

土壌汚染対策のための技術開発事業
事後評価報告書
(案)

平成28年1月
産業構造審議会産業技術環境分科会
研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ

はじめに

研究開発の評価は、研究開発活動の効率化・活性化、優れた成果の獲得や社会・経済への還元等を図るとともに、国民に対して説明責任を果たすために、極めて重要な活動であり、このため、経済産業省では、「国の研究開発評価に関する大綱的指針」（平成24年12月6日、内閣総理大臣決定）等に沿った適切な評価を実施すべく「経済産業省技術評価指針」（平成26年4月改正）を定め、これに基づいて研究開発の評価を実施している。

経済産業省において実施した「土壌汚染対策のための技術開発」プロジェクトは、工場・事業場の操業中からの自主的な土壌汚染対策を促進するため、原位置で行う回収・浄化機能等を有する低コストの土壌汚染対策技術（共通基盤的評価技術を含む）として、重金属等の原位置処理土壌汚染対策及びVOCの微生物等を利用した環境汚染物質の浄化技術を開発するため、平成23年度から平成26年度まで実施したものである。

今回の評価は、この土壌汚染対策のための技術開発の事後評価であり、実際の評価に際しては、省外の有識者からなる土壌汚染対策のための技術開発プロジェクト事後評価検討会（座長：池道彦 国立大学大阪大学大学院工学研究科教授）を開催した。

今般、当該検討会における検討結果が評価報告書の原案として産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ（座長：小林 直人 早稲田大学研究戦略センター副所長・教授）に付議され、内容を審議し、了承された。

本書は、これらの評価結果を取りまとめたものである。

平成28年1月

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ

委 員 名 簿

座長	小林 直人	早稲田大学研究戦略センター副所長・教授
	大島 まり	東京大学大学院情報学環教授 東京大学生産技術研究所教授
	太田 健一郎	横浜国立大学工学研究院グリーン水素研究センター長 ・特任教授
	亀井 信一	株式会社三菱総合研究所政策・経済研究センター長
	高橋 真木子	金沢工業大学工学研究科教授
	津川 若子	東京農工大学大学院工学研究院准教授
	西尾 好司	株式会社富士通総研経済研究所主任研究員
	森 俊介	東京理科大学理工学研究科長 東京理科大学理工学部経営工学科教授

(座長除き、五十音順)

事務局：経済産業省産業技術環境局技術評価室

土壌汚染対策のための技術開発
プロジェクト事後評価検討会
委員名簿

座長	池道彦	国立大学法人大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻教授
	井上千弘	国立大学法人東北大学大学院 環境科学研究科環境修復生態学分野教授
	及川勝	全国中小企業団体中央会 政策推進部長
	駒井武	国立大学法人東北大学大学院 環境科学研究科教授
	宮晶子	水ing株式会社 技術・開発本部執行役員技術・開発統括

(敬称略、五十音順)

事務局：経済産業省商務情報政策局生物化学産業課
経済産業省産業技術環境局環境指導室

**土壌汚染対策のための技術開発
プロジェクトの評価に係る省内関係者**

【事後評価時】

商務情報政策局 生物化学産業課長 西村 秀隆（事業担当課長）
産業技術環境局 環境指導室長 田中 秀明（事業担当室長）

大臣官房参事官（イノベーション推進担当）
産業技術環境局 研究開発課 技術評価室長 岩松 潤

【中間評価時】

（平成24年度）

製造産業局 生物化学産業課長 江崎 禎英（事業担当課長）
産業技術環境局 環境指導室長 實國 慎一（事業担当室長）

産業技術環境局 産業技術政策課 技術評価室長 岡本 繁樹

【事前評価時】（事業初年度予算要求時）

製造産業局 生物化学産業課長 荒木 由季子（事業担当課長）
産業技術環境局 環境指導室長 植田 拓郎（事業担当室長）

土壌汚染対策のための技術開発プロジェクト 事後評価

審 議 経 過

○第1回事後評価検討会（平成27年10月21日）

- ・評価の方法等について
- ・プロジェクトの概要について
- ・評価の進め方について

○第2回事後評価検討会（平成27年12月25日）

- ・評価報告書(案)について

○産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ（平成28年1月26日）

- ・評価報告書(案)について

目 次

はじめに

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・イノベーション小委員会評価ワーキンググループ
委員名簿

土壤汚染対策のための技術開発プロジェクト事後評価検討会 委員名簿

土壤汚染対策のための技術開発プロジェクト評価に係る省内関係者

土壤汚染対策のための技術開発プロジェクト事後評価 審議経過

	ページ
事後評価報告書概要	i
第1章 評価の実施方法	
1. 評価目的	2
2. 評価者	2
3. 評価対象	3
4. 評価方法	3
5. プロジェクト評価における標準的な評価項目・評価基準	3
第2章 プロジェクトの概要	
1. 事業の目的・政策的位置付け	7
2. 研究開発等の目標	12
3. 成果、目標の達成度	20
4. 事業化、波及効果について	191
5. 研究開発マネジメント・体制等	197
6. 費用対効果	212
第3章 評価	
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	231
2. 研究開発等の目標の妥当性	233
3. 成果、目標の達成度の妥当性	235
4. 事業化、波及効果についての妥当性	237
5. 研究開発マネジメント・体制等の妥当性	239
6. 費用対効果の妥当性	241
7. 総合評価	242
8. 今後の研究開発の方向等に関する提言	245
9. 個別要素技術に関するコメントについて	247
第4章 評点法による評点結果	252
参考資料	
参考資料1 経済産業省技術評価指針	
参考資料2 経済産業省技術評価指針に基づく標準的評価項目・評価基準	
参考資料3 土壤汚染対策のための技術開発プロジェクト中間評価報告書（概要版）	
参考資料4 土壤汚染対策のための技術開発プロジェクト基本計画	

事後評価報告書概要

事後評価報告書概要

プロジェクト名	土壌汚染対策のための技術開発																							
上位施策名	環境安心イノベーションプログラム																							
事業担当課	商務情報政策局生物化学産業課 産業技術環境局環境指導室																							
<u>プロジェクトの目的・概要</u> 本技術開発は工場・事業場の操業中からの自主的な土壌汚染対策を促進するため、原位置で行う回収・浄化機能等を有する低コストの土壌汚染対策技術（共通基盤的評価技術を含む）として、重金属等の原位置処理土壌汚染対策及びVOCの微生物を利用した環境汚染物質の浄化技術を開発することを目的としている。また、バイオレメディエーションで利用する微生物の安全性を評価する手法や環境中に存在する微生物群を包括的にモニタリングするための手法を開発し、それらの成果をバイオレメディエーション利用指針に反映し、微生物を利用したバイオレメディエーションの普及促進を図ることを目指す。																								
予算額等（委託 or 補助（補助率：2／3）） （単位：千円） <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">開始年度</th><th style="width: 20%;">終了年度</th><th style="width: 20%;">中間評価時期</th><th style="width: 20%;">事後評価時期</th><th style="width: 20%;">事業実施主体</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>平成22年度 （※平成22年度は、NEDO事業で実施）</td><td>平成26年度</td><td>平成24年度</td><td>平成27年度</td><td>新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ、土壌修復ラジアルウェル技術研究組合、（株）島津製作所、長岡技術科学大学、東京大学、岐阜大学</td></tr> <tr> <td>H24FY 予算額</td><td>H25FY 予算額</td><td>H26FY 予算額</td><td>総予算額</td><td>総執行額</td></tr> <tr> <td>190,000</td><td>179,275</td><td>146,495</td><td>639,594</td><td>596,405</td></tr> </tbody> </table> * 予算額の欄には、直近3年間の予算額を記載。					開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体	平成22年度 （※平成22年度は、NEDO事業で実施）	平成26年度	平成24年度	平成27年度	新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ、土壌修復ラジアルウェル技術研究組合、（株）島津製作所、長岡技術科学大学、東京大学、岐阜大学	H24FY 予算額	H25FY 予算額	H26FY 予算額	総予算額	総執行額	190,000	179,275	146,495	639,594	596,405
開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体																				
平成22年度 （※平成22年度は、NEDO事業で実施）	平成26年度	平成24年度	平成27年度	新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ、土壌修復ラジアルウェル技術研究組合、（株）島津製作所、長岡技術科学大学、東京大学、岐阜大学																				
H24FY 予算額	H25FY 予算額	H26FY 予算額	総予算額	総執行額																				
190,000	179,275	146,495	639,594	596,405																				

目標・指標及び成果・達成度

(1) 全体目標に対する成果・達成度

個別要素技術	目標・指標	成果	達成度
シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発			
シアン汚染サイトのあらゆる土質・地層に適したバイオ技術による浄化工法の開発	1) 現状対策費の1/2のコスト達成 2) あらゆる地盤・地層に対応した技術開発	1) 実証試験において土質に応じた工法適用により、掘削除去のコスト1/2を達成。 ・砂質土：注入工法 ・粘性土：混練工法 2) 実証試験において土質に応じた工法適用により浄化を確認。 ・砂質土：注入工法、 ・シルト・粘土：混練工法、 ・砂質・シルト・粘土の互層：混練・注入工法	達成
全シアン含有量分析方法	いかなる土壌においても全シアンを90%以上回収可能な分析技術の開発	土壌中の全シアン含有量の分析精度（添加・回収率）が95%以上となる分析技術（NSOF法）を確立した。	達成
シアン分解微生物	➢ スティミュレーションの研究 原地盤の在来菌によるシアン分解の確認 ➢ オグメンテーションの研究 培養したシアン分解菌投入によるシアン分解の確認	➢ スティミュレーションの研究 実証試験において在来菌によるシアン分解を確認した。 ➢ オグメンテーションの研究 実証試験において対象地の地下水を揚水して集積培養した微生物を対象地に投入することでシアン分解を確認した。	達成
土質・地層に応じた工法	➢ 混練の仕様の決定 ➢ 混練性能の評価	➢ 地盤改良機を用いた混練試験により、混練の仕様を確認した。 ➢ 地中に混練した栄養剤濃度をTOCとHPLCにより定量して混練性能を評価した。	達成
ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発			
基盤技術（全体目標）	従来の掘削除去方式の約半分のコストで、水溶性かつ移動性の有害重金属等を3年以内に原位置で回収・浄化する。また、狭隘な場所にも適用可能とする。	実証試験に用いた高濃度鉛汚染土壌に関しては、従来方式の半分以上のコストで処理できることを確認・実証できた。また、3種類の室内カラム試験結果から、洗浄プロセス（工程）全体をシミュレートする手法を開発した。	達成
配水循環システムに関する研究開発	狭隘な場所に適用可能となる直径2m程度までの立坑を施工可能とし、サイト全体をくまなく浄化する集配水システムを構築する。	直径2mの立坑での施工方法を見出した。実証試験を通じ、サイト全体を均一にくまなく配水浄化する手法を実証した。	達成

重金属の土壌からの脱着法の研究開発	全ての重金属類に対する効果的な脱着手法と抽出剤を見出す。	鉛に関しては、チオ硫酸による脱着工程と、電気分解を利用する洗浄工程を併用する方式が有効であることが、実証できた。	達成
土壌から脱着した重金属等の吸着処理の研究開発	短期間でサイトからの重金属の回収・浄化を可能にする、効率的な水処理システムを開発する。	鉛に対しチオ硫酸を使用する方式では、パイライトが有効であることが実証できた。別途、無機ポリマー質鉛吸着剤を新規に開発・実用化した。	達成
原位置モニタリング技術に関する研究開発	修復中の洗浄状況をリアルタイムで把握・確認できる3次元モニタリングシステムを構築する。	細径鋼管打設工法を応用し、φ25の井戸を安価に施工する新工法を開発し、実証試験でその有効性が確認・検証できた。	達成
遮水壁に関する研究開発	狭隘な場所にも適用可能で閉鎖系を実現する遮水壁とその工法を開発する。	ベントナイト 100%砕石を使用する地中鉛直連続遮水壁を考案し、継手・隅角部を含む部分地中実証実験を行い、施工性並びに遮水性等の性能を別途確認・実証した。但し、狭隘な場所への適用は、シートパイル等との併用で対応する。	達成
低コスト原位置電気修復技術の研究開発			
模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	模擬汚染土壌を対象として、電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	鉛、六価クロムを汚染物質とした砂、マサ土、笠岡粘土の模擬汚染土壌において、電力消費量 2,250kWh/m ³ 以下で浄化できる土壌 pH、電解液 EC の最適条件を導出した。	達成
実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	鉛実汚染土壌（粘土混じり砂）及び六価クロム実汚染土壌（砂混じり粘土）について、電力消費量 2,250kWh/m ³ 以下で浄化できる土壌 pH、電解液 EC の最適条件を導出した。	達成
汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価	汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価を行う。	鉛を対象汚染物質とした模擬汚染土壌について、環境負荷の低い電解質（塩）を使った電解水による溶出試験を実施し、pH3～pH4の電解水で、鉛の溶出量が著しく増加することがわかり、電気修復浄化への適用可能性を見出した。	達成
電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究	電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究を行う。	鉛を対象汚染物質とした模擬汚染土壌について、土壌 pH が 6 以下でなければ鉛は溶出せず浄化が困難なことを実験的に確認した。	達成
印加電圧パルス化による浄化効率の向上に関する研究	印加電圧パルス化による浄化効率の向上のための検討を行う。	鉛模擬汚染土壌、六価クロム模擬汚染土壌のいずれにおいても浄化効率の向上が認められた。	達成

電解水添加による浄化効率の向上に関する研究	電解水添加による浄化効率向上のための検討を行う。	六価クロム模擬汚染土壌では目標を超える浄化効率の向上が認められた。	達成
原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定	原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定を行う。	土壌 pH-電解液 EC の最適化、印加電圧パルス化、電解水添加の 3 技術を適用することにより、いずれもそれぞれの目標電力消費量以内での浄化を達成した。	達成
電気修復法に使用する電極・井戸の最適化に関する評価検討	設備としての電極ならびに電極井戸の数と配置の最適化、電極材料ならびに井戸構造の最適化を行う。 電極形状（表面積など）をパラメータとして、浄化効率一定の条件下で有効使用電極の総重量を従来の 2/3 に低減する。	電極形状を変更し、電解液中での抵抗値を変えることなく、その総重量を目標である 2/3 以下に削減した。	達成
汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立	汚染現場における浄化対象領域の探索と特定、ならびに浄化過程における浄化進捗状況の把握のために、オンサイト簡易分析手法と迅速マッピング技術を開発する。	汚染分布領域を特定する目的で、携帯型蛍光 X 線分析装置の測定条件を確立した。また鉛を 450mg/kg 含有した汚染土壌を対象とした測定で、 $448 \pm 3 \text{mg/kg}$ の実測値を得ることができ、測定手法として十分な精度があることを確認した。	達成
低コスト電力（自然エネルギー等）の活用検討	自然エネルギーによる電力の利活用を検討する。利用する電力の目標コストは、複数の使用電力料金の平均値として、1kWh あたり 10 円をめざす。	電力コスト低減を目的として、自然エネルギーである太陽光発電による電力利用について調査と試算を行った。現時点では平均的な商用電力料金よりも高額になるが、技術的には適用可能であることが判った。また、太陽光パネル単価は今後ますます低価格化が進むとされており、商用電力の利用できない汚染現場の浄化などの際には、電力を獲得する有効な代替手段として期待できることが判った。	達成
実証試験の実施と目標浄化コストの検証	研究成果をもとに浄化コストを算出し、実際の汚染サイトでの実証試験によって検証する。対象土壌 1m ³ あたり 1,500kWh の電力を使用して、対象重金属について土対法における含有量基準値の 3 倍濃度の汚染土壌、また溶出量基準値の 10 倍程度の汚染土壌について、それぞれを基準値以下に浄化する。処理コストは掘削除去による平均	実証試験の結果、鉛汚染年度について、目標値の 1,500kWh/m ³ での浄化を達成できた。これをもとに、単位電力料金を引用した浄化総コストは 1 m ³ あたり 25,165 円と換算され、当初目標の掘削除去コスト 50,000 円の半額に近い数値となることが示された。	達成

	的な処理コスト（50,000 円／ m ³ ）の半額程度（約 25,000 円／ m ³ ）とする。		
バイオレメディエーションのための標準微生物の確立			
1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
有害菌のドラフト ゲノム解析と指標 遺伝子の特定	バイレメに関連する（環境有害菌） 属種の細菌 50 株以上について、判 別指標となる遺伝子を特定する。	新たに 51 株についてドラフトゲノ ム解析を実施し、指標遺伝子を 特定した。	達成
指標遺伝子を利用した有害性判 定手法の開発	バイレメに関連する属種の細菌 50 株以上について、指標遺伝子を用 いた判別手法を開発する。	バイレメに関連する 7 属群につ いて、指標遺伝子を新たに特定 した 51 株と多数の既往ゲノム解 析株を MLISA 法で解析する判別 手法を開発した。	達成
有害菌データベ ースの作製	既知有害菌に関する情報を収集・ 整備し、微生物の安全評価を一元 的に実施できる体制を整備する。	様々な機関の既知有害菌に関 する情報を収集・一元化し、デー タベースを作成して公開した。	達成
バイオレメディエーションのための標準微生物の確立			
2. 標準微生物の確立（バイオオーグメンテーション実施環境の整備）			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
好気性塩素化エ チレン類分解菌 （群）の収集、培 養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜分解菌 の分離・解析、保管	収集株 122 株について、分解活 性を確認し 13 株を選抜して同定 し、保存した。	達成
嫌気性塩素化エ チレン類分解菌 （群）の収集、培 養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜分解菌 の分離・解析、保管	我が国で初めて嫌気性脱塩素 菌単離に成功し、共培養で活性 化する菌株も選抜して同定し、 保存した。	達成
バイレメ指針適合 株の開発（分解 菌の指針適合確 認）	指針適合に必要な情報を整備、バ イレメ指針適合の確認（3 株以上）、 頒布体制の確立	3 株（RHA1 株、UCH007、 UCH004）について、指針適合確 認の審査を受けた。RHA1 株に ついて確認済み。	一部達成
バイオレメディエーションのための標準微生物の確立			
3. 「多種微生物群の包括的解析技術の開発」			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
2-a) 実験室レベ ルでのバイレメ実 験	実験室レベルでのバイレメ試験系 を確立し、バイレメの有効性と生態 系への影響を評価する。	好氣的分解菌 RHA1 株および 20B 株を用いて試験系を確立 し、効果を確認した。同時に微 生物群集の変化を評価した。	達成

2-b) 実汚染現場におけるバイレメ実験	複数の実環境においてバイオスティミュレーション浄化を実施し、生態系影響のための試料を提供する。	操業中の工場敷地内 3 地点において浄化試験を実施し、試料を提供した。	達成
2-c) 次世代シーケンサーによる網羅的な微生物叢解析	次世代シーケンサーを用いた網羅的な菌叢解析手法を確立し、バイオスティミュレーションサイトにおける生態系影響評価を実施。	3 地点の試験サイトにおいて、新型シーケンサーを用いた網羅的な菌叢解析による生態系影響評価を実施した。	達成
2-d) 超並列塩基配列解析による指標微生物の特定	ヒト病原菌検出系および病原菌等の特定による生態系影響評価手法の確立	指標微生物としてヒト病原菌を検出する系を確立した。	達成
2-e) 環境メタトランスクリプトーム解析	環境試料からの RNA 抽出・配列解析手法の確立、RNA を指標とした網羅的な菌叢解析手法の開発と生態系影響評価。	環境試料からの RNA 抽出・配列解析手法を確立し、生態系影響評価を実施した。	達成
2-f) 指標微生物群の定量的モニタリング手法の開発	指標候補微生物群の検出 PCR プライマーの開発と指標微生物候補に対する定量的モニタリング技術の確立。	細菌、古細菌それぞれに特異的な PCR プライマー設計し、内部標準を用いた定量性測定技術を確立した。	達成
2-g) 生態系影響評価標準的プロトコルの作成	標準的なプロトコルの作成。	標準的なプロトコルを作成した。	達成
2-h) プロトコル実施のための核酸標準物質の整備	プロトコルを実施するための核酸標準物質の頒布体制の整備。	プロトコルを実施するための核酸標準物質の頒布体制を整えた。	達成
バイオレメディエーションのための標準微生物の確立 4. 「生態系への総合的影響評価手法の開発(実証実験)」			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
導入菌株のモニタリング（長岡技大、産総研）	指針適合株のバイオオーグメンテーションにおける動態と効果を評価する。	指針適合株をバイオオーグメンテーションに使用し、動態と効果を評価した。	達成
生態系影響評価手法の確立（東大、産総研、製品評価機構）	開発した生態系影響評価手法を確立する。 バイオオーグメンテーションにおける生態系への影響を評価する。	バイオオーグメンテーション試験で取得したサンプルについて生態系への影響を評価した。	達成
標準株の維持管理（製品評価機構）	バイレメ指針適合株の頒布体制を整える。	バイレメ指針適合株の頒布体制を整えた。	達成

(2) 目標及び計画の変更の有無

なし

<共通指標>

	論文数	論文の 被引用度数	特許等件数 (出願を含む)
シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発	6	1	13
ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発	0	0	0
低コスト原位置電気修復技術の研究開発	3	0	0
次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発	8	12	1
計	17	13	14

評価概要

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

本事業は、技術戦略マップの導入シナリオにおいて位置づけられており、土壌対策法の一部改正に伴う附帯決議を踏まえて実施するものであることから、政策的意義は明確である。また、使用される微生物の安全性評価手法の開発が急がれていることから、国が積極的に支援することは極めて妥当であったと判断される。

本事業は、土壌汚染対策を目的としており、汚染対策などの環境関連の研究開発は、生来が市場性から民間主体で進めるのが難しい面を抱えていることから、国として積極的に関与すべき分野である。

なお、本事業では、必ずしも原位置土壌浄化の重要な課題の全てをカバーできているといえず、より広範な技術開発の支援をするべきである。

2. 研究開発等の目標の妥当性

要素技術ごとに挑戦的でかつ具体的な目標および目標水準が設定されている。また目標達成度を測定判断するための指標が適切に設定されている。

「原位置処理重金属等土壌汚染対策技術開発」では既存掘削除去費用の1/2以内という数値目標を設定している。また、「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」では導入微生物の合理的な安全評価手法と標準的な生態系影響評価手法の確立を目標としており、いずれも明確な目標設定と認められる。

なお、目標に対する成果が、設定条件により変わることから、その部分の説明はより積極的に行われることが望ましい。また、単純な目標設定になっている印象を受けたことから、市場を詳細に調査し、複数の技術や条件との比較から目標を設定する方が望ましい。

3. 成果、目標の達成度の妥当性

各要素技術の開発において実証試験レベルでの検討を行った上で数年以内の実用化が可能な技術を確立しており、目標値のレベルに到達している。また、パイレメ普及に資する安全性評価手法と生態系影響評価手法の確立という目標も達成されている。

学術論文の公表、成果の学会発表、特許の出願等が相当数行われるなどの成果も見られ、事業全体で見ると設定された目標は達成され想定を上回る成果が得られたと判断する。

目標の達成度に関して、どの程度の達成度合かが分かるようできるだけ数値化し、必要に応じて図絵化を図るなどして示していくことが望ましいものがある。

一部の技術開発において、当初計画に比べると限定した範囲の検討にとどまっているものが見受けられる。

4. 事業化、波及効果についての妥当性

各要素技術において数年以内での実用化の方向性は示されており、中にはすでに実質的に実用段階に到達しているものもある。また、当初想定しなかった汚染物質への適用性の確認、要素技術を構成する個別技術での適用性などの波及効果が明らかになっている。

web を利用した情報発信により、相当数の技術相談がなされるといった成果も得られている。

土壌浄化事業は、浄化技術の採用にあたりこれまでの実績が重要視されるため、新規に開発された技術が実用化されるまでには継続的な実証試験が求められる。したがって今回の事業終了後も、実施企業に対して何らかのフォローアップを行う枠組みが作られることで、実用化が促進されるのではないと思われる。

技術、コスト、体制等多面的な検証の実施により、事業化や波及効果の見通しについてさらに計画性のあるものにしていく余地が残されている。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

全体としては大きな計画変更がなく目標達成に至っており、研究計画は適切であった。また、事業の実施者はいずれも実績と実力のある企業／大学で構成されており、適切な選考が行われたと評価できる。

各研究開発について、経済産業省や技術検討委員会が適確なコメントや指示を出すことによって柔軟な事業運営がなされたものと評価できる。

6. 費用対効果等の妥当性

土壌汚染対策の市場規模は約 1,000 億円／年で推移しており、その大部分が掘削除去であるため、掘削除去の 1／2 で対策が可能となる本事業の成果は、大きな対策費用削減効果が得られるポテンシャルを有する。また、掘削除去された汚染土壌の処分場の残容量に限りがあり、新規造成も困難なことから、社会的効果も大きい。

計画に見合った原寸大の成果にあるが、それを超えるものまでには至っていない。

成果を普及させるためには、低コストの原位置浄化技術を開発・提供するだけでなく、組織的なアウトリーチ活動が望まれる。

7. 総合評価

現在の我が国における土壌汚染対策の抱える問題点を解決するためにはバイオレメディエーション等の低コスト・低環境負荷技術の開発は必要不可欠であり、国が積極的に支援することは極めて妥当であった。

事業化については全体として受注には至っていないものの複数の引き合いがあり、実施が期待できる。

バイオレメディエーション微生物評価技術については、環境中に存在する有害菌解析手法を開発したほか、好気性塩素化エチレン分解菌 1 株についてバイレメ指針適合が確認されたことは評価できる。

原位置土壌浄化の幾つかの有望な新技術やその支援基盤が確立されており、今後の実用化への展開が期待できる成果が得られたことは高く評価できる。

各開発技術について、詳細な解析による市場の見積が十分になされているとはいえず、事業の産業上の価値を定量的に評価することを望む。

バイオレメディエーションの普及においては、実施する事業者の裾野を拡大することも重要であるが、今後、市民の理解を得る配慮や工夫も必要である。

8. 今後の研究開発の方向等に関する提言

バイレメ等の浄化技術の本格的な事業化に向けては実証試験を積み重ねてデータを蓄積していくことが必要である。実証試験の実施を企業のみで担うのは容易ではなく、国の継続的な支援が望まれる。実証試験は小規模の現場試験とその結果に基づいたシミュレーションでも構わない。

各要素技術の組み合わせを行うことにより新たな展開も生まれると考えられる。担当者間でとりあえず机上検討だけでも行うことが望まれる。

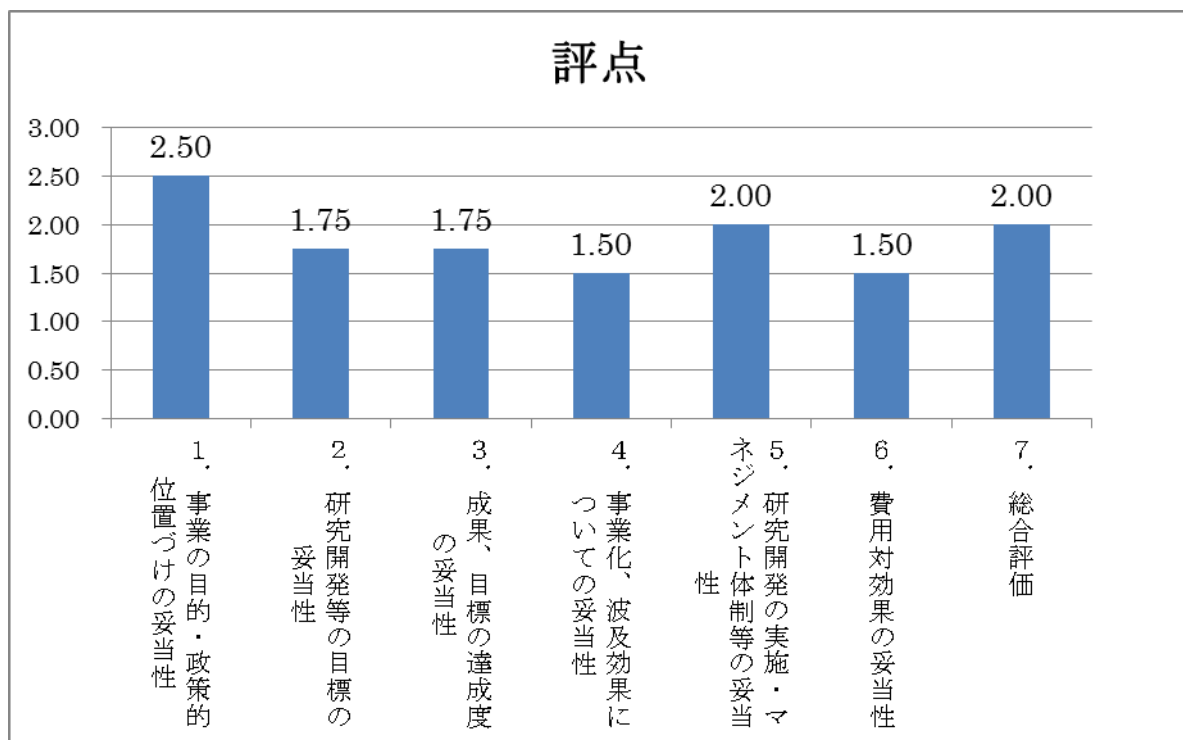
バイレメの普及に資する安全評価手法と生態系影響評価手法については、本研究開発で確立された手法を安価で提供できる事業者の育成が望まれる。

掘削除去に対する優位性を考えると、コスト並びに修復期間の削減が必要となり、今後は、バイオと物理・化学処理との組み合わせについての検討が望まれる。

評点結果

評点法による評点結果
(土壌汚染対策のための技術開発プロジェクト)

	評点	A委員	B委員	C委員	D委員
1. 事業の目的・政策的位置づけの妥当性	2.50	3	2	3	2
2. 研究開発等の目標の妥当性	1.75	2	2	2	1
3. 成果、目標の達成度の妥当性	1.75	3	1	2	1
4. 事業化、波及効果についての妥当性	1.50	2	1	2	1
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等の妥当性	2.00	3	1	2	2
6. 費用対効果の妥当性	1.50	2	1	2	1
7. 総合評価	2.00	2	2	2	2



第 1 章 評価の実施方法

第1章 評価の実施方法

本プロジェクト評価は、「経済産業省技術評価指針」（平成26年4月改定、以下「評価指針」という。）に基づき、以下のとおり行われた。

1. 評価目的

評価指針においては、評価の基本的考え方として、評価実施する目的として

- (1) より良い政策・施策への反映
- (2) より効率的・効果的な研究開発の実施
- (3) 国民への技術に関する施策・事業等の開示
- (4) 資源の重点的・効率的配分への反映

を定めるとともに、評価の実施にあたっては、

- (1) 透明性の確保
- (2) 中立性の確保
- (3) 継続性の確保
- (4) 実効性の確保

を基本理念としている。

プロジェクト評価とは、評価指針における評価類型の一つとして位置付けられ、プロジェクトそのものについて、同評価指針に基づき、事業の目的・政策的位置付けの妥当性、研究開発等の目標の妥当性、成果、目標の達成度の妥当性、事業化、波及効果についての妥当性、研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性の評価項目について、評価を実施するものである。

その評価結果は、本プロジェクトの実施、運営等の改善や技術開発の効果、効率性の改善、更には予算等の資源配分に反映させることになるものである。

2. 評価者

評価を実施するにあたり、評価指針に定められた「評価を行う場合には、被評価者に直接利害を有しない中立的な者である外部評価者の導入等により、中立性の確保に努めること」との規定に基づき、外部の有識者・専門家で構成する検討会を設置し、評価を行うこととした。

これに基づき、評価検討会を設置し、プロジェクトの目的や研究内容に即

した専門家や経済・社会ニーズについて指摘できる有識者等から評価検討会委員名簿にある5名が選任された。

なお、本評価検討会の事務局については、指針に基づき経済産業省商務情報政策局生物化学産業課が担当した。

3. 評価対象

土壌汚染対策のための技術開発（実施期間：平成23年度から平成26年度）を評価対象として、研究開発実施者（新日鉄住金エンジニアリング株式会社、大阪ガス株式会社、株式会社不動テトラ、土壌修復ラジアルウェル技術研究組合、株式会社島津製作所、長岡技術科学大学、東京大学、岐阜大学）から提出されたプロジェクトの内容・成果等に関する資料及び説明に基づき評価した。

4. 評価方法

第1回評価検討会においては、研究開発実施者からの資料提供、説明及び質疑応答、並びに委員による意見交換が行われた。

第2回評価検討会においては、それらを踏まえて「プロジェクト評価における標準的評価項目・評価基準」、今後の研究開発の方向等に関する提言等及び要素技術について評価を実施し、併せて4段階評点法による評価を行い、評価報告書(案)を審議、確定した。

また、評価の透明性の確保の観点から、知的財産保護、個人情報で支障が生じると認められる場合等を除き、評価検討会を公開として実施した。

5. プロジェクト評価における標準的な評価項目・評価基準

評価検討会においては、経済産業省産業技術環境局技術評価室において平成25年4月に策定した「経済産業省技術評価指針に基づく標準的評価項目・評価基準について」のプロジェクト評価（中間・事後評価）に沿った評価項目・評価基準とした。

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

（1）事業目的は妥当で、政策的位置付けは明確か。

- ・事業の政策的意義（上位の施策との関連付け等）
- ・事業の科学的・技術的意義（新規性・先進性・独創性・革新性・先導性等）

- ・社会的・経済的意義（実用性等）
- （２）国の事業として妥当であるか、国の関与が必要とされる事業か。
 - ・国民や社会のニーズに合っているか。
 - ・官民の役割分担は適切か。

２．研究開発等の目標の妥当性

- （１）研究開発等の目標は適切かつ妥当か。
 - ・目的達成のために具体的かつ明確な研究開発等の目標及び目標水準を設定しているか。特に、中間評価の場合、中間評価時点で、達成すべき水準（基準値）が設定されているか。
 - ・目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

３．成果、目標の達成度の妥当性

- （１）成果は妥当か。
 - ・得られた成果は何か。
 - ・設定された目標以外に得られた成果はあるか。
 - ・共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成、プロトタイプの作製等があったか。
- （２）目標の達成度は妥当か。
 - ・設定された目標の達成度（指標により測定し、中間及び事後評価時点の達成すべき水準（基準値）との比較）はどうか。

４．事業化、波及効果についての妥当性

- （１）事業化については妥当か。
 - ・事業化の見通し（事業化に向けてのシナリオ、事業化に関する問題点及び解決方策の明確化等）は立っているか。
- （２）波及効果は妥当か。
 - ・成果に基づいた波及効果を生じたか、期待できるか。
 - ・当初想定していなかった波及効果を生じたか、期待できるか。

５．研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

- （１）研究開発計画は適切かつ妥当か。
 - ・事業の目標を達成するために本計画は適切であったか（想定された課題への対応の妥当性）。

- ・採択スケジュール等は妥当であったか。
- ・選別過程は適切であったか。
- ・採択された実施者は妥当であったか。

(2) 研究開発実施者の実施体制・運営は適切かつ妥当か。

- ・適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか、いたか。
- ・全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか、いたか。
- ・目標達成及び効率的実施のために必要な、実施者間の連携／競争が十分に行われる体制となっているか、いたか。
- ・成果の利用主体に対して、成果を普及し関与を求める取組を積極的に実施しているか、いたか。

(3) 資金配分は妥当か。

- ・資金の過不足はなかったか。
- ・資金の内部配分は妥当か。

(4) 費用対効果等は妥当か。

- ・投入された資源量に見合った効果が生じたか、期待できるか。
- ・必要な効果がより少ない資源量で得られるものが他にないか。

(5) 変化への対応は妥当か。

- ・社会経済情勢等周辺の状況変化に柔軟に対応しているか（新たな課題への対応の妥当性）。
- ・代替手段との比較を適切に行ったか。

6. 総合評価

7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

第2章 プロジェクトの概要

1. 事業の目的・政策的位置付け

1-1 事業目的

平成 22 年 4 月から施行された改正土壤汚染対策法により、従来主流であった汚染土壌を掘削して処理する掘削除去法では、搬出から処理完了までがトレースされる等管理が大幅に強化されたため、とりわけ中小企業に対してコスト増となることが想定される。また、従来の工場廃止時に実施される対策だけではなく、廃業時のリスク低減、事業転換や事業拡大を図るために、操業中から土壌汚染リスクを把握し、早期に対策を実施することが、土壌汚染リスクを管理する企業の自主的な取組として望まれている。これまでに実施されてきた土壌汚染対策は汚染の程度にかかわらず掘削除去が選択される傾向があり、掘削除去に比して対策費用が安価な盛土、封じ込め、原位置浄化等は少ない。重金属は土壌に吸着しやすく原位置浄化が難しい等の理由から、重金属等の土壌汚染の対策としては掘削除去が多くを占めているが、掘削除去は費用が高額であり、汚染土壌の搬出時の汚染拡散の懸念、膨大な汚染土壌を処理する処分場の容量などの問題がある。また、汚染箇所の多い VOC（揮発性有機化合物）の原位置浄化の有力な方法の一つとして、バイオレメディエーションの実用化が期待されており、一部のバイオオーグメンテーションの事業については微生物によるバイオレメディエーション利用指針（平成 17 年 7 月 30 日経済産業省・環境省告示）（以下、「指針」という）への適合確認も得られる状況となっている。しかしながら、指針に定められた生態系への影響評価の範囲が広く、影響評価を実施すべき対象生物種が多数あり、そのコストの高さから新規参入の阻害要因にもなっており、指針の適切な解釈に基づき、かつ、経済観点から見ても過度の負担のない標準的な評価の基準づくりが求められている。このように重金属や VOC 等に関する効果的な土壌汚染対策を推進するためには、搬出される汚染土壌量が抑制されるような原位置浄化技術の開発が急務であり、操業中に実施可能な土壌汚染対策技術の開発が必要である。

上記の点を鑑み、本技術開発は工場・事業場の操業中からの自主的な土壌汚染対策を促進するため、原位置で行う回収・浄化機能等を有する低コストの土壌汚染対策技術（共通基盤的評価技術を含む）として、重金属等の原位置処理土壌汚染対策及び VOC の微生物等を利用した環境汚染物質の浄化技術を開発することを目的としている。また、バイオレメディエーションで利用する微生物の安全性を評価する手法や環境中に存在する微生物群を包括的にモニタリングするための手法を開発し、それらの成果をバイオレメディエーション利用指針に反映し、微生物を利用したバイオレメディエーションの普及促進を図ることを目指す。

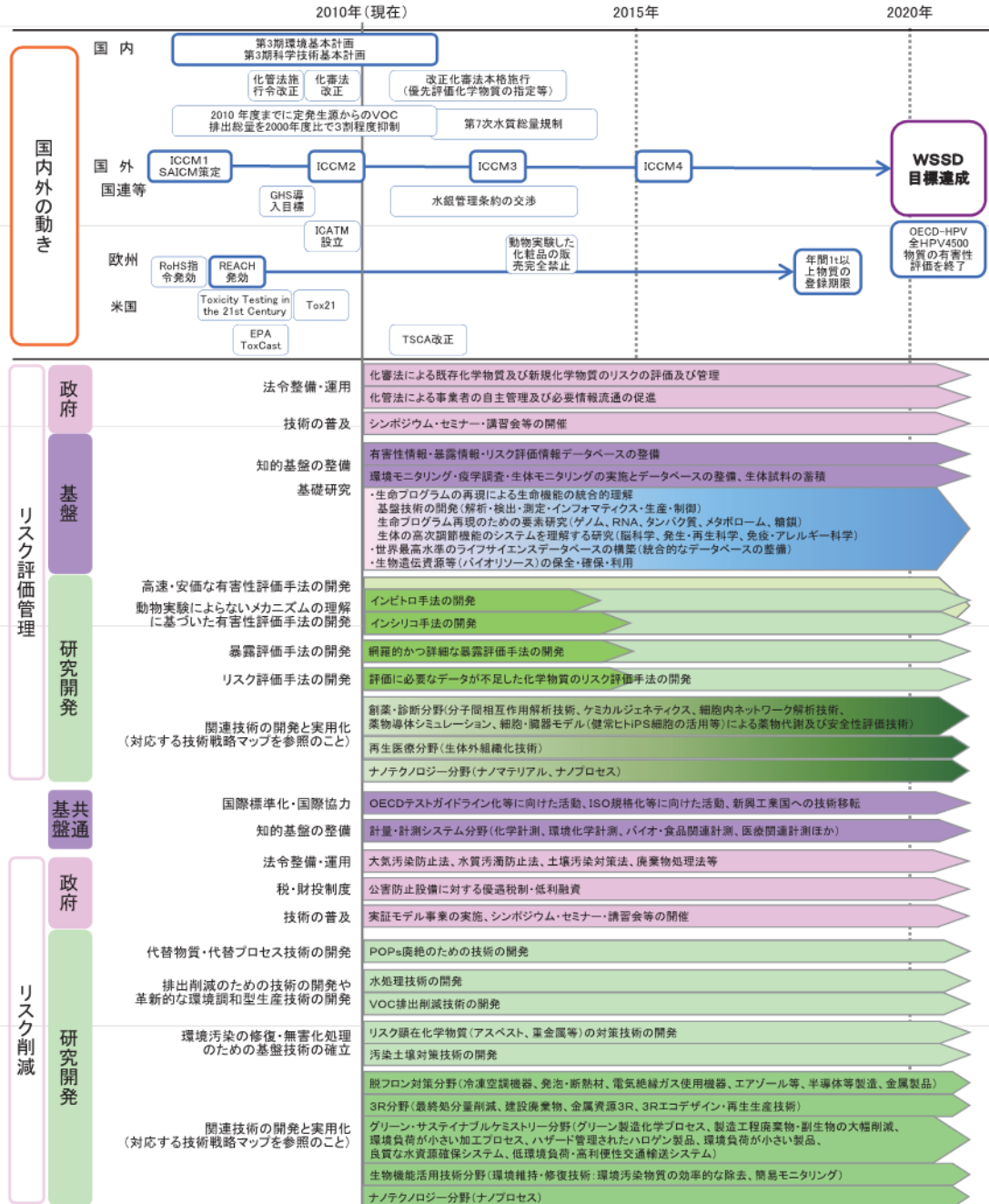
1-2 政策的位置付け

本研究開発は重金属、VOC 等の化学物質によるリスクの削減に資するプロセス、手法の開発、更にはバイオレメディエーションの普及に資する安全性評価システムの構築に関する技術開発であり、技術戦略マップ上の位置づけとしては、化学物質総合評価管理分野の技術マップ（リスク削減）中の「化学物質総合評価管理分野の導入シナリオ」において「環境汚染の修復・無害化処理のための基盤技術の確立」等、生物機能活用技術分野の「生物機能を活用した環境維持・修復技術」として位置づけられている。上位政策との関連から見た位置づけとしては、本研究開発は土壤汚染対策法の一部を改正する法律に対する附帯決議（平成 21 年 4 月 16 日参議院環境委員会）において土壤汚染対策の現状にかんがみ、未然防止措置について早急に検討を進めるとともに、工場等の操業中の段階から計画的に土壤汚染対策に取り組むための措置を検討すること、中小企業などが抱えている課題について配慮するよう努めるものとする決議を踏まえて実施する。また、本研究開発は第 4 期科学技術基本計画（平成 23 年 8 月閣議決定）における「グリーンイノベーションの推進」で、「社会インフラのグリーン化」において「自然環境や生物多様性の保全の実現等に向けた取組」に位置づけられる。さらに、本研究開発はライフサイエンスサミット（平成 20 年 4 月）におけるライフサイエンス分野での「最先端技術の社会への導入が円滑に行える環境整備」において、「国民の安全・安心を確保した上で」、「バイオテクノロジーに対する国民の理解の向上及び技術の恩恵の実感を伴った社会受容の促進を図る。」との提言を踏まえて実施する。

化学物質総合評価管理分野の導入シナリオ

目標

- 行政、企業等による化学物質の科学的なリスク評価とその評価結果を踏まえた化学物質の使用
- 行政、企業、国民等間のリスクコミュニケーションを通じた化学物質管理についての理解促進
- 化学物質の排出削減が進むことによる、環境負荷の低減への寄与、国民の健康の保護と生活環境の保全
- 日本の産業の国際競争力の強化



例 1) 出典：技術戦略マップ 2010

図 1. 化学物質総合評価管理分野の導入シナリオ

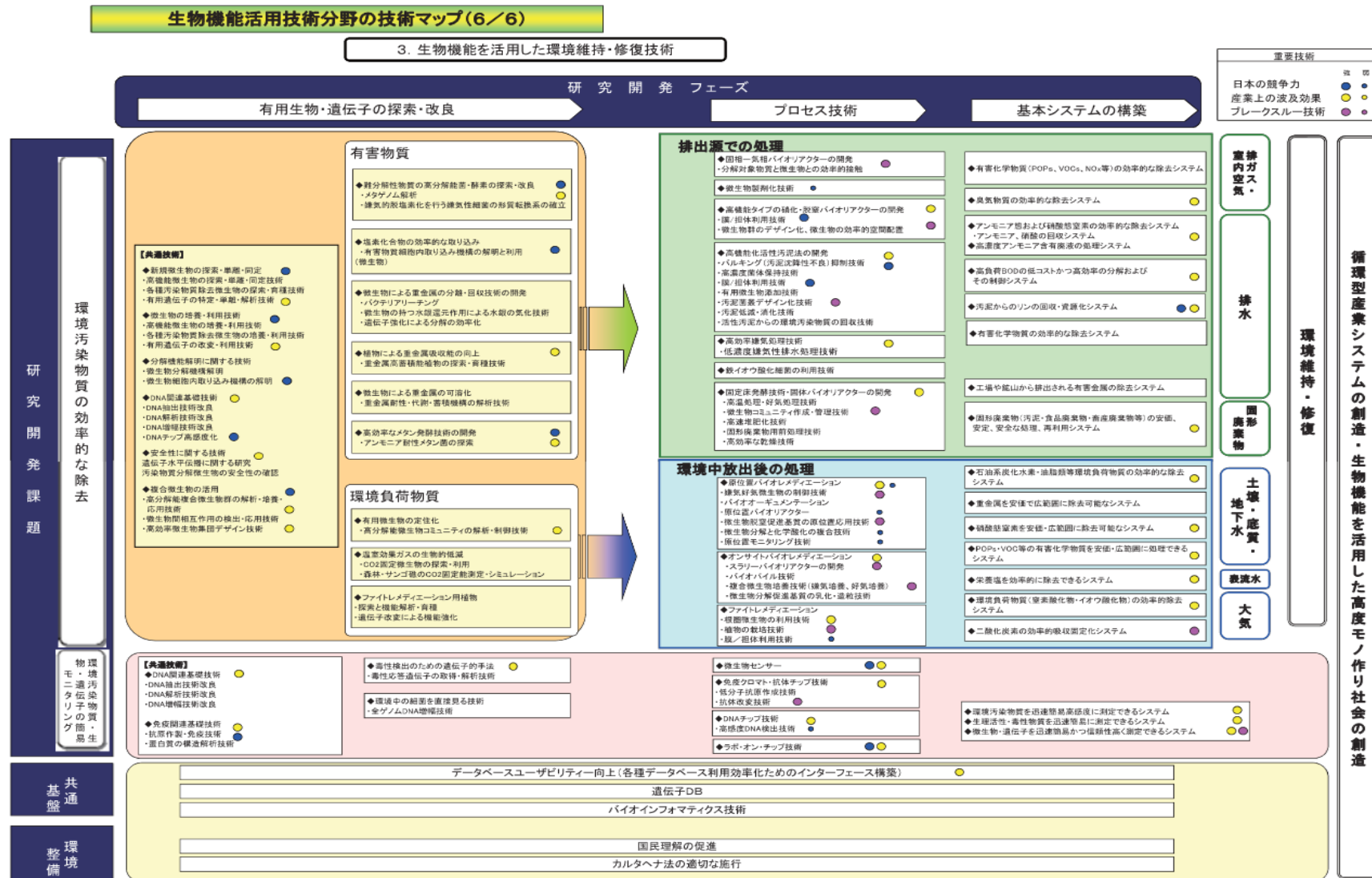


図2. 生物機能活用技術分野の技術マップ

出典：技術戦略マップ2010

1-3 国の関与の必要性

本技術開発は、汚染原因者が実施する土壤汚染対策そのものを支援するものではなく、事業廃止時のみならず、事業活動を行いながら合理的に原位置浄化等が可能となる土壤汚染対策技術の構築を目指すものである。重金属等（第2種特定有害物質*）による汚染は、化学的分解や地下水揚水があるものの、対象とする重金属等がシアンなど限定的であることなどからこれまでの実績も極めて少なく、掘削除去を選択せざるを得ない場合が多い。したがって、本技術開発により重金属等の新たな原位置浄化等対策技術を構築することは、掘削除去を回避し合理的な対策を促進することにつながり、施策としての意義は極めて大きい。特に、平成22年4月に施行された改正土壤汚染対策法において、掘削除去に対する規制が強化されたこともあり、掘削除去によらない汚染浄化手法として原位置浄化手法のニーズは高まりつつあるが、民間企業のみによる技術開発が十分に進められてこなかった。したがって民間企業が主体となって実施する技術開発に対して国が必要となる設備費、人件費等の補助を行うことにより、原位置浄化技術の確立を促し、実用化を加速させる必要がある。

バイオレメディエーションにおいては、微生物を利用することによって生じる病原性の有無等の安全性や環境影響性に関する評価手法、浄化状況のモニタリングなど微生物を土壤汚染対策に利用する際の共通基盤となる技術が確立されておらず、そのことがバイオレメディエーション普及のネックとなっていること、さらに、これらの技術を共通基盤として開発することは個別企業では困難であることから、国が主導して実施していくことが必要である。

*土壤汚染対策法施行規則第5条第1項第2号に基づく特定有害物質：カドミウム及びその化合物、六価クロム化合物、シアン化合物、水銀及びその化合物、セレン及びその化合物、鉛及びその化合物、砒素及びその化合物、ふっ素及びその化合物、ほう素及びその化合物の9種類。

2. 研究開発目標

2-1 研究開発目標

2-1-1 全体の目標設定

本事業の実施にあたっては、プロジェクトを着実に推進するために表 1 に示すような研究開発全体について、中間評価時点での目標と事後評価時点での関目標を設定するとともに、4つの個別要素技術開発事業についても2-2に示すように研究開発目標を設定し、到達すべき点を明確にして研究開発を推進している。

表 1. 全体の目標

目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
土壌汚染の7割以上を占める重金属等を対象として、事業活動を継続しながら、汚染土壌の掘削除去を伴わない、原位置で浄化可能かつ安価な土壌浄化技術を確立する。	掘削除去による対策費用の1/2のコストで浄化が可能な手法について、ラボレベルでの要素技術を確立させる。	重金属等を対象とした汚染土壌の原位置浄化技術は、日本の土質に対応した低コストに施工できる技術が実用化されていなかったため、ラボレベルでの要素技術の確立が必要である。これらを達成することで、実汚染土壌での実証を行い、最終目標である原位置浄化技術を確立することができる。
バイオレメディエーションの普及に資する効率的な導入微生物の評価手法及び標準的な生態系影響評価手法を確立する。	バイレメ利用指針に関わる導入微生物の効率的な評価手法及び合理的な生態系影響評価手法を確立するのに必要となる指標遺伝子の特定、網羅的な微生物叢の解析手法の確立、指標微生物の特定及びその定量的モニタリング手法の確立等を実施する。	バイオレメディエーションの普及を促進するためには導入微生物の安全性や導入微生物の生態系影響に関する科学的知見を提供するための評価手法を確立することが必要である。本目標を達成することで事業者がバイオレメディエーションを利用しやすい環境を整備する。

2-1-2 個別要素技術の目標設定

シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーション

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発	シアン汚染サイトのあらゆる土質・地層に適したバイオ技術による浄化工法の開発。 1) 現状対策費の 1/2 のコスト達成 2) あらゆる地盤・地層に対応した技術開発	操業中の工場・事業場においても適用可能な低コストの原位置浄化技術の開発。 1) シアン汚染土壌に対してこれまでの対策（掘削除去）は事業者負担が大きいため、掘削除去の 1/2 コストを目標とした。 2) 実際の地層・地盤は、砂質・シルト・粘土等の互層地盤が多く、いかなる土質にも対応可能な原位置浄化技術が望まれている。
①全シアン含有量分析方法に関する開発	（目標） 微生物によるシアン分解経過や程度を正確に把握するための分析方法の確立。 （指標） 土質によらず 90%以上の回収率となる分析方法の確立。	土壌の全シアン含有量は微生物による分解傾向を測る上で重要な指標であるが、JIS で規定された分析方法である底質調査法は、シアン化合物の形態によっては正確な全シアン含有量を表していないことがある。シアンの浄化方法を確立する上で、シアンの浄化経過や程度を正確に把握するための分析方法の確立は不可欠である。
②シアン分解微生物に関する研究	（目標） 原地盤の微生物活性により、シアンの分解を確認する。 （指標） 実証試験により土壌・地下水中のシアンの基準を達成（0.1mg/L 未満）すること。	排水処理分野でシアン化合物の生物処理が利用されており、土壌の原位置浄化工法としてバイオレメディエーションが期待できる。 元来嫌気性である土壌中を好気性とする浄化方法は好気性維持の付帯設備によりコストアップとなるため、

			自主的な対策実施を促進するためには、嫌気条件でバイオレメディエーションを進める必要がある。
	③土質・地層に 応じた工法の研究	(目標) 地盤に均一に栄養剤を混合するための混練仕様の設定。 (指標) 実混練施工機を用いた原位置混練試験を行い、栄養剤の混合による土壌中の分布状況を土壌分析により確認する。	シルト・粘土質に対して注入工法では栄養剤等が十分に浸透しないため、バイオ浄化が進まない箇所が生じる可能性がある。混練施工機で栄養剤等を混合する方法は、栄養剤等を土壌に直接的に混合するため、透水性等の土質性状が悪い条件でもバイオ浄化が可能な環境を形成でき、様々な土質にバイオレメディエーションの適用範囲が拡大する。

低コスト原位置電気修復技術の研究開発

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
①電気修復法における汚染物質の浄化効率の向上と最適条件の確立		
模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	模擬汚染土壌を対象として、電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	土壌 pH、電解液 EC は電気修復法の基幹的要素で、この最適化は重要である。六価クロム及び鉛は重金属汚染の代表物質として採用した。浄化実験は、まず人工的な模擬汚染土壌で行い、その結果を踏まえた上で実汚染土壌で行う。
実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	
汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価	汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価を行う。	土壌 pH、電解液 EC の最適化条件を決定していく上での基礎研究として天然粘土物質のカオリンを使用した実験検討は有効である。
電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究	電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究を行う。	土壌 pH、電解液 EC の最適化条件を決定していく上での基礎研究として粒

		径・単一組成のカオリンを使用した実験検討は有効である。
印加電圧パルス化による浄化効率向上に関する研究	印加電圧パルス化による浄化効率の向上のための検討を行う。	土壌 pH、電解液 EC の最適化に追加できる、他の有効な浄化効率向上手段として、印加電圧のパルス化を提案する。
電解水添加による浄化効率の向上に関する研究	電解水添加による浄化効率向上のための検討を行う。	土壌 pH、電解液 EC の最適化に追加できる、他の有効な浄化効率向上手段として、酸性電解水の利用を提案する。
原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定	原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定を行う。	これまでのラボ浄化試験を、実際の汚染サイトに適用して、最適化条件を決定し、次段階の原位置実証試験に適用を図る。
②電気修復法に使用する電極・井戸の最適化に関する評価検討	電極形状（表面積など）をパラメータとして、浄化効率一定の条件下で有効使用電極の総重量を従来の $2/3$ に低減する。	浄化設備の設置コストのひとつである、電極材料コストを低減する上で重要である。
③汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立	汚染現場における浄化対象領域の探索と特定、ならびに浄化過程における浄化進捗状況の把握のために、オンサイト簡易分析手法と迅速マッピング技術を開発する。	汚染領域を現場で簡便に特定することは、電気修復法にとって浄化規模を適正にする上で重要である。
④低コスト電力（自然エネルギー等）の活用を検討	自然エネルギーによる電力の利活用を検討する。利用する電力の目標コストは、複数の使用電力料金の平均値として、1kWh あたり 10 円をめざす。	電力コスト低減の目的で、より低コストの電力活用は重要である。
⑤実証試験の実施と目標浄化コストの検証	研究成果をもとに浄化コストを算出し、実際の汚染サイトでの実証試験によって検証する。 対象土壌 1m ³ あたり	模擬汚染土壌で得られた知見と実際の汚染サイトから採取された実汚染土壌での評価を基に、現場での実証試験により確認、検

	1,500kWh の電力を使用して、対象重金属について土対法における含有量基準値の 3 倍濃度の汚染土壌、また溶出量基準値の 10 倍程度の汚染土壌について、それぞれを基準値以下に浄化する。処理コストは掘削除去による平均的な処理コスト（50,000 円／m ³ ）の半額程度（約 25,000 円／m ³ ）とする。	証することは重要である。また、実証試験での現実的な環境等による影響を確認することの重要性は技術検討委員会において指摘されている。
--	--	--

ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発		
①基盤技術支援（全体目標）	従来の掘削除去方式の約半分のコストで、水溶性かつ移動性の有害重金属等を 3 年以内に原位置で回収・浄化する。また、狭隘な場所にも適用可能とする。	現実的な実用化を目指すことと、対象となるサイトが狭隘な場所が多いと判断されるため。
②配水循環システムに関する研究開発	狭隘な場所に適用可能となる直径 2 m 程度までの立坑を施工可能とし、サイト全体をくまなく浄化する集配水システムを構築する。	操業中の工場・事業場内の狭隘な敷地においても土壌修復を可能とするため。通水量のバラツキによる浄化のバラツキを避けることと、経済性を考慮した設計・施工を行うため。
③重金属の土壌からの脱着法の研究開発	全ての重金属類に対する効果的な脱着手法と抽出剤を見出す。	各重金属の洗浄方法の確立と抽出剤の選定のため。また、効果的な洗浄方法を提案し、洗浄に使用する水量の低減を図るため。
④土壌から脱着した重金属等の吸着処理の研究開発	短期間でサイトからの重金属の回収・浄化を可能にする、効率的な水処理システムを開発する。	効率的な脱着手法のみならず、その後の吸着処理・沈殿処理技術の確立が、処理期間の短縮とコスト低減に繋がるため。

⑤原位置モニタリング技術に関する研究開発	修復中の洗浄状況をリアルタイムで把握・確認できる3次元モニタリングシステムを構築する。	従来技術にはない、精密でリアルタイムな原位置モニタリング技術を安価に提供するため。
⑥遮水壁に関する研究開発	狭隘な場所にも適用可能で閉鎖系を実現する遮水壁とその工法を開発する。	サイトへの洗浄中と修復後の重金属の流出入を防止することが必要であるため。

次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発

研究開発項目①「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

①- 1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
有害菌のドラフトゲノム解析と指標遺伝子の特定	バイレメに関連する（環境有害菌）属種の細菌 50 株以上について、判別指標となる遺伝子を特定する。	バイレメに関連する環境有害菌となり得る属種でゲノム情報が不足しているのが50株程度であり、これらについて優先的に指標遺伝子を整備する。予算規模から年10株程度の解析が可能である。
指標遺伝子を利用した有害性判定手法の開発	バイレメに関連する属種の細菌 50 株以上について、指標遺伝子を用いた判別手法を開発する。	
有害菌データベースの作製	既知有害菌に関する情報を収集・整備し、微生物の安全評価を一元的に実施できる体制を整備する。	散在している既知有害菌に関する情報を集約し、事業者の利用環境を整備する。

①- 2. 標準微生物の確立（バイオオーグメンテーション実施環境の整備）

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
好気性塩素化エチレン類分解菌（群）の収集、培養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜分解菌の分離・解析、保管	バイレメ指針適合の確認を受けろべき分解菌を開発するため、VOC 分解菌の収集・純化と選抜を行う。
嫌気性塩素化エチレン類分解菌（群）の収集、培養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜分解菌の分離・解析、保管	
バイレメ指針適合株の開発（分解菌の指針適合確認）	指針適合に必要な情報を整備、バイレメ指針適合の確認（3 株以上）、頒布体制の確立	指針適合に必要な情報を整備し、指針適合の審査を受ける。

研究開発項目②「多種微生物群の包括的解析技術の開発」

要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
2-a) 実験室レベルでのバイレメ実験	実験室レベルでのバイレメ試験系を確立し、バイレメの有効性と生態系への影響を評価する。	不飽和層の浄化や DCE の分解に優れた好気性分解菌を用いるバイレメ処理に対応するため。
2-b) 実汚染現場におけるバイレメ実験	複数の実環境においてバイオスティミュレーション浄化を実施し、生態系影響のための試料を提供する。	バイオオーグメンテーション処理における生態系影響評価の対照となるバイオスティミュレーションデータの収集するため。
2-c) 次世代シーケンサーによる網羅的な微生物叢解析	次世代シーケンサーを用いた網羅的な菌叢解析手法を確立し、バイオスティミュレーションサイトにおける生態系影響評価を実施。	バイオオーグメンテーション処理における生態系影響評価の対照となるデータの収集。
2-d) 超並列塩基配列解析による指標微生物の特定	ヒト病原菌検出系および病原菌等の特定による生態系影響評価手法の確立	バイレメ利用指針に関わる合理的な生態系影響評価手法の開発のため。
2-e) 環境メタトランスクリプトーム解析	環境試料からの RNA 抽出・配列解析手法の確立、RNA を指標とした網羅的な菌叢解析手法の開発と生態系影響評価。	活発な微生物を指標する生態系影響評価手法を検討するため。
2-f) 指標微生物群の定量的モニタリング手法の開発	指標候補微生物群の検出 PCR プライマーの開発と指標微生物候補に対する定量的モニタリング技術の確立。	指標微生物の定量による簡便な生態系影響評価手法を開発するため。
2-g) 生態系影響評価標準的プロトコルの作成	標準的なプロトコルの作成。	バイレメ指針に準じた標準的な生態系影響評価手法を提供するため。
2-h) プロトコル実施のための核酸標準物質の整備	プロトコルを実施するための核酸標準物質の頒布体制の整備。	生態系影響評価手法を実施するための環境を整備するため。
研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発（実証実験）」		
要素技術	目標・指標	設定理由・根拠等
導入菌株のモニタリング（長岡技大、産総研）	指針適合株のバイオオーグメンテーションにおける動態と効果を評価する。	開発した指針適合株の有効性を調べるため。
生態系影響評価手法の確立（東大、産総研、製品評価機構）	開発した生態系影響評価手法を確立する。 バイオオーグメンテーションに	バイオオーグメンテーションに特異的な菌叢変化を把握し、生態系への影響を評価す

	おける生態系への影響を評価する。	るため。
標準株の維持管理 (製品評価機構)	バイレメ指針適合株の頒布体制を整える。	バイレメ株を頒布し、バイレメ浄化を実施するための環境を整備するため。

3. 成果、目標の達成度

3-1 成果

3-1-1 全体成果

本研究開発事業は全体として順調に進捗し、平成 26 年度末までに所定の目標を達成し、終了している。これまでに発表論文数 17 報、特許等件数 14 件などの成果がでている。個別要素技術開発のそれぞれの成果については「3-1-2 個別要素技術の成果」で詳しく述べるが、原位置での土壤汚染浄化技術として「低コスト原位置電気修復技術」、「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壤修復技術」、「シアン汚染土壤の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーション」等の重金属を対象とした汚染浄化技術の開発は終了しており、今後は現場での実用化が期待される。

また、「バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」においては以下の成果が得られた。

研究開発項目①「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

①-1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発

- 1) バイオオーグメンテーションにかかわると予想される七つの菌属等について、新たに 51 株(表 1)のドラフトゲノム解析を行い、Multilocus sequence analysis (MLSA)法により病原性菌との同異の判別手法を開発した。
- 2) 開発した判別手法のプロトコルをホームページで公開した。
- 3) 病原性菌のバイオセーフティレベルや法規制にかかわる情報を収集したデータベースと構築して公開した。

①-2. 「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

- 1) トリクロロエチレン(TCE)と cis-1,2-ジクロロエチレン(cDCE)を分解して分解能が TCE や cDCE で誘導される *Rhodococcus jostii* RHA1 株を浄化菌として開発し、指針適合確認を受けた(平成 26 年 10 月 8 日)。
- 2) TCE や cDCE ならびに塩化ビニルモノマー(VCM)を浄化できる嫌気性脱塩素菌 *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株と UCH007 株の活性を増進する *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株を日本で初めて単離に成功し、両者について指針適合審査を受けた(平成 27 年 11 月 25 日)。
- 3) RHA1 株等を含め 10 株の浄化菌を開発し、頒布できる保存菌株とした。

開発項目②「多種微生物群の包括的解析技術の開発」

- 1) 次世代シーケンサーを利用した網羅的微生物叢解析手法と人工配列を導入した定量化により高精度な微生物叢解析手法を開発し、バイオスティミュレーション実験において生態系影響評価への有効性を示した。
- 2) 環境中の微生物叢から有害菌候補を定量的に検出する方法を開発し、更に病原遺伝子を指標に有害菌かどうかを判定する方法を開発した。
- 3) 環境中の転写 RNA から微生物叢を解析する手法を開発し、生態系影響評価への有効性を示した。

研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発(実証実験)」

- 1) バイオオーグメンテーション実験において上記技術の有効性を確認した。

3-1-2 個別要素技術成果

3-1-2 (1) シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーション

① 全シアン含有量分析方法に関する開発

(a) 目的

シアンの浄化経過や効果を把握する分析技術を確立する。

(b) 成果

塩化第二銅・塩化スズを添加試薬とした還元蒸留方法（NSOF 法）を開発し、土壌中の全シアンの精度（添加・回収率）が 95%以上となる分析技術を確立した。

② シアン分解微生物に関する研究

(a) 目的

安価な浄化技術としてバイオレメディエーションの開発を推進し、シアン分解微生物による浄化技術を開発する。

(b) 成果

・スティミュレーションの研究

不溶性シアン化合物を栄養剤・微生物活性により可溶化させ、pH 及び ORP を所定範囲に制御するシアン化合物のバイオスティミュレーション技術を確立した。揚水処理を併用することで、難分解性シアン化合物も処理可能であり、地下水の環境基準値及び土壌汚染対策法の含有量及び溶出量の基準に適合させた。

・オーグメンテーションの研究

不溶性シアン化合物を栄養剤・微生物活性により可溶化させ、揚水した地下水を集積培養することで、在来するシアン分解菌を増殖させ、集積培養液を注入するバイオオーグメンテーション技術を確立した。揚水処理を併用することで、難分解性シアン化合物も処理可能であり、地下水の環境基準値及び土壌汚染対策法の含有量及び溶出量の基準に適合させた。

また、分離したシアン分解菌による地下水の揚水技術を検討し、分解菌の増殖とそれに伴う全シアン濃度の低下を確認した。分離した分解菌によりシアンの分解を確認した。

③ 土質・地層に応じた工法の研究

(a) 目的

地盤に均一に栄養剤を混合するための混練仕様を設定する。

(b) 成果

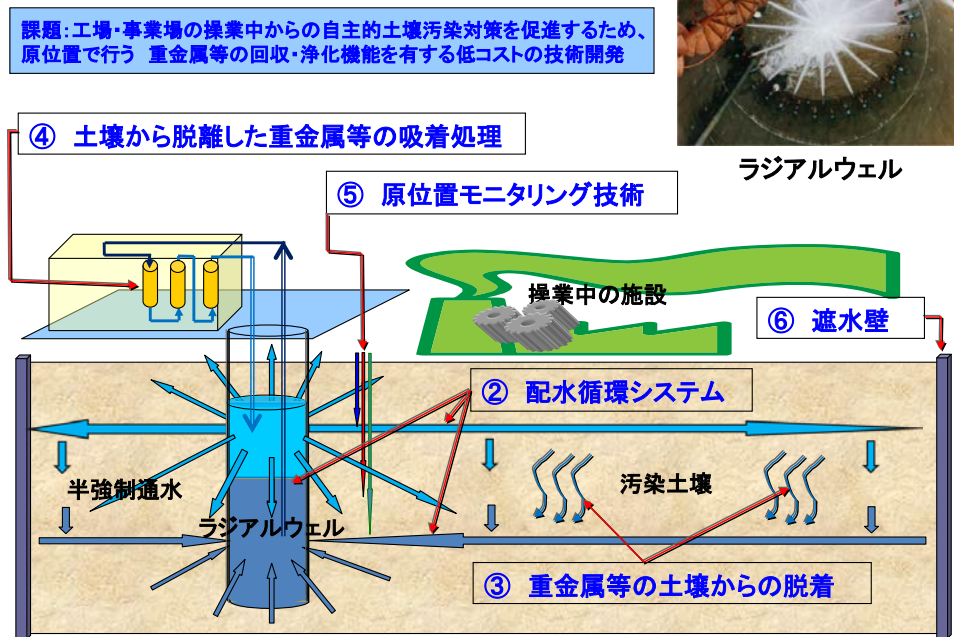
実証試験によりバイオ浄化技術に適合し、かつ、シアン汚染サイトの土質（砂層またはシルト・粘土層）及び地層（飽和層または不飽和層）に適合した工法として、混練・注入ハイブリッド工法を開発した。

3-1-2 (2) ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発

(a) 目的

以下に示す②～⑥の各要素技術を改良・改善し、重金属汚染土壌の現位置処理技術を実用化すると共に、コスト目標の達成を図る。

土壌修復技術の概念



こととしている。

従って、上部配水管と下部集水管との間の水の流れの制御（不均一な土壌に対しての均一化）が、克服すべき課題となっている。

また、操業中の工場等への適用を想定しているため、一般的な井戸径 4 m では対応できないことも予想されることから、小口径化も新たな課題となっている。

③ 重金属等の土壌からの脱着：

上記した上部配水管と下部集水管との間が汚染土壌となっているので、循環水がその間を通るときに、土壌中にある（水溶性の）重金属等を脱着（脱離、溶離）させ、それを集水して井戸に集めることになる。

従って、如何にスピーディに脱着させられるか（不均一な土壌に対して、少ない循環回数で均一に）ということが課題となる。また、水だけでは効率が悪い重金属類に対しての脱離促進薬剤等の検討も必要となる。

存在する重金属の種類と濃度にもよるが、一般的に浄化対象土壌体積の 10 倍量の水を循環させれば脱着できるであろうと想定している。

④ 土壌から脱着した重金属等の吸着処理

脱着した重金属等を含む、集水された汚染水を吸着除去する。なるべく全ての重金属をその都度吸着除去できることが好ましいことから、当然のことながら各種の重金属に対する高性能な吸着剤が求められる。

また、ホウ素などの、吸着処理に限界があるような対象には、凝集沈殿処理も行うこととなるが、そのための効率の良い凝集沈殿剤も必要となる。また、時々刻々集水されてくる汚染水に対して、通水すればよいカラム式の吸着処理のみならず、凝集沈殿処理も安価な連続式であることが望ましい。

以上の②、③、④の要素技術が、後述する遮水壁によって区画される閉鎖系内での土壌浄化サイクルを構成している。

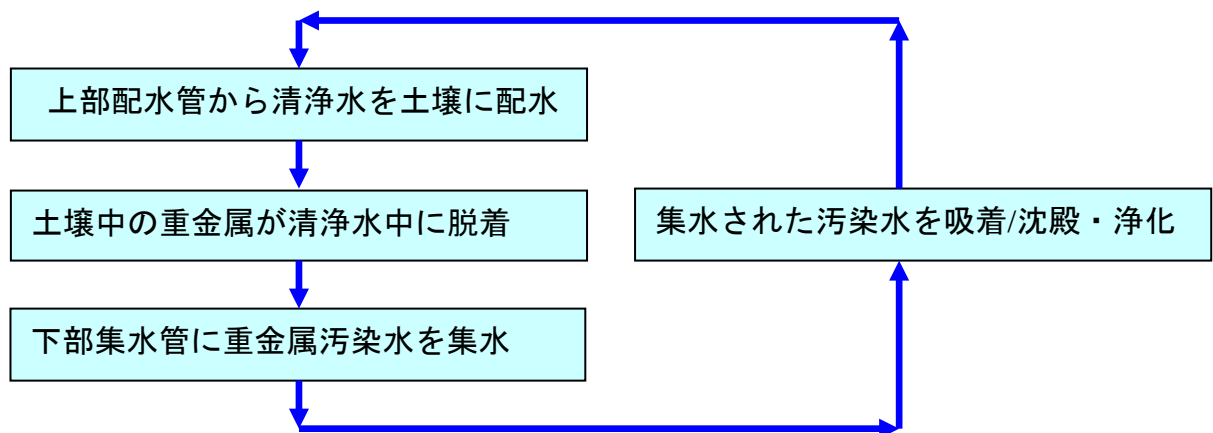


図 3-1-2(2)-2 土壌浄化サイクル

⑤ 原位置モニタリングシステム

土壌浄化実施中に、リアルタイムで浄化度合いを把握することができれば、いろいろな意味で有意義である。と同時に、浄化完了に関しても顧客に対して納得できるデータを供することができる。

従来は、数値解析が主流で、浄化完了したと判断された後、1～2箇所のボーリング調査を必要に応じて実施していたようであり、リアルタイムに実測することは意外に配慮されていなかった。

本システムでは、1箇所につき3深度の採水井戸を設け、敷地全体の状況が把握できるように、例えば5mピッチにその採水井戸を配置することで、3次的に対象土壌全体の浄化状況が把握できることを目指している。

井戸本数が多くなることから、安価な方式の開発が求められている。

⑥ 遮水壁

上述した土壌浄化システムは、基本的に閉鎖系を前提としている。

即ち、周辺と遮水区画し、汚染を周囲に拡散させることなく効率よく区画内で水を循環させ浄化するほか、浄化完了後に周囲からの汚染の流入を防止できることで成立している。

そのために求められる遮水性能は無論のこと、恒久的に存置することとなるので、環境に負荷を与えない、土壌に近い材料であることが望ましい。また、狭隘な場所でも施工可能な方式であることが求められる。

なお、適用対象とする土壌等の条件は以下に示すごとくとなっている。

＜土質＞

砂層、シルト混じり砂層

＜地層の条件＞

主な汚染部位の層の 透水係数は、 5×10^{-5} m/s 以上

＜広さ＞

土壌中における浄化の範囲は、一つのラジアルウェルから水平方向に半径 20 m 程度以内

地上部には 2 m 径のラジアルウェルおよび配水浄化処理施設用として駐車場 2 台分強程度のスペースが必要)

＜深さ＞

汚染部位の深さは、地表から－5 m 程度まで

＜適用対象となる重金属種、濃度と分布＞

適用対象の重金属等は、総水銀、カドミウム、鉛、六価クロム、砒素、セレン、フッ素、ホウ素。汚染濃度は、土対法における土壌溶出量基準（以下、「溶出量基準」という）値の 40 倍程度の汚染（例えば、鉛の場合、0.4 mg/L）を適用対象とし、分布については特に限定しない。

＜除去性能＞

水溶性の汚染物質に対し、土壌溶出量基準の 40 倍程度の汚染（例えば鉛の場合、0.4 mg/L）から土壌溶出量基準値以下まで浄化修復する。

浄化期間は、溶出量基準値以下までの浄化に 3 年以内を目標とする。

（b）成果

実証試験結果を総括したものを以下にとりまとめ、成果報告とする。

実証試験に関しては、利用可能な実汚染サイトが結果的に最後まで見つからなかったこともあり、大規模な地上試験土層による試験を行うこととなった。また、試験に使用する実汚染土壌として鉛汚染土とすることになった。

そのため、実証試験開始年度以降の本プロジェクトの対象汚染重金属は鉛に限定することとなった。従って、以下の成果報告には鉛以外の汚染に関する記載はないが、上記③重金属の土壌からの脱着及び④土壌から脱着した重金属等の吸着処理ともども、鉛以外の重金属や複合汚染について問題なく処理できる目処がついていることを注記しておきたい。

なお、遮水壁に関しては、一般部のみならず地中での継手部及び隅角部の施工性と性能等についての実証試験を別途行い、検証済みとなっている。

（A）実証試験

- 目次
- （１）地上土槽による実証試験
 - （１）－１ 実証試験設備の概要

(1) - 2	実証試験に用いた汚染土壌の性状	
a)	物性	b) 鉛汚染土壌の組成
(1) - 3	浸透試験結果	
(	1	) - 4
チオ硫酸を用いた鉛溶離プロセス、排水循環システムの概要		
(1) - 5	脱離工程、洗浄工程における水質分析結果	
(1) - 6	全井戸モニタリング、地上土槽解体時モニタリングの概要	
(1) - 7	全井戸モニタリング分析結果	
(1) - 8	地上土槽解体時の土質試験結果	
(1) - 9	地上土槽解体時の土壌等分析結果	
(1) - 10	実証試験における物量バランス	
a)	鉛の物量バランス	
b)	物質収支	
(1) - 11	チオ硫酸によって溶離する鉛の形態について	
a)	各種鉛化合物に対するチオ硫酸溶離の特徴	
b)	tessier 逐次抽出法での形態に対するチオ硫酸溶離の特徴	
(1) - 12	実証試験のまとめ	
(1) - 13	実証試験結果に関する考察	
a)	終了時に土壌環境基準を超過した試料について	
b)	チオ硫酸による鉛汚染浄化の特徴について	
(2)	室内カラム試験結果からの現地浄化シミュレーション	
(2) - 1	室内カラム試験の概要	
(2) - 2	一次元物質移動モデルの構築	
a)	脱離工程	
b)	洗浄工程	
(2) - 3	室内カラム試験結果の数値モデルへのフィッティング	
①	塩化ナトリウムを用いた分散度の決定	
②	室内カラム試験での溶離モデル決定と関与物量・速度定数のフィッティング	
③	室内カラム試験フィッティング結果から、土槽モデルでのパラメータ推定	
(2) - 4	地上土槽における流れの3D解析	
(2) - 5	一次元モデルと3D解析を統合した浄化期間の予測	
(	2	) - 6
室内カラム試験結果からの現地浄化シミュレーションまとめ		
(2) - 7	計算シミュレーションに関する考察と今後の課題	
a)	計算結果と地上土槽データの濃度乖離について	
b)	速度定数の推定精度について	

(1) 地上土槽による実証試験

地上土槽による実証試験は、2013 年 11 月より通液を開始し、2014 年 7 月に解体・最終分析を実施した。表 1 に実証試験工程表を示す。

2013 年 3 月には循環通液量が 10BV (BV はベッドボリューム、本試験では 1 BV

が通流量 41.6m³ に相当する) に至り、集水管出口の鉛濃度が定量下限値 0.001mg/L を下回る状況となった。冬期凍結期間を避けて、4月から5月にかけて一時的に通水を停止した。

ここで、原位置浄化現場でリバウンドと呼ばれる、残存する溶離性の鉛が地下水中に拡散する現象が起こらないことを確認したのちに、土槽の解体・サンプリングを実施した。

地上土槽による実証試験の概要を以下に記す。

1. 試験設備設置

地上土槽試験装置の作成設置、付帯する水処理設備・配管等の設置。

2. 浸透流試験

水位測定用観測井戸を用いて、集配水時の土槽内水位の変化を確認した。

3. 脱離工程（チオ硫酸 Na 通液）

地上土槽内の鉛を溶出させることを目的とし、チオ硫酸 Na 用液を通液した。集水管より回収した鉛を含むチオ硫酸 Na は、凝集沈殿等を行い液中の鉛を除去し、チオ硫酸 Na 用液を再度、地上試験土槽に配水した。

4. 洗浄工程（電解液通液）

地上土槽中に残存する脱離工程時に使用したチオ硫酸 Na を回収し、チオ硫酸 Na 用液の効果を無効化させるため、集配水管より回収したチオ硫酸 Na 用液を電解処理し再度、地以上試験土槽へ排水した。

5. モニタリング

5.1 水質モニタリング

5.1.1 日々モニタリング

3. 4. の試験期間中、概ね通液 1m³ 毎に集水管より採水・鉛分析を実施した。

5.1.2 全井戸モニタリング

地上土槽内に設置している 12 箇所×3 深度の観測井戸計 36 箇所より、採水・鉛分析を実施した。

5.1.3 解体時底面水モニタリング

地上土槽解体時に、集配水管下より採水・鉛分析を実施した。

5.2 土壌モニタリング

5.2.1 浄化前土壌モニタリング

地上実証試験で用いる鉛汚染土壌の性状を確認するため実施した。

5.2.2 浄化後土壌モニタリング

浄化完了後、本法の浄化効果を確認するため、平面 12 箇所×3 深度 の土壌を採取・分析した。

表 3-1-2(2)-1 実証試験工程表

年 月 日	2013										2014																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8	15	22	29	1	8

