

土木研究所資料

平成23年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2011 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成24年10月

独立行政法人 土木研究所

Incorporated Administrative Agency  
Public Works Research Institute

Copyright © (2012) by P.W.R.I.

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

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

# 平成23年度下水道関係調査研究年次報告書集

材料資源研究グループ      リサイクルチーム  
水環境研究グループ      水質チーム

## 概要

本報告書集は、平成23年度に独立行政法人土木研究所において実施された下水道に関する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

# 目 次

## I リサイクルチーム

		頁
1	下水処理水の再生水利用における処理水質の信頼性評価手法検討 (受託業務費)	1
2	下水道革新的技術実証事業一般化検討調査 (受託業務費)	18
3	地域バイオマスの資源管理と地域モデル構築に関する研究 (運営費交付金)	20
4	下水道を核とした資源回収・生産・利用技術に関する研究 (運営費交付金)	24
5	低炭素型水処理・バイオマス利用技術の開発に関する研究 (運営費交付金)	35
6	水環境中における病原微生物の対策技術の構築に関する研究 (運営費交付金)	39
7	開発途上国における都市排水マネジメントと技術適用に関する研究 (運営費交付金)	49
8	再生水利用の安全リスクに関する研究 (運営費交付金)	53
9	21世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価(水の衛生学的評価) (戦略的創造研究推進事業)	61
10	下水灰の肥料用原料化技術の開発研究 (農水省実用技術開発事業)	71

## II 水質チーム

11	下水道における水系リスク評価と制御技術に関する調査 (受託業務費)	73
12	流域スケールで見た物質動態特性の把握に関する研究(2) (運営費交付金)	77
13	土地利用や環境の変化が閉鎖性水域の水質・底質におよぼす影響に関する研究 (運営費交付金)	87
14	水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明 (運営費交付金)	95
15	下水処理プロセスにおける化学物質の制御技術に関する研究 (運営費交付金)	101
16	閉鎖性水域の貧酸素化に及ぼす陸域負荷の影響と対策手法に関する研究 (運営費交付金)	107
17	地球環境の変化が河川湖沼水質に及ぼす影響の評価に関する研究 (運営費交付金)	109
18	水生生物の生体反応を用いた下水処理水の毒性評価に関する研究 (運営費交付金)	117
19	水生生物に蓄積している未規制化学物質の実態の解明に関する研究 (運営費交付金)	121
20	魚類の繁殖・稚魚の生育試験による下水処理水の安全性評価に関する研究 (運営費交付金)	123
21	微量金属を対象とした藻類抑制手法の提案 (運営費交付金)	126
22	亜酸化窒素の水環境中動態に水質が与える影響に関する基礎的研究 (運営費交付金)	130
23	21世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価(バイオモニタリング) (戦略的創造研究推進事業)	133
24	下水処理水に残存する医薬品の除去技術の開発 (河川整備基金助成)	150

\*受託業務費とは、国土交通省からの受託によるものである。

\*流域スケールで見た物質動態特性の把握に関する研究(1)は、水災害研究グループによって行われており、本報告書には、掲載していない。

## I. リサイクルチームによる研究

## 下水処理水の再生水利用における処理水質の信頼性評価手法検討

研究予算：受託経費（下水道事業調査費）

研究期間：平 23 年度

担当チーム：材料資源研究グループ（リサイクル）

研究担当者：内田勉、諏訪守、安井宣仁、岡本誠一郎

### 【要旨】

本調査では、下水処理水の再生水利用における衛生学的安全性の確保を目的に、実用的な管理手法の構築を検討するものである。下水処理水の再利用を想定し、人体に影響を与える可能性のある病原微生物等を対象として、原水（2次処理水）の水質変動と処理方法の組み合わせにより、下水処理水質の信頼性評価を行うための手法を検討した。具体には、実際の下水を用いて、異なる処理方法・条件のもとで得られた水質データを利用し、下水処理水質の信頼性評価として、食品、飲料水などのリスク管理手法として推奨されている HACCP の適用を検討し、処理水質の信頼性評価のためのリスク評価を実施した。評価対象にはノロウイルスを利用し、その削減量から評価を行った。HACCP の適用に際しては、重要管理点を特定する上で病原微生物による健康影響被害の影響程度の評価に、定量的微生物リスク評価（QMRA）の 1 手法である DALY を用い検討を行った。

その結果、活性汚泥処理水では、塩素処理を行うことで DALY 値を低減できる効果が確認された。また、通常の活性汚泥処理水に比較して、各種生物学的高度処理法の処理水の DALY 値は低く見積もられた。

下水処理水の再生水利用を目的とした再生処理施設における評価では、再生処理プロセスとして生物膜処理水、オゾン処理水、塩素処理水を各々評価した。各処理プロセスが正常に運転されることで DALY 値の低減効果は向上したが、いずれかのプロセスで処理が不十分である場合には DALY 値の低減効果は減少した。調査対象とした再生処理プロセスでは、塩素処理が DALY 値の変動に及ぼす影響が大きいため、本プロセスが重要管理点であると評価された。

キーワード：下水処理水、再生水利用、ノロウイルス、HACCP、DALY、重要管理点

## 1. はじめに

下水道普及率の向上に伴い下水処理水量も増加しており、年間 140 億  $m^3$  に及んでいる。安定した水資源として注目されているが、再生水利用としての利用割合は 1.4% 程度であり<sup>1)</sup>、さらなる再利用方策を構築することで有用な水資源となり得る。現在、下水処理水の再生利用を行う上での基準に関しては、再生水水質基準マニュアル（案）が策定され、水質基準や施設基準等が提示されている<sup>2)</sup>。衛生的な安全性を評価するため、現状では大腸菌群を中心に管理が行われているが、病原微生物の知見の集積により、ウイルス、原虫といった病原微生物が関与した水系感染症の課題が生じてきている。ふん便汚染としては大腸菌(群)指標を活用することで評価が可能と考えられるが、下水処理工程としての消毒プロセスを経た水質評価では、各病原微生物間で消毒耐性や存在濃度が異なる。このため、各病原微生物の特性に応じた処理水質の信頼性を評価するための手法を構築する必要があると考えられる。

本検討調査では、上記の要請を踏まえ下水処理水の再生水利用を想定し、その水質の信頼性評価として HACCP の適用を検討することで、処理水質として病原微生物に関わるリスク評価を行った。リスク評価にあたっては、近年、知見が集積されつつあるノロウイルスを対象に、標準的な活性汚泥処理水を含め、生物学的窒素・りん高度処理法の処理水や再生処理施設における再生水のノロウイルス濃度を調査し、その結果から得られたデータを活用した。

本調査結果は、下水処理水の再生水利用を行う上でのリスク管理手法の構築を検討することで、感染リスク低減に資することができる。

## 2. 調査内容および方法

本調査の内容は、下水処理水の再生水利用における処理水質の信頼性評価手法の検討である。検討を行うため、(1) 実下水を用い、パイロットスケールの実験施設での調査実験により 2 次処理水の水質評価、(2) (1) の結果との比較のため生物学的高度処理水や再生処理施設での評価、(3) 処理水を再生水として利用している再生処理施設を対象に、処理法毎のリスク低減効果を試算するためのデータ取得、(4) 報告書とりまとめ、より構成される。

## 3. 調査方法

### 3.1 各種下水処理法によるノロウイルス濃度の実態

#### (1) パイロットプラントを利用した処理水質の調査

実下水を用いたパイロットプラント利用による処理水質の調査では、複数の市町村からの下水を受け入れている流入下水量が約 9 万  $m^3$ /日規模の関東圏内にある A 下水処理場の流入下水を流入原水とした。調査では水処理条件が処理水質に与える影響を把握するため、曝気槽の HRT や MLSS 濃度が異なった 3 系列のパイロットプラントを利用した。

パイロットプラントには、A 流域下水処理場の流入下水を連続的に流入させ、各々設定した MLSS 濃度に安定するよう稼働させた。パイロットプラントの運転条件を表-1 に示す。標準的な活性汚泥処理法の運転条件として反応タンクの HRT を 8 時間・設定 MLSS 濃度を 2,000mg/L とした条件に加え、HRT12 時間・設定 MLSS 濃度を 2,000mg/L、HRT8 時間・設定 MLSS 濃度を 1,000mg/L とした 3 条件において調査を行った。その内 1 系列においては、塩素消毒による評価を行うため、処理水に次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度が 2mg-Cl/L、接触時間を 20 分間とした条件を加えた。

各系列において、設定値 MLSS 濃度に概ね安定した段階において、流入下水、処理水の採水を行った。採水は、4 時間毎の 24 時間採取とし流入下水の採取後、施設滞留時間を考慮し処理水を採取した。

表－1 パイロットプラントの水処理条件

運転条件	反応タンク HRT (h)	設定MLSS濃度 (mg/L)	次亜塩素酸 ナトリウム添加
I系	12	2,000	－
II系	8	1,000	－
III系	8	1,800	2mgCl/L、20分間

## (2) 高度処理法の水質の調査

生物学的高度処理法の水質の調査は、A 下水処理場を対象とした。A 下水処理場では凝集剤添加活性汚泥処理法（凝集法）、A<sup>2</sup>/O 法、修正 Bardenpho 法（修正法）、循環式硝化脱窒法（循環法）などの各種高度処理法により水処理（表－2）が行われている。これらの高度処理法は窒素・リンの高度除去を目的としているが、積極的に高度処理法を採用している場合には、放流先の公共用水域において様々な水利用形態が予想される。今後、放流先水域のリスク評価を行う上で高度処理法導入施設でのノロウイルス除去率を明らかにすることは必要であると考えられる。

各系列の処理水調査は、パイロットプラントと同様に 4 時間毎の 24 時間採取とし流入下水の採取後、施設滞留時間を考慮し処理水を採取した。なお、過去に行った調査の既存データも利用したため、その時の水処理条件も併せて追記した。

表－2 各種高度処理法の水処理条件

水処理方式	反応タンク HRT (h)	MLSS濃度※ (mg/L)	反応タンクHRT (h) 20年度	MLSS濃度 (mg/L) 20年度	凝集剤添加量
凝集剤添加活性汚泥法	21.2	2,800	8.5	2,500	約4～5mgAl/L
A <sup>2</sup> /O法	8.5	3,100	9.7	2,400	－
修正Bardenpho法	10.1	2,200	11.8	2,000	－
循環式硝化脱窒法	10.4	3,000	15.2	2,500	約2mgAl/L

※ 採水日、直近の値

## (3) 再生処理施設での調査

B 下水処理場の処理水を再生水として利用している再生処理施設を対象に、各処理プロセスにおける処理水のノロウイルス濃度を調査し、処理法毎のリスク低減効果を試算するためのデータ取得を行った。本再生処理施設の再生水は主にトイレ水洗利用に用いており、その処理方式は二次処理水を生物膜ろ過処理+オゾン処理+塩素処理している。図－1 に本施設の処理フローと採水箇所を示す。図－1 で示した採水箇所より水質変動を考慮し採水を行った。処理前の水は 24 時間で 4 時間毎に計 6 回の採水を行った。また、各処理プロセスでの処理後の水は、滞留時間の変化を考慮して複数回の採水を行った。

なお、上記 3.1 のノロウイルス濃度の実態調査は、胃腸炎感染症の流行期である 2～3 月の間に実施した。

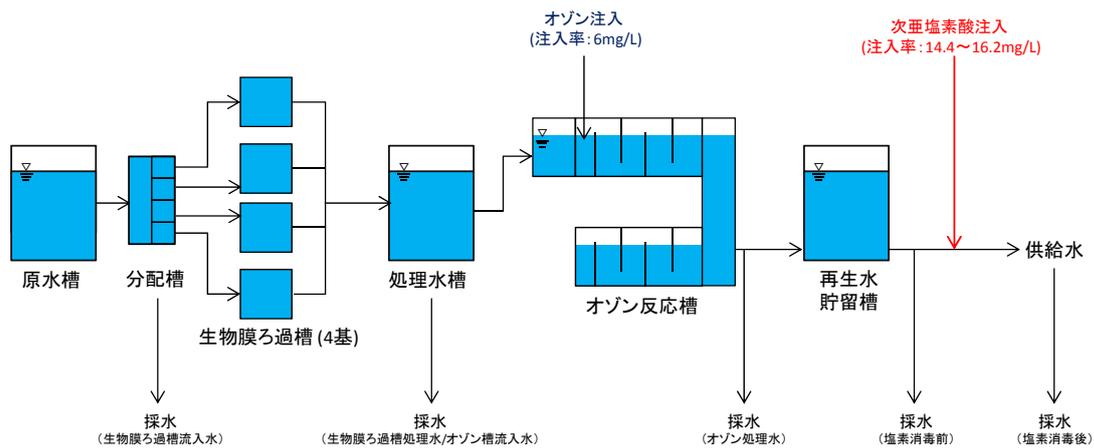


図-1 再生処理施設の処理フローと採水箇所

### 3.2 ノロウイルスの測定法

安定したノロウイルスの定量値を得るため、試料の濃縮はポリエチレングリコール（PEG）沈殿法を基本とした。PEG 沈殿法は試料中に PEG # 6000（終濃度 8%）および NaCl（終濃度 0.4M）を添加・攪拌し完全に溶解させた。4℃で 1 夜静置の後、10,000×G で 30 分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣を RNase-free 水（遺伝子分解酵素を除去した水）に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。濃縮液中のウイルスは、リアルタイム PCR 法により定量<sup>3)</sup>を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液から QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN 社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit（QIAGEN 社）でウイルス RNA を精製した。上記で抽出したウイルス RNA 試料 0.5μg をランダムプライマー、Omniscrypt RT Kit（QIAGEN 社）を用い全量 20μL の系または 100μL の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 2μL または 10μL をリアルタイム PCR に供した。ノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」<sup>4)</sup> に準じた。リアルタイム PCR 反応のための試薬は QuantiTect Probe PCR Kit（QIAGEN 社）を用い、リアルタイム PCR 装置は LightCycler（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を使用した。逆転写反応に使用する抽出 RNA 量は Spectrophotometer（NanoDrop 社製）により定量した。

なお、ウイルス濃縮液をウイルス遺伝子抽出カラムに通水しノロウイルス遺伝子を捕捉させる際、抽出カラム 1 本あたりの濃縮試料の通水量は、SS 負荷量を基準とし全ての測定試料で抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した。遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量が異なることでウイルス検出濃度に大きな影響を及ぼすため、SS 負荷量を統一しないと検出濃度にバラツキが生じて精度の高い定量評価ができなくなるためである<sup>3)</sup>。

### 3.3 他の水質測定項目

ノロウイルス以外の水質測定項目は、水温、pH、濁度、SS、残留塩素とした。測定手法は下水試験方法を準拠した。

### 3.4 リスク評価方法

#### (1) HACCPに基づくリスク評価

HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) は、食品分野で開発された衛生管理手法であり、その特長はハザード要因を特定し、それをコントロールすることで、未然にハザードを予防できることにある<sup>5)6)</sup>。HACCP の手順としては、国連食料農業機関(FAO)と世界保健機構(WHO)の合同機関である食品規格(CODEX)委員会によるガイドラインで示されている 12 の手順に沿って、危害分析、重要管理点 (Critical Control Point) を決定し HACCP を策定<sup>6)</sup>、図-2 に示す作業手順が定められている。再生水利用におけるリスク管理では、既にハザードとして病原微生物や化学物質等を含む水に対する、健康影響被害または生態系の影響に対して、有効な処理を施すことで、それらのハザードを除去または低減することが主たる目的となりうる<sup>7)</sup>。そのために、図-2 で示した HACCP 7 原則における重要管理点の特定が重要である。

重要管理点の特定は各ハザード、本検討では再生水利用における病原微生物汚染による健康影響被害とし、影響程度を検討して管理上の重要性 (=リスクレベル) から重要管理点を特定する。影響程度の評価は定量的微生物リスク評価の QMRA (Quantitative Microbial Risk Assessment) による評価を活用する。

水に関する危害因子は、急性毒性や慢性毒性、重篤度の違い、年齢別による発症確率の違いなど、様々な因子を客観的に比較されるべきであり、影響の深刻度、影響の継続時間、被害者数、感染から発症する確率を考慮した共通の指標が必要である。共通の指標としては、損失余命が利用されることが多い<sup>8)</sup>。そこで本検討においても損失余命を用いた QMRA によるリスク評価を行った。損失余命の試算には、QMRA 法の 1 つで近年、WHO の飲料水質ガイドラインにおいても、健康影響の評価として用いられている障害調整生存年数 (Disability Adjusted Life Years: DALY) を適用し検討した。

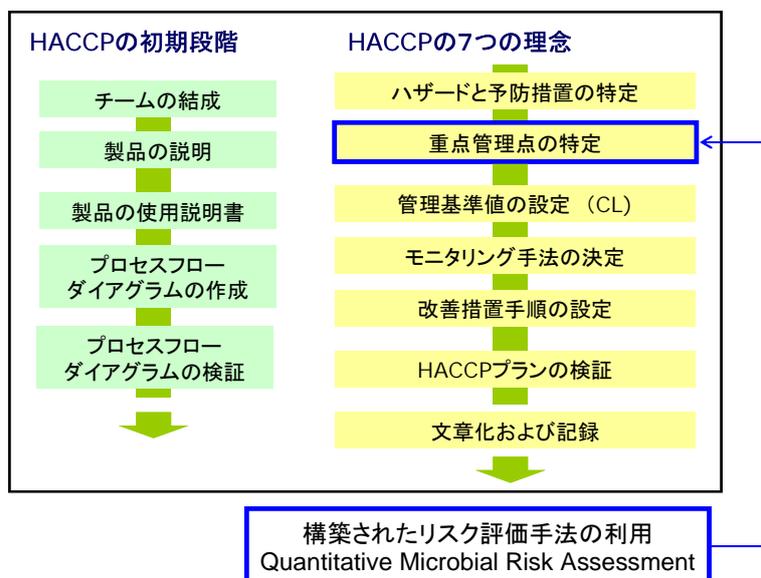


図-2 HACCP の手順と QMRA の活用 (参考文献<sup>9)</sup>を基に作成)

## (2) 障害調整生存年数 (DALY)

障害調整生存年数(Disability Adjusted Life Years: DALY)DALY は、特定の疾病やリスク要因による健康負荷の指標である<sup>10)</sup>。DALY の損失は、特定の疾病による障害か死亡によって失われた時間を、健康で疾病による障害が無い寿命と比較することにより求められる。1 人 1 年あたりの疫病負荷 (DALYs per person per year) は式(1)により算出される。

$$DALY\ ppppy = \left(1 - (1 - P_{mf}(D))^n\right) \times R_{mf} \times DB \quad (1)$$

ここで、

DALY ppppy: DALYs per person per year、1 人 1 年あたりの疫病負荷 (年/人)

$P_{mf}(D)$ : 感染確率 (用量反応モデル式(2)より決定)

$D$ : 摂取病原微生物量 (Copies/L)

$n$ : 年間曝露数

$R_{mf}$ : 発症確率 (Ratio of illness/infection)= 0.8<sup>11)</sup>

DB: 疫病負荷 (年) (Disease burden) =  $9.0 \times 10^{-4}$ <sup>12)</sup>

## (3) ノロウイルスの容量-反応モデル

ノロウイルスは動物感染、細胞培養による培養系が確立されておらず、直接感染価を求めることが出来ないため、明確なノロウイルスの用量反応モデルに関する知見は多くない。ここでは、ノロウイルスの容量-反応モデルとして Masago ら<sup>13)</sup>の研究結果における仮定を用いた。Masago らにおけるノロウイルスの感染確率は式(2)で示される。

$$P_{mf}(D) = 1 - \exp\left(-\frac{ID_{50}}{ID_{50}} \times D\right) \quad (2)$$

ここで、

$ID_{50}$ : 50%の確率で発症する際の摂取病原微生物量 = 100 copies

## (4) リスク試算方法

下記手順に従いリスク試算を行った。

- ① 原水および処理水の実測値よりノロウイルス濃度の対数正規分布の推定を行い、平均値と標準偏差から濃度分布を求める。
- ② ①より推定した濃度分布から除去率分布を算出する。
- ③ 利用用途を決定し、1 回あたりの曝露量および年間曝露数を設定する。
- ④ ①より推定した原水の濃度分布と②より算出した除去率分布から処理水の濃度分布を推定し、1 回あたりのノロウイルス摂取量を算出し、式(2)にて感染確率を算出する。
- ⑤ 式(1)に④で算出した感染確率を代入し、モンテカルロシミュレーションにより試行回数を 10,000 回として DALY の分布を算出する。

除去率分布およびリスク試算においては、モンテカルロシミュレーションによる計算を行った。モンテカルロシミュレーションとは不確実な変数に対し乱数を発生させ、推定した確率分布から値を拾い出しシミュレーションを何度も行うことにより近似解を求める手法であり、乱数を発生させ、シミュレーションを行うことで、不確実性を考慮した計算手法である。なお、計算には Crystal Ball (Ver. 7.2.2)を用いた。

## 4. 調査結果

### 4.1 各種下水処理法によるノロウイルス濃度の実態

処理条件の異なるパイロットプラントおよび生物学的高度処理法前後でのノロウイルス濃度変動を図-3～6に示す。GI、GIIともにパイロットプラントの運転条件としてI系(HRT=12h、MLSS=2000mg/L)およびIII系+塩素(HRT=8h、MLSS=2000mg/L+塩素処理)が他の運転条件(II系:HRT=8h、1000mg/L、III系:HRT=8h、2000mg/L)よりも除去率が高い傾向が確認された。

一方、高度処理法では、GI、GIIともに各処理法において、概ね2～3Logの除去率であったが、GIの除去率に関してはやや変動幅が大きい傾向が見られた。

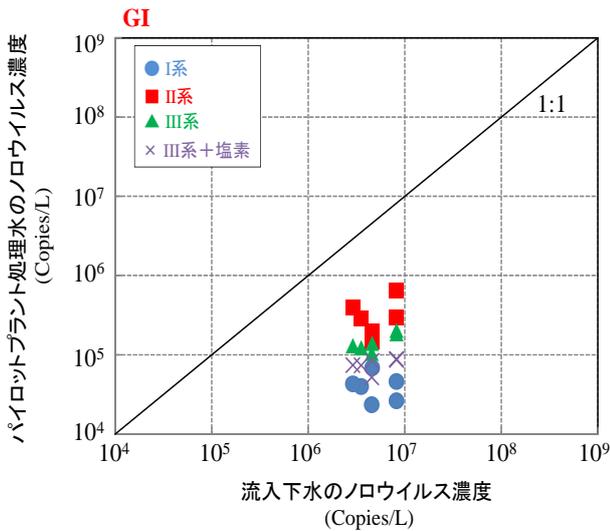


図-3 パイロットプラントでの処理前後でのノロウイルス濃度 (GI)

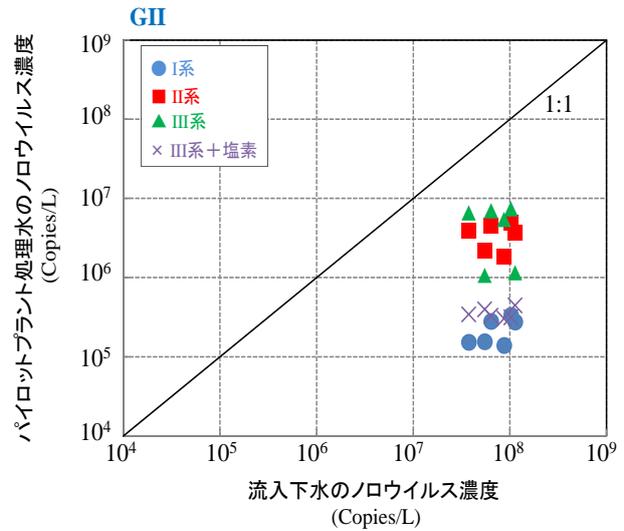


図-4 パイロットプラントでの処理前後でのノロウイルス濃度 (GII)

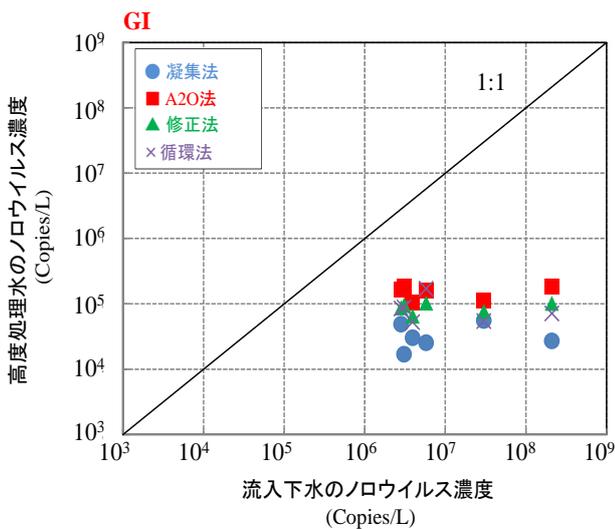


図-5 高度処理前後でのノロウイルス濃度 (GI)

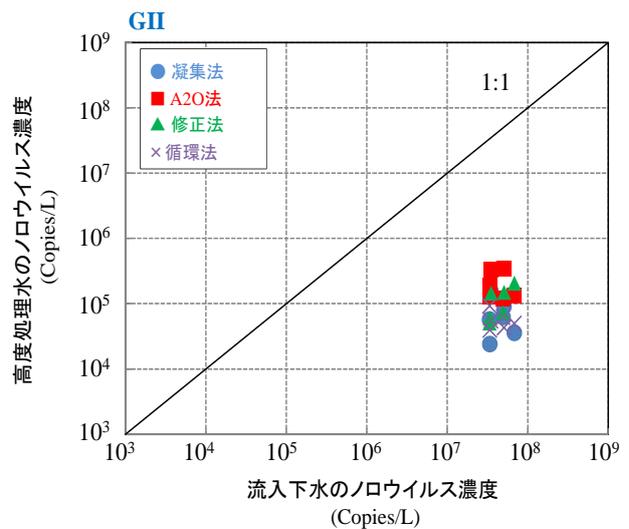


図-6 高度処理前後でのノロウイルス濃度 (GII)

## 4.2 平均滞留時間を考慮した再生処理施設のノロウイルス濃度の推移

平均滞留時間を考慮した、再生処理施設のノロウイルス濃度推移を図-7に示す。調査日の再生水の1日あたりの供給量は791m<sup>3</sup>/日であり、生物膜ろ過処理槽の平均滞留時間は6h、処理水槽で3h、オゾン流入槽+反応槽+流出槽で3h、再生水貯水槽で8h、塩素接触は、概ね塩素注入率が15mg/Lで接触時間が5分間程度であり、施設内の平均滞留時間は概ね20hであった（処理フローの詳細は図-1参照）。

図-7より、GIおよびGIIは同様の濃度推移で、GIは100μL系の定量で検出限界以下(48copies/L未満)、GIIは2.5copies/tube=59copies/L(定量下限以下)で、再生処理施設において（塩素後）4Log以上の除去が見込まれた。

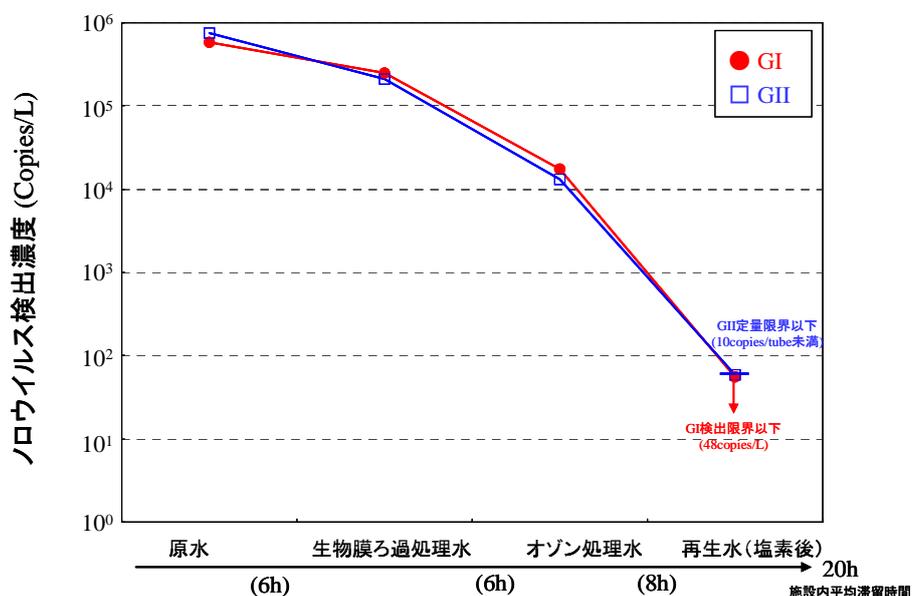


図-7 再生処理施設のノロウイルス濃度推移

## 4.3 再生処理プロセス毎のノロウイルスの除去特性

再生処理施設の生物膜ろ過処理前後、オゾン処理前後、塩素処理前後のノロウイルス濃度を図-8、10、12に示す。また、生物膜ろ過処理およびオゾン処理におけるHRTとノロウイルス濃度の関係を図-9、図-11に示す。図-13には塩素注入率×接触時間（CT値）と再生水のノロウイルス濃度の関係を示す。再生水は一部のデータは、反応用量100μL系のReal-time PCRによる定量にて10copies/tube未満の定量下限値および検出限界値以下(1copies/tube)未満であった。検出限界以下のデータは1copies/tube検出されたと仮定して、濃度を算出した。生物膜ろ過処理では、GIは最大1.2Log（平均値=0.78Log, 標準偏差=0.37Log）であり、GIIは最大1.2Log(平均値=0.85Log, 標準偏差=0.39Log)の除去率であった。また、生物膜ろ過処理水は滞留時間との間に相関は確認されなかった。

オゾン処理ではGI、GIIともオゾンによる除去（不活化）率はほぼ同等であり、滞留時間が長くなることで除去（不活化）率の向上傾向が確認された。滞留時間により除去率（不活化）が異なるが、GI、GIIで最大1Log程度、最小で0.2Log程度であった。

塩素処理における再生水中のノロウイルス濃度の多くはGI、GIIともに定量下限値または検出下限値以下であった。検出限界以下のデータを1copies/tubeで検出された場合と仮定し、換算濃度を算出すると塩素処理で概ね、GI、GIIとも2Log以上の除去（不活化）率が見込めた。また、塩素注入率×接触時間(CT値)とノロウイルス濃度の関係(図-13)を見ると、GIIのみがCT値の増加に伴い除去（不活化）率が増加しているが、GIはほぼ一定の除去（不活化）率であった。これは検出限界以下のデータを1copies/tubeと仮定して換算した定量値が多数含まれているため、CT値が増加しても除去（不活化）率が一定の値を示したものと考えられた。

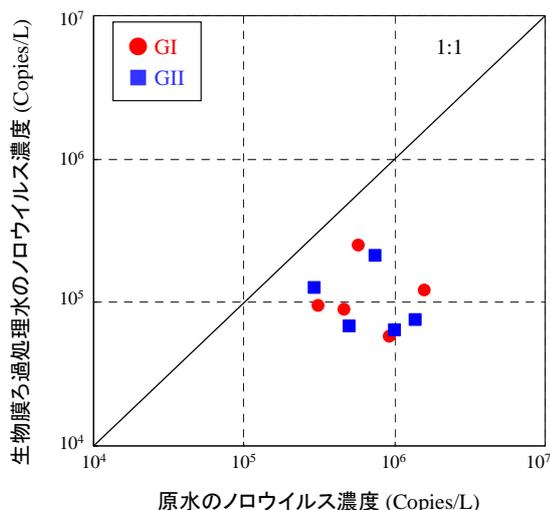


図-8 生物膜ろ過処理前後のノロウイルス濃度

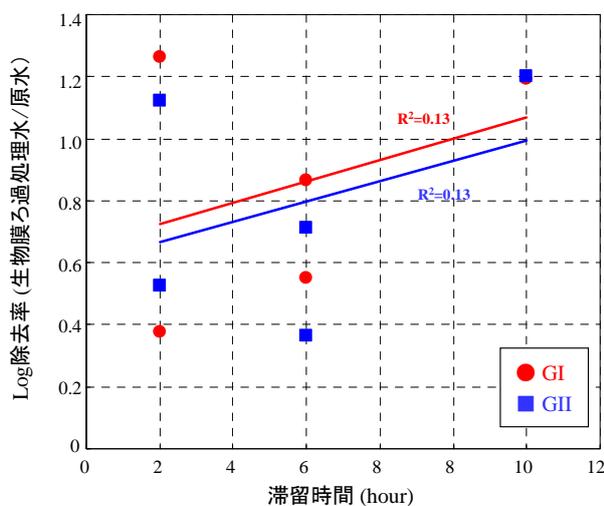


図-9 生物膜ろ過処理における除去率と滞留時間の関係

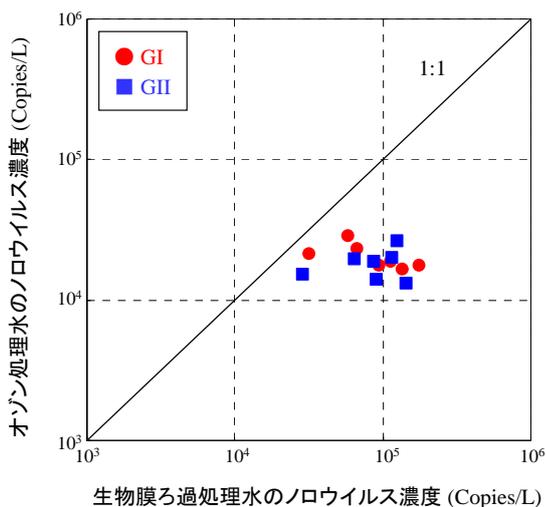


図-10 オゾン処理前後のノロウイルス濃度

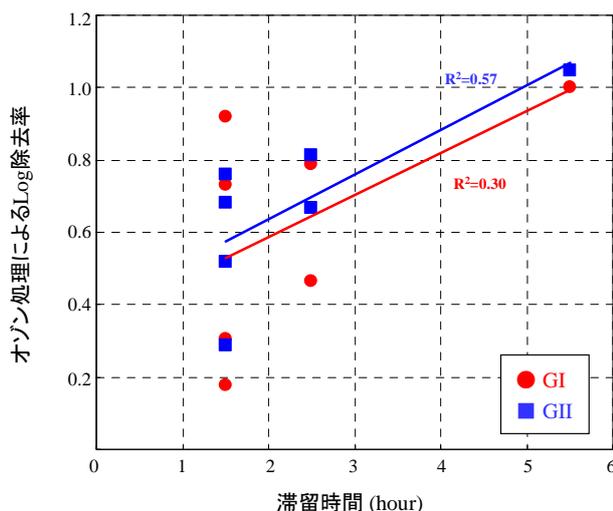


図-11 オゾン処理における除去率と滞留時間の関係

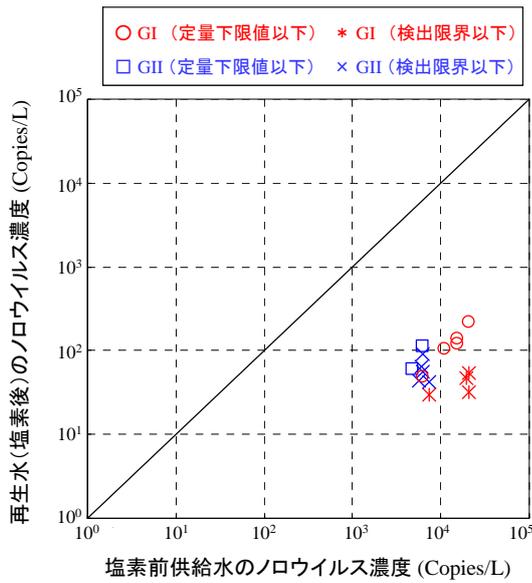


図-12 塩素処理前後のノロウイルス濃度

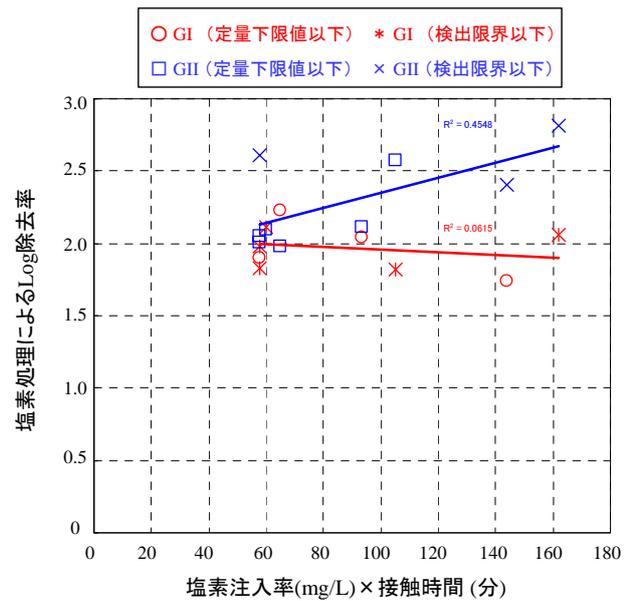


図-13 塩素処理における除去率と滞留時間の関係

#### 4.4 調査データを利用したリスク評価

##### (1) 再生水中のノロウイルス濃度分布の推定

再生水中のノロウイルス濃度分布の推定法として、Shapiro-Wilk 検定による正規性の評価を行った。評価結果を図-14 に示す。ノロウイルス濃度を対数変換し検定した結果、有意水準 5%で再生水中の濃度分布は対数正規分布に従うと考えられた。よって、本施設の再生水中のノロウイルス濃度分布は図-15、16 に従うと推定した。

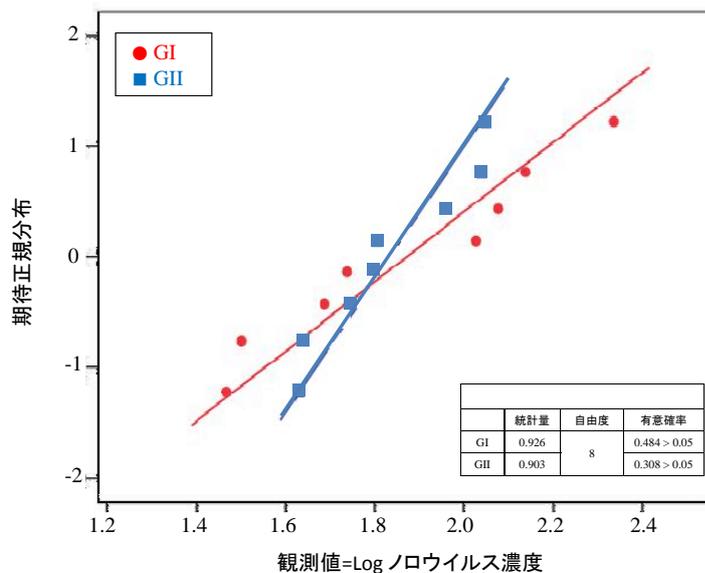


図-14 対数変換したノロウイルス濃度分布の正規性検定

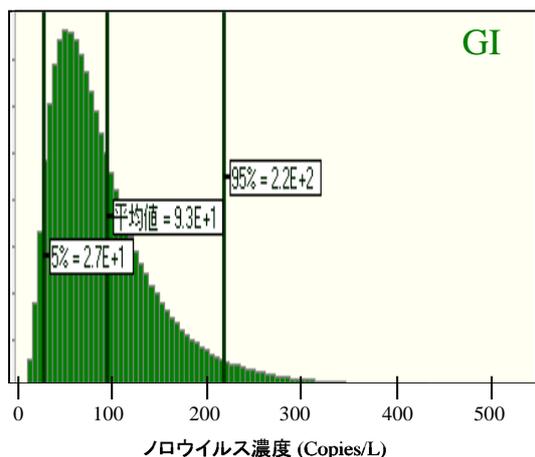


図-15 再生水中のノロウイルス GI 濃度分布

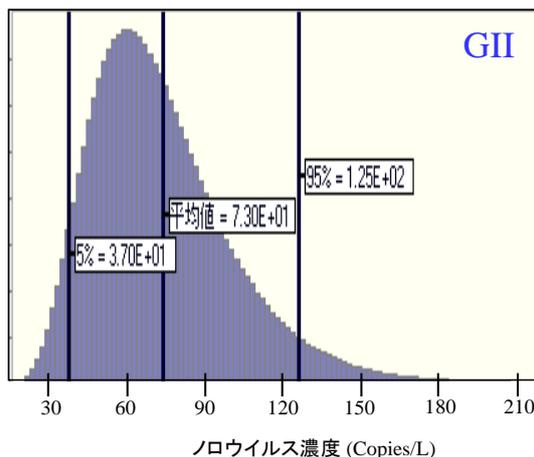


図-16 再生水中のノロウイルス GII 濃度分布

### (2) 再生水の利用用途と曝露量、年間曝露数の設定

再生処理施設の再生水は現状では、水洗トイレに用いられているため、利用用途は「水洗トイレ利用」と設定した。曝露量および年間曝露日数は、「ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案)」に基づき、使用者が水洗トイレ利用時にしぶきが口に入ることを想定し、曝露量を 0.02mL/回、年間曝露数を 3 回/年と設定した<sup>14)</sup>。

### (3) 試算結果

再生水中の濃度分布を考慮し、モンテカルロシミュレーション (n=10,000 回) により水洗トイレ利用における DALY を用いたリスク評価の結果を図-17 に示す。安全側を考慮して 95% 上限値を採用すると、1 人 1 年あたりの疫病負荷が GI で  $6.4 \times 10^{-8}$ 、GII で  $3.7 \times 10^{-8}$  となった。WHO では再生水利用時のリスクとして DALY を  $10^{-6}$  以下に設定することを提唱している<sup>10)</sup>。本再生処理施設の場合、95% 上限値で評価すると WHO 提唱値を達成していることから、水洗トイレに利用しても衛生学的に問題のないレベルであるといえた。

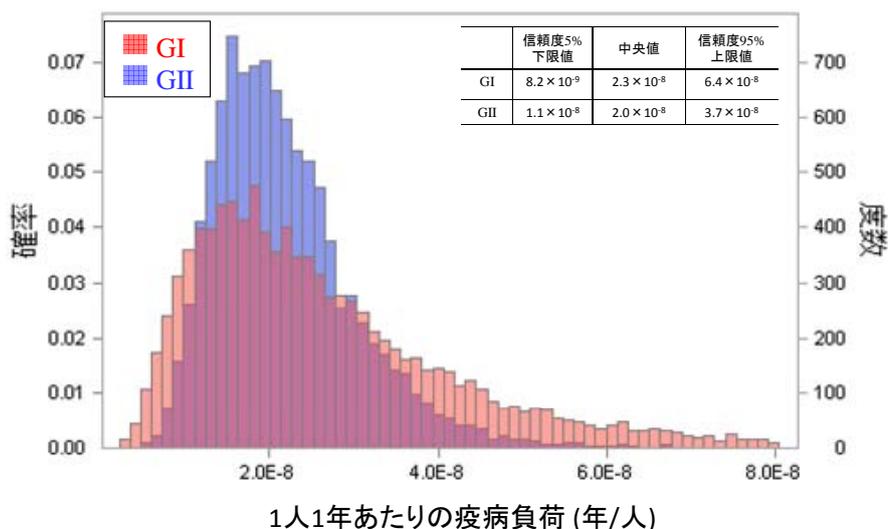


図-17 水洗トイレ利用時における DALY の頻度分布  
(モンテカルロシミュレーション 10000 回による試行計算結果)

#### (4) 各処理水の試算結果

再生処理施設では、再生水利用を目的に二次処理水の高度処理として、生物膜ろ過処理、オゾン処理、塩素処理を行い再生水を供給しており、上記 4.4(3)において DALY を用いたリスク評価を行った。そこで、本節では処理方式の異なる高度処理水（凝集法、A<sup>2</sup>O 法、修正法、循環法）および処理条件の異なるパイロットプラント(I 系～III 系、III 系+塩素処理)処理水において、それぞれを再生水と同様に水洗トイレに直接利用すると仮定した場合に、どの程度のリスクとなるか試算を行った。

なお、リスクの試算は前項と同様の手順、つまり、原水および各処理水の実測値より濃度分布を推定し、除去率分布を算出する。除去率分布から各処理水の濃度分布を推定し、モンテカルロシミュレーション（10,000 回）による不確実要素を考慮した、1 人 1 年あたりの疫病負荷（DALY）により評価を行った。濃度分布の推定は Shapiro-Wilk 検定を用いた。

Shapiro-Wilk 検定より有意水準が概ね 5% で流入下水および処理水の濃度分布は表-3 に示す、平均値および標準偏差に従う対数正規分布であるとした。これらの濃度分布より除去率分布を推定し疫病負荷（DALY 値）の試算を行った。表-4 および図-18 に処理方式毎における 1 人 1 年あたりの DALY 値の試算結果を示す。

表-3 各処理水のノロウイルス濃度の平均値と標準偏差

		GI (copies/L)		GII (copies/L)	
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
C 処理場	二次処理水	$1.9 \times 10^7$	$9.4 \times 10^6$	$4.5 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$
P.P	流入下水	$5.3 \times 10^6$	$2.3 \times 10^6$	$7.7 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$
	I 系	$4.1 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$2.2 \times 10^5$	$8.2 \times 10^4$
	II 系	$3.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$3.5 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
	III 系	$1.5 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	$4.7 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$
	III 系+塩素	$7.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5$	$5.4 \times 10^4$
高度処理水	流入下水	$9.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$
		$2.7 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$5.9 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$
	凝集法	$3.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$7.1 \times 10^4$	$4.7 \times 10^4$
		$1.7 \times 10^5$	$6.7 \times 10^4$	$2.9 \times 10^5$	$2.0 \times 10^5$
	A2O 法	$1.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
		$4.8 \times 10^4$	$4.1 \times 10^4$	$4.8 \times 10^4$	$2.8 \times 10^4$
	修正法	$8.7 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.1 \times 10^5$	$6.2 \times 10^4$
		$6.6 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$
	循環法	$8.6 \times 10^4$	$4.3 \times 10^4$	$5.7 \times 10^4$	$1.9 \times 10^4$
		$3.2 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$

\*高度処理水：上段：H23 年度調査データ

下段：H20 年度調査データ（既存データ）

表-4 処理方式毎の1人1年あたりの疫病負荷

		DALY (年/人)					
		GI			GII		
		信頼度5% 下限値	中央値	信頼度95% 上限値	信頼度5% 下限値	中央値	信頼度95% 上限値
C処理場	二次処理水	$3.5 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-5}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-4}$
P.P	I系	$3.6 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-5}$	$3.5 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-5}$	$5.9 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^{-4}$
	II系	$2.4 \times 10^{-5}$	$8.1 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-4}$	$2.7 \times 10^{-4}$	$5.3 \times 10^{-4}$	$7.0 \times 10^{-4}$
	III系	$1.5 \times 10^{-5}$	$4.1 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-4}$	$2.7 \times 10^{-4}$	$5.8 \times 10^{-4}$	$7.2 \times 10^{-4}$
	III系+塩素	$8.3 \times 10^{-6}$	$2.2 \times 10^{-5}$	$5.8 \times 10^{-5}$	$4.2 \times 10^{-5}$	$9.6 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-4}$
高度処理水 (H23年度)	凝集法	$8.9 \times 10^{-6}$	$4.5 \times 10^{-5}$	$8.3 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$6.8 \times 10^{-5}$	$5.9 \times 10^{-5}$
	A2O法	$1.5 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-5}$	$3.3 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-4}$
	修正法	$3.3 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-5}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$2.9 \times 10^{-6}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$8.3 \times 10^{-5}$
	循環法	$1.2 \times 10^{-6}$	$7.8 \times 10^{-6}$	$2.1 \times 10^{-4}$	$8.5 \times 10^{-7}$	$4.8 \times 10^{-6}$	$3.8 \times 10^{-5}$
高度処理水 (H20年度)	凝集法	$9.5 \times 10^{-7}$	$9.2 \times 10^{-6}$	$2.0 \times 10^{-4}$	$5.2 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-5}$	$3.1 \times 10^{-4}$
	A2O法	$4.7 \times 10^{-6}$	$4.3 \times 10^{-5}$	$7.4 \times 10^{-5}$	$1.9 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-5}$	$6.3 \times 10^{-5}$
	修正法	$2.8 \times 10^{-6}$	$2.6 \times 10^{-5}$	$8.9 \times 10^{-5}$	$9.9 \times 10^{-6}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$6.2 \times 10^{-5}$
	循環法	$2.1 \times 10^{-6}$	$2.3 \times 10^{-5}$	$4.7 \times 10^{-5}$	$6.6 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$2.7 \times 10^{-5}$

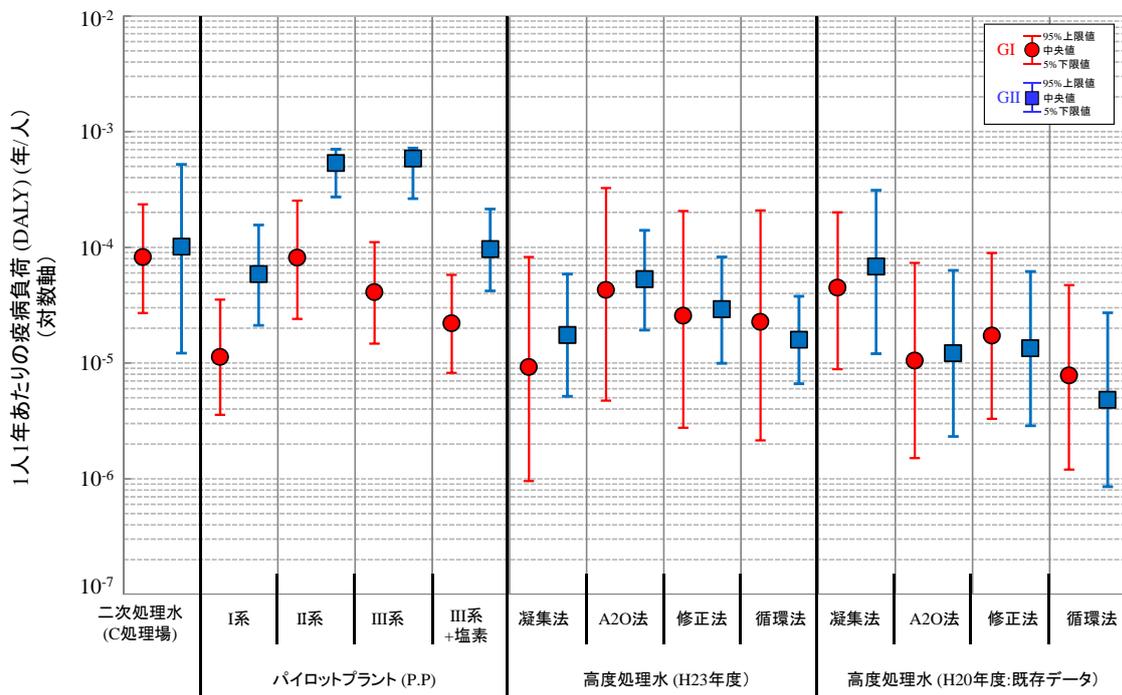


図-18 処理方式毎の1人1年あたりの疫病負荷

P.P.のIII系(HRT=8h、MLSS=2000mg/L)とC処理場(HRT=11h、MLSS=1,800mg/L)を標準的な活性汚泥処理法とした場合、HRTをやや長時間としたI系、塩素処理を行ったIII系のDALY値は低下した。各高度処理法では活性汚泥法と比較して全体的にGIIのDALY値は低下したが、GIでは同レベル

であった。過去に実施した高度処理法の既存データを利用した試算結果では、凝集法を除き GII、GI ともに活性汚泥法と比較すると DALY 値は低く見積もられた。過去の調査時と比較して今回の調査では、高度処理法の各系列で MLSS 濃度は若干高濃度となっていたが、反応タンクの HRT は凝集法では長時間となり、他の系列ではやや短時間となっていた（表-2）。ノロウイルスの除去率の変動要因の 1 つは、反応タンクの HRT の長短が影響を与えていると推定され、その変動が DALY 値に反映されたものと考えられた。また、HRT が 8h、MLSS 濃度 1000mg/L の II 系では、標準的な処理条件（III 系）と比較して GII はほぼ同等の DALY 値であったが、GI では上昇する結果となった。

以上の結果から、標準的な活性汚泥法に比較して高度処理法は施設の運転条件にもよるが、DALY 値を低減できると試算されたが、これらの処理水を直接再利用水として水洗トイレ利用に用いるには、WHO の提唱する  $10^{-6}$  DALY を達成できないと評価された。しかし、今回のリスク評価にあたっては、高度処理水に消毒プロセスを考慮していないが、調査対象とした再生処理施設での塩素処理によるノロウイルスの平均除去（不活化）効果が 2Log 程度と見込まれたため、その効果を考慮すれば  $10^{-6}$  DALY の達成の可能性は高まると推定される。また、今回の調査は、冬季の胃腸炎感染症流行期に実施したが、夏季から秋季の非流行期では、各高度処理水のノロウイルス濃度レベルは 2 オーダー程度低下することが明らかとなっている<sup>15)</sup>。このため、非流行期における処理水の濃度レベルを考慮する必要もある。さらに、上記試算結果においては、ノロウイルスの遺伝子量を定量しているため、実際の感染価を考えた際、試算結果における DALY よりも小さくなると考えられるが、感染価の推定方法が現状では明らかとなっていないため、より安全側を考慮した試算結果である点に留意が必要である。

WHO が提唱する  $10^{-6}$  DALY の値は、飲料水や農業利用による提唱値である。具体的障害調整生存年数としては、1,000 人に対し約 0.4 日(DALY)の疫病負荷であり、今後、下水処理水の再生水利用における目標値についての議論が必要と考えられる。また、各下水処理法によるノロウイルスの処理水濃度や除去率の変動が大きい場合には、その分布が広範となることから、試算された中央値あるいは 95% 上限値の DALY 値の評価についても検討が必要と考えられる。

## （5）重要管理点の検討

本節では、再生処理施設での調査データに基づき、再生処理施設の各処理プロセスの処理が不十分であった場合、つまり、生物膜ろ過処理、オゾン処理、塩素処理の各々および双方の消毒処理が不十分であった場合を想定して、水洗トイレ利用時における DALY 値の試算を行った。処理プロセス毎による DALY 値の低減効果を試算することで、重要管理点を検討した。

なお、試算方法は前項と同様とし、使用したデータは下記のとおりとした。

### Case1: 生物膜ろ過処理のみが不十分な場合

生物膜ろ過による処理が不適切で処理されなかったことを想定し、原水がそのままオゾン処理、塩素処理により再生水と供給されると仮定した。なお、オゾン処理によるノロウイルスの遺伝子の除去（不活化）率は、実測データに基づき GI および GII ともに除去率分布を考慮した。

### Case2: オゾン処理のみが不十分な場合

オゾン流入水(=生物膜ろ過処理水)がそのまま塩素処理されることを想定した。塩素処理による除去（不活化）率は、実測データに基づき除去率分布を考慮した。

### Case3: 塩素処理のみが不十分な場合

生物膜処理を経たオゾン処理水がそのまま再生水として利用されることを想定した。

**Case4:** オゾン、塩素処理の双方が不十分な場合

生物膜処理水が直接、再生水として利用されることを想定した。

表-5 各想定における1人1年あたりの疫病負荷

各Caseの想定条件	DALY (年/人)					
	GI			GII		
	信頼度5% 下限値	中央値	信頼度95% 上限値	信頼度5% 下限値	中央値	信頼度95% 上限値
Case 1: 生物膜ろ過処理のみが不十分	$5.7 \times 10^{-8}$	$2.8 \times 10^{-7}$	$1.4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-7}$	$5.4 \times 10^{-7}$	$1.6 \times 10^{-6}$
Case2: オゾン処理のみが不十分	$3.8 \times 10^{-8}$	$1.8 \times 10^{-7}$	$8.3 \times 10^{-7}$	$1.0 \times 10^{-7}$	$2.9 \times 10^{-7}$	$8.3 \times 10^{-7}$
Case3: 塩素処理のみが不十分	$1.7 \times 10^{-6}$	$6.0 \times 10^{-6}$	$2.1 \times 10^{-5}$	$1.5 \times 10^{-6}$	$5.2 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-5}$
Case4: オゾン、塩素処理の双方が不十分	$1.3 \times 10^{-5}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$6.7 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-5}$	$5.7 \times 10^{-5}$
正常運転時	$8.1 \times 10^{-9}$	$2.3 \times 10^{-8}$	$6.4 \times 10^{-8}$	$1.1 \times 10^{-8}$	$2.0 \times 10^{-8}$	$3.7 \times 10^{-8}$

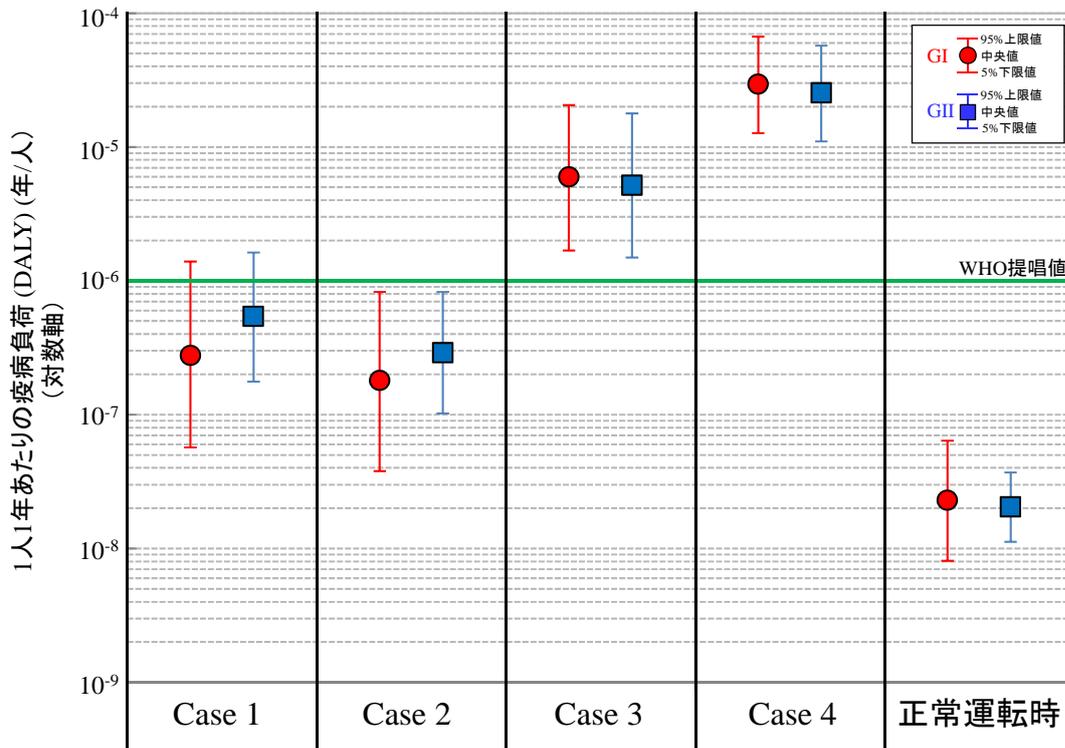


図-19 各 Case における1人1年あたりの疫病負荷の比較

各 Case における DALY 値の試算結果を表-5 および図-19 に示す。本再生処理施設が正常に運転された場合には、4.4(3)で試算したとおり、水洗トイレ利用時の衛生学的安全性は担保されると考えられた。各 Case において、正常運転時の DALY 値 (95%上限値での評価) と比較すると、Case4 の消毒プロセスの機能が不十分な場合では、GI で約 1100 倍、GII は約 1500 倍上昇すると試算され、消毒プロセスが重要管理点であることが明らかとなった。また、塩素処理が不十分な Case3 においては、正常運転時の DALY 値よりも GI で約 300 倍、GII は約 500 倍上昇した。一方、オゾン処理のみが不

十分な Case2 では、GI で約 10 倍、GII は約 20 倍、生物膜処理のみが不十分な Case1 では、GI で約 20 倍、GII は約 40 倍、DALY 値が上昇する結果となった。特に、本再生処理施設の場合には、オゾン処理よりも塩素処理による DALY 値の低減効果の寄与率が高い。

よって、本再生処理施設においては、塩素の注入率および残留塩素や接触時間等の消毒効果に影響を及ぼす因子のモニタリングが、水洗トイレ利用時における衛生的安全性を担保する上で、重要管理点であるといえる。

## 5. まとめ

本調査では、下水処理水質の信頼性評価として HACCP の適用を検討し、処理水質の信頼性評価のためのリスク評価を実施した。評価対象にはノロウイルスを利用し、その削減量から評価を行った。HACCP の適用に際しては、重要管理点を特定する上で病原微生物による健康影響被害の影響程度の評価に、定量的微生物リスク評価 (QMRA) の 1 手法である DALY を用い検討を行った。

得られた結果を以下に示す。

- 1) 活性汚泥処理水では、塩素処理を行うことで DALY 値を低減できる効果が確認された。
- 2) 通常の活性汚泥処理水に比較して、各種生物学的高度処理法の処理水の DALY 値は低く見積もられた。
- 3) 再生処理プロセスとして生物膜処理、オゾン処理、塩素処理を各々評価し、各処理プロセスが正常に運転されることで DALY 値の低減効果は向上したが、いずれかのプロセスにおいて処理が不十分である場合には DALY 値の低減効果は減少した。
- 4) 調査対象とした再生処理プロセスでは、塩素処理が DALY 値の変動に及ぼす影響が大きいため、本プロセスが重要管理点であると評価された。

## 謝辞

本調査・検討を実施するにあたり A、B、C の下水処理場管理者の関係各位には多大なご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

## 参考文献

- 1) (社) 日本下水道協会、平成 22 年下水道白書、日本の下水道。
- 2) 国土交通省都市・地域整備局、国土交通省国土技術政策総合研究所 (2005)、下水処理水の再利用水質基準等マニュアル。
- 3) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子 (2009)、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集、46(561),91-101。
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課(2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 5) 杉浦善明 (2001) HACCP 検証と科学的証明、株式会社 鶏卵肉情報センター。
- 6) 清涼飲料水 HACCP 研究班編著 (2005)、HACCP:衛生管理家各の作成と実践 改訂清涼飲料水実践編、中央法規出版。
- 7) Westrell, T., Schonning, C., Stenstrom, T.A. and Ashbolt, N.J. (2004) QMRA and HACCP for management of pathogen in wastewater and sewage sludge treatment and reuse, Water science and technology, Vol.50, No.2, pp.22-30.
- 8) 伊坪徳宏、田原聖隆、成田暢彦 (2007) LCA 概論、(社)産業環境管理協会。

- 9) 岡本誠一郎、都市排水の再生利用における衛生学的リスク管理に関する研究 (2011)、京都大学大学院博士論文。
- 10) World Health Organization (2006) WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, volume II, wastewater use in agriculture.
- 11) Mara, D. and Sleigh, A. (2010) Estimation of norovirus and Ascaris infection risks to urban farmers in developing countries using wastewater for crop irrigation, *Journal of Water and Health*, pp.527-576.
- 12) Kemmeren J.M., Mangen M.-J.J., Y.T.H.P. van Duyhoven and A.H. Havelaar, 2006, Priority setting of foodborne pathogens –Disease burden and costs of selected enteric pathogens-, RIVM report 330080001/2006, p.41-50, p.65-71, pp.73-78.
- 13) Masago Y, Katayama H, Watanabe T, Haramoto E, Hashimoto A, Omura T, Hirata T and Ohgaki S. (2006) Quantitative risk assessment of Noroviruses in drinking water based on qualitative data in Japan, *Environ. Sci. Tech.*, Vol.40, No.23, pp.7428-7433.
- 14) 高度処理会議 (2001)、ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案)。
- 15) 国土交通省都市・地域整備局、平成 21 年度、下水道におけるウイルス等の安全性評価に関する調査報告書。

# 下水道革新的技術実証事業一般化検討調査

リサイクルチーム 上席研究員

内田 勉

主任研究員

日高 平

## 1. はじめに

地球温暖化対策の進展や資源・エネルギー問題の対応に向けて下水汚泥の嫌気性消化の工程で発生するバイオガス（メタンガス）の有効利用に期待が高まっており、平成23年度には、大阪および神戸で下水道革新的技術（B-DASH）実証事業が実施されている<sup>1)</sup>。これらの実証事業では、いずれも下水汚泥の嫌気性消化技術を核として、周辺の技術開発をあわせて、新たなシステムが開発されている。これらの成果を活かしながら対象技術の全国展開に向けた可能性・阻害要因を明らかにするためには、実証フィールドとなる下水処理場以外の条件での対象技術の適用可能性を検証する必要がある。特に、いずれの実証フィールドでも、下水汚泥以外の有機性廃棄物（他バイオマス）と下水汚泥を混合消化させることが提案されているものの、地域により汚泥や他バイオマスの性状が異なる可能性があり、実証フィールドの結果のみからでは、全国展開に必要な情報が得られない。そこで本業務では、消化槽を有する全国の処理場を対象として、他バイオマスとの混合消化に関する調査および実験的検討を行うことで、B-DASH 実証事業の成果のガイドライン化に資する基礎知見の収集を目的とした。こうした基本的知見は、既設の消化槽に対しても、他バイオマスの受入に関する新技術開発の際の基礎ともなることから、今後、下水処理場の再生可能エネルギー供給拠点化に向けた各分野の検討に際しても必須の検討事項である。

そこで本調査では、消化槽を有する全国の処理場を対象として、他バイオマスとの混合消化に関する調査および実験的検討を行うことで、B-DASH 実証事業の成果のガイドライン化に資する基礎知見の収集を目的とした。

## 2. 本調査の成果

本調査で得られた成果は以下の通りである。

### (1) 比較検証を行う都市の選定とバイオガス精製に係る現状・課題に関する調査

消化槽を有する都市を全国から選定し、消化槽の運転状況や、バイオガス精製に係る現状や課題について、ヒアリングや文献調査などを行い整理した。規模や排除方式など処理場の条件が異なるように全国の消化槽を有する都市を選定し、ヒアリングを含めた調査を行った。

その結果、消化率はおおむね6割程度であり、消化槽の運転は安定しているものの、得られた消化ガスの利用については、季節変動と発電施設のバランスで十分には活用されていないなどの課題も明らかになった。

### (2) 回分式の消化実験と混合消化による影響分析

選定した都市の下水汚泥について、実験室にて回分式の消化実験を同一の条件下でそれぞれ21日間行った。各都市の下水汚泥の消化特性を把握するとともに、他バイオマスを投入した実験もあわせて行い、その際のメタン転換特性や阻害要因などの影響について分析を試みた。

消化汚泥および混合汚泥を用いた回分式実験の結果、異なる都市の汚泥でも、一般的な指標であるTSやCOD<sub>Cr</sub>などの観点で、消化特性を評価可能であることが示された。いずれの汚泥もおおむねCOD<sub>Cr</sub>/VS比は1.7程度であり、COD<sub>Cr</sub>基準でのメタン転換率は5~6割程度であった。

他バイオマスと混合した回分式実験では、食品廃棄物の場合馴致期間を必要とせずメタン転換が可能であった。COD<sub>Cr</sub>基準でのメタン転換率は5~9割程度であり、その反応速度も混合汚

泥以上であった。それに対して、剪定枝の場合は21日間の実験期間でほとんどメタンへ転換せず、都市によっては混合汚泥からのメタン転換がやや阻害させる傾向も見られた。連続式実験や実証実験関連の調査の結果と比較して、剪定枝などのバイオマスについては、馴致期間を確保することが、より正確な評価につながると考えられた。

### (3) 実証都市と他都市の下水汚泥の消化実験による比較検証

実証都市での連続式実験における他バイオマス投入の影響を検討するために、他都市の下水混合汚泥を用いた中温嫌気性消化の連続式実験を、有効容積100Lの実験用嫌気性消化槽3系列により行い、I系には下水混合汚泥のみを投入、II系には下水混合汚泥に生ごみを投入、III系には下水混合汚泥に剪定枝を投入し、実証都市での連続式実験との比較検証を試みた。その結果、生ごみについては投入量に応じたメタンガス生成量の増加が示され、特に阻害影響は観察されなかった。

また、実証都市および連続式実験の消化汚泥を用いた脱水試験も行い、他バイオマス投入による脱水性への影響も検討した。その結果、他バイオマスを投入した場合でも、全体として、脱水効率や脱水ろ液の水質への悪影響はない、もしくはやや改善される効果があると考えられた。

### (4) 革新的技術の他都市への適用性に係る検討

全国でのアンケート調査により、下水汚泥と混合消化を行う他バイオマスとして、地域により、農業系廃棄物、食品工場廃棄物、し尿・浄化槽汚泥、生ごみ、木質廃材など、様々な可能性が示された。

ただし、他バイオマスを受け入れるためには、流域下水道の構成市町村、他バイオマス排出先、廃棄物処理業者、周辺住民などの関係者との調整、法制度上の問題、技術的な問題に対する不安などが課題として挙げられた。また、現状で下水汚泥の処理・再利用が順調に成立している場合、新たに他バイオマスを受け入れることには消極的である場合も見られた。

## 3. まとめ

実験的検討により、異なる都市で他バイオマスを受け入れる際の基本的な特性が示された。本調査で明らかになった他バイオマス受入に関する課題は、地域によって状況が異なり、革新的技術の他都市への適用を検討する際には、地域の特性を踏まえた調査が必要であるものの、関連の制度を整備しながら、また技術的な課題に対する不安を解消する実証データを蓄積することで、今後普及が進むことが期待できる。

## 謝辞

本調査を行うにあたり、ヒアリング調査、ならびに下水汚泥試料およびその他必要試料の採取では、地方自治体関係各位および実証実験関係者各位の多大なる協力を得ており、謝意を表します。

## 参考文献

- 1) 白崎亮：下水道革新的技術実証事業(B-DASH プロジェクト)の概要，再生と利用，Vol. 36，No. 134，pp. 16-19，2012.

