下水道と水環境から見た化学物質管理の方向性

国立研究開発法人土木研究所
水環境研究グループ（水質）
○山下洋正、北村友一、村田里美、高沢麻里

本日の話題

下水道と水環境から見た化学物質管理の
方向性に関する3つの観点

１．下水処理への化学物質影響

２．下水道～水環境への化学物質の動き

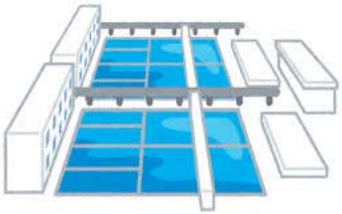
３．下水処理水の生物影響

１．下水処理への化学物質影響

アンモニア酸化細菌を用いた下水中の硝化阻害物質の探索

国土交通省下水道応用研究
下水処理場における硝化阻害物質の高効率探索システムの開発

下水処理におけるアンモニア酸化細菌の役割



下水処理場

流入下水 → 活性汚泥処理 → 放流水

生物学的硝化

アンモニア → 亜硝酸 → 硝酸

・独立栄養細菌
・増殖が遅い

アンモニア酸化細菌

化学物質による阻害

・硝化の低下（硝化阻害）が起きやすい
・長年の処理場問題

Q. どのような化学物質が原因で硝化抑制が起こるのか？

硝化阻害の発生実態

アンケート・ヒアリング

対象：全国の下水処理場
時期：令和2年１月−2月

主な結果

全般

*出典：平成28年度版下水道統計

- 有効回答:1,613件/ 処理場:1,556件（全体*の71.6%）
- “硝化阻害の経験あり”と回答した処理場は全体の16.2%（261件/1613件）。
- 平均発生頻度は1回/年（但し、96回/年等ばらつき有）

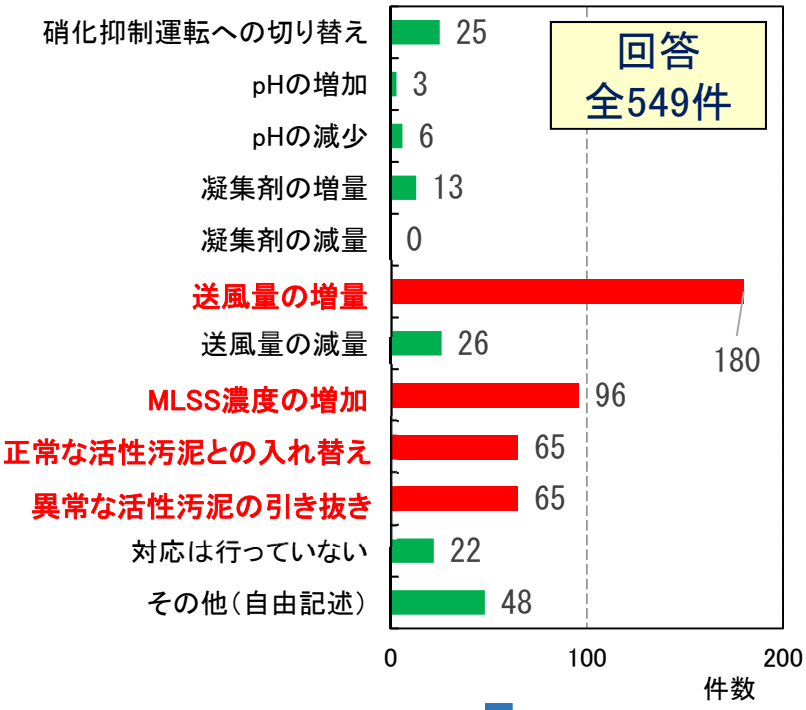
発生時の環境条件

- 特に急激な気温低下時に発生する傾向

発生状況・想定する原因・併発する問題

- 単一ではなく、複数・全ての系統の発生が多い傾向
- 復旧まで1日～数週間（149/260件）or 都度異なる
- 想定原因は複数（38.7%）。処理条件より環境条件や流入水質が多い傾向。（特定物質：全体の6.1% ）
- BOD・COD・TOCやリンの処理悪化が併発傾向

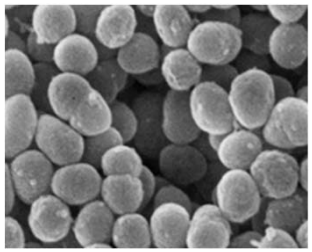
発生時の対応



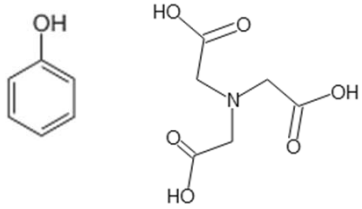
どのような化学物質が影響しているか、原因はわかっていないが、困っている

硝化阻害の評価方法

硝化菌を用いた酵素活性評価



アンモニア酸化細菌
（*Nitrosomonas europaea*）



各試験化学物質
(10 mg/L, 1 mg/L)

曝露
18時間、28℃）

24穴プレート

反応試験

マイクロプレートリーダー

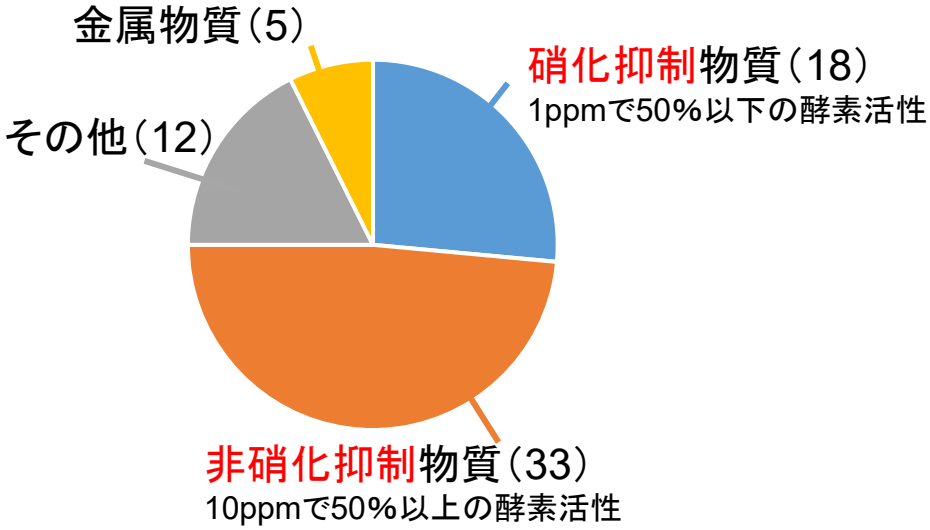
吸光度545 nm（赤色発色）

亜硝酸生成濃度で活性を評価

化学物質の選定

①文献情報に基づき、阻害活性が高い物質
（EC_{50}≦1 mg/L）
②PRTR対象物質より選定された物質
③金属物質

68物質を検討



$$\text{亜硝酸生成率}(\%) = \frac{\text{化学物質添加培養(吸光度545nm)} - \text{NC(吸光度545nm)}}{\text{コントロール(吸光度545nm)} - \text{NC(吸光度545nm)}} \times 100$$

硝化阻害物質は化学構造から5種に分類(18/68)

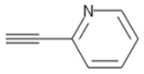
1mg/Lに対して硝化阻害50%以上

I: アセチレン系

$HC{\equiv}C(CH_2)_3CH_3$

1-ヘキシン
有機合成原料 (6.1%)

AMO阻害？



2-エチニルピリジン
有機合成原料 (6.7%)

$CH_3(CH_2)_4{-}C{\equiv}CH$

1-ヘプチン (12.1%)

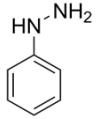
$HC{\equiv}C{-}CH_2OH$

2-プロピン-1-オール
腐食防止剤 (22.6%)

$CH_3CH_2CH_2{-}C{\equiv}CH$

1-ペンチン(34.2%)

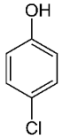
V: その他



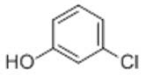
フェニルヒドラジン

PRTR物質

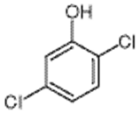
II: クロロフェノール



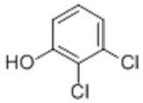
4-クロロフェノール
有機合成原料 (5.1%)



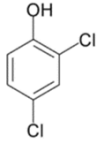
3-クロロフェノール (5.6%)
医薬・農薬中間体



2,5-ジクロロフェノール
有機リン酸系の殺虫剤 (5.6%)

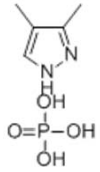


2,3- ジクロロフェノール
有機合成原料 (6.7%)



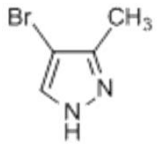
2,4-ジクロロフェノール
有機リン系殺虫剤(24.6%)

III： ピラゾール



りん酸3,4-ジメチルピラゾール
硝化抑制剤 (12.3%)

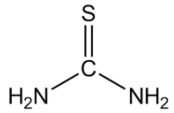
ピラゾール
鎮痛剤、抗炎症剤 (23.6%)



4-ブロモ-3-メチルピラゾール (28.7%)

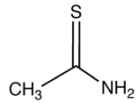
酵素阻害？
殺菌作用？

IV: S=C-N



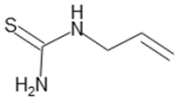
チオ尿素

樹脂原料、医薬，農薬の合成原料 (4.3%)

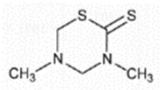


チオアセトアミド

金属硫化物の原材料 (4.4%)



アリルチオ尿素
硝化抑制剤 (4.7%)



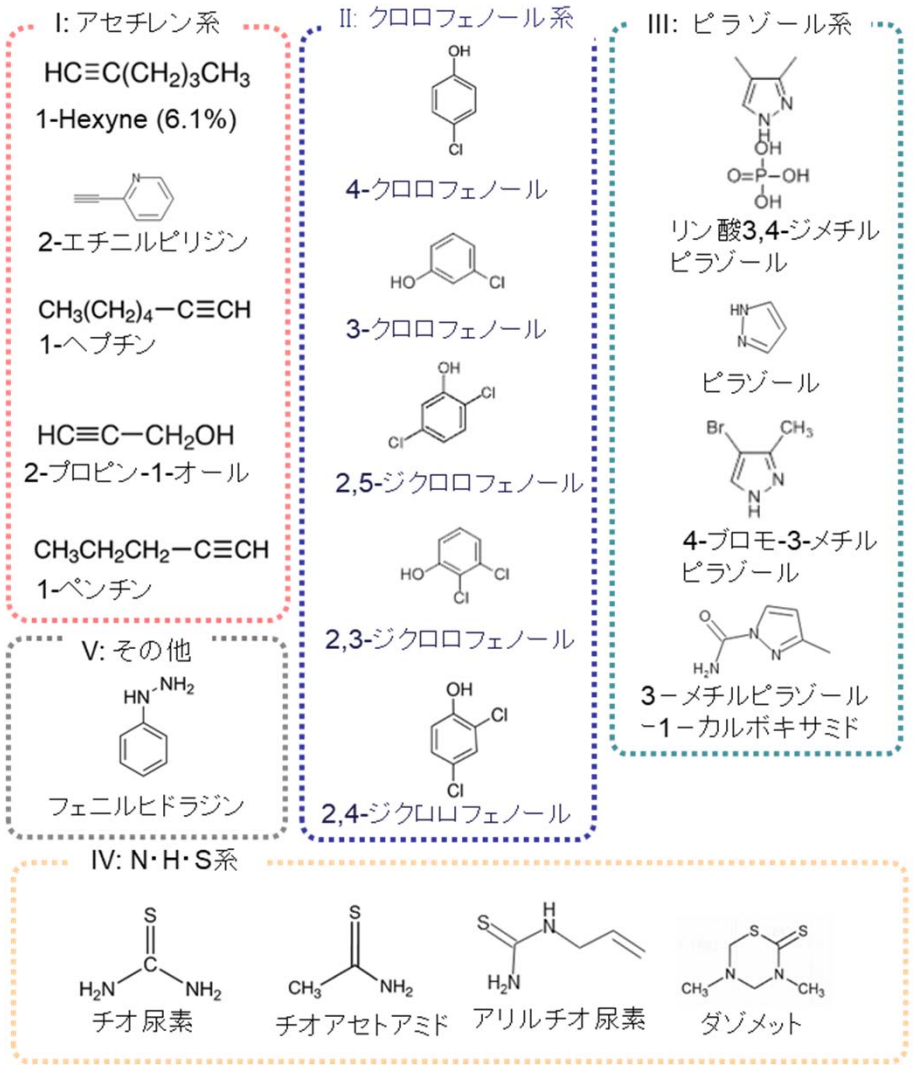
ダゾメット
殺線虫・殺菌・除草剤
(23%)

括弧：各化学物質(1ppm)を曝露した際のコントロールに対する亜硝酸生成量

アンモニア酸化細菌（*N. europaea*)を用いた硝化阻害物質のEC_{50}

阻害活性の高い物質のランキング

Group	Chemical	EC_{50} (mg/L)
Ⅳ	アリルチオ尿素	0.019
Ⅳ	チオアセトアミド	0.019
Ⅳ	チオ尿素	0.020
Ⅰ	1-ヘキシン	0.029
Ⅴ	フェニルヒドラジン	0.036
Ⅰ	1-ヘプチン	0.057
Ⅰ	2-エチニルピリジン	0.146
Ⅲ	リン酸3,4-ジメチルピラゾール	0.159
Ⅱ	2,5-ジクロロフェノール	0.164
Ⅰ	1-ペンチン	0.253
Ⅱ	4-クロロフェノール	0.276
Ⅲ	4-ブロモ-3-メチルピラゾール	0.277
Ⅱ	3-クロロフェノール	0.287
Ⅲ	3-メチルピラゾール-1-カルボキサミド	0.294
Ⅱ	2,4-ジクロロフェノール	0.356
Ⅱ	2,3-ジクロロフェノール	0.410
Ⅰ	2-プロピン-1-オール	0.413
Ⅳ	ダゾメット	0.613
Ⅲ	ピラゾール	0.680

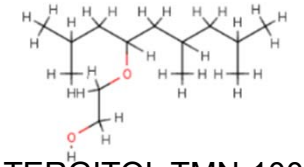


Group Ⅳ（N･H･S系）とGroup Ⅰ（アセチレン系）は強い阻害効果を示す。

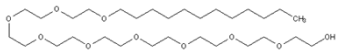
非硝化阻害物質は化学構造から4種に分類(33/68)

10mg/Lに対して硝化阻害50%未満

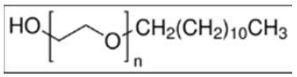
V: 長鎖型 （界面活性剤）



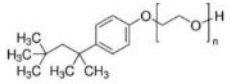
TERGITOL TMN-100X
(113.5%)



