塩酸セフトリアキサム、ヘキサセチル	17	0	47	0	37.0
33	スルピリド	13	0	30	0	42.5
34	硫酸コリスチン	9	69	10	80	86.0
35	テオフィリン	7	65	8	80	81.4
36	タイロシン	7	54	10	80	67.9
37	バルサルタン	6	32	14	71	45.2
38	イコサセント酸エチル	4	26	2.7	16.7	153.9
39	バルプロ酸ナトリウム	4	0	3	0	147.1
40	フロキサジン	4	4	6.6	0	61.8
41	セフジトレン ピボキシル	4	0	20	0	20.9
42	ウルソデオキシコール酸	3	69	1.1	27.7	247.8
43	塩酸ドキシサイクリン	2	17	10	80	21.5
44	イソプロパドール	1	0	0.93	0	76.8
45	ケトプロフェン	1	0	2.7	0	47.7
46	カルバマゼピン	1	0	3	0	42.6
50	イブプロフェン	0	0	0	0	82.8
47	塩酸クロロビジン	0	0	0.02	0	37.7
48	ブランチカスト水和物	0	33	0.24	98.9	33.6
49	塩酸フラボキサート	0	0	0.002	0	22.0

排泄率に関する情報がないものは、尿中80%：糞中10%（または尿中10%：糞中80%）と仮定。

排泄率の情報が得られず尿中に80%、糞中に10%放出されるという仮定で計算したものが多く、推定の精度の点で問題が残るが、医薬品の薬効の観点からは、できるだけ体内では代謝・不活化されず、尿中の未変化体回収率が高い医薬品が好ましいようであるため、排泄率などに関する十分な情報が得られない医薬品については、未変化体の尿中排泄率が高いとみなして安全側の集計を行うのもやむを得ないと考えられる。

しかし、このために情報が得られない医薬品については高めの推定値となる傾向があり、排泄率が低いという情報がある医薬品についてのみ放出量の推定値が低くなるという、不統一な結果とならざるを得なかった。従って第二段階のスクリーニングの結果は、順位はあくまでも目安であり、放出量のオーダーを示すものとする必要がある。

また、人用医薬品の場合、排泄された医薬品は下水処理場等を経て、水環境中に移行すると仮定できるが、動物医薬品および飼料添加物の場合は、排泄物が堆肥化されて土壌に施用される場合が多いため（水産を除く）、水環境への移行経路としては、堆肥—土壌施用—浸透・流出または堆肥—直接流出（雨天時など）などが考えられるが、その移行率の推定は難しい。従って排泄物として環境への放出量を推定しても、そこから水環境中の濃度を正確に推定するのは現時点では困難と考えられた。

また、人用医薬品についても、尿中および糞中に排泄されたものがそのまま溶解性および固形性画分にとどまるとは限らず、抱合体から遊離体への変化などにより、変動することが考えられる。さらに、未変化体がグルクロン酸または硫酸に抱合されたものなどは、未変化体ではないが、環境中でふたたび遊離体にもどることもありうることから、これらの形態で排泄される医薬品類をどう評価すべきかは一律に決めたい。

これらの不確定要素をふまえて、現時点の第二段階のスクリーニングとしては、生産量等の多い医薬品類の中から、排泄率が低いものを除外して、尿中および糞中にそれぞれ多く排泄される可能性がある物質を把握することが重要と考えられた。

3-1-3 環境中濃度および環境毒性に関する調査

PEC および環境毒性に関する検討結果を表3-3に示す。PEC>0.01 μg/L となったものは、アミノエチルスルホン酸

(13.7)からドキシサイクリン(0.01)までの50物質となった。

表3-3 第三段階スクリーニング (PEC および PEC/PNEC) の結果

順位	和名	PEC ($\mu\text{g/L}$)	PEC/PNEC ($\mu\text{g/L}$)	PNEC ($\mu\text{g/L}$)	下水処理場 の除去率 (%)	播種投出量 (原中1000g)
1	アミノエチルスルホン酸	18.87	n.s.	n.s.	0	2724
2	スクラルファート	12.08	n.s.	n.s.	0	2416
3	アセトアミノフェン	3.10	0.34	9.2	0	619
4	レカルボシステイン	2.84	n.s.	n.s.	0	527
5	メフェナム酸	1.85	3.8	0.43	0	226
6	オキシテトラサイクリン	1.59	6.9	0.23	0	318
7	イオパミドール	1.23	n.s.	n.s.	0	245
8	ウルソオキシコール酸	0.72	n.s.	n.s.	0	144
9	塩酸クロルテトラサイクリン	0.54	10.7	0.05	0	107
10	アロプリノール	0.61	0.0075	80.8	0	121
11	バルプロ酸ナトリウム	0.59	n.s.	n.s.	0	118
12	イオヘキソール	0.02	n.s.	n.s.	0	4
13	テオフィリン	0.34	0.0022	155	0	67
14	トラネキサム酸	0.19	n.s.	n.s.	0	38
15	ラニチジン	0.19	n.s.	n.s.	0	38
16	ロソプロフロキシナトリウム	0.17	n.s.	n.s.	0	34
17	フェルビズナク	0.25	n.s.	n.s.	0	49
18	塩酸セフトリアキソン	0.28	n.s.	n.s.	0	56
19	タイロシリン	0.26	n.s.	n.s.	0	51
20	バルサルタン	0.20	n.s.	n.s.	0	40
21	塩酸コリスチン	0.30	n.s.	n.s.	0	59
22	アモキシシリン	0.17	21.8	0.0078	0	34
23	クラリスロマイシン	0.15	47.0	0.0031	45	53
24	スルファメトキサゾール	0.21	7.0	0.03	0	42
25	カラムプロフェン	0.085	n.s.	n.s.	0	17
26	塩酸チクロロジジン	0.13	n.s.	n.s.	0	26
27	ストレプトマイシン	0.18	1.4	0.133	0	36
28	塩酸セフトアキサム	0.17	n.s.	n.s.	0	34
29	アンピシリン	0.24	n.s.	n.s.	0	47
30	スルピリド	0.19	n.s.	n.s.	0	38
31	塩酸セフカペンピロキシル	0.10	n.s.	n.s.	0	20
32	ベザフロキサート	0.040	n.s.	n.s.	50	16
33	エリスロマイシン	0.080	3.5	0.0227	0	16
34	ケトプロフェン	0.082	n.s.	n.s.	69	40
35	アルジホキサ	0.15	n.s.	n.s.	29	29
36	フランカスト水和物	0.14	n.s.	n.s.	0	27
37	インドメタシン	0.057	n.s.	n.s.	83	67
38	スルファモキシチン	0.055	n.s.	n.s.	0	11
39	塩酸ラニチジン	0.015	0.000026	582	0	3
40	イコサペント酸エチル	0.26	n.s.	n.s.	0	51
41	サリメタインナトリウム	0.015	n.s.	n.s.	0	3
42	塩酸ジルチアゼム	0.015	n.s.	n.s.	0	3
43	レボフロキサシン	0.008	0.0026	3.1	46	3
44	モネシナナトリウム	0.005	n.s.	n.s.	0	1
45	塩酸ドキシサイクリン	0.020	n.s.	n.s.	0	4

下水処理場の除去率が不明のものについては、0%と仮定した。

PEC/PNEC \geq 1 と推定されたものは、メフェナム酸、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、スルファメトキサゾール、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、クラリスロマイシン、アモキシシリンであった。

PEC/PNECが0.1~1と推定されたものはアセトアミノフェン(0.34)のみであった。PEC/PNEC<0.1と推定されたものは、アロプリノール、ラニチジン、ファモチジン、レボフロキサシン、テオフィリン、ロサルタンで、レボフロキサシン(0.019)以外はいずれも0.01以下であった。その他の医薬品類は、PNECが不明でありPEC/PNECが算出できなかった。

放出量が多い医薬品類の中では、アミノエチルスルホン酸、カルボシステイン、イオパミドール、イオヘキソール、トラネキサム酸、トドララジン、スクラルファートなどがあつた。イオパミドールおよびイオヘキソールについては、同じ非イオン性X線造影剤のイオプロミドについてPNECが137 $\mu\text{g/L}$ と報告されており^{H17-21)}、毒性が同程度と仮定するとPEC/PNEC<0.01となるため、環境毒性が低い可能性が高いが断定はできない。

このように、第三段階のスクリーニングでは、PEC/PNECにより環境毒性の観点からの評価を行ったが、PNECの値は報告例でも大きく異なっている場合が見受けられた。これは、算出の元となる急性毒性値としてどの値を採用するかの違いによるものと考えられたが、同じPECでもPNECの違いにより、PEC/PNECが異なり、環境毒性についての評価に影響を与える。

例えば、アセトアミノフェンについては、英国の調査結果^{H17-22,23)}ではPNECとして9.2 $\mu\text{g/L}$ を採用しているためPEC/PNECが約40で最大となっているが、別の報告^{H17-21)}ではPNECが500 $\mu\text{g/L}$ とされており、こちらを採用すると英国でもPEC/PNECが約0.7とかなり低くなる。本調査結果でも9.2の代わりに500を採用すると、PEC/PNECが0.34から0.0062と大きく低下して、要検討物質から詳細調査不要の対象へと区分が変更されてしまう。

このように、PECの推定の不確実性に加え、PNECの選択の問題もあり、PEC/PNECによるリスク評価に基づくスクリーニングも決定的なものではないと言わざるを得ない。従って、重要物質のPEC/PNEC>1の医薬品類については詳細な調査を行うとともに、0.1 \leq PEC/PNEC<1の物質であっても、PECが大と推定されている物質については、可能な限り調査対象に追加することが望ましいと考えられる。PNECはあくまでも各物質が単独で作用した場合の毒性を推定しているに過ぎず、現実の極めて多種類の医薬品類およびその他の化学物質が混在している中での毒性については、明らかではない。物質間の相互作用(相加的、相乗的、拮抗的)もありえるため、特にPECが大である物質については、他の物質の毒性に影響を与える可能性も否定できないことから、調査対象とすることが望ましいであろう。

また、PEC が比較的大と推定されているものの PNEC が不明で PEC/PNEC が算出できなかった物質については、引き続き毒性情報の入手につとめ、PEC/PNEC が判明した時点で、あらためて判断するのが適切と考えられた。

以上より、現段階のスクリーニング結果として重要物質および要検討物質ならびに保留物質は以下のとおりである。

1. 環境毒性が疑われる重要物質（8 物質）（PEC/PNEC \geq 1）

メフェナム酸、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、スルファメトキサゾール、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、クラリスロマイシン、アモキシシリン

2. 環境中の存在量が大きと推定される要検討物質（16 物質）（PEC \geq 0.1 μ g/L、ただし PEC/PNEC $<$ 0.1 は除外）

アセトアミノフェン、アミノエチルスルホン酸、カルボシステイン、イオパミドール、イオヘキソール、トラネキサム酸、トドラジン、スクラルファート、ロキソプロフェン、アルジオキサ、サリノマイシン、スルファモノメトキシ、スルファジメトキシ、アンピシリン、ジルチアゼム、ファモチジン

3. 環境中の存在量が比較的大と推定されるが環境毒性が不明である保留物質（21 物質）（0.01 \leq PEC $<$ 0.1 μ g/L、ただし PEC/PNEC $<$ 0.1 は除外）

モネンシン、セファレキシン、セフォチアムヘキシチル、セフカペンピボキシル、カルバミン酸クロルフェネシン、センノシド、ベンジルペニシリン、ラサロシド、ベザフィブラート、スルピリド、コリスチン、セフジニル、タイロシン、インドメタシン、バルサルタン、イコサペント酸エチル、セフジトレンピボキシル、フェルピナク、バルプロ酸、ウルソデオキシコール、ドキシサイクリン

3-2 分析方法の開発

3-2-3 質量分析条件の検討

(1) LC/MS/MS

1) LC/MS/MS による質量分析条件の検討

インフュージョンの結果より得られた、物質ごとの Q1 イオン、Q3 イオン、イオンモード（ポジティブモードあるいはネガティブモード）及び測定条件（DP、EP、CE、CXP）を表 3-4 に示す。

多くの対象物質について既往の報告と同じ結果となったが一部の対象物質においてイオンが大きく異なる結果となった。これは報告例と本分析機器における使用機器の違いであると考えられた。

表3-4 LC/MS/MSのインフュージョン結果

(1) positive モード

No.	物質名	Infusion 溶媒	Infusion 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	流速($\mu\text{L/min}$)	分子量	precursor ion 強 度(cps)	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	保持時間(分)
1	Amoxicillin trihydrate	M	1000	10	419.45	1.E+06	366.102	113.9	56	10	27	10	1.925 ± 0.28
2	Ciprofloxacin	A	500	10	331.25	5.E+05	332.174	231.2	66	10	53	18	7.555 ± 0.19
3	Lincomycin hydrochloride	A	100	10	443	1.E+06	407.233	126.1	66	10	39	10	6.33 ± 0.27
4	Ofloxacin	A	500	10	361.37	5.E+05	362.147	318.3	81	10	27	16	7.58 ± 0.07
5	Clarithromycin	A	100	10	747.95		748.494	158.1	101	10	37	10	10.485 ± 0.09
6	Erythromycin	A	100	10	733.92	1.E+06	734.468	158.1	106	10	41	8	9.595 ± 0.08
7	Spiramycin	A	500	10	843.05	2.E+06	843.543	174.2	131	10	51	12	8.445 ± 0.11
8	Cyclophosphamide monohydrate	A	100	10		5.E+05	260.991	139.9	91	10	33	10	8.965 ± 0.02
9	Osandomycin phosphate	A	100	10	785.86	4.E+05	688.439	158.2	81	10	37	12	9.34 ± 0.04
10	Oxltetracycline hydrochloride	A	100	10	496.89	1.E+05	461.148	426.1	76	10	27	12	7.495 ± 0.08
11	T imicosin	A	500	10	889.13	9.E+05	889.632	174.1	176	10	65	14	9.35 ± 0.36
12	Tylosin	A	100	10	916.1	5.E+05	916.574	174.2	121	10	55	14	9.77 ± 0.05
13	Atenolol	A	500	10	266.34	8.E+05	267.168	190.1	86	10	27	14	1.35 ± 0.25
14	Enalapril	A	100	10	376.45	5.E+05	377.173	234.1	71	10	29	14	9.365 ± 0.04
15	Omeprazole	A	100	10	345.42	6.E+05	346.101	198	51	10	19	16	8.48 ± 0.3
16	Ranitidine hydrochloride	A	100	10	350.86	5.E+05	315.103	176	46	10	27	14	2.17 ± 0.44
17	Salbutamol (free base)	A	500	10	239.31	4.E+05	240.1	148.1	66	10	27	28	1.685 ± 0.29
18	Carbamazepine	A	100	10	236.27	2.E+06	237.118	194	96	10	25	16	8.915 ± 0.02
19	Albuterol-d3	A	500	10	242.33	3.E+05	243.195	151.1	61	10	31	26	1.63 ± 0.25
20	Octocrylene	A	1000	10	361.5	2.E+05	362.202	250.1	136	10	13	8	14.85 ± 0.02
21	Benzophenone-3	A	100	10		1.E+06	229.092	151.1	71	10	31	10	12.645 ± 0.02
22	MBC	A	500	10	254.367	9.E+05	255.176	105.1	121	10	45	6	11.03 ± 0.01
23	EHMC	A	1000	10	290.397	1.E+05	291.257	179	101	10	13	14	15.065 ± 0.3
24	(-)-Nicotine	A	100	10	162.23	8.E+05	163.149	132	71	10	21	10	0.35 ± 0.02
25	Metolachlor-d6	A	100	10	283.8 (283.8)	6.E+05	280.128	258.1	71	10	23	26	12.415 ± 0.02
26	Caffeine-d1	M	100	10	194.19 (195.19)	1.E+06	196.129	139.1	76	10	29	8	6.31 ± 0.24
27	Methyl dihydrojasmonate	M	100	10	226.31	6.E+05	227.159	153.1	66	10	19	12	12.22 ± 0.02
28	Ampicilin	M	1000	10	349.4	1.E+06	350.078	106	66	10	31	6	7.22 ± 0.09
29	Benzophenone	M	100	10	182.22	1.E+06	183.134	105	61	10	23	6	12.145 ± 0.02
30	Benzophenone-d10	M	100	10	192.28	8.E+05	193.166	110	66	10	25	6	12.08 ± 0.01
31	alpha-Isomethyl ionone	M	1000	10	206.33	4.E+05	207.187	111.1	66	10	17	8	3.35 ± 0.01
32	Methotrexate	M	1000	10	454.44	7.E+05	455.151	308	101	10	29	8	7.195 ± 0.09
33	Propranolol hydrochloride	M	100	10	295.81	2.E+06	290.194	116.1	91	10	25	20	9.425 ± 0.04
34	Altoprilol	M	1000	10	136.11	1.5E+06	137.059	110	76	10	29	6	1.165 ± 0.02
35	Sotalol hydrochloride	M	1000	10	306.3	2.4E+06	273.103	255.3	71	10	17	46	2.185 ± 0.22
36	Fenofibrate	M	1000	10	360.83	8.0E+05	361.087	233.1	96	10	25	4	14.025 ± 0.02
37	Acetophenetidine	M	1000	10	179.22	1.2E+06	180.163	110.2	76	10	35	20	9.07 ± 0.02
38	Levofloxacin	M	1000	10	361.36	2.4E+05	362.127	318.2	71	10	31	10	7.58 ± 0.07
39	Chlortetracycline	M	1000	10	515.35	6.5E+05	479.106	444.1	56	10	31	12	8.73 ± 0.3
40	(+)-Fluoxetine hydrochloride	M	1000	10	345.79	1.4E+05	310.11	148.2	36	10	13	12	10.895 ± 0.12
41	Norfloxacin	M	1000	10	295.3	1.7E+05	296.127	134.3	36	10	11	4	10.67 ± 0.10
42	Carbamazepine 10,11-epoxide	M	1000	10	252.1		253.039	190.1	66	10	37	4	9.105 ± 0.01
43	Monensin sodium	M	1000	10	692.9	1.1E+06	693.417	675.4	16	10	45	8	17.42 ± 0.18
44	Z-Ethoxy benzamide	M	1000	10	165.2	6.0E+05	166.051	121.1	66	10	25	10	8.9 ± 0.02
45	HMS(Homosalate)	M	1000	10	262.35	2.5E+05	263.144	139	26	10	11	22	17.855 ± 0.86
46	Ampicilin-d5	M	1000	10	354.4	1.0E+06	355.171	111.1	56	10	29	8	7.19 ± 0.09
47	Canamycin A-disulfate d hydrate	M	1000	10	716.67	2.2E+05	485.214	163.2	91	10	35	14	0.75 ± 0.08
48	Cefazolin sodium	M	1000	10	476.49	4.0E+05	477.059	406.9	96	10	15	16	7.885 ± 0.08
49	Dihydrostreptomycine 1.5ulfate	M	1000	10	730.75	1.2E+05	584.216	263.4	196	10	43	42	0.715 ± 0.3
50	OTC hydrochloride-13C1-d3	M	1000	10	500.9	1.2E+05	465.137	430.2	81	10	29	12	7.41 ± 0.14
51	Penicilin G potassium-d5	M	1000	10	377.5	6.0E+05	340.101	217.1	111	10	21	10	9.705 ± 0.04
52	Tetracycline hydrochloride	M	1000	10	480.9	3.2E+05	445.123	410.2	91	10	29	12	7.815 ± 0.06
53	Verapam hydrochloride	M	1000	10	491.07	7.0E+06	456.189	164.9	136	10	39	12	10.615 ± 0.11
54	Diltiazem hydrochloride	M	1000	5	450.98	7.5E+06	415.177	150.2	81	10	55	4	9.925 ± 0.06
55	Metoprolol	M	1000	10	267.36	7.0E+06	268.155	73.8	81	10	41	2	8.19 ± 0.04
56	Roxithromycin	M	1000	1.75	837.04	4.9E+06	838.111	680.5	36	10	25	8	10.54 ± 0.09
57	Atenolol-d7(Isospropyl-d7)	M	1000	5	273.39	4.3E+06	274.153	190.1	91	10	29	18	1.7755 ± 0.35
58	Carbamazepine-d10	M	1000	10	246.33	1.4E+06	247.109	204.3	106	10	31	34	9.855 ± 0.01
59	Doxycycline hydrochloride	M	1000	10	512.94	1.1E+06	445.136	428.2	76	10	27	12	8.945 ± 0.3
60	Fenbendazole	M	1000	10	299.35	6.5E+05	300.066	268	111	10	29	42	10.77 ± 0.04
61	Ketoprofen	M	1000	10	254.28	1.6E+06	255.086	209.1	86	10	21	20	11.015 ± 0.01
62	Praziquantel	M	1000	10	312.41	5.5E+05	313.156	203.1	106	10	25	4	10.955 ± 0.02
63	Pyrantel pamoate	M	1000	10	594.68	5.0E+05	207.105	150	86	10	43	28	10.83 ± 0.08
64	Sulfamethoxazole-d4	M	1000	10	257.3	1.4E+06	258.111	160.1	71	10	23	14	8.35 ± 0.02
65	Sulfamonomethoxine	M	1000	10	298.32	1.1E+06	281.027	155.9	76	10	25	16	8.32 ± 0.3
66	Ticlopidine hydrochloride	M	1000	10	300.25	6.0E+05	265.049	125	71	10	45	20	8.87 ± 0.05
67	1,3,9-Trimethylxanthine	M	1000	10	194.19	4.5E+05	195.035	138.2	86	10	27	4	1.645 ± 0.23
68	Norfloxacin	M	1000	10	319.33	1.5E+06	320.147	302.2	81	10	27	14	7.555 ± 0.07
69	Norfloxacin-d5	M	1000	10	324.34	5.9E+05	325.109	307	96	10	33	6	7.49 ± 0.12
70	Antipyrine-d3(N-methyl-d3)	M	1000	10	191.25	3.4E+06	192.128	59	96	10	53	10	7.645 ± 0.06
71	(-)-Cotinine	M	1000	10	176.22	1.2E+06	177.081	79.9	76	10	33	6	0.85 ± 0.02
72	Cotinine-d3(N-methyl-d3)	M	1000	10	179.24	1.0E+06	180.036	80	106	10	33	14	0.86 ± 0.3
73	Famotidine	M	1000	10	337.45	5.0E+05	338.102	259.3	51	10	17	16	1.875 ± 0.35
74	Orbifloxacin	M	1000	10	395.4	5.0E+05	396.134	352.1	91	10	29	4	8.02 ± 0.05
75	Triclabendazole	M	1000	10	359.66	7.0E+05	360.97	346	136	10	37	18	12.58 ± 0.01
76	Betaxolol hydrochloride	M	1000	7	348.89	6.9E+06	308.336	55.2	86	10	65	8	9.565 ± 0.06
77	CPE(Ceftidoren)	M	1000	10	620.73	3.5E+06	621.07	241	151	10	35	14	10.8 ± 0.02
78	Erofloxacin	M	1000	10	359.39	1.0E+06	360.119	316	96	10	27	14	7.94 ± 0.05
79	Famotidine-13C3	M	1000	10	340.43	9.4E+05	341.027	191.9	61	10	31	12	1.87 ± 0.35
80	Ormetoprim	M	1000	10	274.32	4.5E+05	275.045	259.2	86	10	37	24	7.62 ± 0.06
81	Spectinomycin hydrochloride	M	1000	10	388.91	1.5E+06	332.961	98	101	10	39	8	0.78 ± 0.02
82	Terbinafine hydrochloride	M	1000	4.5	327.89	6.9E+04	292.18	141	31	10	49	8	11.785 ± 0.21
83	Terbinafine hydrochloride-d7	M	1000	10	334.93	3.5E+05	299.258	148.2	76	10	37	10	11.74 ± 0.21
84	Thiabendazole-13C6	M	1000	10	207.3	3.3E+05	208.089	181	91	10	39	16	6.5 ± 0.19
85	Trimethoprim	M	1000	10	290.32	9.0E+05	291.002	274.9	101	10	35	6	7.285 ± 0.09
86	Acetaminophen	M	100	10	151.16		152.149	110.1	31	10	23	18	2.23 ± 0.15
87	Disopyramide	M	100	10	339.47		340.288	239.2	56	10	25	12	8.58 ± 0.04
88	Diazepam	M	1000	10	284.74	1.5E+06	286.085	194.1	96	10	41	12	11.225 ± 0.01
89	Hexylcinnamaldehyde	M	1000	10	216.32	4.0E+05	217.149	129	76	10	25	8	14.255 ± 0.02

infusion溶媒 M:メタノール, A:アセトニトリル

2) GC/MS による質量分析条件の検討

(2) negative モード

No.	物質名	Infusion 溶媒	Infusion 濃度 (μ g/L)	流速(μ L/min)	分子量	precursor ion 強 度(cps)	Q1 mass (amu)	Q3 mass (amu)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	保持時間(分)
1	Su famethoxazole	A	100	10	253.28	2E+05	251.979	155.9	-65	-10	-22	-25	0.81 ± 0.02
2	Ibuprofen	A	100	10	206.28	2E+05	205.053	161.1	-55	-10	-10	-9	8.23 ± 0.02
3	Ibuprofen-d3	A	100	10	209.28	2E+05	208.049	164	-50	-10	-10	-7	8.24 ± 0.03
4	17beta-Estradiol	M	1000	10	272.38	2E+06	271.044	144.9	-155	-10	-54	-15	10.525 ± 0.02
5	Estron(E1)	M	100	10	270.37	7E+04	268.975	144.9	-115	-10	-54	-5	11.025 ± 0.02
6	Bezafibrate	A	100	10	361.8	7E+04	359.919	273.8	-65	-10	-22	-5	7.965 ± 0.03
7	Clofibrate acid-d4	A	100	10	218.65		217.077	130.8	-50	-10	-24	-7	6.4 ± 0.04
8	Furosemide	A	100	10	330.74	6E+05	328.96	284.9	-65	-10	-24	-9	6.885 ± 0.02
9	Hydrochlorothiazide	A	100	10	297.74	6E+05	295.928	288.8	-95	-10	-28	-7	0.82 ± 0.01
10	17alpha-Ethinylestradiol	M	1000	10	296.41	7E+05	295.107	144.9	-125	-10	-52	-9	10.945 ± 0.02
11	Propyl paraben	A	100	10	180.2	6E+05	179.03	91.9	-70	-10	-34	-5	6.85 ± 0.02
12	Buthyl paraben	A	100	10	194.23	6E+05	193.05	92	-80	-10	-34	-5	7.725 ± 0.02
13	Ethyl paraben	A	100	10	166.17	1E+05	164.942	91.8	-65	-10	-34	-7	2.705 ± 0.14
14	Methyl paraben	A	100	10	152.15	1E+05	150.901	91.9	-65	-10	-30	-5	1.34 ± 0.02
15	Triclosan	M	1000	10	289.54	2E+06	288.847	141.8	-75	-10	-46	-5	9.455 ± 0.07
16	lithalamic acid	M	1000	10	613.92	6E+05	612.8	126.7	-45	-10	-30	-19	0.745 ± 0.05
17	5-Amino-2,4,6-triiodosopha thic acid	M	1000	10	558.84	2E+05	557.741	513.6	-30	-10	-8	-13	0.63 ± 0.05
18	Iopromide	A	1000	10	791.15	9E+05	789.974	126.8	-110	-10	-60	-9	1.37 ± 0.05
19	Iopamidol	A	1000	10	777.12	1E+06	775.886	126.7	-115	-10	-46	-21	0.815 ± 0.02
20	Salicylic acid	A	1000	10	138.12	2E+06	136.945	92.8	-50	-10	-22	-5	1.11 ± 0.06
21	Acetylsalicylic acid	M	1000	10	180.16	5E+05	178.864	136.9	-45	-10	-10	-7	0.795 ± 0.03
22	Sodium-17beta-Estradiol-2,4,16-d4-3-sulfate	M	100	10	378.45	2E+06	355.126	275.1	-80	-10	-50	-1	8.235 ± 0.02
23	3,4,4-Trichlorocarbamilide	M	100	10	315.59	8E+05	314.949	161.8	-75	-10	-18	-11	13.1 ± 0.01
24	Clofibrate acid	M	1000	10	214.65	8E+05	212.922	126.9	-45	-10	-22	-7	6.42 ± 0.06
25	Sodium valproate	M	100	10	166.2	5.4E+06	142.937	71.2	-55	-10	-52	-1	0.825 ± 0.02
26	Indomethacin	M	1000	10	357.79	2.0E+06	356.09	311.8	-35	-10	-16	-15	8.645 ± 0.02
27	Indomethacin-d4	M	1000	10	361.79	1.5E+05	360.007	316.1	-45	-10	-10	-5	8.635 ± 0.02
28	Gemfibrozil	M	1000	10	250.3	2.2E+06	249.055	120.8	-45	-10	-18	-19	8.655 ± 0.01
29	Phenytoin	M	1000	10	252.27	8.9E+05	250.978	102	-65	-10	-38	-7	7.005 ± 0.01
30	Ivermectin	M	1000	10	874.5		873.541	229.3	-110	-10	-40	-1	15.83 ± 0.03
31	N-(4-hydroxyphenyl)-2,3,5,6-d4-acetamide	M	1000	10	155.17		153.742	110.9	-30	-10	-18	-19	1.24 ± 0.02
32	Fenoprop(2,4,5-TP)	M	1000	10	269.35	8.4E+05	268.76	196.8	-45	-10	-24	-11	8.02 ± 0.02
33	Abamectin	M	1000	10	873.1	2.5E+05	871.468	229.1	-100	-10	-44	-1	14.395 ± 0.02
34	Benzylpenicilin sodium	M	1000	10	356.4	1.0E+06	332.174	268.2	-70	-10	-38	-47	10.1 ± 0.03
35	Diatrizoic acid	M	1000	10	613.91	4.5E+05	612.737	126.6	-35	-10	-16	-17	0.745 ± 0.05
36	Iohexol	M	1000	10	821.1	6.0E+05	819.908	126.9	-115	-10	-94	-21	1.265 ± 0.03
37	Oxolinic acid	M	1000	10	261.23	1.4E+05	261.036	79.8	-135	-10	-70	-1	9.775 ± 0.27
38	Piperazinecitrate pentahydrate	M	1000	10	732.74		448.246	286.1	-105	-10	-42	-13	10.35 ± 0.06
39	Thiamphenicol	M	1000	10	356.22	1.5E+06	354.95	185.9	-85	-10	-28	-13	7.375 ± 0.05
40	Tiamulin fumarate	M	1000	10	609.81	1.6E+05	608.395	114.8	-60	-10	-22	-19	13.26 ± 0.09
41	13C12-Triclosan	M	1000	10	303.57	1.2E+06	302.923	254.7	-60	-10	-12	-17	3.675 ± 0.31
42	4-Aminobenzoic-2,3,5,6-d4 acid	M	1000	10	141.6	2.1E+06	139.943	95.9	-40	-10	-18	-5	0.705 ± 0.05
43	Cefalexin monohydrate BP	M	1000	10	365.4	8.0E+05	345.954	267.8	-50	-10	-18	-19	0.815 ± 0.02
44	Diclofenac sodium	M	1000	10	318.13	4.3E+05	293.97	250	-40	-10	-10	-13	8.605 ± 0.01
45	Flubiprofen	M	1000	10	244.26	5.0E+05	242.915	198.9	-20	-10	-8	-13	8.215 ± 0.05
46	(S)-(+)-Naproxen	M	1000	10	230.26	4.0E+05	228.932	169.9	-75	-10	-22	-5	7.23 ± 0.02
47	Fenoprofen	M	1000	10	242.27	2.5E+06	241.039	196.7	-40	-10	-10	-27	7.98 ± 0.02
48	Su fadimethoxine-d4	M	1000	10	314.33	3.0E+06	312.958	65.8	-125	-10	-76	-9	0.81 ± 0.01
49	Diclofenac-d4	M	1000	10	300.8	2.5E+06	300.34	255.8	-55	-10	-20	-1	8.59 ± 0.01
50	4-Hydroxybenzoic acid	M	1000	10	138.12	2.1E+06	136.654	92.8	-70	-10	-20	-3	1.11 ± 0.07
51	N-(4-Hydroxyphenoxy)-acet-2,2,2-d3	M	1000	10	154.18	1.0E+05	152.906	106.8	-60	-10	-26	-7	0.81 ± 0.01
52	Losartan potassium	M	1000	10	422.91	6.5E+06	421.983	126.9	-85	-10	-38	-11	8.375 ± 0.02
53	Losartan-d3	M	1000	10	425.93	2.0E+05	425.171	126.7	-85	-10	-42	-21	8.38 ± 0.02
54	Triclabendazole metabolite	M	1000	10	329.6	3.5E+05	328.836	181.9	-395	-10	-28	-33	10.835 ± 0.01
55	Ursodeoxychoic acid	M	1000	10	392.57	1.2E+06	391.246	373.1	-165	-10	-44	-3	8.335 ± 0.04
56	Su fadimethoxine	M	1000	10	310.33	1.6E+06	309.081	65.6	-80	-10	-52	-7	1.165 ± 0.01
57	Su famethazine	M	1000	10	278.33	2.4E+06	276.854	122.1	-100	-10	-34	-7	1.16 ± 0.04
58	Benzoic acid	M	1000	10	122.12	1.6E+06	120.901	77.1	-35	-10	-16	-3	0.76 ± 0.04
59	p-Hydroxybiphenyl	M	1000	10	170.21	2.0E+06	168.872	141	-85	-10	-32	-15	8.765 ± 0.01
60	4-Hydroxybiphenyl-d9	M	1000	10	179.27	1.0E+06	178.017	98	-100	-10	-40	-1	8.74 ± 0.01
61	(+)-Trippental	M	1000	10	242.3	1.8E+06	240.994	58.1	-40	-10	-36	-7	6.665 ± 0.03
62	3,4,5-Trichlorophenol	M	1000	10	197.45	1.2E+06	196.861	160.7	-65	-10	-28	-31	7.985 ± 0.04
63	Ursodeoxy acid -d5	M	1000	10	397.6	1.0E+06	396.386	378.6	-115	-10	-42	-3	8.35 ± 0.04
64	Valsartan	M	1000	10	435	2.6E+05	434.235	350.1	-80	-10	-24	-25	7.115 ± 0.02
65	Salinomycin	M	1000	10	751	4.7E+04	749.538	241.1	-105	-10	-46	-1	9.515 ± 0.01
66	Sodium rifurstyrenate	M	1000	10	281.2	9.0E+05	258.055	184.1	-35	-10	-20	-29	7.355 ± 0.02
67	Theophylline	M	1000	10	180.16	3.7E+06	179.044	163.8	-85	-10	-26	-13	1.155 ± 0.04
68	Valsartan-d3	M	1000	10	438.54	2.2E+06	437.172	349.9	-95	-10	-28	-11	7.115 ± 0.02
69	Theophylline 2-13C	M	1000	10	183.164	2.8E+06	182.044	167.3	-85	-10	-28	-7	0.785 ± 0.02
70	Mefenamic acid	M	100	10	241.28		239.998	196	-75	-10	-24	-13	8.735 ± 0.02
71	Phenobarbital sodium	M	1000	10	254.22	1.5E+06	231.972	189.1	-50	-10	-16	-15	0.805 ± 0.02
72	Pyrantel pamoate※	M	1000	10	594.68	1.5E+06	387.03	143.2	-55	-10	-54	-9	7.11 ± 0.04
73	17beta-Estradiol	M	1000	10	272.38	2E+06	271.044	144.9	-155	-10	-54	-15	10.525 ± 0.02
74	Estron(E1)	M	100	10	270.37	7E+04	268.975	144.9	-115	-10	-54	-5	11.025 ± 0.02
75	17alpha-Ethinylestradiol	M	1000	10	296.41	7E+05	295.107	144.9	-125	-10	-52	-9	10.945 ± 0.02
76	Sodium-17beta-Estradiol-2,4,16-d4-3-sulfate	M	100	10	378.45	2E+06	355.126	275.1	-80	-10	-50	-1	8.235 ± 0.02

infusion溶媒 M:メタノール A:アセトニトリル

表3-5 LC/MS/MS の FIA による最適化結果

(1) positive モード

Positiveモード	
イオンソース条件	Gas1:40 Gas2:60 Curtain Gas (CUR):50 Ion Spray (IS):4500 Temperature (TEM):500 Collision Gas (CAD):6 Interface Heater (ihe):Off
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3 μm, 2.0mm × 50mm)
溶離液	A:アセトニトリル B:0.1%酢酸水
流速	200 μL/min
分析時間	20分 0 min B:100% A:0% ↓ グラディエント通液 10 min B:0% A:100% ↓ アイソクラテック通液 12 min B:0% A:100% ↓ グラディエント通液 14 min B:100% A:0% ↓ アイソクラテック通液 20 min B:100% A:0%

(2) negative モード

Negativeモード	
イオンソース条件	Gas1:30 Gas2:80 Curtain Gas (CUR):20 Ion Spray (IS):-4500 Temperature (TEM):400 Collision Gas (CAD):6 Interface Heater (ihe):Off
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3 μm, 2.0mm × 50mm)
溶離液	A:アセトニトリル B:0.05%TEA水
流速	200 μL/min
分析時間	20分 0 min B:100% A:0% ↓ グラディエント通液 10 min B:0% A:100% ↓ アイソクラテック通液 12 min B:0% A:100% ↓ グラディエント通液 14 min B:100% A:0% ↓ アイソクラテック通液 20 min B:100% A:0%
※Estrogen4物質	
カラム	Imtakt Candenza CD-C18(3 μm, 2.0mm × 50mm)
溶離液	A:アセトニトリル B:0.05%TEA水
流速	200 μL/min
分析時間	22分 0 min B:100% A:0% ↓ グラディエント通液 6 min B:70% A:30% ↓ グラディエント通液 13 min B:0% A:100% ↓ アイソクラテック通液 15 min B:0% A:100% ↓ グラディエント通液 16 min B:100% A:0% ↓ アイソクラテック通液 22 min B:100% A:0%

(2) GC/MS

条件の検討結果を表3-6および表3-7に示す。各物質について、保持時間、測定イオンおよび確認イオンの条件を決定できたため、本条件では42分で全対象物質を検出可能と考えられた。

表3-6 GC/MS 質量分析条件 (1)

使用機器	HP5890/HP MSD 5973 (Agilent社製)
使用カラム	30m, 0.25 mm i.d. HP-5MS (J&W)
測定条件	35°C→200°C(5°C/分)→285°C(20°C/分)5分保持 スプリットレス注入(1μL)

表3-7 GC/MS 質量分析条件 (2)

	保持時間(分)	確認イオン(m/z)	定量イオン(m/z)
Benzyl acetate	11.21	150	108
Terpineol-d3	11.7	139	62
Terpineol	11.79	136	59
Methyl salicylate	11.97	152	120
Isobornyl acetate	14.31	136	95
Iso methyl ionone	19.11	206	150
DPMI	19.51	206	191
BP-d10	22.47	192	110
BP	22.55	182	105
Methyl dihydrojasmonate	23.16	156	83
ADBI	24.51	244	229
AHMI	25.36	244	229
OS	26.245	138	120
Caffeine	27.14	-	194
Caffeine-d9	27	115	203
ATII	27.16	-	215
Musk xylene-d15	27.154	-	294
HHCB	27.17	258	243
AHTN	27.43	258	243
Musk xylene	27.42	297	282
HMS	27.74	138	69
Benzyl salicylate	27.54	228	91
Metalochlor-d6	29.642	168	244
Musk ketone	29.77	294	279
4-MBC(Z)	30.359	239	254
BP-3	30.57	227	228
Ft-d10	30.775	-	212
4-MBC(E)	30.994	239	254
Benzyl cinnamate	31.69	131	91
Menthyl anthranilate	32.14	119	137
EHMC(Z)	32.989	290	178
Octyl PABA	34.281	277	165
EHMC(E)	34.758	290	178
OC	36.907	361	249

3-2-4 前処理および測定条件の検討

(1) LC/MS/MS

1) 溶解性試料の前処理・測定条件の検討

各対象物質の保持時間は表3-4に示した通りである。多くの対象物質において保持時間の変動は0.1分以内と小さかったが、例えばRanitidine hydrochlorideのように変動が0.44分と大きな物質がいくつかあった。今後この原因を検討する必要がある。オフロキサシン、ジヒドロストレプトマイシン、ドキシサイクリン塩酸塩およびイブプロフェンについて作成した検量線を図3-1に示す。

今回対象とした多くの物質については1000ppbまでの濃度範囲で $R^2=0.99$ 以上の線形性が確認された。しかし、ジヒドロストレプトマイシンのような一部の物質については500ppbや1000ppbといった高濃度領域でピークのエリア面積の変動が大きくなり再現性が若干低下する傾向(ジヒドロストレプトマイシンにおける1000ppbでのピークのエリア面積の変動係数が14%)が見られた。

以上より、溶解性試料の前処理条件については、既往の報告事例^{H17-24)}を参考にして、図3-2に示す方法を採用することとし、分析対象物質ごとに検出下限値、定量下限値の確認、固相カートリッジの最適化、回収率の確認を行い、実試料の分析へ適用することとした。

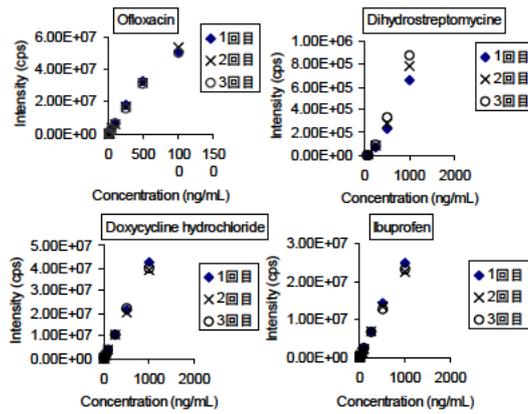


図3-1 オフロキサシン、ジヒドロストレプトマイシン、ドキシサイクリン塩酸塩およびイブuproフェンの検量線

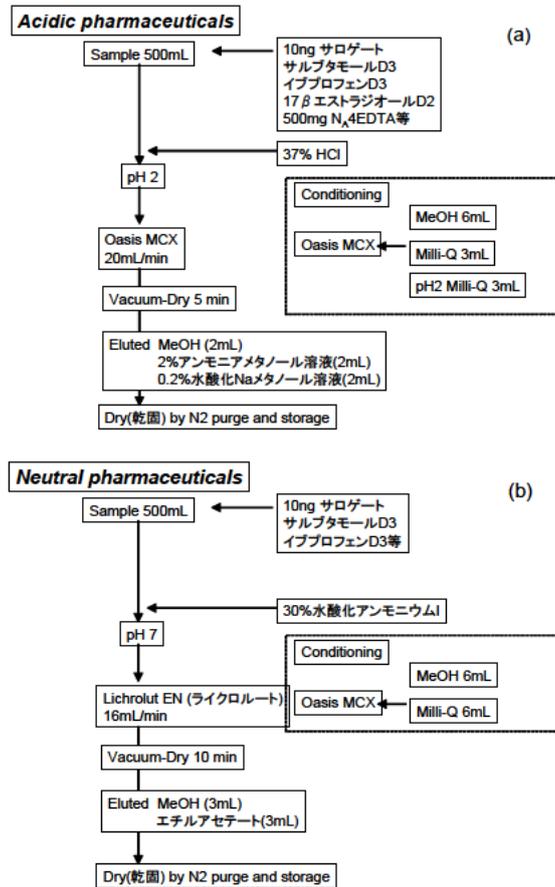


図3-2 LC/MS/MSによる医薬品類分析の前処理方法 (a:酸性化合物用, b:中性化合物用)

2) 固形性試料からの抽出方法の検討

固形状試料からの抽出方法の比較実験の結果を表3-8に示す。

表3-8 高速溶媒抽出法と超音波抽出法による分析結果

物質名	高速溶媒抽出法 (ng/L)				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Allopurinol	0.0	19.3	0.0	6.4	11.2
Ketoprofen	2.8	3.6	2.8	3.0	0.5
物質名	超音波抽出法 (ng/L)				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Allopurinol	16.6	15.5	21.9	18.0	3.4
Ketoprofen	2.9	2.9	2.9	2.9	0

結果として、両方法において十分な回収率が得られた。また、試料抽出物より Allopurinol と Ketoprofen の2物質を定量できた。Allopurinol については、高速溶媒抽出法では平均値 6.4ng/L、超音波抽出法で平均値 18.0 ng/L と超音波抽出法のほうが高い抽出効率を示した。Ketoprofen については、高速溶媒抽出法では平均値 3.0ng/L、超音波抽出法では平均値 2.9 ng/L とほぼ同等であったが、両抽出法の標準偏差を比べると、超音波抽出法のほうが低い値であり、ばらつきが小さいとみなせた。

従って固形状試料からの医薬品類の抽出方法として、超音波抽出法は高速溶媒抽出法に比べて抽出効率が高く、かつ高精度に定量できると考えられた。また、作業効率においても、超音波抽出法は高速溶媒抽出法よりも作業時間が短く、効率的であった。一方、香料等についても、ジクロロメタンおよびアセトンを用いた超音波抽出法により、良好な結果が得られた。以上の理由により、固形状試料からの医薬品類および香料等の抽出方法として、超音波抽出法を採用することとした。

3) 添加回収試験による回収率検討

医薬品類の添加回収試験で得られた回収率の平均および変動係数は表3-9に示す通りであった。

下水処理場の流入水および放流水（溶存態）ならびに活性汚泥（懸濁態）の全てにおいて回収率が 50%~150%、回収率の変動係数が 30%以下であり、溶存態および懸濁態の定量が可能と考えられたのは 27 物質であった。

下水処理場の流入水および放流水（溶存態）について、回収率が 50%~15%、変動係数が 30%以下であり、溶存態の定量が可能と考えられるが、活性汚泥（懸濁態）については十分な回収率が得られなかったのは 28 物質であった。

また、検出下限値および定量下限値については、定量下限値付近の測定値の標準偏差のそれぞれ 3 倍および 10 倍として設定したが、ほとんどで数十 ng/L 以下のオーダーとなり、十分な感度が得られた。

これらの結果より、ほとんどの医薬品類について、スクリーニング目的では十分な精度で分析可能と考えられた。また、活性汚泥（懸濁態）についての回収率が不十分な物質については、超音波抽出法の改良を試みる予定である。

表3-9 医薬品類の添加回収試験における回収率と検出下限値

物質ID	物質名	用途	人用 医薬品	動物用 医薬品	日用品	推定生産量 (t/年)	m/Q水 回収率-CV (%)	流入下水 回収率-CV (%)	処理水 回収率-CV (%)	下水検出下限値 (ng/L)	河川水検出下限値 (ng/L)			
C1	イブプロフェン	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	○			82.8	110.4	(10.2)	91.9	(20.3)	107.7	(2.0)	7.1	1.4
C2	ケトプロフェン	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	○			47.7	100.6	(6.7)	27.6	(4.5)	48.3	(10.0)	4.2	0.8
C3	ナロキセン	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	○			3	99.8	(6.4)	12.7	(65.6)	34.8	(11.7)	8.1	1.6
C4	フルロビプロフェン	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	○			0.4	115.9	(6.6)	82.6	(18.0)	82.4	(14.5)	29.5	5.9
C5	フェブプロフェン	非ステロイド系抗炎症薬(プロピオン酸系)	○			-	140.1	(13.7)	88.4	(7.1)	106.0	(13.0)	11.1	2.2
C6	ジクロフェナクナトリウム	非ステロイド系抗炎症薬(フェニル酢酸系)	○			7.4	104.5	(16.4)	67.4	(12.3)	84.6	(11.8)	4.1	0.8
C7	インドメタシン	非ステロイド系抗炎症薬(インドール酢酸系)	○			83.2	129.7	(3.6)	118.7	(6.8)	145.8	(4.9)	1.5	0.3
C8	メフェナム酸	非ステロイド系抗炎症薬(アントラニル酸系)	○			407.7	82.6	(3.7)	135.4	(6.4)	130.8	(12.6)	3.3	0.7
C9	アセトアミノフェン	非ステロイド系抗炎症薬(アニン系)	○			909	77.0	(3.3)	38.8	(4.4)	43.8	(13.5)	31.0	6.2
C10	アセトフェネチジン	非ステロイド系抗炎症薬(アニン系)	○			-	91.3	(11.4)	70.5	(3.1)	83.9	(3.2)	3.1	0.6
C11	サリチル酸	非ステロイド系抗炎症薬(代謝物)・防腐剤	○		○	3.2	92.8	(5.5)	12.9	(21.9)	21.0	(7.8)	2.4	0.5
C12	アセチルサリチル酸	非ステロイド系抗炎症薬(サリチル酸誘導体)	○			-	89.9	(9.0)	20.4	(58.5)	40.3	(7.1)	9.2	1.8
C13	エテンザミド	非ステロイド系抗炎症薬	○			-	90.1	(8.7)	150.7	(2.2)	151.4	(5.9)	1.8	0.4
C14	クラシロマイシン	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	○			76	49.9	(25.1)	46.7	(26.7)	54.0	(18.7)	5.5	1.1
C15	ロキシシロマイシン	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	○			-	44.5	(40.7)	56.7	(14.1)	58.9	(18.1)	47.7	9.5
C16	オキサメシリン	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	○			-	84.6	(13.9)	81.0	(6.4)	90.8	(6.2)	7.3	1.5
C17	タイピシリン	抗生物質(マクロライド系)・蛋白質合成阻害薬	○			67.9	57.1	(45.1)	121.0	(11.8)	120.6	(2.5)	3.7	0.7
C18	アピシリン	抗生物質(ペニシリン系)・細胞壁合成阻害薬	○			59.3	170.8	(16.0)	55.3	(17.1)	97.3	(12.8)	8.7	1.7
C19	ベンジルペニシリン	抗生物質(ペニシリン系)・細胞壁合成阻害薬	○			20.1	53.2	(6.7)	98.1	(5.8)	122.2	(39.9)	8.0	1.6
C20	リンコマイシン	抗生物質(リンコマイシン系)・蛋白質合成阻害薬	○			17.2	103.2	(3.0)	38.0	(5.9)	77.6	(5.4)	1.6	0.3
C21	サリノマイシン	抗生物質(イオフォア)(飼料添加物)	○			32.1	51.3	(6.4)	25.7	(2.4)	42.9	(7.6)	0.7	0.1
C22	スルファトキサゾール	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	○			52.9	88.1	(2.8)	43.2	(3.1)	22.3	(53.8)	3.8	0.8
C23	スルファジメキシム	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	○			30.8	91.5	(13.4)	425.1	(1.8)	194.9	(47.6)	4.5	0.9
C24	スルファジミジン	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	○			4	97.6	(5.9)	35.3	(2.7)	31.9	(33.1)	10.2	2.0
C25	スルファメトキシム	合成抗菌剤(サルファ剤)・核酸代謝阻害薬	○			35.4	104.4	(3.4)	398.6	(3.0)	173.7	(43.0)	2.1	0.4
C26	ファンベンダゾール	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)	○			2.6	96.7	(0.5)	61.9	(13.4)	81.2	(2.8)	4.3	0.9
C27	トリクラベンダゾール	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)	○			0.7	88.0	(4.8)	32.8	(33.1)	78.0	(10.3)	2.9	0.6
C28	トリクラベンダゾール代謝産物	抗寄生虫薬(チアベンダゾール系)代謝物	○			-	120.9	(10.6)	34.2	(3.5)	70.1	(4.2)	8.2	1.6
C29	イベルメクチン	抗寄生虫薬(アベルメクチン系)	○			0.2	64.0	(18.3)	67.7	(19.1)	79.3	(5.2)	0.9	0.2
C30	フロランタール	抗寄生虫薬	○			7.6	99.9	(4.9)	42.0	(2.6)	67.2	(2.7)	1.4	0.3
C31	トリメプリム	合成抗菌剤	○			13.8	92.7	(18.6)	63.6	(8.8)	70.7	(13.3)	8.7	1.7
C32	オルメテプリム	合成抗菌剤	○			1.2	86.3	(7.7)	122.4	(19.7)	110.8	(10.9)	3.9	0.8
C33	ニフルステレン酸ナトリウム	合成抗菌剤(ニトロフラン系)	○			5.5	94.5	(8.6)	10.2	(37.0)	26.0	(10.5)	5.0	1.0
C34	テルビナフィン	抗真菌薬	○			14.1	73.7	(8.6)	62.7	(5.5)	72.2	(3.4)	1.9	0.4
C35	3,4,5-トリクロロフェノール	抗菌剤・防腐剤			○	-	123.7	(2.0)	151.6	(3.1)	150.4	(3.4)	8.3	1.7
C36	3,4,4'-トリクロロカルボニル	抗菌剤・消毒剤			○	-	76.2	(6.8)	36.6	(12.8)	74.2	(5.5)	3.8	0.8
C37	p-ヒドロキシベンフェニル	抗菌剤・消毒剤			○	-	78.4	(5.1)	61.5	(6.9)	68.3	(8.0)	9.7	1.9
C38	プロピルパラベン	防腐剤			○	-	89.1	(2.5)	21.3	(47.4)	45.6	(2.2)	2.8	0.6
C39	ブチルパラベン	防腐剤			○	-	95.5	(5.7)	18.5	(48.8)	43.7	(7.2)	3.2	0.6
C40	エチルパラベン	防腐剤			○	-	84.2	(6.3)	21.6	(16.6)	35.0	(2.4)	2.2	0.4
C41	メチルパラベン	防腐剤			○	-	80.7	(8.5)	21.3	(1.5)	31.2	(2.9)	1.6	0.3
C42	クロフィリン酸	高脂血症治療薬(フィブラート系)	○			1.4	94.5	(2.4)	18.0	(46.5)	46.1	(2.1)	0.8	0.2
C43	フェキサラート	高脂血症治療薬(フィブラート系)	○			-	81.3	(4.8)	37.5	(9.7)	58.8	(0.8)	1.2	0.2
C44	ベザフィブラート	高脂血症治療薬(フィブラート系)	○			40.4	172.5	(17.0)	71.8	(36.6)	129.1	(14.7)	2.4	0.5
C45	ゲンフィブロジル	高脂血症治療薬(フィブラート系)	○			-	99.3	(4.3)	137.5	(2.5)	140.4	(8.0)	1.0	0.2
C46	アロプリノール	高尿酸血症治療薬	○			172.8	100.7	(34.4)	93.9	(25.2)	100.8	(13.0)	30.5	6.1
C47	フロセミド	降圧薬(ループ利尿薬)	○			7.5	94.9	(1.8)	1.8	(469.3)	43.7	(2.6)	1.6	0.3
C48	ジルチアゼム	降圧薬(Ca拮抗薬)	○			32	44.9	(5.5)	31.3	(33.5)	29.8	(12.2)	8.4	1.7
C49	エナラプリル	降圧薬(ACE阻害剤)	○			-	79.1	(19.3)	81.9	(5.7)	94.0	(5.9)	2.7	0.5
C50	トプロロール	降圧薬(β遮断薬)	○			1.3	100.5	(7.6)	87.6	(5.0)	105.5	(11.6)	10.4	2.1
C51	プロプラノロール	降圧薬(β遮断薬)	○			1.2	122.9	(12.5)	31.9	(10.1)	352.8	(3.4)	5.3	1.1
C52	ベタキソロール	降圧薬(β遮断薬)	○			-	101.0	(6.9)	91.5	(8.8)	94.2	(3.8)	5.1	1.0
C53	バルサルタン	降圧薬(ARB製剤)	○			45.2	350.7	(2.3)	416.6	(37.9)	449.4	(10.8)	10.3	2.1
C54	ロサルタンカリウム	降圧薬(ARB製剤)	○			17.6	154.4	(14.1)	125.2	(6.9)	164.4	(5.7)	12.1	2.4
C55	ベラミジル	抗不整脈薬(Ca拮抗薬)	○			12.4	52.3	(18.9)	84.3	(5.8)	89.3	(5.6)	4.5	0.9
C56	カルバマゼピン	抗てんかん薬(イミダズピリン系)	○			42.6	98.9	(0.7)	41.3	(7.7)	51.3	(9.0)	3.0	0.6
C57	カルバマゼピン代謝物	抗てんかん薬(イミダズピリン系)代謝物	○			42.6	103.4	(16.8)	45.8	(5.1)	59.0	(2.2)	5.0	1.0
C58	ジアゼパム	抗てんかん薬(ベンゾジアゼピン系)	○			-	98.2	(10.4)	63.9	(9.7)	88.4	(7.3)	8.6	1.7
C59	デスマチルジアゼパム	抗てんかん薬(ベンゾジアゼピン系)	○			-	97.1	(2.0)	55.0	(3.3)	78.7	(2.7)	8.7	1.7
C60	フェントイン	抗てんかん薬(ヒダントイン系)	○			-	102.4	(2.4)	16.4	(18.2)	35.7	(1.0)	2.9	0.6
C61	フルオロキセチン	抗うつ剤(SSRI)	○			-	75.4	(16.4)	158.7	(8.8)	176.6	(5.3)	4.5	0.9
C62	ノルフロキセチン	抗うつ剤(NDRI)	○			-	74.0	(24.5)	54.9	(30.2)	76.3	(6.4)	8.0	1.6
C63	チオペンタール	麻酔薬(バルビタール系)	○			-	98.5	(11.2)	11.7	(57.8)	27.3	(5.8)	2.9	0.6
C64	テオフィリン	気管支拡張薬(β刺激薬)	○			81.4	72.3	(1.0)	66.7	(26.9)	44.5	(4.1)	2.3	0.5
C65	サルブタモール	気管支拡張薬(β刺激薬)	○			-	86.3	(1.7)	46.5	(6.0)	41.9	(19.3)	6.7	1.3
C66	ウルステオキシコール酸	胆道疾患治療薬(胆汁酸阻害薬)	○			247.8	82.4	(22.9)	89.3	(44.9)	97.3	(6.9)	84.8	17.0

医薬品類の定量下限値もやはり数ng・l⁻¹レベルの研究が多く、また、同じPPCPsの医薬品類に関して、ヨーロッパにおける生態リスクガイドライン値^{H18-3)}が10ng・l⁻¹であることや、Simonichら^{H18-4,5)}、Balmerら^{H18-6)}、Buserら^{H18-7)}及びPoigerら^{H18-8)}の既往の分析方法の精度と大きく変わらないことを考えると、今回の河川水における検出下限値は決して高い値ではなかった。なお、ミリQ水を用いた添加回収試験においても、サロゲートで補正しない絶対的な回収率はすべての対象物質において、77~200%、サロゲートで補正した回収率では、61~110%と良好であった。

(2) GC/MS

1) 溶解性試料の前処理・測定条件の検討

前処理に用いる固相カートリッジについて、ミリQ水に各物質を添加して回収率を検討した結果を図3-3に示す。ここでいう回収率とはサロゲート物質で補正した濃度を用いて計算した回収率ではなく、未補正の濃度で計算した絶対回収率を指すものとする。この結果より、いずれの固相カートリッジにおいても、対象物質すべてに対し、測定に十分な回収率を得られなかった。

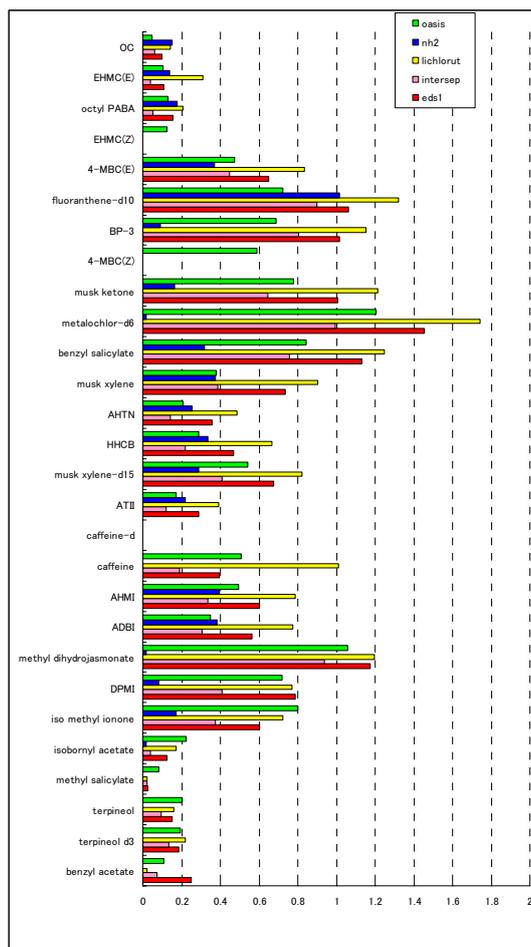


図3-3 前処理の固相カートリッジの回収率

特に、benzyl acetate や terpineol 等の log Kow が 4.5 よりも小さく揮発性の高い香料や Octyl PABA や OC のような log Kow が大きく疎水性の高い紫外線吸収剤で回収率が著しく小さかった。考えられる原因として、充填剤の種類も考えられたが、揮発性の高い香料では充填剤の種類に関係なく低かったことから、窒素ページによる濃縮方法に問題があるのではないかと推測された。

そこで、濃縮方法について検討した結果を図3-4に示す。

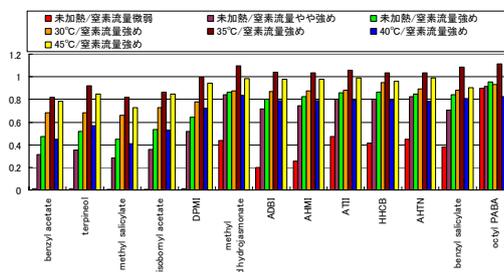


図3-4 濃縮方法と回収率

結果として、加熱しながら窒素流量を強め（液面が大きく波立つ程度）で濃縮を行うことで、揮発性の対象物質の回収率が大幅に改善することが明らかとなった。一方、疎水性の強い Octyl PABA は濃縮条件に大きな影響を受けず、いずれの条件においても 80%以上の高い回収率を示した。このことは、揮発性の高い対象物質は緩やかな条件で濃縮する

とジクロロメタンと一緒に揮発する一方で、高温で窒素流量が大きい条件では相対的にジクロロメタンの揮発速度が大きくなる結果、対象物質の揮発量が少なくなり、回収率が改善されるものと考えられた。したがって、本研究では最適な濃縮条件として 35°C で窒素流量を大きめで行うことを採用した。なお、このときの濃縮にかかった時間は 27 分程度であったことから、時間も約 27 分で終了するように窒素流量を適宜調整して行った。以上のことから、図 3-5 のような前処理フローチャートが確立された。なお、固相カートリッジからのジクロロメタンによる溶出については 10ml で吸着された対象物質の 98% 以上が溶出されることを確認している。一方で疎水性の強い紫外線吸収剤で回収率が低かった原因は充填剤の特性やミリ Q 水中の分散性の低さが原因が大きいと考えられた。

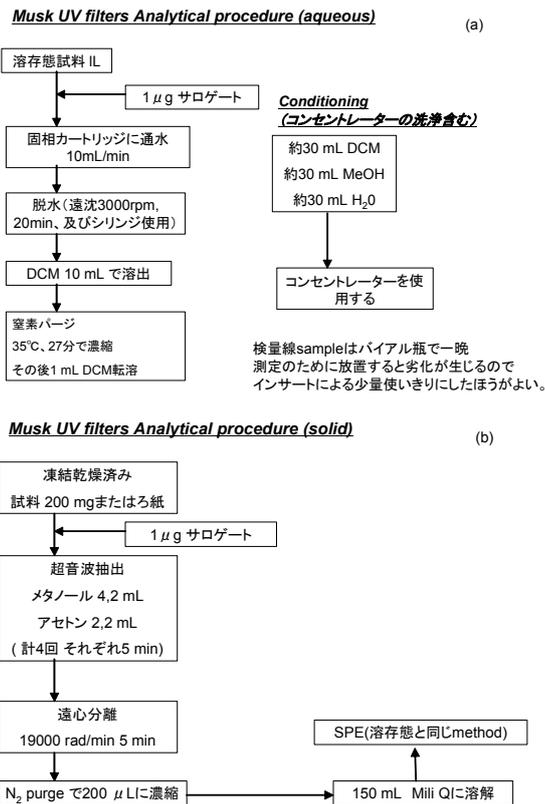


図 3-5 GC/MS による香料・紫外線吸収剤等の前処理方法

(a:溶解性試料(ろ液)用, b:固形性試料(SS)用)

次に、非汎用固相カートリッジの検討のため、polar, Oct, light および env の 4 種の固相カートリッジを使った添加回収率試験結果を図 3-6 に示す。なお、疎水性の強い紫外線吸収剤のミリ Q 水中での分散性を高めるため、実験系によってはアセトンで標準物質を溶解しておこなった。しかし、polar についてアセトン添加系と無添加系を比較したところ、全体的にアセトン添加系では回収率が若干低めであり、特に Benzyl acetate や caffeine では著かった。したがって、アセトン添加は回収率改善に有効ではなかった。これはアセトン添加により親水性物質の吸着が抑制されたためと考えられた。

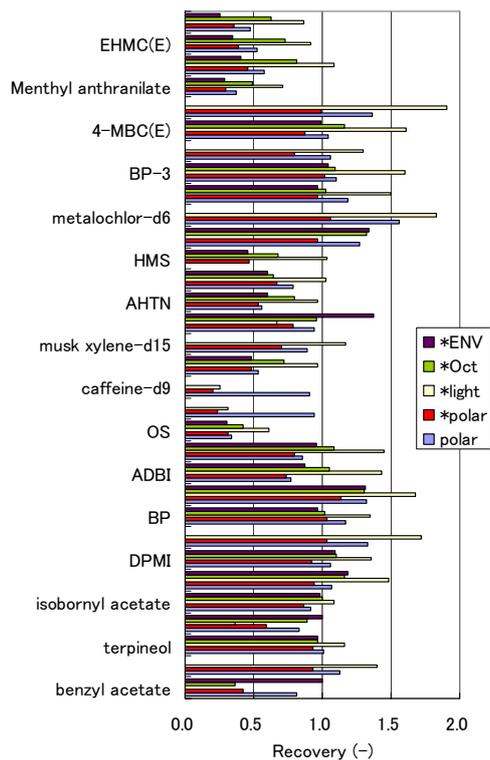


図3-6 非汎用固相カートリッジの回収率

一方、固相カートリッジ別に各対象物質の回収率は大きく異なった。その中でも *light* や *Oct* は紫外線吸収剤の回収率が高かったが、*caffeine* や *benzyl acetate* などの親水性の対象物質の回収率は著しく低い結果となった。逆に *polar* ではこれらの物質の回収率が高かった。したがって、単一の固相カートリッジではなく、複数の固相カートリッジを直列に連結したタンデム式で分析を行うことが有効であることが示唆された。

そこで、タンデム式で検討を行った結果を図3-7に示す。この結果から *tandem* 式で行うことで多くの対象物質で80-120%の良好な回収率を得られることが明らかになった。特に *polar/polar*、*polar/env* でよい回収率を示したが、*OS* や *Menthyl anthranilate* では40%と依然と回収率が低かった。

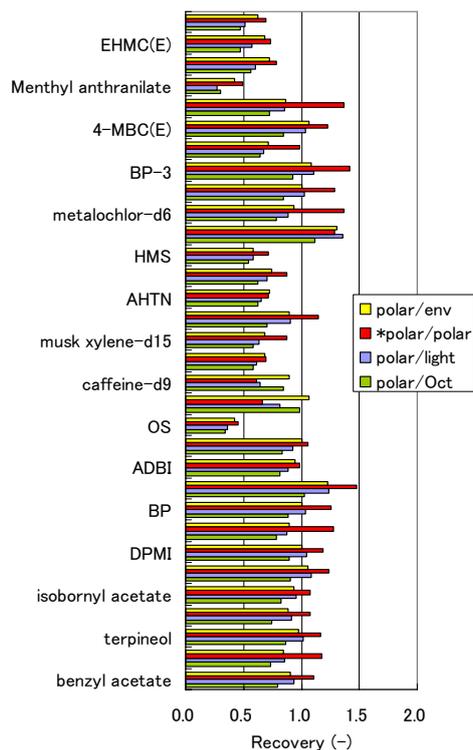


図3-7 タンデム式固相カートリッジの回収率

以上の結果から図3-5のフローチャートに基づき、polar/polar、polar/envといったタンデム式の固相カートリッジを使用することで対象物質の多くを80-120%の良好な回収率で分析できると考えられたことから、添加回収試験を行った。

2) 添加回収試験による回収率検討

表3-10に下水処理場流入水、下水処理水、河川水(表流水)、下水処理場流入水中の懸濁態、返送汚泥、底質からの添加回収試験結果と検出下限値を示した。検出下限値はS/Nが3のときの濃度とした。

添加回収試験結果では、底質からのBP-3からの回収率が5%と低い結果以外は、いずれの物質についても環境媒体の種類に大きな影響を受けず、回収率はおおむね良好であることが明らかとなった。

検出下限値については、他の物質に比べ、homosalateの定量下限値が高かった。また、試料水容量が100 mLと少なかつたため、下水処理場流入水と下水処理水において全体的に高く、0.5~63 ng・l⁻¹であった。しかし、河川水については、homosaltae以外は数 ng・l⁻¹レベルであった。

表3-10 香料等の回収率および定量下限値

compounds	influent (dissolved)		effluent (dissolved)		surface water (dissolved)		influent solid		activated sludge		sediment	
	% recovery (±rsd)	LOD (ng·l ⁻¹)	% recovery (±rsd)	LOD (ng·l ⁻¹)	% recovery (±rsd)	LOD (ng·l ⁻¹)	% recovery (±rsd)	LOD [※] (ng·g ⁻¹)	% recovery (±rsd)	LOD [※] (ng·g ⁻¹)	% recovery (±rsd)	LOD (ng·g ⁻¹)
benzyl acetate	88.7 ± 2.9	8	107 ± 3.7	8	93.7 ± 8.2	2	72.7 ± 10.6	-	84.3 ± 4.7	-	75.1 ± 10.9	2
terpineol	95.2 ± 8.7	7	100 ± 0.5	7	105 ± 7.5	1	99.3 ± 1.2	-	108 ± 3.1	-	98.4 ± 4.4	1
methyl salicylate	171 ± 10.2	10	114 ± 6.4	10	95 ± 9.2	2	61.6 ± 13.0	-	93.2 ± 7.0	-	47.5 ± 22.4	2
isobornyl acetate	91.2 ± 2.7	4	72.2 ± 6.2	4	61.9 ± 5.8	1	50.6 ± 20.6	-	73.1 ± 5.5	-	52.7 ± 8.1	1
iso methyl ionone	88.3 ± 1.9	5	80.6 ± 1.0	5	80.6 ± 4.5	1	85.9 ± 5.5	-	96.3 ± 3.1	-	83.2 ± 4.2	1
DPMI	89.5 ± 1.5	5	80.4 ± 0.8	5	84.4 ± 4.8	1	83.2 ± 4.2	-	89.8 ± 1.7	-	83.7 ± 3.2	1
BP	87.2 ± 0.2	9	94.4 ± 2.1	9	103 ± 3.7	2	103 ± 5.0	-	103 ± 1.2	-	94.3 ± 3.6	2
MDJ	127 ± 7.6	11	121 ± 4.2	11	114 ± 4.5	2	121 ± 1.5	-	126 ± 0.7	-	115 ± 2.4	2
ADBI	88.6 ± 1.2	1	80.1 ± 2.2	1	75.7 ± 5.0	0.2	93.4 ± 2.0	-	99.3 ± 3.9	-	79.8 ± 10.1	0.2
hexyl cinnamaldehyde	109 ± 2.0	28	96.7 ± 4.6	28	128 ± 11.6	6	178 ± 1.8	-	134 ± 6.5	-	139 ± 12.0	6
AHMI	81.4 ± 1.4	3	78.1 ± 2.2	3	77.1 ± 4.7	1	98.8 ± 1.9	-	98.2 ± 4.0	-	87.3 ± 12.4	1
octyl salicylate	169 ± 10.8	10	98.4 ± 5.1	10	95.8 ± 8.0	2	87.5 ± 7.3	-	75.7 ± 3.6	-	83.3 ± 19.0	2
ATII	82.1 ± 3.6	0.5	71.3 ± 3.1	0.5	81.8 ± 7.3	0.1	101 ± 3.2	-	95.8 ± 5.0	-	82.4 ± 6.5	0.1
HHCB	98.3 ± 4.3	2	84 ± 6.7	2	73 ± 6.1	0.3	130 ± 3.5	-	105 ± 6.6	-	113 ± 9.1	0.3
AHTN	71.2 ± 4.5	1	82.6 ± 4.1	1	78.7 ± 6.3	0.2	102 ± 2.8	-	115 ± 9.2	-	85.7 ± 8.7	0.2
MX	106 ± 2.4	7	110 ± 4.0	7	104 ± 4.2	1	96.7 ± 0.4	-	88.4 ± 0.3	-	95.2 ± 3.2	1
homosalate	76.9 ± 16.8	63	95.6 ± 2.1	63	82.2 ± 7.5	13	74.4 ± 14.3	-	83.1 ± 12.4	-	64.2 ± 9.4	13
benzyl salicylate	121 ± 12.2	14	102 ± 2.2	14	118 ± 8.0	3	109 ± 4.4	-	172 ± 0.9	-	113 ± 4.8	3
MK	103 ± 2.0	5	91.5 ± 1.2	5	103 ± 6.4	1	87.7 ± 4.3	-	118 ± 1.3	-	99.1 ± 4.9	1
4-MBC	137 ± 4.7	6	103 ± 2.6	6	106 ± 6.5	1	133 ± 1.2	-	124 ± 1.2	-	124 ± 3.0	1
BP-3	106 ± 14.5	8	158 ± 6.2	8	132 ± 3.7	2	104 ± 12.7	-	172 ± 4.0	-	51.3 ± 35.6	2
isoamyl methoxycinnamate	81.4 ± 2.4	5	76.2 ± 3.2	5	89.8 ± 6.5	1	83.9 ± 5.1	-	91.3 ± 1.7	-	91.7 ± 5.5	1
EHMC	88.2 ± 5.4	2	100 ± 2.1	2	98.9 ± 10.3	0.3	118 ± 8.9	-	108 ± 3.5	-	104 ± 17.5	0.3
OD-PABA	78.9 ± 4.3	1	82.9 ± 3.1	1	87.9 ± 10.3	0.3	121 ± 5.3	-	103 ± 3.7	-	105 ± 8.4	0.3
octocrylene	105 ± 5.2	5	79.7 ± 2.4	5	87.4 ± 9.9	1	91.2 ± 13.4	-	77 ± 7.1	-	85.6 ± 32.9	1

3-3 環境への放出・移行・変化量の把握

3-3-1 下水処理場調査

(1) 医薬品・日用品類 (LC/MS/MS 測定物質)

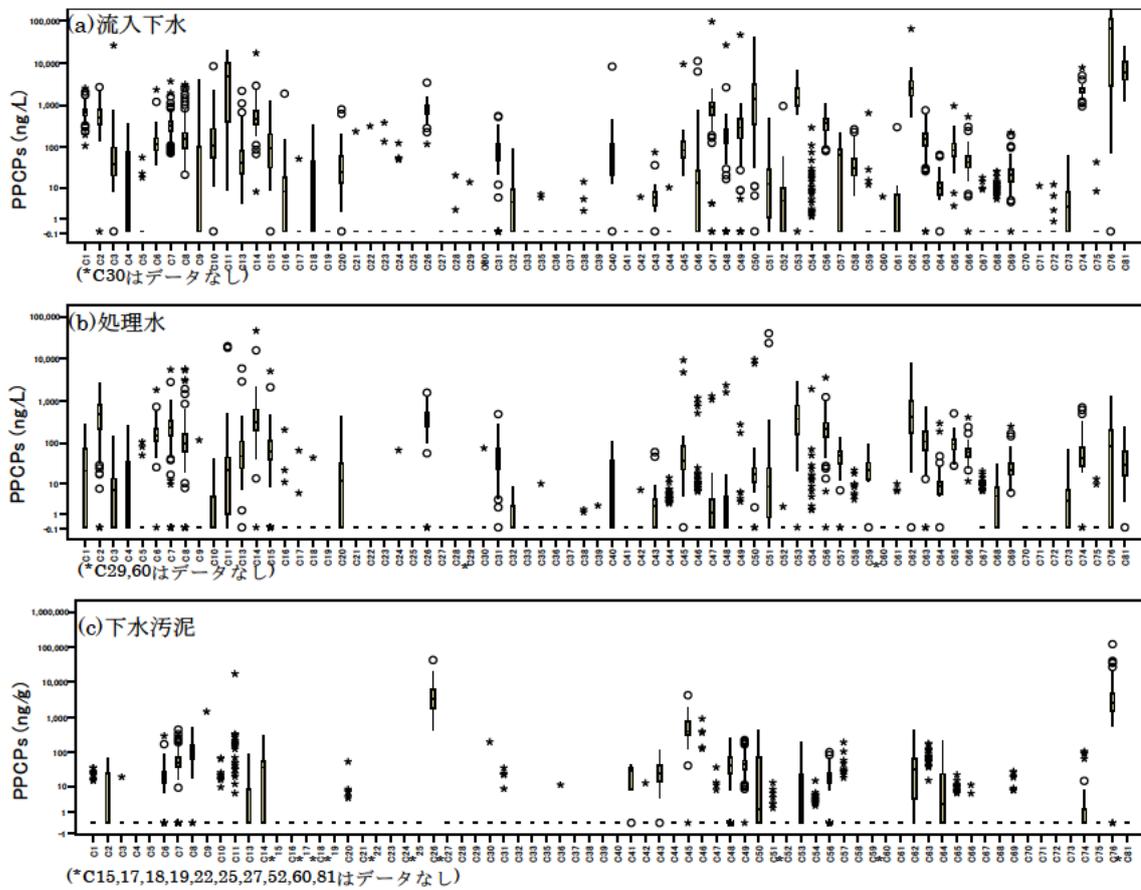
下水処理場 120 ヶ所における PPCPs の年間の挙動について、流入下水・処理水中の溶存態濃度および下水汚泥中の懸濁態濃度の濃度の分布を図 3-8 に示した。

測定結果の全体的な傾向として、人用医薬品の非ステロイド系抗炎症薬(C1~13)の多くが流入下水中に高濃度で検出され、多用されている実態を反映しているものと考えられた。特に、C11 サリチル酸が中央値で 1 μg/L 以上であり、C1 イブプロフェン、C2 ケトプロフェン、C6 ジクロフェナクナトリウム、C7 インドメタシン、C8 メフェナム酸および C10 アセトフェネチジンが中央値で 100ng/L 以上であった。このうち、C11 と C1 は処理水中でも検出されるものの濃度は大幅に低下しており、下水汚泥中濃度も低い場合が多いことから下水処理で大部分が除去されるものと考えられた。C2、C6、C7 および C8 は処理水中でも同レベル (中央値で 100ng/L 以上) で検出され、下水処理における除去率が低いものと考えられた。C6、C7 および C8 は下水汚泥中にも中央値 10ng/g 以上で検出され、汚泥へも残留していた。

抗生物質(C14~30) では、C26 レボフロキサシン (オフロキサシン含む)、C14 クラリスロマイシンが流入下水中で高濃度 (中央値で 500ng/L 付近) で検出され、両者とも処理水中にも高濃度で残存して除去率が低いものと考えられた。下水汚泥中では C26 が中央値で 1 μg/g 以上の高濃度で残留しており、C14 はより低いものの中央値で 10ng/g 以上で検出された。これら以外にも、抗菌・防腐剤として C45 トリクロロカルバニド (トリクロカルバン) および C47~50 パラベン類が高濃度に流入して、処理水や下水汚泥からも検出されるなど、多様な物質が年間を通じて下水処理場に流入しており、その除去率は様々であり、処理水や下水汚泥に残留する場合も多いことが明らかとなった。今後、下水処理場における収支の把握、除去率への影響因子の推定等より詳細な検討を進めることとしたい。

なお、本調査では安定同位体を前処理時に添加して回収率補正を行う同位体希釈法 (サロゲート法) により測定を行った。絶対検量線法と比較して多くの場合により良好な結果が得られたが、一部の試料でサロゲート物質の検出値が極

端に低くなり測定値が過大と見られるような場合もあった。測定試料数を多くして測定結果の統計処理を行い、外れ値を除外して信頼性を高めることが必要と考えられた。



a : 流入下水（溶存態濃度）, b : 処理水（溶存態濃度）, c : 下水汚泥（懸濁態濃度）

, 試料種類・物質に応じて n = 28 から 119

図3-8 流入下水、処理水、下水汚泥中のPPCPsの年間挙動

(2) 香料・紫外線吸収剤 (GC/MS 測定物質)

香料・紫外線吸収剤の測定結果を表3-11に示した。下水処理場の調査結果だけでなく、河川試料の調査結果も含まれているが、まとめて記載したものである。

1) 下水処理場流入水

下水処理場流入水では、対象物質25物質中、MX及び4-MBCを除く23物質が検出された。MXはすでに国内における使用が禁止されているため、検出されなかったものと考えられた。一方、4-MBCはスイスの化粧品としての紫外線吸収剤市場で2番目に多い物質^{H18-8)}と推定されている。しかし、我が国では化粧品類のポジティブリスト^{H18-9)}に含まれておらず、化粧品類として使用されていない可能性が高く、使用量も少ないため、検出されなかったと考えられた。

さらに、検出された23物質のうち、benzyl acetate, terpineol, AHMI, octyl salicylate, benzyl salicylate, isoamyl methoxycinnamate 以外は95%以上の調査対象下水処理場で検出されていた。

表3-11 香料等の濃度分布および検出数

compounds	influent (N=47)		effluent (N=47)		surface water (N=43)		sediment (N=43)			
	(av±SD)* ng·l ⁻¹	number of detection*	(av±SD) ng·l ⁻¹	number of detection*	(av±SD) ng·l ⁻¹	number of detection*	(av±SD) μg·kg ⁻¹	number of detection*		
benzyl acetate	191 ± 1304	3	0.3 ± 1.8	1	-	-	0	-	0	
terpineol	593 ± 2162	36	10 ± 15	27	2.0 ± 3.3	21	1.4 ± 6.5	2	2	
methyl salicylate	623 ± 3630	47	17 ± 36	29	5.3 ± 14.5	30	2.0 ± 0.9	41	41	
isobornyl acetate	122 ± 296	47	18 ± 19	29	12.2 ± 10.9	43	3.0 ± 1.7	42	42	
iso methyl ionone	308 ± 633	47	22 ± 29	37	0.6 ± 1.7	9	0.2 ± 0.3	10	10	
DPMI	168 ± 935	46	14 ± 10	38	-	-	0	-	0	
BP	5101 ± 13683	47	657 ± 1159	45	277.7 ± 172.4	43	128.9 ± 104.9	43	43	
MDJ	3358 ± 4166	46	41 ± 43	36	2.2 ± 4.0	16	0.1 ± 0.4	2	2	
ADBI	110 ± 575	46	4 ± 7	40	0.02 ± 0.1	3	0.02 ± 0.1	6	6	
hexyl cinnamaldehyde	1517 ± 6865	47	47 ± 36	40	17.4 ± 13.5	41	4.6 ± 5.9	33	33	
AHMI	31 ± 158	31	3 ± 13	15	-	-	0	0.02 ± 0.1	2	2
octyl salicylate	173 ± 621	38	3 ± 6	10	-	-	0	-	0	0
ATII	210 ± 712	47	9 ± 6	46	0.05 ± 0.2	2	0.2 ± 0.4	14	14	
HHCB	7781 ± 21384	47	388 ± 270	47	9.4 ± 9.4	43	6.6 ± 14.0	43	43	
AHTN	4487 ± 13853	47	175 ± 123	47	9.8 ± 9.3	43	5.9 ± 12.4	43	43	
MX	-	0	-	0	-	-	0	-	0	0
homosalate	29224 ± 107007	46	6 ± 16	6	-	-	0	0.02 ± 0.1	1	1
benzyl salicylate	361 ± 1351	35	4 ± 18	4	0.4 ± 1.9	2	-	-	0	0
MK	1023 ± 3440	47	104 ± 83	45	3.7 ± 8.0	12	0.9 ± 2.0	11	11	11
4-MBC	-	0	-	0	-	-	0	-	0	0
BP-3	550 ± 2672	46	11 ± 18	23	2.6 ± 4.5	19	0.5 ± 0.8	22	22	22
isoamyl methoxycinnamate	57 ± 358	3	0 ± 2	2	-	-	0	0.1 ± 0.3	3	3
EHMC	4962 ± 14008	47	1171 ± 997	47	380.6 ± 479.5	43	79.0 ± 242.2	43	43	43
OD-PABA	180 ± 630	47	27 ± 35	47	1.8 ± 1.7	30	1.0 ± 0.4	43	43	43
octocrylene	293 ± 629	46	2 ± 4	13	-	-	0	-	0	0

このことから今回の対象物質の多くは地域的偏りがなく国内で幅広く日常的に使用されていることが推定された。また、濃度が最も高かったものは香料ではBP, MDJ, hexyl cinnamaldehyde, HHCB及びAHTNで $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルの濃度であった。Simonichら^{H18-5)}はアメリカとヨーロッパにおける下水中の香料の組成を比較している。本結果と彼らの報告を比較した場合、彼らの報告では揮発性の高いterpineolやmethyl salicylate, benzyl salicylateの濃度が数十 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ と高かった。この違いはサンプルの保存方法の違いのほか、風習の違いによる使用量の違いが推定された。今後、商品中濃度の測定等から下水中の香料の濃度を推定する、あるいは、下水処理対象区域人口一人当たりの排出量で比較すれば下水処理水中の香料の濃度の把握や国別の比較がより正確にできるものと考えられる。一方、生態リスクアセスメントの事例のある疎水性の高いHHCBやAHTN及びMKについては同じ濃度レベルであった。また、本研究では彼らと異なりBP濃度を測定しており、 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルと対象物質の中でも高濃度であることが明らかとなった。

下水処理場流入水中の紫外線吸収剤については本研究では、EHMCとhomosalateが最も高く $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルであった。下水中の紫外線吸収剤の報告事例は世界的にも少なく、下水処理対象区域人口を加味した比較は難しい。しかし、濃度という観点のみでBalmerら^{H18-6)}の報告と比較すれば、本研究のEHMCの平均値は彼らとほぼ同じ濃度レベルであったが、BP-3やoctocryleneは1/10程度であった。一方で本研究ではOD-PABAとhomosalateを世界で初めて測定したが、どちらの物質も検出されており、特にhomosalateはEHMCと同じかそれ以上の濃度であった。

2) 下水処理水

下水処理水でも、下水処理場流入水と同様に対象物質25物質中、MX及び4-MBCを除く23物質が検出された。ただし、95%以上の下水処理場で検出された物質は下水処理場流入水よりも少なく、BP, ATII, HHCB, AHTN, MK, EHMC, OD-PABAであった。

香料についてSimonichら^{H18-5)}報告と比較すると、HHCB及びAHTN以外の物質は同じ濃度レベルであったが、これら二つの物質については、アメリカではいずれも平均が約 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルであったのに対し、本研究はそれぞれ $388\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $175\ \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

一方、紫外線吸収剤ではBP, EHMCが $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルで最も高く検出されたほか、OD-PABAやBP-3が数十 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ レベルで検出された。

特に、本研究のEHMCの平均濃度はBalmerら^{H18-6)}の報告値よりも50倍も濃度が高く、約 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ であった。

この原因として、一つは日本とスイスにおけるEHMCの使用量の違いが考えられる。日本では前述の議論のようにス

イスで大量に使用されている 4-MBC が使用されていない。また、比較的海外での使用量が多い octocrylene も平成 13 年にポジティブリストに含まれた新しい物質で国内使用量は多くないと考えられる。この結果、EHMC の国内使用量は高くなり、そのため高濃度で検出されたと考えられる。二つ目の原因は測定対象と分析方法の違いである。Balmer ら^{H18-6)}は下水及び下水処理水ともに溶存態に注目し、下水については遠心分離後の液体試料のみを測定している。下水処理水については、懸濁態については別途分析をせず、固相に直接サンプルを通水している。本研究で EHMC は疎水性が高いこともあり懸濁態中に高濃度に含まれていることが明らかとなっている。これらの点を考慮すると、彼らの報告は過小評価している可能性があると思われる。

以上のように、下水処理水中にも数多くの香料や紫外線吸収剤が含まれており、これらが環境中へ排出されていることが明らかとなった。また、香料や紫外線吸収剤の中には疎水性が高いものもあり、本研究でも下水中や下水処理水中の溶存態と懸濁態の濃度割合は物質によって大きく異なっていた。香料や紫外線吸収剤の下水中の存在形態や下水処理プロセスにおける挙動に関しては世界的にもデータが不足しており、特定のケースのデータがいくつかあるのみである。本研究で初めて下水中に含まれていることが明らかとなった OD-PABA と homosalate を含め、水中での分配や下水処理場等による水処理プロセスにおける除去率について今後検討していく必要がある。

3-3-2 河川・湖沼調査

(1) 医薬品・日用品類 (LC/MS/MS 測定物質)

河川・湖沼 66 地点の表流水中の各季節の PPCPs 濃度を図 3-9 に示す。

1) 季節変動: C1 イブプロフェン (非ステロイド系抗炎症薬)、C14 クラリスロマイシン、C26 レボフロキサシン (抗生物質) 等の濃度が冬期において高くなっており、感冒等の感染症の流行による使用量の季節変動を反映しているものと考えられた。一方、非ステロイド系抗炎症薬でも C7 インドメタシン、C13 エテンザミド等は冬期に特に高くなっていない等、物質によって季節変動に違いが見られた。

2) 流域特性: 都市影響が顕著である鶴見川・多摩川では、他河川と比較して、PPCPs 濃度が高い傾向にあった。また上述の季節変動についても、66 地点全体では変動がやや不明瞭であるが、鶴見川・多摩川ではより明瞭に観察された。

3) 底泥: 表流水と比較して検出物質は少なく、特に湖沼底泥では河川底泥よりもさらに検出が少ない傾向であり、LC/MS/MS で測定可能な PPCPs は環境中での残留性・蓄積性が低いものが多いと考えられたが、抗菌剤・防腐剤として多用されている C48 ブチルパラベン～C50 メチルパラベンは底泥中で広く検出されるなど、例外も見られた。

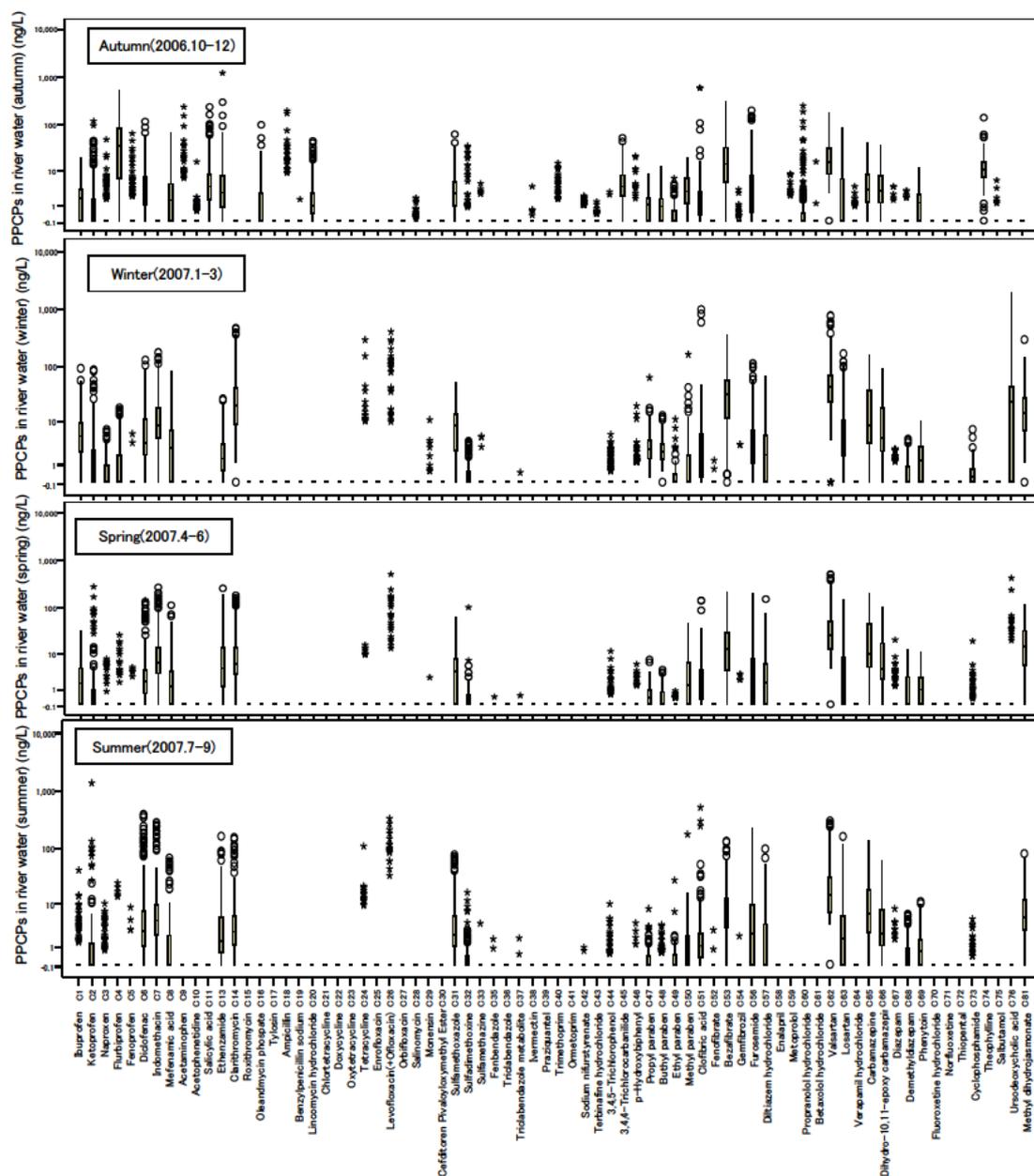


図3-9 関東地方の河川のPPCPs濃度

(2) 香料・紫外線吸収剤 (GC/MS 測定物質)

測定結果は表3-11に示した。

1) 河川水

河川水では、対象物質25物質中、16物質が検出された。この中で95%以上の地点で検出されたのは isobomyl acetate, BP, hexyl cinnamaldehyde, HHCb, AHTN 及び EHMC であった。また、OD-PABA も30地点で検出された。これらの物質のうち、HHCb や AHTN は海外の報告例があり、1994年から1996年のライン川における調査結果^{H18-10)}では、それぞれ $10 \sim 220 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $10 \sim 130 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ と報告されている。本研究結果はこの報告よりも低く、 $1.7 \sim 54 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $2.2 \sim 40.7 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ であった。一方、本研究ではBPやEHMCが数百 $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ レベルで検出されており、既往の研究で香料の中で環境中の濃度が最も高い物質と取り扱われている HHCb や AHTN よりも濃度が著しく高かった。さらに、今回調査した地

点は人口密度が高くない河川の上流部も含まれているにも係らず、全地点で検出されたことは注目すべき結果であり、下水処理場を経由しない環境中へ排出経路を含めた発生源の解析の必要性を示唆しているものと思われる。

2) 底質

底質では、対象物質 25 物質中、18 物質が検出された。この中ですべての地点で検出されたのは BP、HHCB、AHTN、EHMC 及び OD-PABA であった。そのほか数箇所を除くすべての地点で検出されたのが、methyl salicylate, isobornyl acetat であった。HHCB、AHTN はそれぞれ $0.7\sim 84 \mu\text{g}/\text{kgD.W.}$ 、 $0.5\sim 71 \mu\text{g} \cdot \text{kgD.W}^{-1}$ 検出され、これはライン川の報告値^{H18-11)}、 $5\sim 110 \mu\text{g} \cdot \text{kgD.W}^{-1}$ 、 $5\sim 180 \mu\text{g} \cdot \text{kgD.W}^{-1}$ よりも低かった。一方で、BP や EHMC は HHCB や AHTN よりも著しく高く、 $48\sim 546 \mu\text{g} \cdot \text{kgD.W}^{-1}$ 、 $3.6\sim 1446 \mu\text{g} \cdot \text{kgD.W}^{-1}$ であった。

従来の環境中の紫外線吸収剤濃度の報告ではこのような底質中濃度の報告事例はなく、貴重なデータであると評価できる。また、一方で底質中の紫外線吸収剤が高濃度であった原因として EHMC と BP の疎水性や生物分解性といった化学特性が推測され、今後、物理化学的特性からこれら物質の環境中挙動を検討していく必要がある。特に、紫外線吸収剤に関しては、生態毒性や生態リスクアセスメントの報告事例がほとんどなく、今後の研究が期待される。さらに、Balmer ら^{H18-6)}の報告では紫外線吸収剤の水生生物への生物蓄積が確認されており、生物蓄積性を加味した生物毒性及びリスクアセスメントの必要性もあるものと思われる。

都市影響を受けている湖沼における香料等濃度の季節変動を把握するため、霞ヶ浦の湖内 7 地点の冬期 (2 月) および夏期 (8 月) における香料の溶存態および懸濁態の平均濃度を図 3-10 に示し、紫外線吸収剤について同様に図 3-9 に示した。

香料で最も高濃度であった Methyl dihydrojasmonate (MDJ) は、ほとんどが懸濁態で存在しており、夏期の方が濃度が高かったが、それ以外の香料は季節による違いがあまりなく、むしろ冬期の方がやや濃度が高い傾向にあった。

紫外線吸収剤では、2-Ethylhexyl p-methoxycinnamate (EHMC) が最も高濃度であり、他もほとんどが懸濁態で存在し、夏期の方が顕著に高濃度で冬期ではほとんどが検出下限値未満であり、夏期の使用増大によると考えられた。

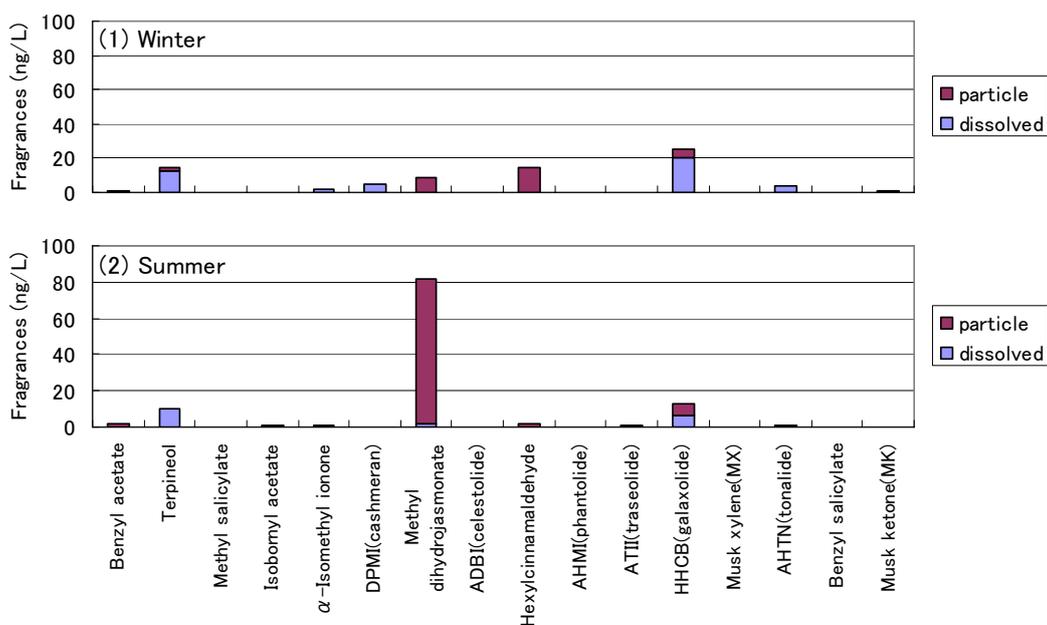


図 3-10 霞ヶ浦における香料の挙動

3-3-3 都市の雨天時表面流出水調査

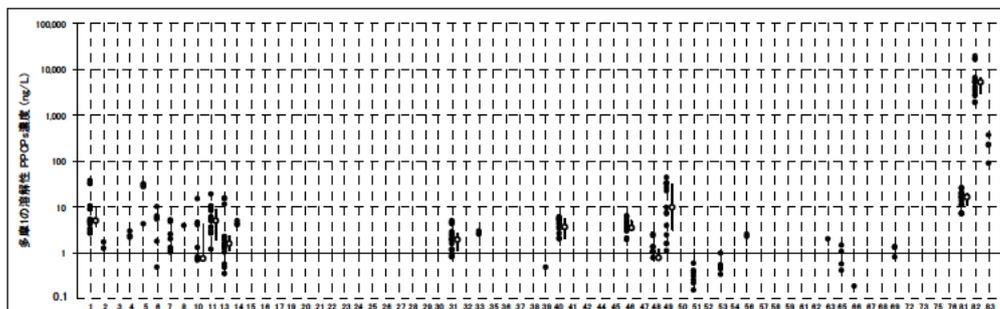
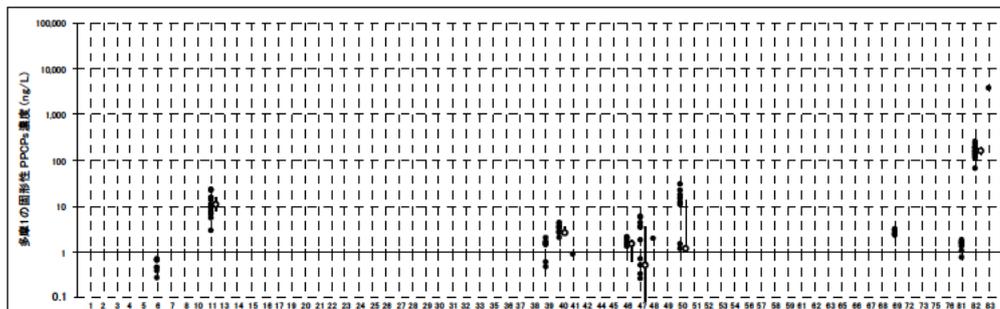
都市の雨天時表面流出水中の PPCPs の濃度について、LC/MS/MS で測定した医薬品・日用品類の固形性および溶解性濃度を図 3-1-1 に示し、GC/MS で測定した香料・紫外線吸収剤の固形性および溶解性濃度を図 3-1-2 に示した。以下に、結果の詳細を述べる。

