



環境ホルモン分解菌を用いた廃水浄化装置の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 室蘭工業大学SVBL 公開日: 2008-03-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 克彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10258/412

環境ホルモン分解菌を用いた排水浄化装置の開発

室蘭工業大学 応用化学科・藤井 克彦

1 はじめに

高まる市民の環境保全意識とEU等環境先進国からの働きかけにより、我国の関連行政も環境ホルモンを含めた環境汚染問題への包括的な対策に重い腰をようやく上げたところである。環境ホルモンによる生態影響は、その曝露を受けた生物の子供あるいは孫の世代で異常が発現する可能性が高いことから次世代を追跡調査しないと完全な答えが得られず、大変厄介な環境問題である。しかし世代交代の早い野生生物のレベルでは子孫で深刻な形質異常が発現することが確認済みであることから我々ヒトでも同様の影響があると考えられている。この問題を解決すべく多くの大学等研究機関で環境ホルモン処理に関する研究開発が行なわれている。処理手法で大きく分けると、放射線を照射したり酸化剤を作用させたりする物理・化学的方法と分解微生物を用いた生物学的方法があるが、前者はランニングコストおよび二次的環境影響の問題が未解決である一方、後者は処理速度の問題が実用化を阻むケースが多く、さらなる実用研究の進展が期待されているところである。筆者は以前より、我国でも首都圏河川を中心に報告されている「魚のメス化現象」の原因物質であるノニルフェノールとエストラジオールに焦点を絞り、分解微生物の探索と環境浄化への応用可能性についての検討を行ってきた。

2 ノニルフェノール分解微生物

NP (図-1a) は工業分野で今日でもよく利用されている中間原料であり、平成9年には20,000t (推定) が国内で生産されている。主な用途としては、非イオン系界面活性剤であるノニルフェノールポリエトキシレート (Nonylphenol polyethoxylate : NPEO) の原料である事が挙げられる。NPEOは工業用洗剤あるいは分散剤として、繊維工業、製紙工業、金属工業、農薬工業等で幅広く利用されており、抗酸化剤や殺菌剤として用いられる場合もある。この産業上有用なNPの環境ホルモン作用を最初に報告されたのは1991年であるが¹⁾、それ以降多くの科学者が様々な動物種を用いてその作用を確認済みであり、EU諸国の多くでは2000年を目途に使用制限や廃止をかけている。我国でも規制がかけられるのは時間の問題となっている。このNPの問題が社会的に大きく報じられてきた平成10年頃から、筆者は当時報告例のなかったNP分解微生物を探索してきた。その結果、都内下水処理場への流入下水に強力なNP分解活性を見出し、分解細菌の単離に成功した。図-2aに分解細菌の電子顕微鏡写真を示す。この菌はグラム陰性の好気性桿菌であり、生化学および遺伝学的系統解析から *Sphingomonas* 属の新種であることも判明、*S. cloacae* S-3 と命名した。S-3 は環境濃度の約100万倍に相当する1,000ppmのNPを約10日で完全分解することがわかった。NPが最終的にどのような化合物にまで分解されるのかをガスクロマトグラフ質量分析計

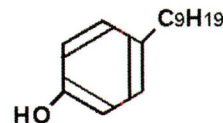


図-1a. NP (a)の構造。

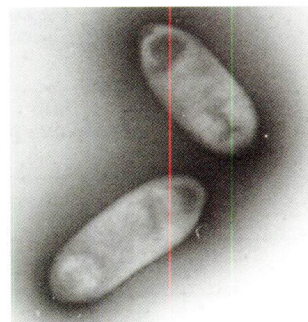


図-2a. NP分解細菌の電子顕微鏡像。
(a) はNP分解細菌 *S. cloacae* S-3

(GC/MS) 及び核磁気共鳴分光器 (NMR) を用いて解析したところ、NPのベンゼン環は完全に分解され、環境負荷の低いアルコールを発生していることがわかった。このように、S-3 が環境浄化への応用に強い期待を持てる菌であることが示された。

