

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04476

研究課題名(和文) 中東・アフリカ・南米の水質汚染解析による都市排水ユニバーサルマーカースの開発

研究課題名(英文) Development of universal markers of wastewater by comparative study of water pollution in Middle east, Africa and South America

研究代表者

高田 秀重 (Takada, Hideshige)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70187970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：イラン、レバノン、インド、マレーシア、ベトナム、カンボジア、および台湾で現地調査を行い、コプロスタノール、直鎖アルキルベンゼン(LABs)、合成甘味料、抗生物質の下水マーカーとしての有効性を比較した。コプロスタノールが最も高感度なマーカーであると結論づけられた。イラン、カンボジアでの現地調査では0.01%の下水の混入が検知可能であった。ただし、家畜排水の寄与も観測された。24-エチルコプロスタノール/コプロスタノール比による家畜排水と識別手法を開発し、抗生物質の組成比との比較からその妥当性が確認された。大腸菌との比較から、水浴適基準として250 ng/Lが提案された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各マーカーの特徴を明らかにした上で、優先して測定すべきマーカーやその基準を定量的に明らかにした点で、今後のモニタリング計画を考える上で意義深い。特にこれまでのステロール組成の比較からは困難とされていたヒト糞便と豚糞便の区別を24-エチルコプロスタノールを用いて可能にした点は学術的にも実務的にも意義深い。本研究成果は今後汚染状況の経年的な推移を追うためのモニタリングを行う際の測定項目の選択のための基礎となるものであり、汚染モニタリングにとって、重要な礎を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Through field observation in Iran, Lebanon, Cambodia, Vietnam, India, Malaysia, and Taiwan, four sewage markers including coprostanol, linear alkylbenzenes (LABs), artificial sweeteners, and antibiotics were evaluated as sewage markers. Coprostanol was concluded to be the most sensitive marker of sewage pollution in surface water. Diluted sewage by a factor of 10000 was detected in an Iran river and in Mekong River. To distinguish live-stock animal wastes from human wastes, co-measurements of 24-sthylicoprostanol and antibiotics have been recommended. Primary contact limit of coprostanol was proposed at 250 ng/L through their comparison with E. Coli. In groundwater, acesulfame was most frequently detected in Iran, India, Cambodia, and Sudan and was recommended as potential marker of sewage in groundwater.

研究分野：環境汚染化学

キーワード：コプロスタノール ステロール類 直鎖アルキルベンゼン 合成甘味料 抗生物質 モニタリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水環境汚染の実態把握には BOD, COD, 栄養塩類、大腸菌などの指標が用いられてきた。これらの従来型の指標は、汚染源の特定やそれに基づく発生源対策には不十分である。マーカーはこれらを補完するための指標として有効である。マーカーとは特定の汚染源に固有で安定な化合物(分子マーカー)や元素(指標元素)を総称するもので、汚染源の特定、排水の種類、識別、負荷強度の把握等の情報を得るのに有効である(Takada and Eganhouse, 1998)。水質汚濁源対策の世界的な流れの中で、工場排水については、比較的早期に対策や規制が進み、対策が遅れているものが家庭排水(下水)であり、下水は経済的な発展途上国も含め世界的にみて重要な汚染源であり、下水マーカーは水質汚染対策にとって重要である。

下水の分子マーカーとしては、ヒトの糞便に含まれるステロール類の一種コプロスタノール(Isobe *et al.*, 2002)、合成洗剤に含まれる未反応の原料物質の直鎖アルキルベンゼン(LABs)(Takada and Ishiwatari, 1987)、ヒトに投与される医薬品・抗生物質(Shimizu *et al.*, 2013)、合成甘味料(Buerge *et al.*, 2009)等が提案され、応用されてきた。いずれのマーカーについても、欧米、オーストラリア、日本におけるフィールドでの観測が基になり、マーカーとしての提案が行われ、応用も欧米と日本におけるものが大半で、最近、熱帯アジア、アフリカ、中南米、中国、韓国等へ応用の範囲が広がられてきた。研究の地域的広がりの中でマーカーの濃度や組成が所得レベル(Segura *et al.*, 2015)や気候(Isobe *et al.*, 2004)の影響を受けることが明らかになってきた。このことから、既存のマーカーについて、経済状況や気候帯の異なる様々な国で現地調査を行い、ユニバーサルマーカー(世界中どこでも使えるマーカーやその組み合わせとその評価軸)を確立する必要がある。