(1) 医薬品・日用品類 (LC/MS/MS 測定物質)

測定結果の全体的な傾向として、都市の雨天時表面流出水中の医薬品・日用品類の濃度は、下水処理水や河川水よりも低濃度であった。従って、都市表面流出由来のこれらの PPCPs の排出量は全般的に少ないものと考えられた。また、雨天時に低濃度の都市表面流出水が河川に流入することにより、河川水中濃度は低下するものと考えられた。一方で、C83 ニコチンについては、溶解性で高濃度であり特異的に流出していることから、路面のタバコの吸い殻等に由来するものではないかと推定され、都市の表面流出に由来する微量化学物質汚染の指標マーカーとして有用であると示唆された。検出頻度の高い物質は河川水・下水処理水と同様であり、非ステロイド系抗炎症薬 (C1 Ibuprofen~C13 Ethenzamide)、人用抗生物質の C14 Clarithromycin、サルファ剤の C31 Sulfamethoxazole、日用品の抗菌剤 C45 Triclocarban、C46 p-Hydroxybiphenyl、防腐剤の Paraben 類 (C47~C51)、高脂血症薬の C53 Bezafibrate、降圧剤の C62 Valsartan、抗てんかん薬の C65 Carbamazepine 等であった。また、C82 Caffeine についても、中央値が溶解性で $1 \mu\text{g/L}$ 以上で高濃度であった。

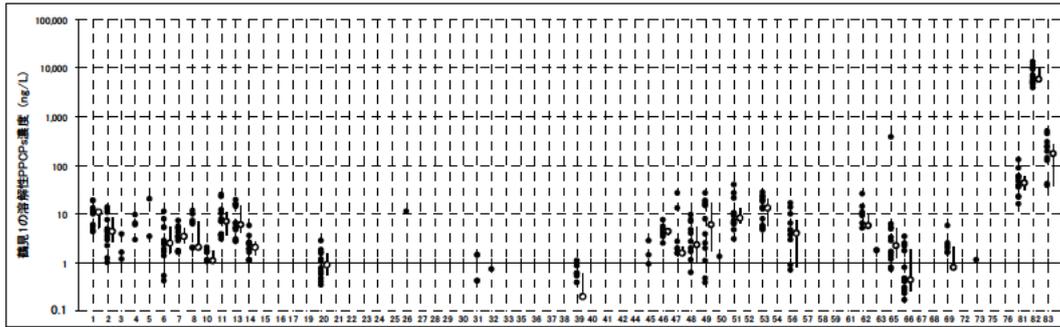
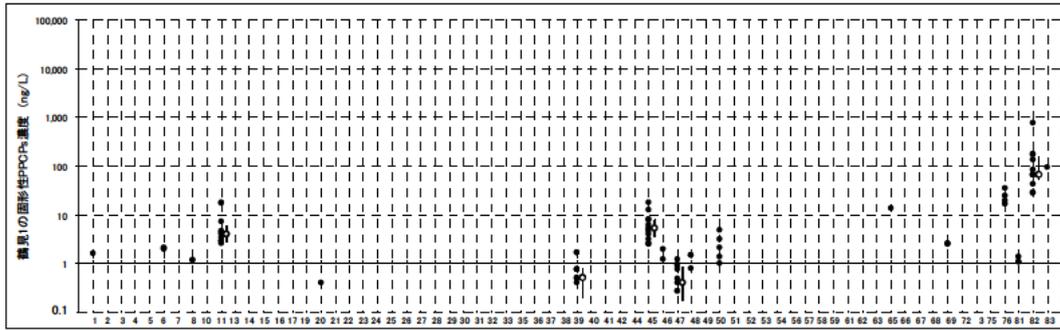
一方、固形性物質については、溶解性物質よりも存在量が少なく検出率も低い場合が多かったが、C45 Triclocarban では固形性の方が高濃度であった。Triclocarban は物性として固形性で存在する割合が高い傾向があり、雨天時の表面流出水中には SS 等の懸濁物質が多く存在することから、固形性濃度が高くなったものと考えられた。

医薬品・日用品類由来の化学物質は、主として下水中に排出されると考えられることから、今回の調査対象である下水道整備済みの区域では、雨水 (雨天時の表面流出水) 中にはほとんど検出されないと予想された。しかし結果としては、低濃度ながらも幅広い物質が検出されており、その排出源は明らかではないが、雨水の水路等に存在している PPCPs が、降雨により希釈された流出水として河川等に放流されるものと考えられた。



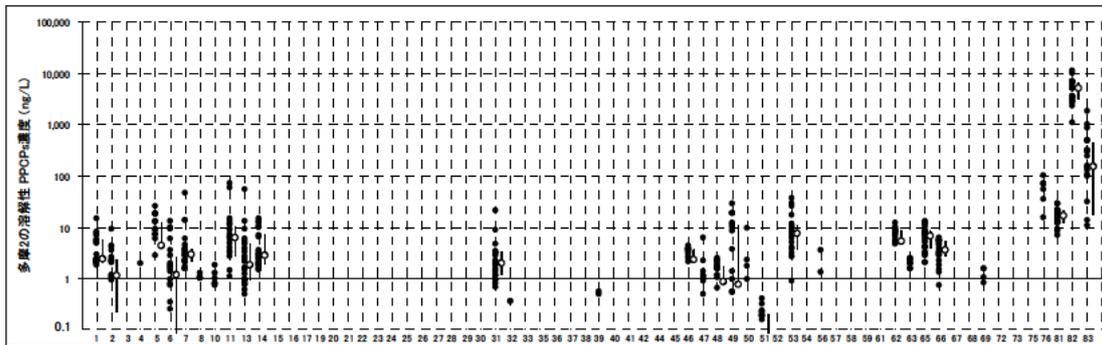
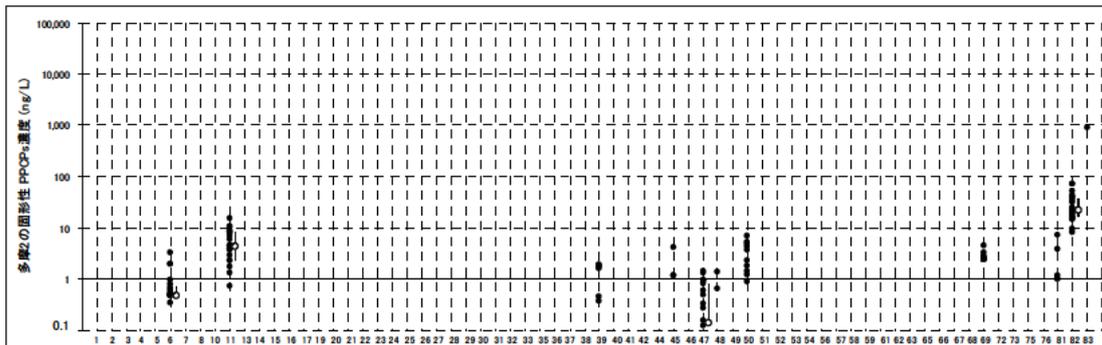
(横軸は C1 等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は 25%~75% 値を示す。)

3-1-1 (1) 都市の雨天時表面流出水の医薬品類濃度 (鶴見 1)



(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%~75%値を示す。)

図3-11(2) 都市の雨天時表面流出水中の医薬品類濃度(多摩1)

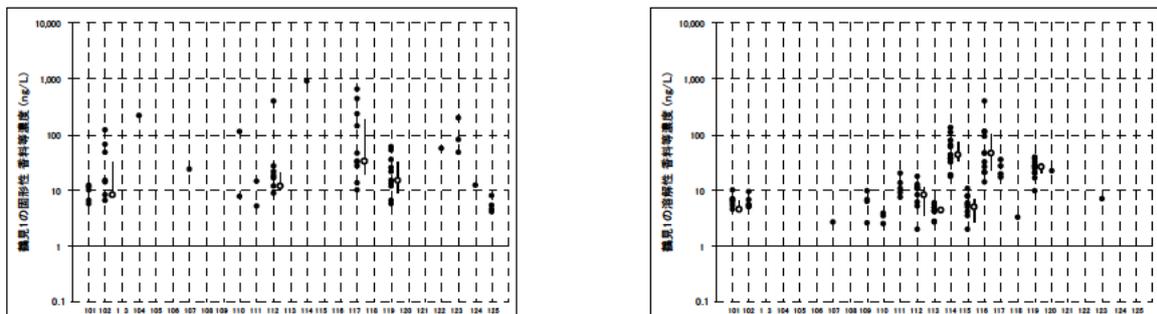


(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%~75%値を示す。)

図3-11(3) 都市の雨天時表面流出水中の医薬品類濃度(多摩2)

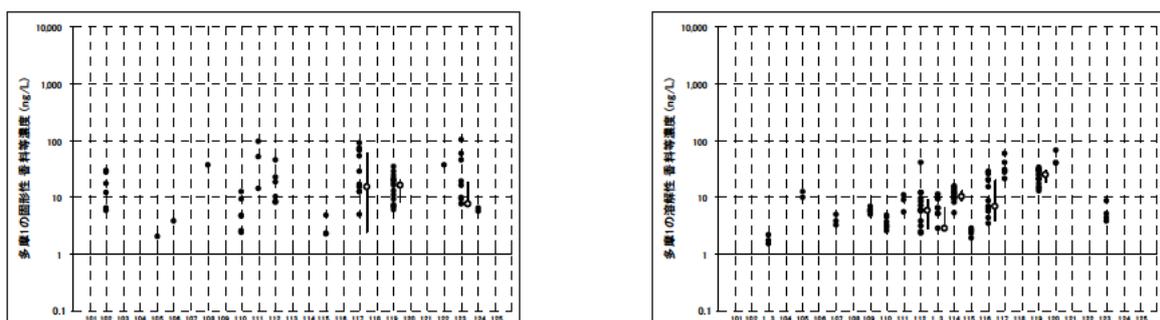
(2) 香料・紫外線吸収剤 (GC/MS 測定物質)

測定結果の全体的な傾向として、都市の雨天時表面流出水中の香料・紫外線吸収剤の濃度は、下水処理水や河川水よりも低濃度であった。従って、都市表面流出由来のこれらのPPCPsの排出量は全般的に少ないものと考えられた。また、雨天時に低濃度の都市表面流出水が河川に流入することにより、河川水中濃度は低下するものと考えられた。香料では芳香族系アルデヒドのC112 Jasmonal H, シクロペンタンのC117 Methyl dihydrojasmonate (Hedion)が高濃度でよく検出され、ほとんどが溶解性で存在していた。紫外線吸収剤では、桂皮酸誘導体のC117 2-Ethylhexyl p-methoxycinnamate (EHMC), ベンゾフェノン誘導体のC119 Benzophenone, 安息香酸誘導体のC123 Octyl PABAが高濃度でよく検出され、固形性が溶解性と同等またはより存在量が大である傾向にあった。固形物重量ベースでの濃度は、河川底泥の報告値と同等またはそれ以上の傾向が見られたことから、雨天時に河川に輸送されるSS等の固形性物質が、河川底泥中で検出される香料・紫外線吸収剤の排出源となっている可能性が考えられた。香料・紫外線吸収剤は、医薬品類とは異なり、表皮等に外用される割合が高いことから、その排出先が主として下水であるとは限らないと考えられ、多様な経路で都市の表面流出水中に移行するものと推測された。



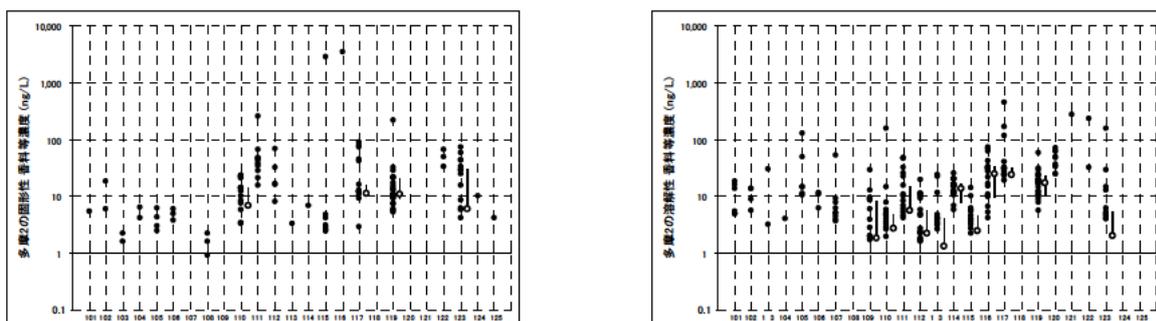
(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%~75%値を示す。)

図3-12 (1) 都市の雨天時表面流出水中の香料等濃度 (観見1)



(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%~75%値を示す。)

図3-12 (2) 都市の雨天時表面流出水の香料等濃度 (多摩1)



(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%～75%値を示す。)

図3-12(3) 都市の雨天時表面流出水中の香料等濃度(多摩2)

3-3-4 畜産・浄化槽排水の影響を受ける河川・湖沼調査

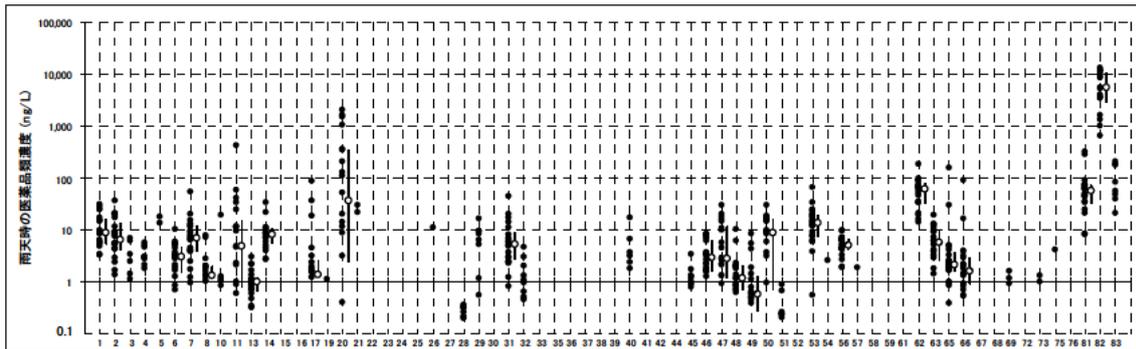
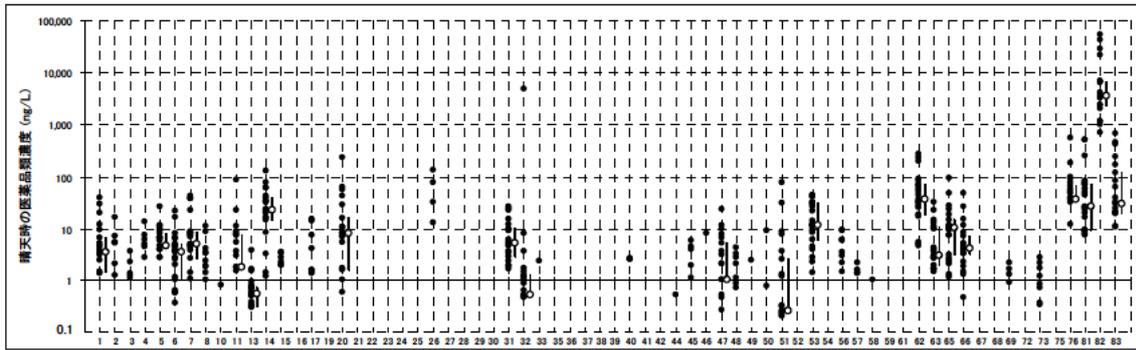
畜産・浄化槽排水の影響を受ける河川・湖沼水中のPPCPsの濃度について、LC/MS/MSで測定した医薬品・日用品類の固形性および溶解性濃度を図3-13に示し、GC/MSで測定した香料・紫外線吸収剤の固形性および溶解性濃度を図3-14に示した。以下に、結果の詳細を述べる。

(1) 医薬品・日用品類(LC/MS/MS測定物質)

(1) 医薬品・日用品類(LC/MS/MS測定)

測定結果の全体的な傾向として、浄化槽・市街地排水の影響を受けている河川(山王川)では、人用抗生物質をはじめとして、下水処理水が放流されている河川でよく検出される医薬品類が同様に検出されていた。また、畜産排水の影響を受けている河川(鉾田川)では、動物医薬品などが高濃度に検出される一方で、人用医薬品・日用品類の検出頻度は低く、低濃度であった。雨天時と晴天時の比較では、浄化槽排水由来と考えられる人用医薬品等は雨天時に濃度が低下する傾向が見られたが、畜産排水由来と考えられる動物医薬品は雨天時においてより高濃度となる場合があった。従って、人用医薬品等は一定量が排出されている中で雨天時に河川水量が増加することにより濃度が低下するものと考えられた。逆に動物医薬品等は、排出された物質の一部が晴天時に流域に蓄積して雨天時に一挙に流出する可能性が示唆された。

園部川・巴川では浄化槽排水と畜産排水の両方の影響が見られ、中間的傾向にあった。霞ヶ浦においては、河川流入部に近い地点では多くの物質が検出されたが、湖心では低濃度または不検出の物質が多かった。しかし、低濃度ながらもサルファ剤のC31 Sulfamethoxazole、抗てんかん薬のC65 Carbamazepineおよび代謝物(C66)、日用品のC82 Caffeine、C83 Nicotine等が検出され、PPCPsが湖心にまで到達して残留していることが確認された。



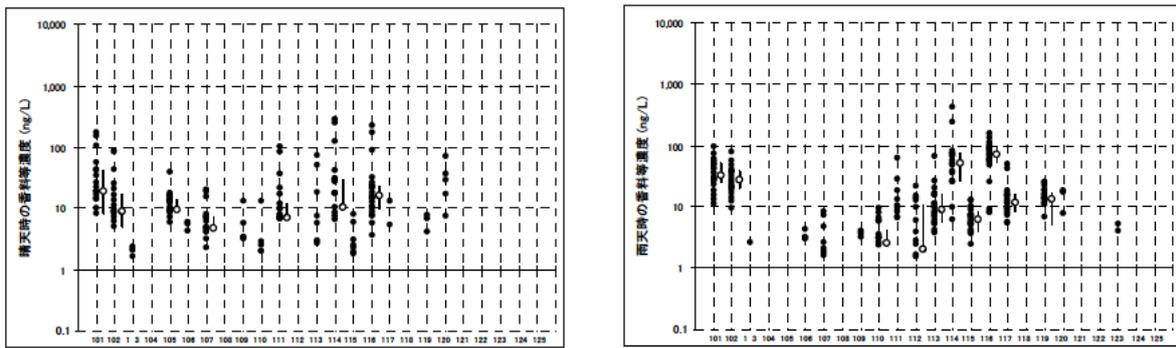
(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%～75%値を示す。)

図3-13 霞ヶ浦流域の河川湖沼の医薬品類濃度

(2) 香料・紫外線吸収剤 (GC/MS 測定物質)

測定結果の全体的な傾向として、浄化槽排水の影響を受けている河川水中の香料・紫外線吸収剤の濃度は、下水処理水が放流されている河川水と同程度であった。香料については、多環状ムスクのC101 HHCb, C102 AHTN, C105 AHMI, ニトロムスクのC107 Musk ketone, 芳香族アルコールエステルのC109 Benzyl salicylate, シクロペンタンのC114 Methyl dihydrojasmonate (Hedion), 環状テルペンアルコールのC116 Terpineol等が検出され、特に山王川流域で最も高濃度となる場合が多かった。

湖沼水では、C116 Terpineolが全地点で検出された他は、C101 HHCb, C102 AHTN, C107 Musk ketoneが桜川沖や巴川沖で検出されるなど、少数の検出事例はあったものの、検出濃度および頻度ともに河川水よりは低かった。紫外線吸収剤については、晴天時にベンゾフェノン誘導体のC120 Benzophenon-3が主に山王川流域の河川水で検出されたが、湖沼水では不検出であった。雨天時には河川水中で桂皮酸誘導体のC117 EHMCが晴天時よりも高頻度・高濃度で検出され、固形性での存在割合も高かった。EHMCは物性として固形性で存在する割合が高い傾向があることから、晴天時に河川底泥等に堆積したものが雨天時に流出している可能性が示唆された。これらより、霞ヶ浦流域では、浄化槽・市街地排水の影響が大きい山王川流域において特に香料・紫外線吸収剤が高い濃度で検出されるが、湖沼では濃度が低下するものと考えられた。また、紫外線吸収剤の検出例は少なかったが、調査時期が冬季であったため、使用量が少ないことにより低濃度であった可能性も考えられた。



(横軸はC1等の物質番号を示す。●は個別のデータを示す。その右横の○は中央値、上下の縦棒は25%～75%値を示す。)

図3-14 霞ヶ浦流域の河川湖沼の香料等濃度

3-3-5 希土類元素を指標物質とした河川調査

希土類元素の測定結果について、鶴見川・多摩川について図3-15および図3-16に、霞ヶ浦について図3-17に、銚田川・園部川について図3-18に、銚田川の畜産施設の下流について図3-19に、園部川の畜産施設の下流について図3-20に、それぞれ示した。また、参考として下水処理水の結果を図3-19にあわせて示した。

ここで希土類元素濃度はNASC (North American Shale Composite) により標準化した^{H21-8,9)}。Gdアノマリーは以下の通り産出した。

$$\text{Gd(SN)/Gd(SN)*} = \text{Gd(SN)} / (\text{Sb(SN)} \times 0.33 + \text{Tm(SN)} \times 0.67)$$

ここでGd(SN)は実測したGd濃度のNASC標準化値であり、Gd(SN)*は地質由来のNASC標準化濃度の推定値として、Gdの近傍の希土類元素(Sb, Tm)のNASC標準化濃度より比例計算で算出した^{H21-1)}。Gdアノマリーが13以上の場合に、人為起源Gd汚染が疑われると報告されている。

図3-15より、鶴見川および多摩川を夏季および秋季に調査した結果、上流で都市排水の影響が少ない地点では、Gdアノマリーは1.3未満であり、下流で都市排水の影響が大きい地点ではGdアノマリーが2.4～15となっていた。従って、Gdアノマリーを把握することで、都市排水の影響が明確に判断できることから、Gdが指標物質として有効であることが分かった。

図3-16より、畜産排水自体および畜産排水が流入している小河川においては、高濃度のPPCPsが検出されるにもかかわらず、Gdアノマリーは1.3未満であり、人為起源Gdはほとんど含まれていないことが分かった。従って、Gdを指標物質とすることで、都市排水の影響の有無を判断できることが明らかとなった。

図3-17より、銚田沖ではGdアノマリーが1.2であり、湖心、園部川沖、土浦沖の3点ではいずれもGdアノマリーが1.4～1.5であった。従って、銚田沖では人為起源Gdはほとんど存在せず、他の3点では人為起源Gdが存在すると考えられた。銚田川は畜産の影響が大きい河川であり、都市的な人為起源汚染の影響が少ないため、他の地点と異なっていたと推測された。湖心でも人為起源Gdが存在することは、霞ヶ浦が都市的なPPCPs汚染の影響を広範囲で受けていることを示唆していた。

また、畜産排水の影響が大きい銚田川においても、浄化槽排水の影響も含まれており、また動物とヒトに共通して使用されるPPCPsも存在するため、PPCPs汚染の起源は必ずしも明確に判断できない場合もあるが、人為起源Gdを調べることにより、畜産排水の影響が主体なのか、下水処理水や浄化槽排水の影響が主体なのかを判断しやすくなるものと考えられた。

以上の検討結果より、希土類を測定して Gd アノマリーを把握することで、人為起源 Gd の存在状況が分かり、都市排水の影響を受けているかどうか判断できることが確認できた。従って都市的な PPCPs 汚染の指標物質としての Gd の有効性が明らかとなった。

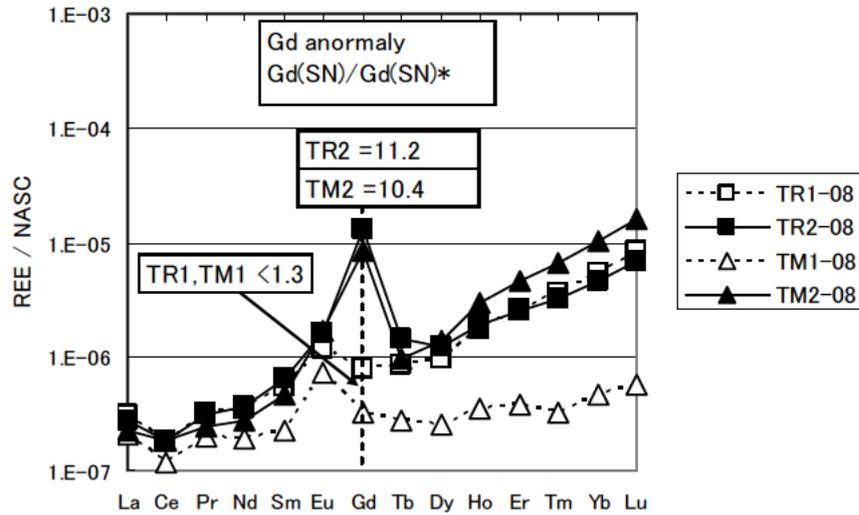


図3-15 鶴見川・多摩川の希土類元素の濃度分布（夏季）

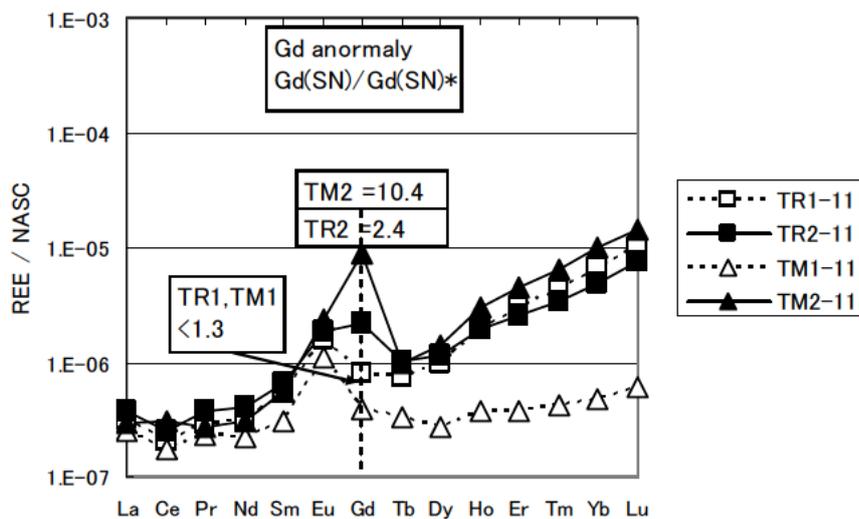


図3-16 鶴見川・多摩川の希土類元素の濃度分布（秋季）

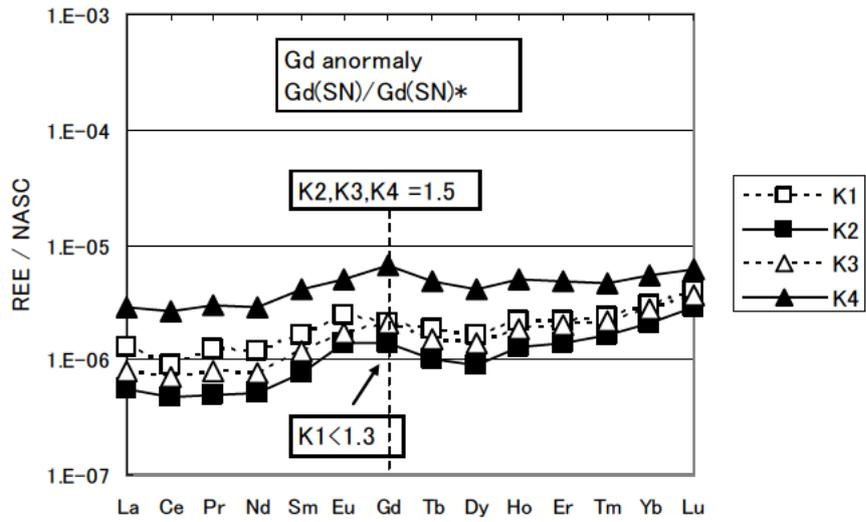


図3-17 震ヶ浦の希土類元素の濃度分布

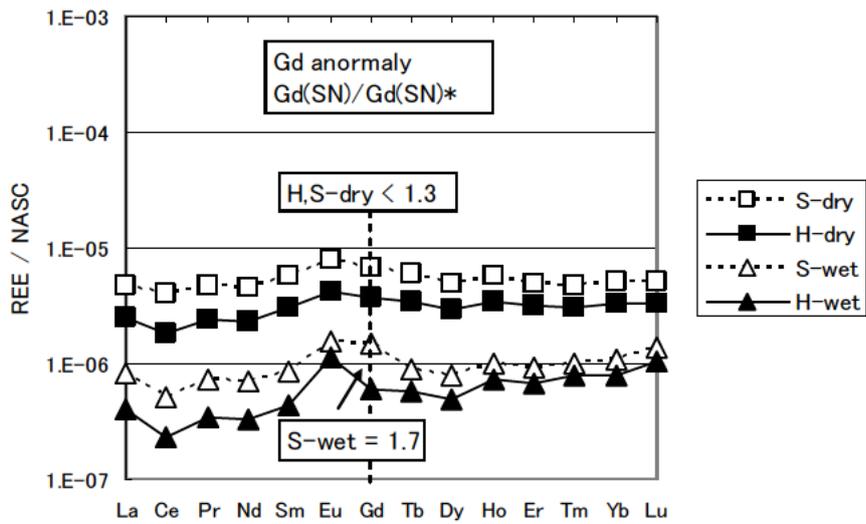


図3-18 園部川, 銚田川の希土類元素の濃度分布 (晴天時および雨天時)

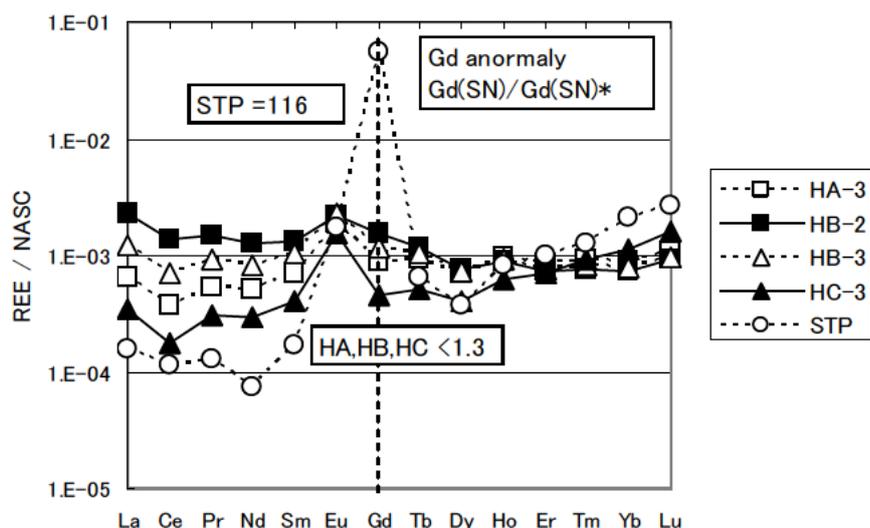


図3-19 銚田川流域の畜産施設の下流の希土類元素の濃度分布（下水処理水含む）

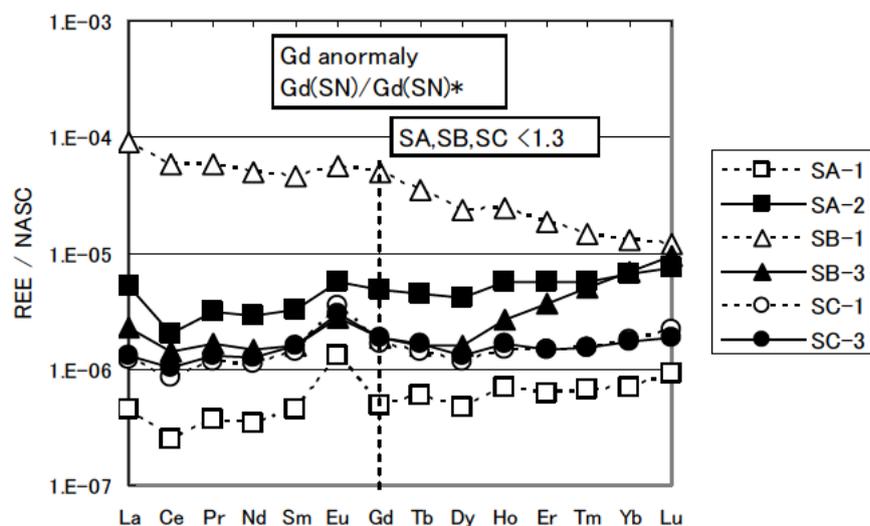


図3-20 園部川流域の畜産施設の下流の希土類元素の濃度分布

3-4 流域における挙動の解明

3-4-1 都市排水由来のPPCPsの河川における挙動の解明

(1) 流域特性

鶴見川流域では、6地点中4地点（寺家橋、浅山橋、落合橋、亀の子橋）は上流～中流側であり下水処理水等の都市排水の流入の影響を受けており、他の2地点（鳥山、高田橋）はそうした影響のより少ない支流に存在していた。

多摩川流域では、7地点中2地点（調布橋、東秋留橋）は都市排水影響の少ない上流側で比較的清浄な水質であり、3地点（日野橋、高幡橋、石原）は下水処理水等の都市排水の流入の影響を強く受けてやや水質が悪化しており、残り2地点（浅川橋、報恩橋）はそうした影響のより少ない支流で中間的な水質の傾向であった。

こうした流域特性をふまえて、個別の物質について検討した結果を（2）以降に示す。

(2) 物質ごとの特性

1) Clarithromycin (マクロライド系抗生物質) の挙動

Clarithromycin の検討結果を鶴見川について図3-21, 多摩川について図3-22にそれぞれ示す。両方の流域で、夏期よりも冬期の方が高濃度であったことから、Clarithromycin は感染症が流行する冬期により多く使用される抗生物質であり、環境中濃度も高くなるものと推測された。

鶴見川流域では、Clarithromycin は全地点から検出されたが、都市排水影響を受ける4地点は、そうでない支流2地点より2オーダー程度高い濃度を示した。

多摩川流域では、Clarithromycin は清浄な水質の2地点では不検出であり、他の5地点では全て検出されたが、都市排水影響を強く受ける3地点は、そうでない支流2地点より1オーダー程度高い濃度を示した。

これらの結果より、鶴見川および多摩川流域においては、河川水中の Clarithromycin は主として都市排水由来であると推測され、河川に放流された後もすぐに分解されずに、河川をある程度流下するものと考えられた。

2) Levofloxacin (ニューキノロン系抗生物質)

Levofloxacin の検討結果を鶴見川について図3-23, 多摩川について図3-24にそれぞれ示す。両方の流域で、夏期よりも冬期の方がやや高濃度であったが顕著な差ではなかったことから、Levofloxacin は通年的に使用される抗生物質であり、環境中濃度の季節変動も少ないものと推測された。

鶴見川流域では、Levofloxacin は都市排水影響を受ける4地点ではほぼ常に検出され、特に浅山が夏期冬期ともに最も高濃度であったが、都市排水影響の少ない支流2地点は常に不検出であった。

多摩川流域では、Levofloxacin は都市排水影響を強く受ける3地点では冬期は常に検出され、夏期も2地点で検出された。清浄な水質の2地点および中間的な水質の2地点では夏期冬期ともに常に不検出であった。

これらの結果より、鶴見川および多摩川流域においては、河川水中の Levofloxacin は Clarithromycin と類似した挙動を示すものの、濃度および検出頻度はやや低くなっていると考えられた。これは、Clarithromycin が Levofloxacin より出荷量で約3倍、排泄量で約2倍大と推定されることから、河川への放出量の違いを反映しているものと推測された。

3) Sulfamethoxazole (サルファ剤)

Sulfamethoxazole の検討結果を鶴見川について図3-25, 多摩川について図3-26にそれぞれ示す。鶴見川流域では冬期よりも夏期の方がやや高濃度で、多摩川流域では逆の傾向であったが、いずれも顕著な差ではなかったことから、Sulfamethoxazole は通年的に使用される抗生物質であり、環境中濃度の季節変動も少ないものと推測された。

鶴見川流域では、Sulfamethoxazole は都市排水影響を受ける4地点ではほぼ常に検出され、都市排水影響の少ない支流2地点よりも1オーダー以上高濃度であった。多摩川流域では、Sulfamethoxazole は都市排水影響を強く受ける3地点でほぼ常に検出され、中間的な水質の2地点でも1オーダー以上低いもののほぼ常に検出された。清浄な水質の2地点のうち、最上流の調布橋ではほぼ常に不検出であったが、東秋留橋では微量ながらほぼ常に検出された。

これらの結果より、鶴見川および多摩川流域においては、河川水中の Sulfamethoxazole は Clarithromycin や Levofloxacin と類似した挙動を示すものの、都市排水影響の少ない清浄な水質が想定される地点でもしばしば検出されることが明らかとなった。Sulfamethoxazole は人および動物用の医薬品として用いられており、都市域以外での排出の可能性も考えられた。

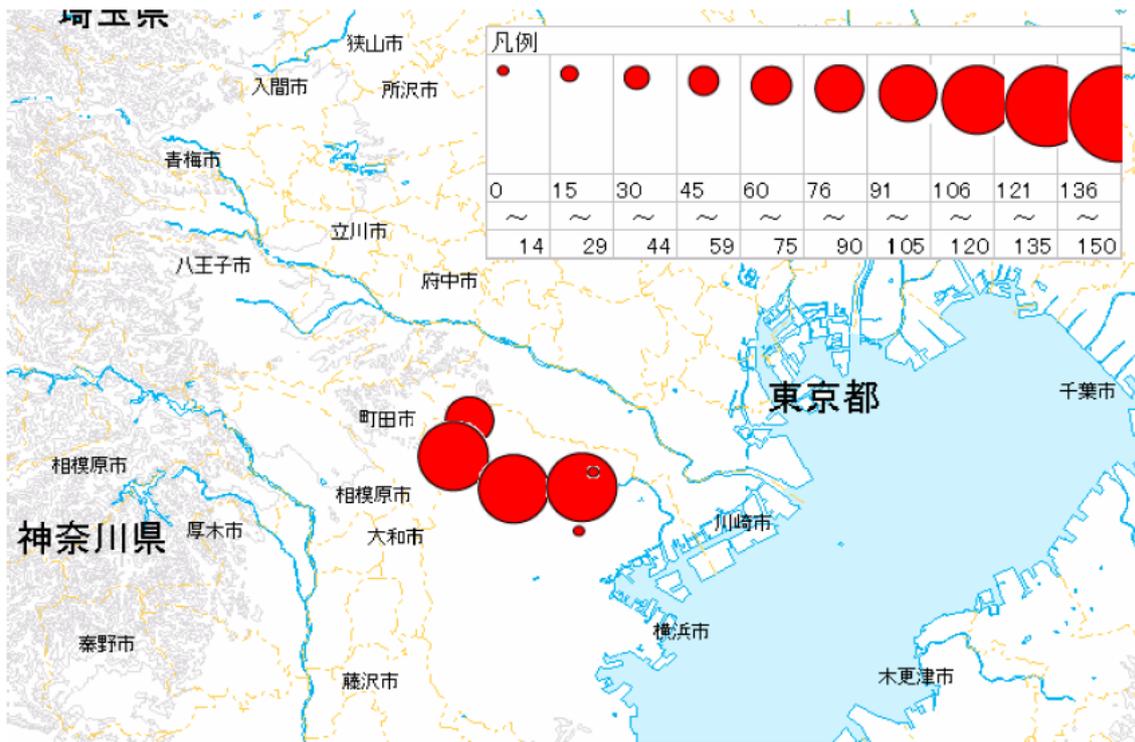


図3-21 (1) 鶴見川流域のClarithromycinの挙動(夏期)

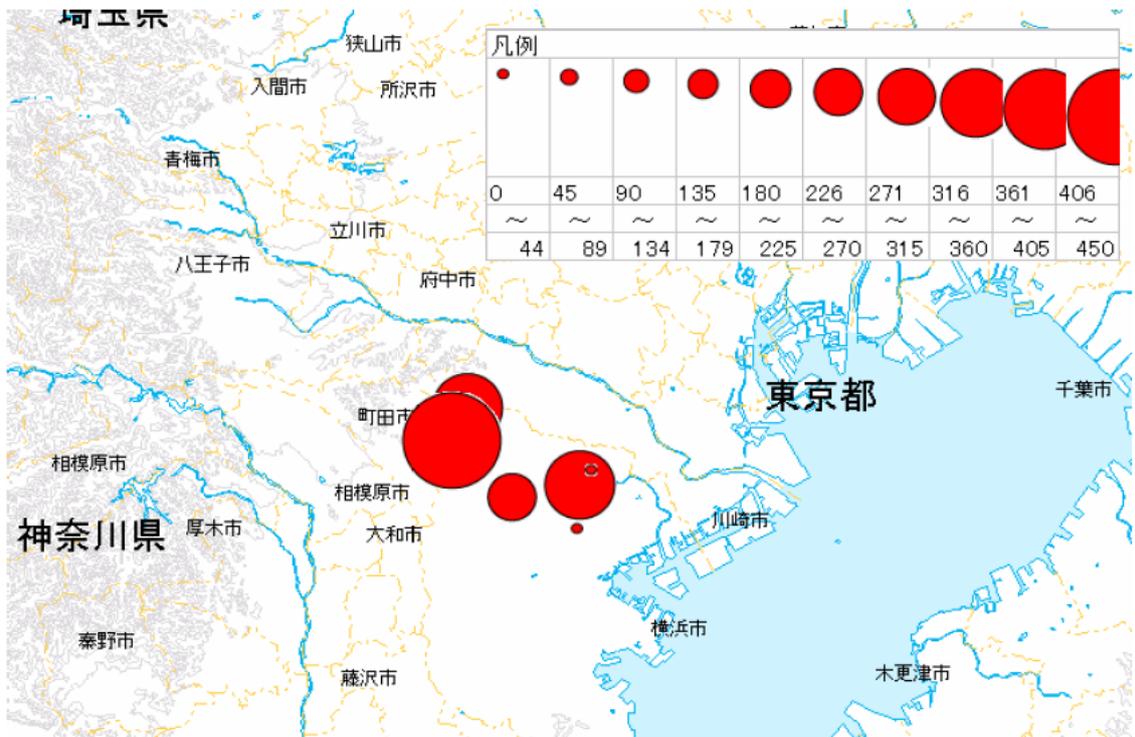


図3-21 (2) 鶴見川流域のClarithromycinの挙動(冬期)

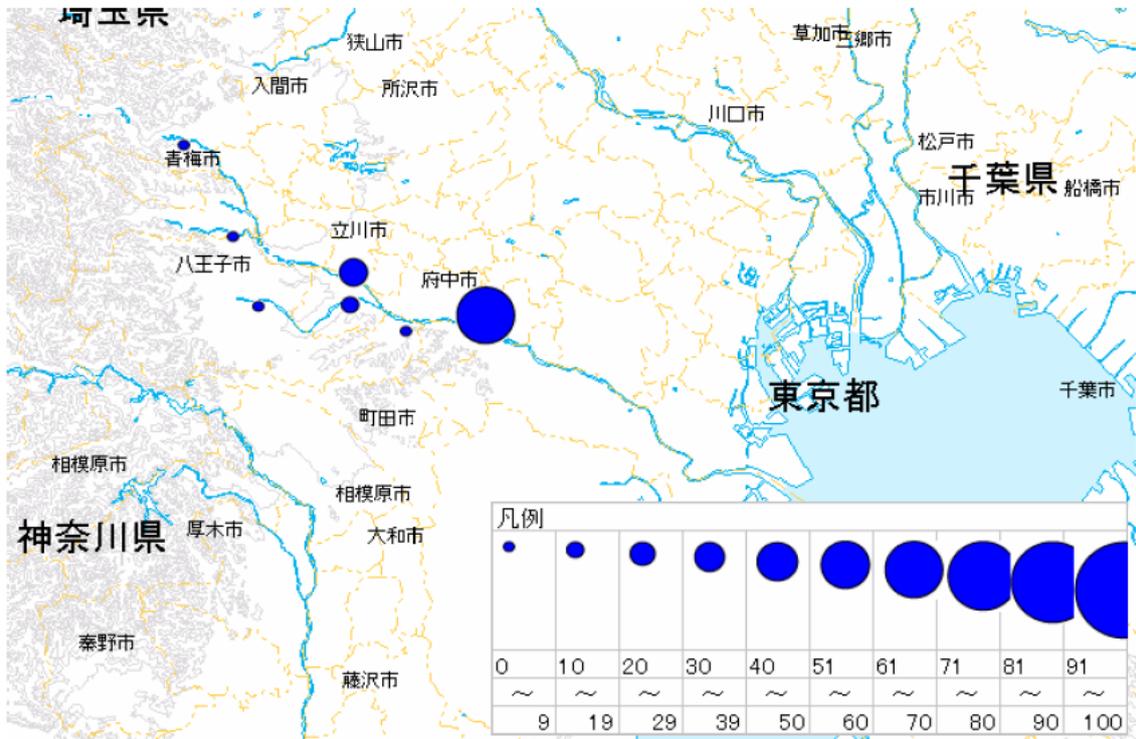


図3-22 (1) 多摩川流域のClarithromycinの挙動(夏期)

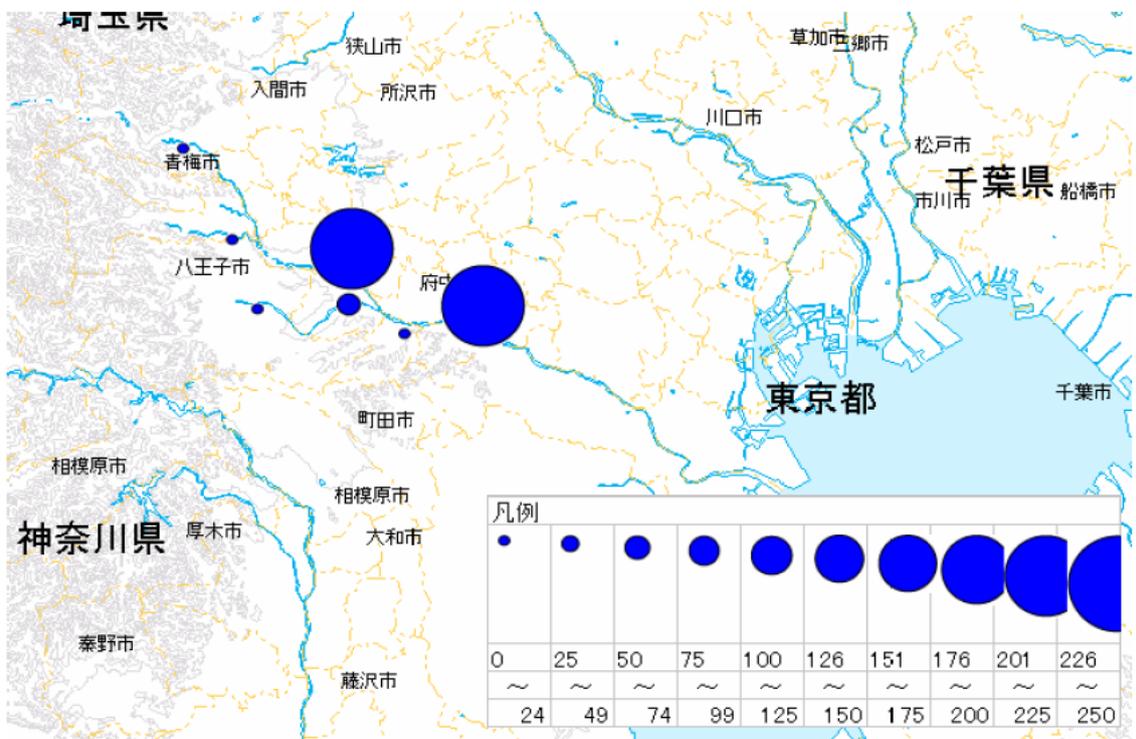


図3-22 (2) 多摩川流域のClarithromycinの挙動(冬期)

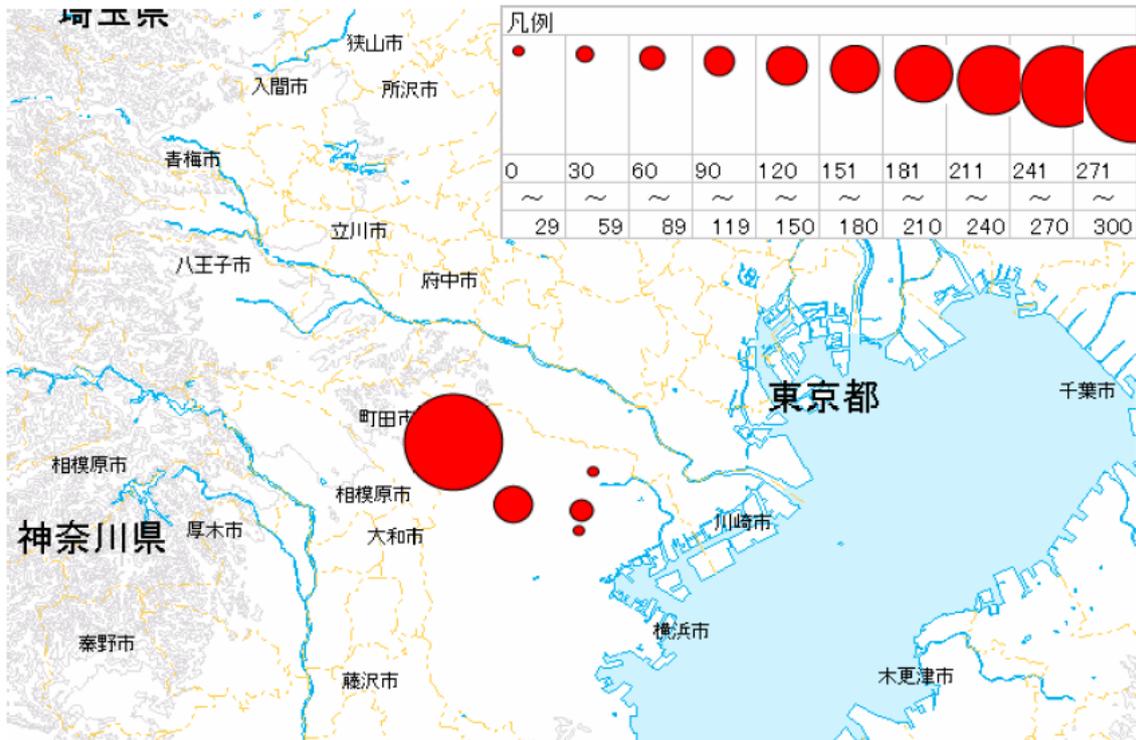


図3-23 (1) 鶴見川流域の Levofloxacin の挙動 (夏期)

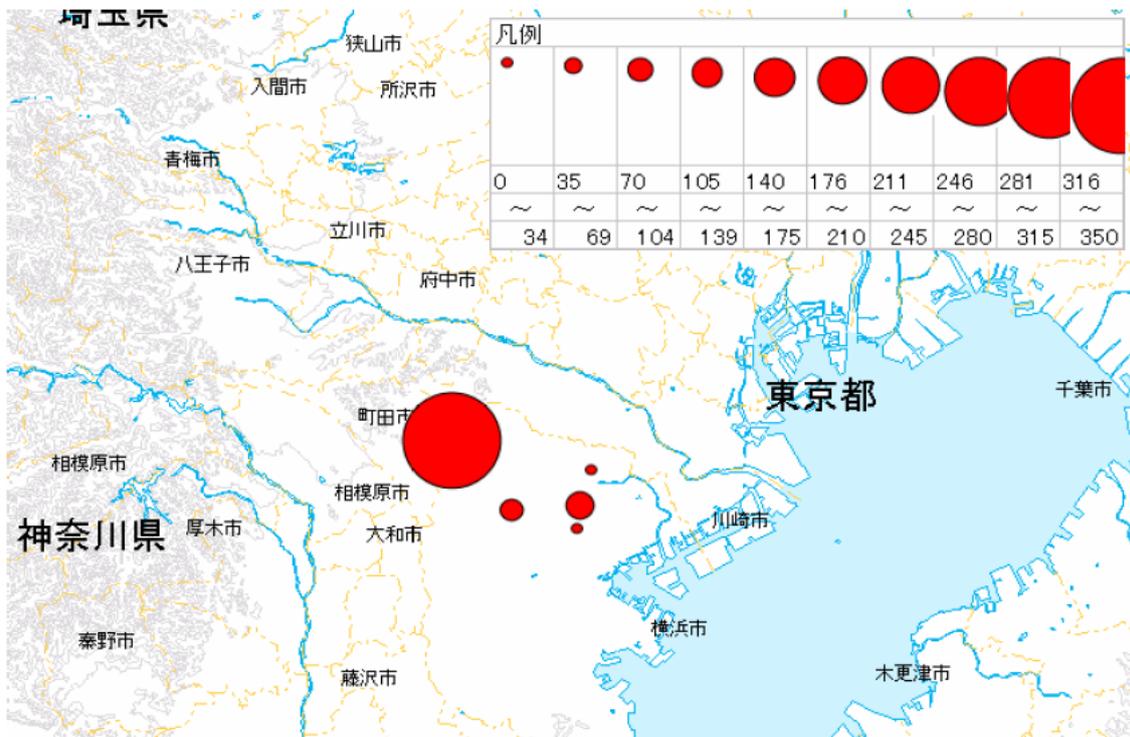


図3-23 (2) 鶴見川流域の Levofloxacin の挙動 (冬期)

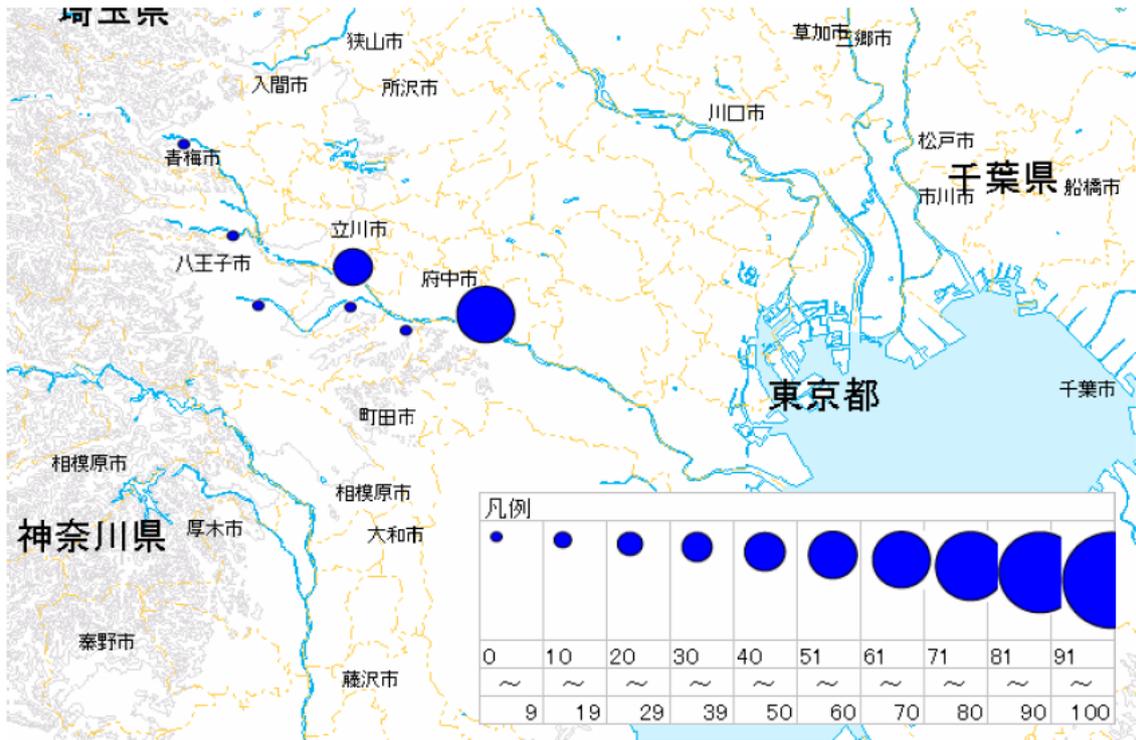


図3-24 (1) 多摩川流域のLevofloxacinの挙動(夏期)

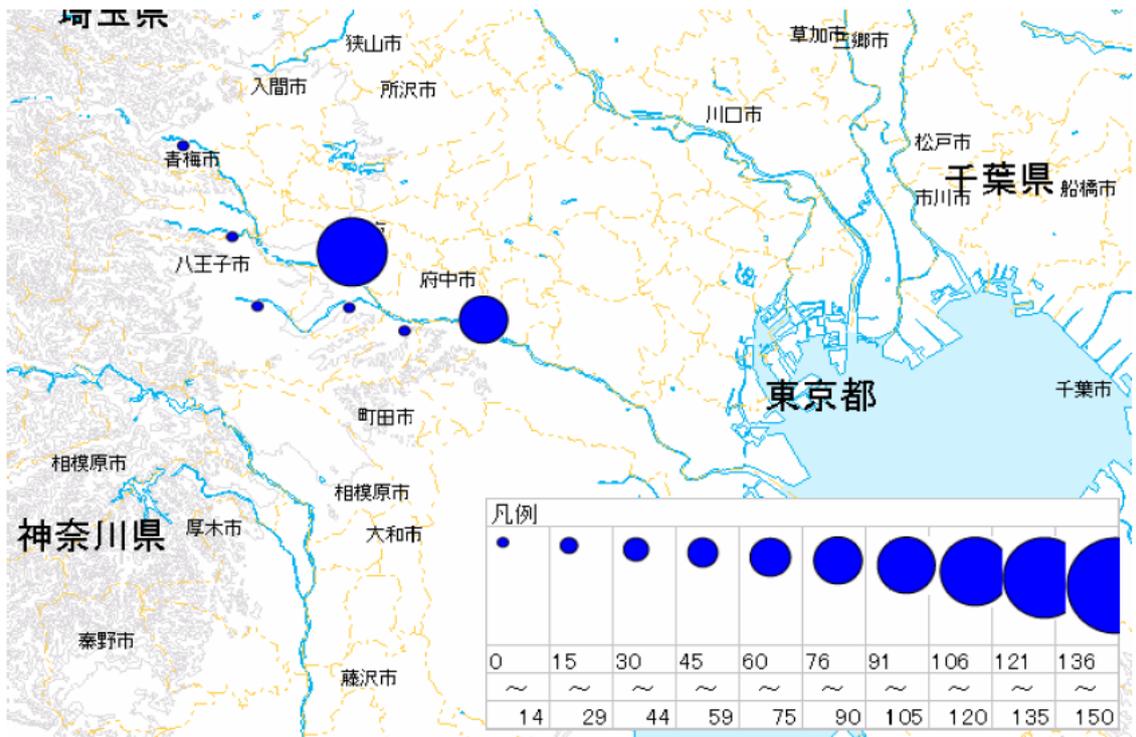


図3-24 (2) 多摩川流域のLevofloxacinの挙動(冬期)

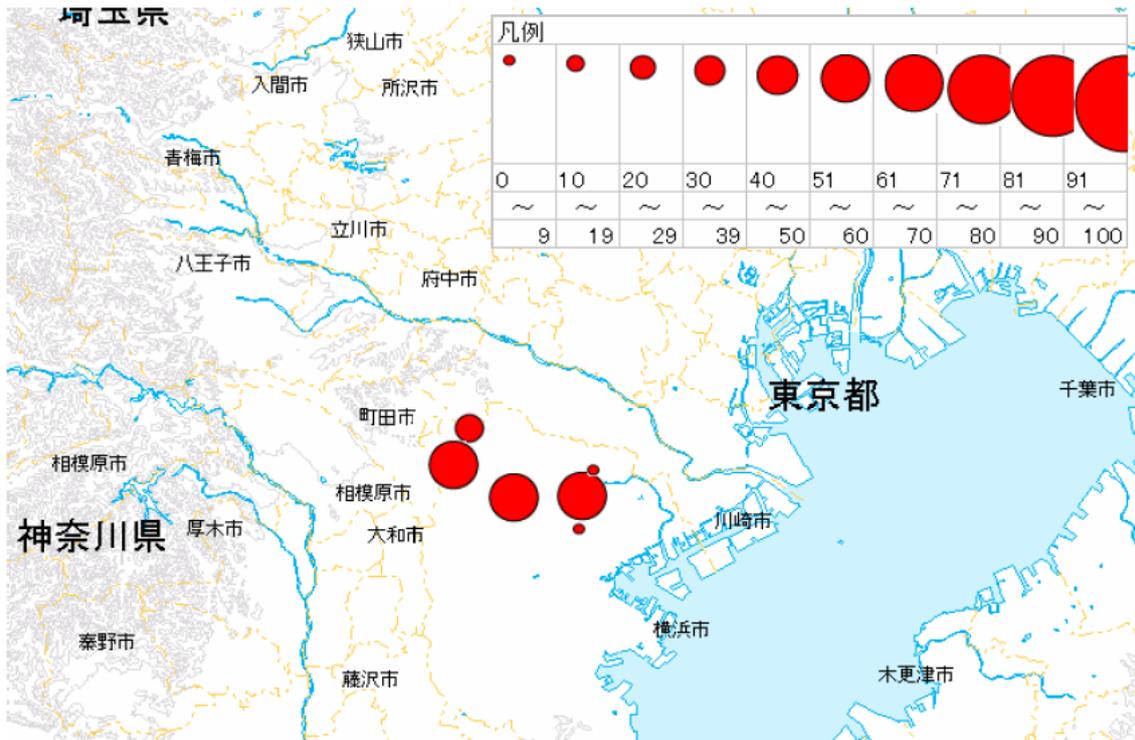


図3-25 (1) 鶴見川流域の Sulfamethoxazole の挙動 (夏期)

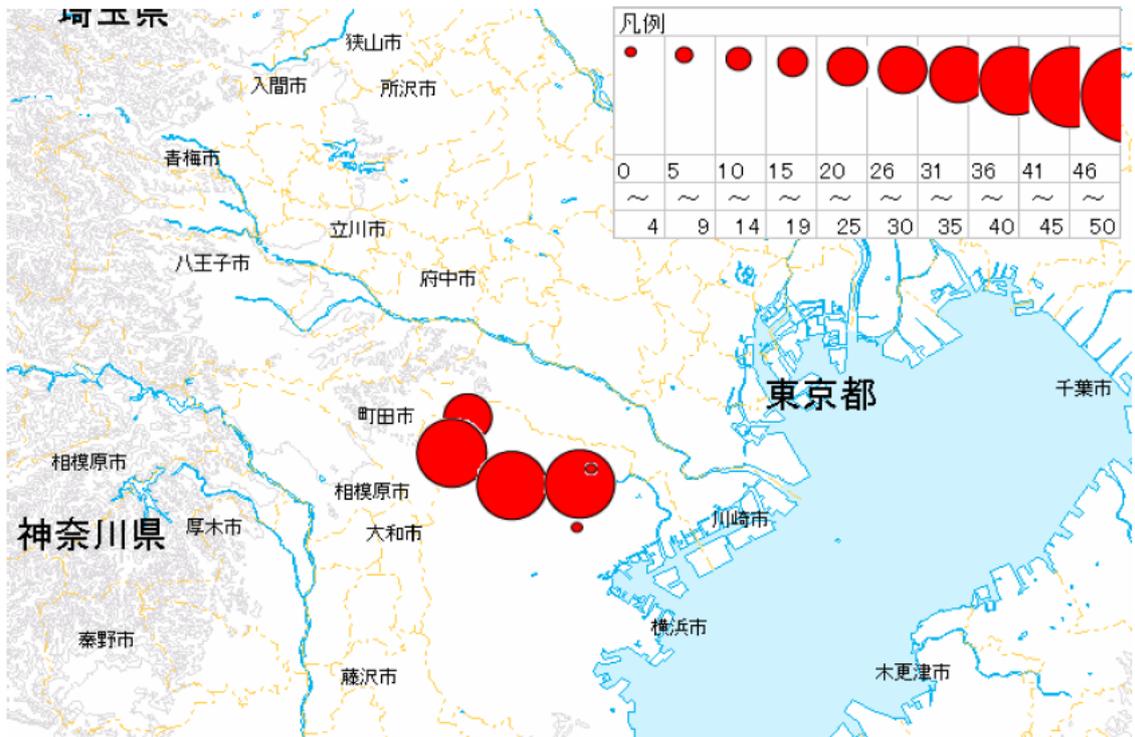


図3-25 (2) 鶴見川流域の Sulfamethoxazole の挙動 (冬期)

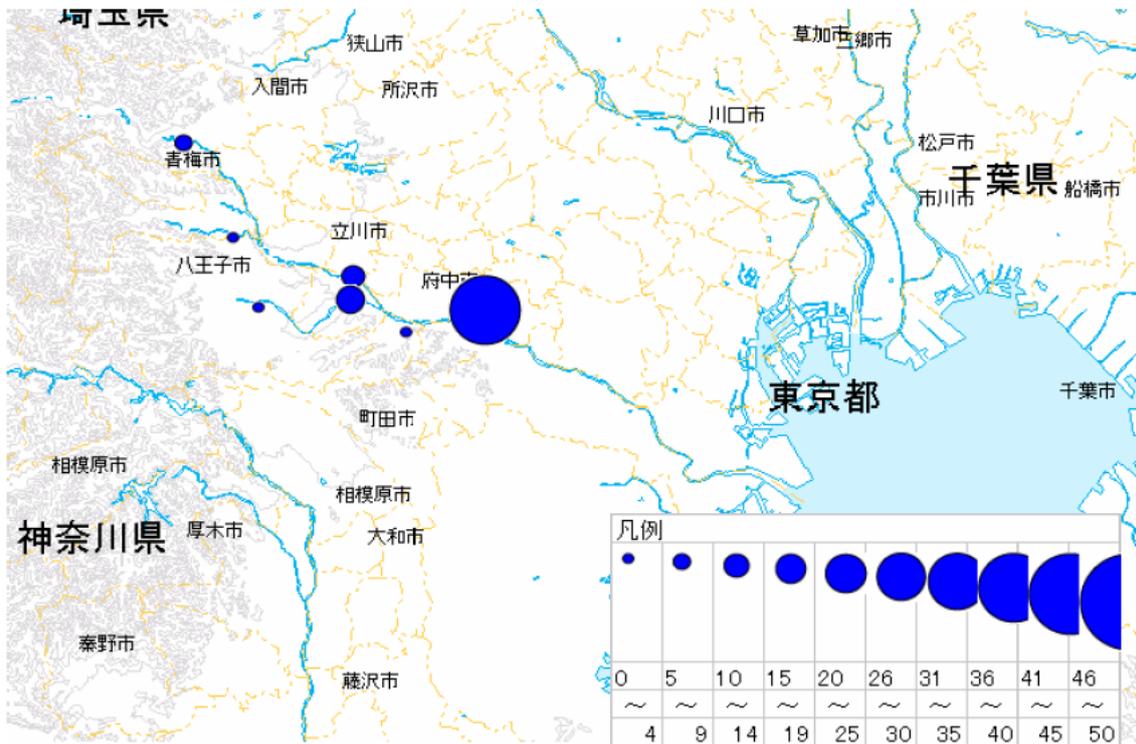


図3-26 (1) 多摩川流域の Sulfamethoxazole の挙動 (夏期)

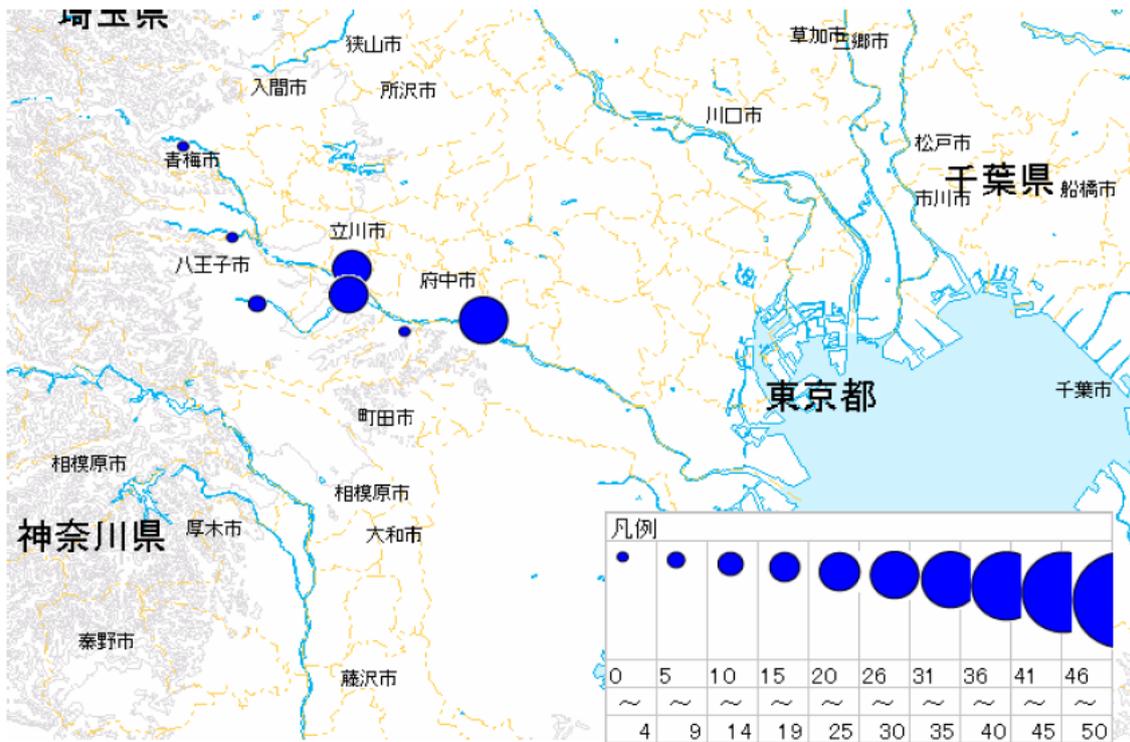


図3-26 (2) 多摩川流域の Sulfamethoxazole の挙動 (冬期)

3-4-2 浄化槽・畜産排水由来のPPCPsの河川・湖沼における挙動の解明

(1) 流域特性

霞ヶ浦流域には、下水道整備が進んでいない地域が残っており、特に山王川流域は浄化槽・市街地排水の影響が強いとされている。また、銚田川は畜産影響が強いとされており、園部川、巴川でも下水道以外の影響が強いと考えられる。恋瀬川、清明川、小野川、桜川は霞ヶ浦に流入する主要河川である。湖内においては、西浦に5地点があり、桜川沖（土浦入り）は桜川の影響を受けやすい湖岸に近い位置にあり、高崎沖（高浜入り）は恋瀬川および山王川の影響を受けやすい湖岸に近い位置にある。園部川沖（高浜入り）は、湖岸より離れているが園部川の影響を受ける位置にあり、玉造沖（高浜入り）はより湖内に入った位置にある。湖心は湖岸より遠く、流入水質の影響を減少していると考えられる位置にある。巴川沖は北浦にあり、銚田川および巴川の影響を受けやすい位置にある。外浪逆浦は、西浦および北浦となっており両者の影響を受けると考えられる。

こうした流域特性をふまえて、個別の物質について検討した結果を(2)以降に示す。

(2) 物質ごとの特性

1) Lincomycin（リンコマイシン系抗生物質）の挙動

C20 Lincomycinの検討結果を、溶解性濃度の挙動について図3-27(a)に、輸送量について図3-28の(a)にそれぞれ示す。動物用医薬品であり、畜産影響が強いとされる銚田川で高濃度が予想されたが、晴天時には園部川流域が最も高濃度（約63~240mg/L）であり、1オーダー以上低い10ng/L付近の濃度で、銚田川、巴川、桜川で検出された。一方、雨天時には銚田川が最も高濃度であり、最大で約2 μ g/Lとなり晴天時の200倍程度であった。

銚田川では、本流の上流側の地点（No.9 駒木根橋下流）よりも、そこへ合流する前の支流の地点（No.8 安房合流前）の方が高濃度であり、下流の地点（No.10 富士橋）において検出された濃度は主として支流からの寄与によるものと考えられた。

園部川では、上流の大手橋よりも下流の園部大橋で低濃度であったことから、大手橋より上流部でLincomycinが多く排出されているものと考えられた。

湖内では、西浦の園部川沖、玉造沖で約29ng/L、約44ng/Lで検出されているのは園部川の影響と考えられ、桜川沖で約5ng/Lで検出されているのは桜川の影響と考えられるが、恋瀬川および山王川で1~2ng/L程度にもかかわらず、高崎沖で約16ng/Lで検出されている理由は不明である。

また、北浦の巴川沖で約56ng/Lで検出されているのは巴川および銚田川の影響と考えられるが、流入河川よりも湖内濃度が高くなる理由は不明であり、他の小さな流入河川などで高濃度の流入がある可能性も考えられた。

湖心においても約11ng/Lで検出されていることから、Lincomycinは湖へ連続的に供給されていること、水環境中での分解が比較的遅く湖への流入後に速やかに分解されることなく湖心にまで到達していることが推定され、流域での挙動に注意する要する物質であると考えられた。

輸送量については、山王川、園部川、巴川および銚田川の最下流地点での合計値として、晴天時で約80 μ g/s、雨天時で約3.9mg/sおよび約1.2mg/s（約6時間後）であり、雨天時に大幅に増加した。流量の合計が晴天時で4.0m³/s、雨天時で9.4m³/sおよび6.6m³/s（約6時間後）であり、降雨による流量増加は約2.3倍にしか達していないが、Lincomycinの輸送量は約49倍になっている。従って、晴天時に流域で排出されたLincomycinが河川まで流達せずに蓄積しており、雨天時に一挙に流出しているのではないかと考えられた。

輸送量が最も多かったのは、園部川であり（No.5 園部大橋で約3mg/s）、次いで銚田川（No.10 富士橋で約0.65mg/s）であった。銚田川の方が高濃度であったが、園部川の方が流量が大であったため、輸送量で上回った。銚田川では、上流の支流のNo.8 安房合流前の方が最下流のNo.10 富士橋よりも高濃度かつ輸送量も多く、雨天時には晴天時の約3倍の

流量で約 450 倍の輸送量となったことから、雨天時に Lincomycin が大量に流出する排出源を抱えた流域特性を有するものと考えられた。

Lincomycin は主として動物用の抗生物質であり、統計によると年間生産量 17.2t の大半は犬猫用であるが、約 0.3t が豚にも使用されている。仮に犬猫用に使用されたものが流出しているのであれば、地域に大きな偏りなく検出されるはずであるが、実際には園部川や鉾田川流域で特異的に高濃度に検出されていることから、畜産（豚）に集中的に使用された Lincomycin が、雨天時に流出している可能性が示唆された。

2) Clarithromycin（マクロライド系抗生物質）の挙動

Clarithromycin の検討結果を、溶解性濃度の挙動について図 3-27(b)に、輸送量について図 3-28の(b)にそれぞれ示す。まず晴天時の結果については、人用医薬品であることから、浄化槽・市街地排水の影響が強い山王川流域でも高濃度（約 61~130ng/L）であった。それ以外の河川でも、約 15ng/L~42ng/L の範囲の全地点で検出されていることから、Clarithromycin が広く使用されて排出が広範囲でなされていることが分かった。

また、畜産排水の影響が大きい鉾田川では約 15~21ng/L であったのに対して、山王川では約 61~130ng/L、園部川では約 33~40ng/L、桜川では約 42ng/L であり、浄化槽排水の影響が大きいと考えられる流域で、より高濃度であると考えられた。

湖沼では、湖心を除く各地点で検出された。桜川沖が約 79ng/L で最も高濃度であり、桜川の影響を受けているものと考えられた。次いで巴川沖で約 22mg/L で検出されており、主として巴川の影響を受けているものと考えられたが、恋瀬川および山王川の影響を受ける高崎沖ならびに園部川の影響を受ける園部沖、さらに湖内よりの玉造沖では、流入河川の濃度が巴川よりも高いにもかかわらず湖水濃度は約 1~3ng/L と低い値であり、その理由は不明であった。湖心では不検出であったことから、河口部から離れると速やかに濃度が減少する可能性が考えられた。

従って、Clarithromycin は水環境中での残留性はあまり高くなく、湖心までほとんど到達しないものの、多量に使用されて排出されているために河川水中では高濃度となり、湖水中でも河川流入部近くでは高濃度となっていると推定され、市街地排水等の影響を受けている近傍の地点では注意が必要な物質であると考えられた。

雨天時においては、晴天時より濃度が低下する傾向であった。輸送量は、山王川、園部川、巴川および鉾田川の最下流地点での合計値として、晴天時で約 110 μ g/s、雨天時で約 79 μ g/s および約 40 μ g/s（約 6 時間後）であり、雨天時に輸送量が増加することはなかった。従って、Clarithromycin は晴天・雨天にかかわらず定期的に河川に流出しており、雨天時には流量の増加により濃度が低下するものと考えられた。この挙動特性は、主たる排出源が浄化槽排水であるとの想定に一致している。

3) Caffeine（カフェイン）の挙動

Caffeine の検討結果を、溶解性濃度の挙動について図 3-27(c)に、輸送量について図 3-28(c)にそれぞれ示す。医薬品としても用いられているが、主として日用品（飲料等）であり、晴天時の結果では、浄化槽・市街地排水の影響が強い山王川流域で最も高濃度（約 29~55 μ g/L）であった。それ以外でも、河川の全地点で約 2.4~23 μ g/L 程度で検出されており、前述の Lincomycin、Clarithromycin に代表される他の医薬品類がせいぜい 100ng/L 程度で ng/L レベルであったのと比べて、3 オーダーほど高濃度の μ g/L レベルで存在していたことから、広範囲に排出されているものと考えられた。

鉾田川では約 2.4~3.5 μ g/L であったのに対して、山王川では約 29~55 μ g/L、園部川では約 6.8~23 μ g/L、桜川では約 7.0 μ g/L であり、市街地排水の影響が大きいと考えられる流域で、より高濃度であると考えられた。

湖沼でも全地点で検出され、巴川沖が約 3.9 μ g/L で最も高濃度であり、湖心が約 0.7 μ g/L で最も低濃度であった。巴川沖については、巴川の下流（栗野橋）で約 3.5 μ g/L、鉾田川の下流（富士橋）で約 2.4 μ g/L であり他の流入河川と比較して低濃度であることから、これらの流入河川以外の負荷源が寄与している可能性が示唆された。次いで、高崎沖が

約 3.3 $\mu\text{g/L}$ で高濃度であったが、これは山王川が最も高濃度であったことと、恋瀬川でも約 4.1 $\mu\text{g/L}$ であったことから、これらの流入河川の影響を受けているものと考えられた。

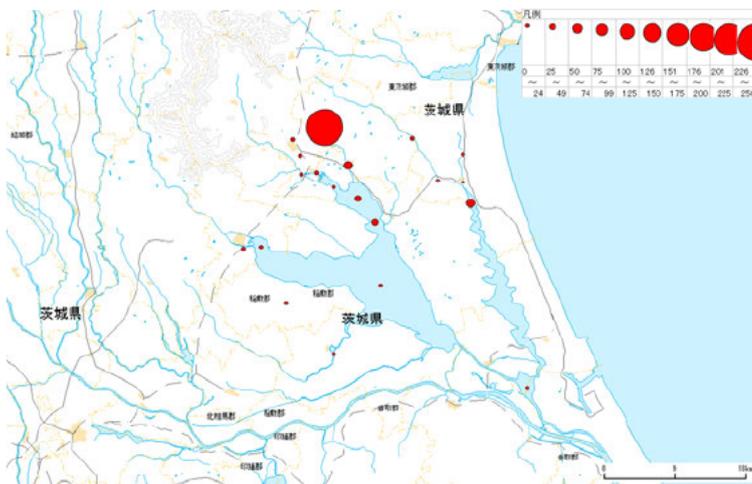
逆に、園部川の下流（園部大橋）で約 6.8 $\mu\text{g/L}$ 、桜川で約 4.2 $\mu\text{g/L}$ と高濃度であったにもかかわらず、これらの流入河川の影響を受けている園部川沖では約 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、桜川沖では約 2.1 $\mu\text{g/L}$ であり比較的 low 濃度であった理由は不明であった。

また、湖心でも、 $\mu\text{g/L}$ レベルで検出されたことから（約 0.7 $\mu\text{g/L}$ ）、高濃度で流入した Caffeine が減少しながらも湖心にまで到達していることが分かった。

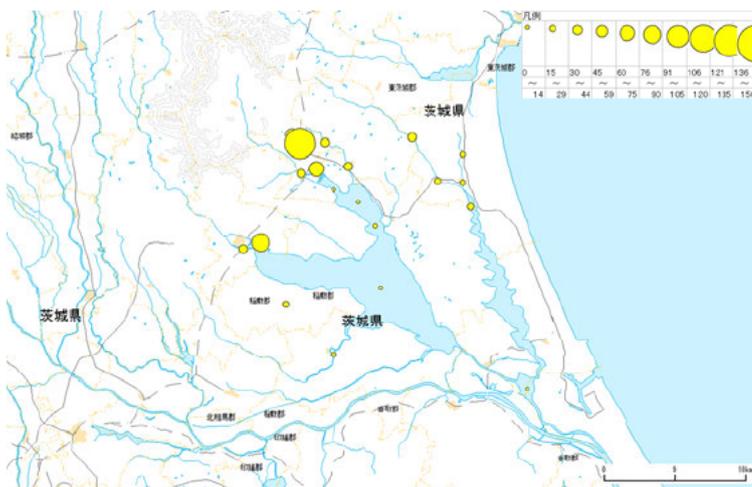
従って、Caffeine は他の医薬品類よりも 3 オーダー程度高い濃度で水環境中に存在しており、水環境中でも急速には分解されず、湖心にまで到達していることから、極めて広範囲かつ高濃度で検出される物質であることが分かった。Caffeine 自体に強い環境影響があるとの報告はないものの、高濃度・高頻度検出の特性を利用して、他の医薬品類の挙動を検討する上での指標物質として活用できる可能性が示唆された。

雨天時においては、浄化槽・市街地排水の影響が大である山王川では晴天時より濃度が低下する傾向であり、それ以外の河川では雨天時にやや増加する場面が見られた。輸送量は、山王川、園部川、巴川および鉾田川の最下流地点での合計値として、晴天時で約 23mg/s、雨天時で約 60mg/s および約 43mg/s（約 6 時間後）であった。

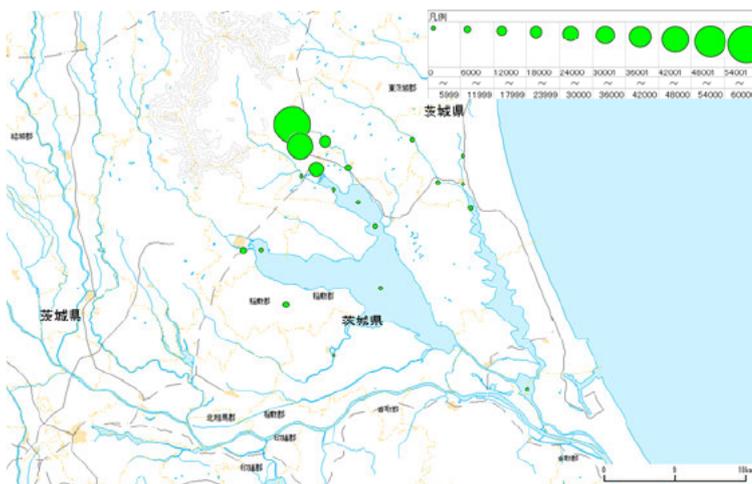
Caffeine は主として人の日用品由来と考えられることから、Clarithromycin と同様に晴天・雨天にかかわらず定期的に河川に流出しており、雨天時には流量の増加により濃度が低下するものと予想されたが、山王川以外では、雨天時に濃度が増加していた。流域内で蓄積された Caffeine が雨天時に流出している可能性も考えられるが、固形性での Caffeine 濃度は溶解性よりも大幅に低いことから、雨天時に輸送量が増加する挙動の機構は不明であった。



(a)C20 Lincomycin

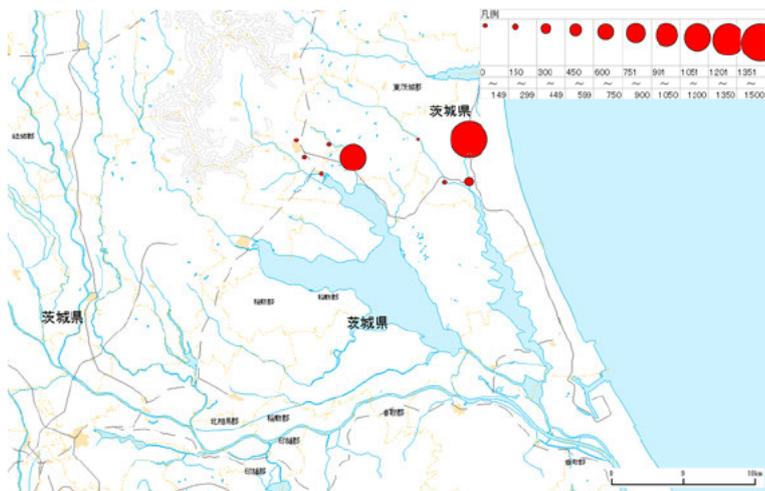


(b)C14 Clarithromycin



(c)C82 Caffeine

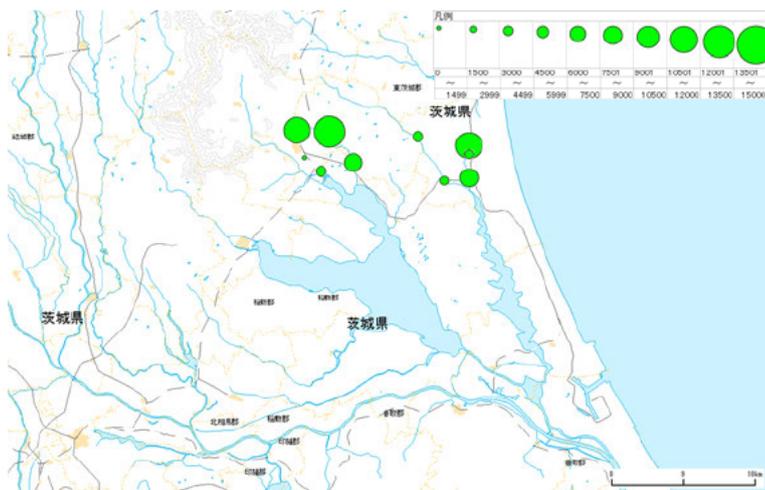
図3-27(1) 霞ヶ浦流域のPPCPs挙動(晴天時, 21地点, 溶解性濃度ng/L)



(a)C20 Lincomycin



(b)C14 Clarithromycin



(c)C82 Caffeine

図3-27(2) 霞ヶ浦流域のPPCPs挙動(雨天時, 10地点, 溶解性濃度 ng/L)

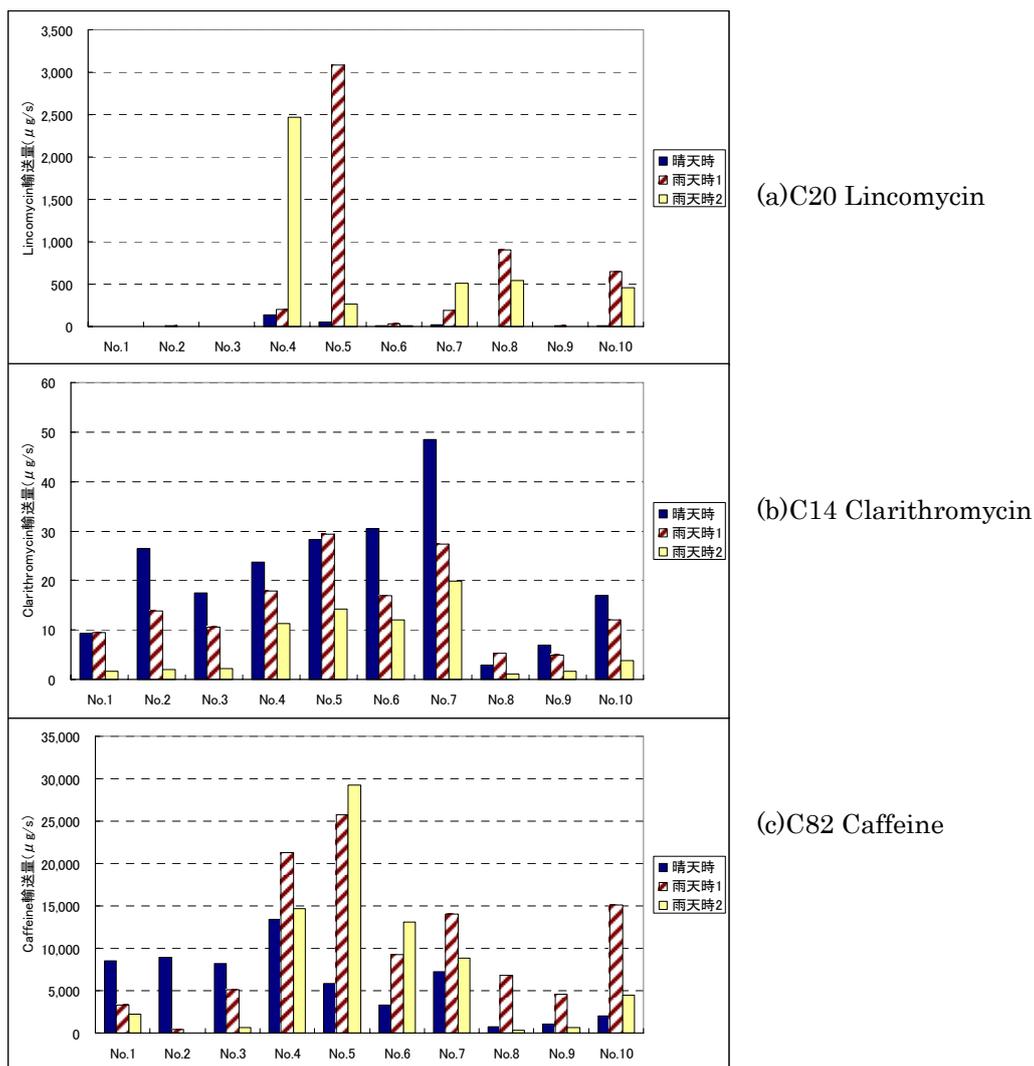


図3-28 震ヶ浦流域の河川における雨天時のPPCPsの輸送量

3-4-3 都市排水由来のPPCPsの水生生態系における挙動の解明

(1) 医薬品類の挙動

鶴見川および多摩川の河川試料および生物試料の医薬品類濃度を表3-12に示した。

これより、河川水中には、人用医薬品の抗生物質 (Clarithromycin)，合成抗菌剤 (Ormetoprim)，サルファ剤 (Sulfamethoxazole)，鎮痛解熱剤 (Indomethacin, Mefenamic acid)，高脂血症薬 (Bezafibrate, Gemfibrozil)，抗てんかん薬 (Carbamazepine)，降圧剤 (Valsartan, Losartan)，抗菌剤 (Triclocarban) 等が特に下流地点でよく検出され、都市影響を強く受けていることが確認された。

固形性試料では、SS・底泥、付着藻類、底生生物について、抗生物質 (Ormetoprim)，高脂血症薬 (Gemfibrozil)，防腐剤 (Propyl paraben, Methyl paraben) 等が検出され、抗菌剤 (Triclocarban) は下流地点で底生生物中によく検出された。魚 (コイ) の胆汁からは低頻度ながら様々な医薬品類が低濃度で検出された。魚 (コイ) の生殖腺および魚肉からは顕著な医薬品類の蓄積は見られなかった。

全般的に生物試料への医薬品類の移行・蓄積は多くなく、かつ低濃度の場合が多かった。特に高次の生物 (魚) でこの傾向が大であった。この理由としては、医薬品類には親水性のものが多く、生物組織に長期間残留するものが少ない

こと、分解を受けること、食物連鎖による濃縮の可能性が低いこと、等が考えられた。従って、医薬品類の挙動として、生物組織への移行はあまり活発でないと示唆された。

(2) 香料等の挙動

河川水の溶解性試料では、香料については、Terpineol, MDJ, DPMI, HHCB, AHTN, Musk ketone 等が検出され、特に下流地点で高濃度となる場合が多かった。

溶解性試料の紫外線吸収剤については Benzophenon, Benzophenon-3, EHMC が検出され、8月に多く、11月は少なかった。

懸濁態では、香料については Terpineol が多く検出され、Hexylcinnamaldehyde, Isobornyl acetate, HHCB 等も主に下流地点で検出された。紫外線吸収剤については Benzophenon, EHMC が多く検出された。

固形性試料では、魚(コイ)の胆汁では、紫外線吸収剤の EHMC のみがよく検出された。付着藻類、底生生物、魚(コイ)の生殖腺については、香料の Terpineol, 紫外線吸収剤の EHMC がよく検出され、香料の HHCB, AHTN も主に下流地点で少し検出された。

このうち Terpineol は、自然にも存在する物質であり、必ずしも人為的放出とは断定できないが、それ以外の香料(HHCB, AHTN 等)および紫外線吸収剤(EHMC 等)の挙動としては、環境中へ放出された後に、生物組織へ移行する可能性があることが明らかになった。これらの香料および紫外線吸収剤は環境中への放出量が多く、河川水や底泥中にもよく存在していることから、一部の物質は生物組織へも移行しているものと考えられた。

そこで、よく検出された物質として、紫外線吸収剤の EHMC および香料の HHCB を例にとり、生物試料中の濃度と、河川水濃度(溶解性および固形性の合計)、底泥濃度の比較検討を行った。鶴見川、多摩川の各季節ごとに上流と下流を対にして図3-14～図3-15に示した。

EHMC では、夏季・秋季ともに、河川水中濃度は上流より下流の方がわずかに大であった。一方、生物試料中の濃度は下流より上流地点の方が大である場合もあったが、明確な傾向はなく、変動の範囲内と考えられた。全体として、付着藻類と底生生物で高濃度の場合が多く、底生生物は夏季と秋季で同程度の濃度であったが、付着藻類は秋季の方が高濃度となる傾向が見られた。紫外線吸収剤の河川水中の濃度は夏季の方が高いにもかかわらず、付着藻類中の濃度が秋季の方が高い理由は不明であったが、季節による藻類の優占種の違い(夏季には下流で藍藻が見られたが、秋季は珪藻が主体)や、藻類への残留、増殖が活発な夏季の方が藻類重量あたりの濃度は低くなるなど、いくつかの可能性が考えられた。また、コイの内蔵等の濃度は、夏季の方が高濃度の傾向であり、付着藻類や底生生物の濃度変化よりも、河川水中の濃度変化の影響を受けているように推測された。

HHCB では、鶴見川、多摩川の両方で、主として下流地点を中心に検出された。付着藻類からは、両河川で夏季・秋季ともに同程度の濃度で検出されていた。一方、コイの内蔵等では、夏季にのみ、肝臓、生殖腺、胆汁から検出されていた。底生生物からは不検出であり、底泥では鶴見川でのみ検出された。

表3-12(1) 鶴見川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(8月, 上流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TR1-08-WT	0	6.32	0	0	0	0	0	1.91	0
TR1-08-SS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TR1-08-SD	0	0	0	0	11.4	0	0	0	0
TR1-08-AL	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0
TR1-08-FF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-08-FG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-08-FB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	43.2	0.0
TR1-08-BN	0.0	0.0	0.0	0.0	27.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TR1-08-WT	0	3.21	0	0	0	0	14.2	0	0
TR1-08-SS	0	0	5951	0	0	0	0	0	0
TR1-08-SD	0	0	9.79	0	0	0	0	0	0
TR1-08-AL	0	0	124	0	0	0	0	0	0
TR1-08-FF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-08-FG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-08-FB	0.0	41.9	0.0	0.0	0.0	202.0	0.0	0.0	29.2
TR1-08-BN	0.0	0.0	84.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表3-12(2) 鶴見川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(8月, 下流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TR2-08-WT	3.2	0.0	0.0	11.3	0.0	13.9	5.6	37.3	0.0
TR2-08-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	11.6	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FB	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	87.9	0.0
TR2-08-BN	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TR2-08-WT	4.8	86.5	0.0	0.0	0.0	0.0	93.8	0.0	259.9
TR2-08-SS	0.0	0.0	3063.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-SD	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-AL	0.0	0.0	101.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FF	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FG	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-08-FB	0.0	32.9	0.0	0.0	0.0	1348.5	0.0	0.0	286.2
TR2-08-BN	115.8	0.0	90.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	21.3

表3-12(3) 鶴見川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(11月、上流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TR1-11-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	39.0	0.0
TR1-11-BN-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TR1-11-WT	2.9	6.6	0.0	0.0	0.0	0.0	27.4	0.0	3.1
TR1-11-SS	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-SD	129.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR1-11-BN-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表3-12(4) 鶴見川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(11月、下流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TR2-11-WT	2.0	0.0	0.0	9.8	0.0	30.6	5.5	86.8	0.0
TR2-11-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FG-1	0.0	0.0	-----	-----	-----	-----	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	56.9	0.0
TR2-11-BN-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TR2-11-WT	33.0	152.6	0.0	0.0	0.0	0.0	744.9	0.0	57.2
TR2-11-SS	1316.7	0.0	392.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-SD	19.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-AL	771.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TR2-11-BN-1	204.3	0.0	45.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表3-12(5) 多摩川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(8月、上流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TM1-08-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-BN-1	0.0	0.0	0.0	0.0	68.7	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TM1-08-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-SS	0.0	0.0	3006.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-SD	0.0	0.0	8.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-AL	0.0	0.0	94.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-08-BN-1	0.0	0.0	90.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	27.5

表3-12(6) 多摩川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(8月、下流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TM2-08-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0
TM2-08-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	9.7	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-BN-1	34.5	0.0	0.0	0.0	48.6	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TM2-08-WT	2.8	21.1	0.0	0.0	0.0	0.0	17.9	0.0	6.1
TM2-08-SS	0.0	0.0	6299.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-SD	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-AL	0.0	0.0	80.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-08-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	263.4	0.0	0.0	0.0
TM2-08-BN-1	73.3	9.1	84.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表3-12(7) 多摩川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(11月、上流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TM1-11-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-BN-1	0.0	0.0	0.0	0.0	87.2	0.0	0.0	0.0	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TM1-11-WT	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-SS	0.0	0.0	441.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM1-11-BN-1	0.0	0.0	48.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表3-12(8) 多摩川の生物試料、底泥及び水中の医薬品・日用品類濃度(11月、下流)

Sample	Lincomycin	Salbutamol	Betaxolol	Metoprolol	Ormetoprim	Trimethoprim	17beta-Estradiol	Estrone	17alpha-Ethinylestradiol
TM2-11-WT	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	15.1	0.0	10.1	0.0
TM2-11-SS	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-AL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	62.6	0.0
TM2-11-BN-1	19.3	0.0	0.0	0.0	45.7	0.0	0.0	100.7	0.0

Sample	3,4,4-Trichlorocarbanilide	Indomethacin	Gemfibrozil	Ivermectin	p-Hydroxybiphenyl	3,4,5-Trichlorophenol	Valsartan	Salinomycin	Mefenamic acid
TM2-11-WT	20.2	40.1	0.0	0.0	0.0	6.1	89.6	0.0	19.1
TM2-11-SS	3056.8	0.0	1331.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-SD	9.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-AL	299.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FF-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FG-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-FB-1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TM2-11-BN-1	169.1	0.0	53.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

