ＩＳＳＮ　　0386-5878
土木研究所資料　第4080号

土木研究所資料

平成１８年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2006 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成19年10月

独 立 行 政 法 人　　土 木 研 究 所

Incorporated Administrative Agency

Public Works Research Institute

Copyright © (2007) 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。

土 木 研 究 所 資 料
第4080号　平成19年10月

平成１８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
耐震研究グループ　振動チーム
材料地盤研究グループ　土質チーム

概要

本報告書集は、平成18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係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、汚泥、水質、リサイクル、水環境

Technical Note of PWRI
No.4080 October 2007

FY2006 ANNUAL REPORT OF WASTEWATER MANAGEMENT AND WATER QUALITY CONTROL

RECYCLING RESEARCH TEAM
of MATERIAL AND GEOTECHNICAL ENGINEERING RESEARCH GROUP

WATER QUALITY RESEARCH TEAM

of WATER ENVIRONMENT RESEARCH GROUP

GROUND VIBRATION RESEARCH TEAM
of EARTHQUAKE DISASTER PREVENTION RESEARCH GROUP

SOIL MECHANICS RESEARCH TEAM
of MATERIAL AND GEOTECHNICAL ENGINEERING RESEARCH GROUP

INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY PUBLIC WORKS RESEARCH INSTITUTE

Synopsis

This Annual Report introduces researches on wastewater system, wastewater treatment, advanced wastewater treatment, wastewater sludge and water quality control carried out in Fiscal 2006 by Incorporated Administrative Agency Public Works Research Institute.

Key words: wastewater system, wastewater treatment, wastewater sludge, water quality control, recycling ,water environments

目　次

I. 下水道事業調査費による研究

1. 下水汚泥からのメタンガス増産技術等をいかした低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する調査 ……(リサイクルチーム)…… 1
2. 下水処理場を核とした湿潤系バイオマスの資源化技術に関する調査……(リサイクルチーム)…… 11
3. 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……(水質チーム)…… 21
4. 最適な水環境創造に資する下水道整備のあり方に関する調査……(水質チーム)…… 29
5. 下水道整備における土質・地盤に関する研究……(土質チーム)…… 67
6. 下水道整備における土質・地盤に関する研究業務……(振動チーム)…… 73

II. その他の予算による研究

[リサイクルチーム]

1. 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…… 77
2. 再生材の特性を活かした利用技術の開発に関する研究…… 83
3. 余剰有機物と都市排水の共同処理技術に関する研究…… 87
4. 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）…… 91
5. アジア･モンスーン地域の下水処理施設における病原微生物の消長に関する研究…… 93
6. 水環境中における病原微生物の消長に関する研究……104
7. 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……112

[水質チーム]

1. 流域における物質動態特性の解明と流出モデルの開発（2）……129
2. 難分解性溶存有機物の由来と水域挙動に関する研究……135
3. 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……139
4. 遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究……146
5. 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……159
6. 都市水環境における水質評価手法に関する調査……163
7. 底質の酸素条件が藻類増殖に与える影響に関する調査……169
8. 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……177

Ⅰ. 下水道事業調査費による研究

下水汚泥からのメタンガス増産技術等をいかした低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する調査

研究予算 ： 受託業務費
研究期間 ： 平 18
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 ： 尾崎正明，落修一，庄司仁

【要旨】
本調査は、下水汚泥を嫌気性消化することにより発生する下水道バイオガスの化石燃料の代替製品としての利活用の推進に寄与するために、投入される下水汚泥の性状変化による影響調査および有機物の分解率とCO_2供給に関する調査を行うとともに低コスト・低エネルギー型の下水道システムについて検討した。その結果、全国の嫌気性消化施設の運転結果を気候的に8地域に分割し、個々の地域における汚泥性状の年間変化を明らかとした。また、嫌気性消化過程へのCO_2供給の有効性を示唆するデータを得るとともに、効果発現への生物学的評価を加えた。極小規模下水道用の低コスト型下水処理施設の計画・設計法を検討し、処理プロセスを提案するとともに、低エネルギー型下水処理場に貢献するための汎用型消化ガスエンジンシステムの開発実験を行い、実現の可能性が高い成果を得た。
キーワード：下水汚泥、バイオガス、嫌気性消化法、低コスト、下水道計画、消化ガスエンジン

1. はじめに

下水汚泥を嫌気性消化することにより発生するメタンを主成分とする下水道バイオガスは、化石燃料の代替製品としての利活用が期待されており、効率的な有効利用を促進するためには、嫌気性消化工程における消化率の向上や、下水道システム全体のエネルギー消費量の削減と低コスト化に向けた技術的な検討を行う必要がある。

本調査は、下水汚泥の嫌気性消化の効率を向上させてメタンガスを増産し、下水汚泥からのエネルギー回収量を向上させる技術を開発するとともに、これらの技術を活用して下水道システムのエネルギー消費量の削減と低コスト化を目指すため、下水汚泥を嫌気性消化させる技術である「嫌気性メタン発酵法」を活用する下水道システムについて、エネルギー消費量やコストの低減効果の評価を行うことを目的とするものである。

2. 調　査

本調査では、目的達成のために、大きく、「投入される下水汚泥の性状変化による影響調査」、「有機物の分解率とCO_2供給に関する調査」および「低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する検討」の3つの課題が設定された。

2．1　投入される下水汚泥の性状変化による影響調査

地球温暖化対策やエネルギー対策として下水汚泥の消化ガス利用が大きく注目されている。本調査は、全国で発生する消化ガスのさらなる利用推進や嫌気性消化法の機能向上、普及拡充に資する基本情報を得るために、実際に嫌気性消化に取り組んでいる自治体関係者の意見と施設稼動データをアンケート方式により収集解析したものである。

2.1.1　調査方法

アンケート調査は、下水汚泥嫌気性消化法を採用している全国の自治体や関係機関 226 箇所に対して行い、167 の自治体ならびに関係機関から回答が得られた。得られたデータに基づき下水汚泥性状の変化を定量把握するとともに、その嫌気性消化への影響を評価した。また、消化ガス利用や嫌気性消化法普及への意見を集約した。

2.1.2　調査結果

（1）下水汚泥性状の変化

平成16年4月から平成18年10月までの嫌気性消化槽への投入汚泥データが整備されている処理場を選択し、解析のデータベースを作成した。さらに、我が国の気象を考慮して大きく北海道全域、東北全県域、関東全都県域、北陸全県とその以南の日本海側県域、中部全県域、近畿全府県と瀬戸内沿岸県域、山口県と高知県および九州全県域、および沖縄県域の8地域に分類、集計した。

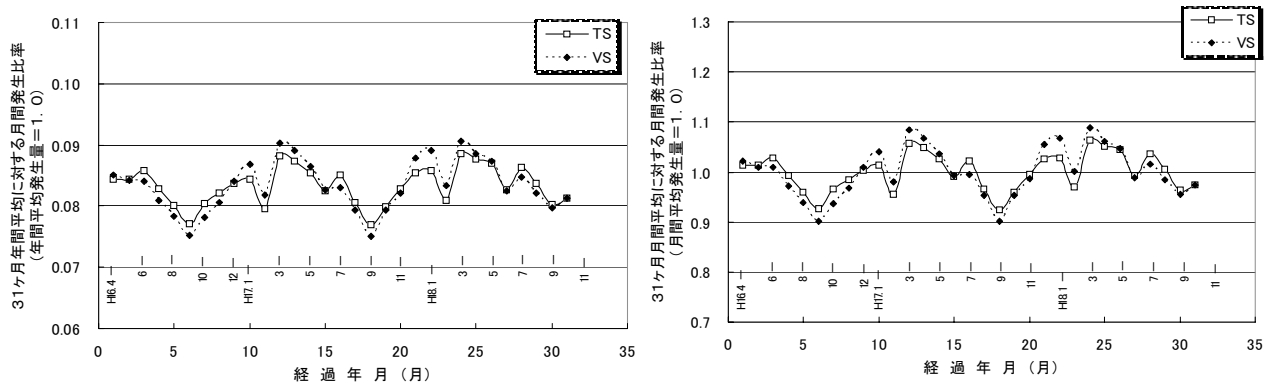
解析では、無次元化して表すために、各域毎に「31ヶ月年間平均に対する月間発生比率」と「31ヶ月月間平均に対する月間発生比率」を求めた。解析結果は**表－1**にまとめた。また、全国値として集計・解析した結果を**図－1**と**図－2**に示した。

（2）消化ガス利用と嫌気性消化法普及に関する意見

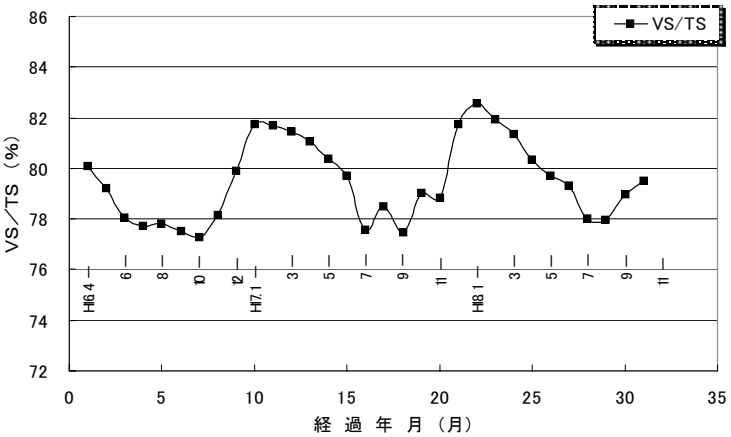
アンケートにより、「消化ガスの利用促進に関するご意

表－1　下水汚泥の発生量とVS／TSの変動解析結果

検 討 区 域	解析対象件数（ｎ）		31ヶ月年間平均に対する月間発生比率（年間平均発生量＝1．0） TS	VS	31ヶ月月間平均に対する月間発生比率（月間平均発生量＝1．0） TS	VS	VS／TS（％）
北海道	18	最大値	0.090	0.090	1.084	1.078	85.6
		最小値	0.074	0.075	0.884	0.904	80.8
東 北	16	最大値	0.090	0.091	1.084	1.093	85.1
		最小値	0.075	0.077	0.901	0.919	81.3
関 東	20	最大値	0.093	0.091	1.112	1.091	83.4
		最小値	0.075	0.074	0.905	0.883	73.5
北陸･同以南日本海側県	17	最大値	0.101	0.094	1.208	1.127	80.8
		最小値	0.072	0.071	0.864	0.850	69.3
中 部	6	最大値	0.105	0.104	1.261	1.253	86.2
		最小値	0.068	0.069	0.821	0.824	81.7
近畿･瀬戸内県	33	最大値	0.094	0.096	1.129	1.153	82.1
		最小値	0.073	0.071	0.876	0.853	76.2
山口県･高知県･九州	31	最大値	0.095	0.096	1.140	1.150	80.3
		最小値	0.074	0.074	0.890	0.893	73.8
沖縄県	2	最大値	0.108	0.107	1.292	1.289	85.9
		最小値	0.071	0.072	0.853	0.859	81.7
全 国	143	最大値	0.089	0.091	1.063	1.088	82.6
		最小値	0.077	0.075	0.924	0.901	77.3



図－1　無次元化した月間汚泥発生量の全国値の経時変化



図－2　発生汚泥VS／TSの全国値の経時変化



図－3 実験に用いた反応装置（ガラス容器，スターラー，pH制御）

見」と「嫌気性消化法の整備拡充に関するご意見」を求めた全ての意見を内部資料「嫌気性消化施設に関するアンケート調査報告書」としてとりまとめ、アンケート回答が得られた自治体、関係機関に結果の還流を図った。

2．2 有機物の分解率とCO_2供給に関する調査

下水汚泥の嫌気性消化を効率化するためには、消化率（汚泥分解率）と消化速度の両者を向上させることが重要である。消化率が高ければ、より多くのメタンガスを回収できるだけでなく、発酵残渣の処理費用を低減することもできる。消化速度については、必要な滞留時間すなわち装置の規模を介して、初期費用の大小を左右する。

嫌気性消化は、前段の可溶化－酸発酵と後段のメタン発酵という、異なる生物群による反応を組み合わせた工程である。前述の課題のうち、消化率の向上は前段の可溶化－酸発酵と深く関わっており、生物による反応を最適化するような運転・制御方法の検討に加えて、オゾン処理や加熱といった物理化学的な前処理技術の提案がなされている。一方、消化速度の向上を目指す場合、嫌気性消化全体の律速となりがちな、メタン発酵段階での有機酸の分解反応を最適化するような運転・制御方法を追及することとなる。いずれにしても、異なる生物群による異なる反応を最適化することになるので、反応装置を前段と後段に分ける「二相式」の有効性が強く示唆される。さらに、メタン発酵液の一部を返送する「二相循環式」についても研究が行われており、滞留時間の削減と消化率の向上が可能であったとされている[1)]。

一方、嫌気性消化の運転・制御技術として、土木研究所において、炭酸ガスの吹き込みの有効性を確認している[2)]。当初の検討では、単に二酸化炭素を利用したメタン発酵が促進されることが原因であると考えられた。しかし、その後の調査により、発酵液中に含まれる溶解性無機炭素（IC）が、可溶化や酸発酵を促進している可能性が示唆された。そこで本調査では、二相循環式嫌気性消化に炭酸ガスの吹き込みを行うと、前段の可溶化－酸発酵において供給された炭酸ガスがICの形態で有機物の分解率を向上させるとの仮説を立てて、その検証および反応機構の解明を目指す。

表－2 液体培地の組成（1L 当り）

物質	最終濃度	
NH_4Cl	2	g
K_2HPO_4 or KH_2PO_4	0.5	g
$MgCl_2\ 6H_2O$	0.1	g
$CaCl_2\ 2H_2O$	0.1	g
$FeSO_4\ 7H_2O$	10	mg
$NiCl_2\ 6H_2O$	5	mg
$MnSO_4\ 5H_2O$	1	mg
$CuSO_4\ 5H_2O$	0.5	mg
Na_2EDTA	5	mg
酵母エキス	10～20	mg

2.2.1 調査方法

（1）実験装置

本調査では、多数の専用容器（約1リットル）を装着した振とう培養装置（実験1～2、実験6の一部）、ならびに約2リットルのガラス容器でpHの制御が可能な**図－3**に示す装置（実験3～7）を、35℃の恒温室に設置した。

（2）実験条件

＜実験1＞

目的：さまざまな基質の可溶化・酸発酵に対するICの影響を明らかにする。

条件設定：**表－2**に示す液体培地に、基質として可溶性でんぷん、セルロース、マルトース、セロビオース、グルコ

ース、N－アセチルグルコサミン（NAG）、フミン酸、リグニン、アルブミン、カゼイン、ポリペプトンを、2.0～2.8gC/L となるように投与した（各A系列）。これに 2g/L となるように炭酸水素ナトリウムを加えたB系列、同じく 2g/L となるようにリン酸二水素カリウムを加えたC系列を設定した。実験開始時のpHは、7.5 となるように調整した。植種源は、都市下水処理場から採取した活性汚泥および嫌気性消化汚泥の混合物である。

＜実験2＞

目的：セルロースとフミン酸を基質として、大量のIC添加の影響を明らかにする。

条件設定：実験1と同様にセルロース投与とフミン酸投与の系を3系列ずつ設定して、無添加、炭酸水素ナトリウム（17.5g/L 相当）添加、リン酸二水素カリウム（45g/L 相当）添加とした。植種源は、実験室で運転していた嫌気性消化汚泥である。

＜実験3＞

目的：セロビオースとセルロースを基質として、炭酸ナトリウムによるpH制御の効果を見る。

条件設定：まずセロビオースの実験では、表－2の液体培地に 4g/L 相当のセロビオースを加えて、2mol/L の水酸化ナトリウム水溶液あるいは炭酸ナトリウム水溶液で、pH を 6.5 に制御した。次にセルロースの実験では、表1の液体培地に 2.5g/L 相当のセルロースを加えて、pH制御を行わないもの、2mol/L の水酸化ナトリウム水溶液あるいは炭酸ナトリウム水溶液で 6.5 に制御するものの3系列を設定した。植種源は、実験室で運転していた嫌気性消化汚泥である。

＜実験4＞

目的：セルロースの可溶化および酸発酵に対する中和液の影響を確認する。

条件設定：表－2の液体培地に、

A＝セルロース単独（3gC/L）、1/4mol/Lの水酸化ナトリウムによる中和

B＝セルロース単独（3gC/L）、2mol/L の炭酸ナトリウムによる中和

C＝セルロース（2.5gC/L）セロビオース（0.5gC/L）混合、2mol/L の炭酸ナトリウムによる中和

D＝セルロース（2.5gC/L）グルコース（0.5gC/L）混合、2mol/L の炭酸ナトリウムによる中和

の4種類の基質条件を設定して、pHは 6.5 に制御した。なお、A系列である程度まで可溶化・酸発酵が進んでから、中和液を炭酸ナトリウム使用液に変更した。植種源は、実験3のセルロース投与・炭酸ナトリウム中和系列の発酵残渣である。

＜実験5＞

目的：実験開始時に炭酸塩を添加する効果を見る。

条件設定：表－2の液体培地に、3gC/L のセルロースを加える。その他の条件は、

A＝実験4A系列の発酵残渣を植種、0.2mol/L 水酸化ナトリウム中和

B＝実験4A系列の発酵残渣を植種、実験開始時に炭酸塩添加、0.2mol/L 水酸化ナトリウム中和

C＝実験4B系列の発酵残渣を植種、1.5mol/L 炭酸ナトリウム中和

D＝実験4B系列の発酵残渣を植種、実験開始時に炭酸塩添加、0.2mol/L 水酸化ナトリウム中和

とした。pHの制御目標値は、すべて 6.5 とした。

＜実験6a＞

目的：実験開始時にIC濃度を高める効果を見る。また、植種源の影響を確認する。

条件設定：表－2の液体培地に、3gC/L のセルロースを加える。植種源および炭酸水素ナトリウムの添加に関して、以下のような条件を設定した。

A＝実験5A系列の発酵残渣を植種、炭酸水素ナトリウム無添加

B＝実験5A系列の発酵残渣を植種、炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加

C＝実験5C系列の発酵残渣を植種、炭酸水素ナトリウム無添加

D＝実験5C系列の発酵残渣を植種、炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加

いずれも 0.5mol/L の水酸化ナトリウム水溶液を用いて、pHの制御目標値を 6.5 とした。

＜実験6b＞

目的：セルロース分解能を有する植種源に対して、ICの効果を再確認する。

条件設定：表－2の液体培地に 3.5gC/L 相当のセルロースを加える。5系列には炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加、別の5系列は無添加とした。それぞれのpH を 6.5 に調整してから、振とう培養装置に設置した。植種源には、実験5Cの発酵残渣と実験室の嫌気性消化汚泥を混合して用いた。

＜実験7＞

目的：実験開始時におけるICの添加とpH制御目標値の影響を見る。

条件設定：表－2の液体培地に 3gC/L のセルロースを加える。pHの制御目標値および炭酸水素ナトリウムの添加に関して、以下のような条件を設定した。

A＝炭酸水素ナトリウム無添加、pH6.5

B＝炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加、pH6.0

C＝炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加、pH6.5

D＝炭酸水素ナトリウムIC≒200mg/L 相当を添加、pH7.0

植種源は実験6aC系列の発酵残渣を用いた。また、中和液は 0.5mol/L 水酸化ナトリウムである。

（3）測定項目

発酵試料の溶解性成分は、ガラス繊維ろ紙（GF/F）でろ過した後、ろ液のTOCとIC（TOC-5000、島津製作所）を測定した。また実験1では、ろ液のpH、PO_4-P・NH_4-N・NO_2-N（TRAACS オートアナライザー、Bran+Luebbe）、有機酸濃度（イオンクロマトグラフィー、島津製作所）を測定した。固形分については、下水試験方法 [3]の遠心分離法に準じてMLSSを測定した。実験3～7では、消費された中和液の量を記録した。

（4）細菌群集解析

Muyzer ら [4]の方法に従って、実験4から実験6までの試料について、PCR－DGGE法による細菌群集構造の解析を行った。まず発酵液を遠心分離（14000rpm、5 分間）して、沈殿した汚泥から FastDNA Spin Kit for Soil（Q-BIOgene）を用いて核酸を抽出した。精製キット MonoFas（ジーエルサイエンス）で抽出液の不純物を取り除いてから、所定の PCR Buffer、dNTP、AmpliTaq Gold（いずれも Applied Biosystems）を混合して PCR 反応に供した。使用したプライマーセットは、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3 領域を標的とする 341fGC-518r である。PCR 反応の温度条件は、94℃:10 分、{94℃:30 秒、50℃:30 秒、72℃:2 分}×30 サイクル、72℃:10 分とした。

得られた PCR 産物は、D-Code システム（Bio-Rad）による DGGE 解析に供した。8%のポリアクリルアミドゲルには、35～65%の変性剤（尿素・ホルムアミド）濃度勾配を設定した。このゲルに、20μL の PCR 産物と 4μL の Loading buffer（タカラバイオ）の混合物を滴下した。電気泳動の条件は 130V、60℃、5 時間である。泳動終了後、SYBR Gold（Amersham）で 15 分間の染色を行い、トランスイルミネータ 008-XD（コスモバイオ）で撮像した。

2.2.2 調査結果

（1）さまざまな基質の分解に対するICの影響

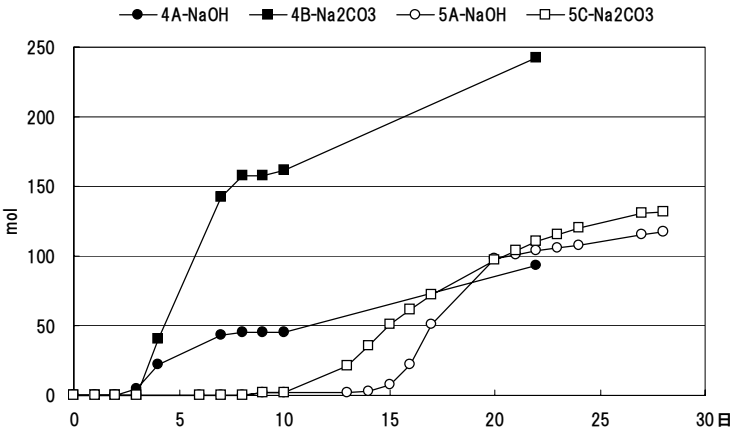
実験1では、基質によって有機酸の生成量に極端な差が見られた。セルロースやフミン酸、リグニンといったものは有機酸の生成がほとんどなく、また、不溶性のセルロースとフミン酸に関しては、可溶化（溶解性TOCの増加）も見られなかった。一方、その他の単糖、二糖、NAG、蛋白質およびポリペプトンは、IC添加の有無や、pH緩衝剤としてのリン酸添加の有無と関わらず、速やかに有機酸への発酵が進んだ。これらのことから、低分子有機物の酸発酵や、蛋白質の可溶化－酸発酵においては、ICの効果は小さいものと考えられる。しかしながら、セルロースやフミン酸などへのIC添加効果は、添加の有無に関わらず発酵の進まなかった実験1、添加量を大きく増やしたものの発酵の進まなかった実験2から知見を得ることはできない。

発酵を安定化させるためにpH制御機能を設けた実験3では、セルロースの分解（ポリマーであるセルロースから、セロビオース＝二糖、グルコース＝単糖を経て酸発酵される）に注目して条件を設定した。セロビオースについては、やはりIC添加の有無と関係なく、実験開始の翌日に酸発酵が進んだ。これに対して、同様の条件を設定したセルロースの実験では、ICを添加した系列のみで可溶化・酸発酵が進んだ。したがって、セルロースの分解にICが影響しているならば、それは酸発酵や低分子化よりも、可溶化の段階と関連しているものと推察された。

（2）セルロースの分解に対するICの影響

(1)で得られた結果を踏まえて、実験4以降では、セルロースの可溶化・酸発酵におけるICの影響に着目した。まず実験4と5で、中和液に水酸化ナトリウム水溶液と炭酸ナトリウム水溶液を用いて、その消費量から酸発酵の進展を**図－4**に示すとおり確認した。

実験4では消費量に大きな差が見られたが、消費が始



図－4 実験4，5における中和液消費量

まった時期すなわち発酵が始まった時期は大差なく、また、可溶化の指標であるTOCの推移も大差なかった。一方、実験5では、消費量がほぼ同等であるにもかかわらず、炭酸ナトリウム中和系列の酸発酵の開始時期が数日ほど早くなっている。このような現象の再現性を確認する必要は残されているが、ICによるセルロース可溶化・酸発酵の促進効果の一例として、注目に値する結果である。

IC添加効果の再現性を確認するために、実験6bとして、IC添加の有無のみを変更したそれぞれ5系列ずつを設定して、振とう培養装置による実験を行った。溶解性TOCの結果を**図－5**に示すが、5系列すべてについて、IC添加による可溶化・酸発酵（VFA臭気で確認）の著しい促進効果が見られた。

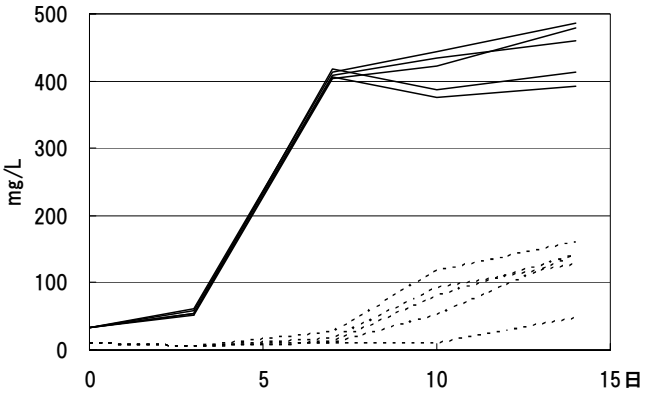
また、炭酸の添加方法の検討として、実験開始時にIC成分を添加／無添加の系列についての比較も行った（実験6）。その時の中和液消費量から、植種源とIC成分添加との関係について興味深い傾向が観察された。それは、**図－6**に示すとおり水酸化ナトリウム中和系列を植種源としたABではIC無添加のAで、炭酸ナトリウム中和系列を植種源としたCDではIC添加のDで、それぞれ可溶化・酸発酵の進展が早かった。このことは、これまでに確認されたICの添加効果は、ICが豊富な環境に順応した細菌群集に対して見られることを示唆している。

さらに、IC添加効果とpHとの関係を確認した実験7では、pHが 6.5、7.0、6.0 の順で中和液を早くかつ多く消費した。また、対照系として設定したIC無添加系列は、最も消費量／速度が小さかった（結果はデータ集参照）。可溶化・酸発酵段階のpHについて、これまで考えられていた酸性条件よりも中性側で盛んであること、そして高いIC濃度かつpHのメタン発酵液を循環させる「二相循環式」の有効性を再確認させる結果である。

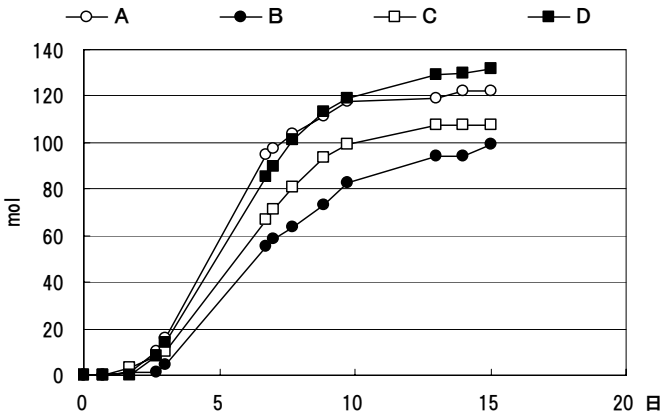
（3）IC添加と細菌群集構造の推移

PCR－DGGEの結果を次ページの**図－7**に示す。まず全体的な傾向として、植種源の細菌群集構造（バンドパターン）は、発酵後の細菌群集構造において維持されていないことが読み取れる。一部に共通な位置のバンドが存在するものの、解析対象である実験4～6では、発酵を担う細菌群集がそれぞれ異なっていたと考えられる。

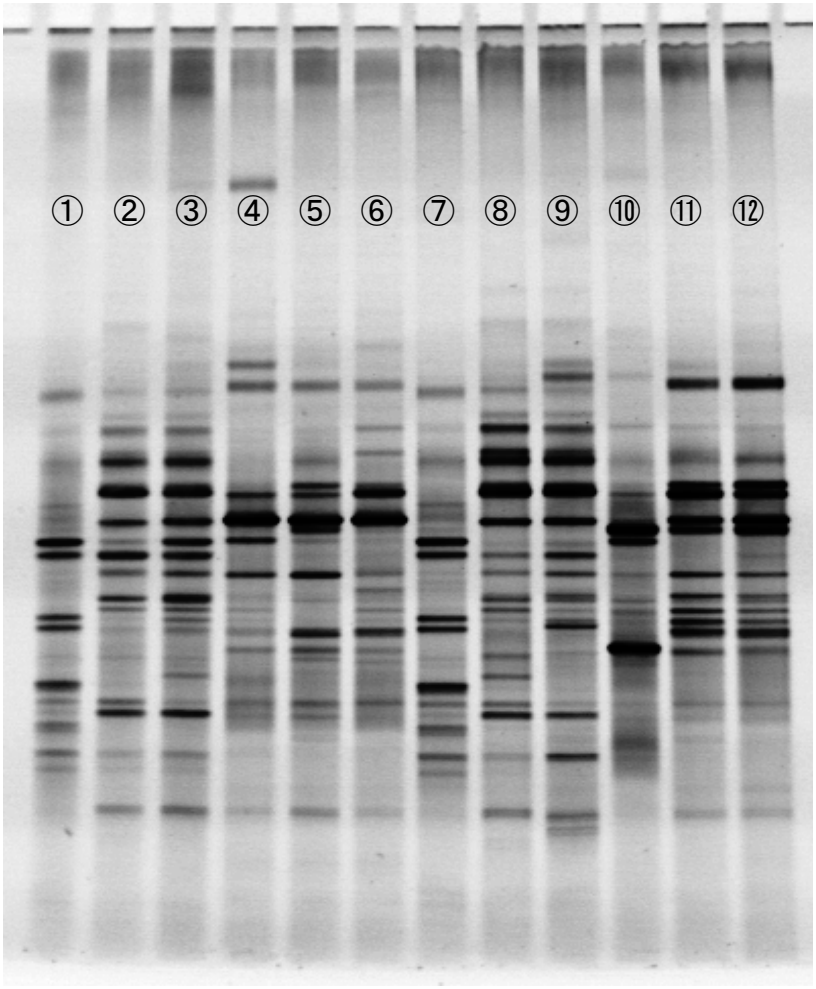
次にIC添加の影響については、実験4ではバンドパターンの違いが少なく（水酸化ナトリウム中和：②③と炭酸ナトリウム中和⑧⑨との比較）、実験5では大きく異なり（水酸化ナトリウム中和：④と炭酸ナトリウム中和：⑩との比較）、実験6では再び違いが少なかった（⑤⑥の比較ならびに⑪⑫の比較）。しかしながら、特に実験6において、植種源およびIC添加の有無、さらには発酵の進み具合が異なっていても、⑤⑥⑪⑫という全系列のバンドパターンが似通っていたことは注目に値する。つまり、IC添加は、特定の細菌の増殖を促進したり抑制したりすることはないと言える。それにもかかわらず発酵の進み方が異なっていたことについては、ICが広範囲の細菌に対して同様の影響をもたらしているため、あるいは、本調査の分析対象でないメタン細菌（古細菌）に影響をもたらしているため、といった理由が考えられる。本調査で行った実験結果だけから結論付けることはできないが、捕集されたガスにメタンガスがほとんど含まれていなかったことから、後者よりも前者の可能性が高いと言える。



図－5　実験6bにおける溶解性TOCの推移



図－6　実験6aにおける中和液消費量



図－7　PCR－DGGEの結果

①	実験3・35 日目＝実験4植種	⑦	実験3・35 日目＝実験4植種
②	実験4・A7 日目	⑧	実験4・B7 日目
③	同・A22 日目＝実験5植種	⑨	同・B22 日目＝実験5植種
④	実験5・A29 日目＝実験6植種	⑩	実験5・C29 日目＝実験6植種
⑤	実験6・A10 日目	⑪	実験6・C10 日目
⑥	実験6・B10 日目	⑫	実験6・D10 日目

2．3　低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する検討

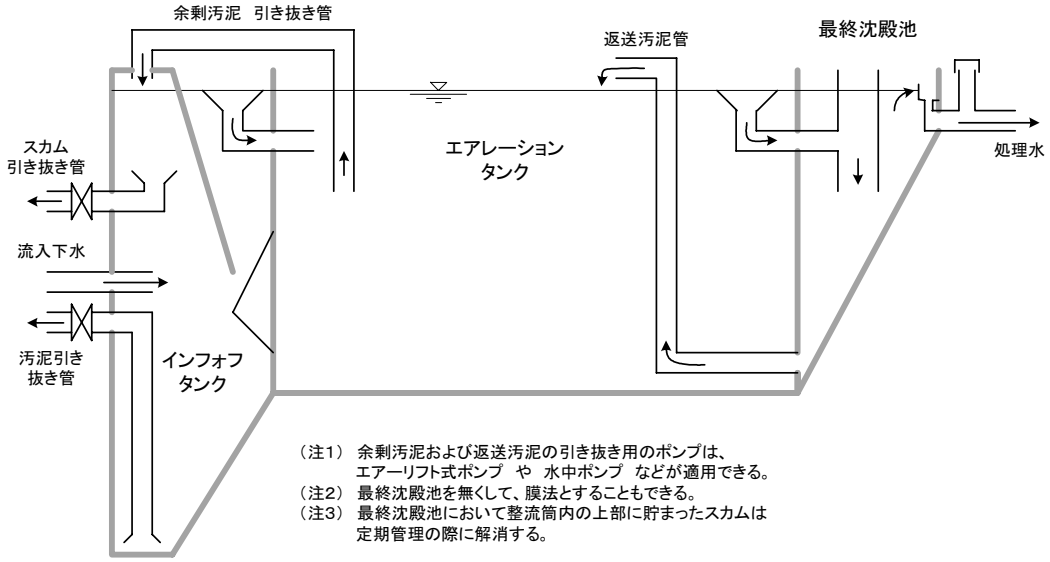
下水道未普及地域の解消や下水処理施設でのエネルギー対策が重要視されている。このため、極小規模下水処理システムの検討と汎用型消化ガスエンジン開発実験を行った。

2.3.1　極小規模下水処理システムの検討

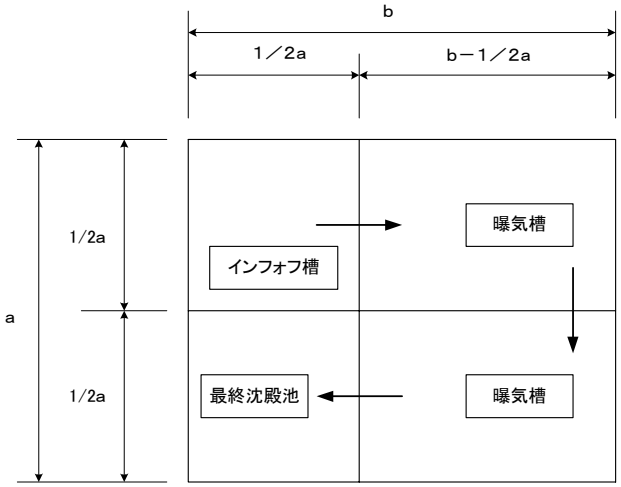
極小規模下水処理システムの検討では、一般的な公共下水道の処理水質が得られることと合わせて建設経費が30万円／m^3以内であることの条件が賦された。この条件において、独立行政法人土木研究所は、処理水質に関しては何ら問題なく達成できる技術を蓄積してきている。課題は、建設経費：30万円／m^3以内で可能かにあった。

（1）基本設計

検討した極小規模用下水処理システムの基本フローと平面配置を**図－8**と**図－9**に示す。これらの設計に際しては、通常の下水処理場の設計手法[5)]と同様に諸元を解析し、決定した。ここでは、極小規模となることから維持管理における汚泥操作が重要視される。そのために、汚泥の取り扱い頻度を押さえるように、最初沈殿池と汚泥貯留槽を兼ね合わせるインフォフタンク構造を適用することとした。また、設計、計画が容易なように、施設全体の容積を計画



図－8 極小規模用下水処理システムの基本フロー



H ： 水深

a･b･H ＝ ｜日最大汚水量｜
＝ HRT：24hr

図－9 極小規模用下水処理システムの平面配置

表－3 極小規模用下水処理システムの建設経費分析結果

計画日最大汚水量 (m3/日)	目標・建設コスト (300千円/m3) (千円)	材料費 生・コン (千円)	鉄筋	空気圧縮機	小計	曝気装置	機械室	土工費	鉄筋ｺﾝｸﾘｰﾄ施工費	電気工事費	機器配管付帯工	場内整備	計
500	150,000	2,933	4,264	2,847	10,043	6,870	1,848						18,761
300	90,000	2,114	3,089	2,464	7,667	6,220	1,232						15,119
100	30,000	642	1,560	1,533	3,735	2,060	1,001						6,796
50	15,000	427	1,045	1,095	2,568	1,430	271						4,269
30	9,000	273	699	548	1,520	720	198						2,438
10	3,000	99	366	548	1,013	380	153						1,546

日最大汚水量に相当する平均滞留時間（HRT）を24時間、すなわち1日分の容積とした。

（2）経費分析

極小規模施設は、地域の業者が施工する（不明な事項は（独）土木研究所が指導する）ことを前提として、その資材手配から通常入手できる価格として「建設物価」[6]を適用（市場では、これに記載の価格は高いと言われている）した。特別な製品、例えば高効率型散気装置や膜ユニットなどは専門メーカへヒヤリングした。

費用算出の結果を**表－3**に示す。この表の空白を埋めると完成であるが、そこは、地域の業者の裁量に委ねられる。 これらの結果から推察するに、建設経費：30万円／m^3以内は十分に満足するものと思われる。

2.3.2 汎用型消化ガスエンジン開発実験

下水汚泥の嫌気性消化から得られる消化ガスが完全に利用されている訳ではなく、全国では年間発生量の 1/3 相当の約1億m^3（約30億円−都市ガス相当）が焼却されている。例えば、下水処理場は多くの電力を必要としており、消化ガスによる発電を行えば下水処理場のエネルギー自給向上・経営健全化に大きく貢献するものであるが、現有のガスエンジン発電やマイクロガスタービン発電は、出力からみて相当に高価であり、普及を制限している。これを解決するために、消化ガス発電機を初めとする汎用性の高い動力システムを開発する必要がある。

（1）方 法

開発実験は、ガスエンジン発電実験装置を所内の屋外実験場に設置して、市販の工業用メタンガスと二酸化炭素を用いて調整した人工燃料によるエンジンの稼動安定性を調べた。

人工燃料の調整は、高圧用のガス流量計で混合比を設定、供給しながら、その混合比によるエンジン稼動出力が得られた時点の燃料を採取してガスクロマトグラフ（TCD）による組成分析を行いCO_2およびCH_4のガス濃度を求めた。

（2）結 果

ガスエンジン発電実験装置を50Hzおよび60Hzの条件で、燃料ガス濃度を変えて運転した結果、CO_2濃度が15%ほどで不安定となり、30%を超えると稼動不能となった。この原因に人工燃料作成上のガスのミキシング不足が考えられたために、混合方式に改良を加えて、実験を継続したが不安定は解消されなかった。

この原因について検討した結果、エンジン不安定が燃料ミキシング不足の可能性にあったことが否定され、不安定をもたらすエンジン音や振動状態から、原因はエンジンに直結している燃料供給制御装置にあると特定された。これにより、燃料供給制御装置の改造・調整を図ればエンジン稼動の不安定さは容易に解決できるものと思われ、また、さらに高い CO_2 濃度となった場合でも対応可能と分析された。

3. まとめ

下水汚泥からのメタンガス増産技術等を生かした低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する調査を行った結果を以下にまとめた。

投入される下水汚泥の性状変化による影響調査に関して、

(1) 全国の嫌気性消化施設の運転結果を気候的に8地域に分割し、個々の地域における汚泥性状の年間変化を求めた。また、全国値としての年間変化も求めた。

(2) 消化ガスの利用促進と嫌気性消化法の整備拡充に関する意見をアンケート形式で求め、得られた全ての意見を「内部資料：嫌気性消化施設に関するアンケート調査報告書」としてとりまとめて回答者に還流した。

有機物の分解率とCO_2供給に関する調査に関して、

(3) 溶解性ICは、セルロースの可溶化・酸発酵段階を促進する効果があると考えられる。これは、特に初沈汚泥の分解率向上につながるものと期待される。

(4) 上記のICの効果は、あらかじめIC豊富な環境で馴致された汚泥に対して見られる可能性が示唆された。

(5) ただしIC添加の有無によって、真正細菌の群集構造そのものが大きく変化するわけではなかった。すなわち、メタン細菌（古細菌）を介した間接的な影響、あるいは、広範囲の真正細菌に対して酵素の発現などを左右する影響を与えている可能性がある。このような反応のメカニズムについて、今後さらなる検討を行う必要がある。

低コスト・低エネルギー型の下水道システムに関する検討に関して、

(6) 極小規模下水道の下水処理施設について、必要な処理水質を確保しつつ低コストを達成するための計画・設計法を検討し、低コスト型下水処理プロセスを提案した。

(7) 低エネルギー型下水処理場の構築に寄与する汎用型消化ガスエンジンシステムの開発実験を行い、エンジン回転は CO_2 濃度が15%よりも高くなると不安定となるものであったが、エンジン直結の燃料供給制御装置の改造・調整により、より高濃度となった場合でも解決できると思われた。

参考文献

1) 北條俊昌、李玉友、野池達也：二相循環プロセスによる初沈汚泥嫌気性消化の効率化、日本水環境学会第 41 回年会講演集、2007.

2) 建設省土木研究所：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、1991.

3) 社団法人日本下水道協会：下水試験方法（上巻）、1997

4) Muyzer、G.、Waal、E. C. and Unitterlinden、A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA、 Appl Environ Microbiol、 59、 695-700.

5) 社団法人日本下水道協会：建設省都市局下水道部監修「小規模下水道計画・設計・維持管理指針と解説－1996 年版－」

6) 財団法人建設物価調査会：建設物価－月刊－

下水処理場を核とした湿潤系バイオマスの資源化技術に関する調査

リサイクルチーム　　室　　長　尾崎　正明
主任研究員　山下　洋正
研究員　宮本　綾子

１．　はじめに

一般的に下水処理場はバイオマスをエネルギー転換できる汚泥処理プロセスの導入が可能であり、地域のエネルギー対策や地球温暖化対策の観点から、これらの特徴を活かして湿潤系バイオマス等の地域全体のバイオマスの効率的な利活用を推進することが期待されている。

本調査は、下水処理施設が有する資源・エネルギー供給機能を活用し、下水汚泥のほか、浄化槽汚泥、畜産廃棄物等の湿潤系バイオマスを有効利用するため、湿潤系バイオマスを有効利用する技術である「嫌気性消化法」を活用するプロセスについて、メタンガス等のエネルギーの回収能力や環境負荷削減効果の評価を行うことを目的とするものである。

平成１８年度の実施内容は以下の通りである。

（1）粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件の最適化についての検討
（2）嫌気性混合発酵プロセスの開発
（3）発酵残さの有効利用方法の評価・検討

２．　粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件の最適化についての検討

２．１　調査方法

（1）調査対象

下水汚泥以外の湿潤系バイオマスとしては，浄化槽汚泥，畜産廃棄物等があげられる。このうち，浄化槽汚泥については，主として家庭より排出される人のし尿／雑排水の処理過程で発生したものであり，その性状は下水汚泥に類似すると考えられるため，下水汚泥の有効利用技術が適用可能と考えられる。一方，畜産廃棄物については，牛，豚等の家畜の排泄物がおがくず等の敷料と混合されて排出されるものであり，その性状は下水汚泥と著しく異なるため，下水汚泥の有効利用技術がそのまま適用可能かどうか不明である。従って，本調査においては，下水汚泥と畜産廃棄物をあわせて有効利用するための技術に焦点をあてて検討を行った。

畜産廃棄物には，牛・豚・鶏等の畜産排泄物や食肉加工時の残さ，廃棄牛乳・卵などが含まれると考えられるが，その中でも畜産排泄物については環境保全の観点からもその適切な処理が求められている。このうち鶏糞については肥料として流通が確立されており，牛糞についても堆肥化されて外部に有償／無償で譲渡される他，一般に酪農や肉牛飼育においては圃場を有している場合が多いため，それら農地に施用しての自家消費も可能である。これらと比べて豚糞については，一般に養豚においては圃場を有していない場合が多いため，堆肥として外部に引き取ってもらう以外には処分の手段が極めて限られている。特に，畜産排泄物の適正処理の促進に関する法律が施行されて以降，適正処理の手段として堆肥化が推進された結果として堆肥生産が増加しており，供給が需要を上回り引き取り手が不足することも想定されるため，豚糞の堆肥化以外の有効利用・適正処理は今後重要な課題となると考えられる。従って，本調査においては，畜産廃棄物の中でも特に豚糞に着目して検討を進めた。

養豚における飼育形式は様々であるが，おがくず，もみ殻，稲わら等を敷料として豚舎に敷き詰めて，その上で豚を飼育して糞尿を排泄させ，水分は尿排水として別途処理して，固形分は数ヶ月に一度排出して，糞および廃敷料をそのまま混合発酵させて堆肥化する方法が広く用いられている。この場合，易分解性有機物を多く含む糞と粗大・粗繊維物が主体である敷料を分離することは困難であり，両者一体の固形分として処理するしかない。このため，下水汚泥と敷料を含んだ豚糞をあわせて処理する技術の開発が求められるが，敷料由来の粗大・粗繊維バイオマスはそのままでは効率的な分解・利用が困難であることから，爆砕処理技術を用いて前処理を行うことが有効と考えて，次に示すとおり必要な実験を行った。

（2）実験方法

豚糞に含まれる可能性のある敷料として，おがくず（広葉樹），おがくず（針葉樹），もみ殻，稲わらの 4 種類の粗大・粗繊維バイオマスを選定した。これらのバイオマスの乾燥試料を爆砕処理装置により，180℃（約 1MPa，3 分間）および 200℃（約 1.5MP，3 分間）の条件下でそれぞれ爆砕処理を行った。おがくず（広葉樹）については，含水率 50%および 80%の 2 通りの湿潤試料についても 200℃の条件下で爆砕処理を行い，全部で 10 種類の爆砕試料を作成した。

嫌気性消化実験は，各爆砕試料 10mL を生下水汚泥 10mL と TS 比で 1:1 程度に混合した試料を消化汚泥 380mL に添加して（基質汚泥割合 1/20）実施した。対照実験として，爆砕試料を用いずに生下水汚泥 20mL のみを添加する場合および爆砕試料も生汚泥も添加せずに消化汚泥のみ 400mL の場合についても実施した。

実験は，消化温度 35℃，消化日数 4 日の条件下で，500mL 三角フラスコにて回分式で常時振とうして行った。消化ガスの発生量を測定するとともに，ガス成分をガスクロマトグラフで分析し，嫌気性消化の指標としてメタンガス生成量を把握した。また，pH，TS，VS，CODcr もあわせて測定した。

2．2　結果および考察

嫌気性消化実験の結果について，メタンガス発生量を図 2-1 に，結果の整理を表 2-1 にそれぞれ示す。

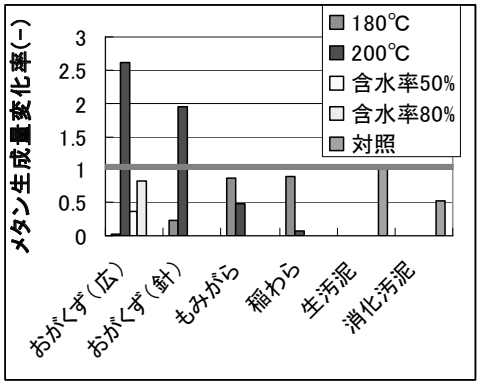


表 2-1　爆砕試料の嫌気性消化への適用可能性

	180℃	200℃	含水率50%	含水率80%
おがくず（広）	×	○	×	△
おがくず（針）	×	○		
もみがら	△	×		
稲わら	△	×		

図 2-1　爆砕試料と下水汚泥混合物の嫌気性消化実験におけるメタンガス発生量

これより，おがくずについては，乾燥試料を 200℃で爆砕した試料を混合した場合では，下水生汚泥単独と比較して，メタンガス発生量が広葉樹で約 2.6 倍，針葉樹で約 2.0 倍，それぞれ増大していた。一方，乾燥試料を 180℃で爆砕した場合には広葉樹・針葉樹ともにメタンガス発生は大幅に減少し，むしろ阻害的に作用していた。爆砕試料由来の溶解性 CODcr については，180℃および 200℃でほとんど同等であるにもかかわらず，200℃ではメタンガス発生増大につながり，180℃では阻害的となっていることから，爆砕処理条件によって抽出される有機物の組成が異なるものと考えられた。

湿潤試料，もみがら，稲わらは爆砕効果なし考えられた。これらのバイオマスは，180℃または 200℃の爆砕処理では効果的に有機成分を取り出すことが難しいと考えられた。200℃を越えると，爆砕処理装置の制約，エネルギー消費増大等の問題も生じるため，これらのバイオマスについては，爆砕処理以外の処理法を検討するか，あるいは，嫌気性消化を行わずに堆肥化等により処理することが望ましいと考えられた。

以上より，粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件としては，おがくず（木質廃材）については乾燥試料を 200℃（1.5MPa，3 分間）で爆砕処理することが最適と判断された。高含水状態では爆砕が不十分となるため,予備乾燥等により含水率を低下させて爆砕するか,他の処理方法を開発する必要があると考えられた。稲わらおよびもみ殻については，爆砕処理による嫌気性消化に適していないと考えられた。

ただし，いずれの場合も爆砕物は完全に可溶化されるわけではなく，かなりの割合で固形物として消化汚泥に残留していた。爆砕により性状が軟化しているため，嫌気性消化槽での混合に問題はなく，完全混合状態が保たれている限り，砂とは異なり消化槽への堆積は少ないと考えられるが，消化汚泥の固形物量が増加してしまうため，今後の技術開発により可能な限り可溶化を促進することが望ましいと考えられた。

３．　嫌気性混合発酵プロセスの開発

３．１　調査方法

（１）調査対象

粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件の最適化を行った結果として，粗大・粗繊維バイオマスでも種類および処理条件を適切に選定して爆砕した場合は嫌気性消化に悪影響をもたらさず基質として利用可能であることが明らかとなった。従って，敷料が混合した畜産廃棄物を下水汚泥と混合して処理する嫌気性混合発酵プロセスの課題としては，敷料ではなく，畜産廃棄物について検討することが妥当と考えられる。下水汚泥と畜産廃棄物（例えば豚糞等）を混合して嫌気性混合発酵を行う際には，豚糞等の性状は下水汚泥と異なるため嫌気性発酵特性が異なる可能性があるとともに，畜産廃棄物由来の微量有機成分（動物用抗生物質，ホルモン等）が嫌気性生物反応に影響を与える可能性がある。近年，下水道に流入する人用抗生物質等については調査が行われ知見が蓄積されつつあるが，下水処理場に畜産廃棄物を受け入れて，下水汚泥と豚糞等を混合処理する場合には，これまで想定していなかった微量有機成分，例えば動物用の抗生物質やホルモン物質が流入してくるため，そうした物質が嫌気性混合発酵プロセスにどのような影響をもたらすかを明らかにし，必要であれば対策技術を開発する必要がある。従って，本調査では，下水汚泥と敷料を含む豚糞の混合物について，嫌気性混合発酵プロセスを開発するに当たり，両者の性状の違いおよび豚糞等に含まれる微量有機成分に着目して検討を行った。

（２）実験方法

(a) 有機微量成分の影響

嫌気性消化におよぼす豚糞由来の微量有機成分の影響を明らかにするために，スクリーニングテストを実施した。テスト対象は，動物用医薬品の統計より推定される使用量，既往文献の報告事例等を参考に，サルファ剤系の(1)Sulfamethoxazole，(3)Sulfadimethoxine および(4)Sulfamonomethoxine，マクロライド系の(2)Tylosin および(5)Oleandmycin の５物質とした。試験は OECD ガイドラインに準じて実施した。

容量 120mL のバイアルびんに，種汚泥（嫌気性消化汚泥）47.5mL，基質汚泥（生汚泥）2.5mL および微量有機成分溶液 0.1mL を添加して，上部の気相を窒素ガスで置換した後密閉して，35℃条件下で，72 時間振とう培養を実施した。培養終了後にシリンジにてガスを採取してメタン等の成分分析を実施し，また水質項目として CODcr，有機酸を測定した。

まず予備試験(n=1)により，5 段階以上の広い濃度範囲において，メタン発酵への影響濃度範囲を把握した。

影響が認められた物質については，詳細試験(n=3)により，メタン発生量の阻害をエンドポイントとしてEC50を求めた。

(b) バイオマスに含まれる微量有機成分の把握

嫌気性混合発酵プロセスの基質として用いる下水汚泥や畜産廃棄物等のバイオマスに含まれる微量有機成分について把握するために，サンプルを収集して分析を行った。分析対象物質は，表 3-1 に示す 20 物質として，LC/MS/MS（高速液体クロマトグラフ－タンデム型質量分析計）等を用いて分析した。

(c) 性状の違いによる影響

下水汚泥と豚糞の性状の違いが嫌気性混合発酵プロセスにおよぼす影響について把握するために，嫌気性消化実験を実施した。基質バイオマスとしては，下水汚泥（生汚泥），畜産廃棄物（豚糞および尿排水処理汚泥）を用いて，表 3-2 に示す実験条件で行った。

実験は、実験装置（容量 2L）を 35℃恒温室に設置して実施した。平日に１日１回，消化汚泥の引き抜きおよび基質バイオマスの投入（100mL／日，HRT20 日相当）を実施した。

表 3-2　実験条件

	生汚泥	豚糞	尿排水処理汚泥 (%)
Run1	100	0	0
Run2	66.6	33.3	0
Run3	50	50	0
Run4	66.6	0	33.3
Run5	50	0	50
Run6	66.6	16.65	16.65

表 3-1　調査対象物質

ID	物 質 名
1	Sulfamethoxazole
2	Clarithromycin
3	Oleandomycin phosphate
4	Tylosin
5	Ampicillin
6	Roxithromycin
7	Sulfadimethoxine
8	Sulfamethazine
9	Benzylpenicillin sodium
10	Fenbendazole
11	Ketoprofen
12	Sulfamonomethoxine
13	Acetaminophen
14	Ethenzamide
15	Salicylic acid
16	Theophylline
17	17β-Estradiol
18	Indomethacin
19	Mefenamic acid
20	Bezafibrate

３．２　結果および考察

(a) 微量有機成分の影響

主要物質に関するスクリーニングテストの結果より，サルファ剤系の(1)Sulfamethoxazole，(3)Sulfadimethoxine，(4)Sulfamonomethoxine およびマクロライド系の(5)Oleandmycin では，設定可能な濃度範囲 100mg/L 以下（メタノール溶液 0.1mL を 50mL に添加）でメタン発酵阻害は 0～30%程度であり，顕著な影響は見られなかった。マクロライド系の(2)Tylosin はメタン発酵への阻害をより明確に示し，EC50（50%阻害濃度）は約 1mg/L であった。Tylosin および Sulfamethoxazole の結果を図 3-1 に示す。

これらの結果は，既往の報告事例（基質等の条件は本試験と異なる）における傾向と概ね一致するものであった。なお，後述するように Tylosin は実試料中でほとんど検出されなかったため，嫌気性消化反応に悪影響を及ぼすことは考えられなかった。

本スクリーニングテストでは，72 時間という急性毒性的な影響のみを検討したものであり，また，データのばらつき等の影響より結果の解析が難しい面もあることから，長期的なメタン発酵活性への影響も含めて，直ちに全て無影響と結論することはできないと考えられる。しかし，実処理プロセスにおける流入基質性状の変動など様々な変動要因の中で，こうした微妙な影響を明らかにすることやそれを考慮した運転管理を行

うことは難しいことから，実質的には影響は無視しうるとしてプロセスを運転して良いのではないかと考えられた。

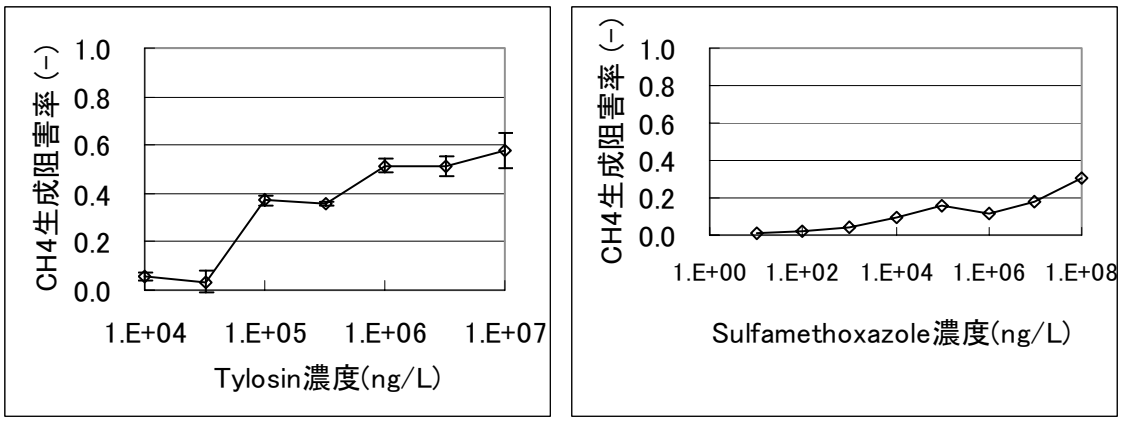


図 3-1 微量有機成分によるメタン発酵阻害試験結果
（左：Tylosin，右：Sulfamethoxazole）

(b) バイオマスに含まれる微量有機成分の把握

バイオマスサンプルの分析結果より，畜産廃棄物（豚糞，尿排水処理汚泥，豚糞肥料）では，チアベンダゾール系の抗寄生虫薬の Fenbendazole，リンコマイシン系抗生物質の Lincomycin，イオノフォア系抗生物質で飼料添加物である Salinomycin 等が検出された。このうち，Lincomycin については，Tylosin と同程度のメタン発酵阻害を与えるとの報告があり，Fenbendazole および Salinomycin については報告事例がないが，いずれの物質についても微量（最大で数 mg/kg 程度）であるため，嫌気性消化中の濃度に換算すると，影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

動物用医薬品の統計において養豚での使用量が大とされている，サルファ剤系の Sulfamethoxazole，Sulfadimethoxine，Sulfamonomethoxine，マクロライド系の Tylosin 等は検出されなかった。また，Ampicillin，Roxithromycin，Benzylpenicillin も検出されなかった。

豚糞については排出直後のものではなく，畜舎で排出後おがくず等の敷料に吸収されたものが数ヶ月毎にまとめて引き抜かれた後に，堆肥場でコンポスト化途上であった試料であるため，微量有機成分がある程度分解・変化している可能性があるが，排出実態に即した試料であると考えられる。尿排水処理汚泥は，尿排水の好気処理において発生した汚泥であり，豚糞と混合して堆肥化されるものである。この汚泥には尿排水中で十分に分解されなかった物質が残っていると考えられるが，微量有機物質の濃度は豚糞試料と同様の傾向を示した。豚糞肥料は，完全にコンポスト化されたものであり，Fenbendazole，Lincomycin，Salinomycin いずれについても，豚糞および尿排水処理汚泥中の濃度よりも低濃度であったことから，コンポスト化により微量有機成分の分解が進むものと推測された。

下水の溶解性試料ではより多くの種類の微量有機成分が検出されたが，下水の固形性試料では，一部の試料からサルファ剤系の Sulfamethoxazole，Sulfamonomethoxine が検出され，Sulfadimethoxine およびマクロライド系の Tylosin は検出されなかった。また，Ampicillin，Roxithromycin，Benzylpenicillin も検出されなかった。これら以外には，Oleandmycin や人用医薬品である Clarithromycin 等が検出された。畜産廃棄物で検出された，Lincomycin，Salinomycin についてはいずれも検出されず，Fenbendazole がわずかに検出されたのみであった。

以上より，畜産廃棄物由来の微量有機成分としては，Fenbendazole， Lincomycin， Salinomycin 等が検出され，下水汚泥由来の微量有機成分としては，Sulfamethoxazole，Sulfamonomethoxine，Oleandmycin 等が検出された。これらの微量有機成分のうち,現時点でメタン発酵への影響が予測されるものはなかったが,不明なものについては引き続き調査が必要と考えられた。

(c) 性状の違いによる影響

下水汚泥と畜産廃棄物の性状の違いが嫌気性消化におよぼす影響に関する実験結果より，メタンガス発生量について図 3-2 に示す。

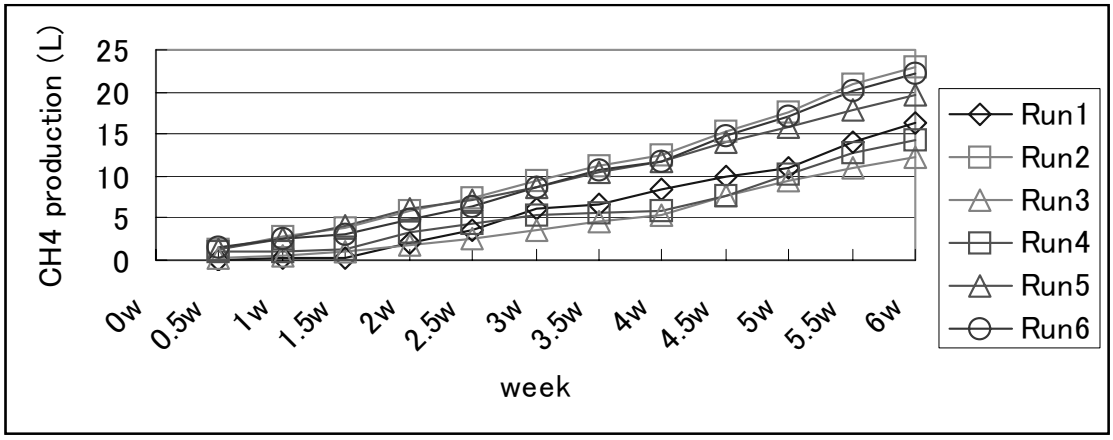


図 3-2　嫌気性消化実験におけるメタンガス発生量

(Run1：下水汚泥のみ，Run2：下水汚泥＋豚糞(2:1)，Run3：下水汚泥＋豚糞(1:1)，
Run4：下水汚泥＋尿排水処理汚泥(2:1)，Run5：下水汚泥＋尿排水処理汚泥(1:1)，
Run6：下水汚泥＋豚糞＋尿排水処理汚泥(4:1:1))

下水汚泥（生汚泥）と豚糞を TS 比で 2:1 および 1:1 に混合して供給した場合は，豚糞の混合割合が低い方（2:1）がメタン発生量が多く，消化汚泥の残存有機物比率（VS/TS）も低く，嫌気性消化がより良好に行われていると考えられた。この理由としては，本実験で用いた豚糞は排出後期間が経過しているため易分解性有機物が減少して TS および VS にしめるおがくず等の敷料の割合が高くなっており，爆砕処理をしていないため敷料がメタン発酵に利用されないため，TS ベースで混合比を調整すると豚糞の割合が高い方がメタン発酵に用いられる有機分が少なくなる可能性が考えられた。豚糞が排出後に短期間でメタン発酵に供される場合は，易分解性有機物の減少が少ないため，豚糞の混合割合が高い場合でもメタン発生量が多くなる可能性もあると考えられるが，含有される敷料に由来して嫌気性消化汚泥中の TS および難分解性 VS も増大するため，豚糞の混合比率をあまり増大させない方が良いと考えられた。

下水汚泥（生汚泥）と尿排水処理汚泥を TS 比で 2:1 および 1:1 に混合して供給した場合は，尿排水処理汚泥の混合割合が高い方（1:1）メタン発生量が多かった。この理由としては，尿排水処理汚泥は有機分がさほど高くないが（VS/TS で約 72%），易分解性有機物質の割合が高く，メタン発酵の基質として効果的に利用可能であったためではないかと推定した。るためと考えられた。ただし，消化汚泥の残存 TS および VS が高めであり，運転期間を通じて増加傾向にあったことから，嫌気性消化としては不十分であり，消化日数 20 日以上を要するものと考えられた。尿排水処理汚泥の混合割合が低い方（2:1）の方が，残存 TS および VS が低いことから，消化日数 20 日の運転条件では，尿排水処理汚泥の混合比率を低めにした方が良いと考えられた。

下水汚泥と豚糞および尿排水処理汚泥をそれぞれ 4:1:1 に混合して供給した場合についても，良好にメタ

ン発酵が行われた。

以上の結果より，下水汚泥（生汚泥）および豚糞（敷料を含む固形物主体）ならびに尿排水処理汚泥を混合してメタン発酵を行う場合は，性状の違いを考慮して，いずれも下水汚泥と他のバイオマスの混合比が 2:1 程度であれば，消化温度 35℃，消化日数 20 日の運転条件で問題なく運転可能と考えられた。

以上より，(a) 微量有機成分の影響，(b) バイオマスに含まれる微量有機成分の把握，(c) 性状の違いによる影響，の各結果を総合して考察すると，下水汚泥と畜産廃棄物（敷料を含んだ豚糞，尿排水処理汚泥）の嫌気性混合発酵プロセスは，敷料がおがくずであれば爆砕処理されていない場合でも混合率 2:1 で良好に嫌気性消化によるメタンガス回収が可能であり，バイオマス由来の微量有機成分は嫌気性消化に短期的には顕著な悪影響をもたらさないと考えられた。

より長期的な影響の可能性，例えば，分解されない敷料等による消化槽内の固形物量の長期的な増加や，微量有機成分の長期的な影響等については，混合嫌気性発酵プロセスの実用化に向けて今後も引き続き調査が必要と考えられる。

４．　発酵残さの有効利用方法の評価・検討

４．１　調査方法

（１）調査対象

下水汚泥の約８割が焼却されて焼却灰が多量に生成されているが、これまでの有効利用に関する研究は適用性に重点が置かれており、建設資材利用の安定的かつ有効な技術は限られている。また、含有リンを資源として回収する場合に、処理コストの面で問題がある。

このため、発酵残さの有効利用方法の評価・検討のため嫌気性消化後の下水汚泥を対象とし、その焼却灰中のリンを回収するための基礎的な調査を実施した。

嫌気好気法等による処理で発生する下水汚泥はリンを大量に含有しており、P2O5 換算で 30%程度のものも存在する。これまでも下水汚泥中のリンを有効利用する様々な手段が提案されているが、本調査では、性状が安定しており取り扱いが容易である下水汚泥焼却灰を対象として、浮遊選鉱法の適用可能性について調査を実施した。浮遊選鉱法とは、水中で気泡表面に特定の固体粒子を付着させ目的とする成分を主とする粒子を浮遊もしくは沈降させて選別する手法で、鉱石の選別手法として用いられるものであり[1)、2)]、りん鉱石の処理についても適用の検討がなされている[3)]。本調査ではりん含有量の高い２種類の下水汚泥焼却灰を対象とし、はじめに粒度分析を行い、浮遊選鉱法の対象となる粒径の範囲にあることを確認した。次に、陰イオン系および陽イオン系の捕集剤を使用した浮遊選鉱法の適用性について調査を行った。

（２）実験方法

１）試料の詳細

本実験の試料として A、B２種類の下水汚泥焼却灰を用いた。ともに A2O 法による処理を行っている下水処理場でサンプリングしたものである。なお、焼却灰 A は凝集剤として PAC を用いているため PAC 由来の Al 含有量を算出したところ、焼却灰の 0.045wt%であった。焼却灰 B は高分子凝集剤のみの使用である。

２）焼却灰の粒度分析

浮遊選鉱法（以下、浮選とする）の対象となる粒子は一般的に粒径 30μm 以上とされる。焼却灰がこの条件を満たしていることを確認するため、レーザー回折散乱法（使用機器：Microtrac、日機装製）による粒度分析を行った。

３）焼却灰への浮選の適用性調査

本実験では図 4-1 に示したような実験装置を使用し、圧縮空気を流量 2.0L/min で孔径 250μm のガラスフィ

ルターを通過させ気泡を発生させた。捕集剤は陽イオン系として Armac-C、陰イオン系としてオレイン酸ナトリウムを使用し、24 のケースについて実験を行った。試料および薬品の種類と使用量は表 4-1 のとおりである。焼却灰とイオン交換水を混合し、pH を調整し起泡剤および捕集剤を添加し攪拌した。フロスは薬さじで随時回収し、実験終了後のパルプは吸引濾過により分離した。これらについて ICP および ICP-MS を使用して主要元素および微量元素の含有量を分析した。パルプ中の Ca イオン等が浮遊性に影響を与えるとの報告もあったため、焼却灰をあらかじめ水洗したケースも設定した。この場合、イオン交換水で２回洗浄後、3μm の濾紙で自然濾過した後浮選に供試した。

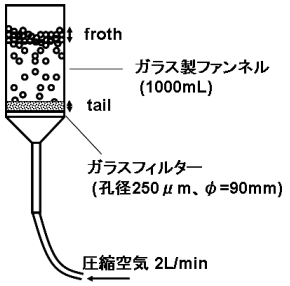


図 4-1　実験装置

表 4-1　焼却灰と試薬配合

	焼却灰	30g
	イオン交換水	285mL
pH調整	HNO3 NaOH	適宜
起泡剤	MIBC	15μL
捕集剤	Armac-C	15mL
（1mg/1mL溶液）	オレイン酸ソーダ	15mL

４．２　結果および考察

１）焼却灰の粒度分析

実験の結果を図 4-2 に示す。80%通過粒径が試料 A で 120μm、B で 96μm と試料 A の方が粒径は大きいが、浮選適用の目安となる粒径 30μm 以上の粒子の割合は両者ともに約 70%であった。これらの試料を SEM で観察したところ 10μm 程度以下の微粒子もみられ灰粒子が凝集している可能性もあったことから溶媒中に界面活性剤を添加したケースについても測定を実施したが粒径にほとんど変化はみられなかった。

界面活性剤	HLB値	mg（試料1gに対し）
ソルビタンモノオレエート	4.3	7.5
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート	15.0	46.0

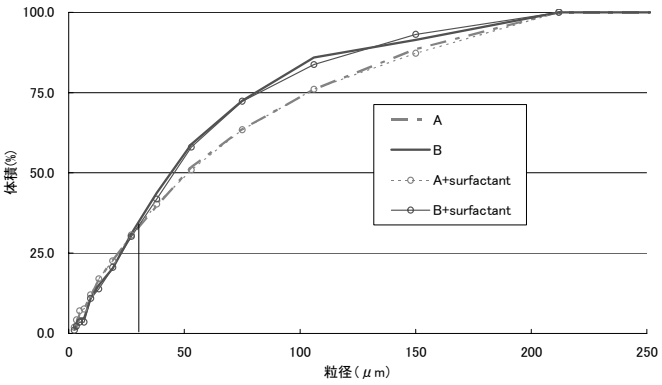


図 4-2　粒度分布

本測定法はレーザー回折を利用していることから気泡の発生により正確な粒径の測定ができなくなるため今回は界面活性剤の添加はこの 1 ケースしか実施していないが、界面活性剤の添加量と粒径の変化についてはさらにデータを蓄積する必要がある。

２）焼却灰への浮選の適用性調査

各焼却灰のイオン交換水による洗浄前後の含有量試験結果より，リンの含有量はＡで 12.2%、B で 11.4%となり、P2O5 換算で約 30%に達していた。A はリン、シリカ以外の主要元素で洗浄後に若干の減少が見られたが、B では洗浄後もほとんど変化は見られなかった。その他の元素では、洗浄によってセレンが大幅に減少することがわかった。

まず、浮選によるリン、シリカ、アルミニウムの含有量の変化を図 4-3 に示す。このグラフでは、浮選を実施する前の焼却灰中の各元素の含有量に対する浮選後のフロス中の含有量の割合を示した。例えばリンの値が 1.2 である場合、フロス中のリン濃度が当初の 20%増加している。

焼却灰 A については浮選の結果、捕集剤にオレイン酸ナトリウムを使用した場合、洗浄の有無に関わらずフロス中のシリカはいずれも減少がみられ、それに伴ってリンの濃度が上昇する結果となった。アルミニウムは、リンとほぼ同様の傾向を示した。

焼却灰 B は同様の浮選を行ったものの、フロスとして捕集される固形物の量が少なく、オレイン酸ナトリウムの pH4.5 では含有量分析が不可能であった。また、測定できたケースについても、浮選の前後で含有量にＡほどの差違が現れなかった。

この中で比較的リンがフロスに濃縮された、焼却灰 A の洗浄あり・オレイン酸ナトリウム使用ケースについて、その他の元素も含めた結果を図 4-4 に示す。このときフロス中のリンの含有量は 150,120mg/kg と約 23%増加した。

SEM-EDX を用いてフロス粒子の元素分析の結果、シリカ、鉄、マグネシウムは独立した粒子として観察されるものが多かった。一方、その他、リン、カルシウム、アルミニウム等は粒子中に混在しているものがほとんどであった。このことからシリカは他の成分と比較して浮選の対象として分離しやすく、結果としてリンなどの成分が濃縮されていたと考えられる。

また、その他の元素で特徴的な挙動を示したものとしてはクロムがあり、沈鉱側の含有量を分析した結果、1.5～1.7 倍と濃縮されるケースが多く見られた

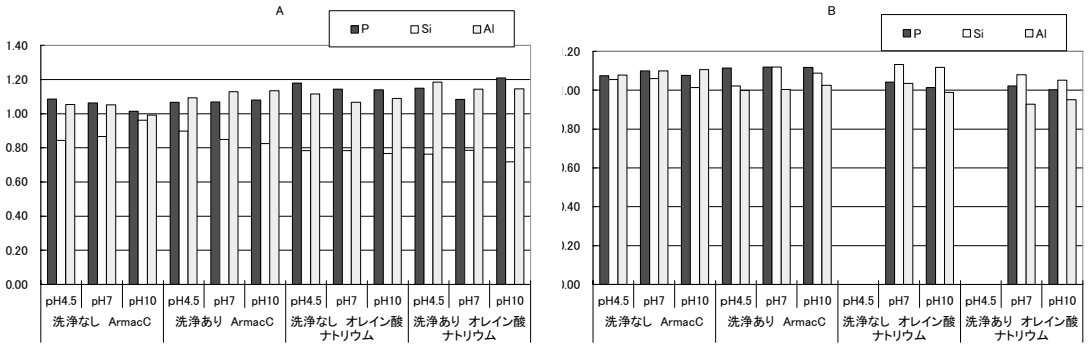


図 4-3　浮選結果（リン、シリカ、アルミニウム）

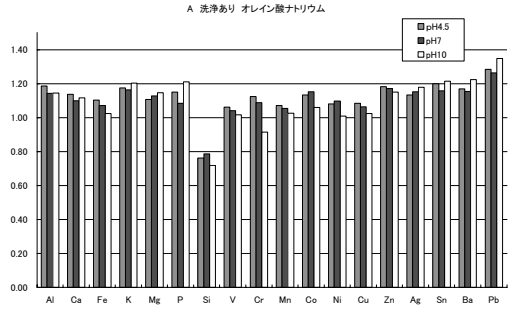


図 4-4　浮選結果　焼却灰Ａ
オレイン酸ナトリウム使用

５．　まとめ

本調査で得られた主要な結果は次の通りである。

（１）粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件の最適化についての検討

①粗大・粗繊維バイオマスの爆砕処理条件としては，おがくず（広葉樹，針葉樹）については乾燥試料を 200℃（1.5MPa，3 分間）で爆砕処理することが最適と判断された。爆砕試料は下水汚泥と混合して良好に嫌気性消化が可能であった。

②高含水状態では爆砕が不十分となるため，予備乾燥等により含水率を低下させて爆砕するか，他の処理方法を開発する必要があると考えられた。稲わらおよびもみ殻については，爆砕処理による嫌気性消化に適していないと考えられた

（2）嫌気性混合発酵プロセスの開発

①サルファ剤系の Sulfamethoxazole，Sulfadimethoxine，Sulfamonomethoxine およびマクロライド系の Oleandmycin では，メタン発酵への顕著な影響は見られなかった。マクロライド系の Tylosin はメタン発酵への阻害をより明確に示し，EC50（50%阻害濃度）は約 1mg/L であったが，実試料中にはほとんど存在しなかった。

②畜産廃棄物由来の微量有機成分としては，Fenbendazole， Lincomycin， Salinomycin 等が検出され，下水汚泥由来の微量有機成分としては，Sulfamethoxazole，Sulfamonomethoxine，Oleandmycin 等が検出された。これらの微量有機成分のうち，現時点でメタン発酵への影響が予測されるものはなかった。

③下水汚泥（生汚泥）および豚糞（敷料を含む固形物主体）ならびに尿排水処理汚泥を混合してメタン発酵を行う場合は，性状の違いを考慮して，いずれも下水汚泥と他のバイオマスの混合比が 2:1 程度であれば，消化温度 35℃，消化日数 20 日の運転条件で問題なく運転可能と考えられた。

（3）発酵残さの有効利用方法の評価・検討

①浮選実験の結果、焼却灰の種類によっては有価物の回収に浮選が有効な手段となる可能性が示された。

②本調査ではリンが最大で 20%程度濃縮される結果となった。この結果は焼却灰中のカルシウムイオン等が各成分の浮遊性に影響したこと、また、それぞれの焼却灰粒子は採取された状態では片刃粒子がほとんどであることが影響したと考えられ、例えば粒子の適度な粉砕等により単体分離するなどの前処理が必要となることがわかった。

③発酵残さの有効利用方法について基礎的な技術を開発することができた。今後は実用可能な段階に進めるため、浮選の際の気泡のサイズ、界面活性剤等についてさらに条件を検討し、焼却灰中のリン以外の成分の濃度にも着目していくことが課題となる。

参考文献

1）松岡功、浮選・液－液抽出、資源と素材、1997、vol.113、No.12、pp.924-928

2）山口吉郎、浮遊選鉱法、1942

3）例えば　鈴木孝太郎、森川薫淳、足立元彦、りん鉱石の浮選について　I 各種捕収剤による浮選性、公害資源研究所彙報、1984、vol.14、No.2、pp.7-16

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：運営費交付金（一般勘定）
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：鈴木穣、小森行也、岡安祐司

【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。本調査は、ヒト由来のエストロゲン類の下水処理過程における効率的な除去手法の開発と下水道における生理活性物質の存在実態と下水処理過程における挙動を把握することを目的としている。平成 18 年度は、下水処理過程でのエストロゲン類除去効率について検討した結果、最終沈殿池や返送汚泥系などの下水処理場の生物処理工程後段における酸化還元状態の管理方法が除去効率に大きな影響を与えると考えられた。また、下水道における医薬品、抗生物質の存在実態に関する調査を行った。

キーワード：エストロゲン、17β-エストラジオール、エストロン、医薬品、抗生物質

１．下水処理過程でのエストロゲン類除去効率の把握

既往の調査によれば、① 内分泌撹乱作用が疑われる物質の中に、河川水中や下水道に広く存在するものがあり、② 下水処理場の放流先河川の一部の雄コイの血清中からビテロジェニンが検出されている。現在のところ、下水処理水とビテロジェニン誘導の因果関係は、明確には確認されていないが、下水処理水の *in vivo* の試験系による評価は検討されているところである。

一方で、*in vitro* の試験系によるエストロゲン様活性の測定手法と水中の化学物質の分画手法を用いた、下水中の内分泌かく乱化学物質の同定に関する調査結果[1) 2)]によれば、下水処理水のエストロゲン様活性は下水処理場ごとに大きく異なっており、その大部分は 17β-エストラジオール（E2）やエストロン（E1）などの遊離体エストロゲンの寄与によるものであることが判明している。このため、下水処理場の放流先河川における魚類のビテロジェニンの誘導を抑える対策として、下水処理場における E2 や E1 などの遊離体エストロゲンを削減することが有効である可能性が大きいと考えられる。

水質チームの既往の研究結果では、図 1-1 に示すように、下水処理工程の後段部分における DO 濃度の状況によって、下水処理水中の遊離体エストロゲン（特に E1）の濃度が大きく左右されることが示唆されている[3) 4)]。本調査では、わが国の大部分の下水処理場で採用されている標準活性汚泥法の高水温期の代表的な運転方法である硝化促進型運転及び低水温期の代表的な運転方法である硝化抑制型運転を再現し、下水処理工程の後段部分（最終沈殿池や返送汚泥系）における無酸素及び嫌気条件下でのエストロゲンの変化の特性を把握するために、易分解性有機物の除去が終了した段階の活性汚泥を用いて、無酸素条件下及び嫌気条件下での回分実験を実施し、遊離体エストロゲンの変化の特性を把握した。

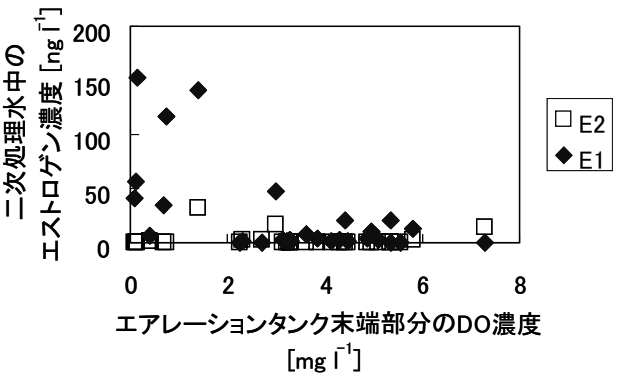


図 1-1　標準活性汚泥法パイロットプラントにおけるエアレーションタンク末端部分の DO 濃度と二次処理水中のエストロゲン濃度の関係

１．１．硝化促進型標準活性汚泥法におけるエストロゲン類除去効率の把握

１）実験方法

① 回分実験

下水処理場の易分解性有機物の除去が終了した段階の活性汚泥におけるエストロゲン関連物質の変化を考察するために、エアレーションタンク流出液を用いた回分実

験（実験時間：10h）を実施した。エアレーションタンク流出液は、茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場の流入下水を用いた標準活性汚泥法パイロットプラント（有効水深 2m, エアレーションタンク規模 10m³, HRT＝8hr）より入手した。

回分実験装置は、容量 150L のステンレス製容器を用い、曝気は行わず撹拌機により撹拌し、無酸素条件を作成した。実験前後の MLSS（活性汚泥浮遊物質量）および MLVSS（活性汚泥浮遊物質量）（ガラス繊維ろ紙法）を測定するとともに、1.5 時間間隔で活性汚泥混合液を採取し、20 分間程度静置後、上澄水を GF/B ろ紙によりろ過した。ろ液は、エストロゲン関連物質を測定するための試料として 1L、ノニルフェノール関連物質を測定するための試料として 1.1L それぞれ分取し、酸化防止のために 1g/L のアスコルビン酸を添加後直ちに冷蔵・保存した。分析は 2 日以内に固相抽出までを実施した。また、ろ液の一部は回分実験の進行状況を観察するため、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N および、NO_3^--N を併せて測定した。

なお、本検討は 11 月の硝化促進型運転時に実施した。実験実施時の反応水槽の水温はそれぞれ 19～22℃であった。また、実験日以前の 3 日間は、降雨は無かった。

② 組み換え酵母法

試料中のエストロゲン様活性を、英国 Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いて評価した。試験方法は、Routledge らの方法[5] を改変した矢古宇らの方法[6] に従って実施した。

③ 化学分析

試料中のエストロゲンを化学分析により測定した。対象物質は、女性ホルモンの 17β-エストラジール（E2）、その代謝生成物であるエストロン（E1）、合成エストロゲンの 17α-エチニルエストラジオール（EE2）およびノニルフェノール（NP）である。

E2, E1, EE2 は、固相抽出－液体クロマトグラフ質量分析法[7] により測定した。測定条件、検出下限値、標準物質の添加回収率などの詳細は文献[8] のとおりである。NP の測定は、HPLC[9] を用いて分析を行った。

2）実験結果と考察

表 1-1 および図 1-2 に、回分実験用活性汚泥を採取時の、パイロットプラントにおける運転状況および水質分析結果を示す。パイロットプラントのエアレーションタンクは、押し出し流れの再現のために流下方向に 4 区画に分割されている。なお、いずれの試料もスポットサンプルである。

エアレーションタンクでは硝化が促進し、エアレーションタンク流出液（AT-4）中の溶解性窒素の形態は硝酸性窒素となっていた。二次処理水は、スカムを一部採取した関係で、SS 濃度、アンモニア性窒素濃度がやや高い値となっていた。エアレーションタンク内（AT-1～AT-4）の溶解性遊離体エストロゲンは、E2、E1 については、エアレーションタンク前段で検出されたが、エアレーションタンク流出液（AT-4）では検出されなかった。また、EE2 はいずれの試料においても検出されなかった。

図 1-3 に、回分実験反応槽溶液の DOC および溶解性窒素の濃度変化を示す。内生脱窒に起因すると考えられる硝酸性窒素の減少が観測され、アンモニア性窒素が分解によって生じた。

表 1-1　パイロットプラントの運転状況
および水質分析結果

採取箇所	pH	MLDO	SS mg/L	VSS mg/L	DOC mg/L	NH4-N mgN/L	NO2-N mgN/L	NO3-N mgN/L
流入下水	–	–	243	207	44.6	28.53	n.d.	0.00
沈後水	6.72	–	157	132	41.1	26.74	n.d.	0.00
AT-1	6.68	0.00	–	–	7.9	11.32	n.d.	0.06
AT-2	6.41	0.10	–	–	7.0	5.38	0.15	3.75
AT-3	6.26	0.26	–	–	6.7	n.d.	n.d.	8.63
AT-4	6.00	3.00	1740	1480	9.3	n.d.	n.d.	9.57
二次処理水	6.07	–	25	21	9.6	3.14	n.d.	8.73
余剰汚泥	–	–	4280	3560	–	–	–	–

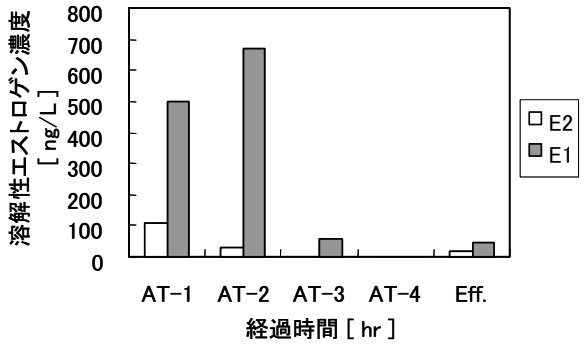


図1-2　パイロットプラントのエストロゲン分析結果

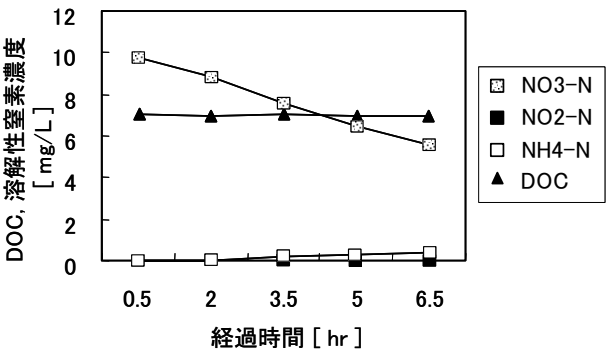


図1-3 回分実験での、DOC, 溶解性窒素濃度の経時変化

エストロゲン様活性（図 1-4）は、実験開始 30 分経過後に 4.75ng-E2 当量/L が検出され、5 時間目に 579ng-E2 当量/L のピークを迎え、その後やや減少した。図 1-5 に E2 および E1 の濃度の経時変化を示す。E2 は、実験開始 30 分経過後には検出されなかったが、その後は増加の一途を辿り、6.5 時間後には 245.9ng/L にまで達した。E1 は、実験開始後 30 分後に既に 75.9ng/L であり、E2 同様、実験期間中増加の一途を辿り、6.5 時間後には 5571.8ng/L にまで達した。なお、E1 の測定結果は、検量線範囲を超えていたため、外挿により求めたものであり、数値の信頼性は低いものと考えられる。

EE2 はいずれの試料でも検出されなかった（検出下限値 0.2ng/L）。NP は 0.1～0.2μg/L の濃度を推移した。図 1-6 では、組み換え酵母により測定されたエストロゲン様活性と、E2、E1、NP のエストロゲン様活性への寄与を算出した理論活性値とを比較した。理論活性値は各物質濃度に比活性値を乗じることによって算出した。各物質の比活性値は、矢古宇らの文献[6] に従い、E1=0.3、E2=1、NP=0.001 とした。結果は、E2、E1、NP 由来のエストロゲン様活性理論活性値の合計が、組み換え酵母により実測された数値を大きく上回った。両者の差の原因は、外挿により E1 の濃度を求めたこと、各試験方法での誤差の影響、各物質間または下水中の成分との拮抗作用等の影響によるものなどが考えられるが、詳細については判明していないため、今後の検討課題としたいと考えている。

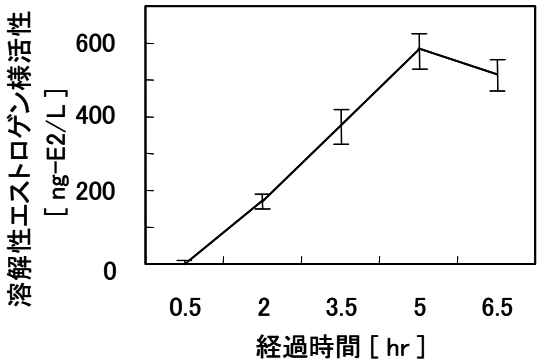


図1-4 回分実験での、溶解性エストロゲン様活性の経時変化

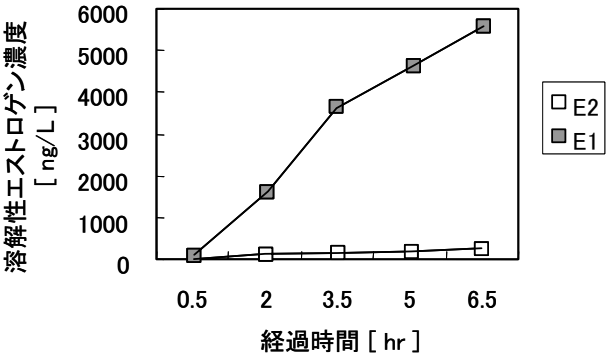


図1-5 回分実験での、溶解性エストロゲン濃度の経時変化

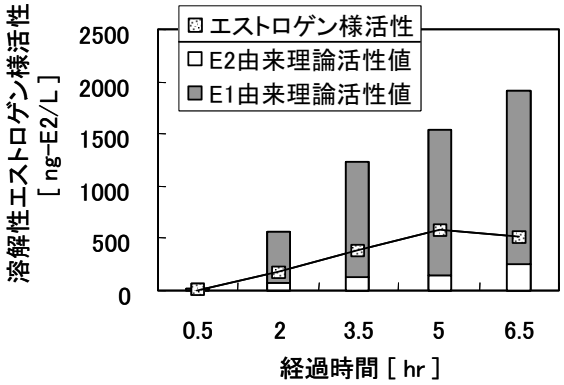


図1-6 回分実験での溶解性エストロゲン様活性実測値と E2, E1由来理論活性値の関係

１．２．硝化抑制型擬似嫌気好気活性汚泥法におけるエストロゲン類除去効率の把握

１）実験方法

① 連続実験

連続実験は、茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場内の実験施設室内に設置した標準活性汚泥法実験プラント（有効水深 2m、最初沈殿池容量 0.5m^3、反応槽容量 2m^3、最終沈殿池容量 0.5m^3、HRT＝8 時間、SRT＝約 10 日、返送比＝0.4）を用いて実施した。なお、本報告の連続実験は、冬季に行われたものであり、期間中の水温は 12～15℃程度であった。また、本実験では、4 つに区切った反応槽の第 1 槽の送風を、最低限撹拌が行える程度に絞り、擬似的な嫌気状態とした。

測定対象物質は、遊離体エストロゲンの E2、E1、合成エストロゲンの EE2 の計 4 化合物である。これらの物質の分析計量は、反応槽の 4 箇所および二次処理水でスポット採取した試料のろ液について実施した。一般項目（MLSS/VSS、DOC、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N、PO_4^{3-}-P）の分析計量は、エストロゲン分析用試料と流入水および最初沈殿池流出水試料をそれぞれスポットサンプリングして実施した。分析方法は、下水試験方法[11) 12)] によった。

② 回分実験

下水処理場の易分解性有機物の除去が終了した段階の活性汚泥におけるエストロゲン関連物質の変化を考察するために、既述の連続実験装置のエアレーションタンク流出液を用いた回分実験（実験時間：6h）を実施した。回分実験の方法は、**1.1. 1) ①**に示す方法のとおりである。

なお、本検討は 2 月の硝化抑制型擬似嫌気好気運転時に実施した。実験実施時の反応水槽の水温はそれぞれ 12～15℃であった。また、実験日以前の 3 日間は、降雨は無かった。

3）実験結果と考察

連続実験では、反応槽の平均汚泥濃度は MLSS/VSS=1080/940mg l^{-1} であった。二次処理水中の溶解性窒素の形態は 99.9%以上をアンモニア性窒素が占め、反応槽では硝化は進行しなかった。また、図 1-7 に示すように反応槽では生物脱りんが観察された。エストロゲンのうち EE2 は、いずれの試料においても検出されなかった。E2 および E1 は、図 1-8 に示すように、反応槽では流下方向に沿って減少する傾向が見られたが、最終沈殿池では増加する傾向が見られた。

この現象を確認するために実施した回分実験の結果は、図 1-9 に示すように、溶解性エストロゲンはある一定レベルにまで増加する傾向が見られた。このことから、易分解性有機物の処理後の嫌気条件下で、溶解性エストロゲンが増加する機構が存在すると考えられた。二次処理水中のエストロゲン濃度低減のためには、この機構の適切な制御が重要であると考えられる。

1．3．まとめ

最終沈殿池や返送汚泥系などの、下水処理場の生物処理工程後段におけるエストロゲンの挙動を考察するために、硝化促進型標準活性汚泥法で連続運転した活性汚泥処理装置のエアレーションタンク流出液を用いた無酸素条件下での回分実験を行った。6.5 時間の実験期間中に、溶解性遊離体エストロゲン濃度が著しく上昇する現象が観察された。

一方、硝化抑制型擬似嫌気好気活性汚泥法で連続運転した活性汚泥処理装置のエアレーションタンク流出液を用いた嫌気条件下での回分実験においても、6 時間の実験期間中に、溶解性遊離体エストロゲン濃度は著しく上昇した。このことから、易分解性有機物が分解された後の溶存酸素が無い無酸素条件または嫌気条件下で、溶解性遊離体エストロゲンが増加する何らかの機構（抱合体エストロゲンの脱抱合、活性汚泥からの脱着・放出、代謝物の還元等）が存在する可能性が考えられた。

今後は溶解性遊離体エストロゲンが増加する機構の詳細について検討を行う必要があると考えられる。また、下水処理場での遊離体エストロゲンの低減を図るためには、エアレーションタンク末端部分や最終沈殿池における酸化還元条件の管理が重要であることが示唆された。

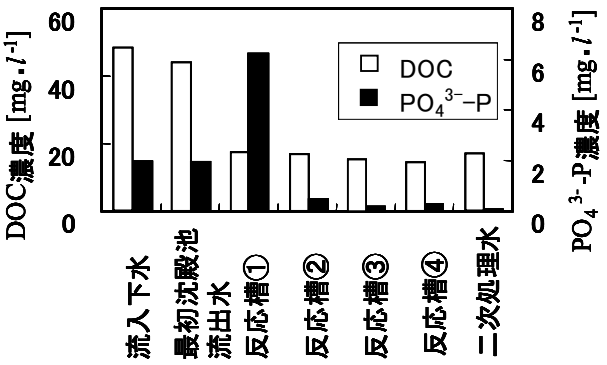


図 1-7 連続実験における DOC、PO_4^{3-}-P の濃度分布

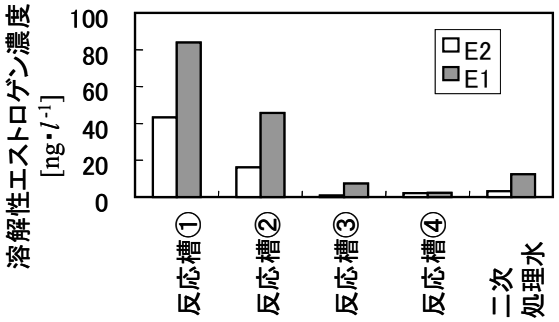


図 1-8 連続実験における
溶解性エストロゲンの濃度分布

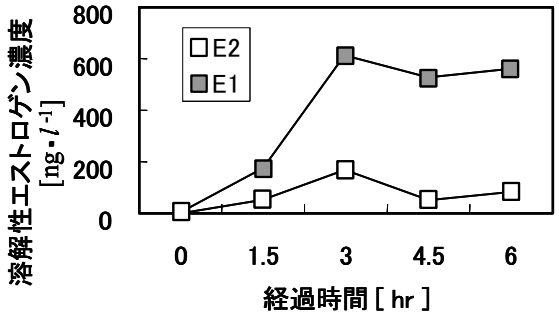


図 1-9 嫌気性回分実験における
溶解性エストロゲンの経時変化

参考文献

1) 矢古宇ほか, 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン様活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol. 36, pp.199-204, 1999

2) H. Tanaka et al., Occurrence of endocrine disruptors in sewage and their behavior in sewage treatment plants in Japan, *Environmental Science*, 10, pp.389-411, 2003

3) 岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣, 下水処理工程におけるエストロゲン関連物質の変化に与える DO 濃度の影響,

第 42 回下水道研究発表会講演集, pp.64-66, 2005
4) 岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣, 活性汚泥処理におけるエストロゲンの挙動について, 第 40 回日本水環境学会年会講演集, pp.247, 2006
5) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P., *Environ Toxicol Chem*, Vol. 15(3), pp.241-248, 1996
6) 矢古宇靖子 他, 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン様活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol. 36, pp.199-204, 1999
7) 下水試験方法（追補暫定版）－内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編－－2002 年版－, pp.275-299
8) Koya Komori *et al.*, Analysis and Occurrence of Estrogen in Wastewater in Japan, *Water Science & Technology* (50) 5, 93-100, 2004
9) 小森行也 他, 下水試料中のエストロゲンおよびノニルフェノキシ酢酸類の分析, 土木技術資料, Vol. 43, No.11, p44-49, 2001
10) 岡安祐司, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穣, 活性汚泥処理の運転条件とエストロゲンの挙動の関係について, 第 43 回下水道研究発表会講演集, pp.64-66, 2006
11) 日本下水道協会(1997) 下水試験方法
12) 日本下水道協会(2002) 下水試験方法（追補暫定版）－2002 年版－、pp.275-299
13) 岡安祐司、小森行也、鈴木穣(2007) 活性汚泥処理における嫌気条件下のエストロゲンの挙動について、第 41 回日本水環境学会年会講演集、pp.464

２．下水道における医薬品、抗生物質の存在実態の把握

２．１　目的

人及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。従来，医薬品類が使用された後の環境動態については、注意が払われていなかったが、近年、水環境中や下水中での医薬品類の存在実態 [1),2)]が報告されるようになってきたことから、水環境中への排出経路、水生生物や人間への影響、あるいは、薬剤耐性菌出現への影響に関心が寄せられるようになってきている。

これまでの報告によると，水環境中で検出された人用医薬品の濃度に比べて下水処理水のそれが高いこと [1), 3), 4)]、下水処理場下流において河川水中の人用医薬品類の濃度が高まること [1),3)~6)]、さらには、下水処理場を含む河川水系における人用医薬品の負荷量収支の検討結果 [7)]から、水環境中に存在する人用医薬品類の主たる排出源は、下水処理場であると考えられている。

本調査では、これまで公表されている国内外の研究成果から、主要な人用医薬品に関して、流入下水と処理水中の医薬品濃度について取りまとめるとともに、下水処理プロセスにおける解熱鎮痛剤等医薬品の挙動について調査することを目的とした。

２．２　流入下水と処理水中の医薬品類濃度

国内外で測定 [3),8)~12)]された下水処理場の流入下水および処理水中の医薬品濃度を表 2-1 に示す。

解熱鎮痛剤は、日本の流入下水中には数百 ng/l の濃度レベルで検出されており、物質によって異なるが、ある程度の処理を受けて、50～200ng/l ほどの濃度で放流されている。一方、海外においては流入下水中の濃度は数 μg/l と高く、処理水においても μg/l オーダーのものが見られている。物質としては、イブプロフェン（Ibuprofen）が比較的良好に除去されているのに対し、その他の物質については、概して大きな除去率は得られていない。

抗高脂血症剤のベザフィブレート（Bezafibrate）も、海外において数 μg/l の比較的高い濃度で検出されているが、その除去率については幅が大きい。

抗てんかん剤であるカルバマゼピン（Carbamazepine）は、日本の流入下水中に数百 μg/l ほどで検出されているが、処理を受けた後においてもその濃度は低下していない。海外における濃度は日本よりかなり高いが、処理においては、日本と同様、ほとんど除去効果が見られていない。

抗生物質については、日本においては 500ng/l ほどの濃度で下水処理場に流入し、処理過程で約 50%の除去を受けた後、放流されている。海外における流入下水中濃度には幅が見られ、国による抗生物質の使用状況を反映していると考えられるが、処理による除去率は、日本より高めである。これがどのような原因によるのかは不明であるが、同じ物質での比較ではないことから、医薬品の物性が影響している可能性も考えられる。

X 線造影剤であるイオプロミド（Iopromide）についても、海外において高い濃度で検出されており、下水処理過程での除去程度も高くはない。

表 2-1　下水処理場の流入下水及び処理水中の医薬品類

濃度（単位：ng/l）

		スイス	スウエーデン	ドイツ	スペイン	オーストラリヤ	フィンランド	日本
解熱・鎮痛剤	Diclofenac	1,400 950	- -	3,020-3,500 810-2,510	ND ND	3,100 1,500	350 250	- -
	Ibuprofen	1,980 <50	- -	5,000 370	2,750-3,700 970-1,300	1,500 22	13,000 1300	734 54
	Ketoprofen	- -	- -	- -	- -	- -	- -	252 229
	Naproxen	- -	- -	- -	3,300 1,750	- -	- -	128 104
抗高脂血症剤	Bezafibrate	- -	- -	4,900 2,200	ND ND	2,565 103	420 205	- -
抗てんかん剤	Carbamazepine	690 480	- -	1,780-2,200 1,630-2,100	- -	912 960	750 400	170 241
抗生物質（マクロライド系）	Clarithromycin	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	Roxithromycin	20 15	- -	830 100	ND ND	43 66	- -	- -
抗生物質（ニューキノロン系）	Levofloxacin	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
	Ciprofloxacin	434 72	158 20	- -	- -	- -	- -	- -
	Norfloxacin	388 57	102 17	- -	- -	- -	- -	- -
X線造影剤	Iopromide	810 790	- -	13,000 750	6,600 9,300	ND ND	- -	- -
文献番号		8, 11	9	3, 11	10, 11	11	11	12

（上段：流入下水、下段：処理水）

２．３　下水処理プロセスにおける解熱鎮痛剤等医薬品の挙動

２．３．１　調査方法

調査対象とした下水処理場は、日本における代表的な処理方式の標準活性汚泥法で運転している 5 ヶ所の処理場（処理水量：225,000～700,000m³/day）である。中には、AO 法、A2O 法の処理系列を有する処理場もあるが、本調査では標準活性汚泥法の処理系列において調査を行った。各処理場で 2 時間毎に流入水と各処理プロセスの処理水を採水し、流量比例で混合した 24 時間コンポジット試料を分析に供した。

得られた試料は、Nakada ら[13]の方法に従いガラス繊維フィルターでろ過した後、ODS カラム（tC18）により固相抽出し、必要に応じ誘導体化を行い精製・濃縮後、GC/MS により分析した。解熱鎮痛剤の Ibuprofen、Naproxen、Mefenamic acid、Ketoprofen、Fenoprofen、Ethenzamide、殺菌剤の Triclosan、昆虫忌避剤の Diethyltoluamide、鎮痒剤の Crotamiton、抗てんかん薬の Carbamazepine（計 10 物質）について分析を行った。本方法による検出下限値は、Fenoprofen の 0.1ng/l から Aspirin の 5ng/l である。

２．３．１　調査結果及び考察

解熱鎮痛剤の Fenoprofen、Ethenzamide の 2 物質はどの試料においても検出下限値未満（N.D.）であった。検出された 8 物質について結果を整理し図 2-1 に示した。平均値の計算に当たって、N.D.は検出下限値の 1/2 を用いた。

Ibuprofen、Triclosan は下水処理過程で大きく減少しており、平均値を用いて算出した除去率（表 2-2）は 90%以上であった。Naproxen、Ketoprofen、Diethyltoluamide は概ね 50%、Crotamiton は 20%の除去率であった。Mefenamic acid は、処理が進むに従い濃度が高くなっていた。一般に流入水は夾雑物を多く含み分析を妨害することが知られているが、Mefenamic acid については、夾雑物が流入水試料の定量に影響したと考えることもできる。また、生体内で抱合体を形成していたものが下水処理を受け脱抱合したことも考えられる。Carbamazepine は下水処理過程で大きな濃度変化（33～44ng/l）はなく下水処理によって除去されにくい物質であることが確認された。

表 2-2　下水処理場における調査対象医薬品の除去率

医薬品	効能	除去率(%)
Ibprofen	解熱鎮痛剤	95
Tricrosan	殺菌剤	90
Naproxen	解熱鎮痛剤	55
Ketoprofen	解熱鎮痛剤	50
Diethy l toluam	昆虫忌避剤	49
Crotamitone	鎮痒剤	20
Carbamazepine	抗てんかん薬	-25
Mefenamic acid	解熱鎮痛剤	-240

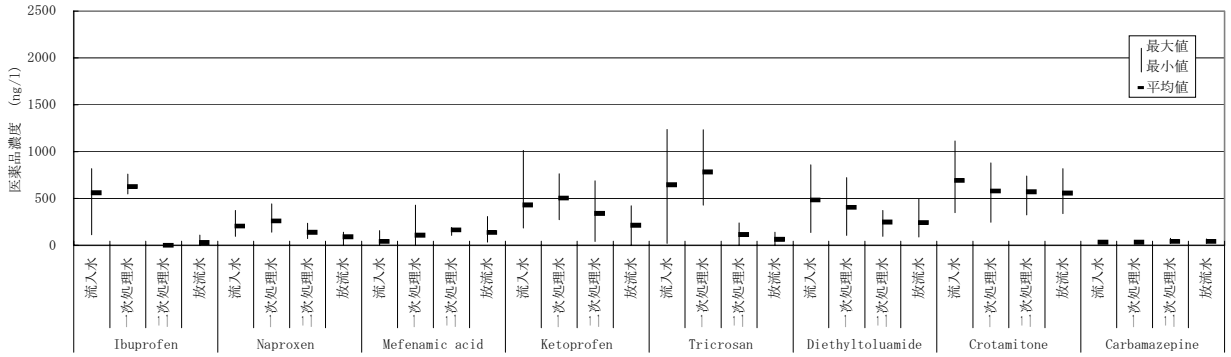


図 2-1　下水処理場の各処理プロセスにおける医薬品濃度

２．４　まとめ

公表されている国内外の研究成果を基に主要な人用医薬品の流入下水と処理水中の濃度についてまとめるとともに、下水処理プロセスにおける解熱鎮痛剤等医薬品の挙動について調査を行い以下の結果を得た。

１）流入下水と処理水中の医薬品類濃度

日本における下水中の解熱鎮痛剤は、流入下水中に数百 ng/l の濃度レベルで存在し処理を受けて、50～200ng/l の濃度で放流されている。抗てんかん剤であるカルバマゼピンは、流入下水中に数百 μg/l ほどで検出されているが、処理を受けた後においてもその濃度は低下していない。抗生物質については、500ng/l ほどの濃度で下水処理場に流入し、処理過程で約 50%の除去を受けた後、放流されている。

X 線造影剤であるイオプロミド（Iopromide）は、海外における調査例でみると他の医薬品類に比べ高い濃度で検出されており、下水処理過程での除去程度も高くはない。

２）下水処理プロセスにおける解熱鎮痛剤等医薬品の挙動

Ibuprofen、Triclosan は下水処理過程で大きく減少しており、除去率は 90%以上であった。Naproxen、Ketoprofen、Diethyltoluamide は概ね 50%、Crotamiton は 20%の除去率であった。Mefenamic acid は、処理が進むに従い濃度が高くなっていた。Carbamazepine は下水処理過程で大きな濃度変化はなく下水処理によって除去されにくい物質であることが確認された。

参考文献

1) Ternes, T (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, **32**, 3245-3260.

