ＩＳＳＮ　　0386-5878
土木研究所資料　第4347号

土木研究所資料

平成27年度下水道関係調査研究年次報告書集

FY2015 Annual Report of Wastewater Management and Water Quality Control

平成29年1月

国立研究開発法人　土木研究所

National Research and Development Agency
Public Works Research Institute

Copyright © (2017) 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、国立研究開発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、国立研究開発法人土木研究所理事長の文書による承認を得ずしてこれを行ってはならない。

土 木 研 究 所 資 料
第4347号　平成29年1月

平成27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
水環境研究グループ　　水質チーム

概要

本報告書集は、平成27年度に国立研究開発法人土木研究所において実施された下水道に関係する調査研究の成果を集約して資料としてとりまとめたものである。

キーワード：下水道、下水処理、高度処理、汚泥、水質浄化、リサイクル

目　　次

Ⅰ　材料資源研究グループ

			頁
1	ウイルス感染価の推定手法に関する調査	（受託業務費）	3
2	下水道資源・エネルギーを最大限に活かした希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産	（受託業務費）	12
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）	16
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）	26
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）	54
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）	65
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）	79
8	多様化する感染症に応じた下水処理水の高度な消毒手法の構築に関する研究	（運営費交付金）	89
9	震災時の機能不全を想定した水質リスク低減手法の構築に関する研究	（運営費交付金）	97
10	新規省エネルギー型下水処理技術の開発	（運営費交付金）	102
11	下水中の病原微生物の網羅的検出法の開発に関する研究	（運営費交付金）	106
12	遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発	（運営費交付金）	110

Ⅱ　水質チーム

13	下水道における最適なリスク評価手法と対策技術の構築に向けた検討業務	（受託業務費）	117
14	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）	123
15	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）	173
16	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）	194
17	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）	207
18	生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究	（運営費交付金）	227
19	地球温暖化が水環境に与える影響評価と適応策に関する研究	（運営費交付金）	234
20	レポータージーンアッセイを用いた再生水の安全性評価に関する研究	（運営費交付金）	240
21	消毒副生成物の水環境中での挙動とその影響に関する研究	（運営費交付金）	252
22	河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と生体・生態影響評価	（運営費交付金）	254
23	下水処理水が両生類の変態に及ぼす影響に関する基礎的研究	（運営費交付金）	261

＊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．材料資源研究グループによる研究

ウイルス感染価の推定手法に関する調査

研究予算：受託研究費
研究期間：平 27
担当チーム：材料資源研究グループ（資源循環担当）
研究担当者：南山瑞彦、諏訪守、安井宣仁

【要旨】

一般的に消毒プロセスにおける病原微生物の不活化の評価では、指標微生物やモデルウイルスを試験水に添加し、その消毒前後の不活化率（除去率）から消毒効果を評価する。しかしながらノロウイルスは、モデルウイルスを直接試験水に添加することが出来なく、遺伝子定量法に基づき RT-qPCR 法で定量した場合、不活化されているのにもかかわらず RT-qPCR 法で検出される可能性がある。

本調査では、ノロウイルスの感染価推定手法の開発を目的に、新たな手法を用いた標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法における検出濃度向上手法を検証した。その上で、塩素消毒ならびに紫外線消毒によるノロウイルスおよび野生株の大腸菌ファージ MS2 の遺伝子減少割合について、開発した遺伝子定量法で評価することでノロウイルス感染価の推定手法の構築を試みた。検証の結果、野生株大腸菌ファージ MS2 とノロウイルスの各消毒における標的遺伝子の減少速度は同程度であることから、標的遺伝子の感受性が野生株の MS2 とノロウイルスで同等と仮定し、ノロウイルスの感染価を類推すると、概ね塩素消毒では、Ct 値 40mg・min/L、紫外線消毒では照射線量が 40mJ/cm^2 で 3Log 程度減衰する可能性が見いだせた。

今後、水質性状として処理水中の有機物濃度や濁質等の変動を考慮した上で、野生株 MS2 ファージの消毒実験による不活化データや、ノロウイルスの遺伝子減少割合との関係を明らかとするためのデータ蓄積を行い、本調査で検討した推定方法を再評価し、精度を高める必要があると考えられた。

キーワード：ノロウイルス、MS2 ファージ、不活化評価、塩素消毒、紫外線消毒

1．はじめに

冬季における感染性胃腸炎の大流行に際し、感染者から排出されるノロウイルスによる水系感染症拡大が懸念される。このため、国土交通省は下水道管理者に対し処理水の消毒を適正に行うなど、終末処理場における水質管理の徹底を図るよう通達を行っている。ノロウイルスは、感染-発症確率が 80%[1]と他の腸管系ウイルスと比較して高いことに加え、流域での患者数の増加に伴い、流入下水中の濃度も増加する傾向が報告されており、消毒等の強化により対策を講じる必要がある。しかしながら、ノロウイルスは細胞培養法や動物感染試験等による感染価の測定が不可能である課題を有している[2]。現状でのノロウイルスの定量方法は、一般的に Real-time qPCR(RT-qPCR)法が用いられている。RT-qPCR 法は、ターゲットとしたウイルスの核酸を定量することから、RT-qPCR 法で得られる値によりウイルスが存在している、あるいは存在していた事が明らかとなるが、ウイルスの生死を判定することは出来ない。従って、消毒プロセスでのノロウイルス感染価の低減効果の適切な評価ができず、目標とすべき消毒レベルの設定が困難である課題が生じている。

一般的に消毒プロセスにおける不活化の評価には、指標微生物やモデルウイルスを試験水に添加し、その消毒前後の生残率から消毒効果を評価する。しかしながらノロウイルスは、培養法が確立されていないことから、直接試験水に添加することが出来なく、遺伝子定量法に基づき RT-qPCR 法で定量した場合、不活化されているのにもかかわらずノロウイルスの核酸が検出される可能性がある。特に現在一般的にノロウイルスの定量法として用いられている RT-qPCR 法は、ノロウイルスの全ゲノム長は約 7500 bp に対して、1%程度の約 100bp を標的遺伝子として評価しているため、消毒後の実際のノロウイルスの感染性を考慮した場合、適切に消毒効果を評価できない。

本調査では上記の課題を踏まえ、ノロウイルスの感染価推定手法の開発を目的に、新たな手法を用いた標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法における検出濃度向上手法を検証した。その上で、塩素消毒ならびに紫外線消毒によるノロウイルスおよび野生株の大腸菌ファージ MS2(以下、MS2 と記す)の遺伝子減少割合について、新たな遺伝子定量法で評価した結果に基づき、ノロウイルス感染価の推定手法の構築を試みた。

２．標的遺伝子増幅域の拡張に伴う検出濃度向上手法の検討

26 年度の調査では、遺伝子定量におけるノロウイルスならびに MS2 を対象に標的遺伝子の増幅域を拡張した Long target Reverse Transcription PCR 法（LT-RT-PCR)を用い評価を行った。その結果では、ノロウイルス、野生株大腸菌ファージともに増幅域を拡張することで検出濃度が著しく低下した。その原因は、試料中におけるウイルス遺伝子の存在形態の影響、RT（逆転写）反応阻害、または、それらの複合的な要因などが推定された。

そこで本調査では、26 年度の調査結果を基に標的遺伝子増幅域の拡張に伴う検出濃度向上手法として、デジタル PCR 法(dPCR 法)により評価を行った。dPCR 法は、ナノ流体チップに精製した核酸、プライマー、蛍光色素（プローブ）ならびに反応試薬を混合した溶液を流し込み、PCR 反応をサーマルサイクラーで実施した後、dPCR 装置にて PCR 増幅産物を検出し、対象ウイルスの濃度を定量する。一般的に dPCR 法は PCR に伴う阻害物質に対して高い耐性を有している他、極微量のウイルス濃度試料に対しても比較高い感度検出が可能な手法とされている[3]。以下に評価手順を示す。

２．１ 評価手順

試験水； dPCR 法による増幅域の拡張に伴う検出濃度向上を検討するために、A 下水処理場の生物膜ろ過処理水を試験対象水とした。試験水の水質は、浮遊物質(SS)が 0.87mg/L、アンモニア濃度が 0.04 mg/L、全窒素が 12.3 mg/L、全リンが 0.91 mg/L、CODcr が 16 mg/L、大腸菌が 180 CFU/mL、大腸菌群が 3100 CFU/mL であった。なお試験水の水質分析は下水試験法に準拠して実施した。

試験水の濃縮方法； 試料中に PEG＃6000（終濃度 8%）および NaCl（終濃度 0.4M）を添加･撹拌し完全に溶解させた。4℃で 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。

核酸抽出方法； ウイルス濃縮液からの核酸抽出は、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。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、検出感度にバラツキが生じないよう抽出カラム 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 0.05 mg-SS となるように統一した[4]。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理した後、RNeasy MinElute Clean up Kit（QIAGEN 社）を用いウイルス RNA を精製した。なお、RNA 精製は逆転写ならびに PCR の反応阻害物質を極力除くために 2 回実施した。

逆転写（RT）反応； 精製した 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 系で逆転写を行い、cDNA を得た。RT 反応はサーマルサイクラー(T-100,Biorad 社製)を用い、37℃60 分間で反応させた後 95℃5 分間反応させた。

dPCR 法； RT 反応により得られた cDNA、1.5μL を QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2（Applied Biosystems 社)を用い、各増幅域の異なるプライマー(Forward(+)および Reverse(-))を終濃度で 0.9μM、Taqman-MGB プローブ（蛍光色素）を終濃度で 0.25μM となるようにナノ流体チップ（QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2、Applied Biosystems 社）に 14.5μL 添加し、PCR 反応を実施した。dPCR 法における PCR 反応条件として、96℃10 分間を 1 サイクル実施し、95℃30 秒、60℃45 秒、72℃30 秒を 1 サイクルトし 50 サイクル実施した後、60℃2 分を 1 サイクルとした。

dPCR 法で用いた、プライマーおよび蛍光色素（プローブ）を表-1 に示す。なお本調査では、昨今、感染胃腸炎患者より検出されるノロウイルスの型の 8 割程度がノロウイルス GII/4-Sydney 型である[5]ことを踏まえ、PCR の特異性を上げ、極力増幅域拡張に伴う検出感度を向上させるため、ノロウイルス GII/4-Sydney 型を対象としたプライマーおよびプローブを用いた。また、同時にノロウイルスの代替指標として利用可能性を検討するために、試験水中に存在する MS2 を対象としたプライマーおよびプローブを設計し、評価検討を行った。

表-1 dPCR 法に用いたプライマーおよびプローブ

	増幅域 (bp)	Primer/Probe	Sequence
GII/4-Sydney型	100	Forward (+)	5' CCCTTGGGCCCTGATCTAAA 3'
		Reverse (-)	5' CGTTCCCCGCGAGAATTAC 3'
		MGB-Probe	5' CCCTACCTATCCCATTTG-MGB 3'
	300	Forward (+)	5' TGTTGATTCCCTTACCCGATGT 3'
		Reverse (-)	5' TGGGACCCGTGAACAACTTT 3'
		MGB-Probe	5' CAATCAAATGACCCTACCATT-MGB 3'
	500	Forward (+)	5' AGACCGTGATTTTGAAGCTAACCA 3'
		Reverse (-)	5' GTCTACGCCCCGTTCCATTT 3'
		MGB-Probe	5' AACACAAAGTTCACCCCAGT-MGB 3'
MS2 phage	91	Forward (+)	5' TGGCAACCCAGACTGTTGGT 3'
		Reverse (-)	5' GTGGCGAAAATTGGAATGGT 3'
		MGB-Probe	5' TAGCCGCATGGCGTT-MGB 3'
	297	Forward (+)	5' GCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAAC 3'
		Reverse (-)	5' GCCTCGTCATTACCAGAACCTAAG 3'
		MGB-Probe	5' ATTACCCATGTCGAAGACA-MGB 3'
	481	Forward (+)	5' TGACAATCTCTTCGCCCTGAT 3'
		Reverse (-)	5' GCACACCCACCCCGTTTAC 3'
		MGB-Probe	5' ATCCACGCCTCTATAAG-MGB 3'

２．２ 評価結果

dPCR 法による各増幅域でのノロウイルスおよび MS2 の検出濃度を図-1 に示す。26 年度の調査結果では、ノロウイルスの増幅域を拡張した LT-RT-PCR 法では、増幅域を拡張した場合、最大で 1/1000 程度の検出濃度の低下傾向が確認されたが、本調査において検証した dPCR 法では、増幅域を拡張しても顕著な濃度低下は確認されず、対象とした増幅域での GII/4-Sydney 型の試験水中の濃度は約 5.0×10^4 copy/L であった。また、試験水中に予め存在している MS2 の濃度も GII/4-Sydney 型と同様に標的遺伝子の増幅域を拡張しても濃度低下は確認されず、約 3.0×10^4 copy/L であり試験水中に存在するノロウイルス GII/4-Sydney 型と MS2 濃度はほぼ同等であった。以上より、標的遺伝子の増幅域を拡張しても dPCR 法を適用することで検出濃度を向上させることが出来た。

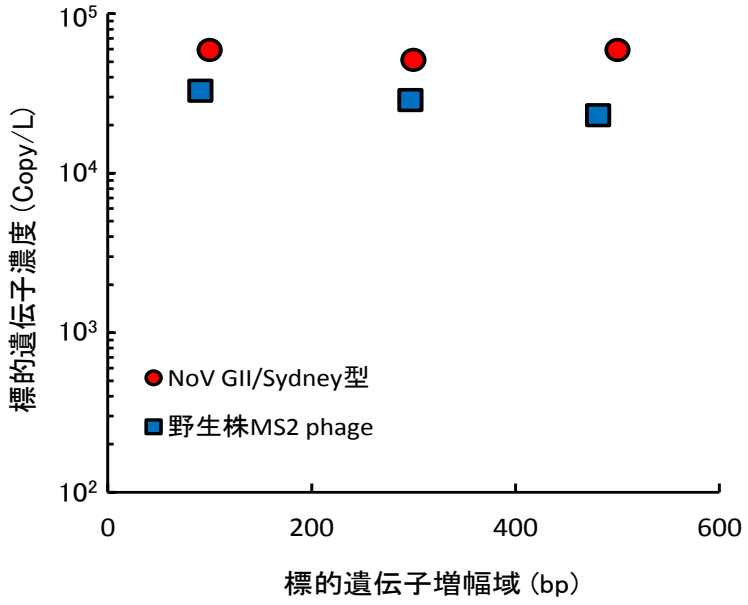


図-1 dPCR 反応における各増幅域での GII/4-Sydney 型と野生株 MS2 ファージ濃度

３．野生株大腸菌 MS2 ファージの消毒感受性評価

実試験水中に予め存在している MS2 を対象に上記 2.で確立した dPCR 法を用い、塩素ならびに紫外線消毒による MS2 の消毒感受性を評価した。消毒条件として、塩素消毒では総残留塩素で Ct 値が 0～40mg・min/L、紫外線消毒では平均紫外線量が 0～40mJ/cm^2 とした。なお消毒実験用に用いた試験水は上記 2.で用いた試験水と同様の A 下水処理場の生物膜処理水とした。

３．１ 塩素消毒実験における野生株大腸菌 MS2 ファージの感受性評価手順

図-2 に示すように、塩素消毒実験は回分式にて行った。試験水 1000mL に対して初期投入塩素濃度を 2.5mg/L、3.5mg/L、4.3mg/L、5mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し、接触時間を全ての実験系で 15 分間とし、設定 Ct 値が 10、15、25、40mg/L・min となるように調整した。塩素添加後から 5 分間隔で全塩素濃度を適宜モニタリングした。設定 Ct 値に達した試料は、残留塩素の中和のために直ちにチオ硫酸ナトリウム溶液を添加した後、試験水 400mL を上記 2 で示した手順に従い、試料を濃縮し表-1 に示すプライマーを用い dPCR 法により濃度を定量した。

野生株の大腸菌ファージは直接感染性が測定可能であるため、参考文献[6]を参照し、寒天培地法を用い同時に定量を行った。なお感染性測定には、*E.coli k12*$^+$*(A/λ)*を用いたが、本宿主菌は、RNA ファージの全般が測定可能であるため、感染性の測定で得られた値は、試験水中に含まれる全 RNA ファージであることに留意が必要である。

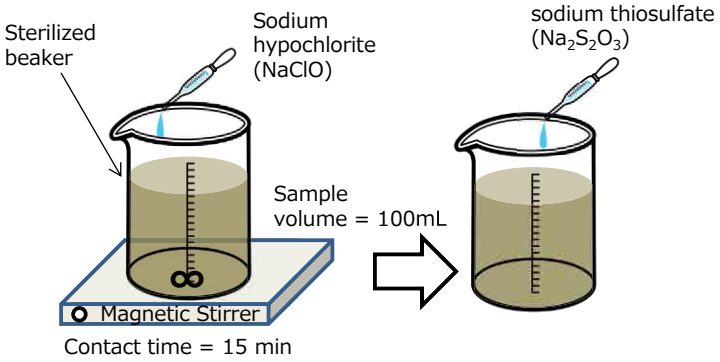


図-2 回分式塩素消毒実験

３．２ 塩素消毒実験における野生株大腸菌 MS2 ファージの感受性評価結果

塩素消毒による MS2 の標的遺伝子増幅域ごとの減少割合と、野生株大腸菌ファージの感染価減少割合を図-3 に示す。MS2 の遺伝子は Ct 値（塩素濃度×接触時間）に比例して減少していく傾向が確認された。*E.coli k12* 株の野生の大腸菌ファージは、初期濃度が 5770 PFU/L と濃度が低く、Ct 値が 10mg・min/L 以上では全て不検出（N.D/400mL）であった。

標的遺伝子減少割合と Ct 値が一次反応であると仮定し、速度定数を算出した結果、増幅域が 91bp の場合、-4.0×10^{-2} (mg・min/L)$^{-1}$、297bp で -7.0×10^{-2} (mg・min/L)$^{-1}$、481bp で -12×10^{-2} (mg・min/L)$^{-1}$ であり、増幅域が 1.5 倍拡張することで、標的遺伝子減少速度も 1.7 倍程度増加する傾向が確認された。一方、野生株大腸菌ファージの感染価は実験を行った範囲内では、Ct 値が 10 (mg・min/L)で約 2.3Log 不活化され、同様に Ct 値と不活化率とが一次反応に従うと仮定すると、不活化速度は -59×10^{-2} (mg・min/L)$^{-1}$ であった。本実験結果では、対象遺伝子増幅域 91bp では、標的遺伝子を 1Log(残存率=0.1)減少させるのに必要な Ct 値は 57.5(mg・min/L)に対し、297bp で 32.9(mg・min/L)、481bp で 19.3(mg・min/L)であった。

以上より、一般的な下水処理水の消毒強度である Ct 値が 40mg・min/L で MS2 は dPCR 法で検出されたが、感染性試験では不検出（3Log 以上の不活化を達成）であったことから、本実験範囲内での Ct 値で最大 3Log 程度は野生株の大腸菌ファージが不活化されている可能性が考えられた。

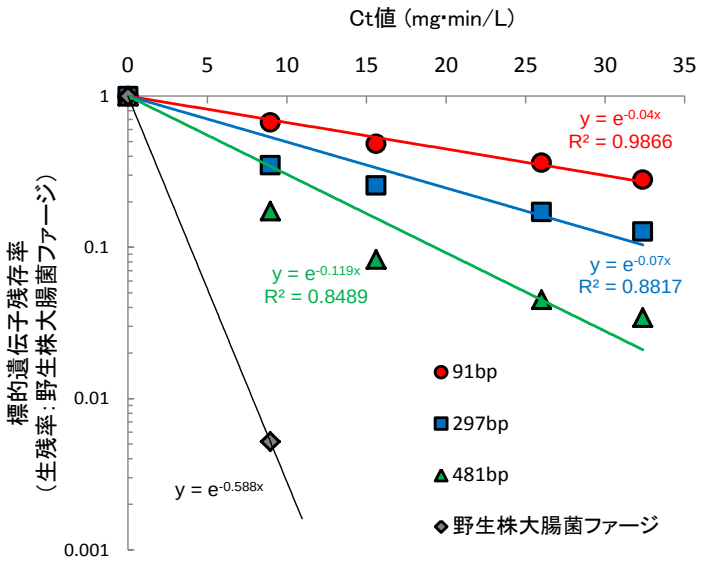


図-3 Ct 値と増幅域ごとの野生株大腸菌ファージ MS2
の標的遺伝子残存率と感染価の減少割合

３．３ 紫外線消毒実験におけるにおける野生株大腸菌 MS2 ファージの感受性評価手順

次いで、紫外線消毒による消毒効果の有効性を把握した。紫外線ランプは 6 W の低圧紫外線ランプ(UL0-6DQ、ウシオ電機社製)を用い、図-4 に示す回分式装置にて上部より紫外線を照射した。設定線量が 10, 20, 30, 40mJ/cm² となるように予め波長が 254nm の紫外線吸光度を測定し、照射時間を設定した。滅菌ガラスシャーレ(直径=9cm、深さ=5.7cm)に試験水を 310mL 添加し、気泡が入らないように厚さ 2mm の石英ガラスで蓋をし、マグネティクスタラーにて試験水を攪拌した。

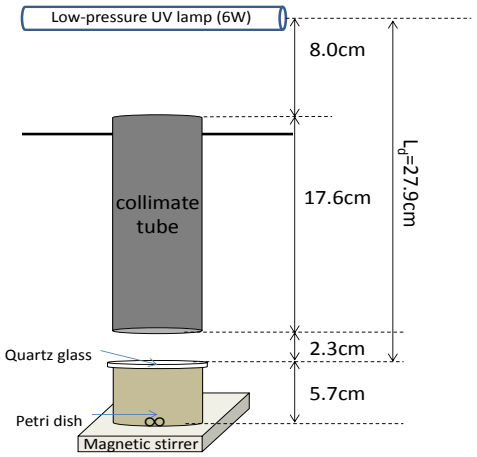


図-4 紫外線照射装置

照射後の試験水は塩素消毒実験と同様の方法で dPCR 法にて MS2 の遺伝子量を定量した。試験水に照射された紫外線量を適切に評価するために、紫外線積算光量計(UIT-250、ウシオ電機社製)および化学光量計 [4]を用い、石英ガラス表面からガラスシャーレ底面までの紫外線照度を測定し、式(1)の数値積分により平均紫外線照度(I_{avg})を算出し、照射時間を掛け紫外線量を求めた。

$$I_{avg} = \frac{1}{d}\int_0^d I_x \cdot exp(-2.3Abs_{254} \cdot x)dx \quad (1)$$

$$I_x = \alpha(L_d + x)^{-\beta}$$

ここで、I_xはランプ表面からガラスシャーレ底面までの距離 5.7cm での紫外線照度、d は水深(5.7cm)、L_dは紫外線ランプからガラスシャーレ表面までの距離（27.9cm）、Abs254 は試験水の波長 254nm での吸光度(cm^{-1})である。

３．４ 紫外線消毒実験による野生株大腸菌 MS2 ファージの感受性評価結果

紫外線消毒による MS2 の増幅域ごとの減少割合を図-5 に示す。塩素消毒と同様に MS2 の遺伝子は、平均紫外線量に比例して減少していく傾向が確認された。塩素消毒実験の結果と同様に紫外線量と標的遺伝子減少割合が一次反応に従うと仮定し減少速度を算出すると、91bp で$-8.4\times10^{-2}(mJ/cm^2)^{-1}$、297bp で$-12.1\times10^{-2}(mJ/cm^2)^{-1}$、481bp で$-16.1\times10^{-2}(mJ/cm^2)^{-1}$であり、増幅域拡張に伴い、紫外線消毒における遺伝子減少速度も増加した。また、野生株大腸菌ファージの感染価は、$5mJ/cm^2$で約 1.2Log であり、不活化速度は$68\times10^{-2}(mJ/cm^2)^{-1}$であった。さらに、$10mJ/cm^2$以上では不検出（N.D/500mL）であった。本実験結果では、91bp の増幅域を対象とした評価は、標的遺伝子を 1Log 減少させるのに必要な紫外線量は約$30mJ/cm^2$であったが、297bp、481bp と拡張することで 15～$20mJ/cm^2$程度となった。MS2 を対象に増幅域を拡張した塩素ならびに紫外線消毒の感受性（標的遺伝子の減少傾向）は双方の消毒法でほぼ同等であった。

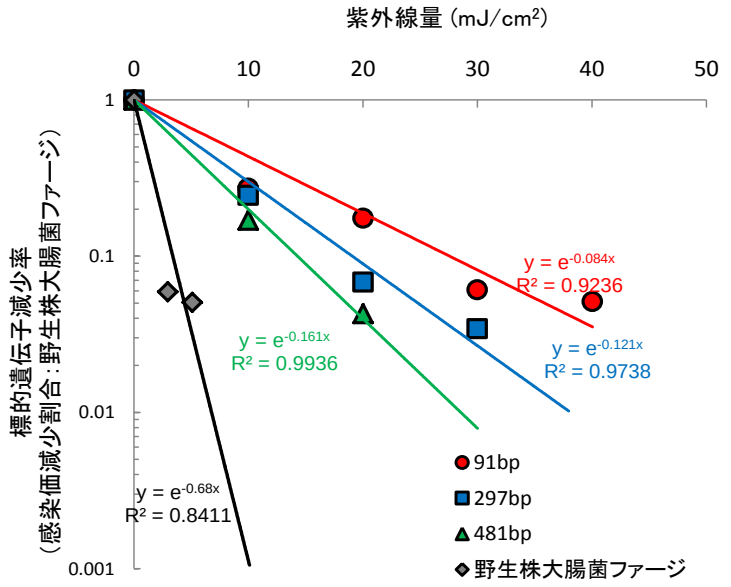


図-5　平均紫外線量と増幅域ごとの野生株大腸菌ファージ MS2 の標的遺伝子減少率と感染価の減少割合

４．ノロウイルス感染価推定手法の検討

ノロウイルスは生育活性を直接評価することが出来ないため、消毒による不活化効果を的確に評価することが難しい。一般的に消毒効果を評価する際、代替指標（モデルウイルス等）を予め高濃度で作成し、試験水に添加し、代替指標の不活化率から消毒効果を評価する。ノロウイルスの代替指標としては、ヒトノロウイルスと同じノロウイルス属に属するマウスノロウイルス(MNV)がある[7),8)]。しかしながら、下水試料を対象とした際、試料水中に含まれる濁質等の影響により、代替指標を添加して消毒効果を評価した場合、試験水中での存在形態が異なる可能性があり、的確に消毒効果を評価することが困難であると考えられる。従って、下水試料における代替指標としては、以下の要件を満たしていることが望ましいと考えられる。

・試験水中に予め存在していること
・検出が簡便かつヒトに対する感染性を有していないこと
・ノロウイルスよりも消毒耐性が同等か強いこと

本調査では、塩素消毒実験ならびに紫外線消毒実験によるノロウイルスの遺伝子減少割合と、上記 3.で実施した野生株大腸菌 MS2 ファージの消毒感受性の評価結果を基に、ノロウイルスの感染価推定を試みた。

４．１ 評価手順

上記 3.の野生株大腸菌 MS2 ファージの消毒感受性評価と同様に、同一の試験水を用い塩素消毒、紫外線消毒を実施し、表-1 に示した GII/4-Sydney 型用の増幅域を拡張したプライマーを用いた dCR 法によりノロウイルスの定量を行った。なお、双方の実験ともに、MS2 を対象とした消毒実験と同一の試料、同一手順により GII/4-Sydney 型の遺伝子減少量を定量した。塩素消毒実験の設定 Ct 値は、0～40 mg/L・min、紫外線消毒の設定線量は 0～$40mJ/cm^2$とした。

本実験結果と上記 3.の結果を比較し評価することで、ノロウイルスの感染価の推定を行った。具体的には、GII/4-Sydney と MS2 の同程度の増幅拡張域での遺伝子減少割合を比較し、双方の各増幅域での遺伝子減少速度を算出

することで、ノロウイルスの感染価を推定した。

４．２ 塩素消毒によるノロウイルスと野生株 MS2 ファージの遺伝子減少速度の比較

塩素消毒による各増幅域での GII/4-Sydney と MS2 の遺伝子減少割合を図-6 に示す。双方とも Ct 値と標的遺伝子減少割合が一次反応に従うと仮定し算出した増幅域と遺伝子減少速度を図-7 に示す。図-7 において縦軸は図-6 より算出した遺伝子減少速度を対数軸で示し、横軸は増幅域(bp)とした。図-6 より、GII/4-Sydney と MS2 の各増幅域での遺伝子減少割合はほぼ同等であったことから、塩素消毒による MS2 の遺伝子減少と GII/4-Sydney の遺伝子減少が同等であると仮定し、野生株の大腸菌ファージの感染価（不活化率）から類推すると塩素消毒による Ct 値が 40mg・min/L で概ね GII/4-Sydney も感染価が 3Log 程度減衰すると考えられた。野生株の大腸菌ファージを定量し消毒後の不活化率を算定することで、ノロウイルスの感染価の減衰を推定できる可能性が見いだせた。

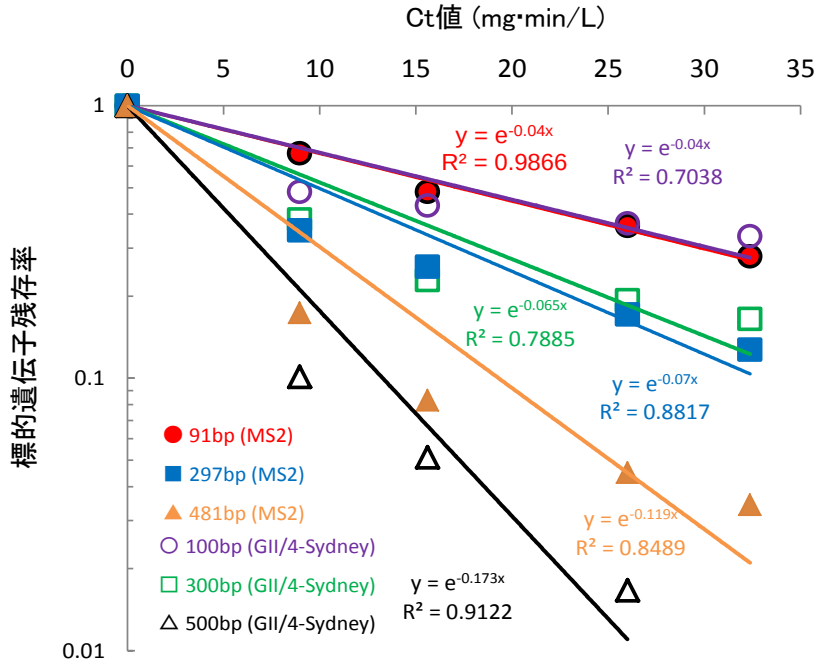


図-6 塩素消毒による各増幅域での GII/4-Sydney と MS2 の遺伝子減少割合

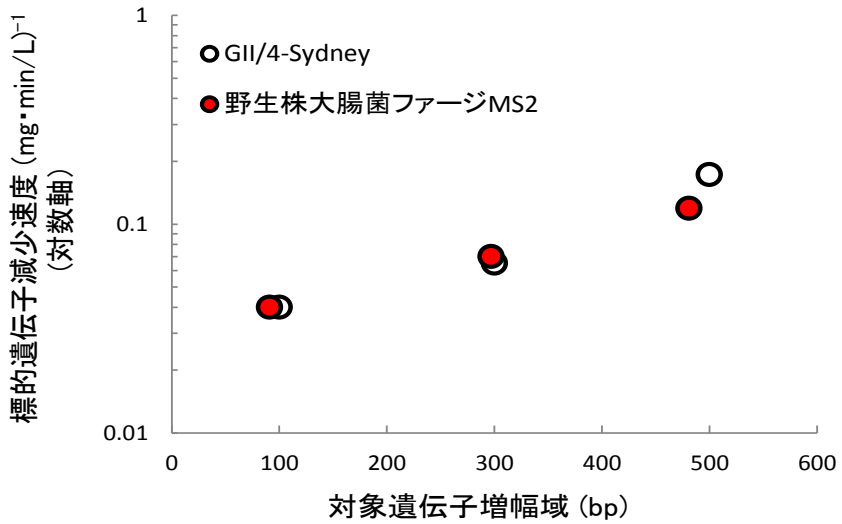


図-7 塩素消毒による各増幅域での GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子減少速度

４．３ 紫外線消毒によるノロウイルスと野生株 MS2 ファージの遺伝子減少速度の比較

紫外線消毒によるノロウイルス GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度を比較するために、紫外線消毒後における GII/4-Sydney の標的遺伝子減少割合を把握した。その結果を図-8 に示す。塩素消毒実験による各遺伝子の減少速度の比較と同様に紫外線消毒における GII/4-Sydney と MS2 の各増幅域での標的遺伝子減少速度を図-9 に示す。

GII/4-Sydney の各増幅域での標的遺伝子減少速度は、塩素消毒時と異なり、MS2 より減少速度が若干大きい傾向が確認された。これは、標的遺伝子に紫外線が照射されることで、核酸塩基のピリミジンが隣り合う部位にチミンの二量体が形成されるが、この二量体の形成量の違いによるものと推定された。紫外線照射による各増幅域での標的遺伝子の減少速度は MS2 よりも GII/4-Sydney が大きかったが、仮に GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子の減少速度が同等と仮定し、GII/4-Sydney の感染価の減衰割合を類推すると、紫外線照射量が 40mJ/cm² で 3Log 程度となった。

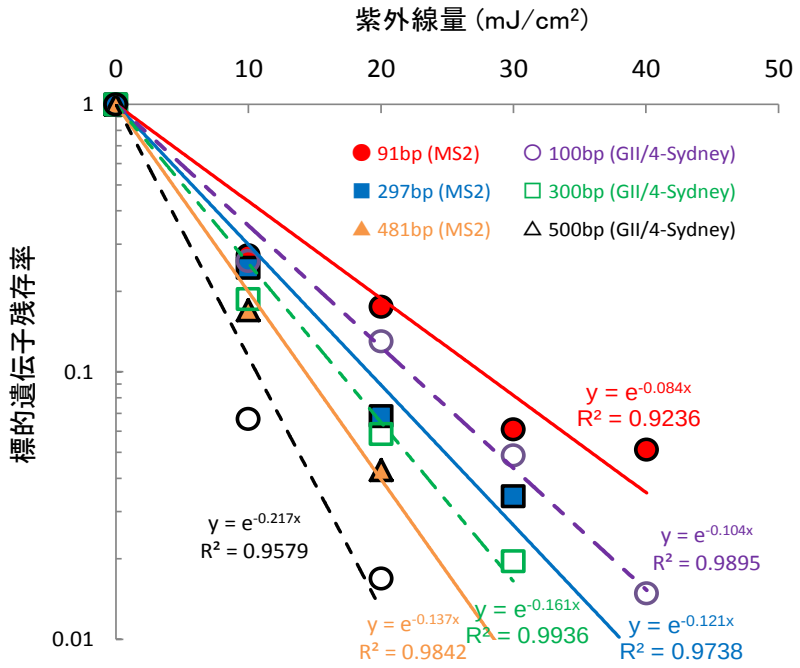


図-8 紫外線消毒による各増幅域での GII/4-Sydney と MS2 の遺伝子減少割合

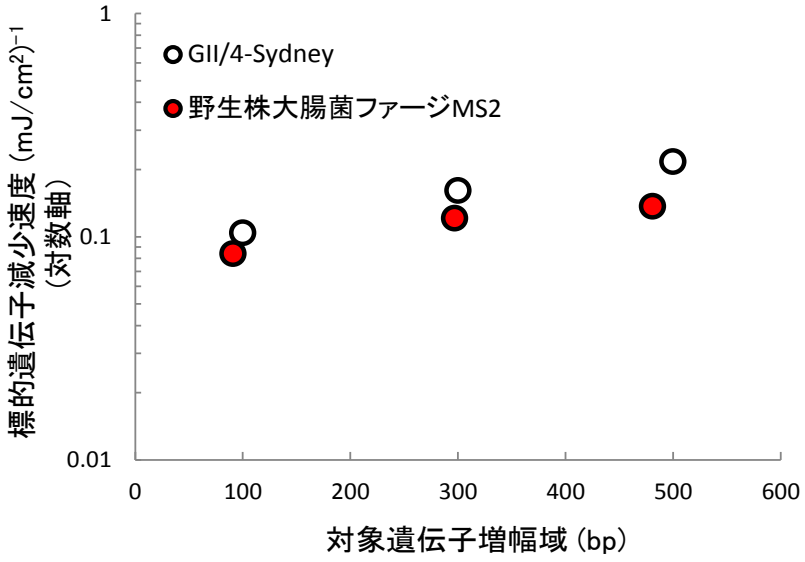


図-9 紫外線消毒による各増幅域での GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子減少速度

本項では、塩素消毒や紫外線消毒による MS2 と GII/4-Sydney の標的遺伝子減少速度を算出し、野生株の大腸菌ファージの感染価からノロウイルスの感染価を類推した結果、塩素消毒では Ct 値が 40mg・min/L、紫外線消毒では紫外線量が 40mJ/cm² でノロウイルスの感染価を 3Log 程度減衰できるものと考えられた。しかしながら、本類推結果は、あくまでも野生株の大腸菌ファージの不活化割合から推定した結果であることに加え、消毒効果は試験水の水質性状に影響を受けるため、より詳細な評価が必要不可欠である。すなわち水質性状の異なる下水試料を対象にデータを蓄積するとともに、野生株の大腸菌ファージが比較的高濃度で存在している試料を対象に評価を行い、本調査で検討した推定方法を再評価し精度を高める必要がある。

５．まとめ

本調査では、ノロウイルスの感染価推定手法の開発を目的に、新たな手法を用いた標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法における検出濃度向上手法を検証した。その上で、塩素消毒ならびに紫外線消毒によるノロウイルスおよび野生株の大腸菌ファージ MS2 の遺伝子減少割合について、開発した遺伝子定量法で評価することでノロウイルス感染価の推定手法の構築を試みた。得られた結果を以下に示す。

1）本調査において検討した dPCR 法を用いることで、26 年度に検討した LT-RT-PCR 法よりも高感度で下水処理水中のノロウイルスおよび野生株の大腸菌ファージ MS2 を検出することが可能となった。

2）塩素消毒や紫外線消毒による野生株の大腸菌ファージ MS2 の標的遺伝子残存率は、Ct 値、紫外線量に比例して減少し、また、標的遺伝子の増幅域を拡張することで、その減少速度も増加する傾向が確認された。塩素消毒では、Ct 値が 40mg・min/L、紫外線消毒では紫外線量 40mJ/cm^2 で野生株の大腸菌ファージを 3Log 程度不活化できる可能性があると考えられた。

3）ノロウイルス GII/4-Sydney と MS2 の標的遺伝子に対する感受性を dPCR 法で評価した結果、塩素消毒、紫外線消毒ともに標的遺伝子の減少速度は同程度であった。野生株の大腸菌ファージ MS2 の塩素消毒、紫外線消毒の感染価の減少割合から、標的遺伝子の感受性が野生株の MS2 とノロウイルスで同等と仮定し、ノロウイルスの感染価を類推すると、概ね塩素消毒では、Ct 値 40mg・min/L、紫外線消毒では紫外線量 40mJ/cm^2 で 3Log 程度、ノロウイルスの感染性が減衰されている可能性が見いだせた。

本調査において、野生株の MS2 ファージは、塩素、紫外線消毒における感受性がノロウイルスと同程度であることが見いだされた。野生株の MS2 ファージを指標として用いることで、消毒効果を類推できることに加え、他の腸管系ウイルスとは異なり大腸菌による plaque assay により簡便に評価が行えることから、ノロウイルスの代替指標として適用の可能性があると考えられた。

今後、水質性状として処理水中の有機物濃度や濁質等の変動を考慮した上で、野生株 MS2 ファージの消毒実験による不活化データや、ノロウイルスの遺伝子減少割合との関係を明らかとするためのデータ蓄積を行い、本調査で検討した推定方法を再評価し、精度を高め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) Moe CL, Preventing norovirus transmission: how should we handle food handlers?. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):38-40.
2) Duizer E., Schwab J.k., Neill H.F, Atmar L.R.,Koopmans P.G.M. and Estes K.M.: Laboratory efforts to cultivate noroviruses, Journal of General Virology,85,pp.79-87,2004.
3) Huggett Jim F., Bushell Claire A., Cowen Simon, Scott Daniel J., and Foy Carole A. : Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification, Anal. Chem., 2011, 83 (17), pp 6474–6484.
4) 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.
5) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報（IASR）, Vol. 31 pp. 312-314, 2010.
6) 土木学会 衛生工学研究委員会 (1993), 環境微生物工学研究法, 技報堂出版, pp.309-312.
7) 社団法人日本実験動物協会、LABIO21、No.38、2009., ISSN 1345-9147.
8) 清水優子、牛島広治、北島正章、片山浩之、遠矢幸伸、ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルスを用いた消毒薬による不活化効果（2009）、環境感染誌、Vol.24, No.6, pp.388-394.

下水道資源・エネルギーを最大限に活かした 希少水草栽培および微細藻類培養・エネルギー生産

材料資源研究グループ　　上席研究員　南山瑞彦
主任研究員　岡安祐司
研　究　員　高部祐剛

1. はじめに

下水処理場が有する豊富な栄養塩を利用した微細藻類培養・燃料化技術の開発が行われている[1)]。微細藻類を培養する際、炭素源である CO_2 を、培養水中 pH を指標として培養水に添加することで、培養量およびエネルギー生産量が向上することが明らかとなっている[2)]。一方で、市販の CO_2 を炭素源として利用した場合、微細藻類培養・回収コストに占める市販 CO_2 利用に関するコストの割合が 52%と試算されている[3)]。そのため、下水処理場内消化タンクから発生する嫌気性消化ガス中 CO_2 といった、現状では未活用の CO_2 について、微細藻類の炭素源としての利用が期待される。

本研究では、下水処理水を用いて土着藻類を培養した上で、下水処理場から生産する嫌気性消化ガスの膜分離精製での副産物である膜分離 CO_2 の土着藻類培養での有効性を検証することを目的に、室内連続培養実験を実施し、膜分離 CO_2 添加が土着藻類培養に与える阻害影響について検討を行った。

2. 実験方法

新潟県内 A 下水処理場内の中温嫌気性消化タンクから採取した嫌気性消化ガスを対象として、既往研究[4)]に記された膜分離手法により膜分離 CO_2 を得た。嫌気性消化ガスでの CO_2 および CH_4 の体積比率は、それぞれ 39.6%および 59.9%であったのに対して、膜分離 CO_2 では 98.3%および 0.902%であった。膜分離 CO_2 を 47 L 容量のガスボンベに約 1 MPa で充填した後、ガスボンベを土木研究所内実験施設に搬送した。

培養実験は、土木研究所内実験施設に設置された人工気象器 (LPH-350SP、日本医化器械製作所、日本)で実施した。人工気象器内の温度は 25℃とし、白色蛍光灯を 12 時間おきに点灯・消灯させ、点灯条件での光量子束密度は約 130 μmol/m^2/s とした。土着藻類培養に用いる下水処理水は、茨城県内の B 下水処理場内に設置された標準活性汚泥処理装置 (曝気槽有効容積: 100 L、水理学的滞留時間: 6 時間)より採取した。

培養は、有効容積 2 L のガラス製ビーカー2 個で行い、片方の培養装置には膜分離 CO_2 を添加 (装置名: 膜分離 CO_2)し、もう一方には、市販 CO_2 (CO_2 体積比率: 99.95%)を供給した (装置名: 市販 CO_2)。各培養装置での水理学的滞留時間が 2 日となるように、培養水と下水処理水を 1 L/d で入れ換えを行った。

膜分離 CO_2 および市販 CO_2 は、既往研究に従い[2)]、培養水での pH が 8 になった時点で添加を開始し、pH が約 7.9 に低下した時点で添加を停止した。培養水の pH は、pH コントローラ (NPH-660NDE、日伸理化、日本)によって制御した。膜分離 CO_2 および市販 CO_2 は、それぞれ 10 L 用のアルミニウムバックに充填し、ペリスタポンプ (FPC100、AS ONE、日本)を用いて添加した (添加ガス流量: 20 mL/min)。連続培養実験は、2016 年 1 月 13 日に開始し、2016 年 2 月 15 日までの 33 日間実施した。

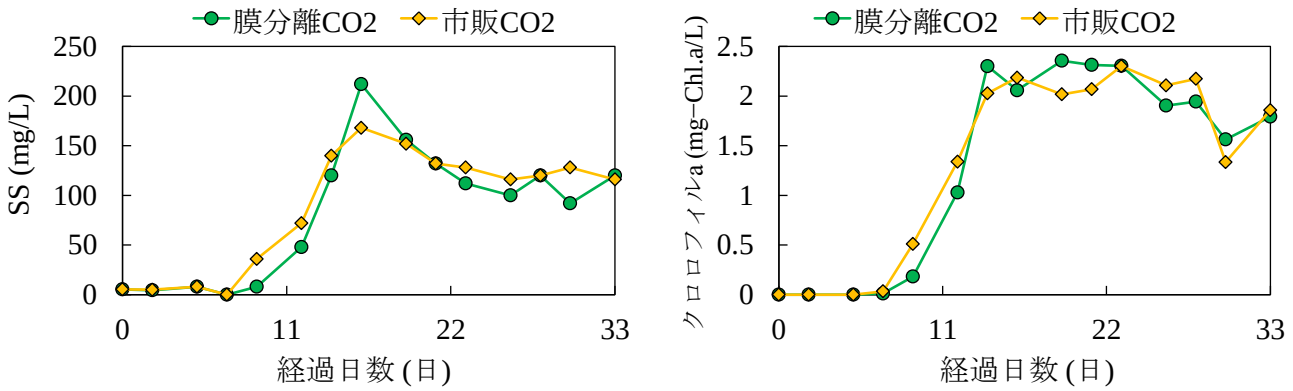
各培養装置での培養水を定期的に採取し、溶存酸素 (Dissolved oxygen: DO)、浮遊性物質 (Suspended solids: SS)、クロロフィル a、全窒素 (Total nitrogen: TN)、溶存態窒素 (Dissolved total nitrogen: DTN)、全リン (Total phosphorus: TP)、溶存態リン (Dissolved total phosphorus: DTP)および無機炭素 (Inorganic carbon: IC)を測定した。クロロフィル a 測定の際のろ過は、孔径 1.2 μm の GF−C (Whatman、アメリカ)を用い、それ以外のろ過は孔径 1.0 μm の GF−B

(Whatman、アメリカ)を用いた。DO は、55 Dissolved Oxygen Instrument (YSI、アメリカ)で測定した。SS は Standard methods[5]に、クロロフィル a は河川水質試験方法 (案)[6]にそれぞれ従い測定を行った。TN、DTN、TP および DTP は TRAACS2000 (Bran+Luebbe、ドイツ)で、IC は TOC-V CPH (島津製作所、日本)で、それぞれ測定した。

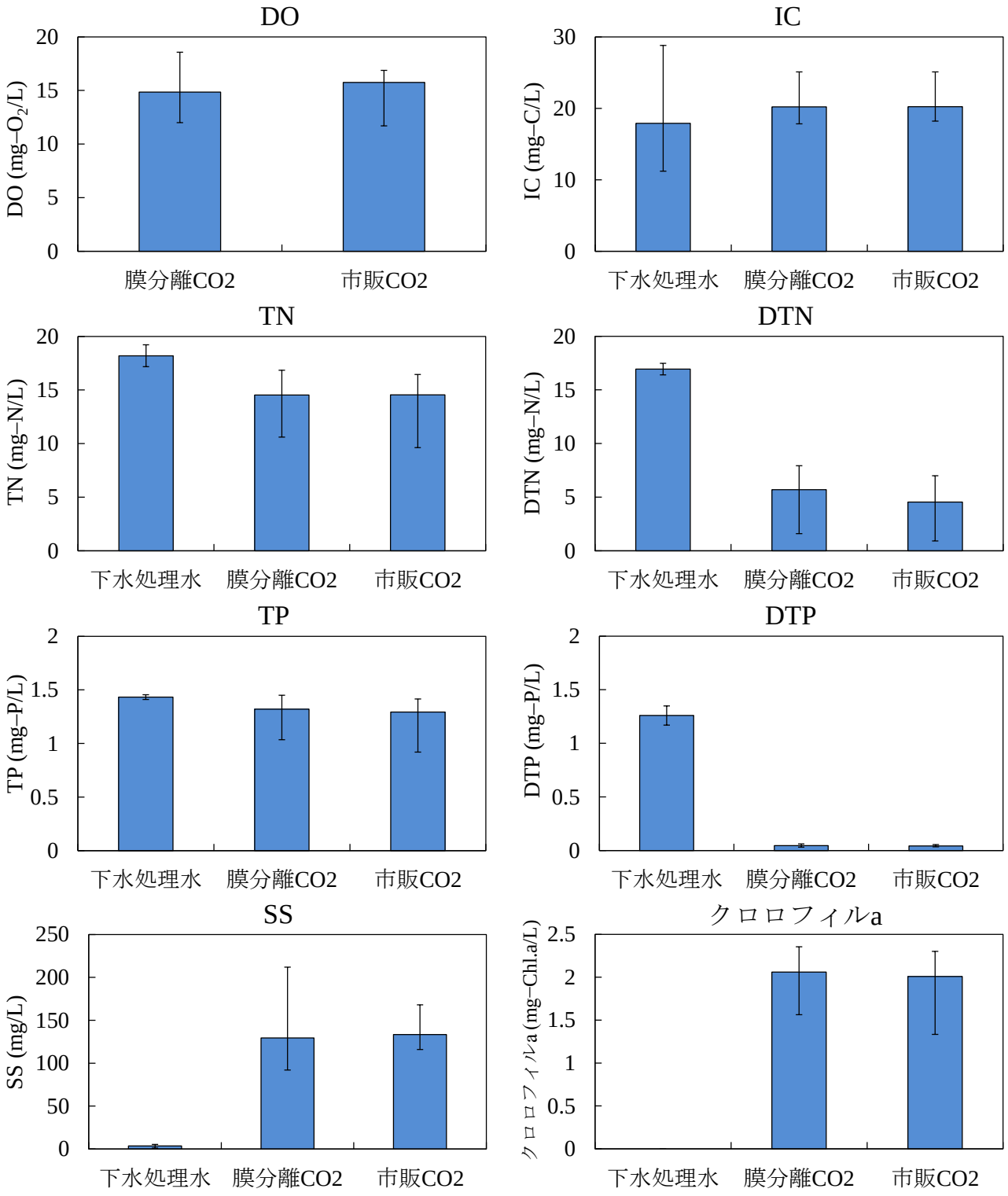
3. 結果および考察

各培養水での SS およびクロロフィル a の経時変化を図−1 に示す。藻類培養におけるバイオマス濃度の指標となる SS およびクロロフィル a について、両培養装置において、実験開始 9 日から 14 日目まで継続的に増加し、その後は一定の値を示した。

SS およびクロロフィル a がほぼ一定となった 14 日目以降での、下水処理水ならびに各培養水における各水質項目の分布を図−2 に示す。DO について、各培養水で 12 mg−O_2/L 以上となり、光合成にともない過飽和の状態であった。IC は、平均値で下水処理水において 17.9 mg−C/L であったのに対して、CO_2 添加により各培養水で 20.2 mg−C/L と上昇した。TN および TP は、下水処理水、膜分離 CO_2 および市販 CO_2 の培養水でそれぞれ、18.2 mg−N/L および 1.43 mg−P/L、14.5 mg−N/L および 1.32 mg−P/L、ならびに 14.5 mg−N/L および 1.29 mg−P/L となった。TP はそれぞれの試料で同程度であった一方で、TN は、下水処理水に比して、各培養水での濃度がやや低く、脱窒が生じた可能性が考えられる。DTN および DTP は、下水処理水で 16.9 mg−N/L および 1.26 mg−P/L であったのに対して、膜分離 CO_2 の培養水で 5.70 mg−N/L および 0.05 mg−P/L、市販 CO_2 の培養水で 4.55 mg−N/L および 0.04 mg−P/L であり、土着藻類培養により、下水処理水中 DTN および DTP が、膜分離 CO_2 で 66.3%および 96.3%、市販 CO_2 でそれぞれ 73.2%および 96.7%除去された。下水処理水では、SS が 3.5 mg/L であったのに対して、膜分離 CO_2 および市販 CO_2 の培養水でそれぞれ 129 mg/L および 133 mg/L となり、土着藻類培養により SS 濃度が増加した。また、クロロフィル a についても、下水処理水では検出されなかったが、膜分離 CO_2 および市販 CO_2 の培養水でそれぞれ 2.06 mg−Chl a/L および 2.01 mg−Chl a/L と増加した。SS およびクロロフィル a について、膜分離 CO_2 および市販 CO_2 間で有意水準 0.05 のもと、ウェルチの t 検定を行った。結果として、SS およびクロロフィル a ともに、膜分離 CO_2 および市販 CO_2 間で有意な差が得られなかった (p>0.05)。このことから、膜分離 CO_2 添加が藻類培養に与える阻害影響は小さく、藻類培養における膜分離 CO_2 利用が有用である可能性を示した。



図−1　各培養水における SS およびクロロフィル a の経時変化



図−2　下水処理水 (n=2)および各培養水 (n=9)における各水質項目の分布
(バーは平均値を、エラーバーは最小値、最大値を示す)

4. まとめ

本研究では、土着藻類を対象として、嫌気性消化ガスを膜分離した際の副生成物として得られる膜分離 CO_2 および市販 CO_2 をそれぞれ添加した、対照培養実験を行った。結果として、膜分離 CO_2 添加が SS やクロロフィル a

といった土着藻類培養に与える阻害影響は小さく、土着藻類培養における膜分離 CO_2 利用が有用である可能性を示した。

なお、本調査研究は、国土交通省　下水道技術研究開発（GAIA）からの受託業務費により実施されたものである。

謝辞

長岡技術科学大学　環境・建設系　資源エネルギー循環研究室　姫野修司准教授、小松俊哉准教授、南條公平様には、膜分離 CO_2 の提供を頂きました。ここに記して、謝意を表します。

参考文献

1) Sutherland, D.L., Howard–Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J.: The effects of CO_2 addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo–physiology, biomass production and nutrient removal. Water Res., 70, 9–26, 2015.

2) Takabe, Y., Hidaka, T., Tsumori, J., Minamiyama, M.: Effects of CO_2 addition on energy production by indigenous microalgae cultivation with treated effluent in wastewater treatment plants. J. Water Environ. Technol. (Accepted: 15 June 2016)

3) Slade, R., Bauen, A.: Micro–algae cultivaiton for biofuels: Cost, energy balance, enviromental impacts and future prospects. Biomass Bioenerg. 53, 29–38, 2013.

4) 佐々木星弥、姫野修司、小松俊哉、南條公平、本間康弘: CO_2 利用のためのバイオガス精製技術の開発、第 53 回下水道研究発表会講演集、181–183、2016.

5) American Public Health Association (APHA): Standard methods for the examination of water and wastewater, nineteenth ed. Washington, DC, USA, 2005.

6) 建設省技術管理業務連絡会水質部会: 河川水質試験方法 (案)、1997.

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
研究期間：平 23～平 27
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、岡安祐司、桜井健介

【要旨】
公共緑地等で発生する刈草等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ため、公共緑地で発生する刈草の性状を整理し、刈草の公共緑地から発生した刈草の処理方法（存置、野焼き、焼却(発電無し)、焼却(発電有り)、飼料化、堆肥化、バイオガス化）について、温室効果ガス(Greenhouse gas, GHG)排出量を算定し、焼却(発電有り)、飼料化、バイオガス化は、他の処理方法に比べて、正味の GHG 排出量が少なく、有効な利用方法と考えられた。
また、公共用水域で大量に発生する水草バイオマスの有望な利用方法の一つとして考えられる下水処理場での嫌気性消化技術導入に必要な基礎的知見を収集するために、水草と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する実験を行った。水草と下水汚泥の混合嫌気性消化実験では、単独消化時よりも混合消化時に、メタンガス生成量が増加することが示された。
キーワード：地球温暖化対策、温室効果ガス、刈草、水草、メタン発酵

1. はじめに

河川、道路、公園、ダムなどの公物管理のため、草や木が多量に伐採・処分されている。それらをエネルギーや堆肥などの有機資材として有効利用し、化石資源由来のエネルギーやそのエネルギーの消費により製造される製品を代替できれば、温室効果ガスの排出を削減し、地球温暖化対策として貢献が可能である。

本研究は、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ため、公共緑地で発生する刈草の性状を整理し、刈草の公共緑地等から発生した刈草の処理（存置、野焼き、焼却(発電無し)、焼却(発電有り)、飼料化、堆肥化、バイオガス化）について、温室効果ガス(Greenhouse gas, GHG)排出量を算定した。また、水草と下水汚泥の混合嫌気性消化実験を行った。

2. 公共緑地等から発生した刈草の処理による温室効果ガス排出量の算定

2.1 背景

河川管理において重要な堤防法面の点検と堤体保全のため、堤防除草が定期的に行われている。除草後の刈草は、河川管理上あるいは廃棄物処理上支障がなく刈草を存置できる場合を除いて、焼却などにより処理されてきた。平成 23 年 5 月に策定された「河川砂防技術基準　維持管理編(河川編)」(国土交通省)では、これまでの方法に加え、新たに刈草の飼料等への有効利用や野焼きによる処分等の取り組みに努めることとされた[1]。

一般に、刈草を含むバイオマスは広く、薄く存在している上、水分含有量が多い、かさばる等の扱いづらいという特性のために収集が困難であることが、十分に活用されていない原因の一つである[2]。しかし、河川管理で発生する刈草は、毎年、一定量が発生し、管理システムが確立しており、比較的利用しやすいため、有効利用が期待される。

刈草の特徴は木材に比べリグニンの含有量が少なく柔らかい点であり[3]、生物による分解が比較的早い。この特徴を活かし、飼料化[4,5]だけでなく、堆肥化[6,7]や嫌気性消化[8,9]なども有望な有効利用方法と思われる。

刈草をエネルギーや堆肥など有機資材として有効利用し、化石資源由来のエネルギーやそのエネルギーの消費により製造される製品を代替することは、GHG の排出を削減できることから、地球温暖化問題への対策として期待される。これは、植物が成長過程で光合成により二酸化炭素(CO_2)を吸収することから、大気中の CO_2 を増加させない「カーボンニュートラル」と呼ばれる特性[10]を有しているためである。

現状では、河川堤防の管理者等が、地球温暖化対策としての効果の大きさを考慮に加えて、処理方法を選択し

ようとしても、比較のための情報は十分に整備されていない。このため、河川管理者によるGHG排出量の算定を容易にするため、様々な処理に伴うGHG排出量の算定方法を開発し、GHG排出量を算定した。

2.2 刈草の有効利用技術の導入検討事例

2.2.1 刈草の有効利用技術の概要

刈草の特徴は木材に比べリグニンの含有量が少なく柔らかい点であり[3]、生物による分解が比較的早い。この特徴を活かし、バイオガス化、飼料化、堆肥化などが有望な有効利用方法と思われる。

バイオガス化は、刈草を破砕機等で破砕した後に、嫌気性消化させ、メタンを含むバイオガスを発生させ有効利用する方法である。一般的に、発電等に用いられる。特に、国内に200か所程度存在する嫌気性消化槽を有する下水処理場で刈草を受け入れ、下水汚泥と混ぜて嫌気性消化させる方法は、既存施設を活用でき、有望と考えられる。

飼料化は、刈草をラップサイレージ化し、乳牛等に飼料として利用する方法である。国内で使用される粗飼料の一部は、オーストラリア等から輸入されているが、それらを代替できれば、輸送等で消費されていた石油燃料等の消費を削減することができる。

堆肥化は、植物廃材を腐熟させ、微生物の作用により各種含有物を分解安定化することによって、植物生育に有用な物質に変化させ[11]、堆肥として利用する方法である。それらが従来使用されていた化学肥料を代替できる場合、化学肥料の製造等に伴って消費されていた石油燃料等の消費を削減することができる。

2.2.2 バイオガス化の事例

新潟市の中部下水処理場において、刈草を受け入れて、下水汚泥と刈草等の混合嫌気性消化を行い、発生したメタンガスを用いて発電が行われる予定である[12,13]。北陸地方整備局において、信濃川下流河川事務所管内で発生する刈草のうち、従来、焼却場で処理していた刈草を新潟市中部下水処理場で受け入れた場合についてケーススタディを実施し、両者ともにコスト削減効果が見込まれ、温室効果ガス排出量も削減効果が見込まれている[14]。

海外において、刈草をメタン発酵して発電する事業についての文献は見当たらないが、畜産廃棄物と刈草の混合嫌気性消化や刈草を主体とする嫌気性消化の採算性を検討されている[15,16,17]。刈草を主体とする嫌気性消化[17]においては、発電規模500kW以上において、採算性が確保できるとされている。

2.2.2 飼料化の事例

千葉県、島根県等で飼料化が行われている。

千葉県では、河川堤防刈草を活用した乳用牛発酵TMR（total mixed rations:混合飼料）飼料化実証事業[18,19]が行われており、ロールベーラで回収した堤防除草刈草をラップサイレージ化し、乳用発酵TMR飼料加工して近傍の畜産農家へ提供された。生産コスト約25円/kgであり、畜産農家の購入希望価格とほぼ同等と報告されている。

島根県では、道路で除草された刈草を集積場に運搬集積し、異物除去後、梱包ラッピング、その場で保管し、引き渡し日を決めて畜産農家が持ち帰り、牛の飼料として有効利用した[20,21]。これまでの処分場での処理経費に比べ、梱包ラッピングに掛かる経費は安価で、経費削減が達成された。

2.2.3 堆肥化の事例

東京都・埼玉県、三重県等で堆肥化が行われている。

東京都・埼玉県に所在する荒川上流河川事務所では、河川堤防等で発生した刈草を破砕し、4か月間発酵させて、堆肥化している。「荒川緑肥（肥料登録）」と命名し、近隣の農家や園芸愛好家に提供したり、市・学校での利用やイベント会場で配布したりしている[22]。

三重県亀山市では、刈り草コンポスト化センターにおいて、道路、河川敷、家庭等から出る刈り草を堆肥化し、市民へ配布したり、公共施設及び関係機関等で活用したりしている[23,24]。

2.3 GHG排出量の算定方法

2.3.1 算定方法

GHG排出量の評価にあたっては、原料の調達から製品の廃棄までの環境影響を評価する、ライフサイクルアセスメント[25]の考え方を用いた。

GHG排出量は、プロセス毎に活動に伴って消費される化石燃料、電力、薬品量にGHG排出係数を乗じ算定し、それらを積み上げてシナリオ全体のGHG排出量とした。GHG削減量は、シナリオ内で生じる資源化物（焼却や嫌気性消化から発電した電力、飼料、堆肥）が同等の機能を提供するシステム（電力供給、飼料の供給、化学肥料の供給）を代替するとみなし、この代替システム分を算定した。GHG排出量および排出削減量は、シナリオ中の運用に由来するGHG排出および排出削減を対象とし、比較的小さいと思われる施設や設備の建設や廃棄は対象外とした。

算定対象とするGHGの種類は、二酸化炭素(CO_2)、

メタン(CH_4)、一酸化二窒素(N_2O)とした。各シナリオのGHG排出量と排出削減量を求める際には、各種のGHG量に地球温暖化係数を乗じて二酸化炭素換算量とした上で、合算して求めた。地球温暖化係数は、京都議定書の前提となっているIPCC第二次報告書[26]における積分期間100年の係数とし、重量当たりの温室効果がCO_2に対し、CH_4は21倍、N_2Oは310倍とした。刈草の焼却や分解に伴うCO_2の排出は、草の成長時に吸収したCO_2を還元する効果とみなせるので、IPCCガイドライン[27]と同様に、温室効果は無いものとした。

2.3.2 算定範囲

本研究における評価対象は、除草(面積1,000m² を1回)から、焼却または加工後、最終的に灰の埋め立てや農地還元等を通して、安定した状態となるまでとした。

2.3.3 刈草の性状

刈草の発生重量、組成、含水率は、土木研究所が以前実施した全国調査での測定結果[28]に基づいた。刈草の高位発熱量は、18.5±1.3MJ/kg-dry(平均±標準偏差)であった。2、3日存置し乾燥を行った刈草の含水率は0.180±0.088kg/kg-wetであり、灰分は0.112±0.044 kg/kg-dryであった。

刈草の元素の重量割合を表-1に示す。一般にバイオマスは、主要構成成分がセルロースやリグニンであるため、炭素と水素は、それぞれ、45-50%、5-6%であることが知られており[29]、採取した刈草もそれらの範囲内であった。刈草の低位発熱量は、13.8MJ/kg-wetであり、ごみの低位発熱量の全国平均値(平成16年)約9.0 MJ/kg-wet[30]より高かった。

表-1　河川の維持工事で発生した刈草86検体の元素の平均重量割合(単位：%)

	炭素	水素	窒素	硫黄	酸素
平均	46.3	5.42	1.34	0.01	40.5
標準偏差	2.7	0.35	0.41	0.03	2.3

刈草の年間回収重量の相加平均値は、667g-wet/m² であった。GHG排出量の試算にあたっては、除草は年2回が基本[1]であることから、1回あたり334g-wet/m² として計算することとした。また、刈草は2、3日存置し、乾燥されて回収されることが多く、刈草の含水率は、測定された含水率(18.0%)と同等と仮定した。

2.3.4 評価シナリオ

評価シナリオは、図-1に示すとおり、実例のある、または、実用段階にある(A)存置、(B)野焼き、(C)焼却(発電無し)、(C')焼却(発電有り)、(D)飼料化、(E)堆肥化、(F)バイオガス化とした。

各シナリオに共通の除草プロセスおよび集草プロセスでは、一般的な刈幅150cm、ガソリン燃費9.2L/h[31]のハンドガイド式草刈機を用いることとした。除草と集草の作業時間は、文献[32]から、それぞれ、1.28h/1000m²、1.04h/1000m² とした。トラックへの積み込みや積み下ろしは人力とした。人力による作業は、GHG排出が無いものとした。

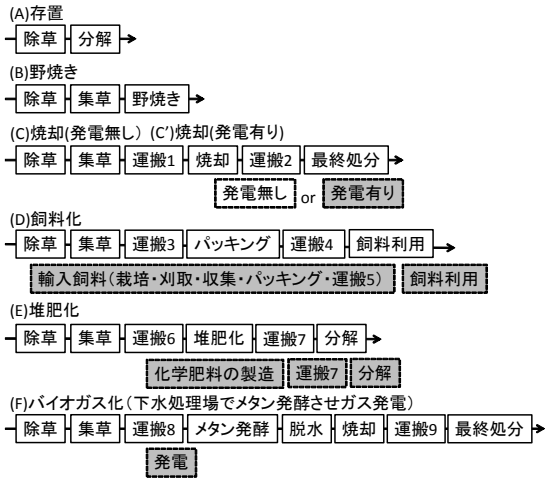


図-1　温室効果ガス排出量の評価対象とするシナリオと構成プロセス(灰色に着色された部分は、代替されるプロセスを示す)

a)　存置シナリオ

存置シナリオは、除草と分解プロセスより構成されるものとした。分解プロセスにおける炭素と窒素のCH_4やN_2Oへの転換率は、有機肥料や化学肥料の畑地での施肥[33]と同値とした。

b)　野焼きシナリオ

野焼きシナリオは、除草および集草後、現地で焼却されるものとした。焼却時のCH_4、N_2O転換率は、農業残渣の野焼き[27]と同等とした。

c)　焼却シナリオ

焼却シナリオは、発生した刈草を既存のごみ焼却場で中間処理し、灰を最終処分することを想定した。焼却のGHG排出量は、文献[34-36]によると、炉の形式、炉の大きさ、発電効率、溶融の有無などにより異なる。本報告において焼却施設の処理方式は、全国で最多(1221施設中463施設[35])の全連続運転のストーカ式施設とした。実施設において刈草のみの焼却に伴う電力、燃料、薬剤の使用量を把握するのは困難であるため、文献[20]の計算モデルを利用して算定し、特に説明の無いものは計算モデルのデフォルト条件を採用した。焼却施設の処理規模は、規模別施設数で最多帯[37]の200t/dを仮定した。計算モデルでは、発電量は、ごみの量と低位発熱量に依存

する発生蒸気量と主に施設規模に依存する場内蒸気使用量の差から使用可能蒸気量を求め、発電効率を用いて計算される。本シナリオでは、既存の焼却処理場に刈草が追加的に投入されることを想定し、場内蒸気使用量は変わらず、発生蒸気量が増加するものとして計算した。また、刈草を投入していない状態でも発生蒸気量は場内蒸気使用量を上回っており、かつ、補助燃料は利用していないものとした。集塵灰は、薬剤処理後セメント固化されるものとした。全連続運転のストーカ式焼却炉の CH_4、N_2O 転換率は、一般廃棄物焼却炉の CH_4 と N_2O 排出係数（廃棄物総量ベース）[38]および一般廃棄物の炭素と窒素の標準含有率[30]から計算して、設定した。

最終処分プロセスでは焼却灰のセメント固化物を対象とした。処分場の設計条件は計算モデル[20]中のデフォルト条件とした。

d) 飼料化シナリオ

飼料化シナリオは、ラップサイレージ化した刈草と乾草が同等の栄養価および嗜好性がある[39]ので、刈草をラップサイレージ化して、乳牛等に飼料として利用することとし、同量のオーストラリア産輸入乾草と代替することとした。パッキングプロセスは、梱包、密封、積込から構成され、それぞれの軽油消費量は、文献[40]から 0.6L/1000m²、0.4L/1000m²、0.4L/1000m² とした。代替するオーストラリア産輸入乾草の生産・輸送に伴う GHG 排出量は、文献[41]から全国平均値を計算して、258.1g-CO_2/kg-wet を用いた。オーストラリア産輸入乾草の含水率は 10%として計算した。

e) 堆肥化シナリオ

堆肥化シナリオについては、有機堆肥の製造および施用に伴う GHG 排出量から、相応の化学肥料の製造および施用に伴う GHG 排出削減量を差し引くことで全体の GHG 排出量を計算した。有機堆肥の製造は、バックホーにより電気式の破砕機に投入し、破砕後、ホイールローダーによる切り返しを行うものとした。バックホー軽油消費量、破砕機電力消費量、ホイールローダー電力消費量は、文献[42]の測定値から、それぞれ、0.0157L/dry-kg、18.0Wh/dry-kg、0.00798L/dry-kg とした。相応の化学肥料の製造とは、有機肥料中の窒素とリン酸の量と等しい窒素とリン酸を含む化学肥料の製造とし、その製造に伴う GHG は文献[43]から、1.64kg-CO_2eq./kg-N と 1.44kgCO_2eq./kg-P_2O_5 を用いた。刈草の堆肥化の過程では、窒素量に変化が無いものと仮定し計算した。一般に、国内の河川堤防等で見られる草本のリン含有率は、0.1-0.4%程度[44]であり、堆肥のリン酸含有率は、堆肥化事例[32]を元に 0.4%とした。化学肥料および有機堆肥の施肥に伴う炭素と窒素の CH_4 や N_2O への転換率は、IPCC ガイドライン[27]と同様に区別がないものとし、存置シナリオと同値とした。化学肥料の製造については、GHG 排出量を文献値[40]のまま計上した。

f) バイオガス化シナリオ

バイオガス化シナリオは、刈草を 2、3cm 程度に破砕後、嫌気性消化槽と発電機を有する既存の下水処理場にて下水汚泥と混合して嫌気性消化し、バイオガスを回収した後、機械脱水した後に焼却して、灰を埋め立てるものとした。回収されたバイオガスは、精製して、ガスエンジンにて発電し、従来の電気と代替することとした。破砕に係る消費電力は、前節の堆肥化と同じとした。消化、脱水プロセスは、中温消化、遠心脱水によるものとし、消化、脱水による電力消費量は、処理体積に比例するものと仮定し、汚泥体積と電力消費量の実測値[46]から、それぞれ 7.2、7.6kWh/m³ とした。刈草の比重は、文献[47]を参考に 220 kg/m³ として計算した。脱水プロセスでは、刈草の含水率が下水汚泥と比べてかなり低いため、刈草が保持していた水分は、脱水後も変化しないことと仮定した。焼却プロセスは、主な形式である流動床式[48]とし、消費電力量は、ごみ焼却の計算モデル[34]を利用して設定した。施設規模は、規模別施設数で最多帯[48]の 100t/d とした。

メタンガスの発生条件については、破砕機で 2、3cm 程度に破砕された刈草を消化した実験結果[9]より、消化ガス発生量 0.31NL/gVS、メタン濃度 64%、VS 分解率 23%とした。メタンガスの低位発熱量およびバイオガスの精製による消費電力量は、それぞれ、35.9MJ/Nm³、0.387Wh/NL-CH_4[46]と設定した。ガスエンジンの発電効率は、一般に 25-39%であり[49]、33%として計算した。消化のための加温は、ガスエンジンの排熱利用から賄うものとし、化石燃料の利用は無いものとした。消化後の刈草の高位発熱量は、VS 分解率と同じく 23%が失われたものとして計算した。

活動に伴って消費される化石燃料、電力、薬品量または GHG 排出量は、以下に示す各シナリオに基づき、表-2 のとおり設定した。

バイオマスが焼却や生物反応によって分解される際には、CO_2 以外に CH_4 や N_2O が排出される。刈草が焼却や生物分解される際に、バイオマス中の炭素および窒素が表-3 の転換率に従い、CH_4 や N_2O によって転換されるものとした。また、化石燃料と電力の使用による GHG 排出係数は文献[50]に基づき、化学薬品の GHG 排出係数

は、LCI データベース IDEA ver.1.1[51]を参照した。化石燃料、電力、化学薬品の GHG 排出係数は、表-4 に示した。

表-2　刈草の処理に関する各プロセスにおいて消費される化石燃料，電力，薬品量または GHG 排出量(1000m² ・除草 1 回あたり)

プロセス，消費物	原単位	参照文献
(1)除草・集草		
草刈機ガソリン消費量(L)	14.9	31),32)
(2)焼却(発電無し)		
ごみ焼却場内消費電力 (kWh)	36.8	34)
消石灰使用量(kg)	1.8	34)
セメント使用量(kg)	1.3	34)
キレート剤使用量(kg)	0.16	34)
(3)焼却(発電有り)		
ごみ焼却場内消費電力(kWh)	36.1	34)
効率 10%時発電量(kWh)	-88.3	34)
効率 20%時発電量(kWh)	-177	34)
消石灰，セメント，キレート剤使用量は(3)と同じ		
(4)最終処分		
浸出水処理の消費電力(kWh)	0.042	34)
浸出水処理の消費重油(L)	0.0036	34)
埋立用重機の消費軽油(L)	0.0080	34)
(5)飼料化		
密封関連機械消費軽油(L)	1.4	40)
輸入飼料の生産運搬に係る GHG(kg-CO_2eq.)	-71	41)
(6)堆肥化		
バックホー軽油使用量(L)	4.3	42)
破砕機等消費電力(kWh)	4.9	42)
ホイールローダー軽油使用量(L)	2.2	42)
化学肥料製造（窒素）に係る GHG(kg-CO_2eq.)	-6.0	43)
化学肥料製造（リン）に係る GHG(kg-CO_2eq.)	-0.79	43)
(7)バイオガス化		
バックホー軽油使用量(L)	4.3	42)
破砕機等消費電力(kWh)	4.9	42)
消化の消費電力(kWh)	7.5	46)
脱水の消費電力(kWh)	7.9	46)
流動床式焼却の消費電力(kWh)	27.8	34)
消石灰使用量(kg)	1.1	34)
セメント使用量(kg)	3.8	34)
キレート剤使用量(kg)	0.46	34)
ガスエンジン発電量(kWh)	-148	49)
浸出水処理の消費電力(kWh)	0.065	34)
浸出水処理の消費重油(L)	0.0055	34)
埋立用重機の消費軽油(L)	0.0158	34)

注意) 刈草の有効利用による排出削減量は，マイナスで表記した.

表-3　各シナリオで採用されたCH_4，N_2O転換率

シナリオ	CH_4転換率 (g-CH_4-C/kg-C)	N_2O 転換率 (g-N_2O-N/kg-N)	参照文献
(A)存置	-	6.2	33)
(B)野焼き	5.0	7.0	27)
(C)，(C')焼却	0.046	0.35	30), 38)
(D)飼料化	-	6.2	33)
(E)堆肥化	-	6.2	33)
(G)バイオガス化	0.046	0.35	30), 38)

表-4　化石燃料，電力，薬品の使用による GHG 排出係数

対象	CO_2(kg)	CH_4(g)	N_2O(g)	参照文献
ガソリン (/L)	2.32	1.87*	0.0215*	50)
軽油(/L)	2.58	-	0.0641	50)
重油(/L)	2.71	-	0.0665	50)
電力(/kWh)	0.550	-	-	50)
消石灰(/kg)	1.05	-	-	51)
セメント(/kg)	0.86	-	-	51)
キレート剤(/kg)	1.37	-	-	51)

*自動車の場合は含まれない

2.4 シナリオ別の GHG 排出量の算定

GHG 排出量と GHG 排出削減量の計算結果を図-2 に示した。これらの合計が、正味の GHG 排出量として評価された。焼却(発電有り)、飼料化、バイオガス化は、正味の GHG 排出量が特に少なくなっていることがわかった。焼却(発電有り)は、発電効率が 10%の場合を例示した。20%以上の発電効率を持つごみ焼却施設もわずか(全 1,189 施設中 15 施設)に有り[52]、その場合には、GHG 排出削減量がさらに大きくなる。なお、除草場所から焼却や加工施設や利用先への運搬に伴う GHG 排出量は、含まれていない。除草面積 1,000m² から発生した刈草を 2 トントラックで運搬すると、GHG 排出量が 1km あたり 0.38kg-CO_2 増加することを考慮する必要がある。

各シナリオに共通の除草・集草プロセスでは、ハンドガイド式草刈機を用いることとしており、GHG 排出量は 50.8kg-CO_2 であった。シナリオによっては GHG 排出量の半分以上を占めており、刈草の処理方法だけでなく、除草・集草プロセスからの GHG 排出量低減も重要であると考えられた。

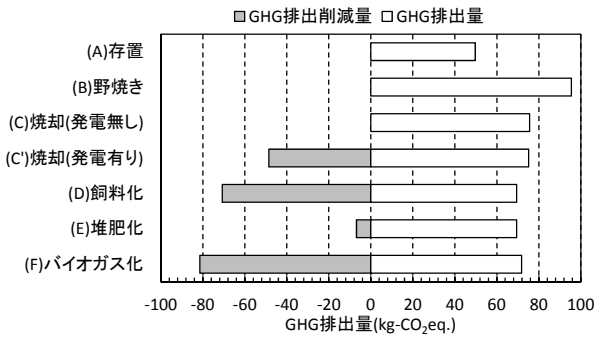


図-2　公共緑地 1000m² から発生した刈草の処理シナリオ別の温室効果ガス排出量と排出削減量

2.5 公共緑地等から発生した刈草の処理による GHG 排出量の算定のまとめ

公共緑地で発生する刈草の性状を整理し、刈草の公共緑地等から発生した刈草の処理（存置、野焼き、焼却(発電無し)、焼却(発電有り)、飼料化、堆肥化、バイオガス化）について、正味の GHG 排出量を算定したところ、以下の知見を得た。

1) 焼却(発電有り)、飼料化、バイオガス化は、他の処理方法に比べて、正味のGHG排出量が特に少なくなっていた。
2) 各シナリオに共通の除草プロセスにおいて、ハンドガイド式草刈機を用いた場合、GHG排出量は50.8kg-CO_2であった。シナリオによってはGHG排出量の半分以上を占めていた。

3. 水草と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する実験的検討

3.1 目的

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検討している。特に、近年では、河川・湖沼等の公共用水域で水草が異常発生している[53]ことを踏まえて、水草の下水処理場での有効利用方法を想定した、水草と下水汚泥の混合嫌気性消化の実験を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 回分式実験

嫌気性消化槽での、濃縮汚泥および水草投入による効果を確認するために、消化汚泥、濃縮汚泥および水草を用いて、消化汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥のみを添加する系列、消化汚泥に濃縮汚泥と水草の混合比を変化させて添加する系列、ならびに、消化汚泥に水草のみを添加する系列について、中温条件（35℃）にて回分式嫌気性消化実験を行った。実験に使用した消化汚泥は、茨城県霞ケ浦浄化センターの濃縮汚泥を基質として、中温条件（35℃）、HRT を 20 日に設定した嫌気性反応器を連続運転し、そこから得られた余剰消化汚泥とした。実験に使用した濃縮汚泥は、茨城県霞ケ浦浄化センターで採取したものとした。実験に使用した水草は、2015 年 6 月に、滋賀県琵琶湖の矢橋帰帆島中間水路において刈り取られた後、1 か月程度天日乾燥された水草（主にオニビシ）を、ペースト状になるまで粉砕したものを用いた。

回分式嫌気性消化実験は、ガラス瓶および攪拌機を組み合わせた反応器を用い、消化汚泥 400mL を投入し、表-5 に示す所定量の濃縮汚泥、水草を添加し、沸騰後冷ました水道水を加えて 500mL とした。その後、反応器内を窒素ガスで十分に置換し密栓後、35℃に調整した恒温水槽内に設置し、経時的にメタンガス発生量を測定した。

表-5 回分式嫌気性消化実験における基質の組成

系列名	投入消化汚泥	投入基質（gVS）	
		濃縮汚泥	水草
1-1	400mL	－	－
1-2	400mL	0.647	－
1-3	400mL	0.647	0.641
1-4	400mL	0.647	1.282
1-5	400mL	－	0.641
1-6	400mL	－	1.282
2-1	400mL	－	－
2-2	400mL	0.837	－
2-3	400mL	0.837	0.418
2-4	400mL	0.837	0.836
2-5	400mL	－	0.418
2-6	400mL	－	0.836

3.2.2 分析方法

消化汚泥、濃縮汚泥、投入水草、実験終了後の培養液の性状分析は、下水試験方法に従って行った。なお、CODCr の分析は吸光光度計（DR2400、HACH 社）により、COD 試薬を用いた。アンモニア性窒素濃度は、自動比色分析装置（TRAACS2000、BRAN LUEBBE 社）を用いた。発生メタンガス量の測定は、水上置換方式のガス流量計（BioReactor Simulator AMPTS Ⅱ、Bioprocess Control）を用いた。

3.3 結果および考察

回分式実験におけるメタン生成量の経時変化を、図-3、図-4 に示す。なお、回分式実験で用いた消化汚泥、濃縮汚泥、水草の VS は、1.0%、6.2%、16.9%（系列 1）および 0.7%、1.3%、16.7%（系列 2）であった。濃縮汚泥や水草を投入した系列では、実験開始後 1 週間程度の間は、メタン発生速度が大きかったが、その後は、基質を投入しなかったブランクの系列と同程度にまで発生速度が低下した。本実験では実験期間を 6 週間（42 日間）に設定し、累積メタン発生量を整理した。表-6 に、各系列における累積メタン発生量、他の系列でのメタン発生量を差し引いて計算される水草由来のメタン発生量を示す。さらに、各系列に投入した水草量と、水草由来のメタン発生量の関係を図-5 に示す。水草のみを単独で嫌気性消化する場合に比べて、下水汚泥と混合して処理した方が、メタン発生量が大きい結果が得られた。混合処理により、栄養バランスの改善や、下水汚泥の酸発酵で活性化する微生物群により水草の可溶化および酸発酵が促進されることなどにより、水草からのメタン転換が促進されると考えられる。

また、本実験における、投入基質の VS ベースのメタン転換率は、濃縮汚泥のみを投入した場合で、0.17～0.21NL/gVS であり、オキシデーションディッチ法の脱水汚泥を用いた嫌気性消化におけるメタン転換率の報告値 0.1～0.2NL/gVS [54]と同程度であり、標準活性汚泥法における濃縮汚泥を用いた場合に比べて小さかった。本実験で使用した濃縮汚泥は、PAC 添加標準活性法、嫌気無酸素好気法、凝集剤添加循環式硝化脱窒法、担体投入型修正 Bardenpho 法などの各種の高度処理方式が導入された

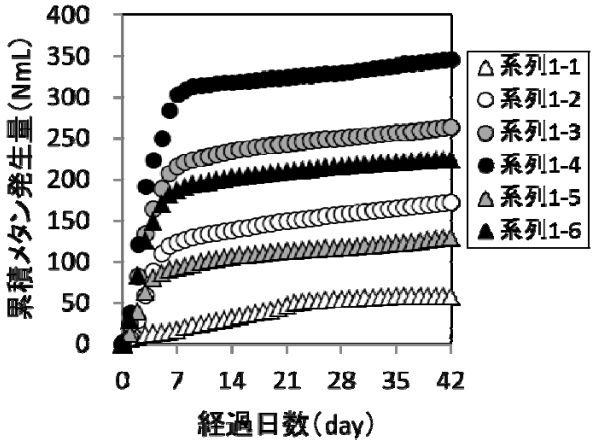


図-3 回分式嫌気性消化実験（系列 1）におけるメタン生成量の経時的変化

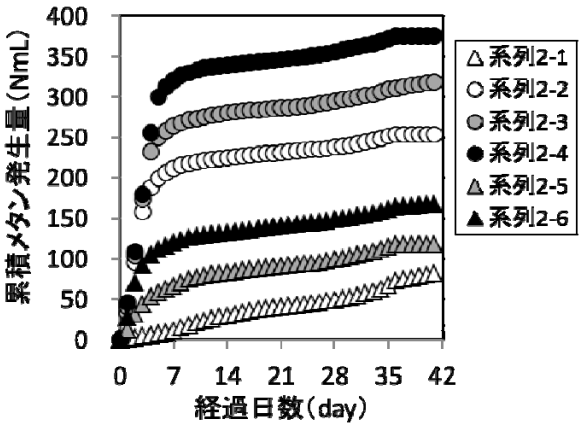


図-4 回分式嫌気性消化実験（系列 2）におけるメタン生成量の経時的変化

表-6 回分式嫌気性消化実験におけるメタン発生量

系列名	累積メタン発生量（NmL）	水草由来メタン発生量（NmL）	備考（水草由来メタン発生量の推定方法）
1-1	58.6	―	
1-2	171.8	―	
1-3	263.2	91.4	(1-3)－(1-2)
1-4	346.2	177.4	(1-4)－(1-2)
1-5	129.9	71.3	(1-5)－(1-1)
1-6	224.8	166.2	(1-6)－(1-1)
2-1	81.4	―	
2-2	253.8	―	
2-3	318.5	64.7	(2-3)－(2-2)
2-4	375.0	121.2	(2-4)－(2-2)
2-5	117.9	36.5	(2-5)－(2-1)
2-6	167.2	85.8	(2-6)－(2-1)

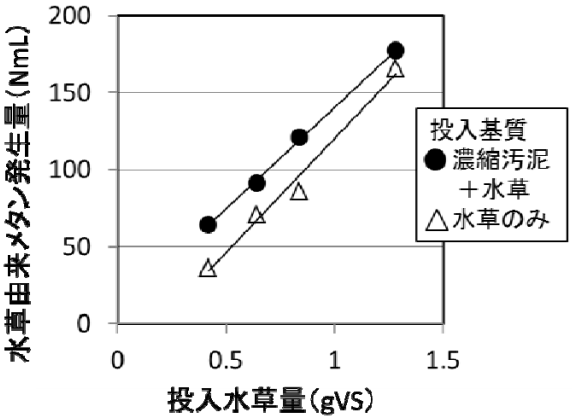


図-5 回分式嫌気性消化実験における投入水草量と、水草由来メタン発生量の関係

下水処理場から採取されたものであり、汚泥性状がメタン転換率に影響を与えていたと考えられる。なお、CODベースメタン転換率は、濃縮汚泥のみを投入した場合で5～9%、水草のみを投入した場合で 7～12%、濃縮汚泥と水草を混合して投入した場合で9～16%であった。

4. おわりに

公共緑地等で発生する刈草等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ため、公共緑地で発生する刈草の性状を整理し、刈草の公共緑地から発生した刈草の処理方法（存置、野焼き、焼却(発電無し)、焼却(発電有り)、飼料化、堆肥化、バイオガス化）について、温室効果ガス(Greenhouse gas, GHG)排出量を算定し、焼却(発電有り)、飼料化、バイオガス化は、他の処理方法に比べて、正味のGHG排出量が少なく、有効な利用方法と考えられた。

また、公共用水域で大量に発生する水草バイオマスの有望な利用方法の一つとして考えられる下水処理場での嫌気性消化技術導入に必要な基礎的知見を収集するために、水草と下水汚泥の混合嫌気性消化に関する実験を行った。水草と下水汚泥の混合嫌気性消化実験では、単独消化時よりも混合消化時に、メタンガス生成量が増加することが示された。

謝辞

汚泥採取、水草採取などでお世話になりました下水処理場関係各位に謝意を表します。

参考文献

1) 国土交通省：河川砂防技術基準維持管理編（河川編）(http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/gijutsu/gijutsukijunn/ijikanri/kasen/pdf/gijutsukijun.pdf)，2013.
2) バイオマス・ニッポン総合戦略，平成18年3月31日閣議決定
3) 公益社団法人化学工業会，一般社団法人日本エネルギー学会編：バイオマスプロセスハンドブック，株式会社オーム社，2012.
4) 愛知県畜産総合センター：河川敷刈草飼料利用促進の取り組み(http://www.pref.aichi.jp/0000022559.html)，2009.
5) 国土交通省関東地方整備局河川部河川管理課：堤防の刈草無償提供(http://www.ktr.mlit.go.jp/river/shihon/river_shihon00000127.html).
6) 道路緑化保全協会：植物発生材堆肥化の手引き―緑のリサイクルの実現を目指して，1998.
7) 環境省九州地方環境事務所：野草堆肥利用マニュアル，平成18年3月，2006.
8) 独立行政法人土木研究所：下水道施設におけるバイガスの完全利用に関する調査，平成21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4191号，pp.1-16，2010.
9) 独立行政法人土木研究所：下水処理場の再生可能エネルギー供給拠点化方策検討調査，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.1-39，2011.
10) 閣議決定：バイオマス活用推進基本計画，2010.地球温暖化対策の推進に関する法律（平成十年十月九日法律第百十七号)、第20条の1第1項、最終改正：平成二六年五月三〇日法律第四二号
11) 社団法人道路緑化保全協会、植物廃材堆肥化技術暫定指針（案)、平成7年3月
12) 新潟市：中部下水処理場混合消化施設受入事務に係る要綱を制定しました、新潟市ホームページ https://www.city.niigata.lg.jp/kurashi/jyogesuido/gesui/work/konngoushouka.html、2016.2.17
13) 山本 茂浩：バイオガス発電 刈草等と下水汚泥の混合消化と消化ガス発電について〈新潟市〉（特集 下水道の創エネルギー）月刊下水道 38(3), pp.48-51, 2015.
14) 山崎憲人・杉浩行：河川堤防の刈草を活用した下水汚泥の混合消化ガス発電の経済性と環境負荷軽減の検討、平成26年度・北陸地方整備局・事業研究発表会、pp.1-5, 2014.
15) バイオマス産業エネルギー研究所、BTS社のバイオガス発電システム、http://www.zenkei.ne.jp/pdf/biomass.pdf
16) Michael Kottner：How to built Grass based ecological Biogas Plants?、International Biogas and Bioenergy Center of Competence、2012. http://www.docme.ru/doc/409319/how-to-build-grass-based-ecological-biogas-plants-%3F
17) Martin Elsaber,Jorg Messner,Ulrich Keymer, Reinhard Robberg, Frank Setzer：Biogas from Grass、DLG Expert Knowledge Series 386, 2012.
18) 高梨勝：河川堤防刈草を有効活用した乳牛用発酵TMR飼料の利用技術、畜産技術 701, pp.13-17, 2010.

19) 須藤吉康、江藤哲雄：河川堤防刈り草を有効活用した乳牛用発酵 TMR 飼料の開発による牛生産コスト削減効果の評価、河川堤防刈草の有効活用、pp. 39-48, 2013.
20) 島根県土木部道路維持課：「神話の国しまね」新たな維持管理への挑戦、道路行政セミナー（河川堤防の刈草を家畜の飼料に）、pp.5-6、2009.
21) 島根県畜産技術センター、畜産技術普及グループ：土木部との連携により、道路の刈草を家畜の飼料に、畜産技術レポート、2010.
22) さいたま統計・情報センター：堤防除草で発生する刈草を堆肥化、さいたま統計・情報センター情報収集資料（公開資料）
23) 亀山市：亀山市一般廃棄物処理基本計画（ごみ処理基本計画編）平成 23 年 3 月、
24) 日本エヌ・ユー・エス株式会社：ごみ減量化検討事前調査業務報告書　平成 24 年 3 月、三重県
25) 伊坪徳宏、田原聖隆、成田暢彦：LCA 概論、社団法人産業環境管理協会発行、2007
26) IPCC Second Assessment Report: Climate Change 1995 (SAR), 1995.
27) IPCC: Reporting Instructions, Revised 1996 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, 1996.
28) 独立行政法人土木研究所:土木研究所資料4157号、pp.38-46、2009
29) 日本エネルギー学会編：バイオマスハンドブック, オーム社, 2002.
30) 社団法人全国都市清掃会議編：ゴミ処理施設整備の計画・設計要領　2006 改訂版, p.33, 2006.
31) 公園・緑地維持管理研究会編集：公園・緑地の維持管理と積算　改訂 4 版, 財団法人経済調査会発行, 2005.
32) 一般財団法人建設物価調査会発行：国土交通省土木工事標準積算基準書(河川・道路編)平成 25 年度(10 月改正), 2013.
33) 温室効果ガスインベントリオフィス（GIO）編, 環境省地球環境局総務課低炭素社会推進室 監修:日本国温室効果ガスインベントリ報告書 2013 年 4 月, 2013.
34) 松藤敏彦：都市ごみ処理システムの分析・計画・評価　ーマテリアルフローLCA 評価プログラムー, 技報堂出版株式会社, 2005.
35) 田畑 智博, 李 一石, 菱沼 竜男, 楊 翠芬：統計資料を用いた一般廃棄物焼却施設の LCI データ簡易算定法に関する検討, 第 21 回廃棄物資源循環学会研究発表会講演論文集, 2010.
36) 楊翠芬, 田畑智博, 菱沼竜男, 玄地裕：廃棄物由来 CO_2 排出量を考慮した焼却施設の LCA 手法の検討ー千葉県を事例に, 都市清掃, 61(283), pp.235-241, 2008.
37) 環境省：平成 24 年一般廃棄物処理実態調査結果 (http://www.env.go.jp/recycle/waste_tech/ippan/h24/index.html), 2014.
38) 環境省温室効果ガス排出量算定方法検討会：温室効果ガス排出量算定に関する検討結果　廃棄物分野における算定方法の改善について　平成 22 年 3 月 (http://www.env.go.jp/earth/ondanka/santeiho/kento/h2203/7.pdf), 2010.
39) 中井里香, 朝倉康夫, 松田浩典, 倉田佳洋, 西野 治, 億 正樹：河川敷野草の飼料化への試み(第 1 報), 奈良県畜産技術センター研究報告第 39 号, pp.1-12, 2015.
40) 農業機械学会：農業機械による環境保全機能向上のための調査研究, 1992.
41) 農林水産バイオリサイクル研究「システム化サブチーム」：バイオマス利活用システムの設計と評価, 資料 2 輸入飼料の地域別ライフサイクル・エネルギー消費量および GHG 排出量データベース, pp.253-261, 2006.
42) 藤原宣夫：植栽樹木の二酸化炭素固定量からみた都市緑化施策の評価に関する研究, 千葉大学学位申請論文, 2005.
43) 農林水産バイオリサイクル研究「システム化サブチーム」：バイオマス利活用システムの設計と評価, 第 IV 部バイオマス利活用システムの評価手法, pp.163-183, 2006.
44) 独立行政法人土木研究所：草木系バイオマスの組成分析データ集, 土木研究所資料 4095 号, 2008.
45) 国土交通省荒川上流河川事務所, 肥料取締法に基づく表示「荒川緑肥」（平成 26 年 1 月生産）, 埼玉県特肥 428 号, 2014.
46) 惣田訓, 池道彦：処理規模を考慮した様々な下水汚泥処理システムのエネルギー消費量の比較評価, 再生と利用, 34(129), pp.6-15, 2010.
47) Onoda, Y., Westoby, M., Adler, P. B., Choong, A. M., Clissold, F. J., Cornelissen, J. H., Diaz, S., Dominy, N. J., Elgart, A., Enrico, L., Fine, P. V., Howard, J.

J., Jalili, A., Kitajima, K., Kurokawa, H., McArthur, C., Lucas, P. W., Markesteijn, L., Perez-Harguindeguy, N., Poorter, L., Richards, L., Santiago, L. S., Sosinski, E. E., Jr., Van Bael, S. A., Warton, D. I., Wright, I. J., Wright, S. J., Yamashita, N., Global patterns of leaf mechanical properties, Ecology letters, 14, 301-312, 2011.

48) 公益社団法人日本下水道協会発行：平成 23 年度版 下水道統計，第 68 号，2013.

49) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：下水汚泥エネルギー化技術ガイドライン　―改訂版―(http://www.mlit.go.jp/common/001083170.pdf)，2015.

50) 環境省：温室効果ガス排出量算定・報告マニュアル(Ver3.5)，2014.

51) 産業技術総合研究所，産業環境管理協会：LCI データベース IDEAver.1.1, MiLCA ガイドブック, 2012.

52) 環境省大臣官房廃棄物・リサイクル対策部廃棄物対策課：一般廃棄物の排出及び処理状況等(平成 24 年度)について、2014.3

53) 滋賀県琵琶湖環境科学研究センター：南湖生態系の順応的管理に関するサイエンスレポート，平成23～25 年度南湖生態系の順応的管理方法に関する研究の成果報告書, 2015

54) 日高平，對馬育夫，津森ジュン，南山瑞彦，下水の脱水汚泥性状が中温嫌気性消化に及ぼす影響，土木学会論文集 G（環境）, Vol.71, No.7, pp.III_27-III_37, 2015.

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：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、高部祐剛

【要旨】
白金コーティングチタン電極を用いた電気分解により、消化脱離液からのリン回収率 41%および回収析出物でのリン含有率 160 mg-P/g を達成し、回収リン資源の肥料利用の可能性を示した。エネルギー生産を目的として下水処理水を用いた土着藻類培養を実施し、屋外連続培養で SS 培養量 12.9 g/m^2/day、高位発熱量 16.4 kJ/g を達成した。また、藻類増殖を表現する数理モデルを構築し、処理場へのモデルの適用手法を示した。全国処理場へのアンケート調査により、焼却灰のク溶性リン供給のためのリン資材としての利用可能性を示した。
キーワード：電気分解、リン回収、土着藻類培養、再生可能エネルギー、焼却灰、肥料

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ている。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、「高濃度栄養塩含有物質からの資源回収・利用技術の開発」、「藻類による資源生産システムの開発」、「下水中の有用元素のインベントリ整備」、「回収・生産した資源の有効利用のための安全性評価方法の開発」を行った。

2. 高濃度栄養塩含有物質からの資源回収・利用技術の開発

下水道には、リンが豊富に存在することが広く知られており、下水道からのリン回収によるリン資源確保への貢献が期待されている。一方で、リン回収におけるコスト、安定的な取引先の確立といった課題が存在し[1)]、広く普及に至っていないのが現状である。

これまでのリン回収技術として MAP (リン酸マグネシウムアンモニウム)法や Hap (ヒドロキシアパタイト)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 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 として結晶物を取り出すことができる。

一方で、電気分解 (以下、電解と記す)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ても 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の取り出しが可能であることが報告されている[2)]。

本研究では、下水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 (以下、消化脱離液と記す)、および汚泥濃縮過程での分離液 (以下、濃縮分離液と記す)を電解することで得られるリン等の回収物の組成と量を調べた。

2. 1 方法

2. 1. 1 濃縮分離液の電解

図 2-1 に電気分解試験装置の概要を示す。電気分解の容器には 5 L ビーカーを用いた。白金コーティングチタン電極 (以下、電極と記す)板 (図 2-2)4 枚を陽極と陰極を交互に配列した。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。実処理場より採取した濃縮分離液の上澄み 5 L をビーカーに入れた。その後、電流を 5 A に設定し電流一定で 14 日間通電した。容器内の濃縮分離液の上澄みの液は、試験期間中の平日、1 日 1 回交換を行い、水理学的滞留時間 (HRT)が約 15 日となるように交換量を調節した。また、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を濃縮分離液の上澄みに 0.25

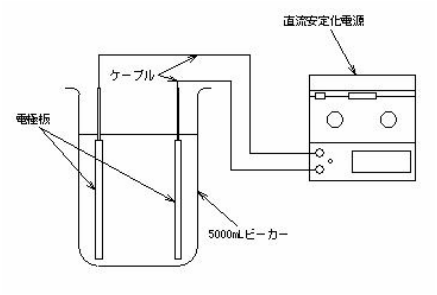


図 2-1　電気分解試験装置の概要

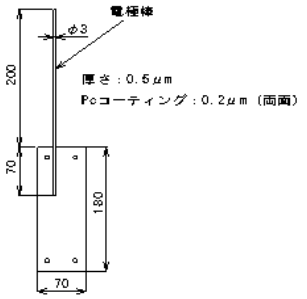


図 2-2　電極板外形図

wt%添加した系でも試験を行った。電極上の析出物を回収し、凍結乾燥、粉砕、秤量後に元素分析と構造解析を行った。

次に、同様の実験系において、電流を 5 A に設定し電流一定で 4 日間 (96 時間)通電した。容器内の濃縮分離液の上澄みは、通電開始後 20、44、68、92 時間後の 4 回、一定量 (2 L)を入れ替えた。96 時間後、通電を停止した。電極上の析出物、容器内に生成した浮遊物、沈殿物を回収し、凍結乾燥、粉砕、秤量後に元素分析と構造解析を行った。

元素分析は高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法によった。析出物を加圧ボンベ法 (MLS1200MEGA、Milestone)で硝酸により分解したのち SPS3000 (SEIKO Instruments)を用いて定量した。また、濃縮分離液の上澄みの液体試料についても、硝酸による分解ののち定量した。構造解析に関しては、粉末 X 線回折分析装置((株)リガク、RINT2200)により回折パターンを求め、解析ソフト (MDI JADE6)を用いて析出物中のリン酸塩結晶を同定した。

2．1．2 消化脱離液の電解

図 2-3 に実験装置概要を示す。実験には 5 L 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。

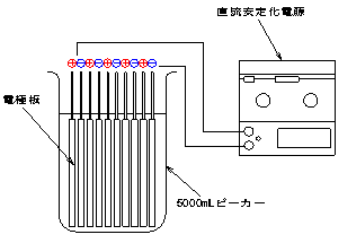


図 2-3　実験装置概要

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脱離液の上澄みを試料とした。条件は表 2-1 に示すように消化脱離液のみの条件、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^2 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、転極 (陽極と陰極を逆に接続)により剥離させた。転極の時間は約 3 時間とした。

次に、5 L ビーカーに、実消化脱離液をそのまま注ぎ、電極板 2 枚 (1 cm 間隔)を 1 組とした電極セットを計 4 組配置した。各電極セットにおいて、片側の電極が陽極、もう片側が陰極となるように直流電流 (4A)を各電極セットに流した。電流を 3 時間流した後、電流の向きを変え転極させ、そのままの状態で 3 時間通電した。最後に、再度転極し、10 分間通電した。

実験前の実消化脱離液中の全リン (TP)および溶存態リン (DTP)を測定し、懸濁態に含まれるリンを TP と DTP の差から算出した。実験終了後は、表層水 1L を採取し、ここに含まれる懸濁態を「懸濁態 (浮上) 」と定義した。また、表層水 1 L 以外の試料に含まれる懸濁態を「懸濁態 (沈殿)」と定義した。それぞれの懸濁態に含まれるリンを TP と DTP の差から算出した。また、各試料の懸濁物質 (SS)を測定した。

TP および DTP は HACH の全リン測定キット(HACH1471)を用いて測定し、SS は、Standard method[3)]に従って測定した。

2．1．3 下水汚泥の消化工程と電解のハイブリッド

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、汚泥の可溶化が促進されるの

表 2-1　電解実験条件の条件

	試料	条件	電極枚数	電極割合 (m^2/m^3)	時間	電流密度 (A/m^2)	電流 (A)	備考
No.1	脱離液上澄み	―	10	25.2	24	40	5.04	
No.2		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のエアーを送る
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

(mg/L)

		pH	TS	VS	SS	VSS	T-P	T-N	PO_4-P	NH_4-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

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。

図 2-4 に下水汚泥連続実験装置概要を示す。実験装

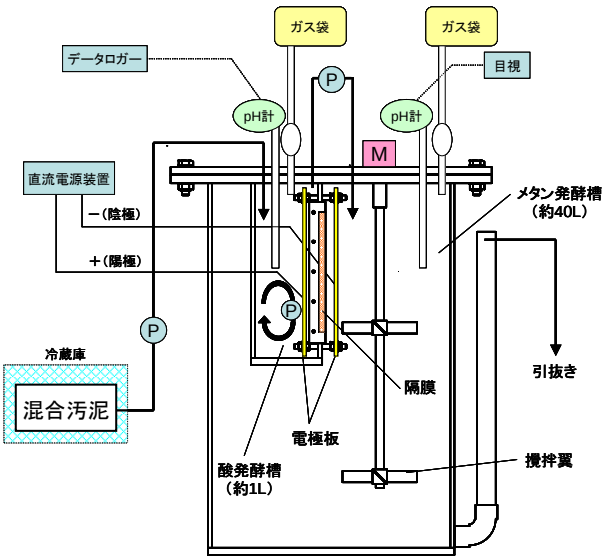


図 2-4　下水汚泥連続実験装置概要

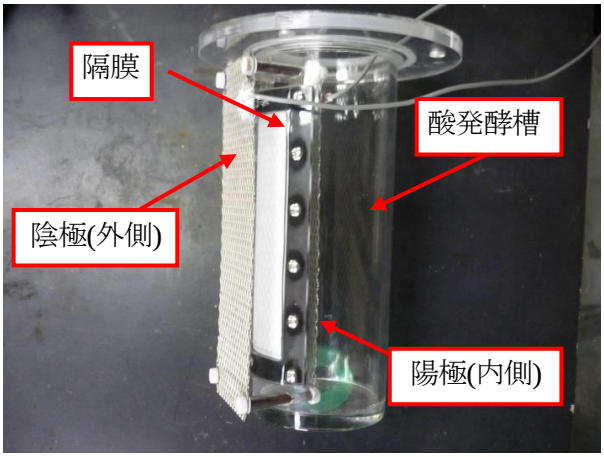


図 2-5　電解部写真

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 2-5 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撹拌のみを行った。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せた。

2. 2 結果

2. 2. 1 濃縮分離液の電解

図 2-6 には電圧の変化を示すが、$MgSO_4$ の添加によりイオンの量が増加するため、濃縮分離液のみの系に比べ電圧が低くなる傾向が示された。電気分解後に得られた析出物の乾燥重量は濃縮分離液のみの系では 0.62 g、$MgSO_4$ 添加の系では 2.4 g となった。$MgSO_4$ の添加により、電気分解に係る消費電力の低下、回収量の向上が示された。

粉末 X 線回折により析出物の構造解析を行った。電極に鉄を適用した場合、析出物としてリン酸鉄が得られることが報告されている [4]。一方で、白金コーティングチタン電極を用いた場合、リンは電極触媒反応によりリン鉱石等の結晶 $MgCa_2(PO_4)_2(H_2O)_2$、$Ca_2P_2O_7$、$Ca_5F(PO_4)_3$ の形で回収され、電極に鉄を用いた場合とは異なることが明らかとなった。また、濃縮分離液の上澄み中および析出物中の元素成分を定量し、回収率を求めた (図 2-7)。回収率は、濃縮分離液中に含まれる元素の重量 ($MgSO_4$ 添加の重量を含む)に対する析出物中に含まれる元素の重量の割合で示した。カルシウムや鉄では、回収率にほとんど違いが見られないが、リンの回収率は $MgSO_4$ 添加により約 2 倍増加し 14% 程度となった。

96 時間の通電を停止したのち回収した電極上の析出物、容器内の浮遊物および沈降物の元素分析を行った。結果を図 2-8 に示す。析出物の主要成分はカルシウム、マグネシウム、リンであった。浮遊物および沈降物には主要成分としてカルシウム、リンのほか、鉄が含まれた。これらの構成元素がどのような構造で存在するかの情報を得るため、X 線回折分析を行った。結果を図 2-9 に示す。析出物中には、いくつかの シャープなピークが見られる。これらは、ヒドロキシアパタイトおよび水酸化マグネシウムに帰属され、ヒドロキシアパタイトが電極上で合成されることが明らかとなった。水の電気分解によって、水素と酸素が発生すると同時に陰極付近の pH はアルカリ性側に、陽極付近の pH は酸性側に変化する。アルカリ側に変化した pH を利用することによりアルカリ剤の添加を必要とせず、また種晶を用いることなしに、陰極上にヒドロキシアパタイトを合成することができた。また、水酸化マグネシウムも生成した。浮遊物および沈降物にもリンが含まれるが、これらの X 線回折ピークには、ブロードなピークしか見られない。図 2-8 に示される構成元素が非結晶の状態で存在していることが考えられた。

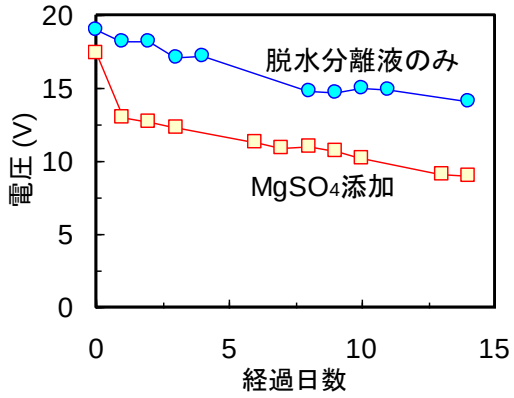


図 2-6　電気分解中の電圧の変化

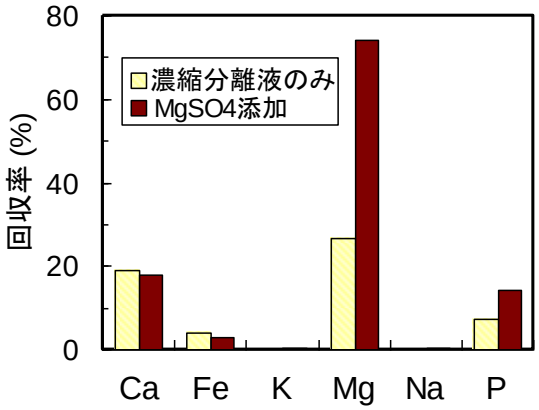


図 2-7　濃縮分離液上澄みに対する析出物中の元素の回収率

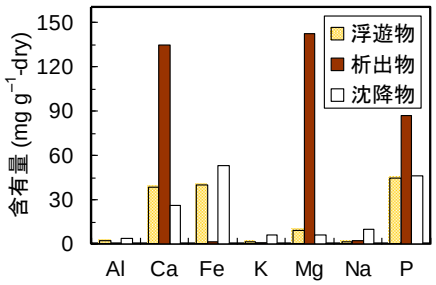


図 2-8　回収物の元素組成

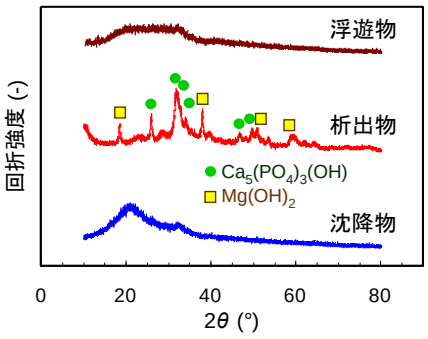


図 2-9　回収物の X 線回折

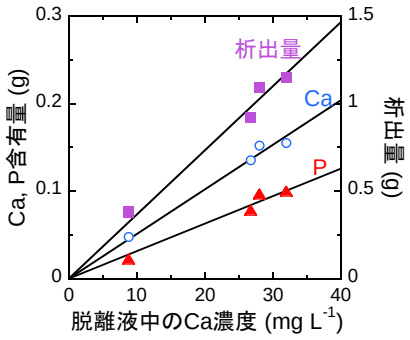


図 2-10　析出量と濃縮分離液中のカルシウム濃度の関係

さらに、異なる元素組成の濃縮分離液を試料として同様の試験を 4 回行った。96 時間通電後の析出物の総重量および析出物中のヒドロキシアパタイトの構成元素であるカルシウムおよびリンの含有量 (重量)を求めた。これらの重量を濃縮分離液試料中のカルシウム濃度に対してプロットしたところ、比例関係が認められた (図 2-10)。ヒドロキシアパタイト中のカルシウムとリンのモル比は 5:3、重量比で 2.2:1 である。結晶中でより多くの重量を必要とするため、リンではなくカルシウムの濃度に依存 (比例)すると考えられる。

2. 2. 2　消化脱離液の電解

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に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 2-11 に沈降物中の金属類含有量、図 2-12 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 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 MAP 主体

表 2-3　結晶物重量測定結果

(g)

		浮上物	沈降物	析出物	沈降物+析出物
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

		リン含有量 (mg)				リン回収率 (%)		
		試料	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

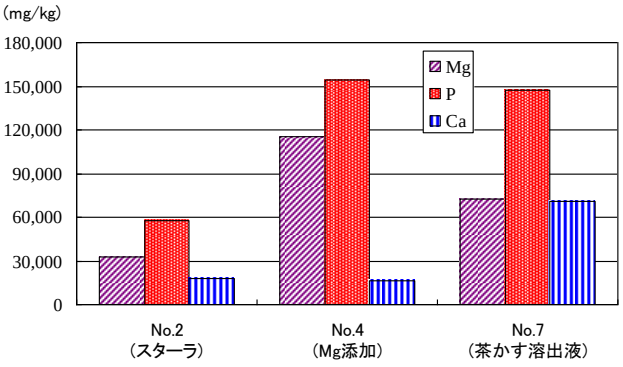


図 2-11　沈降物金属類含有量

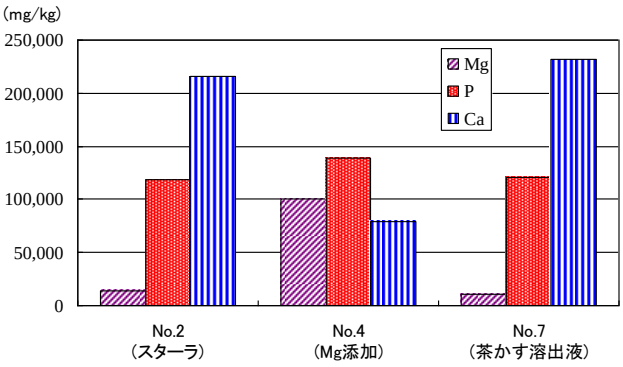


図 2-12　析出物金属類含有量

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 Hap 主体の結晶物が生成されていることが推測される。

次に、消化脱離液をそのまま用いて電解を行った実験系における、実験開始前と実験開始後のビーカー内でのリンの存在実態について、図 2-13 に示す。

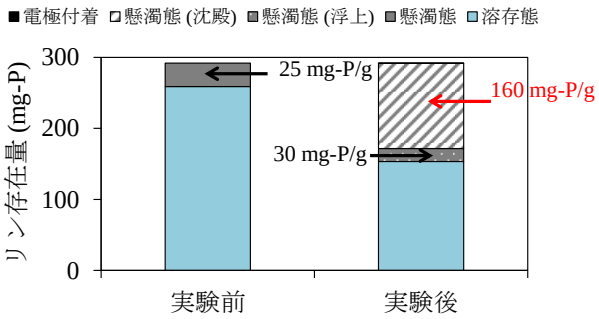


図 2-13　電解前後でのリンの存在実態

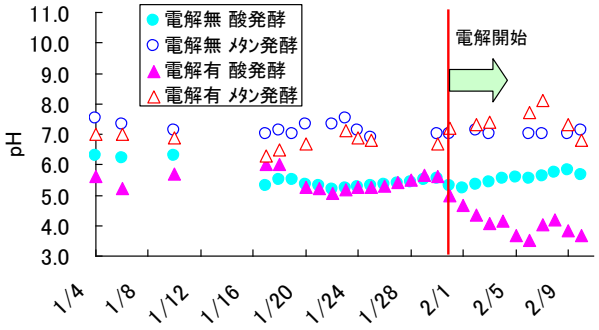


図 2-14　pH の推移

実験開始前は、系内での 11%のリンが懸濁態リンとして存在していたが、実験終了後は、47%のリンが懸濁態リンとして存在し、割合が増加した。これは、電解により溶存態リンが析出し、かつ転極により、リンを含む析出物が液中に懸濁物として剥離した結果であると考えられる。以下の式(2-1)を用いて電解によるリン回収率を算出した結果、リン回収率は 41%となった。

$$\text{リン回収率 (\%)}=\frac{\left(\text{実験後の系内の懸濁態リン量 (mg-P)}\right)-\left(\text{実験前の系内の懸濁態リン量 (mg-P)}\right)}{\text{実験前の系内の溶存態リン量 (mg-P)}}\times 100 \quad (2\text{-}1)$$

本実験においては、理論的に約 10 L/h の気体 (酸素+水素)が電解により発生するが、消化脱離液に元々含まれていた懸濁態は、この発生したガスにより水面に浮上する一方で、電極より剥離した析出物は、ガスの発生にかかわらず、ビーカーの底に沈殿することを目視で確認した。結果として、消化脱離液に元々含まれていた懸濁態と電極による析出物が分離され、析出物を多く含む懸濁態 (沈殿)でのリン含有率が 160 mg-P/g と高いことが明らかとなった。なお、懸濁態 (沈殿)の肥料利用の可能性については、第 5 章において検討を行っている。

2. 2. 3　下水汚泥の消化工程と電解のハイブリッド

図 2-14 に pH の推移を示す。実験開始から 1 月 31 日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、メタン発酵槽では除々に上昇した。

図 2-15 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 2-16 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_2 の割合が大きくなった。これは電解

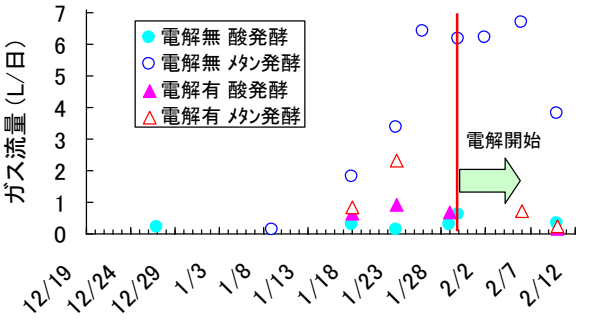


図 2-15　ガス発生量の推移

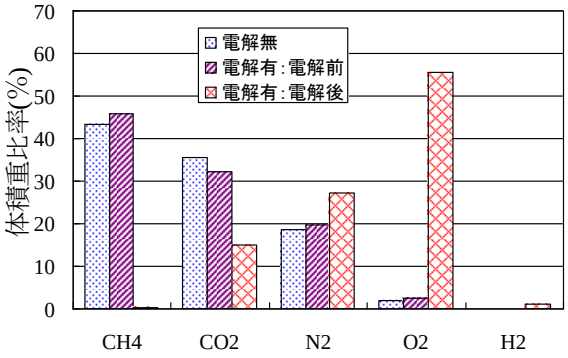
により陽極から O_2 が発生したためである。メタン発酵槽については電解開始後からわずかではあるが H_2 が検出された。これも電解により陰極から H_2 が発生したためである。

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全固形物濃度が上昇し、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 10,500 mg/L 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。電解開始後も有機酸は減少し、安定した値を示していた。

(a) 酸発酵槽



(b) メタン発酵槽

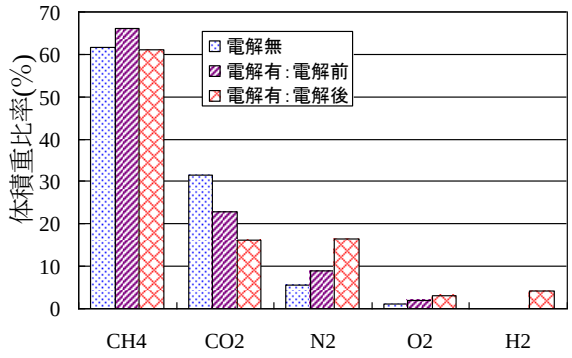


図 2-16　ガス分析結果

表 2-5　CODcr 分析結果

(mg/L)

	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

図 2-17 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もとの混合汚泥 (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 mg/L から 270 mg/L 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 2-18 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 48,000 mg/kg 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。

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

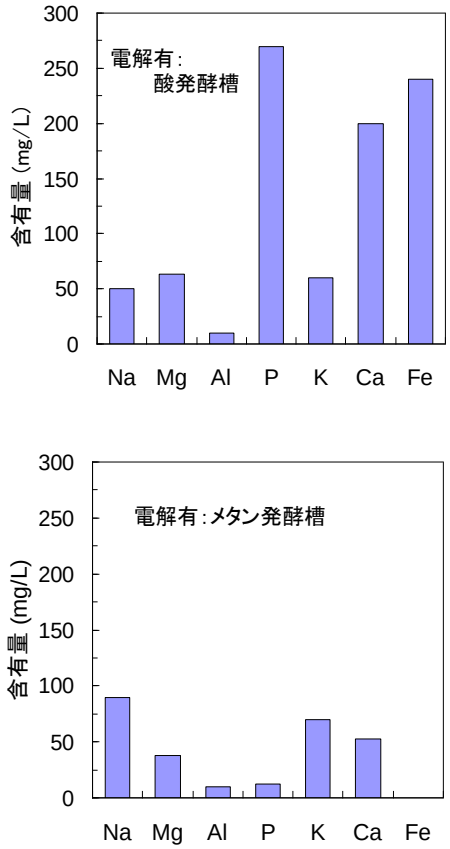


図 2-17　連続実験装置槽内溶解性金属類元素

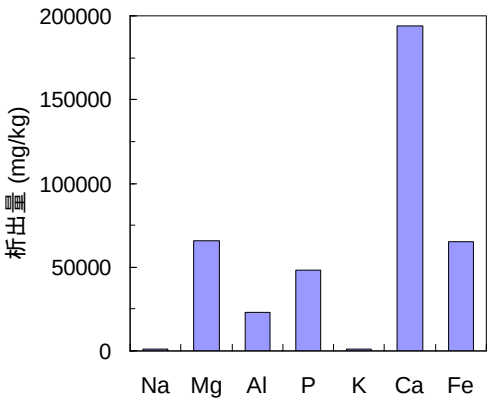


図 2-18　析出物金属類元素

2. 3 まとめ

本章では、濃縮分離液、消化脱離液を対象として、電解法によるリン回収手法の検討を行った。白金コーティングチタン電極による電解により、リンがヒドロキシアパタイトの形で回収されることが分かった。また、実消化脱離液中溶存態リンについて、電極法によりリン回収率41%を達成した。また、電解により発生する気体により、消化脱離液に元々含まれていた懸濁態は、水面に浮上する一方で、電極より剥離した析出物は実験系の底に沈殿し、結果として、電極での析出物を、リン含有率160 mg-P/gの沈殿物として回収できることを示した。

3. 藻類による資源生産システムの開発

化石燃料の枯渇への懸念、化石燃料利用にともなう地球温暖化を背景に、再生可能エネルギーの利用が推進される現代において、藻類を用いたエネルギー生産に大きな注目が集まっている。近年では、都市下水や工場排水に豊富に含まれる窒素、リンといった栄養塩を用いた藻類培養の試みが実施されてきている[5), 6)]。日本のように下水道システムが広く普及している国々では、処理プロセスを経た処理水に含まれる栄養塩や、焼却炉や消化ガス由来CO_2といった下水処理場が有する資源および下水処理場でのストック (土地、施設)を活用した藻類培養によるエネルギー生成が期待される。

既往研究において[7), 8)]、ボトリオコッカスやクロレラといったオイル含量の高い特定藻類を対象に、下水処理水を用いた培養がラボレベルで実施されているが、これら特定の藻類の培養は、実環境下での適用性に課題が残る。

そこで、本研究では、特定藻類の接種は行わず、下水処理水を直接培養液として用い、与えられた環境条件で優占する土着藻類 (以下、藻類と記述)の培養技術の確立および培養藻類のエネルギー利用手法の検討を目的とした。

3. 1 方法

3. 1. 1 室内実験

A 下水処理場の処理水 (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)、Japan)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 μmol/m^2/s)を照射した。実験は恒温室内で行い、水温は約20℃に保った。マグネッチックスターラーによりフラスコに備えられた羽根 (撹拌子)を撹拌しながら培養した。また、流速約1 mL/min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℃の冷蔵状態で保存した。

水理学的滞留時間 (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_2流入の影響に関する試験においては、CO_2を流速0.01、0.05 mL/min (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。培養時の撹拌および曝気の影響に関する試験においては、撹拌および曝気、撹拌のみ、曝気のみ、撹拌・曝気いずれもなしの4条件で試験した。

各態窒素 {(全窒素 (TN)、溶存態全窒素 (DTN)、NH_4^+、NO_2^-、NO_3^-}、各態リン {全リン (TP)、溶存態全リン (DTP)、PO_4^{3-}}、無機炭素 (IC)および全有機炭素 (TOC)、懸汚物質 (SS)、クロロフィル aおよびb、ならびに重金属類の測定を行った。また、藻類種の同定・計数を行った。

CO_2添加条件を最適化するために、別途の室内実験を行った。藻類の培養は、B下水処理場の処理水を用いた。B下水処理場の実流入下水を活性汚泥法処理装置 (曝気槽容量: 100 L、HRT: 6時間)を用いて処理し、50 L容の最終沈殿池の上澄みを採取し、藻類培養に用いた。培養実験は、人口気象器 (LPH-350SP、日本医化器械製作所、Japan)内で実施し、気温および光量子束密度をそれぞれ25°C および130 μmol/m^2/sに設定した。明/暗の時間は、それぞれ 12 時間とした。4つの三角フラスコに処理水をそれぞれ3.0 L入れ、HRTが4日となるように、0.75 L/日でフラスコ内培養水と処理水を交換した。一般的に、微細藻類の増殖に関する至適pHは7-9であるため[9)]、3つのフラスコには、培養水のpHが6.7-7.0 (リアクターA)、7.7-8.0 (リアクターB)、8.9-9.0 (リアクターC)となるように、市販のCO_2 (純度: 99.95%)を添加した。残り1つのリアクター (リアクターD)には、CO_2を添加しなかった。リアクターA、BおよびCでの培養水の pH は、pH コントローラ(NPH-660NDE、日伸理化、Japan)で調整した。培養水での SS および高位発熱量を測定した。

3. 1. 2 20L 容培養装置を用いた屋外培養

藻類の屋外培養を、B下水処理場で、2012年7月か

ら 12 月に行った。処理水を透明の培養容器 (容量 20 L、ポリカーボネート製)に入れ、屋外に設置し半連続培養した。空気量約 4 L/min で曝気 (培養水中に空気を送風)しながら培養した。容器内の培養水は培養期間中の平日、1 日 1 回交換を行い、HRT が 4 日または 10 日となるように処理水の交換量を調節した。

培養時における培養水に含まれる DTP、DTN の分析を行った。また、培養終了後、藻類種の同定・計数を行った。さらに、藻類の高位発熱量の定量を行った。

3．1．3 380L 容培養装置を用いた屋外培養

2013 年および 2014 年に、B 下水処理場の屋外に設置した Raceway 型 380 L 培養装置に連続的に処理水を流入させ、藻類培養を行った。

図 3-1 に示すように、水深 0.25 m、容量 380 L の Raceway 型培養水槽内で藻類が培養され、ここから流出する藻類を含む培養水は、後段側に接続された容量 32 L の凝集水槽に流入する。この培養水槽および凝集水槽を組み合わせた培養装置を 2 系列設置した。実流入下水を標準活性汚泥法処理装置 (容積: 100 L、HRT: 6-8 時間)で連続的に処理し、50 L 容の最終沈殿池の上澄みを採取し、藻類培養に用いた。

まず、2013 年 6 月から 2014 年 1 月までの間、藻類の返送の有無が藻類培養特性に与える影響を把握した。2 つの培養装置に、6 月 18 日に HRT 4 日 (流入速度約 64 mL/min)の条件で、処理水の水槽への供給を開始した。ブロアを用いて水槽内に空気流入を行い、馴致を行った。また、2 系列の培養装置のうち 1 系列において、7 月 24 日から返送を開始した。図 3-1 のフロー図に示すように返送ありの系列では、凝集水槽の底部に設けられた配管から、凝集、沈降した藻類を流速約 32 mL/min (培養水槽への培養原水の流入速度の 50%)で培養水槽に返送した。返送なしおよび返送ありの系列での培養特性を比較した。8 月 13 日に両系列とも上記の空気流入を停止し、撹拌機を用いて約 100 rpm の速度で撹拌を開始し、培養水槽内の水を循環させた。また、後述する藻類の培養量を考慮し、返送なしの系列では 8 月 23 日から、返送ありの系列では 10 月 2 日から HRT を 4 日から 8 日に変更した。HRT を 8 日としたときの培養水の流入速度は、約 32 mL/min であり、凝集水槽から培養水槽への返送速度は約 16 mL/min とした。

培養水槽での各態窒素、各態リン、IC、溶存態有機炭素 (DOC)、アルカリ度、SS、水温、pH を測定した。また、培養水槽内の藻類種の同定・計数を行った。さ



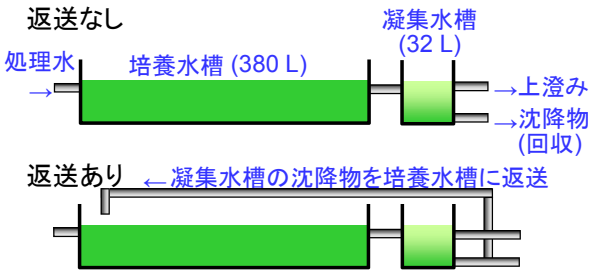


図 3-1　Raceway 型 380 L 藻類培養装置の写真および概要 (上側が返送なし、下側が返送ありの系列)

らに、凝集水槽底部から回収した藻類の高位発熱量の定量を行った。培養期間中の平日 1 日につき 1 回、凝集水槽の底部に設けられたコックから、凝集、沈降した藻類を回収し、20 L プラスチック容器に移し、冷蔵保存した。2 週間おきに、容器内の回収液の上澄みを捨て、沈降バイオマスを凍結乾燥、粉砕を行ったのち、高位発熱量を定量した。

2014 年には、培養装置 1 系列に、培養水の pH が 7.7-8.0 となるように、培養水槽に CO_2 を添加した。2013 年の培養と同様に HRT は 4 日とし、藻類の返送は行なかった。培養水槽への CO_2 添加を 2014 年 6 月 6 日より開始し、11 月 21 日に装置の運転を停止した。培養水槽の pH は、pH コントローラ (FP-01、東京硝子器械、Japan)で調整した。培養水での水温、pH および DO、各態窒素、各態リン、クロロフィル a、SS、DOC および IC を継続的に測定した。また、藻類および動物プランクトンの同定を実施するとともに、凍結乾燥したバイオマスを粉砕した後、高位発熱量および全脂質含量を測定した。

3．1．4 異なる下水処理場での屋外培養

後述する数理モデルの異なる下水処理場への適用性を検討するため、2015 年に、B 下水処理場および C 下水処理場で藻類培養実験を行った。

藻類培養のための処理水は、B 下水処理場において

は、実流入下水を標準活性汚泥法処理装置 (容積: 100 L、HRT: 6-8 時間)で連続的に処理し、50 L 容の最終沈殿池の上澄みを用いた。C 下水処理場においては、実処理水 (疑似嫌気好気法の最終沈殿池上澄み)を用いた。

水深 0.25 m、容積 22 L の円柱型の藻類培養装置 (図 3-2)を、両処理場に設置し、培養装置内 HRT が 2 日となるように、処理水を流入させた。それぞれの培養装置には、培養水の pH が 7.7-8.0 となるように、CO_2 を添加した。運転期間は、2015 年 7 月 3 日から 11 月 17 日である。培養水槽の pH は、pH コントローラ (B 下水処理場: FP-01、東京硝子器械、Japan; C 下水処理場: NPH-660NDE、日伸理化、Japan)で調整した。

水温、DO、各態窒素、各態リン、クロロフィル a、SS、DOC および IC を継続的に測定した。また、藻類の同定を実施するとともに、凍結乾燥したバイオマスを粉砕した後、高位発熱量を測定した。

数理モデルでの係数を算出するために、C 下水処理場での処理水を用いた簡易な室内実験を実施した。実験は、人口気象器 (LPH-350SP、日本医化器械製作所、Japan)内で実施し、気温および光量子束密度をそれぞれ 25°C および 130 μmol/m^2/s に設定した。明/暗の時間は、それぞれ 12 時間とした。ガラスビーカーに処理水を 2 L 入れ、HRT が 2 日となるように、1 L/day でフラスコ内培養液と処理水を交換した。培養水での SS、TP および DTP を測定した。

3．1．5 下水培養藻類の活性汚泥による回収

排水処理の一つに、High Rate Algal Ponds (HRAP)がある。HRAP は、滞留時間 2-8 日間、水深 0.2-1 m で継続的に攪拌されたポンドであり、藻類の光合成による酸素供給によって、排水中の溶解性有機物が従属栄養細菌によって好気分解するのを促進する方法である [10]。HRAP によって得られた藻類は、嫌気性消化によりエネルギー化されることが検討されている [11]。しかし、藻類は沈殿しにくいため、藻類の除去効率が悪いことが、HRAP の課題の一つである。

一方で、活性汚泥は、有機物等を吸着・摂取することが知られている [12]。HRAP で培養された藻類が活性汚泥により効果的に吸着・摂取され、活性汚泥と共に沈殿することにより、除去される可能性が考えられる。

そこで、本研究の目的は、HRAP と活性汚泥を組み合わせた処理方法の開発の可能性を評価するため、簡易試験により、HRAP で培養された藻類の活性汚泥による除去効果を明らかにすることである。試験では、

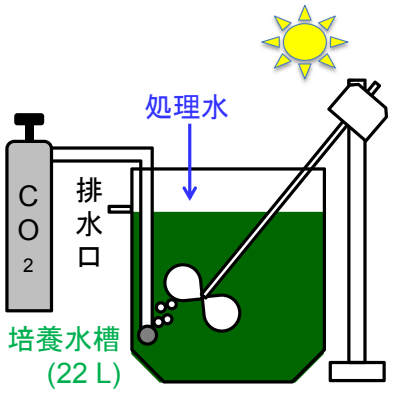


図 3-2　22 L 容藻類培養装置の概要

藻類の量を示す指標としてクロロフィル a を使い、活性汚泥と HRAP 試験装置の処理水を用いたバッチ試験により、曝気時間と活性汚泥濃度の観点から評価した。

3．1．5．1 下水培養藻類の活性汚泥による回収

曝気時間と上澄みに残留するクロロフィル a の関係を把握するため、藻類培養液 100 mL に、活性汚泥 100 mL を混合し、ブロワーを用いて異なる曝気時間、曝気した後に、容量 200 mL のメスシリンダーで 30 分間静置させて上澄み 50 mL を採取し、水質を分析した。曝気時間は、10 分、30 分、2 時間、4 時間とした。藻類培養液は、HRAP (HRT: 8 日、水深 0.25 m、容量 380 L)と沈殿池 (HRT: 約 16 時間、容量約 32 L)で構成された HRAP 試験装置の処理水を用いた。そのため、処理水には、直径数十 μm 以下の沈殿しにくい藻類が多く含まれていた。HRAP には、実際の下水処理場に流入する下水を実験用の標準活性汚泥装置によって処理した処理水を供給した。活性汚泥は、同じ下水を処理している別の標準活性汚泥装置から採取し、30 分間静置した後、半分の上澄みを取り除き、約 2 倍に濃縮したものを用いた。実験は、系列毎に異なる日に HRAP 試験装置の処理水や活性汚泥を採取し、実施した。また、各系列において、対照系として、活性汚泥 100 mL の代わりにイオン交換水 100 mL を用いて、10 分間曝気した試料も同様に調査した。採取した試料の上澄み中のクロロフィル a 濃度と濃縮活性汚泥の浮遊物質 (MLSS)を測定した。

3．1．5．2 活性汚泥濃度が下水培養藻類の除去に与える影響

活性汚泥濃度の違いが、下水培養藻類の除去に与える影響を調べるため、HRAP 試験装置の処理水 100 mL にイオン交換水で希釈されて濃度の異なる活性汚泥を

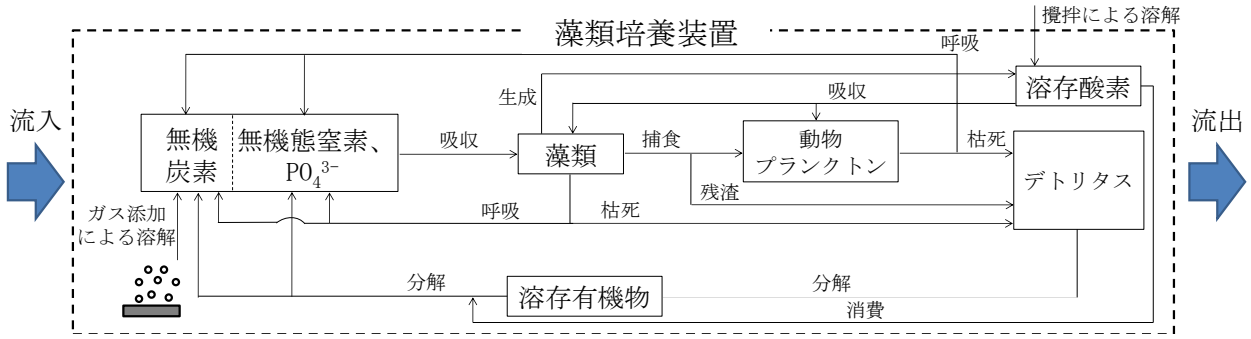


図 3-3　数理モデルの概念図

100 mL 添加して、マグネチックスターラーで 10 分間撹拌して 30 分間静置した後、上澄みのクロロフィル a 濃度を測定した。水質の分析方法は、前節と同様とした。活性汚泥は、前節と同様に実下水を連続的に処理している標準活性汚泥装置から採取し、約 2 倍に濃縮して使用した。添加した活性汚泥の濃度は、3,100、1,600、780、390 mg/L とした。さらに、活性汚泥 0 mg/L に相当する試料として、活性汚泥の代わりにイオン交換水 100 mL を添加し、試験した。

3．1．6 水質等分析

B 下水処理場での培養実験においては、pH および水温は、HM-31P (東亜ディーケーケー、Japan)で、DO は DO-31P (東亜ディーケーケー、Japan)でそれぞれ測定した。C 下水処理場での培養実験においては、水温は、PH72 (横河電機、Japan)で、DO は CyberScan DO 110 (Eutech、Singapore)でそれぞれ測定した。各態窒素および各態リン濃度は、TRAACS2000 (Bran Luebbe、Germany)で、また、TOC、DOC および IC は、TOC-V CPH (島津製作所、Japan)でそれぞれ測定した。SS、MLSS およびアルカリ度、クロロフィル a、高位発熱量、ならびに全脂質はそれぞれ Standard method[3]、下水試験方法[13]、河川水質試験方法 (案)[14]、JIS M 8814[15]および Zhou ら[16]の手法に従い測定した。藻類および動物プランクトンの同定は、光学顕微鏡 (BH-2、オリンパス、Japan)で行った。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。クロロフィル a 測定でのろ過は、孔径 1.2 μm の GF/C (Whatman, USA)で、その他の水質項目についての溶存態濃度測定の際は、原則孔径 1.0 μm の GF/B (Whatman, USA)でろ過を行った。

3．1．7 藻類増殖に関する数理モデルの構築

藻類培養・エネルギー生産システムの下水処理場への普及支援に際して、藻類培養システム導入を検討している下水処理場において、どの程度の培養藻類量が見込めるかを予測するツールが必要となる。培養藻類量は、水温、日射量、降雨といった自然環境の変化、水質の変動といった因子が複雑かつ相互に関係し影響が及ぼされるため、その予測には、これらの因子を考慮した数理モデルを構築・利用することが有効である。そこで、藻類増殖を表現する数理モデルの構築を行った。

数理モデルの概念図を図3-3に示す。数理モデルは、Tsuno et al.[17]の湖沼モデルを参考に構築し、さらに本研究では藻類の増殖における無機炭素の影響を考慮した。状態変数は、藻類 (*M*: mg-Chl a/L)、動物プランクトン (*Z*: mg/L)、デトリタス (*D*: mg/L)、溶存有機物 (*C*: mg-C/L)、無機炭素 (*IC*: mg-C/L)、無機態窒素 (*N*: mg-N/L)、PO_4^{3-} (*P*: mg-P/L)および DO (*O*: mg-O_2/L)である。なお、以下に示す数式において、系内への各状態変数の流入は、右下に"in"と表記する。

藻類の増殖での影響項は無機炭素、無機態窒素およびPO_4^{3-}濃度、水温ならびに全天日射量を考慮し、影響項の式は既往研究を参照とした[17), 18)]。藻類の増殖、呼吸・枯死は一次式で、また動物プランクトンによる捕食は温度影響および藻類濃度による影響を考慮した[17)]。

培養水槽内での各状態変数の物質収支について、式(3-1)から(3-11)に示す。なお、培養槽での無機炭素の変化は、実測値を直線的に変化するものとし、培養槽内は完全混合であるとした。また、モデルで用いる諸係数については、2014年の屋外培養実験で得られた値、または文献値[17)-25)]を参照した。

藻類

$$\frac{dM}{dt}=\frac{Q}{V}M_{in}+\mu_{maxM}\cdot f_T\cdot f_I\cdot f_{CNP}\cdot M-k_{dM}\cdot M-F_{maxZ}\cdot\frac{T}{20}\cdot\frac{K_{MZ}}{K_{MZ}+M}\cdot M\cdot Z-\frac{Q}{V}M \quad (3\text{-}1)$$

$$f_T=-\frac{(T-T_{opt})^2}{T_{opt}^{\ 2}}+1 \quad (3\text{-}2)$$

$$f_I=\frac{e}{(\alpha+\varepsilon_0(\gamma_{MD}\cdot M+Z+D))\cdot H}\left[\exp\left\{-\frac{I}{I_{opt}}\cdot\exp(-(\alpha+\varepsilon_0(\gamma_{MD}\cdot M+Z+D))\cdot H\right\}-\exp(-\frac{I}{I_{opt}})\right] \quad (3\text{-}3)$$

$$f_{CNP}=\frac{IC}{K_{ICM}+IC}\cdot\frac{N}{K_{NM}+N}\cdot\frac{P}{K_{PM}+P} \quad (3\text{-}4)$$

動物プランクトン

$$\frac{dZ}{dt}=\frac{Q}{V}Z_{in}+\gamma_{MZ}\cdot Y_{MZ}\cdot F_{maxZ}\cdot\frac{T}{20}\cdot\frac{K_{MZ}}{K_{MZ}+M}\cdot M\cdot Z-k_{dZ}\cdot Z-\frac{Q}{V}Z \quad (3\text{-}5)$$

デトリタス

$$\frac{dD}{dt}=\frac{Q}{V}\cdot D_{in}+\gamma_{MD}\cdot Y_{MD}\cdot k_{dM}\cdot M+\gamma_{MD}\cdot(1\text{-}Y_{MZ})\cdot F_{maxZ}\cdot\frac{T}{20}\cdot\frac{K_{MZ}}{K_{MZ}+M}\cdot M\cdot Z+Y_{ZD}\cdot k_{dZ}\cdot Z-k_{dD}\cdot D-\frac{Q}{V}\cdot D \quad (3\text{-}6)$$

溶存有機物

$$\frac{dC}{dt}=\frac{Q}{V}\cdot C_{in}+\gamma_{DC}\cdot k_{dD}\cdot D-k_{dC}\cdot C-\frac{Q}{V}\cdot C \quad (3\text{-}7)$$

無機態窒素

$$\frac{dN}{dt}=\frac{Q}{V}\cdot N_{in}+\gamma_{CN}\cdot k_{dC}\cdot C+\gamma_{MN}\cdot(1-Y_{MD})\cdot k_{dM}\cdot M+\gamma_{ZN}\cdot(1-Y_{ZD})\cdot k_{dZ}\cdot Z-\gamma_{MN}\cdot\mu_{maxM}\cdot f_T\cdot f_I\cdot f_{CNP}\cdot M-\frac{Q}{V}\cdot N \quad (3\text{-}8)$$

PO_4^{3-}

$$\frac{dP}{dt}=\frac{Q}{V}\cdot P_{in}+\gamma_{CP}\cdot k_{dC}\cdot C+\gamma_{MP}\cdot(1-Y_{MD})\cdot k_{dM}\cdot M+\gamma_{ZP}\cdot(1-Y_{ZD})\cdot k_{dZ}\cdot Z-\gamma_{MP}\cdot\mu_{maxM}\cdot f_T\cdot f_I\cdot f_{CNP}\cdot M-\frac{Q}{V}\cdot P \quad (3\text{-}9)$$

DO

$$\frac{dO}{dt}=\frac{Q}{V}\cdot O_{in}+k_L\frac{A(O_{sat}-O)}{V}+\gamma_{MO}\cdot\mu_{maxM}\cdot f_T\cdot f_I\cdot f_{CNP}\cdot M-\gamma_{MO}\cdot(1-Y_{MD})\cdot k_{dM}\cdot M-\gamma_{ZO}\cdot(1-Y_{ZD})\cdot k_{dZ}\cdot Z-\gamma_{CO}\cdot k_{dC}\cdot C-\frac{Q}{V}\cdot O \quad (3\text{-}10)$$

$$O_{sat}=16.5-\frac{8.0}{22.0}T \quad (3\text{-}11)$$

ここで、Q: 系内への流入・流出水量 (m^3/day)、V: 系内の水量 (m^3)、A: 系内の水表面積 (m^2)、H: 系内の水位 (m)、T: 水温 (℃)、I: 全天日射量 (MJ/m^2/day)、O_{sat}: 飽和溶存酸素濃度 (mg-O_2/L)、f_T: 水温による影響項 (-)、f_I: 日射量による影響項 (-)、f_{CNP}: 無機炭素、無機態窒素およびPO_4^{3-}濃度による影響項 (-)、μ_{maxM}: 藻類の最大比増殖速度 (day^{-1})、T_{opt}: 藻類の最適水温 (℃)、I_{opt}: 藻類の最適全天日射量 (MJ/m^2/day)、K_{ICM}: 無機炭素の半飽和定数 (mg-C/L)、K_{NM}: 無機態窒素の半飽和定数 (mg-N/L)、K_{PM}: PO_4^{3-}の半飽和定数 (mg-P/L)、k_{dM}: 藻類の呼吸・枯死速度 (day^{-1})、α: 水の吸光係数 (m^{-1})、ε_0: SSの吸光係数 (L/mg/m)、F_{maxZ}: 動物プランクトンの最大ろ過速度 (L/mg/day)、K_{MZ}: 動物プランクトンのろ過の半飽和定数 (mg-Chl a/L)、k_{dZ}: 動物プランクトンの呼吸・枯死速度 (day^{-1})、k_{dD}: デトリタスの分解速度 (day^{-1})、k_{dC}: 溶存有機物の分解速度 (day^{-1})、k_L: 酸素ガス移動係数 (m/day)、Y_{MD}: 藻類の呼吸・枯死における枯死の割合 (-)、Y_{ZD}: 動物プランクトンの呼吸・枯死における枯死の割合 (-)、Y_{MZ}: 動物プランクトンによる藻類の捕食の割合 (-)、γ_{MD}: クロロフィルaから乾燥重量への換算係数 (mg/mg-Chl a)、γ_{MZ}: 藻類から動物プランクトンへの換算係数 (mg/mg-Chl a)、γ_{DC}: デトリタスから溶存有機物への換算係数 (mg-C/mg)、γ_{MO}: 藻類の光合成・呼吸における酸素発生・消費量 (mg-O_2/mg-Chl a)、γ_{ZO}: 動物プランクトンの呼吸における酸素消費量 (mg-O_2/mg)、γ_{CO}: 溶存有機物分解時の酸素消費量 (mg-O_2/mg-C)、γ_{MN}: 藻類の窒素含有量 (mg-N/mg-Chl a)、γ_{ZN}: 動物プランクトンの窒素含有量 (mg-N/mg)、γ_{CN}: 溶存有機物の窒素含有量 (mg-N/mg-C)、γ_{MP}: 藻類のリン含有量 (mg-P/mg-Chl a)、γ_{ZN}: 動物プランクトンのリン含有量 (mg-P/mg)、γ_{CN}: 溶存有機物のリン含有量 (mg-P/mg-C)