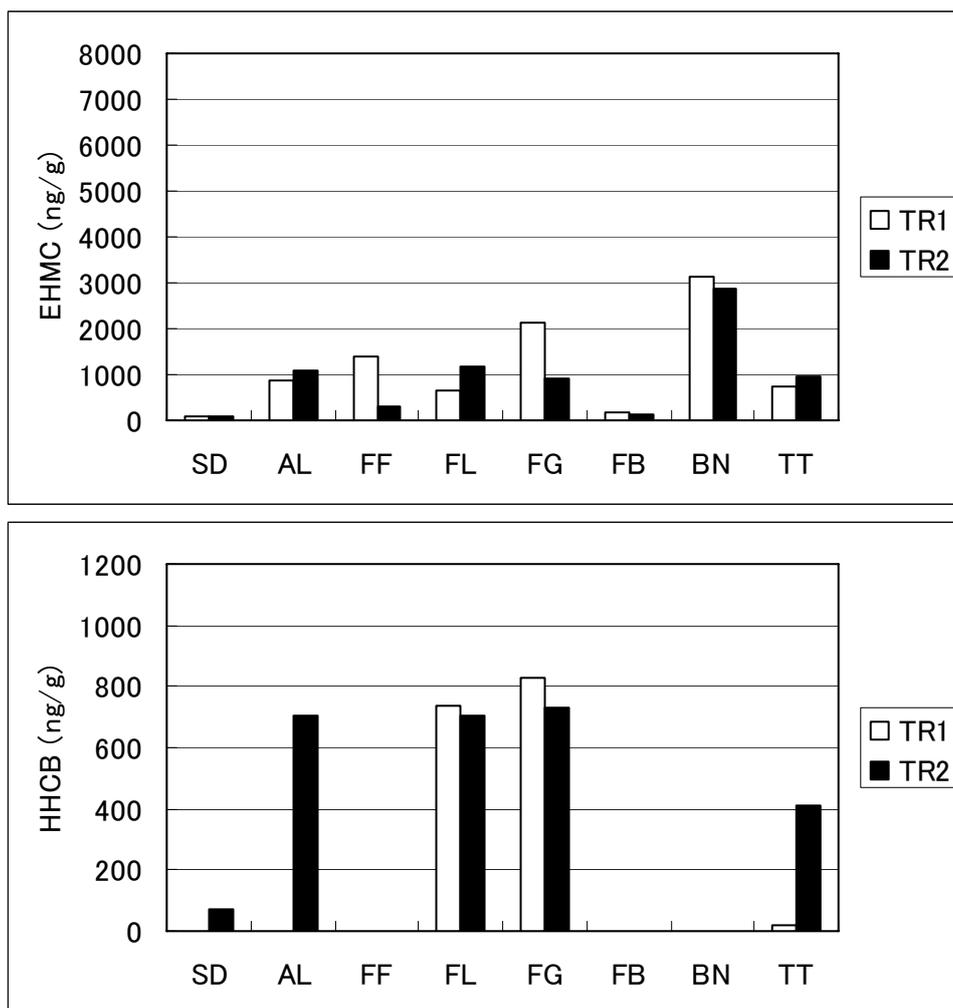


図3-14(1) 鶴見川の生物試料、底泥および水中の紫外線吸収剤 EPMC および香料 HHCB の濃度比較 (夏季調査, TR1 : 上流地点の高田橋, TR2 : 下流地点の亀の子橋)

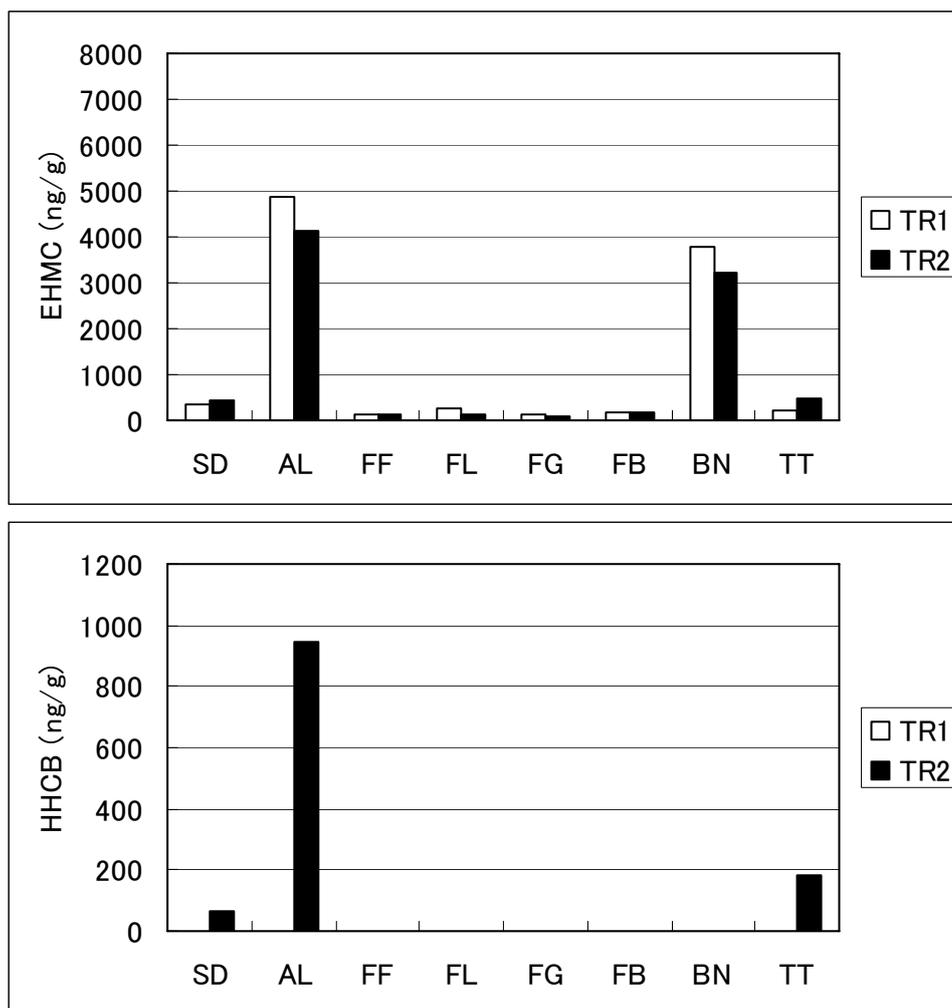


図3-14(2) 鶴見川の生物試料、底泥および水中の紫外線吸収剤 EPMC および香料 HHCB の濃度比較 (秋季調査, TR1 : 上流地点の高田橋, TR2 : 下流地点の亀の子橋)

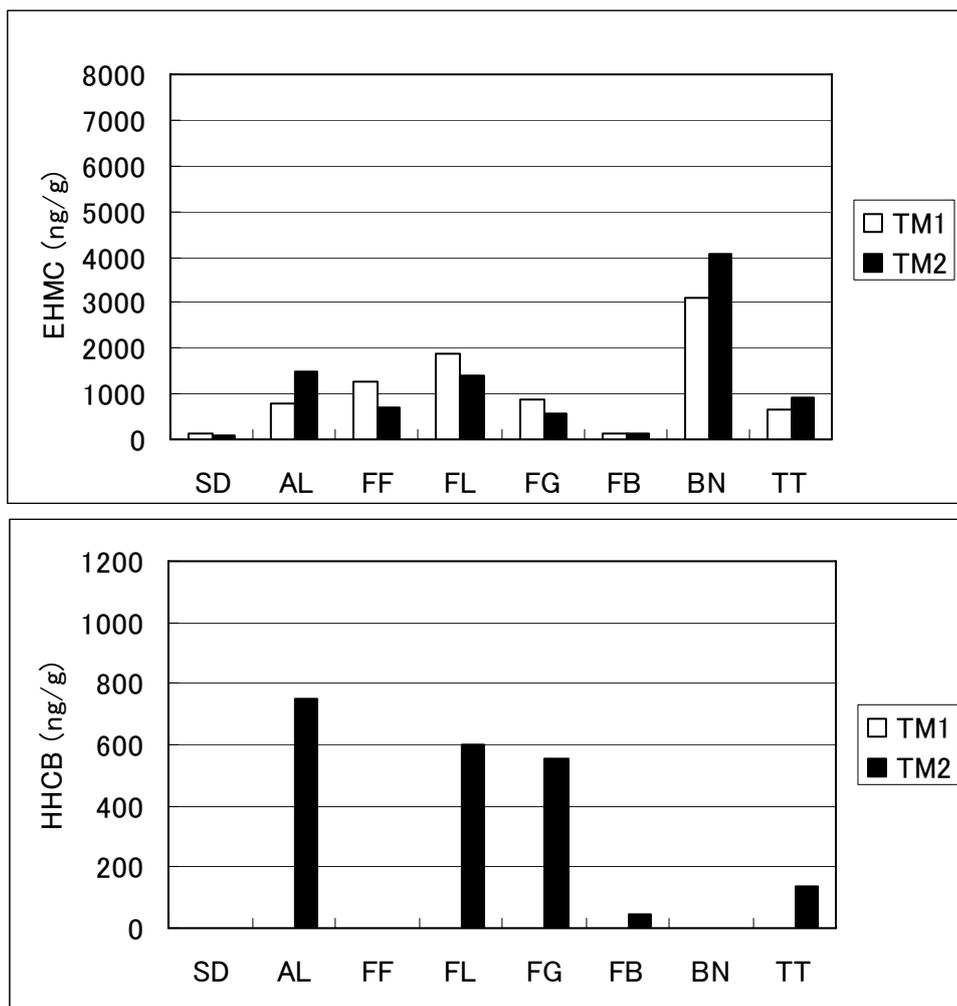


図3-15(1) 多摩川の生物試料、底泥および水中の紫外線吸収剤 EHM および香料 HHCB の濃度比較 (夏季調査, TM1 : 上流地点の調布橋, TM2 : 下流地点の石原)

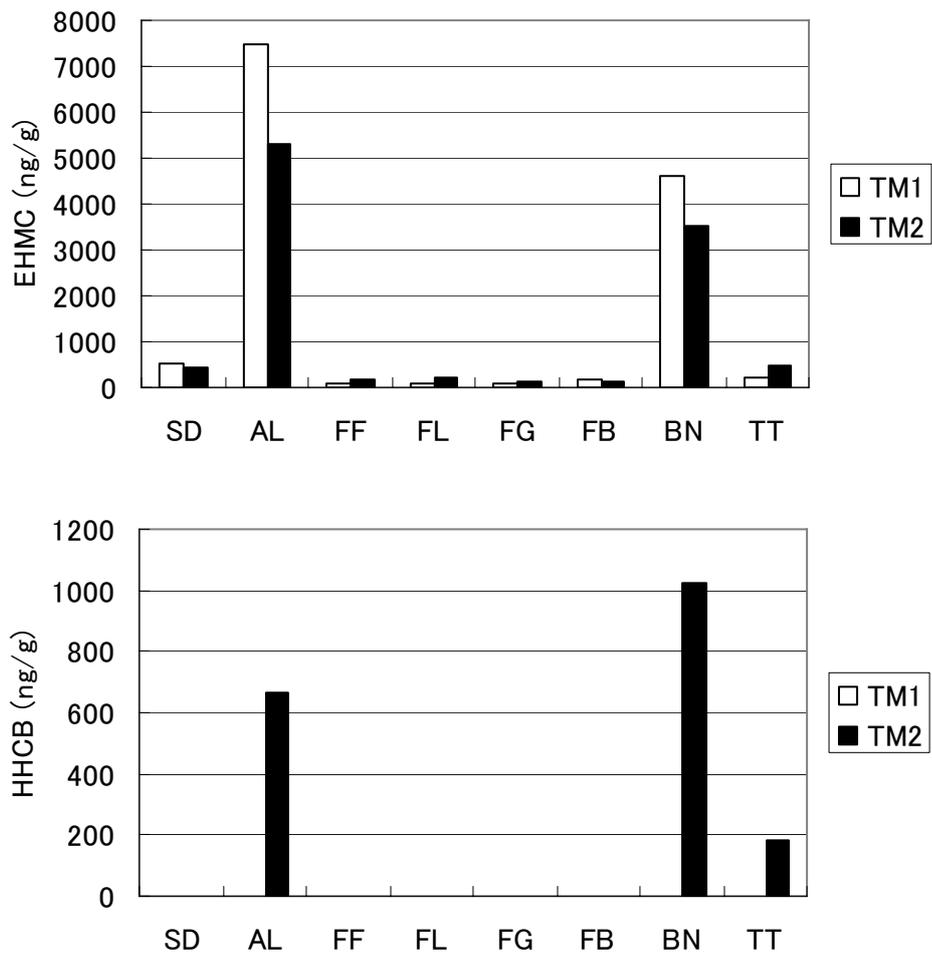


図3-15(2) 多摩川の生物試料、底泥および水中の紫外線吸収剤EHMおよび香料HHCBの濃度比較(秋季調査, TM1: 上流地点の調布橋, TM2: 下流地点の石原)

4 まとめ

4-1 重要物質のリスタアップ

我が国における PPCPs の生産量等を調査し、ヒトおよび動物における排泄率や下水処理場での除去率を考慮して、PEC を算出するとともに、毒性情報が得られた物質について PEC/PNEC を求めて、重要物質のスクリーニングを行った。結果として、環境毒性が疑われる重要物質 (PEC/PNEC \geq 1) として、メフェナム酸、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、スルファメトキサゾール、エリスロマイシン、ストレプトマイシン、クラリスロマイシン、アモキシシリンの8物質が選定された。さらに、環境中の存在量がたとえ推定される要検討物質 (PEC \geq 0.1 μ g/L、ただし PEC/PNEC $<$ 0.1 は除外) として、アセトアミノフェンなど物質 16、環境中の存在量が比較的大と推定されるが環境毒性が不明である保留物質 (0.01 \leq PEC $<$ 0.1 μ g/L、ただし PEC/PNEC $<$ 0.1 は除外) として、モネンシンなど 21 物質をそれぞれ選定し、現地調査の対象物質の候補とした。

4-2 分析方法の開発

固形性試料中の医薬品類および香料等を、超音波抽出、固相抽出、LC/MS/MS および GC/MS を用いて分析する方法を開発した。

医薬品類 (人用医薬品、動物用医薬品、日用品防腐剤等) については、LC/MS/MS により 66~73 物質を同時分析する手法を開発した。香料等 (香料および紫外線吸収剤) については、GC/MS により 25 物質を同時分析する手法を開発した。いずれの分析方法も実試料 (下水処理場の流入水・下水処理水・下水汚泥、河川・湖沼水、河川・湖沼底泥、都市の雨天時表面流出水、畜産排水、付着藻類、底生生物、魚の体組織) において良好な回収率が得られ、適用可能であった。

4-3 環境への放出・移行・変化量の把握

下水処理場の流入水・処理水および下水汚泥、河川・湖沼の水および底泥、都市の雨天時表面流出水、畜産排水等を調査し、河川流域において使用された PPCPs がどのように環境へ放出され、移行し、変化するのかを把握することができた。多様な PPCPs が環境中に存在することが明らかとなった。

4-4 流域における挙動の解明

河川流域において、多様な PPCPs が使用され、下水処理場の処理水、浄化槽排水、畜産排水等より環境へ放出され、流域の特性に応じて、河川や湖沼中で一部は分解等を受け、水生生態系の付着藻類、底生生物、魚等に取り込まれながら、流域内を移動している挙動を全体として詳細に把握することができた。

5 終わりに

以上より、河川流域における PPCPs (医薬品および日用品等由来化学物質) の挙動の解明が可能となり、環境保全に資することができた。調査にご協力いただいた地方公共団体に深く感謝する次第である。本調査研究は、地球環境保全等試験研究費により実施されたものである。

6 参考文献

H17-1) 薬事工業生産動態統計年報 (平成 15 年版), 厚生労働省医政局編集, じほう

H17-2) 医薬ランキング 2005 年版, Monthly ミクス 2005 増刊号, エルゼビア・ジャパン

H17-3) 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量, 社団法人日本動物医薬品協会, 2003

H17-4) 医療用医薬品の添付文書情報, 独立行政法人医薬品医療機器総合機構, http://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html

- H17-5) 動物用抗菌剤マニュアル, 動物用抗菌剤研究会編, Inter Zoo, 2004
- H17-6) 新獣医薬理学 (付録 CD-ROM 獣医臨床薬理データ), 伊藤勝昭他編, 近代出版, 2004
- H17-7) Guideline on the environmental risk assessment of medical products for human use (draft), Committee for medicinal products for human use, European Medicines Agency, 2005
- H17-8) Guidance for industry for the submission of an environmental assessment in human drug applications and supplements, Food and Drug Administration, 1995
- H17-9) Marianne E. Balmer, Hans-Rudolf Buser, Markus D. Müller, Thomas Poiger, Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes, *Environmental Science & Technology*, 2005, 39, 4, 953-962
- H17-10) Hans-Rudolf Buser, Marianne E. Balmer, Peter Schmid, Martin Kohler, Occurrence of UV Filters 4-Methylbenzylidene Camphor and Octocrylene in Fish from Various Swiss Rivers with Inputs from Wastewater Treatment Plants, *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 5, 1427-1431
- H17-11) Staci L. Simonich, William M. Begley, Greet Debaere, William S. Eckhoff, Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and Treated Wastewater, *Environmental Science & Technology*, 2000, 34, 6, 959-965
- H17-12) Thomas A. Ternes, Matthias Bonerz, Nadine Herrmann, Dirk Löffler, Elvira Keller, Bárbara Bagó Lacida, Alfredo C. Alder, Determination of pharmaceuticals, iodinated contrast media and musk fragrances in sludge by LC/tandem MS and GC/MS, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1067, , 213-223
- H17-13) Tatsunori Yamagishi, Tomoyuki Miyazaki, Shozo Horii, Seiji Kaneko, Identification of Musk Xylene and Musk Ketone in Freshwater Fish Collected from the Tama River, Tokyo, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1981, 26, 5, 656-662
- H17-14) Thomas Poiger, Hans- Rudolf Buser, Marianne E. Balmer, Per-Anders Bergqvist, Markus D. Müller, Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, *Chemosphere*, 2004, 55,951-963
- H17-15) Kai Bester, Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant, *Chemosphere*, 2004, 57, 863-870
- H17-16) Hermann Fromme, Thomas Otto, Konstanze Pilz, Polycyclic Musk Fragrances in Different Environmental Compartments in Berlin (Germany), *Water Research*, 2001, 35, 1, 121-128
- H17-17) Haruhiko Nakata, Occurrence of Synthetic Musk Fragrances in Marine Mammals and Sharks from Japanese Coastal Waters, *Environmental Science & Technology*, 2005, 39, 10, 3430-3434
- H17-18) Aaron M. Peck, Keri C. Hornbuckle, Synthetic Musk Fragrances in Lake Michigan, *Environmental Science & Technology*, 2004, 38, 2, 367-372
- H17-19) Elsa Artola-Garicano, Iris Borkent, Kay Damen, Tjalling Jager, Wouter H. J. Vaes, Sorption Kinetics and Microbial Biodegradation Activity of Hydrophobic Chemicals in Sewage Sludge: Model and Measurements Based on Free Concentrations, *Environmental Science & Technology*, 2003, 37, 1, 116-122
- H17-20) 松本比佐志, 足立伸一, 鈴木定彦, 紫外線吸収剤及びその関連化合物によるエストロゲン様作用, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2005, 125, 8, 643-652
- H17-21) VIRGINIA L. CUNNINGHAM, MARY BUZBY, THOMAS HUTCHINSON, FRANK MASTROCCO, NEIL PARKE, NICHOLAS RODEN, Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps, supporting information, *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 3456-3462.
- H17-22) N J Ayscough, J Fawell, G Franklin and W Young, Review of human pharmaceuticals in the environment, R&D technical report

- P390, Environment Agency UK, 2000
- H17-23) O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals, *Water Research*, 36, 5013-5022, 2002
- H17-24) Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Davide Calamari, Roberto Fanelli, Ettore Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 206-215
- H18-1) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2006) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H18-2) Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Davide Calamari, Roberto Fanelli, Ettore Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 206-215
- H18-3) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2001) Draft CPMP discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use, CHMP/SWP/4447/00, Draft report, London, UK.
- H18-4) Simonich, S.L., Begley, W.M., Debaere, G., and Eckhoff, W.S. (2000) Trace analysis of fragrance materials in wastewater and treated wastewater, *Environ. Sci. Technol* , 34, 959-965.
- H18-5) Simonich, S.L., Federle, T.M., Eckhoff, W.S., Rottiers, A., Webb, S., Sabaliunas, D., and De Wolf, D. (2002) Removal of fragrance materials during U.S. and European wastewater treatment, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 2839-2847.
- H18-6) Balmer, M.E., Buser, H., Müller, M.D., and Poiger, T. (2005) Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 953-962.
- H18-7) Buser, H., Balmer, M.E., Schmid, P., and Kohler, M. (2006) Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 1427-1431.
- H18-8) Poiger, T., Buser, H., Balmer, M.E., Bergqvist, P., and Müller, M.D. (2004) Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, *Chemosphere.*, 55, 951-963.
- H18-9) 厚生省 (2000) 化粧品基準(厚生省告示第三百三十一号).
- H18-10) Plassche, E.J.van de, Balk, F. (1997) Environmental risk assessment of the polycyclic musks AHTN and HHCb according to the EU-TGD, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Report 601503008, Bilthoven.
- H18-11) Landsanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (2001) Untersuchungen zum Vorkommen von Xenobiotika mit toxikologischer oder endokriner Wirkung in Schwebstoffen und Sedimenten, Abschlußbericht Luni 2000, Karlsruhe, Germany
- H19-1) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2006) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H19-2) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2007) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H19-3) Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Davide Calamari, Roberto Fanelli, Ettore Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 206-215

- H20-1) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2006) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H20-2) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2007) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H20-3) 尾崎正明, 山下洋正, 亀田 豊, (2008) 河川流域における PPCPs(医薬品および日用品等由来化学物質)の挙動の解明に関する研究, 地球環境保全等試験研究費報告書
- H20-4) 15509 の化学商品, 化学工業日報社, 2009
- H20-5) Sara Castiglioni, Renzo Bagnati, Davide Calamari, Roberto Fanelli, Ettore Zuccato, A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1092, 206-215
- H21-1) Michael Bau; Peter Dulski,1996,"Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters, *Earth and Planetary Science Letters* 143, 1996,pp.245-255
- H21-2) KLAUS KUMMERER; ECKARD HELMERS,2000,Hospital Effluents as a Source of Gadolinium in the Aquatic Environment,*Environ.Sci.Technol*,34,4,573-577
- H21-3) PHILIP L. VERPLANCK; HOWARD E. TAYLOR; D. KIRK NORDSTROM; LARRY B. BARBER,2005,"Aqueous Stability of Gadolinium in Surface Waters Receiving Sewage Treatment Plant Effluent, Boulder Creek, Colorado",*Environ.Sci.Technol*,39,18,6923-6929
- H21-4) M. Rabiet; F. Brissaud; J. L. Seidel; S. Pistre; F. Elbaz-Poulichet,2009,Positive gadolinium anomalies in wastewater treatment plant effluents and aquatic environment in the Hérault watershed (South France),*Chemosphere*,75,8,1057-1064
- H21-5) Michael G. Lawrence; Christoph Ort; Jurg Keller,2009,"Detection of anthropogenic gadolinium in treated wastewater in South East Queensland, Australia",*Water Res*,43,14,3534-3540
- H21-6) Mohammad B. Shabani; Tasuku Akagi; Akimasa Masuda,1992,Preconcentration of Trace Rare-Earth Elements in Seawater by Complexation with Bis(2-ethylhexyl) Hydrogen Phosphate and 2-Ethylhexyl Dihydrogen Phosphate Adsorbed on a C18 Cartridge and Determination by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry,*Anal. Chem*,64,7,737-743
- H21-7) Michael G. Lawrence; Alan Greig; Kenneth D. Collerson; Balz S. Kamber,2006,Direct quantification of rare earth element concentrations in natural waters by ICP-MS,*Applied Geochemistry*,21,5,839-848
- H21-8) LARRY A. HASKIN; MARY A. HASKIN; FRED A. FREY; THOMAS R. WILDEMAN,1968,Relative and Absolute Terrestrial Abundances of the Rare Earths,*Int. Ser. Mon. Earth Sci.*,30,,889-912
- H21-9) L. PETER GROMET; ROBERT F. DYMEK; LARRY A. HASKIN; RANDY L. KOROTEV,1984,"The "North American shale composite": Its compilation, major and trace element characteristics",*Geochimica et Cosmochimica Acta*,48,12,2469-2482

Ⅱ. 水質チームによる研究

下水道における生理活性物質の実態把握と制御に関する調査

研究予算：受託（下水道）

運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、岡安祐司、
北村友一

【要旨】

人および動物用医薬品や身体ケア製品起源の化学物質は生理活性作用を有し、低濃度で特異的に作用することから、人や水生生物への影響や薬剤耐性菌の発生が危惧されている。また、最近、医薬品、化粧品等日常生活において多く使用されている化学物質の環境汚染に関する調査・研究が数多く見られるようになってきた。河川、湖沼等に生息する生物へのインパクトの懸念から、下水処理水中に残留する医薬品の濃度レベルについても関心が持たれている。下水処理場は、生活排水、工場排水等を受け入れ汚濁物質を除去・削減（一般的には生物処理）したのち環境へ戻している施設であり、環境負荷削減に寄与している重要な施設である。平成 21 年度は、下水処理水中の医薬品類の塩素処理工程における除去特性について検討を行なった。また、平成 20 年度に実施した活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の挙動調査データを用い処理プロセスにおける医薬品の物質収支を求めた。

キーワード：医薬品、挙動把握、実態把握、一斉分析

1. はじめに

最近、医薬品、化粧品等日常生活において多く使用されている化学物質環境汚染に関する調査・研究^{1)～6)}が数多く見られるようになってきた。河川、湖沼等に生息する生物へのインパクトの懸念から、下水処理水中に残留する医薬品の濃度レベルについても関心が持たれている。下水処理場は、生活排水、工場排水等を受け入れ汚濁物質を除去・削減（一般的には生物処理）したのち環境へ戻している施設であり、環境負荷削減に寄与している重要な施設であるが、医薬品類の中には、生物処理による除去が困難であり、下水処理水中に残存する物質も少なくない。

本調査では、下水処理水中の医薬品類の塩素処理工程における除去特性について検討を行なった。また、平成 20 年度に実施した活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の挙動調査データを用い処理プロセスにおける医薬品の物質収支を求めた。

2. 下水処理水中の医薬品類の塩素処理工程における除去特性

2. 1 はじめに

本調査では、下水処理の生物処理プロセスを経た後の下水処理水に対して化学的手法である塩素処理を適用し、

下水処理水中に残存する医薬品類の除去率を向上させる手法を検討した。

2. 2 実験方法

1) 下水処理水への塩素処理の適用における医薬品の挙動把握調査

下水処理水の塩素処理実験は、2009 年 5 月 13 日に、茨城県霞ヶ浦流域下水道霞ヶ浦浄化センター内に設置されている土木研究所の湖北総合実験施設で実施した。湖北総合実験施設へは、霞ヶ浦浄化センターの生物処理水に対して急速砂ろ過法を施された高度処理水が導入されており、塩素処理実験には、この高度処理水を用いた。

まず、容量 2L のポリエチレン製容器を 11 個準備し、各容器に、高度処理水を 9 分目程度まで均等に注水した。これらのうち、3 個には、有効塩素濃度が 2.5mg/L になるように、3 個には有効塩素濃度が 5.0mg/L になるように、3 個には有効塩素濃度が 7.5mg/L になるように次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 5.0%）を添加した。残りの 2 個には、次亜塩素酸ナトリウム溶液は添加しなかった。

次亜塩素酸ナトリウムを添加した後、高度処理水で総ての容器を満たした後、栓をし、実験を開始した。

次に、次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加しなかった 2

個の容器のうち、1個を直ちに開封し、曝気ブローアを装着したエアストーンを容器内に入れ、15分間曝気を行い、曝気終了後の試料を、試料1(ブランク 塩素無添加 0分)とした。曝気は、試料保存時における、残留塩素による酸化を防止するために脱塩素の目的で行った。

実験開始15分後には、有効塩素濃度が2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/Lになるように設定した容器の中から各1個を開封し、曝気ブローアを装着したエアストーンを容器内に入れ、15分間曝気を行い、曝気終了後の試料をそれぞれ試料2(塩素2.5mg/L 15分間)、試料3(塩素5.0mg/L 15分間)、試料4(塩素7.5mg/L 15分間)とした。

実験開始30分後にも同様に、有効塩素濃度が2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/Lになるように設定した容器の中から各1個を開封し、曝気ブローアを装着したエアストーンを容器内に入れ、15分間曝気を行い、曝気終了後の試料をそれぞれ試料5(塩素2.5mg/L 30分間)、試料6(塩素5.0mg/L 30分間)、試料7(塩素7.5mg/L 30分間)とした。

実験開始60分後には、次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加しなかった容器、有効塩素濃度が2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/Lになるように設定した残りの容器を開封し、ブローアを装着したエアストーンを容器内に入れ、15分間曝気を行い、曝気終了後の試料を、試料8(ブランク 塩素無添加 60分)、試料9(塩素2.5mg/L 30分間)、試料10(塩素5.0mg/L 30分間)、試料11(塩素7.5mg/L 30分間)とした。

2) 水質分析

高度処理水および試料1~11の試料水について、浮遊物質(SS)、溶解性有機炭素(DOC)、全窒素(TN)、アンモニア性窒素(NH₄⁺-N)、亜硝酸性窒素(NO₂⁻-N)、硝酸性窒素(NO₃⁻-N)、全りん(TP)、オルトリン酸態りん(PO₄³⁻-N)の各濃度および色度を測定した。下水処理水に残存する有機物の、塩素添加に伴う酸化の程度を評価するための指標として色度を測定した。

また、調査対象医薬品類は表-1に示す94物質とした。これらのうち、92物質を固相抽出-液体クロマトグラフ質量分析法^{7) 8)}により分析した。これらのうちNo.1~No.92は、薬事工業生産動態統計年報で生産量が1トン以上と多く一般的に用いられていると考えられる医薬品の他、我が国でこれまで検出例のある物質である。これらは、解熱鎮痛消炎剤、利尿剤、神経系用剤、抗生物質、不整脈用剤、高脂血症用剤、抗不安剤、強心剤、抗てんかん剤、止血剤、混合ホルモン、気管支拡張剤等であり、

使用対象は人用、動物用、両用である。また、抗菌剤のtriclosan(No.93)、thymol(No.94)の2物質は固相抽出-ガスクロマトグラフ質量分析法⁹⁾により分析した。

2. 3 実験結果

高度処理水中の浮遊物質(SS)濃度は1mg/L未満、全窒素(TN)濃度は6.4mg/L、全りん(TP)濃度は0.09mg/Lであった。なお、遊離塩素の消費に関連する溶解性有機物やアンモニア性窒素(NH₄⁺-N)はそれぞれ、溶解性有機炭素(DOC)濃度が3.9mg/L、アンモニア性窒素(NH₄⁺-N)濃度が0.03mg/Lであった。また、色度は20.5度であった。試料1~11に関しては、色度以外の項目については有意な変化は見られなかった。色度は、図-1に示すように、有効塩素濃度が2.5mg/Lになるように設定した場合には、15分後の試料で10度程度に、30分以降の試料で5度程度にまで低下していた。また、有効塩素濃度が5.0mg/L、7.5mg/Lになるように設定した場合には、15分後以降の試料で2度程度にまで低下していた。

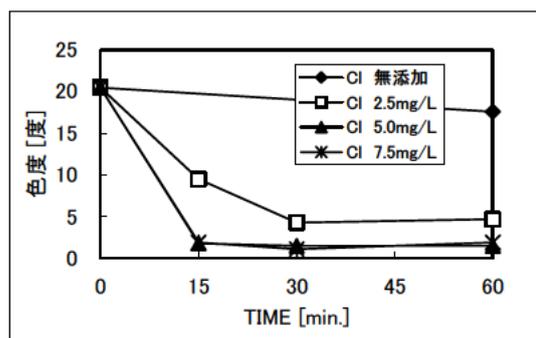


図-1 塩素処理実験試験水の色度

医薬品類の測定結果は、分析対象とした94物質のうち、No.6、No.23、No.24、No.26、No.32、No.33、No.34、No.37、No.38、No.39、No.41、No.54、No.62、No.72、No.74、No.77、No.83、No.89、No.90およびNo.92の計20物質は、いずれの試料からも検出されなかった。高度処理水中の、分析対象とした医薬品類94物質の総濃度は5,933ng/Lであった。なお、積算に当たっては、検出下限値未満の場合は0を、検出下限値以上、定量下限値未満の場合には測定値を用いた。

試料1~11中の医薬品類94物質の総濃度を図-2に、最も高濃度で検出された消化性潰瘍用剤のsulpiride(No.47)の濃度を図-3に、環境リスク初期評価で懸念されている¹⁰⁾ clarithromycin(No.6)、triclosan(No.93)の濃度をそれぞれ図-4、図-5に示す。なお、高度処理水と試料1の測定結果はほとんど差がなかった。総濃度、sulpiride(No.47)、clarithromycin(No.6)については、

表-1 調査対象医薬品類リスト

1. acetaminophen	20. mefenamic acid	38. sulfadimidine	58. griseofulvin	77. neospiramycin
2. antipyrine	21. metoprolol	39. sulfadimethoxine	59. diphenidol	78. thiamphenicol
3. atenolol	22. naproxen	40. sulfamethoxazole	60. chlorpromazine	79. chloramphenicol
4. carbamazepine	23. p-phenylphenol	41. sulfamethoxazole	61. nalidixic acid	80. primidone
5. clarithromycin	24. pindolol	42. tetracycline	62. dextromethorphan	81. phenytoin
6. clenbuterol	25. propranolol	43. oleandomycin	63. acetazolamide	82. haloperidol
7. clofibric acid	hydrochloride	44. kitasamycin	64. trimethoprim	83. pentoxifylline
8. crotamiton	26. salbutamol	45. josamycin	65. ampicillin	84. caffeine
9. cyclophosphamide	27. sotalol	46. novobiocin	66. prednisolone	85. bezafibrate
10. diclofenac sodium	28. theophylline	47. sulphiride	67. tolperisone	86. levofloxacin
11. N,N-diethyl- m-toluamide	29. terbutalline	48. flavoxate	68. amitriptyline	87. azithromycin
12. disopyramide	30. benzylpenicillin	49. amoxicillin	69. promethazine	88. phenobarbital
13. ethenzamide	31. chlortetracycline	50. dipyridamole	70. imipramine	89. phenacetin
14. fenoprefen	32. danofloxacin	51. furosemide	71. metoclopramide	90. methox salen
15. ibuprofen	33. diclazuril	52. verapamil	72. scoporamine	91. dexamethasone
16. ifenprodil tartrate	34. nicarbazin	53. diltiazem	73. chlormazinnone	92. dexamethasone acetate
17. indomethacin	35. oxytetracycline	54. tolbutamide	acetate	93. triclosan
18. isopropylantipyrine	36. 2-quinoxalic carboxylic acid	55. carbazochrome	74. mepirizole	94. thymol
19. ketoprofen	37. sarafloxacin	56. bromovalerylurea	75. pirenzepine	
		57. spironolactone	76. fulfenamic acid	

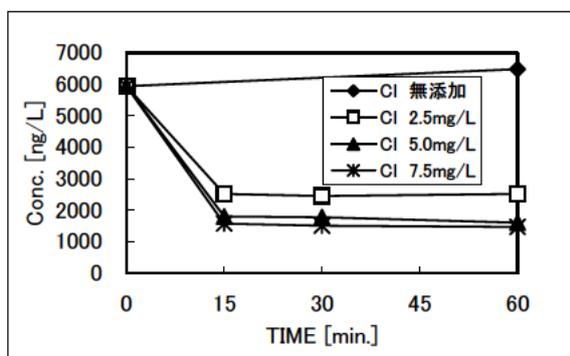


図-2 塩素処理実験における PPCPs 総濃度

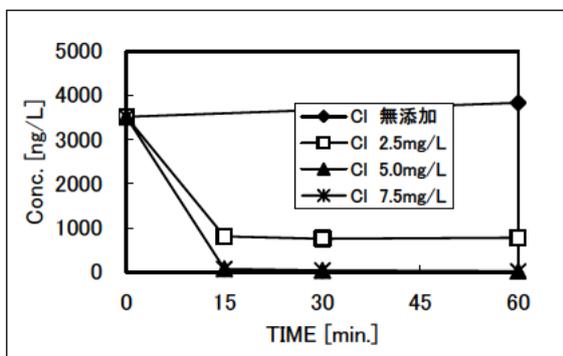


図-3 塩素添加実験における sulphiride 濃度

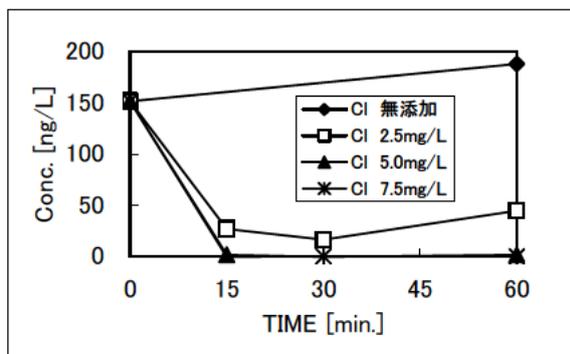


図-4 塩素処理実験における clarithromycin 濃度

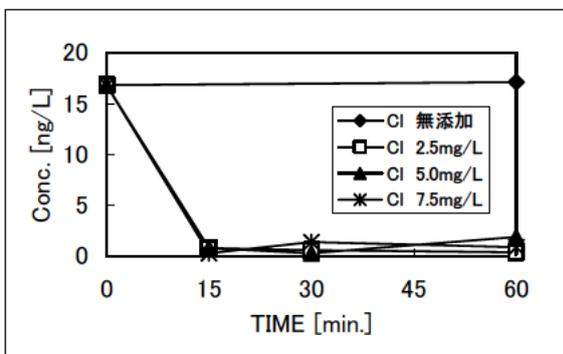


図-5 塩素処理実験における triclosan 濃度

有効塩素濃度が 2.5mg/L の場合より、5.0mg/L の場合の方が、除去率は高くなったが、5.0mg/L の場合と 7.5mg/L の場合を比較すると、大きな差がみられなかった。triclosan (No.93) の場合は、有効塩素濃度が 2.5mg/L 以上の範囲では除去率に差はなかった。接触時間について見てみると、有効塩素濃度が 2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/L のいずれの場合も、15 分、30 分、60 分の接触時間を設定した系列間では大きな差がみられず、接触時間を 15 分以上の任意の時間に設定しても除去率へは影響を与えないことがわかった。

2. 4 まとめと今後の課題

下水処理の生物処理プロセスを経た後の下水処理水に対して、化学的手法である塩素処理を適用し、下水処理水中に残存する医薬品類の除去率を向上させる手法を検討した。

有効塩素濃度を 2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/L の 3 段階に、接触時間を 15 分、30 分、60 分の 3 段階に設定し、計 9 系列の条件下における、医薬品等の化学物質の除去特性を検討した。

分析対象とした医薬品類 94 物質の総濃度でみた除去率は、有効塩素濃度が 2.5mg/L の場合より、5.0mg/L の場合の方が高くなったが、5.0mg/L の場合と 7.5mg/L の場合を比較すると、大きな差がみられなかった。また、接触時間について見てみると、有効塩素濃度が 2.5mg/L 以上の場合には、接触時間を 15 分以上の任意の時間に設定しても、医薬品類 94 物質の総濃度でみた除去率は影響を受けないことがわかった。

今後は、医薬品等の環境リスク評価結果を参考にして、除去すべき医薬品等を絞り込み、絞り込まれた医薬品等の下水処理水で達成すべきレベルを把握し、下水処理場で達成すべき目標を設定することが必要であると考えられる。さらに、それに照らした場合に、今回の検討で得られた塩素処理による医薬品等の除去特性が、目標を満足するものであるか、否かを判定した上で、有効塩素濃度、接触時間の最適化を検討する必要があると考えられる。なお、最適化の検討にあたっては、塩素処理に伴い発生する副生成物の有害性にも配慮した検討が必要であろう。

3. 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

3. 1 はじめに

河川、湖沼等に生息する生物へのインパクトの懸念から、下水処理水中に残留する医薬品の濃度レベル或は下水処理プロセスにおける挙動についても関心が持たれて

いる。そこで本研究では、平成 20 年度に実施した活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動把握調査の課題となっていた、各処理プロセスにおけるフラックスとしての評価を行った。

3. 2 医薬品類の分析

フラックスの算出に先立ち、分析精度(添加回収試験、分析再現性試験)の確認を行った。

1) 添加回収試験

流入水及び放流水の溶存態試料について添加回収試験を行なった。流入水のろ過試料(8 検体)50mL と放流水のろ過試料(7 検体)200mL に、研究対象医薬品 92 物質をメタノールに溶かした混合標準液を 100 μ L 添加した。混合標準液の各医薬品濃度は、clarithromycin、crotamiton、disopyramide、sulpiride、caffeine、bezafibrate、levofloxacin、phenobarbital については添加試料中の濃度が 200 μ g/L となるように設定した。他の医薬品は添加試料中の濃度が 2000 μ g/L となるように設定した。また、流入水の懸濁態試料についても添加回収試験を行なった。流入水 50mL をろ過(1 検体)し、ろ紙上に残った残渣を凍結乾燥した後、医薬品 92 物質をメタノールに溶かした混合標準液を 50 μ L 添加した。前述の添加試料に加え無添加の試料についても分析操作手順に従い医薬品を測定し、この両者の値から回収率を計算した。

流入水、放流水の溶存態試料及び流入水の懸濁態試料について行なった添加回収試験結果を図-6 に示した。横軸は各医薬品を示しており番号は表-1 の調査対象医薬品類リストと対応している。複数試料について行なった溶存態試料については平均値を示した。流入水(溶存態、懸濁態)、放流水(溶存態)の添加回収試験においてどの試料においても回収率が 70~120%のものが 16 物質(clofibric acid、disopyramide、ethenzamide、2-quinoxaline carboxylic acid、tolbutamide、bromovalerylurea、prednisolone、mepirizole、chloramphenicol、primidone、phenytoin、bezafibrate、phenobarbital、phenacetin、dexamethasone、dexamethasone acetate)あった。また、いずれか 2 試料で回収率が 70~120%のものが 11 物質(acetaminophen、antipyrine、clenbuterol、fenoprofen、ketoprofen、naproxen、sulfamonomethoxine、kitasamycin、amoxicillin、griseofulvin、ampicillin)あった。これら 27 物質を比較的精度良く分析可能な物質とした。

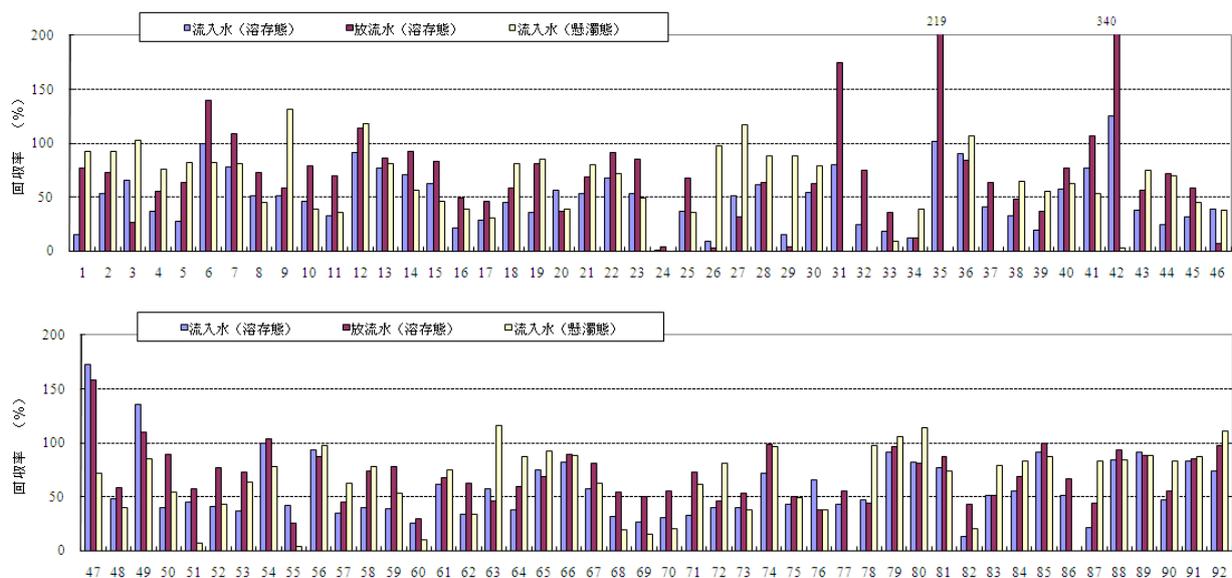


図-6 添加回収試験結果

2) 分析再現性試験

流入水及び放流水の溶存態試料と流入水の懸濁態試料の分析再現性試験を行なった。流入水の溶存態試料は3試料、放流水の溶存態試料は2試料、流入水の懸濁態試料は1試料について分析再現性試験を行った。各試料とも同一の操作を5検体について並行試験した。

流入水の溶存態試料(3試料)、放流水の溶存態試料(2試料)、流入水の懸濁態試料(1試料)について行なった分析再現性試験により、検出下限値以上で検出された物質について平均値、標準偏差を計算し、この両者から変動係数(CV%)を求めた。添加回収試験において比較的精度良く分析可能と判断した27物質のCV%は、流入水(溶存態)では antipyrine (23.4%)、naproxen (21.4%)、chloramphenicol (21.0%)、primidone (22.7%)、dexamethasone acetate (62.9%)であった他は20%以下であった。流入水(懸濁態)はいずれの試料も検出下限値以下であり分析再現性の確認ができなかった。これら医薬品類の多くは水に溶けやすい性質を有しており、懸濁成分中の存在量は少ないものと考えられる。また、放流水(溶存態)では、clofibric acid (22.2%)、bromovalerylurea (31.0%)、griseofulvin (25.6%)であった他は20%以下であり比較的再現性良く測定された。

3. 2 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

平成20年度に報告した医薬品濃度と各処理プロセスの流量等のデータから医薬品類のフラックスを求めた。比

較的精度良く分析が可能と判断した27物質のうち、流入水(溶存態、懸濁態)試料から検出されなかった clenbuterol、fenopropfen、sulfamonomethoxine、kitasamycinの4物質を除く23物質について図-7に示した。余剰汚泥の医薬品濃度は返送汚泥とほぼ同じと考えられることから、返送汚泥の濃度に余剰汚泥引抜き量を乗じ余剰汚泥のフラックスとした。図-7に示したフラックスは流入水1月8日と1月13日の平均値とした。初沈流出水のフラックスは23物質中 antipyrine、ethenzamide、tolbutamide、griseofulvin、phenacetinの5物質が流入水の0.37、0.64、0.75、0.28、0.45の値を示し、滞留時間が約5時間の最初沈殿池において半分程度除去される結果となった。他の18物質は、流入水のフラックスに対し1あるいはそれ以上の値を示し、最初沈殿池では除去されないことがわかった。物質収支が合わない理由の一つとして、本調査がスポット採取試料であることが考えられる。終沈流出水のフラックスは antipyrine、clofibric acid、disopyramide、primidone、phenytoin、phenobarbitalの6物質が流入水のフラックスに対し1あるいはそれ以上の値を示し、活性汚泥処理によっても除去されない物質であることがわかった。これらの結果は平成20年度に報告した濃度による除去率の結果とも一致している。Acetaminophen、2-quinoxaline carboxylic acid、amoxicillin、tolbutamide、griseofulvin、prednisolone、mepirizole、phenacetin、dexamethasone、dexamethasone acetateの10物質は流入

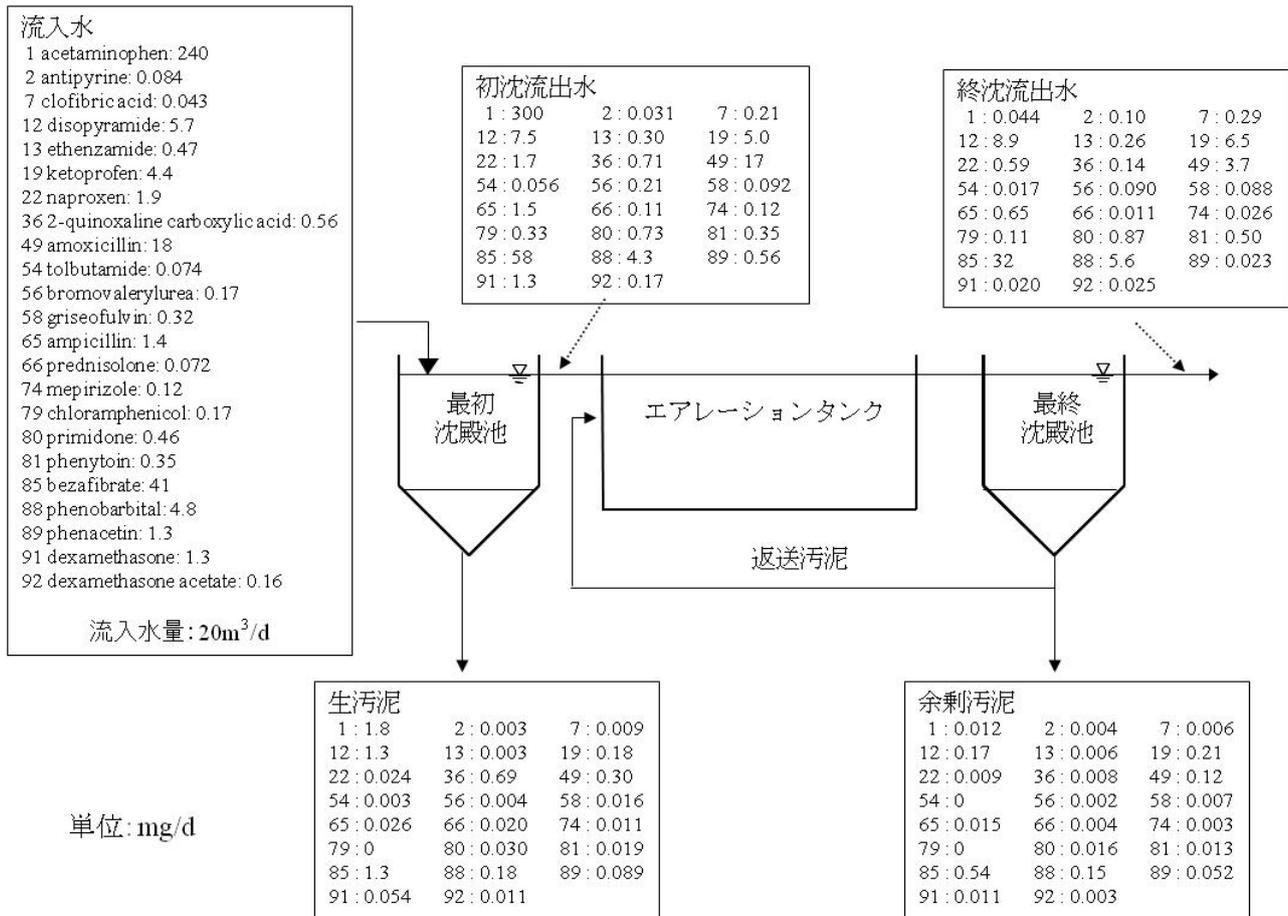


図-7 各処理プロセスにおける医薬品 (23 物質) のフラックス

水のフラックスに対し、0.3以下の値であり活性汚泥処理によって比較的除去され易い物質であることがわかる。また、流入水のフラックスに対し、生汚泥として引き抜かれるフラックスは、clofibric acid が 0.22、disopyramide が 0.23、2-quinoxaline carboxylic acid が 0.12、prednisolone が 0.28、余剰汚泥として引き抜かれるフラックスはclofibric acidが0.15であり、他の物質は 0.1以下であった。生汚泥、余剰汚泥として引き抜かれる量は比較的少ないことがわかった。

3.3 まとめと今後の課題

医薬品 92 物質について溶存態・懸濁態別の分析精度 (添加回収率、分析再現性)を確認し、比較的精度良くできると判断された 27 物質について活性汚泥処理実験プロセスにおける医薬品類の挙動把握を行なった。終沈流出水の医薬品フラックスは antipyrine、clofibric acid、disopyramide、primidone、phenytoin、phenobarbital の6物質が流入水のフラックスに対し1あるいはそれ以上の値を示し、活性汚泥処理によって

も除去されない物質であること、acetaminophen、2-quinoxaline carboxylic acid、amoxicillin、tolbutamide、griseofulvin、prednisolone、mepirizole、phenacetin、dexamethasone、dexamethasone acetate の 10 物質は流入水のフラックスに対し、0.3以下の値であり活性汚泥処理によって比較的除去され易い物質であることが確認された。また、生汚泥、として引き抜かれるフラックスは流入水のフラックスに対し、clofibric acid が 0.22、disopyramide が 0.23、2-quinoxaline carboxylic acid が 0.12、prednisolone が 0.28、余剰汚泥として引き抜かれるフラックスは clofibric acid が 0.15 であり、他の物質は 0.1以下であった。

今後は、分析精度の向上を図り、フラックスとしての評価が行われなかった他の医薬品についても検討が必要である。

4. まとめ

下水処理水中の医薬品類の塩素処理工程における除去特性の検討と平成 20 年度に実施した活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の挙動調査データを用い処理プロセスにおける医薬品の物質収支を求めた。

下水処理の生物処理プロセスを経た後の下水処理水に対して、化学的手法である塩素処理を適用し、下水処理水中に残存する医薬品類の除去率を向上させる手法を検討した。有効塩素濃度を 2.5mg/L、5.0mg/L、7.5mg/L の3段階に、接触時間を 15 分、30 分、60 分の3段階に設定し、計 9 系列の条件下における、医薬品等の化学物質の除去特性を検討した。分析対象とした医薬品類 94 物質の総濃度でみた除去率は、有効塩素濃度が 2.5mg/L の場合より、5.0mg/L の場合の方が高くなったが、5.0mg/L の場合と 7.5mg/L の場合を比較すると、大きな差がみられなかった。また、接触時間について見てみると、有効塩素濃度が 2.5mg/L 以上の場合には、接触時間を 15 分間以上の任意の時間に設定しても、医薬品類 94 物質の総濃度でみた除去率は影響を受けないことがわかった。

医薬品 92 物質について溶存態・懸濁態別の分析精度（添加回収率、分析再現性）を確認し、比較的精度良くできると判断された 27 物質について活性汚泥処理実験プロセスにおける医薬品類の挙動把握を行なった。終沈流出水の医薬品フラックスは antipyrine、clofibric acid、disopyramide、primidone、phenytoin、phenobarbital の6物質が流入水のフラックスに対し1あるいはそれ以上の値を示し、活性汚泥処理によっても除去されない物質であること、acetaminophen、2-quinoxaline carboxylic acid、amoxicillin、tolbutamide、griseofulvin、prednisolone、mepirizole、phenacetin、dexamethasone、dexamethasone acetate の10物質は流入水のフラックスに対し、0.3以下の値であり活性汚泥処理によって比較的除去され易い物質であることが確認された。また、生汚泥として引き抜かれるフラックスは流入水のフラックスに対し、clofibric acid が 0.22、disopyramide が 0.23、2-quinoxaline carboxylic acid が 0.12、prednisolone が 0.28、余剰汚泥として引き抜かれるフラックスは clofibric acid が 0.15 であり、他の物質は 0.1 以下であった。

＝参考文献＝

- 1) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹 (2004) わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, 27, 685-691.
- 2) 桐賢太郎, 高田秀重, 田中宏明, 原田新, 中田典秀, 鈴木穰 (2006) 水環境中における合成医薬品の動態, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 188-189.
- 3) 村田綾子, 真名垣聡, 高田秀重, 村上和雄, 田中宏明, 原田新, 中田典秀, 鈴木穰 (2006) 日本の河川の抗生物質汚染の実態解明, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 190-191.
- 4) 杉下寛樹, 山下尚之, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂, 宝輪勳, 小西千絵 (2007) 淀川流域の下水処理場放流水と支川における医薬品の存在実態, 環境工学研究論文集, 44, 307-312.
- 5) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穰 (2007) 下水道未整備地域の小河川における医薬品の実態調査, 学会誌「EICA」, 12 (2/3), 37-44.
- 6) Nakada, N., Komori, K., Suzuki, Y., Konishi, C., Houwa, I. and Tanaka, H. (2007) Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan, Water Science & Technology, 56, 133-140.
- 7) 小西千絵, 宝輪勳, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明, (2006) 水環境中医薬品の LC-MS/MS による一斉分析法の検討, 環境工学研究論文集, pp.73-82
- 8) 小森行也, 岡安祐司, 鈴木穰 (2007) 下水道未整備地域の小河川における医薬品の実態調査, 学会誌「EICA」第12巻2/3号, pp.37-44
- 9) N. Nakada et al.(2006) Pharmaceuticals chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, Water Research, 40, pp.3297-3303
- 10) A. Harada et al.,(2008) Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river waters affected by different wastewater treatment levels, Water Science & Technology, 58(8), pp.1541-1546

下水道における微量化学物質の安全性評価に関する調査

水質チーム 上席研究員 南山 瑞彦
 主任研究員 北村 友一
 研究員 村山 康樹

1 はじめに

近年、医薬品類や生活ケア用品（PPCPs）をはじめとする、水環境中の微量化学物質に関する研究、報告が多くなされるようになり、下水処理水中にも多種の化学物質が微量ながら存在していることが明らかになってきている。一方で、これらの物質が実環境中で及ぼす影響については十分明らかになっていない。下水処理水による人や水生生態系への影響を低減、防止し、健全な水環境を確保するためには、従来からの個別物質規制に加え、多様な化学物質を総合的に管理、規制することが必要となる。このような状況のなか欧米では、放流水の総体的毒性について評価を行う WET (Whole Effluent Toxicity) 手法を活用した規制が導入されており、わが国に於いても検討が進められている。

本調査では、流入下水及び処理プロセスの異なる複数の下水処理水に対して、複数のバイオアッセイ手法を適用して水生生態系に対する総毒性評価や、微量化学物質の分析結果との比較を行ない、下水道が放流先水域の水生生態系に与える影響について検討した。

2 細菌、藻類、甲殻類を用いた検討

2.1 調査方法

2.1.1 対象とした下水

(1) 流入下水

主に生活排水を処理しているA下水処理場の流入下水のうち、分流式下水道として整備されている幹線からの流入下水を用いた。

(2) 二次処理水

(1) の流入下水に対して、屋外に設置された処理実験装置を用いて標準活性汚泥処理を行い、得られた処理水を用いた。実験装置の概要を図2.1.1に示す。

(3) 三次処理水

A下水処理場の三次処理水を用いた。同施設では、

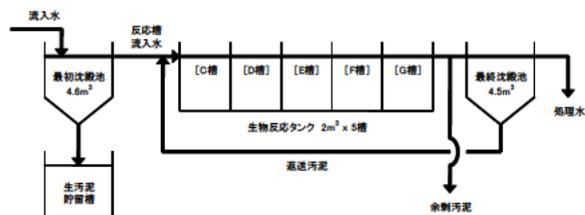


図2.1.1 標準活性汚泥処理施設の概要

生物学的栄養塩除去法（一部は凝集剤を併用）＋急速砂ろ過処理が採用されている。

2.1.2 調査時期、採水方法

試料の採取は、平成21年6月～11月の各月に1回、計6回行った。採取した試料は氷冷状態で試験室に持ち帰り、以降の試験操作に供した。

なお、各試料はそれぞれスポット採水したもので HRTなどを考慮してはいないため、同日の流入水と処理水とは厳密には対応していないことに留意が必要である。

2.2 バイオアッセイ手法

2.2.1 試料の前処理

わが国の下水処理水では、汚濁の程度が低く急性毒性が比較的小さい場合が多く、そのままの状態では処理レベルによる生態影響の変化を検討することは困難である。本研究では、医薬品類などの下水中に含まれる有機物質に由来する毒性に注目し、吸着樹脂を用いた固相抽出・濃縮法により試料中の有機物質などを濃縮した後、バイオアッセイに供する手法を適用した。

ガラス繊維ろ紙(Whatman社、GF/B)で濾過した処理水試料100mLを、固相カートリッジ(Waters社製、OASIS-HLB)に通水した後、メタノールで溶出した溶出液を乾固し、100μLのジメチルスルホキシド(DMSO)に

転溶することで、10000倍濃縮試料を得た。各試験では、この濃縮試料を適宜希釈して用いた。

2.2.2 細菌によるバイオアッセイ

海洋性発光細菌*Vibrio fischeri*を供試生物とし、発光阻害を観察するバイオアッセイを実施した。本調査では、Strategic Diagnostics Inc.社から市販されている生態毒性試験システムMicrotox®を用い、システム添付のプロトコールに従って、サンプルの段階希釈系列(公比2)中に5分及び15分曝露した後の発光阻害を測定し、付属の計算ソフトにより半数影響濃度(EC₅₀)を求めた。最大暴露濃度は、9倍(溶液中のDMSO濃度0.09%)に設定した。

2.2.3 藻類によるバイオアッセイ

藻類を供試生物とし、暴露期間中の生長阻害を観察する「藻類生長阻害試験」は、経済協力機構(OECD)によって標準化¹⁾されており、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)」に基づく生態毒性試験法としても規定されている。本調査では、淡水性の単細胞緑藻*Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35株)を用い、藻類生長阻害試験を実施した。最大暴露濃度は、流入下水は4.2倍(DMSO濃度0.042%)、処理水は42倍(DMSO濃度0.42%)に設定した。処理水ではDMSOの試験濃度が0.1%を超えている。DMSOの無影響濃度は1%以上であることを過去の検討において確認しているが、結果の解釈には注意が必要である。

Yamashitaら²⁾の方法を参考に、96ウェルマイクロプレート培養容器とする手法を適用し、温度24℃、照度4000Lux、振とう速度120rpmの条件下、サンプルの段階希釈系列(公比2)中で96時間曝露を行った。暴露期間中は、24時間毎にマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer社、ARVO SX-1420)を用いて各ウェルの吸光度(450nm)を測定し、関係式から細胞濃度を求めて生長速度を算出した。EcoTox-Statics Ver.2.6d³⁾を用い、暴露開始後72時間の生長速度と暴露濃度の関係から半数影響濃度(EC₅₀)を求めた。

2.2.4 甲殻類によるバイオアッセイ

甲殻類を用いるバイオアッセイとしては、ミジンコ類の遊泳阻害を観察する「急性遊泳阻害試験」や、産仔数を観察する「繁殖試験」が、OECDテストガイド

ラインによって標準化⁴⁾されており、化審法に基づく生態毒性試験としても規定されている。本調査では、淡水性の鰓脚綱オオミジンコ(*Daphnia magna*)を用い、ミジンコ急性遊泳阻害試験を実施した。最大暴露濃度は、10倍(DMSO濃度0.1%)に設定した。

供試生物の継代飼育や馴化等に用いる費用と労力を軽減するため、MicroBioTests社から市販されている毒性試験キット(DAPHTOXKIT FTM magna)に付属する休眠卵を用い、キットに付属の試験容器または6ウェルマイクロプレートを培養容器として試験を行った。温度20℃、暗条件下、サンプルの段階希釈系列(公比2)中で48時間曝露を行い、曝露後の遊泳阻害率と暴露濃度の関係から、EcoTox-Statics Ver.2.6dを用い、半数影響濃度(EC₅₀)を求めた。

2.3 水質分析項目と分析方法

2.3.1 一般項目

懸濁物質(SS)、溶解性有機態炭素(DOC)、全窒素(T-N)、アンモニア態窒素(NH₄-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、全りん(T-P)及びりん酸態りん(PO₄-P)について、下水試験方法⁵⁾に記載の方法又はそれに準じた方法により測定を行った。なお、DOCの測定にはTOC計(島津製作所製、TOC-5000)を、各態窒素・りん分析には自動比色分析装置(旧Bran Leubbe社、TRAACS2000)を用いた。

2.3.2 医薬品類

これまで土木研究所で調査対象としてきた医薬品類92物質⁶⁾、及びthymol、triclosanの計94物質について分析を行った。これまで土木研究所でこれらの物質は、平成15年度の生産量が1トン以上⁷⁾と多く、一般的に用いられていると考えられる医薬品類を中心に、我が国でこれまで検出例が報告されている物質を選定したもので、解熱鎮痛消炎剤、神経系用剤、抗生物質、不整脈用剤、動物用医薬品等が含まれている。

試料中の溶存態成分について、thymol、triclosanの2物質は宝輪ら⁸⁾の方法を参考にGC-MS法により、その他92物質は小西ら⁹⁾の方法を参考にLC-MS-MS法により、それぞれ一斉分析を行った。

2.4 調査結果

2.4.1 バイオアッセイ結果

流入下水、二次処理水、三次処理水について、バイオアッセイにより半数影響濃度(EC₅₀)を算出した結果を、表2.4.1に示す。EC₅₀の値は、試料（流入下水または処理水）に対する濃縮倍率（もとの試料濃度を1倍とする）として示した。

流入下水では、3生物種のいずれの試験系においても明らかな影響が見られ、半数影響濃度EC₅₀の値は、細菌の系で0.16~0.55倍（平均0.30倍）、藻類の系で0.74~1.7倍（平均1.3倍）、甲殻類の系で0.77~2.0倍（平均1.4倍）であった。処理水については、細菌の系では二次処理水に対して、甲殻類の系では二次処理水及び三次処理水の両方に対して、6回の調査のほとんどで試験濃度範囲において影響が見られず、EC₅₀が算出できなかった。これら2生物種の系では、DMSOの影響や試験水量の面から、本調査以上の濃度での暴露は困難である。一方、暴露濃度を比較的高濃度に設定した藻類の系ではEC₅₀の値が算出され、二次処理水で18~31倍（平均23倍）、三次処理水で23~69倍（平均32倍）であった。

ここで半数影響濃度EC₅₀は、毒性が強いほど数値が小さくなり、毒性が確認できない場合には値が無限大となるため他の指標との比較検討において扱いにくいことから、EC₅₀値の逆数をとり毒性単位TUを算出した（TU=1/EC₅₀）。TUは、値が大きいほど試料の生態毒性が強い事を示し、試料のEC₅₀が濃縮倍率1倍であるときTU=1となる。結果を図2.4.1に示す。

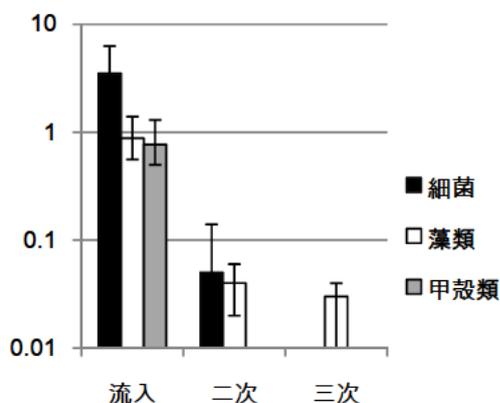


図2.4.1 毒性単位 (TU) の変化

表2.4.1 細菌、藻類、甲殻類に対する下水のEC₅₀

(単位：倍[試料原水(1倍)に対する濃縮倍率])

供試生物 エンドポイント		細菌 5min 発光阻害	緑藻 72hr 生長阻害	甲殻類 48hr 遊泳阻害
調査1 (6月)	流入	0.31	0.82	0.77
	二次	>9 (25)	18	>10 (36)
	三次	>9 (28)	30	>10 (n.c.)
調査2 (7月)	流入	0.55	1.8	2
	二次	7.1	31	>10 (n.c.)
	三次	>9 (17)	23	>10 (n.c.)
調査3 (8月)	流入	0.16	0.74	1.1
	二次	>9 (22)	20	>10 (n.c.)
	三次	>9 (n.c.)	41	>10 (n.c.)
調査4 (9月)	流入	0.28	1.3	1.4
	二次	>9 (32)	>42 (45)	2.1
	三次	>9 (68)	>42 (69)	>10 (14)
調査5 (10月)	流入	0.34	1.3	1.7
	二次	>9 (40)	23	>10 (n.c.)
	三次	>9 (n.c.)	24	>10 (n.c.)
調査6 (11月)	流入	0.3	1.7	1.6
	二次	>9 (31)	24	>10 (n.c.)
	三次	>9 (n.c.)	42	>10 (n.c.)

※ 網掛けは、EC₅₀が最大暴露濃度以上

※ n.c.は、not calculatedの略

表2.4.2 水質分析結果(一般項目)

(単位：mg/L)

		DOC	T-N	NH ₄ -N	T-P
調査1 (6月)	流入	33	38	22	4.6
	二次	4.8	11	0.16	1.4
	三次	4.3	6.2	0.11	0.09
調査2 (7月)	流入	-	35	20	4.1
	二次	-	24	21	1.2
	三次	-	5.9	0.2	0.24
調査3 (8月)	流入	43	41	23	4.4
	二次	5.9	14	1	1.6
	三次	4.5	6.9	0.02	0.23
調査4 (9月)	流入	41	52	35	4.9
	二次	8.5	23	18	0.9
	三次	4.7	6.9	0.14	0.65
調査5 (10月)	流入	46	24	11	2.6
	二次	5.5	12	0.08	1.5
	三次	3.3	4.7	<0.01	0.23
調査6 (11月)	流入	29	38	23	4.2
	二次	4.9	11	0.08	1.5
	三次	4.1	6.2	<0.01	0.06

このグラフからは、流入下水中に存在する有機物質に由来する生態毒性が、下水処理プロセスで大きく低減されていたことがわかる。また、細菌及び藻類の系の結果からは、下水処理のレベルが上がる（標準活性汚泥処理→高度処理+砂ろ過）ことで、毒性低減の度合いも大きくなる傾向が見られた。

2.4.2 水質分析結果

(1) 一般項目

水質一般項目の分析結果の一部を表2.4.2に示す。流入下水では、第5回調査時に濃度が低い項目が見られる（前日に50mm程度の降雨）以外は大きな変化は見られなかった。二次処理水では、T-N、NH₄-Nの濃度から、特に第2回、第4回の調査日には良好な処理状態でなかったことがわかる。三次処理水ではいずれの項目も安定して低く、良好な維持状態が継続されていたと考えられる。

(2) 医薬品類

医薬品類の分析結果のうち、流入下水で100ng/L以上、または処理水で10ng/L以上の濃度で検出された物質（94物質中31物質）について表2.4.3に示す。

物質により、流入下水、二次処理水、三次処理水中の濃度変化のパターンが大きく異なっており、流入下水に比べて、二次処理水、三次処理水ともに大きく低減されている物質（acetaminophen、caffeine、theophyllineなど）、二次処理水、三次処理水ともにほとんど低減されていない物質（crotamiton、disopyramide、primidoneなど）、二次処理水、三次処理水ともに低減されているが、三次処理水の低減率がより大きい物質（bezafibrate、furosemide、levofloxacinなど）などが見られた。

また、31物質中、平成20年度調査¹⁰⁾でのリスク評価において、注意が必要であると判断された7物質（azithromycin、caffeine、clarithromycin、crotamiton、levofloxacin、thymol、triclosan）に注目したのが図2.4.2である。caffeineとthymolでは二次処理水、三次処理水ともに流入水に比べて大きく低減されているのに対し、その他の5物質では流入水と処理水の濃度差が小さく、特にcrotamitonでは二次処理水、三次処理水ともに流入水との差が見られなかった。また、azithromycin、clarithromycinでは、若干ではあるが二

表2.4.3 水質分析結果(医薬品類、6回の調査の平均値)

	(単位：ng/L)		
	流入	二次	三次
acetaminophen	570	1	<0.5
atenolol	220	15	9
azithromycin	16	18	6
bezafibrate	910	100	28
caffeine	5,200	5	9
carbamazepine	8	16	19
clarithromycin	190	230	72
crotamiton	440	390	400
diclofenac sodium	78	68	41
diltiazem	<0.2	18	20
disopyramide	260	190	180
fenoprofen	43	11	16
furosemide	140	56	11
ibuprofen	440	43	12
indomethacin	49	42	18
ketoprofen	100	130	17
levofloxacin	720	330	160
mefenamic acid	37	18	24
metoprolol	6	14	10
DEET	200	69	63
naproxen	34	13	6
phenobarbital	110	290	300
phenytoin	7	22	22
prednisolone	120	<0.4	<0.4
primidone	33	25	26
sulfamethoxazole	10	14	29
sulpiride	5,500	3,500	2,700
tetracyclin	35	11	4
theophylline	450	3	4
thymol	340	13	6
triclosan	340	170	100

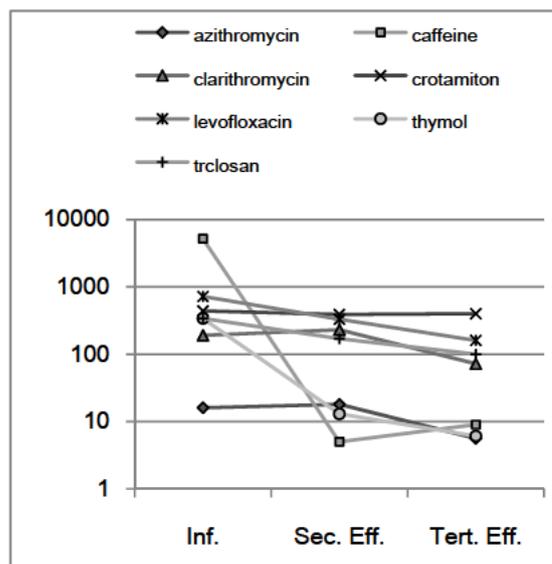


図2.4.2 医薬品類7物質の分析結果 (ng/L)

次処理水の濃度が流入水よりも高くなっていた。先述の通り、各試料はスポット採水されているため単純な比較は出来ないが、水酸化体や抱合体などの代謝物として流入してきた成分が、処理工程において再度clarithromycinに変化している可能性も考えられる。

2.4.3 水質と総体的毒性の比較検討

(1) 医薬品類に由来する生態リスク

はじめに、下水処理水中に含まれる医薬品類に由来する生態リスクについて検討を行った。過去に(独)土木研究所が行ってきた研究において、本調査で測定対象とした医薬品類94物質中43物質について、水生生物に対する予測無影響濃度 (PNEC) が算出されており、8物質については、正確な値は算出されていないが、PNECが10 μ g/L以上であると判定されている (一部の物質は未報告) ¹¹⁾。この中には、今回の調査で検出濃度が高かったとして表3.2.5に示した31物質中、26物質が含まれている。この値を用い、各試料中の医薬品類による生態リスク評価を行った。

1) 個々の医薬品の生態リスク評価

PNECが算出されている43物質について、生態リスクの指標として、各試料中の濃度 (MEC) と予測無影響濃度 (PNEC) の比 (MEC/PNEC) を算出した。試料中の濃度が検出下限値未満であった場合には検出下限値をMECとみなして計算した。

生態リスク初期評価の指針を示した「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」¹²⁾においては、MEC/PNECが1以上の物質は詳細な検討を行う候補であると考えられ、0.1以上1未満の物質については情報収集に努める必要があると考えられる、とされている。本調査において、18試料中1試料についてもMEC/PNECが0.1以上となった11物質について、表2.4.4に整理した。11物質中、acetazolamide、caffeine、ibuprofen、thymolの4物質では、MEC/PNEC \geq 0.1以上となった試料は流入下水のみであったが、その他の物質は二次処理水または三次処理水においてもMEC/PNEC \geq 0.1 以上となる試料があった。azithromycin、clarithromycin、crotamiton、levofloxacin、triclosanの5物質は、二次処理水、三次処理水の何れについても、6回の調査の平均でMEC/PNEC \geq 0.1以上となり、中でもclarithromycinとtriclosanは、すべての試料でMEC/PNEC \geq 1以上であった。上記の医薬品類5物質の用途をみると、4物質 (azithromycin、clarithromycin、levofloxacin、triclosan) が抗生物質や殺菌剤である (crotamitonは鎮痒剤)。このことから、下水中に存在する医薬品類には生態リスクの観点から注目すべき物質があり、抗生物質や殺菌剤などの下水道における存在実態、挙動について詳細な把握を行う必要があると考えられる。

表2.4.4 本調査においてMEC/PNECが1以上の試料があった医薬品類

	PNEC (μ g/L)	MEC/PNEC								
		Influent			Secondary effluent			Tertiary effluent		
		Max.	~ Min.	Ave.	Max.	~ Min.	Ave.	Max.	~ Min.	Ave.
acetazolamide	1.4	1.4	~ 0.11	0.41	0.00	~ 0.00	0.00	0.00	~ 0.00	0.00
azithromycin	0.019	1.3	~ 0.59	0.83	1.7	~ 0.22	0.96	0.44	~ 0.24	0.29
bezafibrate	10.	0.11	~ 0.07	0.09	0.03	~ 0.00	0.01	0.01	~ 0.00	0.00
caffeine	5.2	1.1	~ 0.87	0.99	0.00	~ 0.00	0.00	0.00	~ 0.00	0.00
clarithromycin	0.012	24.	~ 12.	16.	34.	~ 4.0	19.	9.3	~ 4.8	6.0
crotamiton	3.5	0.14	~ 0.10	0.13	0.12	~ 0.10	0.11	0.13	~ 0.09	0.11
ibuprofen	2.3	0.25	~ 0.15	0.19	0.07	~ 0.01	0.02	0.01	~ 0.00	0.01
ketoprofen	2.0	0.07	~ 0.04	0.05	0.11	~ 0.01	0.06	0.01	~ 0.00	0.01
levofloxacin	1.5	0.64	~ 0.30	0.48	0.34	~ 0.14	0.22	0.14	~ 0.07	0.11
mefenamic acid	0.39	0.21	~ 0.04	0.09	0.08	~ 0.03	0.05	0.14	~ 0.02	0.06
triclosan	0.012	47.	~ 22.	32.	27.4	~ 8.9	14.	31.	~ 2.2	8.5
thymol	1.6	0.34	~ 0.11	0.21	0.03	~ 0.00	0.01	0.01	~ 0.00	0.00

* 太字はMEC/PNECが1以上、網掛けはMEC/PNECが0.1未満

2) 調査対象医薬品類全体としての生態リスク

1) で求めた個々の物質の生態リスク (MEC/PNEC) をもとに、各試料中における対象医薬品類全体としての生態リスクについて検討した。多種類の物質が共存する場合の複合影響について評価するモデル、手法は確立されていないが、相加性が仮定出来る場合には、個々の物質の影響(リスク)の総和を混合物の影響(リスク)とみなして評価する手法が比較的広く用いられている¹³⁾。医薬品類の水生生物に対する作用機序は十分明らかにされておらず、それに基づく詳細な検討はできないため、本検討では全ての医薬品類について、水生生物に対する毒性が濃度相加的 (concentration additive) であると仮定した。この仮定のもとでは、対象医薬品類全体としての生態リスクは、個々の物質の生態リスクの合計値 ($\Sigma(\text{MEC/PNEC})$) で表現される。

各試料について $\Sigma(\text{MEC/PNEC})$ を算出した結果を、表2.4.5及び図2.4.3に整理して示す。各試料の $\Sigma(\text{MEC/PNEC})$ は、流入水で44~62 (平均値52)、二次処理水で28~46 (平均値35)、8.7~36 (平均値15) となった。試料がスポット採水であることに留意する必要があるが、得られた数値を用いて簡易的に流入水に対する除去率を計算すると、二次処理水では33% (10~44%)、三次処理水では71% (42~81%) となった。

3) 医薬品類の生態リスクと総体的毒性評価の比較

2) で求めた流入水、処理水各試料の生態リスクの合計値 ($\Sigma(\text{MEC/PNEC})$) と、バイオアッセイ手法により評価した毒性単位 (TU) との比較を行った。ここでPNECは、その算出過程において、急性慢性比、感受性の種間差、試験室と実環境の差などを外挿するための安全係数 (アセスメントファクター) が適用されている。比較のため毒性単位TUについても、「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」¹²⁾の安全係数を参考に、1000を乗じた値を算出して用いた。結果を図2.4.4に示す。

バイオアッセイにより求めた試料の毒性単位TUと、水質分析結果から算出した医薬品類由来の生態リスク評価値 ($\Sigma(\text{MEC/PNEC})$) は、ともに流入水>二次処理水>三次処理水の順に小さくなっており、

表2.4.5 試料中の医薬品類に由来する生態リスク

		$\Sigma(\text{MEC/PNEC})$	clarithromycin	triclosan
調査1 (6月)	流入	44	13	28
	二次	28	17	8.9
	三次	10	5.6	3.8
調査2 (7月)	流入	46	16	26
	二次	32	4	27
	三次	12	6	5.3
調査3 (8月)	流入	62	12	47
	二次	35	18	15
	三次	36	4.9	31
調査4 (9月)	流入	47	13	31
	二次	28	9.5	17
	三次	8.7	5.5	2.4
調査5 (10月)	流入	60	17	40
	二次	42	31	9.5
	三次	12	4.8	6.8
調査6 (11月)	流入	51	24	22
	二次	46	34	9.2
	三次	12	9.3	2.2
平均	流入	62	19	39
	二次	42	23	17
	三次	18	7.2	10

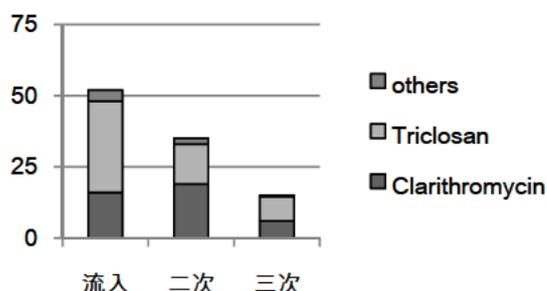


図2.4.3 医薬品類由来の生態リスク (6回の平均値)

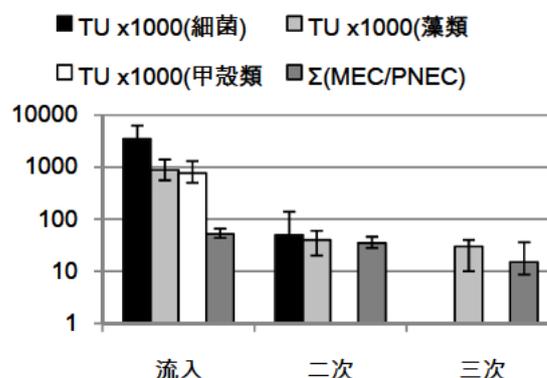


図2.4.4 試料の生態毒性TU*1000と医薬品類由来の生態リスク $\Sigma(\text{MEC/PNEC})$ の比較

下水処理及びその高度化により、流入下水の生態毒性、医薬品類が除去されることが確認された。一方で、流入水と処理水を比較した場合、 $\Sigma(\text{MEC/PNEC})$ の低減率はTUの低減率に比べて小さく、下水処理水中では、有機成分由来の生態リスクに占める医薬品類の寄与が、相対的に大きくなっている可能性が示された。

2.6 まとめ

本検討では、下水道が処理水放流先の水生生態系に下水処理水の総毒性評価手法による下水の検討を目的に、3生物種（細菌、藻類、甲殻類）を用いたバイオアッセイ手法による流入下水、処理水の総毒性評価を行うとともに、医薬品類の分析を行ない、水生生態系に対するリスク評価を試みた。結果は以下のとおりである。

- 1) 流入下水では、3生物種のいずれに対しても EC_{50} が1倍前後となった。流入下水中には、多くの水生生物種に対して毒性を示す有機物質が、比較的高い濃度で存在していると考えられる。
- 2) 二次処理水、三次処理水では、いずれの生物種に対しても、流入下水と比較して毒性の大きな低下が見られたが、細菌及び甲殻類の系では定量的な評価は困難であった。
- 3) 藻類に対する EC_{50} 値は、流入下水で0.74~1.7倍（平均1.3倍）、二次処理水で18~31倍（平均23倍）、三次処理水で23~69倍（平均32倍）となり、流入下水中の有機物質に由来する生態毒性は、活性汚泥処理によって大きく低減され、高度処理（生物学的脱窒素・脱りん法や急速砂ろ過処理）を行うことで、さらに低減の度合いが高まる可能性が示された。
- 4) 下水中の医薬品類濃度と各物質の生態毒性データ、及び下水自体の総体的毒性評価のデータを比較した結果、良好な処理条件下では医薬品類に由来する生態影響は比較的小さいと考えられるが、抗菌薬 Triclosan や抗生物質 Clarithromycin などいくつかの物質については、下水中での挙動に注目する必要があることが確認された。
- 5) バイオアッセイにより求めた試料の毒性単位TUと、水質分析結果から算出した医薬品類由来の生態リスク評価値（ $\Sigma(\text{MEC/PNEC})$ ）は、ともに流入水>

二次処理水>三次処理水の順に小さくなっており、下水処理及びその高度化により、流入下水の生態毒性、医薬品類が除去されていることが確認された。一方で下水処理水中では、有機成分由来の生態リスクに占める医薬品類の寄与が相対的に大きくなっている可能性がある。

3 魚類を用いた検討

これまで土木研究所で行ってきた下水処理水中のエストロゲンやエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響の調査から、下水処理水中に残存しているエストロゲン類は、オスメダカ肝臓中のビテロゲニンやコリオゲニン遺伝子を誘導することがわかってきた。オスメダカ肝臓中でのビテロゲニンやコリオゲニン遺伝子は、処理水中のエストロゲン濃度が数ng/Lであっても誘導されていたことから、遺伝子発現の変化を指標とすることにより、高感度での魚類影響の把握やこれによる下水処理水の安全性評価ができる可能性がある。そこで本調査では、生物影響の指標になると考えられている遺伝子に着目し、処理の程度が異なる下水処理水にメダカを短時間曝露し、下水処理レベルとメダカ遺伝子発現の関係についての基礎的知見を得ることとした。

3.1 調査方法

3.1.1 対象とした下水

(1) 二次処理水

2.1.1 (2) と同じ、標準活性汚泥処理実験装置の処理水を用いた。

(2) 三次処理水

2.1.1 (3) と同じ、A下水処理場の三次処理水（生物学的栄養塩除去法（一部は凝集剤を併用）+急速砂ろ過処理）を用いた。

(3) 下水放流水

A下水処理場の塩素消毒後の放流水を用いた。

3.1.2 調査時期

試料の採取及び曝露試験は、平成21年5月（下水放流水）、7月（二次処理水）および10月（三次処理水）に行った。

3.2 バイオアッセイ手法

3.2.1 暴露条件

前年度までの調査では、メダカの曝露時間を1週間以上としてきたが、下水処理水の安全性をより迅速に評価するために、本研究では、曝露時間を24時間とした。

表3.2.1に曝露条件を示す。

表3.2.1 曝露条件

暴露方式	半止水式
暴露期間	24時間
試験水量	3L
供試生物	d-rRメダカ雄魚、3~5カ月齢
供試生物数	5個体 / 曝露期間 / 試験区
試験水温	24°C
照明	16時間明 / 8時間暗
給餌	なし
エアレーション	なし

3.2.2 解析臓器

遺伝子発現解析の対象臓器は、肝臓とエラとした。肝臓は、薬物代謝機能や様々なタンパク質を作る機能を有しており、エラは、水中の化学物質と直接接触する器官である。これらの臓器は、毒物の影響が現れやすいと考えられる。さらに、これらの臓器は、比較的摘出しやすく、他の臓器と比べると大きく、RNAの抽出も容易である。

臓器の摘出は次のとおり行った。曝露期間終了後、1匹ごとメダカを水槽からタモで取り上げ、氷冷麻酔の後、RNAlater（RNAの分解を防ぐ細胞保存液）中で解剖し、エラ、肝臓を摘出した。摘出した各臓器は、RNA抽出までの間RNAlater中で保存した。

3.2.3 遺伝子発現解析

各臓器からのRNA抽出は、QIAGEN社製のRNA抽出キットRNeasy mini kitを使用した。RNAを抽出液は、バイオアナライザーでRNAの分解の程度を確認し、RNAが分解されていない試料について、QuantiTect Rev. Transcription Kit (QIAGEN社製)で逆転写後、QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN社製)を用い、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法により、コリオゲニン遺伝子(ChgH)、シトクロムP450 1A1遺伝子(CYP1A1)、P53遺伝子、メタロチオネイン遺伝子、さらに、内在性遺伝子コントロールとして Acidic ribosomal

表3.2.2 アルタイムPCR法で使用したプライマーとプローブの配列

遺伝子	プライマー / プローブの配列
ChgH	Fw. CGG ATA GTC CTC TTT CCA TTG C
	Rev. TTT GAC ACT GCC CAT TGG C
	Probe FAM- AGC TTG GAC CCC TCA AGT GTA CTT GCA -BHQ
CYP1A1	Fw. GCC ATT CTT CAT TTC TCC CTT TC
	Rev. ACG TGT CTT TGG GAA TAT AGT AAC CAT T
	Probe FAM- CAA TTC CAC ACT GCA CAA CAA GGG ACA -BHQ
P53	Fw. GCA GAC CCA TCC TCA CCA TC
	Rev. CGG CTT TCC TCC TCC GTT
	Probe FAM-TCA CTC TGG AAA CCG AGG GTC TGG TTC-BHQ
メタロチオネイン	Fw. TTG CAC CTG CAC AAA CTG C
	Rev. TGA CAA CAA GTA GTG TCG CAG G
	Probe FAM-AGC TGC AAG AAA AGC TGC TGT GCA TG-BHQ
ARP	Fw. TGT TGA ACA TCT CGC CCT TCT
	Rev. CGA GGA CCT CAG GGC TGT AG
	Probe FAM-CTT CGG ACT CAT CAT CCA GCA GGT GTA TG-BHQ

phosphoprotein (ARP) 遺伝子の発現量を測定した。ただし、エラについては、CYP1A1遺伝子とP53遺伝子、及びARP遺伝子のみを測定した。表3.2.2にPCR実験に使用したプライマーとプローブの配列を示す。

また、各遺伝子の概要は以下のとおりである。

1) コリオゲニン遺伝子 (ChgH)

コリオゲニンは、卵膜タンパク質の前駆物質であり、女性ホルモンの作用により肝臓で作られ血液にのって卵巣に運ばれる。ChgH遺伝子は、雌の肝臓で強く発現しているが、雄の肝臓でも弱く発現している。女性ホルモン様物質により、雄でも遺伝子発現が増加し、女性用ホルモン物質の指標となると考えられる。

2) シトクロムP450 1A1遺伝子 (CYP1A1)

薬物代謝酵素遺伝子であり、平面構造をもつ多環芳香族炭化水素などにより、遺伝子発現が増加する。このことから、CYP1A1遺伝子発現は、環境汚染物質のバイオマーカーとして利用できると考えられる。

3) P53遺伝子

ガン抑制遺伝子であり、DNAを修復するタンパク質の活性化やDNAの修復が不可能な場合は、細胞死を誘導する。P53遺伝子発現は、DNA損傷物質の有無の指標となる可能性がある。

4) メタロチオネイン遺伝子

金属結合タンパク質であり、重金属の解毒や微量元素の維持の機能をもつと考えられる。本遺伝子発現は、重金属の汚染の指標になると考えられる。

3.3 調査結果

脱塩素水道水（コントロール）に24時間曝露した5個体の平均値を基準として、それに対する24時間曝露

区個体の遺伝子発現倍率を算出した。コントロール区と下水処理水曝露区で大きく変動した遺伝子は、エラではCYP1A1遺伝子、肝臓ではコリオゲニン遺伝子であった。その他の遺伝子は大きな変化はみられなかった。

図3.2.1は、下水処理のレベルとエラでのCYP1A1遺伝子発現強度の関係を、図3.2.2は、下水処理のレベルと肝臓でのコリオゲニン遺伝子発現強度の関係を示したものである。エラのCYP1A1遺伝子は、2次処理水区ではコントロールの40~120倍程度、3次処理水区でも10倍程度発現しており、短時間曝露でも高感度に下水処理の魚類影響を検出できることがわかった。

肝臓のコリオゲニン遺伝子発現は、二次処理水区でコントロール区の100倍程度増加しており、女性ホルモン様物質の残存が考えられた。三次処理水区、下水放流水区では、大きな変化はみられなかった。

以上の結果から、エラのCYP1A1遺伝子、肝臓のコリオゲニン遺伝子に着目したバイオモニタリングを行うことにより、処理水中の女性ホルモン様物質や多環芳香族炭化水素など（現時点では、エラのCYP1A1遺伝子がどのような物質に反応しているかは明らかでない）の化合物の存在の有無に関する情報を得られるものと考えられる。

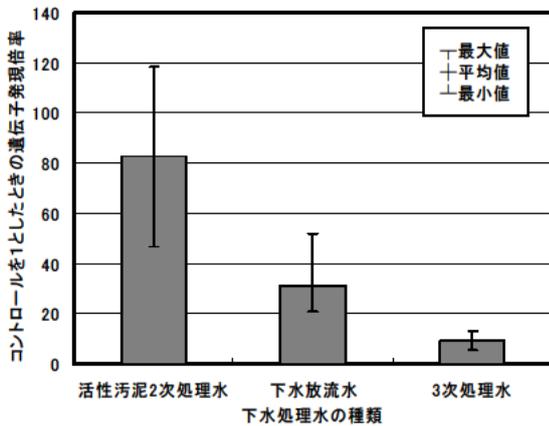


図3.2.1 下水処理水の種類とメダカエラのCYP1A1遺伝子発現の関係（24時間曝露）

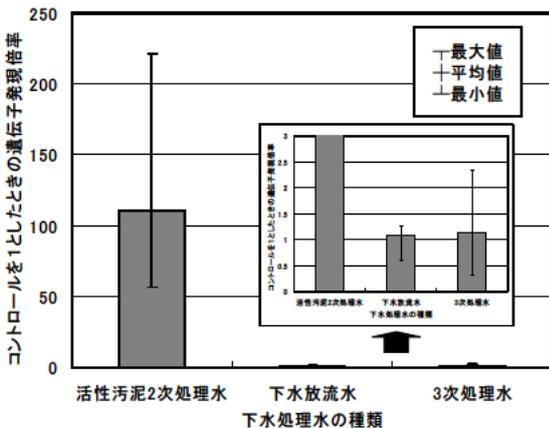


図3.2.2 処理水の種類とメダカ肝臓のコリオゲニン遺伝子発現の関係（24時間曝露）

3.4 まとめ

本検討では、メダカを試験魚として、生物影響の指標になると考えられている遺伝子（コリオゲニン遺伝子、CYP1A1遺伝子、P53遺伝子、メタロチオネイン遺伝子）に着目し、処理レベルの異なる下水処理水にメダカを短時間曝露した場合のこれらの遺伝子発現と下水処理レベルとの関係について調査した。結果は以下のとおりである。

- 1) 高度処理（3次処理）水に短時間（24時間）曝露した場合、肝臓での各遺伝子発現は大きく変動しなかったが、エラではCYP1A1遺伝子の発現が数十倍程度高くなることが確認された。
- 2) 処理レベルが低下すると、肝臓でのコリオゲニン遺伝子の発現が高くなることが確認された。
- 3) エラのCYP1A1遺伝子、肝臓のコリオゲニン遺伝子は、下水処理水の魚類影響のバイオマーカーとなる

可能性が示された。

また、本調査では4つの遺伝子に着目したが、他にも有効なバイオマーカー遺伝子が存在する可能性もあり、今後、網羅的な遺伝子発現解析を行っていく必要がある。さらに、遺伝子の発現プロファイルによる、魚類影響の予測手法の開発も重要である。

4 水生昆虫を用いた検討

水生昆虫類は河川の底生動物の主要な構成群であり、河川生態系における一次消費者として重要な機能を担っている。また、有機汚濁などの水質に対する指標生物として、市民参加型の河川管理、環境評価の中でも注目されることも多い。下水処理水が流入する河川では、処理水流入の前後で、生物相が大きく変化し、水生昆虫類の種多様性や非汚濁耐性種の減少がみられることがある。

カゲロウ目やトビケラ目の一部の種の幼虫は、夜間を中心に流下行動を示すことが知られている。流下行動に伴う移動は、自然環境においては成虫の遡上行動、産卵により回復されることでその場における種の生息が保たれているが、何らかの要因により、多量の流下が一時期に発生した場合や通常と異なる時間帯の流下が増加した場合には、生息密度の低下や魚類による捕食圧の増加などにより、生息の維持が困難となる場合が考えられる。本調査では、河川に放流された下水処理水が水生昆虫の流下行動に与える影響について、河川を模した実験水路を用いて検討を行った。

4.1 水路実験

4.1.1 概要

調査は、平成22年3月に行った。使用した実験水路は、幅200mm×高さ150cm×全長4000mmで、材質は塩化ビニル樹脂製の水路末端に2m³の受水槽が設置されており、水中ポンプにより試験水を循環させるシステムになっている。本検討では、両系列の水温・DO濃度をそろえるため、試水を全量循環させる方式で実験を行った。

実験水路内の底面に礫材を設置した後、2系列のそれぞれに下水処理水または河川水を通水した。16時間ほど通水し、水路内を安定させた後、水路上流部に水生昆虫を静かに投入して実験を開始した。水路末端にサ

ーバーネットを設置し、実験開始から1時間後、3時間後、8時間後、24時間後、32時間後、48時間後の6回、流下した試験生物を分けて捕集した。また、48時間経過後に水路に残存していた個体も別に回収した。実験終了後、各時間区に流下または水路に残存した試験生物について、生死の区別、種の同定及び定量を行った。

4.1.2 下水処理水及び河川水

(1) 三次処理水 [試験区]

2.1.1 (3) と同じ、A下水処理場の三次処理水（生物学的栄養塩除去法（一部は凝集剤を併用）＋急速砂ろ過処理）を用いた。

(2) 河川水 [対照区]

利根川水系の神流川において採水した河川水を対照区として用いた。同川は、関東地方整備局管内の1級河川の中で、平成16年度以降5年連続で最も水質が良いとされている河川である¹⁴⁾。

4.1.3 試験生物

本検討では、過去に土木研究所が行った調査で得られた知見などを参考に、以下の2グループの水生昆虫に注目した。

- 1) 匍匐型のカゲロウ目（ヒラタカゲロウ科など）
- 2) 造網型のトビケラ目（シマトビケラ科、ヒゲナガカワトビケラ科など）

河川水採取地点の河床から礫ごと水生昆虫を採取し、河川水を入れたクーラーボックス中で急激な温度変化を避け、エアレーションを行いながら実験施設まで搬送した。

4.2 水質分析

4.2.1 一般項目

水質一般項目として、溶解性有機態炭素(DOC)、各態窒素、りんについて分析を行った。各項目の分析手法は、2.3.1で述べたのと同様である。試験開始時と終了時の2回採水、分析を行い、その幾何平均を算出した。

4.2.2 バイオアッセイ手法による生態毒性評価

2.2で述べた手法により、細菌、藻類、甲殻類を試験生物としたバイオアッセイを行ない、生態毒性評価を実施した。実験開始時の試験水を対象とし、半数影響濃度(EC₅₀)から毒性単位(TU)を算出した。

4.3 実験結果

4.3.1 試験条件

試験期間中の水路の物理条件は、処理水（試験系）及び河川水（試験系）ともに、流速50cm/s程度、水深（礫まで）10cm程度で差がなく、実河川における“瀬”に近い条件で試験が行われた。また、DO濃度は8.1～9.6mg/Lで推移し、十分な酸素濃度であったと考えられる。一方、水温は、循環方式で試験を行ったため2系列間での差は小さかった一方で、期間を通じて上昇傾向が見られ、48時間後（22～23℃）には開始時（12～13℃）に比べ10℃程度高くなっていた。

4.3.2 生物種の同定

今回試験に供した生物種のうち匍匐型カゲロウは、全てヒラタカゲロウ科に属する種であり、平均スコア法(ASTP法)¹⁵⁾ではスコア9に属する、非汚濁性の高い種であった。一方、造網型トビケラは、ヒゲナガカワトビケラ科（スコア9）、またはシマトビケラ科（スコア7）に属する種であり、同様に非汚濁性の高い種であった。

4.3.3 水質分析結果

水質一般項目及び生態毒性試験の分析結果を表4.3.1に示す。DOC、りんに関しては河川水と処理水に差がなかったが、T-Nは河川水が2.6mg/L、処理水が7.0mg/Lと差が見られた。NH₄-Nは両者とも0.02mg/Lであり、T-Nの差はNO₃-Nの差によるものである。一方、毒性単位については、藻類を用いた試験系で処理水から弱い毒性（TU=0.04）が検出された以外は不検出であった。

4.3.4 試験生物の流下率

実験期間中の試験生物の流下率を図4.3.1に示す。匍匐型のカゲロウ種では、対照系（河川水）での流下率は8.7%（n=46）に対して、試験系（下水処理水）での流下率は20%（n=51）となり、倍以上の差が見られた。但し、サンプル数が比較的小さいこともあり、 χ^2 乗検定では両者に有意差があるとは言えなかった（p=0.22）。一方、造網型のトビケラ種では、対照系（河川水）での流下率22%（n=54）に対して、試験系（下水処理水）での流下率は25%（n=72）と、両系列の差は小さく、 χ^2 乗検定でも、有意差があるとは言えなかった（p=0.88）。

表4.3.1 下水質分析及び総体的毒性評価の結果

		対照区 (河川水)	試験区 (下水処理水)
水質指標 (mg/L)	DOC	3.3	4.8
	T-N	2.6	7
	NH ₄ -N	0.02	0.02
	T-P	0.05	0.08
毒性単位 (TU)	細菌	N.E	N.E
	藻類	N.E	0.04
	ミジンコ	N.E	N.E

