

G. 研究発表

2. 学会発表

Kimura, K., Hara, H. and Watanabe, Y.
:Removal of pharmaceutical Compounds
by Submerged MBR, Proceedings of Con-
ference on Membrane in Drinking Water
and Industrial Water Production, L' -
Aquila, 2004

原宏江、木村克輝、渡辺義公：膜を用い
た高度下水処理による医薬品除去、第39
回日本水環境学会年会講演集、P42、
2005.3

有害無機物質の選択的除去～重金属のタンパク質による選択的な吸着～

分担研究者 福士 謙介 東京大学環境安全研究センター助教授

研究要旨

A. 研究の背景および目的

1.1 背景

従来の重金属処理技術は、凝集沈殿、pH 調整などによる固液分離、イオン交換、活性炭吸着などの物理化学的処理が主流であり、広く適用されている。しかし、これらの物理化学的処理は、金属汚染の濃度が 10-100mg/l の範囲では効果的でなく、経済的ではなくなってしまう。また、適用下限濃度は 1mg/l といわれている (Ghosh et al., 1990)。広範囲にわたる重金属汚染には、莫大な費用がかかるため、適用されない。

近年、物理化学的処理の適用できない範囲に関して、生物学的手法を用いることが注目されており、溶液中から金属を回収する手段の一つとして、植物や藻類、微生物などのバイオマスの使用を通じた方法が研究されてきている (Macaskie, 1991, Vieira and Volesky, 2000)。これらの生物は、金属を生物吸着（細胞外高分子に吸着もしくは細胞内に取り込むこと）による除去 (Biosorption)、異化的還元による金属の沈殿 (Precipitation)、酵素反応による形態変化を通じた無害化 (Enzymatic Transformation) などの機構で金属汚染を浄化する (Marc Valls, et al. 2002)。金属の生物学的処理の利点は、物理化学的処理では処理できない低濃度汚染の処理が可能であること、低コストであること、金属の選択的な除去が可能なこと、などが挙げられる。

金属除去能をもつ微生物を用いた排水処理における金属除去/回収プロセスについて、いくつかの研究がなされており、高い割合で金属の除去が確認されている (Dunan et al., 1995, Yusef, 1997, Ghozlan et al., 1999)。また、金属汚染サイトにおける生物を用いた原位置での浄化に関する研究もなされている。微生物には金属耐性機構が備わっている種もあるが、耐性機構を持たない種に関しては、プラスミドに移植した遺伝子によって金属耐性を与えることができる。真核生物の有害金属耐性機構を担っている一つの機構であるメタロチオネイン (カドミウムを高濃度で吸着し、無害化する機能を持つ) を細菌に発現させ、金属耐性を増加させた研究事例も報告

されている。現在研究途上ではあるが、微生物の金属浄化機構を植物に移植し、金属浄化能をもった植物を用いて原位置での浄化を行う研究がなされている (Malin M. and Leif B., 2001)。ここ 10 年ほどで重点的に研究されてきているが、遺伝子工学的技術を利用するにあたり、知られていない機構も多い。

1.2 目的

既往の研究事例において、重金属の生物学的な処理技術を研究するにあたり、プロセスを開発すること、また既知の生物による金属除去機構の解明、に重点が置かれており、環境中に生息する生物から重金属耐性機構に関わっている可能性のある未知の金属タンパク質を探そうとする研究は少ない。

このような背景を踏まえ、本研究では生物を利用した金属処理技術の発展を目指しながら、金属耐性に関わる未知の金属吸着タンパク質を探し出すことを目的とする。

1. 実験方法

本研究における実験の流れを図 2.1 に示す。

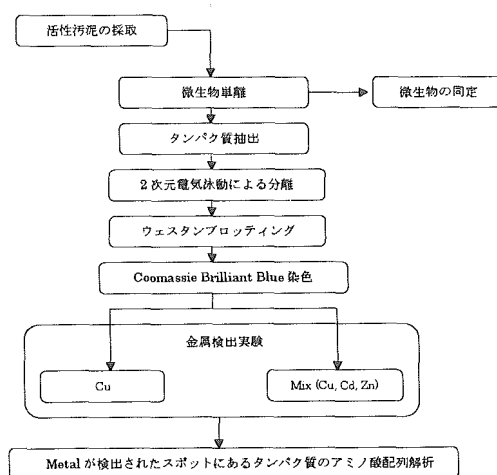


図 1：本研究における実験フロー

2.1 微生物の採取、および単離

本研究では、金属タンパク質を検索するにあたり、芝浦水再生センターから採取してきた活性汚泥微生物からの検索を試みた。

採取してきた活性汚泥を表 2.1 の銅を含む培地で混合培養を行った後、平板寒天培地を用いて銅耐性微生物の単離を行った。

単離した微生物に関しては、16S rRNA(V3)領域の塩基配列を調べ、相同性の高い近縁種の検索を行った。

表 1：培地組成

Glucose (g/L)	Trypton (g/L)	Yeast Extract (g/L)	Copper (mM)
1.0	5.0	2.5	2.5

2.2 単離した微生物からのタンパク質抽出

単離した微生物をリン酸緩衝液中で超音波処理 (50W、10 分) にかけて、細胞を破碎し、リン酸緩衝液に可溶したものを粗タンパク質サンプルとした。

粗タンパク質サンプルには電気泳動を阻害する塩や核酸等が含まれるため、2D Clean-up Kit (Amersham Bioscience) を用いて不純物の除去を行った。

2.3 不純物除去方法の比較

不純物除去には、硫酸アンモニウムによる沈殿、トリクロロ酢酸 (TCA) による沈殿、アセトンによる沈殿、トリクロロ酢酸 (TCA)/アセトンによる沈殿、酢酸アンモニウム含有メタノールによる沈殿+フェノール抽出前処理など数種類の方法がある。しかし、各方法によって不純物除去後のタンパク質残存率 (回収率) が異なる。

本研究では、タンパク質の喪失量の少ない不純物除去法を用いるため、TCA/アセトン沈殿法、TCA 沈殿法、2D Clean-up Kit (Amersham Bioscience) を用いた不純物除去、の 3 種類の除去法のタンパク質回収率の比較を行い、最も回収率の高かった方法を採用した。

2.4 2次元電気泳動によるタンパク質の分離

本研究では、高い分離能を持つ 2次元電気泳動を用い、単離したそれぞれの微生物から抽出したタンパク質の分離を行った。

2次元電気泳動の 1次元目として、タンパク質の電気的な性質で分離する等電点電気泳動法。2次元目として、タンパク質の分子量により分離する SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた。

