

14. 下水道における微量化学物質の評価に関する調査

研究予算：受託経費（下水道事業調査費）

研究期間：平 13～平 17

担当チーム：水循環研究グループ（水質）

研究担当者：田中宏明、小森行也、岡安祐司

【要旨】

現在、下水中には、人や生物に対して、内分泌かく乱作用や毒性作用を示す微量化学物質が含まれている可能性が指摘されているが、これら微量化学物質が原因物質と疑われる下水処理への影響もいくつか報告されている。我が国の下水処理は生物処理が主体であり、有害性のある微量化学物質の影響評価は重要な課題である。本調査は、下水道に流入する可能性のある微量化学物質の評価手法の開発を目的とし、①微量化学物質の検出方法の簡易化、迅速化、②微量化学物質の下水道での挙動把握と下水処理への影響把握、③下水道での微量化学物質の評価技術の開発を行う。本調査は、H11年7月に公布されたPRTR法で対象となる物質を中心に、種々の化学物質を対象とする。

キーワード：内分泌攪乱物質、ELISA法、毒物センサ、PRTR、挙動推定モデル

1. はじめに

下水道施設へ流入する有害な化学物質は、下水道法に基づき水質汚濁防止法で規制されている一部を除いて大部分が未規制であり、下水道に流入する可能性があるが、下水処理施設での挙動・運命についての知見は不十分な状況である。これらの化学物質の中には、微量でも、人や生物に対して、内分泌かく乱作用や毒性作用を示す化学物質が含まれている可能性が指摘されている。

現状では、下水中の内分泌かく乱作用を示す化学物質のうち一部は、機器分析に基づく手法により測定されるが、高価な機器、熟練した技術等が必要であり、幅広く下水中での挙動を把握できる状況ではない。そのため、簡易に、迅速に測定できる手法の開発が求められている。

毒性作用を示す物質については、実際に、これら微量化学物質が原因物質と疑われる下水処理への影響もいくつか報告されている。我が国の下水処理は生物処理が主体であり、有害性のある微量化学物質の影響評価は重要な課題である。しかし、発生源の把握、迅速な対処がなされた例は極めて少ない。この理由は、生物処理に対して阻害影響を与える多種多様の化学物質を総括的に、かつ連続的に監視する技術が確立されていないことにある。

一方、規制されている化学物質に目を転じてみると、1999年7月に公布された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）は、下水道事業もその対象となり、下水道管理者は下水処理場からの環境媒体への規制項目の化学物質の排出量、移動量について登録、公表することが必要となる。しかし、規制項目の化学物質の移動・排出量のすべてを実測により求めていくことは困難であり、限られた測定データから年間の推定量を算定することも困難となることが予想されるので、測定とともに、数値シミュレーションなどの新たな効果的な運命予測手法を開発することも有効であると考えられる。

さらに、より積極的に化学物質対策に下水道が取り組む場合には、下水処理場における運転条件が化学物質の環境媒体への移行先に及ぼす影響を予測、評価することも必要となるであろう。

本研究では、以上のような背景を受け、以下の課題を目的とする。

- ・ 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法を確立し、監視を行う。
- ・ 硝化細菌バイオセンサを毒物モニタレベルに開発・発展させ、下水の迅速な毒性監視を行う。
- ・ 下水道に流入している微量化学物質（PRTR法の対象物質を含む）の挙動・影響把握とその評価技術をまとめ、下水道における微量化学物質の対策に資する。

2. 研究方法

2. 1. 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発

本研究では、下水中の 17β エストラジオールを簡易に定量する手法の開発を検討した。迅速測定手法としては定量性に優れるGC-MSやLC-MS/MSの機器分析による測定手法に比較して、簡易に測定可能なEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法を選択した。 17β エストラジオールに特異的に反応するモノクローナルまたはポリクローナル抗体をマイクロプレートに固定化したELISAキットについては既に複数の民間企業から市販がなされている。しかし、それぞれのキットにおける、抗体と下水中の類似物質との交差反応性、下水中の他の物質による抗体・酵素など活性の妨害の程度については、完全には把握されていない。一般的には、ELISA法による測定結果は、交差反応・妨害等に由来すると考えられる理由により、GC-MSやLC-MS/MSの機器分析による測定手法に比較して過大になることが指摘されている³⁾。

