

廃棄物処理等科学研究補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名・研究番号 = 嫌気性アンモニア酸化型メンブレンバイオリアクターを核とした新規浸出水処理システムの開発と DNA チップを用いた処理水の安全性評価手法の確立 (K1740)

国庫補助金精算所要額 (円) = 60,920,000

研究期間 (西暦) = 2003-2005

研究年度(西暦) = 2003-2005

研究代表者名 = 渡辺 義公 (北海道大学)

共同研究者 = 岡部 聡 (北海道大学)、木村 克輝 (北海道大学)

研究目的

廃棄物管理型処分場から発生する浸出水は、内乱分泌攪乱化学物質 (endocrine disrupting compounds, EDCs) や医薬品由来化合物 (pharmaceutically active compounds, PhACs) など、微量有機汚染物質の主要発生源の一つとなっている可能性があり、浸出水による水環境の汚染が懸念されている。そこで本研究の目的は、メンブレンバイオリアクター (MBR) と NF/RO 膜処理を併用し、廃棄物管理型処分場からの浸出水中の医薬品化合物 (PhACs) およびアンモニア性窒素の高度処理する技術を確立することである。さらに、処理水の安全性 (毒性) 評価を行うために、DNA チップを用いた新規多指標型バイオアッセイ手法の開発を行うことを目的とする。

具体的には、MBR および NF/RO 膜による PhACs の除去については検討事例が決定的に不足しているため、実下水処理場内に設置したパイロットスケール MBR 装置における PhACs 除去性と標準活性汚泥法における PhACs 除去性を比較し、MBR を用いた際の PhACs 除去性向上の可能性について検討した。また、NF/RO 膜による PhACs の除去性についても検討を行った。アンモニア性窒素除去に関しては、Anammox 菌の集積培養方法の確立および迅速なモニタリングツールと成り得る分子生物学的手法 (Real-Time PCR 法等) を開発し、様々な排水処理場の汚泥をモニタリングすることにより、Anammox 菌の集積培養に適した種汚泥の選定を行い、実用化へ向けた集積培養条件を決定し、連続培養系の上向流バイオカラムリアクターを立ち上げた。DNA チップを用いた新規多指標型バイオアッセイ手法の開発に関しては、化学物質のタンパク質変性作用および酸化ストレス作用を持つ代表的な化学物質について検討を行った。これらの化学物質に対する細胞曝露実験条件を決定し、基礎的な遺伝子発現プロファイルの解析を行い、特異的遺伝子マーカー選定のための一連の実験的手法を確立した。

研究方法

標準活性汚泥法を採用している実下水処理場の最終沈殿池流出水を採取し PhACs 濃度を測定した。処理場の最初沈殿池流出水の一部を場内併設の MBR プラントに原水として供給した。本研究では、先行研究例において水環境中で存在が報告されている抗炎症薬や抗癲癇薬などの 14 種類の医薬品を測定の対象とし、MBR における PhACs 除去性と標準活性汚泥法における PhACs 除去性を比較した。

また、先行研究例において水環境中で存在が報告されており、誘導体化-GC/MS 法により測定が可能である 6 種の酸性医薬品 (clofibrac acid, ibuprofen, naproxen, ketoprofen, mefenamic acid, diclofenac) を検討対象とし、

NF/RO 膜による除去性について検討した。使用した NF/RO 膜は、ポリアミド製 NF 膜 (UTC-60) および RO 膜 (UTC-70HB, UTC-70UB) である。MBR 処理水 10 L をろ過原水として 48 時間のクロスフローろ過実験を行った。1 種類の膜について、採取時期の異なる試料水を用いた 3 回のクロスフロー実験を行い、これら酸性医薬品の除去性を比較した。

系統解析で検出された既往の ANAMMOX 菌に近縁なクローンおよび *Candidatus Brocadia anammoxidans*、*Candidatus kuenenia stuttgartiensis* に特異的なプライマーを設計し、Real-Time PCR 法により ANAMMOX 菌の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の定量方法を検討した。植種汚泥の選定を行うために 14 箇所の下水処理施設から 21 種類の汚泥を採取した。その後、ANAMMOX 細菌に特異的なプライマーセット 809f-1066r を用いて RTQ-PCR 法 (SYBR Green Assay) を適用し、ANAMMOX 細菌の 16S rRNA 遺伝子数の定量を行い、得られた結果を基に植種汚泥を選定した。上向流バイオカラムリアクターには不織布を生物膜担体として充填した (充填率約 5%) 高さ 50.0 cm、内径 4.5 cm、容積 0.8 L の上向流カラムを用いた。植種汚泥には RTQ-PCR 方法で選定した汚泥を用いた。基質として van de Graaf らの培地を参考にした人工無機培地を用いた。リアクターは培養温度を 37 °C、溶存酸素 (DO) を窒素曝気により 0.5 mg/L 以下、pH を 6.8-8.0 に調整し運転した。また、リアクター立ち上げ後、形成した生物膜を採取し、生物膜の細菌群集構造や ANAMMOX 活性の解析に供した。