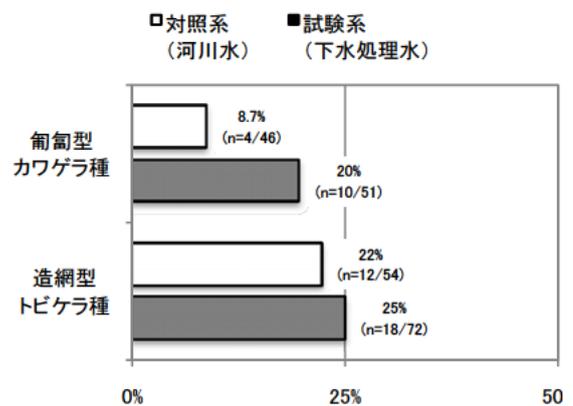


図4.3.1 水路実験結果の概要（流下率の比較）

また、試験期間（48時間）を通じて、日中と夜間、あるいは試験前半と後半などで、流下個体数に明確な差は見られなかった。

4.4 考察とまとめ

本調査で行った水路実験において、造網型トビケラ種では、河川水区と処理水区の流下率には差が見られなかったが、匍匐型カゲロウ種では、河川水区に比べて処理水区で流下率が高くなる傾向が見られた。両生物群の差は、生活型の違いに由来する可能性、種の感受性の差に由来する可能性などが考えられる。河川生態系に対して下水処理水が与える影響が大きい、水温やDO、NH₄-N、残留塩素に関しては、両区での間で差が無かったことから、これらの項目以外に水生昆虫の一部に対して影響を与える要因が、三次処理を受けた良好な水質の処理水中にも存在している可能性が示唆された。

一方、同時に行ったバイオアッセイにおいて、分類学的な位置（節足動物）、及び生態系における地位（一

次消費者) が水生昆虫と近いミジンコの試験系では、河川水、処理水ともに急性毒性は検出されなかった。ミジンコについては、急性慢性毒性比が50を超える物質が比較的多く存在することが報告されている¹⁶⁾ことから、急性毒性試験だけでは、これらの種に対する生態リスクを十分評価出来ていない可能性がある。今後、さらに様々な条件設定での実験を行うとともにフィールドデータを収集し、下水処理水が河川生態系に影響を与える要因を把握し、その低減手法を検討していくことが求められる。

参考文献

- 1) OECD(2006) Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, adopted March 2006.
- 2) Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H. (2006) Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms, Water. Sci. Technol., **53**, pp.65-72
- 3) 吉岡義正(2001) Ecotox-Statics ver.2.x, 環境毒性学会誌, **4**(2), p.113
- 4) OECD(2004) Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test, adopted April 2004.
- 5) 建設省・厚生省(1997) 下水試験方法-1997年版-, (社)日本下水道協会
- 6) 独立行政法人土木研究所(2009) 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料 No.4157, pp.101-114
- 7) 厚生労働省医政局(2004) 薬事工業生産動態統計年報 平成15年, 株式会社じほう
- 8) 宝輪勲, 宮崎沙頼, 中田典秀, 小森行也, 田中宏明(2007) GC-MSによる環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討, 第16回環境化学討論会講演要旨集, pp.774-775
- 9) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明(2006) 環境工学研究論文集, **43**, pp.73-82
- 10) 独立行政法人土木研究所(2009) 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料 No.4157, pp.115-130
- 11) 独立行政法人土木研究所(2009) 平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料 No.4157, pp.131-143
- 12) 環境省(2010) 化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン(平成22年1月版), pp.19-25
- 13) European Chemicals Bureau (2008) TNsG on Product Evaluation
- 14) 国土交通省関東地方整備局(2009) 平成20年 関東地方一級河川の水質現況について <http://www.ktr.mlit.go.jp/kyoku/kisha/h21/07/0404.pdf>
- 15) 全国公害研協議会生物部会(1995) 大型底生動物による河川水域環境評価マニュアル, 全国公害研協議会生物部会
- 16) 第2回厚生科学審議会化学物質制度改正検討部会(平成14年11月7日) 参考資料2「生態毒性の急性毒性値と慢性毒性値の比較」, http://www.env.go.jp/council/05hoken/y053-02/ref_02.pdf

生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：水環境研究グループ(水質)

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、北村友一、村山康樹

【要旨】

医薬品等の生理活性物質は、環境ホルモン同様、低濃度での水生生物への影響が懸念されており、新たな環境汚染問題となっている。このため、生理活性物質が水環境に与える影響を評価し、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じることが求められている。本研究は、医薬品等の生理活性物質の分析法開発、水環境中での実態把握と挙動解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に対して与える影響の評価手法を提案することを目的としている。平成 21 年度は、抗ウイルス剤(タミフル)の分析法開発、水環境中での医薬品の実態把握、バイオアッセイ手法による医薬品類の生態影響評価及び河川水の生態リスク評価を行った。

キーワード：医薬品、一斉分析法、実態把握、バイオアッセイ、生態影響評価

1. はじめに

医薬品等の生理活性物質は、使用の後に水環境中に排出される。これらの物質は環境ホルモン同様、低濃度での水生生物への影響が懸念されており、新たな環境汚染問題となっている。このため、生理活性物質が水環境に与える影響を評価し、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じることが求められているが、それには、生理活性物質の水環境での実態を把握するとともに、水環境中での挙動を解明することが必要である。さらに、水生生物への影響を評価するために、生理活性物質の含まれた環境水の生物影響ポテンシャルを評価する手法が求められている。

このため本研究課題では、医薬品等の生理活性物質の分析方法を開発するとともに、水環境中での実態把握と挙動解明、医薬品等の特性に応じたグルーピングと分析方法および挙動予測手法の提案を行うことを目的とする。さらに、水生生態系への影響を評価するため、様々な生物種を用いたバイオアッセイ手法により医薬品等の評価を行うとともに、生理活性物質の含まれた環境水の生物影響ポテンシャルを評価する手法および水質リスク評価法の提案を行うことを目的とする。

平成 21 年度は、抗ウイルス剤(タミフル)分析法開発、水環境中での医薬品等の実態把握、バイオアッセイ手法による医薬品類の生態影響評価及び河川水の生態リスク評価を実施した。

2. 抗ウイルス剤(タミフルとその代謝物)の下水試料中の分析

2. 1 目的

タミフル(Oseltamivir phosphate: OP、[図-2.1](#))は A 型及び B 型インフルエンザウイルス感染症に対する抗インフルエンザウイルス剤であり、服用後、肝臓のエステラーゼにより加水分解され、Oseltamivir carboxylate(OC、[図-2.2](#))に代謝される¹⁾。また、服用された OP の約 7 割は尿から排泄され¹⁾、下水等を通じて河川水中へ放出される。一方、昨今の世界的なインフルエンザの大流行により、OP 使用量が増加しており、それに伴う水質汚染問題が社会的関心事となっている。しかしながら、下水中の OP や OC を対象とした調査例は極めて少ない²⁾。この理由の一つとして、分析法開発の遅れが指摘される。

このため、本研究では、下水中の OP と OC の LC-MS/MS による高精度分析法の検討を行った。本検討は、(独)土木研究所と(株)島津テクノリサーチの「共同研究」で実施した。

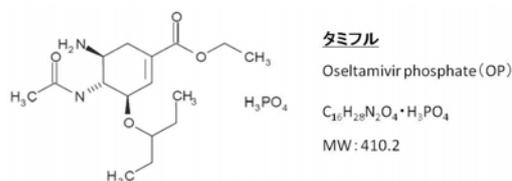


図-2.1 Oseltamivir phosphate(OP)

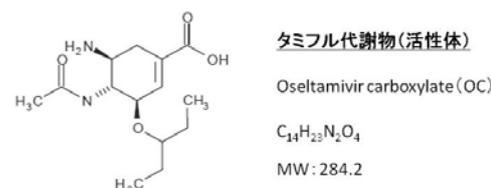


図-2.2 Oseltamivir carboxylate(OC)

2.2 方法

OP の標準物質には APAC Pharmaceutical 製の Oseltamivir phosphate を、OC には Sigma-Aldrich 製の Oseltamivir acid hydrate を使用した。

前処理方法は、採水した試料(100 mL)をガラス繊維ろ紙でろ過し、Oasis HLB(Waters)による固相抽出を行った。メタノールで溶出後、5 mL に定容し、2.5 mL を分取して、ENVI-Carb(SUPELCO)による精製後、1mL に定容したものを測定用試料とした。分析フローの抽出操作を図-2.3、精製操作を図-2.4 に示す。



図-2.3 抽出操作

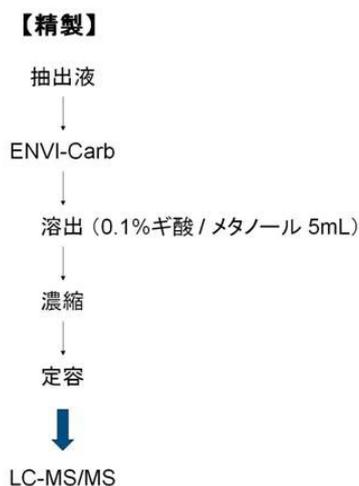


図-2.4 精製操作

抽出・精製液の測定条件は以下のとおりとした。液体クロマトグラフは Prominence(島津製作所)、質量分析計は API 3200(Applied Biosystems)、イオン化法は ESI-Positive を採用し、OP は $[M-H_3PO_4+H]^+$ 、OC は $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選定し、それぞれ

定量イオンは、OP : 313.2/225.0、OC : 285.2/138.0 とした。カラムは Synergi 4u MAX-RP(2.0×150 mm、phenomenex)、移動相には 0.1%ギ酸水溶液とメタノールを使用して、グラジエント条件で測定を行った。

実試料を用いた添加回収試験は、標準活性汚泥法で運転している活性汚泥処理実験装置の流入水を 2009 年 7 月に採水したものをを用いた。

2.3 結果と考察

検量線は OP、OC ともに $r^2=0.999$ と良好な直線性が得られた(表-2.1)。装置検出下限値(IDL)については、試料換算値で OP : 0.34ng/L、OC : 0.29ng/L であり、ばらつき(CV)も極めて小さかった(表-2.2)。採水した流入水に、20 ng/L となるように標準物質を添加して行った添加回収試験(n=5)からも、平均回収率 : 80%、CV : 5%以下と良好な結果が得られた(表-2.3)。従って本研究で開発した分析法は、下水中の OP、OC の定量分析に適用可能であることが確認された。また、OP、OC 各標準物質のメタノール溶液のクロマトグラムを図-2.5、図-2.6 に示す。OP、0.1ng/mL、OC、0.05ng/mL の濃度で S/N 比が 5 以上であり、分離が確認されている。

表-2.1 OP と OC の検量線

化合物	検量線範囲 (ng/mL)	r^2
タミフル(OP)	0.05-5	0.999
タミフル代謝物(OC)	0.05-5	0.999

表-2.2 OP と OC の装置検出下限値(IDL)

化合物	注入液濃度 (ng/mL)	IDL (ng/mL)	IDL試料換算値 (ng/L)	CV (%)
タミフル(OP)	0.1	0.017	0.34	4.3
タミフル代謝物(OC)	0.05	0.015	0.29	6.6

$$\text{※IDL} = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$$

表-2.3 添加回収試験結果(流入水、n=5)

化合物	試料	添加濃度 (ng/L)	検出濃度 (ng/L)	回収率 (%)	CV (%)
タミフル(OP)	下水 (流入水)	20	16	80	4.1
タミフル代謝物(OC)		20	16	80	2.6

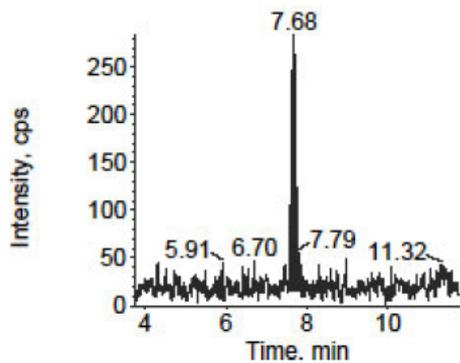


図-2.5 OP 標準液のクロマトグラム

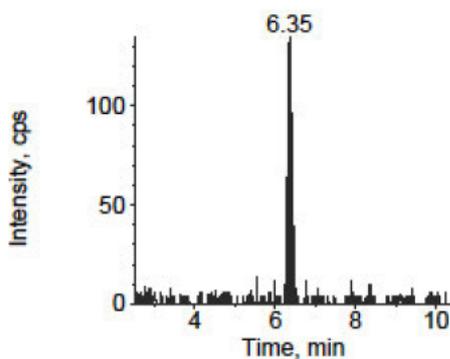


図-2.6 OC 標準液のクロマトグラム

2. 4 今後の展開と課題

本研究において抗ウイルス剤の分析法開発を行った。分析装置の検出下限値は試料換算濃度でOPが0.34ng/L、OCが0.29ng/Lであった。また、流入下水を用いた添加回収試験の結果、OP、OCとも80%の回収率が得られ下水試料への適用が可能である。今後は、本分析法を用い水環境中のOP、OCの実態把握を実施していく必要がある。また、他の抗ウイルス剤についても分析法の検討・開発を継続する必要がある。

3. 晴天時、雨天時の小河川における医薬品類の存在実態

3. 1 目的

新たな微量化学物質汚染として注目されている医薬品類の環境水中の存在実態については多くの調査報告がみられる。しかしながら、晴天時の調査報告がほとんどであり雨天時の流出状況については情報が不足している。本研究では農村地域の小河川において晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出実態の比較を行った。

3. 2 対象医薬品及び分析方法

調査対象とした医薬品類は、Acetaminophen、Amoxicillin、Azithromycin、Caffeine、Chlortetracycline、

Clarithromycin、N,N-diethyl-m-toluamide、Oxytetracycline、Sulfamethoxazole、Sulfamonomethoxine、Tetracycline、Theophylline、Trimethoprimの13物質とした。医薬品類の分析方法は、小西ら³⁾の方法を参考に抽出・濃縮等の前処理を行った後、LC/MS/MSを用いて測定し絶対検量線法により定量した。

3. 3 調査方法

調査地点は、既に報告⁴⁾した霞ヶ浦・北浦に流入する銚田川の支川(St.3、St.5)とした。調査地域の土地利用状況は、田、畑、人口林、広葉樹林が90%を占める農村地域であり、各地点の集水面積はそれぞれ5.4km²、3.9km²である。調査は2008年5月～10月の晴天時に6回、雨天時に4回行った。SS、BOD、COD、DOC、NH₄-Nの一般水質分析用試料、医薬品類分析用試料の採取と試料採取時の流量観測を行った。

3. 4 調査結果と考察

晴天時試料採取時の流量は、St.3は0.06～0.10m³/sec(平均0.08m³/sec)、St.5は0.01～0.11m³/sec(平均0.07m³/sec)であった。また、雨天時試料は降雨(降雨量:17～27mm)の途中で試料採取を行った。試料採取時の流量は、St.3は0.12～0.26m³/sec(平均0.16m³/sec)、St.5は0.19～0.34m³/sec(平均0.25m³/sec)であり、晴天時の2倍(St.3)、3.6倍(St.5)であった。

晴天時、雨天時に採取した試料は持ち帰った後、SS、BOD、COD、DOC、NH₄-Nの5項目について分析を行った。その平均値を図-3.1に示す。多くの測定項目の濃度は晴天時に比べ雨天時に高い値を示した。St.3ではSS(8.5倍)、BOD(5.3倍)、COD(4.5倍)、DOC(1.7倍)、NH₄-N(5.3倍)であった。また、St.5ではSS(7.9倍)、BOD(1.7倍)、COD(2.0倍)、DOC(0.7倍)、NH₄-N(1.2倍)であった。これらの結果からSt.3はSt.5に比べ雨天時における有機性汚濁物質の流出が顕著である。集水域に降雨により流出しやすい有機性物質の汚濁源が存在することが示される。

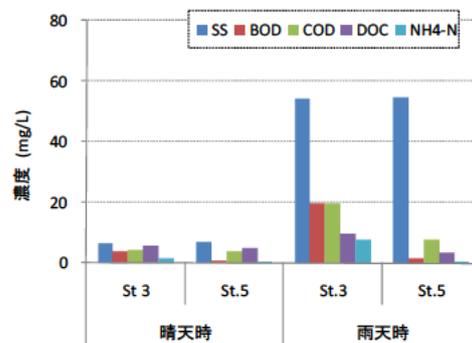


図-3.1 一般水質項目分析結果(平均値)

晴天時、雨天時の医薬品類分析結果(平均値)を表-3.1に示す。平均値の算出にあたり実測値が検出下限値以下のものについては0(ゼロ)とした。また、晴天時と雨天時の医薬品類濃度を比較するため雨天時/晴天時の濃度比を算出し図-3.2に示す。

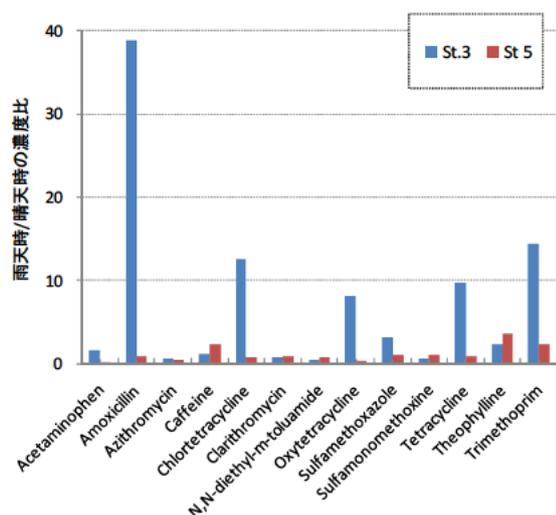


図-3.2 晴天時と雨天時の医薬品類濃度比較

雨天時/晴天時の濃度比は、St.3の人用医薬品6物質(Acetaminophen, Azithromycin, Caffeine, Clarithromycin, N,N-diethyl-m-toluamide, Theophylline)で0.6~2.3を、人・動物両用医薬品6物質(Amoxicillin, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Sulfamethoxazole, Tetracycline, Trimethoprim)で3.2~39、動物用医薬品のSulfamonomethoxineで0.6を示した。人用医薬品6物質と動物用医薬品1物質の雨天時/晴天時の濃度比は、ほぼ0.5~2の範囲であり晴天時、雨天時において大きな濃度変動は見られなかったが、人・動物両用医薬品6物質

は3倍以上と雨天時において濃度上昇が著しく、なかでも Amoxicillin、Chlortetracycline、Oxytetracycline、Tetracycline、Trimethoprimの5物質は、約10倍あるいはそれ以上と大きな濃度上昇が見られた。前述した有機性汚濁物質同様、集水域に降雨により流出しやすい医薬品類が存在することが示された。集水域内を現地踏査したところ、いくつか養豚場の存在が確認されたが、これらが負荷源の一つである可能性がある。

St.5では多くの物質において雨天時/晴天時の濃度比は0.4~3.6の範囲であり雨天時における大幅な濃度上昇は見られなかった。逆にAcetaminophenでは晴天時の1/10以下を示したが、雨による希釈が一因と考えられる。

3.5 今後の展開と課題

晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出特性を比較した。雨天時において晴天時の10倍あるいはそれ以上の濃度で流出する医薬品類がみられ、水環境における医薬品類調査における雨天時調査の重要性が明らかになった。今後は、降雨による流出負荷量の把握など、更に詳しい調査を実施する予定である。

4. 湖沼流入河川の医薬品負荷量と湖沼内の医薬品濃度の関係

4.1 目的

本研究では、平成20年度の報告に続き湖沼とその流入河川における医薬品の存在実態について調査を実施した。

4.2 調査方法

4.2.1 試料採取地点

面積36km²の湖沼内で3ヶ所とその流入河川11ヶ所、合計14ヶ所で試料を採取した(図-4.1)。2009年3月12日に採取し、アスコルビン酸とNa₂EDTAを各約1g/L添加後、冷却しながら分析所に持ち帰った。湖沼流入河川

表-3.1 晴天時・雨天時の医薬品類分析結果(平均値)

物質名	検出下限値 (ng/L)	St.3		St.5	
		晴天時	雨天時	晴天時	雨天時
Acetaminophen	0.4	2.9	4.6	1.4	0.1
Amoxicillin	0.9	17	650	3.8	3.4
Azithromycin	0.4	1.2	0.7	1.2	0.6
Caffeine	5.7	52	61	13	32
Chlortetracycline	1.9	42	530	6.1	4.7
Clarithromycin	1.7	17	12	15	13
N,N-diethyl-m-toluamide	0.2	3.0	1.3	1.4	1.1
Oxytetracycline	1.3	16	130	7.4	3.0
Sulfamethoxazole	1.5	7.1	23	0.8	0.8
Sulfamonomethoxine	1.8	8.4	5.3	0.9	0.9
Tetracycline	1.4	8.9	86	4.8	4.5
Theophylline	0.5	1.4	3.1	0.2	0.6
Trimethoprim	1.6	0.8	12	0.4	0.8

水は試料採取時に流量観測を合わせて行った。試料採取時の流量を図4.1の()内に示した。

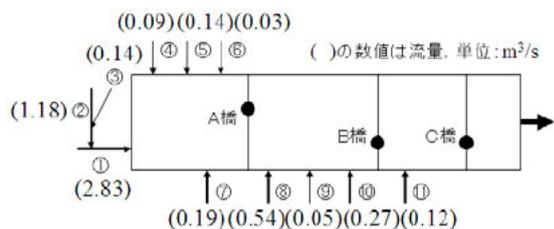


図4.1 試料採取地点と流入河川の流量

4.2.2 調査対象物質および分析方法

調査対象とした医薬品は、解熱鎮痛消炎剤、利尿剤、抗生物質、不整脈用剤、高脂血症用剤等 92 物質とした。これら 92 物質の分析は、小西ら³⁾の方法を参考に抽出・濃縮等の前処理を行った後、LC/MS/MS を用いて測定し絶対検量線法により定量した。

4.3 調査結果と考察

92 物質中 46 物質が 14 ヶ所のいずれかの試料で検出され、その検出濃度は Carbamazepine、Clofibric acid、Naproxen 等の 0.1ng/L から Caffeine の 540ng/L であった。また、14 ヶ所すべての地点から Clarithromycin、Crotamiton、N,N-Diethyl-m-toluamide、Indomethacin、Theophylline、Amoxicillin、Griseofulvin、Caffeine の 8 物質が検出された。

Clarithromycin を例として各流入河川水の濃度と負荷量を図4.2、図4.3 に示した。流入河川水の濃度は、流入河川⑧が最も低く 4.6ng/L で、流入河川①が最も高く 66ng/L であった。また、調査流入河川の負荷量から平均濃度を算出し、湖沼内 3 地点(A 橋、B 橋、C 橋)の濃度とともに図4.4 に示した。負荷量から算出した平均濃度 (18ng/L)は、A 橋(13ng/L)、B 橋(10ng/L)、C 橋(9.5ng/L) の濃度とほぼ同じ値を示した。14 ヶ所すべての地点から検出された 8 物質について clarithromycin 同様、負荷量から平均濃度を算出し、湖沼内濃度と併せ、表4.1 に示した。N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、本調査における晴天時河川流入以外にも負荷が存在する可能性が示された。

4.4 今後の展開と課題

湖沼流入河川の医薬品負荷量から算出した流入河川の平均濃度と湖沼内の医薬品濃度を比較したところ、N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、本調査における晴天時河川流入以外にも負荷が存在する可能性が示された。今後は、

更に詳細な調査、あるいは雨天時においても同様の調査を実施し、全体的な医薬品流出特性の把握を検討する必要がある。

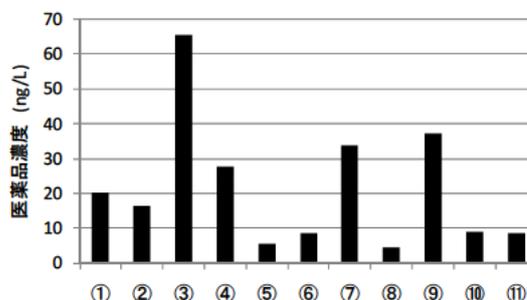


図4.2 各試料の clarithromycin 濃度

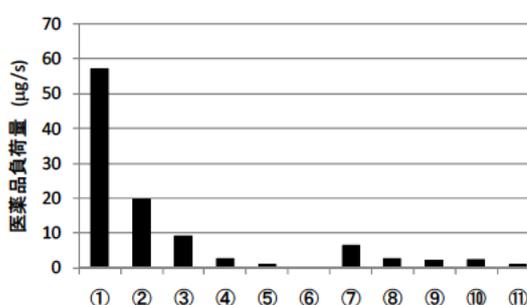


図4.3 各試料の Clarithromycin 負荷量

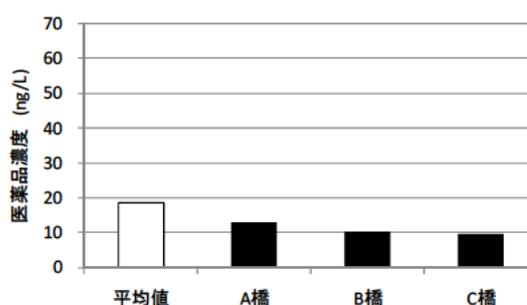


図4.4 Clarithromycin 平均濃度と湖内濃度

表4.1 負荷量から求めた平均濃度と湖沼内濃度(ng/L)

医薬品	平均値	A橋	B橋	C橋
clarithromycin	18	13	10	9.5
crotamiton	13	13	9.1	7.5
N,N-diethyl-m-toluamide	1.2	2.7	3.5	3.8
indomethacin	4.6	0.9	0.6	0.4
theophylline	2.5	6.5	3.5	2.7
amoxicillin	3.5	13	3.4	2.4
griseofulvin	0.6	1.2	0.9	0.8
caffeine	110	110	43	41

5. バイオアッセイによる医薬品類の生態影響評価

5.1 目的

河川水や下水処理水などの環境水中に存在する生理活性物質は、水生生態系を構成する水生生物の生育・生息に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる

生理活性物質の中で医薬品類は、その使用目的から、生物の生体機能へ影響を及ぼす性質を持ち、また、その作用を生体内で維持できるように化学構造が設計されている。一方で、生理活性物質による影響の種類、大きさは生物種ごとに異なることが予測される。医薬品類では、主な投与対象であるヒトなどへの作用については、開発段階における齧歯類等を用いた動物実験を通じて多くの情報が得られているが、それらが体外へ排出された後の環境中の様々な生物への影響(生態影響)の把握については、我が国の法令では義務付けられておらず、十分明らかにされていない。

そこで本研究では、医薬品類が水生生物に及ぼす影響についての知見を充実させ、生態リスク評価方法の検討に資することを目的とし、昨年度に引き続き、水環境中において存在が確認されてきている様々な医薬品類を対象に、細菌、藻類及び甲殻類の3生物種を用いたバイオアッセイ手法を適用し、生態毒性データの集積を行った。

5.2 対象医薬品

評価対象とする医薬品類は、環境中で検出された報告のある物質を中心に選定した。本研究課題では昨年度までに、解熱鎮痛薬、神経系作用薬、循環器薬、消化器薬、抗菌薬など、表-5.1に示す医薬品類44物質について、5生物種に対する生態毒性データを把握してきた。

今年度は、実環境中での検出状況や定量的構造活性相関(QSAR)の予測値を参考に、Bromoalerylurea(プロモワレリル尿素;催眠・鎮静剤)、Disopyramide(ジソピラミド;循環器薬)、Ifenprodil tartrate(酒石酸イフェンプロジル;循環器薬)、Indometacin(インドメタシン;解熱鎮痛消炎剤)、Sulfamethoxazole(スルファメトキサゾール;化学療法剤)、Thiamphenicol(チアンフェニコール;合成抗菌剤)、Trimethoprim(トリメトプリム;化学療法剤)の7物質を対象とした。

各医薬品類について、working solution として DMSO を溶媒に 10g/L の溶液を調製した後、適宜希釈して試験に用いた。各試験においては、曝露溶液中の溶媒(DMSO)濃度が 0.1% を超えないように最大曝露濃度を 10mg/L 程度に設定し、細菌、藻類では公比 2(10 段階)、甲殻類では公比 2(5 段階)の希釈系列を作成した。

5.3 バイオアッセイ手法の概要

昨年度までの調査では、細菌、藻類、原生動物、甲殻

表-5.1 21年度までに評価した医薬品類 44 物質

循環器官用薬 (9物質)	acetazolamide, atenolol, bezafibrate, caffeine, diltiazem, dipyridamol, furosemide, sotalol, verapamil
解熱鎮痛消炎剤 (8物質)	diclofenac, etheznamide, fenoprofen, flufenamic acid, ibuprofen, ketoprofen, mefenamic acid, naproxen
精神神経用剤 抗てんかん剤 (7物質)	amitriptyline, carbamazepine, chlorpromazine, haloperidol, imipramine, phenytoin, primidone
合成抗菌薬 抗生物質製剤 (5物質)	azithromycin, chloramphenicol, clarithromycin, levofloxacin, nalidixic acid
消化器官用薬 (3物質)	metoclopramide, pirenzepine, sulphiride
その他(12物質)	crotamiton, dexamethasone, dextromethorphan, N,N-diethyl-m-toluamide, diphenidol, novobiocin, promethazine, 2-quinoxaline carboxylic acid, thymol, tolbutamide, tolperisone, triclosan

類、両生類の5生物種を用いたバイオアッセイを実施してきた。これまで検討してきた医薬品類の各生物種に対する生態毒性値、試験の操作性、及び生態リスク評価における要求(栄養段階の異なる3生物種)などから、本年度新規に対象とした医薬品類については、細菌、藻類、甲殻類を用いてバイオアッセイを行った。

5.3.1 細菌を用いた試験

海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* を供試生物とし、発光阻害を観察するバイオアッセイを実施した。本調査では、Strategic Diagnostics Inc.社から市販されている生態毒性試験システム Microtox®を用い、システム添付のプロトコールに従って、サンプルの段階希釈系列中に5分及び15分曝露した後の発光阻害を測定し、付属の計算ソフトにより半数影響濃度(EC₅₀)を求めた。

5.3.2 藻類を用いた試験

藻類を供試生物とし、暴露期間中の生長阻害を観察する「藻類生長阻害試験」は、経済協力機構(OECD)によって標準化⁹⁾されており、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)」に基づく生態毒性試験法としても規定されている。本調査では、淡水性の単細胞緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35株)を用い、藻類生長阻害試験を実施した。

Yamashita ら⁹⁾の方法を参考に、96 ウェルマイクロプレート培養容器とする手法を適用し、温度 24℃、照度 4000Lux、振とう速度 120rpm の条件下、サンプルの段階希釈系列中で 96 時間曝露を行った。曝露期間中は、24 時間毎にマイクロプレートリーダー(Perkin Elmer 社、ARVO SX-1420)を用いて各ウェルの吸光度(450nm)を測定し、関係式から細胞濃度を求めて生長速度を算出した。EcoTox-Statics Ver.2.6d⁷⁾を用い、曝露開始後 72 時間の生長速度と曝露濃度の関係から、半数影響濃度(EC₅₀)及び最

大無影響濃度(NOEC)を求めた。

5.3.3 甲殻類を用いた試験

甲殻類を用いるバイオアッセイとしては、ミジンコ類の遊泳阻害を観察する「急性遊泳阻害試験」や、産仔数を観察する「繁殖試験」が、OECDテストガイドラインによって標準化⁸⁾されており、化審法に基づく生態毒性試験としても規定されている。本調査では、淡水性の鯉脚綱オオミジンコ(*Daphnia magna*)を用い、ミジンコ急性遊泳阻害試験を実施した。

供試生物の継代飼育や馴化等に用いる費用と労力を軽減するため、MicroBioTests社から市販されている毒性試験キット(DAPHTOXKIT FTM magna)に付属する休眠卵を用い、6ウェルマイクロプレートを培養容器として試験を行った。温度20℃、暗条件下、サンプルの段階希釈系列中で48時間暴露を行い、暴露後の遊泳阻害率と暴露濃度の関係から、ECOTOX-STATICSを用い、半数影響濃度(EC₅₀)を求めた。

5.4 試験結果

各医薬品類の3生物種に対する生態影響試験の結果をまとめると、表-5.2のようになった。EC₅₀やNOECなどは生物に作用する濃度を示しており、数値が低いほど毒性が強いことを意味している。なおEC₅₀については、計算値が最大暴露濃度(10mg/L)を超える場合の外挿値も、参考値として記載した。

藻類成長阻害試験では、4物質について急性毒性値(EC₅₀)、慢性毒性値(NOEC)が算出され、化学療法剤(抗菌剤)のSulfamethoxazoleは、EC₅₀=0.98mg/L、NOEC=0.31mg/Lと比較的強い毒性を示した。また、細菌の発光阻害試験では、2物質についてEC₅₀が算出された。一方、ミジンコ急性遊泳阻害試験では、7物質すべてについて毒性が検出されなかった。

5.5 予測無影響濃度(PNEC)の算出

化学物質の水生生物に対する生態リスク評価においては、特にスクリーニング的な初期評価として、予測無影響濃度(PNEC: Predicted No Effect Concentration)と、予測環境中濃度(PEC: Predicted Environmental Concentration)を比較し、詳細な評価を行う候補物質を選定する手法が多く用いられている⁹⁾。PNECは、環境中の生物に対して有害な影響を及ぼさないと予想される濃度であり、生物試験の結果得られた毒性値から算出される。「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」⁹⁾では、急性毒性値および慢性毒性値のそれぞれについて生物群ごとに整理した上で、それぞれの中で最も低い値に対して情報量に応じたアセスメント係数を適用して算出された2つの値の

表-5.2 本年度評価した医薬品類7物質の生態毒性

	(mg/L)			
	細菌 (5min)EC ₅₀	藻類 72hrEC ₅₀	藻類 96hrNOEC	ミジンコ 48hrEC ₅₀
bromovalerylurea	N.E	N.E	N.E	N.E
disopyramide	N.E	N.E	N.E	N.E
ifenprodil tartrate	N.E	5.9.E+00	3.1.E-01	N.E
indometacin	1.3.E+01	1.0.E+02	8.3.E+00	N.E
sulfame hoxazole	N.E	9.8.E-01	3.1.E-01	N.E
thiamphenicol	5.0.E+01	1.4.E+01	8.3.E+00	N.E
trime hoprim	N.E	N.E	N.E	N.E

N.E: 設定した濃度範囲において明確な影響が見られなかった。

表-5.3 医薬品類51物質の予測無影響濃度 PNEC

		PNEC (μg/L)	対応する試験系
抗生物質	clarithromycin	1.2 E-02	藻類-急性
抗菌薬	triclosan	1.2 E-02	藻類-急性
抗生物質	azithromycin	1.9 E-02	藻類-急性
精神神経用剤	imipramine	1.5 E-01	藻類-慢性
鎮咳剤	dextromethorphan	1.6 E-01	藻類-慢性
精神神経用剤	haloperidol	1.6 E-01	藻類-慢性
抗生物質	amitriptyline	1.9 E-01	藻類-急性
抗生物質	chloramphenicol	2.1 E-01	藻類-急性
精神神経用剤	chlorpromazine	2.4 E-01	藻類-慢性
抗ヒスタミン剤	promethazine	3.2 E-01	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	mefenamic acid	3.9 E-01	繊毛虫-慢性
沈痾剤	diphenidol	4.1 E-01	藻類-慢性
鎮痙剤	tolperisone	4.1 E-01	藻類-慢性
化学療法剤	sulfamethoxazole	9.8 E-01	藻類-急性
糖尿病用剤	tolbutamide	1.0 E+00	細菌-急性
解熱鎮痛消炎剤	flufenamic acid	1.1 E+00	藻類-急性
利尿剤	acetazolamide	1.4 E+00	藻類-急性
合成抗菌剤	levofloxacin	1.5 E+00	藻類-急性
駆虫剤、防腐剤	thymol	1.6 E+00	細菌-急性
解熱鎮痛消炎剤	ketoprofen	2.0 E+00	藻類-慢性
解熱鎮痛消炎剤	ibuprofen	2.3 E+00	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	diclofenac sodium	3.1 E+00	繊毛虫-慢性
循環器官用薬	ifenprodil tartrate	3.1 E+00	藻類-慢性
解熱鎮痛消炎剤	naproxen	3.1 E+00	繊毛虫-慢性
血管拡張剤	verapamil	3.1 E+00	繊毛虫-慢性
沈痾剤	crotamiton	3.5 E+00	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	ethenzamide	3.7 E+00	藻類-急性
昆虫忌避薬	N,N-diethyl-m-tolamide	4.1 E+00	藻類-慢性
血管拡張剤	diltiazem	4.5 E+00	藻類-急性
強心剤	caffeine	5.2 E+00	藻類-慢性
抗てんかん剤	carbamazepine	5.2 E+00	藻類-慢性
解熱鎮痛消炎剤	fenoprofen	5.7 E+00	藻類-急性
消化器官薬	metoclopramide	7.7 E+00	藻類-急性
合成抗菌剤	nalidixic acid	9.3 E+00	甲殻類-急性
高脂血症用剤	bezafibrate	1.0 E+01	藻類-慢性
血管拡張剤	dipyridamole	1.0 E+01	藻類-急性
解熱鎮痛消炎剤	indometacin	1.3 E+01	細菌-急性
合成抗菌剤	thiamphenicol	1.4 E+01	藻類-急性
抗てんかん剤	phenytoin	2.1 E+01	繊毛虫-急性
動物用抗菌薬	novobiocin	5.3 E+01	細菌-急性

その他11物質は、実施した試験範囲において毒性が検出されなかった。

うち小さい方の値を当該物質のPNECとする、とされている。

本検討においては、アセスメント係数として急性毒性値(EC₅₀、LC₅₀)に対して1000、慢性毒性値(NOEC)に対して100を適用し、昨年度までに試験を実施したものを含め、医薬品類51物質についてPNECを整理した(表-5.3)。

これまで試験対象としてきた医薬品類51物質の中で、予測無影響濃度(PNEC)が0.1μg/L未満と算出されたものが14物質あり、薬効で分類すると、抗生物質(含、合成抗菌剤、化学療法剤)が5物質、精神神経用剤が4物質、解熱鎮痛消炎剤、循環器官用薬、鎮痾剤、鎮痙剤、抗ヒスタミン剤、殺菌剤(医薬部外品)が各1物質であった。

中でも抗生物質の Azithromycin、Clarithromycin 及び殺菌剤（医薬部外品）Triclosan の3物質は PNEC が 0.01µg/L 未満と、比較的低い値(強い毒性)を示した。

また、PNEC に対応する試験系(毒性値/アセスメント係数が最小の試験系)を見ると、藻類の急性毒性または慢性毒性が大半を占め、特に PNEC が 0.1µg/L 未満と比較的低い医薬品では 14 物質中 13 物質において、藻類によるバイオアッセイ結果から PNEC が導出されている(3 生物種の中で藻類に対する毒性が最も強い)。

5. 6 今後の展開と課題

本研究課題の中で、これまでに医薬品類 51 物質について生態毒性データの収集を行い、予測無影響濃度 PNEC を把握してきた。その結果、水環境中に存在する医薬品類の中には、水生生物に対して毒性を示す物質が含まれていることが確認された。中でも、抗生物質の Azithromycin、Clarithromycin 及び殺菌剤（医薬部外品）Triclosan の3物質は PNEC が 0.01µg/L 未満の比較的強い毒性を示した。

また、本検討の中で対象とした医薬品類、バイオアッセイ手法の範囲では、比較的高い毒性が検出された物質の多くが、藻類に対して最も強い毒性を示したことから、医薬品類の水生生物に対する生態影響を検討するうえで、藻類成長阻害試験がスクリーニング的に活用できる可能性が示された。ただし、各生物種に対する生態毒性の大きさは物質により様々であり、生態系に対する医薬品類の影響を詳細に検討する際には、複数の生物種を用いた試験を行う必要があると考えられる。

6. 河川における医薬品類の生態リスク評価

6. 1 目的

近年、水環境中における多様な医薬品類の存在実態が多く報告されており、それらの物質の生態毒性データについても知見が収集されつつある。今後は、これまで得られた知見に基づき生態リスク評価を行うことで、より詳細な情報収集が必要な医薬品類の把握を進めていくことが必要となる。そこで本研究では、実河川を対象に、医薬品類による生態リスクに関する検討を行った。

6. 2 調査方法

6.2.1 調査地点

2つの異なる水系の小河川 15 地点、都市水路 4 地点の計 19 地点を調査対象とした。

6.2.2 水質分析

各調査地点において、表-5.1 に示した医薬品類 44 物質の溶存態成分を対象とした。Triclosan、Thymol の2物質は宝輪らの方法¹⁰⁾を参考に前処理などを行った後、

表-6.1 河川 19 地点における医薬品類 44 物質に由来する生態リスク

	Σ(MEC/PNEC)	Σ(MEC/PNEC)への寄与が大きい物質 [MEC/PNEC(寄与率)]	
		寄与率1位	寄与率2位
KS-1 自然河川	0.85	clarithromycin 0.36 (42%)	triclosan 0.34 (40%)
KS-2 自然河川	0.82	clarithromycin 0.43 (53%)	triclosan 0.26 (32%)
KB-1 自然河川	1.10	triclosan 0.53 (47%)	clarithromycin 0.52 (46%)
YM-1 自然河川	0.43	clarithromycin 0.24 (56%)	triclosan 0.15 (34%)
YM-2 自然河川	0.72	triclosan 0.40 (55%)	clarithromycin 0.24 (33%)
SD-1 自然河川	0.32	clarithromycin 0.18 (55%)	triclosan 0.12 (37%)
SD-2 自然河川	0.96	clarithromycin 0.78 (81%)	triclosan 0.13 (13%)
TD-1 自然河川	0.30	clarithromycin 0.16 (53%)	triclosan 0.12 (39%)
TD-2 自然河川	0.36	clarithromycin 0.22 (60%)	triclosan 0.12 (32%)
TD-3 自然河川 (放流口直近)	3.8	clarithromycin 3.3 (87%)	azithromycin 0.15 (4%)
TD-4 自然河川	0.35	clarithromycin 0.20 (58%)	triclosan 0.12 (34%)
TD-5 自然河川	0.31	clarithromycin 0.17 (54%)	triclosan 0.12 (38%)
TD-6 自然河川 (放流口直近)	2.1	clarithromycin 1.7 (80%)	triclosan 0.18 (8%)
TD-7 自然河川	0.33	clarithromycin 0.18 (55%)	triclosan 0.12 (35%)
TD-8 自然河川	0.47	clarithromycin 0.29 (62%)	triclosan 0.14 (30%)
TJ-1 水路 (河川水)	0.32	clarithromycin 0.17 (52%)	triclosan 0.13 (39%)
TJ-2 水路 (処理水)	0.55	triclosan 0.29 (53%)	clarithromycin 0.19 (35%)
EG-1 水路 (処理水)	0.45	clarithromycin 0.29 (65%)	triclosan 0.12 (26%)
R-1 水路 (処理水)	0.34	clarithromycin 0.20 (58%)	triclosan 0.12 (34%)

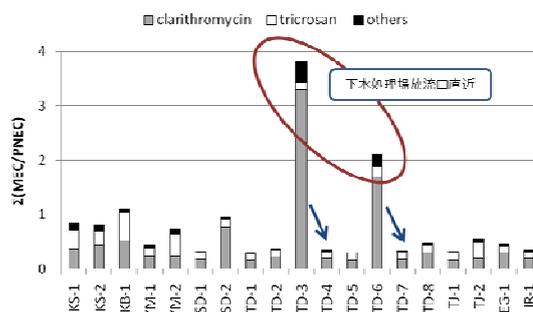


図-6.1 医薬品類由来生態リスクの比較

GC/MS で測定を行い、内標準法にて定量した。その他の 42 物質は 3. 2 で述べた方法(LC/MS/MS で測定し絶対検量線法で定量)により分析を行った。

6.2.3 生態リスク評価

5. 5 で述べたように、化学物質の水生生物に対する生

態リスク評価においては、予測無影響濃度(PNEC)と、予測環境中濃度(PEC)を比較し、詳細な評価を行う候補物質を選定する手法が多く用いられている⁹⁾。本検討では、各医薬品類について、**6.3.1**の水質分析により得られた実測濃度 MEC と表-5.3 で示した予測無影響濃度 PNEC の比 [MEC/PNEC] を求めた。

さらに、調査対象物質全体としての生態リスクについても検討した。多種類の物質が共存する場合の複合影響について評価する手法は確立されていないが、相加性を仮定し個々の物質の影響(リスク)の総和を混合物の影響(リスク)とみなして評価する手法が比較的広く用いられている¹¹⁾。この仮定のもとでは、混合物全体としての生態リスクは、個々の物質の生態リスクの合計値 (Σ (MEC/PNEC)) で表現される。医薬品類の水生生物に対する作用機序は十分明らかにされておらず、それに基づく詳細な検討はできないが、本検討では全ての医薬品類について、水生生物に対する毒性が濃度相加的 (concentration additive) であると仮定し、各地点における Σ (MEC/PNEC)を算出した。

6.3 調査結果

6.3.1 医薬品類の存在実態

44 物質中 38 物質が 19 地点のいずれかで検出され、Azithromycin、Caffeine、Clarithromycin、Crotamiton、Fenoprofen、N,N-Diethyl-m-toluamide の 6 物質は、19 地点全てにおいて検出された。また、19 地点における最大検出濃度が 100ng/L と比較的高濃度であったのは、Caffeine (570ng/L)、Crotamiton (510ng/L)、Sulpiride (1500ng/L)の 3 物質であった。

6.3.2 生態リスク評価

調査河川 19 地点における医薬品類 44 物質の生態リスクについて、概要を表 6-1 及び図 6-1 に示す。19 地点すべてにおいて、 Σ (MEC/PNEC)は 0.1 以上となり、なかでも下水処理場放流口直近の 2 地点 TD-3 と TD-6 では、それぞれ 3.8、2.1 という高い Σ (MEC/PNEC)値を示した。PNEC の算出においてはアセスメントファクター(安全係数)が乗じられているなど、安全側の評価がされており、直ちに水生生物への影響が生じるとは限らないが、生態影響の観点から、さらなる医薬品類の実態/挙動に関する情報の収集が必要であると考えられる。なお、数百メートル下流の地点 TD-4 及び TD-7 では、放流口上流の地点 TD2 及び TD-5 と同程度の Σ (MEC/PNEC)値に低下していた。

一方、個々の物質の MEC/PNEC 比では、抗生物質 Clarithromycin と殺菌剤 Triclosan の 2 物質が、全ての地点で 0.1 以上であり、その他の物質では、抗生物質

Azithromycin(1 地点)、強心剤 Caffeine(1 地点)、鎮痙剤 Crotamiton(2 地点)の 3 物質が、MEC/PNEC 比が 0.1 を超える地点があった。Clarithromycin、Triclosan の 2 物質の Σ (MEC/PNEC)に対する寄与は、19 地点全てにおいて 8 割以上を占め、うち 18 地点で両者が 1、2 位であった。2 者のうち、Clarithromycin は MEC/PNEC 比が大きな変動を示した(0.16~3.3)のに対し、Triclosan の MEC/PNEC 比の変動は比較的小さかった(0.12~0.53)。

6.4 今後の展開と課題

本検討で行った、複数の医薬品類に由来する生態リスクの評価においては、複合毒性について単純な相加性を仮定している。医薬品類の水生生物への影響における複合作用については十分な知見が得られていないが、最新の知見を収集することなどによって、随時妥当性を検討していく必要がある。

今後は、地域的、時間的に異なる様々な河川水中に含まれる医薬品類の存在実態に関する情報を収集し、幅広い水域や様々な流域特性の河川における生態リスク評価の事例を蓄積する。また、河川水中に形成される生物相の現地調査データや、バイオアッセイによる河川水の毒性試験データを併せて集積し、それらの相互関係から、医薬品等の生理活性物質が生態系に及ぼす影響の評価手法を検討・構築することを目指す。

7 まとめ

医薬品分析法の開発については、社会的な関心がみられる抗ウイルス剤の一つである Oseltamivir phosphate (OP)とその活性体 Oseltamivir carboxylate (OC)を対象とした。分析装置の検出下限値は試料換算濃度で OP が 0.34ng/L、OC が 0.29ng/L であった。また、流入下水を用いた添加回収試験の結果、OP、OC とも 80%の回収率が得られ下水試料への適用可能性が確認された。

晴天時と雨天時に医薬品類の実態把握調査を行いその流出特性を比較した。雨天時において晴天時の 10 倍あるいはそれ以上の濃度で流出する医薬品類がみられ、水環境中における医薬品類調査における雨天時調査の重要性が明らかになった。

湖沼流入河川の医薬品負荷量から算出した流入河川の平均濃度と湖沼内の医薬品濃度を比較した。N,N-Diethyl-m-toluamide、Theophylline、Amoxicillin の 3 物質は、負荷量から求めた平均濃度に比べ湖沼内の濃度が高い傾向を示しており、晴天時河川流入以外にも負荷が存在する可能性が示された。

バイオアッセイ手法による医薬品類生態影響評価では、新規に 7 医薬品類について生態毒性試験を実施し、生態

影響データを把握した。その中で、化学療法剤(抗菌剤)の Sulfamethoxazole は、藻類に対する $EC_{50}=0.98\text{mg/L}$ 、 $NOEC=0.31\text{mg/L}$ と、比較的強い毒性を示した。昨年度までの成果と併せると、抗生物質(合成抗菌薬、化学療法剤を含む)と精神神経用剤(抗てんかん剤を含む)に、比較的強い毒性を示す物質が多く見られ、中でも抗生物質の Azithromycin、Clarithromycin 及び殺菌剤(医薬部外品) Triclosan の3物質は PNEC が $0.01\mu\text{g/L}$ 未満の比較的強い毒性を示した。また、医薬品類の水生生物に対する生態影響を検討するうえで、藻類生長阻害試験がスクリーニングに有用である可能性が示された。

河川における医薬品類の生態リスク評価では、小河川15地点、都市水路4地点を対象に調査を行った。その結果、MEC/PNEC 比は19地点全てで0.1を超えており、引き続き医薬品類の挙動に関して情報を収集する必要があると考えられる。中でも、Clarithromycin、Triclosan の2物質の寄与が特に大きい可能性が示された。

参考文献

- 1) 中外製薬：インタビューフォームタミフルカプセル 75、2009年
- 2) Ghosh, G.C. et al.: Oseltamivir Carboxylate, the Active Metabolite of Oseltamivir Phosphate (Tamiflu), Detected in Sewage Discharge and River Water in Japan, *Environ. Health Perspect.*, **118**, pp.103-107, 2010
- 3) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明：環境工学研究論文集、**43**、pp.73-82、2006年
- 4) 小森行也、岡安祐司、鈴木穰：下水道未整備地域の小河川における医薬品の実態調査、学会誌「EICA」、**12** (2/3)、pp.37-44、2007年
- 5) OECD: Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, adopted March 2006.
- 6) Yamashita, N., Yasojima, M., Nakada, N., Miyajima, K., Komori, K., Suzuki, Y., Tanaka, H.: Effects of antibacterial agents, levofloxacin and clarithromycin, on aquatic organisms, *Water Sci. Technol.*, **53**, pp.65-72, 2006
- 7) 吉岡義正, 2001, Ecotox-Statics ver 2 x, 環境毒性学会誌 **4**(2), 113
- 8) OECD: Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test, adopted April 2004.
- 9) 環境省：[3] 生態リスク評価、化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン(平成22年1月版)、pp.19-25、2010年。
- 10) 宝輪勲、宮崎沙頼、中田典秀、小森行也、田中宏明：GC-MSによる環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討、第16回環境化学討論会講演要旨集、pp.774-775、2007
- 11) European Chemicals Bureau (2008) TNsG on Product Evaluation

流域規模での水・物質循環管理支援モデルに関する研究(2)

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、岡安祐司

【要旨】

流域で発生する栄養塩類の閉鎖性水域への流出機構を明らかにするために、生活系、畜産系の汚濁物質発生特性（トレーサー物質及び溶解性栄養塩類の実態）の解明を行った。また、生活系、畜産系の汚濁排出量が多いと考えられる流域を対象として、晴天時、雨天時におけるこれらの物質の流達特性を把握し、トレーサー物質と溶解性栄養塩類の流出負荷量と比流量の関係を整理した。今後は、水位連続観測による流量の連続把握を行うことで、流域からの雨天時を含めた総流出負荷量を把握することが可能となると考えられる。

キーワード：流域モデル、トレーサー、栄養塩類、流出機構、生活排水、畜産排水、物質循環

1. はじめに

閉鎖性水域や河川において、種々の対策が行われているにも関わらず、栄養塩濃度は横ばい傾向にある。水質改善のために河川管理者によるマスタープラン策定が行われているが、発生源ごとの水域への栄養塩類の流出機構が明確でなく、また、発生源ごとの寄与度と対策効果を総合的に評価できる流域規模の水質評価モデルが存在しないという問題点があるため、目標の実現に不確実性が残る。水質改善計画を確実なものとするためには、発生源ごとに窒素・りん等の栄養塩類の流出過程を追跡する手法と、土地利用や営農形態の変化等の定量的影響やそれらの相互関係を含めて総合的に把握・分析できるツールを開発する必要がある。

本研究では、土木研究所で開発中の流域水・物質循環モデル(WEP モデル)を基盤としつつ、栄養塩類の発生源ごとに水域への流出機構を明らかにし、窒素流出・輸送モデルを改良するとともに新たにりん流出・輸送モデルを追加することで、表流水と地下水の流域規模での総合的な水・物質循環モデルとして実用的なものとする。

水質チームは、①試験流域における水質・水文データ収集を行い、その情報を元に、②発生源ごとの水質特性の解明を行い、③発生源から水域への栄養塩類の流出機構の解明を行う部分を担当する。

2. 平成 21 年度調査の内容

2.1 過年度および平成 21 年度の調査内容

流域で発生する汚濁負荷が水域へ到達する機構を考察するための基礎情報収集を目的として、流域におけ

る点源と面源の割合が異なる複数の流域を対象として、水質の実態を調査した。

平成 18 年度調査では、生活系の汚濁物質発生特性の解明、および、流域で発生する汚濁負荷が水域へ到達する機構の解明のため、①利根川水系手賀沼流入河川の大津川の支流、②利根川水系北浦流入河川を対象に晴天時のトレーサー物質及び溶解性栄養塩類の実態を調査した。

平成 19 年度は対象流域として、①利根川水系手賀沼流入河川の大津川の支流（平成 18 年度調査に比べて採水地点を増加）、②利根川水系北浦流入河川の鉾田川（平成 18 年度調査で、畜産系排水の混入が示唆された地点）③群馬県赤城山西南麓の河川を選定し、晴天時のトレーサー物質及び溶解性栄養塩類の実態を調査した。

平成 20 年度は対象流域として、利根川水系鬼怒川の支川である山川を選定し、晴天時のトレーサー物質及び栄養塩類の実態を調査した。本支流域内の家畜頭数は人口と同程度の高水準であり、畜産系排水の混入が想定される。

なお、晴天時には、生活系、事業系、大規模な畜産系等の点源で発生する汚濁が、人為的な処理や流下過程で土壌への吸着や生物などへの摂取により低減されて、その残りが恒常的に水域へ到達していると考えられる。閉鎖性水域へ到達する汚濁負荷の総量を考える際には、晴天時に一時的に流域に保持された汚濁負荷が雨天時に移動することも考慮する必要があり、雨天時も含めた調査が必要である。

そこで、平成 21 年度は、平成 20 年度に引き続き、

利根川水系鬼怒川の支川である山川を対象として、雨天時も含めて、トレーサー物質および栄養塩類の流出実態を把握した。

2.2. 山川における晴天時水質の調査

畜産業が盛んで、流域における汚濁発生量総量に占める畜産系汚濁負荷の割合が大きいと考えられる利根川水系鬼怒川右岸山川流域を対象に、トレーサー物質 (Na^+) および栄養塩類 (K^+ 、 T-N 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、 T-P 、 $\text{D-PO}_4^{3-}\text{-P}$) の実態調査を実施した。また、あわせて、有機性汚濁の指標である SS 、 DOC についても実態調査を実施した。採水は図-1 に示す4箇所で、平成21年4月～平成22年3月の間、各箇所週1回程度の頻度で、晴天時の日中に実施した。

ここでは、山川流域の下流末端に位置する関戸橋における調査結果を図-2～5 に示す。なお、山川流域では、4月～9月の間、水稻栽培が実施され、この期間には、吉田用水や霞ヶ浦用水から灌漑用水が供給されており、ここでは、灌漑用水中の水質も合わせて調査した。また、中流域で流量観測が実施されている山川モデル橋においても、同様に調査を行った。

図-2 の Na^+ 濃度および K^+ 濃度の年間変動を見ると、年間を通じて、大きな変動は見られなかった。

図-3 の窒素濃度の年間変動を見ると、4月になり灌漑期に入ると、徐々に濃度が低下し、灌漑期間中は低いレベルを維持した。一方、9月になり灌漑用水の供

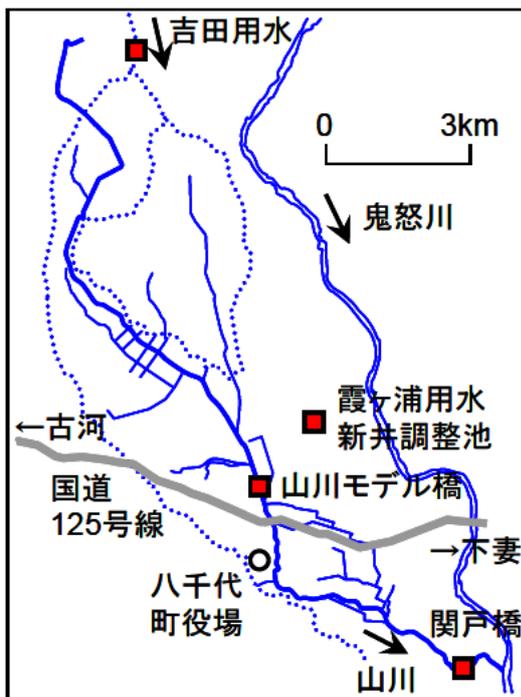


図-1 山川流域採水地点

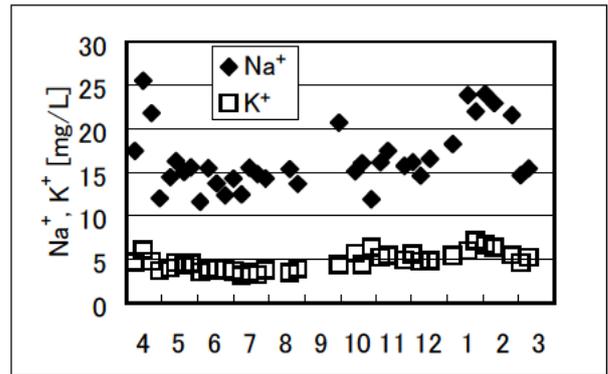


図-2 山川関戸橋における、晴天時の Na^+ 濃度と K^+ 濃度の実態

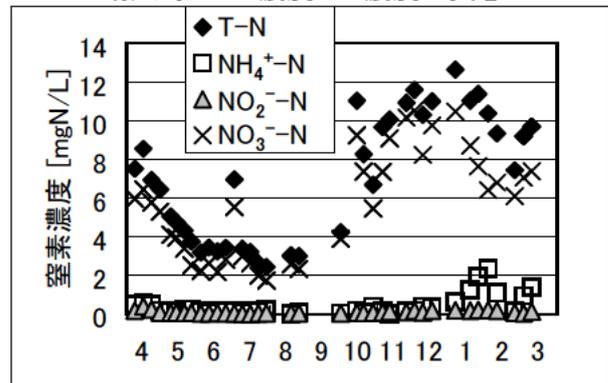


図-3 山川関戸橋における、晴天時の窒素濃度の実態

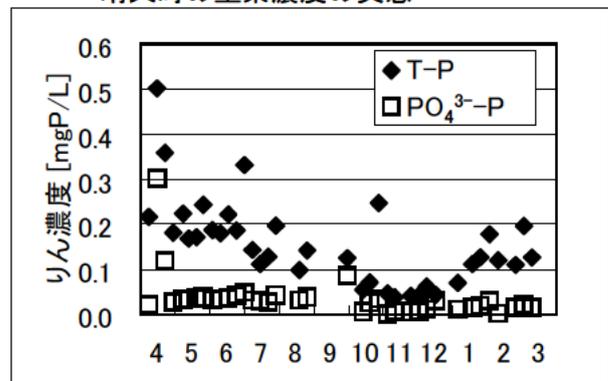


図-4 山川関戸橋における、晴天時のりん濃度の実態

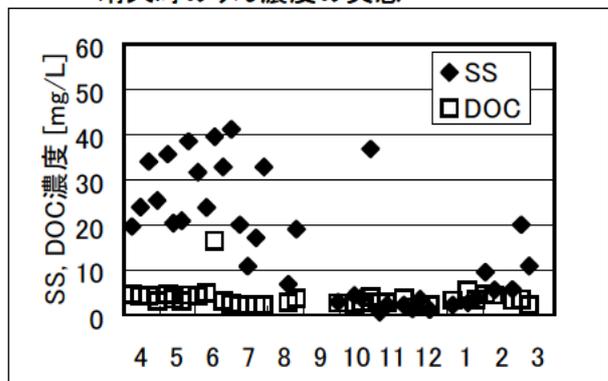


図-5 山川関戸橋における、晴天時の有機性汚濁指標の実態

給が停止した後は、濃度が上昇し、非灌漑期には高い濃度を維持した。また、1月～4月にかけての、低い温度の時期には、アンモニア性窒素が観測され、流域内における硝化の進行が不十分であることが示唆された。

図-4のりん濃度の年間変動を見ると、T-P濃度に関しては、4月～6月の間が最も高く、次いで、7月～9月および1～3月が高く、10月～12月が最も低い傾向が見られた。オルトリン酸態りん ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) 濃度に関しては、年間を通じて大きな変動は見られなかった。

図-5の有機性汚濁指標の年間変動を見ると、SS濃度に関しては、4月～9月の灌漑期が高く、一方、非灌漑期には低い傾向が見られた。溶解性有機炭素(DOC)濃度に関しては、年間を通じて大きな変動は見られなかった。

なお、予め実施した、山川関戸橋における水位と流量の関係を把握する調査結果に基づき、採水時に水位を記録することで、採水時の流量を把握した。

図-5に比流量とナトリウムイオン負荷量の関係を、図-6に比流量とカリウムイオン負荷量の関係を示す。比流量と負荷量の関係を

$$L = aQ^b$$

ここで、 L : 負荷量 [g/s/km^2]

Q : 比流量 [$\text{m}^3/\text{s/km}^2$]

a, b : それぞれ定数

と仮定し近似式を得ると、定数 a, b は表-1のように求められ、比較的よい相関が得られた。

表-1 比流量と負荷量の関係

項目	a	b	r^2
Na^+	5.77	0.65	0.64
K^+	1.99	0.72	0.48

さらに同様に、比流量と、全窒素 (T-N)、溶解性窒素 (D-N)、全りん (T-P)、溶解性りん (D-P)、浮遊物質 (SS)、溶解性有機炭素 (DOC) のそれぞれの負荷量の関係を整理した結果、表-2のようにまとめられた。

全りん (T-P)、溶解性りん (D-P)、浮遊物質 (SS)、溶解性有機炭素 (DOC) に関しては、一定の相関が見られたが、全窒素 (T-N)、溶解性窒素 (D-N) に関しては、相関が見られなかった。L-Q関係を図上にプロットしてみると、2つのグループに分かれている傾向が見られた。灌漑期、非灌漑期の別や、作付けている作物の種類などを反映している可能性があり、今後、

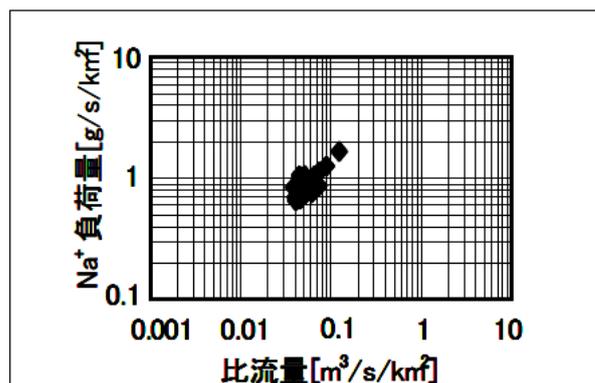


図-5 比流量とナトリウムイオン負荷量の関係

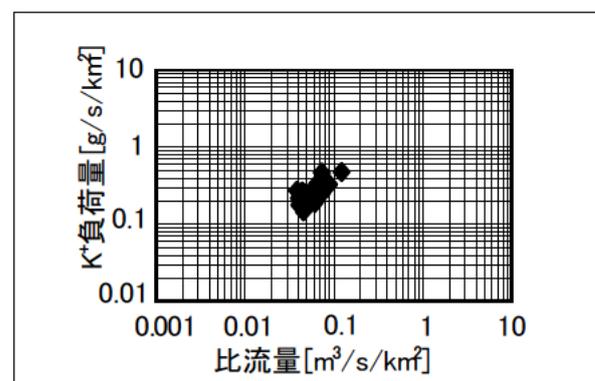


図-6 比流量とカリウムイオン負荷量の関係

表-2 比流量と負荷量の関係

項目	a	b	r^2
T-N	0.23	-0.15	0.0077
D-N	0.16	-0.23	0.0182
T-P	1.07	0.83	0.15
D-P	0.13	1.67	0.20
SS	2303	3.06	0.40
DOC	3.51	1.09	0.59

詳細に検討する必要があると考えられる。

2.3 山川におけ雨天時流出特性の把握

畜産業が盛んで、流域における汚濁発生量総量に占める畜産系汚濁負荷の割合が大きいと考えられる利根川水系鬼怒川右岸山川流域を対象に、雨天時のトレーサー物質 (Na⁺) および栄養塩類 (K⁺, T-N, NH₄⁺-N, NO₂⁻-N, NO₃⁻-N, T-P, D-PO₄³⁻-P) の実態調査を実施した。また、あわせて、有機性汚濁の指標である SS、DOC についても実態調査を実施した。採水は、図-1 に示す山川関戸橋で、夏季 (平成 21 年 8 月 31 日)、および、秋季 (平成 21 年 12 月 3 日~4 日) の間の 2 回、各回、9 試料ずつ採水を実施した。

なお、採水時には、採水地点の流量を合わせて測定した。また、採水時の対象流域における降雨量は、国土交通省【川の防災情報】で公開されている国土交通省関東地方整備局下館河川事務所伊讚出張所 (茨城県筑西市女方) での雨量観測結果を用いた。

図-7 に夏季調査における降雨量の時間変化を示す。降雨開始より 2 時間前を 0 時間の基準と設定した。降雨開始後 12 時間の間の累積雨量は 44mm であった。図-8 に山川関戸橋での比流量の時間変化を示す。

また、図-9 に秋季調査における降雨量の時間変化を示す。降雨開始より 1 時間前を 0 時間の基準と設定した。降雨開始後 13 時間の間の累積雨量は 20mm であった。図-10 に山川関戸橋での比流量の時間変化を示す。図-11 に比流量とナトリウムイオン負荷量の関係を、図-12 に比流量とカリウムイオン負荷量の関係を示す。比流量と負荷量の関係を

$$L = aQ^b$$

ここで、 L : 負荷量 [g/s/km²]

Q : 比流量 [m³/s/km²]

a, b : それぞれ定数

と仮定し近似式を得ると、定数 a, b は表-2 のようにまとめられた。

表-1 比流量と負荷量の関係

項目		a	b	r^2
Na ⁺	夏季	6.16	0.66	0.86
	秋季	1.95	0.35	0.22
K ⁺	夏季	5.59	1.14	0.99
	秋季	5.73	1.06	0.65

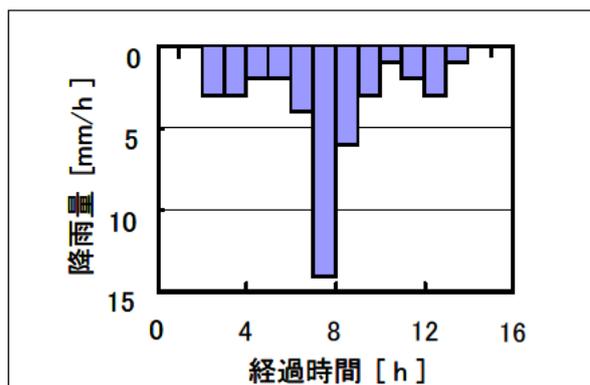


図-7 夏季雨天時調査における降雨量の時間変化

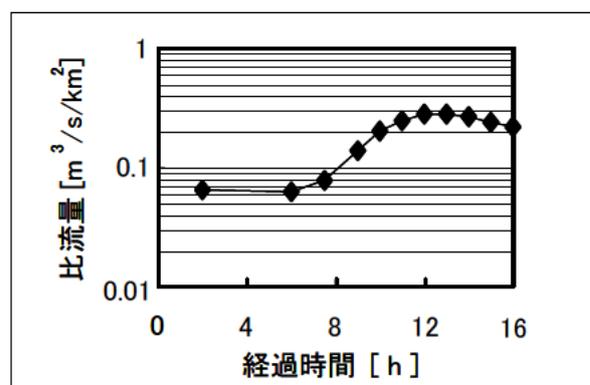


図-8 夏季雨天時調査における流量の時間変化

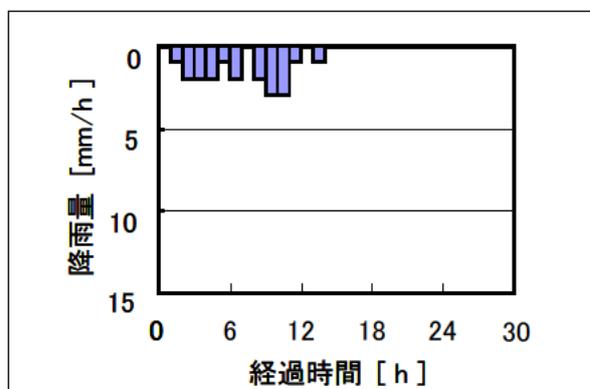


図-9 秋季雨天時調査における降雨量の時間変化

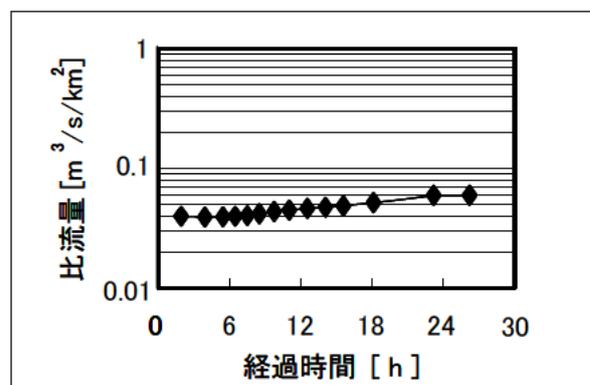


図-10 秋季雨天時調査における流量の時間変化

図-13に K^+/Na^+ の時間変化を示す。平成19年度に、利根川水系北浦の流入河川である鉾田川の支流で実施した雨天時調査結果²⁾では、畜産排水の混入がほとんどなく、流域における汚濁負荷発生総量に占める生活系の割合が大きい支流では、 K^+/Na^+ が0.5程度までの増加で抑えられていた一方、畜産排水の混入が考えられる支流では K^+/Na^+ が0.6~1.4程度にまで増加していたが、平成21年度に実施した山川流域の夏季雨天時調査結果は、畜産排水の混入があるケースに傾向が近く、 K^+/Na^+ が0.7程度にまで上昇した。一方、降雨強度が小さかった秋季雨天時調査結果では、 K^+/Na^+ の上昇は抑えられており、降雨強度が小さいことが K^+ の流出を抑制していた可能性が考えられた。

平成21年度の山川雨天時調査で得られた各栄養塩類、有機汚濁指標負荷量と比流量の関係を図-14~19に、得られた近似式の定数 a 、 b を表-3、表-4に示す。

図20~25に、トレーサー物質(Na^+)の負荷量に対する各栄養塩類、有機汚濁指標負荷量の比率の時間変化を示す。

図20、23に示す全窒素、溶解性窒素については、夏季に比べて、秋季の方が、 Na^+ 濃度に対する比率が高かった。夏季の降雨では比流量が最大 $0.3m^3/s/km^2$ にまで上昇するのに伴って、 TN/Na^+ 、 $D-N/Na^+$ が上昇した。晴天時には流域から排出された Na^+ 、窒素のうち Na^+ の方が流出しやすく、窒素の方が流域の土壌などに吸着されとどまりやすいため、 Na^+ 濃度に対する窒素の比率が低いに対して、雨天時には、流域にとどまっていた窒素も合わせて流出してくることから、逆に、 Na^+ 濃度に対する窒素の濃度の比率が高まると考えられる。一方、秋季には、比流量の変化に関係なく、 Na^+ 濃度に対する窒素濃度の比率が大きく、晴天時のように流域において窒素がとどまり、雨天時に流出するという機構が機能していないことが考えられた。秋季には、葉物栽培の畑作が主に行われており、窒素肥料の施肥が大量に行われることから、土壌中の Na^+ 濃度に対する窒素濃度の比率が高くなるとともに、窒素濃度が土壌の吸脱着の機能が発揮されるレベルではなく飽和しており、晴天時においても流出していることが考えられた。

一方、図21、24に示すりん、および図22、25に示す有機性汚濁指標の Na^+ に対する比率は、降雨初期の比流量が小さい段階では夏季、秋季とも差はなく、比流量の増加に伴って大きくなっていった。晴天時には Na^+ に比べて、りん、有機物は流域にとどまりやすく、比流量の増加に伴い、掃流されて流出してくるものと

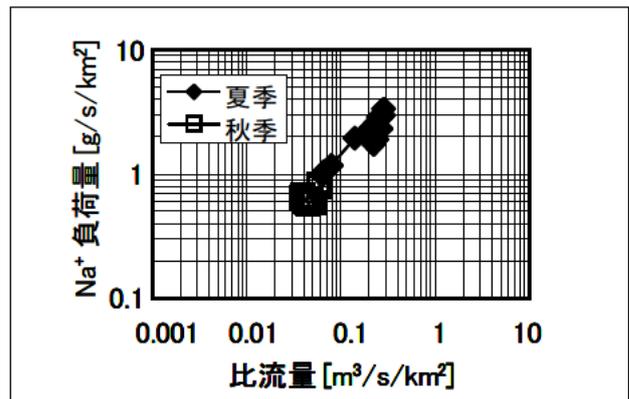


図-11 比流量とナトリウムイオン負荷量の関係

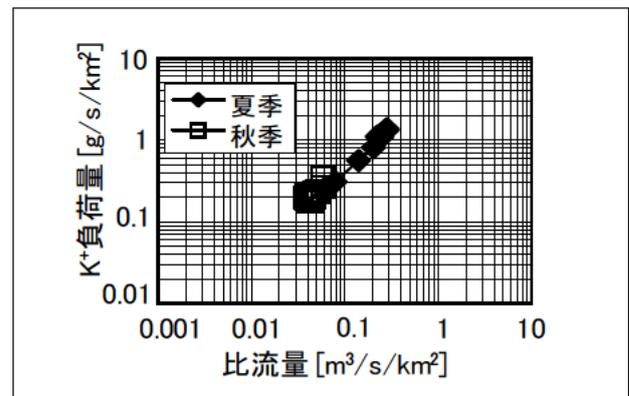


図-12 比流量とカリウムイオン負荷量の関係

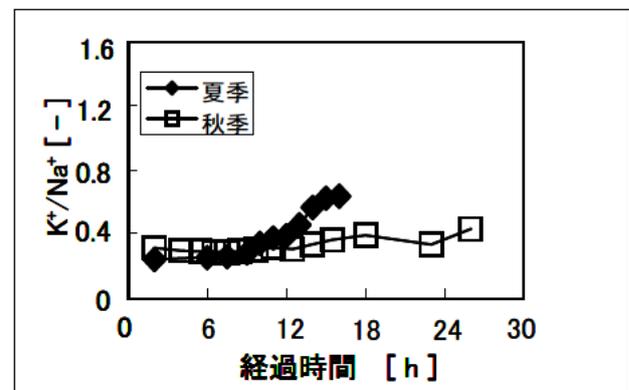


図-13 カリウム/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

考えられる。

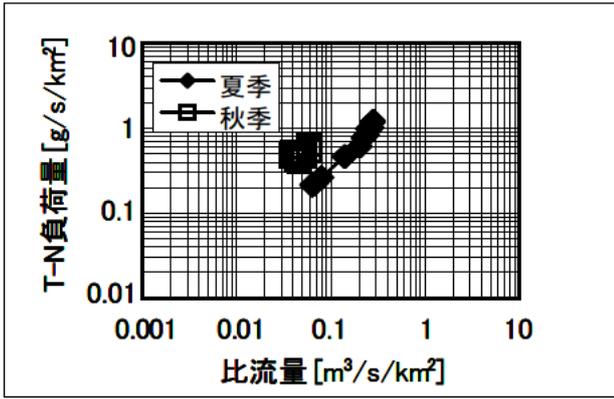


図-14 比流量と全窒素負荷量の関係

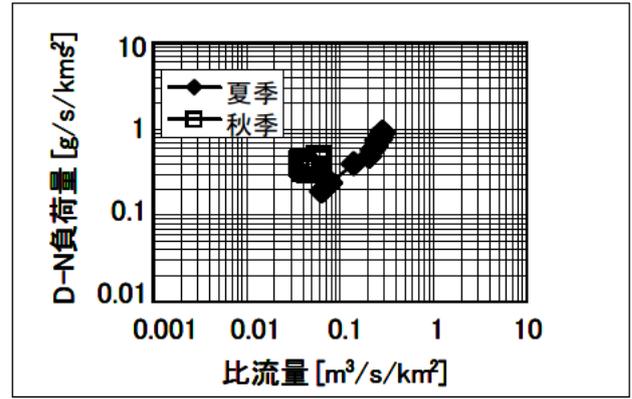


図-17 比流量と溶解性窒素負荷量の関係

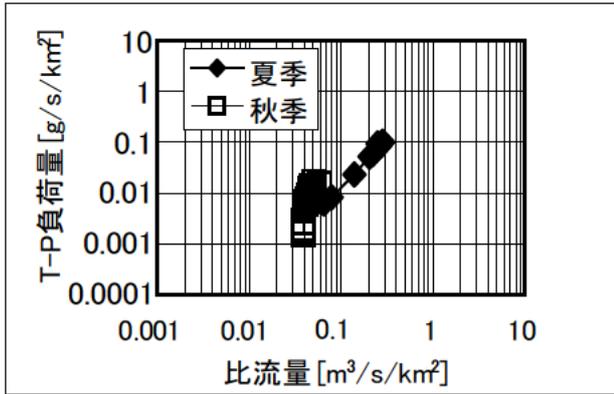


図-15 比流量と全りん負荷量の関係

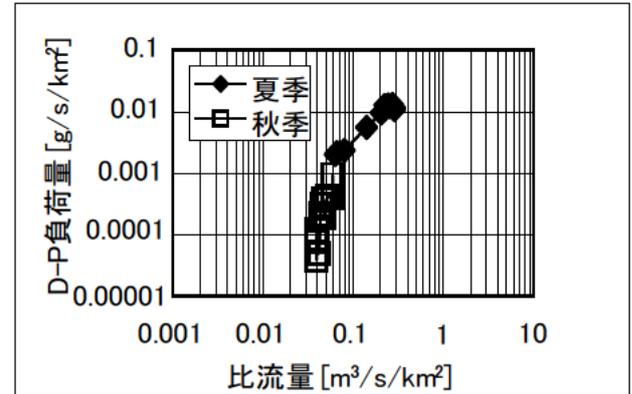


図-18 比流量と溶解性りん負荷量の関係

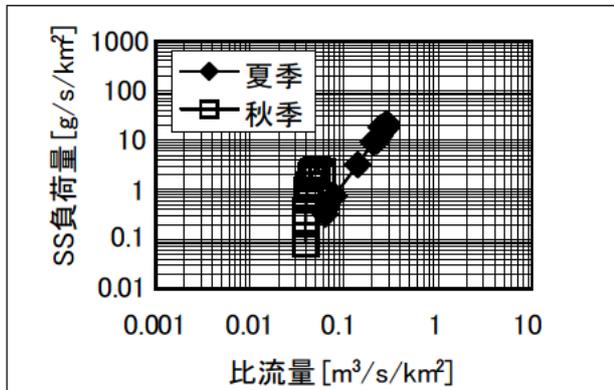


図-16 比流量と浮遊物質負荷量の関係

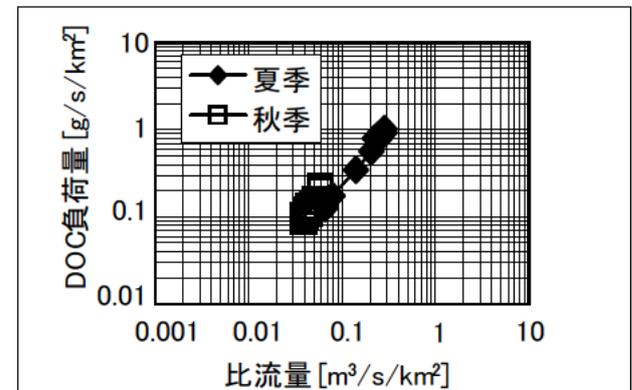


図-19 比流量と溶解性有機炭素負荷量の関係

表-3 比流量と負荷量の関係

項目 ↓		a	b	r ²
T-N	夏季	4.30	1.10	0.98
	秋季	1.71	0.41	0.28
T-P	夏季	1.06	1.88	0.99
	秋季	30457	4.96	0.71
SS	夏季	574.7	2.66	0.99
	秋季	50000000	5.73	0.55

表-4 比流量と負荷量の関係

項目 ↓		a	b	r ²
D-N	夏季	2.75	0.98	0.97
	秋季	0.53	0.11	0.02
D-P	夏季	0.069	1.28	0.47
	秋季	7217	5.65	0.73
DOC	夏季	5.39	1.36	0.99
	秋季	37.7	1.85	0.94

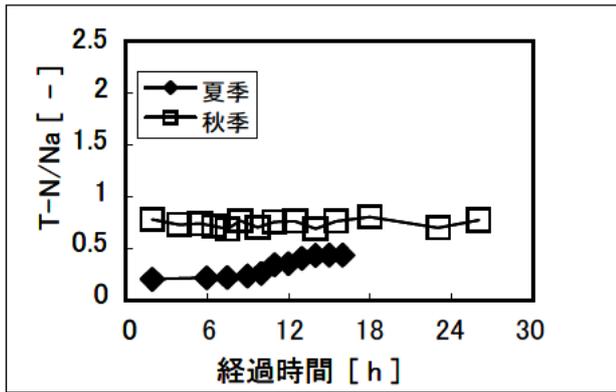


図-20 全窒素/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

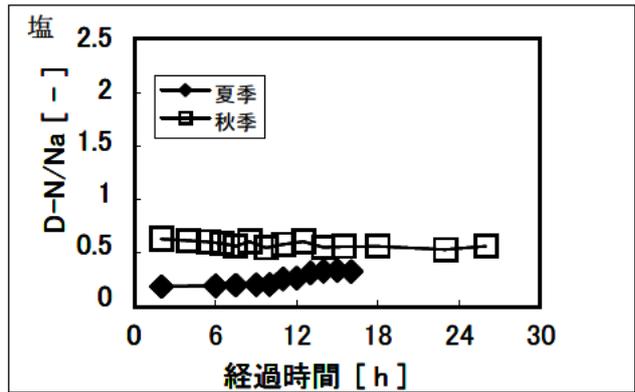


図-23 溶解性窒素/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

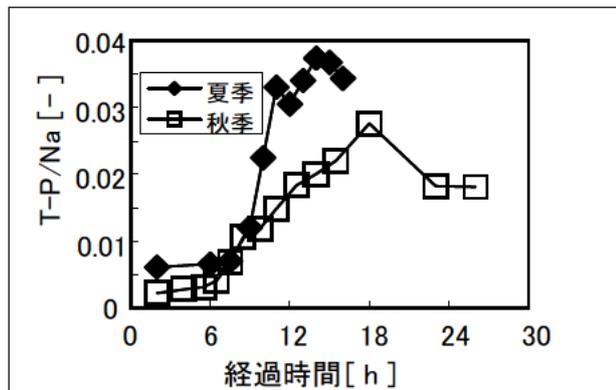


図-21 全りん/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

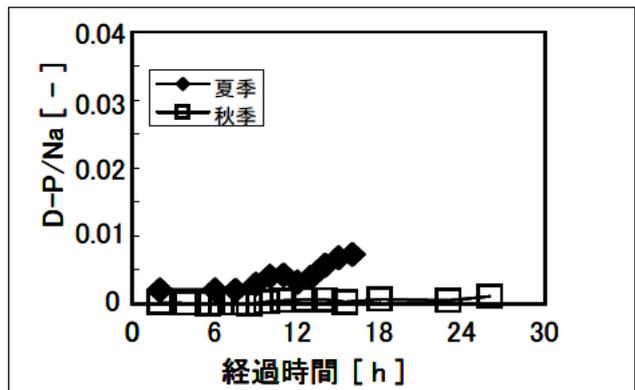


図-24 溶解性りん/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

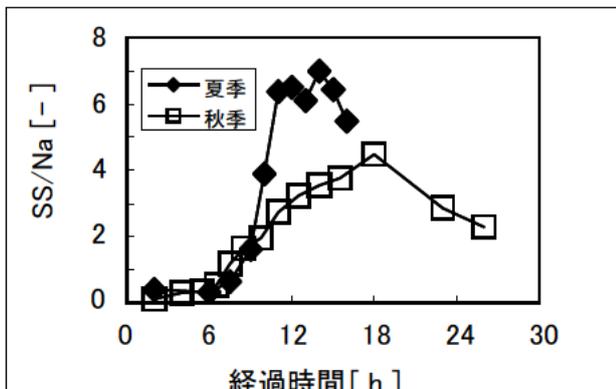


図-22 浮遊物質/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

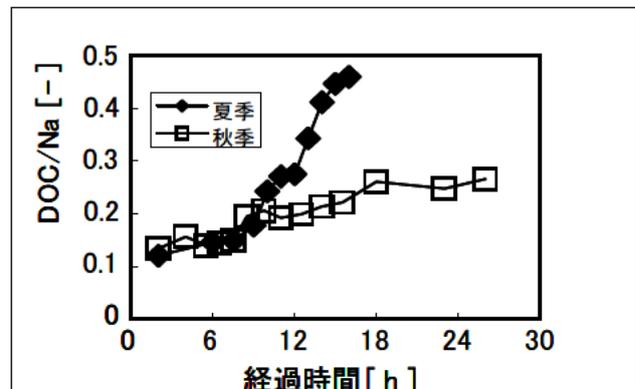


図-25 溶解性有機炭素/ナトリウムイオン濃度比の時間変化

3. まとめ

流域で発生する栄養塩類の閉鎖性水域への流出機構を明らかにするために、平成 21 年度は流域で発生する汚濁負荷が水域へ到達する機構を考察するための基礎情報収集を目的として、利根川水系鬼怒川の支川である山川を選定し、晴天時および雨天時のトレーサー物質及び溶解性栄養塩類の流出実態を調査した。

さらに、比流量とトレーサー物質、栄養塩類、有機汚濁指標の流出負荷量の関係、トレーサー物質と栄養

類、有機性汚濁指標の濃度比の整理を行った。

今後は、水位連続観測による流量の連続把握を行うことで、平成 21 年度調査で得られた比流量と流出負荷量の関係を用いて、流域からの栄養塩類の雨天時を含めた総流出負荷量を把握することが可能となると考えられる。

参考文献:

- 1) 平成 18 年度下水道関係調査研究年次報告書集、
土木研究所資料第 4080 号、pp.21-28、2007
- 2) 平成 19 年度下水道関係調査研究年次報告書集、
土木研究所資料第 4123 号、pp.117-126、2009
- 3) 岡安祐司、鈴木穰、晴天時における、生活排水、
畜産排水起源のトレーサー物質および栄養塩類
の流出実態、環境工学研究論文集、45、pp.19-28、
2008

都市水環境における水質評価手法に関する調査

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 18～平 22

担当チーム：水環境研究グループ(水質)

研究担当者：南山瑞彦、岡安祐司、村山康樹

【要旨】

本研究課題では、都市水環境において豊かな水生生態系を構築することを目標としている。今年度は、生態系影響の面からの水質評価指標の開発に向け、下水道の整備状況が異なる 2 地域において調査を行い、河川生態系に水質が与える影響について統計解析を行った。また、都市における水資源として活用が期待されている下水処理水に対して、好気条件での担体処理を追加的に実施することで、下水処理水放流先水路の付着藻類増殖を抑制する手法を検討した。キーワード：河川水質、水生生態系、統計解析、バイオアッセイ、藻類増殖抑制

1. はじめに

近年、水辺環境や生態系に対する市民の関心が高まっている。様々な対策により、河川における水質環境基準の達成率は上昇してきたが¹⁾、水質環境基準が達成されても良好な水生生態系が形成されるとは限らず、生態系を考慮した水質評価、改善が求められている。

平成 15 年度には、水生生物保全の観点から亜鉛が水質環境基準の生活項目として加えられ、魚類のイワナや水生昆虫ヒラタカゲロウに対する生態影響試験の情報をもとに基準値が設定された²⁾。また、国土交通省では、平成 17 年に「今後の河川水質管理の指標について(案)」をとりまとめ、河川の水質調査に適用してきている(平成 21 年 3 月一部改定³⁾)。同指標(案)では、現状の河川水質管理における BOD による指標性の低下などを課題として挙げ、「豊かな生態系を確保するための水質管理」という視点においては、溶存酸素(DO)、アンモニア態窒素(NH₄-N)などが新たな評価指標として提示されている。しかし、河川水環境中の様々な物質、水質項目が、生態系に与えている影響については、未だ十分に明らかになっていない。

このため本研究課題では、化学的水質分析手法のみならず、現場における生物相の調査手法やバイオアッセイ手法を取り込み、生態影響を対象とした水質評価指標の開発を目的に調査を行っている。平成 18 年度は、様々な汚濁状況の河川を対象に、水質と生物相についてのおおまかな関係を把握した。平成 19 年度は、様々な地域の都市河川を対象に、底生動物に影響を与える水質項目を統計解析から推測するとともに、水のきれいさを表現できる指標の構築を試みた。平成 20 年度は、水質が水生生態系に与える影響解析を進めるとともに、バイオアッセイ手法の水質指標への適用について検討した。

本年度は、下水処理水、生活系排水、事業場系排水など異なる種類の排水の影響が予想される河川 9 地点を対象に調査を行い、水質と水生生態系の関係に関する解析を行った。

また近年、下水処理水は、都市内の水資源として有効利用が求められているが、下水処理水中の窒素やりん等の栄養塩類により、都市内水路や池などに利用した場合に、付着藻類や浮遊藻類の発生を引き起こし、景観障害等の問題が生じる。この問題に対応するため、下水処理水中の栄養塩類の濃度を極めて低くする方法(凝集剤の大量使用によるりんの高度除去等)が試験的に適用されているが、設備費、運転費とも高価であり、普及していないのが現状である⁴⁾。そこで、水質チームでは、下水処理水に対して好気性の生物膜処理を適用し、主としてマンガン濃度を低下させることにより、藻類増殖の抑制を可能とする簡易な手法を、実験室規模で開発してきた⁵⁾、⁶⁾。本年度は、同手法のパイロット規模での実証実験を実施した。

2. 都市河川における水質と水生生態系の関係

2.1 調査地点及び調査時期

本調査では、様々な水質項目が河川生態系に与える影響を明らかにするため、様々な水質の河川における実態調査を行う必要があり、これまで、下水道の既整備地域、整備途上地域、浄化槽混在地域等、延べ 35 地点において、水質及び生態系調査を行ってきた。

本年度は、多摩川中流域の 4 地点(図 2-1)及び利根川水系中流域の支川 5 地点(図 2-2)において、水質分析及び生態系調査を実施した。

多摩川中流域は、下水道がほぼ 100%整備されており、水質が改善されてきた一方で、下水処理水の影響を大き

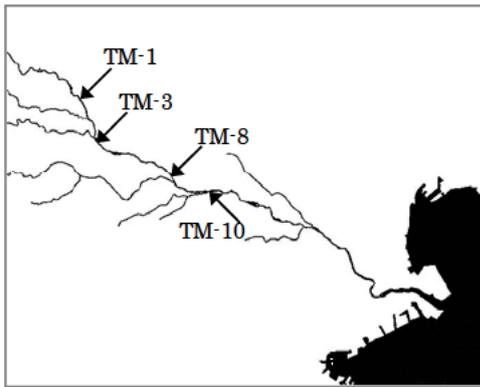


図 2-1 調査地点(1)―多摩川流域

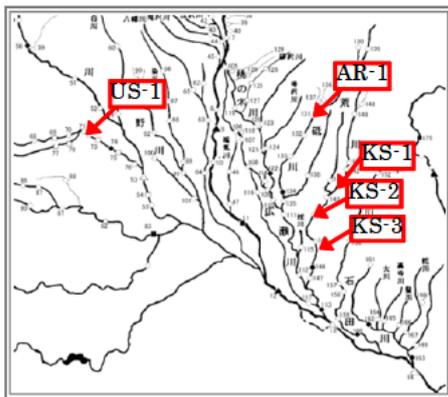


図 2-2 調査地点(2)―利根川流域

く受けている地域である。多摩川本川において下水処理水流入前に 2 地点(TM-1、TM-3)、処理水流入後に 2 地点(TM-8、TM-10)を調査地点として設定した。

一方、利根川中流域では、生活排水処理率は改善されつつあるものの、依然として低い水準にある。生活系及び事業系排水の影響が予想される地域として、広瀬川支川の粕川において、市街地の上流から下流にかけて調査地点を 3 箇所設定した(KS-1～KS-3)。また、畜産系排水の影響が予想される地点として、同じく広瀬川支川の荒砥川の比較的上流部を調査対象とした(AR-1)。また、有機汚濁の程度は低い、比較的高濃度の亜鉛の存在が報告されている⁷鳥川支川の 1 級河川碓氷川についても、調査を実施した(US-1)。

各調査地点は、TM-8、TM-10、US-1 の 3 地点が河川 B 類(BOD3mg/L 以下)、その他の 6 地点が河川 A 類型(BOD2mg/L 以下)に指定されている。また、平成 20 年度の公共用水域水質調査^{8、9)}によると、各地点の BOD75%値は、TM-1、TM-2 では 0.5mg/L 未満、TM-8、TM-10 近傍では 1~1.5mg/L 程度、KS-1~KS-3 近傍では 2~3mg/L 程度、US-1 近傍では 1.1 mg/L、AR-1 では 4.3mg/L となっている。

調査は、平成 21 年 12 月~22 年 1 月に行った。また、

底生生物試料の採取は、原則として、水深が比較的浅く流速が確保されている、いわゆる“瀬”の状態の箇所で行った。

2.2 水質分析

本年度の調査では、水温、DO、各態窒素・りんなどの一般指標 12 項目、及び金属類 22 元素について分析を行った。

2.2.1 一般指標項目

水質一般指標として、採水時の水温、溶存酸素(DO)、電気伝導度(EC)、残留塩素(全塩素:TRC)、懸濁物質(SS)、溶解性有機炭素(TOC)、全窒素(T-N)、アンモニア態窒素(NH₄-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)硝酸態窒素(NO₃-N)、全りん(T-P)、りん酸態りん(PO₄-P)について測定した。

水温、DO、電気伝導度(EC)は、調査地点において、携帯型水質測定器(堀場製作所製、U-20)を用いて測定した。残留塩素については、HACH 社製ポケット残留塩素計(DPD 比色法に準拠)を用いて測定した。

その他の項目は、ガラス瓶、またはポリビンに満水状態で採水し、氷冷状態で分析室へ輸送した後、下水試験方法¹⁰⁾またはそれに準じた方法で分析を行った。TOC については、島津社製自動分析計 TOC-5000A を用い、各態窒素・りんについては、連続流れ分析装置(Bran Lubbe 社、TRAACS800)を用いた。

2.2.2 金属類及びほう素

Be、B、Al、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、As、Se、Mo、Ag、Cd、Sn、Sb、Ba、Tl、Pb、U の 22 元素を対象に、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS 法)により一斉分析を行った。

試料は、ポリビンに採水して氷冷状態で分析室へ輸送し、硝酸を添加した後、分析操作まで冷蔵保存した。分析は、「工場排水試験方法(JIS K0102)」またはそれに準じた方法で行った。前処理として試料に硝酸を加え加熱分解を行い、冷却、内部標準物質添加、定容後、Thermo Electron 社製、X7/CCT にて測定した。

2.3 生態系調査

本年度の調査では、河床の付着藻類および底生動物(マクロベントス)を対象に、出現種の同定、定量を行った。

付着藻類は一次生産者として、水生昆虫をはじめとする底生動物は一次消費者として、ともに河川生態系における重要な機能を担っている。また、栄養塩濃度や有機汚濁など河川水質を反映するという視点から、指標生物としての検討が多くなされている。

2.3.1 付着藻類

水中から採取した石(径 10~30cm 程度)の表面に 5×5cm の方形枠を当て、枠の範囲にある付着物をブラシで

擦り取ることで、分析試料の採取を行った。この操作を1地点について5回行い、計125cm²分を採取、混合した後、その半分(62.5cm²分)を用いて種の定量分析を行い、残りの半分を用いてクロロフィルの分析を行った。

出現種の定量分析用試料は、現地にてホルマリン(約5%(v/v))固定を行い、分析室へ輸送した。光学顕微鏡を用いて出現種の同定および計数を行い、出現種ごとの単位面積当たりの細胞数を算出した。

また、クロロフィル分析用試料は、氷冷状態で分析室へ輸送した後、「河川水質試験方法(案)1997年版」¹¹⁾の標準法1、2に従ってクロロフィル類の定量を行った。

2.3.2 底生動物

「平成18年度版 河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版]」¹²⁾の「III. 底生動物調査」を参考に試料の採取を実施した。概要を以下に示す。

調査地点の河床に30×30cmの方形枠を設定し、その下流側に採集ネットを受けて、枠内にある石表面や底質中に生息する生物を収集した。およそ径10cm以上の石礫については、河川中で表面をブラシ等で擦ることで生物をネット中に洗い落とし、小石や砂泥については水中から取り出し、水を入れたバケツの中で生物を洗い落とし後にピンセット等で採集した。この作業を3回繰り返すことを基本として、採取した全ての試料を混合して分析用の試料とした。分析用試料は、現地にてホルマリン(約5%(v/v))固定を行い、分析室へ輸送した後、出現種の同定および計数を行って、出現種ごとの単位面積当たりの個体数および湿重量を算出した。

2.4 調査結果

2.4.1 一般指標項目

一般水質指標の分析結果を表2-1に示す。ECとNO₃-Nは調査地点間での濃度差が大きく、ともにTM-1、TM-3が低濃度、AR-1、US-1は中程度、TM-8、TM-10及びKS-1~KS-3が高濃度という結果であった。DOを除くその他の指標でも、概ね同様の傾向であったのに対し、DOに関しては、他の項目と逆の傾向が見られた。また、残留塩素は全調査地点においてN.D.~0.04mg/Lと、使用機器の定量下限レベル(0.05mg/L)以下であった。

2.4.2 金属類及びほう素

分析対象とした22元素のうち、全地点で定量下限値(1μg/L)以下であった8元素(Be、Se、Ag、Cd、Sb、Tl、Pb、U)を除く14元素について、分析結果を表2-2に示す。9地点全てで検出されたのが6元素(B、Al、Mn、Fe、Zn、Ba)、一部の調査地点で検出されたのが8元素(V、Cr、Co、Ni、Cu、As、Mo、Sn)で、Al(14~250μg/L、平均120μg/L)、Fe(14~210μg/L、平均97μg/L)、

表2-1 水質分析結果(1)—一般指標項目

	TM-1	TM-3	TM-8	TM-10	KS-1	KS-2	KS-3	US-1	AR-1
Wat.Temp (C)	6.0	6.3	12.2	11.8	9.3	8.8	8.3	5.0	7.4
pH	7.8	8.4	7.5	7.4	7.9	8.0	8.0	7.9	7.9
DO (mg/L)	12.1	12.4	10.3	9.2	11.3	11.8	12.0	12.9	11.7
EC (μS/cm)	100	130	540	440	330	410	400	370	180
Turb. ()	1.1	0.8	1.2	1.4	6.6	6.0	5.8	1.7	4.1
TRC (mg/L)	<0.01	<0.01	0.04	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.04
DOC (mg/L)	1.4	1.0	3.8	3.2	2.2	3.0	2.8	6.5	1.4
T-N (mg/L)	0.63	0.75	7.1	6.8	7.8	8.6	7.2	2.6	3.4
NH ₄ -N (mg/L)	0.04	0.01	0.06	0.07	0.15	0.27	0.13	0.06	0.03
NO ₂ -N (mg/L)	0.01	0.01	0.07	0.10	0.13	0.16	0.13	0.07	0.07
NO ₃ -N (mg/L)	0.48	0.62	6.2	5.9	6.8	7.2	6.2	2.1	2.9
T-P (mg/L)	0.02	0.01	0.63	0.47	0.47	0.52	0.38	0.03	0.13
PO ₄ -P (mg/L)	<0.01	<0.01	0.60	0.44	0.33	0.38	0.29	0.01	0.17