本研究では、比較的簡易に、下水試料中の 17β エストラジオールを濃縮し、かつ交差反応・妨害等を示す物質を分離できる抽出手法を発見することを目的とした。具体的には、実下水処理場における下水試料を用いて、機器分析手法での測定結果と、武田薬品工業製のELISAキット、Assay Design社製のELISAキット(建設省が実施した「水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査、下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査で使用された」)について、設定した各抽出手法によるELISA法の結果の比較を実施した^{5) 8)}。

また、同様にエストロンを定量するELISA法の開発にも着手した¹¹⁾。

なお、本研究は、平成11~13年度の期間で、武田薬品工業株式会社、日本ガイシ株式会社との共同研究「水中の微量化学物質の新しい検出技術(その2)の開発」で実施されたものである。

2. 2. 硝化細菌バイオセンサの開発

これまで、土木研究所および富士電機株式会社が共同で開発した、アンモニア酸化細菌を固定化したバイオセンサの下水道施設への適用性を検討してきた。本装置の下水道施設への適用に関する課題は、

- ・ 濁質を大量に含む下水を連続的に採取・濾過・バイオセンサへ送液する除濁装置の運転が安定して行うことができない。
- ・ 特定のアンモニア酸化細菌に対して阻害を与える化学物質以外を検出することができない。

前者については、随時、除濁装置の改良を実施した^{2) 4)}。後者については、固定化する細菌の種類を多様化することで、アンモニア酸化細菌に対しては阻害を及ぼさない化学物質を新たに検出することを試みた。13年度は、亜硝酸酸化細菌を固定化したバイオセンサを開発した¹⁰⁾。具体的には、亜硝酸酸化細菌は、*Nitrobacter winogradii* IFO14297を用い、バイオセンサの設計諸元(微生物膜製膜、保存条件、センサ試薬組成)を決定した。5種類の有害物質(シアン化カリウム、アセトン、水銀、アジ化ナトリウム)の標準溶液を用いて、用量と呼吸阻害の関係を整理した。

なお、本研究は、平成13年度~15年度の期間で、富士電機株式会社との共同研究「下水道から排出される化学物質の削減手法および下水道へ流入する化学物質の下水処理への影響の判定手法(その1)の開発」で実施されたものである。

2. 3. 下水道に流入している微量化学物質(PRTR対象物質を含む)の挙動把握

土木研究所で開発した数値シミュレーションモデル¹⁾を用いて、PRTR第一種指定化学物質のうち、揮発性有機化合物33物質について、全国の平均的な下水処理場の運転条件(標準活性汚泥処理法を採用している下水処理場の平均的な運転条件)を設定し、生分解性を考慮しない場合の活性汚泥処理における挙動・運命の予測を行い、排出係数(流入量に対する各環境媒体への移行割合)を算出した。また、異なる運転条件を設定した場合の移行性の違いについても推定、検討した^{6) 9)}。

また、上記の検討では生分解性については考慮していない。土木研究所で開発した数値シミュレーションモデルで生分解性を検討する際には、クーロメータを用いて、生分解性パラメータを取得する必要がある。ここでは、クーロメータを用いた生分解試験を実施するに際して、より正確に生分解性を評価するために留意すべき点について検討した。

2. 4. 下水道に流入している微量化学物質（PRTR 法の対象物質を含む）の影響把握

土木研究所が茨城県霞ヶ浦流域下水道湖北処理場内のパイロットプラント内に所有する、実下水処理工程を模した活性汚泥処理実験プラントに、化学物質の流入事故を想定した化学物質の添加を行い、その用量と、下水処理システムに発生する生物処理阻害の影響の関係を調査した。13年度は添加する化学物質として、硝化工程へ阻害影響を与えることが報告されているチオ尿素を選定し、検討を行った。

3. 研究結果

3. 1. 下水道における内分泌かく乱物質の迅速測定法の開発^{5) 8)}

下水試料中の17βエストラジオールの抽出方法として、

- 1) C18 固相抽出+メタノール溶出
- 2) C18 固相抽出+ジクロロメタン溶出

の2つの設定方法を比較した。両手法とも、17βエストラジオールの回収率は確保されていた。結果は、武田薬品工業製の ELISA キット、Assay Design 社製の ELISA キットとも、

[機器分析による測定結果]<[C18 固相抽出+ジクロロメタン溶出による測定結果]<[C18 固相抽出+メタノール溶出による測定結果]

