

II. その他の予算による研究
[リサイクルチーム]

間以上の抽出を行う方法である。

湿泥-ソックスレー抽出法は、環境庁マニュアルで公定法の代替法として注記されている方法の一つである。本法は、試料にアセトンまたはメタノールを加えて乾燥させた後、トルエンで24時間以上ソックスレー抽出を行う方法である。公定法より所要時間が短く、省力化が可能である。なお、本検討では抽出時間を公定法にそろえている。

湿泥-ヘキササン抽出法は湿泥-ソックスレー抽出法とともに環境庁マニュアルで公定法の代替法として注記されている方法である。本法は、試料に水酸化カリウムエタノール溶液を加え、1夜室温で放置した後、ヘキササンで振とう抽出を行う方法である。

PFE法は、試料と抽出溶媒を高温、高压条件下で接触させ、目的物質を比較的短時間で抽出する方法である²⁾。PFE法での抽出条件は、公定法の抽出条件を参考としつつ、底質からの迅速なダイオキシン類抽出を目指して本検討の中で設定したものである。風乾+PFE法は、公定法における抽出操作のみをPFE法に置きかえた操作条件である。これは、16時間以上とされているソックスレー抽出法による抽出時間を40分程度に短縮することを期待して設定した。PFE法条件①~⑦は、一般に数日を要する風乾を行わないことによる迅速化を期待して設定した。PFE法条件①は、風乾+PFE法から乾燥工程を省いた操作条件である。PFE法条件②~⑥はアセトン、条件⑦はエタノールによる脱水を期待して設定した。

超音波抽出法は、試料と抽出溶媒の接触をより効率的に行うために超音波を用いる方法である²⁾。超音波抽出法での抽出条件は、アセトンによる脱水に期待した条件設定とした。

試料の採取および抽出工程より後の分析操作は、環境庁マニュアルに従って行った。分析対象物質はポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン(PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)およびコプラナーポリ塩化ビフェニル(Co-PCBs)とした。

2. 2 研究結果

各乾燥・抽出手法で得られた分析結果(毒性等量)を比較したところ、公定法である風乾+ソックスレー抽出法より高い分析結果となったのは、凍結乾燥+ソックスレー抽出法、風乾+PFE法、PFE法の条件③④⑦であった(図-1)。

各乾燥・抽出手法で得られた分析結果(毒性等量)の変動係数を比較したところ、公定法と同程度以下の変動係数となったのは、風乾+PFE法とPFE法条件④、超音波抽出法であった。

PFE法は抽出時間が比較的短かい抽出方法である。特に、条件①~⑦では乾燥に要する時間が短縮される。これらのうち、条件③④⑦では毒性等量が公定法より高い値を示しただけでなく、ほとんどの化合物で分析結果が公定法での分析結果より高くなっており、安全側の値を示す傾向にあった。これらのうち、条件④で

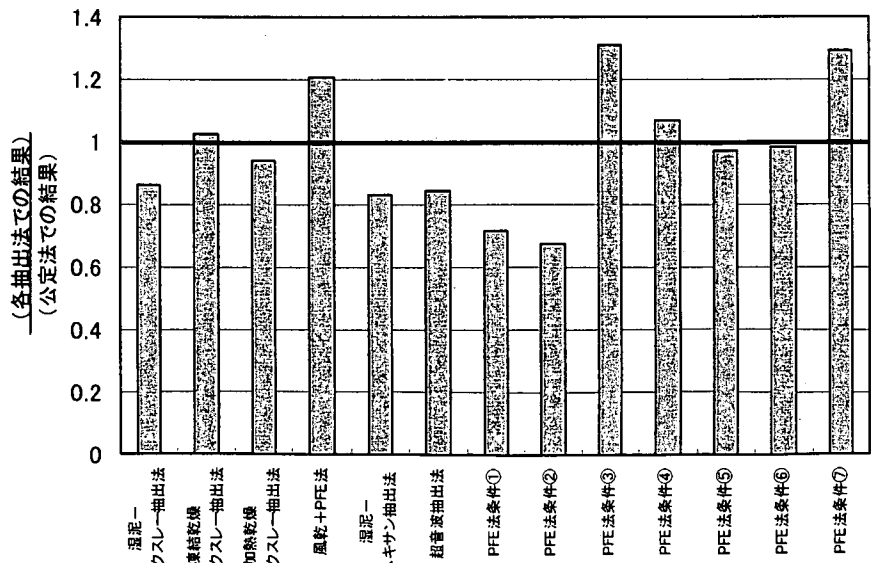


図-1 公定法と各乾燥・抽出手法の分析値の比較

の変動係数が比較的小さいこと、他の操作条件に比べて操作条件が穏やかであることから、底質中のダイオキシン類含有量の迅速・簡易な乾燥・抽出手法としては、PFE法条件④が有望な手法の一つであると考えられる。

ここまでの検討に使用した底質とは性状の異なる底質についても、同等の抽出傾向を示すことを確認するため、表-2に示す4種の底質について、公定法とPFE法条件④で得られた分析結果（毒性等量）を比較した。今回用いた4種の底質試料に関しては、PFE法条件④で得られた分析結果が公定法での結果と同等以上の値を示し、安全側の値を示す傾向にあることが明らかとなった。このため、性状の異なる底質試料に対しても、乾燥・抽出工程へのPFE法条件④の適用が可能であることが明らかとなった。

表-2 公定法とPFE法の分析値の比較

	底質A	底質B	底質C	底質D
泥質	シルト	砂混じりシルト	シルト混じり砂	砂
泥色	黒	オリーブ黒	黒	オリーブ黒
臭気	微硫化水素臭	微硫化水素臭	微硫化水素臭	無臭
混入物	木葉、ビニール	植物片	植物片	なし
含水率(%)	62.8	63.4	45.5	25.7
強熱減量(%)	12.4	10.8	8.2	1.6
公定法結果(pg-TEQ/g-dry)	92	42	17	0.89
PFE法結果(pg-TEQ/g-dry)	98	49	20	1.8

3. 迅速乾燥・抽出手法と簡易検出法との組み合わせに関する検討

3.1 研究方法

複数の河川底質試料を用い、簡易分析技術に関する比較検討を、本研究と協調して研究を実施している水質チームと共同で実施した。乾燥・抽出、精製、検出工程の簡易化・迅速化を目指し、複数の手法の組み合わせによる比較検討を行った。この検討の中で、迅速乾燥・抽出手法と簡易検出法との組み合わせに関する検討を行った。

比較検討した乾燥・抽出手法は、公定法とPFE法条件④である。各乾燥・抽出手法により得られた抽出液を公定法で精製した後、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)を用いる公定法、水質チームで検討したELISA法(ELISA_{ECO}法、ELISA_{DT2}法)、Ahレセプターバインディングアッセイ法(AhR法)の各検出法で測定し、その結果を比較した。

本検討に用いた底質試料は、関東地方の河川底質試料である。これらの試料は、環境省または国土交通省の調査で、ダイオキシン類の濃度が比較的高いと報告がある地点を含むように選定して採取した。同一汚染地域の複数地点で20検体以上の試料を採取し、四重極GC/MSによる簡易法で高濃度試料から低濃度試料までを含むように5試料を選定して使用した。

3.2 研究結果

各乾燥・抽出手法で得られた抽出液を公定法の精製・検出方法で分析した。得られた分析結果（毒性等量）を表-3に示す。本検討で用いた5種の底質試料のうち、4種の試料についてはPFE法の結果が公定法と同等以上の値を示した。また、残る1種（底質1090）についても、7%程度の差であった。分析実測値の例を図-3に示す。底質1020については、個々の化合物の分析値についてもPFE法の方が公定法と同等以上の値を示していた。一方、PFE法での

表-3 各乾燥・抽出手法での抽出試料のHRGC/HRMSでの分析結果

		底質1020	底質1030	底質1060	底質1080	底質1090
強熱減量(%)		17.1	14.3	12.0	12.1	9.6
HRGC/HRMS (pg-TEQ/g-dry)	公定法	65	76	64	77	2.8 × 10 ²
	PFE法	75	88	82	1.0 × 10 ²	2.6 × 10 ²

毒性等量が低めに出た底質1090にはCo-PCBsが高濃度で混入しており、これらの化合物のPFE法での値が低かった。Co-PCBsの毒性等価係数が小

さいため、毒性等量への影響が小さかったものである。本検討では、精製工程において全試料を統一した操作で処理したため、予想外に負荷が大きかった底質 1090 の精製に不具合が生じたことが、値の解離の一因であると思われる。実際の調査で PFE 法の抽出液に公定法による検出を適用する場合は、分析の結果得られる各化合物の濃度分布形状を確認しておく必要があると思われるが、迅速乾燥・抽出手法としての PFE 法の適用は可能であると考えられる。

簡易検出法で得られた実測値と、公定法での各化合物の分析値と交差率の積から算出される計算値を比較した。その結果、PFE 法を用いることにより概ね ELISA_{ECO} 法、AhR 法では実測値と計算値が近い値を示す傾向にあり、ELISA_{DT2} 法では離れる傾向にあったが、それぞれの機構を明確には把握できなかった。PFE 法と簡易検出法との組み合わせに関しては、より多くの試料を用いた検討が必要であると考えられる。

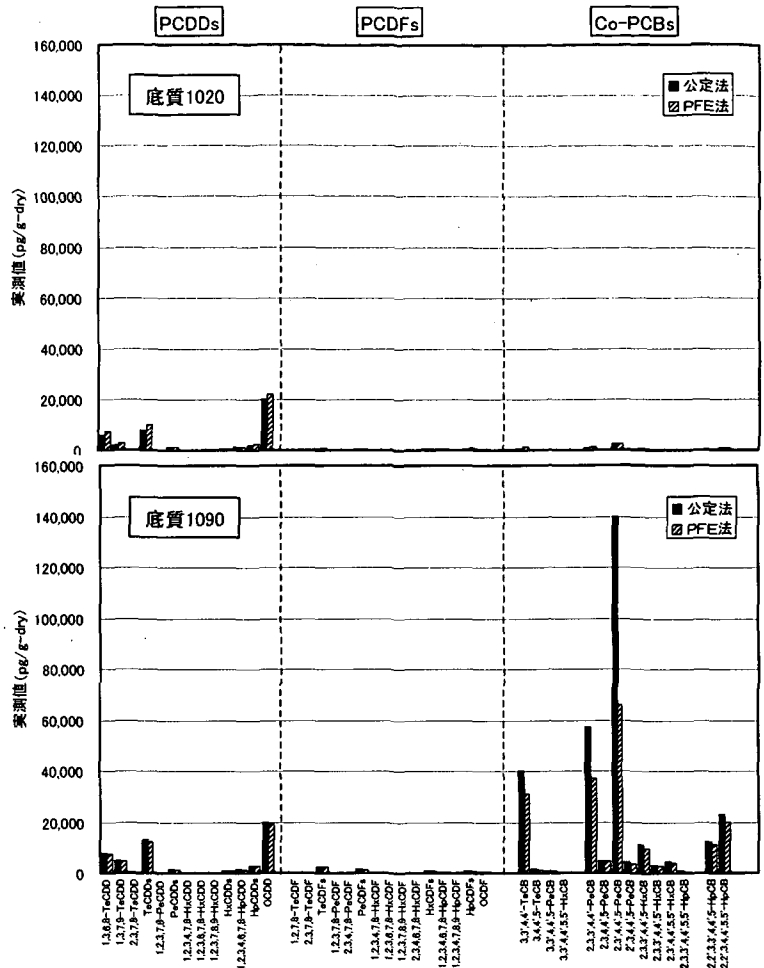


図-3 各乾燥・抽出手法での抽出試料の実測値の例

4. まとめ

底質中のダイオキシン類の汚染調査にあたっては、調査結果の使用目的に応じ、操作に要する時間、回収率、検出方法との適合性等を踏まえて適切な調査方法を選択すべきであると考えられる。

本研究では、短時間で底質のダイオキシン類汚染状況の概略を把握する目的で、公定法としての試験結果を要さない場合を想定し、底質中のダイオキシン類分析のための各分析工程の内、乾燥及び抽出工程の迅速化に関する検討を行ったところ、PFE法の応用による工程の迅速化が可能であることが明らかとなった。

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) 環境庁水質保全局水質管理課：ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル，2000
- 2) U. S. EPA：Pressurized Fluid Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3545A, 2000
- 3) U. S. EPA：Microwave Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3546, 2000
- 4) U. S. EPA：Ultrasonic Extraction, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3550C, 2000
- 5) U. S. EPA：Supercritical Fluid Extraction of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Organochlorine Pesticides, Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods, Method 3562, 1998
- 6) 浦野紘平, 加藤みか：高沸点有機ハロゲン化合物汚染の効率的な調査・監視・対策のための測定方法, 廃棄物学会誌, Vol.12, No. 6, pp.376-385, 2001

2. 河川試料に適した原虫測定法の開発

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木 穰
研究員 北村 友一

1. はじめに

水系の微生物学的安全性を評価するためには、河川水中のクリプトスポリジウムの存在を確認することが重要である。特に、河川水が水道水源や親水として利用されている場合、ヒトに対して重大な健康影響を及ぼす可能性がある。注意勧告などのクリプトスポリジウム対策を迅速に行うためには、河川水中のクリプトスポリジウムを常にモニタリングする必要がある。しかし、クリプトスポリジウムの高感度測定方法は確立されていない。そこで、本研究では、河川水中のクリプトスポリジウムの濃縮、回収方法の検討と検出された原虫がクリプトスポリジウムであることを確定するための遺伝子検査方法を開発することを目的としている。

本年度は、クリプトスポリジウムからの DNA 抽出方法を検討し、一連の検査方法の提案を行った。

2. 実験方法

現時点で簡便なクリプトスポリジウムオーシストの DNA 抽出法は、凍結融解とスピнкаラムを併用する方法と凍結融解と磁性シリカビーズを併用する方法の 2 種類がある。本年度は、どちらの抽出法の回収率が高いかを判断するために、クリプトスポリジウムオーシストの希釈系列 (0.3, 0.9, 3, 10, 30 個/100 μ l) を作成し、両抽出法で DNA を抽出し、どの希釈段階までクリプトスポリジウム DNA が PCR 検出されるかどうかを明らかにした。なお、PCR によるクリプトスポリジウムの検出は、Xiao らの¹⁾方法に従った。

2.1 凍結融解+スピнкаラムによる DNA 抽出方法

100 μ l 当り 0.3 個、0.9 個、3 個、10 個、30 個に調整したオーシストは、液体窒素 (処理時間: 30 秒) と 65 度のヒートブロック (処理時間: 1 分間) を用い凍結融解処理を 5 回施した。その後、Q 社製のスピнкаラムによる DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出操作を行った。スピнкаラムによる DNA 抽出操作は、基本的に添付されているマニュアルに従った。ただし、最終段階での DNA の誘出は、100 μ l で行った。なお、本操作は 6 回繰り返し行い、試験操作の再現性を確認した。

2.2 凍結融解+磁性シリカビーズによる DNA 抽出方法

2.1 と同操作により凍結融解した試料を T 社製の磁性シリカビーズによる DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出操作を行った。磁性シリカビーズによる DNA 抽出操作は、基本的に添付されているマニュアルに従った。ただし、最終段階での DNA の誘出は、100 μ l で行った。なお、本操作は 7 回繰り返し行い、試験操作の再現性を確認した。

3. 実験結果

図-1 は、凍結融解+スピнкаラム法と凍結融解+磁性シリカビーズ法によるオーシストの個数と DNA 検出確率の関係である。凍結融解+スピнкаラム法ではオーシスト数約 1 個より、クリプトスポリジウム DNA が検出されはじめ、オーシスト数約 9 個以上でクリプトスポリジウム DNA を確実に検出できる。凍結融解+シリカビーズ法では、3 個以上からオーシストが検出されはじめるが、オーシスト数 30 個であっても、クリプトスポリジウムの DNA を PCR 検出できない場合がある。凍結融解+スピнкаラム法の DNA 回収率は、凍結融解+磁性シリカビーズ法より約 0.5log 高い結果となった。

本実験でのPCRによるクリプトスポリジウムオーシストの検出は、DNA抽出試料100 μ lのうち10 μ l中にクリプトスポリジウムDNAが存在するかどうかを見たものである。さらに、検出感度を上げるためには、PCRに供するサンプル量を上げる。または、抽出したDNAをさらに濃縮する必要がある。

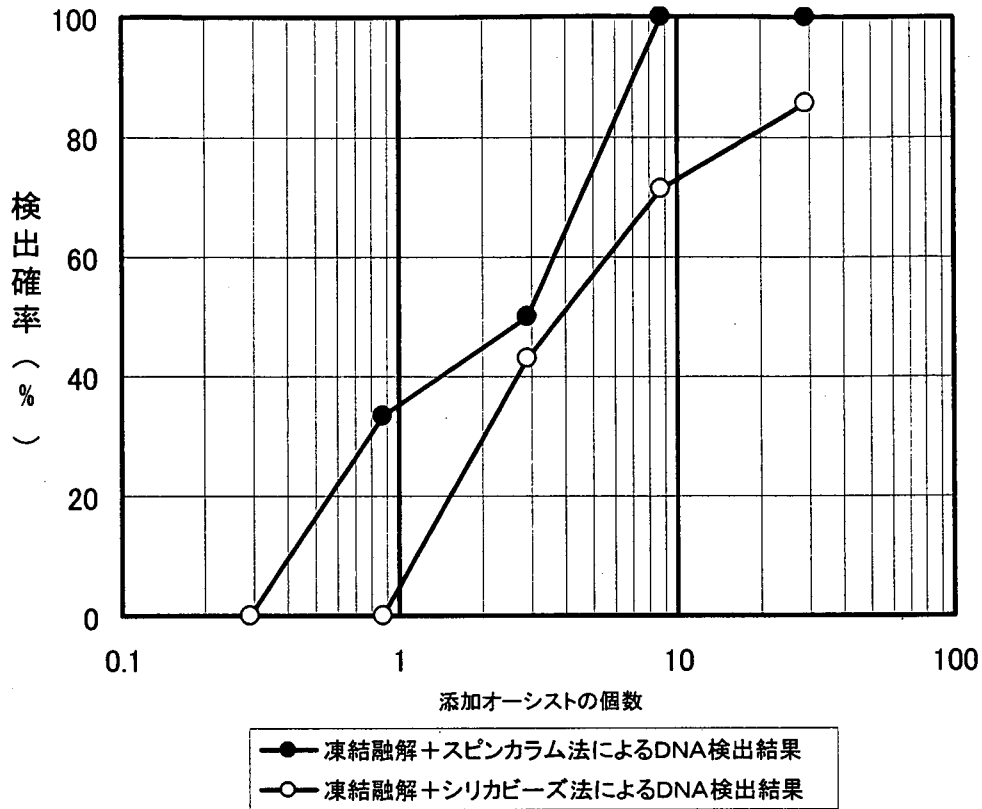


図-1 DNA回収法の比較

4. まとめ

河川水中のクリプトスポリジウムの遺伝子検出は、以下の手順が適していると考えられた。

- ① ポリカーボネートフィルターによる河川水中オーシストの濃縮
- ② 免疫磁気ビーズ法によるオーシストの精製
- ③ 凍結融解+スピncラム法によるDNAの抽出と精製
- ④ PCR法によるクリプトスポリジウムDNAの増幅と検出
- ⑤ PCR増幅産物の塩基配列の決定