2.5 ウェスタンブロッティング~CBB 染色

2次元電気泳動によって分離したタンパク質を、ゲル中から取り出すため、ウェスタンブロッティング法を用いて PVDF (ポリビニリデンジフルオライド) 膜上に転写を行った。

転写後、Coomassie Brilliant Blue によるタンパ

ク質の染色を行った。

2.6 金属検出実験

分離したタンパク質の金属吸着能を調べるため、PVDF 膜上のタンパク質を Metal Binding Solution (10 mM Tris-HCl, 0.1 M KCl, 0.1 mM ZnAc, 1 mM CuCl₂, pH7.4) に浸した後、Washing Solution (10 mM Tris-HCl, 0.1 M KCl, pH8.0) で洗浄し、5 ml の 1 mol/l HNO₃ と混合したのち、ICP-MS を用いて金属の検出を行った。

2.7 アミノ酸配列解析

金属検出実験により、高い金属吸着能を持つと示唆されたタンパク質スポットに関して、エドマン法による N 末端アミノ酸配列解析にかけた。

2. 結果

3.1 微生物単離および近縁種

銅含有培地 (表 2.1) で混合培養した活性汚泥微生物を寒天培地上に撒いたところ、視覚的な違いにより 10 種類のコロニーに分類できた (No.1~No.10)。この 10 種のコロニーを単離し、純粋培養を行った。

得られた各コロニーを純粋培養した後、各微生物の 16S rRNA V3 領域の配列を調べ、微生物分類学上における位置づけを調べた。

16S rRNA の配列の違いより、3 グループ (グループ I : No.1, No.2, No.4, No.6, No.8; グループ II : No.3, No.5, No.7, No.9; グループ III : No.10) に分類された。

3 種類の 16S rRNA の配列が得られ、表 3.2 に示したような近縁種との相同性が高いことが分かった。微生物サンプル No.1, No.2, No.4, No.6, No.8 の 16S rRNA V3 領域の配列は相同性検索の結果、*Acinetobacter* 属の菌種である可能性が高いという結果になった。

微生物サンプル No.3, No.5, No.7, No.9 は、*Enterococcus* 属の菌種と相同性が高いことが分かった。

微生物サンプル No.10 は、*Cupriavidus necator* という銅耐性微生物や *Ralstonia* 属、*Stenotrophomonas* 属に相同性があることが分かった。

3.2 粗タンパク質サンプルからの不純物除去方法の比較

不純物除去操作前のサンプルのタンパク質濃度は 1.31 mg/ml であった。

各不純物除去操作後のタンパク質濃度は、2D Clean-up Kit、TCA/アセトン沈殿法、TCA 沈殿法の順に 1.19 mg/ml、0.87 mg/ml、0.52 mg/ml という結果になった。タンパク質回収率は 2D Clean-up Kit (90.6%) > TCA/アセトン沈殿法

(66.3%) > TCA 沈殿法 (39.2%) となった (図 2)。この結果より、本研究では粗タンパク質サンプル中の不純物を除去するにあたり、Amersham Bioscience 社製の 2D Clean up Kit を用いることとした。

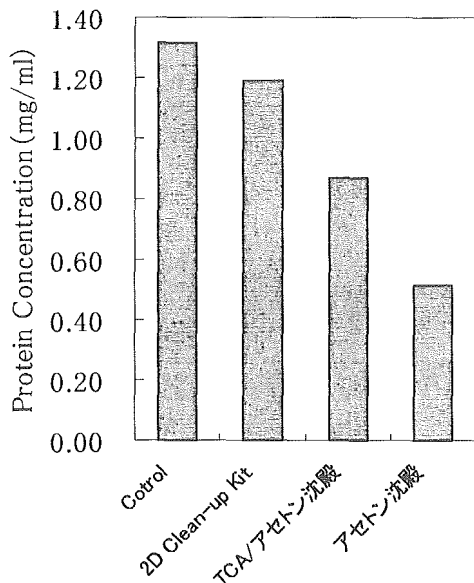


図 2：不純物除去法の比較

3.3 金属検出結果

3.3.1 タンパク質定量結果

各サンプルのタンパク質濃度を Lowry 法により測定したところ、表の結果になった。

3.3.2 2次元電気泳動による分離結果

単離後、純粋培養している 10 種の微生物から抽出されたタンパク質を 2次元電気泳動により分離し、ウェスタンブロッティングにより PVDF 膜上に転写した後、CBB 染色を行った。

CBB により染色したメンブレン上には青い斑点が確認できる。これがタンパク質スポットである。各メンブレン上にはおよそ 30~60 個のスポットが確認された。微生物から分離されたタンパク質のスポット数としては少ない。これは CBB 染色の感度が比較的高くなく、数十 ng/スポット以上でないと検出できないことによる。

タンパク質スポットに関しては、pI4-5 付近に多く、また分子量は 30-40kDa 以上のものが多く検出された。このことから、多くのタンパク質は pH が中性付近の微生物体内では負に帯電していることが示唆される。

3.3.3 ICP-MS を用いた金属検出実験結果

分離した各タンパク質スポットの金属吸着能力を調べるために、3.12 の方法で金属吸着実験を行った。

まず、対象金属に銅 (Cu²⁺) を用い、そのタンパク質と銅の関係を調べた。金属が検出されたサンプルは、No.5 と No.10 であった。また No.10 に関しては、銅 (Cu²⁺)、亜鉛 (Zn²⁺)、カドミウム (Cd²⁺) の 3 種の金属が混在している場合についても調べた。

(1) No.5 における銅吸着実験結果

タンパク質サンプル No.5 を 2次元電気泳動により分離し、Western Blotting した後、CBB 染色した後に確認できたスポットはマーカー (2D スタンダード、Bio-Rad) を除いて 31 スポットであった。

金属吸着操作 (1mM Cu) 後、この 31 スポットを切り出し、それぞれ 5ml HNO₃ と混合し、ICP-MS を用いて銅の検出を行った。

結果は、4 個のスポットから高濃度の銅が検出された (スポット 19、27、28、30)。また同時に分離をしたマーカータンパク質の一つである Bovine Muscle Actin から非常に高濃度の銅が検出された。

(2) No.10 における銅吸着実験結果

タンパク質サンプル No.10 を分離し、CBB 染色した後に確認できたスポットはマーカーを除いて 40 スポットであった。

金属吸着操作後、40 スポットを切り出し、銅の検出を行ったところ、表 6 の結果が得られた。

(3) No.10 における混合金属吸着実験結果

6.2.2 で用いたサンプルとは別に、タンパク質サンプル No.10 を分離し、CBB 染色した後に確認できたスポットはマーカーを除いて 20 スポットであった。

