

下水処理プロセスにおける化学物質の制御技術に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 23～平 27

担当チーム：水環境研究グループ（水質）

研究担当者：岡本誠一郎、小森行也、北村友一
金子陽輔

【要旨】

本研究では、社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質の一部に生物影響が指摘されているものがあることから、下水道を経由する化学物質等の環境インパクト低減を目的として下水処理プロセスにおけるこれら化学物質（医薬品類、LAS）、総毒性の挙動把握とリスクを低減するための制御技術の検討を行った。その結果、下水処理水中に残存する医薬品類の除去手法として微生物担体処理が有効であることが分かった。また、メダカの網羅的遺伝子発現解析による総毒性の評価から、流入下水がメダカに及ぼす影響は活性汚泥および担体処理によって低減でき、特に、生殖影響については担体処理で影響が残存しなくなることが示された。

キーワード：医薬品類、担体処理、メダカ、バイオアッセイ、遺伝子発現解析

1. はじめに

社会生活の中で身近に使用されている医薬品類や PRTR 対象物質（462 物質）については、環境分野や水道分野において実態調査が進められており、主要な排出源が下水道であることが明らかになりつつある。医薬品類には、クラリスロマイシン等の抗生物質の一部に生態影響が指摘されているものがある。また、PRTR では、人の健康や生態系に悪影響を及ぼすおそれがある物質（化管法第一種指定化学物質）を対象としている。医薬品類、PRTR 対象物質の一部の物質については、既往調査により下水処理場での挙動について明らかになっているものがあるが、多くの物質についての存在実態は不明である。下水道を経由する化学物質の環境インパクトを考えると調査未実施の多くの化学物質についての実態解明は急務であり、早期に下水道での実態を把握するとともに、処理水中に残存する物質については新たな制御手法の開発と併せて、リスクを低減するための制御技術の開発を行う必要がある。また、下水処理水中に残存する化学物質の中には、生物への悪影響が懸念される物質も含まれており、下水処理水の再利用先や放流先における水生生物への影響が懸念されている。魚類は、水生生物の代表種、かつ、資源生物であり、下水処理水の再利用先での生態影響評価の優先順位は高く、下水処理水の魚類生態影響の実態や下水処理工程での影響低減効果を明らかにしておく必要がある。

本研究は、①優先的に調査が必要な化学物質を選定し、その分析方法を提案する。②下水処理プロセスに

おける除去特性の把握と下水処理プロセスにおける総毒性の除去特性の把握を行う。③下水処理水中に残存する化学物質と総毒性の除去手法を提案することを目的とした。

2. 調査対象化学物質の選定

2.1 医薬品類

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

表-1 調査対象医薬品

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

2.2 PRTR 対象物質

PRTR 対象物質の中から、中央環境審議会水環境部会の水生生物保全環境基準専門委員会において「水生

生物の保全に係る水質環境基準」の項目追加について検討が行われていたノニルフェノール (NP) と直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) を選定した。NP は平成 24 年 8 月 22 日、LAS は平成 25 年 3 月 27 日に環境基準に追加された。

NP 類似物質の 4-t-オクチルフェノール (4-t-OP) は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 -EXTEND2010- (平成 22 年 7 月、環境省) ⁷⁾によれば、SPEED'98 における取組のなかでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察された物質である。環境省が行ってきた化学物質の生態影響試験結果 ⁸⁾によれば、NP はミジンコ急性遊泳阻害試験の 48h-EC50 が 0.059mg/L、繁殖阻害試験の 21day-NOEC が 0.089mg/L、魚類急性毒性試験の 96h-LC50 が 0.24mg/L と報告されている。また、4-t-OP については魚類急性毒性試験の 96h-LC50 が 0.36mg/L と報告されている。このように NP 及び 4-t-OP は水生生物に対し毒性を有することから水系リスクをもたらす物質と考えられることから本調査における調査対象物質とした。

また、アルキルフェノール(AP)は、界面活性剤のアルキルフェノールポリエトキシレート(APEO)が好気条件下で生物分解し、エトキシ鎖の短いアルキルフェノールエトキシレート (AP1EO、AP2EO) 又は、エトキシ鎖の短いアルキルフェノールエトキシ酢酸 (AP1EC、AP2EC)になり、嫌気条件下で生物分解を受け AP になる ⁹⁾。AP の調査においては前駆物質である APEO、APEC もあわせて調査することが重要となる。本調査では、アルキルフェノール類のうち、AP は NP と 4-t-OP、APEO はノニルフェノールエトキシレートのエトキシ基数が 1~15 の NP(1)EO~NP(15)EO、オクチルフェノールエトキシレートのエトキシ基数が 1~10 の OP(1)EO~OP(10)EO、アルキルフェノールエトキシ酢酸 (APEC) はノニルフェノールエトキシ酢酸のエトキシ基数が 0、1~9 の (NP(1)EC~NP(10)EC)、オクチルフェノールエトキシ酢酸のエトキシ基数が 0、1~2 の (OP(1)EC~OP(3)EC) を調査対象物質とした。

LAS は、ベンゼン環に直鎖のアルキル基 (-C_nH_{2n+1}) が結合した直鎖アルキルベンゼンにスルホ基 (-SO₃H) が結合した化合物である。このうち環境基準項目追加が検討されている LAS は、デシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C10)、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C11)、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C12)、トリデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C13)、テトラデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS-C14)の 5 物質である。本研

究において優先的に調査が必要な化学物質としてこれらの LAS (LAS-C10、LAS-C11、LAS-C12、LAS-C13、LAS-C14) 5 物質を選定し分析法の検討を行った。

3. 調査対象化学物質の分析方法

3.1 医薬品類

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

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

表-2 医薬品分析方法

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

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

トリクロサンの分析は、前処理 (抽出・精製) した後、試料濃度の算出は内部標準法で行った。各対象物質について、横軸に検量線溶液中の濃度、縦軸に対象物質面積値 / IIS 面積値比をとり、検量線 (直線近似式) を求めた。ここで、トリクロサンの IIS には、GC/MS カラム保持時間の近い、p-テルフェニル-d14 を用いた。この検量線に試料中の対象物質面積値 / IIS 面積値比

を代入して、バイアル中の濃度を算出後、最終液量及び試料量から試料中濃度を求めた。これを Label 化体の回収率によって補正した濃度を算出した。検量線の濃度範囲は試料ピーク面積値の大きさに合わせて適宜設定した。その際、濃度段階が4点以上となるようにした。試料量200mLで前処理した場合の検出下限値は、10.8ng/Lであった。

3. 2 PRTR 対象物質

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

NP、4-t-OPの分析は、ろ液とSSに分けて分析する方法とした。ろ液試料は、ジクロロメタンによる液-液抽出の後、5%含水シリカゲルを用いて不純物を除いたのちガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)計により定量した。SS試料は、アセトンを用いて超音波抽出を行った後精製水に溶解した。その後は、ろ液試料と同様の操作により定量した。

NPの検出下限値は25ng/Lであり、5試料について試験した分析操作BLは、29~75ng/Lであった。また、流入下水にNPを100ng添加して行った添加回収試験の結果、回収率は92%であった。4-t-OPの検出下限値は1.6ng/Lであり、5試料について試験した分析操作BLは<1.6~2.7ng/Lであった。また、流入下水に4-t-OPを15ng添加して行った添加回収試験の結果、回収率は76%であった。

LASの分析は、環境省の要調査項目等調査マニュアル¹²⁾の他、佐来ら²²⁾、Garciaら²³⁾の方法を参考とし、図-1に示す分析フローに従った。

各試料は、ガラス繊維ろ紙(1μm)でろ過を行い、ろ液とろ紙上残渣(SS)に分け、ろ液はそのまま固相カートリッジ(Oasis HLB)による抽出を行い、カートリッジからメタノールで溶出させたものを定容して抽出液とした。その抽出液の全量もしくは一部を分取して、必要に応じて精製(Oasis WAX)を行った後、濃縮・定容したものをLC/MS/MS測定溶液とした。

SSはメタノールによる超音波抽出液を定容して抽出液とした。その全量もしくは一部を分取して濃縮後、水で希釈し固相カートリッジ(Oasis HLB)に通液し、精製操作を行った。そのカートリッジからのメタノール溶出液を濃縮し、必要に応じて精製(Oasis WAX)を行い、濃縮・定容したものをLC/MS/MS測定溶液とした。検出下限値は、検量線作成用標準溶液の最低濃

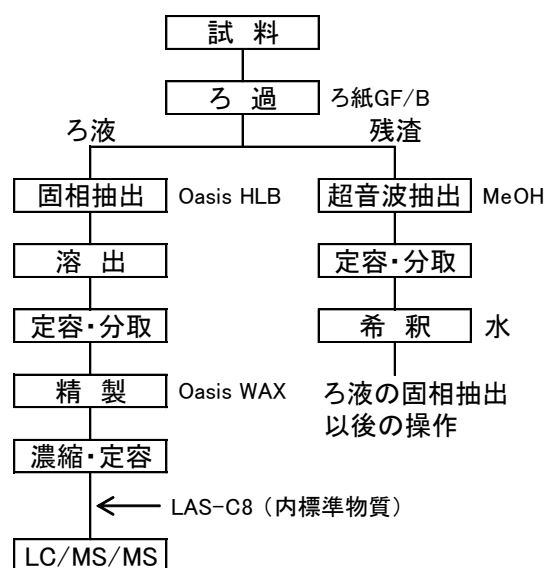


図-1 LAS 分析フロー

度を5回繰り返し測定し、得られた測定値の標準偏差の3倍を装置の検出下限値(IDL)、10倍を装置の定量下限値(IQL)とした。各LASのIDLは、ろ液試料では流入下水0.19~0.40μg/L、放流水0.001~0.002μg/L、汚泥0.004~0.008μg/Lであった。SS試料では流入下水0.38~0.80μg/g-dry、放流水1.9~4.0μg/g-dry、汚泥0.038~0.080μg/g-dryであった。また、流入下水と返送汚泥を用いて行った添加回収試験の結果、流入下水のろ液では81.6~91.2%、SSでは85.6~105%、返送汚泥のろ液では73.6~82.3%、SSでは88.7~100%であった。

4. 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

4. 1 医薬品類分析方法

調査対象とした医薬品類は、2.1のアジスロマイシン(AZM)、ベザフィブラート(BF)、カフェイン(CF)、クラリスロマイシン(CAM)、クロタミトン(CT)、イブプロフェン(IP)、ケトプロフェン(KP)、レボフロキサシン(LVFX)、スルファメトキサゾール(SMZ)、トリクロサン(TC)とし、3.1の方法に従った。

4. 2 調査方法

調査は、有効水深が約2mの最初沈殿池(0.5m³)、エアレーションタンク(0.5m³×4槽)、最終沈殿池(0.7m³)と塩素混和槽(0.1m³)、生污泥貯留槽(0.15m³)、余剰汚泥貯留槽(0.15m³)で構成される活性汚泥処理実験装置(図-2参照)を用いて行った。実下水処理場の流入下水をピットに受けた後、定量ポンプを用いて装置に導入した。

生污泥、余剰汚泥の引扱はタイマーコントロールに

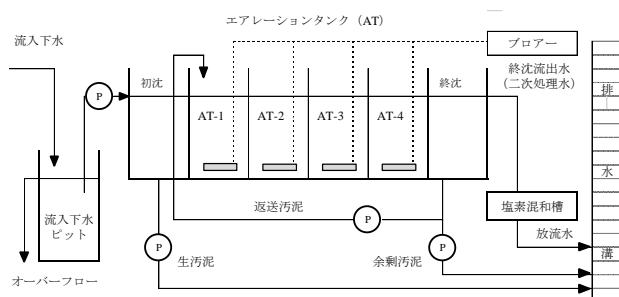


図-2 活性汚泥処理実験装置

よる間欠運転で行った。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液を定量ポンプにより塩素混和槽に注入した。本装置は、流入量 6.8m³/d、汚泥返送率約 38%、HRT 約 7 時間で運転した。

分析試料は、平成 26 年 2 月 5 日～6 日においてそれぞれ 2 時間間隔で採取した各試料を等量混合したコンボジット試料とした。採取箇所は、流入下水、初沈流出水、終沈流出水（二次処理水）、生汚泥、余剰汚泥の 5 箇所である。一般水質項目分析結果を表-3 に示す。本実験装置の BOD 除去率は 94% であり、本装置の処理水質は標準活性汚泥法の実下水処理場と同レベルであった。流入水中の NH₄-N、NO₂+NO₃-N の濃度は、それぞれ 20mg/L、0.05mg/L 以下であるのに対し、二次処理水では 0.47mg/L、18mg/L で十分に硝化が進行していた。また、エアレーションタンク混合液の MLSS、余剰汚泥引き抜き量より計算した SRT は約 13 日であった。