3 エストロゲン分解微生物

産業廃棄物や排水に由来する環境ホルモンと同時に、水生生物に対して強力な環境ホルモン作用を及ぼす人畜由来エストロゲンの存在も知られている。その中で最も強力な作用を示すものは 17β -エストラジオール (E2, 図-1b) である。E2 はヒトや家畜等のし尿から抱合体 (不活性型) として排出されるが、下水中の微生物によって脱抱合され、活性型に戻ることが分かっている⁷⁾。また、環境調査でも多くの水環境から検出されており^{2, 3, 8-13)}、魚のメス化現象もE2とノニルフェノールの協同作用が原因であるという説が有力になっている¹⁴⁾。これを受けた環境省では、天然由

来ではあるものの、要監視物質として前述の『環境ホルモン7物質』と同等に扱いその環境動態について解析を行なっているところである。エストロゲンは、その排出源がヒトを含めた動物であることから、産業由来の環境ホルモンに比べて一般市民の危機意識はまだ低く、その出所からして法的規制も困難である。このような背景から筆者は、し尿下水中のエストロゲンを分解・除去できる微生物処理装置を開発することを目標としてE2分解微生物の探索も行ってきた。図-2bに筆者が分離したエストロゲン分解細菌*N. tardaugens* ARI-1 (以下ARI-1) の電子顕微鏡写真を示す。ARI-1は平成13年に下水処理場の活性汚泥から見出された。1,000ppmのE2を50日間で、300ppmを25日間で分解できる。E2が培養液中で結晶粉末として存在しているのでS-3のNP分解に比べると分解効率が悪いが、実際の下水には水溶性の状態ではE2は溶け込んでいることから、下水処理等の実用化の場ではより高い分解効率が得られると期待される。GC/MSとNMRを用いて分解後の培養液を解析したところ、E2分子内のほとんどの構造部位が二酸化炭素や有機酸などの低分子量化合物にまで分解されていることがわかった。一方で、水環境で検出されているE2以外のエストロゲン(エストロン、エストリオール)に対してARI-1が分解能を持つかどうかについても調べたところ、これらのエストロゲンも同様に分解でき、分解産物の解析でもE2と同様の結果が得られた。このように、魚メス化現象への関与で問題となっている人畜エストロゲンの処理という形で下水浄化の分野に応用可能な菌であることが示唆された。

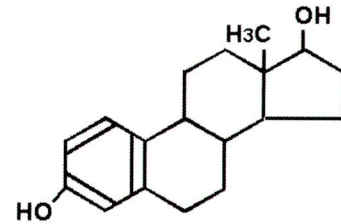


図-1b. E2 (b)の構造。



図-2b. E2分解細菌の電子顕微鏡像。
(b)はE2分解細菌*N. tardaugens* ARI-1株。

4 分解菌の環境浄化への応用可能性

このように、分解菌は環境ホルモンを栄養源として好んで摂取・分解し、有害な分解産物も検出されなかったことから、環境浄化分野への応用が可能かどうかについて応用研究を行った。環境ホルモン問題の特徴として、従来の環境汚染問題では『ゼロ』とみなして差し支えなかったppbやpptの濃度で生物毒性を発揮するという点がある。NPを例に挙げると、10ppbが生態学的に安全な濃度として認識されているが、我国の一般河川等では数ppb～数十ppb、産業排水では数十ppb～数百ppb程度の濃度値で検出されている。そこで、このような極微量濃度のNPに対して菌が分解能を発揮できるかどうか、NP分解菌S-3をモデルにして研究を開始した。

フラスコに200ppbまたは1ppmのNPを含む最少培地(NP以外に炭素源のない培養液)を入れ、そこにS-3を摂取し、振とう培養を行った。培養後に高速液体クロマトグラフで分析した結果、このような微量濃度でもNPが着実に分解されていることがわかった(図-3)。そこで今度は最少培地の代わりに繊維工場の産業排水を用いて同様の実験を行なった。その結果S-3は実際の産業排水中の微量NPでも効率良く分解できることがわかった(図-3)。