(1) - 1 実証試験設備の概要

地上土槽の概要を図 3-1-2(2)-3 に示す。

地上土槽は、層厚 2m、41.6m³ の汚染土壌の上部に配水管、下部に集水管を配置した構造であり、図 3-1-2(2)-3 に地上土槽の概要図を図 3-1-2(2)-4 に集配水管の模式図を示す。

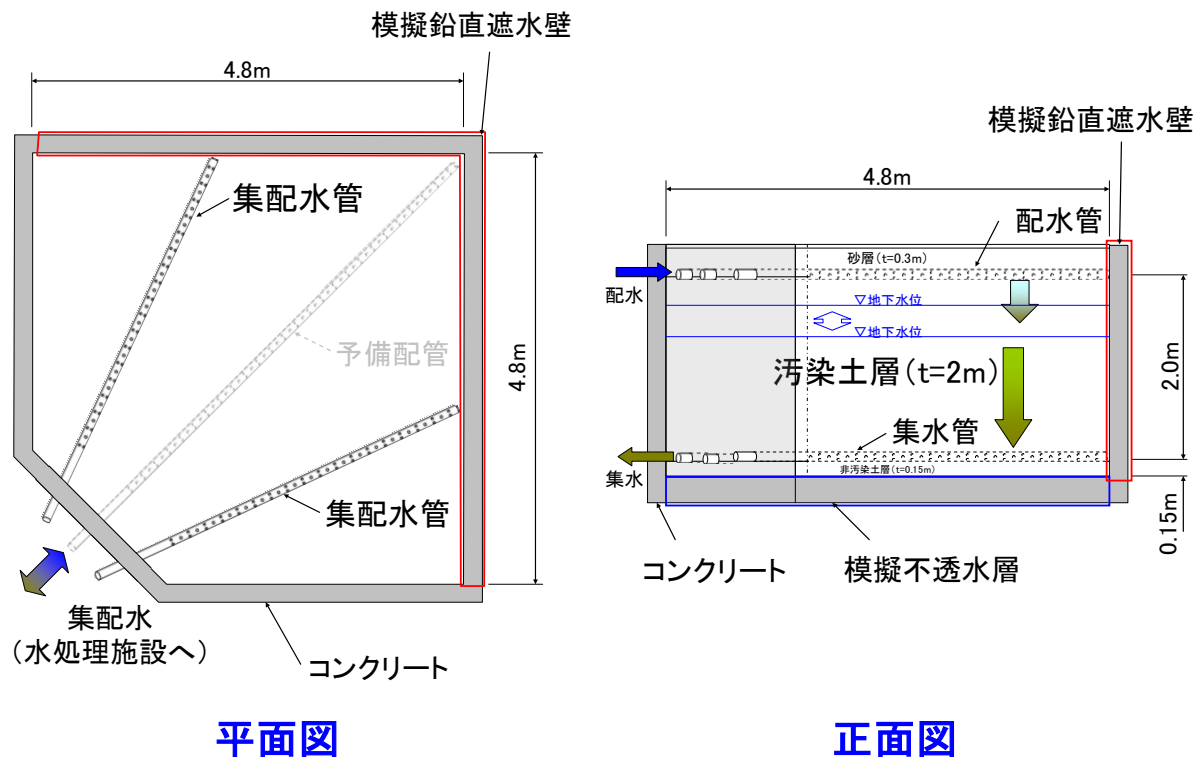


図 3-1-2(2)-3 地上土槽 概要図

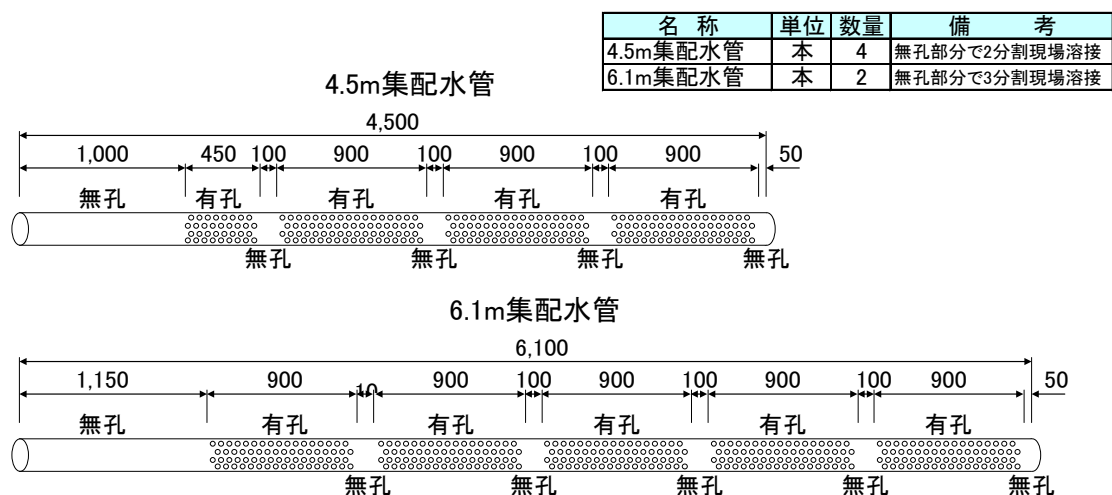


図 3-1-2(2)-4 集配水管の模式図

地上土槽底面より、0.15m 上部に、模擬地下水を回収する集水管を 3 本、集水管上部 2.0m の位置に土槽内へ通液を行う配水管を 3 本設置した。試験中は、予

備配管は使用せず、2本の集配水管のみ使用した。

チオ硫酸 Na 溶液等の集配水は、基礎研究にて均一な配水循環が可能であると確認された水位上下型の手法を用いた。土槽中央上部に水位観測井戸を設けて、自動制御による集配水を行った。

集配水の手順を以下に示す。

1. 地下水位が配水管直下となるまで上部配水管から配水する。
2. 地下水位が配水管直下に至ったら配水を停止して、下部集水管から集水を開始する。
3. 地下水位が集水開始から 30cm 下がるまで、集水を継続する。
4. 地下水位が集水開始から 30cm 下がれば、集水を停止して配水を開始する

。

1 から 4 を繰り返して水位を上下させながら集配水を行い土壌の浄化を行った

。

(1) - 2 実証試験に用いた汚染土壌の性状

a) 物性

試験に用いた鉛汚染土壌の物性のまとめを図 3-1-2(2)-5 に示す。

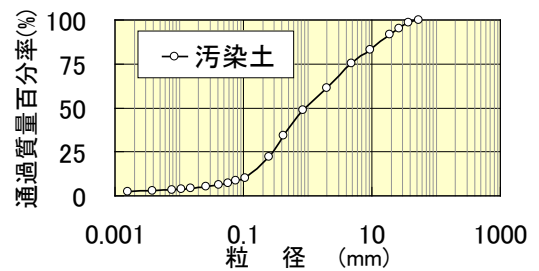
鉛汚染土の地盤工学的分類は細粒分まじり礫質砂であり、比較的均一な締固め状態となる土質であった。

また、透水試験の供試体は、自然含水比の汚染土を突固めによる土の締固め試験方法の A 法で作成したもの（締固め度 97.9%）と自然含水比の試料を締固め度 95%と 100%に調整して作成したものを用いた。

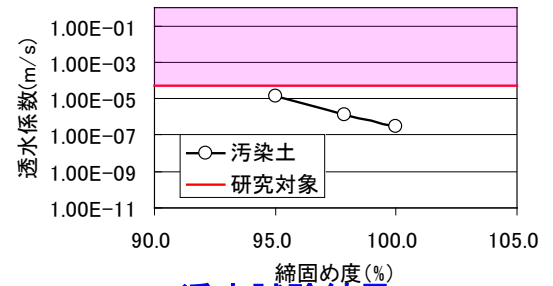
透水試験結果から汚染土の透水係数は $1.0 \times 10^{-6} \text{m/s}$ 程度であることがわかる。これは、本研究で対象とする透水係数から若干低い値であり、配水循環としては安全側（研究対象に対して厳しい条件）の材料であった。

土質試験一覧表

試料名		汚染土
一般	土粒子の密度 ρ_s	g/cm ³ 2.701
	自然含水比 ω_n	% 8.6
粒度	石分 (75mm以上)	%
	礫分 (2mm~75mm)	% 38.7
	砂分 (0.075~2mm)	% 52.8
	シルト分 (0.005~0.075mm)	% 5.2
	粘土分 (0.005mm未満)	% 3.3
	最大粒径	mm 53.0
分類	均等係数 U_c	18.16
	地盤材料の分類名	細粒分まじり 礫質砂
	分類記号	SG-F
締め固め	試験方法	A-c
	最大乾燥密度 ρ_{dmax}	g/cm ³ 1.779
	最適含水比 ω_{opt}	% 14.4
その他	透水係数 k_{15}	m/s 1.43E-5~2.97E-7



粒度試験結果



透水試験結果

図 3-1-2(2)-5 鉛汚染土壌の物性

b) 鉛汚染土壌の組成

実証試験に用いた汚染土の土壌分析結果を表 3-1-2(2)-2 に、写真を図 3-1-2(2)-6 に示す。

汚染土の Pb 溶出量は、0.059 mg/L となり、土壌汚染対策法に定める基準値の約 6 倍（基準値は 0.01 mg/L）であった。また、参考として Pb 含有量の分析も行った。Pb 含有量は 460 mg/kg となり、土壌汚染対策法に定める基準値の約 3 倍（基準値は 150 mg/kg）であった。

表 3-1-2(2)-2 土壌分析結果一覧

分析項目	Pb 濃度
溶出量（環境省告示第 18 号）	0.059 mg/L
含有量（環境省告示第 19 号）	460 mg/kg



図 3-1-2(2)-6 鉛汚染土壌の写真

(1) - 3 浸透試験結果

水位上下方法で集配水した際の地上土槽内の水位変化を確認するため、地上土槽内に設置した 7 箇所の水位測定用井戸の水位を、自記式水位計を用いて測定した。地上土槽内の浸透試験結果を図 5 に示す。

集配水管から距離がある S1 及び S7 井戸の水位が、S2,S3,S4 及び S5 井戸と比較し若干高いものの、水位の上下変動幅は、全井戸で概ね同じであった。

浸透試験の結果、土槽内の水位を均一に上下させることが可能であると確認できた。

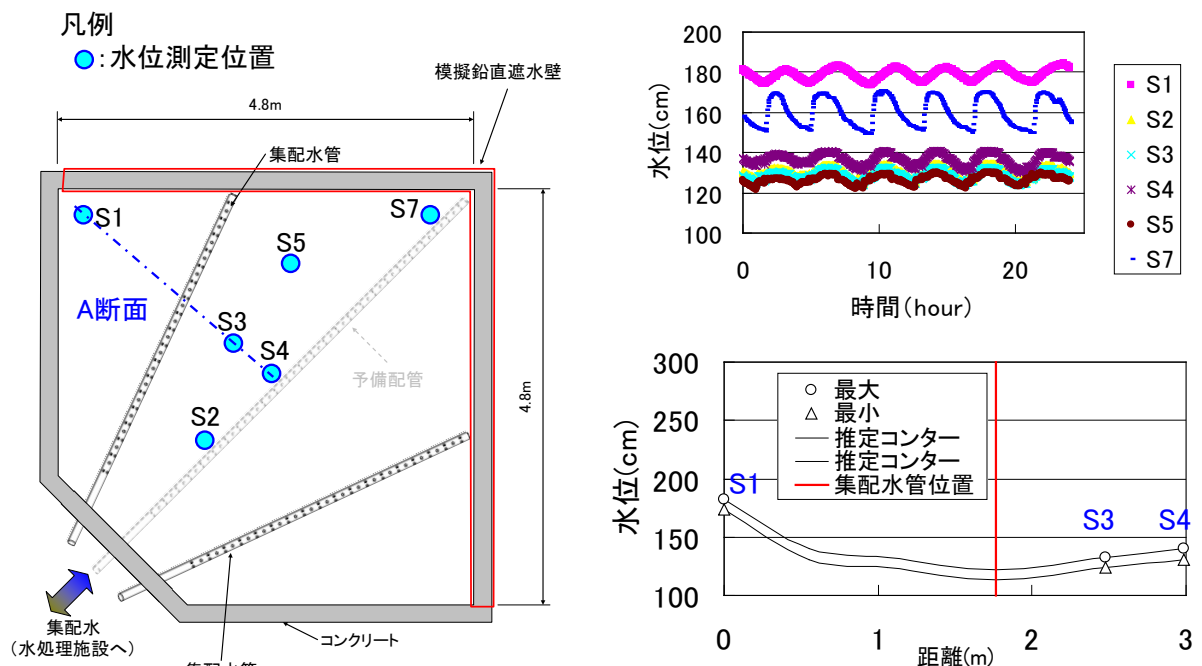


図 3-1-2(2)-7 浸透試験結果

(1) - 4 チオ硫酸を用いた鉛溶離プロセス、排水循環システムの概要

地上実証試験においては、鉛で汚染された土壌にチオ硫酸 Na を用いた溶離プロセスを用いた。プロセスフローを図 3-1-2(2)-7 に示す。

プロセスは「脱離工程」と「洗浄工程」の二段階で構成されている。以下に溶離プロセスを示す。

【脱離工程】

pH=4 に調整されたチオ硫酸 Na 溶液を用いて、土壌中の鉛をチオ硫酸塩として溶離させる。溶離した鉛は、土槽外にて硫化物として凝集沈殿処理を行い回収する。鉛を沈殿させた後のチオ硫酸 Na 用液は繰り返し、土槽へ返送し、鉛の溶離に用いた。チオ硫酸 Na 溶液の回収、鉛の除去、返送を組み合わせ再利用することで、汚染土壌の浄化に利用するチオ硫酸 Na 溶液の量を削減することが可能となる。

【洗浄工程】

鉛汚染土壌から鉛を溶離させるチオ硫酸の脱離効果を無効化するために、集水管から回収したチオ硫酸を含む溶液を電解処理で酸化・還元分解した。また、地上実証試験系内に残存す可用性鉛は、凝集沈殿及び吸着カラムにより回収を行い。鉛を除去し、土槽へ返送した。循環液が放流可能な水質（鉛 0.01mg/L 以下）になるまで洗浄工程を実施した。

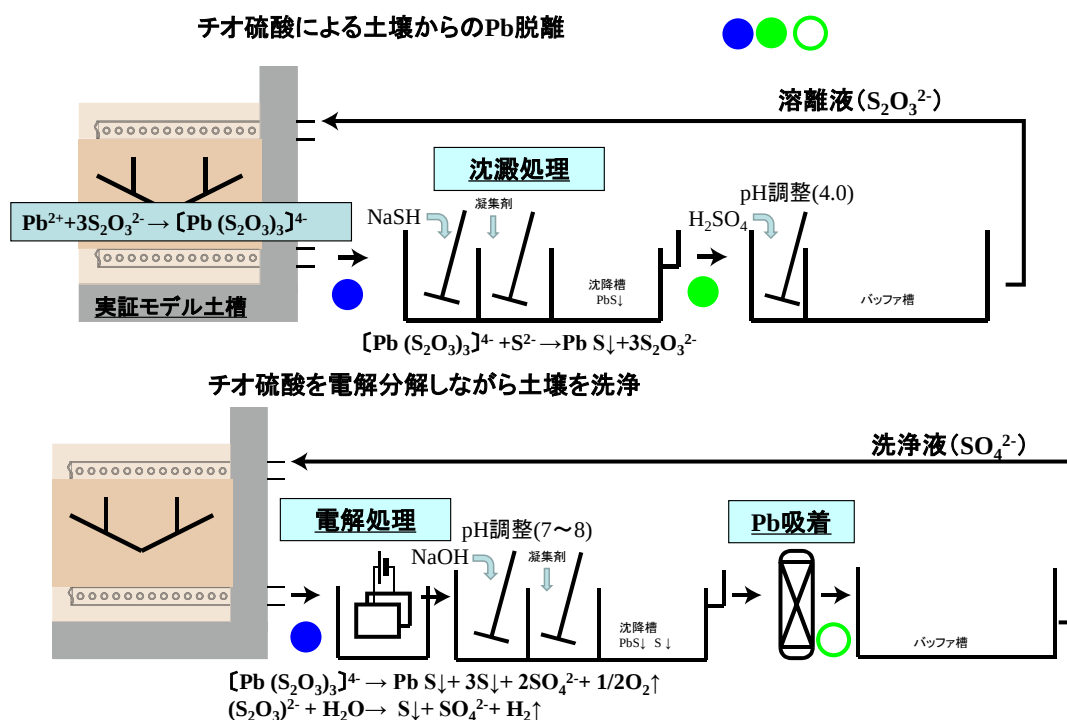


図 3-1-2(2)-7 チオ硫酸を用いた土壌の原位置浄化プロセスフロー

(1)－5 脱離工程、洗浄工程における水質分析結果（日々モニタリング結果）

2013 年 11 月から 2014 年 7 月にかけて実施した脱離工程、洗浄工程中の期間中は、概ね 1m³毎に集水管出口より採水・鉛分析を実施した。集水管出口の鉛分析結果を図 3-1-2(2)-8 に示す。

(1) の実証試験工程表で述べたとおり、鉛濃度はおおむね BV10（2013 年 3 月）を超えた時点で分析定量下限 0.001mg/L 未満となった。

また、脱離工程、洗浄工程ともに土槽外の水処理（沈殿処理及び鉛吸着カラム）によって鉛が除去されており、水処理後の溶液を再利用することによって、水の循環利用を実現した。

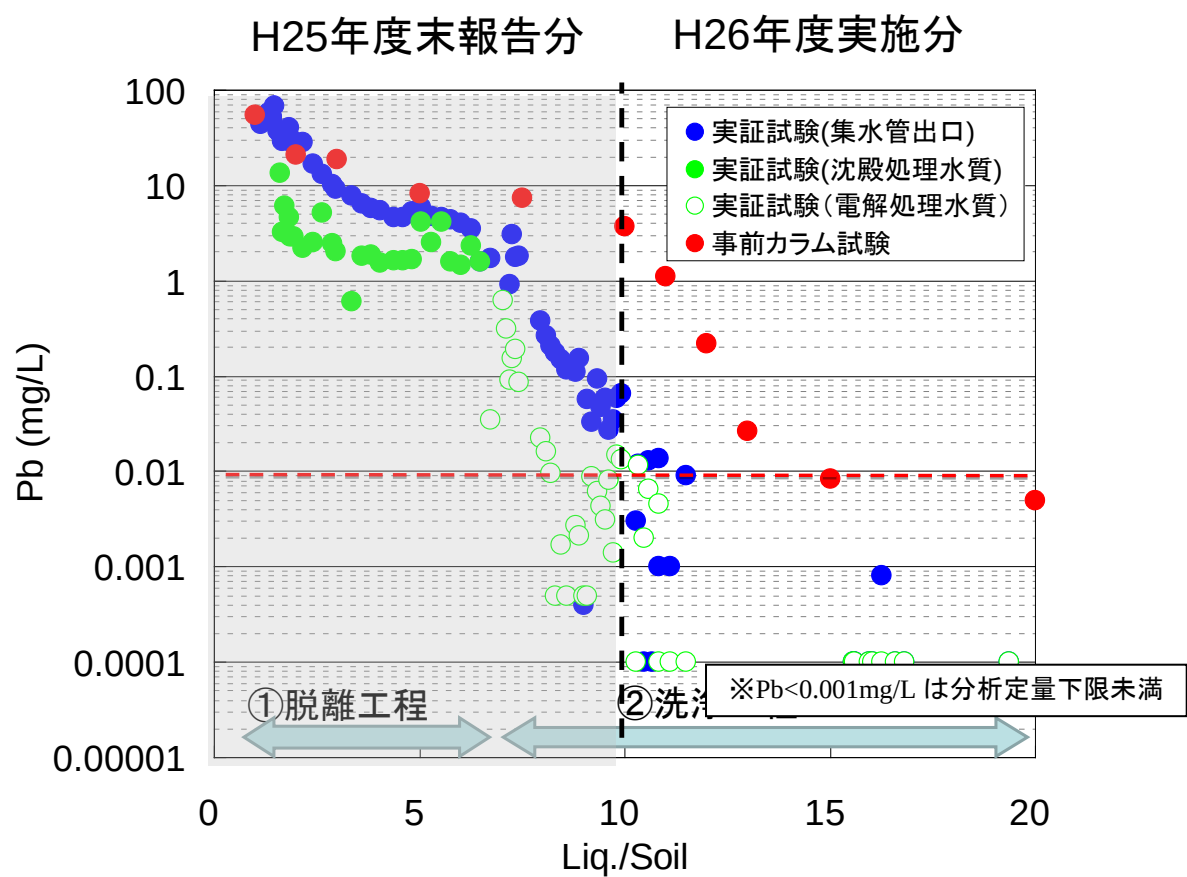


図 3-1-2(2)-8 集水管出口の水質分析（鉛濃度）結果

(1) - 6 全井戸モニタリング、地上土槽解体時モニタリングの概要

全井戸モニタリング、解体時の土壌等サンプリング位置を図 3-1-2(2)-9 に示す。

【全井戸モニタリング】

脱離工程及び洗浄工程の期間中定期的に地上土槽内に設置した 12 本×3 深度のモニタリング井戸で地下水を採取・鉛分析を実施した。

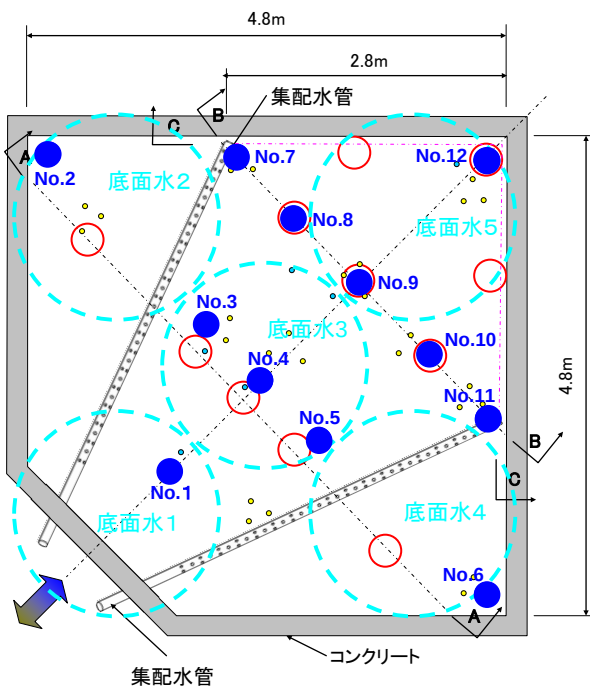
【解体時モニタリング】

地上土槽解体時に、バックホウを用いて土槽上部から土壌を除去しつつ、土質試験 11 箇所×3 深度、土壌分析 12 箇所×3 深度のサンプリングを実施し分析に供じた。

土壌分析サンプリングでは、おおむね 10cm 離れた 3 試料を採取して同量混合したものを分析試料とした。作業状況写真を図 3-1-2(2)-10 に示す。

また、集水管より下部に汚染地下水が滞留していないことを確認するため、解体時に 5 箇所の浸透水を採取し、これを底面水試料とした。

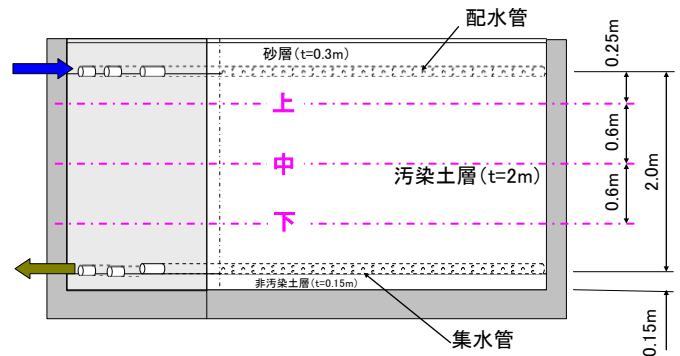
試料採取位置(平面)



凡 例

- 土質試験用試料採取地点 計11地点
- 鉛分析用試料採取地点 計12地点×3深度
- 底面水試料採取範囲 計5箇所
- 水位観測用井戸 計7箇所
- 水質観測用井戸 計12箇所
- 試料採取深度

試料採取位置(深度)



※底面水は下部集水管撤去後にバックホウで土壌を掻き出す際に浸み出た水を採取した。

図 3-1-2(2)-9 水質モニタリング、土壌等サンプリング位置図



掘削状況



深度検尺(下層面)



サンプリング位置だし



土質試験試料採取



鉛分析試料採取1



鉛分析試料採取2

図 3-1-2(2)-10 土壌等サンプリング作業写真 (2014. 7. 8 に実施)

(1) ー7 全井戸モニタリング分析結果

全井戸モニタリング分析結果を図 3-1-2(2)-11 に示す。図は、それぞれの深度で 12 地点の井戸水質平均値を比較したもので、プロットのヒゲはデータの最大値、最小値を示している。

土槽の上部から下部に向けて浄化が進行する状況を水質分析で把握することができた。

ただし、一般的な井戸採水のように 3 倍水量での井戸洗浄が容易にできないことから、洗浄工程の最終段階になると井戸内の残留水が分析誤差の要因となり、データがばらついたと考えられる。

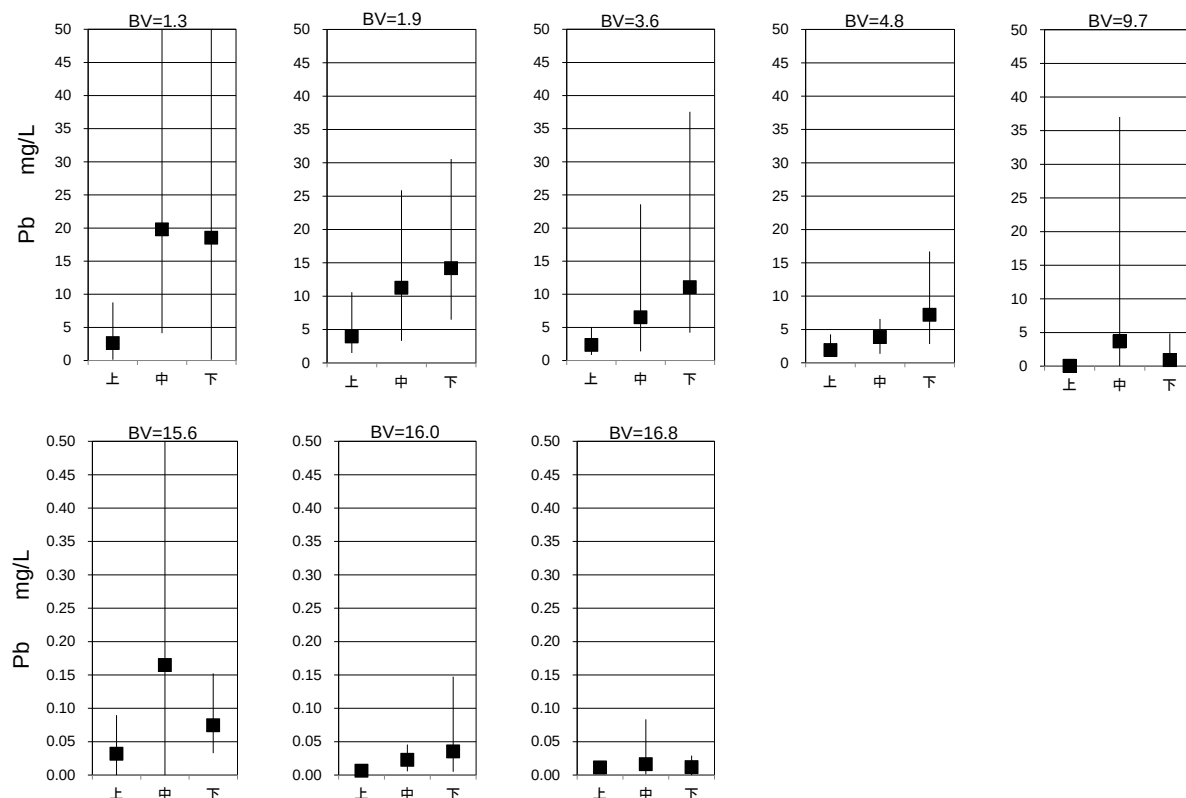


図 3-1-2(2)-11 モニタリング井戸水質分析結果

(1) - 8 地上土槽解体時の土質試験結果

地上土槽解体時に 11 箇所×3 深度の土質試験用試料を採取し各試料の密度試験を実施した。乾燥密度よりと図 3-1-2(2)-12 中の近似式から各試料の透水係数を推定した。

地上土槽内の各地点、深度の透水係数の分布図を図 3-1-2(2)-13 に示す。分布図では、図 8 中の A-A 断面、B-B 断面及び C-C 隅角部展開図の透水係数の分布を示した。

地上土槽中の透水係数は若干の大小は見られるものの、極端に通水性が異なる地点はなく、比較的均一な透水性を持つ土壌であることが確認できた。

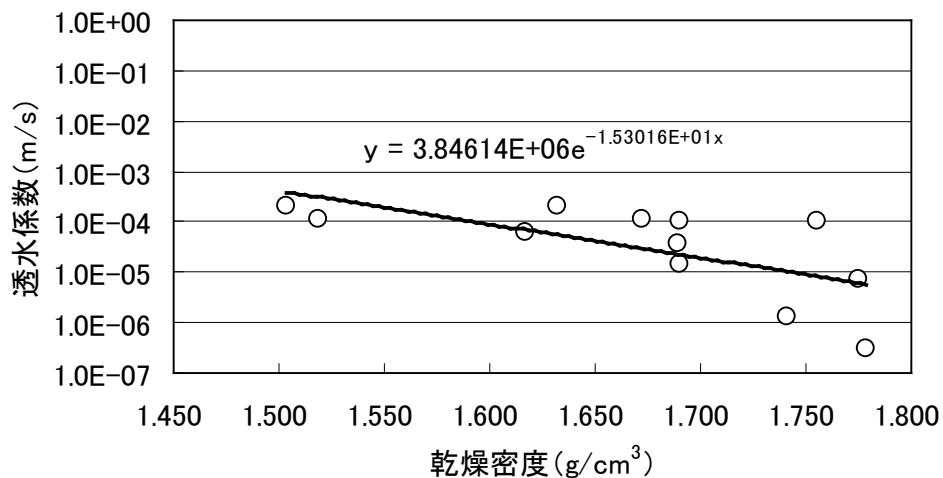


図 3-1-2(2)-12 乾燥密度と透水係数の関係

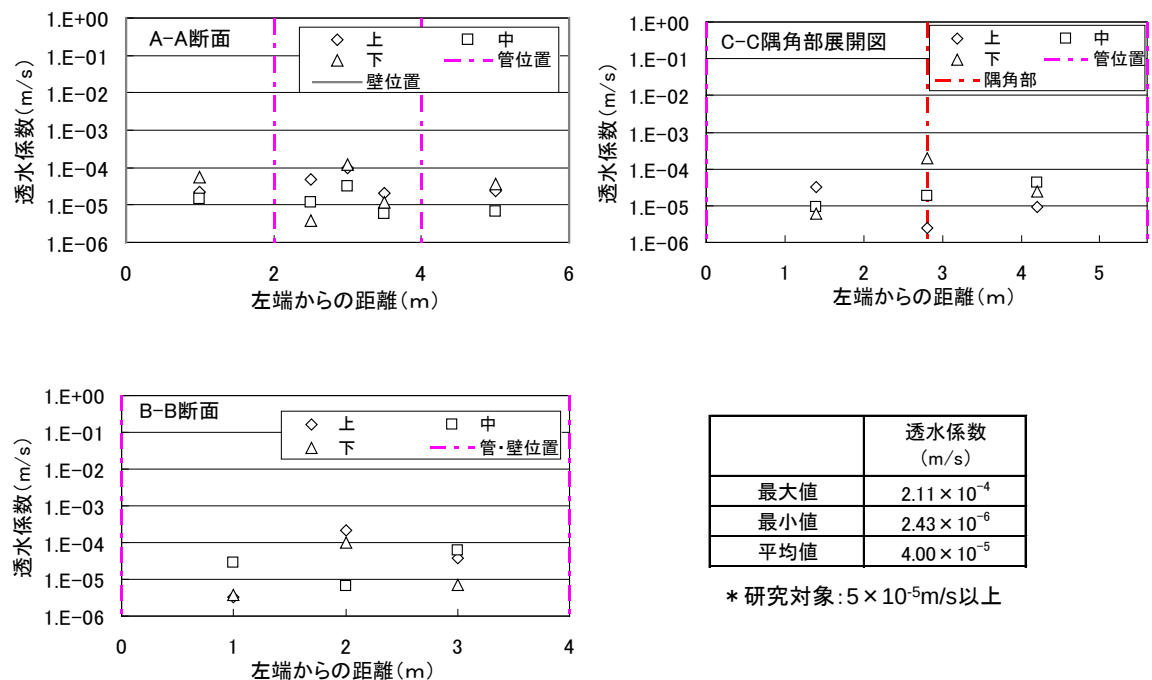


図 3-1-2(2)-13 地上土槽中の透水係数分布図

(1) - 9 地上土槽解体時の土壌等分析結果

地上土槽解体時に土壌及び底面水を採取・分析し浄化効果の確認を行った。
土槽解体時の土壌等分析方法を図 3-1-2(2)-14 に、結果を表 3-1-2(2)-3 に示す。

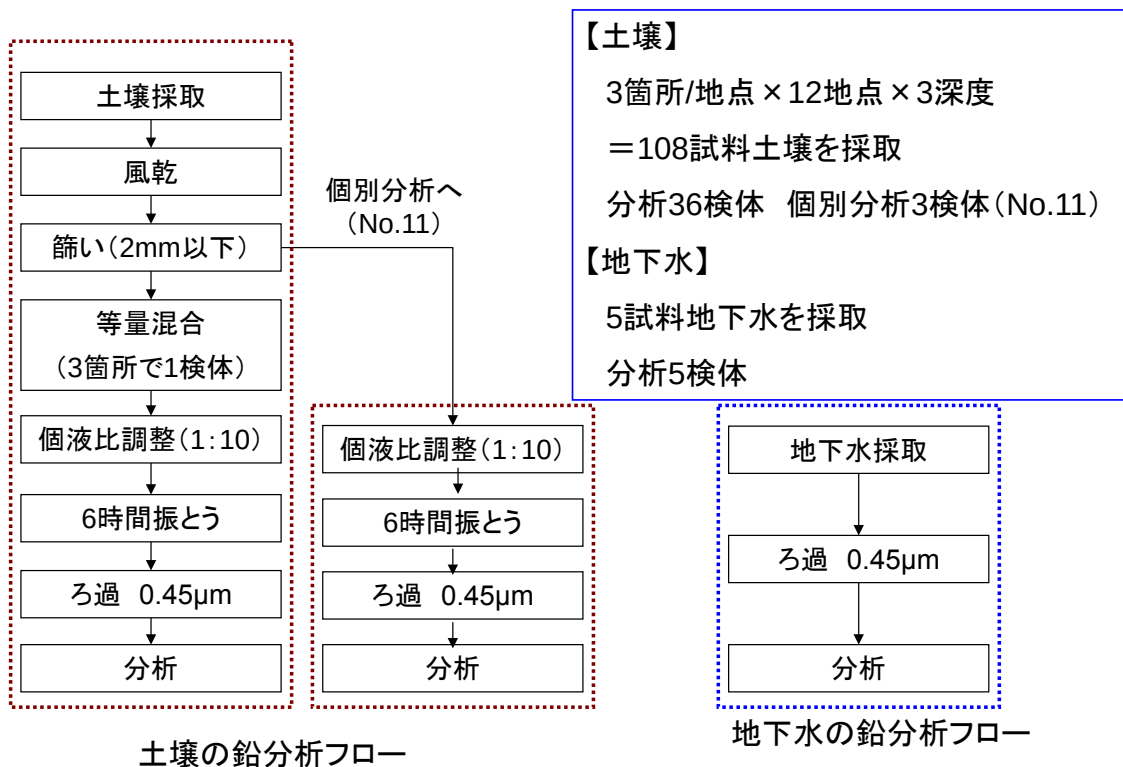


図 3-1-2(2)-14 土槽解体時の土壌等分析方法

表 3-1-2(2)-3 土槽解体時の土壌等分析結果

溶出分析結果

Pb, mg/L

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12
上層(深度0.6m)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0015	<0.001	<0.001	※0.092 0.027 0.23 0.16	<0.001
中層(深度1.2m)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
下層(深度1.8m)	<0.001	0.003	0.001	<0.001	0.002	0.002	0.006	0.005	0.004	0.003	<0.001	0.004

■は環境基準値超過を示す

底面水分析結果

Pb,mg/L

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
底面水	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

含有分析結果(-2mm:環告19号法)

Pb,mg/kg

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Ave.
上	250	244	333	300	632	222	325	295	211	517	160	242	311
中	246	283	290	314	308	192	223	208	237	397	239	254	266
下	316	298	233	552	286	285	255	275	235	219	275	217	287

+2mm粒群の含有分析(環告19号法に準拠) Pb,mg/kg

平均値 288mg/kg

Sample	上部混合	中部混合	下部混1	平均
1N-HCl溶解量	67	279	142	163

土壌の溶出量分析では、12箇所×3深度の36試料のうち、1試料を除いて土壌汚染対策法に定める汚染に関する基準(0.01mg/L)を満足するものであった。

基準を超過した試料(No.11 上層)について混合前の3試料を個別に分析したが、すべての試料が基準を超過していた。

底面水はサンプリングした5試料とも地下水の基準値(0.01mg/L)を下回った。

鉛の含有量(環告19号法による)は、36検体の平均値で288mg/kgであった。参考として分析した+2mm粒群にも平均163mg/kgの鉛含有が確認できた。

(1) -10 実証試験における物量バランス

a) 鉛の物量バランス

地上土槽試験における鉛の物量バランスを、1N-HCl で溶解する鉛を、鉛含有量として計算した。その結果を図 3-1-2(2)-15 に示す。

浄化前土壌の含有量値は 460mg/kg (環告 19 号法) であるが、処理後土壌の含有量値、溶離した鉛の総量とマスバランスが整合しなかった。

そのため浄化前土壌の含有量値はもっとも信頼性の高い処理後土壌含有量値から逆算した数値を用いた。

本試験における鉛の溶離量は、1N-HCl (1M-HCl) 溶解量の 19%であった。

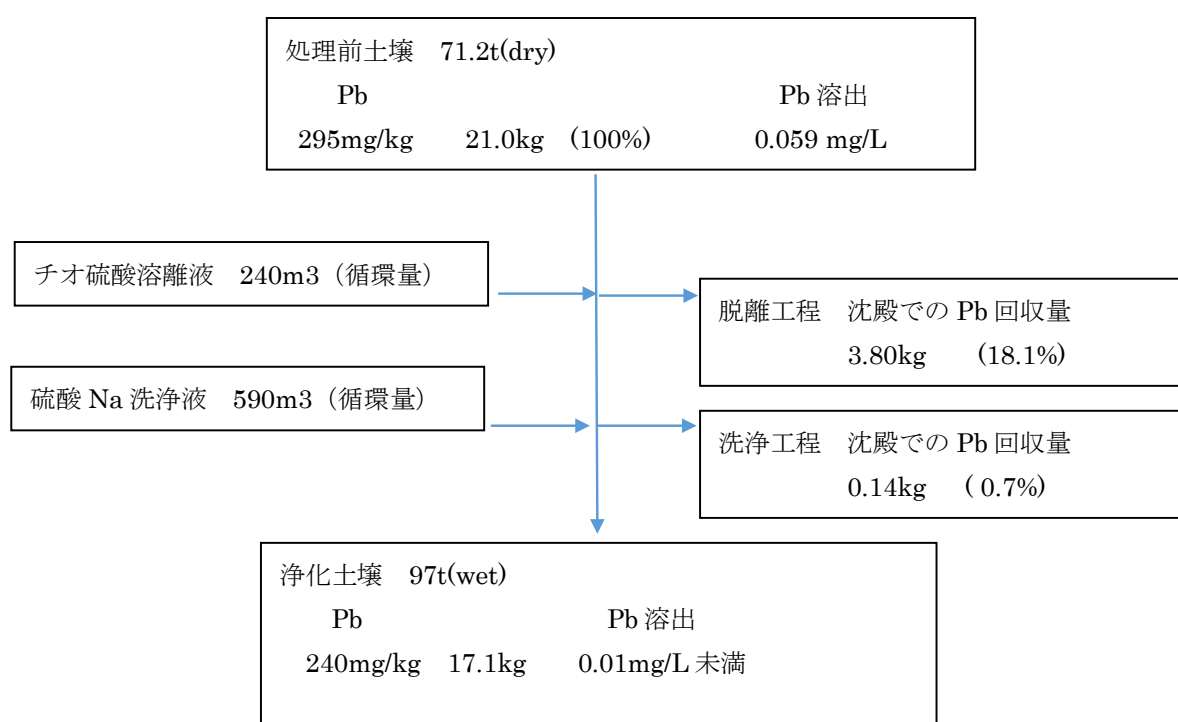


図 3-1-2(2)-15 地上土槽試験における鉛の物量バランス

(含有量は環告 19 号法に準拠した 1N-HCl 溶解量、処理前土壌の含有量は計算値)

b) 物質収支

地上土槽に用いた用水、試薬等の物質収支を図 3-1-2(2)-16 に示す。

図中、インプットは青枠、アウトプットは赤枠で示した。

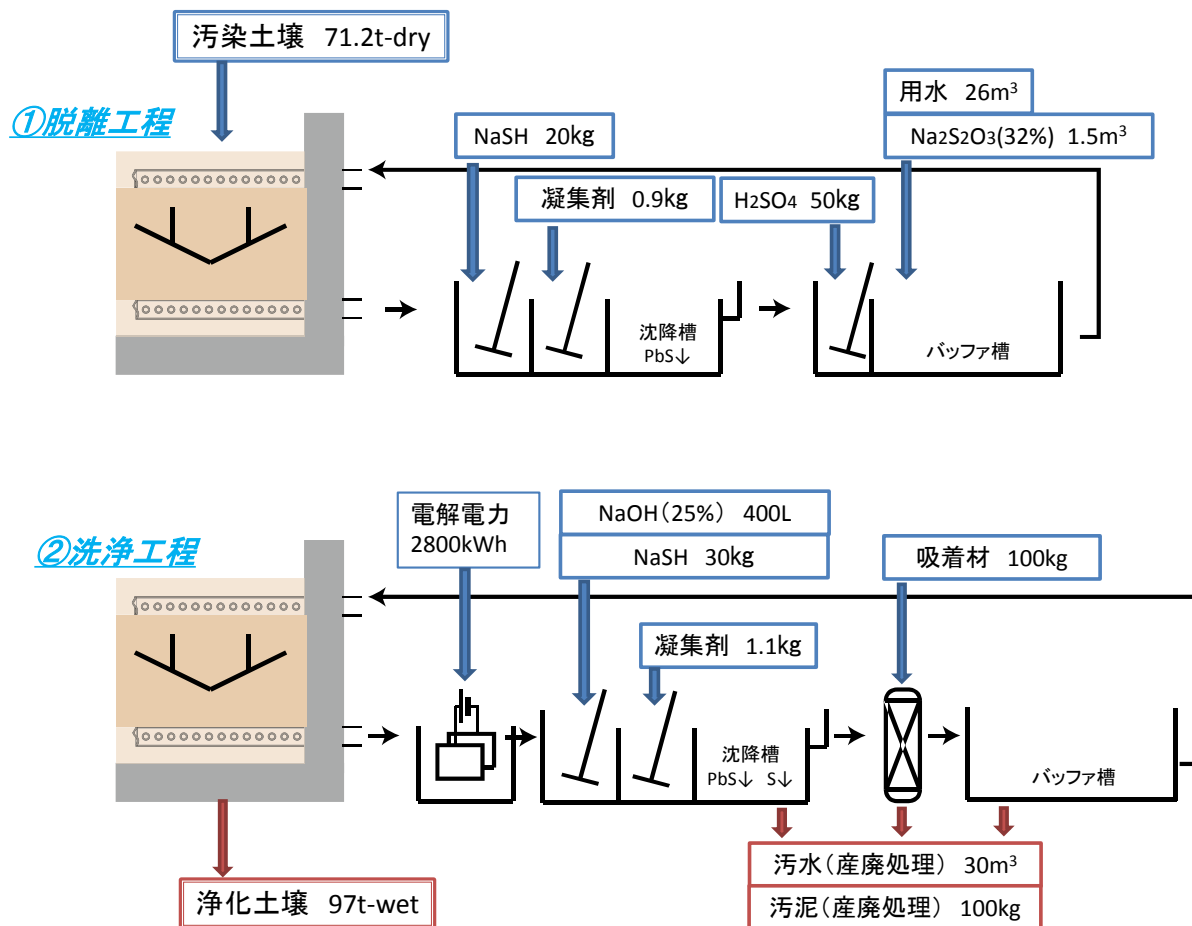


図 3-1-2(2)-16 地上土槽試験における物質収支

(1) - 1 1 チオ硫酸によって溶離する鉛の形態について

a) 各種鉛化合物に対するチオ硫酸溶離の特徴

チオ硫酸による鉛の溶解作用の特徴を明らかにする目的で、各種鉛試薬に対して鉛の溶解濃度を比較する試験を行った。

試験では振とう溶媒量 300ml に対して鉛量が 10mg となるように試薬量を秤量して、蒸留水、1N-HCl、0.1M チオ硫酸 Na (pH4) への鉛溶離濃度を比較した。結果を図 3-1-2(2)-17 に示す。

同様に、土壤共存系での鉛の溶解濃度を比較する試験を行った。

試験では鉛含有量が 1,000mg/kg となるように非汚染土壌（下総層群成田層清川層の砂）と試薬を混合して、湿潤状態で 2 週間養生した模擬汚染土壌を作成し、模擬汚染土壌 10g(dry) を 300ml の溶媒で振とうした。結果を図 3-1-2(2)-18 に示す。

試験に用いた非汚染土壌（下総層群成田層清川層の砂）は透水性が本試験対象土壌と類似していること、入手が容易であったことより、京浜工業地帯（千葉県袖ヶ浦市）の砂質土壌を用いた。清川層は、千葉県及び東京湾周辺、房総半島北部から利根川流域まで広く分布しており、関東ローム層に比べ透水性の高い地層を形成していることが多い。図 3-1-2(2)-19 に東京湾周辺の地質図を示す。

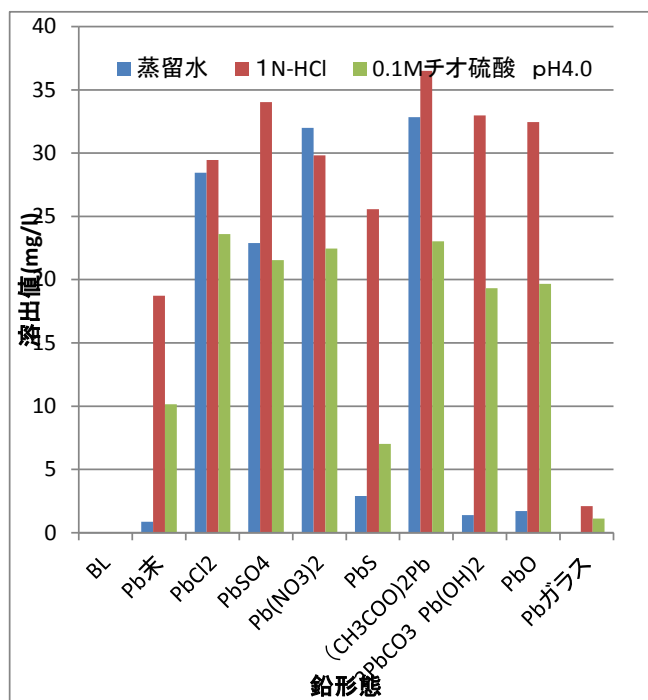


図 3-1-2(2)-17 各種試薬に対する鉛溶離効果

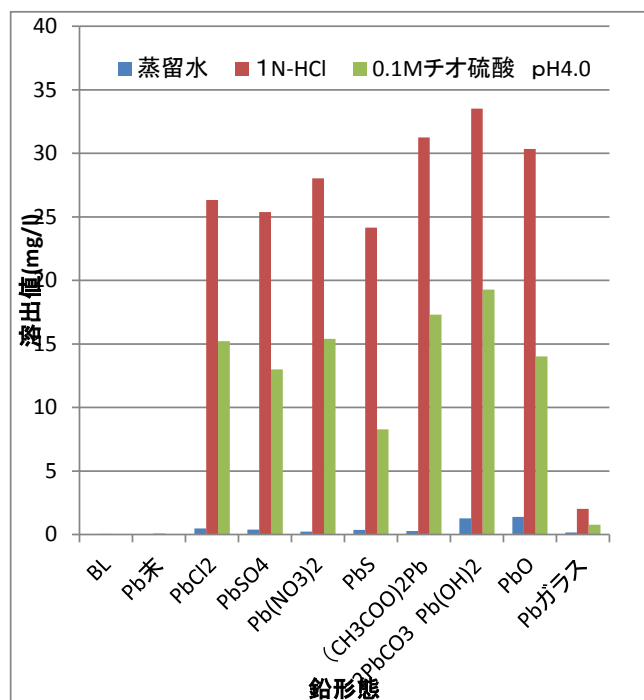
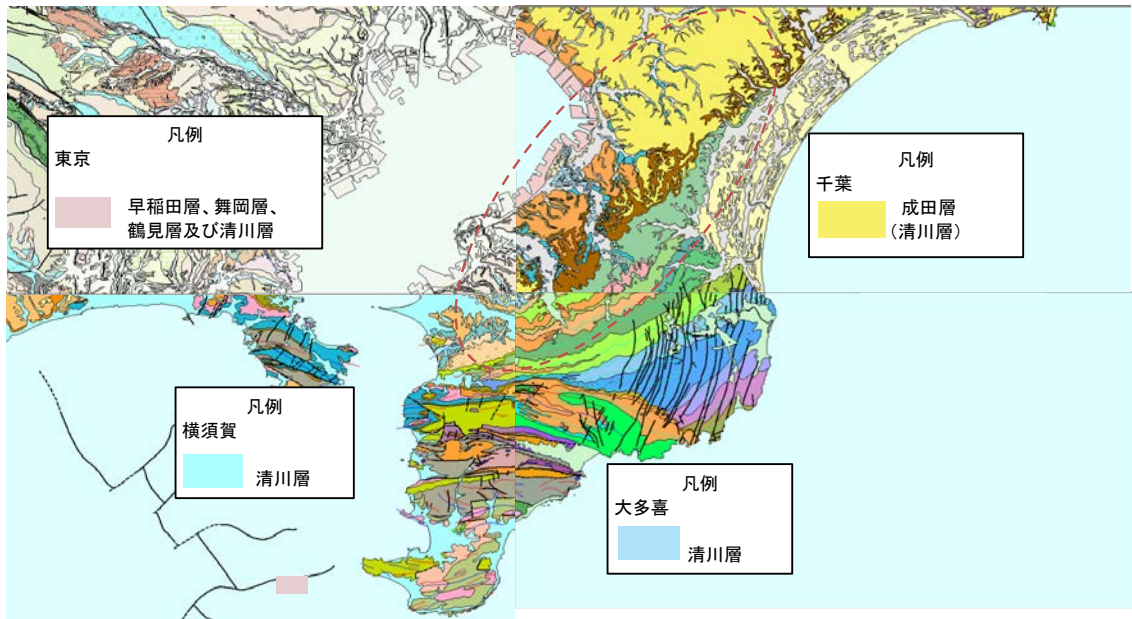


図 3-1-2(2)-18 試薬で汚染された土壌に対する鉛溶離効果



(「20 万分の 1 地質図「東京」「千葉」「横須賀」「大多喜」より抜粋加工」)
 図 3-1-2(2)-19 東京湾周辺の地質図

b) tessier 逐次抽出法での形態に対するチオ硫酸溶離の特徴

汚染土壌の 5mm 網下を縮分して室内カラム試験にて実証試験と同様の脱離・洗浄を行い、浄化前後の土壌を tessier 逐次分析法にて比較した。(カラムはφ 40mm、充填量 125ml で実施)。tessier 逐次分析法の分析フローを図 3-1-2(2)-20 に、結果を表 4 に示す。

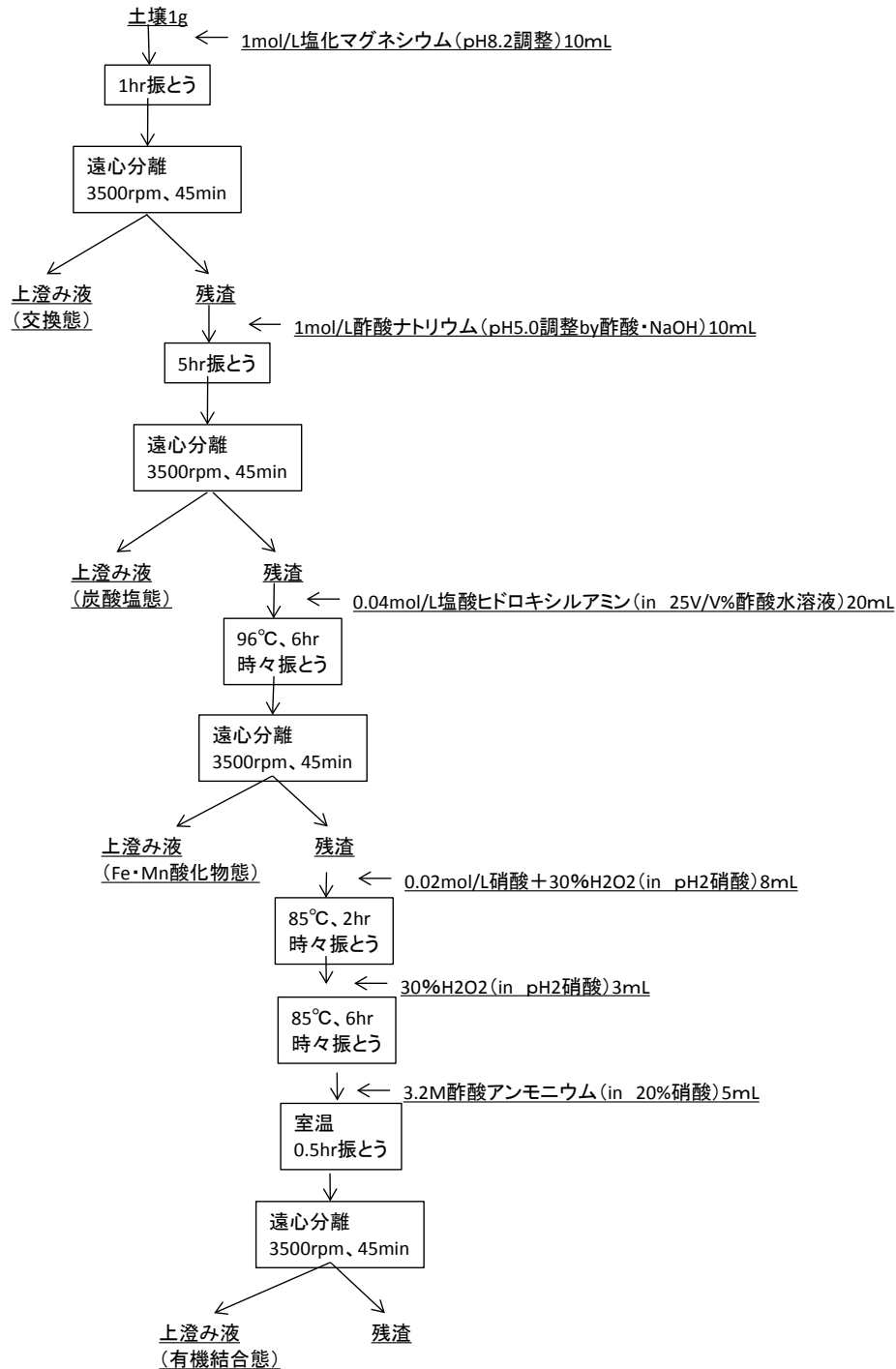


図 3-1-2(2)-20 tessier 逐次分析フロー

表 3-1-2(2)-4 チオ硫酸法による tessier 形態の変化（水溶態は省略）

tessier形態	浄化前 mg/kg	浄化後 mg/kg	除去率 %
交換態	9	4	56
炭酸塩結合態	1,800	1,200	33
Fe-Mn結合態	730	450	38
有機結合態	140	69	51
残渣	26	18	31
全含有(底質法)	2,705	1,741	36

表表 3-1-2(2)-4 のとおり、チオ硫酸を用いた室内カラム試験での各形態の鉛含有量（底質調査法にて分析）の除去率は 31～56%であった。化学形態による鉛除去率に大きな差は認められなかった。全鉛含有量は 36%除去することができた。

（１）－１２ 実証試験のまとめ

層厚 2m、土壌量 41.6m³ の地上土槽にラジアルウエル配水・集水モデルを構築し鉛汚染土壌の原位置浄化試験を実施した。

チオ硫酸 Na 溶液を用いた脱離工程で BV6（循環液量 250m³）、その後 BV22（循環液量 920m³）まで洗浄工程を運転した。

地上土槽解体時のモニタリングでは 36 地点中粘土質の箇所をのぞく 35 地点で土壌の溶出値は基準値を満足した。

含有量としては、環境省告示 19 号法分析で 19%（底質調査法分析で 36%）の鉛を溶離させることができた。溶離させた鉛は、集水管より回収し土槽外にて凝集沈殿及び鉛吸着カラムによって回収した。

また、放射状に分布する水平井戸の外側部分でも良好に溶離液が作用し土槽全体を浄化することができることを確認した。

また、本法では汚染地下水の集水管下部への滞留、地下水濃度のリバウンド上昇も見られなかった。

全井戸モニタリングを実施した、簡易作井による地下水サンプリング井戸は試験期間中を通して有効に機能した。

土壌から溶離した鉛を回収する水処理設備も有効に機能し、用水を循環利用することができた。

（１）－１３ 実証試験結果に関する考察

a) 終了時に土壤溶出量基準を超過した試料について

(1) -9 表 3-1-2(2)-3 のとおり、浄化後試料 36 検体のうち 1 検体 (No. 11 上部) は基準値を満足しない結果となった。

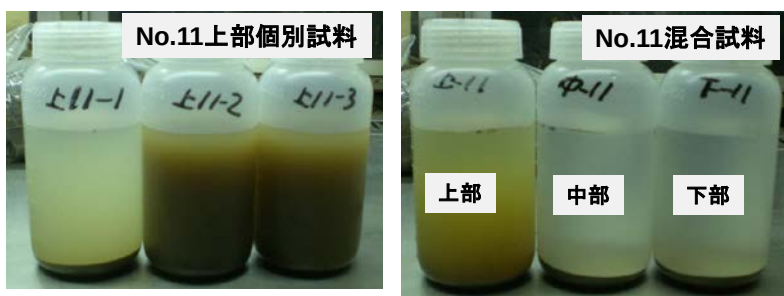
土壤の溶出分析における様子を図 20 に示す。当該土壤のみ、振とう後の沈降性が悪く、濁りがとれなかった。

粒度分布を比較すると、No. 11 上部試料では 0.01mm, 0.3mm 近傍に粒度分布の山が認められるとともに、2mm 以上の粒群比率が少ないことが認められた。

これらのことから、No. 11 上部については局部的に透水係数が低い土壤が存在し、土壤に浸透する溶離液・洗浄液が局部的に少なかったことが汚染残留の原因となったと考えられる。

土壤の溶出試験状況

6時間振とう後に30分静置した状態を他の試料と比較した。



No.11上部土壤の粒度分布

溶出試験に用いた-2mm土壤の粒度分布を平均土壤と比較した。

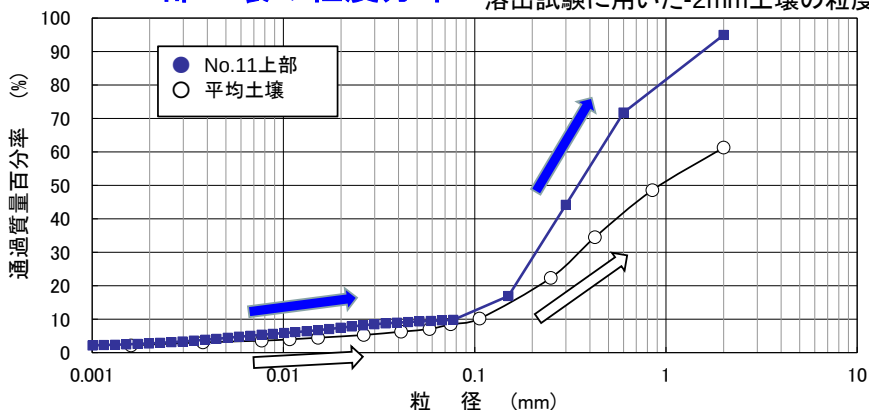


図 3-1-2(2)-21 No. 11 上部試料の観察と粒度分布測定結果

b) チオ硫酸による鉛汚染浄化の特徴について

各種化学形態に対するチオ硫酸の効果については、(1) - 11 図 3-1-2(2)-17 及び図 3-1-2(2)-18 から以下のような特徴が認められる。

- ・チオ硫酸による鉛の溶離量は、化学種にかかわらずおおむね 1N-HCl による溶離の半分程度である

- ・蒸留水では土壌の共存で大幅に溶離率が低下するが、チオ硫酸ではこの影響は軽微である
- ・チオ硫酸による溶離は化学種や土壌共存の影響を受けにくいことから、様々な鉛汚染土壌に適用できるものと判断できる

鉛の溶出挙動と tessier 形態について（社）土壌環境センターでまとめられたデータによると、画分と酸・アルカリへの溶出傾向は表 5 のようにまとめられている（ここでは A～T の国内の重金属汚染土壌 20 試料について試験評価した結果が示されている）。

ここでは、溶出する鉛の形態として、水溶態の他に炭酸塩結合態、イオン交換態があり、pH の変動によって、さらに鉄マンガン吸着態が溶出されやすくなる傾向が認められる。

チオ硫酸を用いた方法は、酸・アルカリでは溶出しにくい有機物結合体に対しても鉛の除去効果が見られることが特徴的である。

ただし、本試験での分析試料検体数が少ないので定量的な評価はできない。

表 3-1-2(2)-5 鉛の溶出挙動と tessier 形態の関連事例

	イオン 交換態	炭酸塩結合態	鉄マンガン 吸着態	有機物 結合体	残渣
46号試験で溶出する鉛	F,P,S	E,M,Q,T			
pH4(酢酸)で溶出する鉛	P	E,G,H,I,J,L,M,O,Q,T	A,B,C,F,R,S		
pH4(硝酸)で溶出する鉛	B,C,P	E,G,I,J,L,M,N,O,Q,T	D,F,R,S		
pH4(硫酸)で溶出する鉛	B,C,P	G,H,I,J,L,M,N,O,T	R,S		
pH12(NaOH)で溶出する鉛	B,C,F,P	G,H,I,J,L,M,N,O,Q,T	A,D,E,R,S	K	

「土壌環境リスク管理手法調査」重金属の溶出特性に関する基礎調査 平成10年3月（社）土壌環境センターより

(2) 室内カラム試験結果からの現地浄化シミュレーション

原位置浄化手法の顧客提案にあたっては、浄化完了時期の推定が、工期及び工事費用の算定において重要となる。本研究では、地上土槽でのチオ硫酸 Na 溶液を用いた鉛汚染土壌の浄化試験を実施した。

本試験で用いた汚染土壌試料より本浄化工法のシミュレートに必要な特性値を獲得し、浄化完了時期を予測するため現地浄化シミュレーションを実施した。

シミュレーションは、以下の 1)、2) の手順を構築実施した。

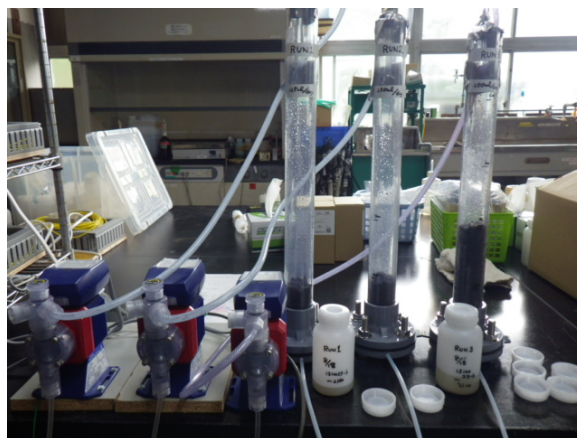
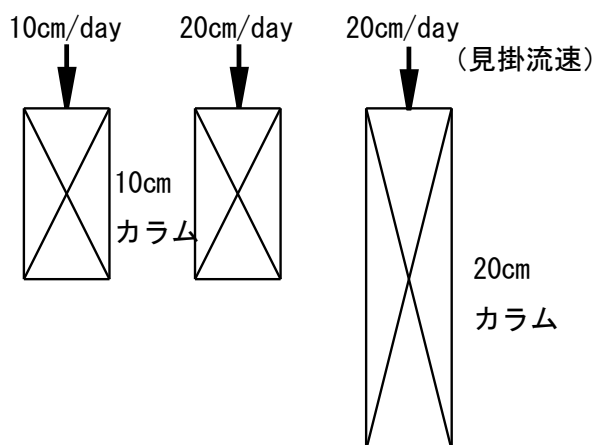
- 1) ラボ試験結果から一次元物質移動を数値モデル化する
- 2) 一次元物質移動と三次元流れモデルを統合して現地浄化を計算予測する

(2) - 1 室内カラム試験の概要

土壌の原位置浄化における溶離液の滞留時間、溶離液の交換回数の影響を把握するために、ラボ試験を実施した。試験概要を図 21 に示す。

試験では直径 40mm カラムを用いた。カラム試験①では土壌充填部長さ 10cm に対して 1BV/day、②では土壌充填長さ 10cm に対して 2BV/day、③では土壌充填部長さ 20cm に対して 1BV/day で通液した。

通液は、溶離工程 10BV を行った後、洗浄工程 10BV を実施した。



カラムNo.	①	②	③
流速 cm/day	10	20	20
空間速度 BV/day	1	2	1
試験期間	20日	10日	20日

- ・BV=10までは1/10チオ硫酸を用いた脱離工程
- ・その後、BV=20まで、硫酸ナトリウムによる洗浄工程
- ・BV1毎に溶離液を分析

図 3-1-2(2)-22 室内カラム試験概要

(2) - 2 一次元物質移動モデルの構築

室内カラム試験結果のフィッティングにあたって、物質溶離モデルを以下の

ように決定した。

a) 脱離工程

チオ硫酸を用いた脱離工程では、チオ硫酸による浄化力に支配されるため、

$$\text{速く反応する成分} : \frac{dMS1}{dt} = -K1 \cdot MS1 \cdot [S_2O_3^{2-}]$$

$$\text{遅く反応する成分} : \frac{dMS2}{dt} = -K2 \cdot MS2 \cdot [S_2O_3^{2-}]$$

(MS1,MS2 はチオ硫酸と反応するカラム中の成分量 mmol/L)

$$\text{溶離液濃度} = \left(\frac{dMS1}{dt} + \frac{dMS2}{dt} \right) / \text{溶離液流速}$$

上式の K1,K2 と、m1,m2（それぞれ MS1,MS2 の初期値）をフィッティングパラメータとして数値モデル化した。

b) 洗浄工程

洗浄工程では土壌から鉛を溶離するチオ硫酸が供給されず、硫酸 Na 溶液での浄化力に支配されるため、

$$\text{速い速度で洗浄される成分} : \frac{dMW1}{dt} = -K3 \cdot MW1$$

$$\text{遅い速度で洗浄される成分} : \frac{dMW2}{dt} = -K4 \cdot MW2$$

(MW1,MW2 は硫酸 Na 溶液で溶離されるカラム中の成分量 mmol/L)

$$\text{溶離液濃度} = \left(\frac{dMS1}{dt} + \frac{dMS2}{dt} + \frac{dMW1}{dt} + \frac{dMW2}{dt} \right) / \text{溶離液流速}$$

上式の K3,K4 と、m3,m4（それぞれ MW1,MW2 の初期値）をフィッティングパラメータとして数値モデル化した。

(2)－3 室内カラム試験結果の数値モデルへのフィッティング

室内カラム試験①～③の結果を、地球化学コード PHREEQC(US Geological Survey)を用いて一次元解析を行なった。解析手順は、以下のとおり。

- ① 塩化ナトリウムを用いた分散度の決定
- ② 室内カラム試験データを用いた関与物量・速度定数のフィッティング
- ③ 室内カラム試験フィッティング結果から、地上土槽モデルでの計算パラメータ決定

① 塩化ナトリウムを用いた分散度の決定

室内カラム試験の挙動を解析するにあたり、充填土壌の固有値として分散度を決定する必要がある。

ここでは充填土壌カラムに塩化ナトリウム水溶液を通液したときのCl-イオンの出口濃度変化を実測し、拡散係数に關係する分散度 α を決定した。図3-1-2(2)-23に分散度決定のためのフィッティング結果を示す。図中の橙色線が実測値と最もよく近似していたため、土壌充填カラムの分散度 $\alpha=3e-3$ と決定した。

$$D=De+\alpha v \quad (D:\text{拡散係数} \quad De:\text{有効拡散係数} \quad \alpha:\text{分散度} \quad v:\text{流速})$$

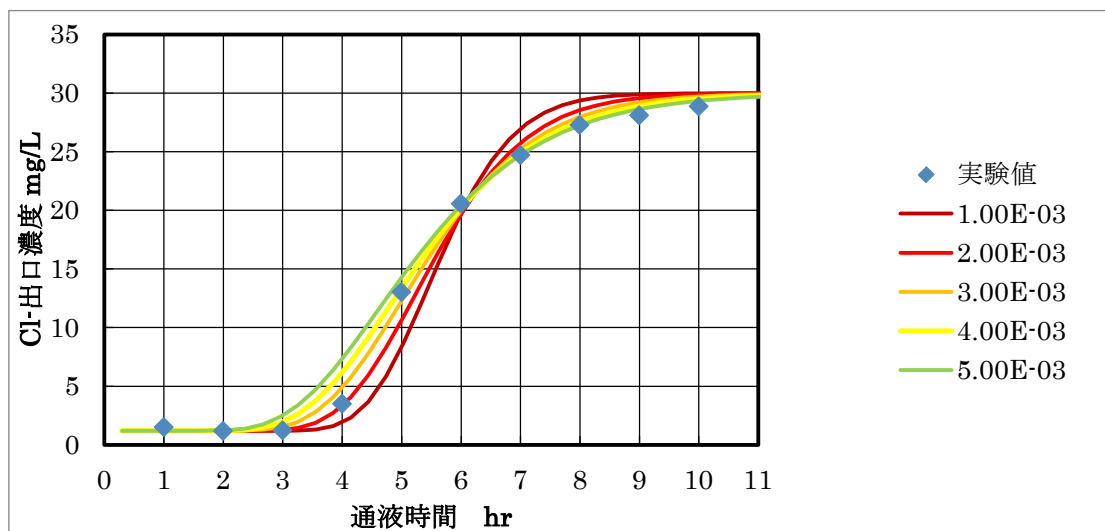


図 3-1-2(2)-23 フィッティングによる分散度の決定

② 室内カラム試験データを用いた関与物量・速度定数のフィッティング

実際のカラム試験データに対して、関与物量 $m_1 \sim m_4$ 、速度定数 $K_1 \sim K_4$ のフィッティングを実施した手順を図 3-1-2(2)-24 に示す。

グラフ上で傾きに相当する $K_1 \sim K_4$ と、接片に相当する $m_1 \sim m_4$ を、実測値と計算値が一致するように順に決定した。

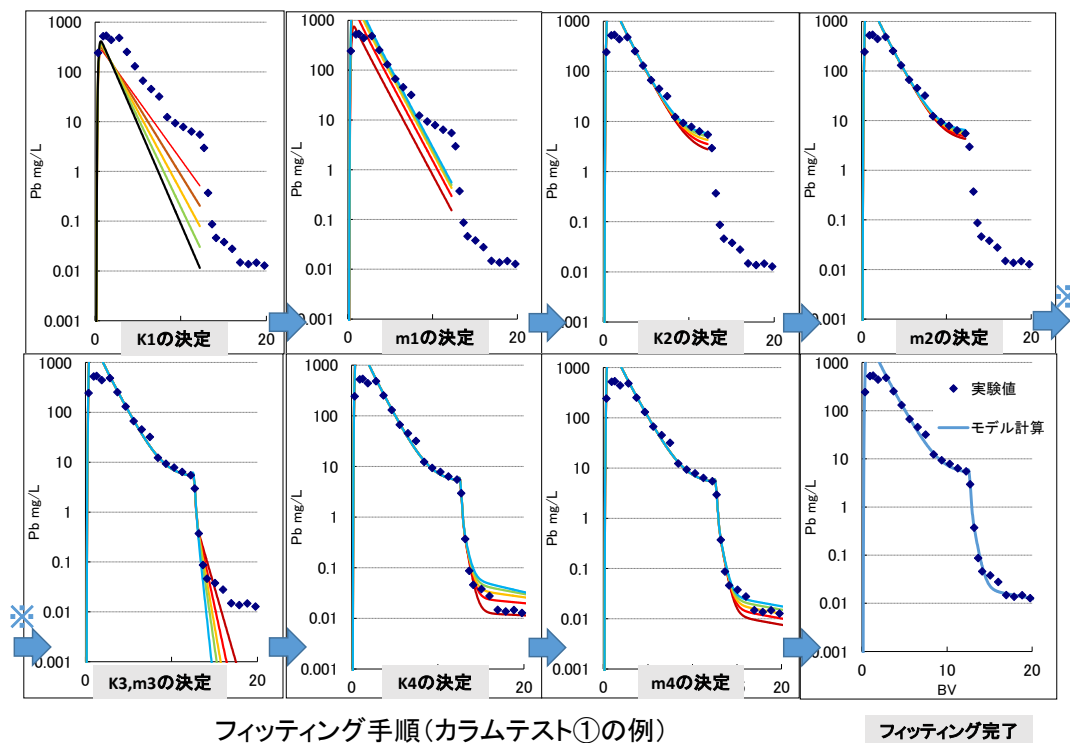
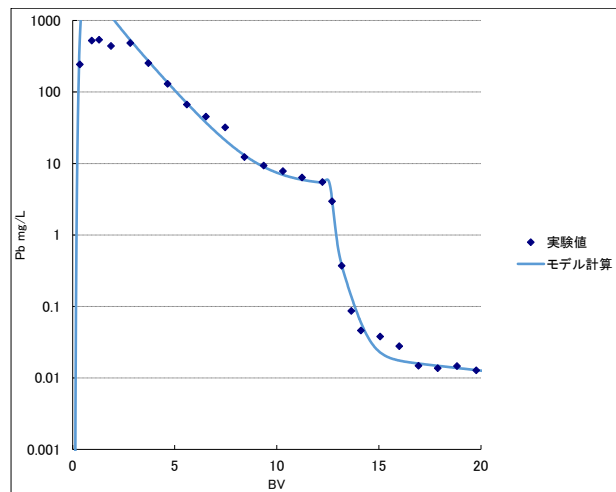
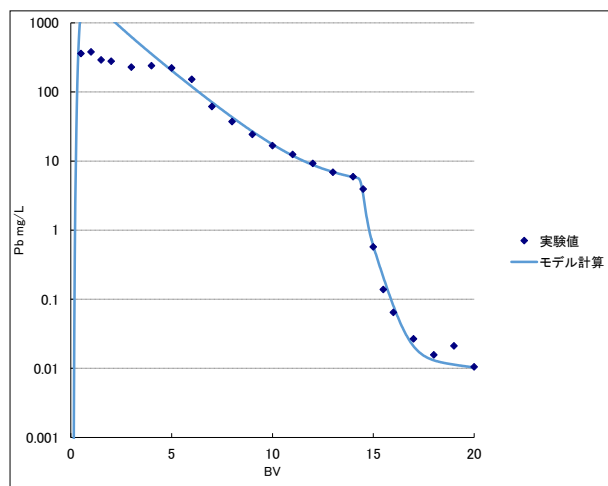


図 3-1-2(2)-24 フィッティング手順（カラムテスト①の例）

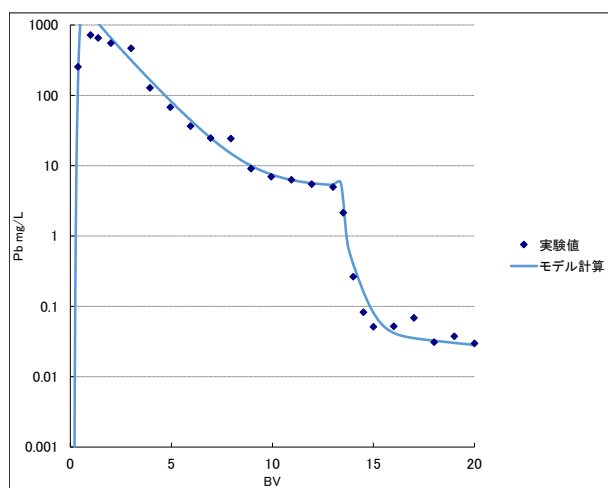
同様に、カラム試験②、③についてもパラメータフィッティングを実施した。得られた数値モデル計算値と、実験実測データの比較を図 3-1-2(2)-25 に示す。いずれもモデル計算値と実験値に良好な一致が得られた。



カラムテスト①の数値モデル化



カラムテスト②の数値モデル化



カラムテスト③の数値モデル化

図 3-1-2(2)-25 モデル計算値と実験値の比較

カラム試験①～③の数値モデル化によって得られたフィッティングパラメータを表 3-1-2(2)-6 に示す。

表 3-1-2(2)-6 カラム試験結果の計算モデル化によるフィッシングパラメーター
覧

カラム試験①		カラム試験①	カラム試験②	カラム試験③
カラム長さ cm		10	10	20
空間速度 BV/day		1	2	1
フィッティング 結果	K1 (× e-6)	8	12.5	8
	K2 (× e-8)	1	2	1
	K3 (× e-5)	2.5	5	2.5
	K4 (× e-7)	8	20	8
	m1	35	35	20
	m2	45	40	45
	m3	0.006	0.006	0.006
	m4	0.0025	0.0015	0.005

② 室内カラム試験フィッティング結果から、地上土槽モデルでの計算パラメータ決定

表 3-1-2(2)-6 より、

- ・ 速度定数 K1～4 は通液速度 BV/day と相関する。
- ・ 関与物量 m1～4 は通液条件によらず一定値である。

との傾向が認められた。したがって、地上土槽の浄化予測計算においては、m1～m4 はカラム試験フィッティングで求められた値を、K1～K4 は図-3-1-2(2)-26 の流れ解析で得られた空間速度(BV/day)に応じて補正された値を用いた。

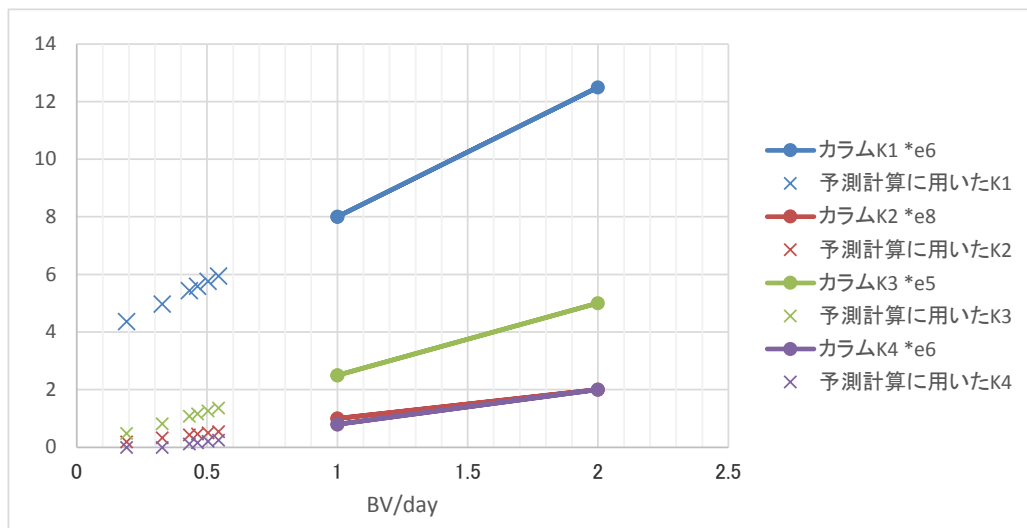


図-3-1-2(2)-26 地上土槽モデルのシミュレーション計算に用いる速度定数の

決定

(2) - 4 地上土槽における流れの三次元解析

一次元解析結果を基に地上土槽試験の飽和不飽和浸透流解析（三次元）を実施した。解析条件を表 7 に示す。

表 3-1-2(2)-7 浸透流解析条件

解析コード	DTRANSU-3D・EL
解析タイプ	浸透流解析のみ(非定常)
節点数	4528
要素数	3945
境界条件	
壁面	不透水面
底面	不透水面
配水管(配水時)	水頭固定点
集水管(集水時)	浸出点