混合金属 (Cu, Zn, Cd の混合溶液、各 1mM) 吸着操作後、20 スポットを切り出し、金属の検出を行ったところ、表 7 の結果が得られた。銅に関しては、銅のみを吸着させた場合と比較して低濃度でしか検出されなかった。亜鉛に関しては全く検出されない、という結果になった。カドミウムについては、検出されたが微量であった。

3.4 アミノ酸配列解析結果

金属が検出されたサンプルのうち、No.10 のスポットに関してエドマン法によるアミノ酸配列解析を行った。

アミノ酸配列解析を行ったスポットは、No.10 から分離したタンパク質のうち 9、10、13 (他のスポットに関しては時間の都合上今回は行っていない)。

3.4.1 スポット 9 (No.10) のアミノ酸配列

スポット 9 の N 末端 15 残基のアミノ酸配列解析結果は次のようになった。N 末端残基がプロリン

(P)、以下順に、バリン (V)、バリン (V)、セリン (S)、グリシン (G)、アラニン (A)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、ロイシン (L)、リシン (K)、アラニン (A)、アラニン (A)、アルギニン (R)、リシン (K)、グリシン (G) となっている。

N 末端 1 残基目に関しては、プロリン (P) のほかにグリシン (G)、チロシン (Y)、セリン (S) も微量だが検出された。2 残基目にはアスパラギン酸 (D)、3 残基目にはイソロイシン (I)、4 残基目にはグルタミン酸 (E) とロイシン (L)、5 残基目にはアラニン (A)、9 残基目にはプロリン (P) も同時に検出された。

NCBI の Web Page 上で、アミノ酸配列の相同性検索を行ったところ、N 末端 15 残基において 100% 一致するタンパク質が 3 種検索された。検索されたタンパク質は、グラム陰性菌である、*Enterococcus faecium* の持つ、

- (1) Fructose/tagatose bisphosphate aldolase (148aa)
- (2) Fructose/tagatose bisphosphate aldolase (251aa)
- (3) fructose-bisphosphate aldolase class-II (289aa)

表 2

N末端から の残基数	アミノ酸	検出量 pmol	備考 (他に検出されたアミノ酸)
1	p	0.72	G(0.66), Y(0.15), S
2	V	0.85	D(0.13)
3	V	1.09	I(0.10)
4	S	0.67	E, L
5	G	0.76	A
6	A	0.88	
7	E	0.68	
8	F	0.55	
9	L	0.62	P
10	K	0.35	
11	A	0.78	
12	A	1.01	
13	R	0.15	
14	K	0.34	
15	G	0.6	

であった。3 種ともにフルクトースビスリン酸アルドラーゼであった。アルドラーゼは生物に広く見られる解糖系の酵素でフルクトースビスリン酸 (フルクトース 1,6 ビスリン酸) を開裂し、ジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド 3-リン酸にする。

3. まとめと今後の課題

4.1 まとめ

4.1.1 単離された微生物に関して

本研究では、高濃度の銅を含有する培地で活性汚泥を培養することで、高濃度銅耐性を持つ微生物の単離が行われた。単離生物は視覚的な基準で 10 種類に分けることができたが、16S rRNA (V3) の塩基配列を調べた結果、3 種類の塩基配列が抽出された。これら 3 種類の塩基配列に対して相同性検索を行ったところ、

- *Acinetobacter*
- *Enterococcus*
- *Leuconostoc*
- *Ralstonia*
- *Stenotrophomonas*
- *Cupriavidus*

の 6 種類の属の細菌に相同性が高いことが分かった。

活性汚泥中の微生物から単離された銅耐性微生物が 16S rRNA の配列で 3 種類のみであったことは、培地の組成に因るものと考えられる。Fukushi ら (2002) の実験では、活性汚泥から 9 種類の異なる銅耐性微生物を活性汚泥中から単離している。

4.1.2 金属結合能評価について

単離された銅耐性を持つ微生物中のタンパク質と金属との関係を調べるため、2 次元電気泳動法を用いてタンパク質の分離を行い、金属吸着実験を行った結果、数種の高い金属吸着能を持つタンパク質が存在することが分かった。金属吸着能を評価

高い金属吸着能が認められたものたいてして、銅、亜鉛、カドミウムの混合溶液を用いて金属の選択性を調べたところ、銅とカドミウムに微量の吸着能を示したものの、高い吸着能は認められなかった。また亜鉛に関しては、有意な範囲での検出はなかった。

4.2 課題

また、下記のような課題が浮き彫りになり、今後の改善点として挙げる。

- 活性汚泥微生物を培養する段階で、用いた培地が、単離された微生物の多様性を結果的に欠いてしまったことは、多様な微生物群の中から検索する上では課題である。微生物を実験室系で培養するに当たり、培地の選択に熟慮が必要である。
- 分離したタンパク質スポットの位置を確認するために、染色操作を行ったが、染色に用いた手法が CBB 染色という比較的感度の低い手法であったため、CBB で染色されたタンパク質スポットのみしか実験に用いておらず、染色されていない微量タンパク質については金属検出実験に用いていない。このことは、多様なタンパク質群の中から目的の金属吸着タンパク質を検索する上で、母集団を減らしてしまうことにつながり、目的とするタンパク質を見逃す可能性が大きくなってしまいます。今後より感度の高い染色手法へと改善されるべきである。
- 本研究では、タンパク質を検索するにあたり、抽出元となる生物群に、活性汚泥中の銅耐性微生物を

用いた。しかし、広く実際の金属汚染サイトに棲息する微生物には未知の金属耐性機構の存在が期待される。その意味で、環境中の生物を対象として、本研究で用いた手法を応用して金属吸着タンパク質を検索することが期待される。

引用文献

Changlin Liu, Huibi Xu (2002) The metal site as a template for the metalloprotein structure formation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 88, 77-86

Yutaka K (1991) Definitions and Nomenclature of Metallothioneins. *Methods in Enzymology* 205, 8-10

Daniel Van Der Lelie, Jean-Paul Schwitzgebee, David J. Glass, Jaco Vangronsveld, Alan Baker (2001) Assessing Phytoremediation's Progress in the United States and Europe. *Environmental Science & Technology* November 1, 447A-452A

S. Karenlampi, H. Schat, J.Vangronsveld, J.A.C. Verkleij, D.van der Lelie, M. Mergeary, A.I. Tervahauta (2000) Genetic engineering in the improvement of plants for Phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* 107, 225-231

U. Kramer, A.N.Chardonens, (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl Microbiol Biotechnology*. 55, 661-672

Amersham Bioscience (1998) , 2-D Electrophoresis principles & methods

Ghozlan HA, Sabry SA, Amer RA. Bioaccumulation of nickel, cobalt, and cadmium by free and immobilized cells of *Pseudomonas* spp. *Fresenius Environ Bull* 1999;8(7/8):428-435.

