

分担研究報告書

最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究

—— 無機物質分科会 ——

主任研究者 眞柄 泰基 北海道大学 創成科学研究機構 特任教授
分担研究者 伊藤 雅喜 国立保健医療科学院 水道工学部 水道計画室長
分担研究者 国包 章一 国立保健医療科学院 水道工学部長

研究要旨

水道統計およびアンケートによるアルミニウムの実態調査を行い、水質基準を 0.1 mg/L へ引き下げた場合の対応可能性等について検討した。浄水中のアルミニウム濃度が 0.1 mg/L を超過もしくは超過の恐れがある浄水場では、アルミニウムの基準値が引き下げられた場合、対応が困難あるいは難しいとしたものが 80%以上となった。プランクトン発生等の原水水質の悪化により凝集剤注入量が増加し、既存施設での制御が難しくなっていることなどが理由として挙げられている。

水道用硬質塩化ビニル管等水道用資機材中に含まれる有機スズ化合物の分析方法、試験方法についてこれまでの研究成果を再検討し今後の課題を抽出した。管の浸出試験操作ではコンディショニング初期に比較的高濃度の有機スズ化合物の溶出が認められ、期間が長くなるほど溶出濃度の低下が見られた。このため水道における溶出実態を反映するような試験方法の検討が必要である。

WHO 飲料水水質ガイドラインの逐次改訂項目としてニッケルと水銀についてドラフトが作成中であり、ニッケルが 0.02 mg/L から 0.03 mg/L、水銀が 0.001mg/L(無機・有機)から 0.006mg/L(無機)への改定案が示されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では水道水質として問題となる無機物質等のうち、新水質基準の項目となったアルミニウム、セレン、フッ素、ホウ素の他、監視項目、要検討項目となっているニッケル、モリブデン、バリウム、さらに水道用資機材から溶出の恐れが懸念される有機スズ化合物を対象物質とし、原水、浄水処理過程、浄水における存在量、除去性の調査および測定方法の開発や処理技術についての調査検討を行うこと

を目的とする。また、WHO の逐次改訂項目となっている無機物質に関しては随時検討項目に取り入れることとした。

B. 研究方法

本研究を実施するため大学、国立試験研究機関、水道事業体等の研究協力者を含めた分科会を作成し、研究を実施した。平成 16 年度は水道に関連する無機物質に対する調査・研究課題として次の 3 つのテーマを設定し、下

記の通り実施した。

1) アルミニウムの制御に関する研究

アルミニウムは平成 16 年 4 月に施行された新水質基準で従来の快適水質項目から基準値 0.2 mg/L が定められ、浄水場でのさなる管理が求められるようになった。アルミニウムに関しては水質基準として着色の観点から 0.1 mg/L とすることも検討されたが、難凝集性原水における濁度管理等において 0.1 mg/L を達成することが技術的に可能であるかについて疑問があることから基準値が 0.2 mg/L とされた。今後、代替凝集剤への転換の可能性等を含め残留アルミニウムをどこまで低減できるか等についての調査が必要である。

本研究テーマでは浄水施設におけるアルミニウムの現状、対策等の調査をおこない、原水特性と残留アルミニウムの関係や、処理・対策上の問題点などを明らかにし浄水処理における改善方法の低減を目指す。合わせて代替凝集剤導入の可能性についても検討する。

平成 16 年度は平成 12～14 年度の水道統計および昨年度に行ったアルミニウムの実態に関するアンケート調査のとりまとめを行うとともに、各水道事業体で行った残留アルミニウムの実態調査、低減化対策、代替凝集剤についての研究事例を収集した。アンケート調査はアルミニウムの最大値が 0.1 mg/L を超える、または近い値である水道事業体および水道用水供給事業の計 76 事業体を対象として、水質基準を 0.1 mg/L としたときの対応可能性等について調査した。