2) 谷島利勝，高田秀重（2002）下水処理放流水中の医薬品起源化学物質の分析，第 11 回環境化学討論会講演要旨集，130-131.

3) Heberer, T., Reddersen, K. and Mechlinski, A. (2002) From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas, *Water Science and Technology*, **46**, 3, 81-88.

4) 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，27，11，685-691

5) 鈴木俊也，宇佐美美穂子，安田和夫（2004）河川水中の解熱鎮痛消炎剤のモニタリング，第 38 回日本水環境学会年会講演集，288

6) 鈴木俊也，宇佐見美穂子，永山敏廣（2005）河川水中のアレルギー治療薬のモニタリング，第 39 回日本水環境学会年会講演集，613

7) 長尾亮治，田中宏明，田中周平，藤井滋穂，小西千絵，宝輪勲（2005）淀川水系における医薬品の検出，第 42 回環境工学研究フォーラム講演集，42-44

8) Golet, E. M., Alder, A. C., Giger, W. (2002) Environmental Exposure and Risk Assessment of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Wastewater and River Water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environmental Science and Technology*, **36**, 17, 3645-3651

9) Lindberg, R. H., Wennberg, P., Jhonsson, M. I., Tysklind, M and Anderson, B. A. V. (2005) Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flow in five sewage treatment plants in

Sweden, *Environmental Science and Technology*, **39**, 10, 3421-3429
10) Carballa, F. Omil, M. Lema, M. Llompart, G. G. Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. Ternes (2004) Behavior of Pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Research*,**38**, 2918-2926
11) Thomas A. Ternes, Marie-Laure Janex-Habibi, Thomas Knacker, Norbert Kreuzinger, Hansruedi Siegrist (2004) *POSEIDON*, detailed report related to the overall duration (1.1.2001- 30.6.2004), http//wwwleu-poseidon.com
12) 谷島利勝, 高田秀重 (2003) 医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動, 第 37 回日本水環境学会年会後援要旨集, 343.
13) Nakada et al., (2006) Occurrence and fate of anti-inflammatory drugs in wastewater treatment plants in Japan, Environmental Sciences, 12, 6, 359-369

最適な水環境創造に資する下水道整備のあり方に関する調査

水質チーム	上席研究員	鈴木　穣
	主任研究員	北村　清明
	主任研究員	阿部　千雅
	主任研究員	岡安　祐司
	研　究　員	北村　友一
	専門研究員	澤井　淳

第１章　下水道整備が閉鎖性水域の水質に及ぼす影響に関する調査

その１　下水道の整備と流域からの汚濁負荷流出特性との関係把握

１　はじめに

下水道は、生活排水に由来する汚濁負荷を収集・処理することにより、閉鎖性水域への汚濁負荷を低減し、閉鎖性水域の水質改善に寄与していると考えられるが、下水道整備に伴い流域からの汚濁負荷流出特性がどのように変化するかは明らかではない。そこで本調査では、下水道整備に伴う流域からの汚濁負荷の流出の変化を把握するための有効な手法を検討することとした。

２　調査の内容

本調査では、各採水地点の上流域からの生活排水の混入の実態を推察するために、生活排水に普遍的に含まれ、かつ、排水処理過程や流下過程における変化が小さいと考えられる陽イオンをトレーサーとして評価することを検討した。

３　調査方法

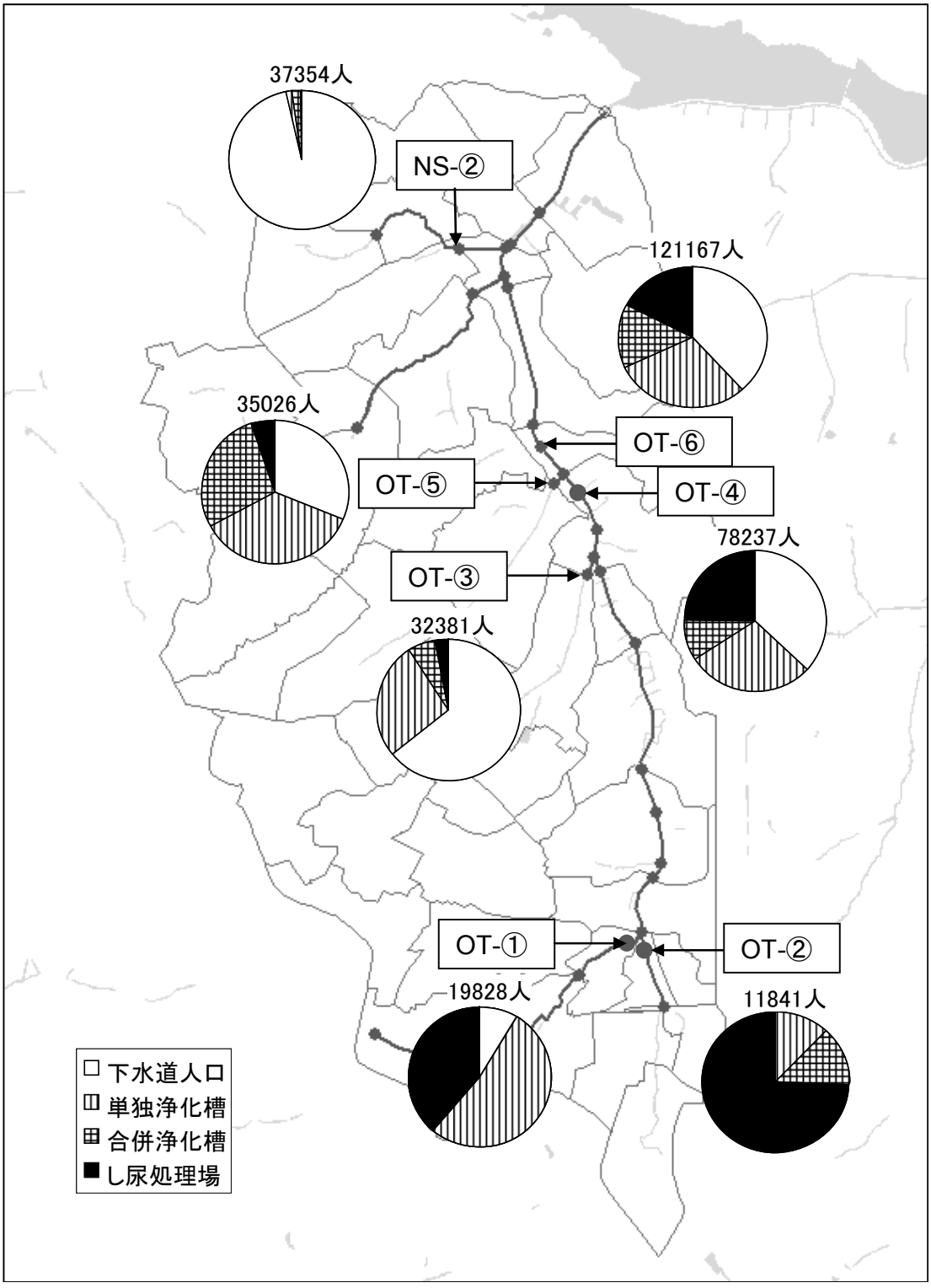
生活排水中の陽イオン濃度および排水処理過程における陽イオン濃度の変化に関する情報を得るために、以下の要領で調査を実施した。

調査日程：平成１８年１１月６日～平成１９年２月２６日
　　週２回程度の頻度で、２９回スポットサンプルを採取
調査場所：１）茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場　土浦幹線（分流式汚水）流入下水
　　２）同流入下水を受け入れている、標準活性汚泥法パイロットプラント二次処理水
調査項目：浮遊物質量（SS)、有機性浮遊物質量（VSS)、ナトリウムイオン（Na^{+})、
　　カリウムイオン（K^{+})、マグネシウムイオン（Mg^{2+})、カルシウムイオン（Ca^{2+})

また、生活排水の混入の実態と汚濁負荷流出特性の関係を把握するため、以下の要領で調査を実施した。

調査日程：月１回の頻度で計４回（平成１８年１１月８日、平成１８年１２月１８日、
　　平成１９年１月２３日、平成１９年２月２７日）
　　なお、これら採水日はいずれも雨天の影響が無い日であった。
調査場所：図―１に示す、大津川支流の地点
調査項目：浮遊物質量（SS)、有機性浮遊物質量（VSS)、溶解性全有機炭素（D-TOC)、

全窒素（T-N）、アンモニア性窒素（NH_4^+-N）、亜硝酸性窒素（NO_2^--N）、
硝酸性窒素（NO_3^--N）、溶解性 COD、全リン（T-P）、溶解性リン酸態リン（D-PO_4^{3-}-P）、
ナトリウムイオン（Na^+）、カリウムイオン（K^+）、マグネシウムイオン（Mg^{2+}）、
カルシウムイオン（Ca^{2+}）



図―１　大津川支流採水地点と流域人口および生活排水の処理形態（平成 14 年度）

４　調査結果

４－１　トレーサーの選定

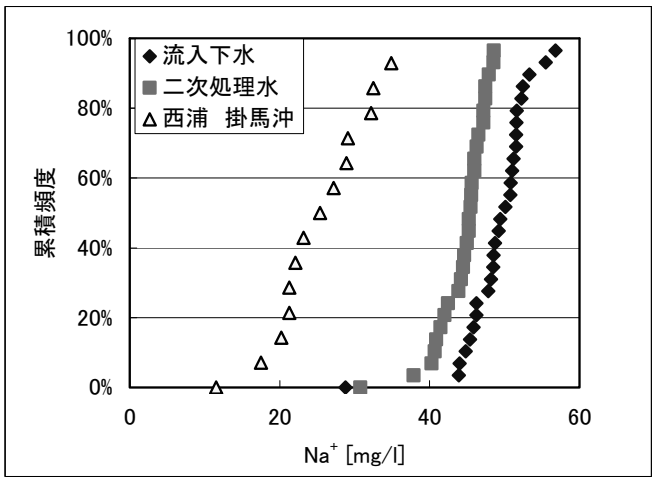
流入下水と二次処理水の陽イオンに関する調査結果を表―１～２および図―２～５に示す。

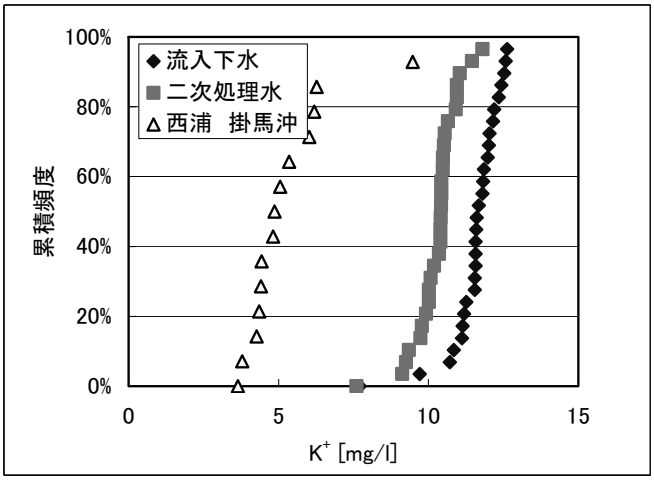
表―１　流入下水中の陽イオン濃度測定結果

採水日	流入下水					
	SS $mg\ l^{-1}$	VSS $mg\ l^{-1}$	Na^{+} $mg\ l^{-1}$	K^{+} $mg\ l^{-1}$	Mg^{2+} $mg\ l^{-1}$	Ca^{2+} $mg\ l^{-1}$
2006/11/6	70	63	47.82	11.80	2.62	7.19
2006/11/10	90	78	49.43	11.57	2.73	7.04
2006/11/13	138	115	55.49	11.68	3.24	8.07
2006/11/20	72	57	28.77	7.71	1.82	5.84
2006/11/24	97	85	46.24	11.26	2.03	14.94
2006/12/1	100	87	50.10	11.57	1.98	6.61
2006/12/5	70	60	44.01	9.71	2.76	7.56
2006/12/8	158	125	50.98	11.85	1.75	4.73
2006/12/11	248	205	53.33	12.34	2.42	7.64
2006/12/15	258	215	49.21	11.57	1.95	5.68
2006/12/18	143	128	56.78	12.62	2.99	8.10
2006/12/22	115	100	51.62	12.53	2.75	9.51
2006/12/25	113	95	51.53	12.15	2.76	7.54
2007/1/5	98	88	46.23	10.71	1.72	5.08
2007/1/9	118	95	44.82	11.18	2.27	6.02
2007/1/12	103	90	45.85	10.85	1.82	5.07
2007/1/15	126	113	50.81	11.54	2.66	6.42
2007/1/19	75	67	50.76	11.82	2.06	5.96
2007/1/22	105	93	48.16	12.19	2.83	6.55
2007/1/26	95	80	43.89	11.98	1.33	3.24
2007/1/30	95	80	51.21	11.12	3.32	8.19
2007/2/2	103	95	45.41	11.61	1.31	2.89
2007/2/6	115	95	52.43	12.58	2.85	5.79
2007/2/9	88	73	48.70	12.03	1.21	2.67
2007/2/13	97	83	51.54	11.54	2.58	5.32
2007/2/16	88	78	48.52	12.02	2.06	4.88
2007/2/20	97	85	52.22	11.59	2.59	5.64
2007/2/23	95	80	51.58	12.43	2.06	5.47
2007/2/26	110	82	48.47	11.14	3.26	6.06
最小値	70	57	28.77	7.71	1.21	2.67
中央値	100	87	49.43	11.61	2.42	6.02
最大値	258	215	56.78	12.62	3.32	14.94

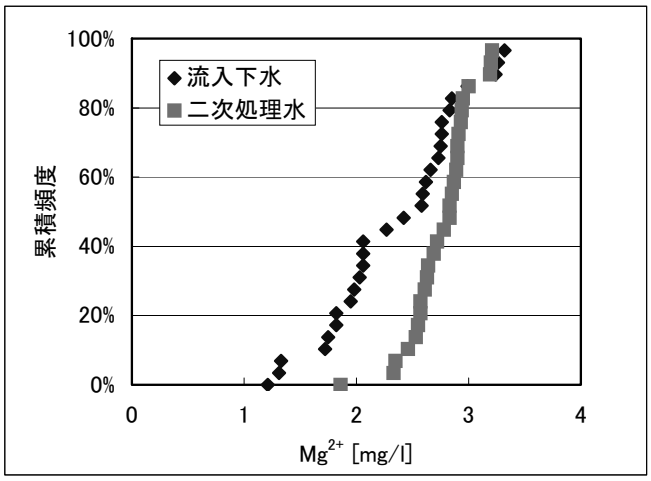
表―２　下水処理水（二次処理水）中の陽イオン濃度測定結果

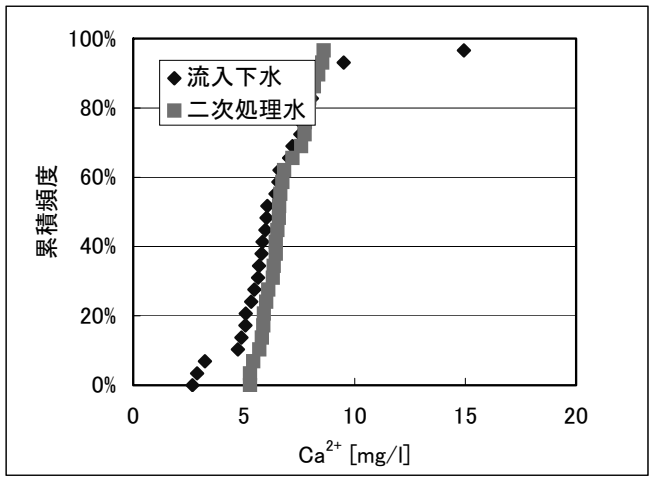
採水日	二次処理水					
	SS $mg\ l^{-1}$	VSS $mg\ l^{-1}$	Na^{+} $mg\ l^{-1}$	K^{+} $mg\ l^{-1}$	Mg^{2+} $mg\ l^{-1}$	Ca^{2+} $mg\ l^{-1}$
2006/11/6	25	21	47.43	11.05	3.19	8.36
2006/11/10	18	15	45.49	10.42	3.00	7.76
2006/11/13	19	15	46.30	10.95	3.20	8.16
2006/11/20	26	21	30.75	7.60	1.86	5.69
2006/11/24	21	18	42.46	10.02	2.57	8.54
2006/12/1	19	16	45.23	10.07	2.69	7.59
2006/12/5	19	16	45.24	10.19	2.90	7.74
2006/12/8	19	17	47.46	10.40	2.87	5.87
2006/12/11	13	11	47.18	10.95	2.91	6.30
2006/12/15	14	12	40.25	9.35	2.35	6.43
2006/12/18	21	18	47.19	10.43	3.21	7.92
2006/12/22	29	25	44.21	10.40	2.90	8.60
2006/12/25	22	19	44.62	10.91	2.95	7.95
2007/1/5	11	10	37.87	9.13	2.46	6.59
2007/1/9	15	12	40.88	9.78	2.89	7.19
2007/1/12	16	13	40.68	9.25	2.57	6.64
2007/1/15	12	11	41.47	9.74	2.83	6.81
2007/1/19	49	44	48.58	11.80	2.93	6.73
2007/1/22	35	32	41.98	10.02	2.61	6.58
2007/1/26	18	15	45.62	10.49	2.63	6.44
2007/1/30	10	8	48.52	10.41	2.85	6.51
2007/2/2	11	9	45.99	10.48	2.55	5.27
2007/2/6	11	9	44.96	10.35	2.83	6.01
2007/2/9	11	9	47.92	10.65	2.53	5.42
2007/2/13	18	16	46.50	11.46	2.78	5.90
2007/2/16	13	11	45.56	10.52	2.33	5.28
2007/2/20	13	9	45.96	9.92	2.72	5.81
2007/2/23	12	9	44.45	10.43	2.64	6.35
2007/2/26	9	8	43.84	10.55	2.94	6.10
最小値	9	8	30.75	7.60	1.86	5.27
中央値	18	15	45.24	10.41	2.83	6.58
最大値	49	44	48.58	11.80	3.21	8.60





図―２　下水中のナトリウムイオン濃度の分布　図―３　下水中のカリウムイオン濃度の分布





図―４　下水中のマグネシウムイオン濃度の分布　図―５　下水中のカルシウムイオン濃度の分布

Na^+、K^+は、流入下水および下水処理水とも濃度分布の幅が小さく、また、下水処理過程での消失は約１０％程度と小さかった。この結果から、トレーサーとしては適した物質であると考えられる。また、下水集水域の水道原水である霞ヶ浦西浦湖水の、2004 年 4 月～2005 年 5 月の間の Na^+、K^+濃度の測定結果を合わせて示す。西浦湖水の Na^+、K^+は中央値で 22.65mg/l、4.63mg/l であり、K^+/Na^+は 0.204 であった。また、流入下水の Na^+、K^+は中央値で 49.43mg/l、11.61mg/l であり、K^+/Na^+は 0.235 であった。水利用に伴う Na^+、K^+の増加分は、浄水工程での変化が無いと仮定し、流入下水と西浦湖水の中央値間を比較することにより求めると、Na^+が 26.78mg/l、K^+が 6.98mg/l、K^+/Na^+は 0.261 となった。これらの結果から、水利用に伴い、Na^+、K^+および K^+/Na^+が増加することがわかった。

一方、Mg^{2+}、Ca^{2+}は、Na^+、K^+と比べると、流入下水および下水処理水とも濃度分布の幅が大きく、また、しばしば、下水処理水中の濃度が流入下水の濃度を上回る場合が見られた。この現象は、洗剤などに金属封鎖剤として添加されているキレート物質と Mg^{2+}、Ca^{2+}が結合した形態で下水処理場へ流入し、下水処理過程で脱キレートして Mg^{2+}、Ca^{2+}が遊離生成する可能性が考えられる。いずれにしても、Mg^{2+}、Ca^{2+}は水環境中で変化する可能性があることから、トレーサーとしては不適であると考えられる。

４－２　生活排水の混入の実態と汚濁負荷流出特性の関係把握

生活排水の混入の実態と汚濁負荷流出特性の関係を把握するために実施した調査の結果を表―３および表―４に示す。

表―３　大津川支流水質調査結果（１／２）

採水日	採水地点	SS mg l^{-1}	VSS mg l^{-1}	D-TOC mg l^{-1}	T-N mg l^{-1}	NH_4^+-N mg l^{-1}	NO_2^--N mg l^{-1}	NO_3^--N mg l^{-1}
2006/11/8	NT-②	5	4	5.32	7.41	0.00	0.00	4.73
	OT-①	5	4	7.36	12.71	0.54	0.23	7.57
	OT-②	5	3	7.97	9.23	0.73	0.16	3.98
	OT-③	3	2	5.05	8.12	0.00	0.00	5.92
	OT-④	12	4	5.43	9.56	0.22	0.17	6.23
	OT-⑤	6	2	6.11	8.12	0.40	0.39	3.87
	OT-⑥	10	4	5.34	9.03	0.25	0.24	5.50
2006/12/18	NT-②	2	2	5.06	6.37	0.00	0.00	4.41
	OT-①	3	3	9.79	14.46	0.98	0.22	7.10
	OT-②	4	3	10.86	9.97	5.57	0.16	2.84
	OT-③	2	1	7.28	8.61	0.13	0.05	5.88
	OT-④	8	4	8.98	9.41	0.54	0.14	5.05
	OT-⑤	5	3	12.11	9.36	3.82	0.16	3.72
	OT-⑥	12	5	8.64	8.81	3.19	0.17	4.23
2007/1/23	NT-②	1	1	3.34	6.77	0.00	0.04	4.76
	OT-①	4	3	6.45	13.96	5.81	0.36	6.54
	OT-②	4	3	5.63	12.63	4.65	0.14	4.64
	OT-③	3	1	4.80		0.24	0.06	6.16
	OT-④	4	2	4.89		3.17	0.16	5.51
	OT-⑤	5	2	4.68	9.36	4.93	0.39	3.74
	OT-⑥	4	1	4.51		3.28	0.21	5.05
2007/2/27	NT-②	3	1	1.88	6.30	0.00	0.00	4.61
	OT-①	5	3	7.17	12.51	8.41	0.34	3.06
	OT-②	5	3	6.57	10.61	7.45	0.10	2.52
	OT-③	3	1	2.97	8.61	0.00	0.05	6.38
	OT-④	7	2	4.09	9.23	4.08	0.11	4.57
	OT-⑤	49	11	4.01	9.15	5.33	0.38	3.04
	OT-⑥	17	4	3.84	9.18	4.56	0.17	3.97

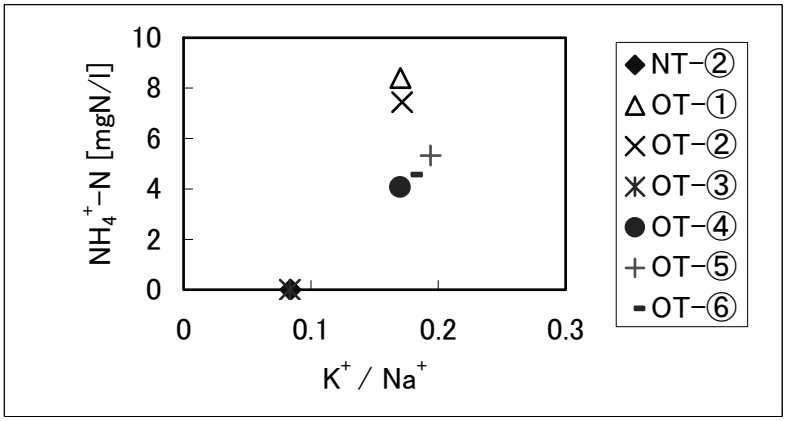
注）表中の空欄は未測定

表―４　大津川支流水質調査結果（２／２）

採水日	採水地点	D-COD_{Cr} mg l^{-1}	T-P mg l^{-1}	D-PO_4^{3-}-P mg l^{-1}	Na^+ mg l^{-1}	K^+ mg l^{-1}	Mg^{2+} mg l^{-1}	Ca^{2+} mg l^{-1}	K^+/Na^+
2006/11/8	NT-②	6.22	0.123	0.027	27.93	2.62	5.15	16.07	0.09
	OT-①	11.89	0.510	0.398	30.55	4.45	7.27	21.24	0.15
	OT-②	11.89	0.621	0.532	28.74	4.61	5.85	16.99	0.16
	OT-③	5.44	0.162	0.139	17.19	1.70	7.38	25.71	0.10
	OT-④	7.14	0.300	0.229	20.89	3.05	7.43	23.33	0.15
	OT-⑤	9.35	0.102	0.060	25.58	4.15	7.00	24.43	0.16
	OT-⑥	7.40	0.261	0.200	21.52	3.32	7.05	22.92	0.15
2006/12/18	NT-②	5.38	0.095	0.058	18.36	1.57	4.89	15.30	0.09
	OT-①	15.49	0.563	0.502	36.39	4.59	7.01	21.08	0.13
	OT-②	14.95	0.722	0.651	31.13	4.43	5.54	15.97	0.14
	OT-③	7.33	0.191	0.175	18.24	1.71	6.98	23.94	0.09
	OT-④	10.72	0.368	0.300	21.22	2.71	7.01	21.90	0.13
	OT-⑤	15.39	0.502	0.411	21.22	4.02	6.48	22.06	0.19
	OT-⑥	11.02	0.342	0.240	20.81	3.67	6.76	22.05	0.18
2007/1/23	NT-②	1.71	0.062	0.046	22.36	1.80	4.86	14.35	0.08
	OT-①	9.86	0.714	0.452	33.53	5.43	6.79	19.10	0.16
	OT-②	6.19	0.915	0.282	22.95	4.09	5.57	14.50	0.18
	OT-③	2.69		0.133	17.78	1.60	6.68	22.60	0.09
	OT-④	4.72		0.287	19.25	3.05	6.67	20.41	0.16
	OT-⑤	5.60	0.241	0.075	21.44	3.97	6.36	21.60	0.19
	OT-⑥	4.62		0.224	19.36	3.33	6.62	20.98	0.17
2007/2/27	NT-②	4.26	0.075	0.044	16.04	1.35	4.64	13.10	0.08
	OT-①	17.31	0.893	0.765	36.79	6.27	5.70	14.70	0.17
	OT-②	14.59	0.889	0.764	26.94	4.62	5.22	13.17	0.17
	OT-③	6.46	0.175	0.156	18.24	1.52	6.42	19.62	0.08
	OT-④	11.80	0.430	0.350	19.49	3.31	6.27	17.70	0.17
	OT-⑤	10.49	0.265	0.114	23.01	4.46	5.92	17.70	0.19
	OT-⑥	8.94	0.363	0.262	20.23	3.63	6.07	17.71	0.18

注）表中の空欄は未測定

既に示したように、ナトリウムイオン（Na^+）、カリウムイオン（K^+）およびそれらの比率が生活排水混入程度の指標であると考えられる。図―６では、気温が最も低い２月に観測されたアンモニア性窒素濃度とK^+/Na^+の関係を示す。低水温期には浄化槽や流域における硝化活性が低下するため、生活排水の混入があれば、アンモニア性窒素濃度が上昇すると考えられ、OT-①、②、④、⑤、⑥地点では生活排水の混入があると考えられる。一方、NT-②、OT-③地点では、K^+/Na^+が低く、低水温期においてもアンモニア性窒素濃度が観測されないことから、生活排水の混入はほとんど無いと考えられる。ここで、NT-②で観測された Na^+、K^+の最低値 16.04mg/l、1.35mg/l、K^+/Na^+＝0.08 程度が、本流域における水利用の無い状況（水道水）を表現するものと仮定し、4-1 章で得られた、水利用に伴う Na^+、K^+の増加分を考慮すると、本流域における生活排水の K^+/Na^+は(6.98＋1.35)/(26.78＋16.04) ＝0.195 程度となる。OT-①、②、④、⑤、⑥で観測された K^+/Na^+＝0.13～0.19 の値は、生活排水の混入が無い（混入率 0%）の場合に K^+/Na^+＝0.08 程度、生活排水の混入率 100%の場合の K^+/Na^+＝0.195 程度と仮定すると、混入率がおよそ 43%～96%の範囲にあると推定される。



図―６　低温期のカリウムイオンーナトリウムイオン比とアンモニア性窒素濃度の関係

また、生活排水の混入と汚濁負荷の流出の関係について考察するために、ナトリウムイオン(Na^+)、カリウムイオン（K^+）濃度と汚濁負荷（D-TOC、D-COD_{Cr}、T-N、T-P、D-PO_4^{3-}-P）の濃度の関係について、図―７～１１、１２～１７のとおり整理した。

いずれの汚濁負荷の場合においても、K^+/Na^+が 0.10 以上の生活排水の混入があると考えられる場所では、トレーサー濃度が上昇すると、汚濁負荷濃度が上昇するという正の相関が見られた。Ｎａ$^+$とＫ$^+$を比較すると、Ｎａ$^+$の方が汚濁負荷指標との相関が若干良い結果となった。各汚濁負荷指標を見ると、Ｄ－ＴＯＣに関しては相関があまり良くないが、その他の指標はｒ＝0.7 程度の相関係数が得られた。

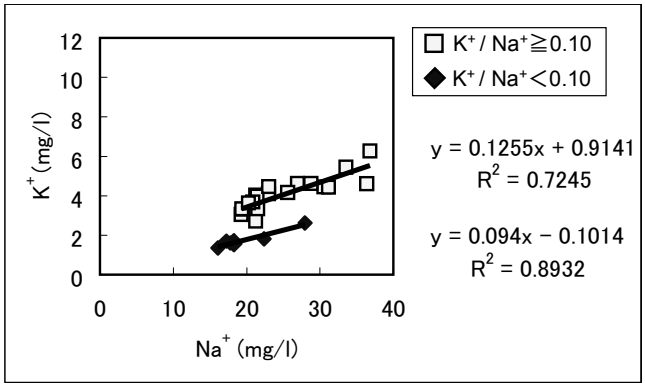
５　まとめ

１）晴天時の、生活排水の混入の程度を推定する方法として、Ｎａ$^+$、Ｋ$^+$をトレーサーとして利用することが有効であると考えられる。

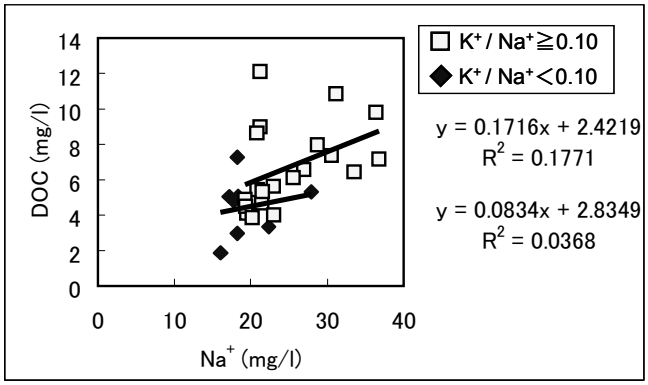
２）晴天時、生活排水が混入する河川におけるＮａ$^+$、Ｋ$^+$濃度と汚濁負荷濃度は正の相関を示した。

３）下水道整備により、生活排水を系外へ排出することが、晴天時汚濁負荷流出を低減するために有効であると考えられる。

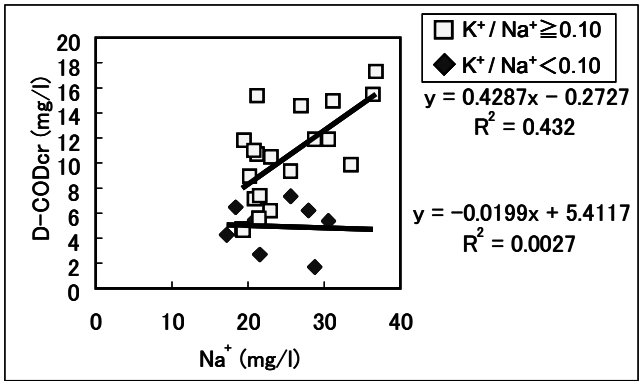
以上



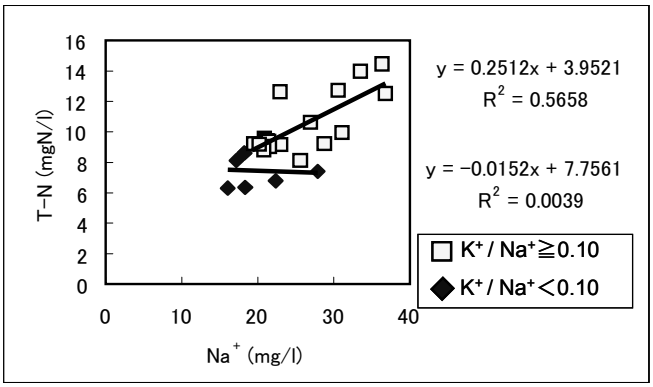
図―６　トレーサー（ナトリウムイオン）と
カリウムイオン濃度の関係



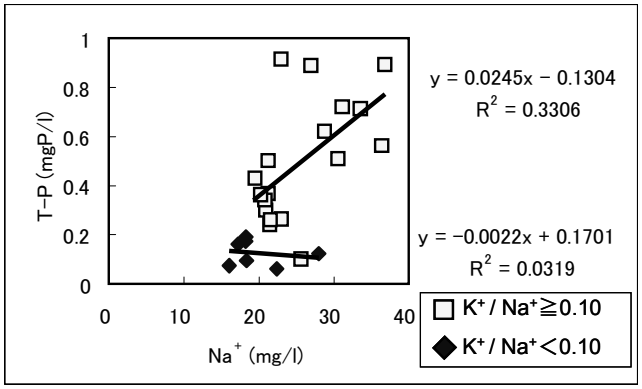
図―７　トレーサー（ナトリウムイオン）と
Ｄ―ＴＯＣ濃度の関係



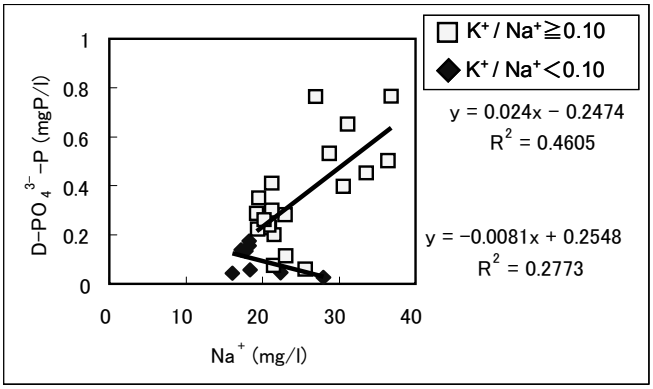
図―８　トレーサー（ナトリウムイオン）と
Ｄ―ＣＯＤ$_{Cr}$濃度の関係



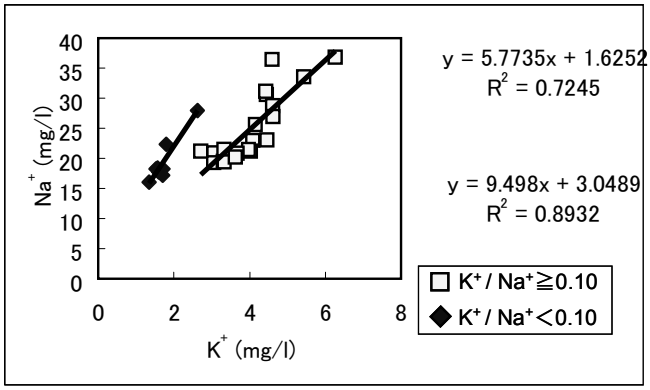
図―９　トレーサー（ナトリウムイオン）と
Ｔ－Ｎ濃度の関係



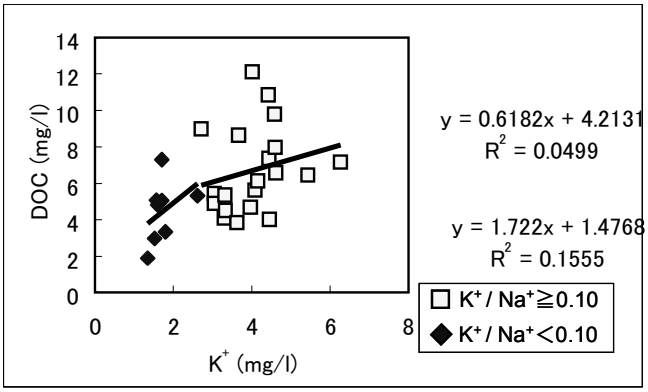
図―１０　トレーサー（ナトリウムイオン）と
Ｔ－Ｐ濃度の関係



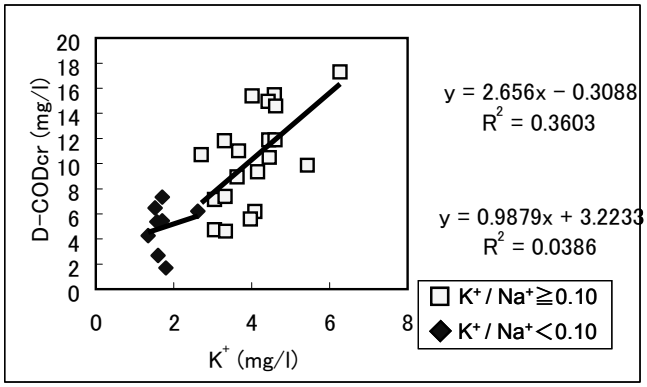
図―１１　トレーサー（ナトリウムイオン）と
Ｄ－ＰＯ$_4$$^{3-}$－Ｐ濃度の関係



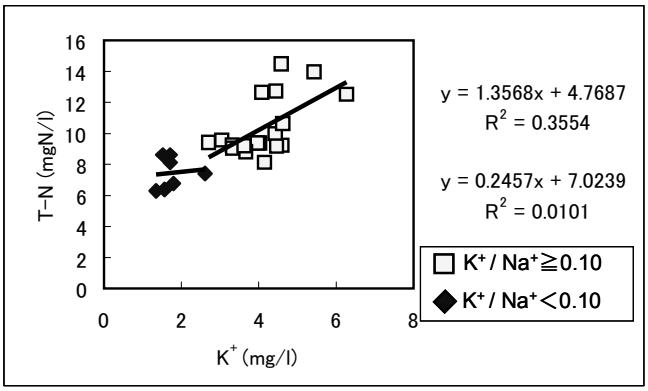
図―１２　トレーサー（カリウムイオン）と
ナトリウムイオン濃度の関係



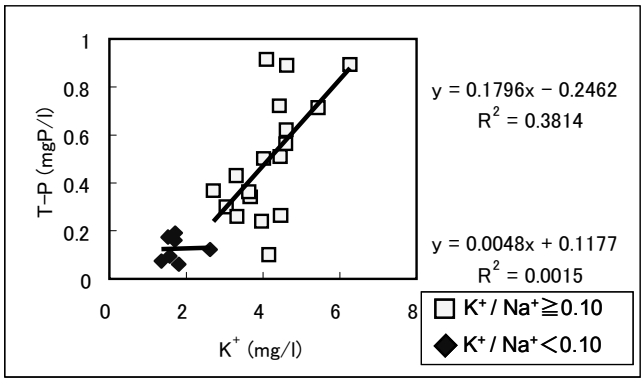
図―１３　トレーサー（カリウムイオン）と
Ｄ―ＴＯＣ濃度の関係



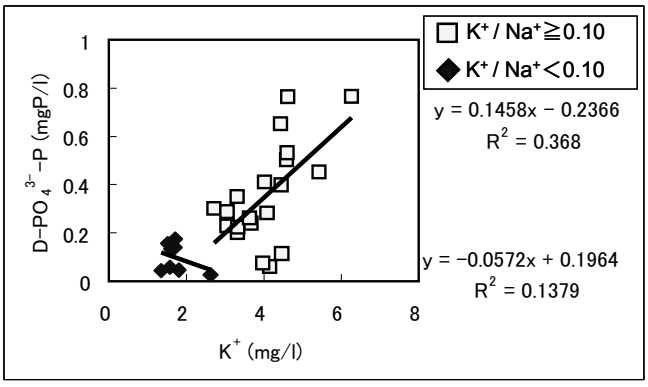
図―１４　トレーサー（カリウムイオン）と
Ｄ―ＣＯＤ$_{Cr}$濃度の関係



図―１５　トレーサー（カリウムイオン）と
Ｔ－Ｎ濃度の関係



図―１６　トレーサー（カリウムイオン）と
Ｔ－Ｐ濃度の関係



図―１７　トレーサー（カリウムイオン）と
Ｄ－ＰＯ$_4$$^{3-}$－Ｐ濃度の関係

その２　下水処理水の地先海域への拡散状況

１　はじめに

下水処理水放流先の水域において貴重な生物の生息や水産活動等がある場合、処理水質や放流方法の設定にあたっては対象水生生物に対する処理水の影響を特に考慮する必要があるが、そのためには、当該水域内における処理水の拡散状況を詳細に把握することにより生物生息場所における影響の度合いを正しく評価する必要がある。

そこで、処理水が流入する閉鎖的な海域における処理水の水平及び鉛直方向の詳細な拡散状況とそれに伴う局所的な水質の変化について、これを表現するシミュレーション計算手法を検討した。

２　検討方法

下水処理水を含む淡水は表層付近に高濃度に存在することが把握できた[1)]ことから、少なくとも海面から表層50cm程度までの間については鉛直方向に10cm程度の厚みでの層分割が可能なシミュレーションモデルを使用する必要があることが分かった。また、モデルの計算項目としては、処理水の水生生物への影響の度合いを評価するという目的から、塩分、水温、水質（COD, SS, D-TN, D-TP）を対象とすることとした。

1)流動解析

予測に用いるモデルは流体力学の基礎方程式（運動方程式、連続の式および水温・塩分の保存式）を差分化することにより解くモデルとした。それらのモデルのうち多層レベルモデルはアセスメント等において幅広く使用されているモデルであるが、潮汐による水位変動を考慮する場合、モデル上の制約から第１層目の層厚さが潮位振幅の２倍以上必要であり、今回検討の条件を満たさない。そこで鉛直方向にはσ座標と呼ばれる海底地形に沿った座標系（図-18）を適用することとした。この手法により、本検討で着目する表層付近で潮位の振幅等の状況に関わらず目的に応じた細かい層分割の設定が可能となった。水平方向の座標系に関しては通常の直交座標系とした。σ座標のモデルについてはPrinceton Ocean Model（Blumberg and Mellor,1987[2)]）を基本とし、干潟を表現するためにOey（2006)[3)]を基本とした冠水・干出の手法も導入したモデルとした。

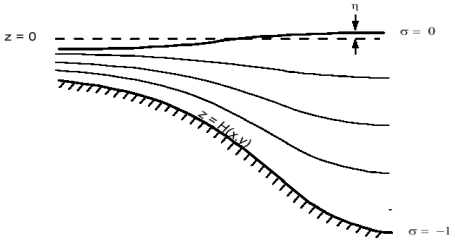


図-18　σ座標系のイメージ

2)水質解析

水質解析モデルは、陸域から海域へ流入した物質が移流と拡散によって移動し海域内へ広がっていく過程を計算するものとした。なお、本調査では処理水拡散状況の把握を目的としているため、内部生産は考慮しないものとした。

3)必要とするデータ

実際の閉鎖性水域をベースに様々な条件を簡略化したモデル海域（図-19）を設定し、この海域における処理水拡散状況をモデルにより計算した。この仮想海域における流入河川a、流入河川b、下水処理水の流量比及び負荷量比はそれぞれ、流量比=2:15:1、TN負荷量比=2:2:1であり、冬季の平均的気象条件を想定した。

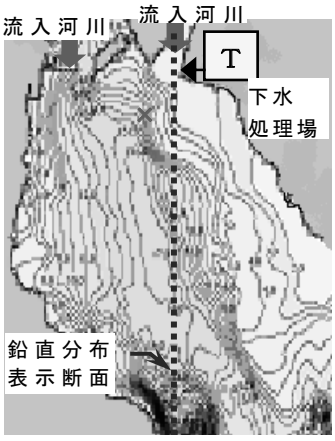


図-19　設定した仮想海域

シミュレーション計算には、対象水域の水深等地形データ、対象水域の潮汐の振幅及び周期、流入河川の流量及び水質、処理水の水量及び水質等の情報を入力した。

3　検討結果

まず、シミュレーション計算結果の妥当性を確認するために計算海域中の 3 地点において計算結果と冬季の年別平均観測データを比較した。その一部として塩分濃度と TN 濃度を比較した結果を図-20、図-21 に示す。上層、中層、下層のいずれにおいても計算値は観測値の幅に入っており、シミュレーション計算結果は当該水域の冬季の平均的な状況を概ね再現していると考えられる。

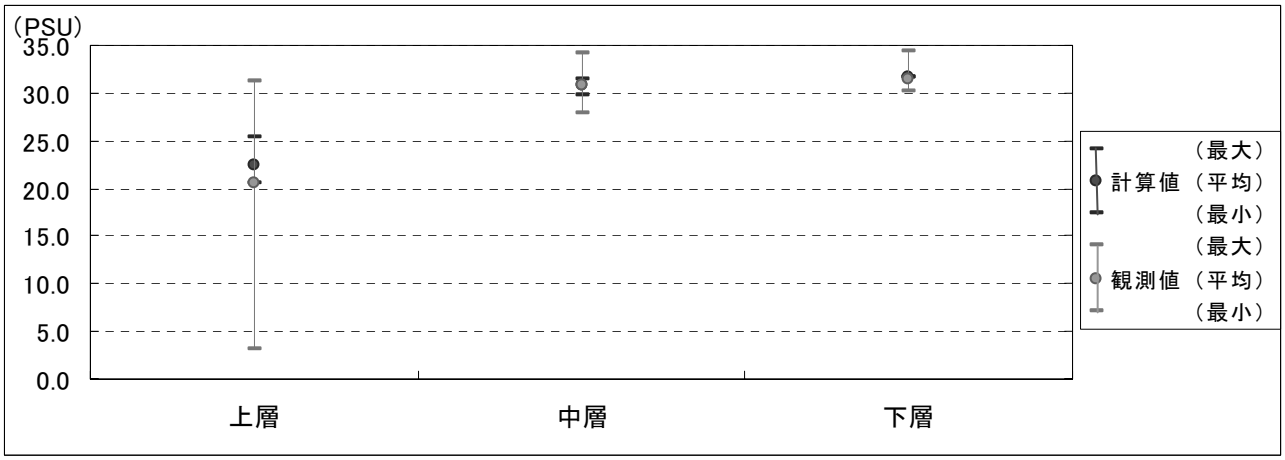


図-20　塩分濃度の計算値と観測値

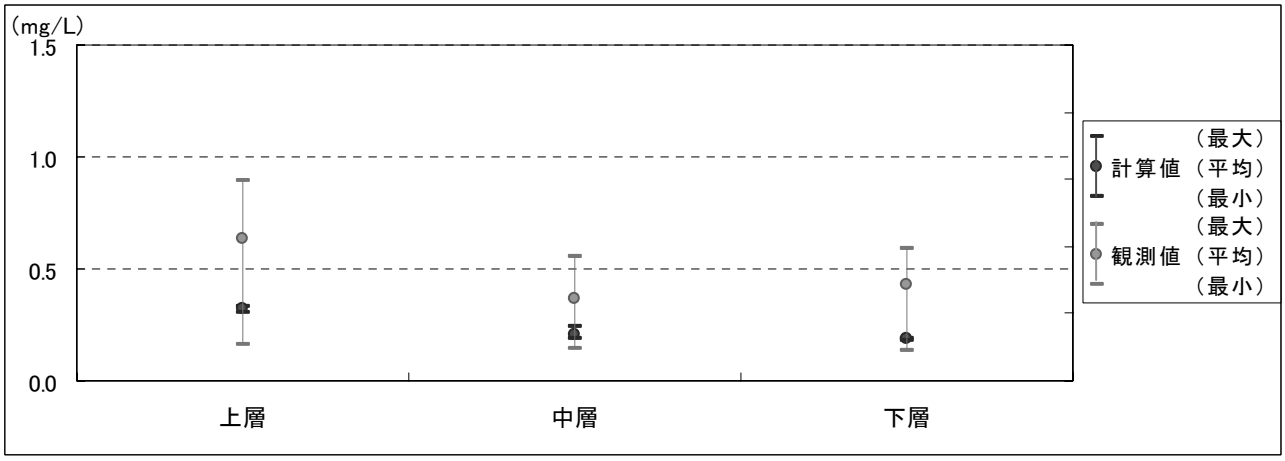


図-21　TN 濃度の計算値と観測値

次に、塩分濃度、TN 濃度の計算結果を図-22、図-23 に示す。水深 30cm から 50cm 程度部分の塩分濃度が下がっている様子を表現できていることが分かる。水質分布は 1 時間毎に計算されるため、潮汐と水質変動との関係を把握することが可能である。さらに処理場や河川等陸域から供給される栄養塩類が拡散する状況が分かり、注目する水生生物の生息場所における影響の度合いを把握することが可能であることが分かった。

4　まとめと今後の課題

本調査は、貴重な水生生物が生息している等の理由により、処理水放流先海域のごく局所的な水質に対して下水処理水がどのような影響を及ぼすかを評価するシミュレーションモデルについて検

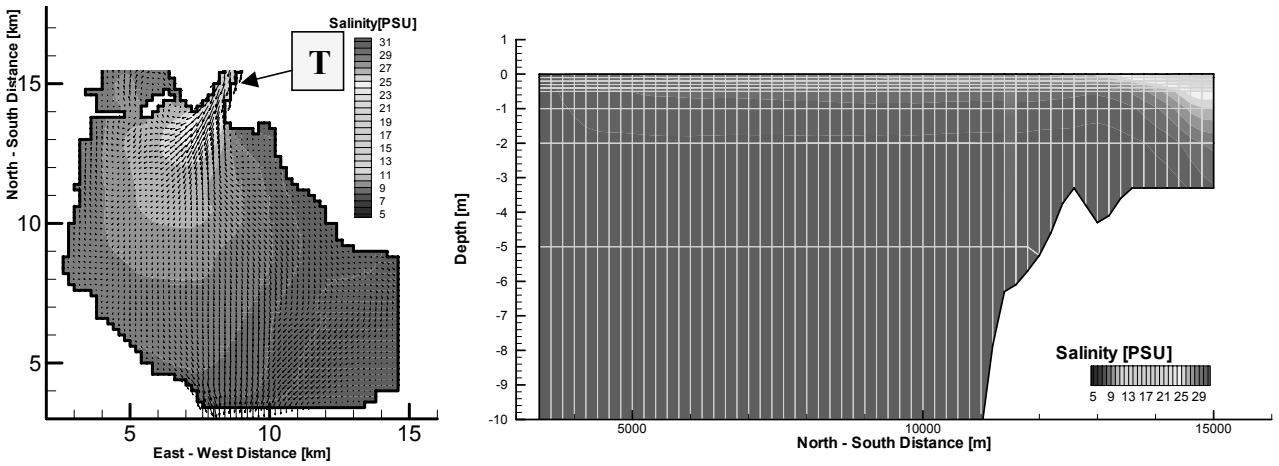


図-22　塩分濃度（日平均）の水平分布と鉛直分布

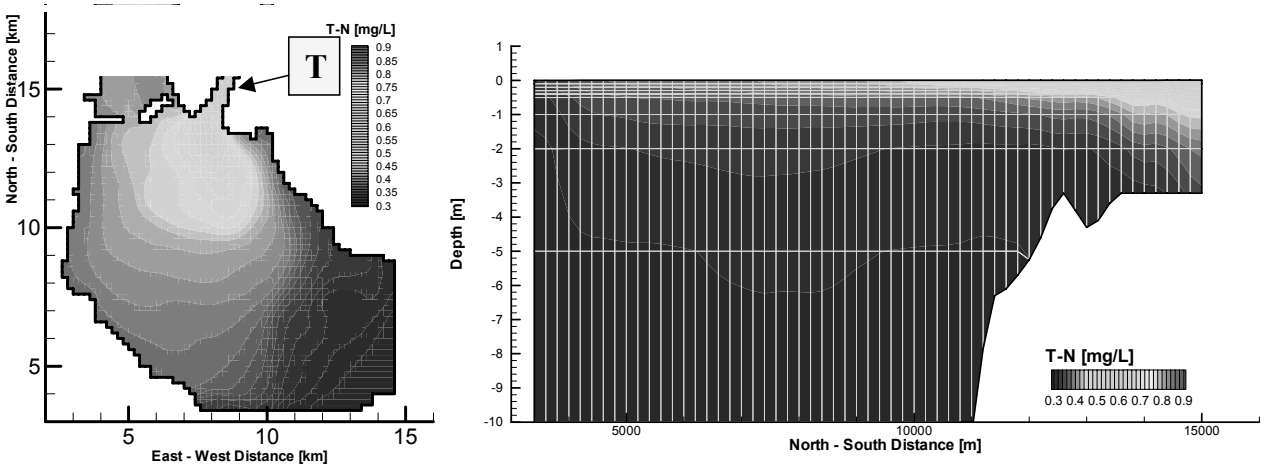


図-23　TN 濃度（日平均）の水平分布と鉛直分布

討を行ったものである。本調査で提案するモデルを用いることで、現状での処理水の影響度合い、処理水質や処理水量が変化した場合等の海域水質変化をきめ細かく、かつ定量的に予測することが可能であると考えられる。放流先海域の水質環境基準達成というマクロの視点からだけでなく、局所的に存在する水生生物等に配慮するというミクロの視点も併せ持った下水道計画を立てる上で有効なツールとなりうると考えられる。今後は、水質計算における内部生産の考慮についても検討するとともに、短期間での条件変化に対する応答性を確認していく必要がある。

参考文献

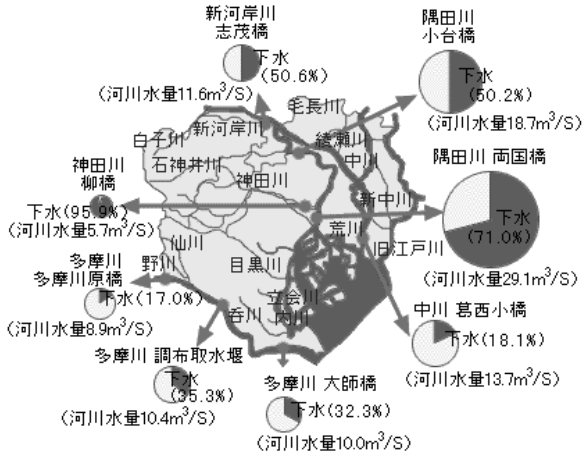
1) 鈴木穣、宮島潔、阿部千雅、岡安祐司 (2006) 下水道による水環境への影響に関する調査, 平成 17 年度下水道関係調査研究年次報告書集, 35-57
2) Blumberg, A. F. and G. L. Mellor (1987) : A description of a three dimensional coastal ocean circulation model. In: Heaps, N. (Ed.), Three-Dimensional Coastal Ocean Models. American Geophysical Union, p. 208.
3) Oey, L.-Y., (2006) : An OGCM with movable land–sea boundaries. Ocean Modelling. 13, 176–195.

第２章　下水道整備による公共用水域の水質改善と水生生態系との関係に関する調査
その１　下水道の整備による水生生物への影響

１　はじめに

近年、下水道整備により公共用水域の水質は改善され、高度成長期にみられたような有機物等による極端な汚濁はかなり改善されてきた。

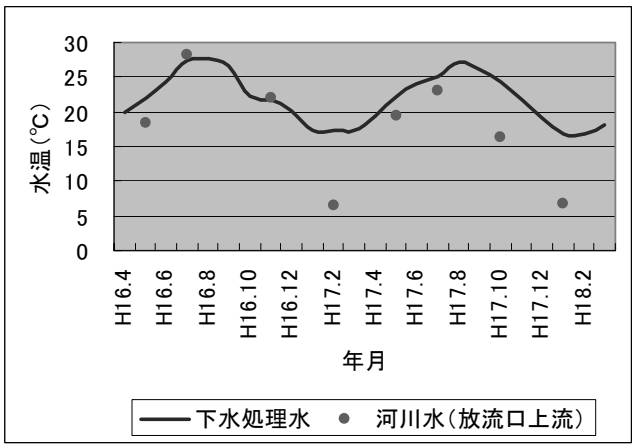
一方で、都市域では人口の集中化に伴い、河川水に占める下水処理水の割合が年々大きくなっており、その割合が図-24に示すように90%を超えるような河川もみられるようになってきている。



（多摩川･荒川等流域別下水道整備総合計画策定調査による試算値）
ニュース東京の下水道 No.154 ＜1998.7＞より

図-24　晴天時の河川水量に占める下水処理の割合

下水処理水が河川水等と性状面で大きく異なる点は、栄養塩類の濃度や有機物量などの物質的な面のほか、水温についても自然状態の水との違いが注目される。特に、図-25に示すように、冬期においてその差は大きくなり、10℃前後の違いとなることもある。この水温差が河川水温に与える影響として、荒川下流における熱収支の観測結果から、都市の人工排熱が下水処理場の放流水を主な排出源として河川水域に放出されていることが報告[1)]されている。



対象処理場は横浜市栄第一水再生センター．放流先河川はいたち川
データは横浜市環境創造局水質試験年報（平成 16,17 年度）より

図-25　処理水が流入する小河川における河川水温と下水処理水温

このような下水処理場放流水による河川水温の変化は、放流先水域における水環境に大きな影響を及ぼし、当該水域に形成される生態系に対しても様々な変化を与えているものと考えられる。

そこで本調査では、食物連鎖の基盤となる付着藻類の生物量と水温との関係を調査することで、水温の違いが河川生態系に及ぼす影響について把握し、今後の下水道整備における生態系への影響および対策を検討する際の基礎的なデータを得ることを目的とした。

２　方法

水温変化が及ぼす付着藻類への影響のみを観察するためには、水温以外の付着藻類増殖に関わる要因、すなわち栄養塩類濃度、有機物量といった他の水質要因や流速、付着基盤、光量といった物理的要因はできるだけ同じレベルに揃えて比較する必要がある。

そこで本調査においては、下水処理場からの処理水を二つに分割して水温のみを変化させ、これを平行して設置した人工水路に流して、さらに付着基盤として同じ素焼き板を両方の水路に配置した。このような方法で、水温以外の要因を統一する実験的手法によって調査検討を行うこととした。

２－１　調査場所

実験調査に用いた下水処理水は、茨城県霞ヶ浦浄化センターの凝集剤添加活性汚泥法、嫌気－無酸素－好気法、凝集剤併用型循環式硝化脱窒法の３系統の処理水が混合された後に急速砂ろ過処理がなされたものである。実験には、この砂ろ過後の高度処理水を未消毒のまま使用した。

２－２　水温調節方法

試験水の温度を変化させるため、処理水と河川水の温度差が最も大きくなる冬期を対象とすることで、外気温を利用して水温を下げることとした。水路間において水温差をつける方法は以下のような方法によった。

人工水路のうち、一方を一過型の掛け流し方式として、もう一方を循環方式とした。掛け流し方式の水路には処理水をそのまま流すことで、高い水温の状態が常に保たれるようにした。循環方式の水路では下水処理水を循環させて冷たい外気との接触時間を長くし、その間に生じる水温低下によって低い水温の状態を形成させた。

このため、循環させることによって水中の物質が酸化されるなどの水質変化が生じる可能性があるが､常に一定量の新しい処理水を補給することで､水温以外の水質変化を緩和させることとした。

なお、本実験は平成18年12月から平成19年3月にかけて行った。

２－３　水路条件

実験に用いた水路の構造と設定した水理条件は表-6のとおりとした。

なお、水路に付帯するポンプの性能による制約から、水深については同一とすることはできなかった。

２－４　付着藻類用人工付着基盤の設置

付着藻類の付着基盤として、9×9cmの素焼きの陶器板を、水路内の流入端より下流22～23mの区間に各20枚設置した。分析用の付着藻類の採取は付着物の付着量を目視によって観察し、増殖状況が把握できるように採取までの経過日数を実験中に随時設定した。

実際に採取を行った経過日数は、以下の通りである。

一過水路：3，7，15，24，38，52日目

循環水路：3，7，15，24，45，66日目

表-6　実験に用いた水路の物理的条件

	一過水路	循環水路
水路長 (cm)	2800	往路：2800，復路：2800
水路幅 (cm)	19.5	19.5
水深 (cm)	0.5 前後	2.0 前後
流速 (cm/sec.)	35 前後	35 前後
供給水量 (L/min)	16	45
補給水量 (L/min)	―	2.5
貯留水槽 (cm^3)	―	124×98.5×45.5
光条件	自然光	自然光

２－５　分析測定対象項目

(1)分析対象項目

この調査で対象とした項目は以下の通りである。

水質：水温，pH，電気伝導度，DO，　TOC，T-N，NH_4-N，NO_2-N，NO_3-N，T-P，PO_4-P

生物：Chl-a

(2)調査方法

調査は、水路から生物および水質の分析用試料を採取し、分析室に持ち帰って分析に供した。

各項目についての試料採取方法および分析方法を以下に示す。

1)現地測定項目

以下の項目について、現地で測定を週2回行った。

水温，pH，濁度，電気伝導度，DO

測定は、調査対象地点において携帯型水質測定器（HORIBA社，U-10）を水中に投入して測定し、週2回の頻度で行った。

また水温については、経時的な変化を把握するため自記式の温度ロガー（onset社，TidbiT v2）を各水路の流入部と流出部、および水路脇に設置し、気温も含めて測定記録を行った。測定の間隔は30分ごとに設定した。

2)化学分析項目

以下の項目について、水路流入口の水をポリビンへ採取し、分析室へ冷蔵で輸送した後、分析を行った。試料の採取は週2回とした。

TOC，T-N，NH_4-N，NO_2-N，NO_3-N，T-P，PO_4-P

分析は、TOCについては自動分析計（SHIMADZU社，TOC-5000A）を用い、リンおよび窒素関連項目についてはオートアナライザー（Bran Lubbe社，TRAACS800）を用いて行った。

3)生物（付着物）

生物の分析は、付着藻類生物量の指標となる以下の項目について分析を行った。

Chl-a，Chl-b，Chl-c，フェオフィチン

付着物の採取は水路に設置した付着基盤を調査回ごとに必要枚数を取り出し、表面にある付着物をブラシで擦り取ることによって採取した。

試料採取に用いた付着板の枚数は、増殖量が少ない1及び2回目の採取時は4枚／水路、その後は2枚／水路ずつとした。

分析は、［河川水質試験方法 58,4,1］に準じて行い、単位面積当たりの重量として整理した。なお、試料は冷蔵下で分析室へ輸送した後に分析を行った。

3　結果

試験期間中の水質分析の結果を表-7に、生物分析の結果を表-8に示す。

表-7　実験水路の水質分析結果

項目	単位	循環水路																	
		0日目	3日目	7日目	10日目	15日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目	35日目	38日目	41日目	45日目	49日目	52日目	56日目	59日目	66日目
				19:15	19:30	18:30	11:00	10:00	18:30	8:40	13:30	9:00	8:30	11:40	17:55	9:15	12:15	9:00	18:00	17:50
pH	―	／	7.95	7.68	7.61	7.54	7.56	7.63	7.54	7.60	7.53	7.64	7.53	7.64	7.57	7.58	6.99	7.17	7.29	7.27
EC	mS/cm	／	0.425	0.417	0.404	0.422	0.427	0.446	0.426	0.438	0.407	0.407	0.346	0.444	0.477	0.497	0.494	0.488	0.469	0.484
DO	mg/L	／	6.47	6.13	5.99	5.73	5.91	6.13	5.72	5.98	5.71	6.19	6.20	8.99	9.18	9.46	8.86	9.42	9.25	8.95
W.Temp	℃	／	12.9	14.8	15.5	16.9	15.2	14.7	16.7	15.0	16.6	14.5	13.6	17.0	16.2	15.4	18.4	15.4	16.1	17.4
NH4-N	mg/L	0.034	0.060	0.034	0.017	0.405	0.022	0.044	0.039	0.020	0.031	0.076	0.043	0.071	0.134	0.039	0.096	0.005	0.030	0.067
NO2-N	mg/L	0.018	0.055	0.016	0.015	0.025	0.003	0.019	0.058	0.019	0.098	0.019	0.033	0.094	0.025	0.029	0.012	0.062	0.050	0.053
NO3-N	mg/L	6.476	5.733	6.026	6.496	4.834	7.193	6.286	8.040	6.339	7.614	6.308	7.552	6.261	7.062	6.783	7.006	6.670	7.255	7.184
D-T-N	mg/L	7.183	6.548	7.484	8.141	6.425	8.670	6.992	9.586	7.260	8.377	7.056	7.152	7.051	8.108	7.552	8.107	7.779	8.650	8.974
T-T-N	mg/L	7.332	6.666	7.518	8.820	7.530	9.054	7.127	8.852	7.578	8.331	7.151	8.624	7.084	8.617	7.711	8.066	11.235	9.103	9.170
PO4-P	mg/L	0.183	0.073	0.053	0.039	0.078	0.057	0.088	0.075	0.101	0.122	0.213	0.093	0.083	0.073	0.083	0.063	0.251	0.071	0.065
D-T-P	mg/L	0.194	0.092	0.090	0.079	0.092	0.086	0.108	0.114	0.150	0.164	0.232	0.113	0.105	0.094	0.111	0.089	0.279	0.105	0.097
T-T-P	mg/L	0.203	0.097	0.103	0.092	0.108	0.096	0.109	0.117	0.253	0.173	0.240	0.123	0.105	0.096	0.117	0.103	0.284	0.125	0.103
D-TOC	mg/L	4.47	4.04	3.72	3.66	4.01	4.39	3.27	3.74	5.72	4.73	5.75	4.90	5.73	5.09	4.41	4.60	4.42	4.80	4.34

項目	単位	一過水路																	
		0日目	3日目	7日目	10日目	15日目	17日目	21日目	24日目	28日目	31日目	35日目	38日目	41日目	45日目	49日目	52日目	56日目	59日目	66日目
				19:15	19:30	18:30	11:00	9:55	18:25	8:40	13:30	9:00	8:30	11:40	17:55	9:15	12:15	9:00	18:00	17:50
pH	―	／	6.72	6.71	6.71	6.70	6.76	6.76	6.68	6.77	6.70	6.81	6.66	6.66	6.65	6.74	6.23	6.35	6.46	6.46
EC	mS/cm	／	0.420	0.418	0.402	0.427	0.426	0.445	0.426	0.441	0.410	0.410	0.345	0.445	0.473	0.496	0.491	0.488	0.465	0.479
DO	mg/L	／	3.00	3.27	3.30	2.91	3.14	2.58	3.02	2.88	2.77	3.08	3.23	4.55	3.83	3.79	4.67	4.08	5.42	4.86
W.Temp	℃	／	17.8	18.4	18.4	18.9	18.8	18.8	18.9	18.5	18.3	18.4	17.1	18.9	19.0	18.9	19.6	19.3	18.9	19.5
NH4-N	mg/L	0.202	0.221	0.084	0.034	1.158	0.071	0.123	0.029	0.0.20	0.086	0.100	0.075	0.139	0.329	0.043	0.117	0.016	0.052	0.080
NO2-N	mg/L	0.022	0.055	0.049	0.015	0.049	0.003	0.057	0.066	0.025	0.159	0.011	0.033	0.176	0.041	0.037	0.015	0.070	0.049	0.053
NO3-N	mg/L	6.012	6.678	5.477	6.646	4.558	6.855	6.079	8.425	5.979	7.364	6.111	7.412	5.890	6.961	6.397	6.770	6.745	7.255	6.955
D-T-N	mg/L	6.563	7.491	7.215	8.143	6.623	7.631	6.811	9.403	6.624	8.169	7.063	7.228	6.680	7.690	7.110	7.755	7.582	8.524	8.662
T-T-N	mg/L	7.455	7.698	7.573	8.762	6.989	8.482	6.922	8.832	7.038	8.023	7.227	8.720	6.799	8.204	7.468	7.888	8.554	8.918	8.714
PO4-P	mg/L	0.169	0.058	0.059	0.039	0.078	0.057	0.098	0.075	0.087	0.107	0.200	0.092	0.081	0.073	0.076	0.060	0.253	0.086	0.065
D-T-P	mg/L	0.180	0.077	0.094	0.080	0.087	0.086	0.107	0.115	0.173	0.162	0.227	0.108	0.100	0.096	0.113	0.093	0.279	0.121	0.100
T-T-P	mg/L	0.188	0.085	0.120	0.092	0.144	0.100	0.126	0.136	0.185	0.172	0.233	0.123	0.104	0.101	0.117	0.109	0.283	0.153	0.128
D-TOC	mg/L	4.65	3.91	3.66	3.92	4.18	4.67	3.96	3.74	5.80	4.91	5.89	5.18	6.00	5.02	4.34	4.51	4.48	4.59	4.55

表-8　付着物中のクロロフィル量

循環水路

経過日数（日）	三波長法			単波長法	
	Chl-a	Chl-b	Chl-c	Chl-a	ﾌｪｵﾌｨﾁﾝ
3	0.0042	0.0022	0.0033	0.0021	0.0037
7	0.0015*	0.0015*	0.0015*	0.0015*	0.0026
15	0.0028*	0.0028*	0.0028*	0.0028*	0.0028*
24	0.0059	0.0022*	0.0027	0.0057	0.0022*
45	0.3469	0.0062	0.0475	0.3139	0.0268
66	1.7427	0.0351	0.2858	1.5925	0.1207

（$\mu g/cm^2$）

一過水路

経過日数（日）	三波長法			単波長法	
	Chl-a	Chl-b	Chl-c	Chl-a	ﾌｪｵﾌｨﾁﾝ
3	0.0017*	0.0017*	0.0017*	0.0017*	0.0017*
7	0.0013*	0.0020	0.0004	0.0015	0.0013*
15	0.0028	0.0022*	0.0025	0.0022*	0.0076
24	0.0059	0.0052	0.0067	0.006	0.0024*
38	0.0128	0.0068	0.003*	0.0089	0.0067
52	0.1311	0.0102	0.0379	0.1248	0.0022*

（$\mu g/cm^2$）

*:定量下限値未満（数値は定量下限を示す）

３－１　水温変化

各水路の水温変化について、一日の平均的な水温として比較するために、24時間毎の移動平均として表したものを図-26に示す。

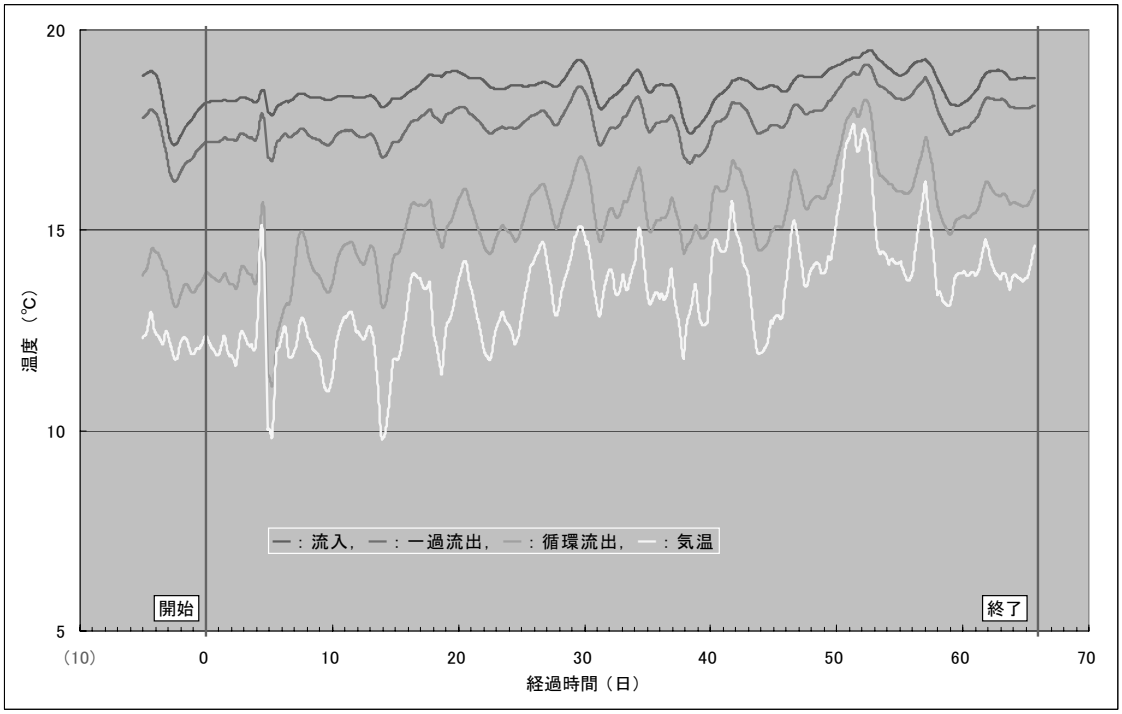


図-26　実験水路の水温変化（24 時間移動平均）

ここから、一過水路と循環水路の間では、実感開始前半の期間においては水温差が3～4℃と比較的開いていたが､実験後半においては気温の上昇に伴い水温差も1～2℃と小さくなっていた｡また、一過水路の流入と流出を比較しても1～2℃の違いがあり、28mの水路を通過するだけで一定の水温低下効果がみられた。これは、水路の材質がステンレスで熱伝導性が高く、また水路が空中に吊された状態でかつ水量が少ないため空気との熱交換効率が良かったことが要因と考えられる。

このように、水路の構造等による細かな変動はあるものの、全体として「一過水路の水温は高く変動も小さい」「循環水路の水温は一過水路と比べて低く、気温の変動の影響を大きく受ける」といった傾向がみられた。

各温度の測定点の温度の平均及び標準偏差をまとめて表-9に示す。

表-9　実験水路における温度（℃）

	平均	標準偏差
流入	18.6	0.4
循環流出	15.3	1.4
一過流出	17.8	0.6
気温	13.5	2.2

このように、循環水路と一過水路の間では、約3℃の温度差が生じていた。

３－２　水質

一過水路および循環水路での水質について、試験期間の平均値を表-10に示す。

表-10　実験水路の水質

項目	単位	循環水路	一過水路
pH	－	7.60	6.72
EC	mS/cm	0.44	0.44
DO	mg/L	7.24	3.58
W.Temp	℃	15.7	18.7
NH_4-N	mg/L	0.067	0.164
NO_2-N	mg/L	0.037	0.052
NO_3-N	mg/L	6.69	6.56
D-T-N	mg/L	7.74	7.52
T-T-N	mg/L	8.19	7.91
PO_4-P	mg/L	0.098	0.095
D-T-P	mg/L	0.126	0.126
T-T-P	mg/L	0.139	0.142
D-TOC	mg/L	4.52	4.63

ほとんどの項目については、循環水路と一過水路で大きな差はみられなかった。違いがみられた項目としては、pHが循環水路で1程度高く、DOが循環水路で4mg/L程度高く、アンモニア性窒素が循環水路で0.1mg/L程度低くなっていた。

この要因としては、循環させることで空気との接触時間が長くなり、また循環水の滞留槽への流入時に生じる撹拌曝気等によって酸素が溶け込み、溶存酸素濃度が上昇したものと考えられる。さらに、溶存酸素濃度の上昇に伴って、アンモニア性窒素の酸化が進み、硝酸性窒素に変化したものと考えられる。pHの変化については、空気との接触や水路内における藻類の増殖などの要因により水中の炭酸ガス濃度が減少したことが要因の一つである可能性が考えられるが、明確な要因は不明である。

しかし、リン濃度や総窒素濃度では、両水路の水質はほぼ同等であり、藻類の増殖能としては大きな違いはないものと考えられる。

なお、アンモニア性窒素については、藻類種によっては窒素源としての利用効率が硝酸性窒素と異なる場合があるため生物との関連を検討する際には一部留意する必要がある。

３－３　生物量

分析によって得られたクロロフィルa,b,cについて、その総和をtotal-Chlとしてまとめ、フェオフィチンと併せて、時間変化を図-27に示した。また、Chl量が両水路ともに定量下限値を超えて測定されるようになった24日目以降の増殖速度について計算した結果を表-11に示す。ここで、フェオフィチンはクロロフィルの分解生成物であり、クロロフィルの中心にあるマグネシウムが脱離したものである。藻類が死ぬとクロロフィルはフェオフィチンに変化するため、藻類の死細胞量の指標となる。

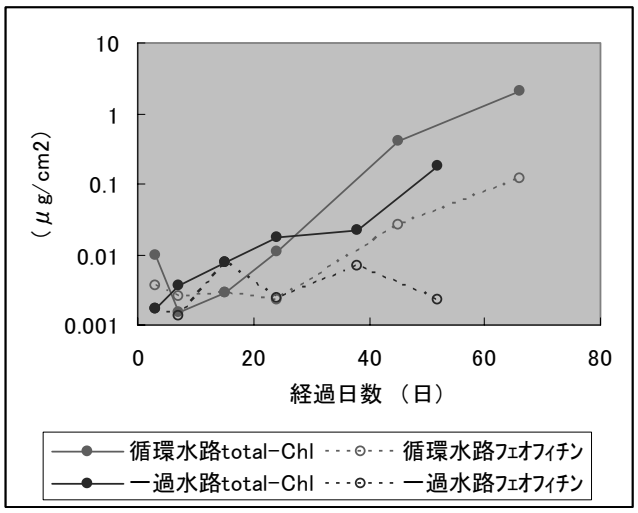


図-27　水路内の生物量変化

表-11　実験水路における藻類増殖速度

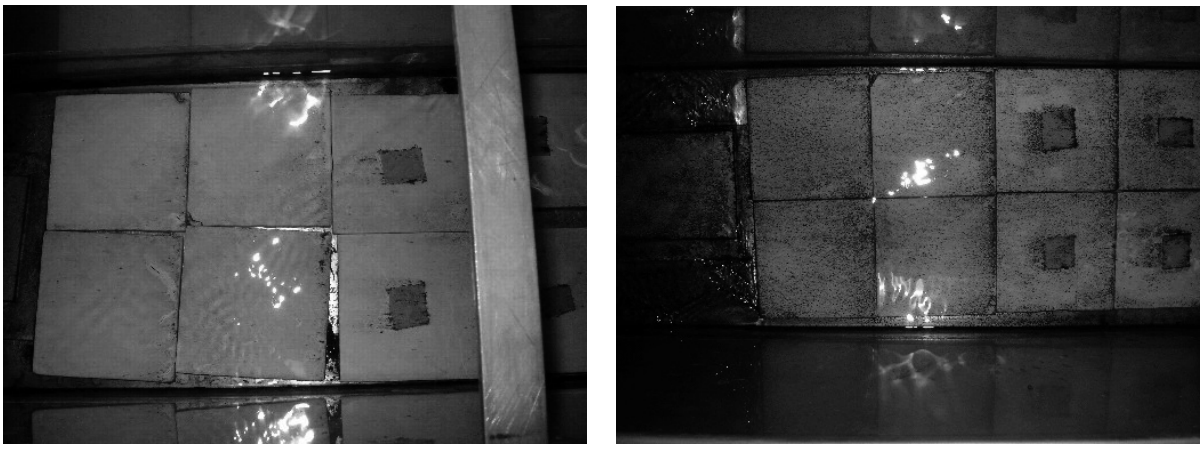
	循環水路 24～66 日目	一過水路 24～52 日目
増殖速度 Log(Chl)/day	0.054	0.036

生物量としては循環水路における付着藻類量の方が若干大きくなっている。しかし、フェオフィチン量をみてみると、循環水路では増加傾向にあるのに対して、一過水路では明確な増加傾向は見られない。このことは、一過水路においては死細胞が付着板上に留まっていないことを意味するものとも考えられ、付着板から剥離している可能性がうかがわれる。この場合には生細胞についても同時に剥離していることが考えられ、クロロフィル量が水路内での生産量を正確に反映していない可能性が推察される。実際、目視で確認した藻類の繁茂状況は図-28に示すように、一過水路の方が藻類は多く繁茂しているようにみえた。

さらに、一過水路においては藻類のもととなる種（シード）は処理水中に含まれるものだけなのに対して、循環水路では一度剥離した藻類が循環水とともに再度水路内に戻るため藻類増殖が進むにつれて、両水路におけるシーディングの条件が異なってきたと考えられる。

また、一過水路においては２度、循環水路においては１度測定した強熱減量はほとんど同じ値であった。

これらのことから、今回の調査におけるクロロフィル量の違いは、明確なものとはいえない可能性も高く、両水路における最終的な生物量および増殖速度の違いについての検討は困難であった。



循環水路　　一過水路

図-28　付着藻類繁茂状況（45 日目）

4　考察

今回の調査においては、水温の低い循環水路において、藻類量および増殖速度ともに若干高い、または同等という結果となった。これは「水温：11～15℃，PO_4-P：0.014～1.3mg/Lの範囲においては水温が高いほど藻類の増殖量が大きくなる」という南山らの報告[3)]から想定された結果とは異なっていた。この南山らの行った試験においては、付着藻類の生物量が20日程度で最大量に達していたのに対して、今回用いた水路においては40～60日でも最大量に達せず、下水処理水中における付着藻類の繁茂としては増殖速度が非常に遅かった。また出現する藻類も褐色の珪藻類とみられる種が主であり、長期間処理水を流した際に通常出現する緑藻類、特に糸状藻類等の出現がみられなかった。



図-29　屋外水路の藻類繁茂状況（春季）

このことの理由としては、光の供給が水路を設置した施設内に差し込む自然光のみであったため光エネルギーが不足し、十分な光合成ができなかったことがあげられる。実際に、屋外に設置した同じ下水処理水を流している水路では、本調査と同じ時期においても図-29に示すように緑色の糸状藻類が全面に繁茂する状況であった。従って、処理水が本来持つ藻類増殖ポテンシャルにまで藻類量が増殖できなかったことが、予想と異なる結果となった要因の一つと考えられる。

また、今回の調査では付着藻類の種別の分類は行っていないが、藻類種によっては増殖に適する水温が異なるものと考えられる。従って、今回の実験における光量や流速水温等の生育条件で出現する藻類種が、低水温下で増殖が盛んになる種であった可能性も考えられるため、水温の高い方が生物量も大きくなるという想定された結果に合わなかったことも考えられる。

5　今後の展開

今回の調査において、冬期の外気温により下水処理水の水温を低下させることで生態系に及ぼす影響を緩和させる手法についての実験系を構築し、比較的単純な装置で数℃の水温低下を実現した。この水温の低下幅は、過去に行われた水温低下実験における「約5℃の低下」[2)]と同等である。

今後は水温以外の条件について、より均等にすることと、実際の野外現場の条件に近付けた実験を行うことで、また生物種についての分類等も含めて、水温と生態系との関係について詳細な検討が必要である。

参考文献

1) 宮本守，木内豪，八木宏，深見和彦：冬期の荒川下流域における水・熱輸送の実態解明，第 60 回土木学会年次学術講演会，Ⅱ-014，2005.

2) 生態系との共生をはかる下水道のあり方検討会：生態系にやさしい下水道をめざして，pp.62，技報堂，2001.

3) 南山瑞彦,荒谷裕介,平出亮輔:生態系の観点からみた下水再生システムのあり方に関する研究，平成 17 年度下水道関係調査研究年次報告書集,国土技術政策総合研究所資料 No.323,pp.57-62，2006.