上述したとおり、本数理モデルの一部の係数は、2014年のB下水処理場での屋外培養実験より算出した。そこで、本モデルについて、同じ処理場での異なる年における藻類培養状況の再現が可能かについて、2015年のB下水処理場での屋外培養実験結果を踏まえ考察した。また、異なる処理場への数理モデルの適用性については、後述するようにB下水処理場の処理水と水質が異なるC下水処理場の処理水を用いた2015年の屋外培養実験結果を踏まえ検討した。

3．2 結果および考察

3．2．1 室内培養結果

HRTの及ぼす藻類培養への影響について、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DTP、DTN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唆された。HRT 2日の場合、DTP、DTN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TP、DTP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 (TPからDTP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

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

条件		pH	TP	TN	DTP	DTN	IC	TOC	クロロフィルa	クロロフィルb
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_2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

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[26]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、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 3-4a、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[27), 28), 29)]。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。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 3-5)。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の結果、B、Mn、Zn、Sr の元素が、それぞれ 55、68、67、88 g/kg-dry 含まれることがわかった。

培養水に CO_2 を流入することによる藻類培養への影響を検討した。CO_2 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[26]。さらに、CO_2 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[9), 26)]。また、燃焼施設からの排ガス中には CO_2 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_2 を 0.01 mL/min (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_2 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_2 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 3-4c)。

培養時における撹拌および曝気の及ぼす藻類培養への影響を検討した。撹拌および曝気 a、撹拌のみ b、曝気のみ c、撹拌・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、DTP は、0.7 mg/L 以下に、DTN は、2.9 mg/L 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 3-6 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、撹拌および曝気を行った条件 a 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、撹拌・曝気いずれもなしの条件 d で 87%、曝気のみの条件 c で 73%と、撹拌を行った場合 a,b (50%程度)に比べて高いことがわかる。撹拌を行うことにより、付着性・沈

表 3-2　異なる撹拌・曝気条件で培養した場合の水質の変化 (単位: mg/L)

条件		pH	TP	TN	DTP	DTN	IC	TOC	クロロフィルa	クロロフィルb
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. 撹拌および曝気	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. 撹拌	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

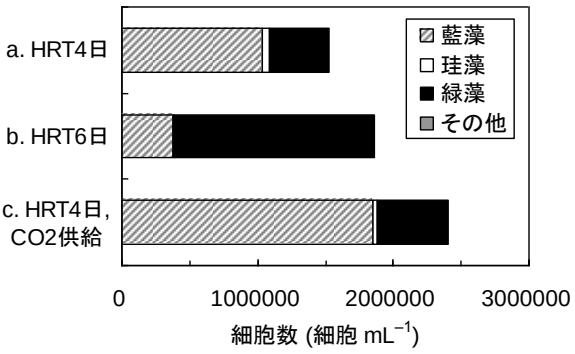


図 3-4　HRT を変えた場合、CO_2 供給を行った場合の培養藻類種

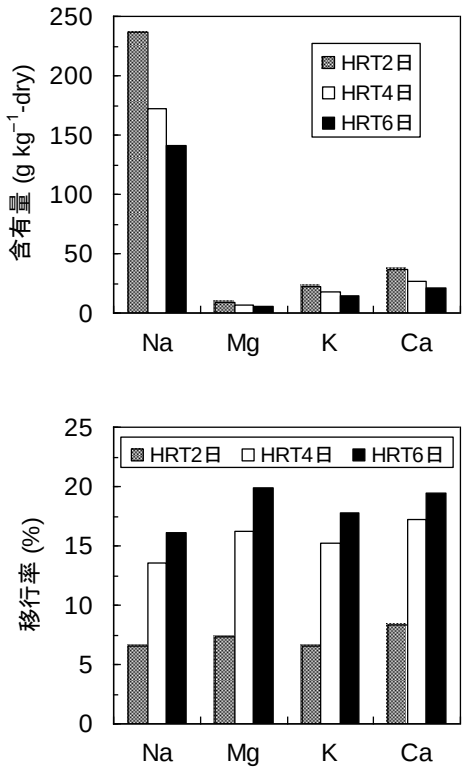


図 3-5　HRT を変えた場合の藻類中重金属含有量と培養原水からの移行率

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 3-7)。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。撹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。

CO_2 添加条件を検討したリアクターA から D におけ

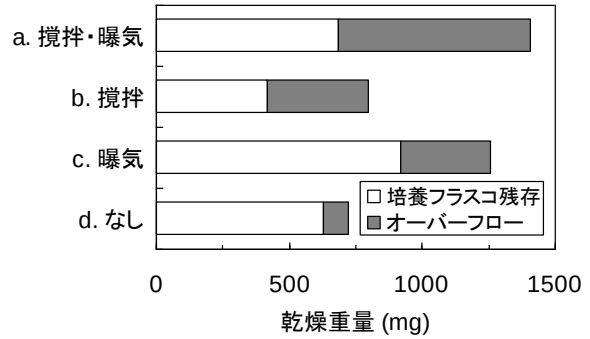


図 3-6　撹拌・曝気条件を変えた場合の培養藻類の乾燥重量

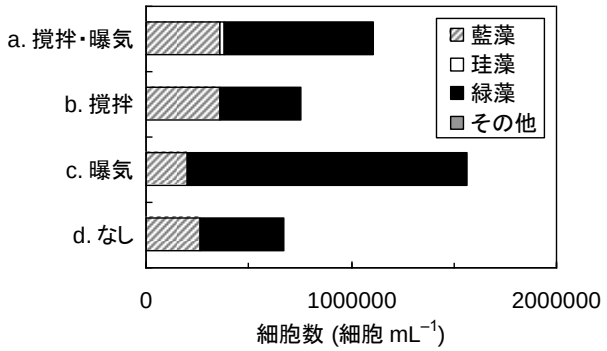


図 3-7　撹拌・曝気条件を変えた場合のフラスコ内に残存した藻類種

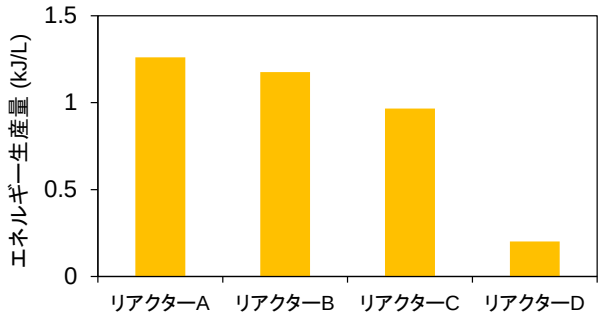


図 3-8　CO_2 添加がエネルギー生産量に与える影響

るエネルギー生産量 {SS (g/L)×高位発熱量 (kJ/g)}を図 3-8 に示す。CO_2 を添加したリアクターA から C でのエネルギー生産量は、CO_2 を添加していないリアクターD の 4.9-6.3 倍であり、CO_2 添加によるエネルギー生産量の向上が明らかとなった。また、リアクターC に比べ、リアクターB でのエネルギー生産量はやや多かった一方で、リアクターA および B では同程度であった。CO_2 添加により培養水の pH を 6.7-7 に保つリアクターA に比べ、pH を 7.7-8 に保ったリアクターB の方が、CO_2 添加に必要なエネルギー消費量は少ないと考えられ、培養水の pH を 8 付近に保つように CO_2 添加を行うことが適切であると判断された。

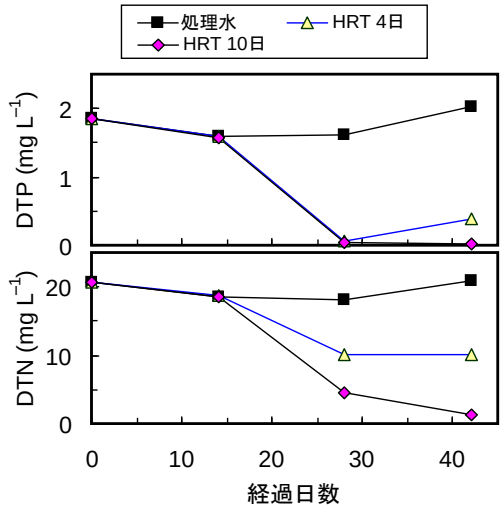


図 3-9　培養時の培養水中の栄養塩濃度

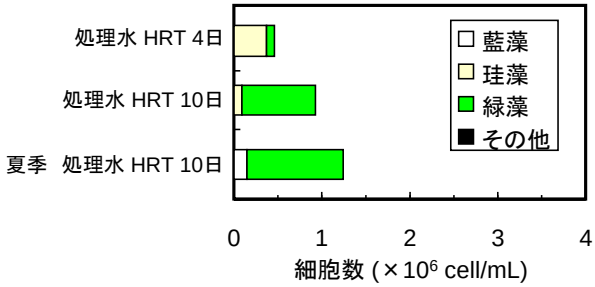


図 3-10　培養された藻類種 (最後段以外は 10～12 月に培養)

3. 2. 2　20L 容培養装置を用いた屋外培養結果

培養水中の栄養塩濃度の変化を図 3-9 に示す。図 3-9 に示す培養は 10～12 月に実施し、期間中の平日は毎日、処理場から原水を採取し容器内の培養水を交換することにより半連続培養を行った。図中には処理水の濃度も示した。培養開始から 14 日後までは、容器内の培養水の色はほとんど変化しなかった。原水と容器内の培養水の栄養塩濃度を比較してもほとんど差が見られない。しかし、14～28 日目にかけて培養水が緑色に着色し、栄養塩濃度も原水と培養水とで大きく差が開いた。藻類の株や栄養塩等を外部から添加、供給することなく、培養原水のみを用いた培養により藻類が増殖することが示された。また、窒素よりもリンが先に枯渇する傾向を示すとともに HRT の増加および CO_2 添加により窒素の消費が進むことが明らかとなった。

培養 42 日後の容器内に残存した (培養水の交換時にオーバーフロー水として排出された水中の浮遊性藻類を除く)藻類種を同定した。結果を図 3-10 に示す。

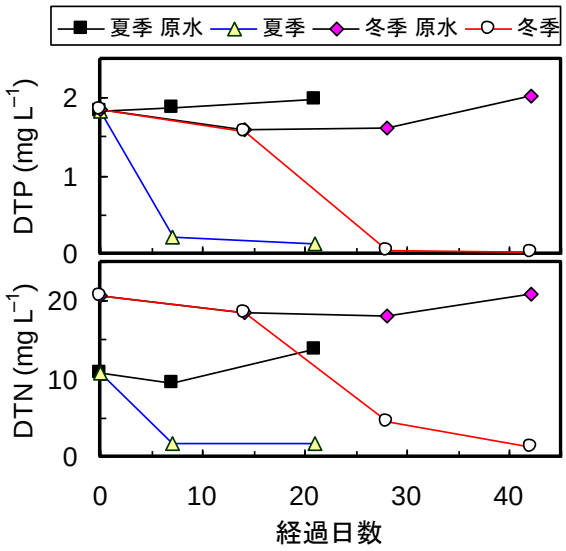


図 3-11　夏季・冬季培養時の培養水中の栄養塩濃度 (HRT 10 日)

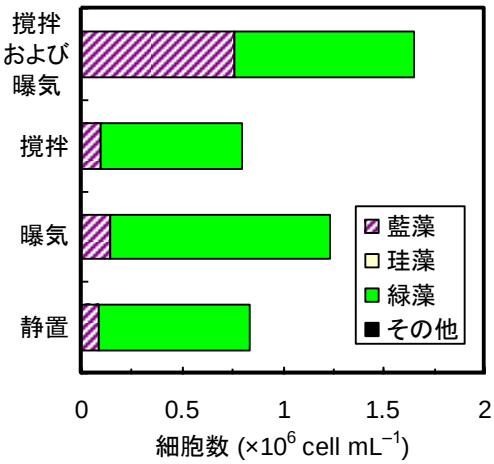


図 3-12　撹拌・曝気条件を変え培養された藻類種 (7～8 月に培養、HRT 10 日)

最後段の夏季の培養結果については後述する。すべての条件において主要成分として緑藻が観察された。また、HRT 4 日の条件では珪藻が高い割合で観察された。HRT を 4 日から 10 日に上昇させることにより、総細胞数および緑藻の割合が上昇した。図 3-10 を見ても培養による 42 日後の窒素の消費量は HRT 4 日よりも 10 日の方が大きく、培養水を長く滞留させることにより培養がより促進されることが示された。

HRT10 日の条件で同様に 7～8 月 (夏季)に培養を行った。図 3-11 には培養時における栄養塩濃度の変化を 10～12 月 (冬季)の培養結果と併せて示した。培養時における午前 10 時の水温は、夏季は 26～37℃、冬季は 1.7～16℃の範囲にあった。夏季の培養水中の DTP、DTN 濃度は、培養開始から 7 日後までに劇的に減少している。一方、冬季の培養においては前述のとおり 14 日目では培養原水および培養水の濃度に変化が見られない。夏季では培養開始後、最初の 7 日間にかけて、冬季では 14～28 日間にかけて培養が大きく進むものと考えられた。夏季 (21 日間培養)および冬季 (42 日間培養)に培養された藻類種を比較すると夏季の方が緑藻の細胞数が増加している。また、夏季の培養では珪藻の割合が減少し、藍藻の割合が増加した (図 3-10)。

培養時における撹拌および曝気の及ぼす藻類培養への影響を検討した。撹拌および曝気、撹拌のみ、曝気のみ、撹拌・曝気いずれもなし (静置)の 4 条件で 7～8 月に 21 日間、半連続培養を行った。藻類種を同定した結果を図 3-12 に示す。撹拌および曝気を行った場合に全細胞数が最も多くなった。しかし、曝気のみの条件において緑藻の細胞数および全細胞数に対する緑藻の割合が最も高くなり、燃料として有用な成分の割合が大きく上昇した。曝気のみの条件において緑藻の細胞数、構成割合が最も高くなる傾向は、室内培養により得られた結果と同様である。

10～12 月 (冬季)に培養された藻類について、HRT 10 日の条件で培養した藻類の高位発熱量は 20 kJ/g であり、HRT を 4 日から 10 日に長くすることにより発熱量は 1.3 倍増加した。

3. 2. 3　380L 容培養装置を用いた屋外培養結果

2013 年の培養期間中における 2 系列の培養水槽内培養水および処理水の水質分析結果の経時変化を図 3-13 に示す。6 月 18 日に HRT 4 日の条件で水槽への処理水の供給を開始した後、1 週間程度で水槽内の水が緑色に変化し、藻類の増殖が確認された。同時に、処理水に比べ培養水の DTP、DTN の値が減少した。藻類の増殖に伴い、これらの栄養塩が消費され、藻類中に取り込まれることが示された。また、処理水を使用したため、窒素の多くは硝酸性窒素として存在している。藻類の株や栄養塩等を添加することなく、処理水のみの供給により藻類が増殖した。2 系列の水槽のうち 1 系列において、7 月 24 日から返送を開始した。8 月 7 日の時点で返送ありの系列の方が SS が少し増加した (処理水中の SS はほぼ 0 mg/L であることから、SS は増殖した藻類の乾燥重量として考える)。8 月 13 日に両系列とも撹拌を開始したところ、返送ありの系列は返送なしの系列に比べ、培養量が 1.8 倍増加し、返送なしの系列において DTP の値が大きく上昇した (8 月

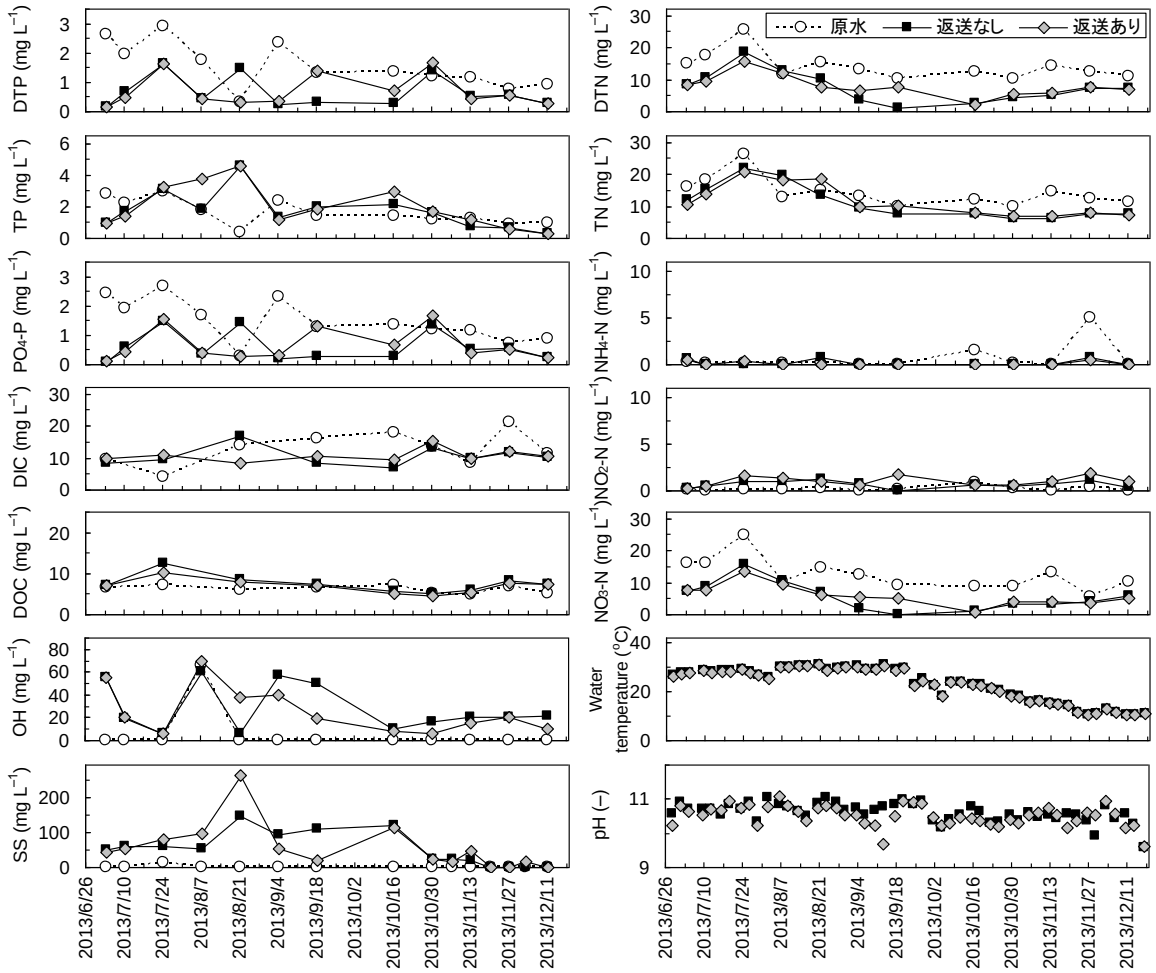


図 3-13　2013 年の屋外培養における処理水および培養水での水質変化

21 日)。撹拌前には藻類が水槽内で不均一に増殖していたが、撹拌を行うことで水槽内の藻類存在の状態がより均一になり、培養量の少ない撹拌なしの系列ではリンの消費が低下し、また、沈降性の藻類の量が増加する傾向が見られた。このため、8 月 23 日に返送なしの系列の HRT を 8 日に変更した。変更後は、再びリンの消費量が増加し、浮遊性の藻類が増加したが、返送ありの系列においても次第に培養量の減少、栄養塩の消費量の低減が見られるようになったため、10 月 2 日に HRT を 8 日に変更した。HRT 8 日の条件であっても、特に 10 月 30 日以降は水温の低下に伴い培養量が大きく減少した。12 月中旬から翌年 1 月まで、水の供給を停止し、回分培養を実施したが、培養量の増加は見られなかった。

培養水槽内の藻類種の同定、計数を行った結果を図 3-14 に示す。室内培養や 20 L 容培養装置による屋外培養では、藍藻や種々の緑藻が多く観察されたが、本培養においては、緑藻であるオオキスティス科、セネデスムス科が優占した。8 月の返送なしの系では、

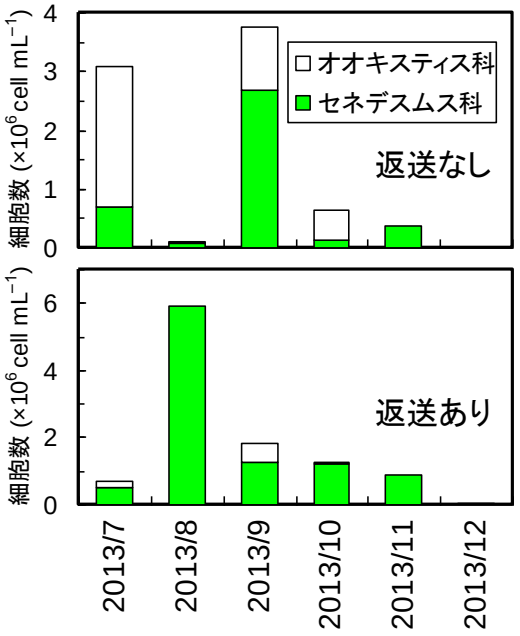


図 3-14　2013 年の屋外培養における培養水での藻類

この 2 科の優占率は 96%であったが、これを除く 7～11 月期のすべての系において 99%を占めた。また、12 月期は総細胞数が大きく減少した。返送なしの系では 11 月期に比べ総細胞数が 1%以下に減少したが、珪藻であるニッチア科は 110 倍に増加した。緑藻、特にセネデスムス科の中にはバイオ燃料として有用な成分も含まれる[27,29]ことから、さらなる細胞数の増加を検討する必要があると考えられる。8 月の返送なしの系において細胞数が大きく減少しているが、これは前述の撹拌によるリンの消費の低下に起因しているものと考えられる。

次に、2014 年の培養について、実験期間での培養を実施した地点における月別平均気温は 12.2-26.0℃の範囲にあり 8 月で最も高く、また、全天日射量は 7.9-18.7 MJ/m^2/day の範囲であり 7 月で最も高かった[30]。

実験期間を通じた、流入下水での SS、TOC、TN および TP の中央値は、それぞれ 97.0 mg/L、26.4 mg-C/L、25.6 mg-N/L および 3.40 mg-P/L であったのに対して、処理水では、4.2 mg/L (除去率中央値: 95.0%)、7.20 mg-C/L (75.5%)、15.6 mg-N/L (39.7%)および 2.00 mg-P/L (43.3%)であった。

藻類培養水槽での DO は、光合成により 10 mg-O_2/L 以上と飽和・過飽和状態であり、pH は CO_2 添加にともない 7.7-8.0 の間で安定していた。

IC は、処理水で 11.8 mg-C/L であったが、CO_2 添加により培養水槽では 21.4 mg-C/L と増加した。 また、藻類増殖における IC の半飽和定数 (3 mg-C/L)[24]を鑑みると、培養水中 IC は豊富に存在していたと考えられる。

図 3-15 に処理水および培養水での SS、無機態窒素、PO_4^{3-}および DOC の経時変化を示す。6 月 25 日から 6 月 27 日にかけて、培養水での SS が 137 から 30 mg/L まで大きく減少し、無機態窒素および PO_4^{3-}が 0.225 から 1.55 mg-N/L および 0.161 から 0.527 mg-P/L まで上昇した。6 月 23 日の曝気槽および処理水での pH がそれぞれ 5.67 および 5.89 と特異的に低く、これが SS の減少に寄与した可能性が考えられる。

7 月に培養水での SS が増加した後、8 月、9 月で、SS が中央値で 206 および 166 mg/L と比較的安定した値を示した。培養水での無機態窒素および PO_4^{3-}はそれぞれの月で 2.56 mg-N/L および 1.39 mg-P/L、ならびに 1.72 mg-N/L および 0.521 mg-P/L であり、処理水に比して 81.5 および 44.4%、ならびに 87.8 および 65.4%の除去率が得られた。10 月 5、6 日の台風での激しい降雨 (降雨量合計: 199 mm)により 10 月 3 日から 7 日にかけて、SS が 136 mg/L から 116 mg/L まで減少したが、1 週間後の 10 月 14 日には 146 mg/L まで回復した。その後、10 月 28 日から 11 月 21 日にかけて SS が 164 から 90 mg/L まで減少し、無機態窒素および PO_4^{3-}も 6.53 から 11.0 mg-N/L および 0.062 から 1.16 mg-P/L まで上昇した。この SS が減少した期間において、水温が 17.4℃から 10.2℃に急激に低下しており、この水温低下が SS 減少の一因であると考えられる。藻類増殖における無機態窒素および PO_4^{3-}の半飽和定数 (0.025 mg-N/L、0.002 mg-P/L)[23]を鑑みると、培養水中無機態窒素および PO_4^{3-}は豊富に存在していたと考えられる。

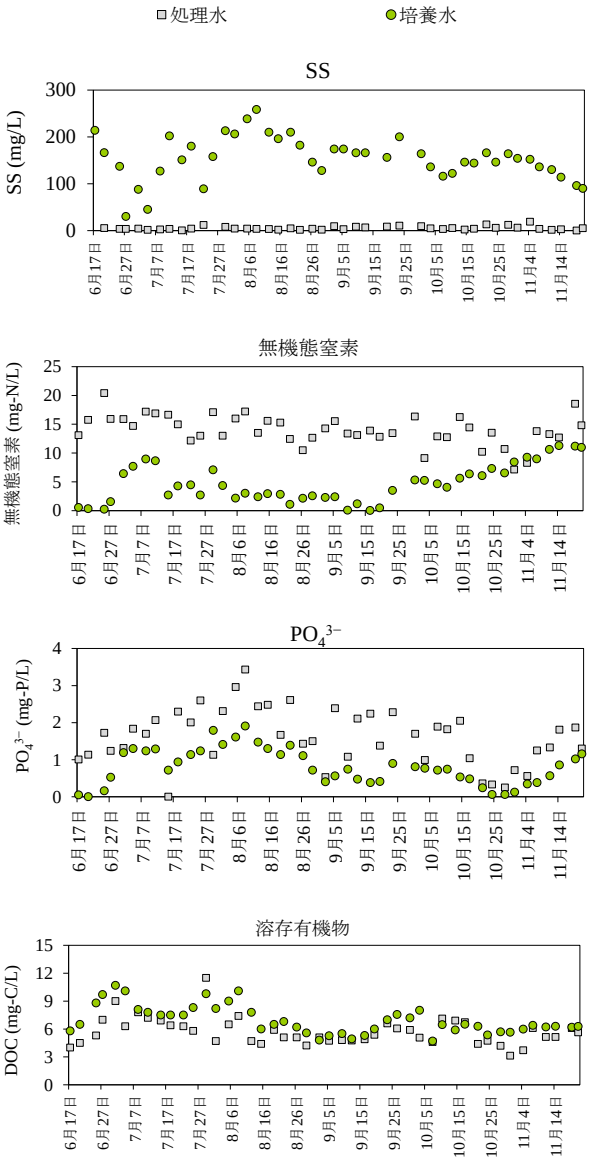


図 3-15　2014 年の屋外培養における処理水および培養水での水質変化

培養槽で確認された動物プランクトンについて、体

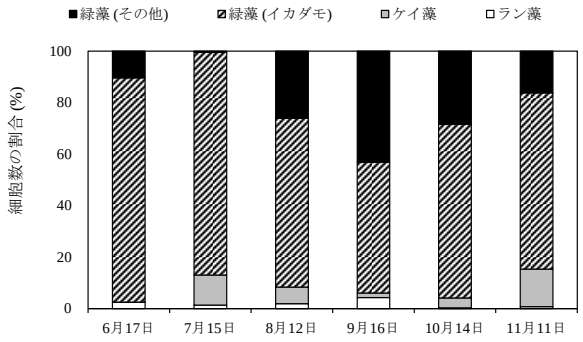


図 3-16　2014 年の屋外培養における培養水での藻類構成

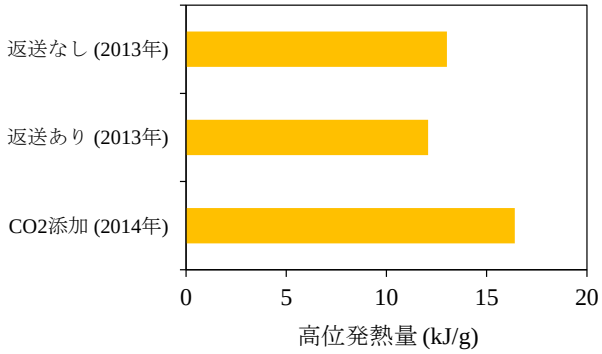


図 3-17　培養藻類の高位発熱量

積から換算した乾燥重量[31]は、培養槽での SS の高々 3.2%であり、SS は藻類および藻類由来のデトリタスで構成されていると考えられる。

SS 濃度が比較的安定した 8 月での培養槽単位面積当たりの SS 培養量は 12.9 g/m^2/day であった。ニュージーランドでの HRAP において、夏季 (11 月-1 月)で 15.3 g/m^2/day の培養量が得られており[5]、本研究での 8 月の培養量は、この HRAP での 85%の値であった。

藻類培養槽での溶存有機物濃度については、処理水中の変動に呼応する形で変化した一方で、培養期間での処理水中濃度 (中央値: 5.30 mg-C/L)に比して、培養槽 (6.40 mg-C/L)での濃度は高かった。藻類の炭素固定にともない SS が増殖し、藻類由来のデトリタスの一部が分解することで溶存有機物濃度が上昇したものと考えられる。

培養槽での藻類同定結果の一例を図 3-16 に示す。培養期間を通じて、全藻類細胞数に占める緑藻の細胞数の割合が 85-97%と高く、特にイカダモ科が 51-87%と優占した。これは、2013 年の培養結果と一致する。

図 3-17 に 2013 年および 2014 年での培養藻類中高位発熱量を示す。それぞれの値は、培養期間での n=5 の測定における平均値である。CO_2 を添加することで、高位発熱量が 16.4 kJ/g となり、CO_2 を添加していない系に比して、約 1.3-1.4 倍に増加したことから、自然条件下での藻類培養における CO_2 添加効果が示された。

藻類の全脂質濃度は、1.0-5.4%の範囲にあった。藻類中全脂質濃度が 40%以下であった場合は、藻類中脂質を利用するよりも、藻類の全細胞を用いた嫌気性消化によるエネルギー生産の方が適しており[32]、また、処理水で培養した藻類について、嫌気性消化の基質としての有効性が示されている[33]。そのため、処理水で培養した藻類をエネルギー生産手法の一つとして、嫌気性消化が有効であると考えられる。

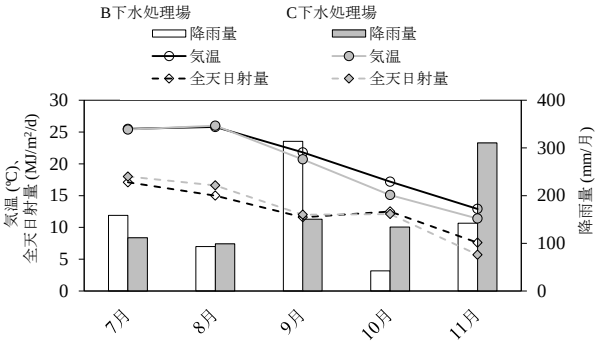


図 3-18　B、C 下水処理場での気象条件 (2015 年)[30]

3. 2. 4　異なる下水処理場での屋外培養結果

図 3-18 に 2015 年の B および C 下水処理場での各月の平均気温、平均全天日照量および降雨量を示す[30]。月ごとの降雨量に差がある一方で、両処理場での気温および全天日照量は同様の値であった。

図 3-19 に B および C 下水処理場での処理水および培養水での水質測定結果を示す。

B および C 下水処理場での処理水における炭素 (IC)：窒素 (無機態窒素)：リン (PO_4^{3-})比の中央値は、それぞれ 23:20:1 および 380:230:1 であった。レッドフィールド比 (106:16:1)[34]を鑑みると、藻類増殖における律速因子は、B および C 下水処理場での処理水でそれぞれ炭素およびリンであり、律速因子が異なっていた。

B 下水処理場における SS の中央値は、113 mg/L と C 下水処理場での値 (88 mg/L)に比べ高かった。これは、下記するように下水処理場 C での培養水中のリンが枯渇していたことが一因であると考えられる。

B および C 下水処理場での培養水中の IC の中央値は、12.4 および 19.1 mg-C/L であり、藻類増殖における IC の半飽和定数[24]を鑑みると、培養水中 IC は豊富に存在していたと考えられる。

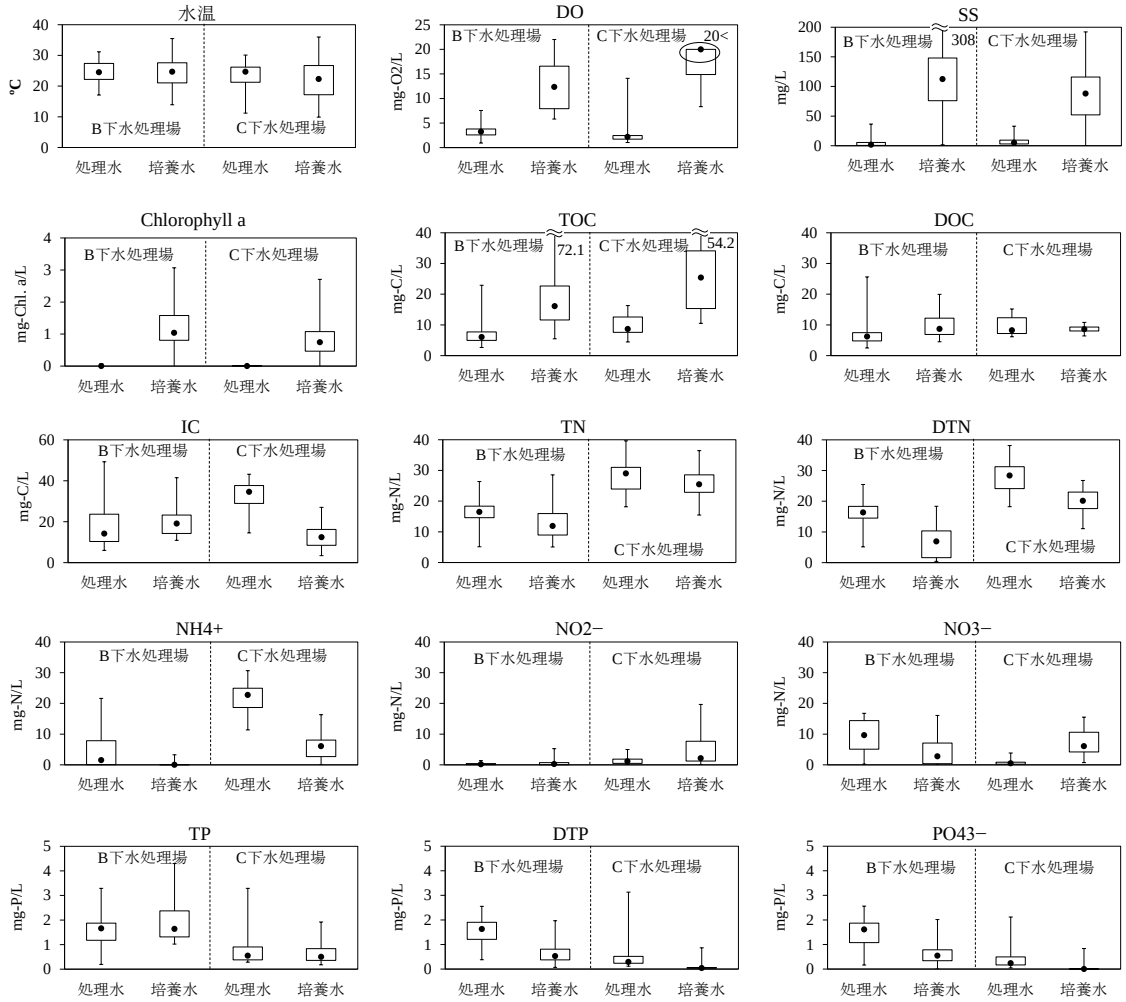


図 3-19　2015 年 B および C 下水処理場での処理水および培養水での水質分布
(中央値は黒丸、25、75 パーセンタイル値は四角、最小、最大値はエラーバーでそれぞれ示す)

両下水処理場において、処理水に比して培養水での TN はやや低い値となった。B 下水処理場においては、処理水に比して培養水での DTN および NO_3^-濃度がそれぞれ 8.71 および 4.06 mg-N/L 低く、藻類増殖に伴う藻類体内への取り込みの寄与が考えられる。C 下水処理場において、処理水に比して培養水での NO_2^-および NO_3^-濃度が上昇していることが分かった。CO_2 添加により培養水 pH を 8 付近に保つことで、微生物増殖および硝化を促進することが報告されており [35]、本研究においても、CO_2 添加による培養水 pH 調整が NO_2^-および NO_3^-濃度の上昇に寄与していると考えられる。また、処理水に比して培養水での DTN は藻類増殖に伴い 8.90 mg-N/L 減少した。藻類増殖における無機態窒素の半飽和定数 [23]を鑑みると、両培養水ともに無機態窒素は豊富に存在していたと考えられる。

両下水処理場において、処理水および培養水での TP 濃度は同程度であった。藻類増殖に伴い、B および C 下水処理場では、処理水に比して培養水での DTP 濃度がそれぞれ 0.890 および 0.274 mg-P/L 低下した。藻類増殖における PO_4^{3-}の半飽和定数 [23]を鑑みると、B 下水処理場での培養水中 PO_4^{3-}は豊富に存在していた一方で、C 下水処理場では PO_4^{3-}が枯渇していることが明らかとなった。

培養水における懸濁態リン (STP: TP と DTP との差)と SS の比率について、C 下水処理場での値 (0.0063 mg-P/mg)は、B 下水処理場 (0.011 mg-P/mg)での値より低かった。藻類は、細胞外にリンが豊富にある環境では、リンを体内にポリリン酸の形で蓄積し、細胞外のリンが枯渇した環境下で、蓄積したリンを利用することが報告されている [36]。上述したように、培養水での SS は、藻類および藻類由来のデトリタスで構成されていると考えられるため、藻類とそのデトリタスでの組成が同じと考えると、C 下水処理場での STP/SS 比が低かった要因として、培養水での PO_4^{3-}枯渇による藻

表 3-3　2015 年 B および C 下水処理場における培養水での藻類構成

	網 (科)	細胞数の割合 (%)								
		7月7日	7月21日	8月4日	8月18日	9月1日	9月18日	10月5日	10月20日	11月17日
B下水処理場	藍藻	0.6	3.2	17.2	35.2	27.7	47.3	6.6	5.6	30.8
	珪藻	0.7	3.6	3.9	0.0	0.2	0.3	3.2	2.6	6.8
	緑藻 (*Micractiniaceae*)	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	緑藻(*Dictyosphaeriaceae*)	89.7	11.0	32.2	56.1	58.5	35.3	68.1	88.0	33.5
	緑藻 (*Scenedesmaceae*)	1.4	64.8	26.6	3.6	4.2	5.6	5.8	1.8	18.4
	緑藻 (その他)	7.6	17.4	19.8	5.1	9.4	11.4	16.3	2.0	10.5
	網 (科)	細胞数の割合 (%)								
		7月7日	7月22日	8月5日	8月20日	9月2日	9月16日	10月6日	10月21日	11月17日
C下水処理場	藍藻	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
	珪藻	71.8	0.2	0.0	0.3	0.0	0.8	0.1	0.1	0.1
	緑藻 (*Micractiniaceae*)	0.0	10.6	98.0	91.7	0.0	90.6	56.5	17.9	0.0
	緑藻 (*Dictyosphaeriaceae*)	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	緑藻 (*Scenedesmaceae*)	0.3	35.5	1.9	7.1	99.9	7.9	36.4	77.5	99.8
	緑藻 (その他)	27.9	52.9	0.1	0.8	0.1	0.6	7.0	4.5	0.1

類細胞中のリン濃度低下が挙げられる。

培養水での藻類の細胞数の割合を表 3-3 に示す。培養期間を通じて、緑藻が B 下水処理場で 52.4-98.7%、C 下水処理場で 28.2-100%と、両下水処理場で緑藻が優占することが明らかとなった。これは、2013、2014 年の B 下水処理場での屋外培養実験と同様の結果であった。

藻類の高位発熱量については、B および C 下水処理場で、それぞれ 14.9 から 19.2 kJ/g および 16.1 から 20.6 kJ/g の範囲にあり、有意水準 p=0.05 のもとウィルコクソンの符号順位検定を行った結果、両下水処理場での高位発熱量に有意な差は見られなかった (p=0.095)。

3. 2. 5 数理モデルの検証結果

2014年のB下水処理場での屋外培養実験結果に関して、バイオマス生産の指標となるSSを対象として、培養水での実測値および構築したモデルによる計算値(藻類+動物プランクトン + デトリタス)を、それぞれ図3-20に示す。なお、数値計算は、SSの増加が始まった7月4日から行った。

図3-20より、培養槽水での増減の傾向を良く再現できていることが理解できる。また、SSが比較的安定した8、9月での実測値および計算値の中央値は178および195 mg/Lであり、モデルでの計算値は実測値と同様の値となり、本モデルによる実測データの再現性が示された。

次に、2015年のBおよびC下水処理場での屋外培養におけるSSの実測値および計算値を図3-21に示す。

B下水処理場においては、8、9月の実測値および計算値の中央値がそれぞれ101 mg/Lと同じ値であったことに代表されるように、モデルによる計算値は実測値を再現していた。上述したように、2014年、2015年ともにB下水処理場での培養水では、IC、無機態窒素およびPO_4^{3-}が豊富に存在しており、類似した培養環境であったことから、数理モデルにおける係数補正の必要がなく、再現できたものと考えられる。以上の結果から、構築した数理モデルについて、同じ下水処理場での異なる年における藻類培養特性の再現が可能である

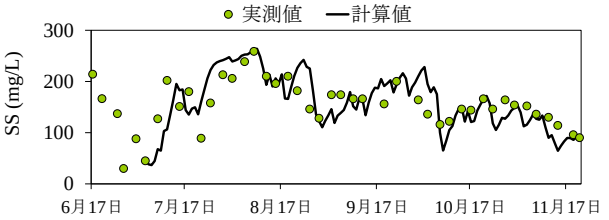


図3-20　2014年のB下水処理場での培養水中SSの実測値および数理モデルによる計算値

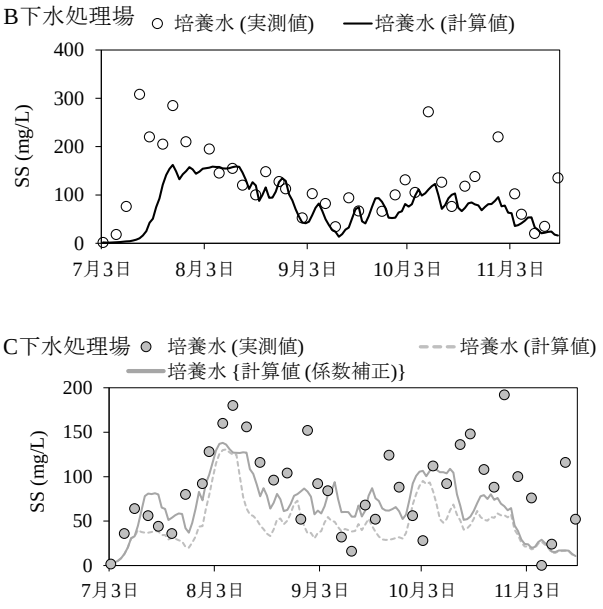


図3-21　2015年のBおよびC下水処理場での培養水中SSの実測値および数理モデルによる計算値

ことが示された。

C下水処理場において、計算値は、実測値の経時的変動を表現できている一方で、8、9月の実測値および計算値の中央値がそれぞれ94 mg/Lと46mg/Lであったことに代表されるように、計算値は実測値に比べ、小さい値であった。これは、培養水でのPO_4^{3-}が枯渇しており、これは、モデル構築に用いた2014年のB下水処理場での培養では検討できなかった新たな培養環境であるため、再現性が悪かったものと考えられる。

そこで、数理モデルにおける藻類増殖に関する諸係数を対象として感度解析を行い、SSへの影響が大きい係数を抽出した。高いバイオマス生産効率が期待できる8月の気象条件下で、藻類増殖に関する係数を既存の値から±10%変動させ、以下の式に示されるSS変化率を算出した上で、SSへの影響を考察した。1つの係数を変動させる場合、他の係数は既存の値とした。

$$\text{SS 変化率 (\%)}=\frac{(\text{変化させた係数で算出した SS})-(\text{既存の係数で算出した SS})}{\text{既存の係数で算出した SS}}\times 100 \quad (3\text{-}12)$$

感度解析の結果を図3-22に示す。藻類のリン含有量の変動が、SS変化率に与える影響が大きいことが明らかとなった。

C下水処理場での藻類培養特性に合うリン含有率を算出するため、上述した簡易な室内培養実験を行った。培養実験結果を図3-23に示す。藻類とそのデトリタスでの組成が同じと考え、SSおよびSTPが安定した19日目以降のデータならびに藻類でのクロロフィルaから乾燥重量への換算計数[17]を用いて藻類のリン含有量を算出した結果、0.22 mg-P/mg-Chl. aとなった。

新たに算出した藻類のリン含有量を用いて、C下水処理場でのSSを再計算した (図3-21)。8、9月の実測値および計算値の中央値がそれぞれ94 mg/Lと77mg/Lとなる等、良好な再現性が得られた。

以上のことから、本研究で構築したモデルについて、以下のステップを踏まえることで、新たな下水処理場への適用が可能であると考えられる。

(1)下水処理場での処理水水質、気象データを用いて、本数理モデルの諸係数についての感度解析を実施し、SSへの影響が大きい係数を抽出

(2)下水処理場での処理水を用いた簡易な培養実験を実施し、(1)で抽出した係数を算出

(3)(2)で算出した係数を組み込んだ上で、モデルによるシミュレーションを行い、バイオマス生産量予測、培養操作条件の検討等を実施

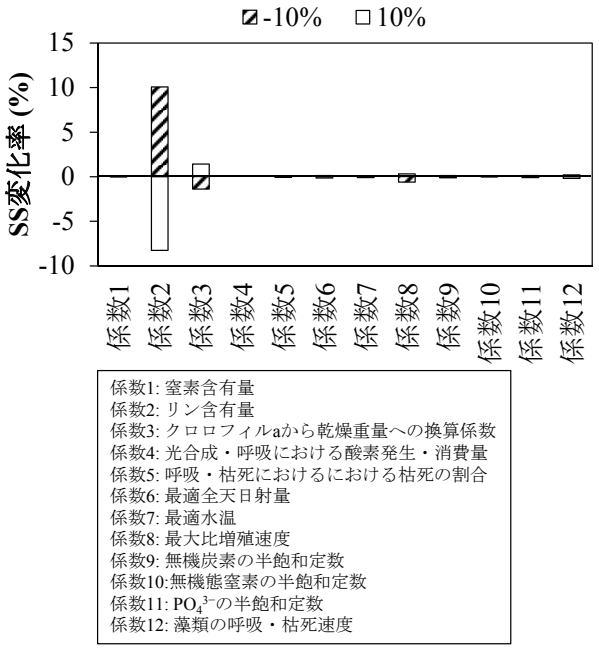


図3-22　数理モデルの感度解析結果

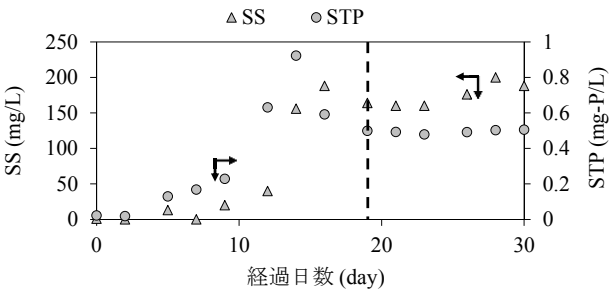


図3-23　係数算出のための室内実験結果

3. 2. 5 回収実験結果

曝気時間と上澄み中のクロロフィル a 濃度の関係を図 3-24 に示す。図中の曝気時間 0 分の点は、参考として、活性汚泥の代わりにイオン交換水を添加した試料の試験結果を示している。本試験より、HRAP 処理水と活性汚泥を混合し曝気し、静置することで、上澄み中のクロロフィル a は減少し、曝気時間が長いほど、その量は減少する傾向を示した。10 分より長く曝気した試料では、上澄み中のクロロフィル a 濃度は、曝気時間が長いほど、低かった。曝気時間 10 分から 30 分までは、それ以後に比べて、時間当たりのクロロフィル a の減少量が大きかった。なお、系列 1 の曝気時間 30 分の試料は測定しなかった。

HRAP 処理水に活性汚泥を加えて始めの 10 分間の減少量が大きい系 (系列 1 と 3)と、ほぼ変わらない系(系列 2)があった。一般的な下水からの活性汚泥による有機物の除去では、接触後の短時間においてその多

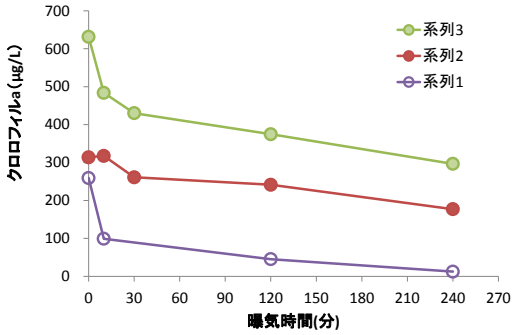


図 3-24　曝気時間と上澄み中のクロロフィル a 濃度の関係

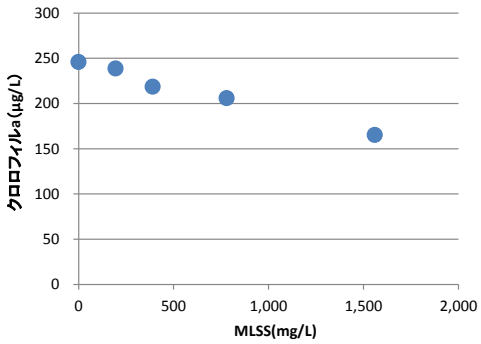


図 3-25　HRAP 試験装置の処理水と活性汚泥の混合液中の活性汚泥濃度とその混合液の曝気・静置後の上澄み中のクロロフィル a 濃度

くが除去される現象 (初期吸着)が知られている[12]。例外も見られたが、藻類についても、初期吸着が生じる場合があった。

本試験より、活性汚泥により下水培養藻類を除去可能であることが明らかになり、HRAP と活性汚泥を組み合わせた方法が有用となりうることが示唆された。活性汚泥との組み合わせは、直列 (HRAP の後に、活性汚泥)や並列 (HRAP と異なる系の活性汚泥の活用)などの配列や曝気時間の変更など、多数の組み合わせが考えられる。本試験では、並列の活性汚泥による試験を行い、曝気時間の影響を受けることが示され、また、初期吸着現象がみられた。この結果から、一般的な標準活性汚泥法のように数時間かけた生物反応による除去だけでなく、初期吸着のみを期待する活性汚泥との短時間の接触と組み合わせた方法も有用となりうることが示唆された。

活性汚泥濃度が下水培養藻類の除去に与える影響について、実験結果を図 3-25 に示す。図中の MLSS が 0 mg/L の点は、活性汚泥の代わりにイオン交換水を添加した試料の試験結果を示している。HRAP 試験装置の処理水と活性汚泥の混合液中の活性汚泥濃度が高いほど、その混合液の上澄み中のクロロフィル a 濃度は低かった。除去量はおおよそ活性汚泥の量に比例することが示された。

HRAP と活性汚泥を組み合わせた方法の検討にあたり、本実験より、藻類と接触する活性汚泥量が多い方が効率的であることが示され、濃度を高くして活性汚泥を保持する方法や、濃縮された汚泥との接触を行う方法などが有用となりうることが示唆された。

3. 3　まとめ

本章では、下水処理水を用いた藻類培養技術の開発およびエネルギー利用方法の検討を行った。まず、藻類の株や栄養塩等を外部から添加、供給することなく、処理水のみを用いた培養により藻類が増殖することを明らかとした。また、HRT や CO_2 添加といった培養操作条件の変化が藻類培養特性に与える影響を踏まえた上で、屋外連続培養において、HRT4 日、CO_2 添加 (培養水 pH を 7.7-8.0 に維持)の操作条件下で、SS 培養量 12.9 g/m^2/day、高位発熱量 16.4 kJ/g を達成し、得られたバイオマスの嫌気性消化によるエネルギー化が推奨された。さらに、藻類培養・エネルギー生産システムの下水処理場への普及支援を目的とした藻類増殖を表現する数理モデルを構築し、下水処理場へのモデルの適用手法を示した。

4. 下水中の有用元素のインベントリ整備

輸入価格の高騰によりリン等の肥料用資源の入手が困難となる場合があり、これらの安定した確保が重要な課題となっている。リンは下水中に多く含まれることから、本研究課題でもその回収方法について検討した結果をここまでに示した。しかし、下水中のリンの含有量や、下水処理工程において多くのリンが移行、集約されることが予想される下水汚泥焼却灰中のその含有量に関する最近の全国的な情報は少ない。

そこで、本研究では、全国約 85 の処理場を対象にアンケート調査を行い、全国の下水汚泥焼却灰の元素組成をまとめ、下水流入水および焼却灰中のリン含有特性について整理した。

図 4-1 には全国の下水流入水中のリン酸イオン態リン濃度のヒストグラム、図 4-2 には全国の下水汚泥焼却灰中のリン含有量 (P_2O_5 換算値)のヒストグラムを示した。それらの全国平均はそれぞれ 4.47 mg/L、19.9%-dry であった。下水中には多量のリン資源が含まれることが明らかとなるとともに、下水処理工程におけるリンの集約・移行特性をさらに検討したうえで、

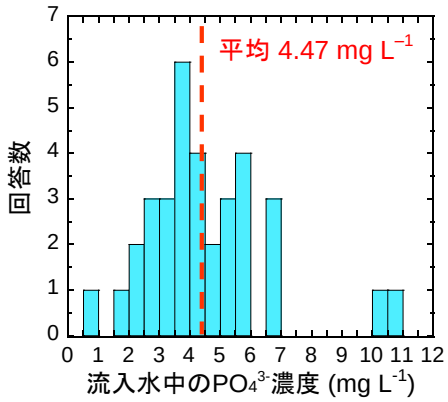


図 4-1　全国の下水流入水中のリン酸イオン態リン濃度

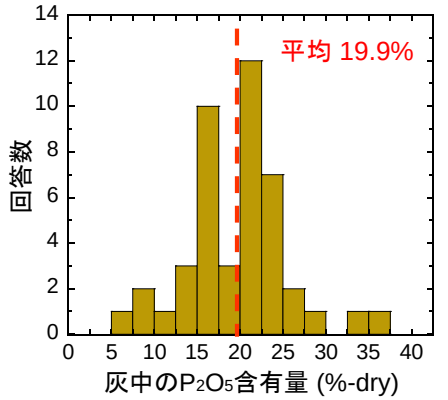


図 4-2　全国の下水汚泥焼却灰中のリン含有量 (P_2O_5 換算値)

効率的なリンの回収技術を提示していくことが必要であると考えられた。

5. 回収・生産した資源の有効利用のための安全性評価方法の開発

回収・生産した資源については、利用可能性や安全性を検証する必要がある。本章では、肥料利用を想定した上で、第 2 章で電気分解により消化脱離液より回収したリン資源、第 4 章でリン含有特性についてアンケート調査を実施した焼却灰、ならびに嫌気性消化液を対象として、組成分析を行い、肥料取締法 (昭和 25 年法律第 127 号)を踏まえた安全性評価、ならびに回収資源の利用方法の提案を行う。

5. 1　方法

5. 1. 1　電気分解による回収リン資源

2.2.2.に記した電解により得られたリンを高濃度に含有する懸濁態 (沈殿)を対象に、組成分析を行った。2.2.2.で記した手法を用いて、実消化脱離液約 300 L に対して電解を行い、懸濁態 (沈殿)を回収した。懸濁態 (沈殿)を凍結乾燥した後、組成分析に供した。分析対象項目は、全リン、水溶性リン、ク溶性リン、全窒素、全カリウム、ヒ素、カドミウム、水銀、ニッケル、クロムおよび鉛である。水溶性リン量およびク溶性リン量は、肥料分析法 [39]、それ以外の項目は下水試験方法 [13]に従い測定した。

5. 1. 2　焼却灰

第 4 章で実施した全国約 85 の処理場を対象に行った焼却灰での元素組成のアンケート調査結果を踏まえ、肥料取締法で基準値が定められているヒ素、カドミウム、水銀、ニッケル、クロムおよび鉛それぞれの焼却灰での存在実態を整理し、肥料利用の可能性を検討した。

5. 1. 3　嫌気性消化液

「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」で対象としている、処理場 D の消化液および反応器 1 の消化液を対象として、肥料としての評価に関する分析を、肥料取締法に基づき行った。反応器 1 からの毎日の引き抜き量は、分析に必要な量と比べて少ないので、経過日数 800 日前後の約 1 ヶ月間で引き抜いた消化汚泥を冷蔵庫 (4℃)で保管しまとめて分析した。処理場 D の消化汚泥は、同時期に現場で 1 回採取したものである。基礎性状および有害成分は、昭和 48 年環境庁告示第 14 号に従い分析した。溶出試験は、昭和 48 年環境庁告示第 13 号により行った。

5. 2　結果

5. 2. 1　電気分解による回収リン資源

電解析出物の組成を表5-1に示す。肥料取締法での基準値に比して、各重金属の含有量は低く、電解析出物の肥料利用の可能性が示された。

析出物では、窒素、カリウムに比して、リンの含有量が高いことが明らかとなった。また、リンについては、ほとんどが緩効性のク溶性リンとして存在していることが分かった。リン肥料として利用されている熔成リン肥および腐植酸リン肥は、ク溶性リンをそれぞれ20%および15%含有しており[40]、これら既存のリン肥料と比してク溶性リン含有量はやや少ないものの、消化脱離液から電解により回収したリンについては、ク溶性リン供給のためのリン資材としての利用可能性が考えられる。

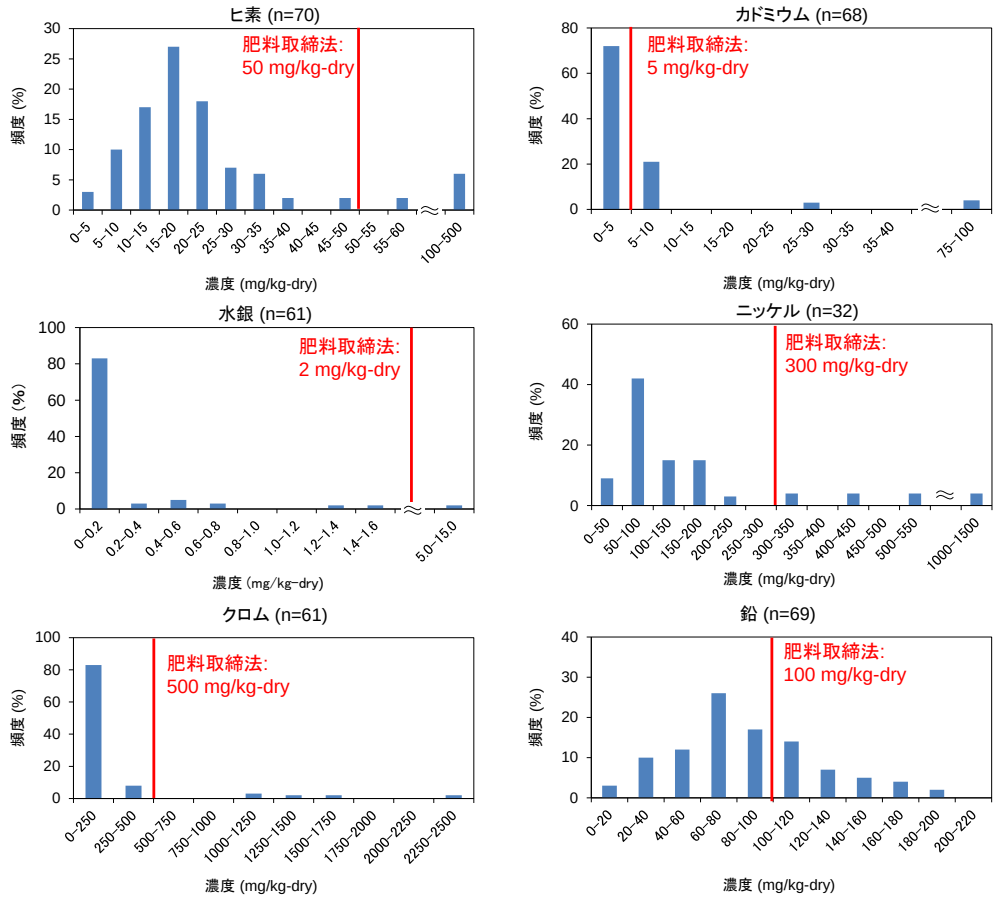


図 5-1　焼却灰におけるヒ素、カドミウム、水銀、ニッケル、クロムおよび鉛の含有量の分布

表5-1　電解析出物の組成

対象物質	電解析出物 (%dry)	肥料取締法 基準値 (%dry)
ヒ素	0.000074	0.005
カドミウム	<0.00005	0.0005
水銀	<0.0002	0.0002
ニッケル	0.00029	0.03
クロム	<0.00025	0.05
鉛	0.00018	0.01
全リン	12.6	–
水溶性リン	0.167	–
ク溶性リン	11.9	–
全窒素	1.31	–
全カリウム	0.115	–

5. 2. 2　焼却灰

焼却灰におけるヒ素、カドミウム、水銀、ニッケル、クロムおよび鉛の含有量の分布を図5-1に示す。ヒ素、カドミウム、水銀、ニッケル、クロムおよび鉛について、それぞれ92、72、98、84、91および68%の下水処理場の焼却灰について、肥料取締法での基準値より低い含有量であり、焼却灰中の重金属含有量は、概ね肥料取締法を満たしていることを明らかにした。

焼却灰には、緩効性のク溶性リンが含有されている一方で、速効性の水溶性リンは殆ど含まれていないため、焼却灰と過燐酸石灰を混合して用いることで肥料効果が得られることが報告されており [40]、焼却灰をク溶性リン供給のためのリン資材とした上で、水溶性リンを含むリン資材との混合利用が推奨された。

5. 2. 3　嫌気性消化液

肥料としての基礎性状分析結果を表 5-2 に示す。%wet 単位で表示している項目については、濃縮した影響で高い値が示されている。%dry 単位で表示している項目についてはそれほど大きな差が無かった。特に有機物割合や高位発熱量はほとんど同じであり、濃縮した基質を嫌気性消化した場合でも、基礎的な性状への影響は少ないことが示されている。

肥料としての有害成分分析結果を表 5-3 に示す。一部の項目では濃縮した基質を嫌気性消化することにより高い値で検出されていた。1、2-ジクロロエタンやシアン化合物など 24 項目を測定した溶出試験でも、同様の傾向が見られた。混合汚泥の濃縮操作を行う際に、固形性成分が濃縮されるのに対して、溶解性成分は濃縮されないので、各物質の存在状態によって濃縮効率

表 5-2　肥料としての基礎性状分析

		反応器1	処理場D
水分	%wet	94.7	98.7
窒素全量	%wet	0.637	0.197
リン酸全量	%wet	0.277	0.155
カリウム全量(加里全量)	%wet	0.025	0.018
カルシウム全量(石灰全量)	%wet	0.103	0.034
亜鉛全量	%wet	0.0044	0.0006
銅全量	%wet	0.0030	0.0007
炭素窒素比	-	7.2	6.8
灰分	%dry	22.4	24.1
pH	-	8.0	8.1
電気伝導率	mS/cm	11.9	6.5
アンモニア性窒素	%wet	0.283	0.108
硝酸性窒素	%wet	0.001未満	0.001未満
マグネシウム全量(苦土全量)	%dry	0.729	1.28
有機物	%dry	77.6	75.9
油分	%dry	0.33	0.12
高位発熱量	KJ/kg	17,900	17,900

表 5-3　肥料としての有害成分分析

		反応器1	処理場A	基準値
ヒ素全量	%dry	0.00070	0.00067	0.005
カドミウム全量	%dry	0.00012	0.00013	0.0005
水銀全量	%dry	0.0000992	0.000108	0.0002
ニッケル	%dry	0.0016	0.0005未満	0.03
クロム全量	%dry	0.0146	0.0005未満	0.05
鉛全量	%dry	0.0032	0.0023	0.01

は一定でない。ただし、いずれも基準値未満であり、高濃度化した場合でも、肥料としての活用に特に問題はないことが確認できた。

5. 3 まとめ

本章では、電解により消化脱離液から回収したリン資源、焼却灰、ならびに嫌気性消化液を対象として、肥料利用における安全性評価、ならびに回収資源の利用方法の検討を行った。肥料取締法に比して、電解法による回収リン資源、焼却灰および嫌気性消化液中の重金属濃度は基準値以下であり、肥料利用の可能性が示された。また、回収リン資源および焼却灰については、ク溶性リン供給のためのリン資材としての利用可能性が考えられた。

6. まとめ

本研究では、まず、下水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脱離液および濃縮分離液からの電解によるリン回収技術の検討を行った。次に、下水処理水を用いた土着藻類培養技術の開発およびエネルギー利用方法の検討を行った。さらに、全国の下水処理場での焼却灰に含まるリン含有特性を整理した上で、他のリン資源も含め、安全性評価を行った。得られた成果を以下に記す。

1) 白金コーティングチタン電極による電解により、リンがヒドロキシアパタイトの形で回収されることが分かった。また、実消化脱離液中溶存態リンについて、電極法によりリン回収率 41%を達成した。電解により発生する気体は消化脱離液に元々含まれていた懸濁態と電極から剥離した析出物を分離し、結果として、電極での析出物を、リン含有率 160 mg-P/g の沈殿物として回収できることを示した。

2) 藻類の株や栄養塩等を外部から添加、供給することなく、処理水のみを用いた培養により藻類が増殖することを明らかとし、また、概ね緑藻が優占することが分かった。HRT や CO_2 添加といった培養操作条件の変化が土着藻類培養特性に与える影響を踏まえた上で、屋外連続培養において、HRT4 日、CO_2 添加 (培養水 pH を 7.7-8.0 に維持)の操作条件下で、SS 培養量 12.9 g/m^2/day、高位発熱量 16.4 kJ/g を達成し、得られたバイオマスの嫌気性消化によるエネルギー化が推奨された。さらに、藻類培養・エネルギー生産システムの下水処理場への普及支援を目的とした藻類増殖を表現する数理モデルを構築し、下水処理場へのモデルの適用手法を示した。

3) 全国約 85 の処理場を対象としたアンケート調査の結果、上記処理場の下水汚泥焼却灰中のリン含有量 (P_2O_5 換算値)は 19.9%-dry であった。

4) 下水焼却灰に含まれる重金属含有量は、概ね肥料取締法を満たしていることを明らかにした。また、電解により消化脱離液から回収したリン資源および嫌気性消化液についても、肥料取締法を満たしていることを示し、これら3つのリン資源の肥料利用の可能性を示した。また、電解により回収したリン資源および焼却灰については、ク溶性リン供給のためのリン資材としての利用可能性が考えられた。

参考文献

1) 佐藤隼、佐藤俊秀、仲川祐司、林志洋、松本頌、城山英明、松尾真紀子、鎗目雅: 国内下水道からのリサイクル・リン普及の課題、社会技術研究論文集、Vol. 11、pp.108-118、2014.

2) 田中恒夫、小池範幸、佐藤孝志、新井忠男、平靖之: 電解法による畜産排水からのリン酸塩の回収、水環境学会誌、Vol. 32 (2)、pp.79-85、2009.

3) American Public Health Association Publication (APHA): Standard methods for the examination of water and wastewater, nineteenth ed. Washington, DC, USA, 2005.

4) 宮本彰彦、中林昭、鈴木晴彦、澄田康光、井関正博、

安田昌司: 鉄電解を用いた下水汚泥脱離液からのりん回収、第 43 回下水道研究発表会講演集、pp.25-27、2006.
5) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond, Water Research, Vol.45, pp.6637-6649, 2011.
6) S. Chinnasmy, A. Bhatnagar, R.W. Hunt, K.C. Das: Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biodiesel application, Bioresource Technology, Vol.101, pp.3097-3105, 2010.
7) S. Cho, T.T. Luong, D. Lee, Y.K. Oh. T. Lee: Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, Bioresource Technology. Vol.102, pp.8639-8645, 2011.
8) E.B. Sydney, T.E. da Silva, A. Tokarski, A.C. Novak, J.C. de Carvalho, A.L. Woiciecohwski, C. Larroche, C.R. Soccol: Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. Applied Energy. Vol.88 (10), pp.3291–3294, 2011.
9) J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton: Wastewater treatment high rate algal ponds for biodiesel production. Bioresource Technology. Vol.102, pp.35-42, 2011.
10) A. Shilton: Pond treatment technology, IWA publishing, 2006.
11) 宮本豊尚、岡本誠一郎：藻類を用いたメタン発酵の可能性検討、第 47 回下水道研究発表会講演集、pp.453-455、2010.
12) 日本下水道協会: 下水道施設計画・設計指針と解説　後編 2009 年版、2009.
13) 日本下水道協会: 下水試験方法 2012 年、2012.
14) 建設省技術管理業務連絡会水質部会: 河川水質試験方法 (案)、1997.
15) 日本工業標準調査会: 石炭類及びコークス類―ボンブ熱量計による総発熱量の測定方法及び真発熱量の計算方法、JIS M 8814、2003.
16) W. Zhou, Y. Li, M. Min, B. Hu, P. Chen, R. Ruan: Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. Bioresource Technology. Vol.102, pp.6909-6919, 2011.
17) H. Tsuno, T. Hidaka, S.E. Jorgensen: 2-Layer Model Development, Planning and Management of Lakes and Re-servoirs, Models for Eutrophication Management, PAMOLARE Training Package Version 1.0, UNEP Inter-national Environmental Technology Centre (UNEP-DTIE-IETC) and International Lake Environment Committee (ILEC). pp.50-73. 2001.
18) D.M. Di Toro, D.J. O'Connor, R.V. Thomann: A dynamic model for the phytoplankton population in the Sacramento San Joaquin Delta, Advanced Chemistry Ser., Vol.106, pp.131-180, 1971.
19) T. Andersen, D.O. Hessen: Carbon, nitrogen and phosphorus content of freshwater zooplankton, Limnology and Oceanography. Vol.36 (4), pp.807-814, 1991.
20) S. Markager, W.F. Vincent: Spectral light attenuation and absorption of UV and blue light in natural waters. Limnology and Oceanography. Vol.45 (3), pp.642-650, 2000.
21) R.J. Geider, H.L. macIntyre, T.M. Kana: A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. Limnology and Oceanography. Vol.43 (4), 679-694, 1998.
22) 津野洋、浦邊真郎、吉川克彦、草野文嗣: 数理モデルによるエアリフト循環の余呉湖水質改善効果の予知に関する研究、水環境学会誌, Vol.19 (3), pp.228-235, 1996.
23) 奥川光治、宗宮功: 数理モデルによる富栄養化のシミュレーション解析、土木学会論文報告集、Vol.337、pp.119-128、1983.
24) J.T.O. Kirk: Light and photosynthesis in aquatic ecosystems, Cambridge University Press., U.K., 1983.
25) E. Evervecq, V. Gosselain, L. Viroux, J.P. Descy, Potamon: A dynamic model for predicting phytoplankton composition and biomass in lowland rivers. Water Research. Vol.35 (4), pp.901-912, 2001.
26) J.B.K. Park, R.J. Craggs: Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. Water Science & Technology. Vol.61, pp.633-639, 2010.
27) 彼谷邦光: 微細藻類オイルの化学、日本微生物資源学会誌、Vol.26、pp.1-10、2010.
28) S. Mandal, N. Mallick: Microalga Scenedesmus obliquus as a potential sourcefor biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.84, pp.281-291, 2009.
29) L. Gouveia, A.C. Oliveira: Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol.36, pp.269–274, 2009.
30) 気象庁、過去の気象データ検索、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/

31) M.A. Gates, A. Rogerson, J. Berger, Dry to wet weight biomass conversion constant for Tetrahymena elliotti (Ciliophora, Protozoa). Oecologia. Vol.55, pp.145-1448. 1982.
32) B.S.M. Sturm, S.L. Lamer: An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. Applied Energy. Vol.88 (10), pp.3499-3506, 2011.
33) T. Hidaka, K. Inoue, Y. Suzuki, J. Tsumori: Growth and anaerobic digestion characteristics of microalgae cultivated using various types of sewage. Bioresource Technology. Vol.170, pp.83-39, 2014.
34) A.C. Redfield, B.H. Ketchum, F.A. Richards: The influence of organisms on the composition of seawater. Interscience, New York, 1963.
35) J.B.K. Park, R.J. Craggs: Nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds with carbon dioxide addition. Water Science & Technology. Vol.63 (8), pp.1758-1764, 2011.
36) N. Powell, A. Shilton, Y. Chisti, S. Pratt: Towards a luxury uptake process via microalgae - Defining the polyphosphate dynamics. Water Research. Vol.43, pp.4207-4213, 2009.
37) 独立行政法人石油天然ガス・金属鉱物資源機構: 鉱物資源マテリアルフロー2011 45.リン (P)、pp.405-410、2012.
38) 公益社団法人日本下水道協会：下水道統計 (平成23年度版)CD-ROM付 (第68号)、2013.
39) 農林水産省農業環境技術研究所: 肥料分析法、1992.
40) 城秀信、白石由美子: 下水汚泥焼却灰のリン酸肥料代替効果、熊本県農業研究センター研究報告、Vol.20、pp.6-14、2013.

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

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 23～平 27
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、岡安祐司

【要旨】
下水汚泥の有効利用方策として脱水汚泥を含む集約型混合嫌気性消化を想定し、設計・操作因子の検討に資する基礎的知見の収集を目的に、異なる下水処理場の各種下水汚泥を対象とした嫌気性消化実験を行った。標準活性汚泥法（循環式硝化脱窒法等の場合も含めて）の混合汚泥および脱水汚泥については　0.4～0.5NL/ gVS-投入程度、オキシデーションディッチ法の脱水汚泥については 0.1～0.2NL/ gVS-投入 程度のバイオガス転換率が得られた。投入汚泥の高濃度化で懸念されるアンモニア阻害や撹拌影響に対して、投入汚泥条件から消化汚泥のアンモニア性窒素濃度および粘度を推測する知見を整理した。また、集約型高濃度嫌気性消化手法を下水処理場へ導入した場合のケーススタディを実施したところ、約 30%の GHG 排出抑制効果が得られる結果となった。
キーワード：脱水汚泥、中温嫌気性消化、アンモニア、粘度

1. 省エネルギー・創エネルギー型処理システムの開発

1.1. はじめに

下水汚泥のリサイクル手法は、1）建築資材利用、 2）肥料利用、3）エネルギー化利用の 3 点に大別される。現在、下水汚泥のリサイクル利用は、セメント化等の建築資材利用および緑農地利用が主体で、消化ガスや汚泥燃料としてエネルギー化利用されている割合は、発生する下水汚泥中の有機分総量の 2 割未満に留まっている[1)]。再生可能エネルギーの利用拡大や技術開発は「エネルギー基本計画」（平成 26 年 4 月）に謳われており、下水汚泥のエネルギー化利用の促進が重要である。こうした社会的背景の下、「下水汚泥エネルギー化技術ガイドライン-改訂版-」が平成 26 年度末に国土交通省から公表されている[2)]。国土交通省の下水道革新的技術実証事業（B-DASH プロジェクト）においても、下水汚泥のエネルギー化利用に関する実証データが集積しつつある。我が国の下水処理場約 2,000 カ所のうち、嫌気性消化を行っている処理場数 300 カ所程度は近年大きな変化がなく、特に小規模施設での採用例は少ない[3)]。新下水道ビジョン[4)] では「水・資源・エネルギーの集約・自立・供給拠点化」として下水汚泥に加えて浄化槽汚泥や生ごみ等の他のバイオマスを下水処理場に集約することが将来に向けた課題とされており、下水汚泥エネルギー化率が低水準に留まっている原因として、規模が小さくスケールメリットが働かない処理場が多くあること等が挙げられている。

小規模施設への展開を促進するためには，拠点となる処理場に、周辺の汚水処理施設で発生する汚泥を含めて、地域の有機性廃棄物を集約することが考えられる[5)]。再生可能エネルギーの固定価格買取制度の影響もあり、下水処理場への消化ガス発電の導入が進みつつあり、小規模施設でも、汚泥を集約して消化ガス発生量を増加させることで、消化ガス発電の効率が向上することにより、一層のエネルギー利用が期待される。集約化において、汚泥の運搬は、脱水等により含水率を減らして体積を減らすことで、輸送を効率的に行うのが望ましい。

嫌気性消化における投入汚泥の高濃度化については、機械濃縮機の導入により、混合汚泥を TS 5% 程度に濃縮して嫌気性消化することで、消化ガス発生量増加および加温用燃料の削減を実現した現場での事例があり[6)]、高濃度化は加温エネルギーの削減の観点からも消化槽運転の効率化につながる。現状として、我が国の現場での下水汚泥の高濃度消化は TS 5% 程度までである[7)]。

一方、これまでの研究では、都市部の下水処理場の高濃度濃縮混合汚泥や脱水汚泥を対象とした連続式中温嫌気性消化実験を行いながら脱水汚泥の嫌気性消化の可能性を調査しており、投入基質の TS 10% 以下であれば，通常の場合と同程度の負荷率で同程度のメタン転換が可能であることを、アンモニア性窒素や粘度への影響とあわせて示している[8,9,10,11,12)]。さらに、より小規模向け水処理方式であるオキシデーションディッチ（OD）法からの脱水汚泥および有機性廃棄物の混合消化の研究も報告されつつある[13,14,15)]。石川県中能登町での事業化が進められており[16)]、従来嫌気性消化には不向きとされてきた

表-1 下水汚泥を採取した下水処理場の条件

処理場	排除方式	現有施設能力 (千m^3/d)	主要処理方式	BOD-MLSS負荷率 (kgBOD/(kgMLSS･d))	SRT(d)	脱水対象汚泥	脱水機
処理場A	分流一部合流	50～100	循環式硝化脱窒法	0.07	16.7	混合汚泥	遠心分離 ロータリープレス
処理場B	合流一部分流	10～50	標準活性汚泥法	0.22	5.8	混合汚泥	スクリュープレス
処理場C	分流	5～10	標準活性汚泥法	0.08*	16.9	混合汚泥	ベルトプレス
処理場D	分流一部合流	100～200	ステップ流入式多段硝化脱窒法	0.10	13.0	混合汚泥	真空ろ過
処理場E	分流	10～50	標準活性汚泥法	0.18	8.7	余剰汚泥	遠心分離
処理場F	分流	1～5	オキシデーションディッチ法	0.04	63	余剰汚泥	ベルトプレス
処理場G	分流	1～5	オキシデーションディッチ法	0.01	71**	余剰汚泥	スクリュープレス
処理場H	分流	1～5	オキシデーションディッチ法	0.03	42**	余剰汚泥	スクリュープレス
処理場X	分流	5～10	標準活性汚泥法	0.15	9	-	-

*曝気槽流入COD濃度および流入BOD/COD=1.2から換算　**汚泥日令(d)

表-2 実験に用いた下水汚泥の性状

	TS(%)	VS(%)	TCODcr(g/kg)	C(%dry)	H(%dry)	N(%dry)	O(%dry)
処理場A(脱水汚泥)	18.5	14.9	252	39.5	6.5	4.0	34.7
処理場B(脱水汚泥)	22.2	18.5	313	42.3	6.5	4.9	32.1
処理場B(混合汚泥)	2.9	2.0	35	36.6	5.5	4.1	26.9
処理場C(脱水汚泥)	21.6	19.1	306	44.7	6.8	4.7	33.4
処理場C(混合汚泥)	2.3	1.9	35	44.3	6.5	4.6	30.1
処理場D(脱水汚泥)	18.8	11.6	209	29.8	5.3	3.7	27.2
処理場D(混合汚泥)	3.9	3.1	55	41.5	6.3	5.8	27.1
処理場E(脱水汚泥)	17.3	14.7	202	40.2	6.8	7.6	29.5
処理場E(余剰汚泥)	1.8	1.5	24	41.7	6.5	8.1	24.8
処理場F(脱水汚泥)	13.4	11.7	184	44.4	7.1	8.5	30.4
処理場G(脱水汚泥)	15.8	13.3	198	42.2	6.6	7.7	30.1

OD 法の脱水汚泥も含めて、小規模施設への普及の機運が高まりつつある。しかしながら、下水脱水汚泥を対象とした嫌気性消化特性についての報告例は限られている。肥料取締法に基づく消化汚泥の元素濃度分析例は報告されている[11,14]ものの、脱水汚泥を含む嫌気性消化過程における元素の挙動についてもほとんど報告されていない。脱水汚泥性状は下水処理場の種々の条件により変化し、現場への導入検討を行うためには、脱水汚泥性状から嫌気性消化特性を予測するための一般化された知見が必要である。さらに、脱水汚泥を含む集約混合嫌気性消化を行う場合には、投入基質条件が複雑になり、これまで蓄積した現場の経験やノウハウでは対応できない懸念があり、適切な維持管理手法が求められている。

そこで本研究では、脱水汚泥の中温嫌気性消化において、汚泥性状が消化特性や消化汚泥性状に及ぼす影響を調査することを目的として、条件が異なる下水処理場 7 カ所で採取した汚泥を対象とした嫌気性消化実験を行った。

1.2. 方法

(1) 用いた脱水汚泥

本研究で用いた下水汚泥を採取した下水処理場の条件を、表-1 にまとめて示す。標準活性汚泥法および循環式硝化脱窒法等（以下、標準法とする）、ならびに OD 法の下水処理場 7 カ所の汚泥を実験に用いた。それに加えて一部の考察では、処理場 H の脱水汚泥を用いた戸苅ほか[13,14]の室内実験結果、ならびに処理場 A および処理場 X の混合汚泥を濃縮して用いた連続嫌気性消化実験の結果[10,11]も引用して、比較した。ここでは下水道統計[7]に記載されている内容、もしくは汚泥採取時期の現場での維持管理データに基づく代表的な値をまとめた。水処理系の BOD-MLSS 負荷率および固形物滞留時間（SRT）も示している。汚泥脱水時には、処理場 A および処理場 E でポリ硫酸第二鉄が、処理場 B で高分子凝集剤およびポリ硫酸第二鉄が、処理場 D で塩化第二鉄および消石灰が、その他の処理場では高分子凝集剤が用いられていた。混合汚泥は濃縮後の最初沈殿池生汚泥および余剰汚泥の混合物であり、混合汚泥を対象とした処理場 A～D において、濃縮前の汚泥量として最初沈殿池生汚泥がおおむね 4～5 割程度を占めている[7]。

汚泥の平均的な性状は、表-2 にまとめて示すとおりである。標準法の混合汚泥由来の脱水汚泥の TS は 20%前後であるのに対して、標準法および OD 法からの余剰汚泥に由来する脱水汚泥の TS は 13～17% 程度とやや低かった。脱水時に消石灰を添加している処理場 D の脱水汚泥の VS/TS 比は 0.62、それ以外の汚泥につい

ては VS/ TS 比が 0.85 程度で処理場毎に大きな差は見られなかった。CODCr/ VS 比は 1.6 程度で、処理場毎に大きな差は見られなかった。余剰汚泥のみの場合 N 比が高い傾向が見られ、処理場 D の脱水汚泥については消石灰添加の影響で CHNO の比率が低めであった。それら以外について、CHNO の含有率に大きな差は見られなかった。

(2) 連続式実験

R9 および R10 以外は有効容積 1.5 L の完全混合嫌気性消化反応器 (BioReactor Simulator, Bioprocess Control) を、R9 および R10 は同等の有効容積 2.0 L の反応器を用いて、中温 (35℃) 条件下にて下水汚泥を基質とした連続式実験を行った (表-3)。まず処理場 A, 処理場 F および処理場 G の汚泥を用いた実験 (R1・2・11～14) を同時期に行い、種汚泥には処理場 A の脱水汚泥を TS3%程度に希釈して中温条件下で培養した消化汚泥を用いた。そして、実験終了時の消化汚泥を種汚泥として、処理場 B、処理場 C および処理場 D の汚泥を用いた実験 (R3～8) を行い、約 2 ヶ月後に R3～8 の消化汚泥の混合物を種汚泥として処理場 E の汚泥を用いた実験 (R9・10) を開始した。処理場 E の脱水汚泥 (R9) を除いて、水理学的滞留時間 (HRT) の 3 倍以上の期間で連続式実験を行った。脱水汚泥については、投入汚泥の TS10% 程度の系を設定するとともに、より高濃度の系もしくは低濃度の系も一部で設定した。投入汚泥の TS10% は、これまでの研究で安定した嫌気性消化が可能であると示されている濃度である[12,13] ことから、処理場間の比較については主として投入汚泥の TS10% の結果を用いた。処理場 B、処理場 C および処理場 D については脱水前の混合汚泥を、処理場 E については脱水前の余剰汚泥を投入する系を設定した。基質投入は週 5 回 (平日) 行い、その際には同量程度の消化汚泥を引き抜いた。脱水汚泥の希釈には沸騰後冷ました水道水を用いた。脱水汚泥の場合は投入基質が通常よりも高濃度であることから、HRT は TS 5% の場合を除いて一般的な設計値である 20～30 d[17] より長い。実験前に調査した平均的な TS 濃度に基づいて希釈率および汚泥投入量を設定したので、実際の有機物 (VS) 負荷率および HRT は処理場毎に多少異なるものの、維持管理指針[18] で示されている 1～3 kgVS/ (m^3・d) の範囲内であり HRT は長めであることから、バイオガスへ の転換反応はおおむね完了し比較可能であると判断した。現場では負荷率範囲の最大値近くで運転するとは少なく、今回の設定値は、現場での一般的な実際の値[19] よりはやや高めである。脱水前の汚泥については、HRT を 20 d 以上とするために, 有機物負荷率はやや低めの設定となった。実験中の HRT は、R12 および R14 で投入 TS 設定値を変化させた場合を除いて、実際の投入汚泥性状の変化に関わらず変化させなかった。

表-3 連続式実験反応器の運転条件

反応器	処理場	汚泥種類	投入TS 設定値(%)	HRT (d)	有機物負荷率 (kgVS/(m^3・d))	運転日数 (d)
R1	処理場A	脱水汚泥	10	38.9	2.1±0.2	279
R2	処理場A	脱水汚泥	15	58.3	2.1±0.2	279
R3	処理場B	脱水汚泥	10	31.3	2.6±0.2	161
R4	処理場B	混合汚泥	2.9*	21.0	1.0±0.2	161
R5	処理場C	脱水汚泥	10	38.2	2.7±0.2	161
R6	処理場C	混合汚泥	2.3*	21.0	0.9±0.1	161
R7	処理場D	脱水汚泥	10	36.8	1.7±0.1	147
R8	処理場D	混合汚泥	3.9*	21.0	1.5±0.1	147
R9	処理場E	脱水汚泥	10	50.9	1.6±0.0	106
R10	処理場E	余剰汚泥	1.8*	28.0	0.5±0.1	106
R11	処理場F	脱水汚泥	10	53.8	1.7±0.2	279
R12	処理場F	脱水汚泥	5～13.4*	26.9～70.0	1.7±0.2	279
R13	処理場G	脱水汚泥	10	38.9	1.9±0.1	279
R14	処理場G	脱水汚泥	5～15.8*	21.9～70.0	1.9±0.1	279

*採取した汚泥をそのまま濃度調整せずに投入、値は実験期間中の平均値

(3) 回分式実験

標準法の混合汚泥および脱水汚泥については、回分式嫌気性消化実験による調査も行った。用いた装置や実験方法等は、日高ほか[20] と同様である。設定条件は表-4 に示すとおりであり、中温 (35℃) 条件下にて 28 日間、嫌気性反応器 (有効容量 0.5 L) に処理場 A の脱水汚泥を TS3%程度に希釈して培養した。消化汚泥および基質を投入し、窒素ガスでパージした後、回分式実験を行った。実験の前後で汚泥や基質の性状を分析すると共に、実験中メタンガス生成量の経時変化を計測した。発生したバイオガスは、強アルカリ溶液を通過させることで二酸化炭素を除去し、メタンガスの生成量として計測した。消化汚泥については、回分式実験開始の 1 週間ほど前から、基質投入を停止した状態で温度条件のみを維持し、ブランク系のガス発生量をなるべく抑えるようにした。実験開始時の消化汚泥の VS は 0.47%, pH は 7.3 であった。消化汚泥量は 0.4 L とし、基質投入量は用いた消化汚泥の VS 量に対して 20% に設定し、最終的に 0.5 L になるように沸騰後冷ました水道水を添加した。基質を投入しないブランク系 2 系列、グルコース添加系 1 系列、処理場 B、C および D の脱水汚泥および混合汚泥についてそれぞれ 2 系列の、合計 15 系列を設定した。グルコース添加系は、メタン発酵に関わる菌群の活性および COD 収支に基づく実験精度を把握するために用いた。

表-4　回分式実験の設定条件

番号	投入基質	投入基質の消化汚泥に対する割合（VS基準）
回分1	ブランク系	–
回分2	ブランク系	–
回分3	グルコース系	20%
回分4	処理場B（脱水汚泥）	20%
回分5	処理場B（脱水汚泥）	20%
回分6	処理場C（脱水汚泥）	20%
回分7	処理場C（脱水汚泥）	20%
回分8	処理場D（脱水汚泥）	20%
回分9	処理場D（脱水汚泥）	20%
回分10	処理場B（混合汚泥）	20%
回分11	処理場B（混合汚泥）	20%
回分12	処理場C（混合汚泥）	20%
回分13	処理場C（混合汚泥）	20%
回分14	処理場D（混合汚泥）	20%
回分15	処理場D（混合汚泥）	20%

（4）分析方法

pH、TS、VS、CODCr、アンモニア性窒素、水溶性揮発性脂肪酸（VFAs）、粘度、発生バイオガス量、ならびに元素組成の分析を、基本的に下水試験方法（2012 年）に従って行った。CODCr の分析は吸光光度計（DR3900, Hach）および CODCr 試薬（HR, Hach）を用いた。アンモニア性窒素の分析には、自動比色分析装置（QuAAtro2-HR, ビーエルテック）を用いた。粘度の分析には、粘度計（VT-04, リオン）を用い、20℃にて測定した。発生バイオガス量（回分式実験ではメタンガス量）の測定は，10 NmL 程度単位の水上置換方式のガス流量計（BioReactor Simulator（回分式実験では AMPTS II）, Bioprocess Control）を用いた。ただし R9 および R10 については、湿式ガスメータ（W-NK-0.5 型, シナガワ）を用いた。CHNO の分析は、元素分析計（FALSH EA1112, アムコ；Vario EL-III, エレメンタール）を用いた。CHNO 以外の元素分析は ICP-AES（Optima8000, パーキンエルマー；SPS5000, セイコーインスツルメンツ）および ICP-MS（X series, Thermo Fisher；7700x, Agilent Technologies）を用いた。ICP 分析における固形性と溶解性の分画は，5C ろ紙にて行った。

1.3. 結果および考察

（1）嫌気性消化処理特性

連続式実験でのバイオガス転換率を、平均値および標準偏差として図-1 に示す。脱水汚泥については、投入 TS 濃度を 10%に設定した反応器の結果のみを示している。処理場 H の脱水汚泥については、戸苅ほか[13] の実験結果を引用している。ここでは、余剰汚泥の分解性に影響を及ぼすと考えられる水処理系での BOD-MLSS 負荷率で整理した。標準法の混合汚泥および脱水汚泥については 0.4～0.5 NL/ gVS-投入程度の、OD 法の脱水汚泥については 0.1～0.2 NL/ gVS-投入程度のバイオガス転換率であった。投入 VS あたりのバイオガス発生量は、標準法の混合汚泥の場合一般的に 0.5～0.6 NL/ gVS- 投入とされている[18]。この値と比べると、標準法の混合汚泥では同程度、標準法の脱水汚泥ではやや低め、OD 法の脱水汚泥ではかなり低めであった。標準法では、処理場 C を除いて脱水汚泥よりも脱水前の混合汚泥でバイオガス転換率が高く、脱水操作により VS あたりのバイオガス生成量はやや低下する可能性が示された。脱水工程を経て希釈していることから、脱水ろ液に含まれる有機酸等の易分解性有機物分が除かれることも原因と考えられる。水処理系の BOD-MLSS 負荷率が低い場合、活性汚泥の自己分解が進み余剰汚泥からのバイオマス転換率は低下すると考えられ、BOD-MLSS 負荷率が最も高かった処理場B で最も高いバイオガス転換率が得られた。Bolzonella ほか[21] は余剰汚泥の中温嫌気性消化を行い、水処理系の SRT45～8 d（負荷率 0.02～0.3 kgCOD/（kgMLVSS・d））に対して 0.07～0.18 L/ gVS-投入のバイオガス転換率を報告している。バイオガス転換率は本研究の余剰汚泥と同程度であり、SRT が短く水処理系の負荷率が高いほどバイオガス転換率が高い傾向を示している。ただし混合汚泥の場合は最初沈殿池からの生汚泥も含まれるためその影響は限られ、バイオガス転換率への影響はそれほど顕著ではなかった。

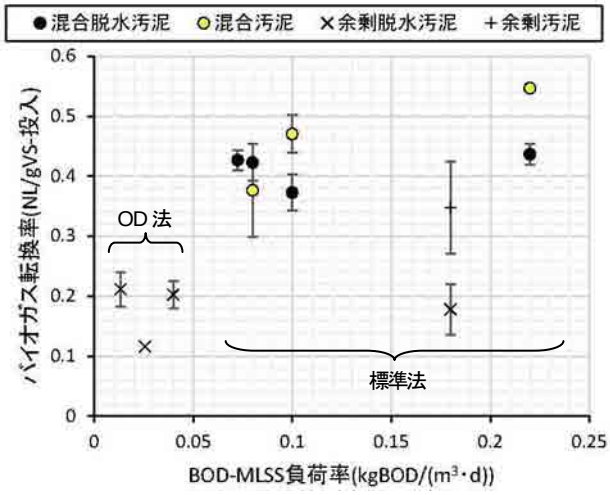


図-1　連続式実験でのバイオガス転換率と水処理系での BOD-MLSS 負荷率の関係

連続式実験での TS 分解率を、図-2 に示す。脱水汚泥については、投入 TS 濃度を 10%に設定した反応器の結果のみを示している。処理場 X の混合汚泥について

は, Hidaka ほか[11] の実験結果を引用している。TS 分解率は、投入汚泥 TS 濃度と消化汚泥 TS 濃度の差を投入汚泥 TS 濃度で除して算出した。全体として、標準法の場合は 0.4～0.5 程度、OD 法の場合は 0.2～0.3 程度の分解率で、同じ処理場の場合、処理場 C を除いて脱水前の汚泥で、脱水汚泥よりも高い分解率が得られた。OD 法の場合は分解率が低く、投入汚泥が従来よりも高濃度であることとあわせて、消化汚泥の TS 濃度が高まり、撹拌等への影響が懸念される。

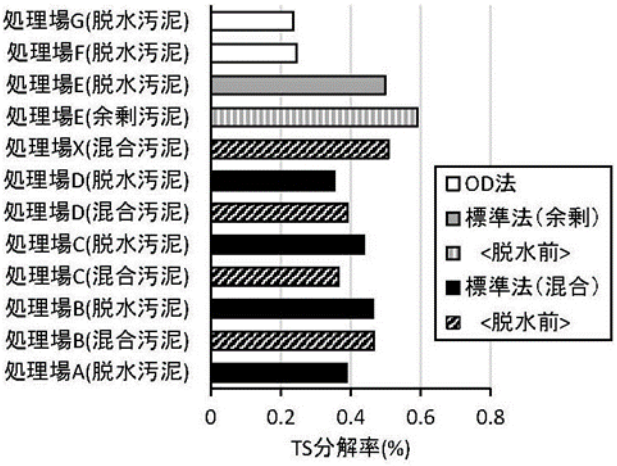


図-2　連続式実験での TS 分解率

回分式実験では、ブランク系分を差し引いたメタンガスの生成が、28 日間の実験終了時におおむね停止していた。実験終了時の pH は 7.6～7.9 程度で、メタン生成に異常をきたさない範囲[18] であった。回分式実験での投入基質量（gCOD）に対する生成メタン量（gCOD）として算出した COD ベースメタン転換率を、図-3 に示す。グルコースに対しては、メタン転換率 0.94 が得られ、菌体収率を考慮すると、本実験において COD 収支は適切に把握できていたと判断した。それぞれ同じ条件での実験を 2 系列ずつ 行っており、おおむね同程度の結果が得られている。いずれの処理場でも、混合汚泥および脱水汚泥の場合の転換率は、それぞれ 0.5～0.6 程度および 0.4～0.5 程度で、脱水汚泥の場合は 1 割程度低い傾向が見られた。COD ベースメタン転換率は、既報の下水混合汚泥での値[19] と同程度である。水処理系の BOD-MLSS 負荷率が最も高かった処理場 B で、最も高いメタン転換率が得られた。これらの傾向は、連続式実験での結果と同様であった。回分式実験での最初の 100 時間のメタン生成速度の経時変化を、図-4 に示す。脱水汚泥に比べて混合汚泥の場合は、実験開始後最初の 12～17 時間で生成速度が速かった。実験開始以降、混合汚泥の投入量（gCOD）に対する混合汚泥の生成速度が速かった期間までの累積メタン生成量の差 (gCOD) の割合は、6～8%であった。COD ベースメタン転換率はそれぞれの投入基質に対する割合として算出しており、投入基質の溶解性 COD 量は測定していないので単純に比較はできないも

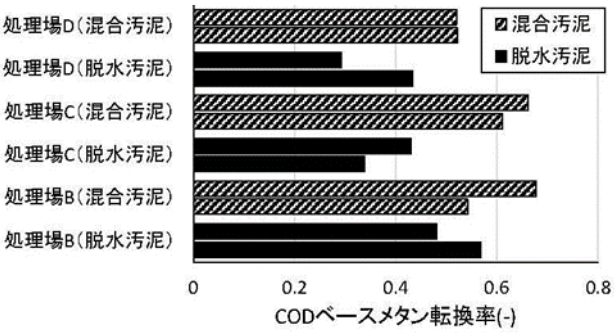


図-3　回分式実験での COD ベースメタン転換率
（それぞれ 2 系列ずつ測定）

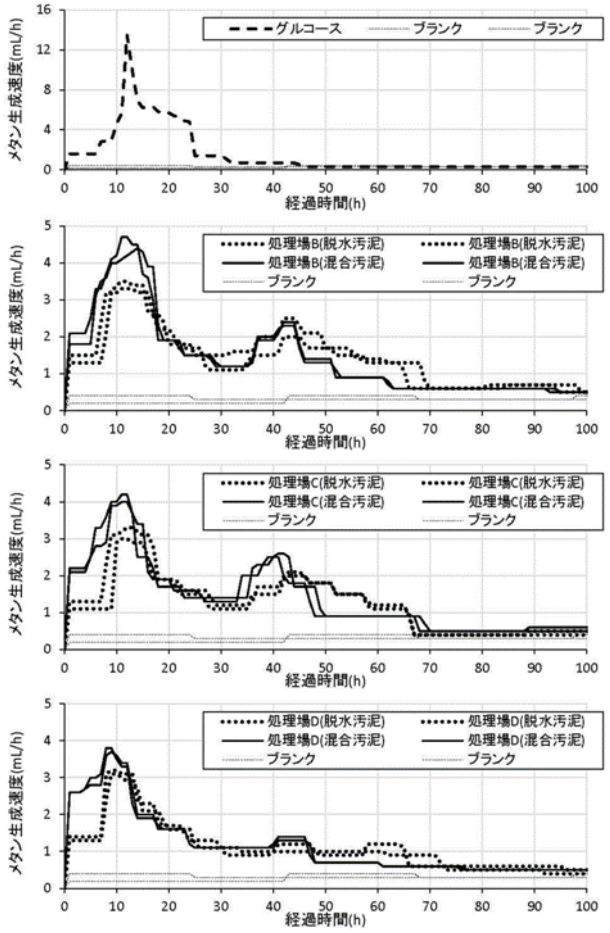


図-4　回分式実験でのメタン生成速度の経時変化

のの、脱水過程で易分解性有機物の一部が除去されることが、メタン転換率低下の原因の一つと考えられた。また 40 時間前後で 2 回目のピークが見られ、これは分解速度が遅めの有機物が寄与していると考えられる。

脱水汚泥のメタン転換率と脱水前の汚泥のメタン転換率の関係を、図-5 に示す。ここでは、処理場 A～E の汚泥の場合の結果を示しており、処理場 A の混合汚泥については日高ほか[20]の実験結果を引用している。本研究で行った回分式実験については、2 回の結果の平均値でまとめている。連続式実験および回分式実験いずれの場合も、脱水汚泥の場合はややメタン転換率が低下することが示されている。投入 TS 10% 程度の中温嫌気性消化実験では限界負荷率 3.2 kgVS/（m^3・d）が提示されており[11]、維持管理指針[18]の範囲内（1～3 kgVS/（m^3・d））での脱水汚泥の嫌気性消化は多少メタン回収率が低下するにしても可能であると考えられる。拠点の下水処理場に脱水汚泥を集約する場合、拠点処理場で生成し長距離運搬の必要のない汚泥については、脱水操作を行わずに嫌気性消化することでメタンガス回収量が向上する。また、投入汚泥の高濃度化は加温に要するエネルギー削減の観点で有用であり、単一の処理場での処理を想定した投入 TS 濃度 8% 程度の高濃度消化法は、従来法よりエネルギー的に高効率であることが報告されている[22]。

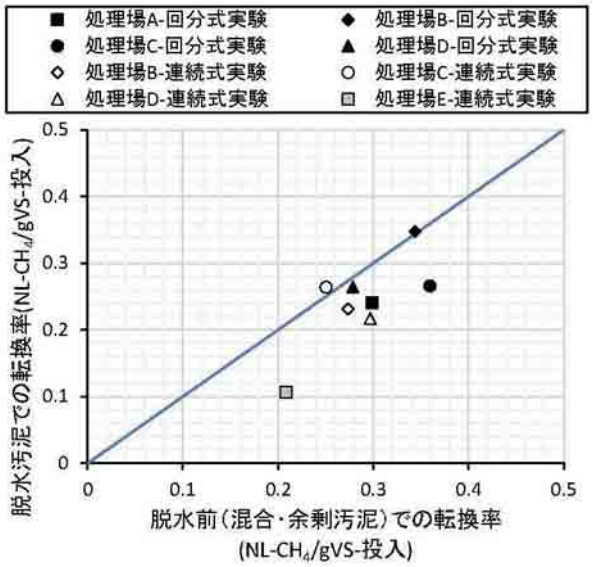
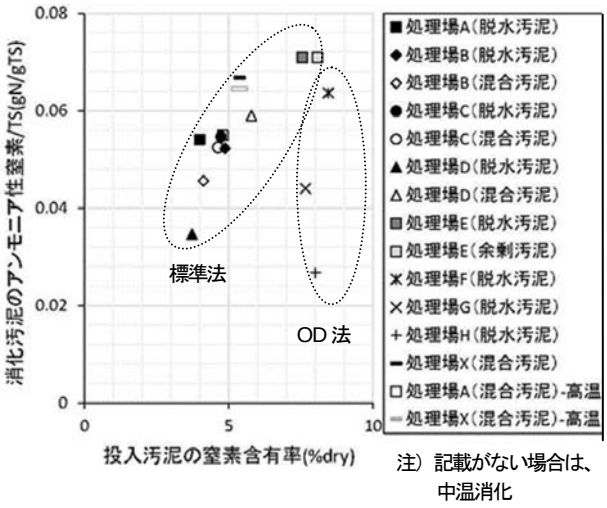


図-5　脱水汚泥と脱水前の汚泥のメタン転換率の関係

(2) アンモニア性窒素濃度への影響

消化汚泥のアンモニア性窒素濃度と TS の関係は、過去の研究例[11,15]と同様に、汚泥毎におおむね比例していた。その傾きとして汚泥毎に算出した消化汚泥中のアンモニア性窒素/ TS 濃度比（gN/ gTS）と投入汚泥の窒素含有率（%dry）の関係を、図-6 に示す。処理場 A の混合汚泥については Wang ほか[10]の実験結果を、処理場 H の脱水汚泥については戸苅ほか[13]の実験結果を、処理場 X の混合汚泥については Hidaka ほか[11]の実験結果を引用しており、高温（55℃）嫌気性消化の場合も含まれる。全体として、投入汚泥の窒素含有率が増加するに従い、アンモニア性窒素/ TS 濃度比は増加する傾向がみられた。標準法については、混合汚泥と脱水汚泥で大きな差が見られなかった。脱水時のろ液中に含まれるアンモニア性窒素濃度の影響は多少あるものの、消化汚泥中のアンモニア性窒素濃度は主に汚泥中に含まれる窒素成分に影響を受けると考えられる。また中温消化および高温消化では、大きな差が見られなかった。ただし、OD 法での脱水汚泥については，投入汚泥の高い窒素含有率に対して消化汚泥のアンモニア性窒素/ TS 濃度比が低かった。これは、OD 法の脱水汚泥は分解率が低いことによるものと考えられる。

標準法の場合は、得られた結果および前述の連続式実験での TS 分解率の結果をあわせることで、投入汚泥条件に対する消化汚泥のアンモニア性窒素濃度がおおむね推測可能である。投入 TS 濃度 15%の場合も含まれる処理場 A を除いて、アンモニア性窒素濃度はほぼ 4,000 mgN/L 以下であった。中温嫌気性消化の場合は、消化汚泥中のアンモニア性窒素濃度 4,000 mgN/L 程度でも安定した処理が可能である[11]。一方、高温嫌気性消化の場合は、アンモニア性窒素の阻害を受けやすく、消化汚泥中のアンモニア性窒素濃度 2,000 mgN/L 以下に維持する



注）記載がない場合は、中温消化

図-6　消化汚泥のアンモニア性窒素濃度比と投入汚泥の窒素含有率の関係

必要がある[9,10]。本研究で得られた知見の範囲では、投入基質 TS10%以下の場合消化汚泥のアンモニア性窒素濃度は 4,000 mgN/L 程度以下と推測され、アンモニアによる阻害影響は問題にならないと考えられる。

(3) 粘度への影響

消化汚泥の粘度と TS の関係を、図-7 に示す。処理場 H の脱水汚泥については戸苅ほか[14]の実験結果を、処理場 X の混合汚泥については Hidaka ほか[11]の実験結果を引用している。OD 法の脱水汚泥の場合、標準法の脱水汚泥の場合と比べて粘度は高く、TS 濃度との関係は処理場によらずおおむね同様であった。特に処理場 G では、撹拌ができない状況になり、その際の粘度は、300 dPa・s を超過していた。標準法については、混合汚泥および脱水汚泥いずれも、粘度と TS の関係は類似していた。Liao・Li[23]は、VS/TS 比が 0.4～0.5 程度の混合汚泥を用いた嫌気性消化実験を行った際、投入 TS5，10，および 15% での平均粘度がそれぞれ 2.6，18.1，および 61.0 dPa・s であることを報告しており、本研究と同様の値である。得られた結果および前述の連続式実験での TS 分解率の結果をあわせることで、投入汚泥条件に対する消化汚泥の粘度がおおむね推測可能である。

粘度が撹拌に及ぼす影響について、数値流体力学法（CFD）による高濃度嫌気性消化槽の解析技術が開発されている[24,25]。高濃度化した下水混合汚泥の中温嫌気性消化を想定した粘度 8.5 dPa・s での CFD 解析では、既設消化槽の撹拌機で対応可能であることが示されている[11]。粘度の増加は消化槽内の撹拌効率に大きな影響を及ぼし、この点では、OD 法の脱水汚泥を用いる場合、標準法の脱水汚泥よりも注意を要することが明らかになった。中温と高温を比較すると、高温では粘度が低いことが報告されている[26]。アンモニア阻害の観点では中温が有利であるのに対して、撹拌の観点では高温が有利である。Liao・Li[23]が粘度の増加に伴う撹拌エネルギーの増加および加温エネルギーの削減のバランスを議論しているように、汚泥性状に応じた最適操作条件の検討が必要である。

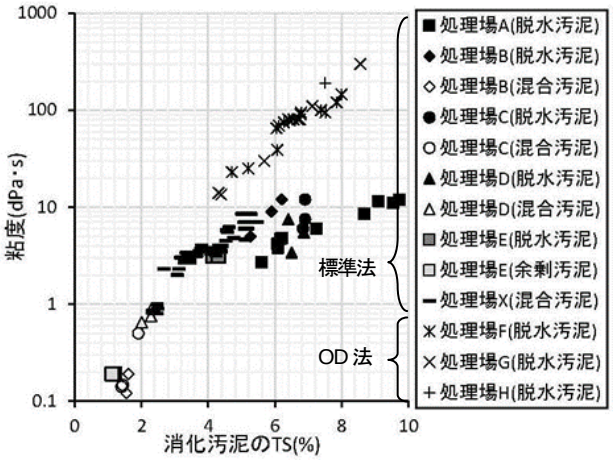


図-7　消化汚泥の粘度と TS の関係

(4) 脱水および消化過程における元素の挙動

溶解性成分も含めて分析した処理場 B～D の汚泥中の元素濃度（mg-元素/kg-汚泥）について、混合汚泥中の濃度に対する比として図-8 に示す。脱水汚泥についてはおおむね元素濃度が増加し、脱水汚泥の嫌気性消化は希釈して行っているので、脱水汚泥からの消化汚泥中の元素濃度は減少している。K や Na 等、溶解性として多く含まれる元素については、脱水後の元素濃度が低めであった。K や Na 等が主として溶解性として存在しているのは、過去の調査結果[20]と同様である。特に処理場 D で Ca および Fe が大幅に増加しているのは、脱水操作時に凝集剤として添加したものである。多くの元素は主として固形性として存在しており、脱水汚泥からの消化汚泥中の元素濃度は混合汚泥からの消化汚泥の場合と比べて、おおむね 3 倍以内に収まっていた。乾燥重量基準（% dry）で比較すると、凝集剤添加および溶解性の影響をうける元素以外では、脱水前後の濃度比がおおむね 1 程度の値であり、脱水工程で元素濃度に大きな変化はないことが確認された。

消化前後の汚泥中の乾燥重量基準（% dry）元素濃度比を、図-9 に示す。脱水汚泥からの消化汚泥については、投入 TS 濃度を 10%に設定した反応器で分析している。消化前後の濃度比については、おおむね 1～3 程度の値である。嫌気性消化における固形物分解率を 0.5 とした場合、元素がそのまま残存すれば固形物あたりの濃度は 2 倍になることから妥当な値である。これは、過去の混合汚泥での調査結果[19]と同様の傾向である。濃度比のばらつきは、HRT を考慮すると投入汚泥と消化汚泥が全く同一でないためと考えられ、汚泥種別や元素別に固有の傾向は特に見られなかった。脱水工程を経る場合でも、凝集剤に含まれる元素濃度（Ca，Fe 等）が増加すること、および溶解性で含まれる元素濃度（K，Na 等）が減少することを除いて、大きな影響は無いことが示された。適切な凝集剤を選定することで、脱水汚泥からの消化汚泥でも肥料利用を検討可能であると考えられる。

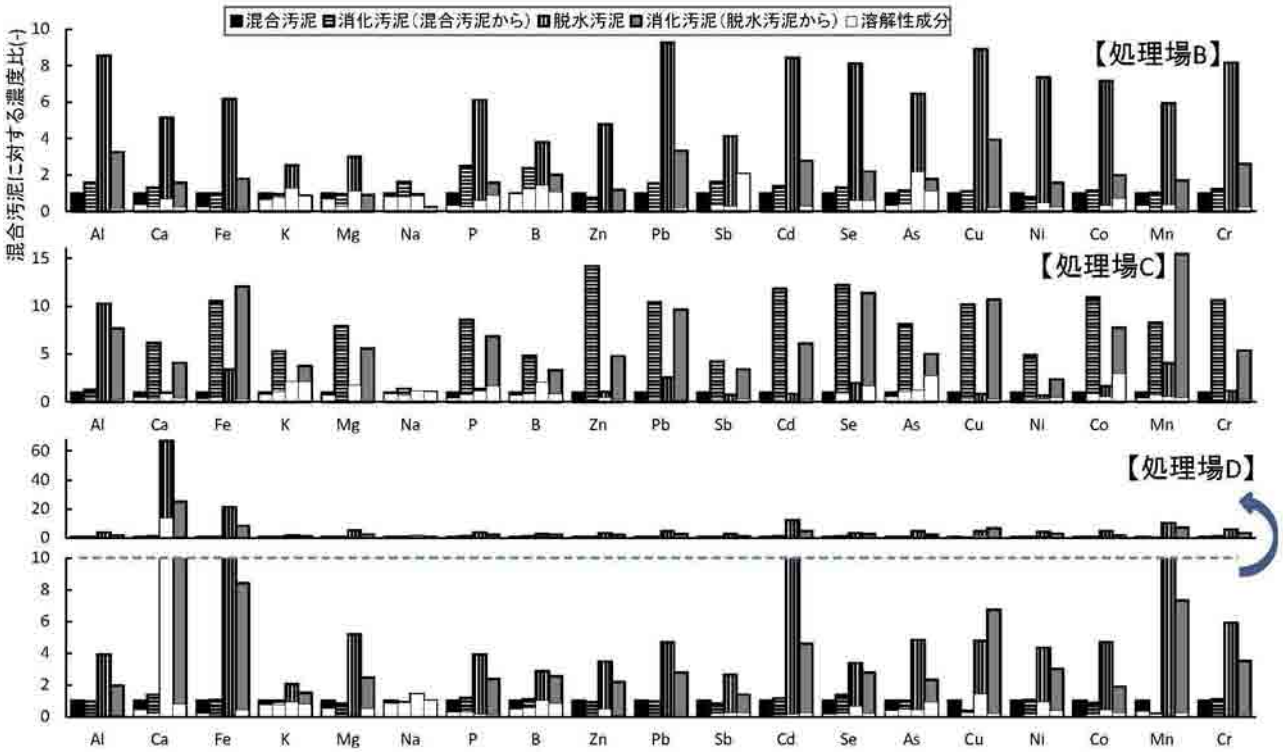


図-8 混合汚泥中の濃度に対する汚泥中の元素濃度（mg-元素/kg-汚泥）比

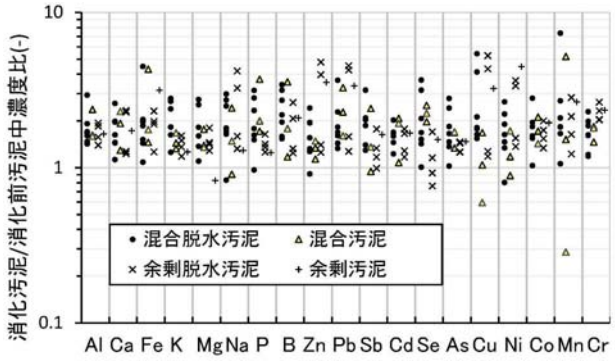


図-9 消化前後の汚泥中の元素濃度（% dry）比

1.4. まとめ

本研究では, 下水脱水汚泥の中温嫌気性消化において、投入汚泥性状が消化特性や消化汚泥性状に及ぼす影響を調査することを目的として、異なる下水処理場の各種下水汚泥を対象とした中温嫌気性消化実験を行った。得られた成果は、以下のとおりである。

1）標準法の混合汚泥および脱水汚泥については、0.4～0.5 NL/ gVS-投入程度の，OD 法の脱水汚泥については 0. 1～0. 2 NL/ gVS-投入程度のバイオガス転換率が得られた。

2）投入汚泥の高濃度化で懸念されるアンモニア阻害や撹拌影響に対して、投入汚泥条件から消化汚泥のアンモニア性窒素濃度および粘度を推測する知見を整理した。

小規模施設間の輸送の点では脱水汚泥が有利であり、他バイオマスの受入等とも組み合わせることで、これまでほとんど検討されていない下水脱水汚泥を含む集約型混合嫌気性消化が、小規模施設で実現可能であると考えられる。

2. 開発技術の下水処理場への導入および GHG 排出抑制効果等の評価

2.1. はじめに

本研究では、複数の小規模の下水処理施設からの下水汚泥や地域バイオマスを集約して処理することを想定し、特に下水汚泥の集約を行う際には、処理場間の運搬を効率的に行うために、含水率を低下させた脱水汚泥を用いた高濃度嫌気性消化手法の評価を進めてきたところである。ここでは、ある一定の想定されたフィールド（石川県中能登町）に本技術を導入した場合の GHG 排出抑制効果を評価した。

表-4　想定フィールドにおける地域バイオマス発生量（年間）

項目	単位	下水 脱水汚泥	油揚げ （乾）	油揚げ （生）	し尿	浄化槽	集排 脱水汚泥	事業系 厨芥類	合計
重量	t-w	1,256	45	26	602	869	42	48	2,888
濃度	%	17	91	55	1.5	1.5	19.5	21.5	10.7
固形物量	t	214	41	14	9	13	8	10	309
混合比率	%	69.3	13.3	4.5	2.9	4.2	2.6	3.2	

2.2 フィールドの概要

想定フィールド内には5つの公共下水道および6つの集落排水処理施設が近接して存在している。また、し尿浄化槽汚泥については、委託処理を実施している状況である。年間発生地域バイオマス量を表-4に示す。

これらの現状から、下水道、集落排水、浄化槽汚泥、し尿等と、さらに町内で発生するその他の地域バイオマス（学校給食残渣、事業系一般廃棄物、食品工場残渣）とを混合処理し、処理過程で発生したメタンガスの可能な限りの回収・有効利用を進め、温室効果ガスの排出量を削減するとともに地域内の資源循環が成立する仕組みとなるように図-10のようにフローを検討した。

2.3 GHG 排出抑制効果の評価

高濃度混合メタン発酵を実施した際の温室効果ガス排出量の削減効果は、現状の個別処理の、各バイオマスを個別に処理する場合には715.5 t/年、想定の処理フローである集約処理（高濃度混合メタン発酵実施）の場合には509.3 t/年となり、年間206 t（約30%）の削減が可能であるという試算結果となった。

また、メタン発酵に伴うエネルギー収支の試算を実施したところ、回収エネルギー量 295,552Mcal/年に対し、消費エネルギー量（投入汚泥の加温に必要な熱量、発酵槽の放散熱損失および配管等の熱損失）は 189,058Mcal/年となり、余剰排熱が発生する結果となった。

本検討は石川県をフィールドとして実施したものの、同様の小規模施設は全国に多数あることから、本開発技術の全国及展開が期待できると考えらえる。そのためには、地域や周辺環境による汚泥性状の違いが、特に高濃度消化特性に及ぼす影響についての知見を集積することが、今後の課題である。

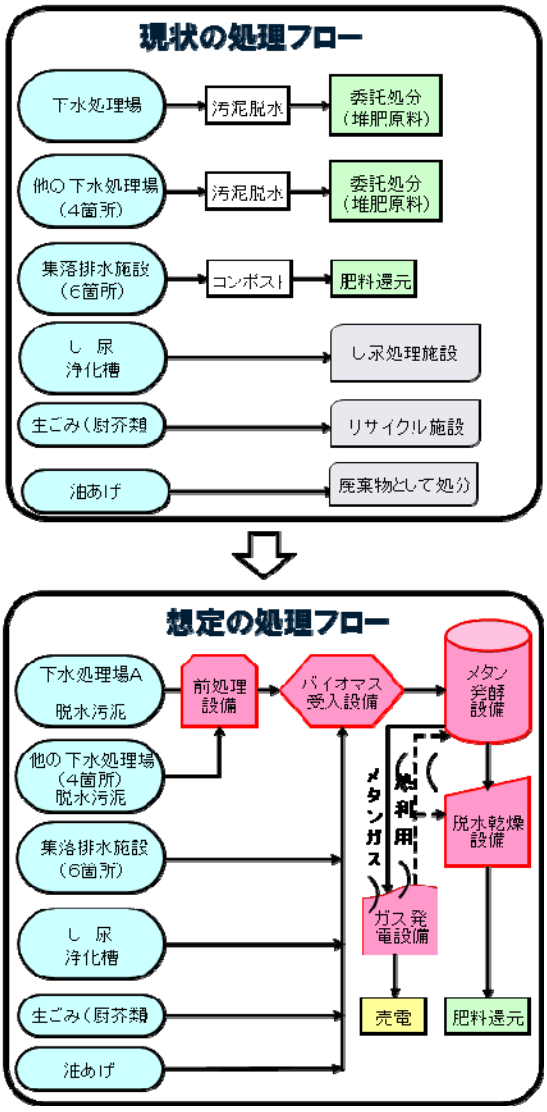


図-10　GHG 排出抑制効果の評価における想定フロー

参考文献

1) 安陪達哉：下水汚泥資源の平成 23 年度有効利用調査結果，再生と利用，38，142，pp.86-88，2014.
2) 国土交通省 水管理・国土保全局 下水道部：下水汚泥エネルギー化技術ガイドラインー改訂版ー, 2015.
3) 国土交通省 国土技術政策総合研究所:地域における資源・エネルギー循環拠点としての下水処理場の技術的ポテンシャルに関する研究，平成 24 年度下水道関係調査研究年次報告書集，国総研資料第 773 号，pp. 109-114，2014.
4) 小規模処理場施設に適したメタンガス有効利用支援に関する共同研究報告書，(独)土木研究所共同研究報告書，第 460 号，2014.
5) 宮﨑好弘：大胆な汚泥処理プロセス変更による汚泥減量化の取り組み，下水道協会誌，51，617，pp. 21-24，2014.
6) 日本下水道協会：下水道統計（平成 24 年度版）（第 69 号），2014.
7) 津森ジュン：土木研究所における汚泥有効利用に関する研究ー小規模下水処理場向け高濃度混合メタン発酵技術に関する研究ー，再生と利用，39，147，pp.36-42，2015.
8) Hidaka T., Wang F., Togari T., Uchida T., Suzuki Y.：Comparative performance of mesophilic and thermophilic anaerobic digestion for high-solid sewage sludge, Bioresource Technology, 149, pp.177-183, 2013.
9) Wang F., Hidaka T., Uchida T., Tsumori J.: Thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge with high solids content, Water Science and Technology, 69, pp.1949-1955, 2014.
10) Hidaka T., Sawahara H., Togari T., Tsumori J.: Anaerobic digestion of sewage sludge with high solid content and its use as fertilizer, Journal of Water and Environment Technology, accepted.
11) 日高平，津森ジュン：都市下水処理場の脱水汚泥の中温嫌気性消化に及ぼす固形物濃度の影響，土木学会論文集 G（環境），70，7，pp.III_433-III_440，2014.
12) 戸苅丈仁，池本良子，中木原江利，中出貴大，GU Tingting，本多了：オキシデーションディッチ汚泥と廃油揚げを用いた高濃度混合嫌気性消化，土木学会論文集 G（環境），69，7，pp.III_597-III_603，2013.
13) 戸苅丈仁，池本良子，GU Tingting，小野紘，日高平，津森 ジュン，柳井敦，木野下裕茂，清水浩之：ＯＤ汚泥と廃油揚げを主体とする 7 種の廃棄物系バイオマスの高濃度混合消化，土木学会論文集 G（環境），70，7，pp. III_425-III_432，2014.
14) 戸苅丈仁，池本良子，GU Tingting，小野紘，日高平，津森 ジュン，柳井敦，木野下裕茂，清水浩之:OD 汚泥と廃油揚げを主体とする 7 種の廃棄物系バイオマスの高濃度混合消化，土木学会論文集 G（環境），70，7，pp. III_425-III_432，2014.
15) 日高平，對馬育夫，津森ジュン，南山瑞彦：オキシデー ションディッチ法の脱水汚泥を対象とした中温嫌気性消化特性調査，第 52 回下水道研究発表会講演集，pp.983-985，2015.
16) 中能登にバイオ発電施設 来年度から整備 17 年度稼働目指す，中日新聞，10 月 29 日朝刊，2014.
17) 日本下水道協会：下水道施設計画・設計指針と解説 2009 年版（後編），2009.
18) 日本下水道協会：下水道維持管理指針-2014 年版-（実務編），2014.
19) 日高平，内田勉：下水汚泥の性状および消化特性に関 する処理場毎の比較調査，土木学会論文集 G（環境），68，7，pp.III_325-III_332，2012.
20) 日高平，王峰，内田勉，鈴木穣：回分式実験による下水汚泥と有機性廃棄物の嫌気性消化特性調査，土木学会論文集 G（環境），69，7，pp.III_605-III_614，2013.
21) Bolzonella D., Pavan P., Battistoni P., Cecchi F. :Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process, Process Biochemistry, 40, pp.1453-1460, 2005.
22) 西井啓典，片岡直明：高濃度・高効率汚泥消化技術の開発（その 3），第 51 回下水道研究発表会講演集，pp. 919-921，2014.
23) Liao X., Li H.: Biogas production from low-organic-content sludge using a high-solids anaerobic digester with improved agitation, Applied Energy, 148, 15, pp. 252-259, 2015.
24) 下水道技術開発プロジェクト（SPIRIT21）委員会：下水汚泥資源化・先端技術誘導プロジェクト，グリーン・スラッジ・エネルギー技術，下水汚泥とバイオマスの同時処理方式によるエネルギー回収技術に係る技術報告書，2007.

25) 寺嶋光春, 小松和也, 安井英斉, ラジブゴエル, 井上千弘, 須藤孝一, 李玉友, 野池達也 : 高濃度嫌気性消化槽 の混合における均一化時間の検討, 土木学会論文集 G（環境）, 66, 3, pp.103-110, 2010.

26) 寺嶋光春, ラジブゴエル, 小松和也, 安井英斉, 高橋弘, 李玉友, 野池達也：中温と高温の嫌気性消化汚泥の粘性特性の比較, 環境工学研究論文集, 44, pp. 687-695, 2007.