2) 水道用資機材からの有機スズ等化合物の溶出に関する研究

水道用硬質塩化ビニル管等の水道用資機材には塩化ビニル樹脂を加熱形成する過程で安定剤として有機金属化合物(主としてジメチル系、ジブチル系およびジオクチル系有機

スズ化合物)が用いられている。また、一部の管メーカーでは有機スズ化合物以外の安定剤としてカルシン(Ca-Zn)を使用している。

本研究テーマでは既往・関連研究に関する調査や毒性に関する最新情報の収集を図るとともに、適切な試験方法の検討と汎用性の高い微量有機スズ化合物の分析方法を確立することにより、塩化ビニル管等の資機材からの水道水中への溶出量を把握し、リスク評価等に活用することを目的とする。

平成 16 年度はこれまで開発してきた分析方法・溶出試験方法等の検討を行い、今後必要となる検討項目の整理を行った。合わせて毒性に関する文献調査も行った。

3) セレン、フッ素、ホウ素等無機物質に関する研究

本研究テーマでは新水質基準で基準値となっているセレン、フッ素、ホウ素の他、監視項目や要検討項目として設定されているニッケル、モリブデン、バリウムを対象として、水道水における存在状態の調査、毒性情報の収集、処理性の検討を行うこととしている。また、WHO の逐次改訂項目として挙げられている無機物質については上記項目にかかわらず最新の情報を収集することとした。

C. 研究結果

1) アルミニウムの制御に関する研究

水道原水の平成 12～14 年度における水道事業体の各浄水場のアルミニウム濃度は、各年度の全データでは 60%の浄水場で快適水質項目の 0.2 mg/L 未満であったが、年間最高濃度が 1.0 mg/L を超える原水を水源としている浄水場は 76ヶ所あった。アルミニウム濃度 0.2 mg/L 以上検出された浄水場は、表流水・湖沼水を水源とするところが半数を占めていた。

浄水の平成 12～14 年度水道事業体の各浄水場のアルミニウム濃度は、各年度とも同様な傾向を示しているので14年度のデータを参考にすると、全データ数の 0.8%に当たる14の浄水場で0.2 mg/Lを上回っていたが、94%に当たる 1,543 浄水場でアルミニウム濃度が 0.1 mg/L 以下であった。また、浄水中に 0.15mg/L を上回るアルミニウム濃度を検出した浄水場について、原水中のアルミニウム濃度との関係を調べたが、原水と浄水のアルミニウム濃度について明確な関係は認められなかった。

アンケート調査を行った事業体の地方別分布を表・1 に示す。

表・1 地域別・事業体別アンケート送付先

	上水道事業	用水供給事業	計 ()内は 浄水場数
北海道	3	2	5 (9)
東北	2	0	2 (10)
関東	18	4	30 (51)
関西	12	4	16 (46)
中国・四国	10	3	13 (23)
九州・沖縄	8	2	10 (26)
合計	53	23	76 (165)

76 水道事業体へのアンケートで、基準値設定が 0.1 mg/L となった場合の対応の可否への回答では、困難・難しいを合わせると 83%が対応できないとしている。その原因は、13 項目 211 の複数回答があり、水源由来のプランクトン・高濁度・低濁度・低水温・高 pH 等による凝集処理能力の低下に起因すること、及び施設的な問題として、老朽化に伴う浄水処理機能低下・薬品注入設備の未整備等があげられる。代替凝集剤への変更については、113 の回答

表・2 アンケート結果の一部

水質基準が 0.1 mg/L 以下での対応		
対応可能	困難	難しい
28	121	16
凝集剤の種類		
PAC	バンド	使用していない
143	13	9
代替凝集剤への変更の有無		
鉄系	考えない	検討中 (実験中)
1	100	12

*水道統計でアルミの濃度が高い 76 事業体(165 浄水場)を対象とした

があり、現状では考えはないとしているが、13 の浄水場で鉄系凝集剤への調査中若しくは設置済みとしている。表・2 にアンケート結果の一部を示す。

このほか、研究協力者の水道事業体で行っている残留アルミニウムの調査、低減化の検討、鉄系凝集剤等代替凝集剤の検討の結果を取りまとめた。

2) 水道用資機材からの有機スズ等化合物の溶出に関する研究

モノ/ジ体の有機スズ化合物の毒性はデータおよび情報が少ないながら、トリブチル等トリ体有機スズ化合物に比較して低く、また、本研究で得られた塩化ビニル管等からの溶出レベルも低いなどから、現段階ではこれらの安定剤の使用が問題となる知見は得られていない。