## 地域バイオマスの資源管理と地域モデル構築に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：リサイクルチーム

研究担当者：内田勉、岡本誠一郎、日高平、  
堀尾重人、井上研一郎

【要旨】バイオマスを地域資源と位置付け、バイオマス利活用に関する地域モデルを構築し、地域レベルでの効率的な利活用方策を検討した。①草木廃材の堆肥化、②メタン発酵、③チップ化(マルチング)、④下水汚泥との混合による嫌気性消化について、LCCO<sub>2</sub>原単位整備を行い、当チームにおいて前年度以前に得られている LCCO<sub>2</sub> 評価モデルを改良した。さらに、特定の地域を対象にモデルを適用し、CO<sub>2</sub> 排出量やエネルギー使用量、運営コスト等の面から、①～④の手法の適合性の評価を行った。今後は、剪定方法や集草方法等を含め、検討したインベントリ毎の CO<sub>2</sub> 排出量等を総合的に勘案し、最適な手法を選定する必要があるものと考えられた。

キーワード：堆肥化、メタン発酵、チップ化(マルチング)、下水汚泥との混合による嫌気性消化

### 1. はじめに

わが国の温暖・多雨な気候により豊富なバイオマスの資源量もたされるが、一方でバイオマス資源は、発生地域が分散していること、形状・性状が多様多様にわたること、有機質であり品質が安定せず変質する可能性が高いこと、資源化・エネルギー化のために一定の処理が必要な場合が多いことなど、その利活用推進には依然として課題も多い。

道路、河川、公園、ダムなどの管理のため、毎年定期的に広大な緑地の雑草の除草や多くの樹木の剪定、流木の回収などが行われている。国土交通省の 109 国道事務所、102 河川事務所、17 公園事務所、25 ダム事務所に対して実施したアンケート結果によればこれらの草木廃材は、熱量換算すると 3.1 PJ/年、剪定枝葉は 0.17 PJ/年相当と推算されている<sup>1)</sup>。こうしたバイオマスは、毎年、一定の発生量が得られ、国や地方公共団体が公物管理、公共サービスの一環として取り扱っているために管理システムが確立しているなど、利用上の特性を有しているものの、特に草木廃材は未利用のまま処理・処分されているものも多い。これらのバイオマスを効率的に利活用していくためには、その特性に留意しつつ、できる限り既存の施設・システムを活用した利活用システムを構築することが有効であり、そのための要素技術の開発が望まれるところである。

本研究では、公共緑地等バイオマスを資源として位置づけ、恒久的に利用していくための要素技術やシステムを提示することを目的とした。提示にあ

たっては、LCCO<sub>2</sub>による評価手法を確立させ、それを踏まえ、公共緑地等バイオマス利用に関する要素技術やシステムの適合性を評価、検討した。

### 2. 各種方式における原単位の整備

草木廃材の堆肥化、メタン発酵、チップ化(マルチング)、下水汚泥との混合による嫌気性消化について、LCCO<sub>2</sub>原単位やその制御因子等<sup>2)</sup>を把握した。例えば、堆肥化におけるインベントリ項目に関しては表-1のように、4方式の原単位設定の範囲に関しては図-1のように設定した。さらに、これらの結果を踏まえ、昨年度までに既にまとめられた LCCO<sub>2</sub>や温室効果ガス排出量の評価手法<sup>3)</sup>の精度を向上させ、LCCO<sub>2</sub>原単位等をその評価手法に反映させることにより評価を行った。

### 3. 各種方式の適合性の評価

刈草 1,000 wet-t/年および剪定枝 1,000 wet-t/年を対象に 4方式におけるインベントリ分析を行った。なお、刈草を 2 日以上乾燥させた場合については、表-2 に示すとおり、乾燥により 36%(63%-27%)の質量減となり、640 wet-t/年となるものとした。適合性評価の結果は図-2～4 に示すが、これらの図の軸は 4方式の平均値に対する割合がとられており、数値は高い(外側)ほど有利となる。

#### 3. 1 刈草（即日乾燥の場合）

人員、運営コスト、建設費、用地面積が優れた方

表-1 堆肥化におけるインベントリ項目

項目		対象	備考	
ユーティリティ	人員	○	・施設の運用に要する人員	
	電力・燃料	○	・燃料は使用しない	
	水	-	・無視する	
	薬品	-	・草木類には脱臭剤は不要とし、考慮しない	
コスト	固定費	人件費	○	・施設の運用に要する人員の直接人件費
		償却費	○	・定額法による建物の償却費
		維持管理費	○	・整備補修費
	変動費	○	・電力費の合計	
	建設コスト	○	この値は償却費、維持管理費、温室効果ガス排出量、エネルギー消費を求めるための数値であり、コストの合計には計上しない	
	原料費	○	・受入費	
エネルギー消費費	収入	○	・堆肥の販売による収入	
		○	・電力の使用による直接投入エネルギー ・建設時、整備補修時に使用する間接投入エネルギー ・堆肥の販売によるエネルギー削減量	
温室効果ガス	CO <sub>2</sub>	○	・電力の使用による直接二酸化炭素排出量 ・建設時、整備補修時に発生する間接二酸化炭素排出量 ・堆肥の販売による二酸化炭素削減量	
	N <sub>2</sub> O	-	・排出なし	
	CH <sub>4</sub>	-	・排出なし	
大気汚染物質	NO <sub>x</sub>	-	・燃料は使用しない	
	SO <sub>x</sub>	-	・燃料は使用しない	
水質汚染物質	BOD	-	・排水は発生しない	
	COD	-	・排水は発生しない	
その他	用地面積	○	・施設の立地に要する土地面積	
	生産物	○	・堆肥生産量	
	副産物	-	・堆肥化施設では発生しない	
	残渣	-	・選別残渣は考慮しない	

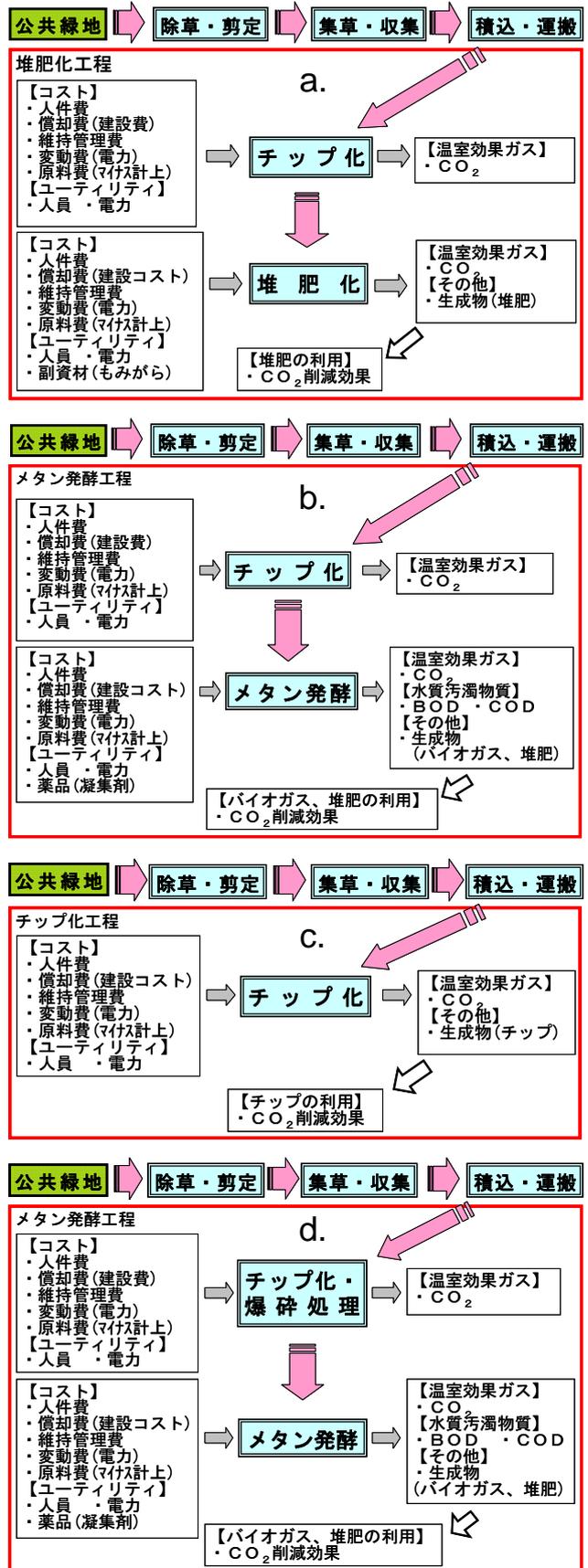
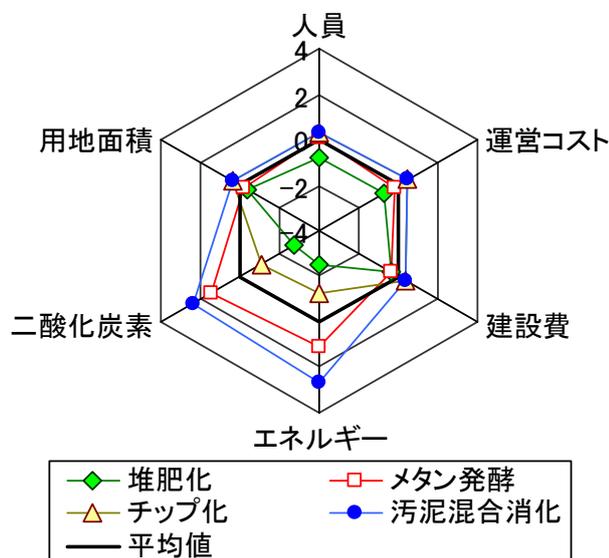


図-1 原単位設定の範囲

a. 草木廃材の堆肥化、b. メタン発酵、c. チップ化(マルチング)、d. 下水汚泥との混合による嫌気性消化

表一 評価条件とした刈草、剪定枝の組成

	刈草 (即日乾燥)	刈草 (2日 以上乾燥)	剪定枝
水分	63.0%	27.0%	61.0%
有機分	27.3%	63.3%	28.8%
無機分	9.7%	9.7%	10.2%

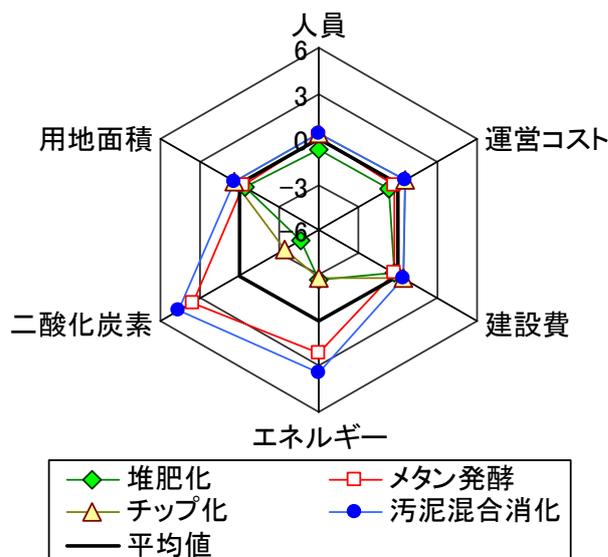


図一 各方式の適合性評価 (刈草、即日乾燥)

式は、チップ化や下水汚泥との混合による嫌気性消化となった(図一)。これは、機器の構成が破砕機を中心とし単純であること、処理工程も単純であることが要因であると考えられる。エネルギー使用量や二酸化炭素の発生量は下水汚泥との混合による嫌気性消化が特に優れていた。二酸化炭素の発生量において、堆肥化やチップ化が劣る理由は、堆肥化の攪拌機やチップ化の破砕機の電力消費が大きいためであると考えられる。メタン発酵や下水汚泥との混合による嫌気性消化では動力をあまり必要とせず、かつ発生したメタンの活用による温室効果ガス削減効果が高いため、結果的に二酸化炭素発生量が低く抑えられると考えられる。

### 3.2 刈草 (2日以上乾燥の場合)

刈草(即日乾燥の場合)とほぼ同様の傾向が得られた(図二)が、エネルギー使用量や二酸化炭素の発生量は下水汚泥との混合による嫌気性消化およびメタン発酵が他の2方式と比べて特に優れるという結果が得られた。十分な乾燥で刈草中の水分を除くことにより、効率的なエネルギー化、二酸化炭素の発生の抑制が可能である。

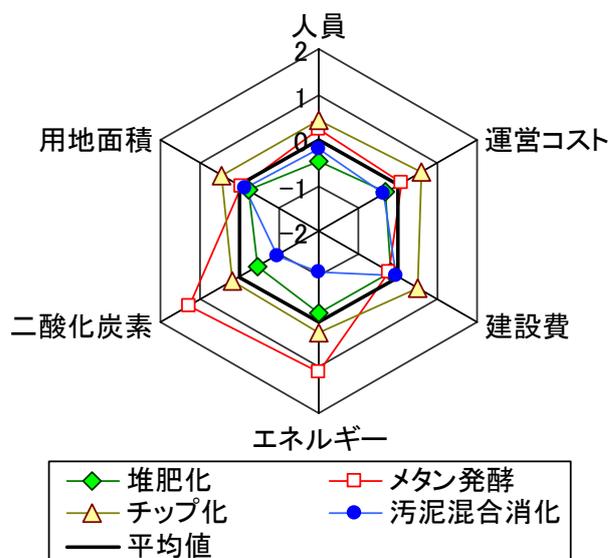


図二 各方式の適合性評価 (刈草、2日以上乾燥)

### 3.3 剪定枝

人員、運営コスト、建設費、用地面積が優れた方式は、チップ化である(図三)。これは、3.1と同様に機器の構成が破砕機を中心とし単純であること、処理工程も単純であることが要因であると考えられる。エネルギー使用量や二酸化炭素の発生量はメタン発酵が特に優れている。

下水汚泥との混合による嫌気性消化は、剪定枝の前処理の爆砕設備に係る運営人員やコストが大きくなる。また、それに係るエネルギー使用量や二酸化炭素の排出量も大きくなるのでこれらの観点から考えると不利になるという結果となった。



図三 各方式の適合性評価 (剪定枝)

#### 4. まとめ

以上の各方式の評価から、運営コストの面ではチップ化(マルチング)が一番よい結果となったが、二酸化炭素の発生量やエネルギーの使用量の面から考えれば、メタン発酵が優れており、刈草であれば下水汚泥との混合による嫌気性消化が優れていた。剪定枝の下水汚泥との混合による嫌気性消化については、爆砕処理設備を追加する必要があり、建設コストや運営コスト、二酸化炭素の発生量やエネルギーの使用量の観点から考えると不利になるという結果となった。

今後は、剪定方法や集草方法等を含め、これらの評価を総合的に勘案し、最適な手法を選定する必要があると考えられる。

また、実際の自治体の国道や河川等において発生した刈草、剪定枝に関して、本研究で得られた評価手法を適用し、地域レベルでの効率的な利活用方策を検討した。

#### 参考文献

- 1) 独立行政法人土木研究所：公共事業由来バイオマスの資源化・利用技術に関する研究、平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 4157 号、pp.38-46, 2009.11
- 2) たとえば、松藤敏彦：都市ごみ処理システムの分析・計画・評価－マテリアルフロー・LCA 評価プログラム、技報堂出版
- 3) 独立行政法人土木研究所：LCA からみた公共緑地等バイオマスの資源利用システムに関する研究、平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 4212 号、pp.121-124, 2011.11

## 下水道を核とした資源回収・生産・利用技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：リサイクルチーム

研究担当者：内田勉、岡本誠一郎、桜井健介、  
堀尾重人、浅井圭介、井上研一郎

【要旨】下水処理場の環境を利用し、バイオマスとして利用価値の高い藻類や肥料として有効な資源の回収、生産、利用を行うための技術開発を行った。藻類の培養により下水、下水処理水中の栄養塩の低減が可能であり、下水の高度処理としても有効であることが示された。培養された藻類の構成要素としてパルミチン酸等の脂肪酸があげられ、バイオディーゼル燃料としての利用の可能性が示された。消化汚泥の脱水分離液の電気分解においてマグネシウムや他バイオマス(茶かす)を混合することにより、リンやカルシウムの回収量が増加した。肥料として有効な成分の回収が可能であることを示した。

キーワード：下水、栄養塩、電気分解、藻類

### 1. はじめに

世界的な食料増産・バイオマス生産のため、肥料用鉱石が戦略物資と産出国で位置づけられ、安定的な肥料の確保が食料安全保障と関連して国家的な課題となってきた。下水汚泥中には食品残渣並びにその代謝物として高濃度の栄養塩が存在しており、これらを回収して資源利用する手法を検討する必要がある。また、下水処理水中の低濃度の栄養塩についても、閉鎖性水域など高濃度の栄養塩が問題となっている地域においては、除去することで放流先の公共水域の水質改善につながることから、極力有効利用することが望ましいと考えられる。これらの達成に向け、「電気分解による下水からのリン資源の回収」、「藻類による資源生産システムの開発」を行った。

### 2. 電気分解による下水からのリン資源の回収

#### 2. 1 消化汚泥の脱水分離液の電気分解

##### 2. 1. 1 研究目的

下水処理場に集約されている栄養塩類を可能な限り多量で、かつ、資源として利用しやすい形で回収することを目的とした。処理場のマテリアルフロー中で比較的高濃度にリンを含有している消化汚泥の脱水分離液から電解によって得られるリン等の回収物の組成と量を調べた。回分実験によりリン回収率向上のための条件の検討をし、他バイオマスとの混合による回収率の検討を行った。また元素の収支の確認を行った。

### 2. 1. 2 研究方法

これまでのリン回収技術として MAP 法や Hap 法があるが、下水からのリン回収を目的とする場合、MAP 法ではアルカリ剤の添加とマグネシウムの添加をすることで、MAP(リン酸マグネシウムアンモニウム)として結晶物を取り出すことができ、Hap 法では pH の制御と種結晶の添加をすることで、Hap(ヒドロキシアパタイト)として結晶物を取り出すことができる。

電解法を用いた場合、水の電気分解により陽極側より酸素、陰極側より水素が発生すると同時に、陽極近傍の pH は酸性側に、陰極近傍の pH はアルカリ側に変化する。よって陰極側においてはアルカリ剤の添加が無くとも MAP や Hap などのような結晶性の物質を生成することができ、陰極への析出物や、陰極近傍で生成された結晶物を取り出すことができるとされている。

図 2-1 に実験装置概要、図 2-2 に電極板外形図を示す。実験には 5000 mL ビーカーを用い、電極板 10 枚を陽極と陰極を交互に配列することで行った。電源には直流安定化電源(菊水電子工学(株)、PCM 18-5A)を用いた。

表 2-1 に電解実験条件、表 2-2 に試料分析結果を示す。実処理場より採取した消化後の脱水分離液の上澄みを試料とした。条件は表 2-1 に示すように脱水液のみの条件、スターラやエアストーンを用いて流速を与えた条件、硫酸マグネシウムを投入した条件、蒸留水に貝殻などの他バイオマスを溶出させ

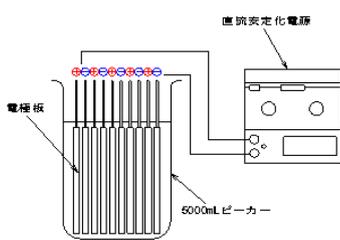


図 2-1 実験装置概要

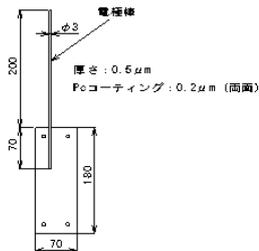


図 2-2 電極板外形図

表 2-1 電解実験条件の条件

No.	試料	条件	電極枚数	電極割合 (m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> )	時間	電流密度 (A/m <sup>2</sup> )	電流 (A)	備考
No.1		—	10	25.2	24	40	5.04	
No.2	脱離液上澄み	スターラ		25.2	24	40	5.04	ダイヤルを2/5回した位置で回転
No.3		バブリング		25.2	24	40	5.04	0.5L/minのエアを送る
No.4	脱離液上澄み+Mg添加	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4999gに対して硫酸マグネシウムを1g投入
No.5	脱離液上澄み+貝殻	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4900gに対して貝殻の溶出液を100g投入
No.6	脱離液上澄み+落葉	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4900gに対して落葉の溶出液を100g投入
No.7	脱離液上澄み+茶かす	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4900gに対して茶かすの溶出液を100g投入
No.8	脱離液上澄み+コーヒーかす	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4900gに対してコーヒーかすの溶出液を100g投入
No.9	畜産排水	—		25.2	4	40	5.04	泡が大量に発生し、溢れ出してしまったため4時間で終了
No.10	脱離液上澄み+畜産排水	—		25.2	24	40	5.04	脱離液4900gに対して畜産排水を100g投入、pHの測定はなし

表 2-2 試料測定結果

No.	試料	pH	TS	VS	SS	VSS	T-P	T-N	PO <sub>4</sub> -P	NH <sub>4</sub> -N
No.1	脱離液上澄み	8.0	1200	470	160	190	82	650	76	610
No.2		8.0								
No.3		7.9								
No.4	脱離液上澄み+Mg添加	8.0	1200	400	130	140	60	670	47	600
No.5	脱離液上澄み+貝殻	8.0	1100	380	130	170	77	620	74	610
No.6	脱離液上澄み+落葉	8.0	1400	590	120	140	74	740	70	580
No.7	脱離液上澄み+茶かす	8.0	1300	540	160	170	73	620	71	570
No.8	脱離液上澄み+コーヒーかす	7.9	1200	460	120	150	79	670	77	600
No.9	畜産排水	8.0	23000	14000			250	2800	48	1600
No.10	脱離液上澄み+畜産排水		1600	700	320	370	83	700	76	590

た溶出液を投入した条件の10条件とした。電解時間は24時間とし、電流密度が40 A/m<sup>2</sup>となるよう電流を5.04 Aに設定し電流一定で実験を行った。電極に析出した結晶物の回収はビーカーより電極を取り出し、イオン交換水で満たしたビーカーに浸漬させ、逆電圧(陽極と陰極を逆に接続)により剥離させた。逆電圧の時間は約3時間とした。

### 2. 1. 3 研究結果

表 2-3 に結晶物の重量測定結果、表 2-4 にリン回収率を示す。浮上物については電解によって発生する気泡と一緒に浮上してきたゴミなどが多くみられたので、電解によって移動するイオンの影響を受けたものではないと考える。析出物は電極でやり取りされるイオンの影響を受け、電極に析出しているが、沈降物については析出したものが剥れて沈降したものと、電解により陰極付近でアルカリとなることでできた結晶物が沈降した場合が考えられる。沈降物についてはNo.4(Mg添加)の条件で37.8%と最も回収率が高く、析出物についてはNo.7(茶かす混合)の条件で7.3%と最も回収率が高い値を示した。一方、No.10(畜産排水混合)の条件で1.5%と最も回収率が低く、析出物についてはNo.8(コーヒーかす混合)で0.1%と最も回収率が低い値を示した。

図 2-3 に沈降物中の金属類含有量、図 2-4 に析出物中の含有量を示す。沈降物で最も回収率の高かったNo.4(Mg添加)の条件と、析出物で最も回収率の高かったNo.7(茶かす混合)の条件についての

表 2-3 結晶物重量測定結果

No.	試料	浮上物 (g)	沈降物 (g)	析出物 (g)	沈降物+析出物 (g)
No.1	脱離液上澄み	0.1244	0.1982	0.0002	0.1984
No.2		0.0208	0.0611	0.1397	0.2008
No.3		0.0537	0.1238	0.1043	0.2281
No.4	脱離液上澄み+Mg添加	0.0654	0.5123	0.0679	0.5802
No.5	脱離液上澄み+貝殻	0.0071	0.1152	0.0409	0.1561
No.6	脱離液上澄み+落葉	0.0199	0.1842	0.0470	0.2312
No.7	脱離液上澄み+茶かす	0.0373	0.0729	0.2055	0.2784
No.8	脱離液上澄み+コーヒーかす	0.0379	0.1213	0.0130	0.1343
No.9	畜産排水				
No.10	脱離液上澄み+畜産排水	0.2221	0.0696	0.0696	0.1392

表 2-4 リン回収率

No.	試料	リン含有量 (mg)			リン回収率 (%)			
		沈降物	析出物	沈+析	沈降物	析出物	沈+析	
No.1	脱離液上澄み	300.0	22.8	0.0	22.8	7.6	0.0	7.6
No.2		300.0	3.5	16.5	20.1	1.2	5.5	6.7
No.3		300.0	13.8	14.8	28.6	4.6	4.9	9.5
No.4	脱離液上澄み+Mg添加	209.0	78.9	9.4	88.3	37.8	4.5	42.3
No.5	脱離液上澄み+貝殻	377.0	11.7	4.9	16.6	3.1	1.3	4.4
No.6	脱離液上澄み+落葉	370.5	21.1	2.8	23.9	5.7	0.7	6.4
No.7	脱離液上澄み+茶かす	340.0	10.7	24.8	35.6	3.2	7.3	10.5
No.8	脱離液上澄み+コーヒーかす	332.0	9.1	0.4	9.5	2.7	0.1	2.8
No.10	脱離液上澄み+畜産排水	321.0	4.8	12.3	17.1	1.5	3.8	5.3

Mg、P、Caの含有量を示したものであるが、どの条件においても沈降物にはMgが多く含まれていることからHap主体の結晶物が生成されていることが推測され、析出物にはCaが多く含まれていることからMAP主体の結晶物が生成されていることが推測される。

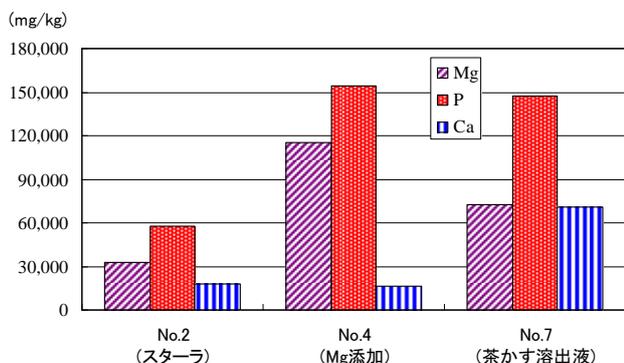


図 2-3 沈降物金属類含有量

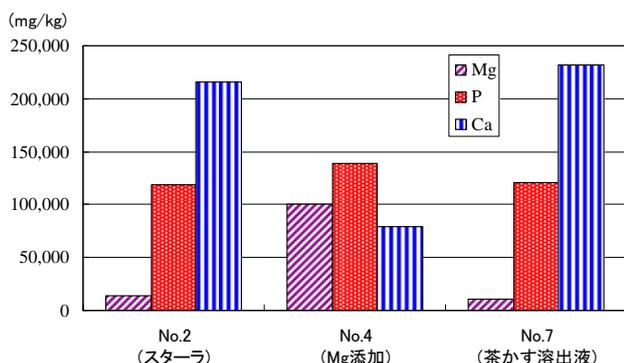


図 2-4 析出物金属類含有量

## 2. 2 下水汚泥の消化工程と電解のハイブリット

電解による下水からのリン回収を最もリン濃度の高いところから回収することを考えた場合、消化槽で行うことも1つの手段として考えられる。また、汚泥中で電解を行った場合、汚泥の可溶性が促進されるので電解と汚泥消化の両方でメリットがあると考えられる。しかし電解をすると陽極側からは酸素が発生するため、消化槽を嫌気性に保つことができない。そこで酸発酵槽とメタン発酵槽を分け、酸発酵槽に陽極、メタン発酵槽に陰極を挿入し、それぞれの槽間で隔膜を介して電解が行える実験装置を製作した。汚泥消化と電解を同時に行うことで相乗効果を得ることができるのかの確認を行った。

### 2. 2. 1 実験方法

図 2-5 に下水汚泥連続実験装置概要を示す。実験

装置は2系列準備し、一方は電解有の系列、もう一方は電解無の系列とした。電解有には図 2-6 に示すように酸発酵槽に電解をするための機構が備わっており酸発酵槽(内側の小さい水槽)の側面に開口を設け、隔膜を貼り付ける。隔膜の前後に電極を取り付け、酸発酵槽、内側の電極を陽極、外側を陰極として電解を行う。隔膜を入れることでイオンのみを通過させることができ、電解による酸素発生がメタン菌への影響を及ぼさないようにしている。電解無についてはこのような機構が備わっておらず、開口や隔膜の取り付けもできないただの水槽となっている。

実験ではまず酸発酵槽とメタン発酵槽に消化汚泥(タネ汚泥)を規程量まで投入し、しばらく馴致期間として攪拌のみを行った。その後、混合汚泥の投入を初め、どちらの系列も安定したガスが発生するようになってから、電解有の系統にのみ電解を開始さ

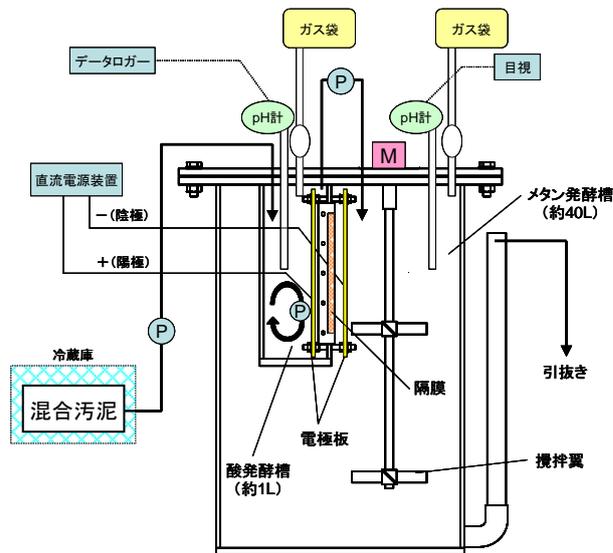


図 2-5 下水汚泥連続実験装置概要

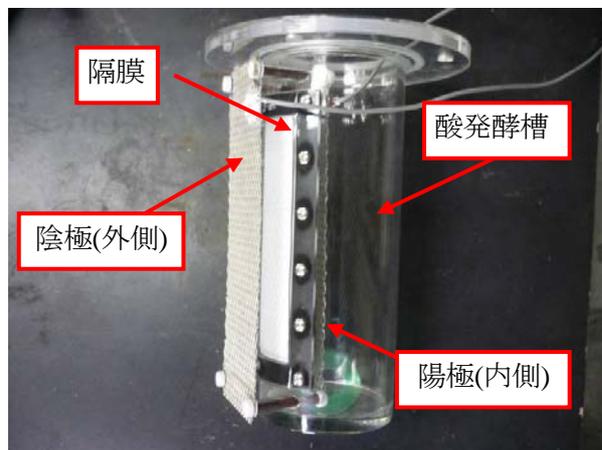


図 2-6 電解部写真

せた。

### 2. 2. 2 実験結果および考察

図 2-7 に pH の推移を示す。実験開始から 1/31 の電解開始までの期間で、電解有、電解無のどちらの系列においても酸発酵槽の pH は約 5.0~6.0 程度を示しており、メタン発酵槽の pH は約 6.3~7.5 を示した。電解開始後は電解有の系列において酸発酵槽の pH は低下し 3.5 を示した。また、メタン発酵槽では徐々に上昇した。

図 2-8 にガス発生量の推移を示す。消化汚泥(タネ汚泥)と混合汚泥(投入汚泥)の採取した処理場が異なることから、ガス発生までに時間がかかっている。

図 2-9 にガス分析結果を示す。酸発酵槽については、電解開始後から O<sub>2</sub> の割合が大きくなった。これは電解により陽極から O<sub>2</sub> が発生したためである。メタン発酵槽については電解開始後からわずかではあるが H<sub>2</sub> が検出された。これも電解により陰極から H<sub>2</sub> が発生したためである。

表 2-5 に CODcr 分析結果を示す。前述のとおり、今回の実験では連続での投入をしており、20 L のポリタンクからポンプを用いて投入しているため、タンク内の汚泥が減るにつれ TS 濃度が上昇し、CODcr の値も上昇している。よって滞留時間を 1 日として

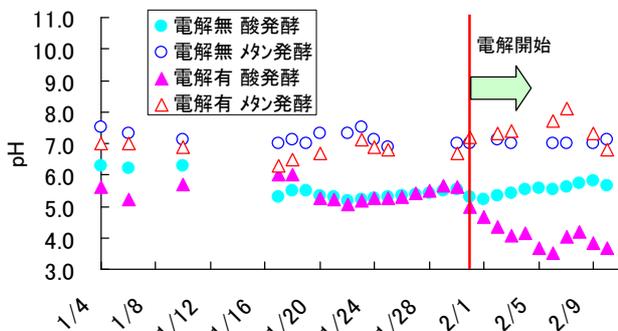


図 2-7 pH の推移

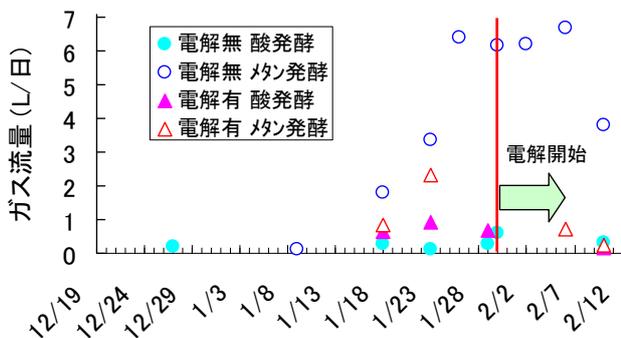
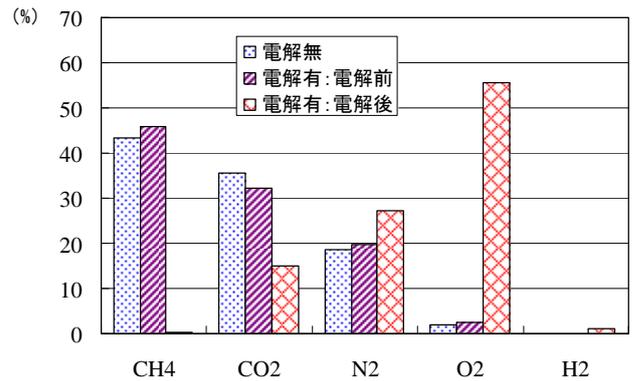


図 2-8 ガス発生量の推移

### (a) 酸発酵槽



### (b) メタン発酵槽

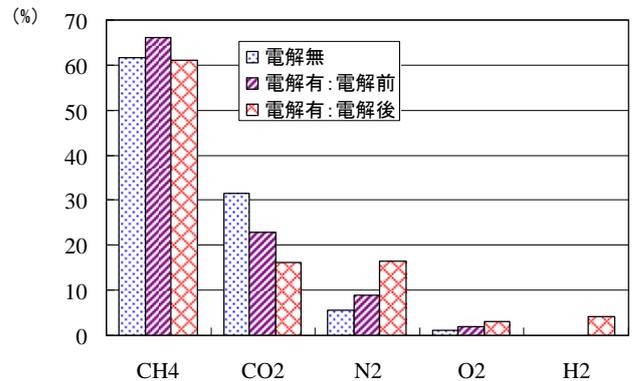


図 2-9 ガス分析結果

いる酸発酵槽はほぼ混合汚泥(投入汚泥)の値となる。メタン発酵槽については滞留時間を 35 日としているためあまり影響はされない。

電解有のメタン発酵槽のガス発生は電解開始前に止まっている。ガス発生が止まってしまったにも関わらず、2月7日の電解有のメタン発酵槽の分析結果は 10500 mg L<sup>-1</sup> で電解開始前の 1月24日と比較してもあまり差はなく、有機物のメタンガスへの転換やメタン菌の活性は衰えていないと考えられる。1月24日と2月7日を比較すると値はわずかに高くなっているが、混合汚泥(投入汚泥)の値の変化に一致しているため、メタン菌は電解の影響を受けていないと考えられる。

表 2-6 に有機酸分析結果を示す。電解開始後も有

表 2-5 CODcr 分析結果

	電解無		電解有	
	酸発酵槽	メタン発酵槽	酸発酵槽	メタン発酵槽
1月10日	21000	8400	21000	8400
1月24日	22000	10000	25000	8900
2月7日	55000	12000	52000	11000

表 2-6 有機酸分析結果

	電解無:酸発酵槽		電解無:メタン発酵槽		電解有:酸発酵槽		電解有:メタン発酵槽	
	電解前	電解後	電解前	電解後	電解前	電解後	電解前	電解後
コハク酸	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.5	N.D.	N.D.
乳酸	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ギ酸	1.4	0.90	0.49	0.17	2.8	2.4	0.40	0.15
酢酸	2100	1800	610	39	2600	1500	170	39
プロピオン酸	1600	1300	140	12	2100	900	79	4.7
イソ酪酸	140	160	12	5.3	150	130	5.2	N.D.
酪酸	740	730	N.D.	N.D.	800	680	N.D.	N.D.
イソ吉草酸	180	210	58	N.D.	190	190	N.D.	N.D.
吉草酸	320	300	N.D.	N.D.	330	250	N.D.	N.D.

単位:mg/L, N.D.は検出限界以下

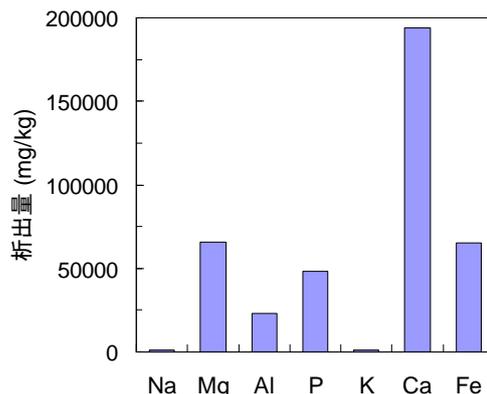


図 2-11 析出物金属類元素

機酸は減少し、安定した値を示していた。

図 2-10 に連続実験装置槽内の溶解性金属類元素組成を示す。電解有の酸発酵槽の金属元素をもととの混合汚泥(投入汚泥)と比較すると、Na、Mg、Al、K、Ca、Fe についてはわずかに低くなった。リンの濃度については  $100 \text{ mg L}^{-1}$  から  $270 \text{ mg L}^{-1}$  へと大幅に高くなった。電解有の酸発酵槽の金属元素についてはリンの濃度は混合汚泥(投入汚泥)より小さくなった。

図 2-11 に析出した金属類元素組成を示す。析出物は実験後電極に析出したあるいは付着した結晶物

を逆電圧により剥離させ、分析したものである。リンの析出量は  $48000 \text{ mg kg}^{-1}$  であった。消化汚泥を用いた場合は電極に汚泥の塊が付着してしまう。析出物金属元素に示された値は、析出物のみではなくその他の汚泥についても分析しているので結晶物としての質も低いと思われる。

### 3. 藻類による資源生産システムの開発

#### 3.1 はじめに

化石燃料の枯渇や地球温暖化防止の観点から、バイオマス燃料の普及が促進されている。日本においては、原子力発電所の事故の影響でエネルギー需要が逼迫され、また、平成 22 年 6 月に閣議決定されたエネルギー基本計画においてバイオマス等の再生可能エネルギーが一次エネルギー供給に占める割合について 2020 年の目標を 10% に設定している<sup>1)</sup>ことから、バイオマス燃料の利活用により、低炭素社会・循環型社会の形成や一層の推進が求められている。

下水道事業における電力使用量は日本全体の電力使用量の約 0.7% であり、また温室効果ガスの排出量も日本全体の約 0.6% を占めている<sup>2)</sup>。これらは下水道普及率の向上に伴い、年々増加傾向にある。一方、下水道にはバイオマス資源を大量に保有していることから、地域の特性を踏まえ、これらを積極的に利活用し、エネルギー供給を促進することが求められる。

典型的なバイオマス燃料の原料としてサトウキビやトウモロコシ等があげられる。これらと比べ、単位面積あたりの収穫量が高く、また一般に食料と競合しないバイオ燃料として藻類が注目されている<sup>3)</sup>。国内でも震災復興等を目的とし、石巻市において燃料等の生産を目的とした藻類の培養が行われるよう

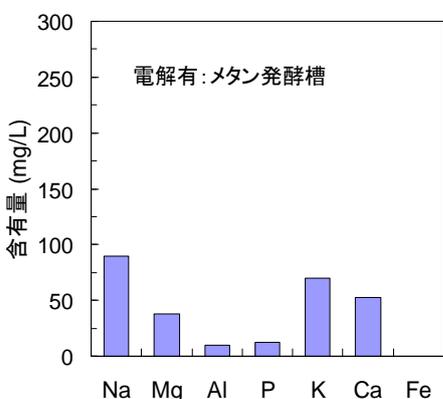
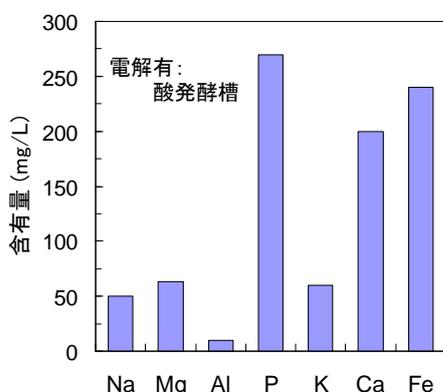


図 2-10 連続実験装置槽内溶解性金属類元素

になったところである<sup>4)</sup>。

下水中にはリンや窒素等の栄養塩が含まれていることから、下水処理場の環境を利用した藻類を培養も期待される。しかし、実際の下水の性状を考慮した培養に関する知見は十分に得られていない。本研究では、下水処理場2施設における下水流入水、下水処理水を用い藻類の培養を試みた。水理学的滞留時間(HRT)、培養時における攪拌・曝気などの操作、培養水中へのCO<sub>2</sub>供給、培養水の種類等の与える藻類培養への影響を検討し、培養条件の最適化を図るための基礎的知見を得ることを目的とした。

### 3. 2 下水処理場 A の処理水を用いた培養

#### 3. 2. 1 研究方法

下水処理場 A の処理水(最終沈殿池流出水)を培養フラスコ(カルスターフラスコ: 柴田科学(株)製)に 2.0 L 入れた。蛍光灯により 1 日あたり 12 時間、培養フラスコの側面から光(光量子束密度: 約 165  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )を照射した。実験は恒温室内で行い、水温は約 20°C に保った。マグネチックスターラーによりフラスコに備えられた羽根(攪拌子)を攪拌しながら培養した。また、流速約 1  $\text{mL min}^{-1}$  で曝気(培養フラスコ内に空気を送風)しながら培養した。培養期間は 14 日間とした。HRT が 4 日となるように、実験原水である処理水を 1 日に 2 度に分けて培養フラスコ内にポンプで供給した。流入に伴い、オーバーフロー管から培養水を流出させ、培養フラスコ内の水位を一定に保った。実験原水である培養フラスコ供給前の処理水は 4°C の冷蔵状態で保存した。

HRT の影響に関する試験においては、HRT 4 日のほか、2, 6 日の条件で試験した。CO<sub>2</sub> 流入の影響に関する試験においては、CO<sub>2</sub> を流速 0.01, 0.05  $\text{mL min}^{-1}$ (曝気による流入空気量の 1, 5% に相当する)で連続的に培養フラスコ内に供給した。培養時の攪拌および曝気の影響に関する試験においては、攪拌および曝気、攪拌のみ、曝気のみ、攪拌・曝気いずれもなしの 4 条件で試験した。

培養時における各種水質分析を行った。全リン(TP)および全窒素(TN)の分析では、下水試験方法の銅・カドミウムカラム還元法<sup>5)</sup>により水酸化ナトリウム-ペルオキシ二硫酸カリウム溶液を用い 120°C、30 分間試料の加熱分解を行ったのち、分析した。溶解性全リン(DTP)、溶解性全窒素(DTN)、リン酸イオン態リン(PO<sub>4</sub>-P)、アンモニア性窒素(NH<sub>4</sub>-N)、亜硝酸性窒素(NO<sub>2</sub>-N)、硝酸性窒素(NO<sub>3</sub>-N)に関しては、

試料を孔径 1.0  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙(GF/B, Whatman<sup>TM</sup>)を用いてろ過し、そのろ液を分析した。連続流れ分析装置 TRAACS 2000 (Bran+Luebbe)を用いた。無機性炭素(IC)および有機性炭素(TOC)に関しては、同様に孔径 1.0  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙によりろ過したのち、TOC-5000 および ASI-5000 ((株)島津製作所)を用いて分析した。クロロフィル a および b は、河川試験方法(案)<sup>6)</sup>に準拠し、孔径 1.0  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙(GF/C, Whatman<sup>TM</sup>)によりろ過し、紫外-可視分光光度計 UV-160 ((株)島津製作所)を用いて分析した。

また、培養終了後、フラスコ内に残存した藻類の乾燥重量の秤量、藻類種の同定を行った。乾燥重量は、藻類の含まれる培養水を孔径 1.0  $\mu\text{m}$  のガラス繊維ろ紙によりろ過し 110°C に加熱後、放冷しろ過前後のろ紙の重量差から求めた。藻類種の同定は、平成 18 年度河川水辺の国勢調査マニュアル<sup>7)</sup>に準拠した。培養後のフラスコ内の藻類の含まれる培養水を攪拌し 100 mL を採取し 40 mL に濃縮した。濃縮した培養水を十分に攪拌した後、オートピペッターを用いて 0.5 mm 間隔の界線入りスライドガラス上に 0.04 mL 採り、カバーガラスを被せた。検鏡を行い、生細胞を対象に種の同定、計数を行った。なお、計数した細胞数は 1 mL あたりの細胞数に換算した。

培養水中および藻類中の重金属類の定量は、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法、高周波誘導結合プラズマ質量分析法により行った。培養原水である処理水を硝酸により分解したのち、また培養した藻類の含まれる培養水を凍結乾燥し、加圧ボンベ法(MLS1200MEGA、Milestone)で硝酸により分解したのち ICPS-8000E ((株)島津製作所)および X7CCT (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))を用いて定量した。

#### 3. 2. 2 研究結果

HRT の及ぼす藻類培養への影響を検討した。合計約 9 L の培養原水を HRT が 2, 4, 6 日となるように培養フラスコ(2 L)に供給した。HRT が 2, 4, 6 日の時の 1 日あたりのフラスコへの培養原水の流入量は、それぞれ 1000, 500, 333 mL、培養期間はそれぞれ 7, 14, 21 日となる。培養時における水質分析の結果を表 3-1a,b,c に示す。HRT が 4, 6 日の場合における溶解性リン、溶解性窒素の培養前に対する培養終了後の濃度は、いずれも 15% 以下に低減されており、藻類の増殖に伴いこれらの栄養塩が除去されることが示

表 3-1 異なる HRT で培養した場合の水質の変化 (単位: mg L<sup>-1</sup>)

条件		pH	TP	TN	DTP	DTN	IC	TOC	クロロフィル <sub>a</sub>	クロロフィル <sub>b</sub>
a. HRT2日	培養開始	8.7	3.3	11	3.3	11	56	4.3	-	-
	7日後	9.0	3.3	10	2.5	6.4	54	7.8	0.79	0.077
b. HRT4日	培養開始	8.6	3.3	11	3.3	11	55	6.2	-	-
	7日後	9.2	2.8	7.5	2.3	4.7	57	5.8	-	-
	14日後	9.2	5.1	16	0.25	1.2	58	13	2.1	0.69
c. HRT6日	培養開始	8.8	3.3	11	3.3	9.9	56	1.7	0.0013	0.0014
	7日後	9.2	3.2	11	2.2	4.1	56	7.7	-	-
	14日後	9.1	1.8	6.7	0.26	1.7	60	11	-	-
	21日後	9.2	5.7	16	0.15	1.3	57	15	1.8	0.57
d. HRT4日, CO <sub>2</sub> 供給	培養開始	7.4	3.3	11	3.3	11	55	6.2	-	-
	7日後	7.5	2.8	7.8	1.6	2.0	62	7.0	-	-
	14日後	7.4	4.9	15	0.35	0.95	63	12	1.7	0.47

唆された。HRT 2 日の場合、溶解性リン、溶解性窒素の培養前に対する培養終了後の濃度は、それぞれ 76, 58% に留まった。培養前後の全リン、溶解性リン濃度の値より、約 9 L の培養原水から培養後のフラスコ内の藻類(オーバーフローにより流出した分を除く)へのリンの移行率を計算した(全リンから溶解性リンの濃度を引いた値の培養前後における差が、培養藻類中のリン濃度として考える)。HRT が 2, 4, 6 日のとき、リンの移行率は、それぞれ 6%, 34%, 37% であった。同様に窒素の移行率を求めると、それぞれ 8, 31, 33% であり、HRT を 4 日から 2 日に減少させることにより、栄養塩の除去率が大きく低下することがわかる。藻類培養による下水の高度処理を考慮した場合、HRT は、4 日以上の方が望ましいことがわかる。クロロフィル a の値は、既報の培養池における培養の結果<sup>8)</sup>と同程度の値を示した。藻類の株や栄養塩等を外部から添加、供給することなく、下水処理水のみを用いた培養により藻類が増殖した。

つぎに培養された藻類種を同定した。結果を図 3-1a,b に示す。HRT 2 日では、培養された藻類の量が少なく同定が困難であったため、HRT 4, 6 日で培養された藻類のみ同定した。HRT を 4 日から 6 日に上昇させることにより、総細胞数およびそのうち藍藻類に対する緑藻類の割合が上昇した。HRT 4 日では藍藻類が 68% を占めるのに対し、HRT 6 日では緑藻類が 79% を占め、セネデスムス科が全細胞数の 56% を占めた。緑藻類、特にセネデスムス科の藻類中には脂質を含有する割合が多く、通常、構成成分中の 15~17% を占める<sup>9-11)</sup>。HRT を 6 日に長くすることにより、燃料として有用となる脂質成分を増加させることができた。さらに、藻類の培養により培養水中の重金属類の低減が可能であることが報告されている。

得られた藻類中の重金属類の含有量を定量した。

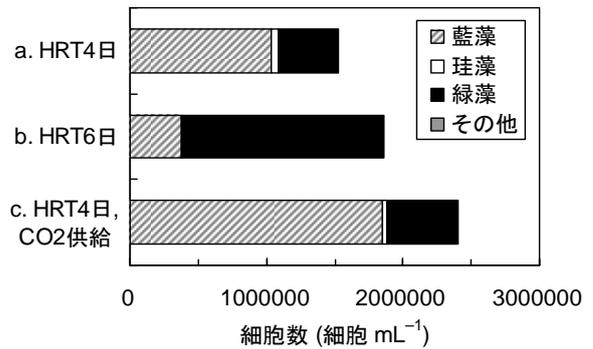


図 3-1 HRT を変えた場合、CO<sub>2</sub> 供給を行った場合の培養藻類種

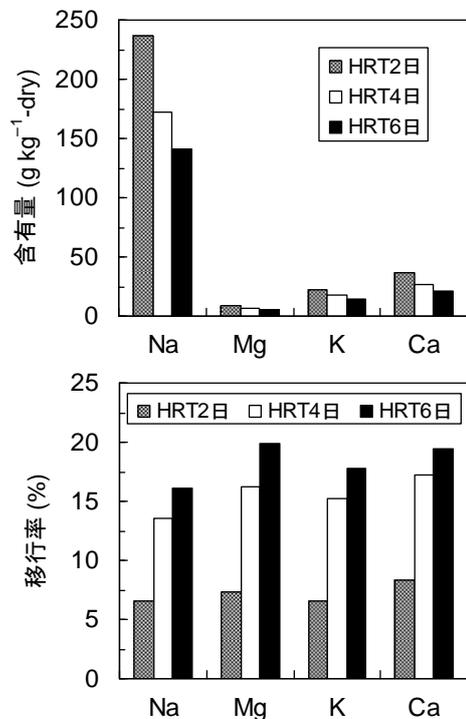


図 3-2 HRT を変えた場合の藻類中重金属含有量と培養原水からの移行率

表 3-2 異なる攪拌・曝気条件で培養した場合の水質の変化 (単位: mg L<sup>-1</sup>)

条件		pH	TP	TN	DTP	DTN	IC	TOC	クロロ <sub>a</sub>	クロロ <sub>b</sub>
培養 原水(1)	培養開始	7.3	3.7	16	3.6	15	39	10	0.00024	0.000083
	4日後	7.3	3.5	14	3.4	13	40	12	-	-
	7日後	-	3.5	14	3.5	14	41	10	-	-
培養 原水(2)	7日後	7.4	2.9	11	2.9	10	59	12	0.00058	0.00010
	11日後	7.6	2.9	11	2.8	10	58	10	-	-
	14日後	7.8	3.2	12	3.1	11	61	2.9	-	-
a. 攪拌 および 曝気	培養開始	8.6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4日後	8.7	3.5	12	3.4	12	36	12	-	-
	7日後	9.4	3.2	10	1.8	3.3	38	14	1.3	0.25
	11日後	9.3	2.6	9.3	0.27	1.4	53	17	-	-
	14日後	9.3	4.0	13	0.15	1.2	62	10	1.4	0.39
b. 攪拌	培養開始	7.9	-	-	-	-	-	-	-	-
	4日後	8.7	3.5	13	3.4	12	36	12	-	-
	7日後	10	2.5	11	0.78	7.3	26	10	0.64	0.14
	11日後	11	2.1	8.7	0.47	3.6	30	13	-	-
	14日後	11	3.9	12	0.64	2.3	39	10	1.2	0.38
c. 曝気	培養開始	8.6	-	-	-	-	-	-	-	-
	4日後	8.7	3.5	12	3.4	12	36	12	-	-
	7日後	9.3	2.8	8.3	2.3	4.9	36	12	0.43	0.10
	11日後	9.3	1.9	5.4	0.93	1.8	53	20	-	-
	14日後	9.3	5.3	17	0.47	1.3	62	12	2.3	0.68
d. なし	培養開始	7.4	-	-	-	-	-	-	-	-
	4日後	8.6	3.5	13	3.5	13	37	11	-	-
	7日後	9.6	2.4	9.4	1.7	8.9	39	9.5	0.12	0.022
	11日後	11	1.1	6.0	0.47	4.9	30	12	-	-
	14日後	11	7.0	20	0.64	2.9	37	12	2.0	0.60

さらに、合計約 9 L の培養原水中に含まれる重金属類含有量を求め、培養された藻類への重金属類の移行率を求めた(図 3-2)。HRT 4, 6 日における 4 元素の移行率は 13~20% の範囲にあるが、HRT 2 日では 6~9% の範囲にあり、リンや窒素と同様、HRT を 4 日から 2 日に減少させることにより、重金属の除去率が大きく低下することがわかった。HRT 4 日で培養された藻類中のその他の元素成分の定量的結果、B、Mn、Zn、Sr の元素が、それぞれ 55、68、67、88 g kg<sup>-1</sup>-dry 含まれることがわかった。

培養水に CO<sub>2</sub> を流入することによる藻類培養への影響を検討した。CO<sub>2</sub> 添加により培養に必要となる炭素源の取り込みを拡大させ、藻類の生産を促進させるという報告がある<sup>8)</sup>。さらに、CO<sub>2</sub> 添加で pH の制御をすることにより、藻類の成長を抑制するアンモニア生成の防止や、リン酸塩の沈殿による栄養素損失の防止などの効果が報告されている<sup>8,12)</sup>。また、燃焼施設からの排ガス中には CO<sub>2</sub> が含まれるため、これを培養水中に流入し藻類を培養することも考えられる。特に下水処理場に併設される焼却炉からの排ガスの利用が期待される。CO<sub>2</sub> を 0.01 mL min<sup>-1</sup>(曝気による流入空気量の 1% に相当する)を流入させ、培養を行ったところ、pH が 7.4 程度を保ち(表 3-1d)、培養による pH 上昇を抑制できた。培養開始後 7 日

目まで CO<sub>2</sub> を流入した場合はしない場合に比べ速く緑色に色付いたが、14 日経過後のフラスコ内の培養水の色に大きい変化は見られなかった。また、CO<sub>2</sub> の流入により、緑藻類の細胞数はほとんど変化しなかったが、藍藻類の細胞数は 1.8 倍に増加した(図 3-1c)。さらに、CO<sub>2</sub> 流入量を空気流入量に対して 5% に増加させ同様に培養したが、CO<sub>2</sub> 流入なしの条件に比し、緑藻類の培養量は 0.7 倍、藍藻類の量は 2.3 倍となった。本試験系では CO<sub>2</sub> の流入により、燃料として有用な脂質含有量の高い緑藻類の培養量を減少させることになった。

培養時における攪拌および曝気の及ぼす藻類培養への影響を検討した。攪拌および曝気 a、攪拌のみ b、曝気のみ c、攪拌・曝気いずれもなし d の 4 条件で 14 日間培養を行った。水質分析の結果を表 3-2 に示す。培養原水は、中間日の 7 日目に新たに採取したものに交換した。いずれの条件においても培養後、溶解性リンは、0.7 mg L<sup>-1</sup> 以下に、溶解性窒素は、2.9 mg L<sup>-1</sup> 以下に減少し、ここでも藻類の増殖に伴いこれらの栄養塩が除去されることが示唆された。図 3-3 に各条件における藻類の乾燥重量を示した。培養終了後のフラスコ内に残存した藻類およびオーバーフロー水中の藻類に分類して表示した。培養された藻類総重量は、攪拌および曝気を行った条件 a

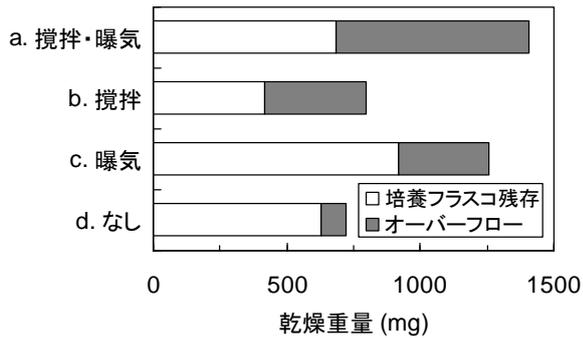


図 3-3 攪拌・曝気条件を変えた場合の培養藻類の乾燥重量

において最大となった。しかし、総重量に対するフラスコ内に残存した藻類の重量の比は、攪拌・曝気いずれもなしの条件 d で 87%、曝気のみ条件 c で 73%と、攪拌を行った場合 a,b(50%程度)に比べて高いことがわかる。攪拌を行うことにより、付着性・沈降性の高い藻類の割合が減少し、原水の供給に伴うオーバーフローによるフラスコ内からの流出量の割合が増加した。これらの 4 条件におけるフラスコ内に残存した藻類種をみると、曝気のみの場合 c が総細胞数が最も多くなった(図 3-4)。また総細胞数のうち、緑藻類の占める割合が 87%、さらに緑藻類のうちセネデスムス科の占める割合が 65%に達し、燃料として有用な成分の割合が大きく上昇した。攪拌を伴うことにより、総細胞数のうち藍藻類の占める割合が増加した。

### 3. 3 下水処理場 B の流入水・処理水を用いた培養

#### 3. 3. 1 研究方法

下水処理場 B の下水流入水および下水処理水(高度処理水)を静置したのちの上澄みを 3. 2 と同様に、培養フラスコに 2.0 L 入れ、蛍光灯を照射し約 20°C で 14 日間、回分および半連続培養した。攪拌および曝気(培養フラスコ内に空気を流速約 1 mL min<sup>-1</sup>で送風)を伴い培養した。半連続培養においては HRT が 4 日となるように、1 日あたり 500 mL の実験原水を 2 度に分けて培養フラスコ内にポンプで流入させた。CO<sub>2</sub> 流入の影響に関する試験においては、CO<sub>2</sub> を流速 0.01 mL min<sup>-1</sup>(曝気による流入空気量の 1%に相当する)で連続的に培養フラスコ内に流入させた。

その他の方法、培養時における水質分析や培養された藻類種の同定方法については 3. 2. 1 と同様とした。

藻類の高位発熱量の定量は、JIS M 8814 に基づき

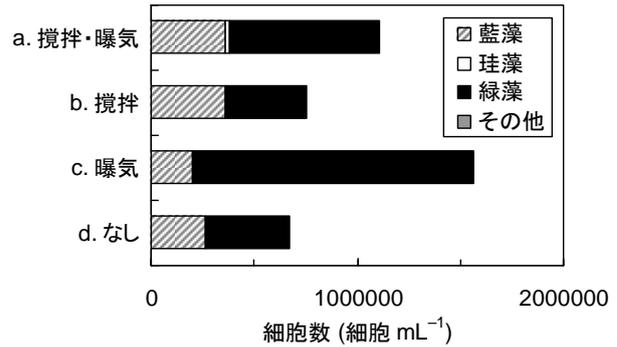


図 3-4 攪拌・曝気条件を変えた場合のフラスコ内に残存した藻類種

行った。乾燥・粉碎後の藻類検体をボンベ型発熱量計 1013-B((株)吉田製作所)を用いて定量した。藻類中の炭水素類の定性は、ガスクロマトグラフィー質量分析法によった。乾燥・粉碎後の藻類検体を *n*-ヘキサンに溶解させ、Agilent 6890/5973 (アジレント・テクノロジー(株))を用いて定量した。

#### 3. 3. 2 研究結果

下水流入水および下水処理水を用いて藻類の回分および半連続培養を行った。ここでも藻類の増殖に伴い、栄養塩が除去されることが示唆された(図 3-5)。

下水処理水半連続培養においては、CO<sub>2</sub> 流入を伴う培養も同時に行った。栄養塩の除去特性に関しては CO<sub>2</sub> の流入を行った場合と行わない場合で、大きい変化がみられなかった。培養前後の全リン、溶解性リン濃度の値より、約 9 L の培養原水から培養後のフラスコ内の藻類(オーバーフローにより流出した分を除く)へのリンの移行率を求めた。CO<sub>2</sub> の流入を行う場合と行わない場合で、移行率はそれぞれ、23, 24%であった。また、同様に窒素の移行率を求めると、いずれも 20%であり、CO<sub>2</sub> の流入による移行率の変化はほとんど認められなかった。また、下水処理水を用い回分式で培養された藻類へのリン移行率は 100%に近かった。

つぎに培養された藻類種を同定した。結果を図 3-6 に示す。流入水 a と c および処理水 b と d のそれぞれの条件を比較すると回分式よりも半連続式の方が全細胞数が増加し、さらに緑藻類の占める割合が増加した。一方、処理水による半連続培養 d では全細胞数に対する藍藻類の細胞数の占める割合が、0.001%未満になり劇的に減少した。また、処理水の半連続培養において CO<sub>2</sub> の流入を行った場合 e は、

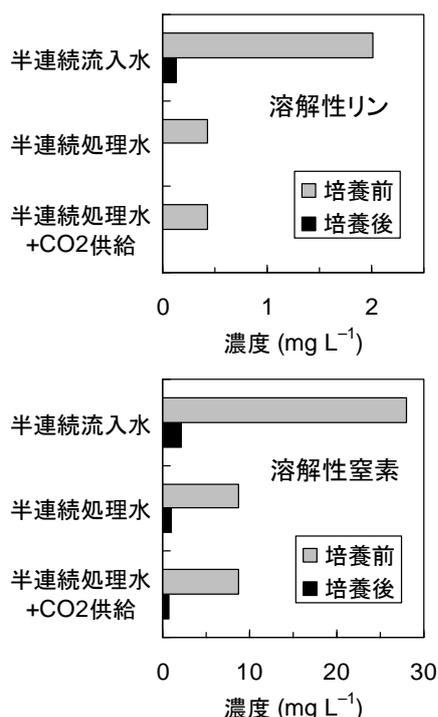


図 3-5 半連続培養における栄養塩濃度の変化

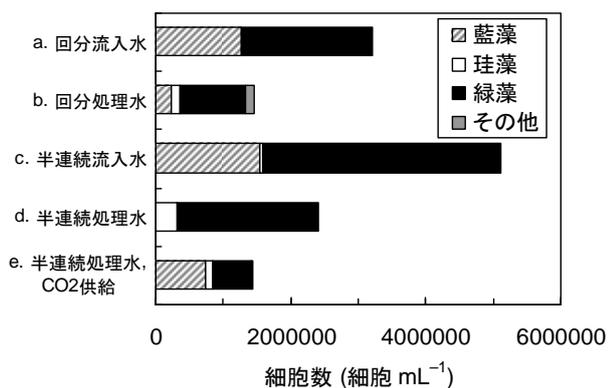


図 3-6 種々の条件における培養藻類種

行わない場合 d に比べて、藍藻類の占める割合が増加した。

ガスクロマトグラフィー質量分析により、藻類を構成する炭化水素成分の定性を行ったところ、いずれの条件においてもパルミチン酸等の脂肪酸が検出され、バイオディーゼル燃料等への利用の可能性が示唆された。さらに流入水により半連続培養された藻類の高位発熱量を測定すると、 $25,000 \text{ kJ kg}^{-1}$ であった。褐炭程度の発熱量を有することが明らかとなり(ほかの 4 条件で培養された藻類は、得られた量が十分でないため発熱量分析は行っていない)、助燃剤として発電や燃焼等への適用の可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

下水処理場の環境を利用し、バイオマスとして利用価値の高い資源の回収、生産、利用を行うための技術開発を行った。消化汚泥の脱水分離液の電気分解においてマグネシウムや茶かす等の他バイオマスを混合することにより、肥料として有効な成分であるリンやカルシウムの回収量が増加した。汚泥消化と電気分解を同時に行うことの可能な実験装置を製作し、リン、カルシウム、マグネシウム等の析出物の組成を求めた。リンの析出量は  $48 \text{ g kg}^{-1}$  であった。藻類の培養により下水、下水処理水中の栄養塩の低減が可能であり、培養された藻類の構成要素としてパルミチン酸等の脂肪酸が含まれていることから、バイオディーゼル燃料等としての利用の可能性が示された。その他、HRT、攪拌・曝気・ $\text{CO}_2$  供給等の培養時の操作等の与える藻類培養への影響を明らかにし、培養条件の最適化を図るための基礎的知見を得た。

#### 参考文献

- 1) 白崎亮ほか：「下水汚泥資源利用の動向と今後の施策について」、再生と利用、印刷中
- 2) 白崎亮：「汚泥エネ導入検討の契機」、日本下水道新聞、第 2094 号、3 頁、平成 24 年 1 月 26 日
- 3) Yusuf Chisti: “Biodiesel from microalgae”, *Biotechnology Advances*, 25, 294–306, 2007
- 4) 三陸河北新報社：「石巻で石油作る藻培養」、石巻かほく、第 9779 号、1 頁、平成 23 年 9 月 16 日
- 5) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修：下水試験方法 上巻 —1997 年版一、社団法人日本下水道協会
- 6) 建設省河川局監修／建設省建設技術協議会水質連絡会・河川環境管理財団編：河川水質試験方法(案) [1997 年版]、技報堂出版
- 7) 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課：平成 18 年度版 河川水辺の国勢調査 基本調査マニュアル【ダム湖版】V 動植物プランクトン調査編
- 8) J. B. K. Park, R. J. Craggs: “Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition”, *Water Science & Technology*, 61, 633–639, 2010
- 9) 彼谷邦光：「微細藻類オイルの化学」、日本微生物資源学会誌、26、1–10、2010
- 10) Shovon Mandal, Nirupama Mallick: “Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel

production”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 281–291, 2009

- 11) Luisa Gouveia, Ana Cristina Oliveira: “Microalgae as a raw material for biofuels production”, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 269–274, 2009
- 12) J. B. K. Park, R. J. Craggs, A. N. Shilton: “Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production”, *Bioresource Technology*, 102, 35–42, 2011

## 低炭素型水処理・バイオマス利用技術の開発に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員	内田 勉
主任研究員	日高 平
交流研究員	浅井 圭介
元上席研究員	岡本誠一郎
元研究員	新井小百合

## 【要旨】

下水処理場に設置している嫌気性消化槽を活用した、低炭素型水処理・バイオマス利用技術を開発するための基礎実験を行った。TS 5%程度の下水混合汚泥を対象とした嫌気性消化の連続式実験を行ったところ、中温条件下では安定した処理が可能でCODベースメタン転換率0.6程度が得られたのに対して、高温条件下ではやや不安定であった。回分式実験1では、混合汚泥を20%投入した場合でもメタン発酵がすすみ、おおむね20日後に基質からのメタン生成が終了した。回分式実験2では、おからおよび豆皮の混合消化の可能性が示された。消化前の濃縮効率向上に活用しうるみずみち棒（土木研究所開発技術）については、導入下水処理場11ヶ所を訪問しヒアリング調査を行い、課題などを調査した。目詰まりの問題や温度影響についての課題が明らかになった。

キーワード：メタン発酵、下水汚泥、混合消化、バイオマス、濃縮

## 1. はじめに

国土交通省下水道部とりまとめデータによれば、下水汚泥のエネルギー資源としての利活用状況を全国ベースで見ると、発生する下水汚泥中の有機分総量のうち、下水道バイオガス又は汚泥燃料としてエネルギー利用された割合は約1割であり<sup>1)</sup>、バイオソリッドの利活用の観点から、下水処理場を核とした下水汚泥と有機性廃棄物の嫌気性消化技術が注目されている。下水汚泥以外のバイオマスとして、食品廃棄物、剪定枝、農業系廃棄物など様々な有機性廃棄物（他バイオマス）との混合消化がますます広まることが期待されている<sup>2,3,4)</sup>。ただし、他バイオマスを受け入れる場合、負荷が高まるので、既設処理場を活用する場合には受入可能な余裕があるかが重要である。負荷率の増加に対応する手段として、中温から高温条件への変更や、投入汚泥の高濃度化が考えられる<sup>5)</sup>。そこで本研究では、一般的な混合汚泥よりも高濃度であるTS 5%程度の混合汚泥を基質として、有効容積3 Lの反応器の連続運転を中温および高温条件下で行い、その比較を試みた。また既設処理場の消化汚泥を用いた回分式実験を行い、混合消化の観点からの処理特性の把握を試みた。

下水汚泥の効率的な嫌気性消化処理では、その前段階で濃縮処理が必要である。すなわち、下水処理場において濃縮プロセスの効率化を図り、改善して

いくことが汚泥処理系全体の改善につながる。重力濃縮は構造が簡単でランニングコストも他の濃縮方式に比べ安価であるため、古くから多く採用されてきた。しかし、汚泥性状の悪化等による濃縮性能の低下などのから濃縮槽の更新を機に機械濃縮に移行している処理場も多い。一方、人口減少による下水道使用量の伸び悩みや改築更新費用の増大など、厳しい財政運営を余儀なくされており、設備のライフサイクルコストを抑える技術が重要になっていくと考えられる。本技術は既存の重力濃縮槽を活かし、簡易な構造で重力濃縮プロセスの効率化を図るための装置として開発されたのが「みずみち棒」である。みずみち棒は、既に日本全国11処理場13槽で導入されており効果を発揮している。しかし、みずみち棒を導入した処理場で効果に差がでていのも事実である。そこで本年度は導入済みの処理場を訪問し、関係者へのヒアリング調査を行い、現場での課題などを調査した。

## 2. 研究方法

## 2.1 嫌気性消化の連続式実験

有効容積3 Lの反応器を2系列準備し、一方を中温(35℃)、もう一方を高温(55℃)の条件下で連続運転を行った(それぞれ中温系、および高温系とする)。

植種汚泥として、中温系は石川県犀川左岸浄化センターの、高温系は石川県大聖寺川浄化センターの消化槽から採取した消化汚泥を用いた。投入汚泥は、犀川左岸浄化センターの混合汚泥を用いた。混合汚泥の濃度は TS 3~4%程度であるので、実験室での遠心分離操作により、5%程度まで濃縮した。基質投入および消化液の引抜操作は1日1回の頻度にて手動で行った。中温系は、運転開始当初数日に1回の頻度で、1回あたり150 mLの基質投入を行った。処理が安定してきたと考えられた40日目以降は、平日のみ1日1回の頻度で150 mLの基質投入を行った。高温系についても運転開始当初は数日に1回の頻度で、1回あたり150 mLの基質投入を行った。しかしながら、メタン発生が停止し処理が安定しなかったことから、運転開始45日目以降基質投入を停止した。有機酸の蓄積は認められたものの、pHの制御などを行ってもメタン発酵活性が回復しなかったので、運転開始77日目には汚泥の半分(1.5 L)を新たに採取した大聖寺川浄化センターの消化槽の消化汚泥と入れ替えた。これ以降の高温系の基質は大聖寺川浄化センターの混合汚泥を5%に濃縮したものとして、79および82日目に50 mL投入したところ、メタン生成活性が認められた。そこで、84日目以降は、平日のみ1日1回の頻度で100 mLの基質投入を行った。その際には、200 mLの消化汚泥を引き抜き遠心分離し、上澄み液100 mLを除いて投入分の基質100 mLと混合してから反応器に投入することで、極力汚泥を流出させないようにした。

pH、TS、VS、COD<sub>Cr</sub>、アンモニア、水溶性揮発性脂肪酸(VFAs)、ならびに発生ガス量および組成を、下水試験方法に従って行った。なお、COD<sub>Cr</sub>の分析はHACH社の吸光光度計DR2400およびCOD試薬(HR)を用いた。発生ガスはガスクロマトグラフ(GC-2014ATF、SHIMADZU)を、アンモニアは自動比色分析装置(TRAACS2000、BRAN LUEBBE社)を、VFAsはイオンクロマトグラフ(IC 20、DIONEX社)を用いた。

## 2.2 嫌気性消化の回分式実験

回分式実験1として、消化汚泥および投入基質の混合比の影響を確認するために、犀川左岸浄化センターの消化汚泥および混合汚泥を用いて、混合汚泥の体積比を0、5、10および20%とした4系列について、35℃にて回分式実験を行った。回分式実験2として、大聖寺川浄化センターの消化汚泥および混

合汚泥、ならびに他バイオマスの例として食品廃棄物(おからおよび豆皮)を用いて、55℃にて回分式実験を行った。ここでは、消化汚泥のみのブランク系、消化汚泥(体積比90%)および混合汚泥(体積比10%)の下水汚泥系、下水汚泥系に食品廃棄物をさらに5 gVS/L添加した系を設定した。

いずれの混合汚泥についても、濃縮操作は行っていない。これらの実験では、250 mLもしくは500 mLのガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用いた。発生ガスはアルカリ剤を通過させることで二酸化炭素を除去し、経時的にメタンガスとしての発生量を測定した。その他の項目の分析方法は、連続式実験と同様である。

## 2.3 みずみち棒の調査

北海道の小樽市、苫小牧市および余市町、四国の今治市、ならびに九州の有田町および熊本市の処理場を訪問し、関係者へのヒアリング調査を行い、現場での課題などを調査した。

## 3. 研究結果

### 3.1 嫌気性消化の連続式実験に関する実験結果

連続式実験における、TSおよびVSの経時変化を図1に示す。中温系では、投入TSおよびVSの実測値が平均でそれぞれ5.1および4.3%であり、消化汚泥ではそれぞれ平均2.4および1.7%程度を安定して維持していた。既設の消化槽での平均的なVSベースでの消化率は60%程度であり、同程度の消化率が得られている。アンモニア性窒素濃度はおおむね1,000 mgN/L以下であり、メタン発酵への阻害影響はなかった。VFAsとして、コハク酸、乳酸、ギ酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸、および吉草酸はほとんど検出されず、酢酸は7~14 mg/Lであり、VFAsの蓄積は特に観察されなかった。一方高温系では、運転開始55日目(前回の基質投入から10日経過)に、酢酸が4,000 mg/L程度、プロピオン酸が800 mg/L程度、酪酸が500 mg/L程度、およびイソ吉草酸が400 mg/L程度蓄積した。同時期に、アンモニア性窒素濃度は1,400 mgN/Lであり、pHは7~8程度を維持していたので、酸発酵活性は問題なく、メタン発酵活性が悪化していたことによると判断した。運転開始77日目に消化汚泥を投入して以降は、メタン生成が観察された。

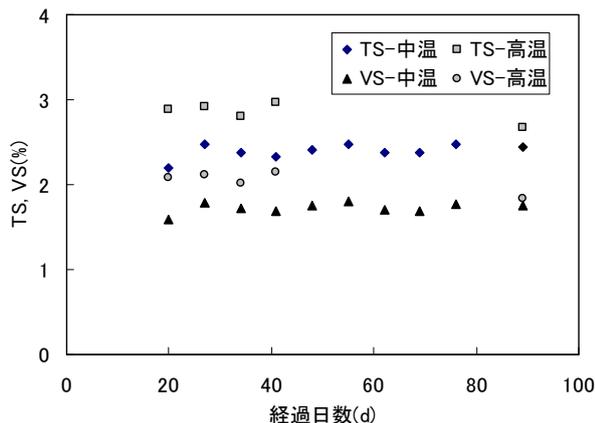


図1 連続式実験における TS および VS の経時変化

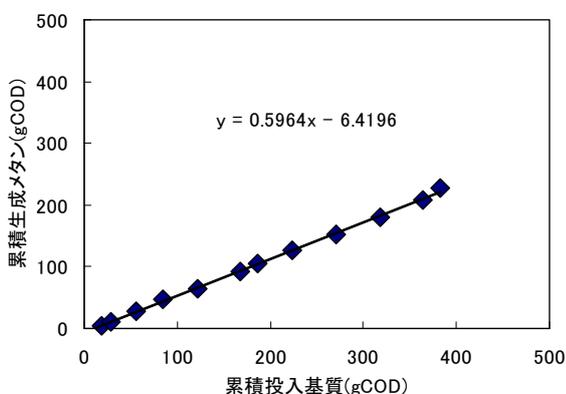


図2 連続実験（中温系）における累積投入基質量と累積生成メタン量の関係

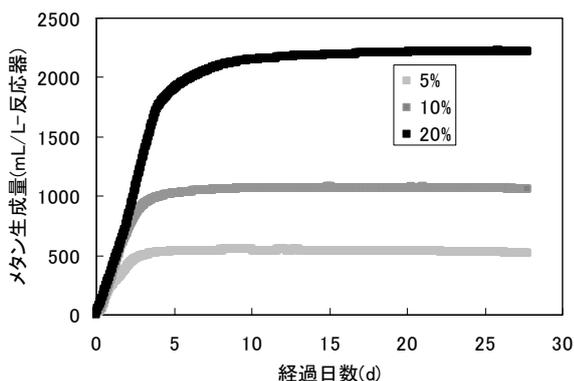


図3 回分式実験1でのメタン生成の経時変化

中温系での累積投入基質量 (gCOD) と累積生成メタン量 (gCOD) の関係を図2に示す。運転開始22日目～96日目の結果をまとめたものであり、全期間を通じて COD ベースで 60%程度の安定したメタン転換が示されている。混合汚泥および消化汚泥の COD/VS 比はいずれも 1.6 程度であったことから、

既設消化槽と同程度のメタン転換率が得られていたことが示された。本研究での負荷率  $1.8 \text{ kgTS}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$  程度で、アンモニアや VFAs の蓄積は特に見られなかったことから、負荷率のさらなる向上は可能であると考えられる。

### 3.2 嫌気性消化の回分式実験に関する実験結果

回分式実験1で用いた消化汚泥および混合汚泥の TCOD<sub>Cr</sub> は、それぞれ 15 および 48 g/L であった。回分式実験1の結果を図3に示す。ここでは、ブランクによるメタン生成量を差し引き、反応器体積あたりに換算して示している。最初の数日間のメタン生成速度は投入基質濃度によらずほぼ同程度であった。5%、10%および20%の系でそれぞれ5日、10日および20日程度経過後に基質からのメタン発生は完了していた。混合汚泥のメタン転換率は COD ベースで 70%となり、最終的なメタン生成量はおおむね投入量に比例していた。水田ら<sup>9)</sup>は、混合汚泥の割合を 20%とした回分式実験で、生汚泥および余剰汚泥の寄与を一次相関式で表しており、この程度の割合であれば、回分式実験でメタン転換率の評価が行えるものと考えられる。

回分式実験2で用いたおからおよび豆皮の VS はそれぞれ 0.24 および 0.37 gVS/g-wet であった。混合汚泥、おからおよび豆皮のメタン転換率は COD ベースでそれぞれ 60%、45%および 50%程度であり、おからおよび豆皮のメタン転換率は、一般的な生ごみ<sup>7)</sup>に比べてやや低かった。またメタンガス発生がほぼ停止するまでにかかった日数は、混合汚泥が 10日程度、おからおよび豆皮が 16日程度であった。馴致期間を確保することでメタン転換率が向上する可能性もあり、今後下水処理場でこうした食品廃棄物を受け入れることが、メタン発酵の観点では可能であると考えられた。

### 3.3 みずみち棒の調査結果

北海道で導入されている処理場へは、平成23年7月7日～8日にかけて訪問した。北海道地方は気温が低いこともあり、スカム発生などの心配もなく、みずみち棒による効果を確認することができた。しかし苫小牧市では、みずみち棒が目詰まりを起こすという問題があった。みずみち棒の目詰まりは濃縮槽の中心に近い最も濃度が高くなる部分で発生しており、目詰まりにより引抜き濃度は低下し、掃除し除去することでまた引抜き濃度は改善するとのこ

とであった。目詰まりを起こすものは髪の毛など繊維状のしさが原因となっているようである。みずみち棒がない場合に比べ、みずみち棒がある場合は重力濃縮槽内の障害物が増えることにもなるので、導入する際はしさを除去を確実に行う必要があると考えられる。しが多い処理場では、重力濃縮槽の前段にしさ破砕機やスクリーンなどを設けることも有効であると考えられる。

四国および九州の処理場へは、平成 23 年 8 月 30 日～9 日 1 日にかけて訪問した。今治市および有田町においては、みずみち棒導入後、引抜き汚泥の濃度は向上したという結果が得られているものの、熊本市では引抜き汚泥の濃度に向上は見られていなかった。温暖な地域では、引抜き汚泥の濃度を高くするために、界面高さを上げると、滞留時間が長くなり、引抜く前に汚泥が腐敗し、スカムが発生する傾向が見られた。腐敗によるガスが汚泥に付着し汚泥を浮上させ、スカムが発生するばかりでなく、引抜き濃度も低下するといった現象が発生するので、汚泥の腐敗時間を考慮した運転が必要である。引抜き汚泥の濃度は向上しないものの、みずみち棒導入によりスカムの発生が抑えられているということであったので、汚泥に付着したガスをみずみち棒により再び分離させるといった効果がある可能性も考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では、下水処理場に設置している嫌気性消化槽を活用した、低炭素型水処理・バイオマス利用技術を開発するための基礎実験を行った。また、みずみち棒については、導入下水処理場を訪問し、ヒアリング調査を行い、現場での課題などを調査した。得られた成果は以下の通りである。

- 1) TS 5%程度の下水混合汚泥を対象とした嫌気性消化の連続式実験を行ったところ、中温条件下では安定した処理が可能であり、全期間を通じて COD ベースで 60%程度のメタン転換が示されたのに対して、高温条件下での運転はやや不安定であった。
- 2) 回分式実験 1 では、混合汚泥を消化汚泥に対して体積比 20%投入した場合でもメタン発酵がすすみ、おおむね 20 日後に基質からのメタン生成が終了した。回分式実験 2 では、おからおよび豆皮の混合消化の可能性が示された。
- 3) 北海道の小樽市、苫小牧市および余市町、四国の今治市、ならびに九州の有田町および熊本市の処理

場を訪問し、関係者へのヒアリング調査を行い、現場での課題などを調査し、北海道では目詰まりの可能性や、温暖な地域では腐敗ガスによる影響などの課題が明らかになった。

今後、嫌気性消化については基礎的実験を継続することでその安定性を評価し、みずみち棒については示された課題に対する基礎実験を行う必要がある。

#### 謝辞

嫌気性消化の実験では、石川県の多大なる協力を得ている。みずみち棒の調査では、導入自治体の多大なる協力を得ている。ここに記して、関係各位に謝意を表す。

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) 日本下水道協会：日本の下水道、平成 23 年度下水道白書, 2012.
- 2) 菅野一敏、村上清志、平川一省：既設下水処理場への複合バイオマスの受入れと混合消化の取組, 第48回下水道研究発表会講演集, 208-210, 2011.
- 3) 堀尾重人、桜井健介、岡本誠一郎：下水処理場を核としたバイオマス利活用による GHG 削減効果, 第 48 回下水道研究発表会講演集, 193-195, 2011.
- 4) 下水道新技術推進機構：下水処理場へのバイオマス（生ごみ等）受入マニュアル, 2011.
- 5) 山口律子、石橋重則、常松順子、松尾和正：福岡市における高温高濃度消化の検証と維持管理に関する一考察, 第 47 回下水道研究発表会貢献集, 912-914, 2010.
- 6) 水田健太郎、山本博英、島田正夫：嫌気性消化における投入基質性状・メタン発酵特性, 第 48 回下水道研究発表会講演集, 199-201, 2011.
- 7) 洪鋒、津野洋、日高平：1 日 1 回給餌操作での生ごみの高温メタン発酵特性に関する研究, 廃棄物学会論文誌, 15(5), 381~388, 2004

## 水環境中における病原微生物の対策技術の構築に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：材料資源研究グループ（リサイクル）

研究担当者：内田勉、諏訪守、桜井健介

### 【要旨】

病原微生物の検出技術の高度化により、下水や環境水での汚染実態が徐々に明らかになりつつあるが、それらに起因する集団感染発生の恐れが危惧されている。現行指標である大腸菌群では汚染の実態を十分に把握できないこともあり、公共用水域への各種汚染源の解明や汚染レベルの違いによる対策手法の構築が望まれている。

本研究では、利用形態に応じた公共用水域の安全性を確保するため、その基本となるリスク評価に資するべく、測定法等の開発を通じた下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の汚染実態を解明する。さらに、対策技術として今まで明らかとなっていない生物学的高度処理法等による病原微生物の除去要因の解明を行う。その結果を基に汚濁負荷の観点から適切な水環境保全システムとしての対策技術を構築するものである。

本研究は、平成 23～27 年度にかけ、①下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明、②リスク評価のための極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発、③生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討、④適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築、⑤水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。

23年度は、上記①に関して、下水道へ排出される病院排水を対象に薬剤耐性菌の実態調査、および浄化槽排水負荷源を流域に持つ河川を対象にウイルス、原虫類の実態調査を行った。

その結果、下水道へ排出される病院排水を対象とした薬剤耐性菌の実態調査では、アンピシリンに耐性を示す多剤耐性大腸菌株が多く検出されたが、カルボペネム系のイミペネムに耐性を示した大腸菌株は、現段階において不検出であった。このため、スーパー耐性菌と称される細菌の存在レベルは未だ低いと推定された。また、浄化槽排水の影響を受ける河川水の調査では、公共用水域に対するノロウイルスの負荷源の 1 つとして、さらに、原虫類についても検出割合・濃度は低い負荷源の 1 つとして浄化槽排水の存在が明らかとなった。

上記③に関して、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果を評価した。今回の震災により壊滅的な被災を受けた下水処理場では、完全な水処理の復旧には長期間を要することから、段階的な対策の実施により公共用水域に対する衛生学的安全性を担保しなければならない。しかし、段階的な対策技術ごとに病原微生物の除去効果が異なると考えられるため、それら対策技術の除去効果を明らかにすることを目的に、被災した処理場を対象に重点的に調査を実施した。

段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価では、その初期対応での簡易沈殿処理法は、沈殿汚泥からの還元性物質による消毒剤の消費が消毒効果に影響するため、汚泥の引き抜き管理の重要性が明らかとなった。次いで、簡易曝気や汚泥の返送系の復旧は、塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やノロウイルス濃度の減少効果の向上に寄与していた。また、生物学的な処理法の復旧により、有機物濃度が減少することで次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を低減でき、より消毒効果が向上するものと考えられた。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、原虫類、ウイルス、浄化槽排水、段階的対策技術

### 1. はじめに

分子生物学的手法による微生物の同定・検出技術の進展により、感染症の原因究明が比較的容易となり病原微生物に関する知見が集積されてきている。殊に分離・培養が容易ではない細菌やウイルスなどの存在実態が徐々に明らかになるにつれ、これまで衛生学的な指標とされてきた大腸菌群に比較して、その存在実態や消毒耐性等に

関し乖離した状況が課題となっている。また、原虫類や一部のウイルスに関しては、近年になっての集団感染発生や、分子生物学的手法による検出技術の進展により、比較的近年に存在実態が明らかとなったことから新興感染症としての位置づけがなされている。一方、薬剤耐性菌などは抗生物質の利用の増加に伴い耐性能力を拡大する細菌が徐々に蔓延してきている状況から、多剤耐性菌

の存在が再興感染症の一原因であるとして大きな社会問題となっている。

これら新興・再興感染症の原因となる病原微生物に関しては、水環境に及ぼす衛生学的な観点から環境水を含め下水処理場等において、その実態把握のため調査・研究は徐々に行われているが、他にも汚染源と推定されるポイント、ノンポイント負荷源は存在しており、実態把握の遅れから対策技術の構築には繋がっておらず、公共用水域に対する汚染の原因ともなっている。このため、公共用水域の衛生学的な安全性を担保する上で、汚染源の実態把握やその汚染源に対する対策技術の構築は重要である。

本研究では上記の要請を踏まえ、利用形態に応じた公共用水域の安全性を確保するため、その基本となるリスク評価に資するべく、下水や水環境中における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の汚染実態を解明する。汚染実態の解明とともに、対策技術として今まで明らかとなっていない生物学的高度処理法等によるこれらの病原微生物の除去要因の解明を行う。その結果を基に汚濁負荷の観点から適切な水環境保全システムとしての対策技術を構築するものである。

特に薬剤耐性菌に関しては、スーパー耐性菌と称される細菌の存在が大きな社会問題となっていることから、存在実態の把握とともに、その存在状況によっては、下水処理場を含めた排水処理施設での適切な対策の構築を早急に実施する必要がある。

本研究で対象としている病原微生物は抗生物質耐性大腸菌、クリプトスポリジウム、ジアルジア、ノロウイルス(NV)とした。23年度は本研究課題の初年度にあたるため、実態把握を主に実施したが、下記2)に関わる項目として、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価を重点的に実施した。

- 1) 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明
- 2) 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

## 2. 研究目的および方法

### 2.1 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明

#### 2.1.1 抗生物質耐性大腸菌の実態

抗生物質の利用増加や開発が繰り返され、複数の抗生物質に対して耐性を有する多剤耐性菌の存在が社会的に大きな問題となっている。殊に、複数の抗生物質に耐性を有する多剤耐性菌の1つであるスーパー耐性菌と称される細菌は、切り札と称される抗生物質に耐性を有することから、臨床分野等においても大きな脅威となっている。

一方、微生物混在系としての下水処理場においても耐性菌の実態調査は行われており、多剤耐性株の存在<sup>1)</sup>や耐性遺伝子の検出報告例<sup>2)</sup>がある。特に、下水処理場へスーパー耐性菌の流入がある場合には、微生物混在系としての活性汚泥中において、ニューデリー・メタロ-β-ラクタマーゼ1(NDM-1:カルバペネムを含む広域β-ラクタム薬を分解する酵素)に代表される耐性遺伝子の伝播により他の細菌に対し多剤耐性能力を付与することが危惧される。海外においてNDM-1の遺伝子を保持した細菌の実態について、水道を含む環境水での検出事例<sup>3)</sup>もあり、抗生物質の消費大国である我が国においても、その実態解明を早急に実施する必要があると考えられる。

本研究課題では、まず、スーパー耐性菌を含めた多剤耐性菌の実態把握を目的に、下水道へ排出される病院排水を対象に、その存在状況について評価を行った。病院排水は、関東圏内にある比較的大規模なF病院を対象とし、排水中に含まれる大腸菌の抗生物質感受性試験により評価を行った。大腸菌の検出はクロモカルト培地による平板培養法とし、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。対象抗生物質はカルバペネム系の代表的な抗生物質であるイミペネム(IPM)以外に、アンピシリン(ABPC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)、セフジニル(CFDN)、テトラサイクリン(TC)、レボフロキサシン(LVFX)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<sup>4)</sup>。

#### 2.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査

公共用水域に対する病原微生物の負荷源はポイント、ノンポイント負荷として様々なものが存在する。本研究においては、これら負荷源の病原微生物の実態を明らかにするとともに、その対策手法の構築、評価を行うもの

である。その中でも汚水処理人口に占める浄化槽の処理人口は比較的多いため、浄化槽排水が公共用水域に及ぼす影響評価が必要であると考えられるが、その実態については未解明である。