その２　下水処理水中の内分泌かく乱化学物質が魚類に与える影響

1　はじめに

下水道の普及により、下水処理水等の都市排水が都市河川に占める割合は急速に大きくなりつつある。従って、下水処理水中に存在するエストロゲンやエストロゲン様物質が、魚類にどの程度影響を及ぼしているのか明確にする必要がある。さらに、その状況によっては下水処理方法の改善等の対策をとる必要があると考えられる。

この問題に対処するため、本年度は夏季と冬季の 2 回、3 種類の処理段階の異なる下水処理水について、雄メダカの雌性化影響を調べた。

2　方法

2-1　調査に用いた下水処理水

湖北総合実験施設内に設置した、標準活性汚泥法実験プラント（有効水深 2m、最初沈殿池容量 0.5m^3、反応槽容量 2m^3、最終沈殿池容量 0.5m^3、HRT 8 時間、SRT 約 10 日、返送比 0.4）で処理された水を用いた（以後、二次処理水とする）。また、これまでの水質チームの研究により、最終沈殿池へ活性汚泥が流入後、溶存酸素が不足すると、遊離体のエストロゲン類濃度が増加することが明らかにされている [1)]。このことから、下水処理場の運転条件が悪い場合の魚類影響のポテンシャルを調査するため、4 つめの反応槽から活性汚泥混合液を引き抜いてエアレーションせずに撹拌し（HRT 2 時間）、その後汚泥を沈殿させた水を用いた（以後、無酸素条件水とする）。さらに、高度処理による魚類影響の低減の程度を把握するため、微生物保持のための担体を入れた反応槽で処理後、汚泥を沈殿させた水を用いた（以後、接触酸化処理水とする）。実験装置の概略を図-30、図-31 に示す。

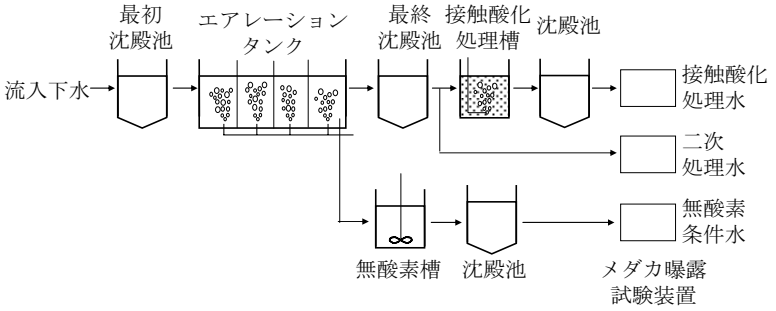


図-30　実験装置概略（夏季試験）

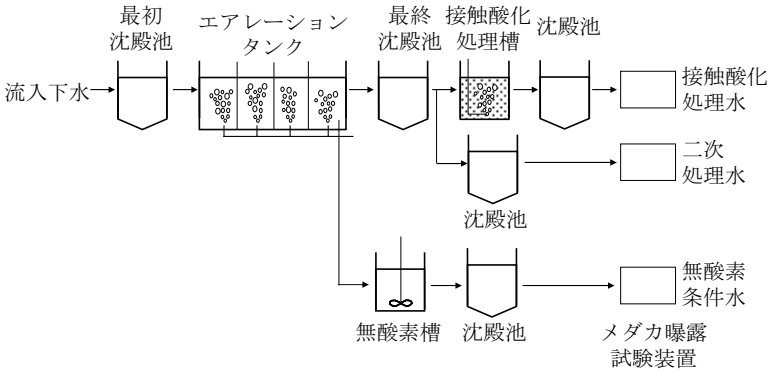


図-31　実験装置概略（冬季試験）

また、対照として所内の水質水文実験棟内で、水道水を活性炭フィルターで脱塩素したものを用いた（以後、脱塩素水道水とする）。

2-2　調査時期

処理状況が良く、硝化が進行しやすい時期として 2007 年 9 月 20 日から 10 月 11 日までの 3 週間に、また、硝化抑制運転をしており、処理状況が悪い時期として 2007 年 1 月 18 日から 2 月 8 日までの 3 週間に調査を行った。

2-3　曝露試験装置

曝露試験には、水質チームが考案、作製した現場型魚類曝露試験システム [2)] を継続して用いた。

この装置を用いることにより、現地試験において新鮮な試験水を導水でき、さらに水温、流量、日照時間等の試験条件も制御できる。試験水の水質を除いたその他の試験条件を統一することが可能なので、複数の曝露試験において、水質と魚類影響との関係を比較検討することが可能である。

2-4　曝露試験条件

各曝露試験の試験条件を表-12、表-13 に示す。

夏季試験は産卵数と受精率に着目し、最も産卵数が増える条件として水温 28℃で行い、さらに試験期間中各水槽内のペア数が変化すると産卵数に影響すると考えられたことから、ビテロゲニン（VTG）濃度測定のための肝臓摘出は曝露 21 日後でのみ行った。

一方、冬季試験は産卵数・受精率よりも VTG 濃度やエストロゲン応答遺伝子の変化に着目した。水温は VTG 誘導に影響するため、飼育時と同じ 24℃で試験を行うこととし、VTG 濃度やエストロゲン応答遺伝子発現量の測定のための肝臓摘出は、曝露期間中の測定値の推移をみるために、曝露 7、14、21 日後に行った。

また、二次処理水と無酸素条件水では、DO が非常に低く酸素飽和度が 60%を超えないと考えられたため、曝露水槽内でエアレーションを行った。エアレーションの程度は 1 日 1 回測定する DO の値を見ながら、5.0mg/L（24.0℃での酸素飽和度 60%値）を目安に強弱の調節を行った。

表-12　曝露試験条件（夏季試験）

供試魚	メダカ（d-rR系、5ヶ月齢）
供試魚数	♂30尾＋♀30尾　/　試験水槽
曝露形式	間欠流水式
曝露期間	21day
試験試料	無酸素条件水、二次処理水、接触酸化処理水、脱塩素水道水
水温	28±2℃
照明	16h 明（6:00～22:00）、8h 暗
試験水槽容量	40L
試験液量	30L
換水率	無酸素（2.4回/day）、二次処理（6.4回/day）、 接触酸化（2.6回/day）、脱塩素（5回/day）
給餌	配合飼料（初期飼料協和N250） 4回/day（10:00、13:00、16:00、19:00）
エンドポイント	産卵数、受精率 肝指数 ♂肝臓中VTG濃度（21日後） ♂肝臓中エストロゲン応答遺伝子発現量（21日後）

表-13　曝露試験条件（冬季試験）

供試魚	メダカ（d-rR系、5ヶ月齢）
供試魚数	対照区；♂45尾、♀43尾、その他；♂35尾、♀35尾
曝露形式	間欠流水式
曝露期間	21day
試験試料	無酸素条件水、二次処理水、接触酸化処理水、脱塩素水道水
水温	24±2℃
照明	16h 明（6:00～22:00）、8h 暗
試験水槽容量	40L
試験液量	30L
換水率	無酸素（3.0回/day）、二次処理（2.7回/day）、 接触酸化（3.1回/day）、脱塩素（5回/day）
給餌	配合飼料（初期飼料協和N700） 4回/day（10:00、13:00、16:00、19:00）
エンドポイント	産卵数変化率、受精率変化率 肝指数 ♂肝臓中VTG濃度（0、7、14、21日後） ♂肝臓中エストロゲン応答遺伝子発現量（0、7、14、21日後） ♂精巣組織観察(0、21日後)

2-5　水質測定

①水質測定項目と測定頻度

各曝露試験水槽内の水の、pH、DO、電気伝導度、濁度を 1 日 1 回、無機態窒素（NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N）濃度、エストロゲン類濃度、エストロゲン様活性は 1 週間に 3 回測定した。エストロゲン類は遊離体のエストロゲンとして、エストロン（E1）、17β-エストラジオール（E2）、エストリオール（E3）を、合成エストロゲンとして 17α-エチニルエストラジオール（EE2）を、抱合体のエスト

ロゲンとして、硫酸抱合体のエストロン 3 サルフェート（E1-3S）、β-エストラジオール 3 サルフェート（E2-monoS）、エストリオール 3 サルフェート（E3-monoS）、グルクロン酸抱合体のエストロン 3-（β-D-グルクロニド）（E1-3G）、β-エストラジオール 17-（β-D）-グルクロニド（E2-monoG）、エストリオール 3-（β-D-グルクロニド）（E3-monoG）を測定した。

②採水方法

無機態窒素濃度、エストロゲン類濃度、エストロゲン様活性測定用の試料は各曝露試験水槽から採水した水を用いたが、夏季試験時はスポットサンプリング、冬季試験時はコンポジットサンプリングを行った。これは夏季試験時の結果から、大きな水質変動が推測されたためであり、冬期試験時には曝露試験期間中の水質を平均化して把握できるコンポジットサンプリングを採用した。コンポジットサンプリングは 1～3 日間、チューブポンプを用い一定流量で連続的に採水を行い、1～3 日分の水を良く撹拌して水質測定に用いた。

③水質測定方法

pH、DO、電気伝導度、濁度を、多項目水質分析計 U21（堀場製作所社製）を用いて測定した。水温は磁気記録式温度計 Thermo Recorder TR-81（T AND D 社製）を曝露試験水槽内に設置し、10 分間隔で測定、記録した。無機態窒素濃度はイオンクロマトグラフ法で測定した。エストロゲン類濃度は「下水試験方法（追補暫定版）2002 年版、下水道協会」に準じて LC/MS/MS で測定した。エストロゲン様活性は矢古宇らの方法 [3] に従い、組み換え酵母を用いた試験（Yeast Estrogen Screen Assay;YES）で測定した。

2-6　メダカの解剖方法

夏季試験では曝露 21 日後に、冬季試験では曝露前と曝露 7、14、21 日後に解剖を行い、雌雄それぞれから肝臓を摘出した。また冬期試験では曝露前と、各試験区の曝露 21 日後の、雄魚 5 個体ずつの精巣を固定し組織標本とした。

メダカを水槽からタモ網で取り上げ、氷冷麻酔をかけてから全長、体長、魚体重を測定した。次にステンレス製メスを用いて、エラよりわずかに尾部側で切断し頭部を除去した。頭部切断後すぐに RNAlater（Ambion 社製）に浸け、RNAlater 中で肝臓の摘出を行った。夏季試験では腹部をピンセットで軽く押し、肝臓を押し出すようにして摘出した。冬期試験の、精巣の組織標本を作製する個体については、腹部を解剖ハサミで切開後、腸管等の他の臓器が大きく移動しないように注意し、ピンセットで摘み出すようにして肝臓を摘出した。肝臓は RNAlater 中で 2 分割し、余計な水分を除去した後、1 方は 1.5mL マイクロチューブに入れて重量を測定し、VTG タンパク濃度測定用とした。もう 1 方は RNAlater を入れた 1.5mL RNase free マイクロチューブに入れて重量を測定し、エストロゲン応答遺伝子の発現量測定用とした。

2-7　VTG タンパク濃度の測定方法

肝臓を buffer（50μL/mg-liver）中でホモジナイズ、冷却遠心分離して得た肝臓抽出液中の VTG 濃度を、メダカビテロゲニン測定用 ELISA キット Enbio Medaka vitellogenin ELISA system（エンバイオテック・ラボラトリーズ社製）を用いて測定した。測定値を buffer で希釈した液量で割り戻し、肝臓 1mg あたりの VTG 量を算出した。

2-8　エストロゲン応答遺伝子発現量測定方法

①測定対象とした mRNA

メダカの雌魚は、卵巣中で卵母細胞の発達が進むと、卵巣の濾胞細胞で E2 を合成し始める。E2 は肝臓細胞のエストロゲンレセプター（ER）に作用し、卵黄タンパク質の前駆物質である VTG や、

卵膜内層タンパク質の前駆物質であるコリオゲニン（CHG）を合成させて、血中に放出させる。メダカの雄魚でも、E2 などのエストロゲンやエストロゲン様物質に曝露されると、これらのタンパク質が肝臓で合成されることが知られている。そこで、ER の 1 つである ERα、既知の 2 タイプのビテロゲニンである VTG Ⅰ、VTG Ⅱ、既知の 3 タイプのコリオゲニンである CHG H、CHG H minor、CHG L の計 6 種類のタンパク質の mRNA 量を測定した。

また、目的のmRNAの発現量を試料間で比較する際には、RNA量を試料間で一定にする必要がある。RNA分子は非常に不安定であり、吸光度の測定により算出したRNA濃度をそろえても、RNA分子の総数が一定であることは証明できない。そこで、一般的に全ての細胞で恒常的に発現しているmRNAを内在性コントロール遺伝子とし、試料ごとに算出したコントロール遺伝子との比の値で比較を行わなければならない[4]。エストロゲンに曝露されても変動しないmRNAとしては、ヒトのacidic ribosomal phospho- protein PO（ARPP）が報告されている[5] ため、メダカでのARPP類似遺伝子（cDNA clone 631-134-03-H）を内在性コントロール遺伝子とし、mRNA量を測定した。

②遺伝子発現量の測定･算出方法

肝臓から RNeasy Mini Kit（QIAGEN 社製）を用いて全 RNA を抽出し、QuantiTect Rev. Transcription Kit（QIAGEN 社製）を用いて mRNA を cDNA に逆転写した。次に cDNA を鋳型として、QuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN 社製）を用いたリアルタイム PCR（polymerase chain reaction）を行い、各反応回数（サイクル数）での PCR 増幅産物量（蛍光強度）を測定した。増幅産物量は、指数関数的に増幅している間は鋳型 DNA 量と高い相関があり次式の関係が成り立つ。

$$[\,\mathrm{DNA}\,]_n = [\,\mathrm{DNA}\,]_0 \cdot (1+e)^{\,n}$$

$$\therefore \quad \log [\mathrm{DNA}\,]_0 = -(\log(1+e)) \cdot n + \log [\,\mathrm{DNA}\,]_n$$

ここで、n はサイクル数、$[\,\mathrm{DNA}\,]_0$ は初期鋳型 DNA 量、$[\,\mathrm{DNA}\,]_n$ は n サイクルでの PCR 増幅産物量、e は平均 PCR 増幅効率である。つまり、初期鋳型 DNA 量（対数値）とサイクル数に直線関係が成り立つ [4]。そのため、PCR 産物増幅曲線で、蛍光強度増加の加速度が最大となるサイクル数 C_T（threshold cycle）を算出し、作成した検量線から初期鋳型 DNA 量（肝臓中で発現していた mRNA 量）を求めた。なお、検量線は最も mRNA の発現量が多い（最も C_T 値が小さい)試料を 3、10、30、100、300、1000 倍希釈したものについて逆転写、PCR を行い作成したため、mRNA 量は最も発現量の多かった試料との比で表される。6 種類のエストロゲン応答遺伝子の mRNA 量の測定値を、それぞれ同じ個体の ARPP mRNA 量で除して補正し、さらに曝露前の対照区の平均値で除して、mRNA の発現量を曝露前から変化した倍数（fold）で表した。

2-9　精巣組織観察方法

肝臓摘出後の胴体部を Davidson 液（ホルマリン溶液 20%、グリセロール 10%、氷酢酸 10%、無水エタノール 30%、蒸留水 30%）と 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、不要部位を切除した後、脱水、脱アルコール、透徹を行いパラフィン包埋した。パラフィンブロックは、雄メダカの背部側から腹腔膜が露出するまでパラフィンを荒削りした後、50～70μm 間隔で薄切し、スライドグラスに添付した。切片は脱パラフィン、ヘマトキシリン・エオシンの二重染色を施した後、封入剤を滴下してカバーグラスで封入し、精巣の組織標本を作製した。精巣の組織標本は、光学顕微鏡下で観察した。

3　結果

3-1　夏季曝露試験結果

①水質

一般項目（水温、pH、DO、濁度、電気伝導度）の測定結果を表-14 に示す。水温は、試験区間の差が±0.2℃の範囲内、試験期間中の変動も±0.3℃以内とほぼ設定どおりであった。pH は、いずれの試験区も 7.0 付近で、±0.1 以内の変動であった。DO は、二次処理水と無酸素条件水でやや低く、酸素飽和度が 60%を下回る日が二次処理水で 3 日間、無酸素条件水で 2 日間あったが、試験期間の平均値はそれぞれ 72.3%、73.6%であった。濁度は二次処理水で最も高く、平均で 5.5mg/L、最大で 22.4mg/L であった。電気伝導度は脱塩素水道水と 3 種類の処理水で明らかに異なり、処理水の方が 1.4 倍程度高かった。9/28 と 10/7 に一時的に脱塩素水道水と同じ程度まで低下したが、これは 9/27 に 92mm、10/6 に 121mm のまとまった降雨があったためと考えられる。NH_4-N 濃度は各試験区とも

表-14 一般水質項目（夏季試験）

測定項目		平均値			
		脱塩素水道水	接触酸化処理水	二次処理水	無酸素条件水
水温	[℃]	27.8 ± 0.2	27.7 ± 0.2	27.5 ± 0.3	27.4 ± 0.2
pH	[-]	7.3 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.9 ± 0.1	7.1 ± 0.1
DO	[mg-O_2/L]	7.2 ± 0.6	6.6 ± 0.8	5.6 ± 1.0	5.8 ± 1.0
酸素飽和度	[%]	93.1 ± 8.0	84.6 ± 9.8	72.3 ± 13.1	73.6 ± 12.8
濁度	[mg/L]	1.0 ± 1.4	3.7 ± 1.6	5.5 ± 4.5	3.5 ± 2.0
電気伝導度	[mS/m]	32.2 ± 1.2	46.6 ± 6.8	46.2 ± 6.6	46.7 ± 6.1
NH_4-N	[mg-N/L]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NO_2-N	[mg-N/L]	n.d.	0.0078 ± 0.0233	0.043 ± 0.130	0.012 ± 0.037
NO_3-N	[mg-N/L]	0.15 ± 0.03	12.1 ± 2.9	10.6 ± 2.2	9.1 ± 4.9

検出されず、NO_2-N 濃度も 10/10 の 3 種類の処理水でわずかに検出されただけだった。NO_3-N は脱塩素水道水ではごく低濃度であったが、3 種類の処理水では 5～20mg-N/L であった。NO_3-N は曝露期間の最初で高く、経時的に減少していく傾向がみられた。

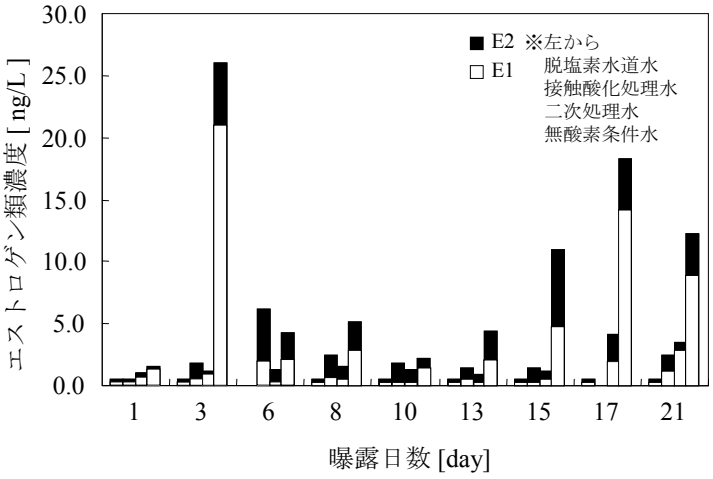


図-32 エストロゲン類濃度（夏季試験）

エストロゲン類濃度は無酸素条件水で高く、E1 濃度が 1.3～21ng/L、E2 濃度が n.d.～6.1ng/L であった。脱塩素水道水、二次処理水、接触酸化処理水中の E1、E2 濃度は 3ng/L 未満であった。EE2 濃度は全ての試験区で定量下限未満であった。E3 濃度は、接触酸化処理水で n.d.～9.2ng/L、二次処理水で 1.3～8.1ng/L、無酸素条件水で 1.7～11.9ng/L であった。なお、抱合体のエストロゲン類は回収率が悪かった。図-32 にエストロゲン様活性の大きい E1、E2 濃度を示す。エストロゲン様活性は、E1、E2 濃度と同様の変動を示した。

②産卵数・受精率

曝露期間中の産卵数、受精率は 3 種類の下水処理水で脱塩素水道水よりも高くなった。受精率の平均値は脱塩素水道水で 59.3%、接触酸化処理水で 75.2%、二次処理水で 76.3%、無酸素条件水で 79.4%であり、脱塩素水道水で低下していた。水温、光周期、給餌量は産卵を促進させる条件であったことから、水質や何らかのストレスの影響が考えられた。各処理水に曝露されても産卵数、受精率は減少しなかった。

③肝指数

曝露 21 日後の肝指数の値を図-33 に示す。接触酸化処理水に曝露された雄魚で他の試験区よりも有意に高かった。

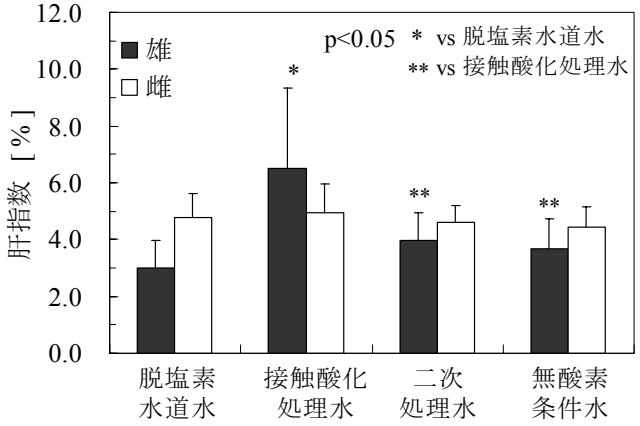


図-33 曝露 21 日後の肝指数（夏季試験）

④VTG 濃度

いずれの試験区でも平均 VTG タンパク濃度の有意な増加はみられなかった。また、定量下限値 1.56ng/mg-liver を超える個体数にも差はみられなかった。

⑤エストロゲン応答遺伝子発現量

4 つの試験区における 6 種類のエストロゲン応答遺伝子の発現量を図-34 に示す。VTG I 遺伝子発現量は、脱塩素水道水および接触酸化処理水曝露時よりも、二次処理水および無酸素条件水曝露時の方が有意に高かった。VTG II 遺伝子発現量は、接触酸化処理水曝露時よりも二次処理水および無酸素条件水曝露時の方が有意に高かった。CHG H、H minor、L の 3 種類のコリオゲニン遺伝子は、接触酸化処理水曝露時よりも二次処理水および無酸素条件水曝露時の方が有意に高く、さらに脱塩素水道水、二次処理水曝露時よりも無酸素条件水曝露時の方が有意に高かった。一方で、ERα 遺伝子発現量は、脱塩素水道水および接触酸化処理水曝露時よりも、二次処理水および無酸素処理水曝露時の方が有意に低かった。

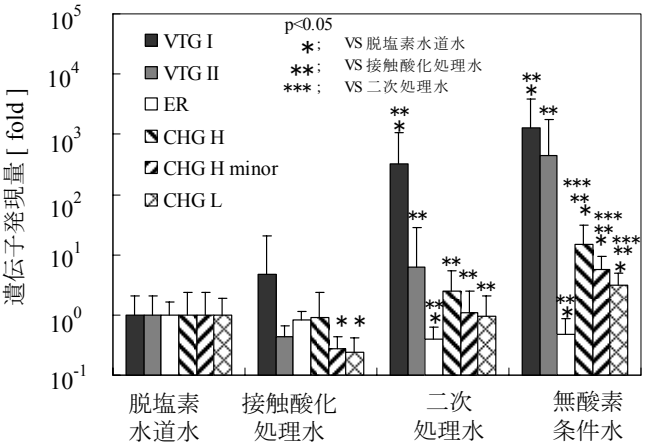


図-34 エストロゲン応答遺伝子発現量（夏季試験）

3-2 冬季曝露試験結果

①水質

一般項目（水温、pH、DO、濁度、電気伝導度）の測定結果を表-15 に示す。水温は、試験区間の平均値の差が±0.4℃の範囲内、試験期間中の変動も、比較的変動の大きい二次処理水と無酸素条件水で、標準偏差が±0.4 程度とほぼ設定温度（24.0℃）に保てていた。pH は、接触酸化処理水でやや

表-15 一般項目水質（冬季試験）

測定項目		平均値			
		脱塩素水道水	接触酸化処理水	二次処理水	無酸素条件水
水温	[℃]	24.2 ± 0.04	23.1 ± 0.3	23.1 ± 0.3	23.2 ± 0.3
pH	[-]	7.0 ± 0.1	6.6 ± 0.2	7.3 ± 0.1	7.1 ± 0.1
DO	[mg-O_2/L]	8.5 ± 0.5	5.9 ± 1.0	4.9 ± 0.9	4.9 ± 0.9
酸素飽和度	[%]	103.9 ± 6.2	70.5 ± 11.8	58.2 ± 10.9	58.6 ± 11.0
濁度	[mg/L]	0.6 ± 0.7	2.4 ± 2.7	3.0 ± 2.3	3.5 ± 4.1
電気伝導度	[mS/m]	26.6 ± 0.4	50.0 ± 1.3	58.9 ± 2.1	55.0 ± 2.7
NH_4-N	[mg-N/L]	n.d.	n.d.	17.9 ± 3.8	9.0 ± 5.2
NO_2-N	[mg-N/L]	n.d.	n.d.	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.5
NO_3-N	[mg-N/L]	0.6 ± 0.1	22.0 ± 2.2	3.8 ± 2.7	13.4 ± 2.9

低めであったが、いずれの試験区も 7.0 付近であり±0.4℃の範囲内であった。また、試験期間中の変動も±0.2℃以内であった。DO は二次処理水と無酸素条件水で非常に低くかったため、エアレーションを行ったが、酸素飽和度の平均値は 60%をやや下回っていた。濁度は無酸素条件水で最も高く、平均で 3.5mg/L、最大で 19.5mg/L であった。電気伝導度は二次処理水、無酸素条件水、接触酸化処理水、脱塩素水道水の順に高く、3 種類の処理水は脱塩素水道水より約 2 倍以上高くなった。NH_4-N は二次処理水と無酸素条件水で高く、二次処理水では 14.6～24.0mg-N/L、無酸素条件水では最大で 15.5mg-N/L であった。NO_2-N も、二次処理水と無酸素条件水で高く、二次処理水では最大で 0.5mg-N/L、無酸素条件水では最大で 1.3mg-N/L であった。NO_3-N は接触酸化処理水と無酸素条件水で高く、接触酸化処理水では 17.1～24.4mg-N/L、無酸素条件水では 8.6～19.5mg-N/L であった。

エストロゲン類濃度は無酸素条件水と二次処理水でやや高く、E1 がそれぞれ、3.1～9.5ng/L、1.6～11.3ng/L であり、E2 はそれぞれ、1.2～3.9ng/L、1.0～3.8ng/L であった。接触酸化処理水では E1 は最大 1.4ng/L、E2 は最大 2.6ng/L であった。脱塩素水道水で E1 は検出されず、E2 は 0.9ng/L が最大値であった。EE2 は無酸素条件水で n.d.～3.2ng/L であったが、その他の試験区では定量下限値未満であった。E3 は接触酸化処理水で 3.3～10.8ng/L、二次処理水で 3.0～14.2ng/L、無酸素条件水で 3.2～14.3ng/L であった。図-35 にエストロゲン様活性の大きい E2 と E1 の濃度を示す。エストロゲン様活性は E1、E2 濃度と同様の変動を示した。

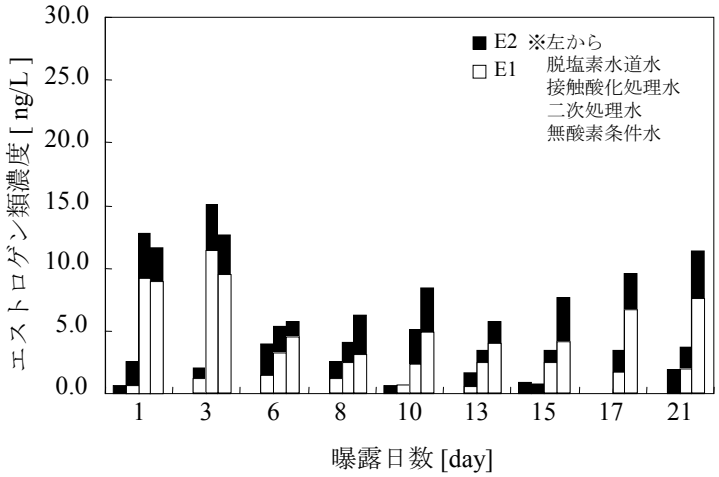


図-35 エストロゲン類濃度（冬季試験）

②産卵数・受精率

曝露期間中の受精卵数は、無酸素条件水では曝露 2 週間後までは少なかったが最後の 1 週間で急激に増加した。二次処理水では最初の 1 週間は少なかったが、2 週目以降増加した。逆に脱塩素水道水では 3 週目で他の試験区ほどの増加が見られなかった。

③肝指数

各試験区の雄魚の肝指数の経日変化を図-36 に、雌魚の肝指数の経日変化を図-37 に示す。雄魚では無酸素条件水において、曝露 7 日目と曝露 21 日目に脱塩素水道水よりも有意に高くなった。雌

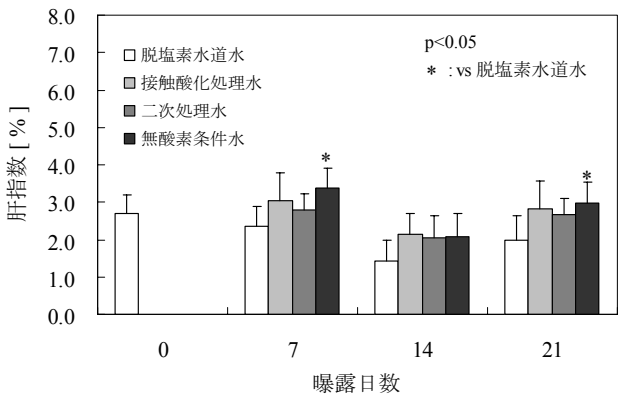


図-36 雄魚肝指数経日変化（冬季試験）

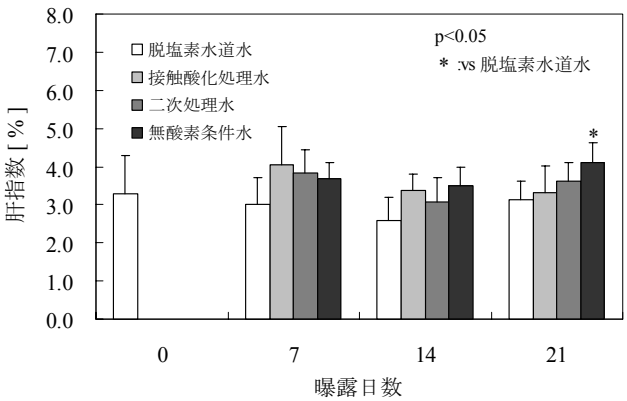


図-37 雌魚肝指数経日変化（冬季試験）

魚では無酸素条件水において、曝露 21 日目に脱塩素水道水よりも有意に高くなった。

④VT G 濃度

各試験区の雄魚の VTG 濃度の経日変化を図-38 に示す。二次処理水では脱塩素水道水とは有意な差がみられなかったが、曝露 7 日後から接触酸化処理水よりも有意な増加がみられた。無酸素条件水では曝露 14 日後から脱塩素水道水および接触酸化処理水よりも有意な増加がみられ、曝露 21 日後には二次処理水よりも有意に増加した。

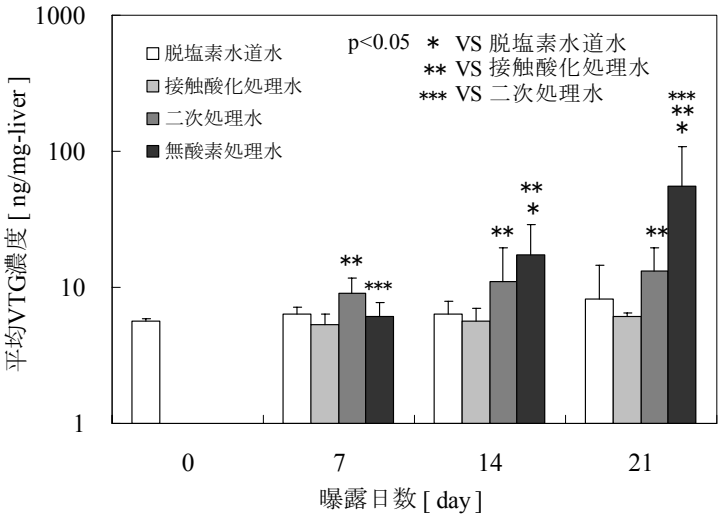


図-38 VTG 濃度経日変化（冬季試験）

⑤エストロゲン応答遺伝子発現量

各試験区の雄魚のエストロゲン応答遺伝子発現量を図-39～44 に示す。VTG Ⅰ遺伝子と VTGⅡ遺伝子の発現量は、二次処理水において曝露 7 日後から接触酸化処理水よりも、曝露 14 日後から脱塩素水道水よりも、有意な増加がみられた。無酸素条件水では、曝露 14 日後から脱塩素水道水、接触酸化処理水よりも有意な増加がみられた。ERα 遺伝子の発現量は、二次処理水と無酸素条件水において曝露 7 日後に、脱塩素水道水および接触酸化処理水よりも有意な増加がみられた。しかし、曝露 14 日後には脱塩素水道水よりも、接触酸化処理水、二次処理水、無酸素条件水で有意な減少がみられた。また、曝露 21 日後には接触酸化処理水と二次処理水で脱塩素水道水よりも有意に高く、なおかつ二次処理水は無酸素条件水よりも有意に高かった。CHG H 遺伝子の発現量は、接触酸化処理水において、曝露 7 日後、曝露 14 日後に脱塩素水道水よりも有意に高くなったが、曝露 21 後には有意差がみられなかった。二次処理水では、曝露 7 日後から脱塩素水道水よりも有意に高くなり、曝露 7 日後は接触酸化処理水よりも有意に高かった。無酸素条件水では、曝露 14 日後から脱塩素水道水および接触酸化処理水よりも有意に高くなった。CHG H minor 遺伝子の発現量は、二次処理水において曝露 7 日後と曝露 14 日後に脱塩素水道水よりも有意に高く、曝露 7 日後には接触酸化処理水よりも有意に高かった。しかし曝露 21 日後には他の試験区との有意差がみられなかった。無酸素条件水では曝露 14 日後に他の 3 試験区よりも有意に高く、曝露 21 日後には脱塩素水道水および接触酸化処理水よりも有意に高くなった。CHG L 遺伝子の発現量は曝

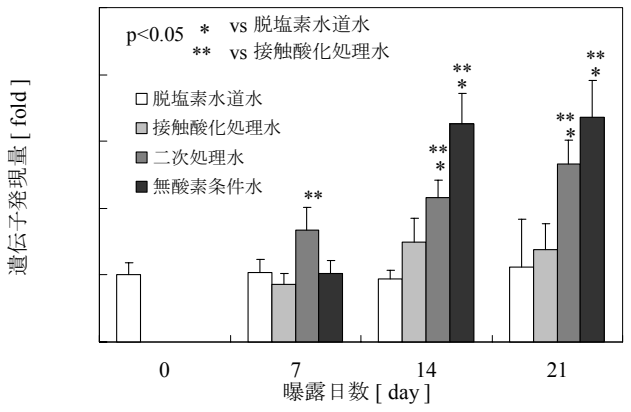


図-39 VTG Ⅰ遺伝子発現量経日変化（冬季試験）

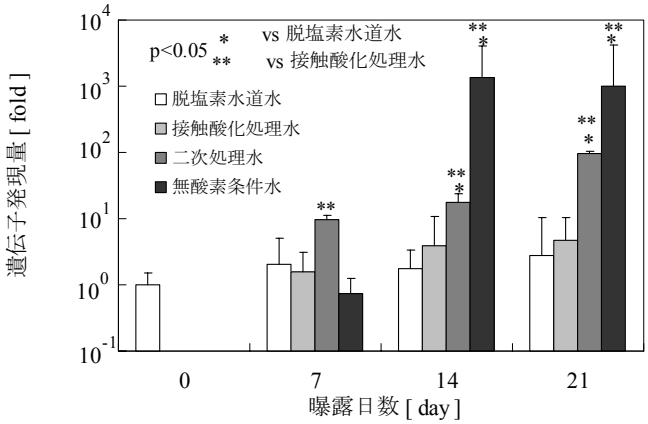


図-40 VTGⅡ遺伝子発現量経日変化（冬季試験）

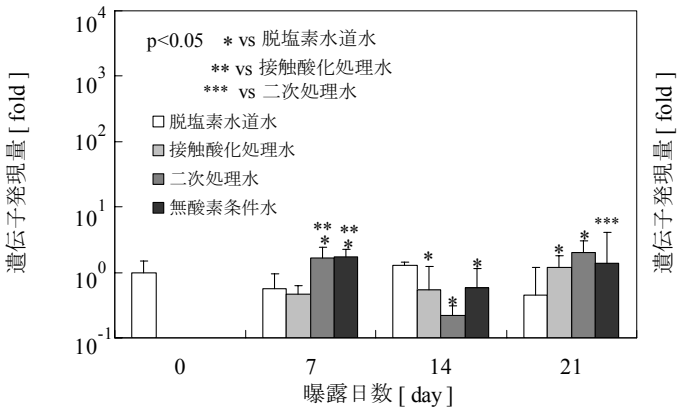


図-41 ERα遺伝子発現量経日変化
（冬季試験）

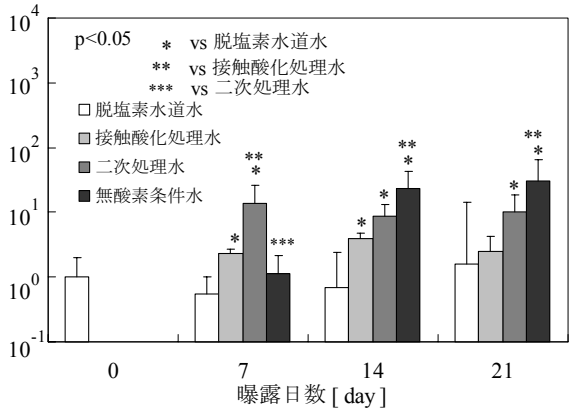


図-42 CHG H 遺伝子発現量経日変化
（冬季試験）

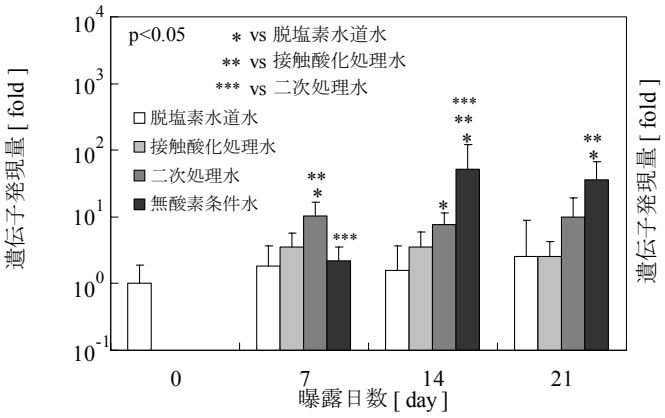


図-43 CHG Hminor 遺伝子発現量
経日変化（冬季試験）

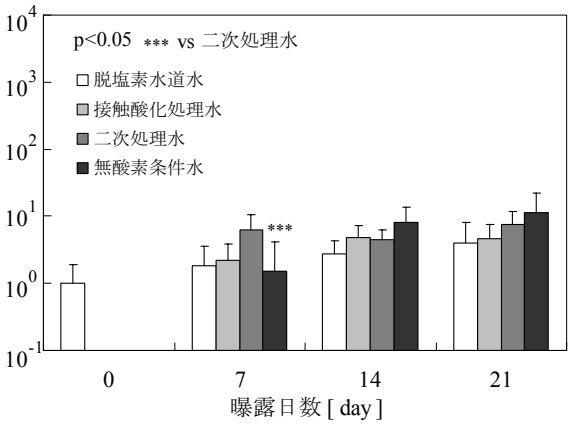


図-44 CHG L 遺伝子発現量経日変化
（冬季試験）

露 7 日後の無酸素条件水が二次処理水よりも有意に低かったが、それ以外に試験区間に有意差はみられなかった。

⑥精巣組織観察

精巣組織の観察結果を表-16 に、異常がみられた個体の精巣の顕微鏡写真を図 45、46 に示す。すべての検体で精巣中に精巣卵（卵母細胞様の細胞）はみられなかった。その他の異常所見としては、接触酸化処理水に曝露された 2 検体に雄生生殖細胞の退行が認められた。

表-16 精巣組織標本観察結果（冬季試験）

曝露日数	試験区	組織異常個体数 / 組織観察個体数		
		精巣卵		その他の所見
0	脱塩素水道水	0/5	0/5	
21	脱塩素水道水	0/5	0/5	
21	接触酸化処理水	0/5	2/5	・精巣全体で雄生生殖細胞の退行および精巣組織の退縮が顕著である。精小嚢内腔、輸精管内に精子はほとんどみられない。 ・精巣全体で雄生生殖細胞の退行が認められる。精小嚢内腔や輸精管内の精子は非常に少ない。
21	二次処理水	0/5	0/5	
21	無酸素条件水	0/5	0/5	

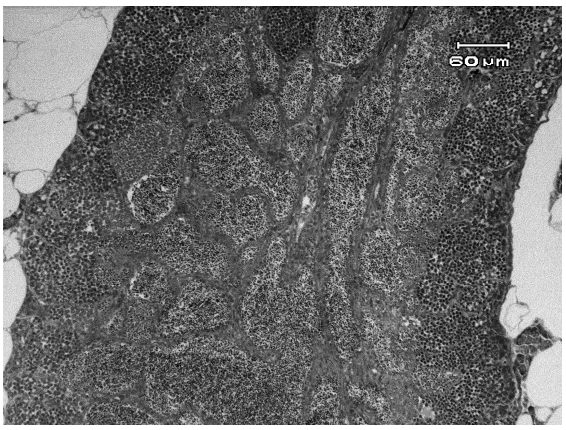


図-45 正常な精巣（脱塩素水道水 0 日目）×20

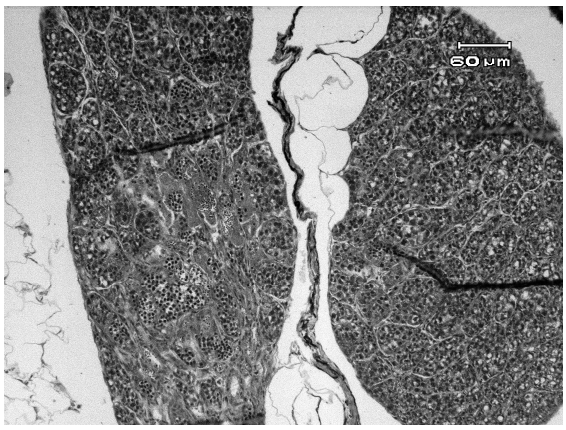


図-46 異常な精巣（接触酸化処理水 21 日目）×20

4 考察

4-1 夏季曝露試験

①エストロゲン類濃度とエストロゲン様活性の関係

E2 のエストロゲン様活性値を 1 としたとき E1 の活性値は 0.8 [6] であったため、E1 由来の理論活性値は E1 濃度に 0.8 を乗じた値である。図-47 に E1 由来理論活性値と E2 由来理論活性値の和と、エストロゲン様活性値を示す。どの試験区もエストロゲン様活性値と、E1、E2 由来理論活性値の和が同程度であることから、エストロゲン様活性は、ほぼ E1 と E2 によるものであると考えられた。夏季曝露試験時には、無酸素条件でも最大 20ng-E2/L 程度にしかエストロゲン様活性が上昇せず、試験期間中の平均値も 7.5ng-E2/L と比較的低かった。また二次処理水では最大で 1.7ng-E2/L と非常に低かった。過去の全国調査での下水処理水のエストロゲン様活性値が、半数以上の地点で 20ng-E2/L 以上で、中には 200ng-E2/L となる地点まであったことと比較すると、今回の各試験区のエストロゲン様活性は低いレベルであったことがわかる。エストロゲン様活性が低かった原因として、硝化促進型運転時だったことが考えられた。

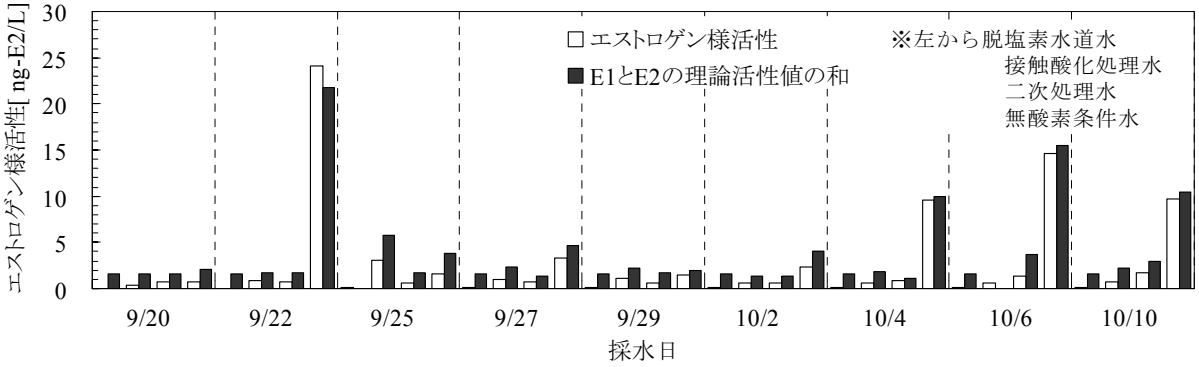


図-47 エストロゲン様活性値と E1･E2 由来理論活性値（夏季試験）

②エストロゲン類濃度とエストロゲン応答遺伝子発現量の関係

低濃度エストロゲン曝露による魚類への影響としては、10ng/L の E2 に曝露された雄メダカ肝臓中で、VTG Ⅰ遺伝子が曝露 3 日目に、VTG Ⅱ遺伝子と ERα 遺伝子が曝露 7 日目に、有意な発現がみられ始めるとの報告 [7] がある。しかし夏季曝露試験では、VTG Ⅰ遺伝子発現量が、エストロゲン類濃度が非常に低い二次処理水でも脱塩素水道水より有意に高かった。このように遺伝子発現量と、エストロゲン濃度との関係が報告例と異なった理由として、①大きな水質変動があり、高エストロ

ゲン濃度を捕らえられなかった可能性、②下水処理水中に含まれる物質の複合影響の可能性などが考えられた。

(2) 冬季曝露試験

①エストロゲン類濃度とエストロゲン様活性の関係

図-48 に E1 由来理論活性値と E2 由来理論活性値の和と、エストロゲン様活性値を示す。どの試験区もエストロゲン様活性値と、E1、E2 由来理論活性値の和が同程度であることから、エストロゲン様活性は、ほぼ E1 と E2 によるものであると考えられた。冬季曝露試験時には、コンポジットサンプリングを行い、水質変動を平均化して測定を行ったが、無酸素条件でも最大 16.9ng-E2/L 程度にしかエストロゲン様活性が上昇せず、試験期間中の平均値も 7.0ng-E2/L と夏季よりも低くかった。一方、二次処理水では最大で 12.9ng-E2/L、平均で 3.5ng-E2/L と夏季よりも高かった。硝化抑制型運転時でエストロゲン様活性が高くなることが予想されたにも関わらず、活性が低かった原因として、メダカ曝露試験装置内での滞留時間が長く、装置内の水温制御部で生物処理が進んでしまったことが考えられた。試験終了後に簡易測定（パックテスト）で、無酸素条件水の曝露に用いた装置内の NO_3-N 濃度を確認したところ、装置流入直後は低濃度だが、水温制御部、メダカ曝露水槽内と進むにつれて高濃度になっていた。冬季試験時は、いずれの処理水も沈殿池を通したものを用いたため、装置内にはそれほど多くの汚泥は溜まっていなかったが、加温していたことと、流入処理水量が少なく装置内の滞留時間が長かったことが原因で、装置内に付着した生物膜による硝化反応やエストロゲン類の取り込みなどが進んだと考えられる。

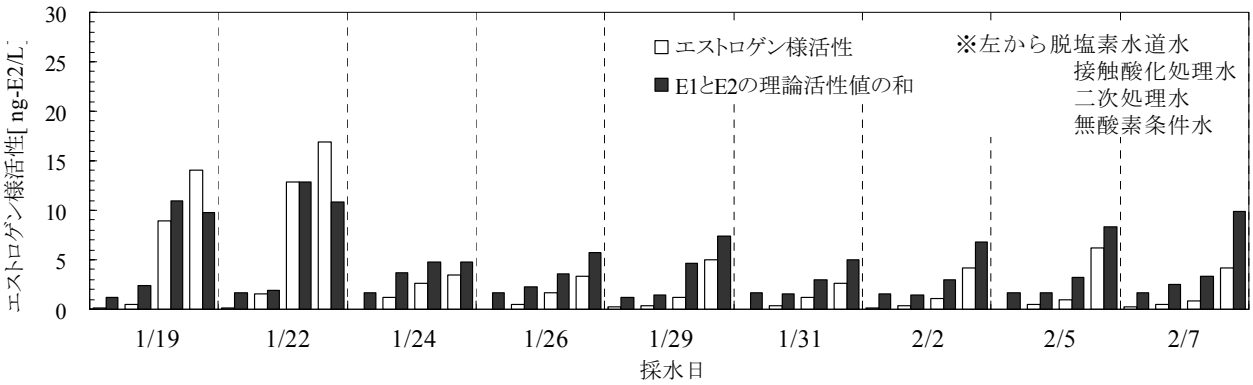


図-48 エストロゲン様活性値と E1･E2 由来理論活性値（冬季試験）

②エストロゲン類濃度と VTG 濃度･エストロゲン応答遺伝子発現量の関係

曝露 7、14、21 日後の各曝露区での平均 VTG 濃度と、解剖前 1 週間の平均濃度の関係を図-49 に示す。なお、雄メダカの肝臓中 VTG 濃度を上昇させる E1 濃度は E2 の 0.22 倍程度である [8] ことがわかっていることから、ここでは、E1 濃度に 0.22 を乗じて E2 濃度を加えた値を、E2 換算エストロゲン濃度とした。曝露 14 日後以降のデータにおいては、3ng-E2/L 以上で VTG 濃度が上昇する傾向がみられた。また、図-50 に E1、E2 を曝露した過去の VTG 濃度測定

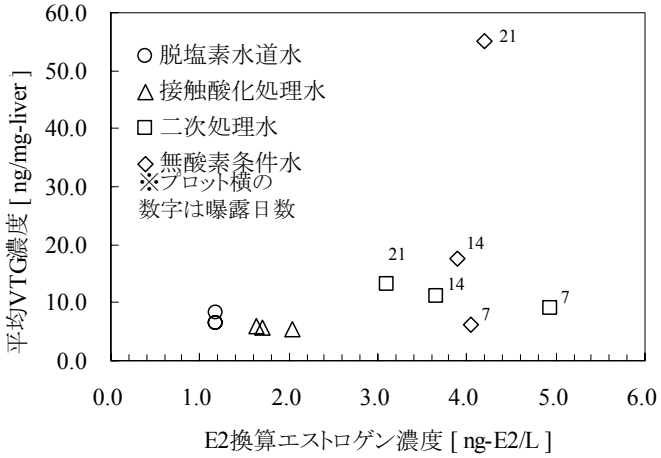


図-49 エストロゲン濃度と VTG 濃度の関係

結果と文献値（E2♂♀）[9] を、冬季試験結果と比較したものを示す。E2 を曝露した結果では、10ng/L 程度から VTG 濃度が 10ng/mg-liver を超えるが、それよりも低濃度ではほとんど上昇がみられない。ただし、雌雄同時に曝露を行うと雌魚由来のエストロゲンの影響等により、水中エストロゲン濃度が低くても、VTG 濃度が 10ng/mg-liver 程度まで上昇する。冬季試験では E2 単物質曝露時よりも低濃度のエストロゲンで VTG 濃度の上昇が生じており、E1、E2 以外のエストロゲン様物質の影響も示唆される。

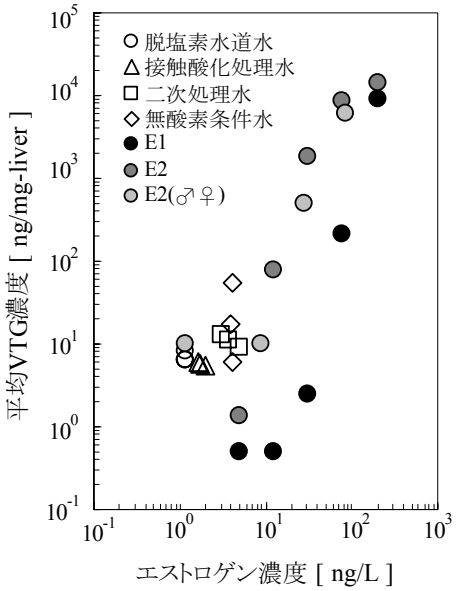


図-50 単物質曝露との比較

次に、処理水中エストロゲン濃度（解剖前の 2 日間コンポジットサンプリングして測定したもの）と曝露 7、14、21 日後の各曝露区の VTG I 遺伝子発現量の関係を図-51 に示す。脱塩素水道水曝露区よりも有意な増加がみられた、曝露 14、21 日後の二次処理水および無酸素条件水曝露区では、VTG I 遺伝子発現量が 1.6ng-E2/L 程度から上昇する傾向がみられた。この傾向は、VTG Ⅱ、CHG H、CHG H minor 遺伝子でもみられた。VTG 濃度とこれら 4 遺伝子の発現量のエストロゲンに対する感度はそれほど変わらないが、図-42、図-43 にも示したように、CHG H、CHG H minor 遺伝子は、二次処理水曝露 7 日後から遺伝子発現量の上昇がみられたことから、CHG H、CHG H minor 遺伝子の発現量は、応答性の良いエンドポイントであるといえる。

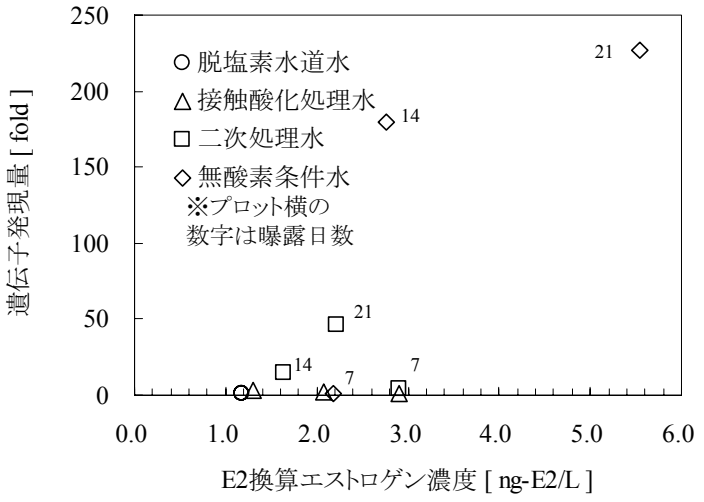


図-51 エストロゲン濃度と VTG I 遺伝子発現量の関係

なお、VTG 濃度上昇後にエストロゲンの曝露を止めると、VTG は徐々に減少していくが、冬季曝露試験時の二次処理水曝露区の平均 VTG 濃度は 2 週間もの間、減少することなくほぼ一定値であった。これらの結果は、二次処理水中に、非常に低濃度のエストロゲンしか存在しなくても、曝露された雄メダカの肝臓中で、VTG が作られ続けていたことを示唆している。

③精巣組織異常と他のエンドポイントとの関係

精巣で異常が観察された 2 個体の、肝指数、VTG 濃度、エストロゲン応答遺伝子発現量は他の個体と差はみられなかった。また、接触酸化処理水に 21 日間曝露されたメダカ 15 ペアの受精卵数は、他の試験区よりも増加しており、接触酸化処理水に曝露された他の個体では、精子形成に問題はなかったと考えられる。原因は不明であるが、接触酸化処理水の水質に関連した影響である可能性は低いと考えられた。

4-3 夏季と冬季の影響の比較

①無機態窒素濃度の影響

夏季は水温が高く硝化促進型運転を行っていたため、NH_4-NとNO$_2$-Nはほとんど検出されなかったが、冬季は水温が低く消化抑制型運転となったため、NH_4-NとNO$_2$-Nが高濃度で検出された。アンモニウムイオン（NH_4^+-N ）の毒性はそれほど高くないが、pH、水温によっては分子状アンモニア（NH_3）となり強い毒性を示す。アメリカ合衆国環境保護庁（U.S. EPA）は、水生生物への毒性を考慮したアンモニア性窒素の環境基準を設定しており、急性毒性を考慮した基準値（CMC；Criteria Maximum Concentration）はpH7.0で36.1mg-N/L、慢性毒性を考慮した基準値（CCC ; Criterion Continuous Concentration）はpH7.0、水温24℃では3.08mg-N/Lである[10]。冬期試験時の二次処理水での最高濃度24mg-N/Lは、CMCより低いがCMCよりはかなり高い濃度である。試験期間の平均でも17.9mg-N/Lであるため、何らかの悪影響を及ぼしていた可能性がある。一方、NO$_2$-N濃度の毒性は魚種により大きく異なり、サケ科の魚類では0.06mg-N/L、その他の魚類では5mg-N/Lを超えるべきではないとしている。冬季曝露試験時の無酸素条件水での最高濃度は1.3mg-N/Lと、5mg-N/L未満でありNO$_2$-Nの急性的な影響は小さいと考えられた。しかし、マウスやラットではNO_2^-から転化したNOが、コレステロールからステロイドホルモンを合成する酵素P450sccの活性を阻害することが報告されており、魚類でも内分泌系に影響を及ぼす可能性が危惧される[11]。

このように、冬季曝露試験時の無機態窒素濃度でも慢性的な影響の可能性が考えられ、内分泌系へ影響することも考えられうる。一方で、模擬生態系を作成してEE2の曝露を行い、その中のファットヘッドミノーのVTG遺伝子発現量を測定したところ、栄養塩（窒素、リン）濃度が低下するとVTG遺伝子発現量が有意に増加したという報告もある[12]。冬季曝露試験では、曝露4日目までのエストロゲン濃度が、二次処理水と無酸素条件水においてほぼ同程度であったにも関わらず、7日後のVTG濃度およびVTGⅠ、VTGⅡ、CHG H、CHG H minor、CHG L遺伝子発現量は、二次処理水でのみ増加していた。これは、この期間に無酸素条件水中で他の試験区よりもNO$_2$-Nが高濃度で存在したために、エストロゲンに対する応答に影響を与えていた可能性も考えられる。

②試験水温の影響

夏季試験時は28℃、冬季試験時は24℃で曝露試験を行ったため、両実験のVTG濃度とエストロゲン応答遺伝子発現量の値は単純には比較できない。実際に、50ng/LのE1に24℃と28℃で曝露したメダカの試験結果から、VTG濃度は7日後、14日後ともに24℃の方が高くなり、VTGⅠ、VTGⅡ、ERα、CHG H、CHG H minor、CHG L遺伝子発現量についても同様の傾向がみられることがわかっている[13]（図-52）。しかし、表-17に示すように、夏季試験時の二次処理水および無酸素条件水において、VTG濃度が有意に検出されていないにも関わらず、VTGⅠ遺伝子発現量は増加しており、その平均値は冬季よりも夏季の方が1オーダー高かった（図-53、図-54）。また、VTGⅡ遺伝子の発現量が、50ng/LのE1曝露（メダカVTG誘導においては、11ng/LのE2に相当）時よりも冬期試験時の方が低かった。VTGⅠ、VTGⅡ遺伝子発現量の挙動はE1曝露時とは異なっており、下水処理水中のエストロゲン、エストロゲン様物質の複合曝露による影響である可能性も考えられた。またVTGⅠ、VTGⅡ遺伝子の挙動は他の

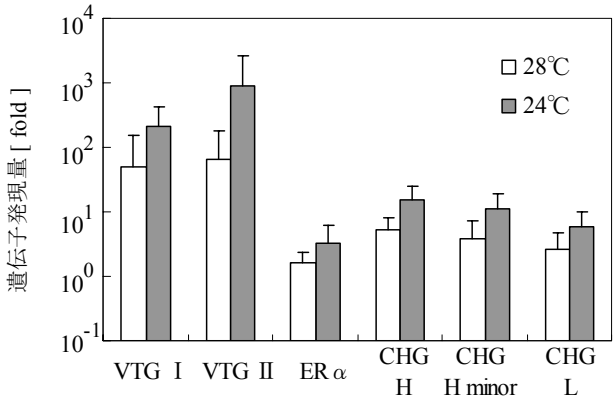


図-52 E1（50ng/L）曝露による遺伝子発現量（曝露 14 日後）

エストロゲン応答遺伝子とも異なっており、各遺伝子の感受性の差が影響していると考えられる。なお、夏季にVTG Ⅰ遺伝子が上昇しているにも関わらず、VTG濃度の上昇が観察されなかったのは、エストロゲンに曝露されてから生成されるまでに比較的時間を要するためであると考えられた。

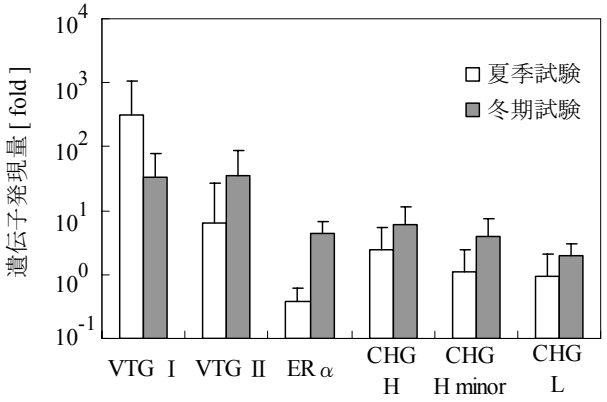


図-53 二次処理水曝露による遺伝子発現量（曝露 21 日後）

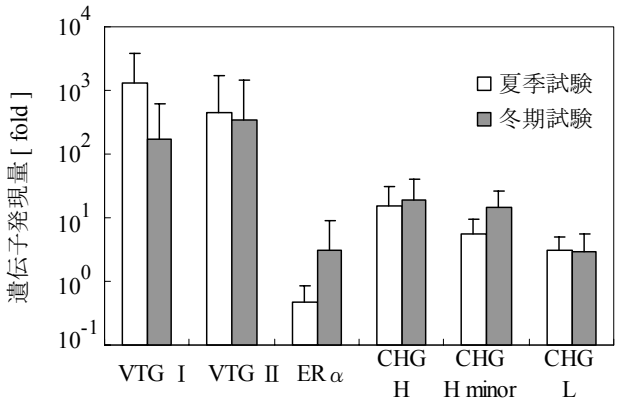


図-54 無酸素条件水曝露による遺伝子発現量（曝露 21 日後）

4-4 処理方法の違いによる影響の差

図-47、48 に示したように、通常の活性汚泥処理に接触酸化処理を加えることによりエストロゲン様活性は大きく減少することが明らかとなった。また、雄メダカの雌性化に及ぼす影響については、表-17 に示すように、夏季に肝指数の上昇、冬季に一部の個体で精巣組織異常がみられたものの、どちらも VTG 濃度、エストロゲン応答遺伝子発現量や、産卵数、受精率などと関連はなく、総合的に考えると二次処理水と比較して雌性化影響は減少すると考えられる。

一方、無酸素条件水では、二次処理水よりもエストロゲン様活性が増加し、夏季、冬季ともにエストロゲン応答遺伝子発現量の増加がみられ、冬季においては VTG 濃度の増加もみられた。今回の試験では夏季に VTG 濃度の上昇がみられなかったが、エストロゲン様活性は冬季よりも高くなる場合があったため、夏季においても雄魚の雌性化影響が現れる可能性がある。このことから、活性汚泥処理でエストロゲン除去効率が低下している場合には、夏季、冬季に関わらず、VTG 濃度の上昇等の、雄魚の雌性化影響が現れる可能性が示された。

表-17 夏季試験と冬期試験の各エンドポイントの比較

エンドポイント		夏季試験			冬季試験								
		接触酸化処理水	二次処理水	無酸素条件水	接触酸化処理水			二次処理水			無酸素条件水		
					day7	day14	day21	day7	day14	day21	day7	day14	day21
遺伝子発現量	VTG Ⅰ	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑	↑
	VTG Ⅱ	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	↑	↑
	ERα	n.s.	↓	↓	n.s.	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↓	n.s.
	CHG H	n.s.	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	↑	↑	↑	n.s.	↑	↑
	CHG H minor	↓	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑	n.s.	n.s.	↑	↑
	CHG L	↓	n.s.	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VTG濃度		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	↑
肝指数	雄	↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑	n.s.	↑
	雌	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	↑
精巣組織観察		-	-	-	-	-	↑	-	-	n.s.	-	-	n.s.

↑ ：脱塩素水道水曝露の個体と比べて有意に増加
↓ ：脱塩素水道水曝露の個体と比べて有意に低下
n.s. ：脱塩素水道水曝露の個体と比べて有意差なし

5 まとめ

本研究において以下のことが明らかとなった。

・VTG 濃度は E2 換算エストロゲン濃度が 3ng-E2/L 程度から上昇がみられた。この濃度はエストロゲン（E1、E2）の単物質曝露時よりも低濃度での影響であることから、下水処理水にはこれら以外のエストロゲン様物質が含まれている可能性が考えられた。

・エストロゲン応答遺伝子の発現量は 3ng-E2/L 以下でも上昇がみられ、CHG H、CHG H minor 遺伝子では VTG タンパクよりも早期に上昇がみられたことから、エストロゲン応答遺伝子の発現量は VTG 濃度よりも高感度のエンドポイントであると考えられた。

・二次処理後に接触酸化処理を行うことで、エストロゲン様活性、雄メダカの雌性化影響が減少したことから、接触酸化処理は硝化の促進だけではなく、魚類影響の低減にも有効であることが明らかとなった。

・活性汚泥処理でエストロゲン除去効率が低い場合、エストロゲン様活性および魚類の雌性化影響が上昇することが示された。

参考文献

1）岡安祐司, 小森行也, 鈴木穣,（2007）活性汚泥処理における嫌気条件下のエストロゲンの挙動について, 第 41 回日本水環境学会年会講演集, p464

2）田中宏明, 小森行也, 玉本博之, 東谷忠他,（2003）都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究, 下水道関係調査研究年次報告書集 概要集, p41

3）矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明,（1999）組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, 36, pp199-208

4）永野麻奈美,（2006）リアルタイム定量 PCR の原理,「DNA チップとリアルタイム PCR」(野島博 編), 講談社, pp157-166

5）Jorge Laborda,（1991）36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein P0., Nucl. Acids. Res., 19（14）, p3998

6）中田典秀, 東谷忠, 宮島潔, 小森行也, 鈴木穣,（2006）下水および河川水試料に含まれるエストロゲン様物質の検索手法の検討, 環境化学, 16（3）, pp389-401

7）山口明美, 高良真也, 有園幸司, 冨永信明,（2005）低濃度 E2 曝露によるメダカエストロゲン応答遺伝子の発現変動, 第 8 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会要旨集, p22

8）鈴木穣, 小森行也, 宮島潔, 東谷忠, 中田典秀, 八十島誠,（2006）都市排水に含まれるエストロゲン様物質が魚類に及ぼす影響と指標化に関する研究, 平成 17 年度下水道関係調査研究年次報告書集, pp254-322

9）Masanori Seki, Saori Fujishima, Toshiki Nozaka, Masanobu Maeda, Kunio Kobayashi,（2006）Comparison of response to 17β-estradiol and 17β-trenbolone among three small fish species., Environ. Toxicol. Chem., 25（10）, pp2742-2752

10）U.S. EPA,（1999）1999 Update of ambient water quality criteria for ammonia（EPA-822-R-99-014）Office of water, Washington, D.C.

11）Frank B. Jensen,（2003）Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals., Comp. Biochem. Physiol. A, 135, pp9-24

12）Denise A. Gordon, Gregory P. Toth, David W. Graham, James M. Lazorchak, Tirumuru V. Reddy, Charles W. Knapp, Frank deNoyelles Jr., Scott Campbell, David L. Lattier,（2006）Effects of eutrophication on vitellogenin gene expression in male fathead minnow（*Pimephales promelas*） exposed to 17α-ethynylestradiol in field mesocosms., Environ. Pollut., 142（3）, pp559-566
13）澤井淳, 北村友一, 鈴木穣,（2006）雄メダカのビテロゲニン誘導に及ぼす水温も影響, 第 9 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会要旨集, p45

下水道整備における土質・地盤に関する研究

土質チーム　上席研究員　小橋　秀俊
研　究　員　桝谷　有吾
研　究　員　吉田　直人
交流研究員　石原　寛隆

1　概要

道路の沈下・陥没は地盤中に形成された空洞・ゆるみが進展し、地表面に届く現象である。空洞・ゆるみの発生原因としては土留め矢板裏の空洞や矢板引抜きによって発生する空洞・ゆるみ、締固め不足等の工事に起因するものと、埋設管の破損部への土砂が流入等の地中埋設物に起因するものがある。地盤の空洞・ゆるみに対する有効な補修方法としては、再掘削・埋戻しがある。しかし埋戻しの際に十分な締固めを行われなければ、再び地盤の空洞・ゆるみが発生する恐れがある。そこで本研究では、締固めが不要な埋戻し材である流動化処理土を用いた下水管渠の埋戻しを、地盤の空洞・ゆるみに対する有効な補修方法として検討した。

2　簡易的な流動化処理土の品質管理

流動化処理土の性状は目視等ではその性状を判断することは難しく、品質の判定はブリージング試験や一軸圧縮試験結果よりなされていた。しかしこれらの試験は結果を得るのに数時間や数日かかる。そこで、簡易的な流動化処理土の品質確認方法について検討した。

2．1 実験方法

実験を行うにあたり、配合設計を行い流動化処理土の原土と水の基本重量比を 3:1 とした。現地での練混ぜ時の計量誤差や含水比の影響を考慮し原土量のみ基本重量±20%の範囲で増減させた流動化処理土を作製した。原土は表 2.1 に示す建設発生土で細粒分まじり砂（S-F）を用い、セメント（高炉 B）添加量も計量誤差を考慮し 60kg/m^3 と 70kg/m^3 とした。実験 case を表 2.2 に示す。流動化処理土の 1case 当りの作製量は 10 リットル程度とし、土と水を容器に入れ 10 分程度攪拌して作製した泥水にセメントを加え、さらに 10 分程度攪拌することにより作製した。

表2.1 流動化処理土の原土の物性

礫分 %	砂分 %	シルト分 %	粘土分 %	土粒子密度 g/cm^3
2.8	86.0	6.0	5.0	2.716

表2.2 実験case

case	比率		セメント添加量 (kg/m^3)
	原土(kg)	水(kg)	
1	2.4	1.0	60
2	2.7		
3	3.0		
4	3.3		
5	3.6		
6	2.4	1.0	70
7	2.7		
8	3.0		
9	3.3		
10	3.6		

製造した流動化処理土は流動化処理土利用技術マニュアル[1]（以下、「マニュアル」という。）で要求品質に試験項目とされる密度・フロー値・ブリージング率・一軸圧縮強度を把握するとともに、粘度管理を導入した品質管理方法について検討した。表 2.3 にマニュアルに示される要求品質を示す。粘度の測定には現場でも用いやすいようハンディタイプの粘度計を用いた。

表2.3 マニュアルの要求品質

密度	1.5 g/cm^{3}以上
フロー値	160.0 mm以上
ﾌﾞﾘｰｼﾞﾝｸﾞ率	3.0 %以下 注
一軸圧縮強度	127.0 kN/m^{2}以上
	490.0 kN/m^{2}以下

注:埋設管埋戻し時

2．2 実験結果

図 2.1 にブリージング率と密度の関係を示す。ブリージングと密度には負の相関関係が見られた。セメント添加量 60kg/m^3 の流動化処理土は、密度 1.536～1.645g/cm^3 となり全て

基準を満足し、セメント添加量 70kg/m^3 では密度が 1.535g/cm^3 以上であれば基準を満足する結果となった。

図 2.2 にフロー値，一軸圧縮強度（σ28）と密度の関係を示す。今回実施した実験 case では、フロー値と一軸圧縮強度（σ28）では、全 case で基準を満たす結果となったが、回帰曲線から基準を満たす密度の上限値を推定すると、セメント添加量 60kg/m^3 では密度が 1.673g/cm^3 を超えるとフロー値の基準を満足出来なくなり、セメント添加量 70kg/cm^3 では密度が 1.669g/cm^3 を超えると一軸圧縮強度の基準を満足出来なくなると考えられる。

以上の結果から、流動化処理土の密度がある一定の範囲に収まれば、マニュアルの要求品質項目であるブリージング率とフロー値、一軸圧縮強度を満足できると考えられる。本実験においてセメント添加量 60kg/m^3 のケースで 1.536～1.673g/cm^3 、70kg/m^3 のケースで、1.535～1.669g/cm^3 であると考えられる。

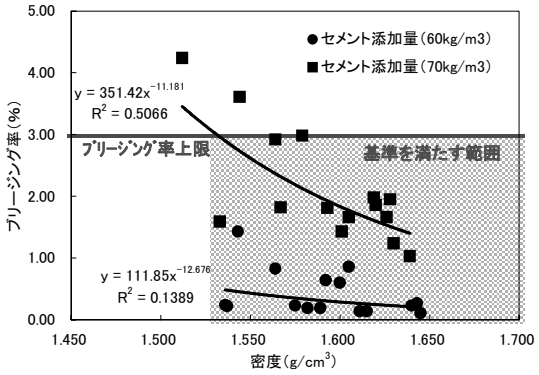


図2.1 ブリージング率と密度の関係

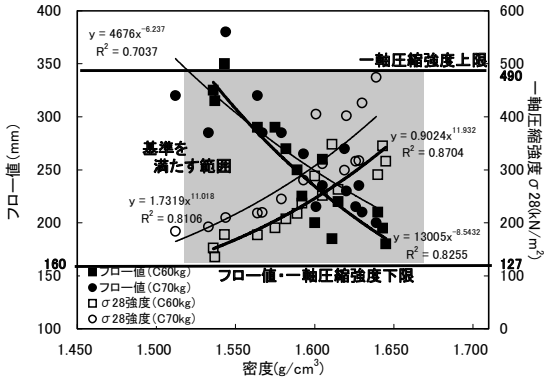


図2.2 フロー値・一軸圧縮強度と密度の関係

次に図 2.3 に密度と粘度の関係を示す。相関係数は、セメント添加量 60kg/m^3 で 0.735、セメント添加量 70kg/m^3 で 0.863 を示し、密度と粘度の間には相関関係があることが確認された。そこで、粘度から密度を推定することにより、流動化処理土の品質管理を行うこととした。図 2.1, 2.2 の結果から求めた要求品質を満たす密度の範囲から、回帰曲線で粘度の管理幅を推定した。その結果、本実験で用いた土は、粘度がセメント添加量 60kg/m^3 では 6.54～21.8Pa・s、セメント添加量 70kg/m^3 では 5.62～11.4Pa・s の範囲に収まれば、マニュアルに示す要求品質を満たすことができるといえる。

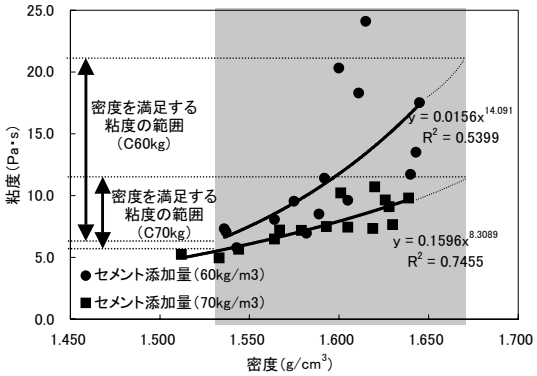


図2.3 粘度と密度の関係

3　不同沈下発生装置を用いた下水管渠のひずみ測定実験

流動化処理土での下水管渠の埋戻しは、従来工法である山砂や改良土、現地発生土での埋戻しとは異なり、下水管渠への浮力が発生する。そこで、本実験では従来埋戻し材として用いられてきた山砂・改良土と流動化処理土が埋戻し過程で下水管に与える影響について、模型実験を行い検討した。また、埋戻し完了後、周辺地盤にゆるみが発生した時の下水管渠への影響について把握する模型実験も重ねて行い、流動化処理土が下水管渠へ与える影響について把握した。

3．1 実験方法

不同沈下発生装置（幅 10m, 奥行き 1m, 高さ 5m）内に幅 1m、奥行き 1m、土被り 1.5m の下水管渠埋戻し模型を作成した。下水管渠（VUΦ250，L=1.0m）は木製プ



図3.1 埋戻しモデル

レート及びワイヤーを用い所定の位置に固定し、壁面との境界にはコーキング材を用いて流動化処理土が管内部に侵入すること防いだ。図 3.1 に作成した実験のモデルを示す。埋戻し材には流動化処理土・山砂・改良土の 3 種類を用い、埋戻し・養生等を行った後、沈下板を埋戻し底面の右半分のみ埋戻し材が追随しなくなるまで沈下させ、埋戻し材の違いによる下水管渠への影響を把握した。表 3.1 に実験 case を示す。埋戻しに使用した流動化処理土の配合は土と水の重量比を 3:1 とし、セメント（高炉 B）添加量は 70kg/m³ とした。表 3.2 に流動化処理土の品質を、表 3.3 に山砂および改良土の物性を示す。なお、山砂・改良土は 1 層あたり 10cm ずつ締固めながら埋戻しを行った。また、管にはひずみゲージを管内面に 1 断面あたり均等間隔に 12 個設置した。ひずみゲージの設置位置を図 3.2 に示す。

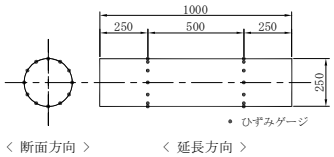


図3. 2 ひずみゲージ設置位置

表3.1 実験case

case	埋戻し材	材齢	締固め度	摘 要
1	流動化処理土	2日	－	－
2	流動化処理土	3日	－	－
3	流動化処理土	7日	－	－
4	山砂	2日	90%	－
5	山砂	1日	82%	－
6	改良土	2日	80%	粒径30mm以下
7	改良土	2日	80%	粒径10mm以下

表3.2 流動化処理土の試験結果

密度	1.531 g/cm³
フロー値	330 mm
ﾌﾞﾘｰｼﾞﾝｸﾞ率	2.27 %
打設時温度	14.3 ℃
粘度	5.74 Pa･s
Pロート	13.16 s

表3.3 山砂･改良土の含水比･物性

	最適含水比 %	最大乾燥密度 g/cm³	埋戻時含水比 %	摘要
case4	17.0	1.737	18.7	山砂
case5			20.0	
case6	63.3	0.944	64.2	改良土
case7			65.6	

山砂の物性				
礫分 %	砂分 %	シルト分 %	粘土分 %	土粒子の密度 g/cm³
1.2	87.0	9.0	3.0	2.689

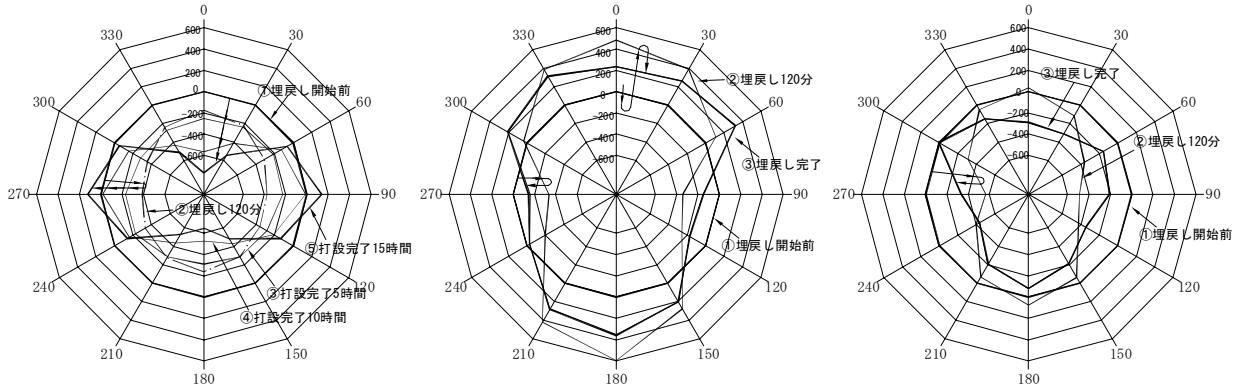
改良土の物性(生石灰5%添加)				
礫分 %	砂分 %	シルト分 %	粘土分 %	土粒子の密度 g/cm³
0.0	27.0	38.0	35.0	2.689

３．２ 実験結果

埋戻し時の下水管渠のひずみを図 3.3 に示す。流動化処理土によって埋戻された管渠は、埋戻し開始後管全体が圧縮側にひずんだ後、時間の経過とともに管頂と管底はひずみ量が大きくなり、管側はひずみ量が小さくなり眼鏡型となった。これは流動化処理土の影響により作用する浮力・液圧によって管全体がひずみ、流動化処理土の硬化とともに浮力・液圧が弱まってくるため眼鏡型に移行していくと考えられる。眼鏡型のひずみに移行する時点で浮力の作用が弱まってくると仮定すると、浮力の持続時間としては、打設完了後 5 時間以内であると考えられる。山砂・改良土の場合は、埋戻し開始後管側が圧縮側にひずみ、埋戻し完了時には管頂部が圧縮側にひずんだ。土被りが増加するに従い、管頂にかかる圧力が増大していくため、管頂が押しつぶされたようなひずみが発生したと考えられる。また山砂・改良土は流動化処理土に比べると硬化作用が限りなく小さいため、埋戻し完了後のひずみの増減はほとんど無かった。

図 3.4 に不同沈下発生装置作動時の下水管渠のひずみを、表 3.4 に実験終了後の天端沈下量を示す。流動化処理土での埋戻しでは、case1 は、case2,3 と比較して大きなひずみが発生しており、流動化処理土の強度不足と判断できる。また、case2,3 の差が少ない為、養生期間が 3 日から 7 日の間では流動化処理土の耐ゆるみ性に大差はないと言える。Case6,7 の改良土では同じ締固め度であるにもかかわらずひずみの大きさに違いがあり、埋戻し土の粒径もゆるみに寄与する可能性があると考えられる（case5 は粒径 30mm 以下、case6 は 10mm 以下）。また、case4,5 の山砂は締固め度が 90%の場合(case4)は全 case 中で、最もひずみが小さかったが、締固め度が 82%だった場合(case5)は管渠のひずみは他 case と比べて 10～1000 倍大きくなった。case5 は沈下板に追随して沈下した埋戻し土量が他 case に比べて多く、管に大きな圧力がかかったためと考えられる。管渠は管頂・管底が圧縮側に、管側が引っ張り側にひずみ、流動化処理土の硬化時と同様の眼鏡型のひずみ分布を示した。

また、管渠はゆるみの発生する方向に変形する傾向がみられた。ゆえに、地盤にゆるみが発生することに



流動化処理土　　山砂　　改良土

図 3.3　埋戻し時の下水管のひずみ （内ひずみ,μm）

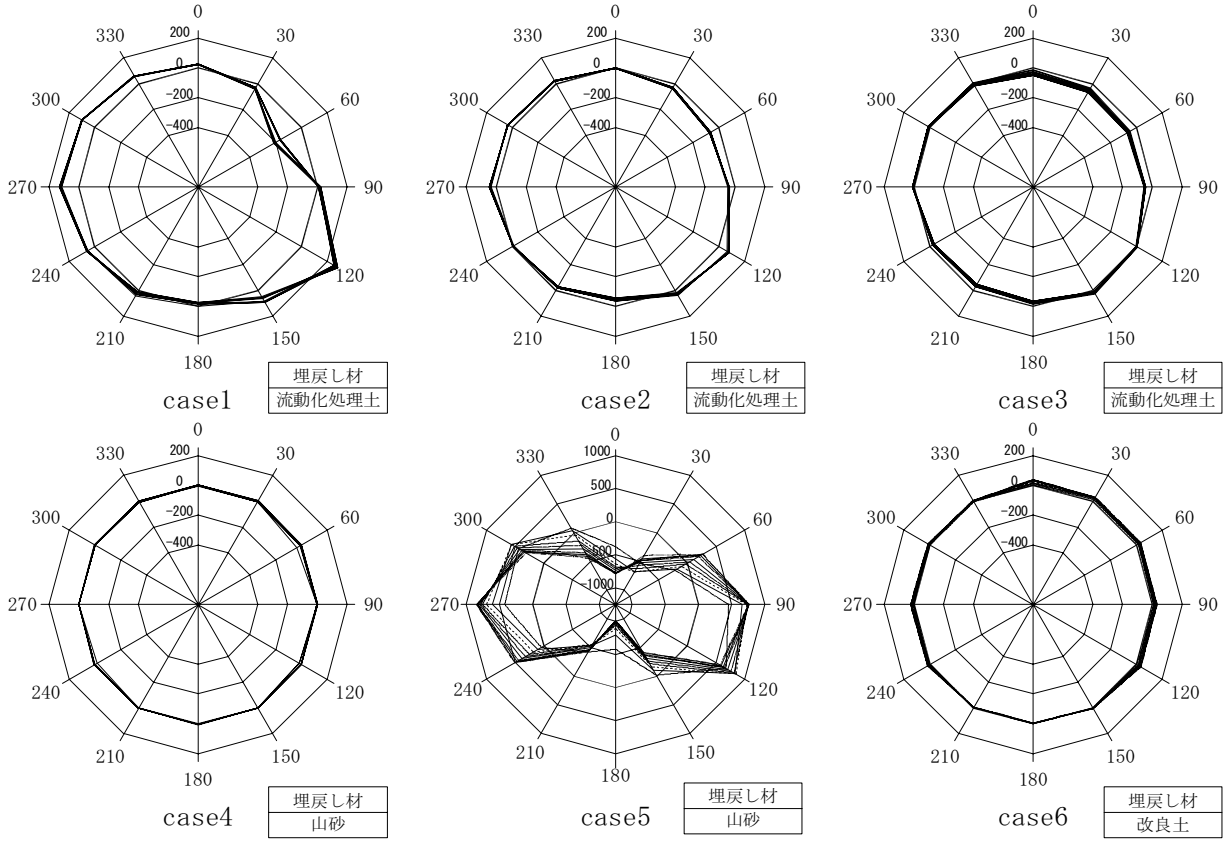
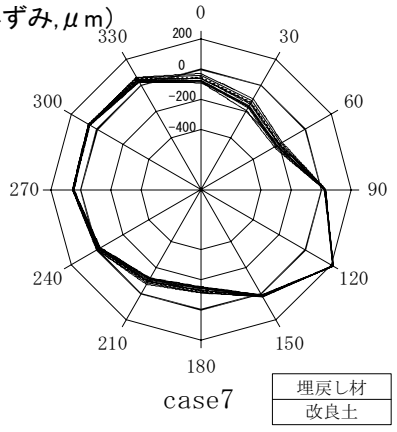


図 3.4　不同沈下発生装置作動時の下水管のひずみ （内ひずみ,μm）

表3.4　天端沈下量

Case	埋戻し材料	強度	平均沈下量	最大沈下量	最小沈下量
1	流動化処理土	2日強度	2.3	4.0	0.0
2	流動化処理土	3日強度	0.6	2.0	0.0
3	流動化処理土	7日強度	0.3	1.0	0.0
4	山砂	締固め度90%	0.7	2.0	0.0
5	山砂	締固め度82%	5.1	5.3	5.0
6	改良土	締固め度80%	0.8	2.0	0.0
7	改良土	締固め度80%	4.7	9.0	2.0

（単位:mm）



より、道路の沈下・陥没につながるだけでなく、管渠に局所的な力が作用することにより、管渠の力学的耐久性が損なわれる恐れがある。

以上の結果より、山砂や改良土による下水管渠の埋戻しにあたっては、十分な締固めを行うことが必要であり、90%程度の締固め度で施工を行うことが求められると考えられる。しかし、下水管渠の埋戻しは掘削幅が狭く（管径＋60cm 程度)、転圧作業が困難である。また、矢板裏面や矢板引抜き跡を締固めることは難しい。そのため現場において締固め度を 90%程度で管理することは非常に難しい。一方で流動化処理土は流動性をもつため、矢板裏面にも回り込み、矢板引抜き跡も残らない。そのうえ一定以上の強度を求めることは容易であるため、山砂や改良土に比べて高い品質を確保できるといえる。

4　流動化処理土を用いた埋戻し実験

流動化処理土は流動性・自硬性があり締固めが不要であるという特性がある一方で、強度発現には多少の時間を要する。そのため下水管渠の埋戻しの実施工にあたっては、通常の山砂や改良土での埋戻しと比べ、矢板引抜きの時期や、復旧の時期について検討しなければならない。

そこで、実際に原地盤を掘削し、流動化処理土を用いて下水管の埋戻しを行い、矢板の引抜きによる下水管渠への影響、流動化処理土の強度を計測した。

4．1 実験方法

深さ 1.85m、長さ 3.0m、掘削幅を 0.9m・0.5m の 2 ケースの埋戻し用原地盤掘削を行い、下水管（VUΦ250,L=3.0m）の埋戻しを行った。図 4.1 に埋戻しモデルを示す。また管の固定方法は、管の下方向及び横方向の固定に土嚢、上方向の固定に単管による抑えを行ったものと、上下方向の固定を単管による吊り輪で用い、横方向には杭による固定を行った 2 ケースとした。固定位置は 2 ケース共に管の両側から 0.75m 入った 2 箇所とした。また、鋼矢板の引抜き時間を打設 4 時間後、及び 1 日後の 2 ケースとして実験を行った。実験ケースを表 4.1 に示す。埋戻しに使用した流動化処理土の配合は原土と水の重量比を 3:1 とし、セメント（高炉 B）の添加量は 70kg/m³とした。使用した流動化処理土の試験結果を表 4.2 に示す。また管にはひずみゲージを管外面に 1 断面あたり 12 個取り付けてあり、ひずみゲージの設置位置を図 4.2 に示す。また流動化処理土の強度発現特性把握のため、平板載荷試験を行った。

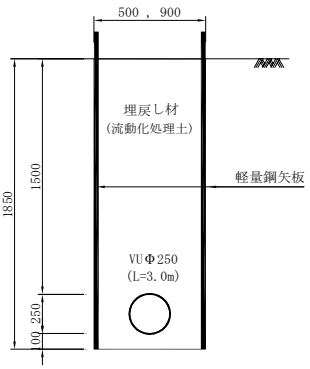


図4.1 埋戻しモデル

表4.1 実験case

case	掘削寸法 (B×H×L)	固定方法	矢板引抜	摘　要
1	0.9×1.85×3.0	1	1日後	－
2	0.9×1.85×3.0	2	4時間後	強度試験
3	0.5×1.85×3.0	2	4時間後	強度試験
4	0.5×1.85×3.0	1	1日後	－

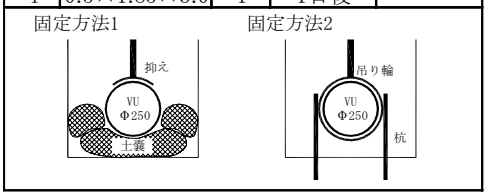


表4.2 流動化処理土の試験結果

密度	1.555 g/cm³
フロー値	350 mm
ﾌﾞﾘｰｼﾞﾝｸﾞ率	3.83 %
打設時温度	13.3 ℃
粘度	2.96 Pa･s
Pロート	12.05 s

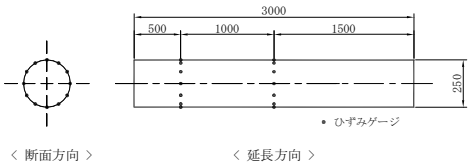


図4.2 ひずみゲージ設置位置

4．2 実験結果

流動化処理土を打設してから 4 時間後と翌日に矢板を引き抜き、下水管渠に与える影響について検討した。矢板引抜き時の下水管渠のひずみを図 4.3 に示す。その結果流動化処理土打設の翌日に矢板を引き抜いた

case1 では引抜き前に比べて管頂・管底で圧縮側に、管側で引っ張り側にひずんだが、その他の case では矢板の引抜きに伴い下水管渠のひずみは小さかった。以上の結果より、現地盤に問題がなければ打設完了後 4 時間程度で矢板を抜いても下水管渠への影響はほとんどないことがわかった。

平板載荷試験の結果を図 4.4 に示す。掘削幅を変えた case2,3 では打設から 3 日目までは地盤耐力に大きな差はなかったが、それ以降は掘削幅が大きい case2 のほうが大きな地盤耐力を示した。また平板載荷試験の結果より換算した CBR 値を表 4.3 に示す。case2,3 ともに打設から 7 日後には CBR 値は 10%を超えた。日本道路公団では高速道路の路床として、上部は修正 CBR10%以上、下部は 5%以上を求めている。本実験においては打設後 7 日以内に路床として十分な強度が得られたと考えられる。

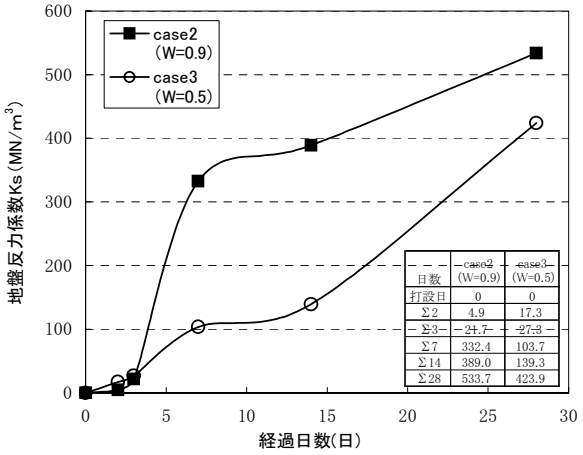


図4.4 平板載荷試験結果

表4.3 平板載荷試験結果の換算CBR値

打設からの経過日数	case2		case3	
	地盤反力係数 K_{30}	現場CBR (K_{75})	地盤反力係数 K_{30}	現場CBR (K_{75})
打設日	0.0	−	0.0	−
σ 2	4.9	−	17.3	−
σ 3	21.7	0.0	27.3	1.1
σ 7	332.4	57.7	103.7	15.2
σ 14	389.0	68.2	139.3	21.8
σ 28	533.7	95.0	423.9	74.6

5 まとめ

本実験の結果以下の結論を得た。

①粘度管理により簡易に流動化処理土の品質管理を行うことができる。

②下水管渠周辺でゆるみが生じた場合、管渠はゆるみ方向に変形する傾向がみられた。

③締固め度 80%程度の埋戻しでは、地盤にゆるみが生じた場合下水管渠に局所的な力が働き、管渠の力学的耐久性が損なわれる恐れがある。しかしながら現場において締固め度 90%で管理することは大変困難であるため、流動化処理土による下水管渠埋戻しは有効な工法である。

④流動化処理土打設後 4 時間程度で矢板を引抜いても、下水管渠へ与える影響は小さいことがわかった。

⑤本実験では流動化処理土は 7 日程度の養生で CBR 値 10%を超えた。

参考文献

1. 建設省土木研究所：流動化処理土利用技術マニュアル、 p 42、(社)日本建設業経営協会中央技術研究所、1997

下水道整備における土質・地盤に関する研究業務

（１）下水道施設の耐震診断技術・耐震対策技術の開発に関する試験調査

(独)土木研究所　耐震研究グループ(振動)　上席研究員　杉田　秀樹
主任研究員　佐々木哲也
研　究　員　水橋　正典

１．はじめに

2003 年十勝沖地震や 2004 年新潟県中越地震では、埋戻し土の液状化による下水道管路やマンホールの浮上がり、路面沈下等の被害が多発した。下水道管路施設が上記のような被害を受けた場合、下水道の使用が不可能になるほか､道路交通機能にも支障をきたし､汚水の漏洩による水質の悪化等の２次的な被害が生じる恐れがある。最近の地震による下水道施設の被害をふまえ、下水道施設の「地震対策の現状と既存施設の地震対策への提言」[1)]がまとめられる等、下水道施設の耐震性の向上が求められてきており、これを踏まえて、「下水道施設の耐震対策指針と解説」[2)]、「下水道地震対策マニュアル」[3)]の改訂が行われたところである。

管路施設の被害の主な要因は周辺地盤および埋戻し部の液状化であり、その発生には周辺の地形条件、地盤条件が強く影響していることが分かっている。この関係を定量的に把握することによって、下水道管路施設の被害想定や、対策区間の合理的な選定が可能となるものと考えられる。そこで 18 年度は、過去の下水道被害事例をもとに、微地形分類に基づく下水道管路施設の被害予測手法について検討した。

２．管路施設の被害予測手法に関する検討

２．１　微地形区分と下水道管路施設の被害率の関係

図１～２に新潟県中越地震における長岡市と小千谷市における被害路線を土地条件図上にプロットしたものを示す。また、**図３～４**に当該箇所における微地形分類毎の管路延長、被害管路延長、被災率をプロットした図を示す。これより、緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等においても多数の被害が生じていることが分かる。これらの地形においては、一般に周辺地盤の液状化の可能性は高くはないが、埋戻し土の液状化により下水道管路が被害を受けた可能性が考えられる。

下水道管路施設の液状化被害の可能性を評価するための１次スクリーニングとして、微地形区分に基づく下水道管路施設の液状化被害の可能性の簡易判定基準について検討している。**表１**に微地形区分に基づく周辺地盤および埋戻し土の液状化の可能性の判定基準を示す。これは、文献 4)，5)による「微地形区分に基づく液状化被害の可能性の判定基準」を元に、周辺地盤に液状化が生じなくても埋戻し部の液状化による被害の可能性の高い緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等の地形区分についての判定基準に修正を加えたものである。この表により、下水道管路施設の周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性を概略推定することが可能となる。ただし、下水道管路施設の周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性を**表１**により概略推定することが可能であるが、震前の被害想定に用いる場合には、地震動の強さと被災率の関係について明らかにする必要がある。

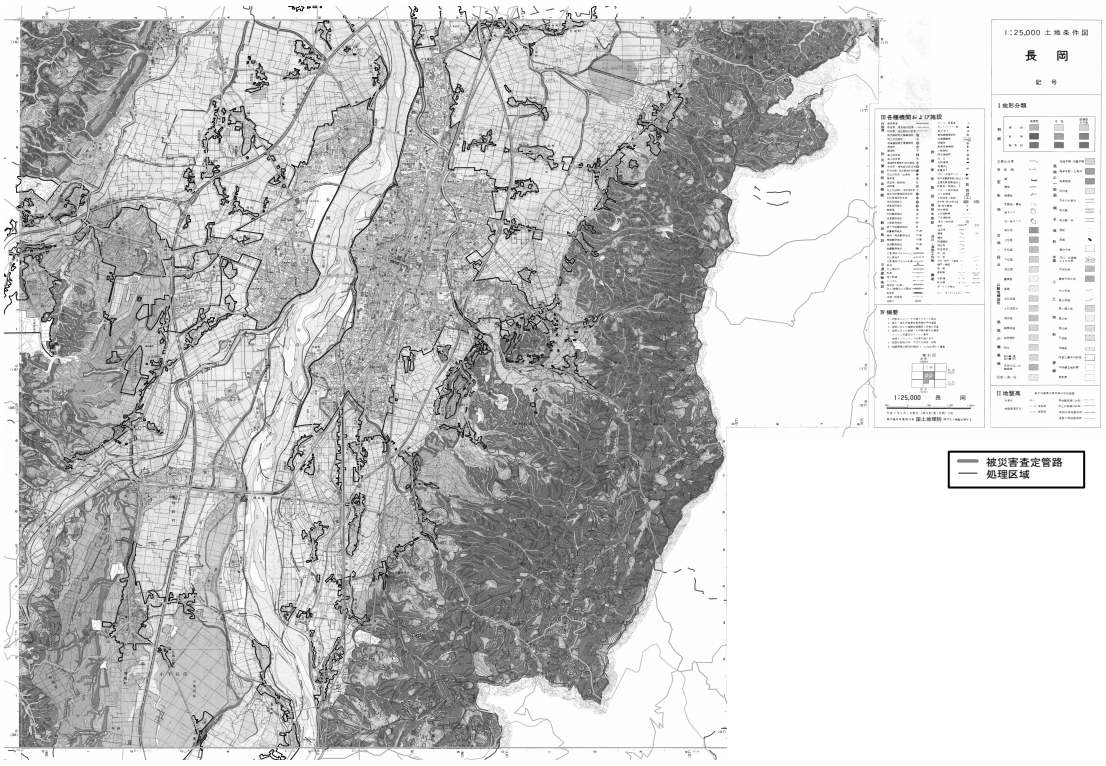


図１　新潟県中越地震による被害路線（長岡市）



図２　新潟県中越地震による被害路線（小千谷市）

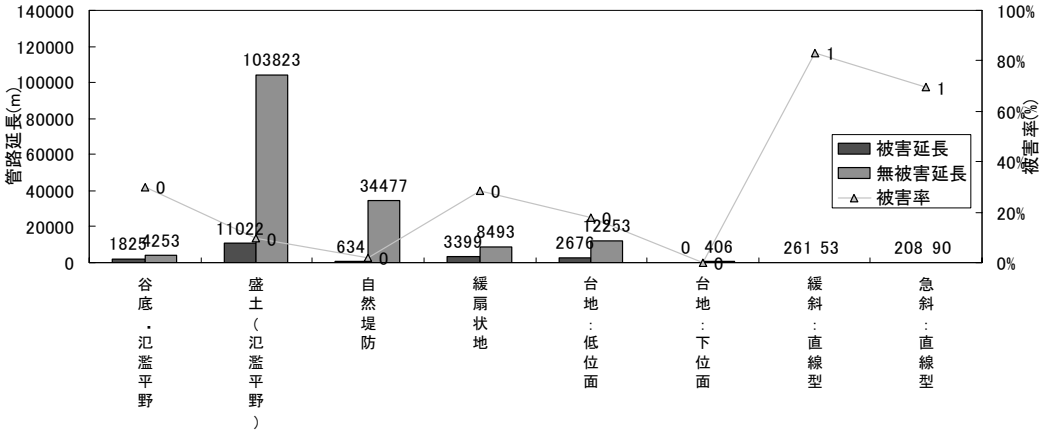


図３　新潟県中越地震による長岡市における微地形区分毎の管路被災率

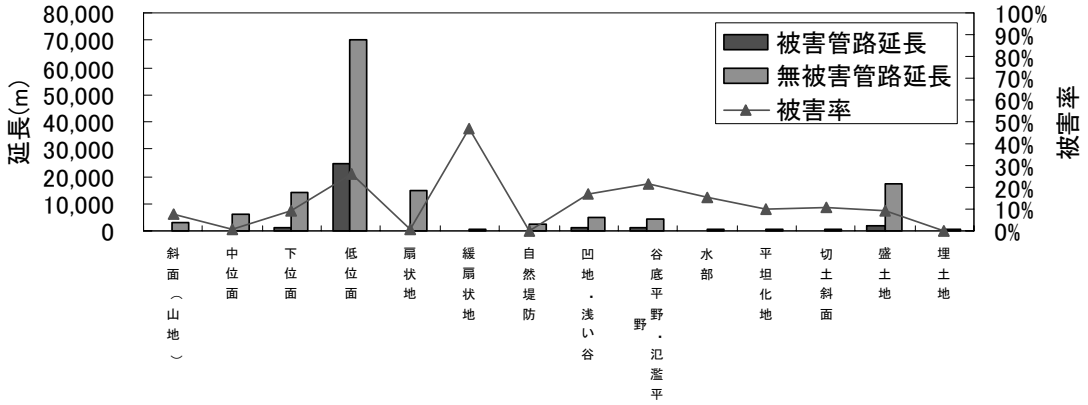


図４　新潟県中越地震による小千谷市における微地形区分毎の管路被災率

表１　微地形分類に基づく周辺地盤および埋戻し土の液状化による被害の可能性の判定基準

微地形		液状化被害の可能性	被害地震
区分	細区分		
谷底平野	扇状地型谷底平野	小	－
	デルタ型谷底平野	中	新潟県中越地震
扇状地	急勾配扇状地・沖積錐	小	－
	緩勾配扇状地*	中～大	新潟県中越地震
自然堤防	自然堤防	中	新潟県中越地震
	比高の小さい自然堤防 自然堤防周辺部	大	新潟地震、新潟県中越地震
ポイントバー（蛇行州）	－	大	－
後背湿地*	－	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、新潟県中越地震
旧河道	新しい（明瞭な）旧河道	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
	古い（不明瞭な）旧河道	中～大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
旧池沼	－	大	日本海中部地震、鳥取県西部地震
湿地*	－	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震、十勝沖地震
河原	砂礫質の河原	小	－
	砂泥質の河原	大	－
デルタ（三角州）	－	中	－
砂州	砂州	中	－
	砂礫州	小	－
砂丘	砂丘	小	－
	砂丘末端緩斜面	大	新潟地震、日本海中部地震
海浜	海浜	小	－
	人工海浜	大	兵庫県南部地震、鳥取県西部地震
砂丘間低地・堤間低地	－	大	日本海中部地震
干拓地	－	中	日本海中部地震
埋立地	－	大	兵庫県南部地震、鳥取県西部地震
湧水地点（帯）	－	大	－
盛土地	砂丘と低地の境界付近の盛土地	大	新潟県中越地震
	崖・急斜面に隣接した盛土地	大	新潟県中越地震
	谷底平野上の盛土地	大	－
	低湿地上の盛土地	大	釧路沖地震、北海道東方沖地震
	干拓地上の盛土地	大	日本海中部地震
	その他の盛土地	元の地形に準ずる	－
台地・段丘	上位面	小	－
	中位面	小	－
	下位面	小	－
	低位面*	中～大	新潟県中越地震

２．２　微地形区分と計測震度に基づく管路施設の被害予測手法の検討

ここでは、過去に下水道管路施設の被害が生じた地震のうち、日本海中部地震における能代市、新潟県中越地震における長岡市と小千谷市の事例を対象に、地震動強さと微地形区分毎の被災率の関係を検討し、下水道管路施設の被害予測手法の検討を行った。被害予測に用いる地震動強さを示すパラメータとしては、計測震度、地表面、最大加速度、最大速度、SI 値等の適用が考えられるが、ここでは簡便性を優先して計測震度を用いることとした。なお、日本海中部地震における能代市の計測震度は明らかになっていないため、ここでは 5.5 と仮定した。

図 5 に計測震度と微地形区分毎の下水道管路施設の被災率の関係を示す。図中には、文献 6)の検討結果を参考に計測震度と被害率の関係が次式で表されると仮定した、微地形区分毎の被害関数を示している。

$$y = a\exp(-1.5808x)$$

ここに、*y*:管路の被災率(%)、*x*:計測震度、*a*:フィッティングパラメータ。

これにより、微地形区分毎の被害関数を用いることにより、計測震度と微地形区分に基づき下水道管路施設の被害率を予測することが可能になる。今後は事例を追加し、微地形区分と計測震度に基づく被害予測手法を提案する予定である。

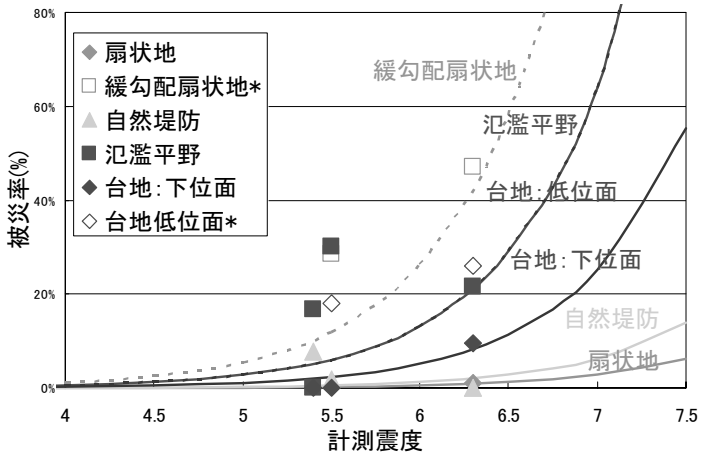


図 5　計測震度と微地形区分毎の下水道管路施設の被災率の関係

３．まとめ

過去の地震被害を分析することにより、微地形区分に基づく下水道管路施設の被害予測手法を検討した。検討結果をまとめると以下のとおりである。

①新潟県中越地震による長岡市、小千谷市の管路施設の被害事例分析により、緩勾配扇状地、湿地、後背湿地、台地･段丘低位面等の地形において、管路施設の被災率が高い傾向が見られた。

②計測震度と微地形区分毎の管路の被災率の関係を整理した。今後は事例を追加し、微地形区分と計測震度に基づく被害予測手法を提案する予定である。

参考文献

1)　下水道地震対策技術検討委員会：新潟県中越地震の総括と地震対策の現状を踏まえた今後の下水道地震対策のあり方、2005.