なお、本調査研究は、関東地方整備局からの受託業務費により実施されたものである。

参考文献

- 1) Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA: Identification of Species and Sources of *Cryptosporidium* Oocysts in Storm Water with a Small-Subunit rRNA-Based Diagnostic and Genotyping Tool. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Dec;66(12):5492-8

3. 病原性微生物の同定方法および挙動に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木 穂
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微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水に含まれる病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生的安全性を評価するためには、下水中の極微量の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

本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、下水中・環境水中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出できる手法を提案する。さらに、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ことを目的としている。

本研究で研究対象としている病原ウイルスは、Norovirus、原虫は *Cryptosporidium* であるが、本年度は、*Cryptosporidium* について以下の研究を行った。

- 1) Real Time PCR 法による *Cryptosporidium* オーシストの定量検出法の確立
- 2) 河川水、海水、水道水中での *Cryptosporidium* オーシストの感染性の消長の解明

2. Real Time PCR 法による *Cryptosporidium* オーシストの定量検出法

Real Time PCR は、PCR により増幅される DNA を蛍光シグナルにより Real Time で検出するものであり、本法により、試料中の DNA を簡便に定量することが可能となる。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。前年度の研究では、*Cryptosporidium* の Heat Shock Protein をコードする遺伝子を標的としたが、検出感度がオーシスト数 20 個と低かったため、今年度は、高感度検出が可能と考えられる 18S リボソーム RNA 遺伝子（以下では 18SrDNA とする）を標的遺伝子とし、検出感度の向上を目指した。

2.1 *Cryptosporidium* の 18SrDNA を Real Time PCR 法により検出するための Primer と Probe の設計

Cryptosporidium の 18SrDNA を Real Time PCR により検出するための Primer と probe は、GeneBank access number AF093489 (Human *Cryptosporidium parvum*) より設計した。設計した Primer と Probe の位置および塩基配列を図-1 に示す。この Primer により増幅される区間の塩基配列を BLAST (相同性検索) 検索した結果、表-1 に示した *Cryptosporidium* と塩基配列が 100% 一致した。本 Primer と Probe を用いた場合、*C. parvum* の他に、*C. meleagridis*、*C. felis* が検出される可能性があった。ヒトに感染性を有する *C. parvum* のみが検出できることが望ましいが、18SrDNA 領域は、*Cryptosporidium* 種間で、配列の異なる部位が少なく、*C. parvum* のみを検出できる Primer および Probe を設計することは困難であった。

781 agatTTTTat cTTTTtatt ggttctaaga taagaataat gattaatagg gacagttggg
 Forward Primer
 841 ggcatttgta tttaacagtc agaggtgaaa ttcttagatt tgtaaagac aaactaatgc
 901 gaaagcattt gccaaggatg ttttcattaa tcaagaacga aagttagggg atcgaagacg
 Fluorescein ● ○ LCRed640
 961 atagatacc gtcgtagtct taaccataaa ctatgccaac tagagattgg aggttgttcc
 1021 ttactccttc agcaccttat gagaaatcaa agtctttggg ttctgggggg agtatggctg
 1081 caaggctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc aggagtggag cctgcggcct
 Reverse Primer

図-1 *Cryptosporidium* 18SrRNA gene 検出用の primer 及び probe の位置

GeneBank:Access number AF093489, Human *Cryptosporidium parvum* より設計、増幅領域 DNA サイズ:263bp

表-1 図-1の増幅対象塩基配列と100%同じ塩基配列であるGeneBank登録*Cryptosporidium*

AY166839 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF262327 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF112576 <i>Cryptosporidium parvum</i>
U11440 <i>Cryptosporidium wrairi</i>	AF248764 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF112575 <i>Cryptosporidium felis</i>
L25642 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248763 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF112574 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>
L16997 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248762 <i>Cryptosporidium wrairi</i>	AF112573 <i>Cryptosporidium</i> sp.
L16996 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248759 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF112572 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030093 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248758 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF112571 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030092 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248757 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF112570 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030091 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248756 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF112569 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030089 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF248755 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF108865 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030088 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248754 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF108864 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AY030086 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248753 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF108863 <i>Cryptosporidium</i> sp.
AY007254 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF248752 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF108862 <i>Cryptosporidium felis</i>
AF513227 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF248751 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF108861 <i>Cryptosporidium</i> sp.
AF481962 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF248750 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF108860 <i>Cryptosporidium</i> sp.
AF442484 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF247535 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF093494 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF411631 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	AF222998 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093493 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF323567 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF164102 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093492 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF323566 <i>Cryptosporidium felis</i>	AF162430 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093491 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF323565 <i>Cryptosporidium felis</i>	AF161859 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093490 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF323564 <i>Cryptosporidium felis</i>	AF161858 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093489 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF323563 <i>Cryptosporidium felis</i>	AF161857 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF087577 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF308600 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF161856 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF087576 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF280053 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF159113 <i>Cryptosporidium felis</i>	AF087575 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF262334 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF159112 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF087574 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF262333 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF159111 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF040725 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF262331 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF159110 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AF015772 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF262330 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF133842 <i>Cryptosporidium parvum</i>	AB089290 <i>Cryptosporidium parvum</i>
AF262329 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF115378 <i>Cryptosporidium wrairi</i>	
AF262328 <i>Cryptosporidium</i> sp.	AF115377 <i>Cryptosporidium parvum</i>	

2. 2 実験方法

実験では Roche 社製の Real Time PCR 装置(LightCycler)を使用した。はじめに、*Cryptosporidium* オーストの個数と Real Time PCR での検出限界を明らかにするため、*Cryptosporidium* オースト (HNJ-1 株) の 87 個, 29 個, 8.7 個, 2.9 個, 0.87 個, 0.29 個, 0 個の 6 段階の希釈系列を作成し、これらの試料から図-2

の手順により DNA を抽出し、この DNA 抽出試料から、*Cryptosporidium* の Real Time PCR 検出を試み、検出限界と定量限界を明らかにした。次に、河川水 10L にオーシストを 5 個添加し、ポリカーボネート製メンブランフィルター（孔径 3.0 μ m）でオーシストを濃縮した後、免疫磁気ビーズでオーシストを精製し、その後、DNA を抽出（図-2 の方法）した後、Real Time PCR により、河川水に添加した *Cryptosporidium* オーシストが検出できるかどうかを検討した。さらに、下水中に存在する *Cryptosporidium* の検出への適用性も検討した。下水中のオーシストの検出では、実流入下水 200ml（オーシストの添加は行っていない）を試料とした。

なお、本実験での Real Time PCR 法によるオーシストの検出は、Hybridization Probe 法により行い、反応試薬には、QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) を使用した。本実験で用いた Real Time PCR 試薬の濃度を表-2 に、Real Time PCR 条件を表-3 に示す。

2.3 実験結果と考察

図-3 は、*Cryptosporidium* オーシストの 0~87 個の希釈系列試料の Real Time PCR 結果である。図よりオーシスト数 0.87 個以上から、蛍光強度が増加していることがわかる。これは、標的としている 18SrDNA 部位が増加していることを意味しており、オーシスト数約 1 個か検出できることがわかる。図-4 は、図-3 の結果をオーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するまでに要するサイクル数の関係に整理したものである。図-4 より、オーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するまでのサイクル数の間に、相関関係が得られ、約 1 個相当のオーシストまで定量検出可能となることがわかる。

前年度の Heat Shock Protein を標的とした Real Time PCR では、オーシスト数 20 個が検出限界であったが、標的遺伝子を 18SrDNA に変更することにより、検出限界を約 1 個まで低下することが可能となった。

図-5 は、河川水にオーシストを 5 個添加した試料と、無添加の試料の Real Time PCR 結果である。図-5 よりオーシストを添加した試料では、蛍光強度が増加しており、蛍光強度が 0.05 に到達するサイクル数は、約 36.5 サイクルであることがわかる。図-4 のオーシストの個数と蛍光強度が 0.05 に到達するに要するサイクル数の関係より、36.5 サイクルに相当するオーシストの個数を読み取ると 3 個となり、河川水に添加したオーシストの回収率は、60% (3/5) 程度となる。

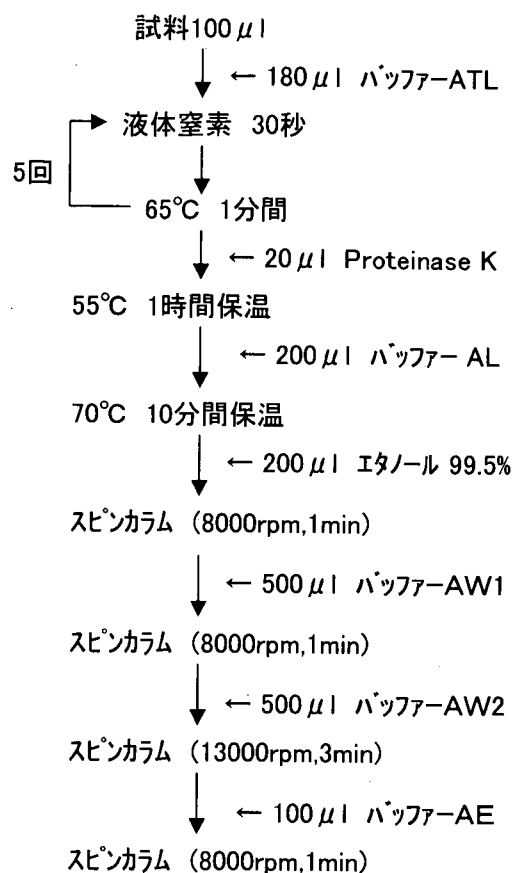


図-2 DNA 抽出手順

凍結融解と DNeasy Tissue Kit(Qiagen)を組み合わせ
た方法

表-2 Hybridization Probe法の試薬濃度

試薬の種類	最終濃度
H ₂ O	適宜
Forward Primer	0.5 μ M
Reverse Primer	0.5 μ M
Fluorescein Probe	0.2 μ M
LCRed Probe	0.4 μ M
QuantiTect Probe PCR Master Mix	2 \times

表-3 Real Time PCR条件

初期	95°C	15分
変性	95°C	1秒
アニーリング	62°C	30秒
エクステンション	72°C	30秒
サイクル数	55回	

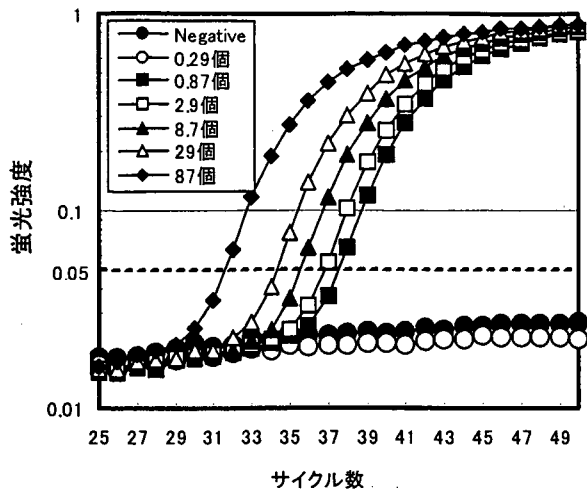


図-3 *Cryptosporidium* オーストのReal Time PCR 結果

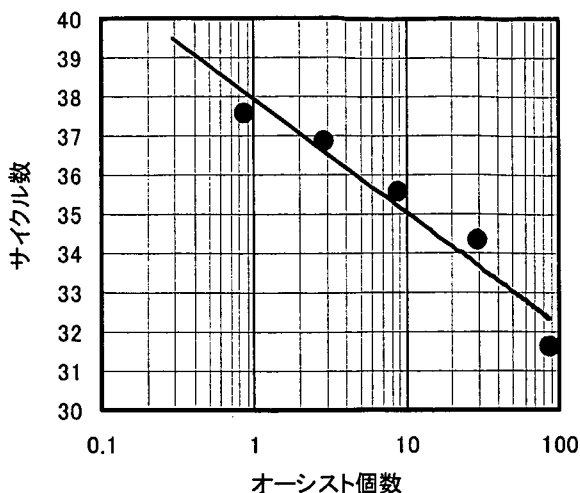


図-4 オーストの個数と蛍光強度が0.05に到達するに要するサイクル数の関係

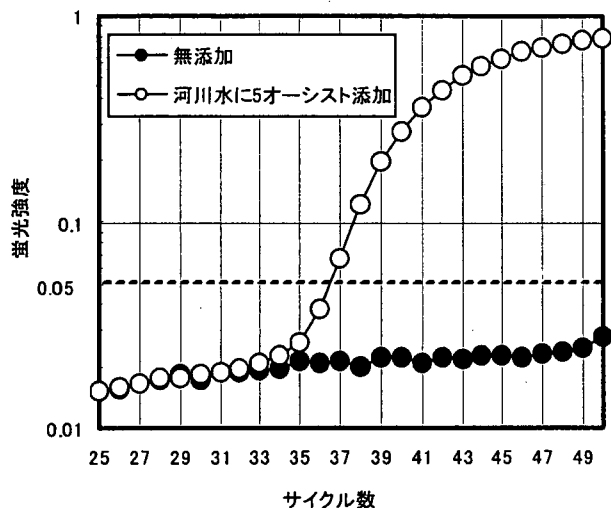


図-5 河川水に*Cryptosporidium* オーストを5個添加したときのReal Time PCR結果

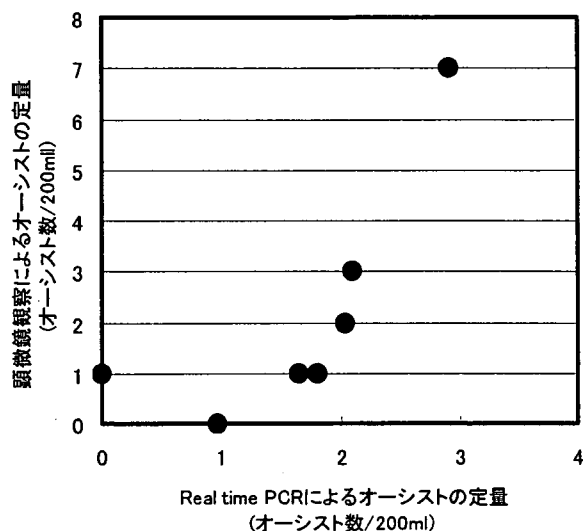


図-6 Real Time PCRによるオーストの定量と顕微鏡観察による定量の関係

図-6は、実流入下水中の *Cryptosporidium* オーストを Real Time PCR により定量検出した結果と顕微鏡観察による定量検出結果の関係である。オーストが顕微鏡観察で2個以上検出できるレベルであれば、Real Time PCR でも *Cryptosporidium* DNA が検出できることがわかる。

Real Time PCR は、顕微鏡観察と同等のレベルまで *Cryptosporidium* を検出することが可能であり、しかも、1時間程度で32サンプル(LightCyclerの場合)の同時定量検出が可能である。さらに、従来のPCR¹⁾では、PCR増幅産物を電気泳動で確認する必要があったが、Real Time PCRでは、増幅産物の定性は不要であり、非常に簡便であり、コンタミネーションの少ない方法である。今後、Real Time PCR法は、*Cryptosporidium* だけでなく、その他の微生物検査の主流になるものと考えられる。

3. *Cryptosporidium* オーストの感染性の消長効果

環境水中で *Cryptosporidium* オーストがどの程度の期間感染能力を有しているかを明らかにすることは、

Cryptosporidium の感染リスクを評価する場合重要となる。そこで、海水、河川水、水道水中での *Cryptosporidium* オーシストの感染能力の消長を明らかにするための実験を行った。

3.1 実験方法

オーシストの保存には、図-7に示したオーシスト保存装置(細胞培養用マイクロプレートを用いた)。オーシストの保存液は、実海水、実河川水、水道水とした。海水、河川水は、0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを、水道水は蛇口から採取したものをそのままオーシスト保存液とした。海水、河川水、水道水の性状は、表-4に示す。海水、河川水、水道水は、カルチャーインサートの内側と外側に入れ(全量 2ml)、セルカルチャーインサートの内側には、オーシストを 10⁶ 個入れた。海水、河川水、水道水のそれぞれのマイクロプレートは、20 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内に保存した。水道水は、1~3日、海水、河川水は1週間に1回交換した。

1ヶ月経過後、カルチャーインサート内からオーシストを回収し、乳のみマウス感染試験を行った。乳のみマウスに投与するオーシスト数は 10⁴ 個とし、1条件につき 5匹の乳のみマウスに投与した。乳のみマウスが *Cryptosporidium* に感染したかどうかは、マウスの腸管を摘出し、腸管からオーシストが検出されるかどうかから判定した。なお、乳のみマウス感染試験では、コントロールとし、新鮮なオーシストの感染試験も同時に行った。

3.2 実験結果と考察

乳のみマウス感染試験の結果を表-4に示す。表より 20 $^{\circ}$ Cの水道水、海水、河川水中に1ヶ月間保存した後でも、*Cryptosporidium* オーシストは、感染能力を有していることがわかる。腸管から回収されるオーシスト数およびマウス感染確率から、水道水、海水、河川水のオーシストの感染性の消失に与える影響を考察すると、海水、水道水、河川水の順で腸管から回収されるオーシストの数、および感染確率が低下していることがわかる。よって、*Cryptosporidium* オーシストの感染性は、海水、水道水、河川水の順番で影響を受けることが明らかとなった。

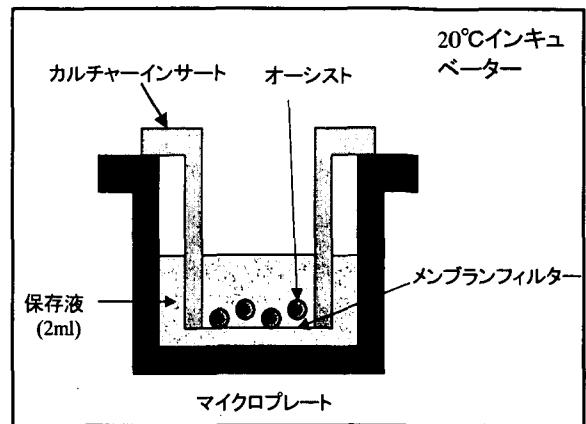


図-7 オーシストの保存装置

表-4 海水、河川水、水道水の性状

海水	塩化物イオン	16000mg/l
	ナトリウム	7900mg/l
	マグネシウム	930mg/l
	カリウム	280mg/l
	カルシウム	320mg/l
河川水	塩化物イオン	5.1mg/l
	ナトリウム	6.3mg/l
	マグネシウム	4.9mg/l
	カリウム	0.9mg/l
	カルシウム	19mg/l
水道水	残留塩素	0.1~0.2mg/l

表-5 乳のみマウス感染試験の結果

保存環境	乳のみマウス番号	腸管から回収されたオーシスト数	腸管オーシストの平均値と感染確率
水道水	1	46000	46280 4/5
	2	2400	
	3	43000	
	4	140000	
	5	0	
海水	1	400	17700 3/5
	2	85000	
	3	0	
	4	3100	
	5	0	
河川水	1	7800	95360 5/5
	2	100000	
	3	290000	
	4	63000	
	5	16000	
コントロール	1	97000	103500
	2	110000	
	3	食殺*	
	4	食殺*	
	5	食殺*	

* 親マウスが子マウスを殺してしまうこと。

Fayerらは、*Cryptosporidium* オーストの感染性は10℃の海水中では3ヶ月以上²⁾、10℃の水中では5ヶ月以上³⁾、保持されることを報告している。このことから、特に冬季の河川水中や海水中では、長期間 *Cryptosporidium* オーストの感染性は保持されることになる。流入下水中の *Cryptosporidium* オーストの濃度も冬季に高くなる傾向が見られる⁴⁾ ことから、冬季の *Cryptosporidium* オースト感染リスクは高いものと考えられる。