表2-2 水質分析結果(2)—金属類及びほう素

	(μg/L)									
	TM-1	TM-3	TM-8	TM-10	KS-1	KS-2	KS-3	US-1	AR-1	
B	7.3	7.6	39	37	32	58	60	36	97	
Al	20	14	49	32	250	220	230	57	190	
V	<1.0	<1.0	1.2	1.3	4.1	3.6	3.5	1.7	4.4	
Cr	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	4.7	4.0	<1.0	<1.0	
Mn	15	2.2	8.5	4.1	16	14	17	10	9.5	
Fe	25	14	51	38	210	150	160	94	130	
Co	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	2	1	<1.0	<1.0	
Ni	<1.0	<1.0	3.1	2.6	<1.0	24	24	2.7	<1.0	
Cu	<1.0	1.1	4.7	3.8	3.3	3.1	4.5	3.2	3.0	
Zn	2.0	1.9	14	12	12	30	29	32	9.1	
As	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1	<1.0	<1.0	
Mo	<1.0	<1.0	2.2	2.0	<1.0	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	
Ba	5.1	5.9	15	16	6.3	12	10	8.4	4.1	

B(7.3~97μg/L、平均42μg/L)は比較的高濃度であった。

一方、半数以上の地点で定量された9元素について調査地点間で濃度を比較すると、B、Al、Fe、Ni、Znの5元素は比較的大きな濃度差(最大濃度/最小濃度が13~24程度)があり、多摩川の処理水流入前2地点(TM-1、TM-3)が低く、流入後2地点(TM-8、TM-10)が中程度、粕川の市街地部2地点(KS-2、KS-3)が高い、という傾向が見られた。また、その他の3地点では、高濃度(KS-2、KS-3と同程度以上)に検出された元素と中程度(TM-8、TM-10と同程度)の元素があり、KS-1ではAlとFe、US-1ではZn、AR-1ではB、Al、Feが高濃度であった。

2.4.3 付着藻類

今年度の調査において確認された付着藻類は73タクサに分類された。うち、珪藻類を中心に66タクサが、種レベルまで同定できた。また、1~3地点で確認されたのが45タクサ、4~6地点で確認されたのが18タクサ、7~9地点で確認されたのが10タクサであった。

調査地点ごとに、優先出現種とその占有率、出現タクサ数、細胞数、沈殿量、Shannon-Wienwerの多様度指

$$H' = - \sum_i^S p_i \ln p_i \quad (\text{式2-1})$$

S: 群集に含まれる種の数

p_i: 種iの個体数が、群集の全個体数に占める割合

表 2-3 生物調査結果(1)―付着藻類

	TM-1	TM-3	TM-8	TM-10	KS-1	KS-2	KS-3	US-1	AR-1
優占種上位 (3タクサ)と その占有率	<i>Homoeothrix janthina</i> 64%	<i>Homoeothrix janthina</i> 64%	<i>Surirella minuta</i> 30%	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> 48%	<i>Surirella angusta</i> 65%	<i>Surirella angusta</i> 64%	<i>Surirella angusta</i> 82%	<i>Surirella angusta</i> 66%	<i>Homoeothrix janthina</i> 50%
	<i>Nitzschia frustulum</i> 30%	<i>Surirella minuta</i> 17%	<i>Lyngbya</i> sp. 18%	<i>Surirella minuta</i> 19%	<i>Achnanthes lanceolata</i> 8%	<i>Lyngbya</i> sp. 6%	<i>Gomphonema parvulum</i> 5%	<i>Homoeothrix janthina</i> 25%	<i>Surirella angusta</i> 27%
	<i>Surirella minuta</i> 3%	<i>Nitzschia frustulum</i> 12%	<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> 15%	<i>Cyclotella radiosa</i> 11%	<i>Nitzschia inconspicua</i> 5%	<i>Navicula decussis</i> 5%	<i>Nitzschia inconspicua</i> 4%	<i>Lyngbya</i> sp. 2%	<i>Nitzschia acicularis</i> 6%
	タクサ数	19	26	22	24	33	29	24	33
細胞数(cells)	69,804,000	243,108,000	9,792,000	9,216,000	544,734,000	156,762,000	592,128,000	326,664,000	134,442,000
沈殿量(mL)	3.0	9.2	2.2	2.0	2.9	3.2	5.8	3.2	1.5
多様性指数	0.92	1.20	2.15	1.82	1.54	1.61	0.90	1.04	1.65
DAIpo	96.0	72.9	56.3	54.7	54.3	55.6	53.0	51.3	63.0
Chl-a(µg/cm ²)	10.7	13.0	24.9	21.8	10.7	13.0	24.9	21.8	15.7
Pheophytin(µ)	1.6	3.4	4.3	4.8	1.6	3.4	4.3	4.8	2.9

※ 試料の採取面積62.5cm²

表 2-4 生物調査結果(2)―底生動物

	TM-1	TM-3	TM-8	TM-10	KS-1	KS-2	KS-3	US-1	AR-1
優占種上位 (3タクサ)と その占有率	<i>Antocha</i> sp. 52%	<i>Antocha</i> sp. 33%	<i>Psychomyia</i> sp. 17%	<i>Baetis taiwanensis</i> 33%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 51%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 55%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 47%	<i>Psychomyia</i> sp. 32%	<i>Asellus hilgendorfi hilgendorfi</i> 69%
	<i>Microtendipes</i> sp. 9%	<i>Pothastia montium</i> 16%	<i>Tenuibaetis sp.H</i> 11%	LUMBRICUL DAE sp. 12%	<i>Cheumatopsyche sp.</i> 10%	<i>Cheumatopsyche sp.</i> 6%	<i>Asellus hilgendorfi hilgendorfi</i> 10%	<i>Antocha</i> sp. 24%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 16%
	<i>Stenopsyche marmorata</i> 7%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 15%	<i>Baetis thermicus</i> 9%	<i>Ecdyonurus yoshidae</i> 7%	<i>Simulium</i> sp. 10%	<i>Baetis thermicus</i> 5%	<i>Asellus hilgendorfi hilgendorfi</i> 10%	<i>Hydropsyche orientalis</i> 16%	<i>Simulium</i> sp. 7%
	タクサ数	37	32	34	16	31	24	22	17
総個体数	701	624	476	146	367	304	251	664	581
湿重量(g)	6.8	9.6	3.0	0.4	5.8	5.2	2.6	2.5	6.3
多様性指数	2.14	2.33	2.77	2.31	1.92	1.93	2.05	2.08	1.13
EPT指数	24	21	18	8	13	8	10	17	8
ASPT値	6.3	6.5	6.3	6.4	7.8	7.8	7.7	6.9	7.1

※ 試料の採取面積0.25m²

数 H' (式 2-1)、DAIpo(Diatom Assemblage Index to organic water pollution)値について整理し、表 2-3 に示す。1 地点あたりの出現タクサ数は 19~33 であり、糸状藍藻 *Homoeothrix janthina*、またはコバンケイソウ *Surirella angusta* が多くの地点で優占していた。単位面積当たりの細胞数(現存量)は、最大の地点と最小の地点を比べると 50 倍以上の差があった。また、多様性指数は、0.90~2.15 の範囲であった。

DAIpo¹³⁾は、付着珪藻群集に基づく有機汚濁指数として開発されたもので、珪藻種を高清水性種、高汚濁性種、その他の種に分類し、それらの出現頻度を基に算出される。0~100 の範囲の値をとり、値が小さいほど汚濁性が高いという評価となる。9 地点の DAIpo 値は 51.3~96.0 の範囲となり、多摩川の処理水流入前 2 地点 TM-1 及び TM-3 では、それぞれ 96.0、72.9 と他の地点に比べて大きな値を示した(概ね β 貧腐水性に相当¹³⁾)のに対し、その他の地点では 63.0~51.3 の値であった(概ね α 貧腐水性に相当¹³⁾)。

一方、クロロフィル量については、表 2-3 に示すとおり、付着藻類の現存量(細胞数、沈殿量)との間に明らか

な関連は見られなかった。

2.4.4 底生動物

今年度の調査において確認された底生動物は 73 タクサに分類された。うち種レベルまで同定できたものは 37 種である。また、1~3 地点で確認されたのが 46 タクサ、4~6 地点で確認されたのが 18 タクサ、7~9 地点で確認されたのが 9 タクサであった。

調査地点ごとに、優先出現種とその占有率、出現タクサ数、総個体数、Shannon-Wienwer の多様性指数(式 2-1)、EPT 指数(カゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目の出現種数の合計)、ASPT(Average Score Per Taxon)値について整理した(表 2-4)。1 地点あたりの出現タクサ数は 16~33 であり、ウルマーシマトビケラ(*Hydropsyche orientalis*)、ミズムシ(*Asellus hilgendorfi hilgendorfi*)、ガガンボ科の一属(*Antocha* sp.)などが優占種として見られた。多様性指数は 1.13~2.77 の範囲であった。

また、ASPT によるスコア法¹⁴⁾は、予めスコアを定めた指標種の出現状況から平均スコア(ASPT 値)を算出することで河川の総合的な水環境の評価をする手法で、日本の河川に適した生物学的な水質評価指標として、近年適

用例が多く見られる^{3, 15)}。ASPT 値は1~10 の範囲をとり、値が大きいほど良好な環境であると評価される。9 地点の ASPT 値は6.3~7.8 の範囲であり、全国の一級河川(平均6.5、標準偏差1.13)¹⁵⁾と比較して、概ね平均、または、それ以上の値となった。

2.5 統計解析

調査地点における水質について、主成分分析による要約を行うとともに、k-平均法によりクラスタリングを試みた。用いる項目は、検出頻度や他の項目との関連性などから、pH、酸素飽和率(水温と DO から算出)、EC、濁度、DOC、NH₄-N、NO₃-N、PO₄-P、及び B、Al、Mn、Fe、Ni、Cu、Zn、Ba の16 項目とした。各項目間には相互に強い相関があるため、主成分分析により変数の集約を行った。定量下限値以下のデータについては定量下限値の 1/2 を代用し、pH 以外の項目については対数変換を行った。その後、各項目の変化の影響を評価するため、正規化(平均値=1、標準偏差=1)した上で主成分分析を行った結果、固有値が1以上の合成変数(主成分)が4つ作成され、この4変数の寄与率の合計は93%を占めた。表2-5及び図2-1に、主成分分析の結果の概要を示す。16項目中、pH、DO、Mn、Baを除く12項目が主成分1と高い正の相関を示し、これらの項目の挙動が類似していることが示された。残りの項目では、pH、DO(飽和率)が主成分2に対して正の、Baは主成分2に対して負の相関を示し、Mnは主成分4に対して弱い正の相関($r=0.62$ 、 $p=0.08$)を示した。また、k-平均法によるクラスタリング(Calinski-Harabasz の基準によりクラスタ数を決定)を試みたが、KS-2とKS-3の2地点のみがグループとなり、その他はグループ化されなかった。

一方、各調査地点における底生動物群集構造については、多次元尺度構成法(MDS)により2次元平面上に表現

表2-5 水質項目の主成分分析

	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4
固有値	3.02	1.8	1.18	1.04
累積寄与率	57.1%	77.4%	86.2%	93.0%
主成分得点				
TM-1	-4.69	0.58	-0.06	2.34
TM-3	-5.94	0.00	0.75	-1.83
TM-8	1.50	-2.37	0.13	0.00
TM-10	0.85	-3.83	-1.11	0.00
KS-1	1.64	1.67	-1.30	0.37
KS-2	3.15	1.02	1.01	0.09
KS-3	2.99	1.30	0.88	-0.28
US-1	0.62	-0.14	1.74	0.26
AR-1	-0.12	1.78	-2.05	-0.87
変数との相関 ($p<0.01$)				
正	pH, DO, Mn, Ba を除く項目	pH, DO	—	—
負	—	Ba	—	—

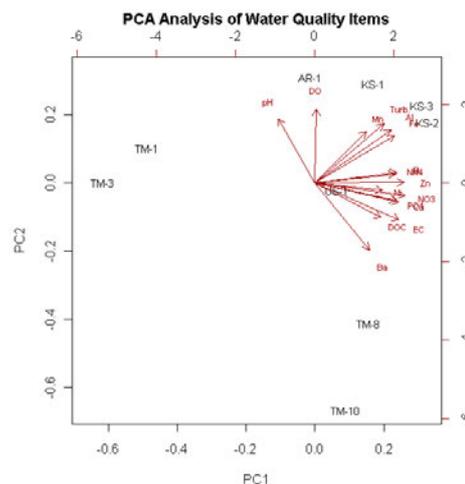


図2-1 水質項目の主成分分析(PC1 vs PC2)

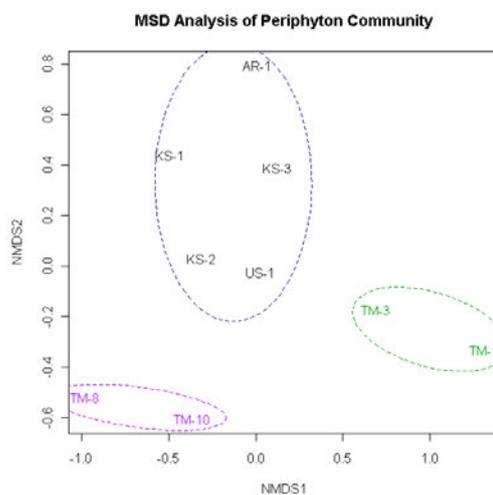


図2-2 付着藻類の群集構造解析による調査地点のグループ化

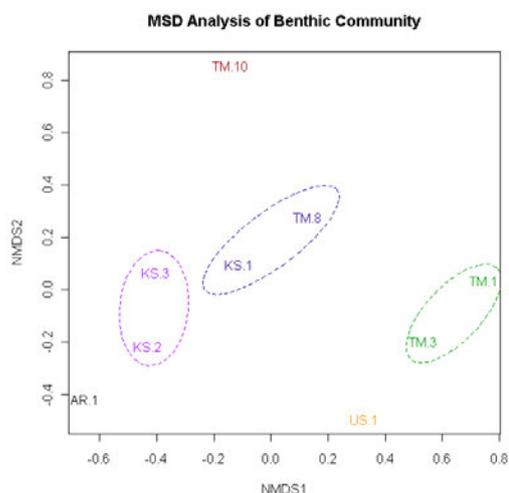


図2-3 底生動物の群集構造解析による調査地点のグループ化

するとともに、k-平均法によりクラスタリングを行った。クラスタ数の決定は、Calinski-Harabasz の基準によった。結果を図 2-2、図 2-3 及び表 2-6 に示す。付着藻類の群集構造からは 3 つのクラスタに、底生動物のデータからは 6 つのクラスタに、それぞれ分類された。TM-1 と TM-3 はいずれのクラスタリングにおいても 2 地点で 1 グループを形成した。一方、TM-8 と TM-10、及び KS-1、KS-2、KS-3、US-1、AR-1 は、付着藻類群集からはそれぞれ 1 グループを形成したが、底生動物群集からは細分化され、TM-8 と KS-1、及び KS-2 と KS-3 がそれぞれグループ化された。また、形成された各グループと水質主成分 4 変数との関係からは、底生動物のグループ化は主成分 1 の値と関連性が強く、付着藻類によるグループ化は主成分 2 の影響が大きい様子が伺える。

さらに水質と生物相との関係を見るため、水質項目の主成分 4 変数と、生物群集に関する指標 9 変数(付着藻類のタクサ数、細胞数、多様性指数、DAI_{po}、及び底生動物のタクサ数、個体数、多様性指数、EPT 指数、ASTP 値)との間の相関係数を求めた(表 2-7)。その結果、多くの水質項目と正の相関が高い水質主成分 1 は、付着藻類の DAI_{po} 指数、及び底生動物の個体数、EPT 指数と負の相関、底生動物の ASTP 値と正の相関を示した。DAI_{po} 指数、EPT 指数は環境が良いほど小さい値を、ASTP 値は環境が良いほど大きな値をとることを考えると、水質主成分 1 は、付着藻類及び底生動物、特に汚濁耐性の低い種に対して負の影響を与えていると考えられ

表 2-6 水質項目の主成分分析結果と生物群集解析によるクラスタリング結果

	TM-1	TM-3	TM-8	TM-10	KS-1	KS-2	KS-3	US-1	AR-1
水質主成分分析									
主成分1	-4.69	-5.94	1.50	0.85	1.64	3.15	2.99	0.62	-0.12
主成分2	0.58	0.00	-2.37	-3.83	1.67	1.02	1.30	-0.14	1.78
主成分3	-0.06	0.75	0.13	-1.11	-1.30	1.01	0.88	1.74	-2.05
主成分4	2.34	-1.83	0.00	0.00	0.37	0.09	-0.28	0.26	-0.87
付着藻類によるグループ化	G _{pp1}		G _{pp2}			G _{pp3}			
底生動物によるグループ化	G _{mb1}	G _{mb2}	G _{mb3}	G _{mb2}	G _{mb4}	G _{mb5}	G _{mb6}		

表 2-7 水質主成分と生物指数の相関解析

		PC1	PC2	PC3	PC4
付着藻類	タクサ数	0.364	0.358	0.093	-0.286
	細胞数	0.287	0.605*	0.200	-0.146
	多様性指数	0.365	-0.507	-0.469	-0.223
	DAI _{po} 値	-0.828**	0.151	-0.080	0.430
底生動物	タクサ数	-0.515	0.213	-0.101	0.254
	個体数	-0.687**	0.297	0.173	0.125
	多様性指数	-0.109	-0.688**	0.452	0.115
	EPT指数	-0.750**	-0.051	0.344	0.309
	ASTP値	0.630*	0.684**	0.034	-0.105

**はp<0.05で、*はp<0.1で有意に相関がある項目

る。また、pH、DO と正の相関を持つ水質主成分 2 は、付着藻類の細胞数、底生動物の ASTP 指数と正の、底生動物の多様性指数と負の相関を示した。これらの水質項目、生物項目間の因果関係や、それらに対して都市排水が与える影響は単純ではないと予想されるが、付着藻類の光合成に伴い DO、pH が上昇すること、好清水性の指標生物に酸素要求性の高い種が多いことなどにより、相関が見られたと思われる。

2.6 今後の展開と課題

本調査課題では、都市域の小河川を中心として、様々な流域特性を持つ河川について、化学的水質分析と水生生態系調査を実施してきた。本年度の調査結果からは、現状の都市河川(BOD₁₋₅程度)においても、河川水質が付着藻類や底生動物の生物群集、特に非汚濁耐性種に影響を与えていることが示された。また、重金属や医薬品類などを含めた微量汚染物質の多くが有機物や窒素、りんと類似した存在実態を示し、それらの項目と生物指標との相関性が高いことから、少なくとも一定程度の人為汚染がある都市河川においては、下水道整備などにより有機汚濁対策を進めていくことが、生態系保全、回復の観点からも効果的であると考えられる。

今後は、これまで調査してきた様々な河川について、得られたデータの整理、解析を進めるとともに、全国における公共用水域水質調査や水生生物調査との比較や、流域情報の詳細な把握を含めた検討を実施する。また、河川水中に形成される生物相の現地調査データと、バイオアッセイ手法による河川水の毒性試験データの相互関係についても検討を行い、都市水環境中に存在する生態毒性物質が生態系に及ぼす影響を含めた評価手法を検討・構築することを目指す。

3. 下水処理水の高度処理による藻類増殖抑制

3.1 研究方法

3.1.1 担体処理実験

担体処理連続実験は、夏季の7月初旬より開始し9月第2週目までの約2ヶ月間実施した。図 3-1 に示すように、凝集剤添加循環式硝化脱窒法および急速砂ろ過法により処理された茨城県霞ヶ浦流域下水道事務所霞ヶ浦浄化センターの下水処理水を、微生物保持担体(JFE エンジニアリング株式会社製 Bio-Tube、ポリプロピレンを基材とした中空円筒状の固体、4mm^{OD}×3mm^{ID}×5mm^L)が添加された円筒形の反応槽(大阪水交株式会社製、材質ポリエチレン、内径 64cm、有効水深 87cm、有効容量 0.28 m³、水理学的滞留時間(HRT) 2 時間)に導入し、下部より曝気を行い、担体表面に自然発生的に付着した生物膜

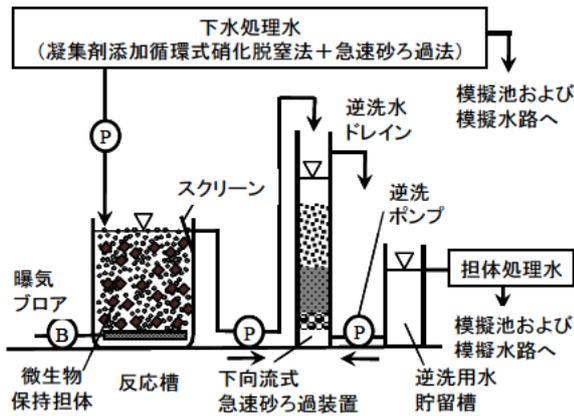


図 3-1 担体処理実験の概要

により高度処理を実施した。なお、反応槽における担体添加率は30%とした。さらに、反応槽流出水は下向流式急速砂ろ過装置(内径10cm、アンスラサイト層厚62.5cm、砂層厚37.5cm、ろ過速度=300m/日)を通過させ、余剰生物膜を分離除去し担体処理水を得た。下向流式急速砂ろ過装置の洗浄は、担体処理水を用いて、3時間に1回の頻度で、1m/分の速度で、2分間回、逆流洗浄した。

水質測定は、微生物保持担体上の生物膜の馴致期間として1ヶ月程度確保した後、8月上旬から実施した。週1回の頻度で、下水処理水および担体処理水について、現地にて、水温、pH、溶存酸素(DO)濃度を観測するとともに、スポット採水試料中の浮遊物質(SS)、有機性浮遊物質(VSS)、溶解性有機性炭素(DOC)、総窒素(T-N)、アンモニア性窒素(NH₄⁺-N)、亜硝酸性窒素(NO₂⁻-N)、硝酸性窒素(NO₃⁻-N)、総りん(T-P)、オルトリン酸態りん(PO₄³⁻-P)の各濃度を測定した。また、2週間に1回の頻度で、スポット採水試料中の総鉄(T-Fe)、総マンガン(T-Mn)の測定を実施した。

3.1.2 模擬水路実験

担体処理実験における微生物保持担体上の生物膜の馴致期間として1ヶ月程度確保した後、8月上旬から、霞ヶ浦浄化センターの下水処理水と、3.1.1で述べた担体処理実験で得られた担体処理水を、それぞれ、屋外に設置された同一形状の循環式試験水路(塩化ビニール製、長さ400cm、幅10cm)に通水し、水深8cm、流速15cm/secになるように流量を調整した。また、水路および循環配管内水の水学的滞留時間(HRT)は約22分となるように設定した。また、水路上に発生する付着藻類等の固形物の状況を把握するために、実験開始時に水路内の壁面および底面に9cm×9cm×0.5cmの素焼き板を三面張り状に敷き詰めた。

水質測定は、週1回の頻度で、下水処理水および担体処理水を通水した模擬水路の表層水について、現地にて、

水温、pH、溶存酸素(DO)濃度を観測するとともに、右岸側、底面、左岸側の素焼き板を各3枚ずつ採取し、素焼き板表面上の固形物をポリエチレン製歯ブラシにて掻き取り、純水に転溶し、5Lにメスアップ、均質化した後の水試料中のSS、VSS、T-N、T-P、Chl-*a*の各濃度を測定し、素焼き板の単位面積当たりの付着物量として整理した。なお、採取した素焼き板の後には、新たな素焼き板を補充して設置した。また、試料採取は14:00に実施した。

3.2 実験結果

3.2.1 担体処理実験

表3-1に、実験期間中の霞ヶ浦浄化センターの下水処理水、担体処理水の水質測定結果を示す。下水処理水に比べて、微生物保持担体による好気性生物膜処理および急速砂ろ過処理を行った担体処理水では、曝気による、酸素と炭酸ガスの交換によるpH、DOの上昇がみられた。また、他の富栄養化関連項目については大きな差が見られない一方、T-Fe濃度はわずかに、また、T-Mn濃度は大きく低下していた。反応槽前後のMnの形態は、担体上のマンガン酸化細菌等の活動により、溶解性から懸濁態へ変化しており、それが、後段の急速砂ろ過装置でろ過され、除去されていると考えられる。

3.2.2 模擬水路実験

表3-2に、実験期間中の霞ヶ浦浄化センターの下水処

表 3-1 担体処理実験における水質測定結果 (SS以降は平均値)

項目	単位	下水処理水	担体処理水
水温	°C	26.4~27.3	25.7~28.1
pH	—	7.1~7.2	8.0~8.2
DO	mg/L	2.7~3.4	4.9~6.8
SS	mg/L	1.2	1.0
VSS	mg/L	0.9	0.5
DOC	mg/L	3.6	3.7
T-N	mg/L	5.8	6.0
NH ₄ ⁺ -N	mg/L	0.1	0.0
NO ₂ ⁻ -N	mg/L	0.0	0.0
NO ₃ ⁻ -N	mg/L	4.7	4.7
T-P	mg/L	0.19	0.19
PO ₄ ³⁻ -P	mg/L	0.15	0.16
T-Fe	μg/L	24.1	20.0
T-Mn	μg/L	7.2	0.4

理水を通水した模擬水路と、担体処理水を通水した模擬水路の水質測定結果を示す。

下水処理水を通水した模擬水路では、実験期間を通じて壁面から糸状藻類が繁茂し、水路の水面上を覆う光景が見られたが、担体処理水を通水した模擬水路では、糸状藻類の繁茂は顕著に抑えられていた。水質測定結果を比較すると、固形物量や藻類の現存量を表す、SS、VSS、T-N、T-P、Chl. a について 1.6~2 倍の差が見られた。

3. 3 考察

ここでは、担体処理水を通水した模擬池および模擬水

表 3-2 模擬水路実験における水質測定結果
(SS 以降は平均値)

項目	単位	下水処理水を通水した模擬水路	担体処理水を通水した模擬水路
水温	°C	27.7~35.1	28.1~35.2
pH	—	7.6~9.7	8.3~10.0
DO	mg/L	5.5~8.1	7.0~8.5
SS	g/m ²	76.6	37.6
VSS	g/m ²	45.0	19.5
T-N	g/m ²	2.6	1.4
T-P	g/m ²	0.35	0.21
Chl. a	mg/m ²	505	298

路で、藻類の増殖が抑制される要因について考察する。Chetelat ら¹⁶⁾が、カナダの南オンタリオと西ケベックの 13 河川について夏場に藻類量と藻類群集に及ぼす栄養塩類濃度と流速の影響を検討した結果によると、藻類量は T-P 濃度と強い相関があり、0.006~0.082mg/L の範囲において T-P 濃度と正の相関があることが示されている。本研究で使用した霞ヶ浦浄化センターの下水処理水および担体処理水では、T-P 濃度は通常の下水処理水に比べて低減されていたが、そのレベルは 0.2mg/L 程度であり、T-P 濃度が藻類増殖の律速になっているとは考えられない。

そこで、担体処理水において特徴的に低減されている T-Mn に注目する。表 3-3 は国立環境研究所¹⁷⁾が販売している環境標準試料のクロレラとアオコの T-P、T-Mn の含有率と下水処理水、担体処理水中の T-P、T-Mn の濃度を示したものである。クロレラとアオコのデータから、T-P/T-Mn が 228~246 を上回る場合には、T-Mn が水中での藻類増殖の制限因子になると考えられる。実際の模擬池や模擬水路では多種多様な藻類が出現しており、一概にクロレラとアオコのみを以て判断することは難しいが、本研究で得られた担体処理水中の T-P/T-Mn は 475 であり、T-Mn が藻類増殖の制限因子となっている可能性が高いと考えられる。

3. 4 今後の課題

本研究にて開発された技術の、実施設での実証検討を

表 3-3 藻類、下水処理水、担体処理水中の P、Mn の組成

項目	クロレラ	アオコ	下水処理水	担体処理水
T-P	1.7%	0.89%	0.19mg/L	0.19mg/L
T-Mn	69±5 mg/kg	39±3 mg/kg	7.2µg/L	0.4µg/L
T-P /T-Mn	246	228	26	475

行う予定である。また、下水再生水の水質以外の、水路における諸条件(水温、水深、流速等)の影響の観点も含めた検討を行う予定である。

4 まとめ

都市水環境における水質と水生生態系の関係解析においては、下水道整備地域として多摩川中流域の 4 地点、下水道整備途上地域として利根川水系中流域の支川 5 地点を対象とし、調査を行った。その結果、調査地点における有機物、窒素、りんや重金属類などの存在実態は類似しており、一方、pH や DO 飽和率などはそれらとは異なる挙動を示した。また水生生態系との関係からは、付着珪藻類に基づく汚濁指標 DA_{Ipo} や一部の水生昆虫種に注目した EPT 指数では、有機物や窒素、りんを中心とする汚濁物質群との関連が支配的であり、これらに由来する水質を直接的に表す指標であると考えられた。これに対し、底生動物の多様性や ASTP 値は pH や DO との関連を示したことから、汚濁濃度以外の水質要因、あるいは物理条件を含めた総合的な生息環境を指標していると考えられた。これらの結果から都市河川においては、有機物、窒素、りん、あるいはそれと類似した挙動を示す物質群による生態系影響があることから、これらの物質の除去を目標とした対策手法は生態系の視点からも効果的であり、またそれらに対する生物学的指標としては DA_{Ipo} や EPT 指数などが適当であると考えられる。

また、下水再生水を、修景用水や親水用水として水路等に利用した際に、付着藻類が増殖する事例が報告されている。この原因としては、下水再生水の水質や水路における諸条件(水温、水深、流速等)の影響が考えられている。本研究では水質に焦点を当て、下水再生水放流先の池や水路における付着藻類増殖を低減することを目的とした。

凝集剤添加硝化脱窒法により T-N 濃度が 6mg/L 以下、T-P 濃度が 0.2mg/L 以下程度にまで低減された下水処理水に対して、さらに結合法微生物固定化担体を添加した反応槽における好気処理および急速砂ろ過を行うことにより、有機物や微量金属の酸化・不溶化除去を行い、下水処理水放流先の水路付着藻類増殖を低減することを試みた。下水処理水および担体処理を付加した処理水を、屋外模擬水路に連続的に通水した結果、担体処理を付加することにより、付着藻類増殖が抑制されることが確認された。また、藻類増殖の制限因子は、担体処理により効率的に除去される T-Mn であると考えられた。

参考

- 1) 環境省水・大気環境局：平成 20 年度公共用水域水質測定結果、2009 年
- 2) 中央環境審議会水環境部会：水生生物の保全に係る水質環境基準の設定について(第一次報告) [平成 15 年 9 月 12 日付]、2003 年
- 3) 国土交通省河川局河川環境課：今後の河川水質管理の指標について (案)、2009 年
- 4) 国土交通省都市・地域整備局下水道部ほか：下水処理水の再利用水質基準等マニュアル、2005 年
- 5) 岡安祐司ほか：下水の高度処理による藻類増殖能の抑制、第 42 回日本水環境学会年会講演集、p.280、2008 年
- 6) 岡安祐司ほか：下水の高度処理による藻類増殖能の抑制、第 43 回日本水環境学会年会講演集、p.359、2009 年
- 7) 中西準子、内藤航、加茂将史：垂鉛、詳細リスク評価書シリーズ 20、丸善、2008 年
- 8) 群馬県環境森林部環境保全課：公共用水域及び地下水水質調査結果について 平成 20 年度水質測定結果、
http://www.pref.gunma.jp/cts/PortalServlet?DISPLAY_ID=DIRECT&NEXT_DISPLAY_ID=U000004&CONTENTS_ID=26336
- 9) 東京都環境局：平成 20 年度 公共用水域及び地下水の水質測定結果、2010 年
- 10) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部 監修：下水試験方法 1997 年版、1997 年
- 11) 建設省河川局 監修：河川水質試験方法 (案) 1997 年版 試験方法編、pp.916-928、1997 年
- 12) 国土交通省河川局河川環境課 監修：平成 18 年度版 河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル[河川版]
- 13) 渡辺仁治：淡水珪藻生態図鑑 群集解析に基づく汚濁指数 DAI_{po}、pH 耐性能、2005 年
- 14) 全国公害研協議会生物部会：大型底生動物による河川水域環境評価マニュアル、1995 年
- 15) 国土交通省河川局河川環境課：河川水辺の国勢調査 1・2・3 巡目調査結果総括検討、2008 年
- 16) J. Chetelat, F.R. Pick, A. Morin and P.B. Hamilton: Periphyton biomass and community composition in rivers of different nutrient status, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **56**, pp.560-569, 1999
- 17) 国立環境研究所：<http://www.nies.go.jp/labo/crm/index.html>

湖水中の藻類生産有機物の性状と挙動に関する研究

水環境研究グループ 水質チーム

上席研究員 南山 瑞彦

主任研究員 北村 友一

1. はじめに

我が国の湖の有機物汚濁は、流域内での発生源対策などが行われているものの、改善されていないのが現状である。有機物汚濁の発生源は陸域からの流入、湖内での生産、湖底泥からの回帰があり、湖水中の有機物の質・量や挙動に関して様々な研究が行われている。しかし、湖内での生産のうち、植物プランクトンと湖水中の溶存有機物との関連については明らかでない。

本研究は湖水中での内部生産のうち植物プランクトンに由来する溶存有機物に焦点を当て、その質・量的特性や湖内での挙動を明らかにすることを目指している。本年度は湖水中の藻類を用いて培養実験を実施し、溶存有機炭素(DOC)および3次元励起・蛍光スペクトル(EEM)分析により藻類の増殖と溶存有機物の質・量の関係を調査した。さらに、藻類培養液を用いた分解実験を行い、藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係を調査した。

2. 藻類の増殖と溶存有機物の質・量の関係および挙動に関する実験方法

2.1 藻類の増殖と溶存有機物の質・量の関係把握実験の方法

2009年度は表1に示す4種類の藻類群を用いて実験を行った。4種類の藻類群は以下のとおり採取した。2009年8月に採水した霞ヶ浦西浦の湖水にフローサイトメトリー法¹⁾を適用し、約5μmの微細な藻類が主体の藻類A、オシラトリア属の糸状藍藻が主体の藻類Bを得た。また2009年8月5日にアオコが発生した土浦港の湖水を採取して培養したものを藻類Cとした。藻類Cには複数の種が混在し、実験開始時には緑色べん毛虫が優占していた。8月に採水した琵琶湖の湖水にフローサイトメトリー法を適用し、ピコ植物プランクトン(0.2~2μm)主体の藻類Dを得た。藻類A~Dの顕微鏡写真を図1に示す。

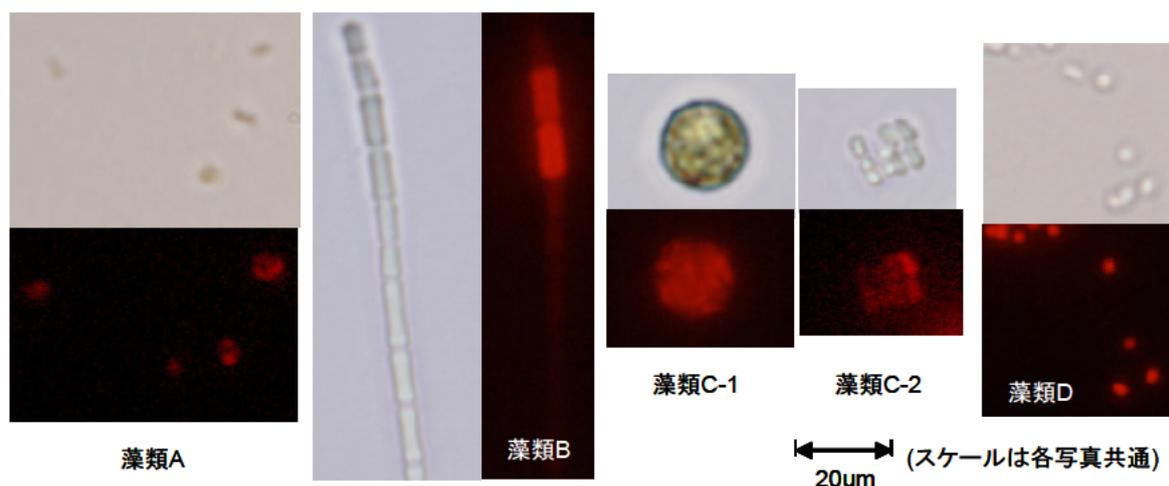


図1 藻類の顕微鏡写真

表1 実験に使用した藻類の一覧

試料名	流域	試料の準備方法	主要構成藻類
藻類A	霞ヶ浦	フローサイトメトリー法により分離	微細なラン藻
藻類B	霞ヶ浦	フローサイトメトリー法により分離	オシロトリア属のラン藻
藻類C	霞ヶ浦	アオコの発生した湖水から培養	緑色べん毛虫など
藻類D	琵琶湖	フローサイトメトリー法により分離	ピコプランクトン(0.2-2um)

本実験での藻類増殖用培地は藻類の増殖と溶存有機物の質・量の関係を調査するため、有機物をほとんど含まない Chu 培地²⁾とした。培地の組成を表 2 に示す。採取した藻類群はそれぞれ Chu 培地で培養し、試験に供するまでほぼ毎週新しい培地への植継を行った。

表2 培地の組成

Chu培地組成 ²⁾		PIV金属混液組成	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.05757g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.196g
K ₂ HPO ₄	0.02g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.036g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025g	ZnCl ₂	0.0105g
Na ₂ CO ₃	0.02g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.001g
FeCl ₃ ·6H ₂ O水溶液	19.6g/Lの液を68 μL	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025g
PIV金属混液	1000 μL	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.0g
water	1L	water	1L

実験は9/23から10/9までの16日間実施した。培養容器として300mLの三角フラスコを用い、200mLの培地を入れ、0.5mLの藻類培養液を加えて培養した。培養温度は24℃とし、16/8時間の明暗周期で白色蛍光灯を側面より照射(照度5600lux)し、80rpmで振とう培養を行った。

培養液の採取は0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16日目に実施した。試料は各培養フラスコからマイクロピペットで約13mLずつ抜き取り、0.45umのシリンジフィルターでろ過し、測定まで凍結保存した。ろ過以降の操作ブランクとしてそれぞれの培養液の採取日に超純水を0.45umのシリンジフィルターでろ過して凍結保存した。培養中の藻類濃度は培養液の650nmの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定することによりほぼ毎日モニタリングした。ろ過試料の分析項目はDOCとEEMである。DOCは全有機炭素計(TOC-V: Shimadzu)を用いNPOCとして測定した。EEMは蛍光分光光度計(F-4500: HITACHI)を用いて測定した。ホトマル電圧は700V、スキャン範囲は励起波長(EX)、蛍光波長(EM)とも200~600nm、スリット幅は5nm、スキャンスピードは2400nm/minとした。得られた蛍光強度は励起波長350nmにおける超純水のラマンピークの面積で割って規格化した。その後規格化した試料の蛍光強度から試料水と同様に規格化したブランク(超純水)の蛍光強度を差し引き、EEMスペクトルを得た。最後に、藻類培養液のEEMスペクトルから操作ブランクのEEMスペクトルを差し引いた。

2.2 藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係把握実験の方法

藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係を調べるため、藻類培養液を用いて56日間の分解実験を実施した。対象藻類は2.1項と同じくChu培地で培養した藻類A, B, C, Dである。藻類培養液は分解実験開始1週間前から500mL容三角フラスコを用いて330mLのChu培地で培養したものを実験に供した。藻類培養液は、ろ過処理無しで3本の300mL容三角フラスコに100mLずつ分注し、後の水質分析で必要となる水量を確保するため超純水を20mL加えて液量を120mLとし、GF/Bでろ過した湖水(霞ヶ浦の藻類A, B, Cには霞ヶ浦湖水、琵琶湖の藻類Dには琵琶湖湖水)を1.2mL添加した。三角フラスコにシリコセンでフタをして電子天秤で重量を測定後、アルミホイルで包んで遮光した。

分解の条件は 20℃、暗所とし、一週間に 3 回約 5 秒間の攪拌を行った。霞ヶ浦の藻類 A, B, C は 9/10 に、琵琶湖の藻類 D は 9/18 に実験を開始し、0, 14, 56 日目に試料を分析した。

分解実験開始後 14, 56 日目は水質分析前に三角フラスコの重量を測定し、0 日目重量との差から蒸発水量を求めた。それぞれの試料は 500mL の超純水で洗った GF/B ろ紙を用いてろ過した後、DOC と EEM を 2.1 項と同様にして測定した。DOC と EEM の測定結果は蒸発による濃縮の補正を行った。

3. 実験結果

3.1 藻類の増殖と溶存有機物量 (DOC) の関係

650nm の吸光度による各藻類の増殖曲線を図 2 に示す。どの藻類も 3 日目から 6 日目に藻体濃度が増加し始めた。藻類 B では藻体が群体を形成し分散しなくなったため 8 日目以降の吸光度が減少する結果となった。藻類 D では 12 日目から 16 日目にかけて吸光度が増加した。藻類 A, B, C については概ね 3 日目から 8 日目までが増殖期、8 日目以降が定常期となっていた。

操作 Blank を差し引いた DOC の初期濃度は A, B, C, D それぞれ 1.5、1.3、1.2、3.3 mgC/L であった。操作 Blank を差し引いた DOC 濃度の変化を図 2 に示す。DOC の増加は藻類の増殖とともに始まり、藻類の増殖が止まってからも DOC は増加し続けた。16 日目の DOC 濃度から 0 日目の DOC 濃度を引いて DOC の増加量を求めると、藻類 A, B, C, D それぞれ 7.3、13.2、10.2、4.9 mgC/L となった。それぞれの経過日間で DOC の増加速度を求めた結果を図 3 に示す。藻類 B, C, D では概ね 10 日目前後に DOC の増加速度が高くなる傾向が見られた。

DOC の増加速度と藻類濃度の関係を見るため、各経過日間ごとで DOC の増加速度を藻類培養液の吸光度の平均値で割って単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度を求めた。概ね理論通りの藻類増殖曲線が得られた藻類 A, C について、単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度を図 4 に示す。単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度は藻類 A では 4-6 日目に、藻類 C では 2-4 日目に最大となった。藻類 C の

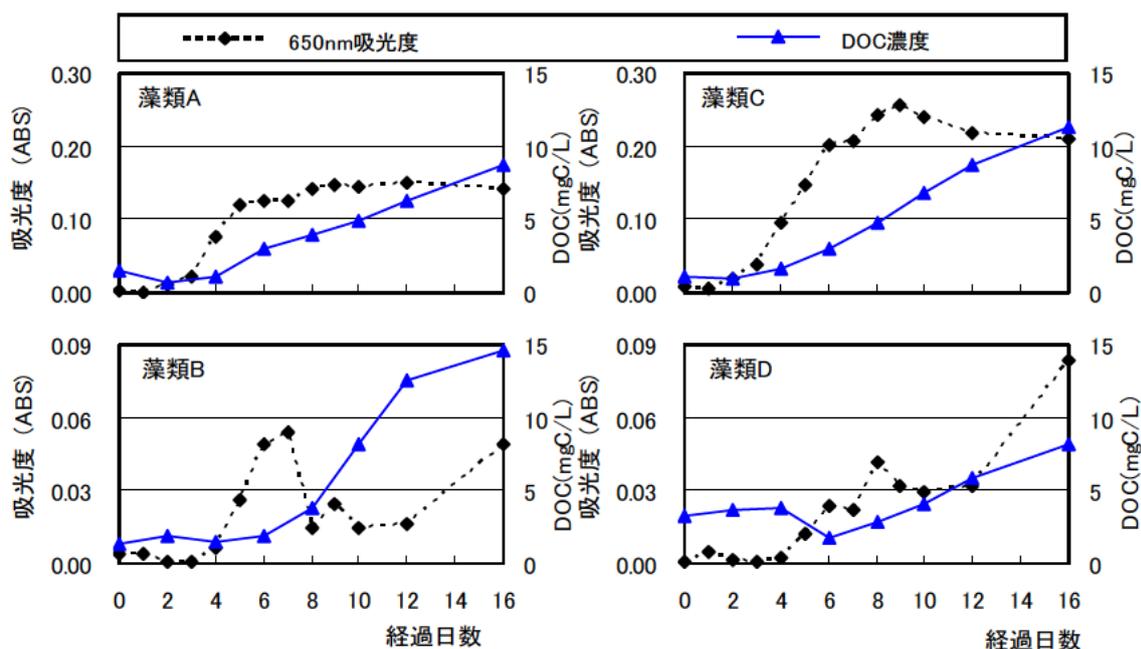


図2 藻類増殖曲線および培養液のDOCの変化

4-6 日目から 10-12 日目までの単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度は概ね一定となっていた。650nm 吸光度による 12-16 日目の単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度は、藻類 A, C それぞれ $4.2, 2.7 \text{ mgC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{ABS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ となった。12-16 日目の藻類 B, D の 650nm 吸光度による単位藻体濃度あたりの DOC 増加速度は、それぞれ $15.3, 10.2 \text{ mgC} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{ABS}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ と藻類 A, C より高い値であった。単位藻体あたりの DOC の増加速度は藻類の種類や増殖過程で大きく異なることがわかった。

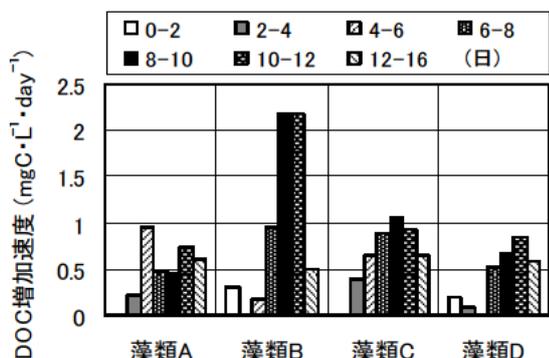


図3 経過日数とDOC増加速度の関係

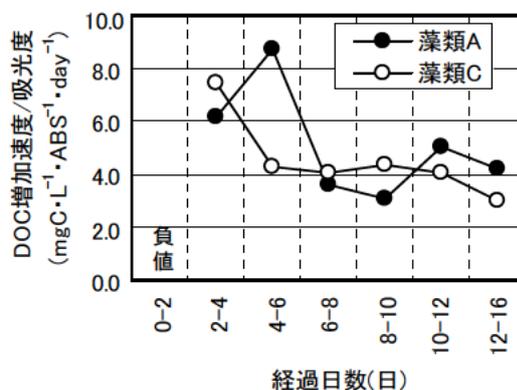


図4 単位藻体濃度あたりのDOC増加速度

3.2 藻類の増殖にともなう溶存有機物の EEM の特性の変化

本実験で観察された EEM スペクトル上の主要なピークの位置を図 5 に、各藻類試料の 0、6、16 日目の EEM スペクトルを図 6 に示す。また、水環境中に観られる代表的なピークの位置と帰属を表 3 に示す³⁾。16 日目の EEM スペクトルに着目すると、藻類 A, B, C では Ex 225nm/Em 315nm 付近 (Peak ①) に最も強いピークが、Ex 280nm/Em 325nm 付近 (Peak ②) に 2 番目に強いピークが観察された。藻類 D で最も強いピークの位置は Ex 220nm/Em 345nm、2 番目は Ex 280nm/Em 345nm であった。Ex 320nm/Em 425nm 付近 (Peak ③) のピークは各藻類に共通して観察され、藻類 B で、この蛍光強度が他より高くなっていた。Ex 225nm/Em 410nm 付近 (Peak ④) のピークは藻類 A, B で観察された。6 日目に着目すると、藻類 B で Ex 255nm/Em 465nm 付近 (Peak ⑤) のピークが強く現れていた。藻類 B では様々な位置に蛍光ピークが現れ、6 日目には Ex 355nm/Em 455nm 付近、16 日目には Ex 290nm/Em 425nm 付近にピークが観察された。

表3 蛍光ピークの位置と帰属³⁾

	ピーク位置 (EX/EM)	帰属
Peak1	230nm/300nm	タンパク質様(チロシン)
Peak2	230nm/340nm	タンパク質様(トリプトファン)
Peak3	230nm/425nm	フルボ酸、フミン酸様
Peak4	280nm/340nm	タンパク質様
Peak5	320nm/425nm	フルボ酸、フミン酸様
Peak6	345nm/435nm	蛍光増白剤様
Peak7	500nm/525nm	下水処理水様

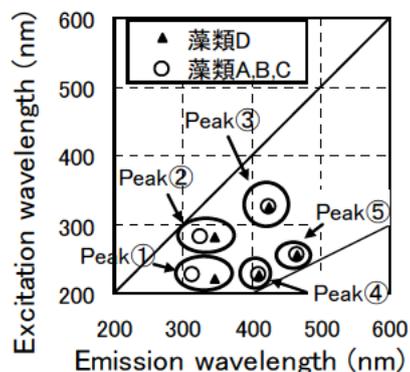


図5 藻類培養液の主要なピークの位置

主要な 5 つのピーク位置における蛍光強度の変化を図 7 に示す。蛍光強度の増加は 4~8 日目から始まり、藻類の種類や EEM スペクトルのピーク位置によって増加パターンに違いが見られた。5 つのピーク位置のうち蛍光強度が最も大きく増加したのは Peak①(藻類 A, B, C : Ex 225nm/Em 315nm、藻類 D : Ex 220nm/Em 345nm)であった。同ピークの蛍光強度は藻類 A, C では 6 日目までに大きく増加しており、藻体濃度の増加パターンと類似していた。藻類 A, B, C ではいずれも Peak②(Ex 280nm/Em 325nm)と Peak③(Ex 320nm/Em 425nm)の蛍光強度が時間とともに増加した。Peak④(Ex225nm/Em410nm)の蛍光強度は藻類 A, B では 8 日目以降お

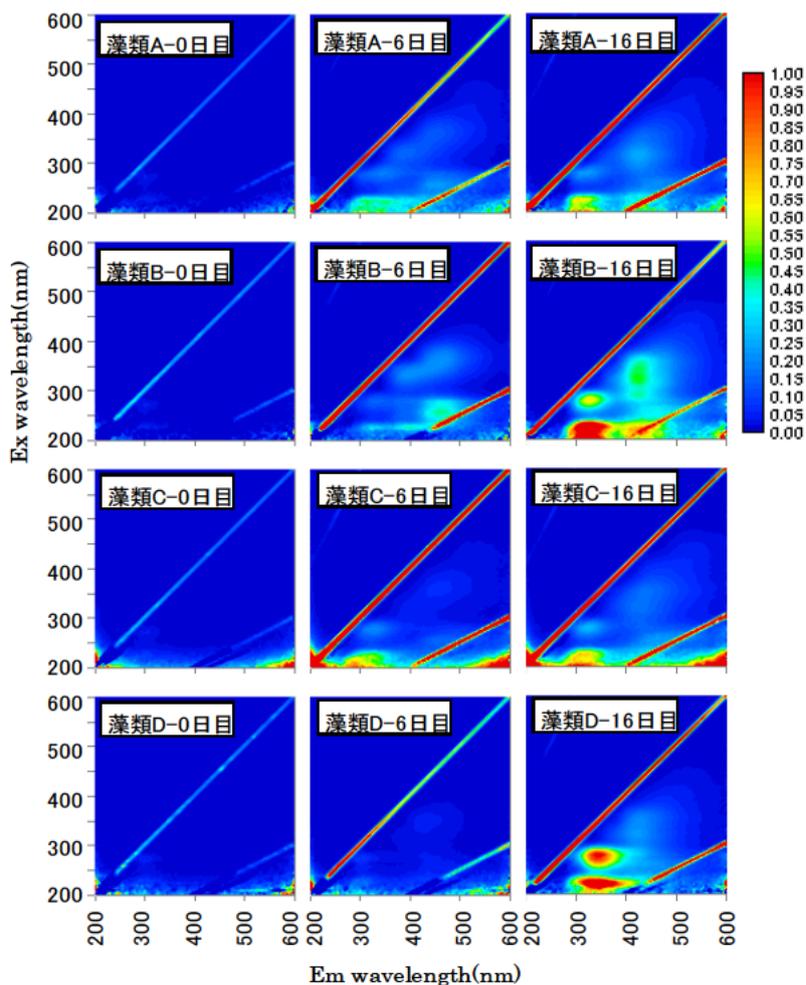


図6 0,6,16日目の藻類培養液の蛍光スペクトル

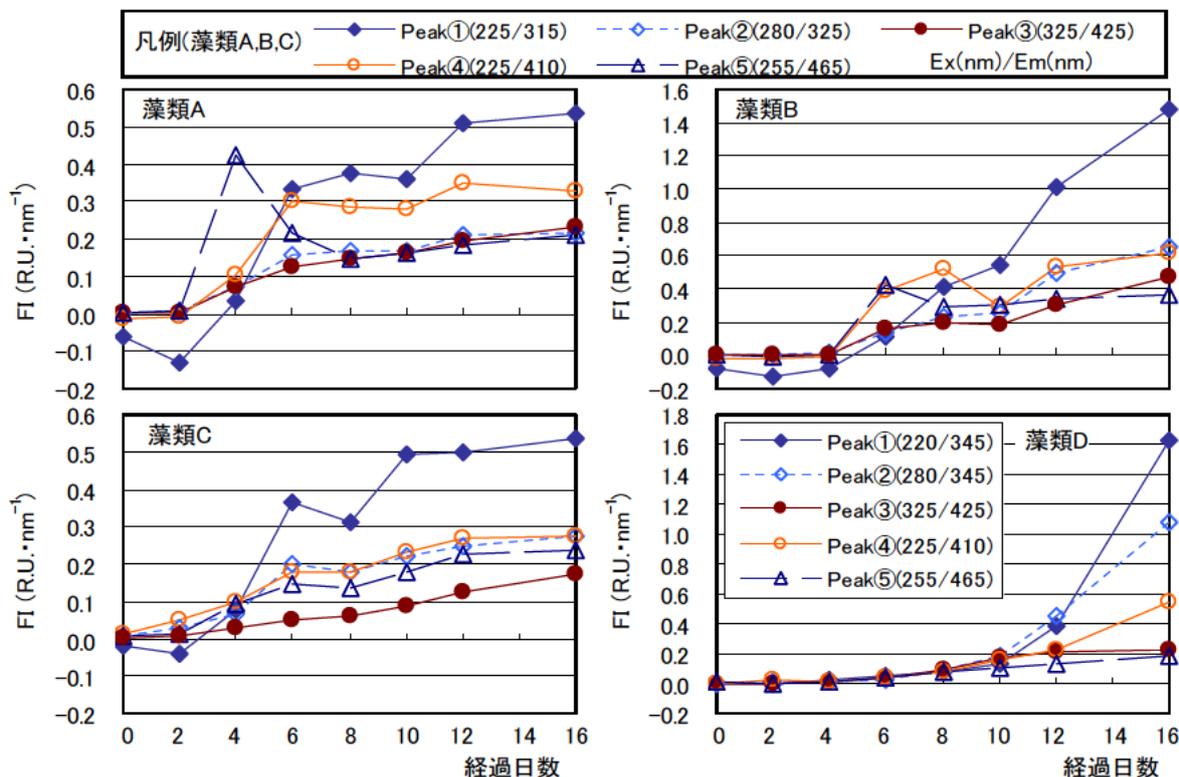


図7 各ピーク位置の蛍光強度の変化

およそ一定となった。Peak⑤(Ex 255nm/Em 465nm)付近の蛍光強度は藻類 A では 4 日目に、藻類 B では 6 日目に最大となった。藻類 D では 10 日目以降に Peak①(Ex 220nm/Em 345nm)、Peak②(Ex 280nm/Em 345nm)、Peak④(Ex 225nm/Em 410nm)の蛍光強度が増加した。

5つのピーク位置の蛍光強度に対し、0日目と8日目(増殖期)の差および8日目と16日目(定常期)の差を求めて増加量を比較した。各期間の蛍光強度の増加量を図8に示す。蛍光強度の増加量は藻類 A ではどのピーク位置でも8-16日目より0-8日目で大きく、藻類 D ではどのピーク位置でも8-16日目で大きかった。藻類 B では Peak①(Ex 225nm/Em 315nm)、Peak②(Ex 280nm/Em 325nm)、Peak③(Ex 320nm/Em 425nm)の蛍光強度の増加量は0-8日目より8-16日目で大きかった。増殖期と定常期の藻類に由来する DOM の質・量は、藻類の種類によって異なることがわかった。

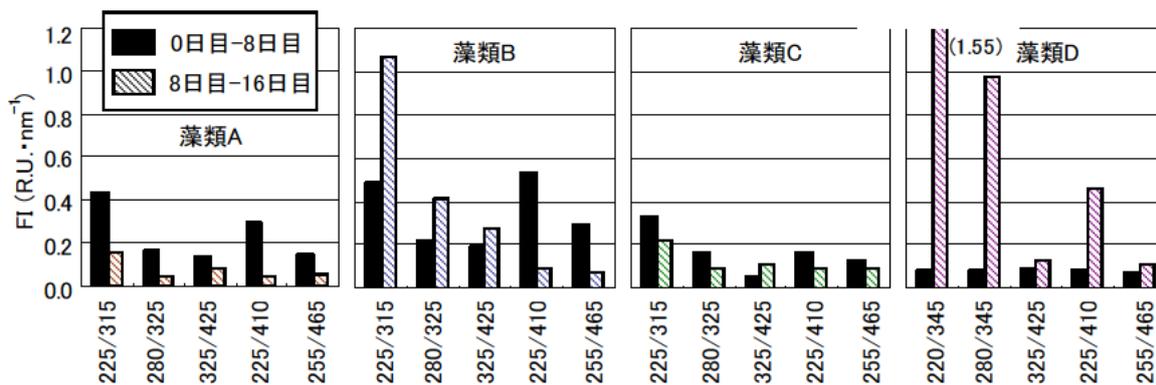
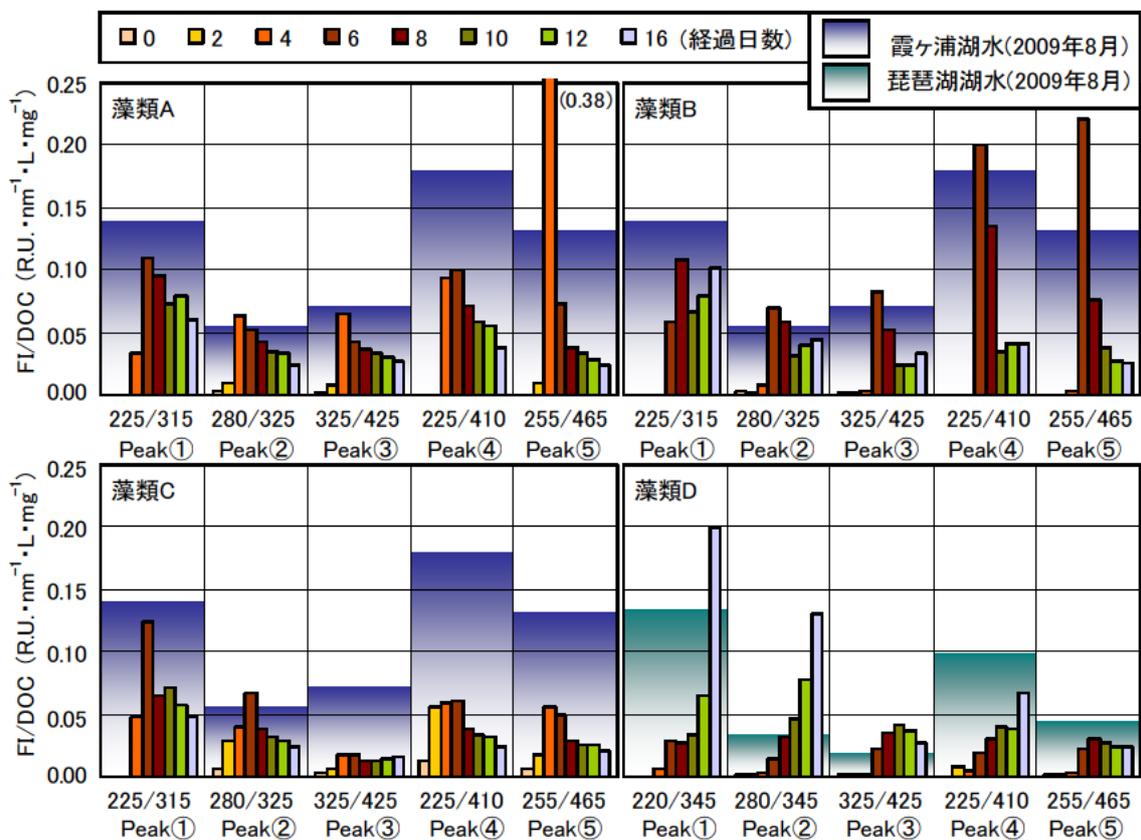


図8 0-8日目と8-16日目における蛍光強度の増加量 Ex(nm) / Em(nm)



※ 負値は表示から除いた。

図9 各藻類の培養期間中の FI/DOC の変化

藻類の増殖期間中における溶存有機物の質の変化を詳細に観るため、経過日ごとにピーク強度とDOCの比(FI/DOC)を求めた。各試料のFI/DOCの変化を図9に示す。また、2009年8月の霞ヶ浦(西浦)湖心と琵琶湖安曇川沖の湖水のFI/DOCを同じく図9に示す。藻類A,B,Cではどのピーク位置でもFI/DOCは4~8日目に最大となった。藻類DではPeak①(Ex 220nm/Em 345nm)、Peak②(Ex 280nm/Em 345nm)、Peak④(Ex 225nm/Em 410nm)のFI/DOCが時間とともに増加し、16日目に最大となった。Peak①(Ex 225nm/Em 315nm)について見ると、霞ヶ浦湖水のFI/DOCは藻類A,Cの6日目や藻類Bの8日目に近い値であった。Peak②(Ex 280nm/Em 325nm)について見ると、霞ヶ浦湖水のFI/DOCは藻類A,B,Cの6日目と同じくらいであった。琵琶湖湖水のPeak①(Ex 220nm/Em 345nm)のFI/DOCは藻類Dの12日目と16日目の中間程度の値であった。

3.3 藻類の分解と溶存有機物の質・量の関係把握実験の結果

藻類の分解実験期間中のDOC濃度の変化を図10に示す。0日目のDOC濃度は藻類A,B,C,Dそれぞれ3.2、4.5、2.6、13.9 mgC/Lであった。0日目から14日目までのDOC濃度の変化を見ると、藻類Bで1.3mgC/L、藻類Dで9.1mgC/L低下していた。藻類Aと藻類Cの56日目のDOC濃度は0日目より高い値となり、藻類Cでは2.9mgC/L増加していた。

各藻類試料の0,14,56日目のEEMスペクトルを図11に示す。また、藻類培養液の代表的な5つのピーク位置について蛍光強度

の変化を図12に示す。0日目から56日目までの各ピーク位置の蛍光強度の変化を見ると、藻類AではPeak①(Ex 225nm/Em 315nm)、Peak②(Ex 280nm/Em 325nm)の蛍光強度が増加した。藻類BではPeak③(Ex 320nm/Em 425nm)以外の4つのピーク位置で蛍光強度が減少傾向を示した。藻類CではPeak①(Ex 225nm/Em 315nm)と

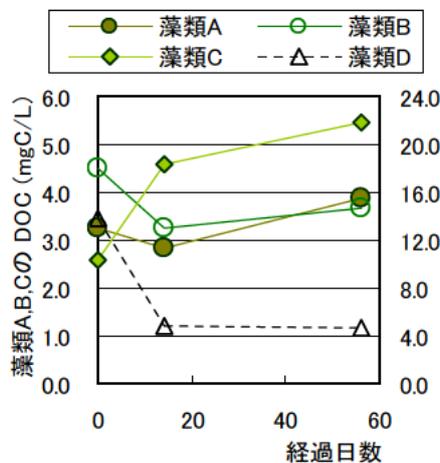


図10 各試料のDOCの変化

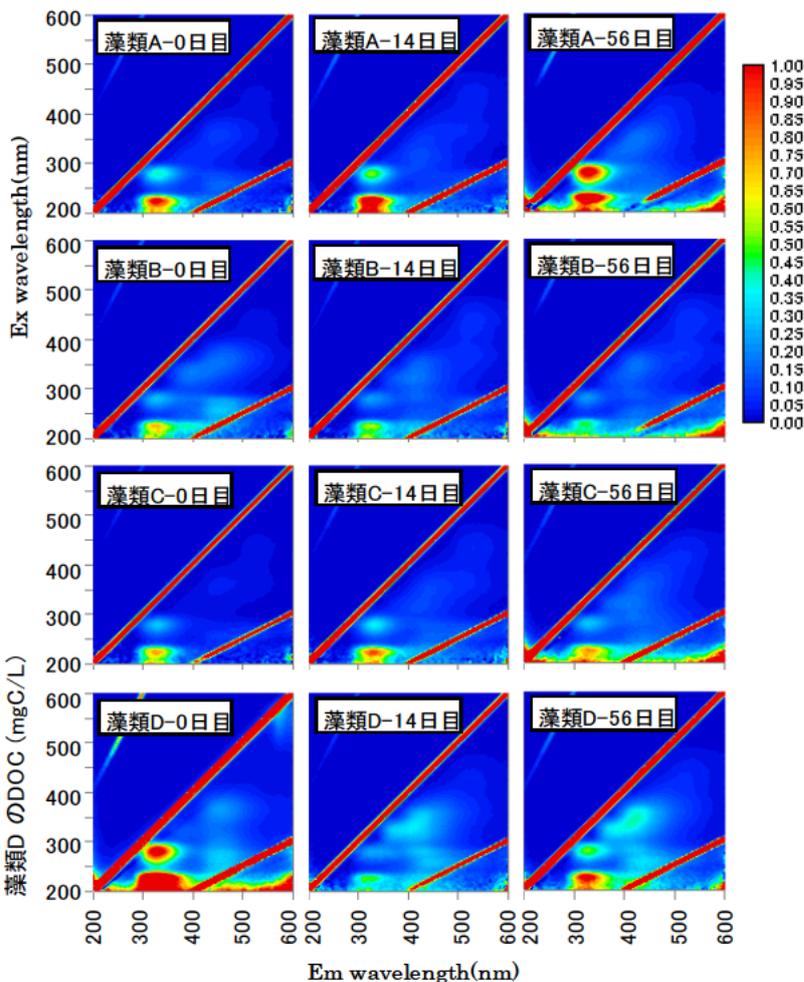


図11 0,14,56日目の藻類培養液の蛍光スペクトル

Peak② (Ex 280nm/Em 325nm) は蛍光強度の変化が小さく、Peak③ (Ex 320nm/Em 425nm) と Peak④ (Ex 225nm/Em 410nm) で蛍光強度が増加した。藻類 D では Peak① (Ex 220nm/Em 345nm) と Peak② (Ex 280nm/Em 345nm) の蛍光強度が減少していた。

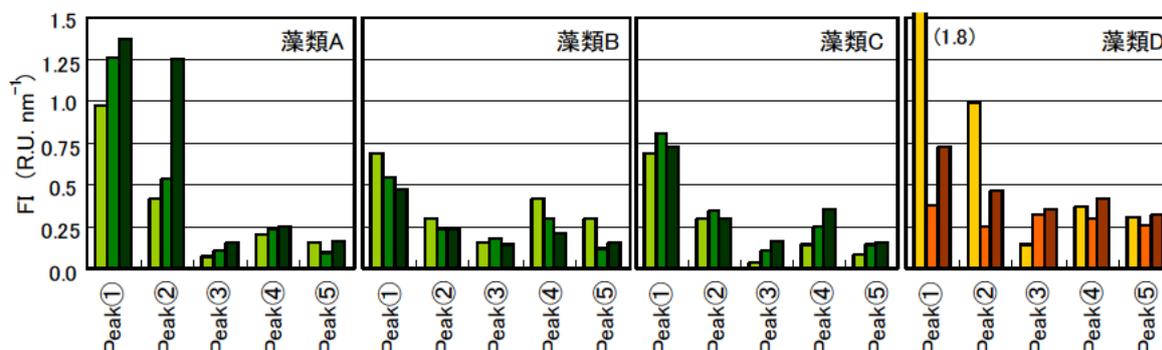


図12 各藻類の分解実験期間中の蛍光強度の変化 (左から0日目,14日目,56日目)

DOC 濃度の異なる各藻類分解試料の組成を比較するため、各ピーク強度と DOC の比 (FI/DOC) を求めた。0 日目と 56 日目の 5 つのピーク位置の FI/DOC の変化を図 13 に示す。さらに図 13 には、湖水と藻類培養液の比較のため、霞ヶ浦と琵琶湖の 2009 年 9 月および 11 月の同ピーク位置の FI/DOC を合わせて示した。4 種類の藻類培養液と琵琶湖湖水では Peak① (Ex 225nm/Em 315nm および Ex 220nm/Em 345nm) の FI/DOC 比が最大となった。霞ヶ浦湖水の FI/DOC は Peak④ (Ex 225nm/Em 410nm) が最大となっていた。

藻類 A では Peak① (Ex 225nm/Em 315nm) の FI/DOC は 56 日間で増加し、藻類 B, C では同ピークの FI/DOC は減少していた。また、藻類 A では Peak② (Ex 280nm/Em 325nm) の FI/DOC が 56 日目に $0.32 \text{ R.U.} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ に顕著に増大し、藻類 B, C とは異なる蛍光特性を示した。56 日目の藻類 B と C の 5 つのピーク位置の FI/DOC は比較的類似していた。

11 月の霞ヶ浦湖水と 56 日目の藻類 A, B, C を比較すると、霞ヶ浦湖水の Peak① (Ex 225nm/Em 315nm) と Peak② (Ex 280nm/Em 325nm) の FI/DOC は藻類 B, C と近い値であった。霞ヶ浦湖水の Peak③ (Ex 320nm/Em 425nm)、Peak④ (Ex 225nm/Em 410nm)、Peak⑤ (Ex 255nm/Em 465nm) の FI/DOC は

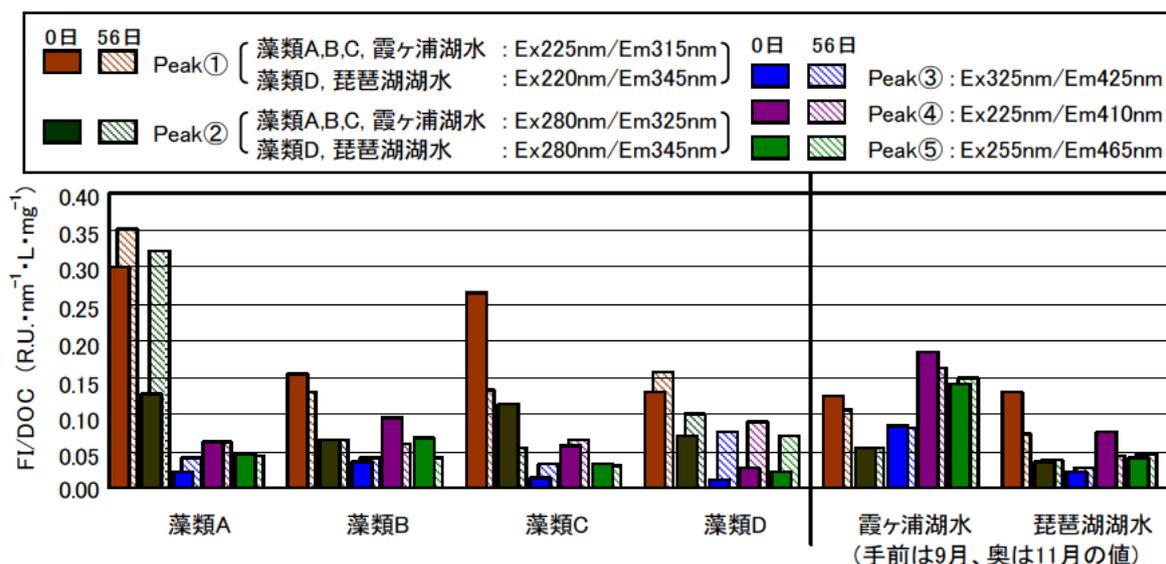


図13 各藻類の0日目と56日目と湖水のFI/DOCの比較

藻類 A, B, C よりも高い値であった。11月の琵琶湖湖水の5つのピーク位置のFI/DOCは、藻類Dの56日目のFI/DOCより低くなっていた。

4. まとめ

本年度は湖水中の数種類の藻類の培養実験と藻類培養液の分解実験により藻類の増殖と分解に伴う溶存有機物の質・量の変化を調査し、以下の知見を得た。

- (1) 藻類培養液のDOC濃度は藻類の増殖が止まった後も増大を続け、DOCの増加速度は培養開始後10日目頃に最大となった。
- (2) 藻類培養液のEEMスペクトル上に5つの主要なピークが観察され、蛍光強度はPeak①(Ex 225nm/Em 315nm)付近が最も強く、Peak②(Ex 280nm/Em 325nm)付近が2番目に強かった。蛍光強度の増加パターンは藻類の種類や蛍光ピーク位置によって異なった。
- (3) 56日間の藻類の分解実験から、DOCおよび各ピークの蛍光強度は藻類の種類によって挙動が異なり、増加するものや減少するものがあることがわかった。

参考文献

- 1) 鈴木穰、北村友一(2009) 水環境におけるプランクトン群集の迅速検出手法に関する基礎的研究、平成20年度下水道関係調査研究年次報告書集、174-179.
- 2) 大村達夫、海田輝之、相沢治郎、小松佳幸、石崎正志、大沼正郎(1991) バッチ培養における*Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の細胞外代謝不揮発性有機酸の培養液中への蓄積、水質汚濁研究、14(9)、615-623.
- 3) 福島武彦、中島俊之、今井章雄、松重一夫、尾崎則篤(2001) EEMsによる水中溶存有機物の特性解析、水環境学会誌、24(10)、686-692.

謝辞

琵琶湖および霞ヶ浦湖水の採水は、琵琶湖河川事務所および霞ヶ浦河川事務所の協力を得て実施された。ここに記して、深く感謝の意を表します。

微量金属を対象としたダム湖富栄養化対策技術の開発

水環境研究グループ 水質チーム

上席研究員

南山 瑞彦

研究員

久岡 夏樹

材料地盤研究グループ

グループ長

鈴木 穰

1. はじめに

日本の多くのダム貯水池では、春季から秋季にかけて水温躍層が形成され、底層が貧酸素状態となる。このような状態においては底泥から栄養塩類や金属類などの溶出が増加し、貯水池の水質の悪化を招く。土木研究所では、水温躍層を破壊することなく効果的に底層の溶存酸素(DO)濃度を回復させることを目的として、高濃度酸素水供給装置(図-1)について検討を行った。また、高濃度酸素水供給による底層の微量金属類濃度の低減についても検討を行った。

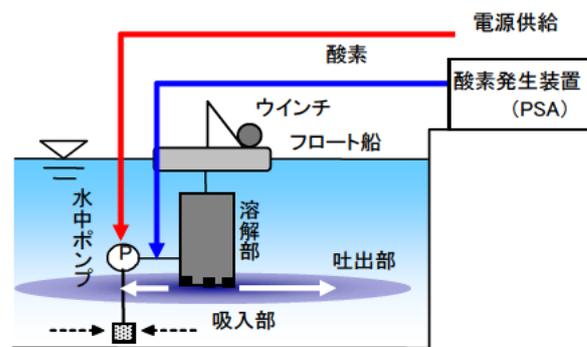


図-1 高濃度酸素水供給装置

2. 実験方法

2.1 高濃度酸素水供給装置

本研究に用いた高濃度酸素水供給装置を図-1に示す。装置は大きく分けて酸素発生装置と気液溶解装置の2つの装置によって構成される。

(1) 水圧を利用した酸素溶解

酸素溶解部である気液溶解装置は、装置の内部と外部を遮断せず、装置内外で水圧が一致するような構造とした。これにより、装置を設置した水深の水圧を利用して酸素を溶解させることができるため、吐出後の発泡を伴わない効率的な高濃度酸素水の供給が可能である。また、酸素は酸素発生装置(PSA)により、空気中の酸素濃度(21%)を高めた(90%以上)ものを使用した。これにより、高濃度酸素水のDO濃度は50~70mg/lとすることができる。

(2) 上昇流の抑制

酸素を溶解させた状態で水平方向に吐出させることにより上昇流を抑制し、水温躍層を破壊することなく高濃度酸素水を供給するような構造とした。吐出後に気泡が生じないため、それによる上昇流や底泥の巻上げが抑制される。

(3) 気液溶解装置の上下移動

気液溶解装置に接続されたワイヤーをウインチで操作することで、吐出部の位置を上下させることができるような構造とした。これにより、任意の水深に高濃

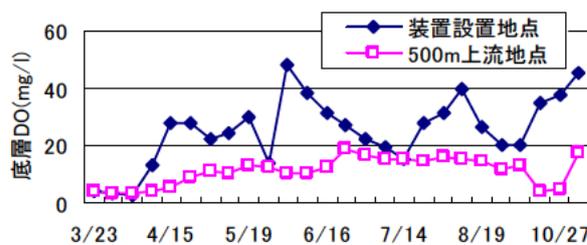


図-2 地点別底層溶存酸素濃度

度酸素水を供給することが可能である。ダムの堤体付近に高濃度酸素水供給装置を設置し、定期的に装置設置地点付近、およびダム堤体から上流へ向かって100mおきに10地点観測地点を設け、DO濃度等の水質測定、および採水を行い、実験室へ持ち帰ってから栄養塩類、微量金属類等の濃度測定を行った。

3. 結果と考察

装置設置地点のダム湖底層のDO濃度は、実験開始直後から上昇し、実験期間中常に過飽和な状態を維持していた。装置設置地点から500m上流の地点においても貧酸素状態が改善されており、広範囲にわたって高濃度酸素水供給による効果があることが確認された(図-2)。実験開始前から形成し始めていた水温躍層は装置稼働にかかわらず維持されており、水温躍層を破壊することなく高濃度酸素水の供給が行われていたことが確認された(図-3)。

溶存態鉄(D-Fe)と溶存態マンガン(D-Mn)の濃度経時変化を図-4、5に示す。装置稼働後しばらくは底層のD-Fe、D-Mn濃度が低く保たれていたが、6月に大きく

上昇した。これは、4月下旬から5月上旬にかけて大量発生した藻類の死骸が沈殿し、その死骸から溶出したことや、死骸分解の際に底泥内の酸素が消費され、その際に底泥に含まれていた微量金属類が還元され溶出したことが推察される。その他の影響としては、降雨による攪乱の影響が考えられるが、はっきりとした原因は特定できなかった。濃度上昇後D-Feはすぐに低減したが、D-Mnはしばらく高い値を保っており、9月、11月にも濃度の上昇が確認された。これは、マンガンが中性付近のpHでは化学的に酸化されにくいことによると考えられる。

4. 結論

高濃度酸素水供給装置を用いてダム湖底層に高濃度酸素水を供給した結果、水温躍層を維持したままダム湖底層の貧酸素状態が広範囲にわたり改善された。また、底層のD-Fe、D-Mn濃度の低下が確認された。しかし、底層で高い酸素濃度を保っていたにも関わらず微量金属濃度の上昇が見られたことから、貧酸素状態の改善だけでは底層の微量金属濃度を低く保つことは難しいことがわかった。今後は、微量金属類濃度を上昇させる原因の解明や、D-Mn濃度をより急速に低下させる技術手法を確立するため、今後更なる検討の必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

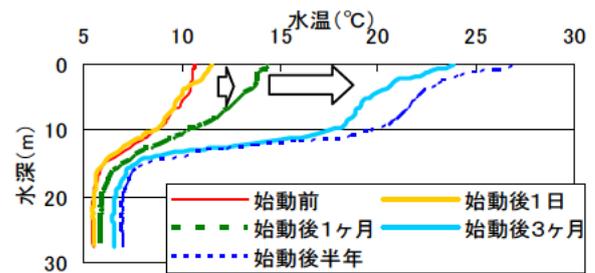


図-3 装置設置地点の水温鉛直分布

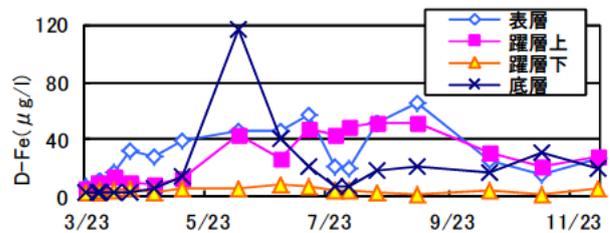


図-4 D-Fe 濃度の経時変化

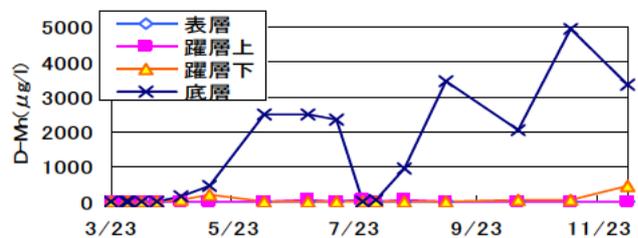


図-5 D-Mn 濃度の経時変化

閉鎖性水域の貧酸素化に及ぼす陸域負荷の影響と対策手法に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 21～平 24

担当チーム：水質チーム

研究担当者：上席研究員 南山 瑞彦

研究員 久岡 夏樹

専門研究員 中菌 孝裕

【要旨】

近年、霞ヶ浦の西浦においてはアオコ大発生による水質障害の事例が減少するという現象がみられ、その理由については、N/P 比のバランスの変化や、藻類が利用可能な鉄やマンガンの低下によるのではないかという説もあるが、未解明である。底層における溶存酸素濃度が近年回復しつつあるとの調査データもみられることから、本研究では、底質の酸素条件が藻類（アオコ）増殖に与える影響について検討することを目的とした。底質性状の分析、底泥の酸素消費・溶出速度実験等を行い、水質改善事業の進む西浦と対照的な北浦を対比し、水質と底質の違いを明らかにするとともに、夏季の高水温期における栄養塩類と金属類の溶出が藻類増殖に及ぼす影響について最新の知見を得た。

キーワード：底泥間隙水、栄養塩類と金属類の溶出、底泥酸素消費速度、藻類増殖潜在能力

1. はじめに

霞ヶ浦においては、水質改善事業の結果、底質の酸素条件が改善されてきていると言われている。しかしながら、この改善が藻類増殖に与える影響については、まだ明らかでなく、底泥浚渫等の事業効果として評価できるに至っていない。本研究においては、底層の酸素濃度、N・P 濃度、微量必須元素濃度の分布を調査するとともに、湖沼水の藻類（藍藻、緑藻）増殖能力を測定し、水質と藻類増殖特性との関係を検討した。また、異なる酸素条件下において、底泥からの栄養塩類の溶出速度を測定し、底質の性状と酸素条件が各物質の動態に与える影響を検討すると共に、水質保全対策の違いによる底質の性状・酸素条件を把握し、浚渫等の水質改善事業が藻類増殖に与える影響の評価を行った。

2. 研究方法

2.1 底泥および湖水の採取

1) 調査地点

調査は霞ヶ浦の西浦（湖心、浚渫区）と北浦（釜谷沖）を対象として行った（図-1）。西浦（浚渫区）では H18 年度に浚渫を行っており、一方、西浦（湖心）や北浦（釜谷沖）は未浚渫の状態であり、更に北浦は下水道の普及率が低く、流域の負荷が高い状況である。

2) 調査・試料の採取時期

霞ヶ浦の 3 地点について、現地観測と底泥・湖水の試料採取を行い、各種試験および分析を実施した。また、水質・底質が藻類の増殖に与える影響を把握するために、西浦（土浦出張所入り江）にて採取した天然アオコ（優占種藍藻：*Microcystis* sp.）株を試験に供した。

- ・西浦 湖心：平成 18～20 年 夏季
- ・西浦 浚渫区：平成 18～20 年 夏季
- ・北浦 釜谷沖：平成 18～20 年 夏季
- ・西浦（土浦出張所入り江）：平成 20 年 8 月 1 日に天然アオコ（優占種 藍藻：*Microcystis* sp.）を採取



図-1 調査地点

また、西浦の流入河川（桜川）と土浦港から湖心に向けての4地点（①～④）において金属類（Fe, Mn）の分布確認を行った（図-1）。

2.2 水質・底質の栄養塩類と金属類の分析方法

表層、中層、下層に切り分けた底泥は、遠心分離により間隙水を採取するとともに、強熱減量、窒素およびリン含有量、粒度分布を測定した。

分析用に採水した直上水および間隙水の試料は、GF/Bろ紙（保留粒子径：1.0 μ m）によるろ過を行った後、栄養塩自動分析装置（TRAACS2000型：ブラン・ルーベ社製）にてアンモニア性窒素（NH₄-N）、亜硝酸性窒素（NO₂-N）、硝酸性窒素（NO₃-N）、溶存態窒素（D-N）、オルトリン酸態リン（PO₄-P）、溶存態リン（D-P）の濃度を測定し、溶存態有機炭素（DOC）の分析には全有機体炭素計（TOC5000型：島津製作所社製）を用いた。

また、栄養塩類と共に藻類増殖の必須微量元素である鉄（Fe）とマンガン（Mn）¹⁾についても、測定を行った。金属類の分析は、ICP-MS（X7CCT：Thermo Fisher SCIENTIFIC社製）によりMnを、ICP-AES（Optima3000：Perkin Elmer社製）によりFeの分析を行った。

2.3 底泥の酸素消費速度試験

霞ヶ浦における底泥浚渫や下水道整備等により、湖内の底質等に変化が生じており、現在の藻類増殖にも起因していることが考えられる。底質にもたらず改善効果を検討するため、各水域における底泥を用いた攪拌系による酸素消費速度試験を行った。

各地点および鉛直層毎の底質の特性を評価することを目的に、採取した底泥の深さ方向の詳細な酸化還元状態をORP計により測定するとともに、底泥を酸化層（0～0.2cm）、還元層（0.2～1cm, 1～2cm, 2～3cm, 3～4cm および 4～5cm）の5層に切り分け、攪拌系による酸素消費速度試験に供した。

試験においては、まず、500mLの三角フラスコに底泥試料を各10g投入し、ろ過後Air曝気にて溶存酸素濃度を8mg/L以上の飽和状態にした各地点の底泥直上水を加えて満水（600mL）にした。その



写真-1 底泥酸素消費速度試験

後、連続攪拌（400rpm）を行いながら、カラム内のDO濃度の連続測定を行い、酸素消費速度を算出した。（写真-1）

2.4 底泥溶出試験

現地にて簡易柱状採泥器により採取した試料を、底泥厚が15cmとなるように底泥量を調整した。試験水は別途採取した直上水をGF/B（1.0 μ m）にてろ過後（Mn：200 μ L添加）、底泥表面を乱さないよう底泥上30cmまでサイホンにて注入し、20 $^{\circ}$ Cの恒温室（暗条件）にてAir曝気による好気条件（DO：8mg/L以上）とN₂曝気による低酸素条件（DO：1mg/L以下）で溶出試験を行った。分析用に採取した試料はオートアナライザー（ブラン・ルーベ社製）にてNH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、T-N、PO₄-P及びT-Pの分析を行った。

2.5 藻類増殖潜在能力試験

1) 試験方法および条件

藻類増殖を助長する要因並びに阻害要因について検討するために藻類増殖潜在能力試験を実施し、各水域の底質性状（栄養塩類、金属類等）が藻類増殖に及ぼす影響の評価を行った。試験に用いた藻類は、2008年8月1日に西浦（土浦出張所入り江、図-1、写真-2）にて採取した天然アオコ（優占種 藍藻：*Microcystis* sp.）株とした。優占種である藍藻（*Microcystis* sp.）を顕微鏡観察にて単離、その後、単離培養を繰り返して増殖した株を試験に用いた。

試験においては、底泥溶出実験終了後20日目の各直上水を別途採取し（その水質を表-1に示す）、0.22 μ mのメンブレンフィルターにてろ過後、ろ液各50mLを三角フラスコ（100mL）中に入れ、西浦から単離・培養した*Microcystis* sp.株をクロロフィルa濃度として20 μ g/Lを添加、藻類培養実験を開始した。藻類の培養試験条件を下記に示す。

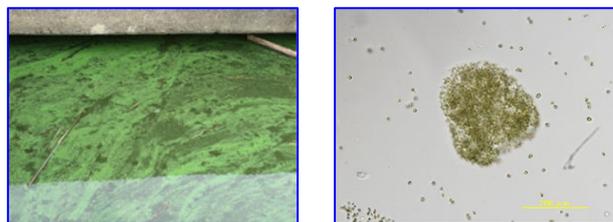


写真-2 アオコ発生状況（左）と優占藍藻：*Microcystis* sp.（右）（ $\times 200$ ）

表-1 藻類増殖試験（培養液水質）

試験水（溶出実験終了時）	NH ₄ -N	PO ₄ -P	NO ₃ -N	NO ₂ -N	D-P	D-N	DOC
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
湖心	0.39	0.13	2.93	0.12	0.18	4.19	8.38
浚渫区	0.40	0.09	4.01	0.16	0.13	4.13	9.50
釜谷沖	1.17	0.53	2.38	0.06	0.54	4.62	17.59
湖心	1.54	1.19	0.59	1.04	1.25	3.85	9.88
浚渫区	3.02	1.34	0.02	0.22	1.38	3.84	10.63
釜谷沖	0.72	1.54	0.67	3.27	1.54	5.31	11.72

藻類培養試験条件

照度：明暗条件：各 12 時間

温度：26°C（アオコ発生時の現地水温）

照度：5000 Lux

培養期間：30 日間

静置：試験期間中は 1～2 日に一回，手振り又はミキサーにて各三角フラスコを混合した。

2) 分析方法

試料は試験期間中の 0, 3, 7, 15, 22 および 31 日目に各 4mL を採取し，直ちに 1.0 μ m のフィルターにてろ過を行い，そのろ紙をメタノールにて抽出，分析試料とした。

クロロフィル a は，HPLC-蛍光検出器を用いて定量分析を行った²⁾。測定条件を以下に示す。

使用機器：GL サイエンス社 GL-7400，設定条件：

- ① カラム：Inertsil ODS-3 3 \times 250mm (GL-サイエンス)
- ② 移動相：メタノール：エタノール=8：2
- ③ 流量：1mL/min
- ④ 蛍光波長：励起波長 430nm，測定波長 670nm
- ⑤ カラム温度：40°C
- ⑥ 注入量：50 μ L
- ⑦ 分析時間：15 分

クロロフィル a 標準品：Chlorophyll a，シグマアルドリッチ社 (No.6144-1MG)

また別途，緑藻：*Pseudokirchneriella subcapitata* を用いた藻類の増殖試験を行い，マイクロプレートリーダーによる吸光度を測定する方法³⁾により，最大増殖細胞数についても評価を行った。

藻類培養条件

照度：明暗条件：各 12 時間

温度：24°C

照度：4000 Lux

培養期間：21 日間

3. 研究結果

3.1 水質の季節変動

2008 年の 4 月から 2009 年の 3 月までの期間，月に 1 回，西浦（湖心）と北浦（釜谷沖）において，上層水（水面より 50cm 付近）と下層水（底泥表面より 50cm の直上）の採取を行った後，水の分析は公定法に準拠し行った。試料採取時に現地観測を行った DO の季節変動と鉛直分布（4 月から 11 月）を図-2 に示す。DO 濃度は，春季に濃度が高くなる傾向が西浦と北浦で確認された。水温が上昇する夏

季には，北浦にて DO 濃度が上層水で高く，下層水で低くなる傾向が確認された。春季・夏季における表層付近の DO 上昇は藻類増殖とそれに伴う光合成によるものと考えられる。なお，今回の調査時には下層の DO 濃度は 5mg/L であったが，霞ヶ浦においては下層水の貧酸素化が報告されており⁴⁾，風浪等の気象条件により湖内の水温成層状況が異なると，貧酸素水塊の形成と消長が発生していると考えられる。

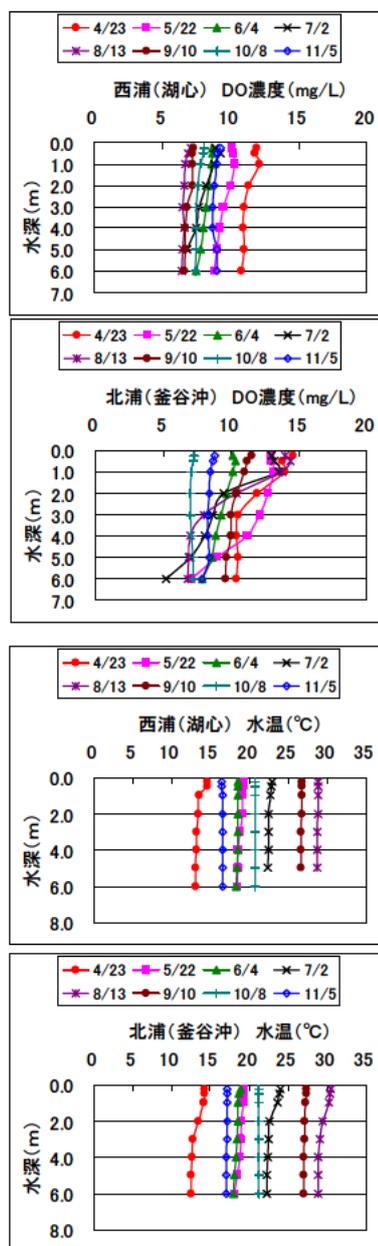


図-2 現地調査時における DO と水温の季節変動と鉛直分布（西浦と北浦）

T-P, T-N, TOC, DOC の季節変動を図-3, クロロフィル a, D-COD, SS の季節変動を図-4に示す。

T-P 濃度は西浦に比べ北浦が高い傾向を示した。T-N 濃度は西浦と北浦で近い傾向を示したが、北浦の8月が高い値を示した。また、北浦は上層よりも下層水の濃度が高い傾向が認められ、底泥からの溶出の影響と考えられる。

クロロフィル a 濃度は、春季から夏季までの間、西浦に比べ北浦が高い傾向を示した。春季のクロロフィル a 濃度が高い原因は、珪藻によると考えられ、7~9月に高い傾向を示しているのは、夏季の優先種である藍藻類によると考えられる。クロロフィル a の他項目との相関に関しては、SS が北浦の上層において、TOC が西浦・北浦の上下層において相関が強く、D-COD についても相関性が見られた。

なお、西浦と北浦の夏季(7~9月)における T-N/T-P 比の平均は、西浦の上層:14, 下層:13, 北浦の上層:7, 下層:6であり、北浦の T-N/T-P 比が西浦の 1/2 と低い傾向を示した。

水中の金属類 (Totalと溶存態-Fe, Mn) の季節変化を図-5に示す。Total の Fe と Mn は共に、下層の濃度が上層に比べ高く、更に西浦 (湖心) より北

浦 (釜谷沖) の濃度が高い傾向を示した。溶存態の Mn については、北浦において上層より下層が高い傾向を示しており、Total-Mn や Fe が下層で高い理由として底泥からの Mn 溶出の影響と推察される。なお、定期調査の試料の採水は、霞ヶ浦河川事務所の調査時に同時に行った。

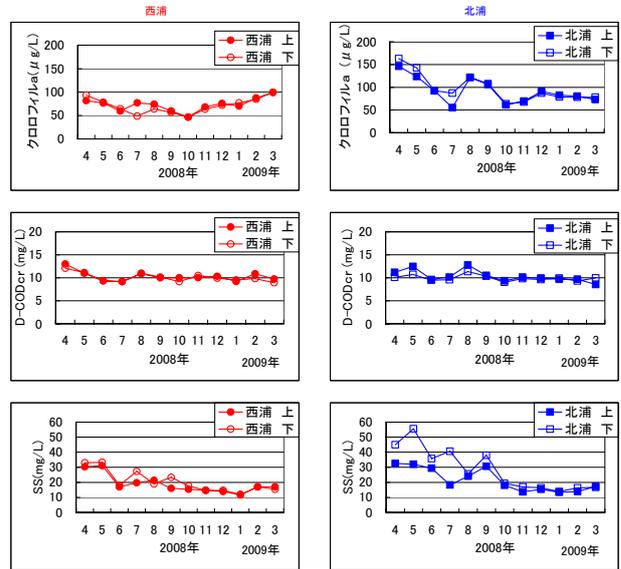


図-4 クロロフィル a、COD、SS の季節変動 (西浦と北浦)

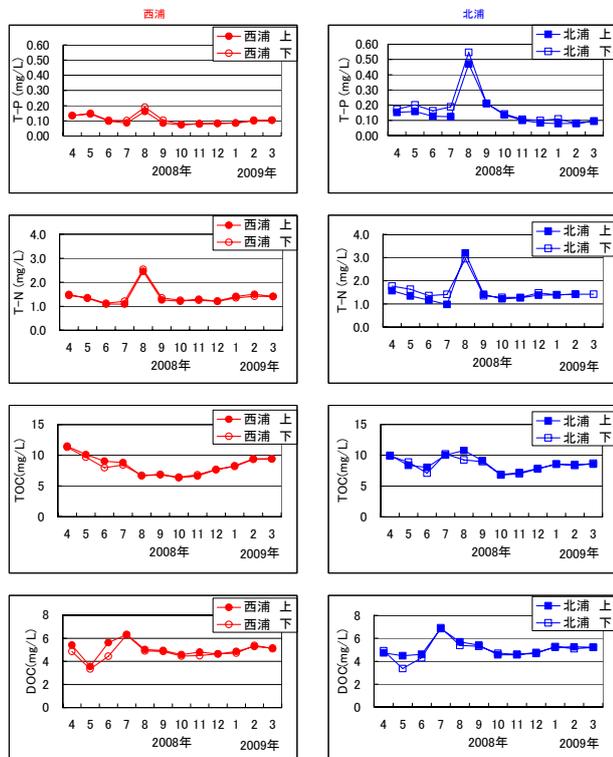


図-3 T-P、T-N、TOC、DOC の季節変動 (西浦と北浦)

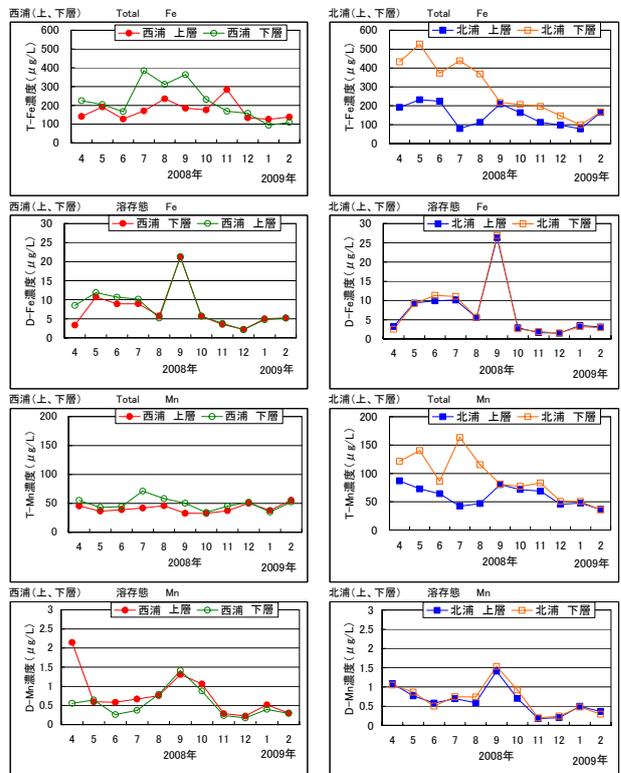


図-5 Total、溶存態の Fe・Mn の季節変動 (西浦と北浦)

流入河川（桜川）および湖水中の Fe、Mn 濃度の分布確認を行った結果を図-6に示す。水中の溶存態 Fe、Mn は流入河川から湖内に向かうにつれ低下し、特に Mn において湖水中での濃度が極端に小さくなった。マンガンの空気酸化は、pH が 10 以上でないと起きないことから、溶存態マンガンの低下は湖内に存在するマンガン酸化細菌の影響によると考えられる。

3.2 底質の性状

調査期間中の底泥および間隙水に含まれる富栄養物質（窒素・リン等）と微量必須元素（鉄・マンガン等）の調査を行った。底泥中の ORP（酸化還元電位）の変化を図-7に示す。ORP は、北浦が西浦に比べ 3mm ほどの浅い深さから緩やかに還元状態となる傾向を示した。夏季における底泥中の全リン、全窒素および全炭素の含有量を図-8に、底泥鉛直方向の間隙水中の D-N、D-P、DOC および Fe・Mn の濃度を図-9に示す。

夏季の霞ヶ浦底泥中の全リン、全窒素、全炭素含有量の鉛直分布を地点毎に比較すると、北浦（釜谷沖）＞西浦（湖心）＞浚渫区（牛込沖付近）となっており、北浦が西浦の2地点よりも高い値を示した。底泥間隙水中の D-P 濃度は、北浦（釜谷沖）の 2～5cm までの濃度が西浦（湖心、浚渫区）よりも顕著に高かった。DOC 濃度は、西浦と北浦ともに差は確認されなかった。Fe 濃度は、西浦（浚渫区）が最も高く、北浦は西浦に比べ低かったが、最大濃度は 100 μg/L 程度であり、湖水と比べて顕著に高くはなかった。Mn 濃度は、北浦が西浦に比べ高く、底泥表層下数 cm がより高かった。さらにその濃度は、2,000 μg/L に達し、湖水に比べて非常に高い値であった。なお、西浦の最表層におい