このため、浄化槽排水の影響を受ける河川を対象とした病原微生物の実態把握を目的に、NV、原虫類の存在実態を評価した。

調査対象河川はB県内にあるC、D、Eの3河川とした。これらの3河川の流域は、下水道整備未普及地域であるものの一部の排水を単独・合併浄化槽により処理している地域が含まれる。調査対象とした河川の流域における浄化槽設置数等を表-1に示す。住戸数の約30%が浄化槽を設置しており、設置数と戸数平均人数から推定される浄化槽人口は約110~220人である。また、当該流域内における浄化槽設置施設は小学校等があり、D、E、C河川流域の順で人口負荷が多い。調査は感染性胃腸炎の流行期である1~2月下旬の間に、これらの浄化槽排水の影響を受ける3河川を対象に4時間間隔で24時間採水を2回実施した。

表-1 影響戸数と浄化槽設置数

	住戸数	浄化槽設置数	浄化槽推定人口(人)	その他流域内浄化槽設置施設(人)	浄化槽推定人口計(人)
C河川	約 210戸	約 60戸	約220	-	約220
D河川	約 120戸	約 30戸	約110	小学校等(約330人)	約440
E河川	約 240戸	約 60戸	約220	保育園(約60人)	約280

原虫類の測定は、試料をポリカーボネート製メンブランフィルターによるろ過濃縮後、超音波処理によりフィルターからオーシスト(シスト)を剥離させ免疫磁気ビーズ法で回収し、蛍光抗体染色を行った。免疫磁気ビーズはダイナル社製のダイナビーズ GC-コンボキット、蛍光抗体染色にはイーグステインを用い、染色したプレパラートを落射蛍光微分干涉顕微鏡にて観察・定量を行った。なお、原虫類の測定試料は4時間毎の24時間採水の6試料を混合したものである。

NVの測定は、安定した定量値を得るため試料の濃縮はポリエチレングリコール(PEG)沈殿法とした。PEG沈殿法では、試料中にPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4M)を添加・攪拌し完全に溶解させ、4℃で1夜静置の後、10,000×Gで30分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣をRNase-free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とし、濃縮液中のウイルスは、リアルタイムPCR法により定量<sup>5)</sup>を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに

微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。上記で抽出したウイルスRNA試料0.5µgをランダムプライマー、Omniscript RT Kit(QIAGEN社)を用い全量20µLの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2µLをリアルタイムPCRに供した。NVの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」<sup>6)</sup>に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティクス社)を使用した。逆転写反応に使用する抽出RNA量はSpectrophotometer(NanoDrop社製)により定量した。なお、ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、検出濃度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した<sup>5)</sup>。

## 2.2 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

### 2.2.1 段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価

東日本大震災による津波により、沿岸部に位置する下水処理場は壊滅的な被災を受け処理機能が停止した。また、下水管渠にも広範囲な被害を及ぼしたことから、流下機能の阻害により、マンホール等からの溢水によっても公共用水域を含めた市街地等の衛生学的なリスク上昇要因にもなった。水道を含めた他のインフラ復旧により下水は継続的に流入するため、下水処理場は応急復旧対策により速やかに下水の排除・水質浄化を行う必要がある。壊滅的な被災のため、完全な水処理の実施には長期間を要することから、段階的な対策の実施により公共用水域に対する衛生学的安全性を担保しなければならないが、段階的な対策技術ごとに病原微生物の除去効果が異なると考えられる。

本評価では、下水処理場の水処理機能が被災により停止した場合、病原微生物の除去のために必要な要件を明らかにすることを目的に実施するものである。また、段階的復旧において生じた課題を明確にして、解決策を提案することで、本研究の達成目標の1つである「水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築」に繋がると考えられる。

本評価では、壊滅的な被災により水処理機能が停止したA下水処理場を対象に実態調査を実施した。段階的な対策技術として①簡易沈殿処理、②簡易沈殿処理+簡易曝気処理、③簡易沈殿処理+簡易曝気処理+汚泥返送系

の仮復旧の各段階における大腸菌群、NV の除去特性と課題を明らかにすることを目的に、現地調査・実験を実施した。併せて原虫類の流入実態についても把握した。

現地調査・実験方法では、上記の評価項目に加え塩素消毒実験等を行い、大腸菌群等の不活化・除去効果について検討を行った。

各病原微生物の測定法は、大腸菌群数では、デソキシコール酸培地による平板培養法とした。

原虫類、NV の測定法は、上記 2.1.2 に示した手法と同様である。

その他の水質測定項目は、水温、pH、DO、ORP、濁度は多項目水質計により、SS は下水試験方法を準拠、残留塩素は DPD 法により測定した。

### 3. 研究結果および考察

#### 3.1 下水や環境水における新興・再興感染症としての病原微生物である原虫類、ウイルス、薬剤耐性菌の実態解明

##### 3.1.1 抗生物質耐性大腸菌の実態

入院患者に対する抗生物質の投与により病院排水中には多剤耐性菌の存在割合が高いと推定されるため、下水や環境水の実態把握に先立ち下水道へ排出される病院排水を対象に、抗生物質耐性大腸菌の存在状況を調査した。調査対象とした病院排水は、関東圏内にある比較的大規模な F 病院である。ここからの排水を複数回採水し、その試料中の大腸菌コロニーについて抗生物質感受性試験を行った。

試験結果を図-1、2 に示す。供試株数は 333 株であり、その内、8 剤の抗生物質に対して耐性が無いと評価された株は 44 株であった。1 剤のみに耐性を示した株は 115 株であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは 62 株であった。2 剤以上の抗生物質に対し耐性を示した多剤耐性株は 174 株であり、供試株数の約 50% であった。174 株の内 169 株が ABPC に耐性を示しており、多剤耐性株の 97% を占めていたことから、多剤耐性株の多くは ABPC に耐性を有することが明らかとなった。また、2 株が最大 7 剤に対し耐性を示した。図-2 は各抗生物質に対する耐性株の割合を示したものであり、ABPC に耐性を示す株は約 70% と最も高く、次いで、TC が約 40% を占めていた。ABPC は 1963 年、TC は 1954 年に発売され長期間使用されており<sup>7)</sup>、時間の経過が耐性株の増加に繋がったと考えられる。現状において比較的販売量が多いとされる LVFX に関しては<sup>8)</sup>、上記 2 つの抗生物質に比較して耐性株の割合は高くないため、抗生物質販売量と耐性株の存在実態との関係はないようである。

一方、カルバペネム系の代表的な抗生物質の 1 つである IPM に対しては、耐性を示した大腸菌株は検出されなかった。大腸菌などの腸内細菌科でカルバペネム剤に耐性を示す株が分離された場合には、NDM-1 産生の可能性を考慮する必要があるとされているが<sup>9)</sup>、今回の実態調査では検出されなかったため、現状においてはスーパー耐性菌と称される細菌の存在レベルは未だ低いと推定された。今後、下水や環境水などを含め調査対象を拡げ実態把握を行う。

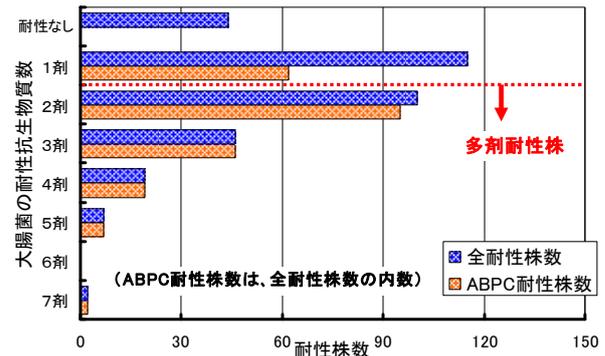


図-1 大腸菌の耐性抗生物質数ごとの検出株数

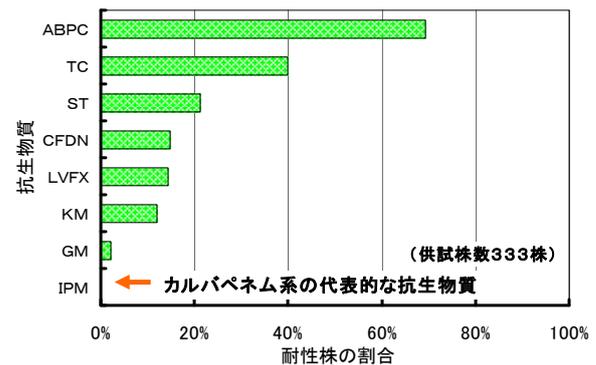


図-2 各抗生物質に対する耐性株の割合

##### 3.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査の結果

1月下旬から2月下旬に行った調査結果を図-3~6に示す。C 河川における NVG2 濃度は概ね 1 月下旬では  $10^4 \sim 10^5$  copies/L、2 月下旬では  $10^4 \sim 10^5$  copies/L、E 河川では同様に 1 月は  $10^5 \sim 10^6$  copies/L、2 月は  $10^4 \sim 10^5$  copies/L、D 河川は  $10^4 \sim 10^5$  copies/L レベルの範囲内で推移しており、2 月に比較して 1 月では 1 オーダー程度高いことから、胃腸炎感染症の流行状況の影響を受けているものと推定された。NVG1 濃度については、NVG2 濃度に比較して全体的に 1 オーダー程度低い状況にあった。また、各河川の流量状況を図-5、6 に示したが、C 河川の流量は他の河川と比較して多いことから、河川水による希釈効果が NV の検出濃度に反映されているものと考えられた。

ここで、河川水量に占める浄化槽排水の割合から排水

中の NV 濃度の推定を行った。水使用量を 1 人にあたり 230L と仮定<sup>10)</sup> し、浄化槽利用推定人口を乗じて排水量を求め、河川流量に占める浄化槽排水量の割合から排水の NV 濃度を試算した。試算に利用した NV データは検

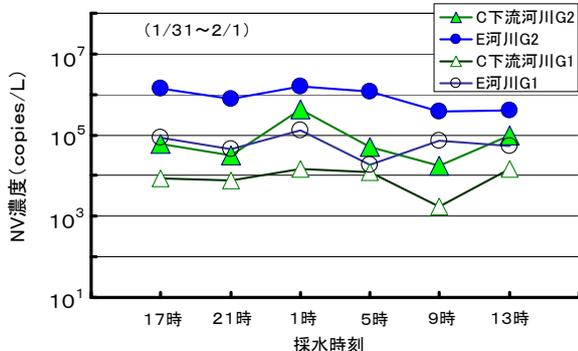


図-3 浄化槽排水の影響を受ける河川水のNV濃度の推移

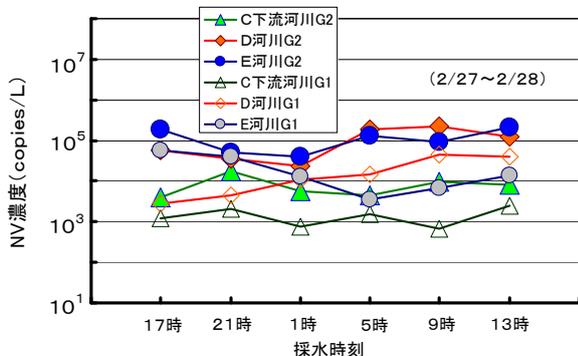


図-4 浄化槽排水の影響を受ける河川水のNV濃度の推移

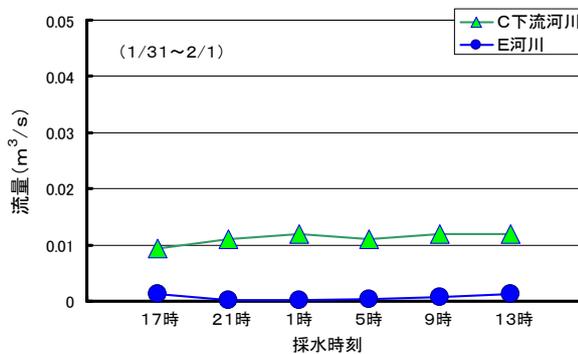


図-5 各河川の流量の推移

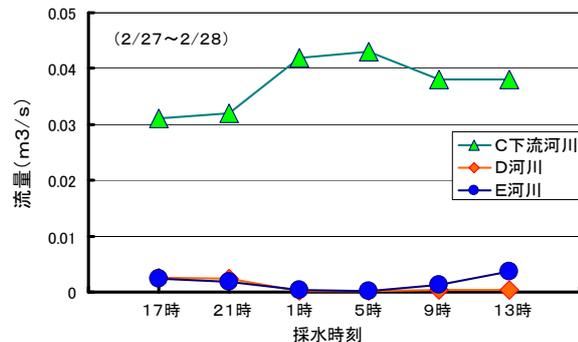


図-6 各河川の流量の推移

表-2 浄化槽排水量の試算と推定ノロウイルス濃度

1/31~2/1	河川流量 (m <sup>3</sup> /日)	浄化槽排水量 (m <sup>3</sup> /日)※	河川流量に占める排水量の割合	割合から推定したNVG2平均濃度 (copies/L)	昼間人口を加え推定したNVG2平均濃度 (copies/L)
C下河川	968	51	0.053	2.3E+06	—
E河川	57	51~55※※	0.89~0.96	1.1E+06	1.0E+06

表-3 浄化槽排水量の試算と推定ノロウイルス濃度

2/27~2/28	河川流量 (m <sup>3</sup> /日)	浄化槽排水量 (m <sup>3</sup> /日)※	河川流量に占める排水量の割合	割合から推定したNVG2平均濃度 (copies/L)	昼間人口を加え推定したNVG2平均濃度 (copies/L)
C下河川	3,223	51	0.016	5.1E+05	—
D河川	86	25~52※※	0.29~0.60	3.8E+05	1.8E+05
E河川	137	51~55※※	0.37~0.40	3.2E+05	3.0E+05

※ 1人230L/日と仮定<sup>10)</sup>

※※ 小学校等の昼間人口として1人230L/日の35%量と仮定<sup>10)</sup>

出濃度の高い状況にあったG2とした。試算結果を表-2、3に示す。浄化槽排水のNVG2濃度は $10^5 \sim 10^6$  copies/Lレベルと試算されたが、既往の調査研究による1~2月の下水処理水のNVG2平均濃度は、通常の活性汚泥法であれば $10^5$  copies/Lレベル、窒素・りんの高度処理法では $10^4$  copies/Lレベルであり<sup>11)</sup>、それらと比較して浄化槽排水のNV濃度はやや高い状況にあった。なお、河川流量に占める浄化槽排水の割合が高いD、E河川を含め全ての河川水試料において残留塩素は検出されなかった(表-4)。

河川水のSS濃度とNV濃度の関係を図-7、8に示す。河川水のNV濃度に対するSS濃度の寄与率は高く、各河川の上流域では浄化槽排水以外に負荷が存在しないことから、浄化槽によるSS除去性能の変動が放流先河川水のNV濃度に影響を及ぼしているものと考えられた。

次いで、原虫類の調査結果を表-4に示す。24時間採水により得られた試料を混合し分析を行ったことから、その水量は5~30L程度となった。クリプトスポリジウムについては全ての試料で不検出(検出限界値0.03~0.2 oocyst/L; 存在していたとしてもこれらの濃度以下)であるが、1試料においてジアルジアの検出濃度は0.54cyst/Lであった。

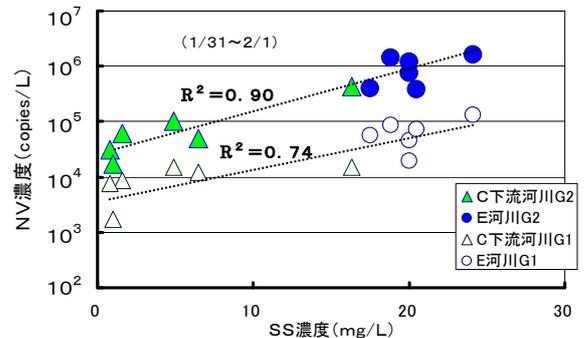


図-7 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

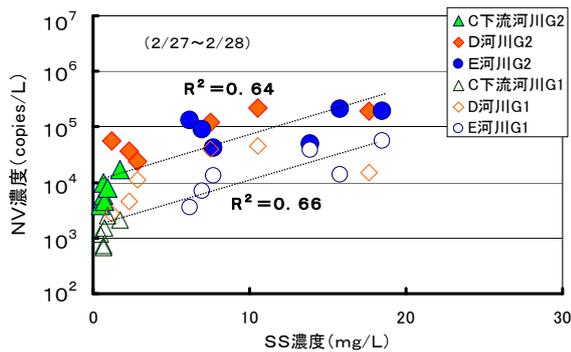


図-8 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

表-4 原虫類等の調査結果

対象河川	河川流量に占める 排水量の推定割合	クリプトスポリジウム (oocyst/L)	ジアルジア (cyst/L)	検出限界値 (oocyst/L)	残留塩素濃度 (mg/L)
1月下旬	C河川	5.3%	N.D.	N.D.	0.06
	E河川	89%	N.D.	N.D.	0.03
2月下旬	C河川	1.6%	N.D.	N.D.	0.2
	D河川	29%	N.D.	N.D.	0.05
	E河川	37%	N.D.	0.54	0.05

これらの結果から公共用水域における NV、原虫類の排出負荷源は下水処理場に加え浄化槽排水の存在が明らかとなったが、その排水の NV 濃度は下水処理水と比較して高濃度であった。

よって、公共用水域における衛生学的な安全性を担保するには、下水道のみならず他の施策における対応の構築が急務であると考えられた。

### 3.2 生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明と消毒法による効果の検討

#### 3.2.1 段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価

震災により水処理機能が停止した A 下水処理場では、被災直後の簡易沈殿処理による対応から翌年の 2 月の時点では、簡易曝気と返送汚泥系の仮復旧により、堆積汚泥の腐敗防止や酸化促進による有機物等の溶出抑制に努めた段階的な水処理を実施している。本評価では、段階的な対策技術に応じて放流水質が大きく変動すると考えられたため、その病原微生物濃度や消毒効果への影響を明らかにした。

まず、A 下水処理場における原虫類の調査結果を図-9、10 に示す。初沈流出水の 5 試料の内、1 試料からクリプトスポリジウムが、2 試料からジアルジアが検出され、検出濃度は各々 1.5oocyst/L、0.5~1.4cyst/L であった。塩素混和池あるいは終沈流出水からは 3 試料の内、1 試料においてジアルジアが検出され、その濃度は 0.45cyst/L (検出限界値：0.25~0.67 oocyst(cyst)/L) であった。クリプトスポリジウムによる集団感染症発生時には感染者から多量のオーシストが排出されるため、流入下水

の検出濃度・割合が高まると報告<sup>12)</sup> されているが、今回の結果では検出濃度・割合とも低いことから、これらの原虫類が原因となる感染症は発生していないものと考えられた。

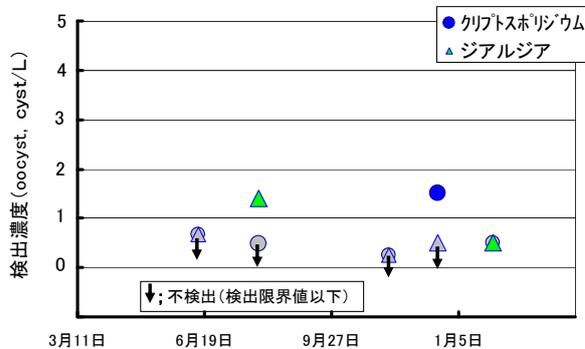


図-9 初沈流出水の原虫類の検出状況

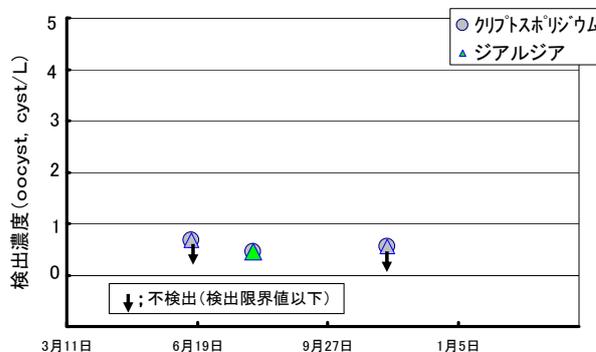


図-10 塩混池 or 終沈流出水の原虫類の検出状況

次いで、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価結果について図-11~13 に示す。

6 月において簡易沈殿処理を経た塩素混和池での大腸菌群の不活化効果は確認できなかった。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 15mgCl/L であったが、残留塩素は検出されなかった。この調査時に並行して行った消毒実験の結果を図-14 に示す。消毒効果の向上を目的に PAC の添加効果の評価したが、PAC を無添加とした 10mgCl/L のケースにおいて先の実態調査とは異なり、次亜塩素酸ナトリウム 10mgCl/L の添加でも消毒効果が得られた。消毒実験に供した試料は簡易沈殿処理を行って間もない新通水系列の処理水であったが、塩素混和池の試料は新通水系列と震災直後から簡易沈殿処理を行っている系列の混合水であった。各々の最終沈殿池の水質状況を表-5 に示すが、ORP と濁度について大きな違いが見られ、震災直後から簡易沈殿処理を行っている系列では下層の濁度が高いことから下層に汚泥が堆積し、沈殿汚泥の存在により生成された還元性物質が消毒剤を消費したと考えられた。このため、簡易沈殿処理時に

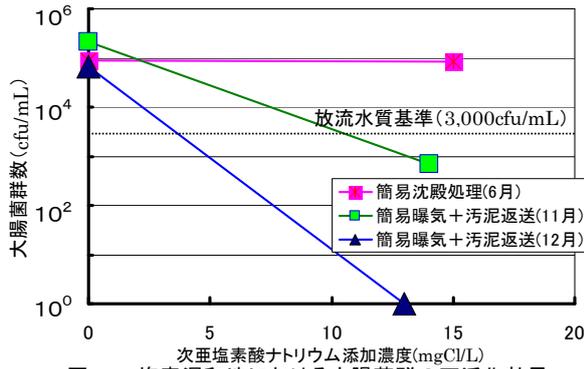


図-11 塩素混和池における大腸菌群の不活化効果

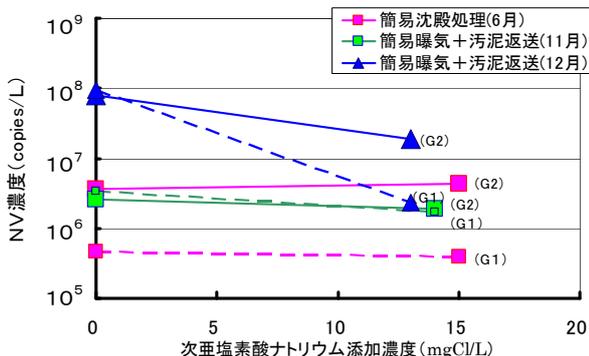


図-12 塩素混和池におけるNV濃度の減少効果

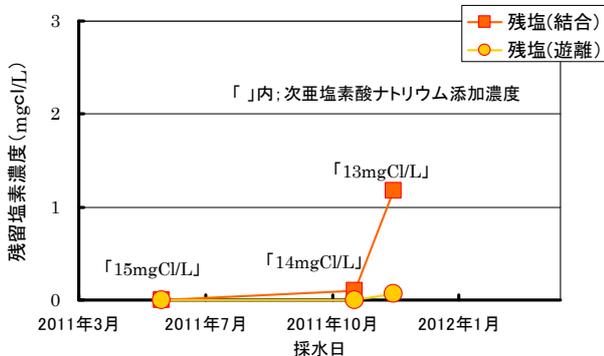


図-13 塩素混和池の残留塩素濃度の推移

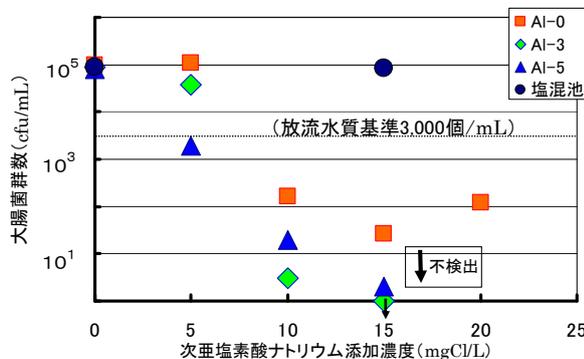


図-14 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係(6月)

表-5 各最終沈殿池の水質状況 (6月)

試料	項目	DO(mg/L)	ORP(mV)	濁度
新通水系列	表層	1.0	-129	60
	下層	0.1	-134	65
汚泥堆積系列	表層	1.2	-203	66
	下層	0.4	-183	990以上

では、堆積汚泥の引き抜き管理の有無が消毒効果に及ぼす重要な因子であることが明らかとなった。

PACの添加効果の評価では、図-14からわかるように、その添加濃度を高めることで塩素消毒の効果が向上し、5mgAl/L、5mgCl/Lの条件下において大腸菌群数は放流水質基準値以下となった。また、NVに対する評価結果を図-15、16に示すが、PACの添加濃度を高めることで、凝集沈殿によるNVの除去が向上するとともに、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を高めることで、遺伝子濃度の減少効果が向上した。放流先下流域に利水施設等が存在し、感染リスクの上昇が危惧される場合には、リスク低減手法の1つとしてPACの添加による対応が考えられる。

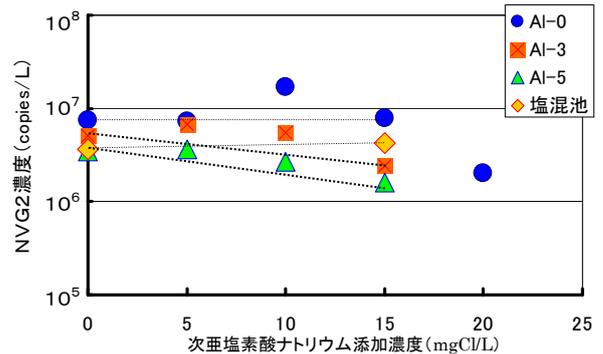


図-15 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2濃度の関係(6月)

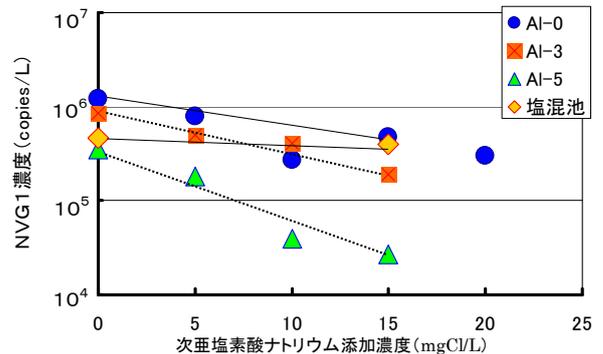


図-16 凝集剤添加濃度条件ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1濃度の関係(6月)

8月からは簡易曝気処理が開始され、11月からはそれに加え、最終沈殿池の堆積汚泥の腐敗防止や酸化促進による有機物等の溶出抑制を目的に汚泥返送系の仮復旧が行われた。

8月の簡易曝気処理時の塩素消毒実験の結果について図-17に示す。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を10mgCl/Lとすることで、曝気槽混合水、終沈越流水で放流水質基準以下となり、沈殿処理のみの場合よりも消毒効果が向上した。また、NV濃度による評価結果を図-18、19に示す。消毒前のNV濃度はG2が $10^6$ copies/Lレベル、G1が $10^5 \sim 10^6$ copies/Lレベルであった。対象水毎で関係直線の傾きが異なり、曝気処理を行うことでNV遺伝子残存率の最大値が得られているため、NV遺伝子に及ぼす塩素消毒の影響が強く反映されるものと考えられた。図-20には塩素消毒実験時における処理段階ごとのORPと残留塩素濃度の関係を示した。曝気による還元状態の改善はORPの向上とともに塩素の残留性向上に寄与しており、上記の消毒実験の結果を裏付けていた。

さらに、11月以降においては簡易曝気に加え汚泥返送系の仮復旧により、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を減少させても塩素混和池において残留塩素濃度が上昇し(図-13)、併せて大腸菌群の不活化効果やNV遺伝子の減少効果が向上した(図-11、12)。

段階的な対策技術により、塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やNV濃度の減少効果は向上したが、NVについては培養系が確立されておらず不活化割合を評価で

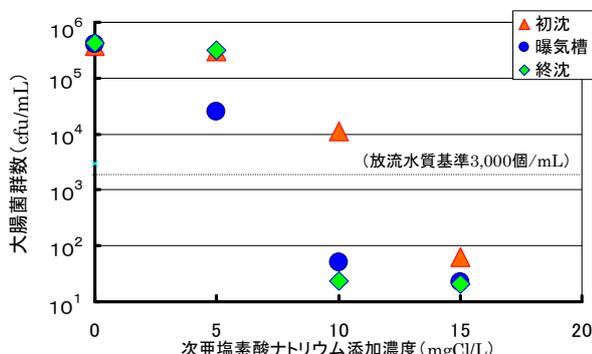


図-17 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係(8月)

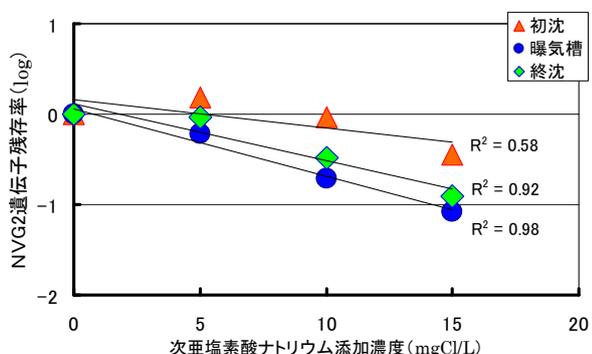


図-18 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2遺伝子残存率の関係(8月)

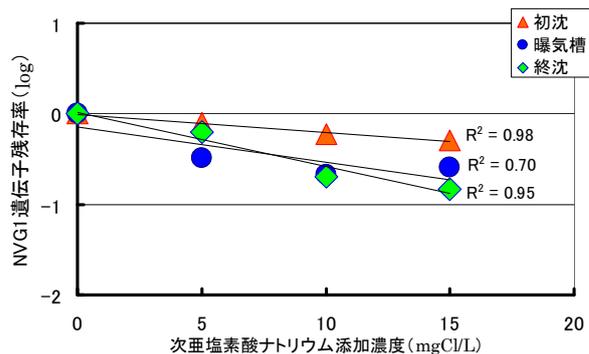


図-19 処理段階ごとの次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1遺伝子残存率の関係(8月)

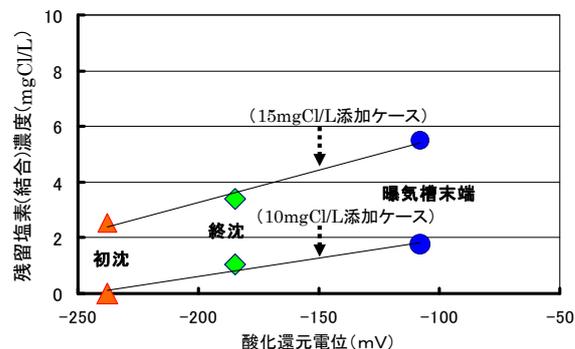


図-20 処理段階ごとの酸化還元電位と残留塩素(結合)濃度の関係

きない課題がある。このため、NV代替指標としてネコカリシウイルス(FCV)の適用に関しての提案<sup>13)</sup>があることから平成22年度に、塩素消毒によるFCVの遺伝子減少量と生残率を明らかにすることで、NVの不活化効果を推定した<sup>2)</sup>。その結果、-1 log程度の遺伝子残存率となれば生残率は5~7 log程度低下することが明らかとなっている(図-21)。11~12月におけるNV遺伝子濃度についても0.5~1.5 log程度の減少効果が確認(図-12)されていることから、2~5 log程度の不活化効果が得られているものと考えられた。

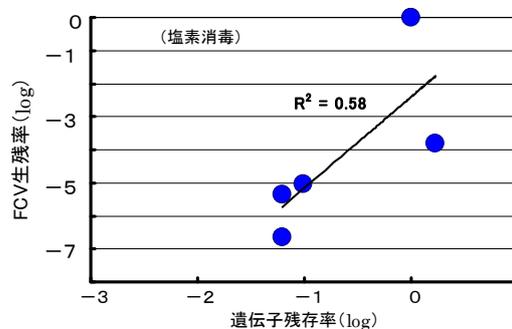


図-21 FCVの遺伝子残存率と生残率の関係<sup>2)</sup>

簡易曝気処理および汚泥の返送系の復旧に至ることができれば、適切な余剰汚泥の引き抜きと曝気風量の管理

により、生物学的な高度処理が可能となる。

ここでは生物学的な高度処理に至る段階として、活性汚泥の生成途上を想定し、処理水質の向上効果が消毒効果に与える影響を回分実験により評価した。生物学的な窒素・りん除去の高度処理を行っている処理場の活性汚泥をMLSS濃度が500mg/L (MLVSS ; 400mg/L) となるよう初沈越流水4Lと活性汚泥1Lを混合した後、曝気混合時間を1~4時間とし、1時間静置沈殿させ、その上澄液に次亜塩素酸ナトリウムを0.6~6mgCl/Lの範囲で添加し大腸菌群数の測定を行った。

実験結果を図-22に示す。有機物濃度の減少効果により次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度を3mgCl/Lとしても大腸菌群数は放流水質基準値以下となり、同日に実施した図-17で得られた結果よりも消毒効果が向上した。活性汚泥処理により還元性物質(硫化物や有機物)が分解あるいは吸着されることで、消毒剤の消費が抑制されたものと考えられた。また、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度とNV遺伝子残存率の関係を図-23、24に示す。同日に実施した図-18、19の実験結果と比較すれば、次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度が低いため、遺伝子残存率の顕著な変化は少なく若干のバラツキがあるが、曝気混合時間毎で減少直線の傾きが異なっている。曝気混合時間が長時間となることで、次亜塩素酸ナトリウムが遺伝子の残存率に及ぼす影響が大きくなる傾向が示された。

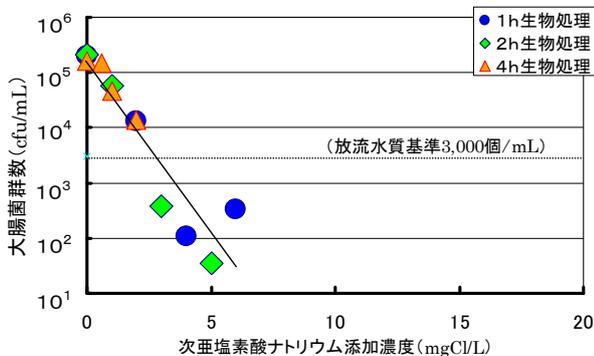


図-22 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と大腸菌群数の関係

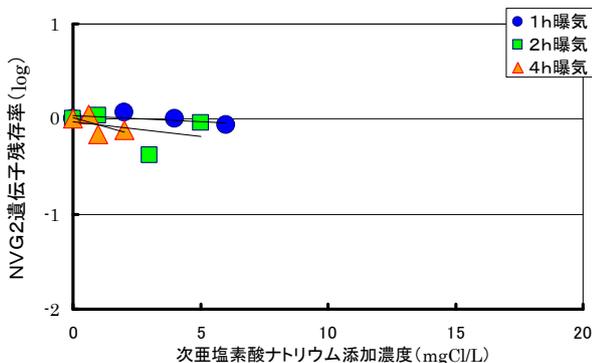


図-23 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG2遺伝子残存率の関係

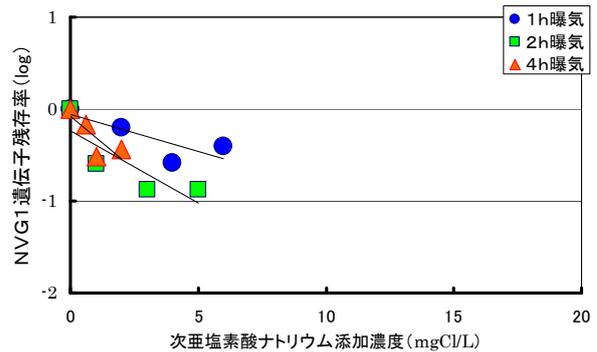


図-24 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNVG1遺伝子残存率の関係

以上の調査、実験により得られた段階的な対策技術の評価結果を表-6に示す。簡易沈殿処理では沈殿池に堆積した汚泥の引き抜き管理が消毒効果に及ぼす重要な因子であり、また、簡易曝気や汚泥の返送の実施により消毒効果は向上するが、活性汚泥の生成を目的とした運転条件とすることで、より消毒効果が向上するとともに消毒剤の低減が図られることを明らかにした。

表-6 段階的な対策技術の評価結果

簡易沈殿処理	堆積汚泥の引き抜き管理が重要
簡易沈殿処理+簡易曝気	簡易沈殿処理よりも消毒効果が向上
簡易沈殿処理+簡易曝気+汚泥返送※	汚泥返送系の回復旧により、さらに消毒効果が向上
簡易沈殿処理+曝気+汚泥返送※※	有機物濃度の減少および消毒剤添加濃度の低減

※ 堆積汚泥の腐敗防止等を目的

※※ 活性汚泥の生成を目的

#### 4. まとめ

23年度は、下水道へ排出される病院排水を主に薬剤耐性菌の実態把握および浄化槽排水負荷源を流域に持つ河川を対象にウイルス、原虫類の実態を把握した。また、東日本大震災により壊滅的な被害を受けた下水処理場を対象に、段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価を重点的に実施した。以下に得られた結果を示す。

##### 「抗生物質耐性大腸菌の実態」

- 1) 多剤耐性大腸菌株の多くはABPCに耐性を有することが明らかとなった。
- 2) 現状における抗生物質販売量と耐性大腸菌株の存在実態との関係は見られなかった。
- 3) カルバペネム系の代表的な抗生物質の1つであるIPMに対して耐性を示した大腸菌株は検出されなかった。

##### 「浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査の結果」

- 4) 公共用水域におけるノロウイルス、原虫類の排出負荷源として、下水処理場に加え浄化槽排水の存在が明らかとなった。
- 5) 浄化槽によるSS除去性能の変動が放流先河川水のノロウイルス濃度に影響を及ぼしているものと考えられ

た。

6) 浄化槽排水の割合が高い河川水でも残留塩素濃度は検出されなかった。

### 「段階的な対策技術による放流水質の改善効果の評価結果」

7) 簡易沈殿処理時においては、堆積汚泥の引き抜き管理が消毒効果を発揮させるために重要な因子であることが明らかとなった。

8) 簡易沈殿処理水を対象とした PAC の添加効果の評価では、その添加濃度を高めることで塩素消毒による大腸菌群の不活化効果やノロウイルス遺伝子量の低減効果が向上した。

9) 簡易沈殿処理に加え簡易曝気や汚泥の返送の実施により消毒効果は向上するが、活性汚泥の生成を目的とした運転条件とすることで、より消毒効果が向上するとともに消毒剤の低減が図られることを明らかにした。

10) 今回、調査対象とした河川水や下水試料からの原虫類の検出濃度・割合は低いことから、これらの原虫類が原因となる感染症は発生していないものと考えられた。

### 謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、A 下水処理場、B 県および B 県内の各下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。また、F 病院排水の採水に協力して頂いた、多くの関係各位に謝意を表します。

### 参考文献

- 1) M.Suwa, M.Ozaki, (2007), Study of the actual condition of antibiotic resistant bacteria in water environments and wastewater, 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Proceedings, pp.354-355.
- 2) 岡本誠一郎、諏訪守、桜井健介 (2011)、水環境中における病原微生物の消長に関する研究、平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集。
- 3) T.R.Walsh, J.Weeks, D.M. Livermore and M.A. Toleman (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study, Lancet Infect Dis., 11, 355-362.
- 4) 細菌感受性試験用、KB ディスク栄研手引き。
- 5) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子 (2009)、下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす濃縮法の影響、

下水道協会誌論文集、46(561)、91-101。

- 6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007)、ノロウイルスの検出法について。
- 7) 橋本一、井上松久 (1993) 病原菌の薬剤耐性一機構の解明とその対策一、学会出版センター。
- 8) 八十島誠、山下尚之、中田典秀、小森行也、鈴木穰、田中宏明 (2004) 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン、クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響、水環境学会誌、27(11)、707-714。
- 9) 日本感染症学会、多剤耐性菌情報-NDM-1 および NDM-1 産生菌の特徴、<http://www.kansensho.or.jp/mrsa/100908ndm-2.html>。
- 10) (社)日本下水道協会(2008) 流域別下水道整備総合計画調査指針と解説。
- 11) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2010)、ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子、下水道協会誌論文集、47(571)、103-111。
- 12) 諏訪守、鈴木穰、尾崎正明(2007)、クリプトスポリジウム集団感染発生地域の下水処理場におけるオーシストの実態、下水道協会誌論文集、44(538)、151-160。
- 13) Antimicrobials Division U.S.EPA, CONFIRMATORY VIRUCIDAL EFFECTIVENESS TEST, Using Feline Calicivirus As Surrogate for Norovirus.

## 開発途上国における都市排水マネジメントと技術適用に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：材料資源研究グループ（リサイクル）

研究担当者：内田勉、諏訪守、日高平、桜井健介

### 【要旨】

新興国を中心に、急速な経済成長により工場排水や生活排水の河川、湖沼等への放流に伴い、著しい水質汚濁とそれに伴う利水障害、生態系の破壊など深刻な影響が生じている。また、昨今、人口増加による水資源の逼迫に伴う高度な水の再利用、地球温暖化対策に配慮した下水汚泥等を有効利用した省エネルギー対策が求められつつある。さらに、京都メカニズムによる温室効果ガス排出削減枠の移転等の要請も高まっている。我が国では、こうした状況に対応しうる優れた公害対策の経験や汚水処理、汚泥有効利用技術等を保有しており、海外の多くの開発途上国から支援要請があるものの、開発途上国では気候風土、生活様式、経済状況、水資源の逼迫状況等が異なっており、我が国における下水道に関する考え方や技術がそのまま適用できない可能性がある。

本研究では、変化する社会的要請や処理水の各種用途への再利用、下水汚泥等の副産物の有効利用や水・汚泥処理の省エネルギー化による地球温暖化対策への寄与が可能な開発途上国向けの水・汚泥処理技術の現地適用手法を開発するものである。

本研究は、平成 23～27 年度にかけ、①途上国の地域要件を踏まえた水・汚泥処理技術の適用性の分類、②水・汚泥処理技術の現地適用手法の開発、③都市排水マネジメント方策の提示、の各項目を達成目標に掲げ実施するものである。

23年度は、上記①に関して、マレーシア国を対象に下水・汚泥処理に関わる地域要件や都市排水に対する社会的要請について現地調査を実施し、適用技術に対する課題、留意点等を整理した。

その結果、処理水の再利用では、心理的な抵抗により需要も明確ではなかった。下水汚泥の有効利用と減量化では、輸入燃料の依存を減らすため炭化燃料化の活用が期待でき、埋め立て処分に代わる焼却方式の提案が必要であると考えられた。省エネルギー型水処理では、現地での適用事例が少ないため、現地の要求性能を踏まえた適用性の評価が必要であると考えられた。汚泥消化ガスの活用に関しては、汚泥消化槽の温度管理、硫化水素対策等が課題であった。

キーワード：開発途上国、都市排水マネジメント、水・汚泥処理技術、排水の再利用、温室効果ガス対策

### 1. はじめに

近年、開発途上国等の都市排水処理において、従来の河川、湖沼汚濁などの問題に加え、人口急増による水資源の逼迫に伴い排水の再利用、地球温暖化対策に配慮した温室効果ガス排出抑制などが求められている。我が国の保有する公害対策の経験や水・汚泥処理技術を活用し、新たな課題に対応が可能な都市排水マネジメントが必要であると考えられるが、気候風土や生活様式、経済状況等が異なることもあり、それらの経験や技術をそのまま適用できない可能性がある。

このため、開発途上国の地域要件を踏まえた水・汚泥処理技術の適用性を分類し、現地適用手法を開発することで、都市排水マネジメント方策の提案が必要である。

本研究では上記の要請を踏まえ、従来の開発途上国向け都市排水マネジメントガイドラインに新たに追加すべき視点として、多様な用途への再生水利用、下水汚泥処

理の適正化・処理プロセスの省エネルギー化、下水汚泥エネルギー活用などの項目を加え、新たな都市排水マネジメントの方策を提案するものである。

23年度は本研究課題の初年度にあたるため、途上国の地域要件を踏まえた水・汚泥処理技術の適用性の分類として、下記の 3 項目についてマレーシア国を対象に、現地調査および関係者からのヒアリング等を実施した。

- 1) 下水処理水の再利用の現状
- 2) 汚泥処理技術
- 3) 温室効果ガス対策

### 2. マレーシア国の下水道事業

マレーシア国の下水道事業は、各組織で役割が明確化されており、政策業務では水セクター政策局、プロジェクトの立案・実施は下水道局、規制業務は国家水サービス

委員会、運転維持管理は国営下水道管理会社が各々担っており、組織・体系的な運営が行われていると考えられる。また、2009年の国家グリーンテクノロジー政策の中で、下水道事業においても「下水処理水の再利用」や「汚泥固形物の活用」、「温室効果ガス対策」などが大きな課題として挙げられており、課題に対する共通認識のもと、技術協力の面で効果的な成果が期待されると考えられることからマレーシア国を調査対象として選定した。

現地調査では、エネルギー・グリーンテクノロジー・水省、国家水サービス委員会、国営下水道管理会社にてヒアリングを行った。その内容は、下水道事業の動向、水質基準、水・汚泥処理方式の決定根拠、処理水の利用の現状、汚泥の処分・利用方法、温室効果ガス対策、消化ガスの利用等である。

## 2.1 下水処理水の再利用の現状

下水処理水は安定した水資源であることから、我が国においても再生利用の促進が図られている。マレーシア国においても急速な都市化の進展により下水処理水の再利用の意義・効果が高まりつつあると考えられ、下水処理や下水処理水再利用の現状について、現地ヒアリング等により把握を行った。

## 2.2 汚泥処理技術

下水処理により発生した汚泥の有効利用率は、我が国では建設資材利用、緑農地、バイオマスなどとして発生汚泥量の約80%に及んでいる。マレーシア国においても、都市部の下水道普及率の高まりから発生汚泥量が増加しており、その処理・処分方法や利活用手法について現状を把握するとともに、その課題を整理した。

## 2.3 温室効果ガス対策

環境問題の解決と温暖化対策を同時に実現するためのコベネフィット CDM (クリーン開発メカニズム) 事業がアジア地域で推進されている。バイオマス関連事業は、この中心的な事業であることから、マレーシア国においても廃棄物処理やパーム油事業に関連したメタンガス発生抑制事業等が進行中である。ここでは、下水道分野の汚泥処理におけるコンポスト化や排出ガス抑制対策等について現状把握を行った。

## 3. 研究結果

### 3.1 下水処理水の再利用の現状

下水処理水の多くは河川等に放流している状況であっ

たが、クアラルンプールのごく一部の下水処理場では、約15%の処理水を場内の環境用水、洗浄用水および修景用水として利用しているのみであり、処理水の再生水利用割合は高くなかった。処理水質レベルは放流先の状況に応じて水質基準が定められており、その項目と基準値について表-1に示す。基準Aの項目は、放流先下流に水道の取水点が存在、基準Bはその他の内陸水域に放流される場合に適用されている。都市部に新規に建設された下水処理場においては、この基準値をクリアしているようであるが、全国的な遵守率は70%弱に留まっている(図-1)。また、処理水の再利用に至っては排泄物等に由来することから、宗教上の抵抗により農業用水への利用は避けられてきたようであり、処理水再利用の需要は明らかではなかった。さらに、マレーシア国では年間降水量が2,000~2,500mmと比較的に多いことから環境用水などへの需要は見込みにくい状況であった。

表-1 要求される処理水の水質レベル(新規の下水処理場)

パラメータ	単位	基準	
		A	B
(a) Temperature	℃	40	40
(b) pH	-	6.0-9.0	5.5-9.0
(c) BOD <sub>5</sub> at 20℃	mg/l	20	50
(d) COD <sub>cr</sub>	mg/l	120	200
(e) 浮遊物	mg/l	50	100
(f) オイル又は油脂	mg/l	5.0	10.0
(g) アンモニア性チッ素(水中混入)	mg/l	5.0	5.0
(h) アンモニア性チッ素(河川)	mg/l	10.0	20.0
(i) 硝酸性チッ素(河川)	mg/l	20.0	50.0
(j) 硝酸性チッ素(水中混入)	mg/l	10.0	10.0
(k) リン(水中混入)	mg/l	5.0	10.0

注) Standard Aは集水区域内の内陸水域に放流する場合(下流に水道の取水点がある)に適用され、Standard Bはその他の内陸水域に放流する場合に適用される。

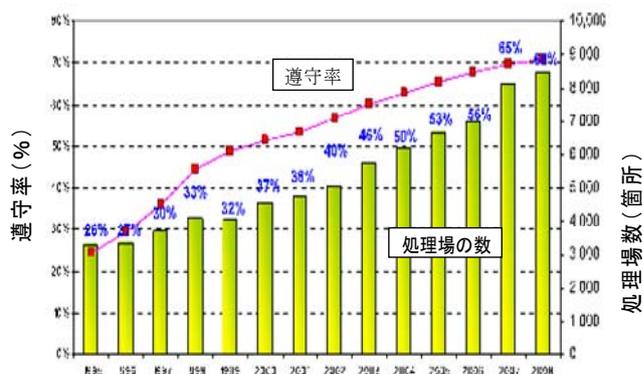


図-1 下水処理場から排出される処理水の水質基準遵守率

一方でエネルギー・グリーンテクノロジー・水省では、省エネ、環境配慮型社会の構築に向けてのスローガンを掲げており、今後、処理水の再利用を展開していく上で処理場内での洗浄用水や処理場外での工業用水、水洗トイレ用水などが想定された。処理水再利用の促進を図るには我が国における再利用事例を紹介し、積極的な啓発活動が必要であろう。

### 3.2 汚泥処理技術

マレーシア国において採用されている汚泥処理方法は、機械式脱水処理法と天日乾燥床の2つに大別される。脱水処理された脱水ケーキはほぼ100%が埋め立て処分されており有効利用は行われていない。現在では腐敗槽や下水処理場からの発生する汚泥量は年間430万 $m^3$ に達し、余力のある下水処理場にて対応しているが、その能力も限界状態となっているようであり、新たな処理施設の設置が急務とされている。ごく一部の既存の下水処理場(写真-1)においては、嫌気性消化施設を有しているが、回収されたガスは燃焼処理されており有効利用は行われていない。また、嫌気性消化において加温設備等がなく、消化槽の温度管理、汚泥日令がコントロールされていない等の課題も見受けられた。さらに、焼却やコンポスト化の工程も導入されていない。



写真-1 Pantai 下水処理場

汚泥の再利用に関しては、現在、国営下水道管理会社では土壌改良と肥料化を検討中としているが、肥料化では直接にヒトの食料とならない作物への適用が望まれている。また、マレーシア国は輸入燃料の依存を減らし、自国で賄える燃料として石炭火力発電所の導入を進めている。併せて、バイオガスを含む再生可能なエネルギーの開発促進を政策に掲げており、今後、汚泥処理に関わる導入すべき技術としては炭化汚泥の燃料化やバイオガ

ス利用による発電が想定された。

### 3.3 温室効果ガス対策

現在、下水道事業において温室効果ガス対策に関する基本的な方針は示されていない。汚泥の焼却を行っていないため、 $N_2O$ の削減効果は期待できないが、マレーシア国内の中・大規模の下水処理場では、活性汚泥法等による水処理法を採用しており、水処理施設で電力需要の大きい曝気槽の嫌気-好気の槽分けや、高効率な曝気装置へのリニューアルを考慮することで、電力使用量の削減は可能である。また、一部の大規模処理場においては、嫌気性消化槽を設置しメタンガスを燃焼していることから、燃料化への適用も期待される。さらに、嫌気性消化の導入にあたっては、気候的に温暖なことから加温に要するエネルギー量が少なく済む利点が挙げられる。

エネルギー消費の少ない省エネ型水処理法としては、温暖な気候を活かした上向流嫌気性汚泥ブランケット法(UASB)やハイレートポンド等の導入が考えられるが、適用事例が少ないため現地の要求性能を踏まえた適用性の評価が必要であろう。

### 4. 技術適用における留意点等の整理

マレーシア国を対象に、下水処理水の再利用の現状、汚泥処理技術、温室効果ガス対策等に関して、現地調査および関係者からのヒアリング等を実施し、その結果から技術適用における留意点等の整理を行った(表-2)。

処理水の再利用に関しては、再利用への心理的抵抗が大きいことから現在のところ需要が明確ではなかったが、マレーシア国が進めるグリーンテクノロジー政策を推進する上で再生水利用は温室効果ガス排出の削減に繋がる。利用用途は限られるが、処理場内での洗浄用水や処理場外での工業用水、水洗トイレ用水などへの活用が想定された。これら再利用促進のためには、需要についての調査を行い、再利用導入による効果の評価とともに、我が国における再利用事例を紹介し、積極的な啓発活動が必要であると考えられた。

下水汚泥の利用あるいはその減量化においては、輸入燃料の依存を減らすため自国で賄える燃料として石炭火力発電所の導入を進めていることもあり、炭化汚泥の燃料化が期待できるが、焼却灰の利用用途を考慮する上で、我が国でも多くが利用されている建設資材への需要について調査が必要であると考えられた。

温暖な気候を活かせる上向流嫌気性汚泥ブランケット法は、汚泥発生量を低減し排水からメタンガスをエネル

ギーとして回収できる利点を有しており、また、藻類利用によるハイレートポンドも省エネ型水処理法として、各々活用ができれば、温室効果ガス排出削減に寄与できる。課題として明らかになったことは、現地での適用事例が少ないため、放流先水域において要求される処理水の水質レベルを達成するために必要な運転条件の最適化を示すことである。

表-2 技術適用における留意点等の概要

適用技術	課題・留意点等
処理水の再利用	再利用への心理的抵抗が大きく、需要も明確でない
下水汚泥の利用	輸入燃料の依存を減らすため、炭化燃料化の活用に期待
汚泥消化ガスの活用	汚泥消化槽の温度管理、硫化水素対策等が課題
汚泥の減量化	埋立てに代わる焼却方式の提案
省エネ型水処理	現地での適用事例がなく、運転条件等の最適化が必要

## 5. まとめ

23年度は、途上国の地域要件を踏まえた水・汚泥処理技術の適用性の分類に関して、マレーシア国を対象に下水・汚泥処理に関わる地域要件や都市排水に対する社会的要請について現地調査を実施し、適用技術に対する課題、留意点等を整理した。

その結果、処理水の再利用では、心理的な抵抗があり需要も明確ではなかった。省エネルギー型水処理では、現地での適用事例が少ないため、現地の要求性能を踏まえた適用性の評価が必要であると考えられた。下水汚泥の有効利用と減量化では、輸入燃料の依存を減らすため炭化燃料化の活用が期待でき、埋め立て処分に代わる焼却方式の提案が必要であると考えられた。汚泥消化ガスの活用に関しては、汚泥消化槽の温度管理、硫化水素対策等が課題であった。

## 謝辞

本調査を実施するにあたり、マレーシア国のエネルギー・グリーンテクノロジー・水省、国家水サービス委員会、国営下水道管理会社の関係各位には、現地調査やヒアリングに特段のご配慮・ご協力を頂いた。ここに謝意を表します。

## 再生水利用の安全リスクに関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 内田 勉  
主任研究員 諏訪 守  
研究員 桜井 健介  
専門研究員 安井 宣仁

### 1. はじめに

平成 22 年度における全国の下水处理場の処理水量は年間 144.4 億  $m^3$  に達している。下水処理水は、都市内における貴重な水資源であり、下水処理場の場外に送水され、工業用水、修景揚水等として年間 2.01 億  $m^3$  の利用があるが、その割合は、処理水量全体の 1.4% に過ぎない<sup>1)</sup>。一方、内閣府が行なった水に関する世論調査<sup>2)</sup>では、「雨水・再生水の利用について」では「使いたい」とする者の割合が 86.4% となっている。同調査で「行政に力を入れてほしいこと」では、「水辺環境の整備」や「水の再利用の促進」が平成 13 年の前回調査に比べ増加するなど、水辺環境や水の再利用に対する要請が強くなっている。また、下水処理水の利用の促進に向けて、再生水の安全性の評価と制御方法の開発などが求められている<sup>3)</sup>。

本研究では、平成 21～25 年度において、再生水利用促進のための要因分析を行うとともに、水質基準を設定するための課題抽出および再生処理技術を評価することである。

平成 23 年度は高ウイルス除去率を得る上で除去対象とする微小粒子径を明らかとすることを目的に、処理方式の異なる下水二次処理水を対象とし、微小懸濁物質と病原ウイルスの存在実態を詳細に把握した。処理水中の粒度分布と SS 濃度の関係性を評価し、今後二次処理水を再生水として利用する際に必要となるウイルス除去手法を考察した。なお、本調査における再生水の利用とは、下水処理水の利用と同義である。

### 2. 微小粒子の粒度分布とウイルスの存在実態に関する検討

#### 2. 1 処理方式が異なる処理水の微小粒子区分毎におけるウイルスの存在実態

本調査では、処理方式が異なる処理水の微小粒子区分毎におけるウイルスの存在実態の把握を目的に、標準的な活性汚泥二次処理水と生物学的高度処理水を対象とした。二次処理水は A 下水処理場内のパイロットプラント処理水、生物学的高度処理水は A 下水処理場における A2/O 法、修正 Bardenpho 法、循環式硝化脱窒法とし、凝集剤添加活性汚泥法の処理水もふくめた。また処理水の採水と同時に流入下水の採水も行った。

#### 2. 2 処理水中の懸濁物質の測定

H22 年度の結果から、下水および処理水中に含まれる微小懸濁物質とウイルスの除去性に関係性が見出せてことから<sup>3)</sup>、本年度も継続して懸濁物質の粒径区分毎の分布を全体と微小な懸濁物質に分けて把握することとした。測定方法は H22 年度同様に、微小懸濁物質粒径の分布の把握には、電気的検知帯法(Electrical sensing zone method, ISO 13319, Multisizer 4.0, Beckman Coulter, Inc.) によった。なお、微小懸濁物質とは、生物処理に大きく影響を受けるとされている  $10\text{-}20\mu\text{m}$  以下の粒子<sup>4)</sup>を指すこととし、分析機の細孔は  $20\mu\text{m}$  (標準測定範囲： $0.4\text{-}12\mu\text{m}$ ) を用いることとした。

#### 2. 3 病原ウイルスの定量

処理水中の微小懸濁物質の粒径分布測定と同時に、孔径の異なるガラス繊維ろ紙( $1\mu\text{m}$ ,  $0.7\mu\text{m}$ ,  $0.4\mu\text{m}$ )および  $20\mu\text{m}$  の篩を用い、各ろ液中の Norovirus を定量することで、粒子区分毎におけるウイルスの存在実態を把握した。Norovirus の定量方法は参考文献<sup>5)</sup>に準拠し、Real-time RT-PCR 法により定量した。なお本定量方法では検出限界は 1copies/tube、定量下限値は 10copies/tube<sup>6)</sup>である。

### 3. 各処理水の水質性状

図1に本調査時の各処理水のSS濃度を示す。また図2~5にその他水質項目としてCOD<sub>cr</sub>, T-N, T-P, 大腸菌, 大腸菌群の測定結果を示す。大腸菌はクロモカルト寒天培地, 大腸菌群はデソコシキレート寒天培地の平板法により定量を行った。COD<sub>cr</sub>, T-N, T-PはHACH社のKitを用い定量した。

流入下水では2回の採水時でSS濃度, COD<sub>cr</sub>濃度が大きく変動していた。一方, 二次処理水は同一処理方式の2回の採水で, 極端な水質変動は見られず, 概ねどの水質指標でも同程度となっていた。

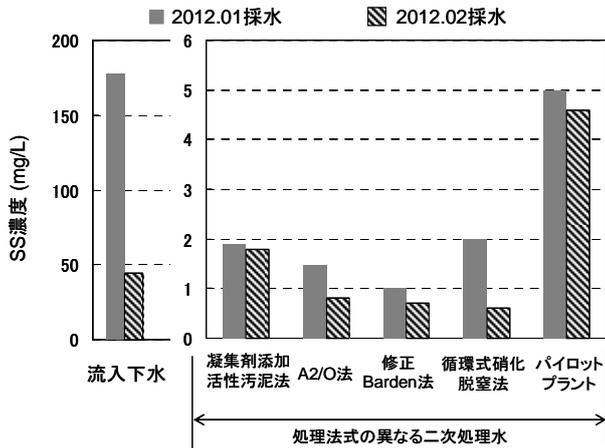


図1 流入下水および処理方式の異なる二次処理水のSS濃度

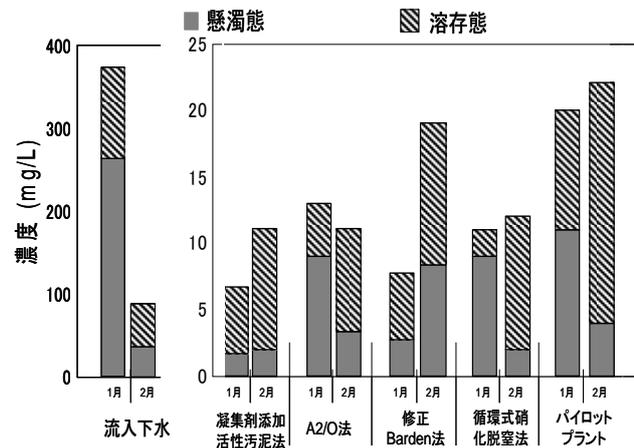


図2 流入下水および処理方式の異なる二次処理水のCOD<sub>cr</sub>濃度

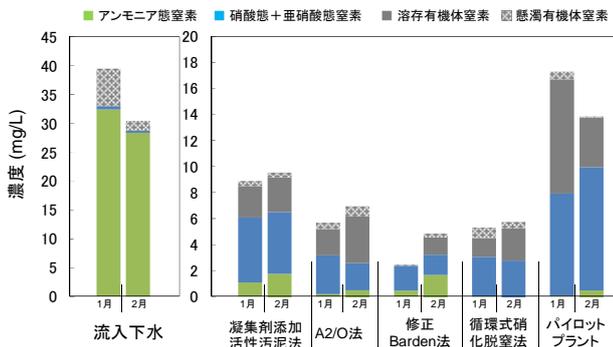


図3 流入下水および処理方式の異なる二次処理水のT-N濃度

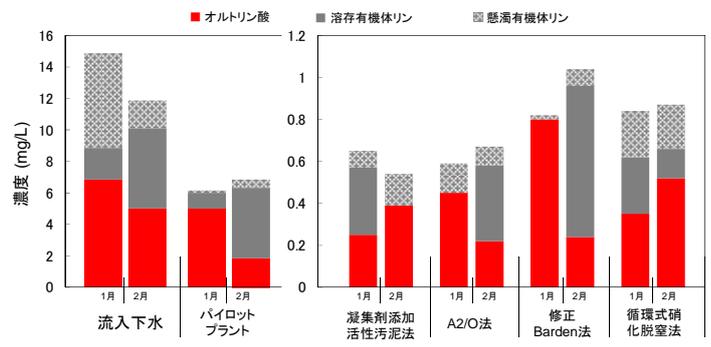


図4 流入下水および処理方式の異なる二次処理水のT-P濃度

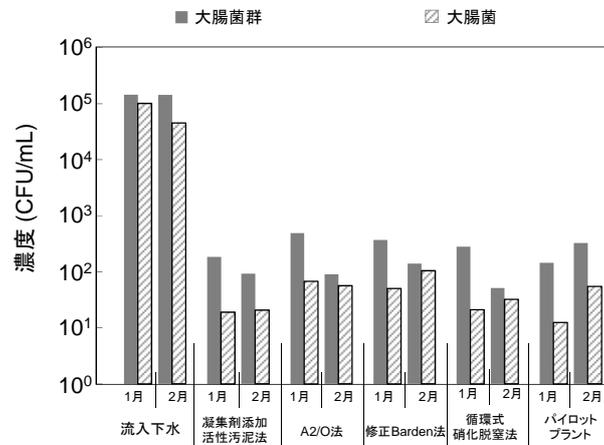
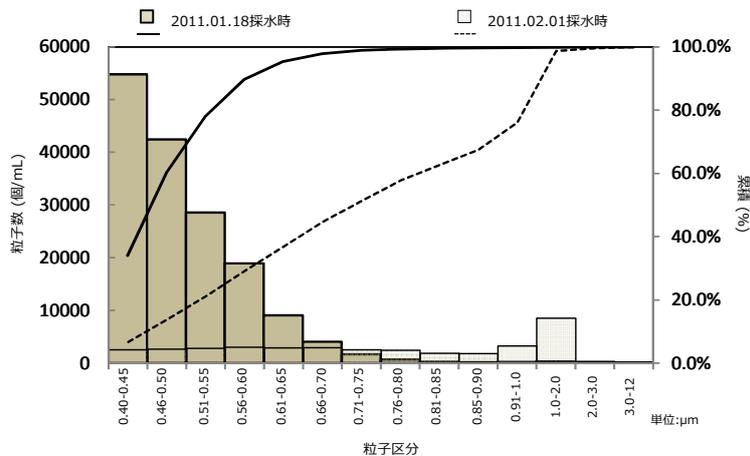


図5 流入下水および処理方式の異なる二次処理水の大腸菌群, 大腸菌濃度

#### 4. 各処理水の粒度分布と粒子区分毎の NoV の存在実態

図 6~11 に流入下水および各処理水の GI, GII の粒子区分毎の濃度と粒子粒度分布を示す。図 6 より、採水日が異なる同一試料で微小粒子( $20\mu\text{m}\sim 0.4\mu\text{m}$ )の粒子量が大きく異なることが分かった。特に図 1 で示した  $1\mu\text{m}$  以上の SS 濃度がほぼ同等でも、 $1\mu\text{m}$  以下の微小粒子数が大きく異なることが確認された。流入下水においては、GI, GII とともに  $1\mu\text{m}$  以上の粒子を除去することで約 50%~70%程度の NoV を除去することが出来ると考えられた。また、 $0.4\mu\text{m}$  フィルターでろ過した試料水中に存在する NoV の濃度割合が 1 月では 6%であるのに対して、2 月では 20~30%と大きく異なった。これは粒子区分の粒度分布からも特に  $0.4\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$  の区分の粒子数が大きく異なったことから、2 月採水時試料では  $0.4\mu\text{m}$  未満の微小粒子の存在により、微小粒子に吸着した NoV が多く存在した可能性が考えられた。特に  $1\mu\text{m}$  以下の粒子数と NoV の存在割合に顕著な差が生じていた。



流入下水の 20 μm 篩通過後の微小粒子の粒子数と累積

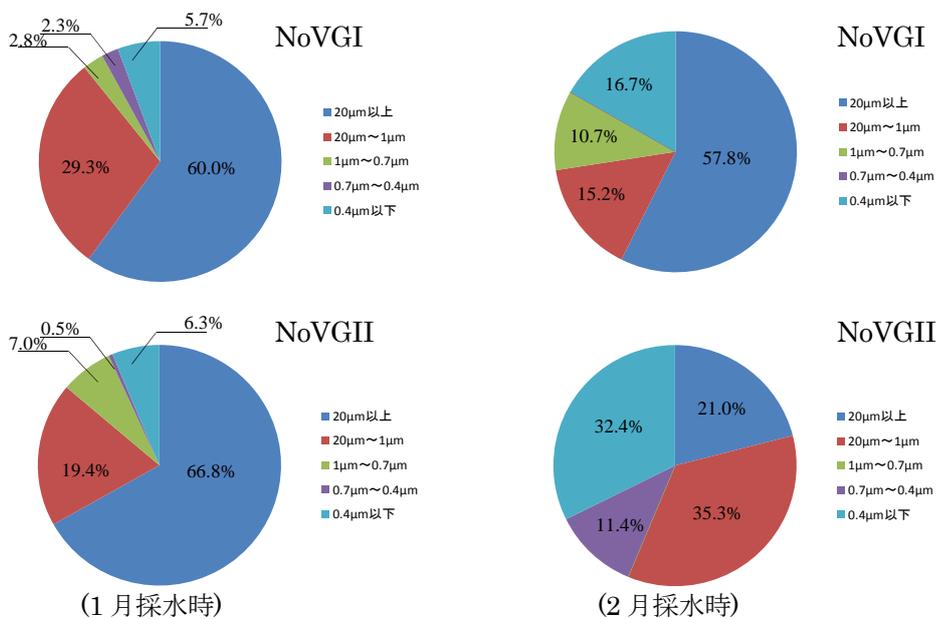


図 6 流入下水の微小粒子の粒度分布と各粒子区分の NoV の存在割合

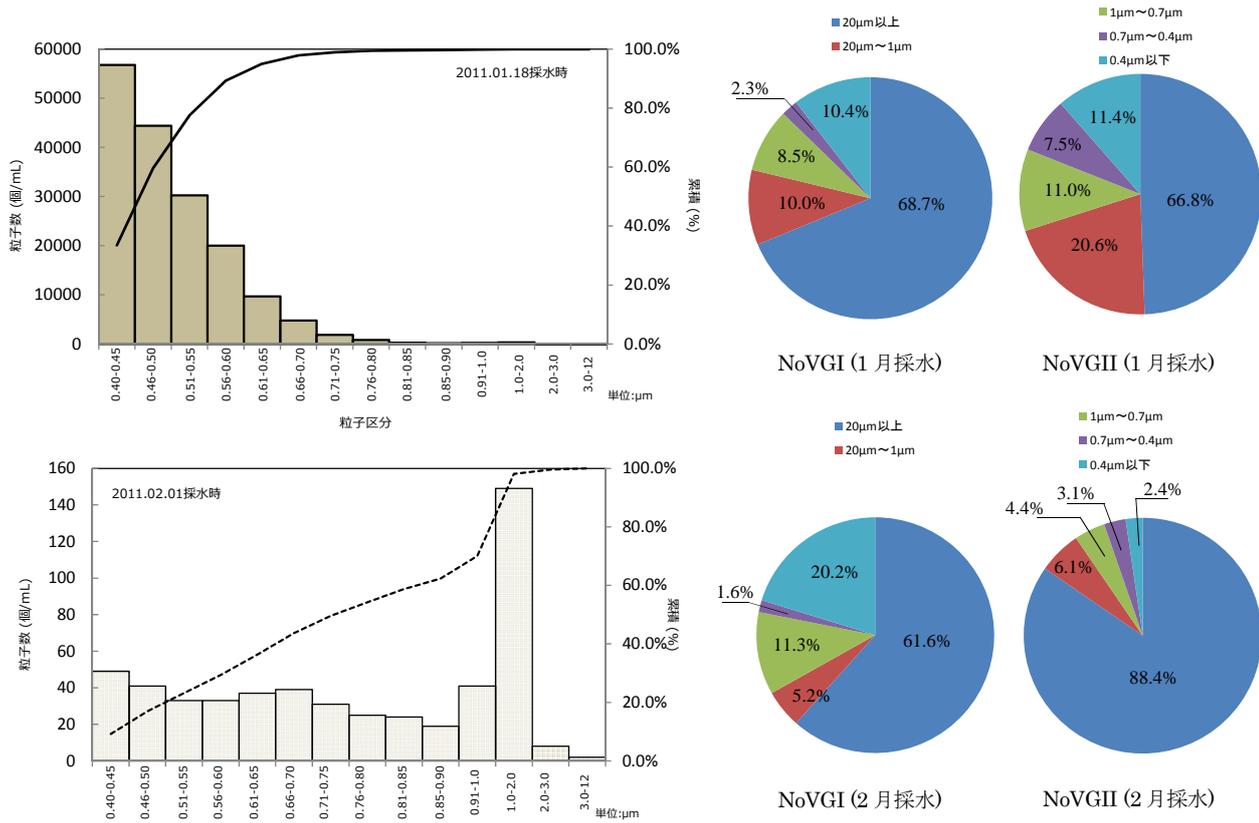


図7 凝集剤添加活性汚泥法処理水の粒度分布と粒子区分毎のNoV存在割合

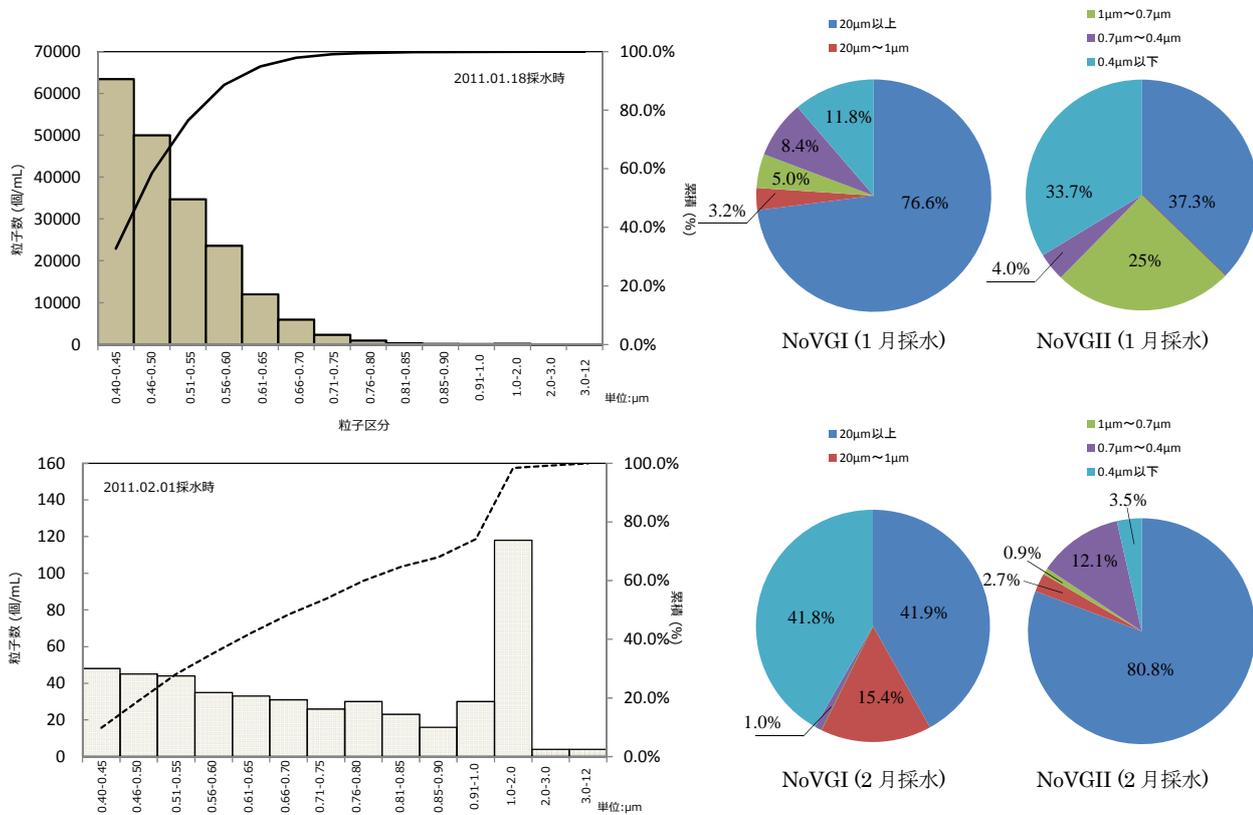


図8 A2/O法処理水の粒度分布と粒子区分毎のNoV存在割合

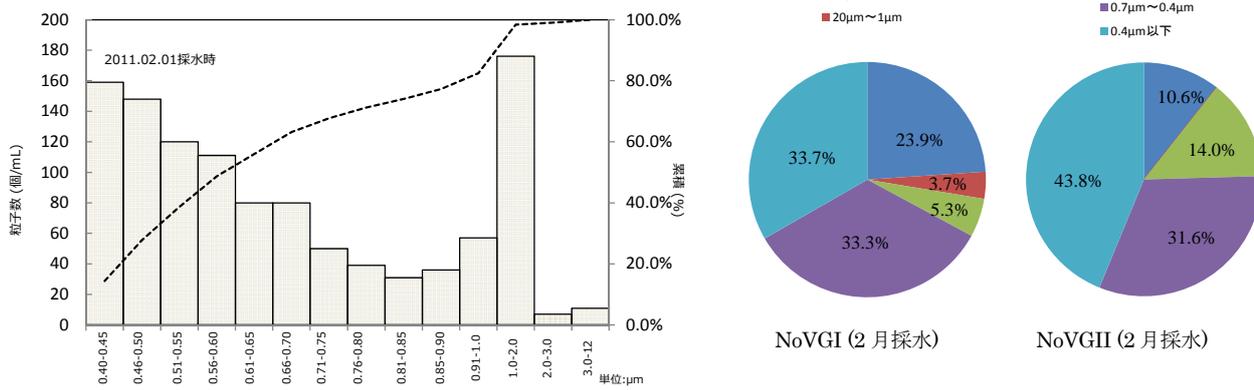
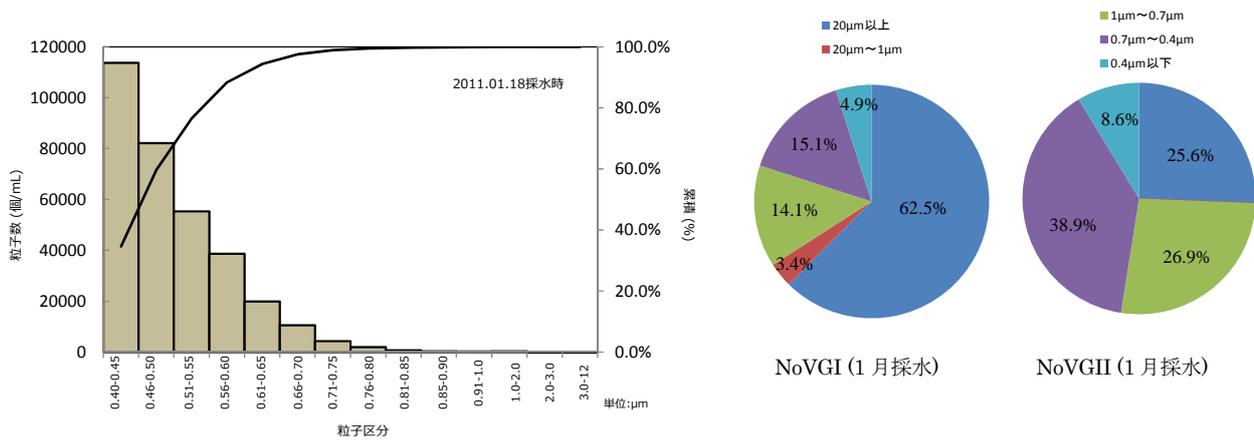