タンパク質変性作用および酸化ストレス作用を誘導する代表的な化学物質にヒト細胞 (HepG2) を曝露したときに、特徴的に発現する遺伝子を DNA チップ技術を用いて解析した。タンパク質変性作用の代表的化学物質としてフェノールおよびドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、酸化ストレス作用として過マンガン酸カリウムおよび過酸化水素、比較対象として重金属としてカドミウムとニッケルを選択し、対象細胞としてはヒト肝細胞癌由来細胞株 HepG2 を用いた。各物質の曝露時間は 6 時間とし、ニュートラルレッドアッセイを用いた基礎細胞毒性試験を行って、細胞生存率が 60~80% となる濃度を曝露濃度とした。決定された曝露条件下で細胞を培養後、RNA を抽出し、逆転写反応、遺伝子断片の蛍光標識を行ってヒト遺伝子 DNA チップ (8795 個の遺伝子を搭載) 上のプローブとハイブリダイズさせた。得られたデータは解析ソフトウェア Avadis (Strand Life Science) を用いて、遺伝子発現量の数値化および統計学的処理を行った。

結果と考察

MBR および NF/RO 膜による PhACs の除去特性

分析の結果、測定対象とした化合物中、clofibric acid、ibuprofen、ketoprofen、naproxen、fenoprofen、mefenamic acid、diclofenac、primidone、carbamazepine の 9 種類の医薬品が流入下水中から検出された。検討対象とした医薬品は、各処理プロセスにおける除去性によって 3 つのグループに分類された。ibuprofen は MBR と標準活性汚泥法の双方において良好に除去されていたが、diclofenac はどちらの処理法によっても顕著な除去は観察されなかった。また、ketoprofen、mefenamic acid、naproxen、fenoprofen、clofibric acid については MBR における除去率が標準活性汚泥法における除去率に比較して著しく大きくなった。これらの PhACs 除去性は各化合物の構造に大きく影響されていることが示唆された。すなわち、構造中のベンゼン環数が 1 つの ibuprofen については、MBR と標準活性汚泥法は同程度の除去性を示していた一方で、ベンゼン環数が 2 つの ketoprofen、mefenamic acid、naproxen、fenoprofen については MBR における除去性が顕著であった。ベンゼン環とハロゲン基をそれぞれ 2 つ有する diclofenac は MBR および標準活性汚泥法の双方において除去率が極めて低い結果となった。

MBR による除去性が十分でなかった ketoprofen と diclofenac については、MBR 処理水中からそれぞれ 100 ng/L 程度の濃度で検出された。しかしながら、MBR 処理水をさらに NF/RO 膜処理することで、これらの医薬品濃度は検出限界付近まで減少させることが可能であった。MBR 処理水中に残存する ketoprofen と diclofenac 以外の医薬品についても、NF/RO 膜処理によって濃度を大幅に低減させることが可能であった。本実験で得られた各医薬品の除去率と公称脱塩率の間には、直接的な関連性が認められなかった。すなわち、clofibric acid

の場合を除いて、最も脱塩率の低いNF膜(UTC-60)を用いた場合に医薬品の除去率は最も高くなった。NF/RO膜を用いてMBR処理水をろ過する際の医薬品除去率は、一般に除去性能の指標とされている脱塩率のみによって予測することが困難であることが分かった。この原因の一つとして、MBR処理水中の有機物の影響が考えられる。