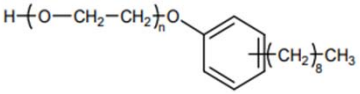
ニッコールBL-9EX
(88.9%)



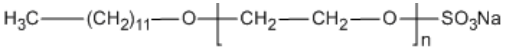
Genepol X-080
(101.7%)



Triton X-114
(91.6%)



ポリ（オキシエチレン）（15 or 18 or 20）ノニルフェニルエーテル
(107.1~108.6%)



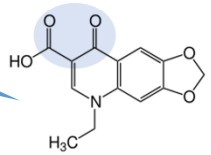
ポリオキシエチレンドデシルエーテル
(97.9%)

この型の殺虫剤、抗生剤は効きにくい

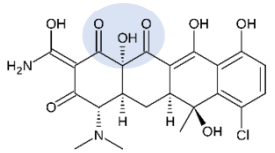
括弧：各化学物質(10ppm)を曝露した際のコントロールに対する亜硝酸生成量

PRTR物質

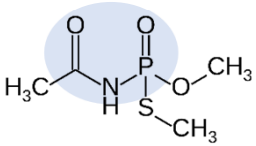
VIII: O=C-X-X=O



オキソリン酸 抗生剤
(7.5%、1ppmで検討)

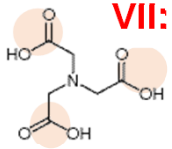


クロロテトラサイクリン
抗生剤 (76.1%)

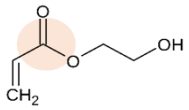


アセフェート
農薬 (85%)

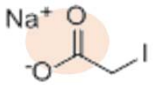
VII: O=C-O



ニトリロ三酢酸
(82.7%)

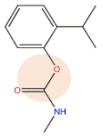


アクリル酸2-ヒドロキシエチル (109.5%)

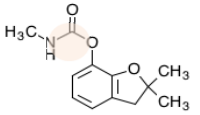


ヨード酢酸ナトリウム
(82.6%)

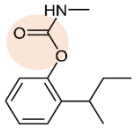
カーバメイト系殺虫剤



イソプロカルブ
(89.7%)

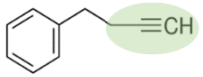


カルボフラン
(82.8%)

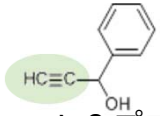


フェノカブルブ
(83.8%)

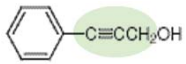
VI: ベンゼン環＋アセチレン構造 （有機合成原料）



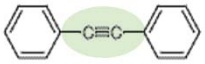
4-フェニル-1-ブチン
(73.6%)



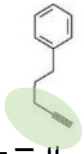
1-フェニル-2-プロピン-1-オール
(86.8%)



3-フェニル-2-プロピン-1-オール
(95.2%)



ジフェニルアセチレン
(87.1%)



5-フェニル-1-ペンチン
(80.8%)

*N.europaea*への硝化阻害は酵素阻害？、殺菌？

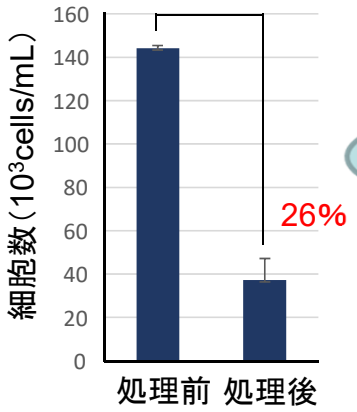
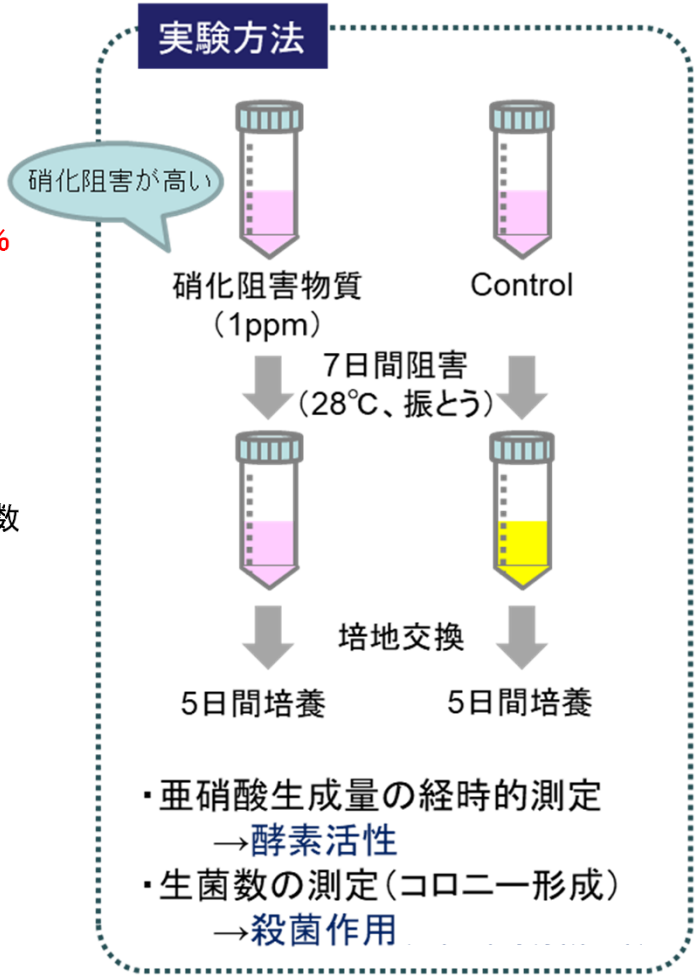


図1　7日間アリルチオ尿素処理後の硝化菌の菌数

菌数の変化は小さい
（殺菌効果は小さい）



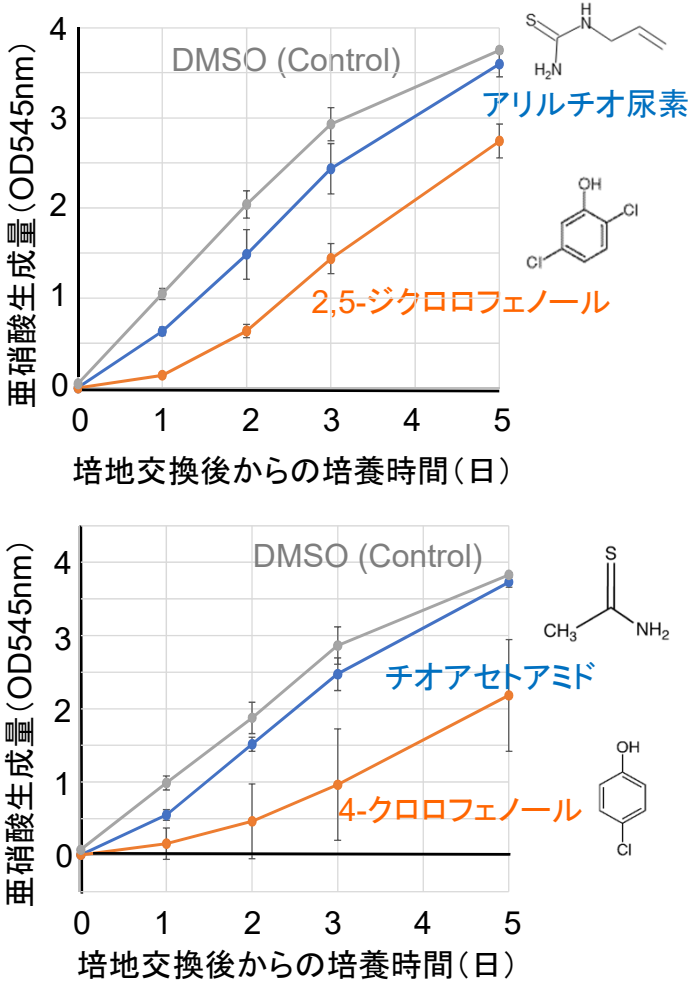


図2　7日間硝化阻害物質処理後の硝化活性

実際の処理場での硝化阻害は、酵素阻害と殺菌のどちらの可能性も考えられる
→処理場のヒアリングで「1週間程度待つと復活する」場合は、硝化酵素の阻害の可能性
→殺菌作用の場合は、復活が遅い可能性あり

まとめ
（1．下水処理への化学物質影響）

・下水処理への化学物質影響の典型例として、硝化阻害を取り上げた

・アンモニア酸化細菌（*N.europaea*）への影響評価による硝化阻害物質、非硝化阻害物質は、特徴的な化学構造がある

化学物質の構造から硝化阻害物質を効率的に推定できる可能性

・アンモニア酸化細菌（*N.europaea*）の硝化阻害は化学物質により作用機構が異なる可能性あり。
→殺菌 or 酵素阻害

2. 下水道～水環境への化学物質の動き

スクリーニング分析の活用による下水中の化学物質の効率的把握

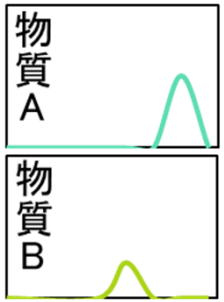
環境研究総合推進費 戦略的研究開発領域（SII-4-1）
PRTRデータを活用した化学物質の排出管理手法の構築

スクリーニング分析の活用による下水試料分析の効率化

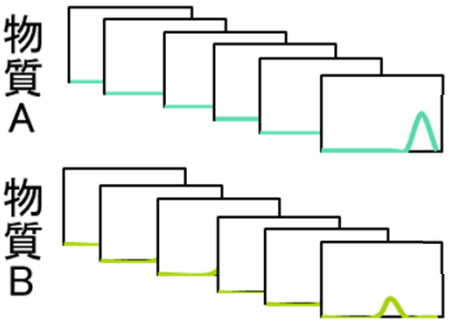
ターゲット分析

従来法

感度・定量性◎
対象物質が限定的
データ活用先 単一
時間・経済的コスト 大



定量分析



新規懸念物質X

データなし⚠

分析法開発

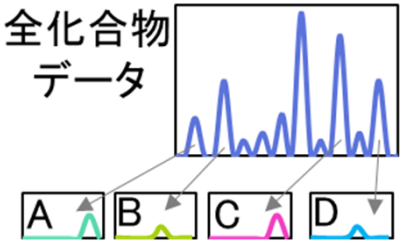
データ取得開始

現在 → モニタリングを継続 → 未来

スクリーニング分析

本研究

感度・定量性△
網羅的にデータ取得
データ活用先 複数
時間・経済的コスト 小



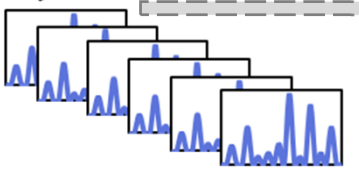
有無判定（あるかないか）
定量分析（どれだけあるか）
化合物探索（なにがあるか）

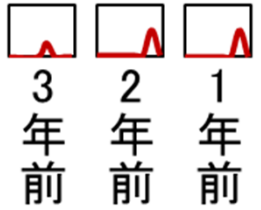
新規懸念物質X

全化合物データ

探索

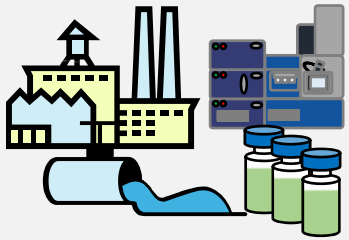
抽出





振り返り分析
（過去になにがどれだけあったか）

下水に含有されるPRTR物質の定量



☆上流事業者により検出される化学物質の数・種類が処理場ごとに異なる(予見困難)