Macaskie, L. (1991) The application of biotechnology to the treatment of wastes produced from the nuclear fuel cycle: biodegradation and bioaccumulation as a means of treating radionuclide-containing streams. *Biotechnology* 11, 41-112.

Malin M. and Leif B. (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 19, 67-73.

Marc Valls., Victor de Lorenzo (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 327-338.

K. Fukushi, S. Babel and H. Xuan (2002) Isolation and examination of copper removing bacteria from activated sludge culture. *Water Sci. Tech.* 46, 189-194.

平野 久 (2001) プロテオーム解析 -理論と方法- 東京化学同人

大島泰郎、鈴木紘一、藤井義明、村松番 編 (2002) ポストシーケンス タンパク質実験法 2 試料調整法 東京化学同人

F 研究発表

無し

G 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 3 : 近縁種の性質など

属	形状・大きさ	グラム染色	存在場所	その他
Acinetobacter	桿菌、直径0.9-1.6 μm、全長1.5-2.5 μm	-	土壌、水中、汚泥中に広く存在	好気性
Enterococcus	0.6-2.0×0.6-2.5 μm、球状もしくは卵型	+	環境中に幅広く存在し、特に脊椎動物の糞便に存在する	通性嫌気性細菌であり、化学合成従属栄養細菌
Leuconostoc	球状、もしくは対か鎖状の場合は細長い形状をしており、0.5-0.7×0.7-1.2 μm	+	植物に広く存在	通性嫌気性細菌、化学合成従属栄養細菌
Ralstonia	桿状、桿球状、もしくは球状で、0.5-1.0×0.5-2.6 μm	-	水中や土壌に存在	偏性好気性細菌
Stenotrophomonas	桿菌	-		
Cupriavidus		-		土壌中の非偏性の細菌捕食細菌、高濃度の銅に対して耐性を持つ

表 4

Sample name	putative division	related species	similarity
No.1, No.2, No.4, No.6, No.8	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales	Acinetobacter baumannii	195/195 (100%)
	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales	Acinetobacter calcoaceticus	195/195 (100%)
	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales	Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus	195/195 (100%)
No.3, No.5, No.7, No.9	Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae	Enterococcus faecalis	194/194 (100%)
	Firmicutes; Lactobacillales; Leuconostoc	Leuconostoc mesenteroides	194/194 (100%)
No.10	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	Ralstonia eutropha	193/194 (99%)
	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales	Stenotrophomonas maltophilia	193/194 (99%)
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	Ralstonia campinensis	193/194 (99%)
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales	Cupriavidus necator	193/194 (99%)

表5

Spot No.	M.W. (kDa)	タンパク質量 (pmol)	Cu (pmol)	Cu/Protein mol/mol
1	76	146	10.91	0.07
2	66	282	3.35	0.01
3	66	42	0.00	0.00
4	66	108	0.00	0.00
5	65	118	0.00	0.00
6	63	222	6.34	0.03
7	58	154	0.00	0.00
8	55	120	0.00	0.00
9	54	156	0.00	0.00
10	54	158	0.00	0.00
11	54	115	0.00	0.00
12	53	113	0.00	0.00
13	52	171	0.00	0.00
14	51	93	0.00	0.00
15	50	580	18.98	0.03
16	50	257	0.00	0.00
17	48	361	0.00	0.00
18	48	327	48.72	0.15
19	45	241	804.05	3.34
20	43	176	2332.54	13.26
21	40	210	436.03	2.07
22	41	93	193.51	2.09
23	38	159	211.98	1.33
24	36	185	210.02	1.14
25	34	153	303.41	1.98
26	36	201	207.52	1.03
27	37	211	749.44	3.56
28	36	135	664.44	4.94
29	36	94	143.56	1.53
30	31	148	677.54	4.56
31	53	50	15.43	0.31