図9 修正 Bardenpho 法処理水の粒度分布と粒子区分毎の NoV 存在割合

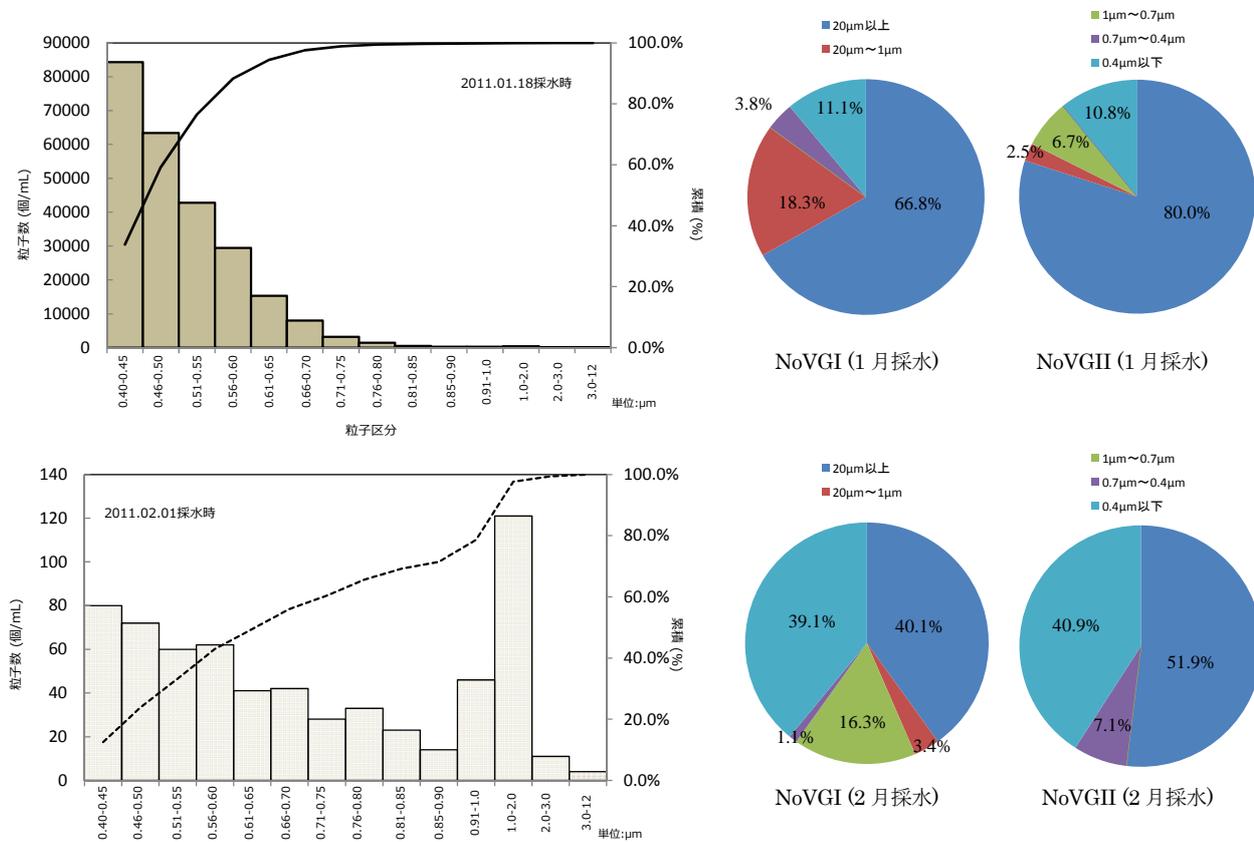


図10 循環式硝化脱窒素法処理水の粒度分布と粒子区分毎の NoV 存在割合

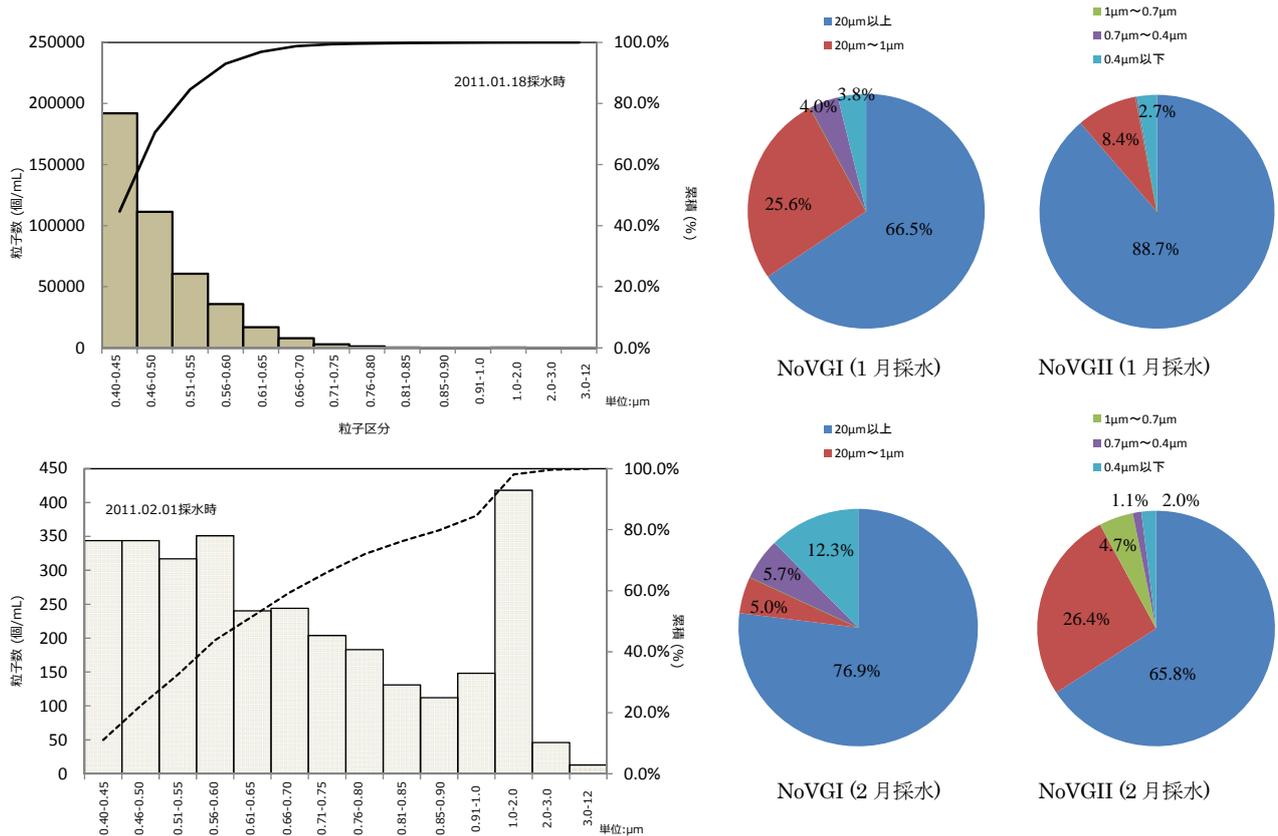


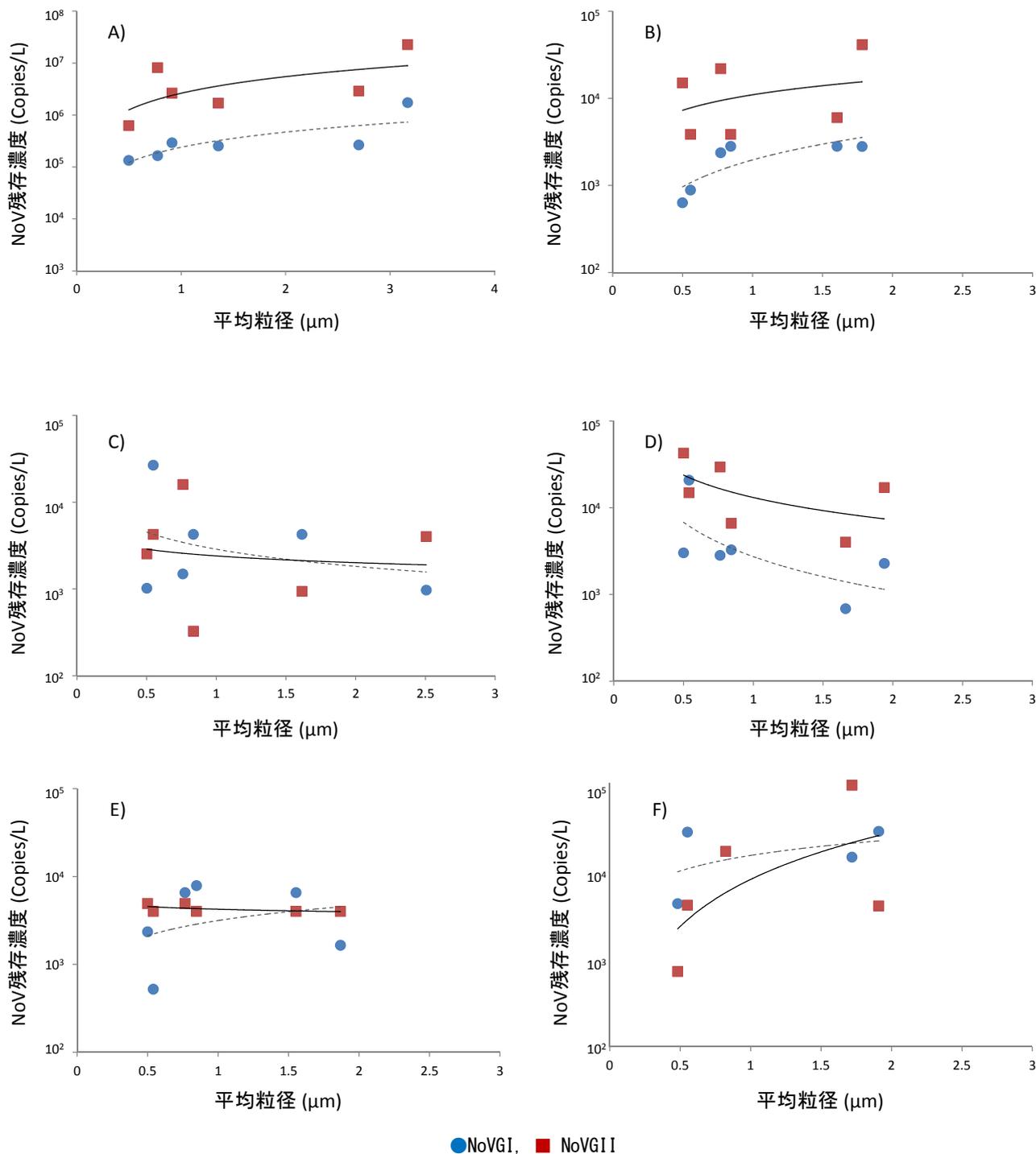
図 11 パイロットプラントの処理水の粒度分布と粒子区分毎の NoV 存在割合

全体を通して、 $0.4\mu\text{m}$ ~ $0.45\mu\text{m}$ の粒子数が多いほど $0.4\mu\text{m}$ ろ過後の NoV の存在割合が低い傾向が確認された。1月採水時と2月採水時を比較すると各処理水ともに顕著に粒子の存在量が異なる傾向が確認されたが、2月採水時の方が微小粒子の量が極端に小さかった。SS濃度で比較すると2月採水時の方が小さい傾向であったものの、最大で $1.5\text{mg/L}$ の差しか確認されなかった。このことから、SS濃度が多少変化しただけでも微小粒子の存在量には大きく影響を及ぼす可能性が考えられた。2月採水時は粒子数が1月採水時比較して顕著に異なることおよび微小粒子の存在量が小さいことから、 $1\mu\text{m}$ ろ過後試料の NoV の存在割合が大きい傾向が確認された。1月採水時は、各処理水の粒子数は約 $60000\sim 200000$ 個/mLであり、最も粒子数が少なかった標準活性汚泥法の処理水で $60000$ 個/mL、パイロットプラントの処理水で $200000$ 個/mLであった。2月採水時では、各処理水の粒子数が1月と比較して極端に少なく、 $200\sim 700$ 個/mLであり処理方式が異なることで $1\mu\text{m}$ 以下の粒子数とその割合が異なることが明らかとなった。

図6~11で示した結果をより詳細に評価するため、各粒子区分の平均粒径と NoV 存在濃度を比較検討した。その結果を図12に示す。流入下水および凝集剤添加活性汚泥法処理水、パイロットプラントの処理水は微小粒子の平均径が大きい粒子にウイルスが吸着した状態で存在しており、粒径 $1\mu\text{m}$ 以上の浮遊態を除去することで約1 Logのウイルス除去が見込める可能性があると考えられた。一方、その他の処理水(A2/O法、循環式硝化脱窒素、修正 Bardenpho 法)では、上記とは異なり粒径が小さくなるほど NoV 残存濃度が高くなる傾向が確認された。

以上のことから流入下水、パイロットプラント処理水、凝集剤添加活性汚泥法処理水では $1\mu\text{m}$ 以上の粒子を除去すれば、GI、GIIとも概ね60%程度、NoVを除去することが可能となるが、残りの40%は $1\mu\text{m}$ 以下の微小粒子態に存在し、特に $0.4\mu\text{m}$ 以下に最大で35%程度、NoVが残存している可能性が示された。生物学的高度処理では、粒径が $1\mu\text{m}$ 以上の粒子と $0.4\mu\text{m}$ ~ $1\mu\text{m}$ 未満の粒子を除去しても NoV の残存濃度がほぼ同等である

ことから、 $0.4 \mu\text{m}$  未満の微小粒子を除去する必要があると考えられた。よって二次処理水を再生水として利用する際、特に生物学高度処理水を原水として使用する場合、 $1 \mu\text{m}$  以上の粒子を除去するより、 $1 \mu\text{m}$  以下、特に  $0.4 \mu\text{m}$  以下の微小粒子を除去の方が効果的にウイルス除去することができると考えられ、その手法として近年注目されている膜処理技術の利用が考えられる。



●NoVG I, ■ NoVG II  
 A) 流入下水, B) 凝集剤添加標準活性汚泥法処理水, C) A2/O 法処理水,  
 D) 修正 Bardenpho 法処理水, E) 循環式硝化脱窒法処理水, F) パイロットプラント処理水

図 12 平均粒径と NoV 存在濃度の関係

## 5. まとめ

平成 23 年度は高ウイルス除去率を得る上で除去対象とする微小粒子径を明らかとすることを目的に、処理方式の異なる下水二次処理水を対象とし、微小懸濁物質と病原ウイルスの存在実態を詳細に把握した。以下に得られた結果を示す。

- ・水質がほぼ同程度の試料においても、 $1\mu\text{m}$  以下の微小粒子の存在量が大きく異なった。
- ・ $0.4\mu\text{m}\sim 0.45\mu\text{m}$  の粒子数が多いほど  $0.4\mu\text{m}$  ろ過後の NoV の存在割合が低い傾向が確認された。
- ・流入下水および凝集剤添加活性汚泥法処理水、パイロットプラントの処理水は微小粒子の平均径が大きい粒子に吸着した状態で存在しており、粒径  $1\mu\text{m}$  以上の浮遊態を除去することで約 1 Log のウイルス除去率が見込める可能性があると考えられた。
- ・流入下水、パイロットプラント処理水、凝集剤添加活性汚泥法処理水では  $1\mu\text{m}$  以上の粒子を除去すれば、GI、GII とも概ね 60%程度、NoV を除去することが可能となるが、残りの 40%は  $1\mu\text{m}$  以下の微小粒子態に存在し、特に  $0.4\mu\text{m}$  以下に最大で 35%程度、NoV が残存している可能性が示された。
- ・生物学的高度処理では、粒子径が  $1\mu\text{m}$  以上の粒子と  $0.4\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$  未満の粒子を除去しても NoV の残存濃度がほぼ同等であることから、 $0.4\mu\text{m}$  未満の微小粒子を除去する必要があると考えられた。

## 謝辞

本調査・検討を実施するにあたり A 下水処理場管理者の関係各位には多大なご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

## 参考文献

- 1) 社団法人日本下水道協会、平成 22 年下水道白書 日本下水道、2010.
- 2) 内閣府大臣官房政府広報室、水に関する世論調査、2008.
- 3) H22 年度下水道関係調査報告書年次報告集、土木研究所資料、2011
- 4) Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications, Metcalf & Eddy, Inc. an AECOM Company, 2007.
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007) ノロウイルスの検出法について
- 6) 陶山明子, 諏訪守, 鈴木穰, 尾崎正明 (2006) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討, 環境工学研究論文集, 土木学会, 第 43 巻, pp.255-261

## 21 世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価（水の衛生学的評価）

リサイクルチーム 上席研究員 内田 勉  
主任研究員 諏訪 守  
研究員 桜井 健介  
専門研究員 安井 宣仁

### 1. はじめに

現在の都市における水利用システムは大量取水、大量排水の「一過型」であるといえ、今後予想される水資源の量的不足と質的悪化に対応するためにも「新たな水利用システム」の開発を行う必要がある<sup>1)</sup>。下水処理水の再利用に関しては、特に処理工程における腸管系ウイルスの挙動が重要であるが、これらは十分に把握されていない<sup>2)</sup>。腸管系ウイルスの中でも、近年、感染症が多発しているノロウイルス（以下、NoV という）が評価対象ウイルスの1つとして挙げられる。

本研究では新しい水利用技術において、安全、安心な利用システムの構築に資するよう遺伝子解析を中心とした手法で、病原微生物である腸管系ウイルスを対象に定量を行い、開発される水処理技術の安全性評価を行う。H23 年度は昨年度構築した衛生学的リスク評価手法を基に障害調整年数(DALYs)による考えを基に定量的微生物リスク評価(QMRA)<sup>1),2)</sup>により、農業利用を想定した衛生学的リスク評価の Case Study を行った。

### 2. 農業利用を想定した障害調整年数(DALYs)を用いた衛生学的リスク評価の Case Study

本検討では、現在までに実施ならびにパイロットプラントの NoV の蓄積データを用い、UF 膜処理による再生水の衛生学的リスク評価を行った。リスクシナリオを複数設定し、対象病原微生物は下水中に多く存在し比較的濃度が高い Norovirus (NoV)、Rotavirus (RoV) および *Campylobacter* (CP) をとした。なお、RoV および CP は文献値より濃度を推定した。

曝露対象者は農業従事者と消費者とした。消費者を対象とした場合の試算においては、流通・加工段階でのウイルスの減衰を考慮した。

#### 2. 1 リスク評価方法

##### 2.1.1 初期設定値

表-1 に各病原微生物の設定値を示す。発症確率(Ratio of illness/infection)、疫病負荷 (Disease burden)、用量反応モデル(Dose-response model)は文献<sup>1),2)</sup>を参考に決定した。病原微生物濃度の二次処理水中濃度は、NoV は実測データに基づき、その他の病原微生物は文献<sup>1),2)</sup>を基に生物処理で 2 Log 除去されると仮定し、文献で示されている下水中の濃度から二次処理水中濃度を決定した。疫病負荷の算定根拠は Appendix にて算定方法を示す。

##### 2.1.2 リスクシナリオ

###### a) 前提条件

図-1 に本検討におけるリスクシナリオのロードマップを示す。

原水は二次処理水とし、再生水処理は UF 膜ろ過処理を基本とする。水利用用途は農業利用として、再生水を 100%利用することを仮定し、再生水を 1 日~2 日貯蔵する場合と生産された水を直ちに利用する場合を考慮した。農業従事者は作物種により再生水の供給方式、曝露日数が異なるが、本試算においては、使用水量が最も多くなる水稲を基本として間接経口摂取による誤飲を仮定、摂取量は 1 作業当たり 0.3mL とし、曝露日数は農業経営指標(長野県)のデータを基に 27.2 日と仮定した。

消費者に対しては、作物は収穫時に 100g 当たり 0.1mL~10mL の再生水が付着した状態を仮定し、全ての作物

で収穫から流通までを1週間と仮定した。作物種として、穀類（米，小麦），豆類（大豆），イモ類（かんしょ，ばれいしょ），野菜，果実（みかん，りんご）とし，野菜，果実は生食用とし，その他作物は加熱調理を行うと仮定した。また全ての作物において調理時に水洗いを考慮する。1日の摂取量は農林水産省「食糧需給表」よりH22年度の1人・1年当たり供給量から算出した。ただし，作物への病原微生物の蓄積はないと仮定した。表-2，表-3に諸条件を示す。

表-1 各病原微生物の設定値

Pathogenic microbe	Concentration of treated sewage (number/L)	Ratio of illness/infection	Disease burden	Dose-response model
Norovirus	Observed data	0.8	$9.0 \times 10^{-4}$	Exponential model
Rotavirus	$10^3$	0.35-0.88	$1.9 \times 10^{-3}$	Beta-Poisson ( $\alpha=0.253, \beta=0.422$ )
<i>Campylobacter</i>	$10^3$	0.3	$2.0 \times 10^{-2}$	Beta-Poisson ( $\alpha=0.145, \beta=7.589$ )

\* Rotavirus, *Campylobacter* は下水中濃度を  $10^5/L$  と設定

\*Rotavirus は文献により発症確率（Ratio illness/infection）の値が異なっていたため，本検討では安全側を考慮して0.88と設定した。

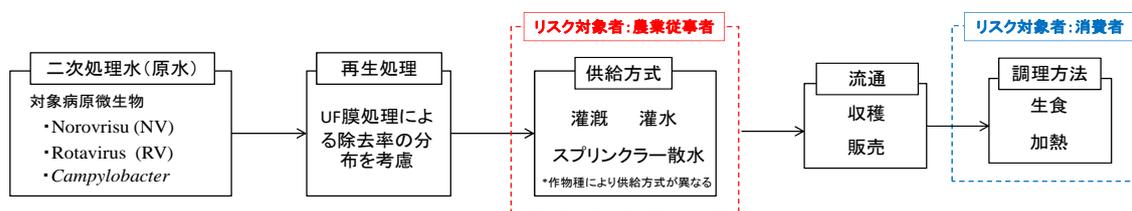


図-2 農業利用におけるリスクシナリオのロードマップ

表-2 評価対象者の曝露形態・量・日数

評価対象者	曝露形態	曝露量	曝露日数	1日の消費量 (g/day)				
				加熱調理用			生食用	
従事者	間接経口摂取	0.3mL/1作業	27.2日	—				
消費者	作物摂取による感染	作物100g当たり10 mL付着	365日	穀類	イモ類	豆類	野菜	果実
				252	51	23	242	100

表-3 収穫-流通-加工までの病原微生物の減衰

作物	収穫～流通による減衰	水洗い	皮むき	加熱調理
加熱調理用 (穀類, イモ類, 豆類)	3.5～7Log (0.5～1Log/日)	1Log	-	6～7Log
果実			2Log	-
野菜(生食用)			-	-

\*果実のみ皮むきによる減衰を考慮する

b) 計算方法

【障害調整生存年数 (DALY)】

障害調整生存年数(Disability Adjusted Life Years: DALY)DALYは、特定の疾病やリスク要因による健康負荷の指標である<sup>10)</sup>。DALYの損失は、特定の疾病による障害か死亡によって失われた時間を、健康で疾病による障害が無い寿命と比較することにより求められる。1人1年あたりの疫病負荷 (DALYs per person per year)は式(1)により算出される。

$$DALY_{pppy} = \left\{ 1 - \left( 1 - P_{inf}(D) \right)^n \right\} \times R_{inf} \times DB \quad (1)$$

ここで、

DALY pppy: DALYs per person per year、1人1年あたりの疫病負荷 (年/人)

$P_{inf}$  : 感染確率 (用量反応モデル式(2), (3)より決定)

D : 摂取病原微生物量 (Copies/L)

n : 年間曝露数

$R_{inf}$  : 発症確率 (Ratio of illness/infection)<sup>11)</sup>

DB : 疫病負荷 (年) (Disease burden)<sup>12)</sup>

【用量反応モデル】

リスクを計算する上で、対象となる病原微生物の用量反応モデルが必要となる。用量反応モデルとは、疫学データに基づき、摂取ウイルスと感染確率を表したモデル式である。RoV および CP は参考文献 x)を参照に式(2)より算出した。NoV は動物感染、細胞培養による培養系が確立されておらず、直接感染価を求めることが出来ないため、明確なノロウイルスの用量反応モデルに関する知見は多くない。ここでは、NoV の用量反応モデルとして Masago ら x)の研究結果における仮定を用い式(3)により算出した。

$$P_{inf}(D) = 1 - \left[ 1 + (D/ID_{50})(2^{1/\alpha} - 1) \right]^{-\alpha} \quad (2)\text{-a}$$

$$ID_{50} = \beta(2^{1/\alpha} - 1) \quad (2)\text{-b}$$

$$P_{inf}(D) = 1 - \exp\left(\frac{\ln 0.5}{ID_{50}} \times D\right) \quad (3)\text{-a}$$

$$ID_{50} = 10 \text{ or } 100 \quad (3)\text{-b}$$

ここで、 $ID_{50}$  : 50%の確率で発症する際の摂取病原微生物量、 $\alpha, \beta$  : 定数

図-3, 4 に各病原微生物の用量反応モデルを示す。

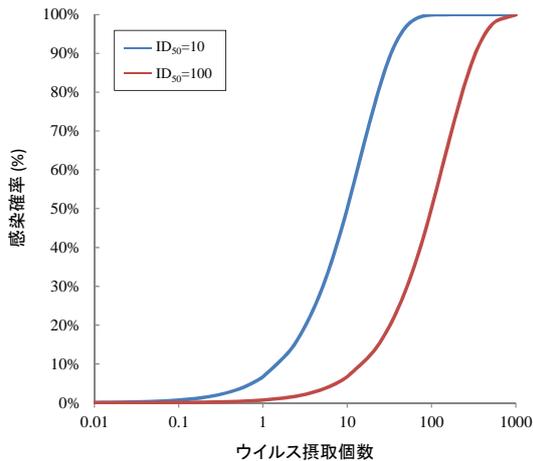


図-3 Norovirus の用量反応モデル

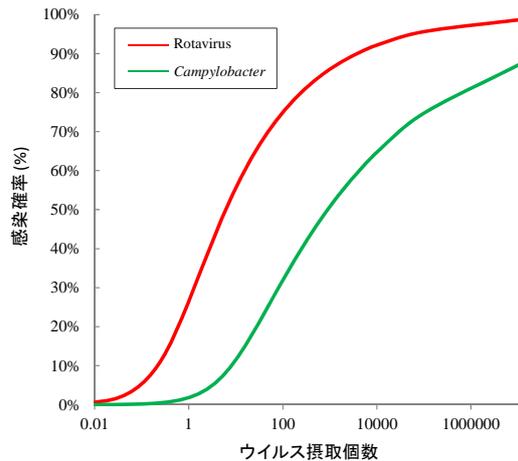


図-4 Rotavirus, *Campylobacter* の  
用量反応モデル

### ① 分布の推定

リスク試算には、各対象病原微生物の原水中の濃度変動、UF 膜処理の除去率分布、作物へのウイルスの付着量分布を考慮し、再生水中のウイルス濃度分布を推定した。

二次処理水中のNoV濃度変動は、Real-time RT-PCR法により定量した結果を用い、現在までに蓄積した実処理施設（4施設）およびパイロットプラントのデータ（n=24）よりNoVGIとNoVGIIを合わせた値から統計的手法を用い検討した。濃度分布の推定法としてShapiro-Wilk検定による正規性の検討を行った。その結果を図-5, 6 に示す。図-5より二次処理水中のNoV濃度は正規分布から大きく逸脱している結果となった。よって、NoVのコピー数を対数変換し検定した結果（図-6）より、二次処理水中のNoV濃度変動は対数正規分布従うと仮定した。ただし、本検討において用いた二次処理水のデータは処理方式が異なるデータならびに季節変動を考慮していないため、比較的濃度変動が大きくなった。RoVおよびCPの二次処理水中の濃度分布はNoVと同様に対数正規分布を仮定し、95%値を各々  $2 \times 10^3$  と仮定し、各病原微生物の平均値は表1に示す値とした。図7~9に各病原微生物の推定した原水の濃度分布を示す。

UF 膜処理水の除去率分布は、Log 除去率が正規分布になることを仮定した。Flux や PAC 添加等の前処理条件が異なるため、現在までに蓄積した UF 膜処理による除去率の平均値を採用し、標準偏差は処理条件が異なるため明確に設定出来ないため、標準偏差を  $0.5 \text{Log}$  とし、 $N(4.2, 0.25)$  の正規分布を仮定した（図 10 参照）。また、消費者へのリスクを算定する際の付着量は作物 100g あたり最小値が 0.1mL、最大値が 10mL の一様分布を仮定した（図 11 参照）。

上記の仮定した各病原微生物の二次処理水中の濃度分布およびUF膜によるLog除去率の分布から、供給される再生水の濃度分布を推定した。（図12~14）

② リスク計算

下記手順に従いリスク試算を行った。

- ① 原水および処理水の実測値よりノロウイルス濃度の対数正規分布の推定を行い、平均値と標準偏差から濃度分布を求める。
- ② ①より推定した濃度分布から除去率分布を算出する。
- ③ 利用用途を決定し、1回あたりの曝露量および年間曝露数を設定する。
- ④ ①より推定した原水の濃度分布と②より算出した除去率分布から処理水の濃度分布を推定し、1回あたりのウイルス摂取量を算出し、式(2)にて感染確率を算出する。消費者を対象とした試算の場合は、流通・加工段階での減衰を考慮した。」
- ⑤ 式(1)に④で算出した感染確率を代入し、モンテカルロシミュレーションにより試行回数を 10,000 回として DALY の分布を算出する。

推定計算にはモンテカルロシミュレーションによる計算を行った（試行回数 n=10000 回）。モンテカルロシミュレーションとは不確実な変数に対し乱数を発生させ、推定した確率分布から値を拾い出しシミュレーションを何度も行うことにより近似解を求める手法であり、乱数を発生させ、シミュレーションを行うことで、不確実性を考慮した計算手法である。なお、計算には Crystal Ball (Ver. 7.2.2)を用いた。

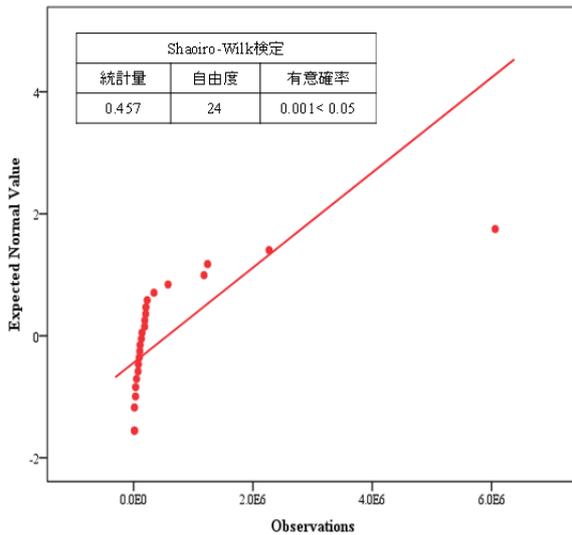


図5 NoV濃度分布の正規性検定

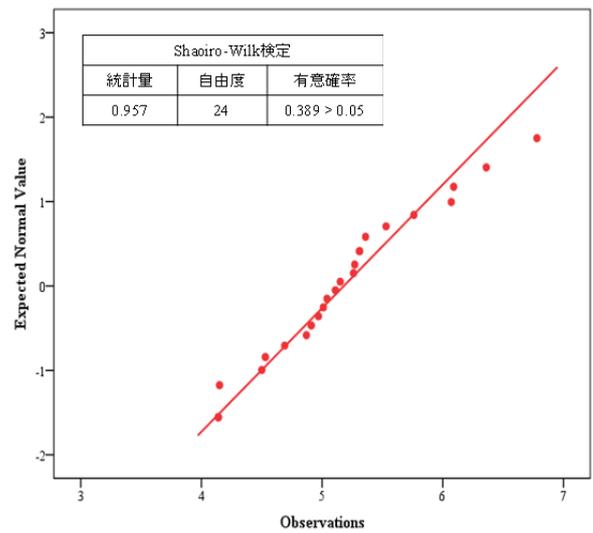


図6 対数変換したNoV濃度分布の正規性検定

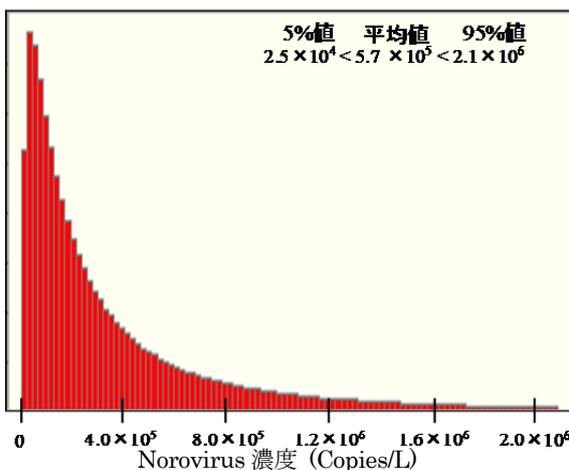


図7 原水中（二次処理水中）のNoV濃度分布

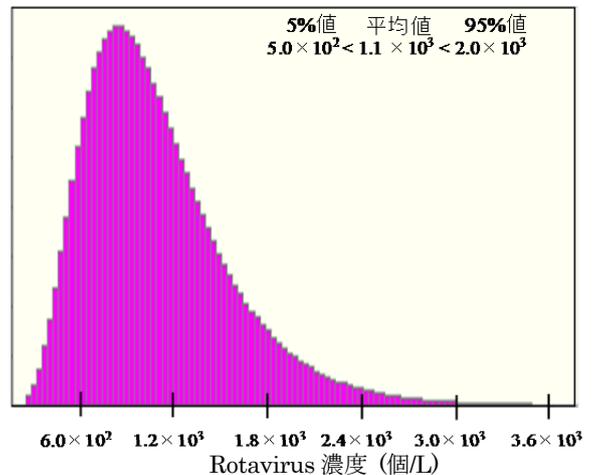


図8 原水中（二次処理水中）のRoV濃度分布

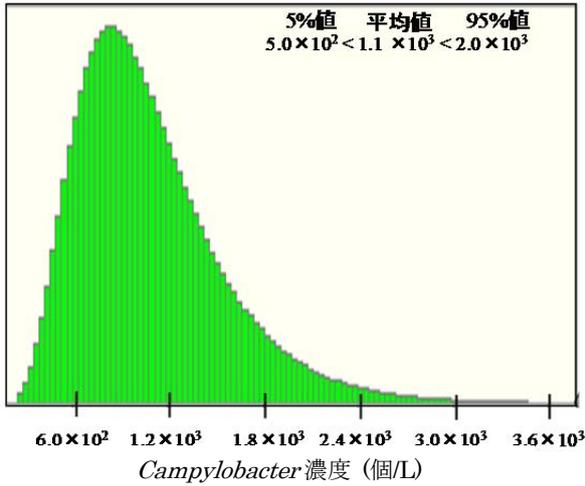


図9 原水（二次処理水中）のCP濃度分布

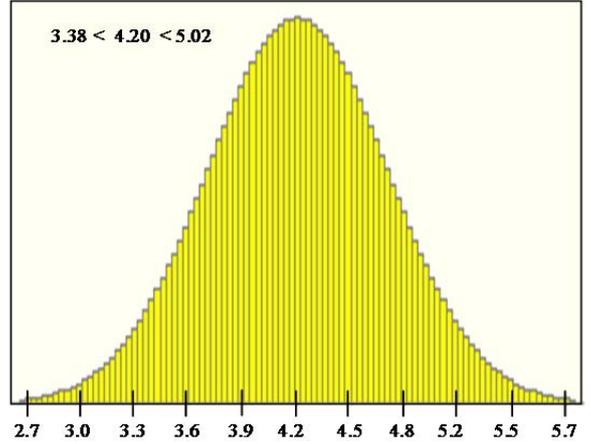


図10 UF膜のLog除去率分布

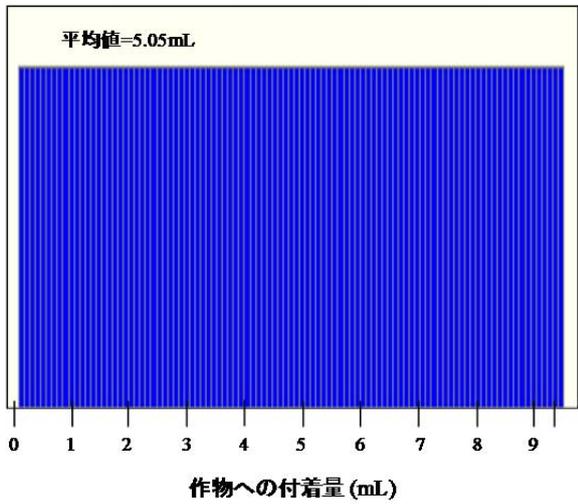


図11 再生水の作物への付着量分布

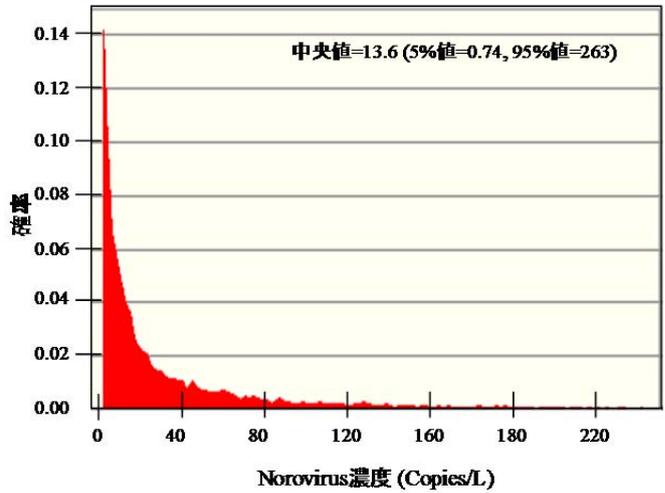


図12 再生水中のNorovirus濃度分布

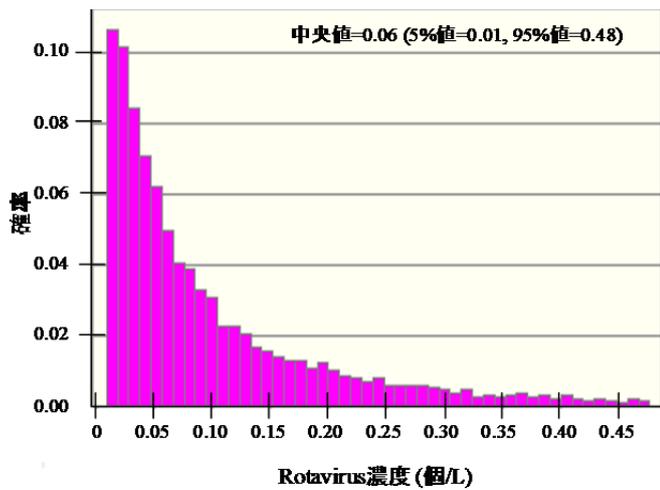


図13 再生水中のRotavirus濃度分布

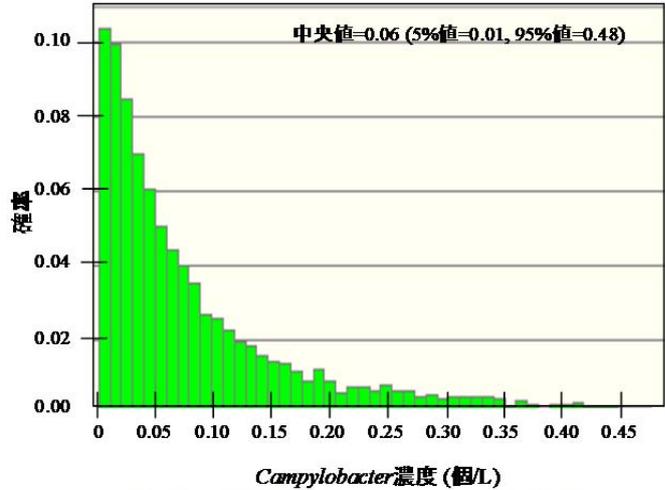


図14 再生水中のCampylobacter濃度分布

### c) シナリオ設定

曝露対象者を農業従事者、消費者と設定し、各シナリオにおいて考慮すべき事項が異なるシナリオを複数設定した。シナリオ A~D のリスク計算の流れを図 15 に示す。

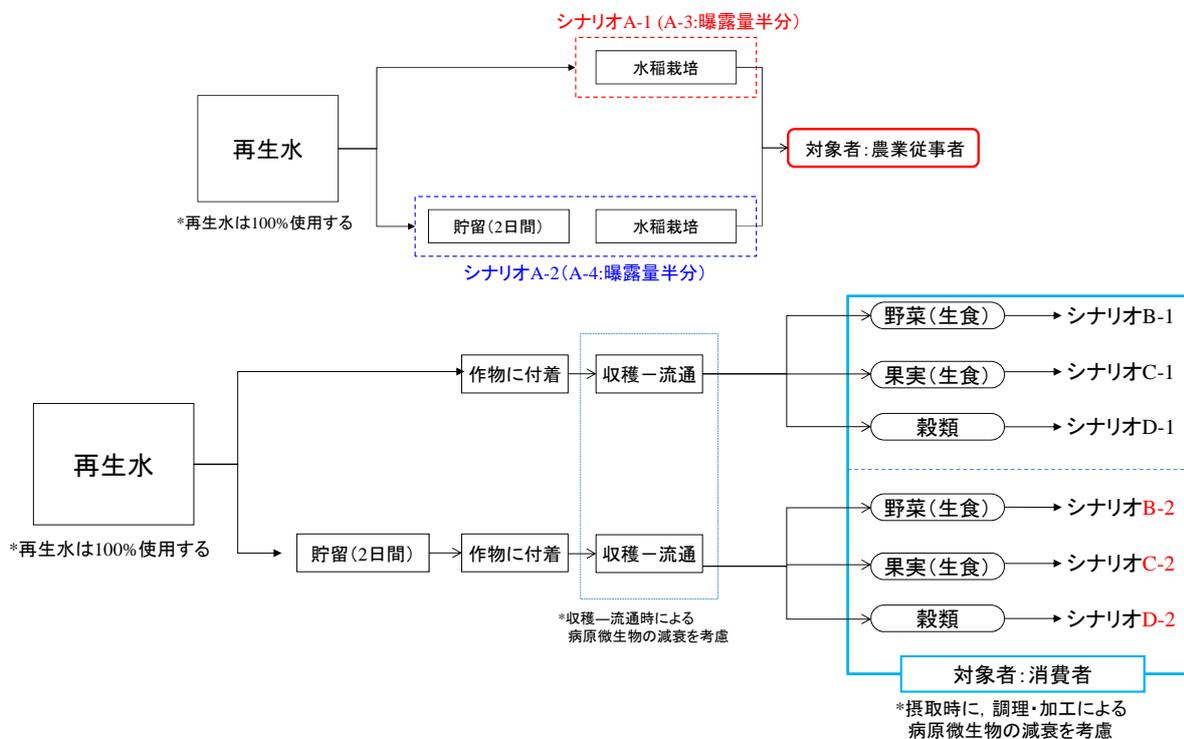


図 15 シナリオ A~D のリスク計算の流れ

### 3. 農業利用を想定したリスク評価結果

図 16~17 にシナリオ毎の各病原微生物の DALY の試算結果を示す。

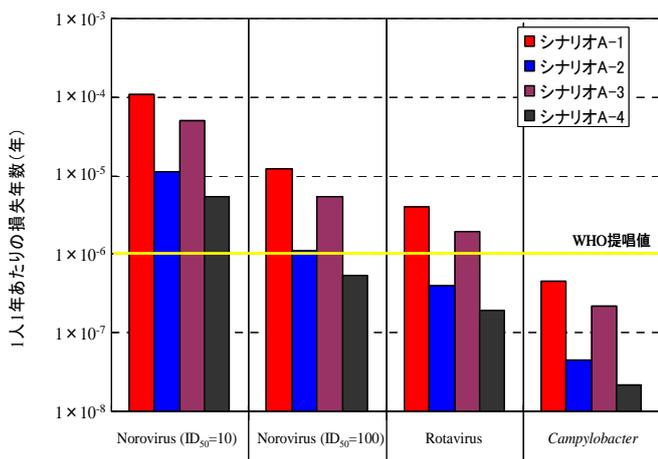


図 16 シナリオ毎の DALY の試算結果 (農業従事者)

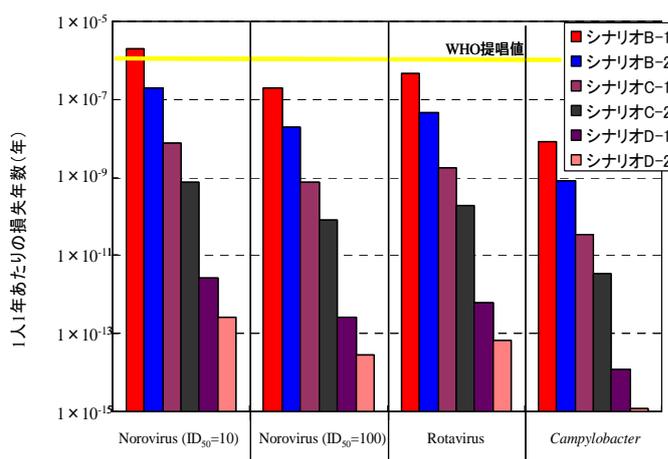


図 17 シナリオ毎の DALY の試算結果 (消費者)

対象者として農業従事者を考慮した場合、安全側を考慮して 95% 上限値で評価すると、シナリオ A-4 の ID<sub>50</sub>=100 を除くシナリオで Norovirus は WHO が提唱する 10<sup>-6</sup> DALY/人・年を上回る値となった。しかしながら、曝露量として設定した値が再生水基準マニュアルによる親水施設 (手足を浸す可能性がある場合) より 1 回あたりの摂

取水量を 0.3mL と設定したが、作業者の作業中の管理を徹底し曝露量を半分以下に抑えること、再生水を一時貯留後に使用することを前提とすれば、 $10^{-6}$ DALY/人・年を下回る可能性が考えられた。一方、Rotavirus、Campylobacter は 1 回あたり曝露量が 0.3mL であっても、再生水を一時貯留し、病原微生物の自然減衰を考慮すれば  $10^{-6}$ DALY/人・年を下回り、水稻栽培に利用可能である結果となった。以上より、Norovirus は感染価が直接推定することができないが、Norovirus のリスクを低減できれば、Rotavirus および Campylobacter のリスクはそれを下回る結果となった。

作物種として果実（生食用）および穀物類（加熱調理用）では、収穫・流通ならびに加工段階で大幅に付着した再生水中の病原微生物濃度が減衰するため、最終的な飲食時の DALYs は検討した全ての病原微生物で  $10^{-6}$ DALY/人・年を大幅に下回る試算結果となった。特に加熱調理を行う穀物類関連は 95%上限値で考慮してリスク上問題がないといえる。一方、生野菜では、再生水を貯留せずに用い場合、Norovirus ( $ID_{50}=10$ ) で  $10^{-6}$ DALY/人・年を上回る試算結果となったが、再生水の使用状況、使用方法を十分に考慮すれば、DALY= $10^{-6}$  を十分に下回ると試算結果になりうると考えられた。

以上の試算結果より、再生水を利用する際、生産された再生水をすぐに使用するのではなく、数日間程度貯留後に使用の方が望ましく、農業従事者は消費者よりも曝露頻度が少ないが再生水中の病原微生物を直接摂取する可能性があり、曝露量が必然的に消費者よりも多くなるためである。農業従事者に対してリスクとして DALY で  $10^{-6}$  を達成するためには、再生水処理の病原微生物の除去率の向上も十分に必要な事項であるが、膜処理で概ね平均で 4 Log 程度除去可能であれば、消費者にはリスクを低減する十分な結果であった。よって、農業従事者に対しては、再生水処理の除去率向上以外にも、再生水の使用法および作業時の管理体制を整えることで補うことが可能であると考えられた。

#### 4. 再生水利用用途毎に必要となる NoV 除去率試算

前節で農業利用を想定した際のリスク評価を行った。そこで本検討では再生水の利用用途毎に要求される NoV 除去率を試算した。用途毎の曝露量、曝露日数は高度理会議、ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル（案）より抜粋し、表 4 の通りとした。ただし、貯留や希釈などの病原微生物の減衰は考慮せず、NoV を対象に産出された再生水を 100%直接利用することを仮定した。再生水の処理方法は UF 膜処理とした。

表 4 再生水利用用途毎の曝露量と曝露日数の設定

利用用途	摂取形態	曝露量 (mL/回)	曝露日数 (回/年)
親水利用 (全身が浸かる可能性がある場合)	水遊びによる誤飲	30	8
親水利用 (手足が浸かる可能性がある場合)	手についた水の経口間接摂取	0.3	20
修景利用 (滝・噴水：大規模)	ミストを吸い込む	1	10
散水利用 (芝生散水)	手についた水の経口間接摂取	0.1	20
トイレ水洗利用	しぶきが口に入る	0.02	3
農業利用	経口間接摂取	0.3	27.2

\*農業利用の曝露量は親水利用（手足が浸かる可能性がある場合）を参照し、曝露日数は長野県農業経営指針より 27.2 回/年と設定した。

再生水原水（二次処理水）の濃度分布は NoV 実測データに基づき、平均値  $5.7 \times 10^5$  (copies/L)、標準偏差  $1.3 \times 10^6$  とした。50%感染確率  $ID_{50}=10$  (copies) とした。設定 DALY は  $10^{-6}$  とし、要求される再生水処理施設の除去率を試算した。試算結果を図 18 に示す。

図 21 より、親水利用として全身が浸かるケースでは平均で約 7Log の除去率が要求されたため、膜処理以外の消毒による除去あるいは RO 膜などの UF 膜よりも孔径の小さい膜での処理が必要となると考えられた。また水洗トイレは曝露日数、曝露量と少ないことから除去率で 3Log 確保されれば問題ないレベルであると考えられた。概ねどのシナリオでも WHO の提唱する  $10^{-6}$  DALY を達成するためには平均 Log 除去率で 5Log 以上が要求されるといえる。

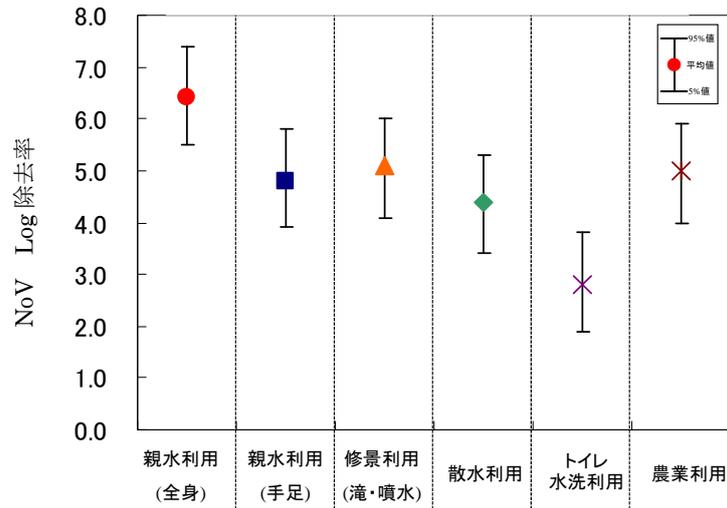


図 18 再生水利用用途別の  $10^{-6}$  DALY を達成するために要求される NoV 除去率

## 5. まとめ

本調査の結果、以下の事項が明らかとなった。

- 1) 農業利用を想定したリスク評価では、曝露対象を農業従事者と想定した場合、安全側を考慮して 95%上限値で評価すると *Norovirus* は全てのシナリオで WHO が提唱する  $10^{-6}$  DALY/人・年を上回る値となった。*Rotavirus* は曝露量が半分かつ再生水を貯留しウイルスの自然減衰を考慮したシナリオでは WHO の提唱値を下回る結果となった。*Campylobacter* は全てのシナリオで WHO の提唱値を下回る結果となった。
- 2) *Norovirus* は感染価が直接推定することができないが、*Norovirus* のリスクを低減できれば、*Rotavirus* および *Campylobacter* のリスクはそれを下回る結果となった。
- 3) 生野菜では、再生水を貯留せずに用い場合、*Norovirus* ( $ID_{50}=10$ ) で  $10^{-6}$  DALY/人・年を上回る試算結果となったが、再生水の使用状況、使用方法を十分に考慮すれば、DALY= $10^{-6}$  を十分に下回ると試算結果になりうると考えられた。
- 4) 農業従事者に対してリスクとして DALY で  $10^{-6}$  を達成するためには、再生水処理の病原微生物の除去率の向上も十分に必要な事項であるが、膜処理で概ね平均で 4 Log 程度除去可能であれば、消費者にはリスクを低減する十分な結果であった。

再生水の利用用途毎に要求される再生水除去率の試算を行った結果、親水利用として全身が浸かるケースでは平均で約 7Log の除去率が要求されたため、膜処理以外の消毒による除去あるいは RO 膜などの UF 膜よりも孔径の小さい膜での処理が必要となると考えられた。その他の利用（親水利用（手足のみが浸かるケース）、修景利用、散水利用、トイレ水洗利用、農業利用）では概ねどのシナリオでも WHO の提唱する  $10^{-6}$  DALY を達成するためには平均 Log 除去率で 5Log 以上が要求される結果となった。

本研究は独立行政法人科学技術振興機構(JST), CREST 戦略的創造研究推進事業「21世紀型都市水循環系構築のための水再生技術の開発評価」の一環により実施されたものであり、土研リサイクル担当分をまとめたものである。

【参考文献】

- 1) 田中弘明, 21世紀都市代謝系としての下水道への期待 (2009) 新都市, Vol.63, No.9, pp.16-22
- 2) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書 (2010)
- 3) 片山和彦 (2004) 感染発症動向調査週報, 国立感染症研究所, 第11号
- 4) Kageyama T., Kojima M., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., and Katayama K. (2003) Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.41, No.4, pp.1548-1557
- 5) 陶山明子, 諏訪守, 鈴木穰, 尾崎正明 (2006) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討, 環境工学研究論文集, 土木学会, 第43巻, pp.255-261
- 6) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介 (2010) ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子, 下水道協会誌, 日本下水道協会, vol.47, No.571, pp.103-111
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007) ノロウイルスの検出法について
- 8) 福田伸治, 桑山勝, 高尾信一, 島津幸枝, 宮崎佳都夫 (2004) 最確数法を用いたカキのノロウイルスの遺伝子の定量, 広島県保健環境センター研究報告, No.12, pp.33-36
- 9) 石村貞夫, 謝承秦, 久保田基夫 (2009) SPSSによる医学・歯学・薬学のための統計解析, 東京図書, pp 8-69
- 10) 酒井麻衣子 (2004) SPSS完全活用法データの入力と加工, 東京図書, pp 54-78
- 11) Sano, D., Matsuo, T., Omura, T., 2004. Virus-binding proteins recovered from bacterial culture derived from activated sludge by affinity chromatography assay using a viral capsid peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, pp 3434-3442
- 12) 愛知県感染症情報 (2010年〔平成22年〕週報), <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/survei/survei2010.html>
- 13) 群馬県, 2010年のデータ及び週報PDF, <http://www.pref.gunma.jp/02/p07110060.html>
- 14) Australian Guidelines for Water Recycling Stormwater Harvesting and Reuse (July 2009), National Water Quality Management Strategy Document, No 23, pp 57, 116

## 下水灰の肥料用原料化技術の開発研究

研究予算：農林水産省 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 23012

研究期間：平 23～平 25

担当チーム：リサイクルチーム

研究担当者：内田勉、岡本誠一郎、堀尾重人、井上研一郎

【要旨】 最近約 1 年間における全国の処理場から排出される下水灰中のリン・重金属類の組成や、水処理、焼却・集じん方法等に関して全国 83 の自治体を対象にアンケート調査を実施した。肥料取締法に基づく汚泥肥料の公定規格による含有を許される有害成分の最大量に対する全国の下水灰の超過率や、集じん温度と灰中重金属の含有量の関係等について報告した。

キーワード：下水灰、肥料、重金属、集じん

### 1. はじめに

下水処理場で発生する下水灰には、わが国が 100%輸入に依存しているリン鉱石に匹敵するリンを含有しているが、これらのリン資源としての利用は、緑農地への還元等一部に止まっている。世界的な食料問題は、肥料や肥料原料の高騰を招いており、リン資源の確保は国家的な重要課題となっている。

下水灰に含まれるリン資源をより有効に利用するために、肥効成分としてのリン含有量等の実態や、肥料原料として不要な重金属等の含有実態を明らかにし、より価値が高く、有価な資源としての利用促進に繋げていくための技術開発の基礎資料を得ることを目的とし、アンケート調査を行った。

### 2. 調査方法

全国の下水灰を排出する 22 都府県、63 市町の 85 の自治体等を対象とし、アンケート調査を実施した。

### 3. 調査結果

図-1 に全国の処理場から排出される下水灰中の Pb 含有量のヒストグラムを示す。肥料取締法に基づく汚泥肥料の公定規格による含有を許される有害成分の最大量の超過率を求めたところ、全回答のうち、28%の下水灰が超過していることが明らかとなった。Cd、Hg、As、Ni、Cr についても同様に求めたところ、超過率はそれぞれ 27, 4.7, 5.4, 12, 6.2%であり、これらの下水灰を肥料として利用するためには、処理が必要であることを示した。バグフィルタ(ろ過式集じん)は、200℃程度、電気集じんはそれよりも高

い温度、300℃前後で適用される傾向が確認された。図-2 に集じん温度と灰中 Se 含有量の関係を示す。200℃程度で適用される低温ろ過式集じん灰では、300℃前後で適用される電気集じん灰と比較し、含有量が高くなる場合が多くみられる。燃焼炉内で揮発した Se を含むガスが集じん機を通過する際低温のため凝集、吸着することから含有量が高くなるものと考えられた。

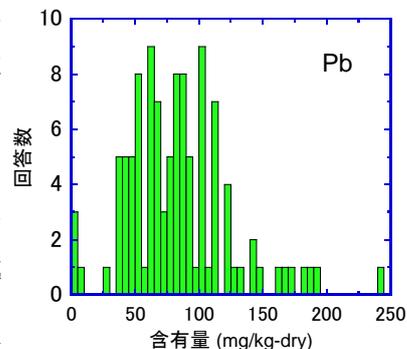


図-1 下水灰中 Se の含有量

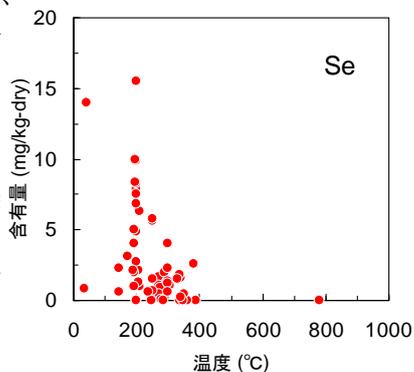


図-2 集じん温度と Se 含有量

### 4. まとめ

全国約 83 の自治体を対象に下水灰に関するアンケート調査を実施した。肥料取締法に基づく有害成分の最大量の超過率は、Pb や Cd が比較的高かったものの、それぞれ 28、27%程度であった。200℃程度の低温ろ過式集じん灰では、300℃前後の電気集じん灰と比較し、Se 含有量が高くなる場合が多くみられた。本調査の内容および結果の詳細は、次年度土木研究所資料として公表する予定である。



## Ⅱ. 水質チームによる研究

# 下水道における水系リスク評価と制御技術に関する調査

水質チーム	上席研究員	南山瑞彦
	総括主任研究員	小森行也
	主任研究員	北村友一
	研究員	村山康樹

## 1. はじめに

ノニルフェノール (NP) は、中央環境審議会水環境部会の水生生物保全環境基準専門委員会において「水生生物の保全に係る水質環境基準」の項目追加について検討が行われている物質である。また、環境省の化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010<sup>1)</sup>によれば、SPEED' 98 における取組みのなかでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察された物質である。環境省が行ってきた化学物質の生態影響試験<sup>2)</sup>においても、ノニルフェノールはミジンコ急性遊泳阻害試験の 48h-EC50 が 0.059mg/L、魚類急性毒性試験の 96h-LC50 が 0.24mg/L と報告されている。このように NP は水生生物に対し毒性を有することから水系リスクをもたらす物質と考えられる。

NP は、界面活性剤のノニルフェノールポリエトキシレート (NPnEO) が好気条件下で生物分解し、エトキシ鎖の短いノニルフェノールエトキシレート (NP1EO、NP2EO) 又は、エトキシ鎖の短いノニルフェノールエトキシ酢酸 (NP1EC、NP2EC) になり、その後、嫌気条件下の汚泥処理により NP となることが知られていることから NP の調査においては前駆物質である NPEO、NPEC もあわせて調査することが重要となる。これら NP 類の調査は過去に国土交通省下水道部が実施<sup>3)</sup>しているが、調査から 10 年以上が経過し、現在では、標準物質の入手、分析機器の進歩もあり、より詳しい調査が可能となっている。本実験では、NP、NP(1)EC~NP(10)EC、NP(1)EO~NP(15)EO を分析対象物質として、活性汚泥処理プロセスにおけるこれら NP 類の除去特性について実験を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 分析方法

NP 類の分析は、下水試験方法<sup>4)</sup>、JIS K0450-60-10<sup>5)</sup>の方法を基本として、下水試料での分析を考慮し NP 分析におけるサロゲート物質の添加、また、NPEC、NPEO 分析における固相抽出の溶出溶剤変更、精製方法の変更など一部変更を加えて行った。また、他の水質項目は、下水試験方法により行った。

### 2.2 活性汚泥処理プロセスと試料採取

実験は、有効水深が約 2m の最初沈殿池 (0.5m<sup>3</sup>)、エアレーションタンク (0.5m<sup>3</sup> × 4 槽)、最終沈殿池 (0.7m<sup>3</sup>) と塩素混和槽 (0.1m<sup>3</sup>)、生汚泥貯留槽 (0.15m<sup>3</sup>)、余剰汚泥貯留槽 (0.15m<sup>3</sup>) で構成される活性汚泥処理実験装置を用いて行った。実下水処理場の流入水をピットに受けた後、定量ポンプを用いて装置に導入した。生汚泥、余剰汚泥の引抜はタイマーコントロールによる間欠運転で行った。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液を定量ポンプにより塩素混和槽に注入した。

分析試料の採取は、実験装置の運転開始から約 6 ヶ月が経過した平成 24 年 3 月に行った。2 時間間隔で採取した各試料を等量混合し分析試料とした。本装置は、流入量 6m<sup>3</sup>/day、汚泥返送率約 30%、HRT 約 8 時間、SRT 約 20 日で運転した。試料採取前約 1 ヶ月間の運転管理状況を表-1 に示す。

### 3. 調査結果

表-1 活性汚泥処理実験装置の運転管理状況

	流入水	AT混合液	二次処理水	放流水	返送汚泥
水温 [°C]	15.7	14.5	13.3	—	—
pH [—]	7.0-7.3	6.9-7.2	7.0-7.2	—	—
SS [mg/L]	68	—	8.5	—	—
残留塩素(T) [mg/L]	—	—	—	1.7	—
MLSS [mg/L]	—	1,790	—	—	4,200

分析対象とした NP、NP(1)EC ~ NP(10)EC、NP(1)EO ~ NP(15)EO の各水処理工程別濃度分布を図-2 に示す。流入水から NP が 390ng/L、NP(1)EC ~ NP(10)EC が 40~90ng/L で検出

され、NPEO は、NP(1)EO の 1,180ng/L を最高濃度に NP(15)EO の 266ng/L まで検出された。流入水中の NPEC は、エトキシ鎖が 0 の NP(1)EC から 9 の NP(10)EC まで広く分布し、NPEO は、エトキシ鎖が 1 の NP(1)EO から 15 の NP(15)EO まで分布していることを確認した。初沈流出水の NP、NPEC、NPEO は、流入水の濃度と少し異なるもののほぼ同じパターンであった。また、流入水、初沈流出水中の NP は約 40%、NP(1)EO は約 50%が SS から検出され、NPEO はエトキシ鎖が長くなるに従いその割合は減少傾向にあった。

二次処理水の NP は、145ng/L、NPEC は NP(1)EC の 480ng/L を最高濃度に NP(5)EC の 11ng/L まで検出され、NPEO は NP(1)EO ~ NP(3)EO が 58ng/L ~ 97ng/L で検出された他は 20ng/L 以下であった。二次処理水中の NP 類は、流入水と比べると NP が減少、NPEC が増加、NPEO が大きく減少した。

本実験の NP 類 (NP、総 NPEC、総 NPEO) 分析結果一覧を表-2 に示す。前述のとおり、NPEC、NPEO は好気・嫌気分解を受け NP となることから、総 NPEC (NP(1)EC ~ NP(10)EC の和)、総 NPEO (NP(1)EO ~ NP(15)EO の和) の算出にあたっては、NP 換算濃度 (ng-NP<sub>eq</sub>/L) とした。

表-2 より、流入水の NP 類濃度は、NP が 390ng/L、総 NPEC、総 NPEO はそれぞれ 281 ng-NP<sub>eq</sub>/L、3,400ng-NP<sub>eq</sub>/L であり、NP 類の合計は約 4,070ng-NP<sub>eq</sub>/L であった。流入水中の NP 類は、その約 90%が NPEO であった。初沈流出水の NP は 460ng/L、総 NPEC、総 NPEO はそれぞれ 290ng-NP<sub>eq</sub>/L、3,300ng-NP<sub>eq</sub>/L であり、NP 類の合計は約 4,050ng-NP<sub>eq</sub>/L であった。国土交通省の調査報告<sup>3)</sup>では、NP 類は最初沈殿池で約 50%除去されていたのに対し、本実験ではほとんど除去されなかった。また、二次処理水の NP 類は、合計約 1,340ng-NP<sub>eq</sub>/L で活性汚泥処理における除去率は 67%であったのに対し、国土交通省の調査では 91%の除去率であった。これらの違いは、国土交通省の調査は、夏・秋の調査であるのに対し、本実験は冬の調査であり低い水温 (15°C) の影響も一因として考えられる。

生汚泥、余剰汚泥について懸濁物質(SS)に吸着している割合を把握するため、溶存態と懸濁態の間での分配を表す指標として用いられる固-液分配係数  $K_d$  (L/kg) を算出した。対象物質が SS とろ液の間で平衡状態に達してい

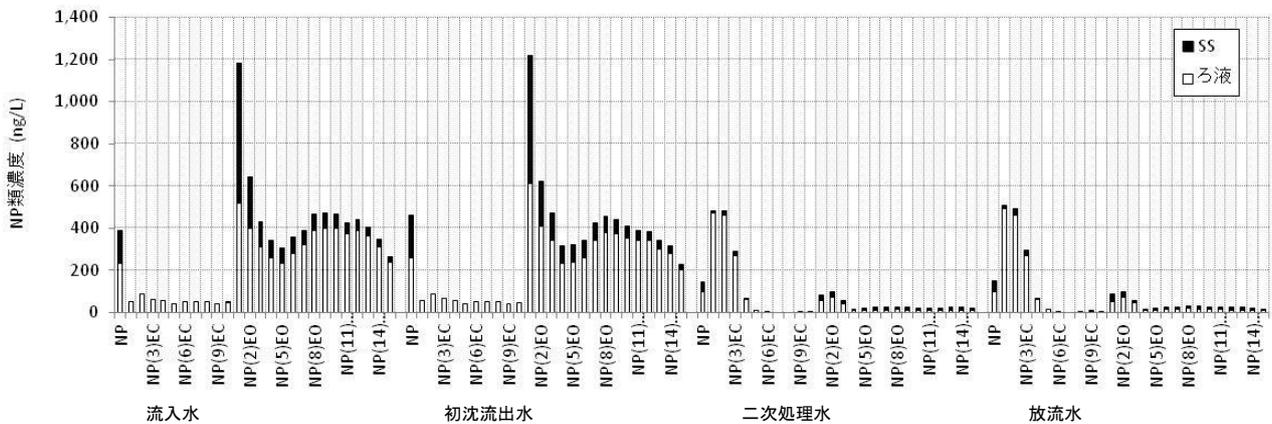


図-2 各水処理工程の NP 類分析結果

表-2 NP 類分析結果 (ng/L)

試料名	NP			総NPEC* <sup>1</sup>			総NPEO* <sup>1</sup>			備考 (SS濃度* <sup>2</sup> )
	ろ液	SS	Total	ろ液	SS	Total	ろ液	SS	Total	
流入下水	230	160	390	280	1	281	2,300	1,100	3,400	55
初沈流出水	260	200	460	290	ND	290	2,300	1,000	3,300	55
二次処理水	98	47	145	890	36	926	170	100	270	3
放流水	95	55	150	910	55	965	180	110	290	5
生汚泥	330	640	970	280	25	305	990	2,400	3,390	180
余剰汚泥	180	3,300	3,480	870	446	1,316	130	2,300	2,430	3,500

\*1: NP換算濃度(ng-NPeq/L)

ND: 検出下限値以下

\*2: SS濃度(mg/L)

ると仮定して(1)式により算出した。

$$K_d(L/kg) = C_s / C_w \cdot \dots (1)$$

ここに、 $C_s$ : SS 濃度 (ng/kg)  $C_w$ : ろ液濃度 (ng/L)

生汚泥の NP、NPEC、NPEO の  $\text{Log}_{10}K_d$  はそれぞれ、4.0、2.7、4.1、余剰汚泥ではそれぞれ、3.7、2.2、3.7 となった。表-2 に示すとおり生汚泥、余剰汚泥の SS がそれぞれ 180mg/L、3,500mg/L のなか、ろ液に比べ SS 濃度が高い NP、NPEO は  $\text{Log}_{10}K_d$  が、3.7~4.1、ろ液に比べ SS 濃度が低い NPEC は  $\text{Log}_{10}K_d$  が 2.2~2.7 と小さい値を示した。

また、本実験の活性汚泥処理実験装置における NP 類の物質収支を求め、流入水中の NP 類 (NP、総 NPEC、総 NPEO) のフラックス合計を 100%とした各処理工程、各汚泥のフラックスを図-3 に示す。流入水と初沈流出水の NP 類は、ほぼ同じ値であり、最初沈殿池における NP 類の除去はみられないが、二次処理水では約 32%に減少しており活性汚泥処理により約 68%除去された。流入水、初沈流出水に対し NP は減少、NPEC は増加、NPEO は大きく減少していた。また、生汚泥、余剰汚泥の割合はそれぞれ約 2%であった。国土交通省の調査<sup>3)</sup>では、生汚泥は余剰汚泥の数倍以上の割合を示しているが、本実験ではほぼ同じ割合であった。本実験の生汚泥の SS 濃度が 180mg/L と極端に低い値であったことが原因と考えられる。また、流入フラックスに対する排出フラックス(放流水、生汚泥、余剰汚泥)は 37%であった。残りの 63%は生分解により除去されたものと考えられる。

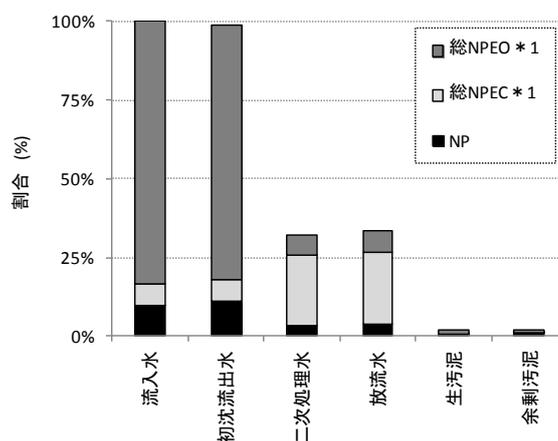


図-3 流入フラックスを 100%とした場合の各フラックス割合  
(\*1: NP 換算濃度で算出)

#### 4. まとめ

活性汚泥処理実験装置を用いた実験により活性汚泥処理プロセスにおける NP 類の挙動調査を行い以下の結果を得た。

流入水と初沈流出水の NP 類は、ほぼ同じ値であり、最初沈殿池における NP 類の除去はみられないが、二次処理水では約 32%に減少しており活性汚泥処理により約 68%除去された。二次処理水の NP は、流入水、初沈流出水に対し減少、NPEC は増加、NPEO は大きく減少していた。また、NP 類の排出フラックス(放流水、生汚泥、余剰汚泥)は、流入フラックスの約 37%であり、残りの 63%は生分解により除去されたものと考えられた。

なお、本調査は、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) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010-、環境省（2010）
- 2) 化学物質の生態影響試験について、環境省、<http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html>
- 3) 平成12年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査の結果について、国土交通省都市・地域整備局下水道部（2001）、<http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/info/naibun/010509.html>
- 4) 下水試験方法（追補暫定版）2002年版、日本下水道協会（2002）
- 5) 工業用水・工場排水中の4-ノニルフェノールの異性体別試験方法、JIS K0450-60-10、日本規格協会（2007）

## 流域スケールで見た物質動態特性の把握に関する研究(2)

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、平山孝浩、  
北村友一、柴山慶行

## 【要旨】

栄養塩類の発生源別流出機構を解明するため、霞ヶ浦流域と印旛沼流域を対象に、GIS を用いて河川ごとの土地利用状況を整理した。そして、各河川集水域の土地利用割合、家畜、人口密度と河川水中栄養塩類濃度等の関係を解析した。霞ヶ浦流域の調査から、河川水の  $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度は集水域の畑の割合および豚の飼育密度と高い正の相関を示すことがわかった。印旛沼流域の調査からも、 $\text{T-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$  濃度は、集水域の畑の割合、豚の飼育密度が高いと高くなる傾向を示した。リンについては、霞ヶ浦、印旛沼とも、集水域の市街地の割合、人口密度が高いと高くなる傾向であった。

キーワード：霞ヶ浦、印旛沼、栄養塩、流出解析、土地利用

## 1. はじめに

近年、閉鎖性水域や河川においては、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。閉鎖性水域においては富栄養化が常態化しており、環境基準の達成率が低いため、閉鎖性水域の水質を良質に保つ必要がある。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いという問題点がある。本研究は、流域の窒素・リンの点源・面源負荷流出における物質動態に関する実態調査を行い、栄養塩類の発生源別と雨天時流出機構の解明を行うことを目的としている。本年度は、栄養塩類の発生源別流出機構を明らかにするため、霞ヶ浦流域と印旛沼流域を対象とし、各河川の集水域の土地利用と河川水質の関係を調査した。

## 2. 研究方法

霞ヶ浦流域の調査は、平成 21 年に調査した各河川流末の水質データとその集水域の土地利用を解析し、土地利用と水質の関係の概要を明らかにした。印旛沼流域の調査は、流域スケールで見た物質動態特性の把握に関する研究(1)と調査フィールドを合わせるとともに、霞ヶ浦流域の解析結果を踏まえ、流域内の畜産に着目した小流域において、より詳細な水質データの取得を行い、土地利用と水質の関係を解

析した。

## 2.1 霞ヶ浦流入河川の溶存態窒素・リン・有機物濃度と集水域の土地利用の関係

## 2.1.1 霞ヶ浦流域の概要

図-1 に、調査対象とした霞ヶ浦の集水域と流入河川を示す。霞ヶ浦は茨城県南部に位置する総面積  $219.9\text{km}^2$ 、平均水深 4m の富栄養湖である。西浦 ( $171.5\text{km}^2$ ) には 29 河川、北浦 ( $36.2\text{km}^2$ ) には 22 河川が流入している。霞ヶ浦流域全体の面積は  $2,157\text{km}^2$  である。本研究では、西浦流入河川のうち恋瀬川支流 2 河川を含む 14 河川、北浦流入河川のうち 9 河川を対象とした。

## 2.1.2 集水域の土地利用情報の整理



図-1 霞ヶ浦の集水域と研究対象河川および調査地点

霞ヶ浦の集水域の土地利用情報は、GIS (Geographic Information System) を用いて整理した。行政界、河川流域界、土地利用のデータは国土数値情報<sup>1)</sup>を利用した。人口と家畜頭数のデータは、「地図で見る統計」<sup>2)</sup>のうち、平成17年国勢調査および農林業センサスを利用した。

各河川の集水域の土地利用は、平成18年度版の100m細分メッシュデータを水田、畑、森林、市街地、荒地および道路・その他・水面(以下、道路等)に区分して河川流域ごとに集計し、土地利用割合を求めた。各集水域内の人口は、500mメッシュ人口データをもとに、河川流域ごとに集計して求めた。各集水域内の家畜頭数は、市町村別の家畜頭数から求めた。すなわち、国土地理院が発表している平成22年の市町村別面積および各市町村に属する湖面積<sup>3)</sup>を用いて各市町村の陸地面積を求め、市町村内の家畜の分布は均等であるとみなして家畜飼育密度を算出した。流域ごとの家畜頭数は、各河川流域の対応する市町村の面積に家畜飼育密度を乗じて算出した。

### 2.1.3 霞ヶ浦流入河川の水質データ

霞ヶ浦流入河川の水質データは、図-1の地点で、平成21年5月から平成22年3月にかけて、7月を除く各月に1回晴天時に調査を行ったものである。

水質測定項目は、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P (TRAACS2000:BRAN+LUEBBE)、DOC (TOC-V:島津製作所)である。なお、流量観測は行っていない。

### 2.1.4 解析方法

データの解析はExcel統計2004を用いて行った。最初に、各土地利用等の項目と水質の関係を散布図と相関係数から個別に解析した。相関の有無の検定にあたっては、外れ値の影響を受けにくい順位相関係数を併用した。次に、土地利用と水質の関係の全体像を把握するため主成分分析および重回帰分析を行った。主成分分析は、土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度(全10項目)の相関係数行列を対象とし、集水域の土地利用を主成分得点で表した。そして、主成分得点と水質の相関関係を図示した主成分負荷量プロットから、土地利用と水質の関係を評価した。重回帰分析は、多重共線性の問題を回避するため、主成分回帰法<sup>4)</sup>により行った。すなわち、土地利用データから計算された主成分得点を説明変数、水質を目的変数として重回帰分析を行い、土地利用と水質についての関係式を得た。

## 2.2 印旛沼流域の土地利用と水質の関係

### 2.2.1 印旛沼流域の概要

印旛沼は千葉県北西部に位置し、総面積は11.55km<sup>2</sup>、平均水深は1.7m、流域全体の面積は541.1km<sup>2</sup>である。図-2に、印旛沼流域における調査対象河川を示す。印旛沼流域では、鹿島川と高崎川流域内の土地利用特性の異なる5つの支流を調査対象とした。

### 2.2.2 集水域の土地利用情報の整理

印旛沼の集水域の土地利用割合、家畜頭数は、霞ヶ浦流域と同様にGISを用いて整理した。各集水域内の人口は、500mメッシュ人口データと市町村別下水道普及率<sup>5)</sup>を用いて、メッシュ毎の下水処理人口と未処理人口を求め、河川流域ごとに集計して求めた。

### 2.2.3 水質測定項目

印旛沼流入河川では、図-2のNo.1~5の地点で、平成24年1月から2月にかけて6回晴天時に流量観測と水質調査を行った。

水質調査項目は、水温、pH、EC、SS、VSS、DOC (TOC-5000:島津製作所)、T-N、T-P (TRAACS2000:BRAN+LUEBBE)、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Cl<sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (イオンクロマトグラフDX-120およびICS-1100:日本ダイオネクス)である。金属類は6回の調査のうち4回、総濃度と溶存態の濃度を測定した。測定項目はFe、Mn、Cu、Mo、B、Zn、Al、Ni、Co、Se (ICP-MS X7CCT:サーモフィッシャーサイエンティフィック)である。

### 2.2.4 解析方法

土地利用と水質の関係は、地点間比較、相関係数、主成分分析によって解析した。各河川の水質は全調

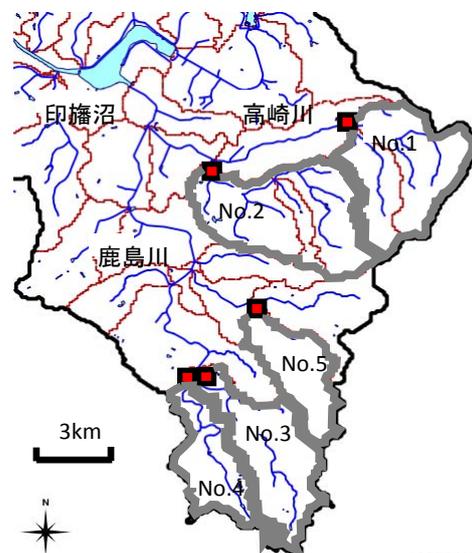
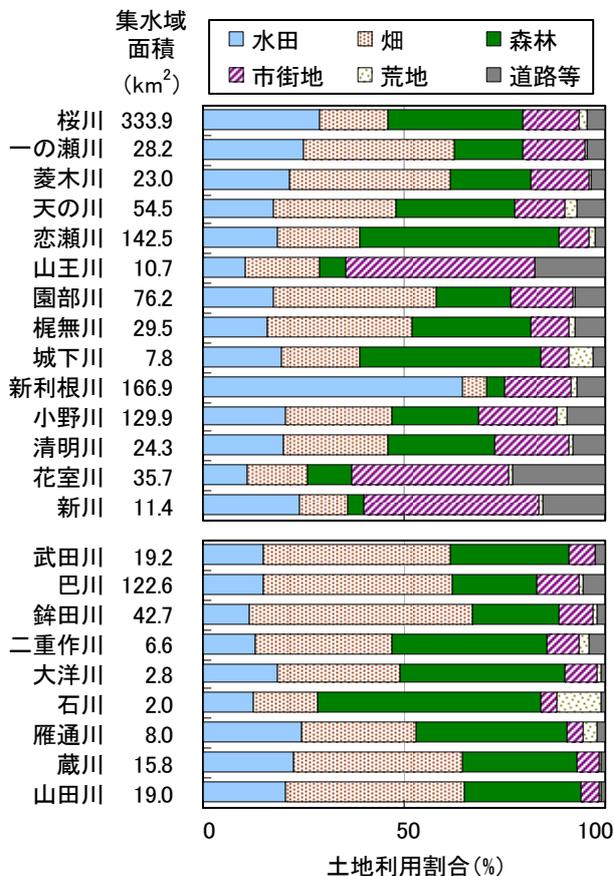


図-2 印旛沼の調査対象河川の集水域と調査地点

査の平均値を解析に用いた。また、T-N と T-P については集水域からの負荷量を原単位法で求め、実測負荷量と比較した。原単位法では、集水域の面源負荷量と、人、家畜による負荷量を各集水域に適用した。面源負荷量は、水田、畑、山林、市街地の面源負荷量原単位<sup>67)</sup>と各集水域の土地利用形態別面積から求めた。森林と荒地の原単位は山林の値を、道路とその他の原単位は市街地の値を使用した。人の生活による負荷量は、下水処理人口分は流域外へ排出され、下水未処理人口分は合併浄化槽を利用すると仮定し、各集水域の下水未処理人口に、1人1日あたりの合併浄化槽の排出負荷量<sup>67)</sup>を乗じて推定した。家畜による負荷量は、各集水域の家畜頭数に、豚と牛の1頭あたりの排出負荷量<sup>67)</sup>を乗じて推定した。実測負荷量は、各調査のT-N、T-P濃度に流量を掛けて平均し求めた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 霞ヶ浦流入河川の溶存態窒素・リン・有機物濃度と集水域の土地利用の関係



#### 3.1.1 各調査河川流域の特徴

図-3に、各河川の集水域面積と土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度を示す。集水域面積 100km<sup>2</sup>以上の河川は西浦流入河川では桜川、恋瀬川、新利根川、小野川、北浦流入河川では巴川である。集水域の土地利用割合のうち、水田の割合が最大の河川は、新利根川 (65%) である。畑の割合が最大の河川は、西浦流入河川では園部川 (41%)、北浦流入河川では銚田川 (56%) である。森林の割合は、恋瀬川、城下川、大洋川、石川で高い。市街地の割合は、山王川、花室川、新川で高く、これらの河川では森林の割合は約 10% と低くなっている。北浦流入河川では市街地の割合はいずれも低い。道路等の割合と人口密度は、市街地の割合が高い河川で高い。豚の飼育密度は北浦の巴川、銚田川、二重作川、大洋川で高い。乳牛の飼育密度は園部川、梶無川、巴川で、肉牛の飼育密度は一の瀬川、天の川、新川で高い。