↓

従来の定量分析法では非効率

↓

スクリーニング分析を活用し効率化

概要

下水試料の測定

測定データ

PRTR物質リストと照合
（有無判定）

PRTR DB

検出有

定量

PRTR物質のターゲットスクリーニング（有無判定）用データベースの構築

100物質について下水試料中の存在有無を判定できる手法・DBを構築（うち**81物質は定量**可能）

検出有無判定と定量が見込める有機化合物 63物質

政令番号	物質名	元素組成	分析方法	フラグメントイオン (m/z)			
17	o-アニシジン	C7H9NO	ESI-(+)	109.05255	108.04402	92.04931	93.05736
22	フィプロニル	C12H4Cl2F6N4OS	ESI-(+)	139.02931	141.02478	158.01968	196.0137
25	メトリブジン	C8H14N4OS	ESI-(+)	131.03728	132.03246	171.04803	121.03124
27	メタミトロン	C10H10N4O	ESI-(+)	102.01062	175.09724		
37	ビスフェノールA	C15H16O2	ESI-(-)	212.08173	211.07496	133.0656	117.03296
40	ピフェナゼート	C17H20N2O3	ESI-(+)	167.07278	168.07964	169.08687	166.06367
41	フルトラニル	C17H16F3NO2	ESI-(+)	243.06455	304.11567	130.02908	93.03409
51	p-オクチルフェノール	C14H22O	ESI-(-)	106.04131	93.0342		
52	アラニカルブ	C17H25N3O4S2	ESI-(+)	150.03758	138.03766	123.02596	208.13271
70	エマメクチン安息香酸塩	C48H73NO13	ESI-(+)	302.19835	126.09154	303.19902	226.14414
90	アトラジン	C8H14ClN5	ESI-(+)	104.00256	132.03231	146.02326	96.05715
96	ジフェノコナゾール	C19H17Cl2N3O3	ESI-(+)	152.05714	188.02545	153.06572	111.00602
113	シマジン又はＣＡＴ	C7H12ClN5	ESI-(+)	104.00256	96.05715	174.0547	68.02522
116	ヘキシチアゾクス	C17H21ClN2O2S	ESI-(+)	168.05841	194.03749	170.05439	230.02357
118	ミクロブタニル	C15H17ClN4	ESI-(+)	220.08766	164.02577	178.04141	130.06643
119	フェンブコナゾール	C19H17ClN4	ESI-(+)	194.04889	163.03114	99.00019	139.03022
141	シモキサニル	C7H10N4O3	ESI-(+)	100.07433			
146	ピリミホスメチル	C11H20N3O3PS	ESI-(+)	152.05714	188.02545	153.06572	181.05328
147	チオベンカルブ	C12H16ClNOS	ESI-(+)	99.00019	100.07637	72.98453	72.04506
156	ジクロロアニリン	C6H5Cl2N	ESI-(+)	127.01809	144.95981	126.00986	
168	イプロジオン	C13H13Cl2N3O3	ESI-(+)	172.02905	156.03987	183.04415	134.05781
170	テトラコナゾール	C13H11Cl2F4N3O	ESI-(+)	129.05822	171.04536	200.04264	123.00248
171	プロピコナゾール	C15H17Cl2N3O2	ESI-(+)	162.97104	159.97996	159.03383	204.98216
172	オキサジクロメホン	C2OH19Cl2NO2	ESI-(+)	202.98845	204.98479	169.03055	167.01446
174	リニュロン	C9H10Cl2N2O2	ESI-(+)	159.97313	153.02268	160.97902	125.00337
198	ジメトエート	C5H12NO3PS2	ESI-(+)	124.98158	110.96618	142.99195	198.96671
206	カルボスルファン	C20H32N2O3S	ESI-(+)	186.06651	125.00675	158.1008	177.03778
221	ペンフラカルブ	C20H30N2O5S	ESI-(+)	162.0682	158.11882	196.0499	144.05617
224	N,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド	C14H31NO	ESI-(+)	212.23663			
225	トリクロルホン	C4H8Cl3O4P	ESI-(+)	127.01719	109.00636	220.95392	78.99453
229	チオファネートメチル	C12H14N4O4S2	ESI-(+)	160.04987	152.03486	118.05313	93.05779
252	フェンチオン	C10H15O3PS2	ESI-(+)	109.01408	216.03551	163.02378	78.06038
267	チオジカルブ	C10H18N4O4S3	ESI-(+)	221.06678	266.97771	282.02758	133.0857
320	ノニルフェノール	C15H24O	ESI-(-)	133.0656	93.0342	212.04296	198.03192
326	クロフェンチジン	C14H8Cl2N4	ESI-(+)	138.01121	102.03519	120.0452	
334	4-ヒドロキシ安息香酸メチル	C8H8O3	ESI-(+)	121.02947	93.03409	153.05618	109.06621
346	2-フェニルフェノール	C12H10O	ESI-(-)	115.05427			
349	フェノール	C6H5O	APGC-(+)				
356	フタル酸n-ブチル=ベンジル	C19H20O4	ESI-(-)	305.08047	212.04893	213.05503	141.01872
357	ブプロフェジン	C16H23N3OS	ESI-(+)	106.06669	145.04298	202.1087	208.05299
358	テブフェノジド	C22H28N2O2	ESI-(-)	166.16008	105.07142	183.01187	189.06706
364	フェンピロキシメート	C24H27N3O4	ESI-(+)	135.04564	144.04635	199.08511	130.06643
369	プロパルギット又は BPPS	C19H26O4S	ESI-(+)	135.08133	131.0487	123.08046	145.06517
370	ピリダベン	C19H25ClN2OS	ESI-(+)	217.0435	218.04881	144.08074	
371	テブフェンピラド	C18H24ClN3O	ESI-(+)	171.03271	189.04342	157.0525	158.09823
383	ブロマシル	C9H13BrN2O2	ESI-(-)	202.94651	159.93973	205.94769	
393	ベタナフトール	C10H8O	ESI-(-)	115.05427	93.0342		
396	PFOS	C8HF17O3S	ESI-(-)	98.95417	79.95603	409.10846	418.97527
402	メフェナセット	C16H14N2O2S	ESI-(+)	136.02263	118.06647	104.05057	152.0172
422	フェリムゾン	C15H18N4	ESI-(+)	117.05891	123.08046	238.13403	163.0991
425	イソプロカルブ又はＭＩＰＣ	C11H15NO2	ESI-(+)	118.06647	121.0655	109.06621	
403	ペンゾフェノン	C13H10O	ESI-(+)	183.08015			
426	カルボフラン	C12H15NO3	ESI-(+)	115.05497			
428	フェノブカルブ又はＢＰＭＣ	C12H17NO2	ESI-(+)	149.09637			
429	ハロスルフロンメチル	C13H15ClN6O7S	ESI-(+)	172.02905	183.04415	156.03732	210.02581
431	アゾキシストロビン	C22H17N3O5	ESI-(+)	83.03733	178.04506	140.04949	194.01317
435	ピリミノバックメチル	C17H19N3O6	ESI-(+)	147.03943	171.04536	144.0422	126.01905
442	メプロニル	C17H19NO2	ESI-(+)	136.03934	108.0447	111.04382	254.02561
444	トリフロキシストロビン	C20H19F3N2O4	ESI-(+)	145.02819	131.07447	187.05619	146.06284
445	クレソキシムメチル	C18H19NO4	ESI-(+)	207.07986	208.08842	194.09737	180.08191
449	フェンメディファム	C16H16N2O4	ESI-(+)	168.06637	149.07138	134.06033	106.06669
452	2-メルカプトベンゾチアゾール	C7H5NS2	ESI-(+)	124.02141	166.98536	92.04931	134.00568
461	りん酸トリフェニル	C18H15O4P	ESI-(+)	251.04616	247.05372	228.09364	233.03837

検出有無判定が可能な有機化合物 19物質

政令番号	物質名	元素組成	分析方法	フラグメントイオン (m/z)	
21	クロリダゾン	C10H8ClN3O	ESI-(+)	104.0495	92.0495
46	キザロホップエチル	C19H17ClN2O4	ESI-(+)	299.0577	271.0632
91	シアナジン	C9H13ClN6	ESI-(+)	68.0243	214.0854
93	メトラクロール	C15H22ClNO2	ESI-(+)	252.115	148.0631
114	インダノファン	C20H17ClO3	ESI-(+)	175.0754	187.0754
117	テブコナゾール	C16H22ClN3O	ESI-(+)	70.0402	125.0153
124	クミルロン	C17H19ClN2O	ESI-(+)	125.0153	91.0542
143	4，4'-ジアミノジフェニルエーテル	C12H12N2O	ESI-(+)	108.0443	80.0493
169	ジウロン	C9H10Cl2N2O	ESI-(+)	72.04488	159.9713
183	ピラゾレート	C19H16Cl2N2O4S	ESI-(+)	172.9556	91.0541
212	アセフェート	C4H10NO3PS	ESI-(+)	94.9891	142.9928
323	シメトリン	C8H15N5S	ESI-(+)	124.0869	68.0243
335	アセトアミノフェン	C8H9NO2	ESI-(+)	110.0597	65.0382
427	カルバリル又はＮＡＣ	C12H11NO2	ESI-(+)	127.0544	145.0651
434	オキサミル	C7H13N3O3S	ESI-(+)	72.0444	90.0549
443	メソミル	C5H10N2O2S	ESI-(+)	72.9982	88.0214
446	4,4'-メチレンジアニリン	C13H14N2	ESI-(+)	106.0647	89.0382
459	りん酸トリス(2-クロロエチル)	C6H12Cl3O4P	ESI-(+)	62.9997	222.9694
462	りん酸トリ-n-ブチル	C12H27O4P	ESI-(+)	98.9837	155.0469

検出有無判定と定量が可能な金属類 18物質

政令番号	物質名	元素組成	分析方法
1	亜鉛の水溶性化合物	Zn	ICP-MS
31	アンチモン及びその化合物	Sb	ICP-MS
44	インジウム及びその化合物	In	ICP-MS
75	カドミウム及びその化合物	Cd	ICP-MS
82	銀及びその水溶性化合物	Ag	ICP-MS
87	クロム及び3価クロム化合物	Cr	ICP-MS
132	コバルト及びその化合物	Co	ICP-MS
237	水銀及びその化合物	Hg	ICP-MS
242	セレン及びその化合物	Se	ICP-MS
272	銅水溶性塩（錯塩を除く。）	Cu	ICP-MS
305	鉛化合物	Pb	ICP-MS
309	ニッケル化合物	Ni	ICP-MS
321	バナジウム化合物	V	ICP-MS
332	砒素及びその無機化合物	As	ICP-MS
394	ベリリウム及びその化合物	Be	ICP-MS
405	ほう素化合物	B	ICP-MS
412	マンガン及びその化合物	Mn	ICP-MS
453	モリブデン及びその化合物	Mo	ICP-MS

- 極性・不揮発性有機化合物を対象に、LC-ESI(±)-QToF-MSで網羅的に取得した精密質量測定データを目的化合物の照合情報が収録されたデータベースと突合し、試料中の目的化合物の存在有無を判定する手法を下水試料へ適用
- 金属類はICP-MSによる一斉分析

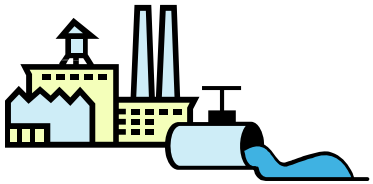
液体クロマトグラフ-精密質量分析計を用いたPRTR物質の簡易スクリーニング手法の構築と下水試料への適用（高沢他、*環境科学会誌*,33(5), 2020）

下水試料のターゲットスクリーニング分析および定量分析結果

政令番号	有機化合物	(n=11) 流入水	(n=11) 処理水
21	クロリダゾン	1	-
25	メトリブジン	1	7
27	メタミトロン	2	1
37	ビスフェノールA	6	7
52	アラニカルブ	4	5
74	p-オクチルフェノール	1	2
90	アトラジン	-	2
93	メトラクロール	-	2
113	シマジン	5	8
117	テブコナゾール	-	1
118	ミクロブタニル	-	1
124	クミルロン	1	3
143	4, 4'ージアミノジフェニルエーテル	-	1
147	チオベンカルブ	1	-
156	ジクロロアニリン	-	2
169	ジウロン	-	3
170	テトラコナゾール	-	1
224	N,N-ジメチルドデシルアミン=N-オキシド	4	-
229	チオファネートメチル	1	1
320	ノニルフェノール	8	2
334	4ーヒドロキシ安息香酸メチル	10	3
335	アセトアミノフェン	7	3
346	2ーフェニルフェノール	-	1
349	フェノール	11	11
358	テブフェノジド	2	1
369	プロパルギット	2	2
370	ピリダベン	2	3
383	ブロマシル	5	5
393	ベタナフトール	4	3
396	PFOS	3	3
402	メフェナセット	-	1
403	ベンゾフェノン	3	1
425	イソプロカルブ	-	2
426	カルボフラン	1	1
427	カルバリル	5	9
444	トリフロキシストロビン	1	2
445	クレソキシムメチル	1	2
446	4,4'-メチレンジアニリン	1	1
449	フェンメディファム	-	1
461	りん酸トリフェニル	3	2

政令番号	金属類	(n=11) 流入水	(n=11) 処理水
1	亜鉛の水溶性化合物	11	11
31	アンチモン及びその化合物	5	5
44	インジウム及びその化合物	1	4
75	カドミウム及びその化合物	2	2
82	銀及びその水溶性化合物	2	4
87	クロム及び3価クロム化合物	11	11
132	コバルト及びその化合物	6	6
242	セレン及びその化合物	11	11
272	銅水溶性塩(錯塩を除く。)	11	11
305	鉛化合物	11	11
309	ニッケル化合物	11	11
321	バナジウム化合物	11	11
332	砒素及びその無機化合物	8	10
405	ほう素化合物	11	11
412	マンガン及びその化合物	11	11
453	モリブデン及びその化合物	11	11

10施設での実測調査を実施(11試料セット)



構築したPRTRデータベースを用いて有無判定

いずれかの施設(試料)で検出された物質数

流入水
- 有機化合物　28 /82物質
- 金属類　16 /18物質

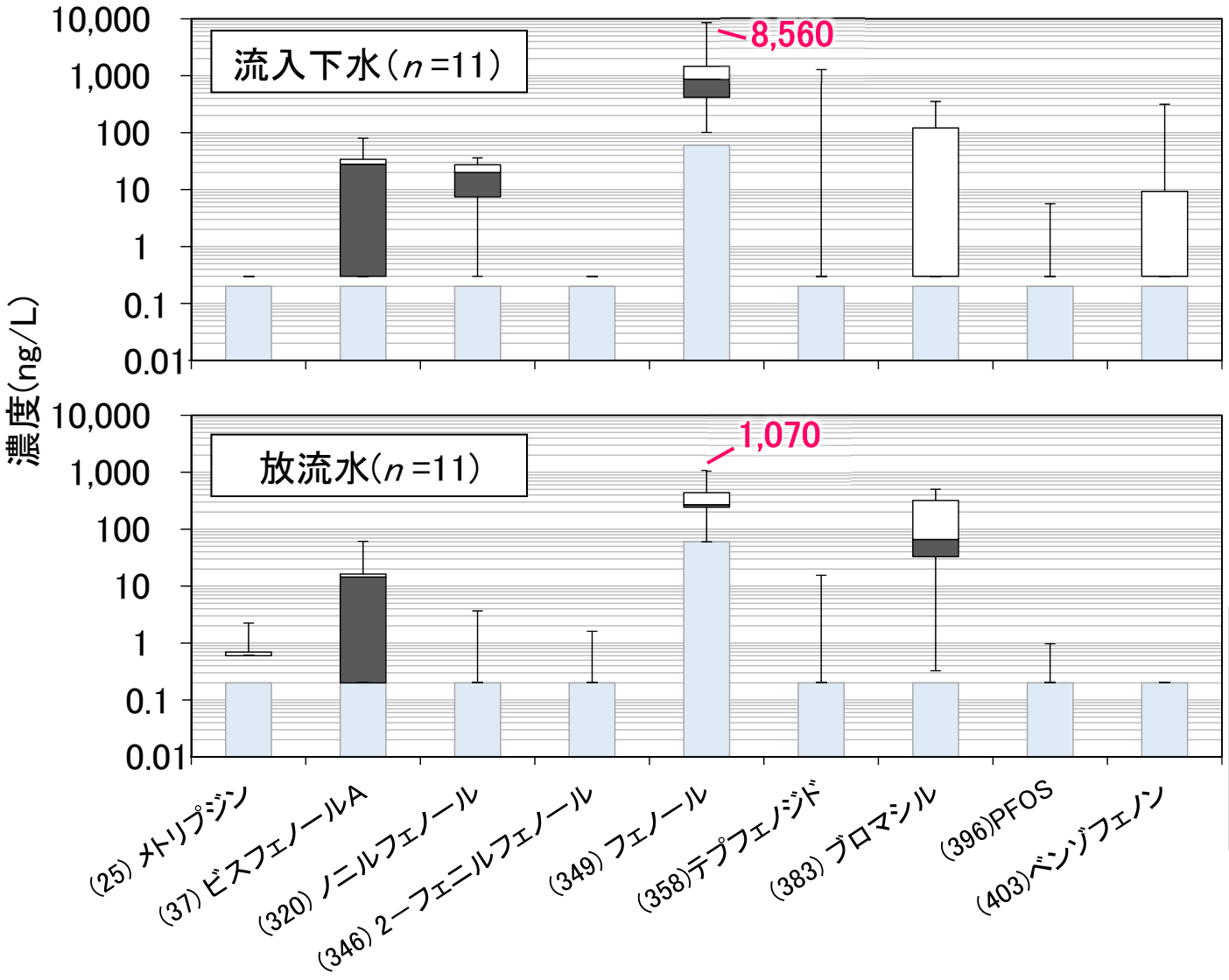
処理水
- 有機化合物　37 /82物質
- 金属類　16 /18物質

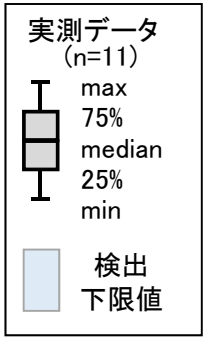
定量された物質数
- 有機化合物　9物質
- 金属類　16物質

流入および排出される物質の予測が困難な下水試料に対し、ターゲットスクリーニング分析を導入することで**効率的に定量値を取得**

有機物質の下水試料中濃度

除去率の中央値(%)	(25)	(37)	(320)	(346)	(349)	(358)	(383)	(396)	(403)
	56.2	47.8	99.0	*N.A.*	22.9	99.9	–	82.7	99.4