次に、より実用を目指した研究を行うため実験機に配置できる小型の産業排水浄化装置を試作し、性能評価を行った。図4に試作した排水浄化装置の写真を示した。本装置はS-3を固定化したプラスチック担体を充填したアクリル樹脂製リアクター(容量3L)、リアクターに空気泡を送るエアープンプ、産業排水を導入する送液ポンプから構成される大変シンプルなものである。将来的に製品化という形で研究成果を産業応用したいという意図から、温度調節、排水pH調整、栄養塩類添加等を一切行わずに性能評価を行った。処理速度を徐々に上げていったところ360mL/hに維持して稼動させた時点までは処理後排水中のNP濃度を生態学的に安全な10ppb以下に抑えることができた。今回用いた産業排水はpH7程度であったことから、排水を酸性(pH6)およびアルカリ性(pH8, 9)にしての性能評価も行った。実験の結果、装置内の分解菌はpH6やpH8の場合でも排

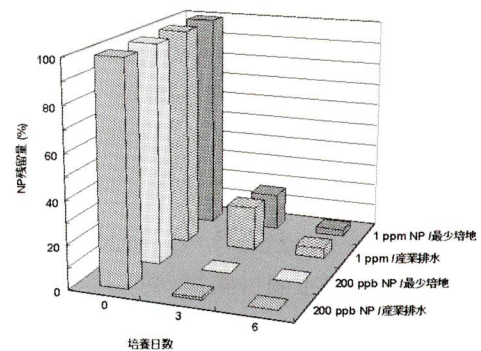


図-3. 極微量濃度におけるNP分解試験。

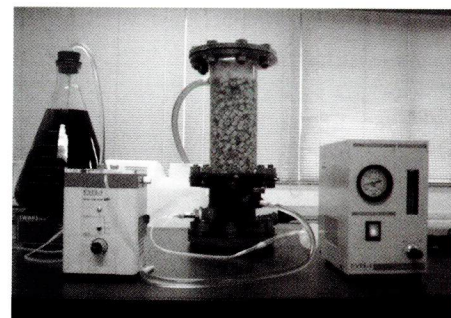


図-4. 試作した排水浄化装置の写真。

水中NPを効率良く分解除去していることが認められたが、pH9の場合は分解活性が消失し、極端なpHの排水を取り扱わない限りはある程度の排水pHの変動には耐え得ることがわかった。

エストロゲン分解菌ARI-1株についても同様の実験を行った。フラスコスケールの実験では初濃度1ppmのエストラジオールが10日で、100ppbが5日間で完全に分解された。初濃度10ppb、1ppb等に対する分解能も確認しようとしたが分析手法の検出限界の問題から今後の検討課題として残っている。それが終わり次第、浄化装置の試作を含めた実用研究に着手していく予定であるが、上述の試作装置で得られた成果やノウハウを活用しつつ、NP分解菌に続く第2弾として、下水処理分野に応用可能な装置の開発と性能評価を行なっていきたいと考えている。

5 大学発ベンチャー企業の設立

環境行政の急激な変化により、欧米同様に我国の製造業や農林水産業事業者（農薬にも今後規制対象となり得るものが数多く含まれている）も高い環境意識を持つことが要求されているが、環境ホルモンを含めて『有害』というレッテルを貼られた物質の多くは産業上有用なものが多く、これらにより今日の豊かで便利な社会が構築、維持されていることも紛れも無い事実である。従って、『有害であることが判明したから明日から使用中止』というわけにはいかず、企業は今後もこれら化学物質を使用すると同時に、業績の良し悪しに関わらず常日頃から自社工場の廃棄物・排水管理に一定の人材とコストを費やさねばならない時代となってきた。しかしBODや油脂分解など『易生分解性物質』については浄化装置が各メーカーから市販され市場もある程度構築されつつあるものの（1997年市場規模：9800億円）、難生分解性物質については装置の製品化例はなく、リーズナブルな価格で優れた性能を持つ装置の開発に期待が寄せられている。そこで筆者は良好な成績を修めた試作機をスケールアップし、これをベースに製品化のための性能適正化を行なったものを販売する大学発ベンチャー企業・有限会社バイオトリートを室蘭市の支援のもと今年3月7日に設立した。代表取締役役に前室蘭市助役（現・榑崎製作所常勤顧問）の加地鐵夫氏、経営担当取締役に齋藤崇・道南清掃株式会社社長と中田孔幸・東海建設株式会社社長、技術担当取締役に筆者と本学科・菊池慎太郎教授、技術アドバイザーとして田頭博昭・本学学長が就任している。時期を同じくして経済産業省の平成14年度即効性地域新生コンソーシアム事業に採択されたことから、本事業において製品化を目指した開発を行うことがベンチャーにとって初仕事となる。本装置は試作機同様にシンプルな構造であることから低価格化の実現を見込める。