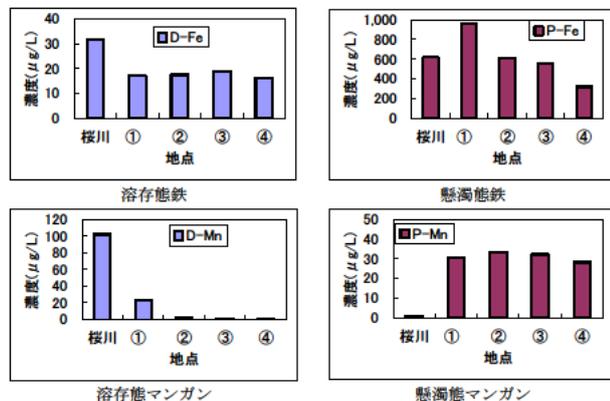


図-6 流入河川および湖水中の金属類 (Fe, Mn) 濃度

て低い値を示しているのは、北浦よりも還元状態が弱く、Mn の還元反応が生じにくくなっているためと考えられる。この測定により、北浦において栄養塩類・有機物含有量が高く、還元性が強いために PO₄-P や Mn おん間隙水中の濃度が高くなっていると底質性状を把握することができた。このため、水温の上昇や DO の低下、風浪等による巻き上げにより⁵⁾、栄養塩類等の溶出は北浦において高い可能性が示唆された。

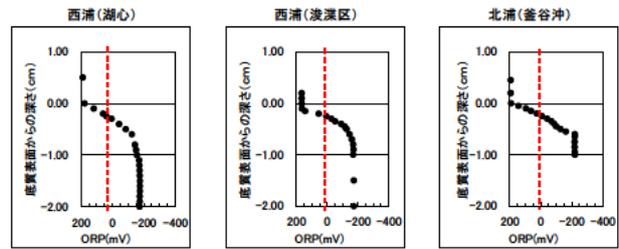


図-7 底泥中の ORP 鉛直分布 (夏季)

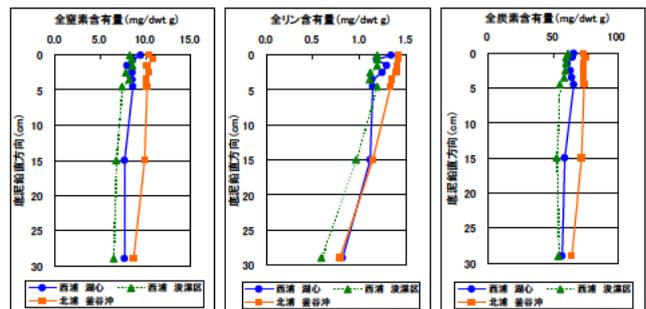


図-8 底泥中の全リン、全窒素、全炭素含有量 (夏季)

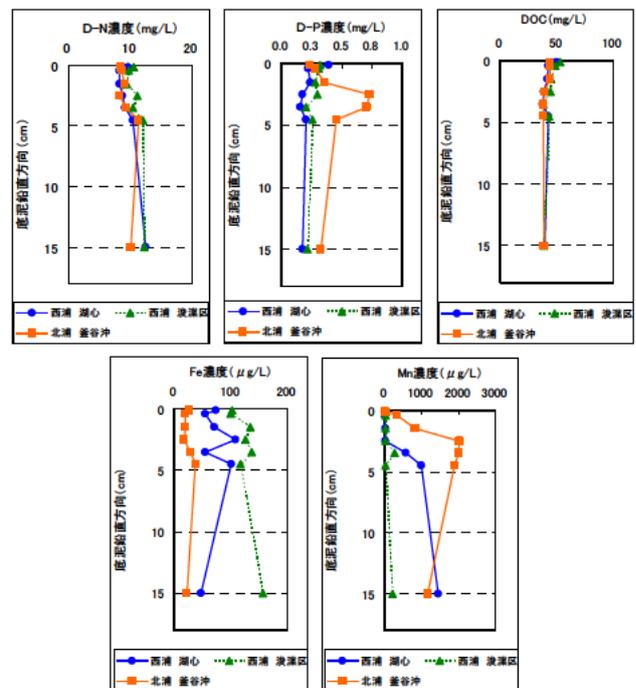


図-9 底泥間隙水における D-N、D-P、DOC と Fe・Mn の濃度

3.3 底泥の酸素消費速度

各地点の層別底泥における攪拌系での酸素消費濃度の変化 (30℃ : 暗室) を図-10 に示す。実験は2時間まで行い、0.5時間目までの平均的酸素消費速度について評価を行った。(図-11)。

表層酸化層における0.5時間後の酸素消費速度を水域別に見ると北浦(釜谷沖) : 2.9 mgO₂ / (g・h)、西浦(湖心) : 3.1 mgO₂ / (g・h)、西浦(浚渫区) : 3.5 mgO₂ / (g・h) となり、各地点とも近い値を示した。しかしながら、0.2~1cm と1~2cm の還元層では、北浦(釜谷沖) > 西浦(浚渫区) > 西浦(湖心) であり、北浦に比べると西浦の酸素消費速度が

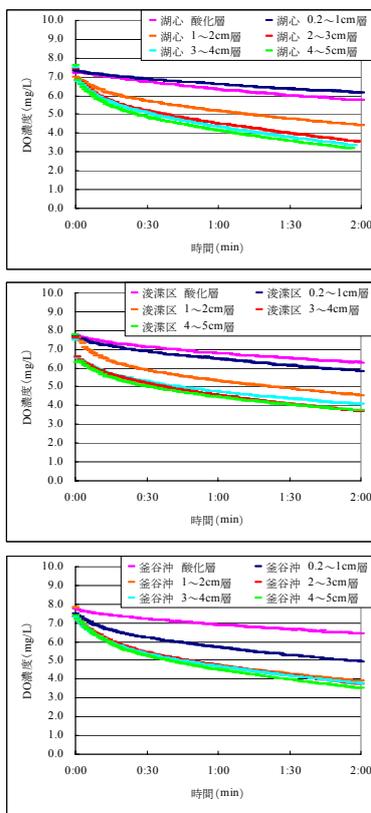


図-10 各地点の層別底泥における酸素消費濃度の変化

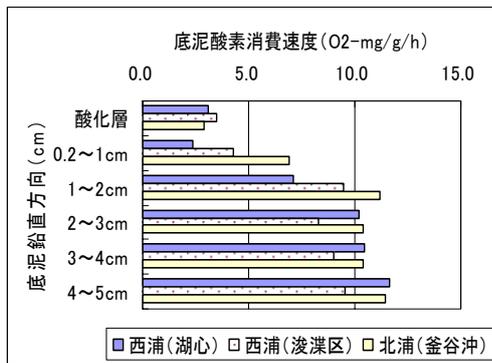


図-11 各層別による底泥の酸素消費速度

低いことが分かった。時間別にみると、初期の0.5時間が最も速く、時間の経過につれDOの消費速度が低下する傾向を示した。これにより、北浦の0.2~2cm深さの底泥は酸素消費能力が高く、底層水の混合状態が弱まった場合には、DO濃度が低下しやすいことが明らかとなった。

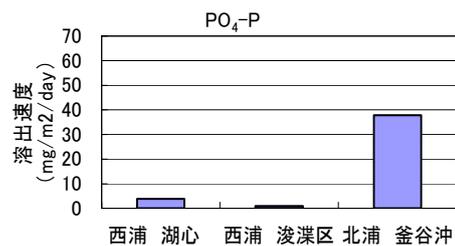
3.4 底泥の栄養塩類と金属類の溶出

夏季の高水温期(30℃)における底泥からのPO₄-P溶出速度の結果を図-12に示す。また、底泥からのPO₄-PとDOCおよび溶存態金属類(Fe, Mn)の溶出挙動を図-13, 図-14に示す。

溶出速度は0~5日目にて算出した。PO₄-Pの溶出速度は、好気条件において北浦(釜谷沖)が37.9mg/m²/dayと最も高く、西浦(湖心) : 3.8mg/m²/day および西浦(浚渫区) : 0.93mg/m²/day は低い値を示した。嫌気条件においては、更に北浦(釜谷沖)が65.1mg/m²/dayと高く、次いで西浦(湖心)で36.6mg/m²/day、西浦(浚渫区)の溶出速度が最も低く24.9mg/m²/dayであり、好気・嫌気条件共に北浦(釜谷沖) > 西浦(湖心) > 西浦(浚渫区)の傾向を示した。底泥浚渫により底泥表層の分解されやすい有機物を含んだ層が除去された浚渫区は、PO₄-P溶出において低い傾向を示した。なお、冬季の低水温期(5.5℃)には、夏季と比較して顕著に溶出が抑えられていた。

底泥中の全リン含有量、間隙水中のPO₄-P濃度、底泥の酸素消費速度は、西浦に比べ北浦の底質が高く、DOの低下やそれに伴うリン溶出が、北浦にお

好気での溶出速度(mg/m²/day) 0~5日目



嫌気での溶出速度(mg/m²/day) 0~5日目

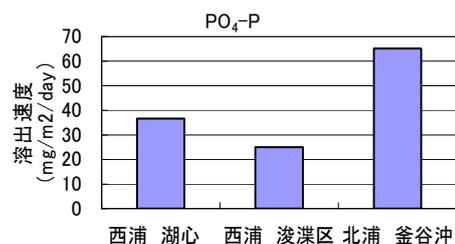


図-12 底泥溶出試験における溶出速度の比較(好気・嫌気条件)

いて進行しやすいことが分かった。

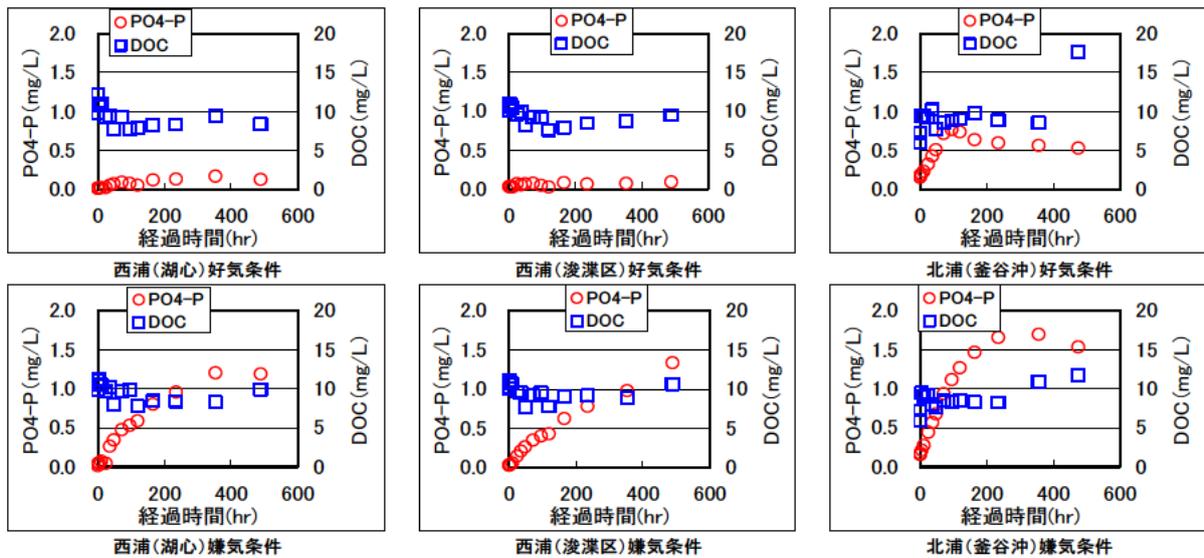


図-1 3 底泥溶出実験における PO₄-P と DOC の溶出挙動

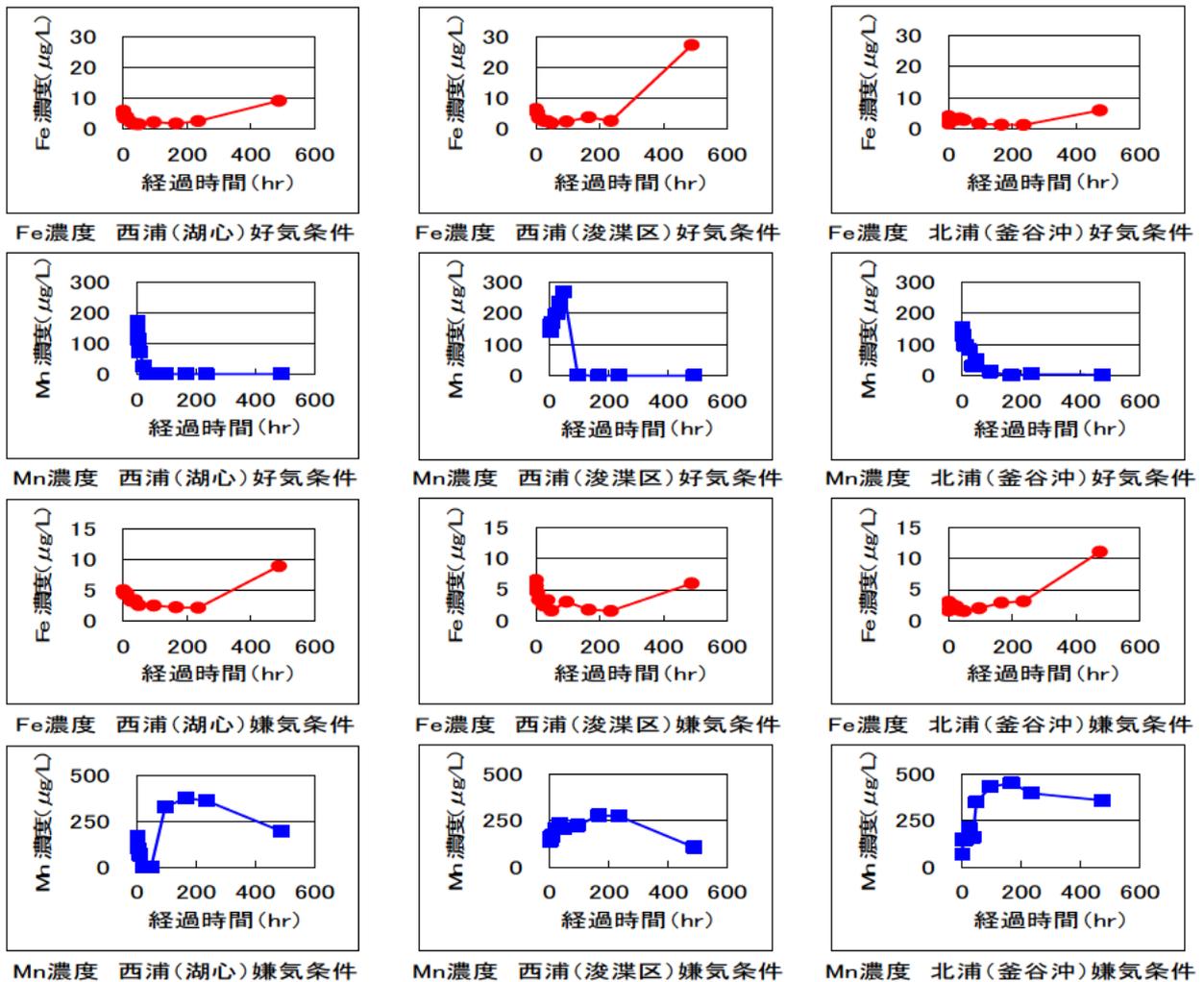


図-1 4 底泥溶出実験における溶存態金属類 (Fe, Mn) の溶出挙動

好気条件においては、Fe・Mn共に濃度の低下が見られた。これは、酸素条件下において、溶存酸素による金属の酸化反応と凝集沈殿が起こったことが原因と考えられる。なお、西浦（好気）の湖心と浚渫区のFe濃度が489時間目に高かったのは、長期間の溶出試験中に底泥の還元層からガス泡が突沸し、直上水に影響したものと思われる。一方、嫌気条件においては、FeとMnの溶出が確認された。特に北浦（嫌気条件下）のMn溶出が非常に大きかった。

底泥表面がDOの存在により酸化され、その状態が維持されると、有機物の酸化や微生物の働きにより金属類の溶出が抑制される一方、DOの低下に伴い、栄養塩類と金属類の水中への溶出が起こりやすくなることが確認された。

3.5 藻類増殖潜在能力

現地藍藻の単離培養株（*Microcystis* sp.）を用いた藻類増殖試験に用いた試験水の各濃度を表-2に、結果を図-15に示す。嫌気条件における最大増殖細胞数を示した15日目のクロロフィルaの濃度は、西浦の湖心水で90 μ g/L、浚渫区水で108 μ g/L、北浦の釜谷沖水では368 μ g/Lであり、北浦が西浦に比べ3倍以上高い値を示した。また、好気条件での溶

出水についても、クロロフィルaは同様な傾向を示した。種類の異なる緑藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*）を用いた試験結果を図-16に示す。クロロフィルa濃度が最も増加した培養液は、藍藻と同様に北浦（釜谷沖）の溶出試験嫌気条件20日目終了後の直上水であった。

D-N/D-P比をレッドフィールド比と比べると、好気条件ではP制限、嫌気条件ではN制限となっていると考えられる。好気条件の浚渫区と北浦を比較すると、D-P濃度比は北浦/浚渫区=0.54/0.13=4.2であるのに対し、クロロフィルa比は北浦/浚渫区=(226-20)/(63-20)=4.8である。

このため、浚渫区の方が、北浦よりも藍藻類が増殖しにくい水質条件が存在すると思われる。D-Mnは浚渫区で0.8 μ g/Lであり、このような低濃度においては、下水処理水を用いた付着藻類増殖実験において、藻類の増殖抑制が見られた⁶⁾ことから、D-Mn濃度が影響している可能性がある。

嫌気条件では、制限因子と考えられるD-N濃度にはあまり差が見られないけれども、藻類濃度には大きな違いが見られた。N濃度レベルからすると、最大クロロフィルa濃度は、300~500 μ g/L程度にな

表-2 藻類増殖試験水（溶出実験：好気・嫌気条件20日目終了後の直上水）

藻類培養試験水		NH ₄ -N mg/L	NO ₂ -N mg/L	NO ₃ -N mg/L	I-N mg/L	D-N mg/L
湖心	好気条件	0.39	0.12	2.93	3.44	4.19
浚渫区		0.40	0.16	4.01	4.57	4.13
釜谷沖		1.17	0.06	2.38	3.61	4.62
湖心	嫌気条件	1.54	1.04	0.59	3.17	3.85
浚渫区		3.02	0.22	0.02	3.26	3.84
釜谷沖		0.72	3.27	0.67	4.65	5.31
		PO ₄ -P mg/L	D-P mg/L	DOC mg/L	D-Fe μ g/L	D-Mn μ g/L
		0.13	0.18	8.38	9.2	0.6
		0.09	0.13	9.50	27.4	0.8
		0.53	0.54	17.59	6.0	3.9
		1.19	1.25	9.88	9.0	197
		1.34	1.38	10.63	6.0	108
		1.54	1.54	11.72	11.1	359

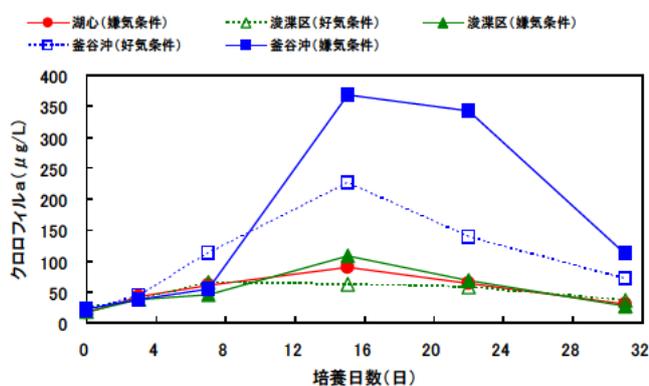


図-15 藻類（藍藻）培養結果

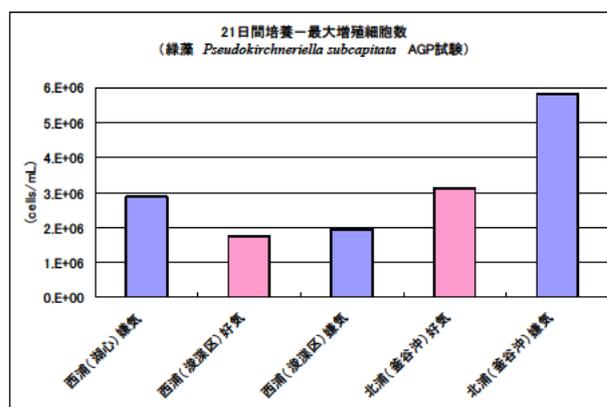


図-16 藻類（緑藻）培養結果

る可能性があると考えられるが、北浦以外は極端にその濃度が抑制されていた。D-Mn 濃度は十分にあることから、制限因子については明確ではない。

しかし、D-Mn の溶出濃度が北浦で大きいことから、底質の還元性は北浦が強いと考えられ、同時に溶出すると想定される有機物等の影響によって好気・嫌気の結果を併せて見ると、還元性の強い北浦において藻類増殖が大きいことから、底質の性状が藻類増殖に影響を及ぼしている可能性があるのではないかと考えられる。

4. まとめ

本研究は霞ヶ浦の底泥の酸素条件と湖水・底泥中の N・P 濃度、微量必須元素濃度、および、藻類の増殖特性に着目し検討を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) 夏季の高水温期には、北浦において DO 濃度が下層ほど低くなる傾向があり、それに伴い底泥からの栄養塩類と金属類の溶出が増し、湖水に影響している実態の把握が行えた。
- 2) 水質改善事業対策の実施状況の異なる西浦と北浦では、水質だけでなく底質状況も異なった。対策等が遅れている北浦において、底泥間隙水中の PO₄-P 濃度と D-Mn の濃度が大きいとともに、これらの溶出速度も大きかった。また、酸素消費速度も表層近くで大きい値を示した。

以上のように、北浦の底質は還元性が強く、これが水質に影響を及ぼしていると考えられる。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 藤永太郎, 宗林由樹, 一色健司 (2005) 海と湖の化学—微量元素で探る—, 京都大学学術出版会, pp.312-332
- 2) Akira Otsuki, Noriko Takamura (1988) Comparison of chlorophyll-a concentrations measured by fluorometric HPLC and spectrophotometric methods in highly eutrophic shallow Lake Kasumigaura, Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie. Verhandlungen IVTLAP Vol. 23, No. 2, pp. 944-951
- 3) 山下尚之, 田中宏明, 宮島潔, 鈴木穰 (2005) マイクロプレートを用いた AGP 試験の検討, 水環境学会誌, Vol.28, No8, pp.493-499
- 4) 小松伸行, 北村立実, 石井裕一, 北澤大輔 (2007) 霞

ヶ浦における貧酸素水塊の現地観測, 茨城県霞ヶ浦環境科学センター年報 第3号, pp.83-92

- 5) 関智弥, 福島武彦, 今井章雄, 松重一夫 (2006) 霞ヶ浦の濁度上昇と底泥巻き上げ現象, 土木学会論文集 G, Vol.62, No1, pp122-134
- 6) 岡安祐司, 原田新, 鈴木穰 (2009) 下水の高度処理による付着藻類増殖の抑制, 第43回日本水環境学会年会講演集, pp.359

湖沼における難分解性有機物の発生源とその質及び挙動特性に関する研究

国土交通省

(委託先)

独立行政法人土木研究所

水環境研究グループ水質チーム

南山 瑞彦

北村 友一

日下部武敏

鈴木 穰

研究期間 平成 18 年度～21 年度

平成 18 年度当初予算 11,920 千円

(研究予算総額 57,121 千円)

Study on Origin, Quality and Behavior of Recalcitrant Dissolved Organic Matter in Lakes

(FY2006～2009)

Mizuhiko MINAMIYAMA, Tomokazu KITAMURA, Taketoshi KUSAKABE and Yutaka SUZUKI,
Water Quality Team, Water Environment Research Group

Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute
Ministry of Land, Infrastructure and Transport

To identify the origin and to elucidate the quality and behavior of the refractory dissolved organic matter (DOM) in the lake watersheds, it is essential to develop methodologies and indices for monitoring, control and management of the lake environments and to shed some light on organic compositions in DOM. The objectives of the research were (1) to develop evaluation technique of DOM characteristics, (2) to clarify DOM characteristics and its origin in lake watershed, (3) to elucidate decomposition behavior of the DOM in lakes.

The research fields were the watersheds of Lake Biwa and Lake Kasumigaura. Results in FY2006-2009 were as follows:

1) Major six peaks at the position of Ex230/Em300(Peak1), Ex230/Em340(Peak2), Ex230/Em425(Peak3), Ex280/Em340(Peak4), Ex320/Em425(Peak5), Ex500/Em525(Peak6) were found in the EEM spectra of the Lake Kasumigaura, Lake Biwa, the river waters and effluent from WWTP.

2) These peak intensities were different by the samples. EEM can clarify the change of the DOM quality in the lakes and estimate the origin of DOM on the basis of these differences. EEM can detect

only the fluorescent DOM, however, it is effective as a monitoring technique of DOM because of its convenience and quickness.

3) Composition of dissolved hydrolysable amino acids (DHAAs) in DOMs of Lake Biwa and Lake Kasumigaura watersheds might be characterized by four constituent amino acids, i.e., alanine, valine, leucine and isoleucine; Carbohydrate composition of DOMs is different between inter-/inner-watersheds. It is suggested that Lake Biwa DOM is contributed by extracellular polysaccharides (EPS). Results of lipid component analysis show simple lipid (SL) and triglyceride (TG) change among samples. Additional analyses of fatty acid composition for each lipid class demonstrate TG fraction has a huge variety of fatty acids and the composition can be a candidate of index for classification.

4) Structural analyses of lacustrine, reverine and effluent from WWTP by ¹H-NMR indicated that DOMs in watersheds both of Lake Biwa and Lake Kasumigaura are highly aliphatic.

5) Concentration and fractionation of DOM by the solid phase extraction was developed. Simultaneous concentration and fractionation of DOM were feasible by using 4 kinds of solid phase cartridges with the different adsorption character of organic matters.

6) DOC and intensity of Peak5 (fulvic acid-like organic matters peak) in Lake Kasumigaura rose in September. Peak1 and Peak2 (protein-like organic matters peak) were lowered in the autumn, which was caused by the lowered algae concentration and decreased DOM productions.

7) DOC profile along depth in Lake Biwa showed decreasing tendency from May to December, but it became flat from January to March because of circulation.

8) The increase of the intensity of Peak1 and Peak2 from 0.5m to 10m depth from May to July coincided with the increase of the algae concentration, which indicate the DOM production by algae.

9) Peak5 intensity rose in the bottom layer from June to December, which might be caused by the elution of fulvic acid-like organic matters from the bottom sediment.

10) DOC decrease ratio after 98 days in Lake Kasumigaura-West water and Lake Biwa lake water were 10% and 0%, respectively. DOM of these lake waters was the recalcitrance. The DOC decrease ratio in river water was 10~20%, higher than the lake water and the rate was higher in the river water including urban area.

11) DOC decrease ratio after 98 days in treated sewage of Kasumigaura and Lake Biwa were 16% and 26%, respectively.

12) The peak intensity of the protein-like DOM in the river water was greatly lowered. On the other hand, the lowering of the peak of the fulvic acid-like was little.

13) Increase and decomposition of algae DOM production. Although the quality of DOM was different by the type of algae, when algae were cultivated the intensity of Peak2 and Peak4 increased.

1 はじめに

1-1 研究背景

近年、流域から湖沼への流入汚濁負荷は各種点源・面源対策の実施により減少傾向にあるものの、湖沼水中の有機物（COD）濃度は横ばいあるいは漸増傾向が観られる。琵琶湖をはじめとして、霞ヶ浦、印旛沼、十和田湖等の湖沼、また広島湾、富山湾などの閉鎖性内湾においても難分解性有機物の増加・蓄積が報告され、その影響が懸念されている（図 1-1.1 および 1-1.2）。湖沼における有機物の特性のみならず発生源や流域内の挙動・動態については不明な点も多く、さまざまな議論や実証的な研究が行われてきた。現在、主な発生源としては、陸域から流入するもの、湖内で産生されるもの、湖底から回帰するもの等が考えられている。しかし、各起源に由来する有機物は水環境中において保存されている訳ではなく、物理的・化学的・生物的にさまざま反応を経て、ダイナミックに質的・量的に変化していることが海洋や生物地球化学等の研究分野を中心に明らかにされつつある。湖沼の難分解性有機物の発生源やその質および水環境中における分解挙動等を明らかにするためには、難分解性有機物の質・量的特性のみならず流域特性をも考慮して炭素循環を網羅的かつ系統的に解明する必要がある。

本研究では、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域を対象流域として、まず湖水に蓄積される難分解性溶存有機物をその特性により詳細に分類するための方法論を確立し、その発生源および質・量的特性を明らかにするとともに、溶存有機物の分解性試験等から湖沼における（難分解性）溶存有機物の挙動を明らかにすることにより、最終的には豊かな水環境の構築・保全に資することを目的としている。

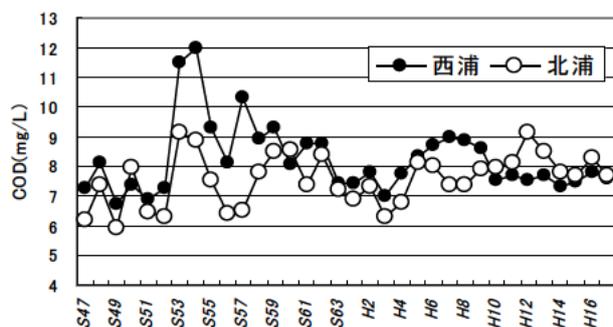


図 1-1.1 霞ヶ浦における COD の経年変化¹⁾

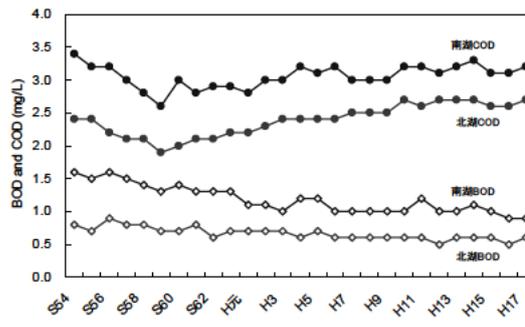


図 1-1.2 琵琶湖における BOD および COD の経年変化²⁾

1-2 霞ヶ浦および琵琶湖における COD の季節変化と方法論および詳細データ整備の必要性

図 1-1.1 および図 1-1.2 に示した COD 値は、各採水地点（基準点）の年平均値であり、COD の上昇や COD の平均値の構成に寄与している採水季節ごとの違いや各採水地点の COD 値は明らかでない。湖沼有機物に関わる様々な現象や影響等を解明するためには、季節ごとあるいは採水地点ごとの有機物の変化を詳細に把握することが重要であると考えられる。そこで、これまでに蓄積されてきた基礎情報を整理し、既存データの解析から明らかにできることと、課題等を整理した。霞ヶ浦においては近年の COD の各月の観測結果、琵琶湖においては COD/BOD 乖離現象あるいは COD 上昇が観られる期間を把握しておく必要があると考えた。

霞ヶ浦では、国土交通省・霞ヶ浦河川事務所で開催している水質データ³⁾をもとに COD の経月変化を整理した。霞ヶ浦の環境基準点のうち 4 地点の平成 12 年度から平成 19 年度までの COD の変化を図 1-2.1 に示す。霞ヶ浦（西浦）では平成 16 年度以降、冬季の COD が顕著に高い値を示していることが分かり、COD 値は大きく季節変動していることがわかった。琵琶湖（北湖）に関しては、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターで開催している水質データ⁴⁾をもとに、COD の各月の変化状況を整理した。1979 年度から 2007 年度までの琵琶湖の COD（18 地点の平均値）の変化を図 1-2.2 に示す。図 1-2.2 より、琵琶湖・北湖では各年の COD 値は春から夏にかけて上昇し、秋から冬に低下する傾向を示していた。昭和 54 年度から平成 19 年度の夏季と冬季 COD に着目すると両季節で長期的な上昇傾向が観られ、特に冬季の COD が年々高くなっていることが明らかとなった。

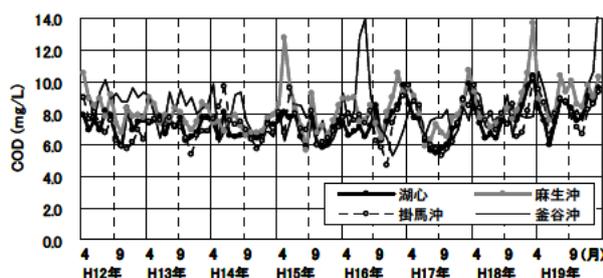


図 1-2.1 霞ヶ浦における COD の経月変化

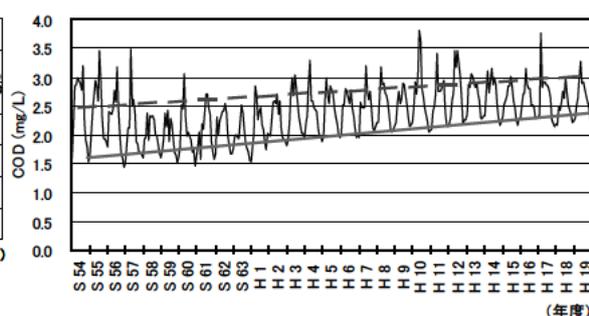


図 1-2.2 琵琶湖北湖における COD の経月変化

蓄積データ量が豊富であり、かつ難分解性有機物の簡易指標である COD に着目し、湖沼有機物の詳細なトレンドを解析した。その結果、湖内生態系の変化や気候変動、土地利用の変化、浚渫など様々な影響が考えられるが、従来の COD では有機物の質的（変化）情報は得られないという限界が示された。以上のことを踏まえ、本研究では、湖沼に蓄積される難分解性溶存有機物の詳細な分類方法の方法論を確立した上で、湖沼およびその流域における有機物の質的特性および発生源並びに（分解）挙動を詳細に明らかにすることにより、新規指標の提案や今後の対策に結びつけることを最終目標とした。

1-3 研究目的と概要

本研究では、湖沼有機物の多くは溶存態であることから、難分解性溶存有機物を研究対象とし、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域を対象として以下の3つの目的を掲げて研究を実施した。

- I. 湖水中の（難分解性）溶存有機物の分類方法および質的特性の評価手法の開発（第2章）
- II. 湖沼流域における（難分解性）溶存有機物の質的特性および発生源の解明（第3章）
- III. 湖沼流域における溶存有機物の分解挙動の解明（第4章）

第2章では、湖水 DOM の質的特性を簡易に把握するために、固相カートリッジを使用した新たな分類方法および LC/MS を組み合わせた湖水中難分解性 DOM の分析法の開発を行った。さらに、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域を対象として、湖水中に蓄積される DOM の質的特性を有機組成分析（アミノ酸、単糖、脂質・脂肪酸）、¹H-NMR、質量分析計などの（高度）機器分析を用いて精密な定性分析および質的特性の把握を実施した。簡易評価手法としては、3次元励起蛍光スペクトル（EEM）等を採用し、質的特性の把握や発生源の解明、新規評価指標の提案などにつながる有効な手法であることを示した。

第3章では、流域内での溶存有機物の質的特性および発生源を解明するため、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域において湖水、河川水、下水処理水を対象に詳細な現地調査を実施した。第2章で提案した EEM 法等の適用により、両流域における DOM の質的特性の把握と発生源について得られた知見をまとめた。

第4章では、まず DOM の分解性を評価するための試験法を確立した。次に、本試験法を用いて、両流域内の湖水、河川水等に含まれる DOM の分解挙動および難分解性の評価を行った。さらに、内部生産（藻類）の寄与を詳細に評価することを目的として、両湖から採取した藻類を実験室内で培養し、その培養液中の藻類由来の DOM の分解性の評価も行った。

2 湖水中の（難分解性）溶存有機物の分類方法および質的特性の評価手法の開発

水環境中には多種多様な溶存有機物（DOM）が遍在している。琵琶湖や霞ヶ浦をはじめとした湖沼では、様々な点源・面源対策が実施されてきたにもかかわらず、COD 漸増や BOD/COD の乖離現象が観られるなど、有機物の質的なレジームシフト（ここでは、1980 年代以降の湖沼有機物の基本的な組成や特性の変化・転換を指す）が指摘され、水圏における有機物の動態や生態系への影響に注目が集まっている。しかし、機器分析により明らかにできる成分は、有機物全体の 10-20%程度と言われ⁵⁾、有機物の発生源や水環境中における環境動態および機能・役割についてはほとんど明らかにされておらず、有機物に関する基盤情報が欠如している。そこで、本研究では、湖沼に蓄積する DOM の詳細な分類方法の提案を第 1 の目標として掲げた。

湖水中の DOM は多種多様な化学物質の混合物であり、その質的特性を明らかにするためには、それらを分類するための方法論の確立が必要不可欠である。これらの基礎的情報を入手することができれば、簡易分類指標および手法を開発することが可能となり、水環境のモニタリングや発生源の推定さらに流域対策につなげることができるものと考えられる。

本研究では、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域を対象流域として、湖水に蓄積される DOM の質的特性を既存の様々な化学分析的な手法から明らかにするとともに、湖水中の DOM の全体像を把握するための手法の開発も行った。本研究で行った分析は次のとおりである。

(1)3 次元励起・蛍光スペクトルによる特性解析

3 次元励起・蛍光マトリックス分光法(Three dimension excitation- emission matrix- fluorescence spectroscopy, EEM) は、蛍光性有機物しか検出できないものの、濃縮等の前処理が不要でピーク位置や蛍光強度などから簡便に有機物の発生源や質的特性に関する情報が得られることから、近年、海洋、陸水、土壌・地下水などの幅広い分野で適用されることが多くなってきている^{6),7)}。また、EEM スペクトルデータから算出される腐植化指標(humification index、HIX)から DOM の質的特性の変化がとらえられる。

(2)有機物組成分析（アミノ酸、糖類および脂質・脂肪酸）

湖沼流域における有機物（炭素）の循環は、藻類・植物による光合成を起点として無機炭素から有機物が生産されることではじまる。水環境中に存在する有機物の組成およびその特性は、発生源および各種物理的、化学的、生物学的プロセスの情報を反映しているものと考えられるが、起点となる生体有機物（タンパク質、糖類および脂質）の影響を強く受けているものと考えられる。これらの主要なグループについて、湖水や河川水中のアミノ酸、糖類および脂質・脂肪酸について有機物組成分析を実施した。

(3)¹H-NMR

核磁気共鳴分光法は、原子核の化学結合状態や分子内／分子間相互作用などによって核の共鳴周波数が変化すること（化学シフト）を利用した構造解析手法である。有機物の NMR 研究では ¹H、¹³C、¹⁵N などが最も広く利用されている。原理的には試料中に存在するすべての観測核種を検出できるため、有機物の全体像の質的特性の把握が可能と考えられる。本研究では、¹H の絶対感度が ¹³C の 5.7×10^3 倍⁸⁾と高いことから、本研究では ¹H-NMR による DOM の構造解析を行うこととした。

(4)LC/ESI-TOF-MS

湖水中 DOM は、非常に多種多様な有機物の混合物であるため、通常の分析化学的な（ボトムアップ型：分解処理し各成分を検出できるよう修飾してから測定）アプローチでは、その全体的な組成・構造・特性などを定性・定量することは困難である。有機物全体を評価するためには、トップダウン型アプローチによる湖水中 DOM の特性評価方法も必要である。近年、その分離能および分解能の向上により汎用装置となった液体クロマトグラフ法（HPLC）とエレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析装置（ESI-TOF MS）を用いて、DOM の網羅的分析を行った。

(5)溶存有機物の分画

DOM の質的特性の簡易把握やそれに続く構造解析を行うためには、有機物の分離と濃縮方法が必要不可欠で

(Ex350/Em395)の蛍光強度を用いて規格化し、ブランク試料(超純水)のEEMスペクトルを差し引くことにより試料のEEMスペクトルを得た。(分析方法の詳細は平成19年度報告書に記載)

2-2-2 EEMスペクトル分析の結果および考察

(1) 琵琶湖のEEMスペクトルの季節変化と鉛直分布

震ヶ浦流域および琵琶湖流域におけるDOMのEEMスペクトルにおいて、主要な7つのピークが検出された(表2-2.1)⁹⁾。図2-2.1には、本研究で得られたピーク位置およびChen et al.による分類¹⁰⁾をまとめて示した。平成19年8月および平成20年1月の琵琶湖安曇川沖の表層水と深層水(底面上1.5m)のDOMのEEMスペクトルを図2-2.2に示す。図より、藻類に由来すると考えられるタンパク質様ピーク(Peak 2およびPeak 4)の蛍光強度は、夏季において強く、冬季に低下することが分かった。したがって、これらのタンパク質様ピークは、内因性起源(autochthonous)の有機物の指標として活用できることが分かった。また、夏季の深層水はフルボ酸/フミン酸様ピーク(Peak 3およびPeak 5)の割合が高くなることが明らかとなった。冬季は表層水と深層水の差は小さくなることが分かった。このことは夏季に深層層に蓄積した難分解性有機物が湖水の全循環により表水層へ供給されたことも影響していると考えられた。したがって、琵琶湖の湖内における有機物の挙動を

表2-2.1 本研究において検出された主な蛍光

ピーク位置	帰属
Peak 1 230/300	タンパク質様(チロシン)
Peak 2 230/340	タンパク質様(トリプトファン)
Peak 3 230/425	フルボ酸、フミン酸様
Peak 4 280/340	タンパク質様
Peak 5 320/425	フルボ酸、フミン酸様
Peak 6 345/435	蛍光増白剤様
Peak 7 500/525	下水処理水様

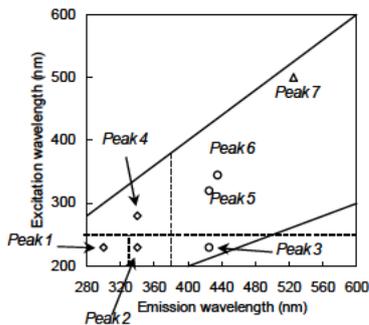


図2-2.1 本研究におけるEEMピークの帰属

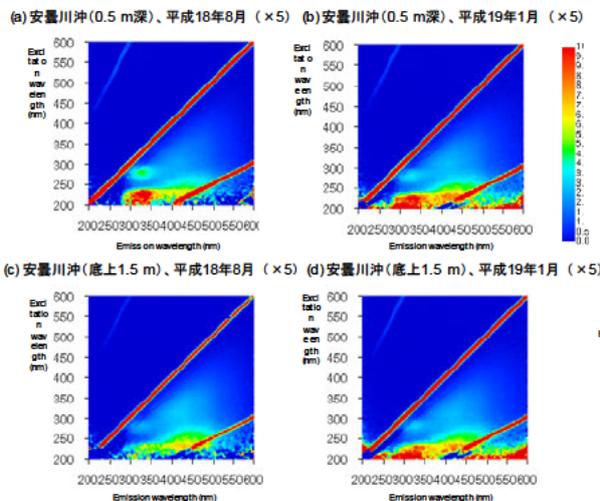


図2-2.2 琵琶湖安曇川沖におけるEEMスペクトルの季節変化(0.5、底上1.5 m)

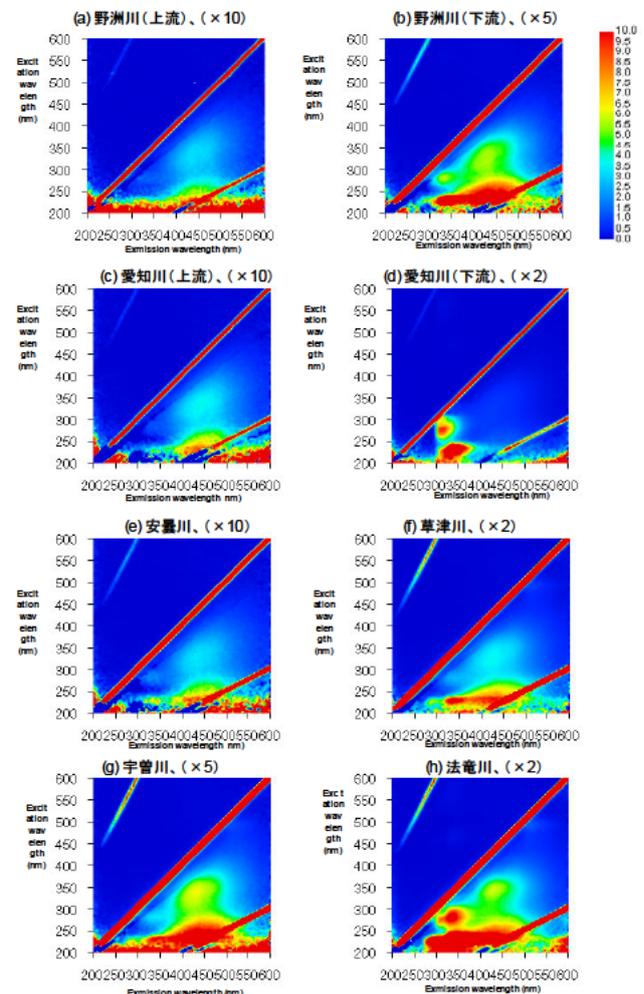


図2-2.3 琵琶湖流入河川のEEMスペクトル(2008年1月)

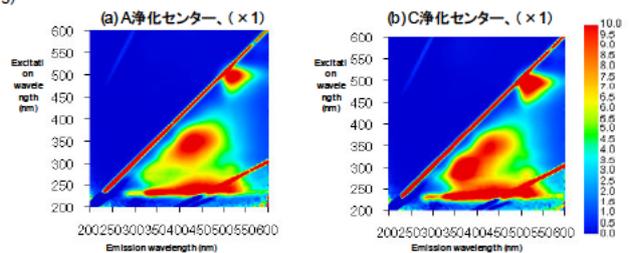


図2-2.4 下水処理水のEEMスペクトル(琵琶湖流域、2008年1月)

考える際には、内因性の発生源のみならず、湖内流動、時空間的な変動要因をも考慮して総合的に調査し、評価することが必要であると言える。

一方、霞ヶ浦水 DOM では、本調査期間を通して、また採水地点間で EEM スペクトル間に大きな違いは観られず、藻類等による内部生産の寄与は琵琶湖 DOM と比較して小さいことが推察された。

(2) 流入河川水中 DOM の EEM スペクトル

湖沼流域において、流入河川は湖水中に存在する有機物の主要な発生源のひとつと考えられる。琵琶湖流域および霞ヶ浦流域において流入河川調査を実施し、EEM による有機物特性を把握した。主な琵琶湖流入河川水の DOM の EEM スペクトル（平成 20 年 1 月）を図 2-2.3 に示す。野洲川および愛知川では、そのほとんどが森林に囲まれている上流域においても採水を実施した。図より、流入河川ごとに EEM スペクトル形状（ピーク位置および蛍光強度）が大きく異なっていることが分かった。図(a)および(c)より、野洲川（上流）および愛知川（上流）においては、フルボ酸／フミン酸様ピーク（Peak 3 および Peak 5）の寄与が大きく、森林土壌に由来する腐植物質が主要な構成成分であると考えられた。また、両河川の下流域においては、EEM スペクトルは上流域のそれとは大きく異なっており、河川ごとに流下にもなる有機物特性の変化に大きな違いがあることが分かった（図 2-2.3(b)および(d)）。森林系河川である安曇川では、全体的な蛍光強度は弱いものの、森林由来と考えられるフルボ酸様ピーク（Peak 3）が相対的に強いことが分かった。したがって、琵琶湖流入河川では Peak 3 は森林由来のフルボ酸の指標として用いることが可能であると考えられた。都市系河川である草津川では、他の河川と比較して Peak 2 の寄与が大きいことが分かった（図 15(f)）。したがって、Peak 2 は生活雑排水等の人間活動の影響を強く受けているものと考えられる。Peak 2 はタンパク質様（トリプトファン）ピークに帰属され、生活雑排水や尿由来物質等の寄与が推察された。農業系河川である宇曾川および法竜川では、水田等の土壌に由来すると考えられるフミン酸様ピーク（Peak 5）が観られるものの、Peak 1、2、3、4 の寄与が大きいことが分かった。しかし、これら 4 つのピークは宇曾川と法竜川で異なるパターンを示しており、法竜川が生活雑排水等の影響を受けている等の流域間の違いを反映しているものと考えられた。

一方、霞ヶ浦流域における流入河川調査の結果より、霞ヶ浦の流入河川水中 DOM の EEM スペクトルは、琵琶湖流入河川のそれと比較して、河川ごとの大きな差は観られなかった。霞ヶ浦流入河川 DOM の EEM スペクトルは、蛍光強度に河川間で多少の差が観られるものの、主に Peak 3 および Peak 5 が検出された。これらのピークは腐植物質によるものと考えられた。したがって、霞ヶ浦流域では外因性（陸域由来、allochthonous）有機物の発生源は、琵琶湖流域と比較して多様性が低いことが推察された。

(3) 下水処理水中 DOM (EfOM) の EEM スペクトル

琵琶湖 A 浄化センターおよび C 浄化センターの下水処理水中の DOM の EEM スペクトルを図 2-2.4 に示す。図より、湖水や河川水と比較して、下水処理水中有機物は蛍光強度が強く、下水処理水に特徴的な Peak 7 が観られた。平成 18 年度に実施した下水処理水中有機物の分解性試験の結果から、Peak 7 は比較的速やかにその蛍光強度が減少することが明らかになっており、河川水や湖水では検出されないか検出されてもごく僅かであったのは、このためであると考えられた。したがって、Peak 7 は処理場付近では検出される可能性は高いが、湖沼流域において下水処理水の寄与を調べるための指標には向かないと考えられる。

処理場間では、EEM スペクトルは概ね同じパターンを示したが、C 浄化センターでは、A 浄化センターのそれと比較して Peak 4 の寄与が大きいことが分かった。Peak 4 は、微生物に由来する水溶性の高い有機物（タンパク質様、microbial soluble byproducts）と考えられることから、活性汚泥由来の有機物であることが推察される。処理場間で比較すると、Peak 4 に差が観られることから、これらの有機物は処理方式の影響を強く受けやすい化学特性を有していると言える。

(4) 腐植化指標 (HIX) を用いた溶存有機物の特性把握

水環境中において、DOM はその腐植化 (humification) の進行にともなって、カルボキシル基含有量等の化学的特性が変化する。特性の変化によって、DOM は化学物質や鉱物表面との相互作用が影響を受けるなど、水環境中における DOM の役割や機能を考える上で腐植化の程度を調べることは重要である。Zsolnay らは、DOM の腐植化にともなって DOM の蛍光波長が長波長側へシフト (red-shifting) することを利用して、蛍光分光法による腐植化指標 (humification index, HIX) を提案している¹¹⁾。ここでは EEM の測定データを利用し、HIX で DOM の特性がとらえられるかを解析した。HIX の定義はいくつか提案されているが、本研究では次式を採用した¹²⁾。

$$HIX = \frac{\sum FI_{435 \rightarrow 480}}{\sum FI_{300 \rightarrow 345} + \sum FI_{435 \rightarrow 480}} \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $\sum FI_{300 \rightarrow 345}$ および $\sum FI_{435 \rightarrow 480}$ は、それぞれ蛍光波長 300 nm ~ 345 nm および 435 nm ~ 480 nm の範囲における補正蛍光強度の総和であり、DOC 濃度に依存しない有機物に固有の値をとり、HIX 値は 0 から 1 の範囲をとる。本研究では、励起波長に 255 nm を採用した。

平成 18 年 8 月から平成 19 年 2 月にかけて採水した琵琶湖 DOM および霞ヶ浦 DOM (表層水) の HIX 値を図 2-2.5 に示す。図より、琵琶湖 DOM は、夏季から冬季にかけてその HIX 値が大きく増加する傾向がすべての地点で観られた。一方、霞ヶ浦 DOM については、季節が異なっても HIX 値は大きく変化せず、琵琶湖 DOM と比較して高い HIX 値を有していることが明らかとなった。琵琶湖 DOM の HIX の季節変化は、夏季表水層において

藻類活動が活発で、また成層化することにより新鮮な有機物、すなわち腐植化の進行していない有機物が多く表水層に存在するためと考えられ、EEM 法で得られた知見と合致するものであった。冬季に観られる高い HIX 値は、Ohno の報告によれば、森林土壌中のフルボ酸 (0.973) と同程度の値¹²⁾であり、これら腐植化度の高い有機物は、陸域由来の有機物中に含まれる分解性の低い成分であることが示唆された。霞ヶ浦 DOM は調査期間をとおして HIX 値は大きく変化をしていないことから、琵琶湖 DOM と比して藻類の影響度は低く、有機物特性は大きく変化しないことを示す結果であった。したがって、霞ヶ浦では季節的な変動が大きいと考えられる内因性有機物の相対的な寄与が少ないと考えられた。

平成 19 年 8 月から平成 20 年 1 月の安曇川沖 (琵琶湖) の水深別の HIX 値を図 2-2.6 に示す。本図より、琵琶湖が成層化している夏季においては、水深が深くなるにつれて HIX 値が増加する傾向が観られた。一方、冬季では、HIX 値は鉛直方向で大きな差は観られず一様に分布していることが分かった。琵琶湖のような深水湖では、季節成層が湖の物理・化学・生物過程とそれらの季節変化を支配していることが知られている¹³⁾。

湖沼流域における有機物の動態を調べることもおよび湖沼間の比較を目的として、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域において、主要流入河川水 (上流および下流)、下水処理水、湖水の採水を実施した。琵琶湖流域および霞ヶ浦

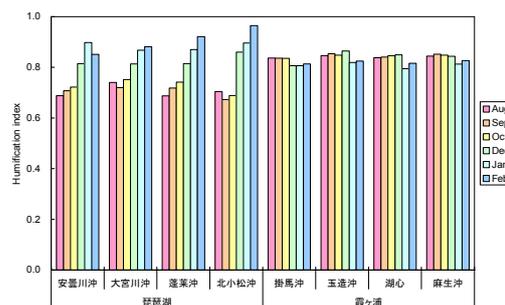


図2-2.5 琵琶湖および霞ヶ浦DOMのHIX季節変化

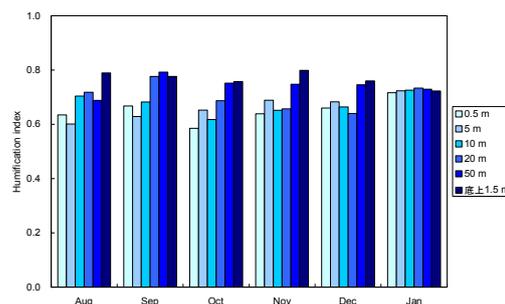


図2-2.6 安曇川沖(水深別)DOMのHIX季節変化

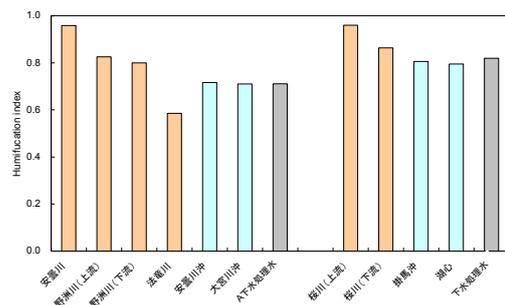


図2-2.7 琵琶湖流域および霞ヶ浦流域におけるDOMのHIX分布

流域における HIX 値の結果を図 2-2.7 に示す。図より、全体的な傾向として、河川水 DOM の HIX 値は上流地点ほど高くなる傾向を示し、湖水 DOM と下水処理水 DOM は同程度の HIX 値を示すことが明らかとなった。なお、周囲を水田および民家で囲まれた法竜川 DOM では最も低い HIX 値が得られた。主な土地利用が森林である安曇川および桜川（上流）において高い HIX 値が得られており、森林土壌由来フルボ酸（腐植物質）の寄与によるものと考えられた。しかし、同様に周囲を森林で囲まれている野洲川（上流）DOM は、比較的低い HIX 値を示し、野洲川（下流）DOM および桜川（下流）と同程度の値であった。森林内における有機物の挙動は複雑であり、植生や土壌構造、先行降雨等の違いによるものと考えられるが、現段階では原因は不明である。Ohno によれば、Corn residue の HIX 値は 0.584¹²⁾であり、法竜川 DOM は水田土壌に由来する新鮮な有機物の割合が多いものと考えられた。法竜川 DOM の HIX 値は他の流入河川と比較しても顕著に低い値を有していることから、生活雑排水等の影響も少なからず受けていることが推察された。また、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域ともに、湖水 DOM と下水処理水 DOM の HIX 値は、同程度の値を有していることから、腐植化度の観点では同様の化学的特性を有していた。本研究で適用した腐植化指標（HIX）を用いた特性評価も DOM の指標の一つになると考えられた。

琵琶湖流域および霞ヶ浦流域において EEM により DOM 特性把握が可能かどうかを調査した。各水試料の EEM スペクトルおよびこれから算出される HIX を比較することにより、簡易に有機物の特性把握ができることがわかった。EEM 法では、分子レベルの分解能はないが、その簡便性、迅速性により、湖沼流域における有機物のモニタリング手法として有効である。

2-3 湖沼流域における DOM の有機物組成

DOM 有機物組成分析用の試料水の採水は、平成 20 年 1 月に、琵琶湖流域は、安曇川、野洲川（上流および下流）、法竜川、安曇川沖、大宮川沖、A 浄化センター（計 7 地点）、霞ヶ浦流域は、桜川（上流および下流）、掛馬沖、湖心、浄化センター（計 5 地点）において実施した。

2-3-1 DOM の加水分解性アミノ酸（DHAA）組成分析

(1) 分析方法

ガラス繊維ろ紙（GF/B）でろ過した試料 10 mL を凍結乾燥した後、1.5 mL の精製水に再溶解させたものを減圧乾固して粉末試料を得た。粉末試料に対して、6 mol/L HCl 400 μ L を添加し、110 $^{\circ}$ C、22 時間の条件で酸加水分解した。加水分解後の試料は、減圧乾固した後、0.02 mol/L HCl 100 μ L で再溶解したものをメンブレンフィルター（0.22 μ m）でろ過してアミノ酸分析計（日立、L-8500 形）を用いてニンヒドリン発色により分析を行った。分析対象としたアミノ酸は、glycine (Gly)、alanine (Ala)、valine (Val)、leucine (Leu)、isoleucine (Ile)、methionine (Met)、phenylalanine (Phe)、proline (Pro)、serine (Ser)、threonine (Thr)、tyrosine (Tyr)、aspartic acid (Asp)、glutamic acid (Glu)、arginine (Arg)、lysine (Lys) の計 15 種類である。

(2) アミノ酸（DHAA）分析結果および考察

河川水および下水処理水の DOM では Pro が主要な成分として検出され、それ以外の成分はほとんど検出されなかった。湖水 DOM のアミノ酸組成について結果を次に記す。アミノ酸分析で得られたアミノ酸濃度から各構成アミノ酸の炭素含有率（%C）を用いて、有機炭素濃度で表したアミノ酸分析結果を図 2-3.1 に示す。霞ヶ浦 DOM のみで Tyr および Met が検出されたが、それ以外の 13 成分は琵琶湖 DOM および霞ヶ浦 DOM で検出された。琵琶湖 DOM および霞ヶ浦 DOM について全体的な DHAA 組成は類似していることが分かった。また、湖水中 DOM の主要な構成アミノ酸は、Gly、Ala、Asp、Glu で、霞ヶ浦 DOM では Thr の含有率も多いことが明らか

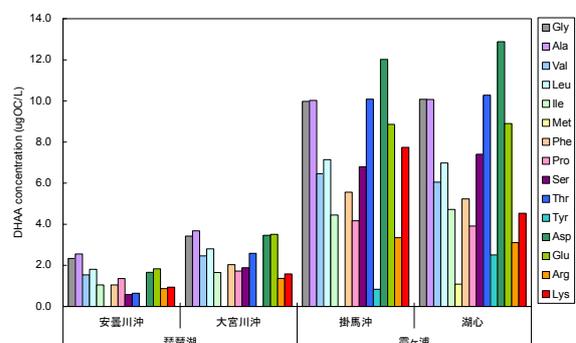


図2-3.1 アミノ酸分析(濃度)結果

となった。

2-3-2 DOMの加水分解性糖類 (HCl-HCHO) 組成分析の方法

(1) 分析方法

中性糖の分析方法

ガラス繊維ろ紙 (GF/B) でろ過した試料 5 mL を凍結乾燥した後、1.5 mL の精製水に再溶解させたものを減圧乾固して粉末試料を得た。粉末試料に対して 2 mol/L トリフルオロ酢酸 400 μ L を添加し、100 $^{\circ}$ C、6 時間の条件で酸加水分解した。加水分解後の試料は、減圧乾固した後、精製水 200 μ L を添加、再溶解させたものをメンブレンフィルター (0.22 μ m) でろ過したものをポストカラム HPLC 分析に供した。分析対象の中性糖は、rhamnose (Rha)、ribose (Rib)、mannose (Man)、fucose (Fuc)、galactose (Gal)、xylose (Xyl)、glucose (Glc) の 7 種類であった。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

アミノ糖の分析方法

ガラス繊維ろ紙 (GF/B) でろ過した試料 5 mL を凍結乾燥した後、1.5 mL の精製水に再溶解させたものを減圧乾固して粉末試料を得た。粉末試料に対して 4 mol/L HCl 400 μ L を添加し、100 $^{\circ}$ C、6 時間の条件で酸加水分解した。加水分解後の試料は、減圧乾固した後、精製水 200 μ L を添加、再溶解させたものをメンブレンフィルター (0.22 μ m) でろ過したものをポストカラム HPLC 分析に供した。分析対象のアミノ糖は、galactosamine (GalN) および glucosamine (GlcN) の 2 種類であった。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

ウロン酸の分析方法

ガラス繊維ろ紙 (GF/B) でろ過した試料 25 mL を凍結乾燥した後、2.0 mL の精製水に再溶解させたものを減圧乾固して粉末試料を得た。粉末試料に対して 2 mol/L トリフルオロ酢酸 400 μ L を添加し、100 $^{\circ}$ C、6 時間の条件で酸加水分解した。加水分解後の試料は、減圧乾固した後、精製水 200 μ L を添加、再溶解させたものをメンブレンフィルター (0.22 μ m) でろ過したものをポストカラム HPLC 分析に供した。分析対象のウロン酸は、galacturonic acid (GalA)、Iduronic acid (IdoA)、glucuronic acid (GlcA) の 3 種類であった。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

糖アルコールの分析方法

ガラス繊維ろ紙 (GF/B) でろ過した試料 100 mL を凍結乾燥した後、3 mL 純水 \times 3 回再溶解させて回収したものを遠心エバポレーターで減圧乾固した。次に、乾燥残渣にピリジンおよび無水酢酸を各 500 μ L を加え、100 $^{\circ}$ C、3 時間の条件で加熱し、アセチル化した。その後、窒素ガスを吹き付け、ピリジンおよび無水酢酸を除去した後、内部標準物質 (2-deoxyglucose、2-DG) を加えて乾固した。残渣をクロロホルム 0.15 mL で抽出し、GC(FID)分析に供した。分析対象とした糖アルコールは、rhamnitol (Rha-OH)、fucitol (Fuc-OH)、arabitol (Ara-OH)、xylitol (Xyl-OH)、mannitol (Man-OH)、galactitol (Gal-OH)、glucitol (Glu-OH)、inositol の 8 種類であった。なお、糖アルコール分析では、加水分解等の前処理は実施しておらず、遊離の糖アルコールを測定対象としている。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

(2) 糖類組成分析結果および考察

本研究で得られた琵琶湖流域および震ヶ浦流域における DOM の糖類組成分析結果を図 2-3.2 および図 2-3.3 に示す。琵琶湖流域においては、河川下流、湖水、下水処理水中の糖類濃度に大きな差は観られなかった。森林系河川である安曇川、野洲川 (上流) では、糖類濃度は低いことが分かった。野洲川 (上流) DOM の糖類組成は他の試料と比べ組成が大きく異なり、Xyl、Glc、Man の順に含有量が多いことが分かった。このことから、野洲川 (上流) DOM 中の糖類は、ヘミセルロース等の木質由来であることが明らかとなった。一方、湖水 DOM では他の地点と比べ、Fuc 含有率が高く、藻類などの細胞外多糖類 (extracellular polysaccharides、EPS) の 1 つであるフコイダン等の寄与が示唆された。さらに、湖水 DOM 中にのみアミノ糖 (GalN、GlcN) が検出された。検出されたアミノ糖は天然に広く存在する代表的なもので、動植物、微生物のムコ多糖、糖タンパク質、糖脂質の構成成分である。湖外の試料中には検出されていないことから、アミノ糖は湖水中に生息している微生物等の寄与に

よるものと推察された。下水処理水(A 浄化センター)では、ウロン酸の1つである GalA が検出された。GalA は細胞壁のペクチン質の主成分であり、植物粘液、細菌多糖などの構成成分として存在しており、細菌由来の有機物の寄与が大きいことが考えられた。また、Glc 含有率も高いことも下水処理水中 DOM の特徴であったが、その由来は不明である。

霞ヶ浦流域においては、桜川(上流)以外の試料では糖類が検出された。桜川(下流)では、糖類濃度が低いために、特徴的な組成が観られなかった。霞ヶ浦 DOM の糖類組成は、琵琶湖 DOM のそれと比べて Rha 含有率が高く、GalA が検出された等の違いが観られた。Rha は、植物・細菌に広く分布し、植物の細胞壁ペクチン質やグラム陰性菌の細胞表層の多糖やリポ多糖中に多く含まれており、これらの寄与が推察された。下水処理水中 DOM の糖類組成は、琵琶湖流域(A 浄化センター)と霞ヶ浦流域(浄化センター)では大差は観られず、Glc および GalA に特徴付けられた組成を有していることが明らかとなった。

糖類組成を比較した結果、霞ヶ浦では下水処理水に特徴的な GalA が検出されており、琵琶湖と比較して下水処理水の寄与が大きいと考えられた。

本研究では、酸加水分解糖類(HCl-HCHO)について組成を調べた。一般に、単糖類をはじめとした低分子の糖類は易分解性であり、冬季の湖水等には残留していないと考えられる。したがって、比較的高分子のオリゴ糖、多糖中の糖類組成を反映していると言える。本研究において得られた糖類組成からは、藻類や細菌等の内部生産に起因する成分が多く、陸域からの影響は小さいことが明らかとなった。

糖アルコール成分は本分析の対象試料からはほとんど検出されなかったが、その他に多くの成分が検出されていることが分かった。現時点で、これらの成分を同定するには至っていないが、試料間で組成の違いが大きいことは明らかであった。したがって、これらの未同定成分に対して GC/MS 等による精密定性分析を実施することにより、DOM 中に含まれる有機物の指標化につなげることが可能と考えられた。

2-3-3 脂質・脂肪酸分析

(1) 分析方法

・脂質の分析方法

ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過した試料 200 mL を凍結乾燥後、クロロホルム/メタノールを加え攪拌し、クロロホルム層を回収した。固相抽出カートリッジ(Sep-Pak Vac 3cc、Silica Cartridge、Waters)に全量を通液した。透過液およびクロロホルム溶出液を回収したものを中性脂質画分とした。次に、固相抽出カートリッジにメタノール 10 mL を通液し、メタノール溶出物を回収してリン脂質画分とした。全ての試料の中性脂質画分、リン脂質画分を窒素吹き付けで溶媒除去後、クロロホルム 50 μ L に溶解し、うち 5 μ L を TLC 分析に供した。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

・脂肪酸の分析方法

TLC 分離した、SL(単純脂質)、TG(トリグリセリド)、FFA(遊離脂肪酸)、DG(ジグリセリド)の溶出位置を掻きとり、メタノリス処理等を行い、クロロホルムに再溶解し、GC(FID)分析に供した。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

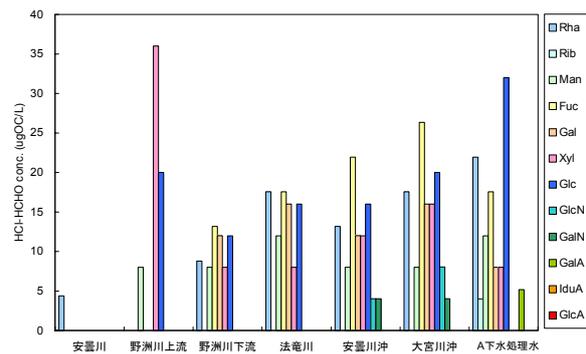


図2-3.2 DOMの糖類分析(濃度)結果(琵琶湖流域)

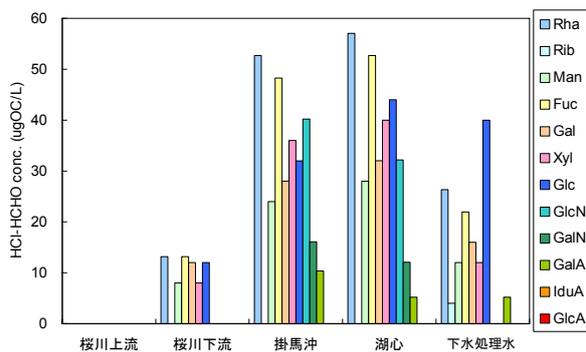


図2-3.3 DOMの糖類分析(濃度)結果(霞ヶ浦流域)

細は H19 年度報告書に記載)

(2) 脂質組成分析の結果および考察

本研究で実施した TLC による脂質組成分析結果を図 2-3.4 に示す。なお、本研究ではリン脂質組成分析も行ったが検出されなかった。これは、有機組成分析を行った試料は冬季に採水したため、藻類等の活動が低かっただけでなく、ろ過した際にガラス繊維ろ紙に捕捉されたためと考えられた。TLC の画像を画像解析し、画像解析で得られた標準試料とスポット強度より 1 点検量線を作成し、TLC 画像のスポット強度より脂質量を計算した。琵琶湖流域および霞ヶ浦流域において得られた DOM の脂質組成割合をそれぞれ図 2-3.5 および図 2-3.6 に示す。琵琶湖流域では、採水地点間で DOM の脂質組成に大きな差が観られ、特に SL (単純脂質) および TG (トリグリセリド) の差が影響していることが明らかとなった。しかし、脂質組成と採水地点の間に一定の関係は観られなかった。一方、霞ヶ浦流域における DOM の脂質組成は、琵琶湖流域におけるそれとは異なり、採水地点間で大きな違いは観られなかった。

次に、TLC により粗分画した脂質クラスごとに GC による脂肪酸組成分析を実施した。各脂質クラスの脂肪酸組成分析の結果、FFA (遊離脂肪酸)、SL (単純脂質) および DG (ジグリセリド) の脂肪酸組成は、試料間で多少の違いは観られるものの、比較的単純な組成であることが分かった。一方、図 2-3.7 より、TG (トリグリセリド) の脂肪酸は、他の脂質クラスと比べて多様であることが明らかとなった。琵琶湖 DOM の脂質および脂肪酸の組成情報は、その多様性を利用することで、分類指標となることが期待できる。

2-4 核磁気共鳴分光法 (NMR)

2-4-1 核磁気共鳴分光法 (NMR) について

NMR スペクトルの横軸は化学シフトで表すのが一般的である。有機物によって NMR スペクトルの形状が変化するためスペクトルの形状から有機物の特性把握が可能と考えられる。Marcolm によるフミン質の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの帰属を図 2-4.1 および表 2-4.1 に示す¹⁴⁾。

2-4-2 $^1\text{H-NMR}$ の分析方法

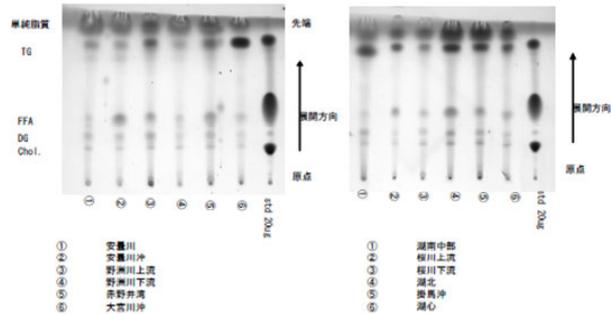


図2-3.4本研究で得られたTLC分析結果

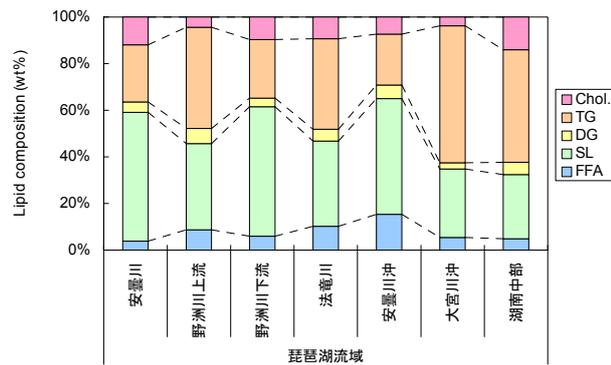


図2-3.5 琵琶湖流域におけるDOMの脂質組成

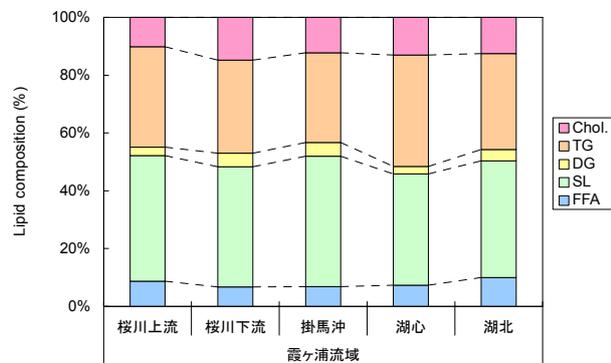


図2-3.6 霞ヶ浦流域におけるDOMの脂質組成

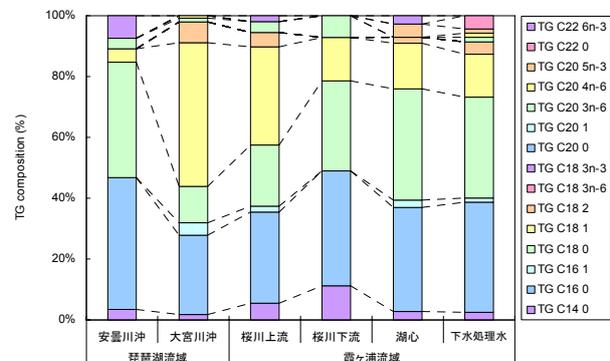


図2-3.7 DOM中脂肪酸(TG)組成の湖沼間比較

ガラス繊維ろ紙 (GF/B) でろ過した試料 200 mL を凍結乾燥して得た粉末試料に DMSO- d_6 を加えて NMR 測定に供した。使用した NMR 装置は、UNITY INOVA 600 型 (バリアン) であった。測定条件は、観測周波数 599.7369 MHz (^1H 核)、 45° パルス (3.4 μsec)、relaxation time 2.184 sec、acquisition time 3.277 sec、sweep width 10,000 Hz、line broadening 1.0 Hz、温度 25°C であった。NMR チューブ径は 5 mm で、回転させずに測定を行った。化学シフトは、重水素化溶媒 (DMSO- d_6) のメチル基 CD_2H シグナル (2.50 ppm) を基準とした。(分析法の詳細は H19 年度報告書に記載)

2-4-3 ^1H -NMR 分析結果および考察

本研究で得られた琵琶湖流域および霞ヶ浦流域における DOM の ^1H -NMR スペクトルの一部をそれぞれ図 2-4.2 および図 2-4.3 に示す。これらの図中の、aroma 領域などで観られるシャープなピークはフタル酸エステル類と考えられるコンタミネーションであることが判明した。DOM は多種多様な有機物の混合物であることから、 ^1H -NMR シグナルは比較的ブロードなピークとなる。したがって、以下ではシャープなシグナル

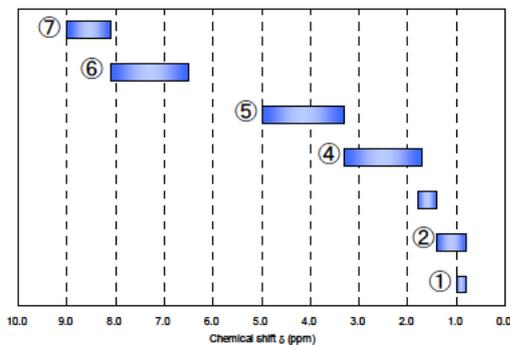


図2-4.1 化学シフトの一般領域

表2-4.1 ^1H -NMRスペクトルの帰属 (Marcolm)

δ (ppm)	Assignment and interpretations
① 0.8-1.0	Terminal methyl groups of methylene chains
② 0.8-1.4	Protons on methyl groups of highly branched aliphatic structures
③ 1.4-1.8	Protons on aliphatic carbons which are two or more carbons removed from aromatic rings or polar functional groups (electronegative groups)
④ 1.7-3.3	Protons attached to aliphatic carbons (methyl and methylene groups) which are α or attached to electronegative groups (e.g., carboxyl group or an aromatic ring)
⑤ 3.3-5.0	Protons on carbons attached to O or N heteroatoms (primarily O in humic substances), e.g., the HCO of saccharides, methoxyl groups, amines and traces of water
⑥ 6.5-8.1	Unhindered aromatic protons
⑦ 8.1-9.0	Sterically hindered aromatic protons, nitrogen heteroaromatics and formate

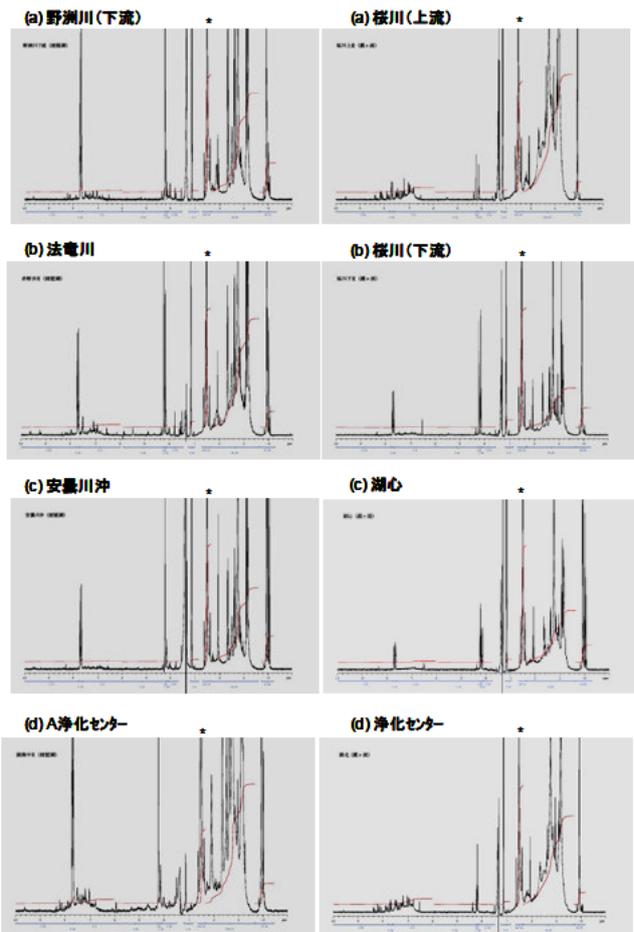


図2-4.2 琵琶湖流域におけるDOMの ^1H -NMRスペクトル (*DMSO- d_6 由来ピーク)

図2-4.3 霞ヶ浦流域におけるDOMの ^1H -NMRスペクトル (*DMSO- d_6 由来ピーク)

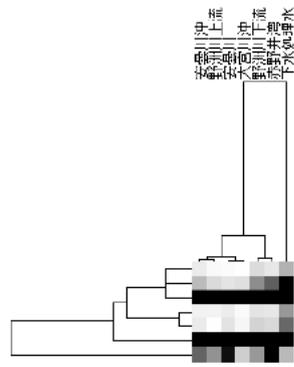


図2-4.4 NMRによる琵琶湖流域サンプルのクラスター解析

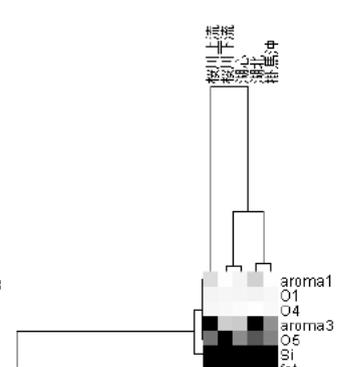


図2-4.5 NMRによる霞ヶ浦流域サンプルのクラスター解析

を無視し、定性的に得られた知見および成果について述べる。

全体的な傾向としては、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域の DOM は脂肪族性に富んだ有機物であることが分かった。低磁場領域（芳香族および二重結合など）では、下水処理水 DOM や一部の河川水 DOM（桜川（上流）、法竜川など）でブロードなピークが観測された。さらに、同じ低磁場領域においてもそのピーク形状は若干異なっているなど、採水地点間の差が観られた。一方、高磁場領域（飽和炭化水素など）では、一連のブロードなピークが観られ、脂肪族性の高さを裏付けていると考えられた。これは、脂質・脂肪酸組成分析の結果とも一致するものであった。図 2-4.4,5 は、各成分を反映するスペクトルの積分値（フタル酸エステルを除く）をもとに、流域ごとで各サンプル間の比較をクラスター解析により行ったものである。琵琶湖では下水処理水、霞ヶ浦流域では桜川上流が他の試料から離れ、類似性が低い結果となった。サンプル数が十分多いとは言えないものの妥当なクラスタリング結果となっており、NMR のスペクトルの形状から有機物の特性把握や発生源の解析も可能となることが分かった。NMR 法は、他の分光法と比べて感度は劣るものの、試料中のすべての観測核を検出できるという網羅性を有しており、得られた ¹H-NMR スペクトルからも DOM 中の多くの成分が同時検出できたことが分かる。今後は、¹³C-NMR および 2D-NMR の適用、もしくは他の分離・分画手法と NMR 法の組み合わせにより、より多くの組成、化学構造に関する情報が得られると考えられる。

2-5 LC/ESI-TOF MS を用いた湖水中溶存有機物の網羅的分析

湖水中の有機物の組成や起源、挙動特性を解明することを目的として、霞ヶ浦流域と琵琶湖流域において採取した DOM に対し、カラムへの吸着特性と精密質量から網羅的分析を試みた。分析法は、高速液体クロマトグラフ装置（HPLC）により DOM を粗分離した後、飛行時間型質量分析計（TOF-MS）による DOM の網羅的精密質量分析を行うものである。TOF-MS では精密質量が得られたため、サンプル間の分子量レベルでの違いや発生源のマーカが探索できる可能性がある。

2-5-1 分析方法

(1) 分析試料

分析試料は琵琶湖水（安曇川沖）、霞ヶ浦湖水（湖心）、霞ヶ浦流入河川水（桜川下流）、下水処理水（茨城県内）、SRNOM (Suwannee River natural organic matter) の 5 種類である。湖水および河川水は、平成 20 年 1 月に採水したものである。SRNOM は国際腐植物質学会（International Humic Substances Society, IHSS）から頒布されているものを約 100 mgC/L に調整したものである。

(2) 前処理

湖水、河川水は GF/B でろ過し、凍結乾燥した後、MeCN/H₂O=25/75 に再溶解し、溶解試料 200 μL をポリプロピレンチューブに採取し、1.5×10⁴rpm、5 分間遠心した。上澄 100 μL を新しいポリプロピレンチューブに移し、さらに、アセトニトリルで 2 倍に希釈して供試試料とした。

(3) LC/TOF-MS 分析条件

LC の分析は、比較的短時間（60 分程度）で幅広く有機物を分離するため、表 2-5.1 に示したグラジエント条件とした。その他の分析条件は以下のとおりである。

HPLC 条件：カラム：ZirChrom（逆相、2.1 mm I.D.×150 mm、5μm、

ZirChrom Separations, Inc.）、

カラム温度：35°C

移動相：移動相 A 液：20 mM AcONH₄ in water

移動相 B 液：Acetonitrile

流量：0.2 mL/min

注入量：50 μL

UV 検出器：254 nm

表2-5.1 グラジエント条件

時間(分)	移動相A液 (%)	移動相B液 (%)
0	95.0	5.0
3	95.0	5.0
15	5.0	95.0
40	5.0	95.0

質量分析条件：使用装置：飛行時間型質量分析計（島津製作所:LCMS-IT-TOF）

イオン化方式：ESI

インターフェース電圧：4.5 kV

CDL 温度：200°C

データ採取時間：40分

測定範囲（MS）： m/z 100-3000

測定イオン：正イオン，負イオン

ネブライズガス流量：1.50 L/分

ヒートブロック温度：200°C

検出器電圧：1.80 kV

(4) ピーク抽出条件と解析

質量分析計で得られた正イオンと負イオンデータに対して、ピーク抽出ソフト（Mass++ ver. 1.4.0）にてピークピックアップを行い、保持時間、 m/z 値、ピーク高さの3項目の情報を得た。さらに、正イオンと負イオンでのピーク抽出結果を用い、それぞれ Cluster3.0 ソフトを用いたユークリッド距離法によるクラスター解析を行いサンプル間の類似性を解析した。

2-5-2 分析結果

図 2-5.1 に正イオンで取得したトータルイオンクロマトグラム（TIC）と保持時間 0~5 分、5~18 分、18~40 分の積算質量スペクトルを示す。本分析では、逆相系カラムを用い、アセトニトリル濃度を高めていくグラジエント分析していることから、0~5 分間に検出される化合物は親水性物質、18~40 分間は、疎水性物質、5~18 分はその中間的な極性を有する化合物を検出していると考えられる。図よりシャープなピークを無視し、各保持時間の質量スペクトルの特徴をみると、0~5 分間は、琵琶湖、霞ヶ浦、河川水、SRNOM とも m/z 300 付近を中心に分布する質量スペクトルが得られた。この 0~5 分間のイオン強度は、正イオンより、負イオン分析の方が高くなる傾向を示した。下水処理水のみで m/z 700 付近を中心とする 22 u（もしくは 44 u、すなわち CO_2 ）の等間隔の特徴的なシグナル群が観られたが化合物の特定まではできていない。5~18 分間の質量スペクトルは、各試料とも m/z 500 付近を中心に分布する質量スペクトルが得られ、試料間で大きな違いは観られなかった。18~40 分間の質量スペクトルは、正イオンモードでは、琵琶湖湖水では m/z 700 付近、霞ヶ浦では m/z 500 付近を中心に分布する質量スペクトルがみられた。

図 2-5.2 は、Mass++ソフトで抽出され

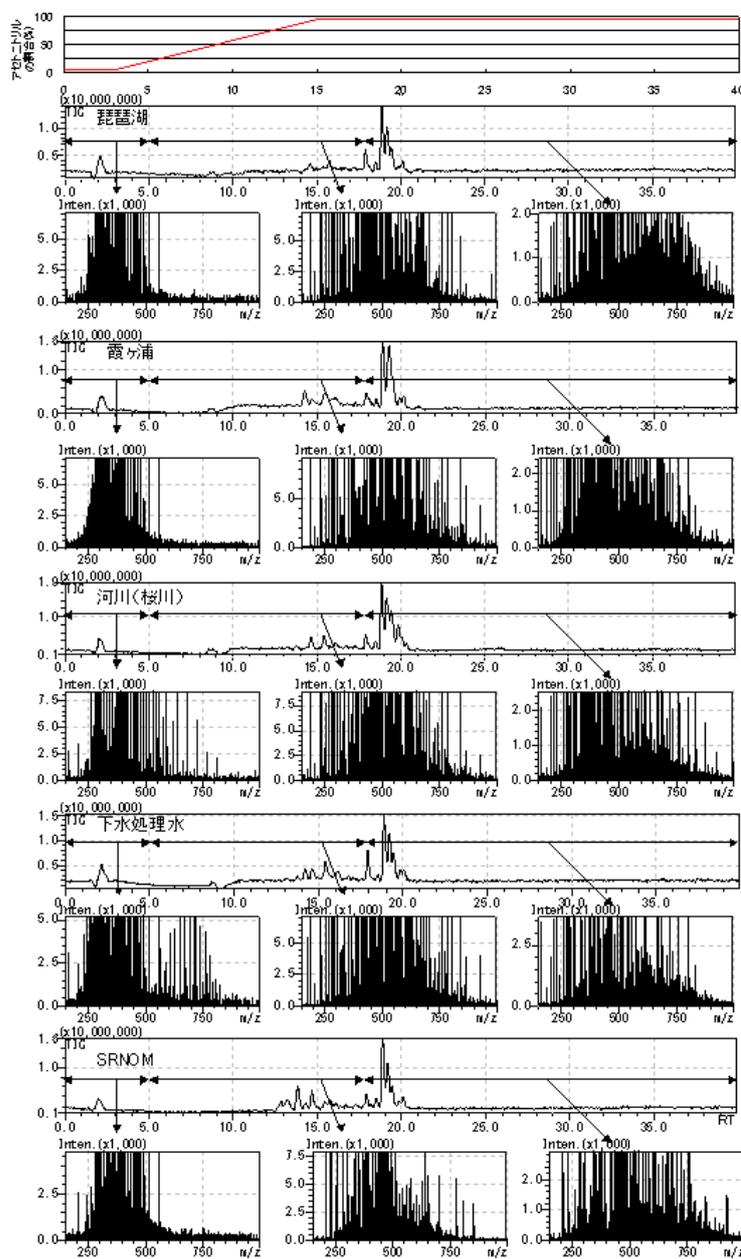


図2-5.1 LC-TOF-MSによる琵琶湖、霞ヶ浦、河川水、下水処理水、SRNOMの分析結果(正イオン)

た正イオンのピーク情報（保持時間、 m/z 値、ピーク高さ）から、霞ヶ浦と琵琶湖特有化合物について保持時間と m/z の関係でピーク位置をプロットしたものである。正イオンモードで保持時間と m/z のピーク位置のプロットパターンを霞ヶ浦と琵琶湖で比較すると、琵琶湖では、保持時間 20~40 分の疎水性有機物が検出される区間で、 m/z 800 付近にプロットが集中する傾向がみられた。負イオンではこの傾向はみられなかったことから、この物質はプラスに帯電しやすい物質であることが分かる。正イオンと負イオン分析では、ピーク位置のプロットパターンが異なることがわかった。

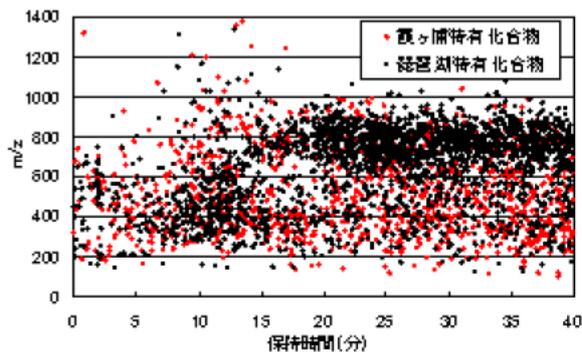


図2-5.2 霞ヶ浦と琵琶湖特有化合物の保持時間と m/z の関係(正イオン)

図 2-5.3 は、正イオンで検出されたピーク情報をもとにクラスター解析を行った結果である。LC/MS による網羅的 DOM の検出と統計解析を組み合わせることにより、試料間の DOM の類似性評価や指標マーカーの検索が行えるものと考えられた。

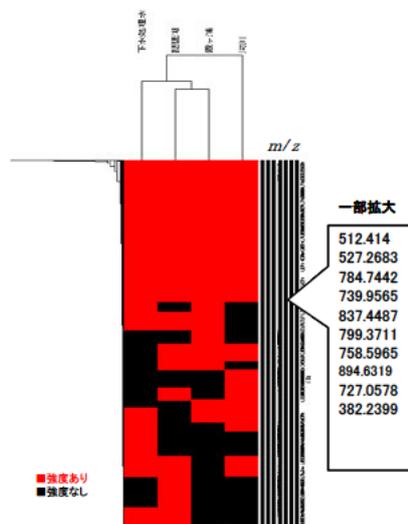


図2-5.3 正イオンピークによるクラスター解析結果

2-6 溶存有機物の分画

2-6-1 ロータリーエバポレーターによる濃縮と分取 HPLC による分画

平成 19 年 1 月に、琵琶湖安曇川沖湖水をポリ容器に 1000 L 採水した。採水水深は、1 m 地点としポンプでくみ上げ、採水した湖水は、試験に供すまで 4 °C の冷暗室で保存した。

採水した湖水はガラス繊維ろ紙(ADVANTEC GB-140、保留粒子径 0.4 μm)で吸引ろ過し、ろ過後の湖水 300 L をロータリーエバポレーター (容量 2 L、水温 55°C、減圧) で濃縮し、全量を 500 mL とした。この 500 mL 溶液を遠心分離(3,000 rpm、5 分間、室温)し、上清を回収した。回収した上清をガラス繊維ろ紙(ADVANTEC GB-140、保留粒子径 0.4 μm)でろ過し、ろ液についてロータリーエバポレーター (容量 2 L、水温 55°C、減圧) で 60 mL まで濃縮 (最終濃縮倍率 = 約 5,000 倍)した。

(1) 濃縮溶液の精製

(1)-1 Sephadex カラムを用いた琵琶湖溶存有機物の精製

濃縮試料には、多量の無機塩が含まれており、IR、NMR、質量スペクトルにより構造解析するためには、これらの分析に際して妨害すると考えられる無機塩を除去する必要がある、ここでは Sephadex カラムによる有機物の精製を試みた。予め蒸留水で十分に膨潤させた Sephadex G-25 SUPERFINE を内径 2 cm のガラス製カラムに高さ 15 cm まで充填した。蒸留水 200 mL を通液して洗浄した後、5,000 倍濃縮湖水 1 mL をカラムに負荷し、蒸留水を 1 mL/min で通水させ、溶出液の 0 ~ 30 mL (S1)、30 ~ 35 mL (S2)、35 ~ 40 mL (S3)、40 ~ 45 mL (S4)、45 ~ 100 mL (S5)の 5 画分を分取した。次に、分取した 5 画分を表 2-6.1 に示した条件で HPLC 測定 (UV 検出) した。HPLC の分析では、予備検討で湖水の親水性 DOM の分離能が良かったアミノプロピルカラムを使用した。その結果 S3、S4 画分に有機物が含まれていることがわかった。

(1)-2 HPLC 分取

Sephadex カラムで精製した後の溶液(S3 と S4)を表 2.6-1

表 2.6-1 HPLC の分析、分取条件

HPLC :	LC-6A (Shimadzu)
カラム :	Mightysil NH2 4.6 mm ϕ × 250 mm (5 μm)
カラム温度 :	40°C
移動相 :	90%CH ₃ CN/Water-(20min)-10 % CH ₃ CN/Water
流量 :	0.8 mL/min
検出器 :	UV (220 nm)

の条件で HPLC 測定し、UV220 nm で検出されたピーク部位 (P0,P1,P2,P3,P4,P5) を分取した。数百回分取作業を繰り返し、得られた分取溶液 (約 100 mL) をロータリーエバポレーター (容量 0.15 L、水温 55℃、減圧) で 5 mL まで濃縮した後、窒素気流で濃縮乾固した。分取物は、超純水に再溶解し、各分取物の EEM 測定を行った。

HPLC 分取した成分のうち試料 P4(上記 S3 に含まれている 4 番目のピーク)については、超純水に再溶解させ、2-6-1 に記した方法で Sephadex カラムで再精製を行い、ロータリーエバポレーター (容量 0.15 L、水温 55℃、減圧) で濃縮した後、窒素気流で濃縮乾固し、FT-IR、¹H-NMR、LC/ESI-MS による構造解析用試料とした。

(2) HPLC 分画の結果

Sephadex カラム処理前の HPLC の分析結果を図 2.6-1 に、処理後の結果を図 2.6-2~6 に示す。Sephadex カラムで処理を行い、各フラクションを HPLC 法で分析した結果、フラクション S3 に P0,P1,P3,P4,P5 の成分が、S4 に P2 の成分が存在することが分かった。

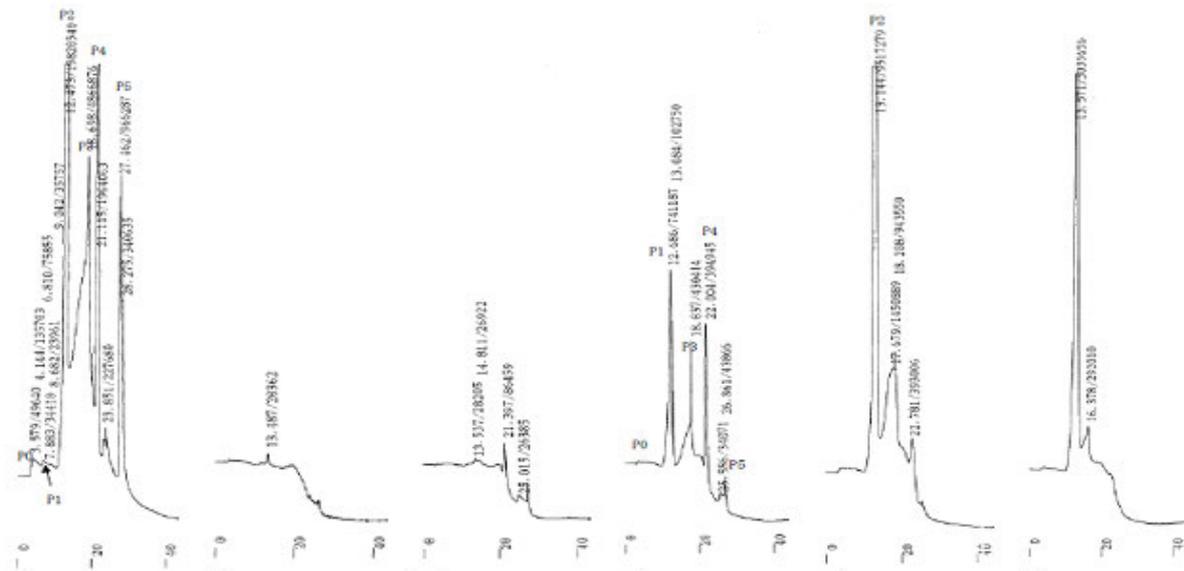


図 2-6.1 湖水の濃縮溶液のクロマトグラフ
 図 2-6.2 Sephadex カラム 精製 (保持容量: 0 ~ 30ml、S1)
 図 2-6.3 Sephadex カラム 精製 (保持容量: 30 ~ 35ml、S2)
 図 2-6.4 Sephadex カラム 精製 (保持容量: 35 ~ 40ml、S3)
 図 2-6.5 Sephadex カラム 精製 (保持容量: 40 ~ 45ml、S4)
 図 2-6.6 Sephadex カラム 精製 (保持容量: 45 ~ 50ml、S5)

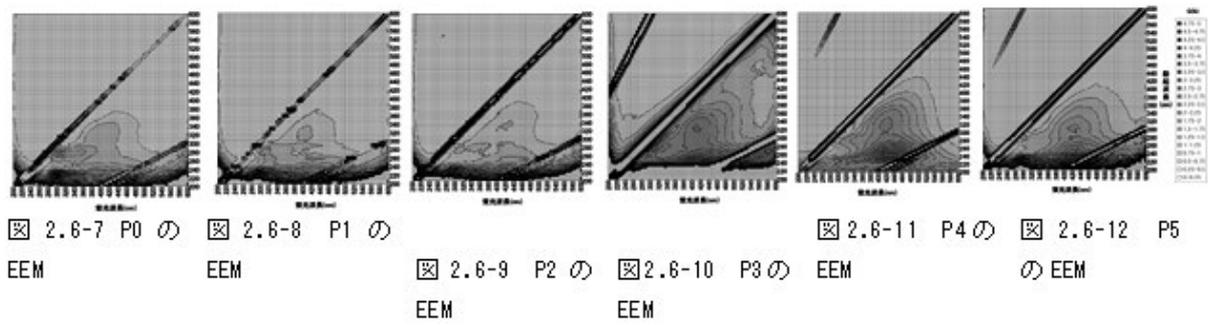


図 2.6-7 P0 の EEM
 図 2.6-8 P1 の EEM
 図 2.6-9 P2 の EEM
 図 2.6-10 P3 の EEM
 図 2.6-11 P4 の EEM
 図 2.6-12 P5 の EEM

P0,P1,P2,P3,P4,P5 の 3D-EEMs 分析結果を図 2.6-7~12 に示す。P0 の疎水性画分のスペクトルは、タンパク質様物質のピークの強度が高く、P4 の親水性画分のスペクトル形状は、河川や湖沼で観測されるフルボ酸様物質のピークが高いことがわかった。

2-6-2 IR、NMR、LC/ESI-MS の測定結果と部分構造推測

湖水 DOM の主要成分と考えられる試料 P4 に対して構造解析を試みた。試料 P4 の NMR、LC/ESI-MS、IR 測定を行った結果を図 2-6.13,14,15 に示す。以下、各スペクトルから推測された部分構造等について考察する。

$^1\text{H-NMR}$ 測定結果より、溶媒ピーク (HOD) よりも高磁場側の領域において、幾つかの鋭いシグナルと DOM 等に特徴的なブロードなピークが観られた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、1.0~1.5 ppm および 1.9~2.2 ppm にブロードなピークが観察された。1.0~1.5 ppm のブロードなピークは脂肪族性プロトン (メチル基およびメチレン基)、1.9~2.2 ppm は二重結合またはカルボキシル基等につなが α 位水素 ($-\text{CH}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$) と推定された¹⁴⁾。