表-3 一般水質項目分析結果 (mg/L)

	BOD	DOC	NH ₄ -N	NO ₂ +NO ₃ -N	TN	TP	MLSS
流入水	150	35	20	<0.05	33	3.2	-
初沈流出水	140	37	21	<0.05	31	3.2	-
終沈流出水	9.1	7.8	0.47	18	20	1.6	-
生汚泥	-	-	-	-	-	-	2,300
余剰汚泥	-	-	-	-	-	-	3,600

4. 3 医薬品挙動調査結果

分析対象とした医薬品類 10 物質の測定結果を表-4 に示す。本調査における流入下水の医薬品濃度は、成宮ら²⁾の報告（中央値）とほぼ同程度かやや高い値を示した。

水処理プロセスの初沈での各医薬品濃度（溶存態+懸濁態）変化は、溶存態、懸濁態の双方とも検出された BF、CF、CAM、CT、KP、SMZ、TC の 7 物質についてみると、流入下水と初沈流出水の値はほぼ同じであり、滞留時間が 2 時間程度の初沈ではほとんど除去されていないことがわかる。また、生物処理反応槽

表-4 医薬品分析結果 (ng/L)

		本研究		既報値（中央値） ¹⁾	
		溶存態	懸濁態	溶存態	懸濁態
AZM	流入下水	310	-	279	26.7
	初沈流出水	360	-		
	二次処理水	270	-	40.3	
	生汚泥	320	-		
BF	流入下水	4,500	52	1,580	37.0
	初沈流出水	4,800	34		
	二次処理水	450	1.4	186	
	生汚泥	3,700	650		
CF	流入下水	46,000	280	37,900	
	初沈流出水	45,000	200		
	二次処理水	1,100	5.8	34.3	
	生汚泥	27,000	2900		
CAM	流入下水	1,600	37	1,530	114
	初沈流出水	1,700	29		
	二次処理水	1,400	17	528	
	生汚泥	1,800	850		
CT	流入下水	1,700	17	1,240	53.5
	初沈流出水	1,900	16		
	二次処理水	1,800	4.4	1,080	
	生汚泥	1,500	170		
IP	流入下水	1,300	-		
	初沈流出水	1,400	-		
	二次処理水	11	<0.068		
	生汚泥	790	-		
KP	流入下水	950	17	1,260	27.8
	初沈流出水	850	13		
	二次処理水	240	0.84	124	
	生汚泥	930	220		
LVFX	流入下水	1,600	-	451	240
	初沈流出水	1,500	-		
	二次処理水	400	-	66.0	
	生汚泥	3,500	-		
SMZ	流入下水	170	2.0	176	
	初沈流出水	200	1.8		
	二次処理水	49	<0.21	90.1	
	生汚泥	200	20		
TC	流入下水	340	1,300		
	初沈流出水	340	1,200		
	二次処理水	69	12		
	生汚泥	210	10,000		
	余剰汚泥	97	7,600		

注：-はSurrogate物質の回収率が低いため濃度計算せず。

のエアレーションタンクを経た二次処理水での除去率を計算すると BF、CF、KP、SMZ、TC の 5 物質は、70% 以上であり活性汚泥処理で一定の除去が行われていた。CAM の除去率は約 13% で、活性汚泥処理による除去率は小さく、CT は流入水濃度より高い値を示した。

また、これら 7 物質について各試料の負荷量を算出し、成宮らの定義²⁾により全処理過程除去率 R_{all} 、初沈汚泥移行率 T_{raw} 、余剰汚泥移行率 T_{exc} 、生物処理消滅率 D を求めた。各医薬品の R_{all} 、 T_{raw} 、 T_{exc} 、 D を表-5 に示す。

表-5 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品の除去

	R_{all}	T_{raw}	T_{exc}	D
BF	90.3	1.6	0.02	88.7
CF	97.7	1.1	0.01	96.6
CAM	15.7	2.7	1.3	11.8
CT	-2.3	1.6	1.0	-4.9
KP	75.8	2.0	0.2	73.6
SMZ	72.3	2.1	0.6	69.6
TC	95.2	10.4	4.7	80.1

BF、CF、TCは、 R_{all} が90%を超え活性汚泥処理により大きく除去された。除去の内訳をみるとBF、CFの T_{raw} 、 T_{exc} は2%以下と小さく汚泥引抜きによる除去が主要な除去機構ではないことが示され、 D が大きいことから生分解が主要な除去機構であることが示唆された。TCは、BF、CFと異なり T_{raw} が約10%、 T_{exc} が約5%と汚泥引抜きによる除去が15%程度あることがわかった。

CAMは R_{all} が約16%と低く活性汚泥処理による除去が困難な物質であることがわかった。また、CTは R_{all} がマイナスとなり、活性汚泥処理後に負荷量が増加する結果となった。これは、分析のバラツキが一つの原因と考えられる。

汚泥引抜きによる除去機構の理解を深めるため、溶存態と懸濁態の間での固-液分配係数²⁾ K_d (L/kg) を算出した。常用対数値 ($\text{Log}_{10}K_d$) として表-6に示す。

$$K_d = C_s / C_w$$

ここで、 C_w : 溶存態の濃度 (ng/L)

C_s : 懸濁態中の濃度 (ng/kg·dry)

分配係数の算出にあたり、生汚泥、余剰汚泥の医薬品濃度は、溶存態と懸濁態の間で平衡状態に達していると仮定した。本調査により求めた $\text{Log}K_d$ の値は、成宮ら¹⁾の報告値とほぼ同程度であった。

また、 $\text{Log}K_d$ と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係を図-3に示す。生汚泥では $\text{Log}K_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる

表-6 固-液分配係数 ($\text{Log}K_d$)

	本研究		既報値 ¹⁾	
	生汚泥	余剰汚泥	生汚泥	余剰汚泥
BF	1.9	2.3	1.8	2.3
CF	1.7	2.6	1.2	2.7
CAM	2.3	2.6	2	2.3
CT	1.7	1.7	1.9	1.8
KP	2.0	2.3	1.8	2.3
SMZ	1.6	1.8	1.6	1.7
TC	4.3	4.3	3.3	

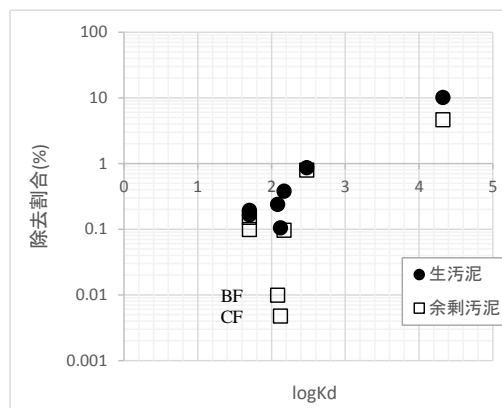


図-3 $\text{Log}K_d$ と引抜き汚泥中の懸濁態として除去される割合の関係

傾向が見られた。余剰汚泥では、BF、CFを除く5物質については生汚泥同様 $\text{Log}K_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向が見られた。

5. 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の下水処理における除去特性

5.1 調査方法

調査は、前述の活性汚泥処理実験装置 (図-2) を用いて行った。実下水処理場の流入水をピットに受けた後、定量ポンプを用いて装置に導入した。生汚泥、余剰汚泥の引抜きはタイマーコントロールによる間欠運転で行った。また、次亜塩素酸ナトリウム溶液を定量ポンプにより塩素混和槽に注入した。

分析試料の採取は、実験装置の運転開始から約4ヶ月が経過した平成25年2月に行った。2時間間隔で採取した各試料を等量混合し分析試料とした。LASは前述した方法により分析した。本装置は、流入量 $6\text{m}^3/\text{d}$ 、汚泥返送率約30%、HRT約8時間、SRT約16日で運転した。下水試験方法²⁴⁾に従い分析した一般水質項目の分析結果 (実験装置の運転管理状況) を表-7に示す。二次処理水のBOD、COD、SS濃度はそれぞれ 5.6mg/L 、 9.4mg/L 、 5.7mg/L で、これらの除去率は96%、87%、96%であった。これらの値は、標準活性汚泥法の実下水処理場と同等であり、本装置の処理水質は実際の下水処理場と同レベルであった。

5.2 調査結果

分析対象としたLASの各水処理工程及び汚泥の濃度を図-4に示す。流入下水の各LAS濃度 (C10、C11、C12、C13、C14) は、 $230\mu\text{g/L}$ 、 $840\mu\text{g/L}$ 、 $610\mu\text{g/L}$ 、 $420\mu\text{g/L}$ 、 $1.7\mu\text{g/L}$ の合計約 $2,100\mu\text{g/L}$ であった。初沈流出水の各LAS濃度は、 $230\mu\text{g/L}$ 、 $840\mu\text{g/L}$ 、 $640\mu\text{g/L}$ 、 $330\mu\text{g/L}$ 、 $2.1\mu\text{g/L}$ の合計約 $2,040\mu\text{g/L}$ で流入下水とほぼ同じ値であり、約2時間の沈殿処理では除去されな

表-7 活性汚泥処理実験装置の運転管理状況

	流入下水	初沈流出水	エアタン(AT4)	二次処理水	放流水
水温 [°C]	19.6 (14.4-25.6)	19.2 (15.2-26.2)	18.2 (13.4-26.8)	18.0 (12.9-26.8)	17.8 (12.7-26.8)
pH [-]	6.8-7.3	6.7-7.2	6.4-6.7	6.4-7.0	6.4-6.9
BOD [mg/L]	150 (87-240)	94 (79-130)	-	5.6 (1.8-9.7)	3.4 (1.3-8.9)
COD [mg/L]	75 (40-100)	45 (34-63)	-	9.4 (6.4-13)	9.4 (7.1-12)
DOC [mg/L]	34 (26-52)	31 (25-46)	-	6.6 (5.6-7.8)	6.5 (5.4-8.0)
SS・MLSS [mg/L]	140 (82-250)	70 (54-110)	2,000 (1,590-2,400)	5.7 (2.0-19)	4.5 (1.9-7.6)
残留塩素(Total) [mg/L]	-	-	-	-	0.45 (0.15-0.69)

上段: 平均値, 下段: 範囲

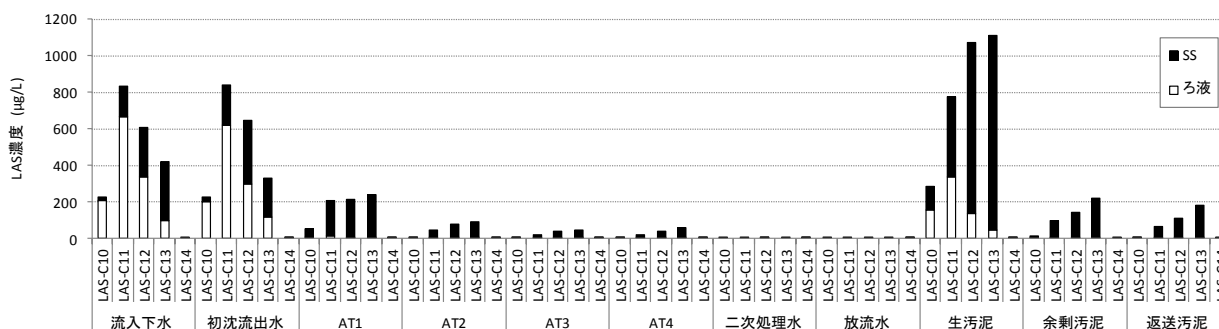


図-4 各水処理工程のLAS分析結果

() 内の数値は各LAS (C10,C11,C12,C13,C14) 濃度の合計

いことがわかった。また、流入下水と初沈流出水の各LASの濃度比もほぼ同じであることから殆ど分解していないものと考えられる。AT内の各LAS濃度は、AT1では52µg/L、210µg/L、210µg/L、240µg/L、1.7µg/Lの合計約710µg/Lとなり、初沈流出水の濃度に対し大きく減少していた。AT2では、7.8µg/L、51µg/L、80µg/L、94µg/L、0.3µg/Lの合計約230µg/L、AT3では、3.5µg/L、22µg/L、39µg/L、48µg/L、0.3µg/Lの合計約110µg/L、AT4では、3.4µg/L、22µg/L、38µg/L、62µg/L、0.5µg/Lの合計約130µg/Lとなった。