土槽を 16 ブロックに分けた場合の各ブロックの重み平均流速の解析結果を図-3-1-2(2)-27 に示す。

集配水管近傍（ブロック No. 2, 12）と集配水管から離れた位置（ブロック No. 4）で、流速は三倍程度に収まっており、地上土槽内の流速は $1.2 \sim 3.4 \times 10^{-6} \text{m/s}$ となった。各地点での流速のばらつきが小さいことより、本工法で採用した水位を上下させる集配水法は、対象土壤に均一に集配水ができることが確認できた。

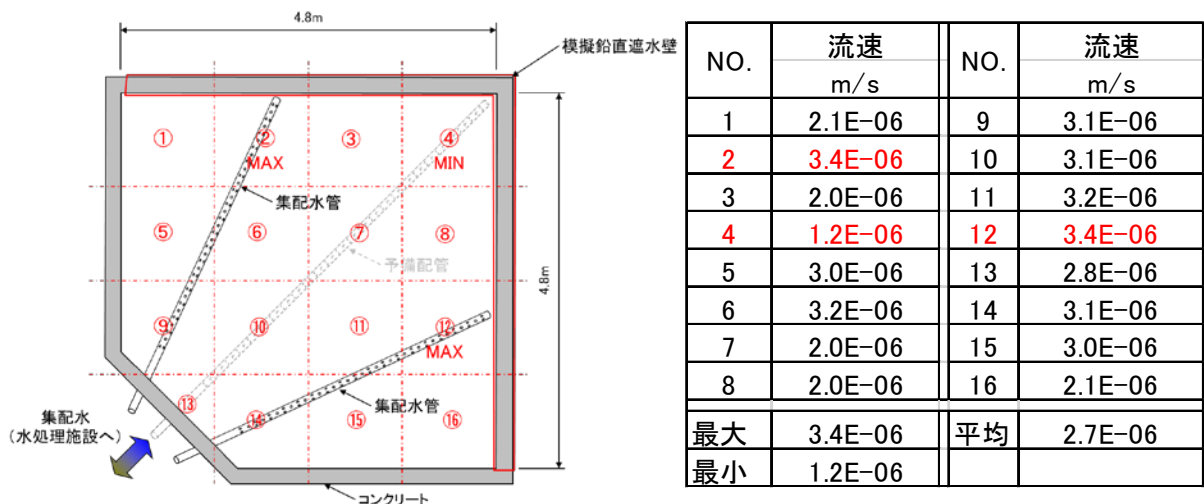


図-3-1-2(2)-27 ブロック分けと解析結果（流速）

(2) - 5 一次元モデルと三次元解析を統合した浄化期間の予測

室内カラム試験のフィッティングで得られた一次元物質移動のパラメータを用いて、(2) - 4 図-3-1-2(2)-27 の地上土槽 16 区画それぞれでの流速、充填密度、土槽高さにおける溶離液濃度を計算し、加重平均値として図-3-1-2(2)-28 の「計算予測値」を導いた。また、参考として図中の緑色破線に最低流速箇所の計算予測値を、黄色破線に最高流速箇所の計算予測値を示している。

図-3-1-2(2)-28 のとおり、浄化完了時期 (BV8~10 の間) において、計算予測値と地上土槽試験結果 (現地データ) は良好に一致した。

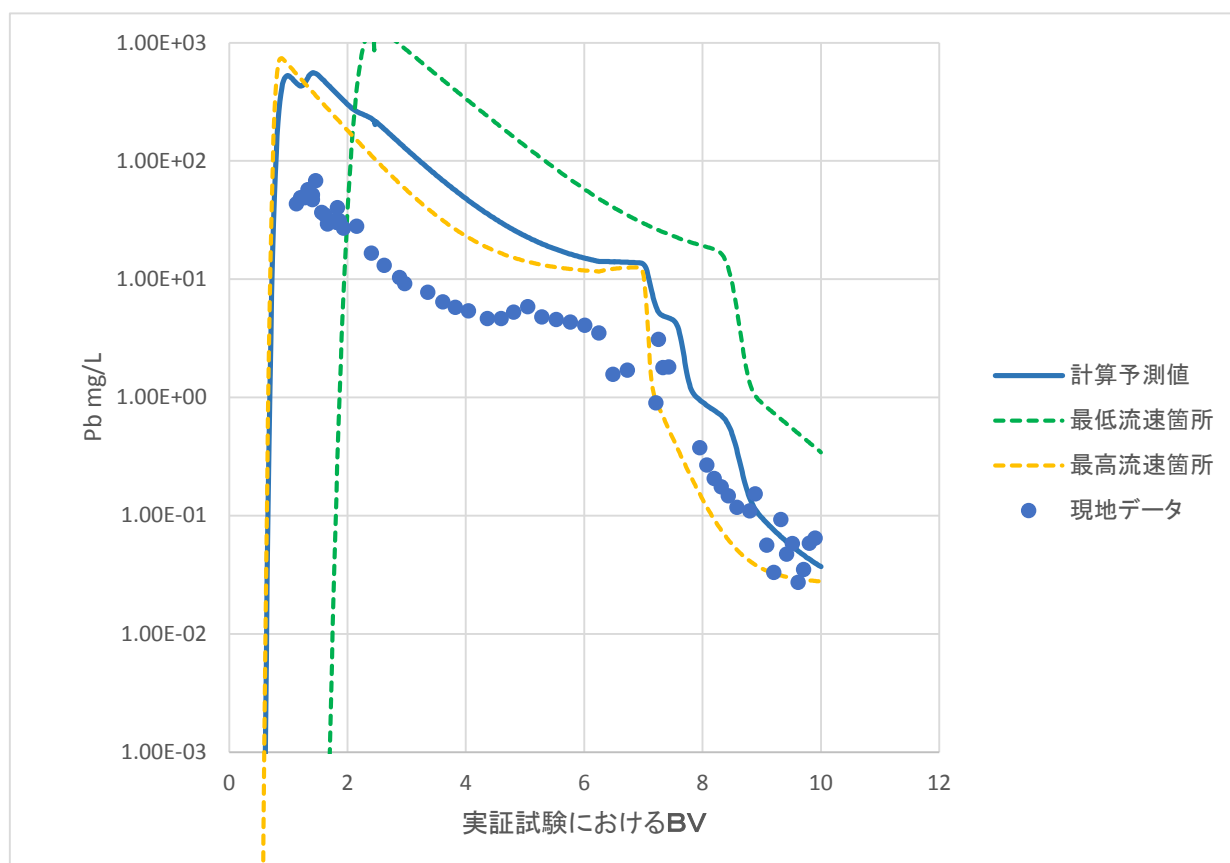


図-3-1-2(2)-28 地上土槽試験のモデル計算値と実測データの比較

(2) - 6 室内カラム試験結果からの現地浄化シミュレーションまとめ

20 日間の室内カラム試験をもとに浄化の一次元モデルを構築し、三次元浸透流解析で求められた実現場の流速等のデータを統合することで、4~5 ヶ月以上かかる土地上土槽試験の浄化パターンを計算モデルにより再現させることができた。

この結果より、室内カラム試験を実施することで原位置浄化の浄化期間を制度よく推定することが可能であると示唆された。

(2)ー7 計算シミュレーションに関する考察と今後の課題

a) 計算結果と地上土槽データの濃度乖離について

図-3-1-2(2)-28 の脱離工程（BV6 まで）に関わる部分で、鉛濃度の計算値と実測値に乖離が見られた。これは、室内カラム試験に用いた土壌の鉛含有量が地上土槽試験の平均値に対して高かったことに起因する。

表 3-1-2(2)-8 サンプルング方法と分析値のまとめ

名称		サンプリング	分析対象	分析値 mg/kg	
実証土槽	元土壌	ランダム5点混合1検体	-2mm	460	
	浄化後土壌	3点混合36検体	-2mm	288	240
		混合試料 上中下の3検体	+2mm	163	
		溶離物量	溶離液濃度の日々分析	全粒群	3.94(kg)
カラムテスト	元土壌	-5mmから1検体分取	-5mm	3,000	
	浄化後土壌	カラム解体して攪拌混合	-5mm	1,010	
	溶離物量	溶離液濃度の日々分析	-5mm	225(mg)	

複数検体の分析値は算術平均値

表 3-1-2(2)-8 に本試験でおこなった土壌の分析値をまとめた。地上土槽の物量バランスを計算するにあたっては元土壌分析値 460mg/kg を用いずに浄化後土壌の分析値から逆算したことは(1)-10 a) で述べたとおりである。

カラムテストに用いた土壌は、表表 3-1-2(2)-8 のとおり地上土槽の分析値に較べて高濃度であった。これは、(2)-3 ③での m1～m4 の変化となって計算結果の乖離の原因となった。

仮に、カラム試験土壌が低濃度であったと仮定すると、シミュレーション結果は図-3-1-2(2)-29 のとおり地上土槽試験データ（現地データ）と良好に一致する。

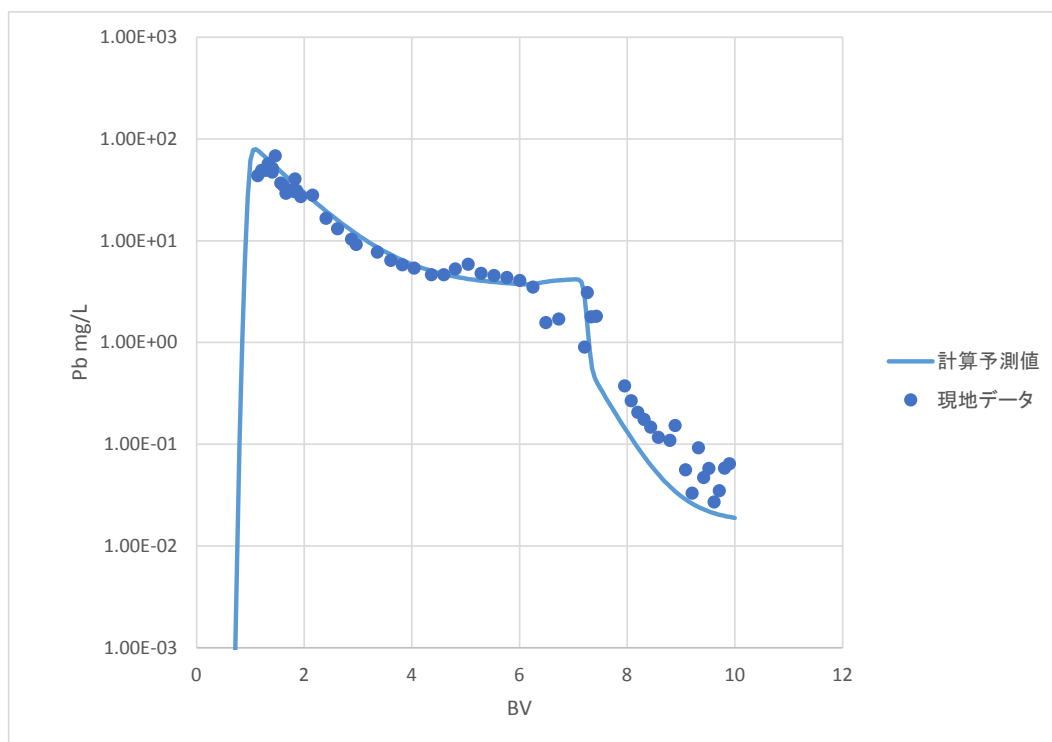


図-3-1-2(2)-29 カラム試験土壤が低濃度であったと仮定した場合の計算結果（参考）

b) 速度定数の推定精度について

今回の予測計算では、図-3-1-2(2)-26 のとおり空間速度の一次関数として現地サイズでの速度定数を推測した。しかしながら、推測の根拠となるラボ試験データは 2 点のみであるため、実モデルでの速度定数推定の精度は低いと言わざるを得ない。

今後は実績を積み重ね、速度定数の推定精度を向上させたい。

(B) 実証試験結果のまとめ

残念ながらプロジェクト期間中に実施できる汚染サイト見つからなかったこともあり、実サイトでの実証試験は実施できなかった。その代わり慎重に計画して実施した実鉛汚染土に対する地上試験土槽による実証試験結果は、本文で結果概要を述べたごとく、洗浄後の土壤サンプル 36 カ所中の 1 か所以外は全て溶出基準値以下であった。その一カ所も、土壤性状が他部に比して透水係数が極めて低く、循環水が浸透しえなかったことに起因している（現実的にこのような箇所からの溶出はありえないもの）と判断された。

その結果、遮水壁を除く本技術を構成する要素技術は、配水循環処理システム、重金属等の土壤からの脱着法、土壤から脱着した重金属等の吸着処理システム、原位置モニタリング技術は、それぞれその有効性が確認・検証された。また、遮水壁も別途実土壤中での実証試験を通じてその性能は確認済であることから、本システム全体の有効性が検証できたと考えている。

今回の実証試験は、溶出量、含有量とも極めて大きい鉛汚染土ということもあり、チオ硫酸を脱着に使う特別な手法を用いたが、その他の汚染土の場合は基本的に水のみで脱着することができ、吸着処理も全ての重金属を処理できるノウハウを保有しているので、より容易なものと判断される。

さらに、3個の室内カラムテスト結果から、チオ硫酸を使用する複雑な洗浄プロセス全体をシミュレートすることができる手法も開発できたので、精度向上を今後さらに図る必要があるものの、実案件に対し洗浄に要する期間と費用の目途が事前につけられるようになった。(水だけで処理できる場合のシミュレーションは、より容易なものとなる)

以上の結果、次ページの表に取りまとめたごとく掘削除去の1/2以下のコストで処理できることは無論のこと、技術的には所期の目的はほとんど達成でき、メドが付いたと考えており、原位置浄化の案件があれば、掘削除去方式より安いコストで、即対応可能と言えるまでになっている。(汚染深度が深ければ深いほど、掘削除去に対し有利となる)

しかしながら、まだ原位置浄化手法そのものに対する認知度が低く、今回のような大規模な地上土槽による実証試験成果をPRすること等により、認知度の向上に地道に努めることが、開発成果を埋没させないためにも肝要と考えている。

コストシミュレーション (20m×20m、鉛)

在来法(掘削除去)		新規土壌修復法 (単位:円/改良 m^3) (実際の汚染層厚が4mの場合)		
		深さ(汚染層厚)	3(2)m	5(4)m 10(9/4)m
準備・仮設	3,400	ラジアルウェル	37,500	24,100 13,200/ 29,700
+			+	
処分場費	60,000	遮水壁	5,400	4,900 4,500/ 10,100
+	従前は、掘削除去として30,000を計上していたが、受入費用を+30,000とした。		+	
埋戻し	14,000	洗浄	10,900	8,800 7,000/ 12,200
+			+	
山留等	5,400	モニタリング	1,600	1,200 800/ 1,900
+	従前は、現場管理費等の4,200円を管理費に含めていたが、比較の観点からここに計上。		+	
管理費	5,300	管理費	5,600	3,900 2,600/ 5,700
合計	88,100	合計	61,000	42,900 28,100/ 59,600
		掘削除去との比較のケース		
		(108,100)・・・深さ10mのケースの山留+α込の概算値		

コストシミュレーション概略内訳

不透水層深度	3m		5m		10m			
汚染層厚	2m (千円)	/m3 (円)	4m (千円)	/m3 (円)	9m (千円)	/m3 (円)	4m (千円)	/m3 (円)
ラジアルウェル	30,000	37,500	38,500	24,100	47,500	13,200	47,500	29,700
遮水壁	4,290	5,400	7,900	4,900	16,230	4,500	16,230	10,100
洗浄(調査)	500	600	500	300	500	100	500	300
(設備)	3,000	3,700	3,000	1,900	3,000	800	3,000	1,900
(脱着) 〈内、チオ硫酸費〉	2,860 〈1,850〉	3,600 〈2,318〉	5,990 〈3,710〉	3,800 〈2,318〉	12,770 〈8,340〉	3,600 〈2,318〉	8,120 〈3,700〉	5,100 〈2,318〉
(洗浄)	1,660	2,100	3,520	2,200	7,050	2,000	6,020	3,800
(カラム他)	700	900	1,100	700	1,800	500	1,800	1,100
モニタリング	1,300	1,600	1,900	1,200	3,000	800	3,000	1,900
管理費	4,440	5,600	6,250	3,900	9,190	2,600	9,190	5,700
合計 (汚染土壌量)	48,750 (800 m3)	61,000	68,660 (1,600 m3)	42,900	101,040 (3,600 m3)	28,100	95,360 (1,600 m3)	59,600

3-1-2 (3) 低コスト原位置電気修復技術の研究開発

① 電気修復法における汚染物質の浄化効率の向上と最適条件の確立

i) 模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化

(a) 目的

六価クロム、鉛を対象汚染物質とし、わが国の代表的な土壌（砂、マサ土、笠岡粘土、ローム）に吸着させた模擬汚染土壌を用いての浄化実験により、土壌 pH、電解液 EC をパラメータとして浄化効率に対する影響の評価検討を行った。この評価は、含有量基準値 3 倍の汚染土壌を対象として、最終目標値である電力消費量 1,500kWh/m³使用時の浄化効率を判断基準として実施した。

(b) 成果

1) 浄化試験用土壌の物性・組成分析

浄化試験で使用する 4 種の土壌（図 1-1）の物性及び組成を確認した。

a) 砂：粒径 0.2～0.4 mm に分級、水洗浄した天然砂

b) マサ土：京都府亀岡市より入手し、乾燥、団粒粉碎後 2 mm 以下に分級した実土壌

c) ローム：埼玉県朝霞市より入手し、乾燥、団粒粉碎後 2 mm 以下に分級した実土壌

d) 笠岡粘土：岡山県笠岡市で産出したモンモリロナイト及びカオリナイト系の混合鉱物



図-3-1-2(3)-1. 浄化試験用土壌写真（乾燥後）

1-1) 粒度分布測定

土壌試料を溶媒（ヘキサリン酸ナトリウム溶液 0.2wt%）に加え、分散処理したものを試料液とし、レーザー回折式分布測定装置（島津製作所製、SALD-3100 又は SALD2000）を用いて粒度分布を測定した（図 3-1-2(3)-2～3-1-2(3)-5）。砂、笠岡粘土についてはそれぞれ $200\sim 500\mu\text{m}$ 、 $0.5\sim 50\mu\text{m}$ で比較的シャープな粒度分布を、マサ土、ロームについてはそれぞれ $0.5\sim 1000\mu\text{m}$ 、 $0.2\sim 100\mu\text{m}$ でブロードな粒度分布をもつことが分かる。

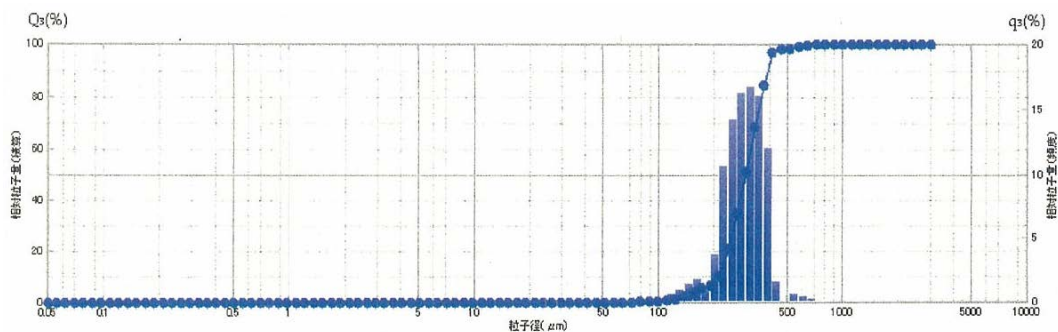


図-3-1-2(3)-2. 砂の粒度分布

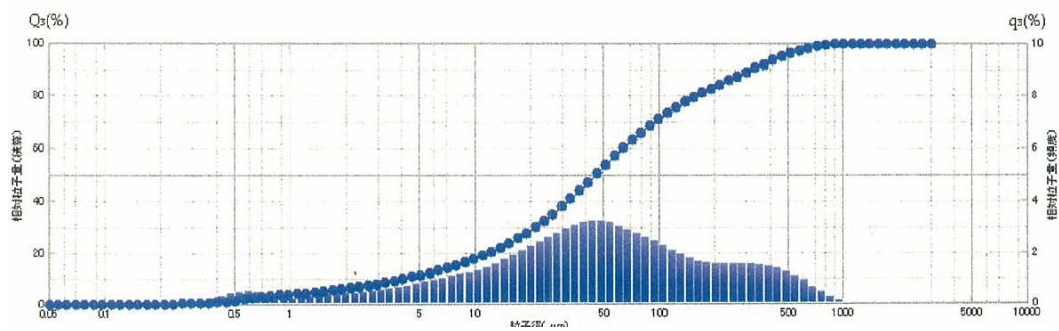


図-3-1-2(3)-3. マサ土の粒度分布

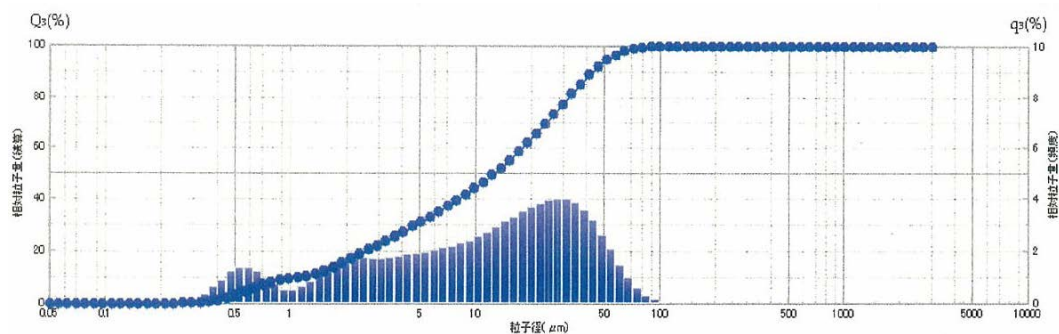


図-3-1-2(3)-4. ロームの粒度分布

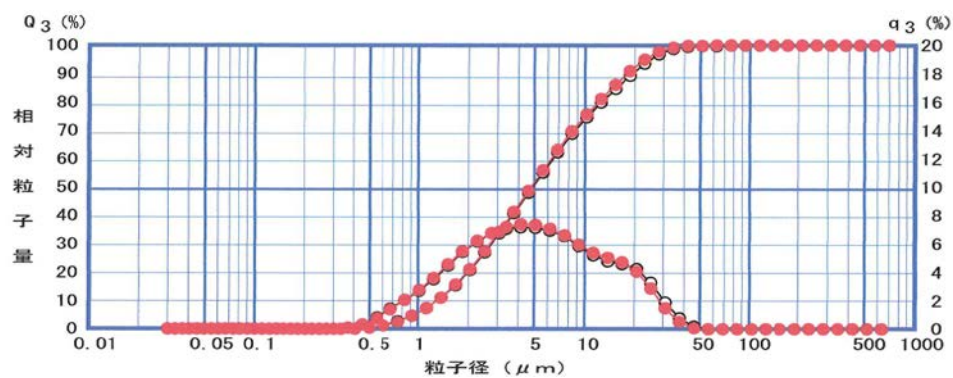


図-3-1-2(3)-5. 笠岡粘土の粒度分布

1-2) X線回折

4種の土壌試料についてX線回折装置（島津製作所製、XRD-6100）を用いて、鉱物の同定分析（表 3-1-2(3)-1）を行った。

表 3-1-2(3)-1. 浄化試験用土壌の鉱物同定結果

土壌	構成物質	ICDDカード No.
砂	石英	SiO ₂
	アルバイト	Na(Si ₃ Al)O ₈
マサ土	石英	SiO ₂
	ハロサイト-7A	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
	モンモリロナイト-15A	NaO ₃ (Al,Mg) ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂ ·4H ₂ O
	ハロサイト-10A	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄ ·2H ₂ O
	アルバイト	Na(Si ₃ Al)O ₈
ローム	石英	SiO ₂
	ハロサイト-7A	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄
	アノーサイト	CaAl ₂ Si ₂ O ₈
笠岡粘土	石英	SiO ₂
	モンモリロナイト	(Na,Ca) _{0.33} (Al,Mg) ₂ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂ ·nH ₂ O
	サナディン(長石類)	K(Si ₃ Al)O ₈
	ハロサイト-7A	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄

1-3) 蛍光 X 線分析

土壌試料を、エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置（島津製作所製、EDX-720）を用いて、定性及びFP法による半定量分析（11Na～92U）を行った。（図-3-1-2(3)-6）構造が比較的単純なカオリナイトに比べて、各土壌の主要 7 元素（Fe, Ca, K, Si, Al, Mg, Na）について構成比に大きな差があることが確認された。

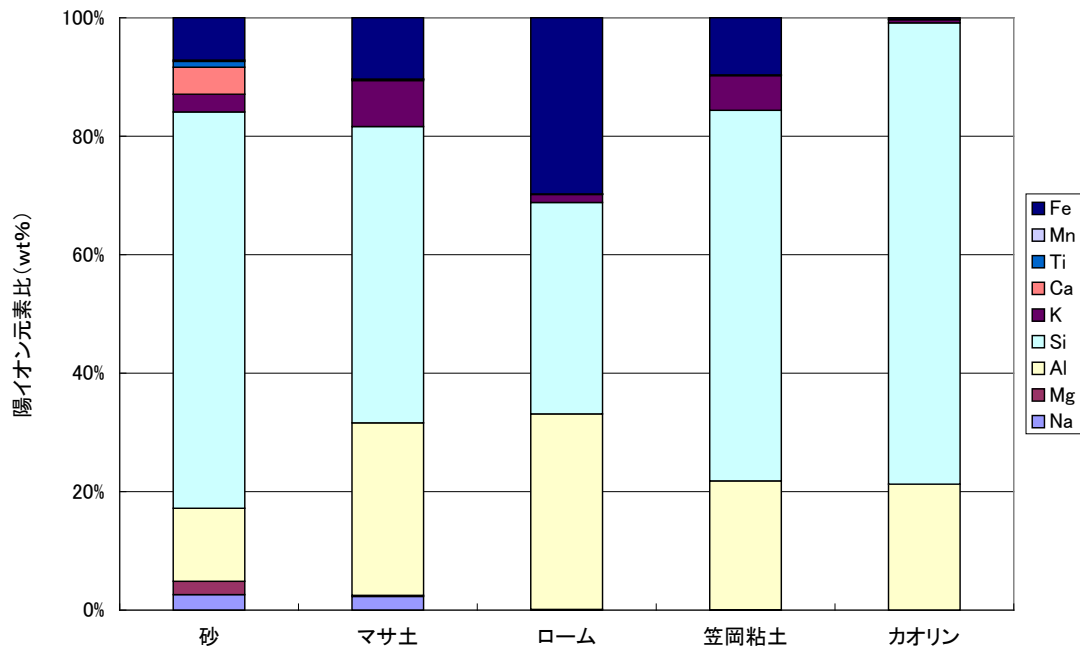


図-3-1-2(3)-6. 各土壌の陽イオン元素比率

1-4) 土壌 pH 測定

土壌を pH7.0 に調整した脱イオン水 50ml を加えて、15 分毎に振り混ぜ、1 時間後に pH を測定した。（表 1-2）砂は中性、マサ土、ロームは僅かに酸性、笠岡粘土は僅かにアルカリ性であることを確認した。

表 3-1-2(3)-2. 浄化試験用土壌の土壌 pH 測定結果

	pH
砂	6.9
マサ土	5.5
ローム	5.8
笠岡粘土	8.2

1-5) 含有試験、溶出試験

乾燥・分級 (<2mm) した土壌を下記①～③の方法で検液を調製し、ICP 分析により検液中のイオン濃度を測定した。分析対象とするイオンは Cr 及び土壌中の存在比が高い Mg, Ca, Al, Fe, Si を選択した。

ロームの 1mol/L 塩酸抽出検液で僅かな Cr を検出したが、全ての土壌が土対法上清浄な土壌であることを確認した。(表 3-1-2(3)-3)

a) 溶出試験検液調整 (公定法準拠)

乾燥土壌 15g に脱イオン水 (pH6.73) 150ml を加え、振とう後、上澄み液を遠心分離、ろ過して検液を調製

b) 含有試験検液調整 (公定法準拠)

乾燥土壌 3g に溶媒 (炭酸ナトリウム/炭酸水素ナトリウム混合液) を 100ml 加え振とう後、上澄み液を遠心分離、ろ過して検液を調製

c) 1mol/L 塩酸抽出検液調整

乾燥土壌 3g に 1mol/L-HCl 100ml を加え振とう後、上澄み液を遠心分離、ろ過して、検液を調製

表 3-1-2(3)-3. 浄化試験用土壌の含有、溶出、1mol/L 塩酸抽出分析結果

		溶出量(mg/L-検液) 含有量(mg/kg-土壌)					
		Cr	Mg	Al	Si	Fe	Ca
溶出試験	砂	0.0	0.7	0.9	3.6	1.1	2.5
	マサ土	0.0	0.0	0.4	3.8	0.2	0.2
	ローム	0.0	7.7	0.0	6.8	0.0	0.0
	笠岡粘土	0.0	0.9	0.3	12	0.2	24
含有試験	砂	0.0	11	34	36	16	76
	マサ土	0.0	4.6	27	36	6.2	92
	ローム	0.0	7.0	4.8	60	0.4	42
	笠岡粘土	0.0	6.0	26	273	20	38
1mol/L 塩酸抽出	砂	0.0	138	712	383	759	309
	マサ土	0.0	474	1855	895	1921	2415
	ローム	1.0	949	77973	31594	24537	2085
	笠岡粘土	0.0	519	897	1131	685	5969

1-6) 土壌への汚染物質吸着量検討

各土壌への六価クロムイオンの吸着量を調査し、目標濃度 (750mg/kg) 以上の汚染土壌の調製が可能な条件を確認することを目的として検討を行った。

乾燥土壌 20g を 250ml-ポリエチレン容器に取り、脱イオン水 80ml、1000mg-Cr⁶⁺/L 溶液 (クロム酸カリウム (K₂CrO₄) 及び重クロム酸カリウム (K₂Cr₂O₇) より調整) 20ml を加え 6h 振とう後、上澄み液を遠心分離 (3000rpm 30min)、0.45 μm メンブランフィルターでろ過し、検液を調製し、ICP で検液の Cr 濃度を測定した。(表 3-1-2(3)-4) Cr 吸着量は添加した Cr 量から上澄み液中の Cr 量を差し引き算出した。

表 3-1-2(3)-4. 六価クロム吸着量測定結果

汚染物質	土壌	Cr吸着量	検液濃度(mg/L)				
		mg/kg	Mg	Al	Si	Fe	Ca
K ₂ Cr ₂ O ₇	砂	18	0.5	0.1	0.7	0.0	2.0
	マサ土	36	0.4	0.0	0.8	0.0	4.2
	ローム	865	2.7	0.0	0.7	0.0	24
	笠岡粘土	0	0.8	0.1	1.7	0.0	17
K ₂ CrO ₄	砂	0	0.4	0.0	0.2	0.0	2.1
	マサ土	30	0.4	0.0	0.3	0.0	6.4
	ローム	811	0.9	0.0	0.7	0.0	6.3
	笠岡粘土	0	0.4	0.0	1.1	0.0	12

上澄みを除去した土壌を乾燥・分級 (<2mm) し、前述と同様の方法で含有試験検液を調製し、ICP 分析により検液中のイオン濃度を測定し、Cr 含有量を算出した。(表 3-1-2(3)-5) 六価クロムは砂、マサ土、笠岡粘土での吸着は弱い、ロームには極めて強く吸着することが示唆された。

表 3-1-2(3)-5. 六価クロム吸着試験土壌の含有試験結果

汚染物質	土壌	Cr含有量	検液濃度(mg/L)				
		mg/kg	Mg	Al	Si	Fe	Ca
K ₂ Cr ₂ O ₇	砂	823	0.1	0.9	0.8	0.3	1.1
	マサ土	694	0.1	1.0	1.1	0.2	0.9
	ローム	241	0.1	0.1	1.3	0.0	0.8
	笠岡粘土	863	0.4	9.4	18	3.6	0.7
K ₂ CrO ₄	砂	756	0.1	0.5	0.5	0.3	1.2
	マサ土	665	0.1	0.6	0.7	0.1	1.1
	ローム	225	0.1	0.2	1.0	0.0	0.7
	笠岡粘土	852	0.1	0.8	4.2	0.4	0.6

2) 六価クロム汚染土壌調製法検討

吸着量検討結果をもとに、浄化試験に使用する目標 Cr 含有量 750mg/kg（基準値 250mg/kg の 3 倍相当）の六価クロム汚染土壌を調製するために、種々の濃度の六価クロム（クロム酸カリウム又は二クロム酸カリウム、ナカライテスク）を添加した汚染土壌について公定法（溶出試験、含有試験）検液及び 1mol/L 塩酸抽出液の Cr 量を ICP 分析により測定した。（表 3-1-2(3)-6、図 3-1-2(3)-7）汚染土壌の調製は、触媒調製法として知られている含浸法を参考にして行った。本法では、磁製皿に採取した所定量の乾燥土壌（<2mm）に、10g/L Cr 溶液を加え、風乾後マイクロウェーブで恒量に達するまで乾燥、粉碎して調製した。

この結果から、砂、笠岡粘土については 1000mg/kg 相当量、マサ土は 1100mg/kg 相当量、ロームは 2500mg/kg 相当量の Cr を土壌に添加することで調製した土壌を浄化試験に使用することとした。なお、ロームについては Cr 1000mg/kg 相当量を添加した土壌も合わせて調製し、浄化試験に用いることとした。

表 3-1-2(3)-6. 模擬汚染土壌の含有、溶出、1mol/L 塩酸抽出分析結果

溶出試験	K ₂ CrO ₄ 添加量(mg/kg)			
	700	1000	1100	2000
砂		80.7		
マサ土	60.2	69.8	100.5	
ローム		4.6		22.1
笠岡粘土		87.9		

含有試験	K ₂ CrO ₄ 添加量(mg/kg)			
	700	1000	1100	2000
砂		756		
マサ土	611	665	901	
ローム		225		697
笠岡粘土		852		

1mol/L 塩酸抽出	K ₂ CrO ₄ 添加量(mg/kg)			
	700	1000	1100	2000
砂		863		
マサ土	665	874	1025	
ローム		615		1531
笠岡粘土		910		

溶出試験	K ₂ Cr ₂ O ₇ 添加量(mg/kg)		
	1000	1200	2000
砂	80.9		
マサ土	68.4	117.4	
ローム	2.1		17
笠岡粘土	83.2		

含有試験	K ₂ Cr ₂ O ₇ 添加量(mg/kg)		
	1000	1200	2000
砂	823		
マサ土	694	1011	
ローム	241		693
笠岡粘土	863		

1mol/L 塩酸抽出	K ₂ Cr ₂ O ₇ 添加量(mg/kg)		
	1000	1200	2000
砂	884		
マサ土	945	1104	
ローム	625		1484
笠岡粘土	877		

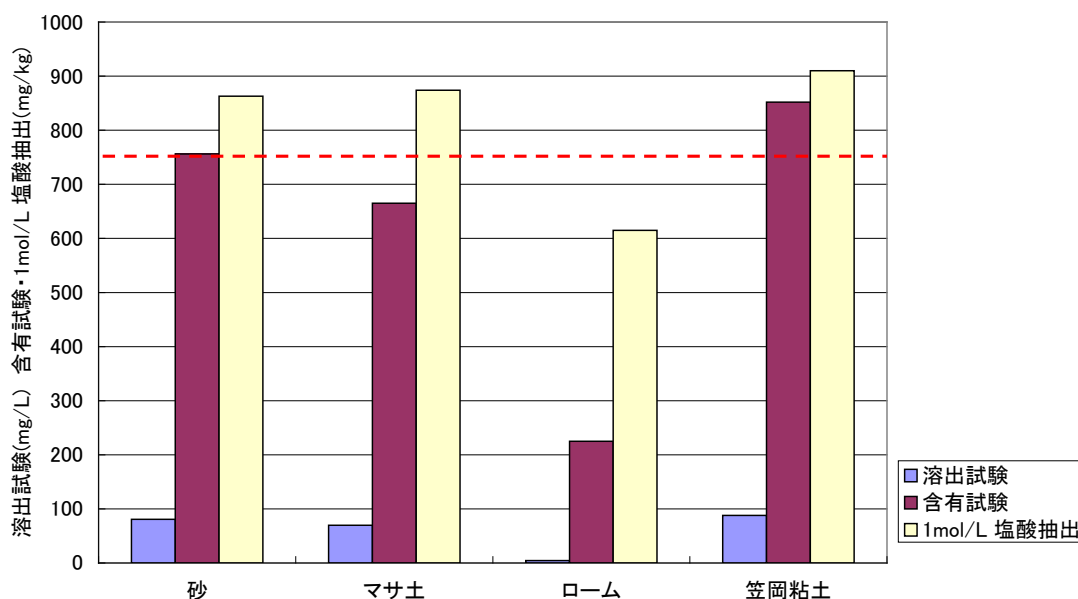


図 3-1-2(3)-7. クロム酸カリウム 1000mg/kg 相当添加模擬汚染土壌の分析結果

3) 鉛汚染土壌調製法検討

前記 4 種の土壌を用いて公定法に準拠した方法で含有試験、溶出試験検液を調製し、検液中のイオン濃度を測定した。4 種の土壌で鉛は検出されず、清浄な土壌であることを確認した。

各土壌への鉛イオンの吸着量を調査し、目標濃度 (450mg/kg) 以上の汚染土壌の調製が可能な条件を確認することを目的として検討を行った。

乾燥土壌に 500mg/kg 相当濃度の硝酸鉛溶液を加え振とう後、上澄み液を遠心分離、ろ過し、上澄み液の鉛濃度を測定した。鉛吸着量は添加した鉛量から上澄み液中の鉛量を差し引き算出した。また、上澄みを除去した土壌から含有試験検液を調製し、検液中の鉛含有量を算出した。(図 3-1-2(3)-8) 鉛は砂、笠岡粘土での吸着は比較的弱い、マサ土、ロームには強く吸着することが示唆された。更にマサ土、ロームについては 550mg/kg 相当濃度の鉛を添加した汚染土壌について含有試験検液の鉛量を測定した結果 (表 3-1-2(3)-7) から、砂、笠岡粘土については 500mg/kg 相当量、マサ土は 525mg/kg 相当量、ロームは 550mg/kg 相当量の鉛を土壌に添加することで調製した土壌を浄化試験に使用することとした。また、各土壌から調製した鉛汚染土壌を pH の異なる硝酸溶液中で鉛の溶出量を検討した結果 (図 3-1-2(3)-9)、鉛が溶出する pH から浄化試験条件を決定した。

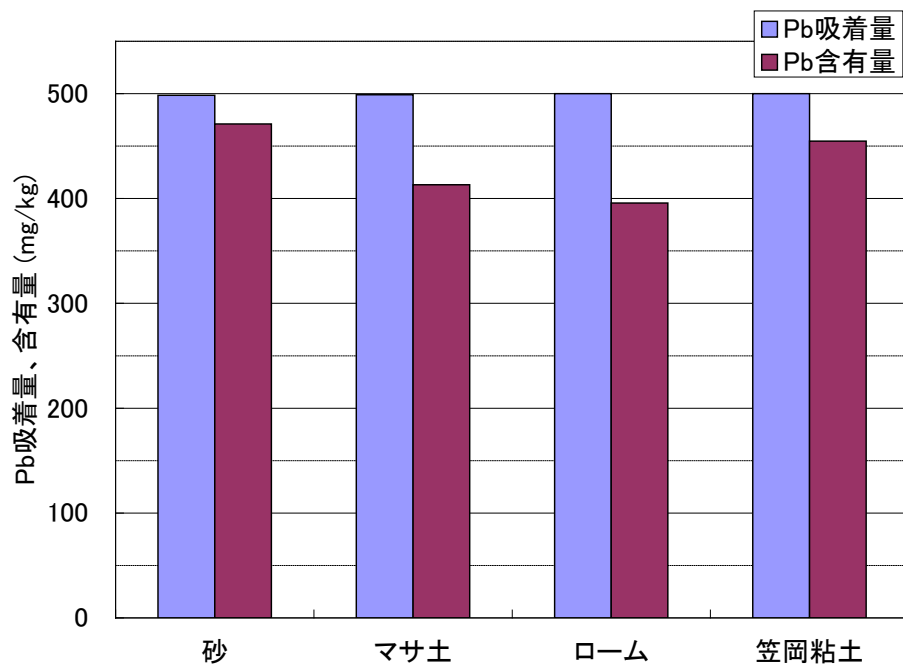


図 3-1-2(3)-8. 鉛 500mg/kg 相当添加模擬汚染土壌の鉛吸着量

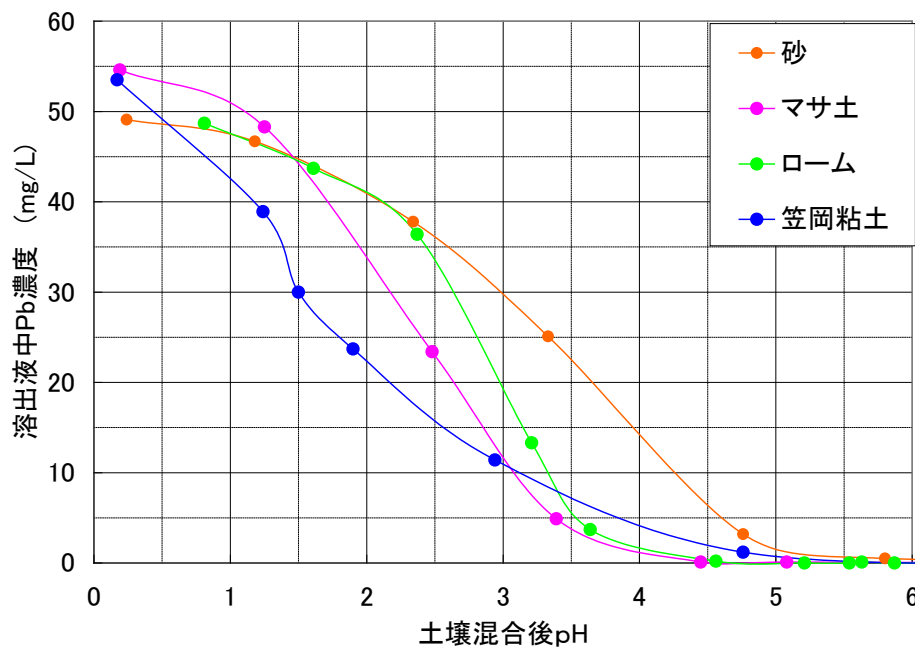


図 3-1-2(3)-9. 鉛模擬汚染土壌の鉛溶出への pH の影響

表 3-1-2(3)-7. 鉛模擬汚染土壌の含有量分析結果

含有試験	Pb添加濃度(mg/kg)	
	500	550
砂	471	—
マサ土	413	540
ローム朝	396	486
笠岡粘土	455	—

4) 浄化試験方法

六価クロム汚染土壌は、クロム酸カリウム (K_2CrO_4) を脱イオン水に溶解し、土壌に添加・混合・乾燥して調製した。電解液は硝酸ナトリウム ($NaNO_3$) を脱イオン水に溶解し、硝酸ナトリウム濃度 0.1 mol/L の溶液を調製し、適時硝酸 (HNO_3)、水酸化ナトリウム溶液 ($NaOH$) を加えて pH を調整した。

使用した土壌浄化システムを図 3-1-2(3)-10 に示す。浄化試験に使用した透明アクリル製浄化試験キット (図 3-1-2(3)-11) は、中央に土壌槽、両端に電極を挿入する電解液槽を有する。アノード電極は金属酸化物をコーティングしたチタン製、カソード電極はステンレス製の板状の電極を使用した。土壌試料の漏出するのを防ぐため、土壌槽と電解液槽の間はメンブランフィルターで仕切った。

各土壌はマイクロウェーブで恒量に達するまで乾燥し、浄化キットの土壌槽に充填した。脱イオン水を電解液槽に投入、土壌を湿潤させたのち、電解液で置換した。両極とも電解液を電解液タンクに投入し、マイクロチューブポンプで電解液槽に送液し、オーバーフローした電解液は電解液タンクに排出・循環した。電解液槽内はスターラーで常時攪拌し、電解液 pH は試作 pH 調整器を用いて測定し、所定の pH を保持するようにアノード電解液には水酸化ナトリウム溶液、カソード電解液には硝酸溶液を滴下し調整した。

浄化試験は、定電圧直流電源を用いて両電極間に所定の電圧を印加して行った。電極間電圧、電流はデータレコーダを取り付け、電流値の変化を監視した。浄化の進行状況については、電解液槽からは適時電解液を採取し、ICP 発光分析装置 (島津製作所製、ICPS-7510) で汚染物質濃度を測定し確認した。

通電終了後の土壌は土壌層より取り出し、3～5 等分に分割して採取、乾燥後、環境庁告示第四十六号、環境省告示第十九号に準拠した方法で含有検液、溶出検液を調製し、ICP で検液中の汚染物質濃度を測定した。土壌 pH は溶出液検液の pH を測定し、試験終了時の土壌部の pH 分布を求めた。

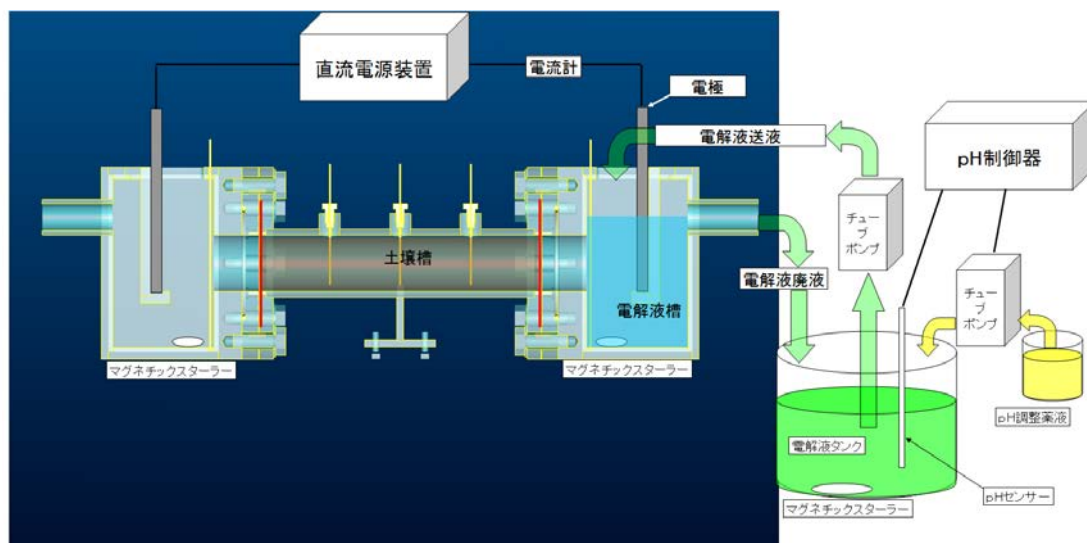


図 3-1-2(3)-10. 土壌浄化システム概想図

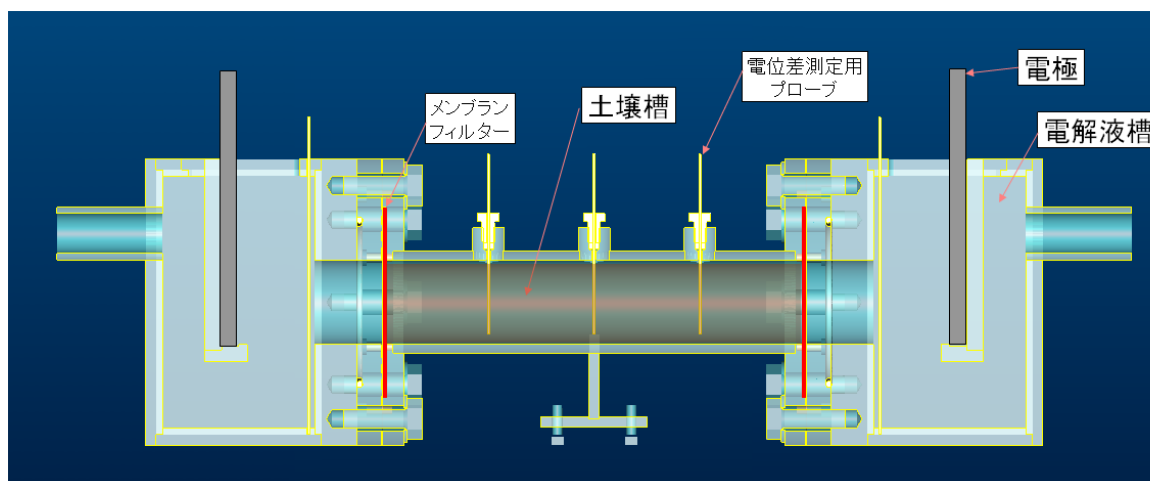


図 3-1-2(3)-11. 浄化試験キット概想図

5) 六価クロム汚染土壌浄化試験結果

六価クロムを対象汚染物質とし、土壌汚染対策法の含有量基準値の3倍の汚染濃度に調製された、4種類の模擬汚染土壌について、浄化試験を実施した。浄化に必要な電力消費量の目標値を $1,500\text{kWh}/\text{m}^3$ とし、浄化試験によって土壌 pH、電解液 EC の最適化を図った。結果として、砂については酸性～中性、マサ土では中性、笠岡粘土では中性～アルカリ性の電解液を使用した時、目標である $1500\text{kWh}/\text{m}^3$ 以下で、含有量基準値の3倍から基準値以下まで浄化できることを確認した。(表 3-1-2(3)-8) 一方、ロームではいずれの条件でも目標の $1500\text{kWh}/\text{m}^3$ では浄化が困難であった。

表 3-1-2(3)-8. 六価クロム汚染土壌浄化試験結果まとめ

土壌種	電解液	pH	電気伝導度 (mS/cm)	削減率(%)
砂	Anodo	2.0~8.0	9.8~13.6	79~88
	Cathode	2.0~12.0	9.9~13.6	
マサ土	Anodo	8.0	9.8	64~88
	Cathode	6.0~12.0	9.9~10.9	
ローム	Anodo	目標の2250kWh/m ³ では 浄化困難		—
	Cathode			
粘土	Anodo	8.0	9.8	84~86
	Cathode	6.0~12.0	9.9~10.9	

6) 鉛汚染土壌浄化試験結果

6-1) 鉛汚染土壌浄化試験結果

鉛を対象汚染物質とし、土壌汚染対策法の含有量基準値の3倍の汚染濃度に調製された、4種類の模擬汚染土壌（砂・マサ土・粘土・ローム）について、浄化試験を実施した。浄化に必要な電力消費量の目標値を 2,250kWh/m³ とし、浄化試験によって土壌 pH、電解液 EC の最適化を図った。砂、マサ土、笠岡粘土では酸性の電解液を使用した時、目標である 1500kWh/m³ 以下で、含有量基準値の3倍から基準値以下まで浄化できることを確認した。（表 3-1-2(3)-9）一方、ロームでは目標の 1500kWh/m³ では浄化が困難であった。

表 3-1-2(3)-9. 鉛汚染土壌浄化試験結果まとめ

土壌種	電解液	pH	電気伝導度 (mS/cm)	削減率(%)
砂	Anodo	1.5~3.0	0.42~14	82~88
	Cathode	1.5	14	
マサ土	Anodo	1.5~3.0	0.42~14	79~83
	Cathode	1.5	14	
ローム	Anodo	目標の2250kWh/m ³ では 浄化困難		—
	Cathode			
粘土	Anodo	1.5~2.0	4.2~14	43~80
	Cathode	1.5	14	

6-2) ロームと他の土壌の溶出成分比較

各土壌から調製した鉛汚染土壌を pH の異なる硝酸溶液中で鉛の溶出量を比較したが、ロームは他の3種の土壌（砂、マサ土、笠岡粘土）に比べて、Pb の吸着力には大きな相違はないとの結果が得られた。一方、一般に土壌から溶出する量が多い5種のイオン（Ca, Mg, Al, Fe, Si）の溶出量を4種の土壌で比較し

た結果（図 3-1-2(3)-12）、ロームは他の 3 種の土壤に比べ 10 倍程度の溶出が見られた。このことから、ロームは鉛以外の溶出イオンが多いため、それらのイオンの移動に電力が消費され、結果として鉛イオンの移動速度が低下し浄化に多くの電力を必要とすると考えられる。

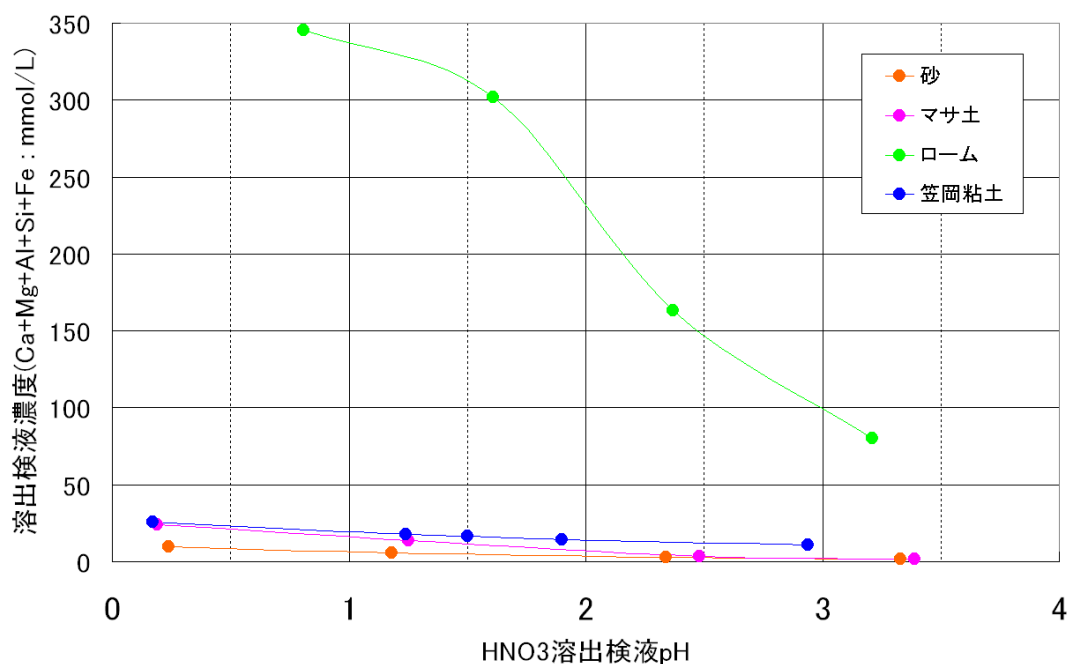


図 3-1-2(3)-12. 陽イオン溶出に対する pH の影響

6-3) 砂-ローム混合土壤での浄化条件結果

乾燥・粉碎・分級した清浄な砂とロームを所定比率で混合後、10g-Pb/L 溶液を所定の量添加したのち乾燥して模擬汚染土壤を調製し、浄化試験キットに充填し、砂で最も浄化に要する電力量が少なかった条件（アノード電解液、カソード電解液とも pH1.5）を使用し、浄化試験を行った。

砂-ローム混合土壤でのローム混合比と浄化に必要な電力量の関係を図 3-1-2(3)-13 に示す。

ロームの混合比が増加するに従い、浄化に必要な電力量は増加し、目標とする 2250kWh/m³ 以下での浄化が可能なローム混合比は 9%以下であった。（図 3-1-2(3)-14）

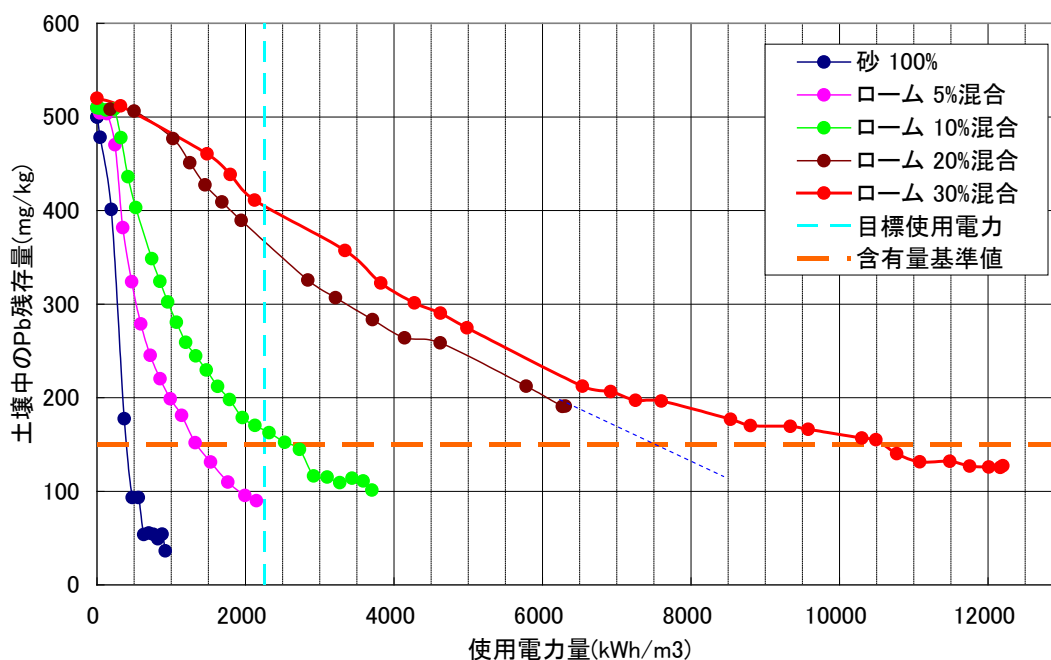


図 3-1-2(3)-13. 砂-ローム混合比による浄化に必要な電力量への影響

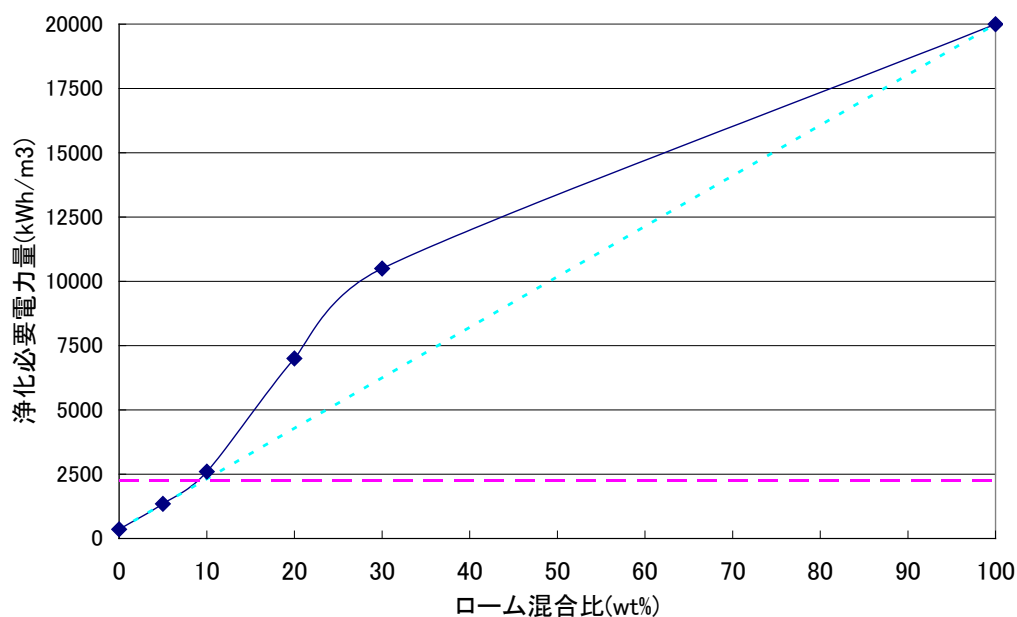


図 3-1-2(3)-14. 砂-ローム混合比対する浄化電力量

ii) 実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化
(a) 目的

六価クロムならびに鉛で汚染された実汚染サイトからサンプリングされた実汚染土壌を用いて前項と同様の浄化試験を実施して、浄化時に単位電力量を最小化する土壌 pH・電解液 EC の最適化を目的とした浄化試験を実施する。本項目

による単位電力量の削減到達目標は 25% ($3,000\text{kWh}/\text{m}^3 \rightarrow 2,250\text{kWh}/\text{m}^3$) とした。

(b) 成果

実験に使用した実汚染土壌は鉛実汚染土壌(粘土混じり砂)、鉛実汚染土壌(マサ土)、鉛実汚染土壌(粘土)、六価クロム実汚染土壌(粘土)である。

鉛汚染土壌についてはカソード電解液を pH1.5 一定に制御し、アノード電解液について pH0~3 の範囲で原則として pH を制御する条件で浄化試験を行った。一部の試験では、アノード電解液 pH 調整を行わず、通電時間の経過とともにアノード電解液の pH が低下する条件(N.C.)での試験も実施した。なお、鉛実汚染土壌(マサ土)、鉛実汚染土壌(粘土)については、鉛含有量が想定値($450\text{mg}/\text{kg}$)より高く、公定法による鉛含有量と鉛全含有量が大きく異なるため、鉛含有量基準値($150\text{mg}/\text{kg}$)以下まで浄化するのに必要な電力量では模擬汚染土壌との比較が困難であると考え、初期含有量から $300\text{mg}/\text{kg}$ 相当の鉛を回収に要した電力量を浄化に必要な電力量と定義し、浄化電力量の評価を行った。

六価クロム汚染土壌については、アノード電解液を pH8.0 一定に制御し、電解液について pH6~12 の範囲で pH を制御する条件で浄化試験を行った。

浄化試験結果を表 3-1-2(3)-2-1~3-1-2(3)-2-4 に示す。アノード電解液の pH が、鉛実汚染土壌(粘土混じり砂)については pH1.5~2.5、鉛実汚染土壌(マサ土)については pH1~2、鉛実汚染土壌(粘土)については pH1 の条件で目標である $2250\text{kWh}/\text{m}^3$ 以下で含有量基準値以下まで浄化できることを確認した。また、六価クロム実汚染土壌についてはカソード電解液 pH6~12 の条件で、目標である $2250\text{kWh}/\text{m}^3$ 以下で含有量基準値以下まで浄化できることを確認した。

表 3-1-2(3)-2-1. 鉛実汚染土壌(粘土混じり砂)の試験結果

	浄化試験条件				浄化必要 電力量 (kWh/m3)	削減率 (%)
	アノード電解液		カソード電解液			
	pH	EC	pH	EC		
試験1	1.5	14	1.5	14	1270	58
試験2	2.0	4.2	1.5	14	2100	30
試験3	2.5	1.4	1.5	14	1550	48
試験4	3.0	0.4	1.5	14	3680	-

表 3-1-2(3)-2-2. 鉛実汚染土壌（マサ土）の試験結果

	浄化試験条件				浄化必要 電力量 (kWh/m3)	削減率 (%)
	アノード電解液		カソード電解液			
	pH	EC	pH	EC		
試験1	1 (N.C.)	38.5	1.5	14	1970	34
試験2	1.5	14	1.5	14	1880	37
試験3	2.0	4.2	1.5	14	2100	30

表 3-1-2(3)-2-3. 鉛実汚染土壌（粘土）の試験結果

	浄化試験条件				浄化必要 電力量 (kWh/m3)	削減率 (%)
	アノード電解液		カソード電解液			
	pH	EC	pH	EC		
試験1	0 (N.C.)	385	1.5	14	2420	19
試験2	1 (N.C.)	38.5	1.5	14	2130	29
試験3	1.5	14	1.5	14	2610	13
試験4	2.0	4.2	1.5	14	2900	3
試験5	2.5	1.4	1.5	14	3410	—
試験6	3.0	0.4	1.5	14	4780	—

表 3-1-2(3)-2-4. 六価クロム実汚染土壌（粘土）の試験結果

	浄化試験条件				浄化必要 電力量 (kWh/m3)	削減率 (%)
	アノード電解液		カソード電解液			
	pH	EC	pH	EC		
試験1	8.0	10	8.0	10	220	93
試験2	8.0	10	12.0	11	460	85
試験3	8.0	10	6.0	10	350	88

iii) 汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価

(a) 目的

電気修復法では、水の電気分解より生成される水素イオンが土壌を酸性化し、汚染物質の溶解度を向上させ、さらに、イオン交換などのプロセスにより、浄化ターゲットとなる重金属イオンを溶脱させ、電場を利用して移動させることが浄化のメカニズム、或いはキープロセスである。このため、酸性電解水による重金属類の溶出特性評価は、電気修復法の適用性検討、浄化条件の設計及び浄化効率の予測などにおいていずれも非常に有用であると考えられる。本研究では、電気修復法のメカニズムを重視し、また浄化設計の知見を整備するために、酸性電解水による重金属類の溶出特性に関する試験研究に実施した。

(b) 成果

本研究で使用した模擬汚染土壌は日本国内産の自然粘土である東江カオリンと硝酸鉛を均一に混合することによって作製した。蛍光 X 線分析を用い、東江カオリンに鉛が元々含有していない、或いは検出限界以下であることを事前に

確認した。(表 3-1-2(3)-3-1) X 線回折分析により、カオリンに含有する主要鉱物は石英とカオリン(1A 及び 1Md)であることが分かった。(図 3-1-2(3)-3-1) また、粒度及び密度分析した結果(図 3-1-2(3)-3-2)、東江カオリンは粘土 25.2%、シルト 70.7%、細砂 3%及び中砂 1.1%であり、密度は 2.628(g/cm³)である。

表 3-1-2(3)-3-1. 東江カオリンの化学的組成(蛍光 X 線分析結果)

組成	S _i O ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	K ₂ O	TiO ₂	MgO	CaO	IgLoss
含有量(%)	61.15	27.89	1.57	0.36	0.54	0.25	0.02	7.54

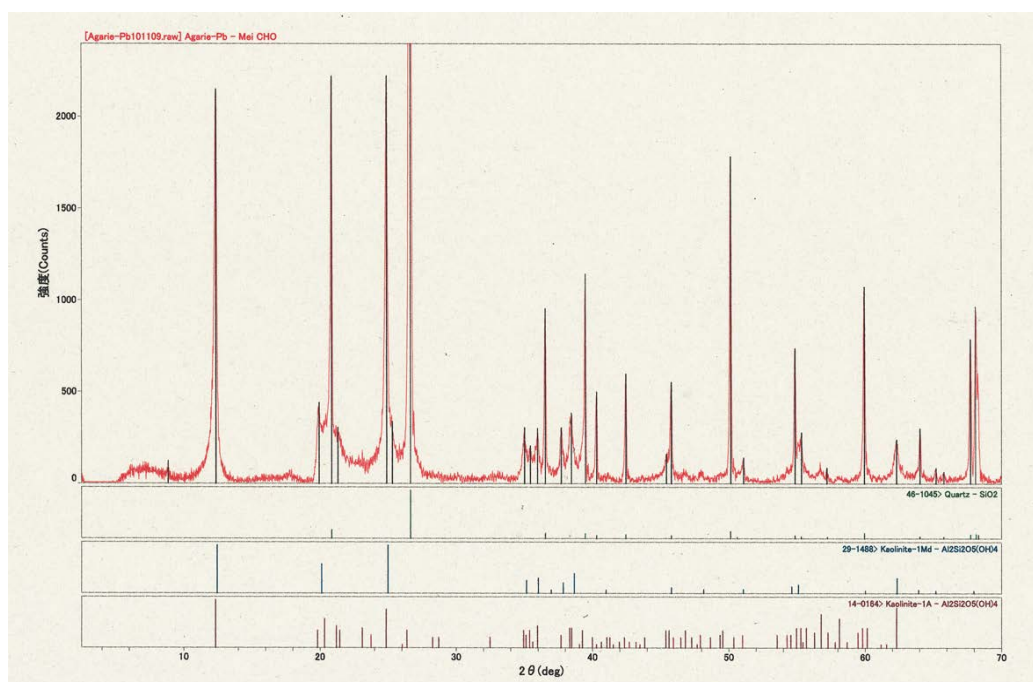


図 3-1-2(3)-3-1. 東江カオリンの X 線回折分析結果

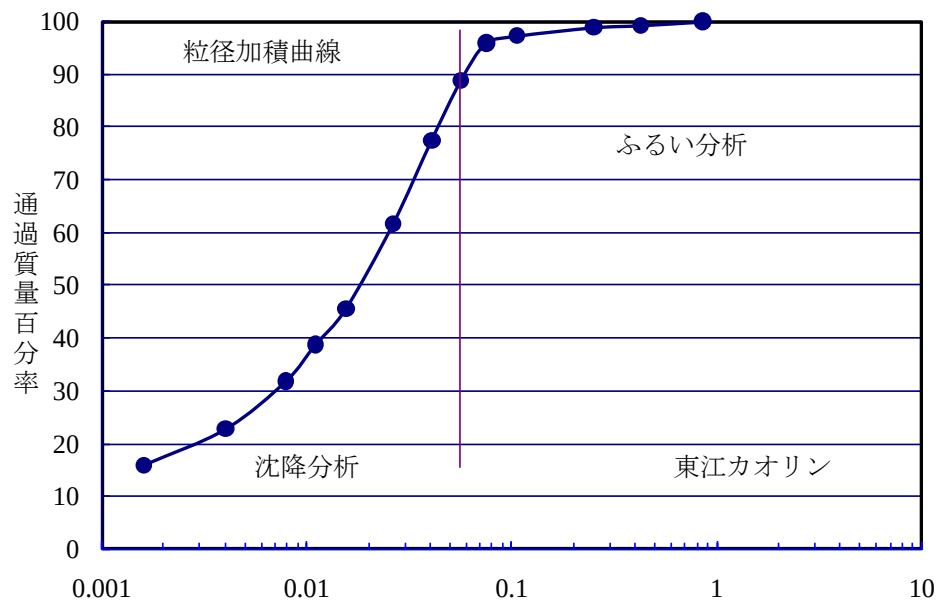


図 3-1-2(3)-3-2. 東江カオリンの粒度分布曲線

模擬汚染土壌の作製に当たって、事前に水だけで予備試験を行い、混合し易い含水比を調べてみた。その結果、水分重量比が 20%では、土壌試料を適度に湿潤させ、また、攪拌・混合も最も容易であることが分かった。この結果を用い、模擬汚染土壌は硝酸鉛溶液を混合し、汚染土壌の全含有量が 450mg/kg となるように調製し、イオン交換水、水道水、pH≒4 の酸性電解水及び pH≒3 の酸性電解水を用いた溶出試験を実施した。(表 3-1-2(3)-3-2、図 3-1-2(3)-3-1) 結果として鉛を対象汚染物質とした模擬汚染土壌について、環境負荷の低い電解質(塩)を使った電解水による溶出試験を実施した。pH 3～pH 4 の電解水で、鉛の溶出量が著しく増加することがわかり、電気修復浄化への適用可能性を見出した。

表 3-1-2(3)-3-2. 鉛模擬汚染土壌の溶出試験条件と結果

溶 媒	溶媒初期 pH	溶出液 pH	鉛溶出量(mg/L)
イオン交換水	6.75	4.30	6.5
水道水	7.62	4.75	5.4
酸性電解水	3.97	4.08	11.5
酸性電解水	2.89	3.21	27.1

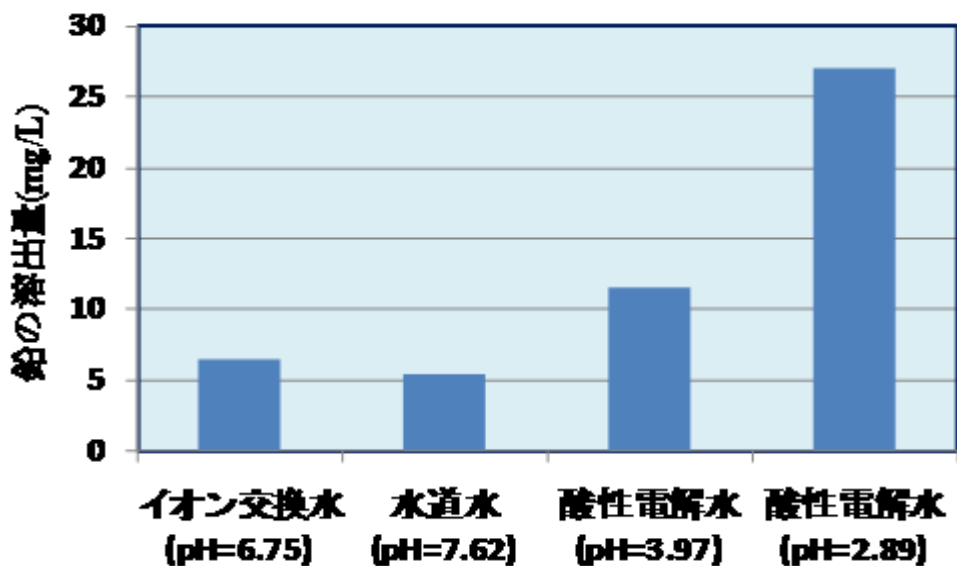


図 3-1-2(3)-3-3. 異なる溶媒による鉛の溶出特性比較

iv) 電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究

(a) 目的

電気（動電学的）土壌修復による重金属の浄化において土壌 pH はその浄化効率を左右する大きな要因である。土壌中に保持される重金属の形態は、重金属により、また、土壌種により傾向が異なる。本研究では、鉛、カドミウムを対象物質として、正確に粒径を制御された細粒カオリンに吸着させた模擬汚染土壌について、その土壌 pH や電解液濃度が浄化効率に及ぼす影響について、浄化試験を実施しながら評価検討を行った。

(b) 成果

実験は土壌を強く酸性化するケース（acidic condition）と中性付近に保持するケース（neutral condition）および土壌を強く塩基性化（アルカリ化）するケース（basic condition）の条件下で実施し、電気土壌修復法による鉛およびカドミウムの浄化効率に与える土壌 pH の影響について、通電終了後の土壌 pH と土壌内の鉛濃度の分布を相対濃度を調査した。

使用した電気土壌修復実験装置概略図を図 3-1-2(3)-4-1 に示す。鉛の場合、土壌を強く酸性化するケースでは、鉛は土壌からほとんど除去される結果となった。（図 3-1-2(3)-4-2）一方、土壌 pH が中性に保持するケースでは、陰極槽において鉛は全く検出されず鉛は浄化されないことが分かった。このように、鉛の浄化効率には土壌 pH が強く影響し、効果的に浄化するには土壌を強く酸性化する必要がある。

カドミウムの場合は、土壌を強く酸性化するケースでは、カドミウムは土壌からほとんど除去される結果となった。（図 3-1-2(3)-4-3）一方、土壌 pH が中性に保持するケースでは、カドミウムは土壌試料中央付近から陰極側にかけて滞留していることが分かった。さらに、土壌を強く塩基性にした場合、カドミウムは土壌全体に滞留したままで、全く浄化されなかった。このように、カドミ

ウムの浄化効率には土壌 pH が強く影響し、効果的に浄化するには土壌を強く酸性化する必要がある。ただし、鉛と比較した場合、カドミウムは中性領域において土壌内から系外に除去することはできなかったが、全体として陰極方向に移動しており鉛よりは移動性が高いことが分かった。

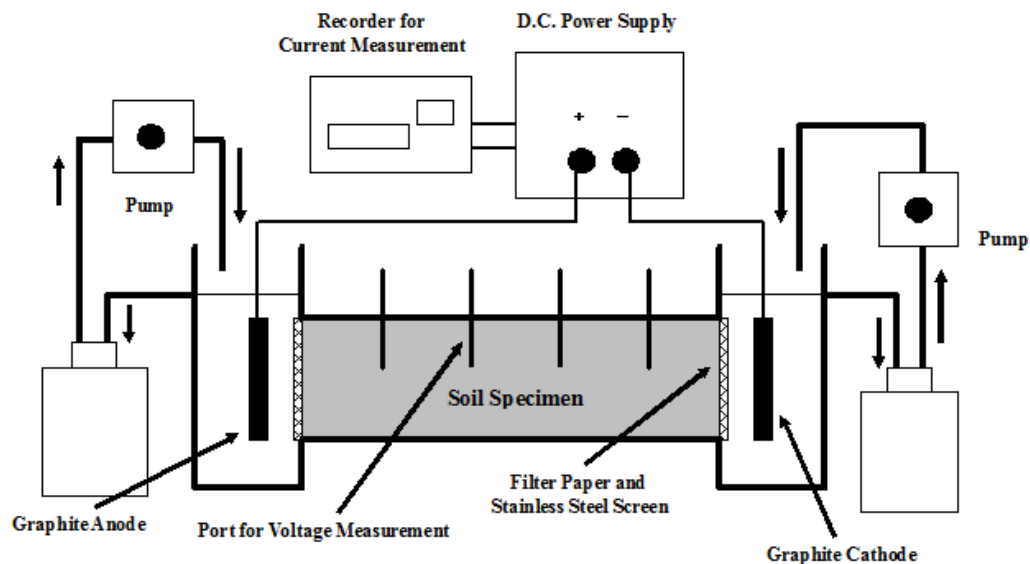


図 3-1-2(3)-4-1. 電気土壌修復実験装置概略図

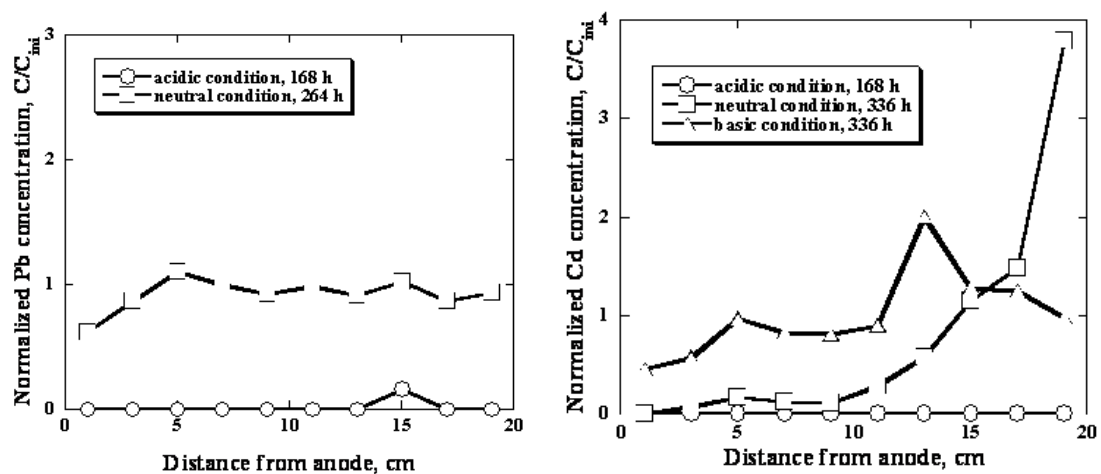


図 3-1-2(3)-4-2. 土壌中の鉛濃度分布

図 3-1-2(3)-4-3. 土壌中のカドミウム濃度分布

v) 印加電圧パルス化による浄化効率向上

(a) 目的

電気修復法での更なる浄化効率の向上を目指した検討は、コスト低減の観点

から重要である。本研究では、六価クロムならび鉛による模擬汚染土壤に、直流電流を矩形波として印加し、印加電圧パルス化による電力使用量の削減効果を実験的に検証した。

(b) 成果

浄化試験は、鉛、六価クロムを対象汚染物質とし、土壤汚染対策法の含有量基準値の3倍の汚染濃度に調製された模擬汚染土壤を試験キットに充填し、定電圧直流電源に分単位で印加電圧のON/OFFを制御できる試作パルス発生装置を接続し、両電極間に所定の電圧を印加して実施した。浄化に必要な電力消費量の目標値を、鉛模擬汚染土壤については2,407kWh/m³、六価クロム模擬汚染土壤については2,324kWh/m³とし、電圧印加パルス化による浄化効率を評価した。(表3-1-2(3)-5-1、表3-1-2(3)-5-2)結果として、鉛模擬汚染土壤ではDuty(電圧ON時間の比率)が50~80%で浄化に必要な電力量を17%以上、六価クロム模擬汚染土壤ではDuty(電圧ON時間の比率)が50~90%で浄化に必要な電力量を39%以上削減することが可能であることが分かり。印加電圧パルス化による浄化効率向上が確認できた。