今回の $^1\text{H-NMR}$ 測定では、芳香族性プロトンは観測されなかった。これは、測定に供した試料が本質的に芳香族性がない (もしくは低い) ためか、試料中に含まれる痕跡量の常磁性核種によるものかは現時点では判断はできない。LC/ESI-MS の測定結果より、ES+、ES-ともに、 m/z 300 以上で一連のシグナルが観測されたが、分画・精製が不十分なため、現段階ではモノアイソトピック質量を議論することはできない。しかし、TIC (トータルイオンクロマト) の溶出時間の異なるピークにおいてマススペクトルを抽出して比較すると、異なったパターンを示した。このことは、本研究で採用した順相 HPLC 法により極性に基づいて試料 P4 が分画されていることを示す結果である。また、クロマトグラムから抽出した多くのマススペクトルにおいて、約 14 u 間隔 ($-\text{CH}_2-$) のラダーが観られ、さらに 2 u 間隔 (H_2) のシグナルの存在が明らかとなった。これは、試料 P4 の主要な構成成分 (部分構造) が不飽和度の異なる脂肪族性であることを意味し、 $^1\text{H-NMR}$ の結果と一致する結果である。

質量分析を用いてより詳細な構造情報を得るためには、LC 部における分離能および MS 検出部における分解能および感度を向上させる必要がある。

IR 測定結果から、 $3,400\text{ cm}^{-1}$ 付近、 $1,600\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$ 付近、 $1,100\text{ cm}^{-1}$ 付近に赤外吸収ピークが観察された。 $3,400\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収は、OH 基に由来するものと考えられる。 $1,600\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$ 付近の複数のピークは、カルボキシル基の C=O 伸縮による吸収とアルケン由来の吸収と推定される。 $1,100\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収は、不純物として精製されずに試料中に残った硫酸由来のシグナルと推定された。

IR 測定は簡便、少量、短時間等の利点を有する分析法であるため、湖沼に蓄積する難分解性有機物の簡易分析手法としても期待できるものである。前処理方法等の検討を重ねることにより、IR による新規評価指標および手法が確立できるものとする。

以上の結果より、米国 Suwannee River 等のフミン質 (疎水性-酸性) 画分が主要構成成分であるとの報告例¹⁵⁾とは異なり、我が国の代表的な湖沼である琵琶湖の溶存有機物が脂肪族性に富んだ有機酸であることが示唆された。本分析方法では、HPLC 法で極性の違いにより湖水の溶存有機物は、おおよそ分離できたものの、分取物の IR、NMR スペクトルのシグナルはブロードとなり、MS スペクトルでは、特異なピークは観測されなかった。これは、Sephadex カラム法により無機塩は除去されてはいるものの、完全には除去されていないためと考えられた。従って、IR、NMR、MS による分析では、無機塩に妨害された結果として有機物由来のピークが明確に観測できなかった可能性もある。溶存有機物の構造情報を得るためには、無機塩を除去する方法を確立することが重要である。さらに、分取した有機物は、微細構造が異なる様々な類似した多種多様な有機物の混合物であると考えられる。さらに精密に分離・同定するためには、2 次元、3 次元 HPLC 法の適用も考えられるが、これらの方法を適用しても単有機物質に単離できない可能性もある。

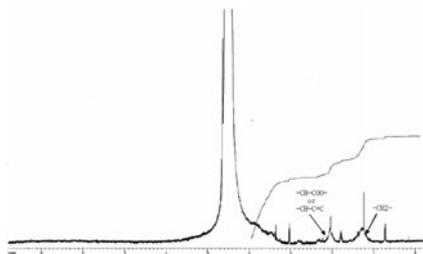


図2.6-13 P4画分のNMRスペクトル

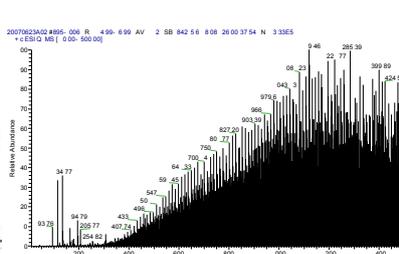


図2.6-14 P4画分のMSスペクトル

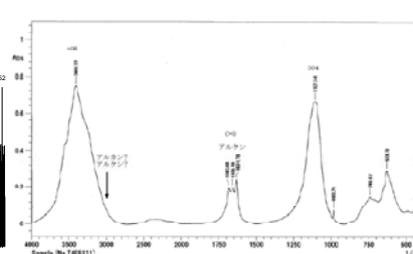


図2.6-15 P4画分のFT-IRスペクトル

2-6-3 固相カートリッジによる有機物の分画法

1970年代には、米国地質調査所(USGS)のグループを中心に非イオン系ポリマー吸着樹脂を用いてDOMを6画分に分画する手法(XAD-8法)の開発が行われた¹⁶⁾。XAD-8法では各画分に含まれる有機物の構造や組成についての詳細な情報は得られない。さらに、樹脂洗浄や分画操作が非常に煩雑であるなどの実験操作上の課題がある。環境(有機)分析の場合、試料中の夾雑物が多くマトリックスが複雑であるため、「分離」がとても重要な意味を持つ。また、成分によって存在濃度が大きく異なるため、ダイナミックレンジの広い検出方法が必要不可欠である。LC/MS法が化学物質の定性・定量に有効な手法であることに鑑み、LC/MS法の前処理として汎用的に用いられている固相抽出法に着目して新規分類方法の提案を行う。

代表的な前処理技術のひとつである固相抽出法(SPE)は、分析試料の濃縮・精製を少量、簡便、短時間、現場での適用が可能である等の多くの利点を有し、多検体の微量分析を行う場合には非常に効率的な方法である。一方で、HPLCは最も汎用的な分離手法で、高精度かつ高分離能を有し、多様な分離モードを組み合わせることが可能である(多次元HPLC)。本研究で提案する固相抽出法による湖沼有機物の分類方法は多次元HPLCの1次元目に位置付けることができ、その後続くHPLC分離、MS分析と同様に重要な要素と言える。MS分析には、HPLCとの相性が良く、生体分子などの分析では欠かせないESI-MS法の採用を想定した操作条件で行うこととした。

2-6-3-1 実験方法

(1) 装置

溶存有機炭素(DOC)濃度は、島津TOC-V_{CPH}を用い、2N HClを添加してNPOCとして測定した。固相抽出カートリッジによる溶存有機物(DOM)の分画にはWatersコンセントレーターを用いた。

(2) 分析試料

固相カートリッジによるDOM分画に供した水試料は、平成21年11月に採取した霞ヶ浦湖水(湖心、釜谷沖)、流入河川水(桜川、新利根川)および茨城県内下水処理場の放流水であった。さらに、本研究では比較対象として同年9月に琵琶湖・安曇川沖中央にて採取した琵琶湖表層水および国際腐植物質学会(IHSS)から頒布されているSRNOMを用いた。採取した水試料は、氷冷しながら実験室に持ち帰ってガラス繊維ろ紙GF/B(0.1 μm、Whatmann)でろ過した後、窒素、リンなどの水質項目の分析も併せて実施した。

(3) 操作

・固相抽出剤のコンディショニング

本研究では、固相カートリッジを単体もしくは最大で5つ連結した状態でコンセントレーターを用いてコンディショニングを実施した。まず、メタノールを流量1 mL min⁻¹で30分間(30 mL)流して充填剤のwettingおよび洗浄を行った。その後、超純水を流量3 mL min⁻¹で334分間(約1 L)通水させることによりカートリッジ内に残留したメタノールを洗い出した。また、コンディショニング直後にカートリッジを使用できない場合は、使用直前に超純水によるフラッシング操作(3 mL min⁻¹、100分)を行ってから使用した。いずれの場合も、使用直前の固相カートリッジから溶出する水のDOC濃度は、0.1 mgC L⁻¹以下であることを実験的に確認した。

・実験操作

採取した水試料はGF/Bでろ過した後、できるだけ速やかに分画操作を施した。本研究では、複数のメーカーから市販されている固相抽出剤を用いて検討を行い、吸着容量、簡便性等の観点からOasis系固相カートリッジ(Waters)を組み合わせてDOMを分画することにした。本研究では、Oasis HLB、MCX、WAX、MAXの順に連結させてDOM分画を行った。試料水をコンディショニングした固相カートリッジに流量2 mL min⁻¹で通水させ、初流3 mLを排水した後に100分間(200 mL)処理(ロード)を行った。なお、本研究では、ろ過した水試料に対してpH調整等の前処理は実施していないため、供試pHはほぼ中性付近であった。各カートリッジへのDOC分布は、各カートリッジ前後のDOC濃度の差で評価し、充填剤からの回収実験等は行っていない。ブランクは、コンディショニング終了直前もしくはカートリッジ使用直前のカートリッジ溶出水のDOC濃度とし、各測定値

から差し引くことで補正した。

本研究では、既往の研究により我が国の一般的な表層水では酸性画分（親水性、疎水性）の割合が多いことを考慮して、HLB で疎水性-中性画分（HoN）、MCX で塩基性画分（Base）、WAX および MAX で 2 つの酸性画分をカートリッジで捕捉させ分画するシステムとした。なお、本研究では、4 つの固相カートリッジに保持されずに通過した画分を親水性-中性画分（HiN）と定義した。

2-6-3-2 分析結果と考察

本研究では固相カートリッジを用いた DOM 分画手法の検討を行い、霞ヶ浦流域において採取した湖水、河川水および下水放流水に適用した。その結果を図 2-6.16 に、また比較対象として琵琶湖水（安曇川沖中央）および IHSS 標準物質（SRNOM）を用いて同様の分画操作を行った結果を図 2-6.17 に示す。

図 2-6.16 より、霞ヶ浦（湖心、釜谷沖）では地点間での違いは観られなかったが、河川水（桜川、新利根川）および下水放流水の DOC 分布とは異なることが検出できた。桜川（下流）の DOC 分布が下水放流水のそれに似ていることから、桜川（下流）の有機物組成は人為的な影響を強く受けていることが示唆された。農業系河川に分類される新利根川の DOC 分布は、HoN、Acid (WAX) および HiN 画分が多く、湖水の DOC 分布と近いことが明らかとなった。これは、3 次元蛍光法（EEM）による結果と一致しており、霞ヶ浦における DOM は農業系土地利用由来の有機物の寄与が大きいことが明らかとなった。

図 2-6.17 より、琵琶湖水（安曇川沖）の DOC 分布は霞ヶ浦湖水のそれよりも桜川（上流）のそれに近いことから、秋季の琵琶湖 DOM の有機物組成は森林系土壌有機物の寄与が大きいことが示唆された。また、SRNOM の DOC 分布は、霞ヶ浦および琵琶湖の DOC 分布と異なっており、本法の適用によって有機物の発生源等の異なる水系の DOC 分布の差を評価できることが明らかとなった。

流域内および湖沼間比較を通して、本研究で開発した固相カートリッジを用いた DOM 分画法の適用により発生源の違いを検出できることが明らかとなった。また、本法のコンディショニング等の準備が 1 日程度でできることから、従来の XAD-8 法と比べて格段に迅速・簡便な方法であることが特徴である。

今後は、より詳細な化学構造・特性に関する情報を得るために、固相カートリッジ上に捕捉した有機物を有機溶媒等で溶脱させて機器分析に供する必要がある。溶脱に使用する溶媒、緩衝液などの条件は、各画分の物理化学的特性および後段の分析機器との相性も考えて確立していく必要がある。

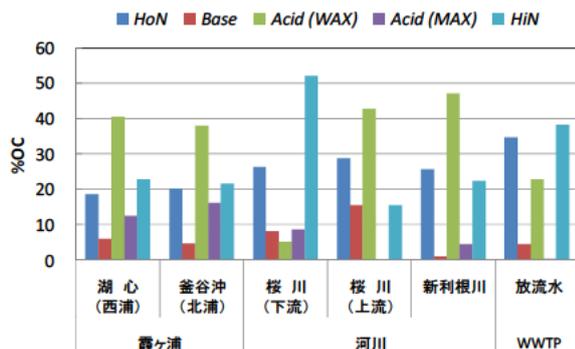


図2-6.16 Oasis系固相カートリッジによるDOM分画の結果(霞ヶ浦流域)

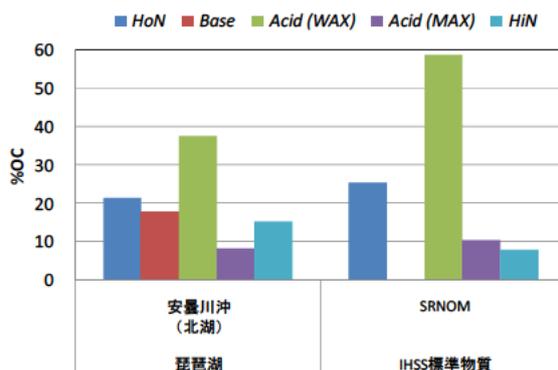


図2-6.17 Oasis系固相カートリッジによるDOM分画の結果(琵琶湖およびIHSS試料)

2-7 LC/ESI-Single Q-MS を用いた湖水中溶存有機物の分析条件の最適化

2-7-1 研究概要

2.5 の LC/ESI-TOF-MS を使用することにより有機物全体の特性把握が可能となることが示唆された。しかし、TOF-MS は精密質量情報が得られるもの的高額な分析機器であり、分析にあたっては分析費用をはじめとする様

々な制約が生じる。そこで、TOF-MS よりも簡易でより一般的な Single Q-MS(四重極型質量分析計)を用いた有機物特性把握法も必要と考えて分析手法の開発を行うこととした。Single Q-MS は、TOF-MS より質量分析の精度が高くないため、single Q-MS で有機物のピークを高感度検出するためには、有機物のイオン化を妨害する無機塩の除去、および、前段の高速液体クロマトグラフでの有機物の分離能を向上させる必要がある。そこで、無機物質の脱塩が簡易に行えると考えられる電気透析の湖水への適用と無機塩の有無が LC-ESI Single Q-MS 分析に与える影響を調査した。さらに、湖水 DOM の分離能の優れた最適なカラムの検索を行った。カラムの選定にあたっては、DOM は湖水中溶存有機物の物理化学的特性が広範囲にわたることに鑑み、分離能に優れた逆相カラムに加えて、SEC (サイズ排除) カラム、近年注目されている HILIC (逆-逆相) カラムを用いることとした。HILIC 分離モードでは、疎水性～親水性までの広範囲にわたる成分を分離することができること、移動相が有機溶媒リッチな条件(順相)で利用できるために固相抽出法 (SPE) や ESI-MS 法との相性がよいこと等の利点を考慮した。

さらに、脱塩と同時に親水性から疎水性有機物の濃縮が可能な固相カートリッジ (Oasis HLB) の溶出画分について、LC-ESI-MS による測定を行い、TIC やマススペクトルから有機物の特性把握を行った。

2-7-2 無機物質が LC-ESI-MS に与える影響

質量分析は DOM の特性把握の有効手法ひとつであると考えられるが、無機物質は質量分析のイオン化・感度を低下させる。湖水には多量の無機物質が含まれており、DOM の質量分析の際にあらかじめ無機物質の影響を把握しておくことが重要である。

琵琶湖水の DOM 濃縮液を電気透析装置に供し、無機成分の除去特性およびその際の有機態炭素の回収率を評価した。さらに、電気透析法による脱塩の有効性を検討するため、無機成分の影響を受けやすいと考えられるエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を用いて検討を行っ

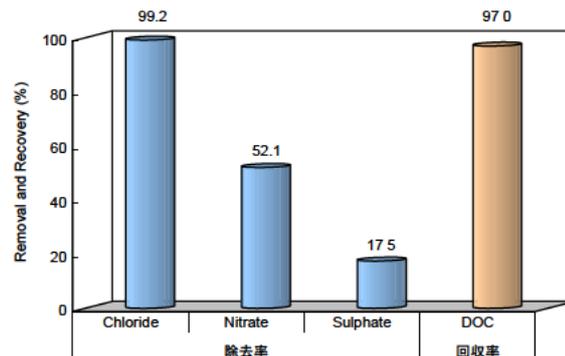


図2-7.1 RO濃縮液(琵琶湖水)への適用結果 (分画分子量:陽・陰イオンともに100 Da)

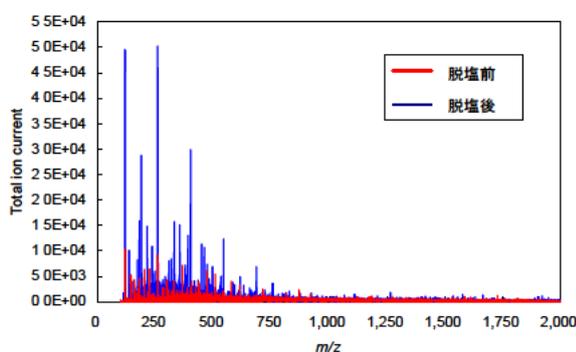


図2-7.2 電気透析前後のESI-MSスペクトルの変化

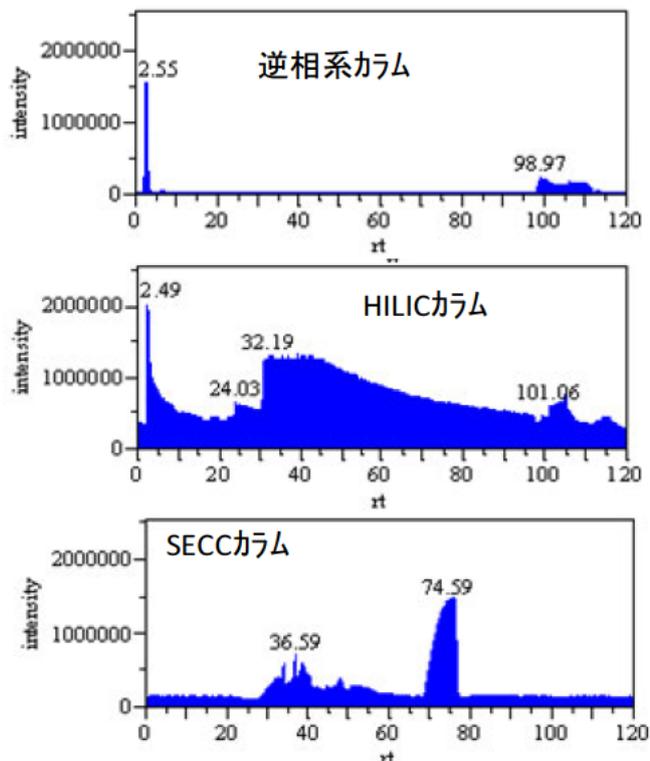


図2-7.3 カラムの種類とTICの関係

た。ESI-MS 分析はフローインジェクション法により行い、電気透析処理前後の質量スペクトルの比較を行った。なお、本研究で使用した質量分析装置は、四重極型 LC MSD (Agilent) であった。

琵琶湖水の RO 濃縮液に対して電気透析処理を行った結果を図 2-7.1 に示す。図 2-7.1 より、RO 濃縮液の電気透析処理において、定性的にイオンの価数が低く、溶媒和イオン半径が小さいイオンほど、高い膜透過性（除去率）を示した。さらに、DOC をほぼ全量回収できており、本法が DOM 濃縮液の脱塩、精製に有効であることを示すことができた。

電気透析処理が DOM の ESI-MS スペクトル（ポジティブモード、ES+）に与える影響を図 2-7.2 に示す。電気透析前後で TIC (total ion current) が 20%程度上昇しただけでなく、いくつかの特徴的なシグナルが検出されるようになったことが分かる。このことは電気透析によって RO 濃縮液中から溶存無機成分が除去され、イオン化抑制 (ion suppression) が低減したことによると考えられた。

2-7-3 カラムの選定

(1) 本研究で使用した天然有機物 (natural organic matter, NOM)

本研究で用いた試料は、琵琶湖・北小松沖にて採取した後、前ろ過、陽イオン交換による前処理を施し、逆浸透膜による濃縮を行ったものである。これに、同体積のアセトニトリルを加えて 2 倍希釈したものを供試した。ここで、添加溶媒としてアセトニトリルを選択したのは、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) では、対象化合物を溶解できる（水、極性有機溶媒）こと、微細な帯電液滴を形成させやすい（低溶媒粘度）こと、LC カラムとの相性などを考慮したためである。NOM 中には、多種多様な物理化学的特性を有する物質が混在していることから、すべての成分について分離、イオン化等の条件を最適化することは不可能である。ここでは、添加剤として酢酸アンモニウム (AcONH₄) 25 mM を加えた系において、主にカラムの選定やグラジエントの効果を LC/ESI-MS 法から検討した。

(2) 本研究で使用した装置および分析条件

本研究では、LC-MS 装置に Agilent 1100-1200 シリーズを用い、逆相モード、HILIC モード、SEC モードのそれぞれ数種類の LC カラムを用いて UV クロマトグラム、TIC クロマトグラム、質量スペクトルを比較することにより分離特性の評価を実施した。本研究における主な質量分析条件は、表 2-7.1 の通りである。なお、MS 分析条件は、DOM が複雑な混合物であることを考慮して比較的標準的な条件としている。また、UV 検出器では、波長 254 nm において UV クロマトグラムを得た。

表2-7.1 質量分析条件

• Ionization mode	: API-ES
• Polarity	: 正、負
• Mass range	: 100 – 1,500
• Fragmentor	: 70 V
• Gas temp.	: 350°C
• Drying Gas	: 10.0 L/min
• Neb. Press.	: 40 psig
• Cap. Vol.	: 3,000 V (Pos, Neg)

(3) 分析結果

四重極 MS では原理的に精密質量が得られないため、ここでは主に TIC クロマトグラムで DOM の分離能を比較した。図 2-7.3 は、逆相、HILIC、SEC カラムのイソクラティック溶出（0~120 分間：acetonitrile15%）での分析結果の一例を示す。

一般に、我が国の淡水系 DOM の主要成分は酸性画分であり、かつ親水性の高いことが知られており、逆相系カラムでは保持されないことが知られている。本研究においても複数メーカーのいずれの逆相系カラムでも、DOM 成分を保持することができなかった。一方、HILIC 系カラムでは、充填材の表面官能基の特性の違いに起因してクロマトグラムの形状は異なるものの、逆相系カラムと比べてよい保持挙動が観られた。DOM は多種多様な官能基を有しており、充填剤との相互作用も多様であることから、それらの差異に基づいて分離（保持）されたものと考えられた。

SEC 分離モードは、一般的に逆相系モードやイオン交換モード比べて分離能は劣るものの、DOM の基本的特性である分子量（サイズ）情報が得られる点で非常に優れた手法である。SEC 分離モードの結果、UVA₂₅₄ クロマ

トグラム上ではシグナルの観られない位置、RT=75分付近に無機物質と考えられるピークがみられることがわかった。DOMはRT=36分付近と考えられ、無機物と有機物のピークを分離することができた。

2-7-4 SPE-LC-MSによるDOMの特性把握の試行

平成22年1月に霞ヶ浦北浦の湖水（北浦大橋から採水）と銚田川の河川水を採水し、ここでは親水性から疎水性有機物を幅広く濃縮回収できる Waters 社製の Oasis HLB の1種類のみを用いて湖水と河川水の固相抽出を行った。固相抽出の条件を図2-7.4に示す。抽出試料を LC-Single Q-MS（Agilent 社製 MSD SL）による SCAN 分析を行った。LCの条件はグラジエント分析とし、カラムは2-7-3の検討の中でグラジエント分析の際にノイズが少なかった逆相系のジルコニウムカラムを使用した。HPLC、Single Q-MSの分析条件を表2-7.2に示す。

図2-7.5は、北浦湖水、銚田川の TIC から操作ブランク（純水に対してサンプルと同操作を行ったもの）TICを差し引き、このブランク補正を行った北浦 TIC から、ブランク補正を行った銚田川の TIC を差し引いたものである。図より正イオン、負イオンとも+側に TIC 強度が高くなっており、北浦の有機物濃度が高いことがわかる。正イオンでは、30分付近、負イオンでは25分付近で、北浦の TIC が高くなることがわかった。このときのマススペクトルを図2-7.6に示す。マススペクトルは、操作ブランク補正ができなかったため、操作ブランクのマススペクトルも示した。今回の分析では、操作ブランクでもピークが検出されており、湖水や河川水に由来する有機物を抽出することが難しいが、図よりおおよその傾向を読み取ると、TIC が最も高くなった保持時間では、北浦で m/z 300~400 のピークが高くなっていることがわ

表2-7.2 HPLC分析条件

・機器名	: Agilent 1100
・移動相	: A液0.1%ギ酸水 : B液0.1%ギ酸アセトニトリル グラジエント分析
・カラム	: ZirChromMS (逆相, 2.1 mm I.D. × 250 mm 3 μm, ZirChrom Separations, Inc.)
・カラム温度	: 40° C
・注入量	: 20 μL
・流速	: 0.2ml/min



図2-7.4 固相抽出の操作手順

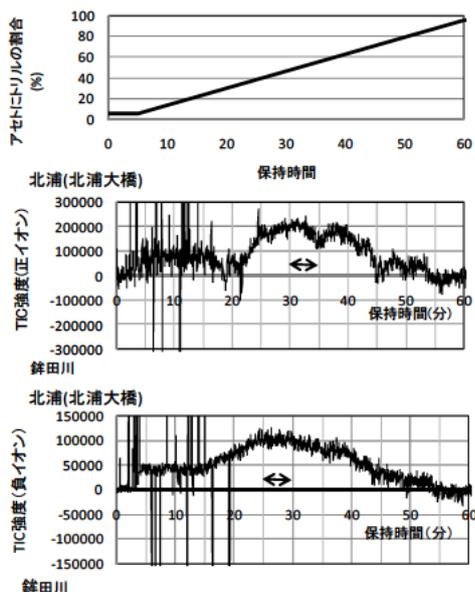


図2-7.5 北浦と銚田川のTICの差

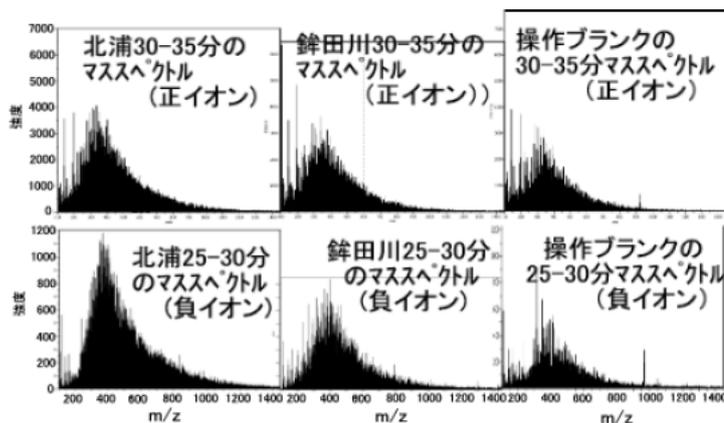


図2-7.6 北浦と銚田川のマススペクトル

かる。これらのシグナル群はグラジエントの条件から判断すると疎水性物質である可能性があった。今回は HLB 画分だけの試行であったが、有機物の吸着特製の異なる様々なカートリッジを使用し、その濃縮成分を LC/MS 分析することにより、多次元での有機物の特性把握が可能となることが示された。

2.8 まとめ

湖沼に蓄積する DOM の発生源や挙動を明らかにするためには、質的特性を評価できる分析法が必要であった。湖沼の水質管理で利用されている COD や TOC では有機物の質的特性は把握できないことから、新たな分析法を湖水 DOM の測定に適用する必要があるがあった。湖水中の DOM は多種多様な化学物質の混合物であり、これらの基礎的情報を入手することができれば、簡易分類指標および手法を開発することが可能となり、水環境のモニタリングや発生源の推定さらに流域対策につなげることができるものと考えられる。本章では、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域を主な対象流域として、湖水に蓄積される DOM の質的特性を既存の様々な分析法から明らかにするとともに、湖水中の DOM の全体像の質的特性を把握するための手法の開発を行った。本章で行った分析は表 2-8.1 のとおりであり、以下に得られた結果をまとめて示す。

- (1) EEM による湖水の性状把握は、蛍光性物質に限定されるものの、琵琶湖および霞ヶ浦における網羅的な採水調査の実施により、湖沼間や季節により EEM スペクトルの形状が異なることを明らかにした。EEM は湖水 DOM の質的变化を簡便に検出できる手法であることを明らかにした。
- (2) EEM を河川水および下水処理水に適用した結果、河川水と下水処理水では EEM スペクトルの形状が異なることが明らかとなった。河川水中 DOM の EEM 分析により、河川ごとに流域の土地利用や人為的な影響を受けて異なる EEM スペクトル形状を示すことが明らかとなり、EEM は DOM の発生源やその寄与などの推定を簡便かつ迅速に行うことができる手法であることが分かった。
- (3) 腐植化指標 (HIX) を湖水、河川水および下水処理水に適用した結果、HIX は夏季の藻類内部生産の影響を受けて琵琶湖表水層では低下すること、河川上流では森林土壌由来のフルボ酸などの影響を受けて値が高くなることを明らかにした。HIX は有機物の発生源のみならず、化学的特性の変化を数値化でき、簡易評価指標として有効であることを明らかにした。
- (4) EEM や HIX などの蛍光分析から、琵琶湖 DOM は、夏季には藻類の活動および季節成層、冬季には湖水の大循環に強く影響を受けていることが明らかとなった。霞ヶ浦流域では、湖水、河川水中 DOM の蛍光特性は琵琶湖のそれと比較して時空間的な変動は少なく、季節や場所による違いは観られなかった。また、霞ヶ浦 DOM は、季節的に大きく変動すると考えられる藻類等の内因性発生源の寄与は小さく、年間をとおして変動が少ないことを明らかにした。
- (5) アミノ酸組成分析では、河川水では Pro 以外は検出されず、湖内では様々なアミノ酸が検出された。湖水中 DOM の主要な構成アミノ酸は Gly、Ala、Asp、Glu で、霞ヶ浦 DOM では Thr の含有率も高かった。
- (6) 糖類組成から、流域内および流域間で組成が異なることを明らかにした。湖内の糖類は、藻類や細菌等の内部生産に起因する成分が多く、陸域からの影響は小さいことが明らかとなった。琵琶湖 DOM は細胞外多糖 (EPS) の寄与が示唆され、霞ヶ浦 DOM は下水由来有機物の影響が観られることも明らかとなった。
- (7) 糖アルコール分析の結果、GC クロマトグラム上に同定されない成分が多数検出され、有機物組成の指標 (指紋) としての利用可能性が示された。
- (8) 脂質は、河川、湖内、下水処理水から検出された。脂質組成から、DOM の SL (単純脂質) および TG (トリグリセリド) 含有率は試料間で異なり、DOM の脂質組成を規定していることが示唆された。各脂質クラスごとの脂肪酸組成分析結果から、TG の脂肪酸組成は非常に多様であり分類指標となることが期待できる。
- (9) ¹H-NMR による DOM の構造解析を行った結果、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域の DOM は脂肪族性に富んでいることを明らかにした。NMR スペクトルを試料間で統計解析手法を用いて比較することにより、DOM の

発生源を推定できる可能性があった。

- (10) LC/ESI-TOF MS を用いて逆相カラムによるグラジエント条件で DOM の網羅的分析を行った結果、検出されたピークを保持時間と m/z の関係でプロットすることにより、DOM 全体の特性把握が可能になると考えられた。LC/MS による網羅的 DOM の検出と統計解析を組み合わせるにより、試料間の DOM の類似性評価や指標マーカーの検索が行えるものと考えられた。
- (11) 湖水 DOM の濃縮と分画をロータリーエバポレーターと分取 HPLC から行った結果から、アミノプロピルカラムによる順相 HPLC 法で琵琶湖湖水中有機物を極性の違いに基づいて、5 画分に分離することができた。主要な 1 画分を IR、NMR、MS 測定した結果、正確な骨格構造は明らかにできなかったが、その部分構造としてカルボキシル基（極性官能基）、アルカン、アルケン等を有していることが推定された。すなわち、琵琶湖溶存有機物の主要構成成分が脂肪族性に富んだ有機酸であることが明らかとなった。しかし、湖水 DOM の濃縮・分画には数か月必要となり、操作段階も多くコンタミネーションの可能性もあり、簡便な濃縮・分画法が必要である。
- (12) 固相抽出による DOM の簡易濃縮・分画法の開発を行った。有機物の吸着特製の異なる 4 種類の固相カートリッジを利用することで濃縮と分画が同時にできることを明らかにした。各画分の DOC を測定することにより、試料間の比較が可能であり、DOM の発生源の簡易推定が可能になると考えられる。本法のコンディショニング等の準備が 1 日程度でできることから、従来の XAD 法と比べて格段に迅速・簡便な方法であることが特徴であった。
- (13) 無機物質が DOM の質量分析に与える影響を調査した。電気透析処理法を湖水濃縮液からの脱塩処理に適用した。電気透析により ESI-MS スペクトル強度 (TIC) が 20%程度改善されること、イオン強度が低下する成分が少ないことを明らかにし、質量分析における電気透析法の有効性を示すことができた。
- (14) 逆相、HILIC、SEC カラムによる湖水 DOM の分離性能を評価し次の結果を得た。逆相カラムでは、有機物は保持されないことがわかった。HILIC カラムでは、逆相系と比べて有機物は保持されていると考えられた。SEC カラムでは、有機物の分離能は劣るものの、有機物と無機物が分離できることがわかった。
- (15) 1 種類の固相カートリッジ (Oasis HLB) による SPE-LC-MS 分析を霞ヶ浦湖水とその河川水を用いて試行した結果、湖水の TIC が高くなった。 m/z 300 程度の疎水性物質が湖水に多く含まれることが分かった。

表 2-8.1 は、本研究において検討した分析法を簡易性（前処理や試験操作）、網羅性（DOM 全体の質的特性把握）、利用性（分析装置が容易に利用できるか）で評価したものである。利用目的や試料量等に応じて、分析法を使い分けたり、組み合わせることにより、これまでと比して格段に網羅的かつ詳細な情報を得ることが可能となった。例えば、モニタリング目的であれば、発生源や化学構造の変化、ならびに DOC 分布を簡易に評価できる EEM もしくは SPE-TOC が適用可能である。その中でも EEM 法は、分子レベルの分解能はないが、ろ過処理だけで簡易に分析できることから、非常に有効な流域圏における有機物のモニタリング・評価手法として位置付けることを提案する。

次章以降では、本研究で開発・提案した前述のモニタリング・評価手法を適用して、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域において有機物の詳細な実態調査を実施するとともに、流域圏における分解挙動の解明に向けた分解性試験の開発および難分解性有機物の特性評価から得られた知見・成果について詳述する。

表2-8.1 各分析法の評価

分析法	簡易性 (前処理、試験操作)	網羅性 (DOMの全体把握)	利用性 (分析装置)
EEM	○	△	○
有機組成 (アミノ酸、糖、脂質)	×	△	△
1H-NMR	△	○	×
LC-TOF-MS	△	○	×
SPE-TOC	△	○	○
SPE-LC-MS	×	○	△

3 湖沼流域における（難分解性）溶存有機物の質的特性および発生源の解明

湖内の DOM の起源は、流域で発生し湖内に流達したものと、湖内での内部生産に分けられる。流域内で発生する DOM の質的特性は、各河川の土地利用により異なり、また季節的に変化していると考えられる。湖内に蓄積される DOM の起源を推測するためには、流域内で発生する DOM の質的特性を網羅的かつ季節変化を考慮して調査する必要がある。そこで本研究では霞ヶ浦流域と琵琶湖流域を対象に各流域の湖水、河川水、下水処理水の網羅的な採水調査を月単位で実施した。ここでは 2 章で検討した様々な手法のうち分析の簡易性を重視し、主に EEM 分析法による溶存有機物の質的特性の把握を試みた。

3-1 調査方法

3-1-1 調査対象流域

霞ヶ浦流域の西浦と北浦の湖水および流入河川水の採水位置を図 3-1.1 に示す。琵琶湖流域の湖水および流入河川水の採水位置を図 3-1.2 に示す。霞ヶ浦湖水は、平成 21 年 5 月から 3 月の間毎月 1 回 10 地点を対象に調査を実施した。霞ヶ浦の流入河川調査は毎月 1 回湖水の採水日に近い晴天日に行った。西浦流域の調査地点は流入河川 15 地点と土浦港湖水および下水処理水、北浦流域の調査地点は流入河川 11 地点である。

琵琶湖では平成 21 年 5 月から 3 月の間毎月 1 回、表層水の採水調査と表層水とは別の日に水深別の採水調査を行った。表層水の採水調査は 6 地点（知内川沖、安曇川沖、北小松沖、蓬莱沖、大宮川沖、栗津沖）、水深別の採水調査は 2 地点（安曇川沖、大宮川沖）である。さらに 4 カ所の浄化センターの放流水も調査対象とした。琵琶湖の流入河川調査は、平成 21 年 8 月と平成 22 年 2 月に行い、18 河川を調査した。

3-1-2 採水方法

水試料の採水容器はテフロン（PTFE）ライナー付のホウケイ酸ガラス製容器を用い、中性洗剤による 30 分の超音波洗浄、アセトン洗浄、超純水による洗浄後乾燥機で乾燥させて使用した。水試料は採水時に共洗いをした容器に詰め、氷冷して実験室に持ち帰るか冷蔵して配送した。

3-1-3 分析方法

水試料は 500 mL の超純水で洗浄したグラスファイバーフィルター（GF/B、1.0 μm ）でろ過し、ろ液を分析に用いた。分析項目は TOC（DOC）、EEM、および一般水質項目（ $\text{PO}_4\text{-P}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ ）である。DOC

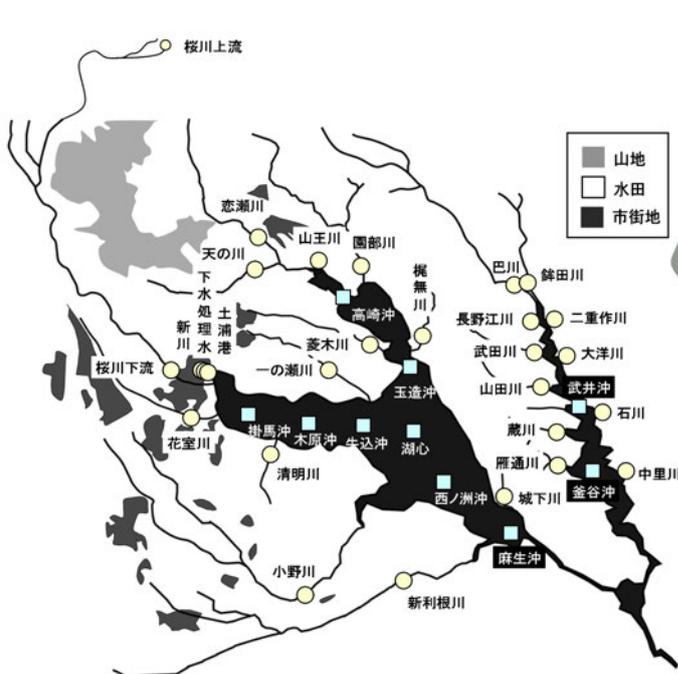


図3-1.1 霞ヶ浦流域調査地点



図3-1.2 琵琶湖流域調査地点

は、燃焼酸化法で不揮発性有機物（NPOC）を測定して求めた。EEM は、励起波長（Ex）、蛍光波長（Em）とも 200～600 nm、サンプリング間隔は 5 nm で測定した。蛍光強度は、超純水のラマンピークの励起波長（Ex）350 nm における蛍光波長（Em）375～415 nm の蛍光強度面積を 1 とし、その相対値とした。なお、ブランクには超純水を用い、全ての測定結果から差し引いた。また、DOM と湖内の藻類の関係を把握することも必要と考えられたことから、霞ヶ浦湖心、釜谷沖および琵琶湖安曇川沖水深別採水の試料について、フローサイトメトリーによる藻類濃度の測定を行った。フローサイトメトリーによる藻類の測定では、未ろ過試料 1 mL を超音波処理し、藻類群体を分散させた後、分散試料 0.1 mL をフローサイトメトリーで測定した。測定回数は 1 試料につき 1 回である。本調査で使用したフローサイトメーターには、488 nm のアルゴンレーザーが搭載されており、クロロフィルの蛍光波長である赤色（675 nm±15 nm）蛍光強度を有する粒子数を測定した。

3-2 結果と考察

3-2-1 霞ヶ浦流域の DOC と EEM の調査結果

(1) 霞ヶ浦湖水の DOC と EEM の調査結果

図 3-2.1 は、霞ヶ浦湖内の各採水地点での DOC、EEM の 6 つのピーク位置（第 2 章表 2-2.1）の蛍光強度および腐植化指標（HIX）の経月変化である。西浦の DOC 濃度は概ねどの地点も 8、9 月に高く、冬季に低下する傾向を示した。採水地点間で DOC 濃度に違いが観られ、11、12、1 月は河口に近い掛馬沖と高崎沖で、DOC 濃度が他の採水地点より低下する傾向が観られた。北浦では、夏季（8 月）に DOC 濃度が高く、冬季に低下する傾向を示し、採水地点間では 10～2 月に武井沖で低下する傾向が観られた。

EEM の蛍光強度について、西浦の採水地点全体での傾向をみると、Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm は 10 月に低下する傾向を示した。平成 20 年度調査¹⁷⁾では、霞ヶ浦西浦では冬から春にかけて藻類が増殖し 9、10、11 月に藻類濃度が低下する傾向が観られることを報告した。平成 21 年度の藻類の測定でも概ね同様の傾向を示しており、Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の低下は、藻類濃度の低下により藻類から細胞外に排出される DOM 量が低下したためと考えられる。HIX は 9、10、11 月に高くなる傾向を示した。北浦では Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度が 10、11、12 月に低下する傾向を示した。北浦の藻類濃度も 11 月、12 月は低下していた。西浦では Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、高崎沖地点を除いて、9 月に高くなる傾向を示した。7 月の西浦湖水では下水特有の蛍光ピークである Ex500nm/Em525nm のピークが低いながらも観察され、このピークは麻生沖に向かって低下する傾向を示していた。7 月は Ex230nm/Em340nm や Ex230nm/Em425nm の蛍光強度が高くなっており、下水処理水由来の DOM の影響を受けている可能性があった。7 月前半に降雨が多かったことから、下水処理水由来の DOM が流下方向に拡散し、蛍光特性に影響を及ぼした可能性が考えられる。

(2) 霞ヶ浦流入河川の DOC と EEM の調査結果

図 3-2.2 は、西浦流入河川水と下水処理水の DOC および EEM の 6 つのピーク位置の蛍光強度の季節変化である。図 3-2.3 は、北浦流入河川について同様に示したものである。西浦流入河川の多くは 5、6 月に DOC 濃度が約 3 mgC/L と高くなっていった。この DOC 濃度は、5 月の西浦湖水の DOC 濃度と同程度であった。北浦流入河川でも 5、6 月に DOC 濃度が高く、北浦南側の流入河川では 7 mgC/L にまで達するものがあった。

霞ヶ浦西浦、北浦流入河川の Ex230nm/Em425nm、Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の季節変化は、DOC 濃度の季節変化と同様の傾向を示し、概ね 5、6 月に高く、夏から秋に向かって低下する傾向を示した。河川によっては、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の季節変化と DOC 濃度の季節変化が同様の傾向を示す河川（たとえば桜川下流、小野川）もあった。霞ヶ浦流入河川水の HIX は、冬季に向かって減少傾向を示すものが多かった。これは、冬季の河川への腐植物質の供給の低下およびタンパク質様物質の増加によるものと考えられる。なお、北浦流入河川の巴川の 3 月で DOC が高く、蛍光強度が高くなっていったがこの原因については不明である。

3-2-2 琵琶湖流域の DOC、EEM の調査結果

(1) 琵琶湖表層の DOC と EEM の調査結果

図 3-2.4 は、琵琶湖の各採水地点での DOC、EEM の 6 つのピーク位置の蛍光強度および腐植化指標 (HIX) の経月変化である。DOC 濃度は、概ね春季から夏季にかけて高い値を示し、冬季 (12 月、1 月、2 月) にかけて低下する傾向を示した。採水地点間で DOC 濃度を比較すると、DOC 濃度は知内沖、安曇川沖、北小松沖、蓬萊沖の順で高くなる傾向が観られる。南湖の DOC は北湖より高く、南湖の中でも栗津沖は、大宮川沖より高くなる傾向を示した。

EEM の各蛍光強度は、採水地点間で異なっていることが分かる。採水地点間の EEM の各蛍光強度の変化は、DOC の変化と完全には一致しないものの、おおよそ同様の傾向を示している。ただし、フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、北湖内では採水地点間で大きな違いは観られないことがわかった。琵琶湖北湖表層ではフルボ酸様物質は、概ね均一になっていると考えられる。栗津沖の各蛍光強度は他の採水地点より高くなっていたが、栗津沖では下水処理水特有のピークである Ex500nm/Em525nm の蛍光強度が高くなっており、栗津沖の DOM は、下水処理水に由来する DOM が含まれている可能性がある。また、栗津沖では Ex320nm/Em425nm の蛍光強度も高く、この値は蛍光増白剤の影響を受けている可能性がある¹⁸⁾。

(2) 琵琶湖水深方向の DOC と EEM および植物プランクトンの調査結果

図 3-2.5 は安曇川沖の水深別の DOC、EEM 上の 6 つのピーク位置の蛍光強度、NO₃-N および藻類細胞濃度の変化である。安曇川沖水深別の DOC は、5 月から 12 月までは水深 0.5 m が最も高く、水深に応じて低下する傾向を示した。水深 0.5 m では 7 月の DOC 濃度が最も高くなり、このときの表層と底層の DOC の差は約 0.6 mgC/L となった。1 月から 3 月の DOC 濃度は、水深によらず一定となった。

Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm、Ex230nm/Em425nm の蛍光強度の季節変化をみると、各蛍光強度は 10、11、12 月に低下する傾向を示した。各水深別に観ると Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度は、5、6、7 月では水深 0.5m から 10m で高くなっていることが分かる。Ex230nm/Em425nm の蛍光強度は、8 月に底層で高くなる傾向が観られた。Ex280nm/Em340nm の蛍光強度は、5 月から 12 月にかけて、水深 0.5m から 10m で高くなっており、特に 7 月に高い値を示した。

藻類濃度は、6 月から水深 0.5m から 10m の範囲で増加し、7 月が最も高く、11 月に向かって低下することが分かった。藻類の増殖の指標となる NO₃-N も 7 月から 11 月までは 0.5m から 10m で低下しており、この期間に水深 0.5m から 10m で藻類が増加していることが分かる。6 月から 11 月の表層での DOC 濃度と Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の増加は、藻類由来の DOM が増加したためと考えられる。1、2、3 月の Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm、Ex230nm/Em425nm の蛍光強度は 10、11、12 月に比べ全水深方向で高い値を示した。1、2、3 月のこれらのピークを反映する物質の由来については明らかではないが、冬季の湖水の全循環により湖内に一様に分布したものと考えられる。

フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、6 月から 12 月は底層で高くなる傾向を示し、1 月から 3 月は水深によらず一定となることがわかった。琵琶湖では Ex320nm/Em425nm の蛍光強度を持つ物質が底泥から溶出し、冬季の湖水の全循環で湖内全体に分布した可能性がある。

(3) 琵琶湖流入河川の DOC と EEM の調査結果

図 3-2.6 と図 3-2.7 は琵琶湖流入河川水と A 浄化センターの下水処理水の DOC および EEM の 6 つのピーク位置の蛍光強度の季節変化を示したものである。琵琶湖の流入河川の DOC 濃度は 8 月で高く、フルボ酸様物質を反映する Ex230nm/Em425nm と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度も 8 月で高くなっていた。愛知川ではタンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em340nm のピークが高く琵琶湖流域の中でも特異的な河川であることがわかった。浄化センター A の放流水の DOC 濃度はどの月も河川より高く、季節間の変化は小さかった。下水処理水特有の Ex500nm/Em525nm のピーク強度は 1 月に高くなる傾向を示した。

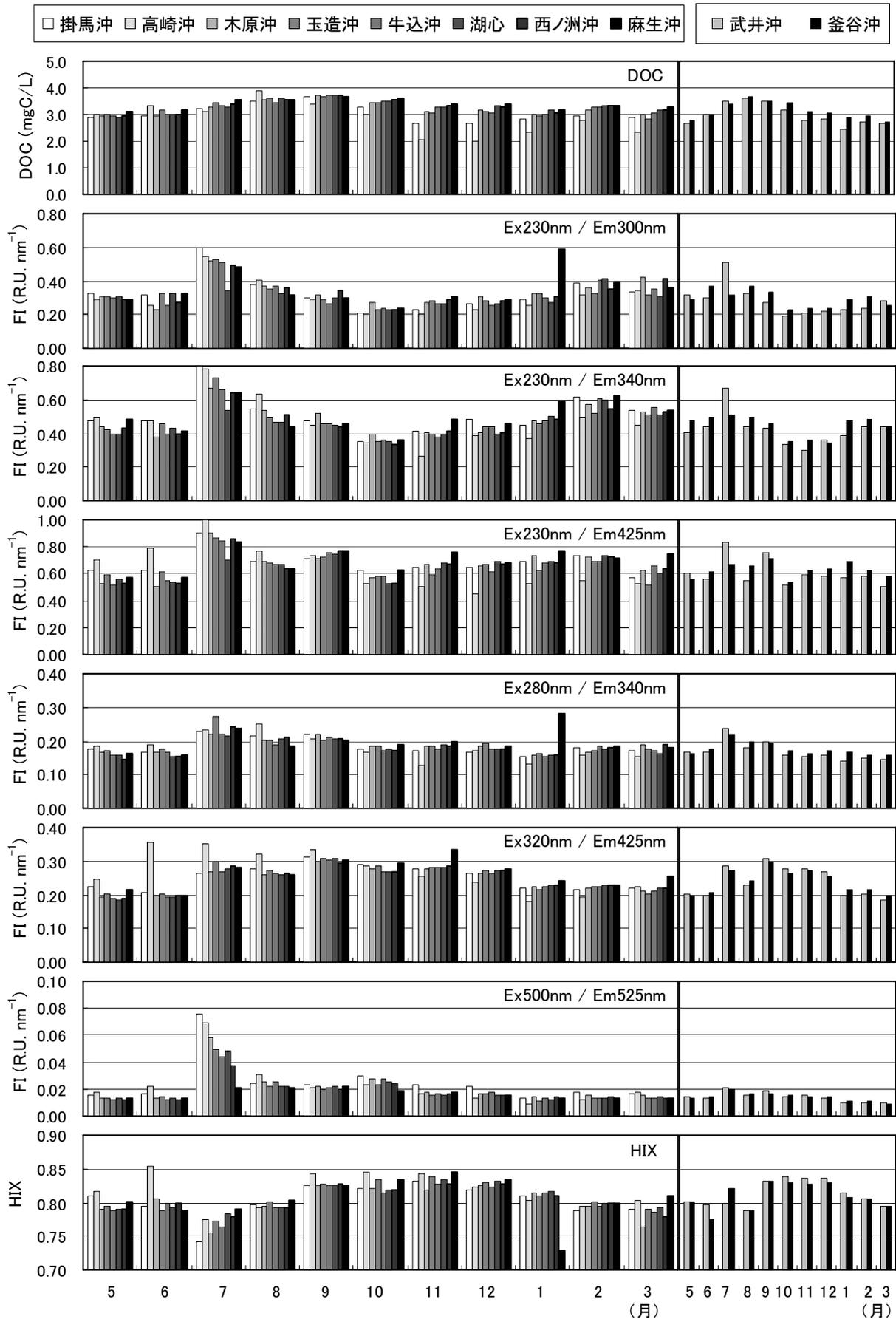


図3-2.1 霞ヶ浦湖水のDOC、蛍光強度、HIXの変化

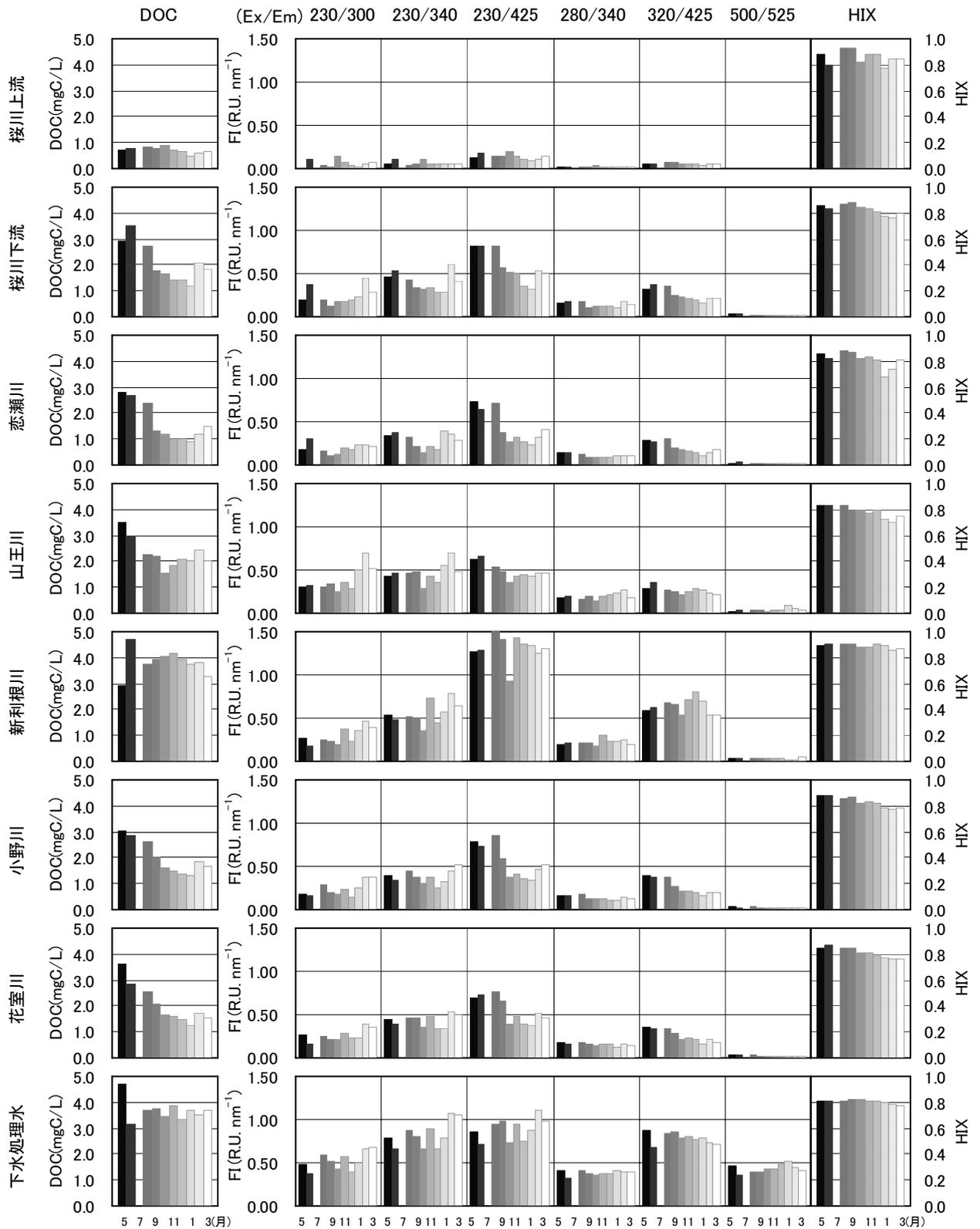


図3-2.2 西浦流入河川のDOC、蛍光ピーク強度、HIXの季節変化
 左から平成21年5月～平成22年3月の順に表示 (※ 7月は欠測)

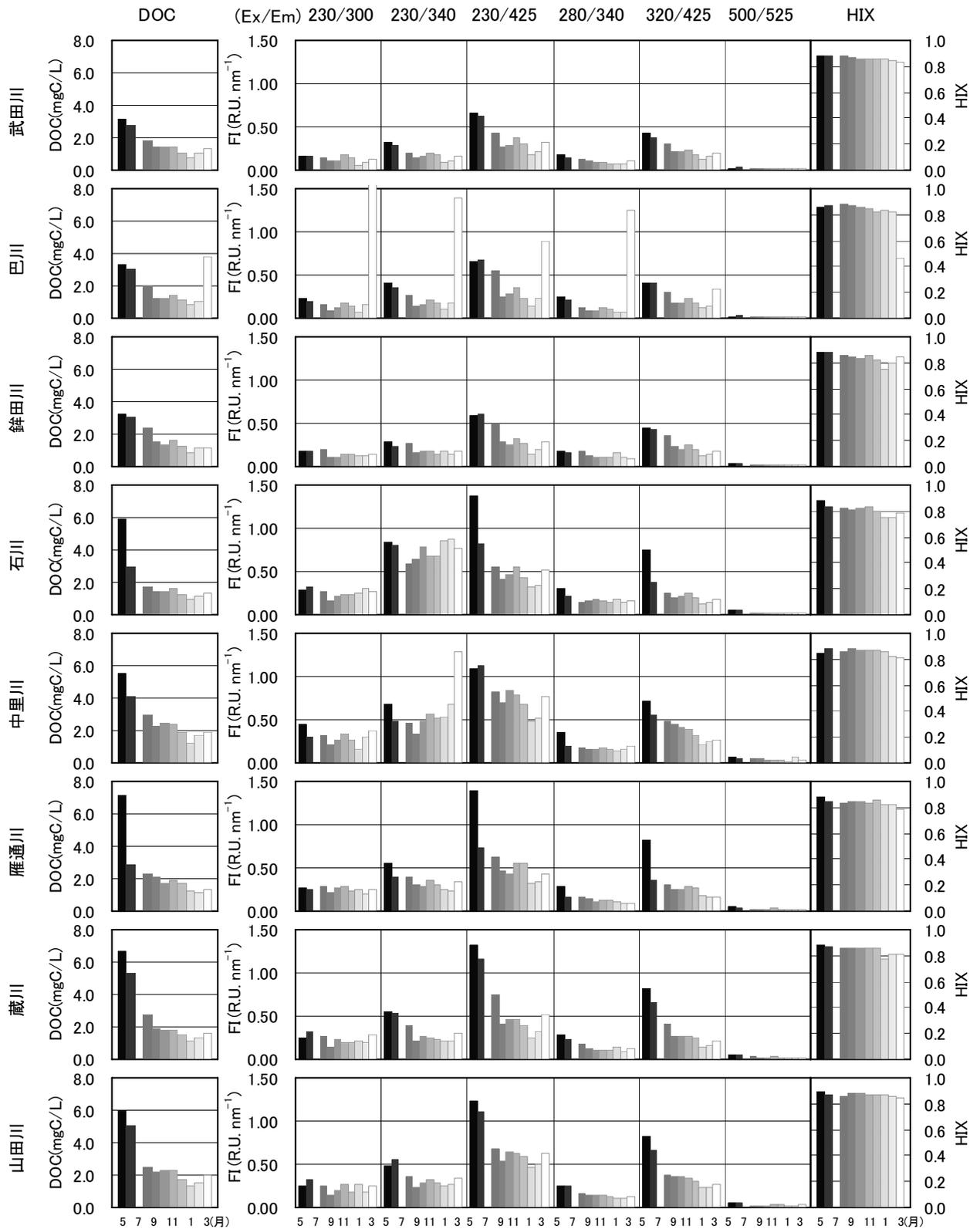


図3-2.3 北浦流入河川のDOC、蛍光ピーク強度、HIXの季節変化
 左から平成21年5月～平成22年3月の順に表示 (※ 7月は欠測)

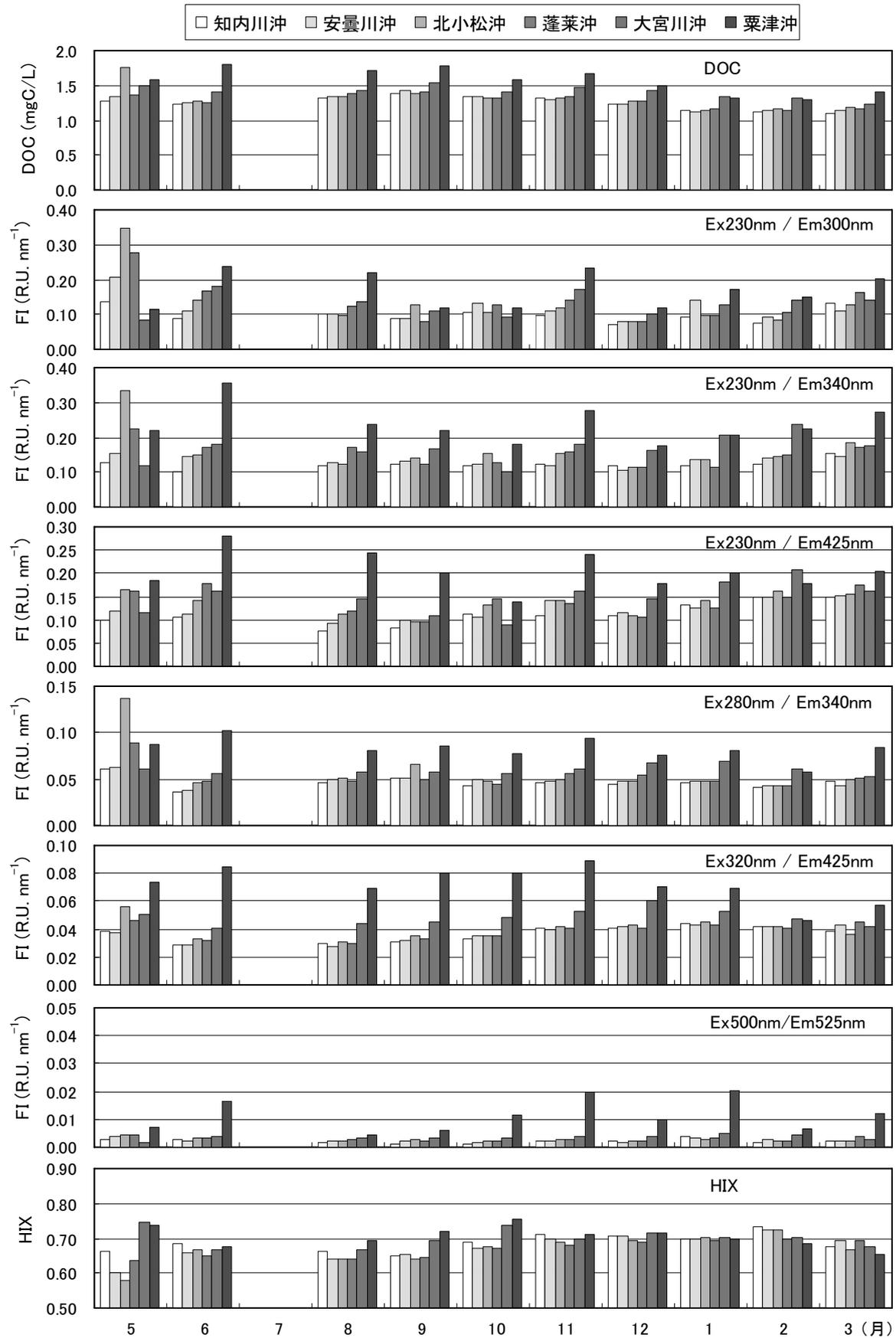


図3-2.4 琵琶湖湖水のDOC、蛍光強度、HIXの変化 ※ 7月は欠測

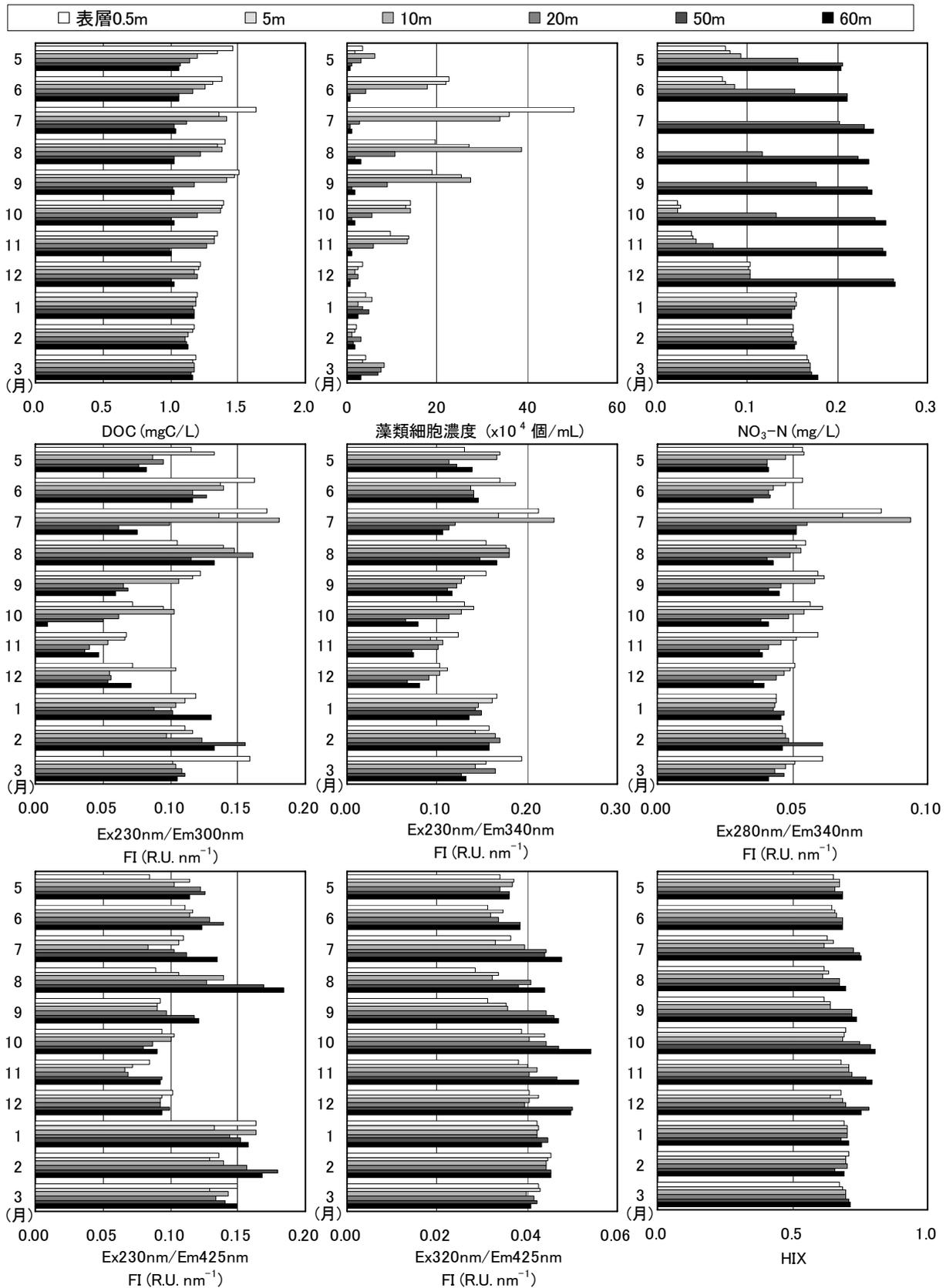


図3-2.5 安曇川沖の水深方向のDOC、蛍光強度、硝酸性窒素と藻類濃度の変化

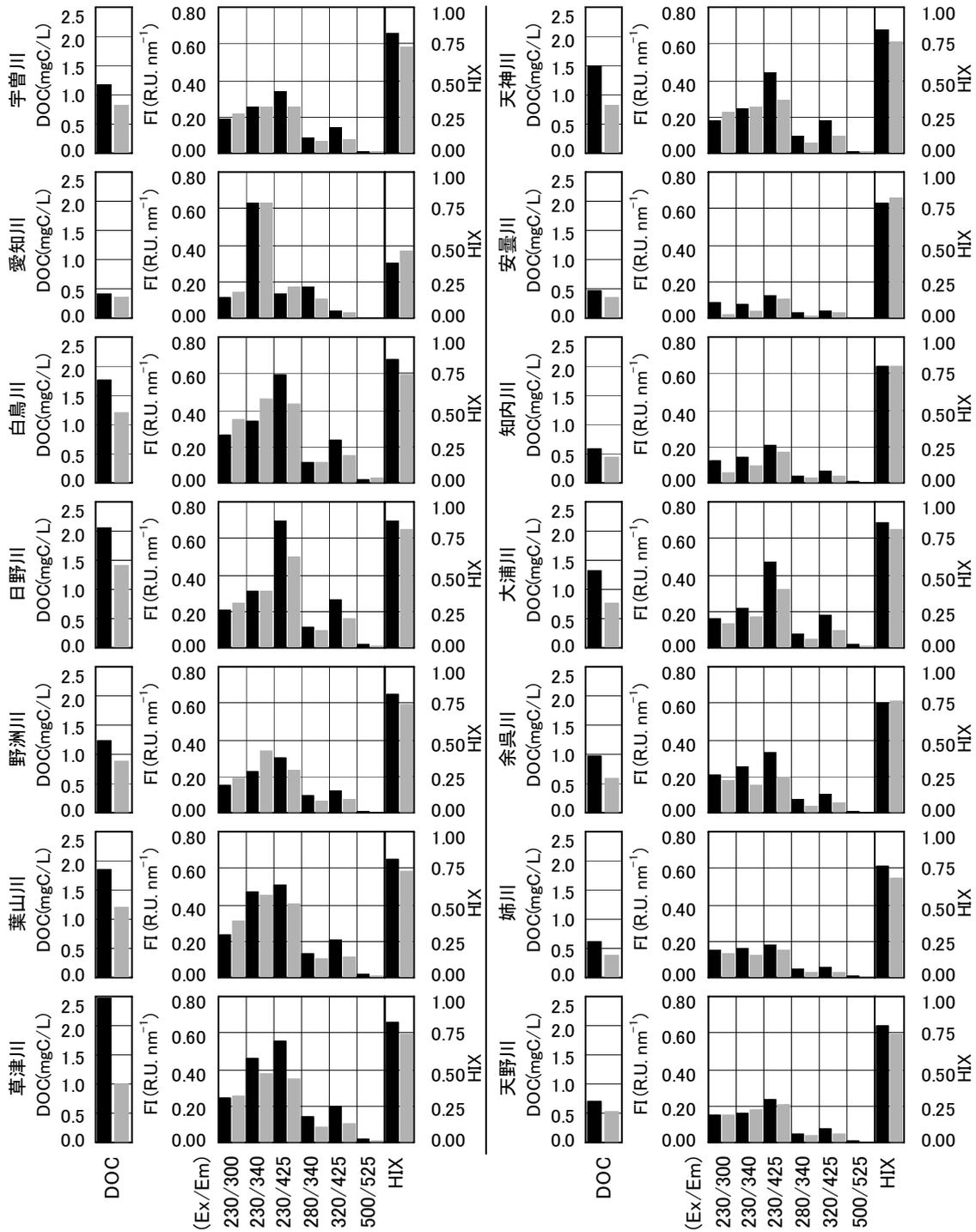


図3-2.6 琵琶湖流入河川のDOCと蛍光強度、HIX（8月は黒、2月は灰色で示した。）

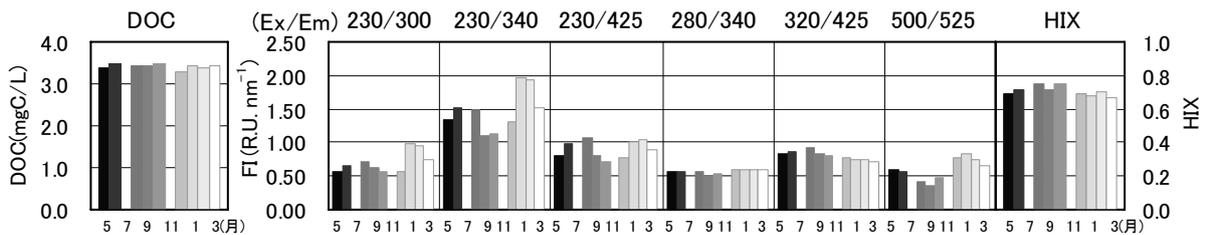


図3-2.7 下水処理水(A浄化センター)のDOC、蛍光強度、HIX（7、11月は欠測）

3-2-3 EEM による DOM の質的特性の簡易比較

EEM で得られた各ピークの位置と強度を用いて、霞ヶ浦流域と琵琶湖流域の水試料間で DOM の質的特性がどのように異なるのかを解析した。図 3-2.8 は、平成 21 年 8 月、平成 22 年 2 月の霞ヶ浦湖心表層水と安曇川沖表層水の各ピークの蛍光強度および DOC で規格化した蛍光強度 (FI/DOC) をレーダーチャートで図示したものである。各蛍光強度は、8 月、2 月のどちらも霞ヶ浦湖心で顕著に高いことが分かる。各ピーク位置の FI/DOC についても、霞ヶ浦湖心で高い値となっていた。8 月の霞ヶ浦湖心のフルボ酸様ピークを反映する Ex230nm/Em425nm、Ex320nm/Em425nm の FI/DOC はそれぞれ琵琶湖安曇川沖の約 3 倍高く、霞ヶ浦と琵琶湖では DOM に占めるフルボ酸様物質の割合が異なることが示唆された。琵琶湖安曇川沖の 2 月の Ex230nm/Em425nm の FI/DOC は、8 月より増加していた。

図 3-2.9 は、8 月と 2 月の桜川上流と下流の FI/DOC である。桜川上流では、フルボ酸様物質のピークである Ex230nm/Em425nm の蛍光強度が高いが、桜川下流ではフルボ酸様ピークの他に、タンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度が高かった。特に 2 月は、DOC に占めるタンパク質様ピークの蛍光強度が高くなることがわかる。琵琶湖流域の森林系河川である安曇川と市街地河川である葉山川の FI/DOC の比較においても、葉山川で 2 月にタンパク質様ピークの蛍光強度が高くなっており (図 3-2.10)、この蛍光物質は農地や市街地に由来している可能性がある。このピーク位置の蛍光強度は、湖内において藻類濃度が高い時期にも視られることから、これらの物質の分解挙動を評価する場合は、外部由来と内部生産 (藻類) に分けて評価する必要がある。

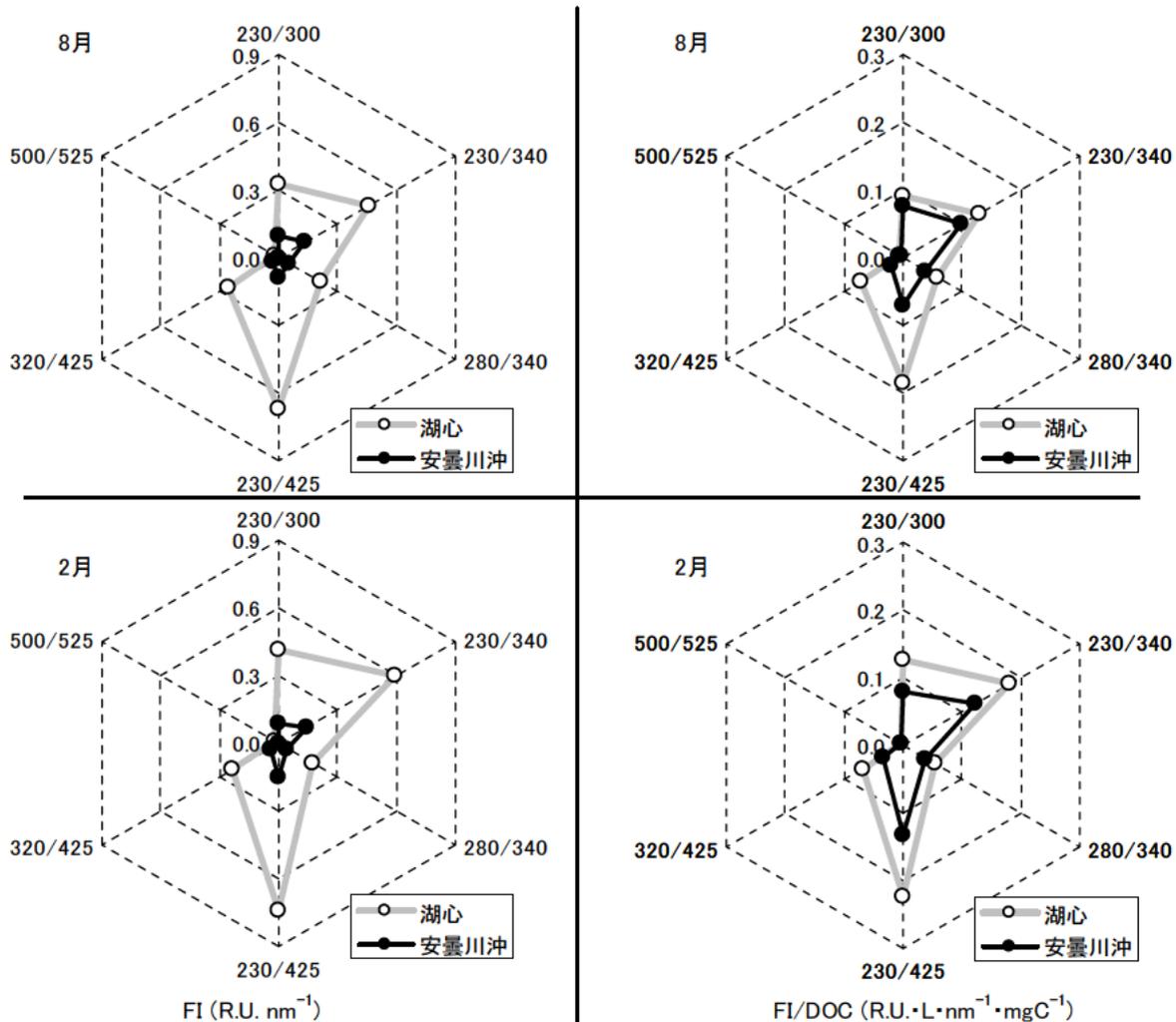


図3-2.8 霞ヶ浦湖水と琵琶湖湖水の蛍光特性の比較

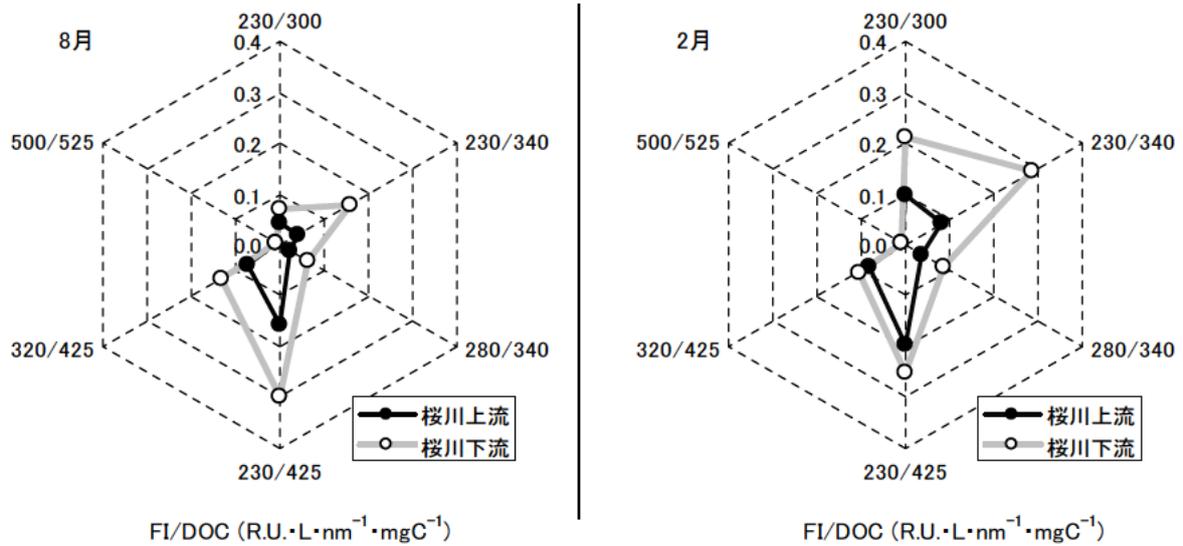


図3-2.9 桜川の上流と下流のFI/DOCによる比較

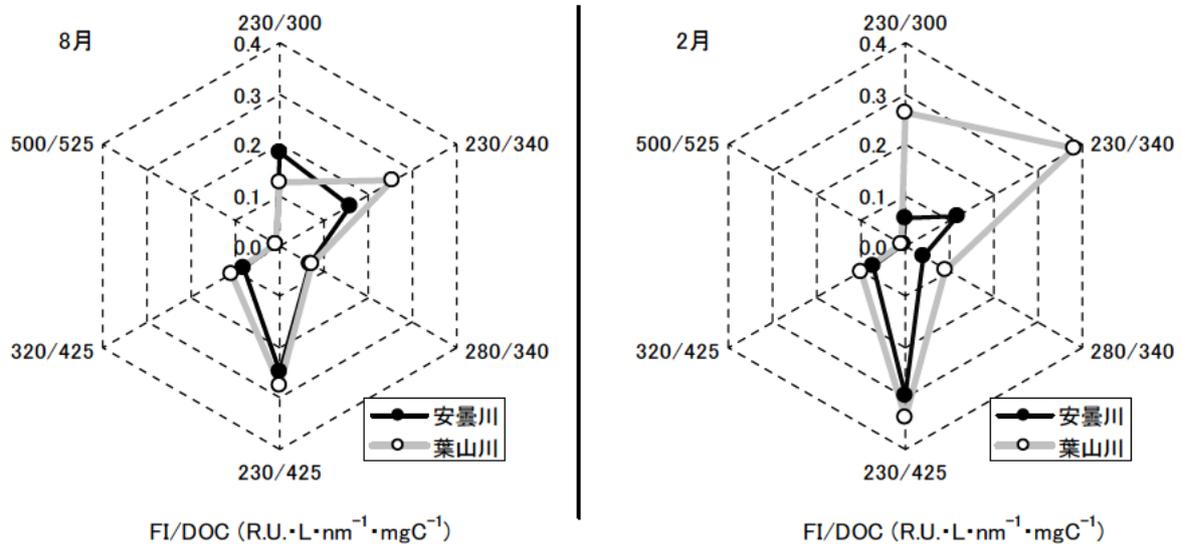


図3-2.10 安曇川と葉山川のFI/DOCによる比較

3-2.4 EEM を利用した湖水中 DOM の由来の推定

吉岡ら¹⁹⁾は、河川水の DOC 濃度と腐植物質様ピークの蛍光強度の関係を用いて湖水の腐植物質様蛍光ピークから外部由来と内部由来の DOC 濃度の推定を行っている。ここでは、湖水の Ex320nm/Em425nm の蛍光強度を河川水由来の腐植物質（フルボ酸）様蛍光と仮定し、吉岡らと同様の方法で霞ヶ浦の湖心、高崎沖、釜谷沖と琵琶湖の安曇川沖表層、同 50m 点、大宮川沖表層の湖水中の外部由来と内部由来の DOC 濃度を推定した。

図 3-2.11 は霞ヶ浦流域の西浦および北浦と琵琶湖流域について、調査期間の湖水と流入河川水の DOC 濃度と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の関係を示したものである。流入河川水では DOC 濃度と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の間に強い正の相関が観られた。湖水では、流入河川水と比較して DOC 濃度に対する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の値が低くなっていた。

図 3-2.12 は、図 3-2.11 に示す流入河川水の DOC 濃度と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の関係式を用いて西浦と北浦の湖水中の外部由来と内部由来の DOC 濃度を推定した結果である。同図には DOC 濃度の実測値と外部由来の DOC の割合を合わせて示している。霞ヶ浦の湖心と釜谷沖では、外部由来の DOC の割合は 50～60%と推定された。高崎沖では変動が大きいものの外部由来の DOC は湖心より高くなる傾向が観られた。外部由来の DOC

濃度の推定値の季節変化は、湖心と釜谷沖では9月頃に、高崎沖では6月頃に高くなる傾向を示した。霞ヶ浦流入河川水の DOC 濃度は5月頃に高くなる傾向があったことから、高崎沖は恋瀬川の河口に近いから、外部由来の DOC 濃度が6月頃に高くなったものと考えられた。湖心と釜谷沖の外部由来の DOC 濃度の変化は流入河川水の DOC 濃度の変化とは対応しないため、内部由来の DOM の影響を受けている可能性も考えられる。霞ヶ浦湖水の EEM スペクトルから外部由来の DOC 濃度を推定するためには、藻類に由来する DOM や底泥から回帰する DOM といった内部由来の DOM とフルボ酸様ピークの関係について詳細な調査が必要である。

図3-2.13 は、琵琶湖安曇川沖の表層、50m と大宮川沖の表層の湖水の DOC 濃度の実測値、外部由来と内部由来の DOC 濃度の推定値および外部由来の DOC の割合である。外部由来の DOC の割合は安曇川沖と大宮川沖の表層では20～35%、安曇川沖の50m 点では30～45%となった。安曇川沖の表層では、DOC 濃度の実測値と内部由来の DOC 濃度の推定値がいずれも夏から冬にかけて低下する傾向を示した。琵琶湖の表層の DOC 濃度の季節変化に内部由来の DOM が影響を及ぼしているものと考えられた。

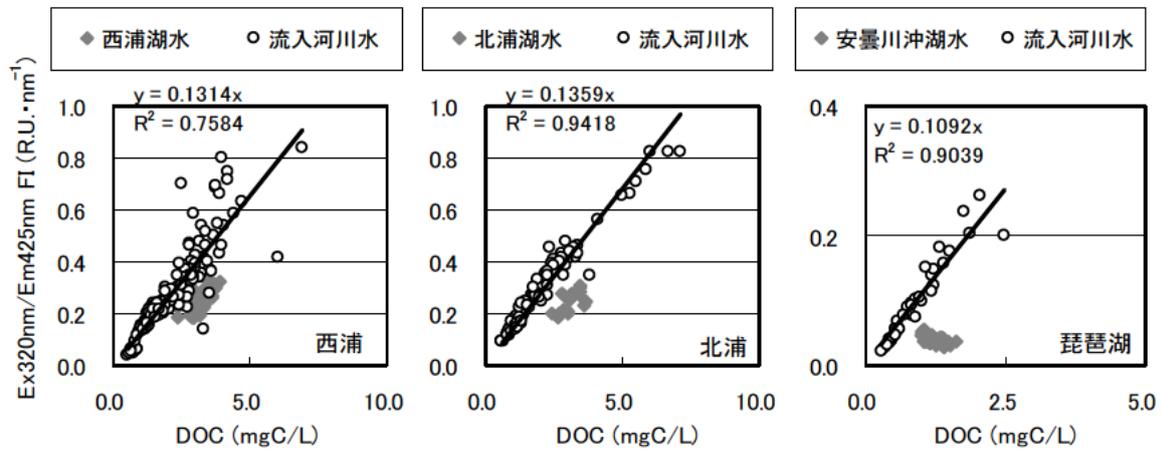


図3-2.11 DOCとEx 320nm/Em 425nm の蛍光強度の関係

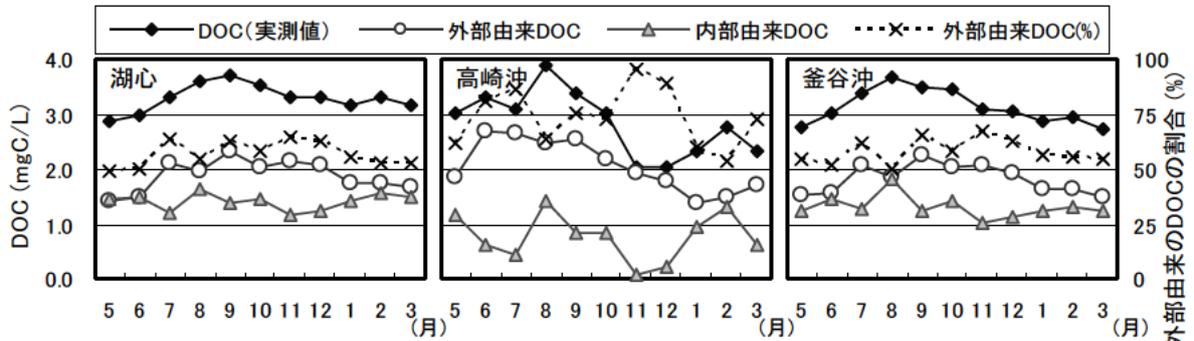


図3-2.12 霞ヶ浦湖水の外部由来と内部由来のDOCの推定値

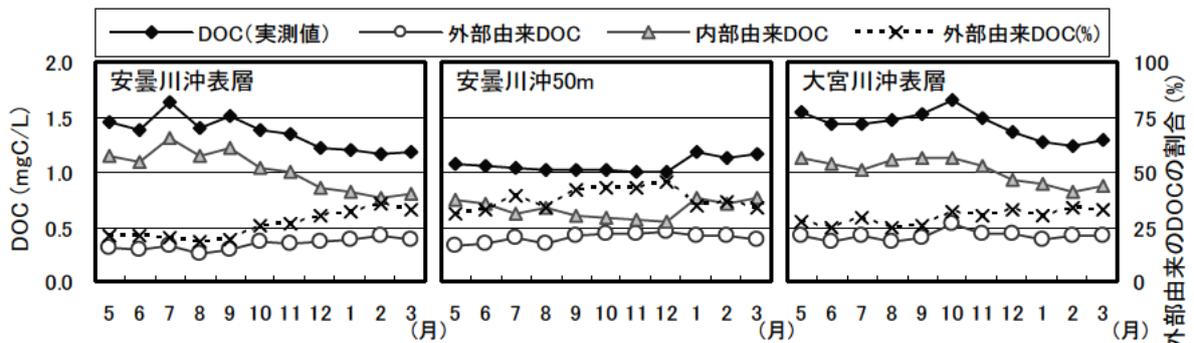


図3-2.13 琵琶湖湖水の外部由来と内部由来のDOCの推定値

3-3 まとめ

湖内に蓄積される DOM の起源を推測するためには、流域内で発生する DOM の質的特性を網羅的かつ季節変化を考慮して調査する必要がある。霞ヶ浦流域と琵琶湖流域を対象に、各流域の湖水、河川水、下水処理水の網羅的な採水調査を行い、主に DOC、EEM 分析法による DOM の質的特性の把握を試みた。本調査で得られた知見は以下のとおりである。

- 1) 霞ヶ浦西浦および北浦の湖水の DOC 濃度は 9 月に高い値を示した。DOC 濃度は採水地点間で異なり、西浦の河口付近の採水地点では、11、12、1 月に低くなる傾向を示した。
- 2) 西浦流入河川の多くは 5、6 月に DOC が約 3 mgC/L と高くなった。この DOC 濃度は、5 月の西浦湖水の DOC 濃度と同程度であった。北浦流入河川でも 5、6 月に DOC 濃度が高かった。
- 3) 霞ヶ浦西浦および北浦のタンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm のピーク強度は、10、11、12 月に低下する傾向を示した。これは霞ヶ浦の藻類濃度が 11、12 月に低下し、内部生産（藻類）が減少したことを反映しているものと考えられる。
- 4) 霞ヶ浦西浦、北浦流入河川の Ex230nm/Em425nm、Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の季節変化は、DOC 濃度の季節変化と同様の傾向を示し、概ね 5、6 月に高く、夏から秋に向かって低下する傾向を示した。河川によっては、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の季節変化と DOC 濃度の季節変化が同様の傾向を示す場合もあった。
- 5) 琵琶湖湖内の DOC 濃度は概ね春季から夏季にかけて高くなり、冬季にかけて低下する傾向を示した。採水地点間で DOC 濃度を比較すると、DOC 濃度は知内沖、安曇川沖、北小松沖、蓬莱沖の順で高くなる傾向が観られた。南湖の DOC 濃度は北湖より高く、南湖の中でも栗津沖は、大宮川沖より高くなる傾向を示した。
- 6) 琵琶湖表層水の EEM スペクトル上の各ピークの蛍光強度は概ね DOC 濃度と同様の傾向を示していた。ただし、フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、北湖内では採水地点間で大きな違いは観られないことがわかった。
- 7) 安曇川沖水深別の DOC 濃度は、5 月から 12 月までは表層で高く、水深に応じて低下する傾向を示した。1 月から 3 月までは DOC 濃度は水深によらず一定となった。
- 8) 安曇川沖水深別の Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度は、5、6、7 月では水深 0.5m から 10m で高くなっていることがわかった。湖内の同ピーク位置を反映する物質は、藻類に由来する DOM であると考えられた。
- 9) フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、6 月から 12 月は底層で高くなり、フルボ酸様物質が底泥から溶出している可能性があった。1 月から 3 月は水深方向によらず一定となることがわかった。
- 10) 霞ヶ浦と琵琶湖の湖水中の DOM を EEM で比較すると、霞ヶ浦湖水では DOC あたりのフルボ酸様ピークの蛍光強度が高くなり、琵琶湖湖水ではタンパク質様ピークの蛍光強度が高くなることが分かった。
- 11) 河川水の DOC 濃度と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の関係を用いて湖水中の外部由来と内部由来の DOC 濃度を推定した結果、外部由来の DOC の割合は霞ヶ浦の湖心と釜谷沖では 50～60%、琵琶湖の安曇川沖と大宮川沖の表層では 20～35%程度となった。

外部由来の DOM の湖内での分解挙動や湖内に蓄積する溶存有機物の由来を推定するためには、様々な質的特性を有する河川水や下水処理水および湖水中の DOM について、湖内での分解挙動を解明する必要がある。また、湖水中の DOM には内部生産（藻類）に由来するものがあることから、藻類に由来する DOM の増加や分解挙動についての解明も必要である。そこで、第 4 章では、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域の様々な河川水、下水処理水、湖水の DOM の分解実験を行う。さらに、藻類に由来する DOM の増加や分解挙動を解明するための実験を行う。

4 湖沼流域における溶存有機物の分解挙動の解明

霞ヶ浦流域および琵琶湖流域で網羅的に採水した水試料の DOC、EEM の測定による実態調査から、湖水、河川水、下水処理水中の DOM の質的特性は互いに異なり、河川によっては DOM の質的特性に違いが観られることがわかった。湖内に蓄積する DOM の由来を推定するためには、様々な質的特性を有する河川水や下水処理水および湖水による分解挙動を解明する必要がある。また、3 章より湖内の DOM は内部生産（藻類）に由来するものがあることが明らかとなった。このことから、藻類に由来する DOM の分解挙動についても明らかにする必要がある。

4-1 実験方法

夏季と冬季の霞ヶ浦流域および琵琶湖流域の河川水、下水処理水および湖水の DOM 分解実験を実施した。さらに、湖内部で生産される DOM のうち藻類に由来する DOM の挙動を明らかにするため、藻類培養実験を行い、藻類の増殖や分解過程での DOM の質・量的特性を詳細に調査した。以下に、実験方法について詳述する。

4-1-1 河川水、下水処理水、湖水の DOM の分解実験

(1) 対象試料

分解実験を行う河川水の選定にあたっては、分解実験に供する河川水の質的特性が多様になるように、各流域内で土地利用が異なる河川を選定した。選定した河川は、霞ヶ浦流域では桜川上流（渓流水）、新利根川（水田 60%）²⁰⁾、小野川（森林、市街地、農地が等分）²⁰⁾、花室川（市街地が半分）²⁰⁾、鉾田川（畜産系排水を含む）、琵琶湖流域では姉川（森林卓越型）²¹⁾、白鳥川（水田卓越型）²¹⁾、日野川（市街地、水田、森林が等分）²¹⁾、野洲川（森林水田混在型）²¹⁾、葉山川（市街地卓越型）²¹⁾ である。

夏季の分解実験では、霞ヶ浦流域では上記流入河川水 5 試料、湖水 2 試料（湖心、釜谷沖）、下水処理水 1 試料（計 8 試料）を、琵琶湖流域では流入河川水 5 試料、湖水 4 試料（安曇川沖水深 0.5 m（北湖-01）、50 m（北湖-09）、底面上 1.5 m（北湖-12）、大宮川沖水深 0.5 m（南湖-01）、下水処理水 1 試料（計 10 試料）とし、これらに加え、国際腐植物質学会（IHSS）から頒布されている米国 Suwannee 川 NOM（以下、SRNOM）、水抽出土壌有機物（water extractable organic matter、WEOM）を供試試料とした。

冬季の分解実験では、上記に加えて、両湖の最大流量河川である、霞ヶ浦では桜川（農地 40%、森林 40%）²⁰⁾、琵琶湖では安曇川（森林卓越型）²¹⁾ の下流の河川水を追加した。なお、冬季の分解実験の試料には WEOM はなく、ブランク試料として超純水を加えた。植種は、実験月に採水した湖水（表層水）とし、霞ヶ浦流域試料は湖心、琵琶湖流域試料は安曇川沖とした。さらに、本実験ではアニリンをコントロール物質として選定した。

(2) 実験方法

試料水および植種用の湖水は、500 mL の超純水で洗浄したガラス繊維ろ紙（GF/B、1.0 μm）でろ過後、実験開始まで暗所にて冷蔵保存した。アニリン 0.050 mL を超純水に溶解して 1,000 mL とした水溶液（約 40 mgC/L）を調整し、これをコントロール試料として用いた。琵琶湖の下水試料は、処理水が北湖に放流されている B 浄化センターおよび C 浄化センターの処理水を 500 mL ずつ混合したものを実験に用いた。SRNOM は、実験開始の前日に SRNOM 粉末試料 10 mg を超純水 1 L に加え一晚攪拌して溶解させ、当日 GF/B でろ過したろ液を分解実験に供した。WEOM は、独立行政法人土木研究所内の表層湿潤土壌を約 50 g をステンレススプーンで採取し、2 L の超純水に懸濁させてマグネチックスターラーで 6 時間穏やかに攪拌して土壌有機物を水抽出した後、GF/B でろ過したろ液を分解実験に供した。なお、土壌微生物による影響を抑えることを目的として、あらかじめ WEOM 溶液には上水試験法²²⁾ に準拠した低温殺菌操作を施した。

分解実験の期間は、夏季は 200 日間、冬季は約 100 日間であった。分解実験容器は 300 mL の三角フラスコとし、これを分解実験期間中の水質測定回数分（夏季は 7 本: 0、7、14、28、56、98、200 日目、冬季は 6 本: 0、7、14、28、56、98 日目）用意した。分解実験に供する水試料は、各三角フラスコにそれぞれ 120 mL ずつ分注した。栄養塩は BOD 試験の希釈水作成に用いられる 4 種の栄養塩液（A、B、C、D 液）とし、希釈水作成方法²³⁾ と同じ割合で添加した。湖水以外の試料については、GF/B でろ過後の湖水を 1vol%（1.2 mL）となるように植種した。

0 日目以外の三角フラスコはシリコセンでフタをして、水分蒸発量を補正するため電子天秤で重量を測定し、暗所の 20℃恒温室に設置した。試料を入れた三角フラスコは 1 週間に 3 回の頻度で約 5 秒間の撹拌を行った。

各測定日に三角フラスコを 1 本ずつ抜き取り、水質分析を行った。分析項目は DOC、EEM、UVA₂₅₄、全細菌数である。測定日は、三角フラスコの重量を測定し、0 日目重量との差から蒸発水量を求め、分析値の補正を行った。細菌分析は、未ろ過試料 1 mL をグルタルアルデヒドで固定したのち、SYBR Green による核染色を行い、フローサイトメトリー法による全菌数の測定を行った。

4-1-2 藻類の増殖に伴う DOM の特性把握実験

(1) 対象試料

培養実験に使用した藻類は 4 種類であり、以下の手順により準備した。平成 21 年 8 月の霞ヶ浦西浦の湖水にフローサイトメトリー法²⁴⁾を適用し、約 5 μm の微細な藻類が主体の藻類 A、オシロトリア属の糸状性藍藻が主体の藻類 B を得た。また平成 21 年 8 月 5 日にアオコが発生した土浦港の湖水を採取して培養し藻類 C とした。ただし、藻類 C には複数の種が混在し、植継ぎを重ねるに従って緑色鞭毛虫が優占となったものである。平成 21 年 8 月に採水した琵琶湖の湖水からフローサイトメトリー法により分取した微細植物プランクトンを藻類 D とした。実験に使用した 4 種の藻類の顕微鏡写真を図 4-1.1 に示す。

(2) 実験方法

本実験で使用した藻類増殖用培地は、藻類の増殖と DOM の質・量的特性を調査するため、有機物をほとんど含まない Chu 培地²⁵⁾とした。培地の組成を表 4-1.1 に示す。採取した藻類群はそれぞれ Chu 培地で培養し、試験に供するまではほぼ毎週新しい培地への植継ぎを行った。

培養容器には 300 mL の三角フラスコを 4 本用い、それぞれに 200 mL の培地を入れ、継代培養した藻類 A、B、C、D を 1 つの三角フラスコに 0.5 mL 加え、1 フラスコ 1 種類で藻類を培養した。培養条件は、培養温度：24℃、明/暗周期：16/8 時間、照度：約 5,600 lux、振とう速度：80rpm で 16 日間の培養を行った。培養液は 0、2、4、6、8、10、12、16 日目に 13 mL 採取し、孔径 0.45 μm のシリンジフィルターでろ過し、DOC と EEM を測定した。培養中の藻類量は培養液の 650 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーによりほぼ毎日測定した。

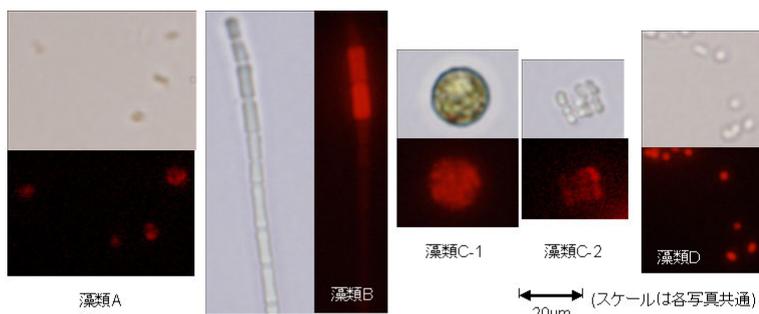


図4-1.1 培養実験に使用した藻類の写真

表4-1.1 Chu培地の組成

培地組成		PIV金属混液組成	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.05757g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.196g
K ₂ HPO ₄	0.02g	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.036g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025g	ZnCl ₂	0.0105g
Na ₂ CO ₃	0.02g	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.001g
FeCl ₃ ·6H ₂ O水溶液	19.6g/Lの液を68 μ L	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0025g
PIV金属混液	1000 μ L	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1.0g
water	1L	water	1L