2. 研究の目的

- (1) 中東、アフリカ、および熱帯アジア諸国で、水試料(下水、下水処理水、河川水、地下水等)を採取し、その中の下水マーカーを測定し、マーカーの分布特性とマーカー間の関連を明らかにする。
- (2) 中東、アフリカ、および熱帯アジア諸国における調査結果を、欧米や日本や中南米の調査結果と併せて、各種社会経済指標や文化・歴史的背景を基に解析し、都市排水について世界的に利用可能なマーカーとその組み合わせおよびその定量的な評価軸(本研究ではこれらを総称してユニバーサルマーカーと呼ぶ)を提案する。

3. 研究の方法

イラン(テヘラン)、レバノン(ベイルート)、インド(ムンバイ)、マレーシア(クアラルンプールおよびマラッカ)、ベトナム(カンター)、カンボジア(プノンペン)、および台湾(宜蘭)に渡航し、現地研究者の協力を得て、下水、下水処理水、畜産施設排水、河川水、河口域海水、地下水を採取した。採取した水試料は現地研究室でガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ液の一部は固相抽出し、カートリッジに抗生物質を吸着させた。ろ紙上の懸濁物とろ液、および固相抽出カートリッジは冷凍し、日本に持ち帰り、試料は分析まで冷凍保存した。ろ液試料については、水溶性のマーカーの合成甘味料を分析した。ろ液を分析直前に解凍し、同位体ラベルの合成甘味料をサロゲートとして添加し、高速液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)にて合成甘味料の分析を行った。抗生物質も水溶性の下水マーカーとして分析した。現地研究室で抗生物質を吸着させた固相抽出カートリッジは、分析の直前に解凍し、溶出、濃縮、窒素吹きつけし減容後、適量に定容したものを LC-MS/MS で分析した。懸濁物試料については、疎水性のマーカーである LABs とステロール類を分析した。懸濁物を含むフィルターを凍結乾燥し、1-phenylalkylbenzenes と同位体ラベルコレステロールをサロゲートとして添加後、メタノールとジクロロメタンで超音波抽出をおこない、抽出液を 10%水不活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画・精製を行った後、ステロール類の画分はアセチル化し、両成分ともガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)で同定・定量した。スーダン(ハルツーム)にて採取された下水と地下水についても、合成甘味料の分析を行った。

4. 研究成果

本研究で入手したイラン、カンボジアの下水の分析結果と、日本の下水についての報告値から、下水中のコプロスタノール、LABs、抗生物質(サルファメトキサゾール: SMX)、合成甘

味料（アセスルファム：ACE）の濃度を表1にまとめた。試水を分析する際の定量限界値（LOQ）も表1にまとめ、下水中濃度の各マーカーの濃度を定量限界値で割り算した値を Detectable Dilution limit(DDL；検出可能最大希釈倍率)として表1に示した。DDLが高いマーカーほど、環境水で希釈された下水を検知する能力が高く高感度なマーカーであることを意味している。下水中の濃度の高さと定量限界の低さから、コプロスタノールが最も高感度なマーカーで、10万倍～100万倍に希釈された下水の検知能力があると結論づけられた。

イランとカンボジアの水域へのコプロスタノールの応用例を図1、図2に示す。イランの首都テヘランの河川の調査では、水源の山岳地域ではコプロスタノールは定量限界以下であり、山間地の集落を流れる間の軽微な下水汚染（0.01%程度 of 下水の混入）が検知された。一方、テヘラン市内では下水の混入は0.1%を越え、市中心部では河川水の50%程度が下水であるという汚染実態をコプロスタノールの分析から明らかにできた。LABsでも同様の汚染パターンは観測されたが、0.1%以下の軽微な下水の混入は検知できなかった。カンボジアの首都プノンペン周辺の河川調査でも、コプロスタノールとLABs共にメコン川およびトンレサップ川本流では低濃度で、市内及び郊外河川および池で高濃度であった。ここでも都市排水流入地点近傍のメコン川本流で0.2%程度 of 下水の流入をコプロスタノールでは検知できたが、LABsでは有意には検知できず、コプロスタノールの下水検知能の高さが確認された。ただし、メコン川とトンレサップ川の本流で検知された0.01%程度 of 下水の混入に相当する10ng/L程度の低濃度のコプロスタノールは分析化学的に有意ではあったが、動物糞便の寄与の可能性も否定できない。LABs等の他の下水マーカーを含め複数のマーカーを使い、下水の負荷を評価することが望ましい。ただし、コプロスタノール以外のマーカーは対象とする国や地域でその人工化学物質の使用状況が変動し、国や地域間でマーカー組成に差異がある点を考慮する必要がある。