4. まとめ

本年度は、Real Time PCR 法による *Cryptosporidium* オーストの定量検出の確立と河川水、海水、水道水中での *Cryptosporidium* オーストの感染性の消長を解明するため、Real Time PCR 実験および感染試験を行い、以下の結果を得た。

- 1) *Cryptosporidium* の Real Time PCR 法では、18SrDNA を標的とすることにより *Cryptosporidium* オースト数約1個から定量検出可能となる。
- 2) 河川水、下水中の *Cryptosporidium* オーストの Real Time PCR 検出も可能であり、その検出感度は、顕微鏡観察法と同程度である。
- 3) *Cryptosporidium* オーストは、20℃の水道水、海水、河川水中に1ヶ月間保存した後でも感染能力を有している。
- 4) *Cryptosporidium* オーストの感染性は、海水、水道水、河川水の順に影響する。

今後は、*Cryptosporidium* の Real Time PCR 検出法および環境中での感染性についてデータの蓄積と精度向上を図るとともに、病原ウイルスの迅速・簡便検出の開発に全力を尽くす予定である。

なお、本調査研究は、運営費交付金（一般勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) D. W. Johnson, N. J. Pieniazek, D. W. Griffin, L. Misener, J. B. Rose: Development of a PCR Protocol for Sensitive Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Water Sample, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.61, No.11, pp.3849-3855, 1995
- 2) R. Fayer, T. K. Graczyk, E. J. Lewis, J. M. Tront, C. A. Farley: Survival of Infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Seawater and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.64, No.3, pp.1070-1074, 1998
- 3) R. Fayer, J. M. Tront, M. C. Jenkins: Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Stored in Water at Environmental Temperature, *Journal of Parasitology*, Vol.84, No.6, pp.1165-1169, 1998
- 4) 中島英一郎, 山下洋正, 斎野秀幸:平成13年度下水道関係調査研究年次報告書集-病原微生物の発生源および対策に関する調査,国土技術総合政策研究所資料,2003

4. 下水汚泥有効利用に伴うリスク評価に関する研究

国土交通省

(委託先) 独立行政法人 土木研究所

材料地盤研究グループ リサイクル

鈴木 稔

北村 友一

峰松 亮

研究期間 平成 13 年度～15 年度

平成 14 年度当初予算額 16,711 千円

Study on Risk Assessment for Reuse of Sewage Sludge

(FY2001～2003)

Yutaka SUZUKI, Tomokazu KITAMUARA, Akira MINEMATSU

Recycling Research Team, Material and Geotechnical Engineering Research Group
Independent Administrative Institution Public Works Research Institute

It is necessary to promote the reuse of the sewage sludge in order to form the recycling-based society. At present, the sewage sludge is recycled as construction material and fertilizer. In addition, the sludge safety is important in order to promote the reuse.

PRTR (Pollutant Release and Transfer Register) law was enforced in 2001. The sewerage manager must measure and reported the behavior of the heavy metal in the sewage treatment process. The goal of this study is to clarify the behavior of the heavy metal in the sewage treatment process and the elution amount of heavy metal from the sludge reuse product.

Material balance of the heavy metal (Zn, Sb, Cd, Ag, Cr, V, Co, Se, Cu, Ni, Pb, Ba, As, Be, Sn, B, Mn, Mo, In, Tl, Te), which are included in PRTR law, in the sewage treatment process was clarified in fiscal 2002.

Influent load fluctuation of Ba, B, Zn, Ni, Cu was large, but that of other elements was small. The behavior of inflow load fluctuation of Ba, B, Zn, Ni, Cu resembled each other. The removal ratio of heavy metal fluctuated, but with the same behavior for V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Sb, Ba, and Pb.

The remaining ratios in the ash of B, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba and Pb were 1.2%, 65.3%, 49.2%, 23.1%, 26.3%, 16.6%, 65.8%, 48.4%, 36.0%, 12.2%, 17.8%, 80.7%, 61.4%, 68.9%, 69.0%, 72.4% and 63.6%, respectively.

The sidestream loads of each heavy metals except for Se were in the range of 9～28 % of the influent sewage, but that of Se reached almost the same amount of influent load.

1 はじめに

下水汚泥は平成 12 年度において 198 万トン (DS) 発生しており、緑農地還元や建設資材利用による有効利用の推進が求められている。一方、PRTR (Pollutant Release and Transfer Register、環境汚染物質排出移動登録) 制度は、人の健康や生態系に有害な影響を及ぼす可能性のある化学物質について、事業者等から環境中 (大気、水域、土壌) への排出量及び廃棄物に含まれる事業所外への移動量を、事業者が自ら把握し行政機関に対して届け出ると共に、行政機関は届出データや推計に基づき、排出量・移動量を推計し、公表する制度である。我が国においては 1999 (平成 11) 年、「特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律」(PRTR 法) により制度化され、平成 13 年 4 月より施行されている¹⁾。

下水道事業者も本制度の対象となっている。届出対象物質は下水道法の規定に基づく水質検査の対象となる第一種指定化学物質の排出量であり²⁾、重金属に限定すると Zn, Cd, Cr, Cr(VI), Hg, Se, Cu, Pb, As, B, Mn の 11 物質 (ほう素は重金属ではないが本研究の対象に含む) である。しかしながら平成 9~13 年度に実施されたパイロット事業において届出対象外の重金属である Sb, Ag, Co, Ni, Ba, Mo が他の事業者から下水道へ移動していることが報告されている^{3) 4) 5) 6) 7)}。下水道事業者の説明責任の観点から、これらの重金属の下水処理プロセスおよび下水汚泥有効利用における挙動を明らかにする必要がある。本研究は、PRTR 法で指定されている重金属の流入実態と処理過程での挙動を解明し、汚泥製品への移行量推定手法を検討すると共に、汚泥製品の環境に対する重金属の負荷量を把握することを目的としている。

2 平成 13 年度の研究成果⁸⁾

2-1 PRTR 対象重金属の分析条件および前処理方法の検討

分析対象は、PRTR 法における第 1 種および第 2 種指定化学物質のうち、重金属を主体とした無機化学物質として表 2-1-1 に示すもの (以下、PRTR 対象重金属と呼ぶ) とした。

また分析装置は、多元素同時分析および微量の定量が可能である⁹⁾高周波誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いるものとし、土木研究所所有の ICP-MS (横河電機製: PMS2000) を使用した。ただし水銀 (Hg) のみ、他元素との同時分析

が困難なため、別途水銀分析計 (PERKIN ELMER 製: FIMS400、還元気化原子吸光法) を用いて分析した。

下水試料として流入下水、放流水、脱水汚泥、焼却灰及び溶融スラグを想定し、ICP-MS の分析条件を表 2-1-2 に示す通り、また試料の前処理方法を表 2-1-3 に示す通り決定した。

表 2-1-1 PRTR 対象重金属

名 称	元 素 記 号	名 称	元 素 記 号
亜鉛	Zn	ニッケル	Ni
アンチモン	Sb	バリウム	Ba
カドミウム	Cd	砒素	As
銀	Ag	ベリリウム	Be
クロム	Cr	ほう素	B
バナジウム	V	マンガン	Mn
コバルト	Co	モリブデン	Mo
水銀	Hg	インジウム	In
セレン	Se	タリウム	Tl
銅	Cu	テルル	Te
鉛	Pb		

表 2-2-2 ICP-MS による PRTR 対象重金属の分析条件

主要な機器調整項目	
高周波出力	1,200 W
ガス流量	プラズマガス: 14±0.5 l/min
	補助ガス: 0.8±0.2 l/min
	キャリアガス: 0.84 l/min
積分時間	1.000 sec
測定条件	
検量線濃度範囲	0~500 µg/l
測定範囲	1~1,000 µg/l
内部標準物質	Sc, Rh, Bi

2-2 下水処理施設における PRTR 対象重金属実態調査

下水処理場における PRTR 対象重金属の分布の実態を把握するため、前項で最適化された分析条件の下で、全国各地の 22 下水処理場から取り寄せた試料 (流入下水、放流水、脱水汚泥、焼却灰、溶融スラグ、コンポストの 5 種類) の分析を行った。

表 2 - 1 - 3 試料の前処理方法

試料の性状	ICP-MS分析の前処理方法		水銀分析の前処理方法	
	固体試料	液体試料	固体試料	液体試料
試料量	約0.2g(乾燥重量)を定量	200mlを定量	約0.2g(乾燥重量)を定量	200mlを定量
分解用試薬の量	HNO ₃ 5ml HF 1ml ミQ 9ml	HNO ₃ 5ml - -	HNO ₃ 1ml HCl 3ml イソ水 5ml	HNO ₃ 5ml H ₂ SO ₄ 10ml KMnO ₄ (50g/l) 20ml
分解方法	マイクロウェーブ分解後水冷し、ヒータプレートに少量のミQで分解液を全て洗い流し、ホットプレートで乾固(180℃)	ホットプレートで残量が1mlになるまで加熱濃縮(180℃)	マイクロウェーブ分解	ペルオキ二硫酸カリウム溶液(50g/l)10mlを加え、約95℃の水浴中に浸漬して2時間加熱後、室温まで冷却した後、塩化トリチルアンモニウム溶液(200g/l)10mlを加えて、過剰な過マンガン酸カリウムと生成した酸化マンガン(IV)を還元
定容方法	放冷後、乾固した試料を1%HNO ₃ で溶解させ、100mlメスフラスコ(PP)に入れ、1%HNO ₃ を加え全量を100mlに定容	放冷後、試料をミQで溶解し、ポット(PP)を使用し、5Bろ紙でろ過したろ液を50mlメスフラスコ(PP)に入れ、内標準物質とミQを加え全量を50mlに定容	分解後水冷し、分解液を50ml比色管に入れ、イソ水を加え全量を50mlに定容	分解液を250mlメスフラスコに入れ、イソ水を加え全量を250mlに定容
ろ過方法	定容した分解液を5Bろ紙でろ過	-	定容した分解液をGF/Bろ紙でろ過	-
検液の保存	100mlポリビン		50mlガラスビン	

3 下水処理施設における PRTR 対象重金属の挙動詳細調査

3-1 目的

今年度調査は一箇所の下水処理場を選び、数ヶ月に渡って継続的に調査を行うことにより、PRTR対象重金属の負荷変動状況や、水処理プロセスにおける除去率および汚泥への移行率を詳細に検討することを目的とした。

3-2 調査方法

調査場所は某流域下水道終末処理施設とし、'02年10月から'03年2月の5ヶ月間、継続的にサンプリングを実施した。採取した試料は、液体試料として流入下水、初沈流出水、放流水、返流水(2系統)、および焼却設備洗煙排水(2系統)の計7試料、固体試料として脱水汚泥、および焼却灰(2系統)の計3試料である。本処理場の処理フローおよび試料採取箇所を、図3-2に示す。なおサンプリングは日祝日の直後を避けた平日に月1回実施し、液体試料は1日間のコンジット試料、固体試料は1試料につき3検体を採取した。

液体試料は、遠心分離(3,000rpm)によりSS分と上澄水とに分離し、個別分析に供した。固体試料

は乾燥後、昨年度決定した前処理方法に従って分析を行った。なお今回の調査では、分析対象重金属として錫(Sn)を追加している。

また、処理場内で使用する薬品類から混入するPRTR対象重金属量を把握するため、重油、高分子凝集剤、次亜塩素酸ソーダ、過酸化水素水、硫酸、苛性ソーダ、消臭剤(1液、2液)をそれぞれ採取し、処理場内での使用量を考慮し適宜希釈した後分析に供した。

3-3 調査結果

3-3-1 PRTR 対象重金属の含有量

流入下水と初沈流出水の分析結果を表3-3-1に、返流水の分析結果を表3-3-2に、焼却排水の分析結果を表3-3-3に、放流水の分析結果を表3-3-4にそれぞれ示す。表中の(D)は遠心分離後の上澄水、(SS)は遠心分離後の沈殿の分析結果を表し、(T)は両者を加算したものである。また、脱水汚泥、焼却灰の分析結果を表3-3-4に、薬品類の分析結果を表3-3-5にそれぞれ示す。なおここでは、10月度の分析結果のみを記載した。

3-3-2 昨年度調査値との比較

流入下水および脱水汚泥における元素毎の含有量（10月度～2月度の平均値）と、昨年度調査によって得られた値を比較したものを図3-3-1、3-3-2に示す。

流入下水については、Niが昨年度調査の平均値を上回っているのを除けば低めの値となっており、昨年度調査値の範囲を逸脱しているものは見られなかった。また、脱水汚泥の分析結果も同様であった。

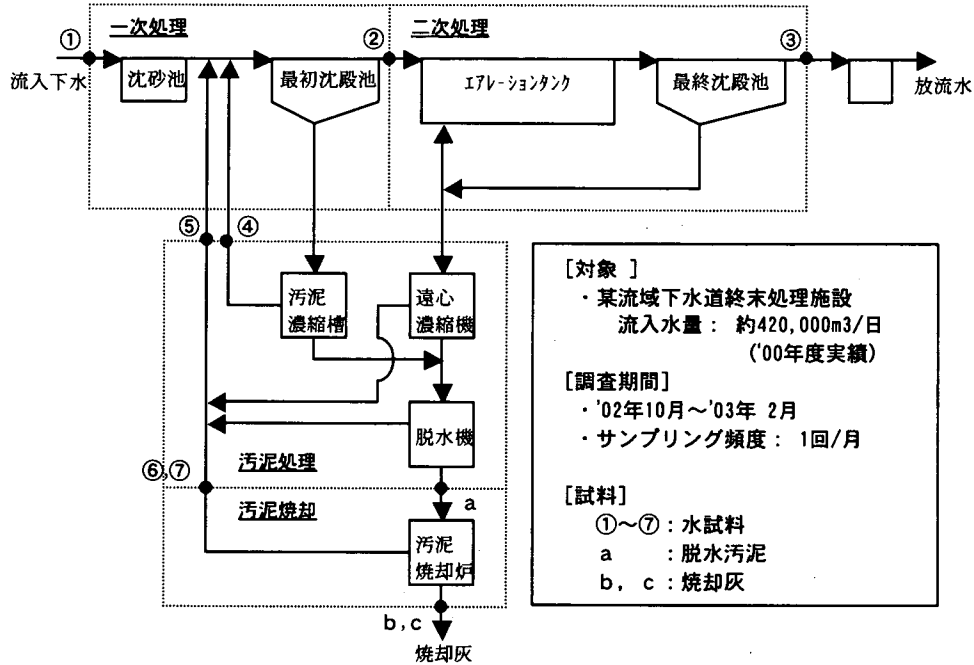


図3-2 試料採取箇所

表3-3-1 試料の分析結果（10月度・1/4）

イオン名	流入下水 (D) ($\mu\text{g/l}$)	流入下水 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	流入下水 (T) ($\mu\text{g/l}$)	初沈流出水 (D) ($\mu\text{g/l}$)	初沈流出水 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	初沈流出水 (T) ($\mu\text{g/l}$)
Be	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
B	74.883	0.764	75.647	75.472	0.510	75.982
V	1.383	0.391	1.774	0.926	0.066	0.992
Cr	2.557	4.580	7.137	1.378	0.427	1.805
Mn	39.294	1.764	41.058	35.252	0.567	35.818
Co	0.839	0.093	0.932	0.755	<0.050	0.755
Ni	60.202	2.484	62.686	49.133	0.701	49.834
Cu	49.744	3.078	52.821	29.418	5.903	35.321
Zn	80.045	2.015	82.060	49.882	2.185	52.067
As	0.860	0.088	0.948	0.826	<0.050	0.826
Se	0.233	0.101	0.333	0.404	0.181	0.585
Mo	2.945	1.434	4.379	3.402	0.716	4.117
Ag	0.611	3.362	3.973	0.357	1.586	1.943
Cd	0.128	<0.050	0.128	0.066	<0.050	0.066
In	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Sn	0.232	0.419	0.651	0.069	<0.050	0.069
Sb	0.076	0.180	0.255	<0.050	0.118	0.118
Te	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Ba	75.205	91.004	166.209	77.169	9.967	87.136
Tl	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Pb	3.125	0.294	3.419	1.712	0.147	1.859
Hg	<0.5	-	<0.5	<0.5	-	<0.5

表 3-3-2 試料の分析結果 (10 月度・2/4)

イオン名	返流水 1 (D) ($\mu\text{g/l}$)	返流水 1 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	返流水 1 (T) ($\mu\text{g/l}$)	返流水 2 (D) ($\mu\text{g/l}$)	返流水 2 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	返流水 2 (T) ($\mu\text{g/l}$)
Be	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
B	83.015	0.643	83.658	88.944	0.982	89.926
V	1.584	0.316	1.900	3.658	0.537	4.195
Cr	4.907	2.906	7.812	7.383	8.873	16.255
Mn	75.693	1.993	77.686	76.655	2.143	78.797
Co	1.171	0.150	1.321	1.491	0.159	1.650
Ni	72.078	4.323	76.401	74.376	8.249	82.625
Cu	19.423	68.491	87.914	180.546	7.022	187.568
Zn	98.765	21.585	120.350	194.512	12.515	207.027
As	0.831	0.343	1.173	2.328	0.194	2.522
Se	0.699	0.541	1.240	5.608	2.369	7.976
Mo	1.372	2.766	4.138	4.189	1.483	5.671
Ag	0.467	5.507	5.974	0.714	11.279	11.993
Cd	0.185	0.084	0.269	0.515	<0.050	0.515
In	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Sn	0.162	0.364	0.525	0.783	0.283	1.065
Sb	<0.050	0.481	0.481	0.168	0.640	0.808
Te	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Ba	113.106	44.602	157.708	19.689	83.490	103.179
Tl	<0.050	<0.050	<0.050	0.119	<0.050	0.119
Pb	4.173	0.843	5.015	3.911	1.937	5.847
Hg	<0.5	-	<0.5	<0.5	-	<0.5

返流水は 2 系統存在する。

表 3-3-3 試料の分析結果 (10 月度・3/4)

イオン名	2 系焼却排水 (D) ($\mu\text{g/l}$)	2 系焼却排水 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	2 系焼却排水 (T) ($\mu\text{g/l}$)	3 系焼却排水 (D) ($\mu\text{g/l}$)	3 系焼却排水 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	3 系焼却排水 (T) ($\mu\text{g/l}$)
Be	0.103	<0.050	0.103	<0.050	<0.050	<0.050
B	97.549	1.949	99.497	125.601	0.382	125.983
V	10.973	1.115	12.087	1.462	<0.050	1.462
Cr	15.647	6.893	22.539	1.914	0.395	2.309
Mn	143.082	3.165	146.247	37.312	0.209	37.521
Co	2.719	0.242	2.961	0.882	<0.050	0.882
Ni	125.448	23.312	148.760	49.346	0.657	50.003
Cu	451.125	39.333	490.458	35.475	1.370	36.844
Zn	547.938	20.017	567.955	64.355	1.190	65.545
As	4.264	0.186	4.450	0.981	<0.050	0.981
Se	11.064	0.469	11.533	20.276	0.164	20.440
Mo	9.832	0.686	10.518	4.085	0.052	4.137
Ag	0.339	30.869	31.208	0.589	0.418	1.007
Cd	1.471	<0.050	1.471	0.156	<0.050	0.156
In	0.259	<0.050	0.259	<0.050	<0.050	<0.050
Sn	3.318	1.462	4.780	0.688	<0.050	0.688
Sb	0.219	1.604	1.823	0.093	<0.050	0.093
Te	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050
Ba	14.962	476.339	491.301	15.424	1.840	17.263
Tl	0.318	<0.050	0.318	<0.050	<0.050	<0.050
Pb	5.507	9.595	15.102	1.414	0.089	1.503
Hg	<0.5	-	<0.5	<0.5	-	0.948