#### 3.1.2 水質調査結果

図-4に、主な河川のNO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、DOC濃度の変化を示す。NO<sub>3</sub>-N濃度は9月以降に高くなる傾向が観られた。PO<sub>4</sub>-P濃度の変化は河川によって異

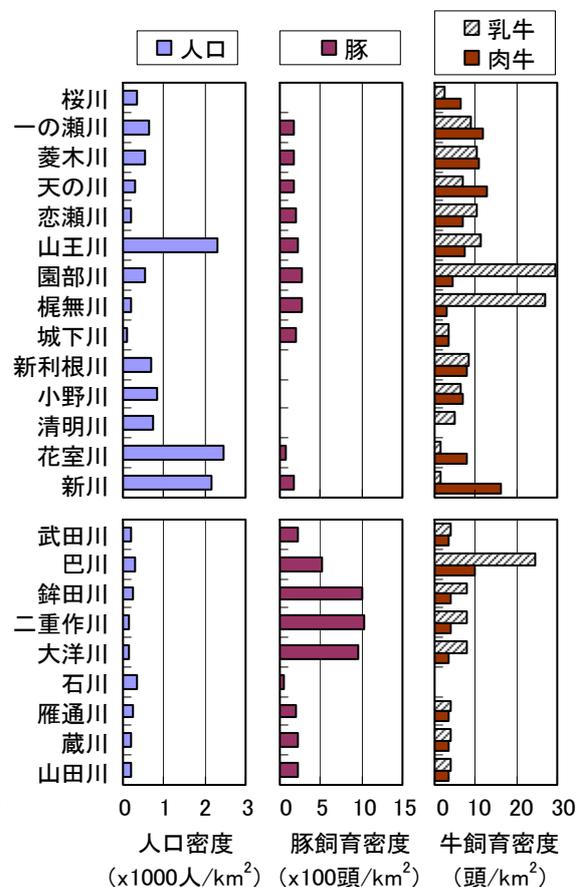


図-3 霞ヶ浦流域の各流入河川の集水域面積、土地利用割合、人口密度と家畜飼育密度

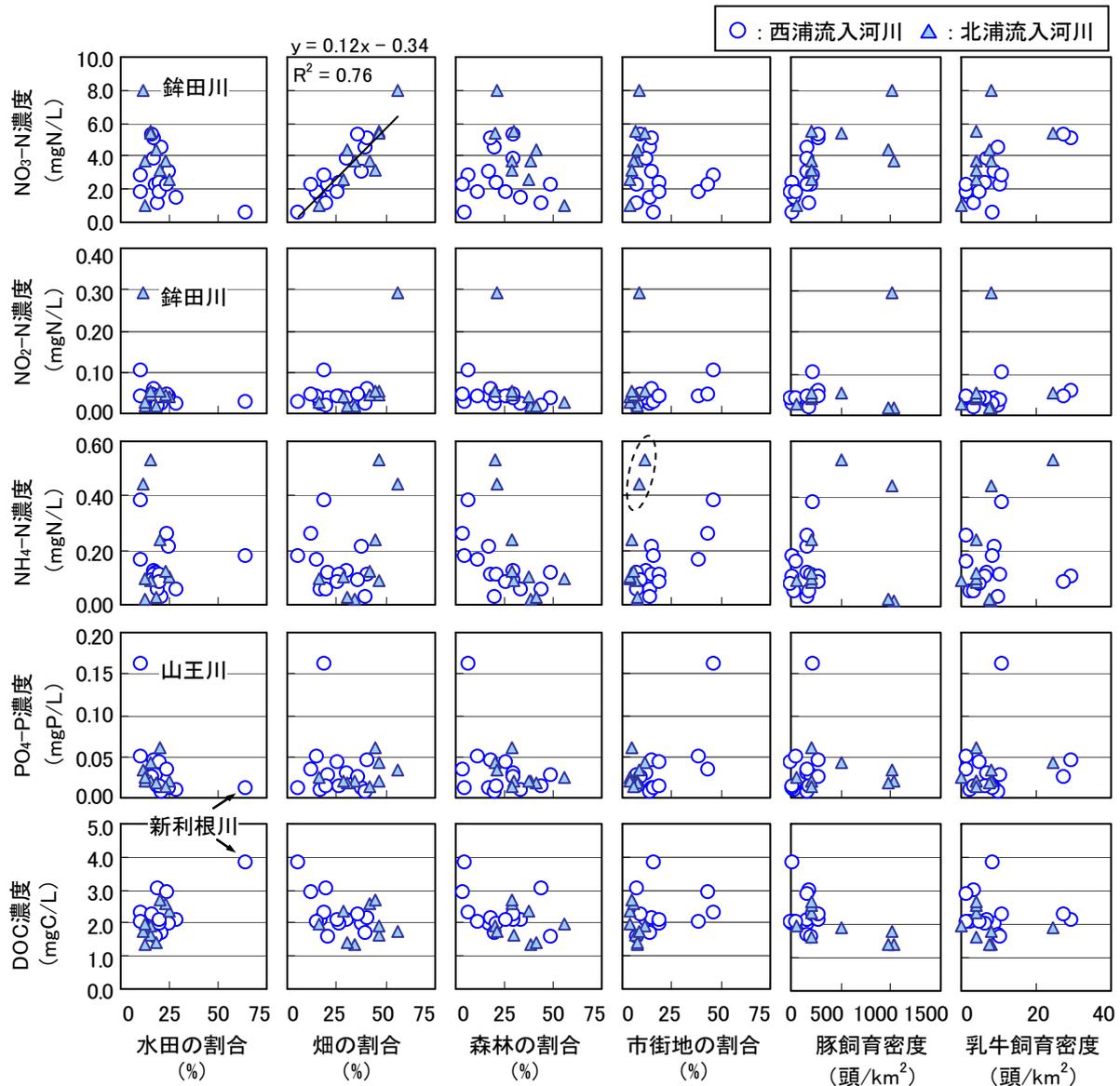


図-5 水田、畑、森林、市街地の割合および豚、乳牛の飼育密度と水質の年平均値の関係（霞ヶ浦）

表-1 土地利用割合および家畜、人口密度と水質の相関係数の一覧（霞ヶ浦）

		土地利用割合(%)						流域の家畜密度(頭/km <sup>2</sup> )			人口密度 (人/km <sup>2</sup> )
		水田	畑	森林	市街地	荒地	道路等	豚	肉牛	乳牛	
NO <sub>3</sub> -N	全域	-0.43 *	0.87 (**)	-0.09	-0.25	-0.41	-0.24	0.64 (**)	-0.02	0.50 (*)	-0.30
	西浦	-0.47	0.85 (**)	0.01	-0.17	-0.36	-0.11	0.70 (**)	0.07	0.77 (**)	-0.19
	北浦	-0.36	0.86 (**)	-0.78 *	0.70 (**)	-0.65	0.31	0.58	0.48	0.46	-0.28
NO <sub>2</sub> -N	全域	-0.26	0.45 *	-0.25 (**)	0.07	-0.18 (**)	0.00	0.44 *	-0.08	0.09	0.06
	西浦	-0.39	0.02	-0.45	0.66 (*)	-0.51 (*)	0.57 (**)	0.36	-0.01	0.31	0.59 (*)
	北浦	-0.40	0.63 (**)	-0.53 (**)	0.31	-0.19	-0.05	0.39	0.06	0.10	0.10
NH <sub>4</sub> -N	全域	-0.12	0.27	-0.49 (**)	0.32	-0.27	0.24	0.19	0.31 (*)	0.24	0.29
	西浦	-0.03	-0.35	-0.65 (**)	0.79 (**)	-0.42	0.62 *	0.15	0.40 (*)	-0.09	0.73 (**)
	北浦	-0.27	0.65 (**)	-0.72 (**)	0.61	-0.26	0.46	0.12	0.68 *	0.70 *	0.35
PO <sub>4</sub> -P	全域	-0.35 (**)	-0.08	-0.37	0.60 (**)	-0.23	0.53 (**)	-0.02	0.02	0.15	0.59 (**)
	西浦	-0.41 (**)	-0.15	-0.37	0.69 (**)	-0.38	0.61 (**)	0.27	-0.08	0.11	0.64 *
	北浦	-0.07	0.40	-0.41	0.14	-0.18	0.17	-0.11	0.36	0.33	0.17
DOC	全域	0.69 (**)	-0.44 *	-0.39	0.21	0.06	0.18	-0.48 *	0.15	-0.11	0.21
	西浦	0.70 (**)	-0.61 *	-0.37	0.13	0.34	0.07	-0.15	0.04	-0.14	0.10
	北浦	0.66	0.07	-0.18	-0.55	-0.04	-0.35	-0.69 *	-0.05	-0.24	0.15

相関係数 \*:p<0.05 \*\*:p<0.01, 順位相関係数 (\*):p<0.05 (\*\*):p<0.01

なったが、1~3月よりも5、6月に高くなる傾向が観られた。DOCは5、6、8月に高く、9月以降は低下する傾向が観られた。新利根川では年間を通じて概ね一定であった。

### 3.1.3 土地利用割合と水質の関係

各河川の水質の年平均値として、10回の水質調査結果の平均値を求め、これと集水域の土地利用の関係を解析した。図-5に、水田、畑、森林、市街地の割合および豚、乳牛の飼育密度と水質の年平均値の関係を示す。表-1に、土地利用割合および家畜飼育密度、人口密度と水質項目の相関係数の一覧を示す。河川全域 (n=23) に加えて、西浦流入河川のみ (n=14)、北浦流入河川のみ (n=9) で相関係数を求め、相関の有無を検定した。NO<sub>3</sub>-N濃度と土地利用の関係に

ついてみると、NO<sub>3</sub>-N濃度は畑の割合に対して直線的な増加を示し、回帰直線の決定係数 (R<sup>2</sup>) は0.76であった。畑の割合との相関係数は、全域、西浦流入河川のみ、北浦流入河川のみのいずれも0.85以上と高かった。水田とは負の相関を示し、水田の割合が高い新利根川で最低となった。森林の割合とは全体としては弱い負の相関を示した。市街地の割合との関係は、西浦流入河川では明確でないが、北浦流入河川では正の相関を示した。豚の飼育密度とは正の相関を示し、300頭/km<sup>2</sup>までは密度とともに増加する傾向であった。1000頭/km<sup>2</sup>付近では河川による違いが大きくなったが、相関係数と順位相関係数の両方でp<0.01で有意と判定された。乳牛の飼育密度とは正の相関を示した。

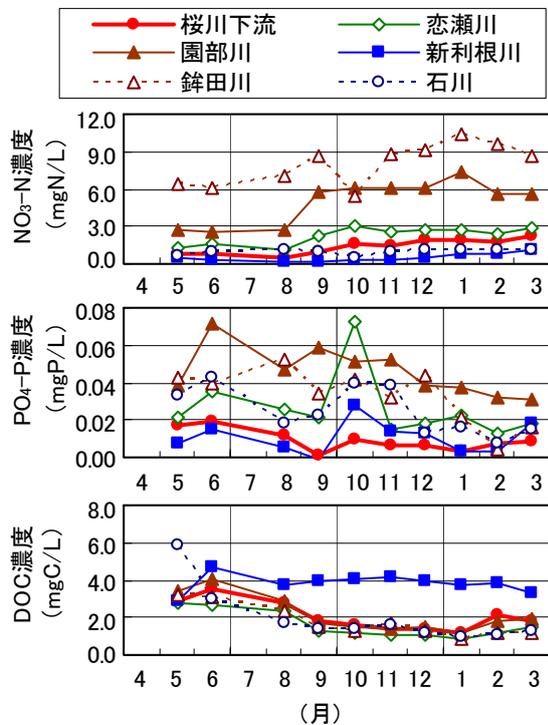


図-4 主な霞ヶ浦流入河川のNO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、DOC濃度の経月変化

NO<sub>2</sub>-N濃度と土地利用の関係は、明確ではないが、全域でみると畑の割合および豚の飼育密度と正の相関を示した。鉾田川はNO<sub>2</sub>-N濃度が高く、他の河川から外れた位置にプロットされた。西浦流入河川のみでは市街地や道路等の割合、人口密度と正の相関を示した。

NH<sub>4</sub>-N濃度は全域でみると、森林の割合と負の相関を示した。また、有意とは判定されなかったが、市街地の割合とは正の相関であった。北浦流入河川では、市街地の割合が低いにもかかわらず、NH<sub>4</sub>-N濃度が高い河川があった。

PO<sub>4</sub>-P濃度は、水田と負の相関を示した。山王川はPO<sub>4</sub>-P濃度が高いため、また新利根川は水田の割合が高いため、他の河川から外れた位置にプロットされた。市街地や道路等の割合、人口密度と正の相関を示したが、順位相関係数はp≥0.05で、有意とは判定されなかった。

DOC濃度は全体でも、新利根川を除いても水田と正の相関を示した。畑の割合および豚の飼育密度とは負の相関を示した。森林とは負の相関であったが、

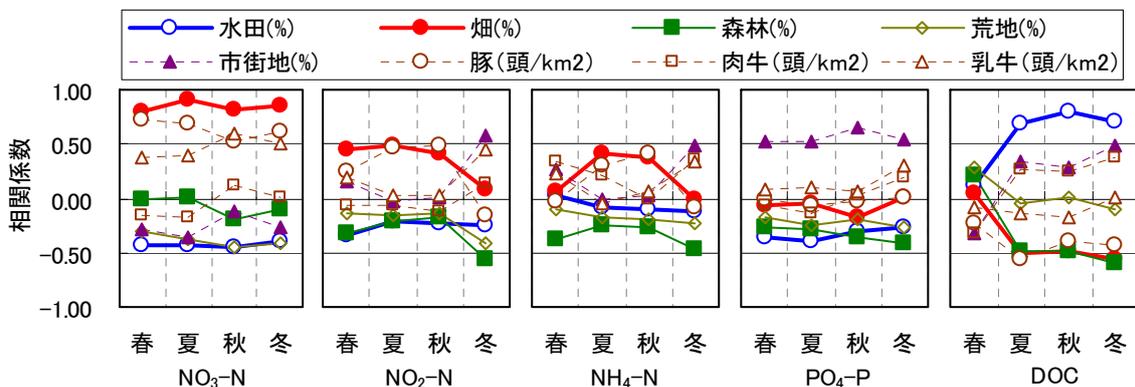


図-6 土地利用と水質の季節平均値の相関係数の比較 (霞ヶ浦)

$p \geq 0.05$  で、有意とは判定されなかった。

春季：5、6月、夏季：8、9月、秋季：10、11、12月、冬季：1、2、3月と区分して水質の平均値を求め、土地利用と季節毎の水質の関係を解析した。図-6に、土地利用割合および家畜飼育密度と季節毎の水質の相関係数を示す。NO<sub>3</sub>-N濃度は、季節によらず畑の割合および豚、乳牛の飼育密度と正の相関を示した。水田の割合とは負の相関を示した。NO<sub>2</sub>-N濃度とNH<sub>4</sub>-N濃度についてみると、冬季は他の季節と異なり、市街地と正の、森林と負の相関を示した。PO<sub>4</sub>-P濃度は季節による相関係数の変化が小さく、市街地の割合と正の、森林や水田の割合と負の相関を示した。DOC濃度は、春季は他の季節と異なり、どの項目とも相関係数が低かった。夏季～冬季は水田の割合と正の、畑や森林の割合と負の相関を示した。

た。

### 3.1.4 多変量解析による水質の形成要因の把握

土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度を用いた主成分分析の結果、第3主成分までの累積寄与率は77.8%となった。集水域の土地利用特性は第1～第3主成分で概ね表現できていると考えられる。図-7aに、第1～第3主成分についての各項目の主成分負荷量プロットを示す。第1主成分は、市街地、道路等の割合および人口密度が+方向に、森林、畑の割合が-方向に分布したことから、集水域の都市化に関連する成分であると考えられる。第2主成分は、畑の割合および豚、乳牛の飼育密度が+方向に、水田が-方向に分布したことから、畑の割合と家畜飼育密度に関連する成分であると考えられる。第3主成分は水田の割合が+方向に分布しており、これを

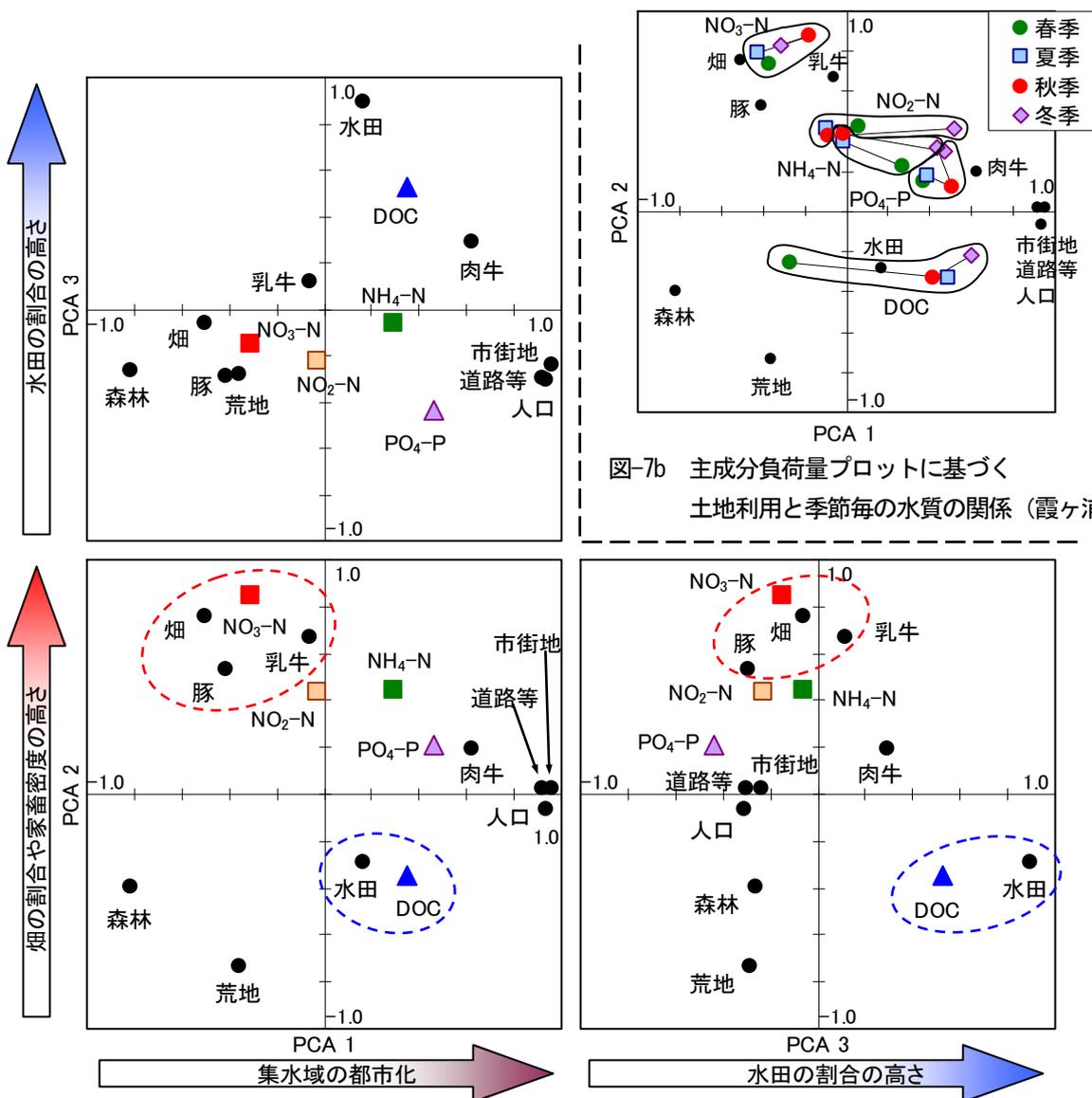


図-7b 主成分負荷量プロットに基づく土地利用と季節毎の水質の関係（霞ヶ浦）

図-7a 主成分負荷量プロットに基づく土地利用と水質の年平均値の関係（霞ヶ浦）

反映する成分であると考えられる。

土地利用の主成分得点と各水質の年平均値の相関係数を求め、図-7aの主成分負荷量プロット上における各水質の分布位置を調べた。NO<sub>3</sub>-N濃度は、畑の割合、豚、乳牛の飼育密度と近い位置に分布した。畑からは肥料や堆肥に由来する窒素が流出するため<sup>8)</sup>、畑の割合とNO<sub>3</sub>-N濃度の位置が近くなったと考えられる。豚の密度との関係については、糞尿によるもの<sup>9)</sup>と考えられる。NO<sub>2</sub>-N濃度は、第2主成分が正であったが、NO<sub>3</sub>-N濃度と比較すると畑の割合から離れた位置に分布した。NH<sub>4</sub>-N濃度とPO<sub>4</sub>-P濃度は、第1、第2主成分が共に正の位置に分布しており、畑だけでなく市街地からも影響を受けていたと推測される。DOC濃度は、水田の近くに分布した。

次に、主成分得点と水質の季節毎の平均値の相関係数を求め、主成分負荷量プロット上の季節毎の分布の違いを調べた。図-7bに、第1、第2主成分と季節毎の水質の関係を示す。NO<sub>3</sub>-N濃度は、いずれの季節も畑の割合や豚、乳牛の飼育密度の近くに分布した。集水域の畑や畜産業は、年間を通じてNO<sub>3</sub>-N濃度に影響を及ぼしていると考えられる。NO<sub>2</sub>-N濃度は、冬季に第1主成分の正の方向に移動し、市街地との相関が高くなった。NH<sub>4</sub>-N濃度は、春季と冬季に第1主成分が正の位置に分布した。PO<sub>4</sub>-P濃度の分布の変化は小さかった。DOC濃度は、夏季～冬季は水田の近くに分布していたが、春季は第1主成分が負となり、水田のプロット位置から離れた分布となった。

集水域の土地利用が水質に及ぼす影響を数値化するため、重回帰分析の1種である主成分重回帰分析を行った。その結果、NO<sub>3</sub>-N濃度に関して、自由度修正済決定係数(R<sup>2</sup>)=0.816で次の回帰式が得られた。

$$\text{NO}_3\text{-N濃度 (mgN/L)} = \left( \begin{array}{l} -0.0375 \times \text{田} (\%) \\ +0.0479 \times \text{畑} (\%) \\ -0.0091 \times \text{森林} (\%) \\ -0.1797 \times \text{荒地} (\%) \\ -0.0052 \times \text{市街地} (\%) \\ -0.0085 \times \text{道路等} (\%) \\ +0.0016 \times \text{豚} (\text{頭}/\text{km}^2) \\ +0.0003 \times \text{肉牛} (\text{頭}/\text{km}^2) \\ +0.0582 \times \text{乳牛} (\text{頭}/\text{km}^2) \\ -0.0002 \times \text{人口} (\text{人}/\text{km}^2) \end{array} \right) + 2.47$$

畑の割合1%あたりのNO<sub>3</sub>-N濃度の変化量は、畑で+0.048mgN/Lであった。家畜密度についてみると、豚は1頭/km<sup>2</sup>あたり+0.0016mgN/L、乳牛は1頭/km<sup>2</sup>あたり+0.058mgN/Lとなった。

## 3.2 印旛沼流入河川の水質と集水域の土地利用の関係

### 3.2.1 各調査地点の水質と集水域の土地利用の関係

図-8に、各集水域の土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度を示す。土地利用割合のうち、畑の割合はNo.1とNo.5で高く、森林の割合はNo.3で高い。水田の割合は、どの集水域も10%未満である。市街地の割合は、No.2の16%が最大であり、集水域による違いが小さい。全人口密度と下水処理されていない人口は、No.1とNo.2で多い。No.3とNo.4は全人口の90%以上が下水処理人口になっている。豚の飼育密度はNo.1で高く、No.3とNo.4で低い。肉牛の飼育密度はNo.2で、乳牛の飼育密度はNo.5で高い。

図-9に各調査地点の主要な水質項目(T-N、NO<sub>3</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NH<sub>4</sub>-N、T-P、PO<sub>4</sub>-P、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Al、DOC)の平均値を示す。表-2および表-3に、土地利用と水質の全項目の相関係数を示す。T-N、NO<sub>3</sub>-N、T-Al濃度はNo.1とNo.5で高く、畑の割合や豚の密度と正の相関を示した。NO<sub>2</sub>-N濃度は、No.1、No.2、No.5で高かった。NH<sub>4</sub>-N濃度はNo.1とNo.2で高く、市街地、道路等の割合や、肉牛の飼育密度、下水未処理人口の密度と正の相関を示した。T-P濃度とPO<sub>4</sub>-P濃度はNo.1、No.2、No.4で高く、市街地、道路等の割合や全人口密度と正の相関を示した。T-N、T-Pは、森林の割合と負の相関を示した。Na<sup>+</sup>濃度はNo.1、No.2、No.4で高く、DOCはNo.2で高かった。

土地利用割合、全人口密度、下水未処理人口密度、家畜飼育密度と水質の平均値(計50項目)を用いた主成分分析の結果、第2主成分までの累積寄与率は76%となった。図-10に、第1主成分と第2主成分の主成分負荷量プロットを示す。主成分1は、市街地の割合、全人口密度、肉牛の密度が正、森林の割合が負になっていることから、集水域の都市化に関連する成分と考えられる。主成分2は、畑の割合、豚と乳牛の密度が正、水田の割合が負になっていることから、畑の割合と家畜飼育密度に関連する成分と考えられる。水質項目についてみると、T-N濃度、NO<sub>3</sub>-N濃度、NO<sub>2</sub>-N濃度は畑の割合や豚の飼育密度の近くに分布した。一方、NH<sub>4</sub>-N濃度は全人口、肉牛の密度、下水未処理人口の密度の近くに分布した。T-P濃度、PO<sub>4</sub>-P濃度、DOC濃度は市街地や道路の割合、全人口密度の近くに分布した。

### 3.2.2 集水域の土地利用と栄養塩の流出負荷量の関係

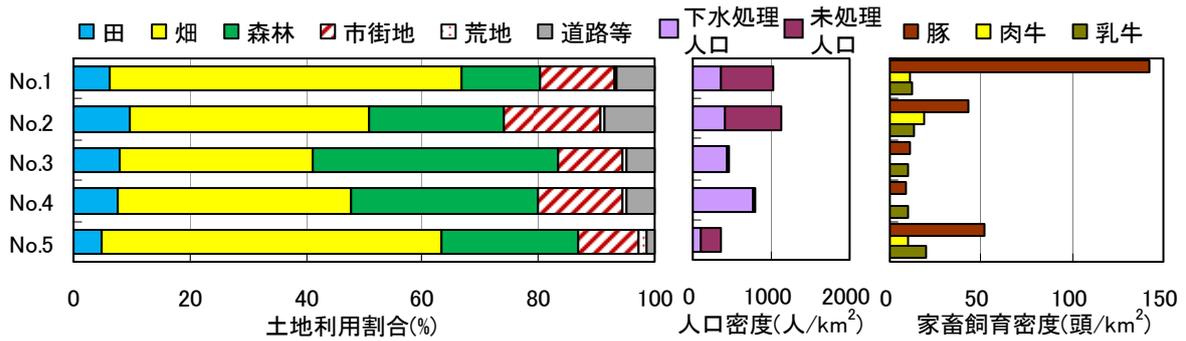


図-8 印旛沼小流域における、各調査河川集水域の土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度

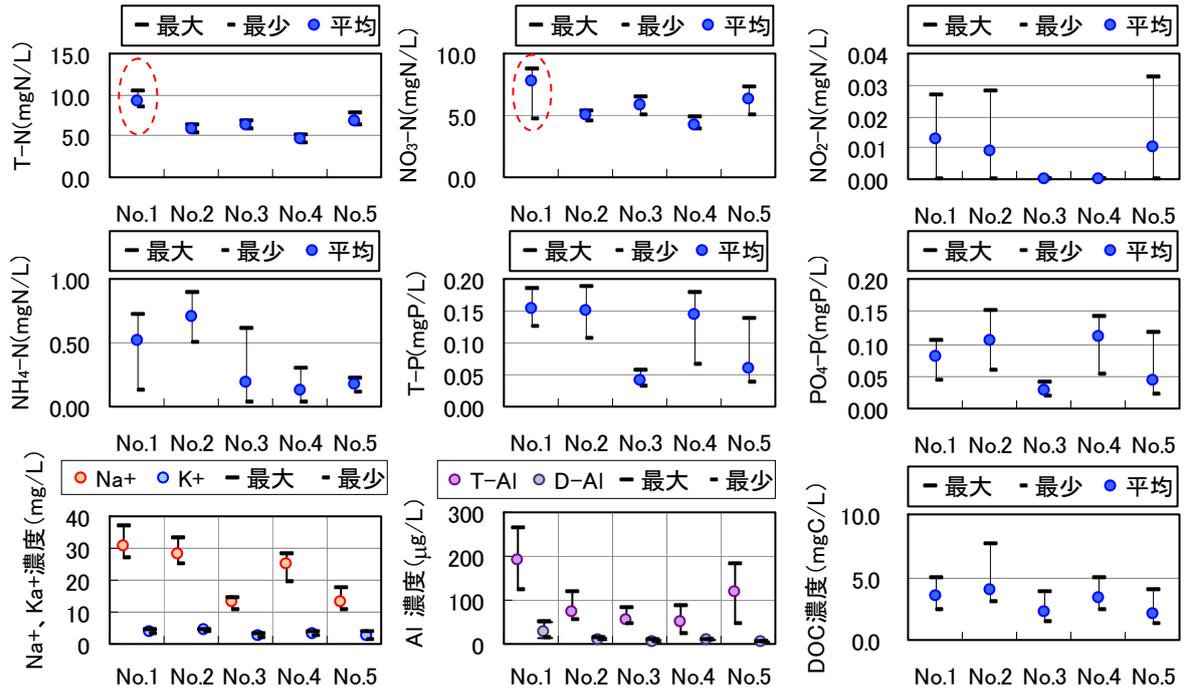


図-9 各調査地点の主要な水質項目の平均値 (印旛沼)

表-2 集水域の土地利用と水質の相関係数の一覧 (一般項目、窒素、リン、無機イオン) (印旛沼)

	土地利用割合 (%)						家畜飼育密度 (頭/km <sup>2</sup> )			人口密度 (人/km <sup>2</sup> )	
	田	畑	森林	市街地	荒地	道路等	豚	肉牛	乳牛	全人口	未処理
pH	0.24	-0.77	0.91	-0.14	-0.17	-0.21	-0.77	-0.90	-0.59	-0.43	-0.89
EC (ms/m)	0.43	0.17	-0.65	0.83	-0.57	0.85	0.50	0.61	-0.28	0.99	0.78
SS (mg/L)	-0.18	0.22	-0.29	0.35	-0.67	0.05	0.15	-0.24	-0.23	0.34	-0.09
VSS (mg/L)	-0.10	0.54	-0.77	0.36	-0.74	0.51	0.84	0.36	-0.21	0.75	0.65
DOC (mgC/L)	0.61	-0.06	-0.46	0.93	-0.56	0.90	0.28	0.52	-0.40	0.98	0.66
TN (mg/L)	-0.52	0.73	-0.64	-0.39	-0.17	0.00	0.91	0.34	0.23	0.13	0.54
D-TN (mg/L)	-0.52	0.72	-0.63	-0.40	-0.16	0.01	0.91	0.33	0.22	0.13	0.53
NH <sub>4</sub> -N (mg/L)	0.47	0.17	-0.61	0.63	-0.12	0.81	0.50	0.88	-0.02	0.82	0.95
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	-0.39	0.85	-0.92	0.00	0.16	0.09	0.83	0.82	0.64	0.33	0.83
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	-0.63	0.75	-0.57	-0.53	-0.08	-0.15	0.86	0.25	0.30	-0.03	0.42
TP (mg/L)	0.32	0.20	-0.62	0.82	-0.65	0.71	0.42	0.45	-0.28	0.92	0.61
D-TP (mg/L)	0.44	-0.02	-0.41	0.91	-0.54	0.65	0.11	0.33	-0.30	0.83	0.41
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	0.44	-0.04	-0.38	0.90	-0.52	0.62	0.07	0.31	-0.29	0.80	0.37
Na <sup>+</sup> (mg/L)	0.34	0.21	-0.65	0.78	-0.69	0.79	0.54	0.49	-0.34	0.97	0.70
K <sup>+</sup> (mg/L)	0.56	0.06	-0.56	0.78	-0.42	0.93	0.47	0.72	-0.28	0.96	0.86
Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	0.45	0.04	-0.42	0.46	-0.49	0.86	0.58	0.53	-0.42	0.79	0.76
Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	0.49	-0.67	0.58	0.36	0.35	-0.06	-0.91	-0.21	-0.06	-0.18	-0.47
Cl <sup>-</sup> (mg/L)	0.33	0.13	-0.53	0.82	-0.71	0.68	0.34	0.32	-0.36	0.89	0.50
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	0.37	0.27	-0.73	0.78	-0.44	0.81	0.56	0.74	-0.13	0.96	0.88

表-3 集水域の土地利用と水質の相関係数の一覧（金属類）（印旛沼）

	土地利用割合(%)						家畜飼育密度(頭/km <sup>2</sup> )			人口密度(人/km <sup>2</sup> )	
	田	畑	森林	市街地	荒地	道路等	豚	肉牛	乳牛	全人口	未処理
T-Fe(μg/L)	0.25	0.32	-0.64	0.34	-0.11	0.67	0.68	0.83	0.04	0.67	0.94
T-Mn(μg/L)	0.62	-0.06	-0.39	0.60	-0.14	0.87	0.37	0.76	-0.20	0.78	0.84
T-Cu(μg/L)	0.10	0.44	-0.79	0.56	-0.67	0.68	0.77	0.54	-0.21	0.89	0.78
T-Mo(μg/L)	0.68	-0.14	-0.32	0.79	0.16	0.71	0.01	0.81	0.07	0.67	0.70
T-B(μg/L)	0.48	0.07	-0.50	0.77	0.17	0.58	0.10	0.85	0.24	0.67	0.72
T-Zn(μg/L)	0.62	-0.01	-0.51	0.82	-0.38	0.94	0.39	0.71	-0.29	0.96	0.84
T-Al(μg/L)	-0.61	0.90	-0.83	-0.25	-0.24	-0.01	0.98	0.41	0.33	0.24	0.60
T-Ni(μg/L)	0.01	0.59	-0.88	0.51	0.06	0.38	0.56	0.90	0.47	0.63	0.86
T-Co(μg/L)	0.15	0.48	-0.81	0.45	0.04	0.56	0.66	0.97	0.32	0.69	0.99
T-Se(μg/L)	-0.03	0.19	-0.27	-0.08	-0.64	0.42	0.67	0.03	-0.47	0.39	0.37
D-Fe(μg/L)	0.51	-0.90	0.91	0.02	-0.24	0.10	-0.71	-0.73	-0.77	-0.21	-0.68
D-Mn(μg/L)	0.70	-0.14	-0.34	0.69	-0.25	0.93	0.31	0.69	-0.32	0.83	0.79
D-Cu(μg/L)	0.43	-0.07	-0.31	0.88	-0.47	0.55	-0.02	0.25	-0.26	0.73	0.29
D-Mo(μg/L)	0.69	-0.21	-0.23	0.78	0.24	0.64	-0.12	0.76	0.09	0.60	0.60
D-B(μg/L)	0.46	0.07	-0.47	0.75	0.22	0.52	0.06	0.83	0.28	0.61	0.68
D-Zn(μg/L)	0.72	-0.15	-0.38	0.96	-0.24	0.86	0.09	0.67	-0.22	0.89	0.68
D-Al(μg/L)	-0.18	0.57	-0.74	0.18	-0.68	0.45	0.91	0.34	-0.19	0.65	0.65
D-Ni(μg/L)	0.09	0.43	-0.71	0.59	0.17	0.30	0.29	0.81	0.49	0.54	0.69
D-Co(μg/L)	0.60	0.03	-0.54	0.81	-0.20	0.88	0.35	0.82	-0.12	0.90	0.87
D-Se(μg/L)	0.08	0.55	-0.86	0.42	-0.02	0.54	0.72	0.95	0.31	0.69	0.99

※相関係数0.7以上または-0.7以下のものは、着色して示した

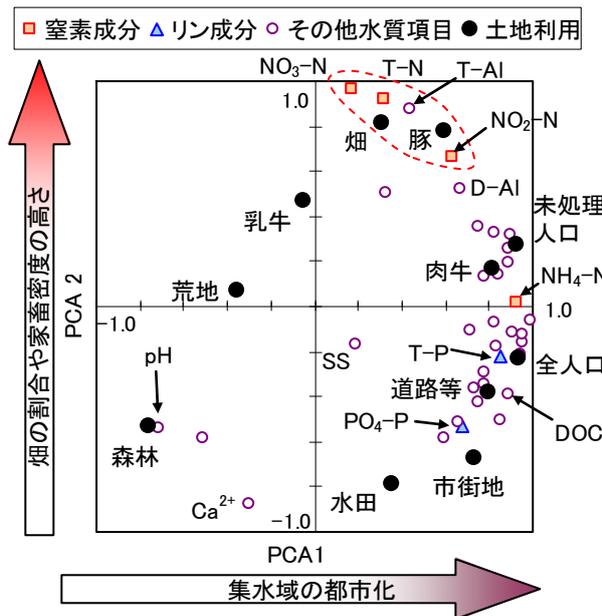


図-10 主成分負荷量プロットに基づく土地利用と各水質項目の関係（印旛沼）

図-11 に、原単位法で求めた各集水域の T-N、T-P 負荷量と、実測負荷量の比較を示す。T-N、T-P のいずれも、各集水域の負荷量多少の傾向は、原単位法と実測とで一致していることがわかる。T-P についてみると、No.1~5 のいずれも、実測負荷量が原単位法による負荷量より低くなった。河川水中の冬季の T-P 濃度が春季より低くなる傾向があることから、

実測負荷量が低く算出された可能性がある。利根川流域別下水道整備総合計画 (A) および第 6 次総量削減計画 (B) に基づく負荷量と、原単位調査事例 (C) に基づく負荷量を比較すると、原単位調査事例 (C) では畑の T-N 負荷量が大きく算出された。印旛沼流域における畑からの T-N の面原負荷量原単位は、様々な地域の調査事例の平均値よりも小さいと推測される。原単位などの妥当性を評価するためには、年間を通じた、また雨天時を含めた調査を行う必要がある。

#### 4. まとめ

霞ヶ浦流域と印旛沼流域を対象に、GIS を用いて河川ごとの土地利用状況を整理した。そして、各河川の土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度と窒素、リン、有機物濃度の関係を解析した。本研究で得られた主な知見を以下に示す。

霞ヶ浦流域の調査では、

(1) 河川水の NO<sub>3</sub>-N 濃度は集水域の畑の割合および豚の飼育密度と高い正の相関を示し、DOC 濃度は水田の割合と正の相関を示した。

(2) 主成分分析から土地利用と水質の関係の全体像を解析した結果、集水域の畑の割合や家畜飼育密度が高い河川で NO<sub>3</sub>-N 濃度が高くなる傾向が示された。

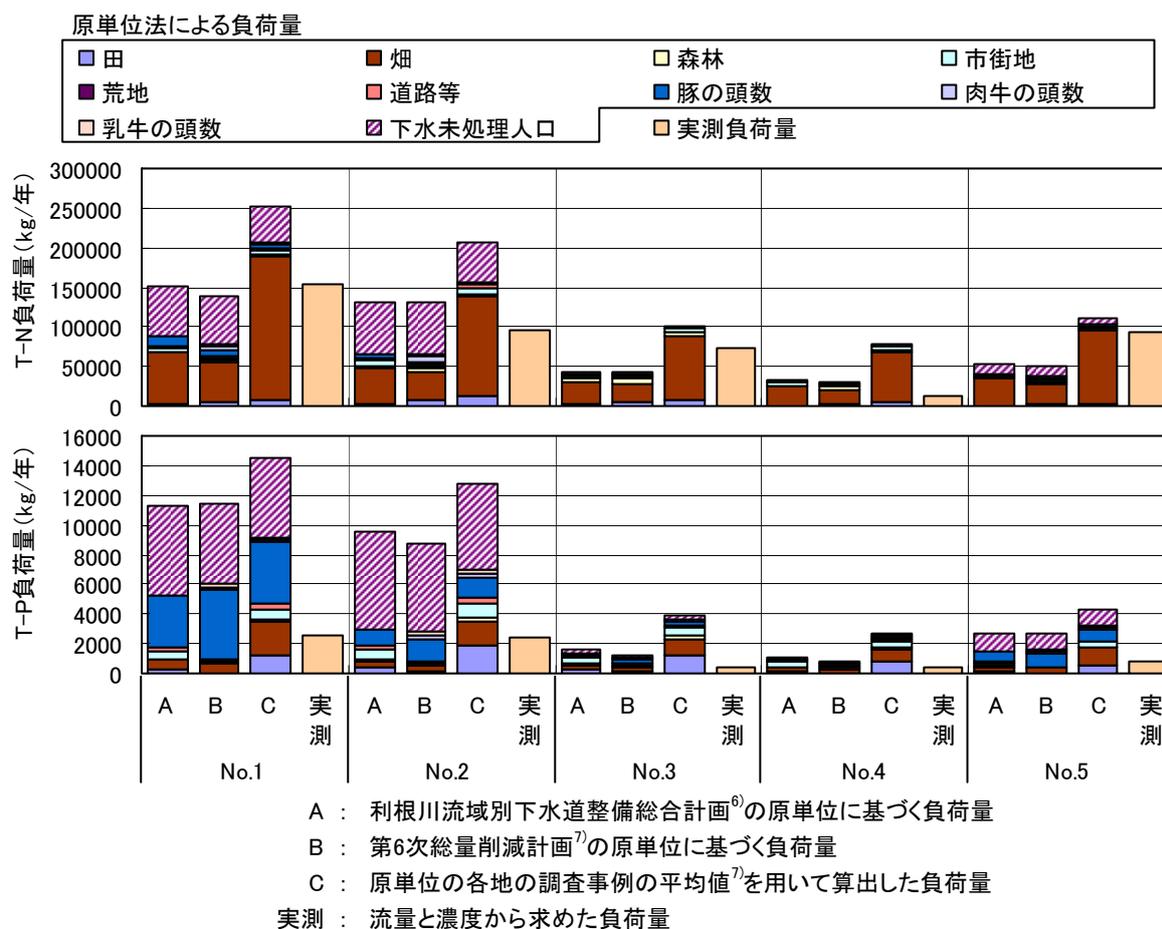


図-11 T-N、T-Pの原単位法による負荷量と実測負荷量の比較（印旛沼）

(3) 河川水のNO<sub>3</sub>-N濃度と集水域の土地利用の関係は、季節による違いは観られなかった。

印旛沼小流域の調査では、

(4) T-N、NO<sub>3</sub>-N濃度は畑の割合や豚の密度と正の相関を示した。

(5) T-P、PO<sub>4</sub>-P、NH<sub>4</sub>-N濃度は市街地の割合や人口密度と正の相関を示した。

(6) 微量金属については、Alが畑の割合や豚の飼育密度と正の相関を示した。

#### 参考文献

- 1) 国土数値情報（平成22年度版行政界データ、平成21年度版河川流域界データ、平成18年度版土地利用細分メッシュデータ）、国土交通省
- 2) 地図で見る統計（H17国勢調査－世界測地系（500mメッシュ）、2005年農林業センサス－農業（総数））、総務省統計局
- 3) 平成22年全国都道府県市区町村別面積調、国土交通省国土地理院
- 4) 吉村季織、福原亘治、三ツ木健一郎、高柳正夫（2011）、Microsoft Excelを用いたケモメトリクス計

算(4) - 主成分回帰 -、*Journal of Computer Chemistry, Japan*, 10(1), 32-43.

5) 平成21年度版下水道統計、日本下水道協会

6) 利根川流域別下水道整備総合計画 計画書より面原負荷量原単位（第5期湖沼水質保全計画）、500人槽以下の通常型合併浄化槽の排出負荷量原単位（第6次総量削減計画）、家畜の排出負荷量原単位（利根川流域総計画基本方針）、千葉県（2012）

7) 流域別下水道整備総合計画調査 指針と解説より原単位調査事例、第6次総量削減計画における原単位、日本下水道協会（2008）

8) 黒田清一郎、田淵俊雄(1996)、湧水中の硝酸態窒素濃度と負荷量の変動 - 野菜畑地からの硝酸態窒素流出特性に関する研究 (I) -、農業土木学会論文集、181、31-38.

9) 志村もと子、田淵俊雄(1996)、素掘貯留池を伴う養豚場が河川の窒素濃度に及ぼす影響 - 畜産主体の集水域における窒素流出に関する研究 (I) -、農業土木学会論文集、182、1-7.

## 土地利用や環境の変化が閉鎖性水域の水質・底質におよぼす影響に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水循環研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、平山孝浩、柴山慶行

### 【要旨】

本研究では、周辺流域の土地利用、閉鎖性水域内の水質や藻類の発生状況等の環境変化が、水質・底質に与える影響について明らかにすることを目的とする。まず、霞ヶ浦のリン濃度が上昇傾向であることに注目し、直上水のリン濃度を变化させた溶出試験を行った。直上水の濃度変化に比してリンの溶出傾向は低下しないことや金属の溶出傾向は項目によってばらつきがあること等、過去に霞ヶ浦で生じたリン濃度の上昇が溶出傾向に及ぼす影響について解析をした。また、桜川と恋瀬川の河口から底質を採取、分析することで流域からの負荷が底質と水質に及ぼす影響について考察した。

キーワード：霞ヶ浦、閉鎖性水域、底質、溶出試験、土地利用

### 1. はじめに

周辺が都市化している閉鎖性水域は、農業や工業、水道用水や人々のレクリエーション等に広く利用されているが、近年においては、水質改善傾向が鈍化しており（例えば霞ヶ浦<sup>1)</sup>）、良質で安全な水供給への社会的要請に対して答えきれていない状況である。COD<sub>Mn</sub>の低下やアオコ発生が減少する等、下水道の整備に代表される水質改善対策の効果が表れる一方で湖内の水質改善が停滞している理由として、底泥からの溶出<sup>2)</sup>や周辺流域からの栄養塩流入の変化<sup>3)</sup>が考えられているが、その詳細な機構については不明なままである。本研究では、底泥からの溶出機構の解明と、土地利用等の周辺流域の状況の変化が、閉鎖性水域内の水質と底質に及ぼす影響を解明することを目的として行うものである。

### 2. 直上水栄養塩濃度の変化にともなう溶出への影響に関する検討

#### 2.1 検討の概要

これまで、溶出対策としての浚渫効果を確認する研究<sup>4)</sup>や、底泥巻上げの影響評価のための研究<sup>5)</sup>、夏季の貧酸素や塩水の混入が溶出傾向に及ぼす影響に着目した研究<sup>6)7)</sup>等が実施されている。しかし、周辺流域や湖内の環境変化が底泥からの溶出に及ぼす影響に着目した研究は行われていない。例えば、霞ヶ浦においては、図 2-1、図 2-2 に示すように、近年では窒素濃度が横ばいで、湖内のリン濃度が漸増傾向にある<sup>3)8)</sup>。また、窒素濃度については西浦の流入河川水で減少傾向にある一方で北浦の流

入河川水では増加傾向にある<sup>9)</sup>ことが指摘されるなど、今後の影響が懸念されるところである。平成 23 年度は、以上のような状況にある霞ヶ浦を対象として、湖内のリン濃度が漸増傾向にあることに注目し、このことが霞ヶ浦の環境にどのようなインパクトを与えるのかを考察した後、その影響が溶出傾向に及ぼす変化を把握するために溶出試験を行った。

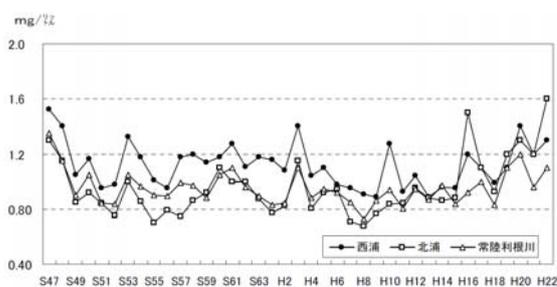


図 2-1 全窒素の経年変化<sup>1)</sup>

(霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画(第6期)より抜粋)

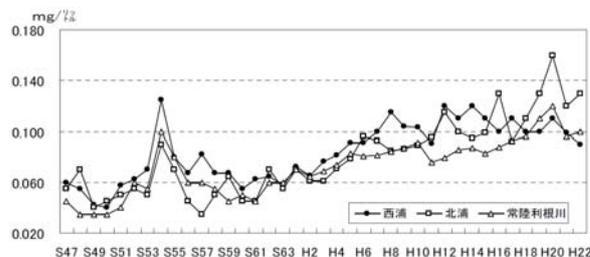


図 2-2 全リンの経年変化<sup>1)</sup>

(霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画(第6期)より抜粋)

## 2. 2. 霞ヶ浦の概要

霞ヶ浦は、西浦と北浦、外浪逆浦の3つの水域と北利根川、常陸利根川、颯川から構成される富栄養湖である。1963年の常陸川水門の閉鎖以前は汽水湖であったが、現在は淡水化している。平均水深4m、最大水深7mと水深が小さい湖であり、このような湖では季節変化に伴う安定した成層は形成されないため、一般的に底層が完全に嫌気化することはないが、霞ヶ浦のような富栄養化している湖においては下層が貧酸素化することが報告されている<sup>10)</sup>。この貧酸素層は、日成層の形成に伴い混合が抑制されるものの、風速10m程度の風により上層と下層が混合し消滅することが多い。しかし、風による混合がしばらく生じない場合や、湖沼の富栄養化による高濁度のために成層が強められる影響から、日成層がその日のうちに消滅せずに有機物の分解が進み下層が嫌気化する可能性もある<sup>11)</sup>。

霞ヶ浦において増加傾向にあるリンは、主に懸濁態状のものと推察される。それらは植物プランクトンとして存在したり、粒子に吸着されたりすることで湖水を漂っている。霞ヶ浦では、底質からの巻上げの影響により懸濁質が増加している<sup>12)</sup>ことも報告されており、湖水中のリンの中には、流入河川からの負荷以外にも巻上げの影響を受けているものも多くあると考えられる。それらの懸濁態状のリンは、下層の嫌気化とともに急速にオルトリン酸態リンとして溶出し、下層の溶解性リン濃度が増加すると予想されるが、そのことが水質や底質、溶出傾向に与える影響を調査した事例は見当たらない。

以上を踏まえて、直上水のオルトリン酸態リンが増加したときの溶出傾向の把握のために不攪乱柱状底泥を用い、溶出試験を実施した。

## 2. 3 実験条件

霞ヶ浦西浦湖心(N36.02.06.00、E140.24.27.00、世界測地系)から採取した内径200mm、厚さ30cmの柱状の底泥を20日間の溶出試験に供した。直上水は採泥と同時に底層から採水し、実験室に持ち帰った後、メンブレンフィルター(公称孔径1 $\mu$ m)を用いてろ過したものを用いた。実験条件は、溶存酸素とリン濃度の違いで4つのCaseを設定した(表2-1)。ここで、好気条件とは、直上水DOが10mg/L程度、低DO条件は1mg/L程度を指し、リン濃度操作は、PO<sub>4</sub>-P換算で1mg/L分のK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を添加することを指す。近年、霞ヶ浦の夏季のTPは0.1mg/L程度を示すことが多いが、底質のばらつきを考慮して、夏季の10倍程度の濃度になるように与えて影響を見る

ことにした。また、霞ヶ浦においては、下層の嫌気状態が生じるとしても短期間だと考えられることや、下層DOが4mg/Lを下回った時点でオルトリン酸態リン濃度が急激に増加する現象が観測されており<sup>12)</sup>、完全な嫌気条件にはしなかった。好気条件は空気曝気を定期的に行うことで、低DO条件は窒素ガスで散気した後パラフィンで厚さ1cmのシールをつくることで嫌気状態を維持した。温度は恒温室内で実験を行うことで20°Cを維持し、明暗条件は光量50 $\mu$ E/m<sup>2</sup>/sとし、12時間周期で切り替えて実験を行った。試料間のばらつきを防ぎ、また、溶出試験水の採水にともなう生じる直上水の減少が実験結果に及ぼす影響を最小限にするために、一つの実験条件あたり3本の柱状底泥を用いて試験を実施した。直上水を、0、1、3、5、7、10、15、20日目に採水し、COD<sub>Mn</sub>(河川水質試験方法(案)[1997年版]<sup>13)</sup>10.3.1)、TOC(同53.3.1)、TN(同53-6.3.1)、TP(同54-3.3.1)、PO<sub>4</sub>-P(同54-2.3.1)の水質分析を行い、さらに、0、1、5、10、20日目に採水した試料については、Fe、Mn、Al、Cu、Mo、Zn、NiのICP質量分析(河川水質試験方法(案)[1997年版]に記載の方法に準じる)を実施した。溶存態と懸濁態の分離には、ガラス繊維ろ紙(粒子保持能1 $\mu$ m)を用いた。また、採水と同時に直上水のpH、DOの測定を行った。

表2-1 溶出試験の実験条件

	溶存酸素条件	リン濃度
Case 1	好気条件	操作なし
Case 2	低DO条件	操作なし
Case 3	好気条件	操作あり
Case 4	低DO条件	操作あり

## 2. 4 結果と考察

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>添加前のPO<sub>4</sub>-Pは、0.001mg/L程度であったので、PO<sub>4</sub>-P換算で、約1000倍の濃度変化を実験条件として与えたことになる。

4ケースともpH、DOの測定結果に大きな変動は見られず、実験条件は管理されていたといえる。

ここでは、閉鎖性水域への負荷を把握するために、溶出量を算出し実験結果を考察する。20日目までのCOD<sub>Mn</sub>、窒素、リン、金属類の総溶出量算出結果を図2-3~2-5に示す。溶出量は以下の式で算出した。

$$R = \frac{\sum (V - \sum V_{n-1}) (C_n - C_{n-1})}{A}$$

ここで、 $R$ : 溶出量 ( $\text{mg}/\text{m}^2$ 、ただし微量金属類は $\mu\text{g}/\text{m}^2$ )、 $V$ : 初期の直上水量 (L)、 $V_n$ :  $n$  回目の採水量 (L)、 $C_n$ :  $n$  回目の濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ 、ただし微量金属類は $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )、 $A$ : コア断面積 ( $\text{m}^2$ ) である。ただし、金属類の 3、7、15 日目の濃度は経過日数によって重みづけし、線形で内挿して計算を行った。

Case1 と Case2 を比較すると、溶出量は低 DO 条件の方が、大きくなる傾向が確認できるが、リンや鉄、マンガンがほとんど溶出しな一方、窒素の溶出量の変化は少ないことが分かる。

次に Case3 と Case4 を比較する。リン濃度は通常の直上水より高い濃度が与えられたため、時間の経過とともに  $\text{PO}_4\text{-P}$  濃度の低下の影響から溶出量が負の値をとっている。しかし、Case3 の窒素溶出量は Case2 と同程度の溶出量を示しており、好気状態においても溶出量の増大につながることを示唆される。Case3 と Case4 の窒素溶出量を比較すると嫌気状態の方が、低い値を示しており、この原因は不明である。金属類については、Case1 と Case2 の比較と同様に、嫌気状態の溶出量増大が確認できる。

Case2 と Case4 は低 DO 条件でリン濃度の違いを与えて実験を行ったものである。窒素とリンの溶出は、リン濃度の上昇あり、なしに関わらず、生じている。直上水リン濃度を増加させるとリンの溶出量が減少することが予想されたが、溶出量の減少は半分程度であった。直上水のリン濃度上昇の割合と比べて減少量が少なかった理由は今後考察する必要がある。

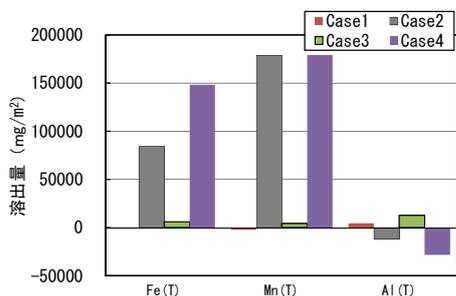


図 2-3 20 日目における溶出量比較

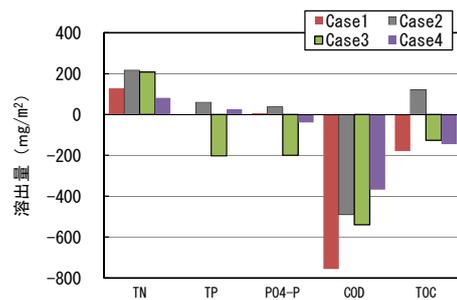


図 2-4 20 日目における溶出量比較

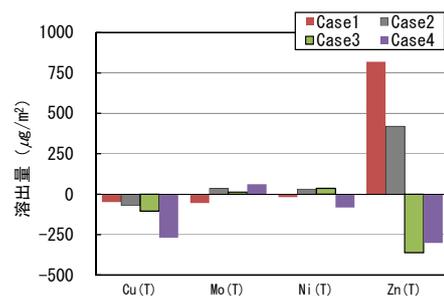


図 2-5 20 日目における溶出量比較

### 3. 流域の土地利用形態が閉鎖性水域の水質・底質に及ぼす影響に関する検討

#### 3.1 検討の概要

本章では、霞ヶ浦西浦に流入する河川を対象とし、その河口にて、採水と採泥を実施し分析を行うとともに、流域の土地利用状況を整理し、流域の状況が閉鎖性水域の水質・底質に及ぼす影響について考察する。対象河川は、桜川と恋瀬川、一の瀬川とし、河口付近において採水と採泥を実施し流域の土地利用状況と比較し、考察した。また、比較対象として西浦湖心と行方市西蓮寺沖も同様に試料採取及び、分析を行った。図 3-1 に採水・採泥地点を表 3-1 に調査地点の座標を示す。



図 3-1 採水・採泥地点

表 3-1 調査地点

調査地点	緯度経度 (世界測地系)	
西浦湖心 (St.1)	N36.02.06.00	E140.24.27.00
桜川河口 (St.2)	N36.04.32.00	E140.13.15.60
恋瀬川河口 (St.3)	N36.09.28.02	E140.18.46.84
一の瀬川河口 (St.4)	N36.03.10.85	E140.21.36.79
行方市西蓮寺沖 (St.5)	N36.03.57.04	E140.24.41.80

### 3. 2 水質・底質調査

#### 3.2.1 調査・分析方法

調査及び、採水と採泥は、2012年1月14～15日の晴天時に実施した。作業時間の確保のため、14日にSt.2を15日に残りの地点の採水・採泥を行った。底泥は、ダイバーにより内径70mmの亚克力パイプを用いて試料を複数本採取し、現地で底泥表層～10cm深、10～30cm深に切り分け混合した後、深さごとにビニール袋に入れ密閉し、冷蔵状態で実験室に持ち帰り速やかに分析を行った。また、底泥採取と同時に船上から表層(水面約0.5m下)、下層(底泥直上より約1m)の水を採水し、水質分析を行った。

底質の分析項目は、pH、全窒素、全リン、鉄、マンガ、亜鉛とし、分析方法は、「底質の調査・試験マニュアル 改訂第三版 社団法人底質浄化協会 平成15年3月」に記載の方法を参考に完全分解後に分析した。

水質分析については、SS(河川水質試験方法(案)[1997年版]11-1.3.1)、VSS(同11-3.3.1)、D-TOC(同53.3.1)、NH<sub>4</sub>-N(同53-2.4.2)、NO<sub>2</sub>-N(同53-3.3.1)、NO<sub>3</sub>-N(同53-4.3.2)、PO<sub>4</sub>-P(同54-2.3.1)、TN(同53-6.3.1)、DTN、TP(同54-3.3.1)、DTP、とし、Fe、Mn、Cu、Mo、Zn、Al、NiのICP質量分析(河川水質試験方法(案)[1997年版]に記載の方法に準じる)も実施した。ろ紙は2.2と同じものを用いた。

#### 3.2.2 分析結果

図3-2～3-4に水質一般項目の分析結果を示す。窒素濃度について比較するとSt.2とSt.3が高い値をとっており、St.1、St.4、St.5はほとんど変わらない値である。St.4の一の瀬川は規模が小さく、St.5付近には規模の大きな流入河川は無いことから、St.1、St.4、St.5の水質分析値は霞ヶ浦に滞留している水質を表していると考えられる。したがって、図3-2のSt.2とSt.3の値の差は流域からの流入水の影響によると考えられる。図3-3のTPと図3-4のSSの傾向は良く似ているが、St.3の表層の部分でSSが少なく定量されている。St.3で溶存態リンが高い値を

示している理由は不明である。St.2とSt.3、St.5の下層でSSやTPが高い値を示しているのは、気象庁土浦観測所によると1月14日の最大瞬間風速が12.2m/s、1月15日は4.9m/sとなっており、St.2については14日の巻き上げの影響が、St.3とSt.5については14日に巻き上げた粒子で沈降が不十分なものの影響が考えられる。St.1とSt.4の上層と下層で差が生じていないことは、湖心付近では静水時、巻き上げ時ともに上下層で濁度差がほとんどない<sup>12)</sup>ことが報告されていることから、妥当な結果だといえる。しかし、St.5では、下層のTNは上層と変わらない値を示していることから、図3-2～3-4の結果の原因は、流入河川水や底質の性状の調査結果を踏まえて判断するべきだと考える。

図3-5～3-14には金属類の分析結果を示したものである。Fe、Mn、AlについてはSt.1とSt.4で似たような傾向を示しており、St.2とSt.3、St.5ではFeとAl濃度が高いのが特徴的である。Znでは、St.2、St.3、St.4で他の地点よりも高い値を示していることが分かる。MnとMoは地点間の大きな差異は認められなかった。

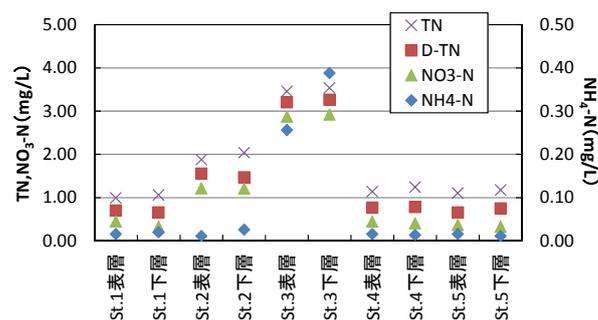


図 3-2 水質分析結果 (窒素)

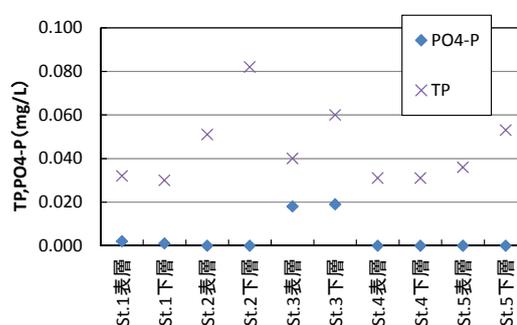


図 3-3 水質分析結果 (リン)

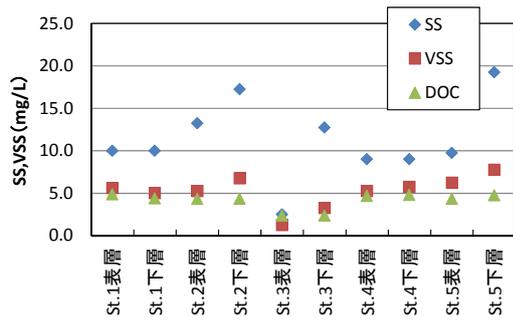


圖 3-4 水質分析結果 (SS、VSS、DOC)

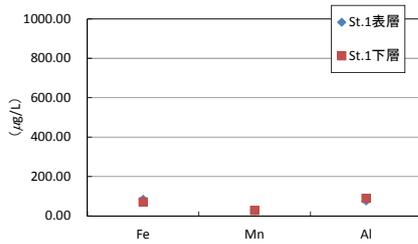


圖 3-5 水質分析結果 (St. 1①)

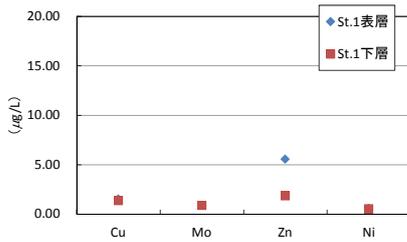


圖 3-6 水質分析結果 (St. 1②)

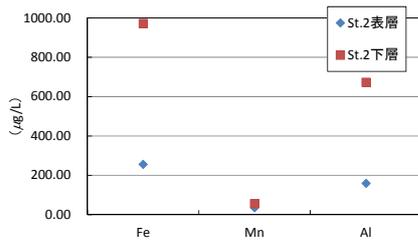


圖 3-7 水質分析結果 (St. 2①)

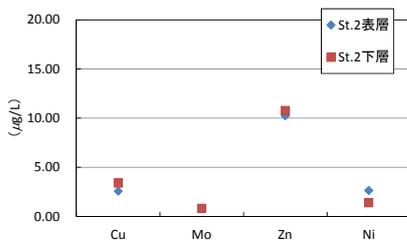


圖 3-8 水質分析結果 (St. 2②)

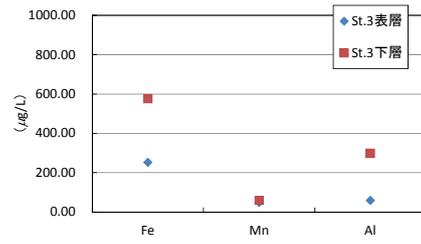


圖 3-9 水質分析結果 (St. 3①)

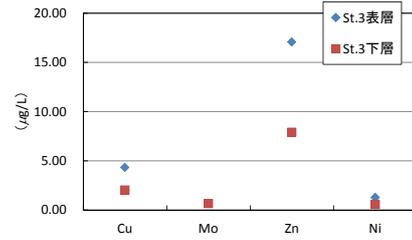


圖 3-10 水質分析結果 (St. 3②)

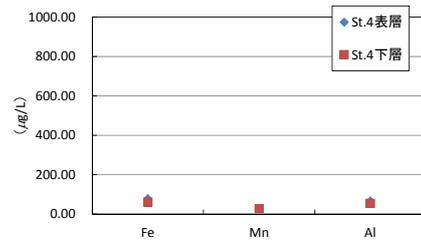


圖 3-11 水質分析結果 (St. 4①)

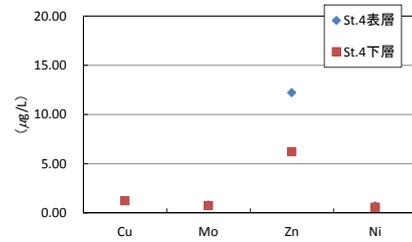


圖 3-12 水質分析結果 (St. 4②)

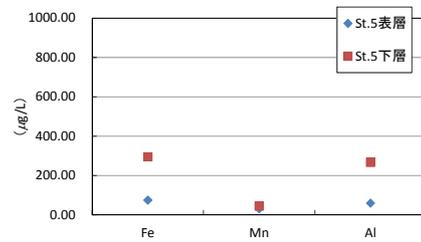


圖 3-13 水質分析結果 (St. 5①)

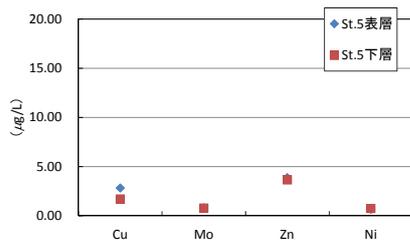


図 3-14 水質分析結果 (St. 5②)

次に、窒素とリン、鉄、マンガン、亜鉛の含有量分析結果を中心に考察を行う。

窒素とリンの分析結果について、図 3-15～3-16 に示す。リン含有量について、St. 5 の値が高いのは、付近で養殖が盛んに行われているためである<sup>15)</sup>。表層～10cm 深よりも、10～30cm 深の値が高いのは、1980 年代以降の生産量の減少や適正飼育の指導、飼料改善など養殖状況の変化の反映<sup>16)</sup> が影響している可能性がある。St. 2 と St. 3 では、窒素濃度が低い傾向が見られたが、一方で全リンの値を比較すると変化が見られない。窒素含有量の差については次のような仮説が考えられる。

①過去の霞ヶ浦浚渫事業の効果

西浦では過去に土浦沖と高崎・高浜沖で浚渫が実施されており、その効果により窒素含有量が低く定量された可能性がある。しかし、今回の採泥地点は、浚渫域と直接重なっている地点ではなく、河口付近であった。周辺の浚渫による影響も否定できないが、St. 3 で窒素含有量が高いことの説明がつかず、浚渫事業のみでこの分析結果を説明することはできないと考える。

②流域からの流入負荷の差によるもの

流域から流入してくる負荷の差が、底質の差につながったと考え、流入水の窒素懸濁態 (PON) に注目し考察した。

まず、採泥と同時に採水した試料の水質分析結果を上層と下層で平均して比較する。桜川河口と恋瀬川河口で、TN が、1.96mg/L、3.5mg/L、PON が 0.45mg/L、0.26mg/L となり、桜川河口の方が PON は高い値をとった。

1 回のみ分析結果では、底質に与える影響を把握できないため、国土交通省霞ヶ浦河川事務所が公開している霞ヶ浦における水質分析結果を用いて考察を行った。対象地点は、桜川河口が掛馬沖、恋瀬川河口が高崎沖と対応すると考え、期間を 2008～2011 年にしぼり PON と PTP 及び Chl-a 濃度について整理したものが、図 3-17 である。図 3-4 より、冬季においては、PON、PTP とともに近い値をとるが、春～夏にかけて、高崎沖では、PON が

1(mg/L)程度の高い値をとることが多い一方で、掛馬沖では、1(mg/L)を超えることは少ない。リン濃度も同様の増減傾向であり、また、値が高崎沖の方が高い。これらの懸濁質は、沈降により、底質を形づくる可能性が高いことから、図 3-17 により底質の窒素とリンの含有量の差を説明できると考えられる。

次に、図 3-15 の水質差が流域からの負荷によるものかを考察する。掛馬沖と高崎沖は、今回採泥した地点よりも沖合に位置し、桜川と恋瀬川の流入水質を直接代表するものではない。今回採水した水の PON は、0.45mg/L、0.26mg/L であり、比較すると冬季の値と良い一致を示すことや、桜川と恋瀬川が他河川に比べ流量が大きい河川であることから、冬季については流入河川水質を代表しているとして問題ないと考えられる。

一方で、春季や夏季に高い値を示すのは藻類の発生が分析結果に影響を与えている可能性がある。図 3-17 では、窒素とリンの増減傾向とクロロフィル濃度の増減傾向はよく似ており、相関があることが分かる。しかし、これだけでは、流入河川の水質が藻類の発生に影響を及ぼし図 3-15 と図 3-16 の結果につながったのか、滞留している水質が藻類の発生に影響を及ぼし分析結果につながったのかは不明である。今後、夏季を中心とした河川水の採水を行い、流域からの流入水の影響について精査する必要がある。

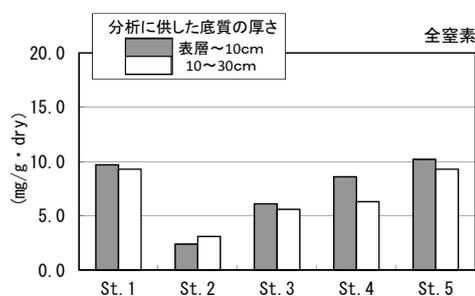


図 3-15 底質含有量分析結果 (全窒素)

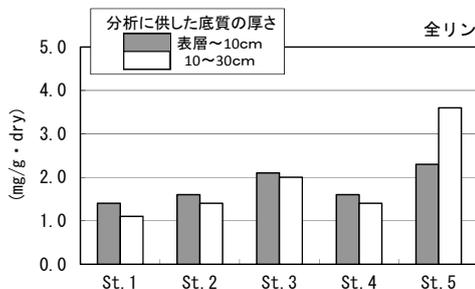


図 3-16 底質含有量分析結果 (全リン)

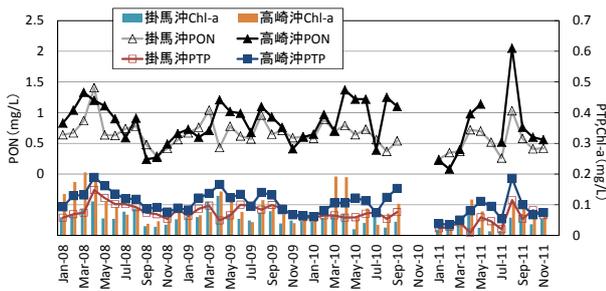


図 3-17 掛馬沖と高崎沖における PON と PTP 及び Chl-a の比較

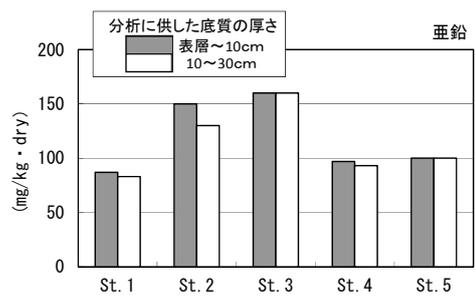


図 3-20 底質含有量分析結果 (亜鉛)

鉄、マンガン、亜鉛の含有量の分析結果について図 3-18~3-20 に示す。過去の調査によると、亜鉛は人間活動に伴い環境中に排出されて蓄積されやすい元素であり、琵琶湖の大津市付近で最高濃度を示した結果<sup>16)</sup>がある。霞ヶ浦における調査でも底泥中の亜鉛は高い含有量を示しているとの報告がある<sup>17)</sup>。今回の調査でも同様の結果を得ており、St.2 と St.3 の亜鉛含有量が高いのは、人間活動が寄与していると思われる。しかし、堆積環境が汽水から淡水へ変化した影響を考慮する必要性も指摘されている<sup>17)</sup>。流入経路と堆積の過程も不明確であるため、この結果を説明するためにはさらなる文献調査や現地調査が必要と思われる。鉄は、地点間の差異は確認できず、マンガンは湖心の表層の値が高いことが特徴として挙げられる。

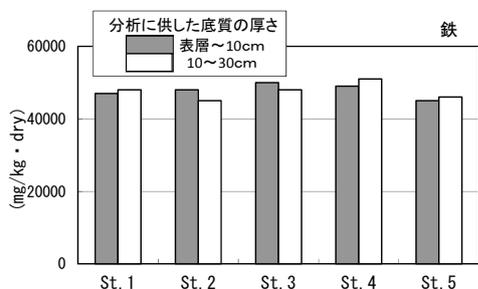


図 3-18 底質含有量分析結果 (鉄)

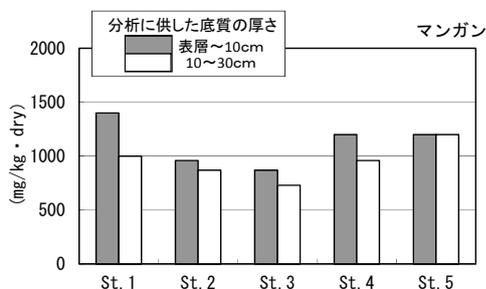


図 3-19 底質含有量分析結果 (マンガン)

### 3.3 流域の土地利用状況の整理

#### 3.3.1 流域情報データの収集

国土地理院発行の数値地図 50m メッシュ (標高) と、国土数値情報 土地利用細分メッシュデータ (平成 18 年)、2005 年農林業センサスを加工ソースとして収集した。

#### 3.3.2 流域情報データの整理

水質・底質調査で対象とした桜川流域と恋瀬川流域、及び一の瀬川流域について、数値地図 50m メッシュ (標高) より流域を設定し、土地利用細分メッシュデータを用いて、流域ごとの土地利用状況を整理した。図 3-21~3-23 に流域全体の面積に占める割合で表したものを示す。桜川流域と恋瀬川流域を比較すると田や森林面積、建物用地に違いがみられる。また、一の瀬川流域には畑用地が多いことが特徴として挙げられる。今後、これらのデータを参考にしつつ、水質と底質の分析結果を解析していく予定である。

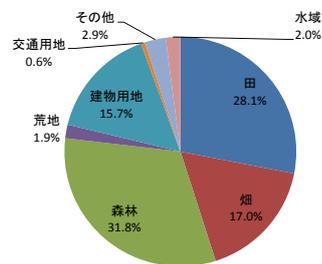


図 3-21 桜川流域

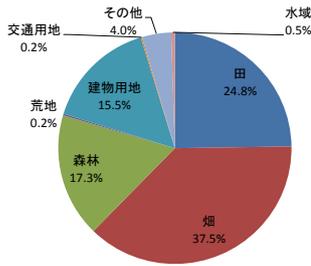


図 3-22 一の瀬川流域

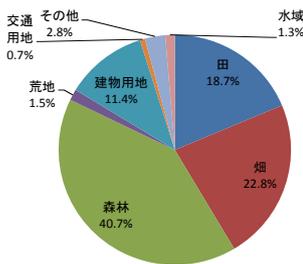


図 3-23 恋瀬川流域

#### 4. おわりに

本報告では、霞ヶ浦を対象とし、周辺環境の変化に伴って閉鎖性水域の水質と底質がどのような挙動を示すのかを明らかにすることによって、今後の水質改善対策に寄与する知見を提供することを目的として実施している。まず、直上水の水質を調査させた際の溶出傾向の変化について確認した。次に、流域の土地利用等の違いによって、閉鎖性水域の水質と底質に与える影響について調べた。桜川と恋瀬川を対象として実施し、地点間によって差が底質の含有成分が異なることが分かった。しかし、底質の違いが、流域間の特性によるものなのか、滞留している湖水の影響なのかはデータが考察に使用したデータが不足していることから判断できなかった。今後は、夏季における河川水の分析等により、流域からの影響について解析していく必要がある。

#### 参考文献

- 1) 茨城県、栃木県、千葉県：霞ヶ浦に係る湖沼水質保全計画（第6期）、pp.1-3、平成24年3月
- 2) 岩佐義朗編著：湖沼工学、山海堂、p.295、1990
- 3) 川村修平、福島武彦、恩田祐一、今井章雄、松重一夫：湖沼への流入負荷水質及び底質の関係、第38回日本水環境学会年会講演集、p.587、2004
- 4) 田中宏明、小森行也、佐々木稔、李建華、和田順之輔：底

泥一水間の物質移動に関する調査、下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料 No.3917、p.327、2003

- 5) 中園孝裕、阿部千雅、鈴木穰：霞ヶ浦の底泥表層の巻き上げ時における栄養塩類と鉄・マンガンの溶出特性、環境システム計測制御学会、14巻、p.45、2009
- 6) 秋元さおり、久岡夏樹、中園孝裕、南山瑞彦、鈴木穰：汽水湖底泥からの金属溶出特性に関する研究、第45回日本水環境学会年会講演集、p.136、2011
- 7) 中園孝裕、久岡夏樹、鈴木穰、南山瑞彦：汽水湖（油ヶ淵）における底泥からの溶出特性に関する研究、第44回日本水環境学会年会講演集、p.252、2010
- 8) 永井孝志、今井章雄、松重一夫、福島武彦：霞ヶ浦における藻類優占種変遷の要因～鉄が原因か？～、第38回日本水環境学会年会講演集、p.587、2004
- 9) 松森聖治、板橋直：霞ヶ浦流域の主要河川の窒素濃度変化とその要因解明、農村工学研究所技報、No.210、pp.61-73、2009
- 10) 外岡建夫、浜田篤信：1988年に霞ヶ浦で発生した酸素欠乏について、茨城県内水面水産試験場調査研究報告、No.26、pp.48-59、1990
- 11) 石川忠晴、田中昌宏、小関昌信：浅い湖の日成層が水質に及ぼす影響、土木学会論文集、No.411/II-12、pp.247-254、1989
- 12) 関智弥、福島武彦、今井章雄、松重一夫：霞ヶ浦の濁度上昇と底泥巻き上げ現象、土木学会論文集 G、Vol.62No.1、pp.122-134、2006
- 13) 湖沼技術研究会：湖沼における水理・水質管理の技術、6-169、2007
- 14) 建設省河川局監修：河川水質試験方法（案）[1997年版]、技報堂出版、1997年
- 15) 小松信行、石井祐一、渡辺圭司、本間隆満、北村立実、根岸正美、岩崎順：富栄養化した霞ヶ浦の堆積物に養殖の痕跡を残すリンの形態と分布、陸水学雑誌、No.69、pp.193-208、2009
- 16) 井内美郎、中尾征三、横田節哉、村上文敏、斎藤文紀、寺島滋、寺島美南子、竹内三郎、吉川秀樹、志岐常正、太井子宏和、徳岡隆夫、公文富士夫：湖沼汚染底質の堆積機構解明に関する研究、環境庁環境保全研究成果集、No.42、pp.64.1-64.14、1986
- 17) 寺島滋、井内美郎、斎藤文紀、宮田雄一郎、片山肇、寺島美南子：湖沼浚渫域の底質における元素の鉛直分布と化学的性質、地質調査所月報、No.42、pp.387-407、1991