表 3-1-2(3)-5-1. 鉛模擬汚染土壌の結果

	電圧印加パルス条件			浄化必要電力量 (kWh/m ³)	削減率(%)
	ON時間	OFF時間	Duty		
	(min)	(min)	(%)		
試験1	60	6	91	2900	
試験2	60	15	80	2400	17
試験3	60	60	50	2050	29
試験4	6	6	50	2150	26
試験5	60	90	40	2800	

表 3-1-2(3)-5-2. 六価クロム模擬汚染土壌の結果

	電圧印加パルス条件			浄化必要電力量 (kWh/m ³)	削減率(%)
	ON時間	OFF時間	Duty		
	(min)	(min)	(%)		
試験1	60	6	91	1100	60
試験2	120	60	67	800	70
試験3	60	30	67	1700	39
試験4	60	60	50	1650	40
試験5	6	6	50	1350	51

vi) 電解水添加による浄化効率の向上

(a) 目的

本研究ではiii) 項で示された酸性電解水の効果を、六価クロムならび鉛による模擬汚染土壌を使用した浄化試験により実験的に検証した。

(b) 成果

浄化試験は、鉛、六価クロムを対象汚染物質とし、土壌汚染対策法の含有量基準値の3倍の汚染濃度に調製された模擬汚染土壌を試験キットに充填し、塩化ナトリウム溶液を電気分解して生成した酸性電解水を土壌に添加して実施した。鉛汚染土壌では電解水の添加により鉛の脱離が促進されたと考えたが、目標とする削減率を達成するような効果はなかった。一方、六価クロム汚染土壌浄化に必要な電力消費量の目標値を、鉛模擬汚染土壌については2,610kWh/m³、六価クロム模擬汚染土壌では検討した5条件のうち4条件で目標とする削減率を上回った。(表 3-1-2(3)-6-1、表 3-1-2(3)-6-2)

表 3-1-2(3)-6-1. 鉛模擬汚染土壌の結果

	電解水投入条件		電解水 投入量	浄化必要 電力量	削減率 (%)
	電解水				
	塩／量・濃度	pH			
試験1	NaCl/0.3g	2.9	150	3500	3
試験2	NaCl/0.3g	2.9	210	2800	
試験3	NaCl/0.3g	2.9	80	3150	2
試験4	NaCl/1.0g	2.3	150	2850	

表 3-1-2(3)-6-2. 六価クロム模擬汚染土壌の結果

	電解水投入条件		電解水 投入量	浄化必要 電力量	削減率(%)
	電解水				
	塩／量・濃度	pH			
試験1	NaCl/0.3g	2.9	1410	2300	17
試験2	NaCl/1.0g	2.3	150	1700	39
試験3	NaCl/1.0g	2.3	1800	2850	
試験4	HNO ₃ /NaOH	1.4	260	1200	57

vii) 原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定

(a) 目的

粘土を主成分とする実際の鉛汚染サイトの土壌を対象として、平成 23～24 年度実施の浄化試験キットを用いた実汚染土壌ラボテストの結果をもとに、浄化に要する単位電力量を最小にするような土壌 pH - 電解液 EC の最適条件を、原位置浄化試験により実験的に導出し、次フェーズで実施予定の原位置実証試験の浄化条件を決定する。

(b) 成果

鉛汚染があるサイトについて、実証試験位置を決定するために、第一次調査として 50m×25m の範囲で鉛汚染分布を確認し、更に絞り込んだ範囲(16m×8m)で鉛汚染分布(図 3-1-2(3)-7-1)を調査した。広い範囲で鉛汚染が分布しているが、土壌の状態、滲出水の有無等を考慮した上で、鉛含有量基準値の3倍以上の汚染を有する位置を原位置浄化試験及び実証試験場所に決定した。(図中、緑色点線で囲まれた部分)

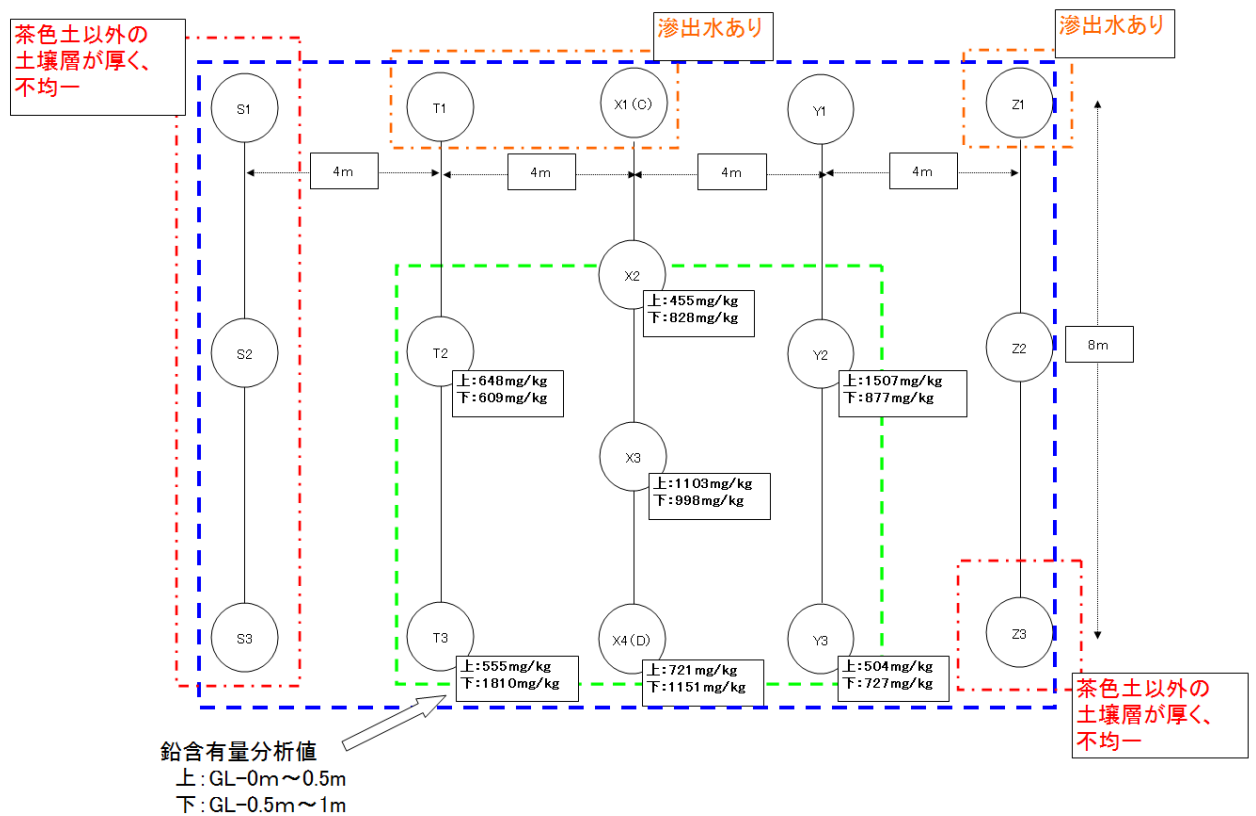


図 3-1-2(3)-7-1. 実証試験サイトの鉛汚染分布

原位置浄化試験レイアウトの概要を図 3-1-2(3)-7-2 に示す。浄化対象土壌の両側に重機で穴を掘り、そこにプラスチック製容器を埋め込み、電解液槽とした。(図 3-1-2(3)-7-3) アノード電極は金属酸化物をコーティングしたチタン、カソード電極はステンレスを使用した。土壌壁と電解液の間はプラスチック製メッシュで仕切った。電解液は常時ポンプで外部に取り出し pH 測定を行い、必要に応じて水酸化ナトリウム溶液又は硝酸溶液を添加して pH 制御を行った。

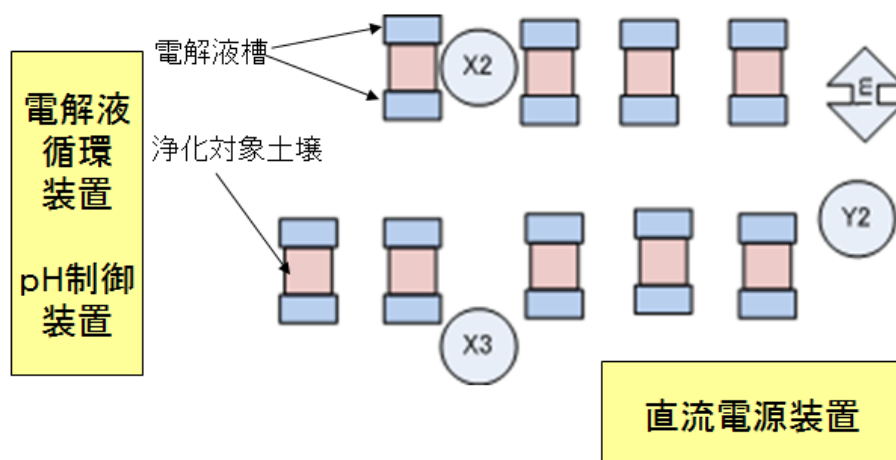


図 3-1-2(3)-7-2. 原位置浄化試験レイアウト



図 3-1-2(3)-7-3. 原位置浄化試験

原位置浄化試験は、直流電源装置から一定電流が流れるように電圧を印加し、電解液は pH 監視・制御を行った。試験は土壌 pH - 電解液 EC、電圧印加パルス、電解水添加の 3 つのパラメータについて各 3 条件について、下記の条件で浄化試験を実施した。

a) 土壌 pH - 電解液 EC

本年度のラボ試験の結果から、カソード電解液は pH1.5 一定とし、アノード電解液 pH を 1 (N.C.)、1.5、2 とした 3 条件で試験を行った。

b) 電圧印加パルス

前年度のラボ試験の結果から、電圧印加パルス条件は、60minON/15minOFF、60minON/30minOFF、60minON/60minOFF の 3 条件で試験を行った。

c) 電解水添加

前年度のラボ試験の結果では十分な効果が得られていないため、今回は初期の段階で土壌の酸性化を促す目的で、通電開始時に土壌へ電解水（1mol/L 硝酸で代用）を 1L、5L、10L 添加する方法を試みた。

前記の条件下で浄化試験を約 3 カ月実施した結果を以下に示す。結果については初期含有量から 300mg/kg 相当の鉛を回収に要した電力量を浄化に必要な電力量と定義し、浄化電力量の評価を行った。

a) 土壌 pH - 電解液 EC では、目標電力量 2250 kWh/m³（削減率 25%）をアノード電解液 pH を 1 (N.C.)、1.5 の条件で下回っており、ラボでの浄化試験と同様に、アノード電解液 pH 1 (N.C.) での浄化電力量が最も小さかった。（図 3-1-2(3)-7-4、表 3-1-2(3)-7-1）

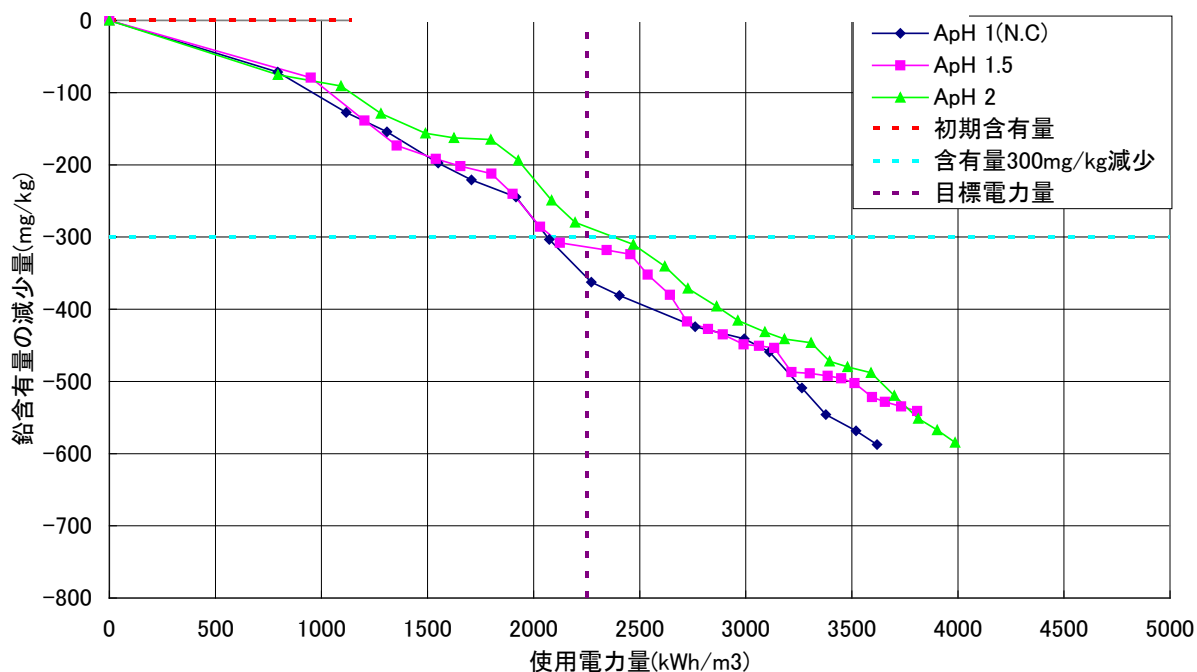


図 3-1-2(3)-7-4. 電解液 pH、EC の影響

表 3-1-2(3)-7-1. 電解液 pH、EC による浄化必要電力量

電解液pH、EC		kWh/m ³
(目標)		2250
条件	ApH1 (N.C.)	2070
	ApH1.5	2090
	ApH2	2380

b) 電圧印加パルスは、土壌 pH - 電解液 EC の実験結果から最適と考えられるアノード電解液 pH を 1(N.C.) とした上で試験を実施した。本試験における目標電力量は 1740 kWh/m³ (削減率 42% : pH-EC 25%+パルス 17%) とした。結果として全ての条件で目標を下回っており、電圧印加パルス条件が 60minON/30minOFF の場合に浄化電力量が最も小さかった。(図 3-1-2(3)-7-5、表 3-1-2(3)-7-2)

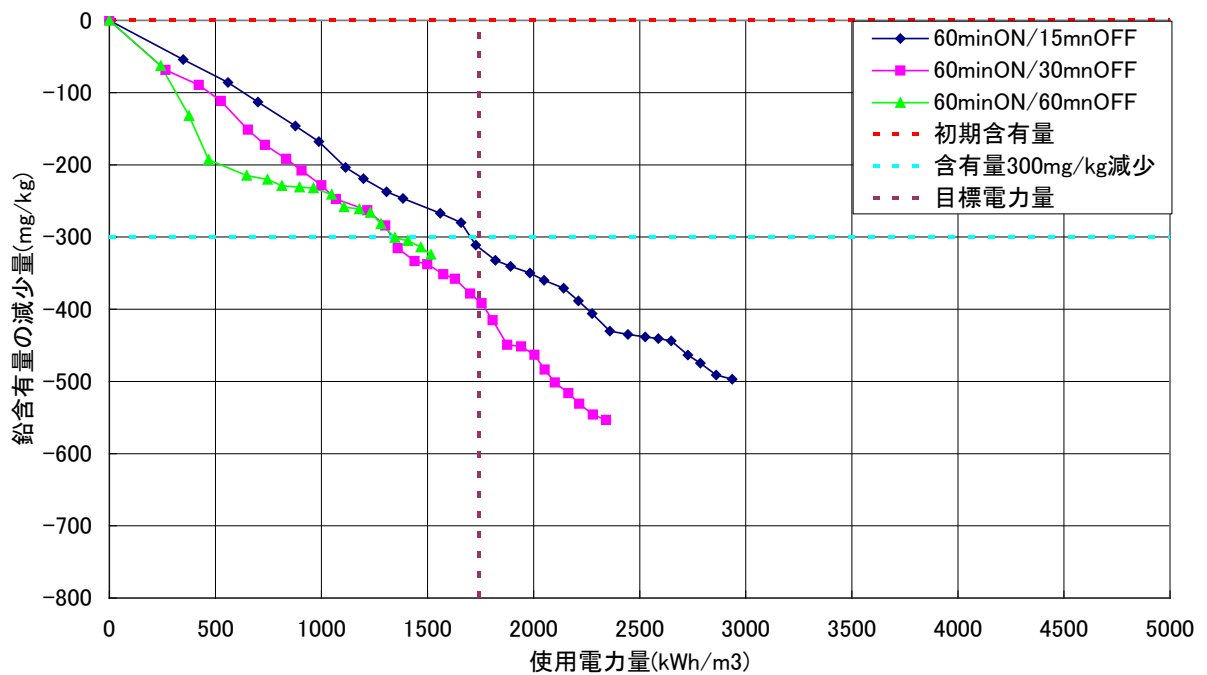


図 3-1-2(3)-7-5. 印加電圧パルスの影響

表 3-1-2(3)-7-2. 印加電圧パルスによる浄化必要電力量

印加電圧パルス		kWh/m ³
(目標)		1740
条件	15min off	1700
	30min off	1330
	60min off	1350

c) 電解水添加は、土壌 pH - 電解液 EC の実験結果から最適と考えられるアノード電解液 pH を 1(N.C.) とした上で試験を実施した。本試験における目標電力量は 1950 kWh/m³ (削減率 35% : pH-EC 25% + 電解水 10%) とした。結果として 1L、5L の場合に目標を下回っており、浄化電力量が最も小さかった。(図 3-1-2(3)-7-6、表 3-1-2(3)-7-3)

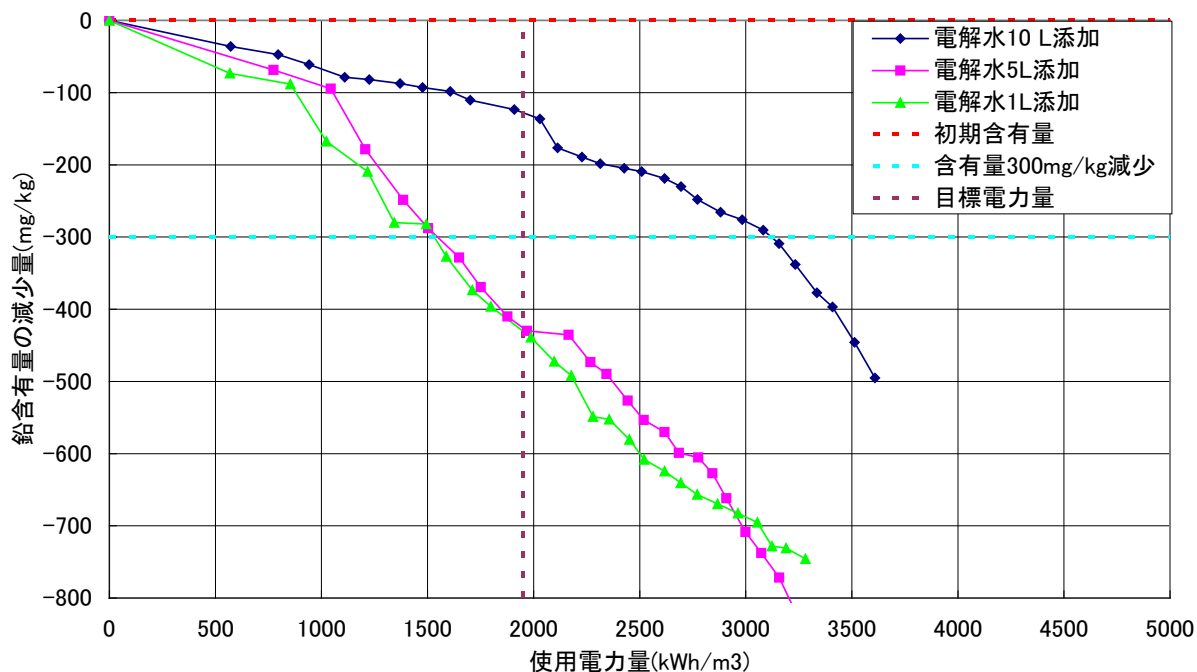


図 3-1-2(3)-7-6. 電解水添加の影響

表 3-1-2(3)-7-3. 電解水添加による浄化必要電力量

電解水添加		kWh/m ³
(目標)		1950
条件	1L	1540
	5L	1540
	10L	3120

② 電気修復法に使用する電極・井戸の最適化に関する評価検討

(a) 目的

浄化コストの低減には、設備としての電極ならびに電極井戸の数と配置の最適化、電極材料ならびに井戸構造の最適化が欠かせない。

電極材料・形状や井戸構造の最適化を図ることで、井戸内電解液中の電極表面に生じる電気抵抗値を低減させて、電極－電解液間の電圧降下を抑制する。供給される電流が対象土壌へより有効に使用されるので、結果として消費電力の低減を図ることが可能となる。

(b) 成果

今回の開発では、アノード側の電極材料はソーダ電解などで用いられるチタンに金属酸化物をコーティングしたものを使用し、従来の板状の試料と表面積の異なる3種類のエキスパンドメタルで評価を行った。(表 3-1-2(3)-8-1) カソード側の電極には板状のステンレス (表面積 3850mm²) を用いた。

表 3-1-2(3)-8-1. 評価に使用したアノード電極

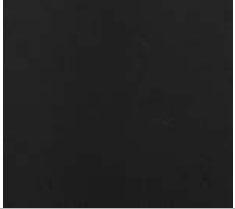
試料名	板状試料(従来品)	エキスパンドメタル1	エキスパンドメタル2	エキスパンドメタル3
形状				
表面積	3850mm ²	6141mm ²	3999mm ²	2773mm ²

図 3-1-2(3)-8-1 に実験装置全景を示す。

測定は、電解液槽に硝酸で pH を 2 に調製した電解液（電気伝導度 4.5mS/c）を投入し、定電圧直流電源で電圧を印加した。入力電圧を段階的に上昇させ電流を測定した。電圧 100V 時における各電極での抵抗値を計算した結果、エキスパンドメタルは従来品の板状電極とほぼ同等との結果が得られた。（表 3-1-2(3)-8-2）

試験に使用した各電極の電解液に浸漬された部分の重量を計算により求めたところ、板状試料が 129g であるのに対し、エキスパンドメタル3は 4g と軽く、従来の板状試料より軽量の電極としてエキスパンドメタルが有効であることを見出し、目標の重量 2／3 を達成することができた。

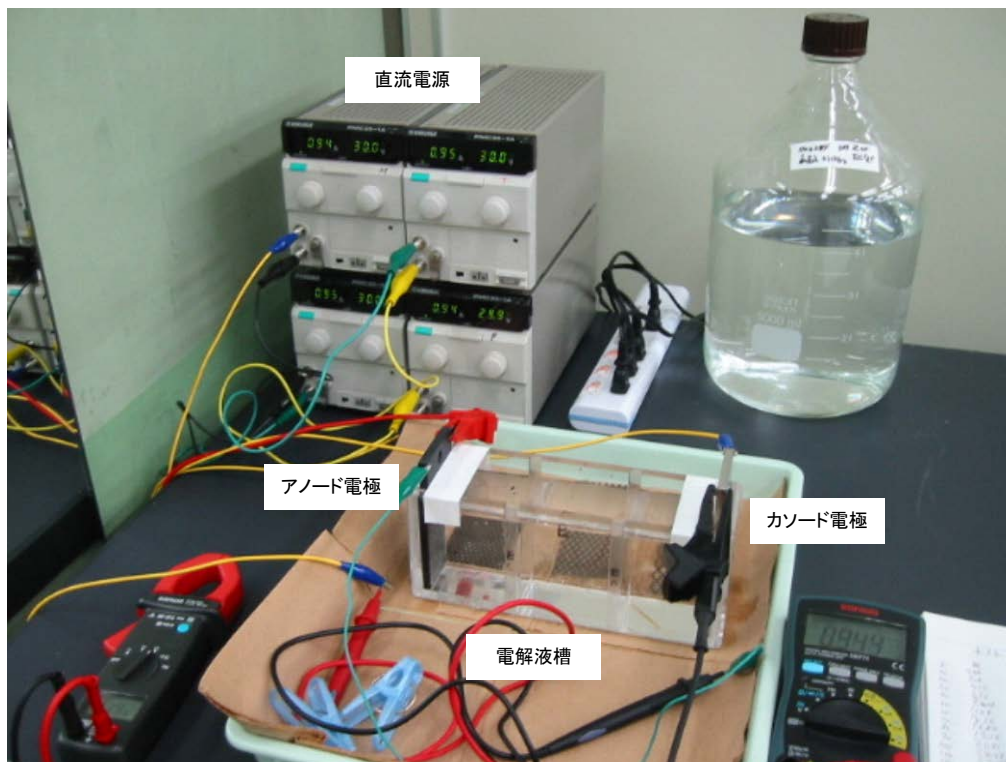


図 3-1-2(3)-8-1. 評価装置全景

表 3-1-2(3)-8-2. アノード電極と抵抗値

アノード電極	板状試料	エキスパンドメタル1	エキスパンドメタル2	エキスパンドメタル3
抵抗値	140M Ω	142M Ω	139M Ω	137M Ω

③ 汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立

(a) 目的

重金属類による汚染は土壌の強い吸着性などにより、一般的に局所的である。このことから汚染領域を現場で簡便に特定することは、浄化規模を適正にする上で必要であり、オンサイト測定評価技術の実用化は電気修復法の低コスト化の一方策として重要である。本研究ではオンサイト汚染領域特定技術及びオンサイト簡易分析法と公定法との相関・信頼性の検討を実施した。

(b) 成果

オンサイト汚染領域特定技術の開発では、携帯型蛍光 X 線分析装置（図 3-1-2(3)-9-1）を使用して、鉛・カドミウムなどの分析データに影響を与える諸条件（試料粒径など）を調査検討し、適用性を把握した上で、実際に小規模な汚染領域の土壌について測定の後、マッピングを試みた。

携帯型蛍光 X 線装置を用いて分析する場合、粉末試料をホルダーに充填し、Polypropylene フィルムで封じて、大気圧条件下で分析しても十分な精度が得られた。また、GPS 受信機内蔵のモバイルマッパー（MobileMapper CX）を導入しその位置測定精度を検証した結果、モバイルマッパーの位置測定精度は 30cm 以内に抑えることが可能であることが分かった。携帯型蛍光 X 線装置とモバイルマッパーを組み合わせると、迅速なオンサイトマッピングが可能と考えられる。

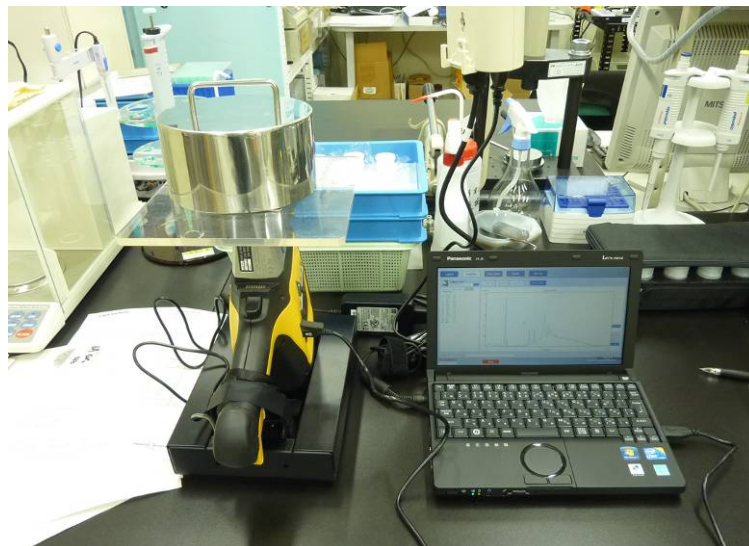


図 3-1-2(3)-9-1. 携帯型蛍光 X 線分析装置

オンサイト簡易分析法と公定法との相関・信頼性の検討では、鉛の全含有量が 450mg/kg である模擬汚染土壌を対象とした測定で、 448 ± 3 mg/kg の実測値を得ることができ、測定手法として十分な精度があることを確認した。

④ 低コスト電力（自然エネルギー等）の活用の検討

（a）目的

電力コスト低減の目的で、より低コストの電力たとえば太陽光発電など自然エネルギーによる電力の利活用を検討する。利用する電力の目標コストは、複数の使用電力料金の平均値として、1kWhあたり10円をめざした調査を実施した。

（b）成果

文献調査や日本の太陽光発電パネルメーカー、電力会社にヒアリングを行い、一定の設計条件下では電気修復法への技術的適用は可能との結果が得られたが、コスト面からは商用電力料金が¥8.5/kWh（当社工場実績）であるのに対し、太陽光発電による電力料金は現状では最も安く見積もった場合でも¥15.7/kWhであり、コスト削減という視点から太陽光発電の採用は厳しい状況にあることが判明した。電力会社による太陽光発電の買取も考慮に入れば、今後、太陽光発電のメリットは大きくなると考える。

⑤ 電気修復法による浄化実証試験の実施と目標浄化コストの検証

i）電気修復法による浄化実証試験の実施

（a）目的

原位置浄化試験の結果をもとに、最適な浄化条件による現場での1m³規模の実証試験を実施し、浄化に必要な電力量を確認する。

（b）成果

原位置浄化試験の結果をもとに本土壌での最適浄化条件（下記）で浄化対象土壌1m³の原位置実証試験を行った。

①土壌 pH - 電解液 EC：アノード電解液 pH 1（N.C.）、カソード電解液 pH 1.5

②電圧印加パルス：60minON/30minOFF

③電解水添加：1L

試験結果を図 3-1-2(3)-10-1、表 3-1-2(3)-10-2 に示す。浄化対象土壌 1m³で最適浄化条件での浄化電力量は 1490kWh/m³であり、目標としていた 1500kWh/m³を下回った。また、試験終了後、土壌のアノード側、中央、カソード側の 3 カ所から土壌を採取し、鉛含有量測定を行った結果を表 10-3 に示す。初期鉛含有量 1100mg/kg に対し、土壌のアノード側、中央では基準値以下まで浄化されており、土壌全体では 81%の鉛が除去できていた。

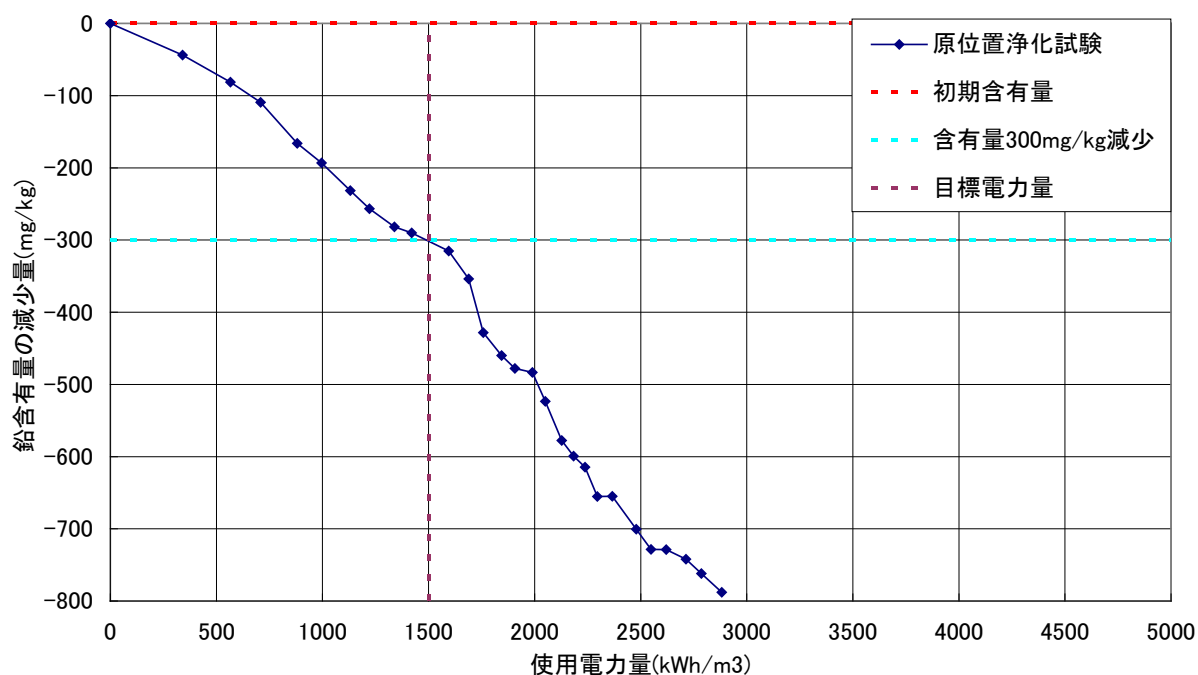


図 3-1-2(3)-10-1. 原位置実証試験結果

表 3-1-2(3)-10-1. 原位置実証試験における浄化必要電力量

原位置浄化試験			kWh/m³
(目標)			1500
条件	電解液pH、EC	ApH1 (N.C.)	1490
	電解水	1L	
	印加電圧パルス	30min off	

表 3-1-2(3)-10-2. 原位置実証試験後土壌分析結果

	鉛含有量(mg/kg)
アノード側土壌	80
中央土壌	130
カソード側土壌	620

ii) 目標浄化コストの検証

(a) 目的

模擬汚染土壌で得られた知見、実際の汚染サイトから採取された実汚染土壌での評価、現場での実証試験の結果をもとに、浄化に要する電力量とその際の浄化コストを確認、検証する。

(b) 成果

消費電力量については、最終的な実証試験の結果として、汚染物質：鉛、土質：砂まじり粘土の条件で、目標とした m^3 あたり 1,500kWh 以下（1,490kWh）を達成した。この土壌を代表値として、コスト計算をすると

電気料金単価	8.5 円/kWh	15 円/kWh
浄化電力コスト	12,665 円	22,350 円
その他コスト	12,500 円	
浄化コスト換算値合計	25,165 円	34,850 円

8.5 円は大手製造業の単位電力料金の代表値として研究計画時の弊社に電力料金から引用した。

15 円は研究開発終了時の太陽光発電のみによる発電コストとして、パネルメーカーからのヒアリングした数値を引用した。

その他コストは、研究成果としての電極材料と形状を採用し、その他は現時点での電極設置のためのボーリング工法を最安価で可以使用するという仮定の下で、当初目標としてコスト（ m^3 あたり 25,000 円）の半額を占める 12,500 円程度と見積もった。

以上より、本技術は適用可能な土質を選択することによっては、当初目標とした m^3 あたり 25,000 円程度での浄化を達成することを示した。ただし、電気料金単価によって電力コストが大きく左右されるため、注意が必要である。また、将来的には、自然由来の電力の内、最も入手しやすい太陽光発電による電力の利用も考慮に入れるべきであるが、現時点ではパネルコストが下がっておらず、本技術の電力コストをそのまま太陽光発電でまかなうのは難しいといえる。

3-1-2 (4) 次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発

研究開発項目①「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

①-1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発

バイレメ指針に基づき、バイオオーグメンテーションに利用する菌株の安全性を確認するには、利用菌株の分類学的な同定を行い属・種名を特定することで、既知病原種との同異を判断するのが有効である。安全性判定には、分類学的な同定を正確にする必要がある。従来、16S rRNA の遺伝子配列を利用した手法が細菌の同定に使用されてきた。しかし、16S rRNA 遺伝子配列のみでは正確な同定が困難であるため、正確に同定するために 16S rRNA 遺伝子よりも種間の違いが大きいハウスキーピング遺伝子等を使用した同定手法が属レベルで開発され、使用され始めている。一方、ヒトや家畜等の病原菌については、その危険度を示すバイオセーフティレベル (BSL) を併記した様々なリストが存在し、病原性を判断する指標として有効である。しかし、リストが散在しているため、利用者が使用しにくい状況にある。

そこで、本項目では①病原菌のハウスキーピング遺伝子に基づいた判別手法の開発、②病原菌データベース構築、について開発を行った。

方法

- 1) **ドラフトゲノム解析：** 本研究開発でゲノム解析を実施した菌株（表 3-1-2 (4)-1）については、製品評価技術基盤機構生物遺伝資源保存施設 (NBRC)、または、岐阜大学医学部病原微生物遺伝子資源センターより入手した。すべての菌株からゲノム DNA を調製し、ゲノム解析は 454 GS FLX チタニウム（ロシュ社製、以下 454 という。）、または、HiSeq1000（イルミナ社製）を用いて実施し、Newbler（ロシュ社製）を用いて DNA 配列のアセンブルを行った。
- 2) **ハウスキーピング遺伝子を用いた Multilocus sequence analysis (MLSA) 法の開発：** 各ハウスキーピング遺伝子の配列は、整列比較して一番短い配列に合わせて長さをそろえた。菌株ごとにハウスキーピング遺伝子配列を一定の順番で連結し、ClustalX にてアライメントを作成した後、NJprot 法により系統樹を作成した。

成果

バイオオーグメンテーションにかかわると予想される以下の七つの菌属等について、新たに51株（表3-1-2(4)-1）のドラフトゲノム解析を行い、菌属等ごとに分類に適した複数のハウスキーピング遺伝子を選抜し、各遺伝子配列を連結して比較解析する Multilocus sequence analysis (MLSA) 法により系統樹を作成して判別手法の開発を実施した。

- 1) 地下水から検出されることの多い腸内細菌科の *Escherichia* 属と *Citrobacter* 属
- 2) 自然界に広く分布し油分解菌も多いが、多剤耐性日和見菌も含む *Acinetobacter* 属
- 3) 河川や湖沼、地下水、下水を含む多様な水圏や魚介類に分布する *Aeromonas* 属
- 4) 自然環境に広く分布し、PCBや2,4-D等の有害物質分解能を有する *Burkholderia* 属
- 5) 自然環境に広く分布し、ビフェニルやフェノールの分解能を有する *Comamonas* 属
- 6) 自然環境中で広く分布し、トルエンやフェノール等の分解で報告が多い *Pseudomonas putida* 群
- 7) 土壌等に広く分布し、アルカン等の炭化水素分解で報告が多い *Gordonia* 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属を含む放線菌群

表 3-1-2 (4)-1. ドラフトゲノム解析株

	属名	種形容語	亜種形容語	株名	基準株	BSL	年度
1	<i>Acinetobacter</i>	sp.		NBRC 100985	No		H22
2	<i>Citrobacter</i>	<i>farmeri</i>		GTC 01319=NBRC 105725	Yes	BSL1*(日和見)	H22
3	<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>		GTC 00108=NBRC 12681	Yes	BSL1*(日和見)	H22
4	<i>Citrobacter</i>	<i>werkmanii</i>		GTC 01321=NBRC 105721	Yes	BSL1*(日和見)	H22
5	<i>Escherichia</i>	<i>albertii</i>		GTC 14781=NBRC 107761	Yes	BSL2	H22
6	<i>Escherichia</i>	<i>blattae</i>		GTC 01342=NBRC 105725	Yes		H22
7	<i>Escherichia</i>	<i>hermannii</i>		GTC 00347=NBRC 105704	Yes	BSL1*(日和見)	H22
8	<i>Escherichia</i>	<i>vulnelis</i>		GTC 00348=NBRC 102420	Yes	BSL1*(日和見)	H22
9	<i>Gordonia</i>	<i>alkanivorans</i>		NBRC 16433	Yes		H22
10	<i>Gordonia</i>	<i>polyisoprenivorans</i>		NBRC 16320	Yes		H22
11	<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i>		GTC 00769=NBRC 15531	Yes	BSL2	H22
12	<i>Nocardia</i>	<i>brasiliensis</i>		NBRC 14402	Yes	BSL2	H22
13	<i>Acinetobacter</i>	sp.		NBRC 108641	No		H23
14	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>		GTC 00071	Yes	BSL1*(日和見)	H23
15	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	<i>anaerogenes</i>	GTC 2794	Yes	BSL1*(日和見)	H23
16	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	<i>dhakensis</i>	GTC 2814	Yes	BSL1*(日和見)	H23
17	<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	<i>ranae</i>	GTC 2816	Yes	BSL1*(日和見)	H23
18	<i>Aeromonas</i>	<i>sobria</i>		GTC 409	No	BSL1*(日和見)	H23
19	<i>Leclercia</i>	<i>adecarboxylata</i>		NBRC 102595	Yes		H23
20	<i>Acinetobacter</i>	sp.		20B	No		H24
21	<i>Burkholderia</i>	<i>bannensis</i>		NBRC 103871	Yes		H24
22	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>		NBRC 14074	Yes	BSL2	H24
23	<i>Burkholderia</i>	<i>gladioli</i>		NBRC 13700	Yes	BSL1*(日和見)	H24
24	<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>		GTC 3P0254	Yes	BSL3	H24
25	<i>Comamonas</i>	<i>aquatica</i>		NBRC 14918	Yes	BSL1*(日和見)	H24
26	<i>Comamonas</i>	<i>granuli</i>		NBRC 101663	Yes		H24
27	<i>Comamonas</i>	<i>koreensis</i>		NBRC 12005	Yes		H24
28	<i>Comamonas</i>	<i>terrigena</i>		NBRC 13299	Yes	BSL1*(日和見)	H24
29	<i>Comamonas</i>	<i>testosteroni</i>		NBRC 14951	Yes	BSL1*(日和見)	H24
30	<i>Nocardia</i>	<i>farcinica</i>		NBRC 15532	Yes	BSL2	H24
31	<i>Nocardia</i>	<i>nova</i>		NBRC 15556	Yes	BSL2	H24
32	<i>Nocardia</i>	<i>salmonicida</i>		NBRC 13393	Yes	BSL2	H24
33	<i>Nocardia</i>	<i>alba</i>		NBRC 108234	Yes		H25
34	<i>Nocardia</i>	<i>caishijensis</i>		NBRC 108228	Yes		H25
35	<i>Nocardia</i>	<i>coubleae</i>		NBRC 108252	Yes		H25
36	<i>Nocardia</i>	<i>cummidelens</i>		NBRC 100378	Yes		H25
37	<i>Nocardia</i>	<i>elegans</i>		NBRC 108235	Yes	BSL2	H25
38	<i>Nocardia</i>	<i>ignorata</i>		NBRC 108230	Yes	BSL1*(日和見)	H25
39	<i>Nocardia</i>	<i>jejuensis</i>		NBRC 103114	Yes		H25
40	<i>Nocardia</i>	<i>solii</i>		NBRC 100376	Yes		H25
41	<i>Rhodococcus</i>	<i>coprophilus</i>		NBRC 100603	Yes		H26
42	<i>Rhodococcus</i>	<i>equi</i>		NBRC 101255	Yes	BSL2	H26
43	<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>		NBRC 15567	Yes		H26
44	<i>Rhodococcus</i>	<i>fascians</i>		NBRC 12155	Yes		H26
45	<i>Rhodococcus</i>	<i>jostii</i>		NBRC 16295	Yes		H26
46	<i>Rhodococcus</i>	<i>rhodnii</i>		NBRC 100604	Yes		H26
47	<i>Rhodococcus</i>	<i>rhodochrous</i>		NBRC 16069	Yes		H26
48	<i>Rhodococcus</i>	<i>ruber</i>		NBRC 15591	Yes		H26
49	<i>Rhodococcus</i>	<i>yunnanensis</i>		NBRC 103083	Yes		H26
50	<i>Rhodococcus</i>	<i>zopfii</i>		NBRC 100606	Yes		H26
51	<i>Rhodococcus</i>	sp.		NBRC 14426	No		H26

1) 腸内細菌科

腸内細菌科は、現時点（2015年9月）において、52属290種から構成されているが、それらは異なる基準で分類されてきており、幾つかの病原菌種は16S rRNA遺伝子配列の類似性に基づき誤って分類されていることが知られている。我々は、これら腸内細菌科においても、特に地下水から検出されることの多い *Escherichia* 属と *Citrobacter* 属を対象に開発を行った。

Escherichia 属には、大腸菌 *Escherichia coli* の他に、*E. albertii*、*E. blattae*、*E. fergusonii*、*E. hermannii*、*E. vulneris* が属しており、これら *Escherichia* 属細菌は膿や痰、便から分離されている。なかでも、*E. coli* はヒトや動物の腸内常在菌であり、その糞便に汚染された幅広い環境で頻繁に検出される。野生株の大腸菌は細菌学会におけるバイオセーフティーレベル2（BSL 2）に分類されているが、その多くは人の糞便内常在菌と同じく特定の病原因子を持たない。

一方、*Citrobacter* 属はヒトおよび動物の腸管内および自然環境中に幅広く分布している。尿路、呼吸器、手術部位、血液等への日和見感染の起炎菌であり、特に *C. freundii* はしばしば臨床検体から単離されている。記載種11種のうち、*C. rodentium* はBSL2に分類されているが、それ以外の10種はヒト臨床試料から分離されており、BSL1*（日和見感染菌）に分類されている。

候補遺伝子は *E. albertii*、*E. hermannii*、*E. vulneris*、*E. blattae*、*C. farmeri*、*C. freundii*、*C. werkmanii* の配列情報を利用し、共通に保存されている必須遺伝子 283 個を抽出した。抽出した各遺伝子のアミノ酸配列について *E. coli* の種内および *Shigella*、*Escherichia* 属内の多型の分布を調べ、平均多型度（average amino acid distance）が大きい10個の遺伝子（*ftsQ*、*ftsX*、*grpE*、*hlyA*、*hlyB*、*hlyD*、*mreD*、*murB*、*murF*、*pssA*）を選抜してMLSA解析を行った。

その結果、16S rRNA 遺伝子の塩基配列で描いた系統樹（図 3-1-2(4)-1）に比べて信頼性を示すブートストラップ値（系統樹上の数字）が飛躍的に向上した系統樹（図 3-1-2(4)-2）が得られ、腸内細菌科の類縁菌の識別に選抜した10個の多型遺伝子が有効であることが示された。また、*Citrobacter* 属では16S rRNA 遺伝子配列の系統樹に比べて1つにまとめ、*Citrobacter* 属の分類の妥当性が示唆された。一方、*E. vulneris*、*E. hermannii* の2種は、*Escherichia* 属とは別属であることが示され、系統樹の樹形から新属であることが示唆された。

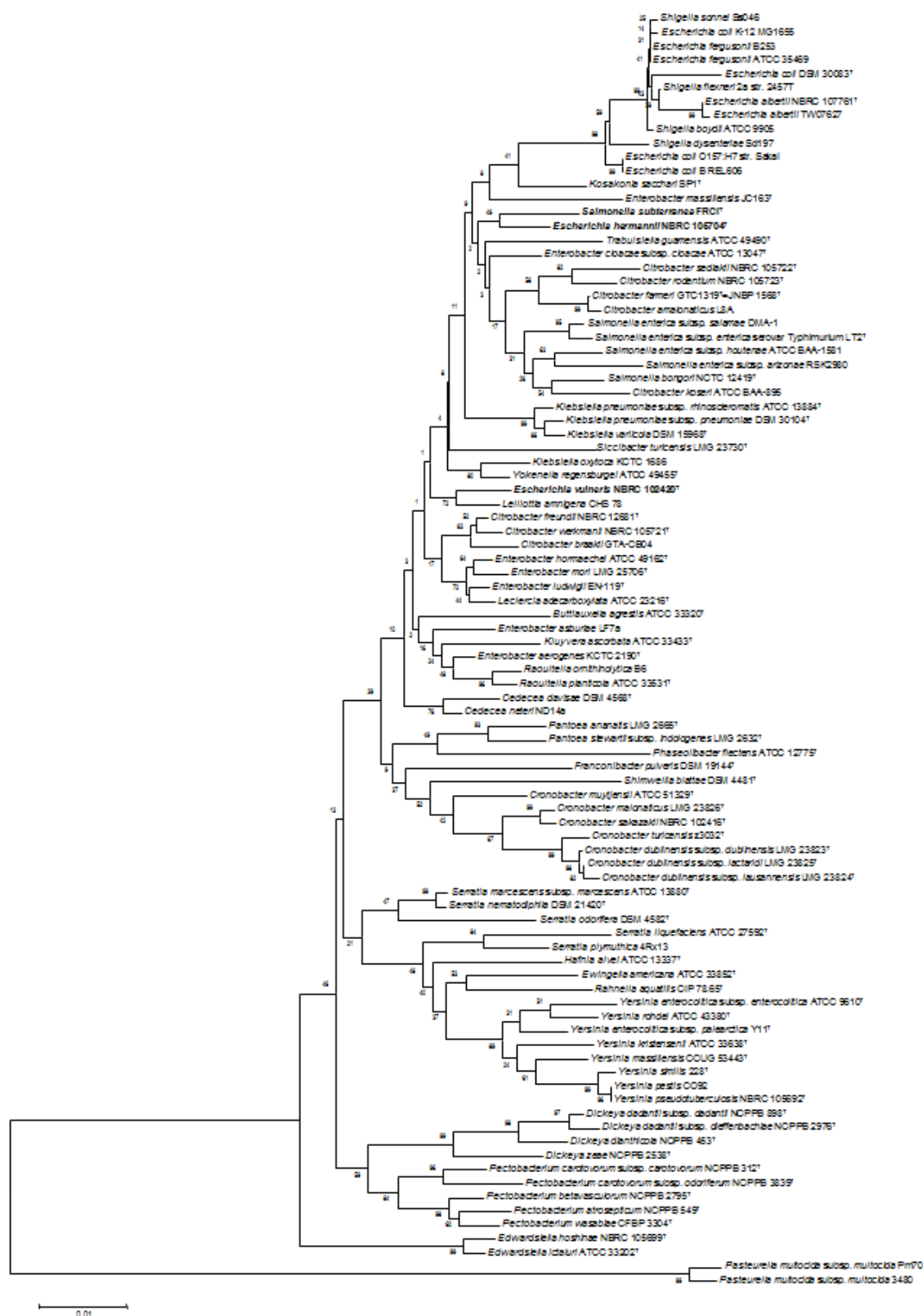


図 3-1-2(4)-1. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく腸内細菌科の系統樹

Acinetobacter 属は、広く自然界の土壌や水系に存在すると共に、病院のみならず家庭でも洗面台などの湿潤な室内環境からの検出も多い。また、感染防御能が低下した患者に対し呼吸器感染症、尿路感染症、創傷感染症などを引き起こす日和見感染菌も含まれる。特に代表的な菌種である *A. baumannii* は最も高頻度に人の臨床材料から分離され、有効な抗菌薬がほとんどない多剤耐性菌が深刻な問題となっており5類感染症病原体に指定されている。その一方で、*Acinetobacter* 属には、多数の油分解菌が報告されており、バイオレメディエーションにおける利用が期待されている。

16S rRNA遺伝子の系統樹では類縁菌種の識別が困難であったが、9個の遺伝子 (*cpn60*, *fusA*, *gltA*, *gpi*, *gyrB*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, *rpoD*) を使用したML SA法において、信頼性を示すブートストラップ値（系統樹上の数字）が飛躍的に向上し、近縁関係をより明確することに成功した（図3-1-2(4)-3）。

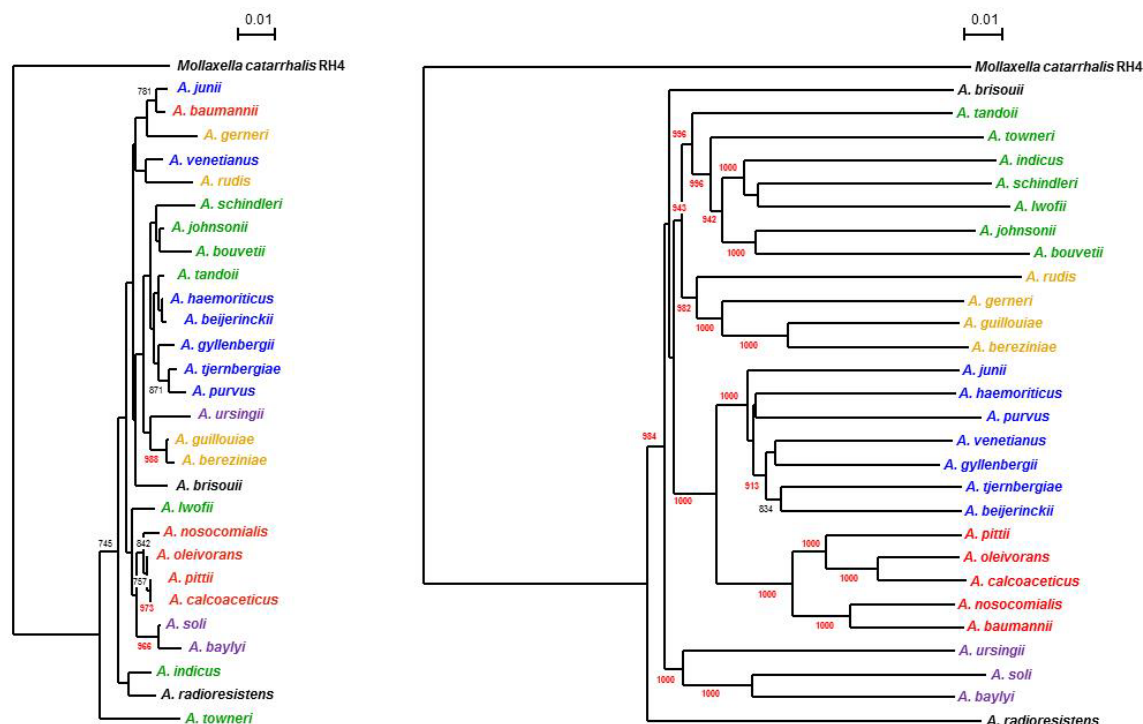


図 3-1-2(4)-3. 16S rRNA 遺伝子 (左) と MLSA (右) による系統樹
ブートストラップ値 700 以上を表示し、900 以上を赤文字で示している。 MLSA
のクレードにしたがって種名を色分けしている

3) *Aeromonas* 属

*Aeromonas*属は、胃腸炎、敗血症、創傷感染症、髄膜炎、肺炎の感染症の原因菌としての報告も多く、特に人に下痢を起こす*A. hydrophila*、*A. sobria*では、亜種も含め4種（*A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*、*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*、*A. sobria* および *A. veronii*）がBSL2に指定されている。さらに、9種がBSL1*に分類されている。ヒト臨床分離株の85%以上は*A. hydrophila*、*A. caviae*、*A. veronii* が占めている。また好冷性の*A. salmonicida*、*A. hydrophila* および*A. veronii* は魚病細菌として重要である。*Aeromonas* 属細菌は河川や湖沼などの淡水域をはじめとして、汽水域、沿岸域、またそれらの水域に生息する魚介類に広く分布しており、地下水や下水および土壌からも検出されている。また、我々の実施したトリクロロエチレンのバイオスティミュレーション試験において検出された。

Aeromonas 属の菌種では 12 個のハウスキーピング遺伝子（*dnaJ*, *grpE*, *hemK*, *hscA*, *hscB*, *hslJ*, *lolA*, *lolB*, *priA*, *recA*, *rlpB*, *rpoB*）を選抜して MLSA 解析に使用した。16S rRNA 遺伝子の系統樹においては、*A. hydrophila* subsp. *ranae*、*A. veronii* および *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* の 3 種間、*A. caviae* および *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* の 2 種間で明確に判別することができなかったが、MLSA 法では明確に区別され、*Aeromonas* 属の種間、亜種間で菌株を解像度高く識別できた（図 3-1-2(4)-4）。

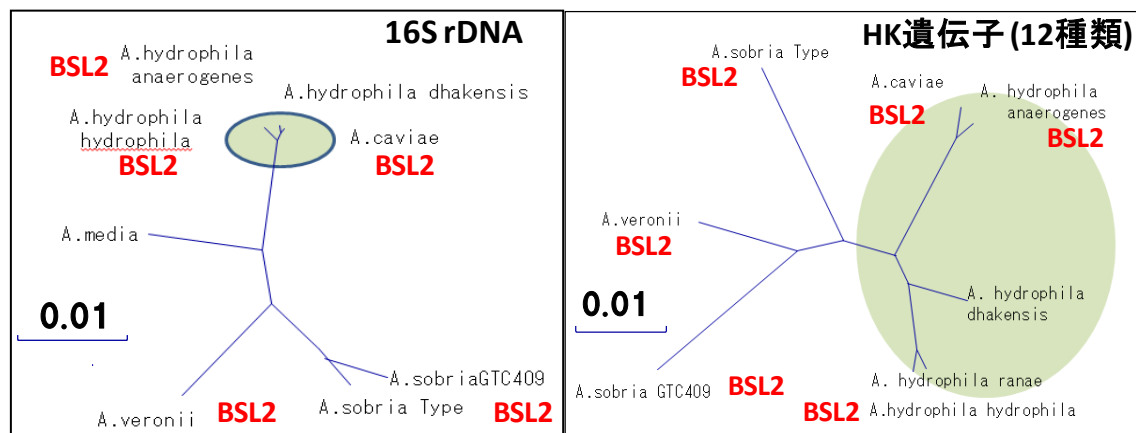


図 3-1-2(4)-4. 16S rRNA 遺伝子（上）および HK 遺伝子 12 種類（下）に基づく *Aeromonas* 属の系統樹

4) *Burkholderia* 属

Burkholderia 属は、自然環境に常在する細菌で、PCB や 2, 4-D などの有害物質分解能や植物の生長促進作用を示す産業有用性の高いグループである。その一方で、ヒト病原菌として、嚢胞性繊維症患者において重大な肺疾患をもたらす BSL2 の *B. cepacia* や人畜共通病原菌として知られる BSL3 の *B. mallei*（鼻疽菌）および *B. pseudomallei*（類鼻疽菌）がある。さらに、*B. cepacia*、*B. gladioli*、*B. glumae*、*B. plantarii* 等が植物病原菌として知られている。

Burkholderia 属において、16S rDNA を使用した系統樹（図 3-1-2(4)-5）では BSL2 および BSL3 の病原菌と類縁な菌種間で 99% 以上類似しており、識別ができなかったが、8 個のハウスキーピング遺伝子（*dnaJ*、*groEL*、*groES*、*hemA*、*holB*、*holC*、*hscA*、*hscB*）を選抜して MLSA 解析に使用したところ、*B. mallei*-*B. pseudomallei* と *B. thailandensis* の間（図 3-1-2(4)-6、A）、*B. gladioli* と類縁の 7 種（*B. plantarii*、*B. cenocepacia*、*B. vietnamiensis*、*B. multivorans*、*B. cepacia*、*B. ambifaria*、*B. pseudomonallei*）の間（図 3-1-2(4)-6、B）、*B. cepacia* と類縁の 9 種（*B. cenocepacia*、*B. vietnamiensis*、*B. ambifaria*、*B. multivorans*、*B. gladioli*、*B. plantarii*、*B. thailandensis*、*B. monallei*、*B. pseudomonallei*）の間（図 3-1-2(4)-6、-C）で識別が可能となった。

更に、上記の選抜した遺伝子情報にもとづき *Burkholderia* 属の病原体を特異的に検出する PCR 法の開発を試みた。両末端配列の保存性が高い *hemA*、*hscA*、*holB* 遺伝子を対象としてプライマーを設計し、*B. mallei*-*B. pseudomallei* を特異的に検出することに成功した。

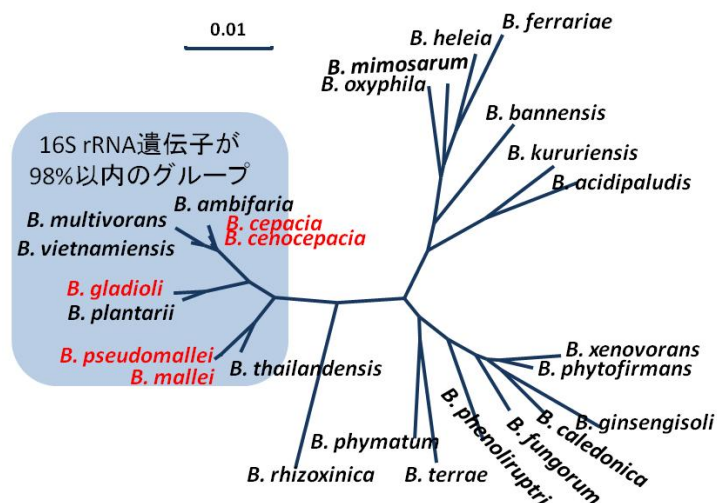


図 3-1-2(4)-5. 16S rDNA の塩基配列にもとづく *Burkholderia* 属の系統関係

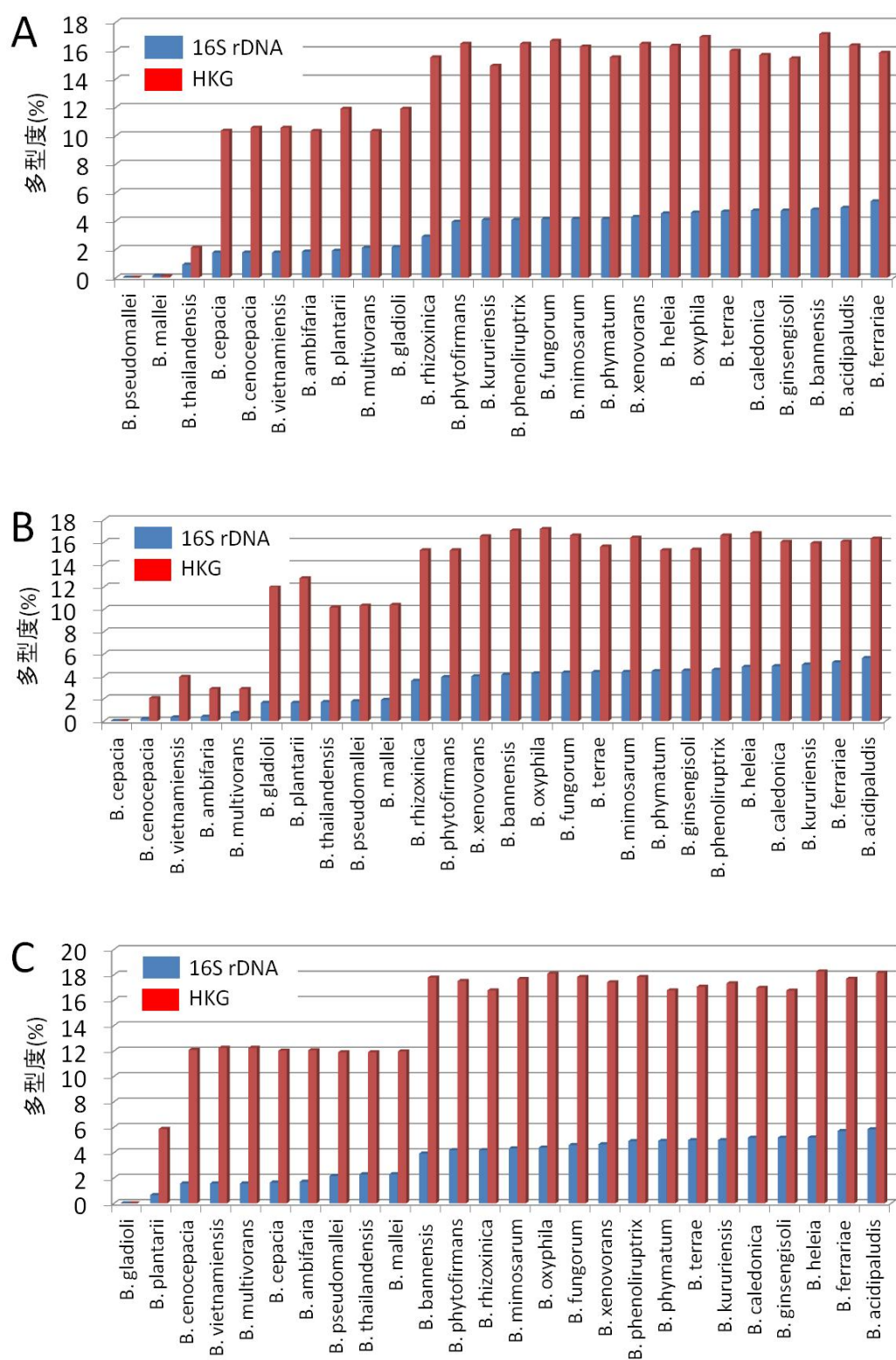


図 3-1-2 (4)-6. *Burkholderia* 属種間での 16S rDNA ならび HKG の配列多型比較

5) *Comamonas* 属

Comamonas 属は 2013 年 3 月現在では合計 16 種が記載されているが、土壌や地下水等の自然環境中で広く検出される。特にビフェニルやフェノールの分解菌として報告例の多い *C. testosteroni* は、ヒト感染症に関する報告も多い。

Comamonas 属細菌では *C. aquatica*、*C. kerstersii*、*C. terrigena*、*C. testosteroni* の 4 種が日和見病原体 (BSL1*) に分類されている。16S rRNA 遺伝子の系統樹では、病原性の *C. testosteroni* と非病原性の *C. thiooxidans* が区別できないという問題がある (図 3-1-2(4)-7)。両者の類縁菌には、4-塩素化ニトロベンゼン分解菌の CNB-2 株、フタル酸分解菌の E6 株、原油分解菌の NBRC 100989 株、PCB 分解菌の TK102 株等の有用株が報告されており、両者の判別とこれらの菌株の分類を試みた。8 個のハウスキーピング遺伝子 (*dnaA*, *dnaJ*, *grpE*, *gyrB*, *hemA*, *holB*, *hscA*, *katG*, *recA*, *rpoB*) での解析を行ったところ、遺伝子ごとに結果が異なり明確な分類が困難であった。

そこで、全ゲノム情報を利用した Average nucleotide identity (ANI) の解析を実施した (表 2)。近年に細菌の種の同定に用いられ始めた ANI では、同一種の ANI の値が 95% 以上になることが示されている。*C. testosteroni* と *C. thiooxidans* は互いに 94.2% の ANI 値を示し、異なる種であることが明確に示された。E6 株および CNB-2 株は、*C. testosteroni* と 94.3%、*C. thiooxidans* とそれぞれ 98.35%、97% の ANI 値を示し、*C. thiooxidans* 種であると判定された。一方、TK102 株と NBRC 100989 株は、*C. testosteroni* および *C. thiooxidans* を含む基準株に対して ANI 値が 95% 以下であり、新種である可能性が示唆された。

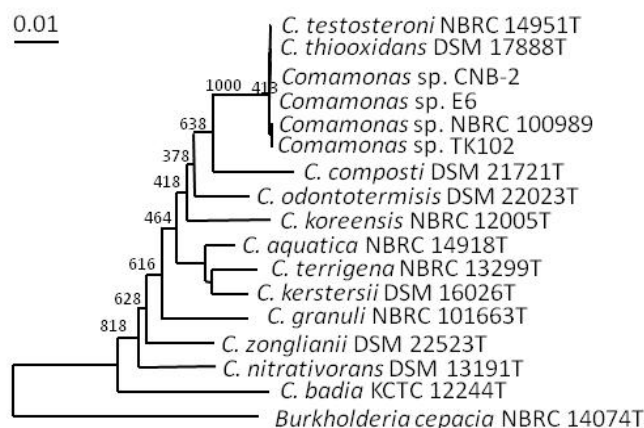


図 3-1-2(4)-7. 16 rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく *Comamonas* 属の系統関係

表 3-1-2(4)-2. *Comamonas* 属菌株の ANI 値(%) 解析結果 (一部省略)

	<i>C. testosteroni</i>	<i>C. thiooxidans</i>	NBRC 100989	TK102	E6	CNB-2
<i>C. testosteroni</i>	–	94.2	92.65	92.65	94.3	94.3
<i>C. thiooxidans</i>	94.2	–	92.15	92.1	98.35	97
NBRC 100989	92.65	92.15	–	98.85	92.3	92.4
TK102	92.65	92.1	98.85	–	92.2	92.25
E6	94.3	98.35	92.3	92.2	–	97
CNB-2	94.3	97	92.4	92.25	97	–
<i>C. koreensis</i>	79.15	79.25	79.2	79.1	79.25	79.25
<i>C. odontotermis</i>	79.55	79.6	79.6	79.55	79.65	79.7
<i>C. terrigena</i>	80.65	80.65	80.85	80.7	80.7	80.7
<i>C. zongliani</i>	79.7	79.95	80	80.25	80	80.15
<i>C. badia</i>	77.4	77.45	77.55	78.2	77.3	77.5
<i>C. granuli</i>	78.75	78.6	78.7	78.75	78.65	78.8
<i>C. nitrivorans</i>	78.65	78.85	78.8	78.9	78.7	78.8
<i>C. kerstersii</i>	79.15	79.25	79.2	79.15	79.2	79.2
<i>C. composti</i>	79.8	79.85	80	80.4	79.75	79.9
<i>C. aquatica</i>	80.15	80.15	80.25	80.15	80.25	80.2

6) *Pseudomonas* 属

Pseudomonas 属細菌の中でも、特に *Pseudomonas putida* はトルエン、ベンゼンやフェノール等の分解菌としての多数の報告がある。その一方で、*P. putida* およびその類縁種 (*P. taiwannensis* および *P. monteilii*) は尿路感染症の患者等からの単離や抗生物質耐性株の報告がある。

16S rRNA 配列においては、基準種の 5 菌種が 98.5%以上の相同性を示し、*P. putida* の分類には不十分であることが知られている。そこで、*P. putida* とその類縁菌 (*Pseudomonas putida* グループ) を識別するために 9 個のハウスキーピング遺伝子 (*argS*, *dnaN*, *dnaQ*, *era*, *gltA*, *gyrB*, *ppnK*, *rpoB*, *rpoD*) を選抜し、MLSA 法を実施した。16S rRNA 遺伝子配列では、系統樹の全分岐点の 8 割が信頼性を示すブーストラップ値が 50%を下回ったが、MLSA 法では全分岐点の 8 割のブーストラップ値が 90%を超えた (図 3-1-2(4)-8)。このことから、MLSA 法の有効性が示された。また、*P. putida* の基準種は、いずれの菌株ともクラスターを形成せず、過去に *P. putida* と同定された基準株以外の菌株は、*P. putida* とは異なる種であることが示唆された。

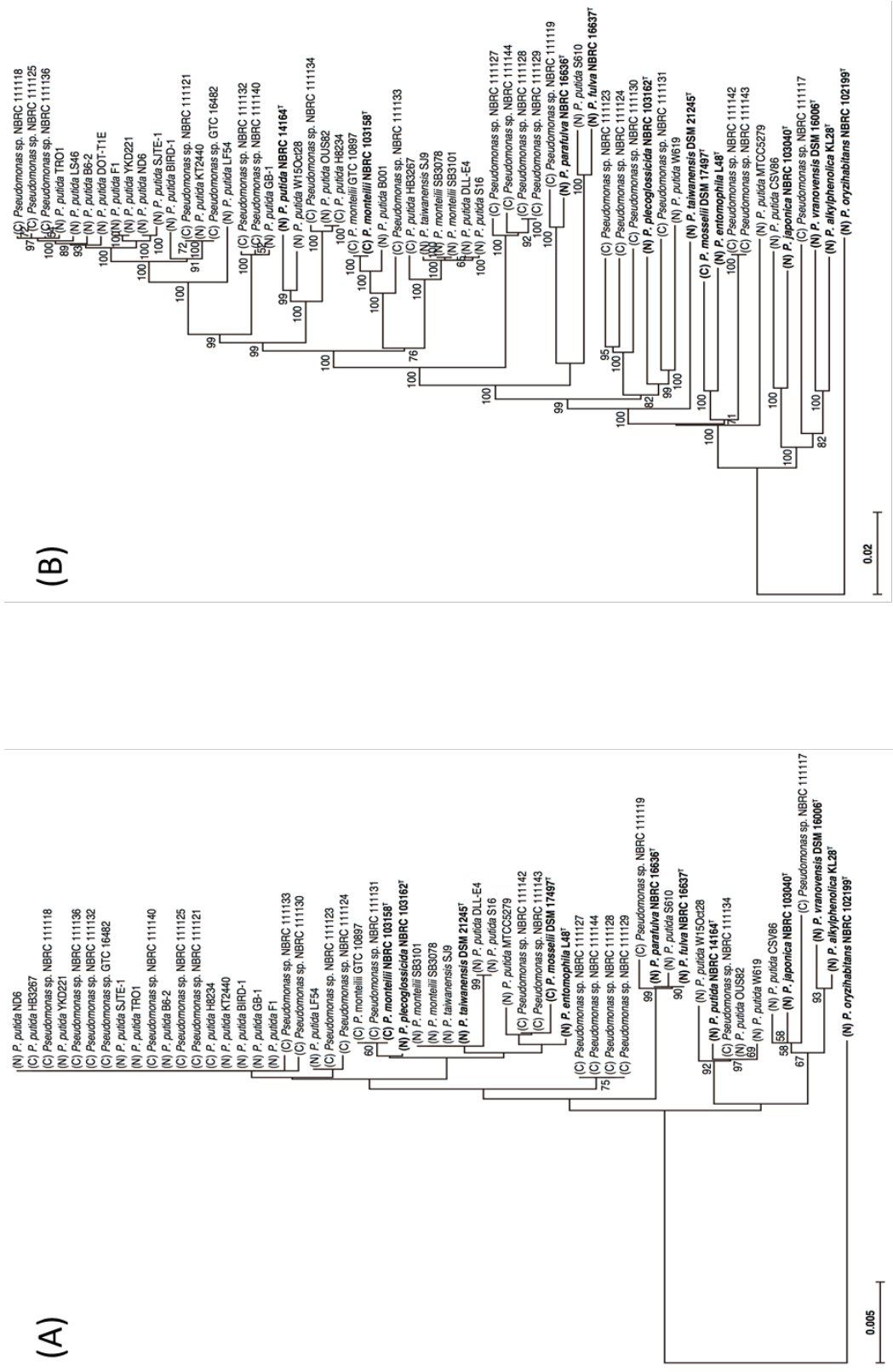


図 3-1-2(4)-8. 16S rRNA 遺伝子 (A) およびハウスキーパー遺伝子 (B) に基づく *Pseudomonas putida* グループの系統樹

放線菌 (*Gordonia* 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属)

Gordonia 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属は共に土壌等の環境から広範囲に検出される菌株であり、アルカン等の炭化水素分解菌としての報告例も多くバイオレメディエーションへの利用が期待される。その一方で、これら放線菌は分類が困難であることが知られており、*Nocardia* 属による感染症（ノカルジア症）は年間約 200 例近くあり、類縁種には病原菌種を数多く含む *Mycobacterium* 属があることから、高精度な判別手法が求められている。

Nocardia 属において遺伝子全長が入手可能で単コピーである 8 遺伝子 (*atpD*, *groL1*, *groL2*, *recA*, *rpoA*, *secY*, *sodA*, *ychF*) から *Gordonia* 属や *Rhodococcus* 属でも遺伝子全長が入手可能で単コピーである 5 遺伝子 (*atpD*, *recA*, *rpoA*, *secY*, *ychF*) を選抜し、MLSA 法を適用したところ、16S rRNA 遺伝子を用いた解析結果（図 3-1-2(4)-9、A）に比べて信頼性と解像度の向上が見られ、*Gordonia* 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属にかかわる正確な系統関係が得られた（図 3-1-2(4)-9、B）。

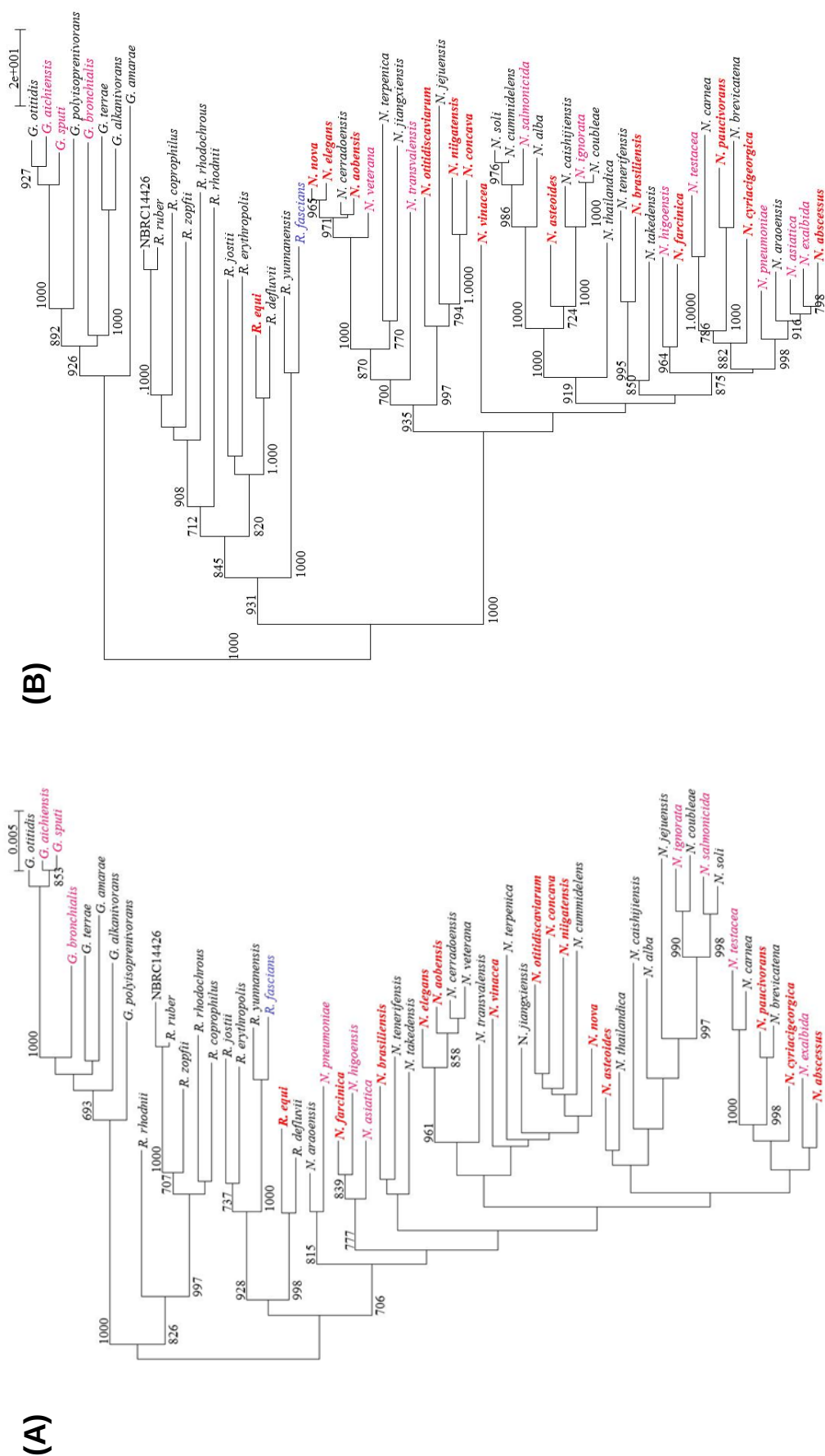


図 3-1-2 (4) -9. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較 (A) と 5 個のハウスキープ遺伝子配列を連結した配列の MLSA 法 (B) に基づく *Gordonia* 属、*Nocardia* 属、*Rhodococcus* 属の系統関係 (ブートストラップ値は 700 以上を表示し、BSL2 の菌の菌名を赤字で、日和見感染菌 (BSL1*) はピンクで、植物病原菌は青字で示した。)

7) 有害菌データベースの作製と利用微生物の安全性評価に必要な技術情報の提供

有害菌データベースの作製

細菌を利用したバイオレメディエーションにおいては、利用菌株の導入によりヒトへの健康影響や自然環境中に存在する他の生物への悪影響を与える危険性がある。このため、事業者はバイオレメディエーション実施に際し、あらかじめ利用細菌の安全性（宿主細菌の病原性や有害物質の産生性等）を評価する必要がある。利用細菌の安全性調査においては、既知情報を活用することが求められるが、既知病原菌の情報は学会および研究機関が公開しているリストや、法律関連文書の中に散在しており、事業者は個別の資料を当たって調査を実施する必要があった。そこで、病原細菌に関わるバイオセーフティーレベル（BSL）、規制等の区分について情報を整理し、病原菌名（学名）ごとにリスト化し、学名から既知病原菌情報が一括で検索できるデータベースを構築した。『微生物有害情報リスト』として、製品評価技術基盤機構（NITE）のウェブページから平成 26 年 3 月から公開した（図 3-1-2(4)-10、URL：<http://www.nite.go.jp/nbrcl/list/risk/>）。