となり、ジクロロメタン溶出の場合の方が、交差反応・妨害を示す他の物質を分離することが可能であると推定された。武田薬品工業製 ELISA キットと Assay Design 社製の ELISA キットを比較すると、武田薬品工業製 ELISA キットの測定結果の方が、機器分析による測定結果に近い傾向がみられた。しかし、依然として、ELISA 法による測定結果は、機器分析のそれを大きく上回っているため、さらに一層のクリーンナップ等を実施する必要があると考えられた。

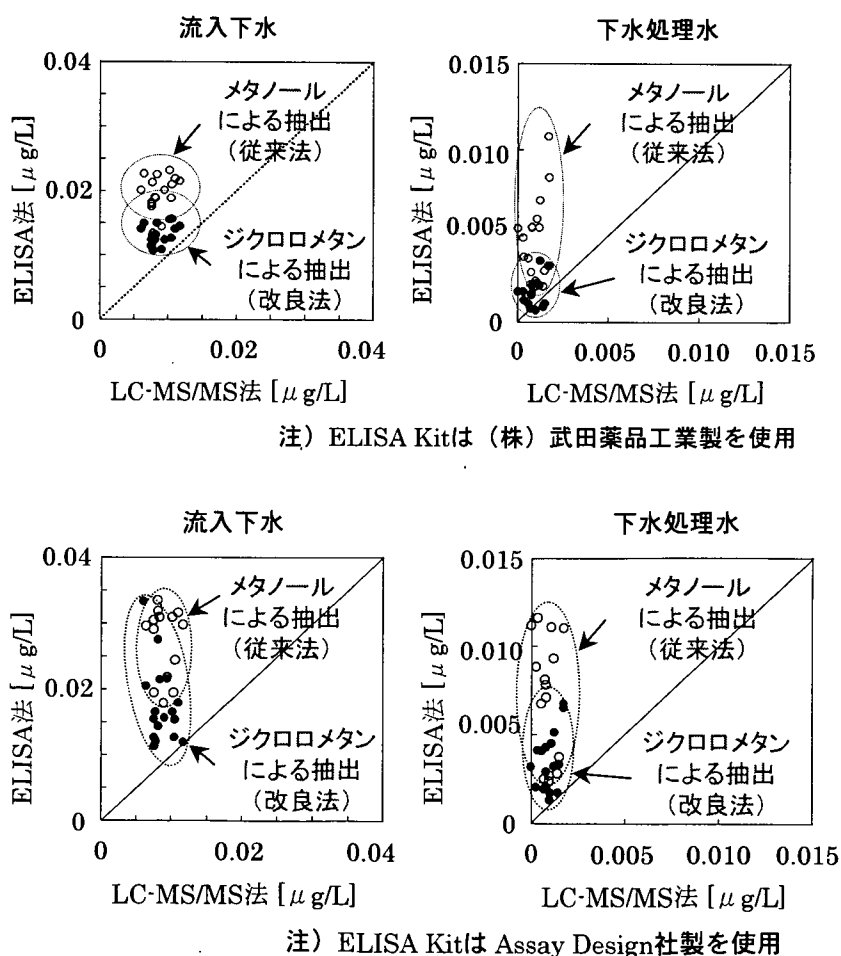


図1 ELISA法における、前処理手法の改良検討

3. 2. 硝化細菌バイオセンサの開発¹⁰⁾

亜硝酸酸化細菌を用いたバイオセンサで呼吸阻害を示した5物質のうち、アジ化ナトリウム、6価クロムは、従来のアンモニア酸化細菌を用いたバイオセンサでは検出することができず、両センサを組み合わせることで、広範囲の有害物質を検出可能であることがわかった。

供試物質	亜硝酸酸化細菌 バイオセンサ 阻害影響濃度 EC10 (mg/L)	アンモニア酸化細菌 バイオセンサ 阻害影響濃度 EC10 (mg/L)
シアン化カリウム	0.06	0.02
アセトン	7.9	0.5
水銀	9.8	1.2
アジ化ナトリウム	0.06	n.d.
6価クロム	5.0	n.d.

