

# 1. 試験研究費による研究

# 1. 汚水性状と管路施設の劣化に関する調査

下水道研究室研究室

室 長 森田 弘昭

研 究 官 森 一夫

交流研究員 能勢 正樹

## 1. まえがき

我が国の下水道処理人口普及率は 62% (H12 年度末) に達し、これまでに整備された下水道管路総延長はおよそ 32 万 km に及ぶ。下水は管路を通じて下水処理場まで輸送される過程で物理的、化学的、生物学的に様々な変質を遂げるが、これらの水質変化は、下水処理場での処理効率や管路の維持管理に影響を及ぼす。例えば、湖沼・内湾等の富栄養化防止を目指した栄養塩類の生物学的除去では、酢酸など低級脂肪酸の下水中含有量が処理効率に大きく影響すると言われているが<sup>1)</sup>、これらは管路内の環境条件によりその量が変わる。また、水質変化の中には、圧送管路における硫化物生成のように、コンクリート腐食の原因となるものもある。コンクリート管路の腐食による破損は、道路陥没のような重大事故を引き起こす可能性があり、事実、大都市を中心としてそのような事故の報告例が増えている。

本稿では、実験と生物学的プロセスに関する理論から、下水道管路内で生じている水質変化をモデル化し、それをを用いた管路内水質変化シミュレーション技術について報告する。

## 2. 圧送管路における硫化物生成

### 2.1 硫化水素腐食のメカニズム

下水道管路は自然流下形式を標準とするが、地形的な制約やライフサイクルコストの試算結果が経済的に優れる場合、ポンプを用いて下水を送る圧送式下水道が採用されることもある。圧送管路では管内への酸素供給が無く、下水が嫌気化しやすい。下水が嫌気化すると、管底の堆積物や管壁に付着した生物膜中に棲息する硫酸塩還元細菌により、下水に含まれる硫酸イオンが硫化水素 (H<sub>2</sub>S) へと還元される。硫化水素は常温では水に溶けにくい気体のため、圧送管から解放されると同時に気相中に放散する。気相中の硫化水素は管壁の結露に吸収された後、硫黄酸化細菌の働きにより硫酸 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) へと酸化され、コンクリートの腐食を引き起こす。

### 2.2 空気注入による硫化水素抑制

硫酸塩還元反応は、溶存酸素がない条件でしか起こらない。よって、管路内で消費される酸素量と同量の酸素を、強制的に管路内に補給してやれば硫化水素の生成は抑制される。このような考えに基づき、圧縮空気を管路内に注入する硫化水素対策手法が実用化されている。この場合、必要となる空気量は、下水中の浮遊バイオマスによる酸素消費速度と、管壁に付着するバイオフィームによる酸素消費速度から(3)式により決定する<sup>2)</sup>。

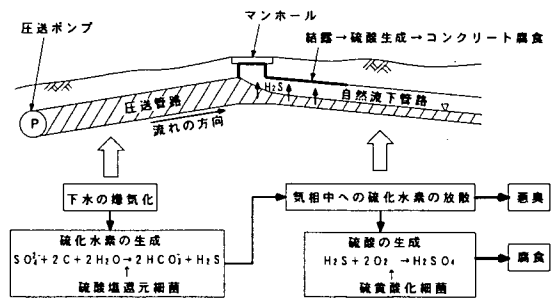
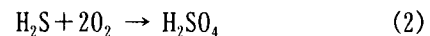
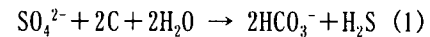


図-1 硫化水素腐食のメカニズム

$$Q_{A(T)} = (R_{r(15)} + \frac{4R_{e(15)}}{D}) \times \frac{\pi D^2 L}{72,000} \times \Theta^{(T-15)} \quad (3)$$

$Q_{A(T)}$  : 必要空気量 (m<sup>3</sup>/min)

$R_{r(15)}$  : 15℃における浮遊バイオマス

による酸素消費速度 (=6g-O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>/h)

$R_{e(15)}$  : 15℃におけるバイオフィーム

による酸素消費速度 (=0.7g-O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/h)

$D$  : 圧送管の管径 (m)

$L$  : 圧送管路長 (m)

$T$  : 下水温度 (℃)

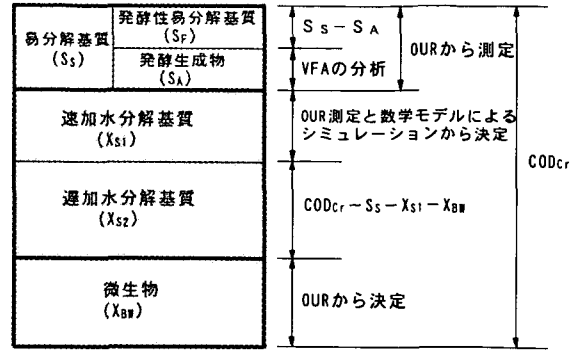
$\Theta$  : 温度補正係数 (=1.07)

### 3. 管路内における下水中有機物の変質

下水中の有機物量を表す指標として、BOD や COD がある。しかし、これらの指標では管路内での水質変化を検討するには不十分である。

よって、本研究ではより詳細な有機物指標として  $COD_{Cr}$  を生物分解性に基づき図-2に示す5つの成分に分類し、管路内での変質プロセスを図-3に示すように仮定する<sup>3)</sup>。

下水が好気的な条件にある場合、易分解基質 ( $S_s$ ) は加水分解基質 ( $X_s$ ) の好気加水分解により増加する一方で、微生物の生存エネルギー獲得および増殖のプロセスで利用される。これらのプロセスでは同時に酸素を必要とするため、下水中の溶存酸素が消費される。下水中の溶存酸素は気相部からの再曝気により補給されるが、再曝気量が少ない場合や、圧送管路のように全く再曝気が無い条件では、下水は嫌気状態へと移行する。嫌気的な下水中の易分解基質は加水分解基質の嫌気加水分解により増加する一方で、硫酸塩還元反応による硫化物生成プロセスで利用される。



OUR (Oxygen Utilization Rate : 酸素利用速度)  
VFA (Volatile Fatty Acid : 揮発性脂肪酸)

図-2 下水中有機物の分類

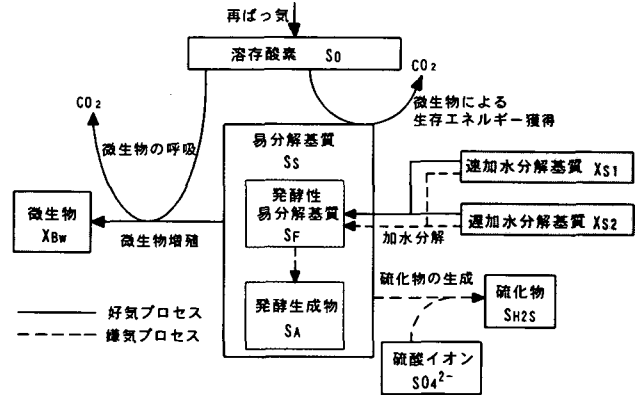


図-3 管路内好気・嫌気水質変化プロセス

### 4. 実験管路における水質変化調査

#### 4.1 実験管路の概要

好気的あるいは嫌気的な条件の管路内における水質変化を確認し、処理場で生物学的な窒素、リン除去を行う場合、重要な炭素源となる易分解基質を保持しつつ硫化水素を抑制できるような空気注入量を検討するため、茨城県霞ヶ浦湖北浄化センター内に設けた実験管路において、当浄化センターに流入する実下水を用いて実験を行った。

実験管路は実験ヤード内にほぼ水平に埋設してある。内径 100mm で全長 1,800m のダクトイル 鋳鉄製管路である。下水は調整槽から汚水ポンプで任意の水量 ( $0\text{m}^3/\text{min} \sim 0.7\text{m}^3/\text{min}$ ) を送ることができ、管路上 225m 間隔に取り付けた分水サドルより採水可能である。また、管路始点には各種薬品や空気を送ることができるポンプ装置を設置した。

#### 4.2 実験条件

実験条件は表-1のとおり、空気注入を実施しない完全嫌気条件(Case1)と、管路始点からの空気注入量を(3)式により求められる  $Q_{A(T)}$  の 25%(Case2)、50%(Case3)、100%(Case4)の3条件に変化させた。

実験では、実験管路内での有機物濃度、硫化物濃度、下水中溶存酸素濃度ならびに気相中酸素濃度の変化を測定した。

表-1 実験条件

条件	下水流速 (m/s)	平均水温 T (°C)	空気注入量	
			$Q_A$ (m <sup>3</sup> /min) <sup>*1</sup>	$Q_A/Q_{A(T)}$ (%)
Case 1	0.3 <sup>**</sup>	22.5	0	0
Case 2		16.9	0.007	約 25
Case 3		16.4	0.015	約 50
Case 4		17.8	0.035	約 100

\*1. 流速0.3m/sは管内滞留時間100minに相当。

\*2. 空気注入量 $Q_A$ は大気圧状態に換算した値。

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 有機物の変質ならびに硫化物の生成

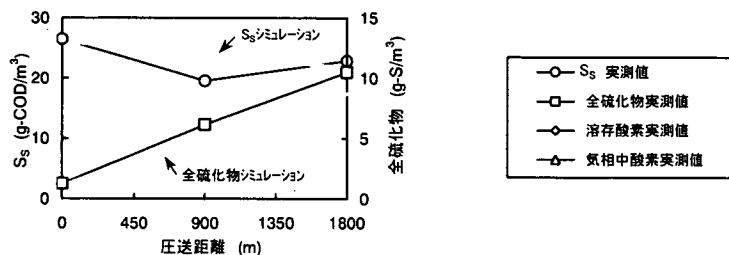
実験時の水質測定結果を図-4に示し、測定結果より得られた有機物の変質速度ならびに硫化物生成速度を表-2に示す。

空気注入を行わない完全嫌気状態 (Case1) では、下水中の易分解基質は管路終点まで保持されている。図-3に示す水質変化プロセスにあてはめた場合、嫌気条件下で易分解基質は加水分解基質が嫌気加水分解されることにより生成されると同時に、硫酸塩還元細菌の働きによる硫化物生成過程で炭素源として消費される。管路終点まで易分解基質が保持されたということで、嫌気加水分解速度と硫化物生成による易分解基質消費速度がほぼ同等であるということが確認できた。

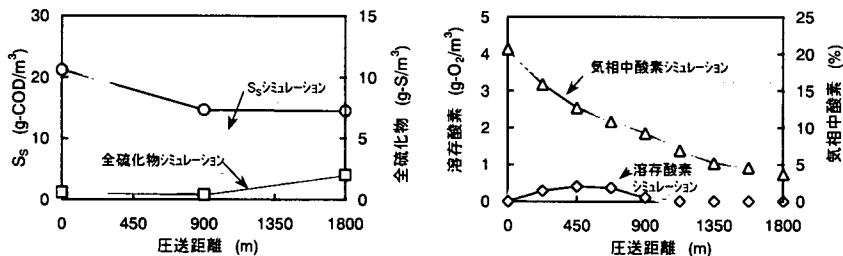
硫化物は、下水中に  $1.0\text{g-S/m}^3$  以上存在すれば、コンクリート施設の腐食を引き起こす可能性があると言われていたが<sup>4)</sup>、本条件では、管路終点で  $10\text{g-S/m}^3$  を超える高濃度となった。

空気注入量を(3)式による必要空気量  $Q_{A(T)}$  とした場合 (Case4)、硫化物の生成は完全に抑制されている一方で、下水中の易分解基質は管路中間点でほぼ消費されつくしている。これにより好気加水分解速度に比べ、微生物の好気増殖による易分解基質消費速度が大きいことが確認できた。

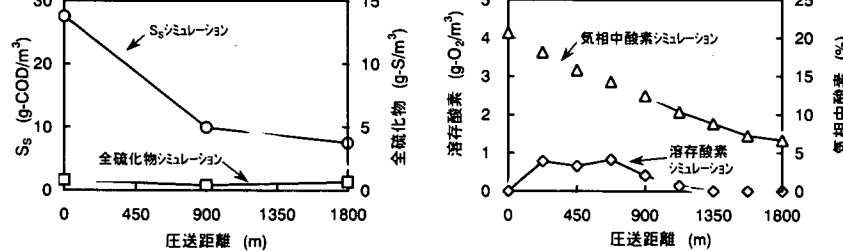
Case1



Case2



Case3



Case4

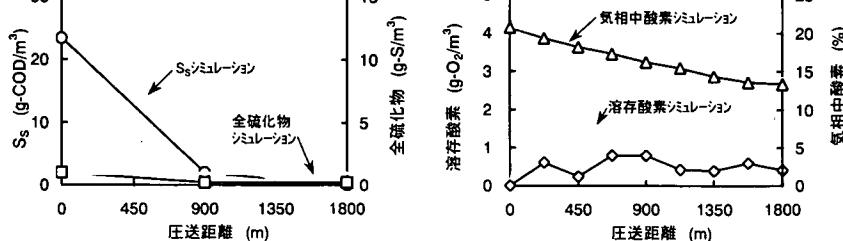


図-4 管路内水質変化実測値ならびにシミュレーション結果

表-2 下水中有機物の変質速度

		Case1		Case2		Case3		Case4	
		管路前半	管路後半	管路前半	管路後半	管路前半	管路後半	管路前半	管路後半
易分解基質 $S_s$	(g-COD/m <sup>3</sup> /h)	-2.7	-2.7	-10.2	-0.6	-19.3	-5.5	-21.8	-11.1
全硫化物	(g-S/m <sup>3</sup> /h)	5.8	4.7	-0.6	2.6	-0.9	0.2	-1.0	-0.2
加水分解速度	(g-COD/m <sup>3</sup> /h)	10.2	7.9	17.4	17.0	16.7	18.1	20.0	16.6
好気増殖による $S_s$ 消費速度	(g-COD/m <sup>3</sup> /h)	-	-	27.6	11.7	36.0	22.9	41.8	27.7
硫化物生成による $S_s$ 消費速度	(g-COD/m <sup>3</sup> /h)	12.9	10.6	0.0	5.9	0.0	0.7	0.0	0.0
酸素利用速度	(g-COD/m <sup>3</sup> /h)	-	-	12.4	5.3	16.2	10.3	18.8	12.5
溶存酸素	(g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> )	0.0	0.0	0.2-0.4	0-0.1	0.4-0.8	0-0.4	0.2-0.8	0.4-0.8

空気注入量を、 $Q_{A(T)}$ の50% (Case3)、25% (Case2)と減少させることで下水中の溶存酸素は低濃度となり、管路後半では嫌気状態となる。その結果、管路後半では硫化物が生成しはじめているが、易分解基質の減少速度は好気状態の時に比べてかなり低下しており、Case2では管路終点でもかなり多くの易分解基質が存在していた。

下水処理場における二次処理（標準活性汚泥法等による、微生物反応を利用した有機物除去）について言えば、管路内である程度有機物が分解されることは、処理場の負荷低減と考えることができる。しかし、処理場における生物学的な高度処理にとって、易分解基質は重要な炭素源であるので、空気注入量が多ければ多いほど、易分解基質の不足による処理効率の低下が懸念される。

#### 4.3.2 圧送管路における硫化物生成速度

これまでに提案されてきた圧送管路における硫化物生成速度予測式は、全て有機物濃度に関する指標としてBODあるいはCODが用いられている。ここで、生物分解性に基づき細かく分類した有機物成分のいずれかを有機物指標として導入すれば、硫化物の生成速度に関して、有機物の変質と関連付けた理論的なアプローチが可能となると考え、各有機物成分と硫化物生成速度の関係について検討した。その結果、硫化物生成速度は易分解基質濃度と最も高い相関を示し、硫化物生成速度式として(4)式を得た。ただし、予測精度に関しては、既に提案されている予測式と同程度であった。

#### 4.3.3 再曝気速度

管路内では、微生物による有機物分解に伴い下水中の溶存酸素が減少するが、同時に空気注入を実施した圧送管路や自然流下管路では、気相部からの溶け込みにより酸素が供給される。よって、下水中の溶存酸素は微生物による酸素消費量と、管内気相部から下水への酸素溶け込み量の大小関係により増減する。

下水中溶存酸素濃度の経時変化をシミュレーションするためには、気相部から下水中への酸素移動に関する係数が必要となるため、実験時の下水中溶存酸素濃度ならびに気相中酸素濃度測定結果を(5)、(6)式にあてはめ、管路前半および後半における総括酸素移動係数  $K_{L(20)}$ の平均値を求めた。

各条件における総括酸素移動係数の計算結果を表-3に示す。

$$R_s = 0.058S_s^{0.30} \times 1.03^{(T-20)} \quad (4)$$

$R_s$  : 硫化物生成速度 (g-S/m<sup>2</sup>/h)

$S_s$  : 易分解基質濃度 (g-COD/m<sup>3</sup>)

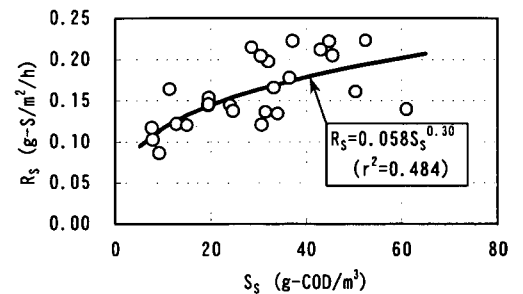


図-5 易分解基質と硫化物生成速度

$$R_{V,O(S1-S2)} = \frac{320,000(C_{O(S1)} - C_{O(S2)})Q_A}{2,240t_{(S1-S2)}Q_W} \quad (5)$$

$$R_{V,O(S1-S2)} = K_{L(20)}d_m^{-1}(S_{OS} - S_O)\alpha_T^{(T-20)} \quad (6)$$

$S_1, S_2$  : 管路上での採水点

$R_{V,O(S1-S2)}$  : S1~S2での再曝気速度 (g-O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>/h)

$C_{O(S1)}$  : S1での気相中酸素濃度 (%)

$C_{O(S2)}$  : S2での気相中酸素濃度 (%)

$Q_A$  : 空気注入量 (m<sup>3</sup>/min)

$t_{(S1-S2)}$  : 下水滞留時間 (h)

$Q_W$  : 下水流量 (m<sup>3</sup>/min)

$K_{L(20)}$  : 総括酸素移動係数 (m/h)

表-3 総括酸素移動係数の計算結果

実験条件		管路前半	管路後半
Case2	$R_{v,0}$ (g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> /h)	11.001	5.034
$Q_A=0.007$ (m <sup>3</sup> /min)	$K_{L(20)}$ (m/h)	0.269	0.400
Case3	$R_{v,0}$ (g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> /h)	15.348	10.806
$Q_A=0.015$ (m <sup>3</sup> /min)	$K_{L(20)}$ (m/h)	0.251	0.343
Case4	$R_{v,0}$ (g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup> /h)	18.461	13.228
$Q_A=0.035$ (m <sup>3</sup> /min)	$K_{L(20)}$ (m/h)	0.200	0.202

$d_m$  : 水理学的水深 (m)  
 $S_{OS}$  : 飽和溶存酸素濃度 (g-O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>)  
 $S_0$  : 溶存酸素濃度 (g-O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>)  
 $\alpha_T$  : 温度補正係数 (=1.024)  
 $T$  : 水温 (°C)

5. 数学モデルによる水質シミュレーション

表-4は、図-3に示す管路内好気・嫌気水質変化の各プロセスと、それらに關与する物質間の量論關係をマトリックス表示したものである<sup>3)</sup>。

このマトリックスに従い、実験時の物質質量變化をシミュレーションした結果を図-4に示す。図-4より、管路における易分解基質および硫化物のシミュレーション結果は、各条件とも概ね実測値に近い物質質量變化を再現できており、モデルの構成が実用的であることが確認できた。

ただし、現段階で本モデルには下水中での硫化物酸化プロセスが含まれていないため、Case4の実験結果に見られるような、生成硫化物が好気状態の下水中で酸化除去される現象は再現できない。

一方、溶存酸素のシミュレーション結果に関しては、絶対値に大きな差がみられるものの、下水が好気状態から無酸素状態に移行する点はほぼ再現できた。シミュレーションによる溶存酸素濃度が実測値よりも高くなった理由については、原因を特定できていない。

表-4 管路内好気・嫌気水質変化プロセスのマトリックス表示

組成 → プロセス ↓	易分解基質 $S_S$		微生物 $X_{Bw}$	速加水分解 基質 $X_{S1}$	遅加水分解 基質 $X_{S2}$	溶存酸素 $-S_0$	硫化物 $S_{H2S}$	プロセス速度
	発酵性 易分解基質 $S_F$	発酵生成物 $S_A$						
下水中好気増殖	-1/ $Y_{Hw}$		1			(1- $Y_{Hw}$ )/ $Y_{Hw}$		式(7)
バイオフィーム中好気増殖	-1/ $Y_{Hf}$		1			(1- $Y_{Hf}$ )/ $Y_{Hf}$		式(8)
生存エネルギーの獲得	-1		(-1)			1		式(9)
速加水分解基質 ( $X_{S1}$ ) の 好気加水分解	1			-1				式(10) #1
遅加水分解基質 ( $X_{S2}$ ) の 好気加水分解	1				-1			式(10) #2
速加水分解基質 ( $X_{S1}$ ) の 嫌気加水分解	1			-1				式(11) #1
遅加水分解基質 ( $X_{S2}$ ) の 嫌気加水分解	1				-1			式(11) #2
下水中とバイオフィーム中 での発酵	-1	1						式(12)
バイオフィーム中での 硫化物生成	-2						1	式(13)
再ばっ気						-1		式(14)

$$\mu_H \frac{(S_F + S_A)}{K_{Sw} + (S_F + S_A)} \frac{S_0}{K_O + S_0} X_{Bw} \alpha_w^{(T-20)} \quad (7)$$

$$k_{1/2} S_0^{0.5} \frac{Y_{Hf}}{1 - Y_{Hf}} R^{-1} \frac{(S_F + S_A)}{K_{Sf} + (S_F + S_A)} \alpha_f^{(T-20)} \quad (8)$$

$$q_m \frac{S_0}{K_O + S_0} X_{Bw} \alpha_w^{(T-20)} \quad (9)$$

$$k_{h\#} \frac{(X_{S\#} / X_{Bw})}{K_{X\#} + (X_{S\#} / X_{Bw})} \frac{S_o}{K_o + S_o} (X_{Bw} + \epsilon_A X_{Bf} R^{-1}) \alpha_w^{(T-20)} \quad (10)$$

$$\eta_{fe} k_{h\#} \frac{(X_{S\#} / X_{Bw})}{K_{X\#} + (X_{S\#} / X_{Bw})} \frac{K_o}{K_o + S_o} (X_{Bw} + \epsilon_{An} X_{Bf} R^{-1}) \alpha_w^{(T-20)} \quad (11)$$

$$q_{fe} \frac{S_f}{K_{fe} + S_f} \frac{K_o}{K_o + S_o} (X_{Bw} + \epsilon_{An} X_{Bf} R^{-1}) \alpha_w^{(T-20)} \quad (12)$$

$$k_{ns} \frac{K_{o(S)}}{K_{o(S)} + S_o} S_s^n R^{-1} \alpha_f^{(T-20)} \quad (13)$$

$$K_{L(20)} d_m^{-1} (S_{os} - S_o) \alpha_T^{(T-20)} \quad (14)$$

表-5 管路内好気・嫌気水質変化プロセスマトリックスの記号説明 (表中数値はシミュレーションでの設定値)