## 水環境中における未規制化学物質の挙動と生態影響の解明

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、北村友一、村山康樹

## 【要旨】

近年、医薬品などの生活に関連した未規制化学物質による水環境の微量汚染や、その生理活性に由来する水生生物への影響が懸念されており、新たな環境問題として注目されている。効率的、効果的なリスク削減対策を講じるためには、多様な化学物質について水環境中における挙動、生態系に与える影響などの解明を進める必要がある。本研究課題では、環境リスクが比較的高いと考えられる未規制化学物質を対象として、河川流域における実態把握と環境中動態の解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に対して与える影響を評価することを目的とした。

キーワード：未規制化学物質、環境中動態、環境リスク評価、医薬品

## 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ことが求められている。

本研究課題では、水質汚濁防止法などの規制対象外となっている化学物質、特に生理活性物質などについて、水環境における環境リスクが懸念されるも

のを検討した上で、それらの物質を対象として水環境中での実態把握と挙動解明を行うとともに、これらの物質が水生生態系に対して与える影響を評価することを目的としている。

## 2. 対象化学物質の選定

本研究チームではこれまで、医薬品類等生理活性物質を対象として、分析法の開発や水環境中における実態把握、生態リスクの検討などを進めてきた<sup>1)</sup>。本年度の調査では、過去の研究成果を基に、河川中において水生生物に対する生態リスクの懸念が指摘されている医薬品類 10 物質を調査対象に選定した。対象物質には抗生物質や殺菌剤、解熱消炎剤などが多く含まれ、PNEC が ng/L オーダーと強い生態毒性

表 2 H23 年度調査の対象物質

物質名	CAS No.	主な効用	PNEC(μg/L) <sup>2)</sup>	
Azithromycin	アジスロマイシン	83905-01-5	マクロライド系抗生物質	0.019
Bezafibrate	ベザフィブラート	41859-67-0	高脂血症治療薬	10.
Caffeine	無水カフェイン	58-08-2	中枢興奮・強心・利尿剤	5.2
Clarithromycin	クラリスロマイシン	81103-11-9	マクロライド系抗生物質	0.02
Crotamiton	クロタミトン	483-63-6	かゆみ止め軟膏	3.5
Ibuprofen	イブプロフェン	15687-27-1	消炎・鎮痛・解熱剤	130.
Ketoprofen	ケトプロフェン	22071-15-4	消炎・鎮痛・解熱剤	0.16
Levofloxacin	レボフロキサシン	100986-85-4	フルオロキノロン系合成抗菌剤	0.079
Sulfamethoxazole	スルファメトキサゾール	723-46-6	サルファ剤(感染症治療薬)	1.6
Triclosan	トリクロサン	3380-34-5	殺菌剤	0.002

を示すものもある。

### 3. 調査方法

#### 3.1 調査地点及び調査時期

H23年度は、流域特性の異なる関東地方の4つの流域に計30箇所の調査地点を設定し、延べ71試料の採水、分析を行った。

##### 3.1.1 多摩川

多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である(延長138km、流域面積:1240km<sup>2</sup>、流域人口:約380万人(H17年)<sup>2)</sup>)。代表的な都市河川であり、高度成長期の急激な流域の都市化の影響を受けて水質が悪化したが、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い改善が進み、近年では中流域(多摩川原橋)の水質は、BOD2mg/L程度で推移している(2001年以降の環境基準はB類型、BOD3mg/L)。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては河川流量の5割以上を下水処理水が占める状態となっている。

下水道整備地域の河川流域における微量汚染化学物質の実態・挙動を検討することを目的として、H23年度は、6/10、10/17、1/31、2/16の4回調査を行った。調査地点の概要を図3.1に示す。

##### 3.1.2 印旛沼流入河川

印旛沼は、千葉県北西部を集水域とし、利根川および東京湾に接続する湖沼である(流域面積:約494km<sup>2</sup>、流域人口:約77万人(H23年)<sup>3)</sup>)。昭和30年代以降、流域の都市化に伴う生活排水の増加などにより水質汚濁が問題となり、1985年に指定湖沼に指定されている。下水道や合併処理浄化槽の整備などの施策が推進されてきたものの、COD75%値は

10mg/L(H22年度)と依然として環境基準(A類型、COD:3mg/L)の達成には至っていない

H23年度は、印旛沼流入河川の鹿島川・高崎川の流域において、生活系排水や畜産系、面源系の流入状況が異なると考えられる地点5箇所を選定し、

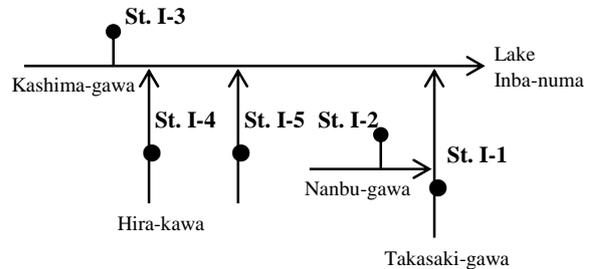


図 3.2 印旛沼の調査地点概況

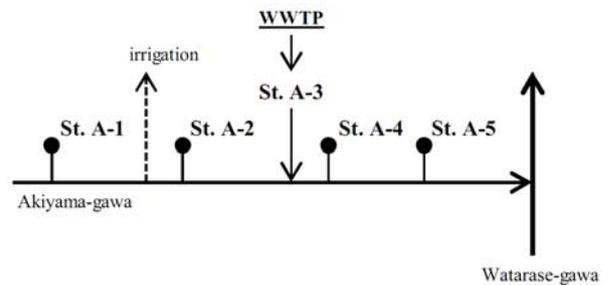


図 3.3 秋山川の調査地点概況

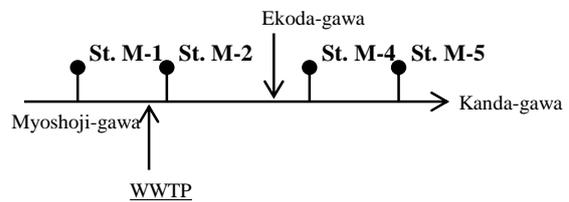


図 3.4 妙正寺川の調査地点概況

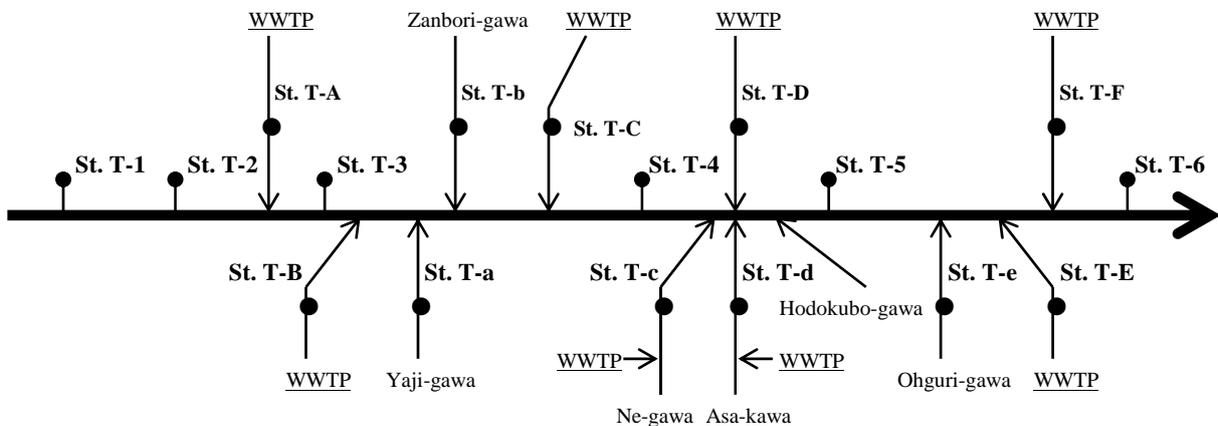


図 3.1 多摩川の調査地点概況

1/12、1/19 の 2 回調査を行った。調査地点の概要を図 3.2 に示す。

### 3.1.3 秋山川

秋山川は、栃木県佐野市を流れる、利根川水系渡良瀬川の支川である（延長：37.7 km、流域人口：約 4.4 万人（H17 年）<sup>4)</sup>）。市街を流下する中下流域では水質汚濁が見られたが、下水道や農業集落排水などの整備などにより、近年では BOD 2mg/L 程度で推移している（C 類型、BOD 5mg/L）。

終末処理場の流入地点より下流では、河川流量に対する下水処理水の寄与が大きくなっていることから、流下過程における微量汚染化学物質の挙動を検討することを目的として調査地点に選定した。H23 年度は、12/19、2/9 の 2 回、調査を行った。調査地点の概要を図 3.3 に示す。

### 3.1.4 妙正寺川

妙正寺川は、東京都区部西部を流れる、荒川水系神田川の支川である（延長：9.7 km、流域面積：21.4 km<sup>2</sup>、流域人口：36.6 万人（H12 年）<sup>5)</sup>）。近年は BOD 2mg/L 程度で推移している（類型指定なし）。

秋山川と同様に、終末処理場の流入地点より下流では、河川流量に対する下水処理水の寄与が大きくなっていることから、流下過程における微量汚染化学物質の挙動を検討することを目的として、2/13 に調査を行った。調査地点の概要を図 3.4 に示す。

## 3.2 調査方法

### 3.2.1 水質分析

#### (1) 一般項目

水質一般指標として、水温、pH、溶存酸素濃度（DO）、電気伝導度（EC）、懸濁物質（SS）、溶解性有機炭素（DOC）、全窒素（T-N）、アンモニア態窒素（NH<sub>4</sub>-N）、亜硝酸態窒素（NO<sub>2</sub>-N）、硝酸態窒素（NO<sub>3</sub>-N）、全りん（T-P）、りん酸態りん（PO<sub>4</sub>-P）を分析した。水温、DO、電気伝導度は、調査地点において携帯型水質測定器を用いて測定した。その他の項目は、ガラス瓶、またはポリビンに満水状態で採水し、冷蔵状態で試験室へ持ち帰った後、「下水試験方法<sup>6)</sup>」に準じた方法で分析を行った。DOC の測定には全有機炭素計（TOC-5000A、（株）島津製作所）を用い、各態窒素・りんの測定には、連続流れ分析装置（TRAACS800, Bran+Luebbe, Inc）またはイオンクロマトグラフ（DX-100, カラム：IonPac AS-12A, 日本ダイオネクス（株））を用いた。

#### (2) 医薬品類

表 2 に示した医薬品類 10 物質を調査対象とした。試料中の溶存態成分および懸濁態成分（一部の試料のみ）について、Triclosan は、Nakada *et al.*<sup>7)</sup>の方法を参考に抽出、濃縮、アセチル化等の前処理を行った後、GC-MS を用いて測定した。その他の物質は小西ら<sup>8)</sup>の方法を参考に抽出、濃縮等の前処理を行った後、LC-MS/MS を用いて測定した。定量は、GC-MS 法、LC-MS/MS 法ともに、多摩川の 6/10 採水試料のみは絶対検量線法、その他の試料は同位体希釈法により定量した

### 3.2.2 流量観測

物質収支や挙動の検討に用いるため、一部の調査地点において、「河川砂防技術基準（案）<sup>9)</sup>」に準じて流量観測を行った

## 4. 調査結果

対象とした医薬品類 10 物質の検出濃度をグラフにまとめた結果を図 4.1 に示す。各物質とも比較的高い検出率を示し、特に Caffeine 及び Crodamiton は全ての試料から検出された。物質ごとに検出濃度は、いずれも 2~4 桁の幅で分布がみられ、地点により大きく異なっていた。また、図 2 に示した PNEC と比

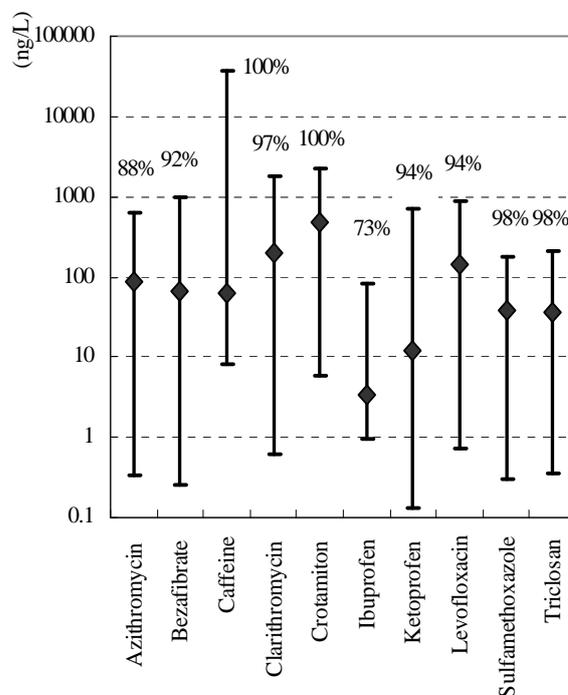


図 4.1 対象医薬品類 10 物質の検出状況（グラフ中のプロットは全試料に対する中央値、バーは検出値の最大及び最小、数字は検出率）

較すると、Bezafibrate、Ibuprofen、Sulfamethoxazoleを除く7物質ではPNECを超過する濃度で検出された試料があり、Azithromycin、Clarithromycin、Levofloxacin、Triclosanでは中央値もPNECを上回っていた。

一般水質項目と調査対象物質の、流域における存在実態や挙動の詳細の一部について以下に例示する。

図 4.2 および図 4.3 は、多摩川の 2/16 調査におけ

る Clarithromycin および Triclosan の検出状況である。下水道整備が進んだ都市河川流域において、これらの医薬品類の流入負荷に対して下水処理水が大きく寄与していることが確認できる。下水処理水の影響のない支川ではほとんど検出されていないのに対して、下水処理水の流入する支川、排水樋管では Clarithromycin は 1000ng/L 程度、Triclosan は 100ng/L 程度と高濃度に存在し、それらが流入する多摩川本

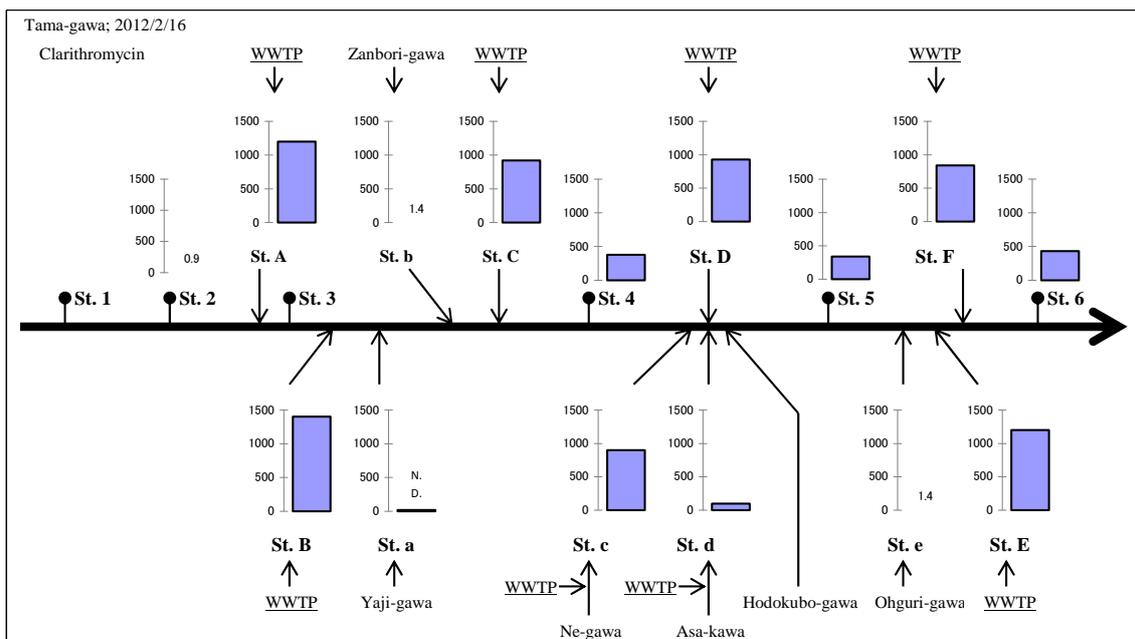


図 4.2 2/16 調査における多摩川流域の Clarithromycin 検出状況

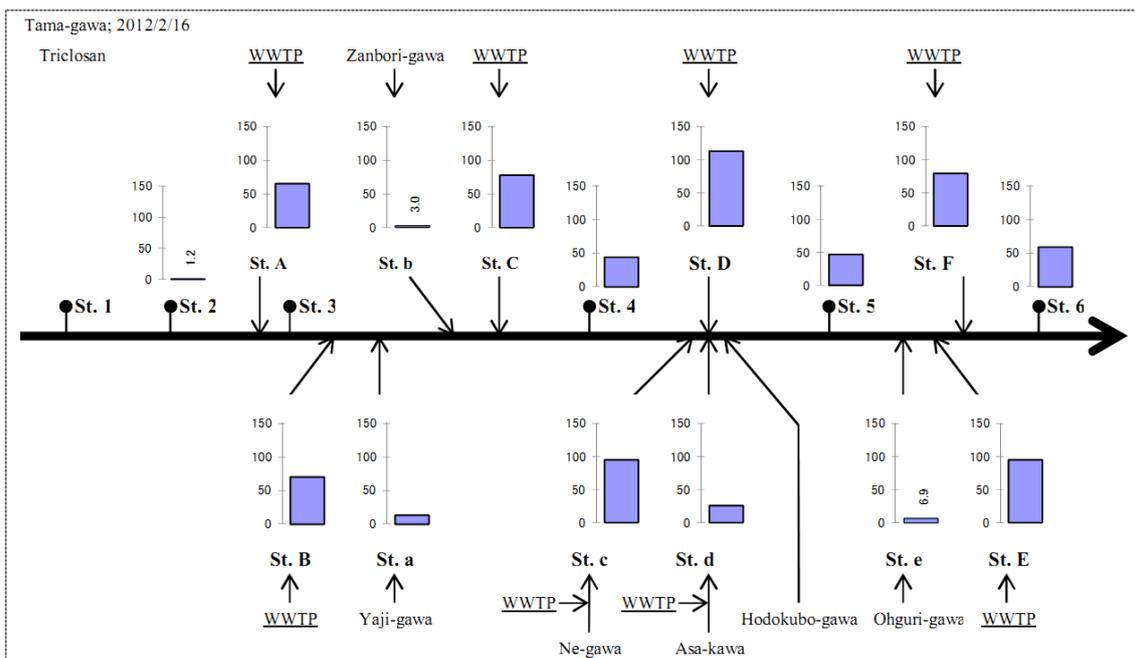


図 4.3 2/16 調査における多摩川流域の Caffeine 値検出状況

川においても、概ね処理場排水樋管の半分程度の濃度検出された。これらの濃度は水生生物に対する予測無影響濃度（Clarithromycin; 20ng/L、Triclosan; 2ng/L）を大きく上回っていることから、生態リスクが懸念され、詳細な検討が必要と考えられる。

図 4.4 は、印旛沼流入河川の 2/16 調査における 10 物質の検出状況である。Caffeine は 5 地点ともに比較的高濃度に検出されたが、特に St. I-1、St. I-2 では 10,000 $\mu$ g/L 以上存在していたのに対し St. I-3~5 では 100ng/L 程度と 100 倍の差がみられた。一方で

Crotamiton の濃度は 5 地点全てで 100ng/L 程度であり、大きな差はみられなかった。

図 4.5 は、秋山川の 2/9 調査における Ketoprofen の検出状況である。St. A-3 で 550ng/L と比較的高濃度の流入により、その下流の St. A-4 でも 240ng/L が検出されたが、さらに下流の St. A-5 では 21ng/L まで濃度が低下していた。St. A-4 と St. A-5 の区間（約 2.0km）では水の流出入がほとんど見られないことから、下水処理水中に残留していた Ketoprofen は河川中において速やかに分解または除去されたと考え

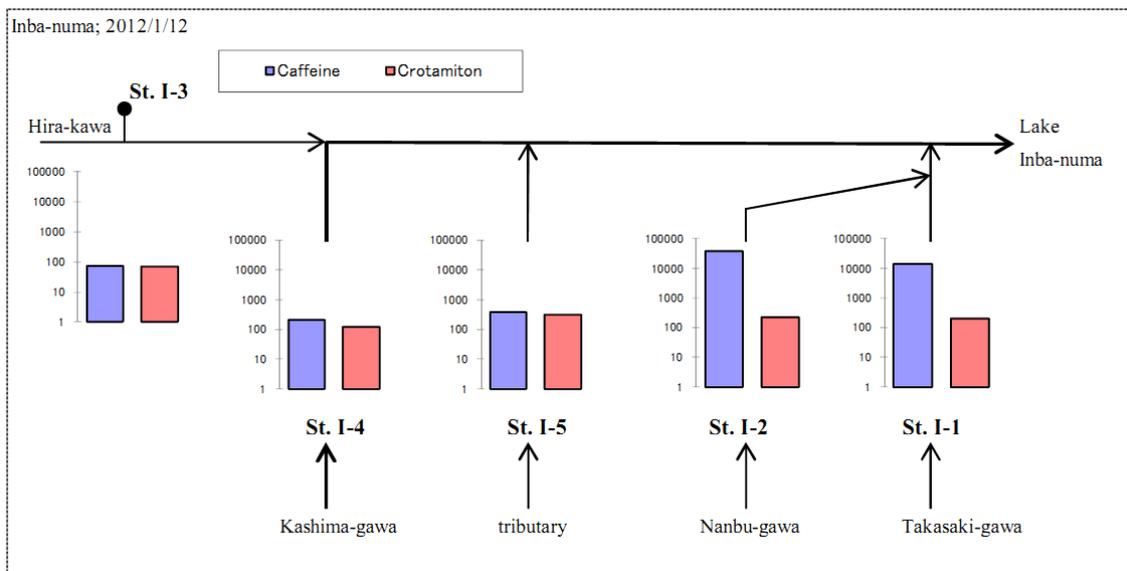


図 4.4 1/12 調査における鹿島川流域の Caffeine、Crotamiton 検出状況

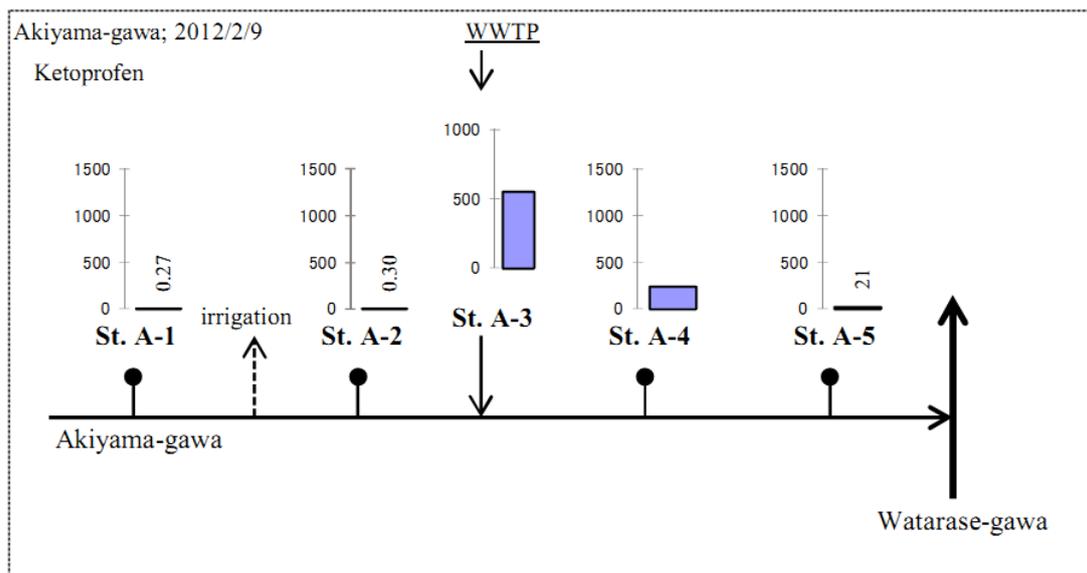


図 4.3 2/9 調査における秋山川の Ketoprofen 検出状況

られる。Ketoprofen は高い光分解性を有することが報告されている<sup>10)</sup>。

## 5. まとめ

本年度は、過去の研究成果を基に、水生生態リスクが懸念されている医薬品類 10 物質を調査対象とした。関東地方の 4 つの流域に計 30 箇所の調査地点を設定し、延べ 71 試料を採水し、分析を行った。

対象とした物質は、いずれも比較的高い検出率を示し、特に Caffeine 及び Crotamiton は全ての試料から検出された。いずれの物質も検出濃度は 2~4 桁の幅があり、存在実態は地点により大きく異なっていた。また、Clarithromycin や Triclosan などでは、水生生物に対する予測無影響濃度を上回る濃度で検出される地点も多くみられた。流下過程での Ketoprofen の大きな濃度低減や、流域における Caffein 濃度の偏在などがみられ、流域スケールでの未規制化学物質の存在実態や挙動の把握を進める必要が示された。

今後は、さらに調査データを集積するとともに、流域条件の整理や、室内実験などによる物性データの収集を進めることで、未規制化学物質の流域スケールでの動態把握、検証を進める予定である。また、これまで検討対象となっていない未規制化学物質についても、生態毒性試験やリスク評価を進め、環境影響が懸念される物質については、順次、調査対象に加えることが必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 南山瑞彦 他：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，平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集，土木研究所資料 No.4212，pp.239-265 (2011)
- 2) 国土交通省：一級水系における流域等の面積、総人口、一般資産額等について，  
[http://www.mlit.go.jp/river/toukei\\_chousa/kasen/ryuiki.pdf](http://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen/ryuiki.pdf)  
(2012 年 4 月確認)
- 3) 千葉県：印旛沼に係る湖沼水質保全計画(第 6 期)，2012
- 4) 国土交通省関東地方整備局：第 2 回利根川流域別下水道総合計画懇談会 資料-2，2008
- 5) 第 4 回神田川流域水循環系再生構想検討委員会 資料-2 参考資料，  
<http://www.mlit.go.jp/tochimizushigen/mizsei/toshisaisei/ka ndagawa4/shiryo2s.pdf> (2012 年 4 月確認)
- 6) 建設省都市局下水道部，厚生省生活衛生局水道環境部：下水試験方法 1997 年版，社団法人日本下水道協会，1997
- 7) Norihide Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K and Takada H: Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, *Water Res.*, **40**, pp.3297-3303, 2006
- 8) 小西千絵，宝輪勲，中田典秀，小森行也，鈴木穰，田中宏明：水環境中医薬品の LC-MS/MS による一斉分析法の検討，*環境工学研究論文集*，**43**，pp.73-82，2006
- 9) 建設省河川局 監修，日本河川協会編集：建設省河川砂防技術基準(案)同解説 調査編，技報堂出版，1997
- 10) 花本ら：水環境中における医薬品類の光分解に関する検討，*日本水環境学会年会講演集*，**45**，pp.535，2011

## 下水処理プロセスにおける化学物質の制御技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、小森行也、北村友一、村山康樹

### 【要旨】

近年、社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質を対象とした環境汚染実態に関する調査が進められ、河川、湖沼等の水環境に対する主要な排出源が下水道であることが明らかになりつつある。医薬品類には、クラリスロマイシン等の抗生物質の一部に生態影響が指摘されているものがある。また、PRTR では、人の健康や生態系に悪影響を及ぼすおそれがある物質（化管法第一種指定化学物質）を対象としている。医薬品類、PRTR 対象物質の一部の物質については、既往調査により下水処理場での除去特性について明らかになっているものがあるが、多くの物質の水環境での存在実態は未だに解明されていない。下水道を経由する化学物質の環境インパクトを考えると調査未実施の多く化学物質についての実態解明は急務であり、早期に下水道での実態を把握するとともに、処理水中に残存する物質については新たな除去手法の開発等、リスクを低減するための制御技術の開発を行う必要がある。平成 23 年度は、優先的に調査が必要な化学物質の選定とその分析方法の検討を行った。

キーワード：医薬品、PRTR、分析方法、LC-MS/MS、GC/MS

### 1. はじめに

社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質（462 物質）については、環境分野や水道分野において実態調査が進められており、主要な排出源が下水道であることが明らかになりつつある。医薬品類には、クラリスロマイシン等の抗生物質の一部に生態影響が指摘されているものがある。また、PRTR では、人の健康や生態系に悪影響を及ぼすおそれがある物質（化管法第一種指定化学物質）を対象としている。医薬品類、PRTR 対象物質の一部の物質については、既往調査により下水処理場での除去特性について明らかになっているものがあるが、多くの物質についての実態は不明である。下水道を経由する化学物質の環境インパクトを考えると調査未実施の多く化学物質についての実態解明は急務であり、早期に下水道での実態を把握するとともに、処理水中に残存する物質については新たな除去手法の開発と併せて、リスクを低減するための制御技術の開発を行う必要がある。

本研究は、①優先的に調査が必要な化学物質を選定し、その分析方法を提案する。②下水処理プロセスにおける除去特性の把握と下水処理プロセスにおける総毒性の除去特性の把握を行う。③下水処理水中に残存する化学物質と総毒性の除去手法を提案することを目的としている。

平成 23 年度は、優先的に調査が必要な化学物質の選定

とその分析方法の検討を行った。

### 2. 調査対象化学物質の選定

#### 2.1 医薬品類

過年度の調査又は既往研究より、河川及び下水処理水中に残存している医薬品類<sup>1)~3)</sup>で水生生物に対する生態リスクが大きい可能性が指摘されている物質<sup>4)~6)</sup>を本研究の調査対象物質として選定した。河川又は下水処理水から検出された医薬品類の最高濃度と各検出医薬品類の予測無影響濃度（PNEC）との比較により表-1 に示す 10 物質を選定した。

表-1 調査対象医薬品

物質名	用途
Azithromycin (アジスロマイシン)	抗生物質
Bezafibrate (ベザフィブラート)	高脂血症用剤
Caffein (カフェイン)	強心剤
Clarithromycin (クラリスロマイシン)	抗生物質
Crotamiton (クロタミトン)	鎮痒剤
Ibuprofen (イブプロフェン)	解熱鎮痛消炎剤
Ketoprofen (ケトプロフェン)	解熱鎮痛消炎剤
Levofloxacin (レボフロキサシン)	合成抗菌剤
Sulfamethoxazole (スルファメトキサゾール)	サルファ剤
Triclosan (トリクロサン)	殺菌剤

#### 2.2 PRTR 対象物質

PRTR 対象物質の 1 つであるノニルフェノール（種-政令番号：1-320）は、中央環境審議会水環境部会の水生生物

保全環境基準専門委員会において「水生生物の保全に係る水質環境基準」の項目追加について検討が行われている物質である。また、類似物質の4-ノニルフェノール(分岐型)と4-t-オクチルフェノール(4-t-OP)は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010-(平成22年7月、環境省)<sup>7)</sup>によれば、SPEED'98における取組みのなかでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察された物質である。EXTEND2005における取組みでも調査が行われ、ノニルフェノールの甲殻類(アミ類)に及ぼす影響に関する実験において、環境水中濃度よりやや高い濃度のノニルフェノールはアミ類の脱皮を抑制することで成長阻害を引き起こすことが認められたと報告されている。環境省が行ってきた化学物質の生態影響試験結果<sup>8)</sup>によれば、ノニルフェノールはミジンコ急性遊泳阻害試験の48h-EC50が0.059mg/L、繁殖阻害試験の21day-NOECが0.089mg/L、魚類急性毒性試験の96h-LC50が0.24mg/Lと報告されている。また、4-t-オクチルフェノールについては魚類急性毒性試験の96h-LC50が0.36mg/Lと報告されている。

このようにノニルフェノール及び4-t-オクチルフェノールは水生生物に対し毒性を有することから水系リスクをもたらす物質と考えられることから本調査における調査対象物質とした。

また、アルキルフェノール(AP)は、界面活性剤のアルキルフェノールポリエトキシレート(ApEO)が好気条件下で生物分解し、エトキシ鎖の短いアルキルフェノールエトキシレート(AP1EO、AP2EO)又は、エトキシ鎖の短いアルキルフェノールエトキシ酢酸(AP1EC、AP2EC)になることが知られている。ApEOは嫌気条件下で生物分解を受けエトキシ鎖の短いアルキルフェノールエトキシレート(AP1EO、AP2EO)又は、アルキルフェノール(AP)になる。好気・嫌気条件下で生物分解を受けエトキシ鎖の短くなったこれらの物質は、嫌気条件下の汚泥処理によりAPとなる<sup>9)</sup>。APの調査においては前駆物質であるAPEO、APECもあわせて調査することが重要となる。

本調査では、アルキルフェノール類のうち、アルキルフェノール(AP)はノニルフェノール(NP)と4-t-オクチルフェノール(4-t-OP)、アルキルフェノールエトキシレート(APEO)はノニルフェノールエトキシレートのエトキシ基数が1~15(NP(1)EO~NP(15)EO)、オクチルフェノールエトキシレートのエトキシ基数が1~10(OP(1)EO~OP(10)EO)、アルキルフェノールエトキシ酢酸(APEC)はノニルフェノールエトキシ酢酸のエトキシ基数が0、1~9(NP(1)EC~NP(10)EC)、オクチルフェノールエトキシ酢酸のエトキシ基数が0、1~2(OP(1)EC~OP(3)EC)を調

査対象物質とした。

### 3. 調査対象化学物質の分析方法

#### 3.1 医薬品類

調査対象医薬品として選定した10物質の分析は、LC/MS/MSによる一斉分析(9物質)と、GC/MSによる分析(トリクロサン)とした(表-2参照)。

LC/MS/MSによる一斉分析は、小西ら<sup>10)</sup>の方法を参考に抽出・濃縮等の前処理を行った後、LC-MS/MSを用いて測定する方法とした。また、GC/MSによるトリクロサン分析は、宝輪ら<sup>11)</sup>の方法を参考に抽出・濃縮・誘導体化等の前処理を行った後、GC/MSを用いて測定する方法とした。

表-2 医薬品分析方法

物質名	分析方法
アジスロマイシン ベザフィブラート カフェイン クラリスロマイシン クロタミトン イブプロフェン ケトプロフェン レボフロキサシン スルファメトキサゾール	固相抽出/LC-MS/MS (一斉分析)
トリクロサン	固相抽出/GC-MS

LC/MS/MSによる医薬品分析9物質一斉分析フローとGC/MSによるトリクロサン分析フローを図-1、図-2に示す。

医薬品9物質の一斉分析は、図-1の分析フローに従い、前処理(抽出・精製)した後、サロゲート法により定量した。各対象物質について、横軸に検量線溶液中の濃度、縦軸にサロゲート物質との面積値の比をとり、検量線(直線近似式)を求めた。この検量線に測定試料中の対象物質とサロゲート物質との面積値の比を代入して、バイアル中の濃度を算出後、最終液量及び試料量から試料中濃度を求めた。試料量200mLで前処理した場合の検出下限値は、アジスロマイシン(2.2ng/L)、ベザフィブラート(4.1ng/L)、カフェイン(12.4ng/L)、クラリスロマイシン(8.1ng/L)、クロタミトン(0.3ng/L)、イブプロフェン(0.9ng/L)、ケトプロフェン(1.1ng/L)、レボフロキサシン(3.3ng/L)、スルファメトキサゾール(5.8ng/L)であった。

トリクロサンの分析は、図-2の分析フローに従い、前処理(抽出・精製)した後、試料濃度の算出は内部標準法で行った。各対象物質について、横軸に検量線溶液中の濃度、縦軸に対象物質面積値 / IIS 面積値比をとり、検量線(直線近似式)を求めた。ここで、トリクロサンのIISには、GC/MSカラム保持時間の近い、p-テルフェニル

-d14 を用いた。この検量線に試料中の対象物質面積値 / IIS 面積値比を代入して、バイアル中の濃度を算出後、最終液量及び試料量から試料中濃度を求めた。これを Label 化体の回収率によって補正した濃度を算出した。

検量線の濃度範囲は試料ピーク面積値の大きさに合わせて適宜設定した。その際、濃度段階が 4 点以上となるようにした。試料量 200mL で前処理した場合の検出下限値は、10.8ng/L であった。

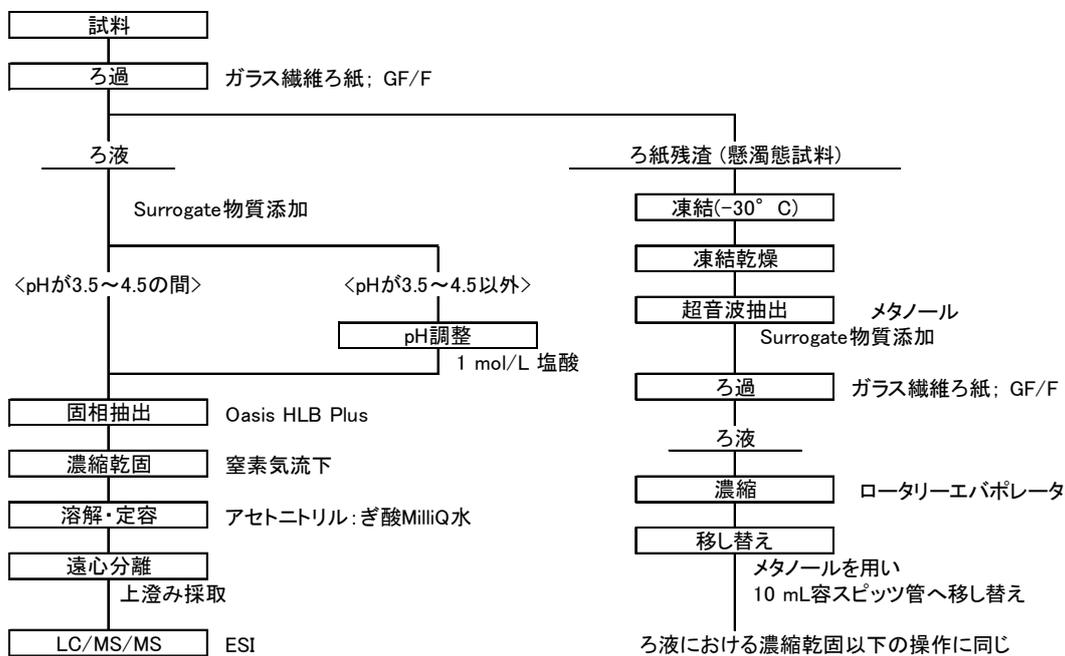


図-1 LC/MS/MS による医薬品分析 9 物質一斉分析フロー

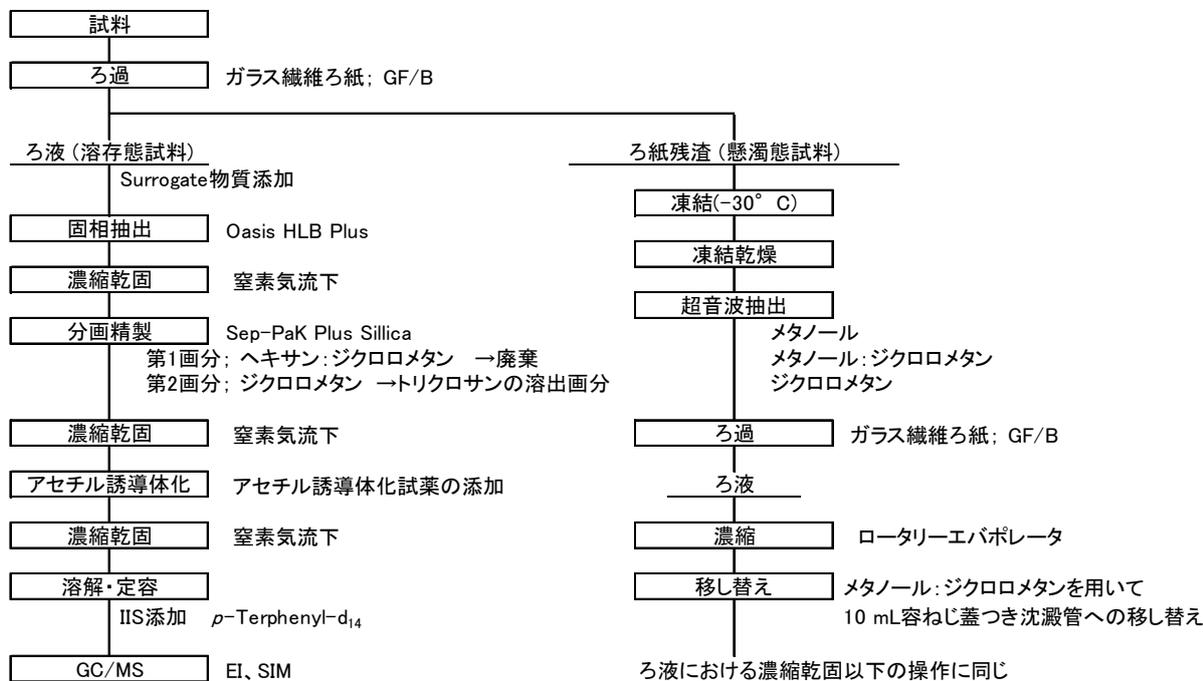


図-2 GC/MS によるトリクロサン分析フロー

### 3. 2 PRTR 対象物質

アルキルフェノール類の分析は、既往研究・調査報告等<sup>12)~21)</sup>を参考に下水試料に最も適した方法を選択した。NP、4-t-OPの分析は、GC/MSにより定量する方法、NPEC、OPEC、NPEO、OPEOはLC-MS/MSにより定量する方法とした。

NP、4-t-OPの分析は、図-3に示すとおり、ろ液試料は、ジクロロメタンによる液-液抽出の後、5%含水シリカゲルを用いて不純物を除いたのちガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)計により定量した。SS試料は、アセトンを用いて超音波抽出を行った後精製水に溶解した。その後は、

ろ液試料と同様の操作により定量した。

NPの検出下限値は25ng/Lであり、5試料について試験した分析操作BLは、29~75ng/Lであった。また、流入下水にNPを100ng添加して行った添加回収試験の結果、回収率は92%であった。

4-t-OPの検出下限値は1.6ng/Lであり、5試料について試験した分析操作BLは<1.6~2.7ng/Lであった。また、流入下水に4-t-OPを15ng添加して行った添加回収試験の結果、回収率は76%であった。

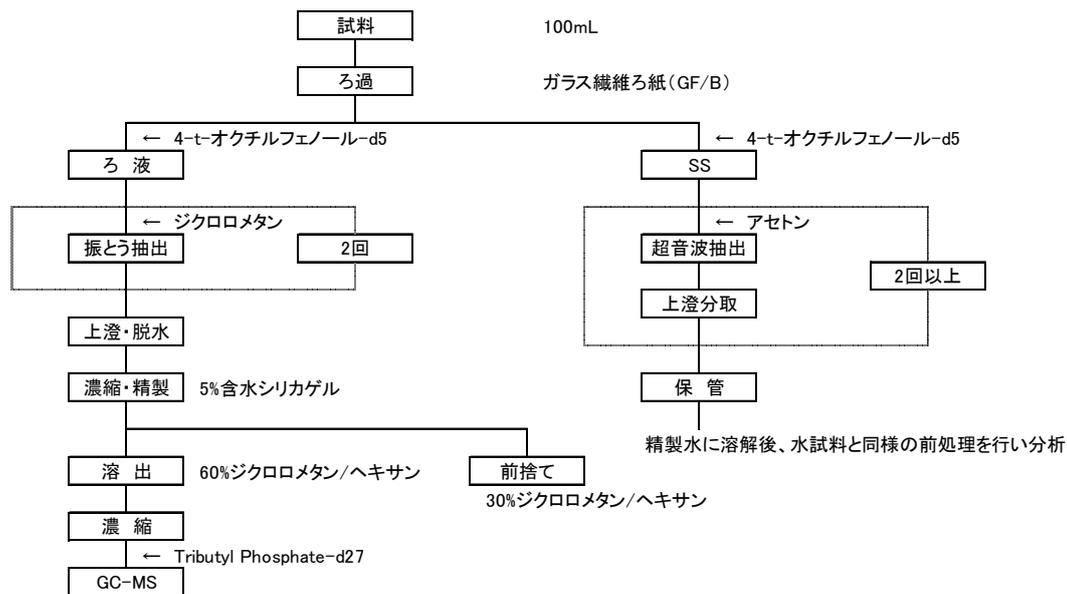


図-3 NP、4-t-OPの分析フロー

EC、OPECの分析は、図-4に示すとおり、ろ液試料は、pH2に調整した後EDS-1による固相抽出による方法とした。メタノールとメタノール/酢酸エチルにより溶出した後、精製し(液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS/MS)計により定量した。SS試料は、メタノールを用いて超音波抽出を行った後精製水に溶解した。その後は、ろ液試料と同様の操作により定量した。

NPECの検出下限値は0.7ng/L~6.1ng/Lであり、4試料について試験した分析操作BLは、すべて検出下限値以下

であった。また、流入下水にNP(1)EC~NP(10)ECをそれぞれ50ng添加して行った添加回収試験の結果、NP(1)EC~NP(10)ECの回収率は74%~90%であった。

OPECの検出下限値は0.7ng/L~5.3ng/Lであり、4試料について試験した分析操作BLはすべて検出下限値以下であった。また、流入下水にOP(1)EC~OP(3)ECをそれぞれ50ng添加して行った添加回収試験の結果、OP(1)EC~OP(3)ECの回収率は75%~93%であった。

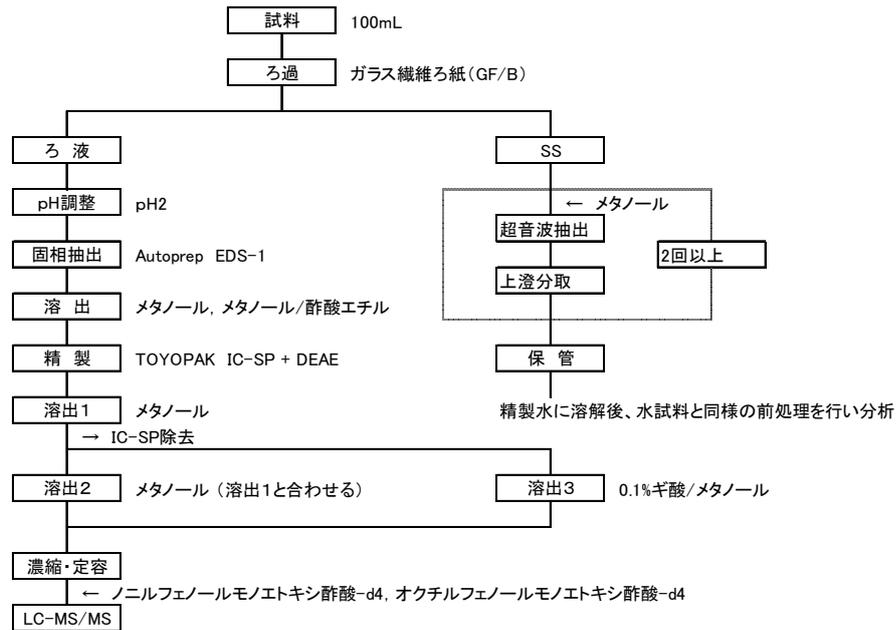


図-4 NPEC、OPEC の分析フロー

NPEO、OPEO の分析は、図-5 に示すとおり、ろ液試料は、pH2 に調整した後 EDS-1 による固相抽出による方法とした。メタノールとメタノール/酢酸エチルにより溶出した後、精製し（液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS/MS）計により定量した。SS 試料は、メタノールを用いて超音波抽出を行った後精製水に溶解した。その後はろ液試料と同様の操作により定量した。

NPEO の検出下限値は 1.1ng/L～7.0ng/L であり、4 試料について試験した分析操作 BL は、2.0ng/L～16ng/L で

あった。また、流入下水に NP(1)EO～NP(15)EO をそれぞれ 200ng 添加して行った添加回収試験の結果、NP(1)EO～NP(15)EO の回収率は 86%～97%であった。

OPEO の検出下限値は 1.0ng/L～2.8ng/L であり、4 試料について試験した分析操作 BL はすべて検出下限値以下であった。また、流入下水に OP(1)EO～OP(10)EO をそれぞれ 200ng 添加して行った添加回収試験の結果、OP(1)EO～OP(10)EO の回収率は 71%～103%であった。

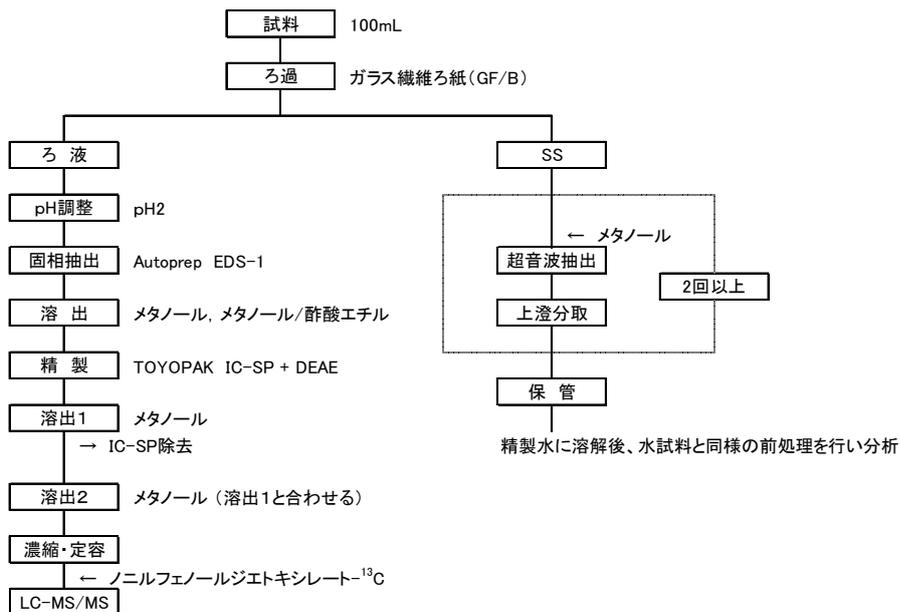


図-5 NPEO、OPEO 分析フロー

#### 4. まとめ

優先的に調査が必要な医薬品類として、河川及び下水処理水中に残存し、水生生物に対する生態リスクが大きい可能性が指摘されている10物質を選定した。また、PRTR対象物質からは、NPとその関連物質の4-t-OP、NPEC、OPEC、NPEO、OPEOを選定した。選定した医薬品類(10物質)及びNP及びその関連物質の分析は、前処理(抽出・精製)後、GC/MS又はLC-MS/MSにより定量する方法を提案した。

医薬品10物質のうちトリクロサンを除く9物質はLC-MS/MSによる一斉分析とし、各物質の検出下限値は、アジスロマイシン(2.2ng/L)、ベザフィブラート(4.1ng/L)、カフェイン(12.4ng/L)、クラリスロマイシン(8.1ng/L)、クロタミトン(0.3ng/L)、イブプロフェン(0.9ng/L)、ケトプロフェン(1.1ng/L)、レボフロキサシン(3.3ng/L)、スルファメトキサゾール(5.8ng/L)であった。また、トリクロサンはGC/MSによる分析で検出下限値は10.8ng/Lであった。

NP、4-t-OPは、GC/MSによる分析とし検出下限値はそれぞれ25ng/L、1.6ng/Lであった。NPEC、OPEC、NPEO、OPEOはLC-MS/MSにより分析とし検出下限値はそれぞれ0.7~6.1ng/L、0.7~5.3ng/L、1.1~7.0ng/L、1.0~2.8ng/Lであった。

#### ==参考文献==

- 1) 小森行也ほか(2009)生活排水の処理状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価、水環境学会誌、Vol.32、No.3、pp.133-138
- 2) 成宮正倫ほか(2009)下水処理過程における医薬品の存在実態と動態、環境工学研究論文集、第46巻、pp.175-185
- 3) 小森行也ほか(2010)下水処理場放流水中の医薬品とその生態リスク評価、資源環境対策、Vol.48、No.8、pp.14-19
- 4) 福永彩ほか(2006)藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価、環境工学研究論文集、第43巻、pp.57-63
- 5) 南山瑞彦ほか(2011)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、土木研究所資料第4212号、平成22年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.239-265
- 6) 環境省、生態影響試験結果一覧(平成23年3月版)、化学物質の生態影響試験について、<http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html>
- 7) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010-、p.2、平成22年7月、環境省
- 8) 環境省、化学物質の生態影響試験について、生態影響試験結果一覧(平成23年3月版)p.38、p.23、

<http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html>

- 9) MARUAN AHEL, WALTER GIGER, MARKUS KOCH (1994) BEHAVIOUR OF ALKYLPHENOL POLYETHOXYLATE SURFACTANTS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT-I, WATER RESEARCH、Vol.28、No.5、pp.1131-1142
- 10) 小西千絵ほか(2006)水環境中医薬品のLC-MS/MSによる一斉分析法の検討、環境工学研究論文集、pp.73-82
- 11) 宝輪勲ほか(2007)GC-MSによる水環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討、第16回環境化学討論会講演要旨集、pp.774-775
- 12) 環境省水・大気環境局水環境課 要調査項目等調査マニュアル(平成22年10月)4-t-オクチルフェノール及びノニルフェノールの分析法、pp.8-17
- 13) 堀井勇一ほか(2004)相対感度係数を用いるノニルフェノール異性体別測定法の開発と検証、分析化学、53、pp.1139-1147
- 14) 小西博之ほか(2006)飲料水中ノニルフェノールの分析法の検討、東京健安研七年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.、57、pp.319-323
- 15) JIS K 0450-20-10:2006 工業用水・工場排水中のアルキルフェノール類試験方法
- 16) JIS K 0450-60-10:2007 工業用水・工場排水中の4-ノニルフェノールの異性体別試験方法
- 17) 吉田寧子ほか(2004)高速液体クロマトグラフ/質量分析法を用いたアルキルフェノールエトキシレート及びその関連物質の定量、水環境学会誌、27、pp.41-46
- 18) Haude, F. et al. (2002) Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenol carboxylic acids in surface water、J. Chromatogr. A、961、pp.245-256.
- 19) 川中洋平ほか(2000)LC/MS/MSを用いた河川水及び下水処理場放流水中のノニルフェノールポリエトキシレートの定量、環境化学、10、pp.607-614
- 20) 環境省環境保健部環境安全課 化学物質分析法開発調査報告書(平成16年度)ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテル
- 21) 環境省環境保健部環境安全課 化学物質分析法開発調査報告書(平成17年度)ポリ(オキシエチレン)アルキルエーテル

## 閉鎖性水域の貧酸素化に及ぼす陸域負荷の影響と対策手法に関する研究

水質チーム 上席研究員 南山瑞彦  
 総括主任研究員 小森行也  
 研究員 柴山慶行

### 1. はじめに

東京湾や伊勢湾等においては、汚濁負荷削減により水質は改善傾向にあるものの、底層の貧酸素化により底生生物の死滅などの被害が生じている。また、アオコの発生が減少している諏訪湖においても、底層の貧酸素化は長期化しているとの報告がある。現時点で、底層貧酸素化における酸素消費機構や、有機物負荷のうち陸域からの外部負荷と藻類発生による内部負荷の寄与度が明確ではないことから、効果的な対策の選定や対策実施による効果の評価が困難となっている。このため、底層における酸素消費機構と汚濁源ごとの酸素消費への寄与度を明らかにし、効果的な対策を提示することが求められている。平成 23 年度は、陸域汚染源から負荷される有機物や内部生産される藻類の酸素消費速度を評価するため、都市域の河川水、水田排水及び集積培養した珪藻の酸素消費量を測定した。また、平成 23 年の夏に霞ヶ浦で異常発生したアオコの酸素消費量を測定した。

### 2. 実験方法

都市域の河川水、水田排水及び集積培養した珪藻を酸素消費量測定用瓶 500mL に採取し、クーロメータを用いて酸素消費量を測定した。クーロメータ内の温度は 20℃とし、酸素消費量を 5 日間連続測定した。

また、平成 23 年の夏に霞ヶ浦で異常発生したアオコの酸素消費量を測定した。土浦港に吹き寄せられたアオコ（写真-1 参照）を 9 月に採取し、遠心分離により集積した後、10℃、20℃、30℃の温度条件下で保存した。約 6 ヶ月間経過した各アオコに霞ヶ浦底泥の上澄液数 mL を植種しクーロメータにより酸素消費量を測定した。

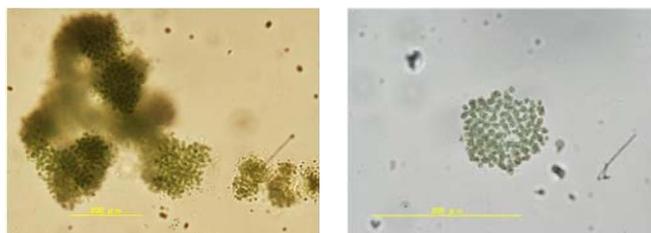


写真-1 H23 の夏に霞ヶ浦で異常発生したアオコ

### 3. 実験結果

都市域の河川水、水田排水及び集積培養した珪藻の酸素消費量を図-1、霞ヶ浦で採取したアオコの酸素消費量を図-2 に示す。

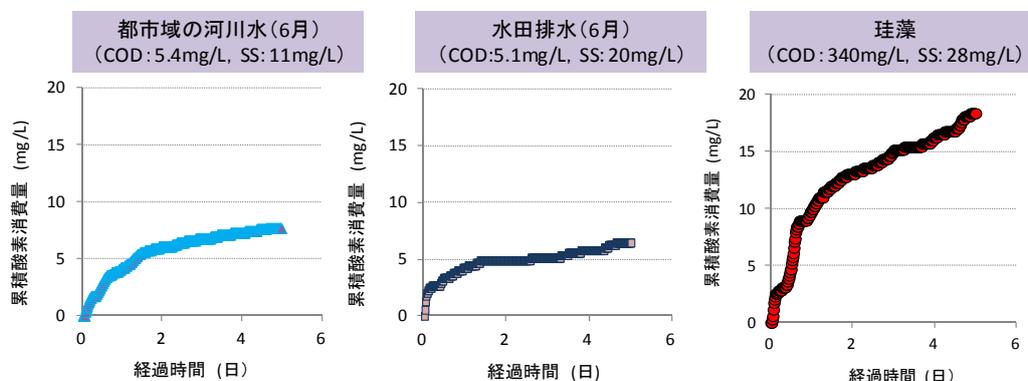


図-1 都市域の河川水、水田排水及び集積培養した珪藻の酸素消費量

図-1 に示すとおり、都市域の河川水、水田排水の酸素消費量は、5日経過時ではほぼ同じであるのに対し、集積培養した珪藻の酸素消費量は、都市域の河川水、水田排水の約3倍であった。これらの酸素消費量は、COD 1 mg/L 当たりで比較すると都市域の河川水(1.6mg/L)、水田排水(1.3mg/L)、珪藻(0.05mg/L)であり、珪藻の酸素消費量は都市域の河川水、水田排水に比べ小さいことが分かった。

また、H23年の夏に霞ヶ浦で異常発生したアオコの5日経過時の酸素消費量は、保存温度による大きな違いは観察されず概ね同じであった。各温度条件下で保存した試料の酸素消費量は、COD 1 mg/L 当たりで比較すると

1.4mg/L (10℃)、1.0mg/L (20℃)、1.5mg/L (30℃) であり、集積培養した珪藻の酸素消費量(0.05mg/L)に比べ大きいことが分かった。

#### 4. まとめ

都市域の河川水、水田排水及び集積培養した珪藻の各試料の酸素消費量は、5日経過時のCOD 1 mg/L 当たりの酸素消費量で比較すると都市域の河川水(1.6mg/L)、水田排水(1.3mg/L)、珪藻(0.05mg/L)であり、珪藻の酸素消費量は都市域の河川水、水田排水に比べ小さいことが分かった。

また、H23年の夏に霞ヶ浦で異常発生したアオコを遠心分離により集積した後、10℃、20℃、30℃の温度条件下で約6ヶ月間保存したものについて酸素消費量を測定した。各温度条件下で保存した試料の酸素消費量は、5日経過時のCOD 1 mg/L 当たりの酸素消費量で比較すると1.4mg/L (10℃)、1.0mg/L (20℃)、1.5mg/L (30℃) であり、集積培養した珪藻の酸素消費量(0.05mg/L)に比べ大きいことが分かった。

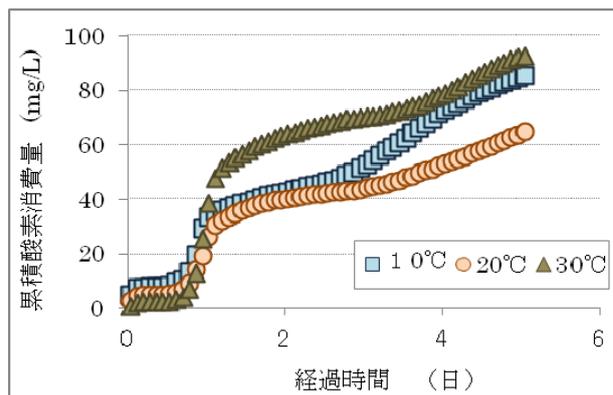


図-2 霞ヶ浦で採取したアオコの酸素消費量

# 地球環境の変化が河川湖沼水質に及ぼす影響の評価に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般）  
 研究期間：平 21～平 25  
 担当チーム：水環境研究グループ（水質）  
 研究担当者：南山瑞彦、平山孝浩、北村友一

## 【要旨】

大気中の温室効果ガス濃度の上昇が引き起こす気候変動は、気温の上昇に伴う物理・生態環境の変化を通じて河川や湖沼の水質に影響を及ぼすことが懸念されている。2011 年度は実湖水中の藻類を用いて藻類培養実験を行い、水温が藻類と水質に及ぼす影響を調査した。その結果、藻類の種類は 27℃や 30℃では緑藻や藍藻の割合、18℃や 21℃では珪藻の割合が高く、藻類の濃度は水温が低いほど高くなる傾向を示した。pH は水温が高いほど高くなる傾向を示し、DOC は、単位藻類当たりでみると 18℃や 21℃よりも 27℃や 30℃で増加量が多くなった。

キーワード：地球温暖化、水温、藻類、琵琶湖、霞ヶ浦

## 1. はじめに

近年、大気中の温室効果ガス濃度の上昇に起因する気温の上昇などの気候変動が問題化している。気温の上昇は、物理・生態環境の変化を通じて河川や湖沼の水質に影響を及ぼすことが懸念されている。

本研究は地球環境の変化が河川、湖沼水質に及ぼす影響を評価することを目的とし、2010 年度は、霞ヶ浦と琵琶湖の既存の水質調査結果をもとに、近年の気温の変化と水温・水質の変化の関係を解析した。その結果、気温の上昇に伴って湖水の水温が上昇し、琵琶湖の表層では水温とともに pH や COD が上昇する傾向であることがわかった<sup>1)</sup>。湖の水温の上昇は藻類の種類と量を変化させ、栄養塩消費や有機物生産を通じて間接的に湖の水質に影響を及ぼすと考えられるが、既存データの解析からこうした複合的な影響を抽出することは困難であった。そこで、2011 年度は霞ヶ浦と琵琶湖の藻類を対象に藻類培養実験を行い、水温と Fe 濃度の変化が藻類と水質に及ぼす影響を室内実験から調査した。

## 2. 実験方法

霞ヶ浦は 2011 年 7 月に土浦港、琵琶湖は同 10 月に東岸大藪湖岸から湖水を採水し、これらの湖水に含まれる藻類を用いて藻類培養実験を行った。藻類培養培地は、Chu 培地を栄養塩濃度が河川水レベルとなるように改変し用いた。図-1 に実験条件の概要、表-1 に人工河川水の組成を示した。水温が藻類の増殖や水質に及ぼす影響を評価するため、培養温度は 18℃、21℃、24℃、27℃、30℃の 5 段階とした。人工河川水の Fe<sup>3+</sup>濃度は、河川水の Fe 濃度が 1987 年から 2005 年にかけて減少していることから<sup>2)</sup>、Fe 濃度と藻類増殖の関係を把握するため 0.1mgFe/L、0.2mgFe/L、0.4mgFe/L の 3 段階に設定した。霞ヶ浦の藻類培養実験での窒素とリン濃度は、2009 年度の西浦流入河川 14 河川の平均の NO<sub>3</sub>-N 濃度 (2.7mgN/L) と PO<sub>4</sub>-P 濃度 (0.034mgP/L) を参考にした。シリカの濃度は、2001～2003 年の茨城県と千葉県河川水 (水道原水) の溶存 SiO<sub>2</sub> 濃度<sup>3)</sup>を参考に、7mgSi/L とした。琵琶湖の藻類培養実験での窒素とリン濃度は、2008 年 8 月の流入河川の NO<sub>3</sub>-N

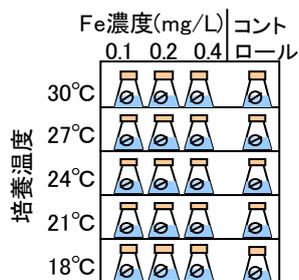


図-1 実験条件の概要

表-1 人工河川水の組成

	霞ヶ浦藻類培養実験		琵琶湖藻類培養実験		PIV金属混液組成	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	25.3 mg	3.0mgN/L	5.1 mg	0.6mgN/L	FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	196.0 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.22 mg	0.040mgP/L	0.17 mg	0.030mgP/L	MnCl <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O	36.0 mg
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	25.0 mg		25.0 mg		ZnCl <sub>2</sub>	10.5 mg
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20.0 mg		20.0 mg		CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	1.0 mg
FeCl <sub>3</sub> ・6H <sub>2</sub> O	設定濃度に応じて添加		設定濃度に応じて添加		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	2.5 mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ・9H <sub>2</sub> O	70.8 mg	7.0mgSi/L	60.7 mg	6.0mgSi/L	Na <sub>2</sub> EDTA・2H <sub>2</sub> O	1000 mg
PIV金属混液(mL)	1 mL		1mL		Water	1 L
Water	1 L		1 L			

濃度 (約 0.56mgN/L) と PO<sub>4</sub>-P 濃度 (約 0.025mgP/L) を参考にした。シリカの濃度は、2003 年の野洲川の溶存 SiO<sub>2</sub> 濃度<sup>4)</sup>を参考に 6mgSi/L とした。また、コントロール試料として超純水に湖水を添加して培養を行った。

藻類の培養は、各実験条件につき 1 本の 500mL 容コニカルビーカーで行った。人工河川水を 300mL 入れ、湖水を 3mL 添加し、マンボー攪拌子を入れてシリコセンで蓋をした。温度は温度勾配恒温機で各条件に合わせ、照明は蛍光灯を用いて照度約 10,000lux、明/暗=16h/8h の周期で側面から照射し、スターラーで常時攪拌し培養を行った。また、別の容器に人工河川水 100mL を取って湖水 1mL を加え、0 日目の試料とした。

7、14、28、42 日目に藻類培養液を抜き取り、藻類と水質の分析を行った。藻類培養液は、未ろ過で pH と 650nm 吸光度を測定し、フローサイトメトリーと顕微鏡により藻類の種類と細胞数を測定した。さらに、藻類の種類と量を簡易に測定できるか否かを検討するため、藻類培養液を GF/B でろ過したろ紙を、110°C で乾燥させた後、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-6300 : 日本分光) により赤外スペクトルを測定 (550cm<sup>-1</sup>~4000cm<sup>-1</sup>) した。ろ液は、DOC と 3 次元励起蛍光スペクトル (EEMs) を測定した。EEMs は蛍光分光光度計 (F-4500 : HITACHI) を用いて測定し、得られた蛍光強度は励起波長 350nm における超純水のラマンピークの面積で割って規格化した後、試料水と同様に規格化したブランク (超純水) の蛍光強度を差し引いた。霞ヶ浦の藻類培養実験では、蒸発水量を求めて分析結果を補正した。琵琶湖藻類の培養実験では、培養中の蒸発水量が多いことがわかったため、実験期間中に 1 週間に 1~2 回蒸発水量に応じて超純水を加えることとした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 実験結果

図-2 は、霞ヶ浦と琵琶湖の藻類培養実験の各測定項目の経日変化である。クロロフィル量を反映する 650nm 吸光度 (図-2a) は、霞ヶ浦藻類培養実験では、24°C、27°C、30°C において 14 日目まで増加し、それ以降は横ばいか減少する変化をしていた。Fe0.1mg/L と Fe0.2mg/L の条件では概ね 27°C や 30°C よりも 18°C、21°C、24°C で高い値となったが、Fe0.4mg/L の条件では水温による違いは小さかった。琵琶湖藻類培養実験では、0~14 日目だけでなく 28~42 日目

にも増加し、27°C や 30°C よりも 18°C、21°C、24°C で増加が大きかった。

図-3 は、フローサイトメトリー分析結果の一例である。藻類は、前方散乱強度 (FS) と赤色蛍光強度で区分することができ、図中 A の領域に観察された藻類はピコプランクトンを反映していると考えられる。そこで、検出されたすべての藻類の細胞数に加えて、領域 A の藻類細胞数も集計した。

藻類細胞数 (図-2b) の変化は、霞ヶ浦藻類培養実験では 7 日目までの増加が大きかった。藻類細胞数は水温が低いほど多くなる傾向を示し、同じ温度で比較すると Fe0.1mg/L の条件で多くなった。琵琶湖藻類培養実験では、Fe 濃度によって藻類細胞数の変化が異なった。Fe0.1mg/L と Fe0.2mg/L の条件では 7 日目や 14 日目に藻類細胞数が大きく増加し、その後横ばいまたは若干減少する変化をしていた。藻類細胞数は Fe0.1、0.2mg/L の条件では 21°C で多くなった。また、Fe0.2mg/L では 28~42 日目に 30°C で藻類細胞数が大きく増加した。Fe0.4mg/L の 30°C では、28 日目まで増加し続ける変化をしていた。

領域 A の藻類細胞数 (図-2c) は、霞ヶ浦藻類培養実験では、琵琶湖藻類培養実験と比較すると増加が少なかった。琵琶湖藻類培養実験の Fe0.1mg/L の条件では 24°C で、Fe0.2mg/L の条件では 24°C と 30°C で 7 日目に多くなっていた。24°C の条件で比較すると、7 日目の領域 A の藻類細胞数は Fe0.1mg/L で最大となった。

霞ヶ浦培養実験では人工河川水の作成時に pH 調整を行わなかったため、0 日目の pH は約 9 となった。琵琶湖培養実験では人工河川水の作成時に pH 調整を行い、0 日目の pH は 6.6 となった。pH (図-2d) は、いずれの条件でも 7 日目に減少し、14 日目以降に増加する変化を示した。水温による pH の違いは小さいものの、Fe0.1mg/L の条件では 18°C や 21°C よりも 30°C で高くなっていた。

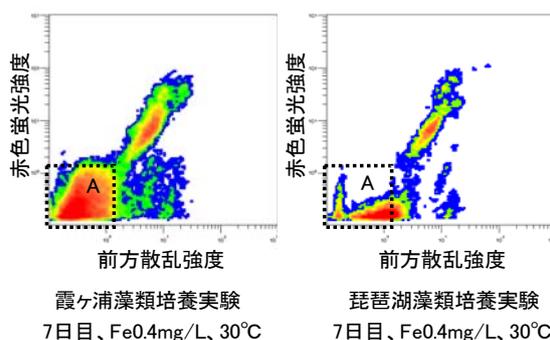
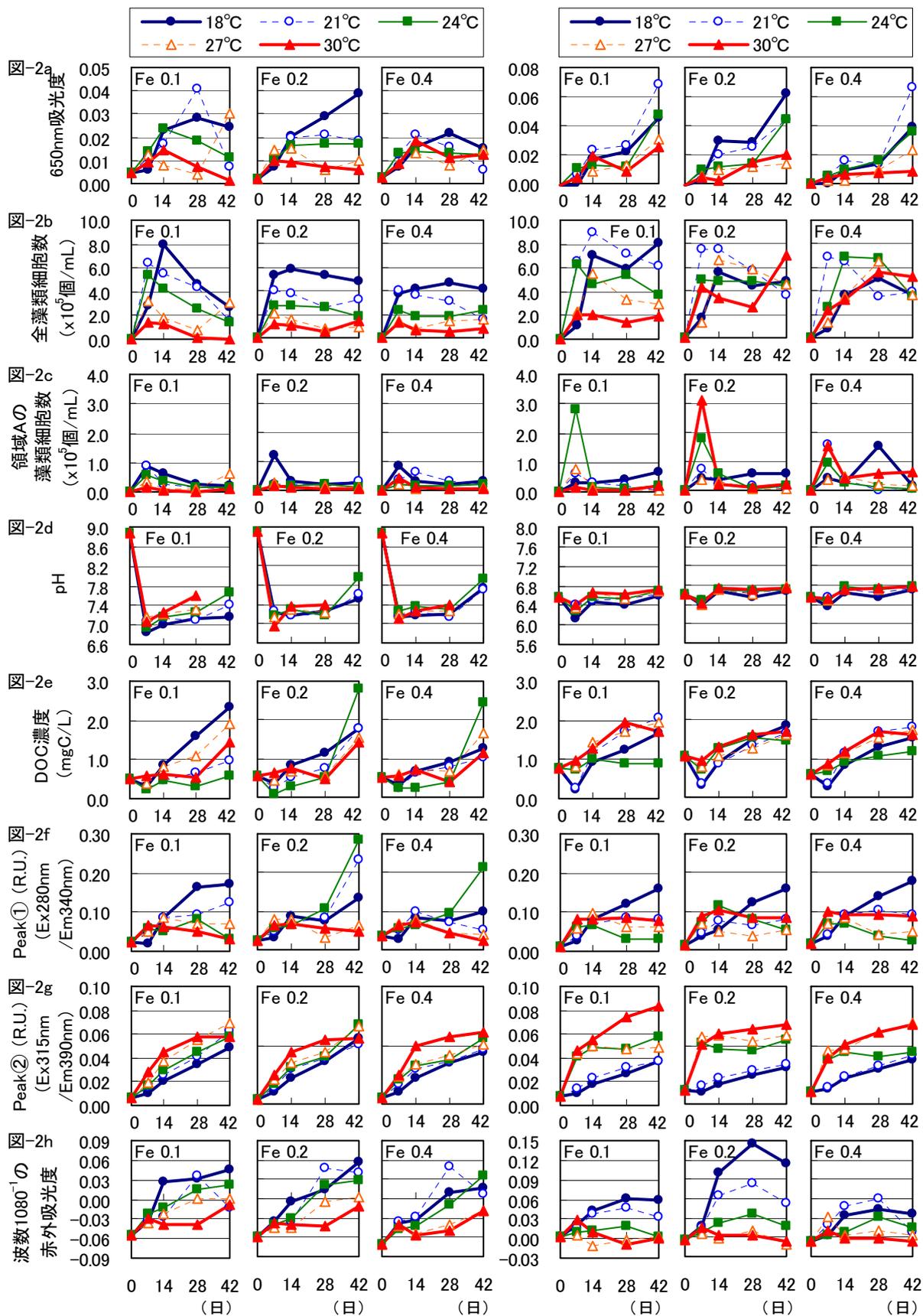


図-3 フローサイトメトリーによる藻類の分析結果の一例



霞ヶ浦藻類培養実験 琵琶湖藻類培養実験

図-2 650nm 吸光度、藻類細胞数、pH、DOC 濃度、EEMs 上の主要なピークの蛍光強度、  
1080<sup>-1</sup>cm の赤外吸光度の変化

コントロール試料（超純水に湖水を加えた試料）では、藻類は増加しなかったが、DOC 濃度では 42 日目には 0.5~1mgC/L に増加していた。そこで DOC の解析にあたっては、人工河川水試料の測定結果から同じ温度のコントロール試料の測定結果を差し引いている。DOC 濃度（図-2e）の変化は、霞ヶ浦藻類培養実験では水温によって異なった。DOC 濃度は 18℃では7日目から42日目まで経時的に増加したが、30℃では 28 日目まであまり増加せず、28 日目から 42 日目に増加した。24℃では Fe0.2mg/L と Fe0.4mg/L の条件で 28 日目から 42 日目にかけて DOC 濃度が増加した。18℃に着目すると、DOC 濃度は Fe0.1mg/L の条件で最も大きく増加した。琵琶湖藻類培養実験では、Fe0.1mg/L の 24℃の条件で横ばいとなり、他の条件では経時的に増加した。7 日目の DOC 濃度は、18℃や 21℃よりも 24℃、27℃、30℃の条件で高い値となったが、42 日目の DOC 濃度は水温によらず概ね等しかった。

図-4 は藻類培養液の EEMs の一例である。EEMs 上には 2 つの主要なピークが確認された。Peak①

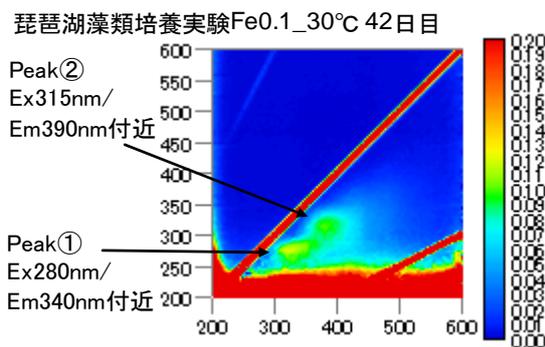


図-4 EEM スペクトルの一例

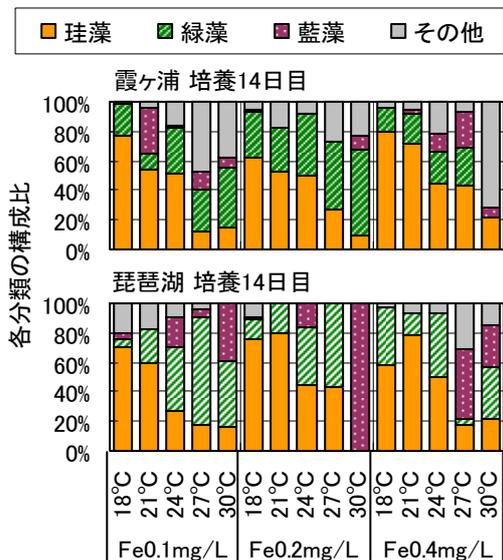


図-5 培養 14 日目の藻類の構成比

(Ex280nm/Em340nm 付近) はタンパク質のピーク位置に近く、Peak② (Ex315nm/Em390nm 付近) は、海水中のフルボ酸のピーク位置に近い<sup>5)</sup>。Peak① (図-2f) と Peak② (図-2g) では蛍光強度の変化が異なった。Peak①は水温によって変化が異なり、18℃では経時的に増加したが、27℃や 30℃では 14 日目以降は横ばいもしくは減少した。霞ヶ浦藻類培養実験での 24℃の、Fe0.2mg/L と Fe0.4mg/L では、28 日目から 42 日目に Peak①が増加した。Peak②は、いずれの条件でも概ね経時的に増加し、水温が高いほど高くなる傾向が観られた。琵琶湖藻類培養実験では Peak②は 24℃、27℃、30℃で 7 日目までに大きく増加した。

水温による藻類の種類の違いを調べるため、顕微鏡観察によって培養液中の藻類を珪藻、緑藻、藍藻、その他に分類し、それぞれの個体数（群体を形成するものは群体数）を求めた。図-5 は、14 日目の藻類培養液中の藻類の構成比である。霞ヶ浦と琵琶湖のどちらの培養実験でも、18℃や 21℃では個体数の約

霞ヶ浦藻類培養実験、28日目、Fe0.1mg/L

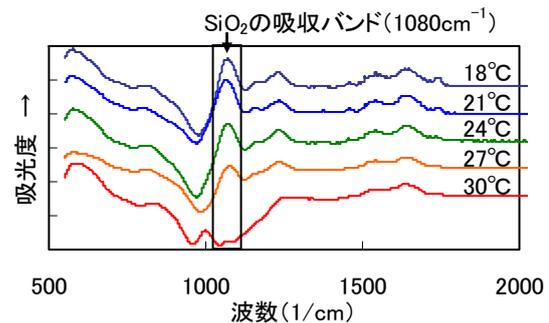


図-6 ろ紙に捕捉した藻類の赤外スペクトルの一例

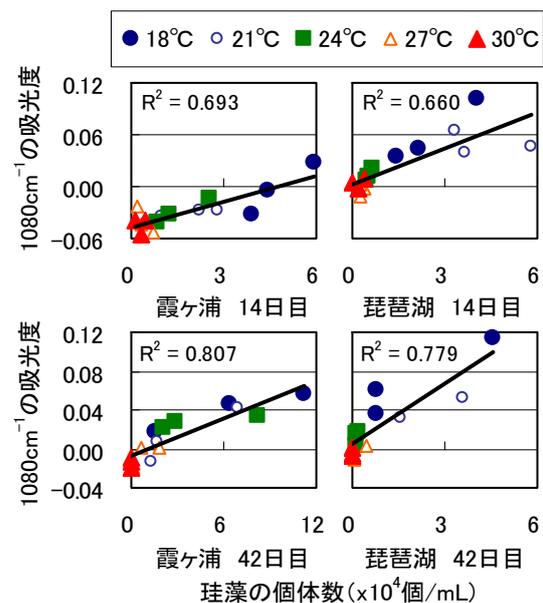


図-7 珪藻の個体数と 1080<sup>-1</sup>の吸光度の関係

60%以上が珪藻であったが、27°Cや30°Cでは珪藻の割合は10~40%となり、緑藻や藍藻の占める割合が高くなった。

図-6はろ紙に捕捉された藻類の赤外スペクトルの一例である。霞ヶ浦と琵琶湖のどちらの藻類培養実験でも、赤外スペクトルは条件によらず類似していた。しかし、水温が低い条件では1080cm<sup>-1</sup>付近に特徴的なピークが観られた。FT-IRのスペクトルデータベースでは、1080cm<sup>-1</sup>付近の吸収はSiO<sub>2</sub>に由来しており、本実験では珪藻殻に由来するものと推測される。図-2hは、1080cm<sup>-1</sup>の吸光度の変化である。霞ヶ浦藻類培養実験では1080cm<sup>-1</sup>の吸光度は、18°C、21°C、24°Cで増加が大きかった。琵琶湖藻類培養実験では18°Cと21°Cで増加が大きく、27°Cと30°Cではほとんど増加しなかった。図-7は、培養14日目と42日目の珪藻の個体数と1080cm<sup>-1</sup>の吸光度の関係である。霞ヶ浦と琵琶湖のどちらの培養実験でも、1080cm<sup>-1</sup>の吸光度は珪藻の個体数と正の相関を示した。赤外スペクトルからも、水温が高い条件では珪藻の増殖量が少なかったことが確かめられた。