ヒト・動物病原細菌の等の情報は下記 1～3 の機関から収集し、ヒト・動物病原細菌の所持、輸入、使用時の管理等および遺伝子組換え生物等の第二種使用等における拡散防止措置に関する情報を下記 4～6 の資料から収集した。

1. 日本細菌学会（URL：<http://jsbac.org/>）により公開されている『病原細菌の BSL』
2. 国立感染症研究所（URL：<http://www.nih.go.jp/niid/ja/>）の安全管理規程『国立感染症研究所病原体等安全管理規程』
3. ドイツ微生物細胞培養コレクション（DSMZ）（URL：<http://www.dsmz.de/>）『Prokaryotic Nomenclature Up-to-date』
4. 感染症法（感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律）における『特定病原体』
5. 家畜伝染病予防法における『監視伝染病の病原体』および『届出病原体』
6. カルタヘナ法（遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律）に基づく『研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令』で定められる『実験分類』

また、細菌の学名は分類体系の変遷により変更されることがあるため、以下の資料を参考に学名の変遷を調べて過去の学名もデータベースに含めた。

1. ドイツ微生物細胞培養コレクション（DSMZ）（URL：<http://www.dsmz.de/>）『Prokaryotic Nomenclature Up-to-date』
2. LPSN bacterio.net(List of prokaryotic names with standing in nomenclature URL：<http://www.bacterio.net/index.html>)

このデータベースを利用することによって、事業者は調べたい細菌のリスク

情報を学名から一括して検索することが可能となった。

利用微生物の安全性評価に必要な技術情報の提供

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」において、バイオオーグメンテーション事業に使用する微生物の指針への適合確認を求めている。しかし、指針への適合確認に必要な利用微生物の安全性評価は、バイオオーグメンテーションを実施しようとする事業者にとっては経験が浅いことに加え、具体的なプロトコルが提示されておらず、事業者にとって大きな負担となっている。このような背景から、利用微生物の安全性評価に必要な技術情報をインターネット上で公開した（図 3-1-2(4)-10）。



具体的には、より正確な細菌種の同定のために、MLSA 法のプロトコルを公開するとともに、環境汚染物質分解菌としての報告が多くありながら、日和見感染菌としての単離例も多く、さらには、16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統解析法では有用菌（環境汚染物質分解菌）と日和見感染菌の識別が困難な分類群である *Acinetobacter* 属および *Comamonas* 属について MLSA 法を開発した成果も公開することとした。また、*Acinetobacter* 属における主要な病原菌種である *Acinetobacter baumannii* を PCR により迅速に検出するためのプロトコルおよび *Comamonas* 属の GyrB 遺伝子を増幅するユニバーサルプライマーも併せて公開した。

別添（次ページ）：

- イメージ 1. 微生物有害情報リスト（一部）
- イメージ 2. 微生物有害情報リスト解説
- イメージ 3. 技術情報の提供（MLSA 法プロトコル）
- イメージ 4. MLSA 及び PCR（*Acinetobacter* 属、*Comamonas* 属）

別添 1. 微生物有害情報リスト（一部）



National Institute of Technology and Evaluation
独立行政法人 製品評価技術基盤機構

[本文へ](#)
[サイトマップ](#)
[募集案内](#)
[お問い合わせ](#)
[English](#)

[詳細検索](#)
[文字サイズ変更](#)

[標準](#)
[大](#)
[最大](#)

[HOME](#)
[ナイトについて](#)
[バイオテクノロジー](#)
[化学物質管理](#)
[適合性認定](#)
[製品安全](#)

バイオテクノロジー

[HOME](#) > [バイオテクノロジー](#) > [微生物の産業利用に向けた安全性情報の提供](#) > [微生物有害情報リスト](#) > 属名がアルファベット「E」で始まるリスト

微生物有害情報リスト: 属名がアルファベット「E」で始まるリスト

このリストは、ヒト・動物病原細菌のバイオセーフティーレベル（BSL[®]）分類、および、法規制の情報を集めたものです。
本リストについての解説は[こちら](#)を、使い方は[こちら](#)をご覧ください。

※微生物・病原体をその危険度に応じて4段階のリスクレベル（BSL1～BSL4）に分類したもの

[A](#)
[B](#)
[C](#)
[D](#)
[E](#)
[F](#)
[G](#)
[H](#)
[I](#)
[J](#)
[K](#)
[L](#)
[M](#)
[N](#)
[O](#)
[P](#)
[Q](#)
[R](#)
[S](#)
[T](#)
[U](#)
[V](#)
[W](#)
[X](#)
[Y](#)
[Z](#)

Display Option: [basonym\(基礎属名\)及び和名を表示](#) ☒

※各列のタイトル行をクリックすると、ソートされます。

属名/種名/菌株名	山形県 等 情報	日本細菌学 会 BSL [説明]	国立感染症 研究所 BSL [説明]	特定病原 体 (感染症 法) [説明]	菌種分 類 (カル タ ヘナ 法) [説明]	監視伝染病の 病原体と菌種 原体 (家畜伝染病予 防法) [説明]	DSMZ リス ク グ ル ー プ [説明]	備考
<i>Edwardsiella anguillimortifera</i>		BSL1*	-	-	-	-	2, t	属名=Edwardsiella tarda
<i>Edwardsiella hoshinae</i>		-	-	-	-	-	±	
<i>Edwardsiella ictaluri</i>		BSL1*	-	-	-	-	2, ht	
<i>Edwardsiella tarda</i>		BSL1*	-	-	-	-	2, ht	属名=Edwardsiella anguillimortifera
<i>Eggerthella hongkongensis</i>		-	-	-	-	-	-	→Paraeggerthella hongkongensis
<i>Eggerthella lenta</i>		BSL1*	-	-	-	-	2, ht	
<i>Eggerthella sinensis</i>		-	-	-	-	-	±	
<i>Eggerthia cateniformis</i>		BSL1*	-	-	-	-	±	
"Ehrlichia bovis"		-	-	-	-	-	-	⇒Anaplasma bovis
<i>Ehrlichia canis</i>		BSL2	BSL2	-	クラス2	菌出菌原体	2, Zng	
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>		BSL2	BSL2	-	クラス2	-	2, Zng	
<i>Ehrlichia equi</i>		BSL2	-	-	クラス2	菌出菌原体	2, ht	属名=Anaplasma phagocytophilum
<i>Ehrlichia ewingii</i>		BSL2	-	-	クラス2	-	2, Zng	
<i>Ehrlichia muris</i>		BSL2	-	-	クラス2	-	2, t	
"Ehrlichia ovina"		-	-	-	-	菌出菌原体	-	
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>		-	-	-	-	-	-	→Anaplasma phagocytophilum
<i>Ehrlichia risticii</i>		-	-	-	-	-	-	→Neorickettsia risticii
<i>Ehrlichia ruminantium</i>		BSL1*	-	-	-	菌出菌原体	2, Zng	
<i>Ehrlichia sennetsu</i>		-	-	-	-	-	-	→Neorickettsia sennetsu
<i>Eikenella corrodens</i>		BSL1*	-	-	-	-	2	
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>		BSL1*	BSL2	-	クラス2	-	2, ht	
<i>Empedobacter brevis</i>		BSL1*	-	-	-	-	2, ht	
<i>Empedobacter falsenii</i>		-	-	-	-	-	2	
<i>Enterobacter aerogenes</i>		BSL1*	BSL2	-	-	-	2, ht	属名=Klebsiella mobilis
<i>Enterobacter agglomerans</i>		-	-	-	-	-	-	→Pantoea agglomerans
<i>Enterobacter amnigenus</i>		-	-	-	-	-	-	→Lelliottia amnigena
<i>Enterobacter asburiae</i>		BSL1*	-	-	-	-	2	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		BSL1*	-	-	-	-	2	
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>		BSL1*	BSL2	-	-	-	2, ht	
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissovens</i>		BSL1*	BSL2	-	-	-	±, R	

[nite](#) National Institute of Technology and Evaluation
 独立行政法人 製品評価技術基盤機構

[本文へ](#)
[サイトマップ](#)
[事業所案内](#)
[お問い合わせ](#)
[English](#)

Google[®]カスタム検索

[詳細検索](#)
[文字サイズ変更](#)
[標準](#)
[大](#)
[最大](#)

[HOME](#)
[ナイトについて](#)
[バイオテクノロジー](#)
[化学物質評価](#)
[適合性認定](#)
[製品安全](#)

バイオテクノロジー

別添 3. (つづき)

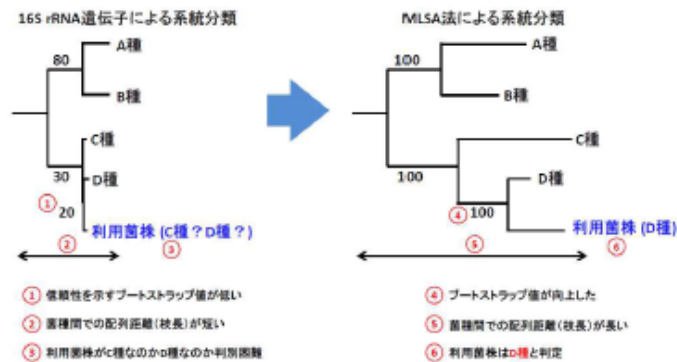


図2 MLSA法による微生物分類の高精度化のイメージ

*1 ハウスキープ遺伝子： 細胞の生育に必須であるため、全細胞で共通に保存されていると考えられる遺伝子のこと。

[ページトップへ](#)

菌種の同定法 ～ Average Nucleotide Identity (ANI) について～

急速な細菌ゲノム情報の蓄積を背景として、菌株間のゲノム配列の類似度をコンピューター上で計算し、簡便・迅速に菌種の同定を行う、Average Nucleotide Identity (ANI)法がDNA-DNA Hybridization (DDH)法にかわる方法として評価されてきています(Goris et al. 2007, IJSEM 57: 81; Richter and Rosselló-Móra 2009, PNAS 106: 105; 図1)。DDHにおける菌種判定の閾値である類似度70%は、ANIにおいて95-96%に相当すると報告されています。このことから、近年では、DDHの代替としてANIに基づく新種の提議が行われてきています(Baek et al. 2015, IJSEM 65: 504; Shahraki et al. 2015, IJSEM 65: 504)。ANI法はDDHと異なり、実験環境や実験者の熟練度などの影響を受けず、ゲノム配列があれば誰が行っても同じ結果を得られます。また、比較したい菌株のゲノム配列が公開されているれば、そのゲノム配列をANIに使用できること、ANIを行うためのWebサイトや無料のソフトウェアが公開されていることから(Figueras et al. 2014, Genome Announc. 2: e00927-14)、対象としている菌株のゲノム配列さえあれば誰でも行うことができます。ただ、この方法はゲノム情報の蓄積が進んだ分類群では容易に利用できますが、ゲノム情報がない分類群では比較対象菌株も含めてゲノム配列を自ら決定する必要があります。今後、より多くの分類群でゲノム情報の蓄積が進むことで、普及してゆくと考えられます。

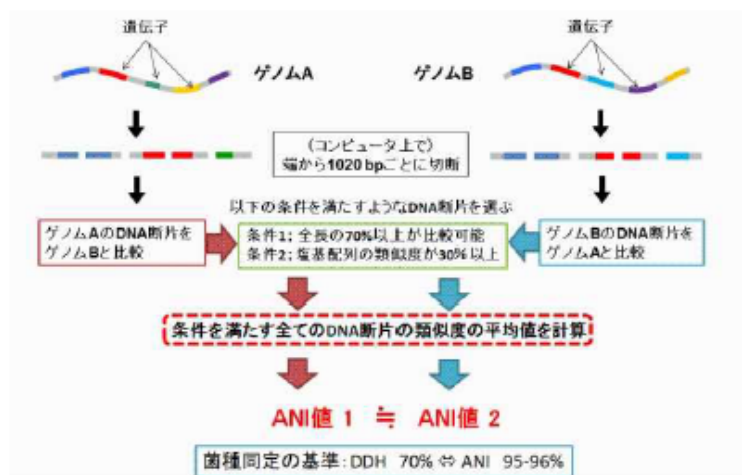


図 ANIの原理

別添 4. MLSA 及び PCR (*Acinetobacter* 属)

Acinetobacter 属

Acinetobacter 属細菌は土壌や河川水などの自然環境中に広く生息する細菌で、環境汚染物質である3, 4-ジクロロアニリン分解菌(NRRC 109690)や原油分解菌(NRRC 109641, NRRC 100985)など私たちに有用な菌株が存在し、これまでに34の菌種が知られています(2014年10月現在)。しかし、*Acinetobacter* 属細菌には *Acinetobacter baumannii* や *Acinetobacter lwoffii* をはじめ、いくつかのヒト病原菌種も存在しています。また、近年では抗生物質が効かない多剤耐性の *Acinetobacter* 属細菌が世界的に問題となっており、日本でも広域β-ラクタム剤、アミノ配糖体、フルオロキノロン系の3系統の薬剤に耐性を示す *Acinetobacter* 属細菌による感染症は、2011年に感染症法で定める5類感染症に加えられ、重点把握の対象となっています。

Acinetobacter 属細菌は各種細菌における16S rRNA遺伝子配列の多型が少なく、正確な分類ができないことが問題となっています。(a) [Kämpfer & Glaeser 2011, Microbiology Australia, 32: 66 \[PDF:201KB\]](#), (b) [Chan et al. 2012, BMC Microbiology, 12: 302](#)。このことから、*Acinetobacter* 属の基準株15株について全ゲノム解析を実施し、既にゲノム配列が公開されている基準株と合わせ、現時点で解析可能な全28種についてMLSAの開発を実施しました。

Multilocus sequence analysis (MLSA)法の開発

A. baumannii のMLST (Multilocus sequence typing) *1-3で用いられ、28株に共通してシングルコピーであった9個のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を使用しました。使用した遺伝子の平均多型は16S rRNA遺伝子に比べて大きいことがわかります(図1)。

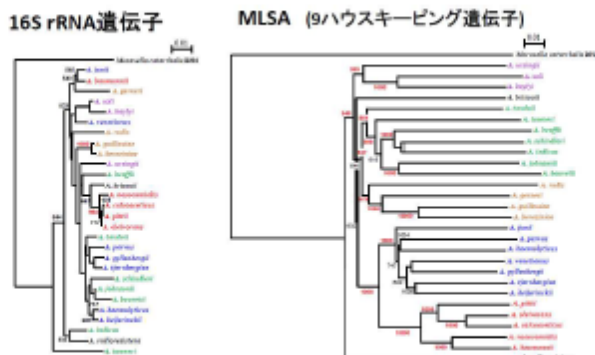


(クリックして画像を拡大)

- *1. ハウスキーピング遺伝子配列に基づいて菌株のタイピングを行い、菌株を識別する方法。
- *2. PubMLST website (<http://pubmlst.org/>) オックスフォード大学が運営しているデータベース (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595)
- *3. PF8:/バスター研究所が運営しているデータベース (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumanni.html>)

9種類のハウスキーピング遺伝子 (cpx60, gltA, gyrB, rplJ, rpoD, fusA, gpi, pyrG, rpoB) を連結した塩基配列を用い

てMLSAを行った結果、16S rRNA遺伝子の塩基配列で描いた系統樹に比べて信頼性を示すブートストラップ値(系統樹上の数字)が飛躍的に向上し、近縁関係をより明確することに成功しました。



(クリックして画像を拡大)
ブートストラップ値900以上を赤字で示している。MLSAのクレードにしたがって種名を色分けしている。

別添 4. MLSA 及び PCR (*Comamonas* 属)

Comamonas属

*Comamonas*属は、土壌や地下水等の自然環境中に広く生息する細菌です。これまでに約17の菌種が知られており、*Comamonas aquatica*、*Comamonas kerstersii*、*Comamonas terrigena*、*Comamonas testosteroni*はまれに臨床検体からも分離されることから、日本細菌学会における病原細菌のバイオセーフティレベル (BSL) で日和見病原体 (BSL1*) に分類されています。*Comamonas*属はおおむね16S rRNA遺伝子配列に基づいた分類が可能です。日和見病原体に該当する*C. testosteroni*と非病原体である*Comamonas thiooxidans*では16S rRNA遺伝子配列が100%一致しており区別できないという問題があります。また、*C. testosteroni*-*C. thiooxidans*のグループには、4-硝基化ニトロベンゼン、ピフェニル、フタル酸および原油等の分解菌の報告があり、これらの有害有用株の安全性を評価する上で*C. testosteroni*-*C. thiooxidans*の判別が重要です。そこで、*Comamonas*属の基準株17株について全ゲノム解析を実施し、MLSAの開発を行いました。

MLSA法の開発

*Comamonas*属およびその類縁な属で系統解析に利用されている表1に示した7種類のハウスキーピング遺伝子を用いました。

遺伝子名	タンパク質名	トリプトファン依存性 (aa)
<i>AutB</i>	DNA polymerase III subunit beta'	934
<i>grpE</i>	Heat shock protein GrpE	435
<i>hemA</i>	Glutaryl-PRNA reductase	1259
<i>dnaJ</i>	Chaperone protein DnaJ	185
<i>grpB</i>	DNA gyrase subunit B	2447
<i>spoB</i>	DNA directed RNA polymerase subunit beta	4107
<i>dhxk</i>	Chromosomal replication initiator protein DnaK	3034

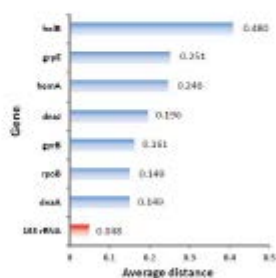
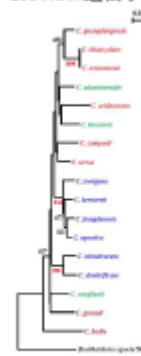


図1 各遺伝子の平均多型度

7種類のハウスキーピング遺伝子 (*dnaA*, *grpE*, *hemA*, *spoB*, *dnaJ*, *grpB*, *dhxk*) を連結した塩基配列を用いて MLSAを行った結果、16S rRNA遺伝子の塩基配列で描いた系統樹に比べて信頼性を示すブートストラップ値 (系統樹上の数字) が飛躍的に向上しました。また、*C. testosteroni*と*C. thiooxidans*を明確に区別することができました。

16S rRNA遺伝子



MLSA (7ハウスキーピング遺伝子)

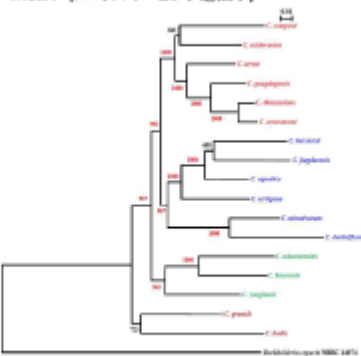


図2 16S rRNA遺伝子とMLSAによる系統樹 (クリックして画像を拡大)

ブートストラップ値900以上を赤字で示している。MLSAのクレードにしたがって種名を色分けしている。



お問い合わせ

独立行政法人製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター 産業連携推進課 天然物創薬支援室

TEL : 0438-20-5764 FAX : 0438-20-5582

住所 : 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ緑地 2-5-8



[お問い合わせフォームへ](#)

①-2. 「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

1. 好気性分解菌の収集、培養、同定、保存

a) 分解菌の収集、培養、同定

塩素化エチレン類の分解菌を取得するために、土壌・地下水試料からの選抜を試みた。環境試料をスターターに用いた集積培養試料から塩素化エチレン類で有意な生育を示す菌を収集し、続いて収集菌の塩素化エチレン類（トリクロロエチレン、シス-ジクロロエチレン、トランス-ジクロロエチレン）分解能を機器分析により評価・選抜した。塩素化エチレン類の中にて決めて選抜を行った。選抜株について、貧栄養培地である R2A 寒天培地または 1/5 LB 寒天培地を用いた純粋分離を行って再度塩素化エチレンでの生育能を確認し、トリクロロエチレンでは 4 株、シス-ジクロロエチレンでは 12 株、トランス-ジクロロエチレンでは 4 株の分解菌候補株を単離した。特にシス-ジクロロエチレン分解菌 YKD221 株は強い分解活性を示し、16S rRNA 遺伝子配列の解析から *Pseudomonas* 属と同定された。

一方、芳香族化合物分解菌におけるトリクロロエチレン分解能の報告が多いことから、芳香族化合物分解能を示す微生物からのトリクロロエチレン分解菌の選抜も行った。環境試料から単離したフェノール資化性菌 (PHE1-3、PHE2-6、PHE3-6、PHE5-1、PHE5-3、PHE5-4) 及びビフェニル分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1、カルバゾール分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 分解菌 *Acinetobacter* sp. 20B 株についてトリクロロエチレン分解試験を行った結果、すべての菌株でトリクロロエチレンの分解が認められた。フェノール資化性菌の 16S rRNA 遺伝子配列の解析から、PHE1-3 と PHE2-6 株は *Comamonas* 属、PHE3-6 株は *Cupriavidus* 属、PHE5-1 株は *Pseudomonas* 属、PHE5-3 株は *Stenotrophomonas* 属、PHE5-4 株は *Variovorax* 属と推定された。

またトリクロロエチレンの分解が報告されている保存菌株 6 株について分譲を受けトリクロロエチレン分解能を調べたが、*Janibacter terrae* NBRC109854 でのみ分解能が認められた。

b) 標準菌株（指針適合株）の保存

本事業で開発した以下塩素化エチレン分解細菌候補株 10 株（表 3）について、（独）製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）に移転し、-その学術研究利用を第 3 者に広げるために NBRC に寄託を行った。

また、嫌気性脱塩素菌 1 株ならびに左記の脱塩素菌の増殖を促進する 2 株については、特許出願のために（独）製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託した。

表3-1-2(4)-3. 分解菌リスト（好気分解菌）

株名	分類	分解基質/必要な誘導基質
RHA1	<i>Rhodococcus jostii</i>	TCE, cDCE/不要
20B	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	TCE, cDCE/ジメチルスルホキシド TCE, cDCE/カルバゾール、アントラ ニル酸
CA10	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	cDCE/不要、TCE/トルエン等
YKD221	<i>Pseudomonas putida</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE1-3	<i>Comamonas thiooxydans</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE2-6	<i>Comamonas thiooxydans</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE3-6	<i>Cupriavidus necator</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE5-1	<i>Variovorax boronicumulans</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE5-3	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等
PHE5-4	<i>Variovorax boronicumulans</i>	TCE, cDCE, tDCE/フェノール等

2. 嫌気性塩素化エチレン類分解菌の収集、培養、同定、保存

a) *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株及び UCH004 株の分離

国内のトリクロロエチレン（TCE）実汚染サイトから採取した地下水及び土壌に、実際のバイオスティミュレーションで使用されている有機資材 TM-B（アミノ酸を主体とする食品添加物、大成建設）または EDC（市販の浄化資材、エコサイクル社）を添加して得られた複合微生物系を接種源とし、*cis*-1, 2-ジクロロエチレン（*cis*-1, 2-DCE）の高脱塩素化活性を有する集積培養物の構築と、アガーシェイク法によるコロニーの分離を行った。

使用培地は He ら (He et al. (2003)) の培地を基本とする炭酸水素緩衝系培地、または改変した MOPS (Good buffer) 系培地を用いた。5mM 酢酸塩、5mM ギ酸塩、5mM 乳酸塩、または有機物 (TM-B 剤) を添加し、バイアル瓶の気相部を、 N_2 (100kPa)、 H_2-N_2 (1:5, 100kPa) 又は H_2-CO_2 (8:2, 100 kPa) とした。*cis*-1, 2-DCE は 0.2-10ppm の濃度範囲で添加した。また、必要に応じて 2-bromoethanesulfonate (BES) と Ampicillin を添加した。全ての培養は 30°C にて行った。

終点希釈による継代を繰り返し半流動培地による集落形成によって得られた微生物コンソーシアムのうち、特に高い脱塩素化活性を示したコンソーシアム Cons. 007 は、16S rRNA 遺伝子のクローン解析の結果、48 個のクローン中 50% の配列が *Dehalococcoides* sp. VS 株の配列 (Accession No. CP001827) と一致し (1343/1344 (99%))、*Dehalococcoides* が高度に集積されていることが明らかとなった。さらに、2-bromoethanesulfonate (BES) と Ampicillin を用いながら希釈培養を繰り返して脱塩素菌を限定化し、アガーシェイク法を用いた 5 回のコロニーアイソレーションを行うことで、国内で初めて *Dehalococcoides* 属細菌 (UCH007 株) の純粋分離に成功した (図 3-1-2(4)-11)。

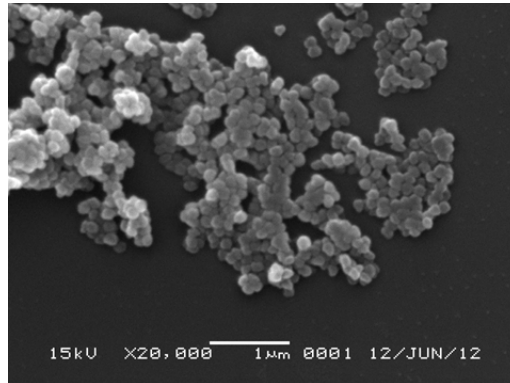


図 3-1-2 (4)-11. UCH007 株の電子顕微鏡写真

UCH007 株は、Löffler ら (2013) が *Dehalococcoides mccartyi* を提唱した際に分類学的基準株 195^T株とともに *D. mccartyi* の同種とした VC 株に対して、1) 全ゲノム情報を利用した類似度 Average nucleotide identity (ANI) が 97.07% であること [Goris ら (2007) は、原核微生物について、ANI での類似性が 96 以上を示せば同種としていることや、2) *D. mccartyi* を特徴づける主な性状と一致することから、*Dehalococcoides mccartyi* と同定された。UCH007 株は、全ゲノム解析の結果、還元的脱塩素酵素 (RdhA) をコードする遺伝子 30 個を有し、PCE 脱塩素化酵素遺伝子 (*pceA*)、TCE 脱塩素化酵素遺伝子 (*tceA*)、*cis*-1, 2-DCE および塩化ビニル VC 脱塩素化酵素遺伝子 (*vcrA*) を有している事が明らかとなったが、培養試験の結果、PCE の脱塩素能を有さず、TCE、*cis*-1, 2-DCE、1, 1-DCE および VC を無害なエチレンにまで脱塩素化できることを確認している。

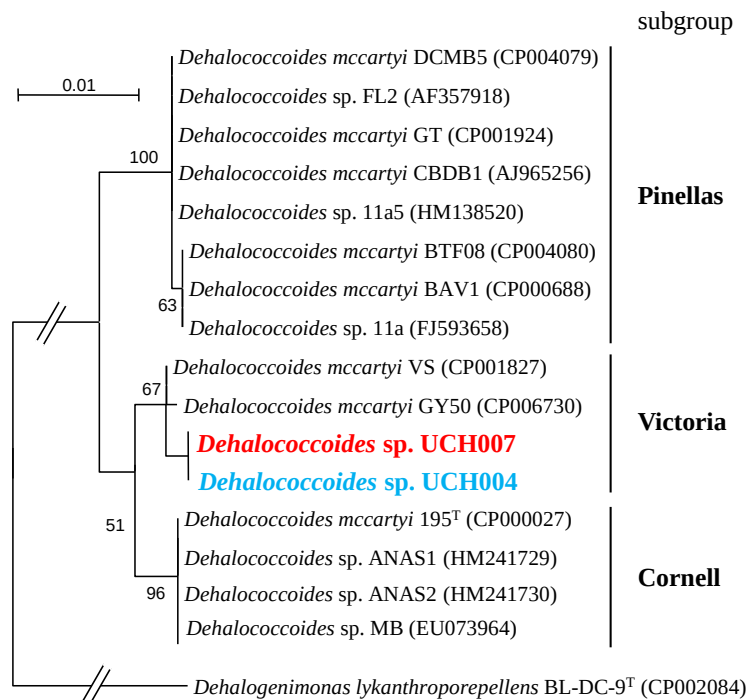


図 3-1-2 (4)-12. 16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹

また、我々は Cons. 007 とは異なった集積培養物から *Dehalococcoides mccartyi* UCH004 株の分離に成功した。UCH004 株は 16S rDNA 塩基配列が UCH007 株と完全一致し、UCH007 と同様、TCE、*cis*-1, 2-DCE、1, 1-DCE および VC の脱塩素能を有する（図 3-1-2(4)-12）。

b) *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株及び UCH003 株の分離と *Sulfurospirillum* 属細菌による *Dehalococcoides* 属細菌の促進効果の発見

我々は、UCH007 株の脱塩素活性を促進する Cons. 007 由来の微生物株のスクリーニングを行い、*Sulfurospirillum* sp. UCH001 株を獲得した。UCH001 株は *cis*-DCE の脱塩素活性は見られなかったが、UCH007 株 UCH001 株を混合し培養したところ、UCH007 単独の場合に比べ、約 2 倍の脱塩素活性が確認された（図 3-1-2(4)-13）。

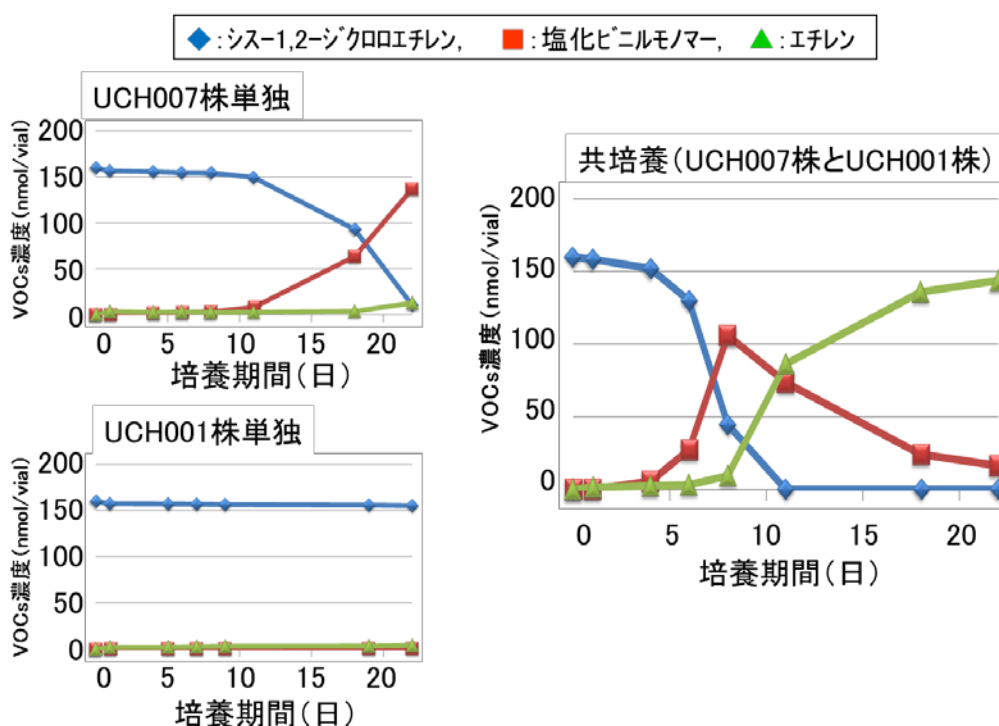


図 3-1-2(4)-13. UCH007 株と UCH001 株の共培養による塩素化エチレンの脱塩素促進効果

Dehalococcoides の促進能は、Cons. 007 とは異なる微生物コンソーシアムから分離した *Sulfurospirillum* sp. UCH003 株や既報の *Sulfurospirillum arsenophilum* MIT-13 株 (NBRC 109478)、*Sulfurospirillum barnesii* SES-3 株 (NBRC 109479)、*Sulfurospirillum multivorans* (NBRC 109480)、*Sulfurospirillum haloferum* PCE-M2 株 (NBRC 109481)、*Sulfurospirillum cavolei* Phe91 株 (NBRC 109482) についても確認され、塩素化エチレン類の脱塩素能の有無にかかわらず、*Sulfurospirillum* 属細菌が共通に有することが示唆

された（図 3-1-2(4)-14）。我々はこの *Dehalococcoides* 属細菌を促進する *Sulfurospirillum* 属細菌との共培養技術について、特許出願を行った（高畑陽ら (2014)）

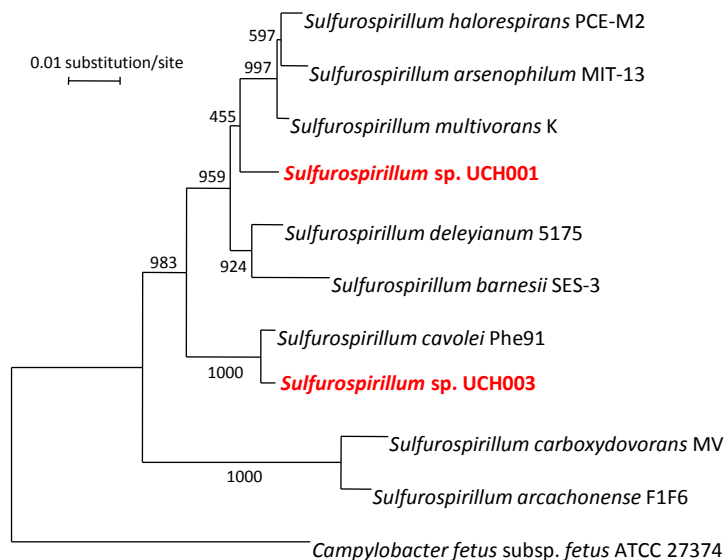


図 3-1-2(4)-14. 16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹

3. バイオレメディエーション指針適合株の開発（好気性分解菌）

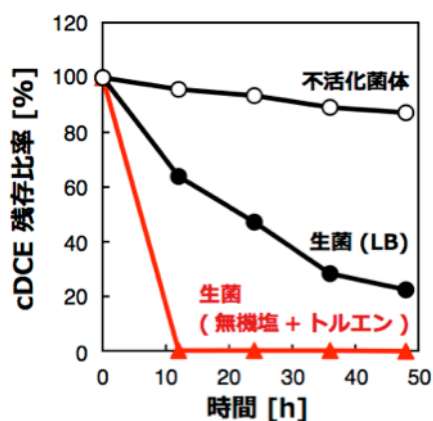
a) 収集分解菌の分解特性解析および選抜

シス-ジクロロエチレン分解菌 YKD221 株の分解能

予めシス-ジクロロエチレンを加えて YKD221 株を培養したところ、分解の促進が観察された。この結果から、YKD221 株のシス-ジクロロエチレン分解がそれ自身によって誘導されることが示唆された。また、対数増殖期中期に最も高い分解活性が得られた。

Pseudomonas 属細菌では、トルエンで生育してトリクロロエチレンを分解する *Pseudomonas putida* F1 株がよく知られている。そこで、YKD221 株のトルエン資化性を調べたところ、トルエンで旺盛に生育し、トルエンで生育した場合にシス-ジクロロエチレンやトリクロロエチレンを強く分解することが明らかになった（図 3-1-2(4)-15）。

A. シス-ジクロロエチレン分



B. トリクロロエチレン分解

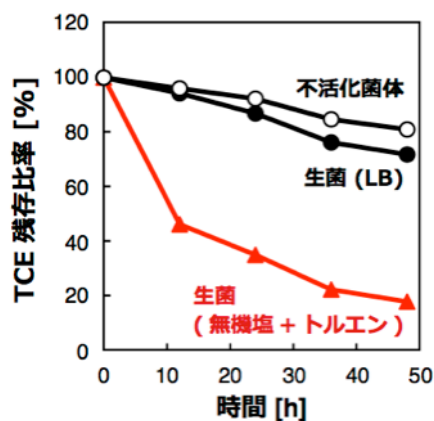
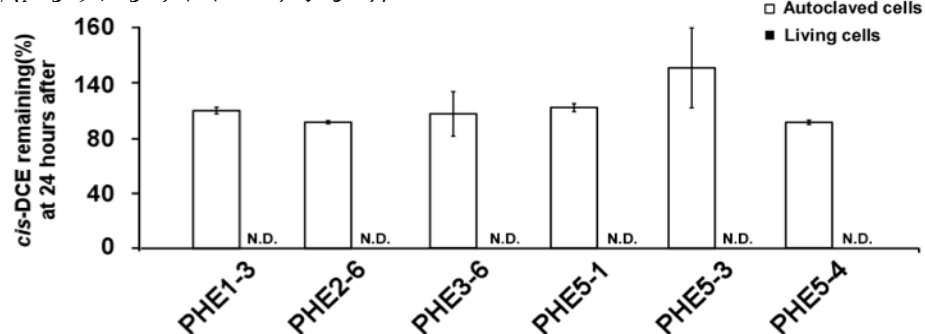


図 3-1-2(4)-15. YKD221 株のシス-ジクロロエチレン分解試験(A) およびトリクロロエチレン分解試験(B). ▲: 無機塩+トルエン培養菌体、●: LB 培地培養菌体、○: オートクレーブ処理した不活化菌体.

フェノール資化性トリクロロエチレン分解菌のフェノールでの生育曲線

6 株のフェノール資化性 TCE 分解菌について、トリクロロエチレン以外の塩素化エチレン類分解能を調べたところ、6 株全てがフェノールで培養することで、トリクロロエチレンに加えてシス-ジクロロエチレン及びトランス-ジクロロエチレンに対する強い分解活性を示した(図 3-1-2(4)-16)。

A. シス-ジクロロエチレン分



B. トランス-ジクロロエチレン分

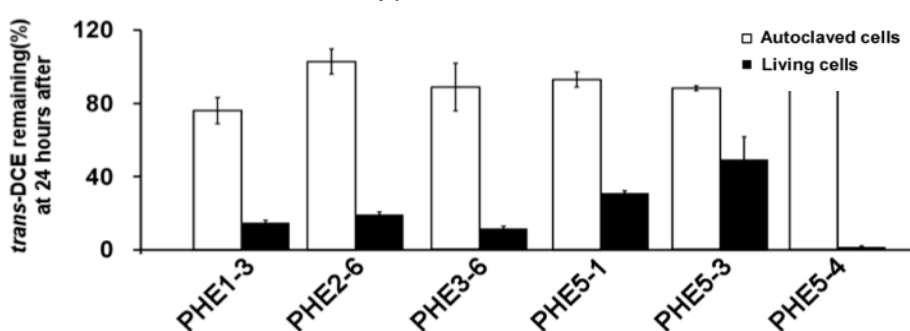


図 3-1-2(4)-16. フェノール資化菌 6 株のシス-ジクロロエチレン (A) およびトランス-ジクロロエチレン (B) 分解試験結果

RHA1 株のトリクロロエチレン分解可能濃度

TCE 濃度を変えて RHA1 による TCE 分解を調べたところ、2 μM まで分解が観察された。0.5 mM では、TCE 存在下で予め培養すると TCE 分解能の促進（誘導）認められたが、1 mM 以上では分解能の誘導は見られなかった（図 3-1-2(4)-17）。RHA1 が分解能を発揮する TCE 汚染濃度は 0.5~1 mM であると予想された。

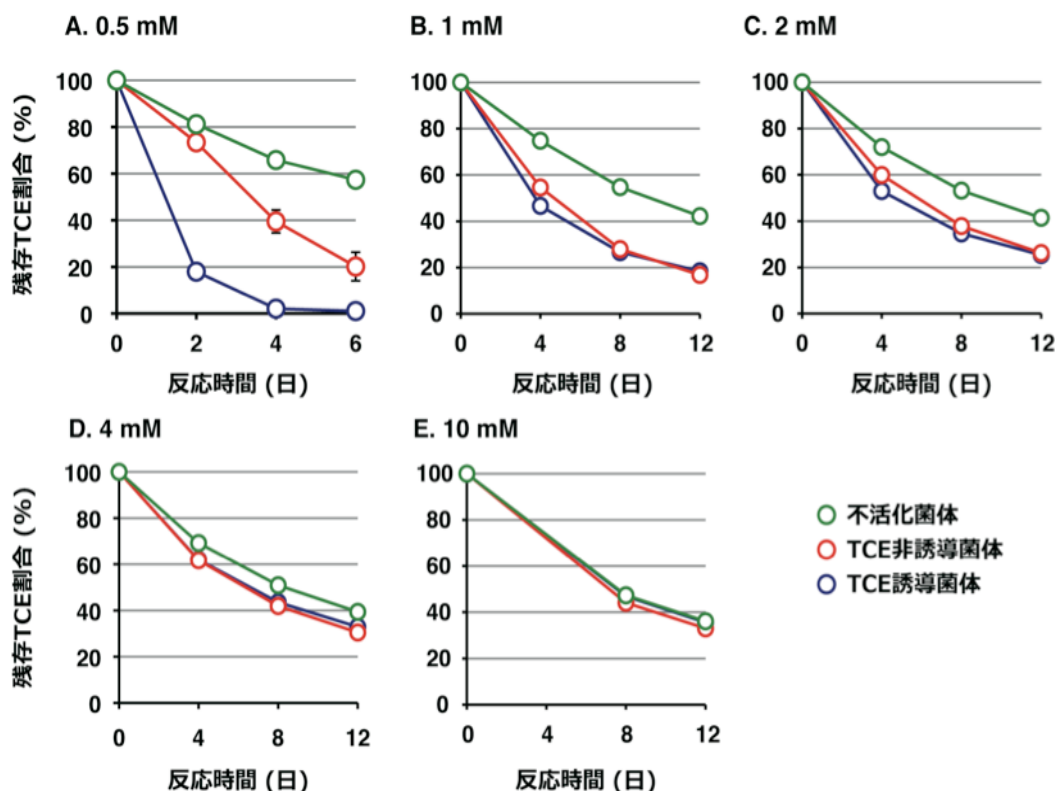


図 3-1-2(4)-17. 様々な TCE 濃度に対する RHA1 株の TCE 分解能試験

RHA1 株のトリクロロエチレン分解遺伝子および分解経路の推定

RHA1 株のトリクロロエチレン分解経路を推定するために、トリクロロエチレン存在下で高発現する遺伝子をマイクロアレイ解析により調べたところ、ビフェニル分解遺伝子群が 12 倍から 62 倍に及ぶ際立った発現上昇を示した。また、ビフェニル培養後にトリクロロエチレン分解が促進されたことから、ビフェニル分解酵素がトリクロロエチレン分解に関与することが示唆された。トルエン分解菌 *Pseudomonas putida* F1 株ではトリクロロエチレンの分解にトルエンジオキシゲナーゼ (TodC) が関与することが明らかにされている。RHA1 株のビフェニル分解には、TodC と類似のビフェニルジオキシゲナーゼ (BphA) およびエチルベンゼンジオキシゲナーゼ (EtbA) が関与しており、BphA および EtbA のトリクロロエチレン分解への関与が考えられた。

そこで BphA および EtbA の遺伝子破壊株を用いてトリクロロエチレン分解への関与を調査した。野生株と BphA 遺伝子破壊株 (HDA1 株) 及び EtbA 遺伝子破壊株 (HDB1 株)、両遺伝子破壊株 (HDAB1 株) について分解能を調べたところ、EtbA 遺伝子破壊株と両遺伝子破壊株で分解能が低下した (図 3-1-2(4)-18)。したがって主として EtbA が分解に関与することが示唆された。

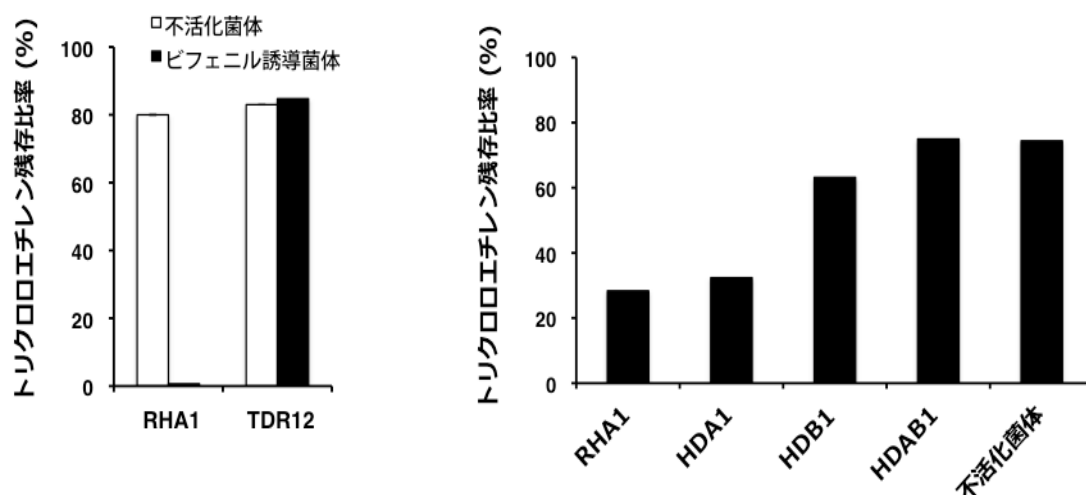


図 3-1-2(4)-18. RHA1 のビフェニル分解酵素系の発現欠損株(TDR12, 左)と初発反応を担うジオキシゲナーゼの各種変異株が示すトリクロロエチレン分解能の解析(右)

更に *Rhodococcus erythropolis* IAM1399 に BphA 遺伝子および EtbA 遺伝子を導入した遺伝子組換え体においても両酵素のトリクロロエチレン分解活性が確認された。以上の結果より、RHA1 株のトリクロロエチレン分解は BphA および EtbA の両ジオキシゲナーゼが触媒することが示唆され、類似のトルエンジオキシゲナーゼが分解を触媒する *P. putida* F1 株と同様のメカニズムによりトリクロロエチレンを分解すると考えられた。*P. putida* F1 株の TodC によるトリクロロエチレンの分解ではギ酸およびグリオキシル酸の生成が報告されている。RHA1 分解でも同様の分解経路で分解されると予想された(図 3-1-2(4)-19)。

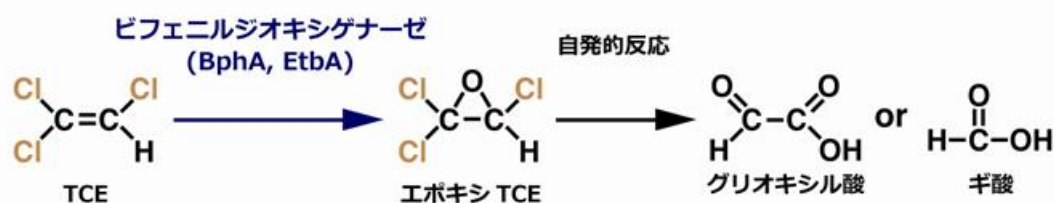


図 3-1-2(4)-19. RHA1 によるトリクロロエチレンの予想分解経路

RHA1 株のトリクロロエチレン以外の塩素化エチレン類に対する分解能

RHA1 株の分解能の誘導性を調べたところ TCE のみでなく他の塩素化エチレン類にも応答してビフェニルジオキシゲナーゼを生産することが示唆された。そこで、TCE 以外の塩素化エチレンに対する分解能を調べたところ、シス-1,2-ジクロロエチレンにも分解活性を持つことが明らかになった(図 3-1-2(4)-20)。

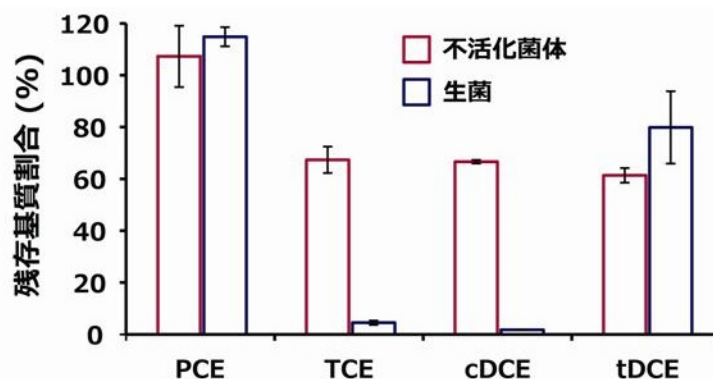


図 3-1-2(4)-20. RHA1 の塩素化シス-1,2-ジクロロエチレン分解能

Acinetobacter guillouiae 20B 株及び *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の塩素化エチレン類分解活性

DMSO 分解菌 20B 株及びカルバゾール分解菌 CA10 株を培養後、TCE 及びシス-1,2-ジクロロエチレン (cDCE) への分解活性を調査した。CA10 株ではアントラニル酸を共存させてカルバゾール分解活性を誘導した。両者は、TCE 及び cDCE の分解性を示した(図 3-1-2(4)-21)。

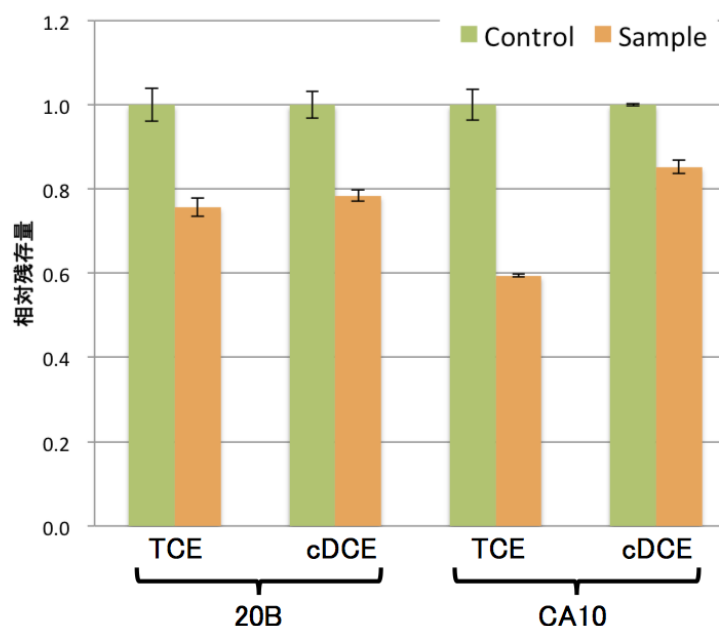


図 3-1-2(4)-21. 20B 株および CA10 株についての TCE および cDCE 分解活性

b) 分解菌のゲノム解析

YKD221 株

ゲノム解析により YKD221 株がトルエン分解菌 *Pseudomonas putida* F1 株と非常に似たゲノム配列を有していることが分かった。YKD221 株の分解に F1 株と同様のトルエンジオキシゲナーゼが関与していることが推定された。YKD221 株のゲノムを調べたところ、F1 株のトルエンジオキシゲナーゼ遺伝子群 (*tod* オペロン) と同じ配列が認められた。(図 3-1-2(4)-22)。

PHE2-6 株および PHE3-6 株

ゲノム解析により PHE2-6 株と PHE3-6 株がフェノール分解菌 *Pseudomonas putida* CF600 株のフェノール 2-モノオキシゲナーゼの α サブユニット (*dmpN*) と類似の遺伝子を持つことが示唆された。(図 3-1-2(4)-23)。

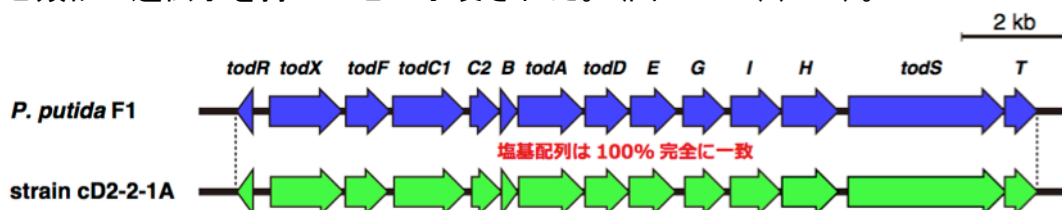


図 3-1-2(4)-. *P. putida* F1 株と YKD221 株の *tod* オペロンの比較

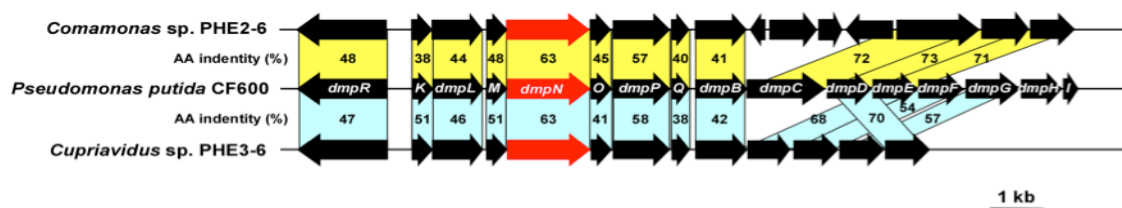


図 3-1-2 (4)-23. PHE2-6 株および PHE3-6 株の推定されるフェノール分解遺伝子クラスター. 赤色で示した *dmpN* はフェノール分解酵素（フェノール 2-モノオキシゲナーゼ α サブユニット）をコードする遺伝子を示す.

20B株

Acinetobacter sp. 20B 株については、ゲノム情報に基づき系統学的に類縁な病原菌で報告のある有害遺伝子の有無を調べて安全性を確認した。20B 株は、緑膿菌の持つ病原因子の転写制御に関する遺伝子に相当する遺伝子を持っていたが、緑膿菌において転写制御を受ける毒素や分泌システムなどの病原遺伝子を有していなかった。一方、緑膿菌においては宿主への感染に関与する重要な病原因子である Type IV pili 関連の遺伝子を 20B 株は保持していた。したがって、20B 株は宿主への付着は可能かもしれないが、宿主にダメージを与えるような毒素、分泌システムは持たないため、有効な薬剤が存在するならばバイレメ株として安全に利用できる菌株であると結論した。

RHA1株

Rhodococcus jostii RHA1株についても、類縁の病原菌である *Mycobacterium tuberculosis*（結核菌）について報告のある有害遺伝子の有無を調べた。結核菌が持つSulfolipid-1合成、Micobactin合成、およびAntigen85 合成に関連した遺伝子については、必要な全遺伝子が揃っておらず機能していないと考えられた。その他に、付着因子hbhA (Heparin-binding hemagglutinin) や抗悪性腫瘍剤ドキソルビシン (doxorubicin) 耐性に寄与するトランスポーター、マクロファージ内での生存に必要であるeis (Enhanced intracellular survival protein)、pknG (Serine/threonine-protein kinase PknG) 等の遺伝子が見つかった。感染に関与するMammalian cell entry (mce) operonsのうちMce4 operonが見つかったがRHA1株自身のステロイド取り込みに関与することが明らかになっている。

c) 動物試験

尚、*Acinetobacter guillouiae* 20B 株と *Rhodococcus jostii* RHA1 株についてはマウスを用いた経口単回投与試験、皮下单回投与試験、経気道単回投与試験、ヒメダカを用いた急性毒性試験、カイコを用いた皮下单回投与試験及び急性経口毒性試験を実施した。カイコを用いた皮下单回投与試験で RHA1 株においてカイコの死滅が認められたものの、その他の試験では被験生物に問題は生じることとはなく、病原性はないと結論された。

d) 定量 PCR 法によるバイレメ利用株を簡便に定量する手法の開発

バイレメ指針適合審査のため、分解菌を特異的に定量する系を構築した。*Acinetobacter guillouiae* 20B、*Pseudomonas* sp. CA10、*Rhodococcus jostii* RHA1、*Dehalococcoides mccartyi* UCH007 の 4 株について、株特異的な定量 PCR 用プライマーおよび TaqMan プローブの設計を行った。配列を下記に示した。前者 3 株については ITS 領域を対象として、*D. mccartyi* UCH007 については 23S-5S rRNA の領域を対象として設計した。*A. guillouiae* 20B は ITS 領域を 7 コピー持ち、設計したプライマー、プローブによりその内 6 コピーが検出可能である。同様に *Pseudomonas* sp. CA10 は ITS 領域 5 コピー全てを検出可能であり、*R. jostii* RHA1 は 4 コピー中 3 コピーを検出可能である。一方、*D. mccartyi* UCH007 の 23S-5S rRNA 領域のコピー数は不明であった。

Acinetobacter guillouiae 20B を検出するプライマーおよびプローブ.

Fo プライマー	5' -CCACCAAGTCTACTGAACACAGAAGA-3'
Re プライマー	5' - CAATTACTTGCTAACATCACTAAAACGA-3'
TaqMa プローブ	5' -FAM- TTCGACTCCGTTAGTCTCCACCACTATATAAAGA-TAMRA-3'

Pseudomonas sp. CA10 を検出するプライマーおよびプローブ.

Fo プライマー	5' - TCGGGTATGTGATAGAAGTGACTTGT -3'
Re プライマー	5' - CAAGCAATCTGCTCGTGATCAT -3'
TaqMa プローブ	5' -FAM- CGGCGAATGTCTCTTCACCCC -TAMRA-3'

Rhodococcus jostii RHA1 を検出するプライマーおよびプローブ.

Fo プライマー	5' - TTTTCTACAGGAAGTGACGACAA -3'
Re プライマー	5' - ACAGACACCAGACCAGAAAAAGC -3'
TaqMa プローブ	5' -FAM- CAAGCACTGCAGGTCAAACCGCA -TAMRA-3'

Dehalococcoides mccartyi UCH007 を検出するプライマーおよびプローブ.

Fo プライマー	5' - GGCTGCATGTGTAAGTACGGTAAC -3'
Re プライマー	5' - GGAGCGGATGCACGCTAT -3'
TaqMa プローブ	5' -FAM-TGTAACAAATATCGCTTGGATCAAGGTTAACAAGTTAMRA-3'

設計したプライマーおよびプローブについては、標的遺伝子が増幅されることをそれぞれ確認した (図 3-1-2 (4)-24)。

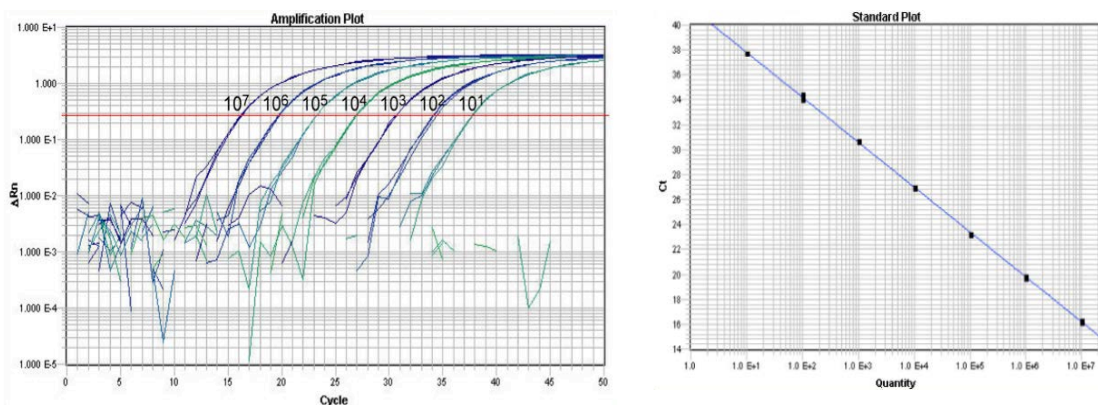


図 3-1-2 (4)-24. *Rhodococcus jostii* RHA1 の増幅曲線(左)と定量のための検量線(右)

4. バイオレメディエーション指針適合株の開発（嫌気性分解菌）

本研究開発事業において単離した *Dehalococcoides* 属細菌 UCH007 株および *Sulfurospirillum* 属細菌 UCH001 株を利用したバイオオーグメンテーションを事業化するためには、両菌株の安全性を確認する必要がある。そこで、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の解説に基づき、利用菌株である UCH007 株と UCH001 株の安全性と利用菌株を野外へ導入した際の生態系への影響評価を実施した。

a) 利用菌株自身の安全性評価

前述の通り、UCH007 株と UCH001 株はそれぞれ、*Dehalococcoides* 属および *Sulfurospirillum* 属と同定されている。*Dehalococcoides* 属及び *Sulfurospirillum* 属ともに、日本細菌学会が作成している病原細菌の BSL レベルのリスト (<http://www.env.go.jp/kijun/wt1.html>) 及び国立感染症研究所病原体等安全管理規程別冊 1 「病原体の BSL 分類等」(平成 22 年 6 月改訂) 等において記載されておらず、ヒトへの病原性の報告はない。また、植物防疫法、家畜伝染病予防法において調査した結果、その病原性は報告されておらず、動植物等への病原性は知られていない。

b) 生態系への影響評価

利用微生物の導入により、汚染環境における土着の微生物群集へ与える影響やヒト動物等の病原菌等の発生する可能性について予め確認しておく必要がある。そこで、塩素化エチレンの実汚染地下水を用いた実験室レベルでの利用微生物を用いたバイオオーグメンテーション試験を実施し、試験期間中における菌叢変化について次世代シーケンサーを用いて解析し、土着の微生物への影響および病原菌が繁殖する可能性について調査した。

また、UCH007株およびUCH001株が浄化作業区域外へ流出したケースを想定し、実験室レベルで非汚染区域から採取した地下水に利用菌株を添加し、経時的に両菌株に特異的なプライマーを使用した定量的な PCR を用いて菌数を計測することで、生残性を確認した。

試験前の汚染地下水に比べ、利用菌株および栄養剤の添加によりトータル菌数は一時的に増加していたが、11日目以降にはトータルの菌数減少が確認された（図 3-1-2(4)-25）。また、菌叢解析の結果では、菌株添加区 11 日目の菌叢において、*Epsilon-proteobacteria* 綱が増加していたが、これは、利用微生物である UCH001 株の添加を反映していると考えられる。しかし、UCH001 株以外の菌叢については全体的に類似していた。以上のことから、トータルの菌数からも菌叢解析からも菌株添加の有無による大きな影響は確認されなかった。

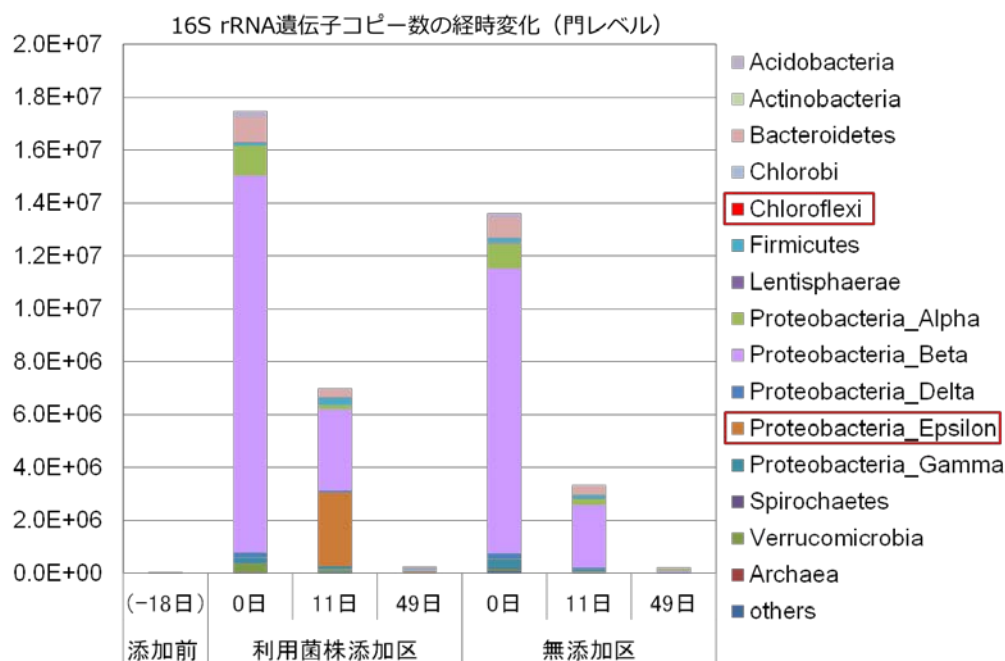


図 3-1-2(4)-25. 利用微生物の添加による生態系影響評価

非汚染地下水における UCH007 株および UCH001 株の残存菌数の推移確認したところ、いずれの菌株も非汚染地下水での増殖は見られず、また、70 日目には投入菌数の約 1000 分の 1 にまで減少することが確認された（図 3-1-2(4)-26）。

以上のことから、万が一、利用微生物が浄化区域外に流出したとしても、塩素化エチレンや栄養物質がない条件下においては減少するものと考えられ、周辺地域への拡散する可能性は低いと判断された。

当該利用微生物は人及び動植物に対する病原性の報告はなく、自然環境中の長期生残性も低いと考えられ、環境中に導入しても生態系等に悪影響を与える可能性は低いと考えられた。

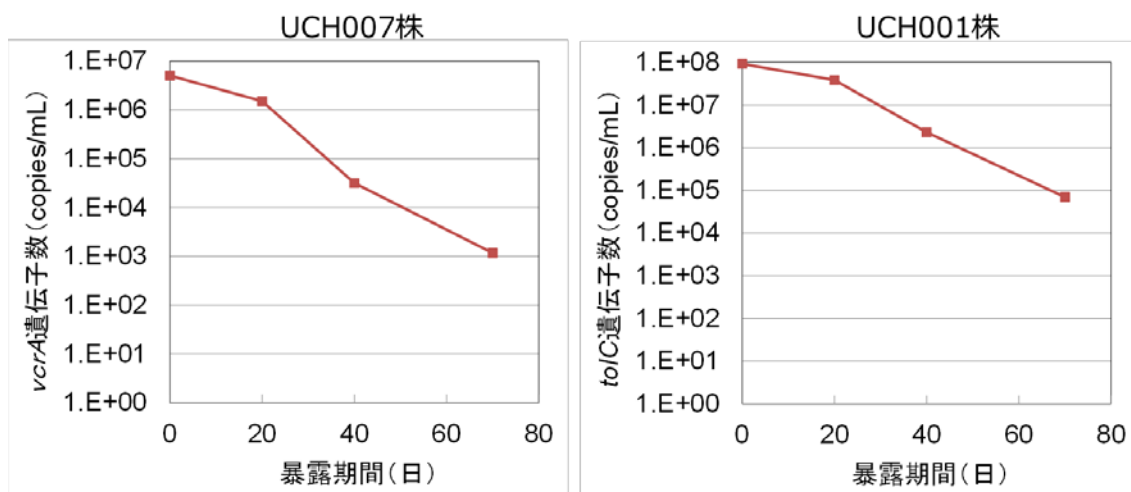


図 3-1-2(4)-26. 定量 PCR 法による UCH007 株と UCH001 株の非汚染地下水での生残性確認

5. 選抜した分解菌の指針適合

選抜した分解菌から塩素化エチレンを好氣的に分解可能な好気性分解菌である *Acinetobacter guillouiae* 20B 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10 株を、塩素化エチレンを嫌氣的に脱塩素化する嫌気性脱塩素菌 *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株と脱塩素反応を促進する *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株及び UCH003 株を、事業名称「バイオオーグメンテーションによる塩素化エチレン類汚染土壌および地下水の浄化」にて「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合確認を申請することとし、平成 26 年 3 月 14 日(木)に開催された経済産業省産業構造審議会化学・バイオ部会微生物開放系利用技術小委員会と環境省中央環境審議会水環境・土壌農薬合同部会バイオレメディエーション小委員会の合同委員会で事前説明を行った。しかし、*Rhodococcus jostii* RHA1 株の分解能が優れていることが明らかになったため、*Acinetobacter guillouiae* 20B 株と *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の代わりに RHA1 株で申請を行った。

1. 好気性分解菌を用いたバイオオーグメンテーション

Rhodococcus jostii RHA1 株

2. 嫌気性脱塩素菌を用いたバイオオーグメンテーション

Dehalococcoides mccartyi UCH007 株と *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株

申請 1 ではトリクロロエチレン及び *cis*-1,2-ジクロロエチレンを浄化対象とし、申請 2 では、トリクロロエチレン及び *cis*-1,2-ジクロロエチレン、塩化ビニルモノマーを浄化対象とした。申請 1 については平成 26 年 4 月 15 日に、申請 2 については平成 27 年 9 月 7 日に、環境省中央環境審議会水環境・土壌薬合同部会バイオレメディエーション小委員会審査分科会と経済産業省産業構造審議会製造産業分科会の合同委員会で（1）分類学上の位置づけと病原性・有害性、（2）分解特性、（3）モデル環境での生残性、（4）モデル環境での生態影響評価試験などについて説明を行い、質疑を受けた。その結果、申請 1 は平成 26 年 10 月 8 日付で、申請 2 については平成 27 年 11 月 25 日付で経済産業大臣及び環境大臣による指針適合確認を受けた。

参考文献：

He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.L., Koenigsberg, S.S. & Löffler, F.E. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* (2003) 424: p62–65.

Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H. & Spormann, A.M. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2013) 63: p625–635.

高畑陽、伊藤雅子、内野佳仁、山副敦司、揮発性有機塩素化合物の脱塩素化能を有する新規微生物およびその利用、特開 2014-108061（2014）

開発項目②「多種微生物群の包括的解析技術の開発」

1. バイオスティミュレーション試験

a) 試験サイトの概要

VOCs 汚染サイトにおけるバイオスティミュレーション実証試験は、平成 23 年度と平成 24 年度の 2 回実施した。2 回の実証試験における井戸配置状況を示した平面図を図 3-1-2(4)-27、断面図を図 3-1-2(4)-28 に示す。ここで、平成 24 年度の実証試験エリアを試験区 1、平成 23 年度の実証試験エリアを試験区 2 とした。各試験区で設置した注入井戸および観測井戸は第一帯水層下部（約 GL-10 m）までのオールスクリーン井戸を用いた。浄化対象とした第一帯水層は砂層または砂礫層が主体であり、透水性の高い土壌であった。注入前に採取した各井戸の地下水性状を表 3-1-2(4)-4 に示す。両試験区では、トリクロロエチレンを主体とする塩素化エチレン類による汚染が確認された。

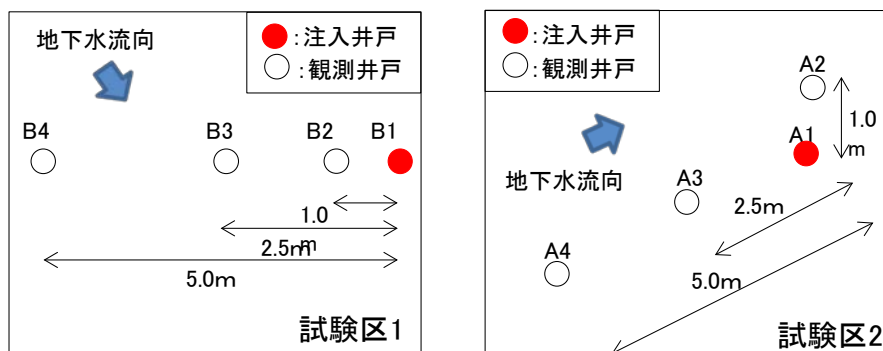


図 3-1-2(4)-27. 実証試験エリアの平面図

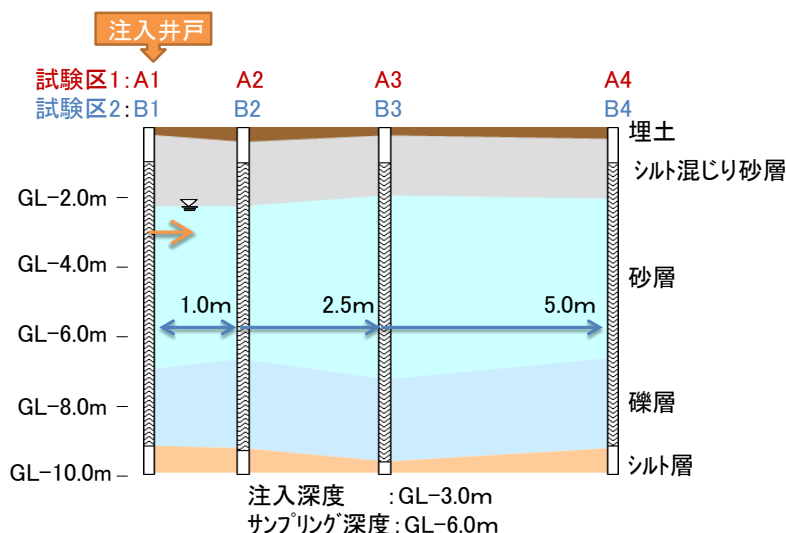


図 3-1-2(4)-28. 実証試験エリアの断面図

図 3-1-2(4)-4. 試験前の地下水の水質性状

測定項目	単位	試験区1				試験区2			
		A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4
pH	—	5.8	5.8	6.0	5.7	5.8	5.8	5.9	6.0
酸化還元電位 (ORP)	mV	64	85	20	111	-63	169	-134	-156
溶存酸素濃度 (DO)	mg/L	<0.1	0.1	<0.1	0.1	<0.1	0.2	0.2	0.1
全有機炭素濃度 (TOC)	mg/L	1.3	0.5	1.6	0.9	0.7	0.9	1.0	1.3
全無機炭素濃度 (IC)	mg/L	17.5	18.2	15.9	11.1	22.1	18.7	17.8	17.2
硫酸イオン濃度	mg/L	27.5	31.2	26.7	22.3	28.8	27.3	27.3	25.0
硝酸性窒素濃度	mg/L	11.0	9.0	6.9	10.7	0.1	0.5	0.3	0.5
亜硝酸性窒素濃度	mg/L	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
アンモニア性窒素濃度	mg/L	0.1	0.3	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
全菌数	cells/ml	4.7E+06	2.6E+06	2.5E+06	1.8E+06	5.7E+05	5.5E+05	5.2E+05	4.3E+05
<i>Dehalococcoides</i> 属細菌 16S rRNA	copies/ml	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
<i>vcrA</i> 遺伝子数	copies/ml	N.Q.	1.4E+02	1.2E+02	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
テトラクロロエチレン (PCE)	mg/L	0.017	0.024	0.018	0.016	0.147	0.156	0.359	0.464
トリクロロエチレン (TCE)	mg/L	0.081	0.136	0.079	0.072	0.128	0.147	0.237	0.306
シス-1,2-ジクロロエチレン (<i>cis</i> -1,2-DCE)	mg/L	0.023	0.022	0.025	0.012	0.027	0.049	0.068	0.081
塩化ビニルモノマー (VCM)	mg/L	0.003	0.004	0.005	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

N.Q.: Not detected (under lower quantification limit)

b) 試験方法

汚染サイトに存在する脱塩素細菌を活性化させて浄化を行うため、ビール酵母エキスを主成分とする即効性有機資材と pH 調整剤を工業用水で希釈して A1 井戸（試験区 1）および B1 井戸（試験区 2）から注入した。注入水中の全有機炭素濃度（TOC）は 500mg/L になるように調製し、トレーサー物質として臭化物イオン（Br⁻）が 10mg/L となるように注入水に臭化ナトリウムを添加した。注入水は高圧ポンプを用いて注入井戸から約 2.7 kL/h の速度で注入し、A1 井戸では 35 時間（総注入量：約 95 kL）、B1 井戸では 40 時間（総注入量：約 110 kL）注入を実施した。定期的に各井戸から水中ポンプを用いて地下水を採取し、VOCs 濃度および水質分析を行った。各試験区における試験条件は表 3-1-2(4)-5 にまとめた。

表 3-1-2(4)-5. 注入試験条件

	試験区1	試験区2
浄化対象	第一帯水層 (GL-2.6~9.6m)	第一帯水層 (GL-2.4~9.0m)
土質性状	砂および砂礫層	砂および砂礫層
汚染物質	塩素化エチレン (トリクロロエチレン主体)	塩素化エチレン (トリクロロエチレン主体)
浄化剤	酵母エキス主体浄化剤 (pH調整剤+トレーサー)	酵母エキス主体浄化剤 (pH調整剤+トレーサー)
有機物濃度	500mg/L	500mg/L
注入速度	2.7kL/h×35時間 (総注入量約95kL)	2.7kL/h×40時間 (総注入量約110kL)
理論注入範囲	注入井戸から3.2m	注入井戸から3.5m
モニタリング期間	10月25日～2月7日 (105日間)	12月1日～2月16日 (77日間)

c) 試験結果

試験区 1 および試験区 2 では、地下水温は概ね 20~25℃の範囲、pH は、5.7 ~6.8 の範囲で推移し、両試験区で大きな違いは生じなかった。

各井戸の溶存性有機炭素濃度（DOC）と臭化物イオン濃度（Br⁻）の推移を図 3-1-2(4)-29、図 3-1-2(4)-30 に示す。両試験区で共に有機資材は注入井戸から 2.5m の範囲（A3, B3）まで到達していることが示された。注入後の Br⁻ 濃度は、試験区 2 で急激に低下する傾向が示され、地下水の移動性には差が見られたが、有機資材の濃度指標となる DOC 濃度は両試験区で同様の減少傾向を示した。有機物が到達した A4 および B4 以外の井戸では、酸化還元電位が VOCs の脱塩素化に適した濃度まで低下していた（図 3-1-2(4)-31）。

有機資材が到達した A4 および B4 以外の井戸では菌数が概ね 1 オーダー以上増加し、その後は漸減傾向を示した（図 3-1-2(4)-32）。一方、図 3-1-2(4)-33、図 3-1-2(4)-34 の試験結果から、試験区 1 では試験区 2 と比較して脱塩素細菌が顕著に増加していることが確認できた。

図 3-1-2(4)-35 から図 3-1-2(4)-36 の VOCs の経時変化の結果から、試験区 1 の A1 井戸および A2 井戸では比較的早い段階で *cis*-1, 2-DCE 以降の脱塩素化が進行し、VCM 以降の脱塩素化も確認された。一方、その他の井戸では、*cis*-1, 2-DCE 以降の速やかな脱塩素化は確認されなかった（図 3-1-2(4)-37、図 3-1-2(4)-38）。この原因として、井戸近辺に流入した有機物濃度が低いため、もしくは到達した有機物が地下水流によって希釈されてしまったため、脱塩素環境に適した嫌気環境が長期的に持続しなかったためと考えられた。

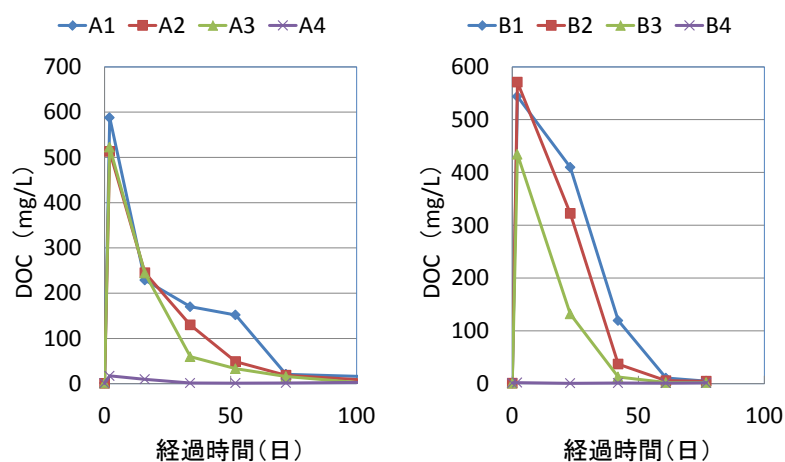


図 3-1-2(4)-29. 溶存性有機炭素濃度の経時変化（左：試験区 1、右：試験区 2）

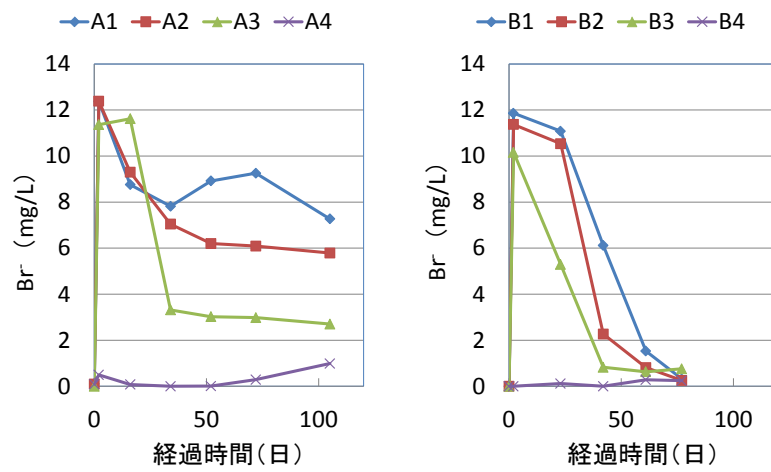


図 3-1-2 (4)-30. トレーサー（臭化物イオン）濃度の経時変化
(左：試験区 1、右：試験区 2)