LASはバッキ時間約2時間のAT1内において大きく減少し、流入下水、初沈流出水の濃度の1/20以下となった。二次処理水の各LAS濃度は、0.1µg/L、0.1µg/L、0.1µg/L、0.1µg/L、NDの合計約0.4µg/Lであった。放流水の各LAS濃度は、0.1µg/L、0.1µg/L、0.1µg/L、0.05µg/L、NDの合計約0.4µg/Lで二次処理水とほぼ同じ値であり、滞留時間が約30分の塩素混和槽内では殆ど変化しないことがわかった。また、生污泥の各LAS濃度は、290µg/L、780µg/L、1,070µg/L、1,150µg/L、12µg/Lの合計約3,300µg/Lで流入下水、初沈流出水の濃度に近い値であった。余剰污泥の各LAS濃度は、

16µg/L、96µg/L、150µg/L、220µg/L、1.6µg/Lの合計約480µg/Lであった。返送污泥の各LAS濃度は、10µg/L、67µg/L、110µg/L、180µg/L、1.4µg/Lの合計約370µg/Lで余剰污泥とほぼ同じ値であった。

次に、活性汚泥処理プロセスにおけるLAS負荷量の挙動を図-5に示す。また、流入水中のLAS(ろ液+SS)負荷量を100%とした各処理工程、各污泥における負荷割合を括弧内に示した。流入水と初沈流出水のLAS負荷量は、ほぼ同じ値であり、最初沈殿池におけるLASの除去はみられないが、AT1で49%、AT2で16%、AT3で8%、AT4で9%と処理が進むに従い大きく減少した。

二次処理水、放流水では0.01%、0.01%となり活性汚泥処理により99%以上が除去されることがわかった。活性汚泥処理におけるLAS負荷量の挙動より、流入負荷量に対する排出負荷量(放流水、生污泥、余剰污泥)の合計は2.6%であった。残りの97.4%は活性汚泥処理により分解・除去されたものと考えられる。

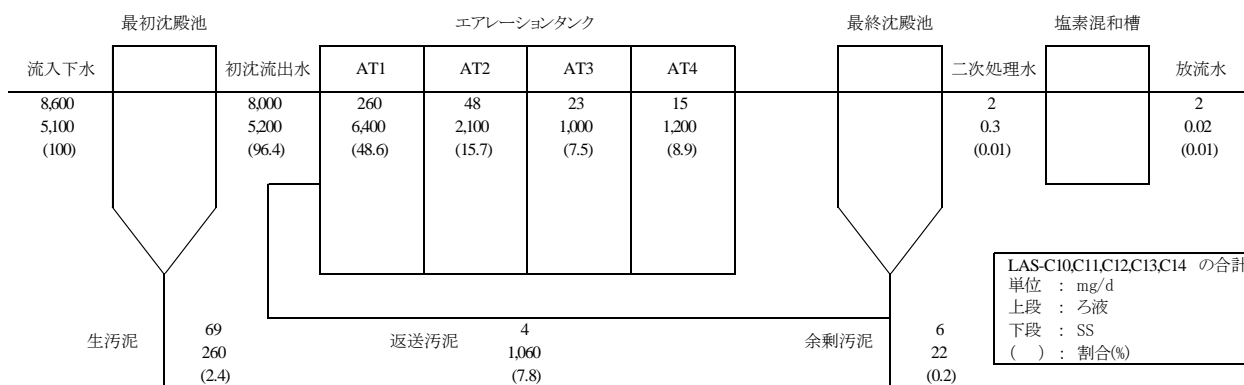


図-5 活性汚泥処理プロセスにおける LAS 負荷量の挙動

6. 活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける医薬品類の除去特性

6.1 調査方法

調査は、有効水深が約 2m の最初沈殿池(0.5m³)、エアレーションタンク(0.5m³×4 槽)、最終沈殿池(0.7m³)で構成される活性汚泥処理実験装置と微生物保持担体を添加した反応槽(10L×4 槽)の担体処理実験装置を用いて行った(図-6 参照)。実下水処理場の流入下水を定量ポンプを用いて活性汚泥処理実験装置に導入した。生汚泥、余剰汚泥の引扱はタイマーコントロールによる間欠運転で行った。活性汚泥処理実験装置は、流入下水量 6.8m³/d、汚泥返送率約 38%、エアレーションタンク HRT 約 7 時間で運転した。担体処理実験装置は担体を高比率 35%で添加、反応槽は担体が浮遊するよう機械攪拌し、担体表面に自然発生的に付着した生物膜により高度処理した。担体処理実験装置の各反応槽の HRT は約 30 分であり、担体処理水④では約 2 時間の HRT となる。

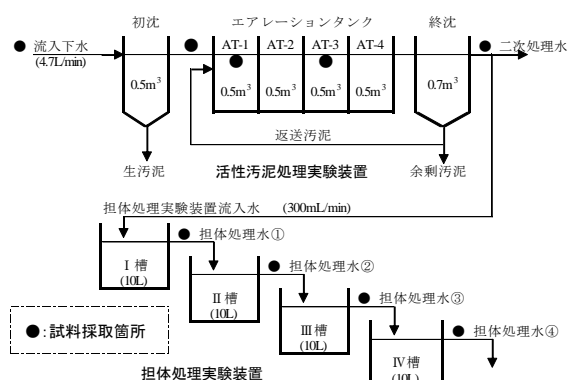


図-6 実験装置の概要と試料採取箇所

分析試料は、運転開始から 2 ヶ月以上経過した後に、流入下水、初沈流出水、AT-1 混合液、AT-3 混合液、終沈流出水(二次処理水)、担体処理水①~④を 2 時間間隔で採取し、それぞれ採取した各試料を等量混合したコンポジット試料とした。

調査対象医薬品類は、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ケトプロフェン、トリクロサンの 4 物質とした。これら 4 物質は下水処理水に残存し、藻類生長阻害⁴⁾²⁵⁾又はミジンコ繁殖阻害⁸⁾があることが報告されている物質である。

クラリスロマイシン、アジスロマイシン、ケトプロフェンは、ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過したろ液を Oasis HLB を用い固相抽出した後、LC-MS/MS により分析¹⁰⁾した。また、トリクロサンの分析は、ガラス繊維ろ紙(GF/B)でろ過したろ液を Oasis HLB を用い固相抽出した後、アセチル誘導体化し GC-MS により分析¹¹⁾した。

6.2 調査結果

一般水質項目分析結果を表-8 に示す。本実験装置の BOD 除去率は 94%であり、本装置の処理水質は標準活性汚泥法の実下水処理場と同レベルであった。流入下水中の NH₄-N、NO_x-N の濃度は、それぞれ 20mg/L、0.05mg/L 以下であるのに対し、二次処理水では 0.47mg/L、18mg/L で十分に硝化が進行していた。また、エアレーションタンク混合液の MLSS、余剰汚泥引き抜き量より計算した SRT は約 13 日であった。

活性汚泥処理実験装置及び担体処理実験装置の各処理プロセスにおける医薬品類 4 物質の分析結果を図-7 に示す。流入下水のクラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)、ケトプロフェン(KP)、トリクロ

表-8 一般水質項目分析結果

	流入水	初沈流出水	二次処理水	担体処理水④
BOD (mg/L)	150	140	9.1	-
DOC (mg/L)	35	37	7.8	6.4
NH ₄ -N (mg/L)	20	21	0.47	0.04
NOx-N (mg/L)	<0.05	<0.05	18	19
TN (mg/L)	33	31	20	20
TP (mg/L)	3.2	3.2	1.6	1.6
水温 (°C)	16.8	16.4	14.9	13.4

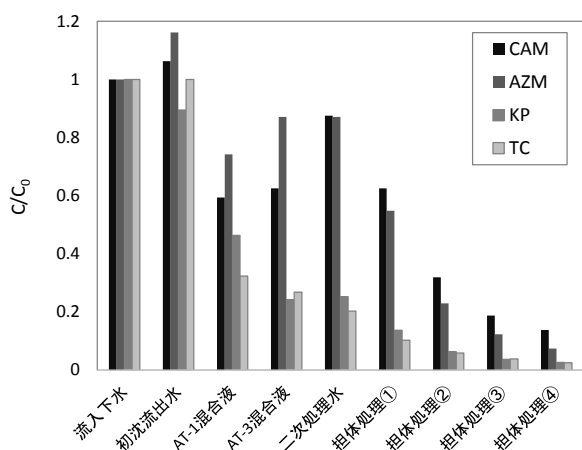


図-7 医薬品類分析結果

サン(TC)の濃度は、それぞれ 1,600ng/L、310ng/L、950ng/L、340ng/L であった。図-2 は、流入下水の医薬品類濃度を C₀、各プロセスの医薬品類濃度を C とし、C/C₀ で示した。CAM、AZM は、初沈流出水で流入下水に比べ約 10% 高い値を示したが、エアレーションタンク内で減少し、二次処理水ではそれぞれ 1,400ng/L、270ng/L となり流入下水の 0.88、0.87 の値を示した。本調査における活性汚泥処理による除去率は、それぞれ 12%、13% である。KP は、初沈流出水で流入下水の 0.89 を示し、エアレーションタンク内で大きく減少し、二次処理水では 240ng/L となり流入下水の 0.25 となった。TC は、初沈流出水では流入下水とほぼ同じ値を示し、エアレーションタンク内で大きく減少し、二次処理水では 69ng/L となり流入下水の 0.2 となった。KP、TC の活性汚泥処理による除去率は、それぞれ 75%、80% である。

担体処置実験装置での医薬品の減少は、各物質とも処理が進むにつれ減少し、担体処理水④では二次処理水（担体処理実験装置流入水）の 1/5 以下となった。担体処理における医薬品類除去率は、合計 HRT が約 2 時間の担体処理水④では、CAM が 84%、AZM が 91%、KP が 90%、TC が 88% であった。CAM、AZM は、活性汚泥処理での除去率（12%、13%）に比べ大きな

除去率を示し、担体処理水④の濃度は 220ng/L、23ng/L であった。KP、TC は、活性汚泥処理における除去率が 75%、80% であり、活性汚泥処理により比較的除去され易い物質ではあるが、流入下水の 20~25% は二次処理水に残存している。これら二次処理水に残存する KP、TC は担体処理により更に除去することができ、担体処理水④の濃度は 25ng/L、8.5ng/L となった。また、担体処理における医薬品類除去は、DOC 除去率 18% に比べ大きな値を示したことから、二次処理水に残存する溶存有機物の中でも比較的除去され易い物質といえる。

7. 下水処理過程における総毒性の除去特性評価

下水処理および追加処理過程での総毒性の低減効果を明らかにするため、下水処理工程水に曝露したメダカの網羅的遺伝子発現解析から総毒性の低減効果の評価を行った。

7. 1 実験方法

7. 1. 1 下水処理実験装置

図-8 に調査に使用した下水処理実験装置の概要を示す。実験装置は、最初沈殿池(0.5m³)、エアレーションタンク(0.5m³×4槽)、最終沈殿池(0.7m³)で構成される活性汚泥処理実験装置の後段に、砂ろ過および担体処理装置を組み合わせたものである。担体処理装置の反応槽は 1 槽とし、微生物が自然発生的に保持されたポリプロピレン製円筒担体(φ 5mm、長さ 5mm、厚さ 1mm)が充填され、水理的滞留時間 2 時間で砂ろ過水を処理した。メダカの曝露水は、流入下水、砂ろ過水、担体処理水とし、対照区は水道水を活性炭処理した脱塩素水道水とした。採水時期は、2014 年 11 月 5~6 日で、24 時間連続採水とした。メダカの曝露水の水質分析は、DOC、NH₄-N、NO₂-N、NO₃-N 濃度とした。

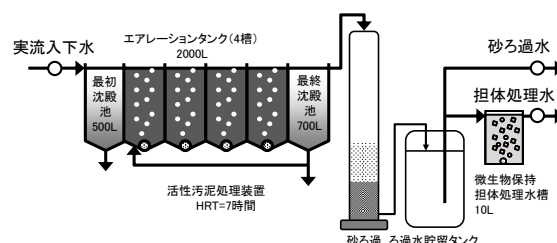


図-8 下水処理実験装置

7. 1. 2 メダカ曝露実験と網羅的遺伝子解析

メダカの曝露実験と遺伝子発現解析は、表-9 の方法で行った。曝露方式は半止水式、曝露時間は 96 時間とし、曝露終了後にメダカを 1 匹ずつ解剖し、肝臓、鰓、

表-9 メダカ曝露実験と遺伝子発現解析の方法

試験魚	d-rR系 ヒメダカ(6~7カ月齢)
曝露匹数	雄メダカ 10匹 / 曝露区 雌メダカ 10匹 / 曝露区
曝露時間	96時間
曝露水量	5L
曝露方式	半止水式(1日1回全換水)
試験水	流入下水 砂ろ過水 担体処理水 脱塩素水道水(対照区)
設定水温	24℃
照明	明期16時間/暗期8時間
給餌	なし
曝気	DOが低い試料は緩やかに曝気 飽和溶解酸素濃度の50%以上を確保
解析臓器	肝臓、鰓、脳
RNA抽出法	RNeasy mini kitにより1個体毎に抽出
RNA試料の調整	同曝露区の10匹分を1つに混合
遺伝子発現解析法	次世代シーケンサー Miseq(v3 150cycle)
cDNAライブラリ調製試薬	Truseq Stranded mRNA Sample Prep Kit