形態別有機スズ化合物の分析方法として、

誘導体化－SPME（ヘッドスペース）－GC/MS 法と誘導体化－溶媒抽出－GC/MS 法についてこれまでの研究結果を整理し、誘導体化－SPME（ヘッドスペース）－GC/MS 法でジメチルスズで 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、他の 7 種の有機スズ化合物で 0.01 $\mu\text{g/L}$ の定量下限値を得た。誘導体化－溶媒抽出－GC/MS 法ではモノおよびジメチルスズ化合物は、濃縮段階で、揮散することなどから分析できなかった。他のスズ化合物ではモノ（ブチル、フェニル、オクチル）スズで 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、ジ（ブチル、フェニル、オクチル）スズで 0.04 $\mu\text{g/L}$ の定量下限値を得た。

管の浸出試験では試験操作においてコンディショニング初期に比較的高濃度の有機スズ化合物の溶出が認められ、期間を長くするほど溶出濃度の低下が見られた。

3) セレン、フッ素、ホウ素等無機物質に関する研究

本年度は WHO 飲料水水質ガイドラインの逐次改訂項目の現状について調査を行い、ニッケルと水銀についてドラフトが作成中であるため、改定案についての情報を収集した。ニッケルが現行の 0.02 mg/L から 0.03 mg/L へ引き上げ、水銀が全量（無機・有機の合計）0.001mg/L から無機水銀として 0.006mg/L への改定案が示されている。

D. 考察

1) アルミニウムの制御に関する研究

浄水中のアルミニウム濃度の高い事業体へのアンケート調査では、水源のアルミニウム濃度の影響は見られなかった。しかし、新たな水源としてのダム（湖沼）やダムから放流され河川自流水と混合した表流水を水源としたため、浄水処理において様々な影響を受けている。

北海道・東北地方では低水温、低 pH、高

濁度、関東以南では植物プランクトン、高濁度、高 pH 等の影響を受け、特に、湖沼系の事業体では植物プランクトンの発生に伴う過閉塞、生物漏出抑制等のために凝集操作に問題が起こっている。現在の水道施設は多くが 1960～70 年代に整備されているため、このままでは十分な対応が難しい施設も多いものと考えられる。

一方、pH 調整や一次的な取水停止、選択取水等の対策についても検討がなされており、代替凝集剤を含む残留アルミニウム低減化のための具体的手段の検討が望まれる。

2) 水道用資機材からの有機スズ等化合物の溶出に関する研究

形態別有機スズ化合物の分析方法として、誘導体化－SPME（ヘッドスペース）－GC/MS 法と誘導体化－溶媒抽出－GC/MS 法で分析ができることを明らかにしているが、検討に参加した事業体によって測定にばらつきがあり、操作手順を含め分析方法を確立する必要がある。汎用性のある誘導体化－溶媒抽出－GC/MS 法はメチル系有機スズ化合物が濃縮操作で揮散することから、現状では微量分析に不適であり、今後の検討課題である。

コンディショニング期間の違いによる溶出濃度に差が出ることも確認されており、実際の水道水の試験方法としてどのような溶出試験（時間、繰り返し数など）手順が最適であるか検討する必要がある。

3) セレン、フッ素、ホウ素等無機物質に関する研究

ニッケルの改定案は体重 1kg あたりの TDI が 5 μg から 11 μg への変更に伴うものである。ただし改定案ではニッケルに敏感な固体の保護もあわせて考慮することをコメントとして追加している。

水銀に関する改定案では汚染されていない飲料水中の水銀はほぼすべてが 2 価水銀 (Hg^{2+}) の形態であると考えられ、飲料水からの有機水銀化合物、特にアルキル水銀を摂取する直接的なリスクはないものと考えている。一方、メチル水銀の無機水銀への形態変換の可能性についてコメントがある。無機水銀に対する TDI は体重 1kg あたり 2 μg と勧告され、飲料水の寄与率を 10% として、ガイドライン改定値が提案された。