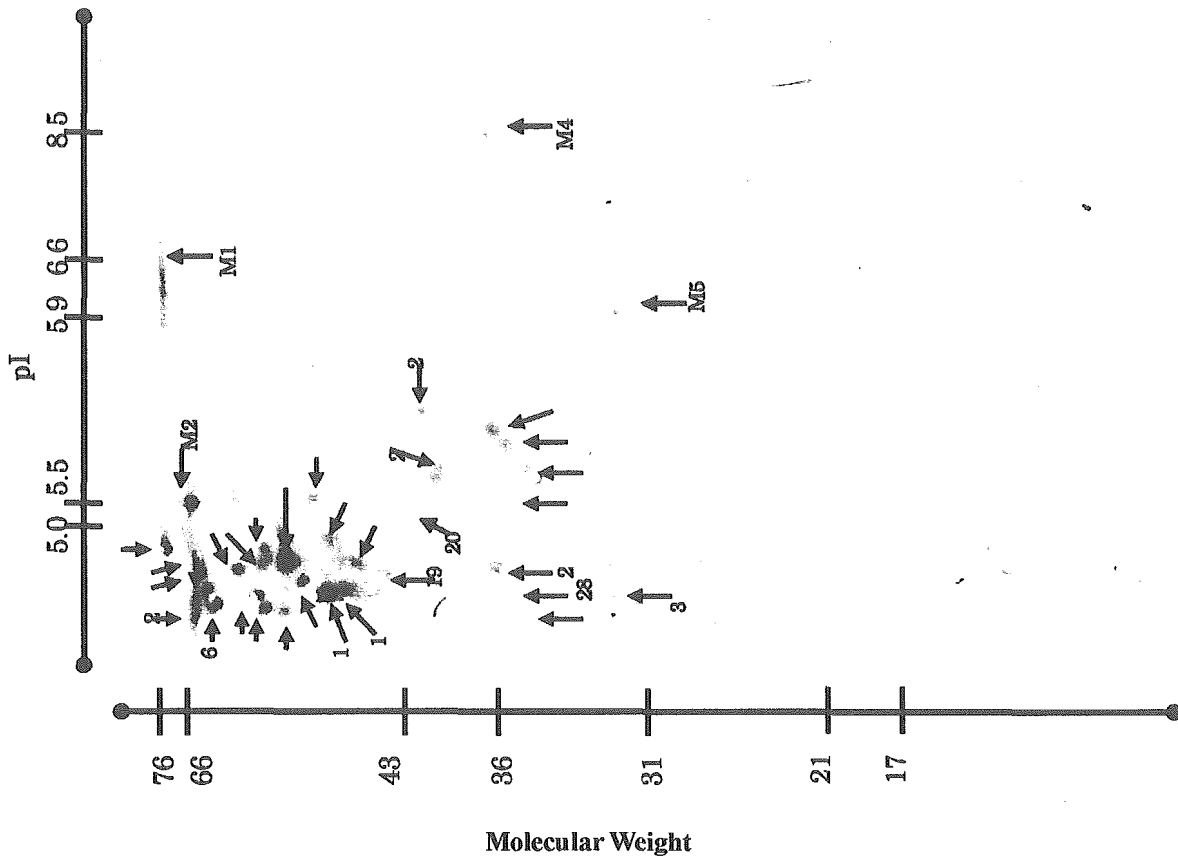


図 6.12 : No.5 のスポット

※ M1~M5 はマーカータンパク質

表 6

Spot	M.W. (kDa)	タンパク質量 nmol	Cu nmol	Cu/Protein mol/mol
1	26	0.895	0.00	0.00
2	18	1.470	1.51	1.03
3	21	0.801	0.35	0.44
4	21	0.857	2.80	3.27
5	32	0.541	4.36	8.07
6	36	0.208	0.60	2.87
7	35	0.210	0.10	0.49
8	37	0.186	0.00	0.00
9	38	0.145	1.33	9.15
10	36	0.163	3.16	19.39
11	36	0.112	0.00	0.00
12	41	0.068	0.00	0.00
13	45	0.076	0.54	7.15
14	44	0.105	0.00	0.00
15	44	0.102	2.54	25.02
16	45	0.069	0.27	3.94
17	43	0.074	0.85	11.39
18	43	0.112	1.64	14.65
19	47	0.033	0.20	6.23
20	50	0.036	0.00	0.00
21	54	0.027	0.39	14.43
22	53	0.048	0.09	1.93
23	52	0.039	0.05	1.23
24	54	0.032	0.00	0.00
25	50	0.065	0.45	6.92
26	50	0.053	0.51	9.62
27	50	0.050	0.11	2.10
28	48	0.050	0.00	0.00
29	50	0.085	0.00	0.00
30	50	0.041	0.00	0.00
31	54	0.091	0.00	0.00
32	54	0.275	0.33	1.21
33	60	0.067	1.09	16.21
34	66	0.035	0.00	0.00
35	68	0.017	0.00	0.00
36	66	0.160	0.27	1.71
37	76	0.199	0.20	1.01

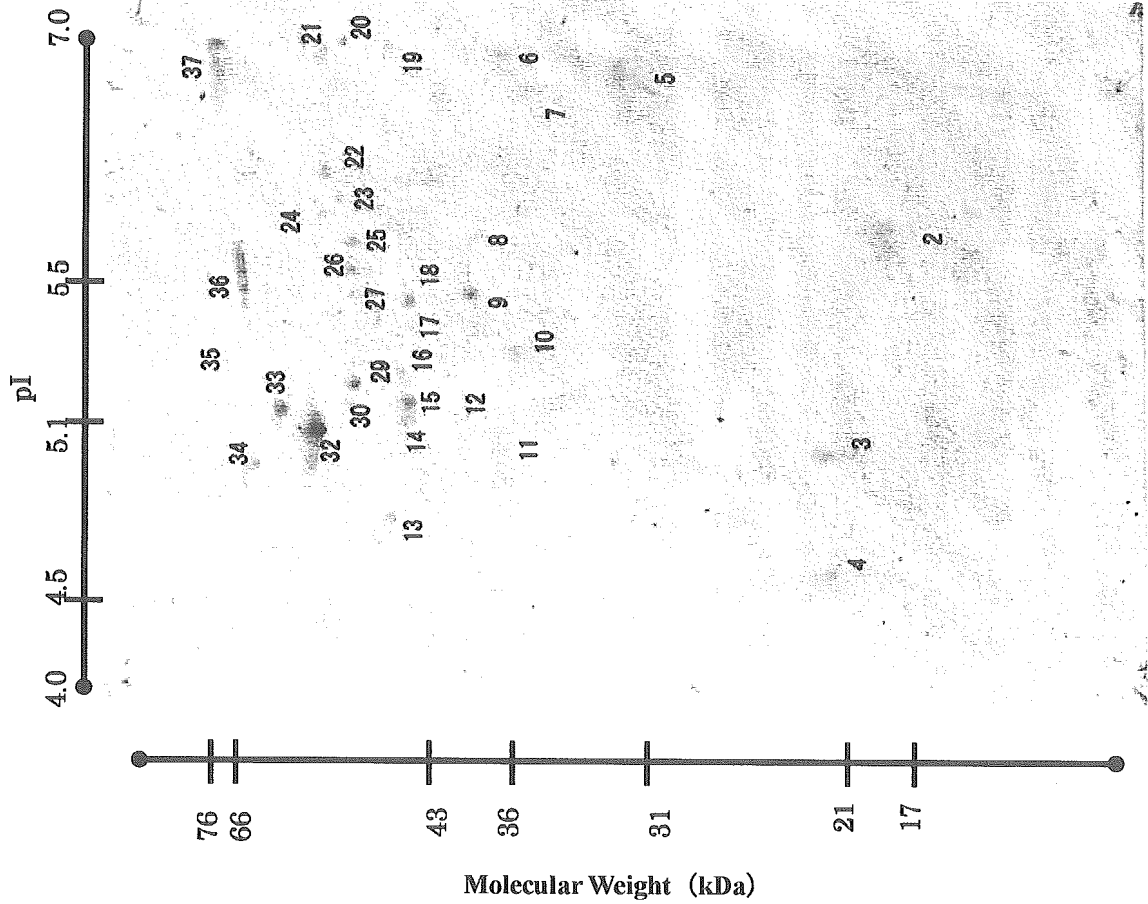
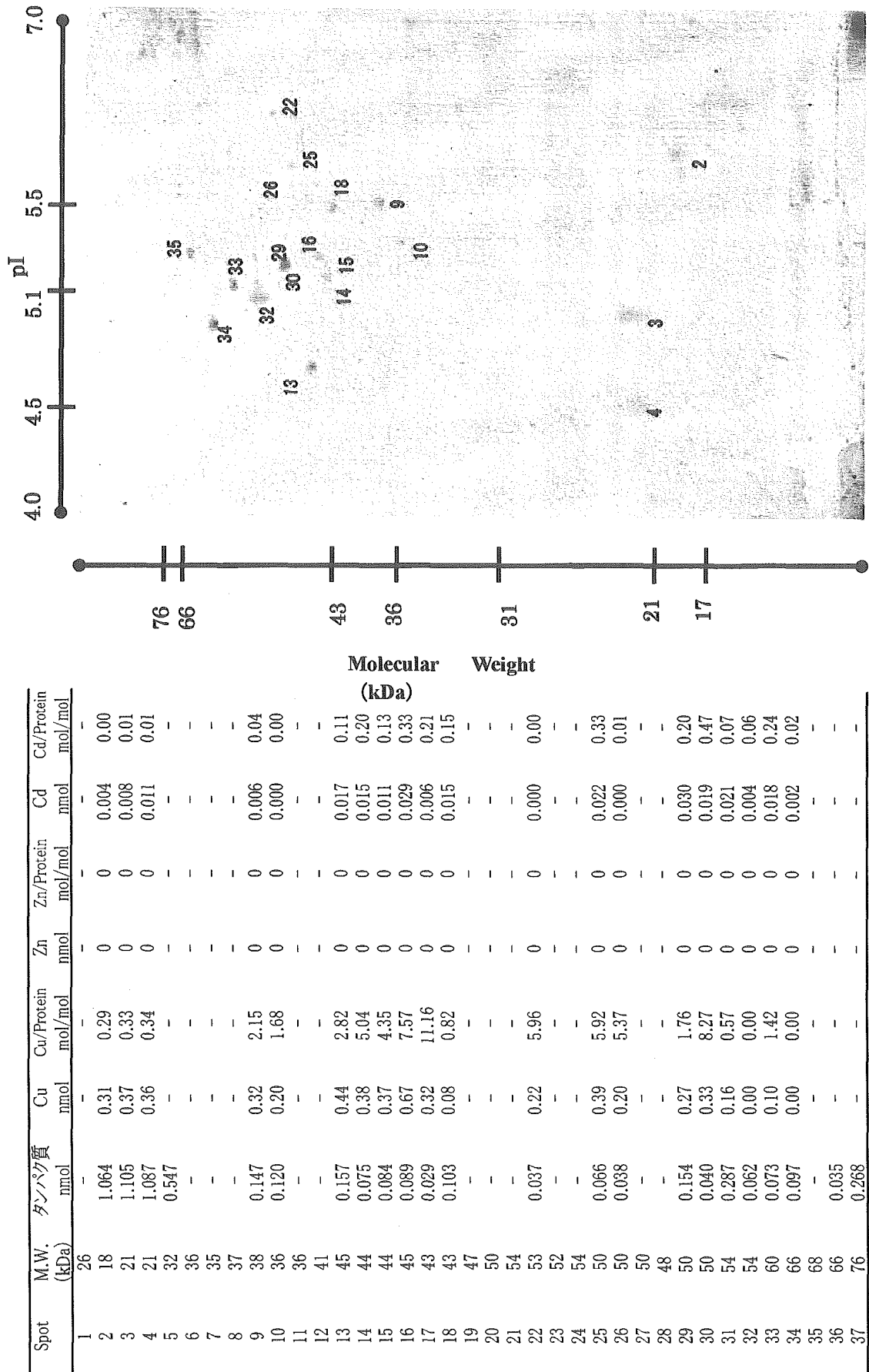