2)　(社)日本下水道協会：下水道施設の耐震対策指針と解説、1997.

3)　(社)日本下水道協会：下水道の地震対策マニュアル、1997.

4)　若松加寿江：詳細な微地形分類による地盤表層の液状化被害可能性の評価、日本建築学会大会学術講演会梗概集、B 分冊構造Ⅰ、pp.1443-1444、1992.

5)　国土庁防災局震災対策課：液状化地域ゾーニングマニュアル（平成 10 年度版）、1999.

6)　大規模地震による下水道被害想定検討委員会：大規模地震による被害想定手法及び想定結果の活用方法に関するマニュアル、2006.8.

II. その他の予算による研究

［リサイクルチーム］

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

研究予算：運営交付金（一般勘定）
研究期間：平 18～平 20
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：尾崎正明、落修一、山下洋正、
宮本綾子、牧孝憲

【要旨】
国土交通省管轄の公共事業からは、毎年定期的に大量のバイオマスが発生している。本研究は、これらを資源と位置付け、安全性を確保しつつ積極的な利用推進に繋げることを目的に、バイオマスインベントリーシステム開発のための基礎調査や微量有機汚染物質に関するヒヤリングを行うとともに、資源化技術や利用技術の開発に関する実験研究を行った。その結果、インベントリーに必要なバイオマス種毎の組成性状を明らかとした。また、雑草抑制に薬剤使用の例は無かった。開発実験からはエネルギー変換技術に関しては完成が近いと思われ、バイオガスエンジンの開発には更に基礎的な実験を重ねる必要があると思われた。
キーワード：バイオマス、公共緑地、エネルギー、ガスエンジン、微量有機汚染物質

１．はじめに

地球温暖化対策、エネルギー対策に大きく貢献することからバイオマス利用が世界的に注目され、我が国においても積極的な取り組みが期待されている。国土交通省管轄の公共事業からは毎年定期的に大量のバイオマスが発生しており、これを資源化・利用に繋げて行くことが重要であり、そのための具体の施策・技術を提供していく必要がある。

２．方　法

本研究は、目的達成のために大きく３つから構成され、それぞれ取り組み方法が異なる。一つは、バイオマスを資源管理するインベントリーシステムの開発であり、そのためのデータ収集とシステム検討を行う。二つ目はバイオマスの安全性に係わるものであり、微量有機汚染物質に関する情報収集と、必要ならば対策法について研究する。三つ目は資源化・利用技術に関するものであり、エネルギー変換技術と大量炭化技術およびバイオガスエンジンの開発を行うともに、緑化基盤用ピートモス代替開発品の現地適用評価研究を行う。

３．結　果

平成 18 年度は、主にインベントリーシステムとエネルギー変換技術およびバイオガスエンジンについて研究した。

３．１　バイオマスインベントリーシステム

国土交通省管轄の河川、道路、鉄道、空港、都市公園等における緑地管理からは定期的な除草や樹木剪定にともなうバイオマスの発生がある。さらに不定期、突発的なものとしてダム等の流木発生[1), 2)]がある。

これらを資源として位置付けるためには時期的な［物］、［質］、［量］および［場所］を明確にする必要がある。また、資源化・利用に繋げるためにはそれらを情報として公開する必要がある。さらに資源化・利用を安定、安全なものとしていくためには公共性と地域の社会構造を考慮した特別のビジネスモデルが必要である。

本研究では、これらを全て満足するために必要となる[バイオマスインベントリーシステム]を開発する。それは、発生場所から利用先までを情報管理・提供するシステムである。

3.1.1　基礎調査

バイオマスインベントリーの基礎となる発生時点までの情報構築検討のための数値を得るフィールド選定を行った。対象は北海道から九州までの国土交通省の各地方整備局管内から一級河川と国道について少なくとも１箇所以上、計２１箇所を踏査、選定した。これらのフィールドでは平成 19 年度における通常管理からの発生に基づき諸量が調べられる。

踏査では現地管理技術者へのヒヤリングを行うとともに草木を採取し、別途の分析に供した。ヒヤリング

の結果、有効利用が進展している地域や事務所があったものの大半は処分の対象となっていた。また、インベントリーシステムの重要性が示唆されるとともに早期構築を求められた。

さらに、高速自動車道と鉄道の情報整備のために、中日本高速道路株式会社中央研究所と東日本旅客鉄道株式会社 JR 東日本研究開発センターに協力を求めた。

3.1.2　微量有機汚染物質

前項の基礎調査において一級河川と国道の現地踏査を行った際に、現地管理技術者に雑草抑制剤等の使用について聞き取りを行った。

結果は、生育抑制工法を採用しているケースはあるものの、薬剤については周辺住民や発生材利用の観点から使用していないとのことであった。このために微量有機汚染物質による安全性に関しては突発事態が生じない限り特別な取り組みは必要ないと思われた。

３．２　資源化・利用技術

3.2.1　エネルギー変換技術の開発

エネルギー変換技術の開発は、独立行政法人産業技術総合研究所と月島機械株式会社ならびに三機工業株式会社との共同研究「高含水バイオマスの熱化学的エネルギー直接変換技術に関する研究」で行っているものであり、さらにその実用化を目指して、この共同研究者と独立行政法人新エネルギー・産業技術総合研究機構との間の共同研究「都市バイオマス収集システムを活用するためのエネルギー転換要素技術開発」に取り組んでいるものである。

（１）開　発

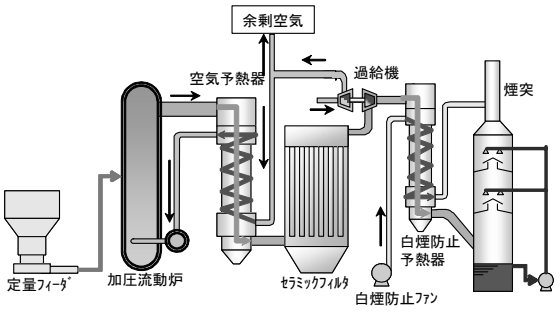
開発の基本技術は 0.2 MPa ほどの圧力下で燃焼させる加圧流動燃焼炉と、そこからの燃焼ガスをセラミックフィルターを介して過給機を稼動させ、過給機で得られる圧縮空気を燃焼炉に供給するとともに、余剰となった圧縮空気や約 500℃－1 気圧の高温燃焼ガスの有効利用が図られる[3), 4)]ものであり、そのシステムフローを**図－１**に示す。

平成 18 年度は､長万部下水道終末処理場内に約 5 t-脱水汚泥／日の能力規模のパイロットプラントの建設と試運転を行った。試運転では、システムの自立運転が達成され、実用化の可能性が高いことが示された。

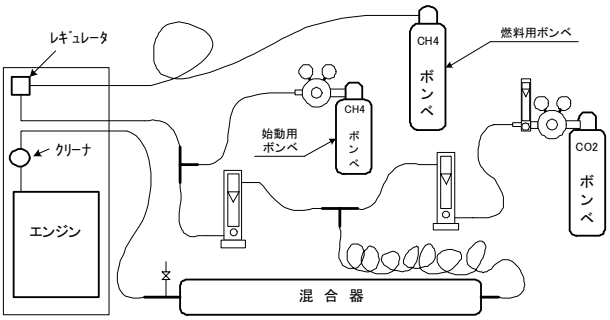
（２）バイオマス分析

エネルギー資源、無機物資源さらにプロセスの制御や開発の基礎データを整備するために各種のバイオマスを採取して、組成・性状を分析した。結果を**表－１**に示す。

エネルギー資源として高位発熱量の結果を見た場合、



図－１　パイロットプラントの構成



図－２　エンジン実験システム

全体は 14,230～20,740 kJ/kg (3,400～4,950 kcal/kg) の範囲にあり、極端に低いスギナとアキタフキの結果を除くと、エネルギー作物として注目されているソルガム：約 4,200 kcal/kg、ケンタッキーブルーグラス：約 4,480 kcal/kg、キャッサバ：約 4,180 kcal/kg 等[5)]と類似の熱量を有しているものである。

3.2.2　バイオガスエンジンの開発

バイオガスエンジンの開発は、ライト工業株式会社と株式会社井上政商店との共同研究「消化ガスエンジン動力システムの開発」で行っているものであり、所内の屋外実験ヤードにエンジンを設置して実験を行っている。

（１）実験方法

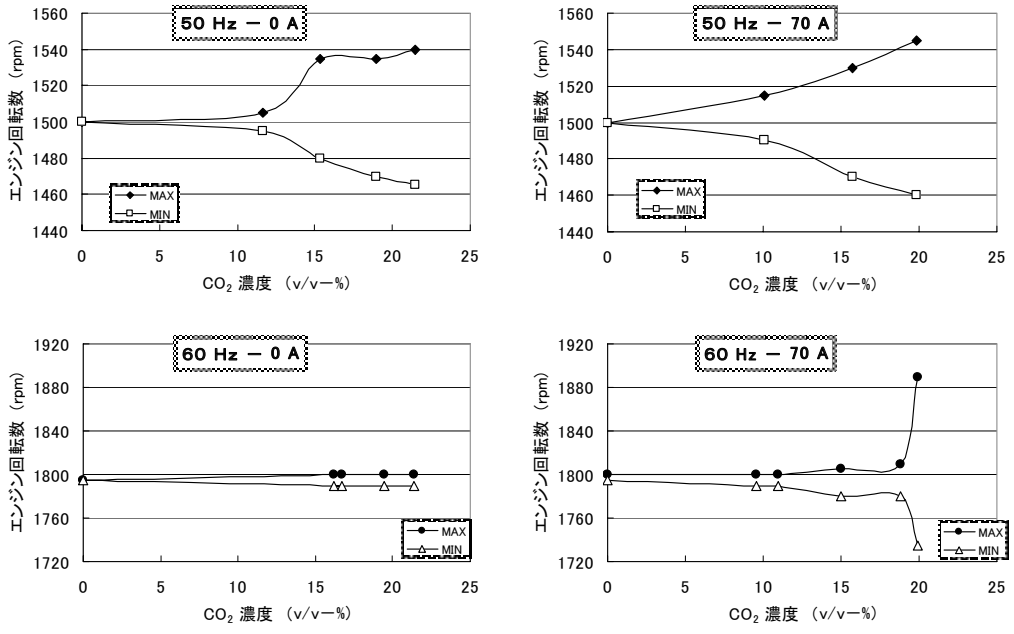
実験は、**図－２**に示す燃料フローのとおり、CH_4 と CO_2 の純ガスを用いて消化ガスを模擬する混合ガス製造ラインを設け、これをエンジンに供給して負荷試験を行った。負荷は発電機稼動とし、50Hz と 60Hz のそれぞれについて 3 相 200 V 発電を 0～140 A の出力範囲で行った。

（２）実験結果

実験結果の一例を**図－３**に示す。エンジンは、CO_2 濃度が高まる毎に回転数が不安定となった。特に CO_2 濃度が 30 %-v/v よりも高濃度となると稼動不能となった。これはエンジン自体の初期設定を 100 %の CH_4 ガス

表－１　バイオマス分析結果（その１／３）

	水 分	強熱減量	N	C	H	S	O	高位発熱量	Ca	K	Mg	Na	P	Si	Fe
	(%-乾重)	(%-乾重)			(%-乾重)			(kJ/kg-乾重)			(g/kg-乾重)			(mg/kg-乾重)	
キク科－①	83.8	84.6	2.61	41.4	5.23	0.178	41.7	18,770	12.23	42.93	5.19	4.39	3.88	1.77	144.6
キク科－②(紫の花)	67.8	93.5	0.80	43.9	5.58	0.000	44.8	17,330	6.4	16.98	1.26	1.5	1.21	5.05	40.9
イネ科－①	22.9	96.7	0.48	45.1	5.90	0.000	44.0	17,820	1.29	4.92	0.6	0.51	0.35	9.55	176.7
イネ科－②	45.2	93.8	0.77	43.8	5.74	0.000	42.3	17,330	1.02	6.79	0.59	0.62	0.92	17.16	120.4
赤クローバー	79.4	91.0	3.01	43.2	5.48	0.000	41.4	19,700	10.79	24.16	3.1	0.27	1.73	1.45	89.2
白クローバー	82.4	90.9	3.80	43.6	5.69	0.000	39.2	18,680	9.4	26.96	3.37	1.47	2.54	1.56	143.7
スギナ	79.0	75.6	1.71	34.6	4.50	0.126	37.4	14,230	22.22	22.47	4.63	1.52	1.5	50.12	152.7
アキグミ	62.7	95.6	2.86	46.8	5.88	0.000	40.6	19,810	5.59	9.53	1.23	1.14	1.47	0.46	119.9
TF	73.9	89.0	1.79	41.6	5.49	0.000	39.8	17,150	2.93	19.01	1.97	0.75	2.56	18.53	271.6
クサイ	64.5	92.7	1.26	42.5	5.49	0.000	43.5	17,410	2.62	13.42	1.36	0.47	2.06	12.30	210.8
ヨモギ	61.9	94.0	0.87	45.0	5.71	0.000	41.4	17,940	4.75	12.76	1.15	1.63	1.79	1.76	54.2
セイタカアワダチソウ	63.7	93.6	0.92	44.4	5.76	0.000	43.7	19,270	7.44	11.56	0.92	1.74	1.09	2.49	51.0
ヨシー1	55.2	93.1	1.35	43.4	5.47	0.000	41.9	19,070	2.51	5.69	0.74	3.17	0.81	16.86	47.7
ススキ(赤)	56.9	95.7	0.74	43.6	5.65	0.000	42.5	17,700	1.48	7.02	0.85	0.73	0.58	8.84	144.4
アキタフキ	80.1	84.2	1.42	41.1	4.78	0.000	41.4	16,640	21.95	17.76	2.88	20.36	1.81	6.41	357.0
イタドリ	71.3	94.2	1.03	44.8	5.42	0.000	42.1	17,950	7.21	10.86	1.88	4.44	0.96	0.28	471.3
ヤナギ	48.2	96.4	1.05	46.4	5.71	0.000	41.5	18,650	7.61	3.48	0.78	0.32	0.98	11.33	133.5
ワラビ	68.7	91.2	1.53	43.3	5.41	0.000	41.3	18,220	4.55	18.61	0.94	0.05	0.77	16.89	24.5
クズ	74.2	93.3	2.30	44.2	5.71	0.000	41.4	18,160	8.33	16.88	1.49	0.00	0.98	4.95	86.6
ヒノキ(葉・枝)	59.3	95.7	1.58	51.3	5.96	0.000	37.4	20,740	16.09	5.59	1.53	0.00	1.41	3.68	190.2
ヒノキ(幹)	52.9	97.1	0.53	46.6	5.86	0.000	41.9	18,760	7.18	1.02	0.34	0.00	0.37	2.58	108.8
ツツジ(葉・枝)	54.4	96.7	0.95	48.3	5.88	0.000	40.0	19,630	6.2	4.82	1.01	0.04	0.46	3.14	162.7
ツツジ(幹)	46.8	99.1	0.49	48.0	5.83	0.000	42.7	20,480	1.23	1.6	0.52	0.00	0.22	1.01	70.2
ササ	65.5	90.7	2.72	42.5	5.36	0.000	39.9	17,410	3.52	17.8	0.96	0.00	1.12	15.96	54.5
ハギ(葉・枝)	52.4	95.9	1.54	46.6	5.75	0.000	41.5	18,970	8.67	6.89	0.46	0.11	0.77	0.74	51.0
ハギ(幹)	40.9	98.4	0.62	46.5	5.96	0.000	43.6	18,710	3.54	1.78	0.51	0.00	0.16	0.65	7.4
ネズミモチ(葉・枝)	62.3	95.1	1.22	47.4	6.01	0.000	41.3	19,790	7.37	10.7	2.19	0.25	0.92	0.65	111.9
ネズミモチ(幹)	46.6	97.5	0.43	46.3	5.85	0.000	42.9	19,240	7.51	10.55	2.27	0.17	0.9	0.55	126.0
グミ	51.6	96.0	1.20	46.5	5.89	0.000	42.6	19,640	7.21	4.67	1.82	0.00	0.7	1.12	121.7
シイ(葉・枝)	54.4	95.3	1.37	46.6	5.99	0.000	41.2	19,040	6.6	4.95	3.04	0.04	0.83	1.11	163.6
シイ(幹)	55.8	98.3	0.75	46.3	5.87	0.000	43.0	18,630	2.9	3.42	0.51	0.01	0.59	1.10	536.5
セイタカアワダチソウ(土研)	63.2	93.8	1.18	45.0	5.91	0.000	42.0	18,240	6.61	15.17	0.96	0.00	0.79	11.61	36.7
ススキ(土研)	50.4	93.4	0.62	43.4	5.59	0.000	42.2	17,500	2.46	5.32	1.13	0.00	0.42	19.36	74.5
クワ(葉・枝)	56.7	87.6	1.58	43.6	5.58	0.000	39.9	17,640	18.84	13.15	0.94	0.04	1.14	2.49	58.1
クワ(幹)	43.1	97.9	0.44	46.0	5.70	0.000	45.1	18,700	4.76	2.8	0.68	0.02	0.47	1.11	104.3
ユリ(枯葉)	1.1	91.6	0.85	51.1	4.32	0.000	44.8	20,070	29.53	1.2	1.48	0.01	0.43	1.39	208.5
ヨシー2	64.1	91.0	0.85	42.1	5.49	0.000	40.5	17,060	4.8	8.78	2.03	0.07	1.7	22.07	114.5
アベリア	58.2	96.0	0.66	47.0	5.99	0.000	41.3	19,010	5.98	9.65	1.4	0.03	0.94	1.02	62.0
ユキヤナギ	47.9	96.0	1.18	48.2	5.96	0.000	41.3	19,610	10.39	4.7	1.44	0.07	0.94	0.74	115.8
ハマヒサカキ	55.6	95.0	1.02	48.5	6.42	0.000	38.9	20,330	10.55	6.79	2.28	0.00	0.69	0.55	132.3



図－３　エンジン稼動実験における燃料中の CO2 濃度とエンジン回転数の関係

表－１　バイオマス分析結果（その２／３）

(ng/kg･DS)

試料名	B	Al	Mn	Zn	Sr	Ba	Cr	Ni	Cu	Mo	Co	Pb	Li	V	Cd	As	Se	Sn
キク科－①	20.0	83.7	97.7	23.2	84.9	45.1	1.0	0.5	7.1	1.5	0.1	0.6	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.1
キク科－②（紫の花）	21.2	22.8	97.6	17.9	40.9	18.0	0.4	0.9	7.7	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1	1.1	0.0	0.1	0.1
イネ科－①	1.8	28.1	37.2	5.9	9.5	7.1	3.1	1.4	2.9	0.5	0.1	0.7	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.3
イネ科－②	1.9	23.7	54.5	4.5	6.2	3.4	1.3	0.6	1.9	0.5	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
赤クローバー	18.2	41.2	21.8	16.2	48.2	18.9	0.8	0.8	7.7	2.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
白クローバー	15.0	40.6	47.2	14.1	41.2	24.5	0.4	0.9	6.1	0.8	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
スギナ	17.2	65.9	57.3	8.6	104.4	59.7	1.1	0.8	3.0	1.2	0.1	1.2	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	0.1
アキグミ	14.3	60.7	154.4	10.5	26.0	15.3	0.4	1.1	5.6	0.3	0.1	0.5	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1
TF	2.4	193.7	150.8	13.3	15.9	14.8	2.9	1.8	3.9	1.4	0.1	0.8	0.1	0.4	0.1	0.1	0.0	0.1
クサイ	3.1	70.7	69.7	10.1	17.7	26.1	1.5	1.1	2.8	1.3	0.1	0.6	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2
ヨモギ	18.7	22.2	40.6	20.3	30.6	39.8	0.2	0.9	5.5	0.1	0.1	0.6	0.3	0.1	1.0	0.0	0.1	0.1
セイタカアワダチソウ	20.3	24.4	40.9	13.2	25.1	8.0	0.7	0.6	3.9	0.4	0.1	0.3	10.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2
ヨシー１	3.1	22.3	39.8	6.7	14.2	15.5	0.6	0.4	2.4	0.9	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1
ススキ（赤）	2.5	14.3	183.6	14.7	9.6	5.3	0.3	0.2	1.9	0.3	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1
アキタブキ	43.5	80.7	38.1	18.8	87.4	34.1	0.4	1.1	11.5	1.8	0.2	0.6	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	0.1
イタドリ	9.3	45.1	76.9	13.1	46.6	24.5	0.7	0.7	2.8	0.3	0.1	0.4	0.9	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ヤナギ	11.8	17.9	306.1	69.4	48.1	16.8	2.1	1.3	4.0	0.4	0.2	0.5	0.3	0.1	2.8	0.1	0.1	0.1
ワラビ	7.3	14.3	89.1	8.0	215.2	209.1	0.1	0.2	2.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
クズ	25.9	28.8	29.3	7.0	36.7	15.2	2.4	1.6	7.3	0.3	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.2
ヒノキ（葉･枝）	11.5	119.7	95.3	10.6	34.1	9.7	1.1	1.0	3.5	0.6	0.5	0.5	0.1	0.3	0.0	0.1	0.1	0.1
ヒノキ（幹）	3.5	86.1	11.4	7.1	9.2	3.3	0.3	0.4	2.9	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1
ツツジ（葉･枝）	17.6	180.0	104.9	11.2	23.1	63.7	0.5	1.3	6.5	0.1	0.1	1.3	0.1	0.5	0.3	0.1	0.1	0.2
ツツジ（幹）	3.7	49.2	65.6	3.9	7.5	24.7	0.4	0.5	3.5	0.0	0.1	0.4	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.1
ササ	1.6	6.9	59.5	20.7	23.8	12.3	2.6	1.4	6.2	2.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.1
ハギ（葉･枝）	11.2	23.9	41.8	7.9	28.3	32.0	0.2	0.9	4.1	0.4	0.1	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1
ハギ（幹）	4.8	7.6	11.2	4.0	16.2	13.8	0.2	0.4	1.9	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ネズミモチ（葉･枝）	15.3	78.4	15.6	13.7	33.7	21.4	0.3	0.3	6.6	0.1	0.1	0.6	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	0.1
ネズミモチ（幹）	15.3	84.0	15.6	12.6	34.7	23.0	0.3	0.3	6.3	0.2	0.1	0.7	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.1
グミ	24.4	14.0	139.9	64.5	34.4	4.3	0.4	0.4	7.2	0.0	2.5	0.2	0.0	0.0	1.2	0.0	0.1	0.0
シイ（葉･枝）	16.4	79.8	289.3	13.7	24.7	62.2	0.5	1.1	4.2	0.1	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1
シイ（幹）	6.3	22.9	10.0	4.7	11.4	4.0	126.6	47.6	4.0	1.7	0.9	0.2	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.2
セイタカアワダチソウ（土研）	16.9	18.5	25.6	6.4	61.8	14.5	0.2	0.2	6.9	0.3	0.0	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1
ススキ（土研）	2.2	37.9	50.6	6.3	7.7	9.1	3.9	1.8	2.0	0.1	0.1	0.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1
クワ（葉･枝）	31.7	35.5	19.8	9.7	67.4	18.7	0.2	0.4	4.0	1.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
クワ（幹）	5.0	35.6	42.2	4.2	22.6	31.9	0.4	0.7	2.8	0.0	0.1	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1
ユリ（枯葉）	25.8	163.4	24.1	7.7	66.0	13.4	0.4	0.9	2.9	0.7	0.1	1.0	0.1	0.4	0.0	0.1	0.1	0.1
ヨシー２	3.1	67.3	16.5	22.4	15.8	28.0	1.9	1.2	3.5	0.4	0.1	1.5	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1
アベリア	18.2	43.5	25.6	13.2	11.8	10.3	0.3	0.9	3.8	0.3	0.1	0.8	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1
ユキヤナギ	12.4	66.5	243.4	34.1	24.2	12.5	0.4	1.3	4.4	0.2	0.4	1.0	0.1	0.1	1.0	0.0	0.0	0.1
ハマヒサカキ	24.9	179.1	310.1	62.6	33.4	84.2	0.8	1.0	4.0	0.2	0.1	1.0	0.1	0.2	0.6	0.1	0.1	0.1

表－１　バイオマス分析結果（その３／３）

（ng/kg･DS）

	Be	Ag	In	Sb	Te	Tl	U
キク科－①	0.013	0.006	0.008	0.033	0.002	0.111	0.021
キク科－②（紫の花）	0.012	0.001	0.009	0.015	0.000	0.021	0.019
イネ科－①	0.011	0.004	0.009	0.016	0.000	0.009	0.019
イネ科－②	0.010	0.005	0.007	0.013	0.000	0.010	0.018
赤クローバー	0.011	0.004	0.007	0.013	0.003	0.016	0.018
白クローバー	0.006	0.001	0.004	0.036	0.031	0.017	0.017
スギナ	0.013	0.012	0.008	0.025	0.006	0.032	0.02
アキグミ	0.012	0.004	0.008	0.029	0.001	0.075	0.019
TF	0.005	0.004	0.004	0.033	0.021	0.022	0.024
クサイ	0.005	0.002	0.004	0.031	0.022	0.018	0.019
ヨモギ	0.011	0.001	0.007	0.009	0.002	0.011	0.017
セイタカアワダチソウ	11.676	0.001	0.008	0.039	0.001	0.033	0.018
ヨシ－１	0.003	0.001	0.003	0.021	0.024	0.021	0.017
ススキ（赤）	0.003	0.000	0.003	0.021	0.024	0.012	0.017
アキタブキ	0.010	0.007	0.008	0.025	0.000	0.028	0.019
イタドリ	0.012	0.002	0.007	0.019	0.000	0.038	0.018
ヤナギ	0.015	0.003	0.008	0.011	0.003	0.038	0.017
ワラビ	0.003	0.06	0.004	0.025	0.021	0.013	0.017
クズ	0.005	0.048	0.004	0.036	0.025	0.013	0.016
ヒノキ（葉･枝）	0.006	0.008	0.004	0.058	0.027	0.029	0.02
ヒノキ（幹）	0.004	0.002	0.003	0.032	0.024	0.066	0.018
ツツジ（葉･枝）	0.007	0.012	0.007	0.081	0.032	0.022	0.023
ツツジ（幹）	0.004	0.007	0.003	0.026	0.021	0.020	0.017
ササ	0.002	0.000	0.003	0.018	0.029	0.014	0.015
ハギ（葉･枝）	0.005	0.002	0.004	0.043	0.030	0.007	0.017
ハギ（幹）	0.003	0.029	0.003	0.015	0.021	0.007	0.016
ネズミモチ（葉･枝）	0.012	0.006	0.008	0.037	0.002	0.030	0.019
ネズミモチ（幹）	0.006	0.006	0.004	0.043	0.028	0.033	0.019
グミ	0.007	0.002	0.003	0.019	0.027	0.011	0.016
シイ（葉･枝）	0.010	0.004	0.004	0.036	0.026	0.007	0.018
シイ（幹）	0.003	0.002	0.003	0.020	0.025	0.005	0.015
セイタカアワダチソウ（土研）	0.005	0.005	0.005	0.052	0.032	0.008	0.018
ススキ（土研）	0.003	0.000	0.003	0.032	0.022	0.006	0.017
クワ（葉･枝）	0.004	0.002	0.004	0.043	0.024	0.009	0.018
クワ（幹）	0.004	0.003	0.003	0.021	0.025	0.004	0.017
ユリ（枯葉）	0.007	0.008	0.005	0.077	0.024	0.008	0.041
ヨシ－２	0.004	0.002	0.003	0.037	0.025	0.012	0.018
アベリア	0.004	0.007	0.004	0.036	0.024	0.006	0.017
ユキヤナギ	0.004	0.006	0.005	0.056	0.028	0.009	0.018
ハマヒサカキ	0.005	0.006	0.005	0.049	0.021	0.010	0.020

燃料で行っているために、燃料組成の変化に対応できないことにあると思われる。このために、燃料組成や品質に応じたエンジン制御システムが必要と思われる。また、100 %－CH_4 ガス燃料はエンジン温度を上昇させやすい傾向にあり、高負荷運転では容易にエンジンの制限温度である 600℃以上となった。自明のことながら CO_2 濃度が高まるほどにエンジン温度は低いものとなった。

４．まとめ

(1) バイオマスインベントリーの構築の基礎となるフィールドデータを得るための現地踏査を行い北海道から九州までの地方整備局管内に河川と道路の調査フィールド 21 箇所を設定した。また、合わせて組成分析用の草木を採取した。

(2) 雑草抑制薬剤等の使用について聞き取りを行った結果、薬剤の使用はないとのことであった。このために微量有機汚染物質による安全性への具体の取

り組みは必要ないと思われた。

(3) エネルギー変換技術として加圧流動燃焼システムを構築し、パイロットプラント実験に着手した。その結果、システムの自立運転が達成でき、実用化に近づいたと思われた。また、草木と下水汚泥の混合燃焼エネルギー変換を目指した基礎データとして、40 種類の草木の組成性状分析を行った。それらの高位発熱量は 14,230～20,740 kJ/kg-乾重の範囲にあった。

(4) バイオガスエンジンを開発するために、CH_4 と CO_2 の純ガスを用いた混合燃焼実験を行った結果、CO_2 濃度が高まる毎にエンジン回転が不安定となり、特に30 %-v/v よりも高濃度となると稼動不能となった。この解決のためには燃料組成・品質に応じたエンジン制御システムが必要と思われた。

参考文献

1) 高橋正人，三宅且仁，牧孝憲，落修一，尾崎正明：ダム貯水池における流木発生量と木質バイオマスとしての利用実態，土木技術資料，Vol.48，No.7，pp.48-53，2006

2) 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，pp.22-29，2007

3) 長沢英和，原達也，落修一，鈴木善三，木原均，永吉義一，渡會知則：下水汚泥を想定した加圧燃焼に於ける運転特性，第 42 回下水道研究発表会講演集，(社)日本下水道協会，pp.1065-1067，2005

4) 木原均，長沢英和，落修一，鈴木善三：高含水バイオマスの熱化学的エネルギー直接変換技術に関する研究報告，学会誌 EICA，Vol.11，No.2.3，pp.189-196，2006

5) 資源エネルギー庁総合政策課：http://www.enecho.meti.go.jp/info/statistics/energy/030520c.pdf

再生材の特性を活かした利用技術の開発に関する研究

土木研究所　リサイクルチーム　上席研究員　尾﨑　正明
主任研究員　山下　洋正
研究員　宮本　綾子

1. はじめに

再生材の土木材料利用では、これまで安全性評価の検討がなされてきたが、物性等の品質面は通常製品の規格によることが多い。今般、一般廃棄物、下水汚泥等の溶融スラグ骨材について JIS 化が予定されており、土木研究所においても「他産業リサイクル材利用技術マニュアル」が策定されたところであるが、利用用途は限定されたものとなっている。安全性の確認された再生材について、その特徴を活かした利用用途を開発するとともに、試験施工の段階など実績の少ないものについて利用を促進するための技術を開発する。本研究課題では、上記の必要性を踏まえ、溶融スラグ等を耐酸性コンクリートに利用する場合において、その特徴を活かした利用技術を開発する。また、土壌改良材として改良土を利用する場合の安全性について検討した。

2. 調査内容

2.1 下水汚泥溶融スラグの耐酸性コンクリートへの適用

下水汚泥溶融スラグのコンクリート用混和材への適用性を検討するための基礎資料を収集することを目的として、下水汚泥溶融スラグ微粉末および下水汚泥溶融スラグ細骨材を用いたモルタルの諸特性、特に耐硫酸性について検討した。

2.1.1 実験内容

1）試料の詳細

エラー! 参照元が見つかりません。に示すように、本試験では、産地の異なる 2 種類の下水汚泥溶融スラグ細骨材およびそれらを粉砕して得られた 2 種類の下水汚泥溶融スラグ微粉末を用いた。また、基材セメントは、普通ポルトランドセメント(以下、普通セメントまたはセメントと略称する)を用いた。更に、下水汚泥溶融スラグ微粉末の比較用として、高炉セメントC種を想定し、高炉スラグ微粉末を普通セメントに 70%置換(質量割合)した粉体についても検討した。

使用材料		記号	密度 (g/cm^3)	備考
水		W	ー	水道水
ｾﾒﾝﾄ		C	3.16	普通ﾎﾟﾙﾄﾗﾝﾄﾞｾﾒﾝﾄ、太平洋ｾﾒﾝﾄ社製
下水汚泥溶融ｽﾗｸﾞ微粉末	ｽﾗｸﾞ1	P1	2.93	A県産
	ｽﾗｸﾞ2	P2	2.72	B県産
高炉ｽﾗｸﾞ微粉末		BS	2.91	ｴｽﾒﾝﾄｽｰﾊﾟｰ60、新日鐵高炉ｾﾒﾝﾄ㈱社製 比表面積：5940cm^2/g 三酸化硫黄：3.12%
細骨材 天然細骨材		S0	2.60(表乾)	陸砂、静岡産
細骨材 下水汚泥溶融ｽﾗｸﾞ	ｽﾗｸﾞ1	S1	2.90(表乾)	A県産
細骨材 粒度調整細骨材	ｽﾗｸﾞ2	S2	2.55(表乾)	B県産
AE減水剤		ad	ー	ﾎﾟｿﾞﾘｽNo.70： ﾘｸﾞﾆﾝｽﾙﾎﾝ酸化化合物とﾎﾟﾘｵｰﾙの複合体 ｴﾇ･ｴﾑ･ﾋﾞｰ社製

モルタルの配合は、混和材の種類、下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類、下水汚泥溶融スラグ細骨材の種類および下水汚泥溶融スラグ微粉末の置換率を相違させた 8 配合について検討した。

具体的には、下水汚泥溶融スラグ微粉末の適用性の検討として、

①セメント代替としての利用

②細骨材代替としての利用

の２点について検討した。（配合番号 A・0~0・B）

また、下水汚泥溶融スラグ細骨材の検討も行った。（配合 C・a～C・b）

本試験では、以後、普通セメント、高炉スラグ微粉末および下水汚泥溶融スラグ微粉末の混合物を粉体（記号：P）と定義する。

配合番号	水粉体比 (wt.%)	水セメント比 (wt.%)	単位量(kg/m^3)								AE減水剤添加量 (P×wt.%)
			W	C	P1	P2	BS	S0	S1	S2	
0-0(基準配合①)	55	55	273	495	—	—	—	1484	—	—	—
A-0	57	111	273	247	230	—	—	1484	—	—	—
B-0	59	111	273	247	—	213	—	1484	—	—	—
0-A	41	55	273	495	167	—	—	1336	—	—	—
0-B	42	55	273	495	—	155	—	1336	—	—	—
C-0(基準配合②)	55	184	270	147	—	—	343	1470	—	—	—
C-a	55	184	270	147	—	—	343	—	1640	—	0.25
C-b	55	184	270	147	—	—	343	—	—	1442	0.3

試験項目および試験方法

圧縮強度試験は、JIS R 5201 附属書 2 に準拠し、材齢 3 日、28 日および 56 日で実施した。

密度特性試験および耐硫酸性試験は、東京都下水道局施設管理部「コンクリート改修マニュアル」参考資料 4.「に準拠した。

試験結果および考察

圧縮強度試験

(1)下水汚泥溶融スラグ微粉末の検討

下水汚泥溶融スラグ微粉末をセメントに対して 50%内割で用いたモルタル(配合番号 A-0 および B-0)の圧縮強度は、いずれの下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類も、セメント単味のモルタル(基準配合①)のそれよりも 70～85%程度も低下し、更に水粉体比が大略、同程度の高炉スラグ微粉末をセメントに対して 70%内割(質量割合)で置換した粉体を用いたモルタル(基準配合②)のそれと比較しても著しく小さい。すなわち、下水汚泥溶融スラグ微粉末をセメントに対して内割で混合して用いる場合、普通セメント単味と同等の強度発現を要求される場合には、下水汚泥溶融スラグ微粉末の置換率の低減、または、水粉体比ならびに水セメント比の低減などの検討が必要と推察される。

下水汚泥溶融スラグ微粉末を細骨材代替として 10%用いたモルタル(配合番号 0-A および 0-B)の圧縮強度は、いずれの下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類も、セメント単味のモルタル (基準配合①)のそれよりも大略、10～20%程度増大する。

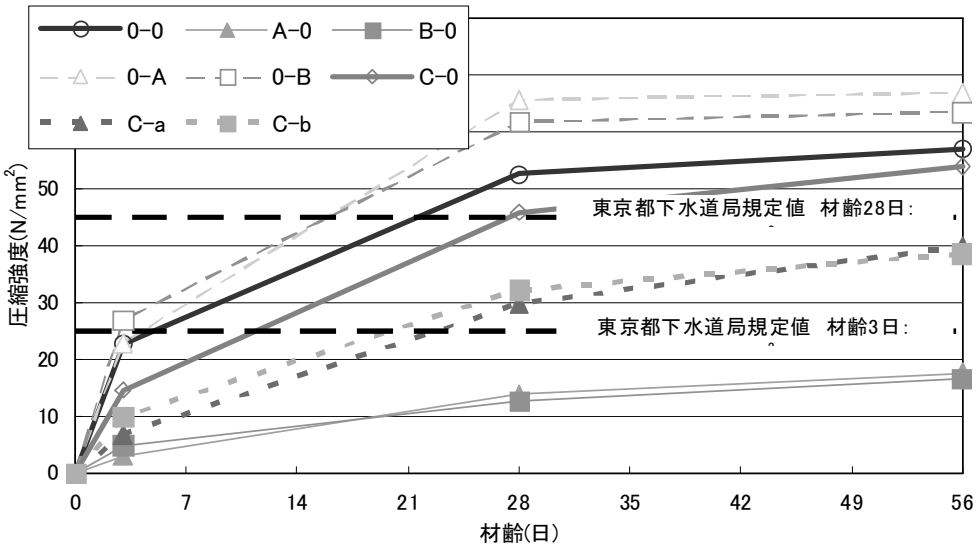
単位水量、水セメント比および下水汚泥溶融スラグ微粉末置換率が同一であれば、下水汚泥溶融スラグ微粉

末 P1 を用いたモルタル(配合番号 A-0 および 0-A)の圧縮強度は、材齢 3 日を除けば下水汚泥溶融スラグ微粉末 P2 を用いたモルタル(配合番号 B-0 および 0-B)のそれよりも大きい。

下水汚泥溶融スラグ細骨材の検討

粉体の種類、単位水量、水粉体比、単位細骨材容積が同一の場合には、下水汚泥溶融スラグ細骨材を用いたモルタル(配合番号 C-a および C-b)の圧縮強度は、材齢、下水汚泥溶融スラグ細骨材の種類にかかわらず、天然細骨材を用いたモルタル(基準配合②)のそれよりも 25～50%程度低減し、特に初期材齢において顕著である。また、下水汚泥溶融スラグ細骨材を用いたモルタル(配合番号 C-a および C-b)の圧縮強度は、比較的初期材齢を除けば、大略、下水汚泥溶融スラグ細骨材の種類が相違しても大差ない。

本研究の範囲では、高炉スラグ微粉末をセメントに対して 70%内割で置換したモルタル(基準配合②、C-a および C-b)の圧縮強度は、材齢 28 日の天然細骨材を用いた結果を除けば細骨材の種類にかかわらず、いずれの材齢においても、上述の東京都下水道局が規定する断面修復材の強度特性に関する要求性能に適合しない。



密度特性(硫酸浸漬)および耐硫酸性

(1)下水汚泥溶融スラグ微粉末の検討

下水汚泥溶融スラグ微粉末をセメントに対して 50%内割で用いる場合には、セメント単味と比較して、浸透深さが大きくなり、耐硫酸性が劣るものの、表面の観察結果より、硫酸侵食に伴う供試体表面からのモルタル部分の消失程度が比較的軽微であり、質量減少率が小さくなったと推察される。

下水汚泥溶融スラグ微粉末を細骨材代替として 10%用いたモルタル(配合番号 0-A および 0-B)の浸透深さおよび質量減少率は、いずれの下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類も、セメント単味のモルタル(基準配合①)のそれよりも大きく、特に質量減少率で顕著である。

したがって、本試験の範囲では、下水汚泥溶融スラグ微粉末の耐硫酸性の改善効果は、セメント代替の場合には不明瞭であり、細骨材代替では期待できないと言える。

単位水量および水セメント比が同一であれば、下水汚泥溶融スラグ微粉末を用いたモルタル(配合番号 A-0、B-0、0-A および 0-B)の浸透深さおよび質量減少率は、同一の下水汚泥溶融スラグ微粉末置換率であれば、下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類が相違しても大差ない。

(2)下水汚泥溶融スラグ細骨材の検討

粉体の種類、単位水量、水粉体比、単位細骨材容積が同一の場合には、A 県産の下水汚泥溶融スラグ細骨材 P1 を用いたモルタル(配合番号 C-a)の浸透深さは、材齢にかかわらず、天然細骨材を用いたモルタル(基準配合②)のそれよりも若干、大きい。一方、B 県産の下水汚泥溶融スラグ細骨材 P2 を用いたモルタル(配合番号 C-b)では、天然細骨材を用いたモルタル(基準配合②)と大差ない。
高炉スラグ微粉末をセメントに対して 70%置換した粉体および下水汚泥溶融スラグ細骨材を用いたモルタル(配合番号 C-a および C-b)の質量変化率は、天然細骨材を用いたモルタル(基準配合②)のそれと同様に増加傾向を示している。これは、高炉スラグ微粉末をセメントに対して 70%置換した粉体を用いたモルタル(基準配合②、C-a および C-b)は、細骨材の種類にかかわらず、普通セメント単味のモルタル(基準配合①)と比較して、硫酸侵食に伴う供試体表面からのモルタル部分の消失や剥落が比較的軽微であるものの、表面部分において膨張に伴うひび割れが生じており、その部分における吸水により質量増加したと推察される。
高炉スラグ微粉末をセメントに対して 70%置換した粉体を用いたモルタル(基準配合②、C-a および C-b)の浸透深さおよび質量減少率は、大略、セメント単味のモルタル(基準配合①)のそれよりも小さく、耐硫酸性に優れる。

３．まとめ

下水汚泥溶融スラグ微粉末

(1)セメント代替(下水汚泥溶融スラグ微粉末をセメントに対して 50%内割使用)

下水汚泥溶融スラグ微粉末をセメント代替として用いた場合には、セメント単味と比較して、強度発現が著しく低下する。また、本試験の範囲では、セメント代替として下水汚泥溶融スラグ微粉末を用いた場合の耐硫酸性の改善効果は、硫酸浸漬に伴う質量減少が小さいものの、浸透深さが大きく、不明瞭である。これらは、下水汚泥溶融スラグ微粉末の種類が相違しても同傾向である。

(2)細骨材代替(下水汚泥溶融スラグ微粉末を細骨材代替として 10%使用)

下水汚泥溶融スラグ微粉末を細骨材代替として 10%用いた場合には、セメント単味と比較して、強度発現が大きい。また、細骨材代替として下水汚泥溶融スラグ微粉末を用いた場合の耐硫酸性の改善効果は、セメント単味と比較して質量減少および浸透深さともに大きいことから期待できず、今後、更なる検討が必要と推察される。

下水汚泥溶融スラグ細骨材

下水汚泥溶融スラグ細骨材を用いた場合には、天然細骨材と比較して、強度発現が著しく低下する。また、下水汚泥溶融スラグ細骨材の耐硫酸性の改善効果は、天然細骨材と比較して、A 県産の下水汚泥溶融スラグ細骨材が若干、劣るものの、B 県産の下水汚泥溶融スラグ細骨材は同等である。

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（一般勘定）
研究期間：平 18～平 20
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：尾崎正明，山下洋正

【要旨】
近年、都市で発生する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ており，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複合処理して資源・エネルギー回収を行う新技術の開発が必要である。そこで，発酵廃水の性状および発生形態について調査を行い，下水処理場流入水質より高濃度で，嫌気性消化脱離液相当以上の濃度であり，特に窒素およびリン濃度が高い傾向を把握した。また，嫌気処理を活用した省エネルギー型下水処理の実証プラントを下水処理場に設置して実験を開始した。
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してい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してエネルギー・資源回収を行う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 発酵廃水の発生形態および性状の評価

余剰有機物をメタン発酵させた際に発生する発酵廃水の発生形態および性状を把握するために文献調査を行い，得られた知見を整理して考察を行った。文献調査は，バイオマス関連の資料を中心に行い，余剰有機物のメタン発酵の実施設，パイロットプラント施設，実験施設等のデータを整理し，発酵廃液の発生形態および性状の評価を行った。

2. 2 FS および処理方式の基本設計

フィージビリテシスタディ(FS)として，余剰有機物と下水汚泥を混合して共同メタン発酵する場合に，それぞれ単独で実施する場合と比較して，発酵特性および経済性に与える影響について検討を行った。

下水汚泥の嫌気性消化施設および下水処理施設については，国土交通省等の資料[2),3)]を参照し，食品廃棄物のメタン発酵施設については，環境省資料[4)]を参照した。

各資料における費用関数等の前提条件が異なっているため，本研究の FS に適用可能な部分を抽出した。

2. 3 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（上向流嫌気汚泥床システム）と DHS（下向流スポンジ担体処理システム）[5)]を用いて，無加温かつ無曝気で処理する技術について実験的検討を行った。UASB-DHS システムのラボスケールの実験装置（UASB:約 16L，DHS:スポンジ容量約 4L）を製作して，模擬排水（SS 成分として，生下水汚泥を添加）を用いて室内（20℃）で運転を行い，処理水中の溶解性および固形性成分の性状把握を行った。

3. 結果および考察

3. 1 発酵廃水の発生形態および性状の評価

文献調査で得られたメタン発酵施設の情報は，余剰有機物として食品廃棄物または畜産廃棄物を対象としてメタン発酵を行っている事例がほとんどであった。

(1) 発酵廃水の発生形態

発酵廃水の一般的な発生形態と処理の状況は次の通りであった。

①湿式のメタン発酵槽から発酵残さをスラリー状で排出
②スラリーを脱水装置で固液分離（または，発酵スラリーを脱水せずそのまま熟成を行い液肥として農地還元）
③脱水ろ液を水処理装置等で処理
④下水道放流基準まで処理して下水道へ放流，または，排水基準まで処理して公共用水域へ放流

なお，下水汚泥の嫌気性消化においては，消化槽の運転形式に応じて，返流水として濃縮槽分離液，嫌気性消化槽脱離液，脱水ろ液等が発生するが，食品廃棄物等のメタン発酵においては，発酵液スラリーの固形物濃度が高いため直接脱水が一般的と考えられるため，発酵廃水としては脱水ろ液のみを想定した。

文献値[6]より，余剰有機物（食品廃棄物）1ｔの湿式メタン発酵により発生する廃水は1.8～3.1（平均2.4）m^3程度と推定される。廃水がほとんど発生しない乾式メタン発酵も実用化されているが，ここでは導入事例の多い湿式について検討することにする。2005年度の全国の食品廃棄物の発生量は約22百万ｔであり[1]，このうち湿式メタン発酵（廃水が発生する）によるバイオガス回収が行われる割合を例えば10，20，30%と仮定した場合，それぞれ5.3，10.6，15.8百万 m^3の発酵廃水が発生することになる。下水汚泥の嫌気性消化により発生している返流水は2004年度で約21百万 m^3程度と推定される[7]ことと比較すると，食品廃棄物のメタン発酵廃水は水量としても相当なものとなることに加えて，(2)で後述する通り有機物および窒素ならびにリンが極めて高濃度であり，下水道へ放出する場合でも前処理が必要となる場合が多く，公共用水域へ直接排水する場合は一層高度な水処理が必要となることから，発酵廃水の処理の重要性は明らかである。

また，全国の畜産廃棄物の発生量は約89百万ｔであり[1]，バイオガス化施設の導入も進められているが，現状では発酵スラリーは固液分離せずに全量を熟成して液肥として農地散布しているところがほとんどである。農地の窒素過多や高濃度の窒素による地下水汚染を避ける必要があり，広大な農地を有する好条件の地域も限られることから，処理の全てを農地還元に頼るのは難しいと考えられるが，処理コストの制約から，十分な廃水処理を実施することも難しいと見られている。

従って，余剰有機物として，食品廃棄物，畜産廃棄物いずれをメタン発酵する場合においても，低コスト・省エネルギーで効率的にメタン発酵廃水を処理する技術が必要である。

(2) 発酵廃水の性状

発酵廃水の性状については，発酵廃水中の各成分濃度が，余剰有機物の投入濃度（水による希釈割合）等に左右されるため異なる処理施設間で比較することは難しいが，以下に示すいくつかの報告事例に基づいて検討した。

（ｉ）畜産廃棄物主体で食品廃棄物を一部混合したメタン発酵施設（約70t/d）の例[8]では，表-1に示すとおり，有機物(COD_{Cr})については40%程度除去されるが，TNおよびTPについてはほとんど除去されず，有機態窒素の分解によりNH_4^+-Nが20%程度増加したことが報告されている。脱水ろ液の水質についてはTS 9700mg/L，SS 1300mg/Lのデータしか示されていないが，例えばNH_4^+-N /TNが0.64であるなど，溶解性のN，Pの割合が高く，そのほとんどが脱水ろ液に移行していると考えられるため，かなりの高濃度と推定できる。

表-1　メタン発酵の水質変化例[8]

		TS	BOD	COD_{Cr}	TN	TP	NH_4^+-N
発酵槽投入	(mg/L)	67,570	26,000	55,000	3,580	590	1,740
発酵後スラリー	(mg/L)	42,200	4,200	32,500	3,330	595	2,140
変化率	(-)	0.62	0.16	0.59	0.93	1.01	1.23

（ⅱ）食品廃棄物の単独処理の場合では，生ゴミ破砕時の水質転換率の例について表-2の通り報告されており[9]，TNおよびTPにしめる溶解性成分の割合はそれぞれ31.5%および72.7%であり，可溶化によりさらに溶解性成分の割合が増加するものと想定される。

表-2　食品廃棄物の破砕時の水質転換率の例[9]

水質転換率	TS	SS	BOD	COD_{Cr}	$DCOD_{Cr}$	TN	DTN	TP	DTP
(g/100g生ごみ)	14.6	8.23	11.3	5.47	2.24	0.73	0.23	0.11	0.08

また，食品廃棄物のバイオガス化施設の運転実績例では，含水率80%，COD_{Cr} 280 g/kgの生ごみを含水率90%程度に希釈して発酵させている[6]。食品廃棄物として生ゴミを粉砕してTS 11800mg/Lに希釈・調製した実験用試料の分析値として，COD_{Cr} 202000 mg/L，TN 4650mg/L，TP 430 mg/L，SS 79600mg/L程度と報告されている[10]ことから推定される比率として，COD_{Cr}/N=43，COD_{Cr}/P=470を用いると，前述の運転実績では，投入濃度としてTN 3300mg/kg，TP 300mg/kg程度と推定され，食品廃棄物のみの場合にもN，P負荷が高いと考えられる。

（ⅲ）下水道の平均的な流入水質はBOD 195mg/L，COD_{Mn} 103mg/L，SS 174mg/L，TN 36mg/L，TP 4.6mg/L程度であり[7]，(i)の事例のメタン発酵廃水はBODで約20倍，TNで約90倍，TPで約130倍の高濃度となっており，特に窒素およびリンが存在比率が高い。

（ⅳ）下水汚泥の嫌気性消化槽の越流水（脱離液）の水質例としてK処理場ではTS 1810mg/L，BOD 52mg/L，COD_{Mn} 161mg/L，TN 481mg/L，NH_4^+-N 429mg/L，TP 49.7mg/L，PO_4^{3-}-P 28.8mg/L程度であり，(i)の事例のメタン発酵廃水（発酵スラリー）はBODで約81倍，TNで約6.9倍，NH_4^+-Nで約5倍，TPで約12倍の高濃度となっている。また，脱水ろ液の水質例としては，SS 252mg/L，TP 161mg/L，PO_4^{3-}-P 131mg/L，TN 931mg/L，NH_4^+-N 979mg/L，TBOD 169 mg/L，COD_{Mn} 140mg/L程度であるが[11]，一般に，嫌気性消化汚泥以外の汚泥もあわせて脱水されている場合が多く，

また，汚泥洗浄等で希釈される場合もあるため，水量・水質の比較は困難である。

以上の事例に基づく検討より，余剰有機物の混合メタン発酵の発酵廃水の性状は，流入下水と比べて特に窒素およびリンではるかに高濃度であり，下水汚泥の嫌気性消化の消化脱離液よりも高濃度の場合が多いと考えられた。これは，一般に，余剰有機物のメタン発酵は下水汚泥の嫌気性消化よりも高濃度で実施されていることによるものと考えられ，発酵廃水の適正な処理が重要と考えられた。

3. 2 FS および処理方式の基本設計

余剰有機物と下水汚泥の共同処理技術のフィージビリテシスタディ(FS)として，メタン発酵特性および処理の経済性への影響について検討した結果を以下に示す。

(1) 発酵特性への影響

有機物，窒素，リンの存在比や微量金属塩類の必要性に関して，共同処理の影響の検討を行った。

（ｉ）有機物／窒素比（COD_{Cr}/N）については，畜産廃棄物主体(15)＜下水汚泥(30)＜食品廃棄物(43)程度であり[8) 10)]，ふん尿主体のものほど窒素比率が高い傾向があると考えられる。メタン発酵に適した炭素／窒素比は 12～16 程度とされ[12)]，COD_{Cr}/N に換算すると 32～43 程度となる。従って，畜産廃棄物主体では窒素過多であり，下水汚泥も窒素が多め，逆に食品廃棄物ではぎりぎり不足しない程度となるため，これらを混合することで，より適切な有機物／窒素比が達成できると考えられる。

（ⅱ）有機物／リン比（COD_{Cr}/P）については，下水汚泥(78)＜畜産廃棄物主体(93)＜食品廃棄物(470)程度であり[8) 10)]，下水汚泥と畜産廃棄物主体でほぼ同等であり，食品廃棄物ではリン比率が低くなっている。有機物／リン比の適正範囲に関する報告はないが，下水汚泥や畜産廃棄物主体の余剰有機物にリン含有比率の低い食品廃棄物を混ぜることで，有機物あたりのリン比率を下げることが可能であり，エネルギー回収量を確保しつつ，発酵廃液のリン負荷を下げることが可能になると考えられる。

（ⅲ）メタン発酵には Ni，Co などの微量金属塩類が必要であるが，食品廃棄物中には少ないため[10)]，食品廃棄物単独でメタン発酵を行うと，微量金属塩類が不足してメタン生成菌の活性が阻害される事例が報告されている[13)]。これらを豊富に含んでいる畜産廃棄物や下水汚泥と混合して微量金属塩類を補うことで，メタン発酵の安定化が可能となる。

以上より，各種の余剰有機物を単独でメタン発酵するよりも，混合して実施した方が，有機物／窒素比の調整や微量金属塩類の供給，さらには発酵廃液のリン負荷の低減等の観点からも適していると考えられた。特に，畜産廃棄物は下水汚泥と性状が類似している点が多いため，性状の異なる食品廃棄物と下水汚泥を混合する方が，成分調整には有利と考えられる。

(2) 経済性への影響

余剰有機物として食品廃棄物をメタン発酵する場合と下水汚泥を嫌気性消化する場合を対象として，それぞれ単独で実施する場合と混合して共同メタン発酵を実施する場合の費用について検討した。排水処理については，既往の活性汚泥法として費用の算出を行った。

食品廃棄物の単独メタン発酵の場合は，含水率 80%で収集し，前処理後に TS10%でメタン発酵し，ガス発電するものとした。発酵廃水は脱水し，固形分は埋め立て処分，排水は前処理後に下水道へ放流するものとした。施設規模としては， 20t/d および 50t/d 処理（TS20%）の２通りの費用試算値[4)]を用いた。

下水汚泥の単独メタン発酵（嫌気性消化）の場合は，消化汚泥は脱水・埋め立て処分，返流水は下水処理場で処理するものとした。施設規模は，下水汚泥 1,000t/d および 5,000t/d 処理（TS1%換算）の２通りを想定した。

下水汚泥と食品廃棄物を混合して共同メタン発酵する場合は，表-3 に示す Case1～4 について，下水処理および汚泥処理の費用関数をベースにして，食品廃棄物の受け入れによる処理量が増加するものとして試算した。

表-3 下水汚泥と食品廃棄物の共同メタン発酵の条件

	下水汚泥 (t/d, TS1%換算)	食品廃棄物 (t/d, TS20%)	食品廃棄物割合 (TSベース%)
Case1	1,000	50	50.0
Case2	1,000	20	28.6
Case3	5,000	50	16.7
Case4	5,000	20	7.4

いずれの Case でも，消化汚泥は脱水後に埋め立て処分，発酵廃水(返流水)は下水処理場で処理するものとした。下水汚泥の単独発酵および共同発酵ともに，濃縮方法およびガス発電の有無について，(a)重力濃縮＋発電なし，(b)機械濃縮＋発電なし，(c)重力濃縮＋発電あり，(d)機械濃縮＋発電あり，の４通りのシナリオで試算を行った。食品廃棄物の受け入れによる排水処理の費用増大分については，水量の増加は全流入水量に比べてわずかであるため施設建設費には反映せず，流入下水水質の 100 倍程度（BOD で約 20 倍，TN で約 90 倍，TP で約 130 倍）の高濃度排水が発生することから維持管理費が水量×水質係数(100 と仮定)の分だけ増加するとして計上した。

年費用の試算結果は図-1 に示すとおりであり，Case2～4 では全シナリオで共同メタン発酵による費用削減効果が得られたが，Case1 ではシナリオ(c)以外では単独処

理より割高となった。

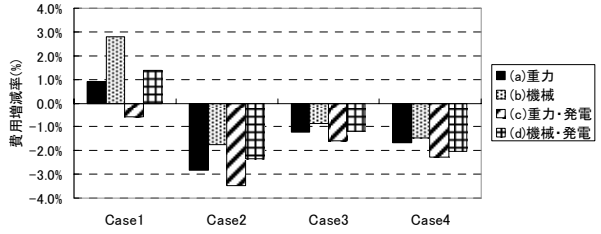


図-1　共同メタン発酵による年費用削減効果の試算例

この理由としては，食品廃棄物単独でのメタン発酵（TS10%程度）と比較して下水汚泥と混合する場合は低濃度（TS2～4%程度）となり容積効率が低下すること，食品廃棄物の混合割合が増えるほど影響が大になること，Case1 は下水汚泥の嫌気性消化施設としては中規模であるが Case3, 4 よりは規模が小さく食品廃棄物の追加によるコスト増加率が高いこと等が考えられる。食品廃棄物の割合が高い場合でも共同処理による費用削減効果を得るためには，下水汚泥の嫌気性消化濃度を高める等の効率化が必要と考えられた。

なお，ここでは廃水処理を既往の標準活性汚泥法によるものとして費用を試算しているが，嫌気処理法を採用すればエネルギー・汚泥発生量削減により費用を大幅に削減可能と考えられることから，全体的な費用効率を向上させることができると考えられる。今後は，嫌気処理法を適用した場合について，費用およびエネルギーの観点でフィージビリティスタディを実施することとする。

3. 3　発酵廃水・下水混合液の嫌気処理の基礎技術の開発

流入下水相当の水質による UASB-DHS システムのラボスケールの実験結果では，安定期間においては良好な水質・除去率であったが，実験装置が小型であり閉塞しやすいこと，浮遊性の汚泥が多くなったことなどにより，しばしば汚泥が浮上・流出し，後段の水質に影響した。無加温では固形物の可溶化速度が律速となることから，発酵廃水を固液分離した後の溶解性成分を処理することが適していると考えられた。

また，嫌気処理を活用した省エネルギー型下水処理の実証プラントを下水処理場に設置して実験を開始した。

4. まとめ

（1）余剰有機物の発酵廃水の性状は，下水処理場流入水質より高濃度で，嫌気性消化脱離液相当以上の濃度であり，特に窒素及びリン濃度が高い傾向であった。潜在的な発生量も下水汚泥の嫌気性消化の返流水並であった。

（2）下水汚泥と食品廃棄物の共同メタン発酵および廃水処理の FS の結果, 食品廃棄物の混合割合が低く下水汚泥が主体の場合は，下水汚泥の嫌気性消化の濃度でも費用削減効果が得られた。食品廃棄物の割合が高い場合は，共同処理の費用削減効果を得るためには，発酵濃度を高める等の効率化が必要と考えられた。

（3）発酵廃水の嫌気処理技術としては，脱水後のろ液等の溶解性成分主体の廃水を UASB-DHS システムにより処理することが望ましいと考えられた。嫌気処理を活用した省エネルギー型下水処理の実証プラントを下水処理場に設置して実験を開始した。

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) バイオマス・ニッポン総合戦略：2006. 3. 31 閣議決定
2) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：バイオソリッド利活用基本計画策定マニュアル，（社）日本下水道協会，2004. 3
3) (社) 日本下水道協会：効率的な汚水処理施設整備のための都道府県構想策定マニュアル（案），2002. 2
4) 環境省：生ごみ等の 3R・処理に関する検討会資料，2006
5) Agrawal, et.al.: Treatment of raw sewage in a temperate climate using a UASB reactor and the hanging sponge cubes process, *Wat. Sci. Tech.*, Vol.36, No.6-7, pp.433-440, 1997.
6) 古市，有機系廃棄物資源循環システム研究会：バイオガスの技術とシステム，オーム社，pp. 85-102，2006. 3
7) (社) 日本下水道協会：平成 16 年度下水道統計行政編，2006. 3
8) 小川他：ふん尿・食品残さのメタン発酵施設における運転データの解析，廃棄物学会論文誌，Vol. 14, No. 5, pp. 258-267, 2003
9) 国土技術政策総合研究所他：ディスポーザー導入社会実験に関する調査報告書, 国土技術政策総合研究所 No. 226, p. 56, 2005. 7
10) 奥野他：生ごみと汚泥の高濃度混合メタン発酵に及ぼす汚泥比率と発酵温度の影響，土木学会論文集 No. 734，Ⅶ-27，pp. 75-84，2003. 5
11) 若山ら：汚泥返流水からの窒素・リン除去技術の開発，第 37 回環境工学研究フォーラム講演集 2000，pp. 16-18，2000
12) 岩井ら：下・廃水汚泥の処理水，コロナ社，pp. 52-55, 1981. 7
13) 東郷ら：生ごみの高温メタン発酵処理システム，鹿島技術研究所年報，Vol. 46，pp. 135-140，1999. 9

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（治水勘定）
研究期間：平 18～平 21
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：尾崎正明，山下洋正

【要旨】
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，河川水および都市排水の調査を行った結果，溶解性鉄は都市排水中の濃度が下水処理場で半分程度以下となるが，河川水中では溶解性窒素・リンと比較して十分な濃度が存在していた。溶解性ケイ素は都市排水中の濃度は下水処理場で変化しないが，河川水中では溶解性窒素とのバランスで不足する場合もあり得ると考えられた。
キーワード：溶解性鉄，溶解性ケイ素，シリカ，河川，都市排水

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，都市河川流域における溶解性の鉄および珪素の挙動を把握するため，河川水および都市排水の調査を行った。

2. 調査方法

2. 1 調査対象物質

調査対象物質は，溶解性の鉄およびケイ素とした。また，窒素およびリンについても同時に調査した。

溶解性の鉄は，表流水中では主にフミン物質等の有機物質と錯体を形成してコロイド状で存在すると考えられており，河川水中濃度は数十μg/L のオーダーであるが，河口付近で塩類濃度上昇に伴って沈降し，表層海水中ではほぼ枯渇する。近年，沿岸域においてコンブ等の有用藻類が減少して白色小型藻類が増殖する現象（磯焼け）が見られており，その原因の可能性の一つとして藻類に利用可能な溶解性鉄の供給減少が挙げられている。

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,河川水中の濃度は数十 mg/L のオーダーであるが，海域では濃度が低下する。近年，渦鞭毛藻類が珪藻類に卓越して異常増殖して有害な赤潮が発生する原因の一つとして，溶解性ケイ素の不足と他の栄養塩類の過剰が疑われている。

必須元素が藻類等に利用される際の比率（レッドフィールド比）は， モル比で C:N:P:Si:Fe=106:16:1:16～50:10^{-3}～10^{-4}程度とされており，必須元素の存在比率の変動は生物バランスに影響を与える。従って，溶解性の鉄やケイ素について論じる際には，絶対濃度のみならず窒素やリンとの存在比率についても把握する必要がある。

2. 2 調査対象流域

河川水および都市排水の調査対象は以下の通りである。

河川について,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・涸沼川・寛政川（霞ヶ浦および涸沼流域）10 地点において流心付近を採水し，湖沼について，手賀沼 6 地点，霞ヶ浦 7 地点において表層水を採水して調査を行った。

調査は秋期・冬期（2006 年 10 月～2007 年 3 月）に実施し，河川は，鶴見川・多摩川・利根川・荒川の最下流地点のみ月２回，その他の地点は月１回調査した。湖沼については，季節毎（３ヶ月に１回）に調査した。

都市排水について，鶴見川および多摩川流域に存在する下水処理場（それぞれ 7 箇所および 9 箇所）の流入下水および放流水を季節毎（３ヶ月に１回）に調査した。

2. 3 分析方法

溶解性の定義は，5 種 C ろ紙（孔径 1μm 相当）を通過するものとした。ICP-MS により溶解性鉄(D-Fe)および全鉄(T-Fe)を測定し，ICP-AES および自動比色分析（モリブデンイエロー法)により溶解性ケイ素(D-Si)を測定した。窒素およびリンについては自動比色分析により測定した。

3. 結果および考察

3. 1 河川水

2006年10月から2007年3月までの河川水中の溶解性の鉄およびケイ素の濃度について図-1および図-2に示す。

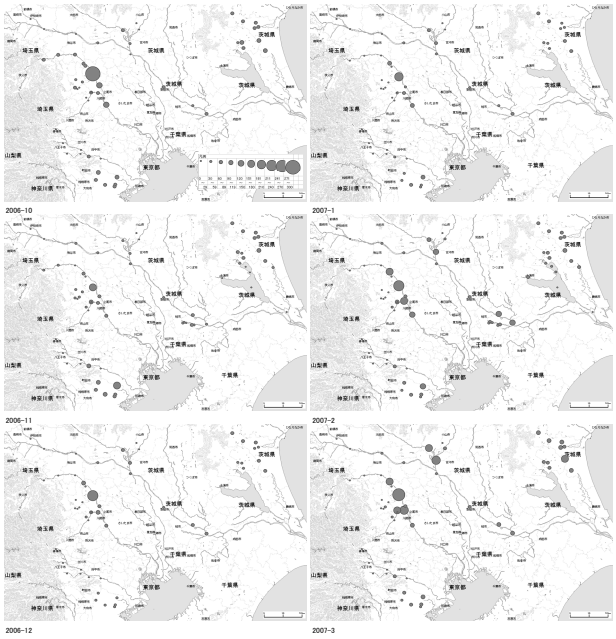


図-1　河川水中の溶解性鉄濃度(2006年10月～2007年3月，湖沼は11月および2月に調査)

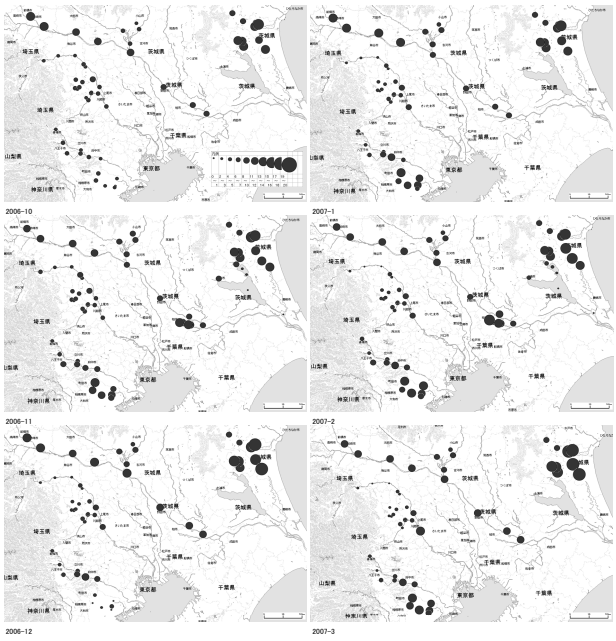


図-2　河川水中の溶解性ケイ素濃度(2006年10月～2007年3月，湖沼は11月および2月に調査)

溶解性鉄濃度は河川で4.2～282μg/L（平均55.1μg/L），湖沼で9.0～79.8μg/L（平均39.4μg/L）であった。溶解性ケイ素濃度は河川で1.4～18.7mg/L（平均9.4mg/L），湖沼で0.3～15.5mg/L（平均8.6mg/L）であった。鉄もケイ素も月ごとに濃度が変動するが，地点ごとの傾向は比較的一定であった。

溶解性鉄と溶解性窒素（NH_4^+-N + NO_x^--N）の比率Fe/Nは，11月の河川水で6.3×10^{-4}～1.8×10^{-2}（平均5.0×10^{-3}），湖沼水で1.3×10^{-3}～1.0×10^{-1}（平均1.7×10^{-2}）であり，レッドフィールド比Fe/N=6.3×10^{-6}～6.3×10^{-5}程度より平均で3オーダー程度大であった。また，溶解性鉄と溶解性リン(PO_4^{3-}-P)の比率Fe/Pは，11月の河川水で2.2×10^{-2}～7.5×10^{0}（平均9.3×10^{-1}），湖沼水で2.3×10^{-1}～1.7×10^{1}（平均4.6×10^{0}）であり，レッドフィールド比Fe/P=1.0×10^{-4}～1.0×10^{-3}程度より3オーダー程度大であった。よって，溶解性の窒素やリンと比較して，溶解性鉄は十分な量が存在していると考えられた。

溶解性ケイ素と溶解性窒素および溶解性リンの比率Si/N，Si/Pについて11月の調査結果を図-3に示す。

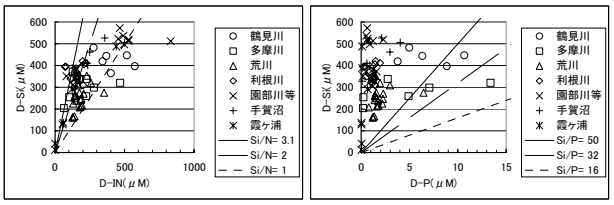


図-3　河川水中の溶解性ケイ素濃度と溶解性窒素・リン濃度との比率（2006年11月調査）

Si/Pについては，ほとんどの地点でレッドフィールド比16～50程度以上となっていた。Si/Nについては，レッドフィールド比1～3.1程度の範囲に収まる地点が大半であり，いくつかの地点で下回っていた。よって，溶解性ケイ素はリンとのバランスでは概ね問題ないが，窒素とのバランスでは不足もあり得ることが推測された。

3. 2　都市排水

鶴見川および多摩川流域に存在する下水処理場（それぞれ7箇所および9箇所）の流入下水および放流水を調査した結果，秋期の結果より，溶解性鉄濃度は放流水／流入下水の比が9.9～56.6%（平均32.7%）であり，半分程度以下となっていた。溶解性ケイ素は流入下水と放流水でほぼ同濃度であり，変化が見られなかった。

4. まとめ

溶解性鉄は，都市排水中の濃度が下水処理場で半分程度以下となるが，河川水中では溶解性窒素・リンとレッドフィールド比で比較して十分な濃度が存在していた。溶解性ケイ素は，都市排水中の濃度は下水処理場で変化しないが，河川水中では溶解性窒素とのバランスで不足する場合もあり得ると考えられた。今後，さらに調査を進め，季節変動等を加味した解析も行うこととする。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

アジア･モンスーン地域の下水処理施設における病原微生物の消長に関する研究

独立行政法人　土木研究所　尾崎正明、諏訪 守、陶山 明子

１．要約

本研究では、主にアジア・モンスーン地域に属するタイにおいて、下水中の病原微生物の実態や現地で採用されているラグーンでの除去特性の解明を目的に実態調査を行った。一部、沖縄県に設置されたラグーン実験施設での調査を含め、タイでの調査はコンケンおよびバンコクのアジア工科大学（AIT）に隣接するラグーンを対象とした。また、コンケンでは都市部の河川において降雨時の汚濁負荷上昇時に実態調査を行い、病原微生物の汚濁状況を把握した。これらの結果から、１）ラグーンでの病原微生物の除去特性、２）下水排除方式の違いが流入下水中の病原微生物濃度へ及ぼす影響、３）都市部河川における降雨時汚濁負荷上昇時の病原微生物濃度について、各々解明するとともに、調査結果から得られた現状での課題を整理した。

タイのラグーン施設での各病原微生物の平均除去率は 80～99.9%程度であり、大腸菌群数、ジアルジアの除去率が比較的高い傾向が見受けられた。ノロウイルスの除去率に関しては大きな変動を示すことから、放流先の水質リスクをさらに低減させるために、安定した除去を行うための対策の構築が必要であると考えられた。既存の土壌浸透式トイレあるいはセプティクタンクを活用した下水の排除方式とすることで、直接に下水がラグーンに排除される方式と比較して、流入下水、ラグーン処理水中の病原微生物濃度は相対的に低くなるため、病原微生物の環境への負荷を低減できる可能性が示唆された。コンケンの都市河川における調査結果では、降雨時の汚濁負荷上昇時においてノロウイルス、ジアルジアともに検出濃度は増加する場合も見受けられたが、一部ノロウイルスでは雨水により希釈され検出濃度・割合は低下し、その傾向は明らかでなかった。

２．研究目的

アジア・モンスーン都市部においても都市化の進展、人口集中などに伴いヒトからの排泄物により、病原微生物の汚染による水環境の悪化が懸念されている。水環境の改善、水資源の確保は重要であり、下水道整備によりその対応を講ずることが望まれる。発展途上国では一般的にラグーンなどにより下水処理が行われているが、処理方法や放流水系状況の違いによって病原微生物の消長は変化するものと考えられ、水環境の改善、水資源の確保の観点からその実態を解明する必要がある。

本研究の目的は、病原微生物を細菌、原虫、ウイルスに分類し、各々の分類毎に指標となる微生物の評価を行い実態を把握するとともに、ラグーン施設の運転条件が病原微生物の除去に及ぼす影響を調査し、水系での消長を解明するものである。

３．研究計画

15 年度は、沖縄県のラグーン実験施設において、降雨、流出 SS、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響を把握するとともに、植生浄化法による病原微生物の消長を調査した。

16 年度は、アジア・モンスーン地域に属するタイのバンコクとコンケンにおいて、流入下水の病原微生物の実態やラグーンにおける消長調査を実施した。

17 年度は、上記調査の 16 年度の報告データが限られたものであったため、17 年 3 月までのデータを補完した。また、コンケンの下水道システムは合流式で雨季に下水の量が増加しラグーンの容量を超えた場合には、その越流水が河川に直接放流されるため、雨季における市街地河川の病原微生物調査は重要であると考えられる。このため、コンケンでは都市部の河川において、降雨時の汚濁負荷上昇時に実

態調査を行い病原微生物の汚濁状況を把握した。

18 年度は、コンケンの各家庭に設置されているセプティクタンクなどが病原微生物の流出抑制に果たす効果などを把握するとともに、各年度に実施した調査結果についてとりまとめた。

４．研究方法および対象微生物

本研究では発展途上国における代表的な下水処理方式のラグーンによる病原微生物の除去特性を解明するため、沖縄県 A 浄化センター内にあるラグーン実験施設とアジア・モンスーン地域に属するタイのコンケンおよびバンコクのラグーン施設において実態調査を行った。沖縄県のラグーン実験施設の概要を図－1 に示す。ラグーンの容量は 100m³、水深は 2m であり、ラグーン実験施設の後段には処理水の高度処理を目的とした施設面積約 0.09ｍ²、水深 30cm のアシを植生した浄化施設を有する。沖縄県では、ラグーンにおける降雨、流出ＳＳ、日間変動などが病原微生物の消長に及ぼす影響やラグーン処理水の処理レベルの高度化を図るため、植生浄化法による病原微生物の消長を明らかにするために通日調査を行った。

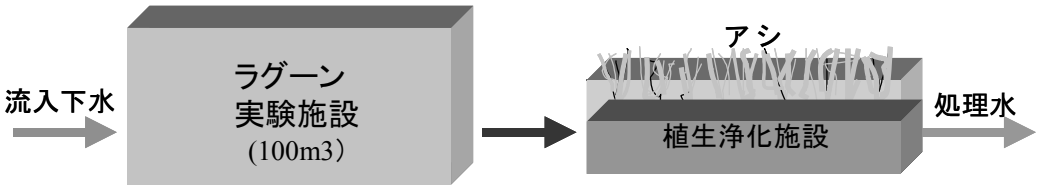


図-1　ラグーン実験施設等の概要

タイのラグーン施設の概要を図－2、3 に示す。コンケンは 3 池のラグーンから構成されており、第 2 池で間欠曝気を行い、総容量は 46,000m³、平均水深は 2m である。バンコクではアジア工科大学（AIT）に隣接するラグーンにおいて調査を行った。AIT は 2 池のラグーンから構成されており、容量は 2,125m³、3,360m³、水深は 1.7m、0.7ｍである。AIT では流入下水、第 1、2 池流出水、コンケンでは流入下

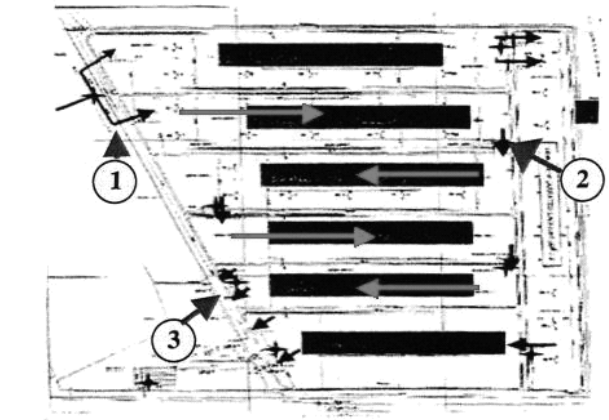


図-2 コンケンのラグーン施設
(1:流入下水，2:第 2 池流出水，3:第 3 池流出水)

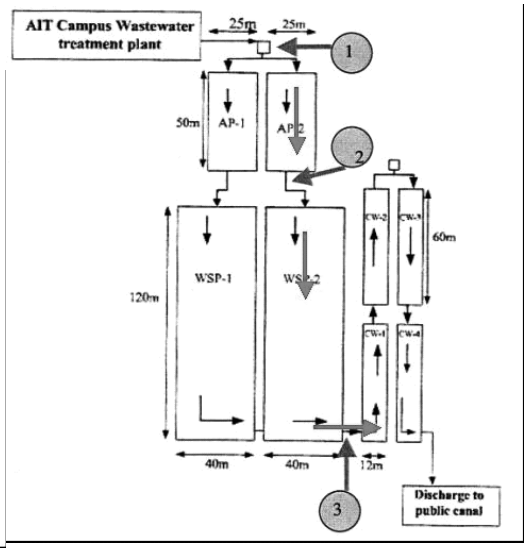
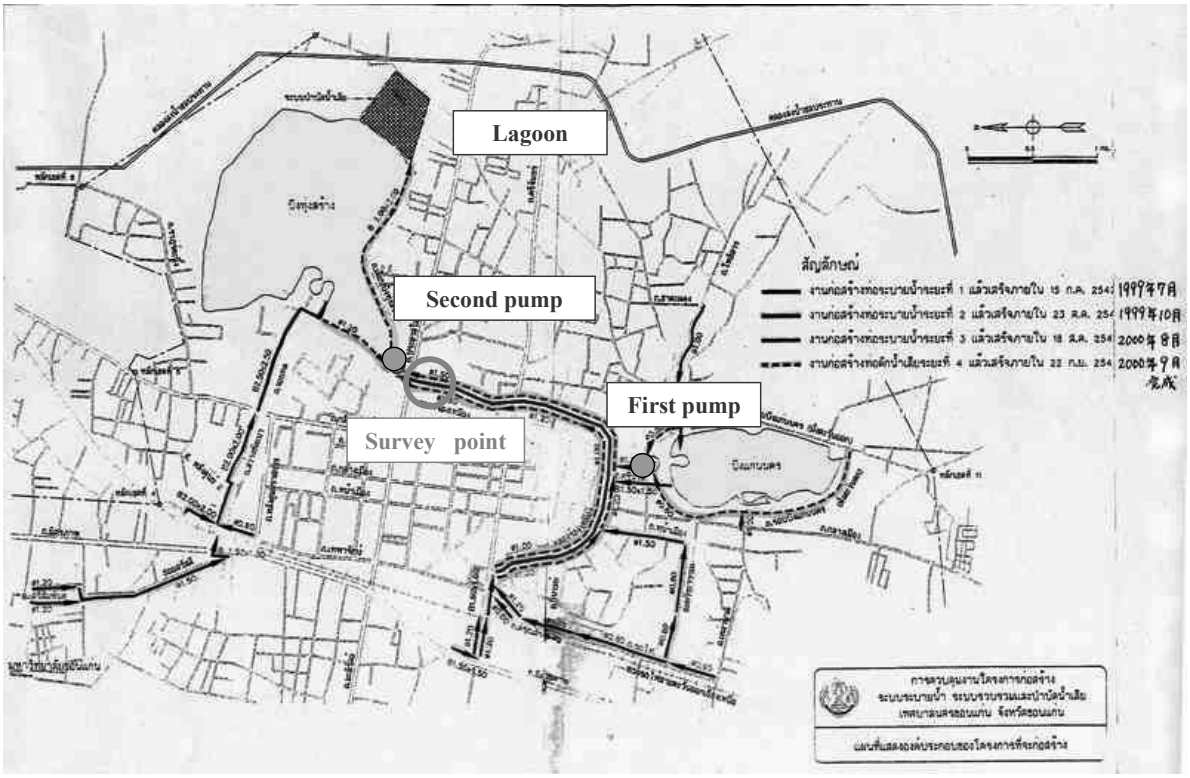


図-3 AIT のラグーン施設
(1:流入下水，2:第 1 池流出水，3:第 2 池流

水、第2、3池流出水の各々3試料について月1回程度の採水を行った。コンケンは個々の家庭でセプティプタンクあるいは浸透式トイレが設置されており、その上澄流出水や家庭雑排水がラグーンに流入するものと考えられる。AITでは水洗トイレにより下水はラグーンに排出される。また、コンケンの都市河川における実態調査箇所の概略を図－4 に示す。降雨時の越流水が河川に流入する複数地点の最終位置で採水を行った。降雨時の汚濁負荷上昇時の分析検体数は 27 検体、比較対照としての晴天時試料は30検体とし、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ノロウイルスの他に濁度、河川流量の測定を行った。タイでは、ラグーンでの病原微生物の除去特性、下水排除方式の違いが流入下水中の病原微生物濃度へ及ぼす影響、都市部河川における降雨時汚濁負荷上昇時の河川水中の病原微生物濃度について各々調査を行った。



図－4　コンケンの都市河川の調査地点

各々の調査で分析対象とした病原微生物は大腸菌群数、ジアルジア、クリプトスポリジウム、ノロウイルス（ファージ）とし、それらの測定法を以下に示す。大腸菌群数法は、MPN 法あるいは平板培養法とした。原虫類のジアルジア、クリプトスポリジウムは試料を遠心濃縮、免疫磁気ビーズによる分離の後、間接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、間接蛍光抗体染色には HYDORO-FLUOR-Combo キット、ENSYS INC.を用いた。大腸菌ファージは、*E.coli*K12F^{+}株を宿主菌とした重層寒天によるプラーク法とした。ウイルスの濃縮法は、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法によるもので、試料中に PEG6000（終濃度 8%）および NaCl（終濃度 0.4M）を添加・撹拌し完全に溶解させた。4℃で一夜静置した後、10,000×G、30 分間遠心分離して沈渣を回収した。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 法により定量を行った。また、リアルタイム PCR 法によるウイルスの定量感度を把握するため、ノロウイルス G1 型[1, 2] G2 型[1, 2]について各々の高度保存領域をクローニングしたコントロール cDNA を作製し、TaqMan プローブを用

いて、その希釈系列に対してリアルタイム PCR 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 Kit(QIAGEN 社)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 1μg 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 2～2.5μl をリアルタイム PCR に供した。使用したプライマーおよびプローブを表－1 に示した。

表－１　使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ノロウイルス	G1 型	COG1F	COG1R	RING1-TP(a) RING1-TP(b)
	G2 型	COG2F	COG2R ALFP	RING2AL-TP

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、食安監発第 1105001 号「ノロウイルスの検出法について」に準じた。リアルタイム PCR 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。ノロウイルス G2 型のみの結果について示すが、図－5 は各希釈系列について PCR サイクル数に対する蛍光強度、図－6 は各希釈系列について蛍光強度が指数的に増加し始めるサイクル数と希釈濃度の対数値に対してプロットし得た検量線である。5～10^{10}コピーの間で蛍光強度と相関性があり、この範囲で定量測定が可能であると考えられた。

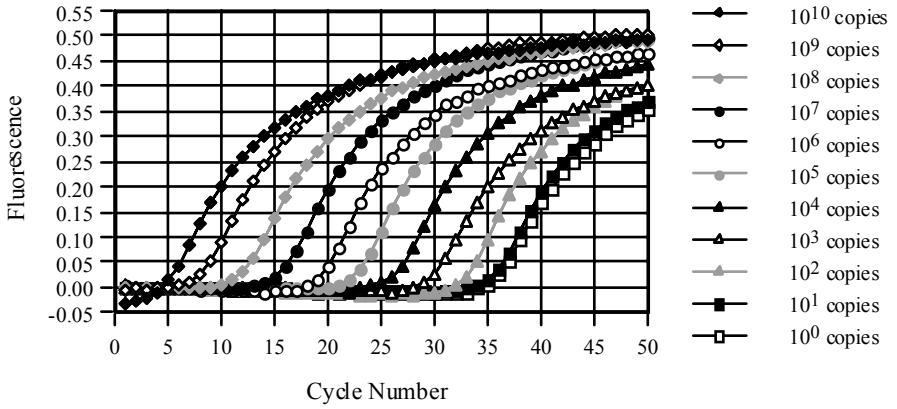


図-5　リアルタイム PCR 法によるノロウイルス標準試料の検出

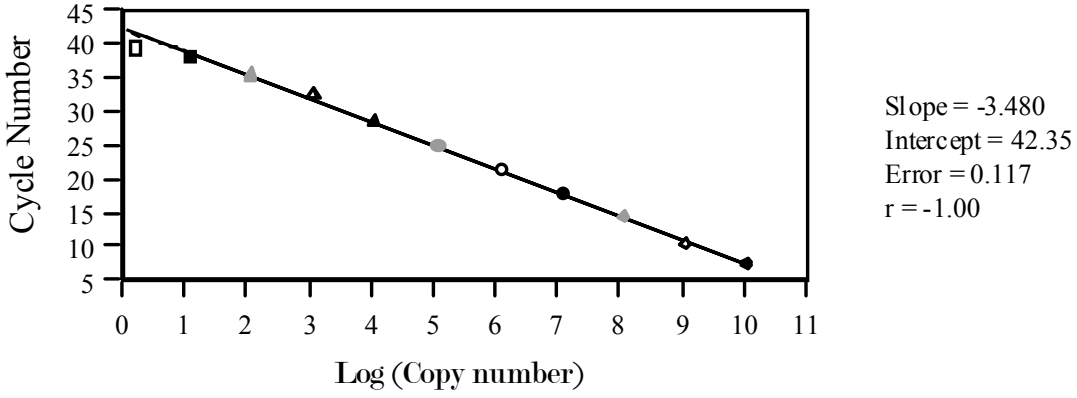


図-6　各希釈系列と PCR サイクル数の関係

５．研究結果および考察

５．１　沖縄県での調査結果

各指標微生物の降雨時および晴天時における日間変動を図－7～10 に、濃度と除去率について整理したものを表－2 に示す。

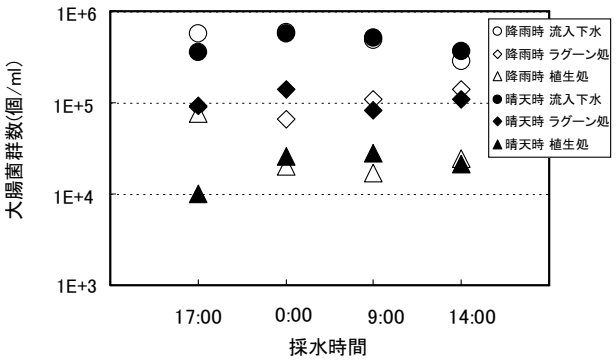


図-７　大腸菌群数の日間変動

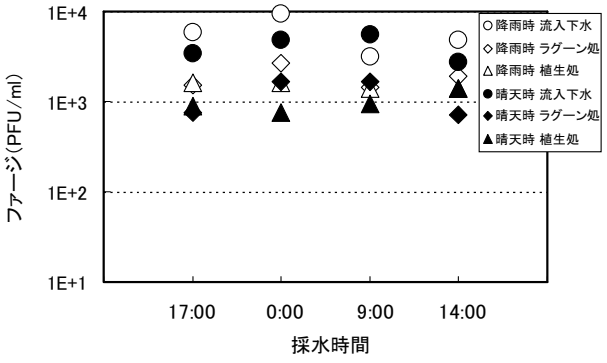


図-８　大腸菌ファージの日間変動

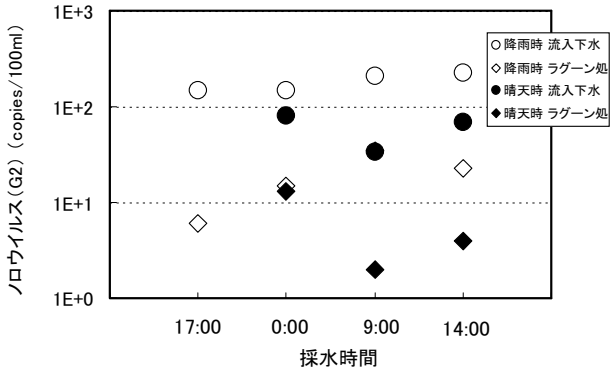


図-９　ウイルスの日間変動

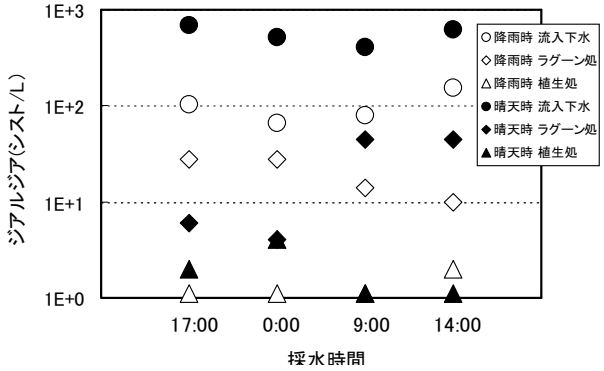


図-１０　ジアルジアの日間変動

表-2　各指標微生物の濃度と除去率

		大腸菌群数（個/mL）	ノロウイルス（上澄液）（copies/100ml）	ファージ（Pfu/mL）	ジアルジア（個/L）	ＳＳ（mg/L）
降雨時	流入下水	4.9E+5	1.8E+2	5.8E+3	1.0E+2	73
()内:除去率%	ラグーン処理水	1.0E+5（79%）	1.9E+1（90%）	1.9E+3（68%）	2.0E+1（80%）	67（8%）
	植生浄化処理水	3.6E+4（93%）	（－）	1.5E+3（74%）	1.0E+0（99%）	52（29%）
晴天時	流入下水	4.6E+5	6.1E+1	4.1E+3	5.6E+2	98
()内:除去率%	ラグーン処理水	1.1E+5（77%）	6.3E+0（90%）	1.2E+3（71%）	2.4E+1（96%）	108（－）
	植生浄化処理水	2.1E+4（95%）	（－）	1.0E+3（76%）	1.5E+0（98%）	63（36%）