$d_m$	水理学的水深	m	$S_s$	易分解基質	g-COD/m <sup>3</sup>
$K_{fe}$	発酵に関する飽和定数	15 g-COD/m <sup>3</sup>	$S_{H2S}$	硫化物濃度	g-S/m <sup>3</sup>
$K_{L(20)}$	総括酸素移動係数	m/h	$S_o$	溶存酸素	g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>
$K_o$	溶存酸素の飽和定数	0.05 g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	$S_{OS}$	飽和溶存酸素	g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>
$K_{o(S)}$	硫化物生成抑制に関する飽和定数	0.02 g-O <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	$T$	下水温度	°C
$K_{X1}$	速加水分解に関する飽和定数	0.6 g-COD/g-COD	$X_{Bf}$	バイオフィルム中バイオマス	20 g-COD/m <sup>2</sup>
$K_{X2}$	遅加水分解に関する飽和定数	0.2 g-COD/g-COD	$X_{Bw}$	下水中バイオマス	g-COD/m <sup>3</sup>
$K_{S_w}, K_{S_f}$	易分解基質の飽和定数	1.0 g-COD/m <sup>3</sup>	$X_{S1}$	速加水分解基質	g-COD/m <sup>3</sup>
$k_{n1}$	速加水分解速度定数	5.0 d <sup>-1</sup>	$X_{S2}$	遅加水分解基質	g-COD/m <sup>3</sup>
$k_{n2}$	遅加水分解速度定数	1.0 d <sup>-1</sup>	$Y_{Hw}, Y_{Hf}$	増殖収率	0.55 g-COD/g-COD
$k_{ns}$	硫化物生成に関するn次速度定数	0.058 g <sup>n</sup> m <sup>-n</sup> /h	$\alpha_w$	下水中プロセスに関する温度補正係数	1.07
$k_{1/2}$	N <sup>-1</sup> バイオマス内好気増殖の1/2次速度定数	4.0 g <sup>-0.5</sup> O <sub>2</sub> <sup>0.5</sup> m <sup>-0.5</sup> d <sup>-1</sup>	$\alpha_f$	N <sup>-1</sup> バイオマス中プロセスに関する温度補正係数	1.03
$n$	反応の次数	0.3	$\alpha_T$	再ばっ気に関する温度補正係数	1.024
$q_{fe}$	最大発酵速度	3.0 d <sup>-1</sup>	$\epsilon_A$	好気条件下N <sup>-1</sup> バイオマス内N <sup>-1</sup> イオンの効率係数	0.1
$q_m$	微生物の生存領域-摂取速度定数	1.0 d <sup>-1</sup>	$\epsilon_{An}$	嫌気条件下N <sup>-1</sup> バイオマス内N <sup>-1</sup> イオンの効率係数	0.3
$R$	径深	m	$\eta_{fe}$	嫌気加水分解の速度低減係数	0.2
$S_A$	発酵生成物	g-COD/m <sup>3</sup>	$\mu_H$	最大比増殖速度	5.5 d <sup>-1</sup>
$S_F$	発酵性易分解基質	g-COD/m <sup>3</sup>			

## 6. おわりに

国際水環境学会による活性汚泥モデル<sup>5)</sup>の提案などにより、下水処理場においては設計・運転管理の場で数学モデルを用いたシミュレーションを活用する環境が徐々に整ってきているが、管路施設においてはその段階に至っていない。

管路施設においても、数学モデルを用いた水質シミュレーションにより、例えば圧送管路での硫化水素対策として空気注入を実施する場合、硫化物の生成を許容範囲内に抑制しつつ、易分解基質も保持するような空気注入量の検討が可能となる。

さらに将来的には、硫化物の下水中での酸化や気相中への放散といった変質プロセスをモデルに追加することで、圧送管下流に位置する自然流下管路での硫化水素影響範囲が予測可能となり、耐酸性材料の使用範囲の決定など管路設計への応用が期待される。

### [参考文献]

- 1) 日本下水道事業団技術評価委員会, 「微生物を利用した窒素及びリン除去プロセスの評価に関する第2次報告書」, 1988年5月
- 2) 建設省土木研究所, 「共同研究報告書 第194号 下水道施設における経済的な硫化水素対策技術の開発に関する共同研究報告書」, pp.242-249, 1998年1月
- 3) Hvitved-Jacobsen, T., J. Vollertsen and N. Tanaka, "Wastewater quality changes during transport in sewers - an integrated aerobic and anaerobic model concept for carbon and sulfur microbial transformations.", Wat. Sci. Tech., Vol.39, No.2, pp.242-249, 1998年2月
- 4) (財)下水道業務管理センター, 「EPA設計マニュアル 下水道施設の臭気と腐食対策」, p.45, 1988年11月
- 5) IWA TASK GROUP ON MATHEMATICAL MODELLING FOR DESIGN AND OPERATION OF BIOLOGICAL WASTEWATER TREATMENT, "ACTIVATED SLUDGE MODELS ASM1, ASM2, ASM2D AND ASM3", IWA Publishing, 2000年

## 2. 発展途上国に適した低コスト型新下水道システムの開発に関する研究

下水道研究室 室 長 森田 弘昭  
 主任研究官 植松 龍二  
 研 究 官 山縣 弘樹  
 下水処理研究室 室 長 中島 英一郎  
 主任研究官 川嶋 幸徳  
 研 究 員 平出 亮輔

### 1. はじめに

発展途上国においては、著しい都市化の進展により衛生環境が悪化し、水環境の改善と水資源の確保が、従前にも増して重要となってきた。都市周辺市街地では、都市中心部よりも、排水を処理することの理解が乏しく、住民は水系伝染病の蔓延や水資源の不足により、劣悪な衛生環境におかれている。これらの課題を解決するには、都市中心市街地に加えて周辺住宅地においても、都市内河川や湖沼等の水質改善を優先して、整備水準を抑えつつ水路、腐敗槽等の既存施設や土壌、植生等を水質向上手法として組み入れた低コスト下水道システムを構築し、下水処理水の水質を向上させ水資源としての価値を高める必要がある。

そこで、本研究ではこれらの地域を対象として、住民参加、効率的な下水道管理等のソフト面も考慮しつつ、既存施設の下水収集・

処理機能を評価し、土地、気候、安価な労力等開発途上国の長が活用できる低コスト型の新下水道システムを開発する。

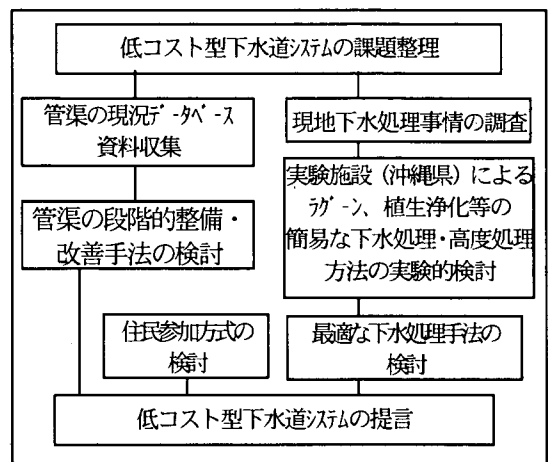


図-1 研究のフロー

### 2. 発展途上国における低コスト型下水道システムの課題

#### 2.1 低コスト型下水道システムの定義

開発途上国における下水道計画の策定においては、事業費の削減が大きな課題である。事業費は管渠と下水処理場に依るものに分類される。管渠の事業費の削減方法としては、①下水道と衛生施設（腐敗槽等）の地域的棲み分け、②低費用下水道（コンドミニアル下水道：図1、簡易化下水道等）の導入があげられる。①については、当面は暫定施設（インターセプター下水道等：図2）で対応し、将来標準的な下水道に移行する段階的整備の概念も含まれる。一方、下水処理場の事業費の削減方法としては、十分な用地が確保できる場合に、維持管理コストが活性汚泥法等に比べて安価な安定化池、ばっ気式ラグーンの採用などがあげられる。低コスト型下水道システムとは、こうした管渠・処理システムを指すものとする。



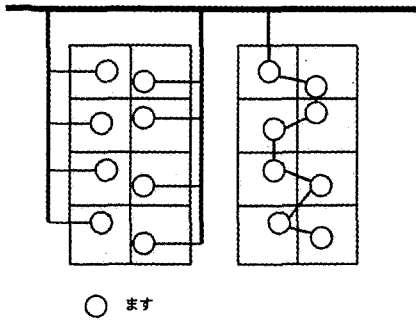


図1 コンドミニアル方式の概念  
(左：従来方式、右：コンドミニアル方式)

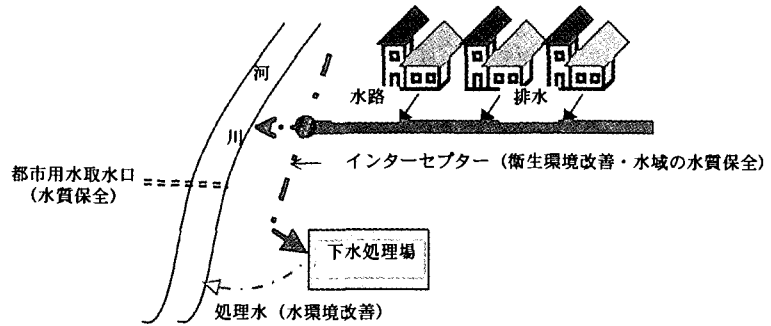


図2 インターセプター下水道の概念

## 2. 2 低コスト下水道システムに関する既往知見の整理

低コスト型下水道システムについて、土木研究所資料第3778号よりその課題を抽出・整理した。

### (1) 下水道・衛生施設の地域的棲み分け、段階的整備の考え方

下水道・衛生施設の地域的棲み分けについてはインドネシア、世銀等で様々な選択アルゴリズムが提案されている。近年のJICA開発調査報告書や建設省「下水道マスタープラン」において、棲み分け及び段階的整備の考え方がとりいれられている。

### (2) インターセプター下水道

段階的整備において暫定施設として採用されるインターセプター方式は、既存の側溝、水路をそのまま活用し、河川に流入する直前に遮集して処理場まで導くもので、遮集管渠のみの建設で済み枝線管渠の布設が不要なので建設費用の削減効果は大きい。

タイ（バンコク）では、個人住宅や小規模アパートは単独浄化槽の設置が義務づけられているため、こうした既設排水管利用のインターセプター方式が採用されている。しかし、このシステムは、単独浄化槽処理水を下水処理場で再度処理することになり処理効率が悪い。また住民側から見ると、単独浄化槽の維持管理責任が残り、住民の周囲の環境改善が下水道システム導入前後で全く変わらず、住民にとってメリットが少ない。さらにインターセプターの埋設深が浅い場合、将来布設される枝線管渠が既設インターセプターに接続できず、新たに幹線管渠整備を要する場合があるなどの問題点が指摘されている。

### (3) 低費用下水道

日本の開発援助の中で、低費用下水道の検討は本格的には行われていない。低費用下水道の建設費は、一般的に簡易化下水道、小口径下水道、コンドミニアル下水道の順で安くなる。簡易化下水道は管渠の緩勾配化、マンホール構造の簡易化、埋設深度の浅深化によりコスト縮減を図るものであり、ラテンアメリカでの試算では標準下水道に比べ約半額になると報告されている。小口径下水道は沈殿流出水のみを移送するもので、固形物を考慮しないため緩勾配化が可能となるが、個別処理の必要性が残る点が課題である。コンドミニアル下水道は枝線管渠延長が大幅に削減されるためコスト縮減効果が大きく、ブラジルでは排水設備の設置費を含めて標準下水道の約4分の1になるという試算がある。また、低費用下水道に関しては、排水設備や個別の腐敗槽の維持管理、下水管渠布設における労働力の提供等、住民の協力・参加によるコスト削減効果が報告されている。

## 2. 3 開発援助専門家へのヒアリング

下水道に関するJICA開発援助専門家経験者にヒアリングを行い、低コスト型下水道について下記のような課題が指摘された。

・タイにおけるラグーン処理場の区域は、インターセプター方式を採用しており、腐敗槽による浄化、管渠内での浄化（沈殿を含む）、地下水浸透等により、処理場への流入水濃度が低く、計画ではBOD200mg/l程度であるが、実際は20~40mg/l程度である。処理水質は、流入水質とほとんど変わらない。腐敗槽の浄化、管渠内の浄化の定量的な評価、ラグーン処理の効率化の検討が必要である。

・バンコクでは、通常水路の表層水はある程度水質になっているが、底泥は汚く、雨天時には堆積物の影響等により大幅に悪化する。既設水路、下水側溝にゴミ、砂がたまり、定期的に浚渫が必要であり、極力浚渫しなくてよい水路構造があれば望ましい。

・大都市においては、不法占拠等の問題もあり処理場用地の確保が困難であり、ラグーン処理のスペース確保は不可能である。土地所有の困難な箇所での処理方法を提案することも必要である。

・腐敗槽の多くは適切に汚泥の引き抜きが行われておらず、腐敗槽汚泥の引き抜き、処理は大きな問題である。

## 2. 4 タイにおける住民参加の現状

平成13年度に国際協力銀行がタイにおいて実施したプロジェクトに対現地調査団の一員として参加し技術支援を行った。その際住民参加について情報収集を行った。

下水道事業に関して現在住民参加はほとんど行われていない。自治体は地域社会に情報提供を行わず、地域社会は下水道事業の必要性、メリット・デメリットに無関心である。特に場所の選定にあたっては通常何の事前説明もない。下水処理場の建設が始まり、自治体が維持管理費の回収を考えるようになった時に下水道の必要性、メリットを説明するようになる。事業への関心、理解のレベルは多少上がるのだが、地域社会は使用料の支払いに否定的である。下水処理よりも洪水防止の方が重視される。また、商業、工業、ホテルとの接触がほとんどなく、これらからの費用回収の努力はほとんど行われていない。

一方、Dankhantod市では、NGOが住民とともに水路の保全活動を行い、水質、美観の改善につながった。この結果下水処理の必要性が減り、河川の水質浄化にもつながると期待される。

## 3. 発展途上国に対応した下水処理実験施設を使用した検討

### 3. 1 実験目的

発展途上国で発生している衛生環境の悪化問題を早急に解決するためには、我が国のような下水道先進国からの技術援助が必要になる。しかし、我が国と気候条件・風土・経済性・社会性の面で大きな違いのある発展途上国に、我が国の先進的な下水道技術をそのまま移行することは、大変困難であると考えられる。そのため、発展途上国に適した技術の開発と維持管理に関する研究を行う必要がある。

当研究では特に、熱帯・亜熱帯地域の発展途上国を対象とした下水道システムとして、ラグーンの研究を行う。実験は、日本唯一の亜熱帯地域である沖縄県において、同県との共同研究で行う。

### 3. 2 ラグーンとは

ラグーンとは、基本的に安定池のことを示す。安定池には、水深・酸素の供給方法・処理特性の違いにより、通性嫌気性(好気-嫌気)安定池・曝気式安定池・好気性安定池・嫌気性安定池などの処理方式がある。当研究では、発展途上国でもっともよく用いられる方式

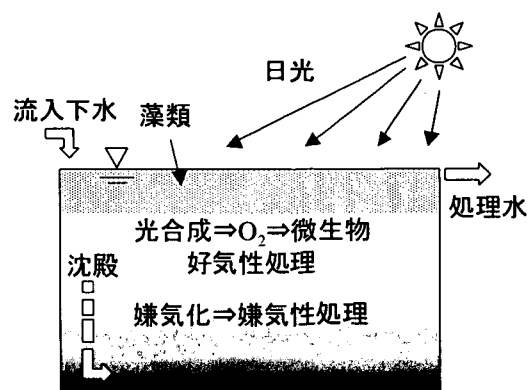


図-3 通性嫌気性安定池の概要

である通性嫌気性安定池を使った実験を行う。

通性嫌気性安定池は、通常1.2～2.5mの水深があり、上層部で好気性処理・下層部で嫌気性処理を行う。滞留時間は5～30日程度である。長時間の滞留時間により、上層部に藻類が繁殖し、光合成により酸素を供給する。その酸素は、上層部において好気性細菌が有機物を分解・処理するために使用される。下層部においては、水深が深いため、光が届かず、藻類の繁殖・光合成が行われない。そのため、酸素の供給がなく嫌気化する。ラグーンの中には、流入水中の沈降性の高い物質が沈降し沈殿する。沈殿した物質は、嫌気性発酵によりゆっくり処理される。

### 3. 3 検討する問題点の抽出

開発援助専門家へのヒアリングから、以下の問題点に関する研究を行うことを考える。

- ・ 熱帯・亜熱帯地域の発展途上国では、下水管渠が屋外開放型であるところが多いため、下水の管渠内での浄化・沈殿効果がある。そのため、下水処理場への流入時には下水のBODは40mg/l程度まで、低下している場合がある。
- ・ ラグーンによって処理された処理水中には、藻類が含有されているため、流入下水と処理水のBODがほぼ同じ値になる場合がある。

上の問題点を踏まえると、低負荷流入水におけるラグーン維持管理に関する検討と、ラグーン処理後のさらなる高度処理に関する検討が必要であると考えられる。当研究室では、下の2課題についての検討を行う。

- 1) 低負荷流入水におけるラグーンの適正維持管理に関する検討
- 2) ラグーン後段に植生帯を設置した高度処理実験に関する検討

### 3. 4 実験方法

実験では、沖縄県具志川浄化センター内のラグーン処理実験施設を使用する。実験施設の概略図を、図-4に示す。実験施設は、大きく分けて流入下水混合槽・ラグーン処理施設・植生帯流入タンク・植生帯の4施設からなる。流れとしては、流入下水混合槽からでた流入下水が、ラグーン処理施設で処理され、その処理水が植生帯に流入している。

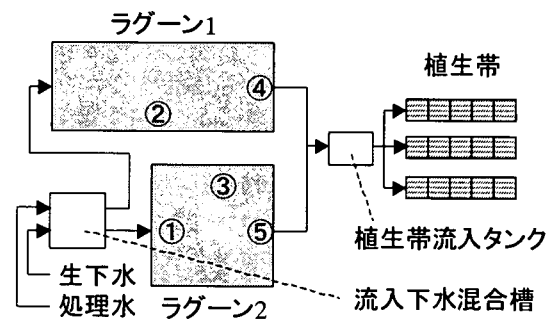


図-4 ラグーン施設の概略図

#### (1) 低負荷流入水におけるラグーンの適正維持管理に関する検討

熱帯・亜熱帯地域の発展途上国の中には、下水管路内において下水に沈降・浄化作用が加わり、計画値に比べかなり低負荷の流入水が処理場に流入している現状がある。このため当実験においては、人為的に低負荷の流入水を作製し、ラグーンに流入させ、処理状態を確認することで、適切な維持管理に関する検討を行う。

実験施設としては、図-4の流入下水混合槽とラグーン1・2である。流入下水混合槽では、ラグーン処理施設への低負荷流入水を作製するため、浄化センター本施設より生下水と処理水を引き入れ、水量の調節によって混合割合を変えられる構造になっている。混合槽の容量は3 m<sup>3</sup>で、ラグーンへの流入水量は最大50 m<sup>3</sup>/dayまで上げられる。次にラグーン処理施設は、2つのラグーン（通性嫌気性安定池）で構成されている。ラグーン2池は共に、容量100 m<sup>3</sup>、水深2 mであるが、池の形状が異なっている。ラグーン1は、14×5.5 mの長方形の形状であり、ラグーン2は8.6×8.6 mの正方形の形状をしている。実験では、流入水をBOD 50, 100, 200 mg/l、HRTを30, 20, 10, 5, 2 dayに変動させて、ラグーンでの処理状態を確認する。サプリングポイントは、図-4の図中の番号のポイントで採取され、各名称を順番に①流入水、②ラグーン1槽内、③

ラグーン2槽内、④ラグーン1処理水、⑤ラグーン2処理水とする。

## (2) ラグーン後段に植生帯を設置した高度処理実験に関する検討

ラグーンにおいて、ある程度の処理水が維持できることは確認されている。しかし、処理水中に藻類が含まれているため、処理水と流入水がほぼ変わらないBODの値を示し、藻類の流出が問題となっている。その他にも、大腸菌のような病原性微生物の除去率の問題もある。このため、ラグーン後段に植生帯を設置し、処理水のさらなる高度化についての検討を行う。

実験施設としては、図-4の植生帯流入タンクと植生帯である。植生帯流入タンクは、植生帯への流入水（ラグーン処理水）の流量調節・分配を行うものである。容量は0.5m<sup>3</sup>であり、ラグーン処理水を3つに分配できる構造になっている。植生帯は、外寸1337×864×793mmの容器（0.5m<sup>3</sup>）に、赤土を水深20cmになるように敷き詰め、現地で自生しているヨシを植付ける。その容器を縦に5つ並べたものを1系列として、合計3系列の植生帯を作製する。うち1つは、blankとしてヨシを植付けていない。サプリングポイントは、植生帯流入水を流入タンクで採取し、あとは各系列ごとに処理水を採取する。実験は、同時期に同処理水を流入させ、対照実験を行う。

### 3. 5 実験結果

今年度の実験としては、施設の設置・改造がほぼ11月に終了し、ラグーン処理施設は12月から運転ができる状態になった。初期の実験条件をBOD 50mg/l、HRT 30dayに設定し、一ヶ月間の養生期間を置き、1月よりデータ取りを行った。その後、2/22にHRTを10dayに変更した。植生帯に関しては、設置工事終了が冬季であるため、ヨシの植付けを行っても根付きが悪いと考えられ、3月の水温上昇後にヨシの植付けを行った。そのため、今年度はデータ取りを行っていない。

ラグーンの実験に関して、実験で測定したデータを図-5に示す。水温のグラフを見ると、ラグーン槽内・処理水の水温は、実験初期に一度上昇しているが、その他は2月中旬までほぼ15℃の値であった。その後、水温は徐々に上昇してお

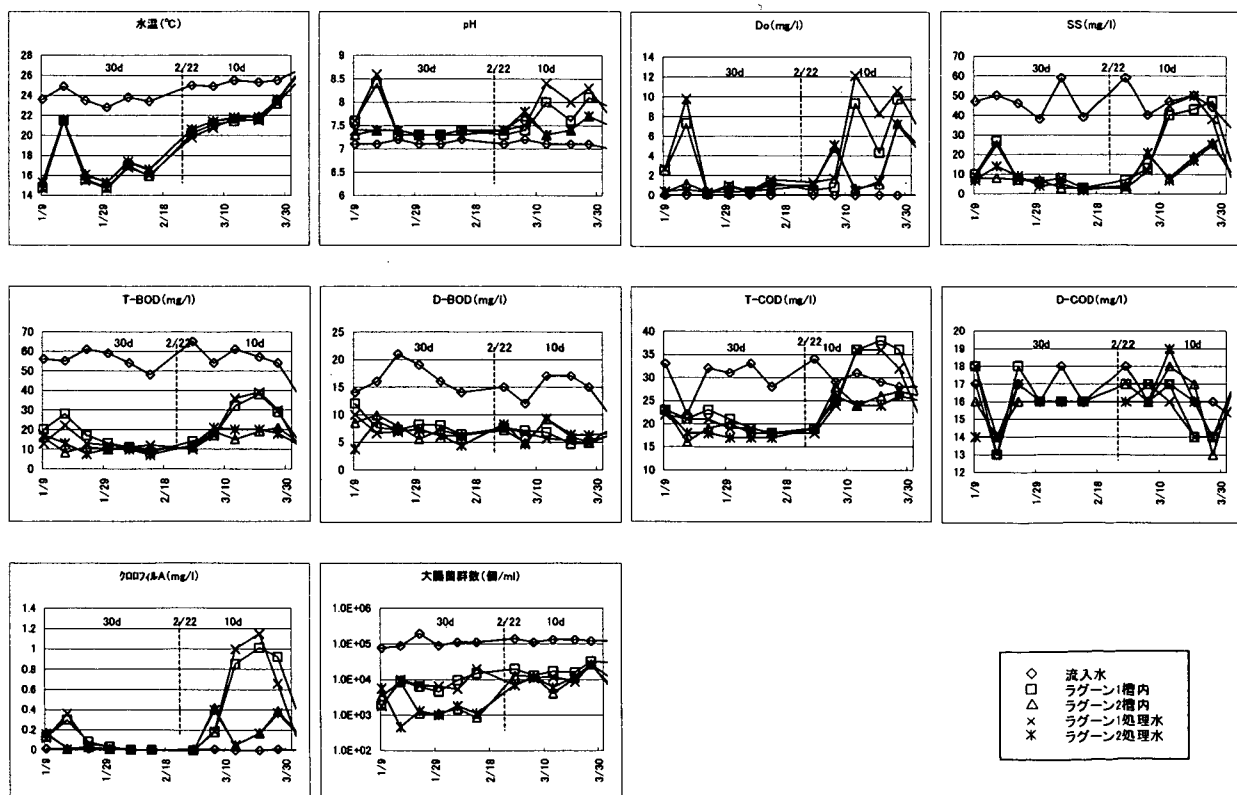


図-5 ラグーン処理施設の各水質項目

り、ほぼ25℃付近まで上昇した。流入水の水温は一定であった。次にpHとDoのグラフを見る。こちらも水温同様、2月中旬辺りから測定値が上昇していた。これは、ラグーン槽内の水温の上昇に伴い、藻類の繁殖が活発になり、多量の藻類が光合成により槽内にO<sub>2</sub>を供給したためであると考えられる。実際に、加77ルAのグラフも、同時期に値が上昇しており、藻類の増殖が原因であることがわかる。(水温20℃を境に藻類の繁殖状態が良好になる。)