濃度

・流入下水・放流水
共にフェノールが最大
(**最大値図示**)

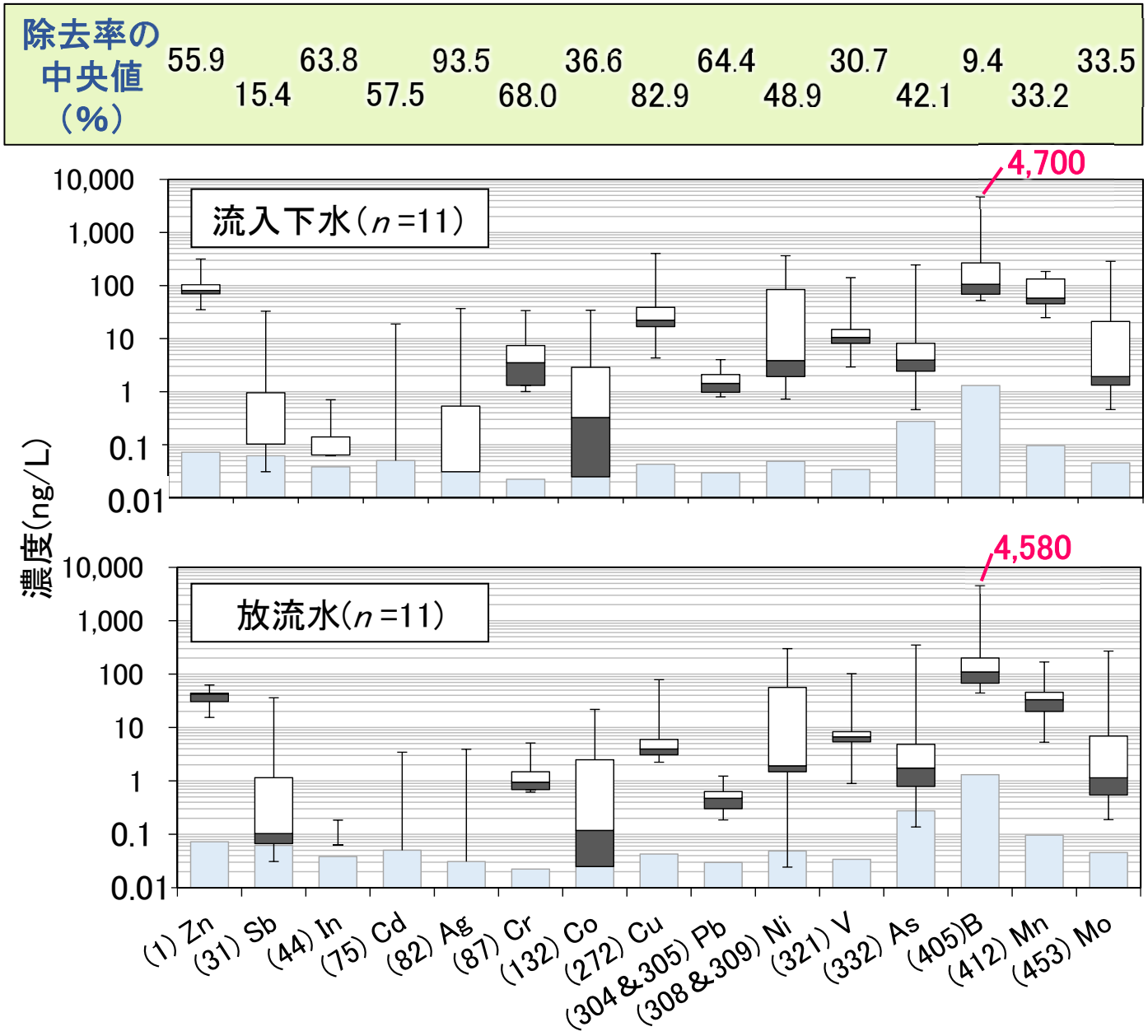
除去率

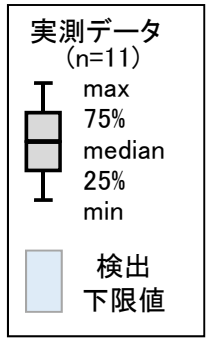
・処理場のばらつきは
あるものの概ね
物質別の傾向を把握

・検出されやすい
物質の傾向を把握
・個別分析法によらず
効率的に調査データを
取得・蓄積

※括弧( )内は政令番号

無機物質の下水試料中濃度





濃度

・流入下水・放流水共にB（ホウ素）が最大

・Cd,Ag,は中央値が定量下限値未満（**最大値図示**）

除去率

・有機物質と同様物質別の傾向を把握

各処理場の存在実態の**比較検討ができる頻度で定量値を取得**

※括弧（ ）内は政令番号

PRTR公表データとの比較｜① 放流水への移行率

届出外推計資料で示されている
移行率設定値 （公共用水域）

比較

実測データから算出した移行率
（放流水濃度/流入水濃度、n =11の中央値）

政令番号	物質	移行率(%)		
		届出外推計の設定値（2016年度）		本研究の実測値（11試料の中央値）
1	亜鉛の水溶性化合物（Zn）	実測(既報)	28.5	44.1
25	メトリブジン	簡易推計式	99.8	43.8
37	ビスフェノールA（BPA）	実測(既報)	3.0	52.2
82	銀及びその水溶性化合物（Ag）	実測(既報)	5.0	6.5
87	クロム及び三価クロム化合物（Cr）	実測(既報)	30.0	32.0
132	コバルト及びその化合物（Co）	実測(既報)	64.0	63.4
272	銅水溶性塩（錯塩を除く。）(Cu)	実測(既報)	20.0	17.1
304/305	鉛/鉛化合物（Pb）	実測(既報)	24.5	35.6
308/309	ニッケル/ニッケル化合物（Ni）	実測(既報)	65.3	51.1
320	ノニルフェノール	実測(既報)	0	1.0
321	バナジウム化合物（V）	実測(既報)	22.0	69.3
332	砒素及びその無機化合物（As）	実測(既報)	51.5	57.9
349	フェノール（Phe）	実測(既報)	1.0	77.1
358	テブフェノジド	簡易推計式	57.1	0.1
403	ベンゾフェノン	簡易推計式	93.9	0.6
405	ほう素化合物（B）	実測(既報)	88.7	90.6
412	マンガン及びその化合物（Mn）	実測(既報)	58.3	66.8

- 11物質は設定値と本研究の実測値の乖離が20%以下

➔ 設定値：実測データに基づく

- 3物質は実測データに基づいているが乖離が大きい

➔ 設定値の参照実測データ数が少ない可能性

（BPA：n =30，その他不明）

- 簡易推計式で移行率が設定されている3物質は乖離が大きい

➔実測データに基づく

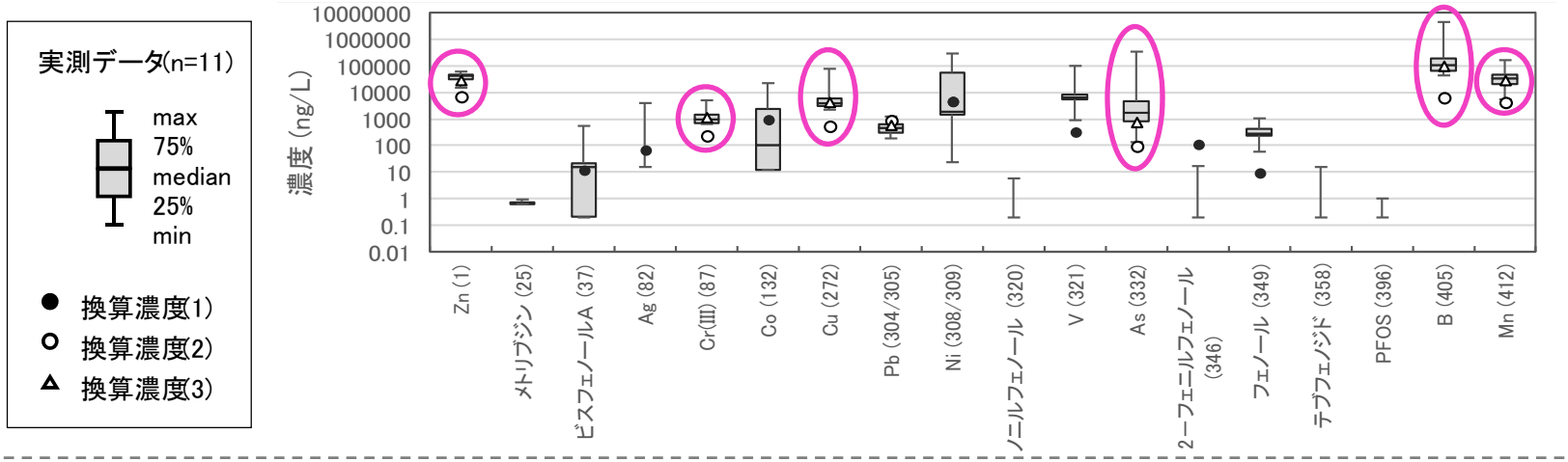
移行率設定の必要性を示唆

□ 届出外排出量推計値が得られている物質

□ 特別要件施設として排出量が届出されている物質

下水道を経由する化学物質の実測データの充実とそれに基づく移行率の設定が
PRTR排出量推計の精緻化に寄与し、化学物質の把握向上につながる可能性

PRTR公表データとの比較｜② 下水道への移動・流入量



● 換算濃度（1）届出外推計排出量を全国処理水量で除して放流水濃度に換算した値

○ 換算濃度（2）届出外推計排出量相当の値（流入量と放流水への移行率から算出）を全国処理水量で除して放流水濃度に換算した値

△ 換算濃度（3）届出排出量（下水道事業者の実測に基づいて算出）を放流水濃度に換算した値

推計誤差要因の検証のために、実測結果と公表データ（2016年度分）を比較できるよう換算
（環境省HP: PRTRインフォメーション広場）

- 換算濃度(1)(2)（公表データから換算した放流水濃度）は、本研究の実測値よりも1桁程度低い
- 換算濃度(3)（事業者の実測に基づく届出排出量）は、本研究の実測値と同程度

PRTR届出外排出量推計で適用されている
下水処理場への**流入量が**
過小評価されている可能性を示唆
（上流事業者からの届出移動量など）

３．下水処理水の生物影響

胚・仔魚期の魚類の生物応答と網羅的遺伝子発現解析による下水処理水の影響評価

ゼブラフィッシュの胚・仔魚期の生物応答と網羅的遺伝子発現解析による下水処理水の短期毒性評価（北村他、*土木学会論文集G(環境)*33(7)、2020

研究背景

排水の管理　→　個別化学物質の濃度管理　→　安全？、限界？

- 新規化学物質、その分解産物、様々な化学物質の複合影響を個別の化学物質の濃度から水生生物への安全性を評価することは難しい。
- 水生生物の安全性は、急性（致死）から慢性影響（個体群存続）評価の方向

平成25年 「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」公表
排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術分科会

	観察項目	
1. 淡水藻類を用いる生長阻害試験法（案）	生長	慢性影響
2. ニセネコゼミジンコを用いる繁殖試験（案）	繁殖	慢性影響
3. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法（案）	ふ化率、生残率	致死

↓

実態調査の結果、一般的な下水処理場の放流水は、概ね影響なし

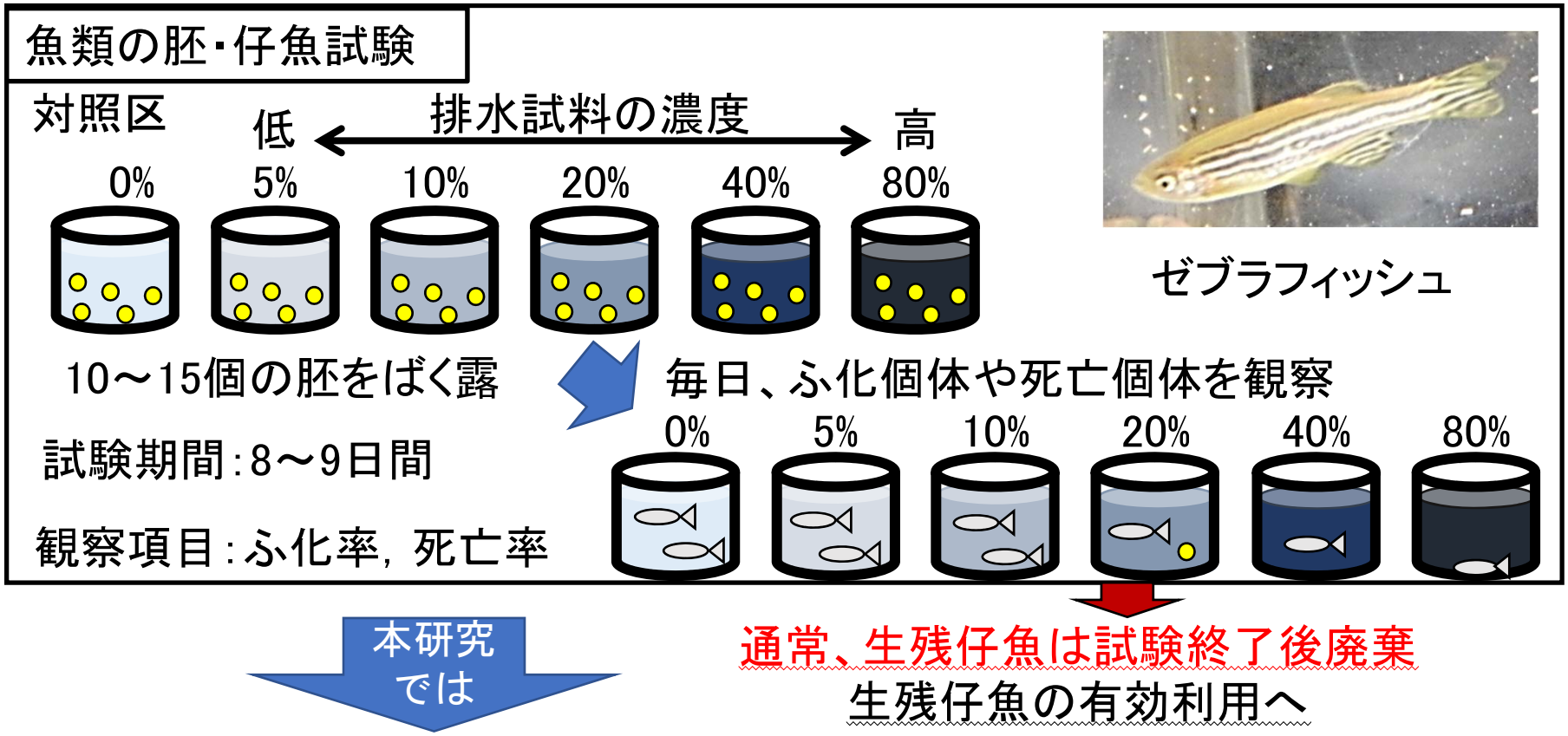
平成31年　この時点では、事業者の自主的な取り組み
（現在　民間企業、地方環境研究センターなどで試験の実施が可能）