下水マーカーと微生物マーカーの間には有意な関係が認められた。図3にイラン、カンボジア、ベトナムの調査時のコプロスタノール濃度と大腸菌(E. Coli)密度の関係を示す。いずれも有意な正の相関が認められ、化学マーカーの指標としての信頼性が確認された。ただし、3カ国で回帰直線の傾きは異なった。微生物の消長に関わる水温や紫外線などの環境因子が異なる可能性がある。コプロスタノール濃度と大腸菌密度の関係から、水浴基準として使用されることが多い大腸菌密度1000 CFU/100mLに対応するコプロスタノール濃度はカンボジア37 ng/L、ベトナム261 ng/L、イラン54 ng/Lと計算された。これらの値はIsobe et al. (2004)のアジアにおける報告値(30 ng/L- 400 ng/L)と同程度の範囲であった。本科研費を開始した当初は南米での調査を実施することを目的としたが、研究期間中にブラジルからのコプロスタノールに関する論文が発表され、大腸菌密度1000 CFU/100mLに対応するコプロスタノール濃度として66 ng/Lが報告された(Albuquerque de Assis Costa et al., 2018)。このコプロスタノール濃度も今回の科研費での算出した値と同程度であった。以上をまとめると、コプロスタノールのみを測定し50 ng/L程度の濃度が検出された場合は、E. Coliや他のマーカーも測定して、その水域の下水汚染の可能や程度を精査する必要があると考えられる。また、250 ng/Lを越えるコプロスタノールが検出された場合は、水浴不適と判断することが妥当であろう。

コプロスタノールが高感度な下水マーカーであることが本研究から明らかになったが、大型哺乳類の腸管内でもコレステロールからコプロスタノールへの還元が起こるため、人間以外の動物糞便の寄与も考慮する必要がある。本研究では草食動物で支配的な24-ethylcoprostanol(Derrien et al., 2011)の測定を行った。まず、標準物質を購入し、24-ethylcoprostanolの測定法を検討・確立した。次に、家畜の糞便試料(ケニア、ガーナ)、養豚場排水(タイおよび台湾)では、Coprostanol/24-ethylcoprostanol比が低いこと(0.01-1.65)を確認した。ヒトの糞便については、コロナ禍のもと個人からの直接糞便の採取・分析はリスクが高いと判断し、日本、イラン、タイ、モザンビークの都市域の下水処理施設流入水の分析からCoprostanol/24-ethylcoprostanol比(Cop/24-EthylCop比:2.60-4.58)を算出した。動物の糞便とヒト糞便のCop/24-EthylCop比の範囲に重なりがなく両者は区別可能であることがわかった(図4)。次に環境試料での24-ethylcoprostanolの測定を、モザンビーク(マプト)、イラン(テヘラン)、フィリピン(マニラ)、インドネシア(ジャカルタ)、タイ(バンコク)、マレーシア(クランおよびマラッカ)、ベトナム(カントー)、台湾(宜蘭県)、および日本で採取された試料、合計140試料に適用した。Cop/24-EthylCop比が2.5以下の地点が数十地点確認され、動物糞便の影響を受けている水域が多いことが示された(図5)。その中には台湾(宜蘭)の試料のように、尿尿汚染のレベルが高く、Cop/24-EthylCop比が低い地点が観測され、それらの地点では家畜排水による尿尿汚染レベルが高いことが示された。台湾(宜蘭)の試料は農業・畜産地域から採取されたもので、抗生物質の組成もテトラサイクリン系が卓越していたり、動物用抗生物