次にラグーンの処理状態として、SS・BOD・CODを見ると、トータルサンプルおよびSSのデータに、2月中旬より測定値の上昇が見られた。しかし、溶解性のサンプルに関しては、期間を通してほぼ横ばいの値であった。これは、上同様、水温の上昇に伴い、槽内・処理水中の藻類濃度が増加したため、測定時にろ過を行わないトータルおよびSSサンプルにのみ、その影響が出ていると考えられる。そのため、藻類をろ過して測定を行う溶解性サンプルにおいては、測定値の変動が見られなかった。熱帯・亜熱帯地域の発展途上国で見られるように、処理水中の藻類の増加により、流入水とほぼ同じようなBOD・CODの処理水が発生した結果となった。次に大腸菌群数は、流入水はほぼ一定であった。ラグーン1もほぼ一定であったが、2月中旬以降、若干高くなっているように見受けられた。ラグーン2については、2月中旬を境に値が上昇していた。これは、2/22にHRTを30dayから10dayに変更したためと考えられる。各ラグーンによりその影響が違うのには、ラグーンの形状が関係している。ラグーン1に比べラグーン2は、流入口と処理水出口の直線距離が短く、流入水の影響を受けやすいためである。

### 3.6 まとめ

今年度の実験では、処理水中の藻類濃度により、BOD・COD値が上昇することが確認できた。特に、水温が20℃を越えると、藻類の繁殖が活発になり、pH・Do・加77ルAの値が上昇し、T-BOD・T-COD・SSの値がかなり上昇する。しかし、藻類をろ過して測定を行うD-BOD・D-CODについては、影響はなく、ほぼ横ばいの数値であった。ラグーンの出入口の直線距離が短い場合、HRTの影響を受けやすいことも確認できた。

### 4. 今後の課題

衛生施設が未発達な発展途上国の郊外部などにおいては、河川や湖沼等の水質改善を優先し、水道水源や農業用水の水質改善を図ることが衛生環境の改善に効果的である。そこで、幹線管渠と処理場を優先整備する低コスト型下水道システムの適用が有効であると考えられる。しかし、低コスト型下水道においては、専門家へのヒアリングから明らかになったように、当面の低い流入負荷に応じた最適な処理システムの開発が必要である。さらに長期的な視野に立つと、将来の面整備を想定した幹線管渠の計画・施工と、面整備の着実な実施およびそれともなう幹線管渠のグレードアップが必要である。今後は、途上国における処理システム、管渠整備の現状等について、現地調査を行い、問題点の把握を行う予定である。最終的には、現状の問題点を踏まえ、低コスト型下水道システムにおける最適な下水処理方法、管渠の段階的なグレードアップ手法等について提言を行うことを目標とする。

### 参考文献

- 1) 土木研究所資料第3778号、熱帯・亜熱帯地域における下水道計画に関する調査、平成13年2月、p.68-88
- 2) 石崎勝義、自然システムを利用した水質浄化(土壌・植生・池などの活用)、技報堂出版2001.8.10

### 3. 水系における病原性微生物の挙動に関する研究

下水処理研究室 室長 中島 英一郎  
研究官 齋野 秀幸

#### 1. はじめに

上水道取水源上流域での下水道普及の進展や国民の水辺回復要求の高まり、水の循環・再生利用の必要性増大等の現状を受けて、水系の衛生学的基準のあり方について再検討する必要性が高まってきている。しかし、放流先水系での病原性微生物の挙動についてはいまだ不明な部分が多い。本研究は、このような衛生学的基準についての判断資料とすべく、消毒方法や水系状況の相違に伴う下水処理水中の病原性微生物の水系での挙動について調査を行うものである。

#### 2. 過年度の調査概要

##### 2.1 平成10年度の調査概要

###### 2.1.1 文献調査

水系における感染症は、飲料水やレクリエーション水（プール、海水浴、親水利用）などによるものがある。近年の我が国における水系感染症の集団発生事例では、原因は地下水、簡易水道を中心とする水道施設の管理不十分や給水設備の故障によるものであり、原因微生物は、大腸菌とカンピロバクターが大部分を占め、その他サルモネラ、赤痢菌、クリプトスポリジウム、ウェルシュ菌等であった。

環境中に放出された微生物の生残・死滅に影響を与える要因は、非生物的要因として、温度、圧力、電磁波、基質、無機養分、イオン組成、有効水、pH、酸化還元電位、ガス組成、毒性等であり、生物的要因としては、競争、拮抗、捕食、植物との相互作用、菌体側の要因として、耐久型細胞の有無、生理状態、保有するプラスミド等が考えられている。

###### 2.1.2 水中における指標細菌の消長

微生物の消長に与える水温および溶存酸素の影響を把握することを目的として、生理食塩水および下水二次処理水に、数種の細菌および大腸菌ファージを添加し、その微生物濃度の変化を把握した。また、同様の実験を、流入下水や消毒処理水を用いて行い、水質の微生物挙動への影響について検討を行った。

その結果、どの微生物も4℃で増殖することはなかったが、20℃および30℃では初期に増加する菌種が認められた。また、減少速度は、温度が高いほど大きくなる傾向が見られた。このように、水温はその微生物の状態（増殖期にあるか、減衰期にあるか）によって、増殖および減衰速度が水温と正の相関があると考えられた。

##### 2.2 平成11年度の調査概要

###### 2.2.1 塩素消毒における細菌再増殖の検討

消毒処理水中における細菌の挙動では、塩素処理水、オゾン処理水および紫外線処理水ともに、細菌の再増殖が懸念されたため、塩素消毒における消毒レベルと細菌再増殖の検討を行った。

その結果、塩素消毒により大腸菌生残比を $-4\log$ とした場合であっても再増殖はみとめられるが、消毒レベルを高めることで、再増殖を防げるとともに増殖までのラグタイムが長くなる傾向がみられた。

##### 2.3 平成12年度の調査概要

###### 2.3.1 水路内における細菌の挙動に関する調査

下水処理水放流先の河川を模擬した実験水路を用いて、大腸菌および大腸菌群を指標とした細菌の挙動について検討を行った。

その結果、水路床がSUSの場合、水路内での細菌の減少は見られないが、水路床が砂利の場合、細菌が減少し、その除去率は水理的滞留時間が長い方が大きくなった。また、水理的滞留時間14分、水路床が砂利の場合、三次処理（砂ろ過）水中の大腸菌は水路内で33%除去され、生物膜や堆積物へ移行し、移行した大腸菌の99.97%は、死滅や被捕食により減衰することが明らかになった。細菌の減衰速度は、時間経過とともに低下する傾向が見られた。水路床が砂利の場合、約1日で大腸菌の減衰速度定数は $0.08h^{-1}$ であり、自然減衰での $0.04h^{-1}$ に比較して高く、生物膜は細菌除去に有効であると考えられた。

### 2.3.2 RT-PCR法による下水処理水中ウイルス検出

大腸菌RNAファージQ $\beta$ を下水処理水に添加し、RT-PCR法で検出した。その結果、RT-PCRの酵素反応の阻害に起因する検出感度の低下は、二次および三次処理水ともに0.5log程度であった。また下水処理水中には、高温下でRNAを分解する物質が多く存在していた。実験で用いたRNA抽出精製キットは、RNAを分解せずに抽出するためには有効だが、RT-PCRの酵素反応を阻害する物質を除去することはできなかった。

## 3. 平成13年度の調査概要

### 3.1 目的

平成10年度の調査では、塩素消毒により一度は細菌が減少したにもかかわらず、100~200時間後には再増殖する傾向が確かめられた<sup>1)</sup>。平成12年度の調査では、未消毒の下水処理水の放流先を模した水路の流下過程で細菌が減少する傾向が見られた<sup>2)</sup>。これらの結果を受け、本年度は塩素消毒後の下水処理水中の細菌が放流後の水系でどのような消長を示すかを平成12年度と同様に模型水路を用いて調査することとした。

### 3.2 方法

国土技術政策総合研究所湖北総合実験施設内に設置した模型水路を用い、水路内での細菌の挙動について検討を行った。模型水路の概要を図-1に、模型水路の写真を図-2に示す。図-1中の四角1~15及びoutは水深を測定した位置を示す。模型水路は原水槽、原水供給ポンプ、循環水槽、循環水供給ポンプ及び水路から構成されている。水路はSUSで作られており、幅20cm、長さ30mの水路を2本直列に接続してあり、合計で60mの長さがある。この水路はそれぞれのポンプを用いて供試水を一過式もしくは循環式で流下

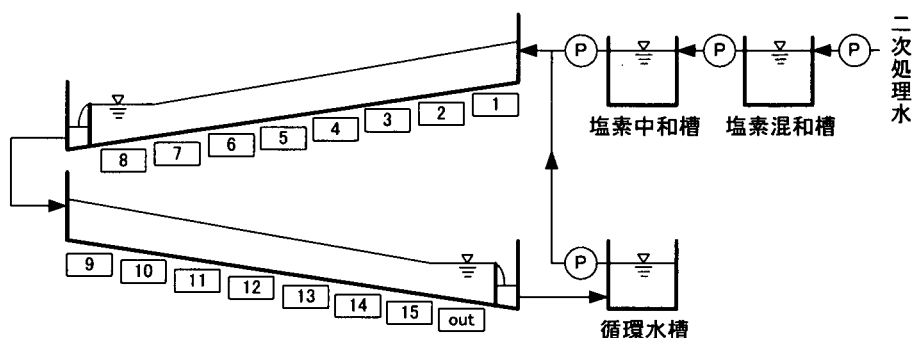


図-1 模型水路の概要

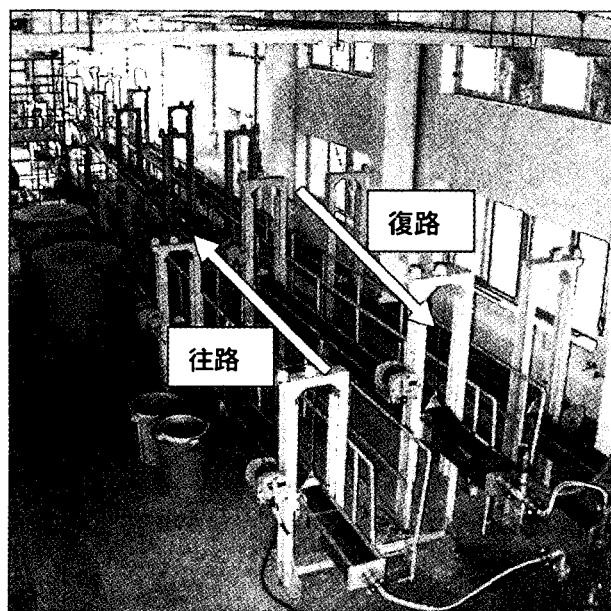


図-2 模型水路

させることが可能である。また、水路は勾配を自由に設定することも可能である。

供試水には実下水を用いた反応槽容量 10m<sup>3</sup> の標準活性汚泥法パイロットプラントから得られた二次処理水を塩素消毒したもの、及びそれをチオ硫酸ナトリウムで中和したものとした。なお、塩素注入率は 0.5mg/L とした。

測定項目は、指標細菌として大腸菌、大腸菌群、及び一般細菌とした。大腸菌及び大腸菌群の測定は、合成発色酵素基質培地（MERCK 社製クロモカルト寒天培地）を用い、βガラクトシダーゼ活性とβグルクロニダーゼ活性の有無を形成集落の色調により判別した。一般細菌、デソキシコール酸塩培地による大腸菌群は下水試験方法に準拠した。また、同時に一般水質項目として、水温、pH、DO、COD<sub>Cr</sub>、SS、各態窒素、及びりんを測定した。

本研究では細菌の再増殖と水路による減衰の関係を調査するが、過年度の研究ではおよそ 100 時間程度で大腸菌群等が再増殖することが示唆されている<sup>9)</sup>。そのため、本実験では供試水を水路に循環させつつ流し、それぞれの条件において循環通水開始前と循環通水開始後およそ 120～150 時間後に、図-1 における「1」から採水し、それぞれの項目について測定した。実験条件を表-1 に示す。水路床は SUS、砂利、及び生物層を付着させた砂利の 3 種類とした。「SUS」の場合

表-1 実験条件及び水路状況

	RUN 1	RUN 2	RUN 3	RUN 4	RUN 5	RUN 6	RUN 7	RUN 8	
水路形状	30,000mm <sup>L</sup> × 200mm <sup>W</sup> × 100mm <sup>H</sup> × 2往復								
水路床	SUS			玉砂利				生物層	
塩素中和	無	無	有	無	有	無	無	無	
流量 [L/min]	15	15	15	15	15	100	100	15	
勾配 [%]	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	6.67	2.33	
平均砂利高 [mm]	0.0	19.0	19.0	19.6	19.0	20.0	19.1	19.0	
平均水深 [mm]	10.3	21.7	21.7	18.4	21.7	45.3	36.7	21.7	
平均流速 [m/sec]	0.121	0.058	0.058	0.068	0.058	0.184	0.227	0.058	
	[m/hr]	7.3	3.5	3.5	4.1	3.5	11.0	13.6	3.5
レイルス数	867	1,151	1,024	808	1,151	4,389	5,353	1,024	
水路容量 [m <sup>3</sup> ]	0.12	0.26	0.26	0.22	0.26	0.54	0.44	0.26	
循環水槽容量 [m <sup>3</sup> ]	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	
全容量 [m <sup>3</sup> ]	0.60	0.74	0.74	0.70	0.74	1.02	0.92	0.74	
水路滞留時間 [min]	8	17	17	15	17	5	4	17	
循環時間 [min/回]	40	49	49	47	49	10	9	49	

※玉砂利の性状:85%が粒径8～12mm、空隙率36.7%

※塩素注入率は0.5mg/L

※「平均水深」は玉砂利の空隙率を考慮した値

「玉砂利」の場合、それぞれの RUN の前に水道水で水路を洗浄し、その後供試水を通水した。

「玉砂利」の場合、それぞれの RUN の前に水道水を用いて丹念に水路と砂利を洗浄し、玉砂利に付いた生物層を落とした上で実験を行った。「生物層」

の場合「玉砂利」の場合と同様に洗浄してから玉砂利を水路に敷き、その状態

で塩素消毒を施していない下水二次処理水を 15L/min で一過式に 1ヶ月間流し続けることにより玉砂利に生物層を付着させ、その後実験を開始した。

また、水質のみならず、玉砂利に付着した指標生物についても分析を行った。分析は、供試水を水路に通水する前と通水した後に行い、それらの差を通水後玉砂利に付着した指標生物量とした。分析方法は、まず

図-1 に示す「1」～「out」からそれぞれ、ほぼ同量ずつ少量の玉砂利を無菌的に採取し、ガラス瓶に入れた。これに高圧蒸気滅菌を施した生理食塩水を入れ、その上で超音波処理を 15 分間行った。この生理食塩水に含まれる指標細菌を測定し、それを単位玉砂利あたりの付着指標生物数とした。

3.3 結果

水路内縦断図を図-3 に示す。なお、横軸は測定地点を示し、図-1 における水路床番号に準じる。また、流れの状況について表-1 に示す。

水路は 2 本の水路を直列につないだものだが、それぞれの末端には堰を設けているため、それぞれの末端にあたる「8」、「out」では水面が高くなっていた。しかし、流速の大きい RUN6、RUN7 を含めて、それぞれの末端部で玉砂利が堆積していることはなかったため、玉砂利が流されていることはなかったものと考え



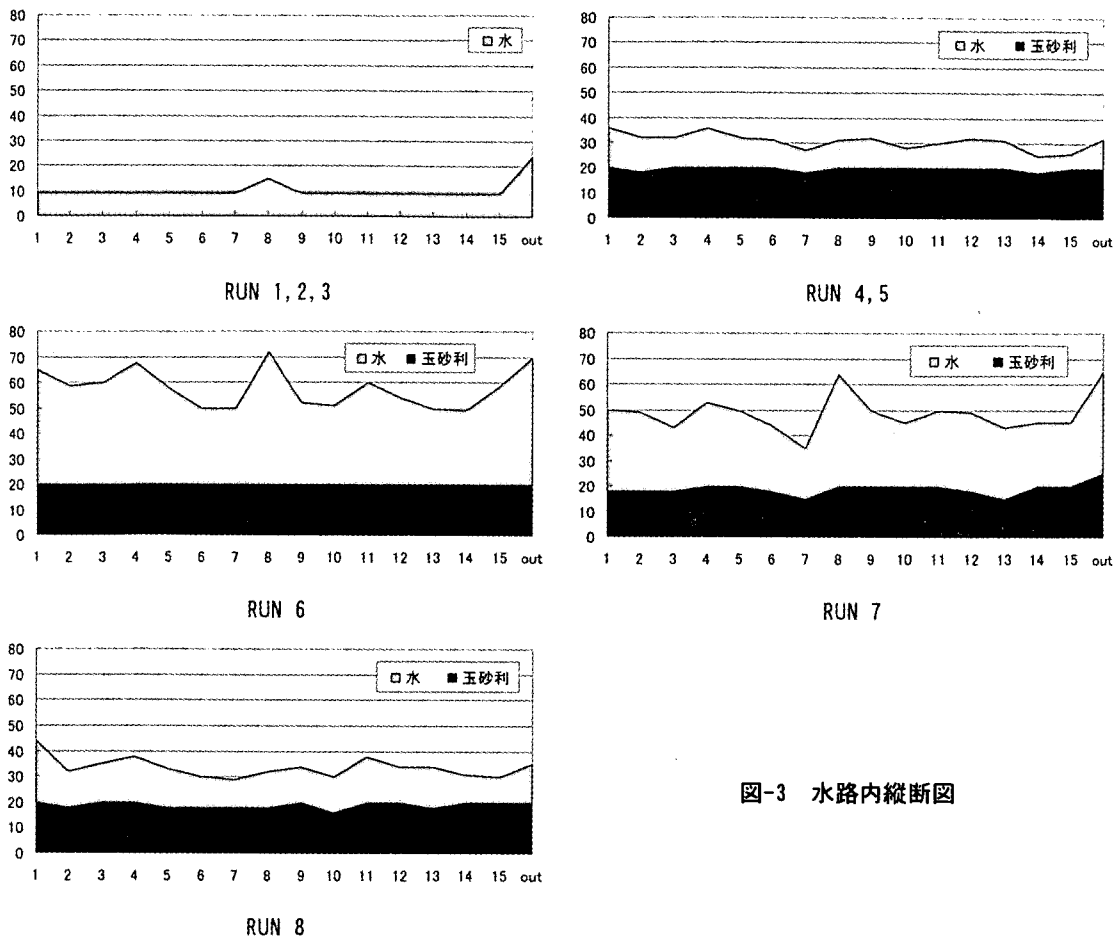


図-3 水路内縦断面

えられる。また、傾斜を大きくしている RUN7 では他の場合に比べ水面及び玉砂利層が不規則になっていた。レイノルズ数は流量の大きい RUN6、RUN7 で大きくなっていった。

表-2 に実験結果を示す。SS は全てのケースにおいて減少していた。水量が多く、乱流状態となっていた RUN6、RUN7 では SS が巻き上がり減少率に差が出るのが予想されたが、RUN6、RUN7 でも他のケースと同程度減少していた。減少した SS は 120～150 時間の通水の間には沈降したものと考えられる。ただし、水路床を生物層とした RUN8 では SS がほとんど減少していなかった。これは採水したときに、玉砂利から剥離した生物層を一緒に採取してしまったこと等が原因として考えられる。COD<sub>Cr</sub> も同様にほとんどのケースにおいて減少していたが、水温の低い RUN1、RUN4、RUN7 では逆に増加していた。水温が低いために COD<sub>Cr</sub> が微生物によって分解されることがなかったため減少はしなかったものと考えられるが、増加した原因は明らかではない。窒素、リンはケースごとに明確な差は見られなかったが、ほとんどのケースでは NO<sub>3</sub>-N が増加することとなり、流下過程において硝化が進んでいることがわかった。総じて水路内は好氣的に保たれており、有機物等は分解されている傾向となっていた。

一方衛生学的指標では、大腸菌は全てのケースにおいて 97%以上の除去率となったが、大腸菌群（クロモカルト）、大腸菌群（デソキシコール）、一般細菌ではケースごとに差が出ることとなった。まず、水温の異なるケースとして RUN1（平均 9.4℃）と RUN2（平均 24.5℃）における指標細菌の除去率を比較すると、RUN1 では大腸菌群（クロモカルト）が 98.9%、大腸菌群（デソキシコール）が 87.9%、一般細菌が 94.1% となっているのに対し、RUN2 ではそれぞれ 70.6%、63.2%、42.5%となっている。過年度に行った文献調査では、河川調査により大腸菌群数が水温と正比例の関係があることがわかっている<sup>3)</sup>。また、過年度に行った基礎実験では、20℃では生理食塩水中（微量の培地成分を含む。）の大腸菌群数は増加するのに対し、

表-2 分析結果

	RUN 1		RUN 2		RUN 3		RUN 4		RUN 5		RUN 6		RUN 7		RUN 8	
	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
水路床			SUS						玉砂利						生物層	
塩素中和	無		無		有		無		有		無		無		無	
流量	15		15		15		15		15		100		100		15	
条件	2.33		2.33		2.33		2.33		2.33		2.33		6.67		2.33	
水温 [°C]	10.3	8.4	25.4	23.5	21.8	21.4	13.8	9.9	24.9	23.9	12.7	11.5	13.2	13.3	17.4	22.7
pH	6.8	7.8	6.4	7.5	7.1	6.9	7.6	7.1	6.5	6.0	6.5	7.5	6.5	7.6	6.2	5.4
DO [mg/L]	5.3	10.6	6.2	8.1	8.3	4.7	8.8	11.2	2.7	4.2	7.6	8.0	7.7	6.6	5.0	4.4
遊離塩素 [mg/L]	0.11	0.06	0.08	0.07	0.07	0.04	0.15	0.09	0.00	0.05	0.10	0.04	0.11	0.09	0.08	0.08
全塩素 [mg/L]	0.14	0.08	0.10	0.07	0.10	0.09	0.23	0.11	0.21	0.10	0.14	0.11	0.12	0.11	0.14	0.12
COD <sub>Cr</sub> [mg/L]	52	54	28	8	59	21	40	54	37	14	51	17	20	31	26	21
SS [mg/L]	18.5	0.3	8.8	1.1	7.6	1.4	2.6	1.7	5.4	1.2	11.8	0.6	6.6	2.4	8.0	7.0
T-N [mg/L]	15.0	12.7	18.1	19.2	18.0	19.0	13.5	21.8	22.0	25.4	15.2	17.0	14.8	15.2	23.9	38.3
NH <sub>4</sub> -N [mg/L]	1.8	0.1	0.2	0.0	0.1	0.1	1.0	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.6
NO <sub>2</sub> -N [mg/L]	8.6	4.4	0.1	0.0	0.0	0.1	5.6	4.8	0.1	0.2	3.9	1.4	11.3	0.0	0.2	0.1
NO <sub>3</sub> -N [mg/L]	1.7	5.9	22.9	18.9	12.6	17.2	3.7	12.3	16.5	16.4	7.1	14.5	2.0	13.7	20.9	33.4
NO <sub>x</sub> -N [mg/L]	10.3	10.2	23.0	18.9	12.6	17.2	9.3	17.1	16.6	16.6	10.9	15.9	13.2	13.7	21.1	33.5
T-P [mg/L]	1.68	1.38	1.82	1.75	1.91	2.02	1.61	1.80	1.97	1.25	1.69	1.50	1.55	1.39	2.13	3.28
PO <sub>4</sub> -P [mg/L]	1.23	1.25	1.75	1.71	1.70	1.76	1.42	1.67	1.68	1.72	1.36	1.50	1.39	1.47	1.60	2.85
衛生指標																
大腸菌 [CFU/mL]	138	1	97	0	41	1	28	0	66	1	55	2	83	2	32	1
大腸菌群 [CFU/mL]	2,125	24	2,810	825	1,935	1,535	1,945	66	4,670	2,050	2,040	113	2,230	107	1,085	633
大腸菌群(デソ) [CFU/mL]	87	11	585	215	1,035	420	206	18	1,035	845	115	13	233	49	171	1,650
一般細菌 [CFU/mL]	5,450	320	2,225	1,280	8,350	595	27,600	2,940	3,550	4,700	8,450	620	21,450	835	2,260	2,660
除去率																
大腸菌 [%]	99.3		100.0		98.8		100.0		99.2		97.3		97.6		98.4	
大腸菌群 [%]	98.9		70.6		20.7		96.6		56.1		94.5		95.2		41.7	
大腸菌群(デソ) [%]	87.9		63.2		59.4		91.5		18.4		89.1		79.2		-864.9	
一般細菌 [%]	94.1		42.5		92.9		89.3		-32.4		92.7		96.1		-17.7	