焼却施設は 2 系統存在する。

表 3 - 3 - 4 試料の分析結果 (10 月度・4/4)

イオン名	放流水 (D) ($\mu\text{g/l}$)	放流水 (SS) ($\mu\text{g/l}$)	放流水 (T) ($\mu\text{g/l}$)	脱水汚泥 ($\text{mg/kg} \cdot \text{DS}$)	2 系焼却灰 ($\text{mg/kg} \cdot \text{DS}$)	3 系焼却灰 ($\text{mg/kg} \cdot \text{DS}$)
Be	<0.050	<0.050	<0.050	-	0.659	0.650
B	78.282	0.220	78.502	12.052	77.874	65.342
V	0.548	<0.050	0.548	7.523	60.712	70.106
Cr	1.711	<0.050	1.711	22.105	178.234	164.485
Mn	31.666	0.183	31.848	72.484	577.512	601.153
Co	0.714	<0.050	0.714	1.593	13.510	14.244
Ni	41.293	0.234	41.527	84.936	639.616	610.977
Cu	5.459	0.067	5.526	297.500	2032.056	2205.029
Zn	35.714	0.389	36.103	285.527	2162.217	2294.678
As	0.492	<0.050	0.492	2.457	17.741	20.209
Se	0.248	<0.050	0.248	2.440	3.792	3.923
Mo	4.016	<0.050	4.016	3.998	26.696	29.369
Ag	0.172	<0.050	0.172	23.897	209.268	189.274
Cd	0.058	<0.050	0.058	0.907	5.427	6.101
In	<0.050	<0.050	<0.050	-	1.657	1.465
Sn	1.079	<0.050	1.079	9.101	90.960	78.021
Sb	<0.050	<0.050	<0.050	1.656	12.005	13.095
Te	<0.050	<0.050	<0.050	-	-	-
Ba	14.709	0.180	14.889	1206.284	8721.438	7649.886
Tl	<0.050	<0.050	<0.050	-	0.852	1.264
Pb	0.891	<0.050	0.891	25.181	151.463	147.584
Hg	<0.5	-	<0.5	1.253	-	-

表 3 - 3 - 5 薬品類の分析結果

イオン名	重油 ($\mu\text{g/l}$)	高分子凝集剤 ($\times 1000 \mu\text{g/l}$)	次亜塩素酸ソーダ ($\times 1000 \mu\text{g/l}$)	過酸化水素水 ($\times 1000 \mu\text{g/l}$)	硫酸 ($\times 1000 \mu\text{g/l}$)	苛性ソーダ ($\times 1000 \mu\text{g/l}$)
Be	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
B	5470.000	1.060	1.300	0.660	0.640	2.210
V	<500	<0.5	2.580	0.510	<0.5	<0.5
Cr	<500	<0.5	<0.5	<0.5	0.730	0.840
Mn	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Co	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Ni	<500	<0.5	<0.5	<0.5	0.630	<0.5
Cu	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Zn	<500	<0.5	<0.5	<0.5	0.710	<0.5
As	<500	<0.5	0.720	<0.5	<0.5	<0.5
Se	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Mo	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Ag	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Cd	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
In	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Sn	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Sb	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Te	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Ba	1280.000	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1.120
Tl	<500	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Pb	510.000	<0.5	0.790	<0.5	<0.5	0.550
Hg	<50	<0.05	<0.05	<0.05	0.108	<0.05

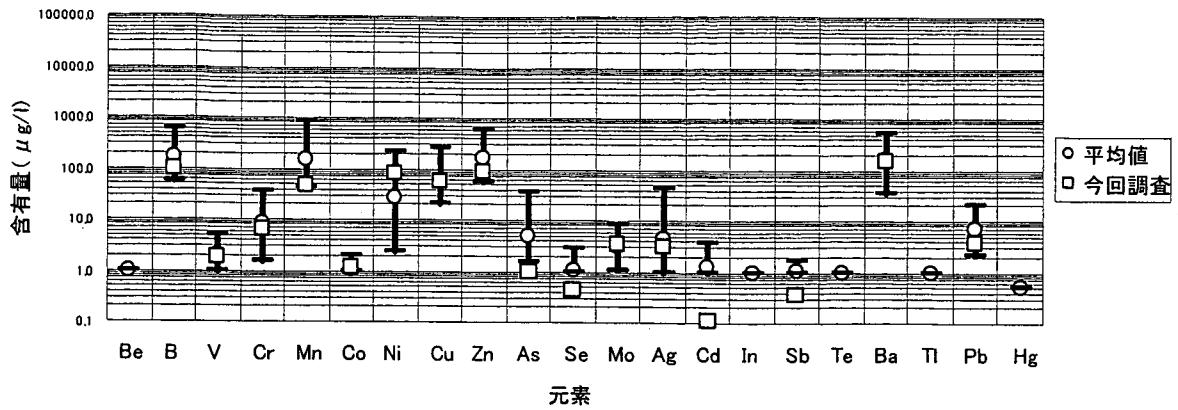


図 3-3-1 流入下水の分析結果

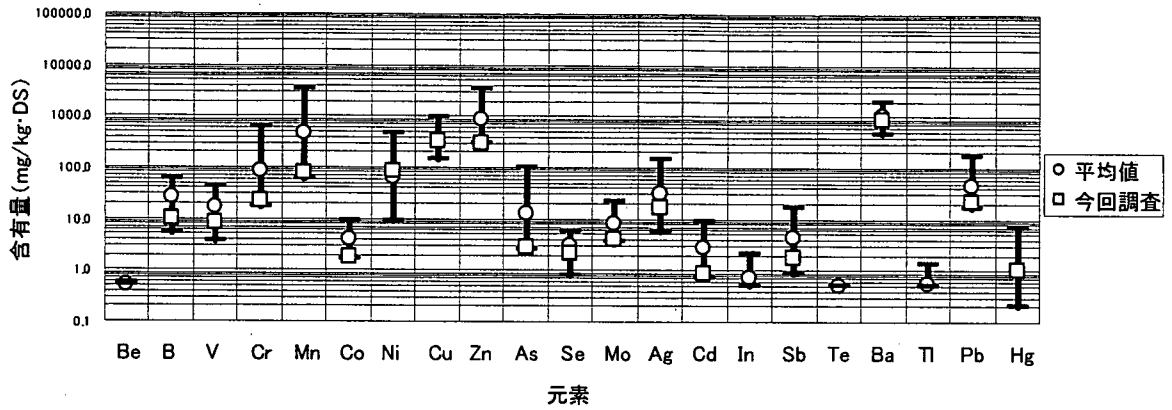


図 3-3-2 脱水汚泥の分析結果

4 考察

4-1 流入下水における負荷変動

流入下水における各元素の月毎の負荷変動を図 4-1 に示す。また、採水時の水質データを表 4-1 に示す。Ba, Zn, Ni の負荷変動状況は酷似しており、何らかの産業活動との関連を示唆している。また、Cu, Mn の組み合わせについても同様のことが言える。Ba, Zn, Ni については 1 月の値が大きく落ち込んでいるが、流入水量および他の水質指標は比較的安定しており、これらの重金属の負荷変動を水質指標より推測することは不可能であると考えられる。

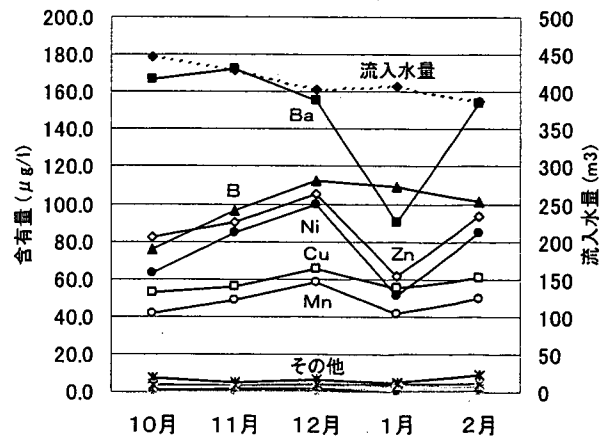


図 4-1 流入下水における負荷変動

表 4-1 採水時の水質データ

	10月	11月	12月	1月	2月
流入水量 (m ³ /d)	446,420	428,020	402,590	406,100	386,590
流入水SS (mg/l)	140	160	165	180	180
初沈流出水SS (mg/l)	30	38	39	33	41
放流水SS (mg/l)	0.9	2.5	3.3	4.0	5.0
SS除去率 (%)	99.4	98.4	98.0	97.8	97.2
流入水COD (mg/l)	90	85	85	84	83
初沈流出水COD (mg/l)	48	42	47	52	50
放流水COD (mg/l)	10	11	12	13	15
COD除去率 (%)	88.9	87.1	85.9	84.5	81.9
流入水pH	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4
初沈流出水pH	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
放流水pH	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
エアタン水温 (°C)	22.9	20.7	19.6	18.3	18.0

4-2 水処理プロセスにおける除去率

ここでの除去率とは各元素の流入下水中の含有量(μg/l)の値から放流水中の含有量(μg/l)の値を引いたものの、流入下水中含有量(μg/l)に対する割合であり、返流水の影響は考慮していない。

昨年度の実態調査結果について、各元素の除去率(%)と、流入下水の含有量のうちSS分画の割合(%)を表したものを図4-2-1に示す。図中のプロットは全国22処理場の平均値であり、除去率およびSS分画の割合とも実際にはかなりのばらつきがあるが、Mnの除去率が低くなっているのを除けば両者はほぼ比例関係あることがわかる。

今年度の調査結果についても同様に整理すると、図4-2-2に示す通りとなった。各元素の除去率は昨年度の結果とほぼ同様であるが、SS分画の

割合が低く、全体的にグラフの左側にシフトした形となっている。この理由は、昨年度はSS分画の分離をろ過(ろ紙(化学分析用)5種B)によって行っているが、今年度はSS分画の分離を遠心分離によって行っており、流入下水中では全SS分画のうち沈降性SS分画の割合が低いとと考えられる。

図4-2-2中のSeの除去率については、図4-2-1の昨年度調査値が100%に対して25.7%と大幅に低い値となっているが、昨年度調査では除去率の算出が可能なデータが1処理場のみでしか得られていないので、今回の値が特異ものとは言いきれない。

なお、Be, In, Te, Tl, Hgについては流入下水の含有量が定量下限値以下であり、除去率の算出が不可能であったため、以降の検討対象から除外した。

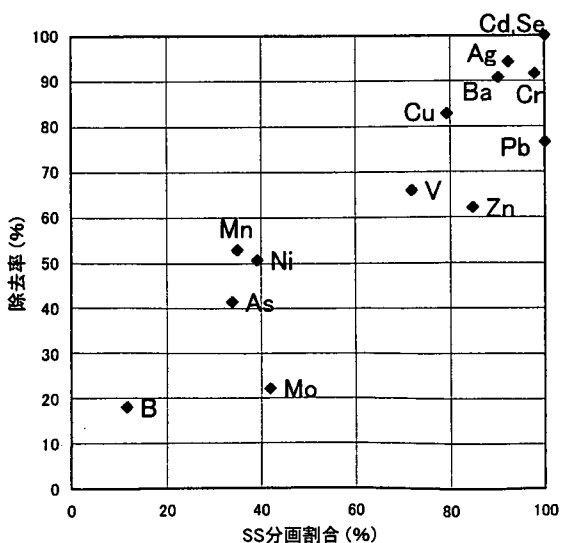


図 4-2-1 SS分画割合と除去率(全国平均値)

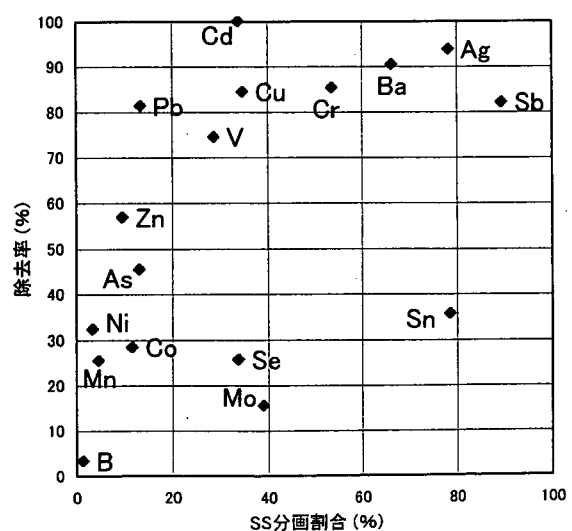


図 4-2-2 SS分画割合と除去率(今回調査)

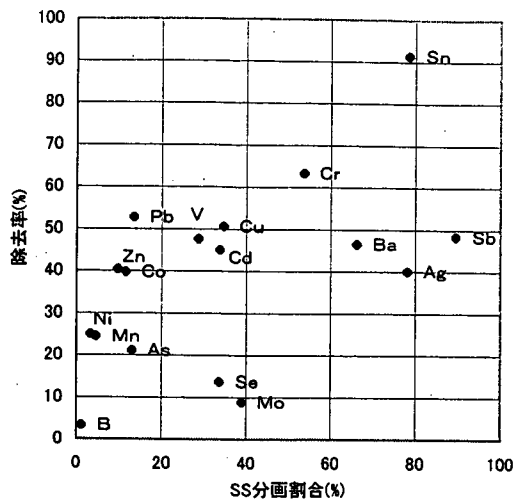


図 4-2-3 SS 分画割合と水処理一次除去率 (今回調査)

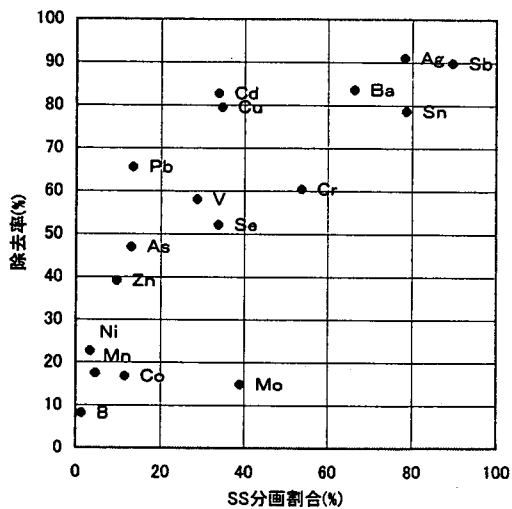


図 4-2-4 SS 分画割合と水処理二次除去率 (今回調査)

今年度の調査結果について、さらに水処理の一次処理と二次処理に分けて除去率を整理すると図 4-2-3、4 に示す通りとなる。Mo の SS 分画分における除去率が比較的低いことがわかる。また、Se の 1 次処理における除去率が低いのは、返流水にて 1 次処理に流入する割合が高いためと考えられる。Sn は 1 次処理において SS 分画分の除去率が高いことがわかる。

4-3 水処理プロセスにおける除去率の変動

水処理の一次処理、二次処理プロセスにおける各元素の除去率を月毎に表したものを図 4-3-1 ~ 図 4-3-17 に示す。B, Se, Cd, Sn, Sb を除けば、各元素の除去率の変動は似通った挙動を示していることがわかる。従って、これらの元素の挙動は共通の機構で説明できる可能性がある。

前項の図 4-2-1 から、各元素の除去率と SS 除去率には相関関係があることが期待された。しかしながら、Zn と Ba の例を図 4-3-18 および図 4-3-19 に示す通り、今回の調査では除去率のばらつきと比較して SS 除去率のばらつきが小さく、SS 除去率との直接的な関係は把握できなかった。