質として使われるサルファメタジンが抗生物質の構成比中 10%以上を占める等畜産排水の寄与が強いこと (図 6) と整合性のある結果となった。ベトナムのメコン川河口のカントー市とその周辺の運河水域の試料は、カントー市の下水、畜産の盛んな郊外の運河、メコン川本流から採取したものであるが、それらの Cop/24-EthylCop 比はカントー市の下水で高く、郊外の運河で低く、メコン川本流ではおおむねその間の値を示した。さらに、我々の既発表の研究 (Shimizu et al., 2013) で提案した畜産用抗生物質サルファメタジンと主にヒト用の抗生物質サルファメトキサゾールの比 (SMT/SMX 比) と Cop/24-EthylCop 比の関係は整合性のある結果となった。両比をクロスプロットすると、カントー市の下水と畜産の盛んな郊外の運河は相重ならない 2 つのグループにプロットされ、メコン川本流の地点はカントー市からの距離に応じてそれらの中間的な位置にプロットされた (図 7)。これらの結果から、Cop/24-EthylCop 比を使った人の糞便と家畜糞便の識別の有効性が確認された。

本研究ではコプロスタノールを中心としてステロールの下水マーカールとしての優位性を示してきた。しかし、地下水を考えた場合、疎水性の高いステロール類は土壤有機物に吸着・除去されるため、地下水への適用は難しい。地下水への下水の寄与を推定するためには、水溶性の高いマーカールの利用が重要である。本研究では、イラン、カンボジア、インド、スーダンの地下水から、合成甘味料を検出し、合成甘味料のマーカールとしての有効性が示唆された。いずれの国でも、測定した 4 種の合成甘味料のうちアセスルファムの検出頻度と濃度が高かった。その濃度は下水よりも 1 桁低く、すなわち、地下水に下水が 10% 程度混入していることを示唆している場合も観測された。詳細な調査と水理学的な情報 (井戸の深さ、地下水の流動) も併せた解析が必要である。

引用文献

- Albuquerque de Assis Costa, L., *et al.*, 2018. Chemical and biological indicators of sewage river input to an urban tropical estuary (Guanabara Bay, Brazil). *Ecological Indicators* 90, 513-518.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.03.046>
- Buerge, I.J., *et al.*, 2009. Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environmental Science & Technology* 43, 4381-4385.
- Derrien, M., *et al.*, 2011. Extreme Variability of Steroid Profiles in Cow Feces and Pig Slurries at the Regional Scale: Implications for the Use of Steroids to Specify Fecal Pollution Sources in Waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7294-7302.
- Isobe, K.O., *et al.*, 2002. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography-mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ Sci Technol* 36, 4497-507.
- Isobe, K.O., *et al.*, 2004. Effect of Environmental Factors on the Relationship between Concentrations of Coprostanol and Fecal Indicator Bacteria in Tropical (Mekong Delta) and Temperate (Tokyo) Freshwaters. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 814-821.
- Segura, P.A., *et al.*, 2015. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: Impact of income inequality between countries. *Environment International* 80, 89-97.
- Shimizu, A., *et al.*, 2013. Ubiquitous occurrence of sulfonamides in tropical Asian waters. *Science of The Total Environment* 452-453, 108-115.
- Takada, H. and Ishiwatari, R., 1987. Linear Alkylbenzenes in Urban Riverine Environments in Tokyo : Distribution, Source, and Behavior. *Environmental Science & Technology* 21, 875-883.
- Takada, H. and Eganhouse, R., 1998. Molecular markers of anthropogenic waste: Their use in determining sources, transport pathways and fate of wastes in the environment, In: Mayers, R. (eds.), *The Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*, pp. 2883-2940, Wiley and Sons

表1. イラン、カンボジア、日本の下水中の下水マーカール濃度と定量限界値を基にした detectable dilution limit (DDL: 検出可能最大希釈倍率)

	下水中濃度 (ng/L)	LOQ (ng/L)	detectable dilution limit
coprostanol	$6.4 \times 10^4 - 1.2 \times 10^6$	1	$7 \times 10^4 - 1 \times 10^6$
LABs	$1.6 \times 10^3 - 1.2 \times 10^4$	15	$1 \times 10^2 - 8 \times 10^2$
SMX	$1.5 \times 10^2 - 1.6 \times 10^3$	0.5	$3 \times 10^2 - 3 \times 10^3$
ACE	$6.3 \times 10^3 - 3.9 \times 10^4$	5	$1 \times 10^3 - 8 \times 10^3$