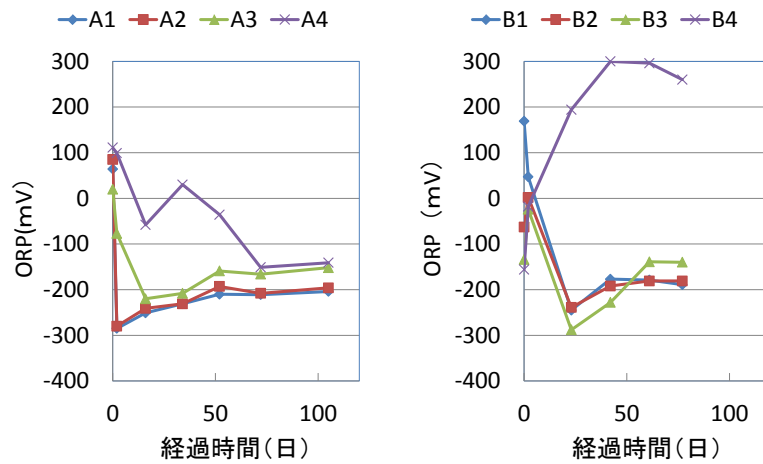


図 3-1-2(4)-31. 酸化還元電位の経時変化（左：試験区 1、右：試験区 2）

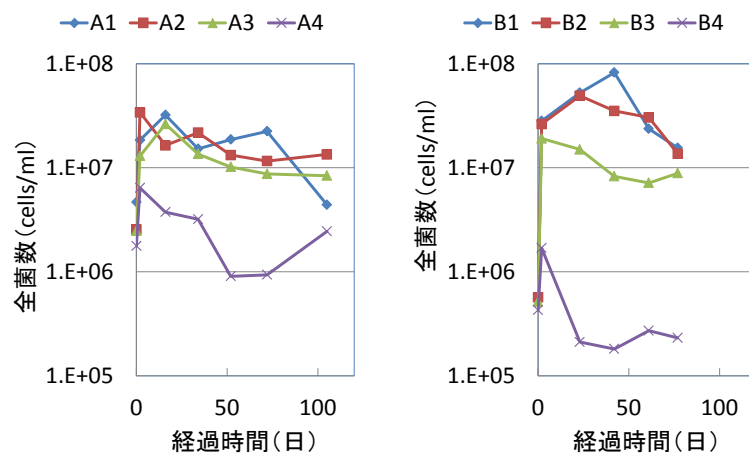


図 3-1-2(4)-32. 全菌数の経時変化（左：試験区 1、右：試験区 2）

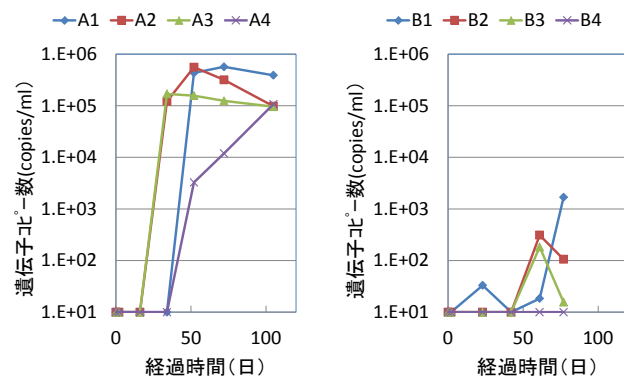


図 3-1-2(4)-33. *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA コピー数の経時変化

(左：試験区 1、右：試験区 2)

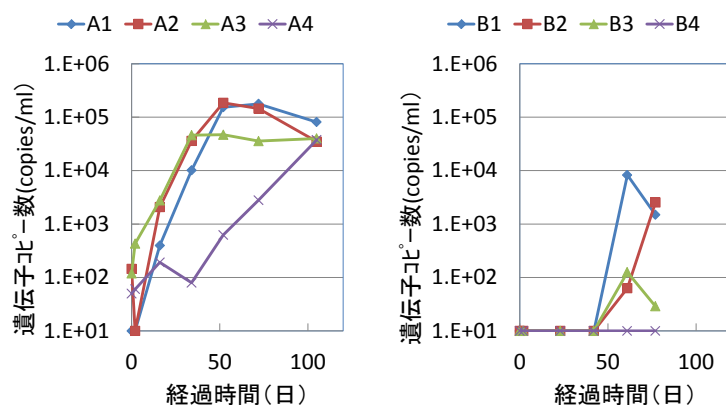


図 3-1-2 (4)-34. *vcrA* 遺伝子コピー数の経時変化
(左：試験区 1、右：試験区 2)

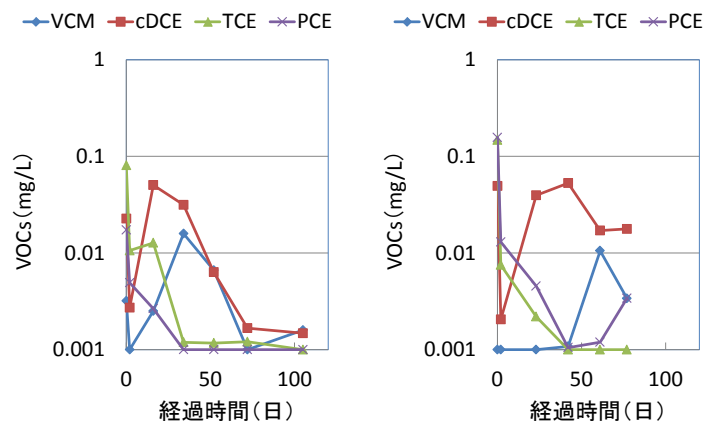


図 3-1-2 (4)-35. 塩素化エチレン類濃度の経時変化
(左：A1 井戸、右：B1 井戸)

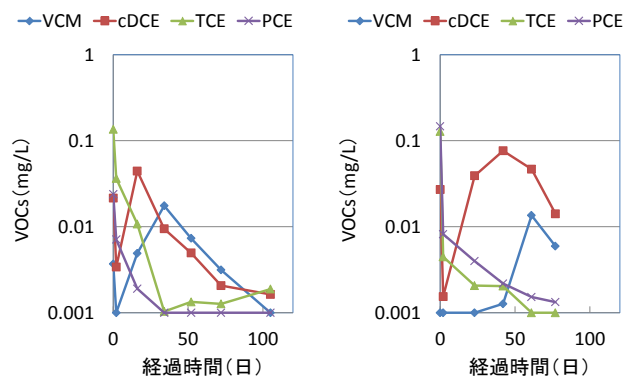


図 3-1-2 (4)-36. 塩素化エチレン類濃度の経時変化
(左：A2 井戸、右：B2 井戸)

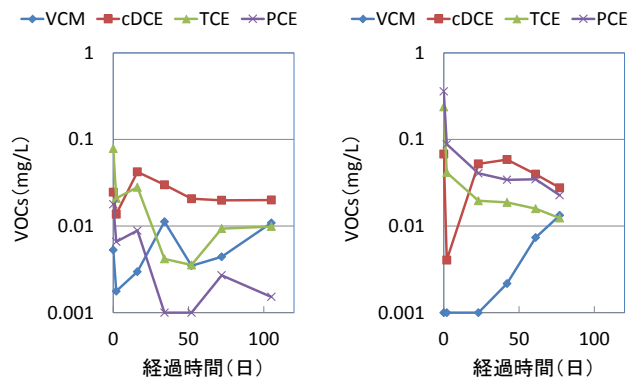


図 3-1-2(4)-37. 塩素化エチレン類濃度の経時変化
(左：A3 井戸、右：B3 井戸)

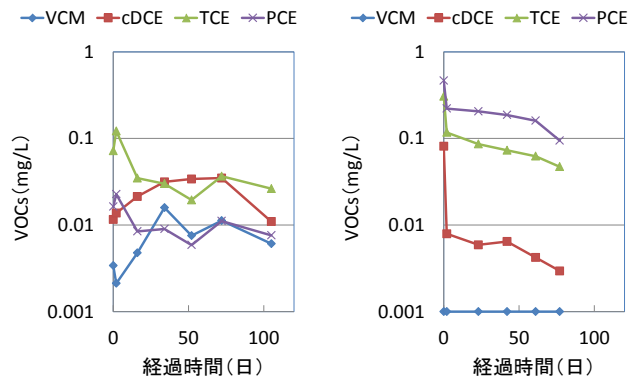


図 3-1-2(4)-38. 塩素化エチレン類濃度の経時変化
(左：A4 井戸、右：B4 井戸)

2. 16S rRNA 遺伝子 DNA 配列による細菌生態系影響評価手法開発

a) 網羅的微生物叢解析手法の確立

次世代シーケンサーを利用した網羅的微生物叢解析手法を確立し、2箇所
の異なる地下水バイオスティミュレーションサイトにおいてその方法を適用し
た。試料としては実汚染現場におけるバイレメ実験で採取した地下水を用いた。
地下水試料を 4℃で遠心して、微生物を回収した。回収した微生物ペレットから
FastDNA SPIN kit for soil を用いて DNA を抽出した。最終的にはそれぞれの
試料について、10~500 ng/μl の DNA 溶液が 100 μl 程度得られた。また、得ら
れた DNA の OD260/280 はほとんどの試料で 1.7 から 1.9 であり、十分な純度の
DNA 試料を抽出することができたと考えられた。本研究では次世代型シーケン
サーとしてロシュ社の GS FLX を用いることとしていたため、PCR での増幅産物

の長さは Pyrosequencing に適した 200～300 bp 程度となるようにプライマーの選定を行った。さらに一度のシーケンス反応で複数の試料を同時に解析するために、それぞれの試料を識別するためのバーコードシーケンス（6 塩基）を 10 種類設計した。設計したバクテリア検出用プライマー配列を表 3-1-2(4)-6 に、原核生物検出用プライマー配列を表 3-1-2(4)-7 に示す。

表 3-1-2(4)-6. バクテリアを検出する次世代型シーケンサー用プライマー
緑：シーケンス用リンカー配列、青：キー配列、赤：バーコード配列（10 種

Bac563F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNNNAYTGGGYDTAAAGVG
Bac802R	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTACCRGGGHTCTAATCC
802R-2	
(ext)	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTACCAGAGTATCTAATTC
802R-3	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGCTACDSRGGTMTCTAATC

類)、黒：バクテリア特異的プライマー配列

表 3-1-2(4)-7. 原核生物を検出する次世代型シーケンサー用プライマー

Uni530F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNNNCAGCMGCCGCGGTAA
Uni802R	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTACNVGGGTATCTAATCC
802R-2 (ext)	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTACCAGAGTATCTAATTC

緑：シーケンス用リンカー配列、青：キー配列、赤：バーコード配列（10 種類)、黒：原核生物特異的プライマー配列

得られた PCR 増幅産物について、次世代型シーケンサー GS FLX (ロシュ社) を用いて微生物叢解析を行った。GS FLX によるシーケンシングは独立行政法人製品評価技術基盤機構が行った。2 箇所の異なるバイオスティミュレーションサイトにおいてそれぞれ、浄化資材を注入した井戸と、そこから 1.0 m、2.5 m、5.0 m の井戸からの地下水を経時的に解析した。

次世代型シーケンサーの一度のランから得られるデータはおよそ百万～百数十万リードに及ぶ。また、各リードは 300 塩基程度の長さの比較的短いデータとなっている。そのため従来のシーケンサーから得られるデータ解析手法とは異なった手法で大量の塩基配列データを処理する必要がある。また、微生物の 16S rRNA 遺伝子を系統情報に基づいて解析するためには、ヒトゲノムの発現解析で用いられているような塩基配列解析パイプラインをそのまま使うことはできない。そこで、100 万シーケンス以上の大量の 16S rRNA 塩基配列データを系統情報に基づいて解析するための UNIX ベースの解析パイプラインを設計・整備した。その解析パイプラインを使用して、地下水試料の 16S rRNA 遺伝子の解析を行った。

原核生物を検出するプライマーを用いた際の結果を図 3-1-2(4)-39 に示す。得られたリード数は 1 試料あたり 3700～25000 リードであった。バイオスティミュレーション実験 1 においては、浄化資材を注入した井戸 (well 0) では注

入前 (Day 0) から注入直後 (Day 2) までは *Proteobacteria* 門が優占的であったが、注入から 23 日目以降では *Firmicutes* 門が優占的であった。注入井戸から 2.5 m 離れた井戸 (well 2.5) においては 23 日目に一度 *Bacteroidetes* 門が増加するが、それ以降は注入井戸と同様に *Firmicutes* 門が優占的となった。注入井戸から 5.0 m 離れた井戸 (well 5.0) では well 0 および well 2.5 とは異なり *Firmicutes* 門が優占的となることはなく、78 日目まで、変動はあるものの *Proteobacteria* 門が優占的な状態が続いていた。バイオスティミュレーション実験 2 においても同様の結果が見られ (図は省略)、well 0 および well 2.5 の資材注入前は *Proteobacteria* 門が優先的であったが、注入後には *Firmicutes* や *Bacteroidetes* 門由来の配列の割合が増加した。Well 5.0 では資材注入前、注入後共に *Proteobacteria* 門が優占的な状態が続いていた。well 2.5 においては浄化資材を注入した井戸からの影響が見られるが、well 0 から離れている well 5.0 においてはその影響が小さかったと考えることができる。

また、検出された微生物群の多様性指数を図 3-1-2(4)-40 に示す。微生物の多様性指数は浄化資材投入直後に一時的に減った後は増加する傾向があることもわかった。この傾向は注入井戸をはじめ全ての観測井戸で見られ、バイオスティミュレーション実験 1 と 2 で同様の傾向を示した。

以上の結果から、構築した 16S rRNA 遺伝子配列をターゲットとした次世代シーケンサーによる解析手法により細菌叢を網羅的に解析することが可能となり、バイオスティミュレーション実験における生態系影響評価に有用であることが示された。

バイオスティミュレーション実験1

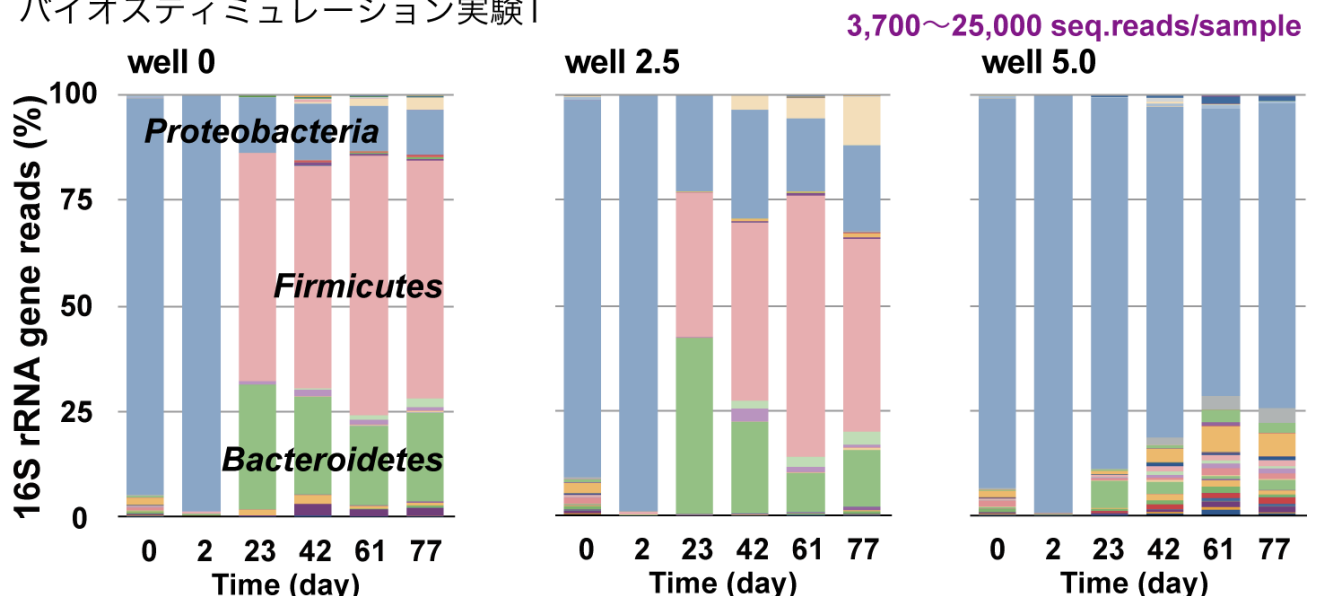


図 3-1-2(4)-39. 次世代シーケンサーを用いた解析による微生物の門レベル系統分類群の分布

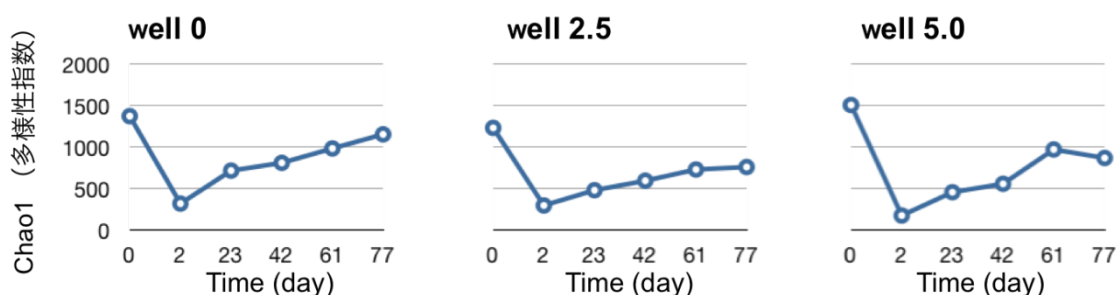


図 3-1-2(4)-40. バイオスティミュレーション実験 1 における微生物の多様性指数

また、構築した UNIX ベースの解析パイプラインについて、特定の微生物群に類似する配列を任意の類似度で抽出するスクリプトの整備を行った。これらの整備されたスクリプトを基盤として、嫌気環境下で PCE などの脱塩素化に関与することが報告されているバクテリアの 16S rRNA 遺伝子データベースを構築し、解析パイプライン上に配置した。このデータベースは *Dehalococcoides* 属バクテリアなどの還元的脱塩素化バクテリア (81 種類) を含むデータベースである。これらのスクリプトを活用して既知の脱塩素化嫌気性バクテリアに近縁な種の消長を解析した。検出された微生物群を属レベルで分類した結果を図 3-1-2(4)-41 に示す。

その結果、97% cutoff 値で *Clostridium* sp. Strain DC1 や *Geobacter lovleyi* strain SZ に近縁な微生物が有機資材注入後に検出されることがわかった。図 3-1-2(4)-41 はバイオスティミュレーション実験 1 のみの結果を示しているが、もう 1 箇所のサイトにおいても同様の結果であった。

また、還元的脱塩素化に関与する可能性のある微生物群として *Dehalobacterium* 属や *Desulfitobacterium* 属の微生物の優占度が浄化資材の投入後に増加していることが明らかとなった (図 3-1-2(4)-42)。

このように、注目したい指標微生物のデータベースを独自に構築することで、バイオレメディエーションの処理過程で特徴的に出現する微生物群の詳細な解析が可能になったことがわかった。

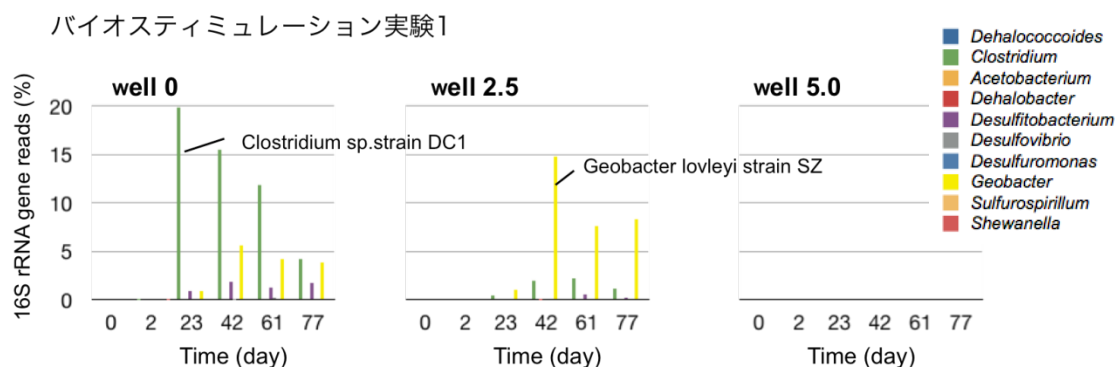


図 3-1-2(4)-41. 次世代シーケンサーを用いた解析による既知の脱塩素化細菌群の消長 (属レベルでの分類)

バイオスティミュレーション実験1

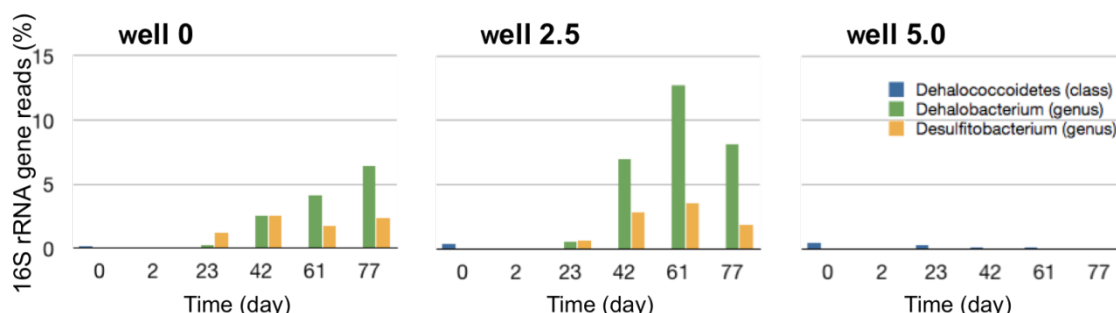


図 3-1-2(4)-42. 次世代シーケンサーを用いた解析による脱塩素化に参与する可能性のある細菌群の消長

b) 定量的微生物群集構造解析手法の開発

さらに、spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子を用いて次世代型シーケンサーから得られる配列データから定量的な微生物群集構造解析を行う手法について開発を進めた。この方法により、定量的 PCR 法を用いることなく次世代シーケンサーによる網羅的な微生物叢解析の際に定量的解析を行うことができる。

spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子はバクテリアの 16S rRNA 遺伝子の V1-8 領域を人工配列（原核生物のゲノム、環境ゲノムのいずれとも類似性の低い配列）に置き換え、保存領域を大腸菌の 16S rRNA とした全長が 1500 塩基の DNA である。人工配列部分の異なる計 5 種類（S1、S2、S3、S6、S8）が存在する。定量 PCR 法による解析結果から、5 種類の spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子の増幅効率ほぼ 0.9~1.0 であること、これらを異なる濃度で混合した際に相関係数の高い検量線を構築できることが明らかになっている。

これらの spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子を試料に既知量添加して PCR を行い、次世代シーケンサーで解析することで、試料中の微生物群に関する定量的なデータを得ることが可能になると考えられる。そこで環境サンプル中の複合微生物群の絶対定量を行う場合の妥当性を検証した。環境サンプルとしては実汚染現場におけるバイオスティミュレーション実験 3 で採取した地下水を計 10 サンプル用いた。最初に地下水試料を 4℃で遠心して、微生物を回収した。各々の微生物ペレットに、5 種類の spike-in 16S rRNA 遺伝子を S1:S2:S3:S6:S8=1:0.3:10:20:30 の比率で混合したものを添加した後、FastDNA SPIN kit for soil を用いて DNA を抽出した。最終的にはそれぞれの試料について、2~100 ng/μL の DNA 溶液が 100 μL 程度得られた。また、得られた DNA の OD260/280 はほとんどの試料で 1.7 以上あり、PCR 増幅可能な純度の DNA 試料を抽出することができたと考えられた。原核生物検出用プライマー配列（Uni530F、Uni802R）を用いて 16S rRNA 遺伝子の v4 領域を増幅し、得られた PCR 増幅産物について、次世代型シーケンサー GS FLX（ロシュ社）を用いて微生物叢解析を行った。GS FLX によるシーケンシングは独立行政法人製品評価技術基盤機構が行った。得られたシーケンスデータを上記と同様の解析パイプラインを

使用して、QIIME で解析を行った。解析したリード数は spike-in 16S rRNA 遺伝子を除いて 1 サンプルあたり 8000~30000 リードであった。

各サンプルについて、サンプルに添加した spike-in 16S rRNA 遺伝子のコピー数を縦軸、次世代シーケンサー解析で得られたリード数を横軸に取って検量線を作成した。一例を図 3-1-2(4)-43 に示す。10 サンプル分の検量線の相関係数は 0.9469~0.9998 の間の値をとっていた。このことから、環境サンプルを用いた場合においてもスパイクイン濃度に依存した次世代シーケンシングのリード数が得られることが明らかとなり、次世代シーケンシングの高い定量性が確認された。

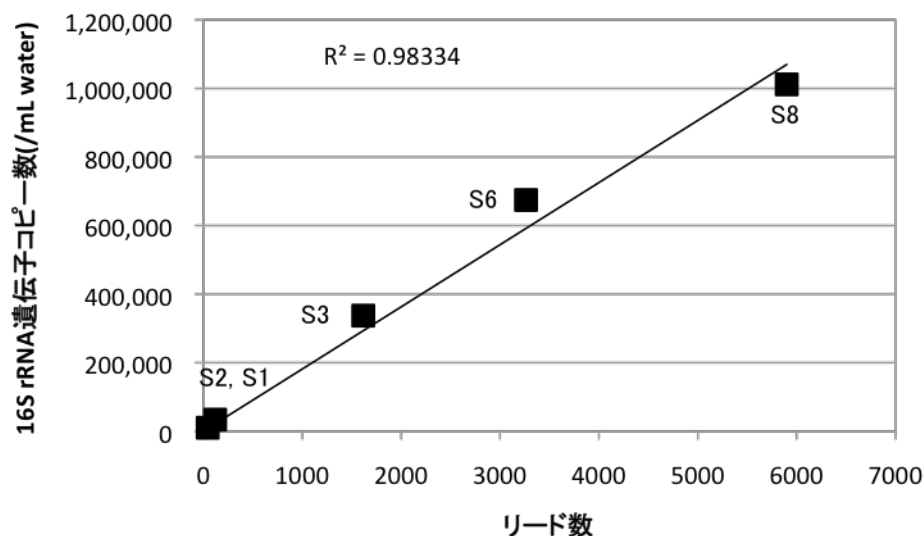


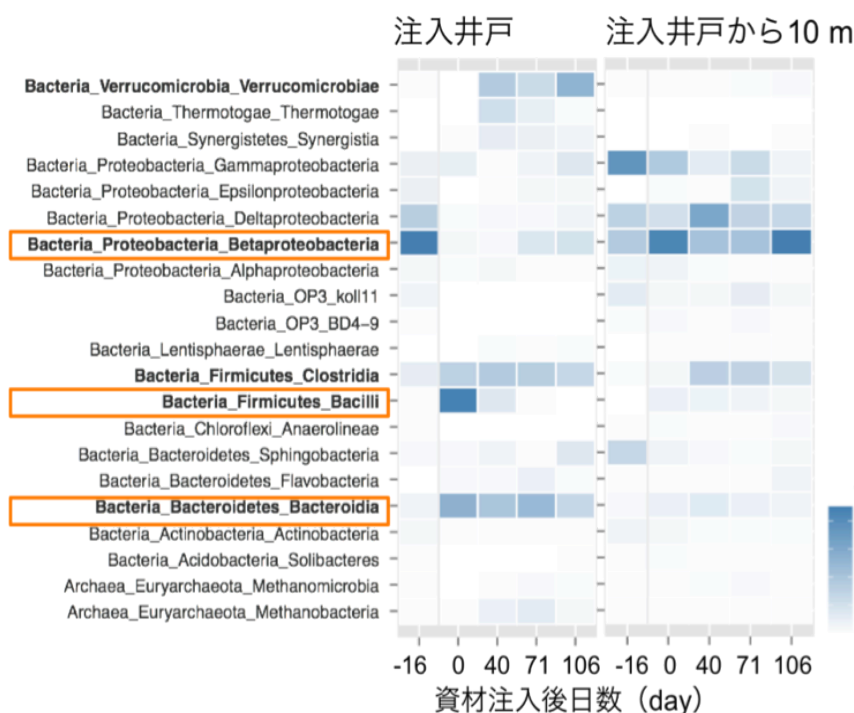
図 3-1-2(4)-43 spike-in 16S rRNA 遺伝子添加量と次世代シーケンサー解析で得られたリード数の相関

次に得られた検量線から、各サンプルに添加した地下水 1 mL あたりの spike-in 16S rRNA 遺伝子の全コピー数を算出した。この値を縦軸に、ダイレクトカウントによる地下水 1 mL あたりの全菌数を横軸にとったところ、両者は、少なくともオーダーレベルにおいてほぼ同じ値を示した。このことから、少なくともオーダーレベルにおいて環境サンプル中の微生物群の絶対定量が妥当であることが確認できた。

以上の結果から、spike-in 16S rRNA 遺伝子を用いて環境サンプル中の複合微生物群の絶対定量を行う場合の妥当性が検証された。

バイオスティミュレーション実験 3 で採取した地下水内の微生物叢を網羅的に解析した結果を以下に示す。有機資材注入井戸および注入井戸から 10 m 離れた井戸の 2 箇所から、資材注入前後の 5 回に渡って採取した計 10 サンプルについて解析を行った。次世代シーケンシングで得られたリードを網レベルで分類し、16S rRNA 遺伝子の存在比率が上位であったものを図 3-1-2(4)-45 に示す。有機資材を注入した井戸においては、注入前 (day -16) には *Betaproteobacteria* 綱や *Deltaproteobacteria* 綱由来の配列の存在比率が高かった。しかし注入直後 (day 0) はそれらの比率は減少し、*Bacilli* 綱や *Bacteroidia* 綱、*Clostridia* 綱などの存在比率が増加するなど菌相の大きな変化が見られた。一方、資材注入井戸から 10 m 離れた井戸においては資材注入前、注入後共に *Betaproteobacteria* 綱、*Deltaproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱などの存在比率が高かった。当該井戸においては資材注入箇所からの影響が小さかったと考えられる。

また、サンプルに添加した spike-in 16S rRNA 遺伝子のコピー数と次世代シーケンサー解析で得られたリード数から検量線を作成し、各綱のコピー数を算出した。資材注入サイトにおける *Betaproteobacteria* 綱は図 3-1-2(4)-45 に示した相対定量値では資材注入後に見かけ上減っているように見えたが、絶対定量の結果その絶対量は増加傾向にあることが判明した。また、資材注入サイトにおいて資材注入後、*Bacteroidia* 綱や *Bacilli* 綱細菌群が 100 倍～10000 倍程度まで増加し、その後減少している様子が確認された。このように、絶対定量を行うことで相対定量では把握できなかった population の変動情報を取得できることが明らかとなった。



図表 3-1-2 (4)-45. バイレメサイトにおける微生物の綱レベル系統分類群のヒートマップ（相対定量値）

c) バイオスティミュレーション実験での有害菌の定量・評価の結果

有害菌の定量および評価を行うために、有害性微生物群の指標微生物としてバイオセーフティレベル (BSL) 1*~3 に該当するバクテリアの 16S rRNA 遺伝子データベースを構築し、上述した解析パイプライン上に配置した。このデータベースは BSL1* (BSL1op、日和見バクテリア)、BSL2、BSL3 に属するバクテリア群 (990 種類以上) のデータベースであり、BSL1*、BSL2、BSL3 をそれぞれ個別に抽出可能な設定になっている。このデータベースを利用して有害性微生物群に近縁な微生物の消長をモニタリングした結果の一部を図 3-1-2 (4)-47 に示す。シーケンシングした配列が有害性微生物群の 16S rRNA 遺伝子配列と 99% 以上一致した場合に近縁種として検出した。

well 0 や well 2.5 においては資材注入後に BSL1*が増加していたが、その増加は一過的なものであった。バイオスティミュレーション実験 1 においては、BSL2 に分類された配列は 1 種類・2seq 存在したが、病原菌の配列と 100% 一致はしなかった。また、BSL3 に分類される配列は存在しなかった。バイオスティミュレーション実験 2 においても BSL2、BSL3 に分類された微生物の存在比率は BSL1*と比較して非常にわずかであり、BSL3 に分類された微生物 (*Bacillus anthracis* と *Yersinia pestis* の計 2 種類・8reads) はシーケンシングに用いた 251 bp の配列が病原菌の配列と 100% 一致したが、同時に BSL1*や BSL2 に分類された微生物の配列とも 100% の一致を示しており、この結果からだけでは BSL3 の微生物の存在を明らかにできなかった。

また、2 箇所のバイオスティミュレーション実験で検出された病原性細菌群近縁種の 相対優占度曲線を 図 3-1-2 (4)-48 に示す。どちらの実験においても、検出された微生物の大半は *Acinetobacter* 属あるいは *Comamonas* 属に属していた。

バイオスティミュレーション実験1

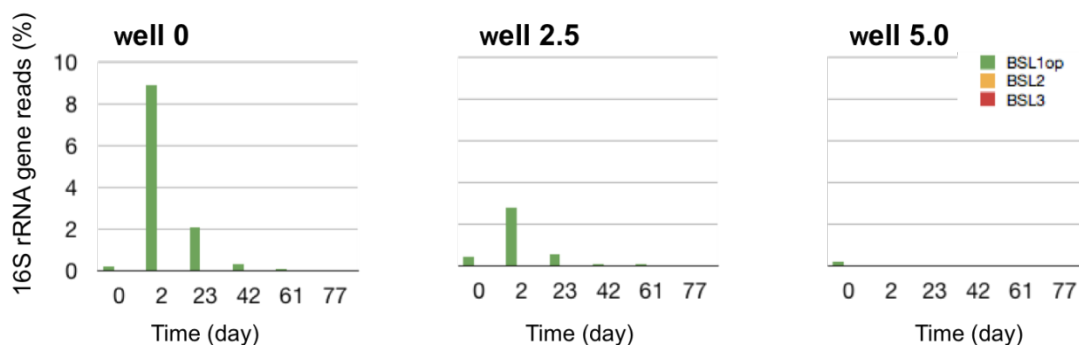


図 3-1-2 (4)-47. 病原性細菌群近縁種の消長

バイオスティミュレーション実験1

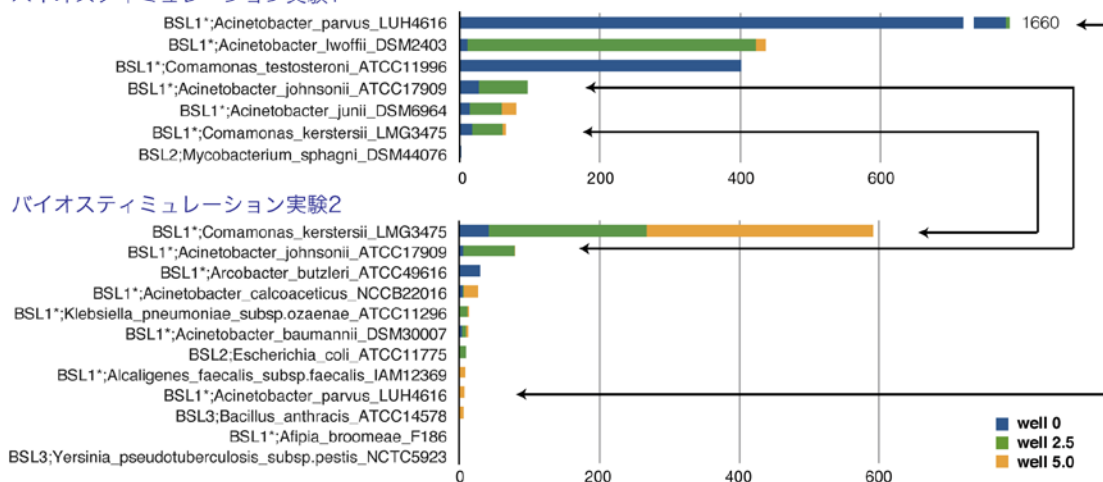


図 3-1-2 (4)-48. 病原性細菌群近縁種の 相対優占度曲線

バイオスティミュレーション実験 3 においても同様に有害性微生物群に近縁な微生物の消長をモニタリングした。結果を図 3-1-2 (4)-49 に示す。最も病原性の高い BSL3 に近縁な細菌群は 1 箇所のサンプリング箇所でのみ検出されたが、そのリード数はごく僅かであった。パイロシーケンシングに用いた部分の配列が *Bacillus anthracis* ATCC 14578 の配列に 100%一致していたが、日和見菌である *Bacillus weihenstephanensis* DSM11821 や病原性を持たない *Bacillus subtilis* の配列とも 100%一致していた、そのためこの配列が真に BSL3 の病原菌由来であるかどうかは 16S rRNA 遺伝子の配列を調べるだけでは明らかにすることができず、各種の機能遺伝子を指標とした検出が必要である。Day 173 およ

び day 191 で検出された病原性細菌近縁種の存在比は day 40～106 と比較して同程度あるいは減少しており、バイレメ処理全体では資材注入直後に一過的に存在比が増加するという傾向はバイオスティミュレーション実験 1 や 2 と違いはなかった。BSL1*データで存在比の大きいものとしては、注入井戸では *Eubacterium limosum*、*Clostridium glycolicum*、*Arcobacter butzleri* などが、また資材注入井戸から 10 m 離れた井戸においては *Guanulicatella balaenopterae* が挙げられたが、これらは全て病原菌の配列と 1 塩基以上不一致の箇所を持っていた。

spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子を用いて BSL2 近縁種の絶対定量値を算出した結果、もっとも存在量の多かった細菌は、有機資材注入井戸の Day 0 における *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* であり、その量は 3.8×10^5 copies/mL 地下水程度であった。検出された BSL2 近縁種のうち、*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* と *Escherichia coli* (ATCC11775) の近縁種として分類されたものについては、シーケンシングに用いた 251 bp の配列が病原菌の配列と 100%一致していた。ただしこれらの配列は BSL1*や非病原菌の配列とも 100%一致する可能性がある。そのため、真に病原菌の配列であるかどうかは 16S rRNA 遺伝子の配列を調べるだけでは明らかにすることができず、各種の機能遺伝子を指標とした検出が必要である。また、他の BSL2 近縁種としては *Streptococcus suis*、*Aeromonas veronii*、*Clostridium chauvoei* などが検出されたが、それらの配列は病原菌として登録されている配列と 1 塩基以上の不一致が見られた。

以上の結果から、16S rRNA 遺伝子配列をターゲットとした有害菌の定量・評価は、有害菌検出の一次スクリーニングとして有用であることが示された。ただし真に有害菌であるかの判断には他の遺伝子解析と組み合わせる必要があると考えられる。

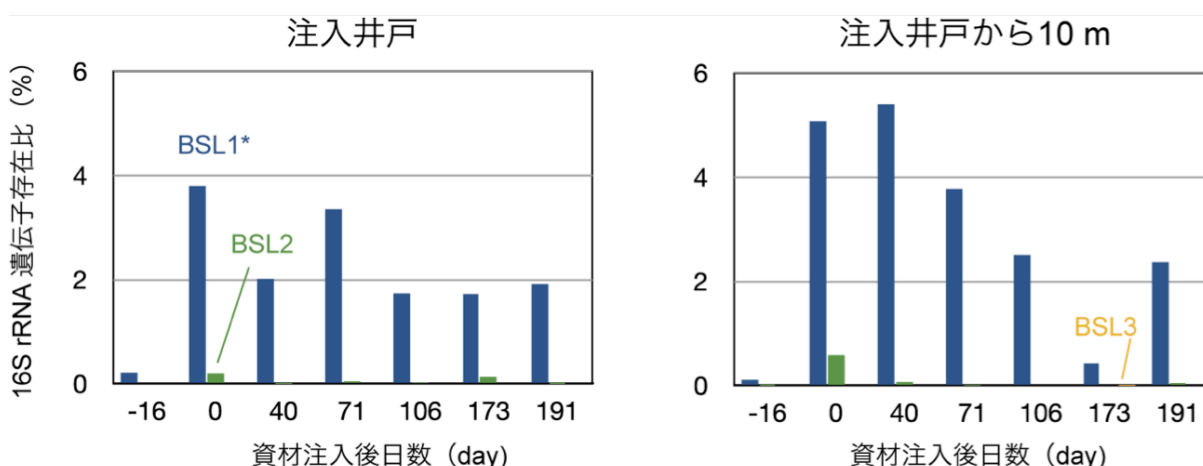


図 3-1-2(4)-49. 病原性細菌近縁種の相対定量値

d) 病原菌特異的な定量 PCR を用いた安全性評価

地下水から直接抽出した DNA 由来の 16S rDNA 遺伝子配列の解析により試料中に含まれる微生物（細菌）種を特定する手法によって、病原性細菌（BSL2 以上）の類縁菌種であることが疑われたサンプルのうち、以下の病原菌類縁菌種が検出されたサンプルについて追試を実施し、検出菌が病原菌であるかの評価を実施した。

使用したプライマーは独自に設計および検証した物を使用した。

① *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の特異的検出

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* (BSL2) は C, G 群溶血性連鎖球菌（溶連菌）に属し、主に高齢者に化膿性疾患を起こすが、代表的病原性菌種 *S. pyogenes*（A 群溶血性連鎖球菌）ほどはヒトへの病原性が強くないが、牛や馬の病原体としても知られている。本菌の類縁菌は（塩基配列 100%一致） $<3.8 \times 10^5$ copy/ml 検出された。BSL2 の病原菌が 10^4 以上検出されると経過観察が必要なレベルであると判断されることから、毒素遺伝子を指標とした追加試験を実施して *Streptococcus dysgalactiae* 種であるかどうかの確認を行うことが必要と判断した。

追加試験は β 溶血性連鎖球菌 A、C および G 群によって産生されるスルフヒドリル活性化毒素である「ストレプトリジン O 遺伝子」およびハウスキーピング遺伝子の「分子シャペロン遺伝子 *dnaJ*」をターゲットとした。その結果、両遺伝子ともに陽性であった（図 3-1-2(4)-51）。したがって、検体試料中に *Streptococcus dysgalactiae* group の菌が存在していると判断した。そのため、経過観察を行ったが、有意な菌数が確認されたのは浄化資材投入後のみであり、40 日目以降には確認されなかった。作業員への暴露や近隣への拡散もないことから問題はないと判断した。

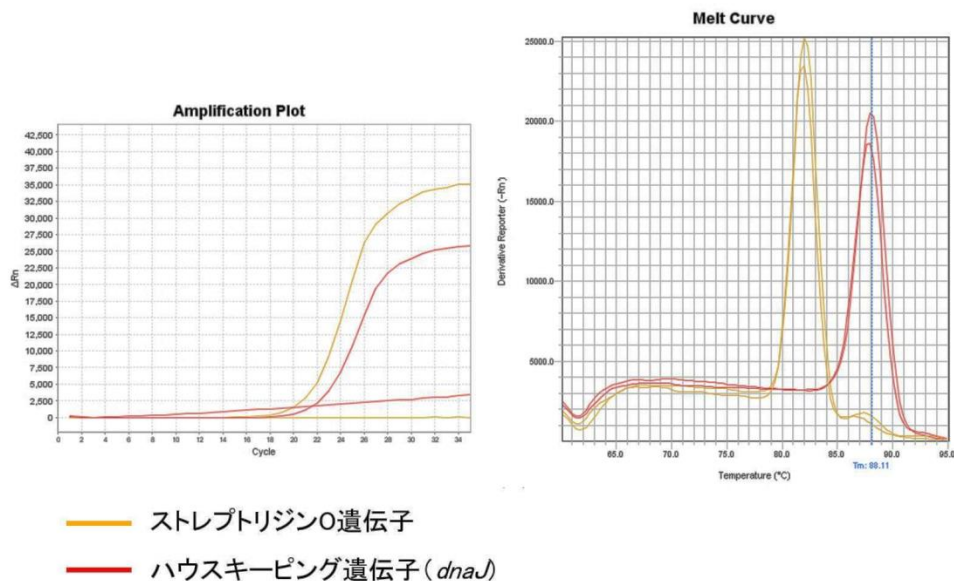


図 3-1-2(4)-51. *Streptococcus dysgalactiae* の検出結果

② *Escherichia coli* (ATCC11775) の特異的検出

大腸菌は、家畜や人の腸内にも存在し、ほとんどのものは無害。病原大腸菌の中には、毒素を産生し、出血を伴う腸炎や溶血性尿毒症症候群（HUS）を起こす腸管出血性大腸菌（O157、BSL2）が知られている。腸管出血性大腸菌であれば、100 匹程度でヒトに病気を起こす可能性があるが、無害な菌と有害な大腸菌は、毒素遺伝子の有無で区別することができる。*Escherichia coli* の検出量は多くはなかったが、（塩基配列は 100%一致： $<1.7 \times 10^2$ copy/ml）

前述したとおり、腸管出血性大腸菌であれば、100 匹以上で浄化工事の中止や除菌が必要なレベルであると考えられることから、腸管出血性大腸菌であるかどうかの確認を行うために、毒素遺伝子を指標とした追加試験を実施した。

追加試験は侵入因子（*invE*）や、志賀毒素（*stx1*、*stx2*）の遺伝子、およびハウスキーピング遺伝子の *dnaJ* をターゲットとした。結果は *dnaJ* 遺伝子以外、すべて陰性であった（図 3-1-2(4)-52）。したがって、検体試料中に上記の病原因子を保有した腸管出血性大腸菌は存在しないと判断した。

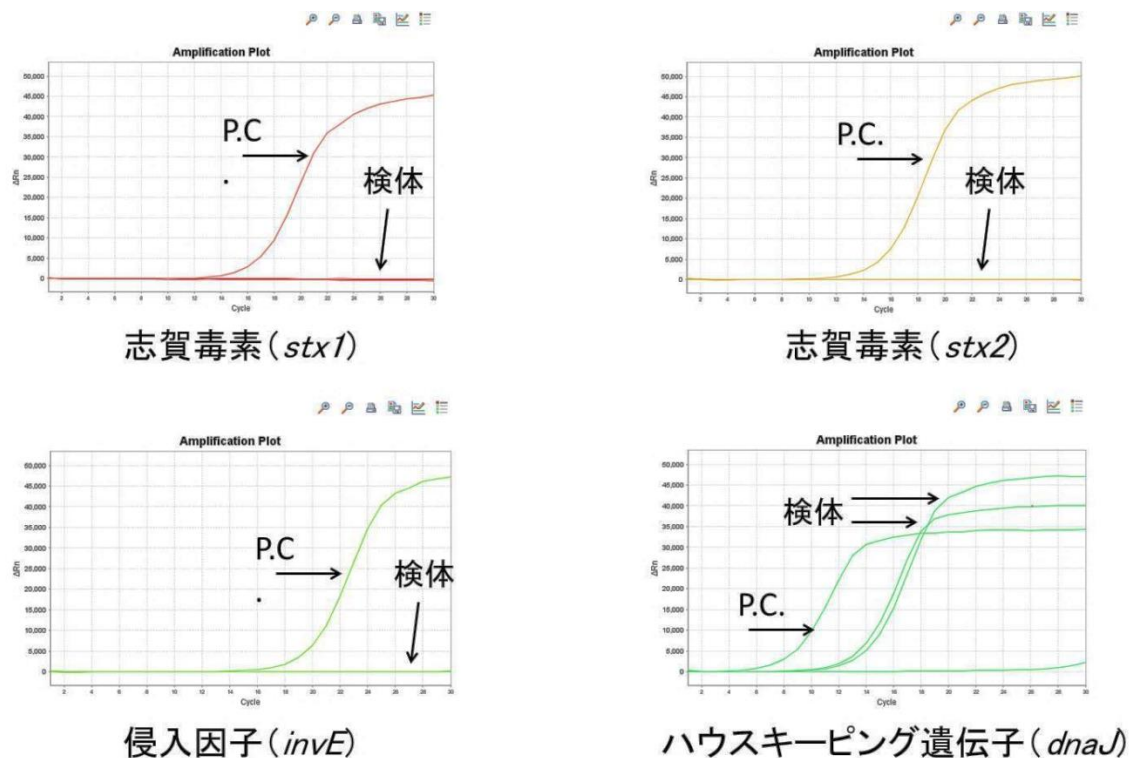


図 3-1-2(4)-52. 腸管出血性大腸菌の検出結果

③ *Bacillus anthracis* の特異的検出

Bacillus anthracis (BSL3) は炭疽菌は、土壤中の常在菌ではあるが、炭疽（炭疽症）の原因菌であり、特定（二種）病原体であるが、炭疽菌は 16S rRNA 遺伝子配列がその近縁種の配列と 100%一致しているため、16S rRNA 遺伝子配列に基づく同定試験だけで検出菌が炭疽菌かどうかを知ることは困難である。*Bacillus anthracis* 近縁種のリード数はごくわずかであったが（塩基配列は

100%一致)、検出量に関わらず炭疽菌が検出されると、浄化の中止や除菌が必要と判断されるため、毒素遺伝子を指標とした追加試験を実施して炭疽菌であるかどうかの確認を行う必要があると考えられた。

追加試験は、防御抗原 (protective antigen) 遺伝子、およびハウスキーピング遺伝子の *dnaJ* をターゲットとした。結果は、どちらも陰性であった (図 3-1-2(4)-53)。したがって、検体試料中に炭疽菌は存在しないと判断した。

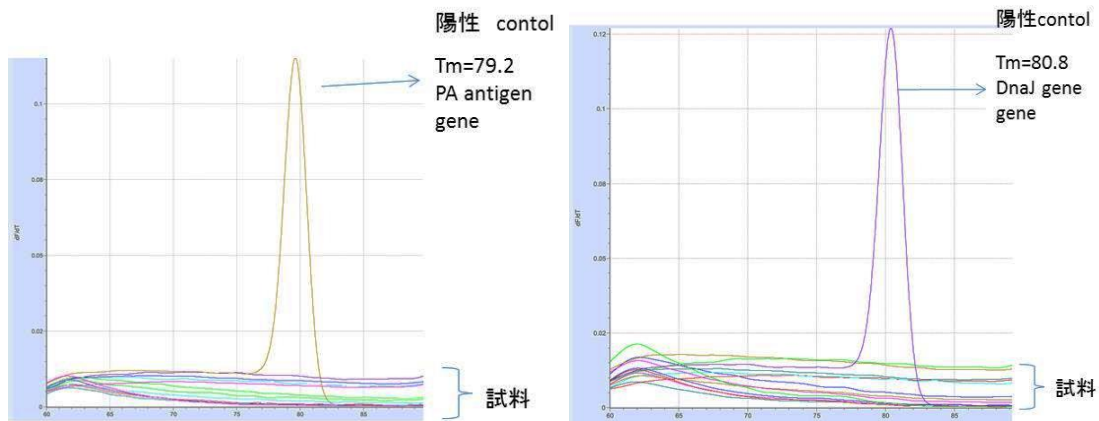
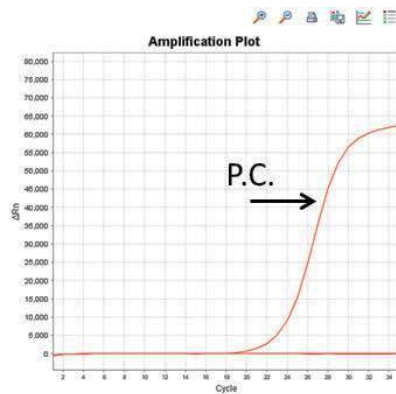


図 3-1-2(4)-53. *Bacillus anthracis* の検出結果

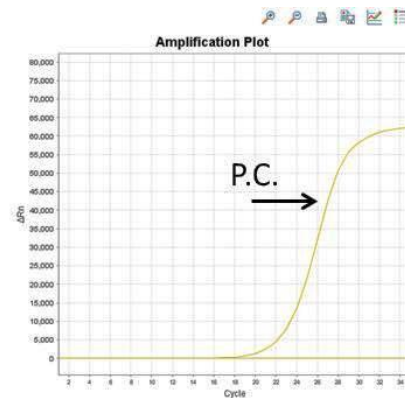
④ *Yersinia pestis* の特異的検出

ペスト菌 (*Yersinia pestis*, BSL3) は、特定 (二種) 病原体であるが、16S rRNA 遺伝子配列が複数の近縁種と 99%以上一致しているため、16S rRNA 遺伝子配列に基づく同定試験だけで検出菌がペスト菌かどうかを知ることは困難である。一方、ペスト菌も検出量に関わらず検出され次第浄化の中止や除菌が必要と判断されるため、毒性プラスミドの有無を調べるための追加試験を実施してペスト菌であるかどうかの確認を行う必要があると考えられた。

追加試験は、F1 プラスミドにコードされる *caf1* (莢膜抗原)、Fra プラスミドにコードされる *fra* (抗食細胞因子) とをターゲットとした。結果は、どちらも陰性であった (図 3-1-2(4)-54)。したがって、検体試料中にペスト菌は存在しないと判断した。



F1プラスミド (caf1)



Fraプラスミド (fra)

P.C. ; Positive control

図 3-1-2 (4) -54. *Yersinia pestis* の検出結果

3. 16S-rRNA 遺伝子転写物 RNA 配列による細菌生態系影響評価手法開発

遺伝子 DNA 配列が転写された転写物 RNA は寿命が短く、専ら生細胞に由来する情報が得られることと、誘導性の遺伝子においては遺伝子機能の発現を反映した結果が得られるメリットがある。DNA を用いた解析との比較を行うため、浄化試験実施現場のサンプルから抽出した RNA を用いて微生物叢解析と生態系影響評価を実施した。更に全生物種の機能遺伝子 DNA をカバーするメタゲノム解析と転写 RNA (mRNA) を対象にしたメタトランスクリプトーム解析を実施し、生態系の変化を遺伝情報に基づく網羅的解析により調べた (図 3-1-2 (4) -55)。

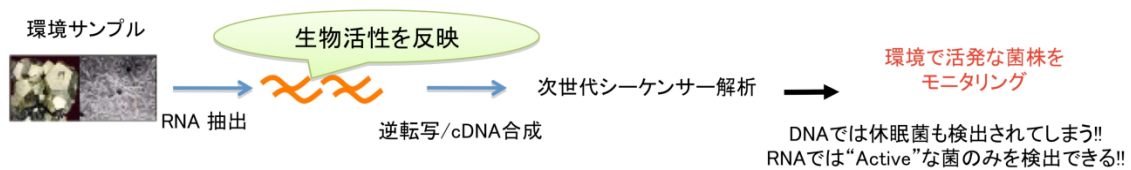


図 3-1-2 (4) -55. 環境メタトランスクリプトーム解析による指標微生物や遺伝子の検出

方法

サンプルは図 3-1-2(4)-56 に示した 5 カ所（注入井戸、NE-1, NE-2, NE-4, NE-7, W-7）で、地上から 6 m の深さから約 2 リットルの地下水を採取した。RNA は分解しやすいので現場地下水を採取直後にドライアイスで凍結し、冷凍庫（-80℃）で保存した。このサンプルから市販の RNA 抽出キットを用いて RNA を抽出し、RNeasy MiniElute Cleanup Kit（QIAGEN）を用いて低分子 RNA を除去した。次に逆転写酵素と Random primer を用いた逆転写反応により cDNA を合成し、更に DNA プライマー Univ530F と 802R を用いた PCR 法にて 16S rRNA 遺伝子 DNA を増幅した。この PCR 産物を精製・回収した後、Roche 社の 454 FLX を使用して塩基配列を決定した。遺伝子配列情報は、QIIME (<http://qiime.org>) を用いて解析して菌叢解析に利用し、菌叢の類似度解析は UniFrac 解析 (<http://bmf.colorado.edu/unifrac/>) を用いた。

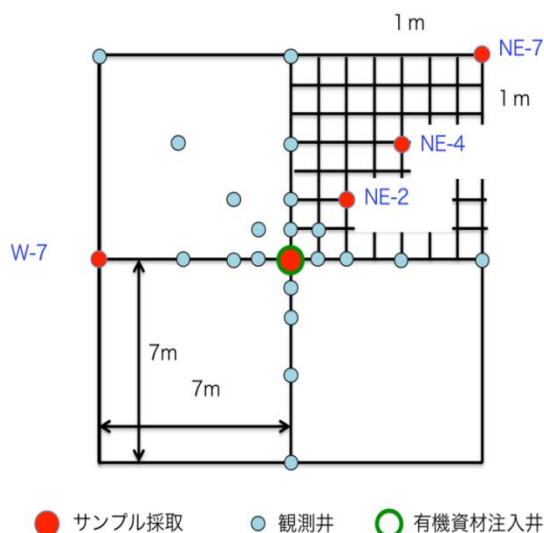


図 3-1-2(4)-56. サンプル採取箇所

a) 成果

16SrRNA 遺伝子 DNA に基づく解析

では、資材注入口については、資材を投入する前（16日前）は *Proteobacteria* が優占していた。しかし、資材を注入した直後（0日後）から *Bacteroidetes* や *Firmicutes* が優占化し、また、*Synergistetes* や *Verrucomicrobia*、*Euryachaeta* が優占してくることが分かった（図 3-1-2(4)-57）。また、転写 RNA に基づく解析では、資材を注入した直後（0日後）から *Euryachaeta* や *Bacteroidetes*、*Verrucomicrobia*、*Synergistetes*、また *Unclassified bacteria* が活性化していることを示すデータが得られた。両解析結果の比較から、DNA のデータで認められた菌叢変化が1ヶ月後に RNA のデータに反映されることが示唆された。

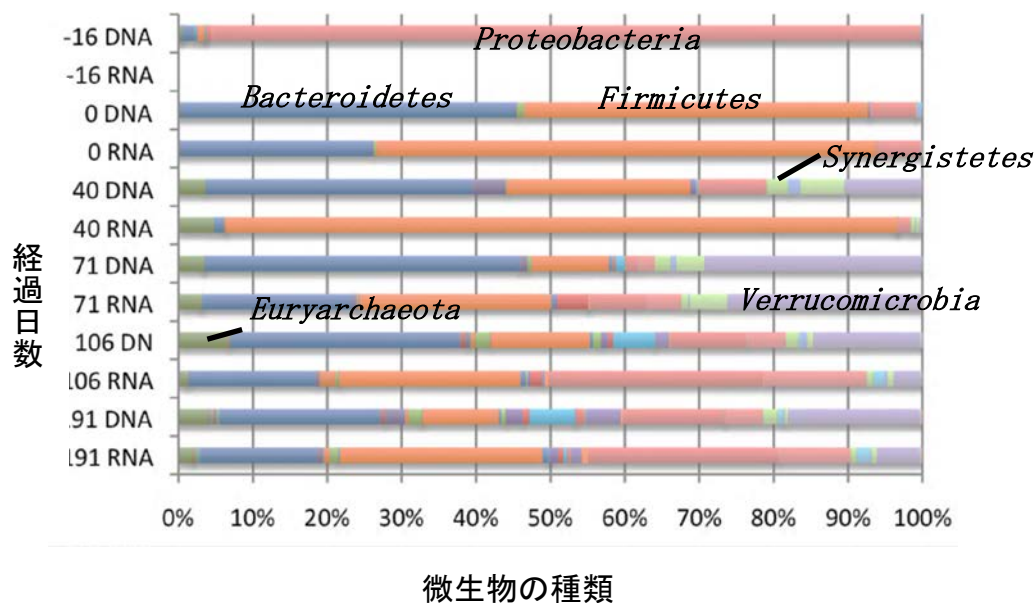


図 3-1-2(4)-57. 資材注入口におけるメタゲノム解析と
メタトランスクリプトーム解析

(縦軸が資材注入後の日数、DNA はメタゲノム解析、RNA は
メタトランスクリプトーム解析、横軸は微生物群集の系統的な割合)

続いて、バイオレメディエーションによる環境影響評価を行う為に、菌叢の類似度解析 (UniFrac 解析) を行った (図 3-1-2(4)-58)。解析には、浄化現場 3 カ所 (注入井戸、NE-7、W-7) より採取したサンプル (資材注入 16 日前、注入後 0 日、40 日、71 日、106 日、191 日) に関する 16SrRNA 遺伝子の配列に基づく菌叢解析のデータを利用した。

まず、資材注入井戸については、資材注入後 0 日目に菌叢が大きく変化することが観察され、さらに時間が経過するに従って菌叢が大きく変化して行く様子を観察することができた。この現象は、DNA (メタゲノム解析) と cDNA (メタトランスクリプトーム解析) を対象に解析した場合に共通した現象として観察された。次に、NE-7 から採取したサンプルについては、資材注入後 0 日目に菌叢が大きく変化することが観察され、資材注入井における資材注入後 0 日目の菌叢に類似度が高いことが明らかとなった。しかし、NE-7 においては時間の経過に伴う菌叢の大きな変化は観察されなかった。さらに、W-7 から採取したサンプルについては、資材注入後 0 日目に菌叢が大きく変化することが観察されたが、資材注入後 40 日目以降については菌叢の大きな変化は観察されず、資材を注入する前 (注入前 16 日) と菌叢が類似していることが明らかとなった。以上の結果は、微生物の菌叢が時間の経過と共に、資材注入前の多様性に戻る傾向が有ることを示している。一方、DNA (メタゲノム解析) と cDNA (メタトランスクリプトーム解析) を対象に解析した場合に、両者のデータから推定される菌叢には類似度が高いことから、サンプルから抽出した DNA を鋳型に

した PCR 産物（16SrRNA 遺伝子）の塩基配列を解析することで、微生物の活性面において重要と考えられる微生物を検出できる可能性が示唆された。

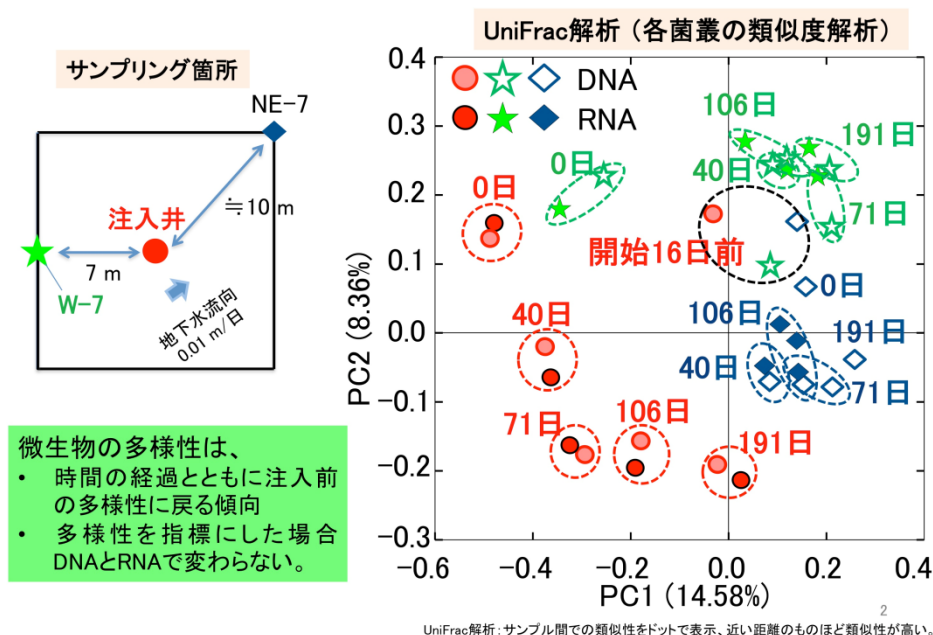
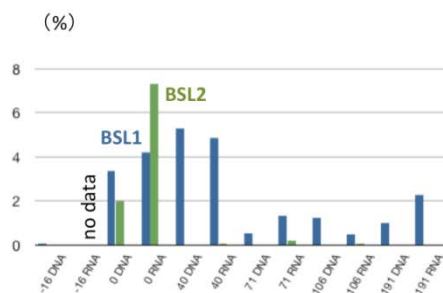


図 3-1-2(4)-58. 資材注入井、サンプル採取井戸（NE-7、W-7）における微生物叢の類似度解析

さらに、cDNA を鋳型にした PCR 産物（16SrRNA 遺伝子）の塩基配列を解析（メタトランスクリプトーム解析）した結果から、病原性菌に対して近縁な微生物の検出を行った。結果として、資材注入0日後のサンプルにおいては、DNA を指標にした病原性近縁種の検出を行ったところ、BSL1 が3%、BSL2 が2%であることに対して、BSL1 が4%、BSL2 が7%程度占めていることを示すデータが得られた（図 3-1-2(4)-59）。さらに、微生物の属種レベルによる分類の結果から、資材注入0日後のサンプルにおいては、*Streptococcus suis* が7.3%の割合で占めていることがメタトランスクリプトーム解析にて明らかとなった。以上の結果は、RNA（メタトランスクリプトーム解析）と DNA（メタゲノム解析）を対象にした解析では病原菌を検出する感度に相違が存在し、RNA（メタトランスクリプトーム解析）を対象にした実験が、病原菌を検出する上で、比較的に高い感度を示すことが明らかとなった。

病原性近縁種の検出 (99% cutoff)



病原性近縁種の検出 (BSL2, BSL3 99% cutoff)

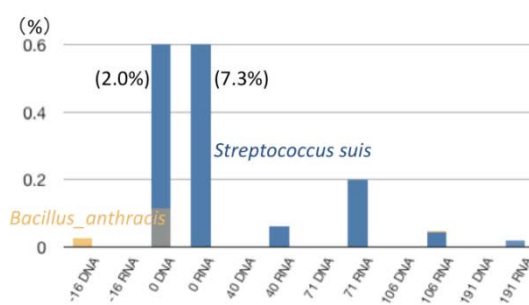


図 3-1-2 (4)-59. 資材注入井の微生物叢より検出された病原性微生物の近縁種

研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発（実証実験）」

1. バイオオーグメンテーション実証試験

a) 実証試験装置と試験サイトの土壌および地下水の性状

実証試験設備の概要

実証試験サイトの概略図を図 3-1-2(4)-60 に示す。実証試験サイトは、第一帯水層を鋼矢板で仕切り 4 つの試験区を作成した。各試験区の中央には、揚水・注水と地下水観測を目的とした井戸（内径：50 mm、スクリーン：GL-2.5m～GL-9.0m）を設置した。

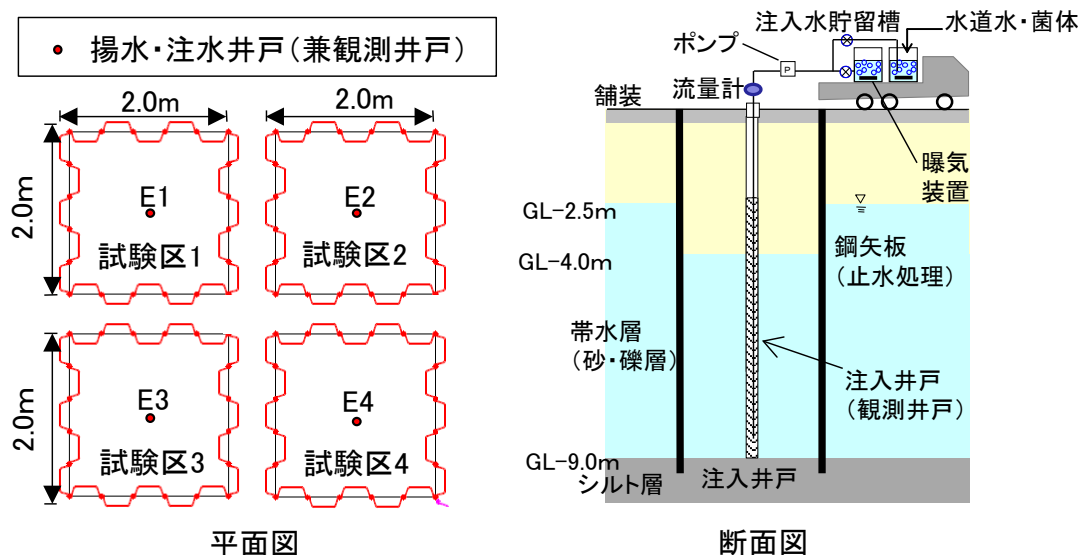


図 3-1-2(4)-60. 実証試験サイトの概略図

試験サイトの土壌および地下水の性状

各試験区の井戸設置地点における土質柱状図を図 3-1-2(4)-61 に示す。4 つの試験区の土質性状はほぼ同様であり、地表面から-2.5mまでがコンクリート殻、レンガを主体とした埋土、-2.5～-5.0m付近までが細砂層、-5.0～-7.0m付近までが中砂、-7.0～-8.0m付近までが砂礫層、-8.0～-9.0m付近までが粗砂層、-9.0m付近から以深がシルト層であった。尚、上部のコンクリート殻、レンガを主体とした埋土については、鋼矢板打設時に掘削して、汚染の無い山砂に置換した後に鋼矢板を打設して上部を舗装した。

試験区-3 から採取した中砂層、砂礫層、粗砂層およびシルト層の土壌粒度分布の結果を図 3-1-2(4)-62 に示す。GL-6.0～-7.0m の中砂層では粒径 0.85～0.25mm の中砂を約 65%含んでいた。GL-7.6～-8.0m の砂礫層では 70%以上が粒径 2.0mm 以上であった。GL-8.5～-8.9m の粗砂層では粒径 2.0～0.85mm の粗砂が約 40%、粒径 2.0mm 以上の礫分を約 30%含んでいた。いずれの深度でもシルト

や粘土分はほとんど含まれていない透水性の高い地盤である。

各試験区の深度毎の VOCs（塩素化エチレン類）土壌溶出量の測定結果を表 3-1-2(4)-8 に示す。帯水層下部のシルト層から環境基準値を超過する *cis*-1, 2-DCE が検出された。一方、PCE および TCE は全ての深度で検出されなかった。

各試験区に井戸を設置してから約 3 ヶ月後に採取した地下水の分析結果を表 3-1-2(4)-9 に示す。各試験区から採取した地下水中には溶存酸素がほぼ存在しない還元状態であることが示された。また、PCE、TCE は環境基準値以下の低い値であったが、*cis*-1, 2-DCE は全ての試験区の地下水で環境基準値を超過した。

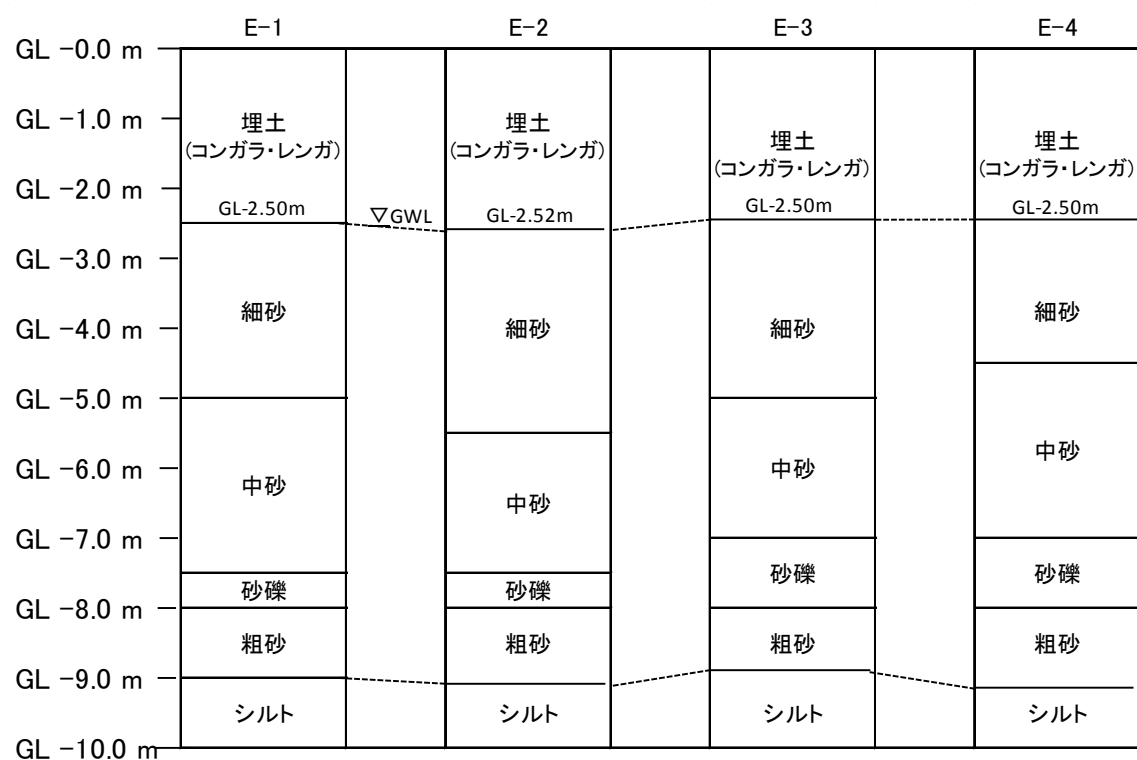


図 3-1-2(4)-61. 各試験区の土質柱状図

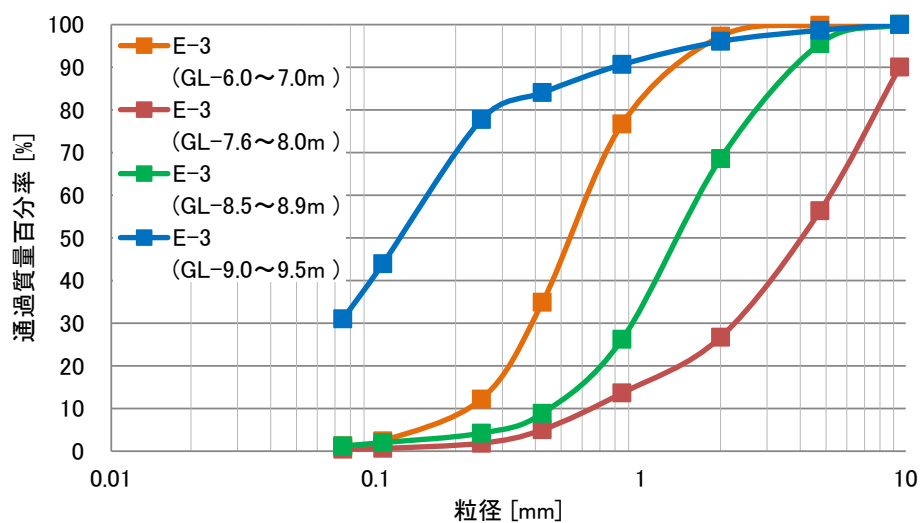


図 3-1-2 (4)-62. 各深度の粒径加積曲線

表 3-1-2 (4)-8. 実証試験サイトの深度別の塩素化エチレン類の土壌溶出量

深度 GL-m	試験区1			深度 GL-m	試験区2			深度 GL-m	試験区3			深度 GL-m	試験区4		
	cis1,2DCE	TCE	PCE		cis1,2DCE	TCE	PCE		cis1,2DCE	TCE	PCE		cis1,2DCE	TCE	PCE
3.5	N.D.	N.D.	N.D.	3.5	N.D.	N.D.	N.D.	3.5	N.D.	N.D.	N.D.	3.5	N.D.	N.D.	N.D.
4.5	N.D.	N.D.	N.D.	4.5	N.D.	N.D.	N.D.	4.5	N.D.	N.D.	N.D.	4.5	N.D.	N.D.	N.D.
5.5	N.D.	N.D.	N.D.	5.5	N.D.	N.D.	N.D.	5.5	N.D.	N.D.	N.D.	5.5	N.D.	N.D.	N.D.
6.5	0.004	N.D.	N.D.	6.5	N.D.	N.D.	N.D.	6.5	N.D.	N.D.	N.D.	6.5	N.D.	N.D.	N.D.
7.5	0.005	N.D.	N.D.	7.5	0.005	N.D.	N.D.	7.5	N.D.	N.D.	N.D.	7.5	0.005	N.D.	N.D.
8.5	N.D.	N.D.	N.D.	8.5	0.005	N.D.	N.D.	8.5	N.D.	N.D.	N.D.	8.5	0.005	N.D.	N.D.
9.0	0.040	N.D.	N.D.	9.0	0.030	N.D.	N.D.	9.0	0.037	N.D.	N.D.	9.0	0.048	N.D.	N.D.
9.5	0.083	N.D.	N.D.	9.5	0.130	N.D.	N.D.	9.5	0.079	N.D.	N.D.	9.5	0.110	N.D.	N.D.