E. 結論

水道統計およびアンケートによるアルミニウムの実態調査を行い、水質基準を 0.1 mg/L へ引き下げた場合の対応可能性等について検討した。浄水中のアルミニウム濃度が 0.1 mg/L を超過もしくは超過の恐れがある浄水場では、アルミニウムの基準値が引き下げられた場合、対応が困難あるいは難しいとしたものが 80% 以上となった。プランクトン発生等の原水水質の悪化により凝集剤注入量が増加し、既存施設での制御が難しくなっていることなどが理由として挙げられている。

水道用硬質塩化ビニル管等水道用資機材中に含まれる有機スズ化合物の分析方法、試験方法についてこれまでの研究成果を再検討し今後の課題を抽出した。管の浸出試験操作ではコンディショニング初期に比較的高濃度の有機スズ化合物の溶出が認められ、期間が長くなるほど溶出濃度の低下が見られた。このため水道における溶出実態を反映するような試験方法の検討が必要である。

WHO 飲料水水質ガイドラインの逐次改訂項目としてニッケルと水銀についてドラフトが作成中であり、ニッケルが 0.02 mg/L から 0.03 mg/L、水銀が 0.001mg/L (無機・有機) から 0.006mg/L (無機) への改定案が示されてい

る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. K. Ohno, M. Uchiyama, M. Saito, T. Kamei and Y. Magara: Practical design of flocculator for new polymeric inorganic coagulant-PSI, Water Science and Technology: Water Supply Vol 4 No 1, pp67-75, 2004
2. 眞柄 泰基 編集、執筆：「水の事典」p322-330、2004-6

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究

—一般有機物分科会—

主任研究者 眞柄泰基 北海道大学創成科学研究機構 教授
分担研究者 安藤正典 武蔵野大学 薬学部 薬学研究所 教授
秋葉道宏 国立保健医療科学院 水道工学部 施設工学室長
西村哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 第3室長

研究要旨：

有機物の指標として、水道水では過マンガン酸カリウム消費量がこれまで長期間継続的に用いられてきた。しかしながら、過マンガン酸カリウム消費量は、有機物が化学的に酸化する際に消費する酸素量で評価する方法であることから、含有する物質に依存して安定性に欠け、かつ精度が保証できない検査方法である。これに対して、全有機炭素（TOC）計による有機物の測定は、有機物を完全に酸化分解して全炭素を直接的に計測する方法であることから、精度ならびにそのトレーサビリティが保証できることから有効である。このことから、先の水質基準の改正における検査方法では、TOC 計による方法を有機物量の検査方法として採用した。しかしながら、100 年を超えて利用されてきた過マンガン酸カリウム消費量 10mg/l の水準は現行の TOC 計による基準値 5mg/l と対応していない可能性があり、過マンガン酸カリウム消費量 10mg/l に見合った TOC の基準値に見直す必要があると考えられることから、本分担研究では従来の過マンガン酸カリウム消費量と TOC との関連性をさらに追跡調査することとした。水道原水および環境水における過マンガン酸カリウム消費量と TOC の関係を検討すると、TOC は過マンガン酸カリウム消費量の約 1/3 であると推定され、TOC として 3~4mg/l となる結果が得られた。しかしながら、水道水ではその値が TOC の検出下限値に近いことが明らかとなった。

揮発性有機物の一つである塩化ビニルの検出状況を検討した結果、水道原水あるいは塩素処理水において僅かに検出されていることがわかった。しかしながら、その存在濃度は非常に低いことから、我が国における検出状況について継続して監視していくことが必要であるものの、現時点で問題となる濃度ではないと評価した。

カビ臭物質 2-MIB、ジオスミンの発生源としての生活排水処理施設を評価するため実態調査を行った。生活排水処理施設として、下水道終末処理施設（2ヶ所）、農業集落排水処理施設（2ヶ所）を選定し、それぞれの施設の放流水中の 2-MIB、ジオスミンを測定した。調査期間は平成 17 年 1~2 月である。放流水中の 2-MIB の濃度は最大 37 ng/L、ジオスミンの濃度は 5 ng/L 以下であった。