脳を摘出した。RNAは、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、同曝露区の10匹分の一部を混合して1曝露区1臓器につき1検体とした。そして、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina) でcDNAライブラリを調製し、次世代シーケンサー Miseq (Illumina) を用い、ペアエンドリード (v3 試薬、75bp×2) で塩基配列を取得した。

7. 1. 3 データ解析

データ解析は、セルイノベーション (国立遺伝学研究所データ解析拠点) ²⁶⁾ を利用した。塩基配列が記載されたFASTQファイルをアップロードし、全てのリードについて、Sickleを用いてQualityスコア20を閾値としてトリミングした。その後、肝臓、鰓、脳の3グループに分けてTophat-Cufflinks解析パイプラインによる解析を実行し、メダカゲノム上の遺伝子の位置と構造を推定し、遺伝子発現量を計算した。

遺伝子発現量は、シーケンスされたcDNA断片の総量と遺伝子の長さの両方で補正した値である、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped) で表した。同じゲノム領域に複数のIsoformが確認された場合は、それらのFPKMの和を求め、ゲノム上の1領域につき1遺伝子となるようにした。FPKM = 0となる遺伝子があったことから、遺伝子発現倍率は、対照区と曝露区のそれぞれの (FPKM+1) の比 ²⁷⁾ とした。そして、各曝露区で、対照区と比較して発現倍率が3倍以上、または1/3以下になった遺伝子を、その曝露区の発現変動遺伝子とした。

推定された各遺伝子の名称や機能情報を得るため、メダカのRefseq mRNA ²⁸⁾ 配列に対して相同性検索 (Blastn) 検索を行い、GeneSymbolを付与した。NCBIのメダカの遺伝子データベースからは機能情報

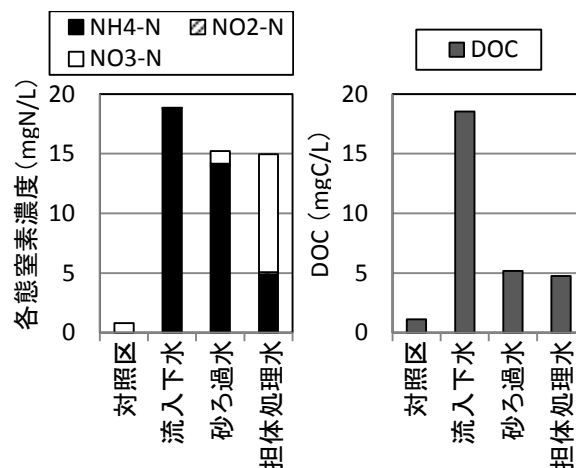


図-9 試験水のNH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、DOC濃度

は十分には得られなかったため、遺伝子の機能は、Uniprot-GOAに登録されている、ヒトのGene Ontology (GO) データベース ²⁹⁾ を利用した。始めに、各遺伝子の塩基配列を用い、ヒトのリファレンスシーケンス (Refseq Protein ²⁸⁾) に対して相同性検索 (Blastx) を行った。そして、それぞれの遺伝子と最も相同性が高いヒトのRefseq IDに対応したGOを、その遺伝子の機能とした。

遺伝子の機能の統計解析には、統計解析環境 R 3.2.0 および Excel を使用した。各曝露区の発現変動遺伝子について、特定の機能に關与する遺伝子が有意に多く含まれているか否かを Fisher の正確確率検定で検定した。遺伝子機能は大きく Biological Process、Molecular Function、Cellular Component の3種に区分されているが、このうち Biological Process 関連と Molecular Function 関連の機能を対象とした。

7. 2 実験結果

7. 2. 1 水質分析結果

図-9は、試験水のNH₄-N、NO₂-N、NO₃-N、DOC濃度である。活性汚泥処理で硝化が抑制されていたため、砂ろ過水のNH₄-N濃度が高くなっていた。流入下水、砂ろ過水、担体処理水のNH₄-N濃度は18.8、14.0、4.9mgN/Lであった。NO₂-N濃度は、担体処理水の0.17mgN/Lが最大で、溶存態窒素濃度に占める割合は低かった。DOC濃度は、活性汚泥処理で72%低下したが、担体処理ではさらなる低下はみられなかった。

7. 2. 2 遺伝子発現解析結果

Miseqから出力されたリードペア数は、1サンプルあたり1,341万~1,902万本であった。メダカゲノム

表-10 臓器別の検出された遺伝子数

	検出した遺伝子の総数	メダカまたはヒトのRefseqが対応した数および割合	ヒトのBiological ProcessのGOが付与された数および割合
肝臓	18,100	15,590 (86.1%)	11,676 (64.5%)
鰓	25,051	20,944 (83.6%)	15,227 (60.8%)
脳	25,389	21,361 (84.1%)	15,847 (62.4%)

にマッピングされたリードペアの割合は約 87%であった。

表-10 は、臓器別の、検出された遺伝子数の比較である。メダカゲノム上で 1 領域につき 1 遺伝子として集計したところ、肝臓では約 1 万 8 千個、他の臓器では約 2 万 5 千個の遺伝子が得られた。相同性検索からは、8 割以上の遺伝子に、メダカの Refseq mRNA またはヒトの Refseq Protein が対応した。ヒトの Biological Process の GO が付与された遺伝子の割合は約 6 割であった。

図-10 は、雄メダカの、各臓器における、対照区に対する曝露区の発現変動遺伝子数である。雄メダカの発現変動遺伝子数は、肝臓では、流入下水、砂ろ過水、担体処理水曝露区の順に減少した。鰓では、流入下水曝露区で多く、砂ろ過水曝露区で流入下水曝露区の半分以下に減少し、担体処理水曝露区は砂ろ過水曝露区と同程度であった。脳は、鰓と同様に流入下水曝露区で多く、砂ろ過水と担体処理水曝露区で少なかった。

図-11 は、雌メダカの発現変動遺伝子数である。雌メダカの発現変動遺伝子数は、肝臓、鰓、脳のいずれも雄メダカに似た変化を示した。担体処理水曝露区の雌メダカの鰓と脳の発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区と比較して減少していた。

生物影響の種類を把握するため、各曝露区について、発現変動遺伝子の中に特定の機能 (GO) を有する遺伝子が多く含まれているか否かを検定した。流入下水曝露区で $p < 0.01$ で有意となった GO は、GO の階層構造における 2 階層目の GO を基に、生殖 (reproduction, reproductive process)、発達 (developmental process)、代謝 (metabolic process)、応答 (response to stimulus)、免疫 (immune system process)、結合作用 (binding)、触媒作用 (catalytic activity)、その他に分類した。そして、発現変動遺伝子の個数から、処理過程での生物影響低減効果を調べた。

図-12a は雄の肝臓の解析結果であり、Biological Process の GO を有し、かつ、各曝露区で発現変動を示した遺伝子の個数である。図-12b は Molecular

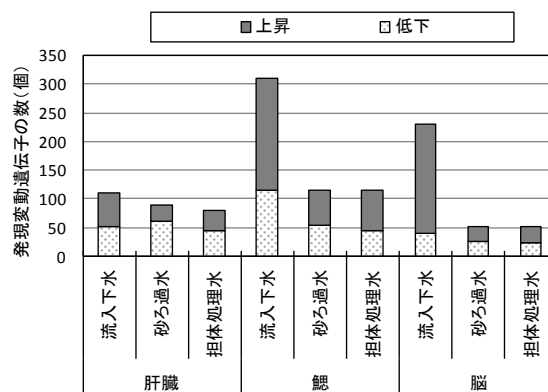


図-10 対照区雄メダカに対する曝露区雄メダカの発現変動遺伝子数

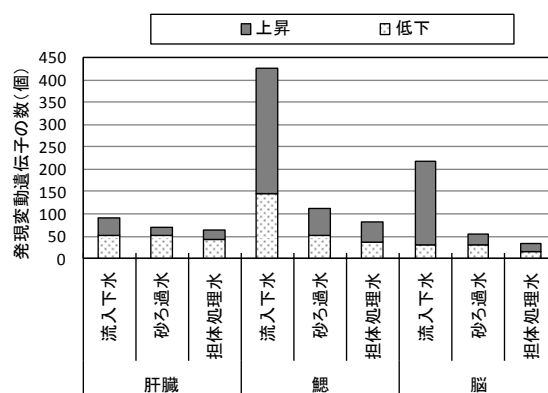


図-11 対照区雌メダカに対する曝露区雌メダカの発現変動遺伝子数

Function の結果である。流入下水曝露区では、Biological Process の GO が 28 種類有意となった。生殖に関連する機能は 2 つあり、その発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区で減少し、担体処理水曝露区では変動しなくなっていた。個別の遺伝子で見ると、流入下水曝露区では、内分泌かく乱影響のマーカー遺伝子として知られる vitellogenin I や choriogeninH の発現量が上昇していた。遺伝子機能の解析からも、流入下水が生殖関連の遺伝子発現に及ぼす内分泌かく乱影響は、活性汚泥および担体処理で低減することが確認できた。

流入下水曝露区では、発達関連の機能に関する遺伝子発現に変動がみられたが、砂ろ過水および担体処理水曝露区では変動はみられなかった。代謝関連の機能に関する遺伝子の中で、流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が最も多かった機能は、酸化還元プロセス (oxidation reduction process) であり、砂ろ過水、担