ただし

下水放流水の魚類への影響評価は、致死に対する影響だけではなく、成長や繁殖への影響評価も重要。「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法（案）」では評価できない。

研究背景と研究目的

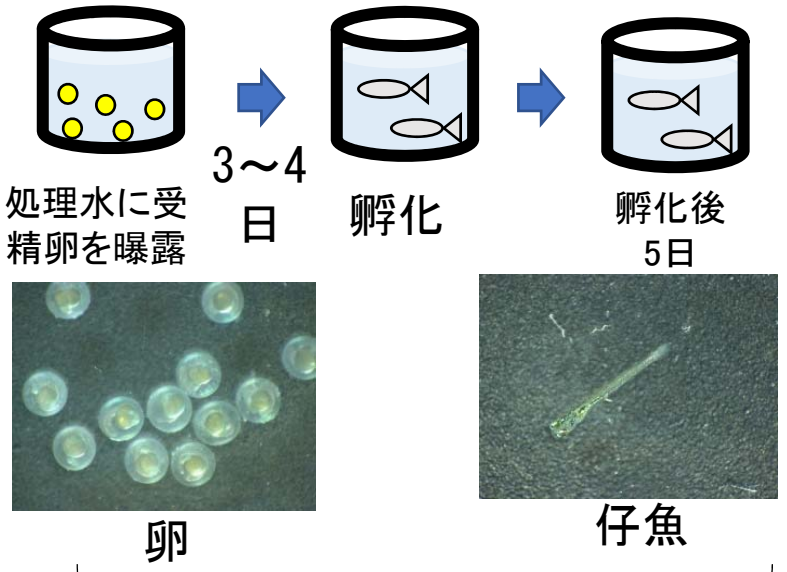
「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法（案）」とは



試験終了後の仔魚は、遺伝子レベルで様々な影響を受けている可能性がある。
生残仔魚に対し遺伝子発現解析を追加することにより、仔魚が受けている様々なストレスを同定できる可能性がある。

研究内容

試験のイメージ



胚･仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験

「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」に準拠）

本研究の範囲

研究内容：

- **孵化仔魚への網羅的遺伝子発現解析手法の適用性（本当に、遺伝子発現レベルでの影響検出が可能か）**
- **下水高度処理過程で遺伝子レベルの影響低減効果の把握**

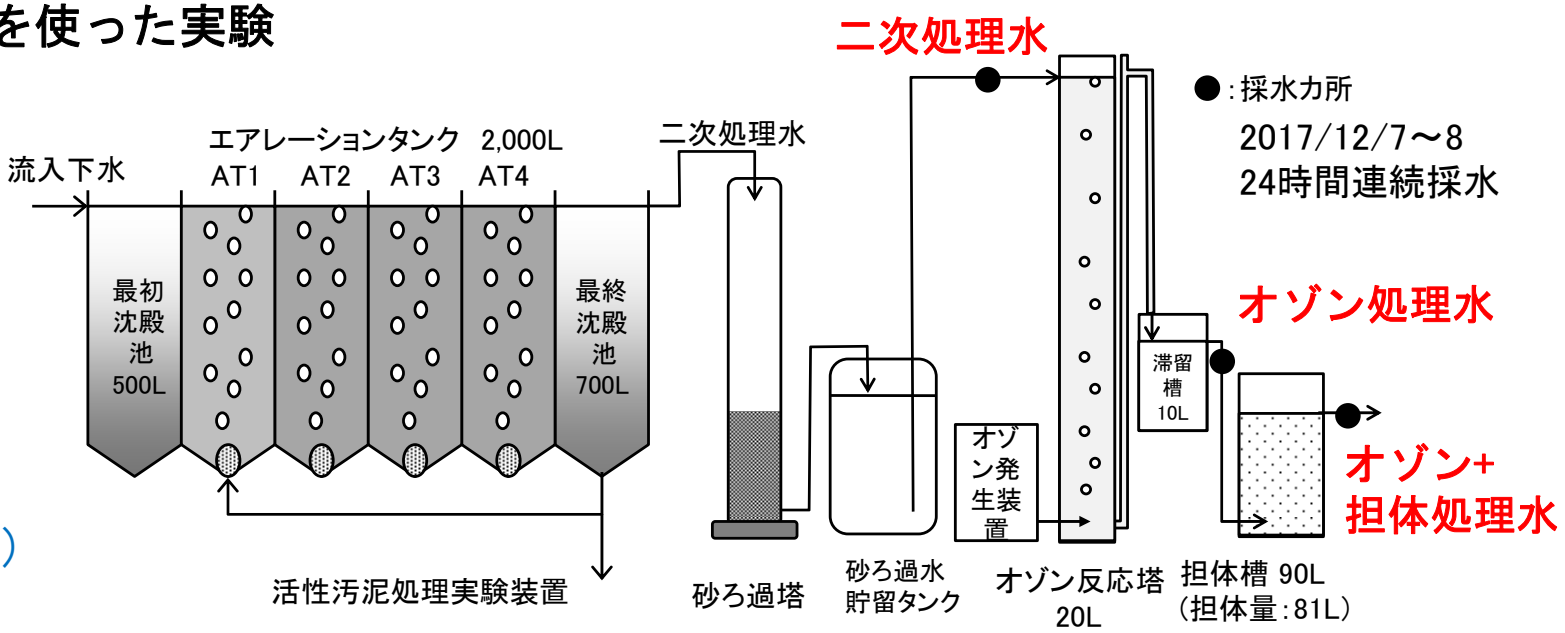
遺伝子レベルでの

→ 短期毒性試験で 慢性影響の評価が可能か

実験方法　下水処理水の処理法と採水ポイント

実下水処理水を使った実験

曝露水の種類
（4種類）
- 二次処理水
- オゾン処理水
- オゾン
　＋担体処理水
- 脱塩素水道水
（コントロール）



オゾン処理条件

- オゾン反応塔：容量20L
- 接触方法：気液対向方式
- オゾン注入量：約 3mg/L

接触時間：約20分

生物膜法：
担体によるろ過処理
（ポリプロピレン担体）

担体処理条件

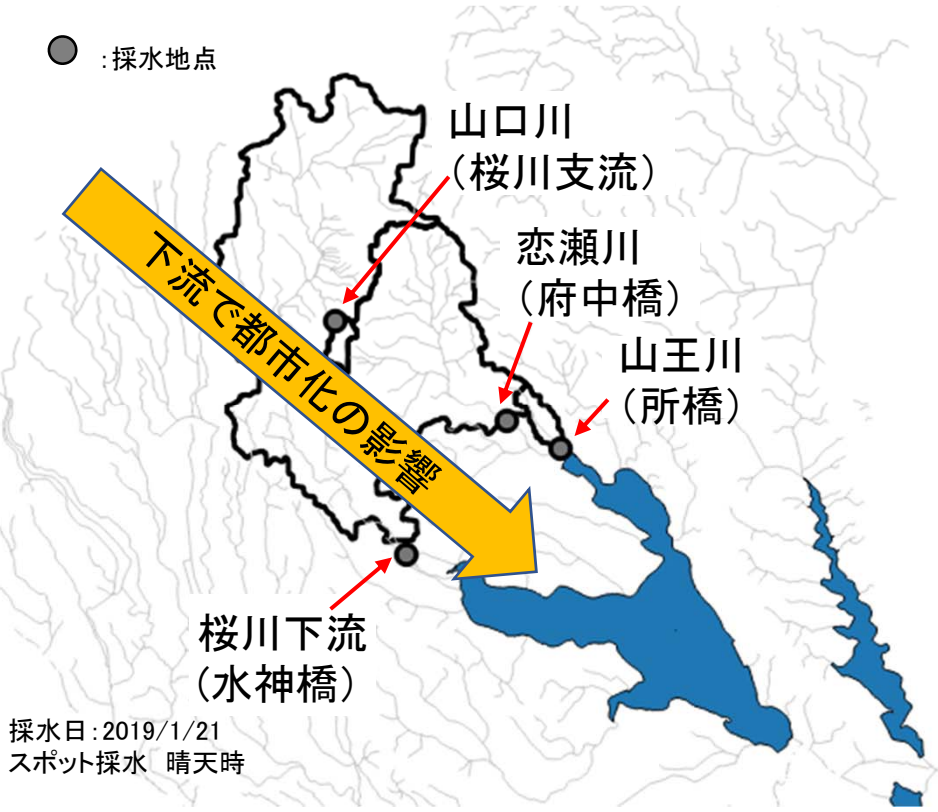
- 容量：90L
- 担体容積：81L
- 担体種類：ポリプロピレン中空担体

$4mm^{OD} \times 3mm^{ID} \times 5mm^{L}$

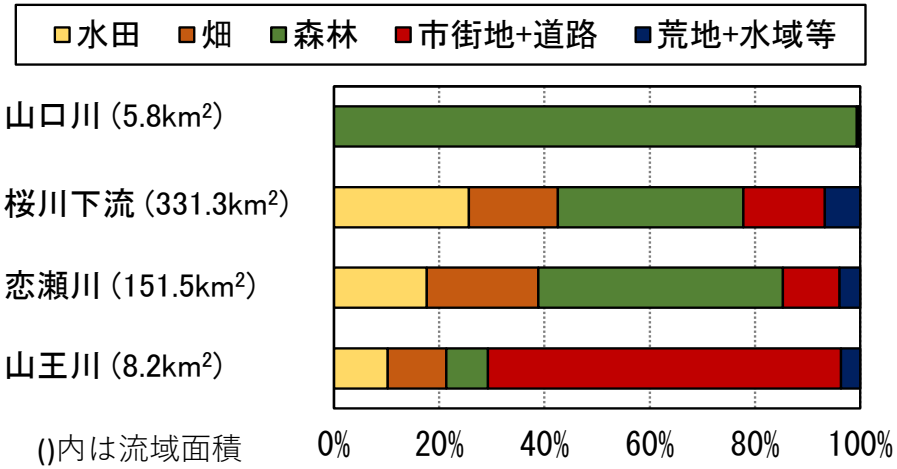
- 接触方式：上向流
- 接触時間：2時間

実験方法　河川水採水地点と土地利用の概要

下水処理水の影響レベルを河川水と比較



霞ヶ浦流入河川



土地利用の割合

生物類型B類型に指定されている河川

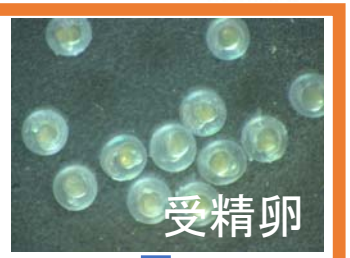
【参考】河川の類型指定の一覧

類型	水生生物の生息状況の適応性
生物 A	イワナ、サケマス等比較的低温域を好む水生生物及びこ れらの餌生物が生息する水域
生物特 A	生物 A の水域のうち、生物 A の欄に掲げる水生生物の 産卵場（繁殖場）又は幼稚仔の生育場として特に保全が 必要な水域
生物 B	**コイ、フナ等比較的高温域を好む水生生物及びこれらの餌生物が生息する水域**
生物特 B	生物 A 又は生物 B の水域のうち、生物 B の欄に掲げる 水生生物の産卵場（繁殖場）又は幼稚仔の生育場として 特に保全が必要な水域

実験方法　生物応答試験＋仔魚遺伝子発現解析

胚･仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験（生物応答を用いた排水試験法（検討案）準拠）

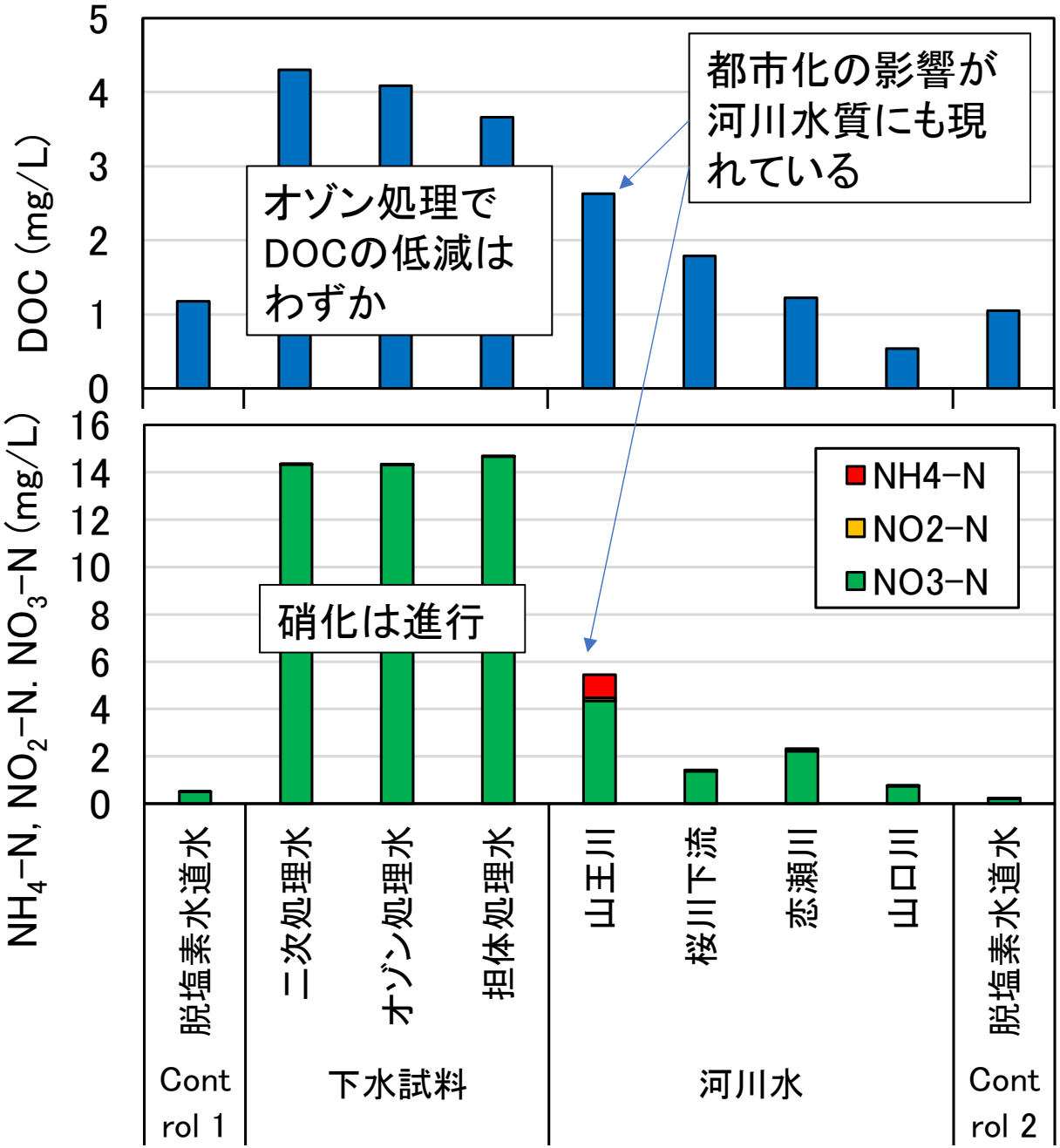
試験生物　：ゼブラフィッシュ受精卵(受精後4時間以内)
対照水、希釈水：脱塩素水道水
試験試料　：二次処理水、オゾン処理水、担体処理水、河川水
試験区　　：二次処理水は80、40、20、10%の4段階
　　※オゾン処理水、担体処理水、河川水は80%曝露区のみ
曝露方式　：半止水式
曝露期間　：ふか後5日間
連数　　：4連/試験区
試験生物数：60個体/試験区(15個体/試験容器)