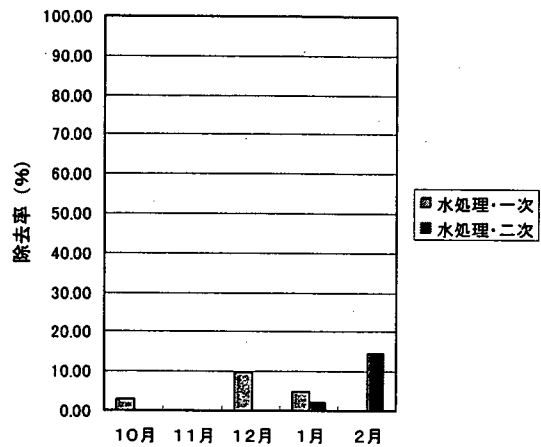


図 4-3-1 B 除去率の変動

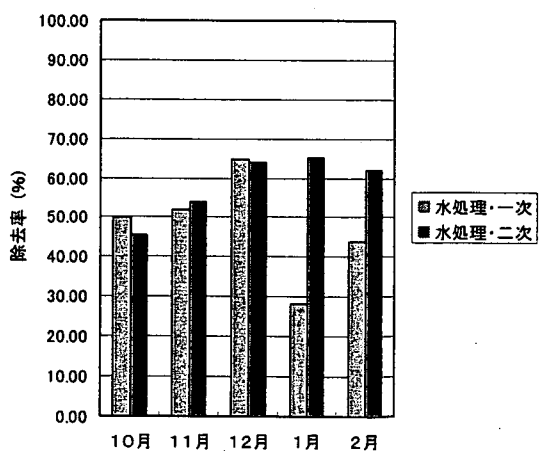


図 4-3-2 V 除去率の変動

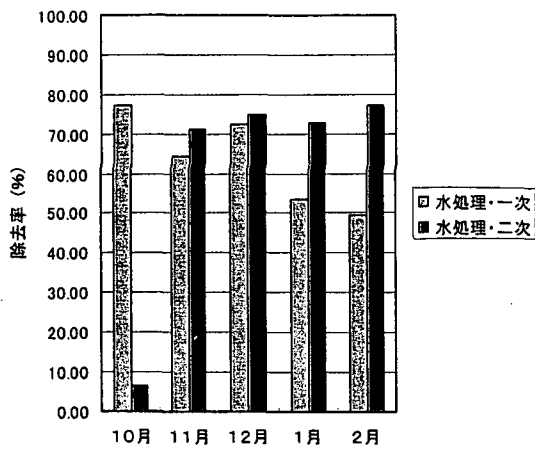


図 4-3-3 Cr 除去率の変動

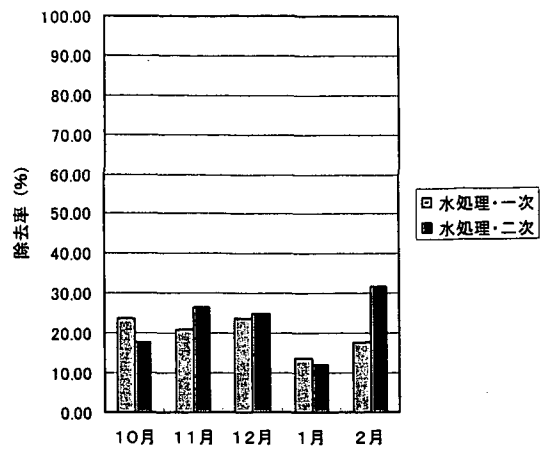


図 4-3-6 Ni 除去率の変動

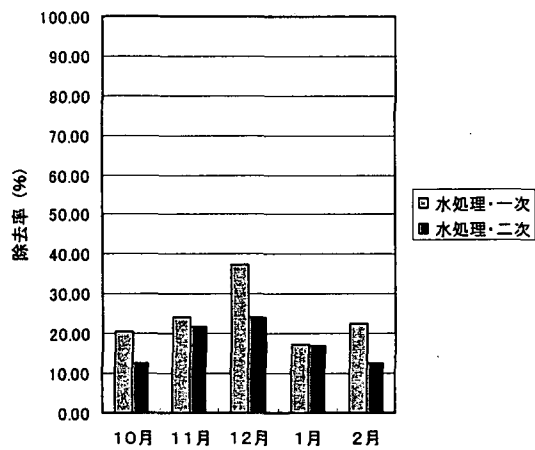


図 4-3-4 Mn 除去率の変動

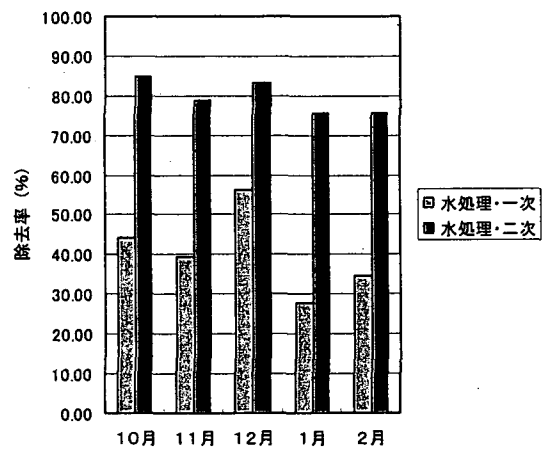


図 4-3-7 Cu 除去率の変動

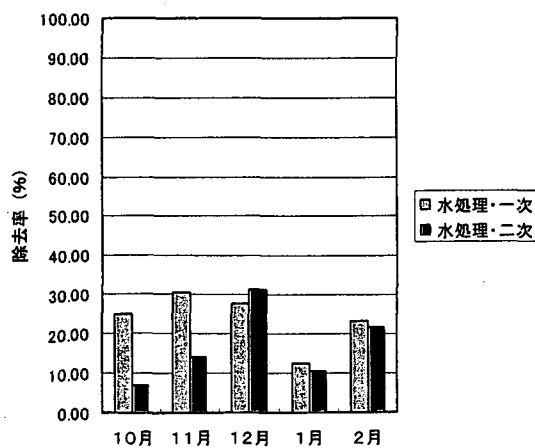


図 4-3-5 Co 除去率の変動

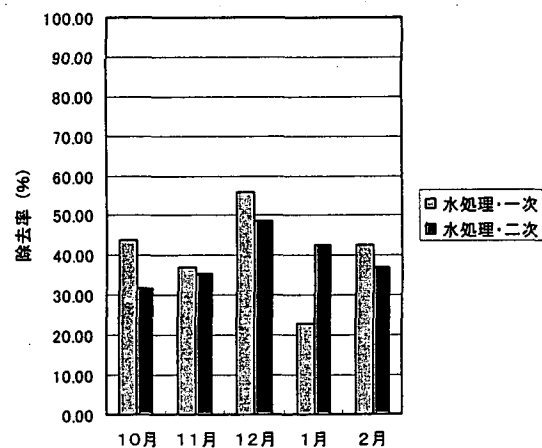


図 4-3-8 Zn 除去率の変動

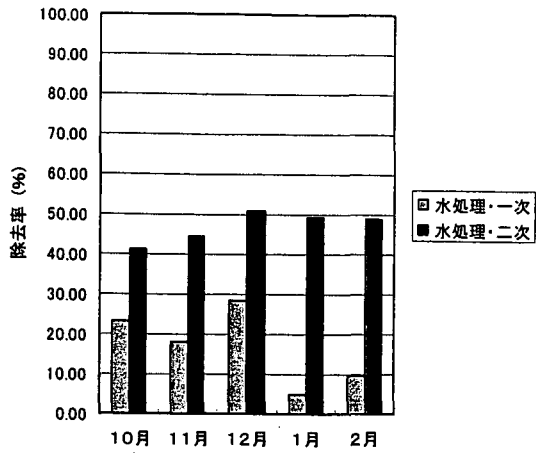


図 4-3-9 As 除去率の変動

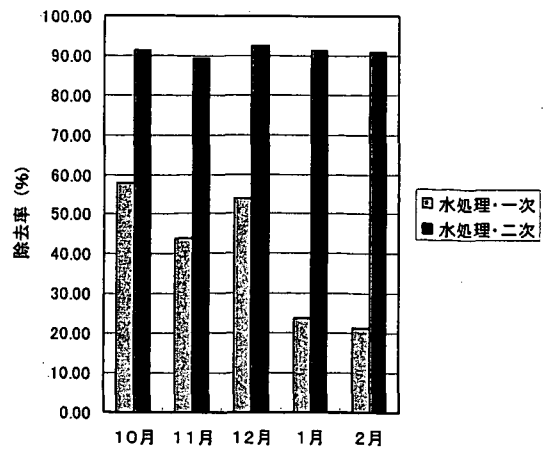


図 4-3-12 Ag 除去率の変動

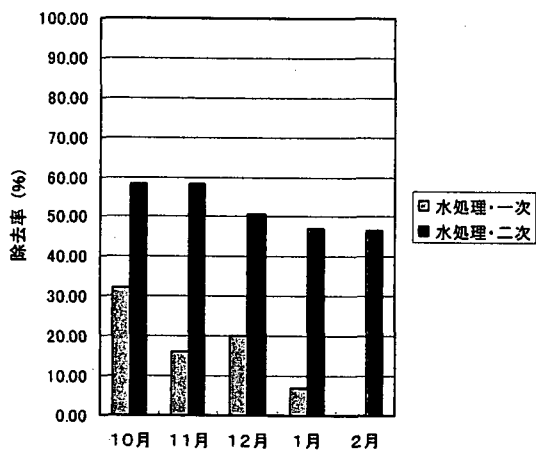


図 4-3-10 Se 除去率の変動

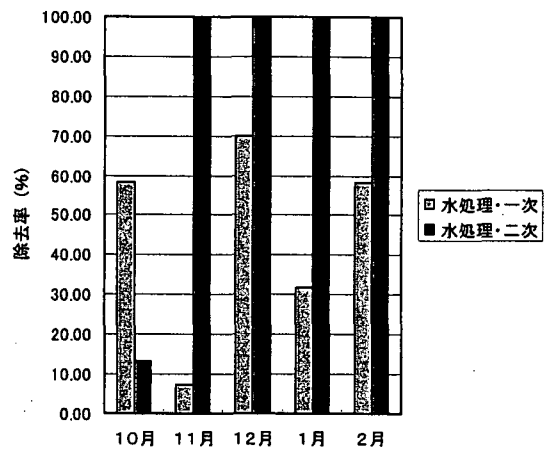


図 4-3-13 Cd 除去率の変動

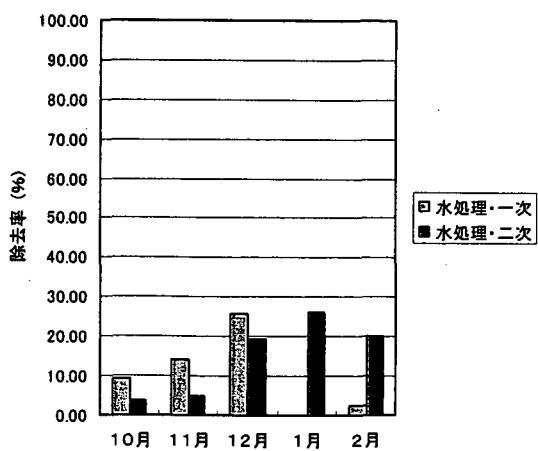


図 4-3-11 Mo 除去率の変動

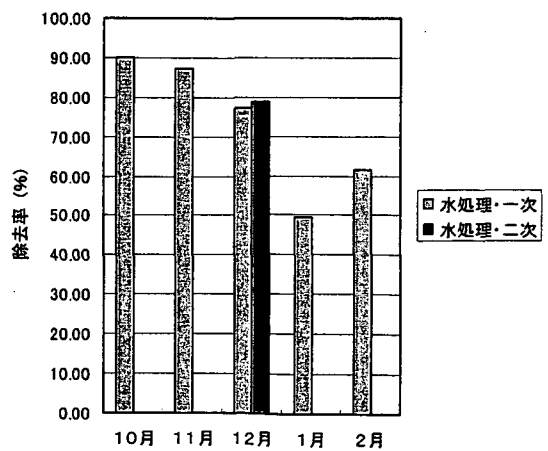


図 4-3-14 Sn 除去率の変動

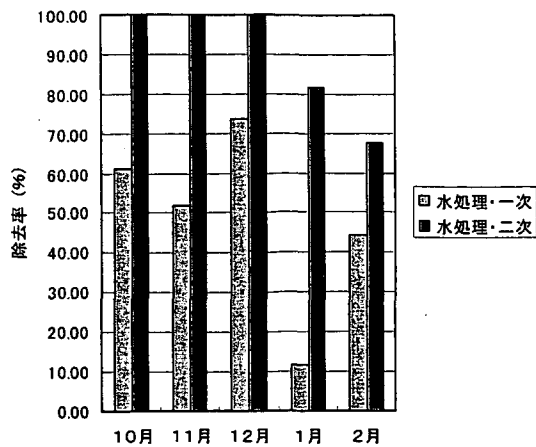


図 4-3-15 Sb 除去率の変動

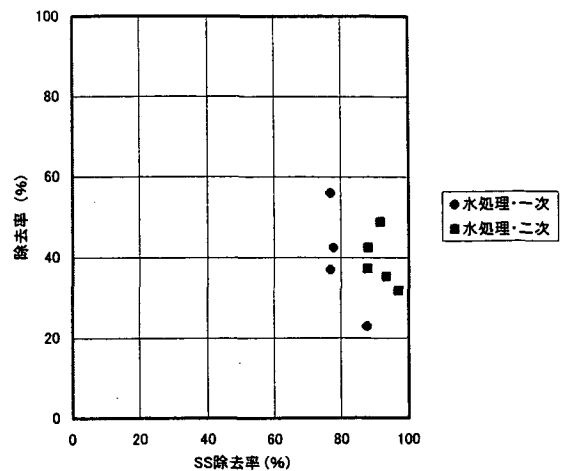


図 4-3-18 Zn 除去率と SS 除去率の関係

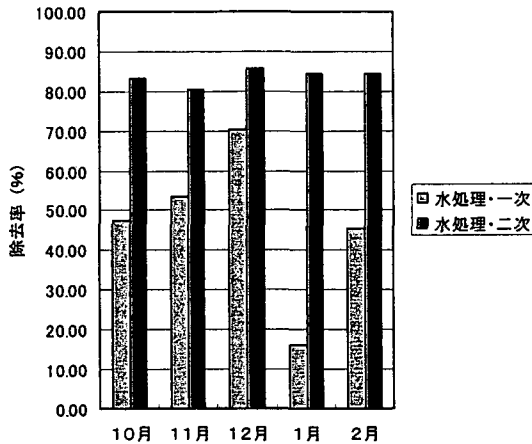


図 4-3-16 Ba 除去率の変動

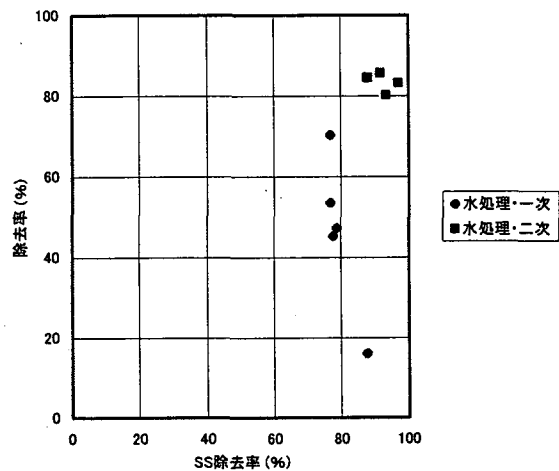


図 4-3-19 Ba 除去率と SS 除去率の関係

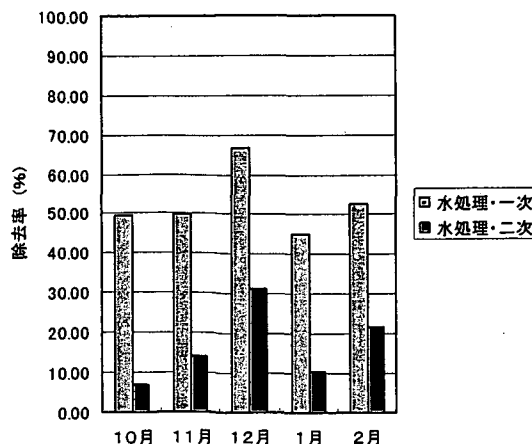


図 4-3-17 Pb 除去率の変動

4-4 下水処理場全体での挙動

下水処理場全体における PRTR 対象重金属の挙動を明らかにするため、各処理プロセスにおける PRTR 対象重金属の収支を計算した。

水処理の一次処理プロセスにおいては、沈砂、しさを除外して検討した。流入は流入下水と返流水（2系統）によるものであり、各重金属の含有量分析値に維持管理日報から得た流量を乗じて流入量を算出した。流出は初沈流出水と初沈汚泥によるものであり、初沈流出水による流出分については実測データより算出しているが、初沈汚泥による流出分については含有量を実測していない

ため、流入分の総量より初沈流出水による流出分を差し引いて算出した。

二次処理プロセスについては、流入は前段の一次処理プロセスからの初沈流出水によるもののみであり、流出は放流水と余剰汚泥によるものである。初沈流出水による流入分と放流水による流出分は実測データに基づくものであるが、余剰汚泥による流出分については両者の差による計算値である。

汚泥処理プロセスについては、流入は初沈汚泥、余剰汚泥、高分子凝集剤等の薬品類および各所への給水（放流水を再利用）によるものであり、流出は脱水汚泥および排水によるものである。流入分のうち、初沈汚泥および余剰汚泥によるものについては前段で算出した計算値を用いているが、他は実測データに基づくものである。流出分のうち脱水汚泥によるものについては実測データに基づくものであるが、排水によるものについては、汚泥処理プロセス単独の排水が、設備上採水不可能であったため、流入分の総和から脱水汚泥による流出分を差し引いて算出した。

汚泥焼却プロセスについては、流入は脱水汚泥、重油、苛性ソーダおよび給水（放流水を再利用）によるものであり、流出は焼却灰、排ガス、排水によるものである。給水・排水は排ガス洗浄に関わるもののみとし、他は除外している。ここでは排ガスによる流出分のみ計算値である。

上記の要領で算出した各元素の流入量、流出量を、水処理の一次処理プロセスにおける流入量を100%として換算し、図示したものを図4-4-1～図4-4-17に示す。図中の数値は10月度～2月度の平均値である。なお汚泥焼却プロセスについては、実際には前段での脱水汚泥発生量と焼却量が異なるが、ここでは両者が同じであると仮定している。

各元素とも返流水廻りの収支が合わないが、この要因としては、前述の通り汚泥焼却プロセスで仮定した処理量と実際の処理量が合わないこと、水処理・汚泥処理系内での汚泥滞留量の増減が影響していること、分析試料の前処理における試料毎の回収率の相違および分析値の誤差などが考えられる。

V, Cu, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Pb における焼却灰への移行割合は 65.3%, 65.8%, 80.7%, 61.4%, 68.9%, 69.0%, 72.4%, 63.6%と比較的高いことがわかる。また、汚泥処理において排水への流出が懸念されたが、Cr, Ni, As の流出が 27.6%, 18.4 %,11.6%と

若干高いことを除けば、汚泥処理プロセスからの返流水による負荷はほとんどないものと考えられる。

汚泥焼却プロセスにおいて、ほとんどの物質は焼却灰に残存するものの、Se は排水への戻り量が非常に多く処理場内を循環している割合が高いことが考えられる。Se を除いた対象物質においては、返流水全体の水処理プロセスへの負荷割合は、9～28%の範囲であることがわかる。