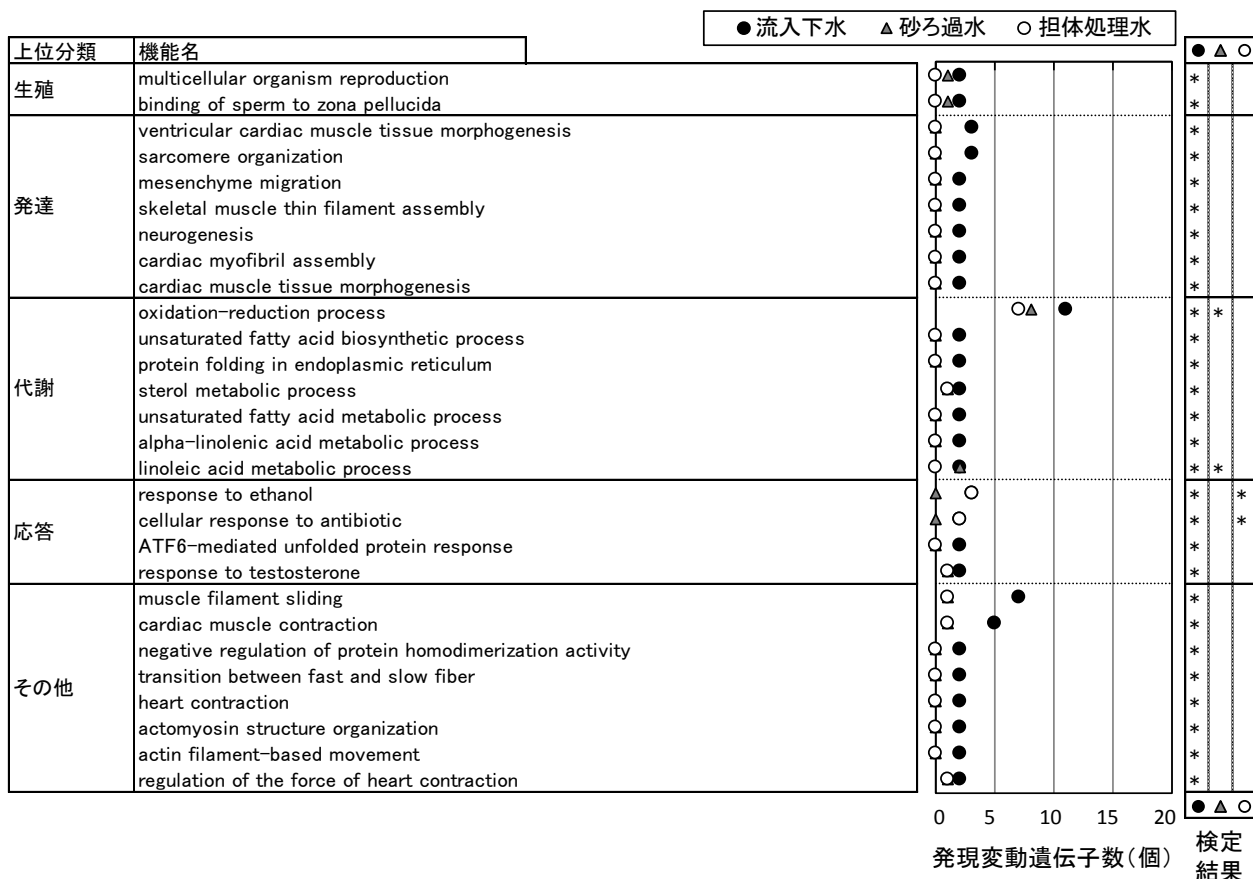


図-12a Biological Process 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

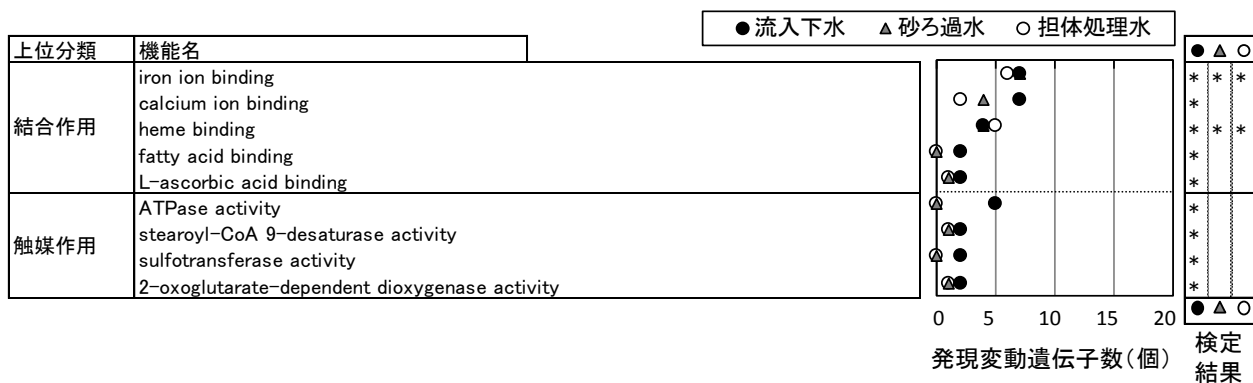


図-12b Molecular Function 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-12 雄メダカ肝臓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

体処理水曝露区では発現変動遺伝子数が減少したものの、発現変動遺伝子数は0にはならなかった。

代謝関連の他の機能も処理過程を経ることで発現変動遺伝子数が減少した。応答関連の機能に関する遺伝子のうち、性ホルモンであるテストステロンへの応答 (response to testosterone) に関する遺伝子は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。その他の機能としては、筋繊維の滑り運動 (muscle filament sliding) に関連する遺伝子が、流入下水曝露区で多く

変動していたが、砂ろ過水曝露区で減少した。

Molecular Function では、流入下水曝露区で9つの機能が有意となった。流入下水曝露区で発現変動遺伝子が多かった機能は鉄イオンとの結合 (iron ion binding) およびカルシウムイオンとの結合 (calcium ion binding) であった。カルシウムイオンとの結合に関連した発現変動遺伝子の個数は、処理過程で減少した。触媒作用ではATPase活性 (ATPase activity) に関連した遺伝子が多く、これも砂ろ過水曝露区で減少

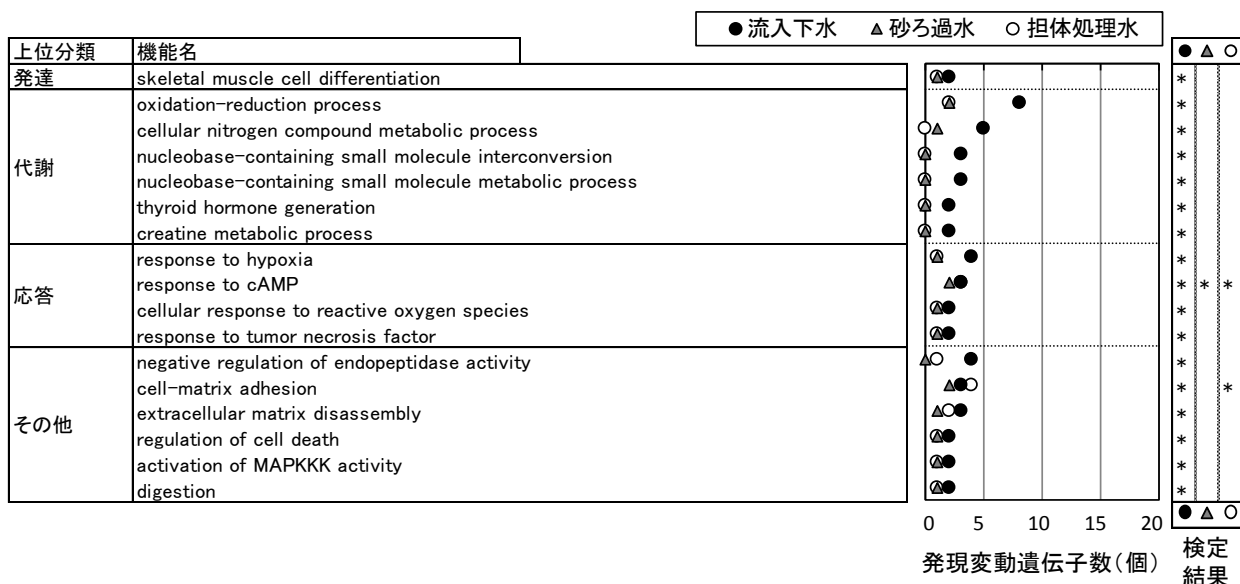


図-13a Biological Process 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

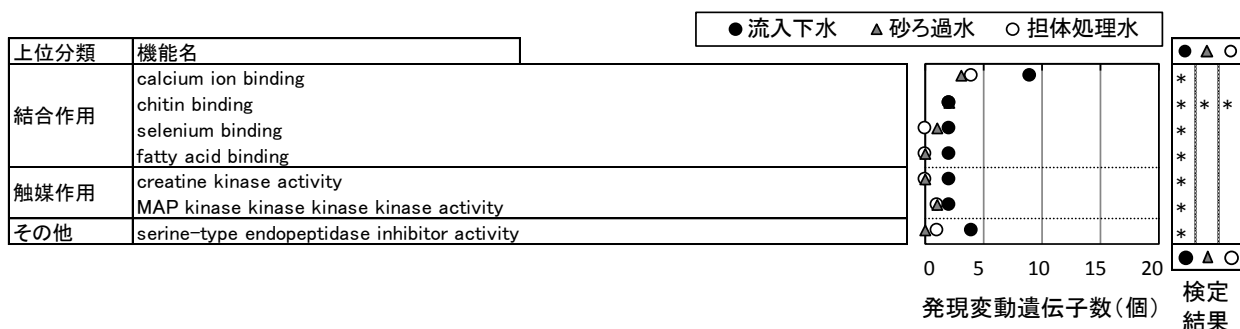


図-13b Molecular Function 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-13 雌メダカ肝臓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

した。

図-13a, 13b は雌メダカの肝臓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で p<0.01 であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process で 17 機能が有意となった。流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が多かった上位 2 機能は、酸化還元プロセスと窒素化合物の細胞での代謝 (cellular nitrogen compound metabolic process) であった。代謝関連の 6 機能のいずれも、発現変動遺伝子数は砂ろ過水、担体処理水曝露区で減少した。流入下水曝露区では、応答関連のうち活性酸素種への細胞応答 (cellular response to reactive oxygen species) 遺伝子に変動がみられたが、砂ろ過水曝露区と担体処理水曝露区では変動はみられなかった。Molecular Function では、流入下水曝露区で 7 機能が有意となった。このうちカルシウムイオンとの結合など 6 機能は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺

伝子数が減少した。

図-14a, 14b は雄メダカの鰓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で p<0.01 であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process で 47 機能が有意となった。発現変動遺伝子数が最も多かった機能は、小分子の代謝 (small molecule metabolic process) で、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。代謝関連の他の機能についても、概ね砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少していた。

生体外物質の代謝 (xenobiotic metabolic process) は、代謝と応答の両方に属する機能であり、薬物代謝酵素 CYP1A などを含む。この機能は、流入下水曝露区で 7 個の遺伝子が発現変動したが、担体処理水曝露区で 2 個に減少した。