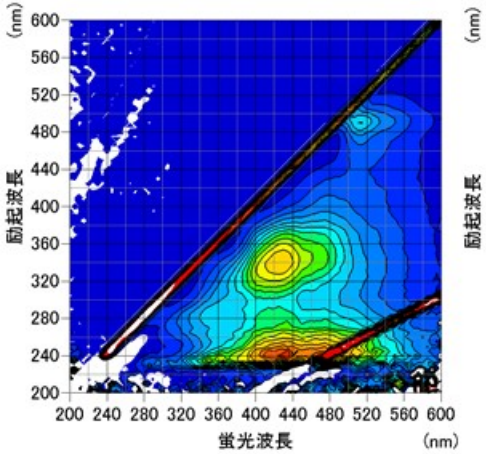
仔魚遺伝子発現解析

① RNA抽出
② 次世代シーケンサー　ライブラリー調製
③ シーケンス
④ ゼブラフィッシュゲノムへのマッピングと遺伝子発現量の算出
⑤ ジーンオントロジー（GO）情報を付与
⑥ 発現変動遺伝子の抽出
⑦ Fisherの正確確率検定で発現変動遺伝子の機能解析

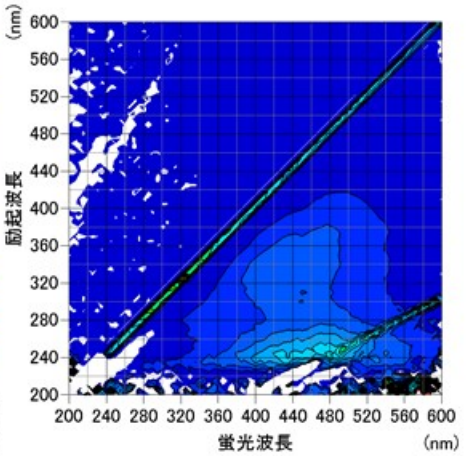
曝露原水の水質(DOC、各態窒素)



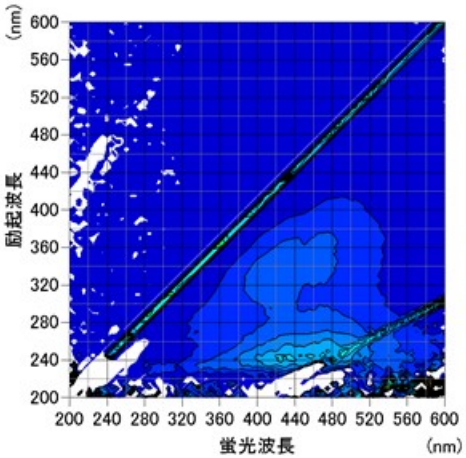
曝露原水の水質（三次元蛍光分析結果）



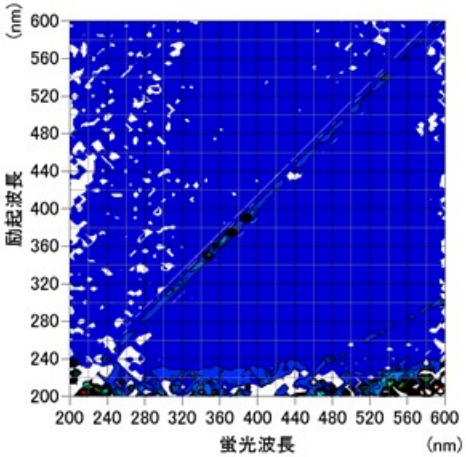
二次処理水



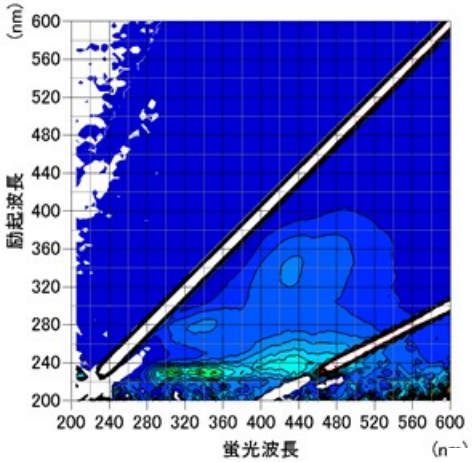
オゾン処理水



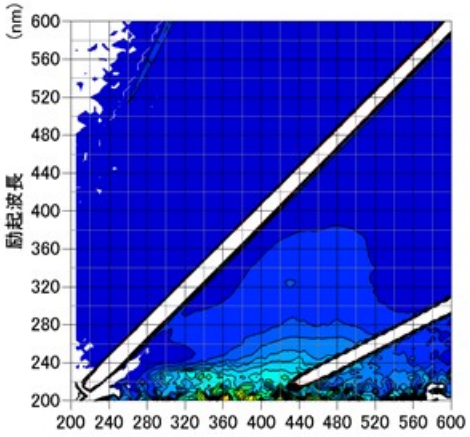
オゾン+担体処理水



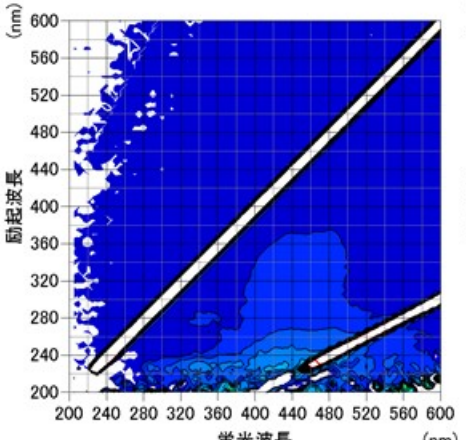
脱塩素水道水
（コントロール）



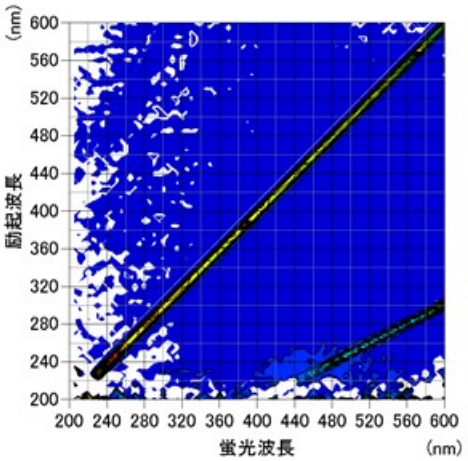
山王川



桜川下流



恋瀬川

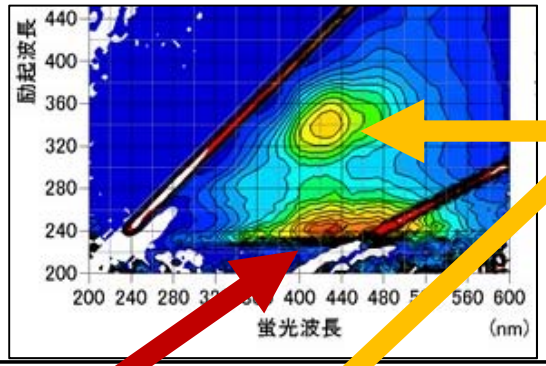


山口川

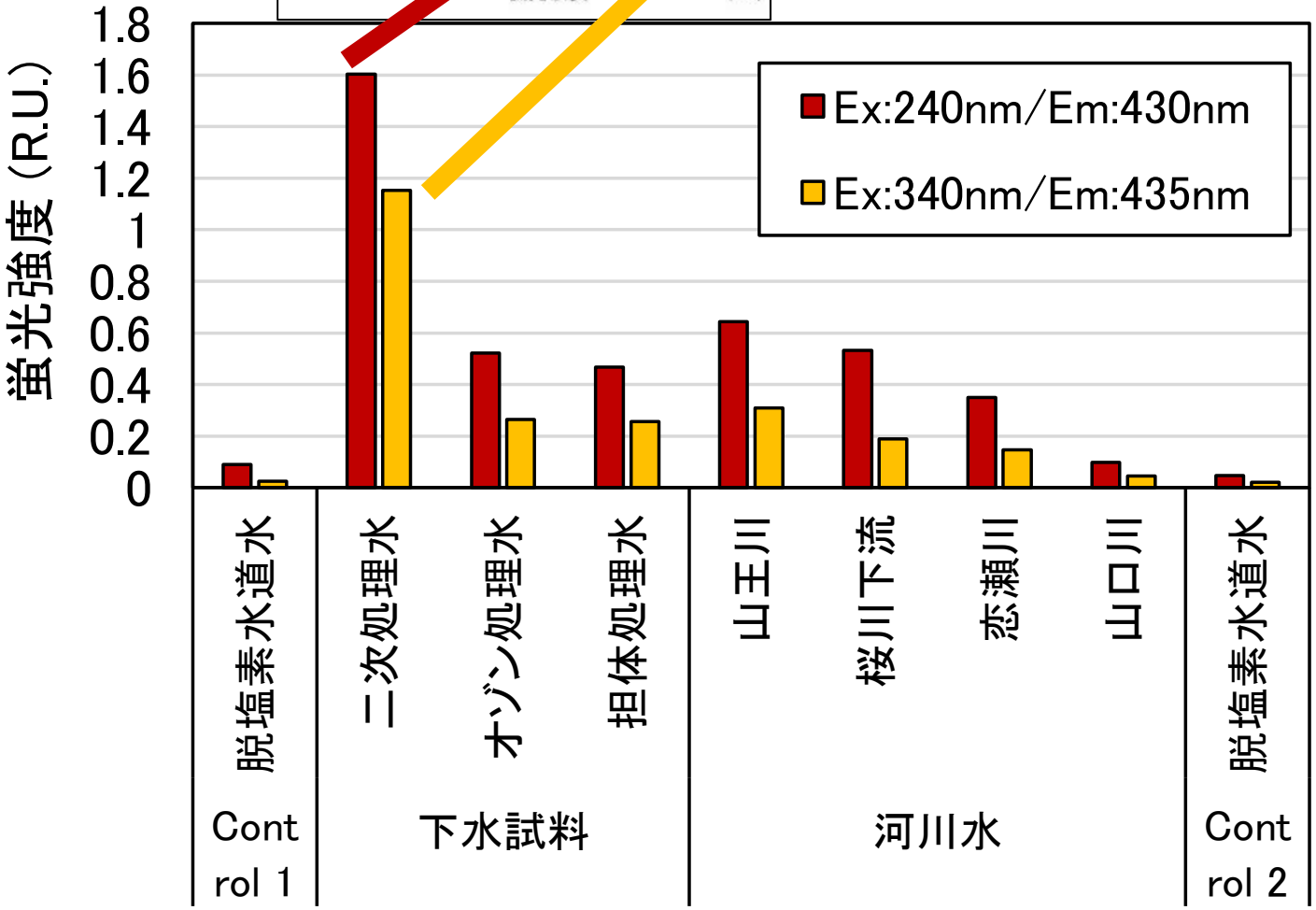
蛍光強度（R.U.）

三次元蛍光分析、日立ハイテクノロジーズ製f-4500
励起波長（Ex）200～600 nm、蛍光波長（Em）200～600 nm、超純水の励起波長350nmのラマンピーク面積で規格化