表1 各バイオセンサ呼吸阻害影響試験結果

3. 3. 下水道に流入している微量化学物質(PRTR

法の対象物質を含む)の挙動把握

標準活性汚泥法での挙動の推定

日本全国の下水処理水量の82%を占める標準活性汚泥法の平均的な運転条件における、これまでに下水道において調査の実績がある33の化学物質について、化学物質の流入濃度を0.1mg/Lに設定した。また、活性汚泥処理における生分解などによる無機化や、他の化学物質の分解過程から生じる中間生成物としての新たな生成効果は無視した。この条件の下で、算出結果から排出係数を整理すると表2のようになる⁹⁾。

1) 標準活性汚泥処理における運転条件パラメータによる感度解析^{6) 9)}

PRTR 第一種指定化学物質の物性の整理を行い、さらに、エアレーションタンクのHRT、送気倍率、MLSS濃度について、全国データの平均値+標準偏差の場合、および平均値-標準偏差の運転状況について感度解析を実施し、PRTR 第一種指定化学物質の各媒体への排出係数を算出し、算出結果から求めた等排出係数線を示した。送気倍率およびHRTを大きく設定することが、大気側への排出を促進し、また、MLSSを高く設定することが汚泥処理系への移行を大きくすることが示唆された。

表2 代表的なPRTR第一種指定化学物質の平均的な活性汚泥処理における排出係数の算出結果

政令 番号	物質名	排出係数		
		大気	二次 処理水	汚泥 処理系
7	アクリロニトリル	0.033	0.939	0.028
8	アクロレイン	0.030	0.943	0.028
11	アセトアルデヒド	0.020	0.953	0.028
16	2-アミノエタノール	0.000	0.972	0.028
24	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩	0.000	0.609	0.391
29	ビスフェノールA	0.000	0.439	0.562
37	EPN	0.004	0.079	0.918
47	エチレンジアミン四酢酸	0.000	0.983	0.017
61	ε-カプロラクタム	0.000	0.987	0.013
63	キシレン	0.705	0.249	0.046
77	クロロフェン(別名塩化ビニル)	0.782	0.215	0.003
95	クロホルム	0.427	0.563	0.010
96	クロロメタン(別名塩化メチル)	0.571	0.424	0.004
116	1,2-ジクロロエタン	0.267	0.724	0.009
118	cis-1,2-ジクロロエチレン	0.447	0.545	0.009
140	1,4-ジクロロベンゼン	0.662	0.238	0.100
145	ジクロロメタン(塩化メチレン)	0.380	0.613	0.007
157	2,6-ジクロロトルエン	0.001	0.915	0.084
177	スチレン	0.537	0.419	0.045
200	テトラクロロエチレン	0.817	0.120	0.003
205	テラフタル酸	0.000	0.930	0.070
206	テラフタル酸ジメチル	0.081	0.850	0.069
209	1,1,1-トリクロロエタン	0.737	0.252	0.012
211	トリクロロエチレン	0.653	0.335	0.012
222	プロホルム	0.195	0.759	0.046
227	トルエン	0.617	0.362	0.021
242	ノニルフェノール	0.100	0.010	0.890
254	ヒドロキノン	0.000	0.988	0.012
266	フェノール	0.000	0.972	0.028
272	フタル酸ビス(2-エチルヘキシル)	0.001	0.036	0.963
299	ヘンセン	0.526	0.464	0.010
307	ポリ(オキシエチレン)アルキルエーテル	0.000	0.275	0.725
310	ホルムアルデヒド	0.000	0.989	0.011