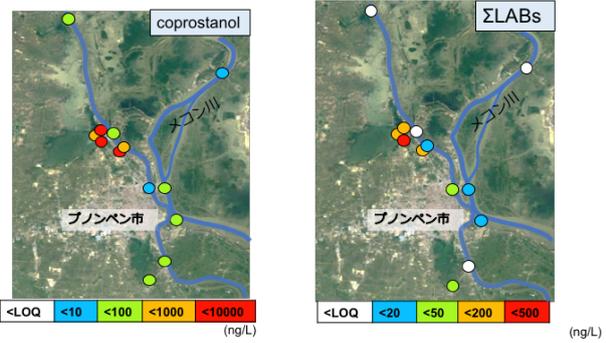
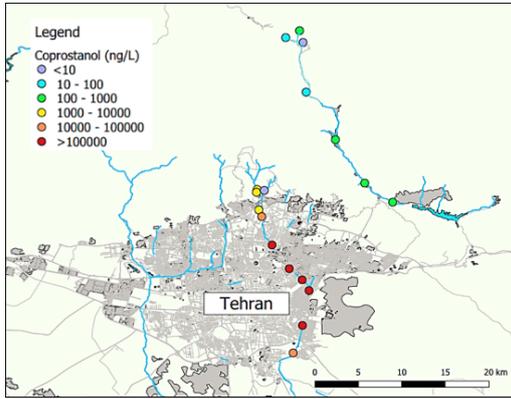