エストロゲンについてはその出所から考えると排出規制をかけることが不可能であるが、これまで自治体が行ってきた下水道事業の民間委託が今後進んでいくことから、下水処理事業に参入する企業の間ではエストロゲン処理は必要不可欠なサービスとなる。すなわち、自社が受託管理している河川区域で万一エストロゲン（または環境ホルモン）による生物の奇形やメス化が発見されれば自社の下水処理能力に疑問符をつけられたり企業イメージが失墜する恐れがあるからである。このような理由から、ARI-1株を用いた装置は下水道事業の分野でその能力を発揮できると期待される。

以上のように、設立された大学ベンチャーは『バイオ』と『環境技術』という両キーワードを合わせ持っているが、これは国（北海道のバイオ産業拠点化）と室蘭市（環境産業の発展支援）の両者の施策に一致しており、新しい北海道、新しい室蘭を形成する上で重要な貢献をしていければと願っている。

文 献

- 1) A. M. Soto, H. Justica, J. W. Wray, and C. Sonnenschein : Para-nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.*, 92, 167-173 (1991).
- 2) 環境庁水質保全局：「水環境中の内分泌攪乱化学物質の実態概況調査（夏季）結果（速報）」について。環境化学, 1, 160-206 (1999).
- 3) 建設省河川局・都市局：平成10年度水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果。環境化学, 4, 491-530 (1999).
- 4) W. Giger, P. H. Brunner, and W. Schaffner: 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 225, 623-625 (1984).
- 5) 佐々木久美子, 高附巧, 根本了, 今中雅章, 衛藤修一, 村上恵美子, 豊田正武：食品中のアルキルフェノール及び2, 4-ジクロロフェノールの分析。食品衛生学雑誌, 40, 460-472 (1999).
- 6) Y. Mato, T. Isobe, H. Takada, H. Kanehiro, H. Ohtake and C. Kaminuma: Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 318-324 (2001).
- 7) G. H. Panter, R. S. Thompson, N. Beresford, and J. P. Sumpter: Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere*, 38, 3579-3596 (1999).
- 8) R. J. Williams, M. D. Jügens, and A. C. Johnson: Initial predictions of the concentrations and distribution of 17 β -oestradiol, oestrone and ethinyl oestradiol in 3 English rivers. *Wat. Res.* 33, 1663-1671 (1999).

- 9) C. R. Baronti, Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, and R. Sampeli: Monitoring natural and Synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 5059-5066 (2000).
- 10) 石井善昭, 沖田智, 鳥貝真, 尹順子: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による環境水中のエストロゲンの定量。分析化学, 49, 753-758 (2000).
- 11) S. Matsui, H. Takigami, T. Matsuda, N. Taniguchi, J. Adachi, H. Kawami, and Y. Shimizu: Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 42, 173-179 (2000).
- 12) 田嶋晴彦, 辻村和也, 山口政俊: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による河川水及び下水放流水中の17 β -エストラジオール分析法の開発。分析化学 49, 843-848 (2000).
- 13) M. Nasu, M. Goto, H. Kato, Y. Oshima, and H. Tanaka: Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants., *Wat. Sci. Technol.* 43, 101-108 (2001).
- 14) 環境庁環境保健部環境安全課: 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。環境化学, 1, 88-119 (2001).