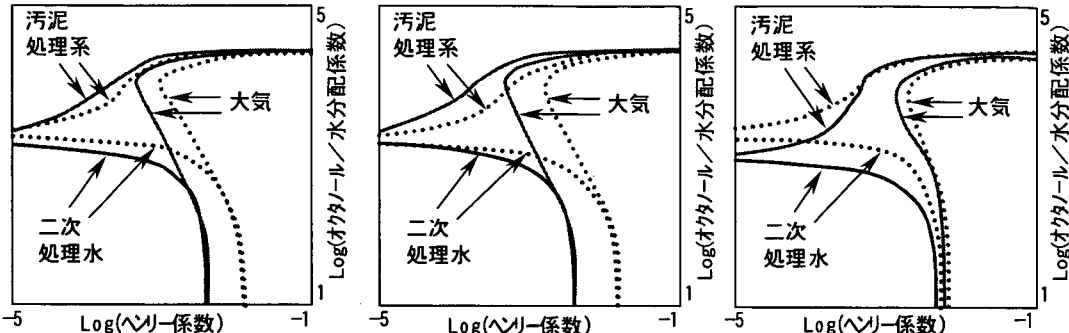
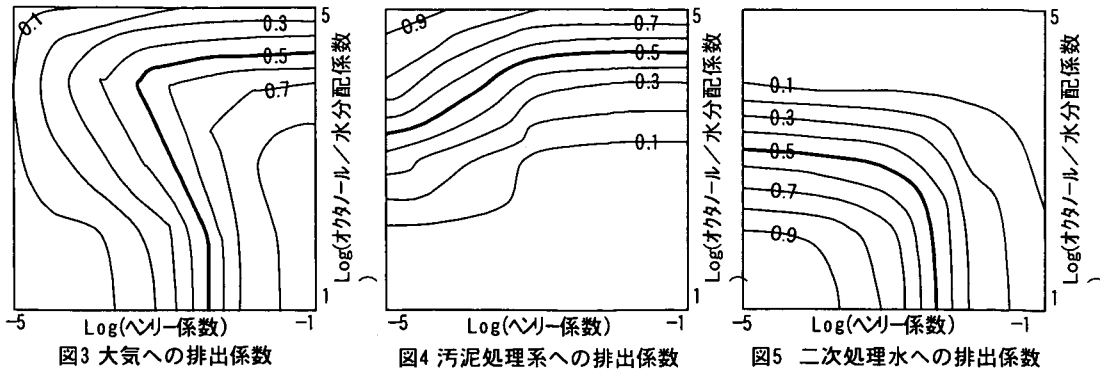


図3 HRTパラメータによる感度解析 図4 送風倍率パラメータによる感度解析 図5 MLSSパラメータによる感度解析
注) 排出係数 0.5の線を示した。実線: 平均値+標準偏差の場合 点線: 平均値-標準偏差の場合

2) 処理方式による相違についての考察⁶⁾

標準活性汚泥法、オキシデーションディッチ法、酸素活性汚泥法の平均的な運転条件の設定における、代表的な化学物質の排出係数をシミュレーションにより推定した。曝気時間パラメータが大気への排出量に対して影響することが推定された。また、同一の化学物質でも、排出係数は、下水処理施設の運転条件により変化することが推察された。

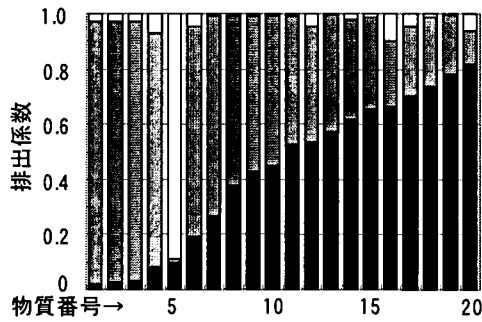


図2 標準活性汚泥法における排出係数

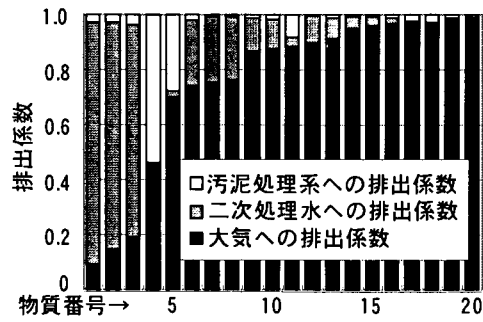


図3 オキシデーションディッチ法における排出係数

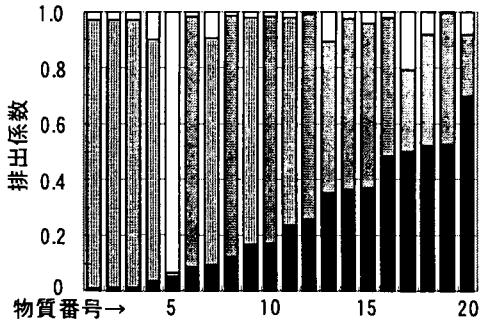


図4 酸素活性汚泥法における排出係数

表1 運転方式ごとの排出計算に用いた物質一覧

No.	物質名	No.	物質名
1	アセアルデヒド	11	ベンゼン
2	アクリレン	12	スチレン
3	アクリロトリル	13	クロロメタ
4	テラフル酸ジメチル	14	トルエン
5	ノルフェノール	15	トリクロロエチレン
6	プロモホルム	16	1,4-ジクロロベンゼン
7	1,2-ジクロロエタ	17	キシレン
8	ジクロロメタ	18	1,1,1-トリクロロエタ
9	クロホルム	19	クロロエチレン
10	1,2-ジクロロエチレン	20	テトラクロロエチレン