図1. テヘラン周辺表流水におけるコプロスタノール濃度

図2. プノンペン周辺表流水における下水マーカー濃度

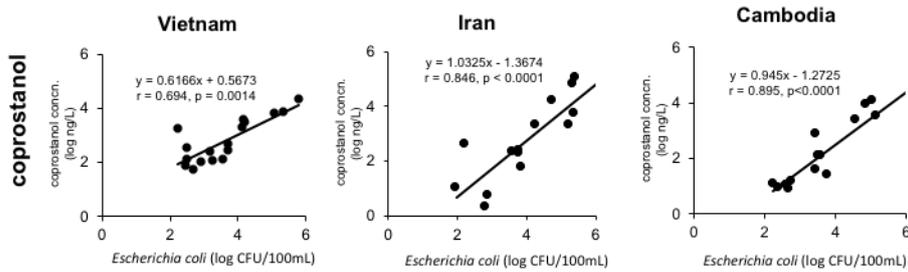


図3. 表流水中の大腸菌密度とコプロスタノール濃度の相関

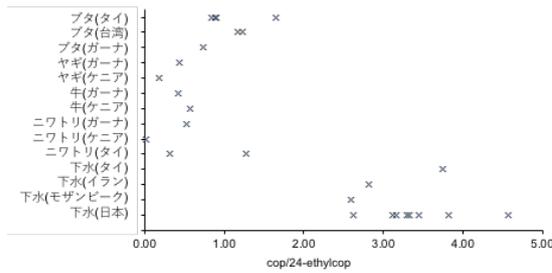


図4. 動物糞便および都市下水中のCoprostanol/24-ethylcoprostanol比

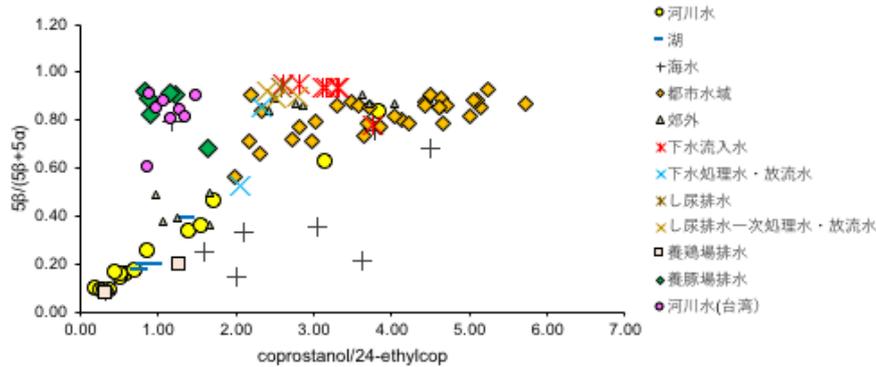


図5. 表流水および各種排水中のCoprostanol/24-ethylcoprostanol比

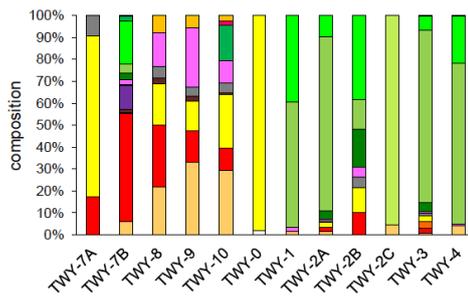


図6. 台湾(宜蘭)の表流水および畜産排水中の抗生物質組成

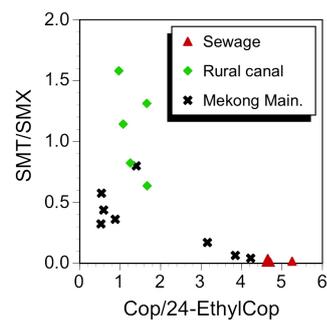


図7. カントー周辺表流水中の抗生物質濃度比(SMT/SMX)およびCoprostanol/24-ethylcoprostanol比のクロスプロット

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Alidoust Mona, Yeo Geok Be, Mizukawa Kaoruko, Takada Hideshige	4. 巻 165
2. 論文標題 Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons, hopanes, and polychlorinated biphenyls in the Persian Gulf in plastic resin pellets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Pollution Bulletin	6. 最初と最後の頁 112052 ~ 112052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.marpolbul.2021.112052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Satoru, Kadoya Aya, Masuda Nagi, Sugimoto Yuta, Takada Hideshige, Mizukawa Kaoruko, Takei Ayaka, Chou Hsin-Yiu, Wu Jer-Horng	4. 巻 29
2. 論文標題 Macrolide resistance genes and mobile genetic elements in waterways from pig farms to the sea in Taiwan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 360 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgar.2022.04.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 高田秀重	4. 巻 43(A)
2. 論文標題 マーカー分析：人間活動のインパクトを予防的に捉える	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 高田秀重	4. 巻 43(A)
2. 論文標題 化学マーカーの近年の応用例と今後の展望	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 325-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾形恒輝、武井彩華、高田秀重、多羅尾光徳
2. 発表標題 イラン・テヘランにおけるふん便汚染 のDNAマーカを用いた由来推定の試み
3. 学会等名 日本環境学会第45回研究発表会（横浜）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井彩華, Mona Alidoust saharhiz lahiji, 高田秀重, 多羅尾光徳, Hashemi Seyed Hossein
2. 発表標題 イランの水環境における合成甘味料および抗生物質の分布と下水マーカーとしての評価
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤果怜、高田秀重、古米弘明、Poopipattana Chomphunut、中島美咲
2. 発表標題 下水の化学マーカーを用いた東京湾沿岸域における雨天時越流水の影響評価
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五味菜尋, 高田秀重, 水川薫子
2. 発表標題 フェノール系内分泌攪乱物質の直接誘導体 化分析法の検討と東京都内河川における汚 染状況の把握
3. 学会等名 第26回環境化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井晶太、高田秀重、水川薫子、武井彩華、関香奈子、清水亜希子
2. 発表標題 アジア・アフリカ地域の水試料分析による疎水性下水マーカ-の評価
3. 学会等名 題28回環境化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 秀重、遠藤 果怜、水川 薫子、古米 弘明
2. 発表標題 下水中の化学マーカ-合成甘味料の組成および下水処理効率
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高田秀重、クリハラ タカシ	4. 発行年 2020年
2. 出版社 クレヨンハウス	5. 総ページ数 96
3. 書名 プラスチックモンスターをやっつけよう!	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	O . A S i a w (Agyeman Siaw) (10293549)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・外国人語学 教員 (12605)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水川 薫子 (Mizukawa Kaoruko) (50636868)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教 (12605)	
研究分担者	多羅尾 光徳 (Tarao Mitsunori) (60282802)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	
研究分担者	熊田 英峰 (Kumata Hidetoshi) (60318194)	東京薬科大学・生命科学部・講師 (32659)	
研究分担者	渡邊 泉 (Watanabe Izumi) (30302912)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	削除：2020年3月2日
研究分担者	鈴木 聡 (Suzuki Satoru) (90196816)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授 (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関