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（資源循環担当）
研究担当者：南山瑞彦、諏訪守、安井宣仁

【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し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した。

その結果、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では、公共用水域に対するノロウイルス（NV)、原虫類の負荷源の 1 つとして、浄化槽排水の存在を明らかにした。下水、河川水、下水道へ排出される病院排水での抗生物質耐性大腸菌に関しては、カルバペネム系のイミペネムに耐性を示した大腸菌は、現在のところ不検出であることを明らかにした。リアルタイム RT-PCR 法による NV の定量にあたり、試料中の阻害物質や試薬反応量の影響を明らかにした。それらの影響回避として、抽出 RNA の逆転写工程および PCR 反応容量に対する供試水量をコントロールする手法の改良により、NV 検出濃度の向上方策を提案した。生物学的高度処理法による除去率向上要因の解明では、活性汚泥生物相などと NV 除去率の関係を把握し、被災下水処理場の復旧において、活性汚泥処理の初期水質管理の重要性を提案した。また、被災下水処理場の段階的な対策技術の導入にあたり、継続した実態調査により放流水の病原微生物の適切な水質管理手法を示せた。さらに、NV 除去と活性汚泥のタンパク質量との関係を把握し、標準活性汚泥法と生物学的高度処理法である A^2/O 法の活性汚泥において 10KDa 以下のペプチド量に大きな違いが見られ、NV の除去能に関与している可能性が考えられた。適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築では、合流式下水道の越流水が公共用水域への NV 汚濁負荷源となる可能性が高いことを明らかにした。合流式下水道の雨天時越流水対策技術として、遮集倍率向上による放流先河川への NV 負荷の低減効果や、雨天時活性汚泥処理による NV 負荷の削減効果を評価し、効果的な負荷削減方策を提案した。水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築として、抗生物質耐性大腸菌を用いて塩素、紫外線による不活化特性を解明した。塩素消毒では Ct 値（添加塩素量）を高めることで、抗生物質耐性大腸菌の割合が上昇し、耐性を有さない菌の割合は減少した。紫外線消毒においては抗生物質耐性大腸菌の不活化のための適切な消毒条件を提案した。抗生物質耐性大腸菌の耐性遺伝子は垂直伝播していると考えられたことから、下水処理場などにおいて適切な消毒管理の必要性を明らかにした。

キーワード：病原微生物、浄化槽排水、段階的対策技術、検出感度向上、合流式下水道、消毒

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では、新たな病原微生物の存在実態や消毒耐性等に関し評価が困難であるという課題が明らかになっている。また、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、新興感染症

の病原微生物として原虫類や一部のウイルスが位置づけされてきている。さらに、抗生物質の利用の増加に伴い耐性能力を有する薬剤耐性菌が徐々に蔓延してきている状況から、特に多剤耐性菌が近年の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、水環境に及ぼす衛生学的な観点から河川水を含め下水処理場等において、実態把握のため調査・研究が行われているが、他の汚染源やノンポイント負荷源について実態把握が遅れており、総合的な対策技術の構築には繋がっていない。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、汚染源の実態把握と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削減の観点から適切な水環境保全システム技術を構築するものである。

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）としている。27 年度は本研究課題の最終年度にあたるため、以下に達成目標ごとに得られた成果を取りまとめた。

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世界的に大きな問題となっており、主要国首脳会議（伊勢志摩サミット）においても、薬剤耐性感染症が重要課題として位置づけられている[1)]。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おり、米国では、耐性菌による感染者が年間 200 万人以上、死亡者は 2.3 万人に及んでいる[2)]。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、多剤耐性菌の存在[3)]や耐性遺伝子の検出報告例[4)]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（New Delhi metallo-ß-lactamase：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[5)]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性があると考えられる。

本研究では、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、河川水、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。下水試料は関東圏内にある 2 箇所の下水処理場、河川水試料は関東地方と関東以西の 8 河川、病院排水は関東圏内にある比較的大規模な病院を対象とし、試料中に含まれる大腸菌の抗生物質の感受性を測定した。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 Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）の実施基準を基にした KB ディスクの手引きを参照した。

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（水路）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4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水路	約 120戸	約 30戸	約110	小学校等(約330人)	約440
E水路	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ジーステインを用い、染色したプレパラートを落射蛍光微分干渉顕微鏡にて観察・定量を行った。なお、原虫類の測定試料は4時間ごとに24時間採水を行い得られた6試料を混合したものとした。

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・撹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RT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社）の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNaseI 処理し、RNeasy MinElute 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」[6]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抽出カラム1本あたり0.05mg-SSとなるように統一した[7]。

2.2 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

分子生物学的手法の進展により従来、培養が困難であった細菌やウイルスなどの検出が可能となってきている。特に、細胞培養法による評価が困難である腸管系ウイルスの定量には、リアルタイムRT-PCR法が主に用いられている。試料の濃縮、遺伝子抽出・精製、逆転写（Reverse Transcription:RT）、PCR 反応とした定量工程では最終的にはμL系の試験操作となるため、濃縮精製試料の極一部量の評価となる。評価対象とするウイルスが試料中に高濃度に存在すれば、安定したPCR値が得られるが、環境水や高度に処理されたウイルス低濃度試料を対象とした場合、定量値のバラツキが大きくなる可能性がある[8]。下水処理水の再生水利用や放流先水域における衛生学的安全性のリスク評価にあたっては、極低濃度のウイルス試料を対象とすることから、安定した定量値を得るための手法を開発する必要がある。

このため、極低濃度試料に対応した濃縮・定量技術の開発を目指し、逆転写やPCR条件などがNV定量値へ及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方策を評価した。

評価対象試料はA、F下水処理場の二次処理水（一部GF/Bろ過水を利用）とG河川水とした。これらの試料をPEG沈殿法や陰電荷膜法により濃縮した。

陰電荷膜法[9]による濃縮は、試料100mLあたり2.5Mの$MgCl_2$を1mL添加攪拌し、HA膜(公称孔径0.45μm、90mm)で試料をろ過した。ろ過後 0.5mM の H_2SO_4 200mL で酸洗浄し、1.0mM の NaOH 10mL をろ過してウイルスを誘出回収した。誘出液を 50×TE バッファー200μL と 100mM の H_2SO_4 50μL を入れた試験管に回収・中和し、誘出液を CentriprepYM-50（ミリポア社製）に入れ2,500rpm・10分間4℃で遠心処理を行いウイルス濃縮液を作成した。なお、陰電荷膜へのSS負荷量の違い

は検出濃度に影響を及ぼすことから [7]、膜への試料通水量は全てのケースで 1mg-SS/膜に統一した。

各ウイルス濃縮液からの RNA の抽出や精製方法は、上記 2.1.2 と同様である。また、陰電荷膜法では公称孔径 0.45μm の膜に試料を通水させ濃縮を行い、その誘出液が濃縮試料となるため、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量はゼロとして考えた。

本評価における逆転写、PCR 条件を整理したものを表-2 に示す。逆転写反応条件は、逆転写回数を 1～3 回、逆転写 RNA 量を 0.1～1.0μg、逆転写反応用の試薬量を通常の 3 倍（3 倍時には逆転写回数を 1 回）とした。また、リアルタイム PCR の反応条件やプローブ、プライマーは「ノロウイルスの検出について」[6] を参照したが、本評価では 100μL の PCR 反応系における cDNA の供試水量を 10μL（従来の割合として 0.1）を基準に段階的に減少させ最小量を 1μL（割合を 0.01）とした。

表-2 逆転写･PCR反応条件

	逆転写RNA量	逆転写回数	逆転写試薬量	PCR反応容量に対する供試水量割合
評価条件	0.1～1.0μg	1～3	1～3倍	0.01～0.1

2.3 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

2.3.1 段階的な復旧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水処理機能が停止した。また、下水管渠にも広範囲な被害が及び、流下機能の阻害によりマンホール等からの溢水が発生したことから、公共用水域を含めた市街地等の衛生学的なリスクが上昇した。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、段階的な復旧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･消毒のために必要な要件を明らかにすることを目的に実施した。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。実態調査は、壊滅的な被災により水処理機能が停止した H 下水処理場を対象に、段階的な復旧対策技術として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、④活性汚泥生成の各段階における大腸菌群、NV の除去･塩素消毒特性と課題を明らかにするために実施した。

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として、MLSS は下水試験方法を準拠、活性汚泥性生物等はノマルスキー型微分干渉顕微鏡を用い計数した。

2.3.2 活性汚泥のタンパク質量と NV 除去能の関係

下水に存在するウイルスは活性汚泥により吸着除去されていると考えられるが、処理プロセス等の違いによって、その除去効果に差が生じている [10]。本評価では、吸着効果に関与が推定される活性汚泥中のタンパク質量とウイルス除去能との関係把握を目的に、標準活性汚泥法と A^2/O 法の活性汚泥を利用した回分実験を行い、その上澄液の NV 濃度と活性汚泥のタンパク質量を測定した。回分実験では、A 下水処理場の標準活性汚泥法と A^2/O 法の活性汚泥を利用し、MLSS 濃度を 500、1,000、2,000mg/L 程度に調整の後、流入下水を添加、1、7、24 時間の曝気混合を行った。上澄液の NV の測定法は、上記 2.1.2 に示した手法と同様である。活性汚泥中のタンパク質量は、Bicinchoninic Acid（BCA）法 [11] により測定した。ビウレット反応を利用したローリー法タンパク質定量をフェノール・キレート剤･還元剤による影響が小さくなるよう改変した方法であり、汚泥中のタンパク質測定に利用されている。なお、タンパク質は透析膜により 3KDa 以下、3-10 KDa、10 KDa 以上に分子量分画し定量した。

2.4 適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築

2.4.1 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響

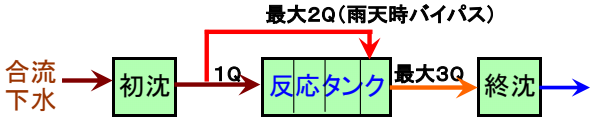
下水道の普及に早くから取り組んできた一部の自治体においては、下水と雨水の排除を同一の管渠とした合流式下水道を採用している。合流式下水道では降雨時において、雨水量が増加し下水処理場において処理対応が困難になる場合には、未処理下水が公共用水域へ放流されることから、衛生学的な安全性を担保するため合流式下水道越流水の対策技術の構築が必要となる。

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が、本研究においては合流式下水道越流水をノンポイント負荷と

してとらえ、これら負荷源における病原微生物としてNV汚染の実態を明らかにするものである。実態調査は感染性胃腸炎の流行期において、NV を対象に降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の有無が河川水へ及ぼす影響を把握した。

2.4.2 合流式下水道越流水の対策技術によるＮＶ負荷の削減効果

降雨時における越流水対策技術の 1 つである雨天時活性汚泥法による NV の負荷削減効果を明らかにするため、L 市 M 下水処理場（嫌気好気法を導入：処理フローの概略は図-1）において実態調査を行った。晴天時の受け入れ可能な流入水量である 1Q 分に対し、降雨時には最大の受け入れ流入水量を 3Q とし、2Q 分の流入下水を反応タンクの後段にバイパス流入させ処理を行っている。本調査では、降雨時の雨天時活性汚泥法の運転直後から終了時まで、流入下水、初沈流出水、二次処理水を採水しNV 濃度を測定することで、その削減効果を明らかにした。なお、この調査は、26～27 年度にかけ感染性胃腸炎の流行期にあたる 12～3 月の間に実施した。



図−1　雨天時活性汚泥法の概略図

2.5 水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築

2.5.1 塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

現在、多くの下水処理場では放流水質基準の達成のため、次亜塩素酸ナトリウムなどの薬剤によって大腸菌群を不活化している。消毒による細菌類の不活化では、塩素などの薬剤が細胞膜を通じ細胞に作用するが、紫外線照射では直接的に細胞に作用する違いがある。抗生物質に対する細菌の耐性機構は多岐にわたるが[12) 13)]、細胞内への薬剤浸透阻止や浸透した薬剤の排出能力などを有した抗生物質耐性菌は、塩素に対しても同様な耐性機能を発現する可能性が推定される。

このため、病原微生物リスク対策技術の構築の一環として、抗生物質耐性大腸菌に対し有効な消毒法の評価を目的に塩素、紫外線消毒による不活化効果を把握した。塩素消毒実験では、A 下水処理場の二次処理水に次亜塩素酸ナトリウムを 0～4mgCl/L の範囲で添加、接触時間を 15 分間とし、チオ硫酸ナトリウムで中和を行った。紫外線消毒実験は、実態調査から得た 0、6 剤耐性大腸菌を培養増殖させ、0.22μm のフィルターにてろ過した二次処理水に添加、滅菌シャーレに分注し紫外線を照射した。

2.5.2 二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の消長

消毒後に残存した抗生物質耐性大腸菌を想定し、その消長把握を目的に、二次処理水中に添加した抗生物質耐性大腸菌の増殖特性や抗生物質感受性の推移を測定した。抗生物質耐性能力の異なる大腸菌を 0.22μm のフィルターにてろ過した二次処理水に各々添加し、20℃の恒温にて最大 7 日間放置した。放置期間中に適宜採水し、大腸菌濃度、抗生物質感受性を測定した。二次処理水に添加した大腸菌は、8 剤の抗生物質に対し耐性を示さなかった 0 剤耐性大腸菌、4 剤耐性（ABPC、TC、CFDN、LVFX）、7 剤耐性（ABPC、TC、CFDN、LVFX、KM、ST、GM）、比較対象として大腸菌の ATCC 25922 株、ATCC 35218 株とした。大腸菌の定量はクロモカルト培地による平板培養法とし、抗生物質の感受性評価手法は、上記 2.1.1 と同様である。

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

各試料中の抗生物質耐性大腸菌の検出結果を表-3 および図-2～4 に示す。供試大腸菌数は計約 3,100 株であり、内訳は下水試料 1,208 株、河川水試料 1,228 株、病院排水試料の 722 株を得た。その内、下水試料では評価対象とした 8 剤の抗生物質に対し耐性が無いと評価された大腸菌の割合は 45.4%（549 株）であった。1 剤のみに耐性を示した大腸菌は 26.2%（316 株）であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは 38.9%（123 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大腸菌は 343 株であり、供試株の 28.4%を占めていた。343 株の内 272 株が ABPC に耐性を示しており、多剤耐性大腸菌の 79.3%を占めていた。また、2 株が 7 剤の抗生物質に対し耐性を示した。

河川水試料では、耐性無しと評価された大腸菌の割合は 45.1%（554 株）、1 剤耐性は 29.6%（363 株）であるが、その内 ABPC に耐性のあるものは 50.4%（183 株）であった。多剤耐性大腸菌は 311 株であり、供試株数の 25.3%を占め、311 株の内 271 株が ABPC に耐性を示しており、その割合は 87.1%であった。さらに、4 株が 6 剤の抗生物質に対し耐性を示した。

病院排水試料では、耐性無しと評価された大腸菌の割合は 28.0%（202 株）、1 剤耐性が 29.9%（216 株）であ

るが、その内 ABPC 耐性が 58.3%（126 株）であった。耐性無、1 剤耐性以外の多剤耐性大腸菌は 304 株であり、供試株数の 42.1%を占め、304 株の内 292 株が ABPC 耐性であり、その割合は 96.1%を占めていた。さらに、3 株が 7 剤の抗生物質に対し耐性を示した。

評価対象とした 8 剤の抗生物質に対し ABPC に耐性を示した大腸菌が多く検出され、さらに、多剤耐性大腸菌の大部分が ABPC に耐性を有していることが明かとなった。このことは、下水処理場における消毒効果を含めた消長等を把握する上で、ABPC に耐性を有する大腸菌を指標とすることで、多剤耐性菌の効率的な管理に資することができるものと考えられた。

表-3 各試料中の抗生物質耐性大腸菌の実態

試料＼項目	供試株数	0剤耐性割合(%)	1剤耐性割合(%)	1剤耐性の内ABPCに耐性(%)	多剤耐性割合(%)	多剤耐性の内ABPCに耐性(%)
下水試料	1,208	45.4	26.2	38.9	28.4	79.3
河川試料	1,228	45.1	29.6	50.4	25.3	87.1
病院排水	722	28.0	29.9	58.3	42.1	96.1

次いで、各抗生物質に対する耐性大腸菌の検出割合を図-2～4 に示す。各試料とも ABPC に耐性を示した大腸菌の検出割合が最も高く、下水、河川水では約 30～40%、病院排水では約 60%を占めていた。そして、TC、ST 合剤の順で耐性大腸菌の検出割合が高く、試料の違いによる検出傾向の差異は見られなかった。ABPC は 1963 年、TC は 1954 年に発売され[12]、長期間にわたる利用が耐性菌の増加に繋がったと推定される。一方、KM、GM も ABPC や TC とほぼ同時期に開発されているが、耐性大腸菌の検出割合は高くなかった。1980 年代以降にはセフェム系、キノロン系の抗生物質への転換により、アミノグリコシド系の抗生物質は臨床現場での利用が減少しているとされており[12]、これらの要因によるものと推定される。

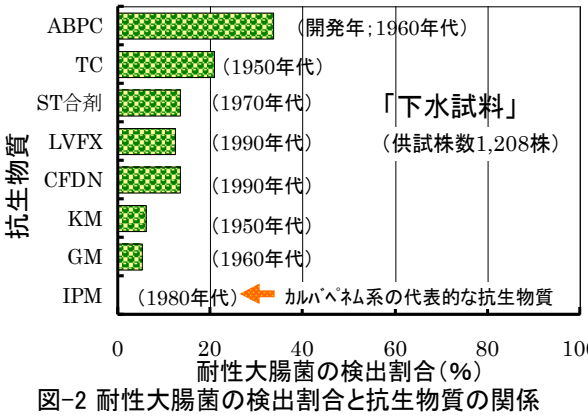


図-2 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

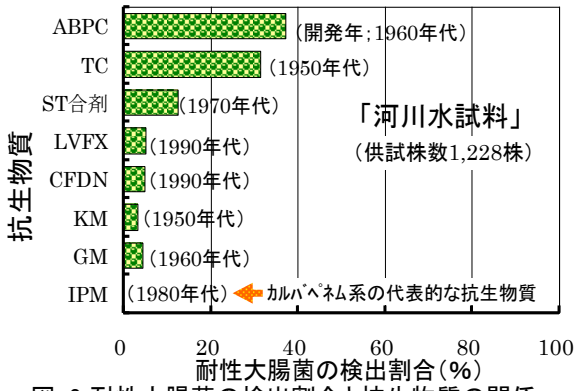


図-3 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

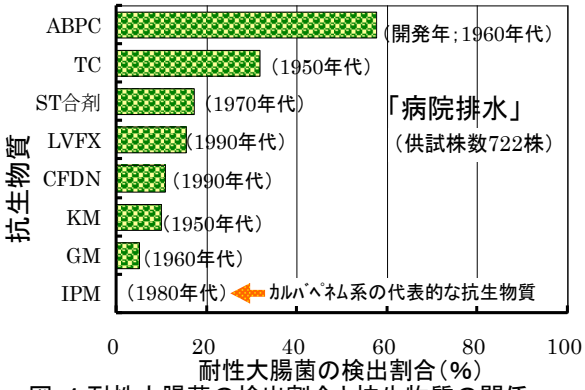


図-4 耐性大腸菌の検出割合と抗生物質の関係

一方、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[14]。今回の評価では、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は検出されなかったため、現状においてカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem-resistant enterobacteriaceae：CRE）の存在状況は低いと推定された。

さらに、河川水に大きな影響を及ぼすと考えられる放流水の影響有無を評価するため、同一河川の上下流ごとに抗生物質耐性大腸菌の検出割合を整理した。対象は 8 河川の内 J、K の 2 河川とした。J 河川では調査対象とした上下流約 7.4km 間に 2 つの下水処理場があり、上流側に位置する処理場の放流口の直上流と上流側約 0.9km 地点で採水を行い影響無し試料とした。影響有り試料としては、上流側の放流口から約 6.5km（下流側の放流口から約 1.9km）地点で採水を行った。K 河川では調査対象とした上下流約 2.8km 間に 1 つの下水処理場があり、放流口から上流側 0.5km の地点で採水を行い影響無し試料とした。影響有り試料は放流口の直下流と 2.3km 地点の試料を採水した。この時の大腸菌濃度は J 河川の影響無

し試料で 0.2～0.75 cfu/mL、影響有り試料で 5.3～12cfu/mL、同様にK河川では1.2cfu/mL、0.3～0.6cfu/mLであった。2 つの下水処理場の影響を受けた J 河川の影響有り試料は、他の試料と比較して大腸菌濃度がやや高めであった。J、K 河川において下水処理場の影響有無による大腸菌の検出濃度に高低の違いが見られたが、放流水の影響が無い上流試料では抗生物質耐性大腸菌（1 剤の抗生物質耐性）の割合が約 30～39%であるのに対し、影響有りの下流試料は約 44～56%に上昇した。また、多剤耐性大腸菌（2 剤以上の抗生物質耐性）では同様に約 4～11%に対し約 21～26%に上昇した（図-5）。下水処理場での消毒により大腸菌濃度は大幅に低減するが、放流水の影響を受ける河川水中での大腸菌の存在割合で見ると、多剤耐性大腸菌の割合は上昇していた。近年では通常の生活の中で発生する市中感染症が大きな問題となっているとされており、公共用水域における衛生学的安全性を考慮する上で、継続したモニタリングの実施が必要であると考えられた。

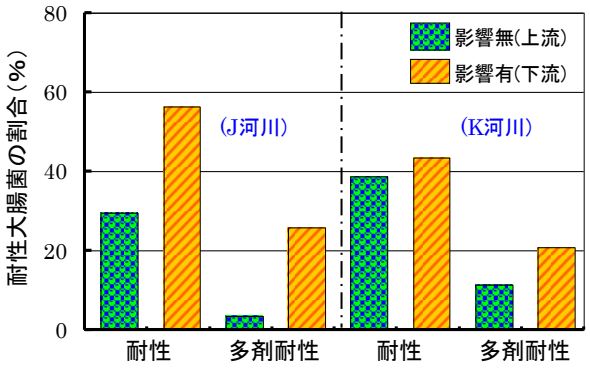


図-5 放流水の影響有無による耐性大腸菌の割合

3.1.2 浄化槽排水負荷の影響を受ける河川調査

1月下旬から2月下旬に行った調査結果を表-4～6および図-6 に示す。ここでは、河川水量に占める浄化槽排水の割合から排水中の NV 濃度を推定した。水使用量を 1 人にあたり 230L と仮定[15] 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。浄化槽排水の NVG2 濃度は最大 10^6copies/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 10^5copies/L レベル、窒素・りんの高度処理法では10^4copies/L レベルであり[10]、それらと比較して浄化槽排水の NV の最大検出濃度はやや高い状況にあった。

表-4 河川流量に占める浄化槽排水量の推定割合

調査時期と対象河川		河川流量（m^3/日）	浄化槽排水量（m^3/日）※	河川流量に占める排水量の推定割合
平成24年1月下旬	C河川	968	51	5.3%
	E水路	57	51～55 ※※	89～96%
平成24年2月下旬	C河川	3,223	51	1.6%
	D水路	86	25～52 ※※	29～60%
	E水路	137	51～55 ※※	37～40%
平成25年1月下旬	C河川	1,757	51	2.9%
	D水路	156	25～52 ※※	16～33%
	E水路	101	51～55 ※※	50～54%
平成25年2月下旬	C河川	7,322	51	0.7%
	E水路	69	51～55 ※※	74～80%

※ 1人230L/日と仮定[15]

※※ 小学校等の**昼間人口**として1人230L/日の35%量と仮定[15]

表-5 推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水のNV濃度

調査時期と対象河川		NVG2平均濃度（copies/L）	NVG1平均濃度（copies/L）	昼間人口を加えたG2平均濃度（copies/L）	昼間人口を加えたG1平均濃度（copies/L）
平成24年1月下旬	C河川	**2.3E+06**	**1.9E+05**	－	－
	E水路	**1.1E+06**	**7.6E+04**	**1.0E+06**	**7.0E+04**
平成24年2月下旬	C河川	**5.1E+05**	**9.4E+04**	－	－
	D水路	**3.8E+05**	**6.9E+04**	**1.8E+05**	**3.3E+04**
	E水路	**3.2E+05**	**5.9E+04**	**3.0E+05**	**5.5E+04**
平成25年1月下旬	C河川	**5.2E+03**	**3.2E+04**	－	－
	D水路	**3.4E+04**	**2.7E+05**	**1.6E+04**	**1.3E+05**
	E水路	**4.0E+04**	**7.0E+04**	**3.7E+04**	**6.5E+04**
平成25年2月下旬	C河川	**2.4E+05**	**1.3E+06**	－	－
	E水路	**1.9E+04**	**2.4E+04**	**1.8E+04**	**2.2E+04**

河川水の SS 濃度と NV 濃度の関係を図-6 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。

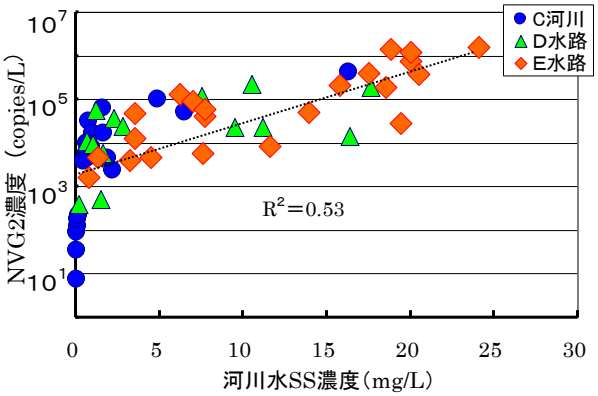


図-6 河川水のSS濃度とNV濃度の関係

次いで、原虫類の調査結果を表-6 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。なお、河川水量に占める浄化槽排水の割合が高い D、E 水路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-6 推定浄化槽排水量から試算した浄化槽排水の原虫類濃度

調査時期と対象河川		ｸﾘﾌﾟﾄｽﾎﾟﾘｼﾞｳﾑ (oocyst/L)	ジアルジア (cyst/L)	検出限界値 (oocyst/L)	残留塩素濃度(mg/L)
平成24年1月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.06	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.03	0
平成24年2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.20	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.05	0
	E水路	N.D.	**0.54**	0.05	0
平成25年1月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.31	0
	D水路	N.D.	N.D.	0.07	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.05	0
平成25年2月下旬	C河川	N.D.	N.D.	0.22	0
	E水路	N.D.	N.D.	0.10	0

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となるケースも見られた。

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 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

測定試料の洗浄（希釈）や逆転写 RNA 量を変動させることによって、NV の検出濃度の向上効果が見られたことから、より詳細に抽出 RNA の逆転写、PCR 条件を考慮し検出濃度に及ぼす影響を明らかにすることで、検出感度向上のための改善方策を評価した。その結果、逆転写回数を 3 回、逆転写試薬量を 1 倍、逆転写 RNA 量を 0.1μg、PCR 反応容量に対する供試水量割合を 0.01 とした条件によって NV の検出濃度を高められる可能性があると考えられた。この結果を基にして濃縮方法が異なる試料に対する影響評価として、同一試料を PEG 沈殿法と陰電荷膜法により濃縮し NV の定量を行った。評価結果を図-7 に示す。濃縮方法が異なっても上記の逆転写・PCR 条件等とすることで、二次処理水、河川水とも最大値が得られた。濃縮方法が異なっても同様な傾向を示したことから、測定試料中の何らかの阻害物質などが逆転写、PCR 反応に対し影響を及ぼすと推定された。

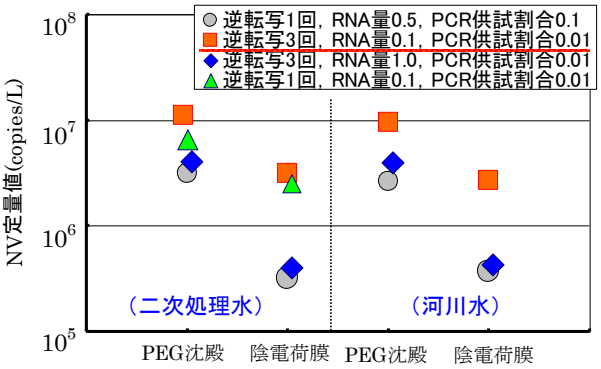


図-7 濃縮方法が異なる試料に対する影響

本評価結果により、逆転写 RNA 量や逆転写回数および、PCR 反応容量に対する供試水量の割合を各々考慮することで、NV の定量値を向上させられることが明らかとなった。濃縮方法が異なる試料でも同様な傾向を示したことから、試料中の阻害物資や試薬反応量の影響が推定されたため、その物質の特定や影響回避のための前処理法を構築する必要がある。現状では、逆転写 RNA 量・回数および PCR 反応容量に対する供試水量をコントロールすることで、NV の定量値が向上することから、これらの手法が簡易かつ有効な検出感度向上方策の 1 つであると考えられた。

3.3 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

3.3.1 段階的な復旧対策技術による放流水質の改善効果の評価

H 下水処理場における段階的な対策の進捗に応じた塩素混和池での大腸菌群の不活化効果について図-8 に示す。震災直後の簡易沈殿処理では、次亜塩素酸ナトリウムが 15mgCl/L の添加濃度によっても消毒効果が得られない状況であった。これは、沈殿池に堆積した汚泥から還元性物質（硫化物や有機物）の溶出による消毒剤の消費が、消毒効果に影響を与えていることが考えられたことから、簡易沈殿処理では沈降汚泥の引き抜き管理が重要であることが明らかとなった。その後、震災直後から簡易沈殿処理を行っていた沈殿池の通水を止め、異なる系列の沈殿池利用や、最終沈殿池の堆積汚泥の腐敗防止・酸化促進による有機物等の溶出抑制を目的とした簡易曝気+汚泥返送系の仮復旧が行われたことで、消毒効果が向上した。また、活性汚泥生成による処理機能の回復にともない添加塩素濃度に対して残留する塩素濃度の割合が高まるとともに、残留塩素濃度が上昇することで大腸菌群の不活化率が向上した。

さらに、次亜塩素酸ナトリウム添加濃度と NV 濃度の関係を図-9 に示す。活性汚泥生成系では NV 濃度が簡易

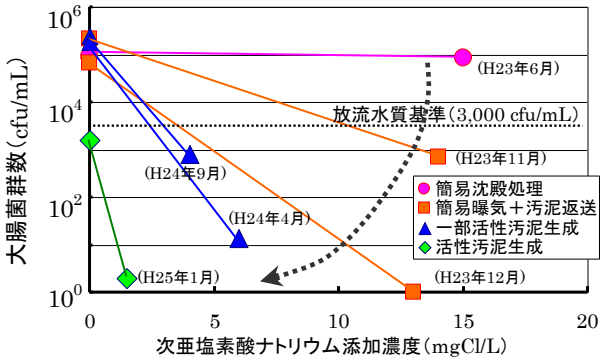


図-8 塩素混和池における大腸菌群の不活化効果

曝気+汚泥返送系の処理水と比較して低く、活性汚泥生成系では塩素消毒による NV 濃度の減少効果がより向上しており、活性汚泥生成にともなう水質の改善効果は、大腸菌群の不活化効果や NV 遺伝子に及ぼす塩素消毒の影響に強く反映するものと考えられた。

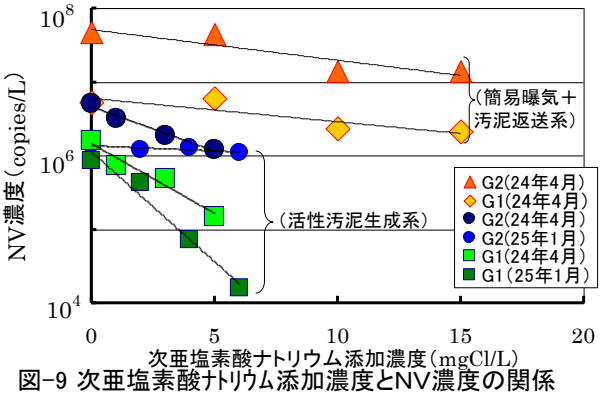


図-9 次亜塩素酸ナトリウム添加濃度とNV濃度の関係

復旧対策技術としては活性汚泥生成による生物処理法への移行により最終段階に至るが、活性汚泥処理への移行当初は活性汚泥生物相が生成途上であると考えられるため、その生物相の状況と NV 除去率の関係を評価した。ここで、活性汚泥性生物とは活性汚泥に出現する微生物の分類[16]の中で *Aspidisca* や *Vorticella* などの原生動物などを指し、指標としては、その他の中間汚泥生物や非活性汚泥生物を含めた全体数に対する割合を求めた。MLSS 濃度は 2,000～2,300mg/L に対し、活性汚泥生物数に占める活性汚泥性生物数の割合は 10～40%程度、活性性、中間、非活性を合せた生物数は 2,400～5,700 個/mL 程度であり、通常の活性汚泥と比較すれば少ない。活性汚泥性生物等の割合と NV 除去率の関係では、活性汚泥性生物の割合が約 44%、中間活性汚泥生物の割合が 54%であった 3 系の NV 除去率は比較的高い傾向が見られた（表-7）。これより活性汚泥性生物の割合が低く中間活性汚泥生物の割合が高い系（1、4 系）では、NV の除去率が低く、活性汚泥生物相の影響を受けている可能性がある。3 系に比べて 1、4 系は活性汚泥処理への移行が遅かったことから、活性汚泥処理への移行当初には、活性汚泥性生物の割合が低く、NV 除去率が劣る可能性があることに留意が必要であると考えられた。

表－7 曝気槽内水質測定結果

測定項目＼曝気槽	1系	3系	4系
MLSS（mg/L）	2,000	2,300	2,300
活性汚泥性生物（個/mL）	730	1,054	888
活性汚泥性生物の割合（%）	**12.8**	**43.9**	**36.5**
中間活性汚泥生物（個/mL）	4,984	1,297	1,526
中間活性汚泥生物の割合（%）	87.2	54.0	62.7
非活性汚泥生物（個/mL）	0	50	20
非活性汚泥生物の割合（%）	0	2.1	0.8
ﾉﾛｳｲﾙｽG1除去率（log）	1.9	2.1	1.9
ﾉﾛｳｲﾙｽG2除去率（log）	1.9	2.3	1.8

原虫類に関して、H 下水処理場処理区内における水系感染症の状況把握のため、震災後から約 1 年半の間に初沈流出水を対象に測定を行った（図-10）。初沈流出水の 9 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（検出限界値：0.17～0.67 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[17]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かったものと考えられた。

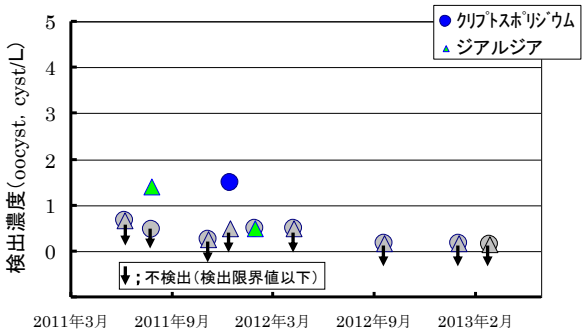


図-10 初沈流出水の原虫類の検出状況

約 1 年半にわたる現地調査や消毒実験により得られた段階的な復旧対策技術の評価結果を表-8 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。最終段階としての活性汚泥処理では有機物濃度が減少し、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が、活性汚泥処理への移行当初は生物相が生成途上であることから、NV 除去率が劣ることに留意が必要であることを明らかにした。

表－8 段階的な対策技術の評価結果

段階的な対策技術	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	沈殿処理よりも消毒効果が向上
簡易沈殿処理＋簡易曝気 ＋汚泥の返送 ※	汚泥返送系の仮復旧により、さらに消毒効果が向上
簡易沈殿処理 ＋ 曝気 ＋ 汚泥の返送 ※※	有機物濃度の減少および消毒剤添加濃度の低減
活性汚泥生成による生物処理	活性汚泥処理移行当初は、生物相が生成途上のため安定化を要する

※ 堆積汚泥の腐敗防止等を目的　　※※ 活性汚泥の生成を目的

3.3.2 活性汚泥のタンパク質量と NV 除去能の関係

回分実験における混合液 20L 中のタンパク質（分子量分画 10KDa 以下はペプチド）量と、その上澄液中の NV 濃度の関係を図-11～13 に示す。曝気混合時間を 1、7、24 時間として実験を行ったが、グラフ上のデータは 7 時間のものである。設定 MLSS を A²/O 法と標準活性汚泥法でともに 500、1,000、2,000mg/L となるよう調整を行ったが、A²/O 法は 7 時間の曝気混合後において 700、730、2,030mg/L、標準活性汚泥法は 440、840、1630 mg/L となった。MLSS が高濃度となることでタンパク質（ペプチド）量が多くなる傾向が見られ、それに比例して上澄液の NV 濃度が低減した。特に A²/O 法と標準活性汚泥法の活性汚泥で 10KDa 以下のペプチド量に大きな違いが見られたことから、タンパク質などの生成に関与する細菌相等が異なっているものと推定された。

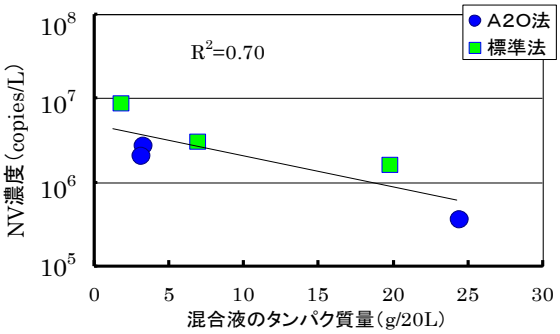


図-11　タンパク質量とNV濃度の関係

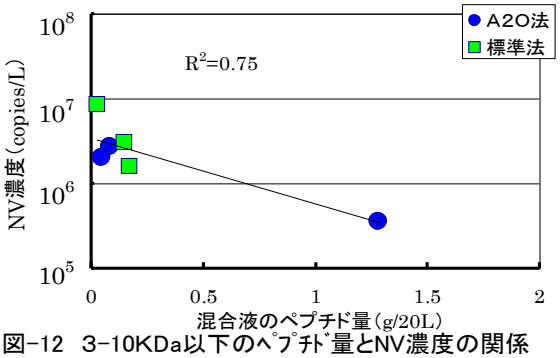


図-12　3-10KDa以下のﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ量とNV濃度の関係

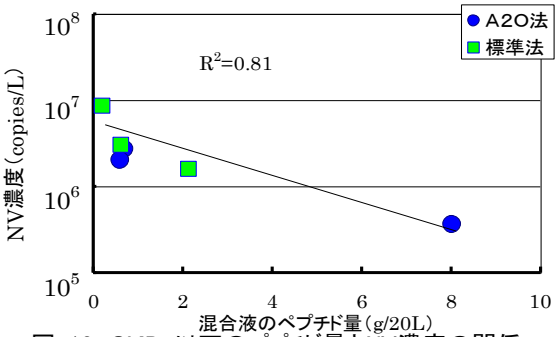


図-13　3KDa以下のﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞ量とNV濃度の関係

上記 3.3.1、3.3.2 の結果から、活性汚泥中に出現する微生物の原生動物や活性汚泥中のタンパク質（ペプチド）量の違いが、NV の除去能に影響を及ぼす要因の 1 つとが考えられた。今後、これらの発現を確認するためのデータを蓄積し、ウイルス除去能向上に適した活性汚泥法の管理手法の評価が必要である。

3.4 適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築

3.4.1 合流式下水道越流水が放流先水域へ及ぼす影響

本評価では、NV を指標として降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の有無が放流先へ及ぼす影響を明らかにした。併せて、対策技術として雨天時活性汚泥法による NV 負荷の削減効果を評価した。越流水の影響を受けた場合の調査結果を図-14 に示す。この時の時間最大降雨量は約 11mm、累積降雨量は 32mm であった。採水試料は処理場あるいは滞水池へ流入する下水、越流水、越流水放流先の G 河川水（越流水放流口から約 400m 下流）とした。比較対象として晴天時（1、2 月）の G 河川水の値を示す。降雨直前の流入下水の NV 濃度は 10^9copies/L レベルであり、冬季の感染性胃腸炎の流行状況を反映したものと考えられた。流入下水の NV 濃度は越流直前にはやや低下していた。越流後は、時間経過にともない、雨水による希釈によって流入下水、越流水ともに NV 濃度の低下傾向が見られた。一方、G 河川水の NV 濃度は、1、2 月の晴天時試料を含め、越流開始前には 10^5～10^6 copies/L 程度で推移していたが、越流後は一時的に最大検出濃度で 10^7copies/L レベルに上昇しており、合流式下水道の越流水は公共用水域への NV 汚濁負荷源となる可能性が高いと考えられた。

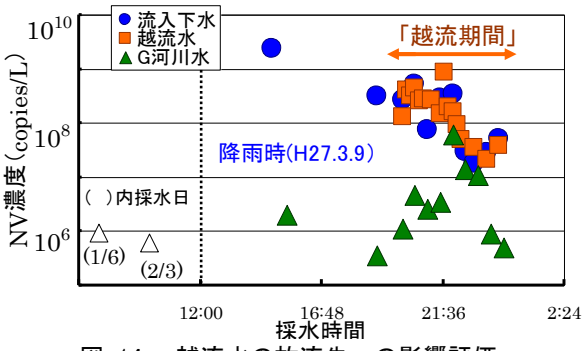


図-14　越流水の放流先への影響評価

下水処理場の施設拡張によって処理能力が増強されたことで、降雨時の遮集倍率向上にともなう越流水の影響が無い状況における調査結果を図-15 に示す。時間最大降雨量は 5.0mm、累積降雨量が 22.5mm における降雨当初の流入下水の NV 濃度は 10^8copies/L 程度であったが、

時間の経過とともに雨水による希釈により濃度低下が見られた。越流水の影響が無いG河川水のNV濃度は降雨初期において 10^4copies/L レベルであったが、その後多くの試料が検出限界値以下で推移しており、処理能力を増強し、越流状況を改善することにより放流先河川への影響が小さくなることが明らかとなった。

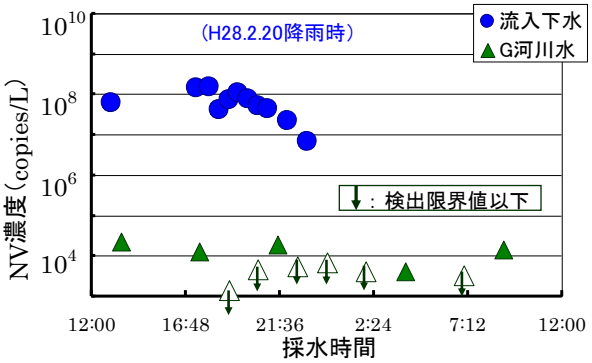


図-15 越流水の放流先への影響評価（遮集倍率向上）

3.4.2 合流式下水道越流水の対策技術によるＮＶ負荷の削減効果

降雨時に越流水対策として雨天時活性汚泥法（嫌気好気法）を導入しているL市M下水処理場におけるNV負荷の削減効果の調査結果を図-16に示す。26年度調査での降雨状況は、時間最大降雨量が5.5mm、2mm、累積降雨量は25mm、12.5mm、27年度では時間最大降雨量が18.5mm、6mm、累積降雨量は54mm、17.5mmであった。本調査時の雨天時バイパス流入量は最大で1Q分であった。雨天時活性汚泥処理時におけるNV負荷の削減効果は、流入負荷量を1とし流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ26年度では0.09～0.12、27年度は0.02～0.06であった。27年度はNV負荷の削減効果がより高まっているが、この要因としては反応タンク内のMLSS濃度の違いによるものと推定され、MLSSを若干高めることでNV負荷の削減効果が高まる可能性が明らかとなった。

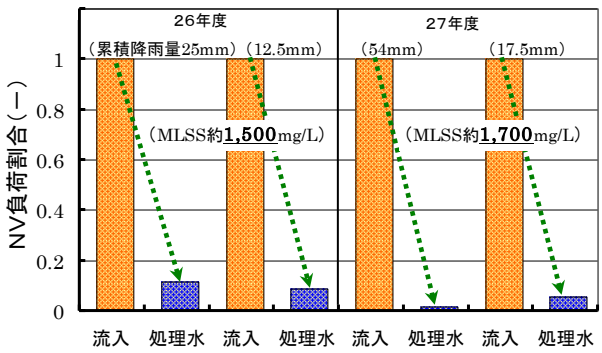


図-16 雨天時活性汚泥処理によるNV負荷の削減効果

雨天時活性汚泥処理を実施しなかったとすると、晴天時の受け入れ可能な流入水量である1Q分を超過したNVの負荷が公共用水域へ直接放流されることとなることから、雨天時活性汚泥処理により放流先河川水への負荷が低減しているものと考えられた。

また、SS、濁度とNV濃度の関係を整理し、その1例として濁度の結果を図-17に示す。NV濃度と濁度との間に高い相関関係（SS含む）が見られることから、濁度、SSなどを指標とすることでウイルス濃度の把握が簡易に行えるものと考えられた。

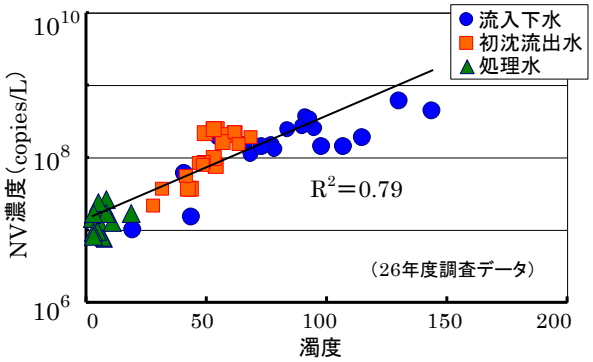


図-17 濁度とNV濃度の関係

3.5 水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築

3.5.1 塩素、紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化評価

抗生物質耐性大腸菌が抗生物質と同様に消毒剤に対し耐性機構を発現することが懸念されることから、塩素消毒に対する耐性評価とともに、薬剤を利用しない紫外線による不活化効果を評価した。塩素消毒による不活化評価結果を図-18、19に示す。抗生物質耐性大腸菌割合として、8剤の抗生物質に対し耐性を有しない0剤耐性大腸菌は塩素消毒前で約70%を占めていたが、塩素消毒後には約50%に低下した。1剤あるいは2剤以上の抗生物質に耐性を有する多剤耐性大腸菌の割合は、塩素消毒後の全てのケースにおいて上昇しており、これらの抗生物質

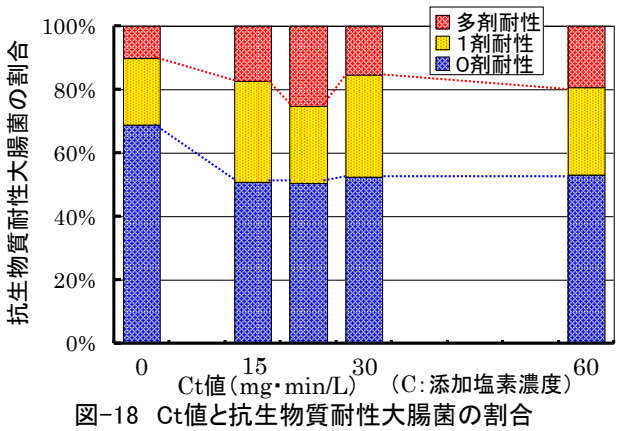


図-18 Ct値と抗生物質耐性大腸菌の割合

耐性大腸菌の多くは、0 剤耐性大腸菌に比較して塩素消毒耐性が高いものと考えられた。

また、この時の大腸菌の不活化率を図-19 に示すが、Ct 値を 30～60mgCl/L と高めても不活化率は 2.5～3 log 程度に留まった。

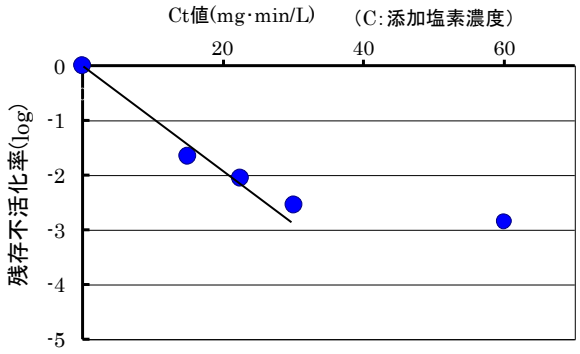


図-19　Ct値と大腸菌の残存不活化率

紫外線消毒による不活化評価結果を図-20 に示す。6 剤耐性大腸菌は 0 剤耐性大腸菌に比較して、紫外線に耐性を有している傾向が見られたが、照射線量を 10mJ/cm^2 とした比較的低線量において 5log 程度の不活化効果が得られていた。抗生物質耐性大腸菌が抗生物質と同様に次亜塩素酸ナトリウムに対し耐性を発現、また、紫外線消毒にも耐性を示す可能性が考えられた。

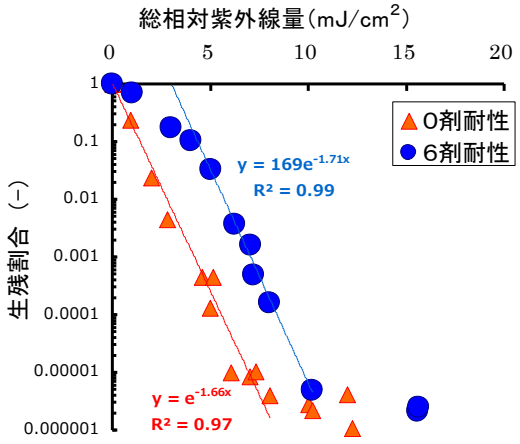


図-20　紫外線消毒による抗生物質耐性大腸菌の不活化特性

下水道統計[18]によれば、次亜塩素酸ナトリウムによる消毒を実施している下水処理場は約 900 ヵ所あり、平均添加濃度は 2mgCl/L、平均接触時間は約 20 分間であることから Ct 値を 40mg･min/L と仮定すると、放流水質基準の達成は見込めるが、その放流水に含まれる抗生物質耐性大腸菌の割合を高めている可能性があるものと考えられた。しかし、紫外線消毒では比較的低線量において多剤耐性大腸菌に対し高い不活化効果が得られる可能性があることから、抗生物質耐性菌への有効な対策手法の 1 つとして考えられる。

3.5.2 二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の消長

消毒後に残存した抗生物質耐性大腸菌を想定した消長把握の実験結果を図-21、表-9 に示す。二次処理水への添加にあたり、トリプトソイブイヨン培地で培養した後に感受性評価を行ったところ、7 剤耐性が 6 剤耐性となった以外に他の大腸菌に変化はなかった。処理水への添加当初の濃度を基準とし経過日数ごとの濃度比を図-21 に整理したが、最終的に 0 剤耐性と 25922 株では 3 倍程度、4 剤耐性と 35218 株は 2 倍程度上昇し、当初 7 剤耐性であった 6 剤耐性には大きな変化がなく、耐性の度合いと増殖能力に違いのあることが明らかとなった。

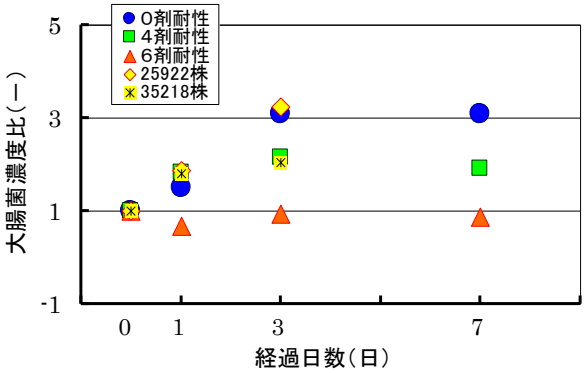


図-21　経過日数と大腸菌の濃度比

二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の増殖に伴う感受性の変化について表-9 に示す。各試料を経過日数ごとに採取し定量培養したコロニーの抗生物質感受性は、0 剤耐性で添加後から一部のコロニーに変化が見られ、7 日後までに採取した 120 コロニーの内 18 コロニーが、25922 株では 5 コロニー、35218 株は 4 コロニーで一部の抗生物質に耐性を示し、4 剤耐性では 1 コロニーのみ 1 剤耐性へと変化した。また、培養後に 6 剤耐性となった大腸菌は 120 のコロニーの内、108 のコロニーが 6 剤耐性を維持、12 のコロニーが当初の 7 剤耐性へと変化した。処理水へ添加後に増殖した多くの大腸菌が当初の耐性能

表-9 二次処理水中における抗生物質耐性大腸菌の感受性の変化

感受性試験結果(当初)	培養後	添加後	1日後	3日後	7日後	計
0剤耐性大腸菌	0剤	8／30	6／30	1／30	3／30	18／120
4剤耐性大腸菌 (ABPC, TC, CFDN, LVFX)	4剤	0／30	0／30	0／30	1／30	1／120
7剤耐性大腸菌(ABPC, TC, CFDN, LVFX, KM, ST, GM)	6剤	4／30	3／30	4／30	1／30	12／120
ATCC 25922株	0剤	2／30	3／30	－	－	5／60
ATCC 35218株	1剤	1／30	3／30	－	－	4／60

上段:変異コロニー数／下段:供試コロニー数

力を維持していることから、今回の培養条件では、耐性遺伝子が垂直伝播し受け継がれているものと考えられた。

放流先の環境条件（有機物、水温）などや、抗生物質への感受性の違いにより増殖する可能性があるため、放流先の水利用の状況に応じて極力、下水処理場にて低濃度化を図る必要があるものと考えられた。

一方、0剤耐性と25922株の大腸菌については、トリプトソイブイヨン培地による培養直後には感受性に変化が無かったが、処理水への添加実験の当初から一部の大腸菌で耐性を有する傾向が見られた。耐性遺伝子の保有状況を調査した既報[19]では、今回の評価と同様の8種類の抗生物質に対して、耐性を持たない大腸菌からもプラスミド性あるいは染色体上の耐性遺伝子が検出されていることから、環境条件が変化することで耐性能力を発現する可能性が推定された。

4．まとめ

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した。以下に得られた結果を示す。

「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の実態解明」

1) 評価対象とした8剤の抗生物質に対しABPCに耐性を有する大腸菌が下水、河川水、病院排水でともに多く検出され、さらに、多剤耐性大腸菌の大部分がABPCに耐性を有していることが明かとなった。

2) 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は検出されなかったため、現状においてCREの存在状況は低いと推定された。

3) 放流水の影響を受ける河川水中での大腸菌の存在割合で見ると、多剤耐性大腸菌の割合が上昇していた。

4) 公共用水域におけるNV、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NV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は検出されなかった。

「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」

7) 逆転写回数を3回、逆転写RNA量を0.1μg、PCR反応容量に対する供試水量割合を0.01とした条件によってNVの検出濃度を高められる可能性があると考えられた。

8) 濃縮方法が異なっても上記の条件とすることで、二次処理水、河川水とも最大値が得られた。

「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」

9) 被災下水処理場の段階的復旧技術における簡易沈殿処理時には、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。

10) 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。

11) 初沈流出水からの原虫類の検出濃度・割合は低いことから、調査対象とした被災下水処理場の処理区域内において、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。

12) 段階的な復旧対策技術を経て活性汚泥処理への移行当初は生物相が生成途上であることから、NV除去率が劣ることに留意が必要であることを明らかにした。

13) A²/O法と標準活性汚泥法の活性汚泥では、10KDa以下のペプチド量に大きな違いが見られ、NVの除去能に影響を及ぼす要因の1つと考えられた。

「適正な流域管理のための非点源負荷と対策技術の構築」

14) 合流式下水道の越流水は公共用水域へのNV汚濁負荷源となる可能性が高いと考えられた。

15) 降雨時の遮集倍率を向上させ越流状況を改善することにより、放流先河川への影響が小さくなることが明らかとなった。

16) 雨天時活性汚泥処理時におけるNV負荷の削減効果は、流入負荷量を1とし流入負荷量に対する処理水の負荷量比を求めたところ0.02～0.12であった。

17) 雨天時活性汚泥法において、反応タンク内のMLSS濃度を若干高めることでNV負荷の削減効果が高まる可能性が明らかとなった。

「水環境保全システムとしての適切な対策技術の構築」

18) 塩素消毒により抗生物質耐性大腸菌の残存割合が高まる傾向が見られた。

19) 紫外線消毒では、比較的低線量においても多剤耐性大腸菌に対し高い不活化効果が得られる可能性があった。

20) 二次処理水へ添加した抗生物質耐性大腸菌は、抗生物質への耐性の度合いが異なることで増殖能力に違いのあることが明らかとなった。

21) 二次処理水へ添加後に増殖した多くの大腸菌が当初の抗生物質耐性能力を維持していることから、耐性遺伝子が垂直伝播し受け継がれているものと考えられた。

謝辞

本研究・調査を実施するにあたり、調査対象とした各下水道管理者には特段のご配慮・ご協力を頂いた。また、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) G7 伊勢志摩首脳宣言、平成 28 年 5 月 27 日.

2) ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States,2013: http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/

3) 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.

4) 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、土木研究所資料第 4212 号.

5) 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.

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) 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.

8) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介(2009) 各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題, 第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集,239-240.

9) H.Katayama, et al., (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plant in Japan, Water Research, 42, 1441-1448.

10) 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.

11) Instruction of Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

12) 橋本一、井上松久 (1993) 病原菌の薬剤耐性ー機構の解明とその対策ー、学会出版センター.

13) 平松啓一 編、改訂 2 版、耐性菌感染症の理論と実践、医薬ジャーナル社.

14) 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.

15) (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.

16) (社)日本下水道協会(1997)下水試験方法（上巻）.

17) 諏訪守、鈴木穣、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.

18) (公社)日本下水道協会(2013) 平成 23 年度版下水道統計.

19) 尾崎正明、諏訪守、陶山明子 (2007) 水環境中における病原微生物の消長に関する研究、平成 18 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料第 4080 号、104-111.

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
研究期間：平成 23～27 年
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、桜井健介

【要旨】
開発途上国における省エネルギー型の水処理技術として高速藻類増殖池(HRAP)に着目し、HRAP で増殖した藻類の沈降を促進させるため *Moringa oleifera* の種子の水溶液を凝集剤として適用させたところ、HRAP の藻類の沈降促進に効果があり、凝集剤添加量や pH の違いが沈降効果に影響を与えること等を確認した。それに伴って生じる下水汚泥や藻類の熱量回収量は、時間・敷地面積当たり、371kJ/(m²・d)であった。下水処理水の安全なかんがい利用に資するため、開発途上国で重症化の懸念があるノロウイルスを対象に、安定化池やエアレーティッドラグーンの下水処理方法による除去率を測定した。さらに、開発途上国におけるノロウイルス感染 1 件あたりの疾病負荷を整理し、健康影響の指標として障害調整生存年数を用い、ノロウイルスによる健康影響軽減を勘案して、安定化池やエアレーティッドラグーン処理水のかんがいへの適切な利用方法を示した。
キーワード：高速藻類増殖池、安定化池、かんがい、ノロウイルス、定量的微生物リスク評価

1. はじめに

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。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場合がある。

本研究は、平成 23-27 年度にかけて、開発途上国の近年の社会的要請を踏まえ、エネルギー消費量の少ない水処理技術の開発とそれに伴って生じる下水汚泥や藻類の有効利用可能性の検討、下水処理水の安全なかんがい利用方法の提示を目指した。

平成 23 年度は、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。特に、エネルギー消費量の少ない水処理技術として、高速藻類増殖池(High Rate Algal Ponds, HRAP)等の導入が有望であるが、適用事例が少ないため適用可能性の評価に資するデータの蓄積が必要と考えられた。

平成 24 年度は、水・汚泥処理技術の適合性の評価やそれらの適用方法の開発に向け、統計情報からアジア地域の現状の整理を行った。また、HRAP で課題となっている藻類の沈降促進を目指し、恒温器内の人工的な環境下で下水から培養された藻類に、熱帯・亜熱帯地域に生育する *Moringa oleifera* の種子の水溶液(MO 溶液)を添加し、撹拌したところ、藻類の沈降が促進することを確認した。

平成 25 年度は、恒温器内の人工的な環境下で下水から培養された藻類に、MO 溶液を凝集剤として適用する条件の最適化を目指し、ジャーテストを行い、凝集剤添加量や pH の違いが沈殿効果に与える影響を調べた。

平成 26-27 年度は、HRAP の藻類を、MO 溶液を用いて効率的に回収する方法の確立を目指し、容量 440L の HRAP を屋外に設けて藻類を増殖させ、MO 溶液の添加濃度が藻類の凝集沈殿に与える影響を調査した。さらに、燃料としての利用可能性を検討するため HRAP で増殖した藻類の熱量を測定した。

また、開発途上国における下水処理水の安全なかんがい利用にも着目し、開発途上国で重症化の懸念があるノロウイルスを対象に、安定化池やエアレーティッドラグーンによる除去率を測定し、農作物の喫食者を想定したシナリオについて、定量的微生物リスク評価(Quantitative microbial risk assessment, QMRA)の手法を用いて、下水処理水のかんがいへの適切な利用方法を示した。

表１　下水道施設の整備に関係する経済・衛生・水資源・エネルギー・農業等の統計情報

	GNI per capita, PPP (current international $, 2011)	Improved sanitation facilities (% of population with access, 2010)	Renewable internal freshwater resources per capita (cubic meters, 2009)	Arable land (hectares per person, 2009)	Agriculture value added per worker (constant 2000 US$)	Energy self-sufficiency rate, net (% of energy use, 2009)	CO2 emissions (metric tons per capita, 2008)
United States	48,890	100	9,186	0.53	47,320	78	18.0
United Kingdom	35,940	100	2,346	0.10	26,330	81	8.5
Japan	35,530	100	3,371	0.03	40,763	20	9.5
Malaysia	15,190	96	20,752	0.06	6,432	134	7.6
China	8,450	64	2,113	0.08	521	92	5.3
Thailand	8,390	96	3,268	0.22	715	60	4.2
Indonesia	4,530	54	8,504	0.10	710	174	1.7
Philippines	4,160	74	5,223	0.06	1,126	60	0.9
India	3,620	34	1,197	0.13	479	74	1.5
Vietnam	3,260	76	4,178	0.07	361	120	1.5
Pakistan	2,880	48	323	0.12	963	76	1.0
Bangladesh	1,940	56	714	0.05	480	84	0.3
Median	8,360	85	2,769	0.14	2,755	77	2.7
Number of countries	162	171	173	203	148	134	197

（世界銀行資料より作成）

2. 統計情報からのアジア地域の現状の整理

近年の開発途上国の社会的要請を踏まえた水・汚泥処理技術の適合性の評価やそれらの適用方法の開発に向け、統計情報を用い国レベルの視点から水・汚泥処理技術の現状について整理した。対象国は、アジア地域 9 か国（マレーシア、中国、タイ、インドネシア、フィリピン、インド、ベトナム、パキスタン、バングラデシュ）と日本、米国、英国とした。

世界銀行の資料 [1]より作成した下水道整備に関係する経済・衛生・水資源・エネルギー・農業等の統計情報を表 1 に示す。衛生施設普及率については、年々改善が進んでいるものの、インドネシア、インド、パキスタン、バングラデシュは、いまだ 60%を下回っている。水資源について、アジア地域は、一人当たりの水資源利用可能量が日本並みの国が多く、比較的恵まれていた。ただし、インド、パキスタン、バングラデシュは、日本の 1/3～1/10 程度であり、処理水の再利用（間接利用を含む）の需要が高いと思われる。また、農業生産高について、マレーシアを除いて各国とも労働者当たりの農業生産高が日本の 1/36～1/113 程度と低かった。安価な汚泥肥料が望まれるものと考えられた。

また、平成 23 年度の調査 [2]や文献 [3]によると開発途上国の排水基準は、下水処理水の放流先の用途によって設定され、BOD20 から 60 程度まで幅広かった。開発途上国では、中級処理を含む幅広いレベルの処理技術が求められているものと考えられた。

3. 恒温器内の人工的な環境下で下水から培養された藻類の *Moringa oleifera* 凝集剤による凝集沈殿効果

HRAP は、滞留日数 2-8 日、水深 0.2-1m で連続的に攪拌される人工池であり、藻類の光合成による酸素供給によって、排水中の溶解性有機物が従属栄養細菌によって好気分解するのを促進する処理方法である [4]。バイオ燃料への変換のために藻類を生産する技術が世界的に研究されており、HRAP は経済的に実施可能で、かつ、最小の環境影響でできる方法と考えられている [5]。しかし、沈殿しにくい藻類の除去及び回収効率が悪いことが、HRAP の課題の一つとなっている。

Moringa oleifera は、アジア、中東、アフリカの熱帯、亜熱帯地域で広く生育する樹木で、MO 溶液が、数ある天然凝集剤の中でも優れた凝集作用を持つ [6]ことが知られている。MO 溶液が HRAP の藻類の凝集沈殿に効果があれば、HRAP の導入が容易になると思われる。また、現在の化学凝集剤の代わりに *Moringa oleifera* の種子が利用されることになれば、化学凝集剤の生産に伴って排出される温室効果ガスの排出抑制になると思われる。

近年、*Moringa oleifera* の凝集性に関しては、いくつか報告がある。Pritchard ら [7]は、開発途上国での浄水処理のための凝集性を評価し、硫酸アルミニウムや硫酸鉄には劣るが、十分な処理能を有することが報告している。Bhuptawat ら [8]は、インド国の下水の処理に適用し、硫酸アルミニウムと比較しながら、下水処理への適用性を検討している。Segupta ら [9]は、ガーナ国の農業かんがい水等に適用し、濁度と寄生蠕虫卵の除去に有効であることを示している。Vieira ら [10]は、乳業排水に、安価に適用

可能であることを報告している。しかし、藻類への適用事例は見当たらない。

そこで、本研究の目的は、MO溶液によるHRAPの藻類の凝集沈殿処理への適用可能性の評価に向けて、簡易試験により、MO溶液による下水培養藻類の凝集沈殿効果を明らかにすることである。試験にあたり、pHの変化がMO溶液による凝集沈殿効果に与える影響について検討を行った後に、MO溶液の添加量が藻類の凝集沈殿効果に与える影響を検討した。比較対象としてポリ塩化アルミニウム(PAC)による藻類の凝集沈殿効果も併せて試験した。また、Ca^{2+}とMg^{2+}がMO溶液と共存することで凝集能力が向上することが知られており[11]、それらの下水培養藻類の凝集沈殿への影響も調査した。

3.1 方法

3.1.1 下水による藻類の培養

HRAPの藻類培養液を想定し、模擬的に培養液を作成した。培養液は、静置した流入下水の上澄み5Lを容量5Lの三角フラスコに入れ、回分式で曝気およびマグネチックスターラーで1,000rpmの撹拌を行い、照明付きの恒温機内で水温24℃、照射条件は光量子フラックス150 μ mol m^{-2} s^{-1}、12h/dで2週間培養し作成した。流入下水は、処理区の一部に合流式下水道を採用している実下水処理場から晴天日（採水前の24時間の降雨量が0mm）に採取した。実験は2回に分けて行い、実験毎に流入下水を採取して培養した。

3.1.2 MO溶液の作成

MO溶液は、精製を行わず、作成が比較的容易な既報の方法[8]とした。すなわち、*Moringa oleifera*の種の内部2gを1.0mol/Lの塩化ナトリウム水溶液200mLに加え、30分撹拌したのち、孔径8.0μm、0.45μmのニトロセルロースメンブレンフィルター（ミリポア社）の順にろ過した。MO溶液のTOCを測定し、炭素量で注入量を管理した。TOC濃度は毎回やや異なり、1,300mg/L程度であった。また、MO溶液の二クロム酸カリウムによる酸素要求量（COD_{Cr}）も測定した。MO溶液の保管中の劣化が不明であったため、溶液は作成後、2日以内に使用することとした。

3.1.3 ジャーテスト

pHの変化がMO溶液による凝集沈殿効果に与える影響を評価するため、異なるpHでMO溶液を反応させ、凝集沈殿後の上澄みの水質を分析した。手順は、下水による藻類の培養液400mLを500mLビーカーに入れ、水酸化ナトリウム溶液または希硫酸でpH調整をした後、急速・緩速撹拌しながらMO溶液を終濃度で20mg-C/Lを添加し、pH4と11の間で反応させた。90分間静置した後、上澄み100mLを水面付近からピペットで採取した。採取した上澄みについて、残存する藻類量の指標としてクロロフィルa、藻類に限らない懸濁物量の指標として波長660nmの吸光度（以下、A_{660}と表記する）、凝集のしやすさを示す指標としてゼータ電位、凝集剤添加による変化の確認のためにpHと総アルカリ度を測定した。MO溶液を注入しない試料も同様に静置し、上澄みの分析をした。

次に、MO溶液の添加量が藻類の凝集沈殿効果に与える影響を評価するため、凝集剤の添加量を変化させて、凝集沈殿後の上澄みの水質を分析した。手順は、500mLビーカーに入れた下水による藻類の培養液400mLを5点用意し、急速・緩速撹拌しながら終濃度で、それぞれ、0、5、10、20、40mg-C/Lを添加し、pH調整なしで反応させた。また、PACはpH調整なしまたはpH7の条件下で、終濃度で0、1.5、3、6、12mg-Al/Lを添加し、同様に試験した。採取した試料のクロロフィルa、全COD_{Cr}（$TCOD_{Cr}$）、溶存態COD_{Cr}（$DCOD_{Cr}$）を測定した。

また、塩化カルシウムと塩化マグネシウムを添加し、Ca^{2+}とMg^{2+}濃度をほぼ倍増させて、pH調整無しで20mg-C/LのMO溶液により凝集沈殿させ、同様に試験した。

凝集のための急速・緩速撹拌は、ジャーテスター（宮本理研工業株式会社、JMD-4E）を用い、2分間150rpm（G値：86 s^{-1}）の後、15分間30rpm（G値：7.7 s^{-1}）で撹拌した。PACは、酸化アルミニウム濃度10.0～10.6重量%のものを用いた。

3.1.4 水質分析

実験中の水質の分析の方法は、以下のとおり行った。クロロフィルaの分析は、分光光度計（島津製作所株式会社、Spectrophotometer UV-160）を用い、河川水質試験方法（案）の三波長吸光光度法に従った。A_{660}は分光光度計にて光路長10mmで波長660nmの吸光度を測定した。pHおよび水温の測定にはポータブルpH計（東亜DKK株式会社、HM-30Pと31P）を使用した。ゼータ電位の測定はDelsa Nano HC（ベックマン・コールター社）と低濃度用フローセルを使用した。MO溶液のTOC分析にはTOC-5000（島津製作所株式会社）を使用した。$TCOD_{Cr}$、$DCOD_{Cr}$およびCa^{2+}やMg^{2+}濃度の測定は吸光光度計DR3900および試薬（ともにハック社）を用いた。$DCOD_{Cr}$およびCa^{2+}とMg^{2+}濃度の測定は、ガラス繊維ろ紙（ワットマン社、GF/B）のろ過試料を用いた。総アルカリ度の分析は、下水試験方法に従った。

3.2 結果

3.2.1 pHがMO溶液の凝集沈殿効果に与える影響

実験原水として用いた藻類を培養した下水（MO溶液注入前）のpHは9.53、クロロフィルa濃度は3,125μg/Lで、その試料の静置後の上澄みは1,281μg/Lであった。異なるpH条件下でMO溶液により凝集沈殿した試料の上澄みのク

ロロフィルa濃度を図1に示す。図1のとおり、高いクロロフィルa濃度を示したpH5と6の条件で反応した試料の上澄みを除いて、MO溶液により凝集沈殿した試料の上澄みは67μg/Lから113μg/L であり、MO溶液が沈殿を促進する効果が確認された。しかしながら、pH5と6は、それぞれ369μg/L、259μg/Lと高く、凝集沈殿効果が劣るpHが存在した。pH7と11の間では、pHが高いほどクロロフィルa濃度が高くなる傾向が見られた。HRAPの放流水はpH7より高くなることが多い[1]が、夜間に重点的に凝集させる、凝集前に日陰を設けるなどの運転方法の工夫や薬品によるpH調整などにより、pH7に近付けた方が効率よく沈殿すると考えられた。なお、A_{660}も同様に、pH5と6が高くなり、pH7と11の間では、pHが高いほどA_{660}も高くなる傾向が見られ（図2参照）、藻類だけでなく濁質全体も同様の対策が有用とが考えられた。

図3に異なるpH条件下で20mg-C/LのMO溶液により凝集沈殿した試料の上澄みのゼータ電位を示す。pH7では、最も増加し、藻類の凝集に適していると言われるゼータ電位（−12mV）[12]に達した。

なお、MO溶液の添加によるpHの低下は最大で約0.1であり、大きく変化しなかった。また、原水の総アルカリ度は96$CaCO_3$-mg/Lであり、MO溶液による凝集後もほとんど変化が無かった。

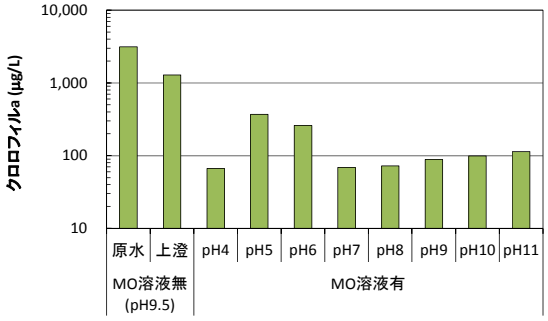


図1　異なるpH条件下で20mg-C/LのMO溶液により凝集沈殿させた試料の上澄み液のクロロフィルa濃度

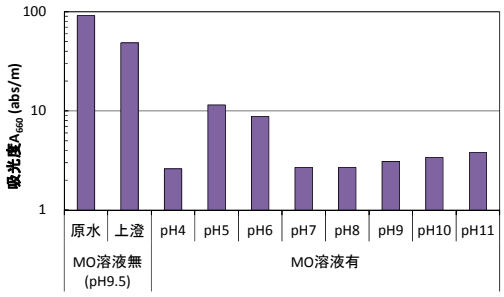


図2　異なるpH条件下で20mg-C/LのMO溶液により凝集沈殿した試料の上澄み液の吸光度A660

3.2.2　MO溶液の添加量が藻類の凝集沈殿効果に与える影響

本試験で用いた藻類の培養環境下では、pH は 24 時間内に 9 と 11 の間で変動し、消灯後 12 時間経過時に pH が 9 程度で最低になった(図 4 参照)。そのため、pH が最も 7 に近付く消灯後 12 時間経過時に実験原水を採取し、試験した。実験原水として用いた藻類を培養した下水の pH は 9.48、クロロフィル a 濃度は 2,119μg/L であった。その試料の静置後の上澄みは 1,085μg/L であった。

MO 溶液(pH 調整無し)またはPAC(調整無しと pH7)により凝集沈殿した試料の上澄みのクロロフィル a 濃度を図 5 に示す。MO 溶液の添加量が多い時に、クロロフィル a 濃度は低下し、凝集沈殿効果の向上が見られた。5mg-C/L 添加時に、凝集剤添加無しで沈殿させた時よりもさらに 60%を除去し、20mg-C/L 添加時には 94%をさらに除去した。PAC も同様に、添加量が多い時にクロロフィル a 濃度は低下し、pH7 に調整したところ、少ない添加量で効率よく低下した。

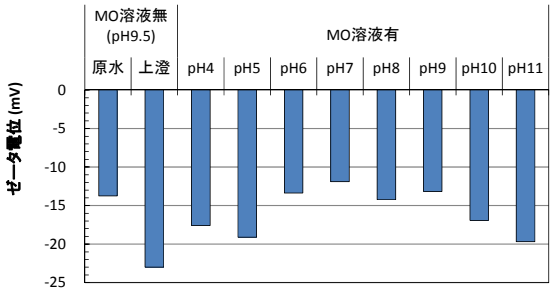


図3　異なるpH条件下で20mg-C/LのMO溶液により凝集沈殿した試料の上澄み液のゼータ電位

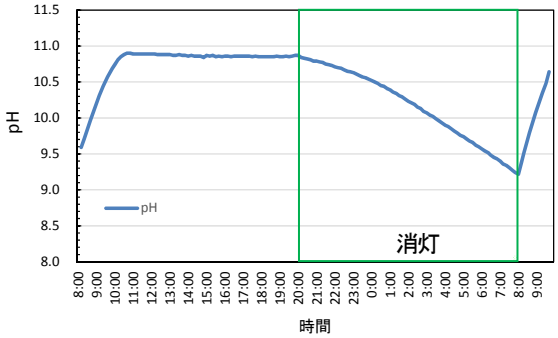


図4　照明付き恒温機による藻類の培養環境下でのpHの連続計測（20時から8時までは消灯）

また、MO溶液(pH調整無し)により凝集沈殿した試料の上澄みのTCOD$_{Cr}$とDCOD$_{Cr}$を図6に示す。MO溶液の添加量を増やすにつれてDCOD$_{Cr}$が増加していた。これは、MO溶液自身が持つ有機物が残留するためと思われる。MO溶

液40mg-C/L($DCOD_{Cr}$で135mg/L)相当を添加した際、上澄みの$DCOD_{Cr}$は、MO溶液を添加しなかった場合と比較して、41mg/L多く、有機物添加量の30%が上澄み中に残留しているものと計算された。そのため、流出する有機物の最小化の観点からは、MO溶液の過剰な添加に配慮する必要があると思われる。

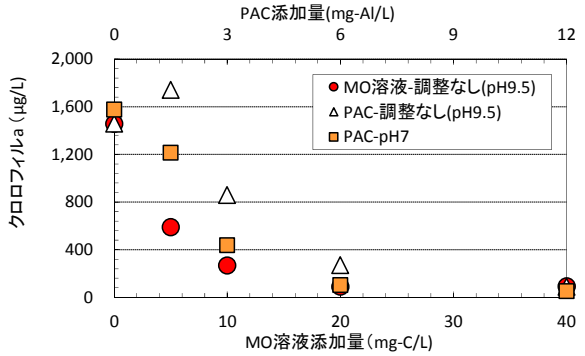


図5 MO溶液(pH調整無し)またはPAC(調整無しとpH7)により凝集沈殿した試料の上澄みのクロロフィルa濃度

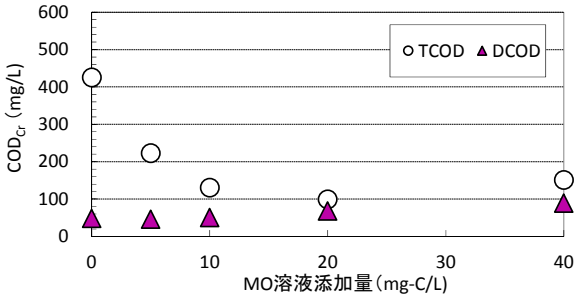


図6　MO溶液(pH調整無し)により凝集沈殿した試料の上澄みの$TCOD_{Cr}$と$DCOD_{Cr}$

3.3　Ca^{2+}とMg^{2+}濃度の変化がMO溶液による凝集沈殿効果に与える影響

pH調整無しで20mg-C/LのMO溶液で反応させた試料の上澄み中のクロロフィルa濃度は96.8μg/Lであった（図1参照）。それと比較して、Ca^{2+}とMg^{2+}濃度をほぼ倍増させて、同様に試験したところ、クロロフィルa濃度は65.3μg/Lとなり、さらに低下した。本試験で用いた藻類を培養した下水は、Ca^{2+}濃度18mg/L、Mg^{2+}濃度2.7mg/Lであった。この結果より、凝集の対象が藻類でも、Ca^{2+}とMg^{2+}がMO溶液と共存することで凝集能力が向上すること確認された。開発途上国で導入する際、地域によっては、本試験で用いた原水よりCa^{2+}とMg^{2+}濃度が高いことが考えられ、その様な場合は、本試験で用いた原水よりも効率的に藻類が除去できる可能性があると考えられる。

3.4 恒温器内の人工的な環境下で下水から培養された藻類の*Moringa oleifera*凝集剤による凝集沈殿効果のまとめ

HRAP で発生する藻類の沈殿効率を向上させるため、下水から培養された藻類に MO 溶液を凝集剤として沈殿実験を行った。その結果、以下のことが明らかになった。

1) MO溶液が下水で培養された藻類の沈殿を促進する効果が確認された。
2) pH4と11の間で20mg-C/LのMO溶液により藻類を凝集沈殿させたところ、pH5と6は効果が小さく、pH7と11の間では、pHが低いほど効果が大きくなった。
3) pH調整無しの条件下で、添加したMO溶液の$DCOD_{Cr}$の30%が上澄み中に残留した。
4) Ca^{2+}とMg^{2+}濃度をほぼ倍増させて、MO溶液で藻類を凝集沈殿させたところ、凝集沈殿効果が向上した。

4. HRAP の藻類の植物由来凝集剤による凝集効果と燃料としての利用可能性調査

前章の調査で、pH の違いが藻類の沈降性に与える影響を調査したところ、HRAP 処理水で想定される pH7 以上において、pH7 が最も効率良く沈降し、pH が高くなるにつれて、沈降性が低下した。このため、HRAP の藻類の沈降性を高めるには、凝集前に日陰を設けて pH7 に近づけることが有効と考えられた。そのため、MO 溶液を用いて効率的に HRAP の藻類を回収する方法の確立を目指し、日陰を設けた時の pH の変化を把握するため、屋外に設置した HRAP の後段に遮光槽を設け、HRAP と遮光槽中の処理水の pH を測定した。また、MO 溶液の添加濃度が藻類を含む浮遊物質の凝集沈殿に与える影響を調査した。さらに、燃料としての利用可能性を検討するため HRAP で増殖した藻類の熱量を測定した。

4.1 実験方法

4.1.1　実験装置および運転方法の概要

茨城県内の屋外に設置した実験装置の概略を図 7 に示す。実験装置は、最初沈殿池（容量 50L、HRT8 時間）、HRAP（容量 440L、HRT3 日間）、遮光槽（容量 50L、HRT8 時間）で構成した。HRAP の有効水深は 40cm とした。全天日射量が多くなる夏季に、実下水処理場の下水を毎分 100mL 流入させ運転した。遮光板設置による処理水の pH への影響を調査するため、運転の途中から遮光槽に遮光板を設置した。HRAP と遮光槽で pH を 15 分間隔で測定した。pH 測定には、ポータブル pH 計（HM-30P、東亜 DKK 株式会社）を用いた。

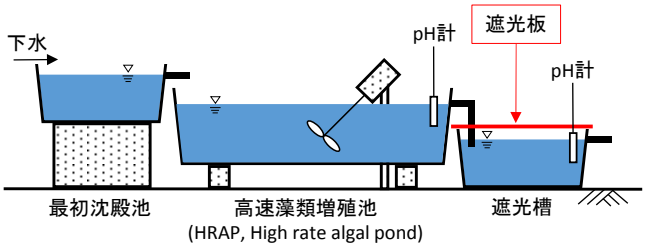


図 7　実験装置の模式図

4.1.2 植物由来凝集剤の調製

MO 溶液は、精製を行わず、作成が比較的容易な既報の方法[11]とした。すなわち、*Moringa oleifera* の種の内部 2g を 1.0mol/L の塩化ナトリウム水溶液 200mL に加え、30 分撹拌したのち、孔径 8.0μm、0.45μm のニトロセルロースメンブレンフィルター（メルク株式会社）の順にろ過した。MO 溶液の TOC を測定し、炭素量で注入量を管理した。TOC 分析には TOC 計（TOC-5000、島津製作所株式会社）を使用し、測定値は 1,310mg-C/L であった。

4.1.3　MO 溶液の添加濃度が藻類を含む浮遊物質の凝集沈殿に与える影響

MO 溶液の添加濃度が藻類の凝集沈殿に与える影響を把握するため、異なる添加濃度で凝集沈殿させ、上澄み液の水質を分析した。手順は、HRAP で採取した試料を遮光しつつ 3 時間静置した後、400mL を 500mL ビーカーに移し、0、5、10、20mg-C/L となるように MO 溶液を添加し、急速・緩速撹拌した。試験時の試料の pH は 7.2 であった。90 分間静置した後、上澄み 100mL を水面付近からピペットで採取し、ゼータ電位、クロロフィル a(Chl.a)を測定した。急速・緩速撹拌は、ジャーテスター（JMD-4E、宮本理研工業株式会社）を用い、2 分間 150rpm（G 値 : 86 s^{-1}）の後、15 分間 30rpm（G 値 : 7.7 s^{-1}）で撹拌した。Chl.a の分析は、分光光度計（Spectrophotometer UV-160、島津製作所株式会社）を用い、河川水質試験方法（案）[13]の三波長吸光光度法に従い測定した。ゼータ電位の測定は、ゼータ電位計（Delsa Nano HC、ベックマン・コールター株式会社）と低濃度用フローセルを使用した。また、藻類を含む浮遊物質の凝集沈殿状況を Chl.a 沈殿率として評価することとし、凝集前の原液と凝集沈殿後の上澄み液の測定値を用いて式(1)によって計算した。

Chl.a 沈殿率(%)＝｛(原液の Chl.a 濃度－上澄み液の Chl.a 濃度）／原液の Chl.a 濃度｝×100 …(1)

4.1.4　遠心分離により回収された藻類を含む浮遊物質の熱量

HRAP で培養された藻類を含む浮遊物質の高位発熱量の測定のため、HRAP 処理水 10L を 1 週間間隔で 3 回採取した。その都度、MO 溶液を 20mg-C/L となるよう添加し、前節と同程度の G 値および撹拌時間で急速・緩速撹拌し、大容量遠心機（H-7000UL、株式会社コクサン）により、2,000g で 20 分間遠心分離し、沈渣を凍結乾燥機（FDU-2100、東京理化器械株式会社）で凍結乾燥させた。その凍結乾燥試料を、粉状にして真空式断熱々量計（OSK150、小川サンプリング株式会社）により高位発熱量を測定した。

4.2 実験結果

4.2.1 遮光板設置による処理水の pH 低減効果

図 8 に、遮光板設置前後の HRAP と遮光槽の pH の経時変化を示す。遮光板設置前では、HRAP の pH のピークから約 2 時間後に、遮光槽の pH のピークが生じていた。遮光板設置後、HRAP の pH は最大で 8.5 まで上昇したが、遮光槽の pH は 7.0-7.3 の範囲となり、凝集の最適値(pH7)に近づいた。

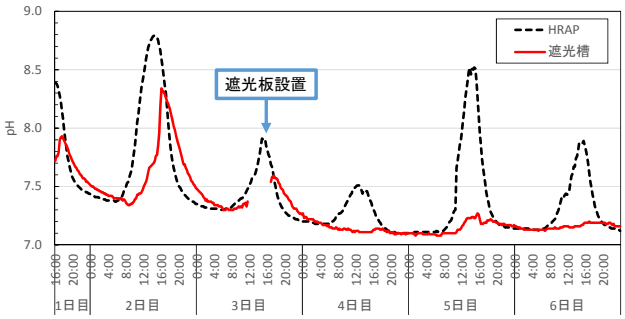


図 8 遮光板設置前後の高速藻類増殖池（HRAP）と遮光槽中の処理水の pH

4.2.2　MO 溶液の添加濃度が藻類を含む浮遊物質の凝集沈殿に与える影響

図 9 に MO 溶液の添加濃度と凝集沈殿後の上澄み液のゼータ電位と Chl.a 濃度を示す。添加前の原液の Chl.a 濃度は 348μg/L、ゼータ電位は－20.6mV であった。MO 溶液添加濃度の増加と共に、ゼータ電位は増加した。MO 溶液添加濃度 20mg-C/L では、ゼータ電位は－11.6mV となり、藻類の凝集に適していると言われるゼータ電位（－12mV 以上）[12]に達した。凝集沈殿後の上澄み液の Chl.a 濃度は、今回の MO 溶液添加条件の中では 20mg-C/L で最も低かった。また、Chl.a 沈殿率は、MO

溶液を添加しない場合(0mg-C/L)は 28%であったが、MO 溶液添加濃度 20mg-C/L の場合は 68%であった。

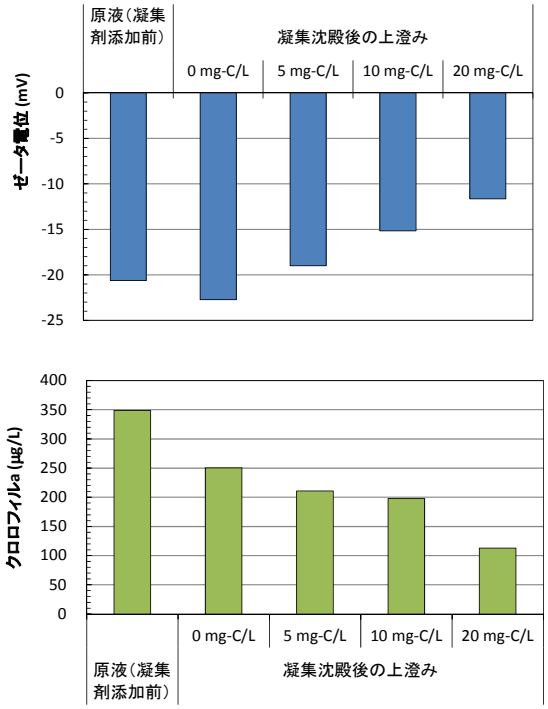


図 9　ジャーテストによる植物由来凝集剤（*Moringa oleifera* の種子の水溶液）の添加濃度と凝集沈殿後の上澄み液のゼータ電位（上図）とクロロフィル a（下図）

4.2.3　遠心分離により回収された藻類を含む浮遊物質の熱量

MO 溶液を添加し、遠心分離して回収した藻類を含む浮遊物質の高位発熱量の平均は 19.4kJ/g-dry であった。これは、ニュージーランドで行われた同様の事例 [14]（19-22kJ/g-dry）と同程度であった。この藻類を含む浮遊物質は、下水汚泥の焼却や発電などの際に、燃料として利用できる可能性がある。

また、藻類を含む浮遊物質の遠心分離による回収量の平均は、時間・敷地面積当たりに換算すると 19.1g-dry/(m²・d)であり、熱量は 371kJ/(m²・d)であった。仮に、MO 溶液を 20mg-C/L となるように添加し、浮遊物質を 68%回収することができた場合、回収熱量は 252kJ/(m²・d)となる。これは、回収熱量を高めるため沈殿した藻類を返送して培養する方法[14]で得られた熱量 195 kJ/(m²・d)と比べて高く、回収熱量を高める方法として有望と考えられる。

4.3　HRAP の藻類の植物由来凝集剤による凝集効果と燃料としての利用可能性調査のまとめ

実下水処理場の流入下水を用いて、屋外に設置した HRAP を HRT3 日、有効水深 40cm で運転し、以下の知見を得た。

1) HRAPの後段に遮光槽を設けることで、処理水のpHは7に近づいた。MO溶液が下水で培養された藻類の沈殿を促進する効果が確認された。
2) HRAPで採取した藻類を含む処理水を対象としたジャーテストの結果、Chl.a沈殿率は、MO溶液を添加しない場合は28%であり、MO溶液添加濃度20mg-C/Lの場合は68%であった。
3) HRAPで採取した藻類を含む処理水にMO溶液を添加し、遠心分離して回収した沈渣の高位発熱量の平均は19.4kJ/g-dryであり、時間・敷地面積当たり、371kJ/(m²・d)であった。

5. 開発途上国における下水処理水の安全なかんがい利用方法の検討

開発途上国では、下水や下水処理水等をかんがいに利用する場合がある[15]。下水や下水処理水がかんがい利用される場合には、農作物の喫食者に対し、病原微生物による健康被害が生じる懸念がある。特に、ノロウイルス(NoV)は、開発途上国で乳幼児 109 万人を入院させ、21.8 万人を死亡させていると推測され、開発途上国で重症化する傾向が報告[16]されており、注目すべき病原微生物の一つと考えられる。しかし、開発途上国における下水処理水中の病原微生物やかんがい利用時の健康影響に関する情報は乏しく、開発途上国において導入が見られる安定化池(Waste stabilization ponds, WSP)やエアレーティッドラグーン(Aerated lagoons, AL)での、NoV 濃度の測定事例は少ない。また、「下水の農業利用に関する WHO ガイドライン」[17]においても、ロタウイルス(RV)などの病原微生物による健康影響について検討されたが、NoV は対象となっていない 。

そこで、健康影響の指標として障害調整生存年数(Disability-adjusted life year, DALY)を用い、NoV による健康影響軽減の観点から、WSP や AL の処理水のかんがいへの適切な利用方法を明らかにすることが有用であると考えられる。手順は、まず、実際の WSP や AL の NoV 除去率を求めた。次に、農作物の喫食者を想定したシナリオについて、QMRA の手法を用いて、健康影響目標値以下を達成可能な NoV 除去率を示した。最後に、それらを比較し、下水処理水のかんがいへの適切な利用方法を示した。

表２　対象処理場の処理方法、流入量と平均滞留時間

処理場	処理名称	処理構成	計画流入量(m^3/日)	流入量(m^3/日)	平均滞留時間
A	WSP	嫌気性池＋好気・嫌気池＋熟成池	約 80,000	約 40,000	約 20 日
B	AL	曝気池＋沈殿池	約 50,000	約 20,000	約 3 日
C	AL	曝気池＋沈殿池	約 20,000	約 10,000	約 2 日

5.1 WSP、AL における NoV の除去率

5.1.1　調査方法

下水処理におけるNoV濃度の除去に関する調査は、インドネシア共和国の表2で示した下水処理場で1度ずつ行った。流入水、処理水中のNoV genogroup1, 2 (G1, G2)濃度、浮遊物質を測定し、NoVの除去率(R)と対数除去率(LR)を$R=(C_{in}-C_{out})/C_{in}\times 100$と$LR=-\log_{10}(C_{out}/C_{in})$により求めた。ここで、$C_{in}$と$C_{out}$は流入水と処理水中のNoV濃度である。また、処理水をガラス繊維ろ紙(GF/B、Whatman)でろ過した試料のNoV濃度も測定した。NoV濃度は、既報[18]に従い、逆転写定量PCR法で測定した。浮遊物質は、下水試験方法に従い、ガラス繊維ろ紙(GF/B、Whatman)で測定した。

5.1.2　調査結果

各下水処理場のNoV G1とG2濃度、除去率および浮遊物質を表3に示す。WSPを採用したA処理場の除去率は、da Silva[19]らによるフランスの事例と同等であり、ALを採用したB、C処理場の除去率より高かった。熟成池は、滞留時間の大半を占め、太陽光の働き等で病原微生物を消毒する役割が期待されており、フランスの事例[19]でも熟成池においてNoVの高い除去率が報告されている。本調査においても、WSP中の熟成池が機能し、高い除去率を示したと考えられる。ただし、逆転写定量PCR法では、不活化されたNoVも検出される場合があり、実際に感染価を有するNoVの除去率は、本調査で測定された除去率よりも高い可能性がある。

各処理水をろ過した試料中のNoV濃度は、各処理水のろ過していない試料中のNoV濃度の11.6%～32.0%であり、大半は浮遊物質に付着していると考えられた。また、B処理場の除去率は、同じくALを採用したC処理場の除去率より、高かった。 C処理場は、流出した浮遊物質がB処理場より多く、多くのNoVは、浮遊物質に付着したまま流出したものと考えられた。

5.2. ノロウイルスの健康影響評価に基づく WSP および AL 処理水のかんがいへの適切な利用方法の検討

5.2.1　方法

WHOガイドライン[17]に従う次の手順で、健康影響目標値を耐容感染確率に換算した後、農作物（レタス、玉ねぎ、穀類・芋類）の喫食者を想定したシナリオについて、QMRA手法を用いて、換算耐容感染確率以下が達成されるかんがい水のウイルス濃度と必要除去率を計算した。必要除去率と前章で示された下水処理による実際に測定した除去率を比較して、WSPおよびAL処理水のかんがいへの適切な利用方法を示した。

第一に、健康影響目標値を耐容感染確率に換算するため、健康影響目標値を、NoV感染1件あたりのDALYで除して、耐容感染確率を求めた。健康影響目標値は、WHO[17]が使用している10^{-6}人$^{-1}$年$^{-1}$を用いた。

NoV感染1件あたりのDALYは、処理水のかんがい利用によって生育した農作物によるNoV発症1件あたりのDALY(DB)に、飲料水質ガイドライン[20]と同様に、感染者あたりの発症確率(0.68[21])とNoVに対して感受性を持つ人の割合(0.8[21])を乗じて算出した。DBは、開発途上国全体のNoV発症によるDALYの合計の5%を年間発症件数で除して算出した。この5%は、WHOが用いているRV[17]の値と同等と仮定して用いた。ここで、開発途上国全体とは、

表３　各下水処理場の NoV G1 と G2 濃度、除去率、対数除去率および浮遊物質

処理場	NoVG1				NoVG2				処理水中の浮遊物質(mg/L)
	流入水 (コピー/L)	処理水 (コピー/L)	除去率 (%)	対数除去率(－)	流入水 (コピー/L)	処理水 (コピー/L)	除去率 (%)	対数除去率(－)	
A	2.7×10^7	1.6×10^5	99.4	2.2	8.4×10^6	6.7×10^4	99.2	2.1	50
B	1.4×10^7	1.5×10^6	88.9	1.0	2.1×10^6	2.1×10^5	89.8	1.0	10
C	5.1×10^6	1.3×10^6	74.5	0.6	5.0×10^6	1.2×10^6	76.0	0.6	55

米国、カナダ、オーストラリア、ニュージーランド、日本、イスラエル、欧州33国を除く全世界である。開発途上国全体のNoV発症によるDALYは、乳幼児(5歳未満)の入院と死亡によるDALYとした。乳幼児の入院未満で軽症のDALYと成人の全症状のDALYは、開発途上国全体のNoV発症によるDALYに占める割合は小さいと推測されることから、加味しなかった。乳幼児の入院および死亡によるDALYは、文献[16]より、入院者数と死亡者数を109万人と21.8万人とし、Havelaarの報告[22]と同様に、入院者数と死亡者数に、重み(入院；0.23、死亡；1)と影響期間(入院；1週間、死亡；損失余命80年)をそれぞれ乗じて計算した。開発途上国全体で発生する年間発症件数は、開発途上国人口50.8億人[23]の0.048件人$^{-1}$である2.44億件とした。この開発途上国人口に占める発症件数の割合は、先進国の値[24]と同等と仮定した。

第二に、下水処理水のかんがい利用により生育した3種類の農作物（レタス、玉ねぎ、穀類・芋類）の喫食者を想定したシナリオについて、QMRA手法を用いて、換算された耐容感染確率が達成されるかんがい水中のウイルス濃度と必要な除去率を計算した。レタスと玉ねぎは、生食を想定し、WHOガイドライン[17]と同じ計算条件とした。穀類・芋類は、加熱調理を想定し、処理水付着量10-15mL/100g、喫食量700g/日、喫食頻度365日/年、農地での収穫時減少率10^{-2}から10^{-3}まで、加熱調理による減少率10^{-6}から10^{-7}まで[17]とした。1日あたり感染確率$P_{inf,d}$は、Teunisら[25]の用量ー反応モデルに基づき、式(2)で計算した。

$$P_{inf,d} = 1 - {}_2F_1(\alpha, \mu(1-a), \alpha+\beta; (-a)/(1-a)) \quad (2)$$

ここで、${}_2F_1$は超幾何関数、μはNoVの摂取量、α＝0.04、β＝0.055、a＝0.0001である。既報[25]では、NoVの凝集の違いを考慮したモデルを提示しているが、残留したNoVの摂取時の凝集に関する判断材料が無いため、既報[21]と同様に凝集が無い状態を想定している。年間感染確率$P_{inf,y}$は、式(3)によって計算した。

$$P_{inf,y} = 1 - \left(1 - P_{inf,d}\right)^n \quad (3)$$

ここで、nは年間の喫食頻度である。なお、この計算される確率には、家庭内での2次感染や他の経路(飲料水など)からの感染は含まれていない。

5.3 結果

NoVのDBは3.6×10^{-3}年・件$^{-1}$であり、健康影響目標値10^{-6}人$^{-1}$年$^{-1}$は、耐容感染確率5.1×10^{-4}人$^{-1}$年$^{-1}$に換算された。RVのDB[17]と比較して、NoVのDBは低かった。しかし、感染者あたりの発症確率とNoVに対して感受性を持つ人の割合は高いため、最終的に、NoVの耐容感染確率は、RVの耐容感染確率(7.7×10^{-4}人$^{-1}$年$^{-1}$)より、わずかに低かった。

レタス、玉ねぎ、穀類・芋類へのかんがい利用で、耐容感染確率5.1×10^{-4}人$^{-1}$年$^{-1}$を達成するNoV濃度は、それぞれ、9.7×10^{-1}、3.7×10^{1}、2.8×10^{5}コピー/Lであった。かんがい水のNoV濃度を、前章で測定した流入水のNoV G1とG2の濃度の合計の中央値の1.6×10^{7}コピー/Lと仮定すると、レタス、玉ねぎ、穀類・芋類へのかんがい利用で、必要な除去率は、それぞれ、99.999994%(LR;7.2)、99.9998%(LR;5.6)、98.4%(LR;1.8)であった。

必要な除去率と下水処理による除去率の比較から、WSPの処理水は、加熱調理用の穀類・芋類には利用可能であるが、ALの処理水は、適当でなかった。また、WSPとAL処理水は、生食用のレタスや玉ねぎのかんがいに使うのは適当でなく、水処理方法の改善や消毒設備の付加が必要であると考えられた。

5.4 開発途上国における下水処理水の安全なかんがい利用方法の検討のまとめ

得られた知見は以下の通りであった。

1) 下水処理場のNoVの実態を調査したところ、WSPの処理場のNoV除去率は、ALの処理場の除去率より高かった。
2) NoVのDBは3.6×10^{-3}年・件$^{-1}$であり、健康影響目標値10^{-6}人$^{-1}$年$^{-1}$は、耐容感染確率5.1×10^{-4}人$^{-1}$年$^{-1}$に換算された。
3) 農作物の喫食者を想定したシナリオについて、健康影響目標値を10^{-6}人$^{-1}$年$^{-1}$（耐容感染確率5.1×10^{-4}人$^{-1}$年$^{-1}$）とした場合、流入水のNoV濃度を1.6×10^{7}コピー/Lと仮定すると、生食用のレタス、玉ねぎ、加熱調理用の穀類・芋類へのかんがい利用で、必要な除去率は、それぞれ、99.999994%(LR;7.2)、99.9998%(LR;5.6)、98.4%(LR;1.8)であった。WSPの処理水は、穀類・芋類にはかんがい用水として利用可能であったが、ALの処理水は、適当ではなかった。また、WSPとAL処理水は、レタスや玉ねぎに使うのは適当ではなかった。

6. おわりに

本研究において、開発途上国における省エネルギー型の水処理技術として高速藻類増殖池(HRAP)に着目し、HRAPで増殖した藻類の沈降を促進させるため*Moringa oleifera*の種子の水溶液を凝集剤として適用させたところ、HRAPの藻類の沈降促進に効果があり、凝集剤添加量やpHの違いが沈降効果に影響を与えること等を確認した。それに伴って生じる下水汚泥や藻類の熱量回収量は、時間・敷地面積当たり、371kJ/(m^2・d)であった。

下水処理水の安全なかんがい利用に資するため、開発途上国で重症化の懸念があるノロウイルスを対象に、安定化池やエアレーティッドラグーンの下水処理方法による除去率を測定した。さらに、開発途上国におけるノロウイルス感染１件あたりの疾病負荷を整理し、健康影響の指標として障害調整生存年数を用い、ノロウイルスによる健康影響軽減の観点から、安定化池やエアレーティッドラグーン処理水のかんがいへの適切な利用方法を示した。

参考文献

1) The World Bank, World Bank Open Data, http://data.worldbank.org/indicator
2) 内田勉、諏訪守、日高平、桜井健介、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、平成23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4241号、p.49-52.
3) 実用水の処理・活用大辞典編集委員会編集、実用水の処理・活用大辞典、産業調査会辞典出版センター、2011.
4) Shilton, A., 2006. Pond treatment technology, IWA publishing.
5) Park, J. B. K., Craggs, R. J., Shilton, A. N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology, 102(1), 35-42.
6) Yongabi, K.A., 2010. Biocoagulants for water and waste water purification: a review, International review of chemical engineering, 2(3), 444-458.
7) Pritchard, M., Craven, T., Mkandawire, T., Edmondson, A. S., O'Neill, J. G., 2010. A comparison between Moringa oleifera and chemical coagulants in the purification of drinking water – An alternative sustainable solution for developing countries. Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C, 35(13-14), 798-805.
8) Bhuptawat, Hitendra, Folkard, G. K., Chaudhari, Sanjeev, 2007. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating Moringa oleifera seed coagulant. Journal of Hazardous Materials, 142(1-2), 477-482.
9) Sengupta, M. E., Keraita, B., Olsen, A., Boateng, O. K., Thamsborg, S. M., Palsdottir, G. R., Dalsgaard, A., 2012. Use of Moringa oleifera seed extracts to reduce helminth egg numbers and turbidity in irrigation water. Water research, 46(11), 3646-3656.
10) Vieira, Angelica Marquetotti Salcedo, Vieira, Marcelo F., Silva, Gabriel F., Araújo, Álvaro A., Fagundes-Klen, Márcia R., Veit, Márcia T., Bergamasco, Rosângela, 2009. Use of Moringa oleifera Seed as a Natural Adsorbent for Wastewater Treatment. Water, Air, and Soil Pollution, 206(1-4), 273-281.
11) 鈴木祐麻，新苗正和，真田靖瑛，2012. 天然凝集剤 *Moringa oleifera* によるカオリナイト粒子の凝集沈殿に水質が与える影響, 環境資源工学, 59, 73-80.
12) Parsons, S. A., and Jefferson, B., 2006. Introduction to portable water treatment processes, Blackwell publishing Ltd.
13) 建設省河川局監修、1997. 河川水質試験方法（案）、技法堂出版、922-923.
14) Park, J. B., Craggs, R. J., Shilton, A. N. 2013. Enhancing biomass energy yield from pilot-scale high rate algal ponds with recycling. Water Research, 47, 4422-32.
15) Takashi Asano, Franklin Burton, Harold Leverenz, Ryujiro Tsuchihashi, George Tchobanoglous, 2007. Water Reuse: Issues, Technologies, and Applications. 61, Mcgraw-hill New York, USA.
16) Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U. D., 2008. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging infectious diseases*, 14(8), pp.1224-31.
17) World Health Organization, 2006. *WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater*. WHO Press, Switzerland.
18) 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、下水道協会雑誌、46(512)、pp.91-101.
19) da Silva, A. K., Le Guyader, F. S., Le Saux, J.-C., Pommepuy, M., Montgomery, M. A., & Elimelech, M. (2008). Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond. *Environmental Science and Technology*, 42(24), pp.9151-9157.
20) World Health Organization, 2011. *Guidelines for drinking-water quality* – 4th ed., pp.131-133, WHO Press, Switzerland.
21) Schoen, M.E., Ashbolt, N.J., 2010. Assessing pathogen risk to swimmers at non-sewage impacted recreational beaches. *Environmental Science and Technology*, 44 (7), pp. 2286-2291.
22) Havelaar A. H., Melse J. M., 2003. *Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality: a burden of disease approach*. RIVM report 734301022.
23) The United Nations Children's Fund, 2005. *The state of the world's children 2005*, UNICEF House, New York, USA.
24) Kemmeren, J.M., Mangen, M.-J.J., van Duynhoven, Y.T.H.P., Havelaar, A.H., 2006. *Priority setting of foodborne pathogens -Disease burden and costs of selected enteric pathogens*. RIVM report 330080001/2006.
25) Teunis, Peter F. M., Moe, Christine L., Liu, Pengbo, E. Miller, Sara, Lindesmith, Lisa, Baric, Ralph S., Le Pendu, Jacques, Calderon, Rebecca L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it?, *Journal of Medical Virology*, 80(8), pp. 1468-1476.

多様化する感染症に応じた下水処理水の高度な消毒手法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 27～平 29
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、諏訪守、安井宣仁

【要旨】
近年、抗生物質耐性菌の出現と蔓延が世界的に問題視されてきており、医療機関だけでなく、下水、下水処理水などから国内問わず海外においても検出報告例がある。H.27 年度は、一般的に広く用いられている紫外線ランプとして、低圧紫外線ランプならびに中圧紫外線ランプを用い、下水試料より同定された耐性菌を単離し、下水処理水に添加し、紫外線照射における不活化と可視光による光回復の影響を評価した。

その結果、アンピシリン、セフジニル、カナマイシン、テトラサイクリン、スルファメトキサゾール･トリメトプリム、ゲンタマイシンの種類の抗生物質に耐性を持つ大腸菌（6 剤耐性大腸菌）および、これらの抗生物質とイミペネム、レボフロキサシンの 8 種類に耐性を持たない大腸菌（0 剤耐性大腸菌）の最大光回復を考慮し，3Log(生残率=0.001)の不活化を見込む場合、0 剤耐性大腸菌は，低圧・中圧紫外線ランプ照射で総相対殺菌有効放射線量（総相対殺菌有効放射照度(mW/cm²)×照射時間(s)）が 15mJ/cm² 以上、6 剤耐性大腸菌の場合，低圧紫外線ランプ照射時では 15mJ/cm² 以上、中圧紫外線ランプ照射時では 20mJ/cm² 以上の紫外線の照射が必要であることが分かった。
キーワード：紫外線消毒、抗生物質耐性大腸菌、低圧・中圧紫外線ランプ、不活化 、光回復

1. はじめに

新たな水資源として下水処理水の利用促進や、公共用水域の衛生学的安全性を担保する上で水系感染リスクを低減させる必要があるが、新興ウイルスの出現や再興感染症としての抗生物質耐性菌の出現と蔓延が世界的に問題視されてきている。これらの問題解決のため、医療関係学会から構成される創薬促進検討委員会 ・ 抗微生物薬適正使用推進委員会が「世界的協調の中で進められる耐性菌対策」として国へ、抗生物質耐性菌対策に取り組むように提言している [1]。抗生物質耐性菌の存在は、医療機関だけでなく、下水、下水処理水などから国内問わず海外においても検出報告例 [2), 3), 4), 5)]がある。また、健常者の糞便試料の内 80.5%に抗生物質耐性菌が存在しており、それら単離された細菌の 98%が大腸菌であったとの報告例もある [6)]ことに加え、下水および下水処理水から検出される大腸菌の内､20～60%が抗生物質耐性大腸菌（以下、耐性菌と記す。）である [5)]ことも明らかとなっている。健常者および保菌者から排出されるであろう、耐性菌が下水道に流入する可能性が高いことから、下水処理場にて適切に除去・不活化する必要があると考えられる。

現在､下水処理場の多くで塩素消毒(次亜塩素酸ナトリウム使用施設数: 1076 施設)[7)]が行われている。耐性菌対策においては消毒の強化が考えられるが、塩素消毒強化に伴い耐性菌の存在割合が増加する傾向が報告されている [8)]。また、現プロジェクト研究(公共用水域における消毒耐性病原微生物の管理技術に関する研究)による研究結果では、通常の塩素消毒レベルにおいて抗生物質耐性菌やノロウイルスに対する高度な消毒効果を得ることが困難な状況であることが明らかになりつつある。細菌の細胞膜やウイルスの表面タンパク質が細胞内への消毒剤の影響を阻止し耐性を有することが考えられるが、紫外線消毒では細胞内の遺伝子へ直接作用することから、塩素消毒に耐性を有する細菌やウイルスに対し有効な手段となり得る可能性がある。紫外線照射における大腸菌に対する不活化効果は、約 6mJ/cm² の低紫外線量で 3Log 不活化 [9)] され、耐性菌に対しても紫外線照射による効果が期待されるが、耐性菌に対する紫外線による不活化および光回復の影響は、現状では明確になっていない。

紫外線による微生物の不活化機構は良く知られており、核酸塩基成分またはウラシルの塩基成分に紫外線が吸収されると二量体が形成され、核酸の複写機能が消失し微生物は活性を失う。DNA の場合、紫外線が吸収されると本来起こり得ない同一鎖上にあるチミン同士が結合した

チミン二量体が形成され、このチミン二量体の生成が、主な紫外線による消毒機構である[10]。紫外線消毒における微生物の不活化においては、遺伝子損傷である二量体に光回復酵素がつき、可視光のエネルギーを受けると二量体が開裂し正常に戻るという光回復現象[11), 12)]を考慮する必要がある。

下水処理場では一部、放流先の生態系および水産資源の保全の観点から、塩素消毒施設から紫外線消毒施設も増えつつあり、耐性菌に対する紫外線消毒の不活化と光回復の知見の集積が必要である。

本研究では、上記を踏まえ、従来、中小規模の下水処理場での導入に限定されてきた紫外線消毒が、近年、紫外線ランプの高出力に伴い、放流先の生態系および水産資源の保全のため、下水処理場への利用拡大が期待されてきており、塩素消毒の代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の確立を目的とするものである。

H.27 年度は、一般的に広く用いられている紫外線ランプとして、低圧紫外線ランプならびに中圧紫外線ランプを用い、下水試料より同定された耐性菌を単離し、下水処理水に添加し、紫外線照射における不活化と可視光による光回復の影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 試験水の調整

試験水は標準活性汚泥法を採用しているA下水処理場の二次処理水をメンブレンフィルター（公称孔径：0.2μm、材質：ニトロセルロース）でろ過を行い無菌状態にしたものを用いた。作成した試験水に同下水処理場の流入下水より分離した抗生物質耐性大腸菌を添加し、紫外線照射実験に供した。実験に用いた試験水の水質は、CODcr= 8mg/L、TOC=3.45 mg/L、溶解性総窒素=14.5mg/L、波長 255nm の紫外線透過率＝80%であった。

2.2 添加用抗生物質耐性大腸菌の準備

クロモカルトコリフォーム寒天培地（Merck Millipore)を用いA下水処理場の流入下水より検出された大腸菌、約50コロニーを釣菌した. その後、トリプトソイブイヨン培地に接種し、35℃で3～4時間培養し、培養液をミューラーヒントS寒天培地に塗布した後、抗生物質を含有したディスク（KBディスク：栄研化学）を平板培地上に貼付後に35℃で18時間培養した。培養後に、平板上に形成された大腸菌が増殖せずに透明に形成された円（阻止円）の直径を測定し、その大きさから耐性の有無を判定した。判定基準は Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI)の実施基準に基づいた KBディスクの手引きを参照した. 判定した大腸菌は、IDテスト(グラム陰性桿菌の同定キット、EB-20「ニッスイ」)により同定した。抗生物質は、イミペネム(IPM)、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種類である。これら8種類の抗生物質は、日本国内における出荷量・額および尿排出率から推定した体外排出量や毒性の視点から、ヒト用抗生物質の上位にランキングされる[13), 14)]こと、および腸内細菌の大腸菌に抗菌作用を有することから選定した。

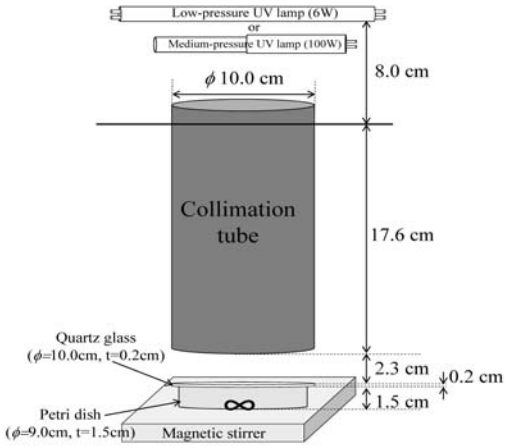


図-1 回分式紫外線照射装置

2.3 紫外線照射実験

耐性菌の紫外線照射による不活化効果を評価するために図-1に示す回分式紫外線照射装置を用い、所定の時間紫外線を照射、照射前後の耐性菌濃度を算定し評価した。

8 種類の抗生物質の内、ABPC、CFDN、KM、TC、ST、GMの6剤に耐性を持つ大腸菌(以下、6剤耐性菌と記す)と8種類全てに耐性を持たない大腸菌（以下、0 剤耐性菌と記す）を流入下水より検出・同定し添加用の耐性菌とした。また、比較対象として8種類の抗生物質に無耐性であった大腸菌であるATCC25922株の純菌も実験に供した。

消毒実験に供するため、ミューラーヒントS寒天培地で培養し増菌させたが、試験水の水質性状が大きく変化することを防ぐために4000rpmで10分間の遠心沈殿処理し、得られた沈渣を滅菌ミリQ水で洗浄したものを添加用の耐性菌とした。試験水添加後の耐性菌濃度が 105 CFU/mL となるように調整した。なお、耐性菌添加前、添

加後に再度、抗生物質耐性の有無および大腸菌の同定を行った。

試験水を滅菌シャーレ(直径(φ)=9cm、水深(d)=1.5cm)に耐性菌添加済みの試験水 80mL を充填した。石英ガラス(t=20mm)で蓋をし、マグネッチクスターラーにて攪拌、所定の時間、上部より紫外線を照射し、照射前後での耐性菌濃度を定量した。紫外線ランプは、発光長=10cm の 6W の低圧紫外線ランプ(ULO-6DQ、ウシオ電機社製)および、発光長＝4cm の 100W の中圧紫外線ランプ(UM-102、ウシオ電機社製)を用いた。紫外線光量計(本体:UIT-250、受光部:UVD-254、ウシオ電機社製) を用い、石英ガラスで蓋をした試験水表面で紫外線照度を測定した。本実験では、紫外線光量計の読み値(I_R)で、低圧紫外線ランプ使用時は IR=0.17～0.18mW/cm^2、中圧紫外線ランプ使用時は、IR=1.20～1.28mW/cm^{2}に設定した。実験開始前に紫外線ランプの照度を安定させるために 30 分間ウォームアップした後、実験を行った。

所定の時間、紫外線を照射した試験水は、クロモカルトコリフォーム寒天培地による平板培養法にて 37℃22 時間培養した後、耐性菌濃度を定量した。紫外線照射前後のシャーレ上に形成したコロニー数をカウントし、式(1)に従って試料の生残率を算出した。

$$S_t = \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

S_tは紫外線照射時間 t における生残率 (-)、N_tは紫外線照射時間 t における耐性菌濃度 (CFU/mL)、N_0は紫外線照射前の初期耐性菌濃度 (CFU/mL)である。

2.4 光回復実験

低圧・中圧紫外線照射後、生残率で概ね10^{-2}～10^{-5}の試料に対して、可視光照射による光回復実験を行った。紫外線照射後の試料を遮光ボトルに保存し、速やかに滅菌シャーレ（φ9cm、深さ 1.5cm）に 80mL 充填した後、石英ガラス(t=20mm)で蓋をし、マグネティックスタラーで攪拌しながら可視光を照射した。照射時間は、0、10、30、60、 90 分間とし、実験中に水温の上昇等を防ぐために可視光が照射可能なインキュベーター（人工気象器、LPH-350SP、日本医化器機製作所）内に試料を置き、20℃一定条件で光回復実験を行った。

可視光照射は、自然光（太陽光）に極力近づくように設計された 40W および 20W のバイタライトを用い、上部および四方から紫外線照射後の試料に可視光を照射した。デジタル照度計(DT-1309、 CEM 社製)を用い、実験中の照度値を常時モニタリングした。本実験中の照度は、815～817 lux であった。

可視光を所定時間照射した試料は、遮光ボトルに保存し、速やかに耐性菌濃度を定量した。また光回復実験と同時に、暗回復の影響を把握するために可視光なしの条件下で 0～90 分間攪拌した試料の耐性菌濃度の定量も行った。

なお、紫外線照射後の試料を用い暗回復実験を行った結果、耐性菌の回復が確認されなかった。従って本研究における暗回復効果は無視できるものと判断した。なお紫外線照射直後および光回復後において耐性菌の抗生物質感受性を再確認した。各試料からランダムに 50 個程度のコロニーを釣菌し、抗生物質に対する感受性を確認したが、添加当初と比較して変化は確認されなかった。

2.5 解析方法

2.5.1 紫外線量の算定

低圧紫外線ランプは、中心波長=254nm の単一の紫外線を放射するため、紫外線量の算定は、試験水表面での紫外線光量計の読み値と試験水の波長 254nm の吸光度から、ランベルト・ベール法則に従い深さ方向に対する紫外線照度の減衰を考慮した平均紫外線量として表すことが可能である。しかしながら、中圧紫外線ランプは、複数の波長の紫外線が放出されていることから、ランプ自体が発光波長分布を有している。また、紫外線光量計の受光部においても受光分布があるなど、紫外線量の算定が非常に複雑である。中圧紫外線ランプ使用時には、以下の事項を勘案して紫外線量を算定することで、低圧紫外線ランプと比較できると考えられる。

・紫外線ランプ発光波長分布
・試料の吸光度分布
・使用した紫外線光量計の受光分布
・大腸菌の紫外線感受性分布

低圧および中圧紫外線ランプでの耐性菌の不活化を的確に評価するために本研究では、双方の紫外線ランプともに文献 [15] を参考に総相対紫外線照度(I_{erf} : Total relative germicidal effective irradiance)を式(2)、(3)、 (4)を用い算出した。算出したI_{erf}に紫外線照射時間を掛け合わせた、総相対紫外線量(mW/cm^2・s=mJ/cm^2)として低圧、中圧紫外線照射における耐性菌の不活化を評価した。

$$I_{erf} = \int I_R \times f_p \times L_\lambda \times \frac{\left(1-e^{-2.3A_\lambda \cdot d}\right)}{2.3A_\lambda \cdot d} \times A_{DNA}(\lambda) \quad (2)$$

$$f_p = \frac{\int RLE(\lambda)\, d\lambda}{\int \frac{RLE(\lambda)}{R(\lambda)} d\lambda} \quad (3), \quad L_\lambda = \frac{RLE(\lambda)}{\int RLE(\lambda)\, d\lambda} \quad (4)$$

ここで、

f_p、 L_λは補正係数 (−)、I_Rは紫外線光量計の読み値(mW/cm²)、A_λは波長λにおける吸光度(cm⁻¹)、$RLE(\lambda)$は波長λにおける紫外線ランプのエネルギー比 (−)、$R(\lambda)$は波長(λ=255nm)を 1 とした際の各波長の紫外線光量計の相対値(−)、$A_{DNA}(\lambda)$は波長λにおけるDNAの波長感受性割合(−)、d は水深 (1.5cm)である。

I_{erf}は、Microsoft Excel 2010 を用い便宜的に波長λ=5nm 間隔とし、波長λ=200～400nm の領域を数値積分により算定した。低圧紫外線ランプ使用時は、単一波長の紫外線を放射するので、$RLE(\lambda$=255nm)=1、R(λ=255nm)=1 となり、式(2)、(3)のf_p、 L_λは 1 となる。

2.5.2 光回復速度定数の算定

光回復の回復過程は、Dulbecco(1955)[16]により、一次反応式が提唱されており、多くの光回復の実験結果において実測値の傾向を表していることが知られている[17]。しかしながら、紫外線量を大きくした際の試料に対する光回復過程がモデル式に従わず、光回復の開始時期に生残率の上昇がモデル式よりも遅れる現象が報告されている[18]。Sanz ら[18]は、これらの現象を説明するために、式(5)で示される二次反応式を提唱している。式(5)は 1838 年に Verhulst により生物学的人口増加における予測式として示された式であり、Sanz ら[18]はこの式を微生物の光回復予測式に適用した。

$$\frac{dS}{dt} = k_1 \cdot (S_m - S) \cdot S$$

$$S = \frac{S_m}{1+\left(\frac{S_m}{S_0}-1\right)\cdot e^{-k_1 \cdot S_m \cdot t}} \quad (5)$$

S は可視光照射時間 t 分後の耐性菌の生残率、S_0は紫外線照射直後の耐性菌の生残率、S_mは最大光回復生残率、k_1は光回復速度定数(1/min)である。なお、最大光回復生残率は可視光照射 90 分後の耐性菌濃度より算出した値を用いた。

本実験においては、耐性菌の光回復の定式化として式(5)を用い低圧および中圧紫外線照射後の可視光照射による光回復速度を評価した。

3. 実験結果

3. 1 紫外線照射による耐性菌の不活化

3.1.1 低圧紫外線照射

図-2 に低圧紫外線ランプ照射における、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌(ATCC25922)の生残率を示す。図中の横軸は総相対殺菌有効放射照度 (I_{erf})と照射時間

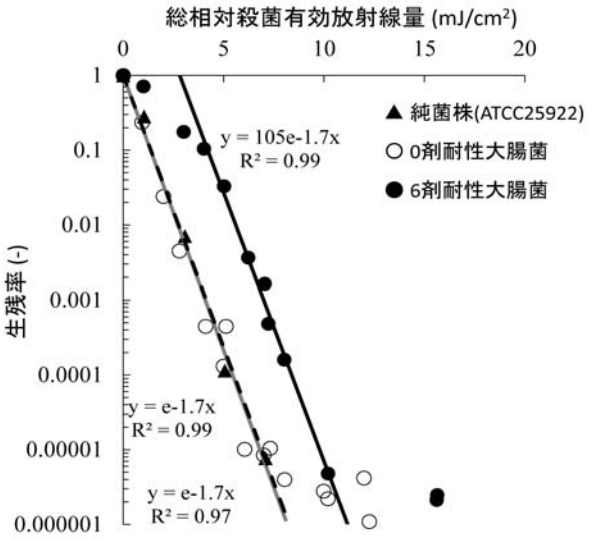


図-2 低圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌 (0 剤, 6 剤耐性大腸菌) および純菌大腸菌の不活化

(s)の積で表される総相対殺菌有効放射線量 (mJ/cm²)とし、縦軸は生残率とした。また、図中の回帰直線は不活化速度を表している。

0 剤・6 剤耐性大腸菌、純菌ともに概ね総相対殺菌有効放射線量に比例して不活化されている傾向が確認され、0 剤耐性大腸菌ならびに純菌の不活化はほぼ同様であり、90%不活化(生残率=0.1)に要する総相対殺菌放射線量は、約 1.4mJ/cm² であることが分かった。一方、6 剤耐性大腸菌は紫外線照射初期(0～3mJ/cm²)では、純菌および 0 剤耐性大腸菌とは異なり、紫外線に対する抵抗を示しており、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約 4.2mJ/cm² であった。0 剤耐性大腸菌および純菌よりも 3mJ/cm² ほど低圧紫外線ランプ照射に対して耐性を有していることが確認された。

0 剤耐性大腸菌および純菌は紫外線照射初期においては紫外線に対する抵抗を示しておらず、6 剤耐性大腸菌はいわゆる「肩」を持つ反応であった。また、0 剤・6 剤耐性大腸菌および純菌ともに総相対殺菌放射線量が 10 mJ/cm² 以上、生残率で 0.00001 (5Log) 以下になると、テーリング現象が確認された。紫外線照射におけるテーリング現象はしばしば報告されている。この現象が生じる明確な理由は定かではないが、紫外線耐性が全て同一な微生物であることが明らかな場合でもテーリング現象は生じる可能性があり、微生物同士の凝集により、単独で存在している微生物よりも見かけの紫外線耐性が大きくなる部分が生じることで起こりうると考えられている[21]。本実験においても同様な現象が生じたと考えられた。

図-2 より低圧紫外線ランプ照射時における、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌と純菌の不活化速度の違いを評価した。総相対殺菌放射線量が 10 mJ/cm^{2}以上でテーリング現象が確認されたため、10mJ/cm^{2}以上のデータを除外し、総相対殺菌放射線量と生残率が一次反応であると仮定し不活化速度を算出した。6 剤耐性大腸菌は「肩」の存在が確認されたため、0～3mJ/cm^2 および 10mJ/cm^2 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。すなわち図中の回帰直線の傾きが不活化速度定数となる。その結果、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌ともに不活化速度は 1.7 (cm^2/mW/s)と顕著な差は確認されなかった。既往の研究結果 [9]によれば、コリメート試験による低圧紫外線照射における Escherichia coli は、「肩」を持たない反応であり、90%不活化に要する紫外線量は約 1.8mJ/cm^2、不活化速度は紫外線量と生残率に比例し、約 1.4 (cm^2/mW/s)と報告されており、本研究で検討した 0 剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は既往の研究結果とほぼ同様であった。

3.1.2 中圧紫外線照射

図-3 に中圧紫外線照射時における 0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌(ATCC25922)の生残率を示す。0 剤耐性大腸菌および 6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に、生残率は総相対殺菌有効放射線量に比例している傾向が確認された。0 剤耐性大腸菌および純菌は、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が約 1.5～1.8 (mJ/cm^2)で、低圧紫外線ランプ照射時とほぼ同等であった。一方、6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約 6.9mJ/cm^2 であり、中圧紫外線ランプを用いた際は、低圧紫外線ランプと同程度の不活化を得るためには、約 1.5 倍の紫外線量が必要となることが明らかとなった。

低圧紫外線ランプ照射時と同様に、各耐性大腸菌および純菌の不活化速度を把握するために、不活化速度を算出した。生残率で 0.00001 (5Log) 以下でテーリング現象が確認されたため、テーリング現象が確認された以降のデータを除き、総相対殺菌有効放射線量と生残率が比例すると仮定して不活化速度を算出した。なお 6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に照射初期で「肩」を持つ反応が確認されたため、総相対殺菌有効放射線量で 3mJ/cm^2 未満 10mJ/cm^2 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。その結果、0 剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は低圧紫外線ランプ照射時と比較し、1.3～1.6 (cm^2/mW/s)でほぼ同等であった。6 剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、不活化速度が 1.1 (cm^2/mW/s)であり、低圧紫外線ランプ照射時よりも 1/1.5 程度、不活化速度が低下した。

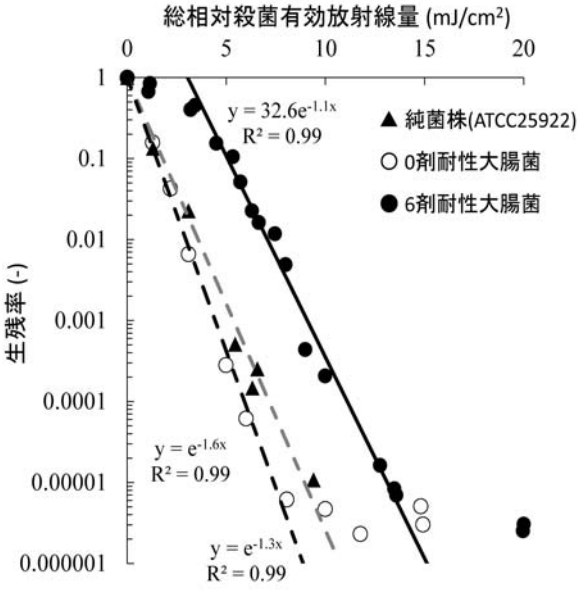


図-3 中圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌 (0 剤, 6 剤耐性大腸菌) および純菌大腸菌の不活化

中圧紫外線ランプは、低圧紫外線ランプの主波長である 254nm 以外の紫外線、主に波長 200～400nm の紫外線を放射する。本研究では、中圧紫外線ランプ照射における耐性大腸菌の不活化には、紫外線光量計、試料吸光度分布、ランプの発光波長分布 (エネルギー分布)、DNA 波長感受性分布を全て考慮した、式(2)における総相対殺菌放射照度を算定し、照射時間を乗じた総相対殺菌放射線量で評価し、低圧紫外線ランプ照射時と比較した。式(2)を用いることで、紫外線の不活化に寄与する波長のエネルギー全てを勘案して不活化を評価することができ、中圧紫外線ランプ照射時は、低圧紫外線照射時よりも、波長 254nm 以外の他波長の紫外線が不活化に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、0 剤耐性大腸菌および純菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射時と比較して、90%不活化に要する紫外線量ならびに不活化速度が同程度であったのに対して、6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時の方が、不活化速度が速く、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が小さかった。

以上より、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌ともに波長 254nm 以外の紫外線が不活化に及ぼす影響が小さかった可能性が考えられた。また、 6 剤耐性大腸菌の不活化速度が、0 剤耐性大腸菌とは異なり、中圧紫外線ランプ照射時に低下したのは、波長 254nm 以外の波長の紫外線の

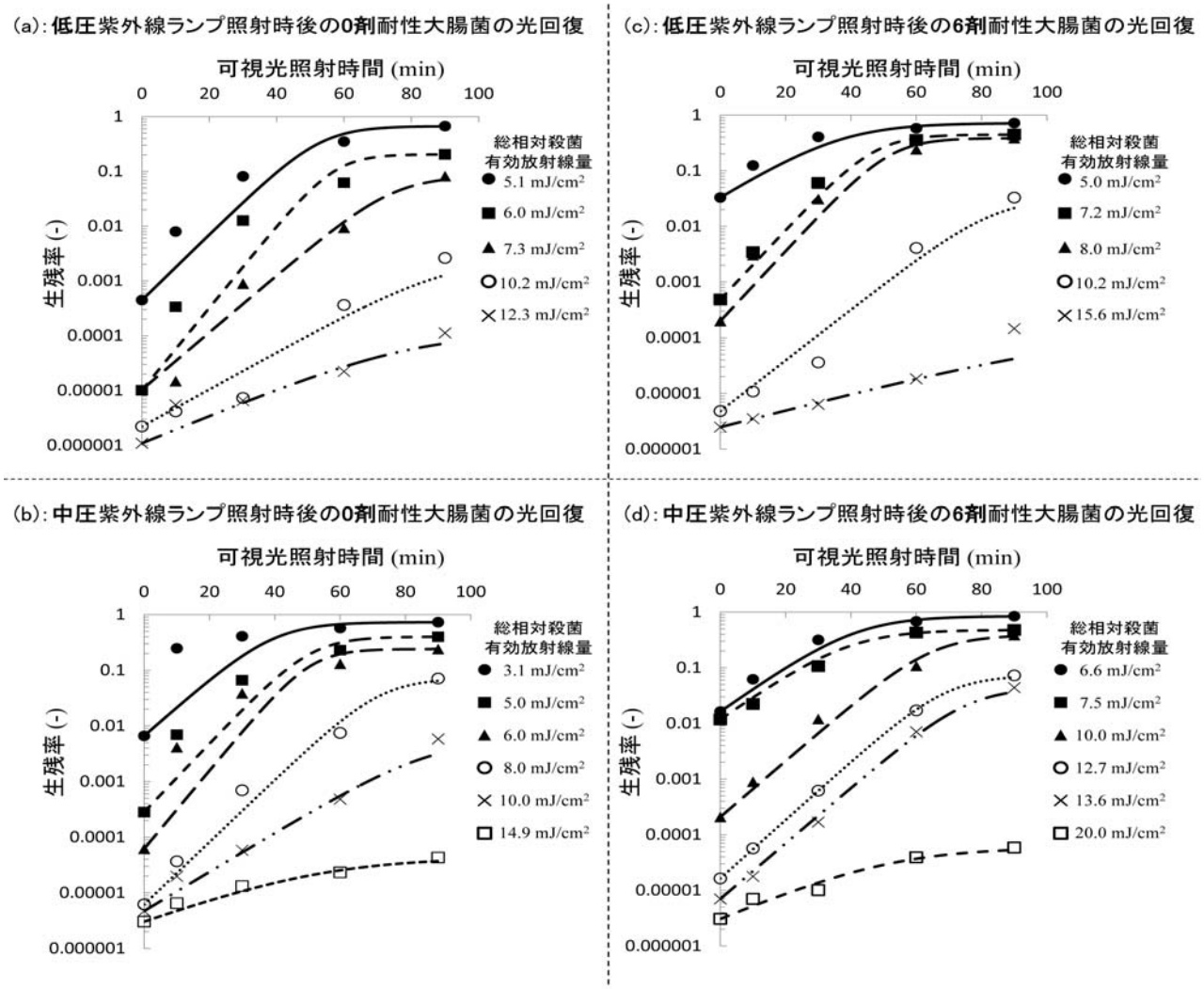


図-4 低圧・中圧紫外線ランプ照射後の 0 剤，6 剤耐性大腸菌の光回復

寄与以外にも、式(2)からも判断できるようにDNAの紫外線に対する波長感受性が異なるためだはないかと考え、不活化速度差異について微生物の薬剤耐性機構や我々の既往の研究結果[8]から推察した。

微生物の薬剤耐性機構は、主に①外膜透過孔の減少による薬剤の不透過、②取り込んだ薬剤の菌体外への排出、③不活化酵素の産出などが知られている[22]。また既往の研究結果[8]では、塩素消毒後に 1 剤あるいは 2 剤以上の抗生物質に耐性を有する多剤耐性大腸菌の割合が上昇する報告がある。すなわち、抗生物質に対する耐性を有している大腸菌は、上記①～③の作用が生じている可能性が考えられ、特にその内①の作用による耐性大腸菌の細胞膜が変質した事で、6 剤耐性大腸菌は、0 剤耐性大腸菌、純菌とは異なる形態になり、結果として紫外線に対する抵抗や感受性が変化したのではないかと推察した。しかしながら、本研究では厳密に 6 剤耐性大腸菌の遺伝情報等の解析がなされていないため、これらはあくまでも推察の領域である。

3.2 可視光照射における耐性大腸菌の光回復

図-4 に 0 剤耐性菌、6 剤耐性菌の可視光照射における光回復の結果を示す。図中の横軸は照射時間(min)とし、縦軸は光回復後の生残率とした。また式(5)におけるモデル式より算出した可視光照射時間 t 分での生残率を実線および破線で図中に示した。式(5)における光回復のモデル式の計算値と実測値では、総相対殺菌有効放射線量が小さい場合、光回復の回復初期で実測値の間に若干の乖離が生じていたが、概ね本研究で検討した光回復の予測式と実測値との間に整合性が確認された。

a) 0 剤耐性大腸菌の光回復

低圧紫外線ランプ照射後（図-4 (a)）における光回復量は、総相対有効殺菌放射線量 10mJ/cm^2 程度では、概ね 3Log (1000 倍) 光回復する傾向が確認されたが、12mJ/cm^2 以上照射することで、1Log 程度光回復を抑制できることが分かった。

中圧紫外線ランプ照射後（図-4 (b)）は、3mJ/cm^2 の低放射線量では 2Log 不活化されるが、90 分の可視光ラン

プ照射後は7割程度、耐性菌濃度が回復した。低圧紫外線ランプ照射時と同様に10mJ/cm^{2}程度では、約3Log光回復することが確認されたが、15mJ/cm^{2}以上照射することで、光回復が1Log程度に抑制された。

b）6剤耐性大腸菌の光回復

低圧紫外線ランプ8mJ/cm^{2}までの照射では、可視光ランプ照射後90分で紫外線照射初期の濃度の4～8割程度回復する傾向が確認された。10mJ/cm^{2}照射すれば6剤耐性大腸菌を5Log不活化可能であったが、可視光ランプ照射により3Log光回復し、15mJ/cm^{2}照射することで光回復を1Log程度に抑制できることが確認された。

中圧紫外線ランプ照射後の光回復は、低圧紫外線ランプ照射時と同様の傾向を示しており、10mJ/cm^{2}以下では4～8割程度、紫外線照射初期の濃度まで回復した。一方10mJ/cm^{2}以上の照射であっても20mJ/cm^{2}未満では、中圧紫外線ランプで5Log程度不活化可能であるが、光回復により約3Log回復する傾向が確認され、20mJ/cm^{2}の照射で光回復を1Logに抑制できることが確認された.

4. まとめ

本研究では、抗生物質耐性大腸菌の紫外線照射による不活化効果と光回復の影響を把握するために、流入下水より単離した大腸菌を用いて低圧・中圧紫外線ランプを用いた照射実験を行い、照射後に可視光ランプ照射による光回復実験を行った。低圧および中圧紫外線ランプ照射でのランプ種の違いによる不活化､光回復の実験では、ランプ発光波長分布、試料吸光度分布、紫外線照度計の受光部の波長分布､DNAの波長感受性を考慮した総相対殺菌有効放射照度と紫外線照射時間の積により定義した総相対殺菌有効放射線量により評価した。評価結果から以下の知見を得た。

1) 低圧紫外線ランプ照射による不活速度は、0、6剤耐性大腸菌とも1.7 (cm^2/mW/s)程度であり、90%(生残率=0.1)の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0剤耐性大腸菌で約1.4mJ/cm^2、6剤耐性大腸菌で約4.2mJ/cm^{2}であった。
2) 中圧紫外線ランプ照射による不活化速度は、0剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同程度で1.3～1.6 (cm^2/mW/s)であった。一方､6剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時と異なり、不活化速度が1.1 (cm^2/mW/s)であり、低圧紫外線ランプ照射時よりも1/1.5程度、不活化速度が低下した。中圧紫外線ランプ照射において90%(生残率=0.1)の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0剤耐性大腸菌で約1.5mJ/cm^2､6剤耐性菌で約6.9mJ/cm^{2}であった。
3) 紫外線照射後の光回復においては、0剤耐性大腸菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射で10mJ/cm^{2}程度では、約3Log光回復することが確認されたが、15mJ/cm^{2}以上照射することで、光回復が1Log程度に抑制された。
4) 6剤耐性大腸菌の光回復は、低圧紫外線ランプ10mJ/cm^{2}照射すれば5Log不活化可能であったが、可視光ランプ照射により3Log光回復し、15mJ/cm^{2}照射することで光回復を1Log程度に抑制できることが確認された。中圧紫外線ランプ照射時は、20mJ/cm^{2}未満では、中圧紫外線ランプで5Log程度不活化可能であるが、光回復により約3Log回復する傾向が確認され、20mJ/cm^{2}の照射で光回復を1Logに抑制できることが確認された。
5) 0剤耐性大腸菌の場合、低圧・中圧紫外線ランプ照射時で最大光回復を考慮し、3Log（生残率=0.001）の不活化を見込む場合､総相対殺菌有効放射線量で15mJ/cm^{2}以上の紫外線を照射する必要があり､6剤耐性大腸菌の場合、低圧紫外線ランプ照射時では15mJ/cm^{2}以上、中圧紫外線ランプ照射時では20mJ/cm^{2}以上の紫外線の照射が必要であることが分かった。

参考文献

1) 創薬促進検討委員会 ・ 抗微生物薬適正使用推進委員会 提言第２弾, 世界的協調の中で進められる耐性菌対策, <http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603_resistant_bacteria_measures_02.pdf> [参照2016-04-21]
2) Trevors JT: Survival of Echerichia coli donor, recipient and trans conjugant cells in soil. Water, Air, and Soil Pollution. Vol.34(4), pp.409-14, 1987.
3) Reinthaler, F.F., Feierl, G., Wust, G., Haas, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F., Marth E.: Antibiotic resistance of E.coli in sewage and sludge. Water Research, 37, pp.1685-90, 2003.
4) 清野敦子, 長谷川泰子, 益永茂樹: 金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布, 水環境学会誌 (27) 11, pp.693-8, 2003.
5) 岡本誠一郎, 諏訪守, 桜井健介： 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，土木研究所資料，第4212号, pp.103-11,2011.
6) Korzeniewska, E.：Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review. Front Biosci (Schol Ed), pp.393-407, 2011.
7) 公益社団法人 日本下水道協会，平成25年度版 下水道統計，第70号，CD-R, 2015
8) 津森ジュン，諏訪守，安井宣仁：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，平成25年度下水道関係調査研究年次報告書，土木研究所資料，第4294号，pp.28-35, 2014.
9) Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J.: Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. Water Research, 40, pp.3-22, 2006.
10) 野津敬一 :紫外線の生物作用 -核酸を中心として-, 共立出版株式会社, pp.19-20, 23, 1975
11) Witkin Evelyn M.: Ultraviolet-Induced Mutation and DNA Repair. Annual Review of Genetics (3), pp.525-552, 1969.
12) 武部啓:ＤＮＡ修復，東京大学出版会，pp.2, 20-26, 1983.
13) Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Approved Standard Tenth ed., M2-A10, 2009.
14) Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI Approved Standard Tenth ed., M100-S19, 2009.
15) 大上浩司，小森行也，八十島誠，小請淳子，鈴木穣：水環境に残留した医薬品の実態調査における対象物質の選定方法について，下水道協会誌（43）pp. 523, 50-51, 2006
16) 八十島誠，山下尚之，中田典秀，小森行也，鈴木穣，田中宏明，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， pp.707－714, 2009.
17) Karl G. Linden, Alexander A. Mofidi: Disinfection Efficiency and Dose Measurement of Polychromatic UV Light. Awwa Research Foundation, pp.37-43, 2003.
18) Dulbecco, R.：Photoreactivation. Radiation Biology, Vol.2, pp.455-486, 1955.
19) 鹿嶋田浩二，神子直之，山本和夫，大垣眞一郎：紫外線照射水処理における光回復の評価，水環境学会誌，Vol.18 (1), pp.44-50,1995.
20) Sanz, E., N., Davila, I., S., Balao J.A.A, Alonso J.M.Q.：Modelling of reactivation after UV disinfection: Effect of UV-C dose on subsequent photreactivation and dark repair. Water Research, 41, pp.3141-3151, 2007.
21) 平田強編，岩崎達行，大瀧雅寛，片山浩之，神子直之，木村憲司，土佐光司，松本直秀，本山信行,森田重光： 紫外線照射 －水の消毒への適用性－，技報堂出版，pp.43-44, 2008.
22) 橋本一，井上松久：病原菌の薬剤耐性 機構の解明とその対策，学会出版センター，pp.6-10, 1993.

震災時の機能不全を想定した水質リスク低減手法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 25～平 28
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：南山瑞彦、諏訪守、安井宣仁

【要旨】

東日本大震災では、沿岸部に位置する下水道施設が津波被災により機能不全に陥り、完全な復旧には長時間を要した。被災地域の他のインフラが復旧するに従い、家庭などから排出される下水が継続して下水道に流入することになるが、下水道が機能不全となった場合には、放流水質の悪化は水系感染症拡大防止に重大な影響を及ぼす。今回の震災では、被災下水処理場は沿岸部に集中したが、水道水源の上流に位置する内陸部の処理場が被災した場合、下流域における浄水・利水施設に対し病原微生物の感染リスクが格段に高まることになるため、応急的な対応においても可能な限り水系感染リスクを低下させる手法を明らかにすることが求められている。

27 年度は、緊急的措置対応である簡易沈殿処理から、段階的復旧として簡易な生物処理の導入を想定し、有機物等の除去効果が期待できる散水ろ床法による病原微生物の除去とその処理水に対する塩素消毒特性を評価した。その結果、散水ろ床法による T-CODcr の除去率は 70%程度、D-CODcr は 50%の濃度減少が見られ、比較的安定して有機物除去が行われていた。また、CODcr に比較して SS は高い除去効果が得られていた。散水ろ床法によるノロウイルスの除去効果は 0.5～0.6log 程度であり、活性汚泥法の 2log と比較して低い状況にあった。散水ろ床法と塩素消毒により最大 1.1log のノロウイルスの低減効果、大腸菌ファージでは 2log の不活化効果が確認された。散水ろ床処理水に PAC を添加することで、ノロウイルス、大腸菌ファージの低減･不活化効果が向上することが確認された。ノロウイルスとともに大腸菌ファージを併せて測定し、除去･不活化効果を評価したが、ノロウイルスの低減効果を上回る結果が得られているため、実際にはより高いウイルスの低減効果が得られているものと推定された。

キーワード：震災、機能不全、消毒、水系感染リスク

１．はじめに

東日本大震災の発生に際しては、下水道が被災して機能不全に陥り、既存の水質管理システムの脆弱性が明らかとなった。被災規模が甚大な場合には、復旧にも長時間を要する。復旧段階での処理水質悪化は、消毒機能にも影響を及ぼす。

東日本大震災では、被災下水処理場は沿岸部に集中したが、水道水源上流に位置する内陸部の処理場が被災した場合、病原微生物の感染リスクが格段に高まることになる。水系水質リスクに対する施策として、これまで、下水道施設の耐震化や平常時の河川流況を勘案した取水･排水系統の再編成などの提言がなされているが[1)]、被災による下水道施設の機能不全により、感染リスクは 1 万倍以上に上昇すると考えられることから、それに応じたリスク低下手法の開発が必要である。

本研究は、大規模災害による下水処理システムの機能不全に対して、他施策等による緊急対策の実施可能性を整理した上で、下水道において病原微生物の感染リスクを低減させる手法を構築することを目的としている。

このため、機能不全に陥った際の処理水質悪化が消毒効果に及ぼす影響評価、応急対策手法の構築、段階的復旧における課題への解決策の提案を行い、衛生学的リスク管理手法を構築するものである。また、衛生学的な指標として、これまでの評価対象である大腸菌群に加えて、塩素消毒に耐性があり集団感染発生要因となるウイルスや原虫類を含める。

27 年度は下記の 1）2）の項目を実施した。

1）散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去効果の評価
2）散水ろ床処理水の塩素消毒特性の把握

２．研究目的および方法

2.1 散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去効果の評価

東日本大震災による津波被災下水処理場では、段階的な復旧の初期対応として、導入の容易さから簡易沈殿処理が多く用いられた。しかし、簡易沈殿処理水の水質は、通常の最初沈殿池を経た一次処理レベルと推定されるとともに、被災の規模や復旧の進展状況によっては、簡易沈殿処理の適用が長期間に及ぶ可能性がある。このため、病原微生物の除去能力の低下や、沈殿池に堆積した汚泥が処理水に及ぼす影響による水質悪化が懸念される。実際の被災下水処理場でも、簡易沈殿処理を長期間にわたり行うことで、沈殿池下層へ堆積した汚泥が塩素消毒効

果へ影響を及ぼす可能性を指摘する報告[2]がある。

27 年度は、緊急的措置対応である簡易沈殿処理から、段階的復旧として簡易な生物処理の導入を想定し、有機物等の除去効果が期待できる生物膜処理法として、散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去、処理水に対する塩素消毒特性を把握した。被災下水処理場の一部では、段階的復旧対策技術として、簡易沈殿処理から簡易曝気法を導入している。曝気処理を行うことで有機物分解に関与する微生物の増殖が図られるが、生物が付着する担体を加えることで、有機物等の除去効率の向上が期待できる。被災地域ではガレキなどの廃材が発生していることから、それらを有効活用することで生物処理の効率化を図れる可能性がある。ここでは、生物膜処理法として散水ろ床法を適用し、ノロウイルスなどの除去性や消毒効果の評価を行った。また、除去・消毒効果の向上を目的に凝集剤（PAC）の添加効果を評価した。散水ろ床実験装置は、直径 300mm の円筒状の容器にプラスチック担体を 2.64m充填した。担体の大きさは直径 15mm、高さ 15mm、厚さ 1mm の円筒状、比表面積は 450m²/m³ であり、散水負荷を 10m³/（m²･d）とした。併せて、凝集剤（PAC）の添加効果を把握するため、散水ろ床の処理水と PAC を混合（5mg-Al/L、1 分間の急速撹拌、60 分間の静置沈殿）させ凝集効果を評価した。

2. 2 塩素消毒によるウイルス低減効果の評価

塩素消毒実験は、散水ろ床処理水、散水ろ床処理水の 4 時間沈殿後水、散水ろ床処理水に PAC を添加した各試料に次亜塩素酸ナトリウムを 0～15mg-cl/L の範囲で添加、接触時間を 15～60 分間とし、チオ硫酸ナトリウムの添加により残留塩素を中和した。

2. 3 水質測定項目

水質測定項目はノロウイルスの他、大腸菌ファージ、SS、CODcr とした。大腸菌ファージは大腸菌 K12（F^+）株を宿主菌とした重層寒天法とした。

ノロウイルスは、ポリエチレングリコール沈殿法により試料を濃縮し、回収した沈渣を 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[3]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。抽出試料を DNaseI 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit（QIAGEN 社）でウイルス RNA を精製した。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 100μL の系で逆転写反応を行い cDNA を作製し 10μL 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」[4]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抽出カラム 1 本あたり 0.05mg-SS となるように統一した[3]。

SS は下水試験方法に準拠して、また、CODcr は HACH による比色法により測定した。

3．研究結果および考察

3. 1 散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去効果の評価

有機物などの除去効果について図-1～3 に示す。T-CODcr では概ね 200mg/L の流入下水に対し処理水では 60mg/L、4 時間の沈殿後水では 50mg/L 程度で推移しており、70%程度の除去効果が得られていた。D-CODcr は概ね 50%程度の濃度減少が見られ、比較的安定して有機物除去が行われていた。SS では 100mg/L の流入下水に対し処理水では平均 20mg/L、沈殿後水では約 10mg/L で推移しており、有機物に比較して SS は高い除去効果が得られていた。

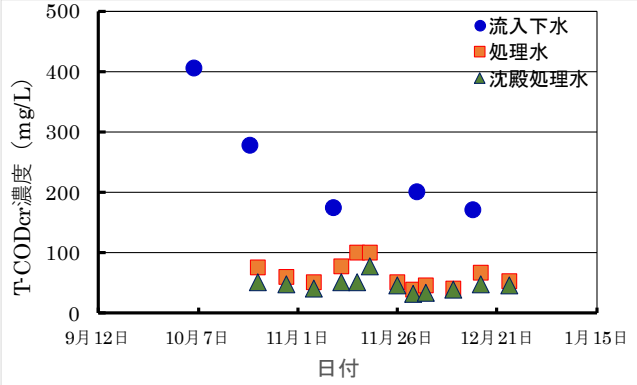


図-1 散水ろ床法による有機物（T-CODcr）の除去

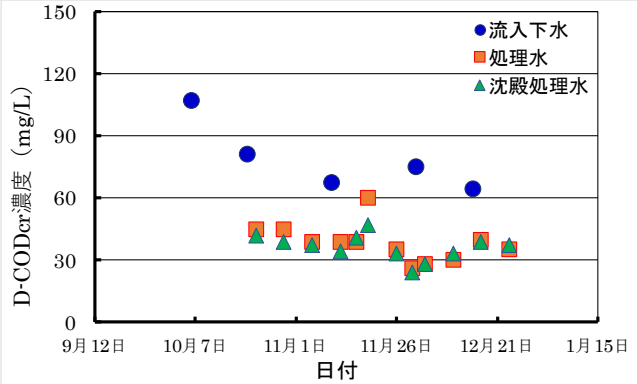
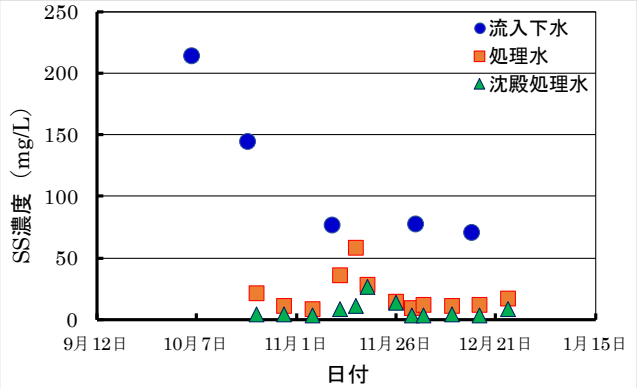
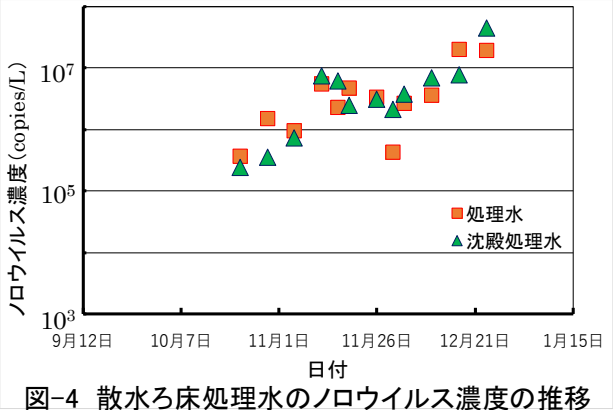


図-2 散水ろ床法による有機物（D-CODcr）の除去



図−3　散水ろ床法によるSSの除去

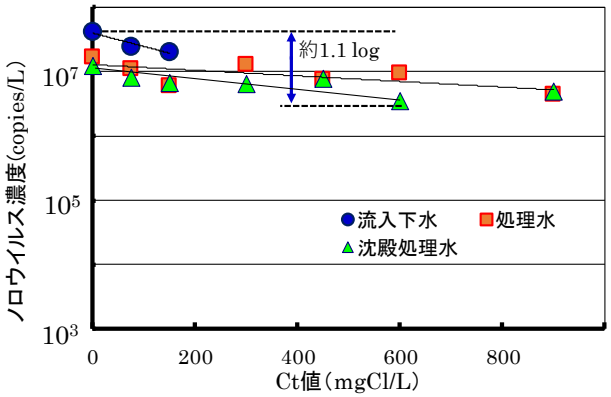
一方、ノロウイルスの濃度推移について図−4 に示す。散水ろ床処理水の秋季におけるノロウイルス濃度は、10^5 copies/L レベルで推移していたが、冬季へ移行するに従い 10^7copies/L レベルに濃度上昇し、2 オーダー程度の違いが見られた。冬季における感染性胃腸炎患者数が増加することで、流入下水のノロウイルス濃度が 2 オーダー程度上昇する調査報告[5)]があることや、秋季と冬季において処理水の CODcr や SS に濃度変動が見られなかったことから、担体に付着した生物の活性の変化ではなく、流入下水のノロウイルス濃度が上昇したことに起因するものと推定される。なお、散水ろ床法によるノロウイルスの除去効果は 0.5〜0.6log 程度（後述の図-5、7 参照）であり、活性汚泥法の 2log[6)] と比較して低い状況にあった。また、散水ろ床処理水を沈殿池で 4 時間滞留させた沈殿処理水の水質は、散水ろ床処理水と比較して浮遊物質の低減効果が限定的であり、溶解性有機物やノロウイルス濃度に大きな違いが見られなかった。



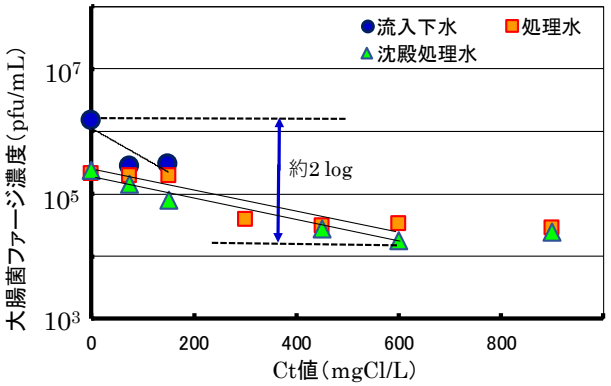
図−4　散水ろ床処理水のノロウイルス濃度の推移

3. 2 散水ろ床処理水の塩素消毒特性の把握

散水ろ床の処理水を対象とした塩素消毒実験結果を図-5〜8 に示す。散水ろ床処理水のノロウイルス濃度に季節変動が見られたことから高濃度、低濃度時に消毒実験を各々行った。また、ノロウイルスの不活化効果を推定するため、大腸菌ファージの測定も併せて実施した。処理水のノロウイルス濃度が 10^7copies/L レベル時に実施した塩素消毒実験の結果を図-5 に示す。散水ろ床法と塩素消毒により最大 1.1log の低減効果が確認された。塩素との接触時間を最大 60 分間とし Ct 値を高めたが、濃度減少の勾配は緩やかであった。図-6 には大腸菌ファージの不活化効果について示すが、散水ろ床法による除去効果は 0.8log 程度でノロウイルスよりも若干高めであり、塩素消毒と合わせた効果は約 2log であった。

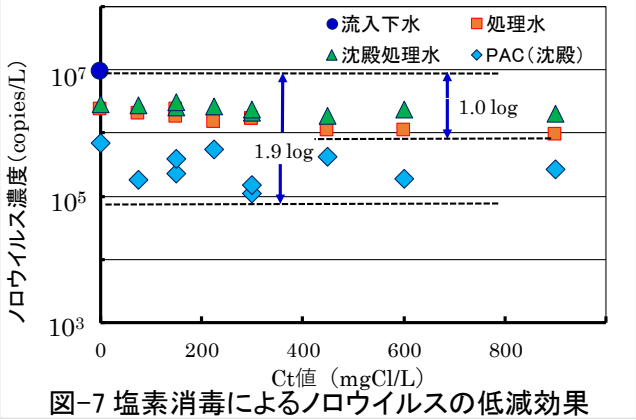


図−5 塩素消毒によるノロウイルスの低減効果

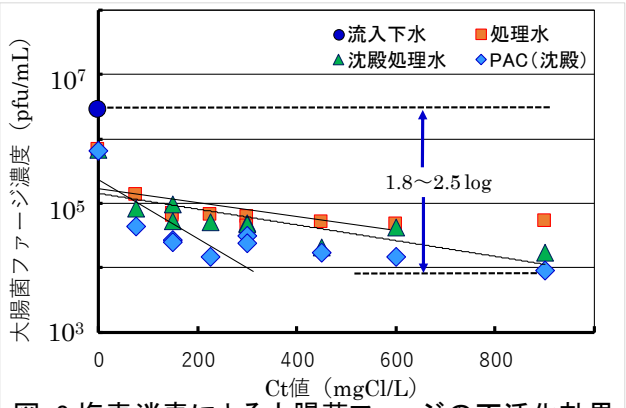


図−6 塩素消毒による大腸菌ファージの不活化効果

次いで、PAC の添加効果の評価結果について図-7、8 に示す。処理水のノロウイルス濃度は 10^6copies/L レベルであり、先に行った消毒実験時よりもやや低い濃度であった。散水ろ床法とその処理水の塩素消毒によるノロウイルスの低減効果は最大 1log 程度であり、図-5 に示した低減効果と同様な結果であった。PAC の添加に加え塩素消毒よる低減効果は最大 1.9log となり、消毒効果が向上することが確認された。大腸菌ファージの低減・不活化効果は、Ct 値が約 200mgCl/L においても 2.3log 程度に上昇、最大で 2.5log となっており、PAC の添加により不活化効果の向上が確認された。



図−7 塩素消毒によるノロウイルスの低減効果



図−8 塩素消毒による大腸菌ファージの不活化効果

塩素消毒によるノロウイルスの低減効果の評価ではリアルタイム RT-PCR 法による遺伝子定量法、大腸菌ファージの不活化効果の評価ではプラーク法での感染価であり、最終的には残存除去率で 10 倍程度(1〜2log)の違いが生じた。リアルタイム RT-PCR 法でのノロウイルスの定量法において、標的遺伝子の増幅域を拡張することで、塩素消毒による遺伝子量の低減効果がより高まる結果が得られており、大腸菌ファージでも同様な傾向を示すとされている。よって、標的遺伝子の増幅域を拡張した遺伝子定量法を適用することで、その定量値はプラーク法による感染価の不活化効果[7]の値に近づくことから、実際のノロウイルスの低減効果は、大腸菌ファージの不活化効果の値に近似していることが推定される。

3.3 各種処理法によるウイルスの低減･不活化評価

これまで本研究課題において、被災後の緊急的措置対応の簡易沈殿処理から、簡易沈殿処理による凝集剤の添加効果、復旧の進展に応じて適用の可能性が考慮できる紫外線消毒法、有機物の除去が期待できる中級処理としての散水ろ床法などを対象とした病原微生物の除去･消毒効果を評価した。それらの結果を整理し表-1 に示す。簡易沈殿処理ではノロウイルスの除去は期待できず、散水ろ床法でも若干の向上効果が見られたが、除去率は低い状況にあった。除去効果を向上させるため、各々、PAC の添加や塩素消毒を実施することで、ノロウイルスの低減効果は 1.2〜1.5log へと向上することが明らかとなった。これにより、PAC の添加条件とし添加塩素濃度を高めることで、平常時における活性汚泥処理の除去レベルである 2log 程度と同等の効果が得られる可能性があるものと考えられた。また、一部の処理法において大腸菌ファージを併せて測定することにより、除去･不活化効果を評価したが、ノロウイルスの低減効果を上回る結果が得られているため、実際にはより高いウイルスの低減効果が得られているものと推定された。

表−1 各種処理法による低減･不活化効果

	ノロウイルス	大腸菌ファージ
簡易沈殿処理法	0.2〜0.3	−
簡易沈殿処理+塩素（Ct値 225mgCl･min/L）	0.8	−
簡易沈殿処理+PAC (5mgAl/L)	0.6〜0.8	−
簡易沈殿処理+PAC+塩素 (225mgCl･min/L、5mgAl/L)	1.5	−
散水ろ床法	0.5〜0.6	0.6〜0.8
散水ろ床法+塩素（Ct値 225mgCl･min/L）	0.6〜0.8	1.7
散水ろ床法+PAC (5mgAl/L)	1.1	0.6
散水ろ床法+PAC+塩素 (225mgCl･min/L、5mgAl/L)	1.2	2.3
紫外線消毒(100mJ/cm^2)	0.9	−
紫外線消毒(30mJ/cm^2) +PAC(4mgAl/L)	1.3	-
紫外線消毒(100mJ/cm^2) +PAC(4mgAl/L)	2.5	−
※塩素消毒のCt値は225mgCl･min/L（添加濃度15mgCl/L×15分間）であり、低減･不活化効果は最大値ではない		
		(log)

一方、処理水に残存する有機物などの消毒剤消費物質の影響を受けにくい消毒法として紫外線消毒が考慮される。被災直後においては電力供給などの課題を有するが、復旧段階における追加的な対応策の1つとして、さらに、塩素などの消毒剤の不足時にも対応できる利点を有する。PAC の添加による凝集沈殿効果と平常時に行われている平均的な照射量である 30〜40 mJ/cm^{2}に対し 3 倍量程度の照射線量とすることで、ノロウイルスの低減効果は 2.5log が得られることが明らかとなっている。

簡易沈殿処理時や散水ろ床法などの適用に併せ、紫外線消毒法を組み合わせることで、ウイルスのより高い除去効果が得られる可能性があるものと考えられる。

4．まとめ

27年度は、緊急的措置対応である簡易沈殿処理から、段階的復旧として簡易な生物処理の導入を想定し、有機物等の除去効果が期待できる生物膜処理法として、散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去、処理水に対する塩素消毒特性を把握した。以下に得られた結果を

示す。

「散水ろ床法による有機物や病原微生物などの除去効果の評価」

1) 散水ろ床法による T-CODcr の除去率は 70%程度、D-CODcr は 50%の濃度減少が見られ、比較的安定して有機物除去が行われていた。また、CODcr に比較して SS は高い除去効果が得られていた。

2) 散水ろ床法によるノロウイルスの除去効果は0.6log 程度であり、活性汚泥法の 2log と比較して低い状況にあった。

「散水ろ床法処理水の塩素消毒特性の把握」

3) 散水ろ床法と塩素消毒により最大 1.1log のノロウイルスの低減効果、大腸菌ファージでは 2log の不活化効果が確認された。

4) 散水ろ床処理水に PAC を添加し、塩素消毒を行うことで、ノロウイルス、大腸菌ファージの低減･不活化効果が向上することが確認された。

5) ノロウイルスとともに大腸菌ファージを併せて測定し、除去･不活化効果を評価したが、ノロウイルスの低減効果を上回る値が得られているため、実際にはより高いウイルスの低減効果が得られているものと推定された。

参考文献

1) 緊急時水循環機能障害リスク検討委員会報告書､平成 19 年 3 月.

2) 諏訪守､安井宣仁､鈴木穣､岡本誠一郎､桜井健介（2013）､津波被災下水処理場の段階的復旧対策技術による水質改善効果､下水道協会誌論文集､50(614)､111-120.

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) 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参考資料（2010）.

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､下水道協会誌論文集､47(571)､103-111.

7) 津森ジュン、諏訪守､安井宣仁（2015）、消毒によるウイルス不活化評価に関する調査、平成 26 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 4309 号、3-9.