4℃では時間に伴う減少が確認されている。本調査でも水温が高い方が大腸菌群、一般細菌が多くなっており、過年度の調査結果と一致する結果となった。また、塩素消毒後の塩素中和の有無においても衛生学的指標に差が出た。RUN2 と RUN3 を比較すると、大腸菌群はクロモカルトとデソキシコールのいずれの培地でも塩素を中和したケースの方が除去率が低くなった。一方、一般細菌は塩素を中和しなかった方が除去率が低くなった。また、水温が異なるために明確な判断はできないが、RUN4 と RUN5 を比較しても、指標細菌の除去率に大きな差が生じている。この差は、水温だけが異なる RUN1 と RUN2 の差よりも大きいため、塩素中和の有無の差が現れているものと考えられる。ただし、RUN2 よりも、塩素中和を施した RUN3 の方が一般細菌の除去率が高くなっている原因、及び RUN5 で一般細菌が増加している原因は明らかでない。また、水路床を生物層とした RUN8 では大腸菌以外の衛生学的指標の除去率は低くなっており、生物層による分解は確認されなかった。RUN8 では他のケースに比べて通水後の SS が高くなっているため、採水時に剥離した生物層と一緒に採取した可能性が考えられる。このため、大腸菌群(デソキシコール)が 10 倍程度まで増加する結果になったものと考えられるとともに、大腸菌群が SS に付着していた可能性が考えられる。

一方、生物層以外の水路床、水量、傾斜による衛生学的指標の差異は見られなかった。水量を増加させたり、傾斜を大きくさせたりすることにより流れが乱れることになり、沈降した SS や衛生学的指標が巻き上げられ衛生学的指標に影響を及ぼすことが予想されたが、その影響は確認できなかった。また、過年度の研究では、水路床が玉砂利の場合は玉砂利への吸着や空隙への捕捉により、水路床が SUS の場合よりも衛生学的指標に影響が出る結果となったが、本実験ではその影響は確認できなかった。この原因として、指標細菌が砂利やその付着生物によって吸着、分解されることよりも、塩素消毒の影響をより受けたことが考えられる。これらのことから、本実験の範囲では、乱流状態としても衛生学的指標にあまり影響を及ぼさないことや、水路床よりもわずかながら存在する残留塩素が影響を及ぼしやすいことがわかった。

表-3 には各衛生学的指標の除去率に関して、相関係数を示す。なお、ここでは除去率が他とは大きく異なっている RUN8 を除外して計算した。大腸菌はすべてのケースにおいて 100%に近い除去率を示していたため、ケースによって差が生じた他の指標とは相関はなかった。一方、デソキシコール酸塩培地による大腸菌

群と一般細菌は高い相関が見られた。しかし、これらが実際の病原性微生物とどれだけの相関があるのかが明らかでないため、今後の研究が必要であると考えられる。

表-4 には玉砂利への付着指標細菌数を示す。これは通水後の付着指標細菌数から通水前の付着指標細菌数を引いた差を示しており、正の値になっているものは通水中に指標細菌が付着して増加ことを示し、負の値になっているものは通水中に指標細菌が玉砂利から離れたことや、死滅により減少したことを示している。表-4 からは、

流量の少ないケースでは細菌が玉砂利へ付着しているのに対し、流量の多いケースでは必ずしも付着しておらず、むしろ付着細菌数は減少している場合が多かった。しかし、玉砂利へ付着した指標細菌数は通水中に減少した指標細菌の0.01%~3%にとどまっておき、付着による指標細菌の除去はあまりないものと考えられ、過年度の調査と一致する結果となった。また、付着した指標細菌が減少している場合でもその減少数は水中の指標細菌数に比較して非常に少なくなっていた。したがって、水路を流下する際は水路床への吸着（または脱着）の影響は少なく、ほとんどが別の要因（例えば被補食、死滅等）の影響を受けているものと考えられた。RUN8 では、付着していたすべての指標細菌が減少することとなった。RUN8 では他のケースに比較して通水後のSSが高いことから、何らかの理由で付着していたSSが巻き上がり、同時に指標細菌も巻き上がったため付着指標細菌が減少したものと予想された。

#### 4. まとめ

- 1) 塩素消毒した下水二次処理水を模型水路に通水した結果、各指標細菌は水温、塩素の中和の影響を受けることとなったが、本実験の範囲では水路床、水量、水路の勾配の影響は受けなかった。
- 2) 水路床を生物層とした場合には各指標生物が減少することが予想されたが、本実験では巻き上げられたSS等の影響により確認できなかった。
- 3) 各指標生物の相関係数を調べたところ、デソキシコール酸塩培地による大腸菌群と一般細菌には相関が見られた。しかし、実際の病原性微生物との相関は不明であるため、今後の研究が必要と考えられる。
- 4) 玉砂利に付着した指標細菌数は全指標細菌数に比べて極めて微少であり、通水により減少した指標細菌はほとんどが付着以外の要因（例えば被補食、死滅）によるものと考えられた。

#### 参考文献

- 1) 土木研究所資料第3661号 平成10年度下水道関係調査研究年次報告書集「水系における病原性微生物の挙動に関する研究」、p.59-64、1999
- 2) 国土技術政策総合研究所資料第10号 平成12年度下水道関係調査研究年次報告書集「水系における病原性微生物の挙動に関する研究」、p.61-68、2001
- 3) 御手洗清「愛媛県における河川の水質について」四国公衆衛生学雑誌、Vol.28、No.1、pp148-151、1983

表-3 衛生的指標の相関係数

	大腸菌	大腸菌群 クロモカト	大腸菌群 デソキシコール	一般細菌
大腸菌	-	0.154	0.214	0.348
大腸菌群(クロモ)	-	-	0.664	0.330
大腸菌群(デソ)	-	-	-	0.899
一般細菌	-	-	-	-

表-4 付着指標細菌数

		RUN4	RUN5	RUN6	RUN7	RUN8
実験条件	水路床	玉砂利				生物層
	塩素中和	無	有	無	無	無
	流量 [L/min]	15	15	100	100	15
	勾配 [%]	2	2	2	7	2
	水温 [°C]	11.9	24.4	12.1	13.3	20.1
付着細菌	大腸菌 [CFU/g]	4	2	-1	-2	-26
	大腸菌群(クロモ) [CFU/g]	261	15,340	290	-464	-5,306
	大腸菌群(デソ) [CFU/g]	101	180	-18	56	-285
	一般細菌 [CFU/g]	12,198	18,442	6,077	-2,331	-3,167

## 4. 微生物群制御による内分泌攪乱物質の分解手法に関する研究

下水処理研究室 室長 中島 英一郎  
主任研究官 小越 真佐司  
交流研究員 北中 敦

### 1. はじめに

都市活動によって排出される内分泌攪乱化学物質等は下水道に流入しており、下水処理で効果的に削減を図る必要がある。多くは、下水処理過程で除去されているが、処理が困難で残留割合が高い物質が存在している。一方、これらをよく分解する微生物が見出されており、それらを利用して既存施設の能力内で除去率を高めることができれば、好都合である。そこで本研究では、この特別な能力を有する微生物が活性汚泥のような複合微生物系の中で、どのような挙動をしているかを検討し、その能力を十分発揮させるために必要な事項を明らかにして、環境ホルモン等によるリスクを低減させる下水処理技術を確立しようとするものである。

平成12年度までの内分泌攪乱化学物質に関する調査・研究によって、下水処理場における主要な内分泌攪乱物質は17βエストラジオールとノニルフェノールであること、これらが活性汚泥処理によって実態として除去されていること、活性汚泥中にはこれらを分解もしくは蓄積する微生物が存在することが明らかになっている。また、分解微生物の単離も様々な研究機関等で行われており、土木研究所でも複数株の細菌を活性汚泥中から分離した。これらのうち、ノニルフェノール除去細菌を活性汚泥に直接摂取して除去率の向上を図ったが、逆に、分解率が低下する結果となった。

平成13年度は、活性汚泥から分離されたノニルフェノール除去菌株の希釈培養条件での除去能力を把握するための検討、活性汚泥によるノニルフェノールの除去機構解明のため、平成11年度から行っている集積部位に関する検討、除去微生物群把握のための第1段階としての活性汚泥処理条件によるノニルフェノール除去性の相違に関する検討を行った。

### 2. 活性汚泥微生物によるノニルフェノールの除去に関する検討

#### 2.1 単離菌株のノニルフェノール除去能力に関する検討

##### 2.1.1 検討方法

下水処理場等の活性汚泥から単一基質培地等を用いて単離したノニルフェノールを資化すると考えられる菌株9株について除去能力を検討した。保存していたこれらの菌株をノニルフェノールを含まない培地で増殖させた後、ノニルフェノール100mg/lを含む培養液10mlに対して菌増殖液1mlの割合で混合し、28℃で培養した。培養開始後、0、5、24、48時間後と7日、14日後に培養液を氷冷して培養を停止し、液相中のノニルフェノールを分析した。培養液は集積培養に用

表-1 培養液組成

成分	濃度 (%)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.35
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.05
NaCl	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.015
微量元素	少量
ノニルフェノール	0.01
酵母エキス	0.005
pH	7.0

いたものと同じ、表-1に示す組成のものを用いた。ノニルフェノールの分析は、図-1に示す通り、培養液からジクロロメタンによって直接液液抽出する方法で行った。

### 2. 1. 2 検討結果

結果を液相から回収したノニルフェノール量の経時変化として図-2に示した。菌増殖液を添加しない培養液からの回収量は990 $\mu\text{g}$  (回収率99%)であった。0時回収量は何れの株もこれより少なく、混合直後に菌体に吸着されたと考えられる。初期吸着量は220~370 $\mu\text{g}$ である。培養開始後5時間までは何れの菌株も回収量が減少したが、24時間後では減少が停止もしくは増加に転じた株が出現した。48時間後にはNo.4株を除く全ての株で最大回収量を観測し、24時間後から48時間後にかけて、一旦取り込んだノニルフェノールを放出する現象が生じたと考えられる。この間の放出量は200~520 $\mu\text{g}$ であった。その後は再び緩やかに回収量を減少させるものと、緩やかな増減を繰り返すものがあるが、No.3、No.6株

以外は、初期吸着時の回収量を上回った。また、すべての菌株において、5時間後もしくは24時間後に記録した最低回収量を下回ることにはなかった。48時間後から14日後までの回収量の減少は、-10~230 $\mu\text{g}$ の範囲であった。以上の結果から、ノニルフェノール資化性菌として分離された菌株のほとんどは吸着によってノニルフェノールを保持しているだけで分解能力はほとんど持たないと考えられる。特に、培養開始後24時間までの液相からの回収量減少は大部分が吸着によるものであったと考えられ、最大吸着量は340~640 $\mu\text{g}$ であった。

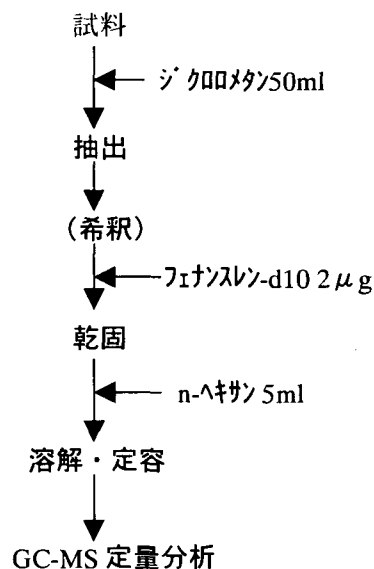


図-1 ノニルフェノール分析方法

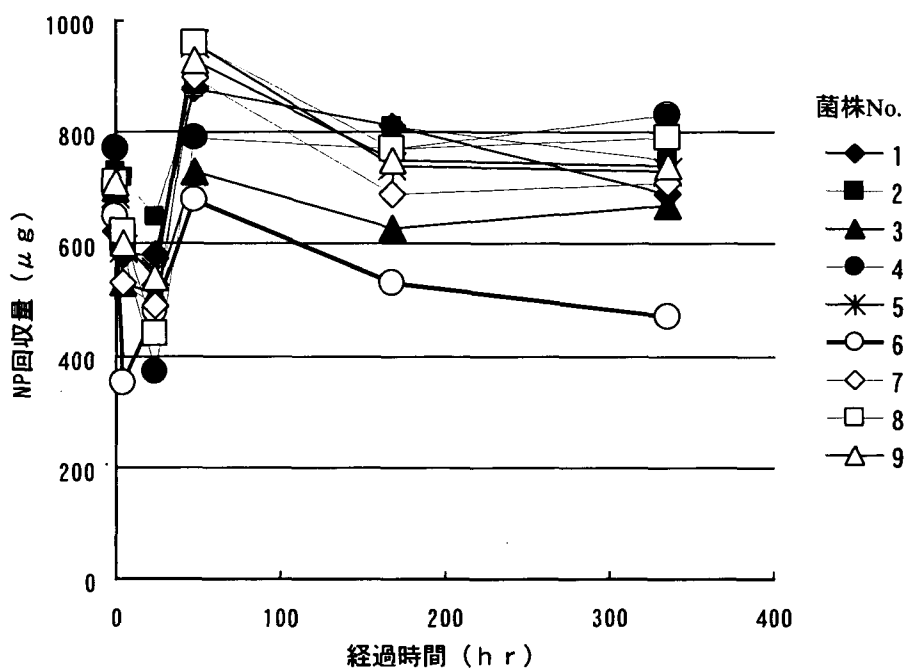


図-2 ノニルフェノール資化性検討実験結果

### 2. 2 活性汚泥による処理条件とノニルフェノール除去性の検討

## 2. 2. 1 実験の目的

実験室内の管理された条件の下で活性汚泥による下水処理を行い、運転方法がノニルフェノール除去に及ぼす影響を把握することを目的としている。今年度はSRTの違いについて検討した。

## 2. 2. 2 実験方法

図-3に示す膜分離活性汚泥処理装置を2組用い、混合液を週に1~2回、各装置所定の量を引き抜くことによってSRTを50日および100日に保った。長いSRTの設定であるが、通常の活性汚泥処理におけるSRTおよび

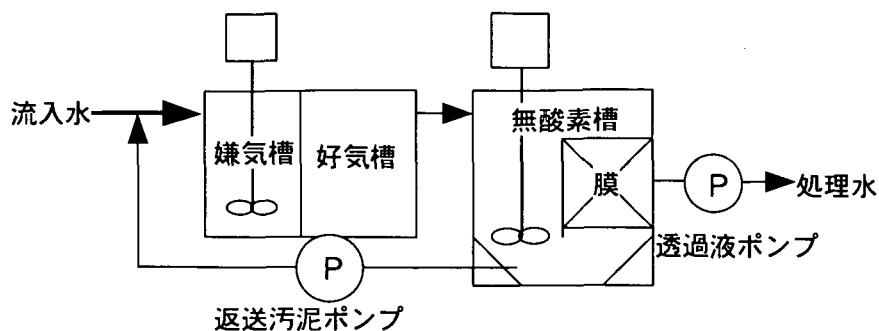


図-3 膜分離活性汚泥処理装置

HRTの影響は別課題で既に検討されていること、ノニルフェノールは生物分解が困難な物質であることから、長いSRTの設定としたものである。

処理対象の下水は茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北浄化センターで採取し#100メッシュスクリーンで夾雑物を除去した流入下水である。実験室内に搬入後は4℃で冷蔵庫内に保存し、ポンプで実験装置に供給した。馴致運転終了後は、エタノールに溶解した4-ノニルフェノールを1mg/lとなるように添加して保存・供給した。

下水処理の反応順序は嫌気-好気-無酸素で、膜は無酸素槽内に設置した。槽容積の比は順に2:3:5で、合計1Lである。無酸素槽から嫌気槽への汚泥返送率は設定流入速度の50%（場合により30~100%）に設定した。好気槽DOは無酸素槽ORPによって0.5または1.5mg/lまたは連続曝気の3段階に切り替わる設定でエアープンプをON-OFF制御し、無酸素槽の嫌気化および好気化を抑制した。

膜透過液の抽出はポンプによる連続抽出方式とし、原水供給ポンプと共に、無酸素槽の液位によってON-OFF制御した。膜透過液は冷蔵庫内の処理装置毎に独立した貯留槽に入り、1~数日分が貯蔵され、満水になると排出される。貯留槽液位、透過液ポンプ吸引圧力が検出・記録される他、透過液ポンプ運転時間の積算タイマーによって膜使用時間の読み取りが可能である。実験期間中に貯留槽液位の上昇速度の低下、吸引ポンプ圧力の低下などが認められた場合には、適宜、膜洗浄を行った。実験室内の温度は20℃であり、その他の運転条件、流入水量等は、表-2に示す通りであった。

分析は週1回、原水と貯留槽内の処理水を採取して環境省告示の方法に準じて水中のノニルフェノール濃度を分析した。

表-2 運転条件等

項目	SY1	SY2
SRT(日)	100	50
平均処理水量(ml/d)	1232	1212
MLSS(mg/l)	2940	2770
好気槽DO(mg/l)	0.59	0.76
嫌気槽ORP(mV)	-259	-306
無酸素槽ORP(mV)	-8.4	10.4

### 2. 2. 3 実験結果

図-4に実験結果を示した。ノニルフェノールの添加開始後（2月3日以降）に処理水中に残留するノニルフェノール濃度は、2系列とも馴養期間中の約 $0.1\mu\text{g/L}$ から、 $4\mu\text{g/L}$ 以上に上昇した。添加開始直後の2回を除く5回の分析結果の平均は、SRT50日のSY2系は $8.7\mu\text{g/L}$ で、SRT100日のSY1系の $4.5\mu\text{g/L}$ のほ

ぼ2倍であった。除去率としての差は0.2%程度であり、両系とも馴養期間中とほぼ同じ99%以上の高い除去率であった。50日以上長いSRTでも、短い方が処理水中へのノニルフェノールの残留性が高まることを示す結果であると考えられる。

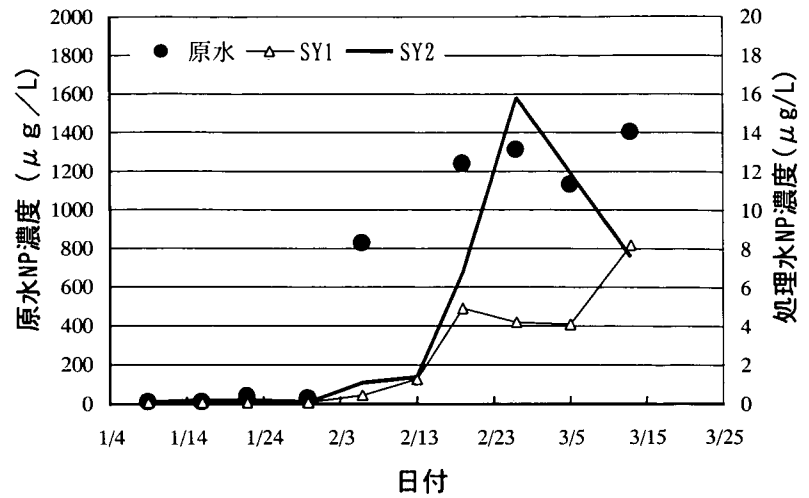


図-4 SRT比較実験結果

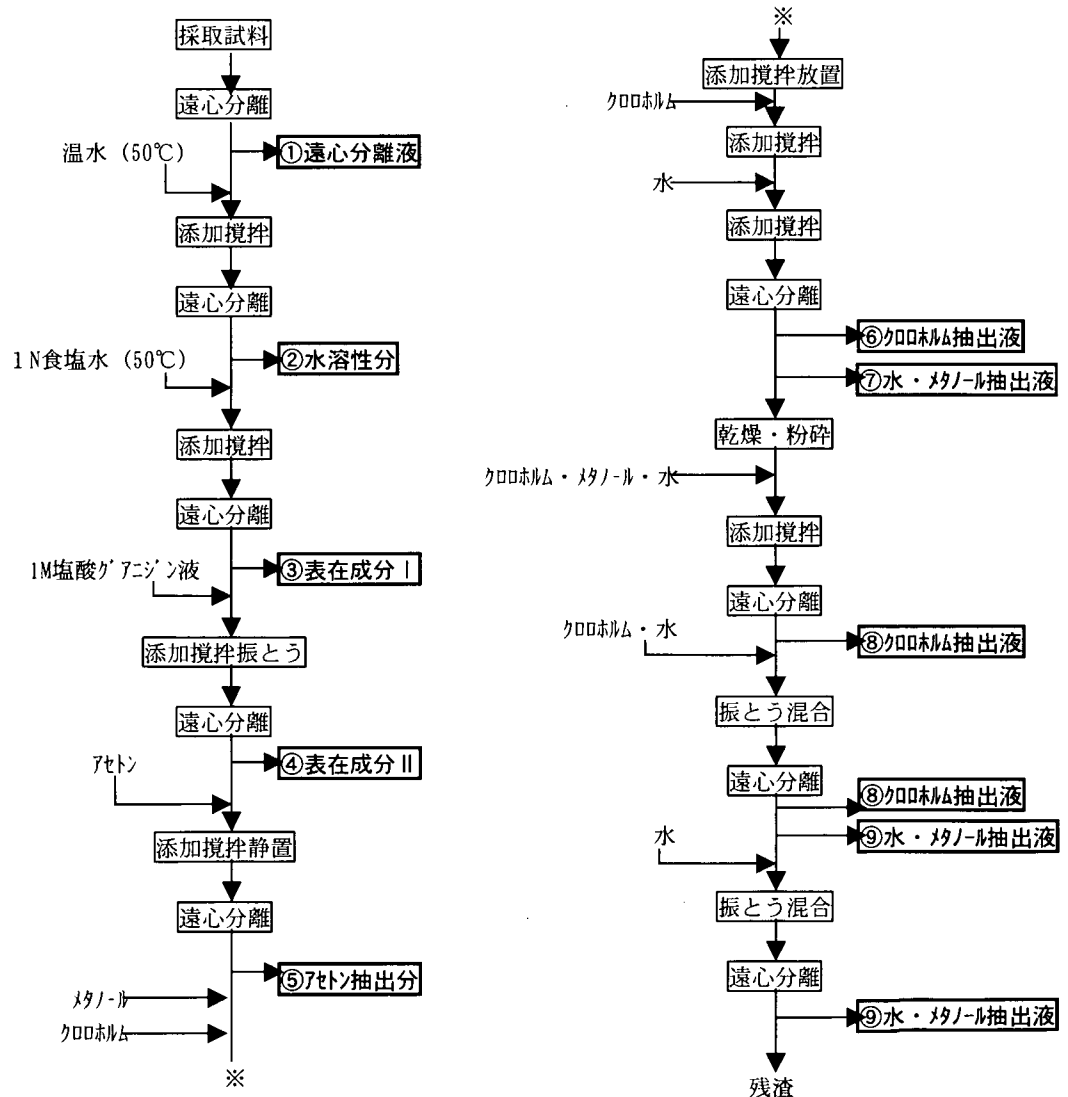


図-5 NP段階抽出操作

## 2. 3 活性汚泥中のノニルフェノールに関する検討

### 2. 3. 1 目的

前節の実験でSRT制御のために引き抜いた活性汚泥について、ノニルフェノールの含有量解析して、ノニルフェノール除去が吸着と分解の何れによるものか推定すると同時に、汚泥中の部位についての平成12年度の検討結果の再現性確認を目的として行った。また、同じ流入下標準的なSRTで処理している実験プラントの活性汚泥を同じ方法で分析して集積部分を比較SRTの長い膜分離法との相違を把握することも目的としている。