応答関連は流入下水曝露区で 8 つの機能が発現変動を示したが、砂ろ過水曝露区ではその内 4 つの機能で

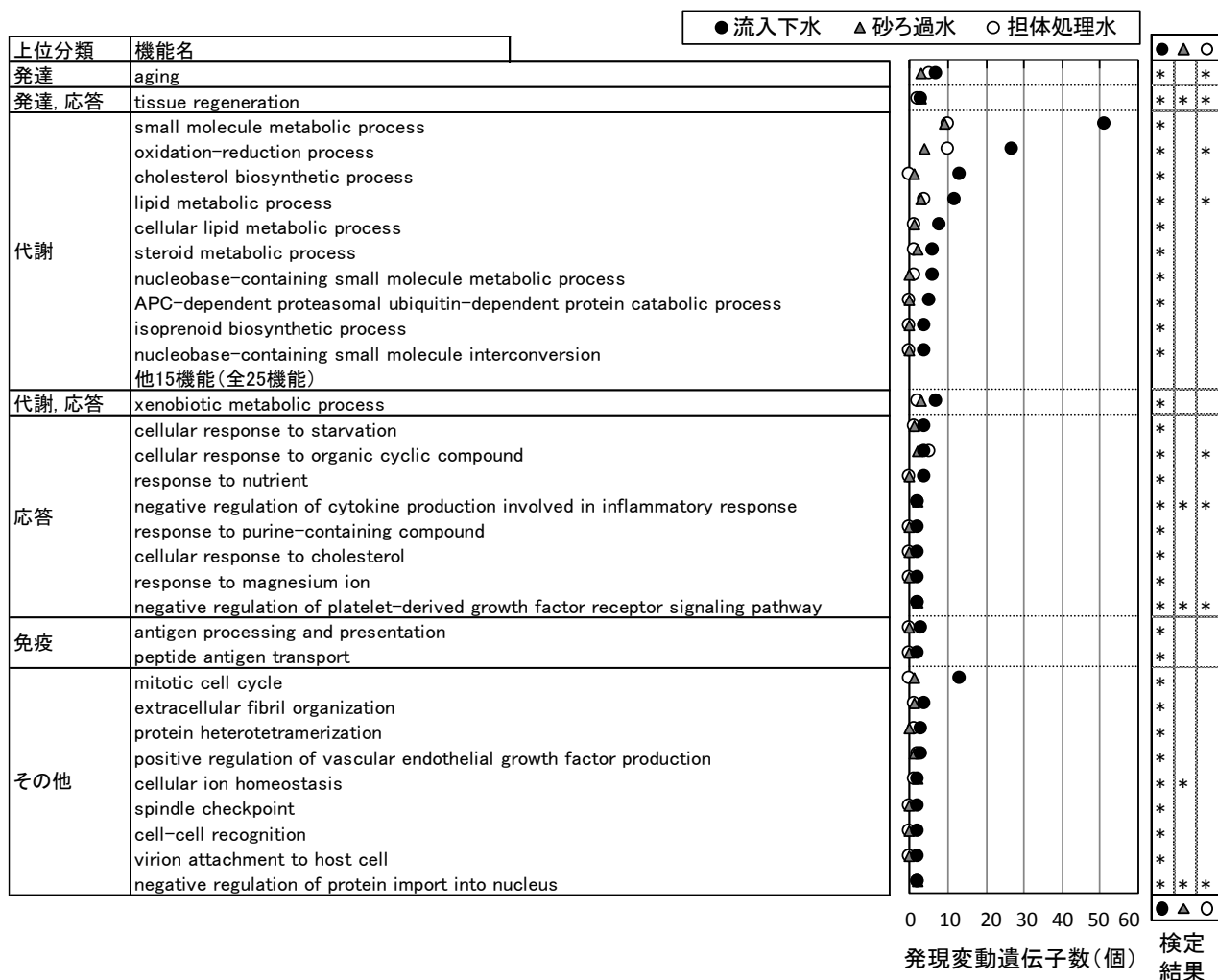


図-14a Biological Process 検定結果の*は、Fisher の検定で $p < 0.01$

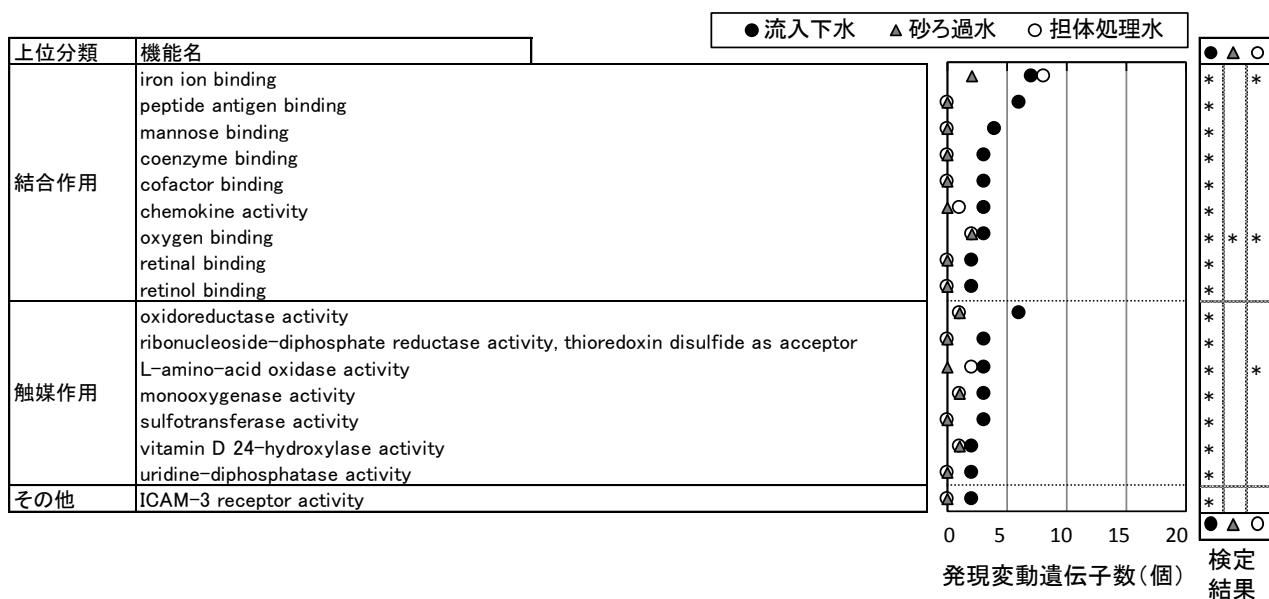


図-14b Molecular Function 検定結果の*は、Fisher の検定で $p < 0.01$

図-14 雄メダカ鰓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

発現変動遺伝子数が 0 個になった。免疫関連の遺伝子も、砂ろ過水曝露区で発現変動がみられなくなった。その他に区分した機能では、有糸分裂サイクル (mitotic cell cycle) 関連の遺伝子が 11 個変動したが、砂ろ過水、担体処理水曝露区で 1 個以下に減少した。

Molecular Function では、17 機能が有意となった。このうち、結合作用 6 機能、触媒作用 3 機能、その他

1 機能は、砂ろ過水と担体処理水曝露区で発現変動遺伝子数が 0 個になった。

図-15a, 15b は雌メダカの鰓の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GOのうち、流入下水曝露区で $p < 0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では、Biological Process の 56 機能が有意であった。発達に関連した機能は 5 つあり、

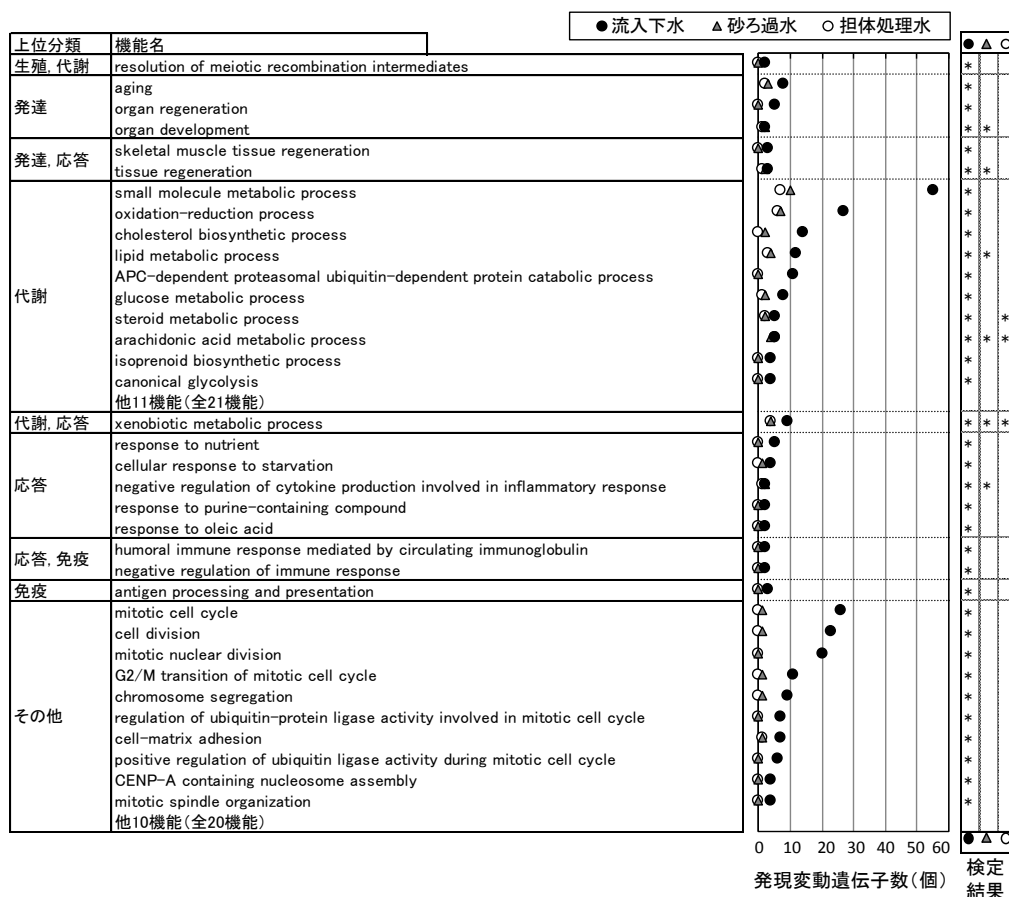


図-15a Biological Process 検定結果の*は、Fisherの検定で $p < 0.01$

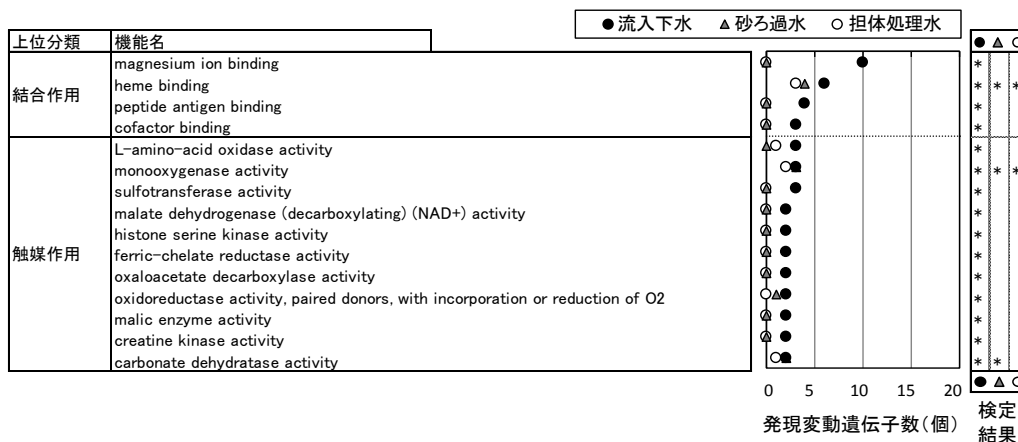


図-15b Molecular Function 検定結果の*は、Fisherの検定で $p < 0.01$

図-15 雌メダカ鰓において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

これらの発現変動遺伝子数は概ね砂ろ過水曝露区で減少した。代謝関連のうち小分子の代謝は、流入下水曝露区で発現変動遺伝子数が最も多かったが、砂ろ過水曝露区で減少した。代謝関連の他の機能も、概ね発現変動遺伝子数が砂ろ過水曝露区で減少した。代謝と応答の両方に属する生体外物質の代謝は、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が低下したが、0個にはならなかった。免疫関連の機能の発現変動遺伝子数は、砂ろ過水曝露区で0個になった。その他では、有糸核分裂 (mitotic nuclear division) や細胞分裂 (cell division) など、細胞の増殖に関係した機能の遺伝子が多く変動していた。これらはいずれも砂ろ過水と担体処理水曝露区では1個以下となっており、活性汚泥処理でその機能への影響が低減したと考えられる。Molecular Function では、結合作用で4機能、触媒作用で11機能が有意となったが、発現変動遺伝子数は概ね処理過程で減少した。

図-16a, 16b は雄メダカの脳の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p < 0.01$ であったものの一覧である。流入下水曝露区では Biological Process で50機能が有意となった。生殖や発達に関連した機能の遺伝子は、砂ろ過水曝露区では発現変動がみられなくなった。代謝では、小分子の代謝と酸化還元プロセスに関する遺伝子の発現変動が多かった。代謝関連で22機能が流入下水曝露区で有意となったが、砂ろ過水曝露区では18機能で発現変動がみられなくなった。応答関連で最も発現変動遺伝子数が多かった機能は酸化ストレスへの細胞応答 (cellular response to oxidative stress) と毒物への応答 (response to toxic substance) であり、いずれも砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が0個になった。流入下水曝露区では抗酸化物質であるグルタチオンの代謝 (glutathione metabolic process) も有意となっていたことから、酸化ストレスが生じていたと考えられる。Molecular Function では23機能が有意となり、最も発現変動遺伝子数が多かった機能は炭化水素への結合 (carbohydrate binding) であった。Molecular Function の機能はいずれも、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が減少した。

図-17a, 17b は雌メダカの脳の GO 解析の結果で、Biological Process と Molecular Function の GO のうち、流入下水曝露区で $p < 0.01$ であったものの一覧である。Biological Process の36機能が有意となっていた。流入下水曝露区で最も発現変動遺伝子が多かった機能は、酸化還元プロセスであった。応答関連では、サイ

トカインで制御されるシグナル経路 (cytokine-mediated signaling pathway) に関する遺伝子が多かった。免疫関連では、流入下水曝露区で免疫応答 (immune response) を含む6機能が有意であったが、GO 別の発現変動遺伝子数は、いずれも活性汚泥処理の後で減少し、砂ろ過水曝露区で2個以下、担体処理水曝露区で1個以下となった。Molecular Function の19の機能はいずれも、砂ろ過水曝露区で発現変動遺伝子数が0個となっていた。

流入下水が有する生物影響と下水処理工程での影響低減効果の概略を把握するため、生殖、発達、代謝、応答、免疫、その他の6つの機能分類について、図-12~17に示したGO別の発現変動遺伝子数を合計した。図-18は、それぞれの機能分類についての各曝露区の発現変動遺伝子数である。

生殖関連の発現変動遺伝子は、流入下水曝露区では雄の肝臓、雄の脳、雌の鰓で検出された。雄の肝臓では担体処理水曝露区で0個に減少し、他の臓器では砂ろ過水曝露区で0個になった。

発達関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雄の肝臓、雌の鰓で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。雌の鰓では担体処理水曝露区でさらに減少したが、0個までは減少しなかった。

代謝関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では雄と雌のどちらも鰓で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。雌の鰓では担体処理水曝露区でさらに減少したが、0個までは減少しなかった。

応答関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雄と雌のどちらも脳で多く、砂ろ過水曝露区で減少した。

免疫関連の発現変動遺伝子数は、流入下水曝露区では、雌の脳で多く、砂ろ過水、担体処理水曝露区で1個以下に減少した。

その他の機能に関連した発現変動遺伝子の数は、流入下水曝露区では、雄は脳、雌は鰓が多かった。発現変動遺伝子数は性別や臓器によらず、砂ろ過水、担体処理水曝露区で10個以下に減少した。

8. まとめ

8. 1 調査対象化学物質とその分析方法

優先的に調査が必要な医薬品類として、河川及び下水処理水中に残存し、水生生物に対する生態リスクが大きい可能性が指摘されている10物質を選定した。また、PRTR対象物質からは、ノニルフェノール (NP)、4-t-オクチルフェノール (4-t-OP) とそれらの関連物質