カビ臭物質 2-MIB、ジオスミンの発生源としての生活排水処理施設を評価するため実態調査を行った。生活排水処理施設として、広島県内の下水道終末処理施設（2ヶ所）、農業集落排水処理施設（3ヶ所）、合併処理浄化槽（2ヶ所）を選定し、それぞれの施設の放流水中の 2-MIB、ジオスミンを測定した。調査期間は平成 17 年 1~3 月である。放流水中のカビ臭物質の最大は、2-MIB 濃度が 5 ng/L ジェオスミンの濃度が 37 ng/L であった。生活排水処理施設放流水中のカビ臭物質濃度は各種処理施設でジェオスミンが 2-MIB よりも大きな値を示す傾向にあった。

水道水源におけるピコプランクトン出現状況を把握するため、平成 16 年 1~12 月までの

1年間にわたり（頻度：1回/月）相模川水系の10地点で最大出現数とその時期、季節変動を調査した。ピコプランクトン出現細胞数は、各調査地点ともに夏季の高水温期（6～9月）に増加した。この期間において、6地点で細胞数が 10^4 個/ml以上であった。取水塔表層水および浄水場原水について、平成15年6～10月（頻度：3～5回/月）、平成16年6～11月（頻度：1～4回/月）の期間実施した。取水塔表層水全34回の測定中27回ピコプランクトンの出現が見られ、その細胞数は 10^3 ～ 10^5 個/mlの範囲であった。細胞数は、9月（平成15年）8月（平成16年）に大きな値を示した。浄水場原水では、全34回の測定中26回ピコプランクトンの出現が認められ、その細胞数は 10^2 ～ 10^5 個/mLの範囲であった。細胞数が大きな値を示したのは、平成16年8月で 10^5 個/mLに達した。同じ採水日の貯水池表層水と浄水場原水の出現細胞数を比べると、浄水場原水出現細胞数は、貯水池表層水より1桁小さい値になる傾向を示した。

浄水処理過程におけるピコプランクトンの挙動やピコプランクトン細胞数が濁度に及ぼす影響を把握することは水質管理上重要な事項であると考えられる。そこで、本研究では、水源湖沼でのピコプランクトンの大発生が問題となっている浄水場を対象として、各処理過程におけるピコプランクトン、濁度の除去特性について検討した。原水でピコプランクトン細胞数が 10^5 個/mLを超えた回数は、全36回の測定中10回、特に7月～10月の期間は、19回の測定中7回であった。各処理過程におけるピコプランクトンの挙動は、原水に対する残存率（%）で表すと、全期間では、凝集沈殿45.5%、ろ過水31.7%、多量存在期間では、凝集沈殿53.5%、ろ過水39.6%であった。全期間をとおしてピコプランクトン細胞数と濁度の間には相関が見られ、多量存在期間では比較的相関性の高い直線関係が見られた。その関係式は、濁度 $=1.3 \times 10^{-6} X + 0.047 (r^2=0.62)$ であった。

凝集沈殿処理におけるピコプランクトンの除去特性を把握するため、ピコプランクトン細胞数 1.4×10^4 個/mL、濁度6度の原水を用いて、急速攪拌15rpm、3分、緩速攪拌60rpm、15分、沈殿時間10分で、ポリ塩化アルミニウム（PAC）を凝集剤としてジャーテストを行った。原水のpHを6.0に固定した場合、濁度はPACの添加濃度1.5～3.0mgAl/lで急激に0.7まで低下したが、その後添加濃度を4.0～6.0mgAl/Lまで増加しても濁度の低下はほとんど見られなかった。一方、ピコプランクトン細胞数は、PAC添加濃度3.0mgAl/Lで、ピコプランクトンの除去率は約60%であったが、添加濃度6.0mgAl/Lまで増加させると、80%の除去率が得られた。このことは、凝集剤添加濃度が濁度除去を目的とした場合、ピコプランクトンは十分に除去できないと考えられる。PACの添加濃度を5.0mgAl/Lに固定し、pHを変化させた系では、濁度はpHの低下に伴い徐々に低下し、pH5.5で最も低い値を示した。一方、ピコプランクトン細胞数はpH6.0～7.5ではその除去率にほとんど変化がなく約60%であったが、さらにpHを低下させた場合（pH5.0）、約80%の除去率を示した。