### 2. 3. 2 方法

活性汚泥からの抽出方法を図-5に示した。平成12年度の結果では実験室汚泥ではアセトン抽出分にノニルフェノールが多く含まれていたため、本年度の抽出法ではクロロホルム-メタノール抽出の前にアセトン抽出段を加えた。その他はほぼ平成12年度の方法と同じである。

### 2. 3. 2 結果

#### a. 活性汚泥中のノニルフェノール

量： 活性汚泥中のノニルフェノール

の含有量は、ノニルフェノールを添加した下水を処理して得た実験室汚泥の方が、ノニルフェノール無添加のほぼ同じ下水を標準的なSRTで処理して得た実験プラント汚泥より10~20倍含有量を示した。添加下水のノニルフェノール濃度は無添加下水の600倍程度あったが、陥は同程度であったから、ノニルフェノール抽出量の除去量に対する比率は、実験プラント汚泥が室内実験汚泥より30~60倍高い。図-6は実験室汚泥から抽出したノニルフェノール量移を示したものである。SRT50日の方は短期の変動が激しいが、長期的には安定した値で推ると見ることができる。平均値は640 $\mu$ gで、SRT100日の平均416 $\mu$ gより高いノニフェノール抽出量を示した。両者

の除去量には大差がないから、SRTの長い方がノニルフェノールとして抽出され難い形になっているものと考えられる。このような変化がノニルフェノールの分解によるものか吸着形態の違いによるものかは今回の結果からは判断できない。

b. 活性汚泥中のノニルフェノールの存在部位：段階抽出の

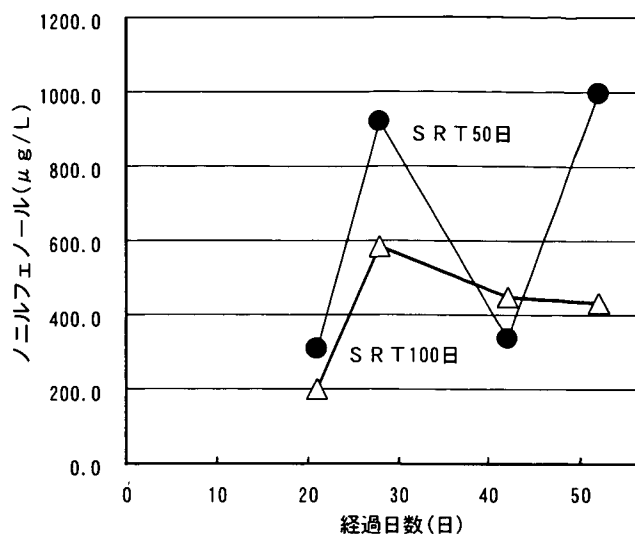


図-6 ノニルフェノール抽出量の推移

ノニルフェノール抽出部位の比較

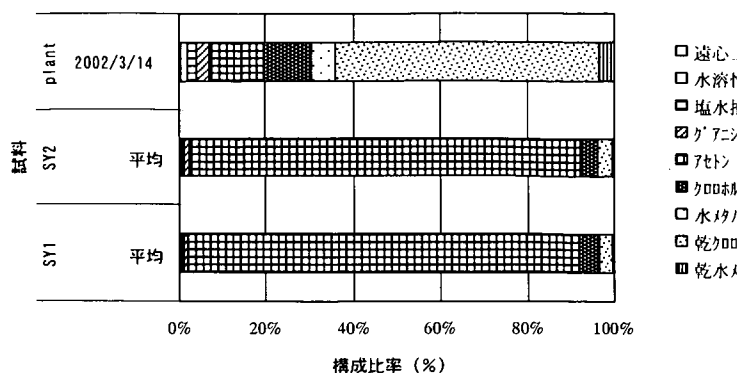


図-7 ノニルフェノール抽出部位の比較



各段での抽出量は  
実験室汚泥と実験  
プラント汚泥とで  
かなり異なった傾  
向を示した(図-  
7)。即ち、実験室  
汚泥ではアセトン  
によって抽出され  
る部分の割合が非  
常に高いのに対し、  
実験プラント汚泥

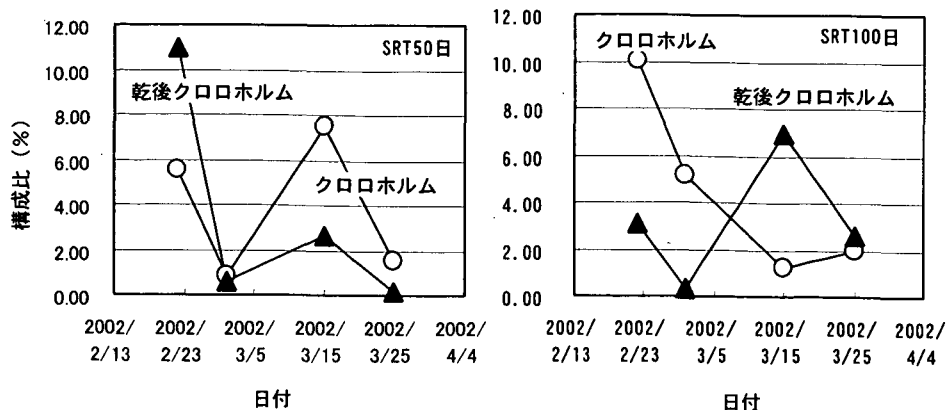


図-8 クロロホルム抽出画分の推移

ではクロロホルムによって抽出される部分が多い。この結果は平成12年度の調査結果とほぼ同じであり、ノニルフェノールの形態や実験プラント汚泥と実験室汚泥の運転条件等に基く違いであると考えられる。実験室汚泥のSRTの違いによると見られる抽出部位の大きな差異は認められず、また、図-8に示すように、主要な抽出部位が経時的に変化する傾向も不明確であった。

表-3 ノニルフェノールの収支

			添加21日後	28日後	42日後
S R T 50 日	総除去量	( $\mu\text{g}$ )	38200	47800	70700
	総引抜き量	( $\mu\text{g}$ )	129	215	391
	保持量	( $\mu\text{g}$ )	306	920	337
	不明分	( $\mu\text{g}$ )	37800	46700	70000
	(不明率)	(%)	98.9	97.6	99.0
S R T 1 0 0	総除去量	( $\mu\text{g}$ )	43400	52900	73600
	総引抜き量	( $\mu\text{g}$ )	42	69	142
	保持量	( $\mu\text{g}$ )	199	586	443
	不明分	( $\mu\text{g}$ )	43200	52200	73000
	(不明率)	(%)	99.4	98.8	99.2

### 3. ノニルフェノールの微生物処理に関する考察 および今後の課題

ノニルフェノール資化性を基準に活性汚泥から分離した菌の多くは、ノニルフェノールを多く吸着する菌であったが、分解は確認できなかった。一旦吸着されたノニルフェノールが大量に放出される現象が全ての株で認められたことから、単純な物理化学的吸着ではなく菌体内への直接的な取り込みあるいは生物活動に伴う菌体外分泌物への吸着等、生物反応による現象の可能性はある。ノニルフェノール添加下水を膜分離活性汚泥法によって処理し、1ヶ月以上にわたって99%以上のノニルフェノール除去率が安定して得られた。この間のノニルフェノール除去量と汚泥中の保持量および余剰汚泥としての排出量の収支を推定してみると、表-3の様になり、SRTが長い方が不明分の割合が高くなった。不明分は今回用いた抽出法では抽出できなかった吸着分や、分解されて他の物質に変換された部分であると考えられる。吸着だけの可能性もあるが、SRTが長い条件で不明分が増えていることから、増殖速度の遅い微生物(群)の作用によって分解が進展している可能性がある。ノニルフェノールの分解が検証できれば、それに関わる微生物(群)と、機能発現のための条件について、解明を進めてゆく必要があると考えられる。

#### 参考文献

鈴木、小越、金「水環境健全化のための環境ホルモン等リスク対策の調査検討」平成12年度下水道関係調査研究年次報告書集、国総研資料第10号 pp53~60

## 5. 病原性微生物の同定方法および挙動に関する研究

材料地盤研究グループ（リサイクル） 首席研究員 鈴木稔

研究員 北村友一

研究員 中村みやこ

### 1. はじめに

下水処理水が関与した病原性微生物による集団感染の未然防止、また、下水処理水や汚泥の再利用にあたり、下水処理水や下水汚泥に含まれる病原性微生物に関する安全性確保が求められている。このため、極微量の病原性微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発や、下水処理過程や環境水中での病原性微生物の挙動の解明が望まれている。

本研究課題では上記の要請を踏まえ、分子生物学的手法（特に PCR (Polymerase Chain Reaction) 法）により、環境水・下水・汚泥中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出する手法を提案する。また、下水処理過程や環境中でのウイルスおよび原虫の挙動を解明する。

水系病原ウイルスの検出に PCR 法を適用する場合、試料の適切な濃縮精製方法の開発と、ウイルスの生死判定が大きな課題となる。そこで PCR 法の適用に先立ち、比較対照として、現在一般的に用いられている培養法で得られたウイルスデータから、下水処理水再利用におけるウイルス感染の危険性の現状を把握し、さらにその制御手法の選定方法について検討した。

原虫に関してはクリプトスポリジウムを研究対象としているが、現在、クリプトスポリジウムオーシストの検出は、蛍光抗体染色を施した後、顕微鏡観察により検出されている。しかし、多くの夾雑物を含む環境水や下水試料中のオーシストを検鏡により検出することは困難であり、簡便かつ迅速な試験方法の開発が望まれている。そこで、本年度は、顕微鏡観察を必要としないリアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムオーシストの定量検出方法を検討した。

### 2. 下水処理水再利用における病原ウイルスの挙動把握および制御手法の検討

#### 2. 1 はじめに

下水処理水は、流量が安定しているため都市における代替水資源として重要視されている。平成 11 年度において、下水処理場で再利用された下水処理水の量は、全下水処理水量の 1.2% である 1.5 億 m<sup>3</sup> となっている。一方、これまで問題にされてこなかった、ウイルスや原虫などの感染事例が多く報告されている。ウイルスに関しては、海外において処理水再利用の水質基準や処理法ガイドラインの設定例が見られるものの、日本ではまだ対策が検討されておらず、早急な対応が求められている。

以上の背景から、水系病原ウイルスに関する安全性確保の方法を検討することを目的として、土木研究所を主体とする「高度処理会議」の中に、平成 6 年に「再生水質検討小委員会」（2. 4 末尾の補注参照）が設置された。本委員会では、土木研究所の研究実施計画に基づき、全国下水処理場のウイルス実態調査、および下水中ウイルスの除去不活化実験<sup>1)</sup>を行った。委員会の調査・実験結果を用いて、幅広い再生水の利用状況に対するウイルス感染リスクを定量的に評価するとともに、より合理的にウイルスを制御する方法について検討した。

#### 2. 2 下水二次処理水中のウイルス存在状況

平成 9、10 年度の 2 年間、8 月から 3 月にかけての 3~4 回/年、全国 10 箇所の下水処理場で行われた病原ウイルス（腸管系ウイルス）の実態調査によると、二次処理水中ウイルス濃度累積頻度の標準偏差を横軸  $x$  に、ウイルス濃度実測値を縦軸  $y$ （対数軸）にとった場合、 $y = 0.9901x - 0.2133$  なる直線関係が得られた。このことから二次処理水中のウイルス濃度全体分布は、平均  $\mu = -0.2133$ （分散  $\sigma^2 = 1$ ）の対数正規分布に従うと推定された（全国の調査結果を一括してデータ解析しているため、地域の特性は考慮していな

い)。

## 2. 3 ウイルス感染リスクの算定と制御手法の検討

### 2.3.1 ウイルス制御手法選定の一般手順

下水および下水処理水中のウイルス濃度を直接測定し、常時監視することは、多大の労力や時間を必要とする。このことから、ウイルス濃度ではなく、再生処理法によってウイルスを制御する方法について検討した。即ち、再生水中のウイルス濃度の分布と、人が誤摂取する再生水量から、ウイルスに感染するリスクを求め、これを目標値以下に抑えるための再生処理法を選定する方法を検討した。

図-2.1 に、下水二次処理水を再利用する場合の、再生処理法を選定する手順を示す。

まず、対象とする再利用施設の利用状況を想定して、再生水を誤って経口摂取する年間頻度と、1回あたりの摂取水量を設定する。

次に、再利用における誤摂取水量・頻度の設定値と、二次処理水中のウイルス濃度(実態調査結果)、および1回あたりウイルス摂取量と感染確率の関係を示す式(文献<sup>2)</sup>から引用)から、二次処理水をそのまま再利用した場合の年間感染リスクを計算する。ウイルス濃度が分布を示すので、モンテカルロ法(確率論的問題の処理に乱数を利用する方法)を適用して年間感染リスクの分布を算出し、リスクの上位2.5%値を年間感染リスク(代表値)とする。

さらに、再生処理による二次処理水中のウイルス除去率を複数仮定し(それぞれ新たなウイルス濃度分布となる)、ウイルス除去後の年間感染リスク(代表値)を上記方法に従い各々計算する。これらの計算結果から、ウイルス除去率(x)と年間感染リスク(代表値)(r)の関係( $r=f(x)$ )を求める。

一方で目標とする年間感染リスク( $r_0$ )を設定し、これを達成するために要求されるウイルス除去率( $x_0$ )を $r=f(x)$ の関係式から求める。そして、別途実験で求められた再生処理法ごとのウイルス除去率と照らし合わせ、要求されるウイルス除去率を達成するための、再生処理法を選定する。

一方で目標とする年間感染リスク( $r_0$ )を設定し、これを達成するために要求されるウイルス除去率( $x_0$ )を $r=f(x)$ の関係式から求める。そして、別途実験で求められた再生処理法ごとのウイルス除去率と照らし合わせ、要求されるウイルス除去率を達成するための、再生処理法を選定する。

### 2.3.2 再生処理法選定の具体例

表-2.1 に、様々な再生水の用途における誤摂取状況の設定例を、表-2.2 に、それに対応した目標年間感染リスクごとの必要ウイルス除去率を示す。また、再生処理法ごとのウイルス除去不活化率を、表-2.3 および表-2.4 にまとめた(ポリオウイルスワクチン株を対象ウイルスとした実験結果<sup>1)</sup>)。

表-2.1 の「芝生の散水」を例として、再生処理法を選定するまでの具体的な手順を図-2.1 に従って示す。

芝生の散水では、芝生上での遊戯や休息における芝生との接触により、年間20回、1回あたり0.1mLを経口摂取すると設定した(表-2.1 参照)。これらの値に、二次処理水中ウイルス濃度分布式(平均0.62[個/L]の対数正規分布)と、ウイルス摂取量と感染確率の関係式を適用して、年間感染リスクの代表値(r:

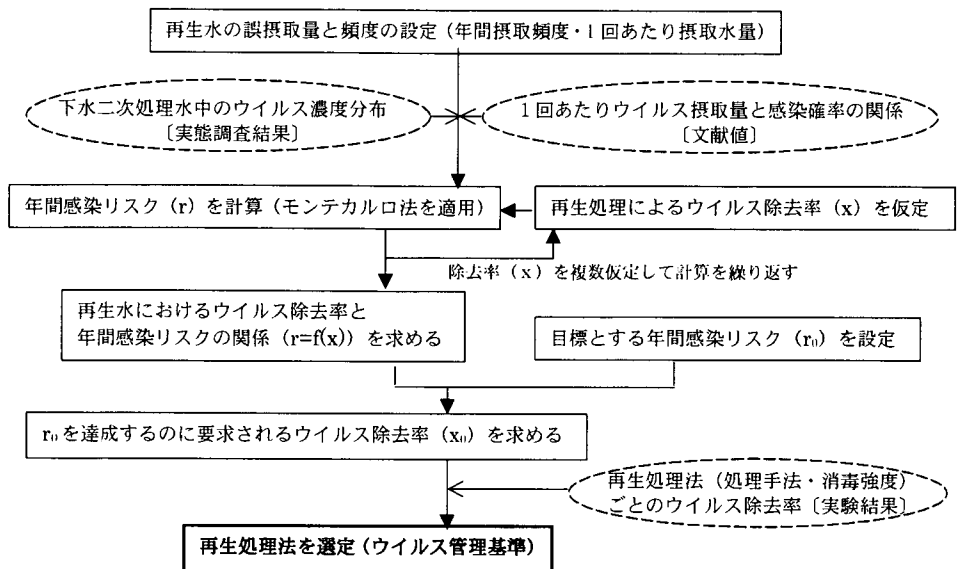


図-2.1 再生処理法を選定するための手順

対数値(log)を求めた。さらに複数のウイルス除去率(x:対数値(log))を仮定して、それぞれに対応するrを計算した。その結果、「 $r = -1.0x - 1.2$ 」という関係式が得られた。この式より、目標とする年間感染リスク $r_0$ がそれぞれ $-2\log (=10^{-2})$ 、すなわち100人に1人)、 $-3\log (=10^{-3})$ 、 $-4\log (=10^{-4})$ のとき、要求されるウイルス除去率 $x_0$ は各々 $0.84\log$ 、 $1.8\log$ 、 $2.8\log$ となる(表-2.2参照)。

表-2.1 様々な再生水の用途における誤摂取状況の設定例

再生水の用途	想定した誤摂取状況	
	年間摂取頻度〔回/年〕	1回あたり摂取水量〔mL/回〕
親水施設(全身を浸す可能性がある場合)	8 (2回/週の確率で摂取(真夏のみ))	30 (水遊びによる誤飲)
親水施設(手足を浸す可能性がある場合)	20 (2回/週の確率で摂取(夏季のみ))	0.3 (手についた水の間接経口摂取)
滝・噴水(大規模)	10 (1回/月の確率で摂取(冬季以外))	1 (ミストを吸い込む)
釣り堀	20 (2回/月弱の確率で摂取(通年))	0.2 (手についた水の間接経口摂取)
芝生の散水	20 (2回/月弱の確率で摂取(通年))	0.1 (手についた水の間接経口摂取)
トイレ水洗用水	3 (オフィスビルで1回/日、週5日使用。約1%の確率で摂取(通年))	0.02 (しぶきが口に入る)

表-2.2 目標年間感染リスクと要求されるウイルス除去率の関係

再生水の用途	要求されるウイルス除去率		
	年間感染リスク： $10^{-2}$	年間感染リスク： $10^{-3}$	年間感染リスク： $10^{-4}$
親水施設(全身を浸す可能性がある場合)	2.5 log (= 99.68%)	3.8 log (= 99.98%)	5.0 log (= 99.999%)
親水施設(手足を浸す可能性がある場合)	1.3 log (= 94.63%)	2.3 log (= 99.50%)	3.3 log (= 99.95%)
滝・噴水(大規模)	1.5 log (= 97.05%)	2.6 log (= 99.76%)	3.7 log (= 99.98%)
釣り堀	1.1 log (= 92.06%)	2.1 log (= 99.24%)	3.1 log (= 99.93%)
芝生の散水	0.84 log (= 85.55%)	1.8 log (= 98.56%)	2.8 log (= 99.85%)
トイレ水洗用水	(除去の必要なし)	0.43 log (= 62.42%)	1.5 log (= 97.05%)

注) 表-2.1の誤摂取状況の設定に基づいた計算

次に、要求されるウイルス除去率を満たす再生処理法を、表-2.3および表-2.4から選択する。例えば芝生の散水で年間感染リスクを $10^{-2}$ にしたい場合、要求される二次処理水中のウイルス除去率は表-2.2より約1logである。表-2.3より、例えば二次処理水中のウイルスを塩素消毒のみで1log除去するためには、塩素注入濃度で15mg/Lが必要である。これに対し、三次処理水中のウイルスを同じく1log除去するためには、2.5mg/Lまで塩素注入濃度が削減可能であることになる。

塩素・オゾン・紫外線消毒のいずれにおいても、二次処理水中より三次処理水中の方がウイルスは不活化しやすい傾向が見られたことから、砂ろ過により下水処理水中の濁度を減らした後で、各消毒方法を適用することがウイルスを不活化するうえで効果的である。表-2.4の砂ろ過水の濁度(1.1~1.2)は、表-2.3の各消毒方法を適用した際の三次処理水の濁度(0.4~0.7)と比較すると少し高い。通常の砂ろ過のみでは濁度が0.5程度まで下がらない場合は、濁度除去率向上のための補助的な方策が必要になると考えられる。

表-2.3 各消毒方法によるウイルス不活化率と消毒強度の関係

消毒方法	原 水		ウイルス不活化率		
	種 類	濁度 (-)	1log (90%)	2log (99%)	3log (99.9%)
塩素 (mg/L) *1	二次処理水*3	3.0~3.5	15	—	—
	三次処理水*4 +NH4-N*5	0.7	7.0	17	—
	三次処理水*4	0.4~0.6	2.5	7.9	13
オゾン (mg/L) *1	二次処理水*3	3.8	16	—	—
	三次処理水*4	0.4~0.6	7.6	13	18
紫外線 (mWs/cm <sup>2</sup> ) *2	二次処理水*3	3.5	980	2,000	—
	三次処理水*4	0.6	560	1,200	1,800

—: データなし (実験の消毒強度範囲からは算出できない)。各数値の有効桁数は2ケタ。

- \* 1 塩素およびオゾンの濃度は注入濃度で、接触時間は15分。
- \* 2 紫外線照射時間は19~280秒。
- \* 3 二次処理水: A2O法 (HRT=8時間)
- \* 4 三次処理水: N・P高度処理 (HRT=13時間) +砂ろ過
- \* 5 NH<sub>4</sub>-Nは原水中での濃度が約10mg/Lになるように添加。

表-2.4 砂ろ過によるウイルス除去率および濁度の変化

試 料	ウイルス濃度 (PFU/mL)	ウイルス除去率	濁度 (-)
原水 (二次処理水)	9,000		3.5
ろ過水 (100m/日) *	4,000	0.36 log (56%)	1.1
ろ過水 (200m/日) *	6,500	0.14 log (28%)	1.2

各数値の有効桁数は2ケタ。

- \* 原水にウイルスを添加したものを、約2~3時間継続ろ過した後、試料を採取した。

## 2. 4 ウイルス制御に求められる測定法の精度と

### 求められる要件

表-2.2において、例えば親水施設 (全身を浸す可能性がある場合) での年間感染リスクを $10^{-4}$ にするために必要なウイルス除去率は5logで、このときのウイルス濃度は平均値で $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 個/Lとなる。ウイルスを完全に制御するためには、この極微量ウイルスを実際に測定して安全性を確認しなければならない。効果的な濃縮精製などの試料前処理方法を含め、極微量ウイルスを確実に検出・測定する手法を開発する必要がある。

## 2. 5 まとめ

本研究では、現在のウイルス濃度測定技術とリスクアセスメント手法を利用し、ウイルス除去技術を評価することにより、ウイルス制御手法の選定方法を検討した。ウイルスを完全に制御するためには、再生水中の極微量ウイルスを実際に測定して安全性を確認する必要がある。効果的な濃縮精製などの試料前処理方法を含め、PCR法を適用して極微量ウイルスを確実に検出・測定する手法を開発することが今後の課題となる。

補注: 「高度処理会議」は、下水をより高度に処理し資源の有効利用や環境保全に資することを目的とした会議。土木研究所を主体とし、国土交通省都市局下水道部、日本下水道事業団、および全国17の地方公共団体下水道部局から構成された (平成13年8月に、「下水道技術会議」に改編された)。

### 3. リアルタイム PCR 法によるクリプトスポリジウムの検出方法に関する研究

近年、PCRにより増幅されるDNAが蛍光シグナルによりPCR中にリアルタイムで検出できるようになってきた。このリアルタイムPCR法を利用することにより、試料中の初期DNAを簡便に定量することが可能となった。即ち、既知試料についてDNAの対数直線増殖領域の蛍光強度を連続測定し、ある蛍光強度に到達するサイクル数と初期DNA濃度の関係をスタンダードとすることにより未知試料中の標的DNAが定量される。これまでに、リアルタイムPCR法によるクリプトスポリジウムの定量検出方法は検討されていないことから、本研究ではクリプトスポリジウムをリアルタイムPCR検出するための基礎的条件の検討を行った。