（滞在時間：ラグーン 10 日間・植生浄化 12 時間）

降雨時の調査期間における近郊の降水量は36mmであった。降雨時と晴天時における流入下水中の各指標微生物の濃度は、大腸菌群数、大腸菌ファージと比較してその変動幅は 10 ウイルスおよびジアルジで大きい傾向が見られた。ラグーンによる大腸菌群数の除去率は80%程度であり、降雨時、晴天時でもラグーン処理水の濃度に大きな違いはなく日間変動も小さかった。大腸菌ファージの除去率は、降雨時および晴天時とも日間平均値で 70%程度であった。しかし、降雨時においてラグーン処理水の大腸菌ファージ濃度はほぼ一定であるが、晴天時の調査では、夜中から朝方にかけ若干の濃度上昇が見られた。図－11～13 に水温、pH、DO の推移を示すが、この時のラグーン処理水の17時と14時のpHは8.4、溶存酸酸素濃度は14～18mg/l、0 時と 9 時では pH は7.2、溶存酸酸素濃度は0mg/l であった。酸化池内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告[3)]もあるが、ラグーン処理水 10 ウイルス濃度は晴天時の調査においてファージの挙動と比較して異なっていた。このため、ファージをウイルスの代替指標として利用する場合には、今後データの蓄積を図りこれらの要因を解明する必要があると考えられた。10 ウイルスの除去率は、降雨時および晴天時とも日間平均値で90%程度であった。原虫類のジアルジアでは、降雨時と晴天時の流入下水の濃度で大きな違いが見られまた、若干除去率に差があるものの、ラグーン処理水の平均濃度はほぼ同じであった。クリプトスポリジウムは、流入下水で 1～4 個/l の範囲で検出される場合もあったが、ラグーン処理水からは検出されていない。

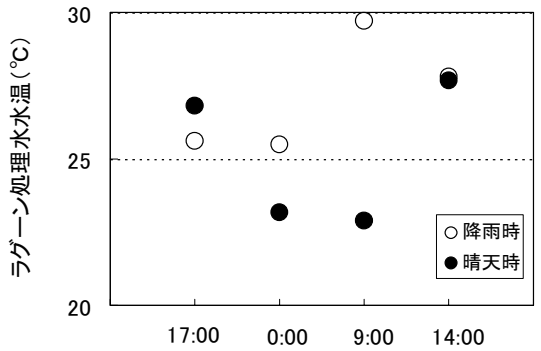


図-11　水温の推移

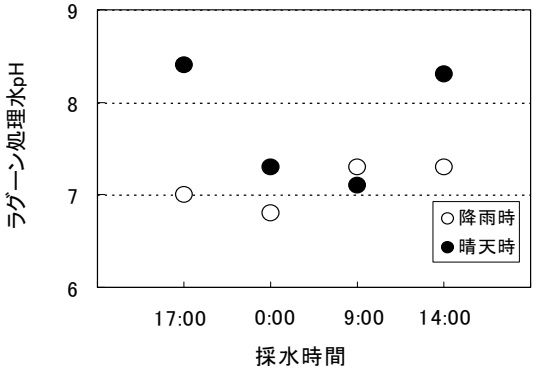


図-12　pH の推移

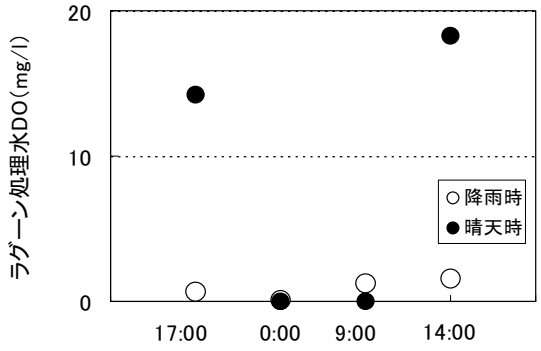


図-13　DO の推移

一方、降雨に伴うラグーン施設からの流出流量は設定流量に対し 10%程度の増加が見られたことから、病原微生物としての流出汚濁負荷量は若干上昇するものと考えられた。

植生浄化法では、大腸菌群数、ジアルジアは1ケタ程度濃度レベルが減少したが、ファージについては、大きな濃度レベルの減少は見られなかった。

ラグーンでのＳＳ除去率は低く、また植生浄化法でも30%程度であるため、ラグーンでの固液分離を良好に行えれば、さらに各指標微生物の除去率を向上させられるものと推定された。

５．２　タイのラグーンによる病原微生物の除去特性

タイでの調査結果を表－3 および図－14～17 に示す。各々コンケンと AIT において下水の排除方式が異なることから流入下水の病原微生物の濃度に大きな違いが見られた。特に AIT の流入下水ではジアルジアのシスト濃度の最大検出濃度は 1.8×10^{4}（cysts／L）、ノロウイルス（G1 型）濃度は 1.8×10^{7}（copies／L）となっており、沖縄県でのラグーンの調査結果との比較となるが、その流入下水と比較すると 2～3 オーダー高い。大腸菌群の濃度レベルは同程度であった。クリプトスポリジウムは我が国の流入下水での調査結果[4)]と比較すると検出割合は比較的高かったが、検出濃度は同レベルであった。コンケンの流入下水の病原微生物濃度は AIT と比較してそれ程高濃度ではないが、沖縄県でのラグーンの流入下水のノロウイルス濃度と比較すると、最大検出濃度は 2 オーダー高い。クリプトスポリジウムは全ての試料で不検出であった。

表－３　各病原微生物の検出濃度範囲と除去率

地点＼微生物		大腸菌群 (cfu or MPN/ml)	ノロウイルスG1 (copies/L)	ノロウイルスG2 (copies/L)	ジアルジア (cysts/L)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)
記載データ		H16.6月～H17.2,3月	H16.6月～H17.3月		H16.6月～H17.3月	
コンケン	流入下水	4.4E+2～2.3E+5	8.6E+3～9.7E+5	4.1E+2～1.6E+5	ND～1.5E+2〔13/16〕	ND〔0/16〕
	第2池流出水	4.0E+1～3.0E+4	ND～1.7E+4	ND～1.7E+4	ND～2.2E+1〔4/16〕	ND〔0/16〕
	第3池流出水	3.8E+1～2.2E+4	ND～6.9E+3	ND～1.0E+4	ND～1.0E+0〔1/16〕	ND〔0/16〕
	除去率の範囲(%)	0～99.6	82.4～100	0～100	99.3～100	—
	平均除去率(%)	83.2	95.2	89.0	99.9	—
AIT	流入下水	2.1E+4～9.0E+6	2.7E+4～1.8E+7	1.1E+4～2.0E+6	2.6E+2～1.8E+4〔21/21〕	ND～1.6E+1〔14/21〕
	第1池流出水	4.6E+3～1.6E+6	6.2E+4～2.2E+6	1.3E+4～1.3E+6	1.1E+1～4.1E+2〔13/13〕	ND～2.0E+0〔2/13〕
	第2池流出水	7.0E+1～5.0E+3	3.6E+1～4.2E+5	ND～6.0E+4	ND～5.6E+1〔20/21〕	ND〔0/21〕
	除去率の範囲(%)	98.1～99.9	0～99.9	56.2～100	94.6～100	100
	平均除去率(%)	99.6	74.1	92.1	99.4	100

原虫類の欄〔 〕内：下段検体数，上段検出検体数

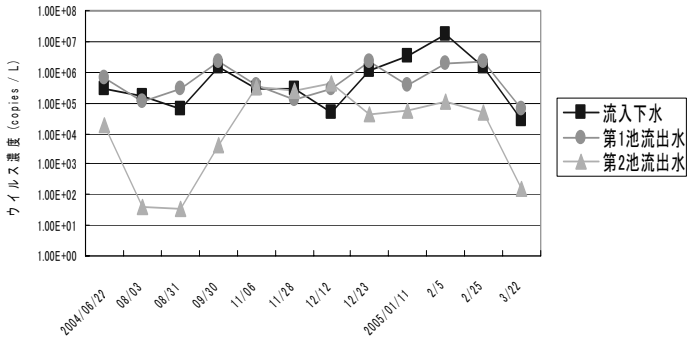


図-14 タイのAIT におけるノロウイルス G1 濃度

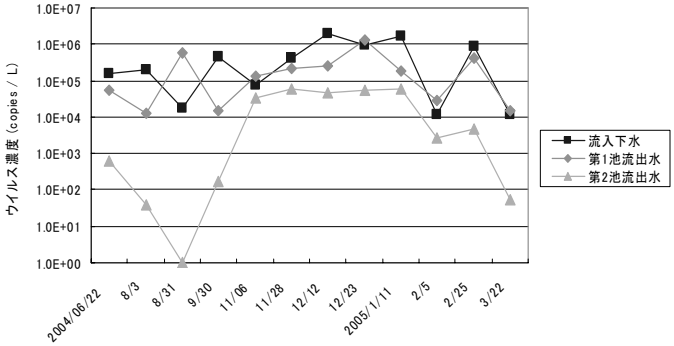


図-15 タイ のAIT におけるノロウイルス G2 型濃度

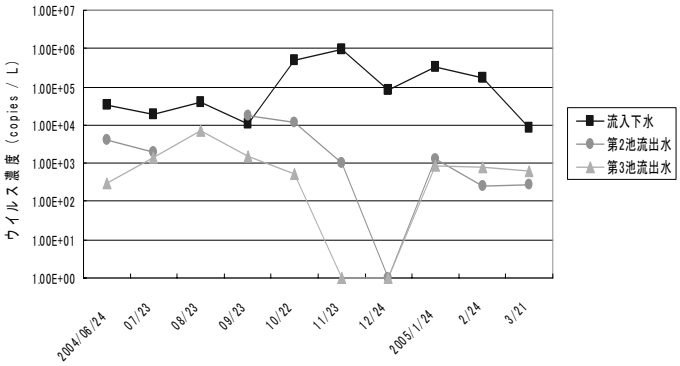


図-16 タイのコンケンにおけるノロウイルス G1 型濃度

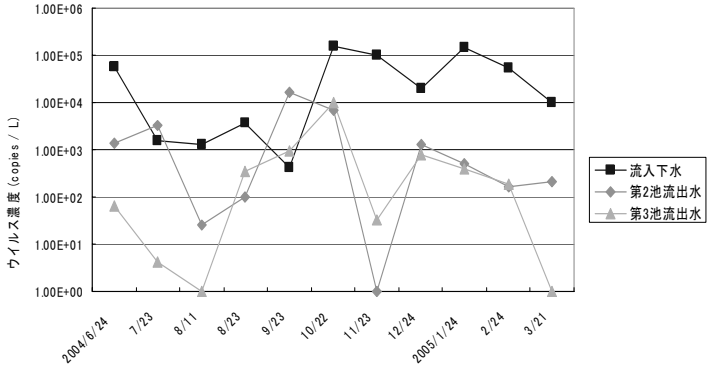


図-17 タイ のコンケンにおけるノロウイルス G2型濃度

環境水に大きな影響を及ぼすと考えられるラグーン処理水の病原微生物濃度は各々低レベルとなっている。ラグーンによって各病原微生物とも 1log 程度から 3log 以上の平均除去率が得られており、ラグーンの滞留時間が 10 日間での沖縄県で行った調査結果と比較すると大腸菌群、ジアルジアの除去率は高い。除去率が高い要因はラグーンの配置が多段であることや、推定ではあるが滞留時間が異なることに起因するものと考えられる。しかし、ノロウイルスの除去率に関しては大きな変動を示した。ラグーン内の溶存酸素濃度とコリファージの藻類等の浮遊状粒子への吸脱着現象についての報告[3)]があることから、ウイルス除去率と溶存酸素濃度や他の水質項目との関係を整理したが、有意な相関関係は見られなかった（図－18～20)。また、流入下水中の病原微生物の各々の関係について整理したものを図－21～23 に示したが、各々の病原微生物との間で有意な相関関係は見られなかった。

このため、放流先の水質リスクをさらに低減させるために、安定した除去を行うための対策の構築や各々の病原微生物の評価に際しても直接測定を行う必要性の課題があるものと考えられた。

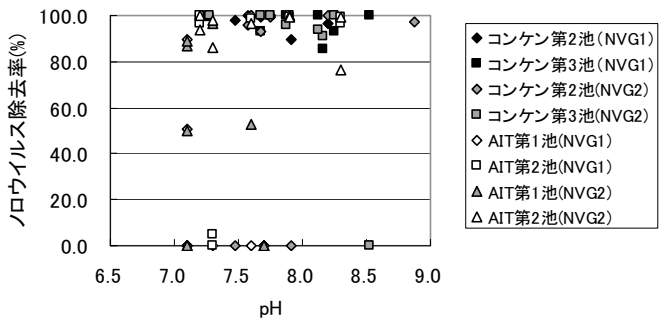


図-18 pHとノロウイルス除去率の関係

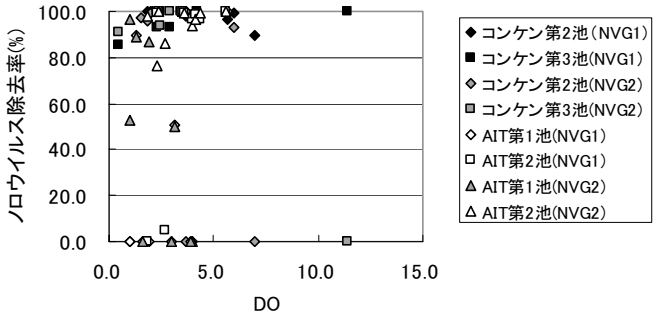


図-19 DO とノロウイルス除去率の関係

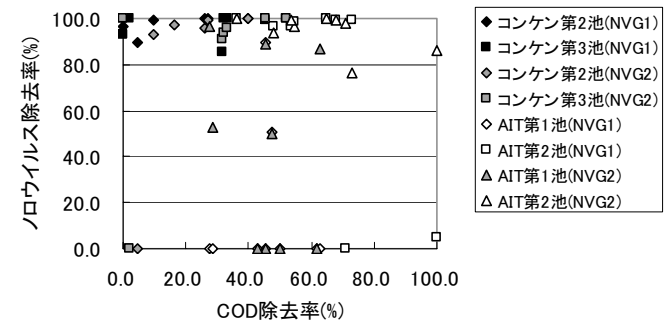


図-20 COD 除去率とノロウイルス除去率の関係

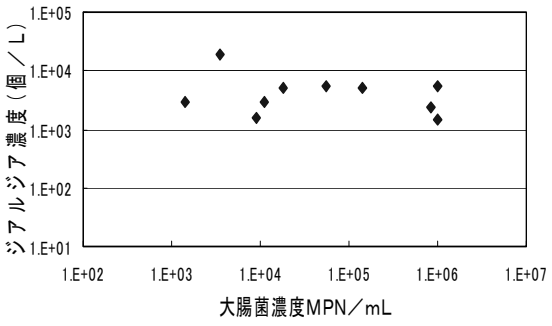


図-21 流入下水中の大腸菌とジアルジアの関係(AIT)

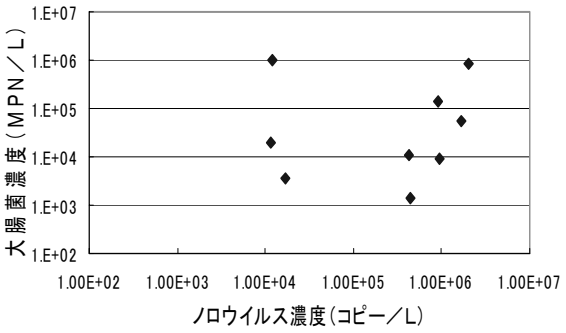


図-22 ノロウイルス濃度と大腸菌濃度の関係(AIT)

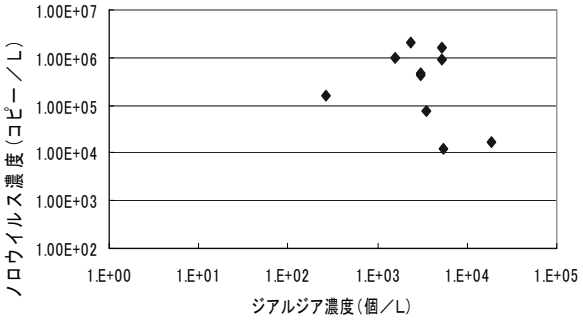


図-23 流入下水中のジアルジアとノロウイルスの関係(AIT)

５．３　下水排除方式の違いが流入下水中の病原微生物濃度へ及ぼす影響

コンケンは個々の家庭に土壌浸透式トイレあるいはセプティプタンクが設置（写真－1、2）されており、ふん尿は堆積した段階で別途収集され市街地郊外で廃棄処分されているため、ラグーンへ排出される下水の大半は生活雑排水が占めると考えられる。堆積汚泥の処分方法は、素堀の穴への投棄により安定化を図っている。バンコク(AIT)では水洗トイレにより下水はラグーンに排出されるため、コンケンとは下水の排除方式が異なることから、流入下水中の病原微生物濃度に 1～2 オーダーの違いが見られた。クリプトスポリジウムはコンケンの全ての試料で不検出であった。AIT では流入下水で検出割合は高いもののジアルジアに比較して検出濃度は低レベルであり、ラグーン処理水からは検出されなかった。AIT に比較してコンケンのラグーン処理水中の病原微生物濃度も相対的に低いため、既存の土壌浸透式トイレあるいはセプティプタンクの活用により、病原微生物の環境への負荷を低減できることが示唆された。しかし、AIT に比較して病原微生物の流入濃度は低いものの、し尿を含む下水がラグーンへ流入している可能性があるため、堆積汚泥の引き抜きなどの適切な管理を行う必要があるものと考えられた。



写真-１　セプティクタンク



写真-２　浸透式トイレ

５．４　都市部河川における降雨時汚濁負荷上昇時の病原微生物濃度

コンケンの下水道システムは合流式であり、雨季に下水の量が増加し処理場の容量を超えた場合には、その越流水が河川に直接放流されるため、雨季における市街地河川の病原微生物調査は重要であると考えられる。このため、越流堰の設置された市街地河川を対象に降雨時の汚濁負荷上昇時において、病原

微生物の実態調査を行いその汚濁状況を把握した。調査結果を表－4 および図－24～27 に示す。18 年度の調査結果を図に示したが、降雨時の汚濁負荷上昇時の濁度負荷量の推移とノロウイルス、ジアルジアとも検出濃度の推移は一致した傾向が見受けられたが、表に示した 17 年度の調査では一部ノロウイルスでは雨水により希釈され検出濃度･割合は低下し、その傾向は明らかでなかった。

近年､コンケンでは新興住宅地や商業施設などに対してはセプティプタンクの設置を推奨しているが、その堆積汚泥の適切な管理を行わなければ、病原微生物負荷が河川へ流出する可能性がある。降雨時の汚濁負荷上昇時や晴天時における河川水中の病原微生物の最大検出濃度は、流入下水の検出濃度と比較して同レベルであり、セプティプタンクからの流出負荷がこれらの一因とも推定されるが、これらの汚濁負荷源の究明とともに、その対策の実施は今後の課題であると考えられた。

表－４　コンケンの都市河川の調査結果

項目 / 各調査時の平均流量範囲(m^3/s)		大腸菌 (MPN/100 ml)	クリプトスポリジウム (oocysts/L)	ジアルジア (cysts/L)	ノロウイルス G1 (copies/L)	ノロウイルス G2 (copies/L)
降雨時流量	検出濃度範囲	5.1E+3～3.5E+4	ND	5.0E+0～2.0E+2	1.6E+2	5.3E+2
1.6～12.6	検出／分析検体数	10/10	0/22	10/22	1/22	1/22
晴天時流量	検出濃度範囲	1.2E+3～9.2E+5	ND	2.0E+0～2.6E+1	4.6E+2～9.3E+2	1.3E+2～1.1E+4
0.32～1.56	検出／分析検体数	10/10	0/15	11/15	2/15	15/15
晴天時流量	検出濃度範囲	6.5E+4～7.7E+5	ND～2.0E+0	2.0E+0～5.8E+1	8.1E+4～9.3E+5	4.4E+4～3.2E+5
0.11～0.17	検出／分析検体数	15/15	1/15	15/15	15/15	15/15

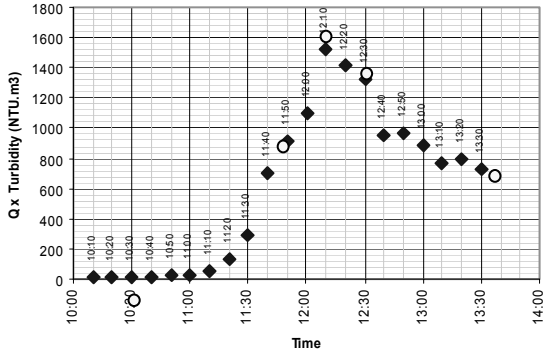


図-24　濁度負荷量の推移

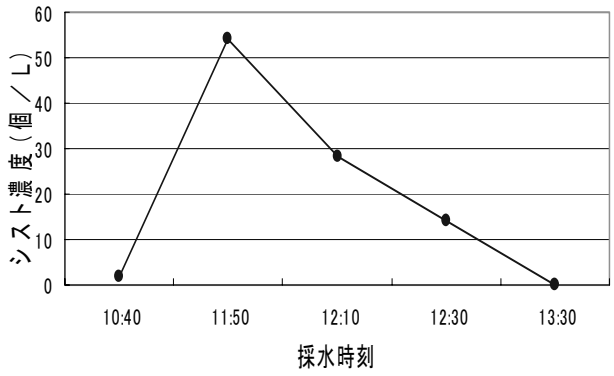


図-25 ジアルジア濃度の推移

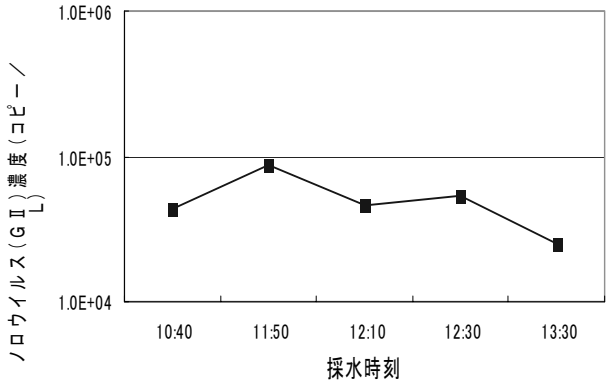


図-26 ノロウイルス濃度(ＧⅡ)の推移

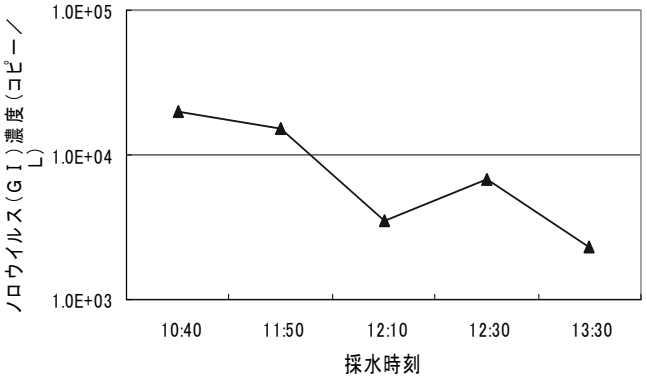


図-27 ノロウイルス濃度(ＧⅠ)の推移

６．まとめ

ラグーンにより病原微生物は除去され放流先水域への負荷を削減していると考えられたが、病原微生物の分類毎に除去率に若干の違いが見られた。また、既存の土壌浸透式トイレあるいはセプティクタンクを活用した下水の排除方式とすることで、直接に下水がラグーンに排除される方式と比較して、流入下水、ラグーン処理水中の病原微生物濃度は相対的に低くなるため、病原微生物の環境への負荷を低減できる可能性が示唆された。

これらの結果から明らかとなった課題としては、ウイルスの安定的な除去を行うための対策の構築や、病原微生物を分類毎に直接測定し評価する必要性、さらには、都市部河川における病原微生物の汚濁原因の解明とその対策の実施と考えられた。

本実態調査は、アジア工科大学のシピン博士、コンケン大学のパイラヤ博士と共同で実施した。

７．引用文献

１）篠原美千代,影山努 (2002)蛍光プローブを用いたRT-PCR法 日本臨床,60(6),1181-1187.

２）影山努,小嶋慈之,福士秀悦,片山和彦(2001)蛍光プローブを用いた Norwalk virus (NV) の高感度検出法の開発,18 (1) 42-49. ＯＫ

３）大垣眞一郎,アウラピン・ケラタナク,ウタイパン・プラセソム(1986) 酸化池内でのコリファージの挙動に及ぼす日射の影響,衛生工学研究論文集,22,163-172. ｏｋ

４)M.Suwa,Y.Suzuki(2001)Occurrence of *Cryptosporidium* in Japan and countermeasures in wastewater treatment plants, *Water Science and Technology*, 43(12),183-186.

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（一般勘定）
研究期間：平18～平20
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：尾崎正明、諏訪守、陶山明子

【要旨】
18 年度は、環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態や下水処理水中での消長を把握した。また、薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価とともに、これらの大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性を行った。その結果、流入下水、処理水の大腸菌濃度とABPC、TC、LVFX耐性大腸菌濃度には強い相関関係あるいは相関関係が見られたが、河川水ではその傾向は認められなかった。河川・下水試料中のABPC耐性大腸菌は、複数の薬剤に対して耐性を示す傾向があるため、多剤耐性の割合も増加する。感受性試験から得られた大腸菌を二次処理水に添加し、その耐性変化を調査したが日数の経過とともに1剤耐性株は耐性を消失したが、3剤耐性株は耐性を保持していた。塩素消毒によるＣｔ値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌の割合を低下させられる可能性が示唆された。塩素消毒により3log不活化するために必要なＣｔ値は、0剤耐性大腸菌を基準とすると6剤耐性大腸菌では1.1～1.4倍量必要であった。また、これらの薬剤耐性大腸菌は、薬剤耐性遺伝子を保有していることが確認された。

キーワード：薬剤耐性大腸菌、耐性遺伝子、クリプトスポリジウム、ノロウイルス、リアルタイムPCR法

１．はじめに

クリプトスポリジウム、ノロウイルス、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の評価を行うとともに、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、現在のところ生死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法を活用し生死判定手法の構築の可能性を検討する。

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。なお、本研究は16年度から実施していた萌芽的研究の水環境中における薬剤耐性菌の消長に関する研究を発展継続させたものである。18年度は以下の研究を行った。

１）環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態の把握
２）薬剤耐性大腸菌の下水処理水中での消長把握
３）薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価
４）薬剤耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

２．研究目的

２．１ 環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態

環境水中における薬剤耐性菌の汚染実態を明らかにすることを目的に、環境水に大きな影響を及ぼすと考えられる下水処理場を含めた各種排水処理施設などからの耐性菌排出量を把握し、環境水への影響の大きさを検討した。処理区域・流域の異なる3箇所の下水処理場、2河川を対象に16年度から調査を行っているが、18年度はこれら一部の処理場・河川での調査データを追加するとともに、新たに1河川を調査対象に加えた。

２．２ 薬剤耐性大腸菌の下水処理水中での消長把握

人畜由来汚濁負荷により、薬剤耐性大腸菌による汚

染は顕著となり、特にABPC（アンピシリン）に耐性を示す大腸菌の存在割合は河川、下水試料ともに高い傾向が見受けられた。環境水中に放出された大腸菌の薬剤耐性については、環境条件や細菌が保有する耐性遺伝子などの有無により、その消長に影響を及ぼしている可能性が推測される。このため、その消長に及ぼす影響の把握を目的に、薬剤に対する感受性の異なる大腸菌を利用し、下水処理水中での耐性の変化を室内実験により把握した。

２．３ 薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価

人畜由来汚濁負荷の影響を受ける下水・河川試料では薬剤耐性大腸菌が存在するが、下水処理過程での活性汚泥処理や消毒プロセスを経ることで、その濃度は大幅に低下することが考えられた。その中でも活性汚泥処理による除去では大腸菌の除去にも限界があることから、これを完全に除去する場合には、最終的には消毒によりその濃度の低減を図る必要がある。ここでは、薬剤耐性大腸菌の消毒耐性の評価を目的に、下水処理場で採用例の多い塩素消毒を対象に、その不活化効果を明らかにした。

２．４ 薬剤耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

17年度までの調査結果から下水、河川水試料中の薬剤耐性大腸菌はABPCやTC（テトラサイクリン）に耐性を示す株が最も多く検出された。グラム陰性桿菌ではABPCなどの耐性遺伝子のほとんどがRプラスミド上にあるとされることから[1)]、活性汚泥処理後の多剤耐性大腸菌の割合増加や水環境中における多剤耐性大腸菌の存在は、Rプラスミドによる耐性遺伝子の伝達が一因であるものと推定された。このため、耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的に、上記2.3で利用した大腸菌を対象に、その保有状況も含め定性分析を行った。

３．研究方法

３．１ 環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態

３．１．１ 調査対象

本研究での調査対象は処理区域･流域の異なる3箇所の下水処理場と3河川である。下水試料はB、D、E処理場の流入下水、活性汚泥処理水であるが、E処理場は病院内の下水処理場であり、その負荷は病院排水のみとなっている。河川試料はA、C、Fの河川水であり、各々の流域汚濁負荷の存在形態は、A河川では畜産系汚濁負荷、C河川は森林、F河川は単独・合併浄化槽の普及地域である。なお、F河川では本川とその支川の合計3ヶ所で調査を行った。

３．１．２ 薬剤耐性・感受性試験

薬剤耐性菌の対象を大腸菌とし、薬剤耐性・感受性試験を行った。大腸菌の測定はクロモカルト培地による平板培養法とした。薬剤耐性試験での対象抗生物質はLVFX（レボフロキサシン）、ABPC、TCの3種類である。LVFXは最終濃度が8mg／Lになるようクロモカルト培地に添加、ABPCでは32mg／L、TCでは16mg／Lとし、添加系と無添加系における大腸菌の検出濃度の違いにより耐性割合を把握した。

感受性試験は、上記の抗生物質無添加培地、さらにはABPC添加培地によって検出された各々の大腸菌の典型コロニーを釣菌、その培養液を平板に固めた寒天培地上に塗布し、平板上に抗生物質の含有されたディスクを置いた。この平板を35℃で16～18時間培養の後、平板上に形成された阻止円の直径を測定し耐性、感受性の判定を行った。対象抗生物質はLVFX、ABPC、TC、CFDN(セフジニル)、KM(カナマイシン)、ST（スルファメトキサゾール･トリメトプリム）、GM（ゲンタマイシン）、IPM（イミペネム）の8種類とした。抗生物質含有ディスクはKBディスク（栄研化学）を利用し、感受性試験の判定基準などはKBディスクの手引きを参照した[2)]。

３．２ 薬剤耐性大腸菌の下水処理水中での消長

D下水処理場の二次処理水を対象とした感受性試験から検出した大腸菌を実験に用いた。8種類の抗生物質に対して耐性の無い株、ABPCに耐性を示した株、またABPCを含め3剤の抗生物質に耐性を示した株である。0.22μmのフィルターでろ過を行った二次処理水中に各々の株を添加、20℃の恒温室内に放置し、1、7日間後に採水し大腸菌の測定を行った。そのコロニーの感受性試験結果を基に耐性の変化について把握した。

３．３ 薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価

消毒実験は、D下水処理場の二次処理水に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、消毒前後における試料中の大腸菌を測定するとともに、それらの大腸菌コロニーを釣菌し感受性試験を実施した。次亜塩素酸ナトリウム

の添加濃度は0～2mg／L、接触時間を15分間とした。最大添加濃度の2mg／Lは我が国の下水処理場における次亜塩素酸ナトリウムの平均添加濃度である[3]。残留塩素の中和処理はチオ硫酸ナトリウムを添加し、塩素濃度の測定はDPD法によった。

また、上記消毒実験では二次処理水中に存在する不特定多数の大腸菌を対象としているが、以下の消毒実験では、下水試料中から検出した大腸菌を用いた。消毒実験に用いた大腸菌は8種類の抗生物質に対して耐性の無い株、ABPCのみに耐性を示した株、またABPCを含め4剤、6剤の抗生物質に耐性を示した5種類の株であり、抗生物質に対する耐性数の違いが消毒効果に及ぼす影響を評価した。さらに、比較対象として薬剤感受性試験で精度管理用に利用している *E. coli* ATCC 25922株、*E. coli* ATCC 35218株の純粋株も塩素消毒実験に用いた。ここでは、各大腸菌株の塩素消毒耐性の比較を行うことから消毒条件の統一を図るため、各大腸菌株の培養を行い一定量に増殖させた後、遠心分離を行い上澄液を除去し沈渣として回収した菌株を生理食塩水に懸濁させ塩素消毒実験に供した。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 0～0.35mg／L、接触時間を15分間とした。

３．４ 薬剤耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

下水、河川水試料中の薬剤耐性大腸菌はABPCやTCに耐性を示す株が最も多く検出されている。ABPCはβ-ラクタム系抗菌薬の一種であるため、βラクタマーゼ関連の耐性遺伝子の検出を主に、blaTEM、blaSHV、blaCMY、blaCTXのプラスミド性耐性遺伝子、その他にも *amp*C の染色体上耐性遺伝子の定性を行った。対象とした大腸菌は上記3.3の5種類の野生株とした。斜面培地上に植え継いだこれら菌株の 1 白金耳分を400μLのRNase-free水に懸濁させ100℃、15分間煮沸することで遺伝子の抽出を行った。4℃、3分間冷却させた後13,000rpm・5分間遠心処理しその上澄液中の耐性遺伝子を検出した。blaTEM、blaCMY、blaCTX、*amp*Cを検出するためのプライマー、blaSHVを検出するためのプライマーとプローブは既存の報告例[4) 5) 6) 7)]を各々参照した。遺伝子検出のためのリアルタイム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。

４．研究結果と考察

４．１ 環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態

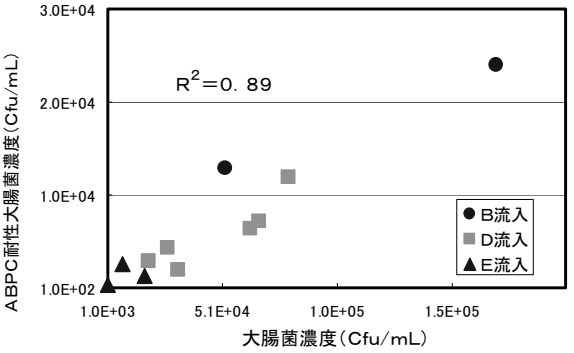
ABPC、TC、LVFXによる薬剤耐性試験結果から得られた各薬剤耐性菌濃度と大腸菌濃度の関係を図－1～9に示す。下水試料の流入下水、処理水ともABPC耐性大腸菌と大腸菌濃度との間には相関関係が見られ、流入下水の大腸菌の約15%濃度、処理水では約12%濃度がABPC耐性大腸菌であった。流入下水のABPC耐性大腸菌濃度は1mLあたり 10^{2}～10^{4} レベルであったが、病院排水の流入が主たるE下水処理場ではB、D下水処理場に比較して濃度レベルは低かった。しかし、大腸菌に占める各抗生物質耐性大腸菌の割合について整理したものを表－1に示すが、B、D処理場の平均が12～20%であるのに対し、E下水処理場では30%と比較的高い割合であった。各処理場の処理水のABPC耐性大腸菌濃度は 10^{-1}～10^{2} レベルとなり、活性汚泥処理により除去されることで流入下水に比較して大幅に濃度は低下している。流入下水と同様にE下水処理場ではB、D下水処理場に比較して処理水の濃度レベルは低かった。各々の割合は流入下水に比較して処理水では約半減しているものの、B、Dでは約7～13%であるのに対し、E下水処理場では約15%であった。病院排水の負荷が主たるE処理場では、流入下水、処理水とも大腸菌に占めるABPC耐性大腸菌の割合が高い傾向が見受けられた。

LVFX、TC耐性大腸菌濃度では、流入下水、処理水の大腸菌濃度との間でやや弱い相関関係が見られたが、その耐性菌濃度は流入下水で1mLあたり 10^{1}～10^{3} レベル、処理水で 10^{-2}～10^{1} レベルであり、TC耐性大腸菌濃度はLVFXのそれよりも若干高濃度であった。大腸菌に占めるLVFX、TCの耐性菌濃度はABPC耐性大腸菌濃度と比較すると低かった。また、ABPCの傾向と同様にE下水処理場ではB、D処理場と比較してLVFX、TC耐性菌濃度はやや低いが、大腸菌に占める割合は高い傾向が見られた。下水試料での薬剤耐性菌濃度は、流入下水、処理水中ともABPC、TC、LVFXの順で高かった。

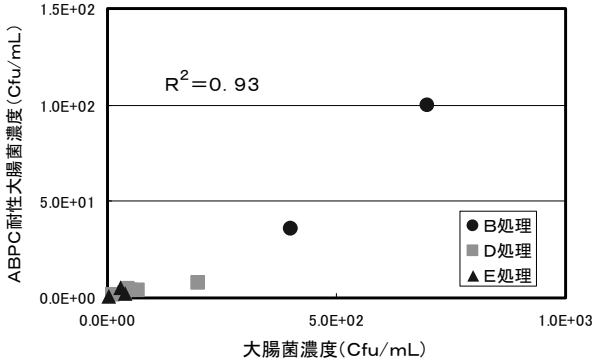
一方、河川水試料では大腸菌濃度と各抗生物質耐性大腸菌濃度との間で相関関係はなく、下水試料と異なる傾向が見られた。人畜由来の汚染のないと推定されるC河川ではABPC耐性大腸菌はほとんど検出されないが、何らかの理由により大腸菌の濃度上昇に伴い低レベルではあるが 1mLあたり 10^{-4}～10^{-3} 濃度で検出される場合もあるものの、他のA、F河川と比較するとその濃度に大きな違いが見られた。A、F河川でのABPC耐性大腸菌濃度は1mLあたり 10^{-1}～10^{1} レベル、LVFX、TC耐性大腸菌濃度は 10^{-1} レベルであり、下水処理水の濃度レベルと同程度か若干低いものであった。しかし、下水処理水は塩素などによる消毒

プロセスを経て放流されるため、確実な消毒を実施することで実際にはA、F河川水の耐性大腸菌濃度よりも放流水中の薬剤耐性大腸菌濃度は低レベルとなることが考えられる。

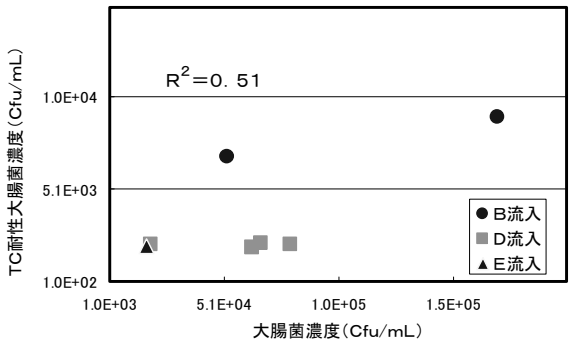
大腸菌に占める薬剤耐性大腸菌割合は、A 河川のABPCで平均約7%、F河川の平均で約3%（一部データを除く）、同様にLVFXで3%、0.6%、TCで1%、0.3%であり、下水処理水よりも同程度か若干低い割合であった。河川水試料も下水試料と同様に薬剤耐性菌濃度はABPC、TC・LVFXの順で高かった。



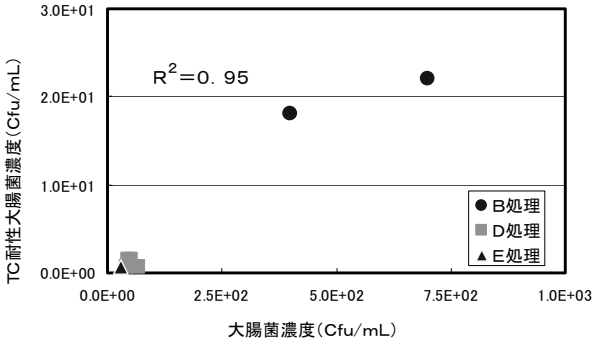
図－1 流入下水中の大腸菌とABPC耐性大腸菌の関係



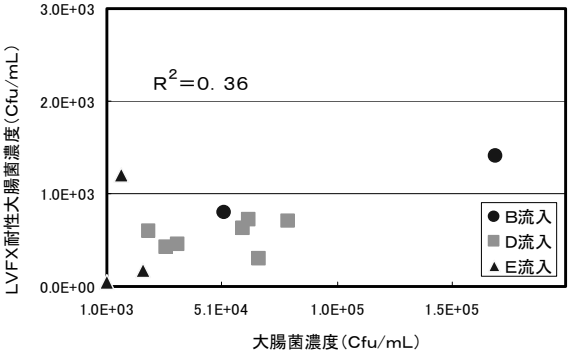
図－2 処理水中の大腸菌とABPC耐性大腸菌の関係



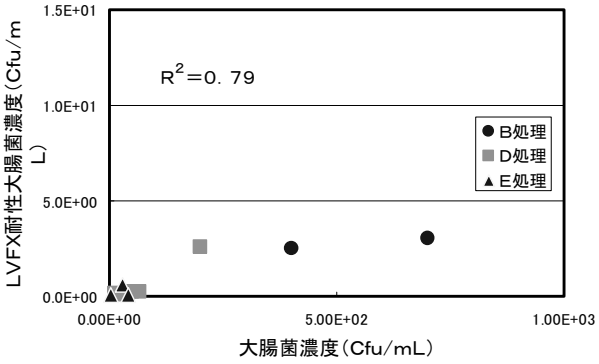
図－3 流入下水中の大腸菌とTC耐性大腸菌の関係



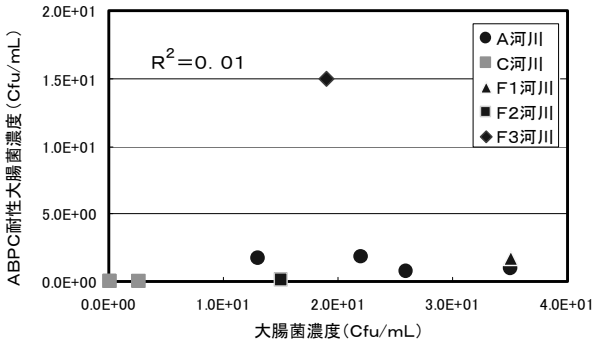
図－4 処理水中の大腸菌とTC耐性大腸菌の関係



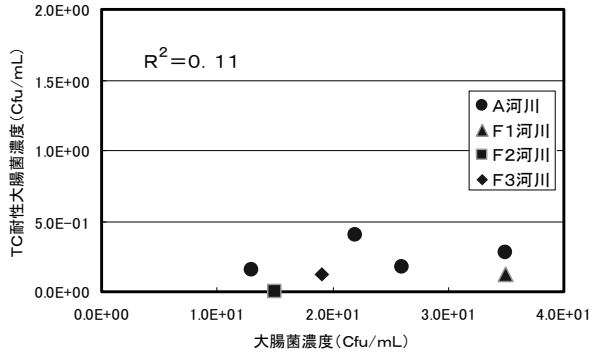
図－5 流入下水中の大腸菌とLVFX耐性大腸菌の関係



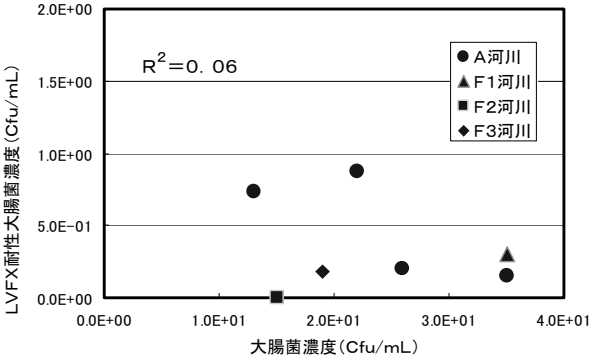
図－6 処理水中の大腸菌とLVFX耐性大腸菌の関係



図－7 河川水中の大腸菌とABPC耐性大腸菌の関係



図－8　河川水中の大腸菌とTC耐性大腸菌の関係



図－9　河川水中の大腸菌とLVFX耐性大腸菌の関係

表－1　大腸菌に占める各抗生物質耐性大腸菌の平均割合(%)

	ABPC 耐性	TC 耐性	LVFX 耐性
B 流入下水	20. 0	9. 3	1. 2
B 処理水	11. 7	3. 8	0. 5
D 流入下水	12. 0	5. 0	1. 4
D 処理水	7. 3	2. 3	0. 6
E 流入下水	30. 0	11. 8	7. 1
E 処理水	14. 5	2. 4	1. 8
A 河川	6. 8	1. 1	2. 7
C 河川	0～1. 2	－	－
F 河川	1. 0～79	0～0. 6	0～0. 9

C 河川では変動が大きいため、F 河川ではその支川での結果も含めたため、平均値でなく検出範囲を記載した。

次いで感受性試験から得られた結果を図－10～11に示す。図－10 は下水試料、図－11 は河川試料中耐性株の平均薬剤耐性数とその耐性株に占める多剤耐性株の割合について各々整理したものである。下水、河川水試料とも耐性株の平均薬剤耐性数の上昇に伴いその多剤耐性株の割合も増加しており、高い相関関係が得られている。処理水中の薬剤耐性大腸菌濃度は流入下水に比較して大幅に減少するが、その耐性株の薬剤耐性数や多剤耐性株の割合が流入下水に比較して若干高くなる傾向が伺える。特に薬剤耐性大腸菌濃度が B、D 下水処理場に比較して低かった E 下水処理場の処理水では、耐性株の平均薬剤耐性数、多剤耐性株の割合はともに高い。河川水試料では主に浄化槽排水の影響を受ける F 河川が最も高く、人畜由来の汚濁負荷の影響を受けない C 河川は最も低かった（一部データを除く）。また、ABPC 耐性試験から得られた ABPC 耐性大腸菌の平均薬剤耐性数とその多剤耐性株の割合は、通常の大腸菌測定から得られた感受性試験の値よりも全てで高いものとなっており、多剤耐性株の割合はほぼ 90%以上を占めていた。17 年度までの調査結果でも多剤耐性株の 90%程度が ABPC に対して耐性を示した株であったことから、これらの結果と一致するものであった。表－1 には各試料の大腸菌に占める ABPC 耐性大腸菌の割合を示したが、通常の下水試料では平均で 10～15%程度、河川水試料では 3～7%程度であり、ABPC 耐性株の 90%は多剤耐性株であることから、下水試料では大腸菌濃度の 10%程度、河川水試料では 3～6%程度が多剤耐性大腸菌であると考えられた。

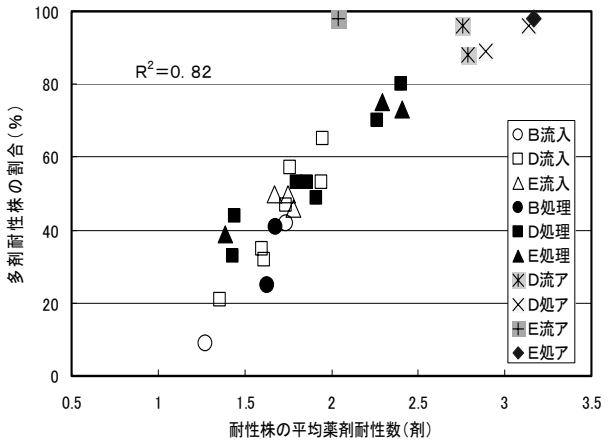
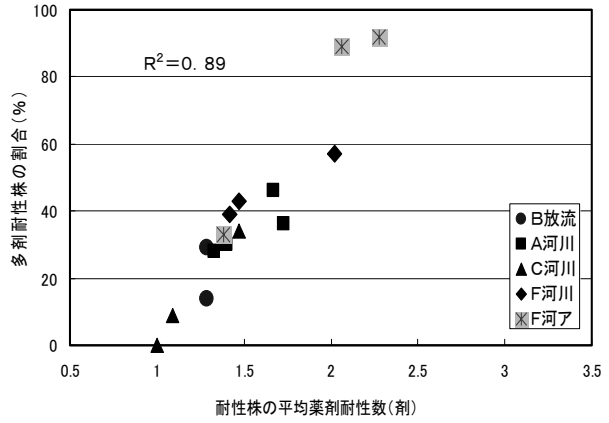


図-10　下水試料中耐性株の平均薬剤耐性数と多剤耐性株割合の関係



図－11　河川試料中耐性株の平均薬剤耐性数と多剤耐性株割合の関係

４．２　薬剤耐性大腸菌の下水処理水中での消長把握

D 下水処理場の二次処理水から得られた薬剤感受性の異なる大腸菌を用いた実験結果を表－2 に示す。8 種類の抗生物質に対する感受性試験結果から得られた各種耐性株として、無耐性株は 4 株、ABPC 耐性株は 3 株、3 剤耐性株は 2 株を用いて各々評価を行った。8 種類の抗生物質に対して耐性を示さない無耐性株については、その感受性に変化はなかった。しかし、ABPC のみに耐性を示した株では、二次処理水に添加してから 1、7 日後とも耐性を示さなくなった。これに対し、ABPC、TC、ST あるいは、ABPC、TC、KM の 3 剤に耐性を示した多剤耐性大腸菌は、1、7 日後ともに耐性を維持しており、多剤耐性株であるか否かの違いにより抗生物質に対する感受性に変化が見られた。二次処理水から採取した大腸菌を利用し、採水日は異なるが同じ二次処理水に添加し実験を行っており、抗生物質の濃度の変化は少ないため、その影響が感受性の変化に関与することはないと推定される。今後、これらの要因を解明するため、耐性遺伝子の検索も含め、河川水中での評価を行う予定である。

表－２　各種耐性株の感受性の変化

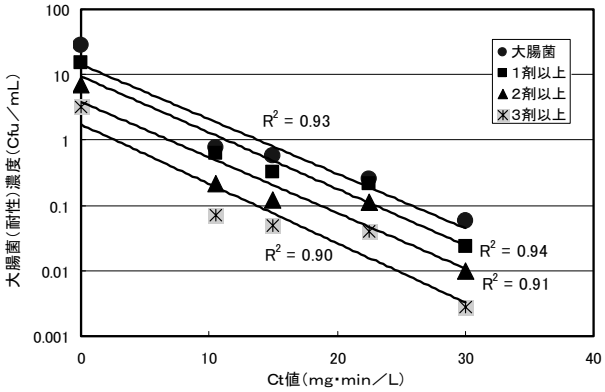
		感受性試験結果	１日目	７日目
無耐性株	No. 1	－	０／５	０／５
	No. 2	－	０／３	０／５
	No. 3	－	０／５	０／３
	No. 4	－	０／５	０／３
ABPC 耐性株	No. 1	ABPC 耐性	０／５	０／５
	No. 2	ABPC 耐性	０／５	０／４
	No. 3	ABPC 耐性	０／５	０／３
3 剤耐性株	No. 1	ABPC、TC、ST 耐性	２／２	４／４
	No. 2	ABPC、TC、KM 耐性	４／４	３／３

表中上段：耐性コロニー数、下段：供試コロニー数

４．３　薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価

D 下水処理場の二次処理水用いて行った消毒実験の結果を図－12 に示す。塩素消毒前後において釣菌した大腸菌コロニーの感受性試験結果から評価を行っているため、図中の大腸菌のプロットは 1～3 剤以上の抗生物質に対して耐性を示した株も含まれており、耐性の無い株、1～3 剤以上の抗生物質に対して耐性を示した株の合計が大腸菌のプロットとなる。塩素消毒によるＣｔ値の増加に伴い残存する大腸菌（耐性）濃度はほぼ直線的に減少し、その直線の傾きは耐性数の異なる大腸菌でもほぼ同じであった。耐性株や多剤耐性株が塩素消毒に対して耐性を発現すれば、1～3 剤以上のプロットは大腸菌の傾きに近づくことが予想されるが、そのような傾向は見られなかった。

さらに、下水試料から採取した大腸菌と薬剤感受性試験の精度管理に利用している大腸菌（純粋株）を用いた塩素消毒実験結果を図－13～14 および表－3 に示す。消毒実験は以下に示す複数株を用いて行ったが、各々でその結果に大きな違いが見られなかったため、グラフでの記載は 2 株のみとした。3log 不活化のためのＣｔ値は 0 剤耐性大腸菌では 5. 2㎎･min／L、6 剤耐性大腸菌では 5. 7㎎･min／L 必要であり、6 剤耐性大腸菌は 0 剤耐性大腸菌に比較して若干ではあるが塩素消毒耐性が大きい傾向が見られた。これら消毒実験から得られた回帰式を基に、0 剤耐性大腸菌を 3log 不活化させるために必要なＣｔ値を基準とし、各耐性株の比を整理比較したものを図－15 に示す。0 剤耐性大腸菌（純粋株・野生株）を基準とすると、6 剤耐性大腸菌を 3log 不活化させるために必要なＣｔ値は 1. 1～1. 4 倍量が必要であると見込まれたが、接触時間や塩素の添加濃度を若干量増加させることで対応が可能なレベルと考えられた。これらの結果から、塩素消毒によるＣｔ値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌の割合を低下させられる可能性が示唆された。



図－12　耐性数が異なる大腸菌の塩素消毒による不活化効果

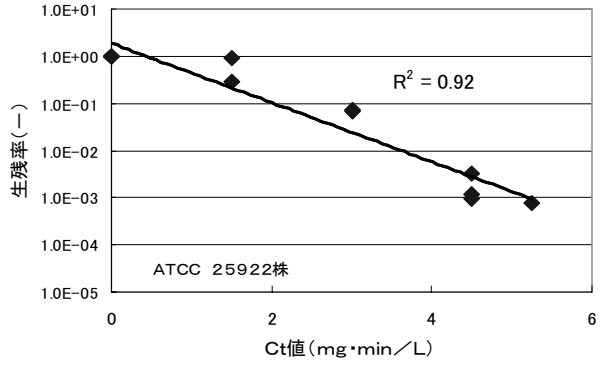
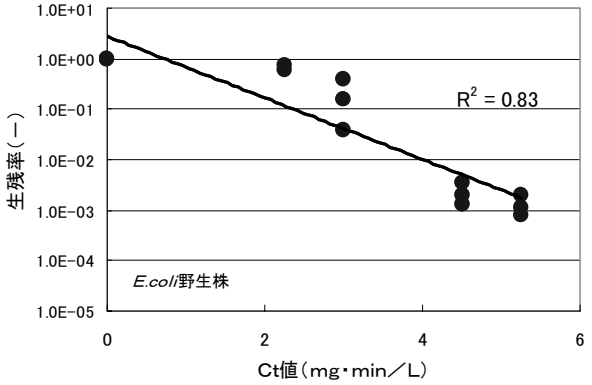
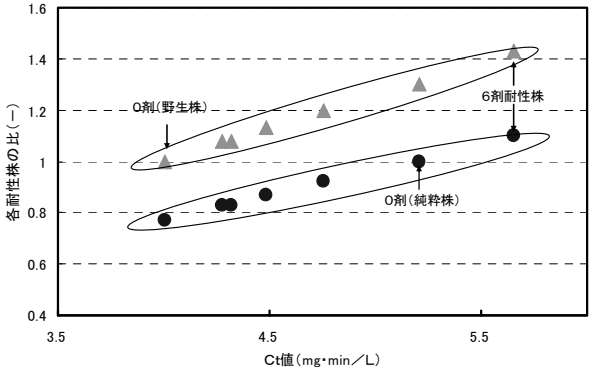


図-１３　０剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性



図－14　6剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性



図－15 0剤耐性株の3log 不活化に必要なCt値を基準とした各耐性株の比

表－3　各耐性株を 3log 不活化させるためのＣｔ値とその比の比較

	3log 必要 Ct 値	各耐性株の比	
0 剤耐性(野生 *E. coli* 株)	4. 0	0. 77	1
4 剤耐性(野生 *E. coli* 株)	4. 8	0. 92	1. 2
1 剤耐性(野生 *E. coli* 株)	4. 3	0. 83	1. 08
4 剤耐性(野生 *E. coli* 株)	4. 5	0. 87	1. 13
0 剤耐性(純粋 *E. coli* 株)	5. 2	1	1. 3
1 剤耐性(純粋 *E. coli* 株)	4. 3	0. 83	1. 08
6 剤耐性(野生 *E. coli* 株)	5. 7	1. 1	1. 43

４．４　薬剤耐性大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性

上記 4. 3 で利用した各種大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性結果を表－4 に示す。下水試料から採取した大腸菌は 8 剤の抗生物質に対しての耐性の有無に関わらず、全ての株でプラスミド性の耐性遺伝子、また染色体上の耐性遺伝子が検出された。ABPC はβ-ラクタム系抗菌薬の一種であるため、β ラクタマーゼ関連の耐性遺伝子が検出されることは、ABPC に対して耐性を示す大腸菌が河川水・下水試料ともに多く存在していることを裏付けた結果となったと推定される。また、8 種類の抗生物質を対象とした感受性試験で耐性を示さなかった株でも耐性遺伝子を保有していることから、これらの株は 8 種類以外の他の抗生物質に対して耐性を示す可能性があるものと考えられる。今回、耐性遺伝子の定性に供した株は限られたものではあるが、全ての株で耐性遺伝子を保有していたことから、水環境中での薬剤耐性菌の汚染やその拡大を防止するには、各種排水処理施設での消毒の徹底を図る必要があるものと考えられた。

表－4　耐性遺伝子の定性結果

	流入下水 0 剤耐性	流入下水 4 剤耐性	二次処理水 1 剤耐性	二次処理水 4 剤耐性	二次処理水 6 剤耐性
bla SHV	－	－	－	－	－
bla TEM	＋	＋	＋	＋	＋
bla CTX	－	－	－	－	＋
bla CMY	＋	－	－	－	－
Amp C	＋	＋	＋	＋	＋

陽性：＋、陰性：－

５．まとめ

18 年度は、環境水中、下水中における薬剤耐性大腸菌の汚染実態や下水処理水中での消長を把握した。また、薬剤耐性大腸菌の塩素消毒耐性の評価とともに、これらの大腸菌が保有する耐性遺伝子の定性を行った。以下に結果を示す。

1）流入下水、処理水の大腸菌濃度と ABPC、TC、LVFX 耐性大腸菌濃度には強い相関関係あるいは相関関係が見られたが、河川水ではその傾向は認められなかった。

2） ABPC 耐性試験から得られた河川・下水試料中の ABPC 耐性大腸菌は、複数の薬剤に対して耐性を示す傾向があるため、多剤耐性の割合も増加する。

3）感受性試験から得られた大腸菌を二次処理水に添加し、その耐性変化を調査したが日数の経過とともに 1 剤耐性株は耐性を消失したが、3 剤耐性株は耐性を保持していた。

4）塩素消毒によるＣｔ値を高めることで二次処理水中の多剤耐性大腸菌の割合を低下させられる可能性が示唆された。

5）塩素消毒により 3log 不活化するために必要なＣｔ値は、0 剤耐性大腸菌を基準とすると 6 剤耐性大腸菌では 1. 1～1. 4 倍量必要であった。また、これらの薬剤耐性大腸菌は、薬剤耐性遺伝子を保有していることが確認された。

参考文献

1) 橋本一、井上松久編、病原菌の薬剤耐性、機構の解明とその対策、学会出版センター.
2) 細菌感受性試験用、KBディスク栄研手引き.
3) 下水道統計、平成16年版、日本下水道協会.
4) Y.Messai, T.Benhassine, M.Naim, G.Paul and R.bakour (2006) Prevalence of β-lactams resistance among *Escherichia coli* Clinical isolates from a hospital in Algiers, Rev Esp Quimioterap, 19(2),144-151.
5) S.Corvec, N.Caroff, E.Espaze, J.Marraillac, H.Drugeon, A.Reynaud (2003) Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains, FEMS Microbiology Letters, 228, 187-191.
6) C.RANDEGGER, H.HACHLER (2001) Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum β-Lactamases, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 1730-1736.
7) S.zhao, et al. (2003) Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 5366-5371.

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　尾崎正明
山下洋正
亀田　豊

研究期間　平成１７年度～２１年度
平成１８年度当初予算額　２０，０７４千円

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

(FY2005～2009)

Masaaki Ozaki, Hiromasa Yamashita and Yutaka Kameda
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.
In FY2006, we carried out the following research.
1. The methods necessary to quantitatively detect PPCPs in solid samples (sewage sludge, river sediments and suspended solids in water) by LC/MS/MS (high performance Liquid Chromatograph / Mass Spectrometry / Mass Spectrometry) and GC/MS (Gas Chromatograph / Mass Spectrometry) such as ultrasonic solvent extraction, sample pretreatment and analysis by LC/MS/MS and GC/MS have been developed.
2. PPCPs of 66 human and/or veterinary drugs and preservatives, 16 synthetic fragrance materials and 9 organic UV filters in influent and effluent samples of 47 wastewater treatment plants, 53 surface water samples and sediment samples in several rivers and lakes were successfully determined.

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 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った [1)]。これらの結果をふまえて，今年度は分析方法の開発および環境への放出・移行・変化量の把握を行ったものである。

２．　研究方法

２－１．分析方法の開発

汚泥等の固形物試料中の PPCPs の分析方法の開発を行った。対象試料としては，下水処理場の余剰汚泥，河川・湖沼の底泥，下水処理場の流入水・放流水，河川水中の懸濁態（SS）を想定した。

２－１－１．固形状試料からの抽出方法

固形物試料からの 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－１に示す条件で機器の使用説明書に従って実

施した。

表－１　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 10μL 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 500μL 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。

２－１－２．抽出試料の分析方法

固形状試料からの抽出試料の分析方法については，前年度に開発した水試料中の PPCPs の分析方法[1)]を適用して検討した。分析対象物質についても，水試料の分析方法で分析可能であった物質を基本として検討した。分析方法および分析対象物質は後述の「２－２．環境への放出・移行・変化量の把握」で示す通りである。

医薬品類については，実試料（下水処理場の余剰汚泥）に分析対象物質を添加して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。

香料等については，実試料（下水処理場の余剰汚泥および河川底泥）に 1 μg 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。

２－２．環境への放出・移行・変化量の把握

２－２－１．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，生産量が大で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に示す 66 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１３種，抗生物質８種，サルファ剤４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５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３種，気管支拡張薬他３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－３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　医薬品類の分析対象物質

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)	milliQ水 回収率	milliQ水 CV (%)	流入下水 回収率	流入下水 CV (%)	処理水 回収率	処理水 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	ナプロキセン	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	フルルビプロフェン	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	フェノプロフェン	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(アニリン系)	○			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(アニリン系)	○			-	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(サリチル酸誘導体)	○			-	90.1	(8.7)	150.7 *	(2.2)	151.4 *	(5.9)	1.8	0.4
C14	クラリスロマイシン	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	ロキシスロマイシン	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	オレアンドマイシン	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	タイロシン	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	(2.9)	3.7	0.7
C18	アンピシリン	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)	43.6	8.7
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(イオノフォア)(飼料添加物)		○		32.1	51.3	(6.4)	25.7 *	(2.4)	42.9 *	(7.6)	0.7	0.1
C22	スルファメトキサゾール	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	スルファジメトキシン	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	スルファモノメトキシン	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	フェンベンダゾール	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	プラジカンテル	抗寄生虫薬		○		7.6	99.9	(4.9)	42.0 *	(2.6)	67.2	(2.7)	1.4	0.3
C31	トリメトプリム	合成抗菌剤	○	○		13.8	92.7	(18.6)	63.6	(8.8)	70.7	(1.3)	8.7	1.7
C32	オルメトプリム	合成抗菌剤		○		1.2	86.3	(7.7)	122.4	(19.7)	110.8	(10.9)	3.9	0.8
C33	ニフルスチレン酸ナトリウム	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'-トリクロロカルバニリド	抗菌剤・消毒剤			○	-	76.2	(6.8)	36.6 *	(12.8)	74.2	(5.5)	3.8	0.8
C37	p-ヒドロキシビフェニル	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	クロフィブリン酸	高脂血症治療薬(代謝物)(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	フェノフィブラート	高脂血症治療薬(フィブラート系)	○			-	81.3	(4.8)	37.5 *	(9.7)	59.8	(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	高尿酸血症治療剤	○			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	メトプロロール	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)	164.0 *	(5.7)	12.1	2.4
C55	ベラパミル	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(イミノスチルベン系)	○			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(イミノスチルベン系)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	デスメチルジアゼパム	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	フェニトイン	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	抗うつ剤代謝物	○			-	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	ウルソデオキシコール酸	胆道疾患治療薬(胆汁酸利胆薬)	○			247.8	82.4	(22.9)	89.3	(44.9 *)	97.3	(6.9)	84.8	17.0

表－３　香料等の分析対象物質

Fragrance materials trade name or abbreviation	Chemical name	log Kow	Vapor pressure (Pa)	Water solubility ($mg \cdot l^{-1}$)
benzyl acetate	phenylmethyl ester acetic acid	2.1	21.9	1265
methyl salicylate	2-hydroxy-methyl ester benzoic zcid	2.6	0.75	1687
MDJ	3-oxo-2-pentyl-methyl ester cyclopentaneacetic acid	3	0.0549	91.72
terpineol	4-trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	3.3	4.09	335.7
isobornyl acetate	1,7,7-trimethyl-acetate bicyclo[2,2,1]heptan-2-ol	4.3	10	23.23
benzyl salicylate	2-hydroxy-phenylmethyl ester benzoic acid	4.3	0.000449	24.59
musk ketone (MK)	1-[4-(1,1-dimethyl-ethyl)-2,6-dimethyl-3,5-dinitrophenyl]-ethanone	4.3	0.00004	1.9
iso methyl ionone	3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl	4.6	1.3	9
DPMI (cashmeran)	6,7-dihydro-1,1,2,3,3-pentamethyl-4(5H)-indanone	4.9	5.2	0.17
hexyl cinnamaldehyde	2-(phenylmethylene)octanol	4.9	0.027	2.75
musk xylene (MX)	1-(1,1-dimethylethyl)-3,5-dimethyl-2,4,6-trinitrobenzene	4.9	0.00003	0.49
AHTN (tonalide)	7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene	5.7	0.0608	1.25
HHCB (galaxolide)	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8-hexamethylcyclopenta-γ-2-benzopyran	5.9	0.0727	1.75
ADBI (celestolide)	4-acetyl-1,1-dimethyl-6-*tert*-butylindan	6.6	0.02	0.015
AHMI (phantolide)	6-acetyl-1,1,2,3,3,5-hexamethylindan	6.7	0.024	0.027
ATII (traseolide)	5-acetyl-1,1,2,6-tetramethyl-3-isopropylindan	8.1	8.1	85.1

UV filters trade name or abbreviation	Chemical name	log Kow	Vapor pressure (Pa)	Water solubility ($mg \cdot l^{-1}$)
benzophenone (BP)	benzophenone	3.2	130	137
benzophenone-3 (BP-3)	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone	3.5	unknown	poor *
isoamyl *p*-methoxycinnamate	isoamyl *p*-methoxycinnamate	4.3	unknown	poor *
octyl dimethyl PABA (OD-PABA)	octyl dimethyl p-aminobenzoic acid	5.7	unknown	poor *
EHMC	3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid 2-ethylhexyl ester	5.8	unknown	poor *
4-MBC	3-(4'-methyl-benzylidene)bornan-2-one	5.9	unknown	poor *
octyl salicylate	2-ethylhexyl 2-hydroxybenzoate	5.97	unknown	poor *
homosalate	3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate	6.2	unknown	poor *
octocrylene	2-cyano-3,3-diphenyl-2-propenoic acid 2-ethylhexyl ester	6.9	unknown	poor *

２－２－２．調査対象地点

全国の下水処理場を処理人口規模別に区分して無作為に抽出した 28 処理場および調査対象河川流域内に存在する 19 処理場において，流入下水・処理水の 24 時間コンポジット試料を採取して調査を行った。

また，図－１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・涸沼川・寛政川（霞ヶ浦および涸沼流域）10 地点の合計 43 地点において流心付近を採水し，手賀沼 6 地点，霞ヶ浦 7 地点については表層水を採水して調査を行った。調査は全て秋季および冬季（2006 年 10～12 月，2007 年 1～3 月）に実施した。

２－２－３．分析方法

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 2 mm 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 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。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は前年度の調査[1)]で開発したものであり，概要は図－２に示す通りである。

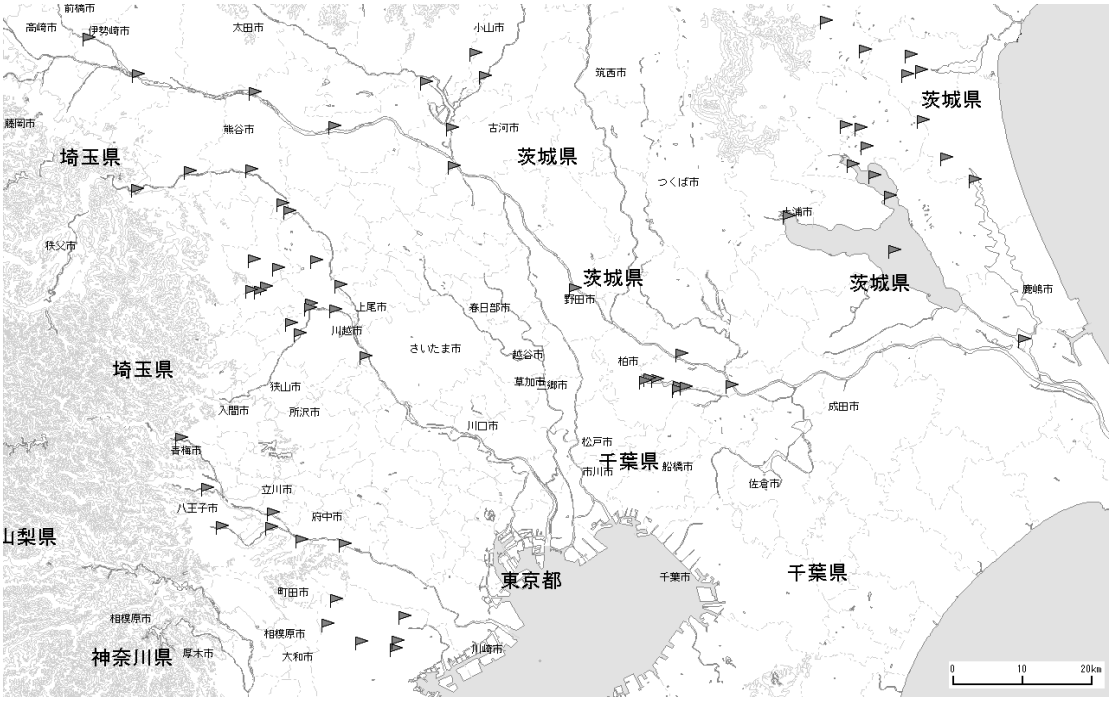
本法は Castiglioni らの方法[2)]を参考に開発したものであり，表－４に示す Method1～6 により，試料水 100～500mL を GF/B でろ過して得たろ液（溶存態）ならびにろ紙上の SS および活性汚泥（懸濁態）を対象とした。懸濁態については，メタノールおよびアセトンにより超音波抽出を行い，ろ液と同様の手法で測定を行った。

表－４　医薬品類の LC/MS/MS による分析方法

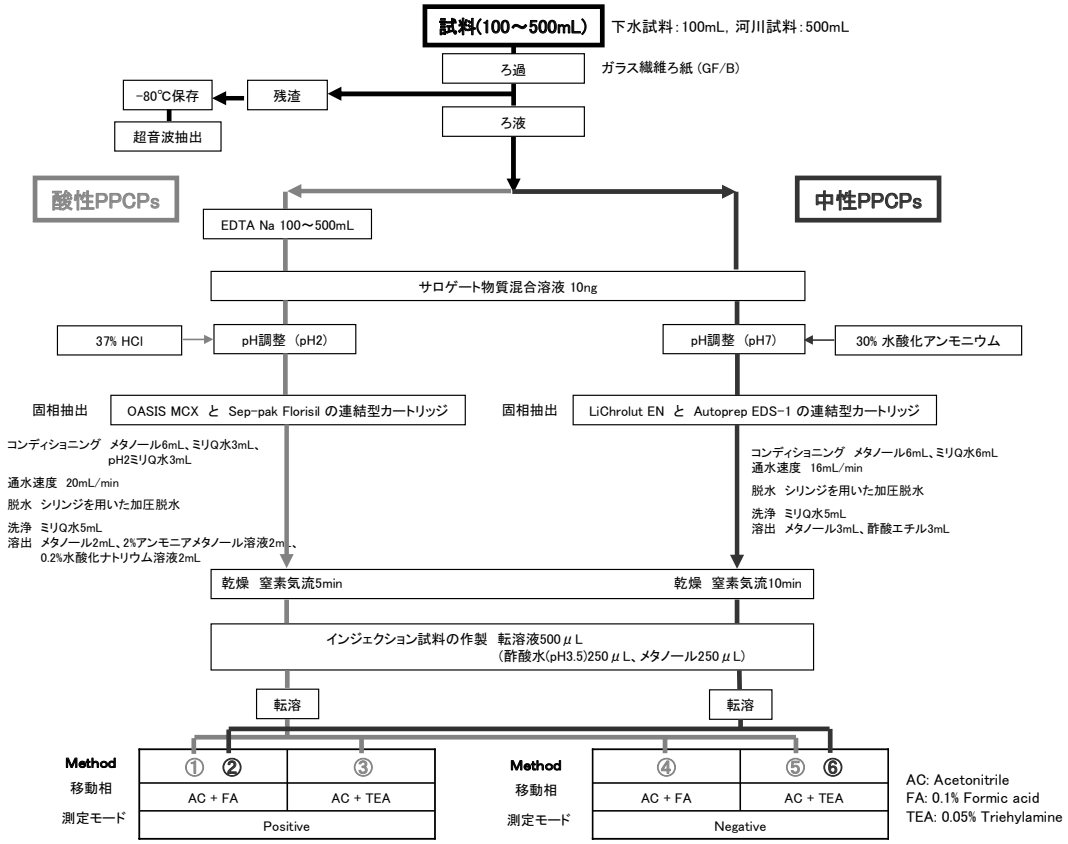
Method	Chemical properties	LC/MS/MS Scan mode	LC/MS/MS Mobile phase	SPE Cartridge
1	Acidic	Positive	Acetonitrile and 0.1% Formic acid	OASIS MCX and Sep-pak Florisil
2	Neutral			LiChrolut EN and Autoprep EDS-1
3	Acidic		Acetonitrile and 0.05% Triethylamine	OASIS MCX and Sep-pak Florisil
4	Acidic	Negative	Acetonitrile and 0.1% Formic acid	OASIS MCX and Sep-pak Florisil
5	Acidic		Acetonitrile and 0.05% Triethylamine	
6	Neutral			LiChrolut EN and Autoprep EDS-1

酸性 PPCPs を対象とした Method 1,3,4,5 では，ろ液に EDTANa100～500mL を添加後にサロゲート物質を添加し，37%HCl により pH2 に調整した後に，Oasis MCX と Sep-Pak Plus Florisil を連結した固相抽出カートリッジに 20mL/min で通水した。これをメタノール 2mL，2%アンモニアメタノール溶液 2mL，0.2%水酸化ナトリウムメタノール溶液 2mL で溶出し，N2 気流下で乾固した。0.01%酢酸水／メタノール(1:1)溶液 500μL にて転溶して LC/MS/MS 注入用試料を作成し，Method1,4 ではアセトニトリルと 0.1 %ギ酸水を移動相としたグラジェント溶離法を行い，Method1 は Positive モード，Method4 は Negative モードで分析した。

Method3,5 ではアセトニトリルと 0.05 %トリエチルアミン水を移動相としたグラジェント溶離法を行い Method3 は Positive モード，Method5 は Negative モードで分析した。



図－１　調査対象地点



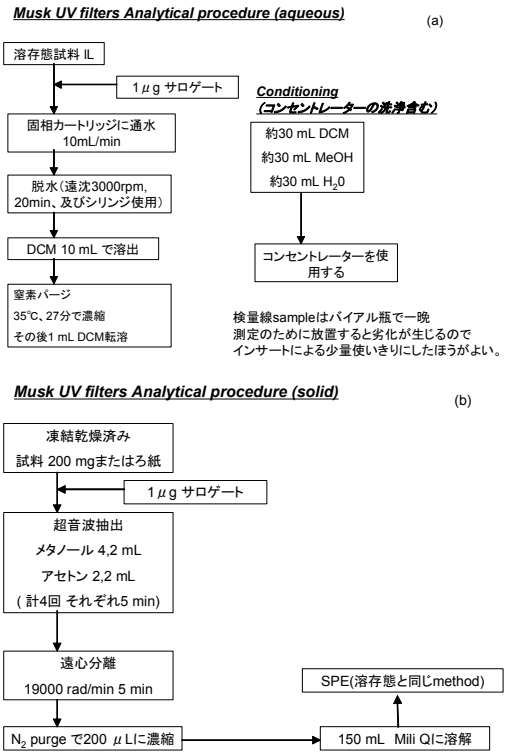
図－２　LC/MS/MS による医薬品類分析方法の概要

中性 PPCPs を対象とした Method 2,6 では，ろ液にサロゲート物質を添加し，30%NH4OH により pH7 に調整した後に， LiChrolut EN と Autoprep EDS-1 を連結した固相抽出カートリッジに 16mL/min で通水した。これをメタノール 3mL，酢酸エチル 3mL で溶出し，以下 Method2 については Method1 と同様に，Method6 については Method5 と同様に分析した。

（2）香料等

香料等の分析方法は前年度の調査[1)]で開発したものであり，概要は図－3の通りである。

表－5に示すサロゲートを 50 ng (河川水及び下水処理水)あるいは 100 ng (下水処理場流入水)添加した後，溶存態試料(下水処理場流入水，下水処理水：100 ml，河川水：500 ml)を，10 ml・min-1 で固相カートリッジに通水した。



図－3　香料・紫外線吸収剤等の分析方法の概要
（a:溶解性試料用，b:固形性試料用）

表－5　香料等の分析条件

compounds	retention time (min)	quantification ion m/z	confirmation ion m/z	surrogate		
				surface water & effluent	influent	sediment, solids or acticated sludge
benzyl acetate	11.22	108	150	terpineol-d3	terpineol-d3	terpineol-d3
terpineol d3	11.78	62	139	-	-	-
terpineol	11.83	59	136	terpineol-d3	terpineol-d3	terpineol-d3
methyl salicylate	12	120	152	terpineol-d3	terpineol-d3	terpineol-d3
isobornyl acetate	14.34	95	136	BP-d10	BP-d10	BP-d10
iso methyl ionone	19.15	150	206	BP-d10	BP-d10	BP-d10
DPMI	19.56	191	206	BP-d10	BP-d10	BP-d10
BP-d10	22.54	110	192	-	-	-
BP	22.62	105	182	BP-d10	BP-d10	BP-d10
MDJ	23.22	83	156	BP-d10	BP-d10	BP-d10
ADBI	24.57	229	244	BP-d10	BP-d10	BP-d10
hexyl cinnamaldehyde	25.17	129	115	BP-d10	BP-d10	BP-d10
AHMI	25.43	229	244	BP-d10	BP-d10	BP-d10
octyl salicylate	26.34	120	138	musk xylene-d15	musk xylene-d15	musk xylene-d15
musk xylene-d15	27.21	294		-	-	-
ATII	27.25	215		BP-d10	BP-d10	BP-d10
HHCB	27.28	243	258	BP-d10	BP-d10	BP-d10
MX	27.48	282	297	musk xylene-d15	musk xylene-d15	musk xylene-d15
AHTN	27.51	243	258	BP-d10	BP-d10	BP-d10
benzyl salicylate	27.64	91	228	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate
homosalate	27.84	138	69	metalochlor-d6	metalochlor-d6	musk xylene-d15
metalochlor-d6	29.7	168		-	-	-
MK	29.82	279	294	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate
4-MBC	30.46, 31.09	254	239	fluoranthene-d10	fluoranthene-d10	musk xylene-d15
BP-3	30.68	227	228	metalochlor-d6	metalochlor-d6	metalochlor-d6
isoamyl methoxycinnamate	30.83	178	161	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate	benzyl cinnamate
fluoranthene-d10	30.97	212		-	-	-
benzyl cinnamate	31.8	91	131	-	-	-
EHMC	33.10, 36.32	178	290	fluoranthene-d10	benzyl cinnamate	musk xylene-d15
OD-PABA	35.08	165	277	fluoranthene-d10	benzyl cinnamate	musk xylene-d15
octocrylene	47.08	249	361	fluoranthene-d10	benzyl cinnamate	musk xylene-d15

固相カートリッジは親水性物質の選択吸着に優れた PolarPlus®C18 (J.T. Bakerbond 社製:充填剤 1 mg) と疎水性物質の選択吸着性に優れた Octadecyl (C18) (J.T. Bakerbond 社製:充填剤 1 mg)を直列に連結したものを使用した。いずれの固相カートリッジもジクロロメタン，メタノール，ミリ Q 水の順にコンディショニングを行った。

通水後，遠心分離及びシリンジで脱水し，SPE10-P (Chratec 社製)を用いて，ジクロロメタン 15 mL を 1 ml・min-1 の流速で通水し吸着物質を溶出させた。なお，紫外線吸収剤の一部が固相カートリッジ通水時に用いたサンプル瓶に吸着することが添加回収試験時に確認されたため，通水後のサンプル瓶のジクロロメタン洗浄液(2 ml)を溶出液に混合させた。

溶出液は 35℃で加温しながら窒素で乾固しないように濃縮され，最終的にジクロロメタン 500 μl で定容され，GC/MS で分析された。なお，窒素の吹き付けを緩やかに行うと，揮発性の対象物質の回収率が大きく減少することが確認されたため，揮発性の対象物質の回収率が十分高くなるような吹き付け速度で窒素による濃縮を行った。

凍結乾燥された固体試料(底質 500 mg)は，表－5 に示すサロゲートをそれぞれ 50 ng ずつ添加した後，ジクロロメタン及びアセトンで各々5 分ずつ計 2 回，合計で 4 回超音波抽出により抽出された。抽出液は一つにまとめられ，35℃の加温下で窒素により乾固しないように濃縮され，アセトンで定容された後，200 ml のミリ Q 水に再溶解された。その後，このミリ Q 水を液体試料と全く同様に処理して GC/MS で分析した。

試料はスプリットレスで HP-5MS GC カラム(30 m, 0.25 mm i.d.)に注入された。昇温プログラムは 35℃で開始し，5℃・min-1 で 200℃まで昇温後，200℃で 10 分保持した。続いて 20℃・min-1 で 220℃までさらに昇温し，さらに 2℃・min-1 で 230℃まで昇温し最後に 2 分間保持した。なお，表－5 に確認イオンと定量イオン，物質ごとに対応するサロゲート及び保持時間を示す。

３． 研究結果および考察

３－１．分析法の開発

３－１－１．固形状試料からの抽出方法

固形状試料からの抽出方法の比較実験の結果を表－6 に示す。

表－6　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。

３－１－２．抽出試料の分析方法

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－２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，超音波抽出方法の改良を試みる予定である。

香料等については，表－７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す。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 と少なかったため，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 $ng \cdot l^{-1}$ であった。しかし, 河川水については，homosaltae 以外は数 $ng \cdot l^{-1}$ レベルであった。

表－７　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 ($ng \cdot l^{-1}$)	% recovery (±rsd)	LOD ($ng \cdot l^{-1}$)	% recovery (±rsd)	LOD ($ng \cdot l^{-1}$)	% recovery (±rsd)	LOD※ ($ng \cdot g^{-1}$)	% recovery (±rsd)	LOD※ ($ng \cdot g^{-1}$)	% recovery (±rsd)	LOD ($ng \cdot g^{-1}$)
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	-	5.13 ± 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

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[3]が10 ｎｇ･l^{-1}であることや，Simonichら[4,5]，Balmerら[6]，Buserら[7]及びPoigerら[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。

３－２．環境への放出・移行・変化量の把握

３－２－１．医薬品類

下水処理場47箇所の流入下水および放流水ならびに河川および湖沼66箇所（延べ70地点）の環境水中の溶存態（ろ過後の液体試料中）の医薬品類について，検出頻度（定量下限値以上の値の割合）を図－４に示し，検出された濃度の中央値を図－５に示した。

測定結果より，流入水試料における検出率が20%以上(47処理場中10処理場以上の試料で検出下限値以上）の物質は34物質であり，そのうち25物質は検出率80%以上(47処理場中38処理場以上で検出下限値以上)であったことから，広範囲の下水処理場において普遍的に多様なPPCPsが流入していることが判明した。

また，処理水試料では検出率20%以上が30物質，検出率80%以上が17物質であったことから，下水処理でPPCPsの検出頻度は低下するが，検出下限値未満までは低減されない物質も多いことが分かった。

河川・湖沼水試料では，処理水試料よりも検出率が低くなる物質が多かったが，動物用医薬品など下水処理場への流入が少ない物質では，河川においてより高頻度に検出される場合も見受けられた。以下，各物質グループについて特徴を述べる。

（１）非ステロイド系抗炎症薬

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，C11サリチル酸が，流入下水・処理水および河川・湖沼水のいずれからも高頻度に検出された。プロピオン酸系については，C2ケトプロフェンが流入下水・放流水中に濃度中央値で同程度存在していたが，C1イブプロフェンは流入下水では濃度中央値で約700ng/L程度で高頻度検出であったが放流水中の濃度中央値は検出下限値未満であったことから，物質毎に下水処理過程での除去率に差があるものと考えられた。C5フルルビプロフェン以外は河川中での濃度中央値は検出下限値未満であった。

（２）抗生物質，合成抗菌剤

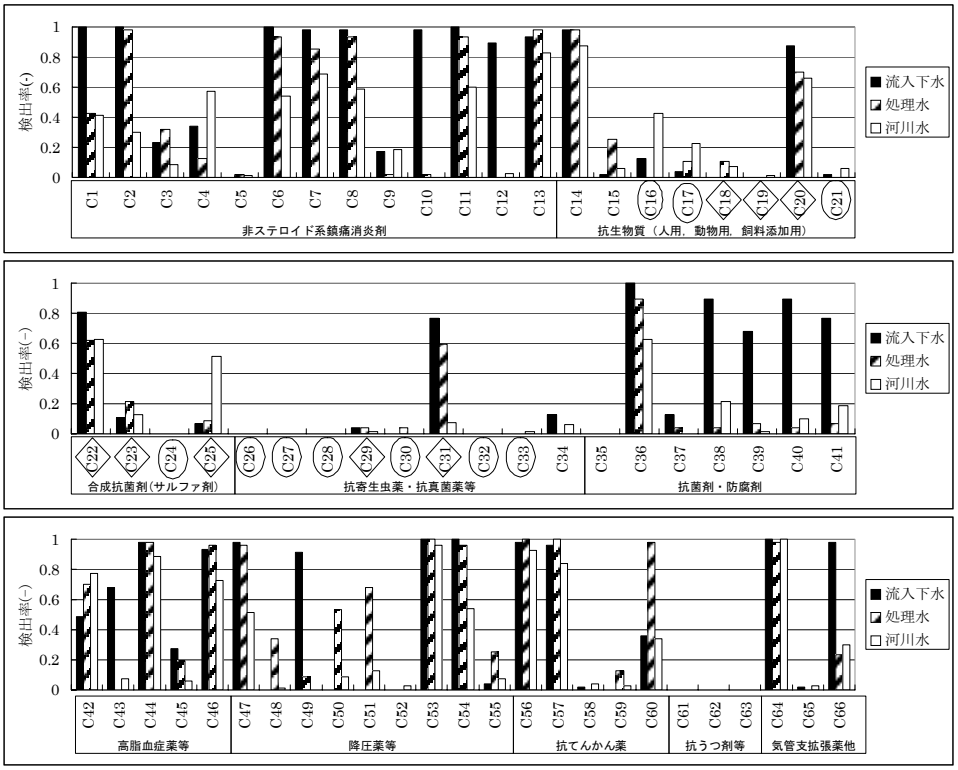
マクロライド系のC14クラリスロマイシン，リンコマイシン系のC20リンコマイシン，サルファ剤のC22スルファメトキサゾールが流入下水・処理水および河川・湖沼水中にともに高頻度に検出された。

（３）抗寄生虫薬

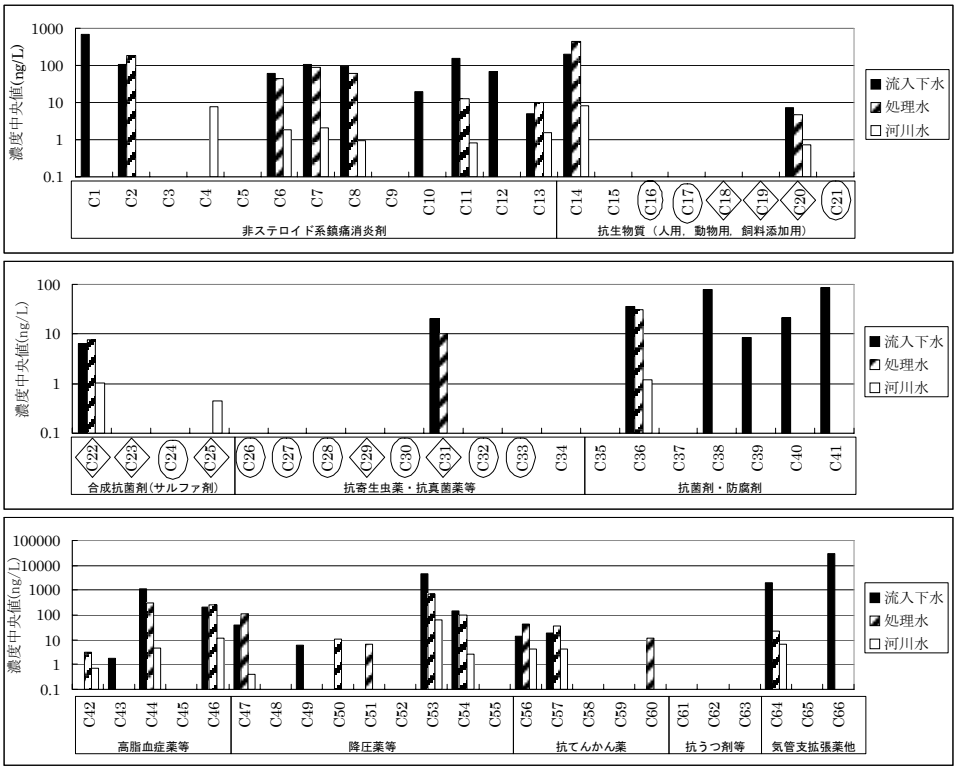
C31 トリメトプリムが流入下水・処理水で高頻度に検出されたが，河川・湖沼水中では少なかった。

（４）抗菌・防腐剤

C36の3,4,4'-トリクロロカルバニリドが流入下水・処理水および河川・湖沼水中にともに高頻度に検出され，C38～41 パラベン類（プロピル，ブチル，エチル，メチル）は流入下水中で高頻度に検出されたが，放流水中にはほとんど検出されず，河川水中でもC38プロピルおよびC41メチルパラベンが20%前後検出される程度であった。



図－４　医薬品類の検出頻度



図－５　医薬品類の濃度中央値

（５）高脂血症薬，痛風治療薬

高脂血症薬のフィブラート系は C44 ベザフィブラートが最もよく検出されて流入下水の濃度中央値が 1μg/L を越えており，処理水および河川・湖沼水中でも高頻度に検出された。他のフィブラート系も検出されていた。痛風治療薬の C45 アロプリノールも流入下水中に濃度中央値約 200ng/L で検出されており，処理水および河川・湖沼水中でも高頻度に検出された。

（６）降圧薬

C47 フロセミド，C53 バルサルタン，C54 ロサルタンが高頻度に検出されており，後の２物質の回収率がやや過大である点を考慮しても，流入下水・処理水および河川・湖沼水中によく存在しているものと考えられた。C49 エナラプリルは流入下水中でのみ高頻度に検出されたため下水処理での除去率が高いと考えられた。

（７）抗てんかん薬

C56 カルバマゼピンおよび C57 代謝物が流入下水・処理水および河川・湖沼水中に高頻度に検出され，C60 フェニトインが処理水中によく検出されていた。

（８）抗うつ剤，気管支拡張薬その他

抗うつ剤は不検出であったが，C61 フルオロキセチンは国内未承認であり使用がないものと考えられた。気管支拡張薬の C64 テオフィリン，胆汁酸利胆薬の C66 ウルソデオキシコール酸は年間生産量が約 80t，250t と大であり流入下水中の濃度中央値で約 2μg/L，約 30μg/L と高頻度に検出されたが，処理水および河川・湖沼水中でも検出されたのは C64 テオフィリンのみであり，C66 ウルソデオキシコール酸は下水処理での除去率が高いと考えられた。

なお，以上の医薬品類の定量には絶対検量線法を用いており，測定のほとんどの場合に回収率は 100%を下回っていると考えられるが補正をしていないため，測定結果は実態よりも控えめの評価となっている可能性がある。特に流入下水では回収率が低くなる物質が多いため，放流水と流入下水の濃度比より算出する除去率の精度が低くなることが考えられる。

絶対検量線法以外にも，安定同位体を前処理時に添加するサロゲート法による回収率補正も試みているが，一部の試料でサロゲート物質の検出の安定性に問題が見られたため，現時点では採用しなかった。今後，より精度の高い定量法を検討するとともに，固体試料（汚泥，底泥等）の分析も進めることとする。

３－２－２．香料等

下水処理場流入水，下水処理水，河川水及び底質中の香料及び紫外線吸収剤の濃度分布及び検出数を表－８に示した。なお，下水処理場流入水，下水処理水及び河川水濃度は懸濁態濃度と溶存態濃度の合計値としている。

以下に，各試料ごとの特徴を述べる。

（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 [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 [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%の以上の調査対象下水処理場で検出されていた。

表－８　香料等の濃度分布および検出数

compounds	influent (N=47) (av*±SD*) ng･l^{-1}	number of detection*	effluent (N=47) (av±SD) ng･l^{-1}	number of detection*	surface water (N=43) (av±SD) ng･l^{-1}	number of detection*	sediment (N=43) (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
methyl salicylate	623 ± 3630	47	17 ± 36	29	5.3 ± 14.5	30	2.0 ± 0.9	41
isobornyl acetate	122 ± 296	47	18 ± 19	29	12.2 ± 10.9	43	3.0 ± 1.7	42
iso methyl ionone	308 ± 633	47	22 ± 29	37	0.6 ± 1.7	9	0.2 ± 0.3	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
MDJ	3358 ± 4166	46	41 ± 43	36	2.2 ± 4.0	16	0.1 ± 0.4	2
ADBI	110 ± 575	46	4 ± 7	40	0.02 ± 0.1	3	0.02 ± 0.1	6
hexyl cinnamaldehyde	1517 ± 6865	47	47 ± 36	40	17.4 ± 13.5	41	4.6 ± 5.9	33
AHMI	31 ± 158	31	3 ± 13	15	- -	0	0.02 ± 0.1	2
octyl salicylate	173 ± 621	38	3 ± 6	10	- -	0	- -	0
ATII	210 ± 712	47	9 ± 6	46	0.05 ± 0.2	2	0.2 ± 0.4	14
HHCB	7781 ± 21384	47	388 ± 270	47	9.4 ± 9.4	43	6.6 ± 14.0	43
AHTN	4487 ± 13853	47	175 ± 123	47	9.8 ± 9.3	43	5.9 ± 12.4	43
MX	- -	0	- -	0	- -	0	- -	0
homosalate	29224 ± 107007	46	6 ± 16	6	- -	0	0.02 ± 0.1	1
benzyl salicylate	361 ± 1351	35	4 ± 18	4	0.4 ± 1.9	2	- -	0
MK	1023 ± 3440	47	104 ± 83	45	3.7 ± 8.0	12	0.9 ± 2.0	11
4-MBC	- -	0	- -	0	- -	0	- -	0
BP-3	550 ± 2672	46	11 ± 18	23	2.6 ± 4.5	19	0.5 ± 0.8	22
isoamyl methoxycinnamate	57 ± 358	3	0 ± 2	2	- -	0	0.1 ± 0.3	3
EHMC	4962 ± 14008	47	1171 ± 997	47	380.6 ± 479.5	43	79.0 ± 242.2	43
OD-PABA	180 ± 630	47	27 ± 35	47	1.8 ± 1.7	30	1.0 ± 0.4	43
octocrylene	293 ± 629	46	2 ± 4	13	- -	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 cinnnamaldehyde，HHCB 及び AHTN で μg･l^{-1} レベルの濃度であった。Simonich ら[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 μg･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，μg･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 μg･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[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[5]の報告と比較すると，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 μg･l^{-1} レベルで

あったのに対し，本研究はそれぞれ 388 ng·l^{-1}, 175 ng·l^{-1} であった。

一方，紫外線吸収剤では BP，EHMC がμg·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 ng·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[6]の報告値よりも 50 倍も濃度が高く，約 1 μg·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[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）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 isobornyl 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[10]では，それぞれ 10～220 ng·l^{-1}, 10～130 ng·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，1.7～54 ng·l^{-1}, 2.2～40.7 ng·l^{-1} であった。一方，本研究では BP や EHMC が数百 ng·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。

（４）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 0.7～84 μg/kgD.W.，0.5～71 μg・kgD.W^{-1}.検出され，これはライン川の報告値[11], 5～110 μg·kgD.W^{-1}., 5～180μg・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，48～546 μg･kgD.W^{-1}., 3.6～1446 ･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ろう。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[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。

４． まとめ

４－1. 分析方法の開発

固形状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 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，放流水および汚泥ならびに河川水および底泥等）において良好な回収率が得られ，適用可能であった。

今後は，本分析方法を用いて環境への放出量等の把握を進めていくとともに，必要に応じて分析方法の改良も行っていくこととする。

４－２．環境への放出・移行・変化量の把握

我が国で利用されている主要な PPCPs として，医薬品類および香料等を対象として，下水処理場 47 箇所および河川･湖沼 53 地点における現地調査を行い，これらの物質の環境への放出・移行・変化量の把握を行った。

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，流入水における検出率が 20%以上の物質は 34 物質であり，そのうち 25 物質は検出率 80%以上であったことから，広範囲の下水処理場において普遍的に多様な PPCPs が流入していることが判明した。

また，処理水では検出率 20%以上が 30 物質，検出率 80%以上が 17 物質であったことから，下水処理で PPCPs の検出頻度は低下するが，検出下限値未満までは低減されない物質も多いことが分かった。

香料等（香料および紫外線吸収剤）については，流入水および処理水では，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。このうち18物質は95%の以上の下水処理場の流入水で検出され，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。処理水では，95 %以上の下水処理場で検出された物質は 7 物質であり，流入水よりも少なかった。

河川水では，対象物質 25 物質中 16 物質が検出された。95 %以上の地点で検出されたのは 6 物質であった。特に，BP や EHMC は数百 ng･l^{-1} レベルで検出された。底質では，対象物質 25 物質中，18 物質が検出され，すべての地点で検出されたのは 5 物質であった。

今後は，現地調査を継続するとともに，挙動の解明に向けた検討も進めていくこととする。

なお、本調査研究は、国土交通省からの受託業務費により実施されたものである。

５． 参考文献

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

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

9) 厚生省 (2000) 化粧品基準(厚生省告示第三百三十一号).