新規省エネルギー型下水処理技術の開発

研究予算：運営費交付金
研究期間：平 26～平 29
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、岡安祐司、桜井健介

【要旨】省エネルギー型下水処理技術の開発を目指し、下水処理場へ流入した下水を用いて散水ろ床実験装置を 1 年間連続的に運転した結果、$TCOD_{Cr}$、$HCOD_{Cr}$(沈澱池で除去が困難な 100μm 以下の粒子に由来する COD_{Cr})、$SCOD_{Cr}$(1μm 以下の粒子に由来する COD_{Cr})の平均除去率は 40%、44%、40%であった。平均 $HCOD_{Cr}$ は、全 23 回採水したうち、水温が 22-28℃の時期を中心に 8 回が、目安として設定した 68.5mg/L を下回った。また、最初沈殿池流出水中の溶解性易分解性有機物をメタンとして回収することを目的として、嫌気性処理を連続的に適用した結果、$TCOD_{Cr}$ の除去率は、無機質担体、活性炭を充填した場合で、それぞれ 57%、62%であった。
キーワード：散水ろ床、活性炭、溶解性有機物、担体、嫌気性処理

1. はじめに

下水道は我が国の年間消費電力量の約 0.7%を占める大口需要家である。下水道施設での電力使用量のうち、水処理工程での使用が約 5 割を占めており、平成 17 年以降、水処理に係る電力使用量原単位は若干悪化している [1]。一方で下水道事業は、人口減少による使用料収入減少など経営管理への影響が懸念されており [2]、水処理工程の省エネルギー化による下水道事業の維持管理コスト縮減が期待されている。

また、下水道事業は、地方自治体の事業のなかで、温室効果ガスの排出量の大きな事業であり、省エネルギー化によって下水道事業に伴う温室効果ガスの排出量を抑制することは、地域の実質的な排出抑制に寄与することができる [3]。

本研究は、従来の消費電力の多い浮遊性微生物法（オキシデーションディッチ法や標準活性汚泥法等）とは異なる、担体や付着性微生物を活用した省エネルギー型下水処理技術の開発を行うことを目的とする。

平成 27 年度は、下水処理場へ流入した下水を用いて散水ろ床実験装置を平成 26 年度から継続して 1 年間運転し、流出水の性状把握を行った。また、最初沈殿池流出水中の溶解性易分解性有機物をメタンとして回収することを目的として、嫌気性処理を連続的に適用し、有機物の除去特性の把握を行った。

2. 散水ろ床法の流出水の性状把握

2. 1　目的

散水ろ床法に要する電力消費量は、一般に標準活性汚泥法の 1/2～1/4 程度であり [4]、消費エネルギーの観点からは優れた下水処理方法である。しかし、処理水の透視度が劣るなどの課題が指摘されている [5]。本研究では、まず処理水質を把握するため、散水ろ床の実験装置を作成し、連続的に最初沈殿池越流水を散水し、流出水の性状を分析した。有機物指標(COD_{Cr})の分析にあたっては、全体の COD_{Cr} ($TCOD_{Cr}$)および溶解性 COD_{Cr} ($SCOD_{Cr}$)に加えて、Schubert と Gunthert[6]が、散水ろ床流出水中の直径 100μm 以上の粒子は、最終沈殿池で除去されたことを報告していることから、沈澱池で除去が困難な 100μm 以下の粒子に着目し、100μm ろ紙でろ過した試料の COD_{Cr}（本研究では $HCOD_{Cr}$ と呼ぶ）も測定した。

2. 2　実験方法

製作した散水ろ床実験装置の断面図を図 1 に示した。本装置は、直径 300mm の円筒状である。図 1 中の網掛け部分は、プラスチック担体（BIO-15、ゼビオプラスト社）を充てんしたエリアを示し、有効高さは 2.64m とした。プラスチック

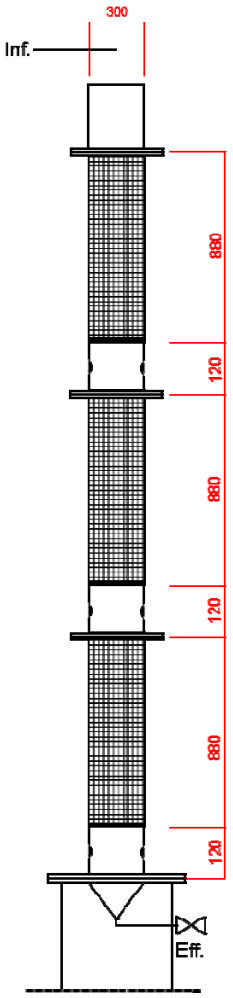


図 1 散水ろ床実験装置の断面図(単位は mm)

担体の大きさは、直径 15mm、高さ 15mm、厚さ 1mm の円筒状であり、比表面積は 450m²/m³ である。また図 1 中の黒色で着色された半円(6 箇所)は、内径 20mm の通気口を示す。

本装置を屋内に設置し、一部合流式を含む下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、越流水をポンプで送水し、散水ろ床実験装置の流入水として、上部から連続的に散水した。また、散水ろ床実験装置の下部から流出水を採取した。散水ろ床法の一般的な散水負荷は、10～75 m³/(m²・d)である[7]ことから、散水ろ床実験装置への散水負荷は、その範囲の 10m³/(m²・d)とした。11 月から散水を開始し、翌年 10 月まで運転し、処理水質を分析した。

水質分析は、水温、$TCOD_{Cr}$、$HCOD_{Cr}$、$SCOD_{Cr}$、NH_4-N を測定した。分析方法は、次のとおり行った。水温の測定にはポータブル pH 計(東亜 DKK 株式会社、HM-30P)を使用した。$TCOD_{Cr}$、$HCOD_{Cr}$、$SCOD_{Cr}$、NH_4-N の測定は吸光光度計 DR3900 および試薬（ともにハック社）を用いた。$HCOD_{Cr}$ の測定は、孔径 100μm のナイロンネットフィルター（メルクミリポア社）のろ過試料を用いた。$SCOD_{Cr}$、NH_4-N の測定は、ガラス繊維ろ紙（ワットマン社、GF/B）のろ過試料を用いた。

2. 3 実験結果

散水ろ床実験装置の流入水と流出水の平均 $TCOD_{Cr}$、$HCOD_{Cr}$、$SCOD_{Cr}$ とそれらの除去率を表 1 に示した。それぞれの除去率は、40%、44%、40%であった。それぞれの除去率は 40%台で大きな差は無かった。

表 1　散水ろ床実験装置の流入水と流出水の平均 COD_{Cr} とその除去率(11 月～翌年 10 月)

	$TCOD_{Cr}$	$HCOD_{Cr}$	$SCOD_{Cr}$
流入水(mg/L)	223	205	84
流出水(mg/L)	133	114	50
除去率(%)	40	44	40

散水ろ床実験装置の水温と処理水の $HCOD_{Cr}$ の関係を図 2 に示した。流出水の $HCOD_{Cr}$ の目標値の目安を 68.5mg/L（COD_{Cr} と BOD の関係式[8]を用いた時の BOD15 mg/L に相当）とする時、全 23 回採水したうち、水温が 22-28℃の時期を中心に 8 回が目安を下回った。水温が低い時期は、目安を上回ることが多く、処理能力の向上が必要であると考えられた。

アンモニア性窒素については、平均で、流入水は 17.2mg/L であり、流出水は 15.1mg/L であった。散水ろ床実験装置の水温と処理水の NH_4-N の関係を図 3 に示した。水温 23-25℃では 10mg/L 程度まで低下し、水温 25℃以上では 1mg/L を下回る場合もあった。

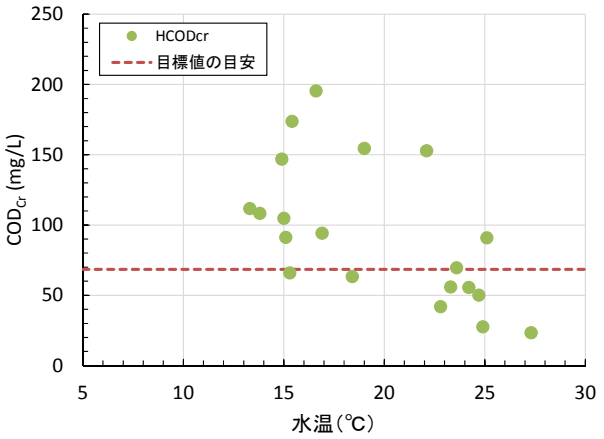


図 2 散水ろ床実験装置の水温と処理水の $HCOD_{Cr}$ の関係(11 月～翌年 10 月)

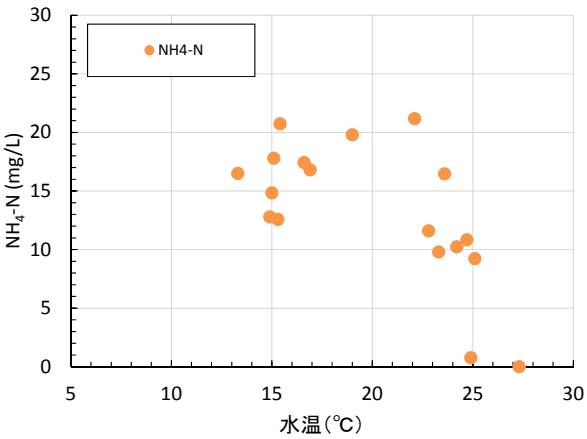


図 3　散水ろ床実験装置の水温と処理水の NH_4-N の関係(11 月～翌年 10 月)

3. 都市下水処理工程からの有機物回収効率向上に関する検討

3. 1 目的

流入下水中に含まれる溶解性有機物は、曝気槽にて酸化されて二酸化炭素として大気中に放出されるのが一般的である。下水処理場での電力消費の約 50%は水処理が占めており[9]、曝気のために必要な電気エネルギーは無視できない。曝気槽への負荷削減手法として、最初沈殿池で凝集剤を添加し、通常の最初沈殿池よりも溶解性有機物の汚泥としての回収率を向上させる前凝集処理に関する研究例では、回収汚泥の嫌気性消化特性が報告されている[10]ものの、残存する溶解性有機物の生物処理は後段で必要である[11][12]。

最初沈殿池での浮遊性物質回収効率を向上させ、流入

下水中に含まれる易分解性有機物をなるべく生汚泥メタンガスとして回収する手法[13]が実証されているものの、最初沈殿池で分離できない溶解性易分解性有機物からのメタン回収は対象外である。ここでのケーススタディでは、最初沈殿池流入 T-BOD および S-BOD がそれぞれ 170 および 50mg/L と設定されており[13]、S-BOD は生汚泥として回収される BOD の半分程度に相当する。直投型ディスポーザーが普及すれば、さらなる S-BOD の増加も考えらえる[14]。BOD 成分は好気条件下で微生物により無機化される有機物であり、嫌気性消化によるメタン転換も可能であると考えられる。

こうした溶解性有機物の新たな回収手法として、本研究では活性炭による吸着に注目した。粒状活性炭を担体として活用する嫌気性反応器が、テレフタルなど特定の有機物の吸着および嫌気性処理を主目的に開発されており[15]、活性炭吸着と嫌気性消化を組み合わせられると考えられる。長期間におよぶ連続式実験もなされており、活性炭の担体としての耐久性は実証されている[16]。しかしながら、流入下水に含まれる溶解性有機物の吸着と嫌気性処理の特性についての報告例は少ない。そこで本年度は、実流入下水に対して、活性炭を担体とした嫌気性処理の連続式実験を実施した。また、並行して、無機質素材担体を用いた系列、担体を用いない系列の連続式実験装置を合わせて運転し、比較検討を行った。

3. 2 実験方法

嫌気性処理実験に用いた部分循環式嫌気性ろ床実験装置の概念図を図 4 に示した。内径 36mm の円筒状で、底面から水面までの高さは 1200mm である。ろ材を充填する系列には、図の網掛け部分（底面から 200mm ～ 600mm の間）に活性炭または無機質担体を充填し、ろ層厚を 400mm とした。活性炭は Filtrasorb 400（カルゴン社）の新品を用いた。無機質担体は、直径 2mm の球状ガラスを用いた。ろ材の上端部分には約 1.5mm メッシュのステンレス製網を設け、ろ材の流出を防止した。また比較対照として、ろ材を充填しない系列も設けた。

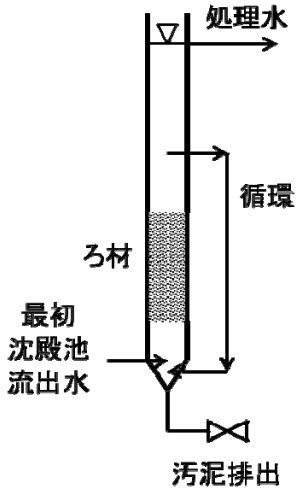


図 4　嫌気性処理実験装置の概念図

本装置を屋内に設置し、一部合流式を含む下水処理場へ流入した下水を、最初沈殿池実験装置で処理し、最初沈殿池流出水をポンプで連続的に注入した。流量は、線速度が 5mm/min.となるように設定した。また、底面から 800mm 地点から底面付近へ、流入水の流量に対して 2 倍の流量で液を循環した。ろ材部分での通過速度は 15mm/min.、底面から 800mm～1200mm 部分での通過速度は 5mm/min.、装置全体の水理学的滞留時間は 240min.である。実験に先立ち、馴致期間として約 4 か月設定し、実験は 12 月～3 月の期間で行った。実験開始当初は、活性炭を充填した系列では、活性炭の粉末と有機物の塊状の物質が底面に堆積し、実験装置内の閉塞が危惧されたため、底部より余剰汚泥を排出したが、その後、この現象は解消されたため、余剰汚泥の排出は行わなかった。ろ材を充填しなかった系列および無機質担体を充填した系列では、一定程度の汚泥の堆積は見られたものの、閉塞が危惧される程度ではなかったため、実験期間中の汚泥の排出は行わなかった。

3. 3 実験結果

部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水および処理水の TCODCr、SCODCr の平均値と、最初沈殿池処理水から処理水の間の、それらの除去率を表 2、表 3 に示した。なお、試料は 1 週間に 1 回程度の頻度で、グラブサンプルを採取した。TCODCr の除去率は、ろ材を充填しない場合、無機質担体を充填した場合、活性炭を充填した場合で、それぞれ 49%、57%、62%

表 2　部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 TCODCr とその除去率

	なし	担体	活性炭
流入水(mg/L)	242		
最初沈殿池流出水	211		
流出水(mg/L)	108	89	79
除去率(%)	49	57	62

表 3　部分循環式嫌気性ろ床実験装置の流入水、最初沈殿池流出水と処理水の平均 SCODCr とその除去率

	なし	担体	活性炭
流入水(mg/L)	93		
最初沈殿池流出水	82		
流出水(mg/L)	63	51	46
除去率(%)	23	37	45

であった。一方、SCODCr の除去率は、TCODCr の除去率に比べて低く、それぞれ 23%、37%、45%であった。なお、余剰汚泥の発生量は極めて少なかったことから、除去された有機物の大部分はメタンや二酸化炭素に変換されたと考えられる。

4. まとめ

本研究の実施内容を、以下にまとめる。

1) 下水処理場へ流入した下水を用いて散水ろ床実験装置を 1 年間連続的に運転した結果、$TCOD_{Cr}$、$HCOD_{Cr}$、$SCOD_{Cr}$ の平均除去率は 40%、44%、40%であった。平均 $HCOD_{Cr}$（沈澱池で除去が困難な 100μm 以下の粒子に由来する COD_{Cr}）は、全 23 回採水したうち、水温が 22-28℃の時期を中心に 8 回が、目安として設定した 68.5mg/L を下回った。

2) 最初沈殿池で分離回収できない溶解性易分解性有機物からのメタン回収を目的として、最初沈殿池流出水に対して、嫌気性反応装置を、冬季に連続的に適用した結果、TCODCr の除去率は、ろ材を充填しない場合、無機質担体を充填した場合、活性炭を充填した場合で、それぞれ 49%、57%、62%であった。余剰汚泥の発生量は極めて少なく、除去された有機物の大部分はメタンや二酸化炭素に変換されたと考えられる。今後は、担体充填方法の最適化、メタンの回収手法、嫌気性処理水の仕上げ処理などを検討することで、省エネルギー型下水処理技術の開発を行う予定である。

謝辞

下水試料採取などでお世話になりました下水処理場関係各位に謝意を表します。

参考文献

1) 下水道における資源・エネルギー施策の現状分析、第 3 回下水道政策研究委員会会議資料、平成26年1月16日、2014.
2) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部、公益社団法人日本下水道協会：下水道長期ビジョン実現に向けた中期計画、新下水道ビジョン、p.4.2、平成 26 年 7 月、2014.
3) 下水道における地球温暖化防止対策検討委員会：下水道における地球温暖化防止推進計画策定の手引き、平成 21 年 3 月、pp.4-5、2009.
4) Water Environment Federation : Energy use in wastewater treatment process, Energy Conservation in Water and Wastewater Facilities, Manual of Practice (MOP) No. 32, p.162, McGraw Hill, New York, 2010.
5) 社団法人日本下水道協会：下水道施設設計指針と解説 1984 年版、p.376、1984.
6) Schubert, W. and Gunthert, W., Particle size distribution in effluent of trickling filters and in humus tanks, Water Research, 35(16), pp.3993–3997, 2001.
7) George Tchobanoglous, Franklin Louis Burton, H. David Stensel : Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, fourth edition international edition, McGraw Hill, New York, p.893, 2004.
8) 後藤雅子、甘長淮：下水処理における窒素除去と放流先の窒素挙動を加味した温室効果ガス排出量の一考察、第 50 回下水道研究発表会講演集、pp.565-567、2013.
9) 日本下水道協会：下水道統計（平成 23 年度版）（第 68 号）、2013.
10) 高岡昌輝、 廣田淳一、 武田信生、 藤原健史：前凝集沈殿汚泥の嫌気性消化特性、 土木学会論文集、 No.685/VII-20、pp.17-26、 2001.
11) 宗宮 功、 津野 洋、 貫上 佳則、 長谷川 明巧、 木下 巖、 日髙 平：前凝集沈殿･浮遊微生物処理法による都市下水の高度処理に関する研究、 下水道協会誌論文集、Vol.36、 No.436、 pp.87-97、 1999.
12) 日髙 平、 津野 洋、 鄭 晋宇、 岸本 直之、 織田 稔幸：生物膜ろ過反応器での前凝集汚泥活用に関する研究、下水道協会誌論文集、 Vol.40、 No.487、 pp.103-116、2003.
13) 国土交通省 国土技術政策総合研究所：B-DASH プロジェクト No.1 超高効率固液分離技術を用いたエネルギーマネジメントシステム導入ガイドライン（案）、 国土技術政策総合研究所資料、 No.736、 2013.
14) 津野 洋、 日髙 平、 朴 鏞珍、 千 智勲、 朴 賛祐：ディスポーザー対応下水道における嫌気性消化のための固形物回収技術の検討、 下水道協会誌論文集、 Vol.42、No.514、 pp.143-152、 2005.
15) Hiroshi Tsuno, Masasumi Kawamura : Development of an expanded-bed GAC reactor for anaerobic treatment of terephthalate-containing wastewater, Water Research, Vol.43, pp.417-422, 2009.
16) 津野 洋、 河村正純、 日髙 平、 本間康弘、 蒲池一将：生物活性炭嫌気性反応装置による SS 含有低濃度有機性廃水の処理に関する研究、 環境工学研究論文集、 Vol.47、pp.561-569、 2010.

下水中の病原微生物の網羅的検出法の開発に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究期間：平 27～平 29
担当チーム：材料資源研究グループ
研究担当者：南山瑞彦、諏訪守、安井宣仁

【要旨】
本研究では感染症発生情報を提供出来るシステムを構築するための、基礎データの集約とデータベース化を図るために下水中病原微生物の網羅的検出法を開発することを目的とした。網羅的な検出には、近年の遺伝子解析技術の向上により医学分野で検討事例のある、次世代シーケンサー（NGS)を用い検討することとした。下水を対象とした NGS による網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は、国内外でも例は極めて少ないため、網羅的検出法に関する最適化された測定手法はない。このため、本研究において、網羅的検出法により得られる「下水中の病原微生物のデータ」は、今後、下水処理プロセスでの病原微生物のリスク制御を検討する上で、有効な情報となり得ると考えられる。NGS による分析には、前処理として対象試料の核酸を抽出する必要があるが、感度よく精度の高いデータを得るためには核酸抽出効率を高め、最適な純度を得ることが重要である。そこで H27 年度は、下水試料を対象に異なる核酸抽出方法を検討し、NGS 分析に最適な前処理方法を評価した。また、実下水処理場の流入下水、処理水を対象に定期採水を実施し、下水、処理水中に混入および残存する可能性のある病原微生物の NGS による網羅的検出を試みた。その結果、0.45μm フィルターに試料を捕捉したろ紙を、ビーズを用いてろ紙表面上を処理することで、最適な核酸濃度および純度を得られ、下水・下水処理水を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。なお、NGS により取得したデータは現在解析作業中である。

1. はじめに

近年、測定技術の向上に伴い、下水や下水処理水および環境水から様々な病原微生物の検出可能となり、それらの存在が徐々に明らかとなってきており、国土交通省「新下水道ビジョン」では、流入水中のウイルス等の疾患に関する情報を提供できるシステムを 10 年間かけて（中期計画）開発することを掲げている。今後、ヒトへ健康被害拡大防止のための感染症発生情報を提供出来るシステムが求められる。

下水中には、原虫、腸管系ウイルス、細菌、その他の感染性ウイルス等が混入する可能性があるが、現状では、特定の病原微生物 （ノロウイルス等）の情報のみが、整備されている状況であり、「どのような種の病原微生物がどの程度の割合で存在？」といった、データ整備がなされていない。

現状での下水中に混入する可能性ある病原微生物の検出法は、主に遺伝子解析手法(PCR 法等)により、個々の病原微生物を定量測定することに留まっており、本来であれば、混入する可能性ある病原微生物すべてを検出することが必要であるが、全てを対象にした場合に困難かつ、時間・コストを有することである。このため、現在顕在化している個々の病原微生物のみならず、未知の病原微生物または想定してない病原体の混入の可能性に対して、網羅的に存在実態を把握する検出法が求められる。

本研究では、感染症発生情報を提供出来るシステムを構築するための、基礎データの集約とデータベース化を図るために下水中病原微生物の網羅的検出法を開発することを目的とし、近年の遺伝子解析技術の向上により医学分野で検討事例のある、次世代シーケンサー(以下、NGS と記す)を下水および下水処理水に適用した。下水を対象とした NGS による網羅的な病原微生物の検出に関する検討事例は、国内外でも例は極めて少ないため、網羅的検出法に関する最適化された測定手法はない。このため、本研究において、網羅的検出法により得られる「下水中の病原微生物のデータ」は、今後、下水処理プロセスでの病原微生物のリスク制御を検討する上で、有効な情報となり得る可能性がある。また排水状況と病原微生物の存在実態を関連付けた調査事例も存在せず、下水道分野での今後の総合的な病原微生物の管理に係わる情報を提供することが可能である。

H27 年度は、 下水・下水処理水を対象とした NGS による病原微生物の網羅的検出法の最適な手法開発を行うため、実処理場にて定期的に下水、下水処理水の採水を行い NGS による病原微生物の網羅的検出を試みた。

2. NGS による病原微生物網羅的検出の最適な検出手法の開発

NGS による遺伝子解析では、使用する試料の核酸抽出の前処理が必要となるが、感度よく精度の高いデータ取得のためには、病原微生物からの核酸抽出効率を高め、最適な純度を得る必要がある。しかしながら、現状では下水ならびに下水処理水を対象に NGS による最適な核酸抽出方法が確立されていない。そこで、本研究では、まず文献ならびに既往の研究成果等で示されている抽出方法ならびに本研究で考案した抽出方法を用い、NGS 分析による最適な前処理方法を検討した。分析フローを図-1 に示す。

2.1 NGS 前処理：核酸抽出方法の検討

NGS に使用できる核酸の状態は、二本鎖の DNA (dSDNA)である必要があり、抽出後の後段の分析において精度良く行える最低濃度として dsDNA 濃度が 25ng/μL 以上必要である。また dsDNA の純度が 1.8～2.0 の範囲であることが望ましい。これらの条件を満たすことが可能な抽出方法を検討した。

A 下水処理場の流入下水を抽出検討用試料として用い以下に示す方法で核酸の抽出を行った。抽出後



図-1 NGS 装置による分析フロー

*核酸抽出が後段の分析の精度・感度に大きく影響する

は Nanodrop 2000c (Thermofisher 製)を用い DNA 純度を測定し、dsDNA 濃度は Qubit3.0 (Thermofisher 製)を用い定量した。

抽出方法 A

PEG 沈法により濃縮した下水試料を QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN 社製)を用い、手順書に従い抽出を行った。

抽出方法 B

抽出方法 A と同様の試料を用い、ウイルスの抽出に最適化された kit として QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN 社製) を用い、手順書に従い抽出を行った。

抽出方法 C

懸濁物質や粒子内に付着している濁質から効率的に抽出するために、0.45μm フィルターで下水をろ過し、ろ紙に捕捉された試料から核酸を抽出する方法を用いた。

抽出方法 D (本研究で開発した手法)

抽出方法 C における前処理と同様に 0.45μm でろ過し、ろ紙に捕捉された試料をビーズが入ったチューブに入れ、ろ紙表面上をビーズで剥がす工程を追加した。具体的にはビーズ入のチューブにろ紙を充填し専用のボルテックスで 5 分間混合させ、ろ紙表面上よりろ紙表面上に捕捉した濁質を効果的に剥がし核酸の抽出を行った。

2.2 実験結果

図-2 に各抽出方法における核酸濃度および DNA 純度を示す。図-2 より分析方法 A、B では抽出後の後段分析が精度良く行える最低濃度である dsDNA 濃度が 25ng/μL未満であり、DNA の純度が 3～3.5 と非常に高く、純度が高すぎる場合、夾雑物の影響があると考えられ、抽出方法 A および B は下水試料を対象とした際の NGS 分析の抽出方法としては不向きであると判断した。一方、抽出方法 C では濃縮方法を従来の PEG 沈法から 0.45μm フィルターに通水しろ紙上に捕捉された試料を用いて抽出を行ったが、抽出方法 A、B と比較して、DNA の純度も後段の分析に最適な 1.9 程度であり、dsDNA 濃度は数倍程度増加したが後段の分析が精度良く行える最低濃度(≧25ng/μL)には達しなかった。本研究で新たに開発した抽出方法 D は、dsDNA 濃度が約 140ng/μL、DNA 純度も 1.8

～1.9 と良好であった。抽出方法 D はフィルターに捕捉された試料をビーズによりろ紙表面上から剥がし取るため、抽出効率が他の抽出方法と比較して向上した可能性が考えられた。

以上より抽出方法 D を用いることで、核酸抽出効率が増加し、分析可能な最適な純度の DNA の抽出が可能となり、下水・下水処理水を対象とした際の NGS 分析に適した核酸抽出方法が確立できた。

3. 実処理施設での NGS 用試料の採水

H.27.7～H.28.2 の期間において、A 下水処理場の流入下水、凝集沈殿標準活性汚泥処理水、A2/O 法処理水を対象に計 48 サンプルの採水を行い、2. の項で開発した抽出方法を用い、下水に混入および処理水中に残存する可能性のある病原微生物を、NGS を用い網羅的に検出することを試みた。なお、季節変動等を考慮するために試料は隔週で採水を行った。

採水した試料は土木研究所水質水文共同実験棟に持ち帰り、SS、濁度、T-N、T-P、pH、COD_{cr}、大腸菌、大腸菌群の一般水質を測定した。併せて NGS 用の前処理として 0.45μm のフィルターに試料を通水し、抽出方法 D を用い核酸の抽出を行った。なお分析を即座に行えない試料は、ろ紙を－80℃で保管し 1 ヶ月以内に抽出作業を実施した。

図-3 に採水期間中での流入下水および処理水中の大腸菌濃度を示す。図-3 より糞便指標である大腸菌は高い濃度変動性があり、病原微生物も同様に濃度変動が生じている可能性があり、病原微生物種も変遷している可能性があると考えられた。

NGS 装置により 48 サンプル分の遺伝子データの取得は完了しており、現在取得したデータを解析中である。H28 年度は① 病原微生物の NGS による網羅的検出および解析　② 感染症発生情報を提供出来るシステムの基礎データの構築のための、流入下水中の病原微生物のデータベース化を実施する予定である。

4. まとめ

H.27 年度は NGS 分析における前処理として核酸抽出方法を検討し、実処理場の下水および処理水を採水し NGS 分析した結果以下の知見を得た。

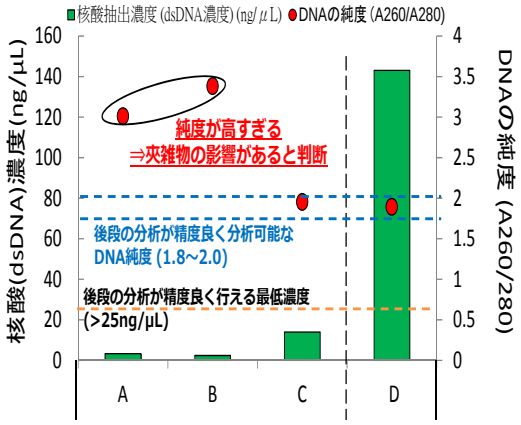


図-2 異なる抽出方法による dsDNA 濃度と DNA

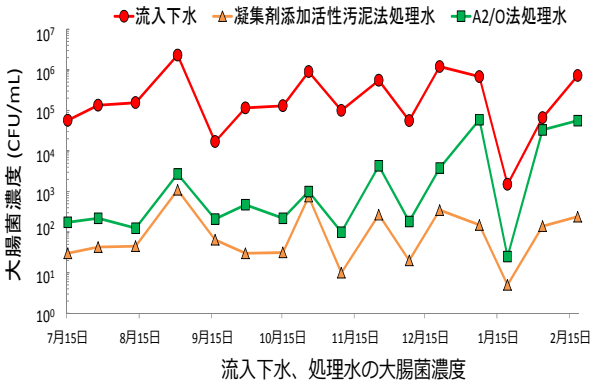


図-3 流入下水・処理水中の大腸菌濃度（H.27.7～H.28.2）

1) 抽出方法として、0.45μm のフィルターで試料をろ過し、ろ紙上に捕捉された試料をビーズにより粉砕工程を経ることで、NGS 分析に最適な核酸濃度および純度を得ることが出来た。

2) 1) で確立した抽出方法を用い、実処理場で下水および処理水を採水し、NGS 分析を行った。現在、解析中である。なお、採水した大腸菌を分析した結果、高い濃度変動性があり、病原微生物も同様に濃度変動が生じている可能性があり、病原微生物種も変遷している可能性があると考えられた。

参考文献

1) 国土交通省水管理・国土保全局下水道部，公益社団法人日本下水道協会：下水道政策研究員委員会　報告書　新下水道ビジョン～「循環のみち」の持続と進化～，2014 年 7 月，p.4.85-4.105.

2) 諏訪守，岡本誠一郎，尾崎正明，陶山明子：下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度に及ぼす

濃縮法の影響,下水道協会雑誌,46 (512), pp.91-101, 2009.
3) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介：下水道におけるウイルス対策手法に関する検討調査, 平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集, No.4191, ISSN 0386-5878, 土木研究所資料, 2010.
4) 津森ジュン, 日高平, 對馬育夫：遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発, No.4309, ISSN:0386-5878, 土木研究所資料, 2015.

遺伝子解析による嫌気性消化槽の維持管理技術の開発

材料資源研究グループ　上席研究員　南山瑞彦
水環境研究グループ　　主任研究員　對馬育夫
材料資源研究グループ　研　究　員　高部祐剛

1. はじめに

低炭素・循環型社会構築のため、都市や農村で発生するバイオマスを、資源やエネルギーとして地域で有効活用する技術開発が求められている[1)]。有用なエネルギー資源の一つとして注目を集める下水汚泥が発生する下水処理場は、嫌気性消化槽といったバイオマスからのエネルギー回収を可能とする施設を有しており、下水処理場を地域の中で、エネルギーの集約・自立・供給拠点化することが目標として掲げられている[2)]。

下水処理場での嫌気性消化について、地域から発生するバイオマスを含めた集約混合嫌気性処理を想定した上で、下水汚泥に生ごみ、食品系廃棄物、間伐材等のバイオマスを加え、その消化特性の把握が試みられている[3)]。一方、集約混合嫌気性処理では、投入バイオマス条件が複雑になり、嫌気性消化槽の維持・管理について、これまで蓄積した現場の経験やノウハウでは対応できない懸念があり、適切な維持管理手法が求められている。

本研究では、集約嫌気性消化が消化槽内微生物群集に与える影響を明らかとするため、濃縮汚泥と生ごみの混合消化実験を行い、投入バイオマスおよび消化槽内微生物群についての遺伝子解析を試みた。

2. 実験方法

混合消化実験は、有効容積 2 L のリアクター計 6 系列 (No.1～6)で実施した。各リアクターでの運転条件を表−1 に示す。濃縮汚泥は A 下水処理場で定期的に採取し、固形物 (TS)濃度を 3%となるように調整した。生ごみは、実生ごみ組成に関する調査結果[4)]を参考に作成した。種汚泥は、土木研究所内設置の嫌気性消化装置内消化汚泥を用いた。各リアクター内水理学的滞留時間 (HRT)は 20 日とし、温度は 35℃程度に制御した。各リアクターは、4 か月間運転を行った。

No.1、2 および 3 では、濃縮汚泥に対する生ごみ投入量変化が、消化槽内微生物群集に与える影響の把握を試みた。生ごみを熱化学処理することで、生ごみの可溶化が促進され、メタン発酵効率が向上することが知られている[5)]。そこで、No.4 では、生ごみの熱化学処理による影響を把握するため、オートクレーブ (121℃、2 時間)による熱処理を施した生ごみを投入した。No.5 では、種汚泥投入の影響を考察するため、種汚泥を投入せず実験を開始した。No.6 には、濃縮汚泥のみ投入した。

表−1　各実験系での運転条件

リアクター	HRT (日)	温度 (℃)	投入バイオマス	種汚泥の有無	濃縮汚泥 TS (%)	濃縮汚泥に対する生ごみの割合 (%) (TSベース)	投入TS (%)	投入VS (%)	投入COD_{cr} (g/L)
No.1	20	35	濃縮汚泥+生ごみ	有	3.0	10%	3.3	2.7	45.6
No.2	20	35	濃縮汚泥+生ごみ	有	3.0	20%	3.6	3.0	49.4
No.3	20	35	濃縮汚泥+生ごみ	有	3.0	30%	3.9	3.3	53.2
No.4	20	35	濃縮汚泥+ 生ごみ (滅菌)	有	3.0	10%	3.3	2.7	45.6
No.5	20	35	濃縮汚泥+生ごみ	無	3.0	10%	3.3	2.7	45.6
No.6	20	35	濃縮汚泥のみ	有	3.0	―	3.0	2.4	41.8

種汚泥、濃縮汚泥および生ごみ、ならびに各リアクターの消化汚泥の 16SrRNA 遺伝子配列に基づく微生物群集解析を行った。DNA 抽出には、Extrap SoilDNAKit Plus ver.2 (日鉄住金環境)を用い、V3−V4 領域を対象としたプライマーセット (Bac341 および Bac850)[6]を用い、PCR を行った。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3 (600 サイクル、Illumina)を用いて解析し、解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH[7]を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)−picking および PCoA 解析は QIIME[8]を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 をリファレンスとした。

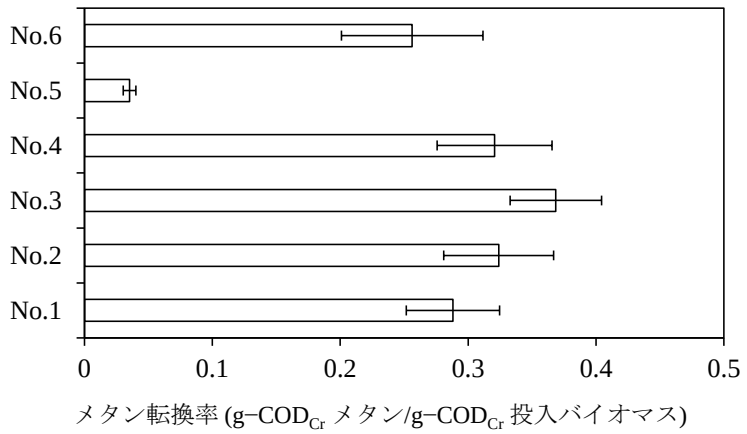
3. 結果および考察

図−1 に各リアクターでのメタン変換率 (COD_{Cr} ベース)を示す。

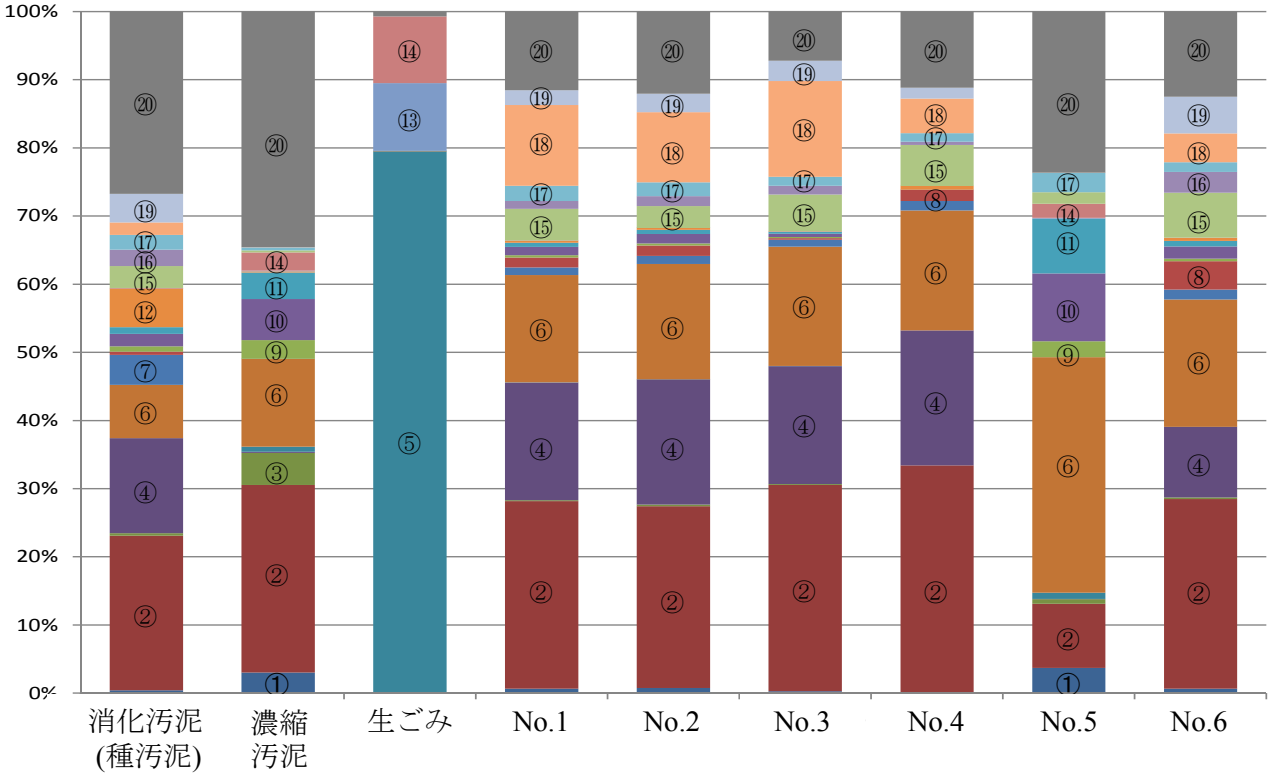
No.5 でのメタン転換率は 0.0353 と、他のリアクター (0.256～0.369)に比べ、極めて低い値となった。これは、種汚泥を加えなかったため、実験期間内でメタン生成に係る微生物が十分増殖しなかったことが原因と考えられる。生ごみの有機固形物の分解率は 0.75～0.85 と高く [9]、濃縮汚泥のみを投入した No.6 (0.256)でのメタン転換率に比して、生ごみを添加した No.1 (0.288)、No.2 (0.324)および No.3 (0.369)でのメタン転換率は高く、また、生ごみ投入の割合が高くなるにつれて、メタン転換率が向上した。No.1 に比して、No.4 (0.321)でのメタン転換率は高い値となった。No.4 でのオートクレーブ処理により、生ごみの一部が可溶化し、結果として、メタン転換率が向上した可能性が考えられる。

微生物群集解析の結果から、Order レベルでの細菌叢を図−2 に示す。種汚泥および No.1−6 において、②*Bacteroidales*、④*Anaerolinaeales*、⑥*Clostridiales* が共通して多く検出された。一方、生ごみから検出された細菌叢は比較的単純でほぼ⑤*Lactobacillales*、⑬E*nterobacteriales*、⑭*Psedomonadales* から構成されていたが、リアクターからはほとんど検出されなかった。種汚泥を投入していない No.5 の細菌叢は、他のリアクターとはやや異なり、⑨*Rhizobiales*、⑩*Burkholderiales*、⑪*Rhodocyclales*、⑭*Pseudomonadales* が検出されるなど濃縮汚泥の細菌叢に比較的類似していた。また、No.1−3 では、⑱*Thermotogales* が比較的多く検出された。種汚泥や投入バイオマスからあまり検出されないことから、リアクターの中で増殖したものと考えられる。

各試料での微生物群集構造を対象とした PCoA 解析結果を図−3 に示す。(1)No.5 を除く各リアクターの消化汚泥および種汚泥、(2)No.5 での消化汚泥、(3)濃縮汚泥、ならびに(4)生ごみの、4 つの群に分かれた。No.5 のプロットは、濃縮汚泥と生ごみのプロットの中間に位置しており、No.5 での微生物群集構造は、他のリアクターに比べ、投入バイオマス (濃縮汚泥、生ごみ)での構造に類似していた。これは、上述した No.5 においてメタン生成に係る

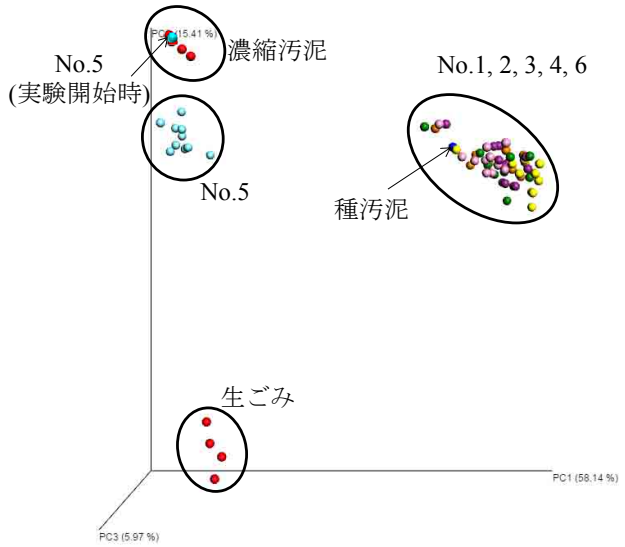


図−1　各リアクターにおけるメタン変換率 (n=5)。バーおよびエラーバーはそれぞれ平均値および標準偏差を示す。



	Phylum	Class	Order		Phylum	Class	Order
①	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	⑪	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales
②	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	⑫	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Syntrophobacterales
③	Bacteroidetes	Saprospirae	Saprospirales	⑬	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
④	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	⑭	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
⑤	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	⑮	Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales
⑥	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	⑯	Spirochaetes	Brachyspirae	Brachyspirales
⑦	Firmicutes	Clostridia	SHA-98	⑰	Synergistetes	Synergistia	Synergistales
⑧	OP8	OP8_1	OPB95	⑱	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales
⑨	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	⑲	WWE1	Cloacamonae	Cloacamonales
⑩	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	⑳	Other	Other	Other

図−2　各試料中微生物群集解析結果例



図−3　PCoA 解析結果

微生物が十分増殖しなかったことを裏付けるものである。一方で、No.5 を除く全てのリアクターおよび種汚泥での微生物群集構造は類似しており、また、投入バイオマス (濃縮汚泥、生ごみ)での構造と異なるものであった。このことから、生ごみ (熱化学処理を施したものを含む)を投入した集約嫌気性消化における消化槽内微生物群集構造は、生ごみ投入の影響を受けず、濃縮汚泥のみを消化した槽内微生物群集構造と同様であることが明らかとなった。

4. まとめ

濃縮汚泥と生ごみの混合消化実験における、投入バイオマスおよび消化汚泥中の微生物群について遺伝子解析を行った。濃縮汚泥および生ごみを投入した集約嫌気性消化槽内微生物群集構造は、濃縮汚泥のみ投入した場合の群集構造と類似していた。このことから、今後、下水処理場で想定される集約嫌気性消化において、生ごみを受け入れた場合でも、消化槽内微生物群集構造に与える影響は小さいことが示された。

謝辞

下水処理場の方々には、汚泥試料採取にご協力頂きました。ここに記して、謝意を表します。

参考文献

1) 日高平ら:下水汚泥のリサイクルと小規模下水処理場向け高濃度混合メタン発酵技術、日本エネルギー学会誌 、日本エネルギー学会 、 94、705−714、2015.
2) 国土交通省：新下水道ビジョン、3·17、2014.
3) 日高平ら：回分式実験による下水汚泥と有機性廃棄物の嫌気性消化特性調査、土木学会論文集 G (環境)、69、III_605− III_614、2013.
4) 谷川昇ら：生ごみの細組成、都市清掃、50、116−119、1997.
5) Sawayama S.ら: Thermochemical liquidization and anaerobic treatment of kitchen garbage, Journal of Fermentation and Bioengineering, 83 (5), 451−455, 1997.
6) Klindworth A.ら: Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, Nucleic Acids Research, 41, 1−11, 2013.
7) Edgar R.: Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, Bioinformatics, 26(19), 2460−2461, 2010.
8) Caporaso J.G.ら: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, Nature Methods, 7, 335−336, 2010.
9) 野池達也：メタン発酵、技報堂出版、2009.

Ⅱ．水質チームによる研究

下水道における最適なリスク評価手法と対策技術の構築に向けた検討業務

水質チーム　上 席 研 究 員　岡本誠一郎
総括主任研究員　小 森 行 也
主 任 研 究 員　北 村 友 一
研　　究　　員　真 野 浩 行
研　　究　　員　武 田 文 彦

水質リスクをもたらす可能性のある化学物質のうち、環境省において環境基準化、排水基準化が検討されている化学物質等について、下水の排除の制限値等を検討するため、下水処理過程での化学物質等の除去特性及び挙動の把握、生物応答手法によるリスク評価を実施し、それらの結果を比較・検討することにより、下水処理過程での化学物質の挙動評価と除去技術の構築を図ることを目的とし、以下の調査を行った。

（1）下水処理過程での化学物質等の挙動評価と除去技術の構築に係る調査

① 活性汚泥処理プロセスにおけるノニルフェノール（ＮＰ）の挙動把握

平成 24 年 8 月 22 日、水生生物の保全を目的とした環境基準項目に追加され排水基準の検討が行なわれているノニルフェノール（NP）の活性汚泥処理プロセスにおける挙動把握実験を行った。

【実験方法】

実験は、図-1 に示す活性汚泥処理実験装置を用いて行った。本装置は有効水深が約 2m の最初沈殿池（0.5 m^3）、エアレーションタンク（0.5m^3 × 4 槽）、最終沈殿池（0.7m^3）と生汚泥貯留槽（0.15m^3）、余剰汚泥貯留槽（0.15m^3）で構成されている。流入水は、実下水処理場の流入下水を一端ピットに受け、このピットから定量ポンプを用いて実験装置に導入した。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。

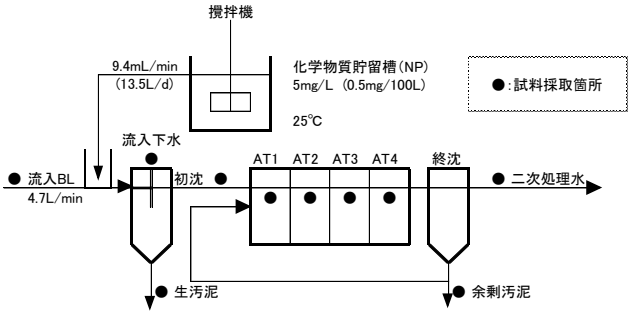


図-1　活性汚泥処理実験装置（概要）

装置の運転は、実下水を流入水とし流入下水量は 6.8m^3/日、最初沈殿池の沈殿時間は約 1.8 時間、エアレーション時間は約 7 時間、最終沈殿池の沈殿時間は約 2.5 時間とした。また、汚泥返送率は 50%に設定した。NP は流入下水に含まれる他、流入下水中の NPEO の分解により生成するものもあることから、これらの影響をできるだけ小さくした実験とするため、本実験では流入下水の NP に対し高濃度の NP を添加した系において実験を行った。過年度の調査により実験プラントの流入下水の NP 濃度は約 0.5μg/L であったことから、本実験での流入下水の NP 濃度は、この約 20 倍濃度（10μg/L）に設定した。具体的には、NP の水への溶解性（7mg/L、25℃）から NP 貯留槽の濃度を 5mg/L に設定し、NP の添加は実験装置への流入下水量（4.7L/min）に対し、1/500 の 9.4mL/min の流量で連続注入した。

実験装置の運転開始から約 2 ヶ月経過した平成 28 年 1 月 12 日に NP 添加を開始し、NP 添加から 1 日、9 日、15 日、22 日、28 日、36 日、43 日経過した時点で NP 挙動調査用試料をスポット採取した。また、NP 添加から 15 日経過時(1/27)と 43 日経過時(2/24)には NP に加え NPEO、NPEC を分析した。

【実験結果】

エアレーションタンク内、最終沈殿池での溶解性 NP 濃度の減少を 1 次反応と仮定し反応係数 k_1 (1/h)を求めたところ、反応係数（k_1）0.074 が得られた（図-2)。この反応係数より溶解性の NP を 50%除去するのに要する処理時間、いわゆる半減期を求めると約 9 時間が得られた。また、70%除去に必要な処理時間は 16 時間、90%除去に必要な処理時間は 31 時間であった。

NP 添加 15 日後（1/27）と 43 日後（2/24）に活性汚泥処理プロセスにおける NP 類（NP、NPEO、NPEC）物質収支を求め図-3 に示す。流入フラックス（IN：流入下水）に対する排出フラックス（OUT：二次処理水+生汚泥+余剰汚泥)は、NP 添加 15 日後が 68%、NP 添加 43 日後が 20%であった。流入フラックスから排出フラックスを差し引いた残りの 32%、80%は生分解により除去されたものと考えられた。

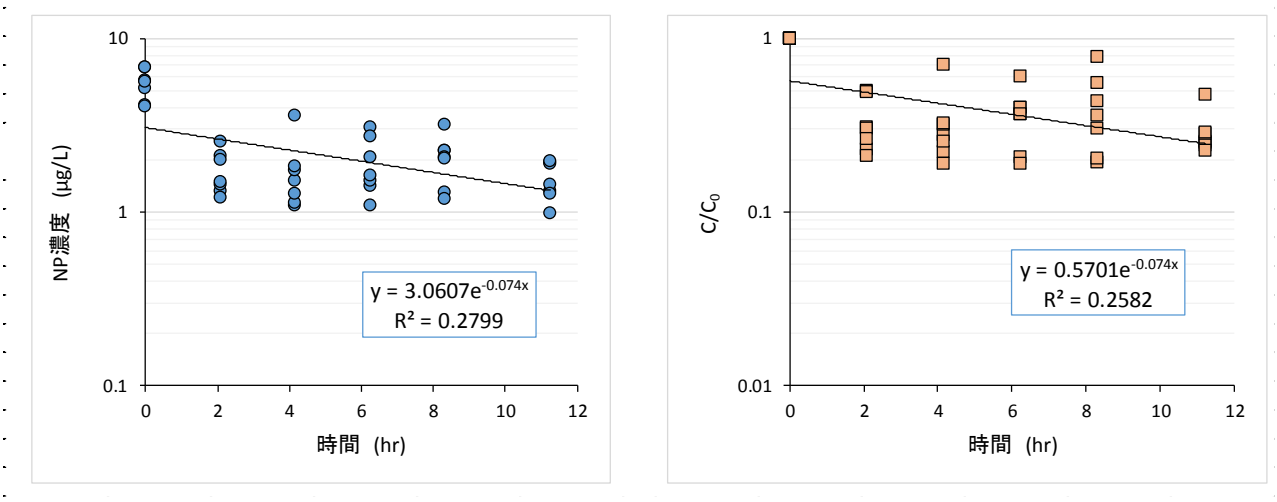


図-2　活性汚泥処理プロセスにおける NP 濃度変化（左図：NP 濃度、右図：C/C_0）

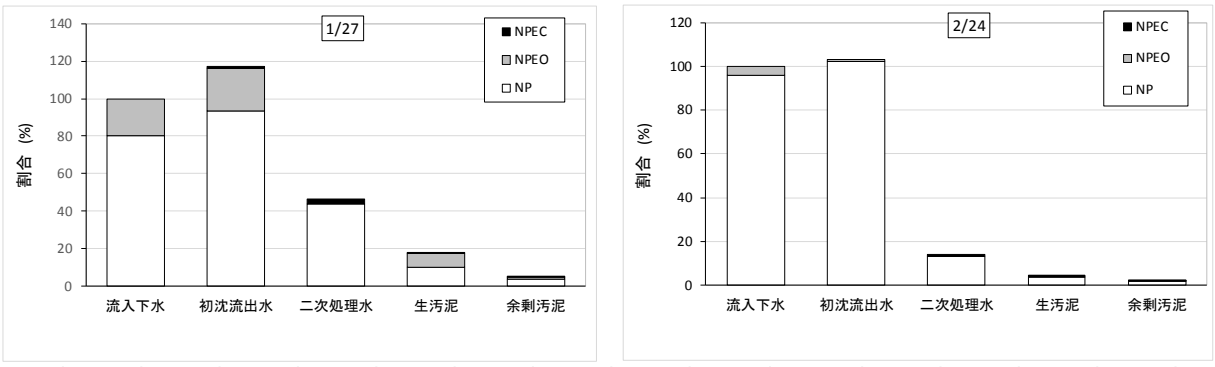


図-3　流入負荷量を 100%とした場合の各プロセスの負荷量割合

② 活性汚泥処理プロセスにおけるアンモニア性窒素の挙動把握

水生生物保全水質目標検討の基礎資料とするため有害性情報の整理が行なわれているアンモニアの活性汚泥処理プロセスにおける挙動把握実験を行った。アンモニアは、水環境中では主として非イオンアンモニアとアンモニウムイオンの 2 つの形態として存在するが、この形態変化は pH 依存性があることから通常の pH(中性)に加え、流入下水が酸性、アルカリ性の場合における窒素の挙動把握を行なった。

【実験方法】

実験は、前述の NP 添加実験に引き続き、図-1 の活性汚泥処理実験装置を用い流入下水の pH が中性（実験１：ｐH7.2)、流入下水の pH が酸性（実験２：ｐH6.1)、流入下水の pH がアルカリ性（実験３：ｐH9.0）の 3 ケースについて行なった。実験 1、実験 2、実験 3 における水質分析は、下水試験方法に従い行なった。また、エアレーション空気中のアンモニアは、排ガス中のアンモニア分析方法（JIS K0099）に従い、試料ガスをほう酸溶液に通し吸収させた後、NH_4-N として分析を行なった。

【実験結果】

TN の流入フラックス（IN：流入下水）に対する排出フラックス（OUT：生汚泥+余剰汚泥+エアレーション+二次処理水)は、実験 1（中性）では 52%、実験 2（酸性）では 54%、実験 3（アルカリ性）では 64％であり、流入下水のｐH が異なることによる大きな違いは見られなかった (図-4)。また、エアレーション空気のアンモニア濃度は、0.11mg/m^{3}以下であり、排出フラックスは非常に小さく流入フラックスの 0.005%以下であった。

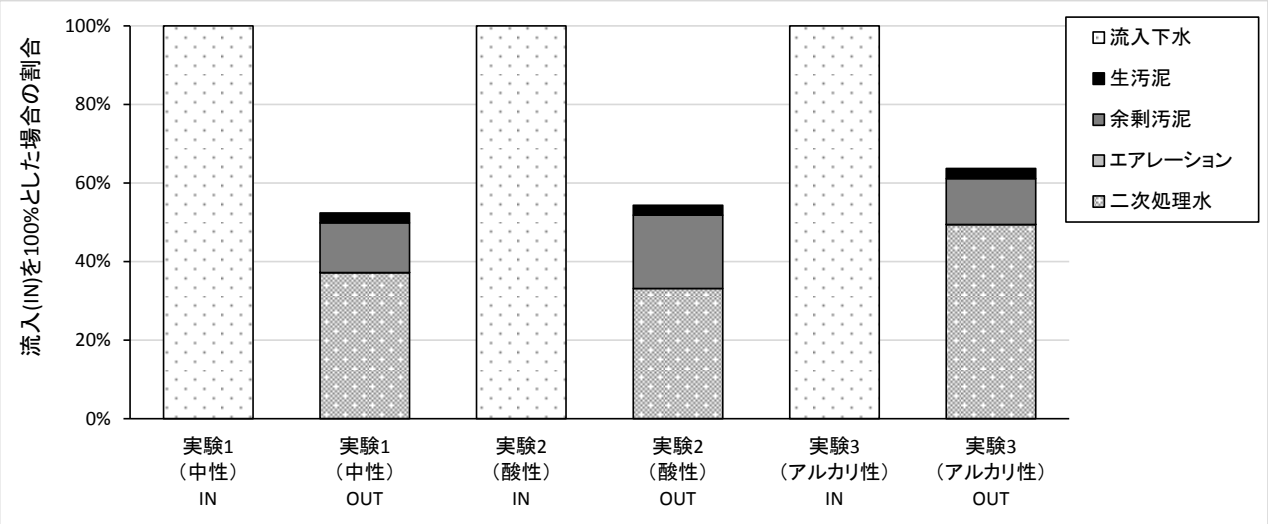


図-4　流入負荷量を 100%とした場合の各プロセスの負荷量割合

（2）生物応答を用いた排水試験に基づく下水処理水の生態影響に係る調査

① 活性汚泥処理プロセスにおける生物影響の変化の評価

本調査ではノニルフェノール（NP）及びアンモニアに着目し、これらの化学物質を含む流入下水及び活性汚泥処理実験装置で処理して得た二次処理水を対象に、藻類ムレミカヅキモを用いた藻類生長阻害試験を実施した。

NPに着目した試験では、流入下水よりも二次処理水の方が無影響となる試料割合が高くなったことから、下水処理によって生物影響の削減が確認できた（図-5）。毒性同定評価試験により、流入下水ではアンモニアのほかNPが原因と見られる無極性有機物による藻類生長阻害が確認されたものの、二次処理水では無極性有機物による生長阻害は発現しなかった。本調査で用いた流入下水、二次処理水でのNP濃度を比較すると二次処理水のほうが濃度が低いことが（1）①の調査で明らかになっていることから、本調査の二次処理水で無極性有機物による藻類生長阻害が見られなかったのは活性汚泥処理によるNPの除去に起因すると考えられた。この結果から活性汚泥処理によってNPによる藻類生長阻害を削減できることが分かった。

アンモニアに着目した藻類試験では、（1）②の調査で流入下水を酸性、アルカリ性に調整して活性汚泥処理をして得た二次処理水を用いて実施した。生物に有害性のある非イオンアンモニアは高pHの際に存在割合が大きくなることから、2016年3月1日及び3日に得た各二次処理水のpHをそれぞれ6.5および8.5（環境省が提案する生物応答試験における、排水pHの下限・上限値）に調整して藻類生長阻害試験を実施した。流入下水を酸性に調整して得た二次処理水では培養試験中に試験水の大幅なpH低下が確認され、pHの変動そのものによる藻類生長への悪影響が懸念されたことから、アンモニアによる生長阻害の影響が評価できなかった。一方、流入下水をアルカリ性に調整して得た二次処理水ではpH6.5よりもpH8.5の方が生長阻害効果が大きかったため（図-6）、高pH下では二次処理水中のアンモニアによる生長阻害効果が発現する可能性が示された。

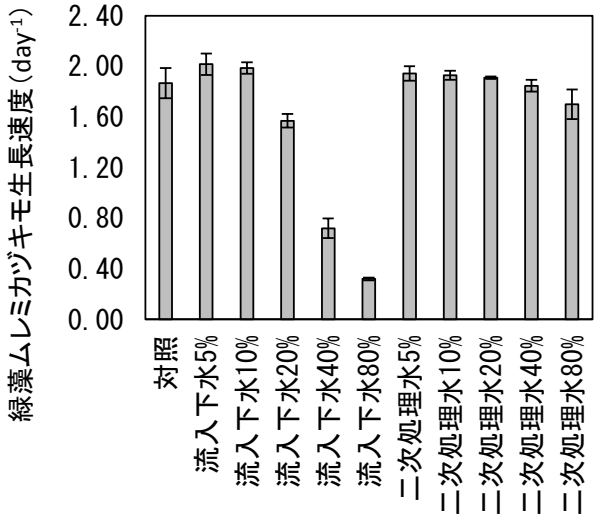


図-5　ノニルフェノールを含む流入下水、二次処理水に曝露した緑藻ムレミカヅキモの生長速度

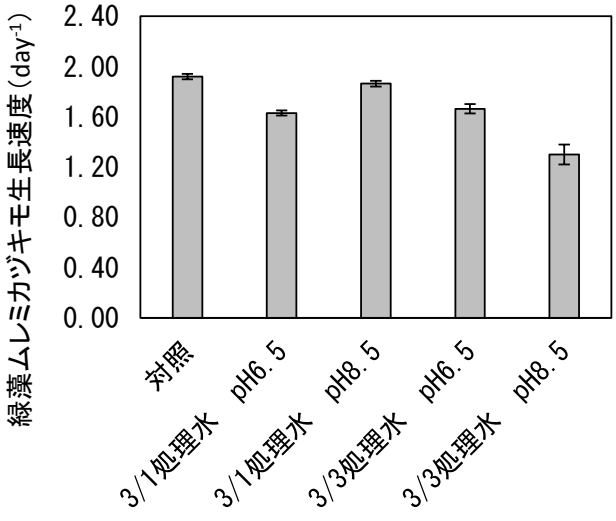


図-6　pH 調整した二次処理水に曝露した緑藻ムレミカヅキモの生長速度

② メダカ仔魚の遺伝子発現解析による下水処理水の安全性評価に関する調査

実験方法

下水処理水がメダカ孵化仔魚に及ぼす遺伝子レベルの影響と、下水処理過程での影響低減効果を明らかにするため、メダカ孵化仔魚の下水工程水への曝露実験と次世代シーケンサーによる仔魚の Whole body での網羅的遺伝子発現解析を行った。対照区は脱塩素水道水とし下水試料と同様に曝露実験を行った。図-7 に下水処理実験装置の概要を、表-1 にメダカ仔魚の曝露条件と遺伝子発現解析の方法を示す。

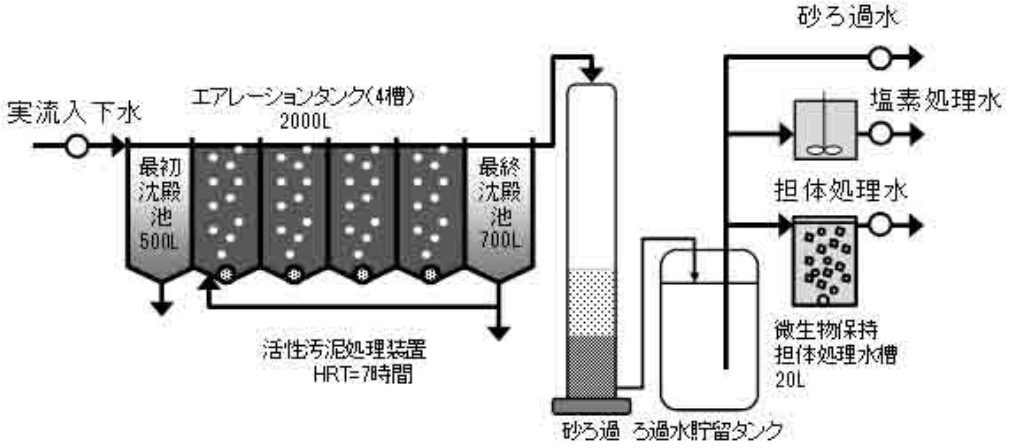


図-7　下水処理実験装置の概要（○：採水ポイント）

表-1　メダカの曝露条件と遺伝子発現解析の方法

供試魚	d-rR系ヒメダカ仔魚	試験水量	50mL
	（孵化後24時間以内）	水交換	なし
試験水	脱塩素水道水	水温・照明	水温24℃、明暗16h/8h
	流入下水	曝気	流入下水曝露区は微曝気
	砂ろ過水	RNA抽出	RNeasy Mini Kit
	塩素処理水	ライブラリ調製	Truseq LT Stranded mRNA Kit
	担体処理水	シーケンシング	Miseq, v3, 150cycle
			（1ラン2検体）
反復数	n=4（n=1の試験を4回実施）	検体数	5検体*4回 = 20
曝露時間	48h	試験開始日	2015年12月

実験結果

1）流入下水曝露区で対照区と比較して有意に発現量が上昇または低下した遺伝子（発現変動遺伝子）は 266 個（上昇：231、低下：35）であった（図-8）。砂ろ過水曝露区の発現変動遺伝子は 6 個であり、流入下水の遺伝子発現へ及ぼす影響は活性汚泥処理で大きく低減した。

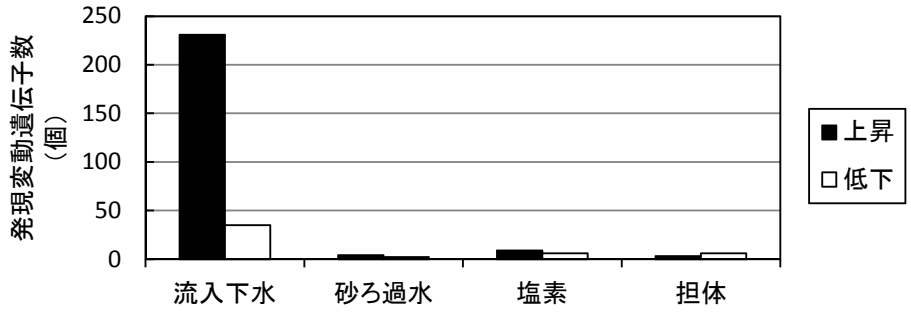


図-8　下水処理工程水の対照区に対する発現変動遺伝子数（有意水準：$p<0.05$）

2) 発現変動遺伝子の機能について統計解析を行った結果、流入下水曝露区で最も有意となった機能は、薬物への応答（response to drug）であった（図-9）。

3) 流入下水で有意となった機能のほとんどは、処理水では有意でなくなり、活性汚泥処理で生物影響が低減していた（図-9）。

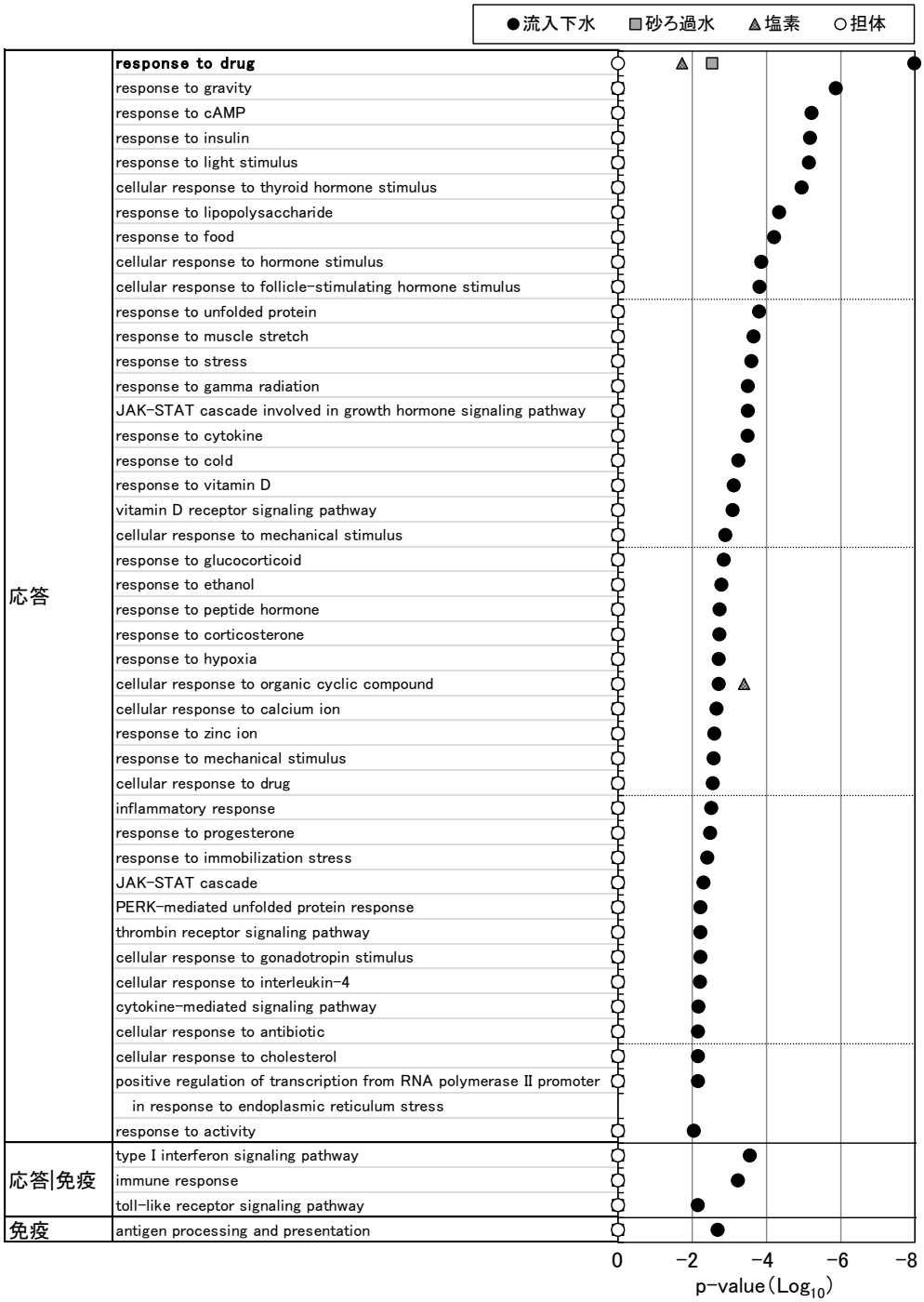


図-9　流入下水で有意となった機能のうち、応答または免疫に属する GO の一覧と、各曝露区の p 値

「なお、本調査研究は、国土交通省水管理・国土保全局からの受託業務費により実施されたものである。」

流域スケールで見た物質動態特性の把握に関する研究(2)

研究予算：運営交付金（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:岡本誠一郎、平山孝浩、北村友一、
對馬育夫

【要旨】
霞ヶ浦と印旛沼流域での流入河川の窒素、リン、微量金属濃度と土地利用の関係を検討するとともに、窒素・酸素安定同位体比により栄養塩類の流出機構を調査し、雨天時の窒素負荷源の寄与率を推定した。また、長期にわたる雨天時調査を継続し、栄養塩等の流出負荷量（L-Q 式）のデータを収集するとともに、市街地を中心に雨天時の平均流出濃度（EMC)の傾向について検討した。その結果、霞ヶ浦と印旛沼流域での栄養塩類と土地利用の関係の検討では、晴天時及び雨天時の溶存態・粒子態の金属の流出特性を把握した。窒素・酸素安定同位体比解析により栄養塩類の流出機構を調査し、高崎川（印旛沼流域）における雨天時の窒素負荷源の寄与率を推定した結果、高崎川上流部および市街地では、晴天時は畑地由来の窒素負荷が高く、降雨時は水田や森林由来の窒素負荷が増加すること等明らかにすることができた。雨天時の平均流出濃度（EMC)を用い、雨天時の市街地からの栄養塩の年間流出負荷量の推計手法を提案するとともに、晴天時/雨天時それぞれの栄養塩の流出負荷の寄与率を解明した。
キーワード：霞ヶ浦、印旛沼、栄養塩、雨天時調査、流出負荷量解析、安定同位体比

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、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。

本研究では、霞ヶ浦と印旛沼流域での流入河川の窒素、リン、微量金属濃度と土地利用の関係を検討するとともに、窒素・酸素安定同位体比により栄養塩類の流出機構を調査し、雨天時の窒素負荷源の寄与率を推定した。また、長期にわたる雨天時調査を継続し、栄養塩等の流出負荷量（L-Q 式）のデータを収集するとともに、市街地を中心に雨天時の平均流出濃度（EMC)の傾向について検討した。

2. 霞ヶ浦と印旛沼流域での河川水質と集水域の土地利用の関係

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。

さらに、畑の割合と豚飼育密度が高い印旛沼流入河川である高崎川を対象とし、より調査地点を増やし、晴天時と雨天時の栄養塩類の流出特性を詳細に調査した。また、畜産業が盛んである鬼怒川支流の山川で雨天時調査を行い、高崎川と比較した。

2.1 研究方法

2.1.1 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

2.1.1.1 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 219.9km^2、平均水深 4m の富栄養湖である。西浦（171.5 km^2）には 29 河川、北浦（36.2 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 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。

2.1.1.2 集水域の土地利用情報の整理

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[1]を利用した。人口と家畜頭数のデータは、「地図で見る統計」[2]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[3]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。

2.1.1.3 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_4-N、NO_3-N、NO_2-N、PO_4-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。

2.1.1.4 解析方法

データの解析はエクセル統計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[4]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。

2.1.2 印旛沼流域の土地利用と水質の関係

2.1.2.1 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^2、平均水深は1.7m、流域全体の面積は541.1km^{2}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。

2.1.2.2 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

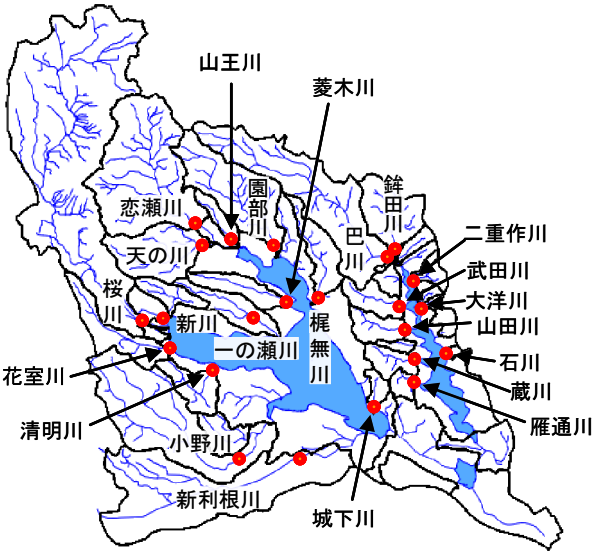


図-1　霞ヶ浦の集水域と研究対象河川および調査地点

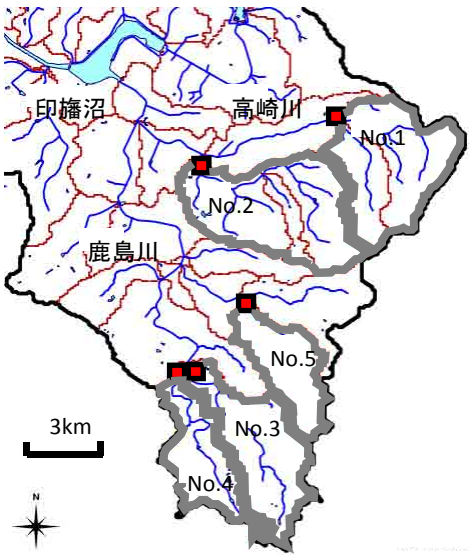


図-2　印旛沼の調査対象河川の集水域と調査地点

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 [5]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。

2.1.2.3 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_4-N、NO_3-N、NO_2-N、PO_4-P、Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}（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。

2.1.2.4 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 [6,7]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 [6,7]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 [6,7]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。

2.1.3 高崎川と山川の土地利用と水質の関係

2.1.3.1 調査河川と水質調査地点

印旛沼流入河川の鹿島川の支流である高崎川と、鬼怒川の支流である山川を対象に、集水域の土地利用情報を整理し、栄養塩類の負荷量調査を実施した。**図-3** は、高崎川と山川の集水域と採水調査地点である。集水域の面積は、高崎川で 79km^2、山川で 32km^2 である。高崎川の晴天時調査は、平成 25 年 1 月から 2 月にかけて 4 回実施した。本流の 7 地点（上流から下流に向かって A～G とする）と、3 つの支流（支流 c、d、f とする）それぞれの上流と下流の、計 13 地点で調査した。

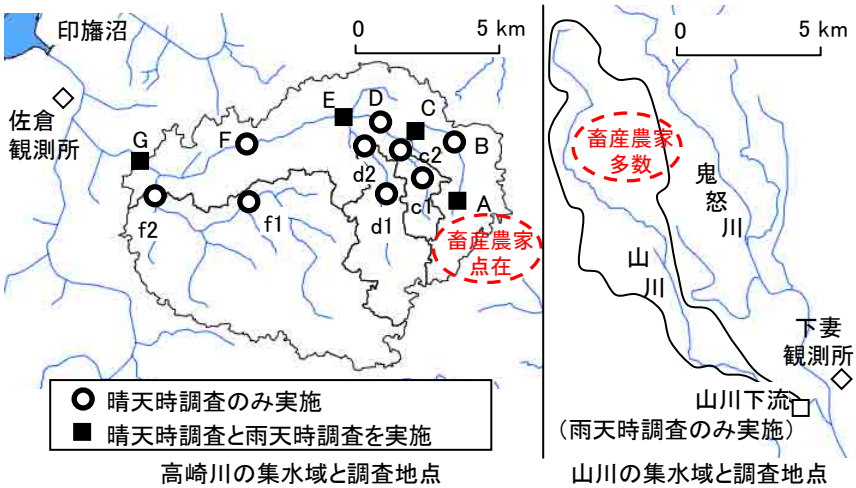
高崎川の雨天時調査は、平成 24 年 11 月 17 日に実施した。先行晴天日数は 4 日、累積降雨量は 38.5mm である。降雨開始前を含め数時間おきに 8 回、本流の A、C、E、G の 4 地点で流量観測と水質調査を行った。

山川の雨天時調査は、平成 24 年 11 月 6 日に実施した。先行晴天日数は 5 日、累積降雨量は 40mm である。下流側の 1 地点で数時間おきに流量観測と水質調査を 11 回行った。

2.1.3.2 土地利用情報の整理

各採水地点より上流の集水域の土地利用情報を、GIS（Geographic Information System）を用いて整理した。高崎川では、数値地図 50m メッシュ標高データ [8]から求めた各メッシュの流下方向に基づき集水域の範囲を決定した。土地利用のデータは国土数値情報 [1]を利用した。人口と家畜頭数のデータは、「地図で見る統計」[2]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。

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、その他の 5 種に区分して集水域ごとに集計し、土地利用割合を求めた。人口は、500m メッシュ人口データをもとに、



高崎川の集水域と調査地点　　山川の集水域と調査地点

図-3　調査河川の高崎川と山川の概形および調査地点

集水域ごとに集計して求めた。家畜頭数は、市町村別家畜頭数を対応する市町村の 500m メッシュに均等に配分し、全集水域で集計した。

山川では、集水域の範囲、土地利用割合、人口、家畜頭数のデータは、利根川流域別下水道整備総合計画に関する基本方針策定調査報告書[9]を用いた。

2.1.3.3 水質調査方法

晴天時､雨天時それぞれの調査では､現地で水温、pH、DO、EC を測定するとともに河川水を採水し、流量観測を行った。水質測定項目は SS、VSS、DOC（TOC-5000：島津製作所）、T-N、T-P および溶存態 N、P（TRAACS2000：BRAN+LUEBBE）、NO_3-N、NO_2-N、NH_4-N、PO_4-P、Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}（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、総濃度と溶存態の濃度を測定した。粒子態濃度は、総濃度から溶存態の濃度を差し引いて求めた。測定項目は Fe、Al、Zn、Cu、Mn、B、Ni、Co、Mo、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。

流量観測は、河川を横断方向に適宜分割して水深と流速を測定し、流量を河川断面積と流速の積として算出した。流速は電磁流速計を用い、6 割水深で測定した。高崎川の地点 G の雨天時調査では水深のみの測定であった。

2.1.3.4 雨天時調査のデータの解析方法

雨天時調査の結果を解析するにあたり、高崎川は佐倉観測所、山川は下妻観測所の 1 時間ごとの雨量データを使用した。各水質成分濃度、流量、集水域面積から比流量と比負荷量を求め、L-Q 式を導出した。また、流量と負荷量について、基底流出分と直接流出分を分離し、土地利用との関係を調べた。なお、高崎川の地点 G については雨天時の流量観測ができなかったため、流量は推定値を用いた。

2.2 結果と考察

2.2.1 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

2.2.1.1 各調査河川流域の特徴

図-4 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^2 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

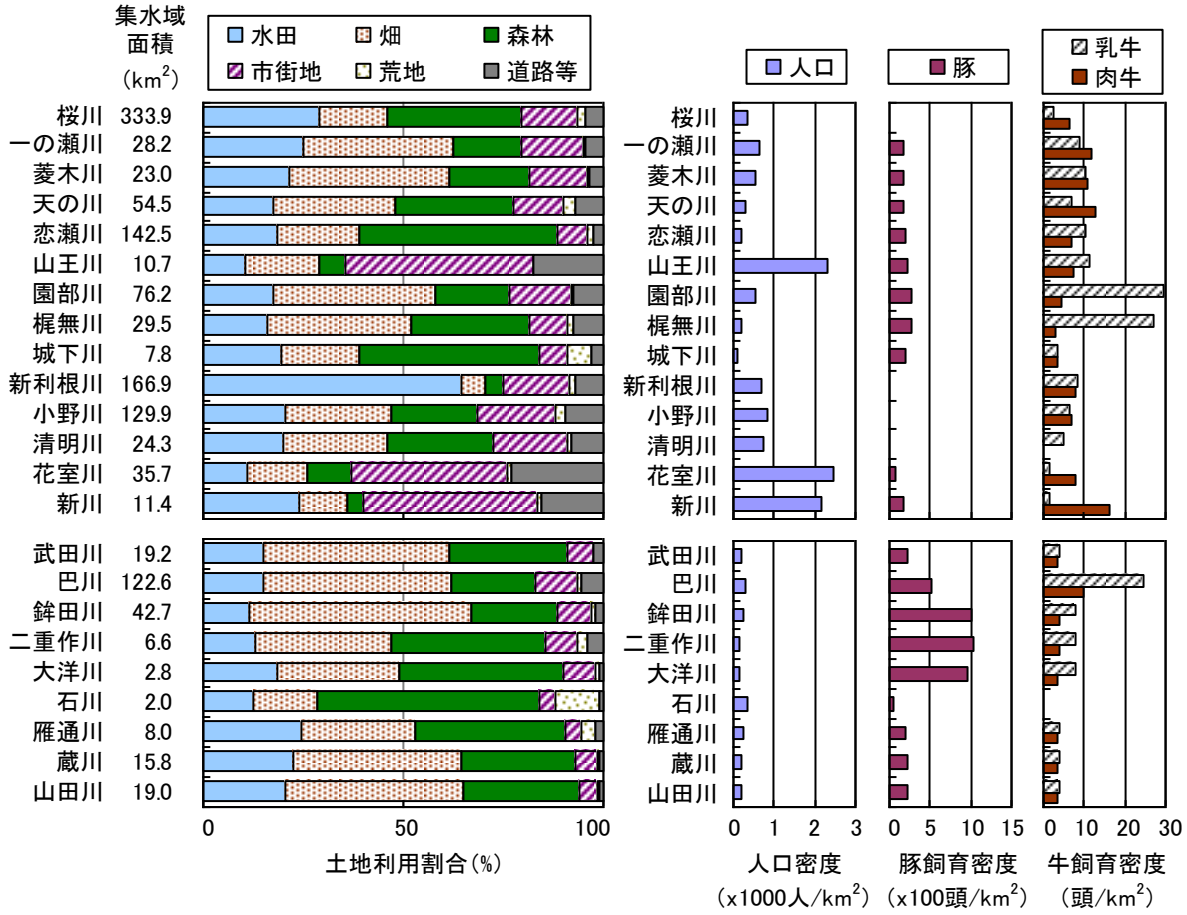


図-4　霞ヶ浦流域の各流入河川の集水域面積、土地利用割合、人口密度と家畜飼育密度

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%）、北浦流入河川では鉾田川（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、鉾田川、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。

2.2.1.2 水質調査結果

図-5に、主な河川のNO_3-N、PO_4-P、DOC濃度の変化を示す。NO_3-N濃度は9月以降に高くなる傾向が観られた。PO_4-P濃度の変化は河川によって異なったが、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。

2.2.1.3 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-6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

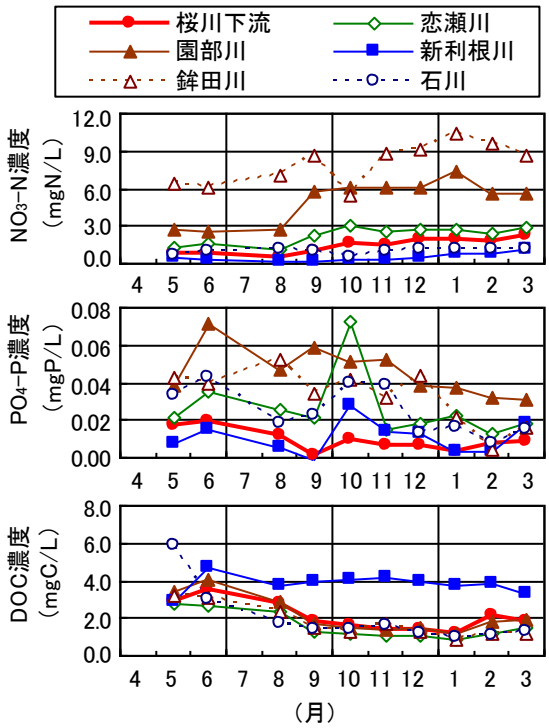


図-5　主な霞ヶ浦流入河川のNO_3-N、PO_4-P、DOC濃度の経月変化

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_3-N濃度と土地利用の関係についてみると、NO_3-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^2）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^2までは密度とともに増加する傾向であった。1000頭/km^2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。

NO_2-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_2-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_4-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_4-N濃度が高い河川があった。

PO_4-P濃度は、水田と負の相関を示した。山王川はPO_4-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$p \geqq 0.05$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、$p \geqq 0.05$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-7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_3-N濃度は、季節によら

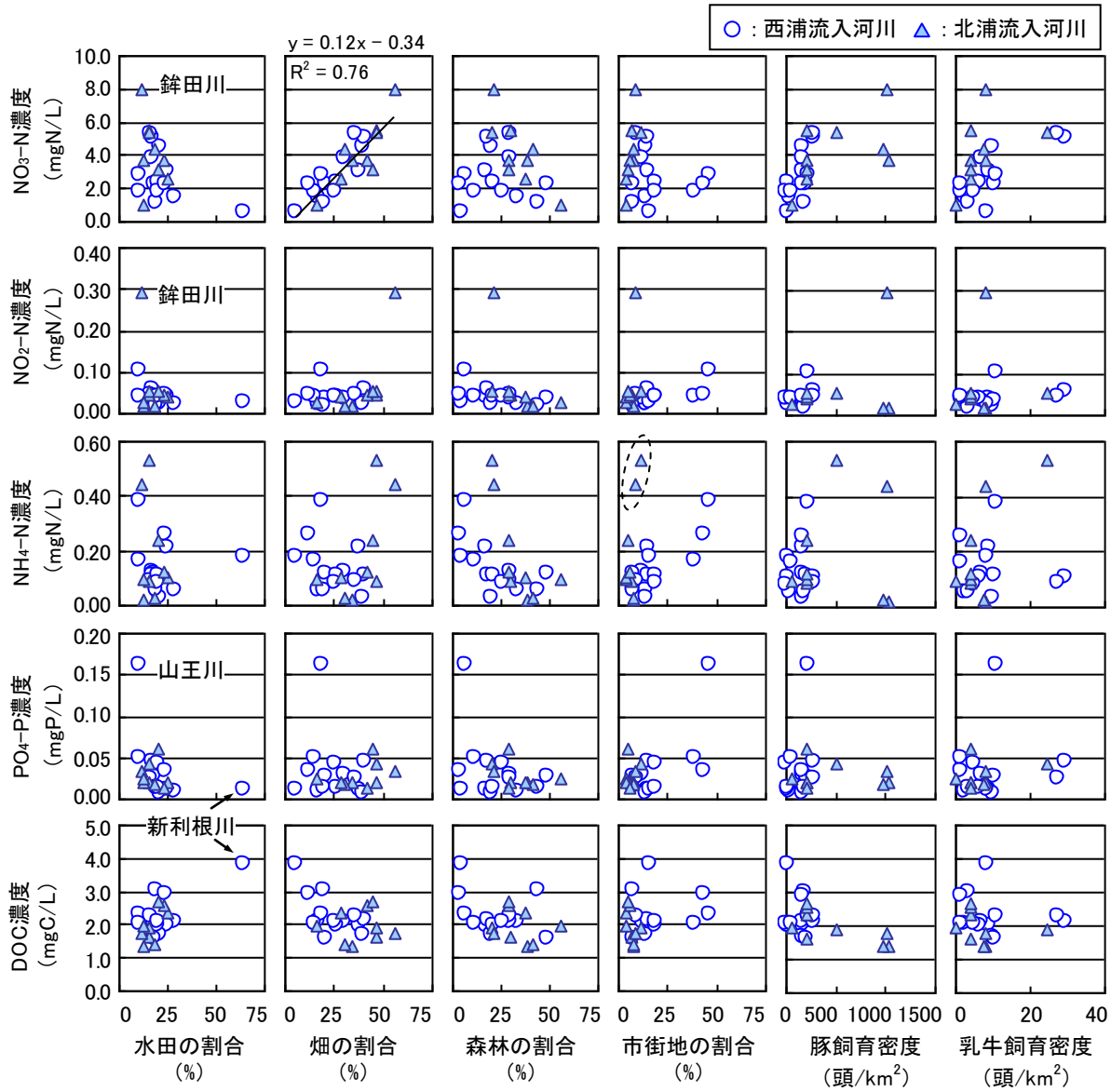


図-6　水田、畑、森林、市街地の割合および豚、乳牛の飼育密度と水質の年平均値の関係（霞ヶ浦）

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/km²)			人口密度
		水田	畑	森林	市街地	荒地	道路等	豚	肉牛	乳牛	(人/km²)
NO_3-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_2-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_4-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_4-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 (**)<0.01

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_2-N 濃度と NH_4-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_4-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

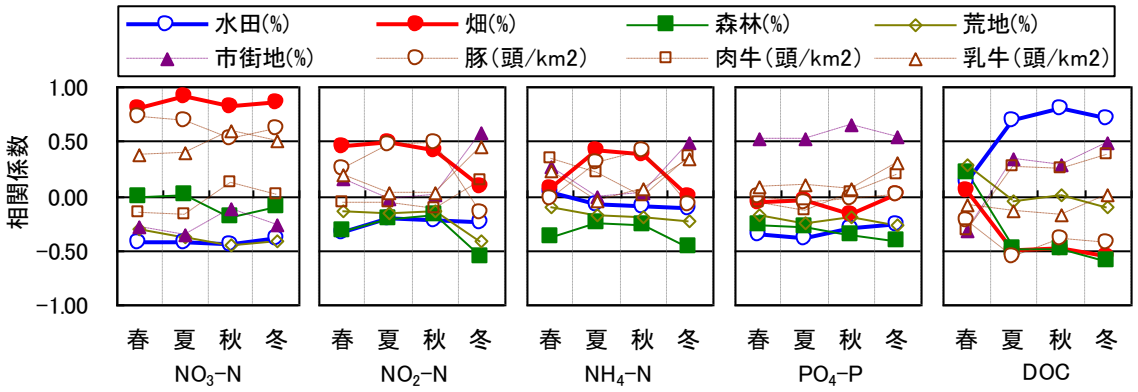


図-7　土地利用と水質の季節平均値の相関係数の比較（霞ヶ浦）

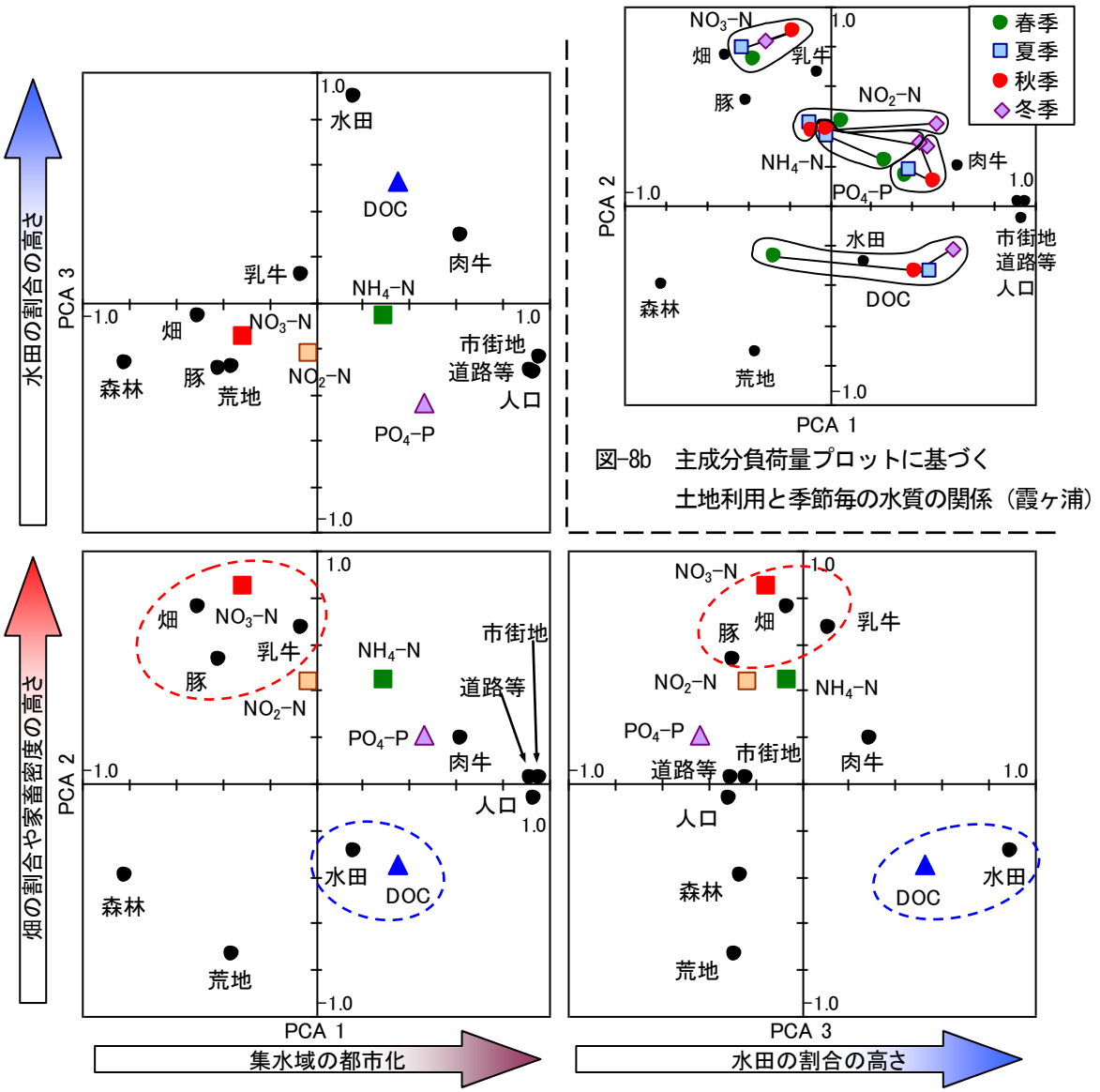


図-8b　主成分負荷量プロットに基づく
土地利用と季節毎の水質の関係（霞ヶ浦）

図-8a　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）

田の割合と正の、畑や森林の割合と負の相関を示した。

2.2.1.4 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-8a**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-8a** 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_3-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[10]、畑の割合とNO_3-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[11]と考えられる。NO_2-N濃度は、第2主成分が正であったが、NO_3-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_4-N濃度とPO_4-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-8b** に、第1、第2主成分と季節毎の水質の関係を示す。NO_3-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_3-N濃度に影響を及ぼしていると考えられる。NO_2-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_4-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_4-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種である主成分回帰分析を行った。その結果、NO_3-N濃度に関して、自由度修正済決定係数(R^2) = 0.816 で次の回帰式が得られた。

$$NO_3\text{-N濃度（mgN/L）} = \begin{pmatrix} -0.0375x田（\%） \\ +0.0479x畑（\%） \\ -0.0091x森林（\%） \\ -0.1797x荒地（\%） \\ -0.0052x市街地（\%） \\ -0.0085x道路等（\%） \\ +0.0016x豚（頭/km^2） \\ +0.0003x肉牛（頭/km^2） \\ +0.0582x乳牛（頭/km^2） \\ -0.0002x人口（人/km^2） \end{pmatrix} +2.47$$

畑の割合1%あたりのNO_3-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^2あたり+0.0016mgN/L、乳牛は1頭/km^2あたり+0.058mgN/L となった。

2.2.2 印旛沼流入河川の水質と集水域の土地利用の関係

2.2.2.1 各調査地点の水質と集水域の土地利用の関係

図-9 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、No3 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-10 に各調査地点の主要な水質項目（T-N、NO_3-N NO_2-N、NH_4-N、T-P、PO_4-P、Na^+、K^+、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_3-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_2-N濃度は､No.1､No.2､No.5 で高かった。NH_4-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_4-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^+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

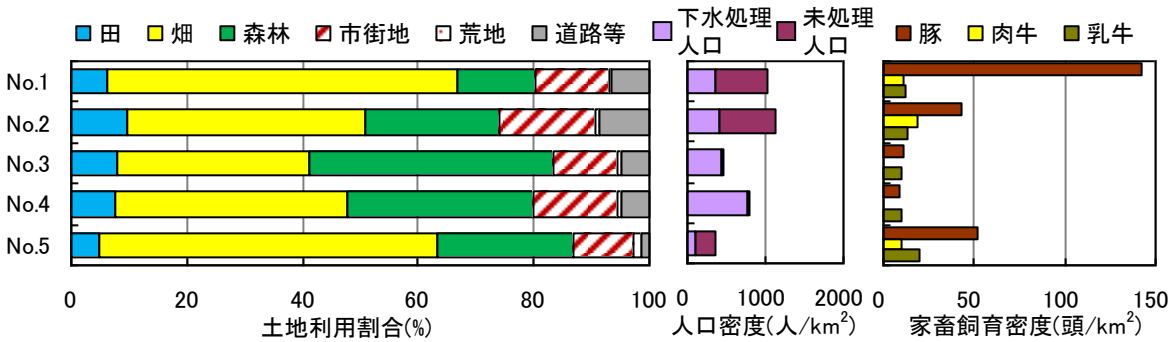


図-9　印旛沼小流域における、各調査河川集水域の土地利用割合、人口密度、家畜飼育密度

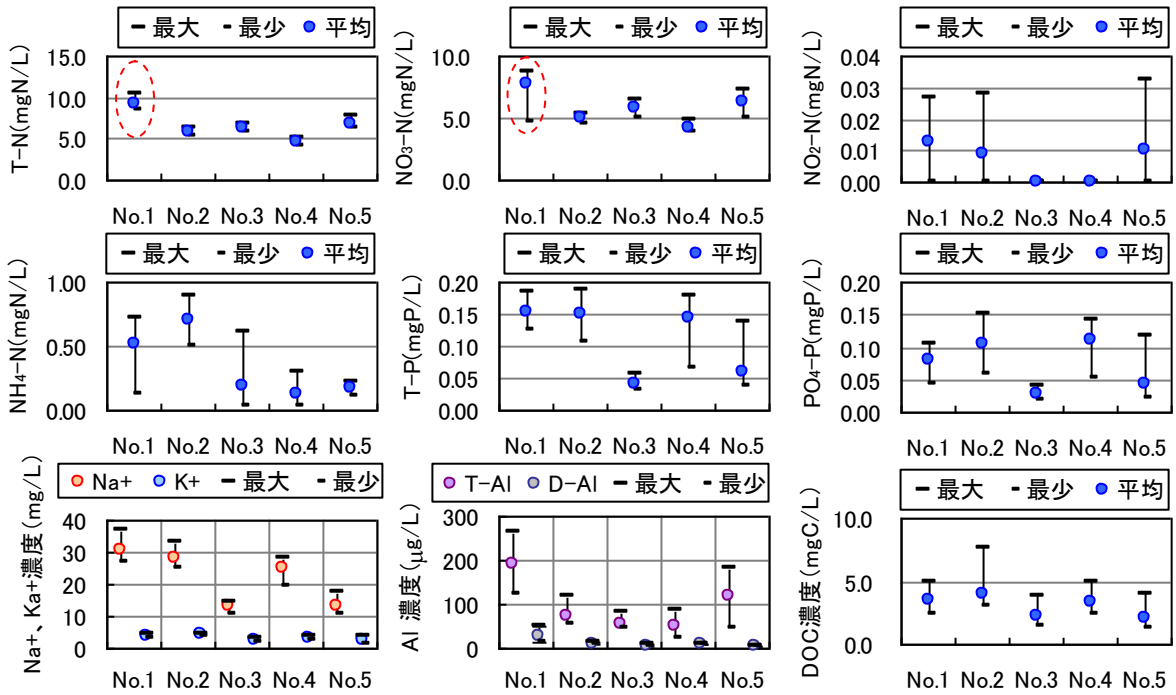


図-10　各調査地点の主要な水質項目の平均値（印旛沼）

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^2)			人口密度(人/km^2)	
	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_4-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_2-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_3-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_4-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^+(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^+(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^{2+}(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^{2+}(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^-(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_4^{2-}(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/km²)			人口密度(人/km²)	
	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

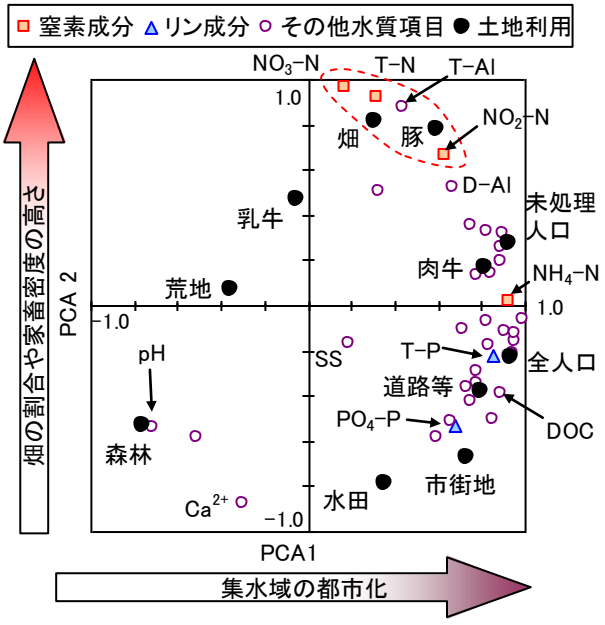
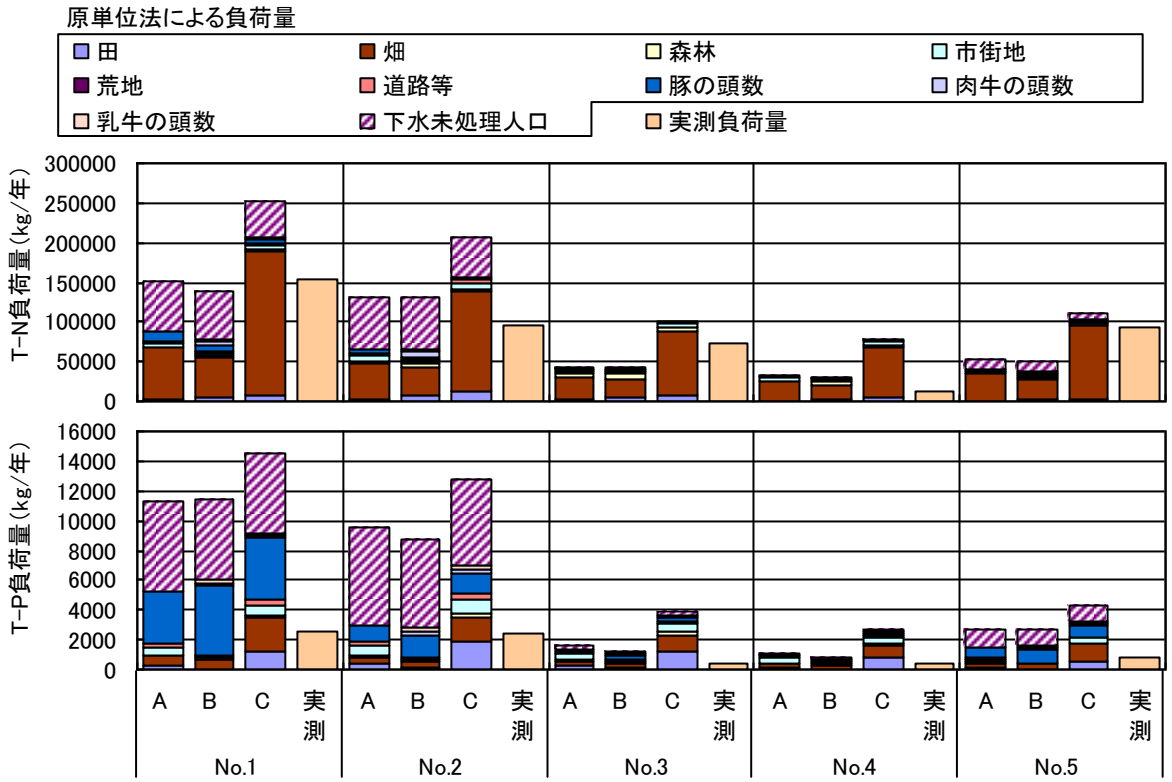


図-11　主成分負荷量プロットに基づく
土地利用と各水質項目の関係（印旛沼）

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-11** 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_3-N 濃度、NO_2-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_4-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_4-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。

2.2.2.2 集水域の土地利用と栄養塩の流出負荷量の関係

図-12 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、年間を通した、また雨天時を含めた調査を行



A ： 利根川流域別下水道整備総合計画[6]の原単位に基づく負荷量
B ： 第6次総量削減計画[7]の原単位に基づく負荷量
C ： 原単位の各地の調査事例の平均値[7]を用いて算出した負荷量
実測 ： 流量と濃度から求めた負荷量

図-12　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）

う必要がある。

2.2.3 高崎川と山川の土地利用と水質の関係

2.2.3.1 集水域の土地利用特性

図-13a は高崎川本流の地点 A～G の集水域面積と土地利用割合、人口密度である。比較のため山川のデータを合わせて示した。高崎川では、最上流の地点 A の畑の割合は 86%であり、地点 G（高崎川全体）の畑の割合は 44%である。本流では下流の調査地点ほど畑の割合が低く、水田、森林、市街地、その他の割合が高い。山川では畑と水田の割合はいずれも 40%で、森林の割合は 3%と低い。高崎川の人口密度は山川と比較して高く、地点別でみると下流側の地点 E、F、G で高い。

図-13b は、3 つの支流 c、d、f の集水域面積と土地利用割合である。支流 c は他の支流と比較すると、畑の割合と森林の割合が高い。支流 f は集水域面積が最も大きい支流であり、市街地の割合が高い。各支流の上流のみで比較した場合も同様の傾向である。人口密度は支流 d と f で高い。

図-13c は、採水区間ごとの小流域 A～G の面積と土地利用割合である。小流域の面積は、D が最小、G が最大である。畑の割合は小流域 A、B で高く、森林の割合は小流域 F、G で高い。市街地の割合は他の小流域と比較すると C、G で高い。人口密度は小流域 C、E、G で高い。

家畜頭数は、市町村別データの特性上、小流域ごとには算出できなかったが、全集水域でみると、高崎川では乳牛、肉牛、豚がそれぞれ 800、1,170、6,250 頭であった。山川ではそれぞれ 119、864、17,005 頭であった。全集水域の豚の密度は高崎川で 80 頭/km^2、山川で 530 頭/km^2 となった。なお、高崎川の現地調査から、上流の地点 A 付近に畜産農家が点在していることを確認した。

2.2.3.2 晴天時調査

2.2.3.2.1 晴天時調査の結果

図-14 は、各調査地点の SS 濃度、溶存態窒素、粒子態窒素、NO_3-N、NO_2-N、NH_4-N、溶存態リン、粒子態リン濃度の 4 回の平均値である。SS 濃度は、本流の地点 E と支流の地点 d1 で高かった。

全窒素濃度（溶存態＋粒子態）は 6.0～15.5mgN/L

の範囲であり、本流の地点 A～G では上流ほど高い値を示し、支流の地点 c1、c2 でも高かった。いずれの地点でも粒子態窒素濃度は 0.6mgN/L 以下であり、全窒素濃度の大部分は溶存態であった。

NO_3-N 濃度は、概ね全窒素濃度と同様の傾向を示し、地点 A、B、C、c1、c2 で高かった。溶存態窒素濃度に占める NO_3-N 濃度の割合は、いずれの地点でも 70%以上となった。全窒素濃度と NO_3-N 濃度は、畑の割合と正の相関があることがわかる。

NO_2-N 濃度は本流の地点 A、B、C と支流の地点 d1、d2、f1 で高かった。

NH_4-N 濃度は、最上流の地点 A で最も高い値を示した。支流では地点 d1、f1 で高かった。

全リン濃度は、0.03～0.57mgP/L の範囲であり、最上流の地点 A は地点 B～G と比較して高い値を示した。支流では地点 d1 で高かった。リンの存在形態をみると、地点 A では大部分が溶存態リンであったが、地点 d1 では粒子態リンの割合が高かった。地点 G では、全リンに対する粒子態リンの割合は約 40%であった。

図-15 は、Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}濃度の、各調査地点の平均値である。Na^+濃度は、地点

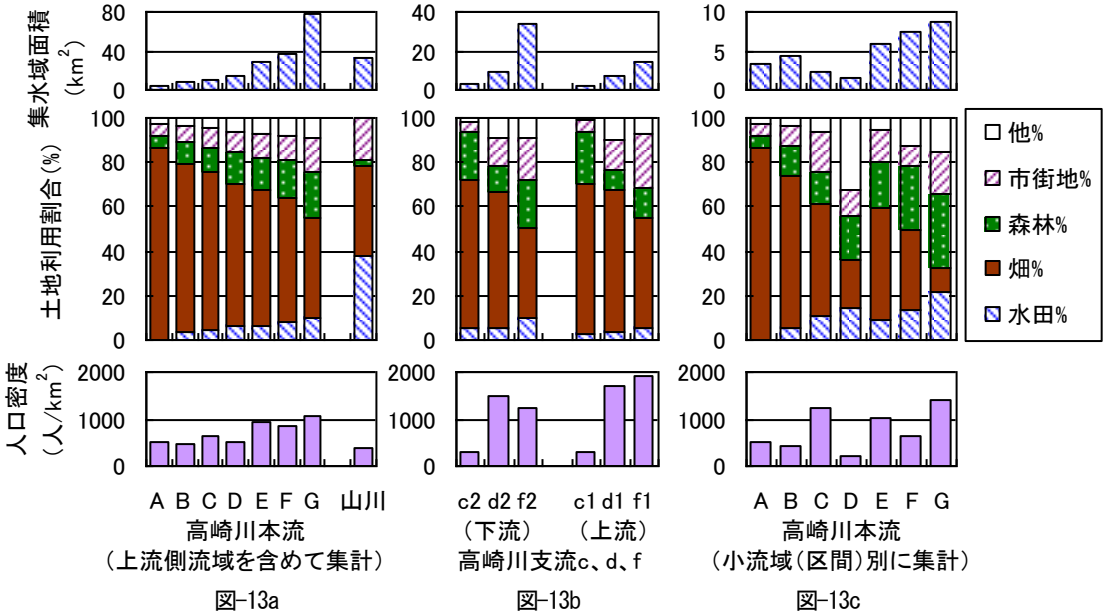


図-13a　図-13b　図-13c

図-13　高崎川 13 調査地点の集水域と、山川の集水域の面積、土地利用割合、人口密度

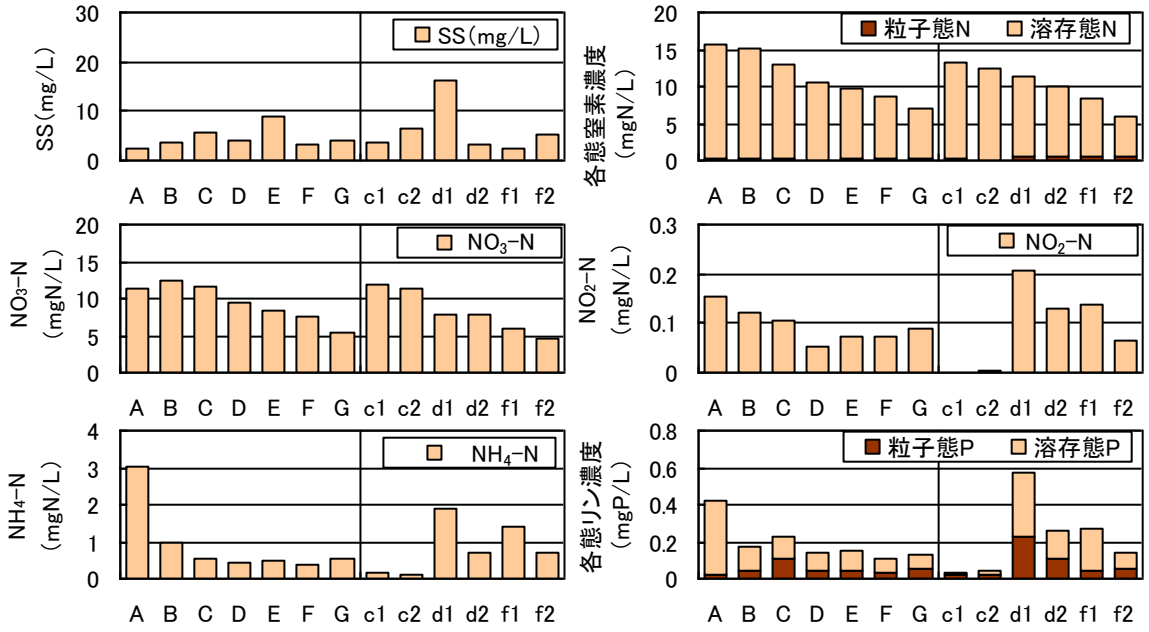


図-14　高崎川晴天時調査の SS、各態窒素、NO_3-N、NO_2-N、NH_4-N、各態リン濃度の平均値

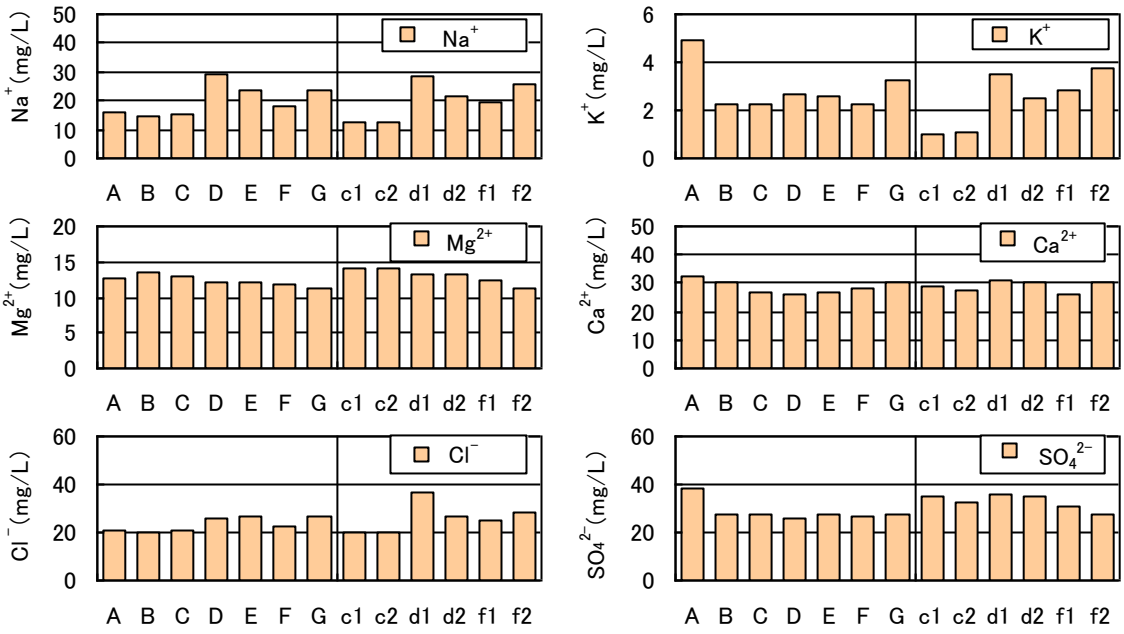


図-15　高崎川晴天時調査の Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}濃度の平均値

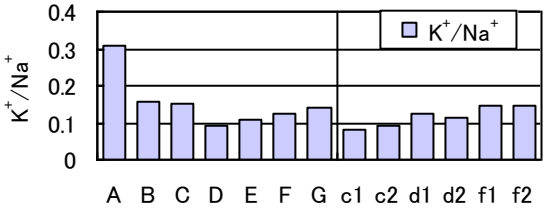


図-16　高崎川晴天時調査の K^+/Na^+

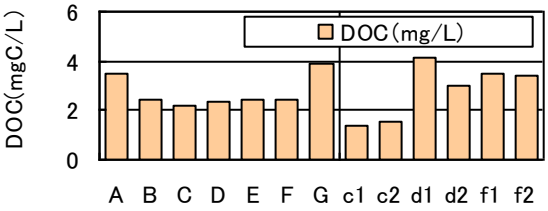


図-17　高崎川晴天時調査の DOC 濃度の平均値

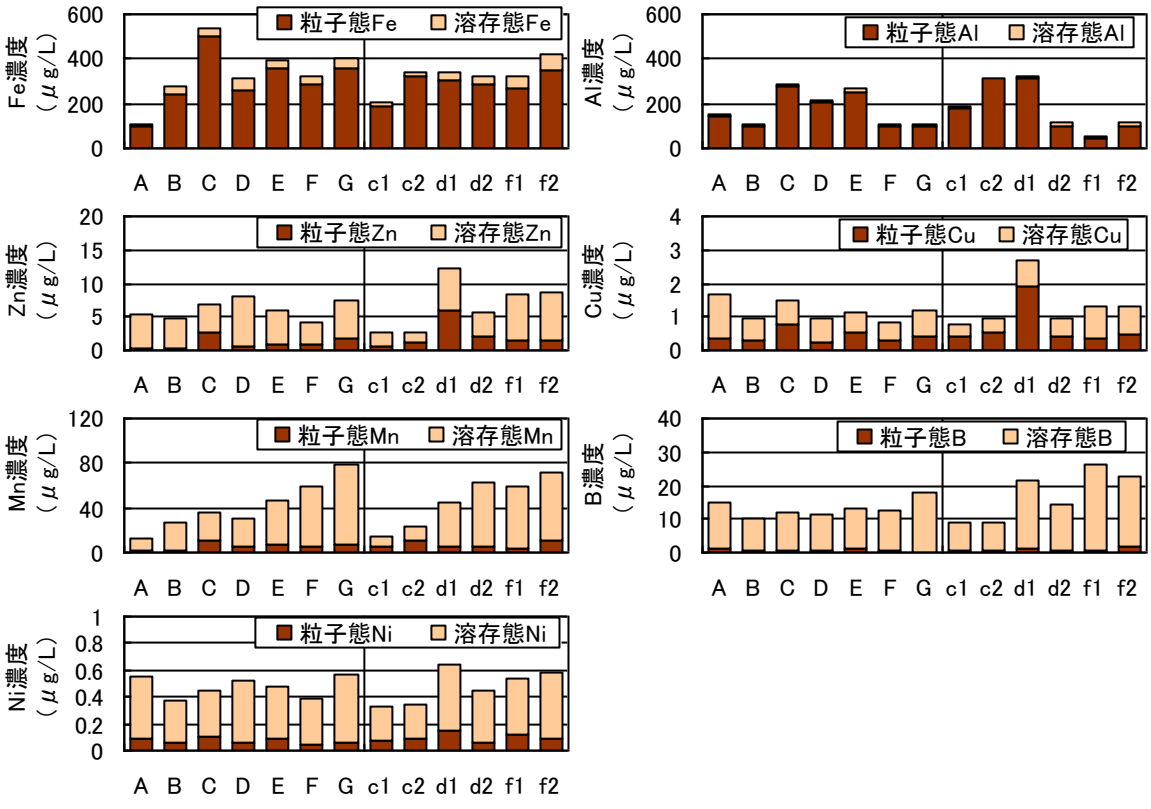


図-18　高崎川晴天時調査の粒子態と溶存態の Fe、Al、Zn、Cu、Mn、B、Ni 濃度の平均値

A～C で低く、地点 D～G で高かった。支流では地点 c1、c2 で低く、地点 d1、d2、f1、f2 で高かった。Na^+濃度と集水域の人口密度は、地点 D を除くと概ね正の相関を示した。

K^+濃度は、集水域に畜産農家の点在する地点 A で最大となった。地点 B～F では濃度の違いは小さかった。地点 c1、c2 では他の地点と比較して低かった。

Mg^{2+}濃度は、本流の上流で高くなる傾向がみられた。3 つの支流を比較すると、支流 c で高かった。

Ca^{2+}濃度は、本流では地点 A と G で高かった。支流では地点による違いは小さかった。

Cl^-濃度は、本流では、地点 D、E、G で高かった。支流では地点 d1 で高い値を示した。

SO_4^{2-}濃度は、地点 A で高かった。地点 B～G の値は概ね等しかった。支流 c と支流 d は、支流 f と比較して高い値であった。

図-16 は、各調査地点の K^+/Na^+である。K^+/Na^+は、畜産排水の流入する河川で高くなることが知られている[12]。地点 A では約 0.3、他の地点はいずれも 0.2 以下であった。地点 A の高い NH_4-N 濃度と K^+/Na^+は、この集水域内の豚飼育密度が高いと推察されることから、畜産に由来するものと考えられる。

図-17 は、各調査地点の DOC 濃度の平均値である。DOC 濃度は、本流では地点 A、G で、支流では d1 で高い値を示した。

図-18 は、各地点の溶存態と粒子態の金属（Fe、Al、Zn、Cu、Mn、B、Ni）濃度の平均値である。河川水中の金属を粒子態と溶存態で区分すると、Fe、Al は主に粒子態、B は主に溶存態で存在していた。Mn、Zn、Cu、Ni は粒子態と溶存態の両方が含まれており、地点によって割合が異なった。地点別では、Mn は下流の地点ほど高くなる傾向がみられた。Fe は他の地点と比較して地点 A で低かった。Zn と Cu は、地点 d1 で高かった。Al は地点 C、c2、d1 で、B は d1、f1、f2 で高かった。Ni は、地点間で大きな違いはみられなかった。溶存態 Mn は、畑の割合と負の相関を示したものの、金属濃度と土地利用との明確な関係は見出せなかった。

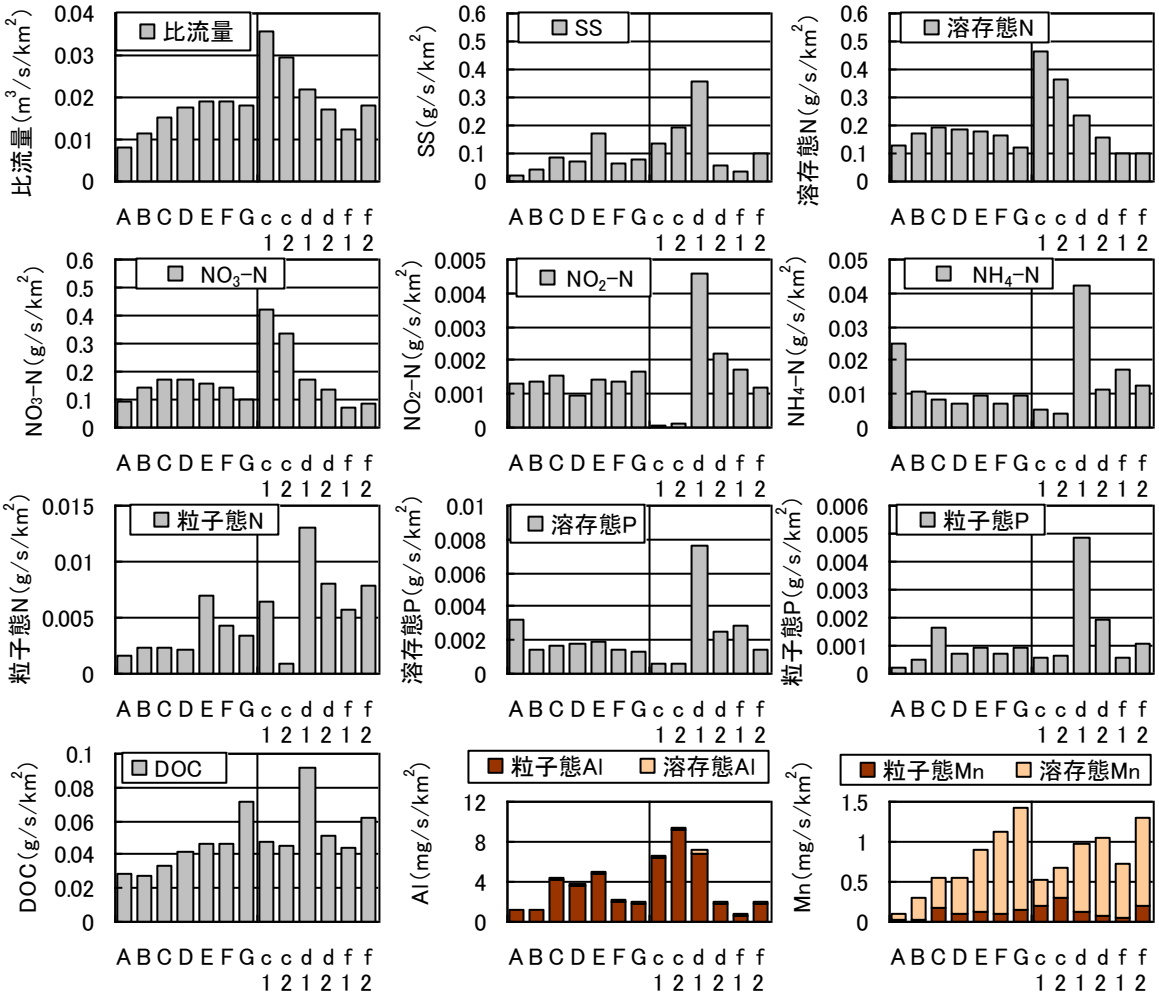


図-19　各地点の比流量と、SS、各態窒素、各態リン、DOC、Al、Mn の比負荷量

2.2.3.2.2 晴天時の流出負荷量の解析

栄養塩類の流出についてより詳細に解析するため、負荷量と比負荷量を算出した。すなわち各水質成分の濃度について、4 回の調査の平均値を求め、平均流量を掛けて地点別の負荷量を算出し、上流側流域を含めた集水域の面積で割って比負荷量を求めた。**図-19** は、各地点の比流量と、SS、各態窒素、各態リン、DOC、Al、Mn の比負荷量である。

比流量は、地点 A で低く、地点 c1、c2 で高かった。

SS の比負荷量は、本流では地点 E で、支流では地点 d1 で高かった。

溶存態窒素と NO_3-N の比負荷量は、比流量と同様の傾向を示し、支流 c の比負荷量が高いことがわかる。NO_2-N は、地点 d1 で、NH_4-N は地点 A と d1 で比負荷量が高かった。粒子態窒素の比負荷量は、本流では地点 E で、支流では c2 を除いた 5 地点で高かった。

溶存態リンの比負荷量は、NH_4-N と同様の傾向を示した。粒子態リンの比負荷量は、溶存態リンと異なり、地点 A で低かった。

DOC の比負荷量は、下流ほど高くなっていた。また、地点 d1 で高かった。

Al の比負荷量は、本流では地点 C、D、E で、支流では地点 c1、c2、f1 で高かった。Mn の比負荷量は、本流では下流側ほど高く、支流では d1、d2、f2 で高かった。

図-20 は、高崎川の各調査地点の位置関係と、地点ごとの溶存態窒素の負荷量である。下流の地点ほど溶存態窒素の負荷量が増大していることがわかる。下流の負荷量と、上流の負荷量の差は、その区間の小流域からの流入負荷量を表すと考えられる。そこで、地点 A～G と支流 c、d、f について各水質成分の負荷量の差分を算出し、対応する区間の小流域の面積で割って、それぞれの小流域の比負荷量を求めた。**図-21** は、各小流域別の、比流量と各水質成分の比負荷量である。

比流量は地点 C、E、支流 c で高かった。

SS の比負荷量は、地点 E で高かった。地点 D、F では差分が負の値になっており、粒子の沈降による負荷量の減少が考えられる。

溶存態窒素の比負荷量は、地点 D では負の値、他の地点では正の値となり、地点 C と支流 c で高かった。NO_3-N の比負荷量は、溶存態窒素と同様であった。NO_2-N は、地点 D では負の値、他の地点では正の値となり、地点 G で高かった。NH_4-N の比負荷量は、地点 A で最大となった。地点 B、C、F では 0 に近い値であった。粒子態窒素の比負荷量は、地点 E で高かった。

溶存態リンの比負荷量は、地点 A、B、D で高かった。粒子態リンの比負荷量は、地点 C で高かった。

Na^+と K^+は、地点 D で高かった。Mg^{2+}は、溶存態窒素と同様の傾向を示し、地点 C と支流 c で高かった。Ca^{2+}は、地点 A、B、D では他の地点より低い値であった。Cl^-は、Na^+と同様の傾向を示し、地点 D で高く、地点 A、F で低かった。SO_4^{2-}は Mg^{2+}と同様の傾向を示した。DOC の比負荷量は、すべての地点で正の値となり、地点 G で高かった。

溶存態の金属では、Fe、Al、Zn が地点 D で高かった。Cu は地点 C、D、F で高かった。Mg は下流の地点ほど高くなっていた。B は地点 C、E、G、支流 f で高く、地点 A、B で低かった。Ni は地点 D、G で高かった。

粒子態の金属では、差分が負の値になる地点が多く、粒子の沈降によって負荷量が減少したものと考えられる。Fe は地点 C、E で高く、Al は地点 C、E と支流 c で高かった。Zn は地点 C、G で高く、Cu は地点 C、E で高かった。Mn は地点 C で、B は地点 E で、Ni は地点 C、E で高かった。地点 C、E では、調査回数 4 回のうち 1 回で粒子態金属濃度が高くなったため、上記の結果となった。晴天時でも金属類の流出特性は変動することが明らかになったことから、より精度の高い金属類の流出特性解析のためには、調査回数や採水ポイントを増やす必要がある。

単位面積あたりの各負荷量と土地利用の関係は明確ではなかった。これは、小流域によって比流量が異なることなどが原因と考えられる。

以上、晴天時調査から、家畜密度の高い集水域で

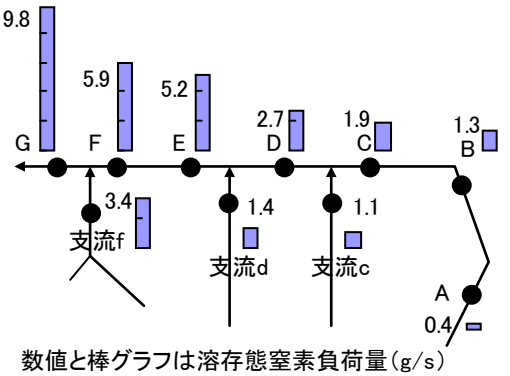


図-20　地点間の位置関係と、溶存態窒素負荷量

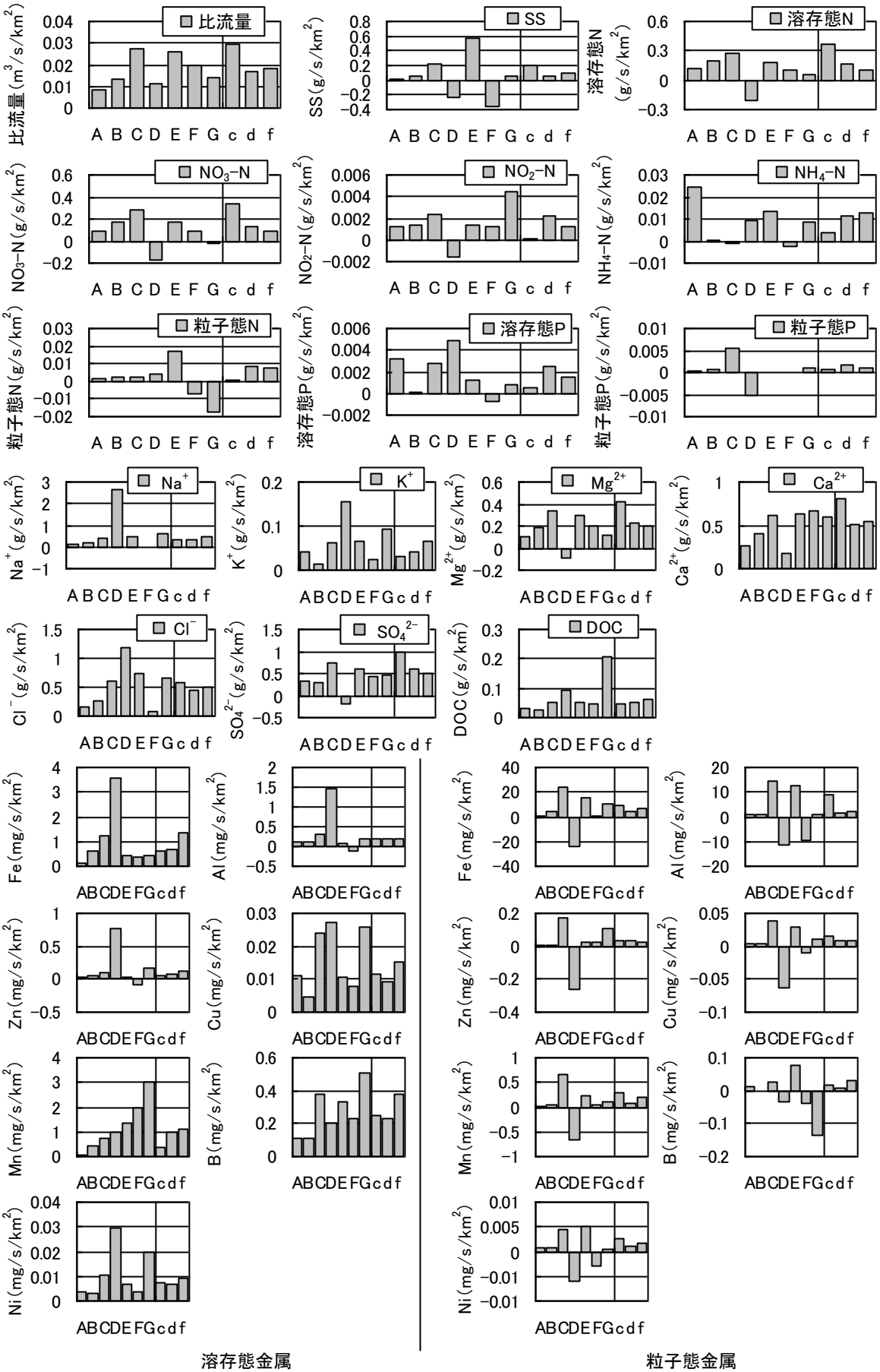


図-21　小流域（区間）別に求めた、比流量と、各水質成分の比負荷量

NH_4-N、溶存態リン、K^+濃度が高く、Na^+濃度が低下する傾向がみられた。必ずしも河川水質を土地利用などで説明できなかったが、より精緻な土地利用、地質、畜産、人口、下水道普及率などの集水域情報および水文情報を重ね合わせることにより栄養塩類の流出機構の解明に近づけると考えられる。

2.2.3.3 雨天時調査

2.2.3.3.1 雨天時調査の結果

図-22 は各時間の雨量と、高崎川の各調査地点における水深、SS 濃度、各態窒素濃度、各態リン濃度、各態窒素比負荷量、各態リン比負荷量、K^+/Na^+の変化である。高崎川の雨天時調査では、雨量のピークは 21 時ごろであった。地点 A、C、E では水深のピークは雨量のピークの直後となったが、地点 G では水深のピークは雨量のピークに対して約 4 時間遅れていた。SS 濃度はいずれの地点でも上昇し、ピークの時間は水深のピークと一致していた。

溶存態窒素濃度は、いずれの地点でも増水時に低下し、水深が下がるとともに上昇した。今回調査の時間内では、開始時と同じ濃度には戻らなかった。

粒子態窒素濃度は、SS 濃度と連動し、いずれの地点でも増水時に上昇したが、水深のピークが過ぎるともとの濃度に戻った。

NO_3-N 濃度は、溶存態窒素濃度と同様の変化を示した。溶存態窒素濃度に占める NO_3-N の割合は、地点 A では降雨前は 95%であったが、高水深時には、54%まで低下した。

NH_4-N 濃度は、地点 A では、原因は明らかでないが一旦上昇した後、溶存態窒素濃度が最低となった 21 時頃に一度低下し、再び高くなる変化を示した。地点間で比較すると、濃度の上昇は上流側ほど大きかった。

NO_2-N 濃度は、地点 A では降雨前に高かったが、降雨後に低下した。地点 C、E、G でも濃度の低下がみられた。

溶存態リン濃度はいずれの地点でも低いまま推移した。地点 A では増水時に低下する傾向がみられた。

粒子態リン濃度は、SS 濃度や粒子態窒素濃度と同様、増水時に上昇した。ピーク時の濃度を地点間で比較すると、上流側ほど高くなっていた。

比負荷量でみると、溶存態窒素は、地点 A では小さいピークを示し、C では概ね横ばい、地点 E、G では増水時に上昇した。

粒子態窒素はいずれの地点でも増水時に上昇した。比負荷量が最大となった時間に着目すると、地点 G の溶存態窒素のピークは粒子態窒素のピークよりも先行していた。

NO_3-N の比負荷量は、溶存態窒素と同様の変化を示した。地点 G では、他の地点と比較してピーク時の上昇が大きかった。

NH_4-N と NO_2-N の比負荷量は、いずれの地点でも増水時に上昇した。地点 A では、他の地点と比較してピーク時の NH_4-N の上昇が大きかった。

粒子態リンの比負荷量は、粒子態窒素と同様の変化を示し、いずれの地点でも増水時に上昇した。溶存態リンの比負荷量は、粒子態リンと比較すると小さかった。

K^+/Na^+は、いずれの地点でも増水時に上昇し、ピークの時間は水深のピークとほぼ一致していた。地点間で比較すると、ピーク時の K^+/Na^+は、降雨前と同様地点 A で最大となっていた。雨天時においても、家畜密度が高いと推察される地点 A で、NH_4-N 比負荷量と K^+/Na^+が高くなる傾向がみられた。

図-23 は各時間の雨量と、山川における水深、SS 濃度、各態窒素濃度、各態リン濃度、各態窒素比負荷量、各態リン比負荷量、K^+/Na^+の変化である。山川の雨天時調査では、雨量は 6 時頃と 12 時頃に大きかった。調査開始時刻は 8 時で、降雨の最中であった。水深は、19 時半まで上昇が続いた。翌 7～10 時には低下したが、調査開始時と比較すると高かった。SS 濃度は、16 時半に最大となり、翌日までには低下した。

溶存態窒素濃度は、18 時までに低下し、翌日まで横ばいであった。粒子態窒素濃度は増水時でも小さく、顕著な上昇はみられなかった。

NO_3-N 濃度は溶存態窒素と同様の変化を示した。NH_4-N 濃度は 8 時の時点では高かったが、10 時以降は低下した。NO_2-N 濃度は増水時に低下した。

溶存態リン濃度はあまり変化がみられなかった。粒子態リン濃度は増水時に上昇したが、翌日までには概ね初期の濃度まで低下した。

溶存態窒素、NO_3-N、NH_4-N、NO_2-N および粒子態リンの比負荷量は、増水時に上昇し、翌日には低下していた。一方、粒子態窒素と溶存態リンの比負荷量はあまり上昇しなかった。

K^+/Na^+は、増水とともに上昇し、翌日も高いままであった。山川の家畜密度は、高崎川の約 6 倍であるが、NH_4-N 濃度や K^+/Na^+は、それに見合った増加は確認されなかった。

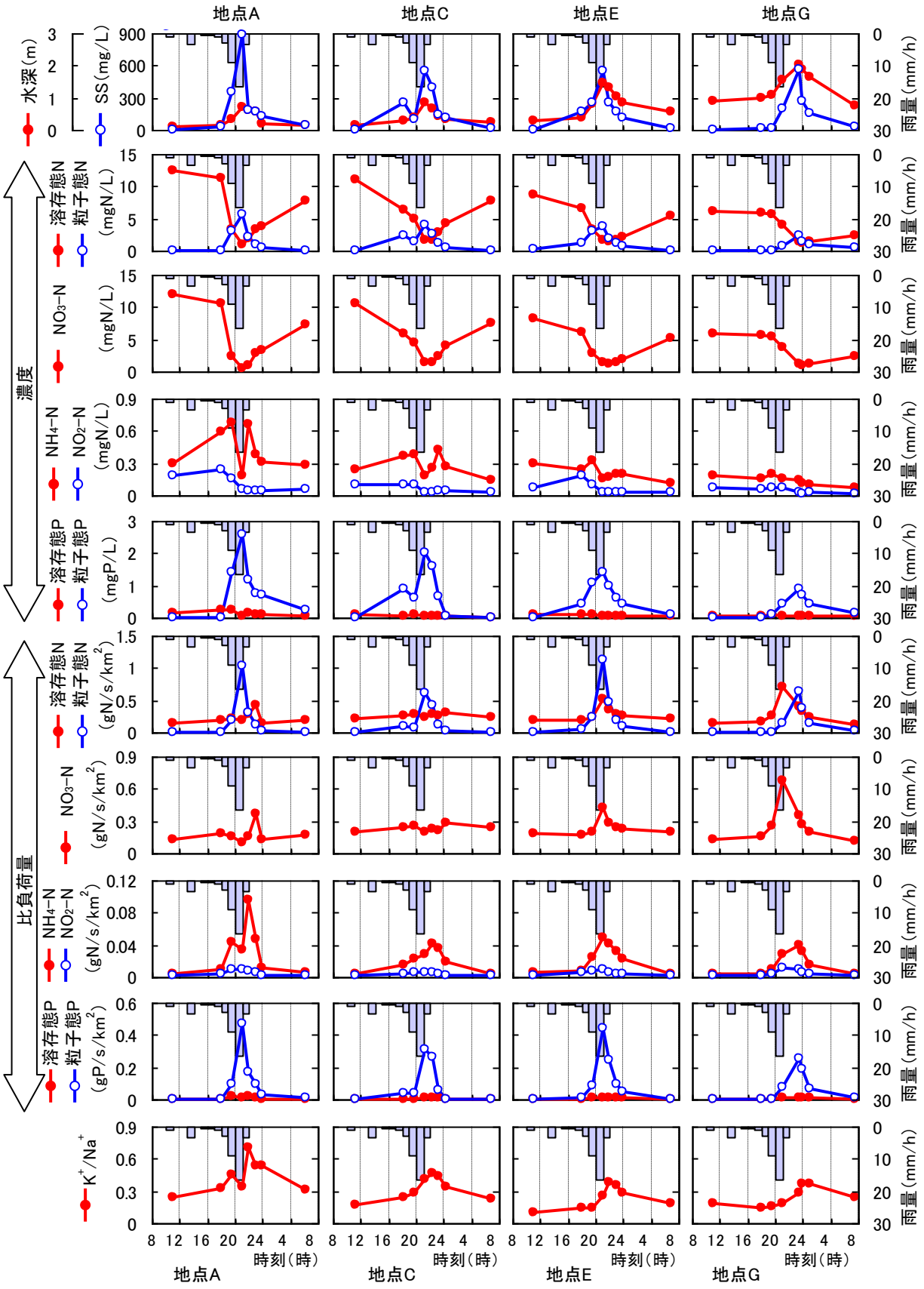


図-22　高崎川の雨天時調査の雨量、水深、SS 濃度、各態窒素および
各態リンの濃度と比負荷量、K^+/Na^+の変化

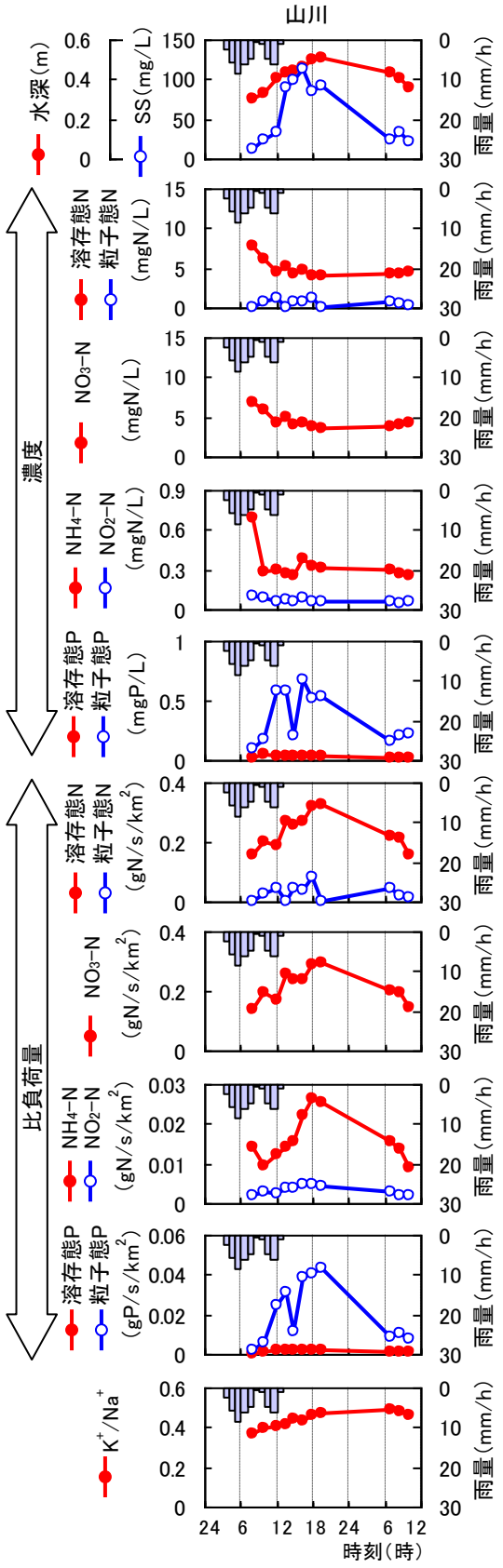


図-23　山川の雨天時調査の雨量、水深、SS 濃度、各態窒素および各態リンの濃度と比負荷量、K^+/Na^+の変化

2.2.3.3.2 雨天時の流出負荷量の解析

図-24 は、溶存態窒素と粒子態窒素に関する、地点Aと地点Gにおける比流量と比負荷量の関係である。比流量と窒素比負荷量は、両対数グラフ上で概ね直線上にプロットされ、窒素の存在形態によって傾きが異なることがわかった。そこで、比流量と各水質成分の比負荷量の関係を、以下の L-Q 式で表した。

$$L=aQ^b$$

ただし、L：比負荷量

Q：比流量

a, b：定数

定数 a, b は、比流量と比負荷量をそれぞれ常用対数に変換して最小二乗法により回帰直線を求めて算出した。表-4 は、主要な水質成分の、地点別の定数と R^2 である。定数 b は増水時の濃度変化を反映し、b<1 は濃度が低下する希釈型、b>1 は濃度が増加する洗い出し型、b=1 は濃度が変化しない一定型に分類される[13]。定数 b に着目すると、SS はいずれの地点でも洗い出し型であった。