2つの浄水場（A：凝集沈殿＋砂ろ過＋粒状活性炭、B：凝集沈殿＋オゾン＋粒状活性炭＋砂ろ過）を対象として、原水、粒状活性炭処理水、ろ過水の輪虫の個体数を測定した。輪虫出現個数は6～9月に多くなる傾向が見られた。また、粒状活性炭処理水で増加したことから、その発生は粒状活性炭層内で繁殖するものと考えられた。粒状活性炭処理水での最大出現個数は、206個/L（浄水0.8個/L）であった。

A. 研究目的

水質基準にかかわる有機汚染物質および有機物指標に関する項目を中心に、水道水が有すべき性状として必要な項目、障害生物・微生物について調査・研究を行うことを目的とする。

これまで長期間利用されてきた過マンガン酸カリウム消費量10mg/lの水準は現行のTOC計による基準値5mg/lと対応していない可能性があり、過マンガン酸カリウム消費量10mg/lに見合ったTOCの基準値に見直す必要があると考えられることから、本分

担研究では従来の過マンガン酸カリウム消費量とTOCとの関連性をさらに追跡調査することとした。

揮発性有機物の一つである塩化ビニルが水道原水あるいは塩素処理水において検出される恐れがあるため、その存在実態と生成機構を検討し、今後の取り組みについて考察を加える。

カビ臭物質である2-MIBとジオスミンの発生源として、藻類だけではなく生活排水が考えられることより、生活排水処理施設からの寄与を評価するため、施設の放流水中の2-MIBおよびジオスミンの実態調査を行う。

浄水処理過程におけるピコプランクトンの挙動やピコプランクトン細胞数が濁度に及ぼす影響を把握することは水質管理上重要な事項であると考えられる。そこで、障害性微生物としてのピコプランクトンの実態を把握するため、水道水源におけるピコプランクトンの出現状況を測定し、最大出現数とその時期、季節変動、各処理過程におけるピコプランクトンと濁度の関係、凝集沈殿処理におけるピコプランクトンの除去特性について検討する。

B. 研究方法

水道事業体において、水道原水・環境水と水道水について、TOCおよび過マンガン酸カリウム消費量、それらと関係のある有機物指標を測定し統計的解析を行っていく。

昨年度まで行われた水道原水に塩素接触の実験結果を基に、塩化ビニルモノマーの実態について評価を加え、今後の取り組みかたを検討する。

生活排水処理施設として下水道終末処理施設（2ヶ所）および農業集落排水処理施設（2ヶ所）を選定し、それぞれの施設の放流水中の2-MIB、ジオスミンを測定した。

水道水源におけるピコプランクトン出現状況を把握するため、相模川水系の6地点と貯水池取水塔表層水および浄水場原水について、ピコプランクトンの最大出現数とその時期、季節変動を調査した。

浄水場の各処理過程におけるピコプラン

クトンと濁度の関係、除去特性について、浄水場内の着水井（原水）、沈殿水、ろ過水のピコプランクトン細胞数、濁度を平成15年4～10月で、1～2回/週の頻度で測定した。

水道水源貯水池の表層水を原水として、凝集沈殿処理をジャーテストで評価した。条件は急速攪拌15rpm、3分、緩速攪拌60rpm、15分、沈殿時間10分で、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム（PAC）を用いた。PACの添加濃度を変化させた系では原水のpHを6.0に、pHを変化させた系ではPACの添加濃度を5.0mgAl/Lに固定した。

高度浄水処理施設を導入している浄水場における粒状活性炭処理水への微小動物の漏出状況と給水栓への流出状況について検討した。

2つの浄水場（A：凝集沈殿＋砂ろ過＋粒状活性炭、B：凝集沈殿＋オゾン＋粒状活性炭＋砂ろ過）を対象として、原水、粒状活性炭処理水、ろ過水の輪虫の個体数を測定した。調査期間は、A浄水場が平成13年4月～平成16年3月、B浄水場が平成13年4月～平成16年12月である。

C. 研究結果及び考察

1. 一般有機物指標としての全有機炭素量と過マンガン酸カリウム消費量の関係

有機物の指標として、水道水では過マンガン酸カリウム消費量がこれまで長期間継続的に用いられてきた。しかしながら、過マンガン酸カリウム消費量は、有機物が化学的に酸化する際に消費する酸素量で評価する方法であることから、含有する物質に依存して安定性に欠け、かつ精度が保証できない検査方法である。これに対して、全有機炭素（TOC）計による有機物の測定は、有機物を完全に酸化分解して全炭素を直接的に計測する方法であることから、精度ならびにそのトレーサビリティが保証できることから有効である。このことから、先の水質基準の改正における検査方法では、TOC計による方法を有機物量の検査方法として採用した。しかしながら、100年を超えて利用されてきた過マンガン酸カリウム