#### 3. 1 クリプトスポリジウムを検出するための標的遺伝子のプライマーとプローブの設計

現在までにクリプトスポリジウムの様々な遺伝子の塩基配列は読み取られ、ジーンバンクに登録されている。その中でもクリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子の全塩基配列は決定されており、また、様々な株の塩基配列も登録されインターネット上で公開されている。そこで、著者らは、クリプトスポリジウムのPCR検出には情報量が豊富にあるクリプトスポリジウム熱ショック蛋白質遺伝子を標的とすることとし、PCR検出のためのプライマーとプローブを設計した。設計したプライマーとプローブの位置および塩基配列を図-3.1と表-3.1に示した。

表-3.1 クリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子のPCR検出用プライマーとプローブの塩基配列

プライマーの塩基配列	
フォワードプライマー :	5'-GTT GCT CCA TTA TCA CTC GG-3'
リバースプライマー :	5'-TCC TTA GTC ATG GCT CTC TC-3'
プローブの塩基配列	
5'-GAA CGT AATACA ACT ATC CCA GCA AAG AAG-3'フルオレセイン	
5'-LCRed640-CAC AAG TCT TCA CTA CTT ATG CTG ATA ACC AG-3'	

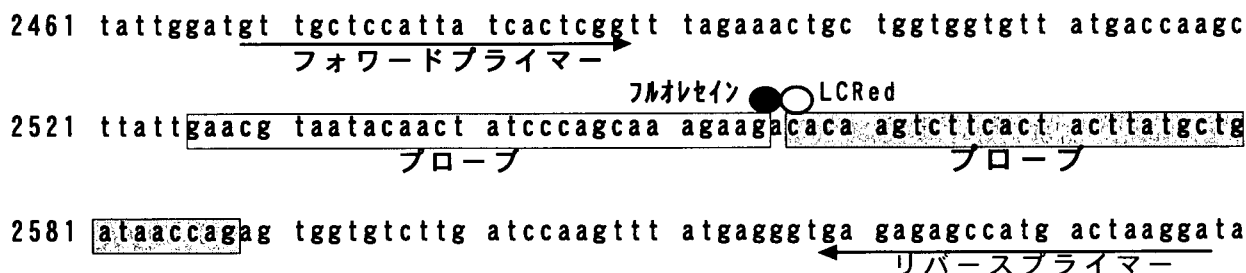


図-3.1 クリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子検出用のプライマー及びプローブの位置

ジーンバンク:登録番号 U11761, *Cryptosporidium parvum* KSU-1 heat shock protein 70 kDa (hsp70) gene, complete cds.より設計、増幅領域DNAサイズ:171bp

#### 3. 2 実験方法

本実験ではロッシュ社製のリアルタイムPCR装置(lightCycler)を使用した。本装置におけるPCR中のDNAの蛍光標識方法には2種類ある。1つは2本鎖状態のDNAに特異的に結合するサイバークリーンという蛍光試薬を利用する方法(以下サイバークリーン法)と、もう1つは、PCRにより合成されたDNAの内部の塩基配列に特異的に結合する蛍光標識を利用する法(以下ハイブリダイゼーションプローブ法)である。はじめに、サイバークリーン法の適用性を検討した。オーシストを20000個,6666個,2000個,666個,200個,66個,20個,6個,2個,0.6個の10段階の希釈系列を作成し、これらの試料から北村らの手順<sup>3)</sup>によりDNAを抽出した。抽出されたDNAは100μlまで濃縮し、このうち5μl中に存在するクリプトスポリジウムのDNAについてサイバークリーン法によるリアルタイムPCR検出を行った。サイバークリーン法の反応試薬にはLightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kitを使用した。本実験での試薬の濃度を表-3.2に示す。

次に、同試料を用いてハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムのDNA検出を行った。ハイブリダイゼーションプローブ法の反応試薬はLightCycler FastStart DNA Master Hybridization probes kitを使用した。反応試薬の濃度を表-3.3に示した。サイバークリーン法、ハイブリダイゼーションプローブ法ともPCR温度条件は同一とし、熱変成を95℃で10分行った後、PCRを95℃15秒、60℃15秒、72℃6秒で50サイクル行った。

さらに、従来の電気泳動による増幅産物の検出方法とリアルタイムPCR法の検出感度を比較するため、表-3.1のプライマーを用いて、PCRを行い、増幅されたDNAを電気泳動法で検出した。従来法のPCR条件は、アニーリング温度をリアルタイムPCR法と同じ60℃に変更した以外は北村ら<sup>3)</sup>と同じ条件で行った。

表-3.2 サイバーグリーン法の試薬濃度

試薬の種類	濃度
H <sub>2</sub> O	適宜
MgCl <sub>2</sub>	3mM
Forward Primer	0.5 μM
Reverse Primer	0.5 μM
LC FastStart DNA Master SYBR Green I	1 ×

表-3.3 ハイブリダイゼーションプローブ法の試薬濃度

試薬の種類	濃度
H <sub>2</sub> O	適宜
MgCl <sub>2</sub>	3mM
Forward Primer	0.5 μM
Reverse Primer	0.5 μM
Fluorescein Probe	0.2 μM
LCRed Probe	0.4 μM
LC FastStart DNA Master Hybridization Probes	1 ×

### 3. 3 実験結果

#### 3.3.1 サイバーグリーン法によるクリプトスポリジウムの検出限界

図-3.2は、サイバーグリーン法によるリアルタイムPCRで検出した結果である。本図はサイクル数と蛍光強度の関係を示している。図よりすべての試料でサイクル数が進行すると共に蛍光強度も増加していることがわかる。蛍光強度の増加は、クリプトスポリジウムを添加していない蒸留水の条件でも観察された。図-3.5の電気泳動の写真においても、蒸留水の条件(レーン1)において標的DNA以外のバンドが確認されていることから、PCR中にプライマーダイマー(プライマー同士が結合すること)が形成され、これにサイバーグリーンが反応したためと考えられる。標的DNAとプライマーダイマーとの判別は、融解温度(DNAの2本鎖が一本鎖になる温度)から判別が可能となる。サイバーグリーン法によるPCR終了後、温度を60℃から95℃までを徐々に上昇すると、DNAが一本鎖になる温度域でサイバーグリーン試薬は排除され、蛍光強度が減少する。図-3.3はこのときの蛍光強度の変化率を示したものである。一般的に、融解温度はDNAの塩基配列が同じであれば同じ温度となり、塩基配列が異なれば融解温度も異なる。図-3.3より試料中のオーシスト濃度が20000個から66個までは、83℃付近に融解点が存在しているが、オーシストが66個以下では融解点は81~82℃付近にあることがわかる。融解点は微妙に異なっているが、1℃程度の融解温度の違いから、クリプトスポリジウムのDNAとプライマーダイマーを判別するのは困難であった。このことからサイバーグリーン法の正確な検出限界を把握することは困難であった。

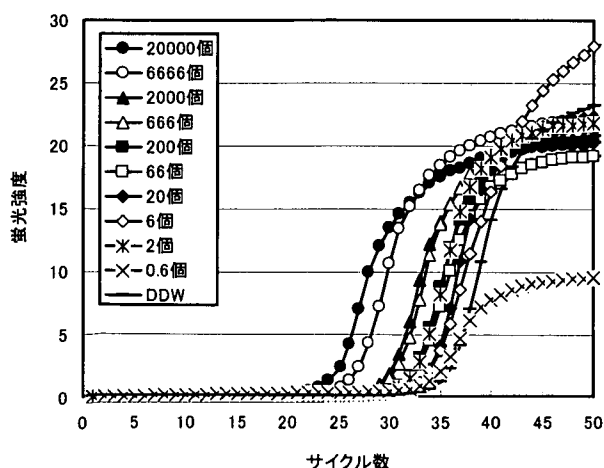


図-3.2 サイバーグリーン法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果

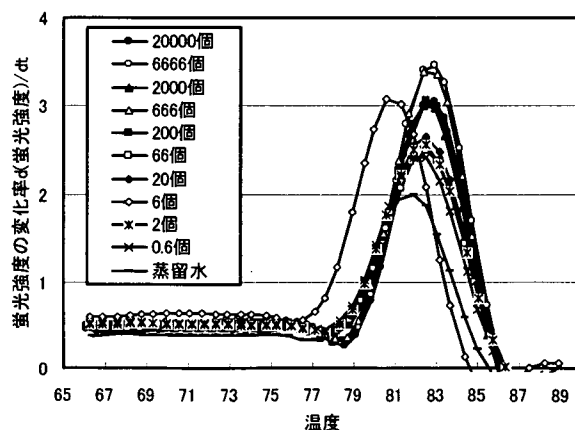


図-3.3 融解曲線((サイバーグリーン法によるPCR終了後、温度を60℃から95℃まで1秒間に0.2℃で上昇したときの、蛍光強度の変化率)

### 3.3.2 ハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムの検出限界

図-3.4 はハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果である。図-3.4 よりわかるとおり、ハイブリダイゼーションプローブ法はサイバークリーン法より特異性が高く標的遺伝子のみを検出することが可能となる。オーシスト数 20 個と 66 個の条件において蛍光強度は逆転したものの、オーシスト数 20 と 66 個の条件の蛍光シグナルは検出された。しかし、オーシスト数 20 個以下では検出できなかったことから、オーシスト数 20 個以上から検出可能となることがわかった。

図-3.5 は、同じ試料を従来法である電気泳動により検出したものである。その結果、オーシスト数 66 個の条件が、バンドが確認できるかできないかの境界であった。ハイブリダイゼーションプローブ法によるリアルタイムPCR法では、従来法の電気泳動法より 3~10 倍高い感度で検出できることがわかった。

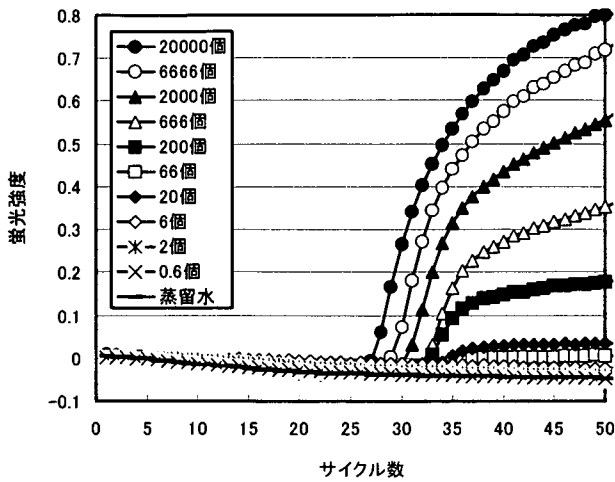


図-3.4 ハイブリダイゼーションプローブ法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果

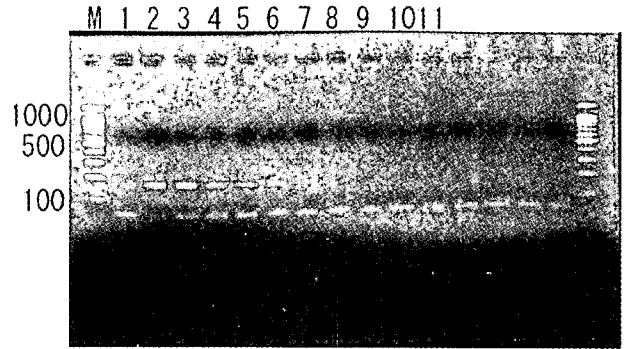


図-3.5 従来の電気泳動法によるクリプトスポリジウムのDNA検出

M:100~1000bp、マーカー1:蒸留水、レーン2:20000 個、レーン3:6666 個、レーン4:2000 個、レーン5:666 個、レーン6:200 個、レーン7:66 個、レーン8:20 個、レーン9:6 個、レーン10:2 個、レーン11:0.6 個

### 3.3.3 リアルタイムPCR法による定量限界

図-3.6 はサイバークリーン法により蛍光強度が 0.1 に到達するまでに要したサイクル数とオーシストの個数の関係を示している。オーシスト数 100 個以上で、直線関係が得られることがわかった。図-3.7 はハイブリダイゼーションプローブ法の場合である。ハイブリダイゼーション法の場合も、100 個以上で直線関係が得られることがわかった。以上のことから、オーシスト数 100 個以上で定量可能となることがわかる。

今回の検討では、DNAを抽出した試料 100  $\mu$ l の内 5  $\mu$ l 中 (1/20) にクリプトスポリジウムのDNAが存在するかどうかを見たものである。さらに、検出限界と定量限界を向上する方法としては、抽出されたDNAを 10  $\mu$ l 程度まで濃縮し、これをリアルタイムPCR検出することにより、検出限界と定量限界は向上するものと考えられる。

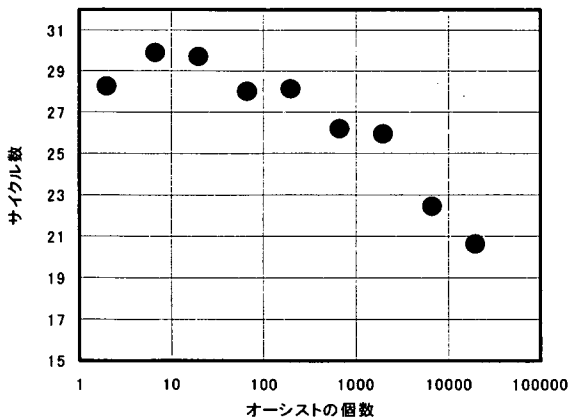


図-3.6 サイバークリーン法による検量線 (オーシストの個数と蛍光強度が0.1に達するまでに要するサイクル数の関係)

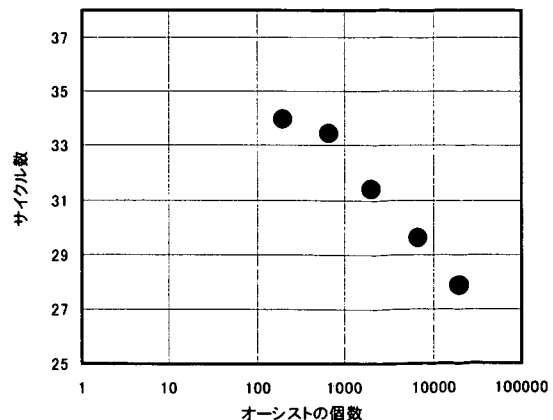


図-3.7 ハイブリダイゼーションプローブ法による検量線 (オーシストの個数と蛍光強度が0.08に達するまでに要するサイクル数の関係)



### 3. 4 生存クリプトスポリジウムオーシストの検出方法の検討

クリプトスポリジウムによる感染リスクを評価する場合、環境水中に存在するクリプトスポリジウムの生死判定は重要である。標的をDNAとしている場合、検出されたクリプトスポリジウムの生死は判断できない。生存クリプトスポリジウムの検出は、mRNA を標的とすることにより可能と考えられている<sup>4)</sup>。これは、mRNA は生細胞においてのみ発現されることによる。そこで、リアルタイムPCR法によるクリプトスポリジウムの熱ショック蛋白質遺伝子（熱ショック蛋白質遺伝子は、細胞が熱や重金属などストレスを受けたときに発現する遺伝子）のmRNA の検出を試みた。

#### 3.4.1 実験方法

新鮮なクリプトスポリジウムオーシストを10000個、1000個、100個、10個の4段階に10倍希釈し、それぞれの試料に熱ストレスを45℃20分間与えた。その後、凍結融解法でクリプトスポリジウムを破壊し、東洋紡社製のMagExtractor RNAキットによりRNAの抽出を行った。RNA抽出液にはDNAの混入もあると考えられるため、DNase（DNA分解酵素）でDNAを分解した。その後、逆転写（Reverse Transcription:RT）、つまり、RNAをDNAに逆転写する反応を行いPCR法によりRNAの検出を試みた。なお、RT-PCR法においてDNAを検出していないことを確認するため、同試料のPCRもおこなった。

次に、50%のキッチンハイター（主成分は次亜塩素酸ナトリウム）中に一晩（約15時間）と65℃で30分間不活化処理を施したオーシストと、さらに、対照として不活化処理を施していないオーシストを45℃20分間の条件でmRNAを誘導発現した後、前述のRNA抽出キットを用い、RNAを蒸留水30μlに抽出した。その後、RNA抽出液を10μlごと3等分し、1つの試料にはRNAのみを検出するためDNase処理を施し、2つ目の試料には、DNase処理で陽性になった試料が、RNAであること再確認するためDNase+RNase（RNA分解酵素）処理を施し（RNAならば陰性となる）、3つ目の試料は未処理とし、それぞれ3試料についてRT-PCRとPCRを行った。なお、RT-PCR法はハイブリダイゼーションプローブ法とし、表-3.1と同じプライマーおよびプローブを使用した。RT-PCRに用いた試薬は、ワンステップ（一本のチューブ中でRTとPCRを行う方法）反応試薬であるLightCycler RNA Master Hybridization probe kitを使用した。反応試薬の濃度を表-3.4に示す。RT-PCRの温度条件は、RT反応を61℃20分した後、続けて、熱変成を95℃2分行い、PCRを95℃5秒、60℃15秒、72℃6秒を45サイクル行った。

表-3.4 RT-PCR法の反応試薬濃度（ハイブリダイゼーションプローブ法）

試薬の種類	濃度
H <sub>2</sub> O	適宜
Mn(Oac) <sub>2</sub>	3.25mM
Forward Primer	0.5 μM
Reverse Primer	0.5 μM
Fluorescein Probe	0.2 μM
LCRed Probe	0.4 μM
LC RNA Master Hybridization Probes	1×

#### 3.4.2 実験結果

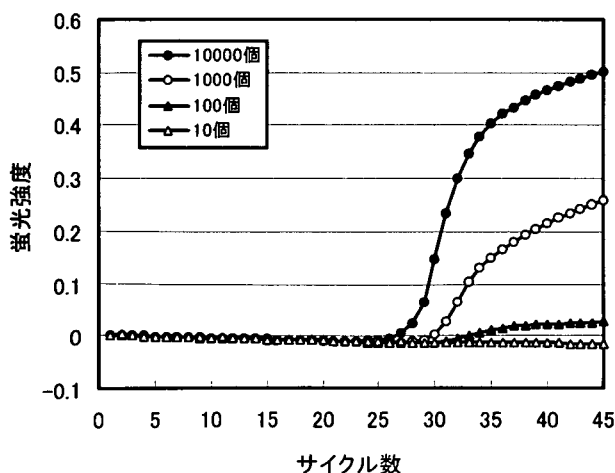


図-3.8 RT-PCR法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果

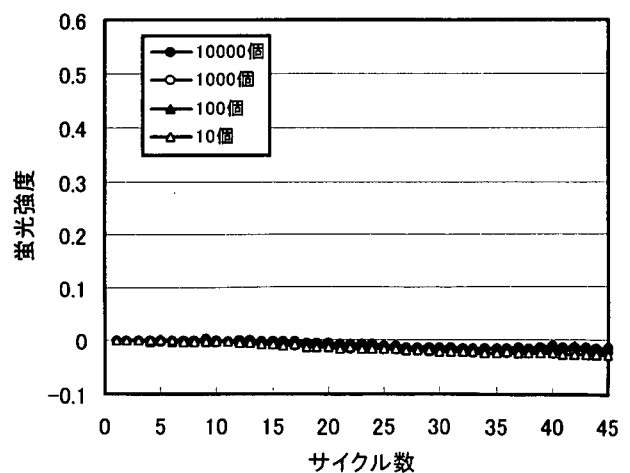


図-3.9 PCR法によるクリプトスポリジウムのリアルタイムPCR検出結果

図-3.8にオーシストの4倍段階10倍希釈系列のRT-PCR法による検出結果を示す。図-3.9は同試料をPCR検出した結果である。図-3.9のRT-PCRの検出結果より、オーシスト数100個以上から蛍光シグナルが検出されることがわかる。一方、図-3.9のPCRの検出結果からわかるとおり、PCRでは蛍光シグナルは検出されなかった。

図-3.10は、塩素と加熱による不活化処理を施したオーシストおよび不活化処理を施していないオーシストをRT-PCRにより検出した結果である。図-3.11は同試料をPCR検出した結果である。表-3.5は本実験結果の一覧表である。不活化処理を施したオーシストのRT-PCR (DNase 処理有り)は陰性となっており、RNAを抽出した試料をDNase処理し、RT-PCRを行うことにより生存オーシストを検出することが可能となることがわかる。RT-PCR法においてmRNAを検出しているともと考えられるが、今後はDNAとmRNAの区別が付くプライマーやプローブを設計する必要があると考えられる。

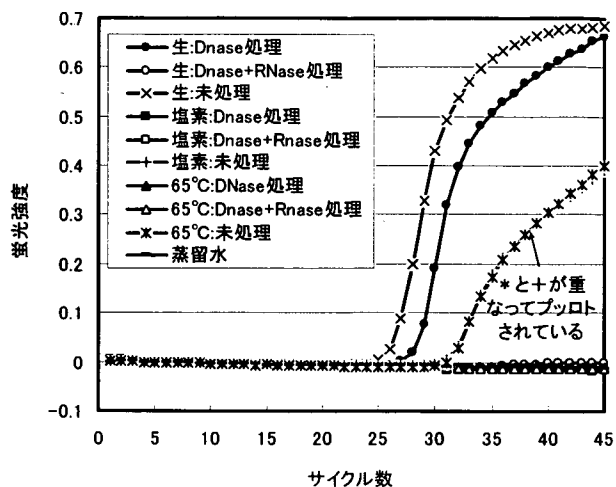


図-3.10 不活化処理を施したクリプトスポリジウムのRT-PCR検出結果

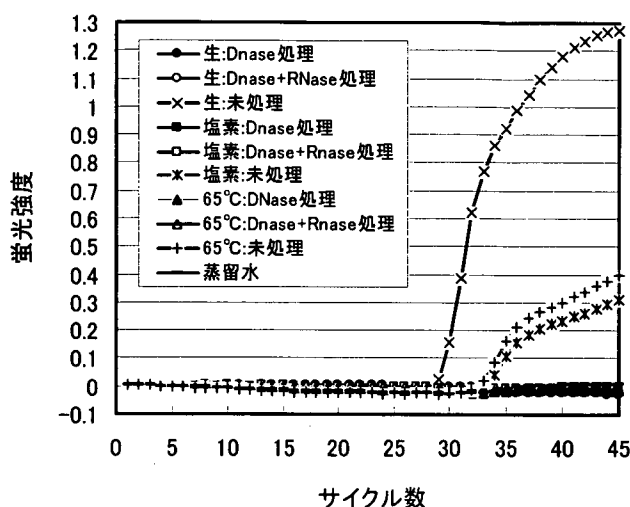


図-3.11 不活化処理を施したクリプトスポリジウムのPCR検出結果

表-3.5 不活化処理を施したオーシストRT-PCRおよびPCR検出結果

	不活化処理方法	DNase	DNase+RNase	未処理
RT-PCR	不活化処理なし	+	—	+
	塩素処理(50%のキッチンハイター中で一晩)	—	—	+
	65°Cで30分間加熱	—	—	+
PCR	不活化処理なし	—	—	+
	塩素処理(50%のキッチンハイター中で一晩)	—	—	+
	65°Cで30分間加熱	—	—	+

#### 4. まとめ

水系病原ウイルスの検出にPCR法を適用するのに先立ち、現在一般的に用いられている培養法で得られたウイルスデータから、下水処理水再利用におけるウイルス感染の危険性の現状を把握し、さらにその制御手法の選定方法について検討した。ウイルス制御においては、再生水中のウイルス濃度の分布と、人が誤摂取する再生水量から、ウイルスに感染するリスクを求め、これを目標値以下に抑えるための再生処理法を選定する方法を検討した。塩素・オゾン・紫外線消毒のいずれにおいても、二次処理水より三次処理水の方がウイルスは不活化しやすい傾向が見られたことから、砂ろ過により下水処理水中の濁度を減らした後で、各消毒方法を適用することがウイルスを不活化するうえで効果的である。なお、ウイルスを完全に制御するためには、再生水中の極微量ウイルスを実際に測定して安全性を確認する必要がある。効果的な濃縮精製などの試料前処理方法を含め、PCR法を適用して極微量ウイルスを確実に検出・測定する手法を開発することが今後の課題となる。

リアルタイムPCR法によるクリプトスポリジウムの検出では、ハイブリダイゼーション法を用いることにより特異性の高い検出が可能となることがわかった。ハイブリダイゼーション法では、オーシスト数20個以上から検出可能であり、100個以上で定量可能となることがわかった。また、mRNAを標的とすることにより生存オーシストの検出も可能となることがわかった。今後は、検出限界と定量限界の向上を目指すと共に、実試料への適用性を検討する必要がある。