曝露原水の水質特性（三次元蛍光分析の蛍光強度）

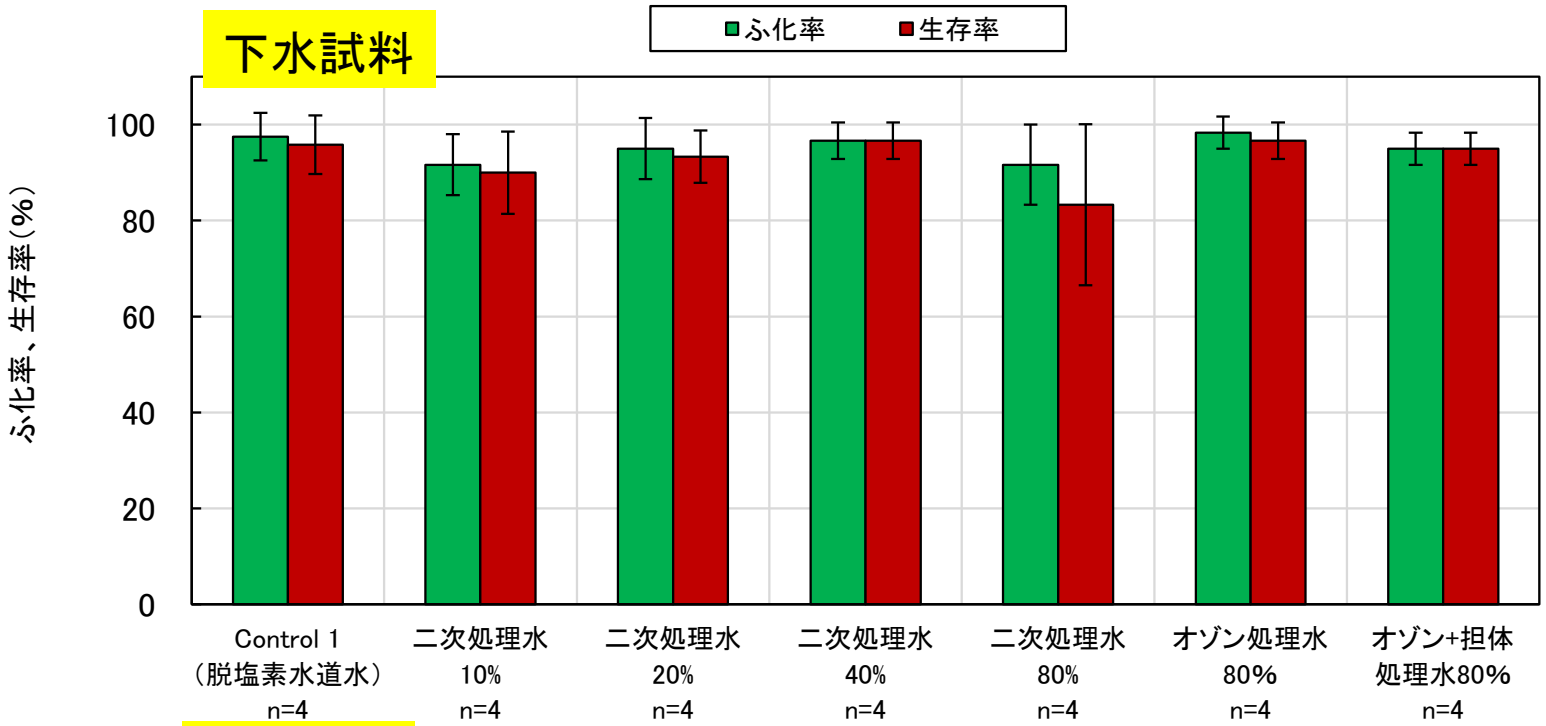


処理水や都市化の影響と
蛍光強度の関連性が示唆される

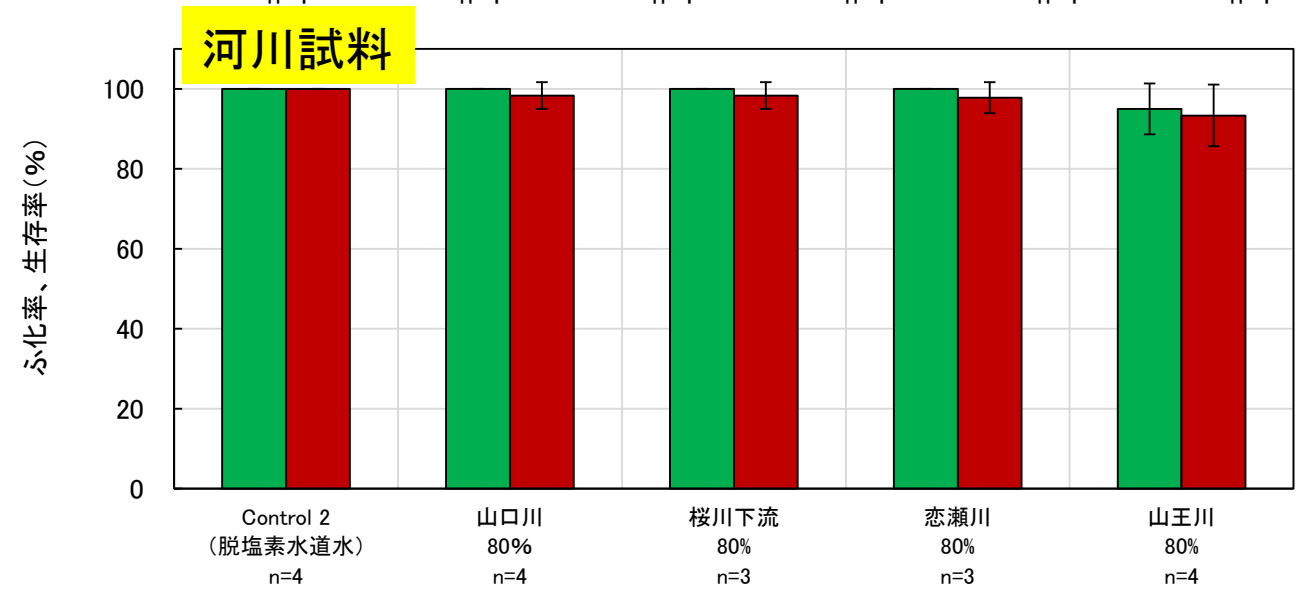


生物応答試験の結果（下水・河川試料）

下水試料



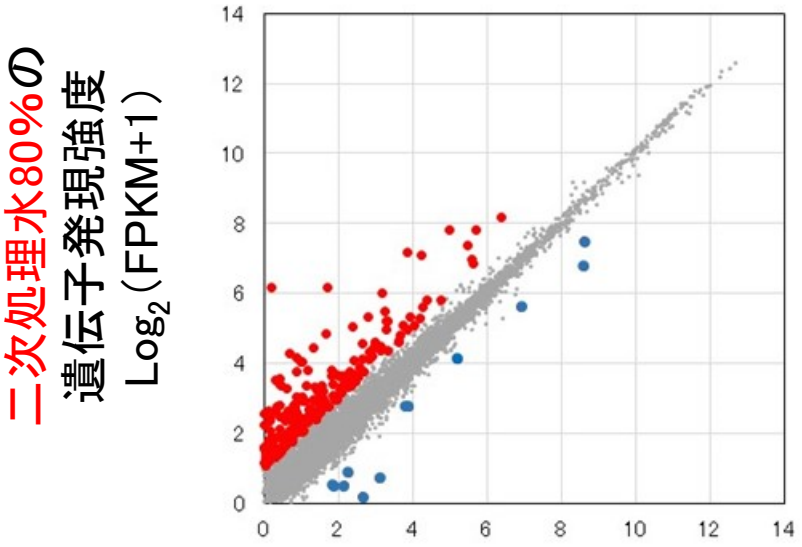
河川試料

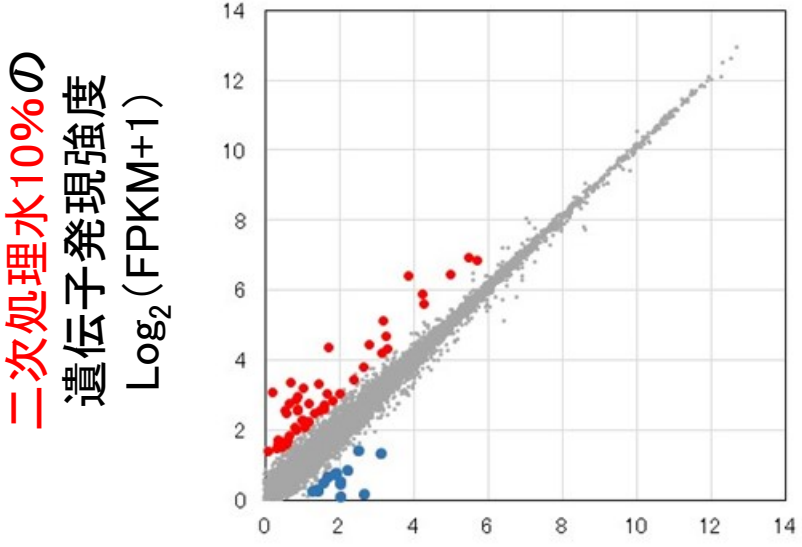


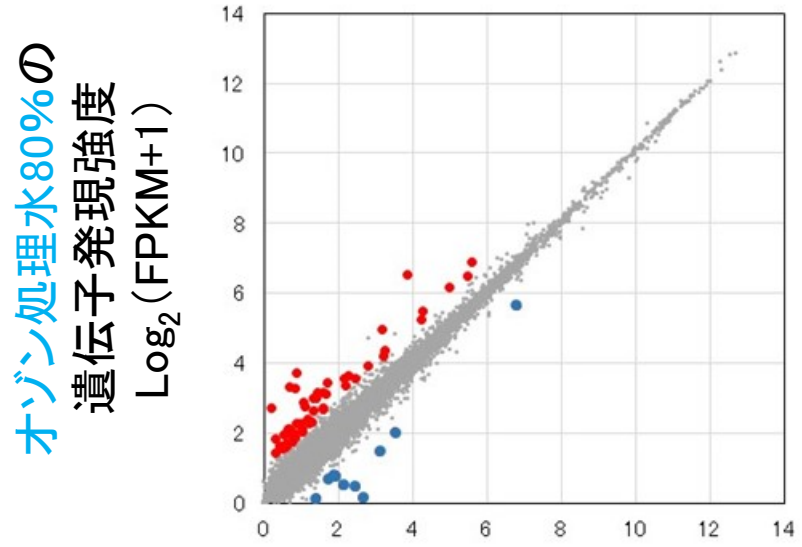
下水、河川試料
すべてで有意差なし

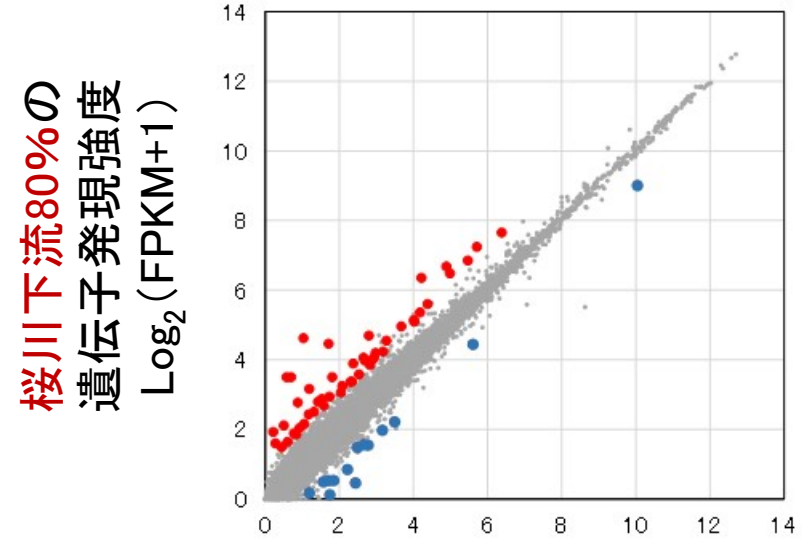
Dunett検定
対照群との比較　$p>0.05$
（Excel統計による）

遺伝子発現解析の結果（発現変動遺伝子強度で抽出）









コントロールの遺伝子発現強度
Log_2（FPKM+1）

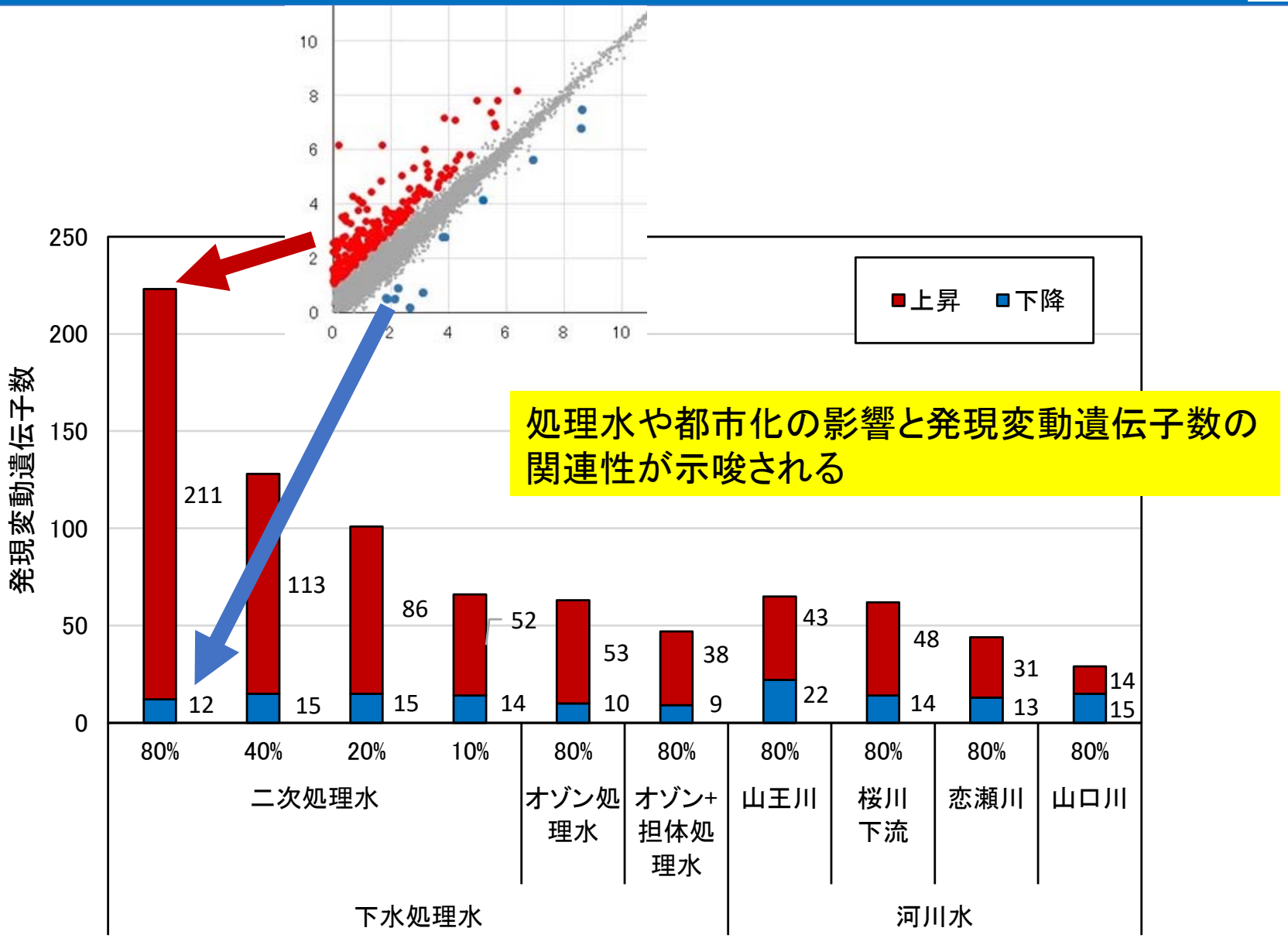
コントロールの遺伝子発現強度
Log_2（FPKM+1）

● 上昇遺伝子

● 下降遺伝子

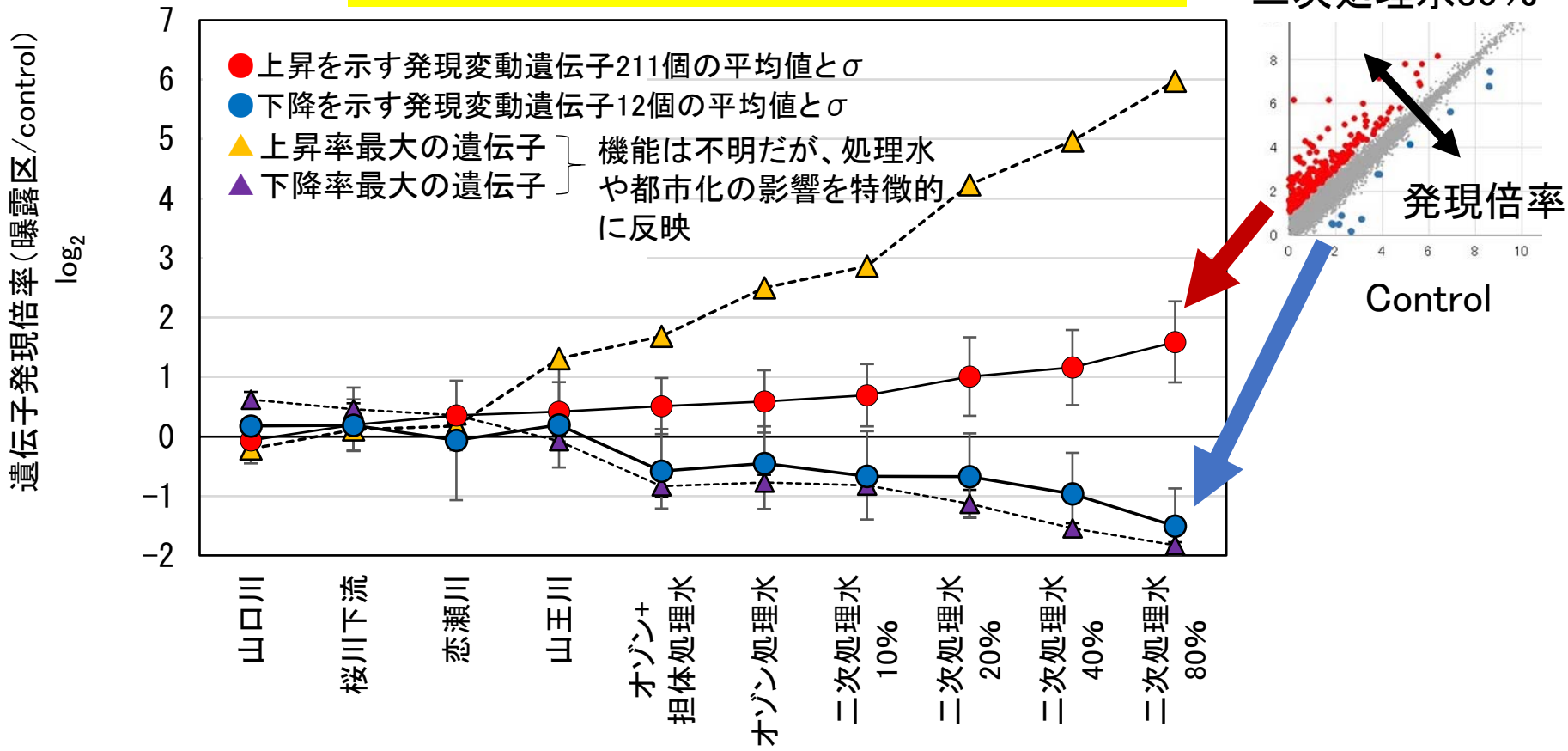
抽出条件
- Fold change
  2
  2倍以上
  ½以下
- t検定
  $p < 0.05$

遺伝子発現解析の結果（発現変動遺伝子数）



遺伝子発現解析の結果（発現変動遺伝子の発現倍率）

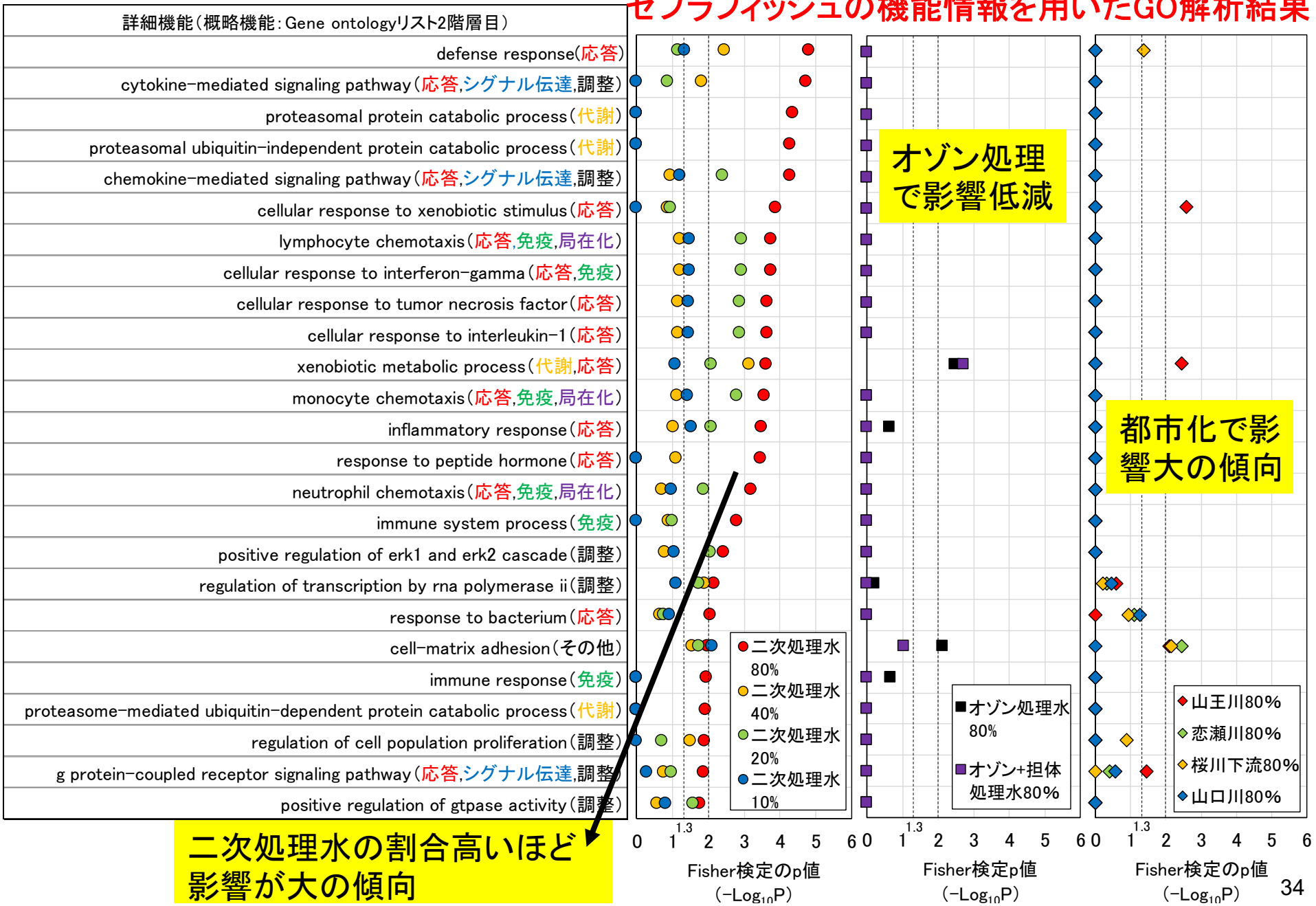
処理水や都市化の影響と発現変動遺伝子の発現倍率との関連性が示唆される



二次処理水80%曝露区で抽出された発現変動遺伝子の希釈試料、オゾン処理水、河川水における発現強度の違い

遺伝子発現解析の結果（機能解析：ジーンオントロジー）

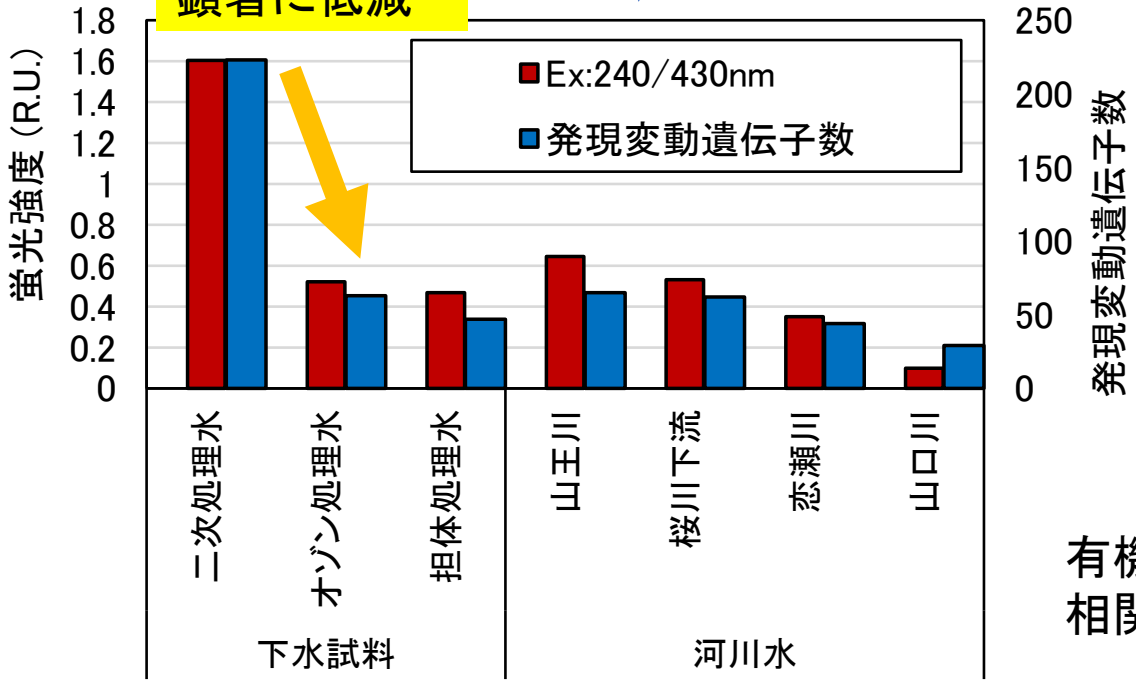
ゼブラフィッシュの機能情報を用いたGO解析結果

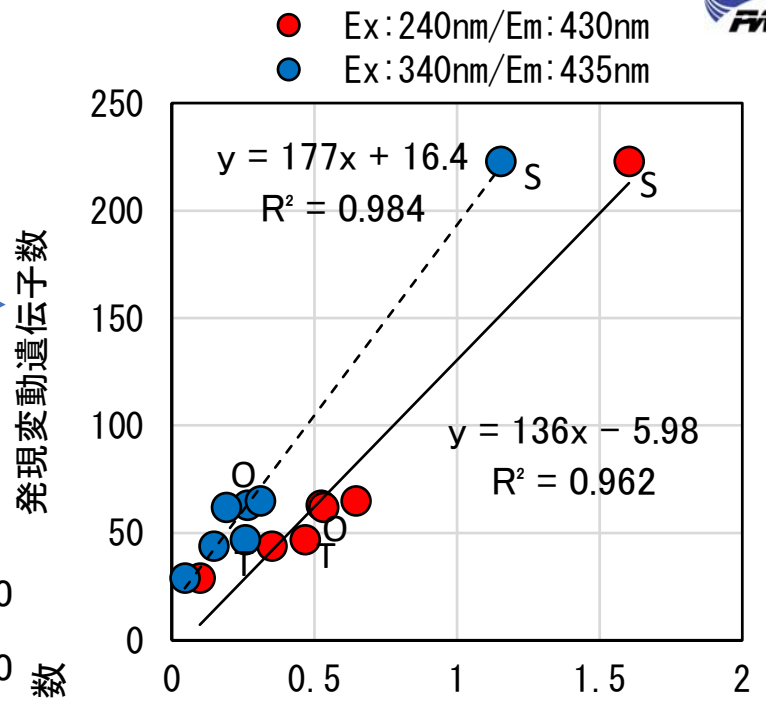