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.

11) Landsanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (2001) Untersuchungen zum Vorkommen vonXenobiotika mit toxikologischer oder endokriner Wirkung in Schwebstoffen und Sedimenten, Abschlußbericht Luni 2000, Karlsruhe, Germany

６． 研究発表

1) 下水道および水環境への PPCPs (医薬品等由来化学物質) 負荷量の推定，山下洋正，亀田豊，尾崎正明，第 43 回下水道研究発表会，pp.76-78，2006

2)多成分の医薬品類の下水道および河川における検出状況，山下洋正，尾崎正明，第 44 回下水道研究発表会講演集，pp.46-48，2007

3)LC/MS/MS を用いた PPCPs の同時一斉分析方法の検討，山下洋正，亀田豊，尾崎正明，第 16 回環境化学討論会講演要旨集，pp.760-761，2007

4)香料及び紫外線吸収剤の多成分一斉分析方法の確立と環境中濃度，亀田豊，山下洋正，尾崎正明，第 41 回日本水環境学会年会講演集，pp.390，2007

5)香料および紫外線吸収剤の下水道における流入及び放流実態，亀田豊，山下洋正，尾崎正明，第44回下水道研究発表会講演集，pp.43-45，2007
6)香料及び紫外線吸収剤の多成分一斉分析手法の確立と環境中の濃度分布，亀田豊，山下洋正，尾崎正明，第16回環境化学討論会，pp.166-167，2007
7)環境中の香料及び紫外線吸収剤の多成分同時分析手法の確立と環境中濃度の把握，亀田豊，山下洋正，尾崎正明，水環境学会誌，(印刷中)，2007
8)PPCPs としての香料及び紫外線吸収剤の研究の現況と今後の展開，亀田豊，山下洋正，尾崎正明，水環境学会誌，(印刷中)，2007

II. その他の予算による研究

［水質チーム］

流域における物質動態特性の解明と流出モデルの開発（2）

研究予算：運営費交付金（治水勘定）
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：鈴木穣、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流出機構を明らかにするために、生活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）の解明と晴天時におけるこれらの物質の流達特性を把握した。その結果、トレーサー物質と溶解性栄養塩類の濃度比の整理から、生活系以外の点源の存在を推定することが可能であった。
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

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・リン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。また、一方で、近年、流域での開発によりシリカやフミン鉄といった必須元素の河川への供給が減少して、河川や海の生態系が悪化しているとの報告が見られる。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。

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リン流出・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。さらに、内外の物質循環モデル適用事例を踏まえつつ、現実の流域で施策立案に有効な情報を抽出するためのモデリングガイドラインを整備する。また、必須元素に関しては、都市雨水・排水由来の負荷量の解明、河川への影響把握と対策の可能性の検討を行うものである。

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トレーサー及び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 18 年度調査の内容

2. 1. 発生源ごとの水質特性の解明

2. 1. 1. 生活系汚濁発生源のトレーサー物質及び栄養塩類の汚濁発生量の実態

生活系汚濁のトレーサー物質及び栄養塩類の汚濁発生量の実態を把握するために、生活排水を主に受け入れている茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場の流入下水中のトレーサー物質及び栄養塩類の実態を調査した。下水道は、時空間的にランダムに発生する生活系汚濁を平均化し、かつロス無く下水処理場まで管渠を通じて収集していることから、下水処理場の流入下水を調査することで生活系汚濁の発生量を把握することができると考えられる。

ここではトレーサー物質として、環境中に比較的高濃度で存在している陽イオン（Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}）に注目した。陽イオンは通常陰性に帯電している土壌への吸着が考えられるが、一般に排水中のこれらの物質の濃度は $Na^+ > K^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+}$であるのに対して、土壌中の濃度は $Ca^{2+} > Mg^{2+} > K^+ > Na^+$の順に減少することが知られており、これらの陽イオンの中では、Na+が土壌等に吸着される割合が最も小さいと考えられることから、Na^+をトレーサー物質として選定した。

調査は、平成 18 年 11 月～平成 19 年 2 月にかけて、表-1 に示すように、週 2 回程度の頻度で流入下水をス

表-1　生活系汚濁発生源のトレーサー物質及び栄養塩類の汚濁発生量の実態

採水日	Na^+ mg l^{-1}	K^+ mg l^{-1}	D-N mg l^{-1}	D-P mg l^{-1}	DOC mg l^{-1}	K^+/Na^+	D-N/Na^+	D-P/Na^+	DOC/Na^+
11/06/06	47.82	11.80	20.18	1.45	36.40	0.247	0.422	0.0303	0.761
11/10/06	49.43	11.57	20.47	1.47	48.60	0.234	0.414	0.0297	0.983
11/13/06	55.49	11.68	21.15	1.70	44.50	0.210	0.381	0.0306	0.802
11/20/06	28.77	7.71	15.03	0.93	16.90	0.268	0.522	0.0323	0.587
11/24/06	46.24	11.26	18.87	1.05	29.20	0.244	0.408	0.0227	0.631
12/01/06	50.10	11.57	22.86	1.83	41.50	0.231	0.456	0.0365	0.828
12/05/06	44.01	9.71	16.76	1.05	34.20	0.221	0.381	0.0239	0.777
12/08/06	50.98	11.85	22.90	1.90	57.60	0.232	0.449	0.0373	1.130
12/11/06	53.33	12.34	19.49	1.23	51.20	0.231	0.365	0.0231	0.960
12/15/06	49.21	11.57	18.76	1.16	46.80	0.235	0.381	0.0236	0.951
12/18/06	56.78	12.62	17.03	0.52		0.222	0.300	0.0092	
12/22/06	51.62	12.53	21.51	1.23	52.40	0.243	0.417	0.0238	1.015
12/25/06	51.53	12.15	21.25	1.95	41.50	0.236	0.412	0.0378	0.805
01/05/07	46.23	10.71	25.32	1.88	38.20	0.232	0.548	0.0407	0.826
01/09/07	44.82	11.18	27.33	2.20	37.70	0.249	0.610	0.0491	0.841
01/12/07	45.85	10.85	19.58	1.50	50.80	0.237	0.427	0.0327	1.108
01/15/07	50.81	11.54	21.48	1.92	45.00	0.227	0.423	0.0378	0.886
01/19/07	50.76	11.82	20.68	1.39	43.30	0.233	0.407	0.0274	0.853
01/22/07	48.16	12.19	25.72	2.22	38.10	0.253	0.534	0.0461	0.791
01/26/07	43.89	11.98	22.97	1.69	41.00	0.273	0.523	0.0385	0.934
01/30/07	51.21	11.12	20.30	1.68	50.50	0.217	0.396	0.0328	0.986
02/02/07	45.41	11.61	24.47	1.41	58.00	0.256	0.539	0.0311	1.277
02/06/07	52.43	12.58	23.28	2.24	56.00	0.240	0.444	0.0427	1.068
02/09/07	48.70	12.03	26.06	1.84	57.70	0.247	0.535	0.0378	1.185
02/13/07	51.54	11.54	22.68	1.71	48.90	0.224	0.440	0.0332	0.949
02/16/07	48.52	12.02	26.79	1.70	46.60	0.248	0.552	0.0350	0.960
02/20/07	52.22	11.59	23.46	2.11	55.70	0.222	0.449	0.0404	1.067
02/23/07	51.58	12.43	29.32	1.98	47.60	0.241	0.568	0.0384	0.923
02/26/07	48.47	11.14	23.62	2.02	44.90	0.230	0.487	0.0417	0.926
平均値	48.82	11.54	22.05	1.62	45.03	0.237	0.455	0.0333	0.922
平均値＋2σ	58.68	13.44	28.55	2.46	63.32	0.265	0.599	0.0498	1.378
平均値－2σ	38.97	9.64	15.54	0.78	26.73	0.209	0.311	0.0169	0.466

ポットサンプリングし、トレーサー物質（Na^+）及び溶解性栄養塩類（K^+、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N、D-PO_4^{3-}-P）の計 6 項目を測定した。水質測定結果を表-1 に示す。ここでは、D-N＝NH_4^+-N+NO_2^--N+NO_3^--N、D-P＝D-PO_4^{3-}-P として表記した。また、トレーサー物質である Na^+に対する各物質の存在割合も合わせて表記した。

生活排水中のトレーサー物質 Na^+の濃度は、平均値で 48.82mg l^{-1} であり、分布を正規分布と仮定した際の 95%信頼区間の上限値（m+2σ）、下限値（m-2σ）はそれぞれ 58.68mg l^{-1}、38.97mg l^{-1} であった。溶解性栄養塩類の Na^+に対する存在割合は、K^+/Na^+の平均値は 0.237、95%信頼区間の上限値（m+2σ）は 0.265、下限値（m-2σ）は 0.209 であった。同様に D-N/Na^+ の各値は、0.455、0.599、0.311、D-P/Na^+の各値は、0.0333、0.0498、0.0169 であった。さらに有機性汚濁の一つの指標である溶解性有機炭素（DOC）についても検討し、平均値、95%信頼区間の上限値（m+2σ）、下限値（m-2σ）はそれぞれ 45.03mg l^{-1}、63.32mg l^{-1}、26.73mg l^{-1} であった。また、DOC/Na^+の平均値、95%信頼区間の上限値（m+2σ）、下限値（m-2σ）の各値として、0.922、1.378、0.466 を得た。

2.2　水質データの収集

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域、②利根川水系北浦流入河川を選定し、順流末端部における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。

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。

2.2.1 生活系汚濁の割合が大きい流域からの流出河川における晴天時水質の調査

既往の調査により、流域における汚濁発生量総量に占める生活系汚濁の割合が大きい流域であることが判明している利根川流域手賀沼流入河川の大津川の支流を対象に、トレーサー物質（Na^+）及び溶解性栄養塩類（K^+、NH_4^+-N、NO_2^--N、NO_3^--N、D-PO_4^{3-}-P）の実態調査を図-1 に示す 7 箇所で 4 回晴天時の日中に実施した。採水日は表-2 に示すとおり、非潅漑期である平成 18 年 11 月～平成 19 年 2 月の間である。また、2.1.1 章で得られた流入下水中の濃度との比較を図-2～図-5 で示す。

観測された Na^+濃度は 16.04～36.79mg l^{-1} の範囲で、生活排水中の濃度の平均値である 48.82mg l^{-1} と比べて低く、生活排水が地下水等で希釈されて流出していると考えられる。Na^+濃度と溶解性栄養塩類の濃度の比は、流入下水と大津川支流における平均値同士をで比較すると、K^+/Na^+では 0.237 から 0.142 へ、D-N/Na^+では 0.455 から 0.325 へ、D-P/Na^+では 0.0333 から 0.0113 へ、DOC/Na^+では 0.922 から 0.261 へそれぞれ低下しており、流出過程において、単純な希釈に加えて、Na^+よりも溶解性栄養塩類が流出しにくい機構が介在していると考えられる。この機構としては、生活系汚濁負荷に対する単独浄化槽や合併処理浄化槽などの人為的な処理や、土壌への吸着や生物などへ摂取が考えられ、結果として晴天時には Na^+に比べて栄養塩類の流出が抑制されていると考えられる。

表-2 生活系汚濁の割合が大きい流域からの流出河川における晴天時水質の調査結果

採水日	採水地点	Na^+ mg l^{-1}	K^+ mg l^{-1}	NH_4^+-N mg l^{-1}	NO_2^--N mg l^{-1}	NO_3^--N mg l^{-1}	D-N mg l^{-1}	D-P mg l^{-1}	DOC mg l^{-1}	K^+/Na^+	D-N/Na^+	D-P/Na^+	DOC/Na^+
2006/11/8	NT-②	27.93	2.62	0.00	0.00	4.73	4.73	0.027	5.32	0.094	0.169	0.0010	0.190
	OT-①	30.55	4.45	0.54	0.23	7.57	8.34	0.398	7.36	0.146	0.273	0.0130	0.241
	OT-②	28.74	4.61	0.73	0.16	3.98	4.87	0.532	7.97	0.160	0.169	0.0185	0.277
	OT-③	17.19	1.70	0.00	0.00	5.92	5.92	0.139	5.05	0.099	0.344	0.0081	0.294
	OT-④	20.89	3.05	0.22	0.17	6.23	6.61	0.229	5.43	0.146	0.317	0.0110	0.260
	OT-⑤	25.58	4.15	0.40	0.39	3.87	4.66	0.060	6.11	0.162	0.182	0.0023	0.239
	OT-⑥	21.52	3.32	0.25	0.24	5.50	5.99	0.200	5.34	0.154	0.278	0.0093	0.248
2006/12/18	NT-②	18.36	1.57	0.00	0.00	4.41	4.41	0.058	5.06	0.086	0.240	0.0032	0.276
	OT-①	36.39	4.59	0.98	0.22	7.10	8.30	0.502	9.79	0.126	0.228	0.0138	0.269
	OT-②	31.13	4.43	5.57	0.16	2.84	8.57	0.651	10.86	0.142	0.275	0.0209	0.349
	OT-③	18.24	1.71	0.13	0.05	5.88	6.06	0.175	7.28	0.094	0.332	0.0096	0.399
	OT-④	21.22	2.71	0.54	0.14	5.05	5.73	0.300	8.98	0.128	0.270	0.0141	0.423
	OT-⑤	21.22	4.02	3.82	0.16	3.72	7.70	0.411	12.11	0.189	0.363	0.0194	0.571
	OT-⑥	20.81	3.67	3.19	0.17	4.23	7.59	0.240	8.64	0.176	0.365	0.0115	0.415
2007/1/23	NT-②	22.36	1.80	0.00	0.04	4.76	4.80	0.046	3.34	0.081	0.215	0.0021	0.149
	OT-①	33.53	5.43	5.81	0.36	6.54	12.71	0.452	6.45	0.162	0.379	0.0135	0.192
	OT-②	22.95	4.09	4.65	0.14	4.64	9.43	0.282	5.63	0.178	0.411	0.0123	0.245
	OT-③	17.78	1.60	0.24	0.06	6.16	6.46	0.133	4.80	0.090	0.363	0.0075	0.270
	OT-④	19.25	3.05	3.17	0.16	5.51	8.84	0.287	4.89	0.158	0.459	0.0149	0.254
	OT-⑤	21.44	3.97	4.93	0.39	3.74	9.06	0.075	4.68	0.185	0.423	0.0035	0.218
	OT-⑥	19.36	3.33	3.28	0.21	5.05	8.54	0.224	4.51	0.172	0.441	0.0116	0.233
2007/2/27	NT-②	16.04	1.35	0.00	0.00	4.61	4.61	0.044	1.88	0.084	0.287	0.0027	0.117
	OT-①	36.79	6.27	8.41	0.34	3.06	11.81	0.765	7.17	0.170	0.321	0.0208	0.195
	OT-②	26.94	4.62	7.45	0.10	2.52	10.07	0.764	6.57	0.172	0.374	0.0284	0.244
	OT-③	18.24	1.52	0.00	0.05	6.38	6.43	0.156	2.97	0.083	0.353	0.0086	0.163
	OT-④	19.49	3.31	4.08	0.11	4.57	8.76	0.350	4.09	0.170	0.450	0.0180	0.210
	OT-⑤	23.01	4.46	5.33	0.38	3.04	8.74	0.114	4.01	0.194	0.380	0.0050	0.174
	OT-⑥	20.23	3.63	4.56	0.17	3.97	8.70	0.262	3.84	0.179	0.430	0.0130	0.190
平均値		23.47	3.39	2.44	0.16	4.84	7.44	0.28	6.08	0.142	0.325	0.0113	0.261
最大値		36.79	6.27	8.41	0.39	7.57	12.71	0.77	12.11	0.194	0.459	0.0284	0.571
最小値		16.04	1.35	0.00	0.00	2.52	4.41	0.03	1.88	0.081	0.169	0.0010	0.117

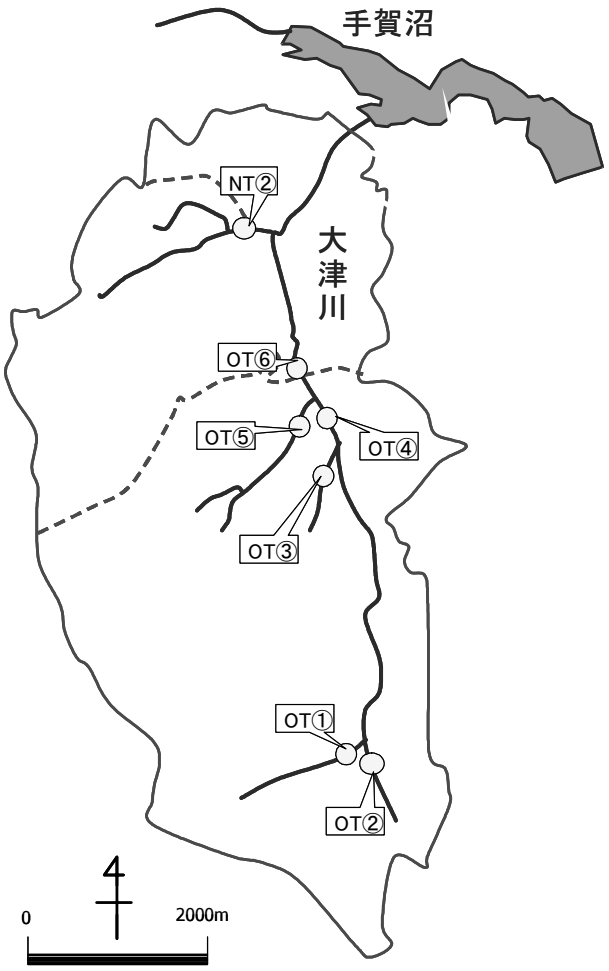


図-1 大津川支流採水地点

2.2.2 生活系汚濁の割合が小さい流域からの流出河川における晴天時水質の調査

流域における汚濁発生量総量に占める生活系汚濁の割合が小さいと考えられる農村地帯の利根川水系北浦流入河川を対象に、トレーサー物質（Na^+）及び溶解性栄養塩類（K^+、NH_4^+-N、NO_2^- -N、NO_3^- -N、D-PO_4^{3-}-P）の実態調査を実施した。採水は表-3 及び図-10 に示す 62 箇所で、平成 17 年 10 月～平成 18 年 9 月の間、各箇所 4～8 回晴天時の日中に実施した 2.1.1 章で得られた流入下水中の濃度と合わせて、結果を図-6～9 に示す。

観測された Na^+濃度（11.36～125.52mg l^{-1}）のうち、生活排水中濃度の 95%信頼区間の上限値（m＋2σ）58.68mg l^{-1} を超える濃度が観測されたのは、N41.5 と S22 の 2 カ所あり、これらの流域には生活系以外の Na^+を排出する汚濁発生源が存在すると推定される。

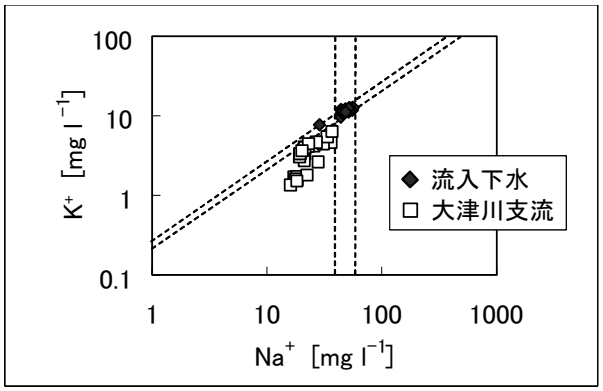


図-2 ナトリウムイオン濃度と
カリウムイオン濃度の関係

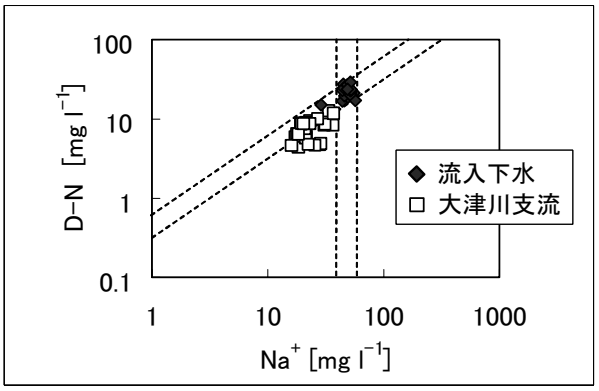


図-3 ナトリウムイオン濃度と
溶解性窒素濃度の関係

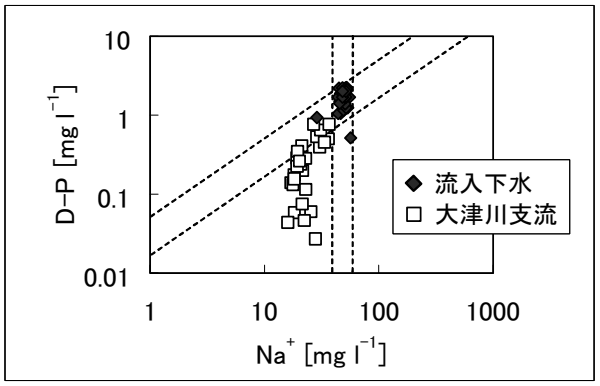


図-4 ナトリウムイオン濃度と
溶解性リン濃度の関係

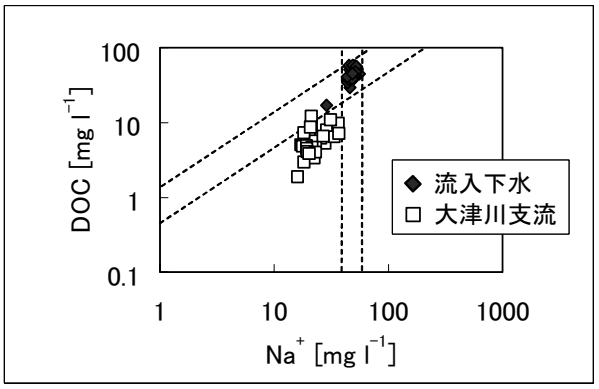


図-5 ナトリウムイオン濃度と
溶解性有機炭素濃度の関係

表-3 北浦流入河川採水箇所

地点略称	流入河川(樋門)
N-2	武田川 内宿大橋
N-6	武田川 武田排水樋門
N-7	北浦 帆津倉第二樋門
N-8	北浦 金上森下樋門
N-9	北浦 穴瀬舟津樋門
N-10	長野江川 (県道の橋)
N-12	串挽第二号排水樋門
N-14	串挽第一号排水樋門
N-16	巴川 北浦橋
N-18	長茂川 長茂川橋
N-19	田中川 第一橋
N-20	北浦 安塚第三号樋門
N-21	北浦 安塚第一号樋門
N-22	二重作第二排水路 第一橋
N-23	北浦 梶山第七号高排樋門
N-24	二重作大排水路 梶山橋
N-25	北浦 上幡木第六号高排樋門
N-26	北浦 梶山第一号高位部樋門
N-27	大洋境川 最下流の橋
N-28	北浦 阿玉第二号高位部排水樋門
N-29	北浦 阿玉第一号高位部排水樋門
N-30	大洋川 最下流の橋
N-31	北浦 第二幹線排水樋門
N-32	北浦 札第一樋門
N-33	北浦 上幡木第一号高排樋門
N-34	白鳥川 最下流の橋
N-35	北浦 白鳥の里樋門
N-36	上幡木志崎境川 最下流の橋
N-37	北浦 沼里排水路
N-38	武井川 最下流の橋
N-39	北浦 白浜二号排水樋管

地点略称	流入河川(樋門)
N-40	蔵川 蔵川橋
N-40.5	大円寺川 塚田樋門
N-41	大円寺川 境橋
N-41.5	大円寺川 吉川第三樋門
N-42	北浦 吉川第二樋門
N-43	北浦 岩手樋門
N-44	山田川 繁昌宝来高位部排水樋門
N-45	山田川 荷下橋
N-46	山田川 山田高位部排水樋管
S-1	北浦 観音下樋門
S-2	北浦 水原第一排水樋門
S-3	北浦 釜谷排水樋門
S-4	北浦 大生樋門
S-5	北浦 大賀排水樋門
S-6	北浦 乙堀第二樋門
S-7	北浦 蓮池第二樋門
S-8	雁通川 最下流の橋
S-9	和田前樋門
S-10	北浦 立原樋門
S-11	北浦 上町樋門
S-12	北浦 奈良毛第一号排水樋門
S-13	中里川
S-14	北浦 沼尾排水樋管
S-15	北浦 須賀高位部排水樋管
S-17	北浦 爪木高位部排水樋管
S-18	北浦 大船津一号排水樋管
S-20	堀割川 下塙排水樋門
S-21	堀割川 谷原橋
S-22	北浦 下幡木(上)高位部排水樋門
I	鉾田川(飯名橋)
W	鰐川取水樋管

Na^+濃度と溶解性栄養塩類の濃度の比は、流入下水、大津川支流、北浦流入河川における平均値同士を比較すると、K^+/Na^+では 0.237、0.142、0.146、D-N/Na^+では 0.455、0.325、0.138、D-P／Na^+では 0.0333、0.0113、0.0045、DOC/Na^+では 0.922、0.261、0.223 となり、K^+、DOC については大津川支流と大きな差が無い一方、D-N、D-P についてはさらに低下しており、大津川支流に比べると汚濁負荷発生特性の違いやNa^+より D-N、D-P が流出しにくい機構の影響が北浦流域全体ではあると考えられる。

しかし、各採水箇所ごとに詳細に見ると流入下水の比率に近い場所や、さらにK^+/Na^+が流入下水の 95%信頼区間の上限値（m＋2σ）0.265 をも上回る箇所も見られた。これらの箇所では、生活系汚濁負荷以外の施肥や畜産廃棄物などに由来する K^+が混入している可能性が考えられる。

同様に、D-N/Na^+、D-P/Na^+、DOC/Na^+についても、それぞれの流入下水の 95%信頼区間の上限値（m＋2σ）を上回る箇所が散見された。図-10 には、各比率が流入下水の 95%信頼区間の上限値（m＋2σ）を上回る箇所を黒、95%信頼区間内の箇所を灰色、下回る箇所を白で示した。特に、K^+/Na^+が上限値を上回る箇所は北浦の北西岸に偏在しており、土地利用形態との関係が推察される。

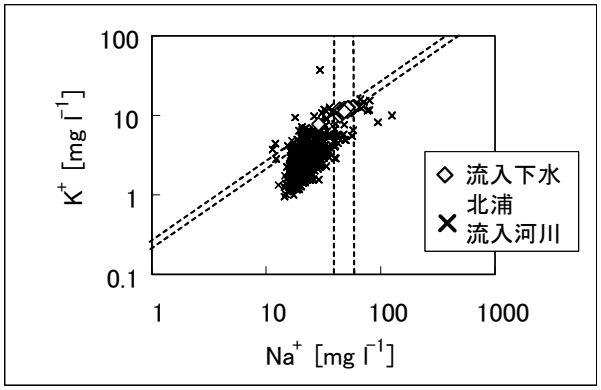


図-6 ナトリウムイオン濃度と カリウムイオン濃度の関係

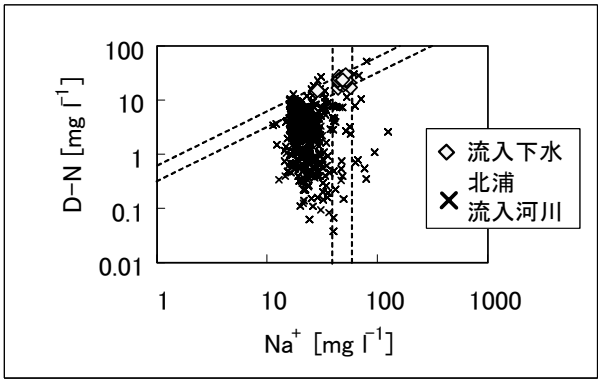


図-7 ナトリウムイオン濃度と 溶解性窒素濃度の関係

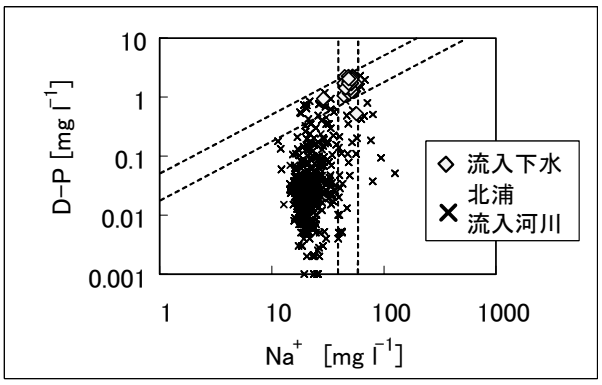


図-8 ナトリウムイオン濃度と 溶解性リン濃度の関係

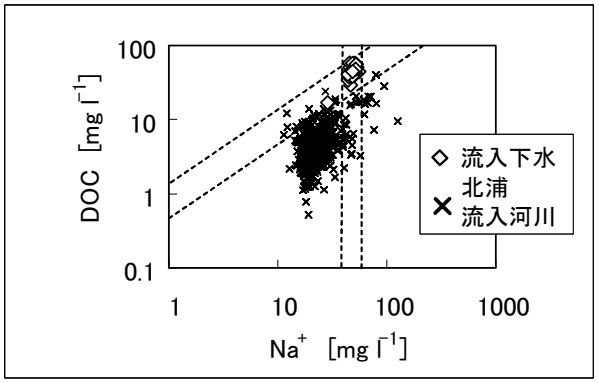


図-9 ナトリウムイオン濃度と 溶解性有機炭素濃度の関係

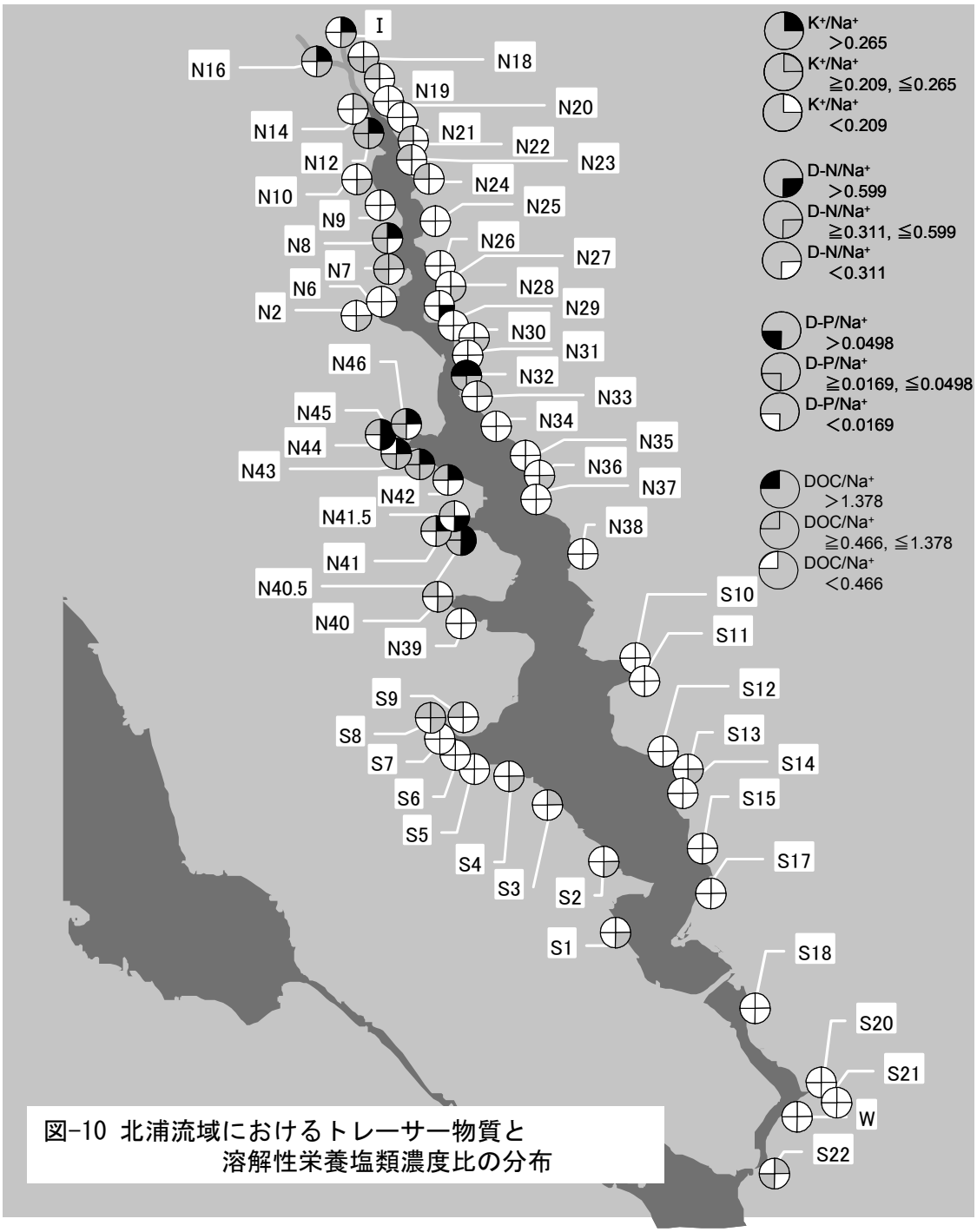


図-10 北浦流域におけるトレーサー物質と溶解性栄養塩類濃度比の分布

3. まとめ

流域で発生する栄養塩類の閉鎖性水域へ流出機構を明らかにするために、平成 18 年度は生活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。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①利根川水系手賀沼流入河川の大津川の支流域、②利根川水系北浦流入河川を選定し、順流末端部における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、晴天時におけるこれらの物質の流達特性を把握した。

さらに、トレーサー物質と溶解性栄養塩類の濃度比の整理から、生活系以外の点源の存在を推定することが可能であった。

今後は、特徴的な流域において、各種発生源の汚濁物質発生特性の把握、土地利用情報収集、懸濁成分の分析、雨天時流出実態調査等の詳細な検討を行い、汚濁発生源から水域へのトレーサー及び栄養塩類の流出機構の解明を行う予定である。

難分解性溶存有機物の由来と水域挙動に関する研究

水環境研究グループ 水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
研究員　北村友一

1．はじめに

流域から湖沼への汚濁負荷は下水道整備などの発生源対策により減少傾向にあるものの、湖沼中の有機物濃度は横ばいあるいは増加傾向が観察されている。琵琶湖では、難分解性溶存有機物が増加していることが明らかとなっており、湖沼において新たな水質汚染が進みつつある。

湖水中に蓄積される難分解性溶存有機物は、フミン物質などの溶存有機物と考えられているものの、精密な定性分析は行われておらず、その発生源についても不明である。また、湖水は水道水源として利用されているところも多く、湖水中の難分解性溶存有機物が水道水を介してヒトの健康に影響を及ぼすことも懸念される。

本研究では、湖沼に流入する河川水や下水などに含まれる難分解性溶存有機物の質的・量的な特性を把握する手法を確立し、湖沼に蓄積する難分解性溶存有機物の発生源を明らかにする。さらに、発生源から水域への到達過程および湖沼内での挙動を明らかにする。

平成１７年度に行った霞ヶ浦流入河川水の３次元励起蛍光スペクトル分析の結果では、霞ヶ浦湖水と霞ヶ浦流入河川の蛍光特性は類似していた。このことから霞ヶ浦湖水中の蛍光物質は河川に由来する可能性がある。そこで、１８年度は、霞ヶ浦流入河川の中で、流量が最も大きい桜川を調査対象とし、桜川のどの地点から蛍光物質が検出されるかを調査した。

2．調査地点

桜川の調査地点は、図-1のとおりであり、採水時期は、平成18年9月5日の晴天時である。霞ヶ浦掛馬沖の採水は平成18年8月3日、下水放流水の採水は平成18年8月24日に行った。

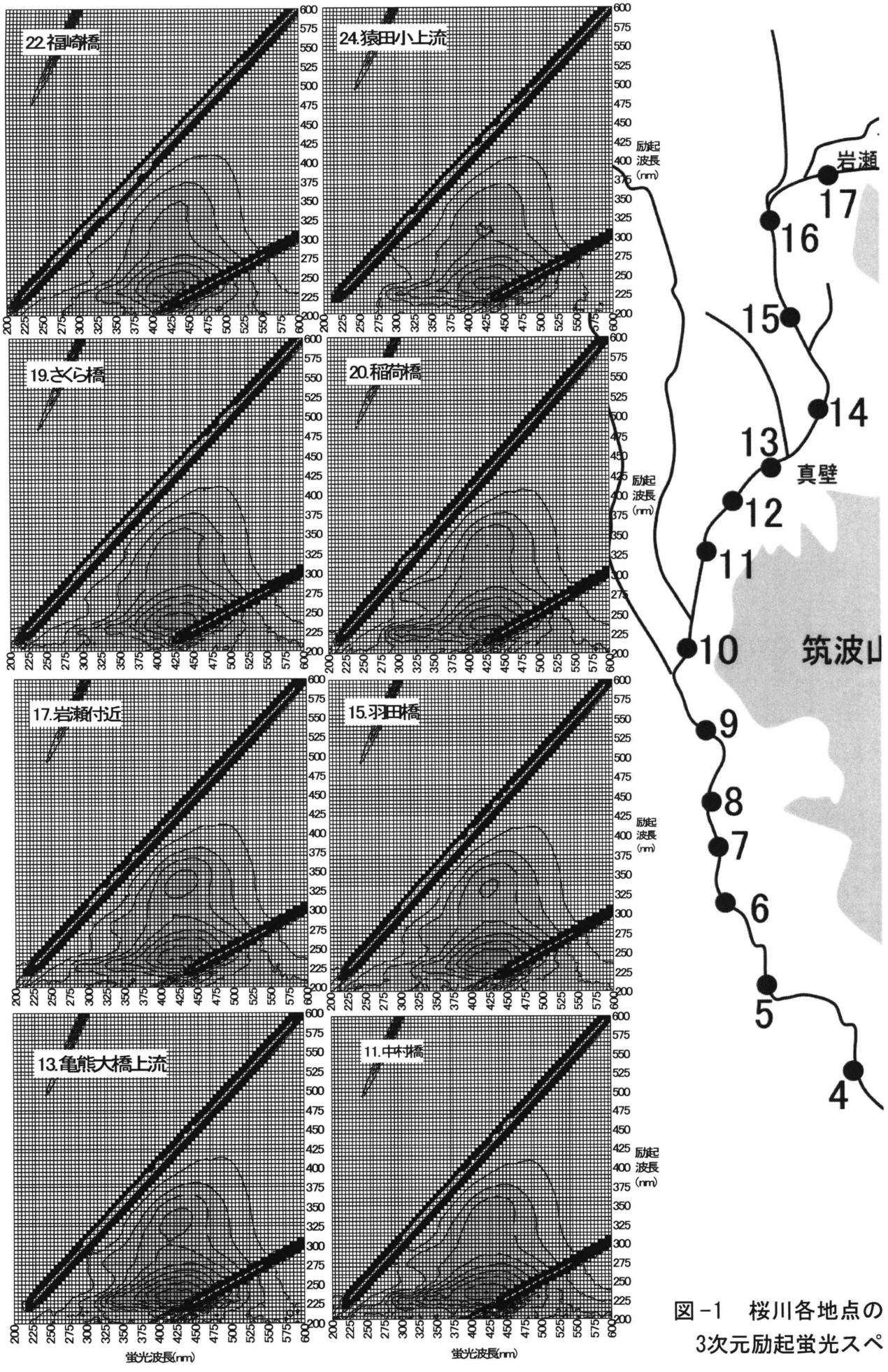
3．分析方法

水試料は、GF/Fグラスファイバーフィルターでろ過し、ろ液を蛍光分光光度計（日立製F-4500）で測定した。測定条件は、励起波長(EX)、蛍光波長(EM)とも200～600nmで、その間隔は5nmとした。蛍光強度は、10μg/Lの硫酸キニーネ水溶液の励起波長(EX)350nm、蛍光波長（EM）450nmの蛍光強度を1QSUとし、その相対値とした。なお、ブランクには、ミリQ水を用い、全ての測定結果から差し引いた。

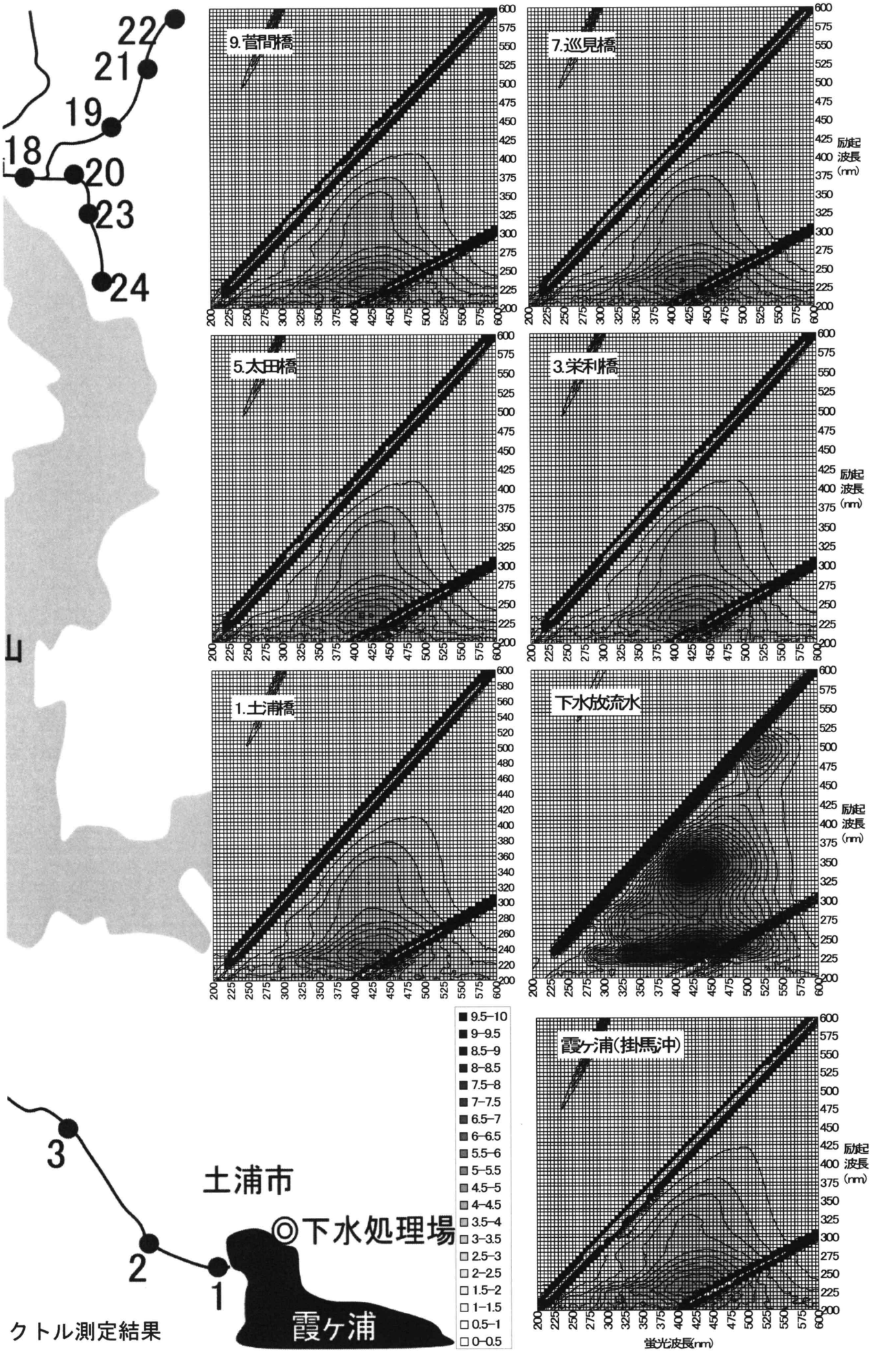
蛍光特性と他の水質項目との関係を調べるため、GF/Fでろ過した試料は、TOC（島津製TOC-5000)、CODcr(ブランルーベ製オートアナラーザーⅡ)、NH_4-N、NO_3-N、NO_2-N(ブランルーベ製TRACCS2000)の分析も行った。なお、ろ過前の試料のpH、SS、VSS、クロロフィルを反映する励起波長(EX)460nm、蛍光波長（EM）680nmの蛍光強度の測定も行った。

4．分析結果

桜川の各調査地点、霞ヶ浦掛馬沖、下水放流水の３次元励起蛍光スペクトルを図-1に示す。図-1より、桜川各地点と霞ヶ浦掛馬沖の３次元励起蛍光スペクトルは、類似しており、いずれの地点でもEX230nm-EM425nm付近の蛍光強度が高いことがわかる。このピークは、桜川上流から下流のすべてで検出されていた。図-2は、桜川各調査地点でのろ過前の試料のpH、SS、VSS、EX460-680nmの蛍光強度およびろ過試料のEX230nm-EM425nmの蛍光強度、TOC、CODcr、NH_4-N、NO_3-N、NO_2-Nの結果である。pHは、桜川の各地点とも7.5付近であったが、霞ヶ浦掛馬沖では、8.6付近となった。クロロフィルを反映するEX460nm-EM680nmの蛍光強度も霞ヶ浦掛馬沖で上昇していた。植物プランクトン濃度が上昇するとpHは増加することから、pHの上昇は植物プランクトン量の上昇が原因であると推察される。SS、VSS濃度は、河口付近で低下しており、EX460nm-EM680nmの蛍光強度と連動していなかった。こ



図－1　桜川各地点の3次元励起蛍光スペ


9.菅間橋
7.巡見橋
5.太田橋
3.栄利橋
1.土浦橋
下水放流水
霞ケ浦(掛馬沖)
励起波長(nm)
蛍光波長(nm)
22
21
19
18
20
23
24
3
2
1
土浦市
◎下水処理場
霞ケ浦
クトル測定結果
9.5–10
9–9.5
8.5–9
8–8.5
7.5–8
7–7.5
6.5–7
6–6.5
5.5–6
5–5.5
4.5–5
4–4.5
3.5–4
3–3.5
2.5–3
2–2.5
1.5–2
1–1.5
0.5–1
0–0.5

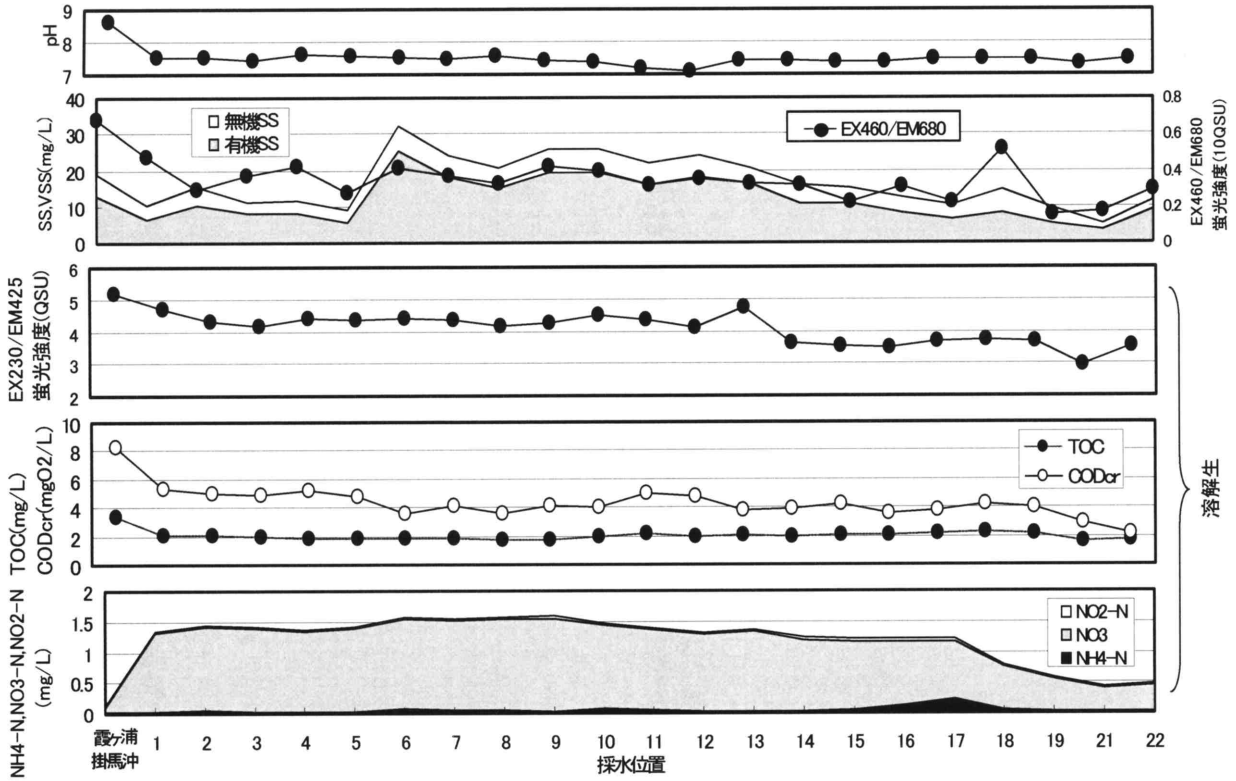


図-2　桜川各地点でpH、SS、VSS、EX460/EM680の蛍光強度、およびEX230/EM425の蛍光強度、TOC、CODcr、NH_4-N、NO_3-N、NO_2-Nの結果

れは、今回の調査では、河川流速は測定しなかったが、河口付近では流速の低下によりSS、VSSは沈降したが 、植物プランクトンは沈降しなかったためと考えられる。桜川のEX230nm-EM425nmの蛍光強度は、河川上流付近で低下する傾向を示した。この傾向は、CODcr、NO_3-Nと概ね類似していることがわかる。霞ヶ浦掛馬沖のTOC、CODcr濃度は、河川水より高い値を示し、一方、NO_3-N濃度は、河川水より低い値となっていた。霞ヶ浦掛馬沖では、、NO_3-Nは植物プランクトンの増殖に利用され、藻類に由来する有機物が生産されている可能性があった。

5．EX230-EM425にピークを有する有機物の検索

河川水中でEX230-EM425をピークとする有機物としてはフルボ酸が考えられる。図-3は、日本腐食物質学会から購入したフルボ酸を5mg/Lになるようにイオン交換水で希釈し、3次元励起蛍光スペクトルを測定したものである。このスペクトル特性は、桜川の各地点のものと類似していることから、桜川で検出された蛍光物質は、フルボ酸に由来するものと考えられる。

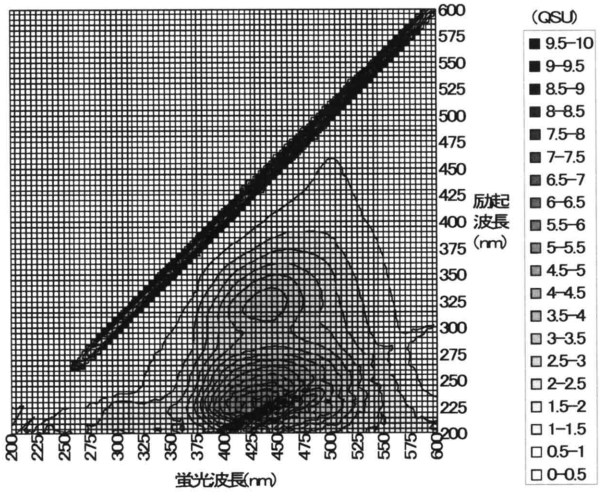


図-3　フルボ酸(5mg/L)の3次元励起蛍光スペクトル

6．まとめ

桜川の上流域から下流域の各地点で採水した河川水の3次元励起蛍光スペクトルを測定した結果、フルボ酸に由来すると考えられる蛍光ピークが検出された。このピークは桜川上流域でも検出され、下流になるに従い高くなる傾向を示した。また、霞ヶ浦では、内部生産により有機物濃度が上昇している可能性があった。

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（一般勘定）
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：鈴木穣，小森行也，北村清明，
北村友一, 原田新（専門研究員），
八十島誠（共同研究員）

【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、水環境中での挙動解明、また、水生生態系への影響評価をするため、魚類・両生類・甲殻類・藻類・細菌等を用いたバイオアッセイ手法により医薬品等の評価法の提案を行うことを目的としている。平成 18 年度は、2 種の抗生物質の分析方法の開発と 5 種の生物を用いたバイオアッセイ手法を用い医薬品が生物に及ぼす影響について検討した。

キーワード：レボフロキサシン、クラリスロマイシン、分析方法、バイオアッセイ

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。

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、水環境中での挙動を解明し、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い、また、水生生態系への影響を評価するため、魚類・両生類・甲殻類・藻類・細菌等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 18 年度は、研究対象医薬品等の選定と分析方法の開発、水環境中での医薬品等の実態把握と挙動解明、バイオアッセイを用いた医薬品等の評価について実施した。

2. 研究対象医薬品等の選定と分析方法の開発

2. 1 目的

医薬品は、「低濃度」かつ「特異的」に作用することから、極低濃度の長期的暴露による水生生物や人間への影響が懸念されはじめている [1)~3)]。医薬品のうち抗生物質は、細菌などによる感染症治療のために日常的に処方され、服用後、主としてし尿排水として下水道を経由し、下水道で除去されないものは環境中に排出される。環境に排出された抗生物質による薬剤耐性をもつ感染微生物の増加が心配される [4)]など、医薬品の中でも注目度が高い物質である。

数多くある抗生物質の中から優先的に調査すべき成分を合理的に選定する方法と選定した抗生物質の分析方法の開発を目的として（独）土木研究所と東和科学（株）が「共同研究」を実施した。

2. 2 対象医薬品の選定方法

抗生物質における対象物質の絞込みを行う際の合理的選定方法の一例として、①体外排泄量、②毒性、③親水性の視点が考えられる。

①については、抗生物質の売上高、薬価、排泄率から体外排泄量を算出した。体外排泄量の算出方法は図 2-1、体外排泄量（環境負荷量）の視点で対象物質をランキングした結果は表 2-1 に示すとおりである。

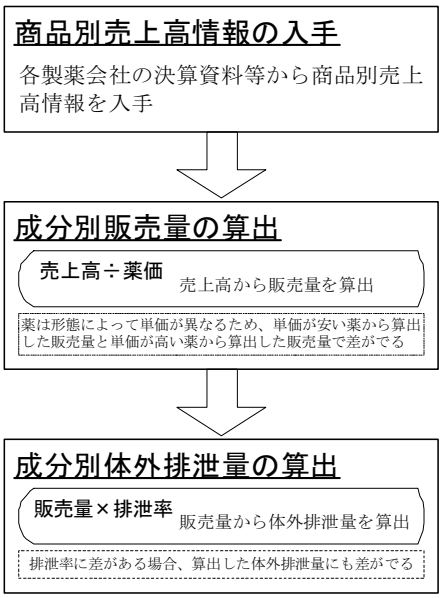


図 2-1 体外排泄量の算出方法

表 2-1 体外排泄量の視点で整理した抗生物質のランキング

順位	薬効成分名	体外排泄量(t/年)	
		最小量※1	最大量※2
1	クラリスロマイシン	8.76	26.2
2	レボフロキサシン	14.6	17.9
3	塩酸セフカペンピボキシル	2.27	15.5
4	フロモキセフナトリウム	9.64	9.64
5	セフジニル	2.22	7.83

※1 : 最小量とは、最も単価が高い薬のみ売れたと仮定した場合の販売量から算出した排泄量（想定される最小排泄量）
※2 : 最大量とは、最も単価が安い薬のみ売れたと仮定した場合の販売量から算出した排泄量（想定される最大排泄量）

②については、環境リスク評価の場合、多くは藻類・ミジンコの EC_{50} や魚類の LC_{50} を用いるが、医薬品についてはこれらの情報がほとんどない。ここでは、最も多くの医薬品で共通して公表されている毒性試験結果であるラットの単回経口投与毒性試験結果（LD_{50}）を整理した結果を表 2-2 に例示した。

表 2-2 毒性の視点で整理した抗生物質のランキング

順位	薬効成分名	単回経口投与毒性試験【ラット】LD_{50}値(mg/kg) ※3
1	レボフロキサシン	1,478
2	アジスロマイシン	>2,000
3	クラリスロマイシン	2,700
4	シラスタチンナトリウム	5,000
5	塩酸セフカペンピボキシル	>5,000
	イミペネム	>5,000

※3 : 数値が低い医薬品はより低用量で影響が現れるため、より影響が強いと考えられる

③については、汚泥吸着や生物濃縮との関連が高いと考えられるオクタノール－水分配係数（以下、Kow）を用いた。Kow は、オクタノールと水間の分配を表す定数で、Kow が小さいほど水系に存在する割合が高くなることが知られている。親水性の視点で整理した結果を表 2-3 に例示した。

表 2-3 親水性の視点で整理した抗生物質のランキング

順位	薬効成分名	オクタノール水分配係数 (Kow)
1	フロモキセフナトリウム	0.010
2	セフジニル	0.04
3	レボフロキサシン	0.553
4	セフジトレンピボキシル	>3.0
5	クラリスロマイシン	7.18

2. 3 分析方法の開発

2.3.1 試薬等

本試験では、標準試薬としてレボフロキサシン：LVFX（Laboratories INC, 純度 90.2%）、クラリスロマイシン：CAM（和光純薬, 純度 90%以上）を 0.5%ギ酸水溶液：アセトニトリル=3：7 に溶解して使用した（以下、STD）。その他の試薬類は、すべて和光純薬製または、関東化学製の試薬特級以上のものを用いた。1,000mg/l の LVFX および CAM の STD は、冷蔵（約 5℃）保存により少なくとも 2 週間は安定であった。

ガラス繊維濾紙（Whatman GF/B、粒子保持能 1μm）は、アセトン洗浄後使用した。固相抽出には OasisHLB 固相抽出カートリッジ（Waters 製、充填剤量：200mg）を用いた。使用したすべてのガラス器具類は，洗剤および水道水による洗浄後、純水、アセトンの順に洗浄して使用した。

2.3.2 前処理方法

試料 100ml を GF/B でろ過した。ろ紙上に残った浮遊物質（SS）は、アセトン 10ml を加えた後、超音波により 2 回抽出し、抽出液をロータリーエバポレータで 0.5ml 程度まで濃縮後，濃縮液をろ液に合わせた。固相抽出は、予めメタノールと精製水（各 3ml）でコンディショニングした OasisHLB に試料を 10ml/min 流速で通水し、CAM、LVFX を保持させた。通水後、OasisHLB カートリッジを強制吸引により脱水（約 1 時間）した。次に、酢酸エチル 6ml で CAM を、次いでメタノール 6ml で LVFX を溶出させた。溶出液は、

窒素気流により濃縮乾固し、0.5%ギ酸水溶液：アセトニトリル=3：7 を 1ml 添加し再溶解させた。この溶解液を測定用試料とした。

2.3.3 測定条件

抗生物質の同定、定量は、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析（LC/MS/MS）法を用いて行った。高速液体クロマトグラフは、Agilent 製 1100、タンデム型質量分析計は AppliedBiosystems 製 API4000 を用いた。カラムは、逆相カラムである phenomenex 製 LUNA C8（2.0mmφ×50mm）を使用した。移動相は、0.5%ギ酸水溶液：アセトニトリル=3：7 とした。カラム温度は 40℃、流速は 0.1ml/min、注入量は 5μl とした。イオン化はエレクトロスプレー（ESI）法（ポジティブ）とし、コリジョンエネルギーは LVFX では 27eV、CAM では 41eV とした。

2.3.4 検出下限値と定量下限値

下水試料は夾雑物が多く、その影響で分析精度を低下させることが考えられることから、下水試料での下限値を確認した。本研究で対象とした LVFX、CAM は、二次処理水中に定量下限値以上の濃度で存在しており、サロゲート物質もないことから、下水試験法[5]に従って二次処理水における検出下限値、定量下限値を求めた。つまり、採取した二次処理水の繰り返し測定結果の標準偏差（S）の 3 倍（3S）を検出下限値，10 倍（10S）を定量下限値と定義[5]した。測定の結果、二次処理水での繰り返し測定結果の標準偏差（S）は、13.8ng/l（LVFX），14.5ng/l（CAM）であった。したがって、二次処理水での検出下限値および定量下限値は 3S, 10S として 41.4ng/l、138ng/l（LVFX）、43.5ng/l、145ng/l であった。また、この時の測定値の変動係数は、LVFX では 4.3%、CAM では 3.6%であった。

2.3.5 添加回収試験

一般に、分析法の妥当性を評価するためには、測定しようとする試料を用いて添加回収試験を行うことが必要である。本試験では、二次処理水を対象に、試料に STD を添加（ろ過前の試料に添加）した標準添加試料（Sa）と試料（S）の測定値の差（Sa－S）と添加濃度の関係から回収率を求め、方法の妥当性を評価した。なお、差を用いているのは、二次処理水中に対象物質が含まれているためである。

二次処理水を用いた添加回収試験（添加濃度：500ng/l）の平均回収率（n=5）は、LVFX では 82%、CAM では 55%であった。また、回収率の標準偏差は，LVFX では 4.5%、CAM では 1.2%であった。CAM の回収率が低かった理由としては、二次処理水に含まれる夾雑成分が測定時に目的物質のイオン化を阻害したことなどが考えられる。

2. 4 まとめ

数多くの医薬品のうち、薬剤耐性をもつ感染微生物の増加が心配されるなど、医薬品の中でも環境中での存在量・動態に関して注目度が高い抗生物質について調査対象成分の選定方法と分析方法について検討を行い以下の結果を得た。

1）選定方法の一例として、①体外排泄量、②毒性、③親水性の視点でランキングをまとめたところ、レボフロキサシン、クラリスロマイシンが上位にランキングされた。

2）レボフロキサシン、クラリスロマイシンの分析方法を開発した。二次処理水での検出下限値および定量下限値は、それぞれ 41.4ng/l、138ng/l（LVFX）、43.5ng/l、145ng/l であった。また、二次処理水を用いた添加回収試験の平均回収率は、LVFX では 82%、CAM では 55%であった。

3. 水環境中での医薬品等の実態把握と挙動解明

3. 1 目的

下水処理場では、処理対象物質については排水を受け入れ適切に処理した後に、また、処理対象ではないが規制を受けている有害物質については特定事業場からの受け入れ基準を定めて、下水処理水が基準を満足することを確認したうえで放流しているが、抗生物質の除去特性は十分に把握されていない状況にある。このため抗生物質が下水道で十分に処理しきれずに河川等に放流された場合、水環境で検出される抗生物質の一因となる可能性がある。そこで、平成 18 年度は二次処理水中の抗生物質の実態を明らかにすることを目的として、開発した分析方法を用いて二次処理水を対象とした LVFX、CAM の分析を行った。

3. 2 調査方法

本研究では、日本国内の下水処理場の代表的な処理方式である標準活性汚泥法による処理を行っており、抗生物質の流入が見込まれる、即ち、主として生活排水を受け入れている 5 箇所の下水処理場を対象とした。対象とした下水処理場の処理能力は、28,000～450,000m³/day の規模である。試料は二次処理水とし、洗浄済みのガラス瓶に採水し、保冷して持ち帰り、直ちに前処理を開始した。

3. 3 調査結果と考察

対象とした下水処理場の二次処理水中の LVFX は

152～323ng/l、CAM は 303～567ng/l の濃度範囲で検出された。海外では、LVFX[6]が 133ng/l（三次処理水）、CAM[1,7]が 57～328ng/l で検出されたと報告されている。本研究で検出された二次処理水中の LVFX、CAM の濃度は、海外の報告値と比較して高い傾向にあった。

LVFX, CAM のオクタノール－水分配係数は、それぞれ 0.553、7.18 [8]であるが、下水処理での化学物質の除去は、生分解性や揮発性が同じ場合、活性汚泥への吸着性に大きく影響を受ける [9]ため、CAM は LVFX に比べて下水処理での除去効果が期待される。一方、LVFX、CAM の体外排出量は大きな差はないことから LVFX、CAM 濃度は、下水処理を受けることで LVFX ＞CAM となることが予想される。しかし、対象とした 5 処理場のうち 4 処理場での二次処理水では、LVFX ＜CAM となっており、下水処理場での CAM の除去が LVFX より大きくない可能性が示唆された。これらのことから、LVFX、CAM の下水処理での除去要因としては、オクタノール－水分配係数 [10]だけではなく、生分解性、pH[11]などが複雑に関係していると考えられる。

3. 4 まとめ

下水処理場の二次処理水中の抗生物質の実態を明らかにすることを目的として、開発した分析方法を用いて二次処理水を対象とした LVFX、CAM の分析を行い、LVFX は 152～323ng/l、CAM は 303～567ng/l の濃度範囲で存在することを確認した。

４．バイオアッセイを用いた医薬品等の評価

４．１　目的

医薬品等の物質は、その本来の目的において生体作用を持つため、環境中に存在するこれらの物質が水域の生態系にも何らかの影響を及ぼすことが懸念される。しかし、化審法による生態影響試験を課せられている化学物質と異なり、医薬品はそのような評価対象とはなっていないため、これらの物質の持つ生態影響に関するデータは未だ十分とはいえない状況にある。

また、人用の医薬品は人体に対しての安全性は確保されているといえるが、水域の生態系は細菌から植物、無脊椎動物、脊椎動物まで様々な生物によって構成されているため、医薬品の影響もそれぞれの生物種によって生理活性作用が異なることが想定される。

そこで、本研究では、表 2-2 で示した生物に対する毒性が強い抗生物質 3 種に加えて、水環境中においてその存在が確認されてきている 6 種類の医薬品を対象に、細菌や甲殻類など 5 種の生物を用いたバイオアッセイ手法を適用し、これらの医薬品が生物に及ぼす影響についての知見を得ることを目的とした。

４．２　方法

4.2.1. 供試生物

(1) 細菌

供試生物として海洋性発光細菌(*Vibrio Fischeri*)を使用する英 SDI 社製の試験システム(MICROTOX®)を用いた。試験は添付の急性毒性試験のプロトコールに従い、曝露時間を 5 分及び 15 分として、50%発光阻害濃度(EC50)を求めた。

(2) 藻類

供試生物として緑藻類の *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35)を用いた。試験は 96 ウェルマイクロプレートを使用して曝露し、マイクロプレートリーダーによる吸光度測定から細胞数を換算する方法で行った。96 時間曝露した後に藻類の増殖量から生長阻害率を計算し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

(3) ワムシ類

供試生物としてツボワムシ(*Brachionus calyciflorus*)を使用するベルギーの MicroBioTests 社の慢性毒性試験システム(ROTOXKIT F CHRONIC)を用いた。試験は生物を 48 時間曝露した後の生物数から増殖阻害率を計算し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

(4) 甲殻類

供試生物としてオオミジンコ(*Daphnia magna*)を使用するベルギーの MicroBioTests 社の急性毒性試験システム (DAPHTOXKIT F MAGNA™)を用いた。試験は生物を 24 及び 48 時間曝露した後に遊泳阻害を観察し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

(5) 両生類

供試生物としてアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を用いた。試験は ASTM に記載されている FETAX (the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)の方法を一部改変して 24 ウェルマイクロプレートで曝露する方法で行った。胞胚期になった胚を 24℃で 96 時間曝露し、死亡及び奇形について観察した。本試験において奇形の発生は確認できなかったため、死亡率をエンドポイントとし、試料濃度と死亡率のグラフから半数致死濃度(LC50)を求めた。

4.2.2. 対象医薬品

試験に用いた医薬品は、毒性の強い物質や下水処理水等の環境中で検出された物を中心に選定し、表 4-1

に示す9物質とした。

試薬はDMSOを溶媒として使用し、各試験における基本的な曝露濃度は、最大濃度を10mg/Lとして希釈段階は2倍ずつ5段階で、10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/Lに設定した。ただし、藻類については最大濃度をレボフロキサシンは10mg/L、アジスロマイシンは0.625mg/L、クラリスロマイシンは0.1mg/L、トリクロサンは0.13mg/L、他の物質は8.3mg/Lとし、ミジンコにおける抗生物質については最大濃度を50mg/Lとした。また、影響の大きい物質については、基本的な5段階の希釈より低濃度の範囲まで試験を行った。なお、いずれも溶媒のDMSO濃度は最大でも0.1%となるように調製した。

表 4-1　供試対象医薬品

医薬品名	用途
アスピリン	解熱鎮痛剤
フェノプロフェン	解熱鎮痛剤
チモール	殺菌剤
トリクロサン	殺菌剤
ジエチルトルアミド	昆虫忌避薬
クロタミトン	鎮痒剤
レボフロキサシン(LVFX)	抗生物質
クラリスロマイシン(CAM)	抗生物質
アジスロマイシン(AZM)	抗生物質

4．3　結果

(1)　細菌

MICROTOXによる試験による計算結果は、表4-2のようになった。

表 4-2　医薬品によるMICROTOXでの影響

医薬品名	EC50	
	5min	15min
ｱｽﾋﾟﾘﾝ	N.E.	N.E.
ﾌｪﾉﾌﾟﾛﾌｪﾝ	10.7*	9.3
ﾁﾓｰﾙ	2.3	3.0
ﾄﾘｸﾛｻﾝ	0.6	0.6
ｼﾞｴﾁﾙﾄﾙｱﾐﾄﾞ	15.6*	19.6*
ｸﾛﾀﾐﾄﾝ	57.6*	N.E.
ﾚﾎﾞﾌﾛｷｻｼﾝ	N.E.	N.E.
ｸﾗﾘｽﾛﾏｲｼﾝ	N.E.	N.E.
ｱｼﾞｽﾛﾏｲｼﾝ	N.E.	N.E.

(mg/L)

・測定器付属ソフトにより計算
・N.E.は設定濃度範囲で明確な阻害無し

表のように、殺菌剤によって強い阻害がみられた。また、抗生物質は細菌の発光に対して阻害効果を示さなかった。

(2)　藻類

藻類の生長に対する医薬品等の影響について、濃度と阻害率の関係を図4-1に示した。

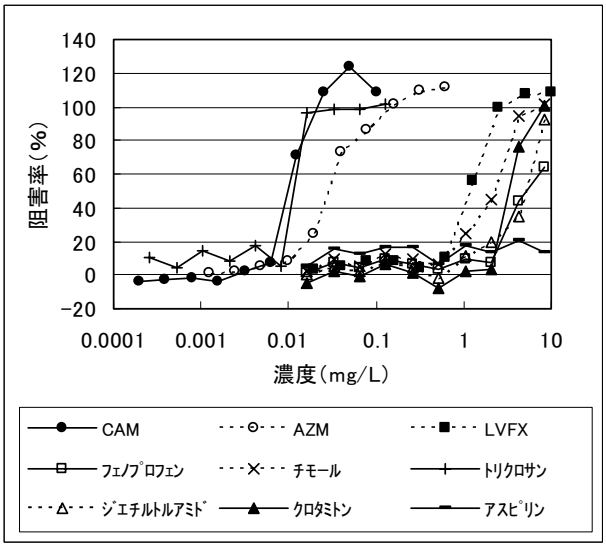


図 4-1　医薬品等の藻類生長に対する影響

アスピリンは明確な阻害影響はみられなかった。また、クラリスロマイシンとアジスロマイシン、トリクロサンでは同程度の藻類生長阻害影響がみられ、他の医薬品と比べて生長阻害作用が顕著であった。

なお、生長（増殖）阻害試験における阻害率の計算は、阻害物質を添加しない対照系との比較により行うため、阻害率が100%を超える場合や0%を下回る場合が計算上生じうる。

(3)　ワムシ

ワムシの増殖に対する医薬品等の影響について、濃度と増殖阻害率の関係を図4-2に示した。

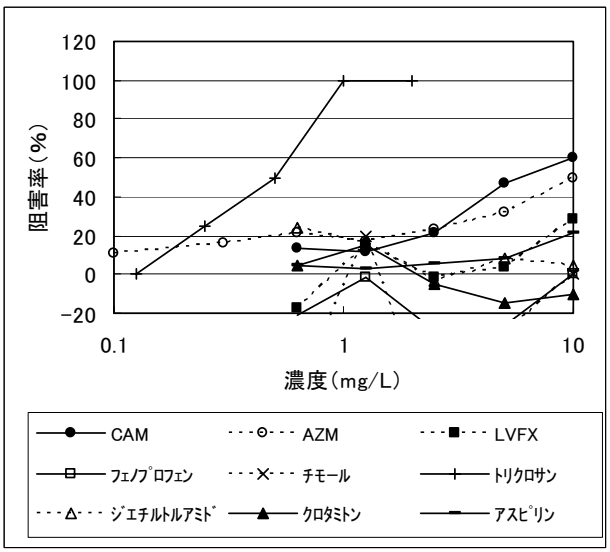


図 4-2　医薬品等のワムシ増殖に対する影響

フェノプロフェン、チモール、ジエチルトルアミド、クロタミトンについては、明確な影響や濃度依存的な反応がみられず、EC50を計算することができなかった。

一方、抗生物質には全て阻害がみられ、またトリクロサンは他の医薬品等と比べて強い阻害作用を示した。

(4) ミジンコ

ミジンコの増殖に対する医薬品等の影響について濃度と遊泳阻害率との関係を図 4-3 に示した。

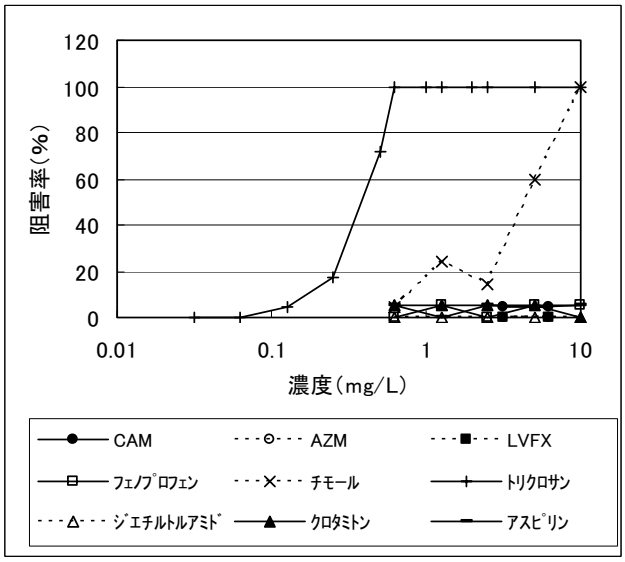


図 4-3 医薬品等のミジンコ遊泳(48 時間)に対する影響

殺菌剤以外の医薬品等については明確な影響がみられなかった。殺菌剤のチモールとトリクロサンではトリクロサンの方が強い阻害影響を示したが、曝露時間の違いによる変化はみられなかった。

(5) カエル胚

カエルの胚発生に対する医薬品の影響について、曝露濃度と死亡率の関係を図 4-4 に示した。

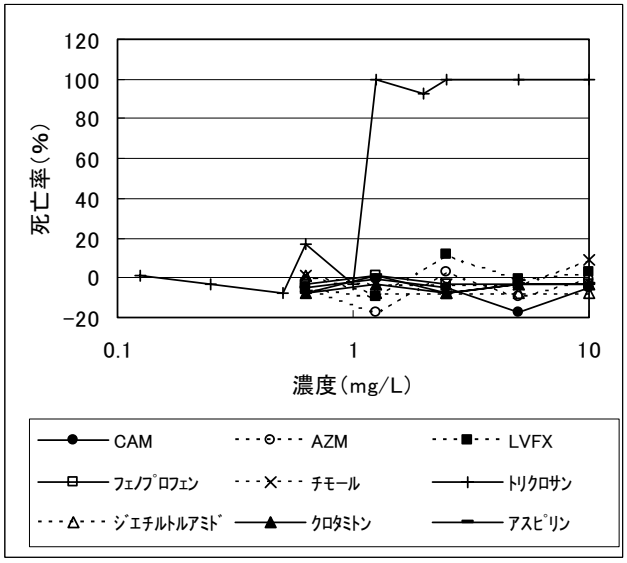


図 4-4 医薬品等のカエル胚発生に対する影響

トリクロサン以外の医薬品については、明確な影響や濃度依存的な反応が確認されなかった。また、影響のみられたトリクロサンについても、他の生物種と比べると、その影響は小さいものであった。なお、今回の試験においては、胚発生の異常としては死亡のみが確認され、奇形の発生等は観察されなかった。

4．3 まとめ

各医薬品に対するバイオアッセイの結果を EC50（カエル胚について LC50）としてまとめると、表 4-5 のようになる。

表 4-5 医薬品等の生物影響まとめ（EC50, LC50）

医薬品名	細菌 発光阻害		藻類 生長阻害	ワムシ 増殖阻害	ミジンコ 遊泳阻害		カエル 胚死亡
	EC50		EC50	EC50	EC50		LC50
	5min	15min	96hour	48hour	24hour	48hour	96hour
アスピリン	N.E.	N.E.	N.E	42.6*	N.E.	N.E.	N.E.
フェノプロフェン	10.7*	9.3	5.5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
チモール	2.3	3.0	1.9	N.E.	5.1	4.4	N.E.
トリクロサン	0.6	0.6	0.012	0.4	0.4	0.4	1.02
ジエチルトルアミド	15.6*	19.6*	4.2	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
クロタミトン	57.6*	N.E.	3.6	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
レボフロキサシン	N.E.	N.E.	1.435	18.2*	N.E.	N.E.	N.E.
クラリスロマイシン	N.E.	N.E.	0.011	6.5	N.E.	N.E.	N.E.
アジスロマイシン	N.E.	N.E.	0.034	10.9*	N.E.	N.E.	N.E.

[N.E.]:設定濃度範囲で影響なし (mg/L)
[*]:設定濃度を超える外挿値

殺菌剤のトリクロサンについては、全ての生物種で毒性影響がみられた。また、同じく殺菌剤のチモールについても多くの生物種で影響が観察された。

しかし、抗生物質を除く他の医薬品については細菌や藻類では阻害がみられるものもあったが、他の生物による急性毒性はほとんど確認できなかった

抗生物質については、藻類やワムシにおいて阻害が確認されたが、他の生物試験では影響がみられなかったことから、急性阻害としては明確な影響がみられないが、生物の増殖に関して影響を及ぼすものと考えられた。

以上のように、対象とする医薬品等と試験に用いる生物種の組み合わせによって、物質と生物ごとに影響の違いがみられた。

また、阻害のみられた濃度は、概ねmg/L 単位の比較的高濃度のレベルであり、実際の環境中の濃度においては、影響が小さいとも考えられるが、藻類では一部にμg/L の濃度で影響が確認される医薬品もあり、環境中における希釈率等によっては、生態系への影響が生じる可能性も想定される。

4．4 今後の課題

課題としては、以下のような点があげられる。

(1) 生物種と試験方法について

・ 対象とする医薬品と生物種によって観察される毒性影響が異なることから、各薬剤の特性に合わ

せて試験生物種や試験方法（急性毒性・慢性毒性など）を選択する必要がある。

- 今回試験に用いた医薬品等のうち、チモールは若干の揮発性を有し、またアスピリンはサリチル酸へ分解する可能性があるなど、各医薬品の物性にも特徴がある。従って、これらの物性を考慮して試験時の曝露濃度が維持されているかどうかを化学分析等により確認する必要がある。
- 環境中には複数の医薬品が同時に混在することから、各医薬品の単体投与ではなく、複数の医薬品や界面活性剤等の他の化学物質の同時投与時にどのような濃度で影響が生じるかも重要な視点となる。

今後もさらに検討を進め効率的な試験やリスク評価につなげるデータとすることを目指す。

参考文献

1) Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. and Kratz, K. L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of Total Environment*, **225**, 109-118.

2) 高田秀重，谷島利勝（2003）医薬品による環境汚染，医学のあゆみ，**205**，159-160.

3) 田中宏明，岡安祐司，中田典秀，八十島誠（2004）新たに登場してきた下水道の微量汚染物質問題，下水道協会誌，**41**（499），27-30.

4) 岩根泰蔵，浦瀬太郎，山本和夫（1998）下水中および河川水中の大腸菌における抗生物質耐性の分布，第 35 回環境工学研究フォーラム講演集，144-146.

5) 日本下水道協会（2002）下水試験法（追補暫定版）－内分泌攪乱化学物質編およびクリプトスポリジウム編－，pp.307-310，日本下水道協会，東京.

6) Göbel, A., McArdell, C. S., Alder, C. A. and Giger, W. (2003) Occurrence and fate of macrolide and sulfonamide antibiotics in wastewater treatment, *Proceedings of The 4th IWA specialized conference on assessment and control of hazardous substances in water -ECOHAZARD 2003*, 20/1.

7) Mcardell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., and Giger, W. （2003） Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environmental Science and Technology*, **37**, 5479-5486.

8) 医療薬学研究会（2003）2004 年版薬剤師のための常用医薬品情報集,1253pp，廣川書店，東京.

9) 日本下水道協会（2003）下水道統計−行政編−平成 13 年度版，pp.750-1117，日本下水道協会，東京.

10) 谷島利勝，高田秀重（2003）医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動，第 37 回日本水環境学会年会講演集，343.

11) 香川千絵，浦瀬太郎，菊田友弥（2004）活性汚泥中での医薬品の除去に影響を及ぼす因子，第 38 回日本水環境学会年会講演集，361.

遺伝子解析手法を用いた環境ストレスの検出技術に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究機関：平14～平18
担当チーム：水質チーム
研究担当者：鈴木　穣、北村友一、澤井　淳

【要旨】

遺伝子反応は、生体における遺伝子発現、免疫反応に代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルにおいて環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待されている。

本研究では、バイオアッセイに利用されることが多いヒメダカを試験魚とし、ヒメダカの遺伝子発現抑制に関する基礎的情報を得るため、ヒメダカを急性毒性（シアン暴露）、水温変化および下水処理水のストレスに暴露したときの発現または抑制する遺伝子情報の取得を行った。

その結果、雄雌メダカ混合条件でのシアン暴露による急性毒性試験では、ビテロゲニンⅠ遺伝子の低下が観察された。水温16,20,24,28℃で飼育したメダカの遺伝子発現解析を行った結果、飼育水温の違いにより多くの遺伝子が変動することがわかった。24℃を基準にした場合、低水温時(16,20℃)は、代謝系および免疫系の遺伝子が抑制され、細胞骨格系のチューブリンα遺伝子と発達系のPax-3遺伝子の発現が促進された。高水温時(28℃)は、代謝系と免疫系の遺伝子の発現が促進された。下水処理水に雄メダカを曝露した実験では、雄メダカ肝臓中で卵形性に関わる遺伝子（ビテロゲニンⅠ,Ⅱ、コリオゲニンH，Hマイナー，L）の発現が高くなることがわかった。

キーワード:遺伝子発現、マイクロアレイ、ヒメダカ、環境ストレス、急性毒性、水温、下水処理水

1.　はじめに

人間生活の質的向上にともなって、新規の化学物質が用いられることが多くなってきた。とくに、日常生活で消費される医薬品や合成洗剤などは下水道に集中するため、下水処理場の放流先では、水生生物への新たな環境ストレスを生み出している可能性があり、さらには水利用によるヒトへの影響についても危惧される。

水生生物におけるさまざまな環境ストレスを評価する手法として、生物の応答によってその程度を検出するバイオアッセイが行われている。しかしながら、従来のバイオアッセイでは、生体における微妙な変化を検出することは困難であり、慢性毒性や急性毒性などさまざまな環境ストレスに共通して対応できる手法は開発されていない。一方、ヒトを対象とする医学分野では、遺伝病の疾病因子つまり遺伝子を明らかにする研究が進んでおり、近年では、疾病遺伝子の発現状況をもとにした遺伝子診断が行われている。そして最近になって、この遺伝子解析手法を環境分野に適用して、生物個体への環境ストレスを検出する新たなバイオアッセイとして確立しようと研究が進められている[1)2)]。

遺伝子反応は、生体における遺伝子発現、免疫反応に代表される生体防御や、生体の恒常性の維持など、外部環境の変化に対し速やかに起こるものと考えられる。遺伝子レベルにおいて環境ストレスを検出し、その影響の程度を評価する手法を確立することは、今後の新たなバイオアッセイとして期待される。とくに、慢性毒性および急性毒性のそれぞれに、あるいは両者に共通して対応する遺伝子を使用することができれば、1つのサンプルからさまざまな環境ストレスを検出することの可能な手法になると期待できる。

そこで本研究は、医学分野における遺伝子レベルでの研究手法をもとに、これを環境ストレスの評価に応用するための基礎的検討に着手し、新たなバイオアッセイの一手法を開発することとした。

2.　実験生物の選定

生物の遺伝子情報の解析は、実験動物として一般的な生物種から着手されており、水生生物では魚類のメダカやゼブラフィッシュ、さらには水産有用魚種で顕著に進んでいる。

本研究では、内分泌撹乱作用や毒性試験などさまざまな調査・研究に用いられているメダカを対象とした。メ

ダカは、河川での化学物質による魚類影響を明らかにするため一般的に用いられている魚種であり、実験動物としての研究事例が多く、他の生物に比べメダカ自体についての生物学的知見も多い。

3. 環境ストレスの選定

環境ストレスがメダカのどのような遺伝子を発現させ、または、抑制させるかについて、基礎的なデータを得るために本研究では以下のストレスを選定した。

(1) 急性毒性（シアン）

急性毒性ストレスとしては、シアン化合物（KCN）を選定した。シアン化合物は毒性作用が強いため、遺伝子変動が顕著に表れると考えられ、急性毒性の遺伝子発現・抑制の基礎データとなると考えられた。

(2) 水温

水生生物のメダカの活性は、水温と関係すると考えられる。水温とメダカの遺伝子発現・抑制の関係は、暴露実験の際の基礎データとなり、この関係を把握しておくことは重要である。

(3) 下水処理水

下水道の普及により河川水に占める下水処理水の割合が年々増加しており、下水処理水が水生生物に与える影響が懸念されている。そこで下水処理水がメダカにどのようなストレスを与えるかを遺伝子レベルで調査した。

4. 実験方法と実験結果

4.1 急性毒性（シアン）によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.1.1 メダカ曝露試験方法

シアンに対するメダカの遺伝子発現の変動を検出するため、曝露方法は半数致死濃度での 96 時間急性毒性試験法を採用した。シアン化合物（KCN）の濃度は、コイの半数致死濃度である 0.5mg/L と設定した。

生体サンプルは、96 時間の曝露の結果生存した個体の肝臓およびエラとした。肝臓およびエラは、それぞれ代謝および呼吸に関与する組織であり、シアンによって遺伝子変動が生じやすい組織であると同時に、平常時においても細胞分裂の活発な組織である。

96 時間曝露後、生存した個体は、体サイズを測定した後に肝臓およびエラを取り出して、これらを速やかに液体窒素で凍結した。また、曝露途中で死亡した個体についても、死亡を確認した時点で同様の解剖を行った。メダカ曝露試験の試験条件を表-1 に示す。また、シアン曝露群および対照群のメダカについて、解剖時の体サイズを表-2 に示す。

表-1　メダカによるシアン曝露試験の試験条件

試験方法	内容
影響物質	KCN
設定濃度	0.5 mg/L
試験魚	ヒメダカ（d-rR 系統）
曝露方式	半止水式（24 時間毎全量交換）
試験水槽	2L ガラス製円形水槽
個体数	48 個体（雌雄各 24 個体）
試験密度	4 個体/L((♂4＋♀4)/水槽×6 水槽)
日長条件	16 時間明−8 時間暗
水温	26℃

表-２　曝露試験に用いたメダカの体サイズ

分類	個体数	全長(mm)	体重(mg)
KCN 生存オス	14	27.9±1.3	170.9±25.6
KCN 生存メス	15	28.1±2.2	179.7±52.0
Control オス	10	29.8±1.0	228.6±21.9
Control メス	10	28.4±1.5	195.8±30.3

4.1.2 遺伝子の抽出方法

シアン曝露生存メダカおよび対照(control)メダカから得られた肝臓とエラ組織のサンプルについて、雌雄および臓器ごとに分けて RNA の抽出および精製を行った。なお、RNA の純度については、抽出・精製の各段階における OD(吸光度:optic density)測定を行った。さらに、Agilent 2100 Bioanalyzer によって電気泳動パターンを確認し RNA の分解が進んでいないかの確認も行った。

(1) RNA 抽出法方法

各組織サンプルは、TRizol（Invitrogen 社）3～6ml を加えてホモジナイズした後、同製品のプロトコールに従い RNA を抽出し、最終的に 50μl の DEPC 処理水に溶解した。抽出した total RNA の一部を用いて、OD260 および OD280 を測定して RNA 濃度を算出した。

肝臓由来の total-RNA は、シアン曝露および対照ともに十分な収量があり、濃度を表す OD260／280 値は期待値 1.7 を上回っていた。しかし、エラ由来の抽出 RNA は、十分な収量が確保できないことが判明した。

(2) mRNA の精製方法

そこで、遺伝子発現・抑制解析の部位は肝臓のみとし、肝臓由来の mRNA の精製には、Oligotex-dT30<Super> mRNA purification kit（Takara）を用いて、製品プロトコールに従って行い、エタノール沈殿・乾燥後、DEPC 処理水 5～10μl に溶解した。得られた mRNA の一部を用いて OD 測定して mRNA 濃度を算出した。各試料とも 3～5μg

の mRNA を得ることができた。次に、雌雄の肝臓由来 mRNA を等量混合して、表-3 に示す 2 つのサンプルを得た。

表-3　遺伝子発現・抑制解析用サンプル

名 称	精製 mRNA
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	生存オス-肝臓(14 匹)　1.5μg 生存メス-肝臓(15 匹)　1.5μg
メダカ肝臓コントロール Mix	Control オス-肝臓(10 匹) 1.5μg Control メス-肝臓(10 匹) 1.5μg

4.1.3　DNA マイクロビーズによる遺伝子発現・抑制解析の方法

遺伝子の発現・抑制解析には、DNA マイクロビーズ法を使用した。これは、発現しているほぼすべての遺伝子を網羅的にそれぞれひとつひとつのマイクロビーズ（直径 5 μm）の表面に固定化し、このビーズを利用して 2 種間の遺伝子発現解析を行う技術である。

(1)DNA マイクロビーズの作成

1 個のマイクロビーズには、あらかじめ 1 種類の Anti-tag 配列が固定化されている。Anti-tag 配列は 4 塩基からなるワード 8 種類を 8 個並べたものであり（表-4 参照）、その組合せ数は 8^8 つまり約 1,700 万種類が準備されている。この Anti-tag 配列に相補的な Tag 配列の mRNA 由来の cDNA（complementary DNA ; mRNA を鋳型として逆転写酵素によって合成される相補的一本鎖 DNA）付加させておくと、Tag と Anti-tag の特異的な結合によって 1 個のマイクロビーズに 1 コピー由来の cDNA が捕獲されたビーズライブラリーを調製することができる。

この DNA マイクロビーズの作成方法の概略は以下のとおりである。

はじめに、解析用サンプルとして調製したメダカ肝臓シアン曝露 Mix とコントロール Mix の mRNA 各 2μg を用いて、それぞれの cDNA を合成し、マイクロビーズ作製用ベクター（Tag 配列のいずれか 1 個を持つプラスミド約 1,700 万種類）にライゲーションする。このベクターを大腸菌に遺伝子導入、培養後、プラスミドを精製する。プラスミドからマイクロビーズとハイブリダイゼーション可能な cDNA 部位を PCR により増幅し、プライマ配列の除去および一本鎖化する。これを、Anti-tag　ビーズと混合し、ハイブリダイゼーションさせ、個々のビーズに対して個々の cDNA を結合させる。

表-5 に、最終的に調整された各サンプルの遺伝子数（マイクロビーズ数）を示す。

表-4　Anti-tag 配列の 8 つのワード

ワード 1 CATT	ワード 2 CTAA	ワード 3 TCAT	ワード 4 ACTA
ワード 5 TACA	ワード 6 ATCT	ワード 7 TTTC	ワード 8 AAAC

表-5　DNA マイクロビーズ数

メダカ肝臓 コントロール Mix	メダカ肝臓 シアン曝露 Mix
約 135 万個	約 123 万個

(2)発現・抑制遺伝子の解析方法

シアン曝露によって変動したメダカ遺伝子の抽出・選択には、セルソーティング技術を用いた。これは、メダカ肝臓シアン暴露 Mix とコントロール Mix の 2 種類の遺伝子を異なる蛍光物質で標識し、4.1.3(1)で作成した DNA マイクロビーズ上で競合ハイブリダイゼーションさせ、セルソーターで解析し、蛍光強度差から既知・未知にかかわらず発現差のある遺伝子を網羅的に分取するものである。さらに、分取したビーズに捕獲されている遺伝子をシーケンシングすることにより、その配列情報を得ることができる。表-6 に、表-3 の各解析用サンプルを標識した蛍光標識色素を示す。

表-6　解析用サンプルと標識蛍光色素

サンプル	蛍光標識色素	
	Fluorescein	Cy5
メダカ肝臓シアン曝露 Mix	×	○
メダカ肝臓コントロール Mix	○	×
シアン曝露 Mix とコントロール Mix の cDNA 等量混合物	○	○

4.1.4　実験結果

図-1 にシアン曝露によるメダカ遺伝子に関する発現変動検出結果を示す。同レベルの発現量を示す遺伝子は y = x の直線上にプロットされ、この直線の下側のプロットは、コントロール Mix で発現しているもののシアン曝露によってその発現が抑制された遺伝子である。図より、シアン曝露およびコントロールで得られたメダカ遺伝子は、ほとんどが同レベルの発現量であると認められるが、発現量が抑制された遺伝子も明瞭に区分できることがわかる。図より明確には分からないがシアン曝露によって発現を促進された遺伝子も認められる。

発現・抑制遺伝子の塩基配列の情報を得るため、発現遺伝子U1と抑制遺伝子D1をゲート設定した(図-1参照)。そして、U1とD1ゲートのビーズのソーティングを行った。表-7は、U1、D1ゲート内ビーズ数である。

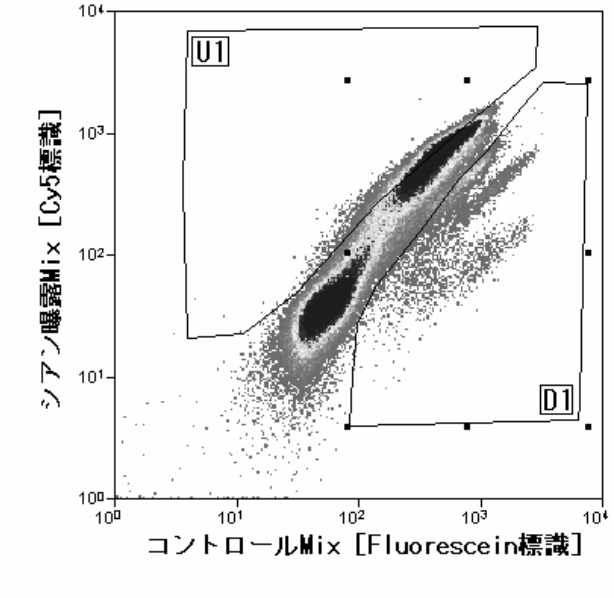


図 1　シアン曝露メダカの遺伝子の発現変動

表-7 検出遺伝子数(マイクロビーズ数)とその割合

解析数	U1	D1
149,000	9,762	6767
	6.55%	4.54%

ソーティングされたマイクロビーズからcDNA断片を回収し、PCR、クローニング後、塩基配列を決定し、Phred値15以上で塩基配列300以上のもの（解析クローン数：352クローン）をクラスタリングし、ホモロジー検索を行った。その結果、352クローンが47のクラスターと55クローンのsingletにわけられた。U1、D1ゲート内で、多く現れた遺伝子の上位10遺伝子（ホモロジー検索で相同性が高い遺伝子情報で表示ただし、相同性が低いものも存在する。）を表-8,9に示す。D1において最も発現変動の大きい遺伝子は、ビテロゲニンIやコリオゲニン遺伝子であったが、これらは、卵形成に関わる遺伝子である。このことから、卵形成に関わる遺伝子が、急性毒性ストレスを受けた場合、発現が抑制される可能性があった。

以上、メダカのシアン暴露実験から、急性毒性の際に変動する遺伝子を網羅的に把握したが、これらの遺伝子が、環境ストレスの指標となるかどうかについて、毒性の異なる化学物質の暴露試験からも検討し、データの蓄積を図っていく必要がある。

表-8　U1 ゲート内の代表的遺伝子

	データベース名|VERSION| DEFINITION
U1	gb| AC121982.3| Mus musculus chromosome 6 clone RP24-
	gb|AC006458.2| Homo sapiens BAC clone GS1-228E12 fro
	gb|AF402815.1| Ictalurus punctatus 40S ribosomal protein
	emb|BX005400.8| Zebrafish DNA sequence from clone CH2
	dbj|AU301100.1| Cyprinus carpio: cDNA clone: 3-074, expre
	gb|AF401581.1| Ictalurus punctatus ribosomal protein L27
	gb|AF401558.1| Ictalurus punctatus ribosomal protein L6
	gb|AF402827.1| Ictalurus punctatus 40S ribosomal protein
	gb|AC012443.8| Homo sapiens BAC clone RP11-17G11 fro
	dbj|D13669.1|ORZHSC70 Oryzias latipes mRNA for heat s