溶存態窒素、NO_3-N、NO_2-N はいずれも希釈型であった。NH_4-N は、上流側の地点 A、C では b=1、地点 E、G と山川では b<1 となった。希釈型とならなかった地点 A、C では、雨天時に集水域から NH_4-N が流出したと考えられる。粒子態窒素は、高崎川ではすべての地点で洗い出し型となった。山川では増水時に粒子態窒素の負荷量が上昇しなかったため、b<1 となった。

溶存態リンは、高崎川では概ね希釈型であったが、山川では洗い出し型となった。粒子態リンはいずれの地点でも洗い出し型となった。地点 C では他の地点と比較して、粒子態リンの定数 b が高かった。

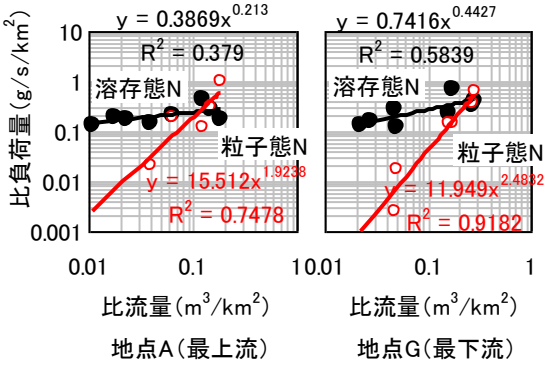


図-24　地点 A と G における比流量と各態窒素の比負荷量の関係

表-4　主要な水質成分の L-Q 式の定数 a、b と R^2

	地点	a	b	R^2		地点	a	b	R^2		地点	a	b	R^2
SS	A	7038	**2.45**	0.92	粒子態	A	6.65	**1.77**	0.91	溶存態	A	57.7	**1.32**	0.99
	C	17405	**2.87**	0.88	P	C	51.87	**2.86**	0.66	Fe	C	42.8	1.04	0.87
	E	1797	**2.17**	0.82		E	2.78	**1.72**	0.82		E	69.4	1.08	0.91
	G	4051	**2.78**	0.99		G	3.36	**2.13**	0.98		G	82.5	1.07	0.97
	山川	8063	**2.65**	0.86		山川	8.86	**2.12**	0.73		山川	93.3	1.02	0.63
溶存態	A	0.39	0.21	0.38	Na^+	A	1.60	0.53	0.83	溶存態	A	113.3	**1.47**	0.97
N	C	0.31	0.06	0.21		C	1.15	0.36	0.86	Al	C	294.7	**1.87**	0.99
	E	0.57	0.31	0.85		E	2.75	0.43	0.60		E	111.6	**1.47**	0.99
	G	0.74	0.44	0.58		G	3.96	0.54	0.66		G	151.9	**1.71**	0.93
	山川	1.30	0.57	0.82		山川	3.42	0.62	0.94		山川	1107.4	**2.38**	0.95
NO_3-N	A	0.18	0.04	0.01	K^+	A	1.29	0.76	0.92	溶存態	A	7.49	1.06	0.90
	C	0.21	−0.02	0.02		C	1.29	0.83	0.98	Zn	C	6.39	1.04	0.90
	E	0.43	0.25	0.75		E	1.59	0.85	0.98		E	6.61	0.95	0.92
	G	0.59	0.39	0.48		G	1.70	0.80	0.95		G	7.30	1.02	0.98
	山川	1.18	0.57	0.83		山川	2.40	0.77	0.96		山川	4.99	1.02	0.79
NO_2-N	A	0.02	0.56	0.56	DOC	A	2.56	0.97	0.97	溶存態	A	2.35	1.06	0.93
	C	0.01	0.55	0.51		C	2.11	0.96	0.97	Cu	C	1.79	1.07	0.88
	E	0.01	0.52	0.44		E	2.97	0.99	0.98		E	2.47	**1.14**	0.90
	G	0.02	0.75	0.72		G	3.12	1.02	0.99		G	2.99	**1.34**	0.99
	山川	0.02	0.66	0.58		山川	4.42	1.07	0.97		山川	2.69	**1.13**	0.99
NH_4-N	A	0.38	1.00	0.83	粒子態	A	350986	**2.35**	0.92	溶存態	A	6.20	1.01	0.55
	C	0.29	1.03	0.81	Fe	C	1099787	**2.84**	0.89	Mn	C	11.51	0.95	0.35
	E	0.15	0.88	0.88		E	105783	**2.21**	0.89		E	3.61	0.83	0.44
	G	0.11	0.90	0.90		G	76548	**2.38**	0.97		G	6.74	0.63	0.80
	山川	0.11	0.65	0.53		山川	478409	**2.74**	0.87		山川	1.35	0.16	0.00
粒子態	A	15.51	**1.92**	0.75	粒子態	A	368687	**2.28**	0.92	溶存態	A	5.84	0.86	0.93
N	C	178.53	**3.00**	0.79	Al	C	2036628	**3.03**	0.89	B	C	4.10	0.75	0.91
	E	4.92	**1.56**	0.85		E	143242	**2.31**	0.88		E	5.55	0.80	0.95
	G	11.95	**2.48**	0.92		G	144572	**2.74**	0.96		G	7.62	0.81	0.95
	山川	0.01	−0.30	0.01		山川	7794176	**3.78**	0.90		山川	12.38	0.86	0.98
溶存態	A	0.06	0.79	0.72	粒子態	A	1.16	0.57	0.27	溶存態	A	0.17	0.75	0.98
P	C	0.04	0.82	0.88	B	C	1.08	0.69	0.28	Ni	C	0.13	0.67	0.97
	E	0.03	0.73	0.86		E	0.85	0.78	0.47		E	0.19	0.76	0.96
	G	0.04	0.92	0.92		G	0.29	0.20	0.20		G	0.29	0.84	0.90
	山川	0.04	**1.16**	0.66		山川	1.50	**1.49**	0.22		山川	0.06	0.42	0.30

※　洗い出し型（b>1.1）は網掛け＋太字で、希釈型（b<=0.9）は網掛けのみで示した。

Na^+と K^+は希釈型であり、表中には載せていないが Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}も希釈型であった。Na^+と K^+は、地点による定数 b の違いは小さかった。

DOC は、いずれの地点でも定数 b が 1 に近い一定型となり、増水時の希釈や洗い出しの作用が小さかった。

粒子態金属では、Fe、Al、Zn、Cu、Mn、Ni はいずれの地点でも洗い出し型であった。粒子態の B は、高崎川では希釈型、山川では洗い出し型となった。

溶存態金属は元素種によって異なった。Fe は地点 A では洗い出し型となり、他の地点では定数 b が 1 に近かった。Al はすべての地点で洗い出し型となった。Zn はいずれの地点でも定数 b が 1 に近い値となった。Cu は、高崎川下流の地点 E、G と山川で洗い出し型となった。Mn は、高崎川下流の地点 E、G と山川で希釈型となった。B と Ni は、いずれの地点でも希釈型となった。

L-Q 式の定数 b から、出水時には溶存態窒素濃度は低下し、粒子態リン濃度は増加することなど、各物質の流出特性が明らかとなった。

降雨が栄養塩類の流出負荷量に及ぼす影響は、河川が増水した期間全体で評価する必要がある。そこで、地点別に累積流量と各水質成分の累積負荷量を求め、基底流出分と直接流出分に分解した。**図-25** は、基底流出と直接流出の概念図である。累積負荷量の計算は、1 回目の調査から最後の調査までの時間範囲で行った。各調査間の濃度の変化を直線で仮定し、全体の累積負荷量を算出した。基底流出の各時間の負荷量は 1 回目（増水前）の負荷量と等しいと仮定して、基底流出分の累積負荷量を算出した。そして、全体から基底流出分を差し引いて直接流出分の累積負荷量を求めた。最後に、地点間の比較のため、集水域面積で割って累積比負荷量を求めた。

図-26 は、各態窒素と各態リンの累積比負荷量である。全窒素の累積比負荷量は、地点 A よりも地点 C、E、G で大きかった。山川は、地点 G と同程度

となった。全窒素の累積比負荷量のうち、基底流出と直接流出はそれぞれ39～59%、41～61%となった。高崎川では、直接流出のうち48～74%は粒子態によるものであった。山川では直接流出のうち22%が粒子態であった。地点間で比較すると、溶存態窒素の直接流出は、地点Gと山川で、粒子態窒素の直接流出は地点Eで大きかった。

全リンの累積比負荷量は、山川と比較して高崎川で大きく、地点別では地点Eで大きかった。リンの累積比負荷量を基底流出と直接流出に分けると、それぞれ約4%、約96%となり、直接流出のうち約95%は粒子態によるものであった。

累積負荷量と土地利用との関係を検討するため、地点C、E、Gについて上流側の累積負荷量との差分を求めた。図-27は、地点A、C、E、G、山川の土地利用割合と、各水質成分の累積比負荷量である。土地利用割合は、上流側の小流域ほど畑の割合が高くなっている。

基底流出と直接流出を含めた全体の累積比負荷量でみると、溶存態窒素は、地点Aは他の地点と比較して小さかった。直接流出のみに着目すると、地点Gと山川で大きかった。

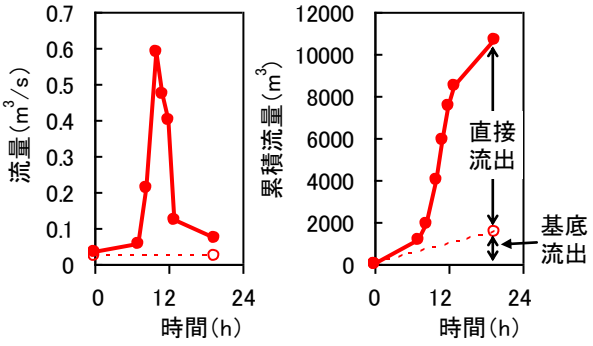


図-25　基底流出と直接流出の分解方法

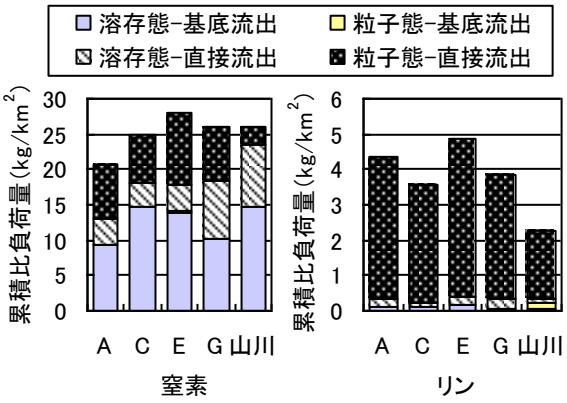


図-26　窒素とリンの累積比負荷量とその内訳

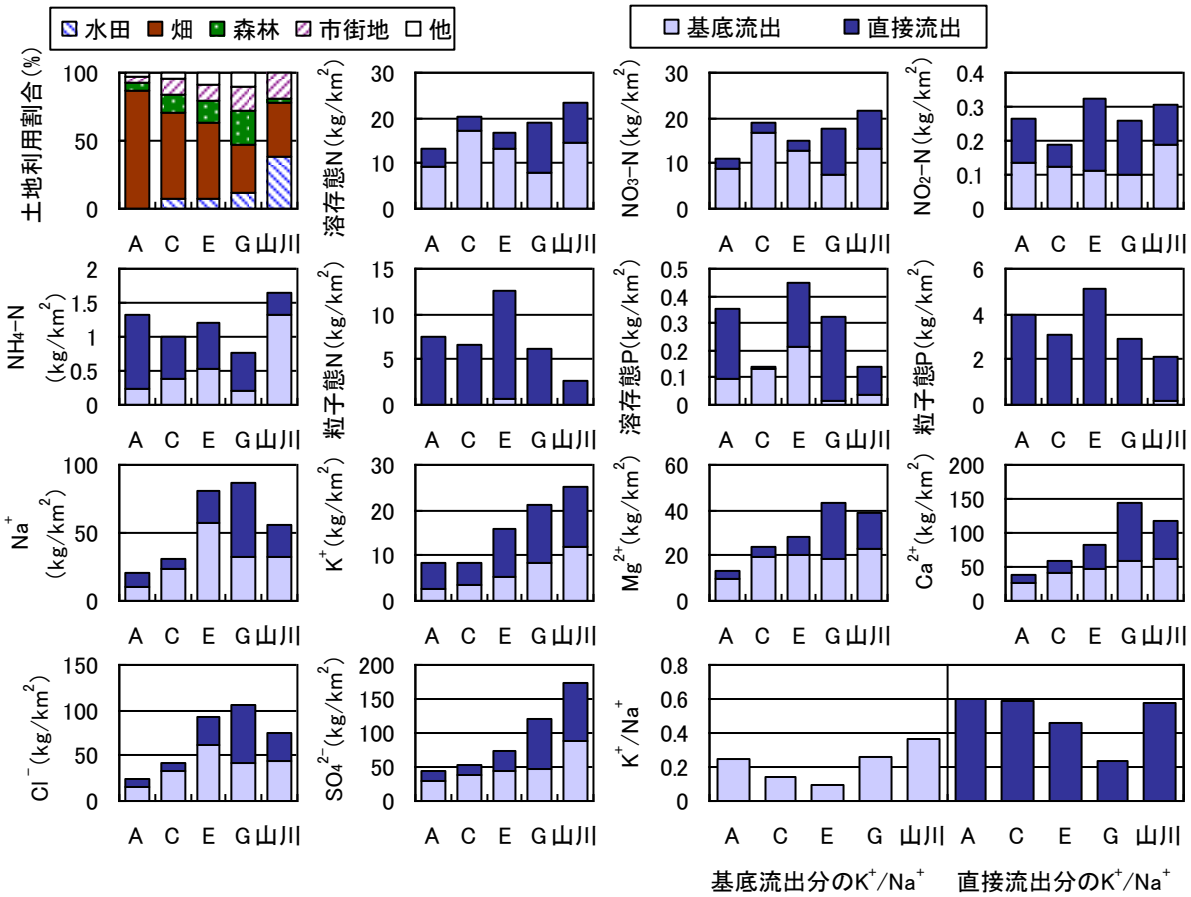


図-27　小流域（区間）別の土地利用と、各水質成分の基底流出と直接流出の累積比負荷量

NO_3-N は、溶存態窒素と同様であった。NO_2-N は、基底流出は山川で大きく、直接流出は地点 E で大きかった。NH_4-N は、全体では地点 A と山川で大きかった。高崎川では、NH_4-N の累積比負荷量に対する直接流出の占める割合は、地点 A では 83%、地点 C、E、G では 55～70%であった。山川の直接流出は低い傾向を示した。

粒子態窒素は、山川よりも高崎川で大きく、特に地点 E で大きかった。粒子態窒素はほぼ全量が直接流出であった。

溶存態リンは、高崎川の地点 A、E、G で大きかった。地点 C では基底流出の割合が高く、地点 G と山川では直接流出の割合が高かった。

粒子態リンは、地点 E で最も大きく、次いで地点 A で大きかった。粒子態リンは粒子態窒素と同様、ほぼ全量が直接流出であった。

高崎川では、Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}はいずれも、累積比負荷量が下流の地点ほど大きかったが、基底流出と直接流出に分けると、イオン種によって違いがみられた。Na^+は、基底流出は地点 E で、直接流出は地点 G で高かった。K^+は地点間で構成が似ており、直接流出の割合は地点 A で 70%、他の地点で約 60%となった。

Mg^{2+}の基底流出は、他の地点と比較して地点 A で小さかった。直接流出は、地点 G で大きかった。Ca^{2+}、は Mg^{2+}と同様の傾向であった。

Cl^-は、Na^+と同様の傾向を示し、SO_4^{2-}は Ca^{2+}と同様の傾向を示した。

Na^+と K^+の累積比負荷量から、基底流出分と直接流出分の Na^+/K^+を算出したところ、地点 A、C、E と山川では、基底流出分と比較して直接流出分で高い値となった。集水域の家畜密度が高いと推察される高崎川上流と山川では、降雨時に畜産由来の負荷が流入している可能性がある。

図-28 は、溶存態と粒子態の金属の、各地点の基底流出と直接流出の累積比負荷量である。溶存態金属の累積比負荷量は、Fe、Al、Zn、Cu はいずれも直接流出の割合が高く、地点間で比較すると地点 E、G で高かった。山川では Fe は高く、Al、Zn は低かった。溶存態 Mn は、地点 C、G、山川で大きかった。溶存態 B は、K^+と同様の傾向を示した。溶存態 Ni は、地点 G で大きく、地点 G では直接流出の割

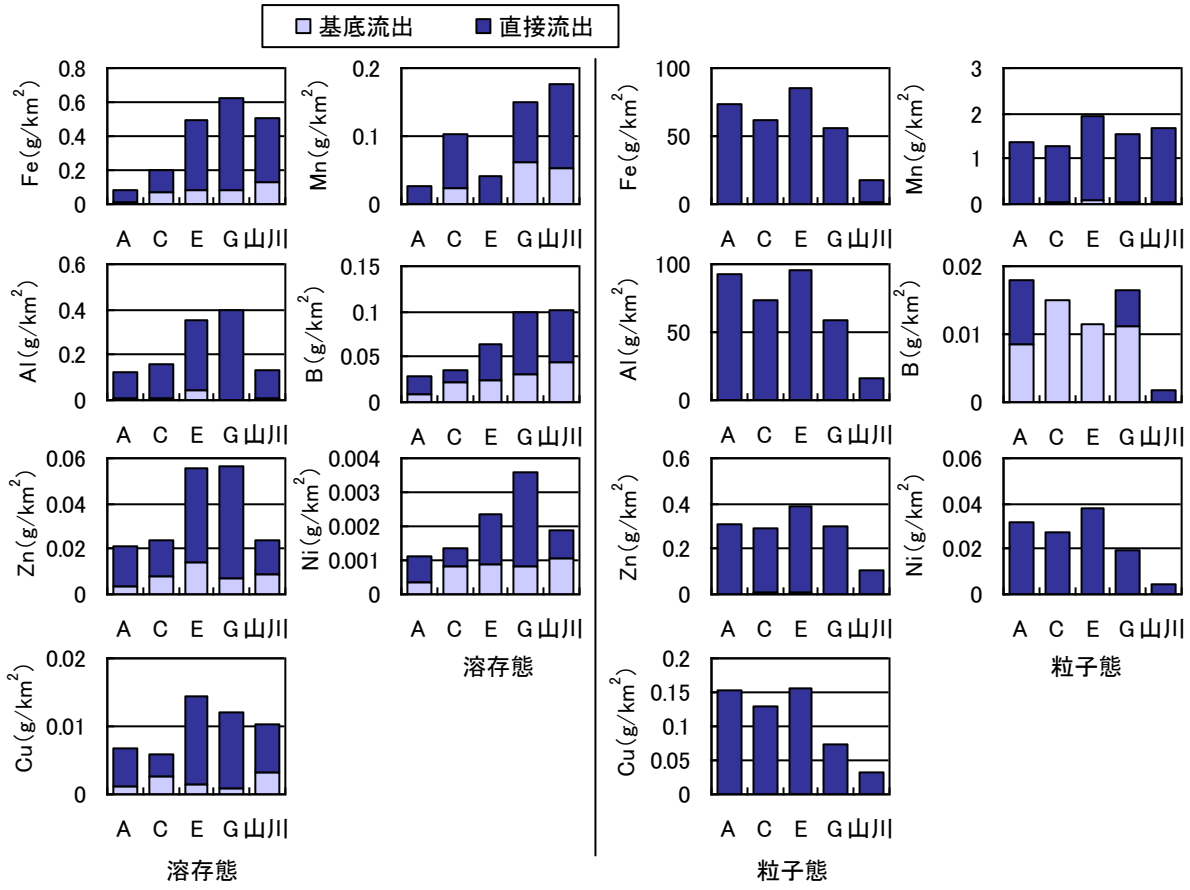


図-28　小流域（区間）別の、金属成分の基底流出と直接流出の累積比負荷量

合が高かった。

粒子態金属では、Fe、Al、Zn、Cu、Ni は同様の傾向を示し、山川よりも高崎川で大きかった。また、大部分は直接流出であった。Mn は、大部分は直接流出であり、山川でも高崎川と同程度の値を示した。粒子態Bは、高崎川では基底流出の割合が高かった。

各水質の累積比負荷量は、土地利用（水田、畑、森林、市街地、その他）だけから傾向をつかむのは難しいが、直接流出に着目すると、畑の割合が低下すると、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^{-}、SO_4^{2-}および溶存態の Fe、Al、Zn、B、Ni の累積比負荷量が高くなる傾向がみられた。これらは、畑以外からの流出と考えられる。より精緻な土地利用、地質、畜産、人口、下水道普及率などの集水域情報および水文情報を重ね合わせることにより、雨天時の発生源別の寄与を推定できる可能性がある。

2.3 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。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_3-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_3-N 濃度が高くなる傾向が示された。

(3) 河川水の NO_3-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_3-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_4-P、NH_4-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。

また、印旛沼流入河川である高崎川を対象とし、晴天時と雨天時の負荷量調査を行うとともに、集水域内に畜産農家の多い鬼怒川支流の山川で雨天時調査を行い、濃度、負荷量、比負荷量の地点間比較や土地利用との関係から流出特性を調査した。得られた知見を以下に示す。

高崎川の晴天時調査からは、

(7) 集水域の畑の割合が高い上流の調査地点で、NO_3-N 濃度が高かった。

(8) 集水域に畜産農家が点在する最上流の調査地点では、NH_4-N、溶存態リン、K^{+}濃度が高く、Na^{+}濃度が低かった。

(9) 金属成分については、Fe と Al は粒子態の割合が、Mn、B、Ni は溶存態の割合が高かった。

(10) 小流域ごとの比負荷量を求めると、NH_4-N の比負荷量は、最上流の地点の集水域で大きかった。溶存態リンは、最上流だけでなく中流にも負荷の大きい集水域があった。

雨天時調査からは、

(11) 高崎川と山川のどちらも、溶存態窒素と NO_3-N の濃度は、増水のピーク時に低下した。NH_4-N 濃度は高崎川の上流側で上昇した。

(12) 高崎川の調査では、L-Q 式の定数 b からは、粒子態 N、P は洗い出し型、溶存態 N、P は希釈型に分類された。また、粒子態成分は概ね洗い出し型、溶存態成分は概ね希釈型に分類されたが、溶存態 Al は洗い出し型に分類された。

(13) 雨天時の高崎川の各地点の窒素の累積比負荷量を基底流出と直接流出に分けると、それぞれ 39～59%、41～61%となり、直接流出のうち 48～74%は粒子態によるものであった。

(14) リンの累積比負荷量を基底流出と直接流出に分けると、それぞれ約 4%、約 96%となり、直接流出のうち約 95%は粒子態によるものであった。

(15) 小流域別の累積比負荷量を算出した結果、高崎川の上流と山川の集水域では NH_4-N の比負荷量が高いことがわかった。

(16) 雨天時の直接流出分の累積比負荷量から K^{+}/Na^{+}を求めると、高崎川の上流と山川で高い値を示した。

3. 安定同位体による栄養塩類の流出機構推定

近年、安定同位体比に着目した流域環境評価が盛んに行われている。安定同位体比には起源や反応履歴を示す情報が「刻印」されているためである（永田[14]、2010）。例えば、^{14}N と ^{15}N では化学的な反応に差異はないが、質量が異なるため、同じ温度条件下でも原子の振動数に違いが現れ、^{14}N の方がより速く振動する。したがって、^{14}N の結合は ^{15}N の結合に比べ切れやすく、窒素固定され易い。また、硝化・脱窒過程では大気中へ放出され易い（和田[15] 1986；酒井ら[16] 1996；高津ら[17] 2005）。一般的に、安定同位体の存在比はある特定の基準物質の安定同位体比に対する千分率偏差（δ 記法）で以下の式で表される。

$$\delta^{15}N(‰) = (({}^{15}N/{}^{14}N \text{ 試料}) / ({}^{15}N/{}^{14}N \text{ 大気}) - 1) \times 1000$$

基準物質と同じ安定同位体比であれば，δ 値は 0 になり、重い同位体がより多く含まれていれば正になり、軽い同位体が多ければ負となる。

図-29 に Kendall ら[18]がまとめた硝酸イオンの $\delta^{15}N-\delta^{18}O$ ダイアグラムを示す。これから以下の特徴がわかる。(i) 下水や畜産排水の処理場に由来する硝酸イオンは、窒素の安定同位体比が高い（$\delta^{15}N$＝＋10～＋20‰）。処理場では、アンモニアの揮発や脱窒に伴って、^{14}N が選択的に大気中に放出される。一方、処理槽内では ^{15}N が「濃縮」される。(ii) 大気に由来する硝酸イオンは、酸素の安定同位体比が高い（$\delta^{18}O$＝＋60～＋90‰）。大気中において、O_3 は非常に高い $\delta^{18}O$ 値（90～122‰）を示すため、降雨に含まれる硝酸イオンの $\delta^{18}O$ まで影響する。(iii) 水域生態系における主要な硝酸イオンの代謝過程に伴い、同位体分別が起こる。このうち、脱窒においては、窒素と酸素の両方について、しばしば大きな同位体分別が伴うため、ある水系の中で、脱窒が活発に進行していれば、$\delta^{15}N-\delta^{18}O$ ダイアグラム上で直線的に並んだプロットとして識別される場合がある（図 29 上の矢印）。

大手ら（2008）[19]は、琵琶湖流入主要河川である野洲川と安曇川の最上流部から河口（琵琶湖への流入地点）までの硝酸イオンの濃度と安定同位体比の流下変化を調査した。その結果、野洲川では、硝酸イオンの濃度は、上流から下流にむけて上昇傾向を示し、これとともに、$\delta^{15}N$ も著しく上昇していたことを報告し、野洲川の中・下流域における窒素の負荷が主に排水系（農業排水を含む）であることを推察した。また、安曇川の流程では、濃度の上昇も野洲川ほどの傾向は見られなかったことから、中・下流に集中した農耕地や住宅地がないため、$\delta^{15}N$ の高い硝酸イオンが流入しないためであると推察した。また、赤松(2010)[20]は河床堆積物中の $\delta^{15}N$ について、流域内に森林しか存在しない河川ではすべての点でほぼゼロに近い値を示している一方で、都市域を流れる河川では全域で富栄養化の基準となる 6‰を超えていたことを報告した。

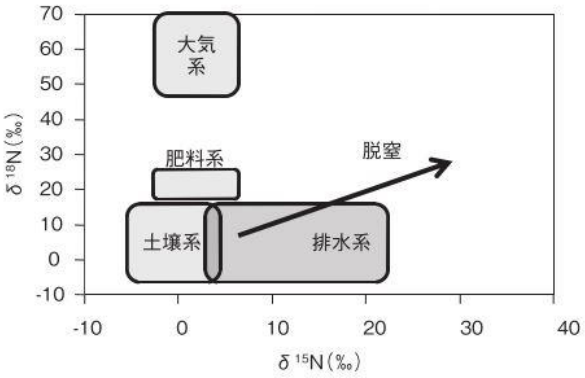
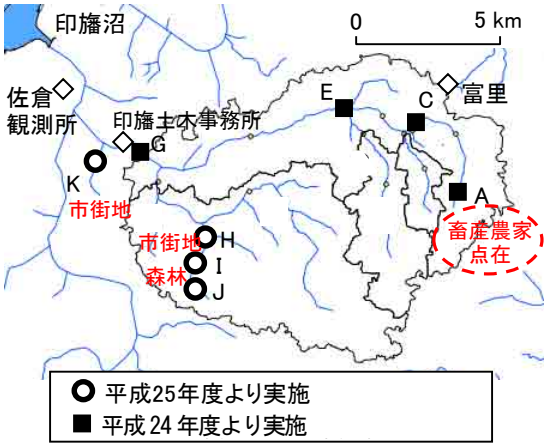


図-29　硝酸イオンの $\delta^{15}N-\delta^{18}O$ ダイアグラム



高崎川の集水域と調査地点



山川の集水域と調査地点

図-30　調査地点

ここでは出水時の河川水の水（H_2O）の酸素・水素、硝酸イオンの窒素・酸素安定同位体比に着目することにより、出水時における栄養塩類の流出機構の解明を試みた。さらに同位体混合モデル[21]を用いて流出した窒素の負荷源の推定を試みた。

3.1 調査方法

3.1.1 調査河川と水質調査地点

印旛沼流入河川の鹿島川の支流である高崎川と、鬼怒川の支流である山川を対象に、集水域の土地利用情報を整理し、栄養塩類の負荷量調査を実施した。**図-30** は、高崎川と山川の集水域と採水調査地点である。集水域の面積は、高崎川で79km^2、山川で32km^{2}である。

高崎川の雨天時調査は、平成24年11月17日と平成25年1月18～20日に実施した。平成24年11月17日の雨天時の先行晴天日数は4日、累積降雨量は38.5mm である。降雨開始前を含め数時間おきに 8 回、本流の C、G の 2 地点で流量観測と水質調査を行った。平成25年12月18～20日の雨天時の先行晴天日数は7日、累積降雨量は45mm であり、I の 1 地点で数時間おきに流量観測と水質調査を 10 回行った。なお、C 地点では畑の割合、I 地点では、森林の割合が多い。

山川の雨天時調査は、平成24年11月6日に実施した。先行晴天日数は5日、累積降雨量は40mm である。下流側の 1 地点で数時間おきに流量観測と水質調査を 11 回行った。

3.1.2 雨天時調査のデータの解析方法

雨天時調査の結果を解析するにあたり、高崎川は佐倉観測所、山川は下妻観測所の 1 時間ごとの雨量データを使用した。河川流量、雨天時河川水の各水質成分濃度、雨水と河川水の δ^2H と $\delta^{18}O$ および硝酸イオンの $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$（以下、$\delta^{15}N_{NO_3}$、$\delta^{18}O_{NO_3}$）は実測とした。水の安定同位体比を用いた増水時の河川水の基底流出と直接流出への分離と硝酸イオンの窒素、酸素の安定同位体比を用いた硝酸性窒素の流出挙動を解析した。なお、採取したサンプルは赤外線半導体レーザーを用いたキャビティリングダウン吸収分光法により、水の δ^2H と $\delta^{18}O$ を、脱窒菌法により硝酸イオンの $\delta^{15}N$ と $\delta^{18}O$ を測定した。

3.1.3 同位体混合モデルを用いた窒素負荷源推定

安定同位体比分析に供した試料のサンプリングは、平成26年10月13日12時から10月14日6時までの18時間に7回、地点 C および K で行った。硝酸イオン濃度はイオンクロマトグラフィーにより測定し、硝酸イオンの $\delta^{15}N$ および $\delta^{18}O$ の測定は、亜硝酸除去後、Sigman et al.[22] の脱窒菌法に従って分析した。脱窒菌によって還元された N_2O はコンフロー式安定同位体比質量分析計（Thermo Fisher Scientific 社製、DELTA plus Advantage）により分析した。また、水の安定同位体比は近赤外線半導体レーザーを用い、キャビティリングダウン吸収分光法（CRDS）法に

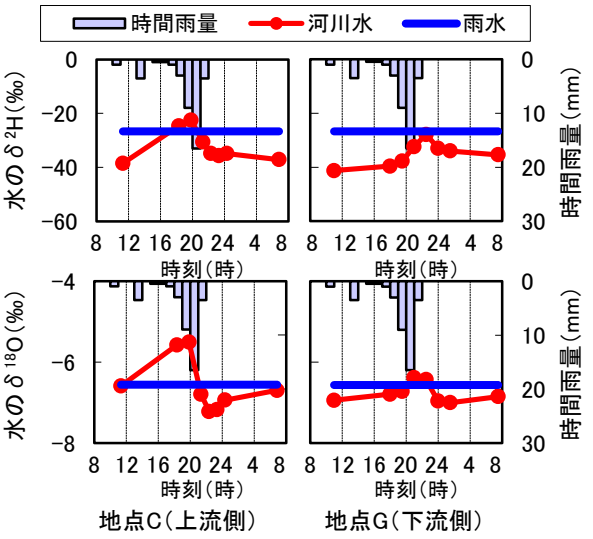


図-31　雨天時の河川水の δ^2H と $\delta^{18}O$ の変化

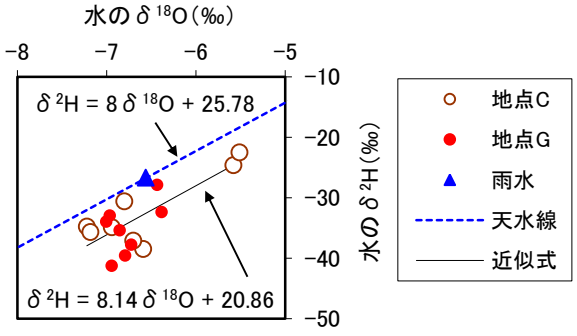


図-32　δ^2H と $\delta^{18}O$ の関係

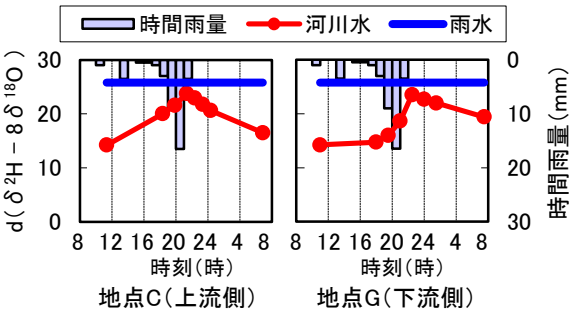


図-33　雨天時の河川水の d(‰) の変化

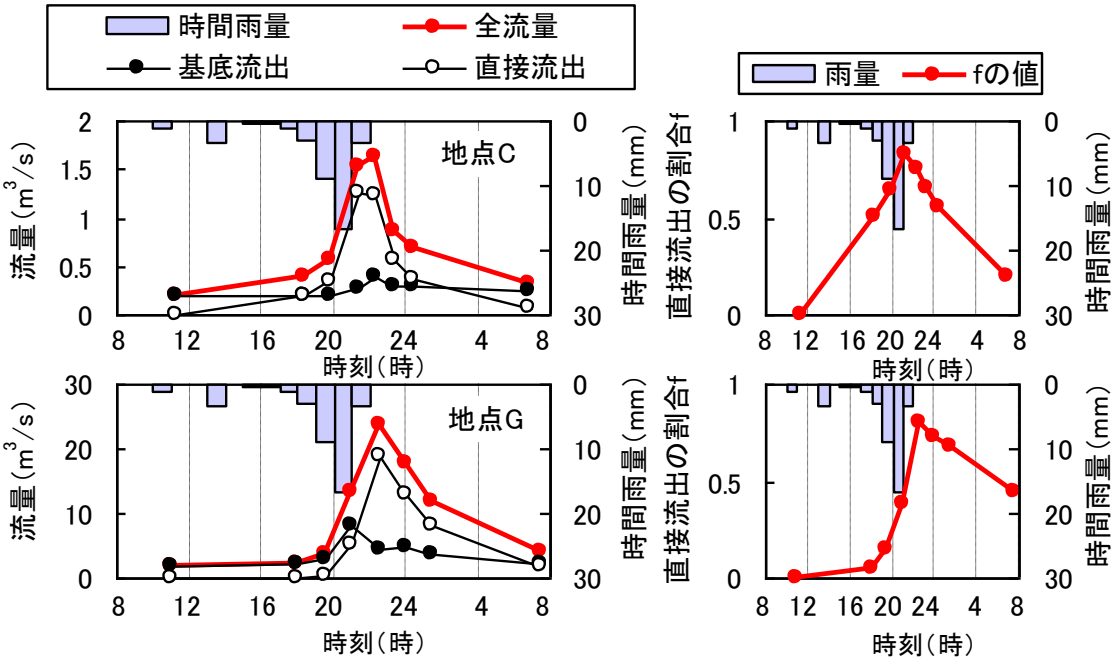


図-34　全体、直接流出、基底流出の流量と f の変化

より行った。なお、$\delta^{15}N$ および $\delta^{18}O$ の測定精度は、それぞれ±0.1‰および±0.3‰であった。負荷源別負荷割合の推定は、高津ら[21]の同位体混合モデルを用いた。

印旛沼流入河川の鹿島川の支流である高崎川を対象に、集水域の土地利用情報を整理し、栄養塩類の負荷量調査を実施した。

3.2 結果と考察

3.2.1 水の同位体比を用いた増水ピークの成分分離

図-31 は、平成 24 年 11 月 17 日の高崎川地点 C、G の河川水と雨水の $\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ の変化である。降雨前の河川水の $\delta^{2}H$ は雨水より低く、降雨に伴って増加した。地点 C では流量ピーク時には雨水より高くなった。河川水の $\delta^{18}O$ は、降雨前は雨水と近い値であり、一旦増加したあと減少し、翌日には初期の値に戻った。図-32 は $\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ の関係である。河川水の $\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ は正の相関関係を示し、16 データで回帰直線を求めると、傾きは約 8 となった。雨水は河川水の近くにプロットされ、$\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ からは、河川水に占める雨水の割合の算出は難しいことがわかる。図-32 の点線は雨水を通る傾き 8 の直線である。大気中の水蒸気の蒸発と凝縮が平衡状態にあるとき、$\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ の比は 8 となることが知られており（天水線[23]）、雨水データは 1 試料しかないが、変動する場合はこの点線に沿って変動するものと推測される。雨水のもととなった水蒸気の生成場所や生成環境を反映する指標（d:deuterium excess parameter）として、以下の式が提案されている[23]。

$$d = \delta^{2}H - 8\,\delta^{18}O$$

雨水の d は、日本では夏に低く（<10‰）、冬に高い（>20‰）[23]。図-33 は、高崎川河川水と雨水の d である。本調査時の雨水試料の d は、26 と高く、冬の降水の特徴を示していた。河川水の d は、降雨とともに上昇し、ピーク時でも雨水の値を下回っていることがわかる。

$\delta^{2}H$ と $\delta^{18}O$ を用いた洪水ハイドログラフの成分分離は、一部が雨水の値を上回ったことや、河川水の値と近いことから、正しく計算できなかった。そこで、成分分離計算には d を用いた。降雨前の d を基底流出水、雨水の d を直接流出水の値として、この 2 成分の混合と仮定し、以下の式を適用した。

$$d_t = f \times d_{new} + (1-f) \times d_{old}$$

$$f = Q_{new} / Q_t$$

Q：河川の流量

f：混合率

d：deuterium excess parameter

添え字 t、new、old：各時間の値、直接流出の値（雨水の値）、基底流出の値（降雨前の値）

図-34 は、全流量の測定値と、成分分離された基底流出、直接流出の流量および f の変化である。基底流出流量は、降雨時に若干増加する程度であり、直接流出流量と比較すると増加が小さかった。全流量がピークを示す 22:30 頃には、直接流出の割合が約 80%（f ≒ 0.8）となった。下流側の地点 G では、

上流側の地点Cと比較して、洪水ピーク後のfの減少が遅かった。なお、平成25年12月18～20日の高崎川の調査では、増水前からの採水ができなかったため、基底と直接流出の成分分離は出来なかった。

3.2.2 硝酸イオンの$\delta^{15}N$、$\delta^{18}O$による流出解析

図-35は、平成24年11月17日の硝酸性窒素濃度と、$\delta^{15}N_{NO_3}$,$\delta^{18}O_{NO_3}$の変化である。河川水では、硝酸性窒素濃度の低下に従い、$\delta^{15}N_{NO_3}$が低下し、$\delta^{18}O_{NO_3}$が上昇した。**図-36**は、今回の雨水と河川水の$\delta^{15}N_{NO_3}$- $\delta^{18}O_{NO_3}$ダイヤグラムと起源情報[24]である。雨水の$\delta^{15}N_{NO_3}$は0‰、$\delta^{18}O_{NO_3}$は72‰であり、降水の範囲に含まれた。河川水は、$\delta^{15}N_{NO_3}$が 6～8‰、$\delta^{18}O_{NO_3}$が1～5‰の範囲にプロットされた。この位置は、土壌由来と糞尿や畜産廃棄物由来が重複している箇所であった。この領域を拡大すると、河川水の$\delta^{15}N_{NO_3}$と$\delta^{18}O_{NO_3}$は、負の相関関係を示した。脱窒反応が進行するときは、同位体分別によって$\delta^{15}N$と$\delta^{18}O$がともに上昇し、正の相関となるから、今回の増水時の河川水中硝酸性窒素の同位体比の変化は、脱窒の進行していない硝酸性窒素の混合があったと考えられる。**図-36**に矢印で示したように、降雨時の$\delta^{15}N_{NO_3}$と$\delta^{18}O_{NO_3}$の変化は単純な往復にはならず、$\delta^{18}O_{NO_3}$が上昇、$\delta^{15}N_{NO_3}$が低下した後は、先に$\delta^{18}O_{NO_3}$が降雨前の値付近に戻り、その後$\delta^{15}N_{NO_3}$が降雨前の値付近に戻った。これは、大気由来と化学肥料等の$\delta^{15}N_{NO_3}$の低い硝酸性窒素の流出割合が増加したためと考えられた。

図-37は、地点C、Gの比流量と$\delta^{18}O_{NO_3}$の関係である。$\delta^{18}O_{NO_3}$は、河川の流量に対して直線的に増加していた。そこで、雨天時の$\delta^{18}O_{NO_3}$は、雨水の高い$\delta^{18}O_{NO_3}$の影響を受けて変化したと仮定し、硝酸性窒素濃度と流量から全体の負荷量を求め、以下の式で雨水由来の硝酸性窒素負荷量を推定した。

$$\delta^{18}O_t = \delta^{18}O_{new} \times f + \delta^{18}O_{old} \times (1-f)$$

この式から、

$$f = (\delta^{18}O_t - \delta^{18}O_{old}) / (\delta^{18}O_{new} - \delta^{18}O_{old})$$

雨水由来負荷量 = f ×全体の負荷量

添え字t、new、old：河川水、雨水、降雨前

図-38は、硝酸性窒素の全負荷量と、雨水由来負荷量およびその割合である。雨水由来の硝酸性窒素の負荷量の全負荷量に対する割合は、0～4%と低く、上流よりも下流で高くなる傾向がみられた。

図-39は、雨水由来の硝酸性窒素負荷量を2通りの方法、すなわち前述の$\delta^{18}O_{NO_3}$を用いる方法と、水のdを用いて表面流出水流量を求め、雨水の硝酸性窒素濃度を掛ける方法で求め、比較したものである。雨水由来の硝酸性窒素負荷量は、地点Cではピーク時の負荷量に差が生じたが、ピークの時間や変化の傾向は互いに類似していた。したがって、増水時の硝酸イオンの$\delta^{18}O$の上昇は、雨水の高い$\delta^{18}O_{NO_3}$の影響によるものと考えられる。硝酸イオンの$\delta^{15}N$と$\delta^{18}O$が、地下水と雨水の混合のみで決定されるとすると、両者は連動して変化するはずである。そこで、$\delta^{18}O_{NO_3}$から求めた混合率fと、降雨前河川水と雨水の$\delta^{15}N_{NO_3}$を用いて$\delta^{15}N_{NO_3}$の推定値を算出した。**図-40**は、$\delta^{15}N_{NO_3}$の変化の推定値と実測値の比較である。雨水由来の硝酸性窒素の混合率が低いため、推定値の$\delta^{15}N_{NO_3}$はほとんど低下せず、実測値と乖離した。

雨天時の河川水中硝酸イオンの起源の正確な推定のためには、地下水と雨水だけでなく、他の要因を考慮する必要があることがわかる。硝酸イオンの$\delta^{15}N$については、雨水の他に、森林渓流水[25]や化学肥料などが低い$\delta^{15}N_{NO_3}$を示すことが報告されており、集水域の土地利用は、地点Cでは畑の割合が70%、と高いことから、増水時には化学肥料等の$\delta^{15}N_{NO_3}$の低い硝酸性窒素の流出割合が増加したと考えられる。今後、森林由来や化学肥料などの$\delta^{15}N_{NO_3}$の測定が必要である。

表-5は、河川水の$\delta^{15}N_{NO_3}$と他の水質項目との相関係数の一覧である。**図-41**は、$\delta^{15}N_{NO_3}$と、K^+/Na^+および溶存態Al濃度の関係である。$\delta^{15}N_{NO_3}$は、増水時に増大する項目である流量やSSとは負の相関を示した。増水時に希釈される項目である硝酸性窒素、EC、無機イオン類各種とは強い正の相関を示した。K^+/Na^+とは負の相関であった。溶存態金属類では、Bと正の、Alと負の強い相関を示した。

以上は、増水時の$\delta^{15}N_{NO_3}$の低下に従って、K^+/Na^+と溶存態Al濃度が高い相関をもって増加することを意味し、増水時に流出する硝酸性窒素は、K^+/Na^+、溶存態Alと同じ起源である可能性がある。

図-42は、平成25年12月18～20日の雨天時の高崎川I地点での硝酸性窒素濃度、$\delta^{15}N_{NO_3}$、$\delta^{18}O_{NO_3}$の変化である。本調査でも流量増加時に、硝酸性窒素濃度の低下に伴う、$\delta^{15}N_{NO_3}$の低下と$\delta^{18}O_{NO_3}$の上昇が確認された。

図-43は、山川の結果である。増水時の山川でも硝酸性窒素濃度の低下に伴って$\delta^{15}N_{NO_3}$が低下していた。ここでは$\delta^{18}O_{NO_3}$の顕著な増加は観られなかった。

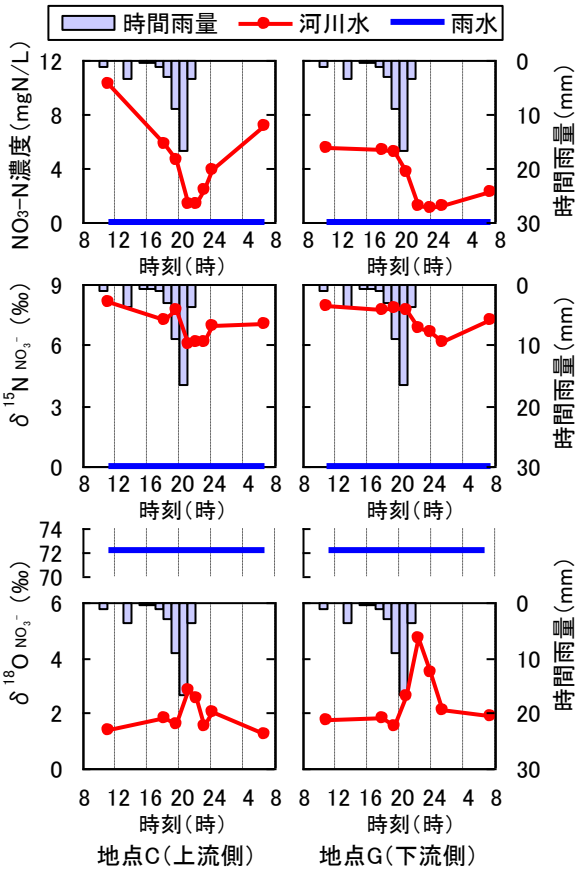
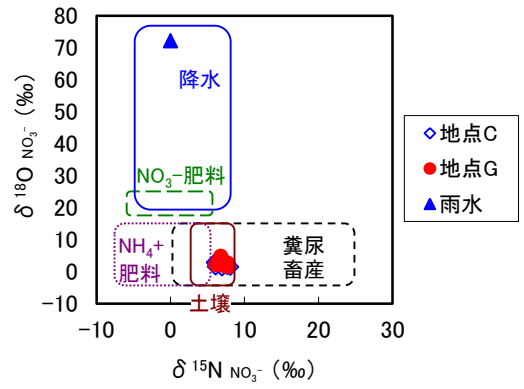


図-35　雨天時の河川水の NO_3-N、$\delta^{15}N_{NO_3^-}$, $\delta^{18}O_{NO_3^-}$ の変化



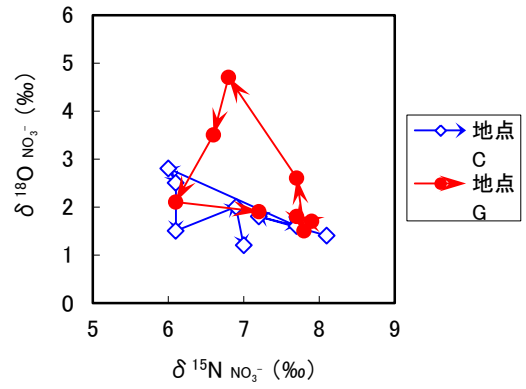


図-36　$\delta^{15}N$-$\delta^{18}O$ ダイヤグラム上の河川水と降水の位置

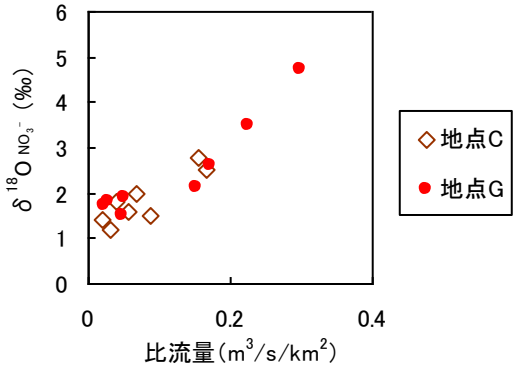


図-37　比流量と $\delta^{18}O_{NO_3^-}$ の関係

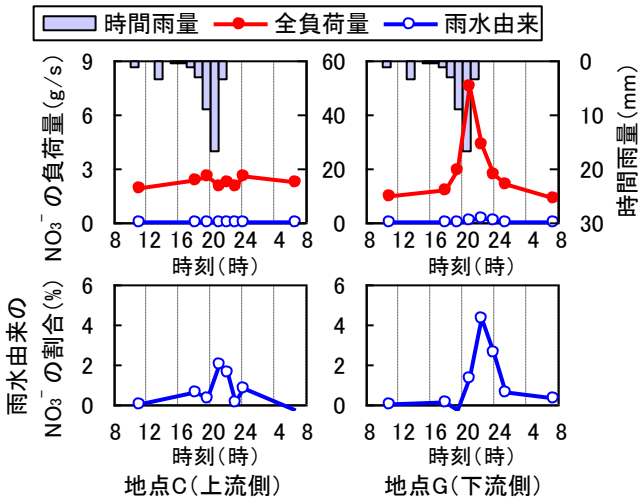


図-38 NO_3-N の全負荷量と雨水由来負荷量およびその割合

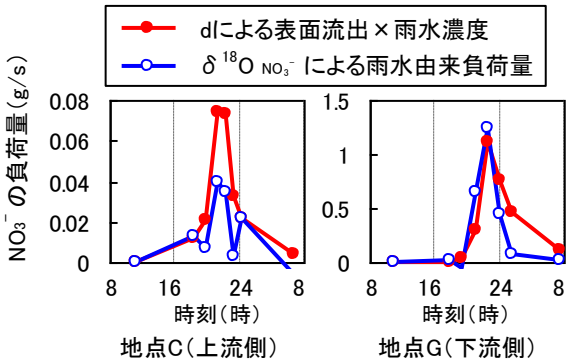


図-39　雨水由来の NO_3-N の、水の d に基づく直接流出流量から求めた負荷量と、$\delta^{18}O_{NO_3^-}$ から求めた負荷量の比較

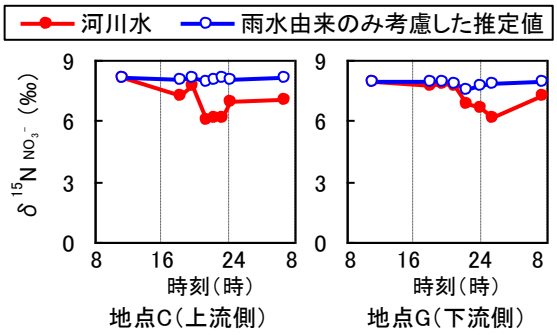


図-40　$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ の実測値と、雨水由来の NO_3-N のみが混合したと仮定した場合の $\delta^{15}N_{NO_3^-}$ の推定値の比較

表-5　$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ と各水質項目との相関係数 R

	全流量	SS	粒子態N	粒子態P	NO_3-N	NH_4-N	NO_2-N	PO_4-P
地点C	−0.83	−0.71	−0.61	−0.67	0.86	0.10	0.82	0.49
地点G	−0.63	−0.53	−0.66	−0.67	0.91	0.75	0.85	0.79
	EC	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}	K^+/Na^+
地点C	0.86	0.93	0.89	0.86	0.89	0.92	0.88	−0.91
地点G	0.93	0.93	0.88	0.92	0.93	0.94	0.91	−0.94
	D-Fe	D-Mn	D-Cu	D-Mo	D-B	D-Zn	D-Al	D-Ni
地点C	−0.31	−0.05	0.22	−0.36	0.89	0.17	−0.88	0.90
地点G	−0.41	0.23	−0.72	0.72	0.90	−0.15	−0.97	0.80

※　網掛けは、危険率1%で有意

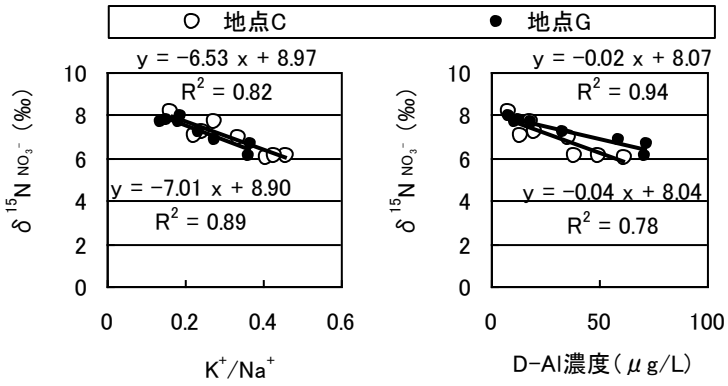


図-41　$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ と K^+/Na^+ および D-Al 濃度との関係

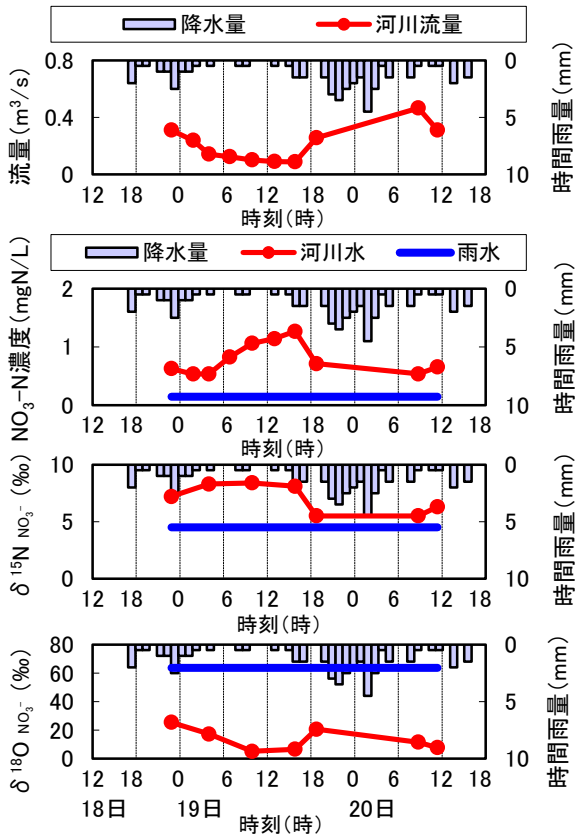


図-42　高崎川地点Ⅰの流量、NO_3-N 濃度、
$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ と $\delta^{18}O_{NO_3^-}$ の変化

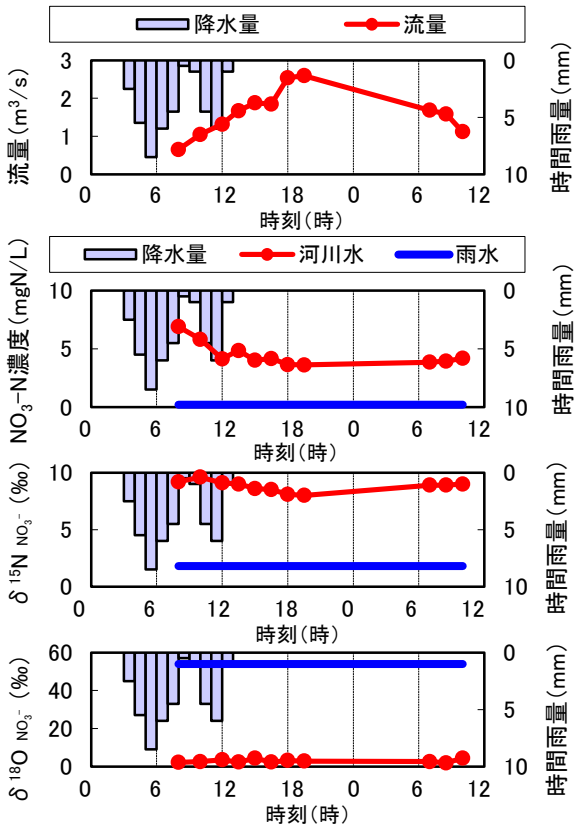


図-43　山川の流量、NO_3-N 濃度、
$\delta^{15}N_{NO_3^-}$ と $\delta^{18}O_{NO_3^-}$ の変化

増水時の硝酸性窒素濃度の低下に伴う $\delta^{15}N_{NO_3}$の低下は、土地利用によらず確認されたが、大気由来の硝酸性窒素の流出特性は、土地利用により異なる可能性があった。

3.2.3　安定同位体モデルによる負荷排出源の推定

図-44 はサンプリング時の時間雨量と河川流量および安定同位体比分析の結果から推定した直接流出量である。直接流出量の推定には、降雨前の d (deuterium excess parameter)を基底流出水、雨水の d を直接流出水の値として、この 2 成分の混合と仮定し、以下の式を適用した。

$d_t = f \times d_{new} + (1-f) \times d_{old}$

$f = Q_{new} / Q_t$

Q：河川の流量

f：混合率

d：deuterium excess parameter

添え字 t、new、old：各時間の値、直接流出の値（雨水の値）、基底流出の値（降雨前の値）

地点 C および地点 K において、ピーク時の全流量は 0.6-0.7 m^3/s とほぼ同等であるが、全流量に占める直接流出量の割合は、地点 C がおおよそ 50-60%に対して、地点 K は 60-80%である。したがって、地点Kでは地点Cに比べ地下水から流出の影響が少ないことが伺われる。

図-45 に地点Cおよび地点Kの各サンプリングの $\delta^{15}N_{NO3}$-$\delta^{18}O_{NO3}$ ダイヤグラムを示す。地点Cでは、$\delta^{15}N_{NO3}$ が 6.7-7.5‰、$\delta^{18}O_{NO3}$ が-1.0-2.2‰であるのに対し、地点Kでは、$\delta^{15}N_{NO3}$ が 2.4-5.8‰、$\delta^{18}O_{NO3}$ が 0.6-12.0‰であった。$\delta^{15}N_{NO3}$ が地点Cでは比較的高いことから、土壌由来の硝酸や畜産廃棄物の影響を受けている可能性が考えられる[24]。また、地点Kでは $\delta^{15}N_{NO3}$、$\delta^{18}O_{NO3}$ ともに変動が大きいことから、時間経過とともに排出起源が大きく異なっている可能性が考えられた。そこで、高津らの同位体混合モデルを用い、負荷源別負荷割合をシミュレートしたところ（**図-46～47**）、地点Cでは、降雨前のサンプリングでは、ほぼ畑地由来であるのに対し、時間の経過とともに森林由来、水田由来からの NO_3-N が増加した。一方、地点Kでは、降雨前のサンプリングでは、水田：森林：畑地が 1：5：4 程度であったのに対し、降雨初期には、森林由来の NO_3-N の割合が増加し、その後、水田由来の割合が増加した。河川流量が平常時に近づくにつれ、畑地由来の割合が増加していることが推察された。これらのことから、地点Kにおける雨天時の窒素負荷源は時間経過ともに大きく変動していたことが示唆された。

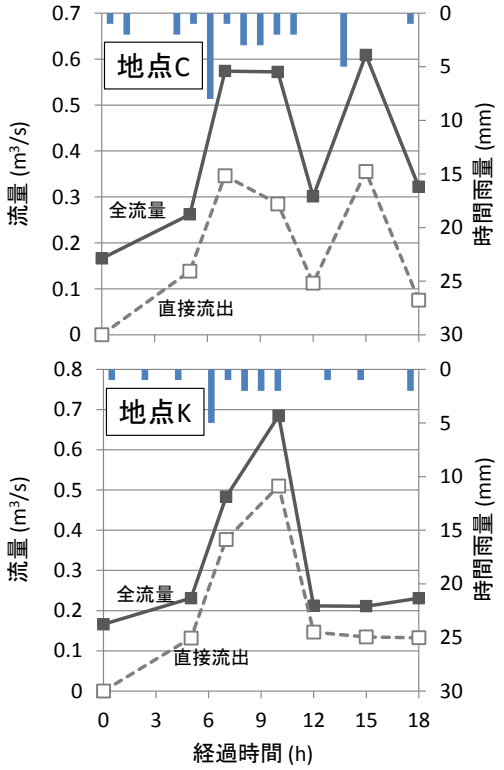


図-44　時間雨量および河川流量

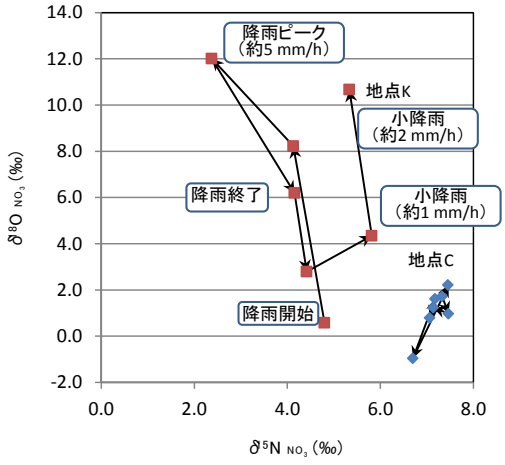


図-45　$\delta^{15}N$-$\delta^{18}O$ ダイヤグラム

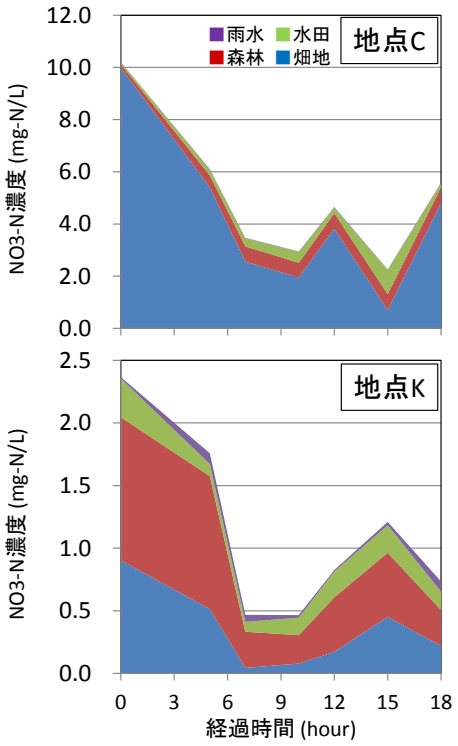


図-46 河川中の NO_3-N 濃度の変化

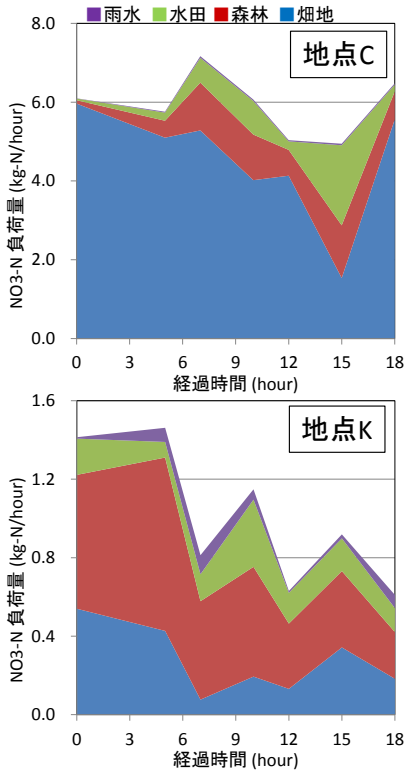


図-47 河川中の NO_3-N 負荷量の変化

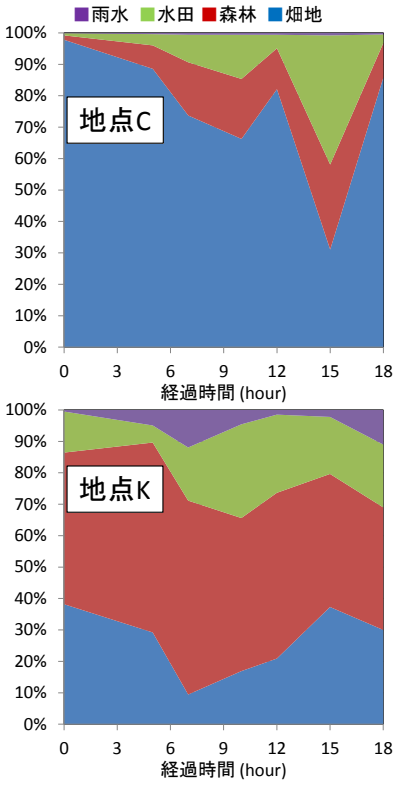


図-48 河川中の NO_3-N 推定負荷源割合の変化

3.3 まとめ

印旛沼流入河川である高崎川で晴天時と雨天時の、鬼怒川支流の山川で雨天時の安定同位体比に着目した負荷量調査を行った。得られた知見を以下に示す。

(1) 高崎川の雨天時において、水の同位体比を用いて成分分離を行ったところ、増水ピーク時の河川水の 80%が直接流出であることがわかった。

(2) 高崎川の雨天時の $\delta^{18}O_{NO_3}$を用いた解析から、増水時の硝酸態窒素負荷量の0～4%が雨水由来である可能性があった。

(3) 畑の割合が多い高崎川の小流域では増水時に $\delta^{15}N_{NO_3}$は低下することが明らかとなった。増水時には化学肥料等の $\delta^{15}N_{NO_3}$の低い硝酸態窒素の流出割合が増加したと考えられた。

(4) 安定同位体比モデルにより、雨天時の窒素負荷源の寄与率を推定した結果、流域の土地利用が主に市街地の地点では、窒素負荷源が時間経過とともに大きく変動し、流域の土地利用が主に畑地の地点では、窒素負荷源は時間経過に関わらずほぼ畑地由来であることが示唆された。

4. 雨天時の平均流出濃度の検討

わが国の湖沼などの閉鎖性水域では、種々の流入負荷削減対策が行われているにも関わらず富栄養化による水質障害が依然として解消していない湖沼が多くみられ、環境基準の達成率も河川や海域と比較して低い状態が長年にわたり継続している[26]。流域においては下水道整備や事業場排水の規制などの対策も進められ、閉鎖性水域への全体的な流入負荷量は漸減している水域も多いとみられるが、一方で総負荷に占める点源汚濁負荷の割合が減少し、山林、農地、市街地等からの非点源（=面源）汚濁負荷の割合が増加する状況となっている[27]。面源負荷の算定に用いられる負荷量原単位は一般に点源負荷のそれと比べて精度が低く、かつ雨天時負荷の評価が不十分なことなどから、実態より過小評価となっていると考えられる[28]。また現在、流域別下水道整備総合計画（流総計画）や湖沼水質保全計画等の策定にも用いられる汚濁負荷量原単位の各種資料における数値には極めて大きなばらつきがあることが明らかになっており[29]、さらに本研究の過年度調査結果などからも、降雨時の流出を的確に把握することの重要さを指摘[30]してきたところである。

こうしたことから、日本水環境学会ノンポイント汚染研究委員会などの場において議論を重ねた結果として、平成 27 年 1 月に改定された流域別下水道整備総合計画調査指針と解説（流総指針）では、市街地からの排出負荷量を単位面積当たりの年間平均汚濁負荷量原単位だけではなく、1 降雨（event）当りで汚濁負荷量を算定する方法についても参考情報を提示することとされた[31]。

今後の閉鎖性水域の水質保全対策の着実かつ効率的な進捗のためには、流域スケールでの栄養塩類等の流出などの物質動態の特性を十分に把握、予測したうえで的確な対策を講ずることが必要であり、本研究では、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。

雨天時における SS、有機物、栄養塩類等の流出特性を把握するため、特に夏期の台風等による豪雨を含む雨天時流出実態調査を行い、平均流出濃度に着目したデータ解析を行った。

4.1 調査方法

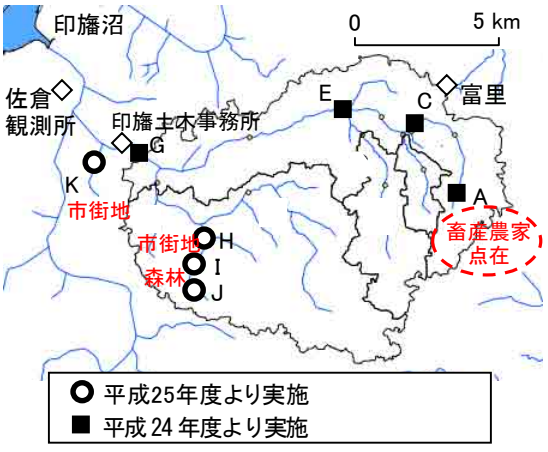
4.1.1 調査河川と水質調査地点

印旛沼流入河川の鹿島川の支流である高崎川を対象に、集水域の土地利用情報を整理し、栄養塩類の負荷量調査を実施した。**図-49** は、高崎川の集水域と採水調査地点である。高崎川の集水域の面積は、79km^2 である。

表-6 に雨天時を実施した日と地点、降雨概要として佐倉観測所での連続降雨（4 時間 0 mm が続いたら不連続）としての総雨量、時間最大雨量を示す。各調査において、おおよそ数時間おきに 5 回～10 回、流量観測と水質調査を行った。

表-6　雨天時調査実施日、実施地点及び降雨概要

調査実施日	実施地点	佐倉観測所の累積降雨量(mm)	佐倉観測所の時間最大雨量(mm)
H24/11/6	A,C,E,G	38.5	16.5
H25/12/18～20	G～K	45	4.5
H26/1/8～9	A,C,E,G～K	23.5	5
H26/1/26	A,C,E,G～K	1	1
H26/2/7～8(降雪)	G～K	35	4.5
H26/3/13～14	G～K	12.5	5.5
H26/7/18～19	G～K	0.5	0.5
H26/9/7	G～K	10.5	2
H26/9/24～26	A,C,E,G～K	9	4
H26/10/5～6(台風)	G～K	176.5	19.5
H26/10/13～14	A,C,E,G～K	19	4.5
H27/7/15～16	A,G,J,K	6.5	3
H27/9/25	A,C,E,G～K	13	4
H27/11/14～15	G～K	28.5	4.5
H28/1/17～18	G～K	62	9.5



高崎川の集水域と調査地点

図-49　調査地点

4.1.2 雨天時調査のデータの解析方法

雨天時調査の結果を解析するにあたり、気象庁佐倉観測所の1時間ごとの雨量データを使用した。

調査データはSS、DOC、TN、TP、Fe、Mn、Cu、Zn、Alについて、流域からの単位面積当たり負荷量である比負荷量Lと、流域の単位面積当たりの流量である比流量QとのL-Q式で整理した。A、C、E及びG地点については、平成25年1月から2月にかけて4回実施した晴天時データ(2.1.3.1参照)も併せてL-Q式で整理した。

一方、特に市街地からの非点源汚濁負荷については、晴天時に堆積して雨天時に降水によって運ばれ公共用水域に排出されると考えられる。前述の通り市街地からの排出負荷量はha あたりの年間平均汚濁負荷量原単位ではなく、1 降雨（event）当りで汚濁負荷量を算定する方が実態の流出現象を把握しやすいとの知見も得られている[31),32)]ことから、得られた雨天時データについて、1 降雨あたりの平均流出濃度（Event Mean Concentration; EMC）により整理し、当該1降雨の時間帯における総降雨量や時間最大降雨量などとの関係について考察した。なお、総降雨量や時間最大降雨量を決定する降雨の時間帯は、ここではEMCを算出する時間帯、すなわち、EMCを算出するための実濃度測定用水試料をサンプリングしている時間帯とした。

また、EMCと総雨量の関係と1降雨における総流出水量と総雨量の関係を求め、各降雨の総雨量から雨天時の年間流出負荷量を算定するとともに、降雨前のデータにより晴天時の年間流出負荷量を推定し、年間総負荷量の推定を試みた。

4.2 結果と考察

4.2.1 栄養塩等・微量金属の流出負荷特性

各調査地点の栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係を図-50～57 に示す。各地点それぞれにおいて比流量と各栄養塩等の流出比負荷量の関係を、以下のL-Q式で表した。

$$L=aQ^b$$

ただし、L：比負荷量

Q：比流量

a, b：定数

定数は比流量と比負荷量をそれぞれ常用対数に変換して最小二乗法により回帰直線を求めて算出した。定数bは増水時の濃度変化を反映し、b<1は濃度が低下する希釈型、b>1は濃度が増加する洗い出し型、b=1は濃度が変化しない一定型に分類される[13)]。

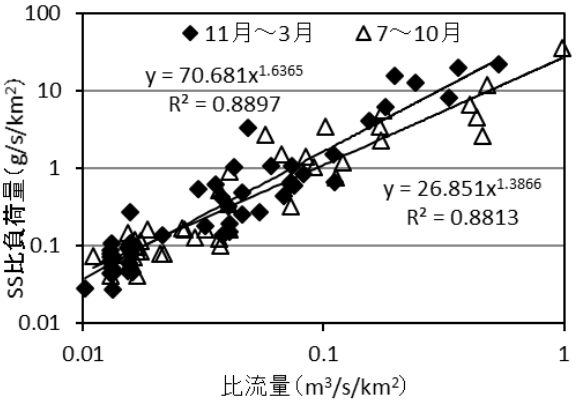
土地利用の70%以上が市街地になる地点Kと60%以上が市街地になる地点J、土地利用の80%以上が畑地になる地点Aに着目し、地点KとJでは、11月～3月と7～10月の期間毎に、地点Aでは、7月～10月と11～2月の期間毎に区分して、それぞれにおいてL-Q式で表した。定数bに着目すると、SSは地点Jの7～10月を除き洗い出し型であった。地点KとJでは、地点Kの11月～3月のTPが一定型で、それ以外全て希釈型であった。地点Aでは、11～2月のDOCが一定型、TNが希釈型、7月～10月のDOCとTPが洗い出し型であった。また、期間の違いによる大きな相違は見られなかった。地点C、E、Gは、土地利用の70～44%が畑地になり、地点Aと同様の傾向であった。地点Jの下流に位置する地点Iの土地利用は約30%が森林で約50%が市街地であり、その下流に位置する地点Hは地点Iより市街地比率が高い。これらの地点は、TPが一定型であること以外は、地点K、Jとほぼ同様であった。

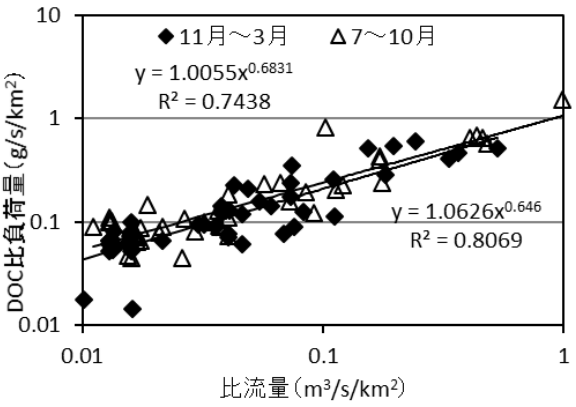
各調査地点の微量金属の流出比負荷量と比流量の関係を図-58～65 に示す。栄養塩等と同様にL-Q式で表した。地点K、J及びAの定数bに着目すると、地点Aは、D-Mn以外すべてが洗い出し型であった。地点Kは、D-Znとトータルすべてが洗い出し型で、D-Cuが一定型で、これら以外が希釈型であった。地点Jは、Fe、Mnが希釈型で、Alが一定型であったこと以外は、地点Kと同じであった。地点C、E、Gは、相関の低いD-Mnを除き、地点Aと同様の傾向であった。地点H、Iは、Mn、D-Cu、D-Znを除き、地点K、Jとほぼ同様であった。

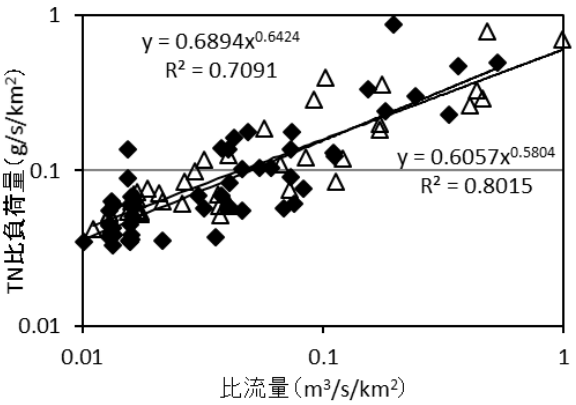
4.2.2 市街地における平均流出濃度

地点Kにおける栄養塩等の1降雨あたり平均流出濃度（EMC）と当該降雨の現地調査時間帯(EMC算出時間帯)の総雨量・時間最大雨量及び先行無降雨日数（調査日前の無降雨日数）との関係を図 66～68 に示す。

DOC、TN、TPでは、EMCと総雨量・時間最大雨量との間には一定の相関が認められた。市街地からの非点源汚濁負荷は、晴天時に堆積して雨天時に降水によって運ばれると推定されることから、先行無降雨日数との関係も考えられたが、いずれのEMCも先行無降雨日数とは、相関関係が認められなかった。なお、これらの傾向は地点Jにおいても同様であった。また、ここで得られたTN、TPのEMCは、既往調査から算出され、流総指針[31)]に掲載されている「1降雨当りの平均水質」の範囲内であった。







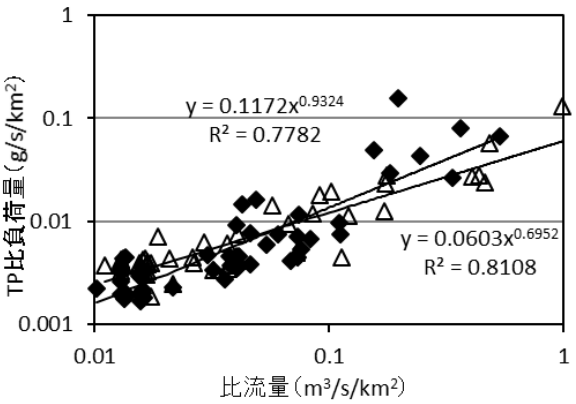
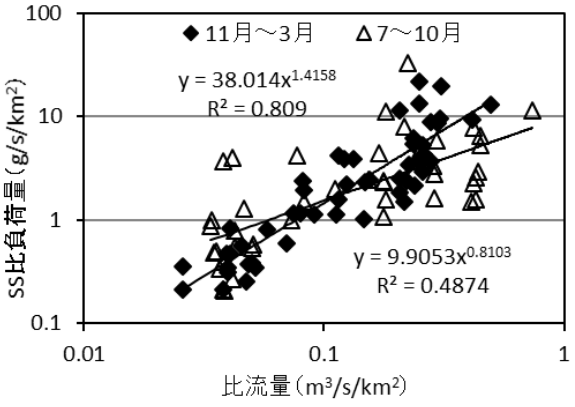
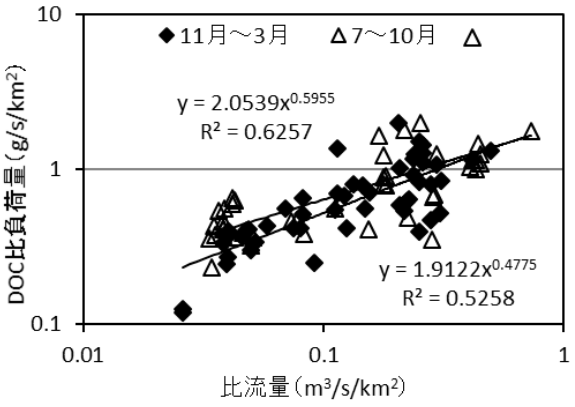
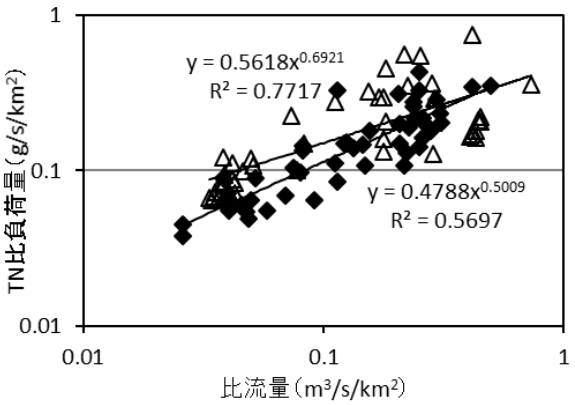


図-50　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 K）







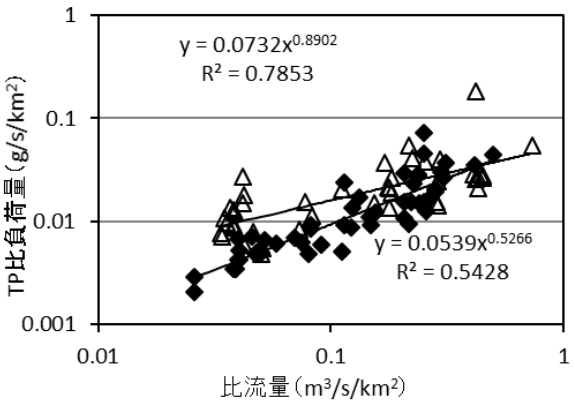
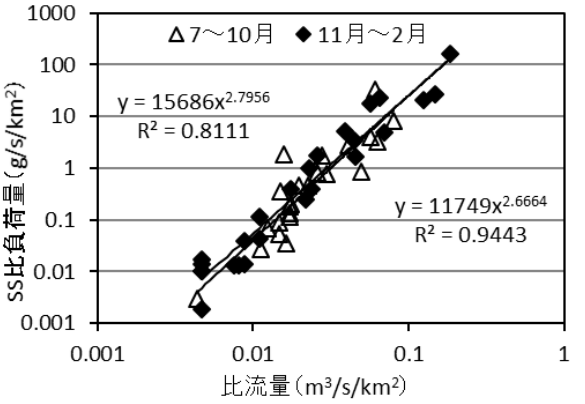
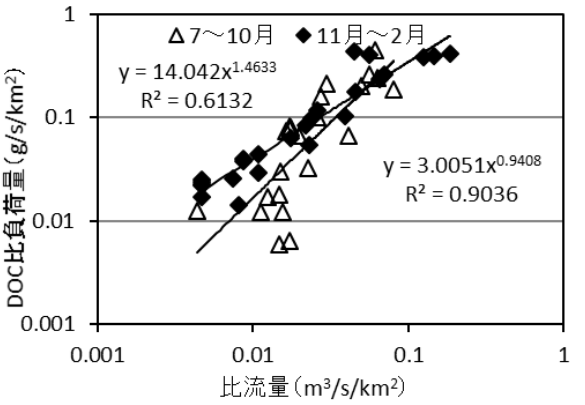
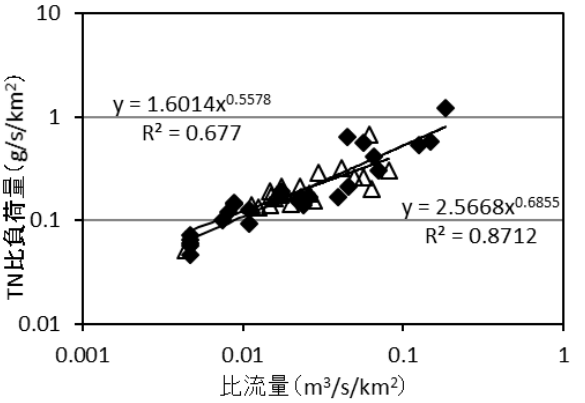


図-51　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 J）







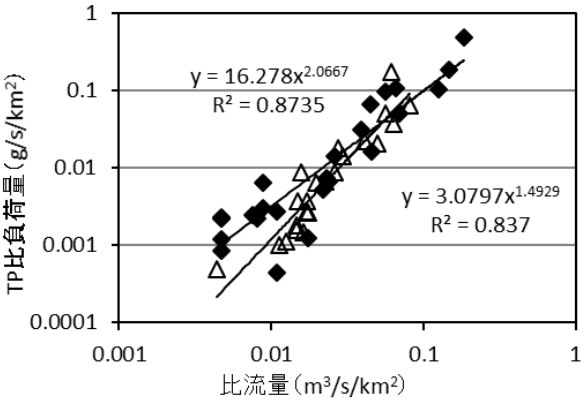
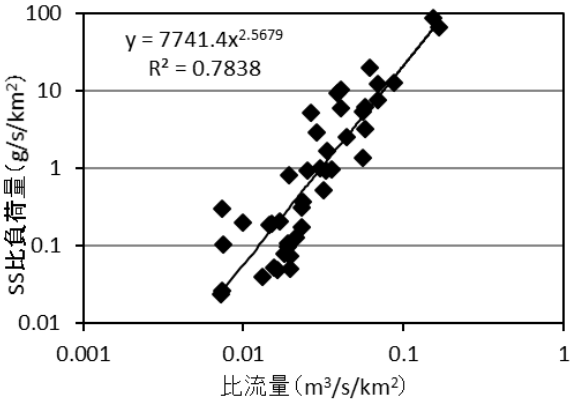
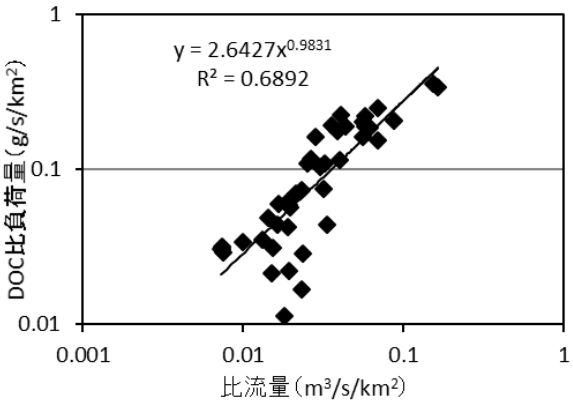
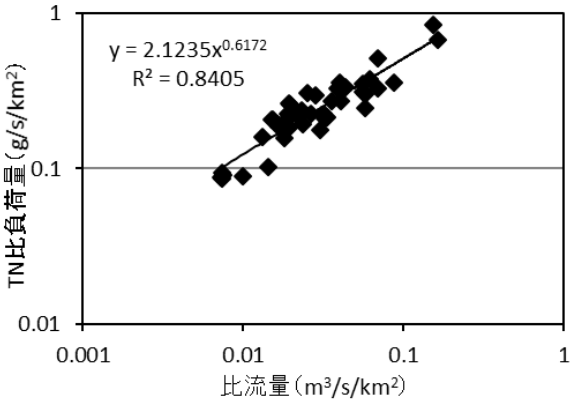


図-52　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 A）







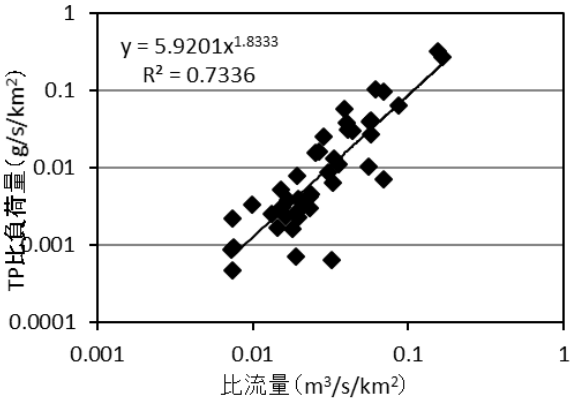
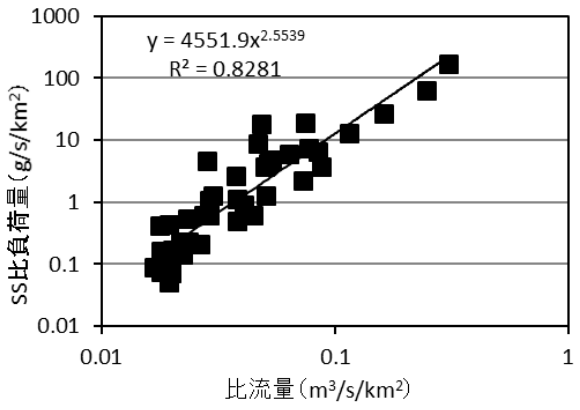
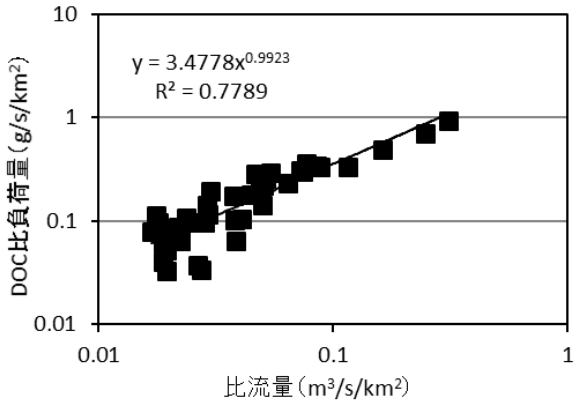
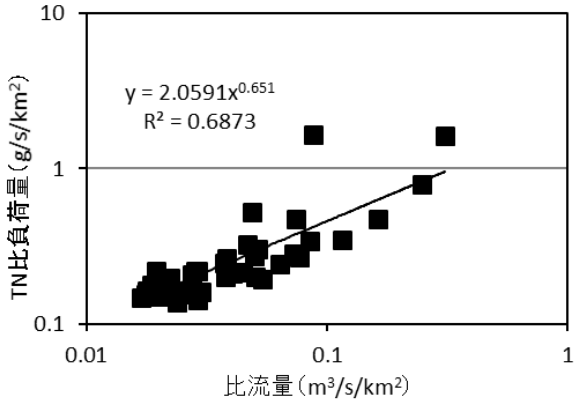


図-53　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 C）







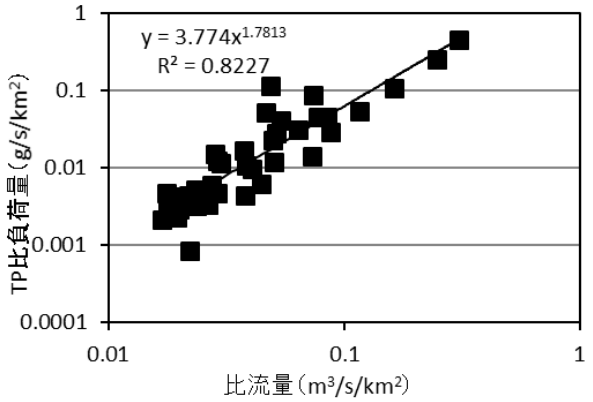
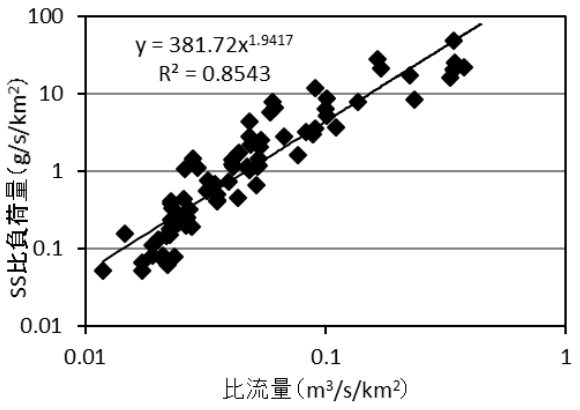
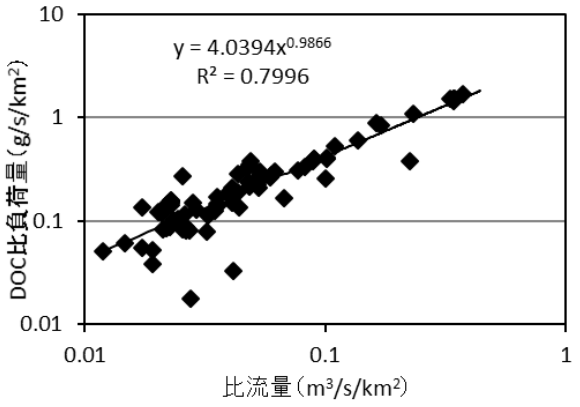
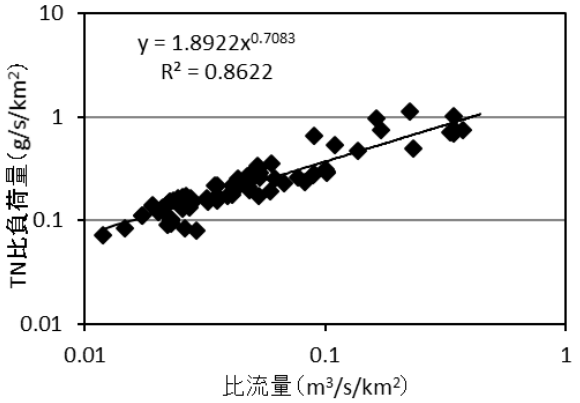


図-54　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 E）







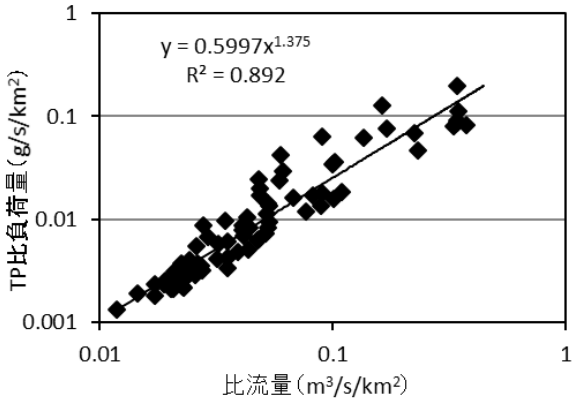
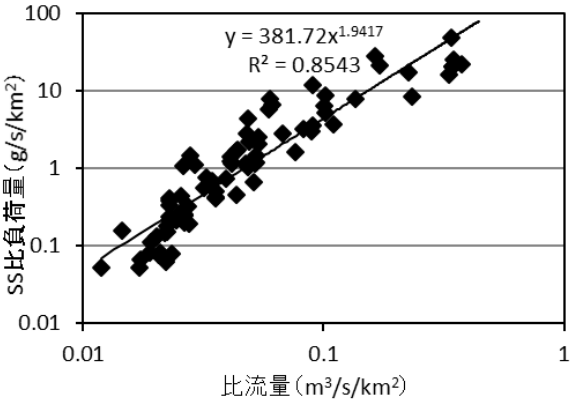
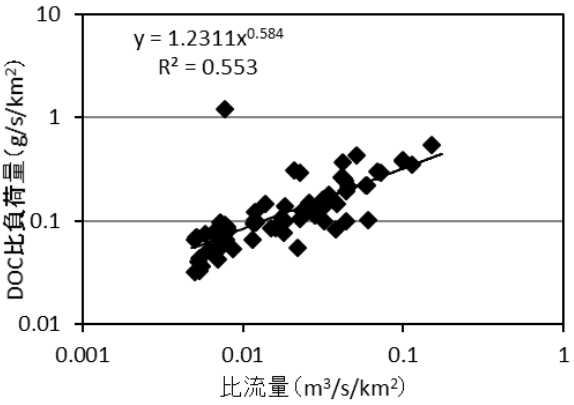
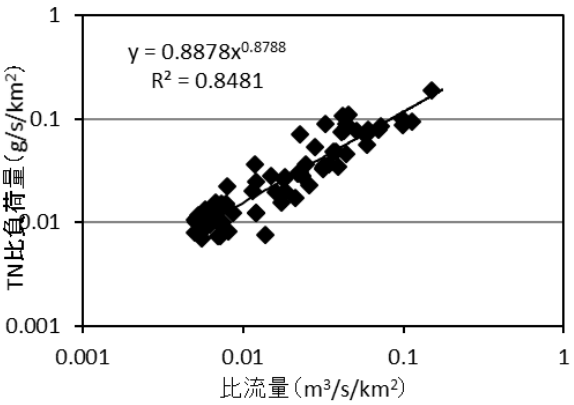


図-55　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 G）







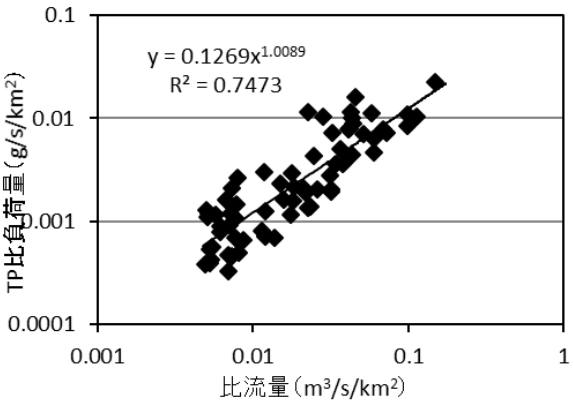
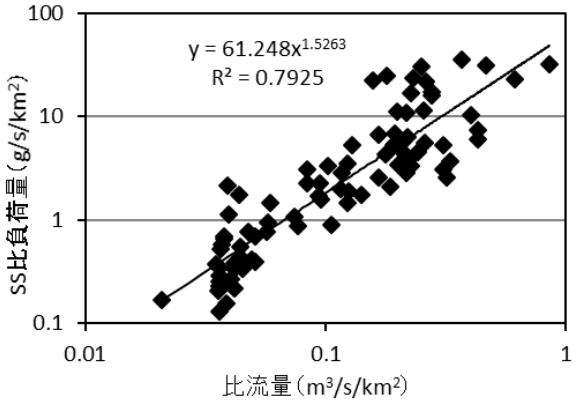
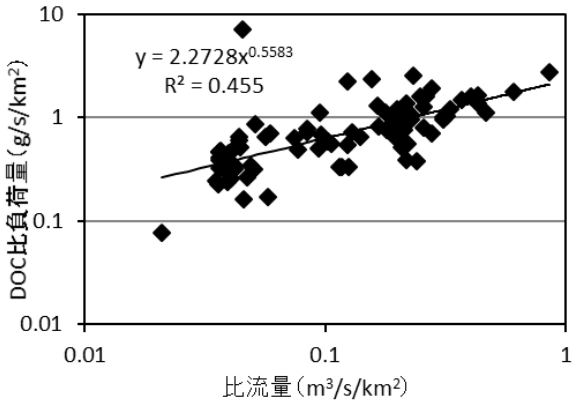
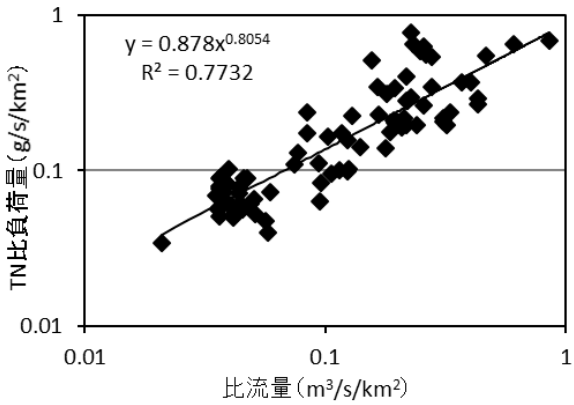


図-56　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 H）







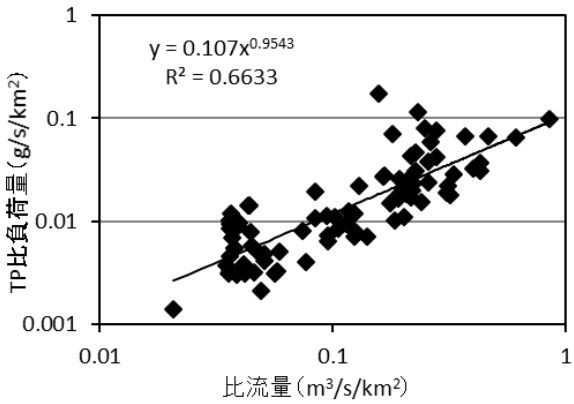


図-57　栄養塩等の流出比負荷量と比流量の関係
（地点 I）

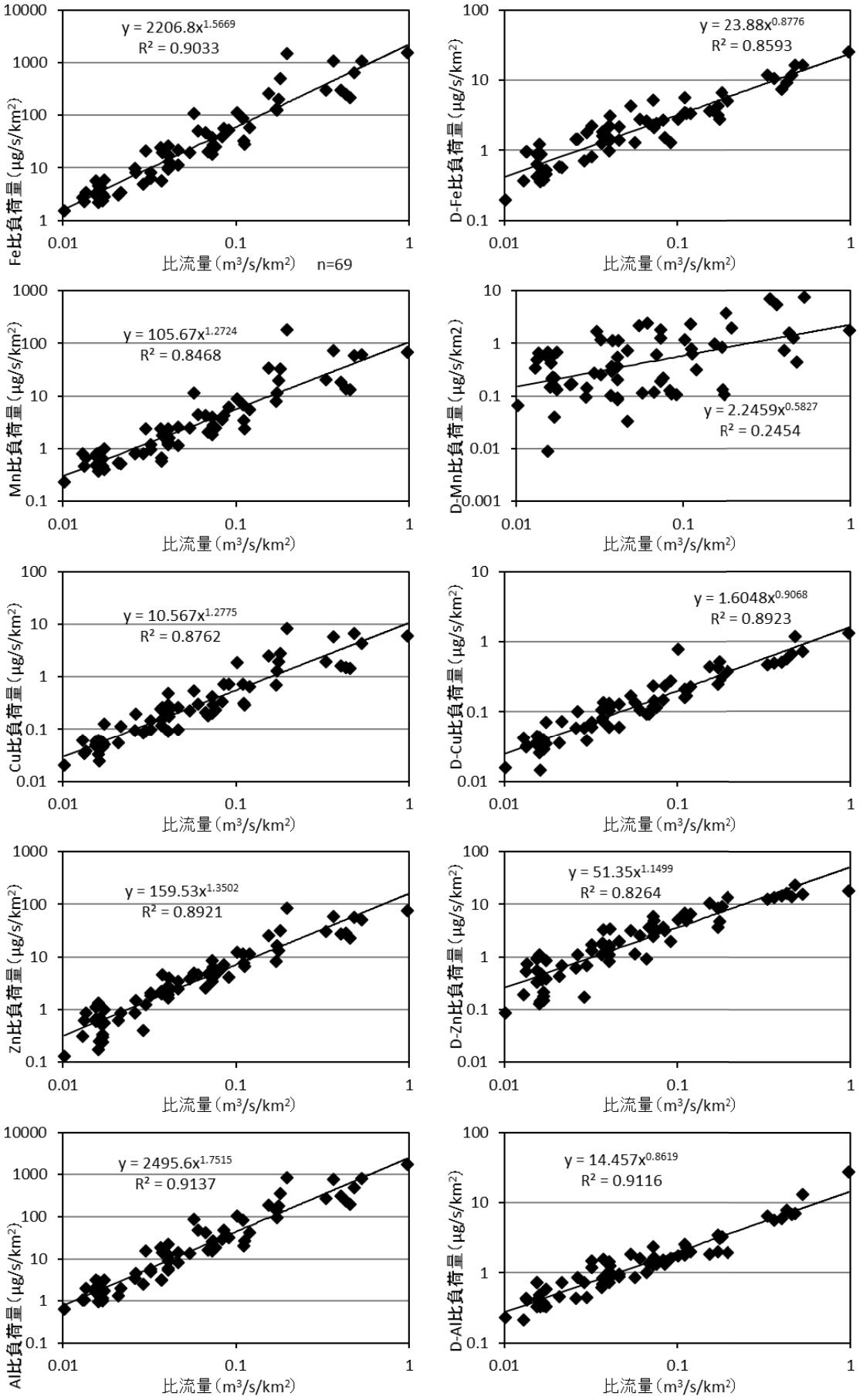


図-58　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点K）

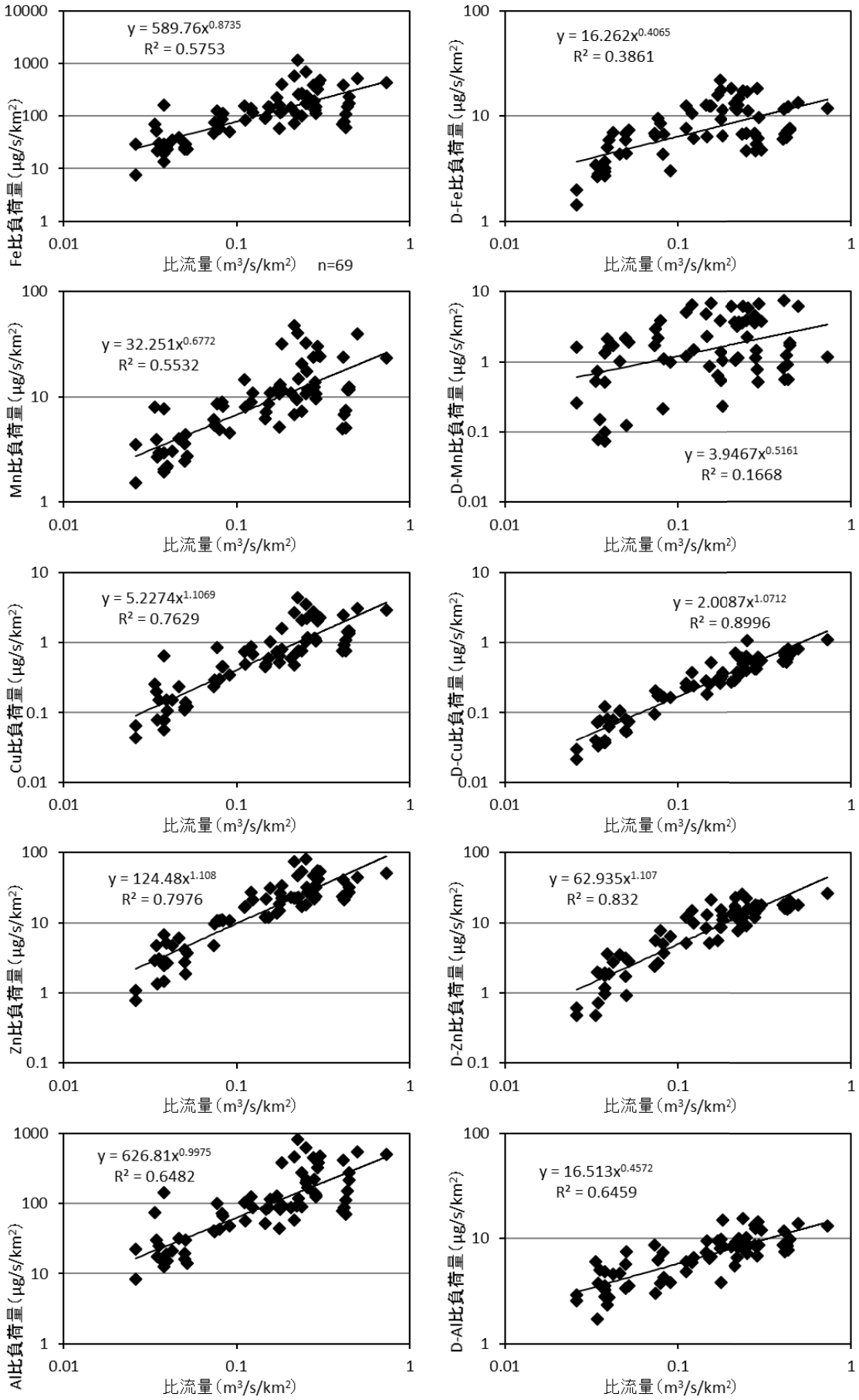


図-59　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 J）

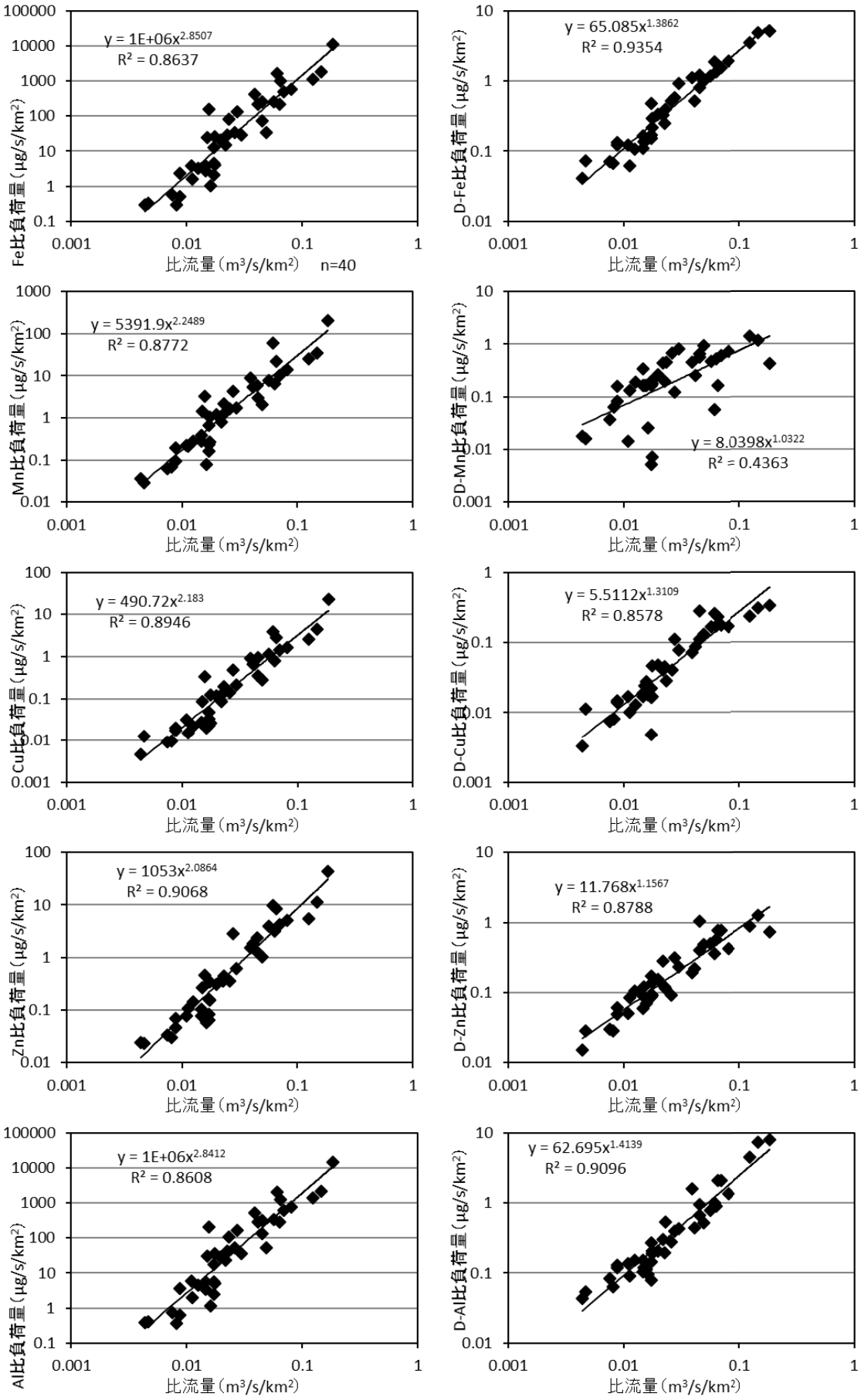


図-60　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 A）

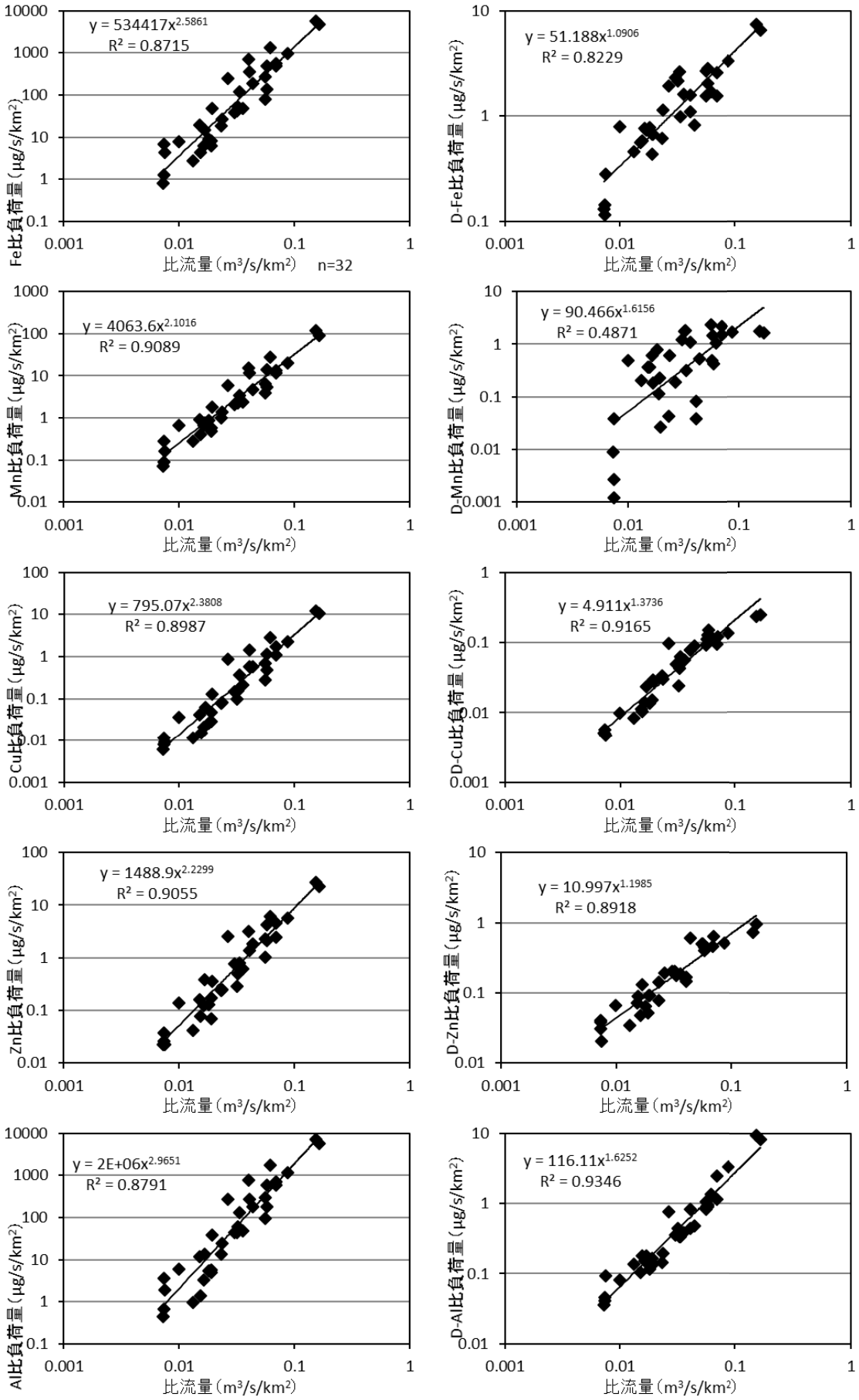


図-61　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 C）

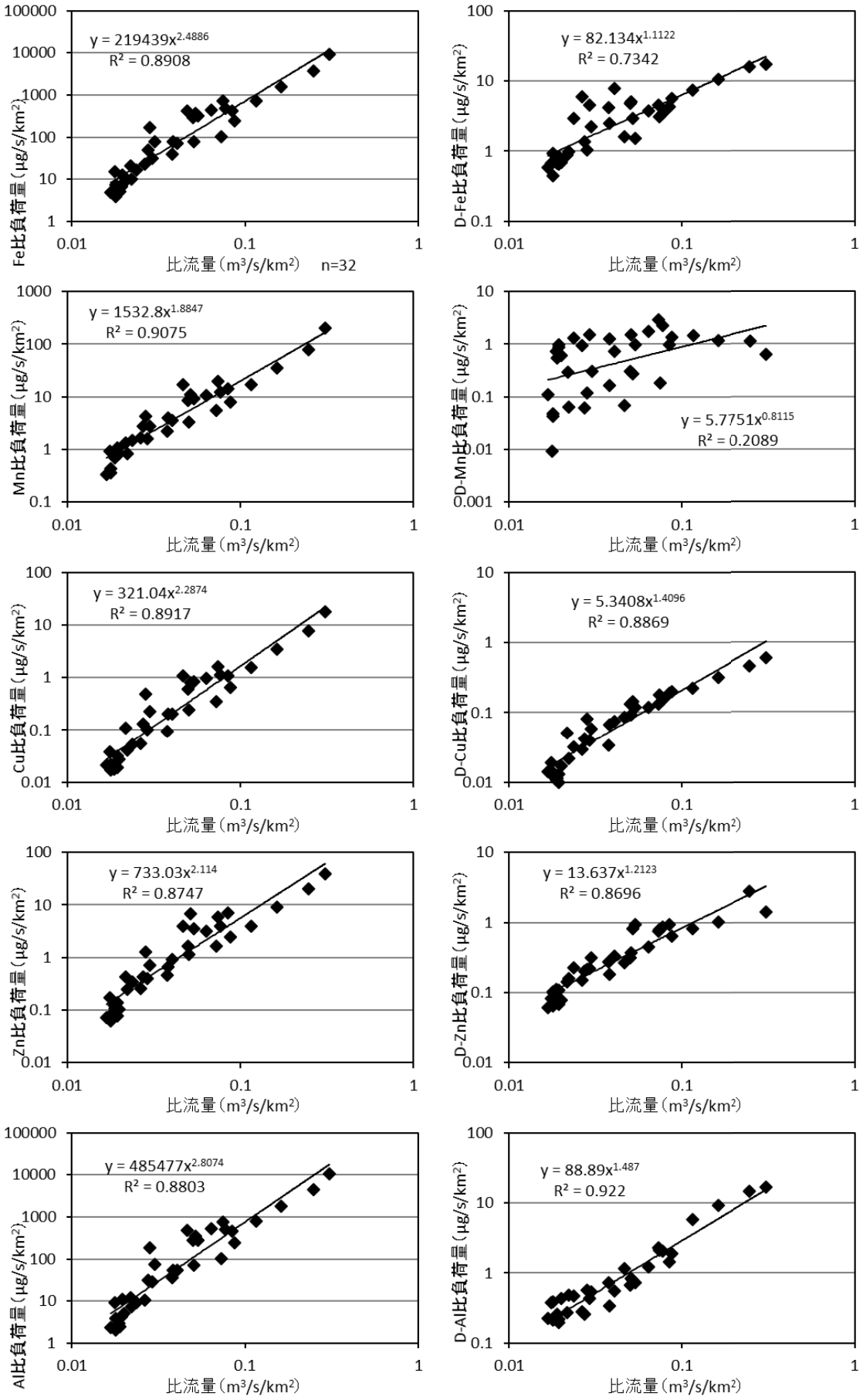


図-62　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 E）

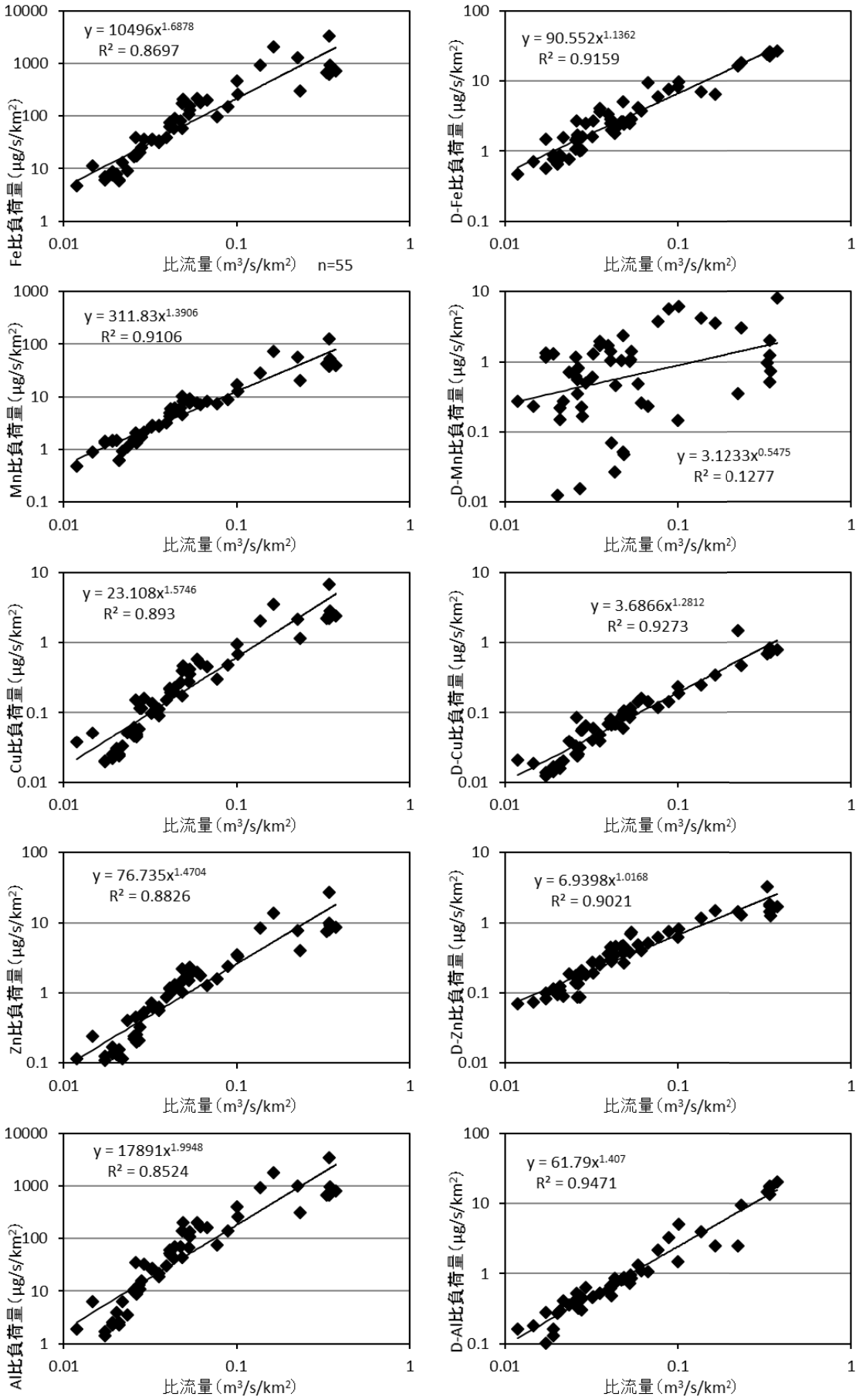


図-63　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 G）

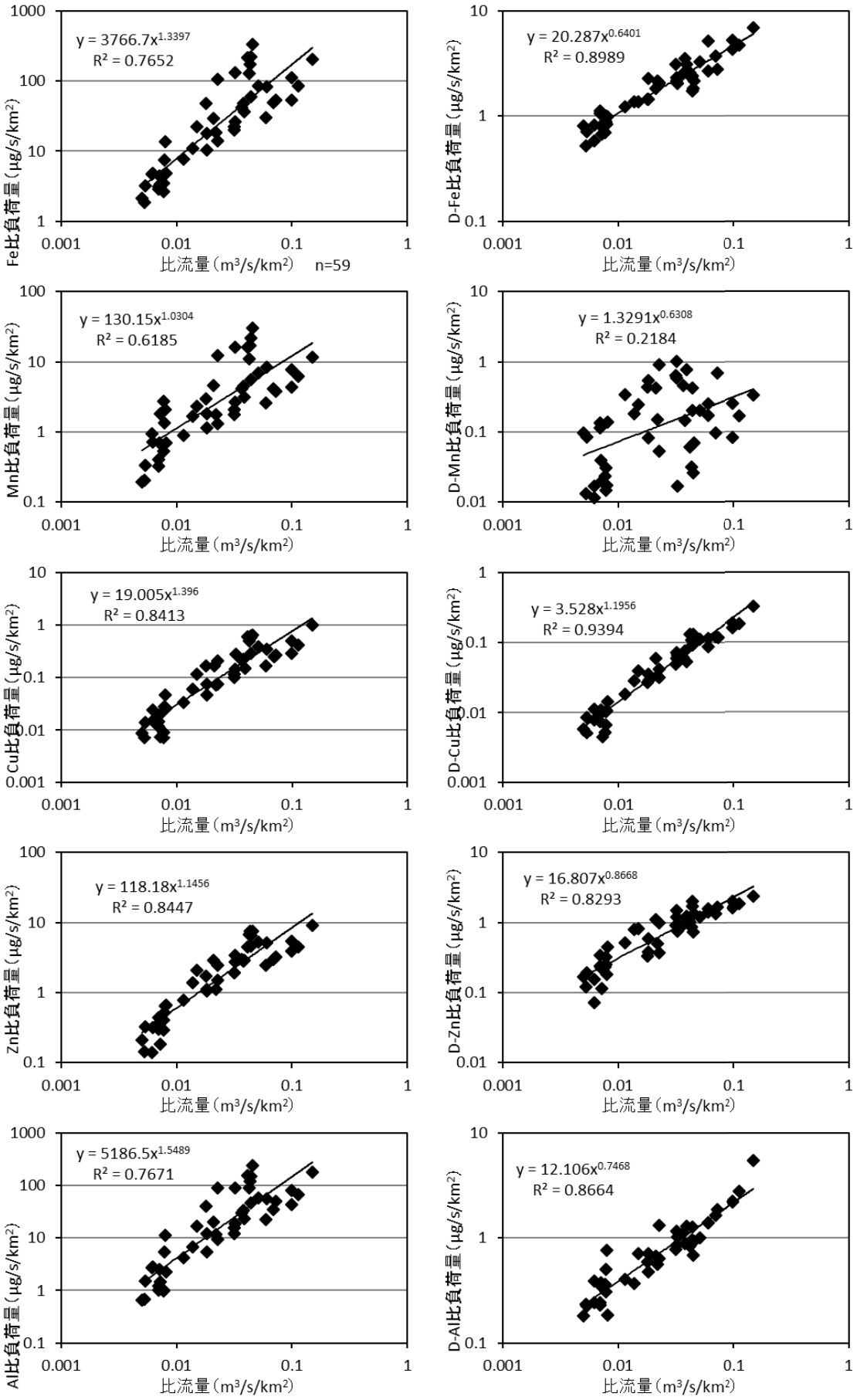


図-64　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点 H）

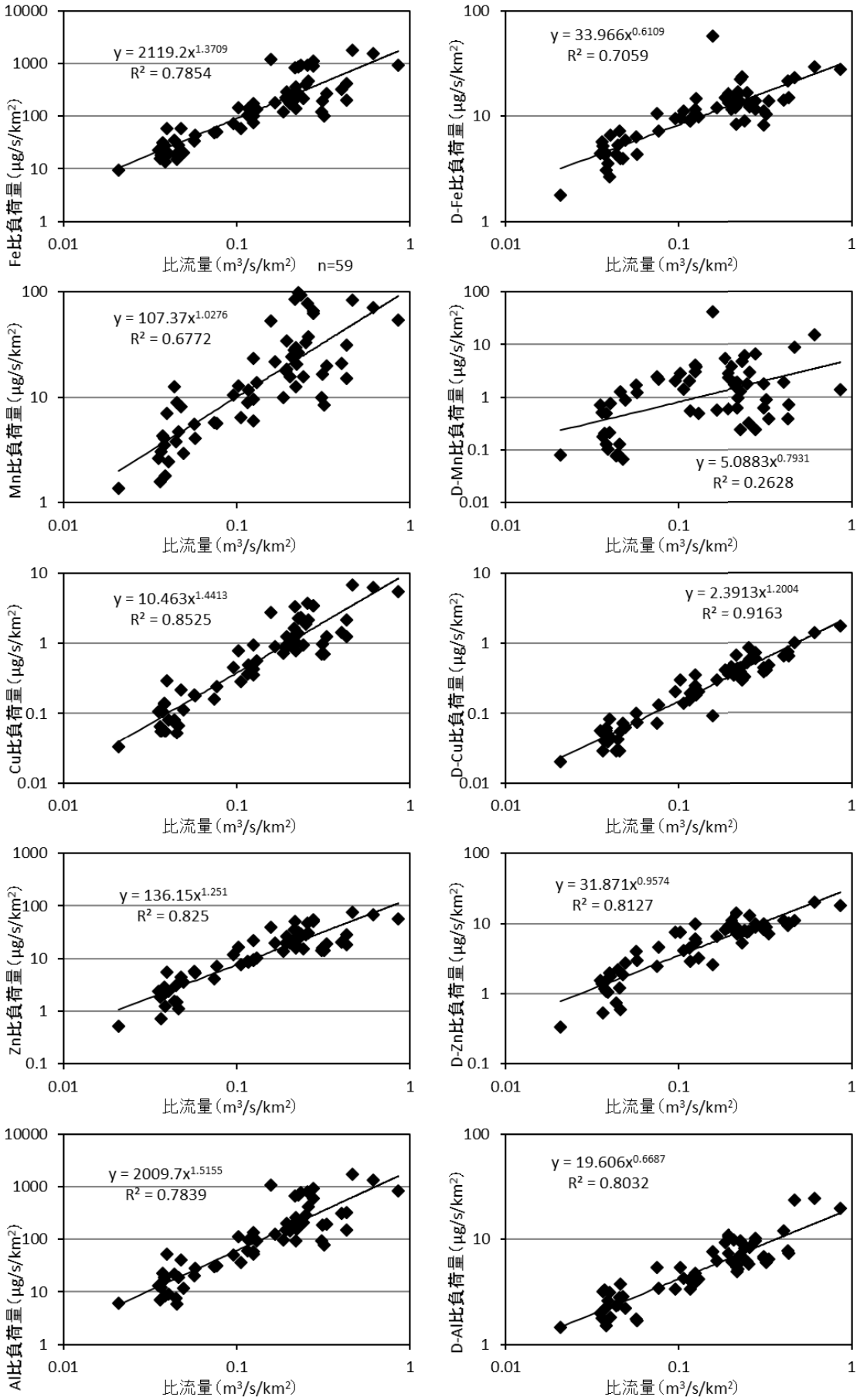
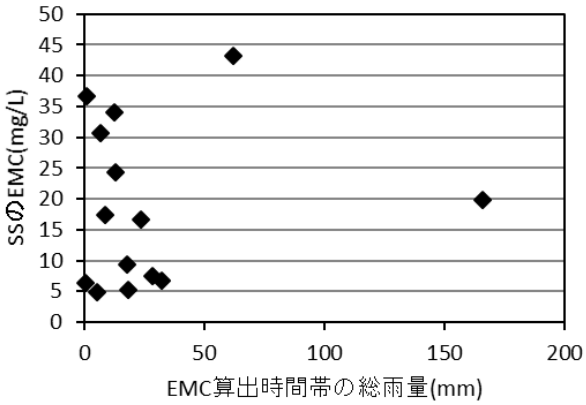
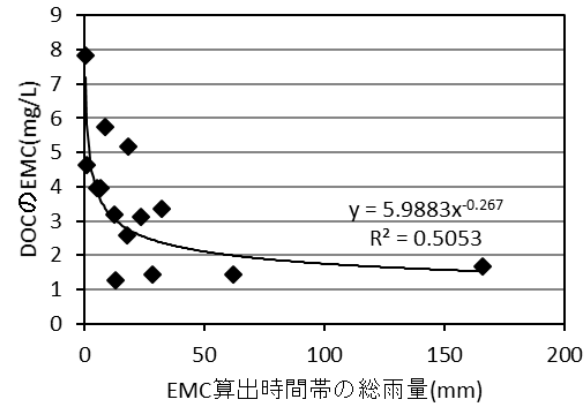
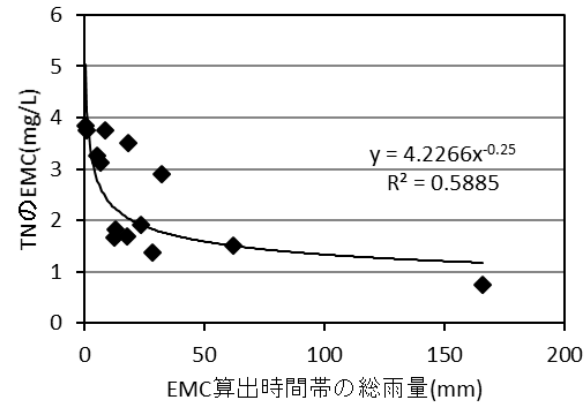


図-65　微量金属との流出比負荷量と比流量の関係（地点Ⅰ）







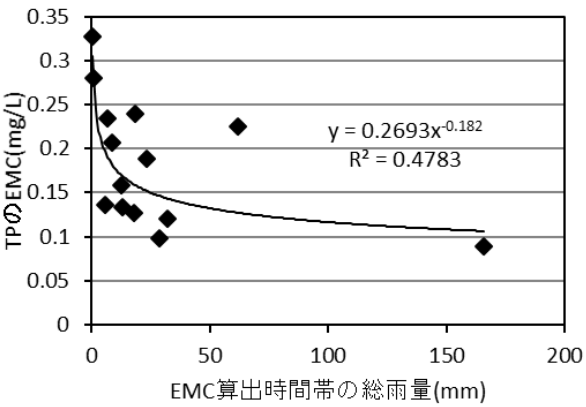
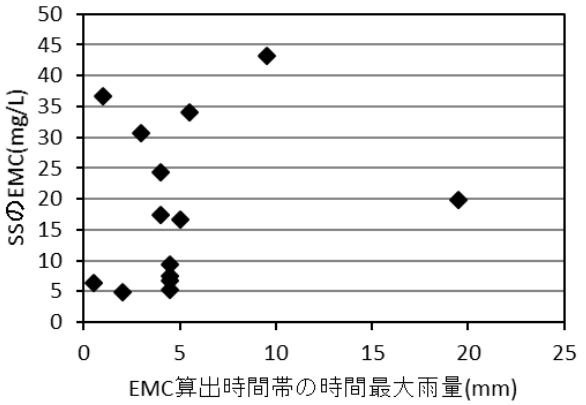
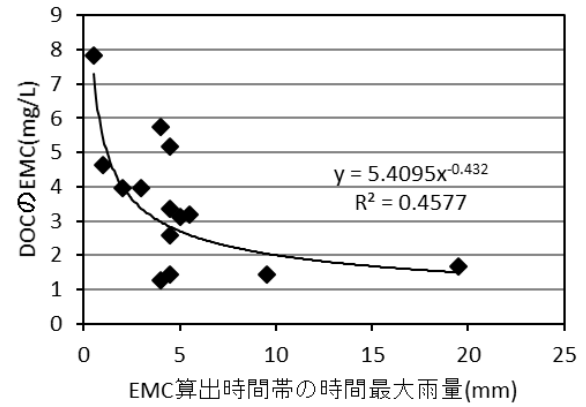
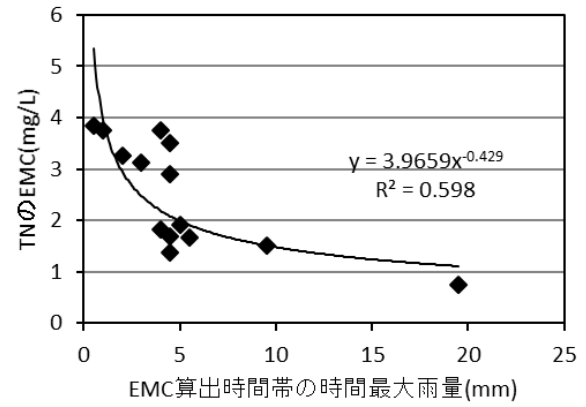


図-66　栄養塩等の EMC と総雨量の関係（地点 K）







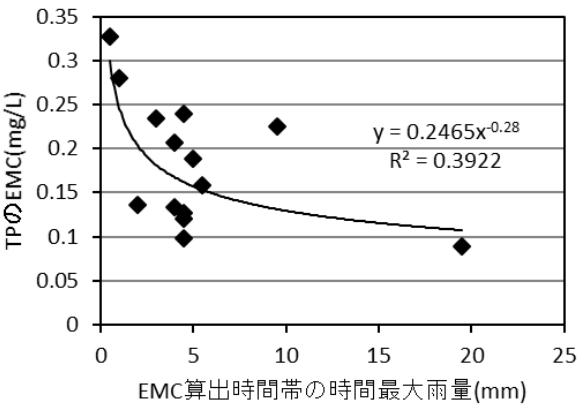


図-67　栄養塩等の EMC と時間最大雨量の関係（地点 K）

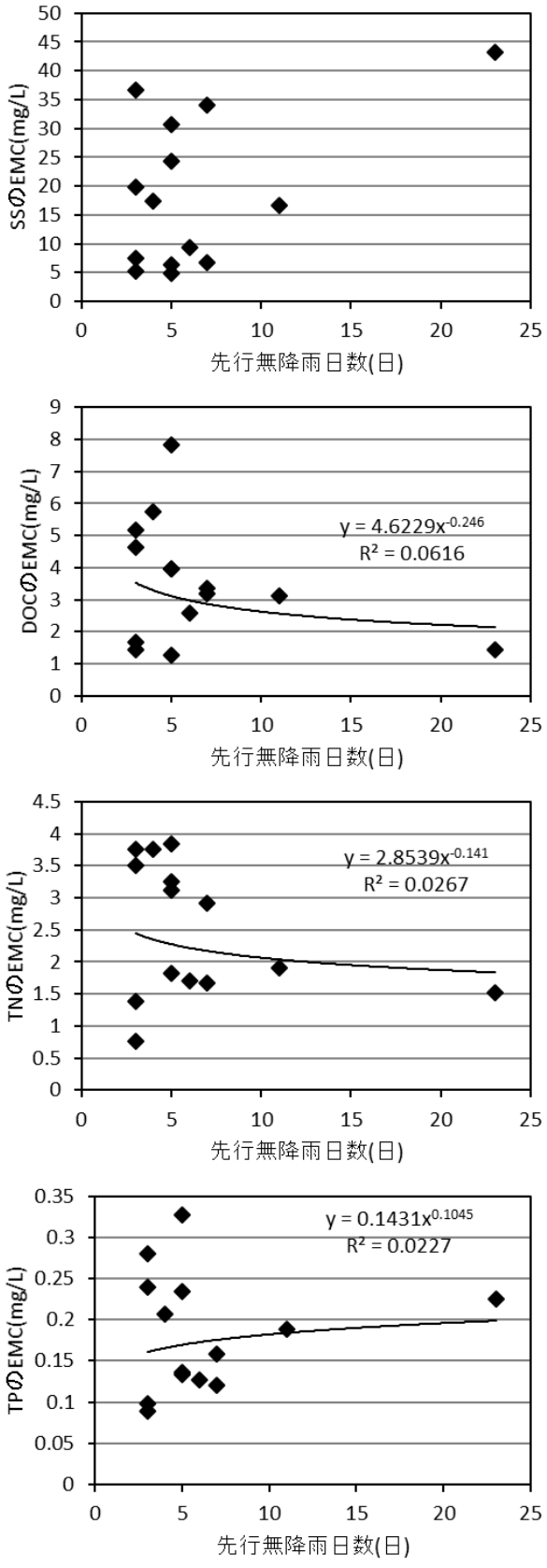


図-68　栄養塩等の EMC と先行無降雨日数の関係
（地点 K）

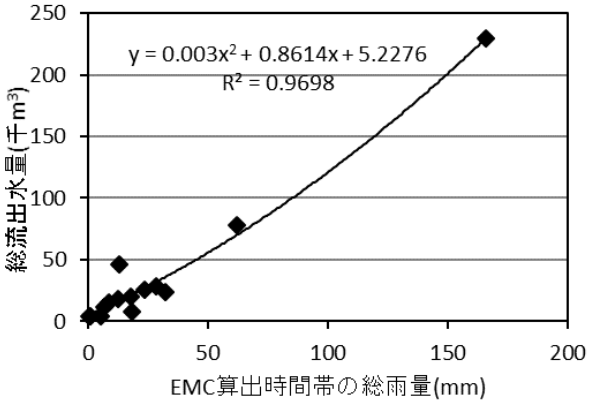


図-69 EMC 算出時間帯の総雨量と総流出水量の関係
（地点 K）

これらの結果から、市街地の DOC、TN、TP の排出負荷量は、EMC とその対象降雨の総雨量・時間最大雨量との関係を把握し、年間の降雨イベント毎の排出負荷量を算出・合計することにより、より精度よく類推できると考えられた。

4.2.3　市街地における平均流出濃度による年間総負荷量の推定

地点 K における EMC 算出時間帯の総雨量と総流出水量の関係を**図-69** に示す。これらには、一定の相関が認められ、最小二乗法により近似式（**図-69** 中）を求めた。

総雨量から**図-66** 中の近似式により EMC を、**図-69** 中の近似式により総流出水量を求め、それらを乗ずることにより、1 降雨での流出負荷量が求められる。これを 1 年分積算し、雨天時の年間総負荷量とした。なお、ここでは雨量 0mm が 12 時間連続した場合に降雨が途切れたものとし、途切れない降雨に含まれる雨量 0mm の時間は雨天時とした。

一方、雨天時調査データのうち、降雨前の流出負荷量の平均値を晴天時の流出負荷量とみなし、前述の雨天時に該当しない時間を晴天時とし、晴天時の流出負荷量を算出した。

地点 K における窒素・リンについて、平成 23 年から 27 年の雨量データより、各年の雨天時及び晴天時の年間総負荷量求め平均した結果を**図-70** に示す。なお、併記している原単位法では、流総指針[31]に掲載されている湖沼水質保全計画印旛沼第 6 期の原単位、GIS データより算出した山林・水田・畑地・市街地面積と千葉県提供の平成 7 年現在人口・家畜数を用い算出した。

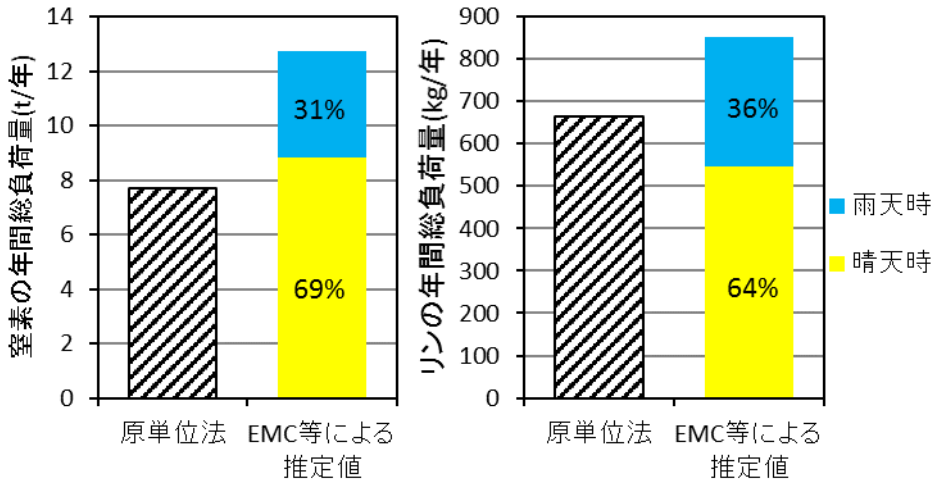


図-70 窒素・リンの年間総負荷量（地点 K）

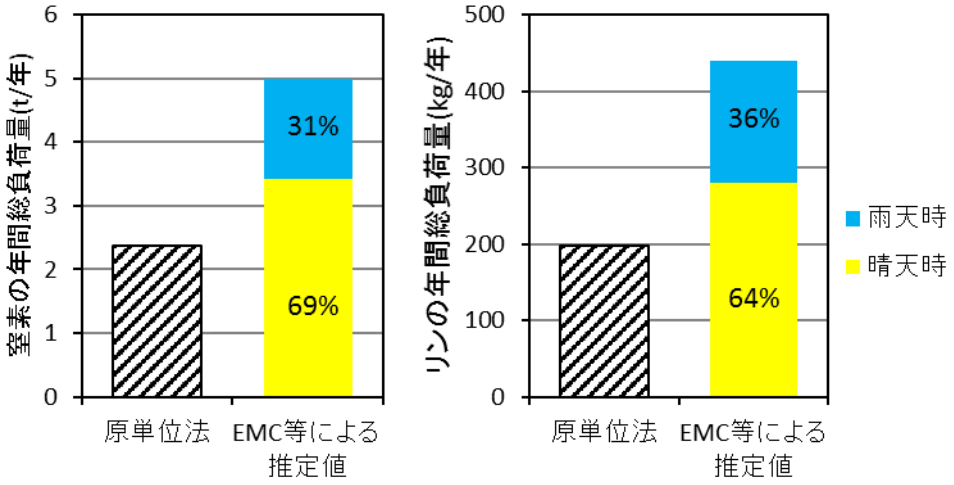


図-71 窒素・リンの年間総負荷量（地点 J）

同様に、地点 J における同様の結果を図-71 に示す。地点 K、J ともに、窒素の年間負荷量の 31%が雨天時、69%が晴天時、リンの年間負荷量の 36%が雨天時、64%が晴天時であった。

原単位法における負荷量のうち、その占める割合が高いものは、いずれの地点においても市街地からの面源汚濁負荷で、地点 K で 8～9 割、地点 J で 6～7 割であった。湖沼水質保全計画印旛沼第 6 期の市街地の原単位は、総雨量 17mm 以下、なおかつ、最大時間雨量 4mm/hr 以下の 3 降雨 7 地点の現地調査[33]によっている。EMC 等による推定値には、総雨量 150mm 以上、なおかつ、最大時間雨量 20mm/hr 程度の雨天時調査結果も反映されている。平間ら[33]は、調査時の最大時間雨量または平均降雨強度が大きいほど、実測調査から求めた原単位の値が大きくなる傾向が見られるとしており、ここで求めた年間負荷量の原単位法と EMC 等による推定値の相違は、調査時の降雨規模の違いが大きな要因の一つと考えられる。

4.3 まとめ

印旛沼流入河川である高崎川で雨天時の平均流出濃度（EMC)に着目した負荷量調査を行った。その結果得られた結果を以下に示す。

(1) 流域の土地利用が主に市街地の地点と主に畑地の地点における栄養塩等の L-Q 式を季節毎に求めた結果、大きな季節変動は見られなかった。

(2) 流域の土地利用が主に市街地の地点における雨天時の EMC の傾向について検討した結果、DOC、全窒素、全リンの EMC は総雨量・時間最大雨量との相関がみられた。

(3) 雨天時の平均流出濃度（EMC)を用い、雨天時の市街地からの栄養塩の年間流出負荷量の推計手法を考案した。

5 おわりに

霞ヶ浦と印旛沼流域での流入河川の窒素、リン、微量金属濃度と土地利用の関係を検討し、晴天時及び雨天時の溶存態・粒子態の金属の流出特性を把握した。

窒素・酸素安定同位体比解析により栄養塩類の流出機構を調査し、高崎川（印旛沼流域）における雨天時の窒素負荷源の寄与率を推定した結果、高崎川上流部および市街地では、晴天時は畑地由来の窒素負荷が高く、降雨時は水田や森林由来の窒素負荷が増加すること等明らかにすることができた。

雨天時の平均流出濃度（EMC)を用い、雨天時の市街地からの栄養塩の年間流出負荷量の推計手法を提案するとともに、晴天時/雨天時それぞれの栄養塩の流出負荷の寄与率を解明した。

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)平成 13 年版数値地図 50m メッシュ（標高）日本－Ⅱ、国土地理院

9)平成 21 年度利根川流域別下水道整備総合計画に関する基本方針策定調査報告書、利根川流域別下水道整備総合計画検討委員会（2009）

10)黒田清一郎、田渕俊雄(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.