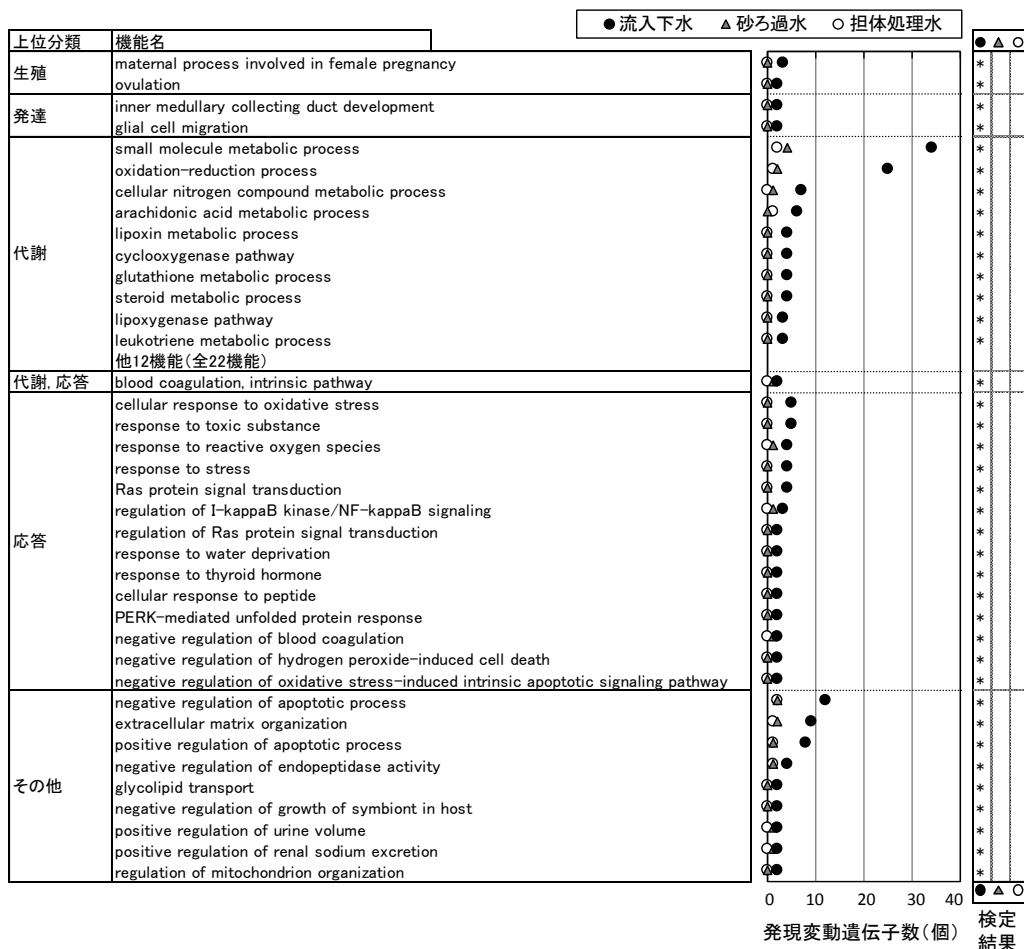


図-16a Biological Process 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

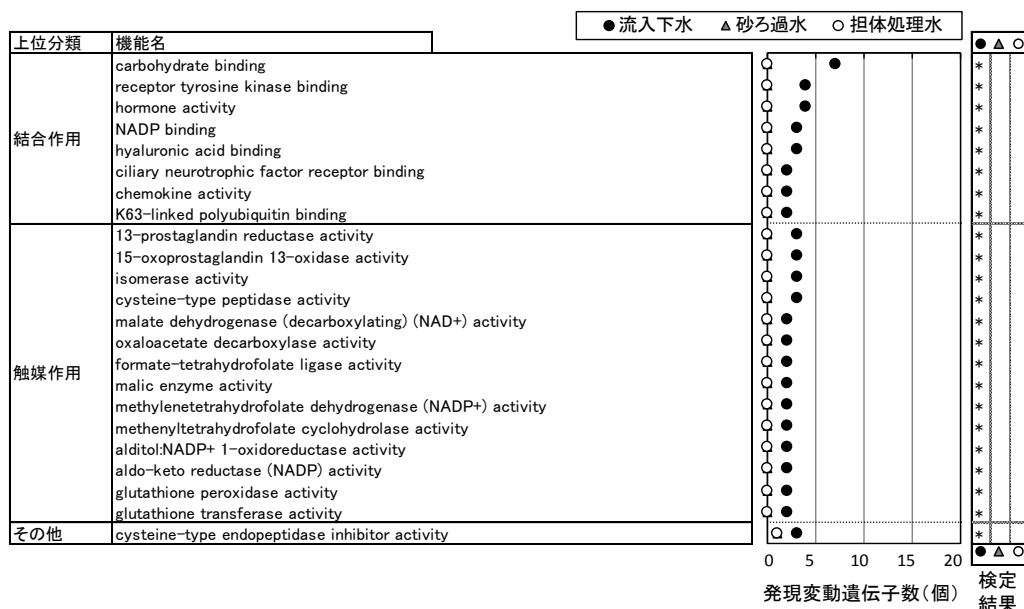


図-16b Molecular Function 検定結果の*は、Fisher の検定で p<0.01

図-16 雄メダカ脳において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

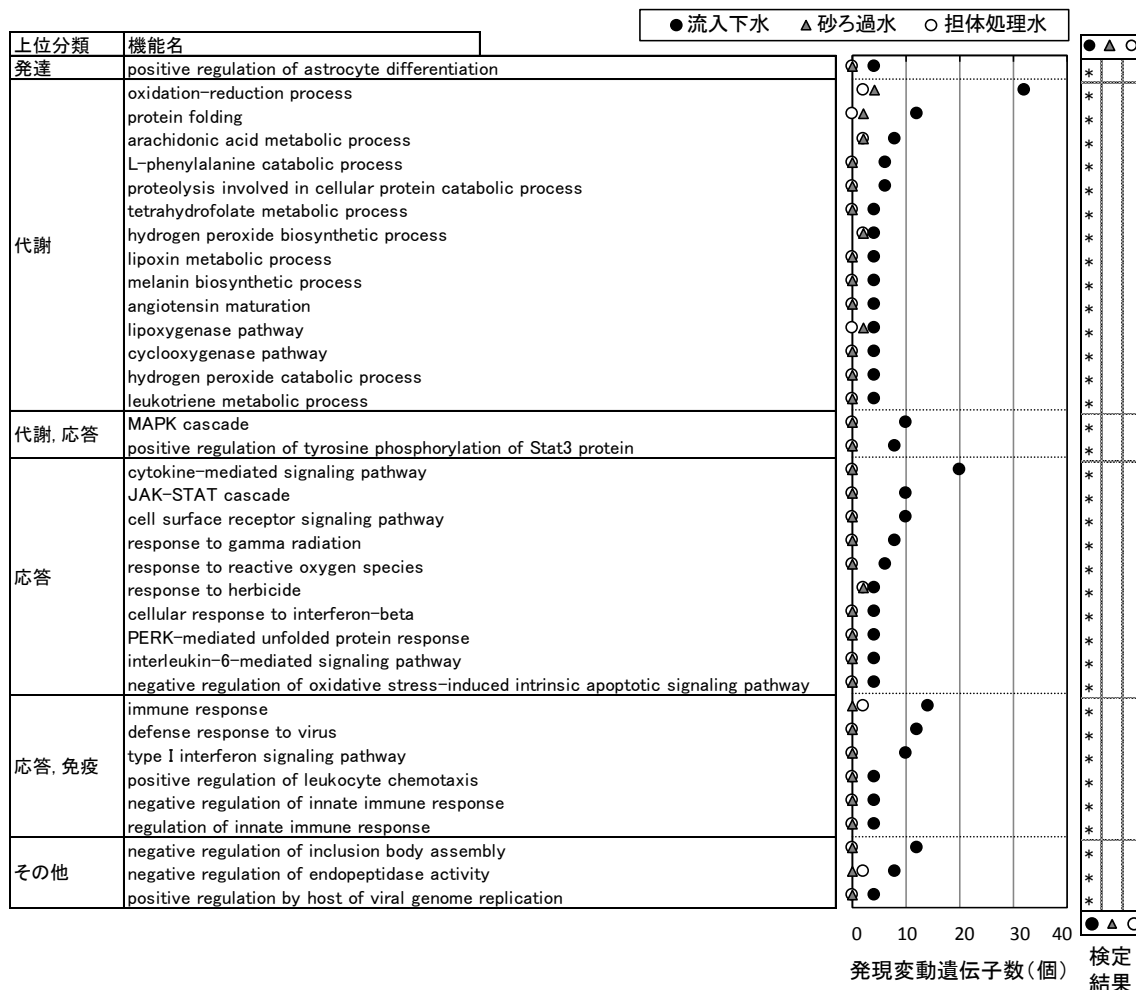


図-17a Biological Process 検定結果の*は、Fisher の検定で $p < 0.01$

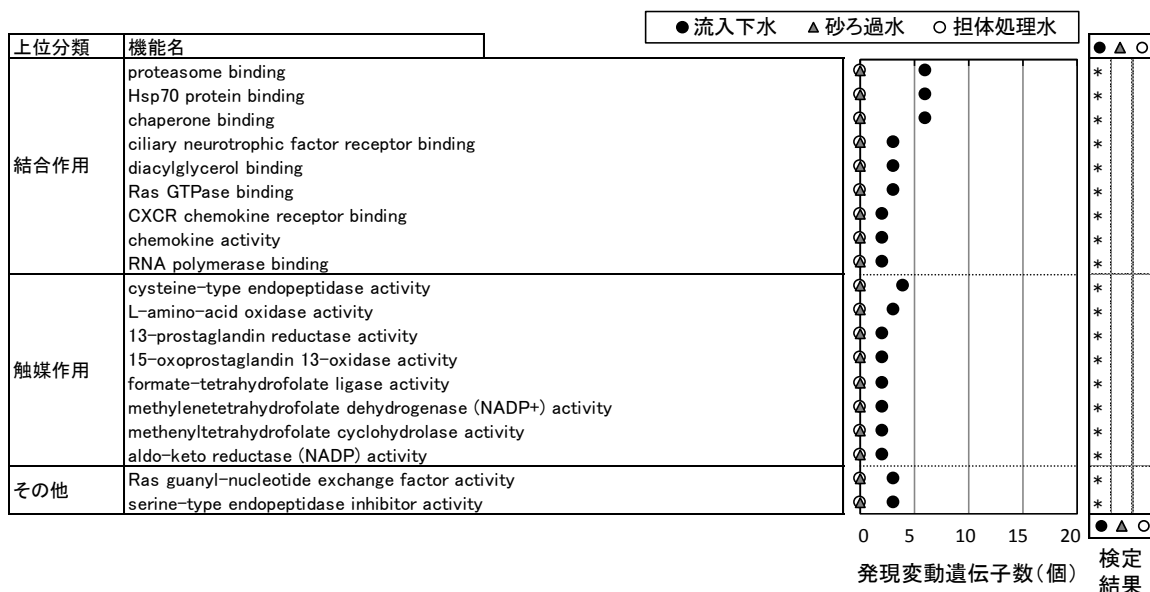


図-17b Molecular Function 検定結果の*は、Fisher の検定で $p < 0.01$

図-17 雌メダカ脳において流入下水曝露区で有意となった機能一覧と処理過程での発現変動遺伝子数の変化

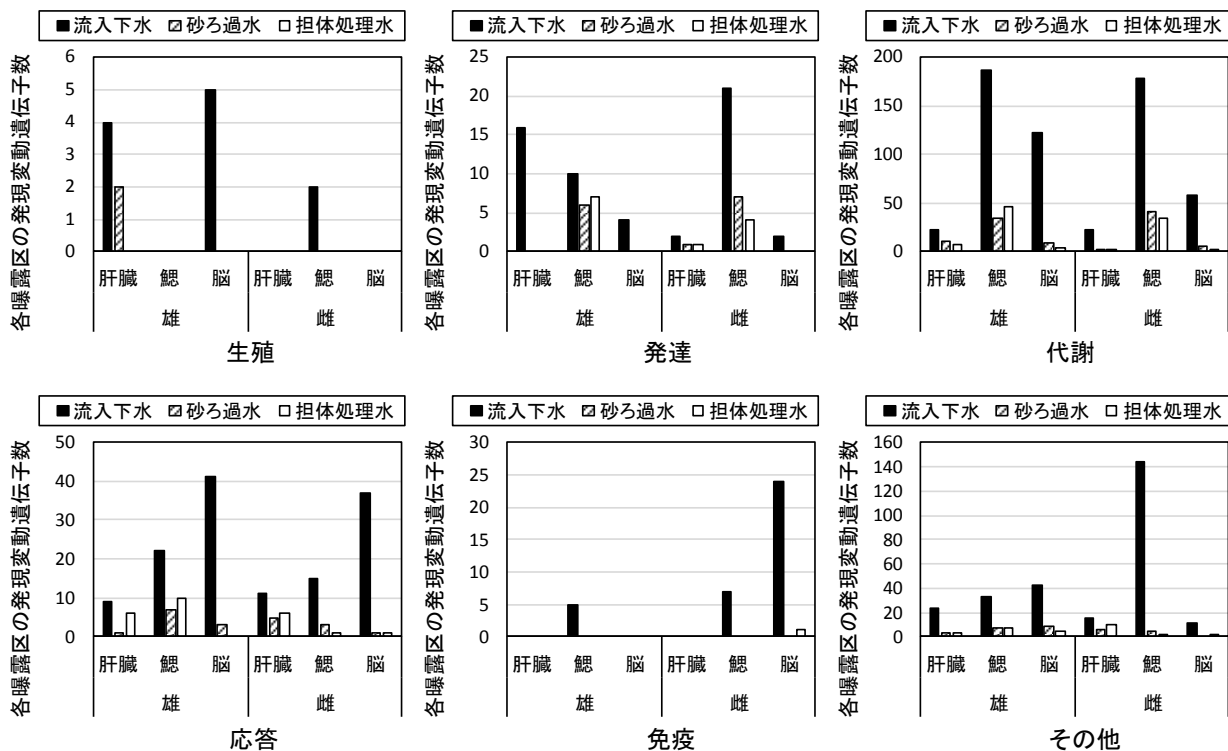


図-18 生殖、発達、代謝、応答、免疫、その他の6つの機能分類についての各曝露区の発現変動遺伝子数の、性別および臓器間比較

の、NPEC、OPEC、NPEO、OPEO、そして直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS) を選定した。選定した医薬品類 (10 物質) 及び NP 及びその関連物質の分析は、前処理 (抽出・精製) 後、GC/MS 又は LC-MS/MS により定量する方法を提案した。