表-9　D1 ゲート内の代表的遺伝子

	データベース名|VERSION| DEFINITION
D1	dbj|AB064320.1| Oryzias latipes Ol-vit1 mRNA for vitelloge
	dbj|D89609.1| Oryzias latipes mRNA for choriogenin H, com
	dbj|AB084753.1| Oryzias latipes mitochondrial cytb gene for
	dbj|AP004421.1| Oryzias latipes mitochondrial DNA, compl
	gb|AC125488.3| Mus musculus chromosome 12 clone RP23
	dbj|AB041929.1| Engraulis japonicus mRNA for trypsinog
	dbj|AB075198.2| Oryzias latipes wap65 mRNA for warm-te
	emb|AJ012191.1|OLA012191 Oryzias latipes mRNA for AT
	gb|AC004383.1|AC004383 Human Chromosome X clone b
	dbj|AP004421.1| Oryzias latipes mitochondrial DNA, compl

4.2　水温変化によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.2.1　実験材料と実験方法

(1)メダカマイクロアレイ

水温変化によるメダカ遺伝子の発現・抑制の測定は、EG750(Ecogenomics社製)メダカマイクロアレイを使用した。このマイクロアレイには約750種類のメダカの遺伝子断片（約300～350塩基のDNA）が配置されている。

(2)雄メダカの水温影響試験

水温24℃で飼育している5ヶ月齢の雄ヒメダカを、流水式の各試験水槽に収容し、飼育水温を1日に0.5～1.0℃ずつ、水槽内に設置した投げ込み式クーラー/ヒーターを用いて、低下または上昇させ、9日目までに飼育水温を16、20、24、28℃とした。なお、水温は下水処理水の水温を想定し16℃～28℃とした。その後、11日目まで設定水温で飼育し、各水槽9個体ずつ雄ヒメダカを取り上げ、マイクロアレイによる遺伝子発現解析に用いた。水温は磁気記録式温度計Thermo Recorder TR-81(T AND D社製)を水

表-10　メダカ水温影響試験の条件

暴露方式	流水式
換 水 率	約5換水／日以上
試 験 区	16℃、20℃、24℃、28℃
暴露期間	11日（うち9日間は馴化期間）
暴露雄メダカ数	各水槽9匹（5カ月齢）
照　　明	16時間明／８時間暗
給　　餌	アルテミア孵化幼生を1回/日
RNA抽出部位	肝臓
遺伝子解析検体数	9サンプル

槽内に設置し測定、記録した。試験条件を表-10に記す。

(3)RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出部位は肝臓とし、肝臓からのRNAの抽出は、RNeasy mini Kit(Qiagen社製)を使用した。抽出したRNAは、Amino Allyl MessageAmp II Kit(Ambion社製)を用い、RNAを増幅した後Cy5で標識した。Cy5で標識したRNAは、メダカマイクロアレイEG750に展開し、60℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、マイクロアレイと結合しなかったRNAを洗い流した後、Affymetrix 428 Array Scanner(Affymetrix社製)で各遺伝子が配置されている各スポットの蛍光強度を読みとった。

(4)マイクロアレイデータ解析方法

スキャナーで読み取った蛍光強度の画像データを、画像データ数値化ソフトImaGene ver.6(BioDiscovery社製)を用いて数値データ化した。得られた数値データは、遺伝子データ解析ソフトGeneSight ver.4(BioDiscovery社製)を用いて、正規化やQuality Controlといったデータの整理を行い、統計解析を行った。各水温間の比較には、一元配置分散分析(ANOVA Test)を行い有意水準5%($p<0.05$)で有意な差が見られた遺伝子のみを用いた。

4.2.2　実験結果

(1)水温

試験期間中の水温変化を図-2に示す。急激な水温変化は見られず、水温低下、上昇中に魚体にかかる大きなストレスは最小限に抑えられたと考えられる。

(2)遺伝子解析結果

試験前の飼育水温である 24℃の個体と、各水温で飼育した個体の遺伝子発現比を比較し、各水温間で有意差が見られた遺伝子は 439 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち発現比が 2 倍以上、増加または減少した遺伝子をリストアップした。各水温との比較結果を表-11 に記す。なお、蛍光強度が低い(遺伝子の発現レベルが低い)遺伝子はノイズと区別がつきにくく、測定値の信頼性が低いことから、比較する両データともに蛍光強度比が $\log_2(-5)$以下の遺伝子は比較に用いなかった。また、特に発現比の

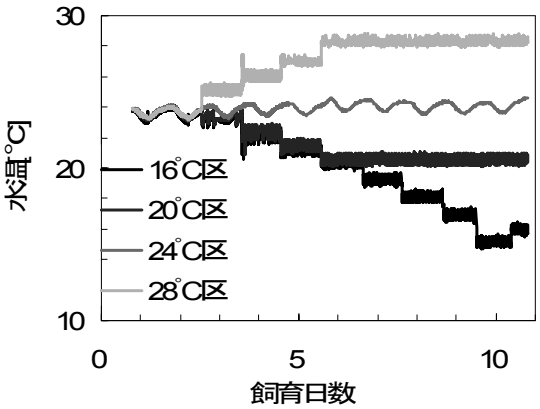


図-2 水温経日変化

変化が大きかった遺伝子として、3 倍以上、増加または減少した遺伝子を表-12 に示す。アノテーション(遺伝子配列情報に付けられた生物学的な機能等の情報)の付いた遺伝子に注目すると、水温低下により、代謝系(metabolism)に関わる遺伝子と、免疫系(immune)に関わる遺伝子の発現が強く抑制され、細胞骨格(cytoskeleton)に関わる遺伝子と、発達(developmental)に関わる遺伝子の発現が強く促進されることがわかった。また、水温上昇により代謝系と免疫系の遺伝子の発現は促進されることがわかった。

4.2.3　考察

(1)水温変化による免疫系遺伝子の発現変化

炎症反応の惹起、病原体の溶解など生体防御に重要な役割を果たす補体の 1 つである C4 遺伝子(Orla C4)と B 因子様遺伝子(Bf/C2)[3]は、水温低下により大きく発現抑制された。また、ヘルパーT 細胞中で免疫促進に働き、エストロゲン受容体の機能の調整にも関わるエストロゲン受容体結合シクロフィリン遺伝子 (estrogen receptor-binding cyclophilin)[4]と類似の遺伝子は、水温上昇により大きく発現促進された。

水温変化によりニジマスの免疫能に変化が生じることは知られており、冬季の低水温時に血漿中抗体量が減少することが報告されている。ただ抗体量と水温の関係を否定する報告もあるため、免疫能の季節変動に対する水温の影響は明らかとはなっていない[5]。また、季節により変動するステロイドホルモン量と免疫能の変化についてもニジマス、キンギョ、コイで調べられ、魚種により応答性に違いがあったと報告されている[5]もののメダカについては明らかとなっていない。

しかし、自然条件で行った上記の実験とは異なり、本研究では、水温、光照射周期、給餌量、水質を制御し、さらに雄魚のみを使用し雌魚による影響を排除したことから、水温低下と免疫系遺伝子の発現抑制の関連性はあると考えられる。

表-11 発現比が2倍以上 減少または増加した遺伝子

機能	遺伝子名	16℃	20℃	28℃
immune	Orla C4	0.25	0.20	2.36
	cDNA clone OLc02.11d similar to pir|A46579| estrogen receptor-binding	1.25	0.46	3.43
	Bf/C2	0.61	0.47	1.43
metabolism	cytochrome P450 1A	0.45	0.43	0.46
	cDNA clone NGY15.03e similar to pir|JC4157| cytochrome P450 2D, endoplasmic reticulum - dog	0.32	0.36	0.74
	cDNA clone D2C37 similar to Fundulus heterclitus cytochrome P450 2N1	0.41	0.38	1.86
	cytochrom P450 3A40	0.39	0.36	2.15
	cDNA clone DA11 similar to Haplochromis xenognathus glucose 6 phosphatase	0.54	0.37	0.76
	cDNA clone OLc03.12g similar to pir|JQ1144| H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) chain b precursor,	0.32	0.35	2.37
	cDNA clone OLc57.10d similar to pir|S22348|H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) delta chain precursor - human	1.50	1.24	2.95
	cDNA clone DB11 similar to Mouse hepatic lipase, gi:6680264	0.34	0.49	1.08
	cDNA clone OLb23.07a similar to lanosterol synthase (EC 5.4.99.7) (human)	1.24	0.51	3.32
	transferrin	0.52	0.48	1.29
	cDNA clone OLc13.06d similar to pir|A00022| CCBN cytochrome C - skipjack	2.20	0.57	1.56
reproduction	GnRH-R2 gene for gonadotropin-releasing hormone receptor 2	0.44	0.38	1.10
	OlGPCPR-alpha G protein coupled	1.11	0.47	2.88
	germ cell-less protein (gcl)	1.36	0.56	2.25
nuc./prot. binding	partial cold-shock domain protein (mfYP2)	0.40	0.45	1.99
	SMC1 alpha	1.16	0.43	2.85
	cDNA clone OLb25.03b similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	0.53	0.45	1.29
	cDNA clone OLb22.05g similar to translation elongation factor EF-1 gamma (African clawed frog)	0.61	0.39	0.55
	cellular nucleic acid binding protein	0.75	0.56	2.53
signal transduction	annexin max2	0.65	0.50	2.13
	annexin max4	0.97	0.65	2.38
	OlGC2 membrane guanylyl cyclase	1.16	0.42	2.16
	Gi2 alpha subunit	0.81	0.58	2.30
	cDNA clone OLb31.08d similar to adenylate kinase (EC 2.7.4.3) 2,	1.92	0.95	2.60
	cDNA clone OLd32.06d similar to pir|I49365|protein tyrosine phosphatase -	0.99	0.41	1.72
cell cycle	cyclin B2	0.93	0.45	2.11
	p53	0.67	0.57	2.33
cytoskelton	cDNA clone OLd14.08f similar to pir|A56635|tubulin alpha chain, brain-specific isotype (clone pTUB5) - chum	3.90	1.05	1.48
developmental	partial dachshund protein (dach)	0.78	0.44	2.98
	Tra2b transformer-2b	1.50	0.78	2.68
	Pax-3	4.30	0.72	1.31
	cDNA clone MF01FSA050G01 5' (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1?, Mus musculus)	0.46	0.41	1.60
	cDNA clone OLe05.09f similar to pir|A00921| KQHUP plasma kallikrein (EC 3.4.21.34) precursor - human	0.51	0.49	0.69
	Gb adult alpha-type globin	0.81	0.36	1.06
	cDNA clone 1061 sequence	1.36	0.66	3.32
	cDNA clone MF015DA011k03 5'	0.74	0.63	0.49
	cDNA clone MF01FFA006k13 5'	2.28	0.55	1.38
	cDNA clone MF01FSA008O22 5'	0.29	0.42	0.44
	cDNA clone MF01FSA029M08 3'	2.70	1.67	1.49
	cDNA clone MF01FSA029M08 5'	2.37	0.67	1.25
	cDNA clone MF01FSA032B13 5'	0.18	0.34	0.91
	cDNA clone MF01FSA032G07 5'	0.93	0.48	1.55
	cDNA clone MF01SSA038B03 5'	1.05	0.34	1.09
	cDNA clone MF01SSA063B10 5'	1.39	0.39	1.18
	cDNA clone MF01SSA123H06 3'	1.65	0.84	2.15
	cDNA clone MF01SSA133F04 5'	0.72	0.36	0.69
	cDNA clone MF01SSA159F10 5'	0.73	0.27	0.72
	cDNA clone MF01SSB002K19 5'	1.43	0.41	1.93

注） 黒色:2倍以上発現促進、 灰色:2倍以上発現抑制

表-12 発現比が3倍以上 減少または増加した遺伝子

機能	遺伝子名	16℃	20℃	28℃
metabolism	cDNA clone NGY15.03e similar to pir|JC4157| cytochrome P450 2D, endoplasmic reticulum - dog	0.32	0.36	0.74
	cDNA clone OLc03.12g similar to pir|JQ1144| H+-transporting ATP synthase (EC 3.6.1.34) chain b precursor, mitochondrial -human	0.32	0.35	2.37
	cDNA clone OLb23.07a similar to lanosterol synthase (EC 5.4.99.7)	1.24	0.51	3.32
immune	cDNA clone OLc02.11d similar to pir|A46579| estrogen receptor-binding cyclophilin - bovine	1.25	0.46	3.43
	Orla C4	0.25	0.20	2.36
	cDNA clone MF01FSA008O22 5'	0.29	0.42	0.44
	cDNA clone MF01FSA032B13 5'	0.18	0.34	0.91
	cDNA clone MF01SSA159F10 5'	0.73	0.27	0.72
	cDNA clone 1061 sequence	1.36	0.66	3.32
cytoskelton	cDNA clone OLd14.08f similar to pir|A56635|tubulin alpha chain, brain-specific isotype (clone pTUB5) - chum salmon	3.90	1.05	1.48
developmental	Pax-3	4.30	0.72	1.31

注） 黒色:3倍以上発現促進、 灰色:3倍以上発現抑制

(2)水温変化による代謝系遺伝子の発現変化

①薬物代謝

薬物代謝に関わるシトクロムP450酵素系遺伝子である、P450 1A 遺伝子、P450 2D 類似遺伝子、P450 2N1 類似遺伝子、P450 3A40 遺伝子は水温低下により発現抑制された。

②脂質代謝

脂質代謝(脂質を加水分解する)を行う酵素(hepatic lipase)の類似遺伝子は水温低下により発現が抑制され、コレステロール生合成の中間体であるラノステロールをスクアレンから合成する際に働く酵素(lanosterol synthase)[6]の類似遺伝子は水温上昇により発現が大きく促進された。

③糖代謝

糖代謝のうち、グリコーゲンから作られたグルコース-6-リン酸をグルコースへと変換する酵素(glucose 6 phosphatase)[7]の類似遺伝子は、水温低下により発現が抑制される傾向が見られた。また、糖代謝に関連する ATP(アデノシン三リン酸)を、ADP(アデノシン二リン酸)から合成する際に働く酵素の前駆物質(H^+ - transporting ATP synthase chain b precursor および delta chain precursor)[8]の類似遺伝子は、水温上昇により発現が促進され、chain b precursor 類似遺伝子は水温低下により発現が大きく抑制された。

④その他

鉄代謝(鉄の輸送)を行い、細菌の増殖に必要な鉄の利用を妨げる働きもするトランスフェリン遺伝子(transferring)[9]は、水温低下により発現が抑制される傾向が見られた。一方で、代謝系で電子伝達に関わる cytochrome C[10]の類似遺伝子は他の遺伝子とは異なり、水温低下によ

り発現が促進された。

代謝系の遺伝子は、水温変化により 11 種の遺伝子で発現変化が見られ、そのうち 10 種の遺伝子において、低水温で発現抑制、高水温で発現促進される傾向が見られた。

魚類は変温動物であり、水温の変動により生体膜の流動性、酵素活性は大きく影響を受け、ミクロソーム膜に存在する薬物代謝酵素である P450 の活性も膜の流動性に影響を受けると考えられている [11]。また脂質や糖質の代謝も水温に影響され、水温の低下は摂取した脂質、糖質を貯蔵する方向に向かわせると考えられる。本研究の結果は、これらの現象を反映しているといえる。

(3)水温変化による生殖系の遺伝子の発現変化

精子形成に関わる生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの受容体遺伝子(GnRH-R2)[12]は、水温低下により発現が抑制され、精子成熟を誘起するプロゲスチンに関連する遺伝子(alpha G protein coupled progestin)[12]は、水温上昇により発現が促進された。また、ショウジョウバエの生殖細胞で、性分化の初期に重要な役割を果たすことが知られている germ cell-less protein 遺伝子 [13]は、雄メダカの肝臓中でも水温上昇により発現促進された。

生殖系の遺伝子は、変動の程度、変動した遺伝子数ともに少ないが低水温で発現抑制、高水温で発現促進される傾向が見られた。

多くの魚類は周期的に生殖活動を行っており、水温や光周期などに強く影響されることが知られている [14]。メダカの精子形成にも年周期的変化があることがわかっている [15]。このため、生殖活動に適さない低水温時に、関連の深い内分泌系の遺伝子が発現抑制され、生殖活動に適した高水温時に発現促進されることが考えられる。本研究の結果はこれらの現象を反映しているといえる。

(4)その他の遺伝子の発現変化

カルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質で、チャンネル形成、膜溶解、小胞輸送、ホスホリパーゼ A2 活性化などに関与しているアネキシン遺伝子(annexin max2、annexin max4)[16]や、細胞内の情報伝達等に関わる cGMP の生成反応の触媒となるグアニリル シクラーゼ(membrane guanylyl cyclase)[17]遺伝子等の、情報伝達に関連する遺伝子は、水温上昇で発現が促進される傾向が見られた。

また、タンパク質合成時に mRNA の翻訳を行うリボソームに結合し翻訳を開始させる因子(eukaryotic translation initiation factor EIF3-p48 subunit)[18]の類似遺伝子、リボソームに作用しペプチド鎖を伸長させる因子(translation elongation factor EF-1 gamma)[18]の類似遺伝子、転写活性化因子、転写促進因子、翻訳促進因子として作用する Y ボックスタンパク質(mfYP2)[19]遺伝子、細胞の減数分裂時に作用するコヒーシンタンパク質(SMC1 alpha)[20]遺伝子といった、核酸やタンパク質に結合して作用する遺伝子でも水温低下で発現抑制、水温上昇で発現促進が見られた。

さらに、細胞周期の制御に関わるサイクリン B(cyclin B2)[21]遺伝子や、細胞増殖を制御する p53 遺伝子 [21]でも、水温上昇により発現促進が見られ、ヘモグロビンの構成成分であるグロビン (adult alpha-type globin) 遺伝子では水温低下により発現抑制が見られた。

これまで挙げたほとんどの遺伝子は、水温低下により遺伝子発現が抑制されるものや、水温上昇により遺伝子発現が促進されるものであった。しかし細胞骨格の 1 つである微小管を形成するチューブリン α(tubulin alpha chain)[22]の類似遺伝子や、発生過程で形態形成の制御を行うホメオボックス遺伝子の 1 つである Pax-3[23]遺伝子などでは、水温低下により遺伝子の発現が促進された。

これらの遺伝子が具体的にどのように作用しているのかは不明であるが、低温耐性等に関わっている可能性も考えられる [22]。

このように水温変化により多くの遺伝子が変動したが、比較的大きく変動したのは、水温低下時に発現抑制された代謝系および免疫系の遺伝子と、発現促進されたチューブリン α 遺伝子と Pax-3 遺伝子であった。

水温変化による遺伝子発現の変化は、生体内の複雑な相互作用のうえで生じ、様々な生体反応に影響を及ぼすことが示唆された。下水処理水や河川水中の化学物質の魚類影響を調査する際に、遺伝子レベルでの評価は、早い段階で現れる影響を把握できるため、非常に有効な手法であると考えられる。しかし、本研究結果からわかるように、試験条件を一定に保たないと、化学物質に曝露されたことによる影響かどうか判断できなくなることが予想される。特に内分泌系に直接的または間接的に作用する遺伝子も変動していたことから、下水処理水や河川水中の化学物質が雄魚の雌性化に及ぼす影響を調査する場合には、水温を一定に制御したうえで曝露試験を行う必要があると考えられる。

4.3 下水暴露によるメダカの発現・抑制遺伝子の把握実験

4.3.1 実験材料と実験方法

(1)メダカマイクロアレイ

メダカ用マイクロアレイは、4.2実験と同様EG750 (Ecogenomics社製) を使用した。

(2)RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作

RNA抽出とマイクロアレイ用試薬およびその操作方法

は、4.2実験と同様とした。

(3)雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析

下水処理水に雄メダカを曝露したとき、メダカの肝臓中で卵形成に関わるビテロゲニンという蛋白質を誘導することが報告[24]されている。これは主に下水中の女性ホルモンによるものと考えられるが、この雄メダカの雌性化現象も遺伝子レベルで検出できるかどうか調査するため、下水への暴露実験では雄メダカを使用することとした。雄メダカの下水への暴露実験の前に雄メダカと雌メダカの遺伝子の発現の違いを確認しておく必要があると考え、脱塩素水で飼育している約3ヶ月齢の雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析を行った。

本実験では雄、雌それぞれ3匹を１検体とし4.2.1に記した方法でマイクロアレイの処理を行った。

(4)下水への雄メダカ暴露実験

下水への暴露実験では、実下水で運転（好気的固形物滞留時間7日、活性汚泥浮遊物質濃度約1300mg/L、処理水中溶存有機炭素濃度約10mg/L）している活性汚泥処理パイロットプラントの処理水とエアレーションタンク（以下AT）2槽目の上澄水にメダカを暴露した。実験装置の概要を図-3に、メダカの曝露条件を表-13に記す。RNAの抽出およびマイクロアレイの前処理は4.2.1に示した方法で行った。マイクロアレイによる遺伝子発現解析は半定量的であることから、マイクロアレイで遺伝子発現が高いと判定された遺伝子については、より定量能の高いリアルタイムPCR法で遺伝子発現の定量化も試みた。さらに、遺伝子発現と蛋白質発現の関係を把握するため、遺伝子発現解析用メダカとは別の個体ではあるが、各条件につき5または10匹のメダカの肝臓中ビテロゲニン蛋白質の測定を行った。

また、曝露開始後0、2、7、14日後に両曝露水槽中の女性ホルモンであるエストロン(E1)と17β-エストラジオール(E2)濃度および遺伝子組み換え酵母によるエストロゲン活性の測定も行った。

表-13　メダカ曝露実験の条件

暴露方式	流水式
換 水 率	約１換水／日以上
試 験 区	処理水とエアレーションタンク2槽目
暴露期間	2、7、14日
暴露雄メダカ数	各水槽約100匹（約3カ月齢）
試験水温	26℃
照　　明	16時間明／８時間暗
給　　餌	3回/1日
RNA抽出部位	肝臓
遺伝子解析検体数	3サンプル（3匹分の肝臓を1サンプル）
肝臓中ビテロゲニン蛋白質測定	5または10匹（ELISA法:Medaka Vitellogenin ELISA System）

4.3.2　実験結果

(1)雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析結果

雄メダカと雌メダカのマイクロアレイ画像から蛍光強度を読みとり数値化し、この数値化データを元に雄メダ

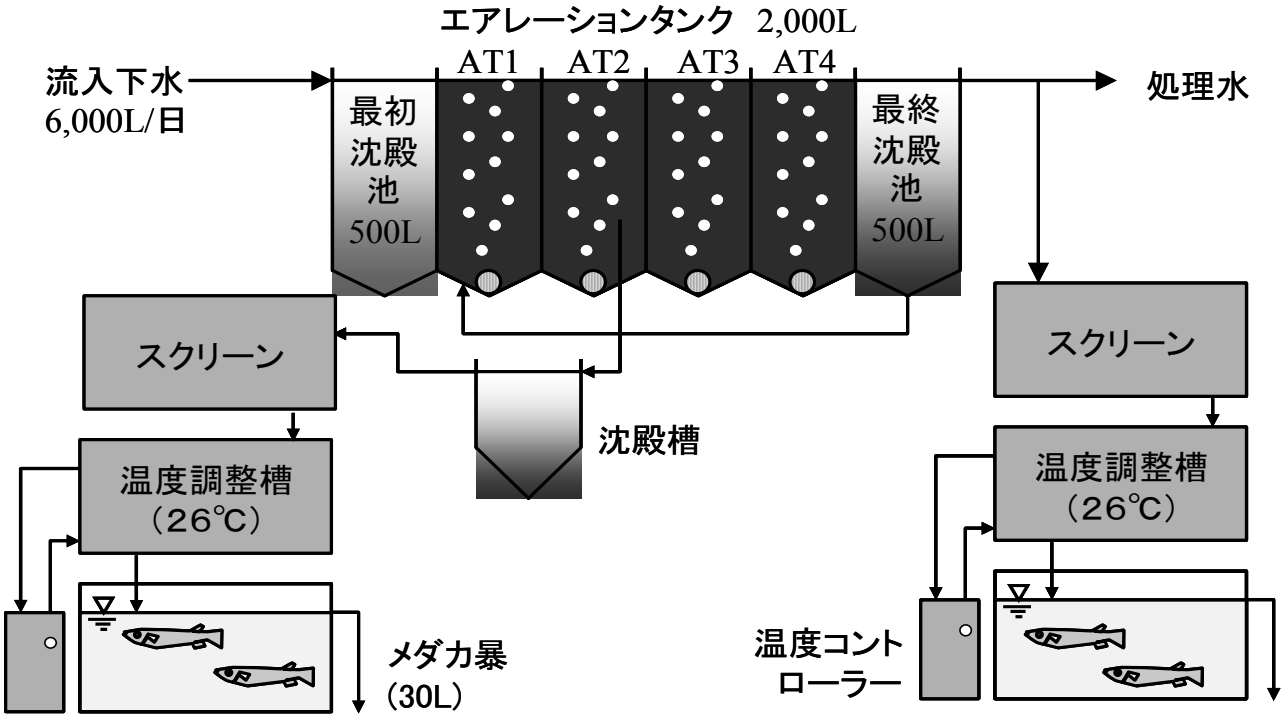
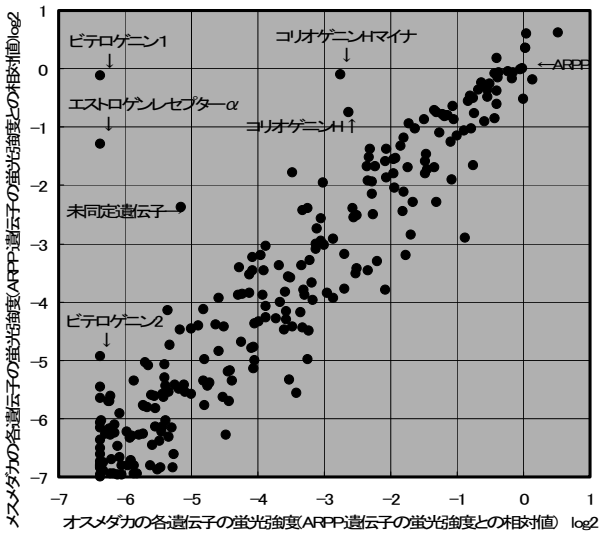


図-3　活性汚泥処理装置とメダカ曝露装置の概要



図−4 雄メダカと雌メダカの発現遺伝子の散布図

表-14 雌メダカ肝臓中で雄メダカの2倍以上発現している遺伝子

遺伝子名	倍率(雌/雄)
ビテロゲニン Ⅰ	75.9
エストロゲンレセプターα	33.6
コリオゲニンH マイナ	6.27
コリオゲニンH	3.69
partial cold-shock domain protein	3.26
ビテロゲニンⅡ	2.70
HOXA9B	2.30
コリオゲニンL	2.07

カと雌メダカで散布図を作成すると図-4が得られる。図-4は、雄雌共通の遺伝子で遺伝子発現の変動が少ないと考えられているAcidic Ribosomal PhosphoProtein(ARPP)遺伝子の発現を1とする相対強度で整理している。横軸と縦軸は$\log_2$スケールで示しており、すなわち、0,-1,-2,-3は1,1/2,1/4,1/8となる。なお、蛍光強度がバックグラウンド以下となる低発現遺伝子は、倍率を算出するため、バックグラウンドの標準偏差の約2倍のかさ上げ処理を行った。

雌メダカ肝臓中で、雄メダカの2倍以上発現している遺伝子を表-14に示す。その結果、卵黄前駆物質の形成に関わる遺伝子であるビテロゲニンⅠ,Ⅱ、卵膜前駆物質の形成に関わる遺伝子であるコリオゲニンH,Hマイナー,L、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高いことが確認できる。雌特有の遺伝子は、主に卵形成に関わる遺伝子であることがわかる。

(2)下水への雄メダカ暴露実験の結果

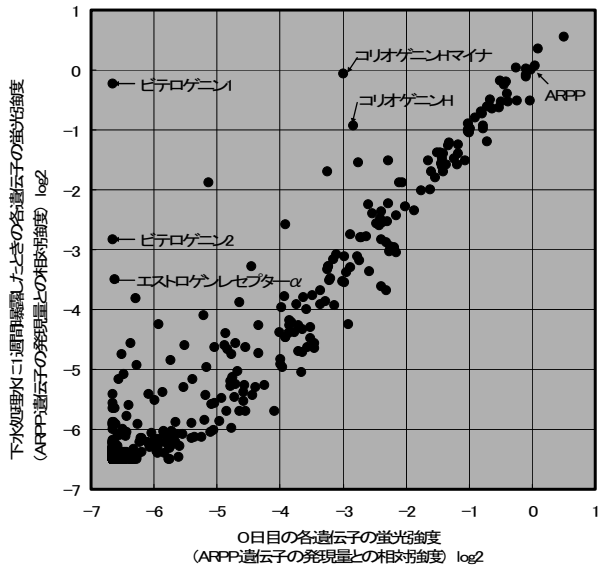
図-5は、0日目をコントロールとし処理水とAT上澄水にそれぞれに１週間暴露したときの雄メダカの各遺伝子発現の散布図である（7日間暴露のみ掲載）。本図は4.3.2と同様にARPP遺伝子での補正とバックグラウンド以下の低発現遺伝子のかさ上げ処理を行っている。表-15は、処理水とAT上澄水に2日,7日,14日間暴露したとき、0日目より遺伝子発現量が3倍以上、1/3以下になった遺伝子でかつ統計的有意(ANOVA検定で$p<0.001$)であったものを列挙したものである。

処理水とAT上澄水に暴露したいずれの場合でも雌特有の遺伝子であるビテロゲニンⅠ,Ⅱ、コリオゲニンH,Hマイナー、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が高くなることがわかる。ただし、処理水に14日間暴露した場合では、これらの遺伝子の発現量は低下していた。

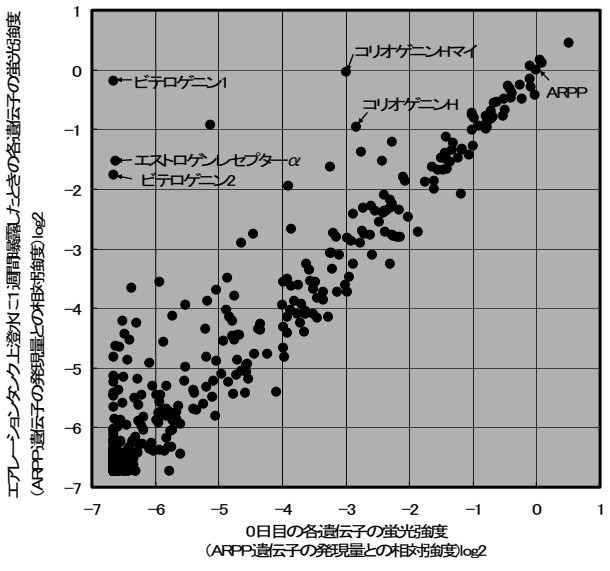
処理水とAT上澄水に暴露したときの発現が増加する遺伝子数を比較すると、曝露期間7日間以上で、AT上澄水に暴露した方が、処理水に暴露した場合よりも発現量が増加する遺伝子数が多いことが確認できた。その中には、卵形成に関わる遺伝子の他に未同定の遺伝子も多く含まれていた。

図-6,7に各暴露水槽中のE1,E2濃度とエストロゲン活性およびビテロゲニンⅠ,Ⅱ、コリオゲニンH,Hマイナー、エストロゲンレセプター遺伝子のリアルタイムPCRの結果を示す。表-16は、リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブの塩基配列である。リアルタイムPCRによる各遺伝子の定量においてもARPP遺伝子の発現量との相対値を求めた後、0日目コントロールとの倍率を算出した。なお、ビテロゲニンⅠおよびⅡは、0日目コントロールの発現量が検出限界以下であった。ここでは倍率を算出するため、0日目コントロールのビテロゲニンⅠおよびⅡ遺伝子発現量を、リアルタイムPCRで35サイクル（検出限界付近のサイクル数）で遺伝子が検出されたと仮定し算出した。

処理水とAT暴露水槽中のE1濃度は、暴露期間中一定ではなく、それぞれ、0日目115, 99.1ng/L、2日目24.1, 37.1ng/L、7日目17.6, 8.85ng/L、14日目0.82, 9.57ng/Lとなり、低下傾向であった。このときのエストロゲン活性の値はE1濃度と同じ傾向を示していた。卵形成に関わる遺伝子の発現量をみると、処理水に14日間暴露したメダカで、ビテロゲニンⅠ,Ⅱ、コリオゲニンH, Hマイナー、エストロゲンレセプター遺伝子の発現が低下しており、E1濃度と同じ傾向を示している。AT上澄水に暴露した方では、14日目に遺伝子発現量の低下は見られなかった。E1濃度10ng/L以上で卵形成遺伝子が発現していることがわかる。図-6より、肝臓中ビテロゲニン蛋白質濃度は、E1濃度、エストロゲン活性値と連動しないことがわかる。



下水処理水1週間暴露



AT上澄水1週間暴露

図-5 0日目の発現遺伝子と処理水およびエアレーションタンク上澄水に1週間曝露したときの雄メダカの発現遺伝子の散布図

表-15 コントロールの 3 倍以上、0.3 以下で ANOVA 検定により $p<0.001$ と判定された遺伝子

曝露日数	処理水			エアレーションタンク		
	遺伝子名	アクセション番号	倍率	遺伝子名	アクセション番号	倍率
2日	ビテロゲニン1	AB064320	92.3	ビテロゲニン1	AB064320	109.2
	ビテロゲニン2	AB074891	14.8	ビテロゲニン2	AB074891	32.3
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.6	エストロゲンレセプターα	AB033491	28.0
	エストロゲンレセプターα	AB033491	4.3	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.8
	コリオゲニンH	D89609	4.2	コリオゲニンH	D89609	3.9
	コリオゲニンL	AF5000194	3.2	コリオゲニンL	AF500194	3.1
7日	ビテロゲニン1	AB064320	85.3	ビテロゲニン1	AB064320	88.3
	ビテロゲニン2	AB074891	14.1	エストロゲンレセプターα	AB033491	33.9
	エストロゲンレセプターα	AB033491	8.7	ビテロゲニン2	AB074891	29.5
	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.5	コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
	コリオゲニンH	D89609	3.7	*cDNA similar to aspartate transaminase precursor, mitochondrial - pig*	AU177265	6.5
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	5.2
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	4.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.9
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AU177788	3.2
				コリオゲニンL	AF500194	3.0
14日	ビテロゲニン1	AB064320	37.0	ビテロゲニン1	AB064320	93.2
	cDNA to similar to cytochrome P450 2D10 – mouse	AU176875	4.2	エストロゲンレセプターα	AB033491	36.8
	cDNA similar to Brain cDNA library Ictalurus punctatus cDNA 5	AU180750	3.0	ビテロゲニン2	AB074891	31.7
	transposon Tol2 transposase	AB031079	0.2	*cDNA similar to aspartate transaminase, mitochondrial - pig*	AU177265	7.9
				コリオゲニンHマイナ	AB025967	7.7
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase alpha chain - mouse	AU176589	5.3
				cDNA similar to H+-transporting ATP synthase beta chain precursor, mitochondrial - bovine	AU177340	4.9
				cDNA clone MF01FSA032M17 5	BJ704342	4.2
				cDNA similar to eukaryotic translation inititation factor EIF3-p48 subunit (fission yeast)	AV670601	4.0
				cDNA similar to cytochrome P450 2C4 - rabbit	AU176982	3.9
				cDNA similar to TR:O75804 O75804 KI-1/57 INTRACELLULAR ANTIGE	AV668414	3.8
				コリオゲニンH	D89609	3.7
				cDNA similar to translation initiation factor eIF-2 gamma chain (human)	AV669804	3.6
				cDNA clone MF01SSA123H06 3	BJ022493	0.3

注）斜体は未同定遺伝子

曝露日数2,7日で処理水とAT上澄水に曝露したメダカの遺伝子発現量を比較すると、遺伝子の種類により倍率は異なるが、AT上澄水に曝露した方が高くなっている。例えば、AT上澄水に7日間曝露したメダカのビテロゲニンⅠ遺伝子の発現は、同条件で処理水に曝露したものの7倍となっている。このとき、肝臓中のビテロゲニン蛋白質もAT上澄水に曝露した方が、処理水に曝露したものより50倍程度高い値を示した。

4.3.3 考察

雄メダカと雌メダカの遺伝子発現解析から雌メダカ特有の遺伝子は卵形性に関わる遺伝子であることがわかった。今回の実験では、雄メダカの雌性化の検出も試みたため、雄メダカを使用したが、雌メダカを使用した方がより高感度に水質を評価できる場合もあると考えられることから、様々な物質で雄メダカと雌メダカの感受性の違いを明らかにしていく必要がある。

表-16 リアルタイム PCR で使用したプライマーとプローブの塩基配列

遺伝子名（アクセション番号）	フォワードプライマー	リバースプライマー	TaqManプローブ	参考文献
エストロゲンレセプターα	aatcgctcccggttctatatca	cgaccctccatactgaaggaca	FAM-atctcgaggcagaatcgagagtccga-BHQ	4)
ビテロゲニン1	tctgttgttgccaagaccaaag	tccatcagttctcactccaatctc	FAM-cttctttgttggagctgctgctgatgttct-BHQ	4)
ビテロゲニン2(AB074891)	gggctgattcttgctctttctct	ggctgaattctggggtgaag	FAM-cccttgtggctgccaaccaactg-BHQ	今回設計
コリオゲニンH	cggatagtcctctttccattgc	tttgacactgcccattggc	FAM-agcttggacccctcaagtgtacttgca-BHQ	4)
コリオゲニンHマイナ(AB025967)	tgttcctcagtgggatttgct	agggatccactggaactaacgtt	FAM-attaatggctgtccaaacatcgacgatcg-BHQ	今回設計
ARPP(AU179751)	ctttgtcttcaccaaggaggatct	cgagctgctgcaggtacct	FAM-actgaagtcagggatctgctgctggc-BHQ	今回設計

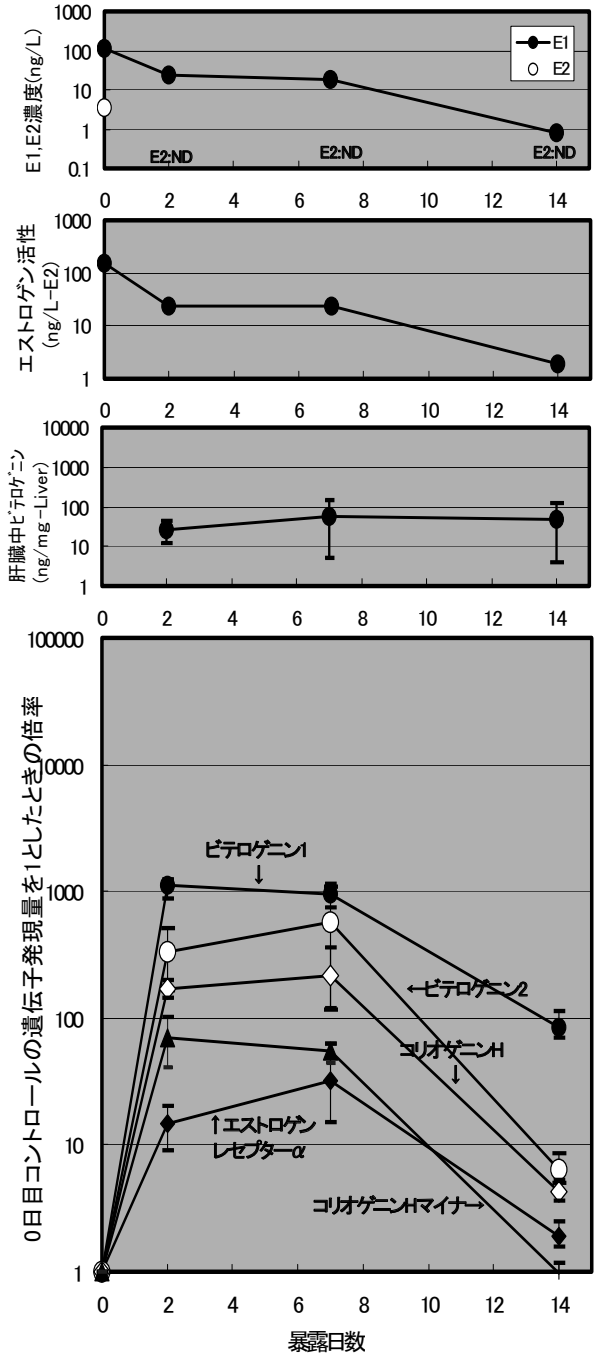


図-6 処理水暴露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン活性値、肝臓中ビテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化（bar は最大、最小値）

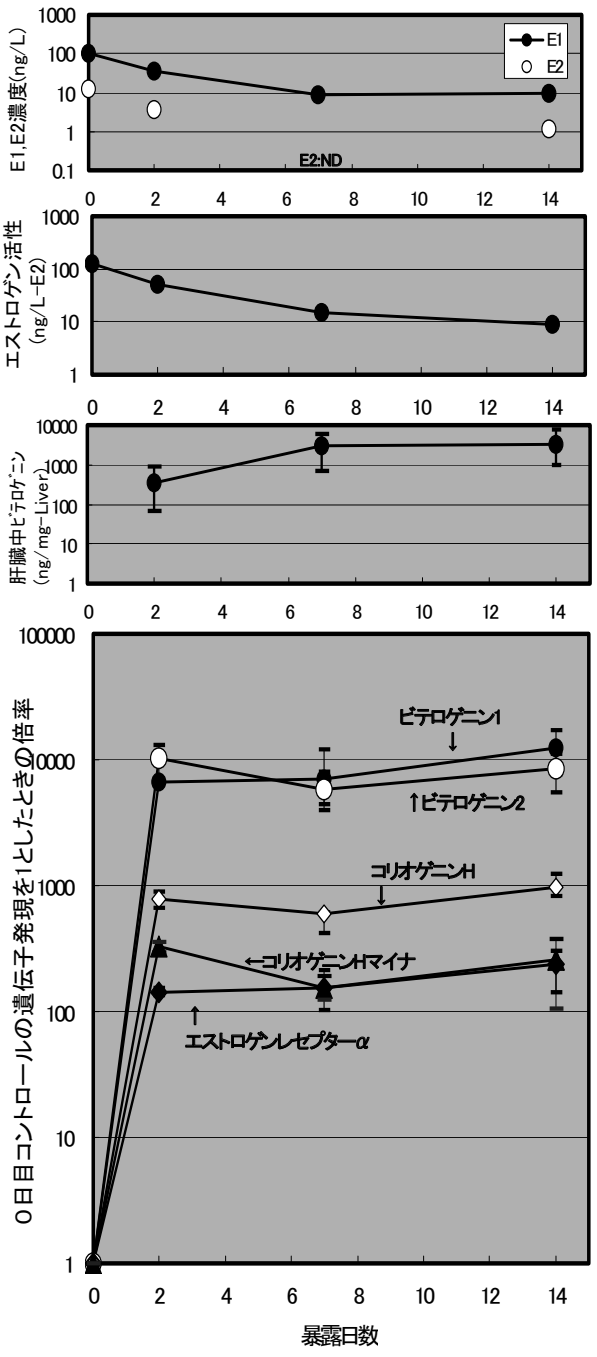


図-7 AT 暴露水槽中の E1,E2 濃度、エストロゲン活性値、肝臓中ビテロゲニン濃度、リアルタイム PCR で測定した各遺伝子の発現倍率の経日変化（bar は最大、最小値）

今回の下水に雄メダカを曝露した実験から雄メダカ肝臓中で卵形性に関わる遺伝子の発現が高くなることがわかった。AT上澄水ではE2が検出されているものの、7日目までの両曝露水槽中のエストロゲン活性値は、ほぼ同じであったにもかかわらず、AT上澄水中に曝露した場合の方が卵形性遺伝子発現が高くなる傾向が得られた。これは、メダカ体内に取り込まれる女性ホルモン量が多かったためと考えられるが、その理由には、以下が推測されるものの明らかではない。曝露水中の溶存酸素濃度を測定していなかったが、AT上澄水は、処理水よりも溶存酸素濃度は低くなっていたと考えられる。AT上澄水中のメダカはより多くの酸素を取り込むため、エラを通る水量が増加したため、結果として体内に取り込まれる女性ホルモン量が多くなった。あるいは、AT上澄水には女性ホルモンの取り込みを促進する物質が含まれている。

今回の肝臓中のビテロゲニン蛋白質の測定結果から、蛋白質の発現では、週間単位での大凡の水質の履歴が判断でき、遺伝子の発現からは、数日単位で水質を評価できるものと考えられる。今後は、水質と遺伝子の応答速度についても明らかにしていく必要がある。

AT上澄水に暴露したメダカは、処理水に暴露したものより、発現量が増加する遺伝子の数が多くなったが、化学物質の影響か溶存酸素の影響かは明らかでない。今後、溶存酸素の高い条件と低い条件での遺伝子発現解析を行う必要がある。

今回の処理水とAT上澄水中のエストロン濃度と卵形成に関わる遺伝子の発現の関係から、エストゲン活性約10ng/L-E2が卵形成に関わる遺伝子発現の閾値であるとと考えられる。

5 まとめ

以下に本実験結果をまとめる。

1)シアンに暴露したメダカ（雄雌混合）で最も発現変動の大きい遺伝子は、ビテロゲニンⅠやコリオゲニン遺伝子であった。これらの遺伝子は、シアン暴露により抑制された。

2) 飼育水温の違いにより多くの遺伝子が変動することがわかった。24℃を基準にした場合、低水温時(16, 20℃)は、代謝系および免疫系の遺伝子が抑制され、細胞骨格系のチューブリン α 遺伝子と発達系のPax-3遺伝子の発現が促進された。高水温時(28℃)は、代謝系と免疫系の遺伝子の発現が促進された。

3)エアレーションタンク上澄水に曝露したメダカは、処理水に曝露したものより発現量が高くなる遺伝子の数が増加した。

4)エアレーションタンク上澄水および処理水に雄メダカを暴露すると卵形成に関わるビテロゲニンⅠ,Ⅱ、コリオゲニンH,Hマイナー、エストロゲンレセプターα遺伝子の発現が増加する。これらの遺伝子は曝露後2日目から検出でき、水中のエストロン濃度と連動して動いている可能性がある。

今後は、溶存酸素濃度や給餌の頻度と発現遺伝子の種類についての知見を収集し、信頼性の高い試験条件を確立する必要がある。さらに、純物質でのメダカの暴露試験から、発現または抑制される遺伝子データを収集し、現場での水質モニタリングに反映させて行きたいと考えている。

参考文献

1)Sirisattha,S., Momose,Y., Kitagawa,E., Iwahashi,H.:Toxicity of anionic detergents determined by Saccharomyces cerevisae microarray analysis, Water Res.,38,61-70,2004

2)Momose,Y., Iwahashi,H.,:Bioassay of cadmium using a DNA microarray:genome-wide expression patterns of Saccharomyces cerevisae responcse to cadmium, Environ. Toxicol.chem.,76,6548-6554,2004

3)矢野友紀・中尾実樹：硬骨魚類の補体の特性，「魚類の免疫系」（渡辺翼 編），恒星社厚生閣, pp50-61, 2003

4)Thomas Ratajczak, Amerigo Carrello, Peter J. Mark, Beverley J. Warner, Richard J. Simpson, Robert L. Moritz, Authony K. House : The Cyclophilin Component of the Unactivated Estrogen Receptor Contains a Tetratricopeptide Repeat Domain and Shares Identify with p59(FKBP59), J. Biol. Chem, 268(18) , pp13187-13192, 1993

5)鈴木穣：生殖内分泌系による魚類免疫系の制御，「魚類の免疫系」(渡辺翼 編)，恒星社厚生閣, pp50-61, 2003

6)会田勝美：代謝ー脂質代謝，「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編)，恒星社厚生閣, pp207-211, 2002

7)会田勝美：代謝ー糖質代謝，「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編)，恒星社厚生閣, pp204-207, 2002

8)Ralf Birkenhager, Michael Hoppert, Gahriele Deckers-Hebestreit, Frank Mayer Karlheinz Altendorf: The F_0 complex of the *Escherichia coli* ATP synthase investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy, Eur. J. Biochem., 230, pp58-67, 1995

9)鈴木穣：生体防御ー自然免疫，「魚類生理学の基礎」(会田勝美 編)，恒星社厚生閣, pp234-242, 2002

10)山本泰彦・照井教文・長谷川淳・三本木至宏・内山進・小林祐次・五十嵐泰夫：電子伝達タンパク質シトクロムｃ

の熱安定性と機能調節の分子機構 生命現象の化学的理解を目指して，化学と生物，41(3)，pp190-197, 2003
11)藤田正一：魚類のP450酵素系，「P450の分子生物学」（大村恒雄・石村巽・藤井義明 編），講談社サイエンティフィック，pp167-182，2005
12)小林牧人・足立伸次：生殖－生殖内分泌，「魚類生理学の基礎」（会田勝美 編），恒星社厚生閣，pp171-175，2002
13) Stefan Scholz, H. Domaschke, A. Kanamori, K. Ostermann , G. Rödel , H.O. Gutzeit : Germ cell-less expression in medaka (*Oryzias latipes*), Mol. Reprod. Dev. , 67(1), pp15-18, 2004
14)小林牧人・足立伸次：生殖－環境と生殖，「魚類生理学の基礎」（会田勝美 編），恒星社厚生閣，pp176-179，2002
15)岩松鷹司：生殖－精巣の発達，「新版メダカ学全書」，大学教育出版，pp233-236，2006
16)Steven A. Farber, Robert A. De Rose, Eric S. Olson, Marnie E. Halpern：The Zebrafish Annexin Gene Family, Genome Res. 13, pp1082-1096, 2003
17)Takehiro Yamamoto Norio Suzuki：Promoter activity of the 5'-flanking regions of medaka fish solubleguanylate cyclase α 1 and β 1 subunit genes, Biochem. J., *361*, pp337-345, 2002
18)田村隆明・村松正實：タンパク質の合成－ペプチド鎖伸長の分子機構，「基礎分子生物学 第2版」，東京化学同人，pp101-103，2004
19)Zend-Ajush E, Hornung U, Burgtorf C, Lutjens G, Shan Z, Schartl M, Haaf T：Isolation and characterization of cold-shock domain protein genes, Oryzias latipes Y-box protein 2 (OlaYP2) and Fugu rubripes Y-box protein 1 (FruYP1), in medakafish and pufferfish, Gene, 296(1-2), pp111-119, 2002
20) Jibak Lee, Toshiharu Iwai, Takehiro Yokota Masakane Yamashita：Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis, J. Cell Sci., 116, pp2781-2790, 2003
21)田村隆明・村松正實：真核細胞の維持・調節機構－細胞周期の制御，「基礎分子生物学 第2版」，東京化学同人，pp187-191，2004
22) H. William Detrich, Sandra K. Parker, Robley C. Williams, Jr., Eva Nogalesi, Kenneth H. Downingi：Cold Adaptation of Microtubule Assembly and Dynamics, 275(47), pp37038-37047, 2000
23) Robert G. Harris, Edward White, Emma S. Phillips, Karen A. Lillycrop：The Expression of the Developmentally Regulated Proto-oncogene *Pax-3* Is Modulated by N-Myc, J. Biol. Chem, 277(38), pp34815-34825, 2002
24)国土技術政策総合研究所，土木研究所：平成16年度下水道関係調査研究年次報告書集，国土技術政策総合研究所資料，土木研究所資料，pp. 243-252，平成17年

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

水環境研究グループ　水質チーム
上席研究員　鈴木　穣
研究員　北村　友一

1. はじめに

湖沼中での有機物の生成や変換および分解には、微生物が大きく関与している。たとえば、藻類は、光合成により二酸化炭素から有機物を生産し、過剰な有機物は体外に排出する。排出された有機物の内、易分解性有機物は、細菌に消費され分解される。藻類や細菌も死後、他の細菌に分解され、溶存有機物に変換され、再度、細菌に利用される。

これらの微生物群集の動態は、湖沼の水質に大きな影響を与えていると考えられる。湖沼の微生物群集構造や活性、相互作用を明らかにすることが、現時点の湖沼の水質の理解を深め、また、将来の水質予測の基礎パラメーターになると考えられる。しかし、湖沼中の微生物の群集測定や解析は、技術的に難しいことからこれまで行われてこなかった。

本研究では、湖沼の微生物群集を簡易に測定できる方法の開発を目指しており、本年度は、フローサイトメトリーセルソーターによるピコ植物プランクトンの検出法の検討を行った。

2. フローサイトメトリーセルソーター（Flow Cytometry Cell Sorter:FCCS）について

FCCSにはいくつかの種類があるが、ここでは著者らが使用しているFCCSの測定原理について簡単に説明する。図-1にFCCSの概略図を示す。微生物は、シース液（細胞を包み込む液）中を層流状態でフローセル内を通過する。フローセルの出口部分は、常にレーザー光(488nm)が照射されており、層流状態で流れてきた微生物はレーザー光に当たると、散乱光と蛍光の2種類の光線を発する。散乱光のうちレーザー入射と同一直線上の光線を、前方散乱光(Forward Scatter :FS)、直角方向の光線を側方散乱光(Side Scatter :SS)と呼ぶ。FSは、微生物の大きさに関する情報を示し、SSは、微生物の核、顆粒などの微生物内部構造に関する情報を反映するとされている。蛍光検出器は、5つの光電子増倍管(Photo Multiplier Tube :PMT)が搭載されており、PMT1ではSSを、PMT2では緑色、PMT3では黄色、PMT4では橙色、PMT5では赤色蛍光を検出できる。

これらの検出器で検出された微生物の内、ある特徴を有する微生物群をソーティングすることができる。その原理は次のとおりである。フローセルに振動を与えると、水流が液滴状態に変換する。レーザー光により蛍光を発した分取しようとする微生物が、液滴となる瞬間に、シース液に正または負の電荷をかける。すると、微生物の含まれる液滴は帯電したまま落下する。正極と負極の偏向板を通過すると、正に荷電した液滴は、負極の偏向板の方に、負に荷電した液滴は、正極の偏向板に引き寄せられる。荷電されていない液滴はそのまま垂直に落下する。このようにして、異なる情報を有する微生物を

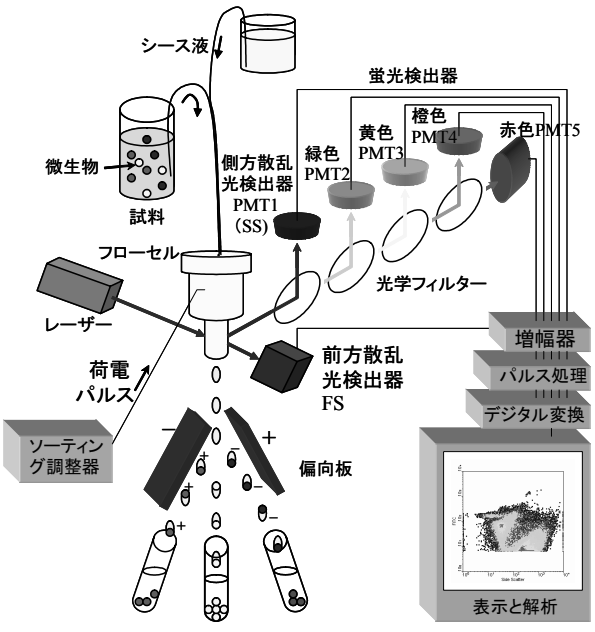


図-1　FCCS の概念図

ソーティングすることができる。本装置の特徴をまとめると次にとおりである。

（１）数分で数万個の細胞を測定できる。

（２）客観性、定量性が高い。

（３）複数の生物学的情報を同時に取得できる。

（４）特定の微生物の分取が可能となる。

3. ピコ植物プランクトンについて

ピコ植物プランクトンとは、2μｍ以下の植物プランクトンの総称であり、様々な種類の植物プランクトンが存在する。これらのピコ植物プランクトンは、通常の光学顕微鏡では検出が難しいことから、これまで見逃されてきた。近年、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡による観察からピコ植物プランクトンが、湖にも 1ml 当たり数十万個存在することが明らかになってきている。ピコ植物プランクトンのバイオマス量は膨大であり、湖水の水質に影響を与えている可能性もある。有機物の一次生産者であるピコ植物プランクトンの動態をとらえることも重要であると考え、FCCS でピコ植物プランクトンが検出できるかどうかや、FCCS で測定した場合どのような情報が得られるのかを調査した。



図-2 採水位置

4. 調査方法

平成 19 年 2 月に、琵琶湖安曇川沖(図-2 参照)で水深 0.5m、5m、10m、20m、50m、底面上 1.5m と大宮川沖(図-2 参照)で水深 0.5m、2.5m、底面上 1.0m から採取した水を 50μｍのナイロン製メッシュでろ過し、ろ液 1ml を FCCS で測定した。FCCS のＰＭＴの条件は、次のとおりである。

FS：450mV、PMT1:450mV、PMT2:650mV、PMT3:650mV、PMT4:700mV、PMT5:650mV

5. 測定結果

琵琶湖安曇川沖水深 0.5m の水の測定結果を図-3 に示す。図-3 上図は、側方散乱強度 SS(PMT1)と緑(PMT2)、黄(PMT3)、橙(PMT4)、赤(PMT5)色強度の関係を、図-3 中図は、前方散乱強度(FS)と緑(PMT2)、黄(PMT3)、橙(PMT4)、赤(PMT5)色強度の関係を、図-3 下図は、FS と SS(PMT1)、黄色(PMT3)と橙色(PMT4)、黄色(PMT3)と赤色(PMT5)、橙色(PMT4)と赤色(PMT5)の関係を対数軸で示したものである。

SS(PMT1)と赤色(PMT5)および FS と赤色(PMT5)の図では、プロットが中心付近に多数あり、微生物群が検出されていることがわかる。クロロフィルは、488nm 付近のレーザー光に励起されると、赤色蛍光を発することから、PMT1 vs PMT5 および FS vs PMT5 で検出された微生物は、植物プランクトンである。FS vs PMT5 の図のプロットは、概ね３つの集団（A,B,C）にわけることができる。PMT3 vs PMT5 および PMT4 vs PMT5 の図より、PMT3(黄色)や PMT4(橙色)も検出されていることから、黄色や橙色の蛍光を発する植物プランクトンも存在することがわかる。(D の集団:D の集団は FS vs PMT5 の図上では、B 集団に含まれる)

6. ソーティング結果

A,B,C,D 領域の微生物群集を分取し蛍光顕微鏡で観察した画像を写真 1～4 に示す。A 領域の植物プランクトンは約 5μｍの球形で細胞内にクロロフィルが 2 カ所に存在している。(直径 2μｍ以上であるが以下ではピコプランクトンとして記述) B 領域の植物プランクトンは、直径約 2μｍの球または楕円球形で *Synechococcus* と考えられる。C 領域の植物プランクトンは、直径 0.5μｍの球形を呈している。D 領域のプランクトンは、橙色の蛍光を発することからフィコビリンを持つ植物プランクトンと考えられる。

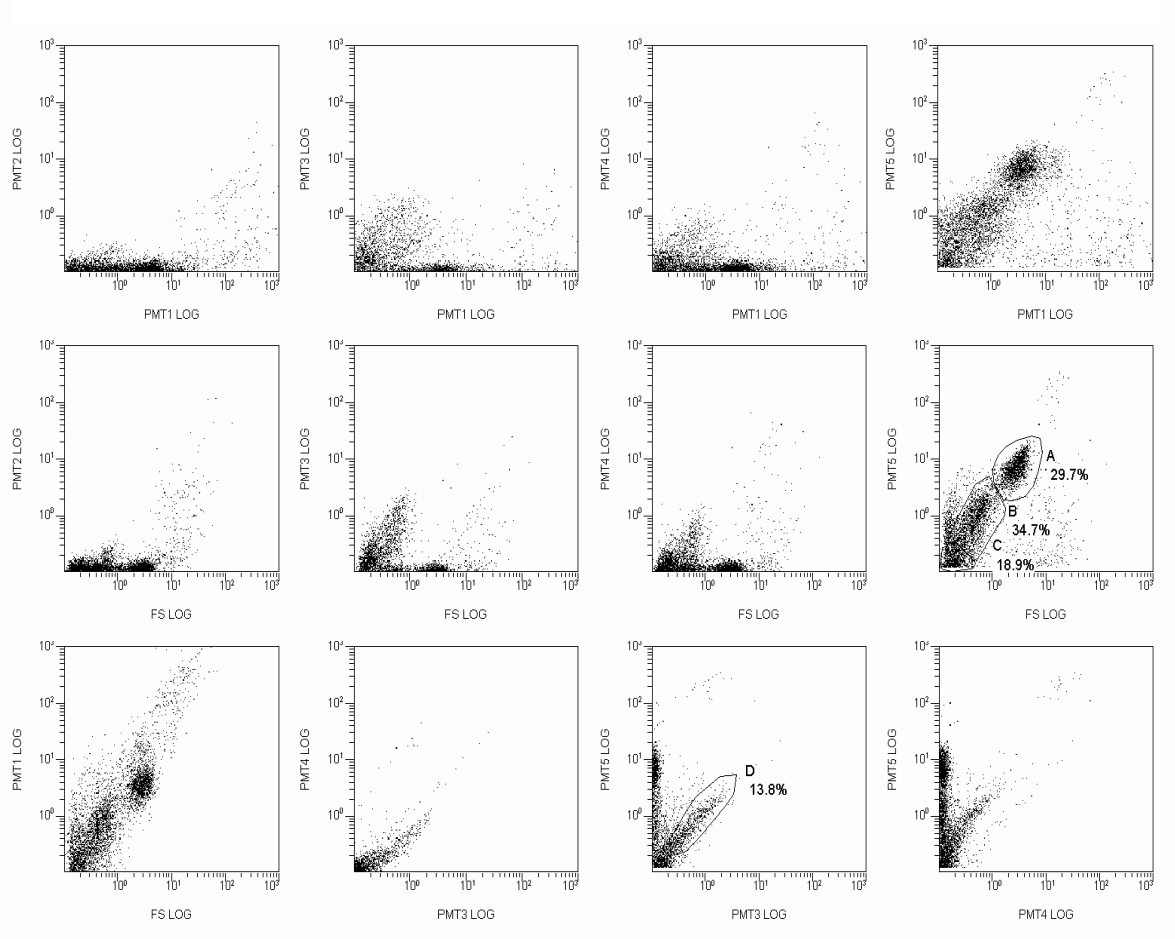


図-3 FCCS による琵琶湖水中のピコ植物プランクトンの測定結果



写真-1 A 領域のピコ植物プランクトン

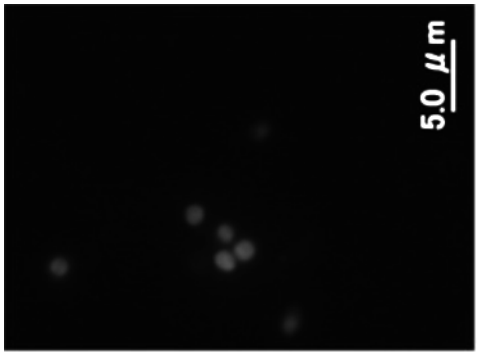


写真-2 B 領域のピコ植物プランクトン



写真-3 C 領域のピコ植物プランクトン

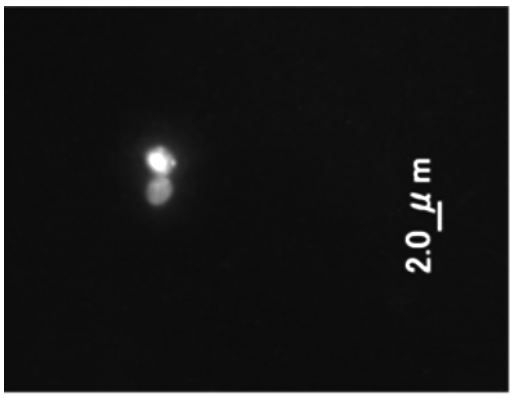


写真-4 D 領域のピコ植物プランクトン

注）写真 1～3 は、蛍光顕微鏡 G 励起下では赤色に、写真-4 は橙色に観察される。

7. 琵琶湖水深方向ピコ植物プランクトンの分布

琵琶湖安曇川沖での水深方向の A,B,C,D 領域のピコ植物プランクトンの鉛直分布を図-4 に、大宮川沖のものを図-5 に示す。安曇川沖でのピコ植物プランクトン数は、5000 個/ml 程度であり、水深 5m 付近で最大となっている。細胞数が水深 10m 付近で低下している理由は不明であるが、水深が低下するに従い細胞数が減少する傾向が確認される。大宮川沖では、1ml 当たり 10 万個弱～20 万個弱のピコ植物プランクトンが存在し、水深が低下するに従い、細胞数が増加していることがわかる。これらピコ植物プランクトンの分布の違いは底泥からの栄養塩の溶出と太陽光の照度が関係しているものと考えられる。

ピコ植物プランクトンの分布は季節や湖水の流動により変動すると考えられることから、湖内の正確な細胞数や分布把握するときは、定期的に調査する必要がある。

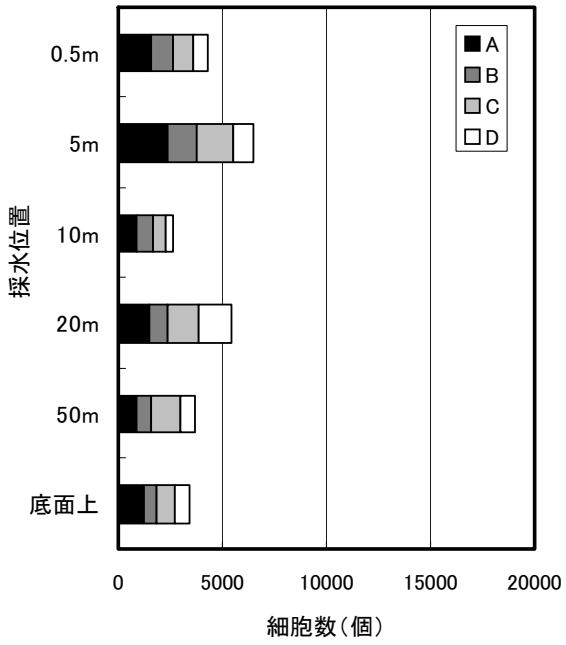


図-4　琵琶湖安曇川沖でのピコ植物プランクトン数の鉛直分布(平成 19 年 2 月)

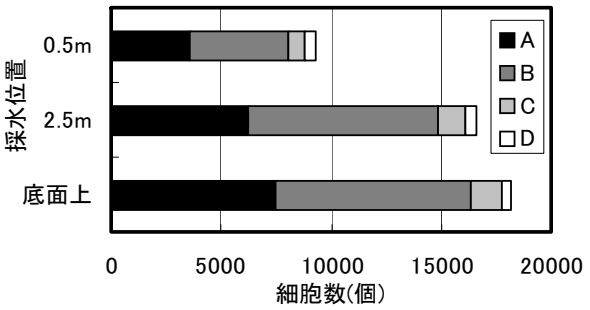


図-5　琵琶湖大宮川沖でのピコ植物プランクトン数の鉛直分布（平成 19 年 2 月）

8. まとめ

FCCS によりピコ植物プランクトンが検出できるかどうか検討した結果、FCCS によるピコ植物プランクトンの検出は可能であり、概ね 4 種類のピコ植物プランクトンを同時に検出できることがわかった。

琵琶湖の北湖と南湖でピコ植物プランクトンを測定した結果、北湖では、1ml 当たり 5000 個、南湖では、1ml 当たり 10～20 万個存在していることがわかった。

今後は、ピコ植物プランクトンの同定や季節変動とピコ植物プランクトンと細菌の同時検出を検討していきたい。

【謝辞】　琵琶湖湖水の採水には、国土交通省琵琶湖河川事務所の協力を得た。ここに記して謝意を表す。

都市水環境における水質評価手法に関する調査

水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　北村　清明
研　究　員　北村　友一
専門研究員　原田　新

【要旨】
河川等の公共用水域においては、水質指標として生活環境項目等の水質環境基準が設定され測定されている。しかし、微量化学物質汚染や、それらの結果としての生態影響の問題については、水質評価手法が確立されてはいないのが現状である。このため、化学的水質分析手法に加えて生態系評価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を開発することが必要である。今年度は、同一水域に流入する河川水について藻類増殖試験を実施し、藻類の生長が阻害される流入河川が多く存在することを明らかにするとともに、流入する排水の種類が異なる河川において底生動物や付着藻類の調査を行い、排水の種類により生息種や数が影響を受けることを明らかにした。今後は、水質と生態影響との関係に影響を与える要因についての解明を行っていく。

キーワード：河川水質，生態影響，バイオアッセイ，藻類生長阻害試験，底生動物，付着藻類

1. はじめに

河川等の公共用水域には、水質環境基準として、BODをはじめとする生活環境項目や人体への毒性の観点から健康項目が定められており、平成15年度から新たに水生生物保全の観点から亜鉛が項目として加えられた。

しかし、都市河川における富栄養化、難分解性有機物質、環境ホルモンなどの微量化学物質汚染や、それらの結果としての生態影響の問題については、水質評価手法が確立されておらず、その結果として対策が必ずしも十分に講じられているとは限らないのが現状である。このため、これまでの化学的水質分析手法に加えて、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を開発する必要がある。

本研究では、都市域における汚濁程度の異なる河川水について、通常の水質分析に加えて藻類の増殖特性や難分解性有機物を測定するとともに、微量化学物質等の水質とバイオアッセイによる水生生物への影響（慢性的，遺伝的）を測定し、全体的な水質特性のグルーピングを行う。また、水環境中に形成された生態系（魚類，藻類，原生動物等）を調査して、水質特性との関係を解明し、生態系のための水質評価手法を構築することを目指す。

今年度は、近接していながら流域の土地利用の違いから様々に汚濁程度が異なる河川水について、バイオアッセイを実施した。また、流入する排水の種類が異なる河川において、底生動物や付着藻類の調査を行った。

2. 近接河川水の藻類増殖試験

2. 1 調査対象水域

近接河川水の藻類増殖試験の調査対象とした水域は、以下に示す根拠により、霞ヶ浦の北浦とし、その流入河川について調査を行った。

- 関東地方における主要な自然湖沼である
- 主要な水道水源となっている
- 流域において、生活系，産業系（畜産等を含む）など多様な汚濁負荷源が存在している
- 流域に下水道の普及地域と未普及地域が存在している

調査地点は、北浦全体にわたる63地点とした。また、平成18年1月から10月までの期間において、季節ごと（1, 3～4月、5～6月、7～8月、9～10月）の試料採取を行った。

2. 2 調査項目

2. 2. 1 水質分析項目

本調査で対象とした水質分析項目は、表2-1に示すように、有機物関連項目、富栄養化関連項目とした。

表 2-1 水質分析対象項目一覧

溶存態総有機炭素	D-TOC
化学的酸素要求量	D-COD
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	D-PO4-P

TOC は自動分析装置(TOC5000, 島津製作所)により分析し、COD, 窒素, リンはオートアナライザー(TRAACS2000, Bran Lubbe)を用いて分析した。

2.2.2 バイオアッセイ項目

バイオアッセイについては、水生生態系における一次生産者として位置付けられ、富栄養化の指標ともなる藻類に着目した試験を行った。

ここでは、藻類の増殖特性への影響を把握するために、藻類生長阻害試験を扱うこととした。

藻類生長阻害試験においては、多数のサンプルを効率的に試験に供するため、Blaise らの方法[1,2]を参考にして、「96 孔のマイクロプレートを用いた藻類生長阻害試験」を適用した。

供試藻類としては、藻類試験に一般的に用いられる緑藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* (NIES-35) を用いた。試験における培養温度は 24℃, 照度 4000Lux, 120rpm の振とう条件で培養を行い、培養期間中マイクロプレートリーダー (ARVO SX-1420 , Wallac) を用いて藻類増殖量の変化をモニタリングし、吸光度 (波長 450nm) から細胞数を換算する方法で、96 時間曝露した後に藻類の増殖量から生長阻害率を計算し、試料濃度と阻害率の関係から半数阻害濃度(EC50)を求めた。

今回の試験における試水の濃度設定は、最大濃度を 83.3%として、公比 2 の 5 段階希釈とした。

求めた EC50 値は、米 EPA による排水規制の手順[3]において用いられている毒性単位(TU)に変換して比較検討に用いた。なお、TU は式(1)のように定義されている。

$$TU = \frac{100\,(\%)}{EC50\,(\%)} \quad (1)$$

なお、採取したサンプルは、ガラスファイバーフィルター (GF/B, Whatman) およびメンブレンフィルター (0.2 μm, Advantec) によりろ過を行った後、試験に供するまでの間、-30℃にて冷凍保存を行った。

2.3 調査結果

2.3.1 水質

調査の結果をまとめ、有機物や栄養塩類の水質を表 2-2 に示す。また、季節による傾向を見るために平均値の推移を図 2-1 に示す。

表 2-2 水質分析結果のまとめ (有機物・栄養塩類等)

		D-TOC	NH_4-N	NO_2-N	NO_3-N	D-COD	D-PO_4-P
冬	最大値	17.07	11.20	0.08	17.67	37.76	0.64
	最小値	0.52	0.44	0.00	0.16	2.27	0.00
	平均値	4.33	4.51	0.00	2.36	9.04	0.07
春	最大値	17.12	10.98	0.05	9.19	30.84	0.76
	最小値	3.88	0.00	0.00	0.00	5.67	0.00
	平均値	7.55	0.69	0.00	1.21	12.77	0.11
夏	最大値	20.64	7.20	0.17	6.00	43.03	0.92
	最小値	2.32	0.00	0.00	0.00	4.71	0.00
	平均値	6.13	0.38	0.03	1.52	10.77	0.11
秋	最大値	16.50	10.37	1.90	52.08	36.18	1.23
	最小値	1.74	0.00	0.00	0.02	2.35	0.01
	平均値	4.83	0.35	0.04	2.71	8.55	0.11
全季節	最大値	20.64	11.20	1.90	52.08	43.03	1.23
	最小値	0.52	0.00	0.00	0.00	2.27	0.00
	平均値	5.71	1.40	0.02	1.96	10.26	0.10

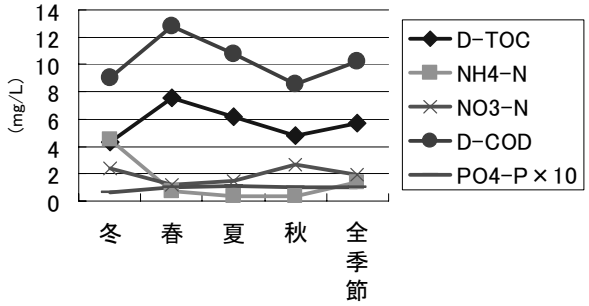
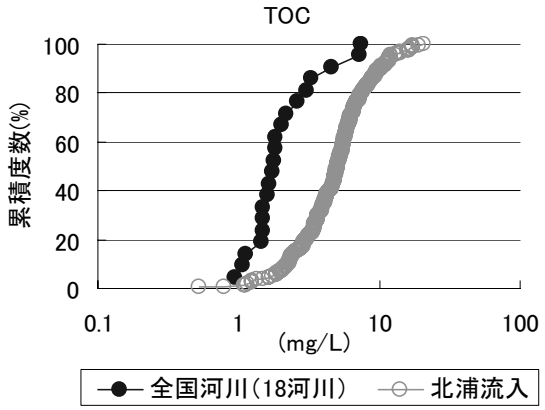


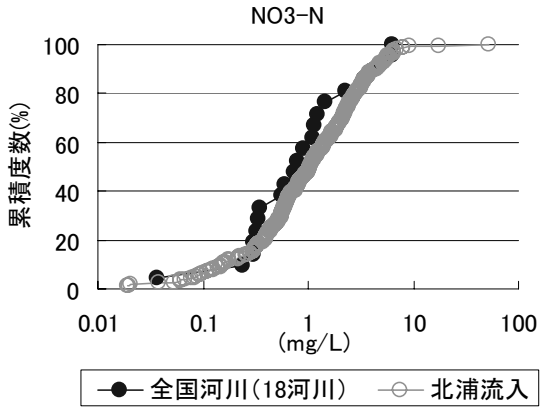
図 2-1 水質分析結果の季節推移 (有機物・栄養塩類等)

表 2-2 からは、北浦に流入する河川や樋門の水質は地点によって大きな差があり、各流入河川の流域における汚濁負荷の状態が異なっていることが推察される。また、図 2-1 からは、アンモニア性窒素が冬に高く、TOC や COD は春に高い等、やや季節的傾向が見られたが、それぞれの項目の傾向は同様ではなかった。

次に、測定した水質項目のうち有機物の指標として TOC を、富栄養化関連物質の指標として硝酸態窒素およびリン酸態リンを代表として取りあげ、全季節の分析値を累積度数分布のグラフとして図 2-2 に示す。この図には、北浦流域の流入河川の水質が他の河川と比べてどの程度のレベルにあるのかを比較するため、全国の国土交通省の直轄河川のうち、各地方整備局管内で流域面積が最大の河川と最小の河川 (18 河川の順流末端) において調査した結果を併せて示す。これらより、栄養塩類の NO3-N と PO4-P の分布は全国河川と北浦流入河川で比較的大きな違いとなっていないのに対して、TOC の分布では北浦流入河川の方が濃度が高い傾向にあることがわかる。従って、北浦流域においては他の日本の河川と比べて有機汚濁の負荷が高くなっていることが推察される。

なお、全国河川のデータは、当チームが(独)科学技術振興機構による CREST「リスク管理型都市水循環系の構造と機能の定量化」における東京大学等との共同研究の一環として行った結果の一部を用いた。





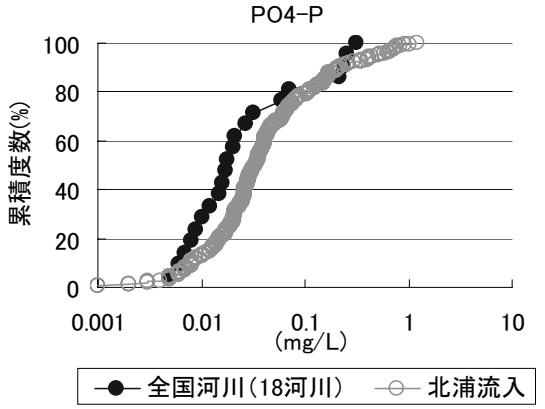


図 2-2 全国河川と北浦流入河川の水質比較

2.3.2 バイオアッセイ

一般的に、環境水のバイオアッセイを行う場合、濃縮しない試料において影響が見られるケースは多くない。従って、環境水の EC50 を求めることは通常はやや困難であるが、今回行った藻類生長阻害試験においては、希釈試料においても EC50 及び TU の数値が得られた試料が約 39%存在していた。残りの約 61%の試料については、今回の試験で設定された濃度範囲においては明確な生長阻害が認められず、毒性が確認されなかった。

生長阻害が見られた試料についての累積度数を図 2-3 に示す。TU は 0.5～2 程度の範囲ではまんべんなく観察された。

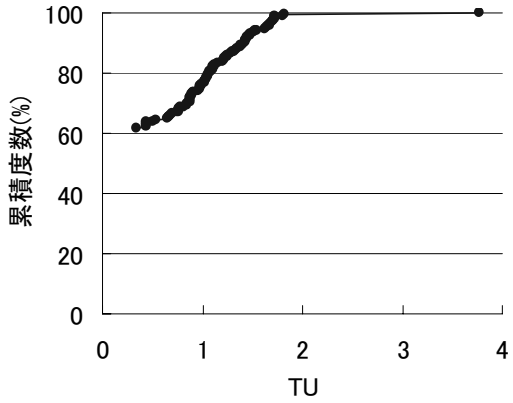


図 2-3 藻類生長阻害試験結果（毒性単位）

また、TU 検出割合ごとの地点数および検出した TU の平均値を表 2-3 に示す。生長阻害がいずれの試料においても見られなかった地点があった一方、全ての試料において TU が検出された地点もあった。

表 2-3 TU 検出割合ごとの地点数および検出平均 TU

TU検出割合	地点数	検出平均TU
0/4	11	-
1/4	20	1.25
2/4	21	1.09
3/4	9	1.17
4/4	2	1.28

2.4 考察

バイオアッセイの結果において見られた藻類の生長を阻害する要因として、一般的に以下のようなものが考えられる。

- 生活雑排水が未処理で流入することによる洗剤や漂白剤等の混入
- 農耕作地から流出する除草剤等の農薬の混入
- 工場等の排水に由来する有害化学物質の混入
- 畜産施設や医療施設、汚水処理施設からの医薬品等の微量化学物質の混入

そこで、水質分析によって得られた結果と、バイオアッセイによって得られた結果とを比較し、藻類生長阻害の要因となった水質項目について検討を行った。ここでは TOC を水質項目として取り上げ、各地点における TOC 値と藻類生長阻害試験の毒性値との関係を図 2-4 に、TU 検出割合ごとの平均 TOC 値を図 2-5 に示す。いずれも水質と毒性影響との間に明確な相関は見られなかった。また、窒素やリン等他の水質項目についても、同様に毒性影響との関係は見出せなかった。

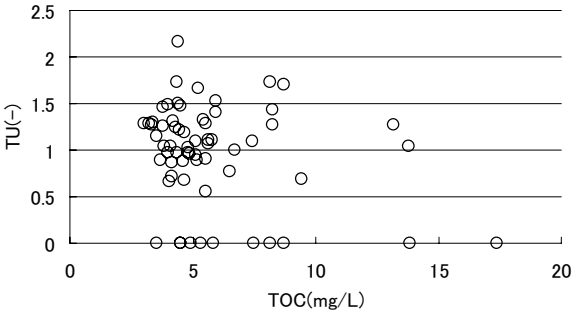


図 2-4 水質関連項目と毒性値との関係

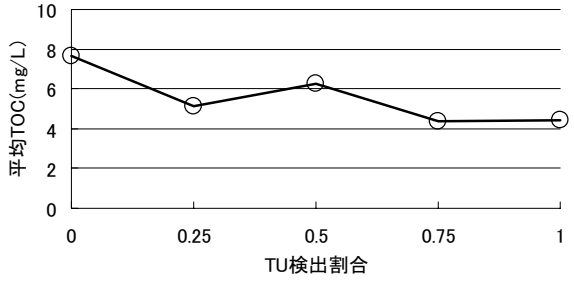


図 2-5 TU 検出割合ごとの平均 TOC 値

このように、TOC やその他の水質項目と毒性影響との相関は低く、藻類の生長に阻害を与えた原因物質はこれらの水質項目では捉えることができないことが明らかとなった。

次に、地点による毒性影響の違いを検討した。既に示した表 2-3 において、TU 検出割合ごと検出平均 TU はどれもほぼ同じ値であったことから、地点による違いはあまりないように予想される。そこで、さらに詳細に検討するため、平均 TU について、統計処理を行った。

表2-3に示されているTU検出割合ごとの地点数について、全データのうち TU が検出された割合を用いて二項検定を行ったところ、TU 検出割合ごとの地点数は有意水準 0.05 で二項分布に従う結果となった。また、表 2-3 に示されている TU が検出された場合の検出率による平均 TU 値についてｔ検定を行ったところ、いずれの組み合わせにおいても平均 TU 値に統計的に有意な差は認められなかった。さらに、図 2-3 に示した TU が検出された地点における平均 TU について正規分布への適合度の検定を 9 層分割のカイ二乗適合度検定により行ったところ、TU が検出される場合の平均 TU 値は、有意水準 0.05 で正規分布に従うことがわかった。

これらの統計処理の結果より、北浦に流入する河川における藻類への生長阻害影響については、地点による明確な違いが認められないことがわかった。

2.5 まとめと今後の課題

今回の調査における水質分析およびバイオアッセイの結果から、北浦に流入する河川ごとに物質濃度や藻類生長阻害の強さが異なっていた。

しかし、全季節の平均データで見ると、地点ごとの明確な違いは見られず、水質や藻類生長阻害がどのような要因により地点ごとに異なるかについての具体的な要因については不明であった。また、藻類生長阻害へ影響を与える要因についても不明であった。これらの要因を解明するためには、流域の土地利用(耕作地か住宅地か等)、汚水処理整備状況や農繁期等に関わる季節変動によって、毒性の要因となる物質が異なると考えられることから、流域の土地利用との関係について情報収集およびデータの解析を行っていくことが必要になってくると思われる。

また、生態系を幅広く捉える指標を検討するためには、藻類に加えて他の生物種を用いた試験も適用し、多様な生物に対する影響を把握する視点も重要である。

今後は、このような状況を踏まえ、生態系との関係が深い水質項目を探索するとともに、生態系を考慮した水質評価手法の構築を目指していく。

3. 流入排水が異なる河川における生態系調査

3.1 調査対象水域

本調査では、下水道整備が河川生態系に与える影響を主に把握するために、下水道が整備されていない水域、特に汚濁由来の主体を生活排水や畜産排水、工業排水、下水処理水等から把握できる水域に加え、汚濁負荷の少ない水域における生物相と水質に関するデータを収集し、それらのデータを整理および解析を行うことで、水質と出現する生物相との関係を検討するものである。試料の採取は平成 18 年 12 月から平成 19 年 3 月にかけて行った。

3.2 調査項目

3.2.1 水質分析項目

水温、pH、濁度、電気伝導度、DO、については、調査対象地点において携帯型水質測定器（HORIBA 社, U-22 または U-10）を河川中に投入して測定を行った。残留塩素については対象地点で採取した試水を携帯型の測定器（HACH 社, Pocket Colorimeter［DPD 法準拠］）を用いて測定した。

TOC、T-N、NH4-N、NO2-N、NO3-N、T-P、PO4-P については、対象地点においてポリビンへ河川水を採水し、分析室へ冷蔵で輸送した後、分析を行った。分析は、TOC については自動分析計（SHIMADZU 社, TOC-5000A）を用い、リンおよび窒素関連項目についてはオートアナライ

ザー（Bran Lubbe 社，TRAACS800）を用いて行った。

3.2.2 生物項目

付着藻類の分析試料は、対象地点において水中にある径 10～30cm の石を採取し、その石の表面へ 5×5cm の方形枠を当てて枠の範囲にある付着物をブラシで擦り取ることによって採取した。この作業を 5 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。なお、この混合試料のうち 1/2 量は付着物分析用試料として使用した。

採取した付着藻類分析用試料は、変質を防ぐためにホルマリンを約 5%(v/v)の割合で混ぜて生物を固定した上で分析室へ輸送した。

分析方法は定量分析とし、光学顕微鏡を用いて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細胞数を算出した。

底生動物の分析試料は、対象地点の河床へ 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た。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た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。

試料採取の対象地点は、水深が比較的浅く、流速が確保されている、いわゆる“瀬”の状態になっている所を原則として選定した。

採取した底生動物分析用試料は、変質を防ぐためにホルマリンを約 10%(v/v)の割合で混ぜて生物を固定した上で分析室へ輸送した。

分析方法は定量分析とし、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。

付着物の分析は、付着藻類採取の際に化学分析用として分取した試料を用いて、乾燥重量、強熱減量、Chl-a について分析を行った。

分析は、乾燥重量については［JIS K0102 14,2］、強熱減量については［JIS K0102 14,5］、Chl-a については［河川水質試験方法 58,4,1］に従って行い、単位面積当たりの重量として整理した。

また、試料は付着藻類用とは別に、冷蔵下で分析室へ輸送した後に分析を行った。

3.3 調査結果

3.3.1 水質

水質調査の結果として、調査地点の最大値、最小値、平均値を表 3-1 に示す。

表 3-1 水質調査結果

		最大値	最小値	平均値
電気伝導度	mS/cm	24.40	0.05	1.50
溶存酸素	mg/L	16.22	3.83	10.35
水温	℃	20.2	6.2	12.2
残留塩素（全）	mg/L	0.83	0.00	0.09
NH4-N	mg/L	5.58	0.04	0.58
NO3-N	mg/L	18.34	0.24	3.07
T-P	mg/L	1.08	0.01	0.21
T-N	mg/L	21.46	0.80	4.55
TOC	mg/L	9.39	0.19	2.48

いずれの項目についても、広い範囲にわたっていた。排水の種類による傾向としては、水温や残留塩素は下水処理水の混入率が高い試料水で高く、栄養塩類、有機物質は、下水処理水の混入率が高い試料水、含畜産系排水試料水、及び、下水道が未整備で浄化槽排水を含む試料水で比較的高い濃度であった。ただし、下水処理水の混入率が高い試料水については、いくつかの項目で濃度が低いケースも見られたが、これは処理状況による水質改善効果によるものと考えられた。

3.3.2 生物項目

生物調査結果として、調査地点の最大値、最小値、平均値を表 3-2 に示す。なお、Shannon-Wiener の多様度指数 H’は式(2)により算出される。

表 3-2 生物調査結果

		最大値	最小値	平均値
Chl-a	μg/cm2	46.40	0.84	16.40
総細胞数	cells/mm2	261006	221	47032
出現種数	種	30	6	23
多様度指数	[shannon]	3.65	0.00	1.55
藍藻類細胞数	cells/mm2	132000	0	20568
珪藻類細胞数	cells/mm2	68525	6	7950
緑藻類細胞数	cells/mm2	261000	0	17908
その他の綱細胞数	cells/mm2	5310	0	606
Chlorolobion細胞数	cells/mm2	261000	0	13737
糸状藻類細胞数	cells/mm2	132304	2	25452
糸状藻類出現種数	種	5	1	2.3
出現種数	種	56	3	27
総個体数	inds./m2	35469	105	10327
多様度指数	[shannon]	4.93	0.73	3.13
総湿重量	g/m2	82.91	0.27	21.98
ミミズ綱	inds./m2	12723	20	1561
ヒル綱	inds./m2	60	0	10
ワラジムシ目	inds./m2	237	0	48
カゲロウ目	inds./m2	14089	0	2024
カワゲラ目	inds./m2	960	0	103
トビケラ目	inds./m2	10026	0	1666
ユスリカ科	inds./m2	29340	30	3949

$$H' = -\sum_{i=1}^{s} (ni/N)\ln(ni/N) \quad (2)$$

S=総出現種数，n_i=i 番目の種の個体数，N=総細胞（個体）数

水質の分析結果同様、いずれの項目も広い範囲にわたって観測された。排水の種類による傾向としては、含浄

化槽排水ではユスリカ以外の底生動物個体数が少ない傾向、下水処理水を含む試料水ではChl-aが高い傾向、底生動物の出現種数や多様度指数は含浄化槽排水と含畜産排水で低くなる傾向が見られたが、河床条件の違いもあり、水質項目ほど明確ではなかった。

3.4 考察

おおまかにではあるが、排水の種類により水質や生態系が異なる結果が観察されたことから、これらには関連があり、水質が水生生態系に影響を与えている可能性がある。そこで、他の試料採取箇所を含め、水質項目と生物調査項目との相関を調べた。その結果を表3-3に示す。この表から、付着藻類の細胞数と残留塩素との相関、底生動物の出現種数と水温との相関のように、下水処理水の流入により影響を受けると考えられている項目で高い相関が見られた他、含浄化槽排水と含畜産排水で低くなる傾向が見られた底生動物の出現種数や多様度指数については、強くはないものの、栄養塩類や有機物濃度と負の相関が見られた。今回の調査においては試料数、水質分析項目数等が十分でなかったこと、水生生態系は河床条件や下位の生物等に影響を受けやすいこと等により、排水の種類による水生生態系への影響は明確には得られなかったものの、より詳細な調査により、排水の種類による水生生態系への影響を明らかにすることができる可能性があると考えられる。

3.5 まとめと今後の課題

様々な排水、特に下水処理水が流入する地点における付着藻類と底生生物の調査を行った結果、下水処理水の流入による影響としてこれまで明らかになっている生態系の変化のみならず、排水の種類により水生生態系が影響を受ける可能性が推測された。

今後は、調査水域や季節を増やしての調査や実験施設を用いる調査により、こういった知見をさらに明らかにし、排水の違い等による水質特性と生態系との関係をより詳細に解明していく予定である。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

参考文献

1） Blaise,C., Legault,R., Bermingham,N., VanCoillie,R., Vasseur,P. :A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment, Toxicity Assessment, 1, pp.261-281, 1986

2) St-laurent,D., Blaise,C., Macquarrie,P., Scroggins,R., Trottier,B. :Comparative assessment of herbicide phyto toxicity to Selenastrum capricornutum using microplate and flask bioassay procedure, Environ.Toxicol.Wat.Qual., 7, pp.35-48, 1992

3) USEPA. Technical Support Document For Water Quality-based Toxics Control, EPA/505/2-90-001. 1991

表3-3 水質項目と生物項目との相関

		電気伝導度	溶存酸素	水温	残留塩素(全)	NH4-N	NO3-N	T-P	T-N	TOC
付着藻類	Chl-a	0.76	−0.06	0.54	0.31	0.01	0.08	0.47	0.12	0.70
	総細胞数	0.28	0.00	0.34	0.73	0.10	−0.21	0.21	−0.14	0.30
	出現種数	−0.21	0.39	−0.44	−0.65	−0.32	0.19	−0.18	0.05	−0.41
	多様度指数	0.28	−0.26	0.22	−0.19	−0.10	0.40	0.15	0.32	−0.06
	藍藻類細胞数	−0.23	0.42	−0.25	−0.19	−0.21	−0.20	−0.08	−0.25	−0.18
	珪藻類細胞数	0.44	−0.49	0.22	−0.10	0.79	0.02	0.79	0.31	0.72
	緑藻類細胞数	0.30	−0.10	0.43	0.90	0.02	−0.13	0.06	−0.10	0.23
	その他の綱細胞数	0.38	−0.45	0.40	−0.15	0.17	0.76	0.03	0.72	0.25
	Chlorolobion細胞数	0.22	−0.06	0.42	0.95	−0.09	−0.16	0.08	−0.16	0.15
	糸状藻類細胞数	−0.07	0.32	−0.20	−0.23	−0.03	−0.13	−0.11	−0.12	−0.04
	糸状藻類出現種数	0.35	0.13	0.00	−0.32	0.23	0.01	0.07	0.11	0.14
底生動物	出現種数	−0.74	0.65	−0.82	−0.37	−0.50	−0.33	−0.55	−0.48	−0.69
	総個体数	0.23	−0.21	−0.20	−0.29	0.47	0.13	0.21	0.27	0.21
	多様度指数	−0.70	0.73	−0.57	−0.06	−0.65	−0.40	−0.81	−0.58	−0.70
	総湿重量	−0.05	0.23	−0.46	−0.23	0.00	−0.04	−0.10	−0.05	−0.21
	ミミズ綱個体数	0.48	−0.37	0.16	−0.10	0.19	0.87	0.19	0.80	0.08
	ヒル綱個体数	0.24	0.25	0.08	−0.14	0.16	0.11	−0.15	0.16	0.11
	ワラジムシ目個体数	0.01	0.28	0.11	−0.12	−0.27	−0.19	−0.18	−0.25	−0.36
	カゲロウ目個体数	−0.15	0.31	−0.47	−0.15	−0.16	−0.23	−0.24	−0.26	−0.35
	カワゲラ目個体数	−0.43	0.16	−0.48	−0.13	−0.17	−0.21	−0.24	−0.27	−0.33
	トビケラ目個体数	0.02	0.25	−0.23	−0.18	−0.22	−0.11	−0.22	−0.17	−0.23
	ユスリカ科個体数	0.28	−0.53	0.08	−0.19	0.85	0.03	0.53	0.33	0.67

底質の酸素条件が藻類増殖に与える影響に関する調査

水環境研究グループ水質チーム　上席研究員　鈴木　穣
主任研究員　阿部　千雅
専門研究員　中薗　孝裕

１．はじめに

湖沼においては「湖沼の水環境の保全に関する政策評価書（平成 16 年 8 月，総務省)」で指摘されているように，底泥浚渫や流域の下水道整備などの水質改善施策が行われてきた．霞ヶ浦においても，依然として N・P 濃度が高い状態である．しかし近年，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．一方，これらの湖沼においては，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．

よって本調査においては，１）底質の酸素濃度，N・P 濃度，微量必須元素濃度の分布を調査するとともに，２）異なる酸素条件下において底質の性状・酸素条件と各物質動態の関係を明らかにし，３）湖沼水の藻類増殖能力を測定し，水質と藻類増殖特性との関係を明らかにすることを目的とする．更に，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を評価する．

２．研究内容および方法

今年度は霞ヶ浦（西浦・北浦）と琵琶湖（南湖）を対象に水質と底質調査を行い，現地にて採取した底泥を用いた底質の性状分析や溶出試験を実施し，それらの結果から栄養塩等の移動・溶出の実態把握と藻類増殖に影響を与える底質の改善効果についての検討を行った．

(1) 採取地点と時期

霞ヶ浦の調査地点を図－1，琵琶湖（南湖）の調査地点を図－2 に示す．霞ヶ浦は西浦の湖心と北浦の釜谷沖の２地点を対象に実施した．平成 18 年の 8 月 28 日に霞ヶ浦（北浦），8 月 31 日に霞ヶ浦（西浦）および 9 月 20 日に琵琶湖（南湖）の夏季底泥を採取し各供試実験に用いた．なお今回の調査地点の水深は霞ヶ浦 6～7m，琵琶湖で約 4m であり，底泥上の直上水（50cm 付近）の DO は霞ヶ浦で約 7mg/L，琵琶湖で約 9mg/L であった．