11)志村もと子、田渕俊雄(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.

12)鈴木穣、小森行也、岡安祐司(2007)、流域における物質動態特性の解明と流出モデルの開発（2)、平成 19 年度下水道関係調査研究年次報告書集、土木研究所資料第 4123 号、117-126.

13)岩田杉夫、遠藤忠嗣、井上隆信、横田久里子、大久保陽子(2013)、中小河川からの栄養塩負荷の流出特性、水環境学会誌、36(2)、39-47.

14)永田 俊（2010）各種安定同位体を用いた流域窒素負荷の診断、地球環境 15(2)、189-194

15)和田英太郎（1986）生物関連分野における同位体効果―生物界における安定同位体分布の変動―、RADIOISOTOPES 35、136-146

16)酒井均、松久幸敬（1996）安定同位体地球化学、初版、東京大学出版会

17)高津文人、河口洋一、布川雅典、中村太士（2005）炭素、窒素安定同位体自然存在比による河川環境の評価、応用生態工学 7(2)、201-213

18)Kendall, C., E. M. Elliot and S. D. Wankel（2007）Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems. In: R. Michener and K. Lajtha, eds., Stable isotopes in ecology and environmental science. 2nd ed., Blackwell Scientific, Oxford, 375-449.

19)大手信人（2008）大気降下物としての窒素が水源域に与える負荷、永田俊・宮島利宏（編） 流域環境評価と安定 同位体－水循環から生態系まで、京都大学学術出版会、59-69

20)赤松 良久（2010）河床堆積物の炭素・窒素同位体比に基づく流域環境評価、土木学会水工学委員会環境水理部会研究集会
<http://www.jsce.or.jp/committee/hydraulic/kankyousuiri/_workshop/h22/docs/08akamatsu.pdf>

21)高津文人、三浦真吾、今井章雄、小松一弘、川崎伸之、佐藤貴之、篠原隆一郎、渡邉未来、林誠二、中島泰弘、尾坂兼一 (2015) 硝酸イオンの酸素と窒素の安定同位体比による負荷源別負荷割合算定結果の検証 第 49 回日本水環境学会年会講演集、303.

22)D. M. Sigman,, K. L. Casciotti, M. Andreani, C. Barford, M. Galanter, and J. K. Bo1hlke (2001) A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of

nitrate in seawater and freshwater. Anal. Chem., 73, 4145-4153.
23)永田俊、宮島利宏(2008)、水の同位体比を利用した水循環の評価、「流域環境評価と安定同位体―水循環から生態系まで―」第 2 章、京都大学学術出版会、33-55.
24)永田俊、宮島利宏(2008)、大気降下物としての窒素が水源域に与える負荷、「流域環境評価と安定同位体―水循環から生態系まで―」第 3 章 1 節、京都大学学術出版会、59-69.
25)井手淳一郎(2011)、窒素・酸素安定同位体比を用いた扇状地河川における出水時の硝酸性窒素の起源推定に関する研究、河川整備基金助成事業成果報告書、助成番号:23-1211-01
26)環境省、平成 26 年版 環境・循環型社会・生物多様性白書、275-276、https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/h26/pdf/2_4.pdf
27)総務省(2004) 湖沼の水環境の保全に関する政策評価書, http://www.soumu.go.jp/menu_news/s-news/daijinkanbou/040803_3_h.pdf
28)井上隆信(2003) 非特定汚染源の原単位の現状と課題, 水環境学会誌 Vol.26、No.3、pp.131-134
29)日本水環境学会(2012)、非特定汚染源からの流出負荷量の推計手法に関する研究、平成 23 年度環境省環境研究総合推進費成果報告書(RFb-11T1)、3-24
30)岡本誠一郎、平山孝浩、對馬育夫(2014), 汚濁の現状把握と削減のためにできること：原単位からその先へ, 第17回水環境学会シンポジウム講演集, 101-102
31)国土交通省水管理・国土保全局下水道部(2015)、流域別下水道整備総合計画調査 指針と解説、74-76、http://www.mlit.go.jp/common/001065300.pdf
32)上原浩、尾崎則篤(2014) 市街地汚濁負荷の現状と課題 第 17 回日本水環学会シンポジウム、103-104
33)平間幸雄、小倉久子(2004)、印旛沼流域の非特定汚染源負荷調査（2）、平成 16 年度 千葉県環境研究センター年報第 4 号、108-109

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

水質チーム　上席研究員　岡本誠一郎
総括主任研究員　小森　行也
主任研究員　平山　孝浩
主任研究員　對馬　育夫
研究員　武田　文彦
研究員　金子　陽輔

【要旨】

本研究は、流域からの汚濁負荷が閉鎖性水域の水質におよぼす影響の解明と対策手法の提案を目的とし、環境の変化が水質・底質に与える影響の解明を試みた。底泥浚渫が栄養塩類溶出に一定の効果があること、台風による出水前後の溶出試験からは、台風通過後では、地点によらず、NH_4-N 溶出速度が大幅に上昇することを見出すとともに底泥の地点別、深度別の細菌群集構造を解析し、細菌種の変化が栄養塩類の溶出に与える影響を把握した。また、底質からの栄養塩溶出に寄与する要因を整理するとともに、閉鎖性水域の生態系モデルを用い、底層嫌気化改善対策の水質改善に対する寄与を解明した。

キーワード：閉鎖性水域、富栄養化、底質からの栄養塩溶出、微生物菌叢解析、生態系モデル

１．はじめに

公共用水域の水質は、「水質汚濁に係る環境基準」における、「人の健康の保護」に係る項目は達成率が次第に高まっているが、有機汚濁等の「生活環境の保全」に係る項目については、特に閉鎖性水域において改善が十分に進んでいない。閉鎖性水域の水質改善のためには汚濁負荷の発生原因をより明確にするとともに、効果的な対策技術を開発、評価していく必要がある。特に、閉鎖性水域の水質改善が進まない原因の一つとして底泥からの溶出が考えられるが、そのメカニズムには明らかになっていない点が多い。本研究は、プロジェクト研究「流域スケールで見た物質の動態把握と水質管理技術」の一環として、浚渫が栄養塩類溶出に与える影響、気象・水象データによるアオコ発生期の簡易予測、台風による出水前後の底泥からの栄養塩類・金属類溶出と細菌群集構造解析、気象自動観測データに基づく水質の影響因子の検討、藻類増殖と栄養塩・微量金属との関係、藻類増殖速度への微量金属（Fe、Mn）の役割と生態系モデルによる閉鎖性水域の水質変化予測について調査し、栄養塩類濃度の変化が底泥からの溶出に与える影響、環境の変化が水質・底質におよぼす影響、閉鎖性水域の水質変化予測手法、水質汚濁対策手法の水質改善に対する寄与について検討した。

２．浚渫が栄養塩類溶出に与える影響

２.１　はじめに

霞ヶ浦では水質改善を目的とした浚渫事業が実施されており、平成 24 年 5 月に完了している[1)]。平成 25 年から平成 28 年の間に、浚渫実施区域と未実施区域を対象に霞ヶ浦の底質を用いて溶出試験を 3 回行い、浚渫が栄養塩類溶出に与える影響について検討した。

２.２　溶出試験の実験条件

表 2-1 に溶出試験の実験条件を示す。H27 年 8 月のデータについては、溶出試験時の水温が 30℃で他と異なるため、データを比較する際には注意が必要である。

表 2-1　溶出試験の実験条件

採水・採泥年月	気象条件	溶出試験時の水温	溶存酸素条件	採取箇所
H25年　1月	晴天日が続いた日	20℃	好気条件 嫌気条件	湖心 掛馬沖
H27年　8月	3日前に日降水量17mmの雨	30℃		湖心 掛馬沖 土浦港沖
H28年　1月	晴天日が続いた日	20℃		

本実験に供した底質は図 2-1 に示す 3 地点から、内径 200mm のアクリルコアを用いて、深さ 30cm 程度の底泥を採取した。St.1 は湖心（36°02'06"N、140°24'27"E）、St.2 は掛馬沖（36°03'03"N、140°15'00"E）で、いずれも国交省の観測所の付近である。St.3 は桜川河口からおよそ 900m 沖の地点で土浦港沖（36°04'35"N、140°13'42"E）とした。この内、St.2 は浚渫実施箇所である。直上水は採取した底層水を GFB フィルターでろ過して静かに流入させた後、嫌気状態と好気状態に設定して、実験を行った。嫌気状態は窒素ガスで直上水を曝気することにより DO が 1mg/L 以下となるように調節し、好気状態は空気曝気により溶存酸素濃度を調節した。溶存態の窒素やリンの分析は、実験開始から 0、1、3、5、7、10、15、20 日目の水試料を用いてイオンクロマトグラフ法にて行った。金属類（Al、Mn、Fe、Zn、As）は 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。また、底質中の COD_{Mn}、TOC、T-P、T-N、金属類は底質調査方法（平成 24 年 8 月環境省水・大気環境局）[2]に記載の方法に従って前処理を行い、定量分析を行った。



図 2-1　調査地点と土浦入における流入河川

2.3　栄養塩の溶出速度について

図2-2、図2-3に水中の溶存態窒素（NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N）、全窒素、全リン（T-N、T-P）、オルトリン酸態リン（PO_4-P）および微量金属（Mn、Fe）濃度の経日変化を示す。

図 2-4、図 2-5 に、溶出試験での水質測定結果を用いて NH_4-N、PO_4-P の溶出速度を算出した結果を示す。溶出速度算定期間については、底質に係わる技術資料（平成 21 年 3 月湖沼技術研究会底質ワーキング）[3]に記載の方法に従って NH_4-N、PO_4-P それぞれの溶出量曲線を整理し、外れ値を除外した上で、溶出量曲線の平均的な傾きを表現できる期間とした。嫌気状態の PO_4-P の溶出速度について、St.1（浚渫未実施）と St.2（浚渫実施）を比較すると、St.2 の方が小さく、浚渫実施区域の方が溶出速度は小さい結果となった。NH_4-N の溶出速度についても St.1 より St.2 の方が小さいが、その差はあまり大きくなかった。また、H25 年 1 月と H28 年 1 月における各地点の溶出速度を比較すると大きな変化はなく、浚渫からの時間経過による栄養塩溶出への影響は見られなかった。また、St.3（浚渫未実施）について、H27 年の 8 月のデータでは NH_4-N、PO_4-P の溶出速度が他の 2 地点と比べて小さくなっている。3 日前の降雨が St.3 にあまり影響しないものと考えると、流入負荷の少ない時期に St.3 の栄養塩溶出は抑えられている可能性があるが、今回のデータのみでは判断できなかった。一方で、H28 年 1 月の St.3 におけるデータについては NH_4-N、 PO_4-P の溶出速度は大きくなっているが、底質採取箇所の水深が 8m 以上（H27 年 8 月では 2.8m）となっており、調査地点にズレが発生し、凹地で底質を採取した可能性がある。

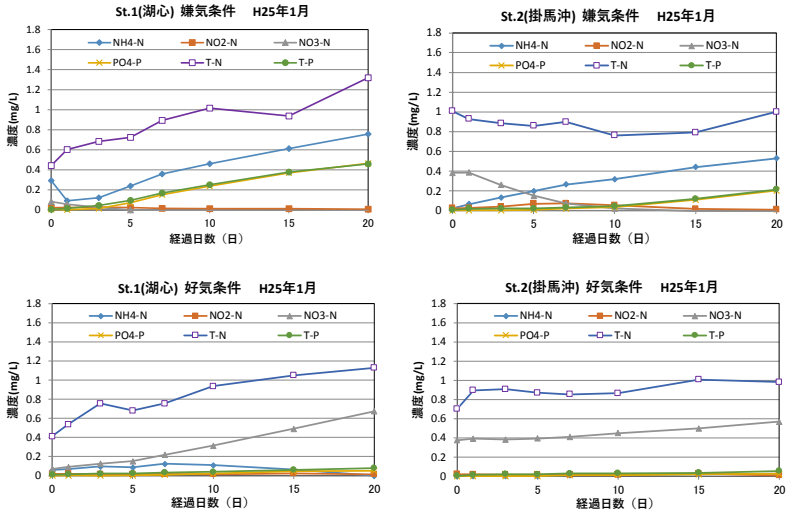


図 2-2（その 1）溶出試験時の栄養塩濃度（サンプル引き抜きを考慮して算出）

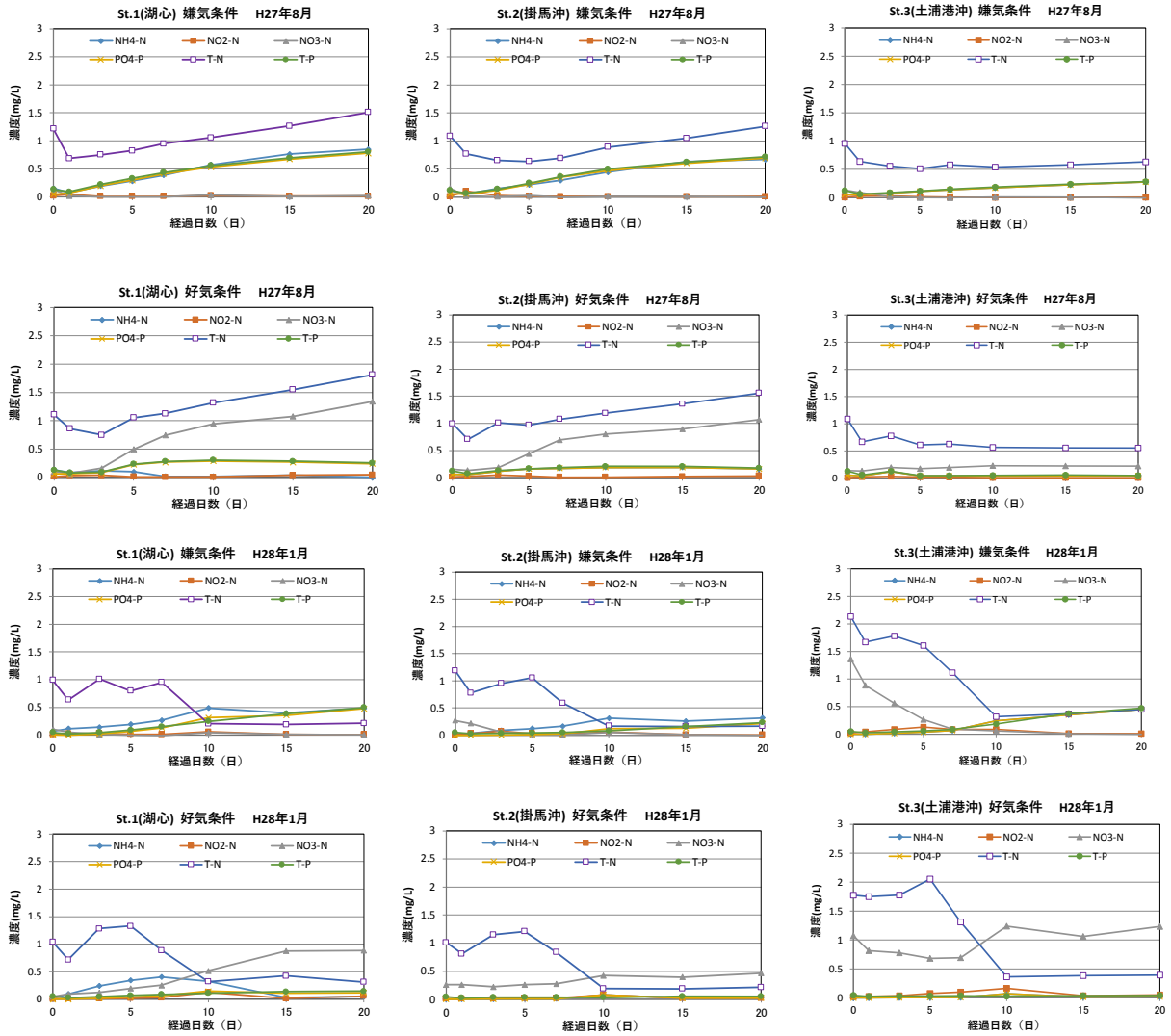


図 2-2（その 2）溶出試験時の栄養塩濃度（サンプル引き抜きを考慮して算出）

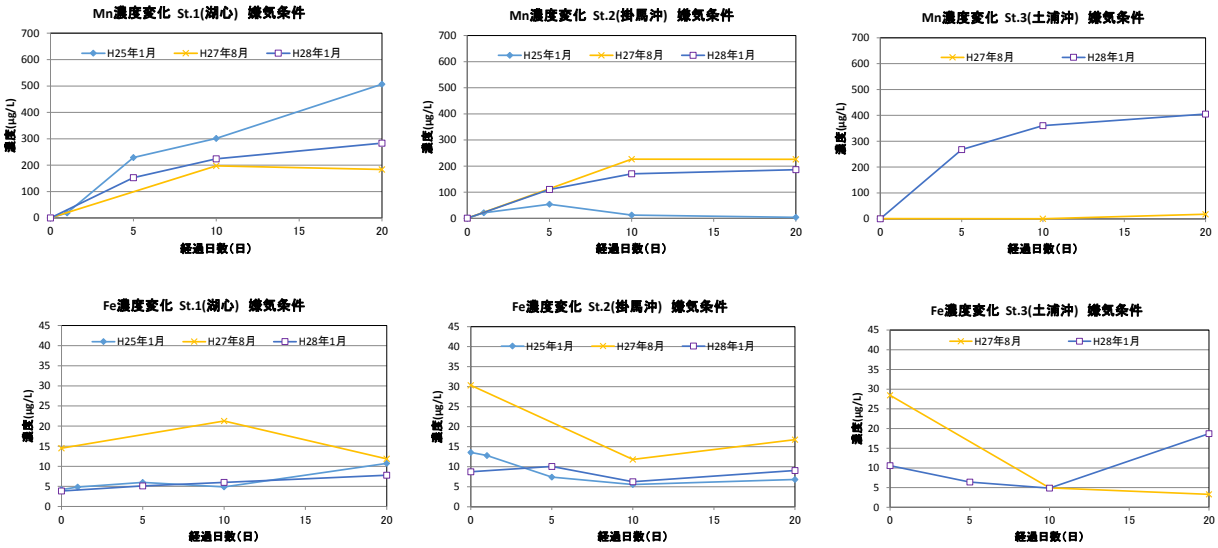


図 2-3　溶出試験時の微量金属濃度（サンプル引き抜きを考慮して算出）

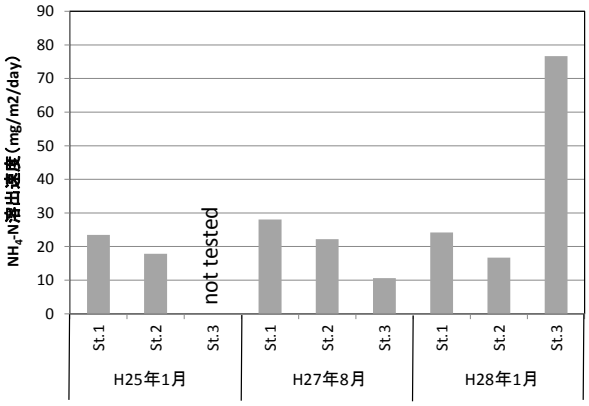


図2-4　NH_4-Nの溶出速度（嫌気条件）

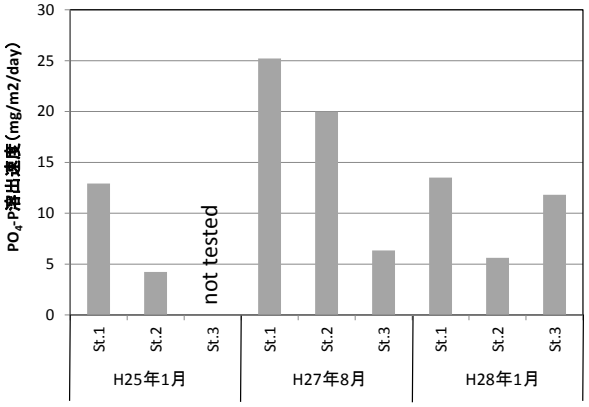


図2-5　PO_4-Pの溶出速度（嫌気条件）

２．４　底質分析結果

H27年8月とH28年1月のサンプリング時の底質中の有機物、栄養塩濃度を表2-2に示す。なお、底質は表層から30cm採取し、10cmごとに分析している。底質に含まれる有機物量についてはH27年8月、H28年1月のデータともにSt.1（浚渫未実施）よりSt.2（浚渫実施）の方が少なくなっており、どの地点についても表層(0～10cm)の底質より表層から10～20cm及び20～30cmの底質の方が有機物量は少なかった。この結果から、浚渫によってもともと有機物の多かったSt.2の表層の底質が取り除かれ、底質が改善されていると考えられる。また、St.3においてはH28年1月の底質の方がH27年7月に比べて有機物量が多くなっているが、2.3にも述べたように、H28年1月に採取したSt.3の底質は、調査地点にズレが発生し、凹地で採取した可能性がある。

また、底質に含まれる微量金属（B、Al、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Mo、Cd、Pb）の濃度を表2-3に示す。St.1とSt.2の表層(0～10cm)の底質を比較すると、底質に含まれる微量金属の大部分を占めるAl、Mn、Feについて、St.1よりSt.2の方が濃度は低くなっていることが分かる。

表 2-2　底質中の有機物・栄養塩濃度

		COD_{Mn} (mg/g-dry)	TOC (mg/g-dry)	全窒素 (mg/g-dry)	硫化物 (mg/g-dry)	全リン (mg/g-dry)	乾燥減量 (%)	強熱減量 (%)
St.1 0～10cm	H27年8月	65.4	55.3	7.4	0.4	1.4	88.1	17.0
	H28年1月	70.7	60.3	7.8	0.1	1.4	87.9	16.9
St.1 10～20cm	H27年8月	56.0	55.1	7.2	0.2	1.2	84.5	16.7
	H28年1月	60.4	58.7	7.6	0.5	1.4	85.4	16.6
St.1 20～30cm	H27年8月	47.7	51.3	6.3	0.2	0.9	80.2	15.9
	H28年1月	57.6	56.1	7.0	0.3	1.2	82.6	15.9
St.2 0～10cm	H27年8月	33.0	26.6	3.3	0.4	0.8	76.3	11.2
	H28年1月	47.6	29.8	3.6	0.2	1.0	80.1	11.5
St.2 10～20cm	H27年8月	27.6	24.6	2.6	0.5	0.6	70.4	10.6
	H28年1月	40.7	27.1	3.0	0.2	0.7	73.5	10.4
St.2 20～30cm	H27年8月	22.1	21.4	2.1	0.3	0.5	63.5	10.3
	H28年1月	34.0	23.8	2.5	0.2	0.5	67.6	10.9
St.3 0～10cm	H27年8月	4.0	2.3	0.3	0.0	0.2	34.7	2.8
	H28年1月	39.4	37.2	4.4	0.2	1.4	79.4	13.4
St.3 10～20cm	H27年8月	4.9	4.1	0.3	0.1	0.2	34.5	3.4
	H28年1月	35.1	35.2	4.2	0.2	1.6	75.8	13.0
St.3 20～30cm	H27年8月	6.7	5.5	0.7	0.0	0.2	35.0	3.5
	H28年1月	27.5	33.8	4.0	0.2	1.7	72.7	12.6

表 2-3　底質中の金属濃度

(mg/kg(DS))

		B	Al	Mn	Fe	Cu	Zn	As	Mo	Cd	Pb
St.1 0～10cm	H27年8月	17	69,000	1,400	47,300	55	111	15.5	0.3	0.4	26.0
	H28年1月	16	70,000	1,500	49,300	58	114	15.4	0.4	0.4	27.4
St.1 10～20cm	H27年8月	9	41,000	1,200	40,300	55	98	13.9	0.5	0.4	25.3
	H28年1月	15	69,000	1,300	51,100	59	115	15.7	0.6	0.5	28.3
St.1 20～30cm	H27年8月	16	65,900	870	47,900	59	105	16.7	0.7	0.4	28.1
	H28年1月	13	61,400	1,100	51,600	61	111	15.9	0.6	0.5	29.8
St.2 0～10cm	H27年8月	8	38,700	820	41,000	47	86	11.2	0.5	0.2	17.9
	H28年1月	8	51,800	990	48,200	54	100	11.4	0.5	0.3	19.1
St.2 10～20cm	H27年8月	11	73,000	650	47,500	48	89	12.8	0.5	0.2	17.2
	H28年1月	8	53,300	740	44,300	49	88	11.4	0.5	0.3	17.4
St.2 20～30cm	H27年8月	11	60,500	620	50,800	37	73	13.1	0.6	0.2	14.2
	H28年1月	7	56,500	590	47,700	44	75	10.7	0.7	0.2	15.6
St.3 0～10cm	H27年8月	4	18,500	330	16,200	12	49	6.7	0.9	0.1	5.6
	H28年1月	9	68,300	1,230	52,100	60	166	11.9	0.9	0.4	24.4
St.3 10～20cm	H27年8月	5	21,500	330	17,200	14	53	7.5	1.3	0.1	7.0
	H28年1月	11	81,400	1,300	57,500	64	179	12.5	0.9	0.5	27.7
St.3 20～30cm	H27年8月	7	29,400	470	26,800	17	52	14.3	2.5	0.1	6.9
	H28年1月	10	78,900	1,200	56,300	63	174	12.4	0.8	0.5	26.6

２．５　まとめ

浚渫を実施した St.2（掛馬沖）および浚渫未実施の St.1（湖心）、St.3（土浦港沖）を対象に底質の溶出試験を行った。その結果、今回試験を行った試料では、嫌気条件において PO_4-P と NH_4-N の溶出速度は St.1 より St.2 の方が小さい結果となった。H25 年 1 月と H28 年 1 月における各地点の溶出速度を比較すると大きな変化はなく、浚渫からの時間経過による栄養塩溶出への影響は見られなかった。また、底質に含まれる有機物量、微量金属類を比較した結果、湖心に比べて掛馬沖の底質の方が有機物量や Al、Fe、Mn の濃度は低い結果が得られた。

３．気象・水象データによるアオコ発生期の簡易予測

３．１　はじめに

霞ヶ浦ではアオコの大量発生時には、アオコ回収船の現地への配置、稼働などの各種対策を実施している。現地の巡視体制や各種対策の体制整備のためにも、アオコ大量発生前にその兆候を把握できれば、湖沼管理上も有効と考えられる。アオコ発生時期に簡易な予測手法により、本格的なアオコ発生の兆候を把握することを目的とし、霞ヶ浦の自動水質観測所のデータ等を解析した。なお、土浦港のような局所的な発生は正確な予測が困難なため、第一目標としては、土浦入の一定範囲にアオコが広がるような状況の兆候把握を目的とした。

３．２ 検討方法

霞ヶ浦西浦の土浦入を検討対象(ケーススタディ)として、湖内に設置されている自動水質観測所（掛馬沖、湖心）の平成 23 年～26 年の春～夏期データを活用し、着目する水質項目の値とその経時変化から簡易にアオコ発生可能性の上昇を予測できる手法を構築した。

着目した水質等の項目は、水温(表層・下層)、pH(表層)、DO(表層・下層)、風向・風速、降雨(気象庁土浦観測所)であ

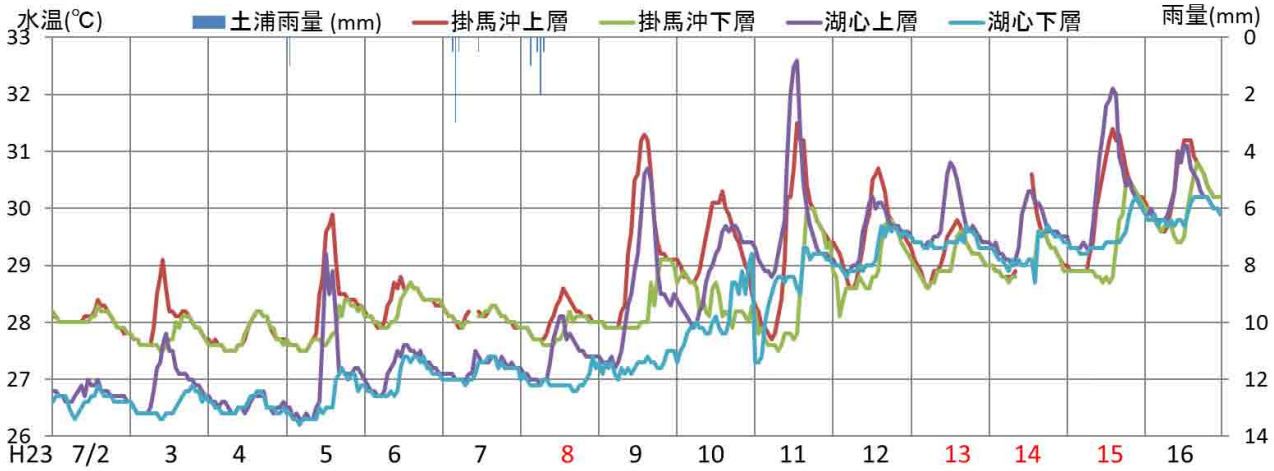


図 3-1 平成 23 年 7 月 2 日～16 日の水温・雨量の経時変化

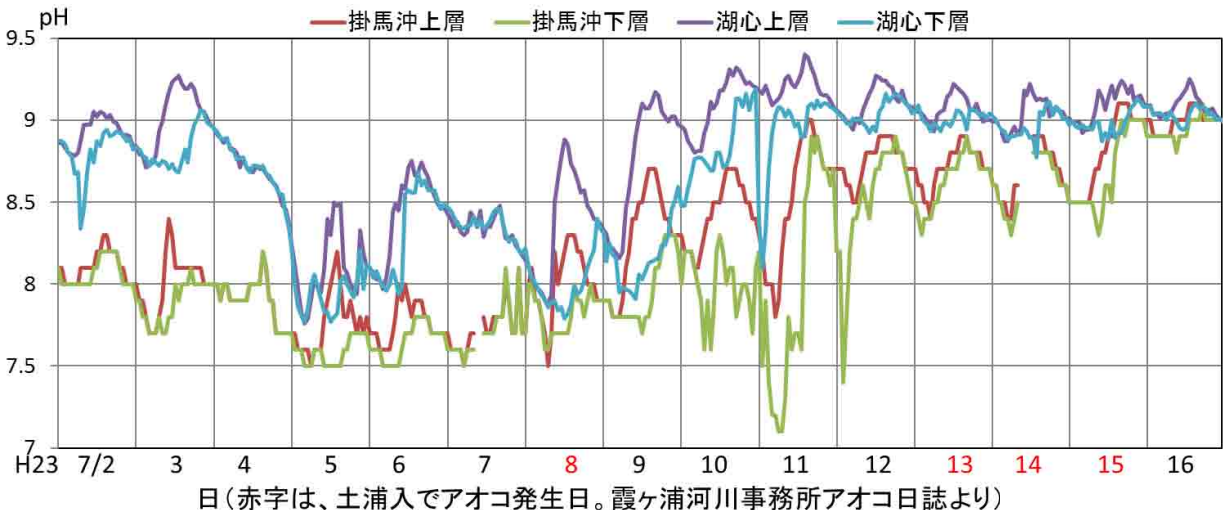


図 3-2 平成 23 年 7 月 2 日～16 日の pH の経時変化

る。自動水質観測所データとアオコ発生状況[4]より、アオコ発生可能性に関する判定項目および目安値を定めた。

３．３ 結果と考察

平成23年には霞ヶ浦でアオコが発生している。その年の7月2日～16日の水温・pH・雨量の経時変化を図3-1、図3-2に示す。水温は7月9日から、表層pHは7月8日から大きな日間変動が見られた。なお、表層DOも表層pHと同様であった。その後、7月13日から土浦入の広範囲にアオコが発生した。なお、7月8日のアオコ発生は、局所的なものであった。

このような例が、複数年見られたことから、アオコ発生の判定手法(案)として、土浦入におけるアオコ発生との関連がより明確な「掛馬沖」のデータで判定（湖心のデータも一部参考）することとし、主要項目が表 3-1 の状況の場合、数日後にアオコ発生の可能性が高いと判定することが考えられる。水温は、藍藻類の好適水温である必要があるとともに、水温の日間変化は、日照や温度成層形成状況を示していると考えられる。表層pHは、藻類の光合成、呼吸による日間変動を示しており、藻類の活性と関連していると考えられる。なお、表層DOも表層pHとほぼ同様のパターンを示す。

表3-1　アオコ発生の判定手法（案）

主要項目	判定の目安
水温（１）	水温が２２℃を超えていること
水温（２）	日間変動が有ること（１～２℃）
表層 pH	日間変動が有ること（１程度）
その他	下層 DO の急激な低下（4mg/L 程度） 前年度大量発生により早期に発生の可能性有

アオコが発生した平成23年では、6月12日に掛馬沖下層においてDO4mg/L程度が観測された。平成23年～26年においては、この時しか観測されていないことから、平成23年は下層の貧酸素状態の後にアオコが発生したものと考えられる。また、平成24年は、他の年より早く5月からアオコの発生が見られた。これは、平成23年に大量発生し、底層に沈降して越冬するコロニー等の量が関連していることが推察されたため、前年度の発生状況も留意が必要であると考えられる。

３．４ まとめ

湖沼等管理者が活用可能なアオコ発生期の水質挙動に着目した簡易予測手法を検討した。霞ヶ浦・西浦掛馬沖の自動水質観測所データより、注目すべき主要項目として、水温、pHを選定し、アオコ発生の「判定の目安」を定めた。平成23年～26年のデータより、主要項目で判定の目安に該当した場合は、数日～1週間以内に土浦入で一定の範囲にアオコが発生する可能性が高いと判断される。

４．台風による出水前後の底泥からの栄養塩類・金属溶出と細菌群集構造解析

４．１　はじめに

本研究において霞ヶ浦を対象に底質の溶出試験を行い、浚渫が栄養塩溶出に与えた効果を把握し、近年のアオコ発生前後の気象・水象データから藻類増殖要因を検討した。また、雨天時負荷の増加や東向風による藍藻の集積がアオコ増殖の要因の一つであることを見出した。さらに、台風通過後の底質を用いた調査では、底泥中の含有栄養塩類・有機物量と、溶出速度の関係が逆転し、雨天時流入汚濁物による影響が示唆された。ここでは、台風等の大規模出水時に焦点を当て、出水前後の底質を用いた溶出試験を行い、その影響の把握を試みた。また、底質はこれまでブラックボックスとして扱われてきており、底質からの栄養塩溶出メカニズムに関する知見は極めて乏しいことから、次世代シークエンサーを用いて、底質中の細菌群を網羅的に解析し、原位置（*in situ*）での物質の挙動や環境状態を推察した。なお、本研究で対象とした湖沼は、水深が浅く温度成層ができにくい富栄養化湖の代表である霞ヶ浦（平均水深3.9 m、最大水深7.3 m、湖面積171 km^2）である。霞ヶ浦は平成21年度には水質が全国ワースト1となったが、その後、改善傾向にあり、平成25年度では、CODが6.8 mg/L（平成21年度は9.5 mg/L）で湖沼水質保全計画の目標値である7.4 mg/Lを22年ぶりに下回った[5]。また、全窒素は1.3 mg/L（平成21年度は1.1 mg/L）、全リンは0.089 mg/L（平成21年度は0.10 mg/L）で、ほぼ横ばい状態が続いている[5]。

４．２ 実験方法

(1)　サンプリング

本実験に供した底質は図4-1に示す3地点で採取した。St. 1は湖心（36º 02' 06" N、140º 24' 27" E）、St. 2は掛馬沖（36º 03' 03" N、140º 15' 00" E）で、いずれも国交省の観測所の付近である。St.3は桜川河口からおよそ900 m沖の地点で土浦港沖（36º 04' 35" N、140º 13' 42" E）とした。なお、平成24年度および25年度にも同様の地点で採水している[6),7)]。今年度のサンプリングは2014（平成26）年9月

と 10 月の計 2 回行い、1 回目のサンプリングは降雨の影響を避けるため、晴天が連続した日に行い、2 回目のサンプリングは出水が底質からの栄養塩の溶出に与える影響を調査するため、2 度の台風（台風 18 号および 19 号）が通過した 5 日後に行った（図 4-2）。なお、サンプリング実施前の 2 週間に観測した降雨は累計 200 mm 以上に達し、多くの濁質成分が河川から霞ヶ浦に流入したものと考えられる。また、台風 18 号は 7 月以降初めて本土に上陸した台風であった。

底質のサンプリングは、溶出試験用と底質分析用に 2 通りの方法で実施し、いずれも「底質の調査・試験マニュアル」[8] に記載の方法に従い、深さ約 30 cm のコアサンプルを潜水士により採取した。溶出試験用の底質は内径 20 cm のアクリル製カラムを用い、1 地点につき 4 サンプル採取した。底質分析用の底質は内径 5 cm のアクリルカラムを用い、陸揚げした後、速やかに保冷し、実験室に持ち帰り分析した。

湖水のサンプリングは船上からステンレスポンプを使用し、水面から 0.5 m および泥面上 0.5 m の 2 層から約 80L 採水した。採水した試料の一部は水質分析に供し、残りは GFB フィルターでろ過し、後述する溶出試験に供した。

(2) 現地観測

各採水地点で、鉛直方向 50-100 cm スパンで pH、DO、EC、濁度、水温を多項目水質計（HORIBA、マルチ水質チェッカ U-50）を用い、計測した。また、採取した底質の泥色、泥臭、泥温、ORP を観測・計測した。

(3) 溶出試験

内径 20 cm のアクリル製カラムで採取した底質は、底層



図 4-1　調査地点と土浦入における流入河川

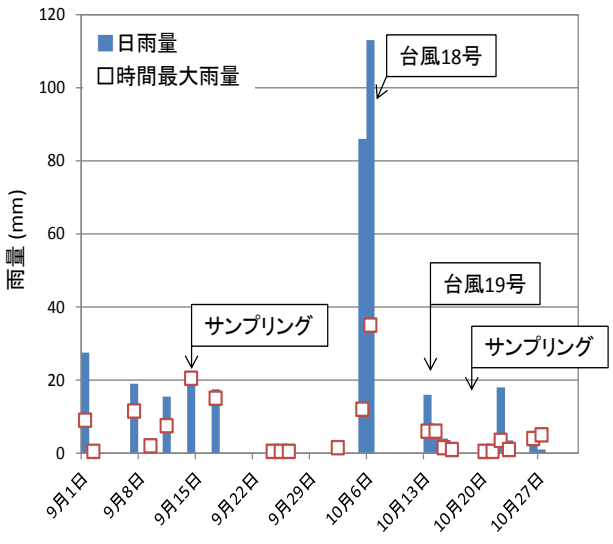


図 4-2　土浦アメダスの雨量観測結果

を乱さぬよう慎重に実験室まで運搬し、カラム内部の水を引き抜いた後、現地で採水し GFB フィルターでろ過した水を静かに注入し、各実験条件下で溶出試験を行った。溶出試験は 30°C 暗所で静置条件で 20 日間行い、好気条件では DO が 8.0 mg/L 程度となるよう空気曝気を行い、嫌気条件では DO が 1.0 mg/L 以下となるよう窒素曝気を行った（N=2）。なお、溶出試験期間中、水質分析用のサンプリングを計 8 回行った（350 mL/回、計 2.8L：水層の厚さ 8.9 cm）。引き抜いた分の水は補充せず、そのまま試験を継続し、水質分析で得た各種濃度は、引き抜いた量を考慮し、再計算を行った。

(4) 分析

溶出試験時の溶液中の NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、T-N、PO_4-P、T-P はオートアナライザー（Bran Luebbe、TRAACS2000）により測定した。Na^+、K^+、Mg^{2+}、Ca^{2+}、Cl^-、SO_4^{2-}はイオンクロマトグラフ（日本ダイオネクス、DX-120 および ICS-1100）により測定した。Al、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Mo、Cd、Pb 等の金属は ICP - MS（Thermo Fisher SCIENTIFIC、X7CCT）により分析した。また、底質中の COD_{Mn}、TOC、T-P、T-N、金属類は底質調査方法（平成 24 年 8 月環境省水・大気環境局）」[2] に記載の方法に従って前処理を行い、定量分析を行った。

(5) 微生物叢解析

現地採泥サンプルの底質表層（0-5 cm）および溶出試験後の底質表層（0-5 cm）および底質底層（20-30 cm）から、RNA を抽出し、cDNA に逆転写した後、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象に MiSeq（Illumina）を用いてシーク

エンス解析を行った。RNA 抽出には、ISOIL for RNA（ニッポンジーン）を用い、逆転写には PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2（TaKaRa）を用いた。逆転写された cDNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー（S-D-Bact-0341-b-S-17 および S-D-Bact-0785-a-A-21）[9] にオーバーハングアダプター配列（F: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-、R: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G）を付加したものを用い、PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は初期変性を 95℃で 3 分行った後、95℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒のサイクルを 25 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit（Beckman Coulter Genomics）を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3（600 サイクル、Illumina）を用いて解析した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH[10] を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME[11] を用いた。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 をリファレンスとした。

４．３　結果と考察

(1)　現地観測および底質分析

サンプリングを実施した 9 月と 10 月の湖水および底質の現地観測結果を**表 4-1～表 4-3** に示す。台風通過前の 9 月に行ったときは、St.1（湖心）の DO が他の地点と比べ、やや低いものの下層においても DO が 5.5-7.3 mg/L であった。一方、台風通過後の St.3（土浦港沖）では、pH が他の地点よりも低く、下層では DO が 0.6 mg/L まで低下しており、貧酸素状態になっていることが伺える。また、底質中の有機物量、栄養塩濃度を**表 4-4** に示す。この結果、底質中に含まれる有機物量は、台風通過前、通過後ともに、St.1（湖心）で最も高く、台風通過後には増加していた。St.2（掛馬沖）では、台風通過前後で大きな変化はなくほぼ一定であった。St.3（土浦港沖）は、台風通過後に減少していた。恐らく、土浦港沖は他の採取地点と比べ、流入河川からの影響を受けやすく、台風の影響に伴い河川から流入した有機物量自体は他の地点と比べ多かったと推察される。その台風により流入してきた有機物が底泥の巻き上げに伴う急激な微生物反応により分解され、pH と DO の低下を引き起こしたと考えられる。

(2)　溶出試験

台風通過前後に採取した霞ヶ浦の底質を用いた溶出試験を行った（30℃暗所、嫌気および好気条件）。**図 4-3** に

表 4-1　9 月 15 日の現地観測結果（台風通過前）

地点	水深 (m)	pH [-]	EC (ms/cm)	DO (mg/L)	濁度 [-]	水温 (℃)
St.1	0.0	7.7	0.278	9.7	11.4	23.9
（湖心）	0.5	7.1	0.278	7.4	11.4	24.0
	1.0	7.1	0.278	7.0	11.6	24.0
	1.5	7.1	0.279	6.8	11.0	24.0
	2.0	7.0	0.280	6.7	11.0	24.0
	2.5	7.0	0.279	6.3	11.7	24.0
	3.0	7.0	0.280	6.3	11.7	24.0
	3.5	7.0	0.280	6.1	11.4	24.0
	4.0	7.0	0.280	6.2	12.1	24.0
	4.5	7.0	0.281	6.2	11.9	24.0
	5.0	6.9	0.281	6.6	12.7	24.0
	5.5	6.9	0.280	6.0	13.5	24.0
	6.0	7.0	0.280	6.3	12.0	24.0
St.2	0.0	8.3	0.255	9.6	12.0	24.6
（掛馬沖）	0.5	8.0	0.256	9.1	12.1	24.6
	1.0	7.8	0.256	8.4	11.9	24.5
	1.5	7.6	0.260	8.1	12.4	24.3
	2.0	7.5	0.260	8.2	12.7	24.3
	2.5	7.5	0.260	6.5	12.0	24.1
	3.0	7.4	0.261	6.9	14.5	24.1
	3.5	7.3	0.261	7.1	18.0	24.0
	4.0	7.4		7.3		24.0
St.3	0.0	8.0	0.261	9.6	9.9	25.0
（土浦港沖）	1.0	7.8	0.262	9.5	9.5	24.9
	2.0	7.4	0.262	8.6	10.2	24.8
	3.0	7.5	0.262	8.2	9.8	24.7
	4.0	7.2	0.263	8.6	9.9	24.6
	5.0	7.1	0.263	8.3	11.5	24.5
	6.0	7.0	0.263	7.3	10.0	24.5
	7.0	6.9	0.264	7.0	10.8	24.5
	8.0	6.9	0.264	7.0	11.0	24.4
	8.5	6.7	0.265	5.5	18.4	24.4

表 4-2　10 月 18 日の現地観測結果（台風通過後）

地点	水深 (m)	pH [-]	EC (ms/cm)	DO (mg/L)	濁度 [-]	水温 (℃)
St.1	0.0	7.4	0.239	10.2	15.0	18.9
（湖心）	0.5	7.4	0.239	10.3	15.0	18.9
	1.0	7.3	0.238	8.3	15.6	18.9
	1.5	7.3	0.238	8.3	15.2	18.9
	2.0	7.2	0.238	7.7	15.2	18.9
	2.5	7.2	0.234	8.1	15.2	18.9
	3.0	7.1	0.238	7.8	15.0	18.9
	3.5	7.1	0.238	7.8	15.1	19.0
	4.0	7.1	0.238	7.6	15.8	19.0
	4.5	7.1	0.238	7.5	16.2	19.0
	5.0	7.0	0.239	7.5	15.6	19.0
	5.5	7.0	0.239	7.5	16.1	19.0
	6.0	7.0	0.239	7.4	16.9	18.9
St.2	0.0	7.5	0.218	9.4	12.2	19.5
（掛馬沖）	0.5	7.5	0.218	9.4	12.2	19.5
	1.0	7.5	0.219	9.3	13.2	19.3
	1.5	7.4	0.218	9.0	12.9	19.1
	2.0	7.2	0.217	8.7	12.9	18.9
	2.5	7.1	0.216	8.6	12.9	18.9
	3.0	7.0	0.217	8.5	12.4	18.9
	3.5	7.0	0.218	8.4	14.4	18.8
	4.0	7.0	0.218	8.1	20.4	18.8
St.3	0.0	6.5	0.203	10.0	9.7	19.3
（土浦港沖）	1.0	6.6	0.203	9.2	9.0	19.8
	2.0	6.4	0.203	8.0	9.9	19.0
	3.0	6.3	0.203	7.2	9.8	18.9
	4.0	6.2	0.202	7.2	9.4	18.9
	5.0	6.2	0.202	7.1	10.2	18.8
	6.0	6.2	0.201	7.1	11.8	18.8
	7.0	7.0	0.201	7.0	14.2	18.8
	8.0	6.2	0.200	0.6	29.5	18.7
	9.0	6.1	0.200	0.7	35.9	18.7

表 4-3　採取した底質の状態

9/15(台風前)	泥色	泥臭	泥温 (℃)	ORP (mV)
St.1 （湖心）	灰茶	無臭	22.6	-128
St.2 （掛馬沖）	淡灰茶	無臭	23.4	-160
St.3 （土浦港沖）	淡緑茶	無臭	22.3	-165

10/18(台風後)	泥色	泥臭	泥温 (℃)	ORP (mV)
St.1 （湖心）	灰茶	無臭	19.6	-119
St.2 （掛馬沖）	淡灰茶	無臭	19.8	-154
St.3 （土浦港沖）	淡緑茶	無臭	20.0	-165

表 4-4　底質中の有機物・栄養塩濃度

	St.1 (湖心)		St.2 (掛馬沖)		St.3 (土浦港沖)	
	台風前	台風後	台風前	台風後	台風前	台風後
COD_{Mn}	40.1	52.6	28.4	26.3	27.3	19.0
TOC	44.8	53.2	24.2	27.7	31.5	23.1
全窒素	5.6	6.9	2.7	3.1	3.8	2.6
全りん	0.8	1.2	0.5	0.8	1.1	0.9

(mg/g-dry)

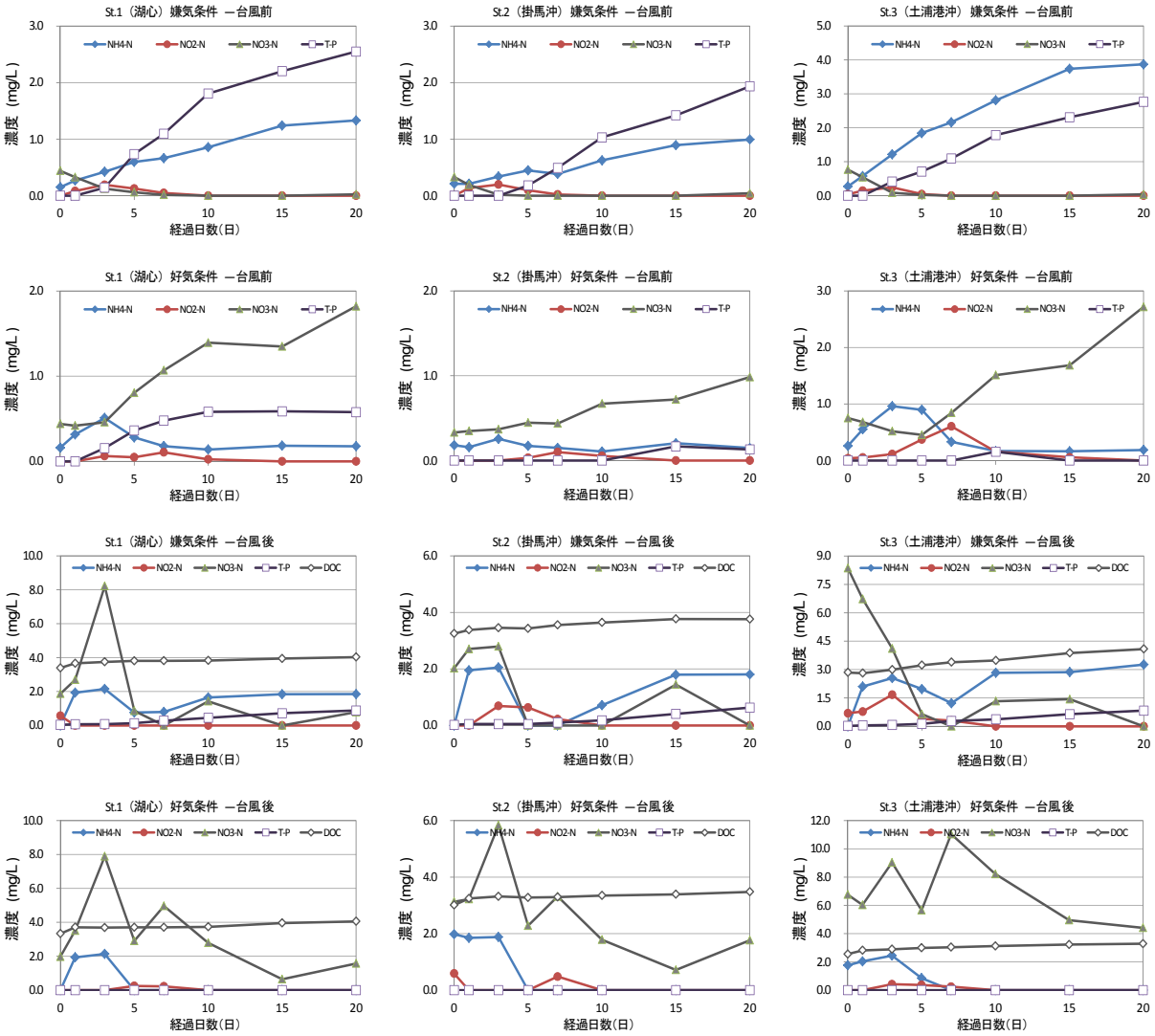


図 4-3 溶出試験時のバルク内の各物質濃度（サンプル引き抜きを考慮して算出）

水中の溶存態窒素（NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N）および総リン（T-P）濃度の経日変化を示す。台風通過前の嫌気条件下での溶出試験結果では、どの系列でも NH_4-N および T-P が時間とともに増加していた。台風通過後の嫌気条件下では、溶出試験に供する底質直上水の NO_3-N 濃度が台風通過前の溶出試験時より高かったが、St.3（土浦港沖）では、溶出試験開始直後から NO_3-N は減少した。St.1（湖心）や St.2（掛馬沖）では一旦上昇した後、低下した。好気条件下では、台風通過前では、どの系列でも NO_3-N の増加が確認された。また、St.1（湖心）で T-P の増加が 10 日目まで確認され、その後は一定であった。台風通過後の好気条件下では、増減はあるものの NH_4-N、NO_3-N は減少傾

表 4-5　底質中の金属濃度

		Mn	Al	Fe	Zn	Cu	As	Mo	Cd	Pb
台風通過前	St.1(湖心)	760	76,000	48,000	93.6	55.5	15.3	0.3	0.3	21.6
	St.2(掛馬沖)	860	54,000	51,000	71.2	39.5	16.9	1.3	0.2	13.8
	St.3(土浦港沖)	1,210	68,000	47,000	140.5	56.1	14.4	1.2	0.3	23.1
台風通過後	St.1(湖心)	920	47,000	42,000	95.7	58.1	15.3	0.7	0.4	28.7
	St.2(掛馬沖)	950	95,000	56,000	89.1	55.2	13.9	0.4	0.2	16.7
	St.3(土浦港沖)	780	45,000	36,000	114.6	41.8	10.8	1.0	0.3	16.6

μg/g-dry

表 4-6　溶出試験時における金属類溶出率（%）

			Mn	Al	Fe	Zn	Cu	**As**	Mo	Cd	Pb
嫌気条件下	台風通過前	St.1(湖心)	0.49	0.0	0.0	−0.2	−0.1	1.5	−7.8	−0.1	0.0
		St.2(掛馬沖)	0.20	0.0	0.0	−0.8	−0.2	2.9	−1.0	−0.4	0.0
		St.3(土浦港沖)	0.36	0.0	0.0	−0.3	−0.2	4.3	−1.6	−0.3	−0.1
	台風通過後	St.1(湖心)	0.50	0.0	0.0	−0.9	−0.1	3.3	−3.3	0.3	−0.1
		St.2(掛馬沖)	0.21	0.0	0.0	0.0	−0.2	6.3	1.2	−0.1	0.2
		St.3(土浦港沖)	0.45	0.0	0.0	−0.2	−0.4	7.9	−11.1	−4.2	−0.8
好気条件下	台風通過前	St.1(湖心)	0.0	0.0	0.0	0.0	−0.1	0.2	−13.1	−0.4	0.0
		St.2(掛馬沖)	0.0	0.0	0.0	0.2	−0.1	0.2	0.0	0.0	0.0
		St.3(土浦港沖)	0.0	0.0	0.0	−0.8	−0.1	0.2	−0.7	−0.1	0.0
	台風通過後	St.1(湖心)	0.0	0.0	0.0	−1.6	0.2	0.3	−2.5	0.0	0.4
		St.2(掛馬沖)	0.0	0.0	0.0	0.0	−0.1	−0.7	2.7	−0.5	0.0
		St.3(土浦港沖)	0.0	0.0	0.0	−0.8	0.0	0.2	−0.6	0.1	−0.2

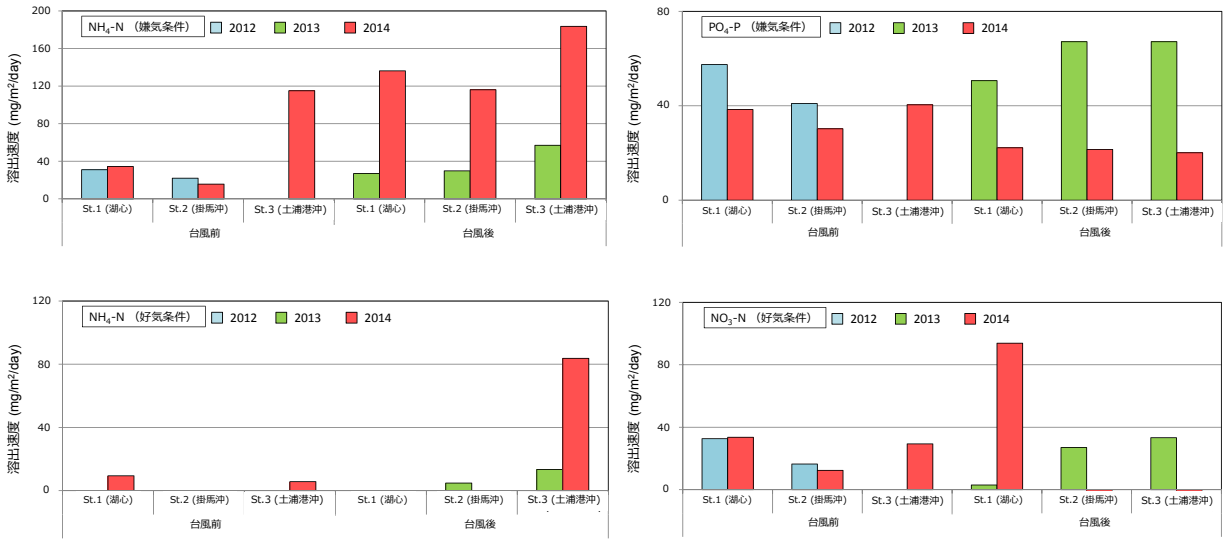


図 4-4　溶出試験時の栄養塩溶出速度

向にあり、T-P も溶出が抑制されていた。

表 4-5 および**表 4-6** に底質に含まれる微量金属（Al、Mn、Fe、Cu、Zn、As、Mo、Cd、Pb）の測定結果と溶出試験後の溶出率を示す。なお、ここで示す溶出率は、底泥表層 2 cm までに存在する微量金属を基準とし、溶出試験 20 日間で水層に移行した量を基に算出した。底質の金属組成は Al と Fe がほとんどで、1%弱の割合で Mn が含まれており、それ以外は 0.0002%-0.1%と非常に微量に含まれる程度である。溶出試験の結果、台風通過前後では各金属の溶出率に大きな差は見られなかった。また、地点間の溶出率にも大きな差は見られなかった。実験条件の違いを比較した場合、嫌気条件下では、Mn と As の溶出率が高く、Al と Fe を除く大部分は溶出試験期間中に濃度が低下していた。一方、好気条件下では、Mn と As は溶出するものの、溶出率は嫌気条件下と比較すると、大幅に抑えられていた。台風通過により、濁質成分の流入や強風による底

質の巻き上げ等の影響は、底質からの金属の溶出には直接影響しないものの、底層が嫌気状態になれば、Mn、Al、Fe、As 等の金属の溶出が促進されることが示唆された。

溶出試験期間中に底質から溶出する NH_4-N、NO_3-N および T-P の溶出速度を算出した結果を**図 4-4** に示す。なお、図には我々が過去に実施した溶出試験の結果を台風通過前後に区分し記載した[6),7)]。ただし、2012 年の溶出試験は 20℃で溶出試験を行っているため、溶出速度を比較する際には注意が必要である。それらの結果、NH_4-N の溶出速度は、嫌気条件下で台風通過後に著しく増加しており、St.3（土浦港沖）が最も大きかった。また、PO_4-P の溶出速度は 2013 年の台風通過後に採取した底質では、非常に高いが、2014 年の調査では、台風通過後にむしろ低下していた。恐らく、2013 年の台風では、流入汚濁物中に含まれるリンは、それまでに溶出の履歴のない、比較的溶出し易い形態で、流入してきたと思われるが、2014 年の台風では、流入汚濁物の影響は少なく、強風による底質の巻き上げがあったことが推測される。中薗らの研究によると[12)]、嫌気条件下で底質の巻き上げが起こった場合、巻き上げそのものによる影響は PO_4-P では少ないが、NH_4-N は影響を受けやすく溶出量が増加するとある。すなわち、St.3（土浦港沖）は、雨天時に流入河川から運ばれる汚濁物の影響も受けやすく、さらに、強風による底質の巻き上げも起こりやすい地点であると言える。好気条件下での NH_4-N の溶出速度を比較した場合においても、本来、好気条件であれば、溶出してこない NH_4-N が台風通過後の St.3 のみで溶出し、さらに NO_3-N が生成されていない。このことは、何らかの影響により硝化反応が抑制されていることの証左となり得るだろう。

(3) 微生物菌叢解析

各サンプルから約 10 万リードの塩基配列を取得（全 30 サンプル）し、QIIME による種の同定およびクラスター解析を行った結果を**図 4-5** に示す。なお、図には Class 別に分類した結果を示す。その結果、サンプル間の菌叢構造に大きな違いはなく、全てのサンプルで Proteobacteria が最も多く（平均51.8%、S.D. 4.0）、次いで、Nitrospirae（13.1%、2.5）、Firmicutes（7.5%、1.1）、Actinobacteria（5.5%、0.7）Verrucomicrobia（3.6%、1.5）、Chloroflexi（2.9%、1.0）、Bacteroidetes（2.0%、1.0）となっていた。また、Proteobacteria の中では、St.1（湖心）では Gammaproteobacteria が最も多く検出され、St.2（掛馬沖）、では、底質表層のサンプルで

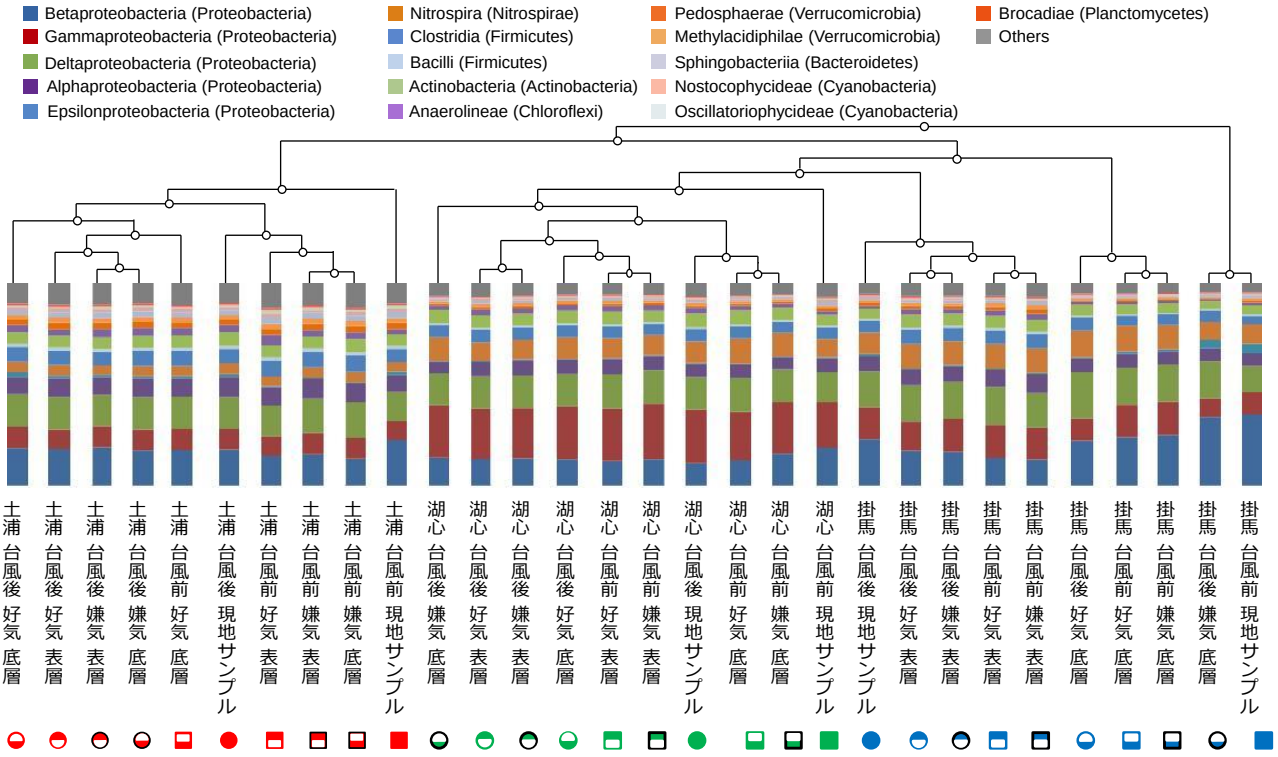


図 4-5　次世代シークエンサーによる系統解析（Class レベル）およびサンプル間のクラスター解析

は Deltaproteobacteria が、底質底層のサンプルでは Betaproteobacteria が最も多く検出される傾向があった。St.3（土浦港沖）では、表層、底層に関わらず、Betaproteobacteria と Deltaproteobacteria がほぼ同程度含まれていた。

代表的なアンモニア酸化細菌 5 属に注目すると、*Nitrosomonas* sp. および *Nitrosolobus* sp.は検出されず、また、その他の *Nitrosococcus* sp.、*Nitrosovibrio* sp.、*Nitrosospira* sp.も全体のわずか 0.0025-0.0054%に相当するに過ぎなかったが、St.1（湖心）では、*Nitrosococcus* sp.が優占し、St.2（掛馬沖）の底質底層では、*Nitrosospira* sp.が優占、底質表層では *Nitrosococcus* sp.が優占しており、表層・底層間で明確な差が表れていた。St.3（土浦港沖）では *Nitrosovibrio* sp.が比較的多く存在していた。一方、亜硝酸酸化細菌が属する Nitrospira 門に着目すると、St.3（土浦港沖）は、亜硝酸酸化細菌が属する Nitrospira の検出割合が 5.0±0.3%と St.1（10.4±1.2%）や St.2（11.4±1.4%）と比べ、低かった。また、Nitobacter や Nitrospina についてはどのサンプルからもわずかに検出されたのみであった。これらのことから、St.3（土浦港沖）における硝化ポテンシャルが他の地点よりも低かった可能性が考えられる。

各サンプルの属レベルの菌叢構造を主座標分析した結果を図 4-6 に示す。各プロット間の距離が菌叢の類似度を示す。各地点それぞれのサンプルが近傍にプロットされることから、各地点で特有の菌叢が構成されていることが示唆された。また、台風通過前後で、各地点での現地サンプルの菌叢は大きく変化していた。それぞれのサンプルの溶出試験後の菌叢を調査したところ、St.1（湖心）

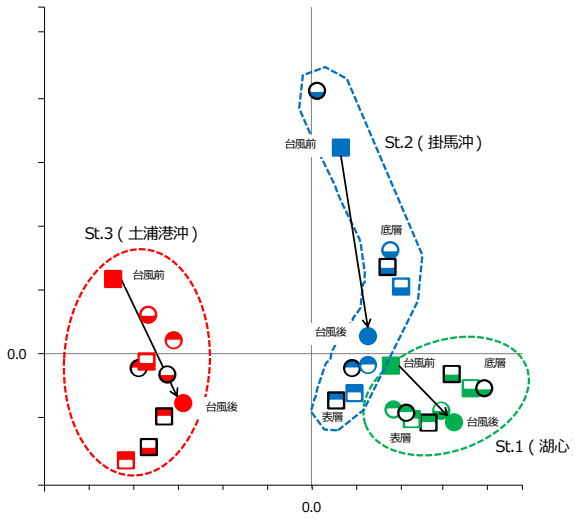


図 4-6　サンプル間の属レベルの主座標分析

や St.2（掛馬沖）では、台風前後にかかわらず、最終的に実現する菌叢には特段の差異が見られず、底質の表層と底層で異なる微生物構造を示した。一方、St.3（土浦港沖）では、台風通過前後でのサンプルの溶出試験後の菌叢は、表層と底層間で特段の差異が見られなかった。このことから、St.3（土浦港沖）では、台風の影響により、底質が大きく攪乱されている可能性が考えられた。

4．4　まとめ

本研究では、霞ヶ浦において、台風による出水前後の底質を採取し、嫌気・好気条件下で 20 日間の溶出試験および次世代シークエンサーによる微生物叢解析を行った。現地調査の結果から、台風通過後の St.3（土浦港沖）では、他の地点に比べ、pH および DO は低い傾向を示した。台風に伴い流入してきた有機成分は、採泥時には既に分解し、溶出し易い成分は既に湖水へ溶出していた可能性が考えられる。溶出試験の結果、NH_4-N の溶出速度は、嫌気条件下で台風通過後に著しく増加しており、St.3（土浦港沖）が最も大きかった。また、PO_4-P の溶出速度は、台風通過後では、むしろ低下していた。また、微生物叢解析の結果、St.3（土浦港沖）では、底質が攪乱されている可能性が考えられた。以上のことから、St.3 の溶出試験（嫌気条件下）で観察された現象（NH_4-N の増加、PO_4-P の減少）は強風による底質の巻き上げの影響を強く受けていると考えられる。

5．気象自動観測データに基づく水質の影響因子の検討

5．1　はじめに

台風などの大雨による流入が霞ヶ浦の水質に及ぼす影響を検討するため、霞ヶ浦の自動水質観測所のデータ等を解析した。

5．2 検討方法

霞ヶ浦西浦湖内に設置されている自動水質観測所（掛馬沖、湖心、麻生沖）の平成 25 年 9 月及び 10 月と 26 年 10 月のデータを使用した。着目した水質等の項目は、濁度(表層・下層)、電気伝導度(表層・下層)、COD、全窒素、全リン、風速、降雨(気象庁土浦・下館観測所)である。降雨時の雨量・風速・湖心水位・各自動観測所水質の経時変化を図示し、それらの関連の有無を確認した。

5．3 結果と考察

気象庁土浦観測所で総雨量150mm以上の降雨を観測した台風の時の各項目の経時変化を図 5-1 に示す。平成 25 年 10 月 15 日から 16 日にかけて台風による大雨があり、湖心水位は大きく上昇するとともに、濁度など各水質項

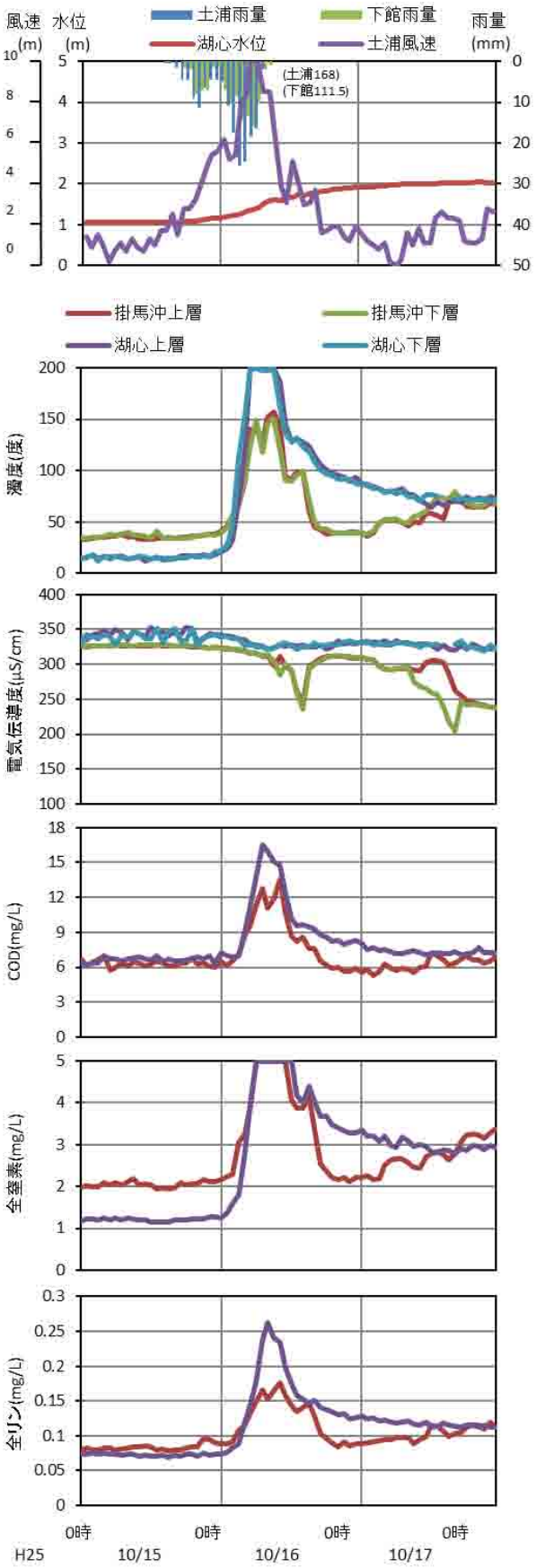


図 5-1　平成 25 年 10 月 15 日～17 日の
各項目の経時変化

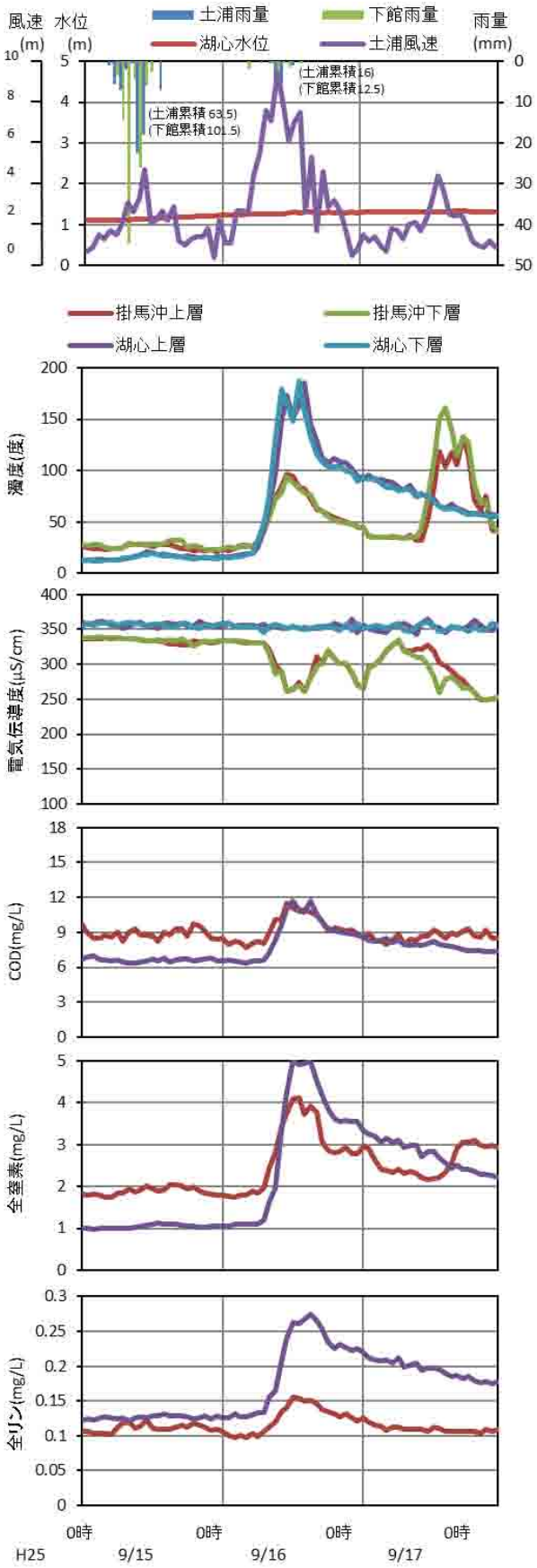


図 5-2　平成 25 年 9 月 15 日～17 日の
各項目の経時変化

目も大きく変化した。土浦観測所で総雨量 60mm 程度の降雨と 20mm 程度の降雨があった平成 25 年 9 月 15 日～17 日の各項目の経時変化を**図 5-2** に示す。15 日と 16 日に降雨があり、16 日より 15 日の降水量が大きかったが、15 日には各水質項目に大きな変化は見られず、16 日には各水質項目に大きな変化が見られた。10 月 16 日と 9 月 16 日では、風速 6m を超える強風が吹いていた。この他、検討対象の期間において、風速 6m を超える強風が吹いた日は、平成 25 年 10 月 9 日（降雨無）、平成 26 年 10 月 6 日（総雨量 200mm 程度の台風）、同 13 日～14 日（総雨量 20～40mm）、同 28 日（降雨無）であり、いずれも各水質項目に大きな変化が見られた。一方、降雨があっても、風速が 6m を超えることがない場合には、各水質項目に大きな変化が見られなかった。

高浜入において昭和 58 年 9 月 27 日から 29 日の台風 10 号による総雨量 100mm 程度・時間最大 8mm程度の降雨の増水時に流入する粒子性栄養塩は、そのほとんどが急速に沈降した報告[13]もあることから、9 月 16 日の各水質項目の大きな変化は、強風による巻き上がりによる影響が大きいものと考えられる。雨量が 100mm を大きく超え、風速 6m を超える強風が吹く台風のような状況を除き、沿岸部を除けば降雨による流入よりも強風による巻き上がりが水質に大きく影響していると考えられた。

５．４ まとめ

霞ヶ浦の自動観測所データより、大雨時・強風時の水質の応答特性を分析し、雨量が 100mm を大きく超え、風速 6m を超える強風が吹く台風のような状況を除き、沿岸部を除けば大雨による流入よりも強風による巻き上がりの水質影響が卓越することを明らかにした。

６．藻類増殖と栄養塩・微量金属との関係

６．１ はじめに

藻類生長に及ぼす栄養塩の影響、実湖沼における水質評価について、これまでは窒素やリンの研究が数多く行われてきた。一方、実湖沼における鉄やマンガンの挙動、藻類生長に及ぼす鉄やマンガンの影響については良く分かっていない。そこで本調査では霞ヶ浦に設置した隔離水界において鉄やマンガンを含めた水質の挙動を評価するとともに、それらの微量金属が藻類生長に及ぼす影響について評価した。本調査は（独）土木研究所と松江土建株式会社が共同研究として実施した。

６．２ 実験材料および実験方法

６．２．１ 隔離水界内の水質挙動評価

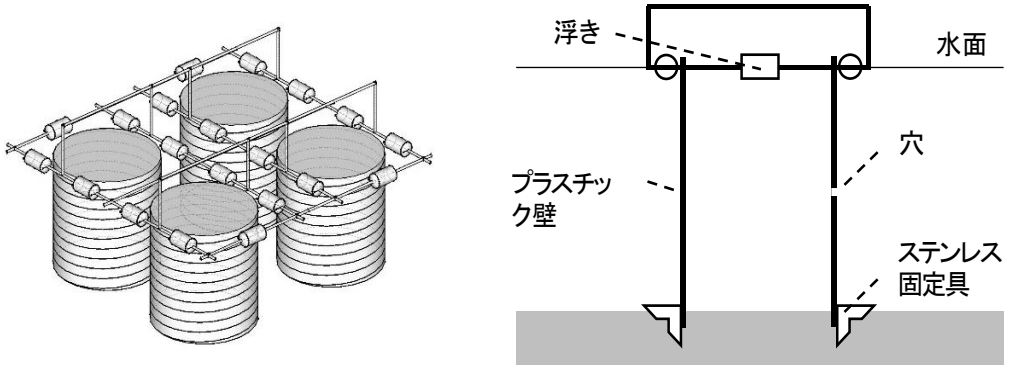
2013 年 6 月に霞ヶ浦に直径 1.2m、長さ 3mの隔離水界（**図 6-1**）を設置した。隔離水界には水面から 1.5m の深さのところに 5cm の穴を設け、霞ヶ浦の水位変動に対応できるようにした。

2013 年 7 月 16、23、30 日および 8 月 8、12、19、22、26 日に、午前 9 時～10 時 30 分の間に水面から 0.5m（表層として）と 2.5m（底層として）から採水を行った。水質として Chl.*a*、水温、pH、溶存酸素 DO、全窒素 T-N、溶存態窒素 DIN、全リン T-P、リン酸態リン PO_4-P、全鉄 T-Fe、溶存態鉄 D-Fe、全マンガン T-Mn、溶存態マンガン D-Mn、溶存態有機炭素 DOC を測定した。

６．２．２ 供試藻類

供試藻類として藍藻類 *Microcystis aeruginosa*（NIES-87）を用いた。本藻類は国立環境研究所より分譲されたものを用いた。

前培養には、CB 培地の成分のうち $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を添



(a) 概観　　(b) 断面図

図 6-1　隔離水界の概要。(a)概観、(b)断面図。

加しない Mn フリーの CB 培地を用いた。光条件は光強度 40 μ mol/m²/s 明暗 12 時間周期、25℃、90rpm 回転振とうとした。生長試験には対数増殖期中期～後期の細胞を使用した。なお、CB 培地の成分は蒸留水 99.7mL に対し $Ca(NO_3)$ ・ $4H_2O$ 15 mg, KNO_3 10mg, Na_2glycerophosphate 5mg, $MgSO_4$・$7H_2O$ 4mg, ビタミン B12 0.01 μg, ビオチン 0.01 μg, チアミン塩酸塩 1 μg, Bicine 50 mg, PIV メタル混液 0.3mL から成る。PIV メタル混液は蒸留水 100mL に対し $FeCl_3$･$6H_2O$ 19.6 mg, $MnCl_2$・$4H_2O$ 3.6 mg, $ZnSO_4$・$7H_2O$ 2.2 mg, $CoCl_2$・$6H_2O$ 0.4 mg, Na_2MoO_4・$2H_2O$ 0.25 mg, Na_2EDTA・$2H_2O$ 100 mg から成る。

６．２．３　藻類生長試験

本試験では鉄の形態（溶存あるいは懸濁）とマンガン添加の有無が *M. aeruginosa* の生長に及ぼす影響を評価する。鉄として Fe-EDTA（$FeCl_3$・$6H_2O$＋EDTA、溶存態として）と EDTA なしの $FeCl_3$・$6H_2O$（懸濁態として、以下 Fe）を用意した。

改変 CB 培地（ビタミン B12、ビオチン、チアミン塩酸塩を添加せず、pH 緩衝材の Bicine の代わりに $NaHCO_3$ を 500mg/L となるよう添加して pH を 8.0 に調整）に対し、鉄とマンガンの添加の有無に基づき以下の 4 系を用意した。

FeEMn：Fe-EDTA および Mn を添加
FeE：Fe-EDTA 添加、Mn 無添加
FeMn：Fe および Mn を添加
Fe：Fe 添加、Mn 無添加

添加濃度は Fe、EDTA いずれも CB 培地の 1/20 とし、Mn は CB 培地と同じとした。初期細胞濃度は 1 万 cells/mL、培養条件は２．２と同じとし、3 日あるいは 4 日おきに細胞濃度を測定した。試験は 4 連とした。AGP 試験 [1]に基づき、1 日当たりの細胞濃度の増加が 5%未満になるまで測定を行った。細胞濃度の測定は粒子計数分析装置（CDA-1000B、100μm アパチャー、Sysmex 社）を用いて行った。

６．３　実験結果及び考察

６．３．１　隔離水界内の水質挙動評価

各水質項目の変化を**図 6-2、図 6-3** に示す。底層では 7 月 23 日以降に DO がほぼゼロとなり、表層よりも T-N,

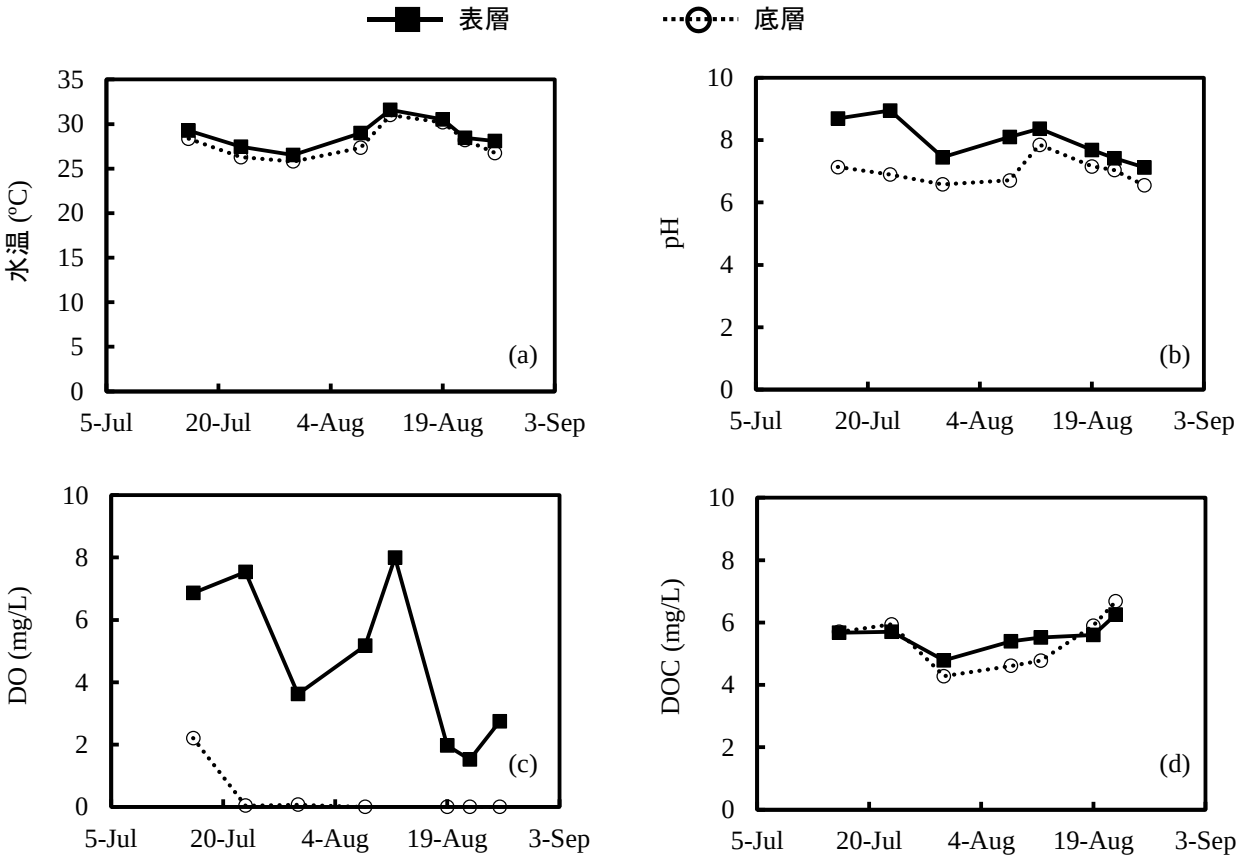


図 6-2　隔離水界の表層、底層における　(a)水温、(b)pH、(c)DO、(d)DOC

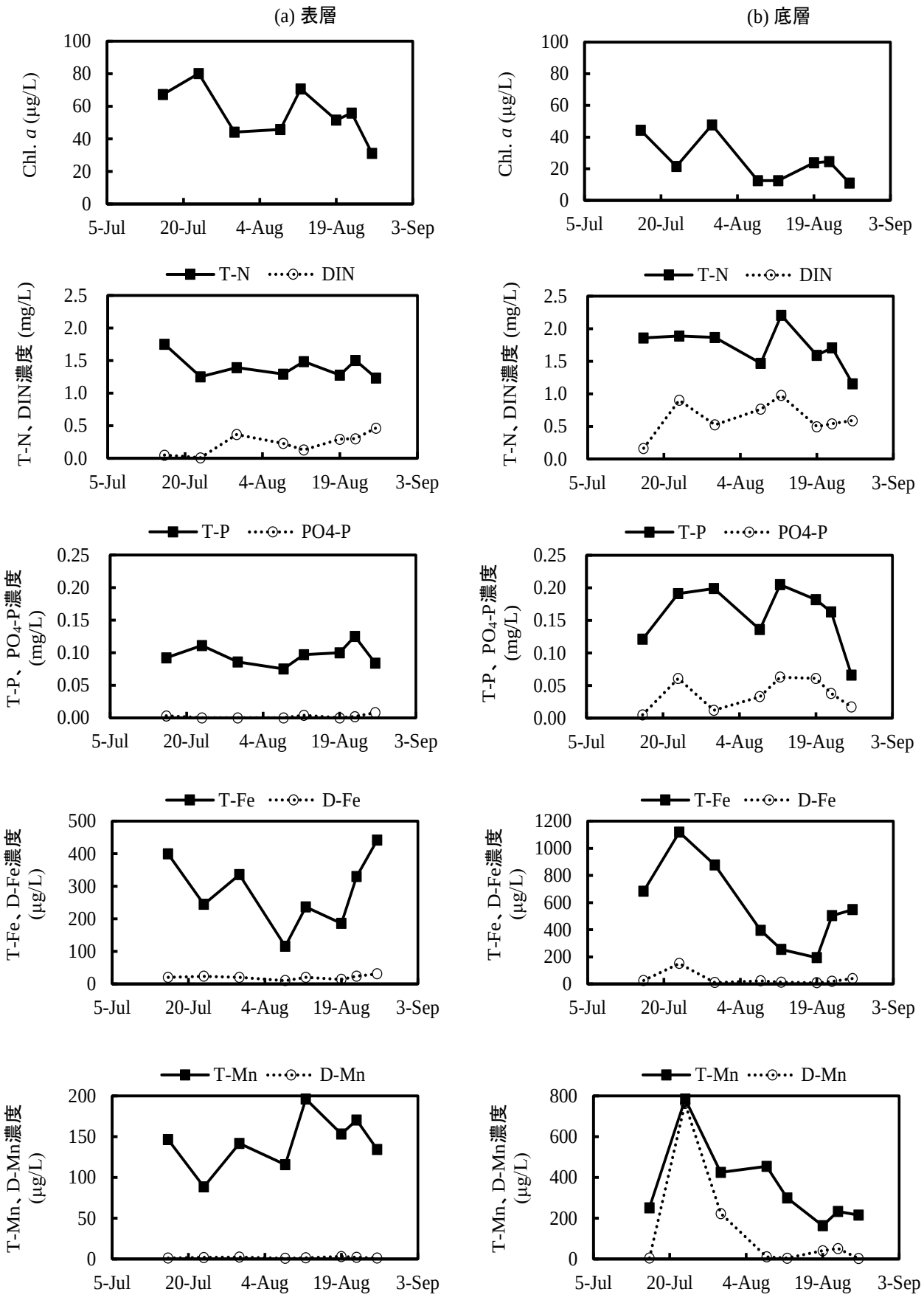


図 6-3　隔離水界の(a)表層、(b)底層における Chl.*a*、T-N、DIN、T-P、PO_4-P、T-Fe、D-Fe、T-Mn、D-Mn

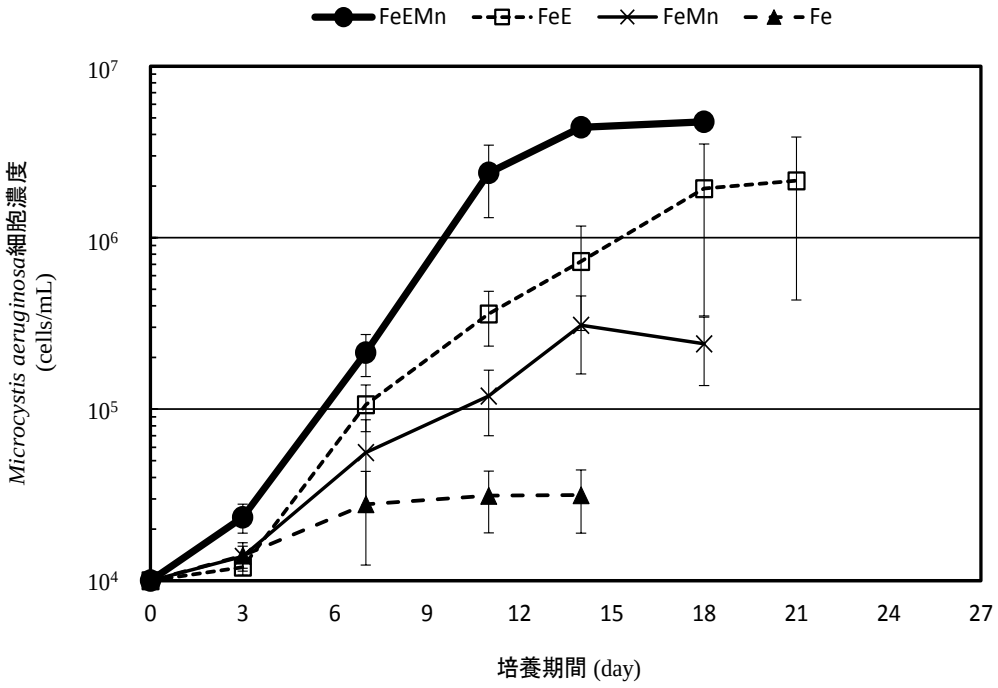


図 6-4　鉄性状が異なる条件下（溶存態・懸濁態）でのマンガン添加・無添加の場合の *Microcystis aeruginosa* 生長曲線

DIN, T-P, PO_4-P, T-Fe, D-Fe, T-Mn, D-Mn の濃度が高くなる傾向が見られた。その原因としては底泥からの溶出が考えられた。DOC については表層と底層でほぼ同程度であったことから、底泥から DOC 成分はほとんど溶出しなかったと推定された。D-Mn 濃度は 7 月 23 日に非常に高かったが、その後は急激に減少した。そのような変動は 23 日以降は D-Mn の溶出がほとんど無かった一方、拡散や藻類による消費などが原因として推定された。

底層では 7 月 30 日と 8 月 19～22 日に Chl.*a* のピークが見られた。それらのピークが見られた際には DIN と PO_4-P 濃度が低下する傾向にあった。T-N, T-P, T-Fe, D-Fe, T-Mn, D-Mn については、変動について Chl.*a* との明確な関連性は見られなかった。T-Fe と T-Mn について Chl.*a* との明確な関連性が見られなかったのは、底層でのそれらの濃度が高すぎたためと考えられた。

表層では Chl.*a* 濃度は 7 月 23 日に高く、7 月 30 日と 8 月 8 日に低下した。8 月 12 日に Chl.*a* 濃度のピークが見られた意向は濃度が減少する傾向にあった。T-N, T-P, D-Fe 濃度の変動は Chl.*a* 濃度と関連性が無かった。底泥からは 7 月 23 日に D-Mn が溶出したと考えられるが、表層での D-Mn 濃度は 3.0 μg/L と低く、藻類による利用が推定された。D-Mn 濃度が試験期間中ほとんどゼロであったため、T-Mn 成分はほぼ全てが懸濁態 Mn（P-Mn）であったと考えられるが、P-Mn 濃度と Chl.*a* 濃度の挙動は類似していた。このような関連性は、藻類による Mn の取り込みや吸着が原因であると推定された。また、Chl.*a* 濃度と DIN 濃度の増減は逆の関係にあることが示されたが、その原因は底層と同様に、藻類生長に伴う DIN 消費であると考えられた。T-Fe（D-Fe 濃度が極めて低いため、ほぼ懸濁態鉄 P-Fe）も DIN と同様の挙動を示すことから、藻類は DIN 同様に P-Fe も生長に利用したと推定された。

これらの結果に基づく仮説として、藻類は生長のために D-Mn を蓄積し、D-Mn を利用して P-Fe を消費するのではないかと考えた。そこで以下に示す藻類生長試験により仮説の検証を行った。

６．３．２　藻類生長試験

図 6-4 に各培養条件での *M. aeruginosa* の増殖曲線を示す。Fe-EDTA を添加した系では、マンガン添加あり（FeEMn）、添加無し（FeE）いずれもよく生長したが、最大細胞濃度は FeEMn の方が有意に大きくなった（$p<0.05$）。Fe の系では *M. aeruginosa* はほとんど生長しなかったが、それは Fe を利用できなかったためと考えられた。しかし、マンガンを添加した FeMn の系では生長が確認された。

Microcystis aeruginosa が Mn フリーの CB 培地で生

長できたことから、Mn は *M. aeruginosa* にとって必須栄養素ではないと考えられる。しかし Mn を添加した系では生長が促進されたことから、Mn は *M. aeruginosa* の溶存・懸濁態鉄いずれにおいてもその利用性を向上させる作用があると示唆された。よって本調査の隔離水界において表層の P-Fe（T-Fe）と Chl.a の増減は逆の関係にあったのは、Mn を蓄積した藻類の生長に伴う P-Fe の消費が原因であると推定された。既往の研究ではアオコ形成の制限因子として窒素やリンに着目した例が多いが、本調査から Mn もまた藻類の鉄利用性の向上を介してアオコ形成の重要な因子になりうると考えられた。

６．４　まとめ

霞ヶ浦に設置した隔離水界内の各種水質項目を測定した。底層では Chl.*a* 濃度の変動は鉄やマンガンとの関連が見られなかったが、表層では Chl.*a* 濃度の変動に対し懸濁態鉄（P-Fe）は負の相関、懸濁態マンガン（P-Mn）は正の相関があると考えられた。このため隔離水界内の藻類は底泥から溶出した溶存態マンガン（D-Mn）を蓄積し、P-Fe を生長に利用していると推定された。室内培養試験から Mn は鉄の状態（溶存態、懸濁態）に関係なく *M. aeruginosa* の生長を促進させることが明らかになった。Mn は鉄の利用性を向上させることによってアオコ形成に寄与する重要な因子になりうることが示唆された。

７．藻類増殖速度への微量金属（Fe、Mn）の役割と生態系モデルによる閉鎖性水域の水質変化予測

７．１　はじめに

既往の研究から藻類生長を考慮した生態系モデル [1]が構築されており、湖沼の水質予測にはそのモデルの活用が有効であると考えられる。しかしその既存モデルでは鉄やマンガンを考慮していないため、新規にモデル式やパラメータを導出する必要がある。そこで本節では鉄とマンガンが藻類生長に及ぼす影響を定量的に評価することによりモデル式の構築を行った。また、確立したモデル式やパラメータ値を既存モデルに組み込み、モデルに基づく水質予測を行った。

７．２　実験材料および実験方法

７．２．１　供試藻類

供試藻類として藍藻類 *Microcystis aeruginosa*（NIES-87）を用いた。本藻類は国立環境研究所より分譲されたものを用いた。

前培養は CB 培地の成分のうち、$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を添加しない Mn フリーの CB 培地を用いた。光条件は光強度 40 μ mol/m²/s 明暗 12 時間周期、25℃、90rpm 回転振とうとした。生長試験には対数増殖期中期～後期の細胞を使用した。

７．２．２　鉄が藻類生長に及ぼす影響

Fe、Mn 未添加の CB 改変培地に対し Fe として 0.1、1、5、10、50μgFe/L となるよう Fe-EDTA を添加した。これらの試験水に *M. aeruginosa* 初期細胞濃度が 1 万 cells/mL となるよう添加した。培養条件は光条件は光強度 40 μ mol/m²/s 連続照射、25℃、90rpm 回転振とうとし、12 時間おきに細胞濃度を測定した。培養期間内において対数増殖期になったと判断された期間での生長速度（day^{-1}）を求めた。

７．２．３　マンガンが藻類生長に及ぼす影響

Fe、Mn 未添加の CB 改変培地に対し Fe として 10μgFe/L となるよう Fe-EDTA を添加した。さらに Mn 濃度が 0（無添加）、1、5、10、50μgMn/L となるように添加した。これらの試験水に *M. aeruginosa* 初期細胞濃度が 1 万 cells/mL となるよう添加した。培養条件は光条件は光強度 40 μ mol/m²/s 連続照射、25℃、90rpm 回転振とうとし、12 時間おきに細胞濃度を測定した。培養期間内において対数増殖期になったと判断された期間での生長速度（day^{-1}）を求めた。

７．３　実験結果

７．３．１　鉄が生長に及ぼす影響のモデル化

図 7-1 に *M. aeruginosa* の生長速度と Fe 濃度との関係を示す。Fe 濃度が高くなるほど生長速度が大きくなる傾向が確認された。

藻類生長と栄養塩濃度に関するモデル式として、以下に示す Monod 式（式(1)）が良く使われる。

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_{Fe}}{K_0 + C_{Fe}} \quad \cdots(1)$$

ここに、

μ：生長速度（day^{-1}）

μ_{max}：最大生長速度（day^{-1}）

K_0：鉄に関する半飽和定数（μg/L）

C_{Fe}：鉄濃度（μgFe/L）

式(1)を変形すると以下の式(2)で表される。

$$\frac{C_{Fe}}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} C_{Fe} + \frac{K_0}{\mu_{max}} \quad \cdots(2)$$

式(2)に基づき実験で得られた値を整理し直線近似を行う

ことにより**図 7-2** が得られる。この近似式から、μ_{max} = 0.943 day^{-1}、K_0= 4.88 μgFe/L と求められた。

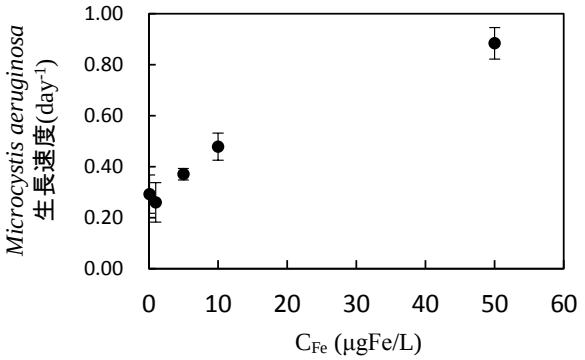


図 7-1　鉄が *Microcystis* の生長に及ぼす影響

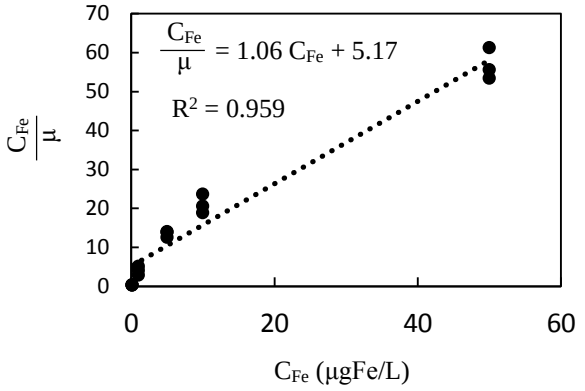


図 7-2　*Microcystis* の生長と鉄濃度との関係

７．３．２　マンガンが生長に及ぼす影響のモデル化

図 7-3 に *M. aeruginosa* の生長速度と Mn 濃度との関係を示す。Fe 濃度が高くなるほど生長速度が大きくなる傾向が確認されたが、5μgMn/L 程度以上からは μ_{max} と同程度になった。

Mn そのものは *M. aeruginosa* の必須栄養塩ではなく、鉄の利用性を向上させると推定されることから、式(3)に示すようにマンガンは鉄に関する半飽和定数の変数として組み込むこととした。

$$K_{FeMn} = K_0 \, e^{-\alpha C_{Mn}} \quad \cdots(3)$$

ここに、

K_{FeMn}：マンガンの影響を考慮した鉄に関する半飽和変数（μg/L）

C_{Mn}：マンガン濃度（μgFe/L）

α：定数（-）

各 Mn 濃度で示された μ から K_{FeMn} を求め、K_{FeMn} と C_{Mn} の関係を示すと**図 7-4** の通りとなる。ただし、μ の値に基づき導出された K_{FeMn} が負の値になった場合は K_{FeMn} = 0 とした。試験結果を式(3)に当てはめ、α = 0.382 と求められた。よって、藻類生長に及ぼす鉄とマンガンの影響を考慮したモデル式として以下に示す式(4)が構築できた。

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_{Fe}}{K_{FeMn} + C_{Fe}}$$

$$= 0.943 \frac{C_{Fe}}{4.88 \, e^{-0.382 C_{Mn}} + C_{Fe}} \quad \cdots(4)$$

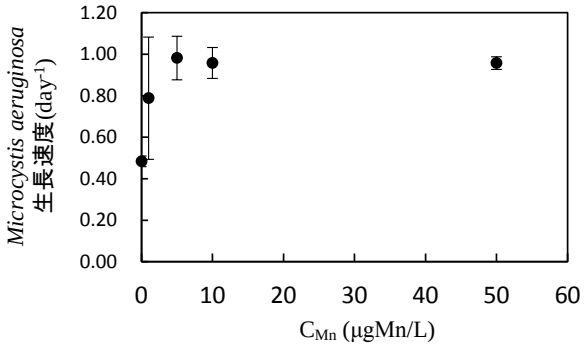


図 7-3　マンガンが *Microcystis* の生長に及ぼす影響

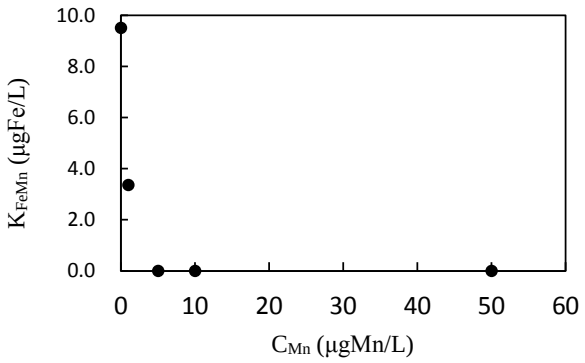


図 7-4　マンガン濃度と鉄の半飽和定数との関係

７．３．３　底泥からの鉄およびマンガン溶出パラメータの導出

既往の研究 [14]では、底泥から一定の割合で栄養塩が溶出（無機化）すると考えた溶出速度を採用している。そこで本調査ではそのモデルを参考にし、**２．３の図 2-2** 及び**図 2-3** で示された DIN、PO_4-P, D-Fe, D-Mn の H27 年 8 月サンプルの溶出試験結果のうち 0-10 日間の溶出をもとに好気・嫌気条件下における窒素、リン、鉄、マンガンの溶出速度を算出した（**表 7-1**）。溶出速度は、湖心、掛馬沖、土浦沖のデータのうち、最も大きい値を採用した。

表 7-1　好気・嫌気条件における各種栄養塩の溶出速度

水質項目	溶出速度（day^{-1}）		使用したデータ
	好気	嫌気	
DIN	6.3×10^{-3}	2.8×10^{-3}	好気、嫌気ともに2．3　図2-2の湖心のデータを使用
PO_4-P	1.9×10^{-3}	2.6×10^{-3}	好気は2．3　図2-2の土浦港沖、嫌気は同図の湖心のデータを使用
D-Fe	0	1.1×10^{-6}	好気はどの地点も溶出なし、嫌気は2．3　図2-3の湖心のデータを使用
D-Mn	0	1.0×10^{-3}	好気はどの地点も溶出なし、嫌気は2．3　図2-3の掛馬沖のデータを使用

本調査で得られた鉄・マンガンに関する知見を既存の藻類生長モデル [14]に組み込むことにより、藻類量や各種栄養塩の挙動を考慮した水質変化予測手法を構築することができた。

7．4　生態系モデルによる水質変化予測

既往の研究 [1]に基づくモデルの概念を**図 7-5** に示す。本モデルは水層と堆積層で構成された完全混合を仮定した 2 ボックスモデルであり、藻類生長や死亡、栄養塩の循環、藻類や栄養塩の流入出が考慮されている。構築したモデ

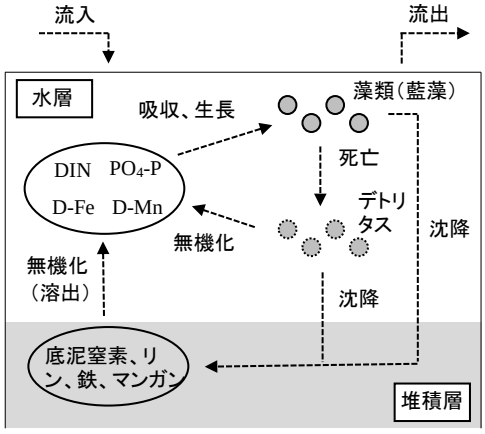


図 7-5　水質予測モデルの概念

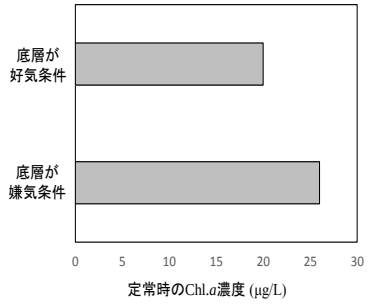


図 7-6　水質予測モデルに基づく好気・嫌気条件下での定常時の Chl.*a* 濃度の比較

ルに基づき計算を実施した。計算は仮想湖沼を想定し、希釈率 0.5 年、湖沼体積 40,000m^3、平均水深 4m とした。流入水の水質は Chl.*a* 5μg/L、デトリタス濃度 5μg/L、DIN 0.1mg/L、PO_4-P 0.01mg/L、D-Fe 5μg/L、D-Mn 1μg/L とした。また湖沼水の各水質の初期値は Chl.*a* 10μg/L、デトリタス濃度 10μg/L、DIN 2mg/L、PO_4-P 0.2mg/L、D-Fe 5μg/L、D-Mn 5μg/L とした。水温は 25℃とした。計算には式(4)、**表 7-1** の各パラメータ値のほか、既往の研究 [14]で示されたモデル式や各種パラメータ値を用い、生態系モデルを構築した。これらの条件により計算を実施し、約 3 ヶ月を経過した際の定常状態における Chl.*a* 濃度を算出した。

計算結果を**図 7-6** に示す。定常時の Chl.*a* の値は好気条件よりも嫌気条件のほうが高くなることが示された。本モデル計算において藻類生長は窒素制限になっていたが、**表 7-1** でも示したように本モデルにおいて底泥からの窒素の溶出速度は好気条件のほうが大きい設定となっている。また、定常状態での PO_4-P 濃度は好気、嫌気でそれぞれ 0.876mg/L、0.766mg/L であり、リンは余剰に残存していた。本計算では好気条件では Fe、Mn は溶出しないが嫌気では溶出することから、嫌気時のほうが Chl.a 濃度が高くなった要因として Fe、Mn も寄与していると考えられた。

本調査およびモデル解析により、湖沼において窒素、リンのみならず Fe、Mn もまた藻類生長を促進する栄養塩となることが示唆できた。今後の課題として、Fe や Mn などの微量金属によるアオコ形成メカニズムや、微量金属管理によるアオコ抑制の検討を行うため、湖沼水に対して微量金属を添加した藻類生長試験を実施することが重要であると考えられた。

7．5　まとめ

藍藻 *Microcystis aeruginosa* を供試藻類として鉄とマンガンが生長に及ぼす影響を定量的に評価し、成長モデルを確立した。また担体を用いた栄養塩溶出試験に基づき、好気・嫌気条件下での各種栄養塩の溶出速度を導出した。これらのモデルやパラメータ値を活用して既存の生態系モデルに組み込み、湖沼での水質予測が可能な生態系モデルを構築した。モデルによる計算結果から、窒素、リンのみならず鉄やマンガンなどの微量金属の溶出もまた湖沼における藻類生長促進を引き起こすことが示唆さ

れた。

８．まとめ

栄養塩類濃度の変化が底泥からの溶出に与える影響、環境の変化が水質・底質におよぼす影響、閉鎖性水域の水質変化予測手法、水質汚濁対策手法の水質改善に対する寄与について検討を行い以下の結果を得た。

- 霞ヶ浦において浚渫実施区域と未実施区域についての底泥の溶出試験を行い、今回得られたデータにおいて、掛馬沖（浚渫実施区域）における栄養塩溶出速度は、湖心（浚渫未実施区域）と比べて小さいことを確認した。
- 近年のアオコ発生前後の気象・水象データから藻類増殖要因を検討して藻類増殖を助長しうる要因を抽出し、さらに自動観測所データをもとにアオコ発生期の簡易予測手法を提示した。
- 台風による出水前後の底質の溶出試験より、NH_4-N 溶出速度は台風通過後に大幅に上昇し、PO_4-P 溶出速度は減少した。また、底泥の地点別、深度別の細菌群集が栄養塩類の溶出に与える影響を把握した。
- 霞ヶ浦の自動観測所データより、大雨時・強風時の水質の応答特性を分析し、沿岸部を除けば大雨による流入よりも強風による巻き上がりの水質影響が卓越することを明らかにした。
- 湖沼等の藻類増殖と栄養塩・微量金属との関連性について、藻類生長試験により評価した。
- 藻類の増殖速度への微量金属(Fe, Mn)の役割と実際の湖沼やダム貯水池等での挙動を解明した。
- 底質からの栄養塩溶出に寄与する要因を整理し、閉鎖性水域の水質変化予測手法を提案した。

「なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである」

参考文献

1) 国土交通省関東地方整備局（2016）平成 28 年度霞ヶ浦河川事務所の事業概要について http://www.ktr.mlit.go.jp/ktr_content/content/000646140.pdf（2016 年 6 月時点）
2)環境省水・大気環境局（2012）底質調査方法、417
3)湖沼技術研究会底質ワーキング（2009）底質に係わる技術資料、141
4) 霞ヶ浦河川事務所 HP、アオコ日誌 http://www.ktr.mlit.go.jp/kasumi/kasumi00313.html
5) 茨城県霞ケ浦環境科学センター（2014）霞ヶ浦の水質状況、 http://www.kasumigaura.pref.ibaraki.jp/04_kenkyu/kasumigaura/kasumigaura.html （2015 年 3 月時点）
6) 柴山慶行、平山孝浩、池田茂（2013）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、土木研究所資料、4275、65-68
7) 柴山慶行、對馬育夫、平山孝浩、岡本誠一郎（2014）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、土木研究所資料、4294、70-76
8) 底質浄化協会（2003）底質の調査・試験マニュアル（改訂第三版）、技術資料 2003-3、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、土木研究所資料、4275、65-68
9) Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplles J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, Nucleic Acids Research, 41, 1-11
10) Edgar R. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, Bioinformatics, 26(19), 2460-2461
11) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, Nature Methods, 7, 335-336
12) 中薗孝裕、阿部千雅、鈴木譲（2009）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、45-52
13)森田弘昭、山田幸男、安中徳二(1985)、洪水時に湖に流入する粒子性栄養塩の挙動、水質汚濁研究 Vol.8、No.4、pp.233-238
14) 武田文彦、中野和典、相川良雄、西村修、島多義彦、袋昭太、仲沢武志、田中仁志、林紀男、稲森悠平 : 生態系モデルによる沈水植物アレロパシーの微細藻類量・群集構造に及ぼす影響解析、水環境学会誌、37(2)、15-28、2014

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（水質チーム）
研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一、真野浩行

【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ことが必要である。本研究課題では、都市部を流れる河川を対象に、医薬品類 10 物質について実態および挙動を調査した。また、PRTR 制度第一種指定化学物質について、下水処理水での生態リスクに基づいたスクリーニングを行い、実態と挙動を調査すべき化学物質を抽出した。抽出した PRTR 化学物質について、都市部の河川での実態および挙動を調査した。また、河川の実態調査結果を用いて、調査対象物質の生態リスク初期評価を実施した。
キーワード：未規制化学物質、環境中動態、一次反応、PPCPs、PRTR 制度

1. はじめに

医薬品類など、水質規制の対象となっていない化学物質（未規制物質）の中には、生活の中で使用されたのち、下水道などを通じて水環境中に排出される物質が含まれている。近年、水環境中に流出する未規制物質による水生生物への影響が懸念されており、水環境における未規制物質の効率的なリスク管理や削減対策が求められている [1)]。下水道事業者がリスク管理や低減対策を講じる上で、未規制化学物質の水環境中での存在実態や挙動を明らかにするとともに、喫緊に対応すべき化学物質を把握することが必要である。

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について、水環境における水生生物への影響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。都市部を流れる河川を対象に、生態影響が懸念される医薬品類および PRTR 制度第一種指定化学物質について存在実態および挙動を調査した。得られた結果を基に、また、より詳細な評価が必要とされる化学物質を明らかにするために生態リスク初期評価を実施した。

2. 医薬品類の実態・挙動の調査

2. 1　目的

近年、医薬品類による水生生物への影響が懸念されている [2)]。そこで、都市部を流れる河川における医薬品類の存在実態とともに流下過程での挙動を調査した。

2. 2　対象医薬品類

本研究では、国内の出荷量 [3)]、実河川中での実態 [4)]、および水生生物への毒性 [4)]の点から、医薬品類 10 物質を調査対象に選定した（表－1）。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、ng/L オーダーで水生生物に影響するものもある。

表－1　調査対象の医薬品類

物質名	主な効用
Azithromycin	マクロライド系抗生物質
Bezafibrate	高脂血症治療薬
Caffeine	中枢興奮・強心・利尿剤
Clarithromycin	マクロライド系抗生物質
Crotamiton	かゆみ止め軟膏
Ibuprofen	消炎・鎮痛・解熱剤
Ketoprofen	消炎・鎮痛・解熱剤
Levofloxacin	フルオロキノロン系合成菌剤
Sulfamethoxazole	サルファ剤（感染症治療薬）
Triclosan	殺菌剤

2. 3 調査方法

2.3.1 多摩川

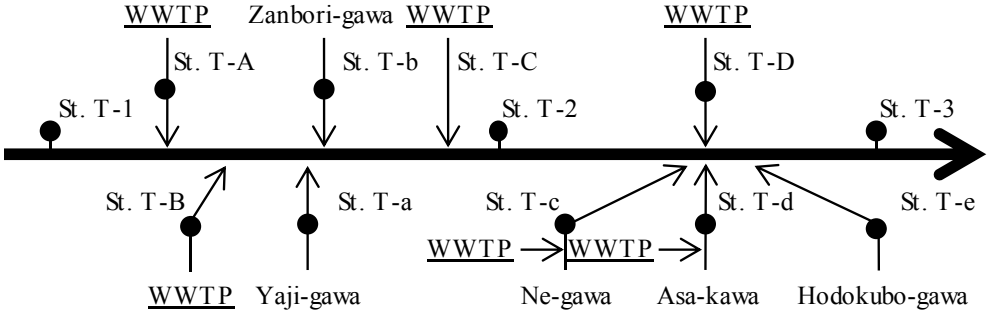
多摩川は、山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本川である（河川法河川延長：481.0 km、流域面積：1240 km^2、流域人口：約 380 万人[5]）。高度成長期の急激な流域の都市化の影響を受けて水質が悪化したが、下水道整備や河川浄化施設の設置などに伴い水質改善が進み、近年では中流域（多摩川原橋）の水質は、BOD 2mg/L 程度で推移している（2001 年以降の環境基準は B 類型、BOD 3mg/L）。一方で、人口増加および下水道普及率の上昇に伴い、中流域においては渇水期に河川流量の 5 割以上を下水処理水が占めることもある。

本研究では、中流域の約 11km の調査区間を設定し、2011 年の 6/10、10/17、2012 年の 1/31、2/16、8/22、2013 年の 1/30、9/30、12/17、2014 年の 8/25、10/27、12/16 の合計 11 回調査を行った（表－2）。調査地点の概要を図－1 に示す。調査地点 St. T-e は、2013 年の 9/30 以降の調査回で対象とした。

また、医薬品類の流下過程での減衰を検討するため、2012 年の 1/31、2/16、8/22、2013 年の 1/30、9/30、2014 年の 12/16 において、「河川砂防技術基準（案）[8]」に準じて、河川の調査地点において、流量観測を行った。また、東京都下水道局から下水処理場からの調査日の放流量データを入手した。得られた流量データから、調査地点ごとに一日当たりの流量を推計した。ただし、St. T-c では、2011 年の 6/10、10/17、2012 年の 1/31、2/16、8/22、2013 年の 1/30 において流量観測を行わなかったため、東京都環境局より入手した調査日と同じ月の流量データを代用した。

表－2　各対象河川での調査対象の医薬品類の実態調査と挙動調査の調査時期一覧

調査河川	実態の調査	挙動（減少係数）の調査
多摩川	2011年6/10、10/17 2012年1/31、2/16、8/22 2013年1/30、9/30、12/17 2014年8/25、10/27、12/16	2012年1/31、2/16、8/22 2013年1/30、9/30 2014年12/16
秋山川	2011年12/19 2012年2/9、5/24、7/10、9/18、12/13 2013年1/7、9/30 2014年1/7	2011年12/19 2012年2/9、5/24、7/10、9/18、12/13 2013年1/7、9/30 2014年1/7
印旛沼流域	2012年1/12、1/19	-
妙正寺川	2012年2/13	-
鶴見川	2015年1/29	-



図－1　多摩川の調査地点

2.3.2 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[6]）。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。終末処理場の流入地点上流から末流までの約 3km を調査区間として設定し、2011 年の 12/19、2012 年の 2/9、5/24、7/10、9/18、12/13、2013 年の 1/7、9/30、2014 年の 1/7 の合計 9 回調査を行った（表－2）。調査地点の概要を図－2 に示す。

また、医薬品類の流下過程での減衰を検討するため、河川調査に併せて、「河川砂防技術基準（案）[8]」に準じて各調査地点で流量観測を行った。放流口から 30m 下流の地点で流量を観測した。また、下水処理場からの調査日の放流量のデータを入手した。放流口下流の河川地点での流量の測定値から下水処理場の放流量を引くことで、河川上流の調査地点における流量を推計した。

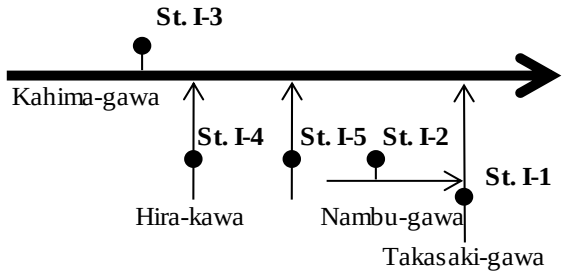


図－2　秋山川の調査地点

2.3.3 印旛沼流域

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 494 km^2、流域人口：約 77 万人[7]）。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。

本研究では、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、2012 年の 1/12、1/19 に調査を行った。調査地点の概要を図－3 に示す。

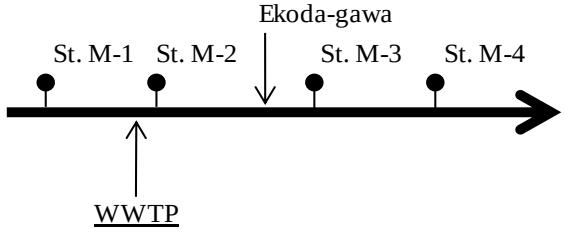


図－3　印旛沼流域の調査地点

2.3.4 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^2、流域人口：36.6 万人[8]）。近年は BOD 2mg/L 程度で推移している（類型指定なし）。

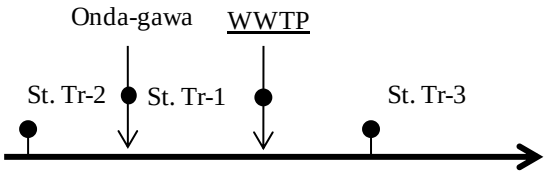
秋山川と同様に、終末処理場の流入地点より下流では、河川流量に対する下水処理水の寄与が大きくなっていることから、流下過程における微量汚染化学物質の挙動を検討することを目的として、2012 年の 2/13 に調査を行った。調査地点の概要を図－4 に示す。



図－4　妙正寺川の調査地点

2.3.5 鶴見川

鶴見川は東京都および神奈川県を流れる鶴見川水系の本川である（河川法河川延長：94.9km、流域面積：235km^2、流域人口：約 205 万人[5]）。本研究では、鶴見川と恩田川の合流地点付近から約 4km を調査区間として設定し、2015 年の 1/29 に調査を実施した。調査地点の概要を図－5 に示す。調査日の日中と日没後に各調査地点で河川水を採取した。



図－5　鶴見川の調査地点

2. 4 分析方法

アルミ箔で遮光したガラス瓶に満水状態で採水し、アスコルビン酸（酸化防止剤）と Na_2EDTA（マトリックス元素のマスキング剤）をそれぞれ約 1g/L となるように加え、冷蔵状態で試験室へ持ち帰った。試料中の溶存態成分について、Triclosan は、Nakada *et al.*[9]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[10]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、同位体希釈法により定量した。本研究では、濃度が検出下限値以上で定量下限値未満の値を示した場合は、その値を濃度として用いた。

2. 5 減少係数の算出

医薬品類が流下過程において、一次反応式に従って減少するという仮定の下で、花本ら[11]を参考に、多摩川及び秋山川において、減少係数 k を以下の式から求めた。

調査区間の最下流地点での負荷量 ＝

$$\sum \text{調査地点}i\text{の負荷量} \times e^{(-k \times \text{調査地点}i\text{から最下流地点までの流下時間})} \quad (1)$$

各調査地点の対象医薬品類の負荷量を把握するため、調査地点ごとに医薬品類の濃度と一日当たりの流量の積から負荷量を算出した。また、医薬品類濃度が検出下限値未満の場合には、検出下限値の 1/2 の値を用いた。また、各調査地点から最下流地点までの流下時間を、Google map を用いて計測した流下距離を本川および支川の調査地点での流量観測で推定された流速で除して求めた。

2. 6 結果と考察

2.6.1 医薬品類の存在実態

表－3 に多摩川流域の調査地点における調査対象の医薬品類 10 物質の分析結果を示す。生活系・事業系排水の影響が少ない上流地点 St. T-1 において、caffeine 以外の 9 物質は、中央値で 10 ng/L 以下と低濃度で検出された。Caffeine は他の医薬品類に比べて、St. T-1 において高濃度で検出された。下水処理水が流入する調査範囲の中流地点 St. T-2 と下流地点 St. T-3 において、azithromycin、caffeine、clarithromycin 、 crotamiton 、 levofloxacin 、 sulfamethoxazole は、最大で 100ng/L を超える濃度で検出された。多摩川の支川では、生活系・事業系排水の影響が少ない St. T-a と T-b に比べ、下水処理水が流入する St. T-c と T-d では、医薬品類が高い濃度で検出された。ただし、St T-a では caffeine が高い濃度で検出されており、この支川に生活系の排水が流入していることが考えられた。下水処理場の排水樋門では、caffeine と ibuprofen を除き、高い濃度で医薬品類が検出された。排水樋管において、caffeine は本川、支川と同程度か低い濃度で検出された。

表－4 に秋山川での調査地点における調査対象の医薬品類 10 物質の分析結果を示す。caffeine 以外の医薬品類 9 物質は河川上流の調査地点 St. A-1 に比べて、下水処理場の放流口 St. A-A および河川下流の調査地点 St. A-2 で比較的高い濃度で検出された。特に、azithromycin、bezafibrate、clarithromycin、crotamiton、ketoprofen、levofloxacin、sulfamethoxazole は、下水処理場放流水において、中央値が 100ng/L 以上の濃度で検出された。Caffeine は河川上流の調査地点 St. A-1 で比較的高い濃度で検出され、下流では St. A-1 より低い濃度で検出された。

表－3 多摩川における医薬品類 10 物質の分析結果（ng/L）

	Azithromycin			Bezafibrate			Caffeine			Clarithromycin			Crotamiton		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
T-1	4/8	0.29	0.78	5/6	0.27	1.2	7/7	39	330	8/8	0.3	0.93	7/7	7.4	12
T-2	10/10	110	210	8/8	68	91	9/9	130	230	10/10	250	600	10/10	515	950
T-3	11/11	72	130	9/9	62	72	9/9	110	270	11/11	150	440	10/10	465	790
T-a	7/8	10	23	7/7	31	150	8/8	435	1600	8/8	21	46	8/8	36.5	58
T-b	7/8	0.37	1.6	4/7	0.17	0.34	8/8	61	110	8/8	0.82	2.3	8/8	5.05	8.3
T-c	7/7	430	500	6/6	175	360	6/6	185	770	7/7	900	1200	6/6	1100	1800
T-d	7/7	5.6	19	6/6	31.5	110	6/6	270	390	7/7	56	100	6/6	200	300
T-e	2/3	3.8	5.3	2/2	5.4	8.7	2/2	50.5	76	3/3	19	45	2/2	59.8	110
T-A	8/8	355	430	7/7	100	140	8/8	36	170	8/8	36	170	8/8	36	170
T-B	8/8	465	610	7/7	110	180	8/8	44	130	8/8	1150	1800	8/8	1300	2100
T-C	8/8	415	570	7/7	360	910	8/8	57	160	8/8	740	1000	8/8	895	1200
T-D	7/7	350	380	6/6	74	130	6/6	38	310	7/7	880	980	6/6	1040	1700

	Ibuprofen			Ketoprofen			Levofloxacin			Sulfamethoxazole			Triclosan		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
T-1	1/6	0.1	0.1	5/7	0.54	1	3/8	0.86	1.1	6/6	0.91	1.2	8/8	1.55	4.9
T-2	7/8	3.3	14	10/10	2.7	30	10/10	185	410	9/9	72	140	10/10	42.95	61
T-3	8/9	2.3	3.8	10/10	1.75	18	11/11	130	270	10/10	77	150	11/11	31	47.7
T-a	6/7	7.5	10	6/8	1.55	6.4	8/8	6.95	31	7/7	4	15	8/8	7.95	15
T-b	2/7	0.13	0.14	7/8	0.41	0.64	8/8	1.9	4.8	7/7	1.3	2	8/8	3	5.7
T-c	6/6	13.5	46	6/6	360	500	7/7	1000	1200	6/6	140	520	7/7	180	210
T-d	6/6	2.9	5.9	5/6	0.43	1.9	7/7	30	57	6/6	42.5	73	7/7	15	27.1
T-e	1/2	0.55	0.55	2/2	0.21	0.27	3/3	6	31	2/2	34	49	3/3	7.1	10
T-A	4/7	1.66	7.5	8/8	200	300	8/8	630	780	7/7	180	230	8/8	155	230
T-B	4/7	1.11	2.2	8/8	255	450	8/8	805	1100	7/7	140	290	8/8	128.9	160
T-C	7/7	38	150	8/8	305	690	8/8	720	910	7/7	180	190	8/8	145	200
T-D	4/6	0.54	2.3	6/6	360	520	7/7	730	890	6/6	140	280	7/7	210	220

表－4 秋山川における医薬品類 10 物質の分析結果（ng/L）

	Azithromycin			Bezafibrate			Caffeine			Clarithromycin			Crotamiton		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
A-1	5/8	0.5	0.53	8/8	1.2	9	8/8	81.5	170	8/8	1.9	5.6	8/8	10.1	50
A-2	8/8	120	230	8/8	130	570	8/8	49	68	8/8	260	660	8/8	350	2000
A-A	8/8	130	370	8/8	375	760	8/8	33.5	49	8/8	405	710	8/8	500	2200

	Ibuprofen			Ketoprofen			Levofloxacin			Sulfamethoxazole			Triclosan		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
A-1	6/8	0.9	2.2	6/8	0.3	0.38	5/8	1	1.6	8/8	2.9	15	8/8	3.2	5.6
A-2	8/8	3.9	21	8/8	5	35	8/8	200	460	8/8	42	120	8/8	37	72
A-A	8/8	10.8	28	8/8	455	640	8/8	485	650	8/8	100	130	8/8	85.3	200

表－5 印旛沼流域における医薬品類 10 物質の分析結果（ng/L）

	Azithromycin		Bezafibrate		Caffeine		Clarithromycin		Crotamiton	
調査地点	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19
I-1	16	16	30	31	14000	8600	24	53	200	200
I-2	15	16	100	89	38000	560	64	78	220	240
I-3	1.5	1.9	4.1	6.7	72	120	4.8	91	71	86
I-4	4.2	4.8	80	50	210	220	17	95	120	280
I-5	6.7	3.1	14	5.4	380	240	25	64	310	37

	Ibuprofen		Ketoprofen		Levofloxacin		Sulfamethoxazole		Triclosan	
調査地点	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19	1/12	1/19
I-1	12	20	7.5	7.4	17	23	2.4	1.5	16.3	19
I-2	29	25	3.6	4	9.2	8.1	16	14	15.5	14.6
I-3	2	3.2	0.13	0.16	5.2	6.9	5.4	4.5	7.3	7.3
I-4	3.4	2.7	0.16	0.27	19	43	1.2	12	8.2	9.8
I-5	13	7	1.7	7.4	6	LOD*	9.6	0.3	12.3	8.2

*LODは検出限界以下を示す。

表－5 に印旛沼流域で実施した 2 回の調査における各調査地点での調査対象の医薬品類 10 物質の分析結果を示す。全ての調査地点で、医薬品類 10 物質が検出された。特に、南部川および高崎川の調査地点 St. I-1 と St. I-2 において、caffeine が比較的高濃度で検出されたことから、この地点では生活系の排水が流入していることが考えられた。

表－6 に妙正寺川での調査地点における調査対象の医薬品類 10 物質の分析結果を示す。下水処理場の下流の調査地点 Sts. M-2～4 では、azithromycin、bezafibrate、clarithromycin、crotamiton、levofloxacin が 100ng/L を超える濃度で検出された。

表－7 に鶴見川の調査地点で対象とした医薬品類 4 物質の分析結果を示す。調査地点 Tr-1 での azithromycin および日没後の levofloxacin、Tr-2 での日没後の triclosan を除き、医薬品類 4 物質は河川水および放流水において 100ng/L 以上の濃度で検出された。また、日中と日没で医薬品類の濃度に大きな変化はみられなかった。

2.6.2 減少係数の算出

多摩川と秋山川における医薬品類について求めた減少係数を表－8 に示す。また、減少係数に係る要因を検討するため、これまでに報告されている光分解と生分解の速度定数と吸着に係る固液分配比（Kd）を整理し、表－9 に示す。Ketoprofen は多摩川および秋山川において高い減少係数を示した。Ketoprofen の光分解の速度定数が高いことから、多摩川と秋山川でみられた高い減少係数は、光分解によるものと考えられた。また、多摩川では、ketoprofen の次に、azithromycin、Ibuprofen、Levofloxacin、Triclosan が比較的高い減少係数を示した。Azithromycin は比較的、固液分配比が高く、吸着により流下過程で減衰したと考えられた。Ibuprofen は生分解の速度定数が比較的高いことから、生分解に

表－6　妙正寺川における医薬品類 10 物質の分析結果（ng/L）

調査地点	Azithromycin	Bezafibrate	Caffeine	Clarithromycin	Crotamiton
M-1	1.9	0.25	25	3.8	14
M-2	480	970	58	1400	1100
M-3	350	590	64	950	1100
M-4	230	370	98	660	920
調査地点	Ibuprofen	Ketoprofen	Levofloxacin	Sulfamethoxazole	Triclosan
M-1	LOD*	0.14	7.3	1.1	7.7
M-2	7.4	450	560	100	96.4
M-3	4.5	16	360	85	53.1
M-4	4.4	2	400	79	36.8

*LODは検出限界以下を示す。

表－7　鶴見川における医薬品類 4 物質の分析結果（ng/L）

	Azithromycin		Clarithromycin		Levofloxacin		Triclosan	
調査地点	日中	日没後	日中	日没後	日中	日没後	日中	日没後
Tr-1	19	LOD*	440	540	110	29	100	100
Tr-2	140	130	380	380	230	250	100	93
Tr-3	270	200	660	600	380	320	130	120
Tr-A	599	632	1019	1083	788	950	208	240

*LODは検出限界以下を示す。

表－8　多摩川および秋山川における医薬品類 10 物質の減少係数の推計値（h^{-1}）

	多摩川				秋山川			
	推計回数	最小値	中央値	最大値	推計回数	最小値	中央値	最大値
Azithromycin	6	0.06	0.16	0.29	9	-0.29	-0.07	0.01
Bezafibrate	5	0.02	0.11	0.18	9	-0.36	-0.02	0.18
Caffeine	5	-0.09	0.03	0.08	9	-0.14	0.07	0.36
Clarithromycin	6	0.05	0.12	0.2	9	-0.38	-0.04	0
Crotamiton	5	0	0.04	0.07	9	-0.44	-0.1	0.04
Ibuprofen	5	0.04	0.17	1.24	9	-0.19	0.1	0.76
Ketoprofen	5	0.35	1.65	2.89	9	0.08	1.19	2.74
Levofloxacin	6	0.08	0.18	0.35	9	-0.26	0.05	0.3
Sulfamethoxazole	5	0	0.03	0.09	9	-0.41	-0.07	0.01
Triclosan	6	-0.03	0.17	0.52	9	-0.22	0.01	0.38

表－9　既報文献から得られた医薬品類の光分解および生分解の速度定数と吸着に係る固液分配比

	光分解	生分解	吸着
	速度定数[h^{-1}]	速度定数[day^{-1}]	固液分配比Kd[L/kg]
Azithromycin	<0.24 [12]	0.04±0.08 [14]	3.6±0.4 [14]
Bezafibrate	<0.24 [12]	0.09±0.05 [14]	0.5±0.1 [14]
Caffeine	<0.24 [12]	0.15±0.09 [14]	1.1±0.0 [14]
Clarithromycin	<0.24 [12]	<0.021 [14]	2.4±0.2 [14]
Crotamiton	<0.24 [12]	<0.021 [14]	0.8±0.1 [14]
Ibuprofen	<0.24 [12]	0.18±0.08 [14]	0.6±0.1 [14]
Ketoprofen	12.69 [12]	0.02±0.01 [14]	0.6±0.1 [14]
Levofloxacin	2.12 [12]	<0.021 [14]	3.5±0.5 [14]
Sulfamethoxazole	<0.24 [12]	0.03±0.01 [14]	0.6±0.1 [14]
Triclosan	0.8 [13]	<0.024 [13]	45, 570 [13]

より流下過程で減衰したと考えられる。Levofloxacin は光分解の速度定数と固液分配比の値が比較的高いことから、流下過程で光分解および吸着により減衰したと考えられる。また、また、トリクロサンの流下過程での減衰は、米国のテキサス州の小河川において調査されており、約 8km の調査区間で 80%近く減少することが確認されている [15]。Triclosan は固液分配比が高いことから [13]、吸着により流下過程で減衰したことが考えられる。

また、ketoprofen 以外の医薬品類 9 物質の減少係数の推計値は、多摩川よりも秋山川で低い値であった。これらの違いとして、調査区間の長さや河床の違いなどが考えられる。多摩川の調査区間は約 11km であり、一方で秋山川の調査区間は約 3km であった。秋山川の調査区間は多摩川の調査区間の約 1/3 であり、医薬品類の減衰を推計するには区間の距離が短かったことが考えられた。また、本研究で調査した秋山川の調査区間は河床および河岸がコンクリートで覆われていたため、流下過程での生分解および吸着が起こりにくい環境であったことが考えられた。本研究の結果から、医薬品類の減衰の程度は河川により大きく異なることが示された。

3. PRTR 制度第一種指定化学物質の実態・挙動の調査

3. 1　物質の選定

3.1.1　目的

PRTR 制度において第一種指定化学物質とされている化学物質を対象に、下水処理水での生態リスクに基づいた初期評価を行い、調査対象とする化学物質を抽出した。

3.1.2　抽出方法

PRTR 制度では、事業者は化学物質の排出量と移動量を年 1 回、国に届け出る義務を負い、国はこれを集計するとともに、届出外も含めた排出量・移動量の推計を行っている。この情報を活用して、下水道への化学物質流入量の情報を得ることが可能であり、水生生物への曝露を評価するためのデータとして利用することができる。評価対象とする PRTR 第一種指定化学物質の下水処理水中濃度は、「PRTR 届出外排出量の推計方法等の概要」（以下、「届出外推計」という）における『全国の下水処理施設から公共用水域への年間排出量の推計値』を『全国の年間処理水量』で除することで推計した。その際に、『全国の年間処理水量』として、「下水道統計」の“水処理施設・年間処理水量[m^3/year]”の全国合計を適用した。求められた値を全国における年間の平均的な下水処理水中濃度の推計値として初期リスク評価に使用した。本研究では、平成 22、23、24 年度の届出データを基に推計された年間排出量 [16,17,18]と全国の年間処理水量 [19,20,21]から、各年度における化学物質の下水処理水中濃度を推計した。

評価対象とした化学物質について、公表されている資料 [22-26]から、生態リスクの初期評価に用いる毒性値の情報（以下、毒性情報等という）を収集した。収集した水生生物に対する毒性情報等を予測無影響濃度としてリスク評価に使用した。複数の資料から化学物質の毒性情報等が得られた場合、原則として最も強い毒性値をリスク評価に採用した。

対象とした化学物質に対する初期リスク評価として、「環境リスク初期評価」などで用いられているハザード比（Hazard Quotient ：HQ）を用いた評価を実施した [27]。この手法では、HQ が一定の基準値

（例えば 1）を上回っているかどうかで、各物質のリスクの有無を明確化できるという利点がある。水生生物が無希釈の下水処理水に曝露される高リスクのシナリオを想定し、安全側の生態リスクの初期評価を行った。式(2)に従い、推定下水処理水中濃度を予測無影響濃度で除することにより HQ を算出した。

HQ＝ 推定下水処理水中濃度 [μg/L]
/ 予測無影響濃度 [μg/L] (2)

本研究では、HQ が 1 を超えた物質を調査対象とする物質として抽出した。

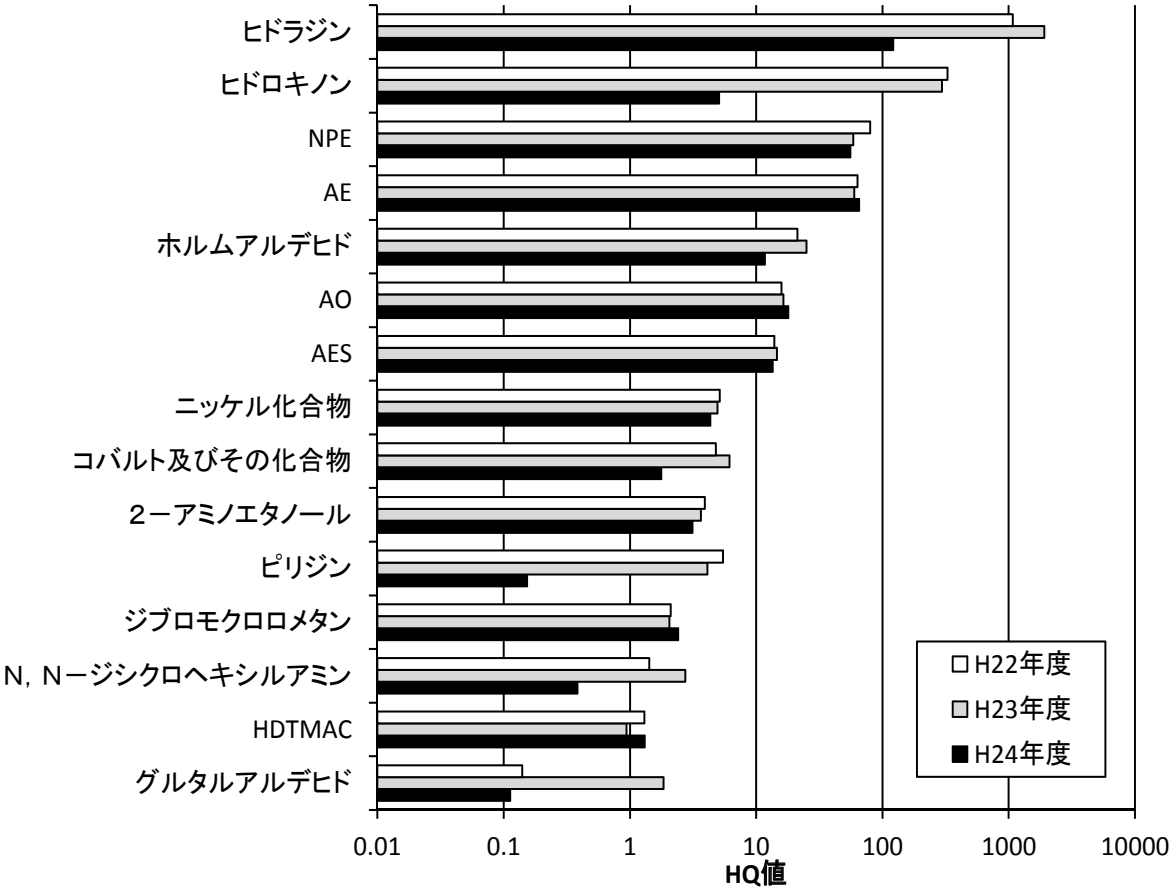
3.1.3 結果と考察

平成 22 年度のデータから 146 物質、平成 23 年度のデータから 145 物質、平成 24 年度のデータから 145 物質の生態リスク初期評価を実施した。図－6 に平成 22 年度から 24 年度の評価において HQ が 1 よりも大きい値を示した PRTR 第一種指定化学物質 15 物質の HQ 値を示す。平成 22 年度から平成 24 年度にわたってハザード比が 1 を上回った物質は 11 物質であった。ピリジン、N, N－ジシクロヘキシルアミンは平成 24 年度において HQ が 1 を下回った。グルタルアルデヒドは平成 23 年度にハザード比が 1 を上回ったものの、平成 24 年度でハザード比が 1 を下回った。ヘキサデシルトリメチルアンモニウム＝クロリド（HDTMAC）は平成 23 年度において 1 を下回る HQ を示したが、その値は 0.94 と 1 に近く、平成 22 年度と 24 年度では 1 よりも高い HQ 値を示した。以上、下水処理水中に含まれ、河川における実態と挙動の調査を実施する必要のある候補物質として PRTR 第一種指定化学物質 15 物質が選定された。

3．2 実態・挙動の調査

3.2.1 目的

本研究では、3.1 において、詳細な評価が必要とさ



図－6 下水処理水中の PRTR 制度第一種指定化学物質のハザード比（Hazard Quotient、HQ）。平成 22 年度から 24 年度において HQ が 1 よりも大きい値を示した化学物質の HQ 値を示す。NPE はポリ（オキシエチレン）＝ノニルフェニルエーテル、AE はポリ（オキシエチレン）=アルキルエーテル、AO はN，N－ジメチルドデシルアミン＝N－オキシド、AES はポリ（オキシエチレン）＝ドデシルエーテル硫酸エステルナトリウム、HDTMAC はヘキサデシルトリメチルアンモニウム＝クロリドを示す。

れた PRTR 制度第一種指定化学物質 15 物質のうち、ヒドラジン、ヒドロキノン、ノニルフェノールエトキシレート（NPE）、ホルムアルデヒド、N, N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド（AO）、ニッケル、コバルト、2-アミノエタノール、ピリジン、ジブロモクロロメタン、グルタルアルデヒドの 11 物質を対象に、都市部の河川における実態および挙動の調査を実施した。

3.2.2 調査方法

本研究では、多摩川、秋山川および鶴見川において、対象化学物質の分析のために、河川水を採取した。多摩川では 2013 年 12/7、2014 年 10/27、12/16、2015 年 8/25、12/9、12/16 に調査を実施し、秋山川では 2014 年 1/7 に調査を実施し、鶴見川では 2015 年 1/29 に調査を実施した（表－10）。多摩川と鶴見川では、医薬品類の調査と同様の調査地点で河川水を採取した。また、秋山川では、St. A-2 の上流にある伊保内新橋の橋上から河川水の採取を行った。

また、対象化学物質の流下過程での減衰を検討するため、多摩川において、2014 年 10/27、12/16、2015 年 12/9、12/16 に河川調査地点で流量観測を実施した。また、東京都下水道局から下水処理場からの調査日の放流量データを入手した。