表 7



Spot	M.W. (kDa)	タンパク質 nmol	Cu nmol	Cu/Protein mol/mol	Zn nmol	Zn/Protein mol/mol	Cd nmol	Cd/Protein mol/mol
1	26	-	-	-	-	-	-	-
2	18	1.064	0.31	0.29	0	0	0.004	0.00
3	21	1.105	0.37	0.33	0	0	0.008	0.01
4	21	1.087	0.36	0.34	0	0	0.011	0.01
5	32	0.547	-	-	-	-	-	-
6	36	-	-	-	-	-	-	-
7	35	-	-	-	-	-	-	-
8	37	-	-	-	-	-	-	-
9	38	0.147	0.32	2.15	0	0	0.006	0.04
10	36	0.120	0.20	1.68	0	0	0.000	0.00
11	36	-	-	-	-	-	-	-
12	41	-	-	-	-	-	-	-
13	45	0.157	0.44	2.82	0	0	0.017	0.11
14	44	0.075	0.38	5.04	0	0	0.015	0.20
15	44	0.084	0.37	4.35	0	0	0.011	0.13
16	45	0.089	0.67	7.57	0	0	0.029	0.33
17	43	0.029	0.32	11.16	0	0	0.006	0.21
18	43	0.103	0.08	0.82	0	0	0.015	0.15
19	47	-	-	-	-	-	-	-
20	50	-	-	-	-	-	-	-
21	54	-	-	-	-	-	-	-
22	53	0.037	0.22	5.96	0	0	0.000	0.00
23	52	-	-	-	-	-	-	-
24	54	-	-	-	-	-	-	-
25	50	0.066	0.39	5.92	0	0	0.022	0.33
26	50	0.038	0.20	5.37	0	0	0.000	0.01
27	50	-	-	-	-	-	-	-
28	48	-	-	-	-	-	-	-
29	50	0.154	0.27	1.76	0	0	0.030	0.20
30	50	0.040	0.33	8.27	0	0	0.019	0.47
31	54	0.287	0.16	0.57	0	0	0.021	0.07
32	54	0.062	0.00	0.00	0	0	0.004	0.06
33	60	0.073	0.10	1.42	0	0	0.018	0.24
34	66	0.097	0.00	0.00	0	0	0.002	0.02
35	68	-	-	-	-	-	-	-
36	66	0.035	-	-	-	-	-	-
37	76	0.268	-	-	-	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（健全な水循環の形成に関する研究分野）
分担研究報告書

コミュニティベースの水管理に関する研究
分担研究者 北脇秀敏 東洋大学国際地域学部教授

（研究要旨）

バングラデシュの地下水中に多く存在し、健康被害の原因となっているヒ素は、地下水のエアレーションにより鉄と供沈することが知られている。一方でグアバは、バングラデシュの村落部においては農家の庭に一般的に植えられている果樹であるが、その葉に含まれるタンニンが地下水中の鉄と反応して黒くなる。この反応を利用して筆者らはグアバの葉を使用した呈色反応後の透視度を測定することにより地下水中の鉄の量を定量化する方法を開発した。

この二つの現象を利用して筆者らはグアバ葉抽出液を用いて地下水からヒ素が除去される過程を視覚的に定量化する方法（以下「グアバ法」と称する）を開発した。なお研究の詳細は添付した論文に示す。