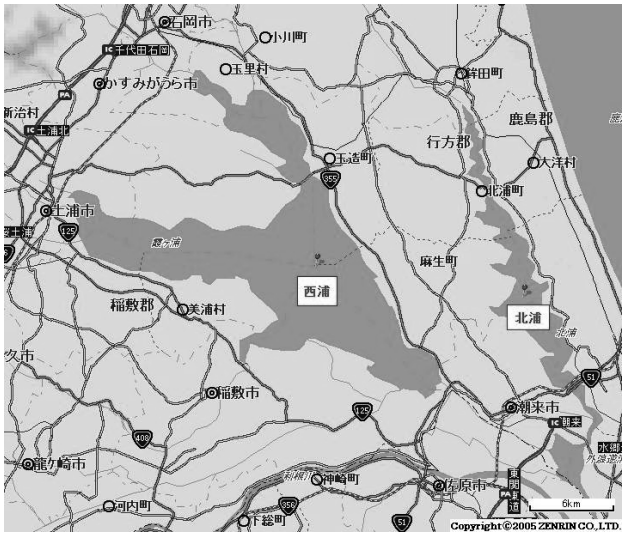


図-1　調査対象地点（霞ヶ浦：西浦、北浦）

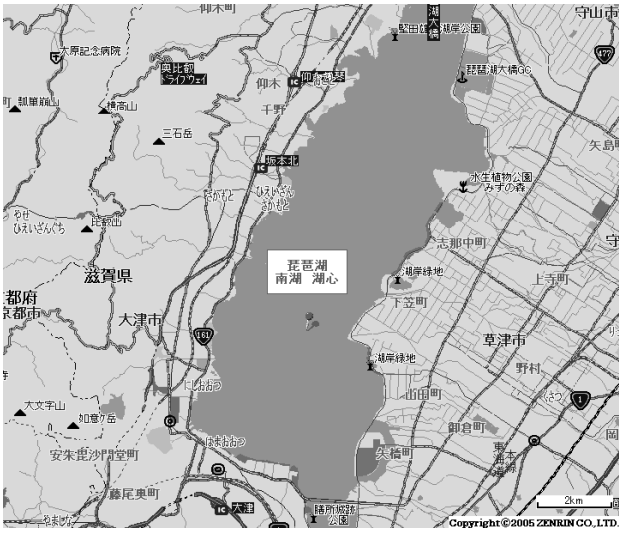


図-2　調査対象地点（琵琶湖：南湖）

(2) 採泥・採水方法

①底泥試料

各地点における底泥の採取は，船上より HR 型不攪乱柱状採泥器（離合社製）および，透明アクリル製円筒型カラム（内径：φ10cm×H50cm とφ4cm×H50cm）を用いて行った．採泥時は，コアサンプル中の底質量がコア高さで 30㎝以上となるように採取した．採取した試料カラムは，低温を保ち底泥表面が攪乱しないよう養生し，速やかに 20℃に温度管理された実験室に運搬した．

②湖水試料

各調査地点において，表層（水面から 50㎝付近）・中層（水深の中間）・下層（底泥表面から 50㎝付近）の 3 湖水試料について各 2L を船上から採水器（バンドーン型）を用いてポリ容器に採取した．なお，底泥溶出試験に必要な直上水試料（下層と同じ）の必要量を同様に採取し，低温状態で輸送した．

(3) 測定項目

底泥及び湖水等の環境条件の観測として，各調査地点の気温，水温，pH，酸化還元電位（ORP），電気伝導率（EC），溶存酸素（DO），濁度を測定した．湖水は，表層から底層直上まで水深方向に 50cm ピッチで携帯型多項目水質計（HORIBA 製：W-22XD）を用いて測定した．他項目の水質は別途，各地点より採取した湖水について，公定法により分析に供した．N,P については，ｵｰﾄｱﾅﾗｲｻﾞｰ（ﾌﾞﾗﾝ・ﾙｰﾍﾞ社製）にて NH_4-N,NO_2-N,NO_3-N,T-N,PO_4-P および T-P の分析を行った．また，底泥の栄養塩含有量等は，カラムに採取した底質の深さ方向 5cm ピッチについて測定した．

(4) 底泥溶出試験

現地にて簡易柱状採泥した試料を，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（1.0μm）にてろ過後，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℃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 N_2曝気による低酸素条件（DO：1mg/L 以下）で行った． なお，湖水中の溶解性 Mn 濃度が極端に低かったため，試験開始時に Mn 濃度が 200μg/L となるように，Mn 溶液を添加した．

３．結果および考察

(1) 現地測定・分析結果

現地測定の夏季調査結果を地点別に気象，水質，底質について表 1～10 に示す．水温は霞ヶ浦で 28℃，琵琶湖（南湖）で 25℃付近であり，DO は 7～9mg/L であった．水中の下層（直上水）の T-N/T-P 比は霞ヶ浦（北浦）で 9.8，霞ヶ浦（西浦）で 6.6 および琵琶湖（南湖）で 2.1 と，霞ヶ浦（北浦）が最も高く，琵琶湖（南湖）が最も低い値を示した．なお，本数値は一般的に言われているアオコ発生の N/P 比：10～20 以下[1)]であるが，一時的な値で変動があるために，傾向を見る上での参考値とした．

次に底泥中の酸化還元電位（ORP）の値について見ると，表層（0～5cm）で霞ヶ浦（北浦）が－278mV，霞ヶ浦（西浦）が－250mV，琵琶湖（南湖）で－159mV と底泥中の汚濁による還元状態の進行は霞ヶ浦（北浦）が最も高く，次に霞ヶ浦（西浦），琵琶湖（南湖）が最も低い値を示した．なお，琵琶湖（南湖）の調査時には，調査地点を含む広範囲で沈水植物のクロモが多量に発生しており，クロモによる底泥からの栄養塩類の吸収と更には水中への放出が行われており，特にクロモの繁茂していた下層付近の T-P 濃度が高い結果より，その影響が多少あると推察される．

表-1　現地測定（気象）

地点	試料	日程	開始時刻	天候	気温
霞ヶ浦：北浦（釜谷沖）	水質	H18.8.28	9:30	晴曇	28.4℃
	底質		11:00	晴曇	27.0℃
霞ヶ浦：西浦（湖心）	水質	H18.8.31	9:30	晴	31.0℃
	底質		10:00	晴	31.0℃
琵琶湖：南湖（湖心）	水質	H18.9.20	9:55	晴	27.0℃
	底質		11:45	晴	27.0℃

表-2　現地測定結果（霞ヶ浦　北浦：水質）

採取層	水深	pH	EC	濁度	DO	水温	ORP
	m	－	mS/m	-	mg/L	℃	mV
上層	0.5	8.50	31.3	8.3	8.36	28.7	101
中層	3.0	8.33	31.4	13.1	7.52	28.4	104
下層	6.0	8.32	31.6	12.0	7.36	28.3	109

表-3　水質分析結果（霞ヶ浦　北浦）

採取層	NH_4-N	T-N	PO_4-P	T-P	TOC
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
上層	0.015	2.05	0.026	0.32	8.58
中層	0.015	1.24	0.027	0.14	6.32
下層	0.025	1.23	0.024	0.13	6.15

表-4　現地測定結果（霞ヶ浦　北浦：底質）

採取層	鉛直分布	ORP	泥温	pH
	cm	mV	℃	-
上層	0～5	－278	28.2	6.87
中層	10～15	－260	27.6	6.84
下層	20～25	－270	27.1	6.93

表-5　現地測定結果（霞ヶ浦　西浦：水質）

採取層	水深	pH	EC	濁度	DO	水温	ORP
	m	－	mS/m	-	mg/L	℃	mV
上層	0.5	8.48	38.3	7.71	8.58	28.2	118
中層	3.0	8.13	38.4	8.91	7.64	27.6	125
下層	6.0	8.05	38.5	9.94	7.31	27.6	127

表-6　水質分析結果（霞ヶ浦　西浦）

採取層	NH_4-N	T-N	PO_4-P	T-P	TOC
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
上層	0.027	0.88	0.019	0.09	4.99
中層	0.036	0.93	0.023	0.15	4.95
下層	0.043	0.94	0.024	0.14	4.97

表-7　現地測定結果（霞ヶ浦　西浦：底質）

採取層	鉛直分布	ORP	泥温	pH
	cm	mV	℃	-
上層	0～5	－250	27.7	6.79
中層	10～15	－237	27.3	6.79
下層	20～25	－262	27.2	6.78

表-8　現地測定結果（琵琶湖　南湖：水質）

採取層	水深	pH	EC	濁度	DO	水温	ORP
	m	－	mS/m	-	mg/L	℃	mV
上層	0.5	8.78	13.6	0.2	9.61	24.9	185
中層	2.0	8.79	13.6	0.5	9.87	24.8	195
下層	4.0	8.75	13.6	0.3	9.35	24.7	196

表-9　水質分析結果（琵琶湖　南湖）

採取層	NH_4-N	T-N	PO_4-P	T-P	TOC
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
上層	0.022	0.39	0.022	0.05	1.97
中層	0.024	0.36	0.015	0.05	2.00
下層	0.022	0.47	0.013	0.23	2.04

表-10　現地測定結果（琵琶湖　南湖：底質）

採取層	鉛直分布	ORP	泥温	pH
	cm	mV	℃	-
上層	0～5	－159	25.8	7.05
中層	10～15	－160	26.1	6.68
下層	20～25	－142	25.7	6.76

(2) 水質および底質の性状分析

底泥直上水中の TOC（全有機炭素）を図－3 に示す．TOC を水域別に見ると霞ヶ浦（北浦）：6.15mg/L＞霞ヶ浦（西浦）：4.97mg/L＞琵琶湖（南湖）：2.04mg/L となり，琵琶湖（南湖）に比べ霞ヶ浦（西浦）は 2.4 倍，霞ヶ浦（北浦）は 3.0 倍と高い値を示した．この TOC 値は，底泥の強熱減量と同様に有機物量の指標であり，流域からの有機物負荷の他，湖内での藻類増殖が影響するものであり，霞ヶ浦（北浦）における富栄養化の程度が高いことが推察される．

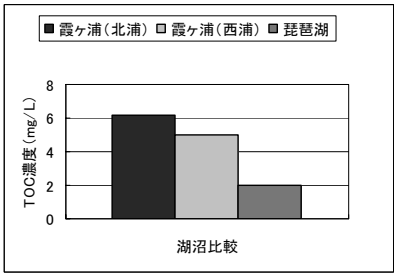


図-3　直上水中の TOC 濃度比較

湖沼底泥の性状分析結果を図－4 に示す．各水域とも底泥と水面の接する表層付近が高く，霞ヶ浦（北浦）＞霞ヶ浦（西浦）＞琵琶湖（南湖）の含水比であった．特に霞ヶ浦（北浦）の表層付近においては含水比が 1000%を超えヘドロに近い性状であった．一方，琵琶湖（南湖）では含水比が 500%を超えるものは無く，密度も高い傾向を示した．

強熱減量（IL）を水域別に見ると霞ヶ浦（北浦）＞霞ヶ浦（西浦）＞琵琶湖（南湖）となり，琵琶湖（南湖）の平均が 8%と低い値に対し，霞ヶ浦（西浦）は 15%，霞ヶ浦（北浦）で 17%と約 2 倍の高い値を示した．先の TOC 値と同じく，底泥に対する有機物負荷（流域流出あるいは湖水中藻類）が高いことを示している．

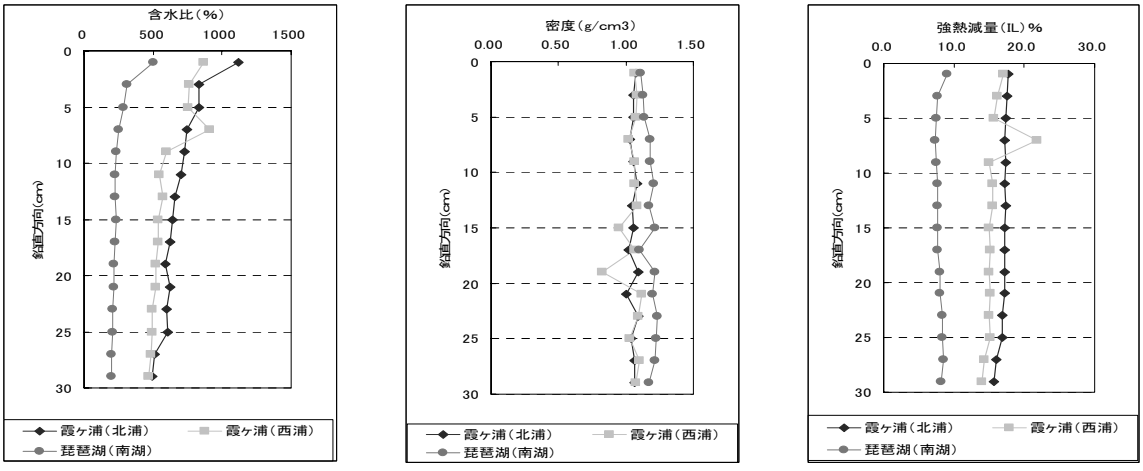


図-4　湖沼底泥の物性（含水比、密度、強熱減量）

(3) 底泥の物質含有量

底泥中の全リン，全窒素，全炭素の含有量を図－5 に示す．全リン，全窒素，全炭素はともに霞ヶ浦（北浦）＞霞ヶ浦（西浦）＞琵琶湖（南湖）となり，霞ヶ浦の底泥においては，西浦と北浦とも表層が高く下層の方が低い傾向を示した．

全リンについて見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 0.71mg/g(dwt)，最小 : 0.52 mg/g(dwt)，平均 : 0.62 mg/g(dwt)であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 1.4mg/g(dwt)，最小 : 0.83 mg/g(dwt)，平均 : 1.3 mg/g(dwt)であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 1.2mg/g(dwt)，最小 : 0.86 mg/g(dwt)，平均 : 1.1 mg/g(dwt)と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦が約 2 倍の値を示した．

全窒素について見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 3.2mg/g(dwt)，最小 : 1.7 mg/g(dwt)，平均 : 2.2mg/g(dwt)であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 8.9mg/g(dwt)，最小 : 7.2 mg/g(dwt)，平均が 8.3 mg/g(dwt)であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 7.2mg/g(dwt)，最小 : 6.0 mg/g(dwt)，平均 : 6.8 mg/g(dwt)と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦が 3 倍以上の値を示した．

全炭素について見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 29mg/g(dwt)，最小 : 21mg/g(dwt)，平均 : 24mg/g(dwt)であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 72mg/g(dwt)，最小 : 60 mg/g(dwt)，平均 : 68 mg/g(dwt)であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 59mg/g(dwt)，最小 : 53 mg/g(dwt)，平均 : 57mg/g(dwt)と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦が 2 倍以上の値を示した．

以上のことから，底泥の栄養塩類含有量は琵琶湖（南湖）に比べ霞ヶ浦の方が高く，更に西浦に比べ北浦が高い結果であった．

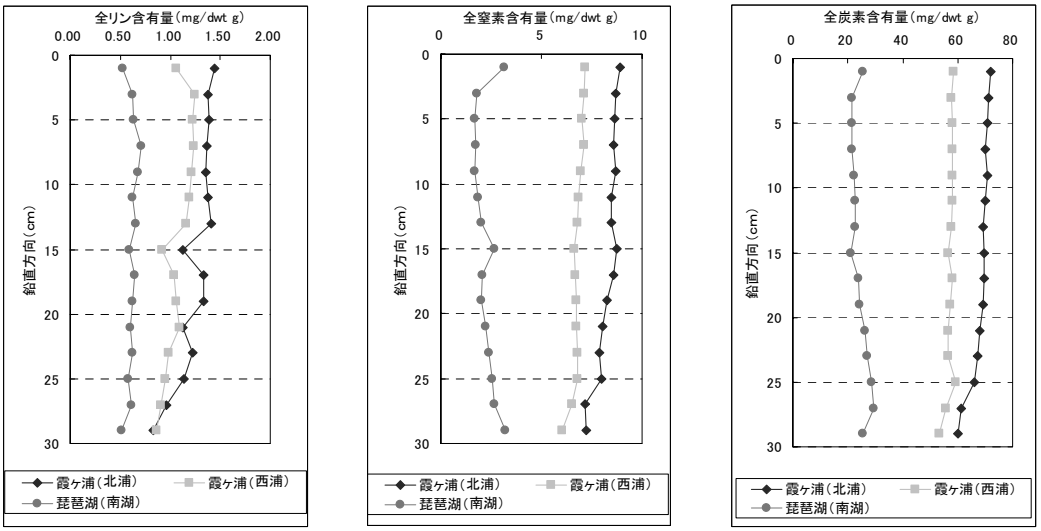


図-5　湖沼底泥中の全リン、全窒素、全炭素の含有量

底泥間隙水中の NH_4-N、PO_4-P，DOC の含有量を図－6 に示す．NH_4-N について見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 2.0mg/L，最小 : 0.43mg/L，平均 : 1.2mg/L であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 4.2mg/L，最小 : 1.8mg/L，平均が 3.6mg/L であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 3.8mg/L，最小 : 2.0mg/L，平均 : 3.0mg/L と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦が 2 倍以上の値を示した．

PO_4-P について見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 0.11mg/L，最小 : 0.01mg/L，平均 : 0.04mg/L であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 1.6mg/L，最小 : 0.06mg/L，平均が 0.60mg/L であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 0.24mg/L，最小 : 0mg/L，平均 : 0.08mg/L と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦（西浦）で 2 倍，霞ヶ浦（北浦）

で 15 倍の値を示した.

また，DOC について見ると琵琶湖（南湖）の最大値は 10mg/L，最小：2.0mg/L，平均：6.6mg/L であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）の最大値は 14mg/L，最小：8.6mg/L，平均が 10mg/L であり，霞ヶ浦（西浦）の最大値は 15mg/L，最小：7.4mg/L，平均：9.6mg/L と，琵琶湖の平均値に比べ霞ヶ浦が約 1.5 倍の値を示した.

水域別では NH_4-N，PO_4-P，DOC ともに霞ヶ浦（北浦）＞霞ヶ浦（西浦）＞琵琶湖（南湖）となり，底泥の分析結果同様に間隙水も琵琶湖（南湖）が低い値を示した．この間隙水濃度を把握することは，先に結果を得た底泥中の栄養塩類含有量から間隙水に移行し，水中に溶出・回帰する機構において重要である．以上のことからも琵琶湖（南湖）に比べ，霞ヶ浦の底泥が持つ栄養塩類のポテンシャルが高いことが分かる.

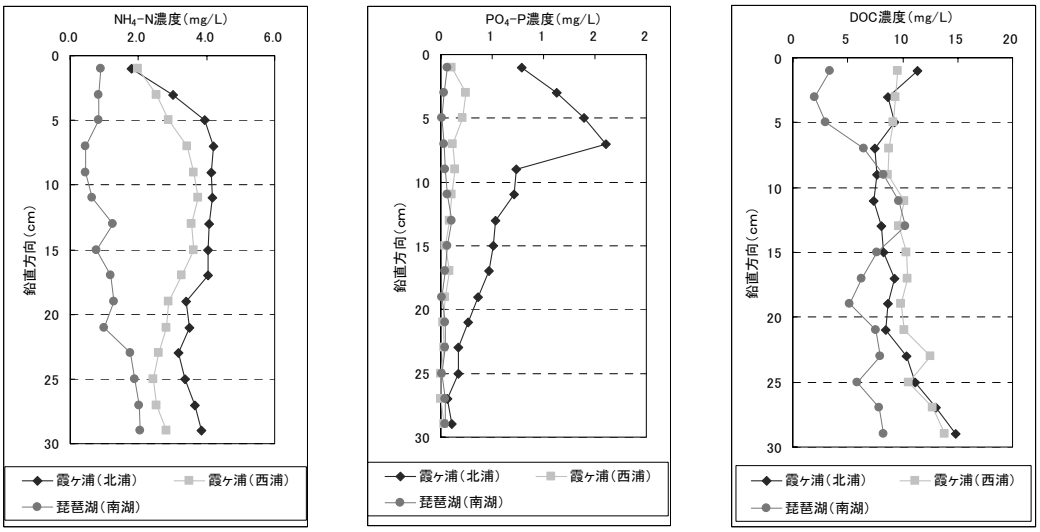


図-6　湖沼底泥間隙水中の NH_4-N、PO_4-P、DOC の含有量

(4) 底泥溶出試験

底泥の溶出試験結果を図－7，図－8 に示す．好気条件における PO_4-P の溶出速度は琵琶湖で 0.7mg/m²/day であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）で 3.0mg/m²/day，霞ヶ浦（西浦）で 3.2 mg/m²/day と約 4 倍の溶出速度であった．低酸素条件における PO_4-P の溶出速度は琵琶湖で 11 mg/m²/day と好気条件に比べて 10 倍以上に増大し，霞ヶ浦においても北浦で 21 mg/m²/day，西浦で 8.6 mg/m²/day と増大したが，北浦の溶出速度が最も大きかった.

好気条件における NH_4-N の溶出速度は琵琶湖で 0.7mg/m2/day であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）で 17 mg/m²/day，霞ヶ浦（西浦）で 36 mg/m²/day と非常に高い溶出を示した．低酸素条件においては琵琶湖で 11 mg/m²/day であるのに対し，霞ヶ浦（北浦）で 22 mg/m²/day，霞ヶ浦（西浦）で 8.3 mg/m²/day の溶出速度であった.

本試験結果から，現在の各水域を再現した好気条件下における PO_4-P と NH_4-N の溶出速度は霞ヶ浦（北浦・西浦）＞琵琶湖（南湖）であった．本試験より夏場において水中の溶存酸素濃度（DO）が好気条件下であれば，低酸素条件下に比べ溶出が抑えられており，底泥付近における DO 濃度の保持が水質汚濁防止の観点から重要であると考えられる.

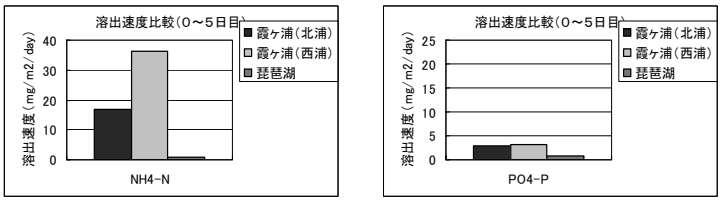


図-7 湖沼底泥の溶出速度（好気条件下）

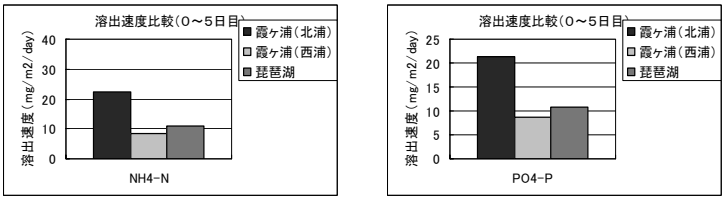


図-8 湖沼底泥の溶出速度（低酸素条件下）

(5) 湖沼底泥の酸素消費速度

各水域における底泥の酸素消費速度測定は 20℃の暗室にて行った．その結果を図－9 に示す．酸素消費は初期が大きくなっていたことから，0～5 日目の値で酸素消費速度を算出した．酸素消費速度を水域別に見ると，霞ヶ浦（北浦）：0.34g/m²/day＞霞ヶ浦（西浦）：0.29g/m²/day＞琵琶湖（南湖）：0.26 g/m²/day となり，酸素消費速度の値も底泥の有機物量と同様の傾向を示した．

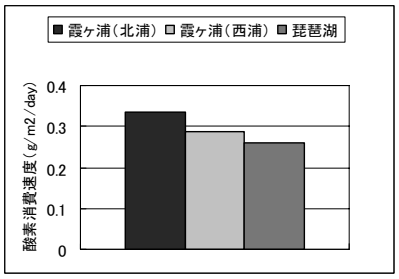


図-9 湖沼底泥の酸素消費速度

(6) 微量必須元素調査

霞ヶ浦（西浦・北浦）底泥の溶出試験における金属類（鉄，マンガン）の溶出挙動を図－10 に示す．鉄，マンガンは実験初期に低下する挙動を示し，底層中に NO_3-N が存在するような酸化還元状態であれば，底泥のごく表層で金属酸化物への吸着や微生物による酸化反応が生じていると考えられる．

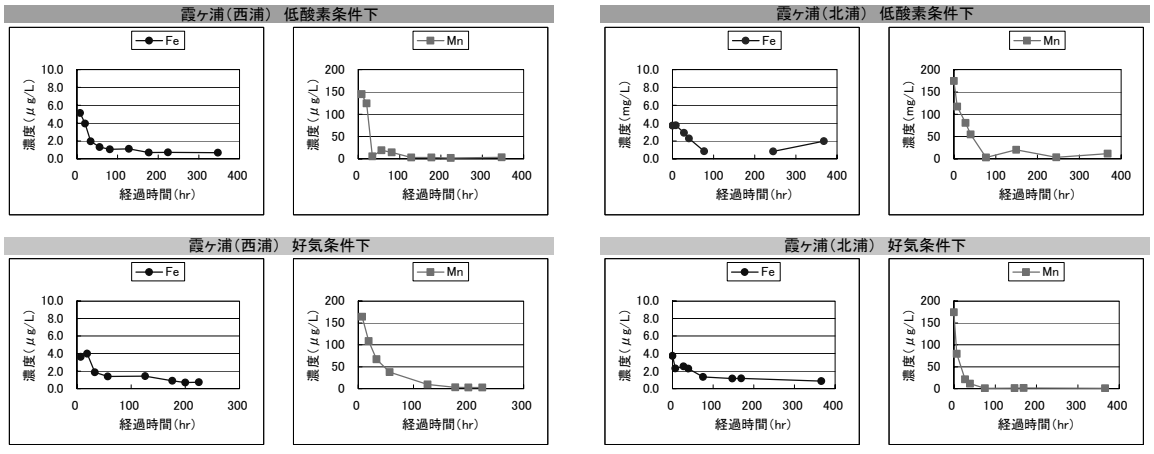


図-10 底泥溶出試験における鉄，マンガンの挙動（左：西浦、右：北浦）

霞ヶ浦（西浦）底泥を用いた酸素条件および微生物活性の有無における金属類（鉄，マンガン）の溶出挙動を図－11 に示す．無加温条件においては鉄，マンガンとも低下したが，加温して微生物活性を抑制した場合には，鉄，マンガンはかえって増加を示した．このことから，底泥表面近くに存在するマンガン酸化細菌が湖水中の溶存態マンガンを酸化して不溶化している機構が考えられる．

なお，加温した低酸素条件化において鉄，マンガン濃度が上昇したのは，微生物の不活性により，体内に取り込まれた金属類が溶出した影響と考えられる．

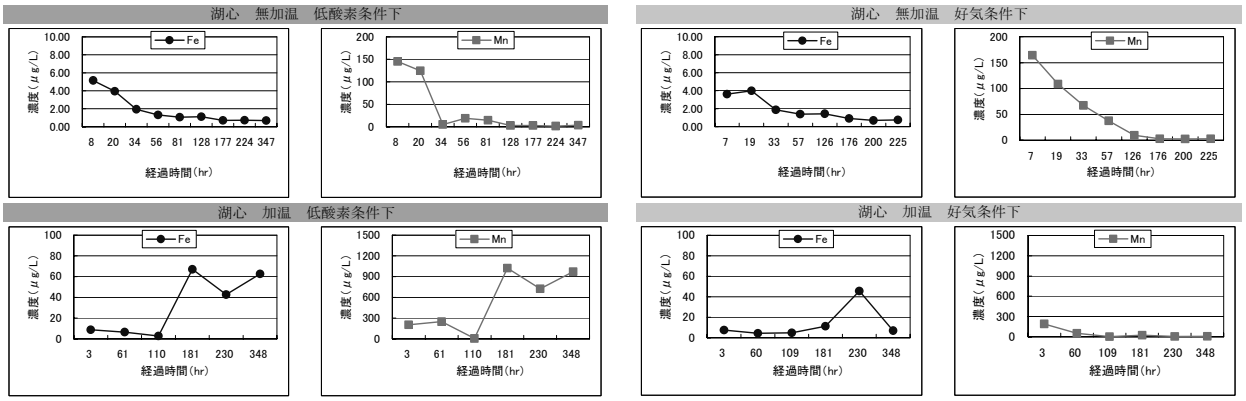


図-11　酸素条件および微生物活性の有無における鉄・マンガンの挙動（左：低酸素、右：好気）

４．まとめ

異なる水域として夏季の霞ヶ浦（西浦・北浦）と琵琶湖（南湖）を対象に水質と底質調査を行い，水質や底質の性状分析と底泥溶出試験から，底質改善効果が進行している琵琶湖（南湖）が低い結果であることが分かった．また，下水道整備の進んだ琵琶湖（南湖）と今後の更なる普及が期待される霞ヶ浦（西浦・北浦）の状況から底質有機物の汚濁負荷と酸素条件に及ぼす影響の要因が確認された．

今後，高水温期と低水温期においての酸素条件の違いによる底泥と湖水間における微量金属類・栄養塩類等の物質移動と，底質改善による酸素消費速度への影響を詳細に把握することで，藻類増殖へ及ぼす影響について検討を進める．

※　なお，本調査は運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである．

参考文献

１）吉田陽一編（1993）水域の窒素：リン比と水産生物，（社）日本水産学会，p107-113

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　鈴木　穣
北村　友一

研究期間　平成１８年度～２１年度
平成１８年度当初予算　１５，８４１千円
（研究予算総額　６９，９５１千円）

Study on origin, quality and behavior of recalcitrant dissolved organic matter in lakes

(FY2006-2009)

Yutaka SUZUKI and Tomokazu KITAMURA
Water Quality Team, Water Environment Research Group

Incorparated Administrative Agency Public Works Research Institute
Ministry of Land, Infrastructure and Transport

To identify and elucidate origin, quality and behavior of the recalcitrant dissolved organic matter (DOM) in the eutrophic lakes, it is essential to develop methodologies and/or indices for characterization of DOM. In fiscal 2006, the fluorescence characteristics of DOM in Kasumigaura Lake, Lake Biwa and their inflowing rivers were investigated with three dimensions excitation-emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy. Inorganic components and impurities in Lake Biwa DOM were removed by gel filtration chromatograph. The purified DOM was fractionated based upon polarity by normal phase HPLC. Furthermore, partial structures of a fraction of Lake Biwa DOM were estimated by means of FTIR, ^{1}H-NMR, and LC/ESI-MS. Results in the fiscal year were as follows:

1) Major seven peaks at the position of Ex230/Em300 (Peak1), Ex230/Em340 (Peak2), Ex230/Em425 (Peak3), Ex280/Em340 (Peak4), Ex320/Em425 (Peak5), Ex345/Ex435 (Peak6), Ex500/Em525 (Peak7) were found in the EEMs spectra of the Kasumigaura Lake, Lake Biwa, and the river waters;
2) The Peak2 was found in most spectra of river waters. It is considered that Peak2 could be originated from fulvic acid-like organic matters. There were the correlations between the fluorescence intensity (*e.g.*, Peak2, Peak3 and Peak4) and DOC;
3) The following clarified from EEMs of every water depth of Lake Biwa. The intesity of Peak2 and Peak4 rose with the decrease of the water depth. DOC also showed similar relationships with water depth. The intensity of Peak3, Peak5, and Peak6 rose with increase of the water

depth. The Peak2 and Peak4 were thought to be affected by the phytoplankton activities. It is indicated that organic matteres appeared at Peak3, Peak4, and Peak5 are supplied from rivers, bottom mud and sediments of the lakes;

4) DOC detected in the Lake Biwa might be a non-fluorescent organic matter;
5) Lake Biwa DOM was fractionated into major five fractions based on polarity by normal phase HPLC; and
6) It was suggested that major component of Lake Biwa DOM could be saturated/unsaturated fatty acids from FT-IR, ^{1}H-NMR, and NP-HPLC/ESI-MS analyses.

1. はじめに

近年、流域からの湖沼への汚濁負荷は下水道整備などの発生源対策により減少傾向にあるものの、湖沼中の有機物濃度は横ばいあるいは漸増傾向が観察されている。琵琶湖では、BOD は減少傾向にあるものの、COD は増加傾向を示している。この現象は湖内で難分解性有機物が増加していることを示しており、琵琶湖では、難分解性有機物による水質汚濁が進みつつあることを意味する。

湖水等に存在している難分解性有機物は、フミン物質などの溶存有機物と考えられてきたが、精密な定性分析は行われておらず、それらの発生源、挙動等の詳細が解明されていないのが現状である。また、湖水は水道水源としても利用されており、湖水中の難分解性有機物が水道水を介してヒトの健康に影響を及ぼすことも懸念される。

本研究では、湖水に蓄積される難分解性有機物をその特性により詳細に分類し、発生源と質・量的特性を明らかにするとともに、難分解性有機物の生分解実験等から湖沼における挙動・動態を明らかにすることを目的としている。

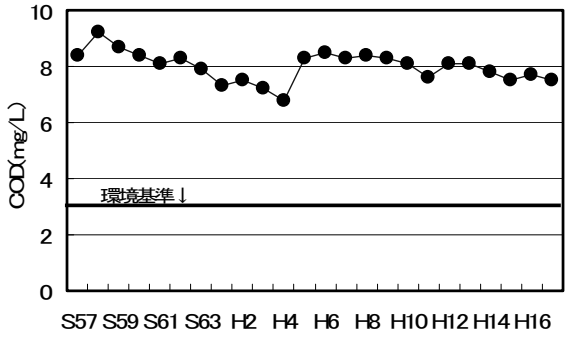


図 1-1　霞ヶ浦の COD の経年変化 [1)2)]

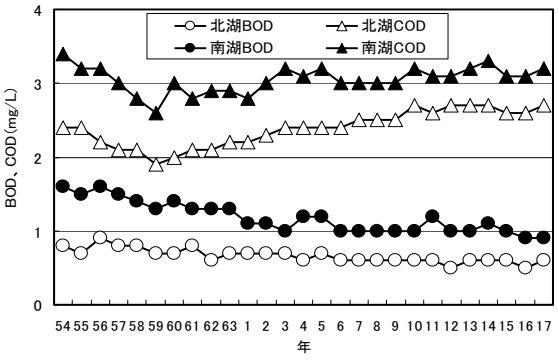


図 1-2　琵琶湖の COD と BOD の経年変化 [3)]

2. 18 年度の研究

図 2.1 に示したとおり、湖水の COD の 9 割近くは溶存態であることから、本研究では溶存態有機物を調査・研究対象とした。溶存有機物の発生源や挙動を調査するためには、はじめに、溶存有機物を分類し、それらを分析する必要がある。そこで、18 年度は、霞ヶ浦と琵琶湖を調査対象とし、溶存有機物の蛍光分析による簡易分析法と HPLC（高速液体クロマトグラフ）、IR（赤外吸収）、NMR（核磁気共鳴）、質量分析を用いた詳細分析についての検討を行った。

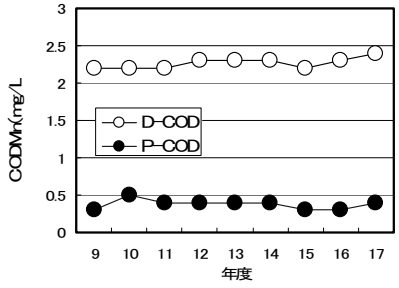


図 2-1　琵琶湖北湖の D-COD と PCOD の経年変化
D-COD（溶存態物質の化学的酸素要求量）
P-COD（粒子態物質の化学的酸素要求量）

2.1　3次元蛍光光度計による簡易分析の適用性

本研究では、水中の溶存有機物の簡易分析法として、蛍光分光光度計を用いた3次元励起･蛍光分光法（three dimensions excitation-emission matrix spectroscopy: 3D-EEMs）を採用した。3D-EEMs は、励起波長を連続的に変化させながらスキャンし、横軸を蛍光波長(Em)、縦軸を励起波長(Ex)として蛍光強度を等高線グラフとして表示させたものである。EEMs のピーク形状や位置から、簡易に水中の溶存有機物の定性と定量が可能であると報告されている [4]。そこで、霞ヶ浦と琵琶湖の流入河川水および湖水のろ液を試験水とし、これらの 3D-EEMs を測定し、どのような 3D-EEMs が得られ、水中の有機物の定性が可能かどうか検討した。さらに、得られた蛍光特性と一般的な水質分析項目（溶存性有機性炭素:DOC、溶存性 CODcr、溶解性窒素 NH_4-N、NO_{2+3}-N、PO_4-P）を比較し、蛍光物質の由来について考察した。

2.2　NMR,ESI-MS,FT-IR の溶存有機物への適用

本研究では、最終目標の１つとして湖沼に蓄積する難分解性有機物の詳細な分類方法の提案することを目指している。本年度は、その前段として琵琶湖溶存有機物に対して ^{1}H-NMR、LC/ESI-MS および FT-IR の適用を試みた。これらの分析手法は、有機物の構造解析において汎用的な方法であり、湖沼の有機物の構造を解明する目的に対しても有効であると考えられる。しかし、我が国の河川や湖沼等においてはその有機物濃度が低いことから、分析に必要かつ十分な質および量の試料を得ることが困難であった。そのため、網羅的かつ詳細な定性・定量分析はほとんど行われていないのが現状である。本研究では、これらの問題を解決するために、ゲルろ過および HPLC による分画、精製方法を適用した。ここでは、得られたスペクトルから推定部分構造について考察した。

3.　3D-EEMs による霞ヶ浦水と琵琶湖水の調査

3.1　調査地点

霞ヶ浦と琵琶湖の流入河川および湖内の採水位置は、図 3.1-1, 図 3.1-2 のとおりであり、採水時期は、霞ヶ浦は平成 18 年 8,11,2 月、琵琶湖は平成 18 年 5,8,11,2 月である。湖内の採水では、基本的に表層水(水深 0.5m)とした。

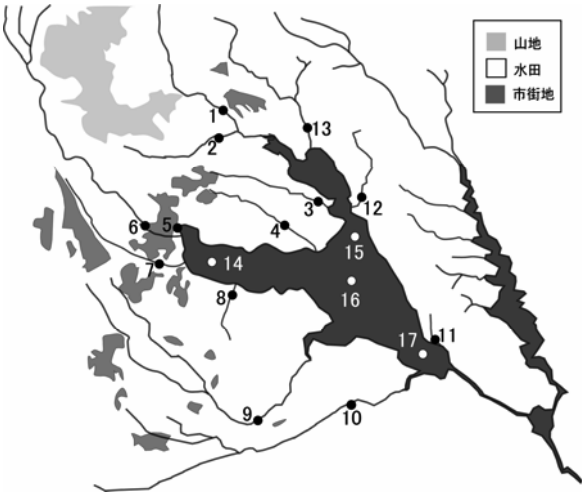


図 3.1-1　霞ヶ浦の採水位置

1.恋瀬川、2.天の川、3.菱木川、4.一の瀬川、5 下水放流水、6.桜川、7.花室川、8.清明川、9.小野川、10.新利根川、11.城下川、12.梶無川、13.園部川、14.掛馬沖、15.玉造沖、16.湖心、17.麻生沖

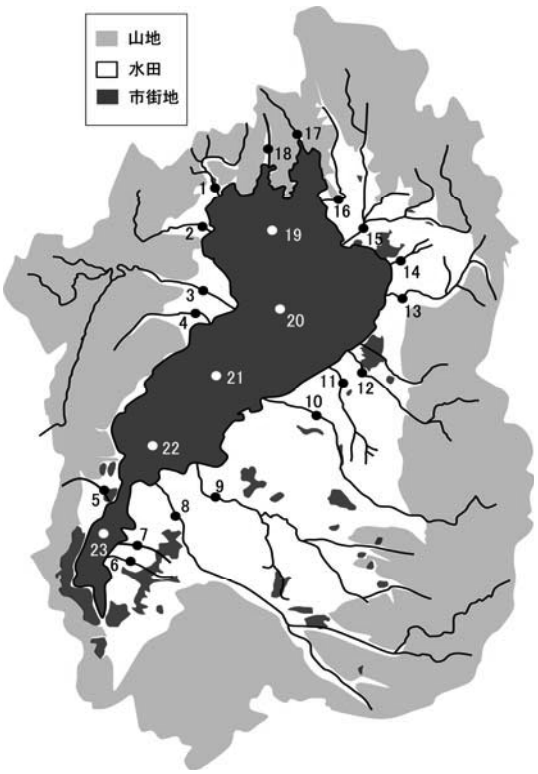


図 3.1-2　琵琶湖の採水位置

1.知内川、2.石田川、3.安曇川、4.鴨川、5.天神川、6.草津川、7.葉山川、8.野洲川、9.日野川、10.愛知川、11.宇曽川、12. 犬上川、13.天野川、14.長浜新川、15.姉川、16.余呉川、17.大川、18.大浦川、19.知内川沖、20.安曇川沖、21.北小松沖、22.蓬莱沖、23.大宮川沖

ただし、琵琶湖湖内の安曇川沖（#20）と大宮川沖（#23）では、水深別の採水も行った。安曇川沖では、水深 0.5,5,10,20,50 m,底面上 1.5 m、大宮川沖は、水深 0.5,2.5 m,底面上 1.0 m の湖水を採水した。さらに、両地点では採泥も同時に実施した。

3.2 分析方法

水試料は、予め 100 mL の超純水でろ過洗浄し、100℃で乾燥したガラス繊維ろ紙（GF/F、0.7 μm）でろ過し、ろ液を蛍光分光光度計（日立製 F-4500）で測定した。泥試料は、遠心分離（3,000rpm、20 分間）後の上澄水を GF/F でろ過し測定試料とした。測定条件は、励起波長（Ex）、蛍光波長（Em）ともに 200～600 nm で、その間隔は 5nm とした。蛍光強度は、10 μg/L の硫酸キニーネ水溶液の励起波長(Ex)350 nm、蛍光波長（Em）450 nm の蛍光強度を 1 QSU（Quinine Sulfate Unit)とし、その相対値として表示した。なお、ブランク試料には Milli-Q 水を用い、全ての測定結果から差し引いた。この他、SS、VSS、ろ過前の pH、クロロフィル a を反映する励起波長(Ex) 460 nm/蛍光波長(Em)680 nm の蛍光強度（ろ紙によるプランクトン濃縮および抽出操作無し）、DOC（島津製作所製 TOC-5000)、CODcr(BRAN+LUEBBE 製 AUTO ANALYZER Ⅱ)、NH_4-N、PO_4-P、NO_{2+3}-N、NO_2-N(BRAN+LUEBBE 製 TRAACS2000)の測定を行った。

3.3 調査結果

霞ヶ浦調査で得られた代表的な 3D-EEMs（桜川、湖心、下水処理場）を図 3.3-1～3 に示す。霞ヶ浦流入河川の 3D-EEMs は、概ね類似した蛍光特性を示し、全ての試料（湖内試料も含む）で Ex230nm/Em425nm 付近の蛍光強度が高かった。このピークは 8 月で高くなる傾向を示し、11 月,2 月の調査でも検出された。

下水放流水は、河川および湖水と異なった傾向を示し、Ex230nm/Em340nm, Ex230nm/Em425nm, Ex345nm /Em435nm, Ex500nm/Em525nm と様々な位置で蛍光強度が高くなった。なお、Ex500nm/Em525nm は下水放流水のみで観察された。

琵琶湖調査で得られた代表的な 3D-EEMs(日野川、姉川、愛知川、北湖、南湖）を図 3.3.4～8 に示す。琵琶湖流入河川でも Ex230nm /Em425nm の位置にピークは検出されたが、この蛍光強度は、河川によって異なり、湖西の河川（知内川、石田川、安曇川)、姉川および琵琶湖湖内で低くなる傾向を示した。Ex230nm/Em425nm の蛍光強度を季節で比較すると、琵琶湖でも 8 月に高くなる傾向を示した。河川の中

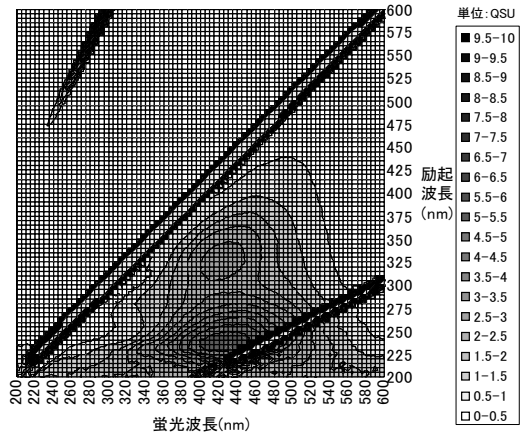


図 3.3-1 桜川(8 月)の 3D-EEMs

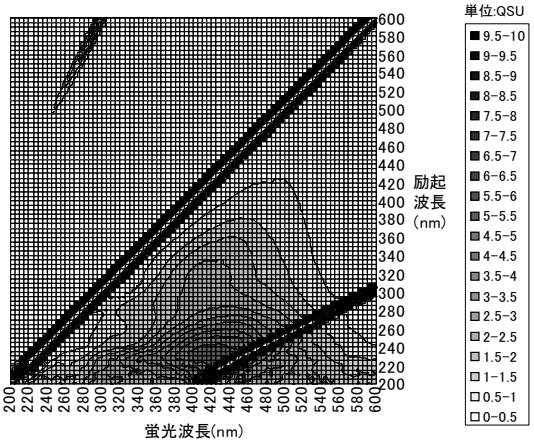


図 3.3-2 霞ヶ浦湖心(8 月)の 3D-EEMs

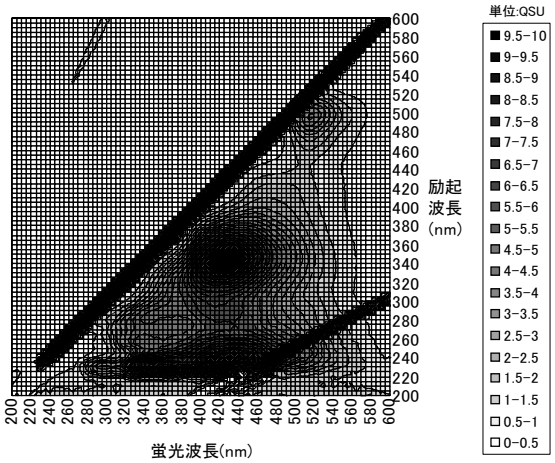


図 3.3-3 下水放流水(8 月)の 3D-EEMs

には、EX230nm/EM340nm と EX280/EM340nm にピークを有する河川（愛知川）も数は少ないが存在した。琵琶湖湖内の蛍光強度は、河川で観測された蛍光強

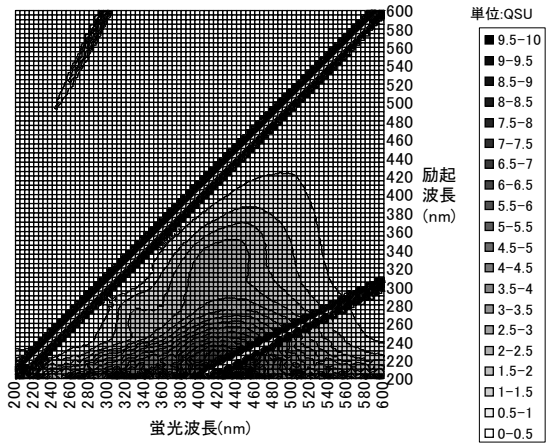


図 3.3-4　日野川(8 月)の 3D-EEMs

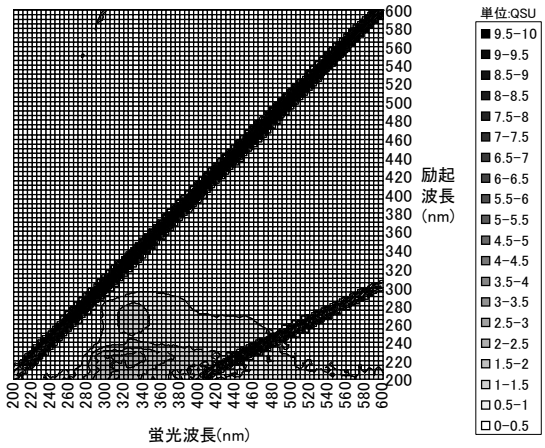


図 3.3-7 北湖・安曇川沖表層(8 月)の 3D-EEMs

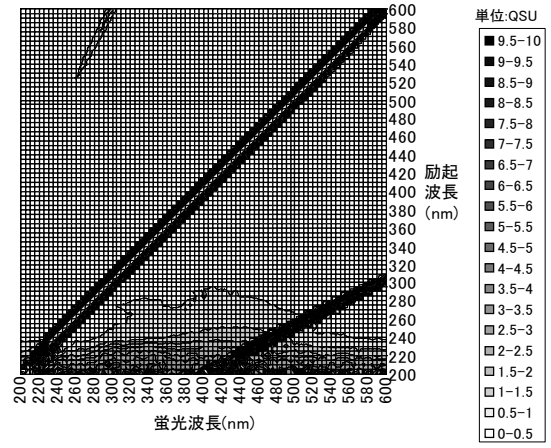


図 3.3-5　姉川（8 月）の 3D-EEMs

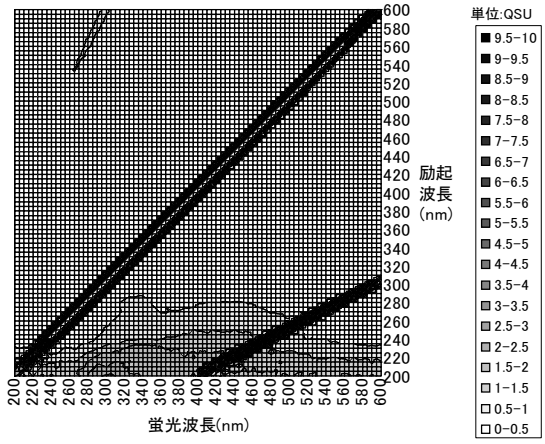


図 3.3-8　南湖・大宮川沖表層(8 月)の 3D-EEMs

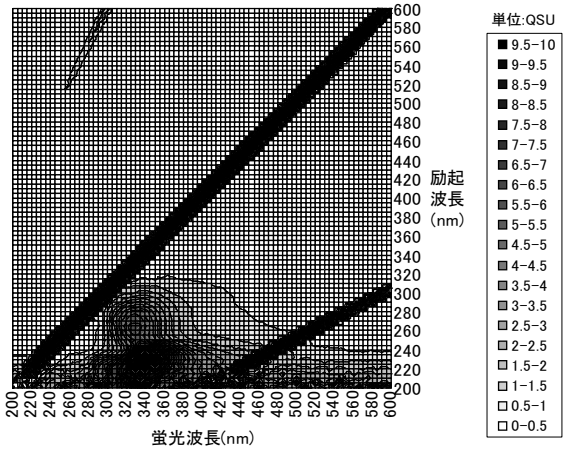


図 3.3-6　愛知川（8 月）の 3D-EEMs

度より低いことがわかる。

3.4　3D-EEMs のピーク物質の検索

ほとんどの河川水の 3D-EEMs 上の Ex230nm /Em425nm 付近にピークが検出されていたことから、このピークを反映する物質は、腐植物質と考えられる。そこで、日本腐植物質学会から購入した腐植物質である段戸フルボ酸を、超純水で 1,5,10 mg/L に調整し 3D-EEMs を 3.2 の方法で分析した。10 mg/L のフルボ酸の 3D-EEMs を図 3.4-1 に示す。図より Ex230nm/Em425nm と Ex320nm/Em425nm 付近にピークがみられ、Ex230nm/Em425nm のピーク強度は、Ex320nm/Em425nm より 1．7 倍高い値を示した。Ex230nm/Em425nm にピークを有する物質はフルボ酸の他にもあると考えられるが、河川水で検出される Ex230nm/Em425nm、Ex320nm/Em425nm の物質はフルボ酸様物質である可能性が示された。

下水放流水に Ex345nm/Em435nm の強いピークが観察され、このピークは蛍光増白剤と考えられる [5]。環境水の 3D-EEMs 測定の際には、蛍光増白剤の

3D-EEMs 特性も把握しておくことも重要であることから、蛍光増白剤入りの市販の洗剤を 5 mg/L に希釈し 3D-EEMs を 3.2 に記した条件にて取得した。その結果を図 3.4-2 に示す。図より EX220nm/EM290nm と EX345nm/EM435nm 付近に強いピークが検出されることがわかる。EX345nm/EM435nm のピークは蛍光増白剤であると考えられる[5]。EX220nm/EM290nm の蛍光強度は、EX345nm/EM435nm の蛍光強度の約 9 倍高い値となっていた。蛍光増白剤入りの洗剤が環境水に存在する場合、この２つのピークが出るもの考えられる。洗剤で観察された EX345nm/EM435nm のピークは、フルボ酸のピーク位置 Ex320nm/EM425nm と近く、蛍光ピークが重なることから、原因物質を特定する際は注意が必要である。

下水処理水は、EX500nm/EM525nm 付近にピークがみられた。しかし、現時点ではこのピークを反映する物質を同定するには至っていない。

これまでに報告されている 3D-EEMs 上に現れる物質に今回の結果を加え表 3.4-1 にまとめた。

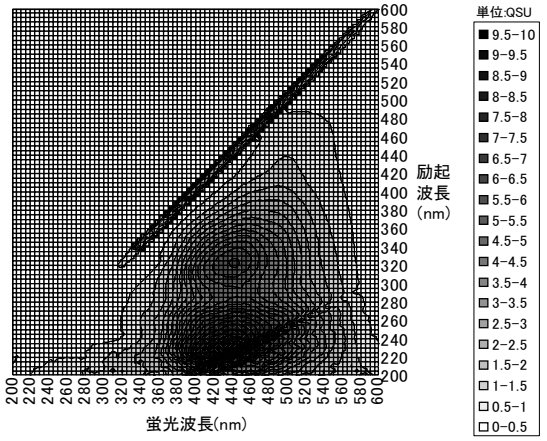


図 3.4-1　フルボ酸 10mg/L の 3D-EEMs

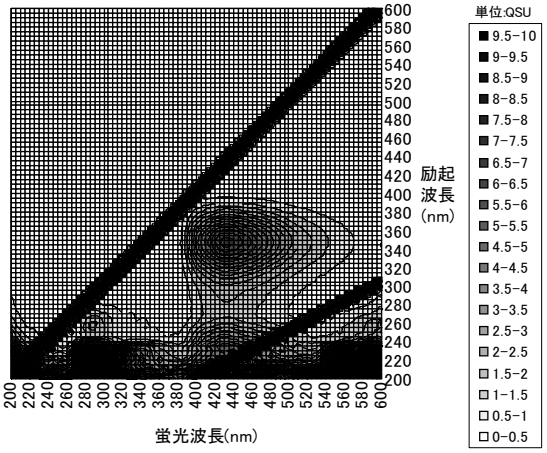


図 3.4-2　市販洗剤 5mg/L の 3D-EEMs

表-3.3.1　検出されたピークと原因物質

	励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)	起源[4]
Peak1	230 / 300	蛋白質様(ﾁﾛｼﾝ)
Peak2	230 / 340	蛋白質様 (ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝ)
Peak3	230 / 425	フルボ、フミン酸様
Peak4	280 / 340	蛋白質様
Peak5	320 / 425	フルボ,フミン酸様
Peak6	345 / 435	蛍光増白剤様
Peak7	500 / 525	下水処理水様

3.5　各蛍光強度と DOC および CODcr の関係

霞ヶ浦流入河川水と琵琶湖流入河川水の 3D-EEMs 上に観察された各ピーク強度と DOC および CODcr の近似式とその相関係数を表 3.5-1,2 に示す。全てのピークの蛍光強度と DOC および CODcr の間に正の相関関係がみられたことから、これらのピークを形成する物質は有機物であると考えられる。霞ヶ浦流入河川と琵琶湖流入河川の両方で、特に相関係数が高かったのは、Peak3(EX230/EM425)、Peak5(EX320/EM425)、Peak6(345/435)であった。これらの Peak は、3D-EEMs で、洗剤特有の EX220nm/EM290 のピークは強く観察されていないことから、フルボ酸を反映しているものと考えられる。

表 3.5-1　霞ヶ浦流入河川水の 3D-EEMs 上の各蛍光強度と DOC、CODcr の相関関係

	励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)	近似式		相関係数 r
Peak1	230/300	0.186(DOC)	+1.016	0.411
〃	〃	0.079(CODcr)	+1.092	0.462
Peak2	230/340	0.6903(DOC)	+1.051	0.623
〃	〃	0.322(CODcr)	+0.844	0.771
*Peak3	230/425	1.718(DOC)	+0.104	0.732
* 〃	〃	0.788(CODcr)	-0.346	0.891
Peak4	280/340	0.269(DOC)	+0.576	0.633
〃	〃	0.131(CODcr)	+0.467	0.818
*Peak5	320/425	0.979(DOC)	+0.013	0.762
* 〃	〃	0.443(CODcr)	-0.214	0.917
*Peak6	345/435	0.848(DOC)	+0.157	0.748
* 〃	〃	0.389(CODcr)	-0.063	0.910
Peak7	500/525	0.020(DOC)	+0.110	0.326
〃	〃	0.009(CODcr)	+0.105	0.397

*霞ヶ浦流入河川と琵琶湖流入河川共に相関係数が 0.7 以上のもの

表 3.5-2　琵琶湖流入河川水の 3D-EEMs 上の各蛍光強度と DOC、CODcr の相関関係

励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)		近似式	相関係数 r
Peak1	230/300	0.467(DOC) +0.867	0.430
〃	〃	0.178(CODcr)+0.950	0.473
Peak2	230/340	0.826(DOC) +2.105	0.144
〃	〃	0.301(CODcr)+2.289	0.151
*Peak3	230/425	1.706(DOC) +0.429	0.761
* 〃	〃	0.597(CODcr)+0.876	0.767
Peak4	280/340	0.303(DOC) +0.702	0.147
〃	〃	0.090(CODcr)+0.823	0.126
*Peak5	320/425	0.749(DOC) −0.019	0.876
* 〃	〃	0.257(CODcr)+0.191	0.866
*Peak6	345/435	0.662(DOC) −0.018	0.870
* 〃	〃	0.226(CODcr)+0.170	0.855
Peak7	500/525	0.053(DOC) +0.014	0.807
〃	〃	0.017(CODcr)+0.032	0.751

*霞ヶ浦流入河川と琵琶湖流入河川共に相関係数が 0.7 以上のもの

3.6　各蛍光強度と栄養塩の関係

霞ヶ浦流入河川と琵琶湖流入河川で 3D-EEMs 上に観察された各ピークと亜硝酸+硝酸性窒素(NO_{2+3}-N)とリン酸性リン(PO_4-P)の近似式とその相関係数を表 3.6-1,2 に示す。琵琶湖では、各ピーク強度と NO_{2+3}-N との間には、相関関係はみられないが、霞ヶ浦では、弱い負の相関関係がみられる。

PO_4-P については、琵琶湖流入河川で Peak5,6,7 で正の相関関係がみられたものの、霞ヶ浦流入河川ではその傾向はみられなかった。

表 3.6-1　霞ヶ浦流入河川水の 3D-EEMs 上の各蛍光強度と NO_{2+3}-N、PO_4-P の相関関係

励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)		近似式	相関係数 r
Peak1	230/300	−0.094(NO_{2+3}-N)+1.808	0.433
〃	〃	2.896(PO_4-P) +1.436	0.133
Peak2	230/340	−0.335(NO_{2+3}-N)+3.612	0.635
〃	〃	4.821(PO_4-P) +2.398	0.090
Peak3	230/425	−0.820(NO_{2+3}-N)+6.429	0.732
〃	〃	−26.101(PO_4-P) +4.282	0.230
Peak4	280/340	−0.116(NO_{2+3}-N)+1.525	0.571
〃	〃	1.126(PO_4-P) +1.118	0.054
Peak5	320/425	−0.395(NO_{2+3}-N)+3.380	0.646
〃	〃	−11.395(PO_4-P) +2.318	0.184
Peak6	345/435	−0.349(NO_{2+3}-N)+3.095	0.646
〃	〃	−7.399(PO_4-P) +2.100	0.135
Peak7	500/525	0.007(NO_{2+3}-N)+0.174	0.235
〃	〃	1.242(PO_4-P) +0.125	0.426

表 3.6-2　琵琶湖流入河川水の 3D-EEMs 上の各蛍光強度と NO_{2+3}-N、PO_4-P の相関関係

励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)		近似式	相関係数 r
Peak1	230/300	−0.007(NO_{2+3}-N)+1.421	0.0002
〃	〃	13.631(PO_4-P) +1.161	0.335
Peak2	230/340	3.592(NO_{2+3}-N)+1.135	0.236
〃	〃	30.496(PO_4-P) +2.505	0.141
Peak3	230/425	−1.077(NO_{2+3}-N)+3.024	0.181
〃	〃	56.196(PO_4-P) +1.383	0.667
Peak4	280/340	1.107(NO_{2+3}-N)+0.460	0.201
〃	〃	10.821(PO_4-P) +0.856	0.139
Peak5	320/425	−0.288(NO_{2+3}-N)+1.020	0.126
〃	〃	24.224(PO_4-P) +0.408	0.757
Peak6	345/435	−0.263(NO_{2+3}-N)+0.905	0.130
〃	〃	21.650(PO_4-P) +0.355	0.757
Peak7	500/525	0.011(NO_{2+3}-N)+0.070	0.064
〃	〃	1.967(PO_4-P) +0.039	0.803

3.7　各蛍光強度とクロロフィルａの関係

霞ヶ浦流入河川において、クロロフィルａを反映すると考えられる EX460nm/EM680nm の蛍光強度と各蛍光強度の相関を表 3.7-1 に示す。今回採用したクロロフィル a の測定法では、琵琶湖流入河川および湖水の蛍光ピークは検出されなかった。

表 3.7-1 より、クロロフィルａは Peak3,4,5,6 と正の相関関係があることがわかる。霞ヶ浦河川水の採水位置は、河川の最下流であり、その流速は上流に比べ低下していることから、採水位置でも藻類が増殖していたため、DOC と相関が高かった Peak3,4,5,6 が、クロロフィルａと正の相関関係を示したものと考えられる。藻類が Peak3,4,5,6 を反映する物質を産生していることを示唆する結果でもあり、今後より詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

表 3.7-1　霞ヶ浦流入河川の各蛍光強度とクロロフィルａの相関関係

励起波長/蛍光波長 EX(nm)/EM(nm)		近似式	相関係数 r
Peak1	230/300	0.253(Chl.a)+1.173	0.425
Peak2	230/340	0.962(Chl.a)+1.262	0.662
Peak3	230/425	2.436(Chl.a)+0.577	0.791
Peak4	280/340	0.408(Chl.a)+0.619	0.727
Peak5	320/425	1.224(Chl.a)+0.494	0.727
Peak6	345/435	1.073(Chl.a)+0.557	0.722
Peak7	500/525	0.009(Chl.a)+0.105	0.397

3.8　湖内と河川の各蛍光強度および DOC,NO2+3-N の関係

霞ヶ浦湖内とその流入河川の DOC、Peak3、Peak4、Peak5、NO_{2+3}-N の関係を図 3.8-1～5 に示す。Peak2

は概ねPeak3と類似し、Peak6の傾向は、Peak5と類似していた。Peak3,5は、特に8月に高い値を示していることがわかる。図3.8-1より霞ヶ浦湖内のDOCは、ほとんどの霞ヶ浦流入河川のDOCより高くなっていることがわかる。CODcrもDOCと類似の傾向を示していた。このDOCと類似した傾向を示した蛍光ピークは、Peak3,4であった。このことから、霞ヶ浦湖内のDOCは、Peak3,4に蛍光を有する物質である可能性がある。

図3.8-5は、NO_{2+3}-Nの結果であるが、湖内でのNO_{2+3}-N濃度が減少していることがわかる。PO_4-PもNO_{2+3}-Nと類似した傾向を示しており、これは、湖内での植物プランクトンの増殖に起因している。NO_{2+3}-NとDOCの関係やPeak4の物質は、生物由来のアミノ酸（トリプトファン）に由来するとの報告もあることから、植物プランクトンがDOCを生産している可能性もある。

琵琶湖湖内とその流入河川のDOC、Peak3、Peak4、Peak5、NO_{2+3}-Nの関係を図3.8-6～10に示す。Peak2は、概ねPeak3と類似し、Peak6の傾向は、Peak5と類似していた。琵琶湖の河川水でもPeak3で、8月に高い値を示した。図3.8-6より琵琶湖湖内のDOCも、琵琶湖流入河川水のDOCより高くなっていることがわかる（CODcrの傾向もDOCと類似）。このDOCの傾向と類似している蛍光ピークは、琵琶湖の調査ではみられなかった。琵琶湖内のDOCは無蛍光性の有機物（脂質など）である可能性がある。

琵琶湖湖内のNO_{2+3}-Nは、霞ヶ浦と同様の傾向を示し、8月のNO_{2+3}-Nの値は、その他の月より低くなっていた。

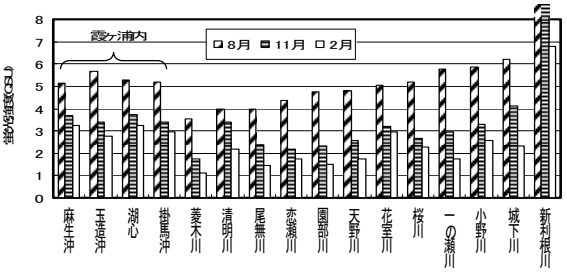


図 3.8-2　霞ヶ浦湖内および霞ヶ浦流入河川のPeak3(EX230nm/EM425nm)の蛍光強度

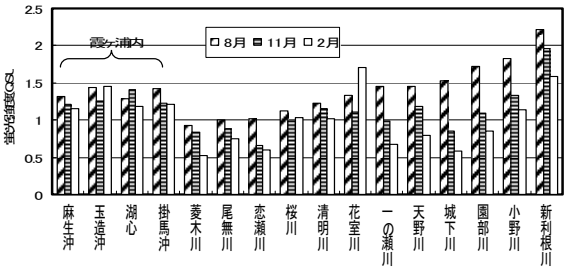


図 3.8-3　霞ヶ浦湖内および霞ヶ浦流入河川のPeak4(EX280nm/EM340nm)の蛍光強度

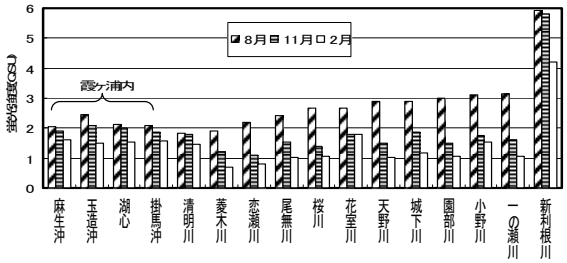


図 3.8-4　霞ヶ浦湖内および霞ヶ浦流入河川のPeak5(EX320nm/EM425nm)の蛍光強度

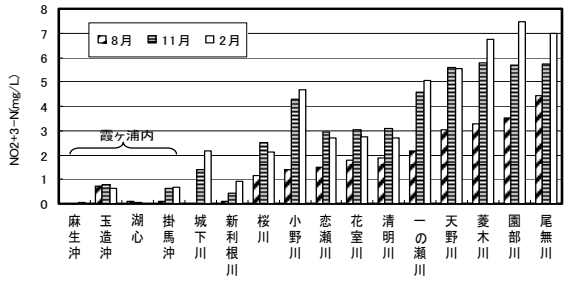


図 3.8-5　霞ヶ浦湖内および霞ヶ浦流入河川のNO_{2+3}-N濃度

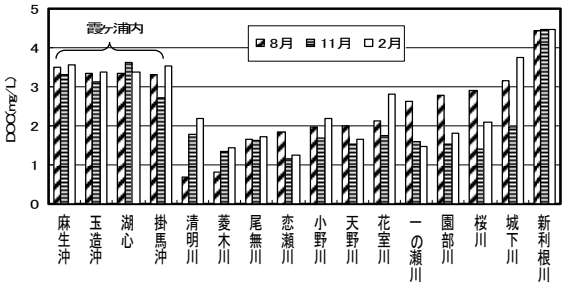


図 3.8-1　霞ヶ浦湖内および霞ヶ浦流入河川のDOC

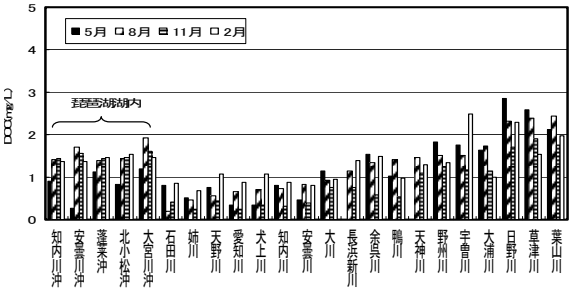


図 3.8-6　琵琶湖内および琵琶湖流入河川のDOC

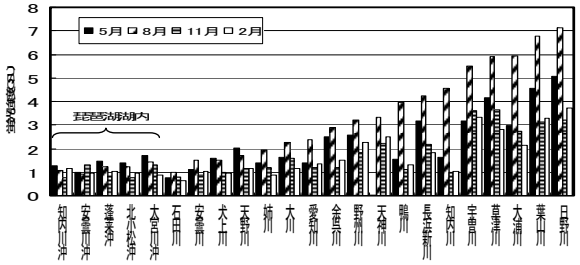


図 3.8-7　琵琶湖湖内および琵琶湖流入河川の Peak3(EX230nm/EM425nm)の蛍光強度

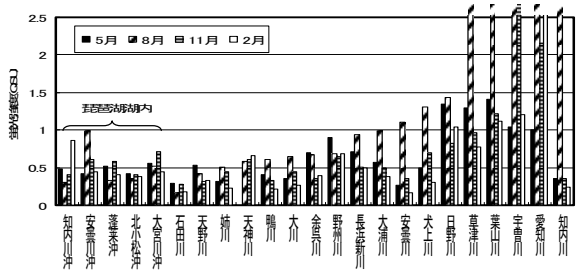


図 3.8-8 琵琶湖湖内および琵琶湖流入河川の Peak4(EX280nm/EM340nm)の蛍光強度

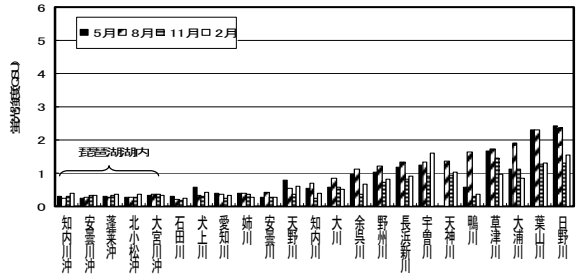


図 3.8-9　琵琶湖内および琵琶湖流入河川の Peak5(EX320nm/EM425nm)の蛍光強度

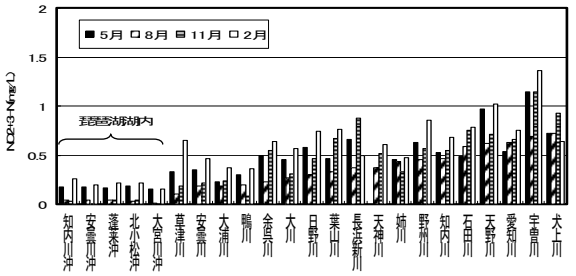


図3.8-10　琵琶湖内および琵琶湖流入河川の NO_{2+3}-N 濃度

3.9　琵琶湖水深方向の各蛍光強度、DOC、NO_{2+3}-N の関係

図 3.9-1 に 8 月と 2 月の北湖（#20 安曇川沖）での水深方向の Peak1,2,3,4,5 の蛍光強度および DOC,NO_{2+3}-N 濃度の分布を示す。8 月では、Peak1,2,4 の表層付近の蛍光強度が高く水深が低下するに従って蛍光強度も低下している。Peak3,5,6 は、8 月、2 月とも水深が低くなるに従い緩やかな増加傾向がみられる。

DOC は、Peak1,2,4 と類似した傾向を示し、8 月に表層で高くなる傾向を示した。2 月でも表層で高くなる傾向がみられるものの、この濃度勾配は 8 月よりも緩やかである。

NO_{2+3}-N は、8 月では表層から水深 10m 付近まで NO_{2+3}-N 濃度が低いことがわかる。このことから、表層付近の DOC、Peak1,2,4 の上昇には、植物プランクトンが関与していることが推察できる。

Peak3,5,6 は湖外部または底泥から溶出されるフルボ酸などの腐植物質、Peak1,2,4 は植物プランクトンが生産する有機物であることが推測される。琵琶湖の DOC は、植物プランクトンに由来する有機物

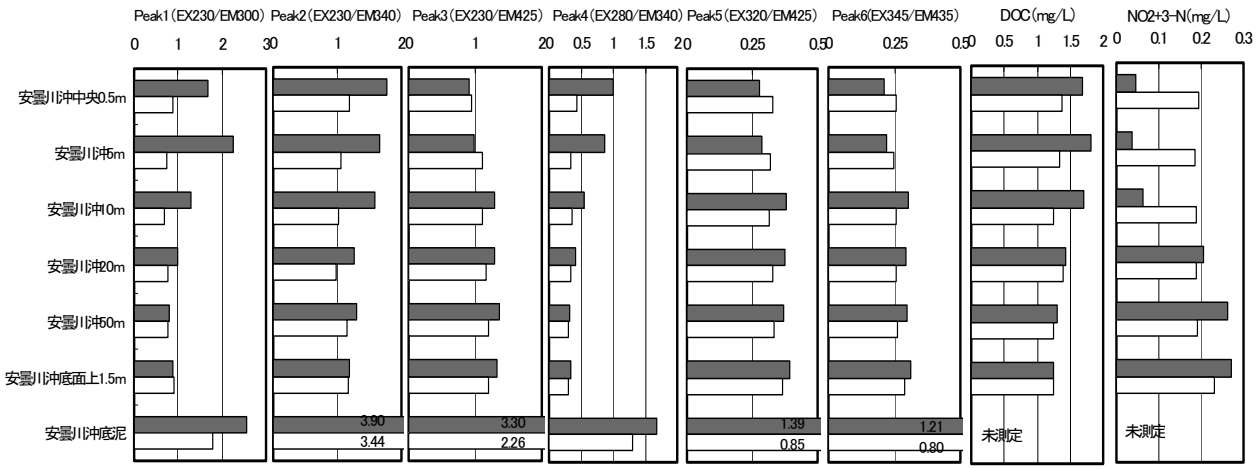


図 3.9-1　琵琶湖安曇川沖の水深方向別の各ピークの蛍光強度と DOC、NO_{2+3}-N の関係（■8 月□２月）

に影響されるものと考えられるが、琵琶湖湖内のクロロフィル a は減少傾向を示しており、植物プランクトンが増加している傾向はみられていない [3]。琵琶湖内で COD を上昇させている有機物については、さらに詳細な調査が必要である。今回の琵琶湖の調査では、下水放流水の水質分析を行わなかったが、琵琶湖 DOC にどの程度、下水放流水が寄与しているかを調査する必要もある。

3.10 霞ヶ浦流入河川水と琵琶湖流入河川水およびその湖水のクラスター解析

図 3.10-1 は、霞ヶ浦の 8 月の 3D-EEMs の peak1～7 の蛍光強度値を用いてクラスター解析(ウォード法)した結果である。霞ヶ浦湖水は、各霞ヶ浦流入河川（新利根川を除く）と概ね同じグループに分類された。霞ヶ浦は、各河川からの有機物負荷が大きいものと考えられる。下水処理水は、このグループから大きく離れているが、下水処理水が湖内に放流された後、蛍光特性が変化し、湖内の蛍光強度を上げている可能性もあり [6]、下水処理水の寄与についての調査も必要である。

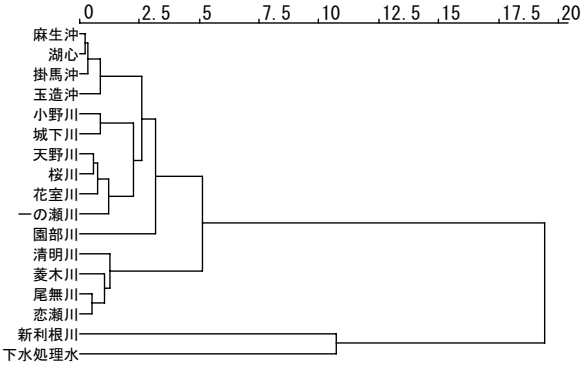


図 3.10-1　霞ヶ浦湖水と流入河川のクラスター解析

図 3.10-2 は、琵琶湖の結果である。琵琶湖湖水は、蛍光強度が低い河川のグループに分類されている。これは、この分類は蛍光特性に基づいた分類であり、無蛍光の有機物の性状が反映されていないためである。琵琶湖の平均滞留時間は、約 5.5 年と霞ヶ浦等と比べて長く、琵琶湖内に流入した蛍光特性を有する有機物は、紫外線や微生物の作用により無蛍光性有機物に変換されている可能性も考えられる。

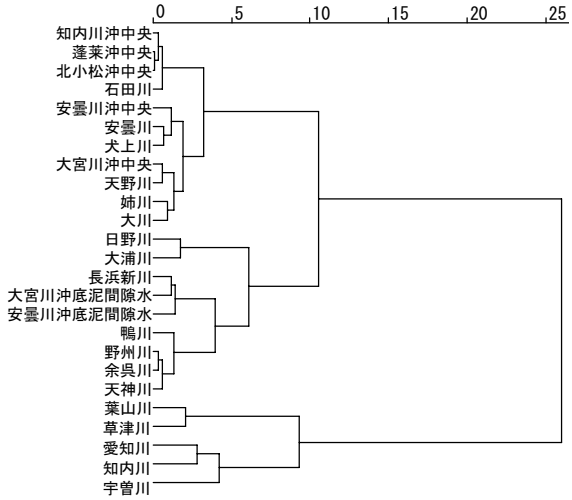


図 3.10-2 琵琶湖水と流入河川のクラスター解析

4. 琵琶湖溶存有機物の精製・分画と構造解析の試み

3D-EEMs 上のピーク物質の推定や湖水中有機物の起源を明らかにするためには、湖水中有機物を詳細に分析・分類する必要がある。本年度は、琵琶湖湖水を対象とし、順相 HPLC による極性の違いにより溶存有機物が分画できるかどうか、さらに分画された有機物の IR(赤外吸収)、NMR(核磁気共鳴)、質量スペクトルを測定し、有機物の分類やその構造の推定を試みた。

4.1 試料

2007 年 1 月 22 日に、琵琶湖安曇川沖(#20 地点　図 3.1-2 参照）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 ℃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 をロータリエバポレーター（容量 2 L、水温 55℃、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エバポレーター(容量 2 L、水温 55℃、減圧)で 60 mL まで濃縮(最終倍率約 5,000 倍)した。

4.2 濃縮溶液の精製

4.2.1 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,質量スペクトルを測定するためには、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。本年度は、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4.2.2-1に示す条件でHPLC測定 (UV検出)、分取した。

表4.2.1-1　HPLCの分析、分取条件

HPLC：	LC-6A(Shimadzu)
カラム：	Mightysil NH2
	4.6 mmφ×250 mm(5 μm)
カラム温度：	40℃
移動相：	90%CH_3CN/Water-(20min)-
	10 % CH_3CN/Water
流量：	0.8 mL/min
検出器：	UV (220 nm)

4.2.2　HPLC分取

Sephadexカラムで精製した後の溶液(S3、S4)を表4.2.1-1の条件でHPLC測定し、UV220 nmで検出されたピーク部位を分取した。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3D-EEMs測定を行った。

4.2.3　再精製

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、4.2.1に記した方法でSephadexカラムで再精製を行い、ロータリエバポレーター（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、構造解析用試料とした。

4.3　IR,NMR,MSの分析条件

4.3.1　FT-IRの分析条件

試料P4を7.6mg採取し、KBr錠剤作成後、(KBr 1mg)表4.3.1-1の条件でIR測定を行った。

4.3.2　^{1}H-NMRの分析条件

試料P4を14.9 mg採取し、D_2O（0.8 mL）に溶解した後、表4.3.2-1の条件で^{1}H-NMR測定を行った。

4.3.3　LC/ESI-MSの分析条件

HPLCで分取した試料P4について、表4.3.3-1の条件でLC/ESI-MS測定を行った。

表4.3.1-1　IR測定条件

FTIR装置：	IRPrestige-21(Shimadzu)
検出器：	DLATGS
測定モード：	透過
分解能：	4 cm^{-1}
積算回数：	16回
観測波数範囲：	4,000～400 cm^{-1}

表4.3-2-1　NMR測定条件

NMR分光計：	BRUKER DRX(500 MHz)
観測核：	^{1}H
共鳴周波数：	500.13 MHz (^{1}H)
溶媒：	D_2O
積算回数 (^{1}H)：	6,500 scans
温度：	323 K
パルス幅：	4.0 μ
DelayTime：	2.03 sec

表4.3.3-1　LC/ESI-MS測定条件

LC：	LC-10A(Shimadzu)
ESI-MS：	TSQ-700(Thermo Fisher Scientific)
カラム：	GLサイエンス Inertsil NH_2
	2.1 mmφ×150 mm(5 μm)
移動相：	90 % CH_3CN/Water-(20 min)-
	10 % CH_3CN/Water
流速：	0.2 mL/min
カラム温度：	40 ℃
注入量：	10 μL
イオン化法：	ESI法
キャピラリー温度：	250 ℃
Heated Capillary Temp.：	250 ℃
イオン化電圧：	4.5 kV
イオン化マルチ：	1300 V
モニターイオン：	ES+およびES-
走査範囲 (*m/z*)：	10 ～ 1,500
Scan Time：	1 sec/cycle

4.4　HPLC分画の結果

Sephadexカラム処理前の結果を図4.4-1に、処理後の結果を図4.4-2～6に示す。Sephadexカラムで

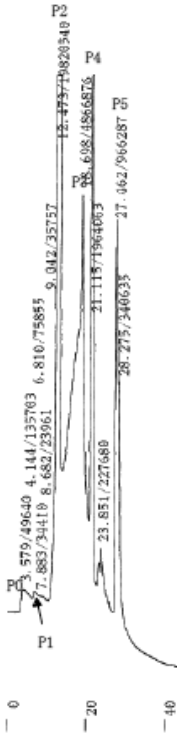


図 4.4-1
湖水の濃縮溶液のクロマトグラフ

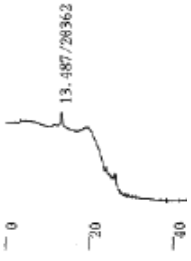


図 4.4-2
Sephadex カラム精製(保持容量:0～30ml、S1)



図 4.4-3
Sephadex カラム精製（保持容量:30～35ml、S2)

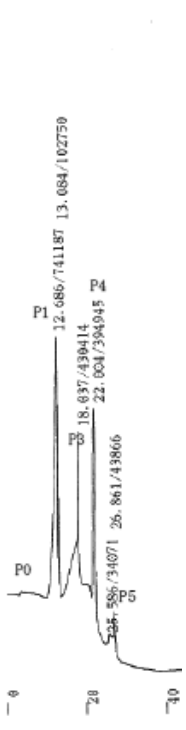


図 4.4-4
Sephadex カラム精製(保持容量:35～40ml、S3)

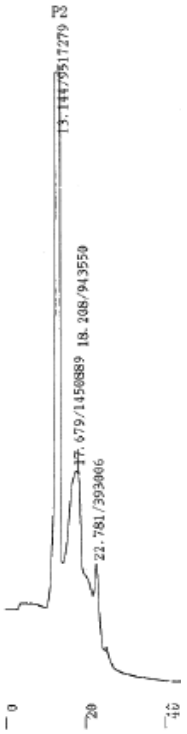


図 4.4-5
Sephadex カラム精製（保持容量:40～45ml、S4)

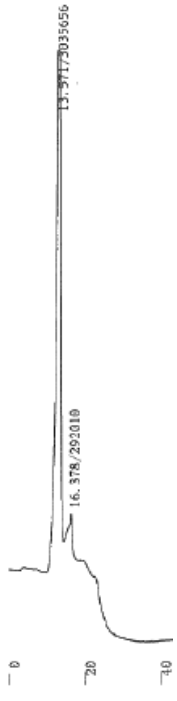


図 4.4-6
Sephadex カラム精製(保持容量:45～50ml、S5)

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わかった。

P0,P1,P2,P3,P4,P5 の 3D-EEMs 分析結果を図 4.4-7～12 に示す。P4 の 3D-EEMs のスペクトル形状は、河川や湖沼で観測された 3D-EEMs と類似していることが明らかとなった。そこで、さらなる構造特性の解明を行うために、試料 P4 に対して構造解析を試みることにした。

4.5 IR,NMR,LC/ESI-MS の測定結果と部分構造推測

試料 P4 の IR、NMR、LC/ESI-MS 測定を行った結果を図 4.5-1～6 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}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}H-NMR スペクトルおいて、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 2 重結合またはカルボキシル基等につながるα位水素（-C<u>H</u>-C(=O) O-）と推定された[7]。

今回の ^{1}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。今後、精製方法の高度化を行って確認する必要がある。また、溶媒ピーク近傍にも幾つかのシグナルが観られることから、溶媒ピーク消去（solvent peak suppression）[8]を行い、より詳細な帰属を行わなければならない。

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

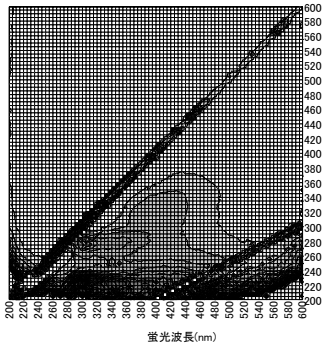


図 4.4-7　P0 の 3D-EEMs(0.2mg/l)

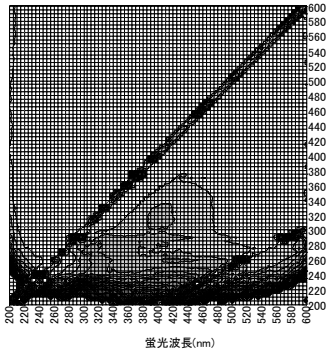


図 4.4-8　P1 の 3D-EEMs(0.2mg/l)

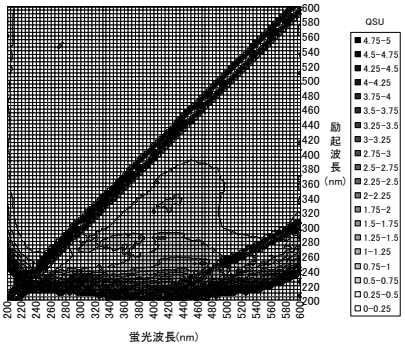


図 4.4-9　P2 の 3D-EEMs(0.2mg/l)

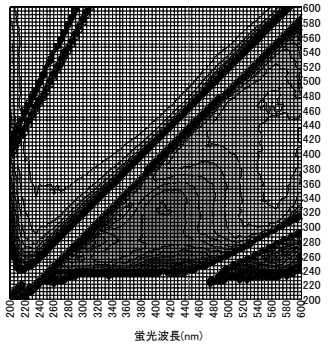


図 4.4-10　P3 の 3D-EEMs(0.1mg/l)

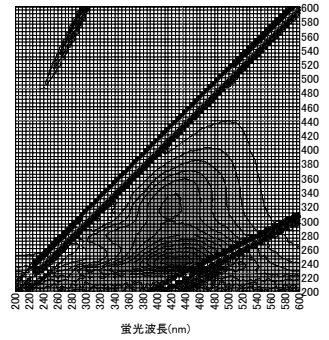


図 4.4-11　P4 の 3D-EEMs(0.1mg/l)

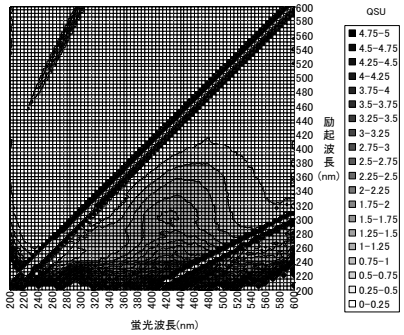


図 4.4-12　P5 の 3D-EEMs(0.1mg/l)

いて、約 14 u 間隔（-CH2-）のラダーが観られ、さらに 2 u 間隔(H2)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}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 部における分離向上および MS 検出部における高感度化が必要となる。今後は、分離条件の再検討と MS 検出条件の最適化を行う必要がある。

IR 測定結果から、3,400 cm^{-1} 付近、1,600～1,700 cm^{-1} 付近、1,100 cm^{-1} 付近に赤外吸収ピークが観察された。3,400 cm^{-1} 付近の吸収は、OH 基に由来するものと考えられる。1,600～1,700 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 cm^{-1} 付近の吸収は、不純物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はあるため、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の確立できるものと考える。以上の結果より、米国 Suwannee River 等のフミン質（疎水性酸）画分が主要構成成分であるとの報告例[9]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。従って、我が国の河川や淡水系湖沼の難分解性有機物に対しては独自の評価手法を確立する必要があると考える。

今回行った分析方法では、HPLC 法で極性の違いにより湖水の溶存有機物は、大凡分離できたものの、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、特異なピークは観察されなかった。これは、本年度採用した Sephadex カラム法により無機塩は除去されていはいるものの、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。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。湖水中の有機物の分類や構造を解明するためには、本年度採用した手法とは異なるアプローチも必要になると考えられる。

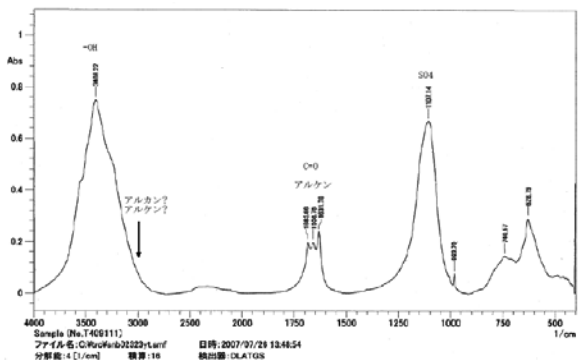


図 4.5-1　琵琶湖 DOM（P4）の FT-IR スペクトル

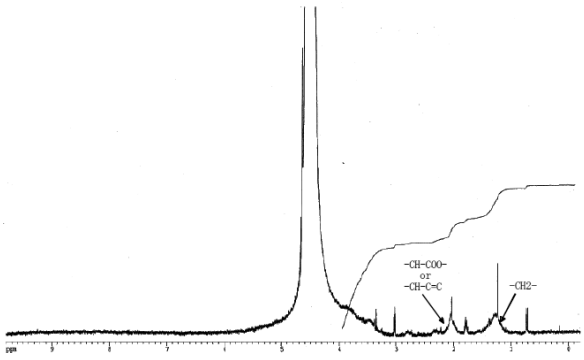


図 4.5-2　琵琶湖 DOM（P4）の ^{1}H-NMR スペクトル

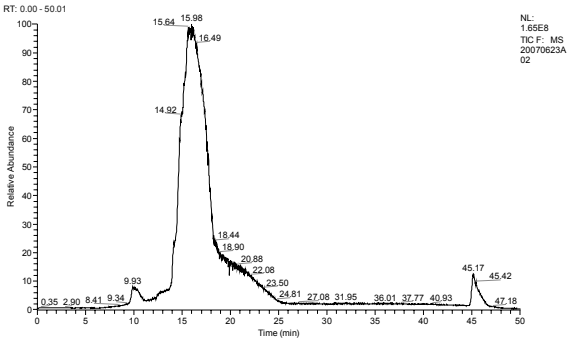


図 4.5-3　琵琶湖 DOM（P4）の TIC クロマト（ES+）

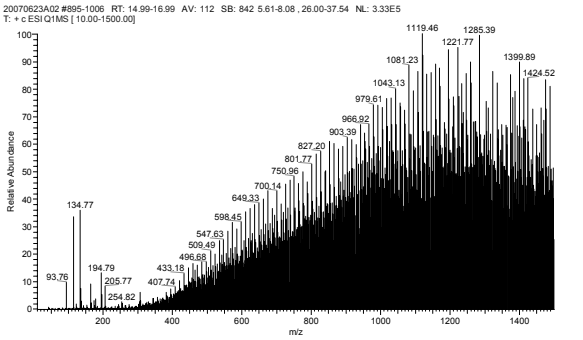


図 4.5-4　琵琶湖 DOM（P4）のマススペクトル（ES+）
（RT15～17min）

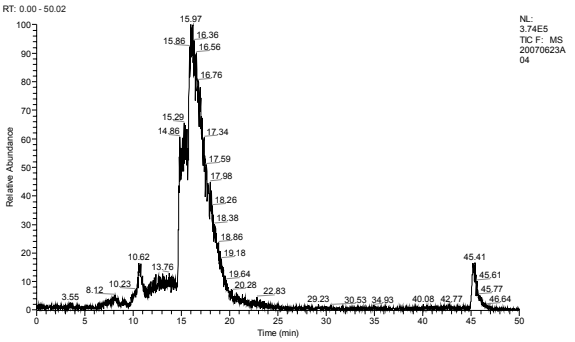


図 4.5-5　琵琶湖 DOM（P4）の TIC クロマト（ES-）

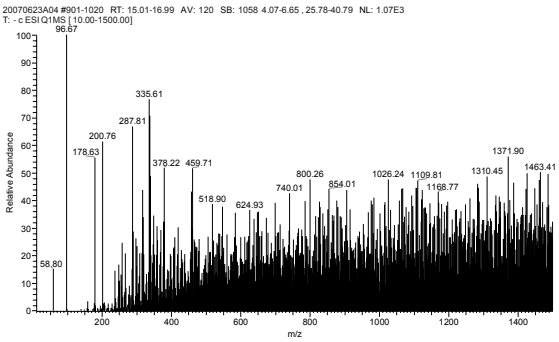


図 4.5-6　琵琶湖 DOM（P4）のマススペクトル（ES-）
（RT15～17min）

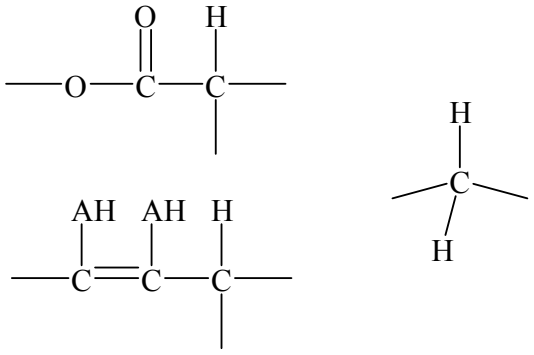


図 4.5-7　本研究で得られた琵琶湖溶存有機物（試料 P4）の推定部分構造
AH：活性プロトンを有する官能基

5. まとめ

湖水に蓄積する難分解性溶存有機物の発生源や湖内での挙動を解明するためには、湖水中の溶存有機物を分類し、測定する必要がある。そこで、18 年度は、霞ヶ浦と琵琶湖およびその流入河川水等を試験水とし、3D-EEMs による溶存有機物の性状把握の可能性と 3D-EEMs 測定結果と他の一般的な水質分析項

目と比較し、蛍光物質の由来について解析した。さらに、琵琶湖湖水を分析対象とし、順相 HPLC による極性の違いにより溶存有機物が分画できるかどうか、さらに分画された有機物の IR、NMR、質量スペクトルを測定し、有機物の分類やその部分構造の推測を試みた。

本年度の成果を以下にまとめる。

① 霞ヶ浦および琵琶湖流域において、それらの流入河川、湖内部、下水放流水の試料を濃縮、脱塩等の煩雑な前処理を必要とせず、簡易に 3 次元蛍光分析ができることが分かった。

② 霞ヶ浦流入河川水と琵琶湖流入河川水およびその湖水の 3D-EEMS 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。

③ Ex230nm/Em425nm の蛍光ピークは、概ね全ての河川で検出されており、このピークを反映する物質は、フルボ酸と考えられた。

④ Ex230nm/Em425nm 、 Ex320nm/Em425nm 、 Ex345nm /Ex435nm の蛍光強度は、DOC と正の相関がみられた。Ex500nm/Em525nm の蛍光ピークは、下水処理水特有のものであった。

⑤ 琵琶湖水深方向別の測定結果から、Ex230/Em340nm、Ex280nm/Em320nm のピーク強度は、表層に近くなるに従い上昇する傾向を示した。この傾向は DOC と類似していた。Ex230nm /Em425nm、Ex320nm/Em425nm のピーク強度は、水深が深くなるに従い微増の傾向を示した。

⑥ Ex230/Em340nm、Ex280nm/Em320nm のピーク物質は、植物プランクトンに関係し、Ex230nm /Em425nm、Ex320nm/Em425nm のピーク物質は、河川由来または底泥からの溶出物質である可能性があった。

⑦ 琵琶湖湖内で検出される DOC は無蛍光の有機物である可能性があった。

⑧ 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。

⑨ 琵琶湖溶存有機物の主要な 1 画分を IR、NMR、MS 測定した結果、精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、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。

6.参考文献

1) 霞ヶ浦水質浄化プロジェクト、霞ヶ浦関係資料 http://www.i-step.org/kasumi/index.shtml
2) 茨城県：平成 18 年度環境白書,p.332,平成 18 年 9 月
3) 近畿地方整備局,滋賀県琵琶湖環境部,滋賀県琵琶湖・環境科学研究センター:平成17年度琵琶湖水質調査報告書,p.35-36,平成 18 年 12 月
4) 福島武彦,中島俊之,今井章雄,松重一夫,尾崎則篤:EEMS による水中様存有機物の特性解析,*水環境学会誌*,Vol.24,No.10,pp.686-692,2001
5) 高橋基之，海賀信好，河村清史：蛍光分析法による環境水中溶存有機物の計測，*水環境学会誌*, Vol.27，NO.11，pp.721-726，2004
6) 北村友一，鈴木穣：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*，p.571，2007.03.
7) R.L. Malcolm, The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environment, *Analytica Chumica Acta*, 232, pp.19-30, 1990.
8) H.Herzog, S.Haiber, P.Burba, and J.Buddrus, Quantification of partial structures of aquatic humic substances by ^{1}H-NMR under WATR conditions, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359, pp.167-170, 1997.
9) USGS, Humic substances in the Suwannee River, Geogia; interactions, properties, and proposed structures, Open-File Report 87-557, 1989.

7.研究発表

（口頭発表）

1) 北村友一、鈴木穣：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，p.571，2007.03.

謝辞

霞ヶ浦および琵琶湖湖水の定期採水は、国土交通省　関東地方整備局　霞ヶ浦河川事務所、近畿地方整備局　琵琶湖河川事務所の協力を得て実施されたものである。ここに記して、感謝の意を表します。

土 木 研 究 所 資 料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4080　　October 2007
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