3.2.3 分析方法

ヒドラジンの分析のため、保存剤として 1mg/L のチオ硫酸ナトリウム 1mL とリン酸 0.1μL を入れた 100mL ガラス瓶に水試料を採取した。採取した水試料を用いて、平成 19 年度化学物質分析法開発調査報告書[28]を参考に分析を実施した。ヒドロキノンの分析のため、保存剤としてリン酸（1+100）5mL、チオ硫酸ナトリウムを 0.2g を入れた 500mL ガラス瓶に水試料を採取した。その後、水試料を用いて、平成 20 年度化学物質分析法開発調査報告書[29]を参考に分析を実施した。NPE について、ガラス瓶またはポリ容器に水試料を採取した後、下水道試験方法[30]を参考に分析を実施した。ホルムアルデヒドについて、ガラス瓶に水試料を採取した後、平成 11 年度要調査項目等調査マニュアル[31]を参考に分析を実施した。AO について、ガラス瓶に水試料を採取した後、平成 15 年度化学物質分析法開発調査報告書[32]を参考に実施した。2-アミノエタノールについて、ガラス瓶に水試料を採取した後、平成 13 年度要調査項目等調査マニュアル[33]を参考に分析を実施した。ピリジンについて、ガラス瓶に水試料を採取。平成 9 年度化学物質分析法開発調査報告書[34]を参考に実施した。ジブロモクロロメタンについて、ガラス瓶に水試料を採取した後、平成 11 年度要調査項目等調査マニュアル[31]を参考に分析を実施した。グルタルアルデヒドについて、ガラス瓶に水試料を採取した後、平成 12 年度要調査項目等調査マニュアル[35]を参考に分析を実施。また、溶存態の金属（コバルトおよびニッケル）の分析は、河川水質試験方法[36]に従った。孔径 0.45μm のフィルター（Millipore 社）でろ過した試料の硝酸分解を行った後、高周波誘導結合プラズマ質量分析装置（X7CCT、サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて定量を行った。

表－10 各対象河川での調査対象の PRTR 制度第一種指定化学物質の実態調査と挙動調査の調査時期一覧

調査対象物質	実態の調査			挙動（減少係数）の調査
	多摩川	秋山川	鶴見川	多摩川
ヒドラジン	2013年12/7 2015年8/25、12/9、12/16	2014年1/7	-	2015年12/9
ヒドロキノン	2013年12/7 2015年8/25、12/9、12/16	2014年1/7	2015年1/29	2015年12/9
NPE	2013年12/7 2015年8/25、12/9、12/16	2014年1/7	-	2015年12/9
ホルムアルデヒド	2013年12/7 2015年8/25、12/9	2014年1/7	-	2015年12/9
AO	2013年12/7、2015年8/25	2014年1/7	-	-
ニッケル	2013年12/7 2014年10/27、12/16 2015年8/25、12/9、12/16	2014年1/7	2015年1/29	2014年10/27、12/16 2015年12/9、12/16
コバルト	2013年12/7 2014年10/27、12/16 2015年8/25、12/9、12/16	2014年1/7	2015年1/29	2014年10/27、12/16 2015年12/9、12/16
2-アミノエタノール	2014年10/27、12/16 2015年8/25	-	2015年1/29	2014年10/27、12/16
ピリジン	2013年12/7、2015年8/25	2014年1/7	-	-
ジブロモクロロメタン	2015年8/25	-	-	-
グルタルアルデヒド	2015年8/25	-	-	-

AOはN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド

3.2.4 減少係数の算出

2.5 と同様の方法により、多摩川において対象とした PRTR 制度第一種指定化学物質 7 物質（ヒドラジン、ヒドロキノン、NPE、ホルムアルデヒド、ニッケル、コバルト、2-アミノエタノール）について、調査区間での減少係数を求めた。

3.2.5 結果と考察

表－11、12 および 13 はそれぞれ、多摩川、秋山川および鶴見川における調査対象の PRTR 制度第一種指定化学物質の分析結果を示す。ジブロモクロロメタンを除き、対象とした化学物質は河川水で検出された。多摩川では、対象化学物質は、下水処理水が流入する地点 Sts. T-2、3、c、d と Sts. T-A～D の放流水において比較的高い濃度で検出される傾向がみられた。また、支川の調査地点 St. T-a では、ニッケルが比較的高い濃度で検出されており、工業排水が流入している可能性が考えられた。秋山川では、ニッケルやコバルトが比較的高い濃度で検出された。

表－11　多摩川の各調査地点における PRTR 制度第一種指定化学物質の分析結果（μg/L）

	ヒドラジン			ヒドロキノン			NPE (1-15)			ホルムアルデヒド			AO		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
T-1	0/1	LOD	LOD	1/1	0.01	0.01	1/1	0.01	0.01	1/1	1	1	-	-	-
T-2	2/2	0.01	0.01	2/2	0.05	0.06	2/2	0.06	0.06	1/1	2	2	-	-	-
T-3	4/4	0.01	0.04	4/4	0.05	0.05	3/4	0.06	0.22	3/3	1.4	2.2	2/2	0.02	0.03
T-a	1/1	0.01	0.01	1/1	0.03	0.03	1/1	0.04	0.04	1/1	1.4	1.4	-	-	-
T-b	0/1	LOD	LOD	1/1	0.04	0.04	1/1	0.03	0.03	1/1	0.71	0.71	-	-	-
T-c	2/2	0.02	0.03	2/2	0.74	1.4	2/2	0.03	0.03	1/1	1.9	1.9	-	-	-
T-d	2/2	0.001	0.001	2/2	0.03	0.05	2/2	0.04	0.04	1/1	4.5	4.5	-	-	-
T-e	1/1	0.001	0.001	1/1	0.02	0.02	1/1	0.02	0.02	1/1	1.3	1.3	-	-	-
T-A	1/1	0.02	0.02	1/1	0.21	0.21	1/1	0.23	0.23	1/1	2.4	2.4	-	-	-
T-B	1/1	0.02	0.02	1/1	0.12	0.12	1/1	0.19	0.19	1/1	1.4	1.4	-	-	-
T-C	1/1	0.01	0.01	1/1	0.05	0.05	1/1	0.07	0.07	1/1	11	11	-	-	-
T-D	2/2	0.03	0.03	2/2	0.15	0.25	2/2	0.04	0.05	1/1	2.5	2.5	-	-	-

	ニッケル			コバルト			2-アミノエタノール			ピリジン			ジブロモクロロメタン		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値	検出頻度	中央値	最大値
T-1	5/5	0.39	0.42	5/5	0.04	0.05	1/2	0.01	0.01	-	-	-	-	-	-
T-2	5/5	4.24	4.73	5/5	0.16	0.26	2/2	0.1	0.15	-	-	-	-	-	-
T-3	6/6	2.4	2.7	6/6	0.13	0.17	3/3	0.06	0.35	2/2	0.06	0.07	0/1	LOD	LOD
T-a	4/4	17.8	33.4	4/4	0.13	0.19	2/2	0.15	0.16	-	-	-	-	-	-
T-b	4/4	0.52	0.63	4/4	0.07	0.08	1/2	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-
T-c	4/4	5.42	10.29	4/4	0.09	0.11	2/2	0.67	1.1	-	-	-	-	-	-
T-d	4/4	0.46	0.57	4/4	0.12	0.13	1/2	0.06	0.06	-	-	-	-	-	-
T-e	4/4	0.46	0.8	4/4	0.12	0.13	1/2	0.05	0.05	-	-	-	-	-	-
T-A	4/4	13.76	15.78	4/4	0.52	0.66	2/2	0.8	0.97	-	-	-	-	-	-
T-B	4/4	4.74	7.01	4/4	0.35	0.37	2/2	0.48	0.78	-	-	-	-	-	-
T-C	4/4	1.12	1.24	4/4	0.13	0.21	2/2	0.5	0.68	-	-	-	-	-	-
T-D	4/4	0.83	0.96	4/4	0.12	0.15	2/2	0.57	0.83	-	-	-	-	-	-

	グルタルアルデヒド		
調査地点	検出頻度	中央値	最大値
T-3	1/1	1.3	1.3

NPE(1-15) はノニルフェノールエトキシレート(エトキシ基数1-15)
AOはN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド

表－12　秋山川での PRTR 制度第一種指定化学物質の分析結果（μg/L）

化学物質名	濃度（μg/L）
ヒドラジン	0.04
ヒドロキノン	0.05
NPE (1-15)	0.28
ホルムアルデヒド	3.8
AO	0.0002
ニッケル	11.85
コバルト	2.24
ピリジン	0.11

NPE(1-15)はノニルフェノールエトキシレート(エトキシ基数1-15)
AOはN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド

表－13　鶴見川の各調査地点における PRTR 制度第一種指定化学物質の分析結果（μg/L）

	ヒドロキノン		ニッケル		コバルト		2-アミノエタノール	
調査地点	日中	日没後	日中	日没後	日中	日没後	日中	日没後
Tr-1	0.03	0.04	0.87	0.92	0.2	0.33	0.39	-
Tr-2	0.02	0.02	1.14	1.06	0.1	0.09	0.35	-
Tr-3	0.03	0.04	2.47	1.72	1.15	0.94	0.92	-
Tr-A	0.05	0.04	3.97	2.93	2.57	3	1.07	-

また、鶴見川では、多摩川と比べて、2-アミノエタノールは比較的高い濃度で検出されたが、そのほかの化学物質は、同程度かそれ以下の濃度で検出された。

表 - 14 は多摩川の調査区間における PRTR 制度第一種指定化学物質 7 物質の減少係数を示す。ヒドロキノンおよび 2－アミノエタノールは比較的高い減少係数を示した。減少係数に係る要因を検討するため、これまでに報告されている生分解の速度定数と吸着に係る土壌吸着性（Koc）を整理し、表－15 に示す。ヒドロキノンは土壌吸着性が高いことから、流下過程での減少に土壌への吸着が関与していることが考えられた。また、2-アミノエタノールは、生分解性が比較的高いことから、流下過程での減少に

表－14　多摩川における PRTR 制度第一種指定化学物質 7 物質の減少係数の推計値（h^{-1}）

	推計回数	最小値	中央値	最大値
ヒドラジン	1	0.03	0.03	0.03
ヒドロキノン	1	0.44	0.44	0.44
NPE（1-15）	1	0.09	0.09	0.09
ホルムアルデヒド	1	-0.007	-0.007	-0.007
ニッケル	4	0.04	0.06	0.08
コバルト	4	0.01	0.03	0.06
2-アミノエタノール	2	0.19	0.33	0.47

NPE(1-15)はノニルフェノールエトキシレート(エトキシ基数1-15)

表－15　既報文献から得られた PRTR 制度第一種指定化学物質 5 物質の生分解の速度定数と Koc

	生分解	吸着
化学物質名	速度定数[day^{-1}]	土壌吸着性Koc
ヒドラジン	0.0007 [23]	14 [23]
ヒドロキノン	0.09 [23]	430 [23]
NPE	0.0005 [22]	6.1 [22]
ホルムアルデヒド	0.17 [23]	1 [23]
2-アミノエタノール	0.13 [22]	1.2 [22]

生分解が関与していることが考えられた。また、ホルムアルデヒドは、生分解性が高く、また光分解性が高いと報告されれているが[24]、多摩川での減少係数は低く、流下過程で減衰しにくいことが示された。今後、ホルムアルデヒドの河川中の挙動を明らかにするために調査をより進める必要がある。

4. 生態リスク初期評価

4. 1　目的

本研究課題で調査対象とした医薬品類と PRTR 制度第一種指定化学物質のうち、今後詳細な生態リスク評価をすべき化学物質を把握するため、河川水中濃度の実測値を用いて生態リスク初期評価を試みた。

4. 2　評価方法

本研究で対象とした医薬品類 10 物質および PRTR 制度第一種指定化学物質について、「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（平成 23 年度 12 月版）」[27]を参考に、生態リスク初期評価を実施した。リスク判定は、以下の式(3)に従い、ハザード比（HQ）により行った。

$$HQ = MEC / PNEC \quad (3)$$

ここで、PNEC（Predicted No Effect Concentration）は予測無影響濃度、MEC（Measured Environmental Concentrattion）は採取試料中の化学物質濃度の実測値である。本研究では、MEC として、各調査地点での化学物質濃度の最大値を用いた。医薬品類の PNEC は、真野ら[37]によって用いられた値を使用した。また、PRTR 制度第一種指定化学物質の PNEC として、ニッケル以外の物質は、環境省の化学物質の環境リスク初期評価[24]の予測無影響濃度を用いた。ニッケルは、化学物質の初期リスク評価書の値を用いた[25]。本研究で使用した医薬品類と PRTR 制度第一種指定化学物質の PNEC の値を整理して、表－16 に示す。

化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン[27]では、HQ 値が 1 以上の化学物質は「詳細な評価を行う候補」という評価分類となっている。

表－16　生態リスク初期評価に用いた医薬品類 10 物質および PRTR 制度第一種指定化学物質 11 物質の予測無影響濃度（PNEC）

化学物質名	単位	予測無影響濃度（PNEC）	文献
Azithromycin	ng/L	19	36)
Bezafibrate	ng/L	10000	36)
Caffeine	ng/L	5200	36)
Clarithromycin	ng/L	20	36)
Crotamiton	ng/L	3500	36)
Ibuprofen	ng/L	130000	36)
Ketoprofen	ng/L	160	36)
Levofloxacin	ng/L	79	36)
Sulfamethoxazole	ng/L	1600	36)
Triclosan	ng/L	5.3	36)
ヒドラジン	μg/L	0.005	22)
ヒドロキノン	μg/L	0.015	22)
NPE (1-15)	μg/L	0.01	22)
ホルムアルデヒド	μg/L	1	22)
AO	μg/L	0.04	22)
ニッケル	μg/L	1	23)
コバルト	μg/L	0.38	22)
2-アミノエタノール	μg/L	25	22)
ピリジン	μg/L	0.1	22)
ジブロモクロロメタン	μg/L	0.63	22)
グルタルアルデヒド	μg/L	10	22)

NPE（1-15）はノニルフェノールエトキシレート（エトキシ基数1-15）
AOはN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド

4. 3　結果と考察

表－17 は各調査地点の医薬品類の HQ 値を示す。全ての対象河川において、Clarithromycin と triclosan のハザード比が 1 を超える調査地点が存在した。また、本研究で対象とした都市部の河川において、azithromycin、caffeine、ketoprofen、levofloxacin の HQ 値が 1 を超える調査地点が存在した。これらの結果から、これら医薬品類 6 物質は、今後詳細な生態リスク評価を行う必要があると考えられた。

また、表－18 は各調査地点の PRTR 制度第一種指定化学物質の HQ 値を示す。ヒドラジン、ヒドロキノン、NPE、ホルムアルデヒド、ニッケル、コバルト、ピリジンの HQ 値が 1 を超える調査地点が存在したことから、これらの化学物質について、今後詳細な評価を行う必要があると考えられた。

表－17　医薬品類 10 物質のハザード比（HQ）

調査河川	調査地点	Azithromycin	Bezafibrate	Caffeine	Clarithromycin	Crotamiton	Ibuprofen	Ketoprofen	Levofloxacin	Sulfamethoxazole	Triclosan
多摩川	T-1	0.04	<0.01	0.06	0.05	<0.01	<0.01	0.01	0.01	<0.01	0.92
	T-2	**11.05**	0.01	0.04	**30.00**	0.27	<0.01	0.19	**5.19**	0.09	**11.51**
	T-3	**6.84**	0.01	0.05	**22.00**	0.23	<0.01	0.11	**3.42**	0.09	**9.00**
	T-a	**1.21**	0.02	0.31	**2.30**	0.02	<0.01	0.04	0.39	0.01	**2.83**
	T-b	0.08	<0.01	0.02	0.12	<0.01	<0.01	<0.01	0.06	<0.01	**1.08**
	T-c	**26.32**	0.04	0.15	**60.00**	0.51	<0.01	**3.13**	**15.19**	0.33	**39.62**
	T-d	**1.00**	0.01	0.08	**5.00**	0.09	<0.01	0.01	0.72	0.05	**5.11**
	T-e	0.28	<0.01	0.01	**2.25**	0.03	<0.01	<0.01	0.39	0.03	**1.89**
秋山川	A-1	0.03	<0.01	0.03	0.28	0.01	<0.01	<0.01	0.02	0.01	**1.06**
	A-2	**12.11**	0.06	0.01	**33.00**	0.57	<0.01	0.22	**5.82**	0.08	**13.58**
印旛沼流域	I-1	0.84	<0.01	**2.69**	**2.65**	0.06	<0.01	0.05	0.29	<0.01	**3.58**
	I-2	0.84	0.01	**7.31**	**3.90**	0.07	<0.01	0.03	0.12	0.01	**2.92**
	I-3	0.10	<0.01	0.02	**4.55**	0.02	<0.01	<0.01	0.09	<0.01	**1.38**
	I-4	0.25	0.01	0.04	**4.75**	0.08	<0.01	<0.01	0.54	0.01	**1.85**
	I-5	0.35	<0.01	0.07	**3.20**	0.09	<0.01	0.05	0.08	0.01	**2.32**
妙正寺川	M-1	0.10	<0.01	<0.01	0.19	<0.01	<0.01	<0.01	0.09	<0.01	**1.45**
	M-2	**25.26**	0.01	0.01	**70.00**	0.31	<0.01	**2.81**	**7.09**	0.06	**18.19**
	M-3	**18.42**	0.06	0.01	**47.50**	0.31	<0.01	0.10	**4.56**	0.05	**10.02**
	M-4	**12.11**	0.04	0.02	**33.00**	0.26	<0.01	0.01	**5.06**	0.05	**6.94**
鶴見川	Tr-1	**1.00**	-	-	**27.00**	-	-	-	**1.39**	-	**18.87**
	Tr-2	**7.37**	-	-	**19.00**	-	-	-	**3.16**	-	**18.87**
	Tr-3	**14.21**	-	-	**33.00**	-	-	-	**4.81**	-	**24.53**

太字は1以上のハザード比を示す

表－18　PRTR 制度第一種指定化学物質 11 物質のハザード比（HQ）

調査河川	調査地点	ヒドラジン	ヒドロキノン	NPE (1-15)	ホルムアルデヒド	AO
多摩川	T-1	-	0.80	0.64	**1.00**	-
	T-2	**1.26**	**3.67**	**6.09**	**2.00**	-
	T-3	**7.60**	**3.20**	**21.81**	**2.20**	0.78
	T-a	**2.20**	**2.00**	**3.53**	**1.40**	-
	T-b	<0.01	**2.80**	**3.29**	0.71	-
	T-c	**5.60**	**93.33**	**3.38**	**1.90**	-
	T-d	0.24	**3.27**	**4.59**	**4.50**	-
	T-e	0.11	**1.20**	**2.49**	**1.30**	-
秋山川	A-伊保内新橋	**8.00**	**3.27**	**28.00**	**3.80**	0.01
鶴見川	Tr-1	-	**2.40**	-	-	-
	Tr-2	-	**1.53**	-	-	-
	Tr-3	-	**2.87**	-	-	-

調査河川	調査地点	ニッケル	コバルト	2-アミノエタノール	ピリジン	ジブロモクロロメタン
多摩川	T-1	0.42	0.13	<0.01	-	-
	T-2	**4.73**	0.68	0.01	-	-
	T-3	**2.70**	0.46	0.01	0.72	<0.01
	T-a	**33.40**	0.50	0.01	-	-
	T-b	0.63	0.21	<0.01	-	-
	T-c	**10.29**	0.29	0.04	-	-
	T-d	0.57	0.33	<0.01	-	-
	T-e	0.80	0.33	<0.01	-	-
秋山川	A-伊保内新橋	**11.85**	**5.89**	-	**1.10**	-
鶴見川	Tr-1	0.92	0.88	0.02	-	-
	Tr-2	**1.14**	0.26	0.01	-	-
	Tr-3	**2.47**	**3.03**	0.04	-	-

NPE(1-15)はノニルフェノールエトキシレート(エトキシ基数1-15)

調査河川	調査地点	グルタルアルデヒド
多摩川	T-3	0.13

AOはN,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド

太字は1以上のハザード比を示す

5. まとめ

本研究では、医薬品類および PRTR 制度第一種指定化学物質について、関東地方の都市部の河川での実態および挙動の調査を行うとともに、生態リスクについて調査を行った。その結果、以下のことが分かった。

1）調査対象とした医薬品類 10 物質は比較的高い頻度で検出された。また、検出濃度は、調査した河川および調査地点により異なっていた。また、多摩川および秋山川で医薬品類の減少係数を求めたところ、減少係数は医薬品類間で異なる値を示した。

2）下水処理水に含まれる PRTR 制度第一種指定化学物質について、既報文献を用いた生態リスク初期評価を実施し、河川における実態と挙動の調査を実施する必要のある候補物質として 15 物質を抽出することができた。

3) 抽出した PRTR 制度第一種指定化学物質 15 物質のうち、11 物質について、多摩川、秋山川、鶴見川で実態調査を実施したところ、ジブロモクロロメタンを除いた 10 物質が検出された。また、多摩川において、7 物質について減少係数を算出した。ヒドロキノンは高い減少係数を示し、これは吸着によると考えられた。また、高い光分解性や生分解性を示すホルムアルデヒドの減少係数は小さい値を示した。今後、さらに調査を行い、挙動の把握に努める必要がある。

4）調査地点で検出された医薬品類 10 物質および PRTR 制度第一種指定化学物質 11 物質の濃度を基に生態リスク初期評価を試みたところ、医薬品 6 物質および PRTR 制度第一種指定化学物質 6 物質のハザード比が 1 以上を示した。これらの化学物質は、今後、詳細な生態リスク評価が必要である。

今後、本研究で得られた未規制化学物質の存在実態・挙動および生態影響に関する成果を、生物影響が懸念される化学物質のモニタリングと影響評価手法に関する研究に活用していく予定である。

参考文献

1) 国土交通省地域整備局下水道部：下水道における化学物質排出量の把握と化学物質管理計画の策定等に関するガイドライン（案）、2005年8月
2) 清野敦子 他 : わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在、水環境学会誌、27（11）、685-691, 2004
3) 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、239-265、2011年
4) 厚生労働省 : 平成22年薬事工業生産動態統計年報、2011年
5) 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（2016年3月確認）
6) 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年
7) 千葉県 : 印旛沼に係る湖沼水質保全計画（第6期）、2012
8) 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/kandagawa4/shiryo2s.pdf（2012年4月確認）
9) Nakada N. et al.: Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment, Water Res., 40(17), 3297-3303, 2006
10) 小西千絵 他 : 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、73-82、2006年
11) 花本征也 他 : 淀川水系における医薬品類の挙動に関する検討、環境工学研究論文集、45、29-37、2008
12) Hanamoto et al.: Modeling the photochemical attenuation of down-the-drain chemicals during river transport by stochastic methods and field measurements of pharmaceuticals and personal care products, Environ. Sci. Tech., 47(23), 13571-13577, 2013
13) 田村生弥 他 : 防菌防黴剤の河川環境中における生分解・光分解と底質への収着、環境化学、22(3)、113-119、2012年
14) 花本征也：確率論的モデルと現地調査とに基づく河川流下過程における医薬品類の光分解に関する研究、博士論文、2013年3月
15) Morral D、McAvoy D、Schatowitz B、Inauen J、Jacob M、Hauk A、Eckhoff W : “A field study of triclosan loss rates in river water(Cibolo Creek, TX)“、Chemosphere, 54, 3634-3639, 2004
16) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課 : 平成23年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2013年
17) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課 : 平成24年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2014年
18) 経済産業省製造産業局化学物質管理課、環境省環境保健部環境安全課 : 平成25年度PRTR届出外排出量の推計方法等の概要、2015年
19) （公社）日本下水道協会 : 下水道統計（平成22年度版）、2012年
20) （公社）日本下水道協会 : 下水道統計（平成23年度版）、2013年
21) （公社）日本下水道協会 : 下水道統計（平成24年度版）、2014年
22) 中央環境審議会水環境部会水生生物保全環境基準専門委員会：水生生物の保全に係る水質環境基準の設定について（第一次報告）、2003年
23) 環境省：水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準の設定に関する資料、2007年
24) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク初期評価、http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html（2012年12月確認）
25) （独）製品評価技術基盤機構：初期リスク評価書、http://www.safe.nite.go.jp/japan/sougou/view/SelectingLists List_jp.faces?child_flg=child&service_id=APDisplayFirstList_jp&tb_form=S_41_SHO（2016年3月確認）
26) 環境省：生態毒性試験結果（平成27年3月版）、2015、https://www.env.go.jp/chemi/sesaku/02e.pdf
27) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン（平成26年度12月版）、2014年
28) （財）日本食品分析センター : 平成19年度化学物質分析法開発調査報告書、239-264、2008年

29) （財）日本食品分析センター：平成20年度化学物質分析法開発調査報告書、167-188、2009年
30) 公益社団法人日本下水道協会：下水試験方法上巻－2012年版－，2012年
31) 環境庁水質保全局水質管理課：要調査項目等調査マニュアル（水質、底質、水生生物）、1999年12月
32) 環境省環境保健部環境安全課：平成15年度化学物質分析法開発調査報告書、2004年8月
33) 環境省環境保健部環境安全課：平成13年度化学物質分析法開発調査報告書、2002年10月
34) 環境庁環境保健部環境安全課：平成9年度化学物質分析法開発調査報告書、1998年5月
35) 環境省環境保健部環境安全課：平成12年度化学物質分析法開発調査報告書、2001年5月
36) 国土交通省水質連絡会：河川水質試験方法（案）[2008年度版]河川管理者のために、http://www.mlit.go.jp/river/shishin_guideline/kasen/suishitsu/houhou.html、2009年
37) 真野浩行 他：PRTR情報等を活用した下水処理水中に含まれる化学物質の環境リスク初期評価、下水道協会誌、50(612)、85-92、2013年10月

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：岡本誠一郎、小森行也、北村友一
金子陽輔

【要旨】

本研究では、社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質の一部に生物影響が指摘されているものがあることから、下水道を経由する化学物質等の環境インパクト低減を目的として下水処理プロセスにおけるこれら化学物質（医薬品類、LAS）、総毒性の挙動把握とリスクを低減するための制御技術の検討を行った。その結果、下水処理水中に残存する医薬品類の除去手法として微生物担体処理が有効であることが分かった。また、メダカの網羅的遺伝子発現解析による総毒性の評価から、流入下水がメダカに及ぼす影響は活性汚泥および担体処理によって低減でき、特に、生殖影響については担体処理で影響が残存しなくなることが示された。

キーワード：医薬品類、担体処理、メダカ、バイオアッセイ、遺伝子発現解析

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挙動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存在実態は不明である。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の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制御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。また、下水処理水に残存する化学物質の中には、生物への悪影響が懸念される物質も含まれており、下水処理水の再利用先や放流先における水生生物への影響が懸念されている。魚類は、水生生物の代表種、かつ、資源生物であり、下水処理水の再利用先での生態影響評価の優先順位は高く、下水処理水の魚類生態影響の実態や下水処理工程での影響低減効果を明らかにしておく必要がある。

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 [1)~3)]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 [4)~6)] 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 対象物質の中から、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たノニルフェノール（NP）と直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）を選定した。NP は平成 24 年 8 月 22 日、LAS は平成 25 年 3 月 27 日に環境基準に追加された。

NP 類似物質の 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）[7]によれば、SPEED'98 における取組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結果 [8]によれば、NP 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-OP 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 NP 及び 4-t-OP 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)になり、嫌気条件下で生物分解を受け AP になる [9]。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、AP は NP と 4-t-OP、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 の 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 の 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 の（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 の（OP(1)EC～OP(3)EC）を調査対象物質とした。

LAS は、ベンゼン環に直鎖のアルキル基（-CnH2n+1）が結合した直鎖アルキルベンゼンにスルホ基（-SO3H）が結合した化合物である。このうち環境基準項目追加が検討されている LAS は、デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C10)、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C11)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C12)、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C13)、テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C14)の 5 物質である。本研究において優先的に調査が必要な化学物質としてこれらの LAS（LAS-C10、LAS-C11、LAS-C12、LAS-C13、LAS-C14）5 物質を選定し分析法の検討を行った。

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 [10]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 [11]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

医薬品 9 物質の一斉分析は、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、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。

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 [12)~21)]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、ろ液と SS に分けて分析する方法とした。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。

LAS の分析は、環境省の要調査項目等調査マニュアル [12)]の他、佐来ら [22)]、Garcia ら [23)]の方法を参考とし、図-1 に示す分析フローに従った。

各試料は、ガラス繊維ろ紙（1μm）でろ過を行い、ろ液とろ紙上残渣（SS）に分け、ろ液はそのまま固相カートリッジ（Oasis HLB）による抽出を行い、カートリッジからメタノールで溶出させたものを定容して抽出液とした。その抽出液の全量もしくは一部を分取して、必要に応じて精製（Oasis WAX）を行った後、濃縮・定容したものを LC/MS/MS 測定溶液とした。

SS はメタノールによる超音波抽出液を定容して抽出液とした。その全量もしくは一部を分取して濃縮後、水で希釈し固相カートリッジ(Oasis HLB)に通液し、精製操作を行った。そのカートリッジからのメタノール溶出液を濃縮し、必要に応じて精製（Oasis WAX）を行い、濃縮・定容したものを LC/MS/MS 測定溶液とした。検出下限値は、検量線作成用標準溶液の最低濃

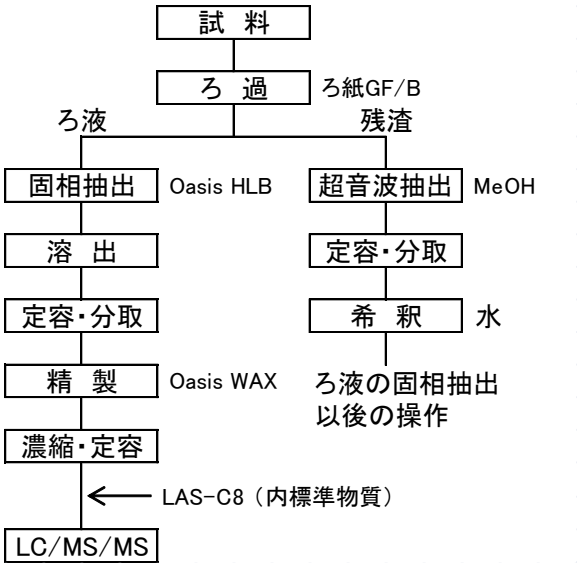


図-1　LAS 分析フロー

度を 5 回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差の 3 倍を装置の検出下限値（IDL）、10 倍を装置の定量下限値（IQL）とした。各 LAS の IDL は、ろ液試料では流入下水 0.19～0.40μg/L、放流水 0.001～0.002μg/L、汚泥 0.004～0.008μg/L であった。SS 試料では流入下水 0.38～0.80μg/g-dry、放流水 1.9～4.0μg/g-dry、汚泥 0.038～0.080μg/g-dry であった。また、流入下水と返送汚泥を用いて行った添加回収試験の結果、流入下水のろ液では 81.6～91.2%、SS では 85.6～105%、返送汚泥のろ液では 73.6～82.3%、SS では 88.7～100%であった。

４．　活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

４．１　医薬品類分析方法

調査対象とした医薬品類は、２．１のアジスロマイシン(AZM)、ベザフィブラート(BF)、カフェイン(CF)、クラリスロマイシン(CAM)、クロタミトン(CT)、イブプロフェン(IP)、ケトプロフェン(KP)、レボフロキサシン(LVFX)、スルファメトキサゾール(SMZ)、トリクロサン(TC) とし、３．１の方法に従った。

４．２　調査方法

調査は、有効水深が約 2m の最初沈殿池（0.5m^3）、エアレーションタンク（0.5m^3 ×4 槽)、最終沈殿池（0.7m^3）と塩素混和槽（0.1m^3）、生汚泥貯留槽（0.15m^3）、余剰汚泥貯留槽（0.15m^3）で構成される活性汚泥処理実験装置（図-2 参照）を用いて行った。実下水処理場の流入下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。

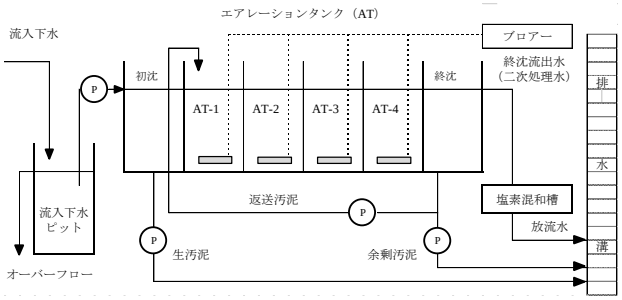


図-2　活性汚泥処理実験装置

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。本装置は、流入量 6.8m³/d、汚泥返送率約 38%、HRT 約 7 時間で運転した。

分析試料は、平成 26 年 2 月 5 日～6 日においてそれぞれ 2 時間間隔で採取した各試料を等量混合したコンポジット試料とした。採取箇所は、流入下水、初沈流出水、終沈流出水（二次処理水）、生汚泥、余剰汚泥の 5 箇所である。一般水質項目分析結果を表-3 に示す。本実験装置の BOD 除去率は 94%であり、本装置の処理水質は標準活性汚泥法の実下水処理場と同レベルであった。流入水中の NH_4-N、NO_2+NO_3-N の濃度は、それぞれ 20mg/L、0.05mg/L 以下であるのに対し、二次処理水では 0.47mg/L、18mg/L で十分に硝化が進行していた。また、エアレーションタンク混合液の MLSS、余剰汚泥引き抜き量より計算した SRT は約 13 日であった。

表-3　一般水質項目分析結果（mg/L）

	BOD	DOC	NH4-N	NO2+NO3-N	TN	TP	MLSS
流入水	150	35	20	<0.05	33	3.2	-
初沈流出水	140	37	21	<0.05	31	3.2	-
終沈流出水	9.1	7.8	0.47	18	20	1.6	-
生汚泥	-	-	-	-	-	-	2,300
余剰汚泥	-	-	-	-	-	-	3,600

4．3　医薬品挙動調査結果

分析対象とした医薬品類 10 物質の測定結果を表-4 に示す。本調査における流入下水の医薬品濃度は、成宮ら [2]の報告（中央値）とほぼ同程度かやや高い値を示した。

水処理プロセスの初沈での各医薬品濃度（溶存態＋懸濁態）変化は、溶存態、懸濁態の双方とも検出された BF、CF、CAM、CT、KP、SMZ、TC の 7 物質についてみると、流入下水と初沈流出水の値はほぼ同じであり、滞留時間が 2 時間程度の初沈ではほとんど除去されていないことがわかる。また、生物処理反応槽

表-4　医薬品分析結果（ng/L）

		本研究		既報値（中央値）[1]	
		溶存態	懸濁態	溶存態	懸濁態
AZM	流入下水	310	-	279	26.7
	初沈流出水	360	-		
	二次処理水	270	-	40.3	
	生汚泥	320	-		
	余剰汚泥	270	-		
BF	流入下水	4,500	52	1,580	37.0
	初沈流出水	4,800	34		
	二次処理水	450	1.4	186	
	生汚泥	3,700	650		
	余剰汚泥	64	45		
CF	流入下水	46,000	280	37,900	
	初沈流出水	45,000	200		
	二次処理水	1,100	5.8	34.3	
	生汚泥	27,000	2900		
	余剰汚泥	160	220		
CAM	流入下水	1,600	37	1,530	114
	初沈流出水	1,700	29		
	二次処理水	1,400	17	528	
	生汚泥	1,800	850		
	余剰汚泥	810	1,300		
CT	流入下水	1,700	17	1,240	53.5
	初沈流出水	1,900	16		
	二次処理水	1,800	4.4	1,080	
	生汚泥	1,500	170		
	余剰汚泥	1,400	260		
IP	流入下水	1,300	-		
	初沈流出水	1,400	-		
	二次処理水	11	<0.068		
	生汚泥	790	-		
	余剰汚泥	11	19		
KP	流入下水	950	17	1,260	27.8
	初沈流出水	850	13		
	二次処理水	240	0.84	124	
	生汚泥	930	220		
	余剰汚泥	120	93		
LVFX	流入下水	1,600	-	451	240
	初沈流出水	1,500	-		
	二次処理水	400	-	66.0	
	生汚泥	3,500	-		
	余剰汚泥	11,000	-		
SMZ	流入下水	170	2.0	176	
	初沈流出水	200	1.8		
	二次処理水	49	<0.21	90.1	
	生汚泥	200	20		
	余剰汚泥	80	17		
TC	流入下水	340	1,300		
	初沈流出水	340	1,200		
	二次処理水	69	12		
	生汚泥	210	10,000		
	余剰汚泥	97	7,600		

注：- はSurrogate物質の回収率が低いため濃度計算せず。

のエアレーションタンクを経た二次処理水での除去率を計算すると BF、CF、KP、SMZ、TC の 5 物質は、70%以上であり活性汚泥処理で一定の除去が行われていた。CAM の除去率は約 13%で、活性汚泥処理による除去率は小さく、CT は流入水濃度より高い値を示した。

また、これら 7 物質について各試料の負荷量を算出し、成宮らの定義 [1]により全処理過程除去率 R_{all}、初沈汚泥移行率 T_{raw}、余剰汚泥移行率 T_{exc}、生物処理消滅率 D を求めた。各医薬品の R_{all}、T_{raw}、T_{exc}、D を表-5 に示す。

表-5 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の除去(%)

	R_{all}	T_{raw}	T_{exc}	D
BF	90.3	1.6	0.02	88.7
CF	97.7	1.1	0.01	96.6
CAM	15.7	2.7	1.3	11.8
CT	-2.3	1.6	1.0	-4.9
KP	75.8	2.0	0.2	73.6
SMZ	72.3	2.1	0.6	69.6
TC	95.2	10.4	4.7	80.1

BF、CF、TC は、R_{all}が 90%を超え活性汚泥処理により大きく除去された。除去の内訳をみると BF、CF の T_{raw}、T_{exc}は 2%以下と小さく汚泥引抜きによる除去が主要な除去機構ではないことが示され、D が大きいことから生分解が主要な除去機構であることが示唆された。TC は、BF、CF と異なり T_{raw}が約 10%、T_{exc} が約 5%と汚泥引抜きによる除去が 15%程度あることがわかった。

CAM は R_{all}が約 16%と低く活性汚泥処理による除去が困難な物質であることがわかった。また、CT は R_{all}がマイナスとなり、活性汚泥処理後に負荷量が増加する結果となった。これは、分析のバラツキが一つの原因と考えられる。

汚泥引抜きによる除去機構の理解を深めるため、溶存態と懸濁態の間での固-液分配係数[2] K_d (L/kg) を算出した。常用対数値（$Log_{10}K_d$）として表-6 に示す。

$$K_d = Cs / Cw$$

ここで、Cw : 溶存態の濃度(ng/L)

Cs : 懸濁態中の濃度(ng/kg･dry)

分配係数の算出にあたり、生汚泥、余剰汚泥の医薬品濃度は、溶存態と懸濁態の間で平衡状態に達していると仮定した。本調査により求めた $LogK_d$の値は、成宮ら[1]の報告値とほぼ同程度であった。

また、$LogK_d$と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係を図-3 に示す。生汚泥では $LogK_d$が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向が見られた。余剰汚泥では、BF、CF を除く 5 物質については生汚泥同様 $LogK_d$が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向が見られた。

表-6 固-液分配係数（$LogK_d$）

	本研究		既報値[1]	
	生汚泥	余剰汚泥	生汚泥	余剰汚泥
BF	1.9	2.3	1.8	2.3
CF	1.7	2.6	1.2	2.7
CAM	2.3	2.6	2	2.3
CT	1.7	1.7	1.9	1.8
KP	2.0	2.3	1.8	2.3
SMZ	1.6	1.8	1.6	1.7
TC	4.3	4.3	3.3	

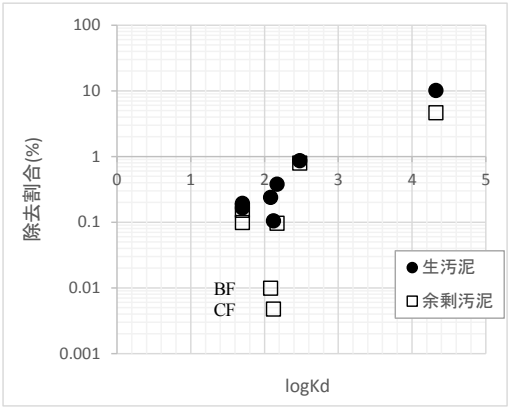


図-3 $LogK_d$と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係

５． 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の下水処理における除去特性

５．１ 調査方法

調査は、前述の活性汚泥処理実験装置（図-2）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 4 ヶ月が経過した平成 25 年 2 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。LAS は前述した方法により分析した。本装置は、流入量 6m³/d、汚泥返送率約 30%、HRT 約 8 時間、SRT 約 16 日で運転した。下水試験方法[24]に従い分析した一般水質項目の分析結果（実験装置の運転管理状況）を表-7 に示す。二次処理水の BOD、COD、SS 濃度はそれぞれ 5.6mg/L、9.4mg/L、5.7mg/L で、これらの除去率は 96%、87%、96%であった。これらの値は、標準活性汚泥法の実下水処理場と同等であり、本装置の処理水質は実際の下水処理場と同レベルであった。

５．２ 調査結果

分析対象とした LAS の各水処理工程及び汚泥の濃度を図-4 に示す。流入下水の各 LAS 濃度（C10、C11、C12、C13、C14）は、230μg/L、840μg/L、610μg/L、420μg/L、1.7μg/L の合計約 2,100μg/L であった。初沈流出水の各 LAS 濃度は、230μg/L、840μg/L、640μg/L、330μg/L、2.1μg/L の合計約 2,040μg/L で流入下水とほぼ同じ値であり、約 2 時間の沈殿処理では除去されな

表-7　活性汚泥処理実験装置の運転管理状況

		流入下水	初沈流出水	エアタン（AT4）	二次処理水	放流水
水温	[℃]	19.6 (14.4-25.6)	19.2 (15.2-26.2)	18.2 (13.4-26.8)	18.0 (12.9-26.8)	17.8 (12.7-26.8)
pH	[－]	6.8-7.3	6.7-7.2	6.4-6.7	6.4-7.0	6.4-6.9
BOD	[mg/L]	150 (87-240)	94 (79-130)	－	5.6 (1.8-9.7)	3.4 (1.3-8.9)
COD	[mg/L]	75 (40-100)	45 (34-63)	－	9.4 (6.4-13)	9.4 (7.1-12)
DOC	[mg/L]	34 (26-52)	31 (25-46)	－	6.6 (5.6-7.8)	6.5 (5.4-8.0)
SS・MLSS	[mg/L]	140 (82-250)	70 (54-110)	2,000 (1,590-2,400)	5.7 (2.0-19)	4.5 (1.9-7.6)
残留塩素（Total）	[mg/L]	－	－	－	－	0.45 (0.15-0.69)

上段：平均値，　下段：範囲

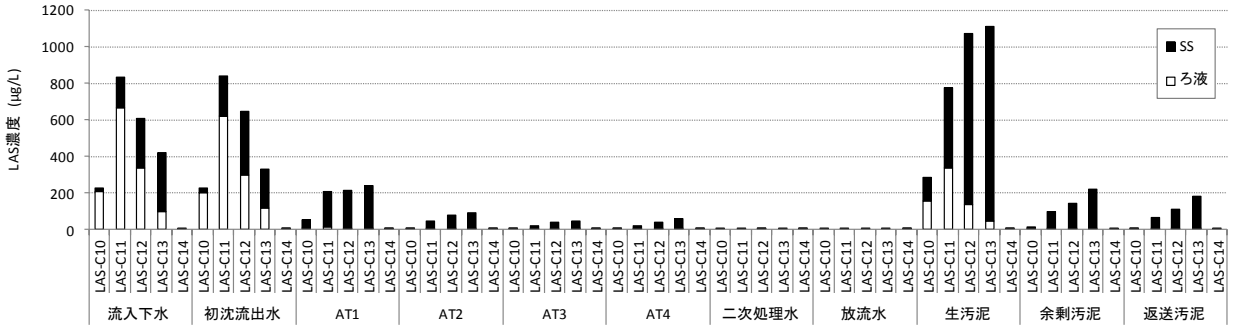


図-4　各水処理工程の LAS 分析結果
（　）内の数値は各 LAS（C10,C11,C12,C13,C14）濃度の合計

いことがわかった。また、流入下水と初沈流出水の各 LAS の濃度比もほぼ同じであることから殆ど分解していないものと考えられる。AT 内の各 LAS 濃度は、AT1 では 52μg/L、210μg/L、210μg/L、240μg/L、1.7μg/L の合計約 710μg/L となり、初沈流出水の濃度に対し大きく減少していた。AT2 では、7.8μg/L、51μg/L、80μg/L、94μg/L、0.3μg/L の合計約 230μg/L、AT3 では、3.5μg/L、22μg/L、39μg/L、48μg/L、0.3μg/L の合計約 110μg/L、AT4 では、3.4μg/L、22μg/L、38μg/L、62μg/L、0.5μg/L の合計約 130μg/L となった。

LAS は曝気時間約 2 時間の AT1 内において大きく減少し、流入下水、初沈流出水の濃度の 1/20 以下となった。二次処理水の各 LAS 濃度は、0.1μg/L、0.1μg/L、0.1μg/L、0.1μg/L、ND の合計約 0.4μg/L であった。放流水の各 LAS 濃度は、0.1μg/L、0.1μg/L、0.1μg/L、0.05μg/L、ND の合計約 0.4μg/L で二次処理水とほぼ同じ値であり、滞留時間が約 30 分の塩素混和槽内では殆ど変化しないことがわかった。また、生汚泥の各 LAS 濃度は、290μg/L、780μg/L、1,070μg/L、1,150μg/L、12μg/L の合計約 3,300μg/L で流入下水、初沈流出水の濃度に近い値であった。余剰汚泥の各 LAS 濃度は、16μg/L、96μg/L、150μg/L、220μg/L、1.6μg/L の合計約 480μg/L であった。返送汚泥の各 LAS 濃度は、10μg/L、67μg/L、110μg/L、180μg/L、1.4μg/L の合計約 370μg/L で余剰汚泥とほぼ同じ値であった。

次に、活性汚泥処理プロセスにおける LAS 負荷量の挙動を図-5 に示す。また、流入水中の LAS（ろ液＋SS）負荷量を 100%とした各処理工程、各汚泥における負荷割合を括弧内に示した。流入水と初沈流出水の LAS 負荷量は、ほぼ同じ値であり、最初沈殿池における LAS の除去はみられないが、AT1 で 49%、AT2 で 16%、AT3 で 8%、AT4 で 9%と処理が進むに従い大きく減少した。

二次処理水、放流水では 0.01%、0.01%となり活性汚泥処理により 99%以上が除去されることがわかった。活性汚泥処理における LAS 負荷量の挙動より、流入負荷量に対する排出負荷量（放流水、生汚泥、余剰汚泥）の合計は 2.6%であった。残りの 97.4%は活性汚泥処理により分解・除去されたものと考えられる。

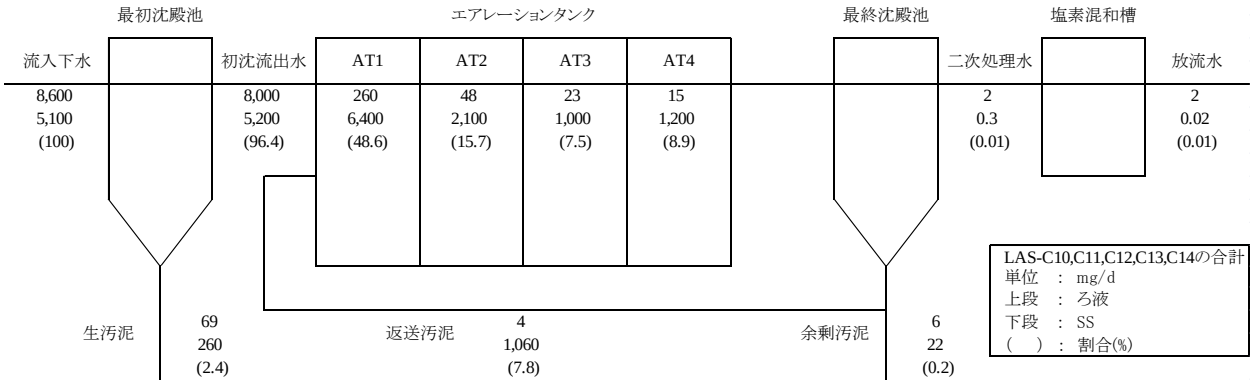


図-5　活性汚泥処理プロセスにおける LAS 負荷量の挙動

６．　活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける医薬品類の除去特性

６．１　調査方法

調査は、有効水深が約 2m の最初沈殿池(0.5m³)、エアレーションタンク(0.5m³×4 槽)、最終沈殿池(0.7m³)で構成される活性汚泥処理実験装置と微生物保持担体を添加した反応槽(10L×4 槽)の担体処理実験装置を用いて行った（図-6 参照)。実下水処理場の流入下水を定量ポンプを用いて活性汚泥処理実験装置に導入した。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。活性汚泥処理実験装置は、流入下水量 6.8m³/d、汚泥返送率約 38%、エアレーションタンク HRT 約 7 時間で運転した。担体処理実験装置は担体を嵩比率 35%で添加、反応槽は担体が浮遊するよう機械攪拌し、担体表面に自然発生的に付着した生物膜により高度処理した。担体処理実験装置の各反応槽の HRT は約 30 分であり、担体処理水④では約 2 時間の HRT となる。

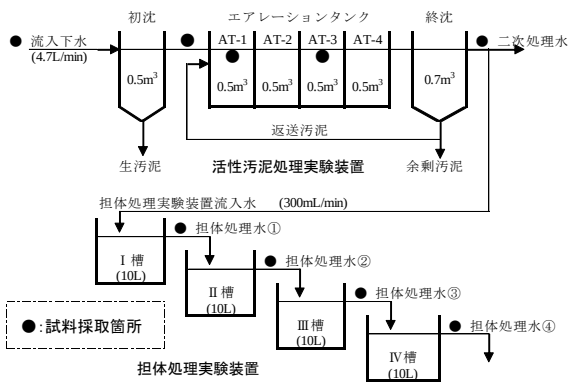


図-6　実験装置の概要と試料採取箇所

分析試料は、運転開始から 2 ヶ月以上経過した後に、流入下水、初沈流出水、AT-1 混合液、AT-3 混合液、終沈流出水（二次処理水)、担体処理水①～④を 2 時間間隔で採取し、それぞれ採取した各試料を等量混合したコンポジット試料とした。

調査対象医薬品類は、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ケトプロフェン、トリクロサンの 4 物質とした。これら 4 物質は下水処理水に残存し、藻類生長阻害[4)25)]又はミジンコ繁殖阻害[8)]があることが報告されている物質である。

クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ケトプロフェンは、ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過したろ液を Oasis HLB を用い固相抽出した後、LC-MS/MS により分析[10)]した。また、トリクロサンの分析は、ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過したろ液を Oasis HLB を用い固相抽出した後、アセチル誘導体化し GC-MS により分析[11)]した。

６．２　調査結果

一般水質項目分析結果を表-8 に示す。本実験装置の BOD 除去率は 94%であり、本装置の処理水質は標準活性汚泥法の実下水処理場と同レベルであった。流入下水中の NH_4-N、NO_X-N の濃度は、それぞれ 20mg/L、0.05mg/L 以下であるのに対し、二次処理水では 0.47mg/L、18mg/L で十分に硝化が進行していた。また、エアレーションタンク混合液の MLSS、余剰汚泥引き抜き量より計算した SRT は約 13 日であった。

活性汚泥処理実験装置及び担体処理実験装置の各処理プロセスにおける医薬品類 4 物質の分析結果を図-7 に示す。流入下水のクラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)、ケトプロフェン(KP)、トリクロ

表-8　一般水質項目分析結果

	流入水	初沈流出水	二次処理水	担体処理水④
BOD (mg/L)	150	140	9.1	-
DOC (mg/L)	35	37	7.8	6.4
NH_4-N (mg/L)	20	21	0.47	0.04
NOx-N (mg/L)	<0.05	<0.05	18	19
TN (mg/L)	33	31	20	20
TP (mg/L)	3.2	3.2	1.6	1.6
水温 (℃)	16.8	16.4	14.9	13.4

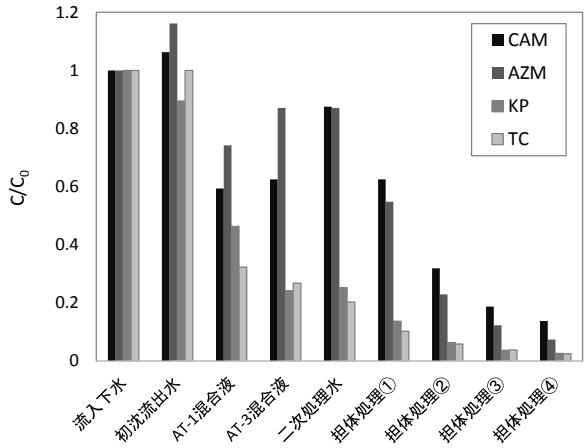


図-7　医薬品類分析結果

サン(TC)の濃度は、それぞれ 1,600ng/L、310ng/L、950ng/L、340ng/L であった。図-7 は、流入下水の医薬品類濃度をC_0、各プロセスの医薬品類濃度をCとし、C/C_0 で示した。CAM、AZM は、初沈流出水で流入下水に比べ約 10%高い値を示したが、エアレーションタンク内で減少し、二次処理水ではそれぞれ 1,400ng/L、270ng/L となり流入下水の 0.88、0.87 の値を示した。本調査における活性汚泥処理による除去率は、それぞれ 12%、13%である。KP は、初沈流出水で流入下水の 0.89 を示し、エアレーションタンク内で大きく減少し、二次処理水では 240ng/L となり流入下水の 0.25 となった。TC は、初沈流出水では流入下水とほぼ同じ値を示し、エアレーションタンク内で大きく減少し、二次処理水では 69ng/L となり流入下水の 0.2 となった。KP、TC の活性汚泥処理による除去率は、それぞれ 75%、80%である。

担体処置実験装置での医薬品の減少は、各物質とも処理が進むにつれ減少し、担体処理水④では二次処理水（担体処理実験装置流入水）の 1/5 以下となった。担体処理における医薬品類除去率は、合計 HRT が約 2 時間の担体処理水④では、CAM が 84%、AZM が 91%、KP が 90%、TC が 88%であった。CAM、AZM は、活性汚泥処理での除去率（12%，13%）に比べ大きな除去率を示し、担体処理水④の濃度は 220ng/L、23ng/L であった。KP、TC は、活性汚泥処理における除去率が 75%、80%であり、活性汚泥処理により比較的除去され易い物質ではあるが、流入下水の 20～25%は二次処理水に残存している。これら二次処理水に残存する KP、TC は担体処理により更に除去することができ、担体処理水④の濃度は 25ng/L、8.5ng/L となった。また、担体処理における医薬品類除去は、DOC 除去率 18%に比べ大きな値を示したことから、二次処理水に残存する溶存有機物の中でも比較的除去され易い物質ということができる。

7．　下水処理過程における総毒性の除去特性評価

下水処理および追加処理過程での総毒性の低減効果を明らかにするため、下水処理工程水に曝露したメダカの網羅的遺伝子発現解析から総毒性の低減効果の評価を行った。

7．1　実験方法

7．1．1　下水処理実験装置

図-8 に調査に使用した下水処理実験装置の概要を示す。実験装置は、最初沈殿池(0.5m^3)、エアレーションタンク(0.5m^3×4 槽)、最終沈殿池(0.7m^3)で構成される活性汚泥処理実験装置の後段に、砂ろ過および担体処理装置を組み合わせたものである。担体処理装置の反応槽は 1 槽とし、微生物が自然発生的に保持されたポリプロピレン製円筒担体(φ5mm,長さ 5mm,厚さ 1mm)が充填され、水理学的滞留時間 2 時間で砂ろ過水を処理した。メダカの曝露水は、流入下水、砂ろ過水、担体処理水とし、対照区は水道水を活性炭処理した脱塩素水道水とした。採水時期は、2014 年 11 月 5～6 日で、24 時間連続採水とした。メダカの曝露水の水質分析は、DOC、NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N 濃度とした。

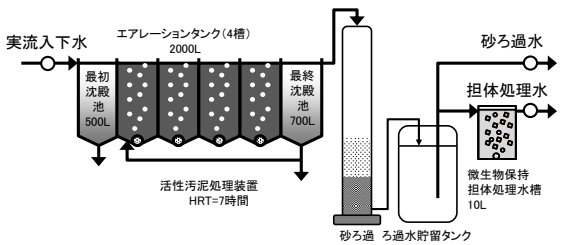


図-8 下水処理実験装置

7．1．2　メダカ曝露実験と網羅的遺伝子解析

メダカの曝露実験と遺伝子発現解析は、表-9 の方法で行った。曝露方式は半止水式、曝露時間は 96 時間とし、曝露終了後にメダカを 1 匹ずつ解剖し、肝臓、鰓、

表-9 メダカ曝露実験と遺伝子発現解析の方法

試験魚	d-rR系 ヒメダカ(6～7カ月齢)
曝露匹数	雄メダカ 10匹 /曝露区 雌メダカ 10匹 /曝露区
曝露時間	96時間
曝露水量	5L
曝露方式	半止水式(1日1回全換水)
試験水	流入下水 砂ろ過水 担体処理水 脱塩素水道水(対照区)
設定水温	24℃
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	なし
曝気	DOが低い試料は緩やかに曝気 飽和溶存酸素濃度の50%以上を確保
解析臓器	肝臓、鰓、脳
RNA抽出法	RNeay mini kitにより1個体毎に抽出
RNA試料の調整	同曝露区の10匹分を1つに混合
遺伝子発現解析法 cDNAライブラリ調製試薬	次世代シーケンサー Miseq(v3 150cycle) Truseq Stranded mRNA Sample Prep Kit

脳を摘出した。RNA は、RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いて抽出し、同曝露区の 10 匹分の一部を混合して 1 曝露区 1 臓器につき 1 検体とした。そして、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit（Illumina）で cDNA ライブラリを調製し、次世代シーケンサー Miseq（Illumina）を用い、ペアエンドリード（v3 試薬、75bp×2）で塩基配列を取得した。

７．１．３　データ解析

データ解析は、セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点）[26]を利用した。塩基配列が記載された FASTQ ファイルをアップロードし、全てのリードについて、Sickle を用いて Quality スコア 20 を閾値としてトリミングした。その後、肝臓、鰓、脳の 3 グループに分けて Tophat-Cufflinks 解析パイプラインによる解析を実行し、メダカゲノム上の遺伝子の位置と構造を推定し、遺伝子発現量を計算した。

遺伝子発現量は、シーケンスされた cDNA 断片の総量と遺伝子の長さの両方で補正した値である、FPKM（Flagments Per Kilobase of exon per Million reads mapped）で表した。同じゲノム領域に複数の Isoform が確認された場合は、それらの FPKM の和を求め、ゲノム上の 1 領域につき 1 遺伝子となるようにした。FPKM = 0 となる遺伝子があったことから、遺伝子発現倍率は、対照区と曝露区のそれぞれの（FPKM+1）の比 [27]とした。そして、各曝露区で、対照区と比較して発現倍率が 3 倍以上、または 1/3 以下になった遺伝子を、その曝露区の発現変動遺伝子とした。

推定された各遺伝子の名称や機能情報を得るため、メダカの Refseq mRNA[28]配列に対して相同性検索（Blastn）検索を行い、GeneSymbol を付与した。NCBI のメダカの遺伝子データベースからは機能情報

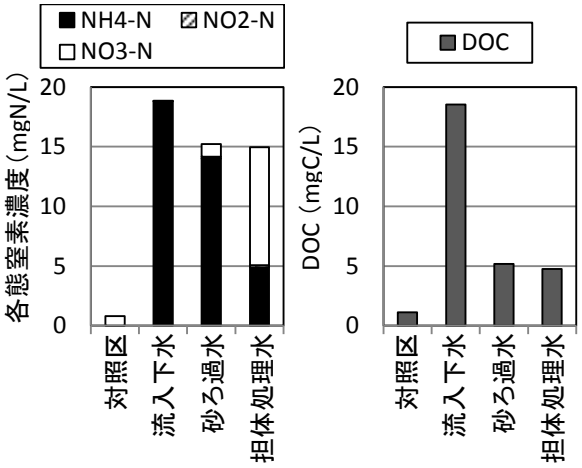


図-9 試験水の NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、DOC 濃度

は十分には得られなかったため、遺伝子の機能は、Uniprot-GOA に登録されている、ヒトの Gene Ontology（GO）データベース [29]を利用した。始めに、各遺伝子の塩基配列を用い、ヒトのリファレンスシーケンス（Refseq Protein[28]）に対して相同性検索（Blastx）を行った。そして、それぞれの遺伝子と最も相同性が高いヒトの Refseq ID に対応した GO を、その遺伝子の機能とした。

遺伝子の機能の統計解析には、統計解析環境 R 3.2.0 および Excel を使用した。各曝露区の発現変動遺伝子について、特定の機能に関与する遺伝子が有意に多く含まれているか否かを Fisher の正確確率検定で検定した。遺伝子機能は大きく Biological Process、Molecular Function、Cellular Component の 3 種に区分されているが、このうち Biological Process 関連と Molecular Function 関連の機能を対象とした。

７．２　実験結果

７．２．１　水質分析結果

図-9 は、試験水の NH_4-N、NO_2-N、NO_3-N、DOC 濃度である。活性汚泥処理で硝化が抑制されていたため、砂ろ過水の NH_4-N 濃度が高くなっていた。流入下水、砂ろ過水、担体処理水の NH_4-N 濃度は 18.8、14.0、4.9mgN/L であった。NO_2-N 濃度は、担体処理水の 0.17mgN/L が最大で、溶存態窒素濃度に占める割合は低かった。DOC 濃度は、活性汚泥処理で 72%低下したが、担体処理ではさらなる低下はみられなかった。

７．２．２　遺伝子発現解析結果

Miseq から出力されたリードペア数は、1 サンプルあたり 1,341 万～1,902 万本であった。メダカゲノム

表-10 臓器別の検出された遺伝子数

	検出した遺伝子の総数	メダカまたはヒトのRefseqが対応した数および割合	ヒトのBiological ProcessのGOが付与された数および割合
肝臓	18,100	15,590 (86.1%)	11,676 (64.5%)
鰓	25,051	20,944 (83.6%)	15,227 (60.8%)
脳	25,389	21,361 (84.1%)	15,847 (62.4%)

にマッピングされたリードペアの割合は約 87%であった。

表-10 は、臓器別の、検出された遺伝子数の比較である。メダカゲノム上で 1 領域につき 1 遺伝子として集計したところ、肝臓では約 1 万 8 千個、他の臓器では約2万5千個の遺伝子が得られた。相同性検索からは、8 割以上の遺伝子に、メダカの Refseq mRNA またはヒトの Refseq Protein が対応した。ヒトの Biological Process の GO が付与された遺伝子の割合は約 6 割であった。

図-10 は、雄メダカの、各臓器における、対照区に対する曝露区の発現変動遺伝子数である。雄メダカの発現変動遺伝子数は、肝臓では、流入下水、砂ろ過水、担体処理水曝露区の順に減少した。鰓では、流入下水曝露区で多く、砂ろ過水曝露区で流入下水曝露区の半分以下に減少し、担体処理水曝露区は砂ろ過水曝露区と同程度であった。脳は、鰓と同様に流入下水曝露区で多く、砂ろ過水と担体処理水曝露区で少なかった。

図-11 は、雌メダカの発現変動遺伝子数である。雌メダカの発現変動遺伝子数は、肝臓、鰓、脳のいずれも雄メダカに似た変化を示した。担体処理水曝露区の雌メダカの鰓と脳の発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区と比較して減少していた。

生物影響の種類を把握するため、各曝露区について、発現変動遺伝子の中に特定の機能（GO）を有する遺伝子が多く含まれているか否かを検定した。流入下水曝露区で $p<0.01$ で有意となった GO は、GO の階層構造における 2 階層目の GO を基に、生殖（reproduction, reproductive process）、発達（developmental process）、代謝（metabolic process）、応答（response to stimulus）、免疫（immune system process）、結合作用（binding）、触媒作用（catalytic activity）、その他に分類した。そして、発現変動遺伝子の個数から、処理過程での生物影響低減効果を調べた。

図-12a は雄の肝臓の解析結果であり、Biological Process の GO を有し、かつ、各曝露区で発現変動を示した遺伝子の個数である。図-12b は Molecular

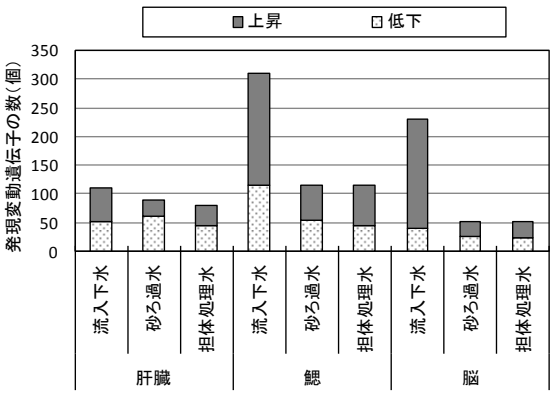


図-10 対照区雄メダカに対する
曝露区雄メダカの発現変動遺伝子数

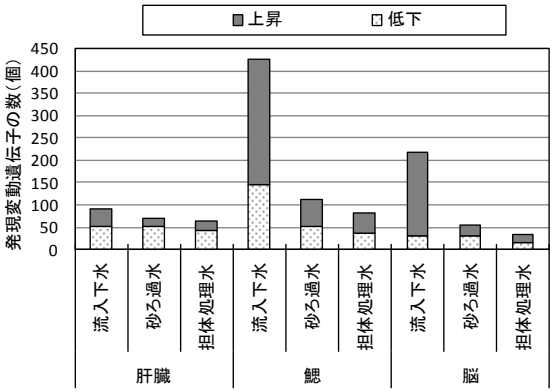


図-11 対照区雌メダカに対する
曝露区雌メダカの発現変動遺伝子数

Function の結果である。流入下水曝露区では、Biological Process の GO が 28 種類有意となった。生殖に関連する機能は 2 つあり、その発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区で減少し、担体処理水曝露区では変動しなくなっていた。個別の遺伝子でみると、流入下水曝露区では、内分泌かく乱影響のマーカー遺伝子として知られる vitellogenin I や choriogeninH の発現量が上昇していた。遺伝子機能の解析からも、流入下水が生殖関連の遺伝子発現に及ぼす内分泌かく乱影響は、活性汚泥および担体処理で低減することが確認できた。

流入下水曝露区では、発達関連の機能に関する遺伝子発現に変動がみられたが、砂ろ過水および担体処理水曝露区では変動はみられなかった。代謝関連の機能に関する遺伝子の中で、流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が最も多かった機能は、酸化還元プロセス（oxidation reduction process）であり、砂ろ過水、担

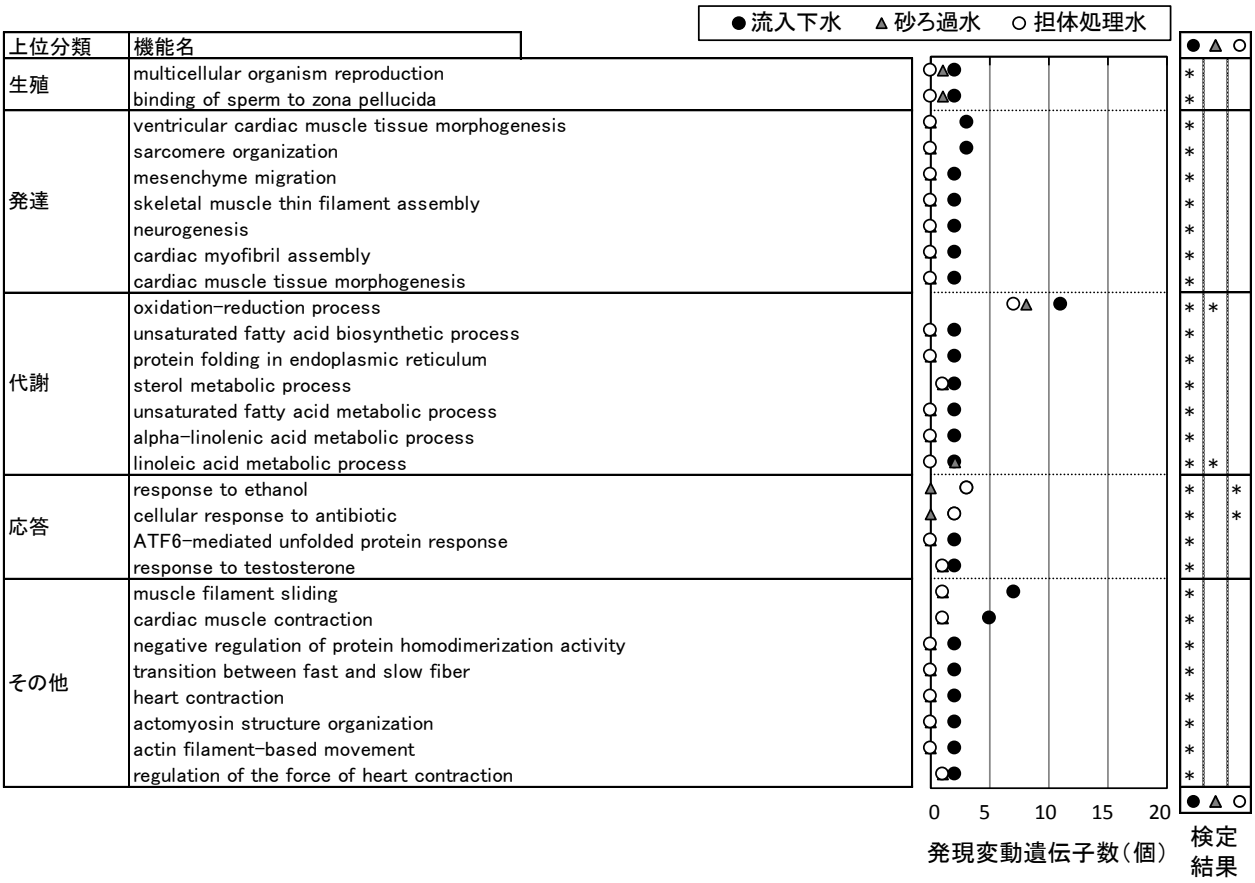


図-12a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$

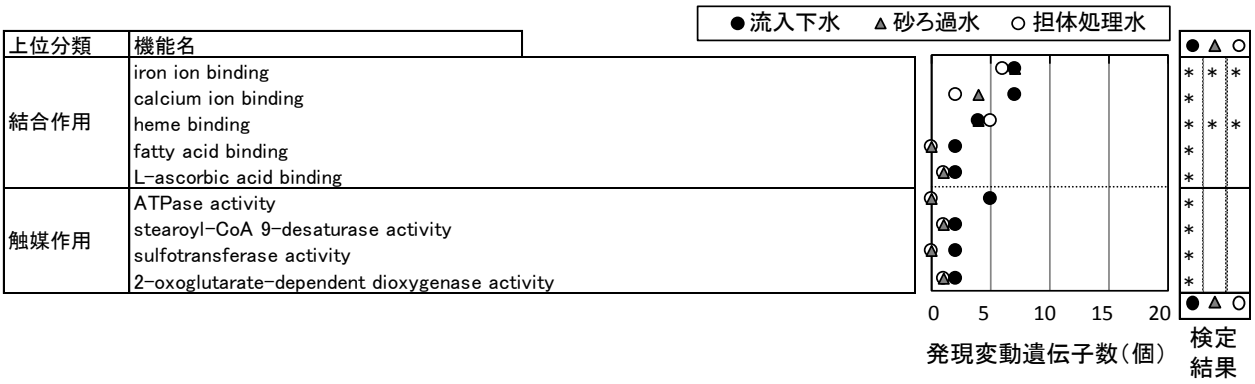


図-12b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$

図-12 雄メダカ肝臓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

体処理水曝露区では発現変動遺伝子数が減少したものの、発現変動遺伝子数は 0 にはならなかった。

代謝関連の他の機能も処理過程を経ることで発現変動遺伝子数が減少した。応答関連の機能に関する遺伝子のうち、性ホルモンであるテストステロンへの応答（response to testosterone）に関する遺伝子は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。その他の機能としては、筋繊維の滑り運動（muscle filament sliding）に関連する遺伝子が、流入下水曝露区で多く変動していたが、砂ろ過水曝露区で減少した。

Molecular Function では、流入下水曝露区で 9 つの機能が有意となった。流入下水曝露区で発現変動遺伝子が多かった機能は鉄イオンとの結合（iron ion binding）およびカルシウムイオンとの結合（calcium ion binding）であった。カルシウムイオンとの結合に関連した発現変動遺伝子の個数は、処理過程で減少した。触媒作用では ATPase 活性（ATPase activity）に関連した遺伝子が多く、これも砂ろ過水曝露区で減少

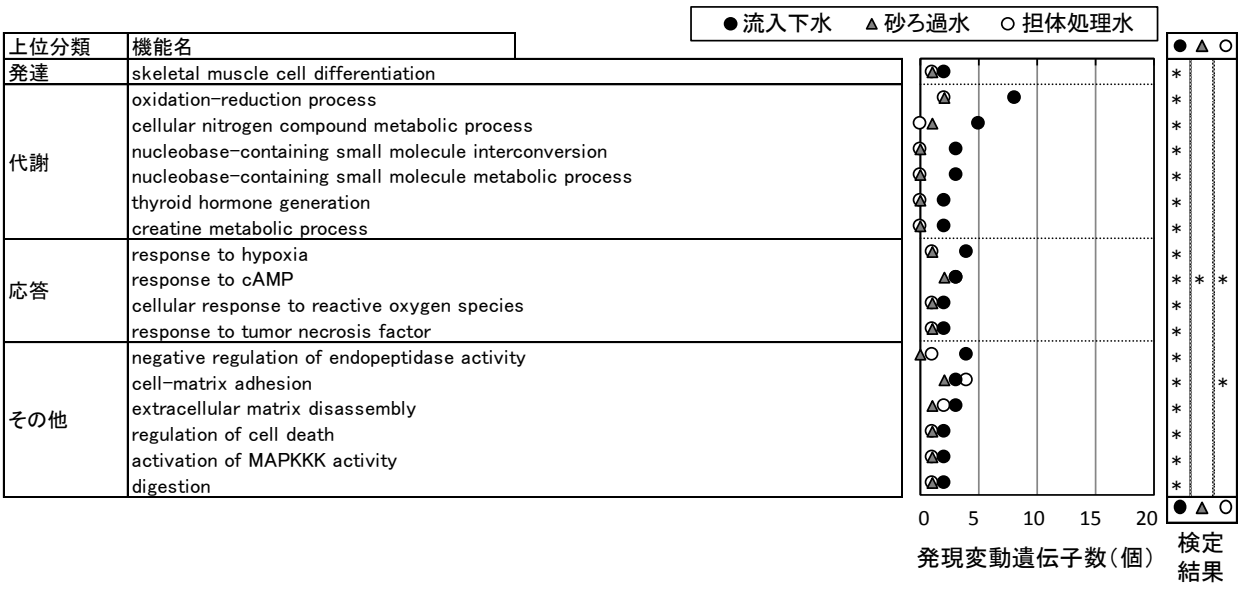


図-13a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$

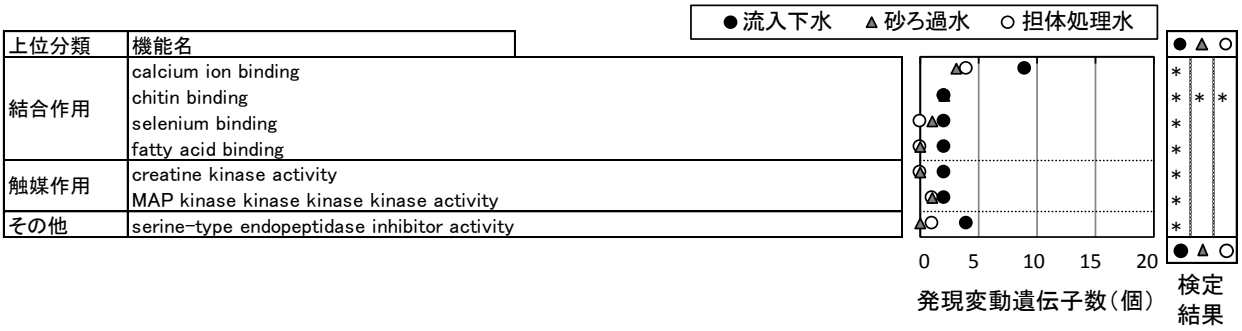


図-13b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$

図-13 雌メダカ肝臓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

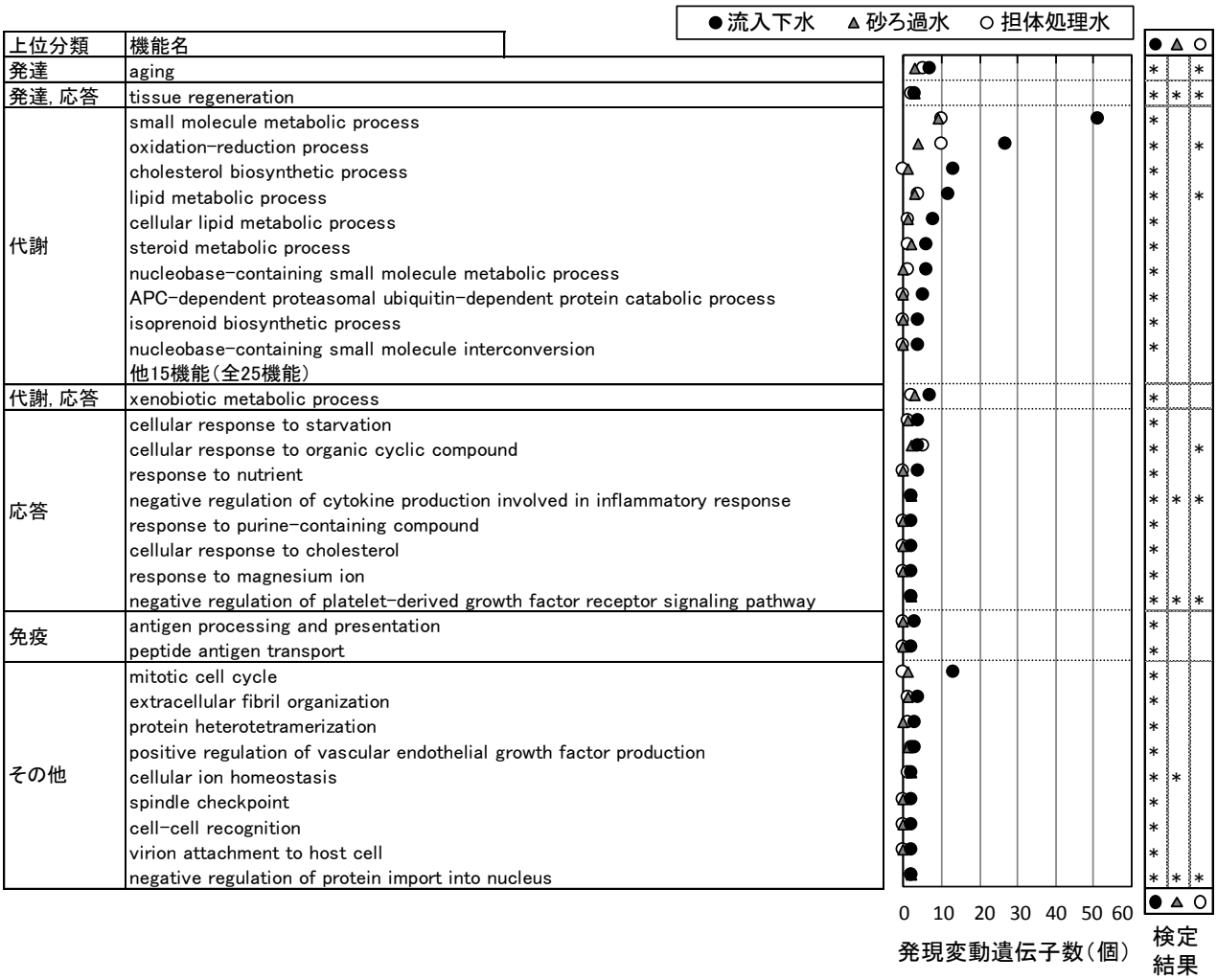
した。

図-13a, 13b は雌メダカの肝臓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p<0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process で 17 機能が有意となった。流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が多かった上位 2 機能は、酸化還元プロセスと窒素化合物の細胞での代謝（cellular nitrogen compound metabolic process）であった。代謝関連の 6 機能のいずれも、発現変動遺伝子数は砂ろ過水、担体処理水曝露区で減少した。流入下水曝露区では、応答関連のうち活性酸素種への細胞応答（cellular response to reactive oxygen species）遺伝子に変動がみられたが、砂ろ過水曝露区と担体処理水曝露区では変動はみられなかった。Molecular Function では、流入下水曝露区で 7 機能が有意となった。このうちカルシウムイオンとの結合など 6 機能は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。

図-14a, 14b は雄メダカの鰓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p<0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process で 47 機能が有意となった。発現変動遺伝子数が最も多かった機能は、小分子の代謝（small molecule metabolic process）で、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。代謝関連の他の機能についても、概ね砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少していた。

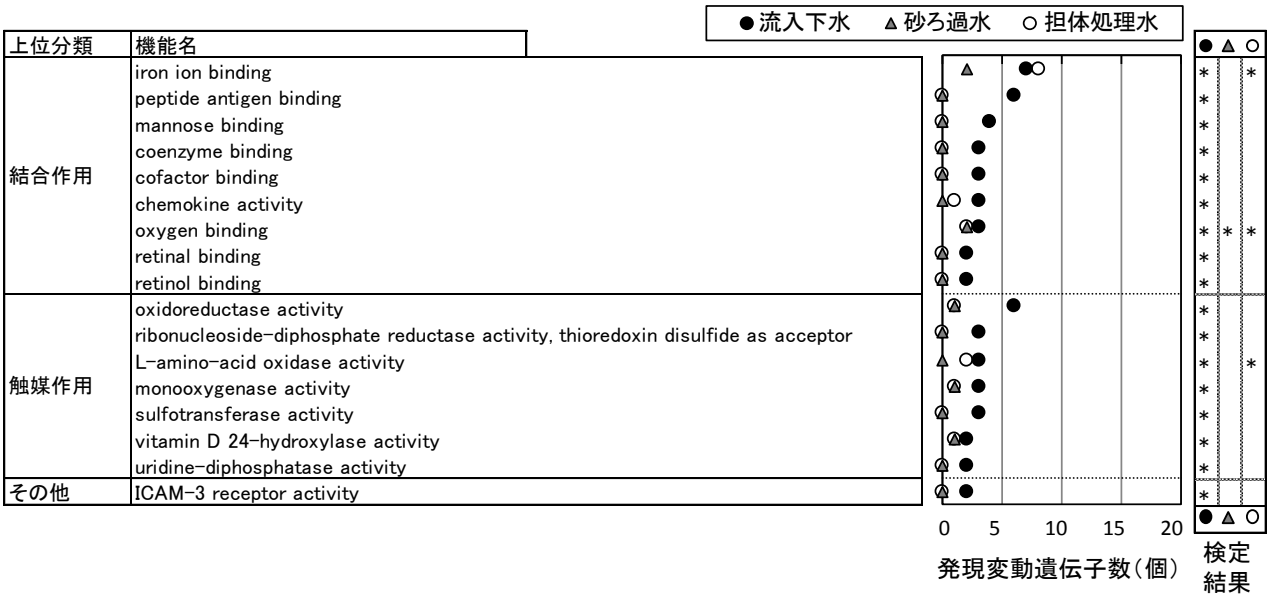
生体外物質の代謝（xenobiotic metabolic process）は、代謝と応答の両方に属する機能であり、薬物代謝酵素 CYP1A などを含む。この機能は、流入下水曝露区で 7 個の遺伝子が発現変動したが、担体処理水曝露区で 2 個に減少した。

応答関連は流入下水曝露区で 8 つの機能が発現変動を示したが、砂ろ過水曝露区ではその内 4 つの機能で



上位分類	機能名
発達	aging
発達, 応答	tissue regeneration
代謝	small molecule metabolic process
	oxidation-reduction process
	cholesterol biosynthetic process
	lipid metabolic process
	cellular lipid metabolic process
	steroid metabolic process
	nucleobase-containing small molecule metabolic process
	APC-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
	isoprenoid biosynthetic process
	nucleobase-containing small molecule interconversion
	他15機能(全25機能)
代謝, 応答	xenobiotic metabolic process
応答	cellular response to starvation
	cellular response to organic cyclic compound
	response to nutrient
	negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response
	response to purine-containing compound
	cellular response to cholesterol
	response to magnesium ion
	negative regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling pathway
免疫	antigen processing and presentation
	peptide antigen transport
その他	mitotic cell cycle
	extracellular fibril organization
	protein heterotetramerization
	positive regulation of vascular endothelial growth factor production
	cellular ion homeostasis
	spindle checkpoint
	cell-cell recognition
	virion attachment to host cell
	negative regulation of protein import into nucleus

図-14a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01



上位分類	機能名
結合作用	iron ion binding
	peptide antigen binding
	mannose binding
	coenzyme binding
	cofactor binding
	chemokine activity
	oxygen binding
	retinal binding
	retinol binding
触媒作用	oxidoreductase activity
	ribonucleoside-diphosphate reductase activity, thioredoxin disulfide as acceptor
	L-amino-acid oxidase activity
	monooxygenase activity
	sulfotransferase activity
	vitamin D 24-hydroxylase activity
	uridine-diphosphatase activity
その他	ICAM-3 receptor activity

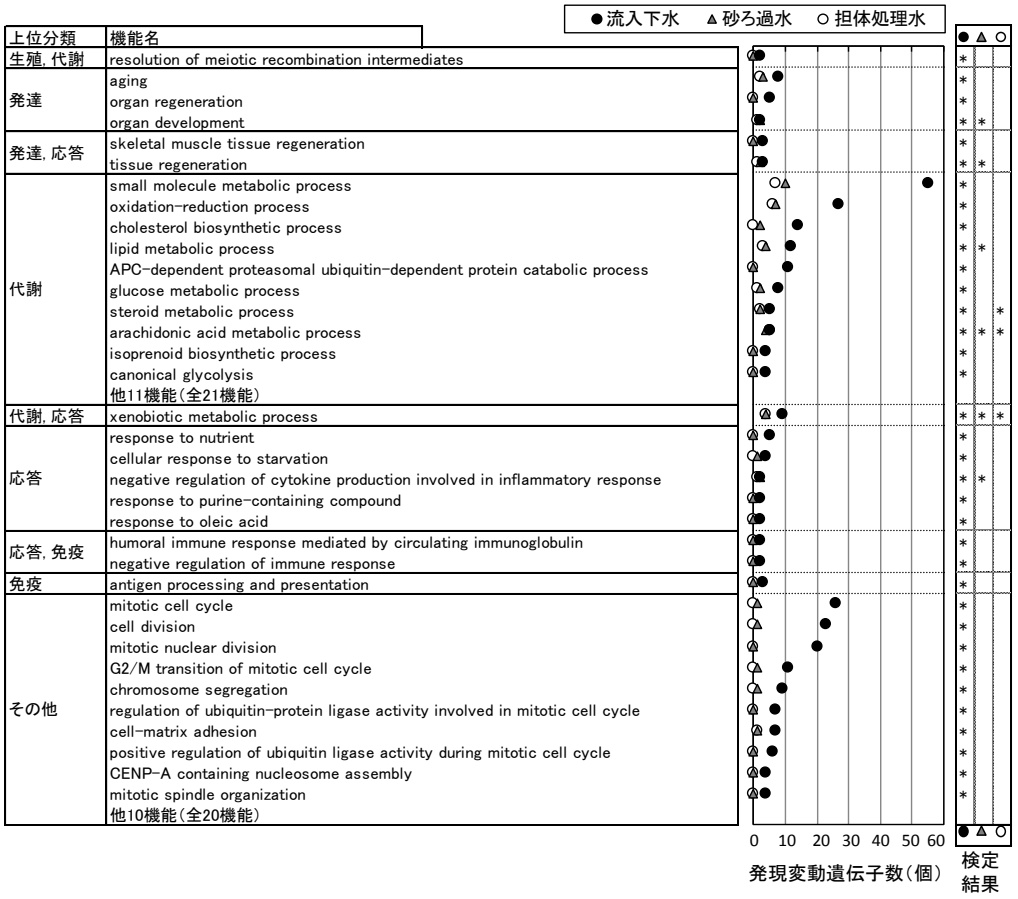
図-14b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-14 雄メダカ鰓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

発現変動遺伝子数が 0 個になった。免疫関連の遺伝子も、砂ろ過水曝露区で発現変動がみられなくなった。その他に区分した機能では、有糸分裂サイクル（mitotic cell cycle）関連の遺伝子が 11 個変動したが、砂ろ過水、担体処理水曝露区で 1 個以下に減少した。

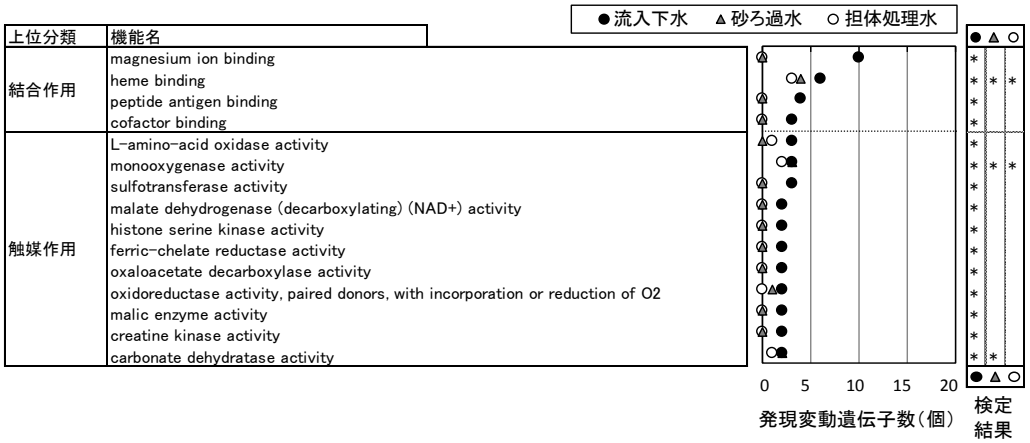
Molecular Function では、17 機能が有意となった。このうち、結合作用 6 機能、触媒作用 3 機能、その他 1 機能は、砂ろ過水と担体処理水曝露区で発現変動遺伝子数が 0 個になった。

図-15a, 15b は雌メダカの鰓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p<0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process の 56 機能が有意であった。発達に関連した機能は 5 つあり、



上位分類	機能名
生殖, 代謝	resolution of meiotic recombination intermediates
発達	aging
	organ regeneration
	organ development
発達, 応答	skeletal muscle tissue regeneration
	tissue regeneration
代謝	small molecule metabolic process
	oxidation-reduction process
	cholesterol biosynthetic process
	lipid metabolic process
	APC-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
	glucose metabolic process
	steroid metabolic process
	arachidonic acid metabolic process
	isoprenoid biosynthetic process
	canonical glycolysis
	他11機能（全21機能）
代謝, 応答	xenobiotic metabolic process
応答	response to nutrient
	cellular response to starvation
	negative regulation of cytokine production involved in inflammatory response
	response to purine-containing compound
	response to oleic acid
応答, 免疫	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin
	negative regulation of immune response
免疫	antigen processing and presentation
その他	mitotic cell cycle
	cell division
	mitotic nuclear division
	G2/M transition of mitotic cell cycle
	chromosome segregation
	regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle
	cell-matrix adhesion
	positive regulation of ubiquitin ligase activity during mitotic cell cycle
	CENP-A containing nucleosome assembly
	mitotic spindle organization
	他10機能（全20機能）

図-15a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$



上位分類	機能名
結合作用	magnesium ion binding
	heme binding
	peptide antigen binding
	cofactor binding
触媒作用	L-amino-acid oxidase activity
	monooxygenase activity
	sulfotransferase activity
	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity
	histone serine kinase activity
	ferric-chelate reductase activity
	oxaloacetate decarboxylase activity
	oxidoreductase activity, paired donors, with incorporation or reduction of O2
	malic enzyme activity
	creatine kinase activity
	carbonate dehydratase activity

図-15b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で $p<0.01$

図-15 雌メダカ鰓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

これらの発現変動遺伝子数は概ね砂ろ過水曝露区で減少した。代謝関連のうち小分子の代謝は、流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が最も多かったが、砂ろ過水曝露区で減少した。代謝関連の他の機能も、概ね発現変動遺伝子数が砂ろ過水曝露区で減少した。代謝と応答の両方に属する生体外物質の代謝は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が低下したが、0 個にはならなかった。免疫関連の機能の発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区で 0 個になった。その他では、有糸核分裂（mitotic nuclear division）や細胞分裂（cell division）など、細胞の増殖に関係した機能の遺伝子が多く変動していた。これらはいずれも砂ろ過水と担体処理水曝露区では 1 個以下となっており、活性汚泥処理でその機能への影響が低減したと考えられる。Molecular Function では、結合作用で 4 機能、触媒作用で 11 機能が有意となったが、発現変動遺伝子数は概ね処理過程で減少した。

図-16a, 16b は雄メダカの脳の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p<0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では Biological Process で 50 機能が有意となった。生殖や発達に関連した機能の遺伝子は、砂ろ過水曝露区では発現変動がみられなくなった。代謝では、小分子の代謝と酸化還元プロセスに関する遺伝子の発現変動が多かった。代謝関連で 22 機能が流入下水曝露区で有意となったが、砂ろ過水曝露区では 18 機能で発現変動がみられなくなった。応答関連で最も発現変動遺伝子数が多かった機能は酸化ストレスへの細胞応答（cellular response to oxidative stress）と毒物への応答（response to toxic substance）であり、いずれも砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が 0 個になった。流入下水曝露区では抗酸化物質であるグルタチオンの代謝（gluthatione metabolic process）も有意となっていたことから、酸化ストレスが生じていたと考えられる。Molecular Function では 23 機能が有意となり、最も発現変動遺伝子数が多かった機能は炭化水素への結合（carbohydrate binding）であった。Molecular Function の機能はいずれも、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。

図-17a, 17b は雌メダカの脳の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p<0.01$ であったものの一覧である。Biological Process の 36 機能が有意となっていた。流入下水曝露区で最も発現変動遺伝子が多かった機能は、酸化還元プロセスであった。応答関連では、サイトカインで制御されるシグナル経路（cytokine-mediated signaling pathway）に関する遺伝子が多かった。免疫関連では、流入下水曝露区で免疫応答（immune response）を含む 6 機能が有意であったが、GO 別の発現変動遺伝子数は、いずれも活性汚泥処理の後で減少し、砂ろ過水曝露区で 2 個以下、担体処理水曝露区で 1 個以下となった。Molecular Function の 19 の機能はいずれも、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が 0 個となっていた。

流入下水が有する生物影響と下水処理工程での影響低減効果の概略を把握するため、生殖、発達、代謝、応答、免疫、その他の 6 つの機能分類について、図-12～17 に示した GO 別の発現変動遺伝子数を合計した。図-18 は、それぞれの機能分類についての各曝露区の発現変動遺伝子数である。

生殖関連の発現変動遺伝子は、流入下水曝露区では雄の肝臓、雄の脳、雌の鰓で検出された。雄の肝臓では担体処理水曝露区で 0 個に減少し、他の臓器では砂ろ過水曝露区で 0 個になった。

発達関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雄の肝臓、雌の鰓で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。雌の鰓では担体処理水曝露区でさらに減少したが、0 個までは減少しなかった。

代謝関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では雄と雌のどちらも鰓で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。雌の鰓では担体処理水曝露区でさらに減少したが、0 個までは減少しなかった。

応答関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雄と雌のどちらも脳で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。

免疫関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雌の脳で多く、砂ろ過水、担体処理水曝露区で 1 個以下に減少した。

その他の機能に関連した発現変動遺伝子の数は、流入下水曝露区では、雄は脳、雌は鰓で多かった。発現変動遺伝子数は性別や臓器によらず、砂ろ過水、担体処理水曝露区で 10 個以下に減少した。

８．まとめ

８．１　調査対象化学物質とその分析方法

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、ノニルフェノール（NP）、4-t-オクチルフェノール（4-t-OP）とそれらの関連物資

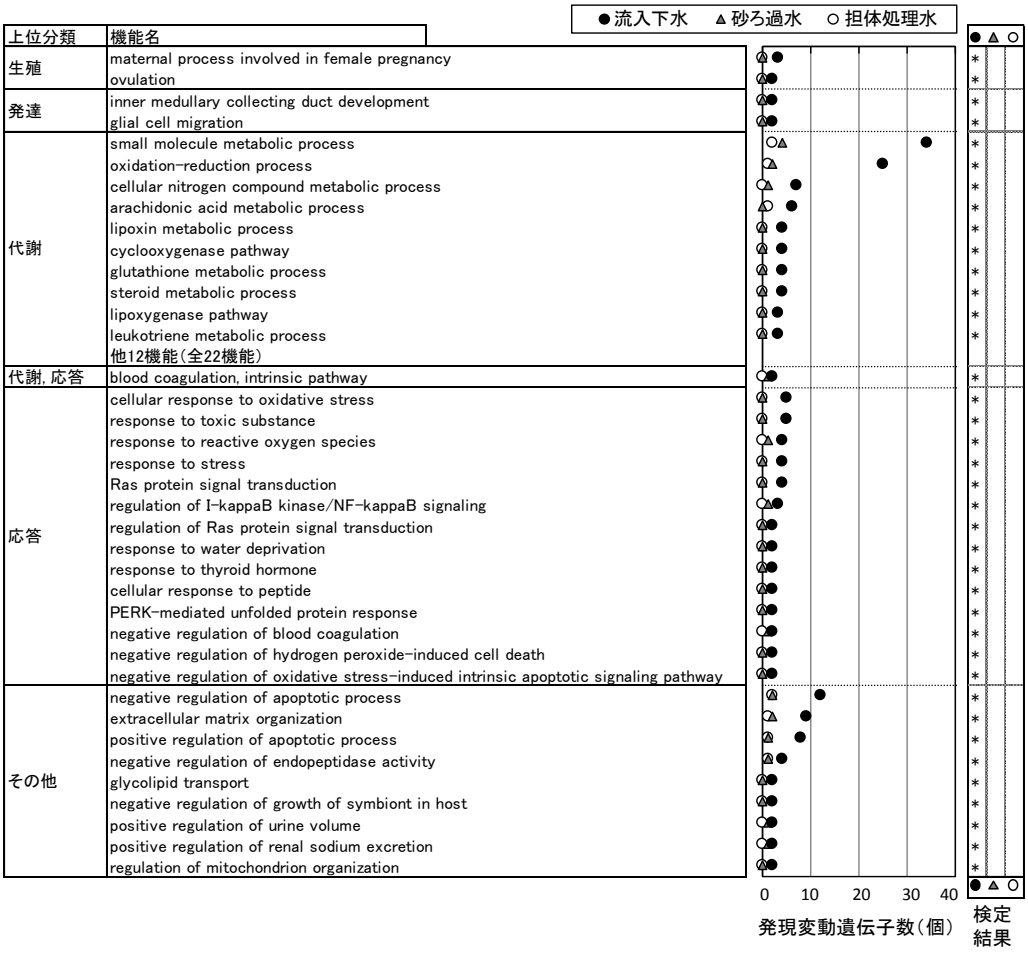


図-16a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

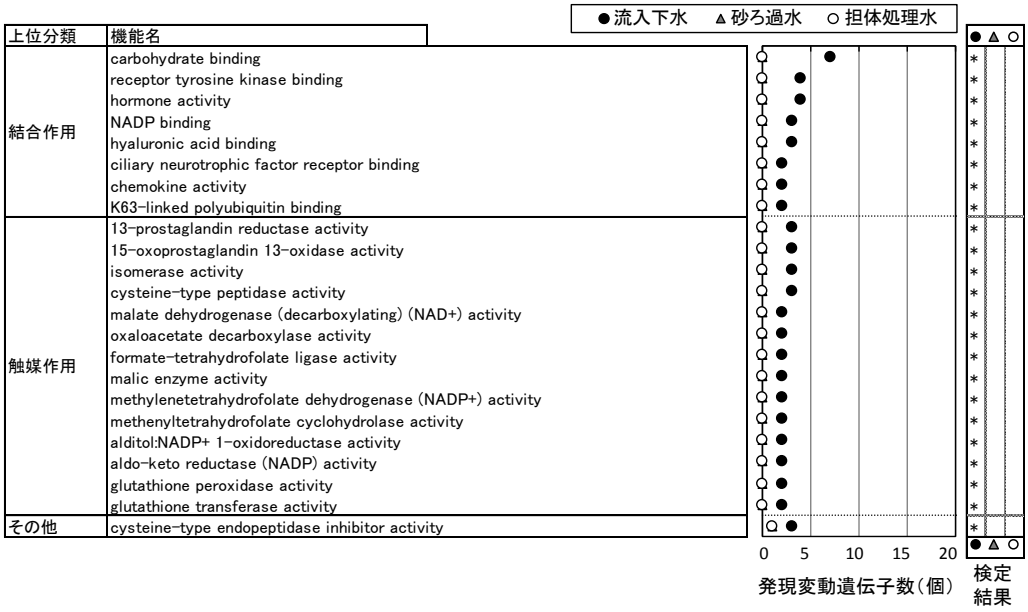
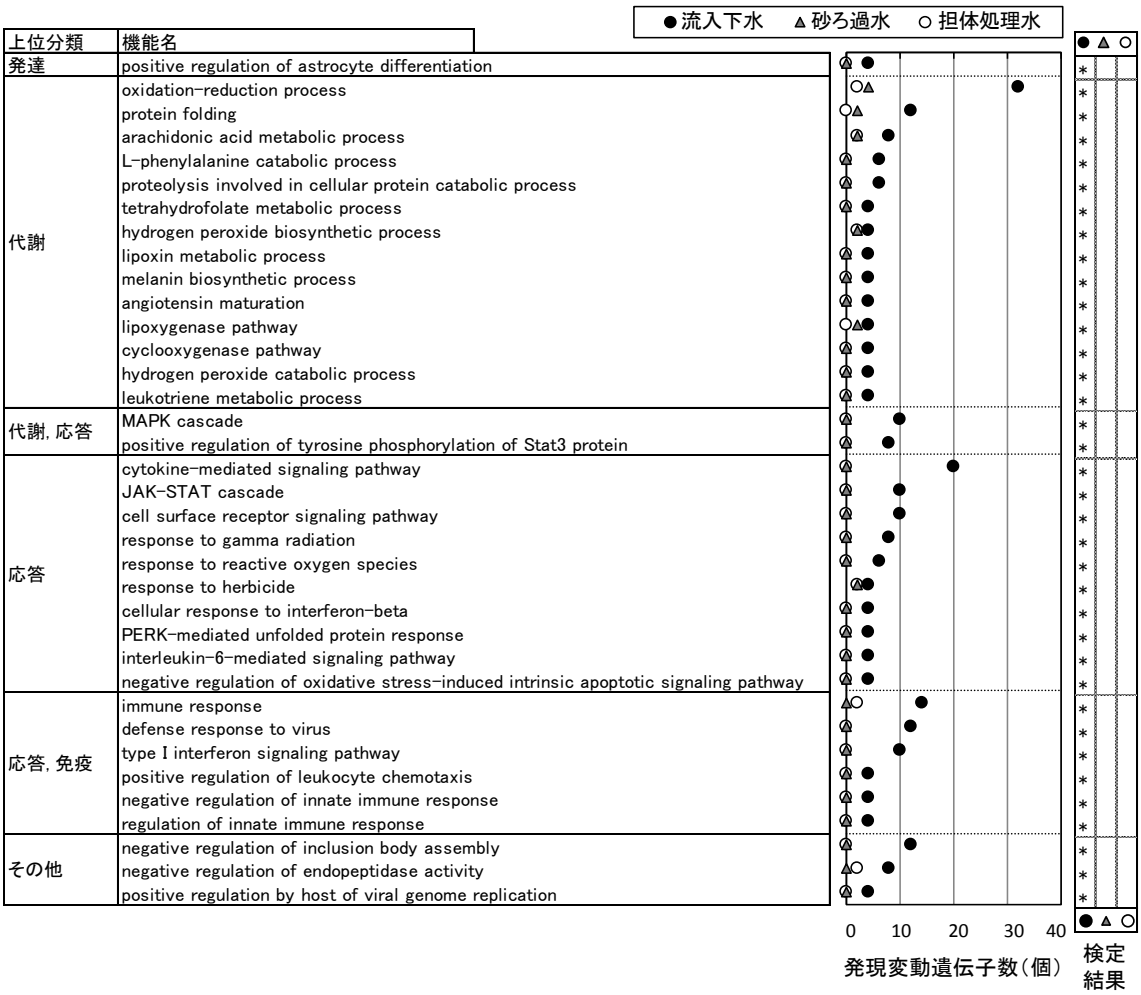


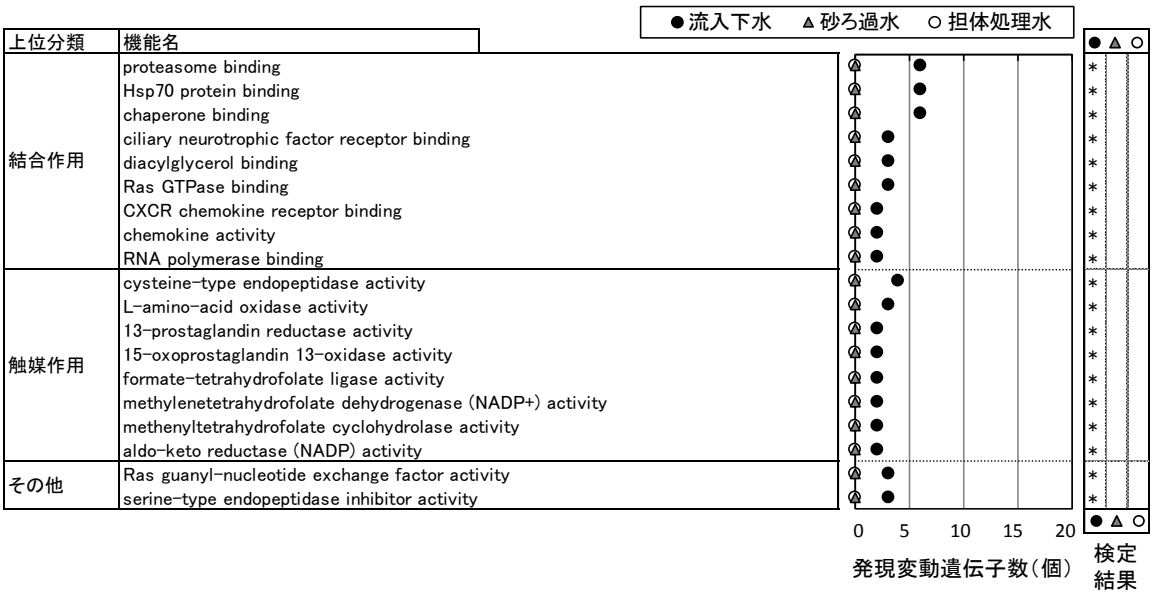
図-16b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-16 雄メダカ脳において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化



上位分類	機能名
発達	positive regulation of astrocyte differentiation
代謝	oxidation-reduction process
	protein folding
	arachidonic acid metabolic process
	L-phenylalanine catabolic process
	proteolysis involved in cellular protein catabolic process
	tetrahydrofolate metabolic process
	hydrogen peroxide biosynthetic process
	lipoxin metabolic process
	melanin biosynthetic process
	angiotensin maturation
	lipoxygenase pathway
	cyclooxygenase pathway
	hydrogen peroxide catabolic process
	leukotriene metabolic process
代謝, 応答	MAPK cascade
	positive regulation of tyrosine phosphorylation of Stat3 protein
応答	cytokine-mediated signaling pathway
	JAK-STAT cascade
	cell surface receptor signaling pathway
	response to gamma radiation
	response to reactive oxygen species
	response to herbicide
	cellular response to interferon-beta
	PERK-mediated unfolded protein response
	interleukin-6-mediated signaling pathway
	negative regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway
応答, 免疫	immune response
	defense response to virus
	type I interferon signaling pathway
	positive regulation of leukocyte chemotaxis
	negative regulation of innate immune response
	regulation of innate immune response
その他	negative regulation of inclusion body assembly
	negative regulation of endopeptidase activity
	positive regulation by host of viral genome replication

図-17a Biological Process　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01



上位分類	機能名
結合作用	proteasome binding
	Hsp70 protein binding
	chaperone binding
	ciliary neurotrophic factor receptor binding
	diacylglycerol binding
	Ras GTPase binding
	CXCR chemokine receptor binding
	chemokine activity
	RNA polymerase binding
触媒作用	cysteine-type endopeptidase activity
	L-amino-acid oxidase activity
	13-prostaglandin reductase activity
	15-oxoprostaglandin 13-oxidase activity
	formate-tetrahydrofolate ligase activity
	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+) activity
	methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase activity
	aldo-keto reductase (NADP) activity
その他	Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity
	serine-type endopeptidase inhibitor activity

図-17b Molecular Function　　検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-17 雌メダカ脳において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

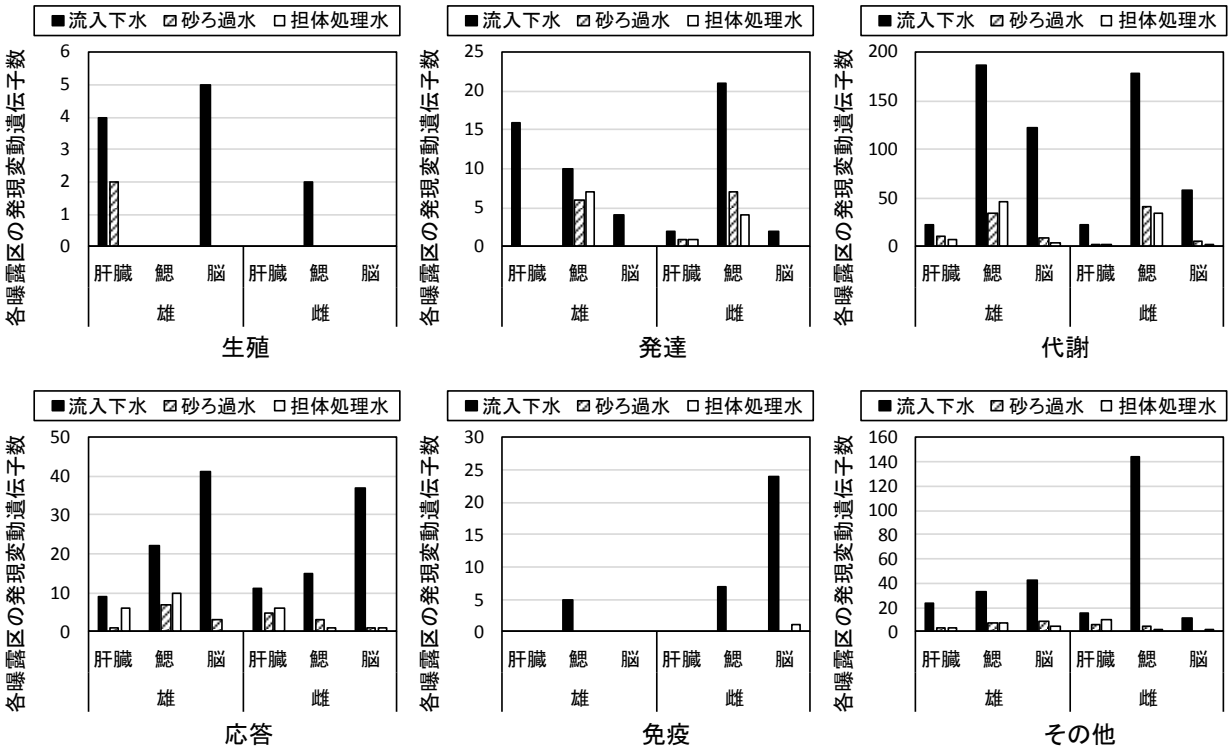


図-18 生殖、発達、代謝、応答、免疫、その他の 6 つの機能分類についての
各曝露区の発現変動遺伝子数の、性別および臓器間比較

の、NPEC、OPEC、NPEO、OPEO、そして直鎖アルキルベンゼンスルホン酸（LAS）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た。各物質の検出下限値は、アジスロマイシン（AZM）（2.2ng/L）、ベザフィブラート（BF）（4.1ng/L）、カフェイン（CF）（12.4ng/L）、クラリスロマイシン（CAM）（8.1ng/L）、クロタミトン（CT）（0.3ng/L）、イブプロフェン（0.9ng/L）、ケトプロフェン（KP）（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（SMZ）（5.8ng/L）であった。また、トリクロサン（TC）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。

LAS の検出下限値は、ろ液試料では流入下水 0.19～0.40μg/L、放流水 0.001～0.002μg/L、汚泥 0.004～0.008μg/L であった。SS 試料では流入下水 0.38～0.80μg/g-dry、放流水 1.9～4.0μg/g-dry、汚泥 0.038～0.080μg/g-dry であった。また、流入下水と返送汚泥を用いて行った添加回収試験の結果、流入下水のろ液では 81.6～91.2%、SS では 85.6～105%、返送汚泥のろ液では 73.6～82.3%、SS では 88.7～100%であった。

８．２　活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類(10 物質)の挙動把握に関する調査を行い以下の結果を得た。

・10 物質中、溶存態、懸濁態から検出された 7 物質の挙動把握ができた。活性汚泥処理による各医薬品の除去率は BF、CF、KP、SMZ、TC が 70%以上、CAM が約 13%であった。CT は二次処理水中の値が流入下水濃度より高い値を示した。また、90%以上の高い除去率を示した BF、CF はその主要な除去機構が生分解であり、TC は生分解が約 80%、汚泥引抜きによる除去が約 15%であることがわかった。

・汚泥引抜きによる除去機構について固-液分配係数（$LogK_d$）との関係を調べたところ $LogK_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向がみられた。

８．３　直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の下水処理における除去特性

実下水を流入水とした活性汚泥処理実験を行い、活性汚泥処理プロセスにおけるLASの挙動・除去特性について以下の結果を得た。

・流入水と初沈流出水のLAS濃度はそれぞれ2,100μg/L、2,040μg/L とほぼ同じ値であり、最初沈殿池におけるLASの除去はみられないが、エアレーションタンク内で大きく減少（AT1：710μg/L、AT2：230μg/L、AT3：110μg/L、AT4：130μg/L）し、二次処理水、放流水では1μg/L以下であった。

・LASの流入負荷量に対する排出負荷量（放流水、生汚泥、余剰汚泥）の合計は2.6%であった。残りの97.4%は活性汚泥処理により分解・除去されたものと考えられた。

８．４　活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける医薬品類の除去特性

下水処理水に残存し水生生物への影響が懸念される医薬品類4物質について活性汚泥処理法プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける除去特性の調査を行い以下の結果を得た。

・CAM、AZMは、活性汚泥処理による除去率は12%、13%であるが、微生物担体処理では84%、91%であり、全体除去率は86%、93%であった。また、KP、TCの活性汚泥処理による除去率は、75%、80%であるが担体処理により更に90%、88%除去が可能であり、全体除去率は97%、98%であった。

・担体処理における医薬品類の除去率は、活性汚泥処理の除去率に比べ大きな値を示したことから、微生物担体を用いる高度処理が二次処理水に残存する医薬品類の除去に有効であることがわかった。

８．５　下水処理過程における総毒性の除去特性評価

メダカ成魚の下水処理工程水への曝露実験と次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、下水が生物に及ぼす遺伝子レベルの影響と、下水処理プロセスでの低減効果について検討した。得られた知見を以下に記す。

・下水処理工程水曝露区で発現量が変動した遺伝子の個数は、肝臓、鰓、脳では流入下水曝露区で高く、砂ろ過水や担体処理水への曝露では発現変動遺伝子数が低下した。特に、鰓の発現変動遺伝子数は、活性汚泥処理で大きく低下することがわかった。

・流入下水が肝臓の遺伝子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝関連の機能が多かった。また、雄では生殖関連への影響がみられた。

・流入下水が鰓の遺伝子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝関連の機能が多かった。また、雌では細胞の増殖に関連した機能への影響がみられた。

・流入下水が脳の遺伝子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝に関連の機能に影響がみられた。また、雄の脳では酸化ストレス、雌の脳では免疫関連の機能への影響がみられた。

・機能遺伝子の発現変動遺伝子数の比較から、肝臓と鰓では活性汚泥処理や担体処理によって、流入下水でみられた生物影響が概ね低減したが、担体処理の後でも、発達、代謝、応答への影響は残存する場合があった。脳では、流入下水でみられた生物影響は活性汚泥処理によって低減した。

参考文献

1) 小森他、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、2009
2) 成宮他、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、2009
3) 小森他、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、2010
4) 福永他、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、2006
5) 南山他、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、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、2011
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-、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, BEHAVIOUR OF ALKYLPHENOL POLYETHOXYLATE SURFACTANTS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT-I, WATER RESEARCH、Vol.28、 No.5、pp.1131-1142、1994
10) 小西他、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、2006
11) 宝輪他、 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、2007

12）環境省要調査項目等調査マニュアル，平成 22 年 10 月，環境省水･大気環境局水環境課
13）堀井他 、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、2004
14）小西他、飲料水中ノニルフェノールの分析法の検討、 東京都健康安全研究センター研究年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst.P.H.、 57、 pp.319-323、2006
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）吉田他、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、2004
18）Haude, F. et al.，Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenol carboxylic acids in surface water、J. Chromatogr. A、961、pp.245-256，2002
19）川中他、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、2000
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)=ノエ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
22) 佐来他，直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)の LC/MS 分析と環境濃度について、三重保険環境研究所年報第 6 号(通巻第 49 号)，65-70、2004
23) M.T. Garcia, E. Campos, J. Sanchez-Leal, I. Ribosa, Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the anaerobic digestion of sewage sludge, Water Research, 40, pp.2958-2964 、2006
24) 下水試験方法-2012 年版、日本下水道協会、2012
25) A. Harada et al., Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river water, Water Science & Technology, Vol.58, No.8, pp.1541-1546, 2008
26) セルイノベーション（国立遺伝学研究所データ解析拠点），最終利用日:2015/10/7
https://cell-innovation.nig.ac.jp/members/index.html
27) Matthew J. Brooks, Harsha K. Rajasimha, Jerome E. Roger, and Anand Swaroop; Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and Nrl$^{-/-}$ retinal transcriptomes, Mol Vis. 2011; 17: 3034–3054.
28) Refseq データベースおよびBlastn 検索プログラム（National Center for Biotechnology Information, NCBI），最終利用日:2015/7/9
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
29) Uniprot-GOA, 利用日:2015/7/9
http://www.ebi.ac.uk/GOA

生物応答手法を用いた下水処理水の評価の高度化に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）
研究期間：平 26～平 30
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一、
真野浩行、武田文彦

【要旨】
本調査では異なる季節に下水に対する生物影響評価を行うことにより、下水処理による生物影響削減効果の季節変化について評価を行った。2015 年 1 月、4 月、7 月、10 月に嫌気好気活性汚泥処理を行う A 処理場で得た流入下水、下水処理水に対して藻類ムレミカヅキモを用いた生物応答試験を実施した。流入下水ではどの時期の試料でもムレミカヅキモの生長速度が対照区よりも有意に低下し、生物影響が確認された。下水処理水では 1 月試料のみ生長速度への影響が確認されたが、それ以外の時期では影響がなかった。1 月の下水処理水で生物影響が見られたのは、水温低下に伴う活性汚泥処理の生物影響化学物質除去能力の低下が原因であると推定された。
キーワード：全排水毒性（WET）試験、下水処理、生物影響、ムレミカヅキモ

１．　はじめに

下水処理水中には流域で使用され、排出された化学物質が含まれると考えられるが、そのような微量化学物質による水生生物への影響が懸念されている。近年、生物学的な応答から水質を評価する生物応答試験が世界的に注目されており、日本でも環境省が生物応答を用いた排水管理の導入を検討している。試験方法として、生物応答を用いた排水試験法（検討案）[1]が 2013 年に提案・公表されており、事業場排水の水生生物影響に関する知見[2)-4)]は増えつつあるものの、下水処理水を対象とした知見[5),6)]は少なく、知見の充実が求められている。

米国の資料[7)]では、下水処理過程において生物処理が排水の生物影響の削減に重要な役割を担っていることが示されている。冬季など水温が低下する時期には排水中の有機物等に対する除去能が低下する傾向にあるため、生物影響の削減能力も同様に低下する可能性がある。しかし我が国の既往研究において各季節における下水処理による生物影響削減効果の変化を評価した研究例は見られない。

そこで本研究では各季節における下水処理による生物影響削減効果を評価することを目的とした。実下水処理場で得られた試料を対象とし、藻類を用いた生物応答試験により生物影響を評価した。また、毒性同定評価によって下水中の生物影響物質に関する知見の収集を行った。

２．　実験材料および実験方法

２．１　下水試料の採水

合流式の単独公共下水道であり、嫌気好気活性汚泥処理を行っている A 下水処理場で、2015 年 1 月、4 月、7 月、10 月に採水した。A 処理場には生活排水のみならず産業排水も流入している。PRTR けんさくん[8)]の公開情報によると平成 25 年度に事業場から届出された PRTR 第一種対象物質の A 処理場に対する流入化学物質種数は約 30 種であり、主に界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物の流入が多いと推定された。

採水は最初沈殿池の流入口付近および最終沈殿池の流出口付近で実施し、それぞれ流入下水、下水処理水とした。A 処理場では施設の構造上、塩素消毒後の放流水が得られなかったため、塩素消毒前の下水処理水を採水した。採水はオートサンプラーを用いて行い、採水期間は 24 時間とし、1 時間ごとに 1 リットルずつ、合計 24 リットル採水した。これらの排水は採水後すぐに土木研究所に持ち帰り、それぞれの 24 リットルの排水をコンポジットした。コンポジットした流入下水、下水処理水に対し水質分析を行い、**表-1** に示す結果が得られた。また、流入下水と下水処理水は 60μm ポアサイズのメッシュでろ過を行い、ろ液を 4℃の冷暗所で保管した。これらのろ液は下水試料として以下に示す生物応答試験に用いた。

表-1　採水後にコンポジットした流入下水、下水処理水の水質

項目	単位	流入下水				下水処理水			
		1月	4月	7月	10月	1月	4月	7月	10月
水温*	℃	7.2	6.8	11.9	15.2	8.4	5.9	11.5	14.0
pH		6.77	6.73	6.65	6.77	6.73	6.98	6.62	6.89
電気伝導度	mS/cm	1.39	1.32	1.33	1.47	1.31	1.18	1.10	1.43
溶存酸素濃度	mg/L	0.002	1.15	0.00	0.00	10.3	8.67	8.11	9.00
塩分濃度	%	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
水の硬度	mg/L	155	140	145	150	160	150	145	150
全窒素	mg/L	23.7	22.4	18.3	21.2	11.7	11.7	10.6	11.6
全リン	mg/L	2.61	3.26	4.32	1.87	0.442	0.468	0.592	0.132
NH_4-N	mg/L	13.6	13.2	11.6	13.8	1.03	9.17	0.257	2.20
NO_x	mg/L	0.131	0.083	8.73	0.111	7.91	1.06	0.040	7.93
PO_4-P	mg/L	0.48	1.00	6.12	0.618	0.056	0.153	0.96	0.063
全有機炭素濃度	mg/L	25.5	22.8	16.3	19.0	13.7	13.1	8.69	9.30

*コンポジット時の水温　　NH_4-N：アンモニア性窒素濃度　　NOx：硝酸性窒素濃度と亜硝酸性窒素濃度の総和

PO_4-P：リン酸態リン濃度

２．２　藻類生長阻害試験

２．２．１　排水試験

本試験は藻類を下水試料に一定期間曝露し、対数増殖期における生長速度を調べ、対照区と比較することにより、藻類の生長に対する下水試料の影響を明らかにする。

試験生物には、生物応答を用いた排水試験法（検討案）[1)]の推奨種となっている単細胞緑藻ムレミカヅキモ（*Pseudokirchneriella subcapitata*、NIES-35 株）を用いた。各試料に対して蒸留水による希釈で 5 段階の割合（試料割合 80%、40%、20%、10%、5%）の試料を作製し、各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加した。対照区は AAP 培地とした。これらの試料は細胞濃度の測定に支障がないよう、0.22μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行った。容量は 30mL/容器とし、生物応答を用いた排水試験法（検討案）[1)]に基づき対照区は 6 連、各下水試料は 3 連とした。培養条件は初期細胞濃度 1.0×10^4 cells/mL、温度 24°C、光強度 3000 Lux 連続照射、回転振とう速度 100 rpm とした。開始から 72 時間後に粒子計数分析装置（CDA-1000B、100μm アパチャー、Sysmex 社）を用いて対照区と各下水試料での細胞濃度を求め、その結果に基づき各試験水での生長速度を算出した。下水試料による生長阻害率は、以下の式(1)により算出した。

生長阻害率（%）＝（対照区の生長速度 － 下水試料での生長速度）÷ 対照区の生長速度×100　・・・(1)

２．２．２　毒性同定評価

２．２．１の試験で影響が見られた流入下水と下水処理水に対し、米国環境保護庁（U.S.EPA）が公布する慢性毒性同定評価 [7),9)]を参考に毒性同定評価 TIE（Toxicity Identification Evaluation）を行った。**表-2** に、各前処理と生物影響に寄与する化学物質（群）との関係を示す。流入下水あるいは下水処理水 80%に対し、無処理、チオ硫酸ナトリウム添加（5mg/L）、EDTA[エチレンジアミン四酢酸]添加（0.5mg/L、EDTA 二水素二ナトリウムを使用）、ばっ気（下水試料 100% 1L/1L air、1 時間、ばっ気後に 20%に希釈）、pH 調整（pH 約 6.5 に調整）の前処理を行った。また、SPE [Solid Phase Extraction、固層抽出] カラム（Sep-Pak C18, Waters 社）を用い、試料を 1.0μm ポアサイズフィルターでろ過後に SPE カラムに通水したもの（SPE カラム通過水）、及び SPE カラムに吸着した物質をメタノールで溶出し蒸留水に添加したもの（メタノール溶出物）も前処理水として同様に試験した。各試料に AAP 培地作製時と同等の栄養塩を添加し、0.22μm ポアサイズのフィルターでろ過滅菌を行ったものを藻類試験に供した。対照区は AAP 培地とし、試験条件は２．２．１と同一とした。

２．３　統計解析方法

排水試験では、生長速度について、Bartlett 検定（有意水準 $\alpha = 0.05$）により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定による多重比較（

表-2　前処理によって生物影響が変化する化学物質のまとめ。本表は米国環境保護庁（U.S.EPA）の資料[7,9]の記述をもとに作成

	pH調整	ろ過	ばっ気	SPE	チオ硫酸ナトリウム	EDTA	物性
酸化物（塩素を含む）			○		○		4℃保存で時間とともに生物影響消失
アンモニア	○[1]						
無極性有機物				○			SPEカラムのメタノール溶出物に生物影響あり
界面活性剤		○	○	○			4℃保存で時間とともに生物影響消失
陽イオン金属		○[2]		○	○	○	
全溶解固形分（TDS）	△			△	△	△	

○：生物影響が低下　　○[1]：pHが低いほど生物影響小

○[2]：pH調整とろ過を組み合わせると生物影響低下　　△：生物影響が低下しない

SPE：固相抽出（Solid Phase Extraction）　　EDTA：エチレンジアミン四酢酸

有意水準 α = 0.05）で対照区と下水試料との比較を実施した。等分散が棄却された場合は Steel 検定（有意水準 α = 0.05）で対照系と下水試料との生長速度の比較を実施した。これらの解析には統計解析ソフト R[10]を用いた。排水試験では、対照系と比較して統計学的に有意な低下が認められない最も高い試料割合を、無影響濃度 NOEC（No Observed Effect Concentration）として求めた。全ての下水試料割合で対照区と生長速度に有意差が認められない場合、最も高い試料割合を NOEC とした。

毒性同定評価では、各試料での生長速度について Bartlett 検定（有意水準 α = 0.05）により等分散性を評価した。等分散が確認された場合、Dunnett 検定による多重比較（有意水準 α = 0.05）で対照区と比較した。等分散が棄却された場合は Steel 検定（有意水準 α = 0.05）で対照区と比較した。無処理区と比較して統計学的に生長速度の有意な増加が認められた場合、前処理による生物影響の改善が見られたと評価した。メタノール溶出物については対照区と同様に AAP 培地にメタノール溶出物を添加して試験しているため、対照区との比較を行い、生長速度の有意な低下が見られた場合はメタノール溶出物による影響があったと評価した。

３．　実験結果

３．１　排水試験

図-1 に各下水試料割合における藻類の生長速度をまとめた。以下、各下水試料の結果の詳細について示す。

３．１．１　1 月試料に対する試験

流入下水は、割合が 40%以上で対照区よりも生長速度が有意に低下した（$p<0.05$、**図-1(a)**）。下水処理水では割合が 80%の場合に生長速度が有意に低下した（$p<0.05$）。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水で 40%と求められた。

３．１．２　4 月試料に対する試験

流入下水は、割合が 80%の場合に対照区よりも生長速度が有意に低下した（$p<0.05$、**図-1(b)**）。下水処理水では最大の試料割合である 80%でも生長速度の低下がみられず（$p>0.05$）、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 40%、下水処理水では 80%以上と求められた。

３．１．３　7 月試料に対する試験

流入下水は、割合が 40%以上の場合に対照区よりも生長速度が有意に低下した（$p<0.05$、**図-1(c)**）。下水処理水では最大の試料割合である 80%でも生長速度が低下せず（$p>0.05$）、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水では 80%以上と求められた。

３．１．４　10 月試料に対する試験

流入下水は、割合が 40%以上の場合に対照区よりも生長速度が有意に低下した（$p<0.05$、**図-1(d)**）。下水処理水では最大の試料割合である 80%でも生長速度が低下せず（$p>0.05$）、藻類の生長速度への影響はなかった。よって NOEC は流入下水で 20%、下水処理水で

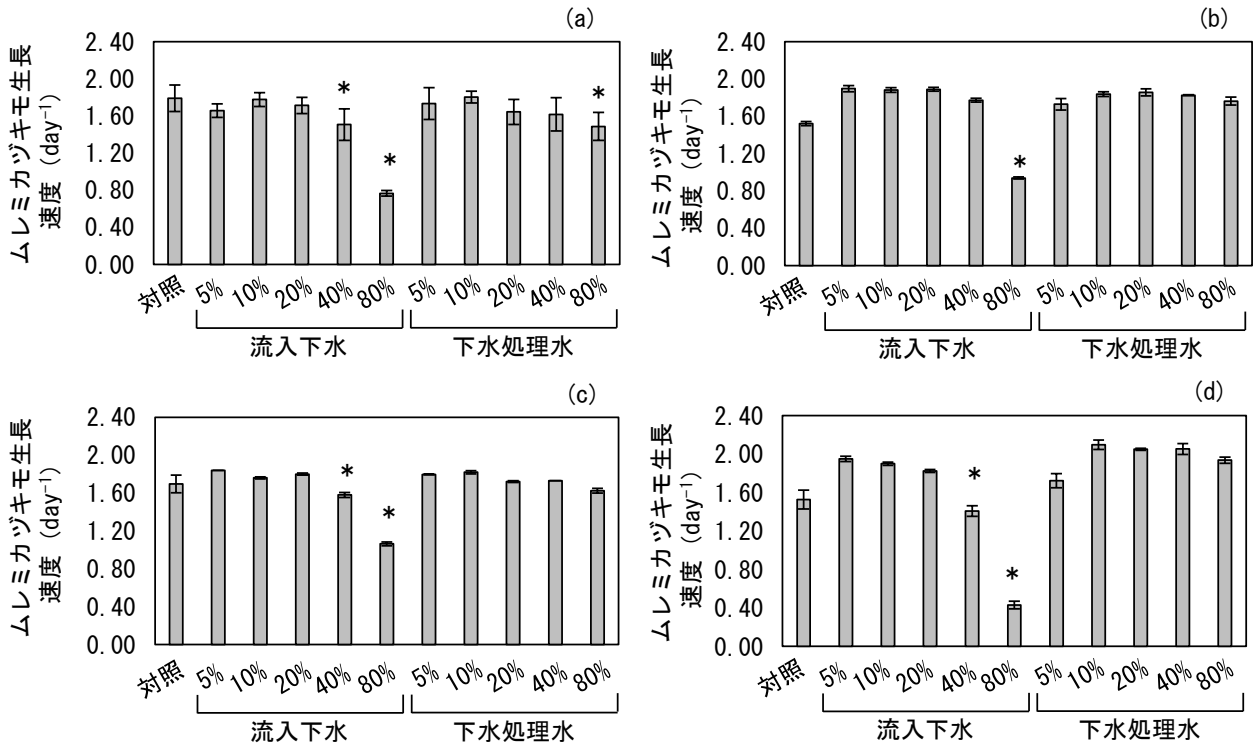


図-1　流入下水，下水処理水に曝露した緑藻ムレミカヅキモの生長速度。(a)2015 年 1 月試料、(b)2015 年 4 月試料、(c)2015 年 7 月試料、(d)2015 年 10 月試料。棒グラフは平均値、エラーバーは標準偏差を示す。＊：対照区よりも有意に低下（$p<0.05$）

は 80%以上と求められた。

３．２　毒性同定評価

図-2 に各前処理試料における藻類の生長速度をまとめた。以下、各前処理試料の結果の詳細について示す。

３．２．１　１月流入下水、下水処理水に対する試験

流入下水（試料割合 80%）に対する TIE の結果を**図-2(a)**に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは SPE カラム通過水であった（$p<0.05$）。また、メタノール溶出物では対照区より生長速度が有意に低下し（$p<0.05$）、影響が見られた。**表-2** よりメタノール溶出物は無極性有機物である。よって流入下水中の主な影響物質は無極性有機物であると推定された。

下水処理水（試料割合 80%）に対する TIE の結果を**図-2(b)**に示す。対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった（$p>0.05$）。無処理に比べて生長速度が有意に増加した前処理区はなかった。下水処理水に対する TIE は排水試験より 8 日後に実施したが、**図-1(a)**の下水処理水 80%と**図-2(b)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 16.9%、4.7%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4℃暗所で保管したことにより生物影響は低下したと判断した。

表-2 より 4℃保存で生物影響が低下する物質は酸化物あるいは界面活性剤である。よって下水処理水中の主な影響物質は酸化物あるいは界面活性剤であると推定された。

３．２．２　４月流入下水に対する試験

流入下水（試料割合 80%）に対する TIE の結果を**図-2(c)**に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加したのは pH 調整であった（$p<0.05$）。また、対照区とメタノール溶出物では有意差がなかった（$p>0.05$）。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、**図-1(b)**の流入下水 80%と**図-2(c)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 38.3%、27.1%であった。生長阻害率は TIE 試験時の方で小さくなったことから、4℃暗所で保管したことにより生物影響は低下したと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が低下する物質はアンモニアであり、4℃保存で生物影響が低下する物質は酸化物あるいは界面活性剤である。よって流入下水中の主な影響物質はアンモニア、および酸化物あるいは界面活性剤であると推定された。

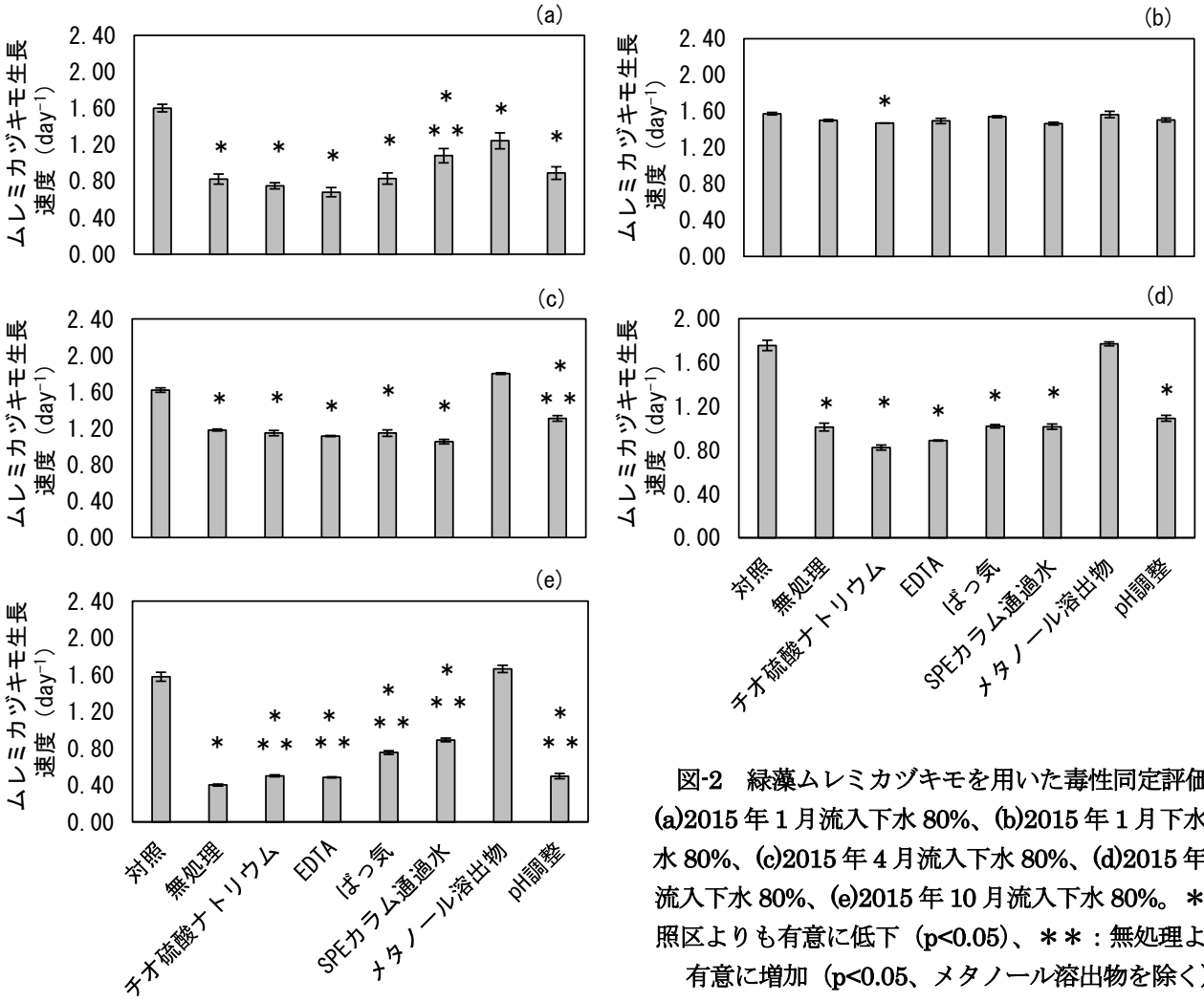


図-2　緑藻ムレミカヅキモを用いた毒性同定評価。(a)2015 年 1 月流入下水 80%、(b)2015 年 1 月下水処理水 80%、(c)2015 年 4 月流入下水 80%、(d)2015 年 7 月流入下水 80%、(e)2015 年 10 月流入下水 80%。＊：対照区よりも有意に低下（p<0.05）、＊＊：無処理よりも有意に増加（p<0.05、メタノール溶出物を除く）

３．２．３　7 月流入下水に対する試験

流入下水（試料割合 80%）に対する TIE の結果を**図-2(d)**に示す。無処理に比べ、生長速度が有意に増加（p<0.05）したのは pH 調整であった。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり（p>0.05）、影響が無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 3 週間後に実施したが、**図-1(c)**の流入下水 80%と**図-2(d)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 37.3%、42.5%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

表-2 より pH 調整で生物影響が低下する物質はアンモニアである。ただし、本試験において pH 調整による生長速度の改善はわずかであることから、流入下水中の主な影響物質はアンモニアのみならずそれ以外の化学物質も複合的に作用していることも推定された。

３．２．４　10 月流入下水に対する試験

流入下水（試料割合 80%）に対する TIE の結果を**図-2(e)**に示す。無処理に比べ、全ての前処理区で生長速度が有意に増加した（p<0.05）。一方、メタノール溶出物では生長速度が対照区と同等となり（p>0.05）、影響が無かった。流入下水に対する TIE は排水試験より 13 日後に実施したが、**図-1(d)**の流入下水 80%と**図-2(e)**の無処理における生長阻害率はそれぞれ 71.8%、74.6%であった。生長阻害率がほぼ同等であったことから、4℃暗所で保管しても生物影響は低下しなかったと判断した。

メタノール溶出物を除く全ての前処理で生物影響が低下したことから、**表-2** より流入下水中の主な影響物質は酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属などが推定された。

４．　考察

表-3 に各試験生物に対する流入下水、下水処理水の NOEC、TIE により推定された生物影響化学物質をまとめた。表中の推定影響物質について、生物影響が見られず TIE を実施する必要がなかった下水試料については「なし」とした。

NOEC をみると、いずれの採取時期においても流入下水より下水処理水の NOEC の値が大きい、あるいは試験における最高の試料割合でも影響がないことから、A 処理場での下水処理によって生物影響が削減されたことが示された。**表-3** に示したように流入下水の生物影響化学物質として種々の生物影響化学物質が推定されたが、下水処理水では生物影響が低減あるいは消失したことから、A 処理場での下水処理によってこれらの化学物質による生物影響が削減されたと考えられた。PRTR けんさくん[8]の公開情報によると A 処理場には界面活性剤、疎水性化学物質、金属類、酸化物等が流入することが示されており、TIE で示された生物影響物質との関連性があると分かった。このような公開情報は下水試料中の生物影響物質の推定や同定を行う上で参考になることが示唆された。本研究で実施した PRTR 情報の活用、生物応答試験、毒性同定評価の一連の調査研究手法は，下水道における新しい排水管理手法になり得ると考えられた。

下水処理水においては 1 月試料のみ生物影響が確認された。2015 年 1 月、4 月、7 月、10 月での A 処理場の下水処理水の月間平均水温は約 18℃、約 19℃、約 28℃、約 27℃であり、1 月に最も水温が低かった。1 月の下水処理水のみムレミカヅキモに対する生物影響が見られたのは水温低下によって生物活性が他の時期よりも相対的に低下し、そのことが生物影響化学物質の除去能低下を引き起こし、その結果として下水処理水中に一部の生物影響化学物質が残存したと推定された。また、本調査では A 処理場のほか標準活性汚泥処理で処理する 2 箇所の処理場でも流入下水と放流水を採水し、同様の試験を行ったところ、2 処理場ともに A 処理場と同様に冬季の水温低下期のみ放流水はムレミカヅキモに対する生物影響が見られた。水温低下による生物影響削減効果の低下は活性汚泥処理で生じやすいことが示唆されるとともに、他の処理方式でも同様の現象が起こるか否か、またそのメカニズムについて今後も情報収集に努める必要があると考えられた。

表-3　緑藻ムレミカヅキモに対する流入下水、下水処理水の NOEC と毒性同定評価により推定された生物影響物質のまとめ。NOEC：無影響濃度（No Observed Effective Concentration）

	下水試料	NOEC（%）	推定された生物影響物質
1月	流入下水	20	無極性有機物
	下水処理水	40	酸化物あるいは界面活性剤
4月	流入下水	40	・酸化物あるいは界面活性剤 ・アンモニア
	下水処理水	≧80	なし
7月	流入下水	20	・アンモニア ・それ以外にも複数の物質が影響？
	下水処理水	≧80	なし
10月	流入下水	20	酸化物、アンモニア、界面活性剤、陽イオン金属など
	下水処理水	≧80	なし

５．　まとめ

本調査では下水処理による生物影響削減能の季節変化を評価するため、嫌気好気活性処理を行う A 処理場において流入下水と下水処理水を採水し藻類生長阻害試験を実施した。結果として、流入下水では計 4 回のいずれの時期においても供試藻類に対する生物影響が見られた。下水処理水では春（4 月）、夏（7 月）、秋（10 月）に得たものは生物影響がなかったものの、冬（1 月）に得たもののみ影響が確認された。その原因として、冬季には下水の水温低下に伴う生物活性の低下に起因して生物影響物質が除去しきれずに残存してしまうことが推定された。

参考文献

1) 国立環境研究所・環境省：生物応答を用いた排水試験法（検討案）、排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会、2013

2) Kusui, T., Takata, Y., Itatsu, Y., and Zha, J.：Whole effluent toxicity assessment of industrial effluents in Toyama Prefecture with a battery of short-term chronic bioassays. *J. Wat. Environ. Technol.*, 12, 55-63, 2014

3) 富川恵子、入江俊行、内田弘美、渡部春奈、鑪迫典

久：WET 法を活用した工場排水管理：化学工業における排水改善の取り組み、環境化学、25(1)、27-33、2015
4) 藤原尚美、野中信一、豊久志朗、鑪迫典久：金属製品製造工場のWETを用いた排水中毒性要因の推定とその改善例、環境化学、25(1)、35-42、2015
5) 山本裕史、安部香緒里、池幡佳織、安田侑右、田村生弥、中村友紀、鑪迫典久：徳島県内の下水処理施設放流水を対象にしたWET試験、環境工学研究論文集、47、727-734、2010
6) 山本裕史、矢野陽子、森田隼平、西家早紀、安田侑右、田村生弥、鑪迫典久：下水処理施設放流水中の残留塩素に着目した毒性同定評価、土木学会論文集 G（環境）、69(7)、III_375-III_384、2013
7) U.S.EPA, Toxicity Reduction Evaluation Guidance for Municipal Wastewater Treatment Plants, EPA/833B-99/002, 1999
8) 経済産業省ホームページ http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/6a.html、平成 27 年 5 月アクセス
9) U.S.EPA, Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I, EPA/600/6-91/005F, 1992
10) R Core Team：R: Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. http://www.r-project.org/, accessed on May 2015

地球温暖化が水環境に与える影響評価と適応策に関する研究

研究予算：運営交付金（一般勘定）
研究期間：平 26～27
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：岡本誠一郎、對馬育夫、金子陽輔

【要旨】
地球温暖化が水環境に与える影響は徐々に顕在化しており、大幅な温室効果ガス排出削減を直ちに行っても、今後少なくとも 20 年間は地球温暖化を伴う気候変動が進行すると予想されている。そのため、温暖化影響の緩和策とともに適応策の検討が重要であり、精度の高い影響予測に基づく適応策の評価と、その実施に向けた取り組みが必要となっている。本研究では、気候変動が水環境に与える影響を検討するための諸条件について検討するとともに、霞ヶ浦湖水を用いた微生物解析を行った。その結果、流入水質データは回帰式やL-Q式を用いて流入水質濃度の境界条件を作成するか、流域水循環モデルを利用した流入水質の予測や土砂生産モデル等を利用した方法が考えられた。また、次世代シーケンサーを用いた藻類モニタリング手法の開発では、プライマーの設計と DNA 抽出効率が今後の開発の課題であった。
キーワード：地球温暖化、湖沼・貯水池、水質モデル、藻類モニタリング、文献調査