また、処理場内で使用する薬品や重油などから混入する重金属類は微量であり収支に影響を与えないレベルであることがわかる。

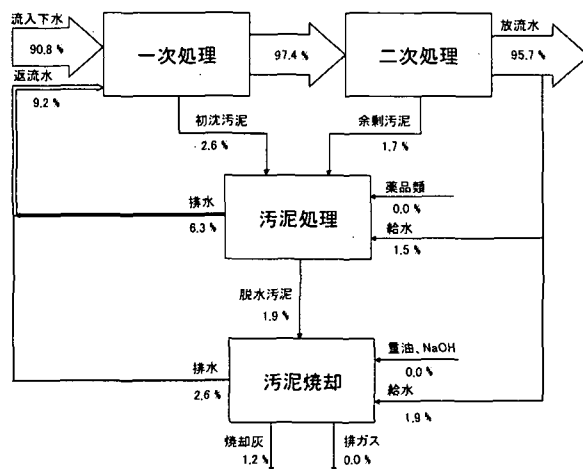


図4-4-1 Bの収支図

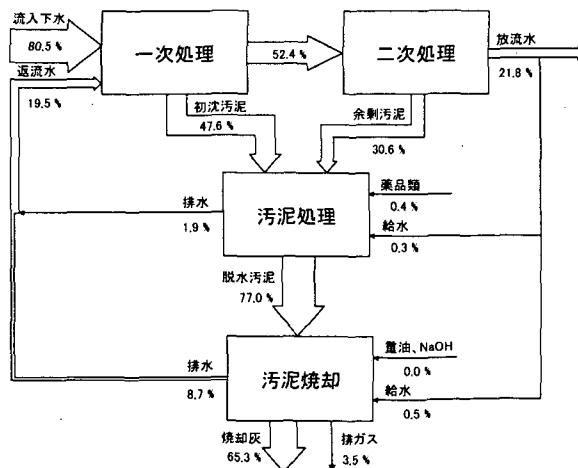


図4-4-2 Vの収支図

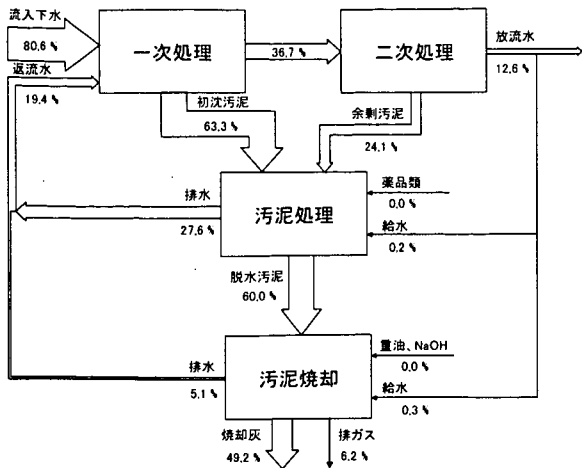


図 4-4-3 Cr の収支図

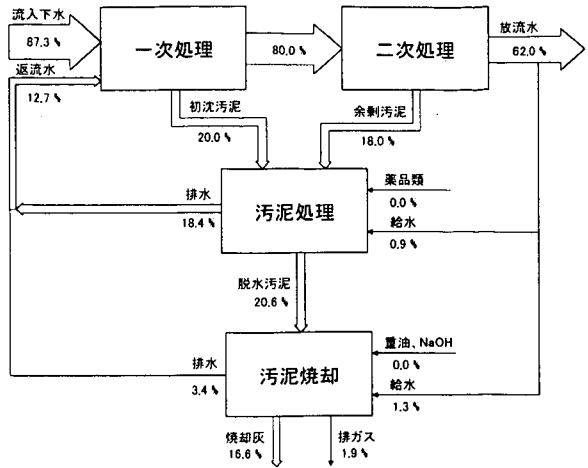


図 4-4-6 Ni の収支図

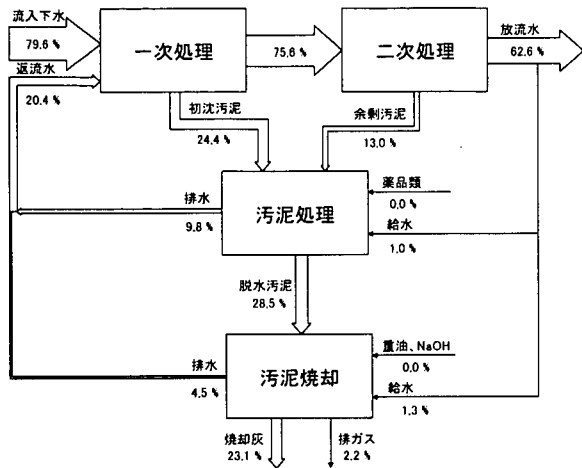


図 4-4-4 Mn の収支図

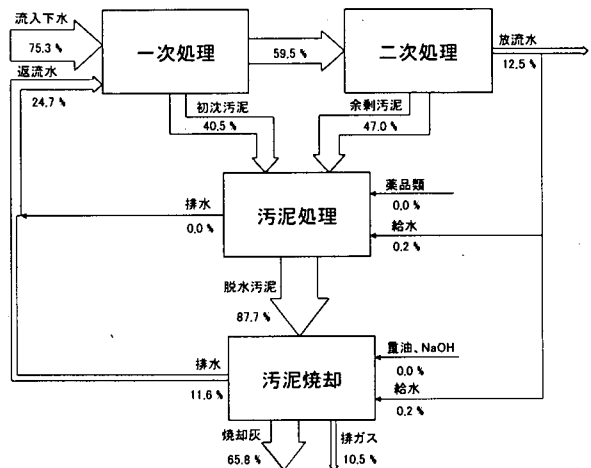


図 4-4-7 Cu の収支図

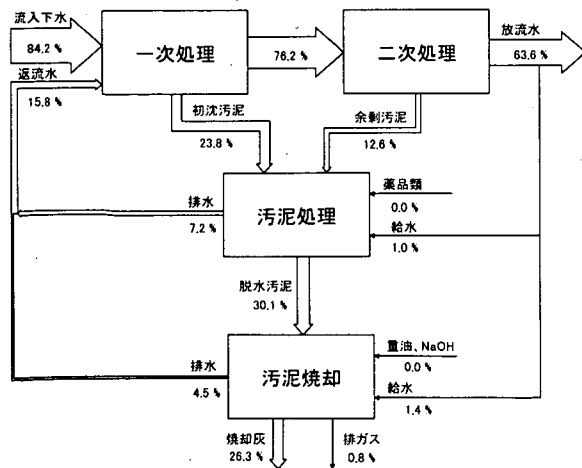


図 4-4-5 Co の収支図

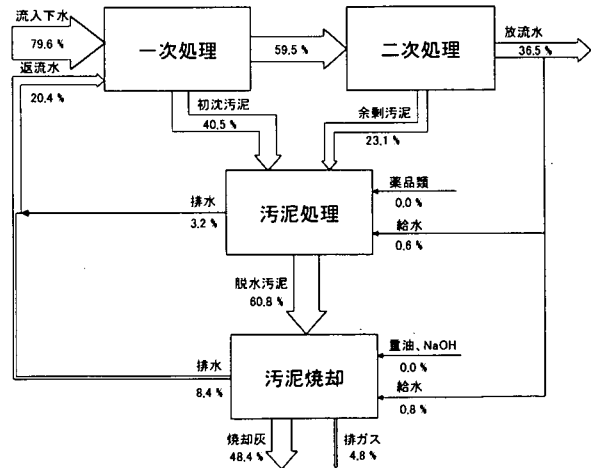


図 4-4-8 Zn の収支図

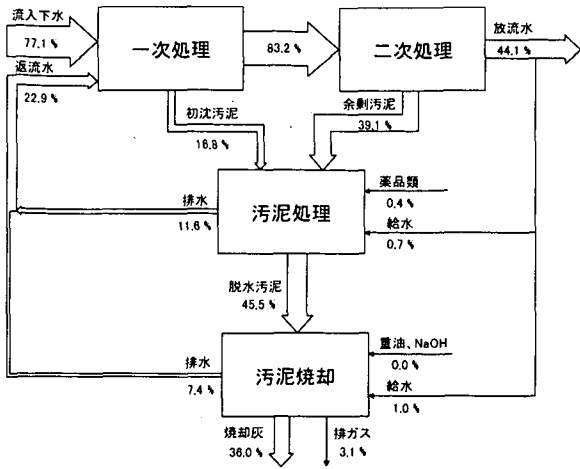


図 4-4-9 As の収支図

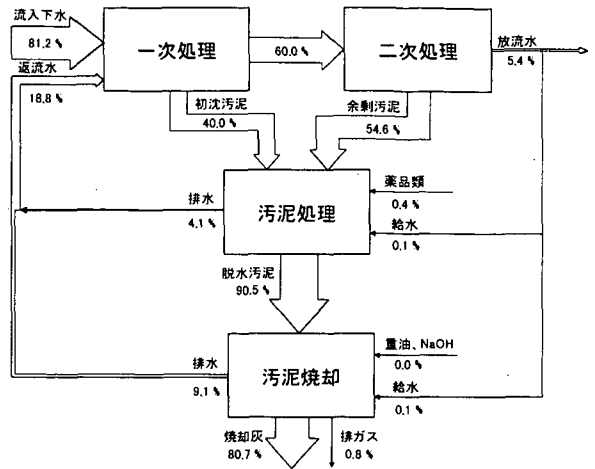


図 4-4-12 Ag の収支図

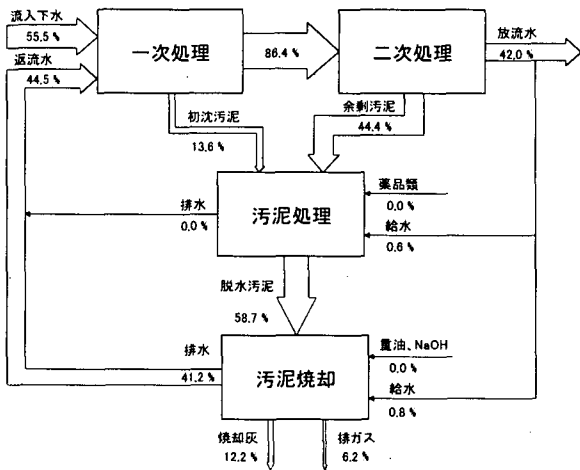


図 4-4-10 Se の収支図

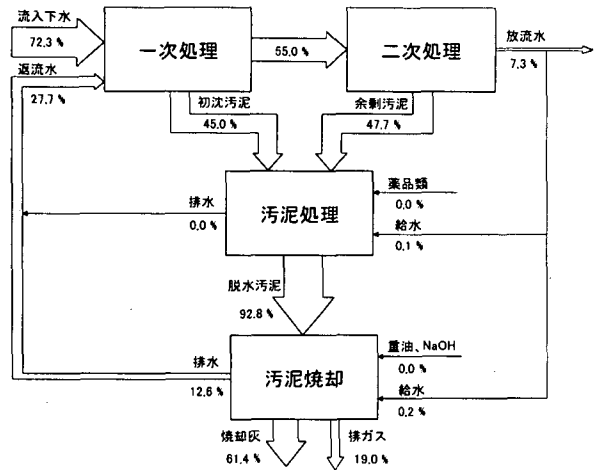


図 4-4-13 Cd の収支図

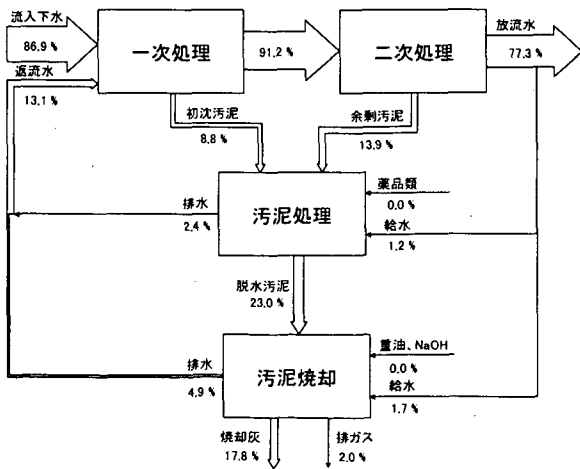


図 4-4-11 Mo の収支図

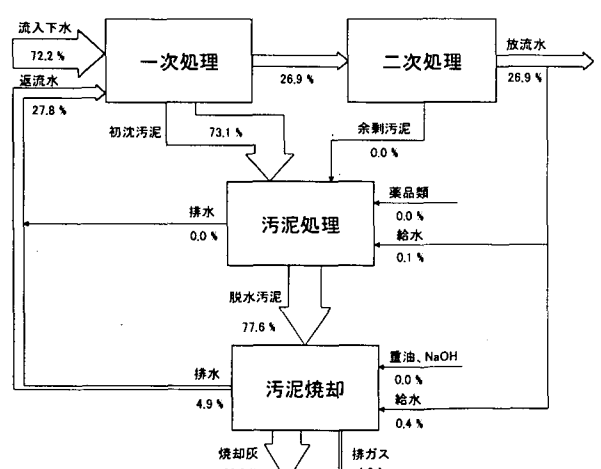


図 4-4-14 Sn の収支図

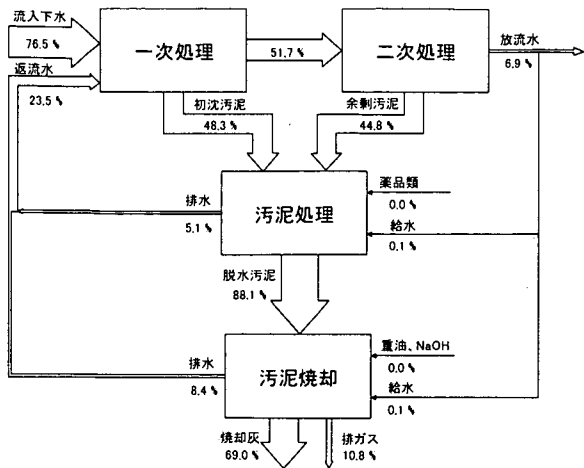


図 4-4-15 Sbの収支図

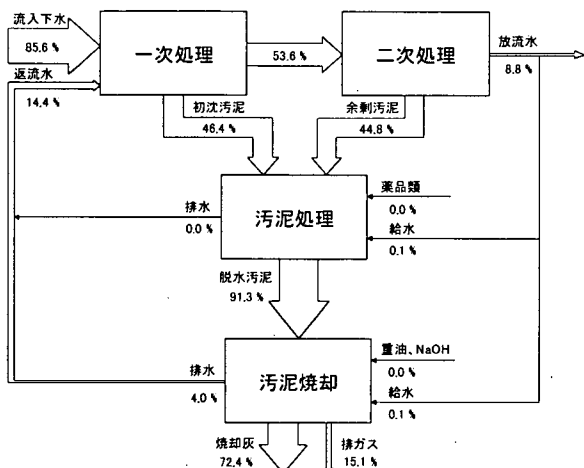


図 4-4-16 Baの収支図

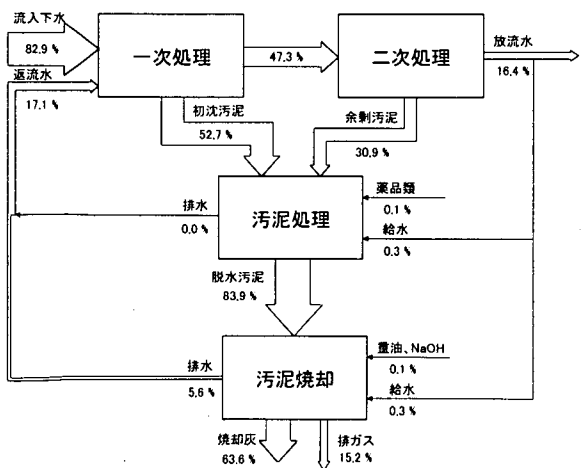


図 4-4-17 Pbの収支図

5. まとめ

某下水処理場において10月～2月の間、継続的な試料採取を行った結果、流入下水における分析値が定量下限値以下であったBe, In, Te, Tl, Hgを除き、以下の知見が得られた。

- ほとんどの元素については流入下水中の含有量の変動は少ないが、今回の例ではBa, B, Zn, Ni, Cu, Mnのように、高濃度の元素の変動幅は比較的大きい。
- 特定の発生源に関係すると思われる、流入下水中の含有量の変動状況が似通った元素の組み合わせが存在する。

水処理プロセスにおいては、SS分画における存在割合の高い元素ほど除去率が高い傾向がある。

B, Snおよび流入濃度が比較的低いSe, Cd, Sbを除いた各元素の水処理プロセスにおける除去率の変動は、ほぼ同じ挙動を示す。

また、各元素の下水処理場全体の収支を試算した結果、以下の知見が得られた。

B, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Ba, Pbの焼却灰へのおおよその移行率は、それぞれ、1.2%, 65.3%, 49.2%, 23.1%, 26.3%, 16.6%, 65.8%, 48.4%, 36.0%, 12.2%, 17.8%, 80.7%, 61.4%, 68.9%, 69.0%, 72.4%, 63.6%となる。

返流水による水処理プロセスの負荷は、一次処理プロセスへの全流入負荷を100%として、Seを除いて9～28%の範囲である。

Seは汚泥焼却プロセス排水からの戻り量が非常に大きく、この戻り量に応じて全体の除去率が左右されると考えられる。

5 参考文献

1) 環境省: "PRTR", 2002,
 <<http://www.env.go.jp/chemi/prtr/risk0.html>>
 (2002, Apr 28)

- 2) 内閣府・財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・国土交通省・環境省: 特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律施行規則, 2001
- 3) PRTR 技術検討会: PRTR パイロット事業評価報告書, 1998
- 4) 環境庁環境保健部環境安全課: 平成 10 年度 PRTR パイロット事業報告書, 1999
- 5) 環境庁環境保健部環境安全課: 平成 11 年度 PRTR パイロット事業報告書, 2000
- 6) 環境省環境保健部環境安全課: 平成 12 年度 PRTR パイロット事業報告書, 2001
- 7) 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 13 年度 PRTR パイロット事業報告書, 2002
- 8) 鈴木 穰、北村 友一: 平成 13 年度環境保全成果集, 課題番号 63, 2002
- 9) 河口広司、中原武利: プラズマイオン源質量分析, 1994

6 研究発表

- 1) 峰松 亮、鈴木 穰、北村 友一: 第 37 回日本水環境学会年会講演集, pp301, 2003



5. 下水処理水再利用のための残存物質の高度除去手法に関する研究

リサイクルチーム 上席研究員 鈴木 穰
 専門研究員 金 時俊

1. はじめに

さらなる都市化や地球温暖化等の気候変動により、今後さらに都市における水資源不足が問題になる可能性があるため、新たな水利用技術が必要になってきている。一方で、都市地域からは流量および水質が安定している下水処理水が放流されていることから、都市の代替水資源として、有効に利用することが求められている。しかしながら下水処理水には低濃度ではあるものの、残存物質が存在し、微生物の再増殖による水質悪化や、放流先生物相の中腐水性化などの問題を引き起こしている。したがって残存物質に由来する障害を取り除き、下水処理水の水資源としての価値を高め、良好な水環境を創造するには、残存物質を効率的に除去する手法が必要となっている。

このような背景から、残存有機物除去法の基礎的検討として、数種類の高度処理法による下水処理水の高度除去実験を行い、その有機物処理特性と処理水の微生物増殖可能性を比較評価した。

2. 実験方法

2.1 高度処理法および実験装置

高度処理法としては、結合固定化担体法（以下固定化法）、膜分離活性汚泥法（以下 MBR 法）およびナノろ過（NF）法を用いた。固定化法は、2L 三角フラスコに、表-1 に示す担体を 30%V/V の割合で充填し散気を行なうものであり、初期に活性汚泥を植種のため投入し、fill and draw の回分法により処理実験を行なった。MBR 法は、アクリル製の反応槽（4L）に平膜型の精密ろ過膜（MF）を浸漬し散気を行なうものであり、初期に活性汚泥を植種のため投入して、吸引ろ過によって処理水を得た。ナノろ過法は、公称塩阻止率が 10%、有効膜面積が 60cm² のナノろ過膜を用いたものであり、操作圧力を 0.5MPa に設定し、クロスフローろ過方式により透過水を得た。MBR 法に使用した精密ろ過膜およびナノろ過膜の性状を表-2 に示す。

表-1 担体の性状

材質	ポリプロピレン
真比重	1.025 g/cm ³
形状	円筒(中空) 外径:4mm, 長さ:5mm
比表面積	1410m ² /m ³
かさ密度	0.217g/cm ³
担体充填率	30V/V%

表-2 精密ろ過膜およびナノろ過膜の性状

	精密ろ過膜(MF)	ナノろ過膜(NF)
材質	ポリオレフィン	スルホン化ポリエーテルスルホン
公称孔径		
公称塩阻止率	0.4μm	10%
膜面積	0.11m ²	60cm ²

表-3 残存有機物除去実験

	固定化法	MBR法	NF法
HRT (h)	48	3	—
容量	2L	4L	—
流入水	下水処理水		生物高度処理水
	fill and draw	水位制御式	クロスフロー式
初期MLSS	500mg/l	30mg/l	—
固液分離	ろ過	精密ろ過	ナノろ過

生物高度処理水: 固定化および MBR 処理水

2.2 実験条件

2.2.1 残存有機物除去実験

各高度処理法の有機物除去特性を求める実験を行なった。植種に用いた活性汚泥および下水処理水は、茨城県霞ヶ浦流域下水道霞ヶ浦浄化センターに設置されている標準活性法パイロットプラントから採水した。下水処

理水の浮遊物質 (SS) 濃度は 1mg/l 未満であった。

実験条件を表-3 に示す。固定化法は、ばっ気時間を 12h から 1h まで短縮させながら実験を行った。反応槽に下水処理水を 1L ずつ投入し、ばっ気装置を取りつけた後ばっ気とともに攪拌を行なった。固定化処理水は 0.45 μ m メンブランフィルターろ過後、分析に供した。MBR 法は、馴養させた活性汚泥 (30mg/l) を種汚泥として反応槽に投入した後、HRT を 3h に設定し、水位制御方式によって反応槽に下水処理水を注入し、吸引ろ過により得た膜処理水を分析に供した。MBR 法において反応層槽下部からのばっ気は、反応槽内の溶存酸素 (DO) 濃度を維持するだけでなく、運転時間の経過とともに膜表面の付着物質を剥離させる効果もあるため、吸引ろ過ポンプの停止時にも常時行なった。ナノろ過法では、両生物高度処理水を原水とし、さらに処理を行なった。各室内実験は 20 $^{\circ}$ C の恒温室内で行なった。