定量下限値:0.002mg/L以下 (単位:mg/L)

表 3-1-2 (4)-9. 各試験区の地下水性状

測定項目		単位	地点名				
			E-1	E-2	E-3	E-4	
水質測定項目	地下水位	GL m	-2.66	-2.72	-2.67	-2.60	
	水温	℃	20.7	20.8	20.9	21.1	
	pH	-	6.2	6.7	6.65	6.51	
	ORP	mV	31	-54	0	-8	
	EC	mS/m	47	68	69	83	
	DO	mg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.1	
有機物濃度		溶存有機炭素濃度 (DOC)	mg/L	5.1	4.5	4.5	6.62
		全無機炭素濃度 (IC)	mg/L	31.2	31.9	23.0	24.9
無機物濃度	カチオン	ナトリウムイオン	mg/L	42.4	36.0	43.2	37.874
		カリウムイオン	mg/L	4.2	6.8	4.7	6.0
		マグネシウムイオン	mg/L	5.2	8.2	7.2	10.8
		カルシウムイオン	mg/L	45.5	58.0	55.1	77.0
		塩化物イオン	mg/L	30.5	26.3	29.2	34.788
	アニオン	臭化物イオン	mg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		硫酸イオン	mg/L	102	147	191	261
		窒素・リン	硝酸性窒素	mg/L	0.6	< 0.1	0.8
	亜硝酸性窒素		mg/L	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
	アンモニア性窒素		mg/L	0.2	0.3	0.3	0.4
	オルトリン酸		mg/L	0.1	0.2	0.1	0.1
	鉄	二価鉄	mg/L	1.03	3.74	1.70	2.64
		全鉄	mg/L	1.29	4.40	2.05	2.91
細菌数		全菌数	cells/ml	3.2E+05	6.9E+05	2.7E+05	4.4.E+05
		DHC菌遺伝子数	copies/ml	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
		vcr A遺伝子数	copies/ml	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²	< 10 ²
塩素化エチレン		テトラクロエチレン	mg/L	0.003	0.003	0.006	0.002
		トリクロエチレン	mg/L	0.021	0.025	0.028	0.013
		シス-1,2-ジクロエチレン	mg/L	0.188	0.236	0.181	0.237
		塩化ビニルモノマー	mg/L	<0.001	0.002	<0.001	0.001

b) 実証試験方法

RHA1 株の大量培養

実証試験で注入する RHA1 株は、300L のファーメンターを用いて通気攪拌条件で純粋培養した。培地は消泡剤を添加した LB 培地 150L を用いて 30℃で 64 時間培養を行い、培養後に遠心分離（5000rpm、20℃、10 分）して回収した菌体を 10mM のリン酸ナトリウム緩衝液（pH=7.5）に懸濁して約 7L の菌体濃縮液として滅菌済みの容器に分注し、直ちに冷蔵便で実証試験サイトに送付した。菌体濃縮液中の RHA1 株菌数は、濁度の測定結果から、約 1.0×10^{14} cells と推計された。

RHA1 株のサイトへの導入（写真-3-1-2(4)-1）

試験条件を表 3-1-2(4)-10 に示す。RHA1 株導入の 30 日前に、各試験区内の地下水を約 1kL 揚水して RHA1 株導入前の地下水性状の分析を行った。注水は、車載した貯留槽から約 1kL の水道水を注入井戸から自然浸透で実施した（注入速度：約 2kL/h）。酸素供給と次亜塩素酸イオン除去の目的で、貯留槽内の水道水は 1 時間程度の曝気処理を行った。

4 試験区のうち、試験区 1 は RHA1 株の菌体濃縮液を水道水に添加・攪拌してから地盤内に供給し、その他 3 つ試験区は水道水のみを供給した。注入開始前 30 日、注入直後、1 日後、7 日後、20 日後、55 日後の地下水を注入井戸から採取し、pH、溶存酸素濃度 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、溶存性有機炭素濃度 (DOC)、全菌数、RHA1 株菌数、塩素化エチレン類濃度について分析を実施した。pH、DO、ORP については、マルチ水質モニタリングシステム (U-22XD：堀場製作所) を用いて現地で直接測定した。DOC（全有機炭素計）、全菌数（アクリジンオレンジ蛍光染色直接計数法）、RHA1 菌数（定量 PCR 法）、塩素化エチレン類濃度 (GC-MS) は現場で適切に前処理を行い、試験室で測定を行った。

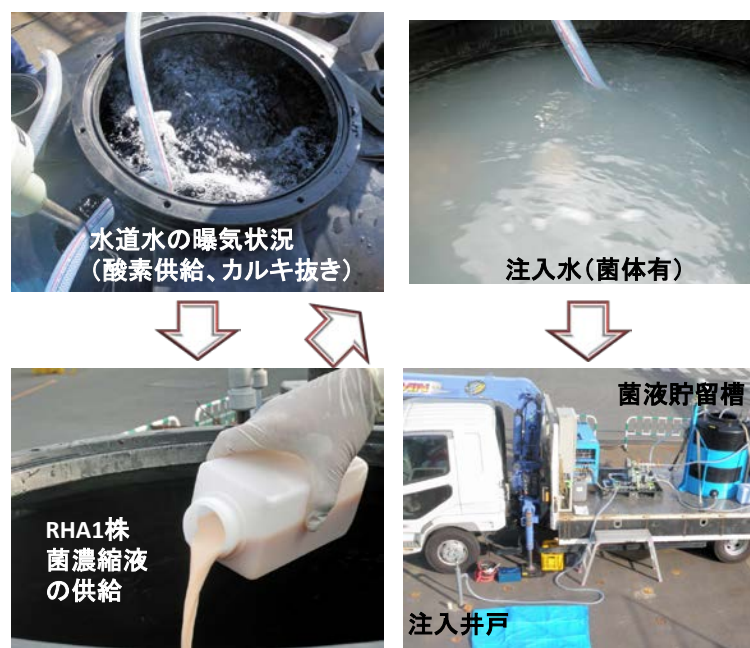


写真-3-1-2(4)-1 RHA1 株の導入状況

表 3-1-2(4)-10. 注入試験条件

区画	条件	RHA1株	浄化剤等	曝気水道水
区画-1	オーグメンテーション	1×10^{14} cells	無	1kL
区画-2	コントロール	無	無	1kL
区画-3	コントロール	無	無	1kL
区画-4	コントロール	無	無	1kL

c) 実証試験結果

実証試験結果は、RHA1 株を含む菌体懸濁液を導入した試験区 1 と、水道水のみを導入した試験区 2～4 で得られたデータを比較した。以後に示す図では、試験区 2～4 は同一条件であるため、3 カ所の平均値で示し、標準誤差をエラーバーで示した。また、図の横軸における経過時間の 0 日目を注入日とした。

地下水性状の経時変化

各試験区の pH、D₀、ORP、溶存炭素濃度(DOC)を図 3-1-2(4)-63～図 3-1-2(4)-66 に示す。注入前の地下水 pH は 6.3～6.5 であり、注水後に pH は一時的に上昇したが、その後は 6.6～6.8 の範囲で安定していた。曝気処理した水道水を注入したため、注入後の全ての試験区で D₀ 濃度が増加した。菌体を導入した試験区 1 では、注入直後に D₀ 濃度が 7.3mg/L まで上昇したが、1 日経過後は 1.8mg/L まで急激に減少した。試験区 1 では、他の試験区と比較して D₀ の減少が速く、導入した RHA1 株により注入水中の酸素が消費されたものと推測された。また、試験区 1 では、注入直後から DOC 濃度も上昇し、菌体注入から 20 日以降の酸化還元電位が他の試験区を比較して大きく低下していることが確認された。これは、酸素が無くなることにより注入した RHA1 株が死滅・溶菌したためと推測された。

菌数の経時変化

RHA1 株菌数の測定結果を図 3-1-2(4)-67 に、全菌数の測定結果を図 3-1-2(4)-68 に示す。RHA1 株菌数は、定量 PCR で得られた遺伝子コピー数の結果を補正したものである。試験区 1 では他の試験区と比較して菌数が増加する傾向を示した一方で、RHA1 株菌数は導入後に減少していき、導入から 55 日目には導入時の約 1/1000 まで菌数が減少していることが確認された。

塩素化エチレン類 (*cis*-1,2-DCE、VCM) の経時変化

cis-1,2-DCE 濃度の推移を図 3-1-2(4)-69 に示す。全ての試験区で、注入水による希釈により注入直後の *cis*-1,2-DCE 濃度が低下した。その後 7 日目には全ての試験区で *cis*-1,2-DCE 濃度が再び上昇したが、RHA1 株を導入した試験区 1 では他の試験区と比較して *cis*-1,2-DCE 濃度の上昇が抑えられ、注入から 55 日後は注入前の約 1/3 の濃度になることが示された。

VCM 濃度の推移を図 3-1-2(4)-70 に示す。全ての試験区で注入から 7 日目、20

日目の地下水中の VCM 濃度は上昇し、環境基準の 0.002mg/L を超過した。その後、注入から 55 日目の試験区 2～4 の VCM 濃度は、環境基準値以下に低下したが、RHA1 株を注入した試験区 1 では VCM 濃度が更に上昇した。

以上の結果、RHA1 株を注入した試験区 1 では、地下水に導入した RHA1 株が地下水中の *cis*-1,2-DCE を分解する一方で、溶存酸素濃度の低下に伴い失活して死滅・溶菌した菌体が炭素源となり、DOC 濃度の上昇や酸化還元電位の低下を引き起こしたものと推測された。また、嫌気的な環境が形成されたことにより、嫌気性微生物が活性化され、時間経過に伴って *cis*-1,2-DCE の還元脱塩素化反応が進行し、VCM 濃度が上昇したものと推測された。

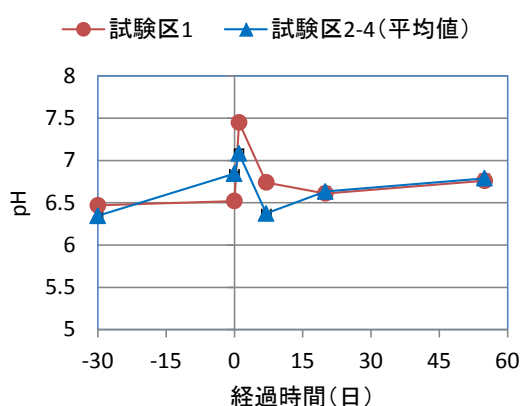


図 3-1-2(4)-63. pH の推移

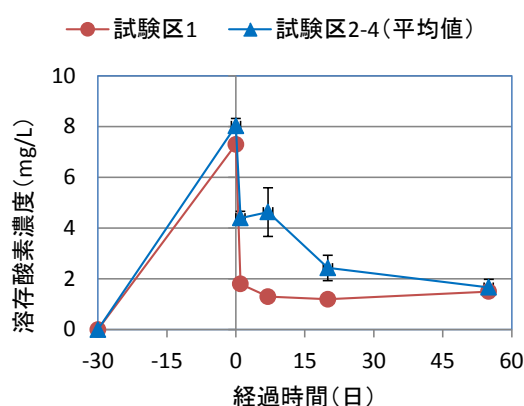


図 3-1-2(4)-64. DO の推移

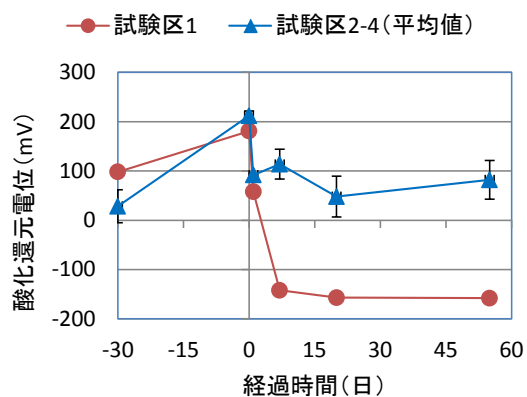


図 3-1-2 (4)-65. ORP の推移

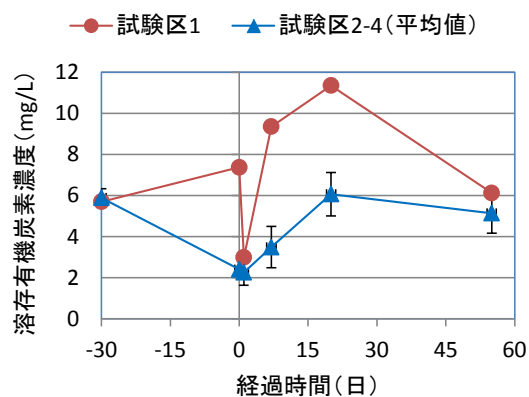


図 3-1-2 (4)-66. DOC の推移

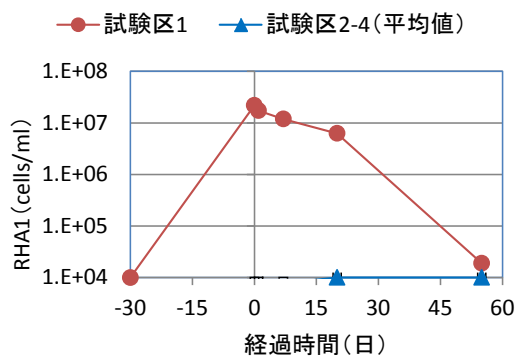


図 3-1-2 (4)-67. RHA1 株菌数の推移

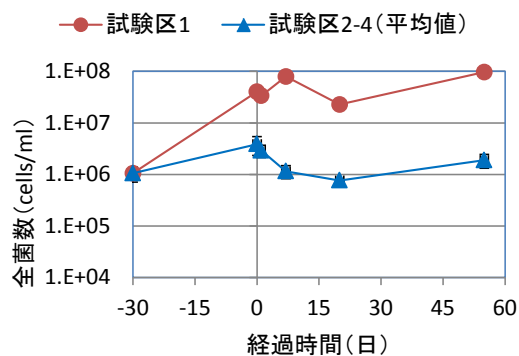


図 3-1-2 (4)-68. 全菌数の推移

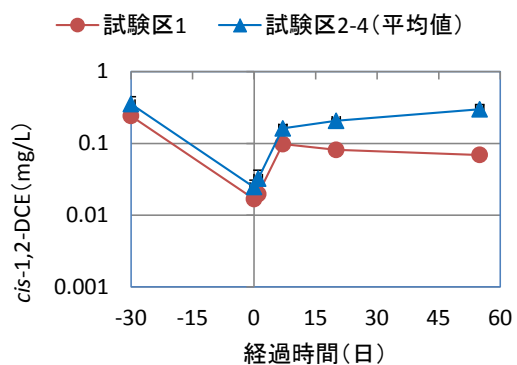


図 3-1-2 (4)-69. *cis*-1, 2-DCE 濃度の推移

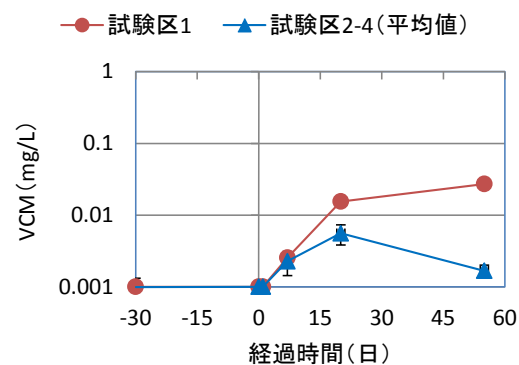


図 3-1-2 (4)-70. VCM 濃度の推移

2. バイオオーグメンテーション実証試験における網羅的な微生物叢解析

VOCs 実汚染サイトを対象として実施された RHA1 株を用いたバイオオーグメンテーション実証試験において網羅的な微生物叢解析を行った。この解析はバイオオーグメンテーションによる汚染物質の浄化処理が周囲の環境に与える影響について知見を得ることを目的としている。解析内容は 16S rRNA 遺伝子を標的とした超並列シーケンシングであり、先に行った実汚染サイトにおけるバイオスティミュレーション実験における微生物叢解析と同様である。ただし、用いる次世代シーケンサーは以前の GS FLX（ロシュ社）ではなく、市場でシェアの大きいイルミナ社の MiSeq を用いた。MiSeq は GS FLX とは異なる原理でシーケンシングを行う機械であり、得られるリード数は GS FLX と比較して多い。

地下水サンプルからの微生物の集菌から DNA 抽出まではバイオスティミュレーション実験時と同様に行い、16S rRNA 遺伝子配列の PCR 増幅、シーケンシングは論文（J. G. Caporaso et al., The ISME Journal, 6, 1621 (2012)）を参考にプロトコルを作成して行った。得られたシーケンスデータの解析についてはペアエンドの配列データを対象として、QIIME で解析を行った。過去のバイオスティミュレーション実験の微生物叢解析の際に用いた解析パイプラインを MiSeq データ用に変更したものを使用した。

地下水サンプルは 8 地点、6 タイムポイントの計 48 サンプルを解析する予定であったが、井戸 M11 からは定量不可能なほど少量の DNA しか抽出できなかったため、解析対象からは外した。得られたリード数は 1 サンプル 12 万リード以上であった。これを門レベル・綱レベルで分類し、主要な門あるいは綱の相対存在比を求めた。

注入前（Day -30）は RHA1 株注入試験区の 井戸 E1、対照区の井戸 E2 どちらにおいても *Betaproteobacteria* 綱由来の配列の存在比率が高かった。RHA1 株注入直後（Day 0）は井戸 E1 において *Actinobacteria* 綱由来の配列の存在比率が 75%以上まで増加した。これらの配列を確認したところ、その多くは RHA1 株の配列と 100%一致していた。RHA1 株注入 1 日後（Day 1）以降は井戸 E1 の周辺井戸である井戸 M3 においても RHA1 株の配列割合が増加していた。井戸 E1 では注入後 55 日（Day 55）が経過した時点では RHA1 株由来の配列はほとんど見られなくなり、*Bacteroidia* 綱の割合が増加していた。RHA1 株は Day 55 までには死滅・溶菌し、井戸内の環境は嫌氣的になったと推測された。対照区の井戸 E4 についてはコントロールとしての水道水注入直後から一貫して *Betaproteobacteria* 綱由来の配列の存在比率が高かった。

以上の結果から、バイオオーグメンテーション試験においてもバイオスティミュレーション実験と同様に、16S rRNA 遺伝子配列をターゲットとした細菌叢の網羅的解析が生態系影響評価に有用であることが示された。

次に、バイオセーフティレベル(BSL)1*3 に該当するバクテリアの 16S rRNA 遺伝子データベースを利用して有害性微生物群に近縁な微生物の消長をモニタリングした。シーケンシングした配列が有害性微生物群の 16S rRNA 遺伝子配列と 99%以上一致した場合に近縁種として検出した。検出された近縁種の大半は日和見細菌に分類され、中でも *Comamonas* 属や *Acinetobacter* 属に分類されるものが多くを占めていた。これはバイオスティミュレーション試験の菌叢解析で見られた傾向と同様である。一方、BSL2 に近縁な細菌群の割合は低く、最大でも菌叢全体の 0.2%未満であった。また、最も病原性の高い BSL3 に近縁な細菌群については、RHA1 株注入井戸 E1 において RHA1 株注入直後に一過的に菌叢全体の 2%程度まで増加し、その後減少していた。そのほぼ全てが、*Bacillus anthracis* の一部の株の配列と 100%一致していた。しかし同時に病原性を持たない *Bacillus subtilis* などの配列とも 100%一致していたため、この配列が真に BSL3 の病原菌由来であるかどうかは各種の機能遺伝子を指標とした検出が必要である。

本プロジェクトの期間中に次世代シーケンサーの性能は著しく向上し、国内でも様々な微生物叢の解析に利用されるようになってきている。本プロジェクトを通じて蓄積された次世代シーケンサーを用いた地下水内の微生物叢解析手法を標準プロトコル化することで、今後バイオレメディエーション現場における生態系影響評価を行う場合においても活用することが可能であると考えられる。そこでこれまでに行ってきた菌叢解析のステップ毎のプロトコルを作成し、標準プロトコルとして活用できるかを確認するため産総研・東大・製品評価技術基盤機構(NITE)の3者で同一の地下水サンプルを解析してその結果を比較した。比較試験の結果、1. 今回作成したプロトコルを用いた場合には DNA 抽出までのステップが菌叢解析に影響する可能性が高いこと、2. 門レベルであれば実験者が異なっても再現性の高い菌叢解析が可能であること、3. 属レベルの細かい解析に対してはさらなるプロトコルの改良が必要なこと、の3点が明らかとなった。

3. 16S-rRNA 遺伝子転写物 RNA 配列による細菌生態系影響評価手法実施

a) 方法

サンプルは資材を注入した井戸を含む計6カ所(図 3-1-2(4)-73、E-1, E-2, M-1, M-2, M-3, M-4, M-5, M-6)から採取した。サンプルの解析は前述の通りに行った。塩基配列の決定はイルミナ社の HiSeq-1000 system を使用し、塩基配列情報の系統解析は MetaCV を使用して製品評価技術基盤機構(NITE)で実施された。

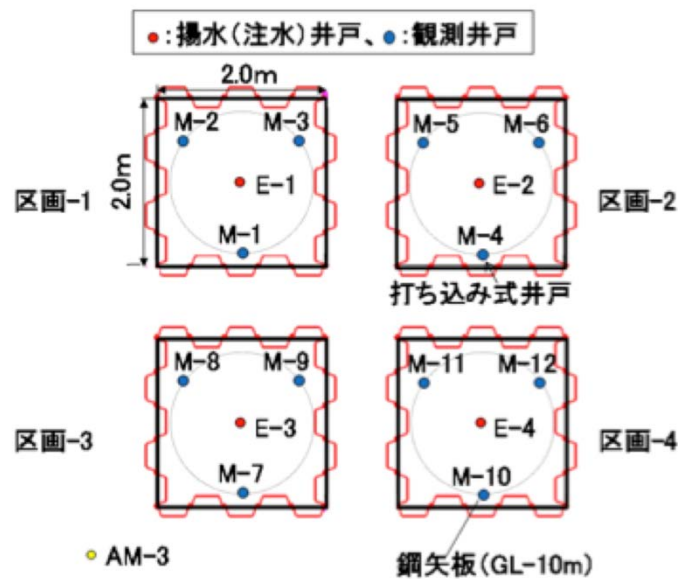


図 3-1-2(4)-73. 実証試験区の概略平面図

b) 成果

注入井戸の菌叢は、資材注入後0日目に大きく変化することが観察されたが、時間が経過することで菌叢が元の状態に変化して行く様子を観察することができた（図 3-1-2(4)-74）。この現象は、DNA（メタゲノム解析）と cDNA（メタトランスクリプトーム解析）を対象に解析した場合に共通した現象として観察された。以上の結果は、微生物の菌叢が時間の経過と共に、資材注入前の多様性に戻る傾向が有ることを示している。

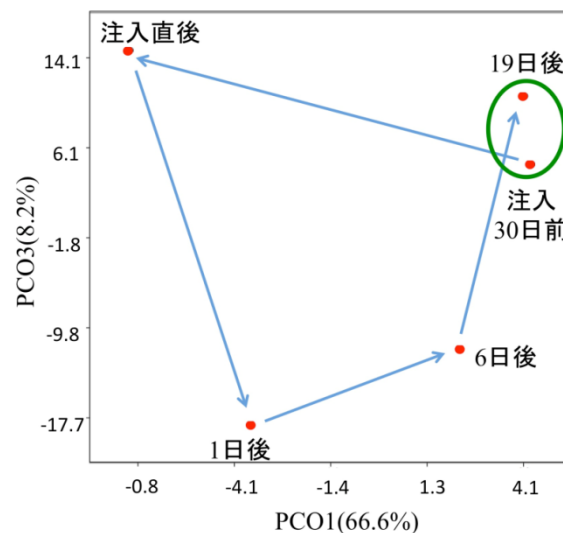


図 3-1-2(4)-74. 資材注入井戸における微生物叢の類似度解析

次に、メタトランスクリプトーム解析で取得した塩基配列データから、微生物の系統分類（属レベル）による各微生物の存在する種別について解析した。図 3-1-2(4)-75 の通りに、0日目と6日目に採取したサンプルのデータの比較を行った。現場に投入した RHA1 株が分類される *Rhodococcus* 属細菌の遺伝子発現量は 0日目と6日目に採取したサンプルのデータ間に相違が見られ、6日目に採取したサンプルにおいて増加が確認されている。しかし、他の属種の菌株を含む微生物叢については大きな変化は確認されなかった。さらに、0日目と6日目に採取したサンプルのデータの比較を行った結果では、*Rhodococcus* 属細菌の遺伝子発現量は他の微生物と比較して大きな相違は確認できなかった。以上の結果から、投入した *Rhodococcus* 属細菌は6日目頃に最も活発であった可能性が示唆された。

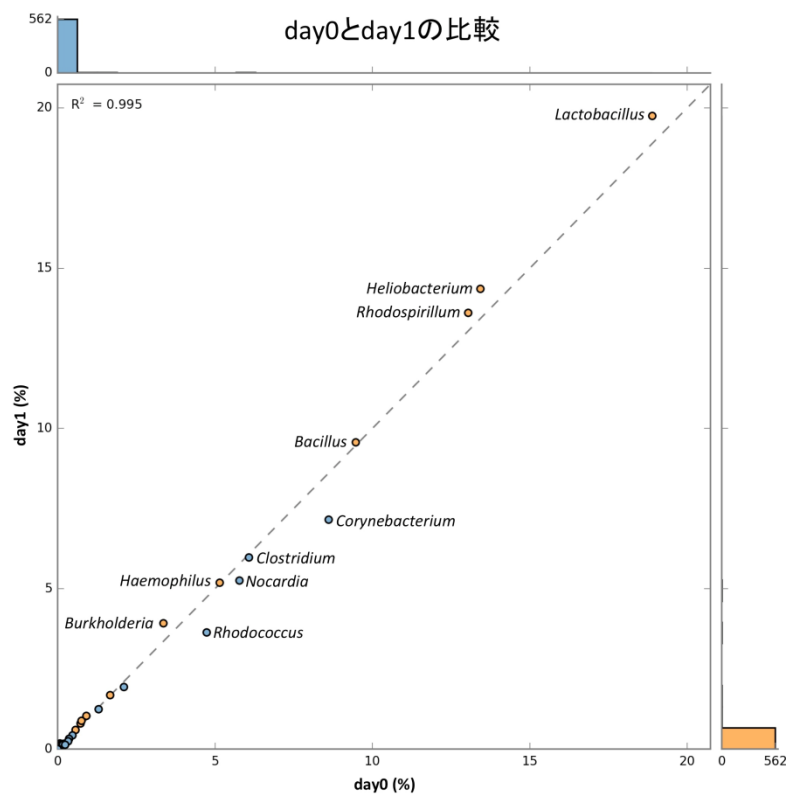


図 3-1-2(4)-75. メタトランスクリプトーム解析による遺伝子発現量の経時変化

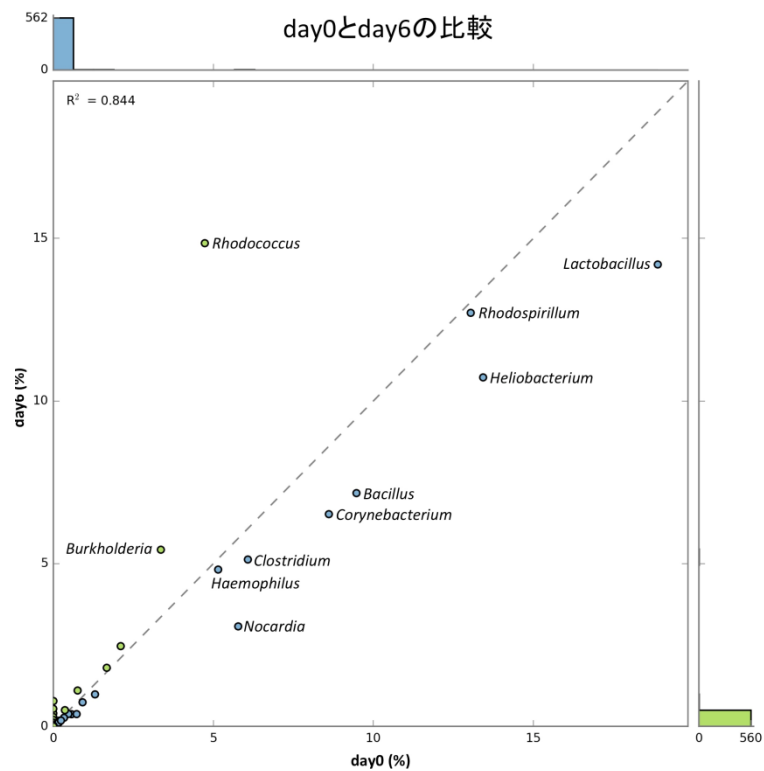


図 3-1-2 (4) -75. メタトランスクリプトーム解析による遺伝子発現量の経時変化
(続き)

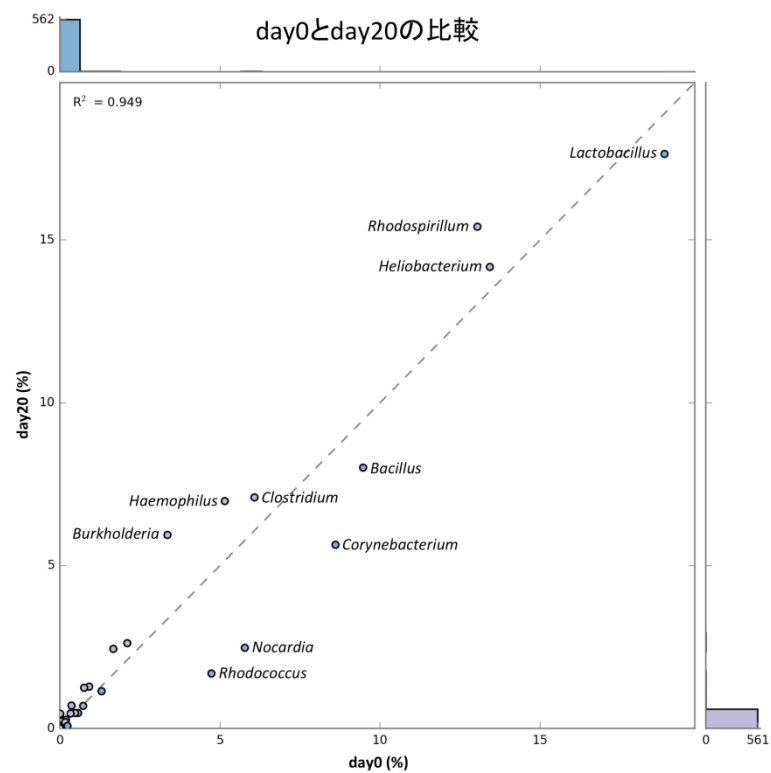


図 3-1-2 (4) -75. メタトランスクリプトーム解析による遺伝子発現量の経時変化
(続き)

さらに、環境トランスクリプトーム解析のデータから TCE/*cis*-1,2-DCE 分解に関わる RHA1 株のビフェニル分解遺伝子 (*bphA1*, *etbA1*, *ebdA1*) の発現量の解析を行った。バイオオーグメンテーション実験を実施した当日 (0 日目) においては 3 種類のビフェニル分解遺伝子が高く発現していることを確認することができた。1 日目や 6 日目には遺伝子の発現量は急激に減少し、19 日目には遺伝子の発現は検出限界以下となった (図 3-1-2(4)-76)。

RHA1 株の菌数は実験を開始したのちに徐々に減少しており、RHA1 株の DNA gyrase subunit B 遺伝子の発現量は試験期間を通じて大きな変化はないことから、ビフェニル分解遺伝子の発現量の減少は菌株の減少や活性の低下によるものではないことが示唆された (図 3-1-2(4)-77)。一方、ビフェニル分解遺伝子の発現量は、溶存酸素量 (DO) と相関関係があることが実験データより示唆された。

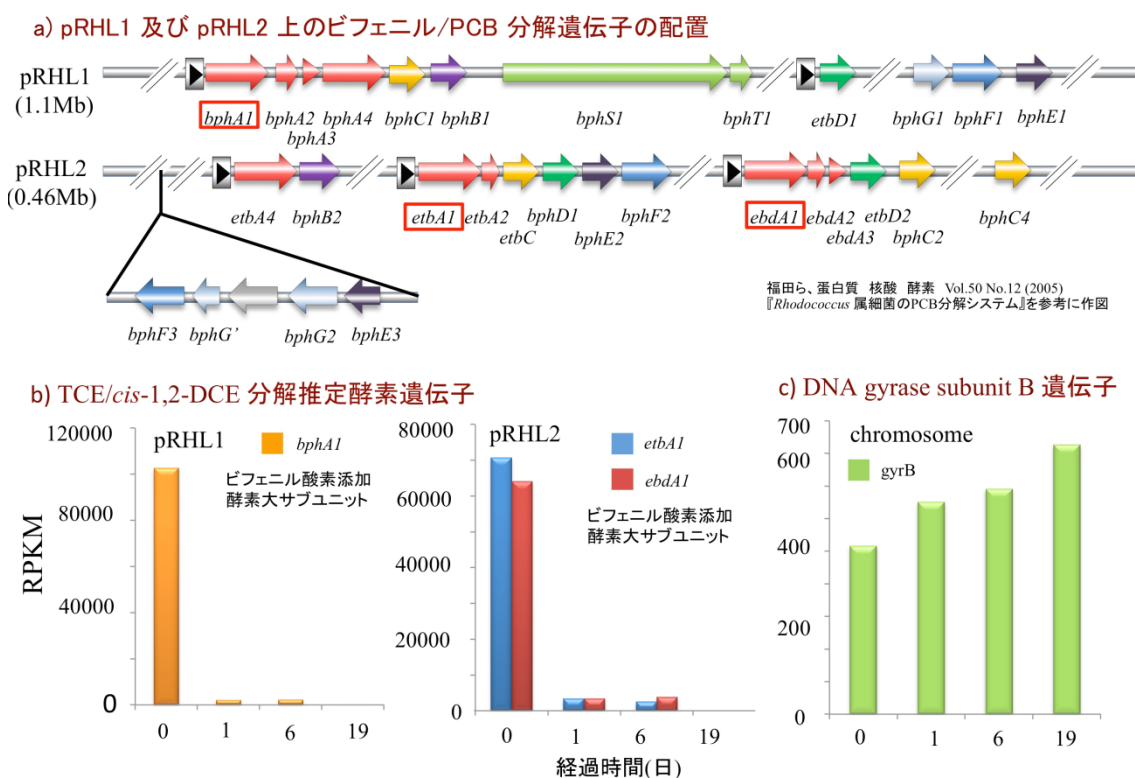
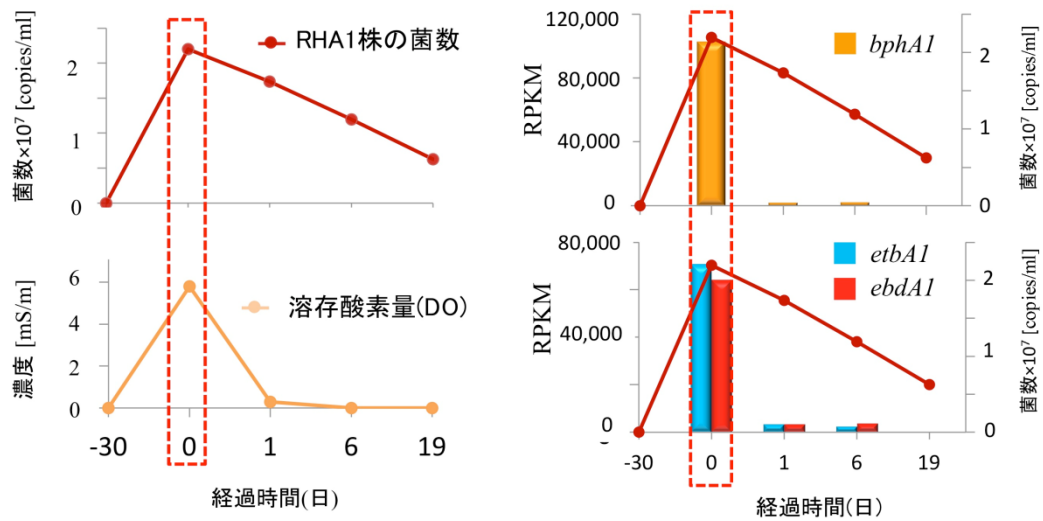


図 3-1-2(4)-76. TCE/*cis*-1,2-DCE 分解に関与すると推定される酵素遺伝子群の発現解析



注入直後に RHA1 菌数、DO濃度の増加及び TCE/*cis*-1,2-DCE を分解すると推定されるビフェニル酸素添加酵素遺伝子群の発現が確認された

図 3-1-2 (4)-77. RHA1 菌数と分解に関与すると推定される酵素遺伝子群の相関関係及び DO の挙動

3-1-3 特許出願状況等

表 3-1-3-1. 特許・論文等件数

要素技術	論文数	論文の 被引用 度数	特許等 件数(出 願を含む)	特許権 の実施 件数	ライセ ンス供 与数	取得ラ イセン ス料	国際標 準への 寄与
シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発	6	1	13 (うち3 件は2015 年度出願)	0	0	0	0
ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発	0	0	0	0	0	0	0
低コスト原位置電気修復技術の研究開発	3	0	0	0	0	0	0
次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発	8	12	1	0	0	0	0
計	17	13	14	0	0	0	0

表 3-1-3-2. 論文、投稿、発表、特許リスト
(シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発)
新日鉄住金エンジニアリング(株)、大阪ガス(株)、(株)不動テトラ

	題目・メディア等	時期
論文	社団法人 日本工業用水協会 研究発表会 土壌中の全シアン含有量分析方法の検討	H24 年 3 月
論文	BUNSEKI KAGAKU 流れ分析法による土壌中の全シアン及びチオシアン酸イオンの同時定量	H24 年 12 月
論文	新日鉄住金エンジニアリング技報 Vol. 4 土壌中の全シアン含有量分析技術と自動分析装置の開発	H25 年 1 月
論文	第 19 回研究集会 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会環 告 19 号含有試験法では困難であった金属シアノ錯体の分析検討と、連続 流れ分析への応用	H25 年 6 月
論文	第 65 回生物工学会大会 (2013) 新規嫌気性シアン分解菌の分離とシアン分解遺伝子のクローニング	H25 年 8 月
論文	講演会名: Separation Science 2013 (安全安心と快適を支える分離と検 出の科学)	H25 年 8 月

	流れ分析法による土壌中のシアン化合物の定量方法の開発	
特許出願	鉄シアノ錯体化合物含有水の処理方法および土壌浄化方法	H24 年 3 月
特許出願	土壌連続分析方法	H24 年 8 月
特許出願	新規微生物および金属シアノ錯体分解方法	H24 年 11 月
特許出願	地中混練体、地中浄化体および汚染土壌の浄化方法	H25 年 3 月
特許出願	汚染地盤の浄化方法	H26 年 1 月
特許出願	新規微生物および金属シアノ錯体分解方法	H26 年 3 月
特許出願	新規微生物および金属シアノ錯体分解方法	H26 年 3 月
特許出願	土壌浄化方法	H26 年 4 月
特許出願	新規微生物および金属シアノ錯体分解方法	H26 年 6 月
特許出願	汚染土壌の浄化方法	H26 年 9 月
特許出願	汚染土壌の浄化方法	H27 年 9 月
特許出願	微生物による浄化方法	H27 年 9 月
特許出願	汚染土壌浄化方法	H27 年 9 月

表 3-1-3-3. 論文、投稿、発表、特許リスト
(ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発)
土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

	題目・メディア等	時期
発表	「産業排水中のホウ素の効率的除去を目的とした材料開発」 松方・正田・関根・菊池・山崎、化学工学会 42 回秋季大会	H22 年 9 月
発表	「パイライトによる環境中のヒ素の吸着特性について」 松方・関根・菊池・正田、化学工学会第 43 回秋季大会	H23 年 9 月
発表	「高濃度の塩が共存するホウ素含有排水の処理剤の開発」 松方・正田・松岡・山崎、化学工学会第 75 回年会	H24 年 3 月
発表	「パイライトを用いた鉛処理技術の開発」 正田・松岡・山崎・松方、化学工学会第 44 回秋季大会	H24 年 9 月
発表	「ラジアルウェルを活用した原位置土壌浄化技術の開発-システムの概要」松方・川上・坂本・正田・山崎・松岡、化学工学会第 49 回秋季大会	H27 年 9 月
発表	「同上-Pb 汚染土壌浄化技術」、日野・川上・下村・松方・山崎・松岡、化学工学会第 49 回秋季大会	H27 年 9 月
発表	「同上-土層内 3 次元流れの解析と配水手法」、坂本・松方・山崎・松岡・川上・下村、化学工学会第 49 回秋季大会、	H27 年 9 月
発表	「同上-多成分系汚染に対応する浄化技術」正田、松方、山崎、松岡、化学工学会、化学工学会第 4 七回秋季大会」	H27 年 9 月
発表	「各種有害カチオンに対する ミクロ多孔性無機ポリマー吸着剤の吸着特性」 正田・松方・山崎・松岡、化学工学会第 49 回秋季大会	H27 年 9 月
発表	第 18 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「カラム試験とシリアルバッチ試験における Pb 溶出挙動の比較」下村、千田、川上、竹下、所	H24 年 6 月
発表	第 19 回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「カラム試験とシリアルバッチ試験による As 溶出挙動の 把握 」下村、	H25 年 6 月

	森本、千田、川上	
発表	第 20 回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「チオ硫酸ナトリウム溶液を用いた Pb 汚染土壌の効果的な 洗浄方法」 下村、本間、渡邊、川上	H26 年 6 月

表 3-1-3-4. 論文、投稿、発表、特許リスト
(低コスト原位置電気修復技術の研究開発)
(株) 島津製作所

	題目・メディア等	時期
論文	キレート剤による汚染土壌からの Pb の抽出に与える Fe(III)および Ca の影響：新苗正和・西垣広大・秋田 憲・太田昌昭，環境資源工学，第 57 巻，第 1 号，29-34 頁，2010 年	H22 年
論文	生分解性キレート剤 [S,S] -EDDS および GLDA による鉛汚染土壌の動電学的浄化処理：新苗正和・鈴木祐麻・古賀俊之・足立美緒・秋田 憲・大田昌昭，環境資源工学，第 58 巻，第 3 号，114-119 頁，2011 年	H23 年
論文	EDDS-enhanced electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated clay soils under neutral pH conditions, Tasuma Suzuki, Masakazu Niinae, Toshiyuki Koga, Tadashi Akita, Masaaki Ohta and Tetsuo Choso, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Vol. 440, pp. 145-150, 2014	H26 年
発表	第 17 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「酸性電解水による汚染土壌からの鉛溶出特性」	H23 年 6 月
発表	第 17 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「蛍光 X 線による簡易分析の精度とその適用」	H23 年 6 月
発表	第 19 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 自然由来汚染土壌における鉛の存在形態の解析	H25 年 6 月
発表	第 19 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 自然由来鉛汚染土壌の溶出特性	H25 年 6 月
発表	RemTech Summit 2011, Chicago, USA. 「Remediation of Polluted Geological Media by Using 「Key Research Subjects for Increasing the Efficiency of In Situ Electrokinetic Remediation」	H23 年 5 月
発表	EDDS Enhanced Electrokinetic Remediation of Pb-contaminated Clay Soils under Neutral pH Conditions : 8th Japan/Korea International Symposium on Resources Recycling and Materials Science, Seoul, Korea	H22 年
発表	EDDS enhanced electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated clay soils under neutral pH conditions : the 10 th International Symposium on Electrokinetic Phenomena (ELKIN 2012), Tsukuba, Japan	H24 年
発表	Electrokinetic / reactive barrier system for the treatment of nitrate in groundwater, XXVI International Mineral Processing Congress, New Delhi, India	H24 年

発表	重金属汚染土壌の動電学的浄化処理への生分解性キレート剤 EDDS の適用：平成 22 年度資源・素材学会春季大会，2010 年	H22 年
発表	生分解性界面活性剤による細粒汚染土壌からの重金属除去性検討：平成 22 年度資源・素材学会春季大会，2010 年	H22 年
発表	生分解性キレート剤を用いた重金属汚染土壌の動電学的浄化処理：環境資源工学会第 125 回例会（ポスター発表），2010	H22 年

表 3-1-3-5. 論文、投稿、発表、特許リスト
（次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発）
国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

	題目・メディア等	時期
新聞	日経産業新聞 「地下水浄化、最短 1 ヶ月 新たな微生物使用 環境負荷軽く」	H27. 11
新聞	日経産業新聞 「汚染対策の市場拡大」	H27. 06
講演	12 th International congress on culture collection (WFCC-ICCC12). Santa Catarina, Brazil, Sep. 25 th -Oct. 3 rd 「Influence of different set of variable gene cluster analysis on the phylogenetic definition of bacterial species」	H22. 09
講演	International Symposium on Bacterial genomics, evolution and pathogenesis. Jiangsu, China. Nov. 30- Dec. 3 rd ., 「Shuffling Classification of high Risk pathogens after complete genome sequencing」	H22. 11
講演	The 30 th anniversary symposium of the Japan Society for Microbial Systematics. Dec 9 th , Tokyo 「History and future of taxonomists to unzip chromosomal information to define bacterial species」	H22. 12
講演	International Union Microbiological Societies Congress 「Reclassification of High Risk Pathogens After genome wide screening of conserved genes」	H23. 09
講演	バイオインダストリー協会 (JBA) セミナー「微生物による Bioremediation の技術開発の現状と規制・課題」	H23. 10
講演	2011 International Conference on Environmental OMICS 「Screening of Environmental Human, Animal and Plant Pathogens in Soil and Water」	H23. 11
講演	第 31 回 日本微生物系統分類研究会年次大会「全ゲノム情報から Family <i>Enterobacteriaceae</i> の菌種属レベルの分類指標となる多型遺伝子群および保存遺伝子群の選択とその根拠」	H23. 11
講演	第 6 回日本ゲノム微生物学会「新時代のゲノム微生物学から種の規定」	H24. 03

	を考える：微生物の分布と種分化」	
講演	第 64 回日本生物工学会大会「バイオオーグメンテーションの実用化への可能性と課題」	H24. 10
講演	第 33 回日本微生物系統分類研究会 「ANI インデックスを使った菌種の分類方法とその意義」	H25. 11
講演	第 33 回日本微生物系統分類研究会 「類縁菌種間の分類に有効な遺伝子の選択方法とその意味」	H25. 11
講演	2013 年 知の市場（バイオ安全特論） 「微生物を用いた環境修復手法と安全性」	H25. 11
講演	第 120 回技術士中央講座 「バイオレメディエーションー微生物による汚染環境浄化技術」	H26. 02
講演	The ESCANBER symposium 2014: 「次世代シーケンサーによる環境中の微生物相解析」	H26. 03
講演	2014 年 知の市場（バイオ安全特論） 「微生物と製品のリスク 微生物の安全性」	H26. 10
講演	環境微生物系学会合同大会 2014 「メタゲノムアプローチによるバイオレメディエーション普及に向けた生態系評価技術の開発」	H26. 10
講演	2014 年 知の市場（バイオ安全特論） 「微生物を用いた環境修復手法と安全性」	H26. 11
講演	JBA 第 3 回生物多様性影響評価検討 WG 「次世代シーケンサーを用いた バイオレメディエーション施行時の菌叢解析」	H26. 12
講演	第 88 回日本細菌学会シンポジウム 環境保全とエネルギー開発に貢献する微生物 「微生物機能を用いた環境浄化」	H27. 03
講演	第 88 回日本細菌学会シンポジウム 環境保全とエネルギー開発に貢献する微生物 「汚染地下水の微生物による修復事例と安全性評価」	H27. 03
講演	NITE 講座 「バイオテクノロジーのためのリスクガバナンス 微生物を用いた環境修復手法と安全性」	H27. 05
講演	知の拠点あいち 環境保全・バイオ活用研究会 「 <i>Dehalococcoides</i> を利用したバイオオーグメンテーションのための技術開発」	H27. 11
講演	知の拠点あいち 環境保全・バイオ活用研究会 「次世代シーケンサーを用いたバイオレメディエーション浄化過程の見える化」	H27. 11
発表	International Symposium on Global Multidisciplinary Engineering 2011 「Transcriptional Regulatory Mechanism of Biphenyl/Polychlorinated Biphenyl-Degradation Genes in <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1」	H23. 01
発表	環境バイオテクノロジー学会 2011 年大会 「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株の土壌中の硝酸利用」	H23. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2011 年大会 「塩素化エチレン類のバイ	H23. 06

	オスティミュレーションにおける有機資材の添加効果」	
発表	International Union of Microbiological Societies Congress 「Enrichment of a highly purified Dehalococcoides containing culture」	H23. 09
発表	International Union of Microbiological Societies Congress 「Bacterial diversity of TCE-dechlorinating enrichment cultures as revealed by Pyrosequencing of 16S rRNA genes」	H23. 09
発表	International Union of Microbiological Societies Congress 「Evaluation of air-treatment of chlorinated ethylene-contaminated soil and ground water in slurry system」	H23. 09
発表	International Union of Microbiological Societies Congress 「The essential sequence for transcriptional regulation of biphenyl/polychlorinated biphenyls-degradation gene promoters in <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1」	H23. 09
発表	International Union of Microbiological Societies Congress 「Characterization of Alkane Hydroxylase Gene in <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1」	H23. 09
発表	第 63 回日本生物工学会大会「塩素化エチレン類汚染環境の好氣的バイオレメディエーションの環境影響評価」	H23. 09
発表	第 27 回日本微生物生態学会大会 「16S rRNA 遺伝子を標的としたパイロシーケンシングによる VOC 汚染バイオレメディエーションサイトの微生物モニタリング」	H23. 10
発表	The 1 st GIGAKU Conference in Nagaoka 「The Regulatory Sequence of Biphenyl/Polychlorinated Biphenyls Degradation Gene Transcription in <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1」	H24. 01
発表	The 1 st GIGAKU Conference in Nagaoka 「 Identification of Genes Important for Way of Life in the soil of PCB-Degrader <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1」	H24. 01
発表	第 46 回日本水環境学会年会「16S rRNA 遺伝子パイロシーケンシングによるバイオレメディエーションサイトの微生物生態系影響評価」	H24. 03
発表	第 46 回日本水環境学会年会「即効性有機資材を用いる塩素化エチレンのバイオスティミュレーション実証試験」	H24. 03
発表	日本農芸化学会 2012 年度大会「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株のステチレン代謝経路の解明」	H24. 03
発表	日本農芸化学会 2012 年度大会「塩素化エチレン類汚染環境の好氣的生物修復の環境影響評価」	H24. 03
発表	第 18 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関わる研究集会「嫌気性微生物を利用した塩素化エチレン汚染地下水の浄化実証試験」	H24. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株によるトリクロロエチレン分解に関する解析」	H24. 06

発表	環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 の BphST 二成分制御系による転写誘導メカニズムの解明」	H24. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会「好気性条件下における <i>cis</i> -ジクロロエテン分解菌の探索」	H24. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会「土壌 DNA 抽出時に用いられるスキムミルクに混入する微生物叢解析」	H24. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2012 年度大会「ジクロロエチレン脱塩素菌 <i>Dehalococcoides</i> sp. UCH007 株の分離」	H24. 06
発表	The 14th International Symposium on Microbial Ecology, poster presentation「Environmental Monitoring of Pathogens During Bioremediation Using Massive Parallel 16S rRNA Gene Sequencing」	H24. 8
発表	第 64 回日本生物工学会大会「トリクロロエチレン (TCE) に応答して発現する <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株のビフェニル分解酵素系による TCE 分解に関する解析」	H24. 10
発表	第 64 回日本生物工学会大会「共代謝基質非存在下で好氣的に cDCE を分解する細菌」	H24. 10
発表	第 64 回日本生物工学会大会「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株の 2, 6-ジヒドロキシ安息香酸代謝酵素遺伝子群の解析」	H24. 10
発表	第 8 回日本ゲノム微生物学会年会「 <i>In silico</i> genome subtraction による難培養性微生物のコンプリートゲノム解析」	H25. 03
発表	日本農芸化学会 2013 年度大会「塩素化エチレン類汚染環境の好氣的生物修復の環境影響評価」	H25. 03
発表	日本農芸化学会 2013 年度大会「トリクロロエチレン分解菌 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 のトリクロロエチレン応答性転写制御因子に関する解析」	H25. 03
発表	日本農芸化学会 2013 年度大会「揮発性有機化合物 VOC 分解菌の探索と解析」	H25. 03
発表	環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会「好気性 <i>cis</i> -ジクロロエテン分解菌の分解特性」	H25. 05
発表	環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会「塩素化エチレン類汚染環境におけるバイオレメディエーションの評価」	H25. 05
発表	環境バイオテクノロジー学会 2013 年度大会「ジクロロエチレン分解菌 <i>Dehalococcoides mccartyi</i> UCH007 株のゲノム解析」	H25. 05
発表	第 19 回 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会「嫌気微生物による塩素化エチレン浄化に対する温度の影響」	H25. 06
発表	第 65 回日本生物工学会大会 2013 年「フェノール資化性トリクロロエテン分解菌の単離と解析」	H25. 09
発表	第 65 回日本生物工学会大会「環境メタトランスクリプトーム解析による塩素化エチレン類汚染修復の環境影響評価」	H25. 09
発表	第 65 回日本生物工学会大会「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株におけ	H25. 09

	る BphST 二成分制御システムの塩素化エチレンへの応答」	
発表	第 33 回日本微生物系統分類研究会 「 <i>Acinetobacter</i> 属細菌の MLSA 解析及び全ゲノム配列に基づく分類」	H25. 11
発表	第 29 回微生物生態学会 「spike-in 用人工 16S rRNA 遺伝子と次世代シーケンサーを用いた複合微生物群の絶対定量」	H25. 11
発表	第 29 回微生物生態学会 「オミックス解析に基づく塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響評価」	H25. 11
発表	第 29 回微生物生態学会 「塩素化エチレン類のバイオスティミュレーションにおいて栄養資材の違いが浄化効果と微生物叢に与える影響」	H25. 11
発表	第 29 回微生物生態学会 「 <i>Dehalococcoides</i> sp. UCH007 株を用いた土壌汚染対策のための技術開発」	H25. 11
発表	第 29 回微生物生態学会 「 <i>Acinetobacter</i> 属の全基準株および臨床分離株の全ゲノム配列に基づく分類」	H25. 11
発表	日本農芸化学会 2014 年度大会 「オミックス解析を活用した塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響の評価」	H26. 03
発表	第 20 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「塩素化エチレン汚染地下水集積地から単離された嫌気性微生物の脱塩素化促進効果」	H26. 06
発表	第 55 回新潟生化学懇話会 「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 の <i>cis</i> -1, 2-ジクロロエチレン分解能と関わる酵素遺伝子の解析」	H26. 06
発表	International Union of Microbiological Societies 2014 “Inducible trichloroethylene degradation system in <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1”	H26. 07
発表	The 15th Int. Symposium on Microbial Ecology 2014 “Absolute quantification of microbial community members using high throughput sequencing with spike-in artificial 16S rRNA genes.”	H26. 08
発表	第 69 回土木学会年次学術講演会 「塩素化エチレン類の浄化に効果的な有機資材の微生物診断による評価」	H26. 09
発表	第 66 回生物工学会大会 「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株の <i>cis</i> -1, 2-ジクロロエチレン分解能解析」	H26. 09
発表	第 66 回生物工学会大会 「オミックス解析に基づく塩素化エチレン類のバイオレメディエーションによる環境影響評価」	H26. 09
発表	The 6th Annual Argonne Soil Metagenomics Meeting “Ecological impact Assessment of a biostimulation site on remediation of Tetrachloroethylene by metagenomic approaches”	H26. 10
発表	環境微生物系学会合同大会 2014 「共生菌を用いた <i>Dehalococcoides</i> の活性化によるジクロロエチレンの浄化促進効果の確認」	H26. 10
発表	環境微生物系学会合同大会 2014 「 <i>Dehalococcoides</i> を含むコンソーシアを用いた実汚染地下水の浄化と微生物叢解析」	H26. 10
発表	環境微生物系学会合同大会 2014 「 <i>Dehalococcoides</i> sp. UCH007 株を	H26. 10

	用いたバイオオーグメンテーションのための技術開発」	
発表	環境微生物系学会合同大会 2014 「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 による <i>cis</i> -1,2-ジクロロエチレンの分解に関わる酵素遺伝子の解析」	H26. 10
発表	HUST-NUT Joint Symposium 2014 “Degradation Characteristics of an Aerobic <i>cis</i> -dichloroethene-degrading Bacterium”	H26. 11
発表	第 49 回日本水環境学会年会 (2015 年度) 「RHA1 株を用いる塩素化エチレン汚染地下水のバイオオーグメンテーション実証試験」	H27. 03
発表	第 88 回日本細菌学会総会 「 <i>Acinetobacter</i> 属細菌のゲノム配列及び MALDI-TOF MS に基づく分類」	H27. 03
発表	第 88 回日本細菌学会総会 「全ゲノム解析から核になる遺伝子を腸内細菌科の菌種の分類体系に選択」	H27. 03
発表	第 88 回日本細菌学会総会 「 <i>Pseudomonas</i> 属の分類の評価に有効な Core House Keeping Gene 選択」	H27. 03
発表	The 10 th Joint Genome Institute, Genomics of Energy and Environment Meeting 2015 “Ecological impact assessment of a biostimulation site on remediation of chlorinated ethylene by metagenomic approaches”	H27. 03
発表	第 21 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会 「 <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 株を用いる塩素化エチレン汚染地下水のバイオオーグメンテーション実証試験」	H27. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会 「塩素化エチレン類のバイオオーグメンテーションに向けた脱塩素菌の開発」	H27. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会 「 <i>Comamonas</i> 属細菌のゲノム配列に基づく高精度分類」	H27. 06
発表	環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会 「バイオオーグメンテーションによる実汚染現場の浄化と微生物叢モニタリング」	H27. 06
発表	第 70 回土木学会年次学術講演会 「塩素化エチレン汚染地下水浄化に用いる有機資材の挙動と脱塩素化効果」	H27. 09
論文	化学と生物「微生物によるバイオレメディエーション利用指針における微生物の生態系等への影響評価」	H23. 03
論文	化学と生物「バイオレメディエーションの実際：揮発性有機塩素化合物による土壌・地下水汚染と対策技術」	H23. 04
論文	J. Biosci. Bioeng. The 24-bp consensus sequence responsible for regulation of the BphS1T1 two-component system in a hybrid promoter	H24. 03
論文	Appl. Environ. Microbiol. Specific gene responses of <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 during growth in soil	H24. 10
論文	Genome. Announc. Complete genome sequence of <i>Sulfurospirillum</i> strain UCH001 and UCH003 isolated from groundwater in Japan.	H27. 03
論文	Microbes Environ. The impact of injections of different nutrients on bacterial community and its dechlorination activity in	H27. 06

	chloroethene-contaminated groundwater.	
論文	バイオサイエンスとインダストリー 生態系影響評価への次世代シーケンサーの活用-バイオオーグメンテーション施工時の微生物叢解析を例に	H27. 07
論文	Stand Genomic Sci. Complete genome sequencing of <i>Dehalococcoides</i> sp. strain UCH007 using a differential reads picking method	H27. 11
書籍	「次世代シーケンサー活用術」第5章 環境中の微生物群集構造	
特許	微生物を用いた有機塩素化合物の新規浄化技術	準備中

3-2 目標の達成度

表 3-2-1. 目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発			
シアン汚染サイトのあらゆる土質・地層に適したバイオ技術による浄化工法の開発。(テーマ全体の目標・指標)	1) 現状対策費の 1/2 のコスト達成	1) 実証試験において土質に応じた工法適用により、掘削除去のコスト 1/2 を達成。 ・砂質土 : 注入工法 ・粘性土 : 混練工法	達成
2) あらゆる地盤・地層に対応した技術開発		2) 実証試験において土質に応じた工法適用により浄化を確認。 ・砂質土 : 注入工法、 ・シルト・粘土 : 混練工法、 ・砂質・シルト・粘土の互層 : 混練・注入工法	
①全シアン含有量分析方法の確立 いかなる土壌においても全シアンを 90%以上回収可能な分析技術を開発する。		塩化第二銅・塩化スズを添加試薬とした還元蒸留方法(NSOF 法)を開発し、土壌中の全シアンの精度(添加・回収率)が 95%以上となる分析技術を確立した。	達成
②シアン分解微生物 スティミュレーションの研究 ➤ 原地盤の在来菌によるシアン分解を確認 オーグメンテーションの研究 ➤ 培養したシアン分解菌投入によるシアン分解を確認		スティミュレーションの研究 ➤ 実証試験において在来菌によるシアン分解を確認した。 オーグメンテーションの研究 ➤ 実証試験において対象地の地下水を揚水して集積培養した微生物を対象地に投入することでシアン分解を確認した。	達成
③土質・地層に応じた工法の研究 ➤ 混練の仕様の決定 ➤ 混練性能の評価		➤ 地盤改良機を用いた混練試験により、混練の仕様の確認。 ➤ 地中に混練した栄養剤濃度を TOC と HPLC により定量して混練性能を評価した。	達成
ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発			
要素技術	目標・指標	成果	達成度

①基盤技術（全体目標）	従来の掘削除去方式の約半分のコストで、水溶性かつ移動性の有害重金属等を3年以内に原位置で回収・浄化する。また、狭隘な場所にも適用可能とする。	実証試験に用いた高濃度鉛汚染土壌に関しては、従来方式の半分以下のコストで処理できることを確認・実証できた。 また、3種類の室内カラム試験結果から、洗浄プロセス（工程）全体をシミュレートする手法を開発した。	達成
②配水循環システムに関する研究開発	狭隘な場所に適用可能となる直径2m程度までの立坑を施工可能とし、サイト全体をくまなく浄化する集配水システムを構築する。	直径2mの立坑での施工方法を見出した。 実証試験を通じ、サイト全体を均一にくまなく配水浄化する手法を実証した。	達成
③重金属の土壌からの脱着法の研究開発	全ての重金属類に対する効果的な脱着手法と抽出剤を見出す。	鉛に関しては、チオ硫酸による脱着工程と、電気分解を利用する洗浄工程を併用する方式が有効であることが、実証できた。	達成
④土壌から脱着した重金属等の吸着処理の研究開発	短期間でサイトからの重金属の回収・浄化を可能にする、効率的な水処理システムを開発する。	鉛に対しチオ硫酸を使用する方式では、パイライトが有効であることが実証できた。 別途、無機ポリマー質鉛吸着剤を新規に開発・実用化した。	達成
⑤原位置モニタリング技術に関する研究開発	修復中の洗浄状況をリアルタイムで把握・確認できる3次元モニタリングシステムを構築する。	細径鋼管打設工法を応用し、φ25の井戸を安価に施工する新工法を開発し、実証試験でその有効性が確認・検証できた。	達成
⑥遮水壁に関する研究開発	狭隘な場所にも適用可能で閉鎖系を実現する遮水壁とその工法を開発する。	ベントナイト100%砕石を使用する地中鉛直連続遮水壁を考案し、継手・隅角部を含む部分地中実証実験を行い、施工性並びに遮水性等の性能を別	達成

		途確認・実証した。 但し、狭隘な場所への適用は、シートパイル等との併用で対応する。	
低コスト原位置電気修復技術の研究開発			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	模擬汚染土壌を対象として、電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	鉛、六価クロムを汚染物質とした砂、マサ土、笠岡粘土の模擬汚染土壌において、電力消費量 2, 250kWh/m ³ 以下で浄化できる土壌 pH、電解液 EC の最適条件を導出した。	達成
実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化を行う。	鉛実汚染土壌（粘土混じり砂）及び六価クロム実汚染土壌（砂混じり粘土）について、電力消費量 2, 250kWh/m ³ 以下で浄化できる土壌 pH、電解液 EC の最適条件を導出した。	達成
汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価	汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価を行う。	鉛を対象汚染物質とした模擬汚染土壌について、環境負荷の低い電解質（塩）を使った電解水による溶出試験を実施し、pH 3～pH 4 の電解水で、鉛の溶出量が著しく増加することがわかり、電気修復浄化への適用可能性を見出した。	達成
電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究	電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究を行う。	鉛を対象汚染物質とした模擬汚染土壌について、土壌 pH が 6 以下でなければ鉛は溶出せず浄化が困難なことを実験的に確認した。	達成
印加電圧パルス化による浄化効率の向上に関する研究	印加電圧パルス化による浄化効率の向上のための検討を行う。	鉛模擬汚染土壌、六価クロム模擬汚染土壌のいずれにおいても浄化効率の向上が認められた。	達成

電解水添加による浄化効率の向上に関する研究	電解水添加による浄化効率向上のための検討を行う。	六価クロム模擬汚染土壌では目標を超える浄化効率の向上が認められた。	達成
原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定	原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定を行う。	土壌 pH-電解液 EC の最適化、印加電圧パルス化、電解水添加の 3 技術を適用することにより、いずれもそれぞれの目標電力消費量以内での浄化を達成した。	達成
電気修復法に使用する電極・井戸の最適化に関する評価検討	設備としての電極ならびに電極井戸の数と配置の最適化、電極材料ならびに井戸構造の最適化を行う。電極形状（表面積など）をパラメータとして、浄化効率一定の条件下で有効使用電極の総重量を従来の 2/3 に低減する。	電極形状を変更し、電解液中での抵抗値を変えることなく、その総重量を目標である 2 / 3 以下に削減した。	達成
汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立	汚染現場における浄化対象領域の探索と特定、ならびに浄化過程における浄化進捗状況の把握のために、オンサイト簡易分析手法と迅速マッピング技術を開発する。	汚染分布領域を特定する目的で、携帯型蛍光 X 線分析装置の測定条件を確立した。また鉛を 450mg/kg 含有した汚染土壌を対象とした測定で、 $448 \pm 3 \text{mg/kg}$ の実測値を得ることができ、測定手法として十分な精度があることを確認した。	達成
低コスト電力（自然エネルギー等）の活用の検討	自然エネルギーによる電力の利活用を検討する。利用する電力の目標コストは、複数の使用電力料金の平均値として、1kWh あたり 10 円をめざす。	電力コスト低減を目的として、自然エネルギーである太陽光発電による電力利用について調査と試算を行った。現時点では平均的な商用電力料金よりも高額になるが、技術的には適用可能であることが判った。また、太陽光パネル単価は今後ますます低価格化が進むと	達成

		されており、商用電力の利用できない汚染現場の浄化などの際には、電力を獲得する有効な代替手段として期待できることが判った。	
実証試験の実施と目標浄化コストの検証	研究成果をもとに浄化コストを算出し、実際の汚染サイトでの実証試験によって検証する。 対象土壌 1m ³ あたり 1,500kWh の電力を使用して、対象重金属について土対法における含有量基準値の 3 倍濃度の汚染土壌、また溶出量基準値の 10 倍程度の汚染土壌について、それぞれを基準値以下に浄化する。処理コストは掘削除去による平均的な処理コスト (50,000 円/m ³) の半額程度 (約 25,000 円/m ³) とする。	実証試験の結果、鉛汚染年度について、目標値の 1,500kWh/m ³ での浄化を達成できた。これをもとに、単位電力料金を引用した浄化総コストは 1 m ³ あたり 25,165 円と換算され、当初目標の掘削除去コスト 50,000 円の半額に近い数値となることが示された。	達成
次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発			
研究開発項目①「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」			
① - 1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発			
要素技術	目標・指標	成果	達成度
有害菌のドラフトゲノム解析と指標遺伝子の特定	バイレメに関連する(環境有害菌)属種の細菌 50 株以上について、判別指標となる遺伝子を特定する。	新たに 51 株についてドラフトゲノム解析を実施し、指標遺伝子を特定した。	達成
指標遺伝子を利用した有害性判定手法の開発	バイレメに関連する属種の細菌 50 株以上について、指標遺伝子を用いた判別手法を開発する。	バイレメに関連する 7 属群について、指標遺伝子を新たに特定した 51 株と多数の既往ゲノム解析株を MLSA 法で解析する判別手法を開発した。	達成
有害菌データベースの作製	既知有害菌に関する情報を収集・整備し、微生物の安全評価を一元的に実施でき	様々な機関の既知有害菌に関する情報を収集・一元化し、データベースを作	達成

	る体制を整備する。	成して公開した。	
① - 2.標準微生物の確立(バイオオーグメンテーション実施環境の整備)			
好気性塩素化エチレン類分解菌(群)の収集、培養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜 分解菌の分離・解析、保管	収集株 122 株について、 分解活性を確認し 13 株を 選抜して同定し、保存し た。	達成
嫌気性塩素化エチレン類分解菌(群)の収集、培養、同定、保存	分解菌の集積・純化、選抜 分解菌の分離・解析、保管	我が国で初めて嫌気性脱 塩素菌単離に成功し、共 培養で活性化する菌株も 選抜して同定し、保存し た。	達成
バイレメ指針適合株の開発(分解菌の指針適合確認)	指針適合に必要な情報を 整備、バイレメ指針適合の 確認(3 株以上)、頒布体制 の確立	3 株(RHA1 株、UCH007、 UCH001)について、指針 適合確認を受けた(RHA1 株:平成 26 年 10 月 8 日 付、UCH007 及び UCH001 株:平成 27 年 11 月 25 日 付)。	一部達成
研究開発項目②「多種微生物群の包括的解析技術の開発」			
2-a) 実験室レベルでのバイレメ実験	実験室レベルでのバイレメ 試験系を確立し、バイレメ の有効性と生態系への影 響を評価する。	好気的分解菌 RHA1 株お よび 20B 株を用いて試験 系を確立し、効果を確認し た。同時に微生物群集の 変化を評価した。	達成
2-b) 実汚染現場におけるバイレメ実験	複数の実環境においてバイ オスティミュレーション浄化 を実施し、生態系影響のた めの試料を提供する。	操業中の工場敷地内 3 地 点において浄化試験を実 施し、試料を提供した。	達成
2-c) 次世代シーケンサーによる網羅的な微生物叢解析	次世代シーケンサーを用い た網羅的な菌叢解析手法 を確立し、バイオスティム レーションサイトにおける生 態系影響評価を実施。	3 地点の試験サイトにおい て、新型シーケンサーを用 いた網羅的な菌叢解析に よる生態系影響評価を実 施した。	達成
2-d) 超並列塩基配列解析による指標微生物の特定	ヒト病原菌検出系および病 原菌等の特定による生態系 影響評価手法の確立	指標微生物としてヒト病原 菌を検出する系を確立し た。	達成
2-e) 環境メタト	環境試料からの RNA 抽出・	環境試料からの RNA 抽	達成

ランスクリプトーム解析	配列解析手法の確立、RNAを指標とした網羅的な菌叢解析手法の開発と生態系影響評価。	出・配列解析手法を確立し、生態系影響評価を実施した。	
2-f) 指標微生物群の定量的モニタリング手法の開発	指標候補微生物群の検出PCR プライマーの開発と指標微生物候補に対する定量的モニタリング技術の確立。	細菌、古細菌それぞれに特異的な PCR プライマー設計し、内部標準を用いた定量性測定技術を確立した。	達成
2-g) 生態系影響評価標準的プロトコルの作成	標準的なプロトコルの作成。	標準的なプロトコルを作成した。	達成
2-h) プロトコル実施のための核酸標準物質の整備	プロトコルを実施するための核酸標準物質の頒布体制の整備。	プロトコルを実施するための核酸標準物質の頒布体制を整えた。	達成
研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発(実証実験)」			
導入菌株のモニタリング(長岡技大、産総研)	指針適合株のバイオオーグメンテーションにおける動態と効果を評価する。	指針適合株をバイオオーグメンテーションに使用し、動態と効果を評価した。	達成
生態系影響評価手法の確立(東大、産総研、製品評価機構)	開発した生態系影響評価手法を確立する。 バイオオーグメンテーションにおける生態系への影響を評価する。	バイオオーグメンテーション試験で取得したサンプルについて生態系への影響を評価した。	達成
標準株の維持管理(製品評価機構)	バイレメ指針適合株の頒布体制を整える。	バイレメ指針適合株の頒布体制を整えた。	達成

注)「達成度」の欄には、達成、一部達成、未達成、を選択して記述。

「一部達成」とは、当該技術開発が複数のテーマで構成され、テーマ毎に目標値が設定されている場合において、テーマ毎に達成、未達成がある場合に選択(成果がおおよそ得られていても、すべてのテーマの目標値が未達成の場合は、「未達成」を選択する)。

4. 事業化、波及効果について

4-1 事業化の見通し

4-1 (1) 「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」新日鉄住金エンジニアリング(株)、大阪ガス(株)、(株)不動テトラ

1) 成果の利用主体

成果の利用主体は、シアン化合物(以下、「シアン」という。)の汚染土壌・地下水を有する土地所有者らとなる。シアンを取り扱う工場は、メッキ工場、選鉱精錬所、石炭ガス精製工場等が知られており、これらが利用主体と考える。

メッキ工場ではシアンが金属イオンと容易に化合物を形成する性質を利用し、シアンを銅、亜鉛、ニッケル、金等の建浴として使用している。メッキ工場は全国に2,000以上存在しており、その多くは高度経済成長期に建設された。メッキ工場では今後の設備老朽化に伴う建て直しや工場移転廃止時において、土壌汚染対策法(以下、「土対法」という。)の第3条に基づく土壌汚染状況調査の実施によりシアンの土壌汚染が判明した際、浄化対策に成果の活用を提案したい。

石炭ガスは石炭をコークス炉で乾留して製造しており、製造ガス中には副生成物としてベンゼン、シアンが含まれていたため、ガス精製装置でこれらを除去して都市ガスを製造していた。石炭ガス工場跡地における汚染物質は、ベンゼン、シアンの複合汚染が多く、シアンは鉄との化合物であるフェロシアンの形態で土壌中に存在することが知られている。石炭ガス工場は、大規模な工場が都市近郊の湾岸部に立地していたため、その跡地利用が活発化することが考えられ、跡地開発の際の汚染対策に成果の活用を提案したい。

このような背景から、シアン汚染の安価な浄化技術が求められていることに着目し、技術開発に取り組んでいる。

2) 事業化に至る期間

新日鉄住金エンジニアリング(株)および(株)不動テトラは、既に土壌浄化事業に取り組んでおり、本技術を開発後すみやかに成果の事業化および展開が可能である。

個別の浄化事業の着手に至るまでに、対策範囲を決定するための汚染状況調査、場合によっては行政・地方自治体との協議が発生するため、浄化の業務委託を受けてから浄化事業の着手までは数か月掛かることが多い。

3) 事業化の問題点の分析と明確な解決策の提示

・技術的な問題について

本開発技術のバイオレメディエーションにおける個別要素技術は、①分析技術、②シアン分解微生物、③土質・地層に応じた工法の3点であり、いずれも目標・指標を達成し、また、テーマ全体の目標である掘削除去のコスト1/2

およびシアン分解についても実証試験を通じて達成したことから技術的な問題は有していない。

・個別の汚染対策に関する問題

土壤汚染が存在はその土地の評価を低下させる情報であることから土地所有者らは汚染を有することの情報開示に消極的である。汚染の情報を閉鎖的に扱うことにより、有益な浄化対策の存在を知り得る機会の逸失となる。昨今では掘削除去より安価な原位置浄化が知られてきているが、重金属類であるシアンに対して原位置浄化が可能であることはあまり知られていない。汚染対策に関する問題は、汚染を有する土地の所有者らが、掘削除去より安価な本開発技術を知り得ていないことである。

汚染を有する土地の所有者や成果の利用主体に対して、シアン汚染土壤の原位置浄化が可能であることを知らしめることが、個別汚染対策の事業化に関する問題解消となる。具体的方法として、開発者らは今後、業界専門誌への開発技術のPR、学会への論文投稿、プレスリリース等により本開発技術を広く世に知らしめる。

４－１（２）「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壤修復技術の研究開発」土壤修復ラジアルウェル技術研究組合

成果の利用主体は、現状、当技術研究組合を株式会社に移行する計画がないことと、建設業の認可を有している企業である必要があることから、組合を構成している各組合員企業もしくはそれらのJV（ジョイントベンチャー）となるものと考えている。

開発した技術の実用化は、経済性の観点も含め、ほぼ目処が立っている状況であり、即実施して従来の掘削除去方式より安価に成果を上げることができると考えている。

さらに、実証試験のようなチオ硫酸を用いる複雑なプロセスでも、3種類の室内カラムテスト結果から、浄化プロセス全体をシミュレートする手法を開発できたことから、ほとんどのケースで事前に工期と費用が予測できるようになっており、実用化上の問題点はほぼクリアできた状況となっている。

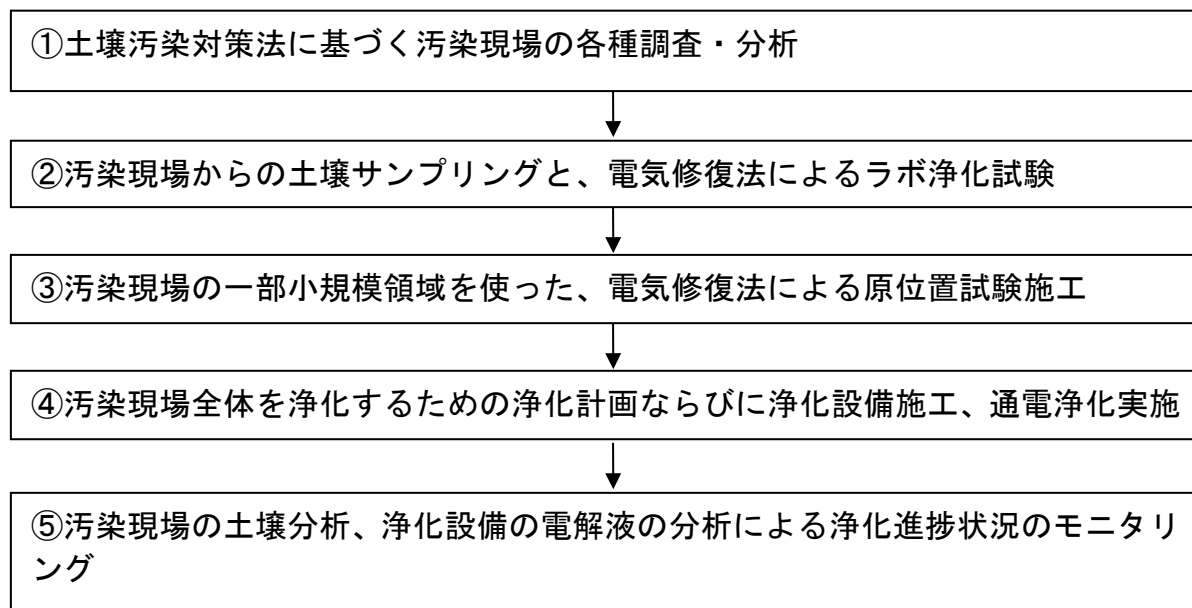
しかしながら、まだ原位置浄化手法そのものに対する認知度が低く、今回のような大規模な地上土槽による実証試験成果をPRすること等により、認知度の向上に地道に努めることが、開発成果を埋没させないためにも肝要と考えている。

また、波及効果に記載のごとく、各要素技術はそれぞれ単独で各分野に利用でき、寄与でき、波及効果は極めて大きい。

４－１（３）「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」（株）島津製作所

・成果の利用主体

本研究開発で得られた成果をもとに、実際に浄化事業を実行する際には以下の手順を踏んで進めることになる。



①、⑤については、例えば、指定調査機関の資格を持つ子会社の「島津テクノロジーサーチ」が、②～④については「島津製作所」内の土壌浄化技術部門（新設）が、それぞれ事業の主担当として進めていく。

・事業化に至る期間

	H22～H24 年度	H25～H26 年度	H27 年度～
主な業務内容	土壌物性評価 模擬汚染土壌によるラボ試験 原位置・実汚染土壌浄化試験	引合い案件における実汚染土壌による、ラボ浄化試験・原位置浄化試験（有償）の実施と浄化条件・ノウハウの蓄積	引合い案件に対する商用浄化施工
事業フェーズ	基礎研究→実用化研究	浄化試験の有償化実施 引合い毎の応用技術蓄積	本格事業化
組織	本社・基盤技術研究所	本社・経営戦略室 土壌浄化 G 事業化組織の検討と新設準備	グループ会社を含む、土壌浄化事業部門（新設）

H25 年度以降は、原位置浄化の引合い案件情報を求めるとともに、本技術の波及効果としてのバッチ式オンサイト浄化の開発と引合い案件情報を求めてきたが、いずれも有効な引合い情報を獲得できていない。

4-1（4）「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

本事業終了時には、バイレメ指針を適合させるための標準的な安全性評価手法の確立、バイレメ指針に適合した分解菌の整備等のバイオレメディエーションに係る一連の基盤が整備される。指針に適合した分解菌については後継プロジェクトで更に浄化試験を進めており、浄化方法を含めた利用環境が整備されつつある。これにより、バイレメ事業者がバイオオーグメンテーションを実施する上で大きな障害となっている「バイレメ指針」の適合審査の費用・労力が軽減される。さらに、本研究で開発された先進的な遺伝子技術を利用したモニタリングにより、正確にバイレメ実施時の微生物生態系影響評価を行うことが可能になり、バイレメの有効性や安全性に係わる科学的な知見が蓄積される。ただ、精度が高すぎるデータの評価法を更に検討することでより洗練された技術として利用価値が高まると期待される。微生物の動態を可視化できた成果を上手に活用することにより、バイオオーグメンテーションの本格的な実施に際して大きな障害となっている社会的受容性（パブリックアクセプタンス）の向上・確保も進み、バイオレメディエーションの普及が進むと期待される。

バイオレメディエーションが様々な実汚染サイトにおいて徐々に実施されるようになれば、汚染地域（150 兆円、44 万 ha 規模）注 1 の新たな有効活用や資産価値の上昇による間接的な経済効果が期待される。

注 1）出典：「土壤汚染をめぐるブラウンフィールド問題の実態等について（中間とりまとめ）」 環境省
2007 年 4 月

4-2 波及効果

4-2 (1) 「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ

1) 土壌の全シアン含有量分析方法開発の波及効果

- ・ 全シアン含有量分析の操作に掛かる操作者の拘束時間を憂慮して開発された「土壌連続分析方法」を他の汚染物質の土壌溶出量または含有量分析方法への応用。

2) シアン分解菌のスティミュレーション技術およびオーグメンテーションの技術波及効果

- ・ シアンをバイオレメディエーションで浄化可能な技術確立により、シアン汚染の潜在的な浄化重要な掘り起こしに繋がる。
- ・ 油、VOC の汚染物質の分解菌のオーグメンテーション技術（分解菌分離、培養、当該地への投入など）への応用。

3) 混練工法の開発の波及効果

- ・ 注入工法の適用が困難な汚染サイトにおいて、バイオ栄養剤または不溶化剤の対象範囲への投入工法としての応用。
- ・ 油、VOC の汚染物質の浄化工法、不溶化工法として混練工法の応用。

4-2 (2) 「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発」土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

要素技術は、それぞれ単独でも利用が可能であり、実用化可能な段階まで到達している。

1) ラジアルウェル技術

小口径ラジアルウェル技術は狭隘な場所でのラジアルウェルの設置が必要とされるケースのほとんどに即適用可能。

2) 土壌からの脱着技術

従来高濃度汚染鉛土壌の場外での洗浄は塩酸で行うことが一般的だったが、機器の錆の問題があった。チオ硫酸を利用することでこの問題が解決可能。

3) 重金属の吸着および凝集沈殿処理技術

ホウ素処理技術は、産業用の排水処理技術として実用化できており、メッキ業、ほうろう産業、金属再生業等の様々な分野における排水処理技術として広範囲に利用され始めている。

4) モニタリング井戸

本プロジェクトが対象としている土壌は、透水係数が $5 \times 10^{-5} \text{ m/s}$ 以上の砂層ないしシルト混じり砂層で、地震時に液状化が生じやすいサイトが多い。汚染処理終了後に、井戸孔に砂利を充填することで、遮水壁と相まって、確実な液状化対策済みサイトとすることが可能。

5) 遮水壁

遮水壁は単独でも原位置封じ込め工法となることから、有害重金属が流出入しない対策だけでよいとする事業に即適用可能。

4-2 (3) 「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」(株) 島津製作所

①汚染現場において一旦掘削した土壌をその場に設置された土壌浄化槽に投入して、電気修復技術を使って汚染土壌から重金属の回収を行うオンサイト土壌浄化手法（バッチ式土壌浄化法）への技術応用、②有用重金属を含む廃土・廃鉱山土壌などから従来の技術に比べて低コストでの金属回収方法への転用、③カドミウムで汚染された圃場において土壌を掘り出すことなくその場でカドミウムを回収し土壌を浄化する技術への転用が期待できる。