的影響についても検討する。

A. 研究目的

北脇は、バングラデシュの村落部で調達可能なグアバの葉を用いたヒ素除去モニタリング手法の開発を行ってきた。本研究では、カウンターパートであるバングラデシュ工科大学の協力を得て現地での実証試験データを蓄積し、村落部でNGO等がヒ素除去のモニタリングに使用できる実用的価値の高いマニュアルを完成させることを目的としている。またフィールドにおいてグアバ法の視覚効果を用いて住民に衛生教育を行う立場のNGOフォーラム（現地小規模NGOを支援する立場のバングラデシュの指導的NGO）と協力し、住民の水使用に対する行動がいかに変容し、ヒ素除去装置の導入がいかに関与されるかなどの社会

B. 研究方法

研究は以下の3つのアプローチにより行った。

①室内実験によるグアバ葉による鉄含有水の呈色後の透視度測定実験とマニュアルの設定

室内実験により鉄濃度とグアバ呈色後の透視度との関係を調査し、検量線を作成する。これを用い、ヒ素除去前後の透視度からヒ素がどの程度除去されているかを推量する表を作成する。

②フィールドにおけるヒ素除去装置の機能調査

バングラデシュの村落部におけるヒ素除去装置であるピッチャーフィルターの構造

と機能を調査し、ヒ素除去のメカニズムの確定とグアバ法によるヒ素除去モニタリング手法のテストを行う

③住民の支払い意思額の変化に関する調査
グアバ法を住民に見せる前後のヒ素除去装置に対する支払い意思額の向上の程度を聞き取り調査等により行う。

C. 研究結果

①室内実験によるグアバ葉による鉄含有水の呈色後の透視度測定実験とマニュアルの設定

グアバの葉からタンニンを含む液を抽出する方法を規格化し、呈色反応を定量的に測定する方法を開発することができた。これにより各濃度で鉄を含む水をグアバ法により呈色させた場合、鉄濃度が増加するに伴い視度が双曲線様の低下を示すことが明らかになった。また鉄の除去量とヒ素の除去量とに相関関係があることが文献値から明らかになっていることから、上記の関係をを用いてグアバ法によるヒ素除去量推量表を作成することができた。これによりヒ素除去量推量のためのマニュアルを作成することができた。

②フィールドにおけるヒ素除去装置の機能調査

バングラデシュ村落部における適正技術であるピッチャーフィルター（素焼きの壺に煉瓦、砂等を入れて井戸水を濾過する装置）の構造を現地調査により明らかにした。

③住民の支払い意思額の変化に関する調査
グアバ法により鉄やヒ素を含む地下水を呈色させるデモンストレーションを住民に対して行った結果、住民のピッチャーフィ

ルターに対する支払い意思額が大幅に増加することが確認された。

D. 考察

E. 結論

グアバ法によりバングラデシュの村落部で用いられているピッチャーフィルターによる地下水中のヒ素除去率が推定できることが明らかになった。またグアバ法による地下水の呈色反応を住民にデモンストレーションすることにより、ヒ素除去装置に対する住民の支払い意思額が大幅に向上することが明らかになった。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

Hidetoshi Kitawaki, Md. Mafizur Rahman, Md. Jahangir Alam, Monitoring of Arsenic Removal Using Guava Leave-Development of Analytical Method Using Locally Available Material, Proceedings of International workshop on water management systems for creating healthy environment, pp.74-79, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況：該当無し

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌、研究発表（学会発表を含む）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
福士謙介、山本和夫、 崔宰薫	実下水への適用を目的とした浸漬型 ナノ濾過膜分離活性汚泥法の開発	用水と廃水	Vol. 46	p. 61-66,	2004
Choi JH, Fukushi K, Yamamoto K	Comparison of treatment efficiency of submerged nanofiltration membrane bioreactors using cellulose treacetate and polyamide membrane	Water Science and Technology	51 (6-7)	305-312,	2005
Hong J., Emori H. and Otaki M.	Photodecolorization of Azo dyes by extracellular metabolites under fluorescent light and influence of operational parameters,	J. of Bioscience and Bioengineering			査読済み, 掲載 予定
洪静蘭, 江守寛子, 大瀧雅寛	光合成細菌の細胞外物質による染料 の光分解	第41回環境工学フォーラム講演集		pp.74-76	2004
三浦佑己、伊藤 司、 岡部 聡、渡辺義公	Membrane bioreactorの運転性に伴う微 生物群集構造の解析	第39回日本水環境学会年会講演集、千 葉			2005
平岩ミリアンのり子、 伊藤 司、岡部 聡、 渡辺義公	Microbial community structure and membrane bioreactor performance	第38回日本水環境学会年会講演集、礼 幌		p546	2004
浦瀬太郎, 香川千絵	活性汚泥中での医薬品・女性ホルモン 様物質の除去に影響を及ぼす因子	用水と廃水	46, 11	955-961	2004

香川千絵, 菊田友弥, 浦瀬太郎	医薬品の除去に対する膜分離活性汚 泥法分離膜の付加効果	水環境学会誌	28, 3	207-210	2005
香川千絵, 浦瀬太郎, 菊田友弥	固液間の化学物質の分配に着目した 医薬品の活性汚泥での吸着分解挙動	土木学会年次学術講演会	59	VII-020	2004
T. Urase, C. Kagawa, T. Kikuta	Factors affecting removal of pharmaceutical substances and estrogens in membrane separation bioreactor	Proc. of International conference on Membranes in drinking and industrial water production, L'Aquila, Italy			2004
佐藤孝太, 浦瀬太郎	ナノろ過膜による医薬品の阻止性能 のpH依存性	土木学会環境工学研			2004
高梨啓和	2 標本 t 検定に基づく変異原性試験 結果の陽性・陰性の判定、	統計数理			印刷中
Nakajima Tsunenori, T. Kawabata, H. Kawabata, Hirokazu Takanashi, Akira Ohki, Shigeru Maeda	Degradation of Phenylarsonic Acid and Its Derivatives into Arsenate by Hydrothermal Treatment and Photocatalytic Reaction	Applied Organometallic Chemistry,			in press
Gao, M.T., Makoto Hirata, Koide, M., Tadashi Hano and Hirokazu Takanashi,	Production of L-lactic acid by electrodialysis fermentation (EDF)	Process Biochemistry,			in press
Gao, M.T., Goto, R., Koide, M., Hirokazu Takanashi, Makoto Hirata and Tadashi Han	Development of continuous electrodialysis fermentation system for Lactobacillus rhamnosus based production of lactic acid	Process Biochemistry,			in press
Hirokazu Takanashi, Tanaka Akiko, Nakajima Tsunenori and Ohki Akira	Arsenic removal from groundwater by a newly developed adsorbent	Water Science and Technology,			in press