消費量 10mg/l の水準は現行の TOC 計による基準値 5mg/l と対応していない可能性があり、過マンガン酸カリウム消費量 10mg/l に見合った TOC 計による基準値に見直す必要があると考えられることから、本分担研究では従来の過マンガン酸カリウム消費量と TOC との関連性をさらに追跡調査することとした。水道原水および環境水における過マンガン酸カリウム消費量と TOC の関係を検討すると、TOC は過マンガン酸カリウム消費量の約 1/3 であると推定され、TOC として 3~4mg/l となる結果が得られた。しかしながら、水道水ではその値が TOC の検出下限値に近いことが明らかとなった。

今後、水道原水・環境水と水道水の全有機炭素量と過マンガン酸カリウム消費量の関係について統計的解析を行っていく。

2. 塩化ビニルモノマーの存在状況

昨年度まで水道原水に塩素接触を行った検討内容について考察を加え、以下の結論を得た。

経時変動については、塩素接触の 6 時間後では、検討した全ての浄水場原水での検出は認められず、定量下限値 (0.02 μ g/L) 以上の生成は認められなかった。24 時間後では 2 浄水場原水で 0.02 μ g/L または 0.03 μ g/L の濃度が検出された。48 時間後では、3 浄水場原水、5 反応条件で定量下限値を超えていた (0.02~0.05 μ g/L)。これらの 5 試料のうち 4 試料は、37 $^{\circ}$ C で反応を行った場合で、反応温度の高い方が生成量が多くなる傾向がみられた。以上の結果から、塩化ビニルモノマーの生成は実験的には認められるが、実際の浄水工程の条件では低濃度でのみ生成すると推定される。

生成量は、塩素との接触時間が長いほど、残留遊離塩素濃度が高濃度であるほど、また反応温度が高いほど、増加する傾向が認められた。また、塩化ビニルモノマー生成の反応は、トリハロメタン生成に比べ長時間直線的に延びる傾向が認められ、その反応速度は遅いと推測された。

反応温度については、反応を 5 $^{\circ}$ C で行った場合は、検討した全ての浄水場原水での定量下限値 (0.02 μ g/L) 以上の検出は認め

られなかった。20 $^{\circ}$ C の反応条件下で、2 原水に低濃度ながら生成が認められた。37 $^{\circ}$ C の反応条件下では 0.02~0.11 μ g/L の濃度での生成が認められた。トリハロメタン生成では反応温度が 20 $^{\circ}$ C 以上となっても生成量に大きな変化は認められないながら、塩化ビニルモノマー生成は温度による影響を受けやすいと考えられる。

水溶液の pH 値の影響については、中性からアルカリ性側の方が酸性よりも塩化ビニルモノマーの生成量は増加する傾向が見られた。水溶液の pH 値については、トリハロメタン生成と同様アルカリ性になるほど生成量が増加すると考えられる。

残留遊離塩素濃度が検出される条件下では、塩化ビニルモノマーの生成量に大きな差は認められなかったが、有効塩素濃度が高いほど生成量が増加する傾向が見られた。

一方、原水の汚濁成分に依存するとの結論には至らなかったが、少なくとも汚濁成分の一部から塩化ビニルモノマーが生成することが示唆された。

ヒトに対する健康影響については、発がん性を持っていることを示唆する疫学的結果が数多く報告され、その評価においても塩化ビニルモノマーはヒトに対して発がん性があると評価できる。IARC においても、ヒトに対する発がん性の十分な証拠があると評価し、グループ 1 に分類している。標的臓器は、肝・胆道系、脳神経系、呼吸器系、造血器系などが示唆され、特に肝血管肉腫の高い発生率との因果関係が示唆されている。動物を用いた実験では、特に吸入曝露による多部位発がん性が報告され、経気道的な曝露の場合、発がん性を示すと評価できる。ヒトへの慢性影響として、門脈圧亢進、Raynaud 現象、指端骨溶解性、強皮症様皮膚変化等が報告されている。遺伝子傷害性を持つことは、多くの報告から明らかであるため、有害性に閾値が無いとするのが妥当と考えられる。