ある。

#### 参考文献

- 1) 鈴木穰、小越眞佐司、諏訪守：病原性微生物の発生源および対策に関する調査、「国土技術政策総合研究所資料 平成 12 年度下水道関係調査研究年次報告書集、国総研資料第 10 号」、pp.145-154、2001
- 2) Joan B. Rose and Charles P. Gerba: Use of Risk Assessment for Development of Microbial Standards, *Wat. Sci. Tech.*, **24** (2), pp.29-34, 1991
- 3) 北村友一、鈴木穰: P C R法による下水中のクリプトスポリジウムオーシストの検出方法の開発、土木技術資料、43・9、pp.22-27、2001
- 4) Christine Kaucner and Timothy Stinear: Sensitive and Rapid Detection of Viable Giardia Cysts and *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Large-Volume Water Samples with Wound Fiberglass Cartridge Filters and Reverse Transcription-PCR, *Appl. Envir. Microbiol.*, **64**, pp.1743-1749, 1998

## 6. 都市排水由来の化学物質の水環境中での挙動に関する研究

水質チーム 上席研究員 田中 宏明  
主任研究員 小森 行也  
研究員 佐々木 稔  
研究員 岡安 祐司  
交流研究員 八十島 誠

### 1. はじめに

近年、水環境中での界面活性剤の分解物質や人畜由来のホルモンなどによって野生生物の内分泌攪乱が生じる場合があると報告されている。こうした内分泌攪乱物質について、発生源や排出源などで効率的なリスク削減対策を講じるためには、これら物質の水、底泥などの水環境での挙動を把握し、水域に与える影響を把握することが必要である。

生物の正常なホルモン作用に影響を与えることが疑われている外因性の物質（内分泌攪乱化学物質）による環境汚染問題が顕在化してきているなか、人畜由来のエストロゲンそのものによる環境影響についても、その内分泌攪乱作用の強さから注目が集まり始めている。都市排水を由来とするエストロゲンとしては、17β-エストラジオール（女性ホルモン、以下E2）、その代謝生成物であるエストロン（E1）、及び経口避妊薬の主成分であるエチニルエストラジオール（EE2）が挙げることができる。

環境中に存在している濃度と内分泌攪乱作用の強さから、エストロゲンに次いで環境に与える影響が大きいと考えられるノニルフェノール（NP）は、都市排水に含まれる非イオン界面活性剤であるノニルフェノールエトキシレート（NPEO）が、下水処理場や河川の中でノニルフェノキシ酢酸（NPEC）等の中間物質を経由して分解されることによって生成しているといわれている。

エストロゲンやノニルフェノール類といった物質による環境リスクを正しく評価するためには、これらの物質の測定法を開発するとともに、水環境中における変化、生成、分解、蓄積、移動といったような挙動を把握することが必要である。

本研究では、適切な前処理、抽出法を用いたこれらの物質の機器分析手法を開発するとともに、生物分解等による環境中での変化現象を調査し、モデルを用いて挙動をシミュレートすることで、環境リスク評価や予測に必要な知見を得ることを目的としている。

### 2. 研究の内容

#### 2.1 エストロゲン分析手法の改良

エストロゲン（E2, E1, EE2）の分析手法としては、従来法に較べ前処理を簡易化することを目的とし、エストロゲンをC18カートリッジで吸着、溶出後のクリーンアップにフロリジルカートリッジとNH<sub>2</sub>カートリッジを用いる前処理法を採用した。

具体的な試料の前処理は、1)試料1,000mlをガラス繊維ろ紙（孔径1μm）でろ過する。2)ろ紙に残った浮遊物質（SS）をメタノール10mlを用い2回抽出（超音波利用）し、抽出液をろ液に合わせる。3)ろ液に内標準物質（E2、E1、EE2の各d体）を添加した後、通水直前にメタノールと精製水でコンディショニングしたC18カートリッジに通水し、E2、E1、EE2を吸着させる。4)通水後のC18カートリッジは、遠心分離と窒素ガスパージにより脱水する。5)酢酸エチル/メタノール（5:1）6mlを通しE2、E1、EE2を溶出させ、溶出液は、窒素吹き付けにより濃縮乾固する。6)ヘキサン/ジクロロメ

タン (1:1) 1ml に溶解 (超音波利用) し、この溶解液をフロリジルカートリッジに通しクリーンアップする。7) 溶解液の入っていた容器はヘキサン/ジクロロメタン

(1:1) 1ml で洗いフロリジルカートリッジに通す。8) フロリジルカートリッジにヘキサン/ジクロロメタン (1:1) 10ml を通し不純物を洗い流す。9) フロリジルカートリッジに吸着した E2、E1、EE2 は、アセトン/ジクロロメタン (1:9) 6ml で溶出させ、溶

出液を窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール 1ml に再溶解する。10) 再溶解した液を NH<sub>2</sub> カートリッジに通しカチオン系の不純物を吸着除去する。11) 再溶解液を通した NH<sub>2</sub> カートリッジにメタノールを 5ml 通し、窒素吹き付けにより濃縮乾固した後、メタノール 1ml を加え再び溶解する、という手順とした。分析は表-1 に示す条件により、LC/MS/MS を用いて行った。

標準溶液の繰り返し測定を行った結果 (表-2) より、バラツキを標準偏差 ( $\sigma$ ) で表した場合の 10 $\sigma$  の検出下限値として、実試料を対象とした場合に E2 で 1.3ng/L、E1 で 0.5ng/L、EE2 で 1.6ng/L という結果となり、従来法と同等の精度が得られた。また、河川水試料へのエストロゲン標準物質の添加回収試験を行い、その結果 (表-3)、ほぼ 100% の回収率を得ることができた。

## 2. 2 ノニルフェノキシ酢酸分析手法の検討

NPnEC 類の分析手法としては、磯部ら<sup>1)</sup>の方法を基に検討、若干の変更を加え、n=0,1,2 の NPEC を対象として分析を実施した。固相カラム tC18 及び陰イオン交換樹脂カラム SAX を用いメタノールに溶出させた NPnEC 溶出液に、BF<sub>3</sub>/メタノールを加え 90℃ で 1 時間加熱してメチル化、ヘキサン抽出後に内部標準物質 (ピレン-d<sub>10</sub>) を加え、表-4 に示す条件で GC/MS による定量を行った。

NPEC(NP0EC, NP1EC, NP2EC)標準メタノール溶液を繰り返し分析した結果 (表-5) から、実試料の 1000 倍濃縮を考慮した 10 $\sigma$  の定量下限値として 0.03 $\mu$ g/L が得られた。また、精製水、下水二次処理水、同一次処理水への標準物質の添加回収試験からは、77.9%~102%と良好な回収率を得ることができた。

表-1 LC/MS/MS測定条件

HPLC	装置	Agilent 1100		
	カラム	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 2.1 $\phi$ × 150mm, 40℃		
	移動相	アセトニトリル/水(60/40), 0.15ml/min		
	注入量	10 $\mu$ l		
MS/MS	装置	TSQ API-2		
	イオン化	ESI, 負イオン		
	コリジョンガス	Arガス		
	測定イオン	E2	271	→ 145
		E1	269	→ 145
		EE2	295	→ 145
		E2-d3	274	→ 145
E1-d2		271	→ 147	
EE2-d4	299	→ 147		

表-2 標準液の繰り返し(n=8)測定結果 (ng/mL)

	E2	E1	EE2
平均値	1.91	2.17	1.76
$\sigma$	0.125	0.045	0.155

表-3 河川水への添加回収試験結果 (ng/mL)

	E2	E1	EE2
無添加濃度	0.0000	0.0001	0.0000
標準物質添加濃度	0.0100	0.0100	0.0100
添加後の濃度	0.0103	0.0106	0.0105
回収率(%)	103	105	105

表-4 GC/MS分析条件

GC条件	カラム	HP-5MS 30m × 0.25mm df=0.25 $\mu$ m
	カラム温度	100℃(1min)~12℃/min~300℃(1min)
	注入口温度	300℃
	注入法	パルスドスプリットレス
	キャリアガス流量	1.2mL/min
MS条件	インターフェイス温度	300℃
	イオン源温度	230℃
	イオン化法	EI
	イオン化電圧	70eV
検出モード	SIM (定量イオン: 221.2, 265.2, 309.2)	

表-5 標準試料の繰り返し分析結果 (ng/ $\mu$ L)

	NP0EC	NP1EC	NP2EC
1	0.071	0.045	0.046
2	0.066	0.042	0.041
3	0.065	0.041	0.042
4	0.064	0.042	0.044
5	0.063	0.040	0.040
平均	0.066	0.042	0.043
標準偏差 $\sigma$	0.0031	0.0019	0.0024
CV(%)	4.7	4.5	5.7

### 2.3 環境水中での化学物質の挙動モデルの検討

化学物質のリスクを評価し、将来的にはリスク削減策を立てるためには、対象となる物質の環境中での変化、生成、分解、蓄積、移動といった挙動を把握する必要がある。

内分泌攪乱化学物質のなかでもノニルフェノール類に関しては、非イオン界面活性剤等として用いられた NPEO が排出された後、環境水中で段階的に NPEC やよりエトキシ基の少ない NPEO へと分解される図-1 に示すような経路を経て、大きな内分泌攪乱作用を持つ NP が生成するといわれている。また、河川や下水処理場で NP 類が生物学的あるいは、物理化学反応等により変化していく過程で、水との親和性や揮発性といった物性が変化するため、分解以外にも水と大気との間の揮散や吸収、懸濁成分との間の吸着や脱着、吸着した懸濁成分の物理的な沈降、巻き上げ等による移動が起こると考えられる。

既往の化学物質の水中での挙動に関する研究についての文献調査からは、単一の有害物質の評価のみが可能なモデルや、底泥と水の間の移動をシミュレートできないモデルなどは発表・公開されているものの、NP 類に代表される複雑な生成経路をもつような物質を対象とし、巻き上げを含めた底泥との間の移動のような挙動をシミュレートが可能なモデルはみつからなかった。本研究では、こうした化学物質の複雑な挙動を把握するための解析手法として、AQUATOX<sup>®</sup>モデルをベースとした槽列モデルを作成し、河川（湖沼を含む）を想定した化学物質挙動をシミュレートするための基本構造を作成した。作成したモデルにおける仮定条件を以下に示す。

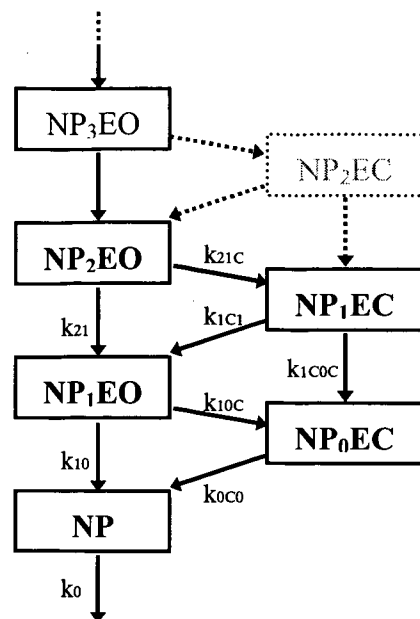


図-1 NP類の分解経路

- 1) エレメント内は完全混合状態である。
- 2) 流量は一定であり、水の蒸発、降雨、及び地下水流入・流出は無視できる。
- 3) 対象物質は水に溶解している、又は固形成分に吸着しているのいずれかの状態にある。
- 4) 大気と水との間の揮散及び吸収は、ヘンリーの法則に従う。
- 5) 反応には様々な経路があり、反応毎に対象物質や前駆物質が異なる。一つの対象生成物質に複数の前駆物質が存在する場合がある。
- 6) 反応機構としては生化学反応、加水分解、光分解があり、対象物質に対してはいずれも一次反応とする。
- 7) 生化学反応速度は好気反応の速度とする。
- 8) 対象物質の吸着平衡量は懸濁成分の有機炭素量に比例する。対象物質の濃度は十分に低く吸着量は濃度に比例し、また、平衡は瞬間的に達成される（吸着速度は無限に速い）。
- 9) 懸濁成分の沈降速度は流速に依存し、定常状態においては一定である。
- 10) 底泥表層からの懸濁成分の巻き上げ速度は流速に依存し、定常状態では一定であり、かつ沈降速度より小さい。
- 11) 底泥中の間隙水の流量は、水柱の流れと比較して無視できる。
- 12) 底泥間隙水と水柱間の物質移動は、拡散によって行われる。
- 13) 底泥間隙水と底泥固形成分の間には、吸着平衡がある。
- 14) 生物への蓄積は植物プランクトン、動物プランクトン、魚類などのバイオマスに比例する。植物プランクトン以外のバイオマスには、懸濁成分に吸着された対象物質も蓄積する。
- 15) 対象物質のバイオマス内での分解は、無視できる。

1 6) 対象物質の底泥表層部から底泥深層部の物質溶出に寄与しない部分（固定層と呼ぶ）への移動は、間隙中の拡散によって行われ、その速度は一定である（但し、温度に比例する）。

これらの仮定に基き、実際に河川環境中で起こると考えられる化学物質の反応及び移動のモデルプロセスを整理すると、以下ようになる。

1) 流入及び流出

$$In = \frac{F}{V} C_{inf}^i = \frac{C_{inf}^i}{HRT} \quad Out = \frac{F}{V} C_{eff}^i = \frac{C_{eff}^i}{HRT} \quad C: \text{濃度}, i: \text{対象物質}, F: \text{流量}, HRT: \text{滞留時間}, V: \text{水容積}$$

2) 大気への揮散、大気からの吸収

$$AtmExch = \frac{k_L A}{V} (C_{SAT}^i - C^i) = k_L a (C_{SAT}^i - C^i) = \frac{k_L}{h} (C_{SAT}^i - C^i)$$

$k_L$ : 物質移動係数,  $A$ : 水表面積,  $C_{SAT}$ : 飽和濃度,  $h$ : 水深

3) 分解反応

$$Allreact = k_{BF} C^j - k_R C^i \quad k_R: \text{総括一次分解反応係数}, C^i: i \text{ の前駆物質濃度}$$

$$\text{光分解反応速度 } Lightreact = -k_L C^i$$

$$\text{加水分解反応速度 } Hydroreact = -k_H C^i$$

$$\text{生化学分解反応速度 } BioreactDec = -k_{BD} C^i$$

$$\text{生化学生成反応速度 } BioreactForm = k_{BF} C^i$$

$$\text{総括一次分解反応係数 } k_R = k_L + k_H + k_{BD}$$

4) 吸着及び溶出

$$\text{吸着平衡 } C_{Ads}^i = k_{ad} C_{SS} C^i \quad C_{ads}: \text{吸着物質濃度}, k_{ad}: \text{吸着平衡定数}, C_{SS}: \text{浮遊物質濃度}$$

$$\log(K_{OC}) = 0.07919 \log(K_{OW}) + 0.0784 \quad K_{OC}: \text{浮遊物中有機炭素への吸着係数}$$

$$K_{ad} = f_{OC} K_{OC} \quad f_{OC}: \text{浮遊物の炭素含有率}$$

$$C_T^i = (1 + k_{ad} C_{SS}) C^i \quad k_{ad}: \text{吸着平衡係数}, C_{SS}: \text{懸濁成分濃度}$$

5) 懸濁成分の沈降

$$Ads = \frac{v_{sed}}{h} K_{ad} C_{SS} C^i \quad v_{sed}: \text{懸濁成分の沈降速度}$$

6) 底泥の巻上げ

$$Rsus = \frac{v_{res}}{h} K_{ad} C_{S-Sed} C_{PW}^i \quad v_{res}: \text{巻上げ速度}, C_{S-Sed}: \text{底泥中固形物濃度}$$

7) 底泥からの溶出（拡散）

$$C_{T-Sed}^i = (1 + k_{ad} C_{S-Sed}) C_{PW}^i \quad C_{T-Sed}: \text{底泥中濃度}, C_{S-Sed}: \text{底泥中固形物濃度}, C_{PW}: \text{間隙水中濃度}$$

$$h^* = \frac{h + h_{Sed}}{2}$$

$$Dissol = \frac{k_{exch}}{h^*} (C_{PW}^i - C^i) \quad k_{exch}: \text{物質移動係数}, h^*: \text{水柱と底泥表面の距離}, C_{PW}: \text{間隙水中の物質濃度}$$

8) 底泥内での拡散

$$Sink = \frac{k_{fix}}{h^S} (C_{PW}^i - 0) = \frac{k_{fix}}{h^S} C_{PW}^i \quad k_{fix}: \text{底泥表層から固定層への物質移動係数}, h^S: \text{表層と固定層中心の距離}$$

9) 植物プランクトンへの蓄積

$$BCF_{Al} = 2.57 K_{Ow}^{0.91} \quad BCF_{Al}: \text{植物プランクトンへの濃縮係数}$$

$$C_{Al}^i = BCF_{Al} C_{Al} C^i \quad C_{Al}: \text{植物プランクトン濃度}$$

$$RAI = \frac{dC_{Al}}{dt} BCF_{Al} C^i$$

10) 非脊椎動物への蓄積

$$\text{Log}(BCF_{Inv}) = (0.7520 \text{Log}(K_{Ow}) - 0.4362) f_{wD} \quad BCF_{Inv}: \text{非脊椎動物への濃縮係数}, f_{wD}: \text{湿重量/乾重量比率}$$

$$C_{Inv}^i = BCF_{Inv} C_{Inv} C^i \quad C_{Inv}: \text{非脊椎動物濃度}$$

$$RInv = \frac{dC_{Inv}}{dt} BCF_{Inv} C^i$$

11) 魚類への蓄積

$$KB_{Fish} = f_{Lip} f_{wD} K_{Ow} \quad f_{Lip}: \text{脂肪率}$$

$$DepFish = 28.18 K_{Ow}^{-0.53} C_{Fish}^i \quad DepFish: \text{魚体中の対象物質濃度減少速度}, C_{Fish}: \text{魚類濃度}$$

$$BCF_{Fish} = KB_{Fish} (1 - \exp\{-DepFish \times TIME\}) \quad BCF_{Fish}: \text{魚類への濃縮係数}$$

$$C_{Fish}^i = BCF_{Fish} C_{Fish} C^i$$

$$RInv = \frac{dC_{Inv}}{dt} BCF_{Inv} C^i$$

各ユニットプロセスを組み込んだ挙動モデルの構造が図-2である。この構造を完全混合の1単位のエレメント(槽)と規定、現実の河川に適用する場合にはエレメントの数を複数(N)個に設定し、図-3に示すような槽列モデルとして計算することによって、河川の特典部分の押し出し流れをシミュレートすることが可能である。

対象物質の濃度分布を、流れ方向の拡散の無い押し出し流れと槽列モデル比較した場合の誤差は、河川の有効拡散係数を100m<sup>2</sup>/s、対象河川区間長20km以上、流速を1m/sと仮定した場合で、槽列数Nを10とすることで5%程度(図-4)となった。この結果より、槽列モデルで適切な槽数を設定することによって、河川区間のシミュレートが可能となるという結論に達した。

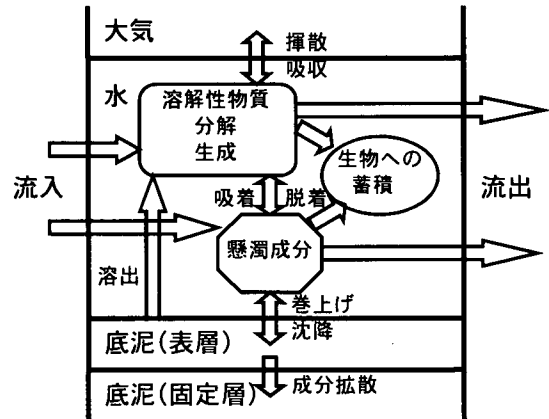


図-2 モデルのエレメントの構造

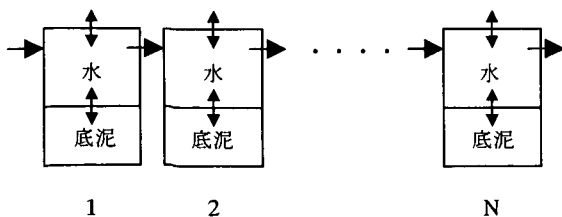


図-3 モデルの槽列構造

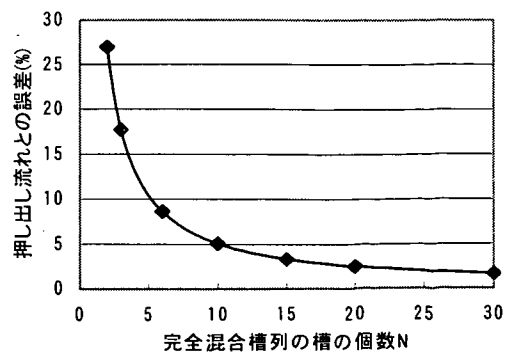


図-4 槽列の数と押し出し流れとの誤差



#### 4. まとめ

平成 13 年度は、環境水試料を対象とした、LC/MS/MS によるエストロゲン分析法の前処理法の簡易化を目的とした改良を行った。ノニルフェノキシ酢酸の分析法に関する検討を実施し、固相カラム及び陰イオン交換樹脂カラムを用いた前処理からの GC/MS による分析手法を確立した。また、水環境中での挙動をシミュレートするための化学物質の挙動モデルの開発に着手し、以下の結果を得ることができた。

- 1) 簡易化した新しい前処理法により、従来と同等の精度でのエストロゲン (E2, E1, EE2) の測定が可能であることを確認した。
- 2) メチル化し GC/MS を用いる手法によって、定量下限値 0.03 $\mu$ g/L での NPEC 類の分析が可能であることを確認した。
- 3) 内分泌攪乱物質を含む化学物質の水環境中での挙動について、AQUATOX をベースとしたモデルによる反応・移動の各プロセス及び完全混合槽列構造による河川のシミュレート法を整理した。

今後は、分析手法に関してはさらなる簡易化、高精度化を図り、モデルに関しては槽列構造での計算を行うための電算化を行っていくことが当面の課題である。また、モデルの各プロセスの反応係数や実際の河川における化学物質の濃度等の情報に関しては、文献調査では不詳な部分も多いため、室内試験による分解速度定数に関する調査や、河川・湖沼等で底泥も対象とした化学物質の実態調査によってデータを蓄積することで、より正確なシミュレートが可能となることが期待出来る。将来的には、内分泌攪乱物質による環境リスクの予測や評価に用いることが可能とするために、モデルの精度を向上し演算結果と実環境の状況との乖離を減らしていくことが課題となる。

#### 参考文献

- 1) E. Routledge, J. Sumpter : 「Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen」、*Environ. Toxicol. Chem.* 15-3、p241-248、1996
- 2) 磯部友彦, 高田秀重 : 「環境試料中のノニルフェノールエトキシカルボン酸 (NPEC) の分析」、第 9 回環境化学討論会、p48-49、2000.6
- 3) 小森行也, 田中宏明, 竹歳健治 : 「活性汚泥処理プロセスにおける NP、NPEO の挙動」、第 37 回下水道研究発表会講演集、p713-715、2000.7
- 4) 小森行也, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明 : 「LC/MS/MS による下水試料中のエストロゲンの測定」、第 9 回世界湖沼会議発表文集 Session3-1、p225-228、2001.11
- 5) US Geological Survey : One-dimensional Transport with Inflow and Storage (OTIS): A Solute Transport Model for Streams and Rivers、*Water-Resources Investigations Report 98 - 4018*、1998
- 6) US EPA : AQUATOX for Windows、EPA-83-R-00-007、2000