4-2 (4) 「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

本事業の成果により、微生物の生態系への影響評価に係わる正確で信頼性のある評価手法が確立される。この結果、環境中での微生物利用に係わる安全・安心が確保されて国民の理解が進み、廃水・廃棄物処理や資源の回収や再利用などの他の分野における微生物の環境利用促進に繋がると予想される。さらに、環境中における遺伝子レベルでの微生物生態系評価技術は非組換え微生物のみならず、遺伝子組換え微生物にも適用が可能である。そのため、本事業の成果はカルタヘナ法における遺伝子組換え微生物の第一種利用に係わる評価・検出技術にも転用でき、遺伝子組換え微生物の第一種利用に道をひらく技術にもなると期待される。

現在、アジア諸国でも日本と同様に土壌・地下水汚染問題が表面化しており、日本より深刻なケースも見られる。我が国の浄化技術をアジア諸国で活用するチャンスは大いにあると考えられ、経済的な事情から低コストのバイオレメディエーションが利用されると予想される。特にバイオオーグメンテーションではバイレメ菌自体の能力やモニタリング技術が重要であり、国際競争力の高い独自の技術を構築することにより、輸出産業として日本経済に貢献出来ると期待される。

本研究で開発される微生物のモニタリング技術ならびに蓄積される知見は、他の食品衛生・臨床微生物検査・環境微生物分野における有害菌の検出等に活用することが可能である。幅広い分野で分析機関等に利用されると期待される。

5. 研究開発マネジメント・体制等

5－1 研究開発計画

5－1（１） 「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動産テトラ

本開発は、平成 22 年 10 月から平成 23 年 3 月までは NEDO との共同研究、平成 23 年・24 年は経済産業省から補助金を受けて実施しており、シアン汚染サイトのあらゆる地層・土質に適したバイオ技術による浄化工法の開発を目的とした。

初年度から 3 年目までは室内レベルでの個別要素技術を確認して行き、3 年目から 5 年目の最終年度にかけて実証レベルでの性能確認を行う予定であった。

全シアン含有量分析方法の開発計画は初年度で基本技術を開発し、2 年目で様々な土壌への適用性確認による技術のブラッシュアップとし、計画通りの成果を挙げた。

シアン分解菌の研究は、初年度と 2 年目で在来菌によるシアンの分解を室内レベルで確認し、3 年目で分解菌の分離・培養を行うと計画設定しており、予定通り進捗して要素技術として確立した。4 年目、5 年目は在来菌によるシアンの分解および培養したシアン分解菌の投入によりシアンの浄化を現場実証レベルで確認し、計画通りの成果を挙げた。

地層・土質に応じた工法の研究は、初年度と 2 年目で混練仕様の決定、混練の性能評価手法の検討を行う計画とし、3 年目から実証レベルでの施工仕様の確認を計画しており、予定通り進捗して要素技術として確立した。4 年目、5 年目ではスティミュレーションとオーグメンテーションの実証試験で混練施工の性能確認を行い、計画通りの成果を挙げた。

研究項目	2010年度	2011年度	2012年度	2013年度	2014年度
開発要素					
全シアン含有量 分析方法の確立	分析方法開発 NSOF法を確立	ブラッシュアップ 様々な汚染土で精度確認	以降、全シアン含有量の評価方法としてNSOF法を活用		
適用工法の確立	室内試験	室内試験	施工機による 混練実証試験		
混練・注入工法	混練仕様設定	栄養剤濃度 分析方法確立	混練・注入ハイブリッド 工法確立	混練工法 実証試験 (ステイミュレーション 実証試験)	オーグメンテーション 実証試験
シアン分解微生物分解の確立	嫌気性試験	嫌気性試験	シアン分解菌特定	ステイミュレーション 技術の確立	
ステイミュレーション(在来菌)の研究					
オーグメンテーション(外部投入菌)の研究			分離・培養	ミニプラント試験	分離・培養 オーグメンテーション 技術の確立

5-1 (2) 「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発」 土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

H.22 基礎検討	H.23 要素技術の開発	H.24 要素技術の確立	H25～H26 実証試験
<u>基盤技術</u> ①各要素技術の課題把握	→各要素技術の改良支援	→システムのコスト把握等	チオ硫酸を使用するケースのコスト把握
<u>配水循環システム</u> ①小口径化の課題抽出 ②飽和不飽和流の解析モデルの構築と簡易浸透流試験装置の試作・実験	→小口径での施工方法検討 →飽和不飽和流の数値計算解析と浸透流試験装置の製作・実験	→施工方法の選定手法確立 →水平集配水管の基本スペックの確立と実証試験フィールドへの適用性検討	→均一な配水循環方式の確立・検証
<u>土壌からの脱着法</u> ①模擬汚染土の試作と攪拌平衡系での基礎脱着試験	→飽和不飽和溶出挙動把握と脱着剤の特性評価(鉛)	→同左(ヒ素、ホウ素、フッ素)	チオ硫酸による鉛脱着方式検証
<u>重金属の吸着処理</u> ①吸着剤の検討・試作 ②沈殿処理剤の調査・検討	→吸着剤の仕様決定 →沈殿処理剤の仕様決定	→吸着剤の改良・改善 →沈殿処理剤の改良・改善	パイライトの鉛吸着性能確認 →新規鉛吸着剤の実用化

③既存水処理システム調査	→ベンチスケール装置設計	→実証試験用装置の設計	
原位置モニタリング ①既存井戸工法の調査・検討	→細径鋼管採用と施工試験	→同左（斜め施工の再試験）	実証試験での性能検証
遮水壁 ①既存遮水壁の調査・検討	→仕様工法と使用材料決定	→施工試験と実性能の確認	→継手・隅角部の施工実験

5-1 (3) 「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」(株) 島津製作所

本研究開発で設定された目標は、

- ①（浄化電力量目標）対象土壌 1m³あたり 1,500kWh の電力を使用して、対象重金属について土対法における含有量基準値の 3 倍濃度の汚染土壌、また溶出量基準値の 10 倍程度の汚染土壌について、それぞれを基準値以下に浄化すること
- ②（処理コスト目標）処理コストは掘削除去による平均的な処理コスト（50,000 円/m³）の半額程度（約 25,000 円/m³）とする。

の二つである。

前述②の目標の達成のために、①で規定された浄化電力量の目標達成のための技術項目：A（主として浄化電力量コストの削減に関するもの）、それ以外の浄化設備コストなど付帯的なコスト削減のための要素技術項目：B の研究開発が必要である。A ならびに B それぞれの個別研究項目とスケジュールを以下に図示する。

		H22 年度	H23 年度	H24 年度
A	電気修復法における汚染物質の浄化効率の向上と最適条件の確立	①模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化		
			②実汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	
		③汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価		
		④電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究		
			⑤印加電圧パルス化による浄化効率の向上	
			⑥電解水添加による浄化効率の向上	

			る研究		
				⑦原位置浄化試験による実証試験の浄化条件決定	
B	電気修復法に使用する電極・井戸の最適化に関する評価検討				
	汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立				
	低コスト電力（自然エネルギー等）の活用の検討				
A+B					実証試験の実施と目標浄化コストの検証

なお、研究項目の実施について、以下のとおり、平成 22 年度はその一部を再委託先の産業技術総合研究所ならびに山口大学が担当した。平成 23 年度以降については、全て島津製作所が担当した。具体的な研究内容については、前述の『個別要素技術の成果』に記載したとおりである。

研究項目	実施者
模擬汚染土壌を対象とした電力量を最小化する土壌 pH、電解液 EC の最適化	島津製作所
汚染土壌の物理化学的特性解析と浄化効率への影響評価	島津製作所 産業技術総合研究所
電気修復法における浄化メカニズムと浄化効率向上に関する研究	島津製作所 山口大学
汚染現場における汚染分布領域の特定技術の確立	島津製作所 産業技術総合研究所

表 平成 22 年度の研究項目と実施者

5-1 (4) 「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

バイオレメディエーションの事業化に際しての大きな障害として、環境での微生物利用に関わる安全性への懸念（社会的受容性の低さ）と浄化に時間がかかること（技術的課題）があげられる。浄化に時間がかかる＝浄化効率が上がらない場合には、外部から浄化能力に優れた微生物を導入するバイオオーグメンテーションが効果を発揮するケースが知られているが、微生物の環境利用にかかわる安全性への懸念が増すことから敬遠される傾向にある。そこで、導入する微生物の安全性を確認する

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針(バイレメ指針)」が設けられている。しかし、バイレメ指針に適合させるためには、病原性、分解経路を含む分解特性、微生物を導入することによる生態影響などにかかわる知見の収集は容易でなく、バイレメ指針への適合にかかる労力とコストが更なる課題となっている。具体的には、病原性判定にかかわる動物実験に大きなコストがかかる上に正確で信頼性の高い生態系影響評価手法が確立されておらず様々な実験を実施する必要がある。このためバイレメ指針適合菌株の数は限られており、所有する事業者が独占的に使用する状況にある。また、環境中の微生物にかかわる正確で信頼性の高い知見が得られないことから社会的受容性が確立できず、バイオレメディエーション、特にバイオオーグメンテーションの実施において、地元の抵抗に遭う事態も生じている。

本事業ではこれらの課題を解決して次世代バイオレメディエーション＝バイオオーグメンテーションの普及を図るものであり、上述の課題を解決するため以下の研究開発を実施した。

1. 病原菌にかかわる精密な分類指標と病原性遺伝子の情報を収集してデータベース化することにより遺伝学的な病原性判定法を確立し、動物試験なしで利用微生物の病原性判定を可能にする。(研究開発項目①. バイオレメディエーションのための標準微生物の確立: ①-1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発)
2. 複数の優れた浄化能力を備えた微生物をバイレメ指針に適合させて頒布し、バイレメ指針適合を行う余裕のない事業者でもバイオオーグメンテーションを実施できるようにする。(研究開発項目①. バイオレメディエーションのための標準微生物の確立: ①-2. 標準微生物の確立)
3. 最新の次世代 DNA シーケンサーを用いて環境中の微生物叢の網羅的把握を行い、生態系の変動を代表する指標菌の把握や利用微生物や指標菌のモニタリング手法の確立を行い、精密で信頼性の高い生態系影響の評価手法を開発する。(研究開発項目②. 多種微生物群の包括的解析技術の開発)
4. 次世代 DNA シーケンサーを用いて環境中の微生物叢にかかわる精密で信頼性の高い知見を収集し、有害菌の有無や挙動を正確に把握して情報提供し、バイオレメディエーションにおける安全性への懸念を取り除く。(研究開発項目②. 多種微生物群の包括的解析技術の開発)

さらに、開発する手法や技術及び微生物を洗練させて実用性を高め、使える手法・技術・微生物として一般の事業者を提供できるようにするため、事業期間後半に実汚染現場における実証試験(研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発」)を実施した。得られる成果によりバイオレメディエーション、特にバイオオーグメンテーションの普及にかかわる障害の多くが除かれると期待し、以上の研究開発項目を図1に示すスケジュールで実施した。

当初の研究開発計画(表 5-1-1)では、H24 年度に使用菌株のバイレメ指針適合確認を受けて H25 年度からバイオオーグメンテーション野外試験を実施する予定であった。しかし、使用菌株の開発とバイレメ指針適合確認に向けたデータ収集に予定より時間がかかったのと、バイレメ指針適合審査を担当する委員会の委員の大幅な再編成があり、審査委員会がなかなか開催されなかったことと不慣れな委員の多い委員会で審査に時間がかかったため、野外試験の実施が遅れて H26 年度のみとなつてし

まった(表 5-1-2)。これに対し、野外試験の準備や地元自治体担当者との情報共有などを指針適合審査と並行して進め、野外試験後のサンプル解析を集中して実施して計画していた全ての実施項目を完了させた。地元自治体の要望もあり矢板を打ったりして予想外にコストがかかり、野外試験を更に実施する資金的余裕がなかったことを考慮すると、最終的な研究開発計画は妥当であったと考えられる。

表 5-1-1. 当初の研究開発計画

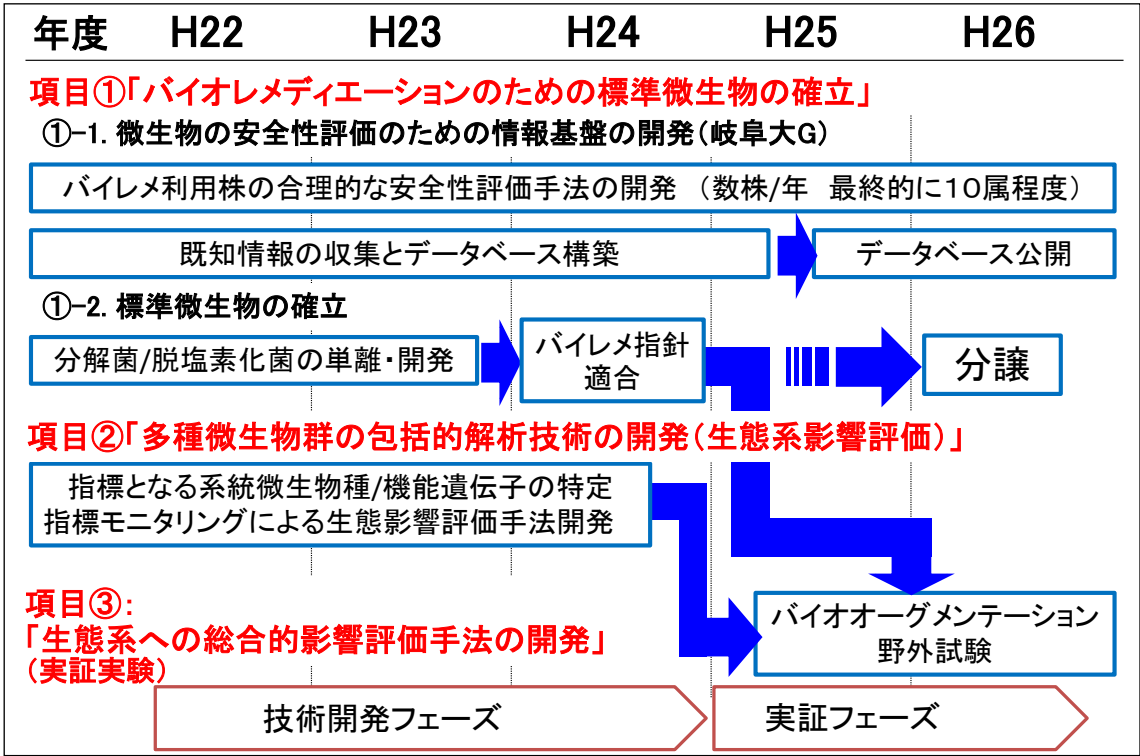
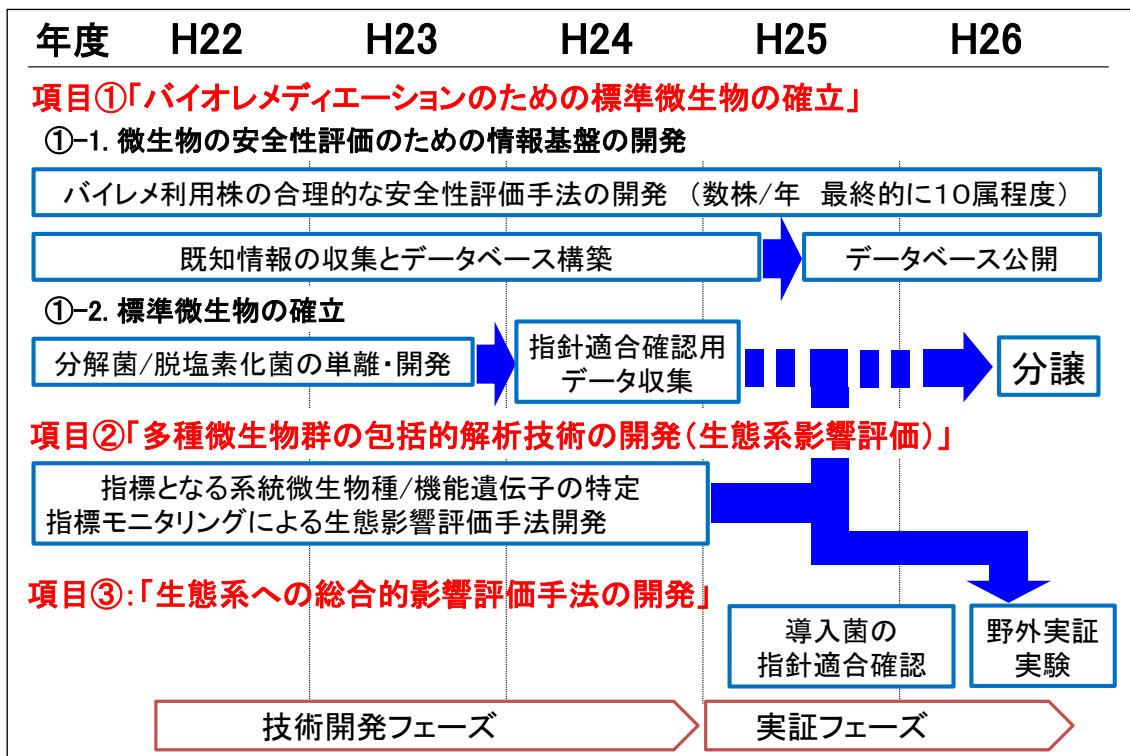


表 5-1-2. 最終的な研究開発計画

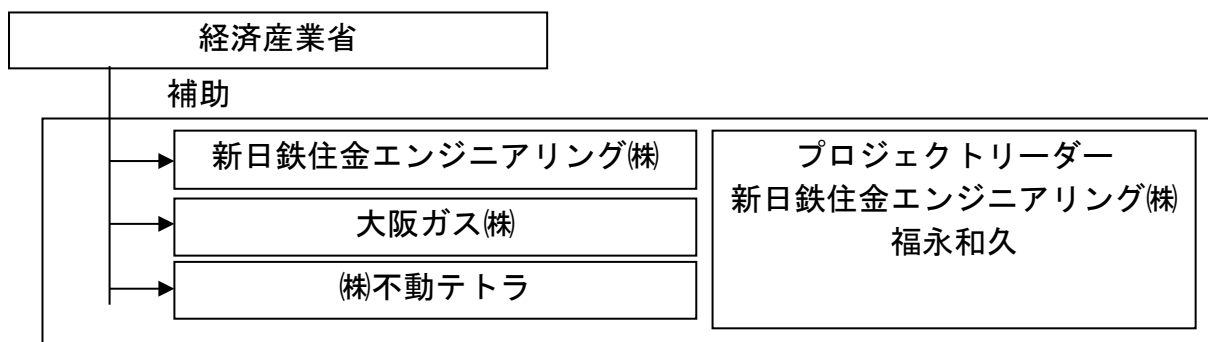


5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

5-2 (1) 「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」新日鉄住金エンジニアリング(株)、大阪ガス(株)、(株)不動テトラ

本研究開発は、選定審査手続きを経て、新日鉄エンジニアリング(株)(当時名称)、大阪ガス(株)、(株)不動テトラが経済産業省からの補助金交付を受けた。

研究開発の実施に当たっては、研究開発を統括するためのプロジェクトリーダー(新日鉄住金エンジニアリング(株) 福永和久)を設置した。



研究開発推進チーム

図 5-2-1-1. 研究開発実施体制

5-2 (2) 「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発」土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

本研究開発は、公募による選定手続きを経て、土壌修復ラジアルウェル技術研究組合が、平成22年度はNEDOとの共同研究で、平成23年度～26年度は経済産業省の補助金を受けて実施した。

技術研究組合は、下図のごとく早稲田大学よりの個人組合員3名と企業組合員5社で構成し、早稲田大学の松方正彦（教授）がテーマリーダーとして、研究開発全体を統括する体制としている。

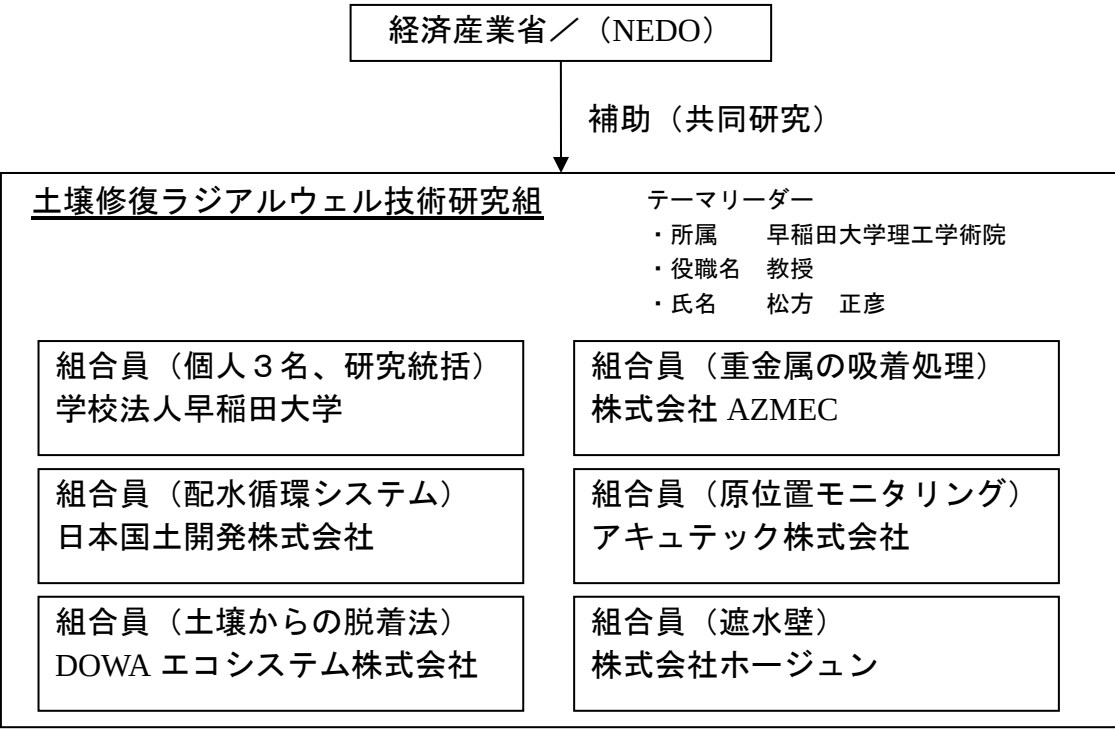


図 5-2-2-2. 研究開発実施体制

5-2 (3) 「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」(株) 島津製作所

本研究開発は、平成 22 年度公募による選定審査手続きを経て、株式会社島津製作所が NEDO との共同開発により実施した。平成 22 年度に限り、再委託先として独立行政法人産業技術総合研究所、国立大学法人山口大学が参加した。

平成 23 年度以降は、株式会社島津製作所が経済産業省からの委託を受けて実施した。

研究開発の実施に当たっては、研究開発を統括するためのプロジェクトリーダー(株式会社島津製作所 秋田 憲)を設置するとともに、研究計画、成果への助言のため、技術検討委員会を設置した。

図 5-2-3-1. 研究開発実施体制(平成 22 年度)

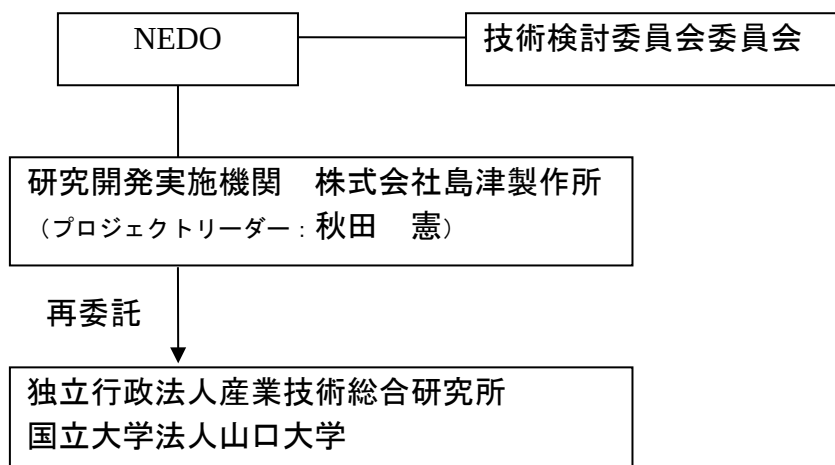
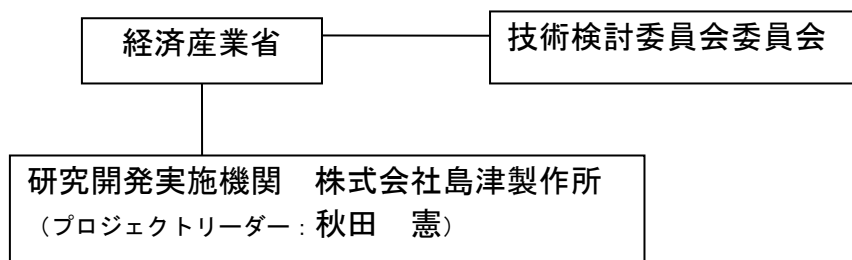


図 5-2-3-1. 研究開発実施体制(平成 23、24 年度)

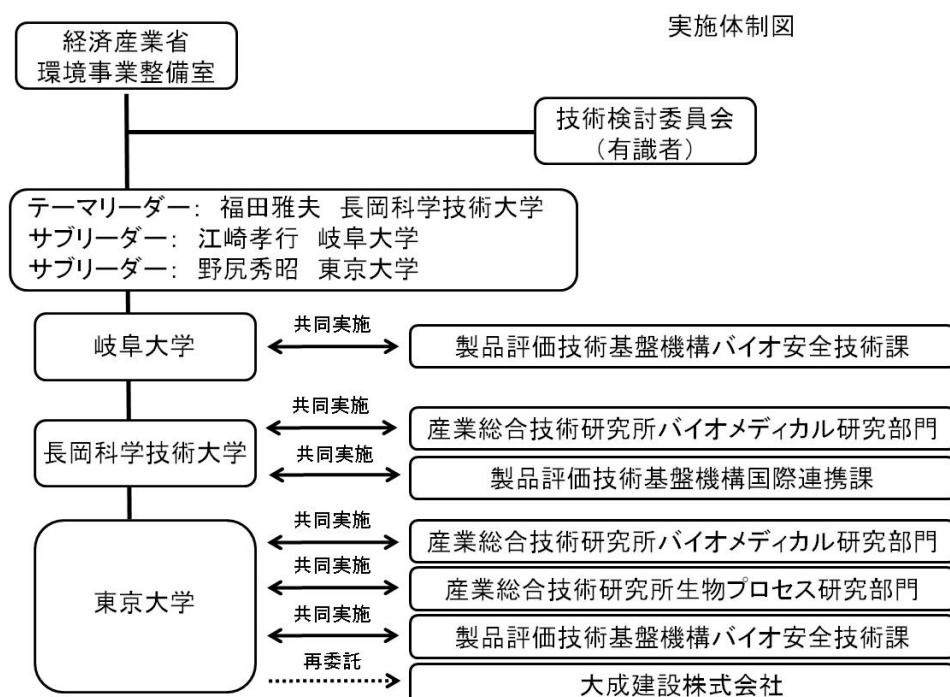


5-2 (4) 「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

本研究開発は、公募による選定審査手続きを経て、3機関（他共同実施先2機関、再委託先1機関）が経済産業省からの委託を受けて実施した。バイオレメディエーションの実施には、学術的な要素の高い基礎基盤技術開発のみならず、それを現場に適用するための応用技術が必要であることから、それぞれの分野をリードする大学、研究機関、企業で構成する研究チーム体制（図5-2-1）を取って実施した。また後述のように細かい役割分担を決めるとともに、必要に応じて他グループの作業を支援・分担して、目標を達成した。

研究開発実施に当たっては、事業を総括するためのテーマリーダーとして本分野での優れた実績を有するテーマリーダー（福田 雅夫 長岡科学技術大学教授、前環境バイオテクノロジー学会会長）を設定するとともに、外部有識者からの意見を取り入れて、研究計画ならびに方針を検討するために技術検討委員会（2回/年）を開催した。サブリーダーの代わりにプロジェクト管理能力に優れるマネージャー（山副 敦司 製品評価技術基盤機構、主任）が活躍し、プロジェクトの適切な進捗を確保した。さらに、テーマリーダー主導のもと、技術検討会の前後に全実施機関の参加による会合を年4回以上開催し、各グループでの進捗報告と技術の共有を行うことで、連携の強化に努めた。特に、予定より遅れが生じた最後の2年間は年6回以上会合を開催した。また、汚染現場でのバイオスティミュレーション試験や、バイオオーグメンテーション野外実証試験に際しては事前および事後に現場の企業および自治体の担当者に対して、実施計画や実施内容および成果を説明して情報共有に努めた。

図 5-2-4-1. 実施体制



役割分担

研究開発項目①「バイオレメディエーションのための標準微生物の確立」

H22～26年度

①-1. 微生物の安全性評価のための情報基盤の開発

- a) 有害菌のドラフトゲノム解析と指標遺伝子の特定 (NITE)
- b) 指標遺伝子を利用した病原菌特定方法の開発 (岐阜大)
- c) 有害菌データベースの作製 (岐阜大、NITE)

H22～26年度

①-2. 標準微生物の確立 (バイオオーグメンテーション実施環境の整備)

- a) 好気性分解菌の収集、培養、同定、保存 (長岡技大、NITE)
- b) 嫌気性分解菌の収集、培養、同定、保存 (産総研、NITE)
- c) 収集分解菌の分解特性解析および選抜 (長岡技大)
- d) 分解菌のゲノム解析 (NITE)
- e) 選抜した分解菌の指針適合 (長岡技大)
- f) 定量PCR法によるバイレメ利用株を簡便に定量する手法の開発 (産総研)
- g) 標準菌株 (指針適合株) の保存 (NITE)

研究開発項目②「多種微生物群の包括的解析技術の開発」

H22～24 年度

- a) 実験室レベルでのバイレメ実験 (東大)
- b) 実汚染現場におけるバイレメ実験 (大成建設)
- c) 次世代型シーケンサーによる塩基配列解読 (NITE)
- d) メタシーケンス配列解析による指標微生物の特定 (東大、産総研、NITE)
- e) 定量PCR法による指標微生物群の定量的モニタリング手法の開発 (産総研)
- f) 環境メタトランスクリプトーム解析 (産総研)

(H25～26年度実施)

- g) 生態系影響評価標準的プロトコルの作成 (東大、産総研)
- h) プロトコル実施のための核酸標準物質の整備 (産総研)

(H26年度実施)

研究開発項目③「生態系への総合的影響評価手法の開発」

- a) バイオオーグメンテーション実証試験 (大成建設)
- b) 導入菌株の挙動モニタリング標準的手法の確認と最適化および分解活性の維持 (長岡技大、産総研)
- c) 指針適合株の維持、管理、保存方法の検討 (長岡技大、NITE)
- d) 生態系影響評価モニタリング標準的手法の確認と最適化 (東大、産総研、NITE)

5-3 資金配分

本技術開発は平成23年度から平成26年度までの4年間の委託・補助事業である（平成22年度においてはNEDO委託・共同研究事業として実施）。平成23年度から平成26年度までの技術開発資金配分表を表1に示す。資金配分については各個別要素技術開発を遂行するのに必要な資金をそれぞれ配分している。平成23年度の研究開発の実施において予算執行率はほぼ100%であり、予算の過不足はない。

表1. 土壌汚染対策のための技術開発資金配分
(予算執行額) (単位: 百万円)

年度 平成	23	24	25	26	合計
シアン汚染土壌の飽和・不飽和 原位置バイオレメディエーショ ンの研究開発	35	40	42	40	157
ラジアルウェルを活用したパッ シブな新規土壌修復技術の研究 開発	25	28	43	23	119
低コスト原位置電気修復技術の 研究開発	15	19	—	—	34
次世代バイオレメディエーショ ン普及のためのセーフバイオシ ステムの研究開発	46	90	79	71	286
合計	121	177	164	134	596

5-4 変化への対応

5-4 (1) 「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ

平成 21 年に改正土壌汚染対策法の法施行前、浄化対策は掘削除去に偏重しており、改正法施工後もその傾向に大きな変化は見られない。（社）土壌環境センターの「土壌汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果によると、平成 20 年頃まで法対応、ならびに、法対応以外の自主対策とともに掘削を伴う対策実施件数は約 30%前後で行われていた。平成 22 年以降は掘削を伴う対策実施件数は 50%以上で行われており、法改正後はより一層汚染の除去が望まれている。

本開発は、操業中の工場や企業の自主的な対策を促進するために、既存の工法より安価な浄化技術を開発することを目的とした。開発成果は汚染の除去が可能であり、市場ニーズに沿ったものである。

年度	掘削を伴う措置			掘削を伴わない措置			掘削・場外処分		原位置・オンサイト		全件数
	掘削場外搬出	掘削（熱処理、洗浄、化学分解、生物処理）	掘削（不溶化埋戻し、遮水工・遮断工封じ込め）	原位置浄化（抽出、生物・化学分解、洗浄）	原位置封じ込め	盛土、舗装、立入禁止	件数	割合	件数	割合	
平成18年度	915	0	0	979	570	234	915	33.9%	1783	66.1%	2698
平成19年度	900	0	0	979	711	166	900	32.7%	1856	67.3%	2756
平成20年度	880	0	0	1219	743	307	880	27.9%	2269	72.1%	3149
平成21年度	915	0	0	1022	616	238	915	32.8%	1876	67.2%	2791
平成22年度	792	34	5	500	44	25	831	59.4%	569	40.6%	1400
平成23年度	710	72	19	337	27	39	801	66.5%	403	33.5%	1204
平成24年度	641	26	83	293	24	146	750	61.8%	463	38.2%	1213
平成25年度	671	47	23	319	15	44	741	66.2%	378	33.8%	1119

5-4 (2) 「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発」土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

東日本大震災で生じた諸々の環境汚染のひとつである津波堆積物処理に、**重金属**の吸着および凝集沈殿処理技術の応用技術である不溶化処理材が 1,300 トンほど利用された。

また、ホウ素の沈殿処理技術は経済的な技術として実用化されており、メッキ業、ほうろう産業、金属再生業等の様々な分野における排水処理技術として、広範囲に利用され始めている。（平成 13 年に施行された水質汚濁防止法の一律排水基準で、暫定規準のままとなっていて平成 28 年 7 月見直し予定のホウ素、フッ素、硝酸性窒素・亜硝酸性窒素のうちのホウ素処理）

なお、重金属の吸着および凝集沈殿処理技術に関しては、水処理設備を必要期間リースする形態等を考慮し、ユーザーの設備投資の抑制対策を検討している。

5-4 (3) 「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」(株) 島津製作所

平成 22 年を境として、土壤汚染対策法改正の影響もあり、要処置区域等指定区域の件数は急激に増加してきた（平成 22 年 4 月：約 380 件→平成 24 年 9 月現在：約 700 件）。

たとえば操業中の工場敷地における汚染土壌の対策として、将来の工場の立替時期あるいは操業停止しての土地の転売時期を待たずに、操業中から（低コストで徐々に）浄化対策を実施していくことがますます望まれている。

今回の研究開発について、当初は平成 22 年度から 5 年間の研究期間を予定してスタートしたが、汚染現場毎に予備的な浄化試験によって土壤浄化条件を決定していく必要がある電気修復法においては、前半の 2 年間で獲得した基礎的な土壤浄化の効率向上の要素技術を応用して、3 年目に実証試験に移行し、その成果をもとに研究段階から実際の市場参入へと移行し、個別に応用技術の改良を重ねていく方が事業化への早道であると判断した。

したがって、補助事業による研究開発は目標を 3 年で達成して完了とし、平成 25 年度以降は実際の引合い案件について対応しながら 2 年後の本格事業化をめざした。

2 年間の営業活動のなかで適用できる汚染現場の引合いを探ってきたが、急激な景気回復にともなって、工場跡地の再開発などでは浄化工期の極めて短い掘削除去・清浄土入替工法が依然として採用されることが多く、弊社の電気修復法についてはまだ本格事業化には至っていない。

5-4 (4) 「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

当初は汚染現場の試料から TCE 分解菌を集積・選抜することに集中していたが、分解菌が取得できる効率が低いため、芳香族化合物等分解菌や既往の保存菌株など選抜材料を多様化させた。その結果、優れた特性をもつ多様な分解菌を得ることができた。

バイレメ指針適合確認の委員会のメンバー再編に伴い、委員会の開催が先送りとなり、指針適合確認が遅れることとなった。これに対して、(1)委員会の審議がスムーズに進むように申請菌株にかかわる情報を充実させるとともに、(2)バイオオーグメンテーション実証試験の準備を並行して進め、指針適合確認後に直ちに実証試験が実施できるようにした。

平成 23 年度にバイレメ指針の解説の改訂が進められ、バイレメ指針適合審査において病原性菌に近縁でない浄化用微生物では動物試験を必須としなくなった。バイレメ指針におけるコスト面でのハードルが低くなった形である、本事業で進める安全性評価手法の開発の意義を問われる変化であった。我々は計画の変更が必要かを検討し、病原性菌に近縁な浄化用微生物では依然として動物試験が必要であること、さらに本来の病原性菌に含まれない日和見病原菌が注

目を集める状況があることから、本事業の安全性評価手法の開発の意義は依然として大きいと結論し、計画の変更はなかった。

次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子部分配列における網羅的解析において、現場資料で病原性微生物に該当する配列が見出された。これに対応して、(1) PCR 法を用いた病原遺伝子の検出法を開発し、(2) 内部標準を用いた定量法を活用して病原性の判定と感染の可能性の判断をした。また、閾値を超える病原性菌の出現に対応するため、浄化事業中止を含む対応マニュアルを作成した。

6. 費用対効果

6－1 費用対効果

6－1（１）「シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発」 新日鉄住金エンジニアリング（株）、大阪ガス（株）、（株）不動テトラ

国内の石炭ガス工場跡地（800 万 m³）が豊洲並みに汚染されていると仮に仮定し、全てを掘削除去すると 4,000 億円程度の費用がかかるが、仮にその全てに本技術を適用し、対策費用が 1/2 になると、本事業に投下された費用（157 百万円）の 1,300 倍弱の効果が期待される。

従来法（掘削除去）による同条件での対策費は、500 百万円/件である。開発法の対策費が半分程度となったことで、これまでコスト負担を理由に対策に着手できなかった企業の実施契機となる。

また、本開発の成果は、掘削を行うことなく原位置で実施可能なため、操業中工場等、建屋の制約があっても対策が可能である。

当該試算はシアン化合物の汚染に限定しており、本開発成果の要素技術である「混練・注入工法」は有機塩素化合物や油等の他の特定有害物質の汚染に対しても適用可能であることから、成果の適用範囲は数倍にも広がり、費用対効果は更なる拡大が期待できる。

6－1（２）「ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発」土壌修復ラジアルウェル技術研究組合

国内の平成 25 年度の土壌汚染対策の受注高が約 1,000 億円、そのうち約 5 割が重金属汚染（一般社団法人土壌環境センター調べ「土壌汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果（平成 25 年度））であり、そのほとんどが掘削除去と想定されるが、仮にその全てに本技術を適用し、対策費用が 1/2 になると、本事業に投下された費用（119 百万円）の 210 倍の効果が期待される。

6-1 (3) 「低コスト原位置電気修復技術の研究開発」(株) 島津製作所

国内の平成25年度の土壤汚染対策の受注高が約1,000億円、そのうち約5割が重金属汚染(一般社団法人土壤環境センター調べ「土壤汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果(平成25年度))であり、そのほとんどが掘削除去と想定されるが、仮にその全てに本技術を適用し、対策費用が1/2になると、本事業に投下された費用(34百万円)の700倍強の効果が期待される。

6-1 (4) 「次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発」国立大学法人長岡技術科学大学、国立大学法人東京大学、国立大学法人岐阜大学

本プロジェクトでは次世代シーケンサーを駆使して遺伝子配列を武器に微生物の安全性の評価や微生物の導入による生態影響評価を行う技術を開発した。目覚ましい次世代シーケンサーの開発競争の結果、土壌や地下水などの環境DNA試料から増幅した特定遺伝子を従来の技術では到達不可能な精度にて網羅的に解析することが可能になった。本事業ではこの技術を生態影響評価に活用し、従来の技術とは比べものにならない精度でバイオスティミュレーションおよびバイオオーグメンテーションによる現場の微生物群集構造の変化を捉えることができた。更に標的微生物種の定量化技術を開発した上で、病原性の判定にも成功した。更に、バイオオーグメンテーションに有望な汚染物質自体で酸化分解能が誘導される分解菌と嫌氣的脱塩素による分解菌を開発し、指針適合確認を受けた。また、分解菌と近縁の病原性菌との同異を識別する高精度の分類手法を6つの微生物属群について開発して正確な病原性の判定を容易にするとともに、有害情報を含む微生物の情報データベースを整備して公開した。これらの成果は直ちに金銭的価値を生むものではないが、環境中での微生物の産業利用やその社会受容性、環境中の微生物のモニタリング、環境中の生態影響評価などに大いに活用できる非常に有益な成果であると考えられる。また、この成果を活用して環境中の微生物群集構造の動態を調べて情報を蓄積することにより、環境中での微生物の産業利用における効率化と安全性確保ならびに環境中の微生物の人為的制御やその安全性確保が可能になると期待される。

また、バイオオーグメンテーションを含む環境中での微生物の利用における生態影響を視覚化し、環境中での微生物利用に従来なかった科学的な説明手段を提供できた意義は大きい。この成果を活用して社会的受容性の向上と効率的な微生物の利用が進めば、バイオレメディエーション活用の活発化と環境浄化事業の活性化が期待できる。現在の環境汚染を全て浄化するには13.3兆円の費用がかかると見積もられており(土壤環境センター)、その内、VOCの浄化には1兆円の市場規模が見込まれている(日本総研)。バイオレメディエーションは環境汚染浄化に用いられる技術のおおよそ1割を占めており、バイオレメディ

エーションが VOC の原位置浄化の有力な方法であることを考慮すると、VOC の浄化におけるバイオレメディエーションの市場規模は少なくとも 1 千億円超と見積もられる。このような将来展望を考慮に入れると、本事業に投下される費用に対し、本事業の波及効果が期待される市場は少なくとも 200 倍、最大 3,000 倍超の価値創造が見込まれ、費用対効果は十分に大きいと考えられる。

第 3 章 評価

第3章 評価

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

- 本事業は、技術戦略マップの導入シナリオにおいて位置づけられており、土壤汚染対策法の一部改正に伴う附帯決議を踏まえて実施するものであることから、政策的意義は明確である。また、使用される微生物の安全性評価手法の開発が急がれていることから、国が積極的に支援することは極めて妥当であったと判断される。
- 本事業は、土壤汚染対策を目的としており、汚染対策などの環境関連の研究開発は、生来が市場性から民間主体で進めるのが難しい面を抱えていることから、国として積極的に関与すべき分野である。
- なお、本事業では、必ずしも原位置土壤浄化の重要な課題の全てをカバーできているといえず、より広範な技術開発の支援をするべきである。

【肯定的意見】

- ・ 現在の我が国における土壤汚染対策は高コストの掘削除去法が偏重されている状況にある。バイオレメディエーション（以下バイレメ）技術は国の技術戦略マップ 2010に明確に位置づけられた内容であり、低コスト低環境負荷の修復技術としての期待は大きい。一方で使用される微生物の安全性に関する不安が払拭されていない状況があり、科学的な知見に基づく安全性評価手法の開発が急がれている。これらの状況は事業期間を通じて大きな変化はなく、それらを打破するためにはバイレメ技術の開発は必要不可欠であり、国が積極的に支援することは極めて妥当であったと判断される。（A委員）
- ・ 政策的位置付けは明確に提示されており、特に、先導性と実用性など技術と経営の両面から見た場合、その政策的意義は大きいものがある。（B委員）
- ・ 本事業は化学物質総合評価管理分野の技術マップ中の導入シナリオにおいて位置づけられ、また土壤汚染対策法の一部改正に伴う附帯決議を踏まえて実施するものであり、政策的意義は明確である。重金属汚染土壤対策としては、現状多く採用されている掘削除去に対して安価な原位置浄化方法の確立が切望されてきた。また、VOC 汚染土壤対策として普及が期待されるバイオオーグメンテーションについては、使用微生物の安全性評価等に対する事業者の負担が高いことが課題になっていた。本事業はこれらの2つの課題を解決することを目的としており、技術的・実用的に意義のあるものである。（C委員）
- ・ 本事業は社会的なニーズが高く、技術確立が急がれることから、国の事業として実施することは妥当である。「原位置処理重金属等土壤汚染対策技術開発」で採択さ

れた各技術は実用性が高く、対策費用の削減に寄与するものと期待できる。一方、バイレメの普及に資する安全性評価システムの構築は公共性が高く、委託事業として実施する必然性が認められる。技術的にも新規性・先進性の高い優れた事業であると評価できる。(C委員)

- ・ 環境行政、科学技術／産業振興の両視点から国の政策と明確に合致した重要な事業とみなせる。また、“環境は”生来が市場性から難しい面を抱えており、国として積極的に関与すべき分野である。(D委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 中小企業・小規模事業者にとって土壌汚染のための対策は、費用、使いやすさ、効果性、時間など多様な選択肢が用意されていることが望ましく、国の適切な関与の下、その事業環境を整備するためには、継続的、着実な取組みが求められる。(B委員)
- ・ 中間評価では上記2課題「原位置処理重金属等土壌汚染対策技術開発」並びに「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」に対するテーマで得られた成果を有機的に結び付けるスキームについて考慮することが望ましいとされていたが、明確なスキームの提案が見受けられなかった。(C委員)
- ・ 各研究開発(4件)では、必ずしも原位置土壌浄化の重要な課題の全てをカバーできているといえず、より広範な技術開発の支援があってもよかった。(D委員)

2. 研究開発等の目標の妥当性

- 要素技術ごとに挑戦的でかつ具体的な目標および目標水準が設定されている。また目標達成度を測定判断するための指標が適切に設定されている。
- 「原位置処理重金属等土壤汚染対策技術開発」では既存掘削除去費用の1／2以内という数値目標を設定している。また、「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」では導入微生物の合理的な安全評価手法と標準的な生態系影響評価手法の確立を目標としており、いずれも明確な目標設定と認められる。
- なお、目標に対する成果が、設定条件により変わることから、その部分の説明はより積極的に行われることが望ましい。また、単純な目標設定になっている印象を受けたことから、市場を詳細に調査し、複数の技術や条件との比較から目標を設定する方が望ましい。

【肯定的意見】

- ・ 4つの要素技術ごとに挑戦的でかつ具体的な目標および目標水準が設定されている。またいずれの要素技術の研究開発においても目標達成度を測定判断するための指標が適切に設定されている。（A委員）
- ・ 目標達成のために、対策費に係るコスト削減、作業時間の短縮、業態に応じた対策の選択肢の提示など、目標水準は適切に設定されている。達成度の判断の設定も適切なものとなっている。（B委員）
- ・ 「原位置処理重金属等土壤汚染対策技術開発」では操業中の工場・事業所でも適用可能な原位置浄化技術の確立を目標とし、既存掘削除去費用の1／2以内という数値目標を設定している。また、「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」ではバイレメの普及に資する導入微生物の合理的な安全評価手法と標準的な生態系影響評価手法の確立を目標としており、いずれも明確な目標設定と認められる。（C委員）

【問題点・改善すべき点】

- ・ 事業の性格上やむを得ない点ではあるが、一部の要素技術において定量的には評価しにくい指標が見受けられた。（A委員）
- ・ 目標に対する成果が、設定条件により、相当程度変わることから、その部分の説明はより積極的に行われることが望ましい。（B委員）
- ・ 「原位置処理重金属等土壤汚染対策技術開発」では対策費用の数値目標が掲げられていることは評価できるものの、対策の実施には当該工法が適用可能な地盤・土層かどうかや、工期などにも大きく影響される。また、掘削除去に対して費用が1／2であることが、特に中小事業者が自主対策を進めるためのインセンティブになり得るのかについての議論が十分になされた上での目標設定であったのか（1／10

にならないと普及しないということはないのか) 不明である。(C委員)

- ・ 「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」では、従来の評価手法に比べて費用、時間の削減効果を数値目標化することも可能であったのではないかとと思われる。(C委員)
- ・ 開発技術の比較対照とする技術と比較の条件(浄化サイトの特性・制約など)を明確に定めることが難しいのは理解するが、全体に単純な目標設定になっている印象を受ける。市場をより詳細に調査し、複数の技術や条件との比較から目標を設定すべき部分があったのではと感じる。(D委員)

3. 成果、目標の達成度の妥当性

- 各要素技術の開発において実証試験レベルでの検討を行った上で数年以内の実用化が可能な技術を確立しており、目標値のレベルに到達している。また、バイレメ普及に資する安全性評価手法と生態系影響評価手法の確立という目標も達成されている。
- 学術論文の公表、成果の学会発表、特許の出願等が相当数行われるなどの成果も見られ、事業全体で見ると設定された、目標は達成され想定を上回る成果が得られたと判断する。
- 目標の達成度に関して、どの程度の達成度合かが分かるようできるだけ数値化し、必要に応じて図絵化を図るなどして示していくことが望ましいものがある。
- 一部の技術開発において、当初計画に比べると限定した範囲の検討にとどまっているものが見受けられる。

【肯定的意見】

- ・ いずれの要素技術の開発においても実証試験レベルでの検討を行った上で数年以内の実用化が可能な技術を確立しており、当初に設定した掘削除去の1/2以内の対策費という目標値のレベルに到達している。また、環境有害菌の判別方法開発や指針適合審査株の選定等を通じ、バイレメ普及に資する安全性評価手法と生態系影響評価手法の確立という目標も達成されている。学術論文の公表、成果の学会発表、特許の出願等が相当数行われるなどの成果も見られ、事業全体で見ると設定された目標は達成され想定を上回る成果が得られたと判断する。(A委員)
- ・ 目標・指標、成果、達成度は明確に示され、妥当なものとなっている。(B委員)
- ・ 「原位置処理重金属等土壤汚染対策技術開発」では、いずれも実証試験を行い開発技術の適用性を確認でき、全体としては掘削除去に対して費用1/2の目標を達成した。個別には、シアン汚染土壌について、透水性の低い地盤についても適用可能な混練・注入法を開発し、原位置バイレメ実証試験で6か月後に基準値以下を確認した。ラジアルウェルを活用したパッシブな土壌修復法については、鉛汚染土壌を地上の大型コンクリート槽に充填し、排水循環システムの有効性を確認した。また、各要素技術も確立した。原位置電気修復技術については、鉛汚染土壌について1 m³の実証試験を行い、電力量の目標値を達成した。(C委員)
- ・ 「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」では、有害菌51株について指標遺伝子を特定し、解析手法を開発したほか、有害菌の情報を一元化したデータベースを作成して公開した。好気性塩素化エチレン分解菌1株についてバイレメ指針適合が確認された。嫌気性脱塩素細菌を我が国で初めて単離した。その他の要素技術についても目標を達成した。(C委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 「達成」と分かりやすく評価することは必要であるが、他方、明確性をやや欠くことにはなるが、どの程度の達成度合かが分かるようできるだけ数値化し、必要に応じて図絵化を図るなどして示していくことが望ましいものがある。（B委員）
- ・ パッシブな土壌修復法については、対象金属ごとに溶出条件が異なるため、複合汚染については複数回の処置が必要となり、掘削除去に対して費用1／2の目標を達成できるのかどうか不明である。原位置電気修復技術については、地盤・土層によって適用範囲が限定されると思われる。また、コストは電気料金に依存するので、ケーススタディを細かく実施する必要があるのではないか。（C委員）
- ・ 一部の技術開発において、当初計画に比べると限定した範囲の検討にとどまっているものが見受けられる。また、論文等の成果の公表も数少ないものがある。（D委員）

4. 事業化、波及効果についての妥当性

- 各要素技術において数年以内での実用化の方向性は示されており、中にはすでに実質的に実用段階に到達しているものもある。また、当初想定しなかった汚染物質への適用性の確認、要素技術を構成する個別技術での適用性などの波及効果が明らかになっている。
- web を利用した情報発信により、相当数の技術相談がなされるといった成果も得られている。
- 土壌浄化事業は、浄化技術の採用にあたりこれまでの実績が重要視されるため、新規に開発された技術が実用化されるまでには継続的な実証試験が求められる。したがって今回の事業終了後も、実施企業に対して何らかのフォローアップを行う枠組みが作られることで、実用化が促進されるのではないかとと思われる。
- 技術、コスト、体制等多面的な検証の実施により、事業化や波及効果の見通しについてさらに計画性のあるものにしていく余地が残されている。

【肯定的意見】

- ・ いずれの要素技術もここ数年間の期間内での実用化の方向性は示されており、要素技術の中にはすでに実質的に実用段階に到達しているものもある。現在引き合いが来ている案件の中から実証試験につなげ、そこでデータを蓄積していくことにより実用化に到達すると考えられる。また、当初想定しなかった汚染物質への適用性の確認、要素技術を構成する個別技術での適用性などの波及効果が明らかになっており、また開設された HP からの情報発信により、相当数の技術相談がなされるといった成果も得られている。（A 委員）
- ・ 事業化に向けた経過年とその内容は示されている。解決方策の明確化に向けた試みがある。波及効果について、一部期待できるところが見られる。（B 委員）
- ・ 全体として受注には至っていないものの複数の引き合いがあり、実施が期待できる。（C 委員）
- ・ 「原位置処理重金属等土壌汚染対策技術開発」はターゲット市場を明確に認識し、既に受注活動を進めている。また、シアン汚染土壌については、高度経済成長期に建設されたメッキ工場の更新、移転を商機としている。また、油複合汚染への適用も可能なため、石炭ガス工場跡地も対象となると期待される。特許出願 13 件は評価できる。ラジアルウェルを活用したパッシブな土壌修復法については、各要素技術が単独で利用でき、波及効果が大きいと期待される。原位置電気修復技術については平成 25 年度以降、営業活動を開始している。（C 委員）
- ・ 「VOC の微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」は NITE のホームページでデータベースを公開済で、約 700 件／月のアクセスがあり、バイレメに対する関

心の高さがうかがえる。また、国内外の学会に数多く発表を行い、論文も 9 件発表していることは評価できる。(C 委員)

- ・ セーフバイオシステムの研究開発は特に、安全性評価というバイレメの大きなハードルの一つを下げる成果を出しており、今後の波及効果は一定以上あるものと評価する。(D 委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 土壌浄化事業そのものの問題に関わることであるが、浄化技術の採用にあたりこれまでの実績が重要視されるため、新規に開発された技術が実用化されるまでには継続的な実証試験が求められる。したがって今回の事業終了後も、実施企業に対して何らかのフォローアップを行う枠組みが作られることで、実用化が促進されるのではないと思われる。(A 委員)
- ・ 実用化、事業化を果たすことで国からの投資に妥当性を見ることから、技術、コスト、体制等多面的な検証等の実施により、事業化や波及効果の見通しについてさらに計画性のあるものにしていく余地が残されている。(B 委員)
- ・ 「原位置処理重金属等土壌汚染対策技術開発」については業界誌等を通じて、掘削除去に対するメリットを需要者にアピールすることが重要であるが、終了時までの对外発表数が少ない。また、バイレメの普及においては、実施する事業者の裾野を拡大することも重要であるが、市民の理解を得る配慮・工夫も必要と思われる。(C 委員)
- ・ 難しいことかもしれないが、各開発技術を適用し得るサイト（市場）をより詳細に解析し、明確化することが重要である。(D 委員)

5. 研究開発マネジメント・体制等の妥当性

- 全体としては大きな計画変更がなく目標達成に至っており、研究計画は適切であった。また、事業の実施者はいずれも実績と実力のある企業／大学で構成されており、適切な選考が行われたと評価できる。
- 各研究開発について、経済産業省や技術検討委員会が適確なコメントや指示を出すことによって柔軟な事業運営がなされたものと評価できる。

【肯定的意見】

- ・ ハードルの高い目標が設定されていたにも関わらず、期間内に所定の目標がすべて達成されていたことから、研究計画は適切であったと判断される。事業の実施者はいずれも関連する業界／学会で実績と実力のある企業／大学で構成されており、適切な選考が行われたと判断される。また各要素技術の検討においては、それぞれのプロジェクトリーダーが責任をもって全体を指揮する体制が確立されていた。全体的な国の研究予算削減の流れの中で、本事業の研究資金は大きな減額なく4年間確保され、またその配分も適切なものであった。研究期間内で大きな社会情勢の変化はなかったものの、ひとつの要素技術の実施過程で検討事項が多岐に広がる懸念が生じた際に、実施者と事務局間で適切な協議が行われ、要点を絞った実施内容に修正する対応がとられた。(A委員)
- ・ 計画とその推進役は機能している。(B委員)
- ・ 変化への対応のための代替手段への意欲、努力も感じ取れるところがある。(B委員)
- ・ 全体としては大きな計画変更がなく目標達成に至っており、当初計画は妥当と認められる。研究実施者の実施体制・運営、資金配分に大きな問題はなかった。実証試験においては、試験サイトの選定等の問題があり、当初予定から計画を変更して実施する場合もあったが、概ね予定通りの成果が得られた。(C委員)
- ・ ラジアルウェルを活用したパッシブな土壌修復法については、実証サイトが確保できなかったため鉛汚染土壌を地上の大型コンクリート槽に充填して試験を実施した。(C委員)
- ・ 「VOCの微生物等を利用した環境汚染物質浄化技術開発」では平成25年度からバイオオーグメンテーションの野外試験を実施する予定であったが、指針適合審査が遅れたため、平成26年度のための野外試験に計画を変更して実施した。(C委員)
- ・ 各研究開発について、経済産業省や技術検討委員会が適確なコメントや指示を出すことによって柔軟な事業運営がなされたものとする。(D委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 予算・資金調達の観点から実施体制に相当な制約が掛かった場合、体制難→運営難→資金難 のマイナスの循環に陥ることのないよう組織と事業の双方で管理の改善を図る面がある。スタートから体制難とならないよう初期管理を徹底すべき。(B 委員)
- ・ 電気修復法については、計画時平成 22 年度の自社の電力料金に基づきコストを計算しているが、産業用電力料金は平成 24 年度には平成 22 年度から約 3 割上昇している(経済産業省平成 26 年 11 月資料「エネルギー価格の動向について」より)現状を考慮する必要はなかったか。(C 委員)

6. 費用対効果等の妥当性

- 土壤汚染対策の市場規模は約 1,000 億円／年で推移しており、その大部分が掘削除去であるため、掘削除去の 1／2 で対策が可能となる本事業の成果は、大きな対策費用削減効果が得られるポテンシャルを有する。また、掘削除去された汚染土壤の処分場の残容量に限りがあり、新規造成も困難なことから、社会的効果も大きい。
- 計画に見合った原寸大の成果にあるが、それを超えるものまでには至っていない。
- 成果を普及させるためには、低コストの原位置浄化技術を開発・提供するだけでなく、組織的なアウトリーチ活動が望まれる。

【肯定的意見】

- ・ 潜在的な市場まで見込んだ場合、バイレメ等の適用が期待される汚染土壤修復の市場は日本国内だけでも数兆円に達すると考えられ、投入された資源量に十分見合うだけの効果が期待できる。(A 委員)
- ・ 投入した費用に順応した効果に対する期待は果たされている。(B 委員)
- ・ 土壤汚染対策の市場規模は平成 19 年以降、約 1,000 億円／年で推移しており、その大部分が掘削除去であるため、掘削除去の 1／2 で対策が可能となる本事業の成果は、大きな対策費用削減効果が得られるポテンシャルを有する。また、掘削除去された汚染土壤の処分場の残容量に限りがあり、新規造成も困難なことから、社会的効果も大きい。バイレメについては、標準化により社会的な受容性が高まり、普及が進むことが期待される。(C 委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 投入した費用を大きく超えるような、想定外の効果に乏しい。(B 委員)
- ・ 計画に見合った原寸大の成果にあるが、それを超えるものまでには至っていない。
- ・ 代替を図ることに対して改善を図る面がある。(B 委員)
- ・ 平成 21 年に土壤汚染対策法の一部が改正され、工場等の操業中から自主的な対策を進めることが促されているものの、法契機以外の対策件数は平成 22 年以降、むしろ減少傾向にある(土壤環境センター「土壤汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果(平成 26 年度)より)。低コストの原位置浄化技術を開発・提供するだけでなく、組織的なアウトリーチ活動が必要ではないか。(C 委員)
- ・ 開発された技術の価値(環境技術としての価値)については概ね十分な費用対効果があるが、実用化に関して、市場規模についてのより精緻な見積が必要である。(D 委員)

7. 総合評価

- 現在の我が国における土壌汚染対策の抱える問題点を解決するためにはバイレメ等の低コスト・低環境負荷技術の開発は必要不可欠であり、国が積極的に支援することは極めて妥当であった。
- 事業化については全体として受注には至っていないものの複数の引き合いがあり、実施が期待できる。
- バイレメ微生物評価技術については、環境中に存在する有害菌解析手法を開発したほか、好気性塩素化エチレン分解菌 1 株、嫌気性脱塩素細菌 1 株についてバイレメ指針適合が確認されたことは評価できる。
- 原位置土壌浄化の幾つかの有望な新技術やその支援基盤が確立されており、今後の実用化への展開が期待できる成果が得られたことは高く評価できる。
- 各開発技術について、詳細な解析による市場の見積が十分になされているとはいえず、事業の産業上の価値を定量的に評価することを望む。
- バイレメの普及においては、実施する事業者の裾野を拡大することも重要であるが、今後、市民の理解を得る配慮や工夫も必要である。

【肯定的意見】

- ・ 現在の我が国における土壌汚染対策の抱える問題点を解決するためにはバイレメ等の低コスト・低環境負荷技術の開発は必要不可欠であり、国が積極的に支援することは極めて妥当であった。本事業を通じて実証試験レベルでの検討を行った上で数年以内の実用化が可能な技術が確立されており、想定を上回る成果が得られたと判断する。今後は実証試験を積み重ねてデータを蓄積していくことにより実用化に到達すると思われる。研究計画は適切であり、適切な事業の実施者が選考され、資金の配分も適切なものであり、研究実施の過程では状況に応じた必要な対応がとられていた。バイレメ技術等の潜在的な市場まで見込むと投入された資源量に十分見合うだけの効果が期待できる。（A 委員）
- ・ プロジェクトの多様性と個性的な取組は本事業の成果として評価する。（B 委員）
- ・ 本事業は土壌対策法の一部改正に伴う附帯決議を踏まえて実施するものであり、上位施策との関連性も明確で、社会的ニーズも高く、国の事業として実施することは妥当である。研究開発では操業中の工場・事業所でも適用可能な原位置浄化技術を確立すること、及びバイレメの普及に資する導入微生物の合理的な安全評価手法と標準的な生態系影響評価手法を確立することの 2 つの目標が定められており、目標達成度を判断する指標も適切に設定されている。重金属等土壌汚染対策技術については、実証試験を行い開発技術の適用性を確認でき、全体としては掘削除去に対して費用 1 / 2 の目標を達成した。バイレメ微生物評価技術については、環境中に存

在する有害菌解析手法を開発したほか、好気性塩素化エチレン分解菌 1 株、嫌気性脱塩素細菌 1 株についてバイレメ指針適合が確認された。(C 委員)

- ・ 事業化については全体として受注には至っていないものの複数の引き合いがあり、実施が期待できる。また有害菌についてはデータベースを公開済で、約 700 件／月のアクセスがある。(C 委員)
- ・ 全体としては大きな計画変更がなく目標達成に至っており、研究実施者の実施体制・運営、資金配分に大きな問題はなかったと認められる。(C 委員)
- ・ 土壤汚染対策の市場規模は平成 19 年以降、約 1,000 億円／年で推移しており、その大部分が掘削除去であるため、掘削除去の 1／2 で対策が可能となる本事業の成果は、大きな対策費用削減効果が得られるポテンシャルを有する。バイレメについては、標準化により社会的な受容性が高まり、普及が進むことが期待される。(C 委員)
- ・ 生来市場性に乏しい環境技術（特に浄化技術）の開発は、国が積極的に関与して支援することが望ましいものであり、本事業の意義は明確である。原位置土壤浄化の幾つかの有望な新技術やその支援基盤が確立されており、今後の実用化への展開が期待できる成果が得られたことは高く評価できる。(D 委員)

【問題点・改善すべき点】

- ・ 浄化実績が重要視される土壤浄化の分野において、新規開発技術の実績を積み上げる過程が大きなネックになる。したがって事業終了後、実施企業に対して何らかのフォローアップを行う枠組みが作られることで、実用化が促進されるのではないかとと思われる。(A 委員)
- ・ 重金属等土壤汚染対策技術開発の数値目標である掘削除去に対して費用が 1／2 については、特に中小事業者が自主対策を進めるためのインセンティブになり得るのか、さらに議論が必要と思われる。また事業化に向けては、掘削除去に対するメリットを周知することが重要であるが、終了時までの対外発表数が少ない。組織的なアウトリーチ活動が必要ではないか。一方、バイレメの普及においては、実施する事業者の裾野を拡大することも重要であるが、市民の理解を得る配慮・工夫も必要と思われる。(C 委員)
- ・ 各開発技術について、詳細な解析による市場の見積が十分になされているとはいえず、事業の産業上の価値を定量的に評価できるまでには至っていないのが残念な部分である。技術開発提案（計画）の段階でより精緻に検討しておくことが望ましい。(D 委員)

【評点を付けるに当たり、考慮した（重要視した）点】

- ・ 今回は事後評価のため、目標の達成度や事業化の目途を重視して評点をつけた。

また、今回の事業は4つの要素技術から構成され、その開発内容は必ずしもフェーズが揃っているわけではないので、その点を考慮し最大公約数的な部分で評価するように努めた。(A委員)

- ・ 計画どおりにいかなかった場合への質的対応を考慮した。(B委員)
- ・ 平成21年に土壤汚染対策法の一部が改正され、工場等の操業中から自主的な対策を進めることが促されているものの、法契機以外の対策件数は平成22年以降、むしろ減少傾向にある(土壤環境センター「土壤汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果(平成26年度)より)。本事業が特に中小事業者による自主的対策の促進に寄与するかどうかを考慮した。(C委員)
- ・ 事業の政策的意義と成果の今後の波及効果を重点的に評価した。(D委員)

【評点の判断に当たり、特に重要視した評価項目】

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性 (D委員)
2. 研究開発等の目標の妥当性 (C委員)
3. 成果、目標の達成度の妥当性 (A委員)(B委員)
4. 事業化、波及効果についての妥当性 (A委員)(C委員)(D委員)
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性 (B委員)

8. 今後の研究開発の方向等に関する提言

- バイレメ等の浄化技術の本格的な事業化に向けては実証試験を積み重ねてデータを蓄積していくことが必要である。実証試験の実施を企業のみで担うのは容易ではなく、国の継続的な支援が望まれる。実証試験は小規模の現場試験とその結果に基づいたシミュレーションでも構わない。
- 各要素技術の組み合わせを行うことにより新たな展開も生まれると考えられる。担当者間でとりあえず机上検討だけでも行うことが望まれる。
- バイレメの普及に資する安全評価手法と生態系影響評価手法については、本研究開発で確立された手法を安価で提供できる事業者の育成が望まれる。
- 掘削除去に対する優位性を考えると、コスト並びに修復期間の削減が必要となり、今後は、バイオと物理・化学処理との組み合わせについての検討が望まれる。

【各委員の提言】

- ・ 各要素技術とも数年以内の実用化が可能な段階まで進捗しており、技術の適用が可能な汚染サイトが見つかれば一気に事業化まで進展すると思われるが、必ずしも都合の良いサイトが存在するわけではなく、バイレメ等の浄化技術の本格的な事業化に向けては実証試験を積み重ねてデータを蓄積していくことが必要である。実証試験の実施を企業のみで担うのは容易ではなく、国の継続的な支援が望まれる。（A委員）
- ・ 実証試験は必ずしも実規模で行う必要はなく、小規模の現場試験とその結果に基づいたシミュレーションでもよいと考えられる。（A委員）
- ・ 今回の事業では取り組みが行われなかったが、今後今回得られた各要素技術の組み合わせを行うことにより新たな展開も生まれると考えられる。たとえば、今回得られたシアン分解菌群に関しての安全性評価、またその浄化現場での生態系影響評価、あるいはラジアルウェル技術を活用した汚染土壌内への微生物の散布などについて、担当者間でとりあえず机上検討だけでも行った方がよいと思われる。（A委員）
- ・ 研究成果の発信については要素技術ごとに差異がみられた。成果の権利化を図る上では特許の出願後に成果の発信をする必要があるため、必ずしも研究実施期間中に成果の発信を行えないことも考えられる。今後のさらなる成果の発信を期待したい。（A委員）
- ・ 化学物質総合評価管理分野の技術マップ（リスク削減）中の重要技術に挙げられている土壌汚染を対象とした技術のうち、市場規模が大きく、リスク削減ポテンシャルも高い技術については、多くが本研究開発の研究領域でカバーされていると思われる。また残る重要技術の一つに、重金属と油の複合汚染土壌のバイオオーグメンテーションがあげられるのではないかと。本研究開発で実施された「シアン汚染土壌

の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーション」においては、結果的に油汚染も同時に除去できることが示されたが、除去のメカニズム等は不明である。(C委員)

- ・ 掘削除去に対する優位性を考えると、対策費用だけでなく、対策に要する期間が重要であることは明白であり、研究開発目標をコスト並びに修復期間の削減とする方向が考えられる。その場合、バイオと物理・化学処理との組み合わせが候補となるのではないか。(C委員)
- ・ バイレメの普及に資する導入微生物の合理的な安全評価手法と標準的な生態系影響評価手法については、本研究開発で確立された手法を安価で提供できる微生物分析事業者の育成が必要と考えられる。(C委員)
- ・ 微生物利用におけるバイオセーフティの評価法の確立に寄与する研究開発は、バイレメの市場拡大においては重要であり、具体的な課題を絞って体系的かつ継続的な検討を行っていくことが望ましい。(D委員)
- ・ 原位置で重金属類やホウ素等その他の無機物の複合汚染を浄化できる技術の開発はニーズが高いものとする。(D委員)

9. 個別要素技術に関するコメント

①シアン汚染土壌の飽和・不飽和原位置バイオレメディエーションの研究開発

【成果に対する評価】

- ・ シアン汚染サイトに対し掘削除去法の半分のコストで砂質土、粘性土いずれの土質にも適合するバイレメを適用した工法が開発されており、当初目標は十分に達成されている。また、土壌中の全シアン濃度を正確に評価する分析方法を確立し、これに基づいてシアン分解菌の分解能力を正しく評価することを可能にするなど、学術的にも意義ある成果が得られている。さらに研究開発の波及効果として油汚染土壌浄化への展開の見通しも立てられている。(A委員)
- ・ スティミュレーション適用中の、シアン分解レベルの高低によって、オーグメンテーションの併用により、分解が進みにくいスポット対応するなど適切な運用が期待できる。(B委員)
- ・ 透水性の低い地盤についても適用可能な混練・注入法を開発し、原位置バイレメ実証試験で6か月後に基準値以下を確認した。また、本処理法は油汚染対策にも有効であることが確認されたことは、適用案件の拡大につながる成果として評価できる。(C委員)
- ・ 原位置浄化技術として興味深いものが確立されたものといえるが、この技術がどのような現場でも適用できるか(バイオオーグメンテーションも現場の微生物に依存することを考慮すると)は明確であるとはいえない。分解微生物が普遍的に存在しているのか。どうすれば選択的に増殖させられるのかなどについて一般的知見を得られていると言えない部分がやや気になる。(D委員)
- ・ シアンの土壌汚染は、調査件数は少ないものの、石炭乾留施設の跡地などでは潜在的に多数の汚染サイトが見込まれるため、今後の土壌汚染対策に適用できる可能性がある。(E委員)

【事業化の見通しに関する評価】

- ・ すでにシアンで汚染された工場跡地における浄化の実証試験が進められており、またいくつかのサイトで実証試験実施の可能性が検討されている。これらの状況を踏まえたシアン汚染サイトに対するバイレメ事業化の道筋が描かれている。(A委員)
- ・ 実用化がイメージ止まりとなっている。メッキ工場という具体的なステージの下、本格展開の実績の期待は大。3社による役割分担の維持・継続がなされれば、事業化の確立は高くなると考えられる。(B委員)
- ・ 高度経済成長期に建設されたメッキ工場の更新、移転を商機としているが、油複合汚染への適用も可能なため、石炭ガス工場跡地も対象となると期待される。(C委員)
- ・ 事業化できるポテンシャルは十分にあるものとするが、本技術で原位置浄化すべき(できる)シアンの汚染現場数はどの程度あるかによっている(さほど多くない

のではとの印象)。(D委員)

②ラジアルウェルを活用したパッシブな新規土壌修復技術の研究開発

【成果に対する評価】

- ・ 浄化対象を鉛汚染土壌に限定しているが、実証試験レベルで掘削除去法の半分以上の浄化コストでの浄化が可能なが示されており、当初目標は達成されたと判断している。(A委員)
- ・ 目標と設定根拠は適切であり、達成度に関しても限られた時間内で十分にデータ収集されている。技術研究組合のいい面が発揮されたものと評価する。(B委員)
- ・ 鉛汚染土壌を地上の大型コンクリート槽に充填し、排水循環システムの有効性を確認した。また、各要素技術も確立した。ただし、対象金属ごとに溶出条件が異なるため、複合汚染については複数回の処置が必要となり、掘削除去に対して費用1/2の目標を達成できるのかどうか不明である。(C委員)
- ・ 重金属類・無機元素の複合汚染にも幅広く適用できる“システム”技術として確立するのが目標であったが、実際の成果は個々の金属・無機元素の検討にとどまっているといえ、複合汚染浄化への適用性は明確でない。今後の検討が必要である。(D委員)

【事業化の見通しに関する評価】

- ・ 遮水壁、吸着処理、凝集沈殿処理といった各要素技術のレベルでの実用化は比較的容易に進むと思われる。ラジアルウェルシステム全体の実用化にあたっては、他の有害元素での実証試験レベルでの浄化実績を積み上げることが必要と考えられる。(A委員)
- ・ 中間評価に対する十分な検証がなされれば、高い事業化率となることが見通せる。(B委員)
- ・ 各要素技術が単独で利用でき、個別に事業化が期待できる。業界誌等を通じて、掘削除去に対するメリットを需要者にアピールすることが重要である。(C委員)
- ・ 単位技術の切り売りの実用化は進められており、一部はニーズの高いものもあると推察できるが、システム技術としては事業化までに残されている検討課題は多いものとする。(D委員)

③低コスト原位置電気修復技術の研究開発

【成果に対する評価】

- ・ 実証試験レベルで掘削除去法の半分以上の浄化コストでの浄化が可能なが示されており、当初目標は達成されたと判断している。特に消費電力量削減のための諸条件の検討が詳細に行われている。(A委員)

- ・ 電気料金の高騰等の大きな変化が合った中、電気修復法のコストと効果に意外性を見つづ提示できたことは評価されてよい。(B委員)
- ・ 鉛汚染土壌について 1 m^3 の実証試験を行い、電力量の目標値を達成したが、地盤・土層によって適用範囲が限定されると思われる。(C委員)
- ・ 原位置電気修復技術としての低コスト化には成功しており、目標はほぼ達成されたものと評価するが、実用技術として競争力を持つものが出来上がったかについては疑問がある(まだ高コスト)。(D委員)
- ・ 再生可能エネルギー(太陽光パネル)による原位置での電力供給の可能性があり、限定的な適用範囲ではあるが休廃止鉱山や精錬所跡地などでの活用も期待できる。(E委員)

【事業化の見通しに関する評価】

- ・ 担当組織の現状を考えると、実用化への見通しは陰しいものと判断せざるを得ない。事業化に向けてやり抜く体制づくりへの評価は消極的となる。(B委員)
- ・ コストは電気料金に依存するので、安価な電力が利用できるかどうかが実用化の鍵になると思われる。(C委員)
- ・ 事業化にはさらなる低コスト化や適用できるサイトの明確化が必要である。(D委員)

④次世代バイオレメディエーション普及のためのセーフバイオシステムの研究開発

【成果に対する評価】

- ・ 環境有害菌 50 株以上についての判別法を開発するとともに、既知有害菌に関するデータベースを作成・公開するなど安全性評価の情報基盤を整備した。また、塩素化エチレンを嫌気条件で脱塩素する細菌を国内で初めて単離するとともに、バイレメ指針に適合する可能性のある3株についてその審査を受け、バイレメ用の標準株の確立を図った。さらに微生物群の包括的解析手法の開発やバイオオーグメンテーションで導入した菌株のモニタリングを通じ、生態系への影響評価を評価する手法の開発を行っており、当初目標は十分に達成されたと考えられる。(A委員)
- ・ 計画と比較して通常の達成度は示されている。成果自体の意義は相当整理されて示されている。達成されなかった場合は、変化への対応などにも見ることができ、評価されるものとなっている。(B委員)
- ・ 有害菌 51 株について指標遺伝子を特定し、解析手法を開発したほか、有害菌の情報を一元化したデータベースを作成して公開した。好気性塩素化エチレン分解菌 1 株、嫌気性脱塩素細菌 1 株についてバイレメ指針適合が確認された。また、嫌気性脱塩素細菌を我が国で初めて単離したことは高く評価できる。(C委員)
- ・ バイオセーフティというバイレメのハードルを一定以上下げることでできる成果を

多数得ており、意義深いものといえる。ただし、これで全ての課題がクリアできているとは言えず、今後継続した取組みにつなげていくことが肝要ではと思う。（D委員）

【事業化の見通しに関する評価】

- ・ ブラウンフィールド解消、食品衛生・環境微生物分野、成長するアジア市場など経済学的分析とその成果を踏まえることにより、より事業化がクリアなものとなる。バイレメへの波及効果は他の事案に比して、高いものがある。（B委員）
- ・ ホームページでデータベースを公開済で、約 700 件／月のアクセスがある。バイレメの普及においては、実施する事業者の裾野を拡大に寄与するものと期待できる。（C委員）
- ・ 本来この開発はダイレクトな事業化につながるものとは考えていないが、バイレメ実施の促進につながる基礎を提供できたものとして評価する。（D委員）

第 4 章 評点法による評点結果

第4章 評点法による評点結果

「〇〇〇〇技術研究開発」に係るプロジェクト評価の実施に併せて、以下に基づき、本評価検討会委員による「評点法による評価」を実施した。その結果は「3. 評点結果」のとおりである。

1. 趣 旨

評点法による評価については、産業技術審議会評価部会の下で平成 11 年度に評価を行った研究開発事業（39 プロジェクト）について「試行」を行い、本格的導入の是非について評価部会において検討を行ってきたところである。その結果、第 9 回評価部会（平成 12 年 5 月 12 日開催）において、評価手法としての評点法について、

(1) 数値での提示は評価結果の全体的傾向の把握に有効である、

(2) 個々のプロジェクト毎に評価者は異なっても相対評価はある程度可能である、との判断がなされ、これを受けて今後のプロジェクト評価において評点法による評価を行っていくことが確認されている。

これらを踏まえ、プロジェクトの中間・事後評価においては、

(1) 評価結果をできる限りわかりやすく提示すること、

(2) プロジェクト間の相対評価がある程度可能となるようにすること、

を目的として、評価委員全員による評点法による評価を実施することとする。

本評点法は、各評価委員の概括的な判断に基づき点数による評価を行うもので、評価報告書を取りまとめる際の議論の参考に供するとともに、それ自体評価報告書を補足する資料とする。また、評点法は研究開発制度評価にも活用する。

2. 評価方法

- ・ 各項目ごとに4段階（A（優）、B（良）、C（可）、D（不可）〈a， b， c， d も同様〉）で評価する。
- ・ 4段階はそれぞれ、 $A(a)=3$ 点、 $B(b)=2$ 点、 $C(c)=1$ 点、 $D(d)=0$ 点に該当する。
- ・ 評価シートの記入に際しては、評価シートの《判定基準》に示された基準を参照し、該当と思われる段階に○を付ける。
- ・ 大項目（A， B， C， D）及び小項目（a， b， c， d）は、それぞれ別に評点を付ける。
- ・ 総合評価は、各項目の評点とは別に、プロジェクト全体に総合点を付ける。

3. 評点結果

評点法による評点結果
(土壌汚染対策のための技術開発プロジェクト)

	評点	A委員	B委員	C委員	D委員
1. 事業の目的・政策的位置づけの妥当性	2.50	3	2	3	2
2. 研究開発等の目標の妥当性	1.75	2	2	2	1
3. 成果、目標の達成度の妥当性	1.75	3	1	2	1
4. 事業化、波及効果についての妥当性	1.50	2	1	2	1
5. 研究開発の実施・マネジメント体制等の妥当性	2.00	3	1	2	2
6. 費用対効果の妥当性	1.50	2	1	2	1
7. 総合評価	2.00	2	2	2	2