1. はじめに

地球温暖化が水環境に与える影響は徐々に顕在化しており、大幅な温室効果ガス排出削減を直ちに行っても、今後少なくとも 20 年間は地球温暖化を伴う気候変動が進行すると予想されている [1]。そのため、温暖化影響の緩和策とともに適応策の検討が重要であり、精度の高い影響予測に基づく適応策の評価と、その実施に向けた取組が必要となっている。平成 27 年 11 月、「気候変動の影響への適応計画 [2]」が閣議決定され、これに伴い、国土交通省が「国土交通省気候変動適応計画 [3]」を公表し、実施予定の適応策について整理した。気候変動による地球温暖化が生じる場合、気温上昇に伴う表層水温の上昇、湖沼の温度分布の変化、生物反応や物理化学反応速度の変化、降雨量や降雨パターンの変化に伴う湖沼流入負荷量や水量の変化が予想されるが、気候変動に伴う湖沼の水質変化を定量的に示した研究は少ない。

これまで水質チームでは、本課題の先行研究にあたる『地球環境の変化が河川湖沼水質に及ぼす影響に関する調査(H21～H25)』の中で、地球温暖化に伴う水温の上昇が湖沼における NO_3^-の上昇、藻類種の変化(珪藻→藍藻)を引き起こす可能性を、1Box モデルを作成することにより導き出した。しかしながら、土地利用や降雨パターンの変化を検討するには、より詳細な検討ができる水質モデルを利用し検討する必要がある。本研究では、水環境における地球温暖化の影響予測の精度向上を目指し、流域における適応策とその効果、優先度を評価することを目的とし、地球温暖化が湖沼や貯水池等の水環境に与える影響とその適応策について検討する。H27 はダム貯水池を対象とした既往の水質モデル(WEC モデル、ELCOM- CAEDYM、CE-QUAL-W2)について特徴を整理し、それぞれのモデルが、「洪水規模・頻度の増加による濁水長期化」、「流入負荷の増加による富栄養化」について、出水時の流量増加と、その際に起こる水質の変化に大きく影響されることを確認した。

また、気候変動に伴い、藻類の異常増殖の発生頻度の増加が懸念されている。湖沼水質を把握する上で、藻類等の植物プランクトンを定性・定量することは非常に重要である。藻類の中にはカビ臭物質や毒性物質を生産するものもあり、水の安全性確保の観点からもダム貯水池における藻類のモニタリングは非常に重要であるが、検鏡による同定は困難で対応できる技術者も限られている。厳しい財政状況や省力化の観点からも、効率的なモニタリング手法の構築が急務となっており、DNA 塩基配列に基づく解析手法の確立が将来のダム貯水池の管理に有効であると考えられる。

今年度は、気候変動が水環境に与える影響を計算するにあたり検討が必要不可欠となるモデルや対象、境界条件、流入水質データの与え方について検討した。また、霞ヶ浦湖水を用い、光学顕微鏡を用いた藍藻類(Cyanobacteria 門)の形態による同定法と次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子配列に基づく微生物分類を行い、比較した。

2. モデルの検討

2.1 対象とするフィールドごとの文献調査

気候変動に関する湖沼・貯水池での既往研究を、仮想の貯水池、複数の実貯水池、1 つの実貯水池を対象としていた研究について、分類し整理した。

2.1.1 仮想貯水池を用いた研究

志田ら[4]は、鉛直 2 次元の数値計算モデル MEC モデルを用いて、地球温暖化による仮想の閉鎖性水域における水温を、全球を対象に、近未来 5 年分および将来予測(2046-2050 年)を行った。その結果、密度勾配が大きい値となる地域が拡大し、乾燥帯地域においては広範囲で深刻な水不足が示唆された。また、気候変動による閉鎖性水域水温へ影響が最も大きい地域は北欧、モスクワ付近、カスピ海周辺、北アメリカ大陸北東部で、密度勾配値の上昇が見込まれた。

佐藤ら[5]は、仮想的な湖における内部のみを考慮した鉛直一次元モデルを用いて、温暖化の影響を受けやすい因子について検討した。彼らは、GCM モデル等の出力値を用いず、シナリオの形で、気温は 1－3℃の上昇、流量は 2 割前後の増減を与えた。その結果、温度上昇による影響では、湖内の DO 濃度が減少し、T-COD 濃度が増加することが推定された。また、流入水中の窒素、リン濃度が一定で、流量のみが増加した場合は、湖の各水質はほとんど変化しないが、流入水の各濃度が変動する場合は、湖沼の各水質は大きく変動することを示した。

2.1.2 複数の実貯水池を用いた研究

梅田ら[6]は、国内 37 箇所のダム貯水池を対象とし、鉛直 1 次元モデルを用いた、現況、今世紀半ば、今世紀末を想定した 20 年 3 期間の水質変化を検討した。その結果、全国的に、将来の年平均表層 Chl-a 濃度が増加する可能性が示され、特に東日本で富栄養湖が増加する傾向が示された。

また、国総研[7]は、耶馬渓ダム、釜房ダム、寒河江ダム、早明浦ダムについて、水利用モデル、流出解析モデルと水質モデルを構築し、これらのモデルに、気候変動の予測データを入力することにより、ダム貯水池における気候変動の影響をまとめた。その結果、どの気候変動シナリオでも、水温が上昇するも、下流への温水放流に関してはダム貯水池ごとに傾向が異なっていた。また、藻類の増殖は、増殖期間が早期化、長期化するも、検討した 4 ダム貯水池において、顕著に増加する傾向にはならなかった。

2.1.3 単一実貯水池を対象に詳細な検討をした研究

崔ら[8]は、3 次元モデル(ELCOM-CAEDYM)を用いて、浦山ダムにおける現況と将来の 9 ヶ年 2 期間の計算を実施して、地球温暖化によるダム貯水池の水質変化について詳細に検討した。地球温暖化による与条件としては、気象(気温、湿度、日射量、雲量、風速、降水量)と流入量を考慮し、これに応じた流入条件も既存の回帰式や L-Q 式を基に変化させた。その結果、貯水池の変化としては、水温が上昇、成層が強固になる傾向と、出水頻度・規模の増加による濁水長期化、Chl-a が低下する可能性を予測した。

谷ら[9]は、ボリビアのトゥニ貯水池を対象に、水温解析モデルを構築し、気候変動による水質影響を評価した。将来の気象条件には、GCM の出力結果を用いており、計算期間は現在(1994 -2003 年)と将来(2090-2099 年)の各 10 年間について計算した。その結果、温暖化により流域内の氷河が消失した後は、トゥニ貯水池への年間総流入量が減少する見込みとなった。また、水温解析モデルによる計算結果では、現在と将来のトゥニ貯水池内の水温を比較すると、将来条件の方が成層化は弱まる傾向が得られた。

2.2 対象フィールド別の検討項目の整理

気候変動に関する対象フィールドの抽出条件について整理した。

2.2.1 仮想貯水池を用いた研究

仮想貯水池における計算を行う場合、i) 貯水池条件、ii) 気候変動の影響として考慮する境界条件、iii) ダム運用、iv) モデルのパラメータ、v) 気候変動シナリオと時期、vi) 水質保全施設の有無等について検討する必要があると考えられる。仮想貯水池を用いる場合、モデルの検証計算は別の貯水池で複数行うことが望ましい。また i) 貯水池条件、iii) ダム運用、iv) モデルパラメータについても検討すべき項目となる。このことから、計算ケース数は数千～数万ケースまで広がる可能性があり、計算量が膨大となる。検討する水質項目を 1-2 項目に限定する、簡易なモデルを使用する等の手法を選択する必要がある。

2.2.2 複数の実貯水池を用いた研究

多数の貯水池を対象フィールドとして用いる場合には、i) 対象貯水池・貯水池数、ii) 気候変動の影響として考慮する境界条件、iii) 気候変動シナリオと時期、iv) 水質保全施設の有無等について検討する必要があると考えられる。モデルの検証計算は各貯水池で行えるが、モデルの検証期間は水質保全施設がない期間に設定することが望

ましい。また、モデルのパラメータについては各貯水池で調整するか、統一的に調整するかは議論の余地がある。計算ケース数は対象とする貯水池数に応じて大きく変わると考えられ、数十～数百ケースと考えられる。多数の実貯水池計算を行うことで、様々なダムの特徴を捉えた計算を実施できることから、対策の適用性について確度の比較的高い検討が可能と考えられる。しかし、計算量が膨大となることも想定される場合には、検討する水質項目を1、2項目に絞ることや、簡易なモデルを使用するなど対応を取らざるを得ない。

2.2.3 単一実貯水池を対象に詳細な検討をした研究

1つの貯水池を対象とした場合には、i) 対象貯水池・貯水池数、ii) 気候変動の影響として考慮する境界条件、iii) 気候変動シナリオと時期、iv) 水質保全施設の有無等について検討する必要があると考えられる。モデルパラメータは検証計算時にキャリブレーションしたものを使用できるため、計算ケース数は数十ケースに留まるものと考えられる。1 つの対象貯水池の計算では、気候変動に係る境界条件の設定を詳細に行うことや、検討項目を多くするなど、他の検討すべき要素に注力できると考えられる。しかし、対象貯水池の特性による影響が大きく含まれてしまう可能性があり、水質保全対策等の検討において他ダムでの適用性が不明であることが大きな課題である。

2.3 境界条件について

本研究において鉛直2次元モデルを使用する場合、境界条件を詳細に設定した気候変動に伴う水質予測計算を行うことが必要と考えられる。考慮する境界条件とその設定方法は水質モデルの使用や検討対象フィールドの現地状況によって変化する。ここでは、気象条件・流入条件等を詳細に設定する場合に、必要と考えられる境界条件の項目とその設定上の留意点について整理する。

2.3.1 気象データ

気候変動による閉鎖性水域の変化を捉える上で、水質モデルに必要な基本的な境界条件(気象項目)は、気温・気圧・湿度・風速・雲量・日射量等が考えられる。

気候変動の影響を把握するうえで、全球気候モデル(GCM)の出力値を使用する必要がある。ダウンスケーリング手法として、力学的ダウンスケーリングと統計的ダウンスケーリングがあるが、どちらもバイアス補正を行い現地条件に合った値を用いなければならない点で差はない。また前者を用いることで得られる気象項目もあるので、水質モデルに必要な気象項目についてそれぞれ手法を検討する必要がある。

2.3.2 流量データ

貯水池内の水質変動を詳細に把握するためには、流入量の時間データを用いた計算が必要と考えられる。流入量の時間データを得るには、気候モデルで出力しバイアス補正した降水量データ(時間データ)を用いて流出解析を行う必要がある。また融雪の多い地域では、積雪も考慮した流出計算モデルを適用する必要があると考えられる。

2.3.3 流入水質データ

気候変動として考慮する流入水質は、気温や流量変化に応じて変化する流入水温、流入 SS、その他流入水質(DO、COD、I-N、O-N、I-P、O-P 等)が考えられる。

既往の研究では、回帰式やL-Q式を用いて流入水質濃度の境界条件を作成している場合が多い。観測値を用いているため、気候変動により流域に大きな変化が生じない場合には利用できるものと考えられる。また、回帰式やL-Q式を使わない手法として、流域水循環モデルを利用した流入水質の予測や土砂生産モデル等を利用した流入 SS の予測がある。いずれも流域モデルの構築が必要であり、流域条件の設定等を検討する必要がある。

3. 藻類モニタリングについて

3.1 サンプル

本研究では、霞ヶ浦湖水(平成27年12月採取)を対象に、光学顕微鏡を用いた形態による同定法と次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子配列に基づく微生物分類を行い、それぞれの結果を比較した。

3.2. 分析方法

3.2.1 光学顕微鏡を用いた藻類同定

湖水 2L から、光学顕微鏡を用い、「平成28年度版河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】[10]」に基づき、藻類の同定・定量作業を行った。なお、糸状体、群体を形成する藻類については、糸状体数、群体数を合わせて計測した。

3.2.2 次世代シーケンサーを用いた解析

湖水 2L を 0.2 μm フィルターでろ過し、フィルター残留物を、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2(日鉄住金環境)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として真正細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を標的としたプライマー(S-D-Bact-0341-b-S-17およびS-D-Bact-0785-a-A-21)[11]にオーバーハングアダプター配列を付加したものを用い、PCR 増幅を行った。PCR 反応条件は初期変性を95℃で3

分行った後、95℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 30 秒のサイクルを 25 サイクル行った。PCR 増幅産物は AMPure XP kit(Beckman Coulter Genomics)を用いて精製した。DNA シーケンシングには Miseq reagent Kit v3(600 サイクル、Illumina)を用いて解析した。解析で得た各リードの塩基配列のキメラチェックは USEARCH[12]を用い、Operational Taxonomic Unit (OTU)-picking およびクラスター解析は QIIME[13]を用い、97%以上の相同性を持つ配列を OTU とした。各 OTU の同定には Greengenes データベース ver. 13_8 をリファレンスとした。

3.3 結果と考察

3.3.1 光学顕微鏡を用いた藻類同定

光学顕微鏡を用いた藻類同定結果、真正細菌 Cyanobacteria 門 Oscillatoriales 属(ユレモ属)に分類される *Oscillatoria planctonica* および Phormidium 属に分類される *Phormidium tenue* がそれぞれ 275 cells/mL、352 cells/mL 検出され、それ以外の藍藻綱は検出されなかった(**表 1**)。これらは、鞘の有無や鞘の形状、鞘内のトリコーム(細胞糸)の数、トリコームや細胞の形態によって細分されている[14]。また、*Phormidium tenue* は、カビ臭原因物質である 2-MIB を産生する種を含んでいることが広く知られている[15]。一方、真核生物であるクリプト藻綱、渦鞭毛藻綱、黄金色藻綱、珪藻綱、緑藻綱に含まれる種は、20 - 1,600 cells/mL 程度存在していた。

表 1 光学顕微鏡を用いた藻類同定定量結果

No.	綱	目	科	種名	霞ケ浦 2015年12月 (Cells/mL)
1	藍藻綱	ネンジュモ目	ユレモ科	*Oscillatoria planctonica*	275
2				*Phormidium tenue*	352
3	クリプト藻綱	クリプトモナス目	クリプトモナス科	*Cryptomonas* spp.	320
4	渦鞭毛藻綱	ペリディニウム目	ペリディニウム科	*Peridinium* spp.	50
5	黄金色藻綱	ヒカリモ目	クリソコッカス科	*Chrysococcus rufescens*	340
6	珪藻綱	中心目	タラシオシラ科	*Cyclostephanos dubius*	320
7				*Cyclotella atomus*	210
8				*Cyclotella meneghiniana*	360
9				*Cyclotella stelligera*	150
10				*Stephanodiscus minutulus*	230
11			メロシラ科	*Aulacosera ambigua*	1,310
12				*Aulacosera distans*	980
13				*Aulacosera granulata*	1,560
14				*Melosira varians*	30
15		羽状目	ディアトマ科	*Asterionella formosa*	40
16				*Fragilaria tenera*	275
17				*Fragilaria vaucheriae*	352
18				*Synedra acus*	320
19			ナヴィクラ科	*Navicula cryptocephala*	50
20				*Navicula gregaria*	340
21			ニッチア科	*Nitzschia acicularis*	320
22				*Nitzschia holsatica*	210
23				*Nitzschia palea*	360
24				*Nitzschia* spp.	150
25	緑藻綱	ボルボックス目	クラミドモナス科	*Chlamydomonas* spp.	230
26				*Chlorogonium elongatum*	1,310
27		クロロコックム目	クロロコックム科	*Schroederia setigera*	980
28				*Tetraedron caudatum*	1,560
29				*Tetraedron trigonum*	30
30			オオキスティス科	*Lagerheimia genevensis*	40
31				*Monoraphidium contortum*	20
32				*Monoraphidium minutum*	680
33				*Oocystis crassa*	320
34			セネデスムス科	*Coelastrum microporum*	350
35				*Crucigeniella crucifera*	220
36				*Scenedesmus acuminatus*	150
37				*Scenedesmus bicaudatus*	60
38				*Scenedesmus denticulatus*	50
39				*Scenedesmus quadricauda*	150
40				*Scenedesmus spinosus*	30
41				*Tetrastrum elegans*	60
42		ホシミドロ目	ツヅミモ科	*Closterium acutum*	110
総細胞数(Cells/mL)					15,254

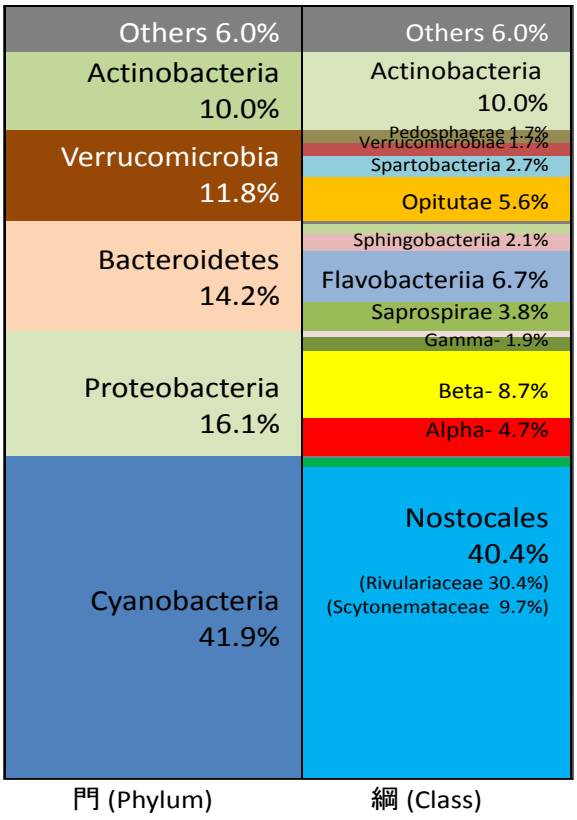
3.3.2 次世代シーケンサーを用いた解析

現在、真核生物あるいは植物プランクトンを網羅的に検出するユニバーサルプライマーは存在しないため、本研究では、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を幅広く増幅することができるユニバーサルプライマーを用いることとした。

図 1 に、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析結果を示す。抽出された DNA サンプルから約 15 万リードの塩基配列を得ることができた。その結果、真正細菌については、5 つの門に大別することができた。そのうち、Cyanobacteria 門が約 40%と一番大きな割合を占めており、次いで、Proteobacteria 門 (16%)、Bacteroides 門 (14%)、Verrucomicrobia 門 (12%)、Actinobacteria 門 (10%)の順であった。

光学顕微鏡を用いた際の Cyanobacteria 門の検出状況を比較すると、Cyanobacteria のうち、Nostocales 目(ネンジュモ目)に含まれる細菌に分類される *Calothrix desertica* および *Scytonema hofmanni* がそれぞれ 31.6%、8.6%検出された。また、カビ臭生産に関与する可能性の高い Oscillatoriales 目 Phormidiaceae 科に分類される細菌が 0.13%検出された。また、アオコ原因藻類である Pseudanabaenaceae 科に含まれる細菌は 0.17%検出された。顕微鏡観察で同定された *Oscillatoria planctonica* および

図 1 次世代シーケンサーを用いた微生物解析結果



Phormidium tenue は、本研究で用いたデータベースからは検出されなかった。次世代シーケンサーでの検出率が自然界中の存在量を反映しているわけではない点に留意する必要があるが、*Calothrix desertica* および *Scytonema hofmanni* がそれぞれどちらかに対応しているものと思われる。光学顕微鏡では形態上分類が困難な場合において、DNA に基づく分類は客観的でより細かな分類を可能とする。しかしながら、本研究では、光学顕微鏡で同定・定量されていた種が、遺伝子を基に定量すると、別属(あるいは別科)に分類されることが示唆された。すなわち、光学顕微鏡で同定される種の中には分類しきれず別種のものも含んでいる可能性が考えられた。

一方、次世代シーケンサーを用いた場合は、顕微鏡観察では同定できない他の門について容易に同定することが可能である。本実験では、Actinobacteria 門において、カビ臭生産に関与すると思われる Streptomycetaceae 科に含まれる細菌が 0.01%とわずかに検出された。また、Actinomycetales 目 ACK-M1 科に分類される細菌が 7.1%検出された。この細菌は、物理、化学および生物学的なパラメータの異なる淡水および弱塩水環境(weakly oligosaline lake)に幅広く存在することが報告されている[16]。

3.4 今後の課題

藻類のモニタリングに DNA を用いる利点として、簡便さと迅速さが挙げられる。さらに、次世代シーケンサーを用いることで、一度に多数のサンプルを並列解析することが可能となり、大幅な時間短縮が可能となる。今後の課題としては、藻類のうち、藍藻類だけが真正細菌に属し、その他が真核生物であるため、同定に用いる DNA 保存領域が異なることから、別々のプライマーを開発・使用しなければならない点が挙げられる。また、藍藻類や珪藻類は細胞壁がその他の細菌や植物プランクトンに比べ強固で頑丈なため、DNA 抽出が困難で、DNA 抽出効率が低い。そのため、それぞれの種の DNA 抽出効率の違いが、検出割合に大きな影響を与えると考えられ、光学顕微鏡では検出が可能な藻類も次世代シーケンサーでは検出されない、あるいは、検出率が低下するといったことも考えられる。したがって、一度に全藻類を対象として増幅可能なプライマーを設計すること、種間でDNA抽出効率に差がでないDNA抽出方法を開発することが期待される。また、これまで蓄積された光学顕微鏡を用いた定量結果との比較方法においても慎重な検討が必要だと考えられる。

4. おわりに

本研究では、気候変動が水環境に与える影響を検討するための諸条件について検討するとともに、霞ヶ浦湖水を用いた微生物解析を行った。その結果、気候変動の検討には、複数の実貯水池を対象に、鉛直 2 次元モデルを構築する場合、流入水質データは回帰式や L-Q 式を用いて流入水質濃度の境界条件を作成するか、流域水循環モデルを利用した流入水質の予測や土砂生産モデル等を利用する方法が考えられる。いずれも流域モデルの構築が必要であり、流域条件の設定等の大きな作業が生じるものと推察される。また、次世代シーケンサーを用いた藻類モニタリング手法の開発には、プライマーの設計と DNA 抽出効率が今後の開発の鍵となるだろう。また、次世代シーケンサーを用いたモニタリング結果と従来の光学顕微鏡の結果のギャップを埋める手法についても検討する余地がある。

参考文献

1) IPCC (2007) Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976.
2) 環境省(2013)気候変動の影響への適応計画、http://www.env.go.jp/press/files/jp/28593.pdf
3) 国土交通省(2013)国土交通省気候変動適応計画 http://www.mlit.go.jp/common/001111532.pdf
4) 志田孝之、風間聡、山本潤(2009)気候変動による湖沼の水温躍層の変化、地球環境研究論文集、17、23-28.
5) 佐藤研三、花木啓祐、松尾友矩(1995)地球環境温暖化による湖沼水質の変化のモデルによる評価、地球環境シンポジウム講演集、3、299-306.
6) 梅田信、落合雄太(2012)気候変動による国内のダム湖水質への影響評価、土木学会論文集 G(環境)、68(5)、127-135.
7) 国土交通省国土技術政策総合研究所(2015)気候変動によるダム貯水池の水質への影響に関する研究、国土技術政策総合研究所資料、856
8) 崔貞圭、矢島啓、谷口健司、馬籠純(2014)浦山ダムにおける気候変動に伴う長期間の将来水質予測、土木学会論文集 B1(水工学)、70(4)、1633-1638.
9) 谷慧亮、梅田信、朝岡良浩、山崎剛(2014)アンデス高地の貯水池における水温変化特性に関する研究、土

木学会論文集 B1(水工学)、70(4)、1627-1632.
10) 国土交通省水管理・国土保全局河川環境課(2016)河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル(ダム湖版) http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/mizukokudam/system/manual.htm
11)Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplles J., Quast C., Horn M., Glöckner F. O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, Nucleic Acids Research, 41, 1-11.
12) Edgar R. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, Bioinformatics, 26, 19, 2460-2461.
13) Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N., Peña A. G., Goodrich J. K., Gordon J. I., Huttley G. A., Kelley S. T., Knights D., Koenig J. E., Ley R. E., Lozupone C. A., McDonald D., Muegge B. D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J. R., Turnbaugh P. J., Walters W. A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, Nature Methods, 7, 335-336.
14) 新山優子(2012)藍藻類ユレモ目の新分類体系の紹介、陸水学雑誌、73、187-196.
15) 木村文宣、本間隆満、牛島健、古里栄一、田中靖(2013)カビ臭産生/非産生に着目した藍藻綱ユレモ目の分類同定手法開発の試み、ダム工学、23(4)、290-299.
16) Jezbera, J., Sharma, A. K,. Brandt, U., Doolittle, W. F., and Hahn, M., W. (2009) 'Candidatus Planktophila limnetica', an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2864–2869.

レポータージーンアッセイを用いた再生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 25～平 27
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：岡本誠一郎、北村友一

【要旨】
下水処理過程でのエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の流入実態と低減効果を明らかにするため、流入下水、活性汚泥処理水、微生物保持担体処理水中のこれらのホルモン様活性値を測定した。その結果、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出された。二次処理水では、エストロゲン様活性が微量であるが検出された。活性汚泥処理でエストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は低下することがわかったが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。微生物保持担体処理水では、エストロゲン様活性は検出されなかった。

キーワード：レポータージーンアッセイ、メダカ、下水処理水、遺伝子発現解析

1. はじめに

下水処理水が放流先の水環境に与える影響の把握や下水を起源とする再生水の安全性の評価のためには、水中に存在する個別の化学物質の実態把握だけでなく、水が水生生物に与える影響を把握する視点も有効であると考えられることから、それぞれの評価法の開発、実態把握、リスク評価に関する研究が進められている。これまで、下水処理水の魚類に対する影響は、下水処理水への魚類の直接曝露試験により調査されてきた。その結果、下水処理水中に女性ホルモン（エストロゲン）が残存している場合、魚類に雌性化影響を与えることが明らかになってきた。下水処理水への魚類の直接曝露法は説得力があり有用な方法であるが、生殖腺の組織観察、マーカー蛋白質や遺伝子発現が指標とされ、試験に要する時間・労力や試験生物のと殺が必要となることから、簡易モニタリングへの適用が困難であり、動物愛護上の問題も発生する。

ここ数年、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン様活性などを試験管内で評価できるレポータージーンアッセイの開発が進んでおり、レポータージーンアッセイは排水を対象とした評価にも有望[1)]であると考えられる。

レポータージーンアッセイを下水処理水の安全性評価に利用するためには、下水試料への適用方法（濃縮方法、固相抽出条件）の最適化や実験動物の応答との関係解明が必要となる。

本研究では、実下水試料を用いて、レポータージーンアッセイによる下水試料に含まれるエストロゲン、アンドロゲン、甲状線ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の測定を行い、これらのホルモン様活性の実態と下水処理過程での低減効果を評価した。さらに、レポータージーンアッセイとメダカの *in vivo* での遺伝子発現との比較も行った。

2. 実験方法

2.1　下水処理実験装置の運転

下水処理実験装置の概要を図-1 に示す。下水処理実験装置は、最初沈殿池（500L）、生物反応槽（500L×4 槽）、最終沈殿池（700L）、担体処理槽（10L×4 槽）から構成されている。

流入下水は、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、標準活性汚泥法による処理を行った。水理学的滞留時間（HRT）は、7 時間となるように流入水量を制御した。担体処理槽では、微生物が自然発生的に保持されたポリプロピレン製円筒担体(φ5mm,長さ 5mm,厚さ 1mm)を充填し、水理学的滞留時間 2 時間で活性汚泥処理水を処理した。流入下水、二次処理水、担体処理水を H25 年 10 月 23～24 日および H26 年 11 月 5～6 日に微量ポンプを用いて 24 時間連続採水を行い、本試料をレポータージーンアッセイに供した。

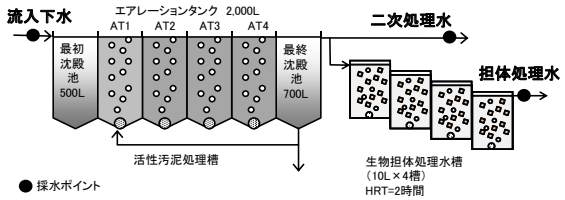


図-1　下水処理実験装置の概要

2.2　下水試料の固相抽出方法

固相抽出の条件は以下のとおりとした。

(1) 固相の種類

固相種類：Oasis HLB Vac cartridge（Waters 社製）
カートリッジ容量：　6 cc
充填剤重量：　500 mg
充填剤粒径：　60 μm

(2) コンディショニング

① ジクロロメタン／メタノール（1:1）10mL
② メタノール 10 mL
③ 純水 20 mL

(3) 通水

通水量：　1 L
通水速度：　10 mL/min

(4) 脱水

吸引および遠心分離（3,500 rpm、5 min）による脱水

(5) 溶出

① メタノール 10 mL
② ジクロロメタン／メタノール（1:1）10 mL

(6) 乾固

窒素気流を吹き付け、40 ℃に加温しながら乾固、乾固後、DMSO 50 μL で再溶解させ、メタノール画分とジクロロメタン／メタノール画分の DMSO 溶液を混合し、10,000 倍濃縮試料 100 μL を調製。

2.3　レポータージーンアッセイ方法

レポータージーンアッセイの方法は以下のとおりとした。

(1) 受容体の種類

検出するホルモン様活性は、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性とし、以下のメダカ受容体を用いた。

・メダカエストロゲン受容体α（ER α）
・メダカアンドロゲン受容体β（AR β）
・メダカ甲状腺ホルモン受容体β（TR β）

(2) リファレンス物質

リファレンス物質は、以下のとおりとした。

・ER α：17β-エストラジオール（E2）
・抗 ER α：4-ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）
・AR β：11-ケトテストステロン（11KT）
・抗 AR β：2-ヒドロキシフルタミド（2OHF）
・TR β：トリヨード-L チロニン（T3）
・抗 TR β：Thyroid hormone receptor antagonist,1-850（1-850）

(3) ERα レポータージーンアッセイの方法

(3)-1　細胞の播種

96 穴マイクロプレートにヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を 1.4×10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間培養した。

(3)-2　ベクターの細胞導入

メダカの ER α を発現するベクター、ER 応答エレメントをホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだベクターERE-TK-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクターpRL-TK-RLuc を導入した。導入試薬は FuGENE 6（プロメガ社）を用いた。

(3)-3　リファレンス物質と被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。このとき、DMSO の最終濃度は 0.1%とした。また、DMSO を最終濃度 0.1%で添加する陰性対照区を設けた。

(3)-4　発光強度の測定

リファレンス物質および被験試料の添加後、CO_2 インキュベータ内で 40 時間静置培養した。培養完了後、細胞を溶解し、基質を添加してホタル及びウミシイタケルシフェリンの発光強度を Dual-Luciferase Assay System（プロメガ社）を用いてルミノメーターで測定し、相対発光強度（ホタル／ウミシイタケ）を算出した。

(3)-5　転写活性化倍率の算出

被験試料の濃度区の相対発光強度を、陰性対照区の相対発光強度の平均値で除した転写活性化倍率を算出した。

(4) 抗 ERα レポータージーンアッセイの方法

(4)-1　細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(4)-2　ベクターの細胞導入

(3)-2 と同様に操作した。

(4)-3　E2、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 2×10^{-10} M となるように E2 の DMSO 溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2%とした。また、DMSO を最終濃度 0.2%

で添加する陰性対照区を設けた。

(4)-4　発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(4)-5　転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(5) ARβ レポータージーンアッセイの方法

(5)-1　細胞の播種

96 穴マイクロプレートにヒト肝がん細胞由来の HepG2 細胞を 1.4×10^4 cells/well となるよう播種し、24 時間培養した。

(5)-2　ベクターの細胞導入

メダカの ARβを発現するベクター、AR 応答エレメントを持つMMTVプロモーターをホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだベクターMMTV-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクターpRL-TK-RLuc を導入した。

(5)-3　リファレンス物質と被験試料の添加

(3)-3 と同様に操作した。

(5)-4　発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(5)-5　転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(6)抗 ARβ レポータージーンアッセイの方法

(6)-1　細胞の播種

(5)-1 と同様に操作した。

(6)-2　ベクターの細胞導入

(5)-2 と同様に操作した。

(6)-3 11KT、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 1×10^{-8} M となるように11KTのDMSO溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2%とした。また、DMSO を最終濃度 0.2%で添加する陰性対照区を設けた。

(6)-4　発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(6)-5　転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(7)　TRβ レポータージーンアッセイの方法

(7)-1　細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(7)-2　ベクターの細胞導入

メダカの TR βを発現するベクター、TR 応答エレメントをホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだベクターTRE-minP-Luc および恒常的にウミシイタケルシフェラーゼが発現する内部標準ベクターpRL-TK-RLuc を導入した。

(7)-3　リファレンス物質と被験試料の添加

(3)-3 と同様に操作した。

(7)-4　発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(7)-5　転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

(8) 抗 TRβ レポータージーンアッセイの方法

(8)-1　細胞の播種

(3)-1 と同様に操作した。

(8)-2　ベクターの細胞導入

(7)-2 と同様に操作した。

(8)-3　T3、リファレンス物質および被験試料の添加

ベクターの導入 4 時間後に、最終濃度が 5×10^{-9} M となるように T3 の DMSO 溶液を添加した後、任意に濃縮倍率を調整したリファレンス物質および被験試料を添加した。DMSO の最終濃度は 0.2%とする。また、DMSO を最終濃度 0.2%で添加する陰性対照区を設けた。

(8)-4　発光強度の測定

(3)-4 と同様に操作した。

(8)-5　転写活性化倍率の算出

(3)-5 と同様に操作した。

2.4　データ解析の方法

(1)　ホルモン受容体レポータージーンアッセイ結果の解析

(1)-1　EC_{50} または PC_{10} の算出

解析ソフト GraphPad Prism（GraphPad Software 社）を用いて、3-parameter の非線形回帰モデルにより最大活性値の 50%の転写活性を示す濃度（EC_{50}）を算出した。

EC_{50} が試験最高濃度よりも高濃度となった場合は、リファレンス物質の最大転写活性の 10%値を挟む 2 点の転写活性化倍率を用いて直線回帰により陽性対照物質の最大転写活性値の 10%の転写活性を示す濃度（PC_{10}）を算出した。

試験濃度範囲において試料の転写活性化倍率に陰性対照区と比較して主に Dunnet のパラメトリック検定で有意（$p<0.05$）な上昇が認められなかった場合、または、最高試験濃度における転写活性化倍率がリファレンス物質の試験から得られた最大転写活性の 10%値を超えなかった場合は、被験試料は試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化が認められないと結論した。

(1)-2　ホルモン様活性値の算出

EC_{50} または PC_{10} が得られた被験試料については、それらのリファレンス物質（E2、11KT、T3）の EC_{50} または PC_{10} で除して各ホルモン様活性値を算出した。

(2)　抗ホルモン受容体レポータージーンアッセイ結果の解析

(2)-1　IC_{50} または $linIC_{30}$ の算出

リファレンス物質（4OHT、2OHF および 1-850）について、解析ソフト GraphPad Prism（GraphPad Software 社）を用いて、3-parameter の非線形回帰モデルにより最大転写活性が 50%阻害を示す濃度（IC_{50}）を算出した。

IC_{50} が試験最高濃度より高濃度となった場合は、リファレンス物質の最大転写活性化倍率の 70%値を挟む 2 点の転写活性化倍率を用いて直線回帰により陽性物質の転写活性を 30%阻害する濃度（$linIC_{30}$）を算出した。

試験濃度範囲において転写活性化倍率が陰性対照区と比較して主に Dunnet のパラメトリック検定で有意（$p<0.05$）な低下が認められなかった場合、または、最高試験濃度における転写活性化倍率がリファレンス物質の 70%値を超えている場合は、被験試料は試験濃度範囲において試験対象としたホルモン受容体に対する転写活性化阻害が認められないと結論した。

(2)-2　ホルモン様活性値の算出

IC_{50} 又は $linIC_{30}$ が得られた被験試料については、それらのリファレンス物質（4OHT、2OHF、1-850）の IC_{50} または $linIC_{30}$ で除して各ホルモン様活性値を算出した。

3. 結果および考察

3.1 ホルモン受容体レポータージーンアッセイ

(1)　転写活性化倍率

H25 年度調査の流入下水、二次処理水、担体処理水、脱塩素水道水について、メダカの ERα、ARβ および TRβ レポータージーンアッセイの転写活性化倍率と被験試料の濃縮倍率との関係を表す用量反応曲線を、それぞれ図-2、図-3 および図-4 に示す。図には陽性コントロール（E2、11KT、T3）の結果も示した。

(2)　EC_{50}、PC_{10} およびホルモン様活性値の算出

被験試料およびリファレンス物質について、メダカの ERα、ARβ および TRβ レポータージーンアッセイで得られた転写活性化倍率から算出した、EC_{50} または PC_{10} 値および各ホルモン様活性値をそれぞれ表-1 に示した。

ERα レポータージーンアッセイにおける EC_{50} は、流入下水についてのみ算出され、1.73 であった。このとき、E2 の EC_{50} は 7.18×10^{-10} M（$logEC_{50}$：-9.14）であった。PC_{10} は流入下水および二次処理水について算出され、それぞれ 0.63

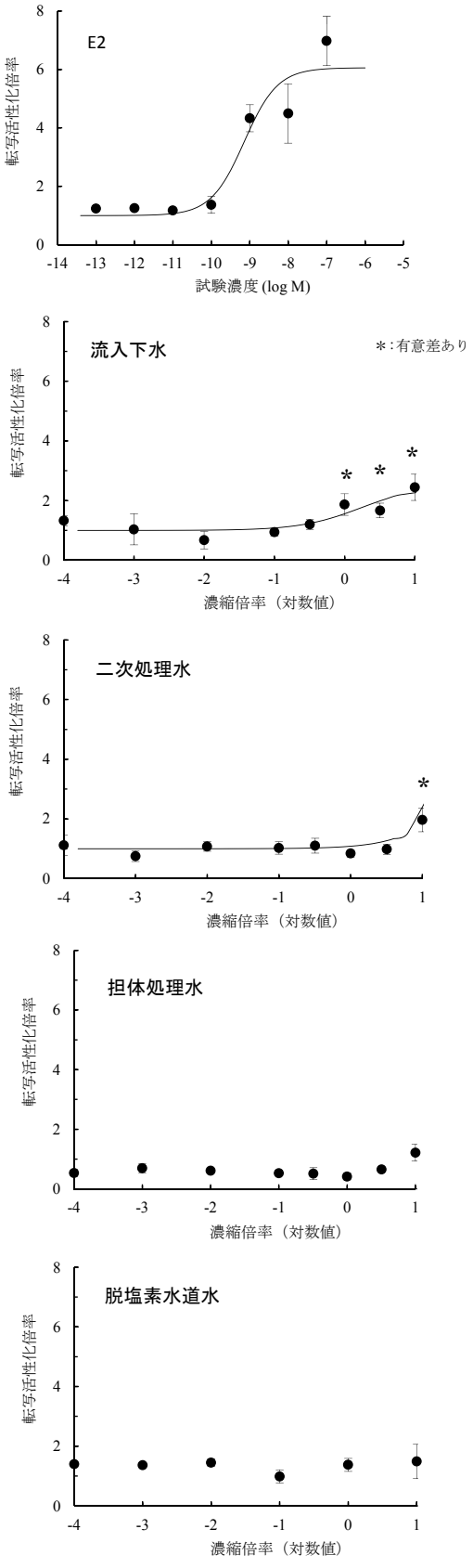
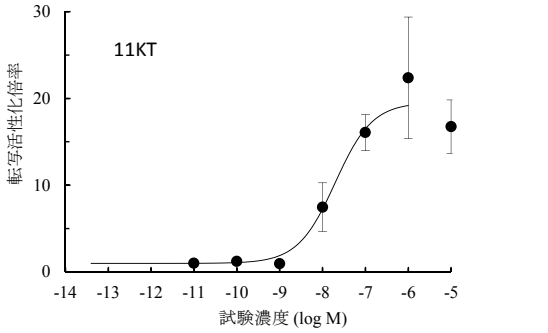
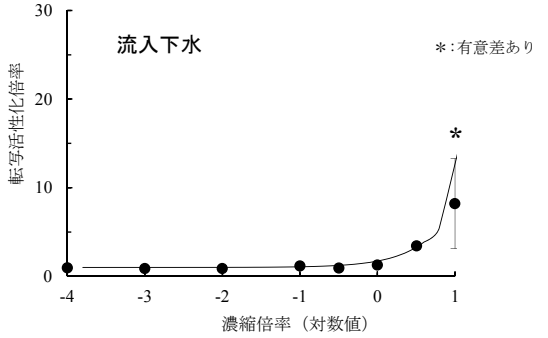
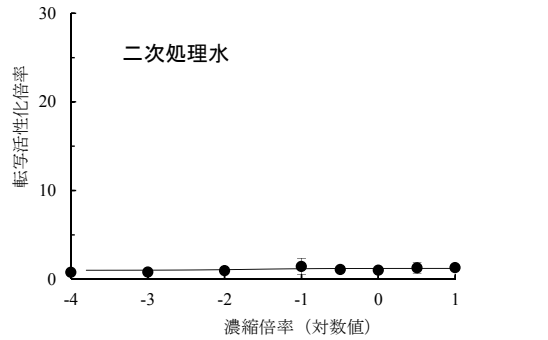
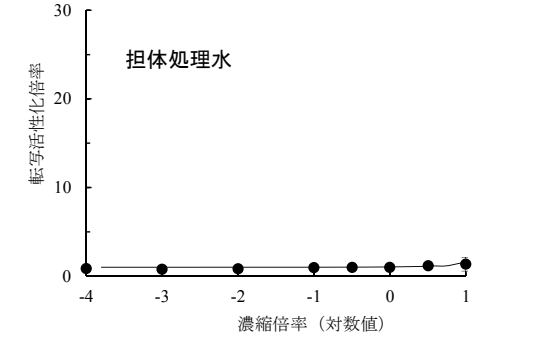


図-2　各下水試料の ERα の転写活性化倍率









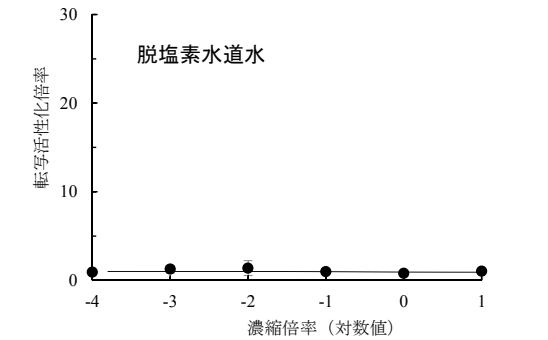
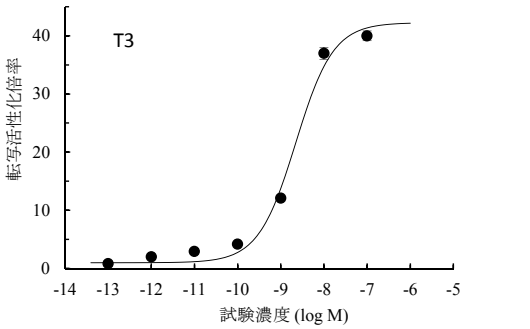
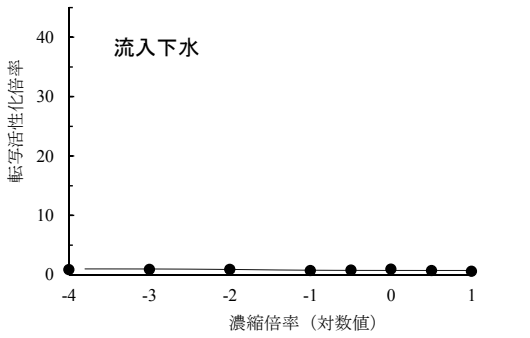
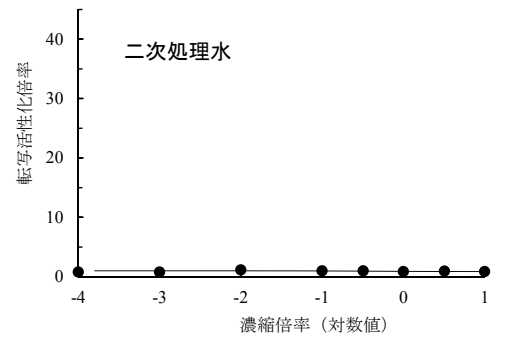
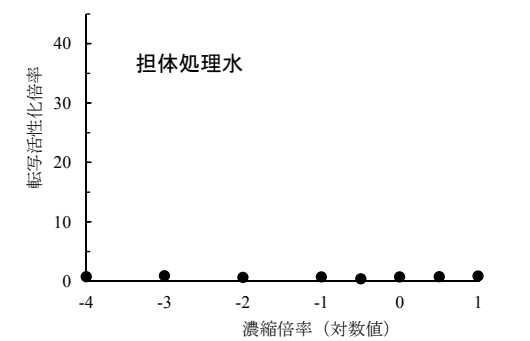


図-3　各下水試料の ARβ の転写活性化倍率









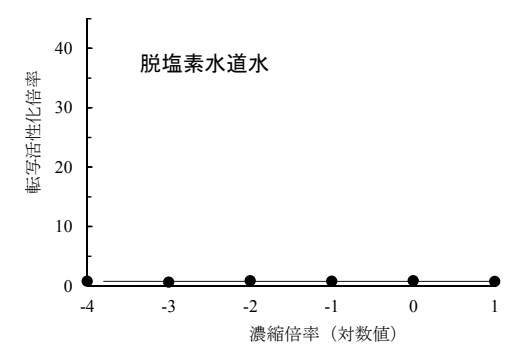


図-4　各下水試料の TRβ の転写活性化倍率

および 6.51 であった。このとき、E2 の PC_{10} は 1.20×10^{-10} M であった。担体処理水および脱塩素水道水についてはエストロゲン受容体の転写活性は認められなかった。

AR β レポータージーンアッセイにおける PC_{10} は、流入下水について算出され、2.03 であった。このとき、11KT の PC_{10} は 1.77×10^{-9} M であった。二次処理水、担体処理水および脱塩素水道水についてはアンドロゲン受容体の転写活性が認められなかった。

TR β レポータージーンアッセイにおいては、すべての被験試料について甲状腺ホルモン受容体の転写活性は認められなかった。

流入下水および二次処理水のエストロゲン様活性値は、EC_{50}、PC_{10} 値を用いて算出した結果、それぞれ 20.1 および 5.0 ng-E2/L となった。担体処理水および脱塩素水道水については、エストロゲン受容体の転写活性が認められなかったため、エストロゲン様活性値は算出しなかった。

流入下水のアンドロゲン様活性値は、264 ng-11KT/L であった。二次処理水、担体処理水および脱塩素水道水については、アンドロゲン受容体の転写活性が認められなかったため、アンドロゲン様活性値は算出されなかった。

TR β レポータージーンアッセイでは、すべての被験試料について甲状腺ホルモン受容体の転写活性が認められなかったため、甲状腺ホルモン様活性値は算出しなかった。

表-1　エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン様活性値の結果（H25 年度調査）

被験試料	EC_{50}（濃縮倍率）	PC_{10}（濃縮倍率）	エストロゲン様活性値 (M)	エストロゲン様活性値 (ng-E2/L)
流入下水	1.73	0.63	7.36E-11	20.1
二次処理水	-	6.51	1.84E-11	5.0
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
E2	7.18E-10	1.20E-10	-	-

被験試料	EC_{50}（濃縮倍率）	PC_{10}（濃縮倍率）	アンドロゲン様活性値 (M)	アンドロゲン様活性値 (ng-11KT/L)
流入下水	-	2.03	8.73E-10	264
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
11KT	1.96E-08	1.77E-09	-	-

被験試料	EC_{50}（濃縮倍率）	PC_{10}（濃縮倍率）	甲状腺ホルモン様活性値 (M)	甲状腺ホルモン様活性値 (ng-T3/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
T3	2.23E-09	1.23E-10	-	-

na:有意な転写活性なし, nd:不検出

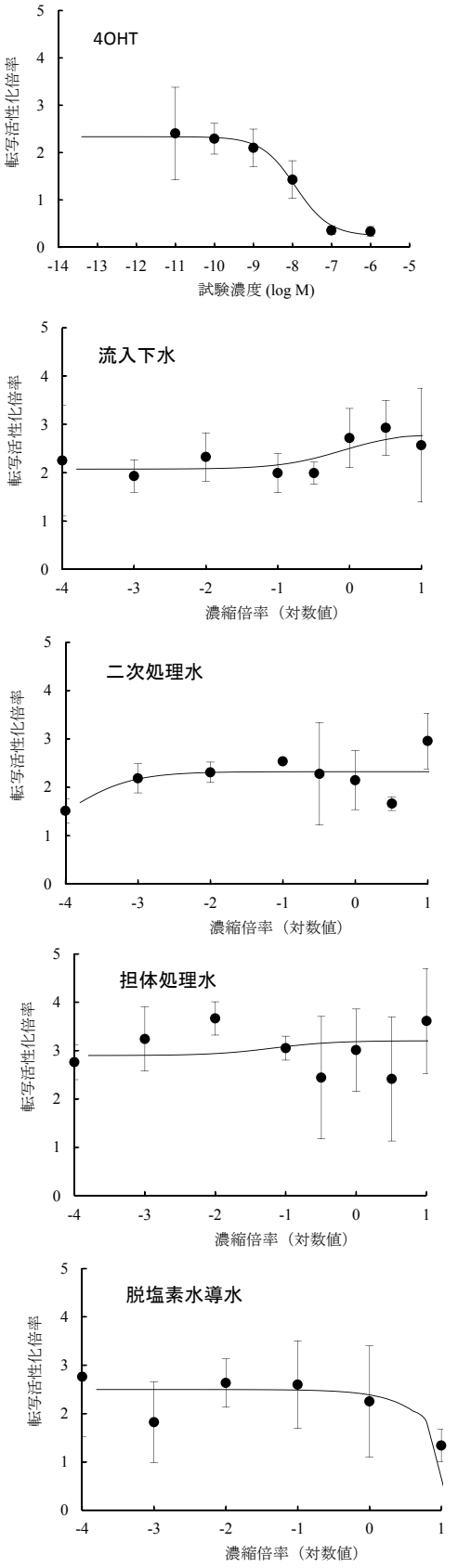
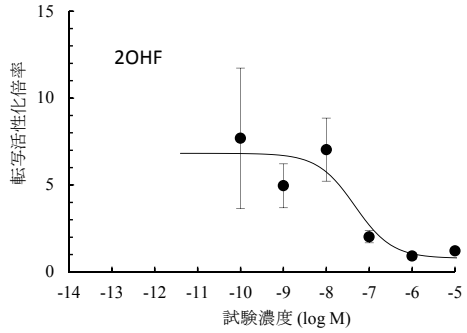
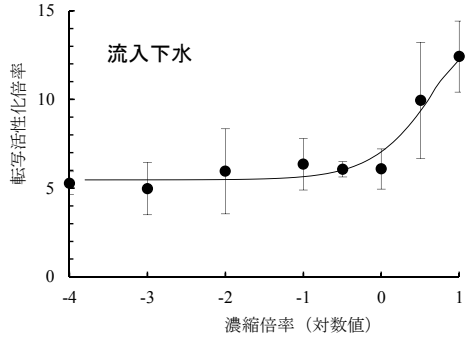
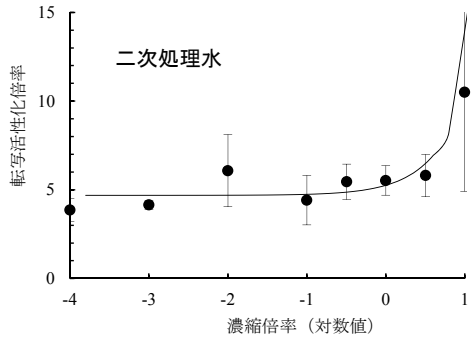
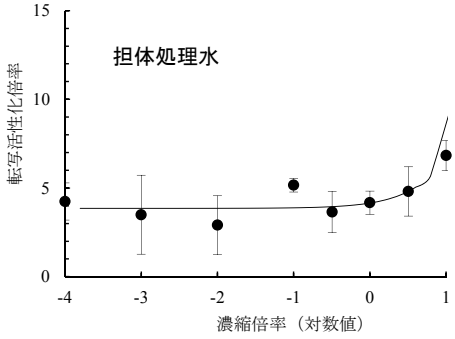


図-5　各下水試料の抗 ERα の転写活性化倍率









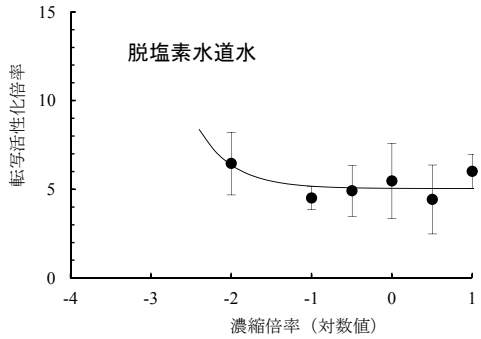
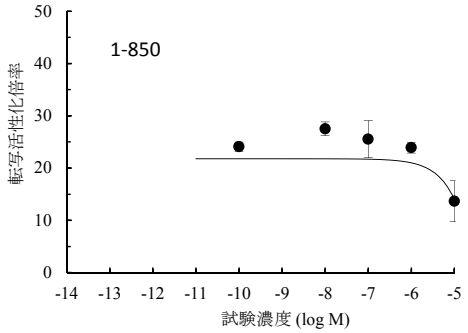
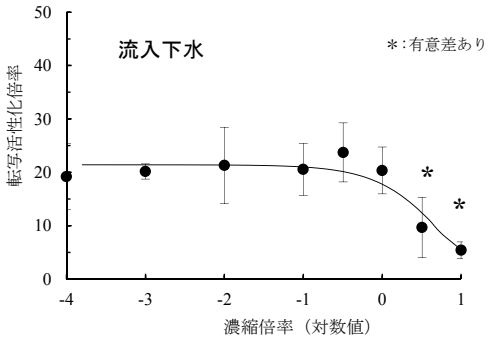
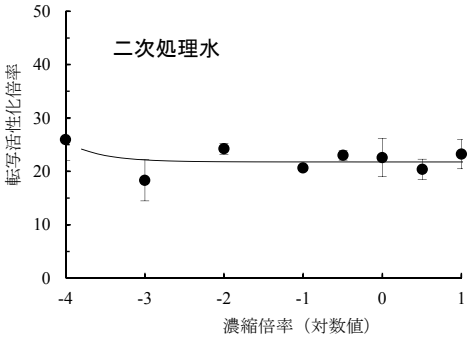
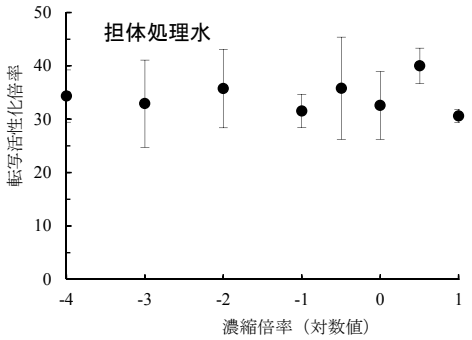


図-6　各下水試料の抗 ARβ の転写活性化倍率









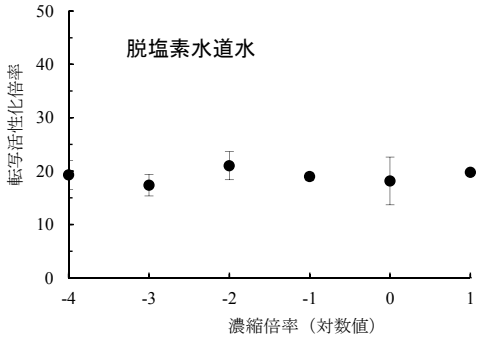


図-7　各下水試料の抗 TRβ の転写活性化倍率

3.2 抗ホルモン受容体レポータージーンアッセイ

(1) 転写活性化倍率

H25 年度調査の流入下水、二次処理水、担体処理水、脱塩素水道水について、メダカの抗 ERα、抗 ARβおよび抗 TRβレポータージーンアッセイの転写活性化倍率と被験試料の濃縮倍率との関係を表す用量反応曲線を、それぞれ図-5、図-6 および図-7 に示す。図には陽性コントロール（4OHT、2OHF、1-850）の結果も示した。

(2) IC_{50}、$linIC_{30}$ および各抗ホルモン様活性値の算出

被験試料およびリファレンス物質について、メダカの抗 ERα、抗 ARβおよび抗 TRβレポータージーンアッセイで得られた転写活性化倍率から算出した。IC_{50} または $linIC_{30}$ の値をそれぞれ表-2 に示した。

抗 ERα レポータージーンアッセイおよび抗 ARβレポータージーンアッセイにおいて、すべての被験試料について各ホルモン受容体の転写活性の阻害が認められなかった。抗 TRβレポータージーンアッセイにおいて、流入下水の $linIC_{30}$ は 2.04 となった。このとき 1-850 の $linIC_{30}$ は 9.71×10^{-6} M であった。

抗 ERα および抗 ARβレポータージーンアッセイにおいて、すべての被験試料について各ホルモン受容体の転写活性阻害が認められなかったため、各抗ホルモン様活性値は算出しなかった。

抗 TRβレポータージーンアッセイにおいて、流入下水の抗甲状腺ホルモン様活性値は 2.20×10^{6} ng-1-850/L と算出された。

3.3 25 年度と 26 年度調査の結果の比較

図-8 は、H25 と H26 年度調査の各ホルモン様活性値の測定結果である。H25 と H26 とも同様の傾向を示し、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出され、二次処理水では、エストロゲン様活性が微量に検出された。活性汚泥処理でエストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は、低下していることがわかるが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。担体処理後は、エストロゲン様活性は検出されなかった。担体処理は二次処理水に残存するエストロゲン様活性の低下に効果があることがわかった。

表-2 抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性値の結果（H25 年度調査）

被験試料	IC_{50}（濃縮倍率）	$linIC_{30}$（濃縮倍率）	抗エストロゲン様活性値 (M)	抗エストロゲン様活性値 (ng-4OHT/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
4OHT	1.19E-08	1.92E-09	-	-

被験試料	IC_{50}（濃縮倍率）	$linIC_{30}$（濃縮倍率）	抗アンドロゲン様活性値 (M)	抗アンドロゲン様活性値 (ng-2OHF/L)
流入下水	na	na	n.d.	n.d.
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
2OHF	4.61E-08	2.61E-08	-	-

被験試料	IC_{50}（濃縮倍率）	$linIC_{30}$（濃縮倍率）	抗甲状腺ホルモン様活性値 (M)	抗甲状腺ホルモン様活性値 (ng-1-850/L)
流入下水	-	2.04	4.75E-06	2.20E+06
二次処理水	na	na	n.d.	n.d.
担体処理水	na	na	n.d.	n.d.
脱塩素水道水	na	na	n.d.	n.d.
1-850	7.29E-01	9.71E-06	-	-

na:有意な転写活性なし, nd:不検出

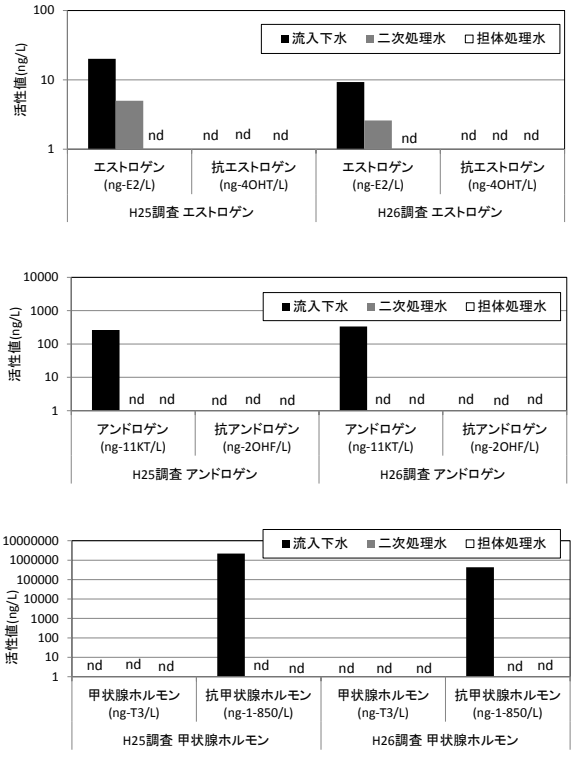


図-8 H25 年度の各ホルモン様活性値の測定結果

4. レポータージーンアッセイと実験動物の応答の比較

4.1　メダカ曝露試験と遺伝子発現解析の方法

レポータージーンアッセイを下水処理水の安全性評価に利用するためには、実際に動物で観察される生体影響と、レポータージーンアッセイでの影響の関係を把握する必要がある。そこで、メダカ成魚を 3 章で用いたホルモン、抗ホルモン物質と下水試料に曝露し、遺伝子発現解析を行った。表-3 は実施した試験の一覧である。雄メダカは 17β-エストラジオール（E2；エストロゲン）および 2-ヒドロキシフルタミド（flutamide；抗アンドロゲン)、雌メダカは 4-ヒドロキシタモキシフェン（4OHT；抗エストロゲン）および 11-ケトテストステロン（11KT；アンドロゲン）について曝露試験を実施した。対照区は雄と雌のどちらも脱塩素水道水とした。試験物質の濃度は、レポータージーンアッセイでの転写活性が低（数%)、中（約 50%)、高（約 90%）となる濃度とした。また、下水処理過程での内分泌かく乱作用の *in vivo* での低減効果を把握するため、図-1 の活性汚泥処理実験装置から 3 章のレポータージーンアッセイに供したものと同時に採水（平成 25 年度）した流入下水、二次処理水、担体処理水で曝露試験を実施した。

表-4 はメダカ曝露試験の実施方法である。1 曝露区あたり 1 個の水槽に試験水 5L とメダカ 10 匹を入れ、24 時間おきに水を交換し、96 時間まで曝露した。曝露終了後メダカを氷冷麻酔して 1 匹ずつ肝臓を摘出し、RNeasy Mini Kit（Qiagen）で RNA を抽出した。RNA 試料は 3 匹分ずつ混合して 1 曝露区 3 検体とし、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析に供した。

表-3　実施したメダカ曝露試験の一覧

ホルモン・抗ホルモン物質曝露		下水曝露
試験① 平成25年10月	試験② 平成26年8月	試験③ 平成25年10月
雄メダカ ・対照区 ・E2_2.7ng/L ・E2_27ng/L ・E2_270ng/L	雄メダカ ・対照区 ・flutamide_1.5ng/L ・flutamide_15ng/L ・flutamide_150ng/L	雄メダカ ・対照区 ・流入下水 ・二次処理水 ・塩素処理水 ・担体処理水
雌メダカ ・対照区 ・4OHT_39ng/L ・4OHT_390ng/L ・4OHT_3900ng/L	雌メダカ ・対照区 ・11KT_1.5ng/L ・11KT_15ng/L ・11KT_150ng/L	雌メダカ ・対照区 ・流入下水 ・二次処理水 ・塩素処理水 ・担体処理水

表-4　メダカ曝露試験の実施条件

試験魚	d-rR系 ヒメダカ(6～7カ月齢)
曝露匹数	10匹/曝露区
曝露時間	96時間
曝露水量	5L
曝露方式	半止水式(1日1回全換水)
設定水温	24℃
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	なし
曝気	DOが低い試料は緩やかに曝気 飽和溶存酸素濃度の50%以上を確保
解析臓器	肝臓
RNA抽出法	RNeay mini kitにより1個体毎に抽出
RNA試料の調整	同曝露区の3匹分を1つに混合(3検体)
遺伝子発現解析法	マイクロアレイ法（Agilentのプロトコルに従う）
基準化法	グローバルノーマライゼーション
遺伝子発現の数値化	発現強度をLog_2変換後、3検体を平均

メダカの網羅的遺伝子発現解析は、Agilent 製 8×60K のカスタムアレイとし、マイクロアレイ搭載遺伝子は、DFCI (Dana Farber Cancer Institute)の Medaka Gene Index(Release 8.0)のデータベースを基に e-Array（Agilent が提供しているプローブ配列設計ツール）でプローブ配列を設計したものである。マイクロアレイ搭載遺伝子の遺伝子名や機能情報は、相同性検索を用いて取得した。すなわち、プローブ設計の元となった塩基配列とメダカの Refseq mRNA 配列を用いて Blastn 検索を実施し、相同性が最も高い配列の Refseq ID, GeneSymbol, GeneName を採用した。同じ GeneSymbol を有する複数のプローブが搭載されていたため、データ解析にあたって E-value が最小かつ bit score が最大のプローブを選択し、1 遺伝子 1 プローブとなるようにした。

内分泌かく乱作用は、性特異遺伝子群の遺伝子発現強度を指標とし、正常な雌メダカに対する各試験水に曝露したメダカの類似性で評価した。性特異遺伝子は、2 回のホルモン物質曝露実験（平成 25、26 年度）の雄と雌メダカの遺伝子発現強度を用いて、正常雄（対照区雄 6 アレイの平均）と正常雌（対照区雌 6 アレイの平均）から、以下の条件で抽出した。

表-5　メダカ性特異遺伝子の GeneSymbol の一覧

雄特異遺伝子 194個				雌特異遺伝子 223個			
a1cf	LOC101154824	LOC101168641	pdp1	1-sf	klhdc4	LOC101164843	LOC105358200
aacs	LOC101155010	LOC101169105	pgam2	(L-SF precursor)	kpnb1	LOC101164991	LOC105358402
abhd5	LOC101155377	LOC101169174	plekhg7	adamts1	lamp5	LOC101165016	lpgat1
acsl3	LOC101155834	LOC101169222	pmm1	adcy6	lgi1	LOC101165161	lsm14a
acss3	LOC101155838	LOC101169597	ppp1r1b	ak1	LOC100049191	LOC101165371	mcm3
acy3	LOC101156099	LOC101169834	rerg	arid3b	(choriogenin Hminor)	LOC101165454	mgat4d
adgrg4	LOC101156321	LOC101169984	rlbp1	aspg	LOC100049343	LOC101165495	myc
agmo	LOC101156571	LOC101170076	sc5d	atf3	LOC100049432	LOC101166566	myo5c
anxa10	LOC101156812	LOC101170321	scn1b	b4galt1	(choriogenin H)	LOC101166704	naca
aptx	LOC101156814	LOC101170364	sfrp1	c-fos	LOC101154956	LOC101166732	nphp4
ar-alpha	LOC101157073	LOC101170495	sgk3	c22h14orf132	LOC101155383	LOC101166945	nr0b2
(androgen receptor)	LOC101157123	LOC101170853	slc16a12	c9h8orf4	LOC101155508	LOC101167064	nxn
arf3	LOC101157186	LOC101170951	slc29a1	cacng1	LOC101155991	LOC101167235	oaz2
ass1	LOC101157281	LOC101171127	snai2	caskin1	LOC101156021	LOC101167359	ol-vit1(vitellogenin 1)
atg2a	(CYP27C1)	LOC101171385	spint1	ccdc51	LOC101156352	LOC101167367	pax6
bcar1	LOC101157407	LOC101171575	st6galnac2	ccna2	LOC101156858	LOC101167980	pcbp3
c1r	LOC101157460	LOC101171753	synm	celsr2	LOC101156872	LOC101168136	pgap1
c22h14orf1	LOC101157497	LOC101171858	tcp11l2	cfap97	LOC101157031	LOC101168744	phc1
c5h1orf50	LOC101157715	LOC101172071	thrsp	chka	LOC101157175	LOC101168823	phldb3
ca7	LOC101158236	LOC101172107	tnr	chkb	LOC101157455	LOC101168919	ppp2r3b
camk2n2	LOC101158556	LOC101172412	tpi1	clstn1	LOC101157499	LOC101169478	prickle2
cfl1	LOC101158874	LOC101172514	tyrp1	cpd	LOC101157638	LOC101169951	rad52
dax1	LOC101159064	LOC101172854	zbtb16	creld2	LOC101157792	LOC101170423	rad54b
ddah1	LOC101159074	LOC101172895	znf423	cygb1	LOC101157829	LOC101170539	rasl11a
dec1a	LOC101159663	LOC101172948	znf521	dap	LOC101157938	LOC101170597	rcn3
dio1	LOC101159757	LOC101174070		dnhd1	LOC101158054	LOC101171080	rdh13
dio2	LOC101160435	LOC101174102		drp2	LOC101158170	LOC101171578	rgs3
dlc1	LOC101160448	LOC101174137		dusp4	LOC101159061	LOC101171723	rps14
dmpk	LOC101160551	LOC101174367		edaradd	LOC101159180	LOC101171732	rtn1
dmy	LOC101160745	LOC101174392		esr1	LOC101159258	LOC101171737	s100b
eef2k	LOC101160785	LOC101175040		(estrogen receptor 1)	LOC101159847	LOC101171757	sec24d
elf4	LOC101160902	LOC105353580		f13b	LOC101160387	LOC101171806	shc4
emb	LOC101160922	LOC105354483		fabp7	LOC101160475	LOC101171895	slc12a4
fabp2	LOC101160952	LOC105355224		fam134b	LOC101160562	LOC101172427	slc13a1
fam167a	LOC101161278	LOC105355355		fam20a	LOC101160711	LOC101172685	slc22a17
fam184b	LOC101161531	LOC105355471		fat3	LOC101161140	LOC101172718	slc25a25
fasn	LOC101161554	LOC105355953		fignl1	(vitellogenin-like)	LOC101172952	slc35g2
fbxo25	LOC101161624	LOC105356059		fmnl3	LOC101161342	LOC101172959	slc41a1
fdps	LOC101162630	LOC105356225		fndc3b	LOC101161348	LOC101173001	slc41a2
foxn3	LOC101163042	LOC105356509		fosl1	LOC101161642	LOC101173070	slc6a2
gadl1	LOC101163376	LOC105357121		fzd3	LOC101161734	LOC101173135	soat1
glrx	LOC101163746	LOC105358658		fzd9	LOC101161853	LOC101173201	socs3
golt1a	LOC101163973	lrch2		gem	LOC101162182	LOC101173923	sox13
grk7	LOC101164058	lrrk1		ggt1a	LOC101162344	LOC101174219	stra6
haus1	LOC101164719	map1lc3c		gldc	LOC101162592	LOC101174266	tbrg4
hes1	LOC101165163	mcf2		gna12	LOC101162606	LOC101174464	tenm2
hmgcr	LOC101165174	mcph1		gnrh-r3	LOC101162837	LOC101174826	tle4
hmgcs1	LOC101165488	me1		gpr135	LOC101162842	LOC101174949	tmem136
hs3st1	LOC101165663	mid1ip1		hnf4g	LOC101163350	LOC101175275	tmem235
idi1	LOC101165729	mob3c		hoxc8	LOC101163485	LOC101175514	tmem255a
isyna1	LOC101166601	msmo1		id4	LOC101163524	LOC101175687	tnpo3
kalrn	LOC101167349	nog		ier2	LOC101164062	LOC105355368	tph2
kcnma1	LOC101167732	nptx1		jarid2	LOC101164390	LOC105355535	txndc12
kctd14	LOC101167930	nsdhl		kazn	LOC101164404	LOC105355548	vit-6 (vitellogenin II)
klf10	LOC101167981	olklklp		kfharr-r2	LOC101164721	LOC105357295	vwc2
klhl24	LOC101168329	papln		kiaa1644	LOC101164744	LOC105357989	xbp1
lamb3	LOC101168495	pdlim2		kiaa1715	LOC101164756	LOC105358028	zmiz1

①遺伝子発現強度が正常雄と比較して正常雌で 2 倍以上または 1/2 以下
②ウェルチの t 検定から、正常雄と正常雌の対数変換した遺伝子発現強度の差が $p<0.05$ で有意

表-5 は抽出されたメダカ性特異遺伝子の一覧である。雄で高発現の遺伝子は 194 個、雌で高発現の遺伝子は 223 個であった。図-9 は正常雄と正常雌の遺伝子発現強度の平均値のスキャッタープロットである。黒色プロットは雌、白色プロットは雄メダカ特異遺伝子、灰色は雄雌共通の遺伝子を示す。

雌に対する類似性評価のための指標は、0(雄)から 1（雌）までの値で表現することが可能な Kishi ら [2]のユークリッド距離（d）とピアソン

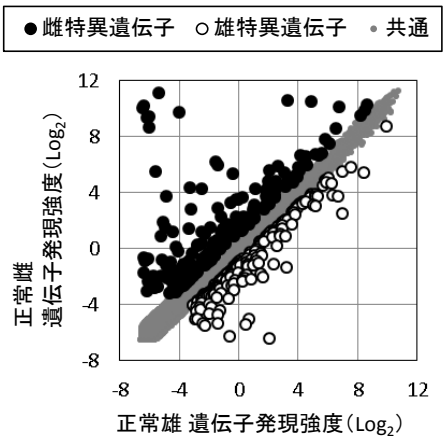
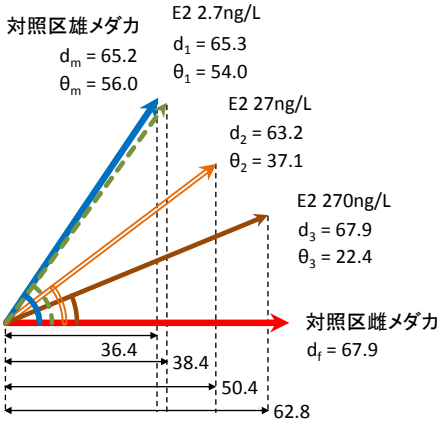


図-9 雄と雌メダカの性特異遺伝子の発現強度のスキャッタープロット

相関係数（cos θ）を用いる feminization factor（以降、f factor）を用いた。図-10 は f factor の算出方法を、E2 曝露試験結果を例として示したものである。矢印の長さは遺伝子発現強度、角度は正常雌と曝露区の類似性を反映している。f factor は、雄メダカの場合は 1 に近づくほど、雌メダカの場合は 1 から離れるほど内分泌かく乱作用を強く受けていると判断される。



E2 2.7ng/L の f factor = $\frac{38.4 - 36.4}{67.9 - 36.4}$ = 0.063

E2 27ng/L の f factor = $\frac{50.4 - 36.4}{67.9 - 36.4}$ = 0.443

E2 270ng/L の f factor = $\frac{62.8 - 36.4}{67.9 - 36.4}$ = 0.837

図-10　f factor の算出例

4.2　遺伝子発現解析の結果

図-11 は E2 および 4OHT 曝露区の f factor である。E2 曝露区の雄メダカの f factor は、曝露濃度が高くなるに従い、0.06 から 0.84 に上昇した。4OHT 曝露区の雌メダカの f factor は、曝露濃度によらずほぼ 1 であり、抗エストロゲン作用による影響はみられなかった。図-12 は flutamide および 11KT 曝露区の f factor である。flutamide 曝露区の雄メダカの f factor はほぼ 0 であり、抗アンドロゲン作用による影響はみられなかった。11KT 曝露区では、150ng/L で雌メダカの f factor が 0.82 まで少し低下した。

抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲンのリファレンス物質が *in vivo* でのメダカ遺伝子発現に及ぼす影響は、レポータージーンアッセイと比較すると小さくなることがわかった。

図-13 は、雄メダカの f factor について、下水処理過程での変化を示したものである。f factor は流入下水で最も高く、活性汚泥処理で低減し、担体処理水ではほぼ 0 となった。図-14 は、*in vivo* 雄メダカ下水曝露実験での遺伝子発現レベルと

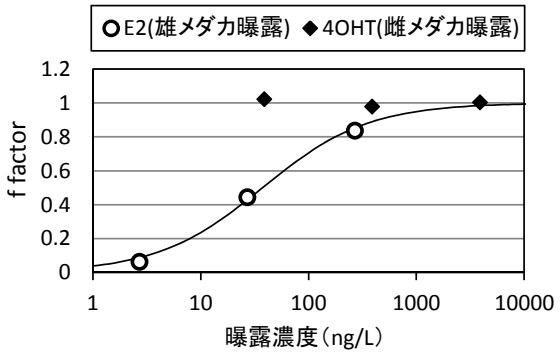


図-11　E2 および 4OHT 曝露区の f factor

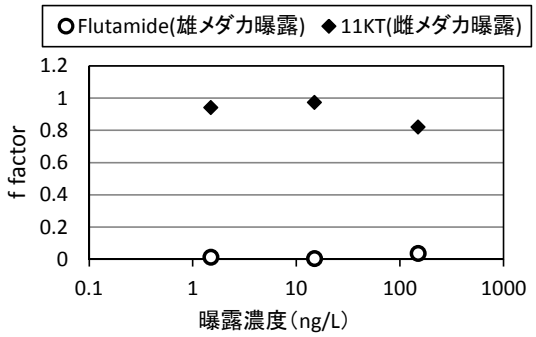


図-12　Flutamide および 11KT 曝露区の f factor

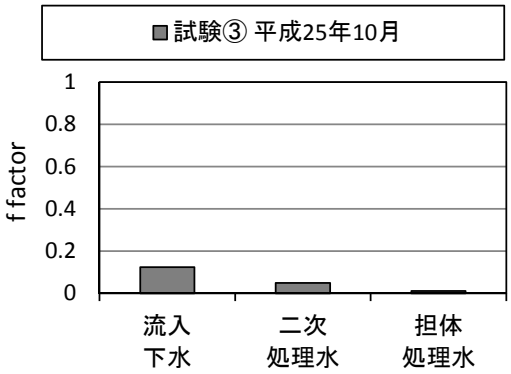


図-13　下水処理工程での雄メダカの f factor の変化

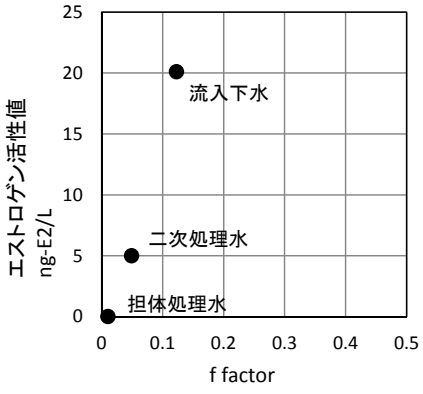


図-14　下水試料に曝露した雄メダカの f factor と、下水試料のエストロゲン活性値の関係

レポータージーンアッセイの反応の関係で、x 軸は f factor、y 軸は ERf レポータージーンアッセイでの転写活性の E2 換算値を表している。プロットは少ないものの、両者の関係は右肩上がりの関係がみられることから、メダカ曝露試験による下水処理水のエストロゲン作用の評価は、レポータージーンアッセイで代替できる可能性があった。ただし、今後、データを積み重ねて、検証してく必要がある。

5. おわりに

下水処理過程でのエストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性の流入実態と低減効果を明らかにするため、流入下水、活性汚泥二次処理水、微生物保持担体処理水中のこれらのホルモン様活性値を測定した。

その結果、流入下水では、エストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性が検出された。二次処理水では、エストロゲン様活性のみが微量であるが検出された。活性汚泥処理でエストロゲン、アンドロゲン、抗甲状腺ホルモン様活性は低減されることがわかったが、エストロゲン様活性は、活性汚泥処理後も残存する可能性があった。担体処理水は、エストロゲン様活性は検出されなかった。

各ホルモン物質、下水試料を用いたメダカ曝露試験による遺伝子発現解析を行った結果、雄メダカへのエストロゲン作用の評価は、レポータージーンアッセイで代替できる可能性があった。

参考文献

1) M. Ihara et. al. (2014), Environ. Sci. Technol., 48(11), 6366-6373.
2) Katsuyuki Kishi et. al., Expression analysis of sex-specific and 17-estradiol-responsive genes in the Japnese medaka, *Oryzias latipes*, using oligonucleotide microarrays, Genomics, 88, pp.241-251, 2006.

消毒副生成物の水環境中での挙動とその影響に関する研究

水質チーム　上 席 研 究 員　岡本誠一郎
総括主任研究員　小 森 行 也

１．はじめに

平成 24 年 5 月に利根川水系の浄水場で水道水質基準を上回るホルムアルデヒドが検出され、取水停止による断水が発生するという水質事故があった。この事故の原因は、ホルムアルデヒドが直接流出したのではなく、利根川の上流で流れ出した化学物質（ヘキサメチレンテトラミン：HMT）と浄水場の消毒用塩素が反応してホルムアルデヒドが生成し水道水質基準を超過したものと推定された[1)]。下水道における下水処理水の多くは塩素消毒した後、公共用水域へ放流されることから、ホルムアルデヒド前駆物質が下水処理水中に残存する場合、浄水処理の塩素消毒と同様にホルムアルデヒドが生成する可能性が否定できない。そのため、下水処理水のホルムアルデヒド生成能を把握する必要がある。

本研究の目的は、下水道で生成する可能性のあるホルムアルデヒド等の副生成物の放流先河川での挙動把握であるが、H27 年度は下水処理の塩素消毒におけるホルムアルデヒド生成の確認試験を行った。HMT を含む下水処理水の塩素消毒におけるホルムアルデヒド生成については処理水中に残存する NH_4-N 濃度と関係があり、NH_4-N 濃度が増すに従いホルムアルデヒド生成率が小さくなる傾向があることが報告[2)]されている。

H27 年度は、蒸留水を用い NH_4-N 濃度とホルムアルデヒド生成の関係把握を行うとともに、HMT を含む下水処理水を用い NH_4-N 共存下における消毒塩素濃度とホルムアルデヒド生成に関する実験を行なった。

２．実験方法

１）実験 1－NH_4-N 濃度とホルムアルデヒド生成の関係

蒸留水に NH_4Cl を添加し、NH_4-N 濃度を 0mg/L、5mg/L、15mg/L の 3 段階に調製した試験水を用い、NH_4-N 濃度とホルムアルデヒド生成の関係把握実験を行なった。試験水を恒温水槽で 20℃とした後、20℃恒温室で実験した。実験手順を以下に示す。

(1) 試料 500 mL に、HMT を 0.05mg/L、0.1mg/L、0.15mg/L、0.2mg/L、0.25mg/L の 5 段階に添加。
(2) 次亜塩素酸ナトリウム溶液を塩素濃度 4mg/L で添加。
(3) マグネチックスターラーを用い、30 分間 300rpm で攪拌。
(4) 残留塩素測定用試料を分取後、チオ硫酸ナトリウム溶液を添加。
(5) 上水試験方法 2011 年版「5.アルデヒド」の方法に従いホルムアルデヒドを GC/MS により測定。

２）実験 2－消毒塩素濃度とホルムアルデヒド生成の関係

硝化促進運転をしている活性汚泥処理実験装置の二次処理水を急速ろ過し、試験に用いた。急速ろ過水の水質は、BOD（1.0～2.4mg/L）、DOC（4.4～4.9mg/L）、NOx-N（9.2～11mg/L）、NH_4-N（0.1mg/L）であった。急速ろ過水に NH_4Cl を添加し NH_4-N 濃度を 15mg/L とした後、3 段階の異なる消毒塩素濃度（2mg/L、4mg/L、8mg/L）で実験を行なった。実験手順は実験 1 と同様とした。

３．実験結果

残留塩素測定結果を表-1、表-2、ホルムアルデヒド測定結果を図-1、図-2 に示す。 表-1 より、実験 1 の残留塩素は、NH_4-N 濃度 0mg/L では全塩素（Total ）の 70%以上が遊離塩素（Free）で存在していたが、NH_4-N 濃度 5mg/L、15mg/L では 97%以上が結合塩素であった。 次亜塩素酸ナトリウムは、水と反応し次亜塩素酸、次亜塩素酸イオンを形成し、殺菌効果を示すことが知られているが、水中に NH_4-N や有機性窒素が存在する場合には結

合塩素のクロラミンを形成[3]する。また、表-2 より、実験 2 の残留塩素は多くが結合塩素であり、Total の 95%以上を示した。本実験試料には NH_4-N が 15mg/L 程度存在することから、塩素添加 30 分後の残留塩素の多くはクロラミン等の結合塩素と考えられる。

図-1、図-2 より、実験 1、実験 2 とも HMT 濃度とホルムアルデヒド生成濃度に高い相関関係が確認できた。これらの関係から 1g の HMT から生成するホルムアルデヒドは実験 1 では、1.24g、1.32g、0.90g となった。

1 g の HMT は塩素と反応して理論上最大で 1.29 g のホルムアルデヒドを生成する。ホルムアルデヒド生成濃度／理論上生成するホルムアルデヒド濃度を「ホルムアルデヒド生成率」と定義すると、実験 1 のホルムアルデヒド生成率は、96%、100%、70%となり、NH_4-N 濃度が 5mg/L 以下では生成率がほぼ 100%であったが、NH_4-N 濃度が 15mg/L では生成率の低下が見られた。また、実験 2 では、1g の HMT から生成するホルムアルデヒドは 0.40g、0.40g、0.39 g となり、異なる消毒塩素濃度においてもホルムアルデヒド生成量に違いは見られず、ホルムアルデヒド生成率は消毒塩素濃度が異なるどのケースにおいても約 31%であった。

表-1　残留塩素測定結果（実験 1）

NH_4-N濃度	残留塩素	HMT濃度 (mg/L)					備考
		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	塩素注入率
0mg/L	Free	3.3	3.3	3.2	3.0	3.0	3.8
	Total	4.2	4.2	4.3	4.1	4.1	4.6
5mg/L	Free	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	3.9
	Total	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.7
15mg/L	Free	0.12	0.13	0.10	0.13	0.10	3.8
	Total	4.8	4.7	4.7	4.8	4.8	4.6

表-2　残留塩素測定結果（実験 2）

塩素濃度	残留塩素	HMT濃度 (mg/L)					備考
		0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	塩素注入率
2mg/L	Free	0.06	0.06	0.08	0.07	0.06	2.0
	Total	1.9	2.0	1.9	2.0	1.9	2.4
4mg/L	Free	0.15	0.17	0.14	0.17	0.16	3.8
	Total	4.3	4.4	4.2	4.3	4.4	4.6
8mg/L	Free	0.26	0.31	0.37	0.37	0.30	8.4
	Total	9.1	9.7	9.4	9.5	9.4	9.8

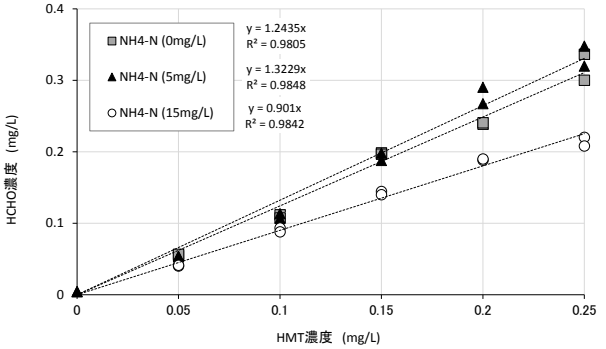


図-1　NH_4-N 濃度と HCHO 生成の関係（実験 1）

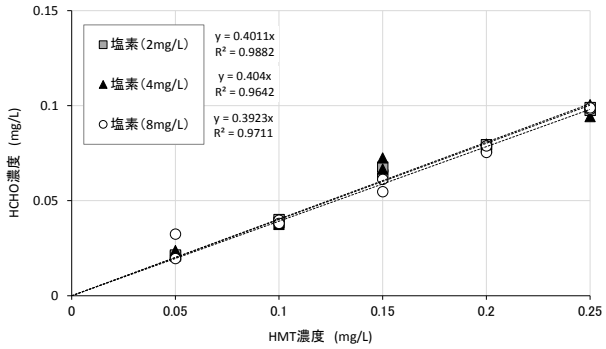


図-2　塩素濃度と HCHO 生成の関係（実験 2）

4．まとめ

蒸留水を用い NH_4-N 濃度とホルムアルデヒド生成率の関係をみたところ、NH_4-N 濃度が 5mg/L 以下ではホルムアルデヒド生成率は 95%以上であったが、NH_4-N 濃度が 15mg/L では生成率が 70%に低下した。

また、消毒塩素濃度とホルムアルデヒド生成率の関係について実験したところ消毒塩素濃度が異なるどのケースにおいても生成率は約 31%であった。今後は、放流先河川を想定した水路実験により水環境中でのホルムアルデヒドの挙動把握を行う。

「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) 小林　憲弘他、ホルムアルデヒド水質汚染の原因物質の特定に至る経緯と水道水中の未規制物質の管理における今後の課題、日本リスク研究学会誌 23(2)、pp.65-70(2013)
2) 小森行也 他、ヘキサメチレンテトラミン(HMT)を含む下水処理水の塩素消毒におけるホルムアルデヒドの生成、第 50 回日本水環境学会年会、p.562(2016)
3) 下水道維持管理指針-実務編-2014 年版、公益社団法人日本下水道協会、pp.662-672(2014)

河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と生体・生態影響評価

研究予算：運営交付金（一般勘定）
研究期間：平 26～平 27

水質チーム　上席研究員　岡本誠一郎
主任研究員　對馬　育夫
研　究　員　真野　浩行
中央大学　准教授　山村　寛（共同研究者）

【要旨】

近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノマテリアル生産量が増加し、これらのナノ成分による人の健康や生態系に与える影響が危惧されている。一方で、下水、河川・湖沼等におけるナノ物質の挙動については、国内外での研究事例は希有である。本研究では、（１）河川中に含まれる金属ナノ粒子の濃度の把握、（２）水中でナノ粒子のキャリアとして作用しうる溶存態有機物がヒト細胞および水生生物に与える影響および（３）下水処理過程におけるナノ粒子及び溶存態有機物の挙動を解明すべく、調査を実施した。その結果、平成 26 年度は、河川中に含まれる溶存有機物が毒性に影響していることを確かめた。平成 27 年度は、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査した。

キーワード：ナノ物質、下水処理場、挙動調査、水質分析

1. はじめに

河川や湖沼などの環境水中から様々な人間活動に由来する微量汚染物質が検出されており、これら成分による健康・生態リスクの把握および制御技術の開発が求められている。特に近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、ナノマテリアル生産量が増加し、ナノ成分による環境汚染が危惧されるようになっている[1]。ナノ粒子は 0.1 μm 以下の粒径を持つ成分全般を指し、炭素等の有機系とシリカや金・銀などの無機系に分類される。これらのナノ粒子は医療やエレクトロニクス分野、環境エネルギー分野において既に実用的に利用されており、製造工場や都市下水処理場から流出していることが過去の研究により報告されている[2]。また、全般的に、ナノ粒子は生態毒性が極めて高いことが明らかになっており、既存の微量汚染物質に加えて、注意を要する成分とされる[2-6]。

既往の研究では、あるナノ粒子成分に着目し、各浄水プロセスでの処理性や下水処理場内での挙動に着目した研究が多く見られる。それらの研究の多くは、ナノ粒子を添加し、その増減を調査しているが、自然環境中に存在するナノ粒子の形態と大きく異なるため、これらの研究により得られた結果では、実環境を反映していないことが予想される[5]。実環境下では、ナノ粒子の存在濃度が極めて低いことに加え、塩や有機・無機コロイドなどが存在することから、ナノ粒子の挙動解明は極めて難しいとされる。そのため、これまでに自然水中に存在するナノ粒子の挙動を検討した例は一例も存在しない。過去のラボ実験によるスパイク実験の結果から、自然水中でナノ粒子は、有機物の総称である Natural Organic Matter（NOM）と共存することで、安定化していると考えられている[4]。NOM は、広い分子量分布を示し、複雑な分子構造、かつ多くの官能基を有することから有機・無機物のキャリアとして機能する[7-10]。よって、ナノ粒子の自然界での挙動を明らかにするためには、ナノ粒子が共存しやすい NOM の粒径画分や有機物特性を明らかにする必要があると考える。

自然界に存在するナノ粒子の毒性について、既往の研究では、単独のナノ粒子による毒性評価に関する研究が多く見られる。一方で、2 種以上の微量汚染物質による

複合作用や夾雑物と微量汚染物質の相互作用により、毒性の強度や効果が変化することが Escher ら[11]の研究により明らかになっている。ナノ粒子は、自然環境水中で NOM と共存していることが予想されるため、ナノ粒子の毒性を評価するにあたっては、単独のナノ粒子ではなく、NOM と共存した状態で毒性を評価することが重要になると考える。

以上より、本研究では河川水中に含まれる微量なナノ粒子成分の定量・定性方法を確立し、これらのナノ粒子がヒト細胞および水生生物に与える影響を評価することおよび下水処理過程における溶存態有機物の挙動を把握することを目的とする。平成 26 年度は、利根川を対象として、河川水を濃縮することによるナノ粒子分析を実施した他、濃縮サンプルを用いた生体毒性試験および水生生物毒性評価試験を実施した。その結果、河川中に含まれる溶存態有機物が毒性に影響していることを示唆した[12]。平成 27 年度は、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、現在、生活用品にも広く利用される銀粒子に着目し、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査することで、銀粒子が下水処理場に流入した場合、下水処理過程で汚泥に移行するか検討した。

2. 実験方法

2.1 採水およびサンプルの調整

本調査は、処理区内に工場・事業場が比較的多く存在する下水処理場（標準活性汚泥法）を対象に行った。採取箇所は、流入原水、最初沈殿池出口、曝気槽槽内、最終沈殿池出口の 4 箇所とし、1 時間に 1 回 2 L を採水し、24 時間継続した。採水したサンプルは即時に、0.1 μm の PVDF 膜によりクロスフローろ過することで、バクテリアなどの懸濁成分を除去した後、コンポジットサンプルとした。

2.2 銀粒子添加試験

本実験では、下水処理水に含まれる有機物による銀粒子の粒径やゼータ電位の変化を把握するため、まずリファレンスとして、pH や電気伝導度が下水処理水と同様の銀粒子の標準液を作成した。1 L ビーカーに Milli Q を 1 L 入れ、スターラーを用いて 500 rpm で撹拌させながら、NaHCl, NaCl を添加していき、pH と電気伝導度が流入原水と類似になるように調整した。その結果、22.0℃で、電気伝導度; 1.672 S/m、pH; 7.51 となった。この溶液 100 mL に銀粒子（平均粒径 2.0-3.5 μm, 粉末状）を 1 g 添加して、500 rpm で撹拌しながら高出力ホモジナイザーで約 1 時間分散させ、これを標準液とした。

次に、0.1 μm の膜ろ過を行った各処理プロセスから採取した水を 200 mL ずつ三角フラスコに入れ、銀粒子の標準液を各 1 mL 添加し、スターラーを用いて 200 rpm で 2 時間撹拌した。その後、これらのサンプルと標準液の粒径とゼータ電位を測定した。

2.3 分析方法

水中に存在する金属の分析は ICP 質量分析計（ICP-MS）（X7CCT：サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて行った。水中の溶存態の金属を分析するため、前処理として、分析試料 50 mL に硝酸 1 mL を添加して加熱分解を行い、放冷させた後に孔径 4 μm のろ紙（定量ろ紙 No.5B：ADVANTEC）を用いてろ過した。

有機物を網羅的に高感度で分析するため、蛍光分光光度計（F-2700 形分光蛍光光度計：日立製作所）を用いて、3 次元励起蛍光スペクトルを分析した。励起・蛍光バンド幅は 5 nm に設定し、220 nm から 550 nm の範囲でスペクトルを取得した。また、有機物の二重結合の量を推定するため、紫外可視分光光度計（UV-1800：島津製作所）を用いて UV_{254} の測定を行い、有機物の構造を推定するため、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）（IRAffinity-1：島津製作所）を用いて測定を行った。さらに、不揮発性有機炭素（NPOC）と全窒素（TN）を TOC-L（島津製作所）を用いて分析した。

ゼータ電位分布及び粒径分布はゼータ電位・粒径分布測定装置（ZEECOM ZC-3000：マイクロテック・ニチオン社）を用いて測定した。今回は粒径が μm レベルの粒子を中心に測定することが目的だったので、LED 散乱光を用いて測定した。カウント粒子数は、測定用セルの前の静止層および後ろの静止層から 100 個ずつ、合計 200 個カウントした。ただし、他の粒子と比較して明らかな外れ値だと判断したものは、その粒子を分析から除外した。

3. 結果と考察

3.1 水質分析

各処理工程から得られたサンプルの不揮発性炭素(NPOC)濃度および全窒素(TN)濃度を**図 1** に示す。下水処理過程において、NPOC は、最終沈殿池に至るまでに減少し、最終沈殿池ではほとんど減少していなかった。また、TN は処理過程全体を通して若干減少しているのみであった。254 nm の波長で計測した UV_{254} を**図 2** に示す。254 nm の波長での吸光度と芳香族化合物の濃度には一定の正の相関がある[13]。**図 2** より、最初沈殿池から曝気槽にかけて、吸光度が減少していることから、サンプル内の

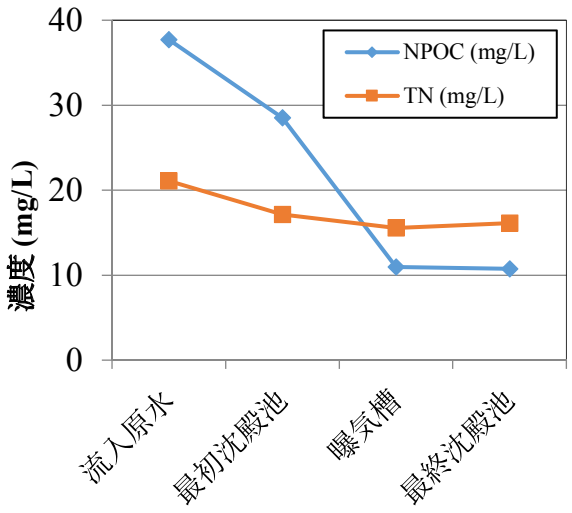


図 1　各処理過程における NPOC および TN 濃度

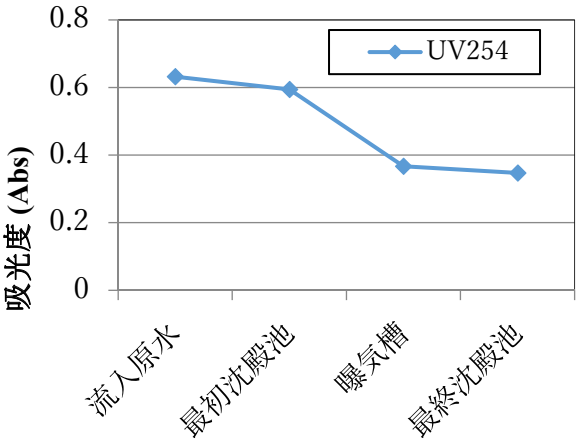


図 2　各処理過程における吸光度 (UV_{254})

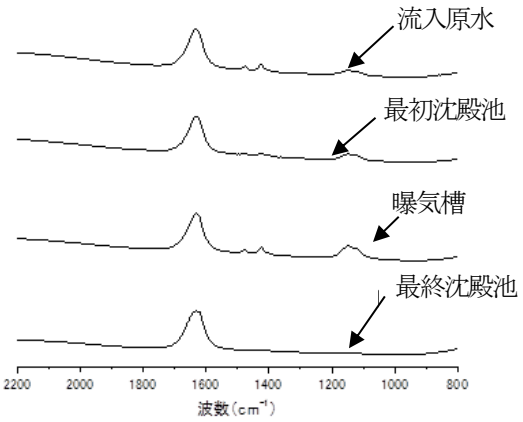


図 3　各処理過程における FT-IR 計測結果

芳香族化合物の濃度が多く減少している可能性が考えられる。FT-IR の結果を**図 3** に示す。1,600~1,700 cm^{-1} のレンジでピークが検出されることから、COO-または C=C 結合を有する有機物が主要であったことが推定できる。蛍光分光計で測定した三次元励起蛍光マトリクスを**図 4** に示す。その結果、下水処理過程において、芳香族化合物を持つタンパク質(トリプトファン様成分)のピークが減少した。また、フミン酸に起因するピークが少しずつ増加した。各処理工程の金属濃度を ICP-MS で計測した結果を**表 1** に示す。採取した水には、様々な金属が入っていることが確認でき、一部の金属を除いて、処理が進むと濃度が減少していることから、汚泥に移行していることが推察される。しかしながら、銀に関しては、流入原水においても定量下限未満だったことから、本研究で対象にした下水処理場には銀ナノ粒子はほとんど流入していないと考えられる。

3.2 銀粒子の挙動解析

本研究で対象とした下水処理場において、銀が検出されなかったため、銀が下水処理場に流入した場合を想定し、各工程から採取した水に銀粒子を添加することにより、その挙動を把握した。標準液および銀粒子を添加した下水処理サンプル（流入下水、最初沈殿池、曝気槽、最終沈殿池）の粒径およびゼータ電位を**図 5**、**図 6** に示す。最終沈殿池から採取した水に銀粒子標準液を添加した系では、銀粒子の粒径が大きくなっていることがわかる。また、ゼータ電位の絶対値は、流入原水、最初沈殿池からの系より、小さくなっていた。ゼータ電位の減少は、処理工程を経ることにより水質が変化し、銀粒子が凝集し易くなったと考えることができる。最終沈殿池からの系において添加された銀粒子は、フミン質等の有機物と結合することにより、表面電位が大きく変化し、凝集していた可能性が考えられる。

標準液に含まれる銀粒子と下水処理水に添加した場合の銀粒子の粒径に有意な差があるかどうか確認するため Mann-Whitney の U 検定を行った（**表 2** および**表 3**）。**表 3** の最初沈殿池以外の値が 0.05 未満であり、銀粒子を添加したことによる粒径の変化およびゼータ電位の変化は最初沈殿池を除き統計的に有意であることが確認できた。また、最初沈殿池の粒径も、効果量の計算から、測定に用いるサンプル数を増やすことによって、有意であることが確認できる可能性が高いと考えられる[14]。

以上のことより、下水処理場に銀粒子が流入する場合、処理過程で凝集しやすい形態に変化し、汚泥に移行することが示唆された。

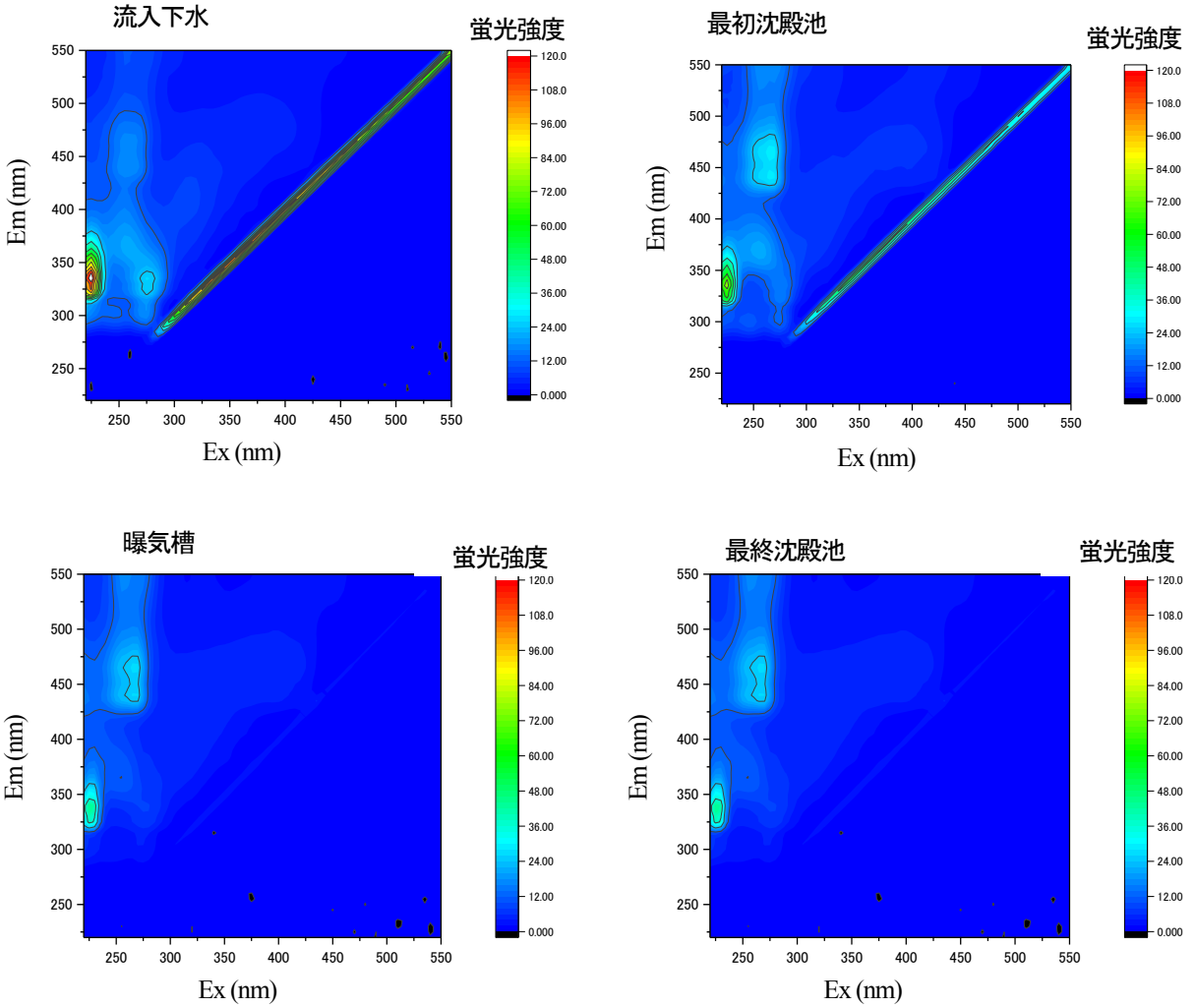


図 4　各処理過程における 3 次元励起蛍光スペクトル強度変化

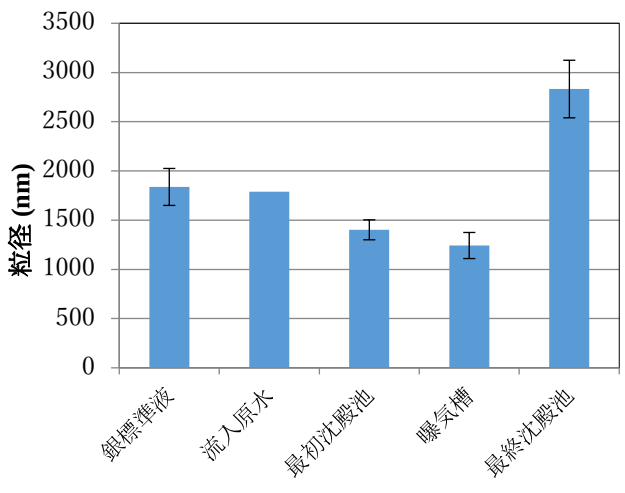


図 5 各サンプルにおける銀粒子の粒径の変化

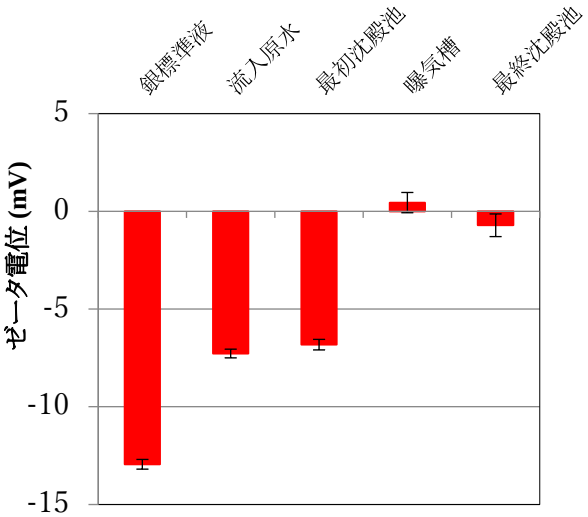


図 6 各サンプルにおけるゼータ電位の変化

表１　各処理過程の排水に含まれていた金属

試料名	①流入下水	②初沈流出水	③反応槽	④終沈流出水
Li	72.07	71.90	69.24	68.16
Be	0.00	0.00	0.00	0.00
B	248.94	156.09	163.04	163.57
Al	180.05	165.85	11.45	9.93
V	77.06	79.34	100.97	77.09
Cr	3.19	1.26	0.66	0.63
Mn	189.67	208.97	218.33	221.62
Fe	53.40	21.59	25.81	17.82
Co	6.99	6.36	6.49	6.64
Ni	396.19	387.15	421.02	429.57
Cu	6.59	8.13	3.63	2.91
Zn	23.70	21.23	22.29	27.67
As	10.05	9.94	10.19	9.68
Se	37.14	39.08	36.97	36.68
Sr	3,070.38	2,802.07	2,744.72	2,689.49
Mo	26.13	24.91	23.46	23.78
Ag	0.03	0.05	0.01	0.01
Cd	1.40	0.81	1.47	0.87
In	0.02	0.02	0.01	0.01
Sn	0.53	0.41	0.32	0.26
Sb	2.21	1.80	1.69	1.69
Te	0.71	0.50	0.53	0.36
Ba	71.33	69.14	59.86	61.23
Tl	0.13	0.07	0.04	0.01
Pb	0.11	0.15	0.14	0.37

単位は全て μg/L、灰色の箇所:定量下限未満

表２　各サンプルにおける銀粒子の粒径の変化に対する Mann-Whitney の U 検定結果

	対応サンプルの差					Mann-Whitney の U	Z	漸近有意確率（両側）
	平均値 (nm)	標準偏差	平均値の標準誤差	差の 95%信頼区間				
				下限	上限			
Reference-最初沈殿池	435.9	3019	214.0	13.81	854.0	1.980 ×10⁴	-0.084	0.933
Reference-曝気槽	595.2	3245	230.0	141.5	1049	1.651 ×10⁴	-2.941	0.003
Reference-最終沈殿池	-983.3	5204	368.0	-1709	-257.7	1.701 ×10⁴	-2.584	0.010

表 3　各サンプルにおけるゼータ電位の変化に対する Mann-Whitney の U 検定結果

	対応サンプルの差					Mann-Whitney の U	Z	漸近有意確率（両側）
	平均値 (mV)	標準偏差	平均値の標準誤差	差の 95%信頼区間				
				下限	上限			
Reference-流入原水	-5.666	4.792	0.3389	-6.334	-4.998	3884	-13.940	<0.001
Reference-最初沈殿池	-6.120	5.039	0.3563	-6.822	-5.417	4582	-13.337	<0.001
Reference-曝気槽	-13.39	8.040	0.5684	14.51	-12.26	545.0	-16.828	<0.001
Reference-最終沈殿池	-12.23	8.983	0.6352	-13.48	-10.98	942.0	-16.485	<0.001

表 4　各サンプルにおける粒径およびゼータ電位の変化に対する効果量算出結果

種類	ゼータ電位分布の効果量	粒径分布の効果量
Reference-流入原水	-0.70（効果量大）	—
Reference-最初沈殿池	-0.67（効果量大）	-0.01（効果量小）
Reference-曝気槽	-0.84（効果量大）	-0.15（効果量小）
Reference-最終沈殿池	-0.83（効果量大）	-0.13（効果量小）

4. まとめ

本研究では、実下水処理場における溶存態物質の実態調査をするとともに、各処理工程から採取した水に銀粒子を添加し、その挙動を調査した。その結果、以下の知見が得られた。

・本研究で対象とした下水処理水では、銀ナノ粒子はほとんど含まれないことが明らかとなった。

・最終沈殿池から採取した水に銀粒子を添加した系では、最初沈殿池からの水に添加した系より、添加された銀粒子の粒径は大きく、ゼータ電位の絶対値は小さくなっていた。

・下水処理場に銀粒子が流入した場合でも、処理過程で凝集し、汚泥に移行することが示唆された。

今後は、下水や公共用水域に含まれるナノ物質の検出方法の構築を目指すとともに、公共用水域でのナノ物質のモニタリングを通して実態把握を行い、今後の水環境におけるナノ物質の影響について検討する必要がある。

参考文献

[1] S. Bakand, A. Hayes, F. Dechsakulthorn, Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure, Inhal Toxicol, 24 (2012) 125-135.

[2] K. Donaldson, C.A. Poland, Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity, Curr Opin Biotech, 24 (2013) 724-734.

[3] T. Walser, D. Meyer, W. Fransman, H. Buist, E. Kuijpers, D. Brouwer, Life-cycle assessment framework for indoor emissions of synthetic nanoparticles, J Nanopart Res, 17 (2015).

[4] S.J. Lin, A.A. Taylor, Z.X. Ji, C.H. Chang, N.M. Kinsinger, W. Ueng, S.L. Walker, A.E. Nel, Understanding the Transformation, Speciation, and Hazard Potential of Copper Particles in a Model Septic Tank System Using Zebrafish to Monitor the Effluent, Acs Nano, 9 (2015) 2038-2048.

[5] N.C. Mueller, B. Nowack, Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment, Environ Sci Technol, 42 (2008) 4447-4453.

[6] B. Reidy, A. Haase, A. Luch, K.A. Dawson, I. Lynch, Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications, Materials, 6 (2013) 2295-2350.

[7] V.K. Sharma, Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment-A Review, J Environ Sci Heal A, 44 (2009) 1485-1495.

[8] A.J. Pelley, N. Tufenkji, Effect of particle size and natural organic matter on the migration of nano- and microscale latex particles in saturated porous media, J Colloid Interf Sci, 321 (2008) 74-83.

[9] D.H. Lin, J. Ji, Z.F. Long, K. Yang, F.C. Wu, The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO_2 nanoparticles to Chlorella sp., Water Res, 46 (2012) 4477-4487.

[10] T. Hiemstra, J. Antelo, R. Rahnemaie, W.H. van Riemsdijk, Nanoparticles in natural systems I: The effective reactive surface area of the natural oxide fraction in field samples, Geochim Cosmochim Ac, 74 (2010) 41-58.

[11] B.I. Escher, K. Fenner, Recent Advances in Environmental Risk Assessment of Transformation Products, Environ Sci Technol, 45 (2011) 3835-3847.

[12] 山村寛、原宏江、對馬育夫、真野浩行、岡本誠一郎：河川水における溶存態有機物の粒径画分の特性解析と生体・生態影響評価、第 43 回関東支部技術研究発表会 (2016)

[13] Juan L. Acero, F. Javier Benitez, Francisco J. Real, Fernando Teva, Micropollutants removal from retentates generated in ultrafiltration and nanofiltration treatments of municipal secondary effluents by means of coagulation, oxidation, and adsorption processes, Chemical Engineering Journal 289 (2016) 48–58

[14] 水本篤、竹内理：効果量と検定力分析入門 - 統計的検定を正しく使うために - 、より良い外国語教育研究のための方法 外国語教育メディア学会（LET）関西支部　メソドロジー研究部会　2010 年度報告論集

下水処理水が両生類の変態に及ぼす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 26～平 28
担当チーム：水環境研究グループ（水質）
研究担当者：岡本誠一郎、北村友一

【要旨】
アフリカツメガエルのオタマジャシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺への影響について調査した。その結果、下水処理曝露区で変態遅延の傾向がみられたものの、変態後の生殖腺組織観察では異常はみられなかった。下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす深刻な影響はないと考えられた。

キーワード：アフリカツメカエル、変態、下水処理水

1. はじめに

生体の内分泌をかく乱する化学物質は内分泌かく乱化学物質(Endocrine disrupting chemicals; EDCs)と呼ばれ、EDCs による水質汚濁は、健全な水生生態系維持に悪影響を与える問題として認識されている。たとえば、英国では下水放流水に女性ホルモンや女性ホルモン様物質が残存し､河川水による希釈が望めない場合、魚の性ホルモン作用がかく乱され、雄魚で雌特有のタンパク質の産生や精巣に卵母細胞が形成されることが報告されている[1)]。

近年、水中の微量化学物質の分析技術の進展も相まって、医薬品等の生理活性物質の中には下水放流水中での検出が報告されている物質がある[2)]。公共用水域に到達した生理活性物質は、EDCs として水生生物の存続に影響を与える可能性が否定できない。我が国は世界的に見て医薬品等の生理活性物質の使用量が比較的多い[3)]といわれており、今後、高齢化に伴い医薬品の使用量が増加する可能性もあることから、これらの生理活性物質が公共用水域の水生生態系に影響を及ぼすことが懸念される。

これまで EDCs が水生生物に与える影響は、現実に水系で起こった現象を踏まえ、主に、魚類を対象とした性ホルモンのかく乱作用が研究されてきた[1)]。一方、生物体内では恒常性維持のため、様々なホルモンが絶妙にコントロールされ分泌されており、EDCs の女性ホルモン作用以外のホルモンかく乱影響については未解明な点が多い。

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水が様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価することが必要である。

両生類であるカエルは環境中で変態（オタマジャクシがカエルになること）し、その後、性成熟（精巣や卵巣の発達）する。この変態と性成熟を指標とすることにより、2 種類のホルモンかく乱影響の評価が可能であり、カエルはホルモンかく乱作用を検出できる優れた試験生物の一つである。2015 年には OECD（経済協力開発機構）からカエルの成長と発達を指標とする化学物質のホルモンかく乱作用等を評価する試験法[4)]が公表され、カエルに対する EDCs の影響解明が期待されている。

下水放流水がカエルに与える影響は未解明であり、その実態把握も重要と考えられることから、下水処理水がオタマジャクシの変態や生殖腺に与える影響を把握するため、実下水処理水を用いたオタマジャクシの長期間曝露実験を行った。

2. 実験方法

実際の下水処理水に孵化後のオタマジャシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、下水処理水中で飼育し、オタマジャクシの変態への影響と生殖腺組織の変化を評価する実験を行った。

実験方法は以下のとおりである。

2.1　供試オタマジャクシ

本実験では、浜松生物教材から購入したアフリカツメガエルを、人工的に交尾・産卵させ試験に供するオタマジャクシを得た。交尾・産卵の手順は以下のとお

りである。プラスチック製コンテナ 70L に、カゴ(コンテナ内に丁度収まる程度の大きさ)を合わせて底を 2 重にした水槽を用意した。これに卵を包んでいるゼリーが水槽の壁へ付着するのを防ぐため、0.2% NaCl の水を水槽の 7 分目まで入れ、さらに、カゴの外からエアーポンプで十分にエアレーションをおこなった。1ml の注射器でカエルの背部リンパ嚢にヒト胎盤性 gonadotorophin (1,000u/mL)を雄には 250 μL、雌には 500 μL を投与し、プラスチックコンテナに一晩入れた。翌日、産卵した卵を駒込ピペットで回収し、卵を包むゼリー状物質の除去は行わず、脱塩素水道水の流水式水槽に移し、孵化後 2～3 日のオタマジャクシを下水処理水曝露試験に供した。

2.2 下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽

下水処理実験装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要を図-1 に示す。下水処理実験装置は、最初沈殿池 (500L)、生物反応槽 (500L×4 槽)、最終沈殿池 (700L) から構成されている。

流入下水は、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、標準活性汚泥法による処理を行った。水理学的滞留時間(HRT)は、7 時間となるように流入水量を制御した。二次処理水は砂ろ過を行い、砂ろ過水をオタマジャクシの曝露水とした。オタマジャクシの曝露は流水式とし、水槽は 10L、1 水槽とし、2.1 に記したオタマジャクシを 50 匹投入した。対照区として脱塩素水道水曝露区を設置した。

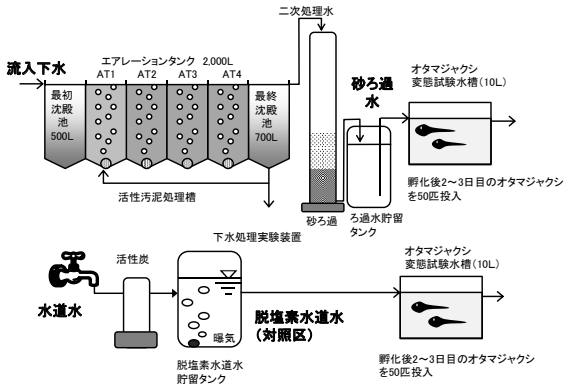


図-1 下水処理装置とオタマジャクシ曝露水槽の概要

2.3 オタマジャクシの飼育と変態の観察

オタマジャクシの曝露条件は、水温：23℃、明暗周期：明期 16h, 暗期 8h、給餌：1 日 1 回オタマジャクシ用餌（浜松生物教材）を給餌した。オタマジャクシの変態観察は、変態が始まった頃から 1 匹ずつ P.D.Nieuwkoop and J.Faber の発達ステージ表[5]と比較し、発達ステージを目視判定し記録した。

2.4 水質分析

曝露期間中の水質の安定性を把握するため、各曝露水槽の水温、pH、DO、EC、DOC、NH_4-N、NO_3-N の分析を週 1 回行った。

2.5 遺伝子レベルでの性決定の方法

全曝露期間は 6 か月弱となり、各曝露水でカエルに変態した後、生残した対照区 7 個体、下水処理水曝露区 19 個体について、遺伝子レベルでの性の決定と生殖腺組織の観察を行った。

各個体は、0.02% MS222 (3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩) を入れたビーカーに 1 個体ずつ投入し、動きが止まるまで静置して麻酔をかけた。指先をメスで切除し、DNA 分析用の被験試料とし、分析に供するまで-80℃で冷凍保存した。DNA 分析用の各被験試料に 10 mg/mL プロテイナーゼK を 2 μL、PCR バッファー(10×HS buffer)を 2.5 μL、滅菌した超純水を 22 μL 加え、56℃で 60 分、95℃で 3 分インキュベートした後、滅菌した超純水 50 μL を加え、PCR 反応用の鋳型 DNA 溶液とした。

遺伝子レベルでの性決定のために用いた PCR プライマー配列を表-1 に示した。遺伝子レベルでの性決定は、常染色体上遺伝子である DMRT1 遺伝子および雌の W 染色体上遺伝子である DM-W 遺伝子を性判別用マーカーとしている。遺伝子レベルでの性の判定は、DMRT1 遺伝子 (203 bp) のバンドのみが確認された個体は遺伝的な雄、DMRT1 遺伝子および DM-W 遺伝子 (259 bp) 両方のバンドが確認された個体は遺伝的な雌と判定される[4]。

表-1 PCR プライマーの配列[4]

Target gene	Primer sequence
DMRT1	
Forward	: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'
Reverse	: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'
DM-W	
Forward	: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'
Reverse	: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

PCR 反応用の鋳型 DNA 溶液を 0.5 μL、TaKaRa Ex Taq(HS)を 0.1 μL、各プライマーを 0.2 μL ずつ、2.5 mM dNTP を 0.8 μL、10×HS buffer を 1 μL、滅菌し

た超純水を6.8 μL混合し、以下の条件でサーマルサイクラーを用いてPCRを実施した。

(step 1)	94℃	2 min
(step 2)	94℃	30 sec
(step 3)	62.5℃	30 sec
(step 4)	72℃	10 sec
(step 2−4: 40 cycles)		
(step 5)	72℃	5 min

PCRで得られた増幅産物は、ローディングdyeと混和後、3%のアガロースゲルで電気泳動(100 V、60 分)を行い、その後、SYBR Goldで染色し、UV照射下でバンドの有無を確認した。

2.6 生殖腺組織観察の方法

各個体を0.02% MS222（3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩）で麻酔後、解剖用はさみを用いて開腹した。生殖腺と生殖腺に近く除去の難しい腎臓と脾臓は残し、他の不要な臓器は除去して生殖腺を露出させ、表現型の観察および生殖腺の組織標本作成に供した。

表現型の性は、露出した生殖腺を肉眼で観察し、形状から精巣と判断された試料の表現型を雄、卵巣と判断された試料の表現型を雌とした。

生殖腺の組織切片の作成法は以下のとおりである。生殖腺を含む頭部から胴体部分をDavidson液に72時間浸漬し、その後、固定液を10%中性緩衝ホルマリン溶液に置換して、生殖腺組織を固定した。

試料中の骨、軟骨組織を柔らかくするために、次の脱灰処理をした。10%中性緩衝ホルマリンに保存した試料をイオン交換水で水洗後、10%ギ酸に入れ、24時間静置した。その後、試料を70%エタノールで洗浄後、同液に入れ保存した。

すべての試料について、メスを用いて脾臓より上部を切除した。その後、図-2に示すようにトリミングした。背骨に対して垂直に生殖腺の中央部を切断し、試料を頭部側（以降、前半部とする）と肛門側（以降、後半部とする）に二分した。ただし、生殖腺が小さい試料は、中央部の切断を行わずに組織標本作製に供した。また、左右の生殖腺の大きさや位置が異なっている試料は、左右どちらかの生殖腺の中央を切断した。トリミングした各試料は、パラフィン包埋に供するまで70%エタノールに入れて保存した。

トリミングした各試料は、表-2に示す手順で、脱水、透徹および溶融パラフィンの浸透処理を施した。60℃

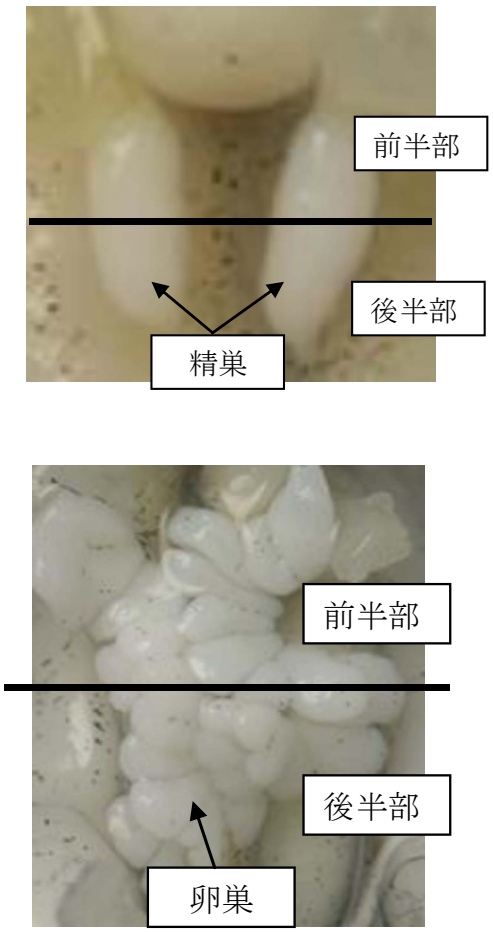


図-2 生殖腺の切断個所

で溶融させたパラフィンを金枠に流し入れ、金枠に試料を投入し、室温で表面が硬化するまで静置した。その後、冷水に金枠ごと投入し、完全にパラフィンを硬化させパラフィンブロックとした。

各試料を包埋したパラフィンブロックは、生殖腺中央切断面側から腎臓が露出するまでパラフィンを荒削りしてから、ミクロトーム(PR-50)を用いて薄切した。試料は、背骨と垂直となる面を、生殖腺中央部の切断面側から生殖腺の端部に向かって、8 μmで薄切した。各試料の前半部において生殖腺中央部および前半部中央の2か所から、後半部において後半部中央の1か所から、計3か所の切片を取得した。作製した各切片は、適量のイオン交換水を載せたスライドグラス（MATSUNAMI MICRO SLIDE GLASS S7214、松浪硝子工業株式会社）に載せ、43℃のホットプレート上で切片を伸展させてから、イオン交換水を除きスライドグラスに添付した。切片を添付したスライドグラスは、ホットプレート上で1晩おいて完全に風乾させてから染色に供した。

スライドグラスに添付した切片は、表-3に示す手順

表-2　パラフィン包埋の工程

Process (reagent)			温度	処理時間
(1)	90% ethanol		RT*3	12 hr
(2)	Ethanol (>99.5%)	(1st)	RT	60 min
(3)	Ethanol (>99.5%)	(2nd)	RT	60 min
(4)	Absolute ethanol *1		RT	60 min
(5)	Hemo-Clear *2	(1st)	RT	3 min
(6)	Hemo-Clear	(2nd)	RT	50 min
(7)	Hemo-Clear	(3rd)	RT	50 min
(8)	Paraffin Wax II60	(1st)	60℃	60 min
(9)	Paraffin Wax II60	(2nd)	60℃	60 min
(10)	Paraffin Wax II60	(3rd)	60℃	12 hr
(11)	包埋			

*1　Ethanol (99.5%)を合成ゼオライト A-3（和光純薬工業）で脱水処理したもの

*2　Absolute Ethanol を Hemo-Clear で洗浄する工程

*3　RT; 室温

表-3　染色の工程

Process（reagent）			処理時間
(1)	Xylene	(1st)	2 min
(2)	Xylene	(2nd)	2 min
(3)	Xylene	(3rd)	2 min
(4)	Ethanol (>99.5%)	(1st)	1 min
(5)	Ethanol (>99.5%)	(2nd)	1 min
(6)	80% ethanol		1 min
(7)	50% ethanol		1 min
(8)	Deionized water	(1st)	3 seconds
(9)	Deionized water	(2nd)	1 min
(10)	Mayer's hemalum solution		3 min
(11)	Deionized water		3 seconds
(12)	Tap water *1		10 min
(13)	Deionized water		1 min
(14)	1% Eosin Y solution		4 min
(15)	90% ethanol		1 min
(16)	Ethanol (>99.5%)	(1st)	1 min
(17)	Ethanol (>99.5%)	(2nd)	1 min
(18)	Ethanol (>99.5%)	(3rd)	1 min
(19)	Xylene	(1st)	3 min
(20)	Xylene	(2nd)	3 min
(21)	Xylene	(3rd)	3 min
(22)	Coverslipping		

*1　縦 24 cm×横 32 cm×高さ 11 cm の平型バットに水道水を水深 5.5 cm となるように入れ、スターラーバーにより流水を生じさせてスライドガラスを洗浄する。

で、脱パラフィンおよびヘマトキシリン・エオシンの二重染色を施した後、封入剤 (Entellan new) を滴下し、カバーグラス(NEO MICRO COVER GLASS, 24x60mm、MATSUNAMI GLASS IND.,LTD.)で封入した。

OECD ガイダンス文書「Histopathology Guidance Document for the Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), (2015)」[6]の生殖腺組織観察の評価基準に従い、各試料の生殖腺組織標本を評価した。

3. 実験結果

3.1　曝露水質分析の結果

曝露水の各水質項目の分析結果を図-3 に示す。水温は下水処理水曝露区、対照区とも概ね 23℃に維持されていた。pH、DO は対照区が高めとなっていた。活性汚泥処理が硝化抑制運転となっていたため、下水処理水曝露区の NH_4-N が高かった。雨の影響や流入下水ポンプの故障により性状が変動することがあったが、下水処理水の水質は概ね安定していた。

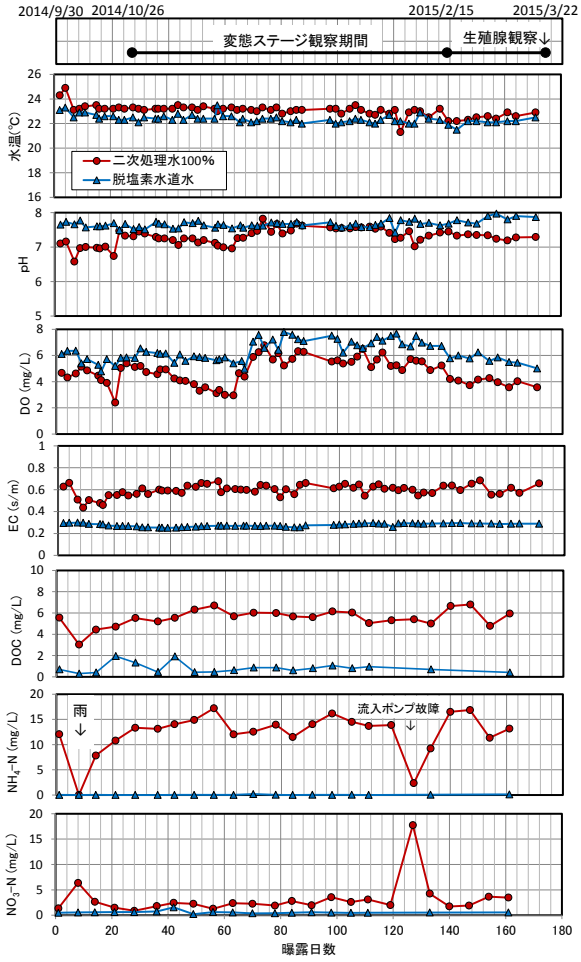


図-3　オタマジャクシ曝露水槽の水質

3.2　オタマジャクシの変態試験の結果

図-4 に、本実験の変態観察時に撮影した、各発達ステージの代表的な写真を示す。P.D.Nieuwkoop and J.Faber のアフリカツメガエルの発達ステージ表[5]と比較し、ステージ番号を付記した。P.D.Nieuwkoop and J.Faber らの発達ステージ表によると 46 ステージから後ろ足が出始め、66 ステージで変態が完了する。

対照区と下水処理水曝露区のオタマジャクシの 46 ステージ以降の変態の進行結果を図-5 に示す。図には各水槽の生残率も合わせて示した。

下水処理水曝露区で変態中に死亡する個体がみられたが、対照区でもみられており、死亡の原因は下水処理水に起因するものではないと考えられる。

下水処理水曝露区は、対照区よりオタマジャクシの成長が早く、変態が始まる時期が早くなった。一方で、変態に要する時間は、中央値でみると対照区では約 20 日、下水処理曝露区で約 60 日となり、下水処理水曝露区で変態遅延の傾向がみられた。ただし、図-5 で示し

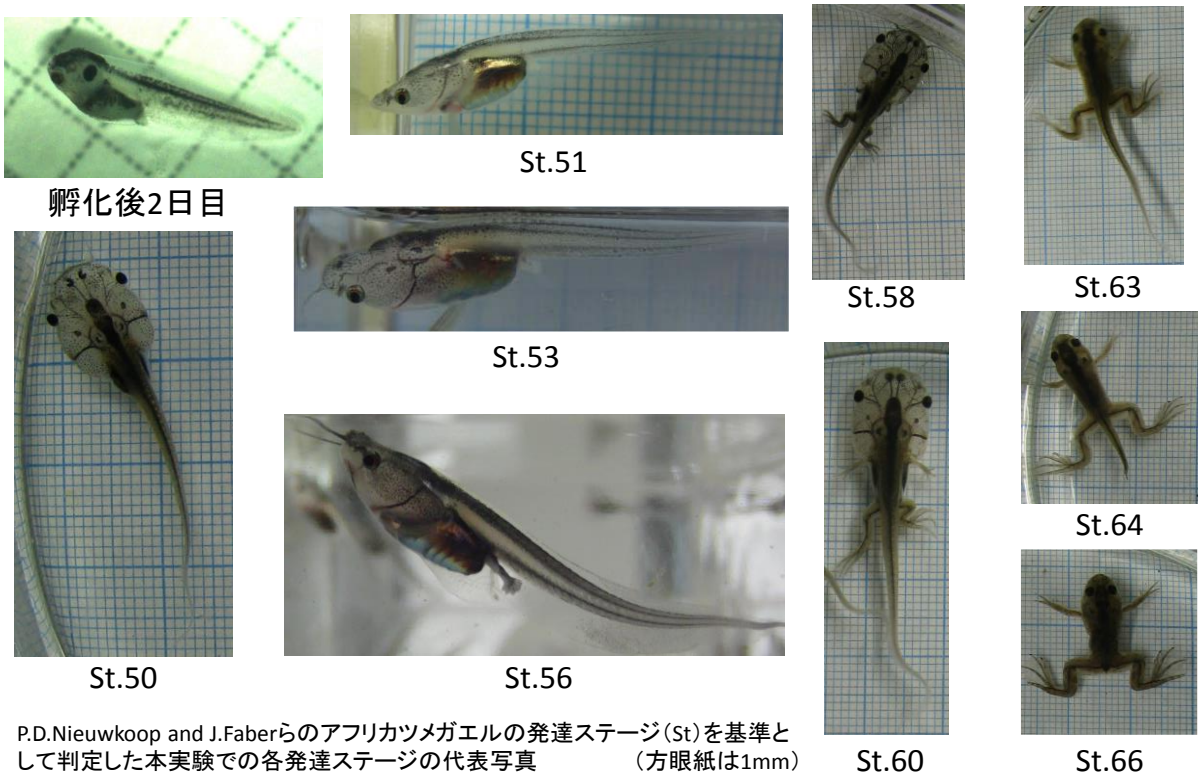


図-4 アフリカツメガエルの各発達ステージの代表写真

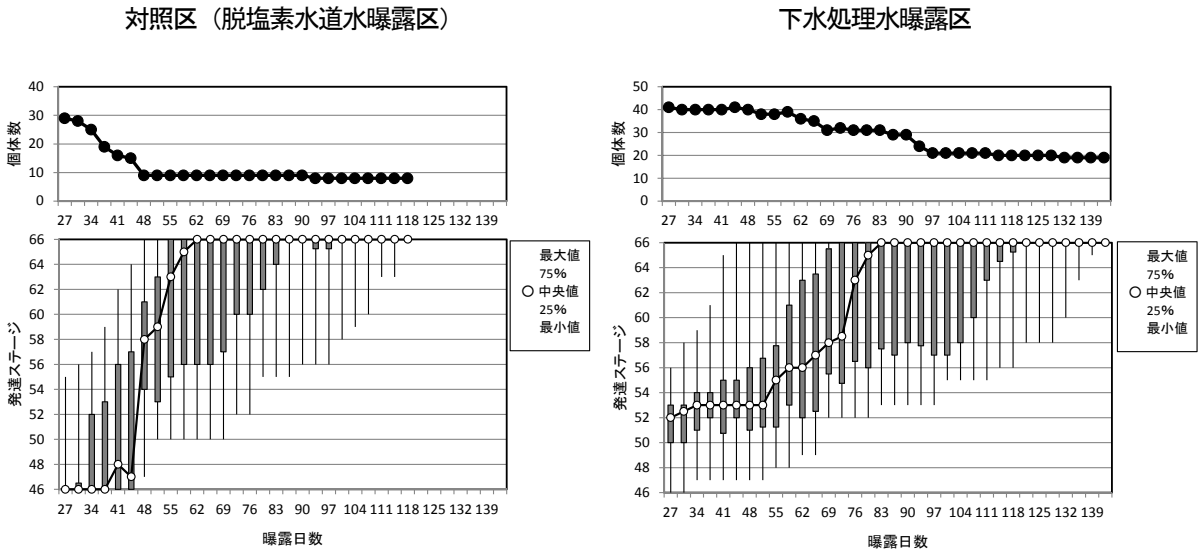
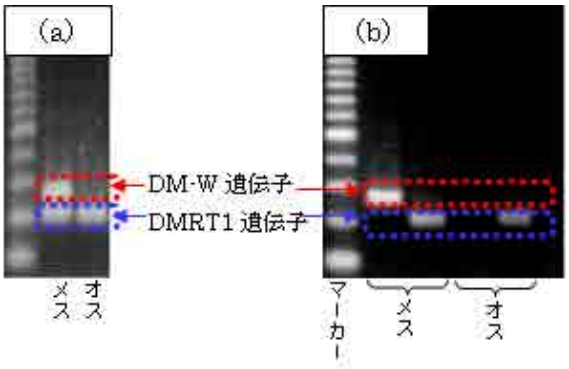


図-5　対照区と下水処理水曝露区の変態期間の生残率と変態ステージの経日変化

た試験結果では変態ステージの個体差が大きかったことから、下水処理水がオタマジャクシの変態速度に与える影響については、再実験による検証が必要と考えられる。再実験に当たっては、飼育密度の均一化や各個体の発達ステージが同調する近交系のカエルの使用など、実験条件の見直しも必要と考えられた。

3.3　変態後のカエルの雌雄の判定結果

図-6 にPCR 試料の電気泳動のバンドの一例を示す。下水処理水曝露区の試料については、1 つの試料につき 1 つのレーン (1 列) に DMRT1 遺伝子および DM-W 遺伝子の2種類のプライマーを用いてPCR を実施した（図-6 (a)）。対照区の試料については、DMRT1 および DM-W のバンドが不鮮明であったため、DMRT1 遺伝子のプライマーを用いて PCR を実施した試料を 1 つのレーンに、DM-W 遺伝子のプライマーを用いて PCR を実施した試料をもう 1 つのレーンに添加して電気泳動させた（図-6 (b)）。



-

図-6 電気泳動した試料のバンドの一例

その結果、対照区 7 個体のうち、遺伝的雄は 3 個体、遺伝的雌は 4 個体で、性比（雄 / 雌）は 0.75、下水処理水曝露区 19 個体のうち、遺伝的な雄は 11 個体、遺伝的な雌は 8 個体で、性比（雄 / 雌）は 1.38 であった。

3.4 生殖腺組織観察の結果

対照区と下水処理水曝露区の雄と雌の代表的な生殖腺の外観およびその組織標本像の図-7, 8 に示す。

対照区、下水処理水曝露区とも生殖腺の表現型から判定した雌雄と、遺伝的な雌雄は、すべての検体において一致していた。また、精巣における精巣卵や、卵巣における精巣の構成要素などは確認されなかった。精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理水曝露区との間に顕著な差は見られなかった。

4. おわりに

健全な水生生態系を維持するためには、下水放流水が、様々な水生生物に与える影響について現況を把握し、評価する必要がある。海外ではすでにその影響が顕在化しているホルモンかく乱影響も、その科学的な知見の集積が必要な水質問題の一つである。ホルモンかく乱影響を検出できる優れた試験生物であるカエルを対象とし、アフリカツメガエルのオタマジャシがカエルに変態し、性成熟するまでの間、実下水処理水中で飼育し、変態と生殖腺組織への影響について調査した。

その結果、下水処理水に曝露したオタマジャクシは変態が始まる時期が対照区より早くなった。一方で、変態にかかる時間は、下水処理水曝露区の方がより長時間を要する傾向がみられた。

対照区と下水処理水曝露区の変態後のカエルの遺伝子レベルでの雌雄と、生殖腺観察から判定した雌雄は、すべての個体において一致し、精巣と卵巣の発達段階についても、対照区と下水処理水曝露区との間に顕著な差はみられなかった。

以上のことから、本実験においては下水処理水がオタマジャクシの変態と性成熟に及ぼす深刻な影響はないものと考えられた。

下水処理水は塩素消毒され公共用水域に放流されている場合が多い。塩素化合物の中には甲状腺ホルモンの働きに影響する物質もある [7]ことから、下水処理水の塩素消毒水がオタマジャクシの変態に与える影響について調査していく予定である。

参考文献

1) Charles Tyler: 魚類における内分泌かく乱作用の重要性について理解する, 環境省 平成 25 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー資料, https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/seminar/seminar2013.html

2) 成宮 他: 下水処理過程における医薬品類の存在実態と挙動, 環境工学研究論文集, 46, pp.175-186, 2009

3) 厚生労働省：医薬品産業ビジョン 2013, p.7, 平成 25 年 6 月 26 日

4) OECD: The Larvae Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), 28-July-2015

5) P.D.Nieuwkoop and J.Faber: Normal table of Xenopus lavies (Daudin), Routledge, pp.Ⅶ-X, 1994

6) 0ECD: Guidance Document on Histopathology Techniques and Evaluation for The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), p21, 2015

7) 環境省: 化学物質の環境リスク評価 第 9 巻, 過塩素酸, p.11-14, 平成 23 年 3 月



図-7(a)　対照区の雄カエルの精巣

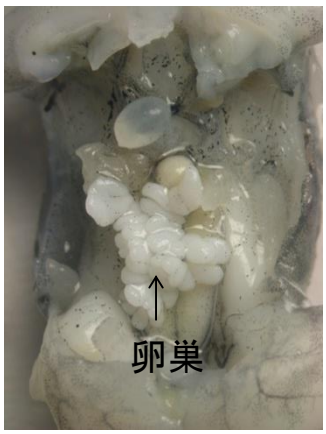


図-7(b)　対照区の雌カエルの卵巣

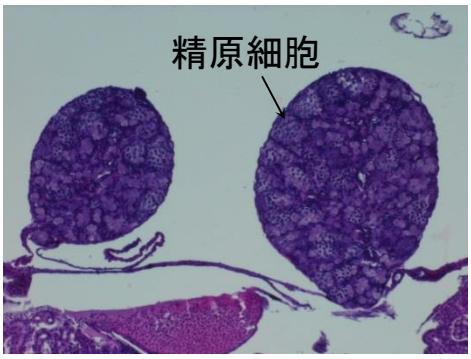


図-7(c)　対照区の雄カエルの精巣の組織像

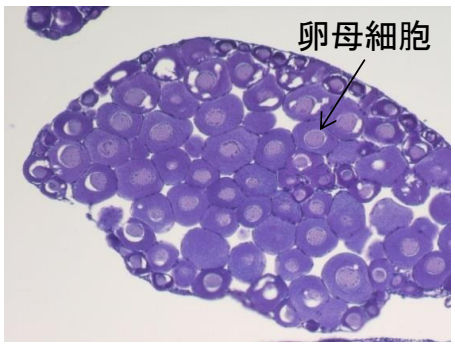


図-7(d)　対照区の雌ガエル卵巣の組織像

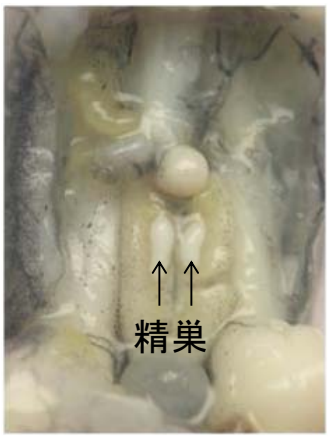


図-8(a)　下水処理水曝露区の雄カエルの精巣

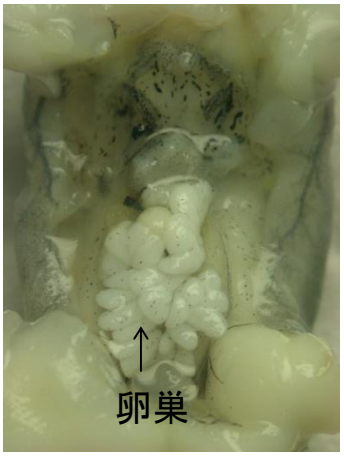


図-8(b)　下水処理水曝露区の雌ガエルの卵巣

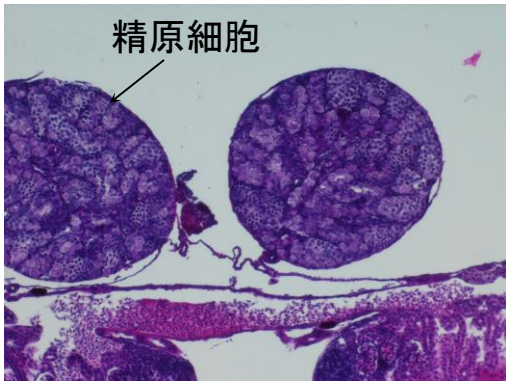


図-8(c)下水処理水曝露区の雄カエル精巣の組織像

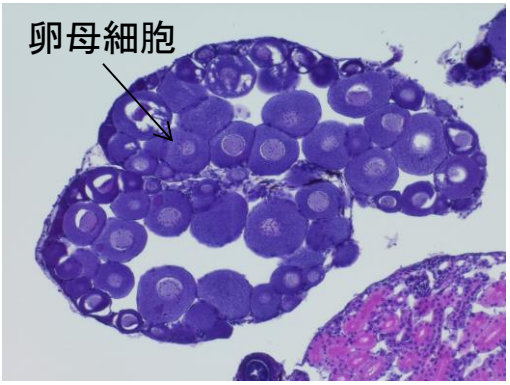


図-8(d)下水処理水曝露区の雌カエル卵巣の組織像

土 木 研 究 所 資 料
TECHNICAL NOTE of PWRI
No.4347 November 2016

編集・発行 © 国立研究開発法人 土木研究所

本資料の転載・複写の問い合わせは

国立研究開発法人 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