Yan-Hua Xu, Akira Iwashita, Tsunenori Nakajima, Hiroyuki Yamashita, Hirokazu Takanashi and Akira Ohki,	Effect of HF addition on the microwave-assisted acid-digestion for the determination of metals in coal by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry	Talanta,			in press
Akira Iwashita, Yuka Sakaguchi, Tsunenori Nakajima, Hirokazu Takanashi, Akira Ohki and Shinji Kambara	Leaching characteristics of boron and selenium for various coal fly ashes	Fuel,			in press
Nakajima Tsunenori, Tomohide Kanda, Takashi Fukuda, Hirokazu Takanashi and Akira Ohki	Characterization of eluent by hot water extraction of coals in terms of total organic carbon and environmental impacts	Fuel,			in press
Hirokazu TAKANSHI, Keiko SHIMPUKU, Mizuki KOSAKA, Hitoshi KAJIYA, Tsunenori NAKAJIMA and Akira Ohki,	Mutagenicity of Biodegraded and Chlorinated Derivatives of Agricultural Chemicals	Proceedings of IWA-Aspire			2005
加治屋仁、小坂瑞樹、新福桂子、高梨啓和、中島常憲、大木 章	水道水の安全性向上を指向した農薬の環境安全性評価	第37回日本水環境学会講演予稿集	p.438		2005.
Nagaoka.H, Nobusawa, Y	Prediction of Trans-membrane Pressure Increase in Membrane Bioreactor Using Extended Kalman Filter	IWA World Water Congress and Exhibition, marrakech, Technical Program and Congress Library	28494		2004
Nagaoka.H., Nemoto,H	Influence of Extracellular Polymeric Substances on Nitrogen Removal in Intermittently-Aerater Membrane Bioreactor	IWA 4th Black Sea International Conference, Book of Proceedings	327-336		2004

Akoh,H, Sugiyama,S, Nagaoka,H	Influence of EPS on permeability of nightsoil-treatment membrane bioreactor	IWA Water Environment-Membrane Technology, WEMT2004	P-4-7	2004
伊藤慎彦、千田祐一郎	流域における小規模分散型水供給シ ステム導入可能性の解析	第39回日本水環境学会年会講演集	p.419	2005
小出繭子、熱海裕介、 松井一彰、遠藤銀朗	可動性遺伝子(トランスポゾン)の転 移頻度に及ぼすUV照射とヒートショ ックの影響に関する研究	平成16年度東北支部技術研究発表会 (宮城県仙台市)		2005
池嶋規人、尾崎博明ら	低圧逆浸透膜の内分泌攪乱物質分離 に及ぼす共存物質の影響	環境工学研究論文集	Vol.41 pp.501-50 7	2004
池嶋規人、尾崎博明ら	低圧逆浸透膜法による内分泌攪乱物 質の分離における天然有機物質の影 響	第59回土木学会年次学術講演会概要 集	71	2004
児戸睦尚、尾崎博明ら	低圧逆浸透膜による内分泌攪乱物質 の分離における影響因子	第39回日本水環境学会年会講演集	487	2005
洪 鋒、津野 洋、日 高 平、千 智勲	1日1回給餌操作での生ごみの高温メ タン発酵特性に関する研究	廃棄物学会論文誌別冊	Vol.15 No.5 pp.381-38 8	2004
津野 洋、宗宮 清水、芳 久、永禮 明、日高 平	資源循環・エネルギーミニマム型ス テム技術：資源回収型の都市廃水・廃 棄物処理システム技術の開発	環境衛生工学研究	Vol.18, No.3 pp.47-52	2004

朴 鏞珍, 千 智勲, 津野 洋, 日高 平	下水汚泥の有機酸発酵特性に関する研究	第41回下水道研究発表会講演集		pp.837-839	2004
佐野川貴弘, 松井佳彦, 松下拓	粒径1 μ m以下の超微粉化活性炭による高速吸着・MF膜複合処理	第39回日本水環境学会年会講演集			2005
Y. Matsui et al	Micro-ground Powdered Activated Carbon for Effective Removal of Natural Organic Matter during Water Treatment.	Water Sci. & Tech.: Water Supply	4(4)	155-163	2004
T. Matsushita et al	Effect of Membrane Pore Size, Coagulation Time, and Coagulant Dose on Virus Removal by a Coagulation-Ceramic Microfiltration Hybrid System.	Proc. EDS & IWA Conference on Membranes in Drinking and Industrial Water Production, CD-ROM, L'Aquila, Italy			2004
Y. Matsui et al.	Enhancing an Adsorption-Membrane Hybrid System with Microground Activated Carbon.	Proc. 4th IWA World Water Congress, CD-ROM, Marrakech, Morocco.			2004
Y Y. Matsui et al.	Rapid Adsorption Pretreatment with Submicron Powdered Activated Carbon Particles before Microfiltration	Proc. Water Environment Membrane Technology Seoul, Korea.	Vol.2	pp.619-626,	2004
Y. Matsui et al.	Enhanced Removal Performances of Ceramic MF by Submicron PAC Adsorption and PACl Coagulation Pretreatments	Proceedings of AWWA Membrane Technology Conference, CD-ROM, phoenix, AZ, USA			2005
Fusheng Li, Akira Yuasa, Aya Obara, Alexander P. Mathews	Aerobic batch degradation of 17 β -estradiol (E2) by activated sludge: Effects of spiking E2 concentrations, MLVSS and temperatures	Water Research			2005 (Accepted for publication.)

久保広明、渡辺義公、 岡部聡、木村克輝	MBR(Membrane Bioreactor)を用いた 都市下水処理システムにおける女性 ホルモン様物質の挙動に関する研究	第38回日本水環境学会年会講演集	P363	2004
大和信大、木村克輝、 渡辺義公	MBRの運転条件が膜フアウリングに 及ぼす影響	第39回日本水環境学会年会講演集	P37	2005
原宏江、木村克輝、渡 辺義公	膜を用いた高度下水処理による医薬 品除去	第39回日本水環境学会年会講演集	P42	2005
T.Itonaga and Y.Watanabe	Performance of membrane bioreactor combined with pre-coagulation/sedimentation	Water Science and Technology, Water Supply	Vol.4(1) P 143-149	2004
Hidetoshi Kitawaki, Md.Mafizur Rahman, Md. Jahangir Alam	Monitoring of Arsenic Removal Using Guava Leave -Development of Analytical Method Using Locally Available Material,	Proceedings of International workshop on water management systems for creating healthy environment	pp.74-79	2005