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

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

LAS の検出下限値は、ろ液試料では流入下水 0.19~0.40µg/L、放流水 0.001~0.002µg/L、汚泥 0.004~0.008µg/L であった。SS 試料では流入下水 0.38~

0.80µg/g-dry、放流水 1.9~4.0µg/g-dry、汚泥 0.038~0.080µg/g-dry であった。また、流入下水と返送汚泥を用いて行った添加回収試験の結果、流入下水のろ液では 81.6~91.2%、SS では 85.6~105%、返送汚泥のろ液では 73.6~82.3%、SS では 88.7~100% であった。

8. 2 活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類の挙動

活性汚泥処理プロセスにおける医薬品類(10 物質)の挙動把握に関する調査を行い以下の結果を得た。

- ・10 物質中、溶存態、懸濁態から検出された 7 物質の挙動把握ができた。活性汚泥処理による各医薬品の除去率は BF、CF、KP、SMZ、TC が 70%以上、CAM が約 13%であった。CT は二次処理水中の値が流入下水濃度より高い値を示した。また、90%以上の高い除去率を示した BF、CF はその主要な除去機構が生分解であり、TC は生分解が約 80%、汚泥引抜きによる除去が約 15%であることがわかった。

- ・汚泥引抜きによる除去機構について固・液分配係数 ($LogK_d$) との関係調べたところ $LogK_d$ が大きくなるほど引抜き汚泥による除去割合が大きくなる傾向がみられた。

8. 3 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸の下水処理における除去特性

実下水を流入水とした活性汚泥処理実験を行い、活性汚泥処理プロセスにおける LAS の挙動・除去特性について以下の結果を得た。

- ・流入水と初沈流出水の LAS 濃度はそれぞれ 2,100 $\mu\text{g/L}$ 、2,040 $\mu\text{g/L}$ とほぼ同じ値であり、最初沈殿池における LAS の除去はみられないが、エアレーションタンク内で大きく減少 (AT1 : 710 $\mu\text{g/L}$ 、AT2 : 230 $\mu\text{g/L}$ 、AT3 : 110 $\mu\text{g/L}$ 、AT4 : 130 $\mu\text{g/L}$) し、二次処理水、放流水では 1 $\mu\text{g/L}$ 以下であった。

- ・LAS の流入負荷量に対する排出負荷量 (放流水、生汚泥、余剰汚泥) の合計は 2.6% であった。残りの 97.4% は活性汚泥処理により分解・除去されたものと考えられた。

8. 4 活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける医薬品類の除去特性

下水処理水に残存し水生生物への影響が懸念される医薬品類4物質について活性汚泥処理プロセスと微生物担体を用いた高度処理プロセスにおける除去特性の調査を行い以下の結果を得た。

- ・CAM、AZMは、活性汚泥処理による除去率は12%、13%であるが、微生物担体処理では84%、91%であり、全体除去率は86%、93%であった。また、KP、TCの活性汚泥処理による除去率は、75%、80%であるが担体処理により更に90%、88%除去が可能であり、全体除去率は97%、98%であった。

- ・担体処理における医薬品類の除去率は、活性汚泥処理の除去率に比べ大きな値を示したことから、微生物担体を用いる高度処理が二次処理水に残存する医薬品類の除去に有効であることがわかった。

8. 5 下水処理過程における総毒性の除去特性評価

メダカ成魚の下水処理工程水への曝露実験と次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、下水が生物に及ぼす遺伝子レベルの影響と、下水処理プロセスでの低減効果について検討した。得られた知見を以下に記す。

- ・下水処理工程水曝露区で発現量が変動した遺伝子の個数は、肝臓、鰓、脳では流入下水曝露区で高く、砂ろ過水や担体処理水への曝露では発現変動遺伝子数が低下した。特に、鰓の発現変動遺伝子数は、活性汚泥処理で大きく低下することがわかった。

- ・流入下水が肝臓の遺伝子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝関連の機能が多かった。また、雄では生殖関連への影響がみられた。

- ・流入下水が鰓の遺伝子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝関連の機能が多かった。また、雌では

細胞の増殖に関連した機能への影響がみられた。

- ・流入下水が脳の前駆子機能に及ぼす影響は、雄と雌のどちらも代謝に関連の機能に影響がみられた。また、雄の脳では酸化ストレス、雌の脳では免疫関連の機能への影響がみられた。

- ・機能遺伝子の発現変動遺伝子数の比較から、肝臓と鰓では活性汚泥処理や担体処理によって、流入下水でみられた生物影響が概ね低減したが、担体処理の後でも、発達、代謝、応答への影響は残存する場合があった。脳では、流入下水でみられた生物影響は活性汚泥処理によって低減した。

参考文献

- 1) 小森他、生活排水の処理状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価、水環境学会誌、Vol.32、No.3、pp.133-138、2009
- 2) 成宮他、下水処理過程における医薬品の存在実態と動態、環境工学研究論文集、第 46 巻、pp.175-185、2009
- 3) 小森他、下水処理場放流水中の医薬品とその生態リスク評価、資源環境対策、Vol.48、No.8、pp.14-19、2010
- 4) 福永他、藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価、環境工学研究論文集、第 43 巻、pp.57-63、2006
- 5) 南山他、生理活性物質の水環境中での挙動と生態系影響の評価方法に関する研究、土木研究所資料第 4212 号、平成 22 年度下水道関係調査研究年次報告書集、pp.239-265、2011
- 6) 環境省、生態影響試験結果一覧(平成 23 年 3 月版)、化学物質の生態影響試験について、<http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html>
- 7) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応-EXTEND2010-、平成 22 年 7 月、環境省
- 8) 環境省、化学物質の生態影響試験について、生態影響試験結果一覧(平成 23 年 3 月版) p.38、p.23、<http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/01.html>
- 9) MARUAN AHHEL, WALTER GIGER, MARKUS KOCH, BEHAVIOUR OF ALKYLPHENOL POLYETHOXYLATE SURFACTANTS IN THE AQUATIC ENVIRONMENT-I, WATER RESEARCH, Vol.28、No.5、pp.1131-1142、1994
- 10) 小西他、水環境中医薬品の LC-MS/MS による一斉分析法の検討、環境工学研究論文集、pp.73-82、2006
- 11) 宝輪他、GC-MS による水環境中の PPCPs 一斉分析法の基礎的検討、第 16 回環境化学討論会講演要旨集、pp.774-775、2007

- 12) 環境省要調査項目等調査マニュアル, 平成 22 年 10 月, 環境省水・大気環境局水環境課
- 13) 堀井他、相対感度係数を用いるノニルフェノール異性体別測定法の開発と検証、分析化学、53、pp.1139-1147、2004
- 14) 小西他、飲料水中ノニルフェノールの分析法の検討、東京健安研七年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst.P.H.、57、pp.319-323、2006
- 15) JIS K 0450-20-10 : 2006 工業用水・工場排水中のアルキルフェノール類試験方法
- 16) JIS K 0450-60-10 : 2007 工業用水・工場排水中の4-ノニルフェノールの異性体別試験方法
- 17) 吉田他、高速液体クロマトグラフ/質量分析法を用いたアルキルフェノールエトキシレート及びその関連物質の定量、水環境学会誌、27、pp.41-46、2004
- 18) Haude, F. et al., Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of nonylphenol polyethoxylates and nonylphenol carboxylic acids in surface water, J. Chromatogr. A, 961, pp.245-256, 2002
- 19) 川中他、LC/MS/MS を用いた河川水及び下水処理場放流水中のノニルフェノールポリエトキシレート の定量、環境化学、10、pp.607-614、2000
- 20) 環境省環境保健部環境安全課 化学物質分析法開発調査報告書 (平成 16 年度) ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテル
- 21) 環境省環境保健部環境安全課 化学物質分析法開発調査報告書 (平成 17 年度) ポリ(オキシエチレン)アルキルエーテル
- 22) 佐来他、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)の LC/MS 分析と環境濃度について、三重保環研年報第 6 号(通巻第 49 号)、65-70、2004
- 23) M.T. Garcia, E. Campos, J. Sanchez-Leal, I. Ribosa, Effect of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) on the anaerobic digestion of sewage sludge, Water Research, 40, pp.2958-2964、2006
- 24) 下水試験方法-2012 年版、日本下水道協会、2012
- 25) A. Harada et al., Biological effects of PPCPs on aquatic lives and evaluation of river water, Water Science & Technology, Vol.58, No.8, pp.1541-1546, 2008
- 26) セルイノベーション (国立遺伝学研究所データ解析拠点)、最終利用日:2015/10/7
<https://cell-innovation.nig.ac.jp/members/index.html>
- 27) Matthew J. Brooks, Harsha K. Rajasimha, Jerome E. Roger, and Anand Swaroop; Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and *Nrl^{-/-}* retinal transcriptomes, Mol Vis. 2011; 17: 3034–3054.
- 28) Refseq データベースおよび Blastn 検索プログラム (National Center for Biotechnology Information, NCBI)、最終利用日:2015/7/9
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 29) Uniprot-GOA, 利用日:2015/7/9
<http://www.ebi.ac.uk/GOA>

A STUDY ON OCCURRENCE AND CONTROL OF MICRO POLLUTANT IN ACTIVATED SLUDGE PROCESS

Budget: Grants for operating expenses
(General account)

Research Period: FY2011-2015

Research Team: Water Quality Research Team,
Water Environment Research Group

Author: OKAMOTO, Seiichiro
KOMORI, Koya
KITAMURA, Tomokazu
KANYKO, Yousuke

Abstract:

The occurrence and fate of physiologically active substances (e.g., pharmaceuticals) in the water environment are emerging issues in environmental chemistry. Although there have been various reports on the efficiency of removing pharmaceuticals at wastewater treatment plants (WTP), many pharmaceuticals still exist in WTP effluent, and sometimes at concentrations exceeding environmental risk levels. Further studies on techniques for removing pharmaceuticals in WTP effluent are required to control these compounds. The objectives of this research are to determine the occurrence and fate of selected pharmaceuticals in activated sludge process and to develop new technique the removal of to remove pharmaceuticals in WTP effluent using the microbial carrier process.

We selected 10 study pharmaceuticals, some alkyl phenol and Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) such as Decylbenzenesulfonate (LAS-C10), Undecylbenzenesulfonate (LAS-C11), Dodecylbenzenesulfonate (LAS-C12), Tridecylbenzenesulfonate (LAS-C13), Tetradecylbenzenesulfonate (LAS-C14). Analytical methods of these pharmaceuticals were examined.

This research was a study of the behavior of selected 10 pharmaceuticals was investigated at experimental sewage treatment plant to clarify their complete mass balance and the use of the microbial carrier process to perform advanced treatment to remove four residual pharmaceutical compounds, triclosan, clarithromycin, azithromycin, and ketoprofen from wastewater treatment plant effluent.

In addition, clarify of behavior of all toxicity in sewage treatment process and development of the all toxicity reduction technique were carried out in this study. As a result of measuring the all toxicity with comprehensive gene expression analysis of medaka, The toxicities of raw wastewater were able to reduced with activated sludge treatment and microbial carrier treated process. Especially, reproduction toxicity was not detected with the microbial carrier treated process.

Key words: analytical method, micro pollutant, pharmaceuticals, wastewater