### 3.2 水温・Fe濃度と藻類・水質の関係

霞ヶ浦と琵琶湖のどちらの培養実験でも藻類細胞数の増加は概ね14日目までが大きかったことから、14日目までを増殖期、14日目から42日目までを定常期と位置づけて、水温やFe濃度と藻類増殖、pH、

DOC濃度との関係を解析した。

図-8は、水温と14日目のpH、650nm吸光度、DOC濃度の関係である。pHは、霞ヶ浦藻類培養実験では、Fe0.1mg/LとFe0.2mg/Lの条件で、水温が高いほど高くなる傾向が観られた。Fe0.4mg/Lの条件では24°Cで最大となった。24°Cの条件で比較すると、Fe濃度が高いほど高くなっていった。琵琶湖藻類培養実験では、Fe0.1mg/Lの条件で、水温が高いほど高くなる傾向が観られた。同じ温度で比較すると、Fe0.2mg/LとFe0.4mg/LよりもFe0.1mg/Lで低い値となった。

650nm吸光度は、霞ヶ浦藻類培養実験では、水温による違いが小さかった。琵琶湖藻類培養実験では、Fe0.2mg/Lで水温が高いほど低くなる傾向を示した。

DOC濃度は、霞ヶ浦藻類培養実験の24°Cでは、他の温度条件より低い値となった。琵琶湖藻類培養実験のFe0.1mg/LとFe0.2mg/Lでは、18°Cや21°Cよりも27°Cや30°Cで高い値となった。どちらの藻類培養実験でも、Fe濃度によるDOC濃度の違いは観られなかった。

図-9は、水温と28日目のpHの関係および水温と42日目の650nm吸光度、DOC濃度の関係である。pHは、霞ヶ浦藻類培養実験の42日目の試料が足りず測定できなかったため、28日目と比較した。pHは、どちらの藻類培養実験でも概ね水温が高いほど

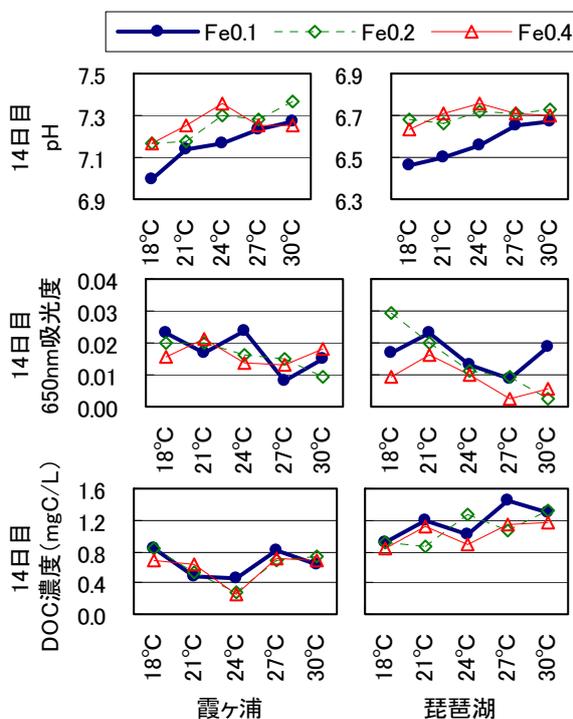


図-8 水温と、増殖期(0~14日目)のpH、650nm吸光度、DOC濃度の関係

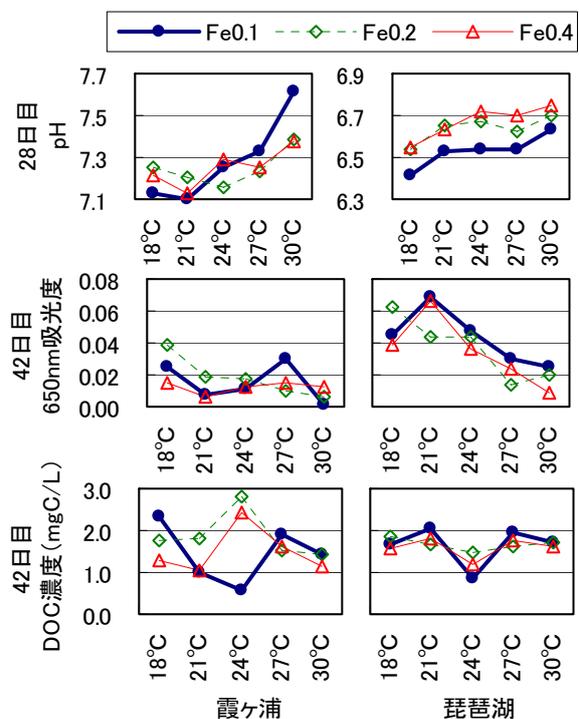


図-9 水温と、定常期(14~28、42日目)のpH、650nm吸光度、DOC濃度の関係

高くなる傾向が観られた。琵琶湖藻類培養実験では、Fe0.2mg/LとFe0.4mg/LよりもFe0.1mg/Lで低くなっていた。

650 吸光度は、霞ヶ浦藻類培養実験では水温による違いは小さかったが、琵琶湖藻類培養実験では、水温が高いほど低くなる傾向を示した。

DOC 濃度は、霞ヶ浦藻類培養実験の Fe0.2mg/L と Fe0.4mg/L では 24°C で高くなっていたが、Fe0.1mg/L では 24°C で低くなっていた。琵琶湖藻類培養実験では Fe 濃度による違いは小さく、24°C で低い値を示した。

藻類増殖と水質の関係を検討するため、増殖期を 0、7、14 日目、定常期を 14、28、42 日目とし、増殖期と定常期の平均藻類細胞数を求めた。図-10 は、増殖期と定常期の水温と藻類細胞数の関係である。増殖期の平均藻類細胞数は、霞ヶ浦藻類培養実験では、水温が高いほど低下する傾向が観られた。同じ水温では、Fe0.1mg/L の条件で最大となった。琵琶湖藻類培養実験では 21°C から 30°C にかけて低下する傾向が観られた。定常期の平均藻類細胞数は、霞ヶ浦藻類培養実験では水温が高いほど低下した。琵琶湖藻類培養実験でも Fe0.1mg/L の条件では水温が高いほど低下する傾向が観られた。

図-11 は、増殖期の平均藻類細胞数と 14 日目の DOC 濃度の関係を散布図で示したものである。全体

で見ると藻類細胞数と DOC 濃度の間には正の相関が観られる。霞ヶ浦藻類培養実験では概ね 18°C、21°C、24°C のグループと 27°C、30°C のグループに分かれていた。琵琶湖藻類培養実験でも、27°C と 30°C は近い位置にプロットされていた。また、27°C や 30°C では、藻類細胞数が少ないにもかかわらず 14 日目の DOC 濃度は他の温度条件と同じくらいの値であった。従って、27°C や 30°C では 18°C や 21°C と比較すると単位藻類当たりの DOC 濃度の増加が大きいと推察される。27°C や 30°C では珪藻があまり増殖せず、緑藻や藍藻が主であったことから、水温によって増殖する藻類の種類が変わると、藻類細胞数と DOC の増加量の関係も変化すると考えられる。

図-12 は定常期の平均藻類細胞数と 42 日目の DOC 濃度の関係を散布図で示したものである。霞ヶ浦藻類培養実験では、概ね 2 つのグループに分かれた。24°C では Fe 濃度によってプロット位置が異なり、Fe0.1mg/L は 18°C と 21°C のグループに入っていた。琵琶湖藻類培養実験では特徴的な関係は観られなかった。

### 3.3 水温と藻類生産有機物の性状の比較

DOC 濃度の異なる試料間で EEMs のピーク強度を比較するため、Peak① (Ex280nm/Em340nm) と Peak② (Ex315nm/Em390nm) について、蛍光強度を DOC 濃度で割った値 (FI/DOC) を求めた。図-13 は、

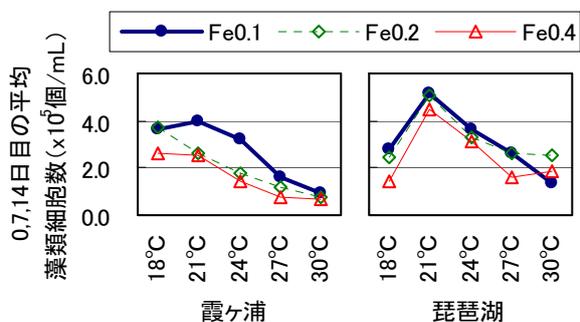


図-10 増殖期と定常期における、水温と藻類細胞数の関係

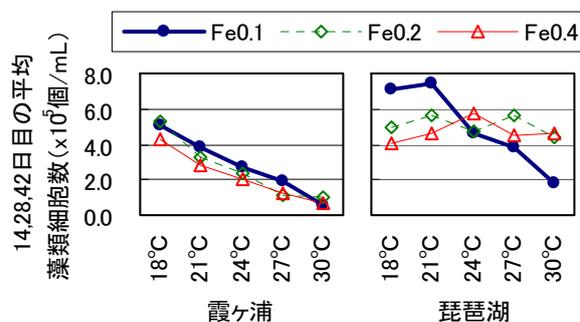


図-12 定常期の藻類細胞数と DOC 濃度の関係

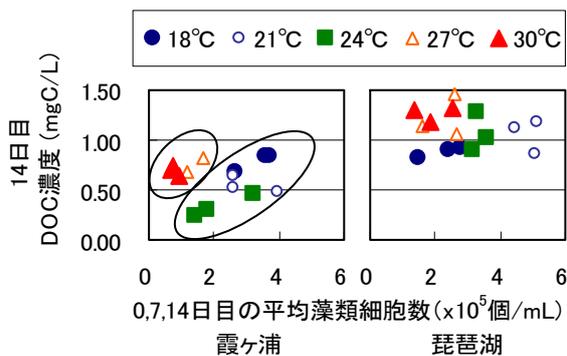
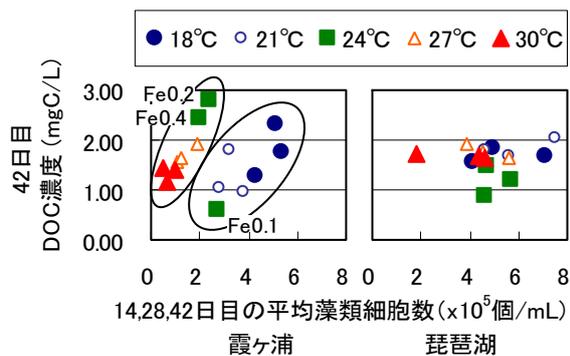


図-11 増殖期の藻類細胞数と DOC 濃度の関係



42日目のEEMsのPeak①とPeak②のFI/DOCである。Peak①のFI/DOCは、27°Cや30°Cよりも18°C、21°C、24°Cで高い値を示した。琵琶湖藻類培養実験ではPeak①のFI/DOCは18°Cで高く、藻類由来のタンパク質様物質は水温が高い条件では蓄積しにくいと考えられる。Peak②のFI/DOCは、Fe0.1mg/Lの条件において24°Cで高い値を示した。Fe0.2mg/LとFe0.4mg/LではPeak②のFI/DOCは温度による違いは小さいものの、18°Cよりも30°Cが高かった。

水温による藻類生産有機物の性状の違いをより詳細に把握するため、HPLC-FD分析を行った。カラムはTSK-GEL SuperAW-2500を用い、分子サイズに基

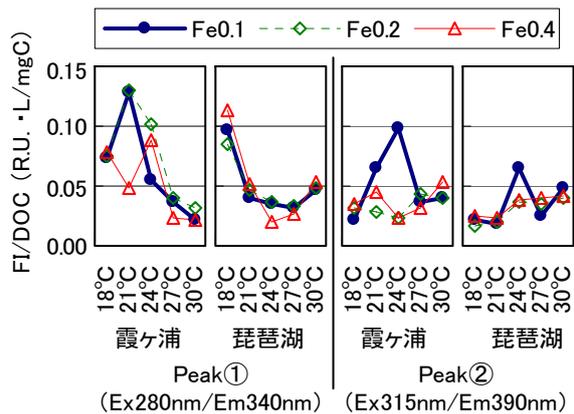


図-13 42日目のEEMs上のPeak①とPeak②のFI/DOC

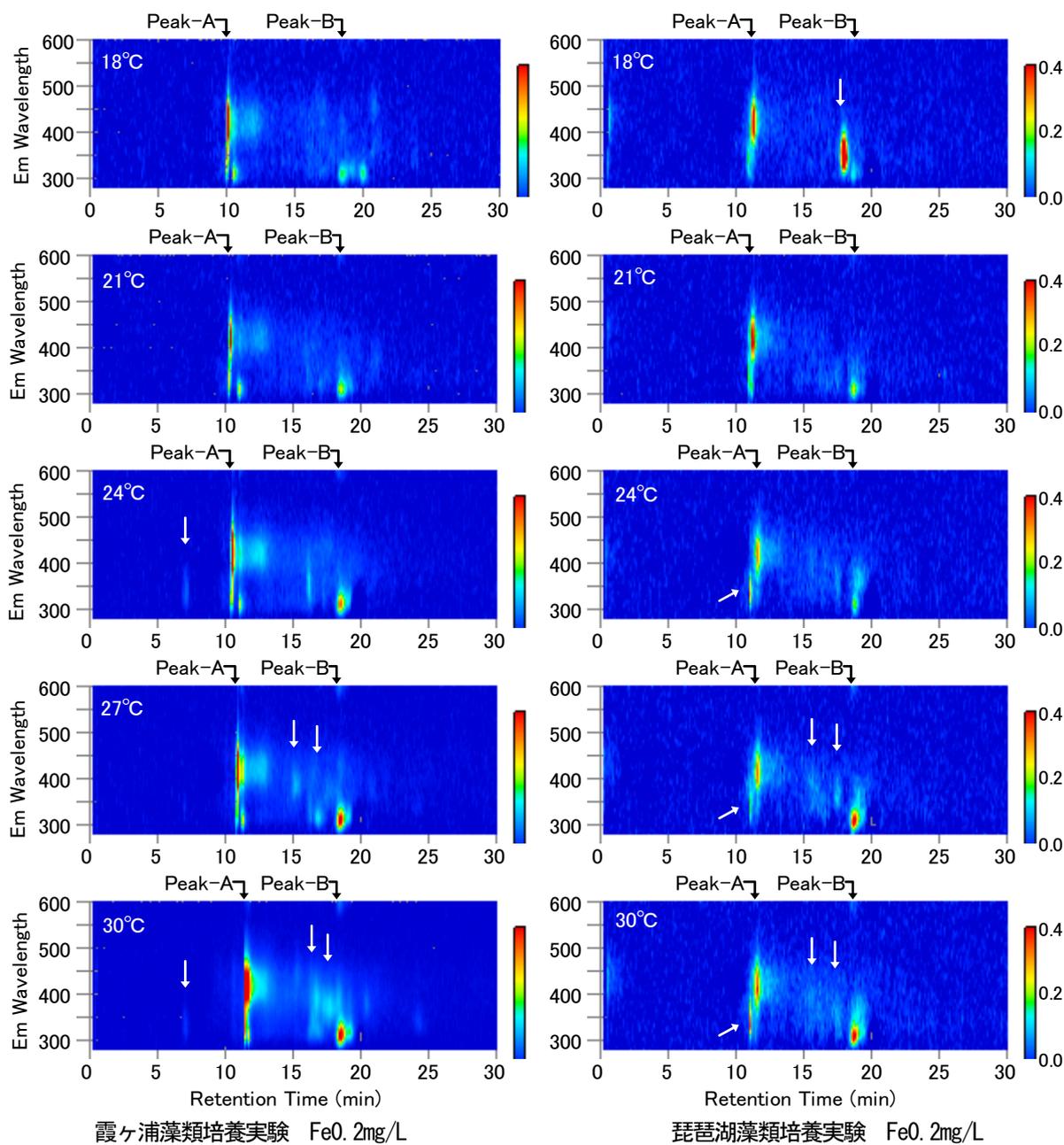


図-14 藻類培養42日目の各試料のEx230nmに対する蛍光スペクトルの比較

づく分離を試みた。カラム温度は40°C、移動相はアセトニトリル：水=50：50、流速は0.2mL/minで30分間のイソクラティック分析とし、試料注入量は100 $\mu$ Lとした。検出器は蛍光検出器を用い、励起波長は様々な蛍光ピークが観察できる230nmとし、蛍光波長（Em）280～600nmの蛍光スペクトルを取得した。

Fe0.2mg/Lを対象に、18°C～30°Cの各温度条件の試料について分析を行った。図-14は42日目の各試料の保持時間ごとの蛍光スペクトルをコンター表示したものである。いずれの試料でもEm420nmのRT:10～11分付近（Peak-A）およびEm310nmのRT:18分付近（Peak-B）に強いピークが確認された。

霞ヶ浦藻類培養実験では、Peak-Bは温度が高いほどピーク強度が強くなる傾向が観られた。27°Cや30°Cでは、Em300～450nmの範囲で16～19分の領域に複数の弱いピークが確認された。また、24°Cと30°CではEm340nmで7分付近に弱いピークが確認された。

琵琶湖藻類培養実験でも、Peak-Bは18°C、21°C、24°Cよりも27°Cと30°Cで強く検出された。18°Cでは、Em340nmの17分付近に強いピークが観られた。24、27、30°CではEm340nmの11分付近にピークが観られた。また、27°Cや30°Cでは、霞ヶ浦藻類培養実験と同様にEm300～450nmの範囲で16～19分の領域に複数の弱いピークが確認された。

Peak-A（Em420nm）のピークはどちらの藻類培養実験でも水温によらず概ね同じ位置に検出されていたことから、本ピークを反映する物質の性状は、あまり水温によって変わらないと考えられる。一方Em300～400nm付近のピークは水温によって検出位置が異なっていたことから、本ピークを反映する物質の性状は水温によって変化しやすいと考えられる。

#### 4. まとめ

地球温暖化に伴う湖水水温の上昇による藻類の種類とその量の変化と、それが湖水水質に及ぼす間接的な影響を評価するため、霞ヶ浦と琵琶湖の藻類を対象に藻類培養実験を行い、水温およびFe濃度の変化が藻類と水質に及ぼす影響を調査した。本研究で得られた主要な知見を以下に示す。

(1) 霞ヶ浦と琵琶湖のどちらの藻類培養実験でも、藻類細胞数は、概ね水温が高いほど少なくなる傾向が観られた。

(2) 顕微鏡観察や赤外スペクトルから、27°Cや

30°Cでは18°Cや21°Cと比較して珪藻が少なく、緑藻や藍藻の割合が高かった。

(3) 琵琶湖藻類培養実験ではFe0.1mg/Lの24°CやFe0.2mg/Lの24°Cおよび30°Cの条件で7日目にピコプランクトンと考えられる藻類が増殖した。

(4) pHは、水温による違いは小さいものの、概ね水温が高いほど高くなる傾向が観られた。

(5) 藻類細胞数とDOC濃度の関係は、霞ヶ浦藻類培養実験では正の相関がみられた。27°Cと30°Cでは他の温度と比較すると単位藻類当たりのDOC濃度の増加が大きかった。

(6) 藻類培養液のEEMs上にはタンパク質様物質と考えられるPeak①（Ex280nm/Em340nm）と、フルボ酸様物質と考えられるPeak②（Ex315nm/Em390nm）が観られた。Peak②のピーク強度は経日的に増加し、水温が高いほど強くなる傾向が観られた。

(7) Fe濃度が低いほど藻類細胞数が多くなる傾向が観られたが、水質への影響は明確には確認されなかった。

以上の結果から、湖水水温が上昇すると、藻類細胞数は減少するが緑藻や藍藻の割合は増加する。それに伴って湖水のpHが上昇すること、また、DOC濃度は顕著には変わらないが有機物の性状が変化することが示唆された。

#### 参考文献・資料

- 1) 北村友一、南山瑞彦（2012）、地球温暖化が湖の水質に与える影響—霞ヶ浦と琵琶湖の約30年間の水質データの統計解析—、土木技術資料、54(3)、6-9。
- 2) 鈴木穰（2007）、地球環境の変化が河川水質に与える影響の基礎的検討、「平成19年度土木研究所成果報告書」、土木研究所、No.13、<http://www.pwri.go.jp/jpn/seika/report-seika2007.html>
- 3) 河川環境管理財団（2007）、河川整備基金自主研究事業「河川におけるケイ酸など無機溶存物質の流出機構に関する研究」報告書、河川環境管理財団、個別研究編1-45。
- 4) 三田村緒佐武、丸尾雅啓、後藤直成（2005）、河川・湖沼におけるシリカ循環の生物地球化学過程に関する研究、環境省地球環境研究総合推進費終了研究成果報告書；D-3「グローバル水循環系のリン・窒素負荷増大とシリカ減少による海洋環境変質に関する研究」、環境省地球環境局研究調査室、27-42。
- 5) 福島武彦、中島俊之、今井章雄、松重一夫、尾崎則篤（2001）、EEMSによる水中溶存有機物の特性解析、水環境学会誌、24(10)、686-692。

## 水生生物の生体反応を用いた下水処理水の毒性評価に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 22～平 24

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、村山康樹、朴 昶範

### 【要旨】

メダカの遺伝子発現プロファイルの変化から下水処理水に含まれる毒性を評価するためには、作用機序の異なる様々な化学物質のメダカの曝露実験から、比較対照として化学物質毎の遺伝子発現プロファイルを得る必要がある。本年度は、昨年度作成したメダカマイクロアレイの各遺伝子に機能などのアノテーション情報を追加した。さらに、フルタミド、クラリスロマイシン、シクロホスファミド、下水試料に曝露したメダカのマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの取得を行った。

キーワード：メダカ、マイクロアレイ、フルタミド、クラリスロマイシン、シクロホスファミド

### 1. はじめに

下水処理水の安全性を個別の化学物質によって管理することは困難であるとの考え方から、バイオアッセイによる排水の総毒性評価と管理が注目されている。排水の毒性評価では、ヒトや生態系への悪影響を未然に防ぐため、迅速かつ高感度の試験法が求められる。しかし、水生生物の毒性試験では、魚類、ミジンコ、藻類の生死や生長阻害などを指標として評価されるが、検出感度が低いこと、さらに、検出感度向上のためには、試料の濃縮が必要であることが問題となっている。

一方で、近年のバイオテクノロジーの発展により、生体反応の微小変化を検出できる遺伝子発現解析などの分析技術の開発が進んでおり、水環境分野においてもこれらの技術の応用が期待されている。

本研究は、下水処理水の水生生物への影響評価手法へ遺伝子発現や代謝物解析技術を適用するための基礎研究と位置付け、処理水の毒性把握のための方法論と評価法の提案を目指している。本研究で使用する水生生物は、遺伝子情報が豊富で、小型で飼育の容易な魚類のモデル生物であるメダカとする。

昨年度は、遺伝子発現解析に必要なメダカマイクロアレイの設計と作成を行った。さらに、メダカの遺伝子発現の変化から下水処理水に含まれている毒性を評価するためには、作用機序の異なる様々な化学物質のメダカの曝露実験から、比較対照として化学物質毎の遺伝子発現プロファイルを得る必要がある。そこで、作成したマイクロアレイにより作用機

序が異なると考えられるエストロン、トリクロサン、NDMA の化学物質に曝露したメダカの遺伝子発現解析を行った。

本年度は、昨年度作成したメダカマイクロアレイに搭載した各遺伝子へのアノテーション（遺伝子の生物学的な機能など）情報追加と、昨年度に引き続き、フルタミド（抗アンドロゲン）、クラリスロマイシン（抗生物質）、シクロホスファミド（抗がん剤）の化学物質、および、下水試料に曝露したメダカの遺伝子発現プロファイルの取得を行った。

### 2. マイクロアレイ搭載遺伝子へのアノテーションの追加

#### 2.1 アノテーションの追加方法

DFCI Gene Index Releas8.0 に登録されている遺伝子の機能情報は少ないため、化学物質曝露で発現変動した遺伝子の役割については不明であった。どのような役割の遺伝子の変動するかを知ることにより、生物影響をより詳細に解析できる可能性がある。そこで、昨年度作成したマイクロアレイに搭載した各遺伝子に機能情報（EntrezID（NCBI のデータベースで染色体の位置、構造、機能などの情報が登録されている ID）と GO:geneontology（遺伝子機能の用語と体系情報））を追加した。機能情報の追加作業工程は以下のとおりである。

マイクロアレイに搭載した各遺伝子についてプローブ設計の基になった mRNA 配列情報（DFCI Gene Index Releas8.0）を用いて Blastx（Blastx：核酸の相同

性検索のひとつで、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後、アミノ酸配列データベースに対して検索を行う方法)検索し、ヒトおよびゼブラフィッシュの RefSeq ID (NCBI(米国バイオテクノロジーセンター)が提供しているデータベースの ID)の遺伝子を取得した。その後、得られた RefSeq ID を用いて NCBI のデータベースから Entrez Gene ID (NCBI の Entrez というデータベース(染色体の位置、構造、機能などデータベース)の ID)を検索し、各リストに Entrez ID を追加した。さらに、RefSeq ID を用いてヒトの GO 情報は、Uniprot-GOA (<http://www.ebiac.uk/GOA/>)、ゼブラフィッシュは、ZFIN(<http://zfin.org>)データベースから取得した。

## 2.2 アノテーション情報の追加結果

44K アレイに搭載されている 43,803 プローブのうち 96.4%にヒトの Entrez Gene ID、98.0%にゼブラフィッシュ Entrez Gene ID を取得することができた。ヒトとゼブラフィッシュで Entrez Gene ID まで取得できた割合を比較すると、ゼブラフィッシュの方がその割合が高かった。残りのプローブについては、相同性の高いヒト、ゼブラフィッシュのアミノ酸配列が存在しなかった。

各 Blastx 検索結果からメダカ塩基配列との相同性の高さを表す E-value (相同性が高いほど低い値を示す)について、ヒトおよびゼブラフィッシュそれぞれの分布を調査した。その結果、ヒトでは、E-value が 1.0E-5 以下だったものは、43,803 プローブのうち 65.6%、ゼブラフィッシュでは、69.4%であった。ゼブラフィッシュと相同性が高いプローブが多かった。

得られたヒトとゼブラフィッシュの RefSeq ID を基に GO 情報を生物学的プロセス(B : biological process)、分子機能(M : molecular function)、細胞構成要素(C:Cellular component)に分けて取得した。43,803 プローブのうちGO情報が取得できた割合は、ヒトGOでは 75.4%(B)、79.0%(M)、83.5%(C)、ゼブラフィッシュGO では、49.7%(B)、53.7%(M)、54.6%(C)となった。

以上の追加した機能情報を利用することにより、発現変動遺伝子の機能解析ができるようになる。本作業で追加した項目を以下に示す。

human RefSeqID,	zebra RefSeq ID
human EntrezGeneID,	zebra EntrezGeneID
human biological process,	zebra biological process
human molecular function,	zebra molecular function
human Cellular component,	zebra Cellular component
human GeneSymbol,	zebra GeneSymbol
human E-value,	zebra E-value

## 3. 化学物質、下水試料に曝露したメダカのマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイルの取得

マイクロアレイによるメダカの遺伝子発現プロファイルの変化から、下水処理水に含まれている毒性物質を予測するためには、作用機序の異なる様々な化学物質のメダカの曝露試験を行い、メダカの遺伝子発現のプロファイルを得る必要がある。

本年度は、下水に含まれる可能性があり、水生生物への影響が懸念されている化学物質のうちフルタミド、クラリスロマイシン、シクロホスファミド、および、実際の下水試料(流入下水、2次処理水、塩素処理水、担体処理水)を曝露試料とした。

### 3.1 曝露実験の方法

曝露条件は表-2のとおりである。各化学物質の曝露濃度は、下水試料で検出されるレベルの3段階とした。概ね、高濃度区が流入下水、中濃度区が2次処理水、低濃度が高度処理水レベルとなっている。

曝露時間は、急性毒性試験で使用される96時間とした。なお、対照区には脱塩素水道水を使用した。使用したマイクロアレイは、昨年度と同じ44Kとした。

下水試料の曝露実験は、化学物質曝露と同条件で行った。

表-2 メダカの化学物質曝露条件の一覧

曝露方式	: 半止水式
曝露濃度	: フルタミド 10、100、1000 (μg/L) クラリスロマイシン 50、500、5000 (ng/L) シクロホスファミド 5、50、500、5000 (ng/L)
水温	: 24±1 °C
曝露期間	: 96時間
供試生物	: d-rR系メダカ雄魚(7カ月齢)
供試生物数	: 8個体/曝露区
照明	: 明期16時間/暗期8時間
給餌	: なし
エアレーション	: なし
遺伝子発現解析臓器	: 肝臓、エラ、精巣、脳
使用マイクロアレイ	: 44K

### 3.2 曝露実験の操作

フルタミド(10、100、1000 μg/Lの3濃度区)、クラリスロマイシン(50、500、5000 ng/Lの3濃度区)、シクロホスファミド(5、50、500、5,000 ng/Lの3濃度区)を調整した脱塩素水道水で7~8カ月齢のd-rRメダカの雄魚を曝露し、曝露開始時および曝露開始から96時間後に、各試験区8個体ずつ、

RNAlater 中で肝臓、エラ、精巣、脳を摘出した。摘出した臓器は1 個体毎にRNAlater に浸漬し、RNA 抽出まで-20℃で保存した。各臓器は、1 個体毎にRNA 抽出 (RNeasy mini kit) を行い、それぞれ6 個体のRNA 抽出液の一部を混合し、アジレントのプロトコールに従い、RNA の増幅、 標識、マイクロアレイスキャン、各プローブの数値化を行った。

### 3.3 遺伝子発現解析の方法

遺伝子発現解析は、subio およびMicrosoft EXCEL を使用した。はじめに、曝露時間および臓器毎にアレイ間ノーマライズ (75%値で規格化) を行い、バックグラウンド以下のシグナルを排除した。抽出された 38,515 遺伝子を用いて、Kishi<sup>1)</sup> らの各遺伝子発現をユークリッド距離とピアソン相関係数による解析を試みた。解析法の概要を図-1 に示す。ユークリッド距離が全体的な遺伝子発現の強度、ピアソン相関が発現遺伝子の種類と強度を反映する。ユークリッド距離とピアソン相関の関係から、生理活性の程度 (Degree of physiological activity) を評価するものである。

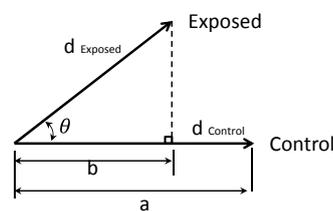
### 4. 実験結果

図-2 は、各化学物質と下水試料についてユークリッド距離とピアソン相関の関係を作図したものであ

る。図より、エストロン曝露では高濃度曝露区で、 $\theta$  の角度大きくなり、コントロールと遺伝子発現の種類が異なっていることがわかる。下水試料でも流入下水曝露区で $\theta$  の角度が大きく、処理レベルが上がるにしたがい、 $\theta$  が小さくなり、ベクトルの方向

$$\text{Euclidean distances (d)} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \underline{x})^2}$$

$$\text{PearsonCC} = \cos \theta = \frac{\sum_{i=0}^n (x_i - \underline{x})(y_i - \underline{y})}{\sqrt{\sum_{i=0}^n (x_i - \underline{x})^2} \sqrt{\sum_{i=0}^n (y_i - \underline{y})^2}}$$



b/a: Degree of physiological activity

図-1 ユークリッド距離とピアソン相関係数、および、生理活性度(Degree of physiological activity)の算出法<sup>1)</sup>

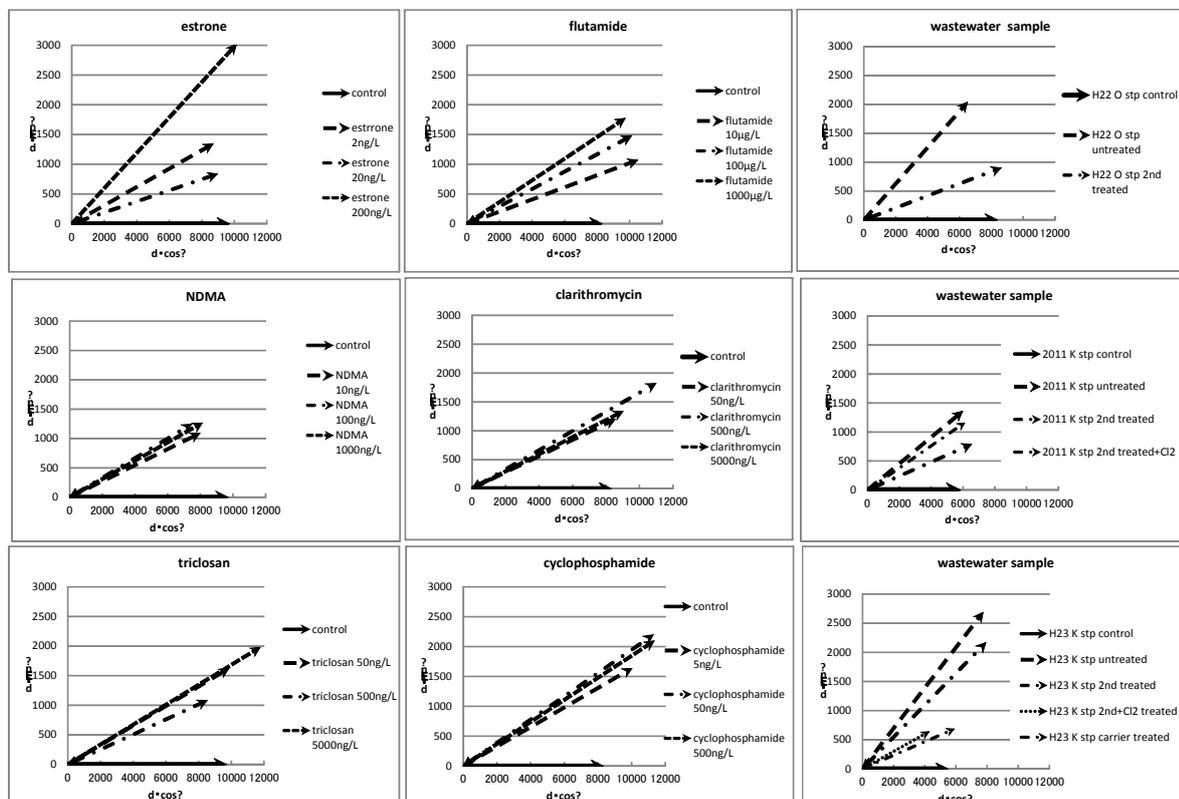


図-2 各化学物質曝露と下水試料曝露区でのユークリッド距離とピアソン相関の関係

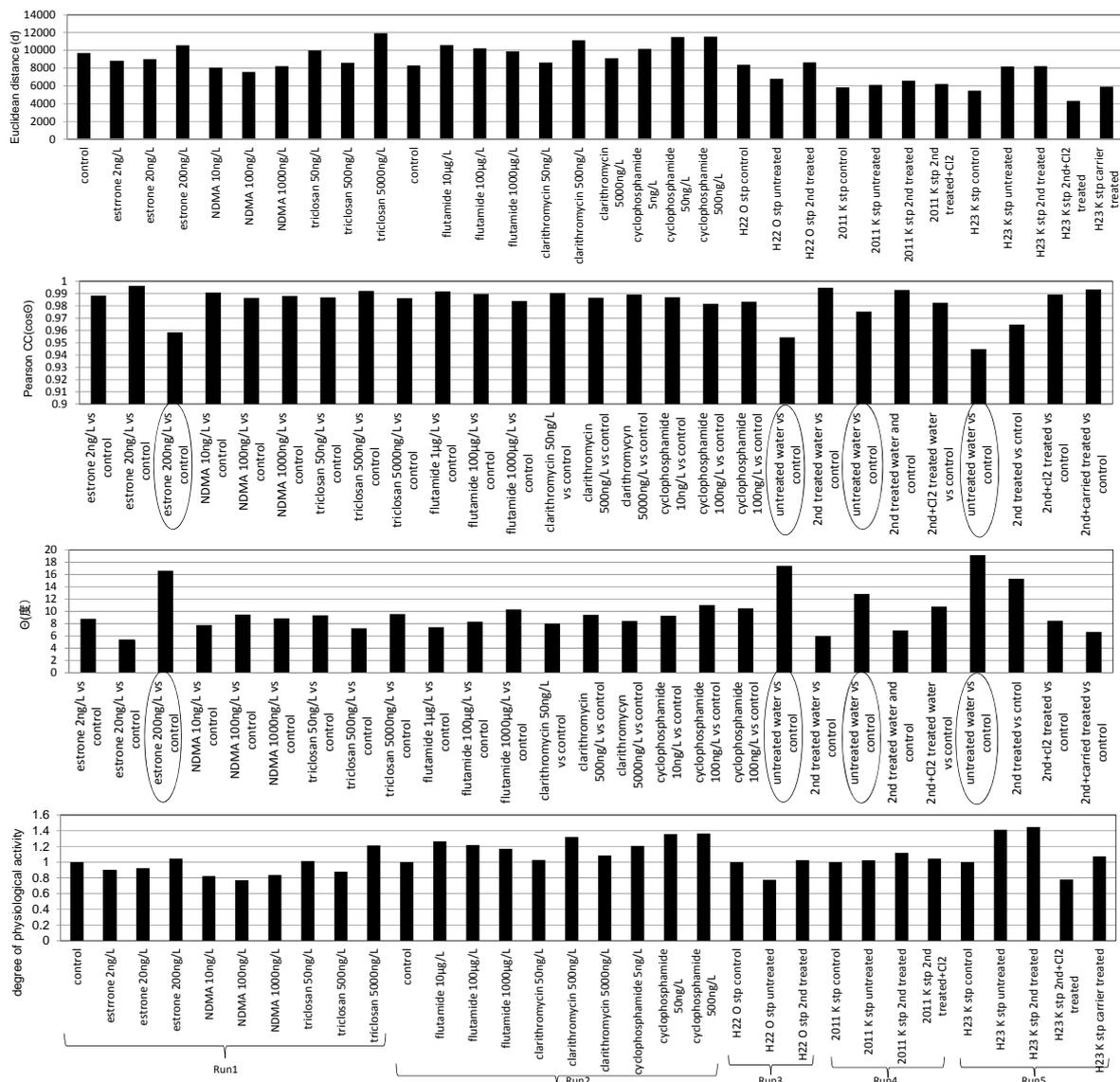


図-3 各化学物質、下水試料曝露区のユークリッド距離(d)、 $\cos \theta$ 、 $\theta$ 、生理活性度(Degree of physiological activity)  
Run1,~2は化学物質、Run3~4は下水試料

がコントロールに近づくことがわかる。図-3は、各曝露区のユークリッド距離(d)、ピアソン相関係数( $\cos \theta$ )、 $\theta$ 、生理活性度(Degree of physiological activity)を表示したものである。図より、エストロン、流入下水で $\cos \theta$ の低下、 $\theta$ の増加がみられる。化学物質と下水試料との比較から影響を推測すると、流入下水はエストロン(女性ホルモン)の影響が強いことがわかった。

## 5. おわりに

化学物質、下水試料に曝露したメダカの遺伝子発現プロファイルを取得し、ユークリッド距離とピアソン相関を解析した。その結果、エストロン、流入下水とともにピアソン相関係数が低下することが明

らかとなった。

今後は、化学物質や下水試料曝露で変動する遺伝子の機能に着目し、生物影響を解析していく予定である。

## 参考文献

- 1) Kishi, K., Kitagawa, E., Iwahashi, H., Suzuki, K., Hayashi, Y. (2008), Medaka DNA Microarray: A Tool for Evaluating physiological Impacts of Various Toxicants, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Biological Responses to Chemical Pollutants*, 143-154

# 水生生物に蓄積している未規制化学物質の実態の解明に関する研究

水質チーム 上席研究員 南山瑞彦  
 総括主任研究員 小森行也  
 主任研究員 北村友一

## 1. はじめに

現在、河川・湖沼においては環境基準が設定され、BOD、COD、重金属、有機塩素化合物、農薬等を指標とした水質管理が行われているが、河川・湖沼に棲息する水生生物への蓄積という視点でみると不明な点が多い。水質（濃度）測定では検出されない物質であっても、生物濃縮により検出可能となる物質も考えられることから、生物濃縮による指標を加えた総合的な水質管理が必要である。本研究の調査対象物質は、水生生態系への影響が懸念されている医薬品類のなかから、広く一般細菌に対する殺菌剤として使用され、石鹸、シャンプー、歯磨き等に含有されている医薬部外品のトリクロサンとした。調査対象生物は、水系食物連鎖における高次消費者の魚類とした。平成 23 年度は、生体試料（魚類）のトリクロサン分析前処理方法として、抽出方法（超音波抽出、高速溶媒抽出）、精製方法（フロリジル、GPC）について検討した。

## 2. 方法

生物試料（魚類）の分析前処理（抽出・精製）及び測定に関する検討は、既往研究・調査報告等<sup>1)~8)</sup>を参考に行った。抽出方法は、超音波抽出、高速溶媒抽出の 2 方法、精製方法はフロリジル、GPC の 2 方法について予備検討を行い、それぞれ回収率の高かった超音波抽出とフロリジル精製による方法とした（図-1 参照）。また、抽出・精製後の測定は GC-MS により行った。GC-MS の測定条件を表-1 に示す。本条件による検出下限値は 2.72ng/g-wet であった。具体的な生物試料（魚類）のトリクロサン分析は、スズキの食肉部位を用い、トリクロサンの添加回収試験（n=5）を行った。

## 3. 結果と考察

抽出の予備検討は、超音波洗浄器（発振周波数：44KHz、超音波：320W、抽出時間：10 分）による方法と高速溶媒抽出装置（抽出温度：100℃、抽出圧力：1500psi）による方法について各 3 試料行った。抽出操作における平均回収率は、超音波抽出が 95.7%、高速溶媒抽出が 77.4%であった。また、精製の予備検討は、フロリジルカートリッジ（Sep-Pak Plus Florisil）にトリクロサンを負荷した後、ヘキサン 5mL の後に 30%酢酸エチル/ヘキサン溶液 10mL で溶出する方法と GPC によるトリクロサンの溶出が認められたフラクション

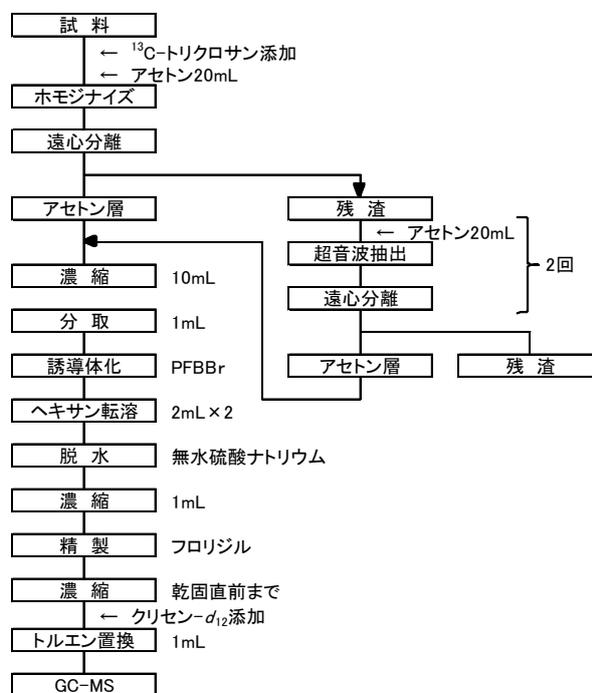


図-1 生物試料（魚類）のトリクロサン分析フロー

を分析対象とする方法について各3試料行った。精製操作における平均回収率は、フロリジルが100%、GPCが89.5%であった。

以上の予備検討に基づき生物試料(魚類)を用いた分析確認は、図-1に示す分析フローに従いスズキの食肉部位を用いた添加回収試験(n=5)で評価した。添加回収試験は、スズキの食肉部位5gを遠沈管にはかりとり、トリクロサン100ngを添加して行った。GC-MSによる定量では、トリクロサン(PFB化体)のマススペクトルを基に定量イオンをm/z252、確認イオンをm/z254に設定した。生物試料(魚類)の前処理試料では、定量イオン(m/z252)のトリクロサン(PFB化体)ピークが生物試料由来と考えられる妨害の影響を受け過大評価された。このため、確認イオンとしていたm/z254を定量イオンに変更し、新たにm/z468を確認イオンとすることでトリクロサン(PFB化体)ピークを得ることができた。スズキを用いた添加回収試験の結果を表-2に示す。試験の結果、添加した試料からは平均79.2%(CV8.2%)の回収が確認され、前処理全体を通じて、生物試料(魚類)への適用が可能であると考えられた。

表-1 GC-MS 測定条件

GC条件		MS条件	
カラム	DB-17ms	イオン化方法	EI法
昇温条件	100°C(1min)-10°C/min -300°C(5min)	イオン化電圧	70eV
注入方法	スプリットレス	インターフェイス温度	280°C
注入口温度	270°C	イオン源温度	260°C
注入量	2μL	検出モード	SIM
キャリアーガス	ヘリウム	定量イオン(m/z)	254
		確認イオン(m/z)	468

表-2 生物試料(魚類・スズキ)のトリクロサン添加回収試験結果

	操作BL	無添加試料	試料1	試料2	試料3	試料4	試料5
試料量(g-wet)	—	5.0	5.1	5.0	5.1	5.0	5.0
添加量(ng)	—	0	100	100	100	100	100
測定値(ng/g-wet)	<2.7	<2.7	13.9	14.9	16.1	16.4	17.2
回収率(%)	—	—	70.7	74.3	82.5	82.2	86.5

#### 4. まとめ

水生生物(魚類)試料のトリクロサン分析の前処理(抽出・精製)について検討し、超音波抽出・フロリジル精製の後、GC-MSによる測定方法を提案した。本方法による添加回収率は、スズキの食肉部位を用いた確認試験(n=5)により、平均回収率79.2%、CV8.2%が得られ、本方法は魚類試料への適用が可能であると考えられた。

なお、本研究は、運営交付金(一般勘定)により実施されたものである。

#### 5. 参考文献

- 1) 田中宏明(2008)河川水中で見出される医薬品の底質汚染の実態と生物影響に関する研究、平成19年度河川整備基金助成事業報告書、平成20年6月
- 2) 高田秀重ほか(2011)東京湾におけるトリクロサン類の分布と動態、第20回環境化学討論会講演要旨集
- 3) 要調査項目等調査マニュアル(水質、底質、生物)、平成15年
- 4) 吉岡敏行ほか(2007)環境中超微量有害化学物質の分析、検索技術の開発に関する研究、岡山県環境保健センター年報
- 5) 亀田豊(2009)化粧品及び高分子製品由来の紫外線吸収剤の水環境中の汚染状況、第18回環境化学討論会講演要旨集
- 6) 篠原竜一ほか(2008)二枚貝を用いたアジア沿岸域の紫外線吸収剤汚染モニタリング、第17回環境化学討論会講演要旨集
- 7) 松原英理子ほか(2011)下水試料中医薬品のGC-MS(LRMS,MS/MS,HRMS)による分析検討、第20回環境化学討論会講演要旨集
- 8) 宝輪勲ほか(2007)GC-MSによる水環境中のPPCPs一斉分析法の基礎的検討、第16回環境化学討論会講演要旨集

## 魚類の繁殖・稚魚の生育試験による下水処理水の安全性評価に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 25

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、村山康樹、朴 昶範

### 【要旨】

下水処理水が魚類の繁殖に与える影響を明らかにするため、活性汚泥処理水、その塩素処理水に 28 日間、雄と雌メダカをペアで曝露し、産卵数、受精率を調査した。その結果、活性汚泥処理水、塩素処理水曝露区は、コントロール区より産卵数、受精卵数が増加した。受精率は、下水処理水曝露区で低下する傾向が観られた。

キーワード：下水処理水、メダカ、産卵数、受精率

### 1. はじめに

科学技術に関する基本政策について、総合科学技術会議（22 年 11 月 17 日）では、人の健康保護や生態系の保全に向けて、大気、水、土壌における環境汚染物質の有害性やリスクの評価、その管理及び対策に関する研究を推進することが位置づけられている。近年、水生生物に影響を与える恐れのある未規制の化学物質が下水処理水中に検出され、さらに、河川水に占める下水処理水の割合が高くなっていることから、水生生物に対する影響が懸念されている。水生生物の中で、魚類は、水生生物の代表種、経済生物でもあり、下水処理水が魚類に与える影響を把握する必要がある。魚類影響は、生態系保全を考慮すると、再生産に関する項目で評価すべきであるが、下水処理水に曝露したときの魚類繁殖への影響や稚魚の成育試験法はまとめられていないこと、さらに、試験に長期間・手間を要することから、下水処理水が魚類の繁殖・稚魚の成育に与える影響についての知見が得られていないのが現状である。

そこで、本研究では、下水処理水に適したメダカを用いた繁殖・成育試験法の提案と本法による下水処理水の魚類影響解明を目指している。

本年度は、下水処理水がメダカの産卵に影響を及ぼすかどうかを明らかにするため、下水処理水に雄・雌ペアのメダカを 28 日間曝露し、その間の産卵数、受精率を調査した。

## 2. 実験方法

### 2.1 活性汚泥処理実験装置

本調査で用いた活性汚泥処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L×4 槽）、最終沈殿池（700L）、塩素接触槽（100L）から構成されており、同じ仕様の装置が 2 系列、並列設置されている（以下、I 系、II 系という）。装置の概要を図-1 に示す。

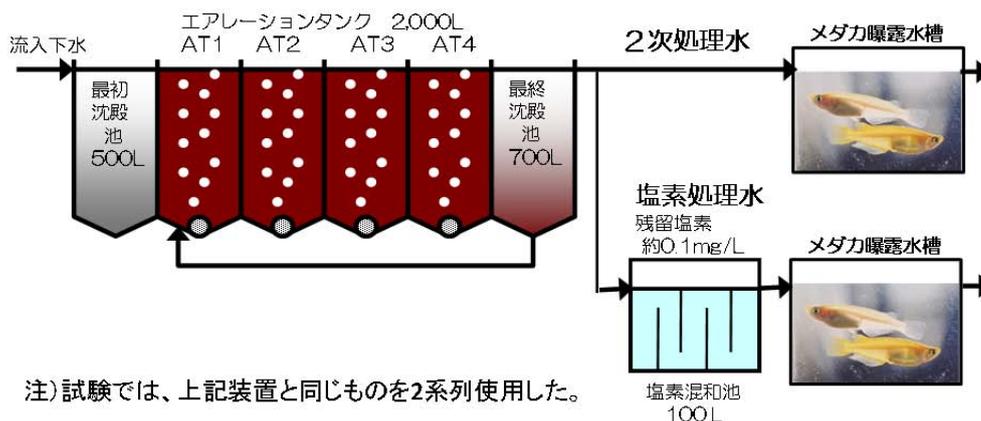
### 2.2 活性汚泥処理装置の運転概要

本調査では、分流式下水道として整備され主に生活排水が流入する下水処理場の生下水を、流入下水として用いた。生物反応槽は、第 1 槽から第 4 槽まで全面エアレーションを行う、活性汚泥法による処理を行った。水理的滞留時間（HRT）は、I 系、II 系ともに 7 時間程度となるように流入水量を制御した。ただし、汚泥滞留時間（SRT）は、I 系で 7 日程度、II 系で 20 日程度を目標に、余剰汚泥引抜量の管理を行った。両系とも AT4 の水温は約 15℃であった。塩素処理槽では、I 系、II 系ともに塩素接触槽の流出水で総残留塩素濃度が 0.1mg/L 程度となるように、次亜塩素酸ナトリウム溶液を連続注入した。

### 2.3 メダカの曝露実験

メダカの曝露水は、活性汚泥処理条件の違いで影響が異なるかどうかを観るため、I 系、II 系の活性汚泥処理水と I 系、II 系の塩素処理水とした。コントロールには脱塩素水道を用いた。評価項目は、産卵数、受精卵数、曝露終了後の肥満度、肝指数、生殖線指数とした。メダカの曝露条件を表-1 に示す。なお、曝露メダカは、曝露当日まで雄・雌を別々に飼育していたものであり、試験前の事前ペアリングは行っていない。

### 2.4 水質分析



注) 試験では、上記装置と同じものを2系列使用した。

図-1 活性汚泥処理装置と流水式メダカ曝露装置の概要

曝露水の性状を把握するため、曝露水槽中の一般水質項目(水温、pH、DO、電気伝導度、DOC、NH<sub>4</sub>-N、NO<sub>2</sub>-N、NO<sub>3</sub>-N、PO<sub>4</sub>-P、残留塩素濃度)の分析を週2回行った。

表-1 メダカの曝露条件

供試魚	4-5か月のd-rR系メダカ (15 pair/曝露区)
曝露水	活性汚泥処理水(I系=SRT7日、II系SRT20日) 塩素処理水(I系=SRT7日、II系SRT20日) 脱塩素水道水(コントロール)
曝気	微曝気あり
曝露期間	28日間、流水式(30L水槽、5回転/日)
水温	24°C
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	人工配合飼料、4回/日
水質分析	pH、DO、残留塩素濃度、電気伝導度、有機汚濁指標(DOC)、各態栄養塩濃度(NH <sub>4</sub> -N、NO <sub>2</sub> -N、NO <sub>3</sub> -N、PO <sub>4</sub> -P)
評価項目	産卵数/日、受精率/日 肥満度、肝指数、生殖線指数/曝露終了後

### 3. 実験結果

#### 3.1 水質分析の結果

図-2 に曝露期間中の一般水質項目の結果を示す。曝露期間中の各曝露水の水温は24°C、pHは7程度、DOは6mgO<sub>2</sub>/L以上に維持されていた。曝露実験開始時は、活性汚泥の馴致が不十分であったため、NH<sub>4</sub>-Nが残留していたが、次第に低下している。II系(SRT=20)は活性汚泥沈降性が悪化し、活性汚泥が流出するなど安定した活性汚泥処理の運転が困難であった。なお、塩素処理水の曝露水槽中での総残留塩素濃度は、I、II系とも0.01~0.05mg/Lの範囲であった。

#### 3.2 産卵数、受精卵数、受精率の結果

図-3 に曝露期間の累積産卵数、図-4 に累積受精卵数、図-5 に受精率の結果を示す。I系の2次処理水

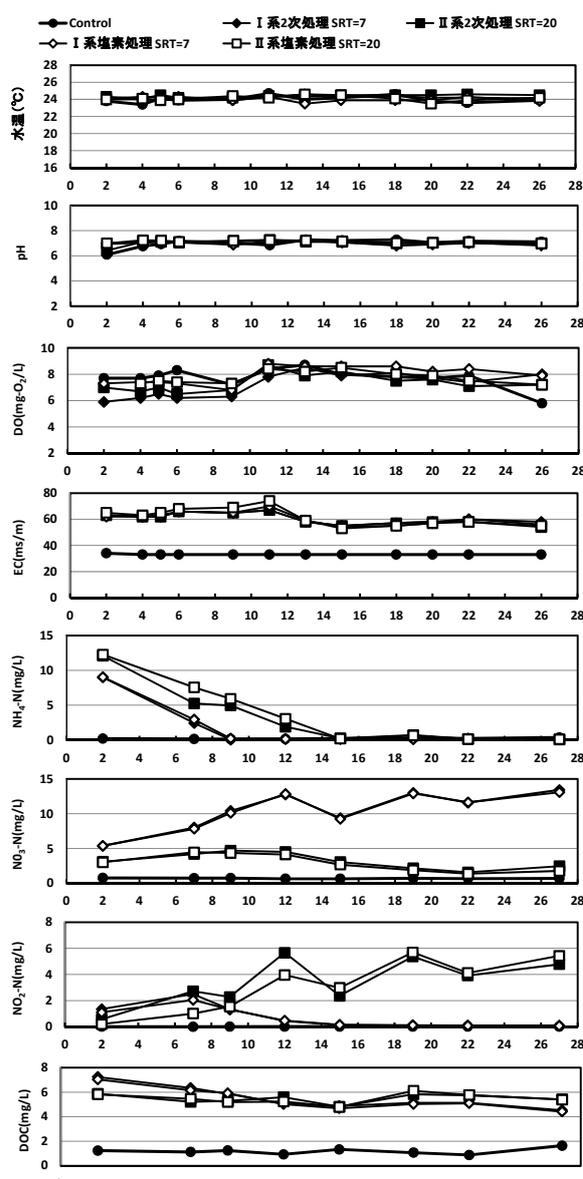


図-2 曝露期間中の各曝露水の水質

曝露区の累積産卵数は、曝露後14日以降からコントロール区に対して有意に増加した。他の処理水曝露

区の累積産卵数は、コントロール区より有意差はなかったが多くなる傾向であった。

図-5 は、曝露終了前 10 日間の受精率であるが、全ての処理区の受精率は、コントロール区より有意に低くなった。

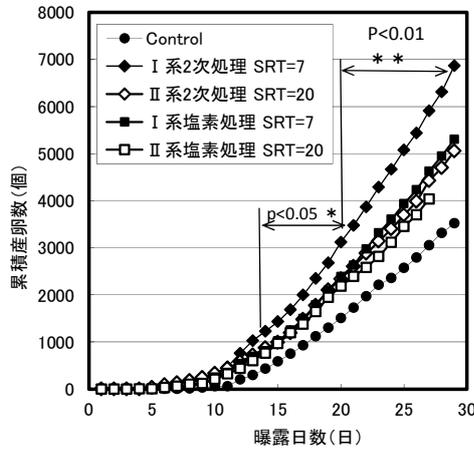


図-3 各曝露区の曝露日数と累積産卵数の関係

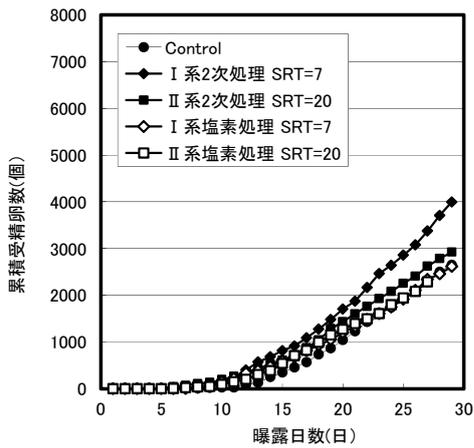


図-4 各曝露区の曝露日数と累積受精卵数の関係

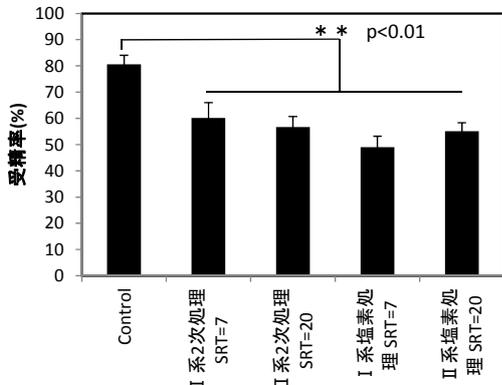


図-5 各曝露区の受精率

### 3.3 肥満度、肝、生殖腺指数の結果

図-6 は各曝露区の雄メダカの曝露終了時の肥満

度、肝指数、生殖腺指数を以下の式から算出したものである。図-7 は雌メダカの結果である。

$$\text{肥満度} = (\text{体重}(\text{mg}) / \text{全長}(\text{mm})^3) \times 100$$

$$\text{肝指数} = (\text{肝重量}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g})) \times 100$$

$$\text{生殖腺指数} = (\text{生殖腺重量}(\text{g}) / \text{体重}(\text{g})) \times 100$$

雄、雌メダカとも、各処理水曝露区の肝指数は、コントロールより有意に高くなった。

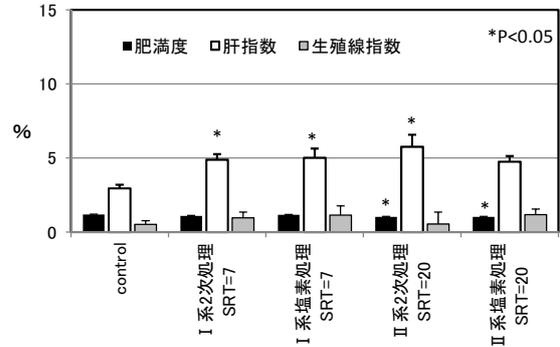


図-6 曝露終了後の雄メダカの肥満度、肝指数、生殖腺指数

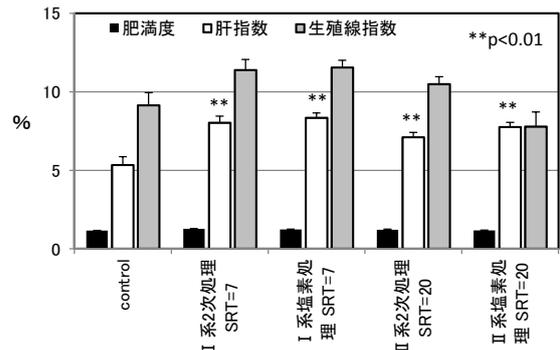


図-7 曝露終了後の雌メダカの肥満度、肝指数、生殖腺指数

### 4. おわりに

下水処理水が魚類の繁殖に与える影響を明らかにするため、活性汚泥処理水、塩素処理水に 28 日間、雄と雌メダカをペアで曝露し、産卵数、受精率などを調査した。その結果、活性汚泥処理水、塩素処理水曝露区は、コントロール区より産卵数、受精卵数、肝指数が増加した。受精率は、下水処理水曝露区で低下する傾向が観られた。

今回の実験では、安定した活性汚泥の運転ができなかったため、処理法と魚類影響の違いは明確ではない。今後は、処理レベルと繁殖への影響を明らかにするため、高度処理水を曝露処理水に加え、再実験するとともに、稚魚の生育試験、2 世代目の影響(産卵数)を調査する予定である。

## 微量金属を対象とした藻類抑制手法の提案

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 26

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、平山孝浩、柴山慶行

### 【要旨】

本研究では、藻類の大量増殖により景観障害や異臭味等の利水上の問題を抱えているダム湖や下水処理水の放流先に対し、微量金属に着目し、藻類の抑制手法を提案することを目的としている。微量金属の抑制手法としては、水質チームの過年度の研究にて、固定化担体を用いることで下水処理水中のマンガン濃度が低下することが報告されているが、下水処理水を修景利用している実施設における適用事例はない。そこで、下水処理再生水に微生物固定化担体による処理を行った水を修景水路の実施設へ適用した事例について本紙にて報告する。二つの水路を比較対象として設定し、一方には下水処理水に担体処理を追加した水を、他方には下水処理水を追加処理なしの水を通水した。水路中に素焼きタイルを設置してタイル上のクロロフィル *a* を比較した結果、担体処理を追加した水路では、付着藻類増殖の低下が確認された。

キーワード：下水処理再生水、微量金属、藻類、マンガン

### 1. はじめに

下水処理水などの再生水の利用が、世界的に進められている。我が国においても、下水再生水を都市内にある水資源の一つとしてとらえ、有効活用を進めている。図-1に、我が国における下水処理水の再利用状況を示す。日本においては下水処理水量の約 1.5%が再利用されている。用途としては、修景用水、河川維持用水の 2 つで半分以上の水量を占めている。水資源の確保とせせらぎ創出を通じた都市のうるおいづくりという、相反するニーズを満たすために下水処理水が利用されている一方で、処理水のほとんどが再利用されずに放流されており、再利用の余地が大きいこともうかがえる。下水処理水再利用の普及に関しては、下水を再利用することに対する人々の意識の問題や、コストと技術面での問題など課題を抱えているのも事実である<sup>1)</sup>。地球環境の変化による渇水リスクの上昇が指摘されている中で、都市における水資源を確保し、うるおいづくりへのニーズを満たしていくためにも、これらの課題を解決していくことが望まれている。

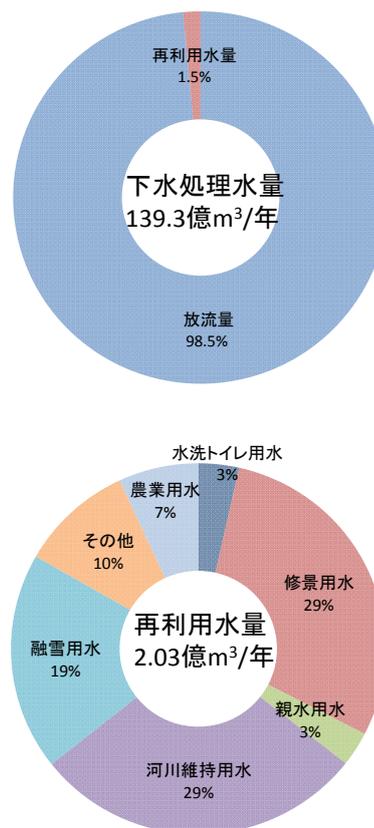


図-1 下水処理水の再利用状況(平成 19 年度国土交通省下水道部)

下水処理水の再利用をすすめるにあたり調査研究をすべき課題として、修景用水利用施設及び親水用水利用施設における美観確保対策、また、安価で高度な水処理技術の開発が求められている<sup>2)</sup>。下水処理水は、窒素やリン等の栄養塩類を比較的高濃度に含む場合があるため、都市内の水路や修景池などに利用した場合に藻類の大量増殖を引き起こし、景観障害等の問題が生じる場合がある。この問題に対応するため、下水処理水中の栄養塩類を極めて低くする手法（凝集剤の使用によるリンの高度除去等）が適用可能であると考えられるが、現状では設備費・運転費ともに高価である。そこで、従来方法よりも安価な微生物保持担体を用いた技術を下水処理水に適用して、修景水路に通水することで問題の解決を試みた<sup>3-4)</sup>。これは、下水処理水に対して好気性の生物膜処理を適用し、微量元素濃度を低下させることにより、藻類増殖の抑制を図るものである。

## 2. 担体処理による下水処理水からの微量元素の除去、及び実施設への適用

### 2. 1 実験概要

図-2に担体処理実験及び、実施設への適用実験の概念図を、写真-1に使用した微生物保持担体を示す。標準活性汚泥法とオゾン処理が施された下水処理水を、微生物保持担体（ポリプロピレンを基材とした中空円筒状の固体 $4\text{mm}^{\text{OD}} \times 3\text{mm}^{\text{ID}} \times 5\text{mm}^{\text{L}}$ ）が添加された円筒形の反応槽を2槽（有効容量 $0.56\text{m}^3$ 、水学的滞留時間計2時間）導入し、下部より空気曝気を行い、担体表面に付着した生物膜により処理を実施した。反応槽における担体添加率は体積比で30%とした。担体処理の効果を確認するために、下水処理水と担体処理水の水質分析を行い比較した。水質分析は、藻類の増殖が活発になる7月から10月までに行い、下水処理水と担体処理水を月1回採水し、採水試料中の浮遊物質（SS）、有機性浮遊物質（VSS）、溶解性有機性炭素（DOC）、総窒素（T-N）、アンモニア性窒素（ $\text{NH}_4\text{-N}$ ）、亜硝酸性窒素（ $\text{NO}_2\text{-N}$ ）、硝酸性窒素（ $\text{NO}_3\text{-N}$ ）、総リン（T-P）、オルトリン酸態リン（ $\text{PO}_4\text{-P}$ ）、総鉄（D-Fe）、溶存態鉄（D-Fe）、総マンガン（T-Mn）、溶存態マンガン（D-Mn）の各濃度を測定した。懸濁態と溶存態の分離は、採水時にガラス繊維ろ紙（粒子保持能 $1\mu\text{m}$ ）で行ったが、金属成分については、メンブレンフィルター（孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）を用いた。

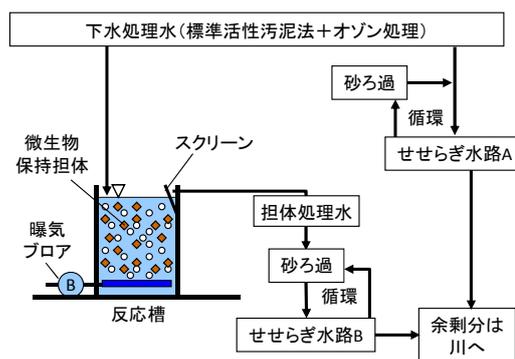


図-2 実験装置概念図



写真-1 微生物保持担体

さらに、担体処理水の藻類増殖抑制効果を確認するために、下水処理水が通水するせせらぎ水路A（写真-2）と、担体処理実験で得られた担体処理水に砂ろ過処理を行った水が通水するせせらぎ水路B（写真-3）とで、双方の水路内で発生する藻類の量を比較した。水路内で発生する付着藻類量を把握するために、それぞれの水路の壁面に $10\text{cm} \times 10\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ の素焼き板を設置し、約1ヶ月間水面下にさらした。1か月後に回収し、素焼き板表面上の固形物をポリエチレン製歯ブラシにて掻き取り、クロロフィルa（Chl.-a）測定し、単位面積当たりで換算したものを比較した。また、双方のせせらぎ水路の始点においてせせらぎ水路への流入水を月1回採水し、採水試料中のSS、VSS、DOC、T-N、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、T-P、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 、D-Fe、D-Fe、T-Mn、D-Mn、Chl.-aの各濃度を測定した。なお、せせらぎ水路を流れる水は循環しており、循環する水の一部だけを過し、再びせせらぎ水路へと供給されている。下水処理水の供給や降雨によりせせらぎ水路内の水量が一定量を超えるとオーバーフローし河川へと排水される仕組みになっている。



写真-2 せせらぎ水路A



写真-3 せせらぎ水路B

## 2. 2 実験結果と考察

### 2. 2. 1 担体処理による効果の確認と考察

表-1に水質の測定結果の平均値を示す。

T-N、T-Pについては、大きな差が見られない一方、Fe濃度とMn濃度の低下が確認された。過去の研究<sup>5-6)</sup>によれば、窒素とリンの定量結果にほとんど影響を与えない一方で、マンガン濃度を高効率に低下させることが報告されており、反応槽前後のD-Feの形態は、曝気処理により、また、D-Mnの形態は、担体上のマンガン酸化細菌等の活動により溶存態から懸濁態へと変化したと考えられる。今回の実験結果では、T-Fe及びT-Mnの値も下がっている結果となっている。これは、1ヶ月に一回の採水であったため、物質収支の把握には不十分だった可能性や曝気量が不十分で懸濁化した鉄とマンガンが十分に混合せず槽内に滞留していた可能性がある。今後は、実施設への適用に向けて適切な曝気量を求める等、運転手法の最適化も含めて再検討する必要がある。

### 2. 2. 2 実施設への適用結果と藻類増殖抑制効果の確認

表-2に、下水処理水を通水したせせらぎ水路Aと、

担体処理を行った後にろ過処理を行った水を通水したせせらぎ水路Bの実験期間中の水質測定結果(平均値)を示す。T-NやTPについては、せせらぎ水路Bがせせらぎ水路Aより半分以下にまで減少していた。金属類に関しては、D-Feには大きな差はみられなかったが、T-Feはせせらぎ水路Bがせせらぎ水路Aの1/6程度であり、Mnは懸濁態、溶存態ともに1/10程度であった。これらの測定結果から、担体処理を行った後にろ過処理を行ったことによる効果がせせらぎ水路の水質にも表れていることが確認された。

設置した素焼き板の表面を確認すると、せせらぎ水路Aでは実験期間を通じて表面全体を覆うほどの付着物が確認されたが、せせらぎ水路Bでは付着物はみられたものの、表面全体が覆われることは無く、付着物の長さも短かった。付着物の分析結果を表-3に示す。せせらぎ水路BのSS、VSSは、せせらぎ水路Aの1/2程度であり、Chl-aは1/3程度であった。

藻類増殖の制限因子として一般的にはリンが挙げられるが、Chetelatら<sup>7)</sup>がカナダの南オンタリオと西ケベックの13河川について夏場に藻類量と藻類群集に及ぼす栄養塩類濃度と流速の影響を検討した結果によると、藻類量は0.006~0.082mg/Lの範囲においてT-P濃度と正の相関があると示されている。本研究で使用した下水処理水および担体処理水のT-P濃度は0.6mg/L程度であり、T-P濃度が藻類増殖の律速になっているとは考えにくい。したがって、目立った減少が確認され、藻類増殖に必要なものと考えられるD-Mn濃度が、制限因子になった可能性が高いと考えられる。

表-1 担体処理実験における水質測定結果(平均値)

項目	単位	下水処理水	担体処理
DOC	mg/L	3.35	2.68
T-N	mg/L	7.37	7.40
NH <sub>4</sub> -N	mg/L	0.07	0.02
NO <sub>2</sub> -N	mg/L	0.47	0.19
NO <sub>3</sub> -N	mg/L	6.31	6.89
T-P	mg/L	0.76	0.53
PO <sub>4</sub> -P	mg/L	0.40	0.37
T-Fe	μg/L	150.1	42.9
D-Fe	μg/L	28.6	6.21
T-Mn	μg/L	35.6	16.9
D-Mn	μg/L	1.96	0.25

表-2 水質測定結果

項目	単位	下水処理水を通 水した せせらぎ水路 A	担体処理+砂ろ 過水を通水した せせらぎ水路 B
SS	mg/L	8.85	3.65
VSS	mg/L	3.85	1.90
DOC	mg/L	3.29	3.98
T-N	mg/L	4.21	1.87
NH <sub>4</sub> -N	mg/L	0.02	0.02
NO <sub>2</sub> -N	mg/L	0.07	0.02
NO <sub>3</sub> -N	mg/L	3.5	1.28
T-P	mg/L	0.21	0.10
PO <sub>4</sub> -P	mg/L	0.13	0.08
T-Fe	μg/L	60.8	10.7
D-Fe	μg/L	6.84	5.66
T-Mn	μg/L	4.85	0.50
D-Mn	μg/L	1.69	0.16
Chl- <i>a</i>	μg/L	28.5	7.13

表-3 付着物の分析結果

項目	単位	せせらぎ水路 A 付着物	せせらぎ水路 B 付着物
Chl- <i>a</i>	μg/m <sup>2</sup>	26.2 × 10 <sup>4</sup>	8.5 × 10 <sup>4</sup>

### 3. まとめ

下水処理水を池や水路に修景利用した際に生じる藻類増殖の問題は、下水再生水の水質や水路における諸条件

(水温、水深、流速等)の影響が考えられる。本研究では水質に焦点を当て、下水再生水を利用する池や水路における付着藻類増殖を低減することを目的とし、微生物保持担体を用いた好気性の生物膜処理の適用を試みたところ付着藻類増殖が抑制された。今回用いた方法は、従来の方法よりも簡易なものであり、実際の修景用の水路や池に適用するニーズがあると考えられる。今後は、Mnなどの微量金属濃度と藻類発生の関係を精査し、実スケールでの実証実験を重ねることで運転技術の向上や効率化を図っていく予定である。

### 参考文献

- 1) 国土交通省:下水処理水の再利用のあり方を考える懇談会報告書, 2009.
- 2) 国土交通省:下水処理水の再利用水質基準等マニュアル, 2005.
- 3) 久岡ら:せせらぎ水路における付着藻類の抑制技術, 第48回下水道研究発表会, 235, 2011.
- 4) Hisaokaら: 8th IWA International Conference on Water Reclamation & Reuse, Barcelona, 2011.
- 5) 岡安, 鈴木 (2008) 下水の高度処理による藻類増殖能の抑制, 第42回日本水環境学会年会講演集, p. 280.
- 6) 岡安, 原田, 鈴木 (2009) 下水の高度処理による付着藻類増殖能の抑制, 第43回日本水環境学会年会講演集, p. 359.
- 7) Chetelatら: Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 56 (4), 560, 1999.