## 7. バイオアッセイによるエストロゲン様物質の指標に関する研究

水循環循環研究グループ水質チーム

上 席 研 究 員

田中 宏明

研 究 員

玉本 博之

交 流 研 究 員

宮本 宣博

### 1. はじめに

近年、内分泌攪乱化学物質による人や生態系への影響が懸念されており、下水道においても多くの内分泌攪乱化学物質について実態調査<sup>1)</sup>が行われてきた。下水や環境水中ではこれらの実態調査の対象物質に加えて、分解生成物などの非意図生成物の存在についても考慮する必要があり、土木研究所ではこれらの包括的な試験法として遺伝子組み換え酵母法（以後、組み換え酵母法）を導入し、下水、下水処理水及び河川水中に様々なレベルのエストロゲン様活性が存在していることを明らかにした<sup>2) 3)</sup>。しかし、これらのエストロゲン様活性の主要物質の特性やその由来についてはいまだに不明な点も多く、現在確認されているエストロゲンやノニルフェノールの存在で説明ができていないのかなど、まだ十分な情報は得られていない。そこで、本研究では、エストロゲン様活性の主要グループの特性把握とその由来推定を行なうことを目的として、固相カラムを用いた分画方法とHPLCを用いた分画方法の検討し、極性の差を利用した化学物質のグループ分け（分画）によりエストロゲン様活性がどの様に変化、分離されるかを確認することとした。

### 2. 試験方法

#### 2.1 組み換え酵母法

遺伝子組み換え酵母は、イギリス Brunel 大学の Sumpter 教授より譲渡された株を用いた。試験方法は Routledge<sup>4)</sup>らの方法を改変した矢古宇らの方法<sup>5)</sup>に従って行った。

#### 2.2 化学分析

エストロゲン様物質の分析項目は全国実態調査の結果<sup>6)</sup>と、各物質のエストロゲン様活性のポテンシャルを考慮して、エストロン(E1)、17 $\beta$ -エストロジオール(E2)、ノニルフェノール(NP)を対象とした。E1及びE2については、LC/MS/MSによって<sup>7)</sup>、NPについてはHPLCによって<sup>8)</sup>分析を行なった。

#### 2.3 理論活性値

上記3物質のエストロゲン様活性への寄与を算出するため各物質の理論活性値を算出した。理論活性値は各物質濃度に比活性値を乗じることによって算出した。比活性値については矢古宇らの文献<sup>5)</sup>に従いE1=0.3、E2=1.0、NP=0.001とした。

#### 2.4 極性の違いによる分画方法の検討

##### 2.4.1 固相カラムを用いた分画方法

試料は組み換え酵母法の濃縮方法に従って固相抽出を行なった試料を、窒素気流下で乾固した後ヘキサン：ジクロロメタン=1：1溶液1000 $\mu$ Lに転溶した。極性分画操作については図2に示すようにアセトン

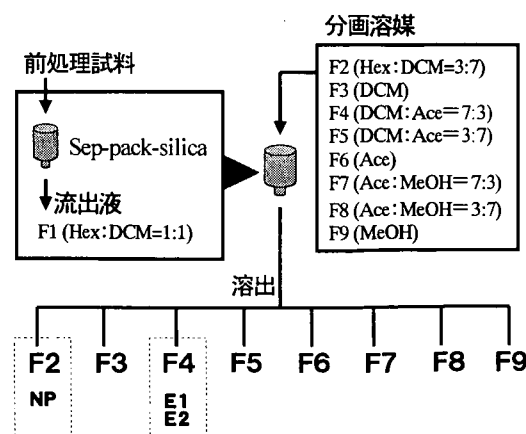


図-1 固相カラムを用いた分画フロー

10ml/min、ヘキサン(Hex)：ジクロロメタン(DCM)=1：1 溶液 10mL/min でコンディショニングを行なったシリカゲル固相カートリッジ (Seppack-silica) に、濃縮試料を保持させた。これをヘキサン、ジクロロメタン、アセトン(Ace)、メタノール(MeOH)の混和液各10ml によって順次溶出させ、溶出液9分画を得た。これらの試料を窒素気流下で乾固した後、MeOHに転溶し酵母法の試料とした。

### 2.4.2 HPLCを用いた分画方法

今回検討、改良を加えたHPLC分画方法は、Giesyら<sup>8)</sup>の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と順相・逆相カラムとを組み合わせ、内分泌攪乱化学物質を抽出・分画し各物質濃度を測定する手法である。本検討ではエストロゲン様活性を主要な物質にグループ分けをして、試料中のエストロゲン様活性の性状把握とこれらのグループ間での相互作用の有無を確認することを目的とした。このため、図-2に示す様に Giesyらの方法とは異なり、逆相カラムを用いず順相カラムとHPLCの組み合わせによりエストロゲン様活性を大きく3つのグループ分けを行う手法とした。未分画及び分画試料について、遺伝子組み換え酵母法によるエストロゲン様活性の測定、及びLC/MS/MS (E1及びE2)、GC/MS (NP)を用いた化学分析を行った。

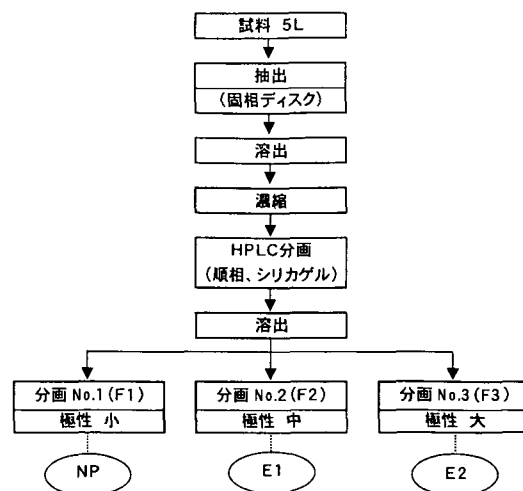


図-2 HPLCカラムを用いた分画フロー

## 3. 結果および考察

### 3.1 固相カラムを用いた分画手法

#### 3.1.1 下水処理工程におけるエストロゲン様活性と各物質の寄与

化学分析から得られたE1, E2, NPの濃度から理論活性値を算出し、これらの物質が組み換え酵母法で得られたエストロゲン様活性にどの程度寄与しているか検討した。なお事前に行なった、E1, E2, NPの標準物質を組み合わせさせた試験では、明瞭な相乗もしくは拮抗作用が確認できなかったため、ここではこれらの物質の相互作用は相加的であると仮定し、各物質の理論活性値を積み上げることによって示した。

各処理場におけるエストロゲン様活性とE1, E2, NPの理論活性値を図1に示す。これらの3物質によって説明できない不明なエストロゲン様活性の割合は、処理場によって異なっていたが、C処理場4月調査時のようにE1, E2, NP3物質の理論活性値によってほぼ説明できるケースも確認された。また、処理工程

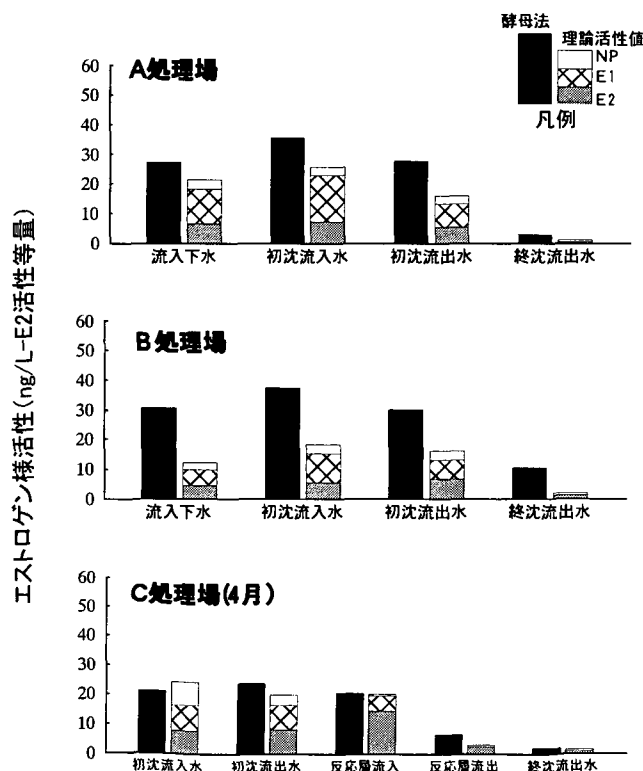


図-3 下水処理工程におけるエストロゲン様活性の変化

が進むにつれて、エストロゲン様活性は低減し、最終沈殿池流出水では、E 1のみが検出された。しかしE 1のエストロゲン様活性への寄与は処理場によって大きく異なり、A, B処理場ではE 1の理論活性値では殆ど説明できなかつた。

### 3.1.2 極性分画によるエストロゲン様活性の性状把握

E 1, E 2, NPの理論活性値によってエストロゲン様活性が説明できるケースとできないケースを示したが、これらの3物質では説明できないエストロゲン様活性の性状把握を目的として、極性の違いを利用した分画を行い、下水中に含まれるエストロゲン様活性の性状について検討を行なった。

C処理場におけるエストロゲン様活性の極性分布を図-4に示す。流入下水及び放流水におけるエストロゲン様活性はF 2～F 4分画でその殆どが占められおり、F 5分画より極性の高い分画のエストロゲン様活性は殆ど確認できなかった。しかし過去に同処理場の実験プラントで行なった結果を図-5に示すが、F 8～F 9分画でもエストロゲン様活性が確認されたケースも見られた。このような結果は、前日の降雨の影響により、1月調査のエストロゲン様活性の極性分布が、晴天時と異なつたことが要因として考えられた。このため今後は、晴天時や降雨時についてのデータの蓄積を行い、エストロゲン様活性の極性分布の特性把握を進める必要がある。また1月調査時の各分画におけるエストロゲン様活性とE 1, E 2, NPの理論活性値について比較を行なった結果、最も高い活性が確認されたF 4分画は、流入下水についてはE 2、処理水についてはE 1の寄与が大きかつた。しかしNPが分画されているF 2分画については、NPの理論活性値ではほとんど説明できなかつた。このような傾向は同処理場の実験プラント

の結果(8月)についても同様の傾向であつた。またE 1, E 2, NP 3物質の理論活性値で説明できないエストロゲン様活性はF 2～F 4分画で大半を占めていることが確認された。

### 3.1.3. 分画試料間における相互作用

上記実験により、下水中の主要3物質の間では、これらの相互作用は相加的であることを示した。しかし、これは下水中の

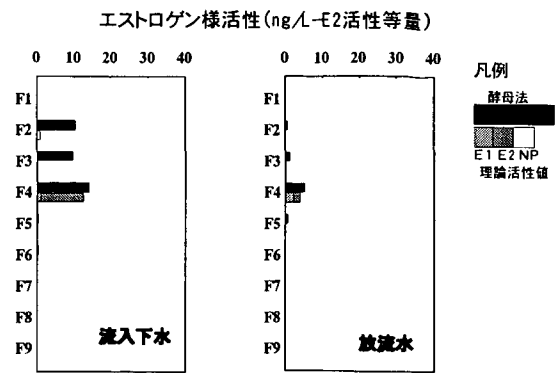


図-4 エストロゲン様活性の極性分布 (C処理場1月)

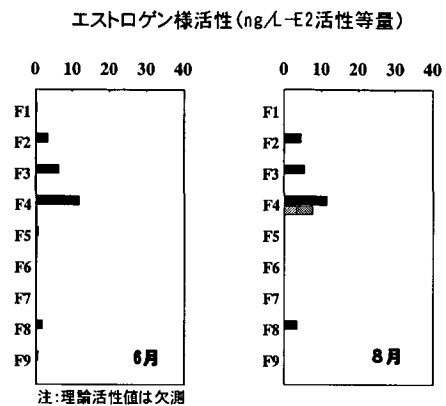


図-5 エストロゲン様活性の極性分布 (C処理場プラント流入下水)

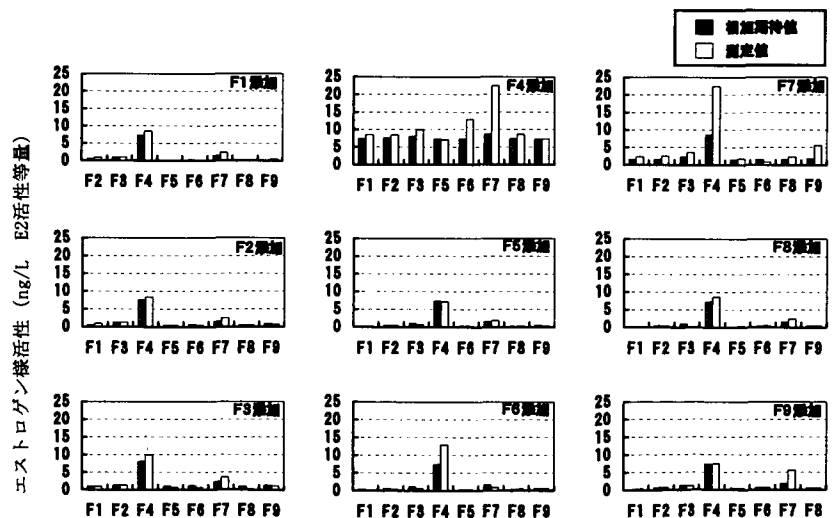


図-6 分画試料間の相互作用

全ての物質間で行なった結果ではないため、実際の試料においては、必ずしも相加的な関係であるという確証にはならない。今回、実際に下水中に存在する主要3物質以外の物質の影響も考慮するため、極性分画を行なった分画試料間での相互作用の有無を確認することで、複数の物質間での相互作用・複合作用について検証を行った。

2.4.1 で示した分画方法によって分画した分画試料F1～F9の試料を等量ずつ混合し、全ての組み合わせ(36通り)の試料を調整した。この試料を組み換え酵母法で分析し、相加期待値(各分画試料のエストロゲン様活性値の合計値)と比較した。その結果を図-6に示すが、F7を加えたケースでは組み換え酵母法で測定した値の方が高くなる傾向が見られ、F6を加えた系についても若干高くなる傾向が確認された。その他の組み合わせにおいては、概ね理論活性値と測定値の間に有為な差は確認できなかった。

### 3.1.4 界面活性剤の影響

F7分画は酵母に対して強い毒性を示しており、エストロゲン様物質以外に、酵母に対して毒性を与える物質の影響が考えられた。またこのF7分画は発泡性も確認されたことから、F7分画に含まれる物質として界面活性剤に焦点を絞り検討を行なった。界面活性剤は国内生産量を考慮し、陰イオン界面活性剤の代表物質としてLASを、非イオン界面活性剤の代表物質としてノニルフェノールエトキシレート(NPnEO)を選び、これらの標準物質について極性分画を行なった。その結果、LAS及びNPnEO( $n \geq 5$ )がF6～F7の分画に含まれることが確認された。そこでこれらの両物質による影響を確認するため、標準物質(E2)20ng/Lに界面活性剤(LAS, NPnEO)を濃度別に添加し、エストロゲン様活性への影響を調べた。その結果を図-7に結果を示すが、NPnEOについては、エストロゲン様活性に変化がなく、酵母測定系への影響は殆ど確認されなかったが、LASについては添加量の増加に伴いエストロゲン様活性が高くなる傾向が確認された。LASは流入下水ではN.D～9.8mg/L程度含まれている報告<sup>9)</sup>があり、この報告を合わせて考えるとLASの共存下ではエストロゲン様活性は最大2.5倍程度高く見積もられる可能性が示唆された。

LASやNPnEO( $n \geq 5$ )はエストロゲン様活性がないため、酵母測定系への誤差要因として働いているものと考えられた。このため組み換え酵母法の測定にあたっては下水等を高濃度に濃縮する場合、LAS分離除去が必要であり分離方法について今後検討を行なう必要があるものと考えられる。

## 3.2 固相カラムを用いた分画手法

### 3.2.1 河川水及び下水処理水のHPLC分画手法の適用

分画操作により、エストロゲン様活性は3つの分画に分離できたが、このうち下水処理場放流水(A, B処理場)のエストロゲン様活性はF2分画にその多くのエストロゲン様活性が分離されていた(図-9)。ただし、このうちF2分画のエストロゲン様活性はその半量以上が測定したNP、E1及びE2濃度からの理論活性値では説

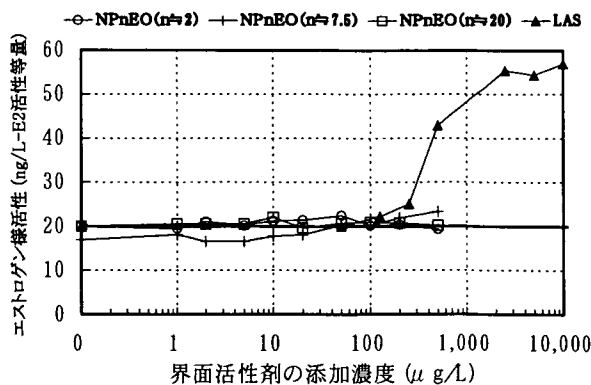


図-7 界面活性剤の添加に伴うエストロゲン様活性の変化

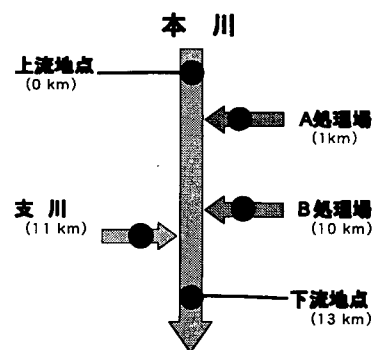


図-8 採水地点の概略図

明できないエストロゲン様活性で占められていた。また、F2フラクションの結果から下水処理場放流水にはE1の他に、E1と類似した極性のエストロゲン様活性が多量に存在していることも推定できた。

### 3.2.2 分画後のエストロゲン様活性の変化

NP、E1及びE2に基づいた理論活性値では説明の出来ないエストロゲン様活性が、分画前後でどのように変化しているかを確認するためエストロゲン様活性値と理論活性値の差を、図-10のように、各試料、各分画ごとに表記した。

この結果、各分画に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値(F1~F3の合計値)と未分画の値には明瞭な差は見られなかった。このことは、説明の出来ないエストロゲン様活性を主要3物質のグループに分離をしても、変化が見られなかったことを表している。仮に、試料中にこの3グループ間での相乗作用が存在するか、前述したようにLASの存在による可能な活性値を引き起こすならば、各分画試料中に存在している説明の出来ないエストロゲン様活性の合計値は未分画の値よりも低くなることが予想される。しかし、今回の調査では分画の前後でこれらの活性値に明瞭な差が見られなかったことから、3グループ間ではそのような顕著な相互作用が説明の出来ないエストロゲン様活性を生じさせている可能性は小さいと考えられる。

ただし、今後多様な試料について同様の調査を行うと共にデータの収集を行ない、確認する必要があるものと思われる。また、下水処理水に存在していた説明の出来ないエストロゲン様活性の由来把握については、より詳細な分画を行い、その性状の把握を行う必要があると考えられる。

## 4. まとめ

### 固相カラムを用いた下水及び下水処理水の分画手法

- 1) 下水中のエストロゲン様活性の主要な由来物質はE1、E2であり、処理工程が進むにつれE1の占める割合が高まった。また今回対象とした3物質(E1、E2、NP)の理論活性値で説明できないエストロゲン様活性の全体に占める割合は、処理場、調査時期によって大きく異なった。
- 2) エストロゲン様活性は低極性~高極性まで広く検出され、代表的なエストロゲン様物質が分画されるF2~F4で全体のエストロゲン様活性の大半を占めた。また、E1、E2、NPで説明できないエストロゲン様活性も、F2~F4を中心として存在していることが明らかとなった。

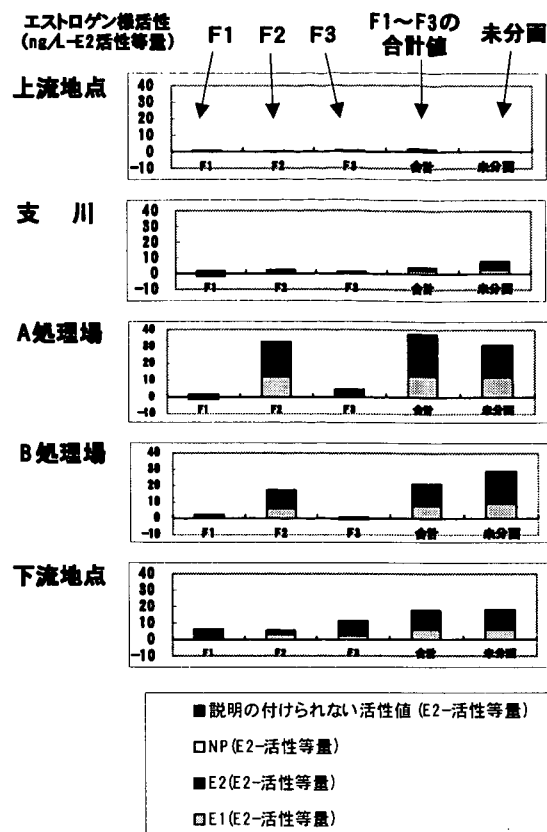


図-9 未分画及び分画試料におけるエストロゲン様活性と理論活性値

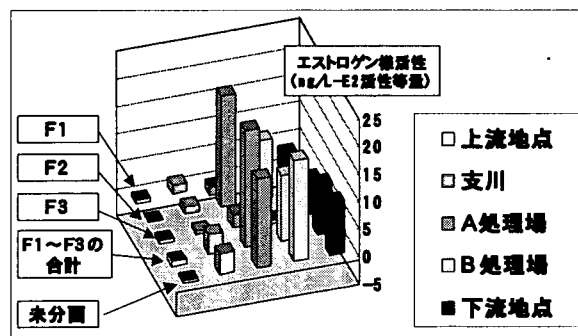


図-10 未分画及び分画試料に存在している説明の付けられないエストロゲン様活性

- 3) 分画試料間の相互的な作用については、LASが存在するF6～F7を加えたケースで相乗的な作用が確認されたが、それ以外のケースでは明瞭な相乗作用、拮抗作用は確認できなかった。
- 4) 試料中にLASが存在することによって、エストロゲン様活性は最大で2.5倍程度高く見積もられる可能性が示唆された。LAS自身はエストロゲン様活性を持たないため、酵母測定系への誤差要因として働いているものと考えられる。このため組み換え酵母法の測定にあたってはLAS分離除去が必要であり、分離方法について今後検討を行なう必要があるものと考えられる。

### **HPLCを用いた河川水及び下水処理水の分画手法**

- 1) 今回検討したHPLCを用いた分画手法は、水環境中に存在する主要な3物質(E1、E2及びNP)を個々のグループに分画できる手法であることが確認できた。
- 2) 河川水及び下水処理水を3つの主要成分の分画に分離した結果、下水処理水のエストロゲン様活性の多くがF2分画(E1が分離されるグループ)に分画された。しかし、このF2分画には、E1の理論活性値だけでは説明の出来ないエストロゲン様活性がかなり存在していることも確認できた。
- 3) E1、E2及びNPの検出濃度だけで説明の出来ないエストロゲン様活性は下水処理水や下流地点に多く存在していたが、この活性値は分画の前後で顕著な変化を示さなかった。この結果から、今回分離した主要3分画の相互(相乗)作用の影響はほとんどないことが示唆された。

### **〈参考文献〉**

- 1) 国土交通省, 下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査結果(2001)
- 2) H. Tanaka, Y. Yakou, A. Takahashi, T. Higashitani and K. Komori; Comparison Between Estrogenicities Estimated from DNA Recombinant Yeast and from Chemical Analyses of Endocrine Disruptors during Sewage Treatment, Water Science & Technology, Vol. 43(2), pp125-132(2001)
- 3) H. Tamamoto, A. Takahashi, Y. Yakou, N. Miyamoto, M. Saito, T. Higashitani, H. Tanaka: IWA 2nd World Water Congress, CD-ROM (2001)
- 4) Routledge, E. J. and Sumpter, J. P.; Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 15(3), pp241-248 (1996)
- 5) 矢古宇靖子, 高橋明宏, 東谷忠, 田中宏明: 組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定, 環境工学研究論文集, Vol. 36, pp199-204, (1999)
- 6) 小森行也, 八十島誠, 高橋明宏, 矢古宇靖子, 田中宏明; 下水試料中のエストロゲン及びノニルフェノキシ酢酸類の分析, 土木技術資料, Vol. 43(11), pp44-49(2001)
- 7) 宮本宣博 他: 下水中のエストロゲン活性の由来に関する検討, 日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会要旨集, p. 217 (2001)
- 8) J. P. Giesy et al.; Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures, Environ. Sci. Technol., Vol. 33, pp2814-2820(1999)
- 9) 小森行也 田中宏明, 竹歳健治; 活性汚泥処理プロセスにおける非イオン界面活性剤の挙動, 下水道研究発表会講演集, pp. 700-702(1999)
- 10) 日本水環境学会編, 水環境と洗剤, p55