ANAMMOXバイオリアクターの構築

様々な処理場から採取した汚泥を対象としてRTQ-PCR法により、ANAMMOX細菌の16S rRNA遺伝子コピー数を定量した。また、ANAMMOX細菌の生育には窒素濃度が高く有機物濃度が低い排水が適していると考えられるため、RTQ-PCR法の定量結果と流入原水のC/N比を考慮して植種汚泥を選定した。ANAMMOX細菌の16S rRNA遺伝子コピー数が最も多く(1.61×10^8 AMX-copies/mg-MLSS)、かつ流入原水のC/N比が1程度であった都市下水処理施設の脱窒槽汚泥が最もANAMMOXポテンシャルが高いと判断し、上向流カラム型リアクターの植種汚泥とした。この汚泥を上向流バイオカラムリアクターに植種し、ANAMMOX細菌の連続集積培養を行った。運転開始から29日目においてANAMMOX反応とみられる $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の同時除去及び硝酸性窒素($\text{NO}_3^-\text{-N}$)の生成が確認され、65日目の窒素除去率は80%(窒素除去速度 $0.2 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$)に達した。ANAMMOX反応確認後の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及び $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 消費量、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生成量の化学量論比は過去に報告されている1:1.32:0.26と同様の1:1.31:0.18であった。また、生物膜が茶色からANAMMOX細菌特有の赤褐色に変化したことからANAMMOX細菌の集積が達成されたと判断した。その後、70日目から流入窒素負荷を段階的に上げたところ、順調に窒素除去速度が上昇し、247日目には $26.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を達成した。これは今までに報告されている世界最高速の窒素除去速度である $9.8 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ を大きく上回る速度である。

DNAマイクロアレイを用いた新規多指標型バイオアッセイ手法の開発

DNAチップを用いた遺伝子発現解析の結果より、HepG2は化学物質曝露によって明らかな遺伝子発現変動を示し、そのパターンには化学物質によって明瞭な差異が認められた。さらに、未処理対象群に対し2倍以上の有意な発現変動($P < 0.05$)を示した遺伝子の中から、タンパク質変性作用(フェノール、SDS)および酸化ストレス作用(過マンガン酸カリウム、過酸化水素)に対し、特異的に発現したと考えられる30前後の遺伝子群を絞り込んだ。これら遺伝子の機能分類をした結果、タンパク質変性作用では細胞内シグナル伝達および細胞分裂、酸化ストレス作用ではDNA修復および過酸化物質処理に関与する遺伝子が含まれており、これらの遺伝子が両作用を反映するマーカー遺伝子群として有用である可能性が示された。これらの遺伝子発現パターンを重金属であるカドミウムとニッケルの場合と比較した結果、上記の遺伝子のうち、酸化ストレスに関与するマーカー遺伝子群の顕著な発現が両重金属に共通して認められた。また、カドミウムについてはタンパク質変性に関与するマーカー遺伝子群の発現も確認された。さらに、重金属特異的遺伝子として、金属結合タンパク質であるメタロチオネインおよびZinc finger proteinの特徴的な発現が認められた。本研究で確立した手法により、重金属をその毒性レベル(酸化ストレスマーカー遺伝子の発現)及び物質レベル(重金属マーカー遺伝子の発現)で評価可能であることが示された。

結 論

本研究では、実下水処理場内に設置したMBR処理およびMBR処理水をろ過原水とした際のNF/RO膜処理による医薬品除去性について検討した。NF/RO膜処理を導入することにより、MBR処理水中に残存する医薬品濃度を大幅に低減させることが可能であることを確認した。また、一般にNF/RO膜性能の指標として多用される脱塩率は、医薬品の除去性とは必ずしも関連しないことが示された。この理由として、主に微生物代謝産物により構成される高分子量有機物(mg/Lのオーダー)により医薬品が収着される結果、また高分子量有機物がNF/RO膜表面に蓄積することでNF/RO膜表面特性が改変される結果、医薬品のNF/RO膜処理における除去性が影響されると考えられる。次に、最適な植種汚泥の選択、Anammox菌の集積度の迅速かつ有効的なモニタリング手法として16S rRNA遺伝子をターゲットとしたReal-Time PCR法を確立した。このモニタリ

ング手法を用いて、Anammox ポテンシャルの高い植種汚泥を選定し、植種することにより、短時間で上向流バイオカラムリアクターを立ち上げることに成功した。さらにHRTを短縮することでSMPによるANAMMOX活性の阻害を軽減し、窒素除去速度 $26.0 \text{ kg-N/m}^3/\text{day}$ (世界最高速)を達成した。最後に、新規多指標型バイオアッセイ手法の開発に関しては、DNA チップを用いた遺伝子発現解析より、タンパク変性作用および酸化ストレス作用の検出に有用なマーカー遺伝子群を見出し、これらの遺伝子を指標として毒性を評価することが可能であることが明らかとなった。さらに、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析が、発癌性評価において有用である可能性が示唆された。しかしながら、これまでに解析した化学物質は少なく、今後は発現遺伝子の特異性を評価するために、解析する化学物質の数を増やし、各有害作用物質によって特異的に発現する遺伝子(群)を探索・選定する必要がある。