4-1-3 藻類の分解に伴う DOM の特性把握実験

(1) 対象試料

分解実験対象藻類は、4-1-2 と同様である。

(2) 実験方法

藻類に由来する DOM の湖内での消長を把握するため、藻類培養液の分解実験を行った。藻類 A、B、C、D の分解実験用培養液は、330 mL の Chu 培地で 1 週間培養したものである。分解実験には、ろ過処理を行わず、3 本の 300 mL 三角フラスコに 100 mL ずつ分注し、その後の分析に必要な水量を考慮し、超純水 20 mL を加えて

液量を 120 mL とした。そこに、GF/B でろ過した湖水（藻類 A、B、C には霞ヶ浦湖水、藻類 D には琵琶湖湖水）を 1.2 mL 添加した。分解の条件は 20℃、暗所とし、1 週間に 3 回の頻度で約 5 秒間の攪拌を行った。分解実験開始後 0、14、56 日目に、三角フラスコを 1 本抜き取り、DOC、EEM、UVA₂₅₄ を分析した。なお、本実験は 4-1-1 の夏季の分解実験と併せて行った。

冬季の霞ヶ浦と琵琶湖の湖水中の藻類を培養し、その藻類を含む培養液の分解実験を実施した。なお、冬季の実験ではフローサイトメトリーによる特定藻類の分取は行っていない。実験に使用した藻類は、平成 22 年 12 月の安曇川沖表層水と霞ヶ浦湖心の表層水を Chu 培地で培養したものである。分解実験用の両藻類は、Chu 培地 1,000 mL で培養し、300 mL 三角フラスコ 6 本に培養液をろ過処理無しで 120 mL ずつ分注し、それぞれに対応する GF/B でろ過した湖水を 1.2 mL 添加した。分解条件や分析項目は前記夏季の藻類培養液の分解実験と同様であり、0、7、14、28、56、98 日目に水質分析を行った。なお、本実験は 4-1-1 の冬季の分解実験と併せて行った。

4-1-4 河川水および下水処理水を用いた藻類の培養と分解実験

実際の湖水での藻類に由来する DOM の質・量的変化を評価するためには、培地による培養実験だけでは不十分である。より実際の湖の環境に近い条件で DOM の質・量的変化を解明することを目的として実河川水と実下水処理水による藻類の培養とその藻類培養液の分解実験を行った。

(1) 対象試料

霞ヶ浦流域の河川水は、桜川上流、桜川下流、小野川、新利根川、花室川、鉾田川、琵琶湖流域の河川水は、安曇川、姉川、日野川、白鳥川、野洲川、葉山川である。

(2) 実験方法

霞ヶ浦流域では平成 22 年 2 月に採水した河川水 6 試料（桜川上流、桜川下流、小野川、新利根川、花室川、鉾田川）と下水処理水 1 試料（計 7 試料）を、琵琶湖流域では同年 2 月に採水した河川水 6 試料（安曇川、姉川、日野川、白鳥川、野洲川、葉山川）と下水処理水 1 試料（計 7 試料）を実験に使用した。

本実験では、各水試料を用いて藻類培養を行い、藻類培養液の分解実験を実施する系（藻類培養系）と、藻類培養を行わずに分解実験のみを行う系（分解実験系）を設定した。藻類培養系では、GF/B でろ過した各河川水および下水処理水 400 mL に、それぞれの流域に対応した湖水を 1vol% の割合で加え、L 字型藻類培養フラスコを用いて藻類の培養実験を行った。藻類の培養は、室温：24℃、照度：10,000 lux、明/暗周期：16/8 時間の条件で 14 日間実施した。14 日目の藻類培養液は、GF/B でろ過後、DOC、EEM、UVA₂₅₄ および未ろ過試料の 650 nm 吸光度と全細菌数を測定した。藻類培養液は、ろ過処理なしで 300 mL 三角フラスコに 100 mL ずつ分注し、シリコセンをはめ、重量を測定した後、4-1-1 と同様に暗条件での分解実験を行った。分解実験の期間は 98 日間とし、分解実験試料は 28、56、98 日目に GF/B でろ過し DOC、EEM、UVA₂₅₄、ならびに未ろ過の全細菌数の測定を行った。

分解実験系では、GF/B でろ過した試料について、藻類培養を行わず、試料を 300 mL 三角フラスコ 3 本に 100 mL ずつ分注し、湖水を 1vol% の割合で添加し、シリコセンをはめ、暗条件での分解実験を行った。なお、本分解実験では栄養塩の添加は行っていない。

4-2 実験結果および考察

4-2-1 河川水、下水処理水、湖水の DOM の分解実験

図 4-2.1 および図 4-2.2 は、夏季の霞ヶ浦流域試料および琵琶湖流域試料の分解実験期間中の DOC および UVA₂₅₄ の経時変化である。なお、DOM の分解性は 100 日間で評価されることが多い²⁶⁾こと、冬季の分解実験が 98 日であったことから、以下では主に 98 日間の分解挙動について得られた結果について述べる。

霞ヶ浦湖水を植種したアニリン（コントロール試験）の DOC の減少率は、14 日目で 96% に達していたことから、分解に関与する細菌の活性は高かったと考えられる。霞ヶ浦湖水の DOC の減少率は 98 日目でも 6~7% 程度と低かった。霞ヶ浦流入河川水の DOC 減少率は、0% に近かった桜川上流を除いて、98 日目で 10~28% となり湖

水よりも高い値となった。霞ヶ浦流入河川水の中で DOC の減少率が高かったのは小野川と花室川で、98 日目それぞれ 25%、28%となった。下水処理水の DOC の減少率は 16%であった。SRNOM や WEOM の DOC の減少率は、10%以下であった。

琵琶湖湖水を植種したアニリン（コントロール試験）の DOC 減少率は、14 日目で 95%に達していたことから、琵琶湖の実験系でも分解に関与する細菌の活性は高かったと考えられる。しかし、琵琶湖北湖の表層水および深層水の DOC の減少は、98 日目でもほとんど観られなかった。南湖（表層水）でも DOC の減少率は 6%程度であった。琵琶湖流入河川で 98 日目の DOC の減少率が高かったのは葉山川で 20%であった。98 日目の琵琶湖の下水処理水の DOC 減少率は 26%であった。

波長 250nm 付近の吸光度は不飽和二重結合やベンゼン環を有する有機物を反映しており、DOC 濃度と相関関係があることが報告されている²⁷⁾ことから、UVA₂₅₄により DOM の質的特性の変化の概要をとらえられる可能性があるため、本実験では分解期間中の UVA₂₅₄の変化を調査した。98 日目の UVA₂₅₄の減少率は、霞ヶ浦湖心と釜谷沖の湖水では 14%および 7%、琵琶湖北湖の表層水では 11%となった。流入河川水の 98 日目の UVA₂₅₄の減少率は湖水より高くなる傾向を示した。

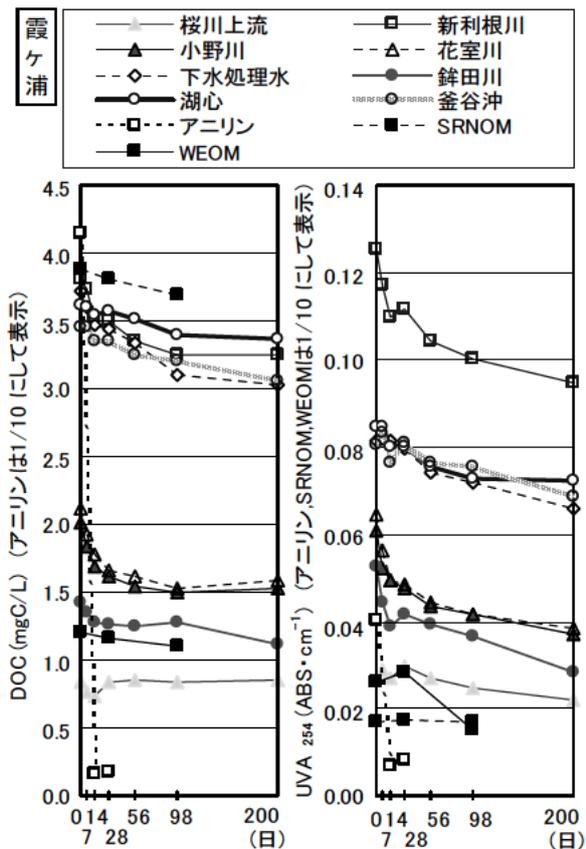


図 4-2.1 霞ヶ浦流域の試料の DOC, UVA₂₅₄の分解実験の結果（夏季）

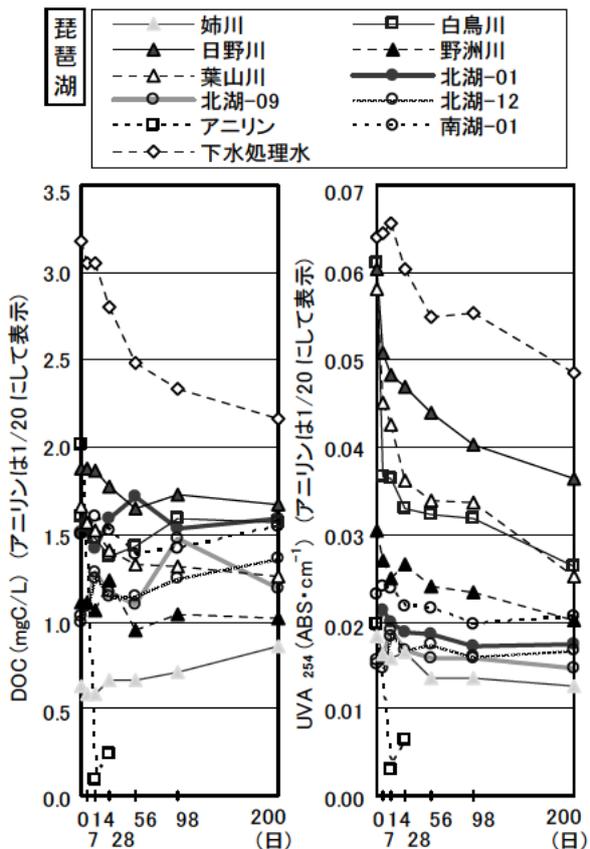


図 4-2.2 琵琶湖流域の試料の DOC, UVA₂₅₄の分解実験の結果（夏季）

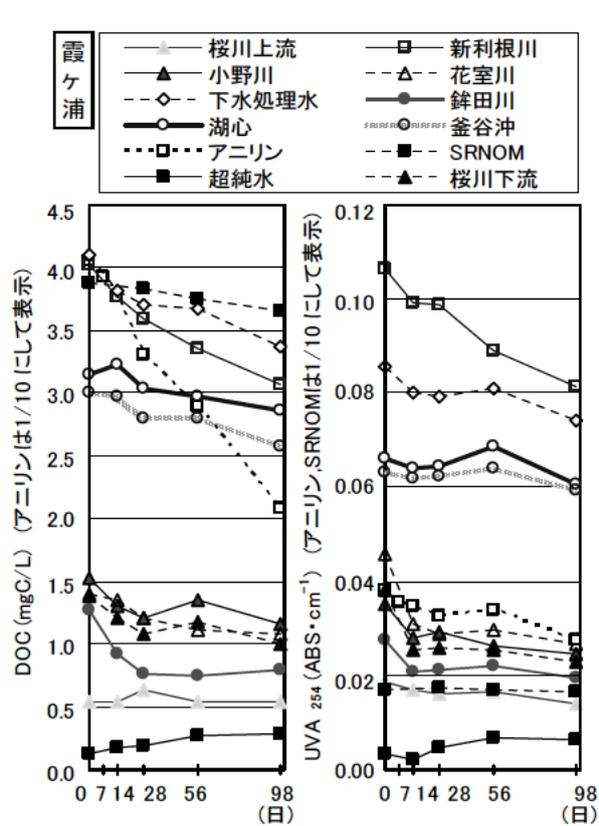


図 4-2.3 霞ヶ浦流域の試料の DOC, UVA₂₅₄ の分解実験の結果 (冬季)

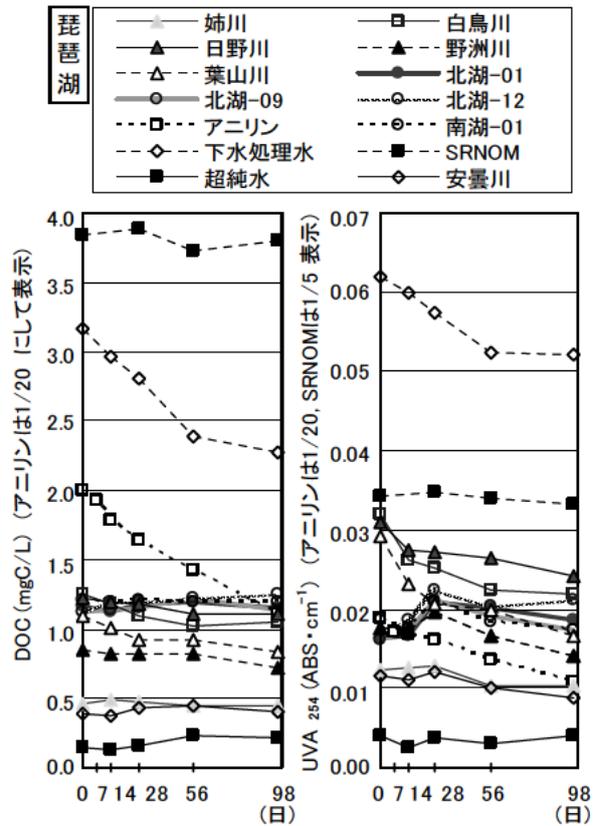


図 4-2.4 琵琶湖流域の試料の DOC, UVA₂₅₄ の分解実験の結果 (冬季)

図 4-2.5、図 4-2.6 は夏季の霞ヶ浦流域試料と琵琶湖流域試料の EEM スペクトル上の各ピーク強度の分解実験期間中の変化である。霞ヶ浦流域試料では、桜川上流以外で湖水、河川水ともに Ex230nm/Em300nm, Ex230nm/Em340nm, Ex230nm/Em425nm の蛍光強度が 98 日目まで低下する傾向が観られた。琵琶湖流域の試料でも同様の傾向が観られた。図 4-2.8 は河川、湖水、下水処理水のタンパク質様物質とフルボ酸様物質を反映する各ピーク強度の減少率を示したものである。タンパク質様物質を反映する蛍光強度の減少率が高く、花室川や葉山川では Ex230nm/Em300nm のピーク強度の減少率は約 60% となった。DOM 中のタンパク質様物質はフルボ酸様物質より変性されやすいと考えられる。

図 4-2.3 および図 4-2.4 は、冬季の霞ヶ浦流域試料と琵琶湖流域試料の分解実験期間中の DOC、UVA₂₅₄ の経時変化である。図 4-2.7 は冬季の分解実験における琵琶湖湖水の EEM スペクトル上の各ピーク強度の変化である。冬季の分解実験では霞ヶ浦、琵琶湖ともアニリンの DOC 減少率が 50% 程度であり、夏季と比較して接種した細菌の活性は低かったことがわかる。夏季と冬季で DOC の減少率を比較すると、夏季の釜谷沖の湖水は 7%、冬季では 14%、夏季の銚田川の河川水は 10%、冬季は 36% と冬季で高くなっていった。その他の湖水試料では、夏季と冬季で DOC の減少率に大きな変化は観られなかった。Ex230nm/Em300nm, Ex230nm/Em340nm の蛍光強度は夏季の分解実験では 7 日目に、冬季の分解実験では 28 日目に高くなる傾向を示した。

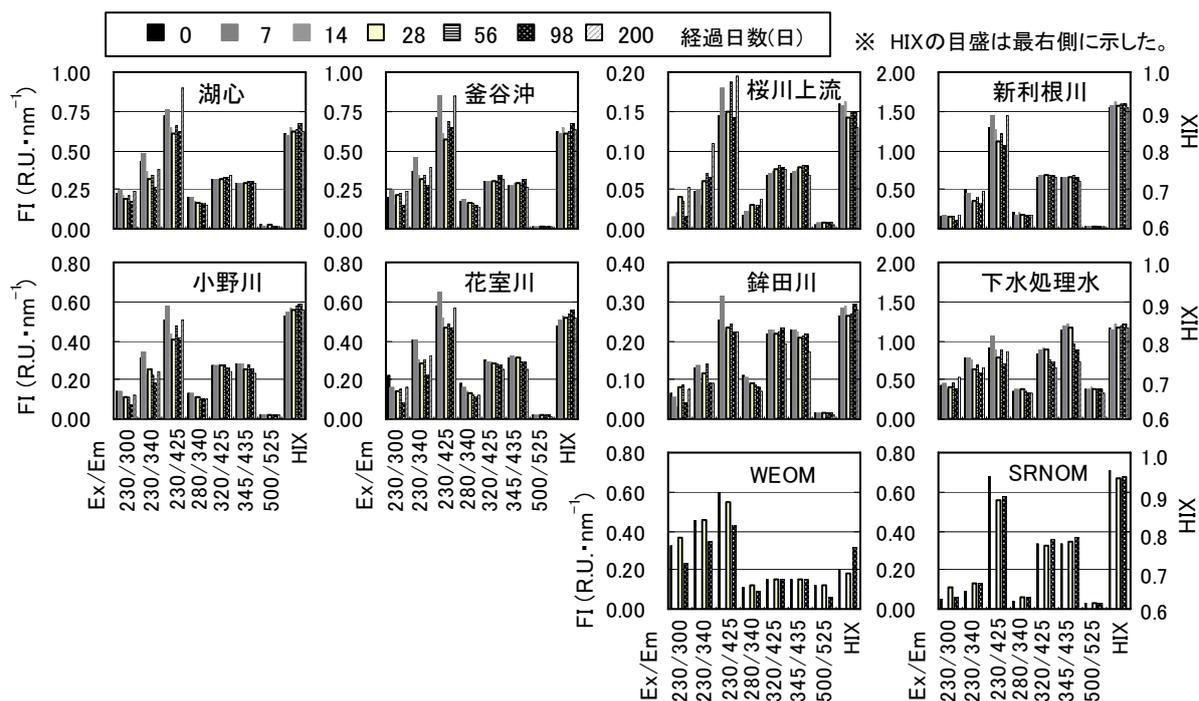


図 4-2.5 夏季の分解実験における EEM の変化(霞ヶ浦流域)

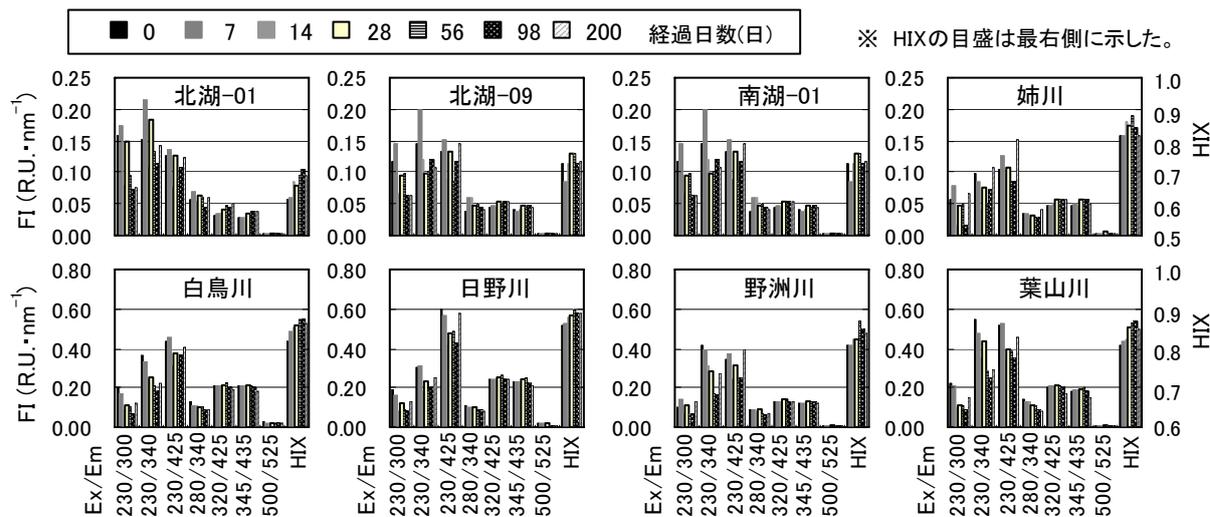


図 4-2.6 夏季の分解実験における EEM の変化(琵琶湖流域)

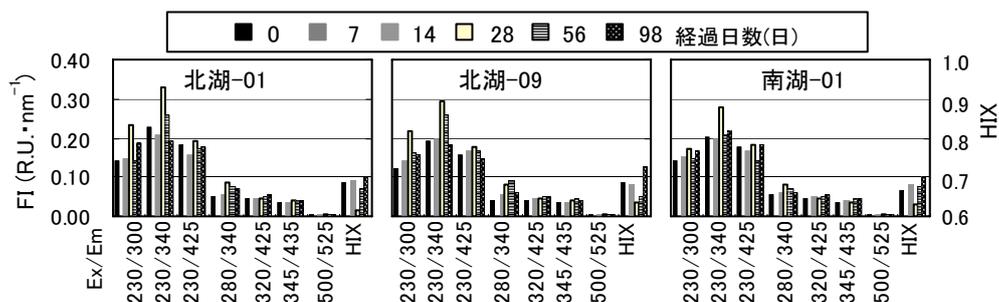


図 4-2.7 冬季の分解実験における琵琶湖湖水の EEM の変化

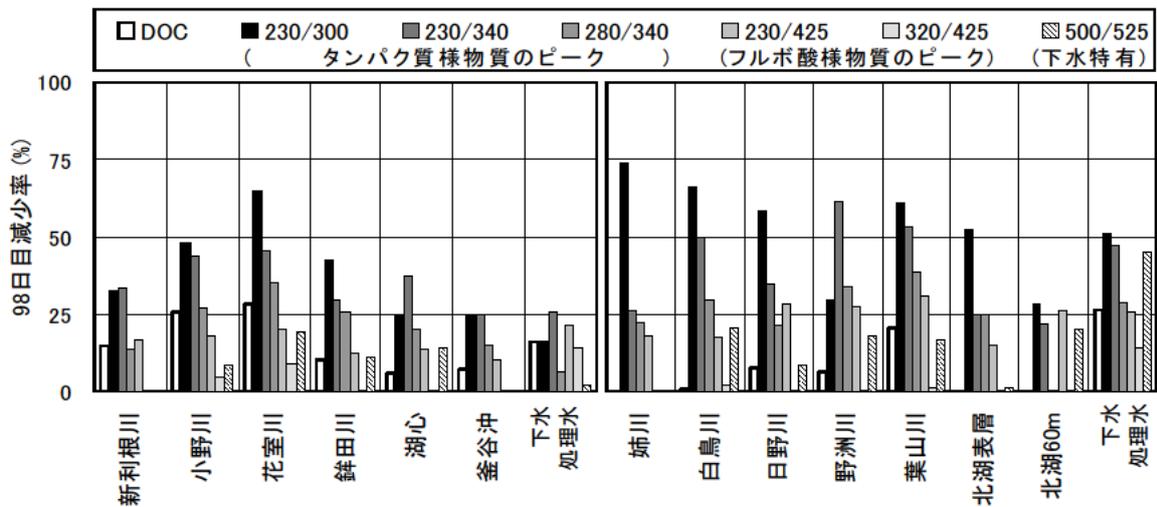


図 4-2.8 夏季の分解実験における蛍光強度の 98 日目の減少率

図 4-2.9 は、夏季と冬季の琵琶湖湖水の全細菌数の経時変化である。全細菌数は、夏季では分解実験開始から 7 日目に最大となるが、冬季の分解実験では、28 日目に高くなった。Ex230nm/Em300 nm、Ex230nm/Em340nm のピークは、細菌数との関係が示唆され、細菌等の微生物に由来する可能性もあった。

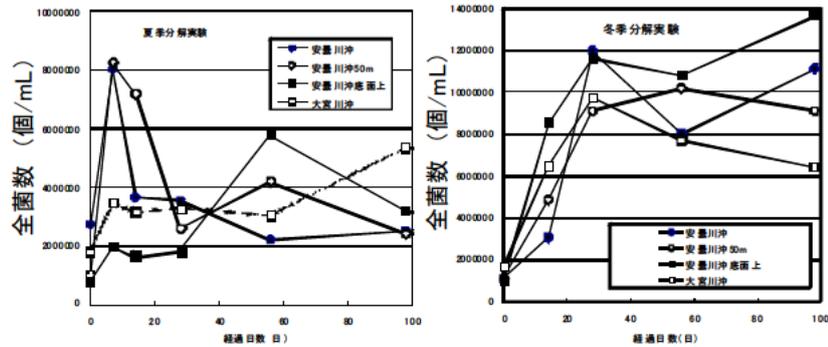


図 4-2.9 琵琶湖湖水の分解実験期間中の全細菌数の変化

表 4-2.1 DOC の 1 次分解反応速度係数 (d^{-1})

	夏季分解実験		冬季分解実験		福島ら ²⁸⁾ の報告値より抜粋			
	0d-28d	28d-98d	0d-28d	28d-98d	0d-20d	20d-100d		
霞ヶ浦	桜川上流	-0.0002	0.0001	-0.0063	0.0024	清明川	0.0052	0.0018
	桜川下流	-	-	0.0087	0.0012	桜川下流	0.0041	0.0024
	新利根川	0.0030	0.0011	0.0041	0.0022	新川	0.0060	0.0020
	小野川	0.0077	0.0011	0.0086	0.0004	下水処理水	0.0046	0.0023
	花室川	0.0086	0.0013	0.0053	0.0015			
	銚田川	0.0043	-0.0002	0.0180	-0.0007			
	湖心	0.0004	0.0007	0.0013	0.0008			
	釜谷沖	0.0011	0.0006	0.0026	0.0012			
下水処理水	0.0027	0.0015	0.0036	0.0014				
琵琶湖※1	日野川	0.0020	0.0004	0.0013	0.0008			
	葉山川	0.0059	0.0009	0.0062	0.0015	安曇川	0.0076	0.0015
	北湖表層	-0.0018	0.0005	-0.0006	0.0004	日野川	0.0048	0.0008
	下水処理水	0.0045	0.0026	0.0043	0.0030	表層湖水	0.0047	0.0014

※1: 琵琶湖流域については、DOC濃度の減少傾向が観られた3試料と北湖表層のみを掲載

DOM の分解は指数関数で近似され、その傾きは約 30 日目までは大きく、その後小さくなるのが報告されている²⁸⁾。表 4-2.1 は、夏季と冬季の分解実験における、0 日目から 28 日目までと 28 日目から 98 日目までの DOC の 1 次分解反応速度係数である。霞ヶ浦湖水では 28 日目までの 1 次分解反応速度定数は夏季と冬季のどちらも桜川上流を除いて流入河川水より低い値を示した。琵琶湖の湖水の

DOC 濃度は減少傾向を示さず、1 次分解反応速度定数は負値となった。夏季分解実験では、霞ヶ浦の流入河川のうち花室川の 28 日目までの 1 次分解反応速度定数が $0.008 d^{-1}$ と高い値を示した。琵琶湖流域では葉山川で 28 日

目までの1次分解反応速度定数が比較的高くなった。福島ら²⁸⁾は西浦の新川で1次分解反応速度定数が高くなることを報告しており、流域に市街地を含む河川水のDOMは易分解性物質の割合が多い可能性がある。冬季分解実験では、銚田川の28日目までの1次分解反応速度定数が夏季より高くなっていた。冬季の銚田川は易分解性物質の割合が多くなっていた可能性がある。

本分解実験から、北浦では冬季に湖水DOMの分解性が高まる結果となったが、霞ヶ浦西浦湖水のDOCの減少率は10%程度、琵琶湖湖水のDOCの減少率は0%に近く、湖水中のDOMは難分解性であることが示された。霞ヶ浦流入河川水のDOCの減少率は20%程度、琵琶湖流入河川水のDOCの減少率は10~20%であることがわかった。河川水の中で、花室川や葉山川のDOCの減少率が高かったが、これらの河川は流域内に都市域を含むことから、都市由来のDOMは易分解性のDOCの割合が多く、DOCの減少率が高くなるものと考えられた。森林系河川である桜川上流や姉川は、初期DOC濃度が低く、分解性評価は難しいが難分解性であるといえる。霞ヶ浦と琵琶湖の下水処理水の減少率はそれぞれ16%、26%となった。本実験結果から河川水由来のDOMは湖内で10~20%程度減少する可能性があった。今回の分解実験は栄養塩を添加した条件下での分解実験であったため、DOCの減少率を過大評価している可能性もあり、本分解実験条件より低濃度の栄養塩濃度である実湖内でのDOMの分解率はさらに低い可能性がある。UVA₂₅₄や98日目までの各ピークの蛍光強度は減少傾向を示しており、湖内でのDOMはCO₂までの分解には至らないが、その化学構造は変化していることが示された。特に、EEMではタンパク質様ピークの蛍光強度が低下する傾向が観られた。これらのDOMは湖内で化学構造の変化により蛍光強度が減少していくものと考えられた。

4-2-2 藻類の増殖に伴うDOMの特性把握

藻類A、B、C、Dの培養期間中の650nmの吸光度とDOCの関係を図4-2.10に示す。650nmの吸光度の経日変化から、どの藻類も3日目から6日目ごろまでに藻体の増加が始まっていることがわかる。藻類B(糸状性藍藻)では藻体が群体を形成し分散しなくなったため8日目以降の吸光度が減少する結果となった。藻類D(琵琶湖微細プランクトン)では12日目から16日目にかけて吸光度が増加した。藻類A、B、Cについては、概ね3日目から8日目までが増殖期、8日目以降が定常期となっていた。各藻類の培養期間中のDOC濃度の増加は、藻類の増殖とともに始まり、藻類の増殖が止まってからも増加し続けた。16日目のDOCから0日目のDOCを引いてDOCの増加量を求めると、藻類A、B、C、Dそれぞれ7.3、13.2、10.2、4.9mgC/Lとなった。2日間隔で測定したDOC値から、DOCの増加速度を求めた結果を図4-2.11に示す。いずれの試料も概ね10日目前後にDOCの増加速度が高くなる傾向が観られた。DOCの増加速度と藻類濃度の関係を観るため、各経過日間ごとにDOCの増加速度を藻類培養液の吸光度の平均値で割って単位藻体濃度あたりのDOC増加速度を求めた。藻類A、Cの単位藻体濃度あたりのDOC増加速度を図4-2.12に示す。単位藻体濃度あたりのDOC増加速度は藻類Aでは4-6日目に、藻類Cでは2-4日目に最大となった。

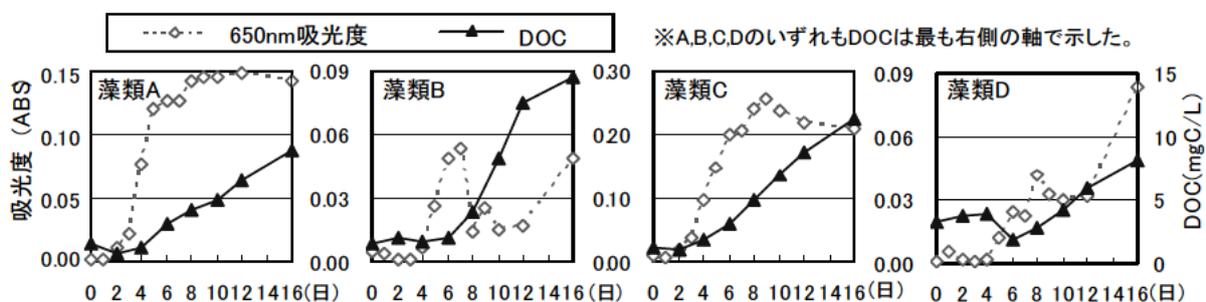


図 4-2.10 各藻類の培養期間中の650nm 吸光度とDOCの関係

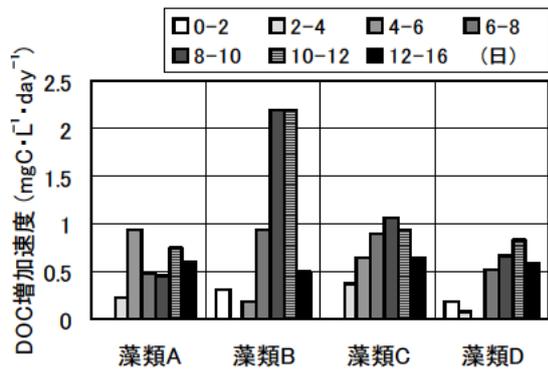


図 4-2.11 各藻類の DOC と増加速度の関係

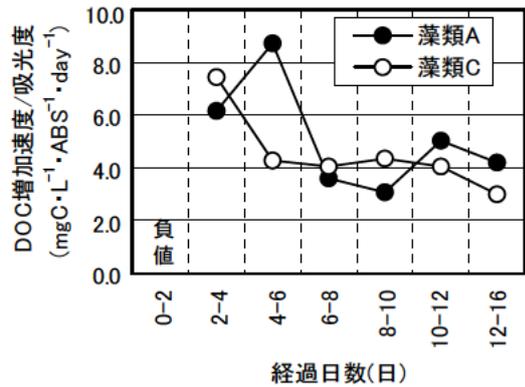


図 4-2.12 単位藻類あたりの DOC 増加速度

本実験で観察された EEM スペクトル上の主要なピークの位置を図 4-2.13 に、各藻類試料の 0、6、16 日目の EEM スペクトルを図 4-2.14 に示す。16 日目の EEM スペクトルに着目すると、藻類 A、B、C では Ex225nm/Em315nm 付近 (Peak①) に最も強いピークが、Ex280nm/Em325nm 付近 (Peak②) に 2 番目に強いピークが観察された。16 日目の藻類 D で最も強いピークの位置は Ex220nm/Em345nm、2 番目は Ex280nm/Em345nm であった。藻類によってピークの現れる位置が異なることが分かった。Ex320nm/Em425nm 付近 (Peak③) のピークは各藻類に共通して観察され、Ex225nm/Em410nm 付近 (Peak④) のピークは藻類 A、B で観察された。

藻類の増殖過程における DOM の質の変化を見るため、経過日ごとにピーク強度と DOC の比 (FI/DOC) を求めた。各試料の FI/DOC の変化を図 4-2.15 に示す。また、平成 21 年 8 月の霞ヶ浦 (西浦) 湖心と琵琶湖安曇川沖の湖水の FI/DOC を同図

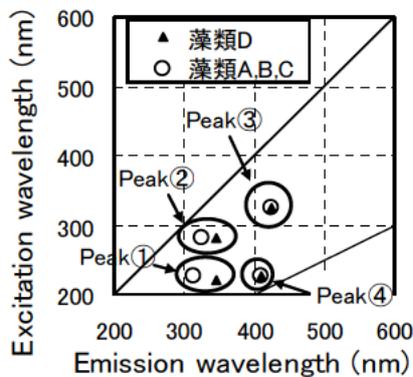


図 4-2.13 藻類培養液中に確認された EEM の主なピーク

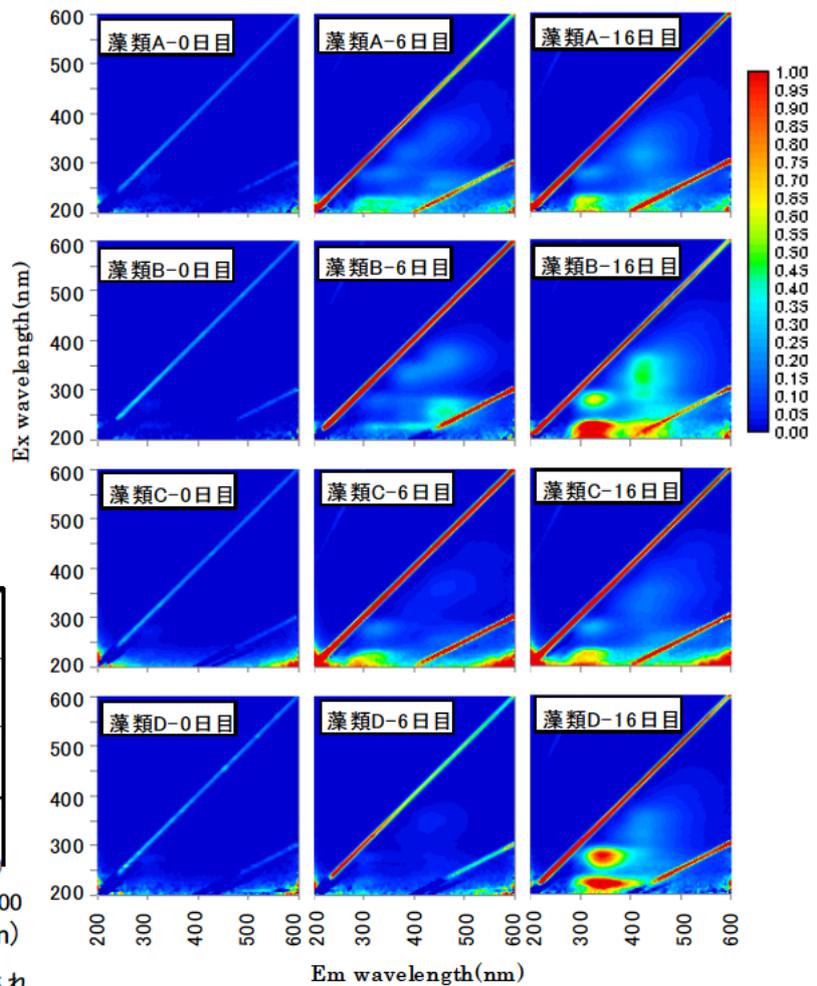


図 4-2.14 各藻類培養液中の EEM の変化 (左から 0, 6, 16 日目)

に示した。藻類 A、B、C ではどのピークの FI/DOC も 4～8 日目に最大となった。藻類 D では 16 日目に最大となった。藻類 A、B、C の培養期間後半は DOC に占める各ピークの蛍光強度は低下する傾向を示している。藻類の増殖期は蛍光特性を有する DOM が増加し、それ以降は、蛍光を有しない DOM が増加していたと考えられる。

平成 21 年 8 月の霞ヶ浦湖水の FI/DOC と藻類 A、B、C の培養日数ごとの FI/DOC と比較すると、藻類 B の 6 から 8 日目の FI/DOC と近い結果になった。平成 21 年 8 月の琵琶湖湖水の FI/DOC と藻類 D の FI/DOC を Peak① で比較すると、琵琶湖湖水の Peak① の FI/DOC は、培養後 12 日目と 16 日目の中間程度の値となった。

4-2-3 藻類の分解に伴う DOM の特性把握

藻類 A、B、C、D の分解実験期間の DOC 濃度の変化を図 4-2.16 に示す。0 日目の藻類 A、B、C、D の培養液の DOC は、それぞれ 3.2、4.5、2.6、13.9 mgC/L であった。図より藻類 D (琵琶

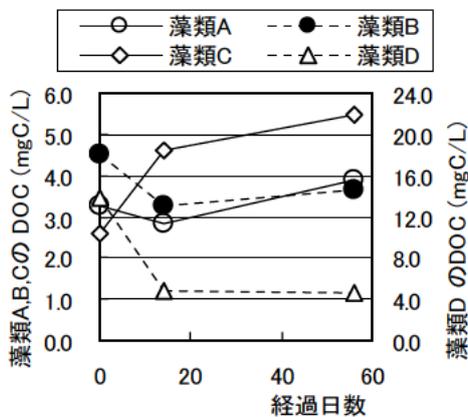


図 4-2.16 藻類分解実験の DOC の変化

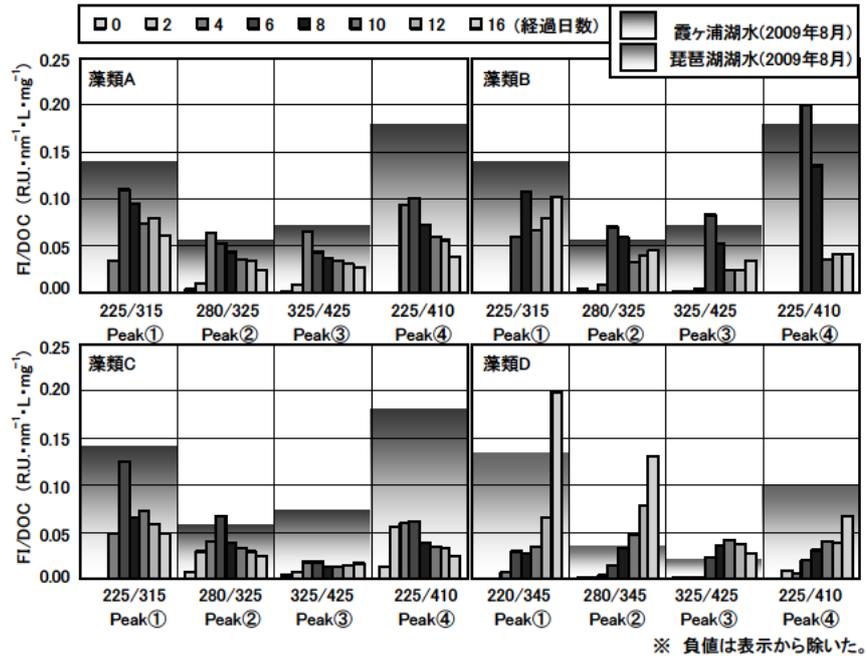


図 4-2.15 各藻類培養液中の F/DOC 比の変化

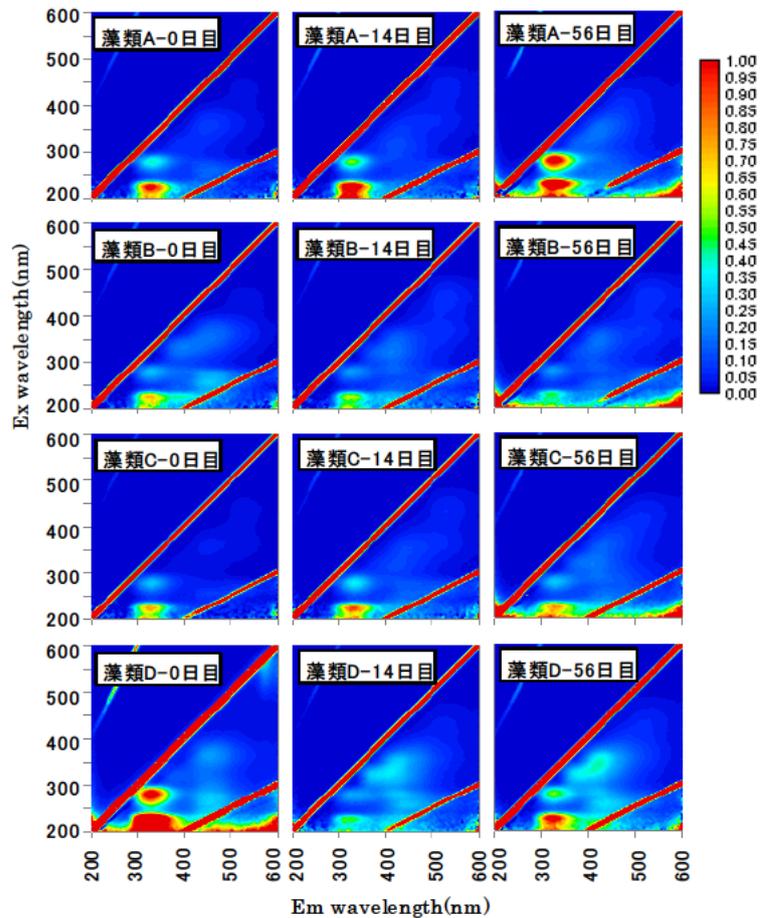


図 4-2.17 分解実験期間中の EEM の変化 (左から 0, 14, 56 日目)

湖微細プランクトン) の DOC の減少率は高いことが分かる。一方で、藻類 C では、顕著に DOC が増加した。

各藻類分解試料の 0、14、56 日目の EEM スペクトルを図 4-2.17 に示す。また、藻類培養液の代表的な 4 つのピーク位置について蛍光強度の変化を図 4-2.18 に示す。0 日目から 56 日目までの EEM の変化を観ると、藻類 A では Peak① (Ex225nm /Em315nm)、Peak② (Ex280nm/Em325nm) の蛍光強度が増加した。藻類 B では Peak③ (Ex320nm/Em425nm) 以外の 4 つのピーク位置で蛍光強度が減少傾向を示した。藻類 C では蛍光強度の変化が小さく、藻類 D では Peak① (Ex220nm/Em345nm) と Peak② (Ex280nm/Em345nm) の蛍光強度が減少していた。

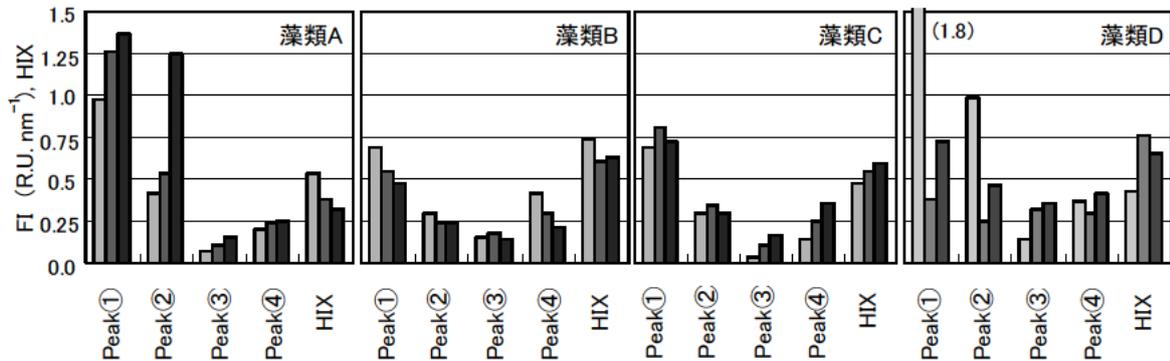


図 4-2.18 藻類 A, B, C, D の分解実験における主要ピークの蛍光強度と HIX の変化 (左から 0, 14, 56 日目)

冬季の霞ヶ浦藻類と琵琶湖藻類の分解実験期間中の DOC の減少率を図 4-2.19 に示す。98 日目の霞ヶ浦藻類の DOC の減少率は 14% となり、琵琶湖藻類では 1 割程度増加していた。冬季の藻類の分解実験では、霞ヶ浦と琵琶湖で DOC の減少率が異なった。

EEM の各ピーク強度の変化を図 4-2.20 に示す。霞ヶ浦藻類は Peak①および②が減少し、Peak③が増加する傾向を示し、琵琶湖藻類では各ピーク強度は大きく変化しなかった。冬季の霞ヶ浦藻類と琵琶湖藻類に由来する DOM は、分解特性が異なる結果を示した。霞ヶ浦の藻類は、糸状藍藻、琵琶湖は直径 5~10 μm 程度の球形の藻類が優先種であった。藻類の種類によって、藻類に由来する DOM の分解特性や EEM の変化が大きく異なることがわかった。冬季の藻類培養液の分解実験から、藻類に由来する DOM は難分解性となる可能性もある。

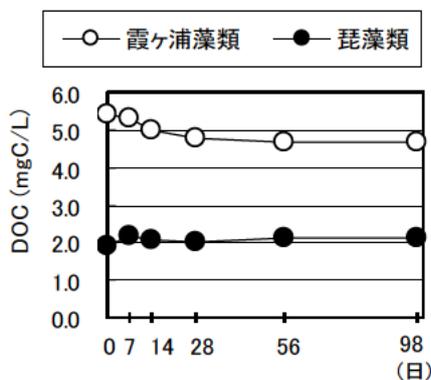


図 4-2.19 冬季藻類分解実験の DOC の変化

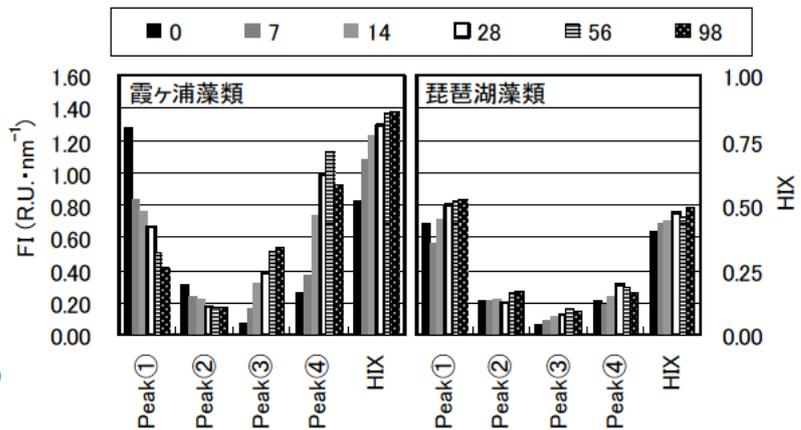


図 4-2.20 冬季藻類分解実験の蛍光強度と HIX の変化

藻類の培養実験および藻類を含む培養液の分解実験から、藻類の増殖にともない DOC が増加することがわかった。また、藻類の分解過程においても DOC が増加する場合もあった。このことから藻類は湖内の DOM の供給源となっていることが改めて示された。EEM スペクトルは藻類によって異なるものの、どの藻類の培養時にも Ex230nm / Em310~340nm、Ex280nm/Em340nm 付近にピークが観られることから、このピークは湖水中の DOM のうち、藻類に由来する DOM の指標になると考えられた。これは、琵琶湖表層で夏季に Ex230nm/Em340nm 付近の蛍光強度が高くなることと一致する結果であった。

4-2-4 河川水および下水処理水を用いた藻類の培養と分解実験

図 4-2.21 は実河川水での藻類培養期間中の 650 nm の吸光度の変化である。霞ヶ浦の流入河川水は、桜川上流以外の河川で 650 nm の吸光度の値が増加し、琵琶湖の流入河川水は、姉川、日野川、野洲川で 650 nm の吸光度が増加していた。実下水処理水を用いた藻類培養実験では両流域ともに 650 nm の吸光度が増加していた。図 4-2.22 上段は、藻類培養系（藻類培養後暗条件で分解実験を行った系）と分解実験系（藻類培養を行わずに暗条件で分解実験のみを行った系）の実験期間中の DOC 濃度の変化である。霞ヶ浦流入河川水のうち花室川や鉾田川の藻類培養系では、暗条件下に移行した後 DOC 濃度が上昇した。これは、暗条件下での藻類の分解過程において DOM が生じたことを示すと考えられた。98 日目には花室川や下水処理水で DOC 濃度が低下したが、これは藻類の分解が進み、また蓄積した藻類由来の DOM も分解したためと考えられた。琵琶湖流入河川では、姉川で同様に DOC 濃度の増加が観られた。図 4-2.22 下段は、藻類培養および分解実験期間中の全細菌数の経時変化である。藻類培養系には分解実験系と比べて細菌が多く存在しており、藻類に由来する DOM により細菌が増加したと考えられた。霞ヶ浦と琵琶湖では細菌の増殖特性が異なっており、藻類由来の DOM の質的性質の違い

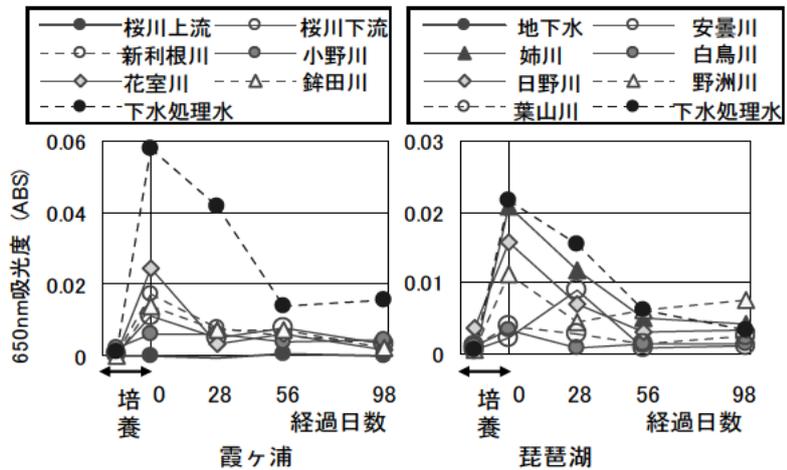


図 4-2.21 霞ヶ浦と琵琶湖の藻類培養系の 650nm 吸光度の変化

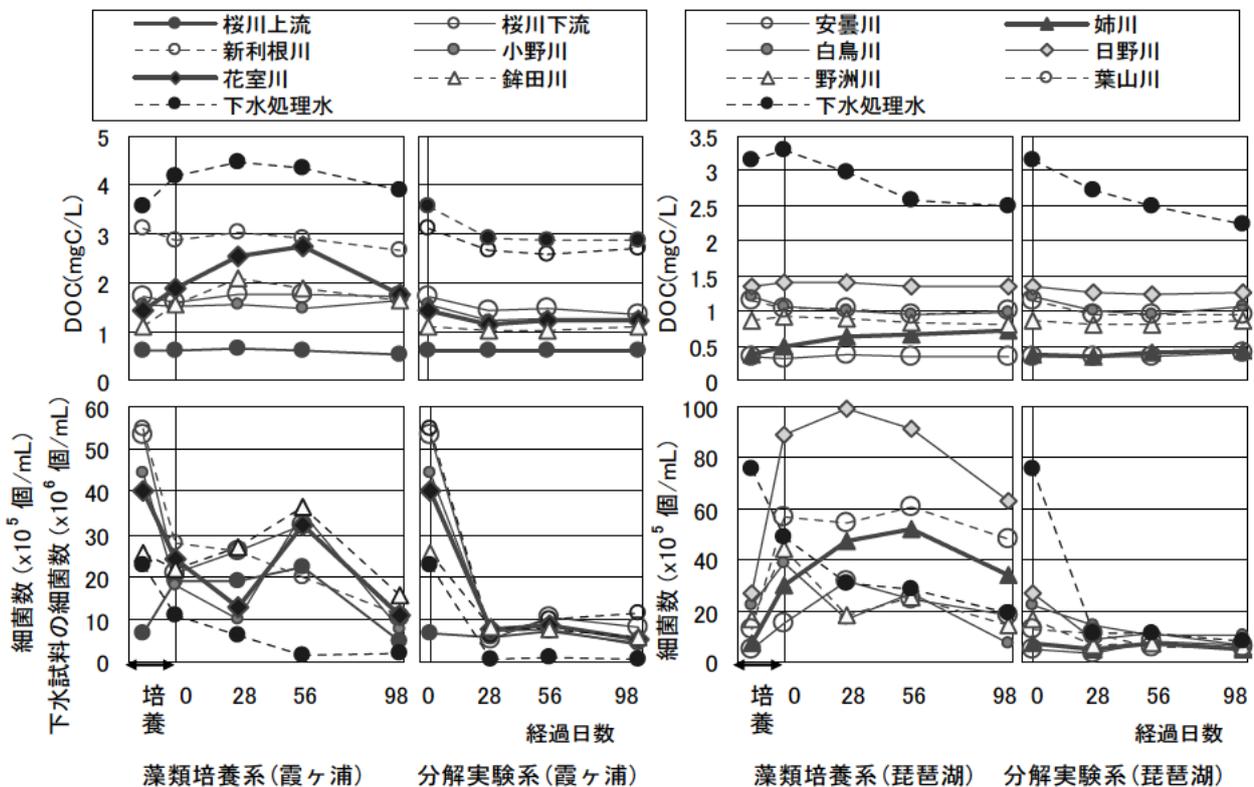


図 4-2.22 実験期間中の藻類培養系と分解実験系の DOC と全細菌数の変化 (図上段: DOC、図下段: 全菌数)

を反映しているものと考えられる。

図 4-2.23 は分析日ごとに藻類培養系の DOC 濃度から分解実験系の DOC 濃度を差し引いて求めた、藻類由来の DOC 濃度である。98 日目の藻類由来の DOC 濃度は花室川で約 0.5mgC/L、下水処理水で約 1.0mgC/L となった。花室川や銚田川で藻類由来の DOC 濃度が高く、河川からの栄養塩の負荷が湖水中の藻類由来の DOC 濃度に影響を及ぼす可能性が示唆された。花室川、銚田川、下水処理水では藻類由来の DOC 濃度は 28、56 日目に高くなっていたことから、湖水中の藻類の分解による DOM の放出は、藻類増殖後 2 ヶ月以上続くものと考えられた。琵琶湖流域の河川では藻類由来の DOC 濃度は姉川で高く、0.3mgC/L となった。図 4-2.24 は実験開始時 (0 日目) と 98 日目の DOC 濃度を比較したものである。霞ヶ浦流域の小野川、花室川、銚田川、下水処理水および琵琶湖流域の姉川で 98 日目の藻類培養系の DOC 濃度が実験開始時 (0 日目) より高くなっていた。河川水および下水処理水中の栄養塩により湖水中で藻類が増加すると、河川水由来の DOC の分解量より多くの藻類由来の DOC が増加する場合もあった。

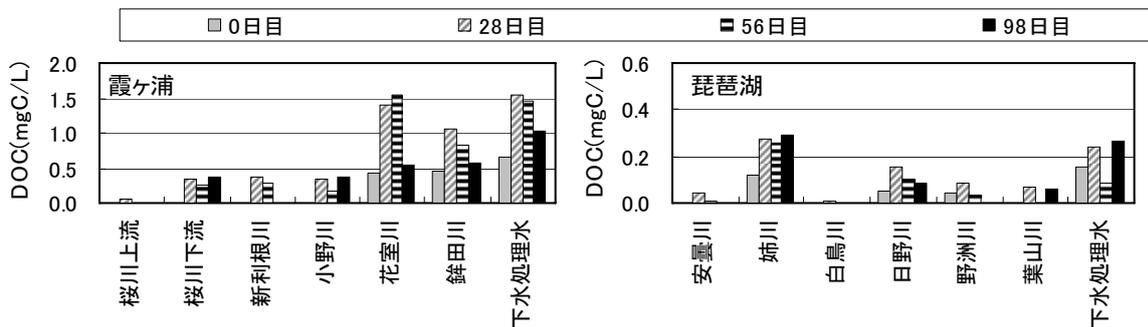


図 4-2.23 藻類由来の DOC 濃度の変化

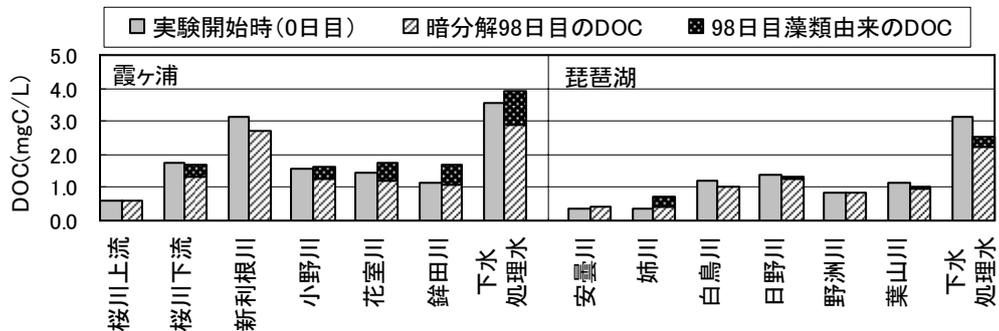


図 4-2.24 実験開始時 (0 日目) の DOC 濃度と 98 日目の藻類培養系の DOC 濃度の比較

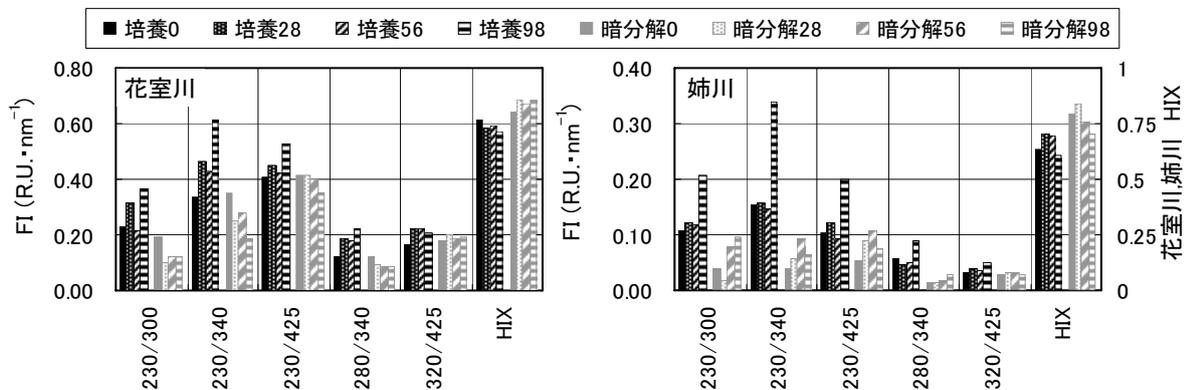


図 4-2.25 藻類培養系と分解実験系の蛍光ピーク強度の変化

図 4-2.25 は藻類培養系で DOC が比較的大きく増加した花室川と姉川について、各ピークの蛍光強度の変化を示したものである。藻類培養系と分解実験系の蛍光強度を比較すると、Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm、Ex280nm/Em340nm のタンパク質様物質を反映する蛍光強度が、藻類培養系で高くなっていった。図 4-2.26 は花室川と姉川の実験開始時（分解実験系 0 日目）、藻類培養系 98 日目および分解実験系 98 日目の FI/DOC をレーダーチャートで示したものである。これらの試料では藻類培養系 98 日目にフルボ酸様ピーク（Ex320nm/Em425nm）よりもタンパク質様ピークで FI/DOC が高くなった。藻類の増加および分解に伴い湖水中の DOC に占めるタンパク質様物質の割合が増加することが明らかとなった。

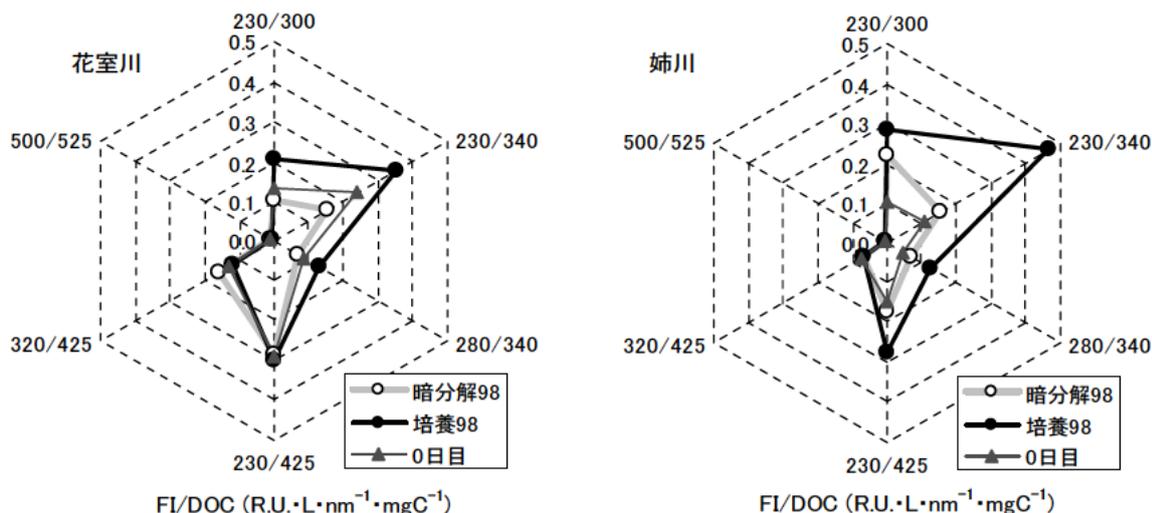


図4-2.26 藻類培養系98日目と分解実験系98日目および実験開始時(0日目)のFI/DOCの比較

4-3 まとめ

霞ヶ浦流域、琵琶湖流域内の湖水、河川水、下水処理水に含まれる DOM の分解実験と、両湖から採取した藻類の培養および分解実験から、DOM の質・量的特性の変化を明らかにした。

本研究で得られた結果を以下に述べる。

- 1) 霞ヶ浦の湖水の DOC 減少率は、10%程度、琵琶湖湖水の DOC の減少率は 0%に近く、湖水中の DOM は難分解性であることが示された。
- 2) 霞ヶ浦の流入河川水の 98 日目の DOC の減少率は 20%程となり、琵琶湖の流入河川水の DOC の減少率は 56 日目には 10~20%となった。流域に市街地を含む河川水中の DOC の減少率は高い傾向が観られた。
- 3) 霞ヶ浦と琵琶湖の下水処理水中の DOC の 98 日目の減少率はそれぞれ、16%、26%となった。琵琶湖流域の下水処理水の減少率は河川水よりも高かった。
- 4) 蛍光強度の減少率は、フルボ酸様物質を反映するピークより、タンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm のピークで高かった。河川水由来のタンパク質様物質は湖水中で変性されやすいと考えられる。フルボ酸様物質を反映するピーク強度の減少率は低いため、これらの物質は大きく変性されることなく、湖水に存在する可能性が示唆された。
- 5) 培地による藻類培養実験から、藻類の種類によって EEM スペクトルは異なるものの、Ex230nm/Em340nm、Ex280nm/Em340nm 付近のタンパク質様ピークが共通して強く現れていた。これらのピークは藻類由来の DOM の指標になると考えられた。
- 6) 実河川水および実下水処理水による藻類の培養および分解実験から、藻類の分解過程で DOM が生成されることを明らかにした。藻類の増加および分解に伴い湖水中の DOC に占めるタンパク質様物質の割合が増加することが明らかとなった。

5 おわりに

本研究では、霞ヶ浦流域および琵琶湖流域を対象流域として、まず湖水に蓄積される難分解性溶存有機物のその質的特性を明らかにするとともに、より詳細に分類するための方法論を確立した。さらに、実環境において DOM の質的特性の実態把握や発生源を推定するとともに、DOM の分解性試験等から湖沼における（難分解性）溶存有機物の挙動を明らかにした。

以下に本研究で得られた知見を目標に沿ってまとめる。

湖水中の（難分解性）溶存有機物の分類方法および質的特性の評価手法の開発

- (1) 霞ヶ浦流域および琵琶湖流域における網羅的な採水調査を実施し、湖水、流入河川水、下水処理水の EEM を測定した結果、Ex230nm/Em300nm、Ex230/Em340nm、Ex230nm/Em425nm、Ex280nm/Em320nm、Ex320nm/Em425nm、Ex345nm/Ex435nm、Ex500nm/Em525nm の位置に蛍光ピークが現われることがわかった。これらのピーク強度は試料によって異なっており、EEM はこの違いにより、湖水中の DOM の質的变化および発生源やその寄与の推定を簡便かつ迅速に行うことができることが分かった。EEM による DOM の質的特性の把握は、蛍光性物質に限定されるものの、その簡便性、迅速性により、湖沼流域における DOM のモニタリング手法として有効である。
- (2) 湖水の有機組成分析から、湖内では様々なアミノ酸が検出され、主要な構成アミノ酸は Gly、Ala、Asp、Gu であり、霞ヶ浦湖水では Thr の含有率が高かった。糖類組成は、流域内および流域間で組成が異なり、湖内の糖類は、藻類や細菌の内部生産に起因する成分が多く、陸域からの影響は小さいことが明らかとなった。琵琶湖の DOM は細胞外多糖（EPS）の寄与が示唆された。脂質は、湖水、河川水、下水処理水から検出され、DOM の SL（単純脂質）および TG（トリグリセリド）含有率は、試料間で異なり、DOM の脂質組成を規定していることが示唆された。TG の脂肪酸組成は非常に多様であり、分類指標となることが期待できる。
- (3) ¹H-NMR による DOM の構造解析を行った結果、琵琶湖流域および霞ヶ浦流域の DOM は脂肪族性に富んでいることを明らかにした。
- (4) LC/ESI-TOF MS を用いて逆相系カラムによるグラジエント条件で DOM の網羅的分析を行った結果、検出されたピークを保持時間と m/z の関係で整理することにより、DOM の極性や質量分布特性の把握が可能になった。
- (5) ¹H-NMR や LC/MS による網羅的な DOM の検出と統計解析手法を組み合わせることにより、試料間の DOM の類似性や DOM の発生源の推定が行えるものと考えられた。
- (6) 固相抽出による DOM の簡易濃縮・分画法を開発を行った。有機物の吸着特製の異なる 4 種類の固相カートリッジを利用することで濃縮と分画が同時にできることを明らかにした。各画分の DOC を測定することにより、試料間の比較が可能であり、DOM の発生源の簡易推定が可能になると考えられる。本法のコンディショニング等の準備が 1 日程度でできることから、従来の XAD 法と比べて格段に迅速・簡便な方法であることが特徴であった。

湖沼流域における（難分解性）溶存有機物の質的特性および発生源の解明

- (7) 霞ヶ浦西浦および北浦の湖水の DOC 濃度は大きく変化しないものの 9 月に高くなる傾向を示した。DOC 濃度は湖水の採水地点で異なり、河口付近の採水地点では、11、12、1 月に低くなる傾向を示した。霞ヶ浦西浦および北浦のフルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm は概ね 9 月に高くなる傾向を示した。タンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm のピーク強度は、10、11、12 月に低下する傾向を示した。これは霞ヶ浦の藻類濃度が 11、12 月に低下し、内部生産（藻類）が減少したことを反映しているものと考えられた。
- (8) 西浦流入河川の多くは 5、6 月に DOC が約 3 mgC/L と高くなった。この DOC 濃度は、5 月の西浦湖水の DOC 濃度と同程度であった。北浦流入河川でも 5、6 月に DOC 濃度が高くなった。霞ヶ浦西浦、北浦流入河川に

においてフルボ酸様物質を反映する Ex230nm/Em425nm、Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の季節変化は、河川水 DOC 濃度の季節変化と同様の傾向を示し、概ね 5,6 月に高く、夏から秋に向かって低下する傾向を示した。河川によっては、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の季節変化と DOC 濃度の季節変化が同様の傾向を示す場合もあった。

- (9) 琵琶湖湖内の DOC 濃度は、概ね春季から夏季にかけて高くなり、冬季にかけて低下する傾向を示した。採水地点間で DOC 濃度を比較すると、DOC 濃度は北から南に向かって高くなる傾向が観られた。南湖の DOC は北湖より高くなり、南湖の中でも栗津沖は、大宮川沖より高くなる傾向を示した。琵琶湖表層の EEM の各蛍光強度は、Ex320nm/Em425nm の蛍光強度を除き、おおよそ DOC 濃度と同様の傾向を示していた。フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、北湖の表層では採水地点間で大きな差は観られなかった。
- (10) 安曇川沖水深別の DOC 濃度は、5 月から 12 月までは表層で高く、水深に応じて低下する傾向を示した。1 月から 3 月までは DOC 濃度は水深によらず概ね一定となった。Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度は、5、6、7 月では水深 0.5m から 10m で高くなっていることがわかった。5 月から 12 月までは、これらの蛍光強度と藻類濃度の水深分布は概ね一致していたことから、この期間での湖内の Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm を反映する物質は、藻類に由来する DOM であると考えられた。
- (11) フルボ酸様物質を反映する Ex320nm/Em425nm の蛍光強度は、6 月から 12 月は底層で高くなり、底泥からフルボ酸様物質が溶出している可能性があった。1 月から 3 月は水深方向によらず一定となることがわかった。
- (12) 霞ヶ浦と琵琶湖の EEM による DOM の比較から、霞ヶ浦では DOC あたりのフルボ酸様蛍光ピークが高くなり、琵琶湖ではタンパク質様ピークが高くなることがわかった。
- (13) 河川水の DOC 濃度と Ex320nm/Em425nm の蛍光強度の関係を用いて湖水中の外部由来と内部由来の DOC 濃度を推定した結果、外部由来の DOC の割合は霞ヶ浦の湖心と釜谷沖では 50~60%、琵琶湖の安曇川沖と大宮川沖の表層では 20~35%程度となった。

湖沼流域における溶存有機物の分解挙動の解明

- (14) DOM の分解実験から、霞ヶ浦と琵琶湖の湖水の DOC の 98 日目の減少率はそれぞれ、10%、0%となり、湖水中の DOM は分解性が低いことが示された。
- (15) 霞ヶ浦の流入河川水の DOC の減少率は 20%程度、琵琶湖の流入河川水の減少率は 10~20%であることがわかった。河川の中でも、流域に市街地を含む河川水の DOC の減少率は高い傾向が観られた。
- (16) 霞ヶ浦流域と琵琶湖流域の下水処理水中の DOC の 98 日目の減少率はそれぞれ、16%、26%となった。琵琶湖流域の下水処理水の減少率は河川水よりも高かった。
- (17) 河川水中のタンパク質様物質を反映する Ex230nm/Em300nm、Ex230nm/Em340nm の蛍光強度の減少率は、高い値を示した。河川水由来のタンパク質様物質は湖水中で変性されやすいと考えられる。フルボ酸様物質を反映する蛍光強度の減少率は低いため、変性されにくいと考えられ、フルボ酸様物質は大きく変性されることなく、湖水に存在する可能性が示唆された。
- (18) 培地を用いた藻類培養実験から、藻類の種類によって EEM スペクトルは異なるものの、Ex230nm/Em340nm、Ex280nm/Em340nm 付近のタンパク質様ピークが共通に強く現れた。これらのピークは藻類由来の DOM の指標になると考えられた。
- (19) 実河川水および実下水処理水による藻類の培養および分解実験から、藻類の分解過程で DOM が生成され、藻類の増加および分解に伴い湖水中の DOC に占めるタンパク質様物質の割合が増加することが明らかとなった。

6 参考文献

- 1) 霞ヶ浦環境科学センター <http://www.kasumigaura.pref.ibaraki.jp/>
- 2) 滋賀県(2005) 平成 17 年(2005 年)版 環境白書.
- 3) 国土交通省 水質水文データベース <http://www1.river.go.jp/>
- 4) 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター 水質データベース <http://www.lberi.jp/root/jp/bkjindex.htm>
- 5) Thurman, E.M. (1985) Organic geochemistry of natural waters, Springer.
- 6) Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V., Gagosian, R.B. (1990) Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature*, 348, 432-435.
- 7) Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K. (2003) Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to qualify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 37 (24), 5701-5710.
- 8) 日本分析化学会編(1994) 改訂 4 版 分析化学データブック, 丸善.
- 9) 福島武彦、中島俊之、今井章雄、松重一夫、尾崎則篤(2001), EEMs による水中溶存有機物の特性解析, 水環境学会誌, 24 (10), 686-692.
- 10) Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K. (2003) Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 37 (24), 5701-5710.
- 11) Cox, L., Celis, R., Hermosin, M.C., Cornejo, J., Zsolnay, A., Zeller, K. (2000) Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 34 (21), 4600-4605.
- 12) Ohno, T. (2002) Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 36 (4), 742-746.
- 13) 宗宮功(2000), 琵琶湖—その環境と水質形成, 技報堂出版.
- 14) Malcolm, R.L. (1990) The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. *Analytica Chimica Acta*, 232, 19-30.
- 15) USGS, Humic substances in the Swanee River, Georgia, interactions, properties, and proposed structures, Open-File Report 87-557, 1989.
- 16) Leenheer, J.A. (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental Science and Technology*, 15 (5), 578-587.
- 17) 北村友一、鈴木穰(2010), 霞ヶ浦における植物プランクトン群集と溶存有機物の蛍光特性の関係, 第 44 回日本水環境学会年会講演集, 506.
- 18) 土木研究所(2007), 平成 18 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 土木研究所資料, No.4080, 177~191.
- 19) 吉岡崇仁(2000), 三次元蛍光測定による溶存有機物の識別, 琵琶湖研究所所報, 18, 49-53.
- 20) 石井裕一、北村立実、渡邊圭司、小松伸行、天野佳正、矢部徹(2009), 河川の水質形成と集水域の土地利用形態との関係, 水環境学会誌, 32(3), 139-146.
- 21) 山本佳世子、東善広、焦春萌、中島拓男(1999), 滋賀県琵琶湖岸における土地利用変化の把握, 琵琶湖研究所所報, 17, 52-61.
- 22) 日本水道協会(2001), 上水試験方法 解説, 935-941.
- 23) 日本下水道協会(1997), 下水試験方法 上巻, 138-139.
- 24) 北村友一、鈴木穰(2009), フローサイトメトリーによる湖水中の植物プランクトン群集の測定, 環境工学研究フォーラム講演集, 46, 13-15.
- 25) 大村達夫、海田輝之、相沢治郎、小松佳幸、石崎正志、大沼正郎(1991), バッチ培養における *Chlorella vulgaris* および *Microcystis aeruginosa* の細胞外代謝揮発性有機酸の培養液中への蓄積, 水質汚濁研究, 14(9), 615-623.
- 26) 国立環境研究所(2001), 湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究, 国立環境

研究所特別研究報告

- 27) 日本水道協会(2001), 上水試験方法 解説, 224-225.
- 28) 福島武彦、今井章雄、松重一夫、井上隆信、小澤秀明(1997), 湖水溶存有機物の紫外外部吸光度 : DOC 比の特性とそれの水質管理への応用, 水環境学会誌, 20(6), 397-403.

7 研究発表

(紙上発表)

- 1) Kusakabe, T., Ikeda, K., Shimizu, Y., Higashi, S., Kawabata, Y., Kitamura, T., Suzuki, Y. (2008) Seasonal and spatial variations in characteristics of Lake Biwa dissolved organic matter: Sorption of pyrene and its derivatives and fluorescence properties. *Water Science and Technology*, 58(8), 1609(2008)
- 2) Kusakabe, T., Kitamura, T., Suzuki, Y. Characterization of Dissolved Organic Matter in Watersheds of Lake Biwa and Lake Kasumigaura by Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy and Application of Humification Index. *Water Science and Technology : WaterSupply*, 8(6), 663-671(2008)

(口頭発表)

- 3) 北村友一, 鈴木穰(2007) 霞ヶ浦流入水および湖水中の溶存有機物の蛍光特性, 第41回日本水環境学会年会講演集, 571.
- 4) 日下部武敏, 北村友一, 鈴木穰(2008) 電気透析による RO 濃縮液中からの溶存無機成分の除去特性. 第42回日本水環境学会年会講演集, 434.
- 5) 日下部武敏, 北村友一, 鈴木穰(2009) 琵琶湖流域および霞ヶ浦流域における溶存有機物 (DOM) の有機物組成 (2009) 第43回日本水環境学会年会講演集, 126.
- 6) 北村友一, 日下部武敏, 鈴木穰(2008) 琵琶湖流域における溶存有機物の蛍光特性. 第42回日本水環境学会年会講演集, 541.
- 7) Kusakabe, T., Kitamura, T., Suzuki, Y. (2008) Characterization of dissolved organic matter in watersheds of Lake Biwa and Lake Kasumigaura by excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and application of humification index. 4th IWA Specialist Conference, Natural Organic Matter: from Source to Tap, Bath, U.K.
- 8) 北村友一, 鈴木穰(2009) フローサイトメトリーによる霞ヶ浦の微細植物プランクトン測定. 第43回日本水環境学会年会講演集, 506.
- 9) 北村友一, 鈴木穰(2009) フローサイトメトリーによる湖水中の植物プランクトン群集の測定, 第46回環境工学研究フォーラム講演集, 13
- 10) 北村友一, 鈴木穰(2010) 霞ヶ浦における植物プランクトン群集と溶存有機物の蛍光特性の関係, 第44回日本水環境学会年会講演集, 506.
- 11) 北村友一, 南山瑞彦(2010) フローサイトメトリーによる琵琶湖の微細植物プランクトン群集の測定, 第22回環境システム計測制御学会

謝辞

琵琶湖および霞ヶ浦における採水は、国土交通省近畿地方整備局琵琶湖河川事務所および関東地方整備局霞ヶ浦河川事務所の協力を得て実施された。また、琵琶湖流域下水道における採水では、滋賀県下水道課および財団法人滋賀県下水道公社の協力を得て実施されたものである。ここに記して、深く感謝の意を表します。

伊勢湾流域圏の自然共生型環境管理技術開発

研究予算：科学技術振興調整費

研究期間：平 17～平 22

担当チーム：水環境グループ（水質）

研究担当者：上席研究員 南山瑞彦

研究員 久岡夏樹

専門研究員 秋元さおり

【要旨】

本研究では、愛知県の伊勢湾流域に位置する油ヶ淵の流域特性と、湖内底泥からの栄養塩の溶出特性を把握するため、流入 2 河川および流出河川における水質と、湖内底泥の特性を調査した。流入 2 河川の水質調査は、晴天時だけでなく雨天時にも行い、それぞれに関して流域からの流出特性を明らかにした。また、塩分濃度、DO 条件を変化させ、底泥からの栄養塩溶出試験を行い、溶出速度を算出した。得られた流出特性、栄養塩溶出速度および湖内からの栄養塩流出負荷量から、油ヶ淵における年間の汚濁負荷収支を計算し、湖内底層水の条件による流出負荷の変化を明らかにした。

キーワード：栄養塩、汚濁負荷、流出特性、溶出速度

1. はじめに

伊勢湾流域圏に位置する油ヶ淵は、長田川・半場川を流入河川、高浜川・新川を流出河川として持つ愛知県唯一の天然湖沼である。面積約 64ha、水深は平均約 3m 程度¹⁾と比較的小さくて浅い汽水湖で、流域の都市化の進展によって水質の汚濁が進んでいる。本研究では、伊勢湾への陸域からの栄養塩負荷の実態の把握とともに油ヶ淵湖内及び流域の栄養塩類挙動を把握することを目的とし、油ヶ淵への流入 2 河川における平水時・出水時の汚濁負荷量調査を行った。また、湖内における内部負荷要因である底泥について、湖水中の酸素条件と塩分濃度が栄養塩溶出に及ぼす影響の検討を行なった。得られたデータから、油ヶ淵湖内における年間汚濁負荷収支の把握

を行った。

2. 実験概要

2.1 水質・底泥調査

調査地域と調査地点を図-1、図-2 にそれぞれ示す。水質調査地点は流入河川である長田川・半場川と、主要な流出河川である高浜川及び油ヶ淵湖内の 4 地点とし、河川水は橋上からバケツにて、湖沼水は船上からバンドーン採水器にて採水した。湖沼水は鉛直方向に表層、中層および下層の 3 地点の採水を行った。また、底泥の溶出実験と酸素消費速度試験に用いる試験水を別途、下層から採取した。平成 20 年 5 月～平成 21 年 3 月の毎月、水質調査（定期調査）を行った。更に、定期調査とは別に

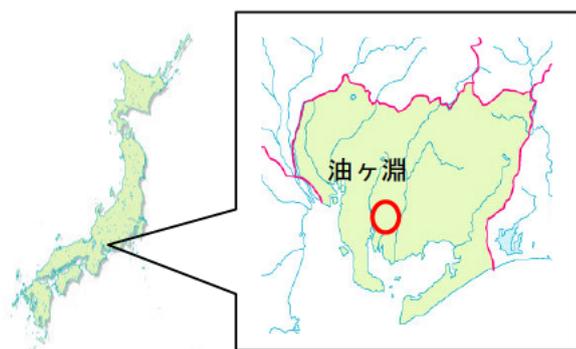


図-1 調査地域



図-2 調査地点

※電子国土ポータル提供

水質と流量の調査を平成 20 年 1 月、3 月、5 月、7 月、9 月（雨天時）、11 月、平成 21 年 7 月に行った。

水質分析項目: $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、D-N、T-N、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、D-P、T-P、SS

底泥の試料は、船上より不攪乱柱状採泥器（離合社製）を用いてアクリル製円筒（内径 4cm 又は 10cm、高さ 50cm）内コア試料として複数本採取し、分析と実験に供試した。

2.2 底泥の前処理と間隙水分析

底泥コア試料は、深さ方向に 30cm まで 2cm 毎（15 層）に切り出しを行い、供試試料とした。なお、前処理中の試料の酸化を防止するため、各底層の切り出し作業は、窒素雰囲気下のグローブボックス内にて行った。また、各底泥試料を遠沈管に分取した後、遠心分離（3000rpm、10min）を行い、間隙水を $1\mu\text{m}$ のフィルターにてろ過後、分析試料とした。試料水は栄養塩自動分析装置（TRAACS2000 型：ブラン・ルーベ社製）にて $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、D-N、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、D-P を測定した。底泥中の含有量分析は、真空凍結乾燥器にて乾燥させて均一に粉碎した底泥について行った。T-N 含有量は CHN 計（FlashEA1112：Thermo Finnigan 社製）にて、T-P 含有量は、栄養塩自動分析装置（TRAACS2000 型：ブラン・ルーベ社製）にて分析を行った。

2.3 底泥溶出試験

湖内と、海水域である高浜水門外にて採取した底泥試料を底泥厚が 15cm となるように調整した後、GF/B（ $1.0\mu\text{m}$ ）にてろ過した試験水を、底泥表面を乱さないよう

底泥上 30cm までサイホンにて注入した。試験水と底泥は 20°C 、暗条件下記条件のそれぞれについて好気・嫌気条件下で溶出試験を行った。条件 1、2 については試験開始から 0.5、4、8、16、24、48、72、96、120 時間後、条件 3 については 0.5、12、24、48、72、96、117、141 時間後、条件 4 については 8、24、32、48、56、72.5、97.5、121.5 時間後に試験水を採取し、D-N、D-P の分析を行った。

1. 湖沼内で採取した底泥+湖沼表層水(塩分濃度 0.0%)
2. 湖沼内で採取した底泥+湖沼表層水と海水(塩分濃度 3.5%)の混合水(1:1)
3. 高浜水門の外(海水域)の底泥+高浜水門外の水(海水、塩分濃度 2.7%)
4. 湖沼内で採取した底泥+底泥直上水(塩分濃度 1.6%)
(年間汚濁負荷収支の算出に使用)

3. 結果および考察

3.1 流入汚濁負荷量

長田川・半場川における栄養塩の懸濁態・溶存態と、SS の各 L-Q 式のグラフを図 3 に示す。平水時、出水時は豊水流量以上、未満で分けた。窒素に関しては懸濁態が溶存態と比較すると流量の増加に伴う負荷量増加が大きい傾向を示した。溶存態は、流量とともに負荷量は増加するが、増加の程度は懸濁態よりやや低い傾向を示した。出水時においても T-N の 9 割程度は D-N と、懸濁態より圧倒的に溶存態の方が多かった。

リンに関しては、溶存態、懸濁態ともに流量増加とと

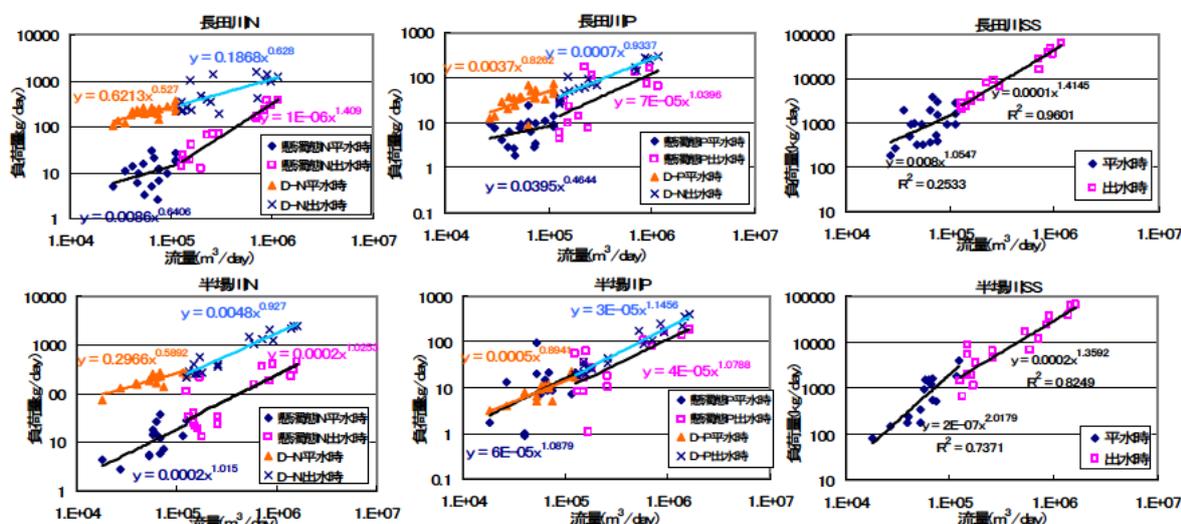


図 3 流入河川 L-Q 式

もに負荷量が増加（濃度としては一定）した。懸濁態が多く流出すると考えられる出水時においても D-P は T-P の 6~7 割程度と高い値を示した。

3.2 底泥間隙水分析

底泥間隙水水質の鉛直分布を図 4 に示す。D-N に関しては、表層の濃度には差があるものの、全体としては湖内と、海水域である高浜水門外で同様の鉛直分布を示した。DOC は表層から深層にかけて湖内

と、海水域である高浜水門外において同様の鉛直分布を示した。それに対し D-P では、表層では両地点において同程度の濃度だったが、その他は湖内の方が高浜水門外よりも高い値を示した。

3.3 底泥溶出試験

油ヶ淵湖内底泥の溶出試験結果を図 5 に示す。嫌気条件における $\text{NH}_4\text{-N}$ は試験水の塩分濃度が高いものほど溶出速度が大きかった。 $\text{NO}_3\text{-N}$ はマイナスの値を示し、嫌気条件では試験水中の塩分濃度が高いほどマイナス値は小さかった。 $\text{NO}_3\text{-N}$ の減少分は脱窒によるものと考えられる。D-P は塩分濃度による明確な差は見られなかったが、好気条件と比較して嫌気条件での溶出速度が 42~63 $\text{mg/m}^2\text{/day}$ 程度大きくなる傾向を示した。

3.4 年間汚濁負荷収支

L-Q 式、1 時間ごとの水位データの日平均値、底泥からの栄養塩溶出速度、流出河川である高浜川の水質、水位データを用いて算出した年間汚濁負荷の収支を図 6 に示す。ここで底泥直上水の条件はサンプリング時の条件に最も近い、湖沼内で採取した底泥+底泥直上水(塩分濃度 1.6%)の好気条件(汽水・好気)と仮定した。流入負荷、流出負荷量、底泥からの溶出から沈降・脱窒により消失する負荷量を計算した。流入負荷と沈降等により消失する負荷量を固定し、底泥直上水の条件による流出負荷の差を表 1 に示した。海水・嫌気条件と淡水・好気条件では T-N 流入負荷の 1 割程度、T-P 流入負荷の 3 割程度の差が出ることがわかった。

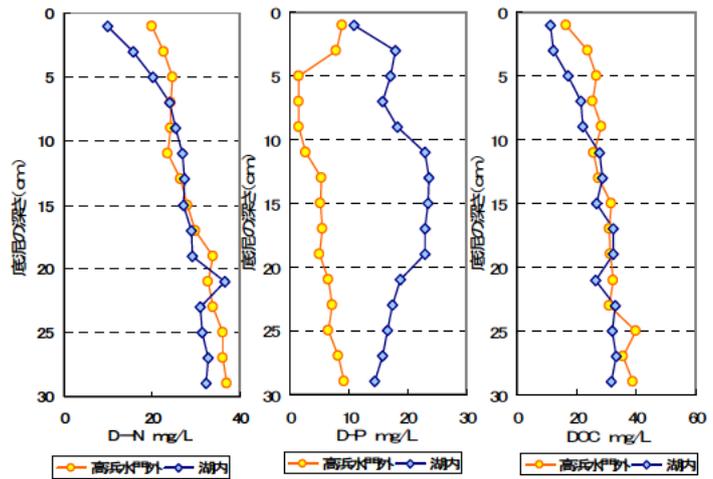


図 4 湖内・高浜水門外における底泥間隙水水質鉛直分布

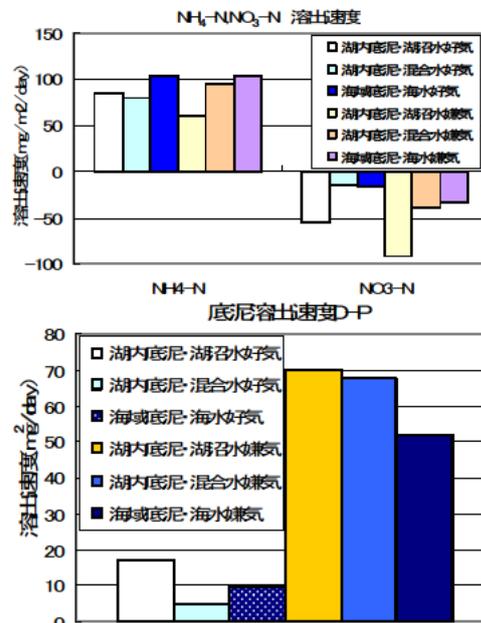


図 5 底泥からの栄養塩溶出速度

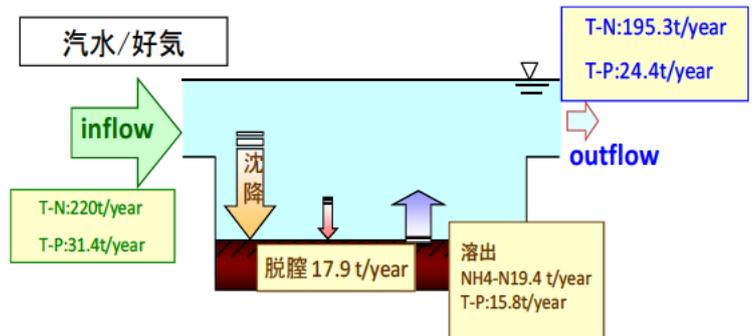


図 6 年間汚濁負荷収支

表 1 条件による負流出負荷の増減

t/year	流出負荷		汽水・好気条件に対する増減	
	T-N	T-P	T-N	T-P
汽水・好気	195.3	24.4	-	-
海水・嫌気	209.1	32.4	13.8	8.0
淡水・好気	188.9	24.3	-6.4	-0.1

4. まとめ

油ヶ淵流域からの栄養塩類流出特性の把握のため、水質調査と底泥溶出試験を行い、年間汚濁負荷収支を計算した結果、湖沼の底層水が海水・嫌気条件と淡水（実験系での湖沼表層水）・好気条件ではT-N流入負荷の1割程度、T-P流入負荷の3割程度の差が出るということがわかった。したがって、底層水を淡水・好気条件に保つことによって油ヶ淵の汚濁負荷の削減、更には下流の伊勢湾への流入汚濁負荷の削減が可能になることが確認できた。

なお、本調査研究は、文部科学省の科学技術振興調整費により実施されたものである。

謝辞

本研究を実施するに当たり、愛知県知立建設事務所、愛知県環境調査センター、碧南市役所経済環境部、愛知建設部下水道部ならびに油ヶ淵漁業協同組合にご協力を頂いたことを、ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

1)油ヶ淵電子図書館

<https://www.aburagafuchi.jp/index.php>

2) 中津川誠:北海道東部の河川流域における汚濁負荷特性、第39回水環境学会年会講演集、p97

メダカの遺伝子解析による河川水質の評価

水質チーム 主任研究員 北村 友一

1. 研究目的

平成 9 年の河川法改正以降、河川管理者は、河川環境（水質、景観、生態系等）の整備と保全に努めている。しかし、河川の水質が水生生物に与える影響を総合的かつ迅速にモニタリングできるシステムがないのが現状であり、水生生態系の保全についての評価は困難となっている。

河川水質が水生生物へ与える影響を簡易に評価する方法には、水生生物の死亡や繁殖または増殖を指標とするバイオアッセイがあるが、こうした従来のバイオアッセイは、比較的汚濁の少ない河川水の場合、水生生物に影響が現れるまでに時間を要することや生体影響を確認できないことがあった。

近年、生物内の遺伝子反応を検出できるマイクロアレイや PCR 法などの技術が進歩し、化学物質に曝露した生物の遺伝子発現についての調査が行われ、生物の遺伝子反応は、化学物質の曝露に対しても反応することが報告されている。水生生物の遺伝子発現の変化を指標とすることにより、短期間曝露実験からでも河川水が水生生物に与える影響を評価できる可能性がある。そこで、本研究は、実河川水に曝露したメダカの遺伝子発現解析から、河川水が生物に与える影響を遺伝子レベルで評価できるかどうか調査した。

2. 研究内容

本研究では、短期間曝露でのメダカの遺伝子発現解析が、河川水の生物影響評価に利用できるかどうかを調査するため、河川水への曝露時間は、24 時間と 48 時間とした。また、メダカの曝露は簡易な半止水式曝露とした。メダカの遺伝子発現解析の臓器は、摘出が容易な肝臓とエラとし、各臓器の遺伝子発現は RT-PCR 法とし、標的遺伝子は、コリオゲニン（エストロゲン応答遺伝子）、CYP1A1（薬物代謝酵素遺伝子）、メタロチオネイン（重金属応答遺伝子）、P53（DNA 修復遺伝子）とした。

3. 研究結果

本研究で得られた結果を以下にまとめる。

- 1) エラの CYP1A1 遺伝子は、曝露時間 24 時間でも、有意に遺伝子発現が増加し、エラの CYP1A1 遺伝子は生物影響の指標に適用できることがわかった。
- 2) エラの P53、肝臓のコリオゲニン、CYP1A1、P53、メタロチオネイン遺伝子は、24、48 時間の曝露では遺伝子発現に変化はみられなかった。

今回の曝露実験から、河川水に曝露されたメダカのエラで CYP1A1 遺伝子発現が高くなることがわかったが、河川水中のどのような物質に反応していたのかについては、不明であり今後、追求していく必要がある。

さらに、エラで CYP1A1 遺伝子の高発現が長期間に続いた場合、生体にどのような影響がでるのか、さらに、魚類生態系に影響を及ぼすかどうかについての知見を得る必要がある。

なお、本調査研究は、財団法人河川環境管理財団の河川整備基金助成により実施されたものである。

担体による都市河川の藻類抑制技術

水質チーム 主任研究員 岡安 祐司

1. 研究目的

都市に水生生態系を復活させて潤いを持たせ、あるいは、都市のヒートアイランド現象を緩和するため、枯渇した都市内小河川に水流を復活させることは重要である。その水源として下水処理水が考えられるが、高い栄養塩類濃度のため、河川内に藻類が異常発生し、景観が損なわれる事例が見られる。従来の藻類増殖抑制手法は、凝集剤等により水中の栄養塩濃度を低下させるものであり、材料・設備とも費用を要し、現実的ではない。そこで、本研究では、生物処理を用いた手法により、安価かつ効率的に、河川河床における藻類異常発生を抑制する技術の実用化を図るものである。

2. 研究内容

本研究では、土木研究所が考案した下水処理水の藻類増殖抑制技術（特開 2009-207985 下水処理水の藻類増殖抑制方法及びその装置）について、本技術による処理水を小河川に適用した場合の藻類抑制効果の評価を行う。

本技術は、微生物保持担体を投入した反応槽内で下水処理水を曝気し、自然発生的に担体上に生育する微生物の働きにより、藻類増殖に必須の微量元素であるマンガン（Mn）を不溶化・除去することで、藻類異常発生を抑制するものである。これまでの実験室規模の検討により、下水処理水について藻類増殖能の低下が確認されていることから、本研究においては、特に夏季における藻類抑制効果を、より実河川に近い規模である模擬水路を用いて評価するものである。

3. 研究結果

下水処理水と、下水処理水に藻類増殖抑制技術を適用した処理水を、夏季（7月～9月）に、屋外の模擬せせらぎ水路へ連続的に通水し、水路における藻類発生状況を比較した。藻類増殖抑制技術を追加した場合、水路上に発生する固形物量とクロロフィル *a* 量が低減されている結果となった。さらに、この 2 種類の水を、水理的滞留時間（HRT）を 7 日に設定した屋外の模擬修景池へそれぞれ通水した。模擬修景池における藻類発生状況を比較すると、藻類増殖抑制技術を追加した方が、顕著に、特に大型糸状緑藻の発生が低減されている結果となった。今後は、この成果を受け、実河川への適用を検討する予定である。

藻類増殖の制限因子について考察すると、下水処理水に比べて、藻類増殖抑制技術を適用した処理水では有機物、窒素、リンの濃度については差がなかった一方、マンガン（Mn）濃度が顕著に低減されていたことから、藻類増殖の制限因子はマンガン（Mn）であると考えられる。水中および藻類中の全りん（T-P）と全マンガン（T-Mn）の存在量比で考慮すると、制限因子はりん、マンガンのいずれになってもおかしくない状況であったが、藻類増殖抑制技術を適用した処理水では、藻類増殖が顕著に抑制されていたことから、マンガンが藻類に利用されにくい形態となっており、藻類増殖が抑制されている可能性が考えられた。今後は、これらの物質の化学形態別の測定（スペシエーション）を行い、藻類への利用されやすさの観点での追加の調査・検討を行う必要があると考えられる。

なお、本調査研究は、財団法人河川環境管理財団の河川整備基金助成により実施されたものである。

土 木 研 究 所 資 料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4191 December 2010

編集・発行 © 独立行政法人 土木研究所

本資料の転載・複写の問い合わせは

独立行政法人 土木研究所 企画部 業務課
〒305-8516 茨城県つくば市南原 1-6 電話 029-879-6754