注) 大気への排出係数が小さい順に並べた。

3) クーロメータを用いた生分解試験結果

クーロメータは、密閉容器内に対象とする化学物質、活性汚泥、無機培地を添加し、生分解試験を行い、生分解によって生じる二酸化炭素を容器内のソーダ石灰に吸収させ、その結果減圧になった分、容器内で電気分解により酸素を供給する実験装置である。

揮発性有機化合物の生分解性試験を実施する際には、生物分解による酸素消費が観察されないにもかかわらず、容器内の揮発性有機化合物の濃度が減少する現象が観測された。この原因は不明であり、今後詳細について検討する必要があると考えられた。いずれにしても、本装置を用いて生分解性パラメータの取得をする際には、最低限、対照系および実験系における、対象とする揮発性有機化合物の濃度の経時変化を追跡する必要があることがわかった。

3. 4. 下水道に流入する微量化学物質の影響把握

活性汚泥処理実験プラントのエアレーションタンクの入り口にチオ尿素を200mg添加した場合と、400mg添加したした場合の、二次処理水のアンモニア性窒素濃度の変化を示す。硝化工程がチオ尿素に阻害されることにより、アンモニア性窒素が酸化されずに残留することになるが、低用量では、速やかに硝化活性が回復する（可逆的な現象である）のに対して、ある用量を超えた場合は、速やかに硝化活性が回復しない（不可逆的な現象である）ことが観察された。今後、実験結果を集積し、硝化細菌の活性、個体数を考慮したモデル化を検討する予定である。

参考文献

- 1) 岡安祐司、小森行也、竹歳健治、田中宏明：「ベンチスケール活性汚泥処理実験装置と数理モデルを用いた揮発性物質の挙動」、環境工学研究論文集、第37巻、pp. 299-310
- 2) T. Inui, Y. Tanaka, Y. Okayasu, H. Tanaka, 「Application of Toxicity Monitor Using Nitrifying Bacteria Biosensor to Sewerage Systems」、Conference Preprints of the 1st IWA Conference on Instrumentation, Control and Automation, Vol. 2 pp.395-402
- 3) 田中宏明、岡安祐司：「ELISA 法の水環境でのエストロゲン測定への利用」、免疫化学測定法研究会第6回(2001年) 学術集会講演要旨集、pp.25-26、2001.6
- 4) 乾 貴誌、田中良春、岡安祐司、田中宏明：「硝化細菌を用いた毒物センサの下水道施設への適用試験」、第38回下水道研究発表会講演要旨集、pp924-926、2001.7
- 5) 郷田泰弘、廣部将人、小林綾子、藤本 茂、池 道彦、藤田正憲、岡安祐司、田中宏明：「女性ホルモン用 ELISA 試料の前処理法検討」、第38回下水道研究発表会講演要旨集、pp903-905、2001.7.
- 6) 岡安祐司、小森行也、田中宏明：「数理モデルを用いた PRTR 指定化学物質の活性汚泥処理における挙動の推定」、第38回下水道研究発表会講演要旨集、pp163-165、2001.7.
- 7) OKAYASU, Y., Tanaka, H., Komori, K., Taketoshi, K. : 「Behavior of Volatile Organic Compounds in Activated Sludge Process Evaluated by Bench Scale Experiment and Mathematical Model」、Proceedings of Asian Waterqual 2001, Vol. 1, pp893-898、2001.9.
- 8) Y. Goda, M. Hirobe, A. Kobayashi, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, Y. Okayasu, H. Tanaka : 「Development of the ELISA for Detection of Estrogenic Hormones in Environment」、Preprints of the IWA 2nd World Water Congress P0013、2001.10
- 9) Yuji OKAYASU, Koya KOMORI, Hiroaki TANAKA : 「Estimation of behavior of chemical substances in activated sludge process by the PWRI mathematical model」、Conference Proceedings of 9th International Conference on the Conservation and Management of Lakes、3-1、pp. 233-236、2001.11.
- 10) 乾 貴誌、田中良春、岡安祐司、田中宏明：「下水用マルチバイオセンサの開発－亜硝酸酸化細菌バイオセンサの開発」、第36回日本水環境学会年会講演集、194、2002.3.
- 11) 郷田泰弘、藤本 茂、藤田正憲、田中宏明：「エストロン定量用 ELISA の開発」、第36回日本水環境学会年会講演集、433、2002.3.