2.2.2 長期間ばっ気による下水処理水中残存有機物の生物分解実験

長期間ばっ気により固定化法および MBR 法の残存有機物の生物分解可能性を調べた。固定化法はばっ気時間を 1, 7, 15 および 21 日間設定し、また MBR 法は 0.13, 1, 7 および 21 日間のばっ気時間を設定し、それぞれバッチ実験を行った。

2.2.3 微生物増殖実験

図-1 に示すよう、固定化反応槽を直列 2 段に設置し、下水処理水を流入水とする固定化反応槽 A (以下固定化 A) と、さらにこの処理水を流入水とする固定化反応槽 B (以下固定化 B) から得た両処理水の TOC 濃度差から微生物による有機物分解特性を調べるとともに、両反応槽から一定量の担体を取り出し、微生物増殖可能性を評価した。

2.3 分析方法

下水処理水、および全ての固定化処理水は、0.45 μ m メンブランフィルターでろ過した後、TOC を測定した。

分子量分布は、ロータリエバポレーターで 10 倍濃縮し、示差屈折器 (Shodex RI-71S) を検出器とし、ポリヒドロキシメタクリレート系を充てん剤としたゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) により測定した。分子量分画の標準物質にはポリエチレングリコール (PEG) を用いた。

限外ろ過 (UF) 分画では、図-2 に示すよう、まず、供試試料水を 0.45 μ m メンブランフィルターろ過を行い、その後分子量分画排除 10000, 5000 および 1000 の 3 種の限外ろ過膜を用い分子量分画を行なった。なお、限外ろ過膜は使用前に、あらかじめ限外ろ過テストセルに 300ml の Milli-Q を注入し、窒素加圧 (0.1MPa) により 1 時間洗浄ろ過した。この操作により、0.45 μ m 以下の溶存有機物を含むろ液 (ろ液 a)、分子量 10000 以下の溶存有機物を含むろ液 (ろ液 b)、分子量 5000 以下の溶存有機物を含むろ液 (ろ液 c) および分子量 1000 以下の溶存有機物を含むろ液 (ろ液 d) を得た [1]。これらそれぞれの分画について、TOC 測定を行った。

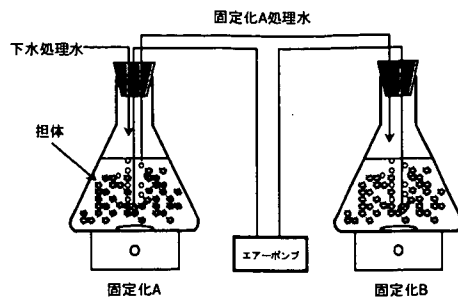


図-1 微生物増殖実験装置

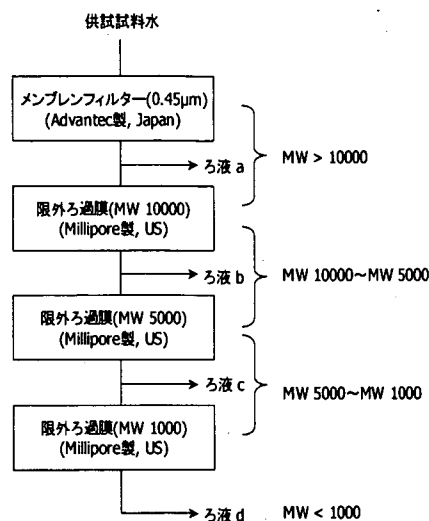


図-2 限外ろ過(UF)による分子量分

担体付着微生物量は、図-1の両固定化反応槽から一定量取り出した担体に 50ml の Milli-Q を加え、超音波処理を行い剥がれ落ちた浮遊物を含んでいる溶液の TN および TP をそれぞれ測定した。

3. 実験結果

3.1 生物高度処理による下水処理水の残存有機物除去

固定化法および MBR 法による下水処理水の TOC 経時変化を図-3 に示す。固定化処理水は、運転初期に流入水である下水処理水より高い濃度を示した。これは下水処理水が貧栄養状態であるため、植種した活性汚泥微生物が担体に付着せずに下水処理水へ漏出したためと考えられる。その後、ばっ気にとまなう摩擦等により付着微生物は常に剥離され、同時に担体表面の微生物増殖、または付着微生物の浮遊微生物の補足などが継続的に進行され定常状態となる[2]。その結果、ばっ気時間の短縮にも関わらず TOC 除去速度の減少はほとんどなかった。MBR 法は馴養された活性汚泥微生物を投入して除去実験を行ったため、実験初期に負の TOC 除去速度を示した固定化法に比べ、正の TOC 除去速度を示した。これはわずかな量の馴養された活性汚泥微生物および MBR 反応槽内の精密ろ過膜とのコンビネーションによるものと考えられる。

固定化法およびナノろ過法における TOC 容積負荷に対する TOC 除去速度を図-4 に示す。TOC 負荷は下水処理水を濃縮して高めており、ナノろ過法は固定化処理水を原水とし、TOC 除去速度を求めた。固定化法は TOC 負荷とともに除去速度が増加した。300g/m³・d 以上の負荷では一定の TOC 除去率を示した。ナノろ過法では除去速度が増加するものの、固定化法に比べて緩やかであり、低い負荷では固定化法より高い除去速度を示した。

3.2 下水処理水の分子量分画

固定化法、MBR 法およびナノろ過法の限外ろ過による分子量分画を TOC 測定したのを図-5 に示す。下水処理水の MW>5000 分画は 4.0~4.8mg/l、MW5000~MW1000 分画は 0~1.0mg/l、MW<1000 分画は 3.9~4.6mg/l であった。固定化法によって MW>5000 の分画がもっとも除去されており、一方、MW<1000 の分画は増加していた。これは、微生物による高分子物質の分解が原因と考えられる。MBR 法 (HRT;3h) では、MW>5000 の分画は除去されず、MW<1000 の分

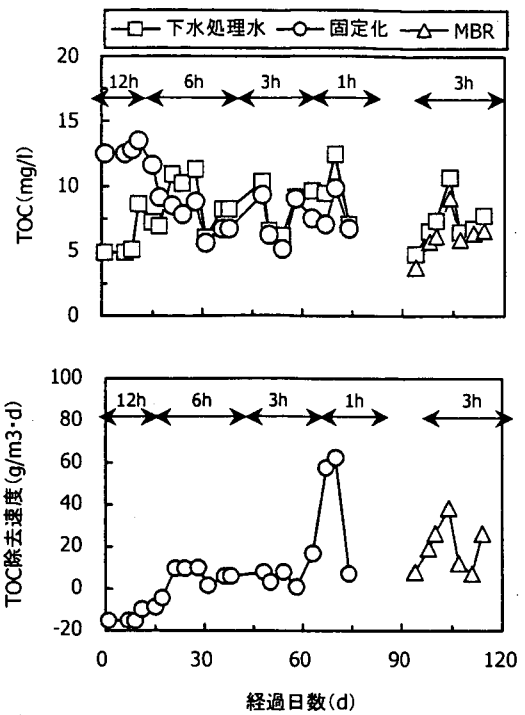


図-3 生物高度処理法による下水処理水の TOC 経時変化

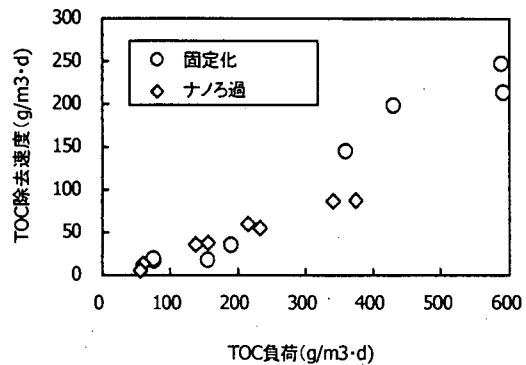


図-4 固定化法およびナノろ過法の TOC 除去速度

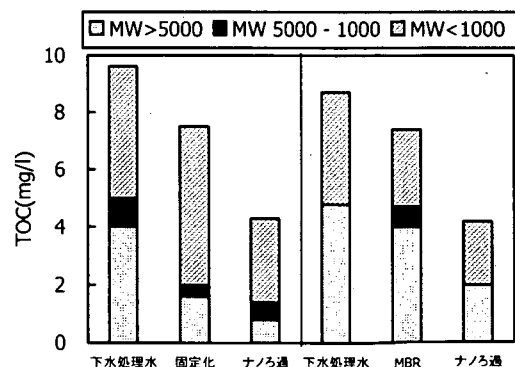


図-5 高度処理による分子量分画ごとの TOC 除去

画でわずかな減少が認められた。全体として TOC 除去率は固定化法と同程度であった。

ナノろ過によっては、両生物高度処理水の MW>5000 の分画がさらに除去された。しかし MW<1000 の分画は除去されているものの、ナノろ過膜の分子量分画排除より小さい有機物質が阻止されなかったため、総分画の約 60% を占めた。しかし膜により微生物再増殖の原因となりうる微生物の流出を制御できると考えられる。

このように生物高度処理およびナノろ過により除去が困難である MW<1000 の分画の有機物は、本来下水中に含まれていた生物分解が非常に遅いか分解されず微生物の成長および増殖に関わらない有機物として系内に蓄積、および微生物の代謝産物としての除去が困難な基質などから構成されていると考えられる[2,3]。

3.3 長期間ばっ気による下水処理水の分子量分画

長期間ばっ気における固定化法および MBR 法処理水の分子量分画を図-6 に示す。ゲルろ過クロマトグラフィーにより、下水処理水は MW>6000, MW1000~700, MW700~200 および MW<200 の 4 つのピークに分画された。両生物高度処理法ともばっ気時間が長いほど生物分解の遅い高分子有機物質が両反応槽内の有用微生物により徐々に分解され、MW<1000 の低分子量分画に転換されたと考えられる。これは、図-7 に示す低分子量ピークが高くなっていることから確認できる。また両分子量ピークから考慮すると、両反応槽内には生殖環境の異なる微生物相が存在する可能性も考えられる。

ところで、微生物再増殖には MW<1000 の天然由来の低分子量分画が影響していると知られている[4,5]。しかし生物高度処理によって分解された低分子有機物は、生物代謝産物であると考えられ、微生物の再増殖に利用されると考え難い。したがって、図-6 より低分子量分画の TOC 濃度の小さいばっ気時間に設定（固定化法;24h, MBR 法;3h）し、実験を継続した。その結果、両処理法とも安定した処理水が得られた。また、固定化法は MBR 法に比べて負荷変動に影響されなかった。

3.4 微生物再増殖量

固定化 A,B2 段の直列固定化法により微生物再増殖可能性を評価した結果を図-8 に示す。固定化 A 処理水の平均

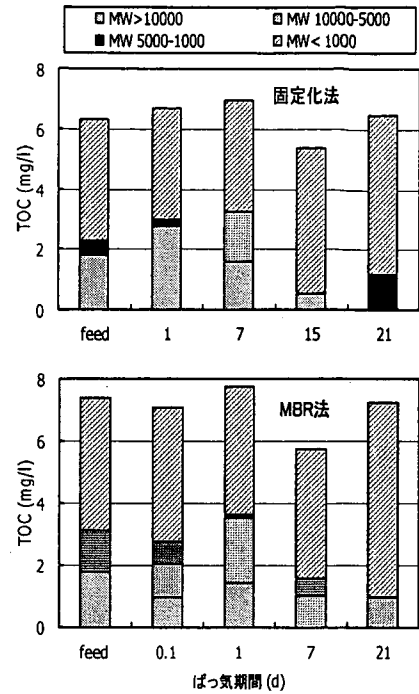


図-6 長期間ばっ気による分子量分画ごとの TOC 濃度

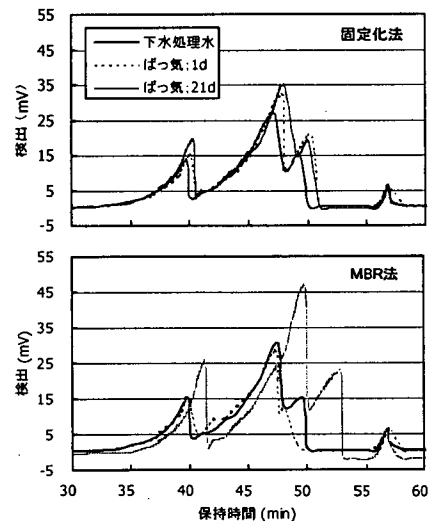


図-7 長期間ばっ気による分子量分布の変化

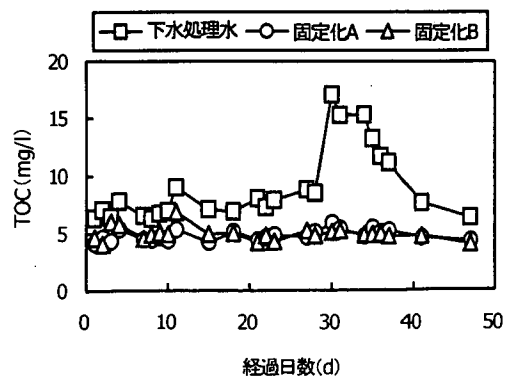


図-8 両固定化法による微生物再増殖

TOC 濃度 4.84mg/l に対し、固定化 B 処理水の平均 TOC 濃度は 4.91mg/l と、除去されていない。これは固定化 A 処理により微生物成長および増殖に関わる残存物質が除去されたため、写真-1 示すよう、固定化 B 担体への微生物付着が少なく、微生物再増殖可能性が低いと考えられる。

また TN および TP 濃度で表した両固定化法の担体付着微生物量を比較した結果を図-9 に示す。操作開始 1 ヶ月後の固定化 B 法の TN 濃度は、0.23mg-N/m² (ブランク) から 0.57 mg-N/m², TP 濃度は 0.01 mg-P/m² (ブランク) から 0.08 mg-P/m² と高くなり、微生物再増殖可能性が示唆された。しかしさらに 1 ヶ月経過後の TN および TP 濃度は、それぞれ 0.53 mg-N/m² および 0.07 mg-N/m² と、その濃度が増加していないことから残存有機物由来の微生物再増殖が抑制されていると考えられる。

生物高度処理水には微生物の栄養源となる有機物量は少ない。しかしこのような水環境を本来の生殖環境とする微生物は、低濃度の有機物を栄養源として利用するのに適応している。固定化法では、このような有用微生物が担体に付着し、系内に集積されたと考えられ、その処理水の微生物増殖可能性は、大きく低下していると考えられる。

4. まとめ

- (1) 下水処理水はゲルクロマトグラフィー分画により、MW>5000, MW1000~700, MW700~200 および MW<200 に分画され、このうち MW1000 以下の低分子量分画が示差屈折器で測定されたピーク面積値として全体の約 75% を占めた。
- (2) 下水処理水の生物高度処理法を、限外ろ過 (UF) による分子量分画の TOC 濃度として評価したところ、MW>5000 の残存有機物の除去効果は向上したが、MW<1000 の低分子量物質の除去が困難であった。
- (3) ナノろ過膜により、さらにそれぞれの生物高度処理水の除去実験を行なった結果、MW>5000 の高分子量物質は生物高度処理より阻止されるものの、MW<1000 の残存有機物の阻止は、生物高度処理法と同様、難しいことがわかった。
- (4) 長期間ばっ気によって生物分解の遅い物質が分解され、低分子量分画の TOC が増加する。
- (5) 固定化法により、低濃度の有機物を栄養源として利用するのに適応している有用微生物が系内に集積され、残存有機物由来の微生物再増殖が抑制された。

今後は、下水処理水再利用にあたって MW<1000 の低分子量物質の性状を把握し、その処理手法の検討を進める必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金 (一般勘定) により実施されたものである。

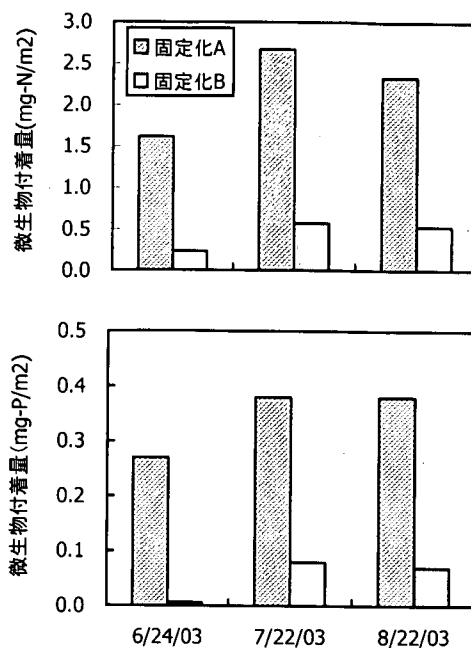


図-9 両固定化法の担体付着微生物量

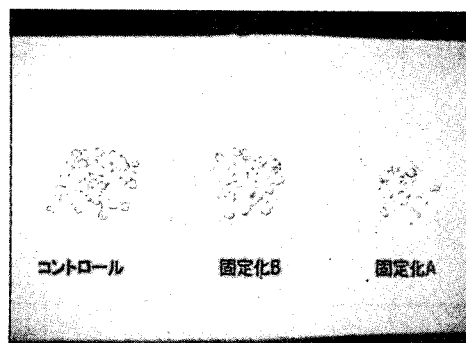


写真-1 両固定化担体の表面比較

参考文献

1. Saunders F. Michael and Dick I. Richard. (1981) Effect of mean-cell residence time on organic composition of activated sludge effluents, *Journal of WPCF*, 53, 201-215
2. 邢 新会, 本多裕之, 白神直弘, 海野 肇 (1991) 流動多孔質担体に担持される有機質廃水資化微生物群の特性, 化学工学論文集, **17**, 524-530
3. Dignac M. -F., Ginestet P., Rybacki D., Bruchet A., Urbain V. and Scribe P. (2000) Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment: nature of residual organic matter, *Wat. Res.* 34 (17), 4185-4194
4. Hem L. J. and Efraimsen H. (2001) Assimilable organic carbon in molecular weight fractions of natural organic matter. *Wat. Res.* 35 (4), 1106-1110
5. LeChevallier M. W. (1999) The case for maintaining a disinfectant residual, *AWWA*, 91 (1) 86-94

6. 底泥中の有機性有害物質の実態および挙動に関する研究

リサイクルチーム

上席研究員

鈴木 穂

主任研究員

南山 瑞彦

1. はじめに

近年、有機性有害物質による環境汚染が懸念されている。閉鎖性水域には、その流域内で発生・使用された有機性有害物質が河川等を経由して集まることが予想されるため、それらの物質による汚染が懸念されている。特に、多環芳香族炭化水素類 (Polycyclic aromatic hydrocarbons、以下、PAHs) による底泥の汚染が指摘されており^{1), 2)}、底泥中でのPAHsの存在実態の解明が必要である。14年度は、閉鎖性水域の底泥中のPAHsの汚染実態に関する文献調査を行うとともに、存在実態の把握のための調査に着手した。

2. 多環芳香族炭化水素類 (PAHs)

2.1 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の概要

PAHsは、複数の環が縮合している有機化合物の総称とされている。2～6環の主なPAHsの構造を図-1に示す。また、主なPAHsの物性値を表-1に示す。PAHsは、オクタノール-水分配係数が大きく、疎水性を示す。また、大気環境中では2～3環はほとんどがガス状、4環はガス状と粒子状の両方、5環以上は粉塵に吸着した状態で存在している⁶⁾とされている。