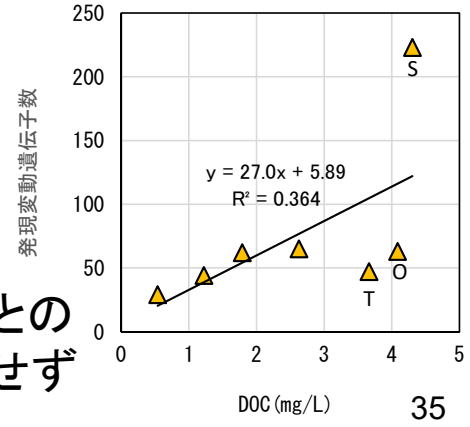
水質と遺伝子発現の関係（蛍光強度と発現変動遺伝子数）

蛍光強度と発現変動遺伝子数には
良好な相関あり
→水質が遺伝子発現へ与える影響
の把握手段として活用可能性あり

オゾン処理で
顕著に低減







有機物や窒素との
相関は見いだせず

まとめ（3．下水処理水の生物影響）

(1)「胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験」に網羅的遺伝子発現解析を追加することで，魚の生体維持に関わる様々な機能への影響が検出できた。

(2) 二次処理水の希釈系列の生物応答試験では，最大濃度80%でも，ふ化率と生存率に影響は見られなかったが，網羅的遺伝子発現解析では発現変動遺伝子数の増加が確認され，遺伝子発現への影響が見られた。

(3) 二次処理水曝露により発現変動を示した遺伝子群を機能解析した結果，応答，免疫，代謝，シグナル伝達など様々な影響を受けている可能性があった。

(4) 二次処理水80%曝露区で見られた遺伝子発現影響は，希釈されることにより低減できることがわかった。10倍希釈されることにより，発現変動遺伝子数を概ね河川水下流程度まで低減でき，各機能への影響も低減できることがわかった。

(5) オゾン処理は発現変動遺伝数の抑制に顕著な効果があった。

(6) 下水処理水が魚類に与える遺伝子発現レベルの影響は，河川水を比較対象とすることで相対評価が可能と考えられた。

(7) 遺伝子発現は，溶存有機物の内，特に蛍光特性を有する有機物に応答した可能性が考えられた。

全体まとめ

- **下水処理への化学物質の影響の観点**より、硝化阻害物質を例に、構造に基づく影響予測による管理効率化の可能性を見出した。

- **下水道～水環境への化学物質の動きの観点**より、精密質量分析によるスクリーニングの活用で、効率的に挙動を把握する手法を見出した。

- **下水処理水の生物影響の観点**より、胚・仔魚期の魚類の生物応答と網羅的遺伝子発現解析により、効率的に影響評価できる可能性を見出した。