## 亜酸化窒素の水環境中動態に水質が与える影響に関する基礎的研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 25

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：南山瑞彦、北村友一、村山康樹

### 【要旨】

河川水中での  $N_2O$  の生成実態を解明するため、はじめに、河川水レベルの溶存  $N_2O$  の測定へのマイクロセンサーの適用性を検討した。次に、マイクロセンサーを用いて下水処理水が流入する実河川水の溶存  $N_2O$  の測定を行った。マイクロセンサーによる溶存  $N_2O$  の検出限界は  $1.7 \mu g-N/L$ 、定量限界は  $17 \mu g-N/L$  となった。この値は、河川水の溶存  $N_2O$  濃度レベルであり、定量値は参考値となるものの河川水中の溶存  $N_2O$  を検出できることがわかった。下水処理水が流入する実河川水の溶存  $N_2O$  の測定では、今回の実態調査からは、下水処理水流入後、および、流下過程で溶存  $N_2O$  濃度の上昇は認められなかった。

キーワード：亜酸化窒素、河川水、下水処理水

### 1. はじめに

主要な温室効果ガスの一つとして、その削減が社会的に求められている亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) の生成源については、図-1 に示した通り、自然土壌や海洋の占める割合が大きいことが知られている<sup>1)</sup>。河川、河口、海岸での  $N_2O$  の発生割合は 10%程度であるとされているが、地球温暖化の抑制のためには、河川分野においても、河川管理上の工夫により、 $N_2O$  発生量を低減していく必要である。

河川での  $N_2O$  の発生量の調査例は少なく、河川での  $N_2O$  の正確な生成量は不明であり、河川での  $N_2O$  の生成実態を把握する必要がある。 $N_2O$  は、硝化や脱窒過程で生成することから、無機窒素を多く含む河川で  $N_2O$  の発生量が多いと予測される。河川水中の無機窒素の発生源は、下水処理水、畜産、畑など

が考えられるが、本年度は、河川水に占める下水処理水の割合の多い河川に着目し、河川水中の  $N_2O$  の実態調査を行った。さらに、下水処理水が  $N_2O$  の発生に寄与するかどうかを明らかにするため、河川底泥と下水処理水を用い、溶存  $N_2O$  の生成能を室内実験から確認した。

### 2. 溶存 $N_2O$ の測定方法

$N_2O$  は、無機窒素が水中で硝化・脱窒され、その過程で生成され、大気に移行する。河川での  $N_2O$  の生成能を明らかにするためには、水中の  $N_2O$  を測定することが重要である。

水中の  $N_2O$  の測定は、気相と水相の  $N_2O$  濃度の平衡関係を用いて、気相の  $N_2O$  濃度をガスクロマトグラフで測定し、水相の  $N_2O$  濃度が算出される場合が多い。この場合、使用するガスクロマトグラフの検出器には、放射性同位元素が封入された ECD 検出機が必要であり、使用上の制約がある。

近年、溶存  $N_2O$  のダイレクト測定が可能なマイクロセンサーが開発されたことから、その適用を試みた。使用した  $N_2O$  マイクロセンサーは、Unisense 社のものであり、検量線の直線性および検出限界を確認した。マイクロセンサーの測定条件は以下のとおりである。

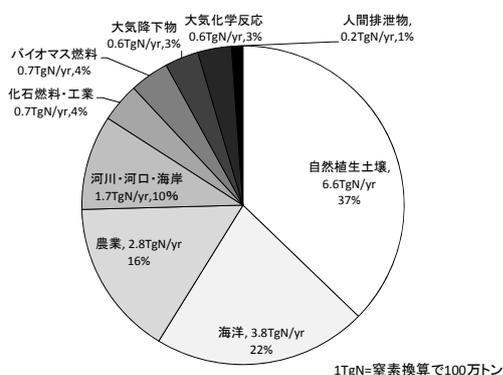


図-1 各分野別の  $N_2O$  の発生状況<sup>1)</sup>

### マイクロセンサーの測定条件

Pre-Amp Range : 1 mV/pA

Polarization : -800 mV

Gain : 1.0

ADC input range : 1

測定時間:1分30秒 (5秒に1回測定)

検量線の作成方法:蒸留水を  $N_2O$  ガス(2%)で曝気し、  
適宜希釈

検量線濃度0 ~ 2713  $\mu\text{g-N/L}$  の 8 濃度(2713, 904,  
301, 100, 33.5, 11.2, 3.72, 0  $\mu\text{g-N/L}$ )

### 3. 実態調査

実態調査は、栃木県下の図-2 に示した下水処理水が流入する小河川で5月に行った。河川水の採水地点は、下水処理水流入前が1地点(No. 1)、下水処理水流入後が2地点(No. 2, No. 3)である。No. 3はNo. 2の約1.7 km 下流である。No. 2 地点上流で、河川水に占める下水処理水の割合は約20%である。これら3 地点と下水処理水を採水し、試料を実験室に持ち帰り、マイクロセンサーで溶存  $N_2O$  濃度の測定を行った。

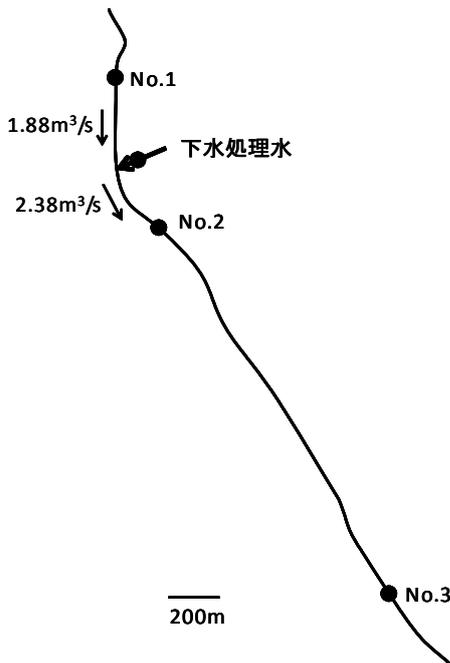


図-2 河川水の調査地点

### 4. 室内実験

図-3 に実験方法の概要を示す。250ml のメジウム瓶に河川底泥(茨城県の花室川中流から採泥)80g を瓶の底に敷き、その上に静かに下水処理水(茨城県の実下水処理水)を満水になるまで注入した。比較対照として、河川底泥に蒸留水を加えたもの、底

泥なしの条件を加えた。溶存  $N_2O$  濃度の測定は、下水処理水または蒸留水の注入直後と19 時間後に行った。

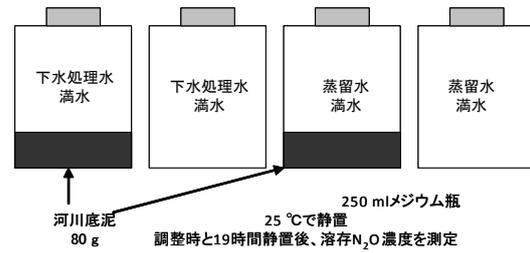


図-3 室内実験の概要

### 5. 結果

#### 5.1 マイクロセンサーの分析感度の確認

検量線作成のために8段階に調整した  $N_2O$  溶液の測定結果を図-4 に示す。シグナルが安定した後の6ポイントのデータを平均し、検量線を作成した。その結果、0~2713  $\mu\text{g-N/L}$  範囲で、 $R^2=0.9993$  で直線性が得られた。

蒸留水をブランクとし、そのシグナル強度から標準偏差 ( $\sigma$ ) を求め、 $3\sigma$  を検出限界、その10倍を定量限界とすると、検出限界は、1.7  $\mu\text{g-N/L}$ 、定量限界は、17  $\mu\text{g-N/L}$  となった。

河川水中の溶存  $N_2O$  濃度は、数~数十  $\mu\text{g-N/L}$  であること<sup>2)</sup>が多く、この値はマイクロセンサー法での検出限界から定量限界の範囲であり、定量分析値については慎重に判断する必要がある。

#### 5.2 実態調査結果

実河川での測定結果を図5に示す。No. 2, No. 3は、下水処理水が含まれる河川水であるが、本地点の溶存  $N_2O$  濃度は、上流水 (No. 1) および下水処理水よりも低濃度であり、流下過程での  $N_2O$  濃度の上昇は観られなかった。この要因には、溶存  $N_2O$  が揮発した、または、不明水により希釈されたことが考えられるが、原因解明には至っていない。

今後は、河川水に占める下水処理水の割合がより大きい河川での実態調査から  $N_2O$  の生成実態を明らかにしていきたい。

#### 5.3 室内実験の結果

図-6 に室内実験の結果を示す。溶存  $N_2O$  の測定値は、定量限界以下であるものの、河川底泥と下水処理を加えた条件は、他の条件より溶存  $N_2O$  濃度が高くなる傾向が観られており、河川での  $N_2O$  の生成には河川底泥が関与している可能性があった。

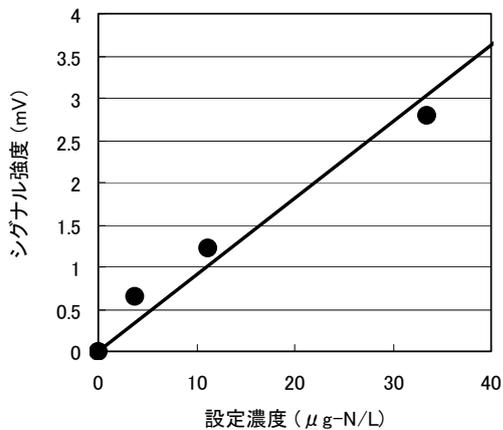
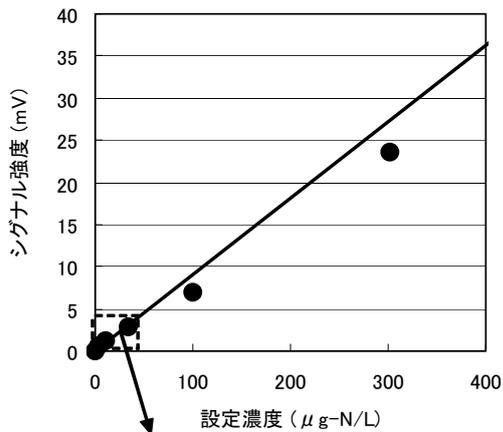
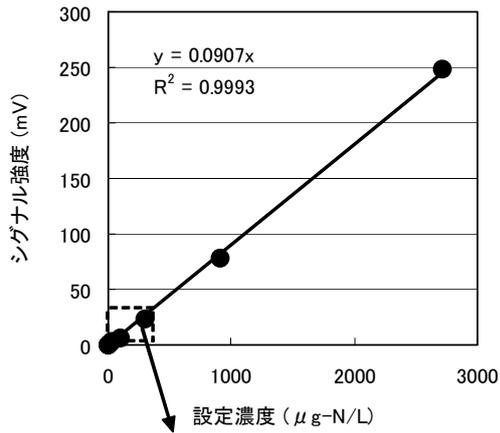


図-4 検量線の直線性の検討結果

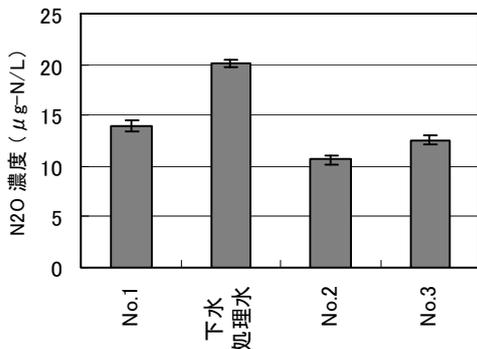


図-5 河川水中のN<sub>2</sub>O濃度

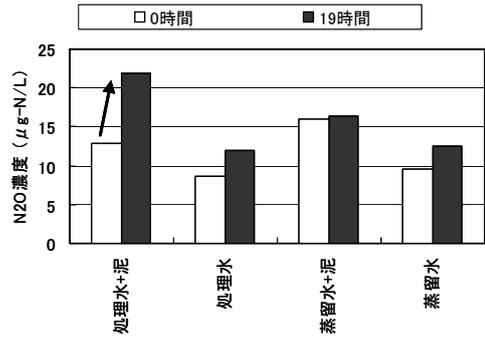


図-6 N<sub>2</sub>O生成実験の結果

## 6. おわりに

河川水中でのN<sub>2</sub>Oの生成実態を解明するため、N<sub>2</sub>Oマイクロセンサーの適用性の検討と下水処理水が流入する実河川水での溶存N<sub>2</sub>O測定を行った。

マイクロセンサーによる溶存N<sub>2</sub>Oの検出限界は1.7 μg-N/L、定量限界は17 μg-N/Lとなり、この値は、河川水の溶存N<sub>2</sub>O濃度レベルであり、定量値は参考値となるものの、河川水中の溶存N<sub>2</sub>Oの検出はできることがわかった。

下水処理水が流入する河川でのN<sub>2</sub>Oの生成実態を把握するため、実河川での調査を行った結果、今回の調査では、流下過程で溶存N<sub>2</sub>O濃度の上昇は認められなかった。一方で、室内実験からは、放流後の下水処理水は、河川底泥との接触によりN<sub>2</sub>O生成が促進される可能性があった。

今後より詳細な実態調査および室内実験から河川でのN<sub>2</sub>O生成実態を調査していきたい。

## 参考文献

- 1) Denman K. L. et al. (2007) Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry, In Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Eds: Solomon S. et al. Cambridge, UK and New York, NY, USA, Cambridge University Press, 546.
- 2) 長谷川聖 他(2006), 都市および農業地域に位置する河川からの亜酸化窒素の生成と放出, 土木学会論文集G, 62, 1, 183-190

## 21 世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価（バイオモニタリング）

研究予算：戦略的創造研究推進事業（CREST）

担当チーム：材料資源研究グループ

水環境研究グループ（水質）

研究担当者：鈴木 穰、南山瑞彦、北村友一、  
村山康樹、朴 昶範

### 1. はじめに

現在の都市の一過性の水循環システムでは、人口の集中化、都市開発事業などにより都市の水資源の不足が生じることから、量的あるいは質的に安全・安心な「新たな水利用システム」の開発を行う必要がある<sup>1)</sup>。下水処理水は都市において安定した水資源であり、その活用を進めることにより水不足が緩和できる。下水処理水を水資源とした「新たな水利用システム」の構築のためには、水質に関するリスクを適切に評価し、効率的にリスクを制御する手法を開発することが重要となる。

これまで、ヒト健康の保全のため、産業・家庭排水を含む下水処理水に関しては、排水規制や環境基準、PRTR 法による有害化学物質の個別規制・管理が進められてきた。さらに、水生生態系保全のため、致死的影响または長期間曝露による影響を評価するために水生生物に対する毒性試験を行い、水生生物への影響を総合的に評価する試みが、平成 21 年度から環境省中心に、生物応答を利用した新たな排水管理手法の検討調査が始められている<sup>2)</sup>。しかし、現在行われている水生生物の生死・繁殖・生長を指標とした毒性評価手法は、下水処理水の水生生物への影響評価において、低濃度の化学物質や比較的早い応答を要求されるモニタリングには適しておらず、生物影響を十分に評価できていない場合がある。

人間の社会活動に由来する多種多様の未規制の化学物質が、下水処理水中に低濃度で検出され、これらの化学物質の一部は公共用水域に流入している状況が明らかになり始めている。これらの化学物質のヒトや水生生態系への悪影響を未然に防ぐため、機器分析技術により下水処理水中や公共用水域の化学物質の種類とその濃度の実態調査も行われているが、個別化学物質の濃度測定から水生生物への影響を評価することは困難である。一方で、生物応答を利用した手法は、下水処理水や環境水中に存在する化学物質などの水生生物への総合的な影響を評価できる強みがあるが、通常の下水処理水では毒性影響が見られないことや毒性原因物質やその影響の作用機構を把握することが難しいという欠点がある。したがって、新たな水利用システムによる安全・安心な水循環システムを構築するためには、これまでより高感度のバイオモニタリングによる下水処理水の総合的な影響評価ができる新たな評価手法が求められる。

近年、遺伝子発現解析とバイオインフォマティクスを用いたバイオテクノロジーの技術発展により、細胞周期や病理組織の研究など網羅的ゲノム機能解析が進んでいる。それらの技術中のゲノム機能解析の手法であるマイクロアレイによる解析は、一度に数千から数万の遺伝子の発現パターンを調べられる技術であり、遺伝子発現解析により、遺伝子の生理的な機能および遺伝子の相互作用、ストレスが細胞に及ぼす影響の予測等多角的解析に利用できる潜在力を持ち、水生生物への化学物質の影響評価においてもこれらの手法の応用が期待されている。

本研究では、メダカを水生生物のモデルとし、高感度・応答速度の速い手法である DNA マイクロアレイにより発現変動された遺伝子を生体反応因子としたバイオモニタリングを行い、発現変動遺伝子解析により、下水処理水の水質評価手法の確立を目指し、下水処理水の水生生物への毒性原因の解明および下水処理プロ

セスによる毒性低減効果を明らかにすることを目的とする。

本年度は、60K メダカマイクロアレイの設計と作成を行った。また、作成した 60K マイクロアレイを用いて、下水試料と下水処理水が占める割合が大きい都市河川（多摩川中流域）水を対象として、水生生物への影響を調査した。さらに、下水試料の水生生物への毒性の同定するため、水生生物への作用機序が異なる 6 種類の化学物質を陽性対照区として、化学物質毎の遺伝子発現プロファイルでの発現変動遺伝子解析を行った。

## 2. 60K メダカマイクロアレイの設計と遺伝子発現解析

### 2.1 マイクロアレイの供試データ

60K メダカマイクロアレイ（図 1）の搭載する遺伝子情報は、公共のデータベース DFCI Medaka Gene Index ([http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=o\\_latipes](http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=o_latipes)) Release8.0 を使用した。

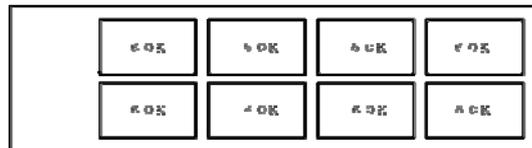


図 1. 60K-マイクロアレイ

### 2.2 60K マイクロアレイ搭載遺伝子の抽出

DFCI Medaka Gene Index Release8.0 に登録されているメダカの遺伝子情報から、TC (Tentative consensus) から始まる遺伝子 (37,177) と TC から始まらずかつアノテーション情報を有する遺伝子 (23,446) を抽出した。また、60K マイクロアレイは 61,657 プローブが搭載可能であるため、別途作成した全シーケンス搭載マイクロアレイ<sup>3)</sup>により、対照区（脱塩素水道水）に対する陽性対照区（流入下水）の発現比 (Log<sub>2</sub> ratio) の絶対値が大きくなる 1,034 プローブ (37,177 遺伝子および 23,446 遺伝子と重なりがないもの) も選定することとした。

### 2.3 マイクロアレイ搭載プローブの設計

マイクロアレイに搭載するプローブの設計は、Agilent 社の eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) を使用した。プローブ設計の際のパラメータは以下のとおりである。

Probe Length: 60bp

Probes per Target: 1

Probe Orientation: Sense

Design Options: Best Probe Methodology, Design with 3' Bias

Target File Details: Upload in FASTA Format

Transcriptome Details: Select Agilent-Provided Transcriptome (by Species)

### 2.4 アノテーションデータの追加

DFCI Gene Index Release8.0 に登録されている遺伝子の機能情報は少ないため、下水処理水曝露で発現変動した遺伝子の役割についての解析を可能とするため、マイクロアレイに搭載した各遺伝子に機能情報

(EntrezID (NCBI のデータベースで染色体の位置、構造、機能などの情報が登録されている ID) と GO : geneontology (遺伝子機能の用語と体系情報)) を追加した。機能情報の追加作業工程は以下のとおりである。

マイクロアレイに搭載した各遺伝子についてプローブ設計の基になった mRNA 配列情報を用いて Blastx

(Blastx : 核酸の相同性検索のひとつで、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後、アミノ酸配列データベースに対して検索を行う方法) 検索し、ヒトおよびゼブラフィッシュの RefSeq ID (NCBI (米国バイオテクノ

ロジーセンター) が提供しているデータベースの ID) を取得した。その後、得られた RefSeq ID を用いて NCBI のデータベースから Entrez Gene ID (NCBI の Entrez というデータベース (染色体の位置、構造、機能などデータベース) の ID) を検索し、各リストに Entrez ID を追加した。さらに、RefSeq ID を用いてヒトの GO 情報は、Uniprot-GOA (<http://www.ebi.ac.uk/GOA/>)、ゼブラフィッシュは、ZFIN(<http://zfin.org>) データベースから取得した。60K マイクロアレイに追加した情報を表 1 に示す。

表 1. 60K マイクロアレイの情報ファイルの構成

名称	解説
ProbeID	60K メダカアレイに登録した Probe の ID
PrimaryAccession	Entrez または RefSeq の何れかの ID (優先順位 1:Entrez, 2:RefSeq)
RefSeqAccession	メダカ塩基配列と最も相同性の高いヒトまたはゼブラフィッシュの RefSeq アミノ酸配列の Accession ID. E-value が同率で複数 hit した場合は最初に blast で hit した ID を代表値とした
GenbankAccession	プローブ設計の基となった DFCI 塩基配列の Genbank の Accession ID
EntrezGeneID	RefSeq ID で NCBI から取得したヒトまたはゼブラフィッシュの Entrez Gene ID. 複数 RefSeq で採用した方と同じ
GeneSymbol	上記 Entrez Gene ID で NCBI データベースを検索して取得した GeneSymbol (生物種は上記 RefSeq で採用した方と同じ)
TIGRID	プローブ設計の基となった DFCI 塩基配列の TIGR の Accession ID
Medaka GO	プローブ設計の基となった DFCI 塩基配列のメダカ Gene Ontology
Human GO	Uniprot-GOA ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )より取得したヒト Gene Ontology
Zebrafish GO	ZFIN( <a href="http://zfin.org">http://zfin.org</a> )より取得したゼブラフィッシュ Gene Ontology
Description	プローブ設計の基となった DFCI 塩基配列の Description
E-value	採用した RefSeqAccession の E-value
Count	Blastx 検索で E-value が同率を示した RefSeq アミノ酸配列の数
Species	E-value が小さい方の生物種

## 2.5. 遺伝子発現解析の方法

### 2.5.1. 8×60K DNA マイクロアレイの1色法

RNeasy® Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて、メダカ 1 個体毎に各臓器 (肝臓、鰓、精巣、脳) から Total RNA の抽出を行った。抽出した Total RNA (肝臓と鰓: 200 ng、精巣と脳: 100 ng) は、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて、cDNA 合成および Cyanine3-ラベル化 cRNA の合成を行った。その後、In situ ハイブリダイゼーションキットにより Cy3-ラベル化 cRNA のハイブリダイゼーションを行い、Agilent scanner により Cy3-ラベル化 cRNA のシグナルを読み取り、数値化を行った。数値化したシグナルデータを QC レポータによりチェックした後、解析ソフトである Subio platform (version 1.15, Japan) を用いて、遺伝子発現解析を行った。8×60K DNA マイクロアレイの1色法の順序を図 2 に示す。

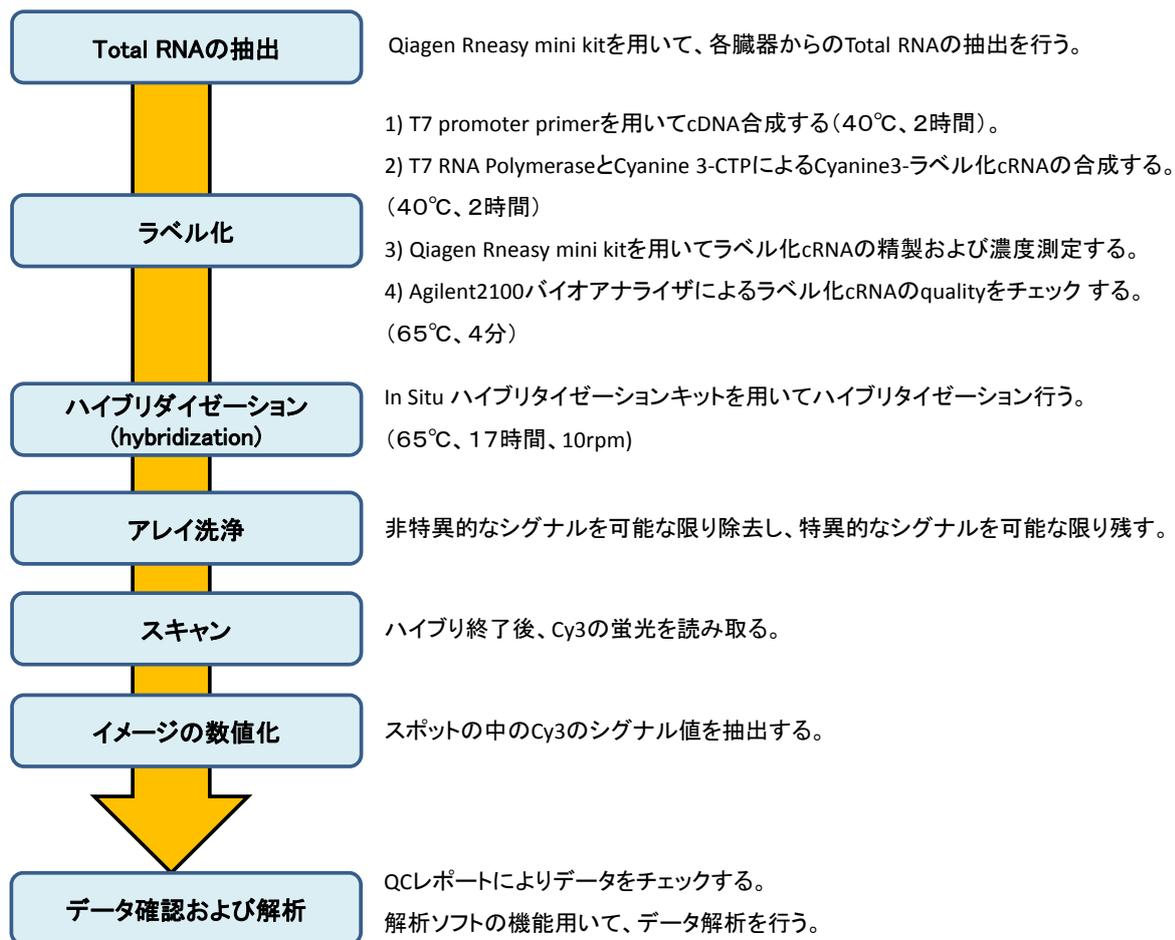


図 2. Total RNA を用いた 8×60K DNA マイクロアレイのプロトコール

### 2.5.2. 解析ソフト用いた遺伝子発現解析

8×60K DNA マイクロアレイから得られた約 60,000 遺伝子の発現レベルは、Subio Platform (Version 1.15, Japan) ソフトでグローバル正規化により標準化し、フィルタリングによる発現レベルが低い遺伝子あるいは曝露後も変動しない遺伝子を除去した。その後、遺伝子発現強度の間における、統計学的な分析を用いてスケール化を行った。すなわち、1 要因多群分散分析 (One-way ANOVA test) により、全ての実験群での発現変動がある遺伝子を抽出し、T-検定を用いて対照群に対する実験群での 2 倍以上アップレギュレートもしくはダウンレギュレートされた遺伝子を同定し、各遺伝子の倍率変化を算出した。それらの遺伝子群は対照群に対する発現変動遺伝子と指定され、この遺伝子群で特定の機能を含む既知の遺伝子セットをスクリーニングする Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 法<sup>4)</sup>を用いて、発現変動遺伝子中の特定機能を持っている遺伝子群をスクリーニングし、その遺伝子群を中心に、DFCI Medaka Gene Index の biological process ([http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/GO\\_browser.pl?species=Medaka&gi\\_dir=olgi](http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/GO_browser.pl?species=Medaka&gi_dir=olgi)) および AmiGO の the Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) の情報から発現変動遺伝子の生物学的な役割を解析した。解析された遺伝子群の発現変動から、対照群に対する実験群の水質安全性や化学物質の有害性を評価した。遺伝子解析ソフトを用いた遺伝子発現解析の順序を図 3 に示す。

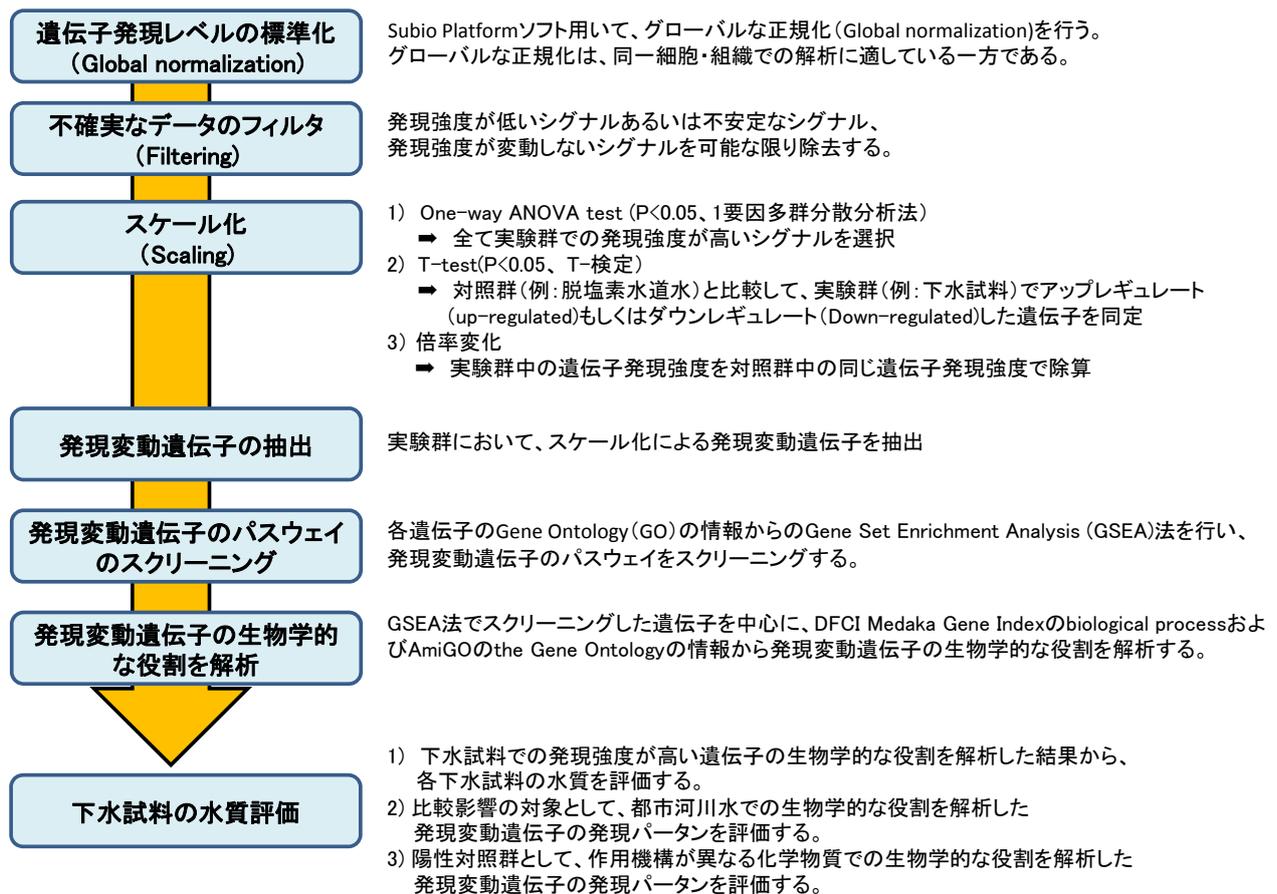


図 3. 遺伝子解析ソフトを用いた遺伝子発現解析のプロトコール

### 3. 雄メダカ遺伝子プロファイルを用いた下水試料の水質評価

河川水や湖沼などの公共用水域には下水処理水が流入され、地域によってはその割合が大きい場合もある。近年、下水処理水中に医薬品や難分解性化学物質が検出され、これらの化学物質の水生生物への影響を評価する必要があると指摘されている。しかし、下水処理水中の個別の化学物質の検出からそれらの化学物質の水生生物への作用機構を解明するには限界がある。従来行われてきた水生生物に対する毒性試験は、致死的な影響または長期間曝露による影響を評価するものであることから、短期間で下水処理水の水生生物への影響とその作用機構を解明できる総合的な評価手法が要る。

本研究では、短期間で総合的な下水処理水の水生生物への影響を評価するための一つ手法として、雄メダカを下水試料に 96 時間曝露し、DNA マイクロアレイ用いた遺伝子発現パターンの変化から生物影響の評価を試みた。

#### 3.1. メダカへの曝露

脱塩素水道水を対照群とした下水試料の曝露条件を表 2 に示す。流入下水は下水処理水の影響を評価するための陽性対照群とした。曝露実験は 3L ガラス水槽を用い、6 匹の雄メダカを各下水試料に半止水式 (1 日に 1 回交換) で 96 時間行った。各下水試料での遺伝子発現変動の解析を行う

表2. メダカのばく露条件

ばく露試料	: 脱塩素水道水(対照群) 流入下水、二次処理水
ばく露方式	: 半止水式
供試魚	: d-rR系メダカ雄魚(9-10ヵ月)
供試魚数	: 6匹/ばく露区
曝露期間	: 96時間
水 温	: 24±1°C
照 明	: 明期16時間/暗期8時間
給 餌	: なし
遺伝子発現解析臓器	: 肝臓、エラ、精巣、脳

ため、1.5mL マイクロチューブに RNAlater (Ambion 社製) 入れ、雄メダカから抽出した肝臓、エラ、精巣、脳をすぐに RNAlater に浸けた。RNAlater に入った各臓器は、Total RNA 抽出までに-20℃冷凍庫に保存された。

## 3.2. 結果と考察

### 3.2.1. 発現変動遺伝子の抽出

下水試料に曝露した雄メダカの各臓器から、対照群に対する発現変動遺伝子を抽出した (T-検定、 $P < 0.05$ )。抽出した各臓器の発現変動遺伝子の数を図 4 に示す。対照群に対して流入下水での各臓器の発現変動遺伝子の数は、1,665 (肝臓)、1,421 (エラ)、634 (精巣)、180 (脳) の順序になった。また、流入下水での発現変動遺伝子の数に比べて二次処理水での発現変動遺伝子

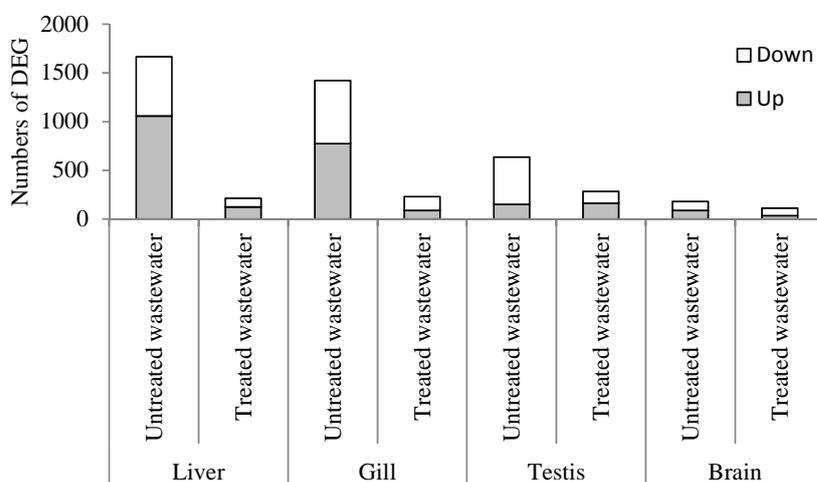


図 4. 脱塩素水道水に対する各下水試料での各臓器の発現変動遺伝子数

(differentially expressed genes, DEG) の数は、脳以外の臓器で 87~55%減少する (肝臓 : 212、エラ :

230、精巣 : 283、脳 : 112) 傾向が観られた。肝臓は流入下水での遺伝子発現反応が高い臓器であり、二次処理水は、流入下水の影響が低減していることがわかった。

### 3.2.2. 発現変動遺伝子のスクリーニング

流入下水の各臓器での発現変動遺伝子における、GSEA 法を用いた遺伝子群のスクリーニングや Gene Ontology (GO) 情報を用いた生物学的な役割を解析した。水生生物の個体レベルの影響を評価するため、流入下水の各臓器での様々な遺伝子群の生物学的な機能の中から、繁殖、ストレス、細胞毒性に関連する遺伝子群を中心に解析を行った。各臓器の発現変動遺伝子の繁殖、ストレス、細胞毒性に関連する遺伝子群の分布比率を図 5 に示す。特に、肝臓では女性ホルモンに反応する遺伝子、他の臓器 (エラ、精巣、脳) ではストレスに反応する遺伝子がそれぞれ高い比率として分布することがわかった。

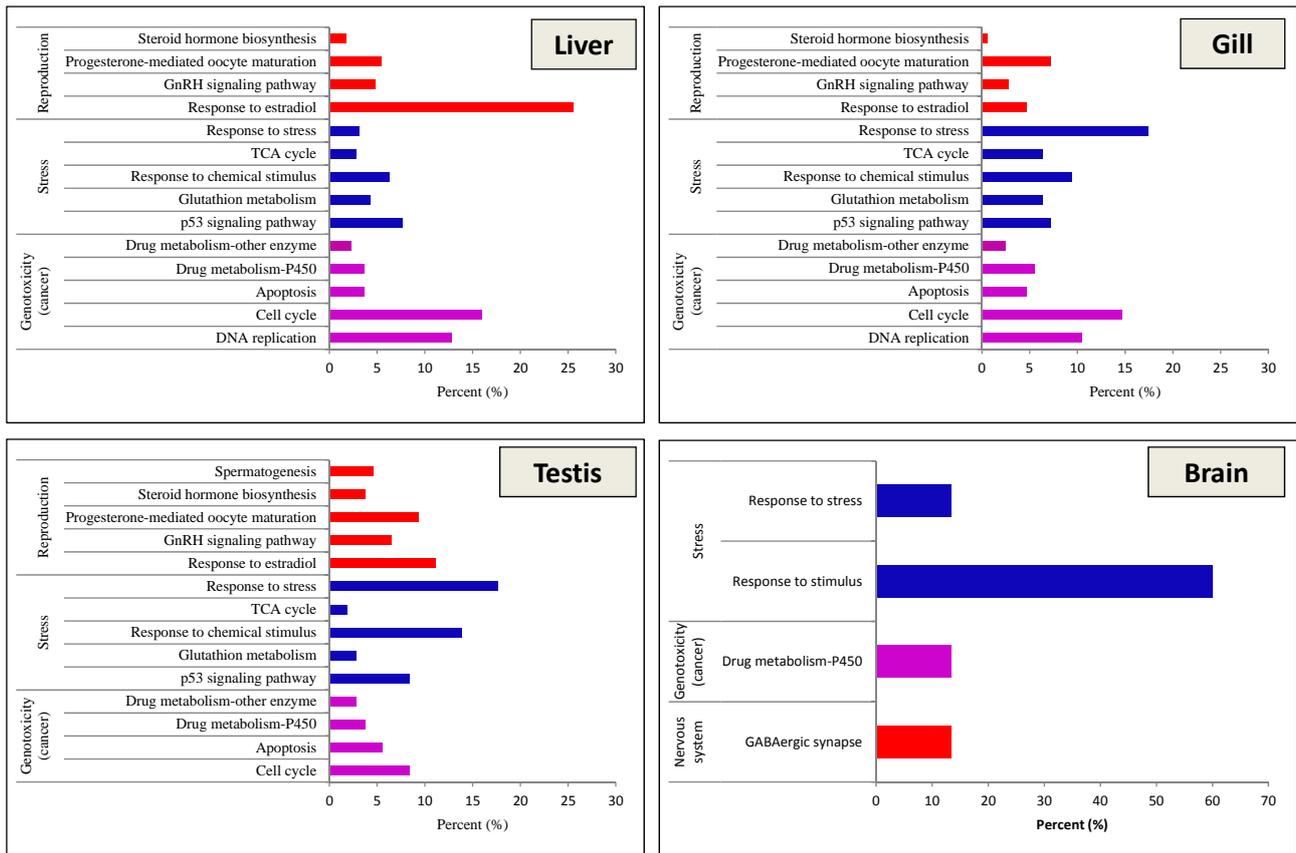


図5. 流入下水の各臓器の発現変動遺伝子の中で繁殖、ストレス、細胞毒性に関連する遺伝子の分布比率

### 3.2.3. 発現変動遺伝子を用いた下水試料の影響評価

発現変動遺伝子群のスクリーニングから得られた結果に基づき、繁殖、ストレス、細胞毒性に関連する遺伝子群について各臓器の遺伝子の発現パターンで下水試料の影響評価を行った。各臓器から着目した遺伝子と下水試料での発現強度を図6に示す。肝臓では女性ホルモンに反応する遺伝子群を、エラではストレスに反応する遺伝子群を、精巣では精巣発達段階に関連する遺伝子群を、脳では外部刺激や神経系に関連する遺伝子群を用いて、下水試料での発現強度を調べた。その結果、肝臓とエラでは、流入下水により女性ホルモンに反応する遺伝子群やストレスに反応する遺伝子群の発現強度が増加したが、二次処理水でのそれらの遺伝子は対照群と同じレベルであった。このことから、二次処理は、流入下水で現れる女性化影響やストレス影響を削減できていると考えられる。しかし、二次処理水の精巣での精巣発達段階に関連する遺伝子群と脳での外部刺激や神経系に関連する遺伝子群の発現パターンは、流入下水により発現変動されたパターンと似ていることから、二次処理水は外部刺激により雄メダカの精巣発達と神経系に影響を与える可能性がある。しかし、それらの影響を明らかにするためには遺伝子群の作用機構や相関関係を考慮した細かい実験を行う必要がある。

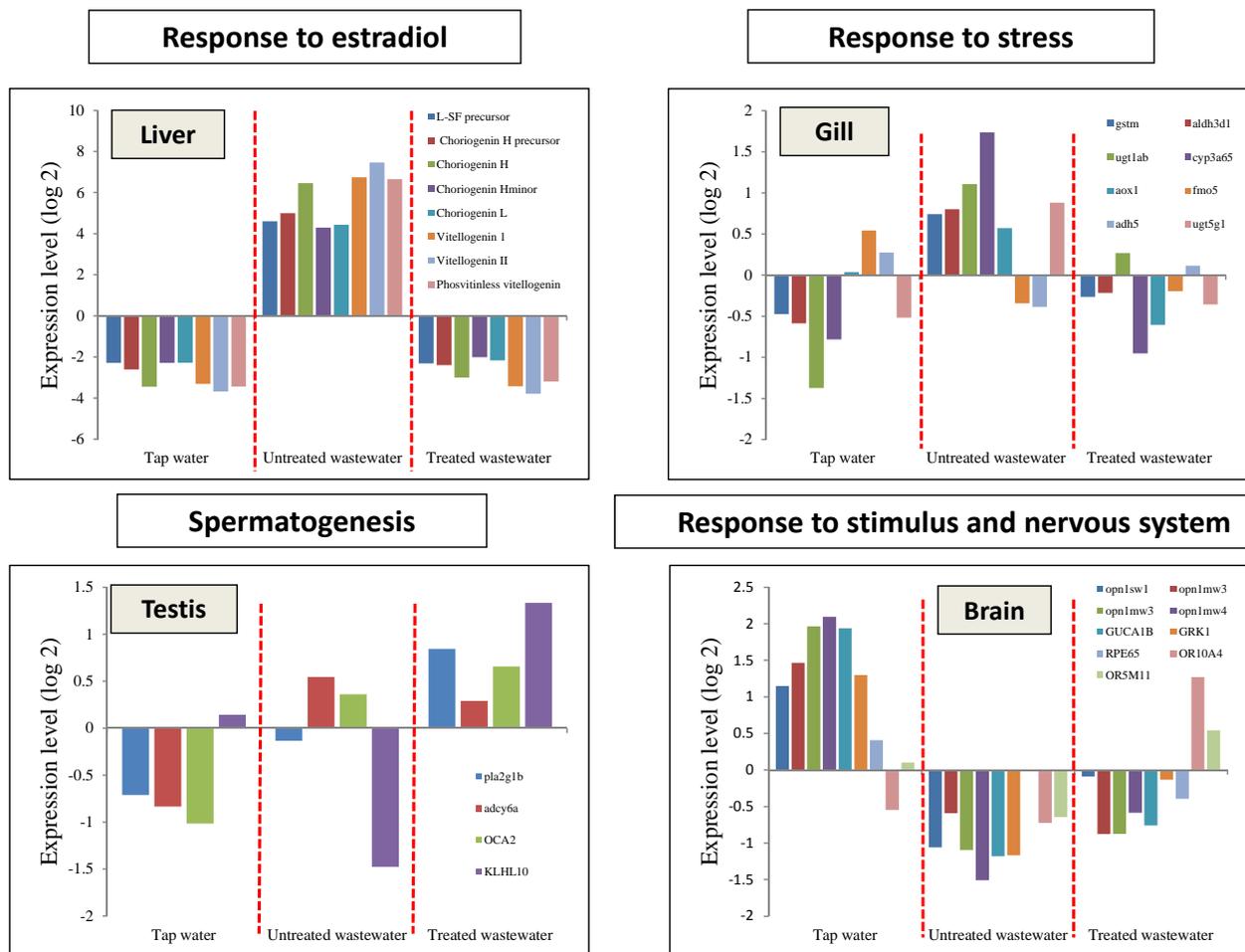


図 6. 各臓器から着目した遺伝子と下水試料での発現強度

### 3.3. まとめ

本研究では、マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の解析によって短期間での下水試料の水生生物への影響評価を行い、遺伝子発現パターンの変化により水生生物への影響評価手法を検討した。その結果、以下の事項が明らかになった。

- 流入下水の各臓器から抽出された発現変動遺伝子群は、下水試料の水生生物への影響を解明するための適切なバイオ指標になる。
- 遺伝子プロファイルを用いた発現変動遺伝子群の解析は、新たな下水処理プロセスによる再生水の水質の安全性評価に応用でき、発現変動遺伝子群の生物学的な役割の解析することにより生物への影響とその作用機構の解明に資することができる。

## 4. メダカの遺伝子プロファイルを用いた都市域の河川水の水質評価

人間社会活動に由来する化学物質等が公共用水域の水生生物に与える影響を総合的に評価し、水質管理をより適切に進める必要がある。本研究では、メダカの発現変動遺伝子を生体反応因子としたバイオアッセイによる都市河川水の水質評価手法の確立をめざし、下水処理水が占める割合が大きい多摩川中流域を対象に、水生生物への影響を高感度に評価することを目的とした。

### 4.1. 実験方法

#### 4.1.1. 都市河川水の採水

多摩川中流域の採水は、図7に示した下水処理水の流入がない地点とある地点で行った。St.1: 拝島橋は、下水処理水の流入はなく、St.2: 日野橋, St.3: 多摩川原橋は、下水処理水の流入がある。季節毎に河川水の水質状態を把握するため、冬と夏に1回ずつ採水し、一般水質項目として、浮遊物質量(SS)、有機汚濁指標(BOD, COD<sub>Mn</sub>, DOC)、各態栄養塩濃度(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, T-N, PO<sub>4</sub>-P, T-P)の分析を行った。

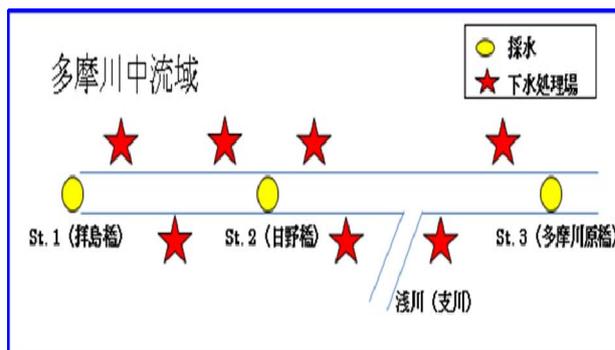


図7. 多摩川中流域の採水

#### 4.1.2. メダカへの曝露

多摩川中流域から採水された河川水のメダカへの曝露試験は表3に示した条件で行った。脱塩素水道水を対照群として、季節毎(夏、冬)に3つの地点から採水した河川水への曝露実験を行った。曝露後、RNeasy® Mini Kit (QIAGEN社製)を用いて、1個体毎に肝臓からRNAの抽出し、対照群に対する各地点の河川水での各遺伝子の発現比を算出し、各地点の河川水による変動遺伝子を抽出した。また、それら変動遺伝子の生理的機能を解析することで、多摩川中流域の河川水の水生生物への影響評価を行った。

表3. メダカへのばく露条件

供試魚	雄メダカ(d-r系)
ばく露試料	脱塩素水道水(対照群)、 拝島橋(St.1)、日野橋(St.2)、多摩川原橋(St.3) 冬・夏毎に1回ずつ
供試魚数	6匹/ばく露区
曝露時間	96時間
水温	24±1度
曝露形式	半止水式(1換水/日)
照明	明期16時間/暗期8時間
餌	なし
遺伝子発現解析臓器	肝臓

### 4.2. 結果と考察

#### 4.2.1. 各地点の水質一般項目

季節ごとの多摩川中流域の各地点での一般水質項目を表4に示す。有機汚濁指標と各態栄養塩濃度は、拝島橋(St.1)に比べて日野橋(St.2)と多摩川原橋(St.3)のほうで高い傾向が観られた。

表4. 季節ごとに多摩川中流域の採水地点の一般水質項目

#### 多摩川中流域の冬

採水地点	St.1(拝島橋)	St.2(日野橋)	St.3(多摩川原橋)
水素イオン濃度(pH)	7.9	7.5	7.4
DO(mg/l)	13.4	11.1	9.8
導電率(mS/m)	12.4	25.9	33.7
全残留塩素(mg/l)	<0.05	0.09	<0.05
遊離残留塩素(mg/l)	<0.05	0.07	<0.05
BOD (mg/L)	0.3	2.1	1.5
CODMn (mg/L)	1.2	5.4	5.3
SS (mg/L)	<1	2	2
DOC (mg/L)	1.6	4.3	4.5
NH4-N (mg/L)	0.01	0.16	0.19
NO2-N (mg/L)	0.00	0.1	0.12
NO3-N (mg/L)	1.0	5.2	7.2
T-N (mg/L)	1.4	5.6	7.7
PO4-P (mg/L)	0.00	0.56	0.41
T-P (mg/L)	0.00	0.61	0.45

#### 多摩川中流域の夏

採水地点	St.1(拝島橋)	St.2(日野橋)	St.3(多摩川原橋)
水素イオン濃度(pH)	8.1	7.5	7.5
DO(mg/l)	-	-	-
導電率(mS/m)	16	39	35
全残留塩素(mg/l)	-	-	-
遊離残留塩素(mg/l)	-	-	-
BOD (mg/L)	-	-	-
CODMn (mg/L)	-	-	-
SS (mg/L)	2	4	5
DOC (mg/L)	1.4	3.6	3.3
NH4-N (mg/L)	<0.02	0.05	0.03
NO2-N (mg/L)	<0.02	0.04	0.05
NO3-N (mg/L)	1.3	4.	5.
T-N (mg/L)	0.57	3.6	4.2
PO4-P (mg/L)	0.	0.23	0.26
T-P (mg/L)	0.	0.24	0.27

#### 4.2.1. 各地点での発現変動遺伝子

DNA マイクロアレイを用いて、対照群に対する各地点の河川水曝露区の遺伝子発現強度の違いから、各地点で変動遺伝子を抽出した(図8)。発現変動遺伝子の数は、夏より冬のほうが多くなることがわかった。また、冬には拝島橋(St. 1)、多摩川原橋(St. 3)より日野橋(St. 2)での発現変動遺伝子の数が多い傾向が観られた。

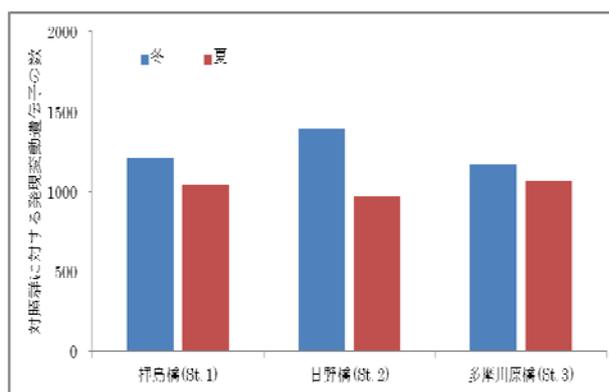


図8. 対照群に対する各地点での発現変動遺伝子の数

#### 4.2.2. 発現変動遺伝子の生物学的役割と発現パターン

雄メダカの遺伝子発現プロファイルを用いて各地点の河川水の影響を解明するため、GSEA法を用いて各地点の発現変動遺伝子の生物学的な役割を解析し、得られた生物学的な役割の情報から水生生物の個体レベルでの影響を評価するため、繁殖、ストレス、免疫反応(細胞毒性を含む)に関連する遺伝子群を中心に発現変動遺伝子の解析を行った。

冬の各地点の河川水での発現変動遺伝子の生物学的役割とそれらの発現パターンを図9に示す。免疫反応に関わる遺伝子群は、冬にすべての地点で発現変動が生じた。また、拝島橋(St. 1)では、外因性刺激に反応する遺伝子群が高い比率(27%)として分布し、日野橋(St. 2)では、ストレス反応に関連する遺伝子が発現された。それらの遺伝子群の発現強度と対照群に対する倍率を算出した結果、拝島橋(St. 1)での外因性刺激に反応する遺伝子群、特に女性ホルモン刺激に反応する遺伝子の発現強度は対照群により1~1/100までに減少したが、雄メダカにはホルモン刺激に反応する遺伝子が発現されないことから、これらの遺伝子は雄メダカに生物学的な役割を持っていないと考えられる。また、免疫反応(細胞毒性を含む)に関連する遺伝子群およびストレス反応に関わる遺伝子群の発現強度は、対照群により各地点で10倍以内の範囲で発現変動が生じた。しかし、対照群に対するこれらの遺伝子群の発現強度は、拝島橋(St. 1)では発現変動は起こっていないあるいは減少する傾向が観られ、日野橋(St. 2)と多摩川原橋(St. 3)では発現変動が増加する傾向が観られた。特に、日野橋(St. 2)でのストレスに反応する遺伝子群の中では、対照群に対して約100程度発現された遺伝子も観察された。

夏の各地点の河川水での発現変動遺伝子群の生物学的役割とそれらの発現パターンを図10に示す。免疫反応・繁殖・ストレスに関連する遺伝子は、各地点の河川水に曝露されたメダカで発現変動が起こっており、各地点での免疫反応に関わる遺伝子群は、発現変動遺伝子群の生物学的な役割の中で10%以上の比率を占めた。数個の免疫とストレスに反応する遺伝子群の対照群に対する発現変動遺伝子の発現強度は、日野橋(St. 2)で100倍に近く増加し、多摩川原橋(St. 3)で1/100に減少することがわかった。また、繁殖に関連する遺伝子群の中で、日野橋(St. 2)と多摩川原橋(St. 3)では対照群に対して発現強度が減少された遺伝子が拝島橋(St. 1)より多かった。

多摩川中流域の各地点での発現変動遺伝子群の発現強度の違いは、下水処理水以外に目立った流入がみられないことから、この傾向は下水処理水の流入に由来すると考えられる。

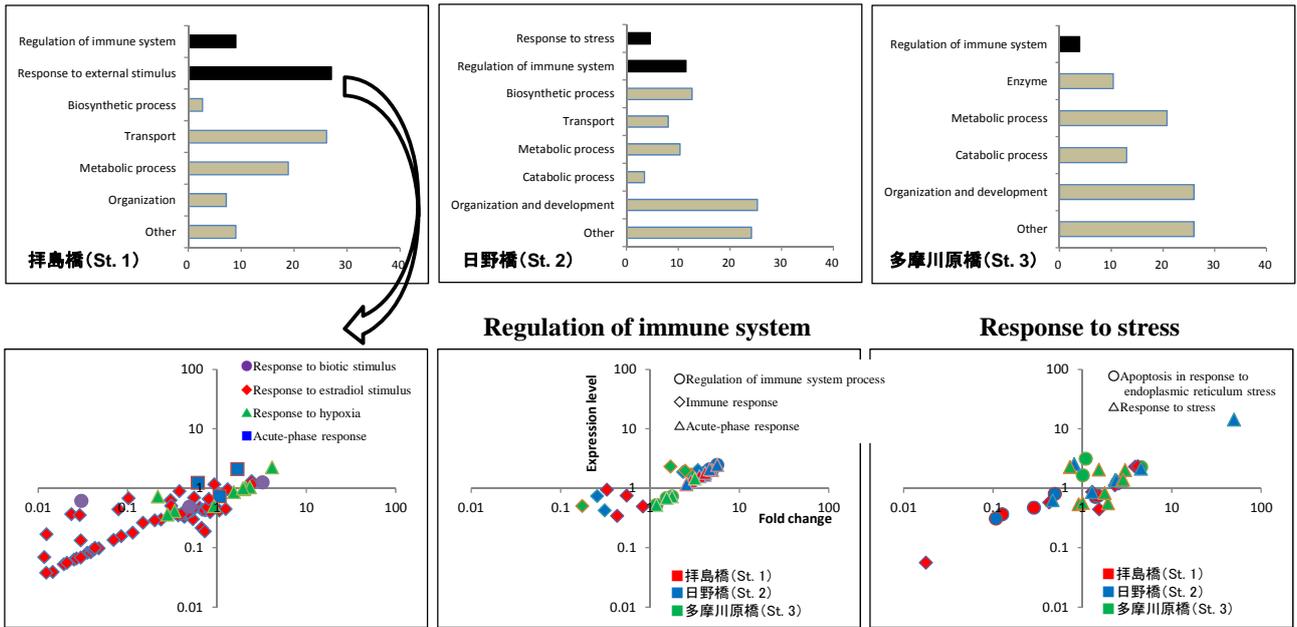


図 9. 冬の高摩川中流域の各地点での発現変動遺伝子の生物学的な役割とそれらの遺伝子群の発現強度

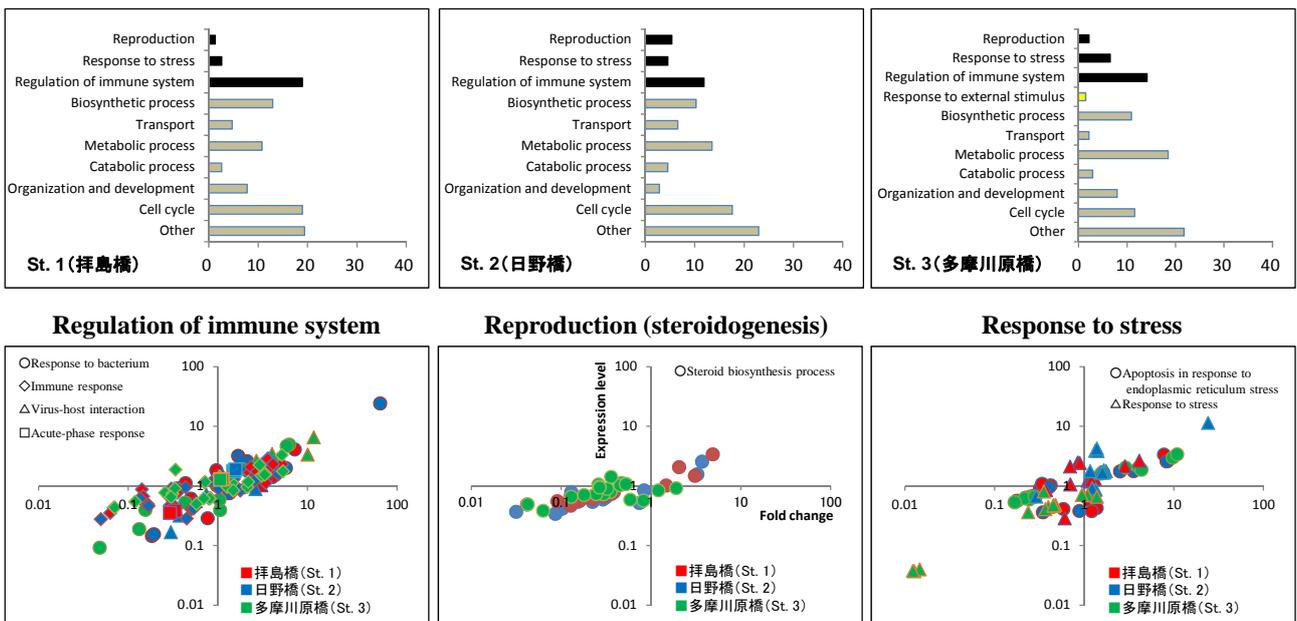


図 10. 夏の高摩川中流域の各地点での発現変動遺伝子の生物学的な役割とそれらの遺伝子群の発現強度

#### 4.3. まとめ

本研究では、都市域の河川水の水質評価手法へ遺伝子発現解析技術の適用を検討した。その結果、以下の事項を明らかになった。

- 下水処理水流入により発現変動遺伝子が多くなることがわかった。
- 季節により河川水での発現変動遺伝子が異なる。
- 発現変動遺伝子の生体機能などの役割は、全ての地点で免疫に関連する遺伝子が発現変動され、特に、下水処理水が流入される地点では、ストレスに反応する遺伝子の発現が増加する傾向が観られた。
- 都市域の河川水に曝露したメダカの遺伝子発現プロファイルは、再利用水の比較対照として利用する

ことができると考えられる。

- しかし、メダカの発現変動遺伝子を生体反応因子とした河川水の水質評価手法の確立するためには、異なる生物学的な役割を持っている発現変動遺伝子の相関性を明らかにする必要がある。

## 5. 雄メダカの発現変動遺伝子を用いた生物への作用機構が異なる6種類の化学物質の影響評価

本研究では、環境中濃度レベルの化学物質の水生生物への影響を高感度に評価する必要がある。DNA マイクロアレイによるメダカの遺伝子発現から、下水処理水に含まれている毒性物質の同定および定量の予測を行うための基礎データを得るために、作用機序の異なる化学物質の曝露試験を行い、化学物質で抽出された発現変動遺伝子の生物学的機能を解析することで、化学物質のマーカー遺伝子の探索を行った。

### 5.1. 実験方法

#### 5.1.1. 6種類の化学物質の雄メダカへの曝露

各化学物質は、下水処理水と環境中に存在する可能性がある6種類の化学物質（エストロン（女性ホルモン様物質）、N-ニトロソジメチルアミン（NDMA、消毒副生物質）、トリクロサン（殺菌剤）、フルタミド（抗アンドロゲン剤）、クラリスロマイシン（抗生物質）、シクロホスファミド（抗がん剤））を対象とした。対照区を脱塩素水道水とした、6種類の化学物質の雄メダカへの曝露試験条件を表5に示した。各化学物質の曝露濃度は、流入下水、二次処理水、高度処理水で検出されるレベルの3濃度区を設定した。ただし、フルタミドの場合は、参考文献を用いて水生生物に影響を与える濃度で設定した。各化学物質の雄メダカへの曝露実験は5Lガラス水槽を用い、8匹ずつの雄メダカを半止水式（1日に1回交換）で96時間行った。曝露開始から曝露終了までに各化学物質の急性毒性を調べるため、曝露区について死亡個体の有無、行動および外観異常の有無を観察した。曝露後、肝臓を摘出し、RNeasy® Mini Kit（QIAGEN社製）を用いて1個体毎に肝臓からRNAの抽出し、対照群に対する各化学物質での変動遺伝子を抽出した。また、それら変動遺伝子の生理的機能を解析し、得られた生物学的な役割の情報から水生生物の個体レベルからの影響を評価するため、繁殖、ストレス、免疫力（細胞毒性を含む）に関連する遺伝子群を中心に発現変動遺伝子の解析を行った。

#### 5.1.2. 実験環境

曝露期間中の各曝露区の水温は、23.8~24.0℃であり、いずれの曝露区においても、曝露期間を通して水温条件の±1℃以内を維持していた。pHは7.2~7.9であり、いずれの曝露区においても、曝露期間を通してOECD化学薬品テストガイドラインTG203<sup>6)</sup>（魚類の急性毒性試験）で試験環境として推奨される範囲（pH；6.0

表5. メダカへのばく露条件

<b>ばく露試料:</b> 脱塩素水道水(対照群)
エストロン(2, 20, 200 ng/L)
N-ニトロソジメチルアミン
(10, 100, 1000 ng/L)
トリクロサン(50, 500, 5000 ng/L)
フルタミド(10, 100, 1000 μg/L)
クラリスロマイシン
(50, 500, 5000 ng/L)
シクロホスファミド
(5, 50, 500, 5000)
<b>ばく露方式:</b> 半止水式(1回/1日)
<b>供試魚:</b> d-rR系メダカ雄魚(6-7ヵ月)
<b>供試魚数:</b> 6匹/ばく露区
<b>曝露期間:</b> 96時間
<b>水温:</b> 24±1℃
<b>照明:</b> 明期16時間/暗期8時間
<b>給餌:</b> なし
<b>遺伝子発現解析臓器:</b> 肝臓

～8.5) を維持していた。曝露期間中の新しい試験液の調製後の溶存酸素濃度 (DO) は、8.2～9.0 mg/L であり、いずれも飽和度 90%以上であった。また、曝露期間中の換水前の曝露後の試験液の溶存酸素濃度は、5.3～8.2 mg/L であり、いずれも飽和度 60%以上であった。いずれの曝露区においても、曝露期間を通して OECD 化学品テストガイドライン TG203<sup>6)</sup> (魚類の急性毒性試験) で試験環境として推奨される範囲 (溶存酸素飽和度 ; 60%以上) を維持していた。

## 5.2. 結果と考察

### 5.2.1. 各化学物質の急性毒性

全ての曝露区で、曝露期間を通して死亡は観られなかった。また、各曝露区とも、曝露期間を通して行動および外観に異常が認められた個体は観られなかった。このことから 6 種類の化学物質のそれぞれ濃度では急性毒性がないことがわかった。

### 5.2.1. 各化学物質の肝臓での発現変動遺伝子

各化学物質の肝臓から抽出した発現変動遺伝子の数を図 11 に示す。各化学物質の肝臓での発現変動遺伝子 (differentially expressed genes, DEGs) の数は、クラリスロマイシン、フルタミド、シクロホスファミド、トリクロサン、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA)、エストロンの順序に多くなる傾向が観られたが、各化学物質の濃度依存性は観られなかった。

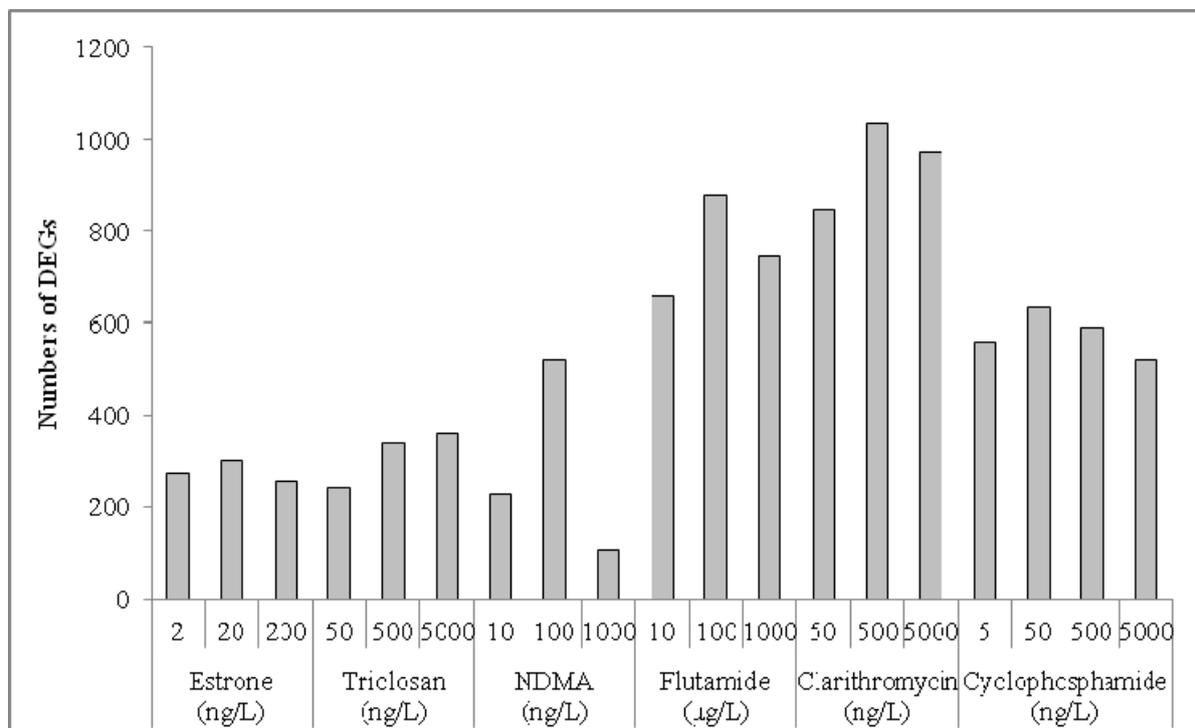


図 11. 各化学物質の肝での対照群に対する発現変動遺伝子の数

### 5.2.2. 発現変動遺伝子の生物学的な役割と発現パターン

エストロン、トリクロサン、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) での発現変動遺伝子の生物学的な役割とそれらの遺伝子の発現パターンを表 6 に示す。エストロンでの発現変動遺伝子は、女性ホルモン刺激に反応す

る遺伝子と免疫反応に関連する遺伝子群が発現された。エストロンの 200 ng/L 濃度では、主に女性ホルモンの刺激による卵巣発達に関わる遺伝子が対照群に対して 2 倍以上の増加し、バクテリア防御反応に関連する遺伝子は 2 倍以上発現減少された。

トリクロサンでの発現変動遺伝子は、生体異物質やストレスに反応する遺伝子とバクテリア防御反応に関連する遺伝子が発現変動された。ストレスに反応する遺伝子とバクテリア防御反応に関連する遺伝子は、トリクロサンの全ての濃度で対照群に対して 2 倍以上の増加する傾向が観られた。

N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) の発現変動遺伝子は、繁殖とストレスに関連する遺伝子より免疫力 (細胞毒性を含む) に関連する遺伝子の数が多く、それらの発現変動遺伝子は NDMA の 1000 ng/L 濃度より NDMA の 10 ng/L 濃度と NDMA の 100 ng/L 濃度で強い発現変動が起こった。特に、NDMA の 10 ng/L 濃度ではバクテリア防御反応に関連する遺伝子が対照群に対して 2 倍以上の減少し、NDMA の 100 ng/L 濃度では生体異物質やストレスに反応する遺伝子が対照群に対して 2 倍以上発現が増加した。

表 6. エストロン、トリクロサン、N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) での発現変動遺伝子と発現パターン

■ No detection or no change ■ > 2 fold up ■ > 2 fold down

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	Estrone (ng/L)		
				2	20	200
Reproduction	Response to estradiol stimulus	VTG1	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)			
		VTG2	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)			
		VTG3	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)			
		CHG H	Zona pellucida glycoprotein, Heavy chain			
		CHG L	Zona pellucida glycoprotein, Low chain			
		Response to hormone stimulus	ER1	Estrogen receptor subtype		
Immunity	Immune response	CLEC4M	C-type lectin domain family 4 member M			
	Defense response to bacterium	cfr	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			
		stab2	stabilin 2			
		BPI	Bactericidal permeability-increasing protein			

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	Triclosan (ng/L)		
				50	500	5000
Reproduction	Response to xenobiotic stimulus	cyp11b2	Cytochrome P450 11beta			
		CYP2K1	Cytochrome P450 monooxygenase			
		Steroidogenesis	hsd11b3	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3		
Stress	Response to stress	dnajb13	Heat shock protein 40			
Immunity	Defense response to bacterium	cfr	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			
		BPI	Bactericidal permeability-increasing protein			

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	NDMA (ng/L)		
				10	100	1000
Reproduction	Response to xenobiotic stimulus	cyp11b2	Cytochrome P450 11beta			
		CYP4F2	Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 1			
		ALDH1A1	Aldehyde dehydrogenase			
Stress	Response to stress	dnajb13	Heat shock protein 40			
		aspm	Activator of Hsp90 ATPase 1 family protein			
Immunity	Immune response	CLEC4M	C-type lectin domain family 4 member M			
		CD209	CD209 antigen			
	Acute phase response	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1			
		ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2			
	Defense response to bacterium	TSC2	Tuberin			
		cfr	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			
		c1ql4l	Complement component 1, q subcomponent-like 4			
		BPI	Bactericidal permeability-increasing protein			

フルタミドの発現変動遺伝子の生物的作用とそれらの遺伝子の発現パターンを表7に示す。フルタミドの発現変動遺伝子の特徴は、免疫力に関連する遺伝子が繁殖やストレスに関連する遺伝子より多く発現され、それらの遺伝子はフルタミドの全ての濃度で対照群に対して2倍以上の発現減少したことがわかった。また、生体異物質に反応する遺伝子はほぼフルタミドの全ての濃度で対照群に対して2倍以上の発現増加する傾向が観られ、ステロイドホルモン刺激に反応する遺伝子は対照群に対して2倍以上の発現減少する傾向が観られた。

表7. フルタミドでの発現変動遺伝子と発現パターン

■ No detection or no change ■ > 2 fold up ■ > 2 fold down

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	Flutamide (µg/L)		
				10	100	1000
Reproduction	Response to xenobiotic stimulus	dio2	deiodinase, iodothyronine, type II	■	■	■
		CYP27B1	25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase	■	■	■
		CYP2K1	Cytochrome P450 monooxygenase	■	■	■
	Response to hormone stimulus	cyp1a	Cytochrome P450 1A	■	■	■
		nr1d4a	Nuclear receptor subfamily 1	■	■	■
		ar	Androgen receptor beta	■	■	■
Stress	Response to chemical stimulus	idi1	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	■	■	■
		fdps	farnesyl diphosphate synthase	■	■	■
	Oxidative stress	gstt1a	Glutathione S-transferase, theta 3	■	■	■
Immunity	Immune response	iclp1	Invariant chain-like protein 1	■	■	■
		si:busm1-48c11.3	MHC class II alpha subunit	■	■	■
		cxcl14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	■	■	■
		mhc2dab	Major histocompatibility complex class II DAB gene	■	■	■
		zgc:113912	MHC class II antigen alpha chain precursor	■	■	■
	Acute phase response	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	■	■	■
		ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	■	■	■
		CRP	C-reactive protein	■	■	■
	Cacinogen	IL18	Interleukin 18 (Interferon-gamma-inducing factor)	■	■	■
		IL18BP	Interleukin-18-binding protein	■	■	■
	Defense response to bacterium	c1ql4l	Complement component 1, q subcomponent-like 4	■	■	■

クラリスロマイシンとシクロホスファミドの発現変動遺伝子の生物的作用とそれらの遺伝子の発現パターンを表8に示す。クラリスロマイシンの生体異物質に反応する遺伝子は、全ての濃度で対照群に対して2倍以上発現増加された。しかし、女性ホルモン刺激に反応する遺伝子は500 ng/Lあるいは5000 ng/L濃度で対照群に対して2倍以上の発現増加する傾向が観られたが、ステロイドホルモンの合成に関わる遺伝子は50 ng/Lで対照群に対して2倍以上の発現増加する傾向が観られた。ストレスに関連する遺伝子については、ほぼ全ての濃度で対照群に対して2倍以上の発現減少することがわかった。さらに、免疫力に関連する遺伝子は、ほとんどの全ての濃度で対照群に対して2倍以上の発現減少する傾向が観られたが、ある遺伝子は全ての濃度で対照群に対して2倍以上の発現増加された場合もあった。

シクロホスファミドでの発現変動遺伝子の発現パターンについて、全ての濃度での女性ホルモン刺激や生体異物質に反応する遺伝子は、対照群に対して2倍以上の発現増加する傾向が観られたが、免疫力に関連する遺伝子は全ての濃度で対照群に対して2倍以上発現減少する傾向が観られた。

以上、作用機構が異なる6種類の化学物質での発現変動遺伝子の発現パターンについて、各化学物質の濃度依存性は明確ではなかったことから、また、各化学物質での着目した繁殖、ストレス、免疫力(細胞毒性を含む)に関連する遺伝子間の関係性は詳細に解析していく必要がある。

ただし、化学物質によって遺伝子発現パターンは異なることから、繁殖、ストレス、免疫力(細胞毒性を含む)に関連する遺伝子群の発現パターンを用いて、各化学物質に反応する遺伝子を決定し、それらの遺伝子の生体機能などの生物学的な役割を考慮して各化学物質の影響を予想することができると考えられる。

表 8. クラリスロマイシンとシクロホスファミドでの発現変動遺伝子と発現パターン

■ No detection or no change ■ > 2 fold up ■ > 2 fold down

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	Clarithromycin (ng/L)		
				50	500	5000
Reproduction	Response to estradiol stimulus	VTG1	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)			
		VTG2	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)			
	Response to xenobiotic stimulus	dio2	deiodinase, iodothyronine, type II			
		cyp27c1	cytochrome P450, family 27, subfamily C, polypeptide 1			
	Steroid hormone biosynthesis	star	steroidogenic acute regulatory protein			
sc4mol		sterol-C4-methyl oxidase-like				
ebp		emopamil binding protein (sterol isomerase)				
Stress	Oxidative stress	gstt1a	Glutathione S-transferase, theta 3			
	Response to stress	sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1			
		SMG1	Serine/threonine-protein kinase SMG1			
		tnnc1	Troponin C, type 1			
Immunity	Immune response	iclp1	invariant chain-like protein 1			
		si:busm1-48c11.3	MHC class II alpha subunit			
		cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14			
		FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog			
	Acute phase response	ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1			
		ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2			
		CLEC4M	C-type lectin domain family 4 member M			
		zgc:113912	zgc:113912			
		AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein			
	Cacinogen	LY75	Lymphocyte antigen 75			
		fzd9b	frizzled homolog 9b			
		RSPO2	R-spondin-2			
		IL18	Interleukin 18 (Interferon-gamma-inducing factor)			
	Defense response to bacterium	CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD			
		stab1l	stabilin 1-like			
		BPI	Bactericidal permeability-increasing protein			
		cftr	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator			
stab2		stabilin 2				

Predicted effect	Biological process	Gene symbol	Description	Cyclophosphamide (ng/L)			
				5	50	500	5000
Reproduction	Response to estradiol stimulus	VTG1	Vitellogenin subtype (precursor of yolk protein)				
		CHG H	Zona pellucida glycoprotein, Heavy chain				
	Response to xenobiotic stimulus	dio2	deiodinase, iodothyronine, type II				
		CYP2K1	Cytochrome P450 monooxygenase				
Immunity	Immune response	cyp11b2	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2				
		iclp1	invariant chain-like protein 1				
		si:busm1-48c11.3	MHC class II alpha subunit				
	Acute phase response	ENDOU	Poly(U)-specific endoribonuclease				
		ORM1	Alpha-1-acid glycoprotein 1				
		ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2				
		CLEC4M	C-type lectin domain family 4 member M				
		zgc:113912	MHC class II antigen alpha chain precursor				
	Cacinogen	IL18	Interleukin 18 (Interferon-gamma-inducing factor)				
		Defense response to bacterium	stab2	stabilin 2			

### 5.3. まとめ

本研究では、下水処理水に含まれ水環境中の存在する微量化学物質の水生生物への影響とその作用機構を理解するため、作用機構が異なる 6 種類の化学物質の評価手法へ遺伝子発現解析技術の適用を検討した。本実験から得られた結果は以下になった。

- 作用機構が異なる 6 種類の化学物質での発現変動された遺伝子は、各化学物質により生物学的な役割と発現パターンが異なった。
- 発現変動遺伝子の発現パターンにおける各化学物質の特徴として、エストロンは、女性ホルモン刺激に反応する遺伝子の発現増加、トリクロサンはバクテリア防御反応に関連する遺伝子の発現増加、NDMA は、特に 100 ng/L 濃度では生体異物質に反応する遺伝子の発現増加、フルタミドはバクテリア防御反応に関連する遺伝子を含む、免疫力に関連する遺伝子の発現減少、クラリスロマイシンはスト

レスに関連する遺伝子の発現減少、シクロホスファミドは女性ホルモン刺激や生体異物質に反応する遺伝子の発現増加と免疫力に関連する遺伝子の発現減少することが明らかになった。

- 各化学物質での発現変動遺伝子の発現パターンは、下水処理水を含む環境水での遺伝子発現の陽性対照として利用することができると考えられる。
- しかし、下水処理水を含む水環境中には毒性情報を持っていない化学物質が多い存在することから、下水処理水を含む環境水の水生生物への影響を解明するためには、広い範囲で化学物質の曝露実験を行い、遺伝子発現解析による様々な化学物質の毒性情報を取得する必要がある。

## 6. 本年度の研究のまとめ

本年度に遺伝子発現解析を用いた水質評価手法の検討の結果、以下の事項が明らかになった。

- ① DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析技術は、下水試料や都市河川水、各化学物質の水生生物への影響を把握することができる。
- ② 再生水の水質評価に際して、都市河川水での遺伝子発現変動は下水試料の比較対照として、各化学物質での遺伝子発現変動は下水試料の毒性同定や作用機構の理解に適用できる。
- ③ 再生水の安全性評価をするためには、各下水処理プロセスごと、季節ごと、化学物質の種類と濃度など、広範囲で遺伝子発現データを蓄積する必要がある。
- ④ また、生物影響を解明するためには、発現変動された遺伝子を中心に、生物学的な役割が異なる遺伝子間の相関関係を明らかにする必要がある。

本研究は独立行政法人科学技術振興機構（JST）、CREST 戦略的創造研究推進事業「21 世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価」の一環により実施されたものであり、土研水質担当分をまとめたものである。

### 【参考文献】

- 1) 田中弘明、21 世紀都市代謝系としての下水道への期待（2009）新都市、Vol. 63、No. 9、pp. 16-22
- 2) 環境省、WET 手法を活用した排水規制手法検討調査、平成 21 年度環境省予算（案）主要新規事項等の概要（2009）
- 3) 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料第 4212 号、pp. 324-331、2011
- 4) Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., Groop, L.C., 2003. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics* 34, 267 – 273.
- 5) OECD; OECD Guideline For Testing of Chemicals 203, Fish Acute Toxicity Test, 1992.

# 下水処理水に残存する医薬品の除去技術の開発

水質チーム 総括主任研究員 小森 行也

## 1. 研究目的

わが国の一人あたり水資源確保量は先進諸国に比べて著しくその水準が低くなっており、また、近年は投資余力の減少や建設適地の減少等から新たなダム等の水資源開発施設整備の進展が遅れるとともに、近年の小雨化傾向などを原因として著しく利水安全度が低下している傾向にある。この不足する水資源を補う水源として下水処理水が考えられるが、下水処理水中には、下水処理工程で完全には除去されない医薬品が残存しており、これらの物質のリスクが懸念される状況である。本研究では、下水処理水に残存する医薬品を効率的に除去する手法を開発することを目的とした。

## 2. 研究内容

本研究では、既に、下水処理水中の内分泌攪乱化学物質の除去性能を有することが確認されている、土木研究所が考案した下水処理水の藻類増殖抑制技術（特許出願中）を用いて、その処理条件の最適化を図り、下水処理水に残存する医薬品の除去を試みたものである。本技術は、微生物保持担体を投入した反応槽内で下水処理水を曝気し、自然発生的に担体上に生育する微生物の働きにより、下水処理水に残存している有機物である医薬品類を分解・除去するものである。これまでの検討により、本技術の適用により、下水処理水中の一部の抗生物質、抗菌剤に対して除去性能が確認されていることから、本研究においては、処理時間、処理水温、担体添加量などの処理条件を変化させて処理実験を行い、処理条件の最適化を図った。

## 3. 研究結果

本研究では、下水処理水に残存する医薬品類を効率的に除去する手法開発の一環として、広く一般細菌に対する殺菌剤として使用され、石鹸、シャンプー、歯磨き等に含有されている医薬部外品のトリクロサンを供試物質として担体処理における処理時間（反応槽滞留時間：HRT）、処理温度（反応槽水温）、担体投入量などの処理条件を変化させた処理実験を行い以下の結果を得た。

(1) 処理時間（HRT）と除去率の関係では、HRT が約 2 時間までは、除去率向上が顕著にみられるが HRT が約 2 時間と約 4 時間では大きな違いがみられなかった。トリクロサン除去に対し HRT を 2 時間程度まで長くとることは有効な手段の一つと考えられるが、除去速度係数（ $k_1$ ）は小さくなることから HRT を長く取り過ぎないように注意が必要である。

(2) 処理温度（反応槽水温）と除去率の関係では、反応槽の水温が高くなるほどトリクロサン除去率が向上する傾向がみられた。また、反応槽水温が高くなるに従い除去速度係数（ $k_1$ ）が大きくなる傾向がみられ、担体処理における処理水温は重要なファクターであることがわかった。

(3) 担体投入量と除去率の関係では、担体無添加の反応槽のトリクロサン除去率は約 20%であったのに対し、担体添加量（嵩比率）20%、35%、50%と担体添加量の増大とともに小さな違いではあるものの除去率が大きくなる傾向がみられた。ただし、トリクロサン除去に対し担体添加量を多くすることは有効な手段の一つであると考えられるが、除去速度係数（ $k_1$ ）は小さくなることから担体添加量を多くし過ぎないように注意が必要である。

下水処理水に残存する医薬品類の除去技術に関する研究は、物理化学的な手法によるアプローチの報告もみられる。今後は、種々の医薬品類、処理コスト、処理規模等の検討の他、他の手法との比較についても調査が必要と考える。

なお、本調査研究は、財団法人河川環境管理財団の河川整備基金助成により実施されたものである。

---

土 木 研 究 所 資 料  
TECHNICAL NOTE of PWRI  
No.4241            October 2012

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