PAHsの一つであるBenzo[a]pyrene (以下、BaP) はその発ガン性が古くから指摘されており、図-1に示されている16種のPAHsでは、BaP以外にも、Benz[a]anthracene、Benzo[b]fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene、Chrysene、Dibenz[a,h]anthracene、Indeno[1,2,3-cd]pyreneが米国環境保護庁によりB2 (probable human carcinogen) に位置づけられている⁷⁾。また、BaPは内分泌かく乱作用を有すると疑われる化学物質の一つに挙げられている⁸⁾。PAHsは残留性有機汚染物質 (POPs) に位置づけられる場合もある⁹⁾。このように、PAHsは、古くから問題のある物質群として注目されている。

2.2 閉鎖性水域の底泥の汚染状況

PAHsには、NaphthaleneやAnthracene等のように工業的に用いられる物質もあるが、多くは「コールタール、アスファルト中の成分で、非意図的生成物としてガソリン及びディーゼルの排ガス、たばこの煙、石炭などの燃焼ガスに含まれる²⁾」とされている。そのため、PAHsによる底泥汚染の経路としては、油の漏出による経路とともに燃焼に基づく大気経由の汚染が懸念される。

閉鎖性水域の底泥のPAHsによる汚染状況に関する報告が公表されている。特に、BaPについては、前述の通り古くから注目されたことから、公的機関でも多くの調査が

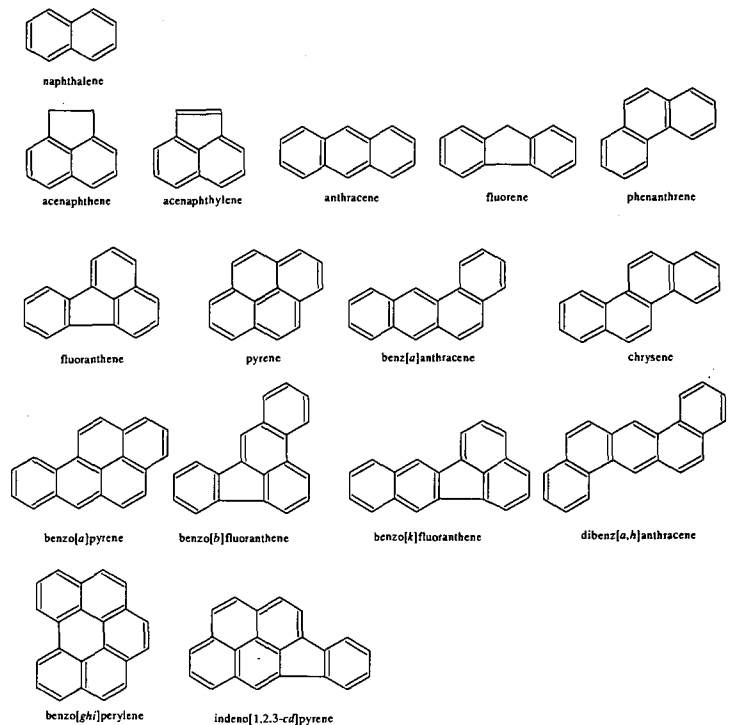


図-1 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の例

行われている。
 主な既往文献中の、淡水域および汽水域におけるBaPによる汚染調査結果をまとめ、図-2に示す。淡水・汽水域の底泥では240ng-BaP/g-dry程度以下の汚染が報告されており、この約10年では横ばい～減少傾向が見られる。

環境省の調査によると、PAHsは水試料での検出頻度は低い一方で底泥試料からの検出頻度が高く、「PAHs全体としてのリスク評価を行うことが必要である^{1,2)}。」とされている。また、PAHsの中には閉鎖性水域の河川流入部近傍での局所的な高濃度域の存在が報告されている物質もある¹³⁾。これらの

表-1 主なPAHsの物性値

	M.W. g/mol	m.p. °C	b.p. °C	Density g/cm ³	Water Solubility mg/L	Diffusivity in Water cm ² /s	Partition Coeff.			Henry's law constant		Vapor Pressure mmHg	Ref.
							logPow	LogKoc	Koc (L/kg)	unitless	atm- m ³ /mol		
Naphthalene	128.18	80.2	217.9		31	7.50E-06	3.3		1.84E+03	1.80E-02		8.50E-02	RAIS
	128.19	80.5	218	1.145	31.7		3.29	2.97			4.60E-04	8.70E-02	ATSDR
Acenaphthylene	152.2	92.5	280		16.1	7.53E-06	3.94		6.12E+03	5.11E-03		9.12E-04	RAIS
	152.20	92~93	265~275	No data	3.93		4.07	1.40			1.45E-03	0.029 at 20°C	ATSDR
Acenaphthene	154.22	96	279		3.93 at 25°C		3.92						環境省
	154.21	93.4	279		3.9	7.69E-06	3.92		6.12E+03	7.44E-03		2.50E-03	RAIS
Fluorene	154.21	95	96.2	1.225 at 0°C	1.93		3.98	3.66			7.91E-05	4.47E-03	ATSDR
	166.22	114.8	295		1.89	7.88E-06	4.18		1.13E+04	3.93E-03		8.42E-03	RAIS
Phenanthrene	166.2	116~117	295	No data	1.68~1.98		4.18	3.86			1.0E-04	3.2 × 10 ⁻⁴ at 20°C	ATSDR
	178.24	100	340		1.29 at 25°C		4.46						環境省
Anthracene	178.24	99.2	340		1.15		4.46		2.08E+04	1.73E-03		1.12E-04	RAIS
	178.2	100	340	0.980 at 4°C	1.20		4.45	4.15			2.56E-05	6.8 × 10 ⁻⁴ at 25°C	ATSDR
Fluoranthene	178.24	218	340		1.29 at 25°C		4.45						環境省
	178.24	215	339.9		0.0434	7.74E-06	4.45		2.04E+04	2.27E-03		2.67E-06 at 145°C;	RAIS
Pyrene	178.2	218	342,340	No data	0.076		4.45	4.15			1.77E-05	1.7 × 10 ⁻⁵ at 25°C	ATSDR
	202.26	111; 107	382; 250		0.265 at 25°C		5.16;						環境省
Benzo[a]anthracene	202.26	107.8	384		0.26	6.35E-06	5.16		7.09E+04	3.62E-04		9.22E-06	RAIS
	202.26	11	~375	No data	0.20~0.26		4.90	4.58			6.5E-06	5.0 × 10 ⁻⁶ at 25°C	ATSDR
Chrysene	202.6	156	393		0.18 at 26°C		4.48						環境省
	202.26	151.2	404		0.135	7.24E-06	4.88		6.94E+04	4.87E-04		4.50E-06	RAIS
Benzo[b]fluoranthene	202.3	156	393; 404		1.271 at 23°C	0.077	4.88	4.58			1.14E-05	2.5 × 10 ⁻⁶ at 25°C	ATSDR
	228.30	161	435		0.011 at 27°C		5.61						環境省
Chrysene	228.3	84	437.6		0.0094	9.00E-06	5.76		2.31E+05	4.91E-04		1.90E-06	RAIS
	228.29	158~159; 162	435sublimations	1.274 at 20°C	0.010		5.61	5.30			1.E-06	2.2 × 10 ⁻⁶ at 20°C	ATSDR
Benzo[k]fluoranthene	228.30	256; 254	448; 488		0.006 at 25°C		5.61~5.91;						環境省
	228.3	258.2	448		0.002	6.21E-06	5.81		2.36E+05	2.14E-04		6.23E-09	RAIS
Benzo[e]pyrene	228.3	255~256	448	No data	0.0028		5.16	5.30			1.05E-06	6.3 × 10 ⁻⁷ at 25°C	ATSDR
	252.32	167	480		0.010 at 20°C		6.12						環境省
Benzo[a]pyrene	252.32	168	442.75		0.0015	5.56E-06	5.78		8.03E+05	2.69E-05		5.00E-07	RAIS
	252.3	168.3	No data	No data	0.0012		6.04	5.74			1.22E-05	5.0 × 10 ⁻⁷ at 20~25°C	ATSDR
Benzo[a]anthracene	252.32	166	480		0.050 at 20°C		6.07 at 20°C						環境省
	252.32	166	No data	No data	6.76 × 10 ⁻³ at 25°C		6.12	4.7~4.8			1.E-06	1.50 × 10 ⁻⁶ at 25°C	ATSDR
Benzo[b]fluoranthene	252.32	217	480		0.0068 at 20°C		6.08						環境省
	252.32	217	480		0.0008	5.56E-06	6.11		7.87E+05	2.39E-05		9.65E-10	RAIS
Benzo[a]pyrene	252.3	215.7	480	No data	7.6 × 10 ⁻⁴ at 25°C		6.06	5.74			3.87E-05	9.59E-11	ATSDR
	252.32	176.5	442.75		0.00162	9.00E-06	6.13		7.87E+05	1.87E-05		5.49E-09	RAIS
Benzo[e]pyrene	252.3	179~179.3	310~312 at 10mmHg;		0.0023		6.06	6.74			4.9E-07	5.6E-09	ATSDR
	252.31	178	493	1.351	0.0046g/L		6.95						環境省
Dibenz[a,h]anthracene	252.30	178~179	310~312 at 10mmHg	No data	6.3 × 10 ⁻³ at 25°C		No Data	No Data			No data	5.7 × 10 ⁻⁹ at 25°C	ATSDR
	278.36	266	524		0.050 at 27°C		6.77						環境省
Benzo[ghi]perylene	278.36	269.5	524		0.00103	5.18E-06	6.54		2.62E+06	5.03E-06		1.39E-11	RAIS
	278.35	262	No data	1.282	0.0005		6.84	6.52			7.3E-08	1 × 10 ⁻¹⁰ at 20°C	ATSDR
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	276.34	278	545		0.0003 at 25°C		7.10						環境省
	276.34	278	486.31		0.00026		6.63		2.68E+06	1.35E-05		1.00E-10	RAIS
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	276.34	273	550	No data	2.6 × 10 ⁻⁴ at 25°C		6.50	6.20			1.44E-07	1.03 × 10 ⁻¹⁰ at 25°C	ATSDR
	276.34	163.6	536		0.00019	5.66E-06	6.7		2.68E+06	1.42E-05		1.25E-10	RAIS
Indeno[1,2,3-c,d]pyrene	276.3	163.6	530	No data	0.062		6.58	6.20			6.95E-08	~10 ⁻¹¹ at 20°C	ATSDR

Ref. 中、環境省：文献2）、ATSDR_M：文献3）、ATSDR：文献4）、RAIS：文献5）。

ことから、閉鎖性水域内の底泥におけるPAHsの分布状況の把握等、存在実態を明らかにすることが必要である。

3. 閉鎖性水域の底泥調査

3. 1 調査方法

閉鎖性水域の底泥を採取し、PAHsの含有量を分析した。

底泥を採取した閉鎖性水域の概略を図-3に示す。調査対象とした水域は関東地方の比較的人為的な汚染が進んでいる水域である。14年度は、PAHsの主な流入源となりうる流入河川や橋等から離れた地点で底泥試料を採取した。約2m間隔で採取した3本のコアサンプルから、表層1cmを切り出し、それぞれを分析試料とした。

底泥試料中のPAHsの分析は、環境庁の方法¹⁴⁾を参考にして行った。この方法は、底泥試料を加熱還流アルカリ分解し、液々抽出した後、シリカゲルカラムを用いて精製し、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)で検出する方法であり、PAHsの同時分析が可能であるとされている¹⁴⁾。本調査で行った

分析の主な流れを図-4に示す。本調査の底泥試料に環境庁の方法を適用したところ回収率が不安定であったため、精製の第2フラクションのアセトン濃度、溶媒量を変更した。定量対象物質は図-1に示した16種のPAHsとした。

3. 2 調査結果

底泥試料の代表的な性状を表-2に示す。また、各試料のPAHsの分析値を表-3に示す。

BaPの調査結果は、図-2に示されている値の範囲内にあり、より汚染程度が低いと思われる水域と同程度であった。今回対象とした水域と同じ関東地方にある手賀沼、印旛沼の値と比較しても、より低濃度であった。BaP以外のPAHsについても、既に報告されている底質の調査結果(河川、海域を含む)²⁾の範囲内の値であった。

約2m間隔で採取した各試料の値は、CV値にして約20%程度であった。今回の試料採取地点は流入河川から離れた地点であったため、比較的底泥の堆積状況が均一

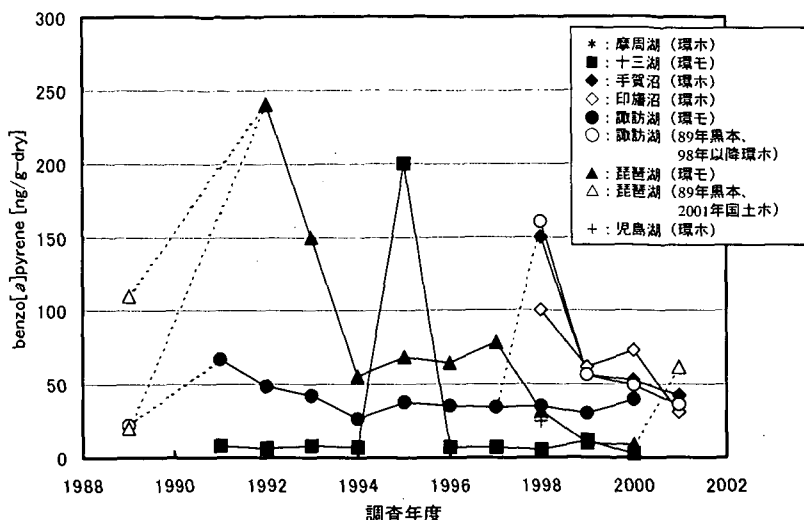


図-2 閉鎖性水域の底泥のBaPによる汚染状況

凡例中、黒本：環境庁調査1)、環モ：環境省調査10)、環木：環境省調査11)、国土ホ：国土交通省調査12)で北湖の値。他の琵琶湖は南湖の値。

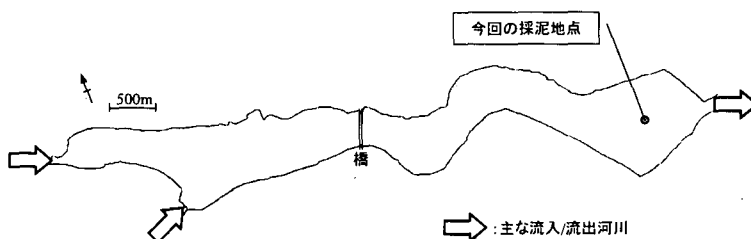


図-3 調査対象閉鎖性水域の概略と採泥地点

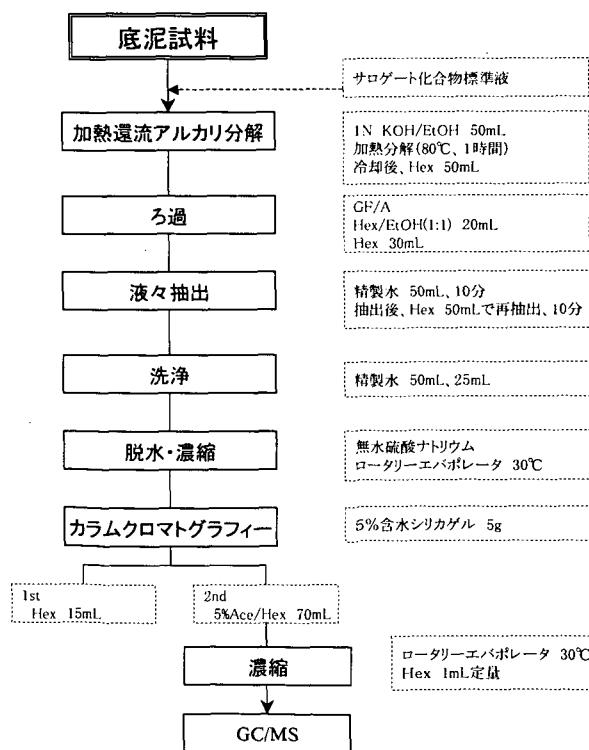


図-4 分析の主な流れ

であったと考えられるが、採取地点によっては、ほぼ同じ地点での採取試料であっても分析値が異なる可能性が示唆された。

表-2 試料(No.1)の性状

含水率	85 %
強熱減量	17 %
硫化合物	0.1 mg/g
全窒素	6.4 mg/g
全りん	1.3 mg/g

表-3 試料の分析結果

	試料測定結果 [ng/g-dry]		
	No.1	No.2	No.3
Naphthalene	83.8	61.5	80.5
Acenaphthylene	22.4	19.3	26.3
Acenaphthene	6.0	4.7	6.2
Fluorene	34.2	25.1	41.3
Phenanthrene	108.7	81.2	75.5
Anthracene	12.0	10.1	12.1
Fluoranthene	80.4	61.9	94.9
Pyrene	70.0	54.2	79.8
Benz[a]anthracene	14.2	10.7	16.5
Chrysene	24.3	18.4	29.1
Benzo[b]fluoranthene	17.4	13.3	19.7
Benzo[k]fluoranthene	7.5	5.6	8.0
Benzo[a]pyrene	12.1	9.0	13.5
Dibenz[a,h]anthracene	0.7	0.4	0.8
Benzo[ghi]perylene	6.9	4.4	7.1
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	24.1	18.1	27.4

4. まとめ

本研究は、閉鎖性水域内の底泥におけるPAHsの分布状況の把握等、存在実態を明らかにすることを目的としている。14年度は、閉鎖性水域の底泥中のPAHsの存在実態の把握のための調査に着手した。比較的人為的な汚染が進んでいる閉鎖性水域の底泥の表層試料中の16種のPAHsの定量を行ったところ、既に報告されている閉鎖性水域の底泥の汚染の範囲内にあり、より汚染程度が低いと思われる水域と同程度であった。今後は、複数の閉鎖性水域を対象とし、水域内での分布等、底泥のPAHs汚染の実態を把握するとともに、流域の土地利用形態と汚染実態との関係等の検討を行う必要がある。

なお、本調査研究は、運営費交付金（治水勘定）により実施されたものである。

参考文献

- 1) 環境庁環境保健部保健調査室：化学物質と環境，平成2年版，1990.12.
- 2) 環境省環境保健部環境安全課：化学物質と環境，平成12年度版，2001.3.
- 3) Agency for Toxic Substances and Disease Registry：Toxicological Profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene, pp.117-119, 1995.8.
- 4) Agency for Toxic Substances and Disease Registry：Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pp.209-221, 1995.8.
- 5) Oak Ridge National Laboratory：Toxicity and Chemical-Specific Factors? Nonradionuclides, Risk Assessment Information System, as of April 2003.
- 6) 木津良一，鳥羽陽，早川和一：多環芳香族炭化水素（PAH）の環境残留とヒトへの曝露，内分泌かく乱物質研究の最前線，季刊化学総説，No.50，pp.187-192，2001.9.
- 7) U.S.Environmental Protection Agency：Integrated Risk Information System, as of April 2003.
- 8) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED'98－，1998.5.
- 9) UNECE：Annex III, The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs).
- 10) 環境省（旧環境庁）：化学物質と環境，平成4年版～平成13年版.
- 11) 環境省（旧環境庁）：水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査（平成10年12月）、平成11年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果、平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果、平成13年度水環境中の内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）実態調査結果の概要.
- 12) 国土交通省河川局：平成13年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果（資料集），2002.12.
- 13) 原田淳，山敷庸亮，山下尚之，清水芳久，松井三郎：湖沼底質中の微量有機汚染評価のための指標物質の検出－琵琶湖赤野井湾を対象として－，環境工学研究論文集，Vol.33，pp.341-348，1996.12.
- 14) 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，pp.176-185，1998.7.