WHO 飲料水水質ガイドラインでは、塩化ビニルの経口曝露に伴う発がん性リスクについてのデータはないことから、ラットの生涯にわたる低容量の経口曝露の実験結果

と線形多段階モデルを適用して、摂取により生涯を通じて増加するリスクが 10^{-5} と相当する飲料水の値、 $5\mu\text{g/L}$ を算出している。

今回の検討結果では、一例 ($0.11\mu\text{g/L}$)を除いて、WHO 飲料水水質ガイドラインの指針値の $5\mu\text{g/L}$ の $1/100$ を超えることはなかった。また、一例においても指針値の $1/10$ 未満であった。

今回の検討で得られた結果では、塩化ビニルの生成原因物質の一部が汚濁性物質であることが示唆されていることも含め、浄水処理が十分に行われている限り問題となる濃度の生成が起こる可能性は低いと考えられる。しかし、生成原因物質を明らかにすることは、浄水処理をより適切に行うための情報を提供するものであり、水道水源を含めた水環境の清浄化に向けた取り組みの一環として、塩素消毒、塩素処理やオゾン処理等の処理における副生成物の把握と削減への貴重な情報を提供するものと考えられる。

揮発性有機物の一つである塩化ビニルの検出状況を検討した結果、水道原水あるいは塩素処理水において僅かに検出されることがわかった。しかしながら、その存在濃度は非常に低いことから、我が国における検出状況について継続して監視していくことが必要であるものの、現時点で問題となる濃度ではないと評価した。

3. 生活排水処理施設放流水中の2-MIBおよびジオスミンの実態調査

カビ臭物質 2-MIB、ジオスミンの発生源としての生活排水処理施設を評価するため実態調査を行った。生活排水処理施設として、広島県内の下水道終末処理施設（2ヶ所）、農業集落排水処理施設（3ヶ所）、合併処理浄化槽（2ヶ所）を選定し、それぞれの施設の放流水中の2-MIB、ジオスミンを測定（SPME-GC/MS法）した。調査期間は平成17年1～3月である。2-MIB濃度は、各種処理施設ともに 5ng/L 以下であった。一方、ジオスミンの濃度は、大きな値を示したのはD 農業集落排水処理施設で2月 37ng/L 、3月 26ng/L 、次いでG 農業集落排水処理施設 19ng/L であった。生活

排水処理施設放流水中のカビ臭物質濃度は各種処理施設でジオスミンが2-MIBよりも大きな値を示した。

4. 生物障害

4-1 水道水源におけるピコプランクトン出現細胞数の季節変動

水道水源におけるピコプランクトン出現状況を把握するため、最大出現数とその時期、季節変動を調査し、その実態について検討した。

(1) 相模川水系

調査は、平成16年1～12月までの1年間にわたり（頻度：1回/月）相模川水系で行った。採水地点は、桂川橋、相模湖表層、弁天橋、沼本ダム、三井大橋（津久井湖）、城山ダムえん堤前（津久井湖）、高田橋、座架衣橋、相模大橋、寒川取水口を選んだ。ピコプランクトン出現細胞数は、各調査地点ともに夏季の高水温期（6～9月）に増加した。この期間においては細胞数が 10^4 個/ml以上をカウントした地点は、桂川橋、三井大橋、城山ダムえん堤前、座架衣橋、相模大橋、寒川取水口であった。細胞数が大きな値を示したのは、津久井湖内の2地点で、三井大橋 5.6×10^4 個/ml（9月）、城山ダムえん堤前 8.2×10^4 個/ml（9月）、次いで相模大橋 1.4×10^4 個/ml（9月）、桂川橋 1.2×10^4 個/ml（9月）であった。

(2) 貯水池

調査は、平成15年6～10月（頻度：3～5回/月）、平成16年6～11月（頻度：1～4回/月）の期間実施した。採水地点は貯水池取水塔表層水および浄水場原水である。貯水池表層水では、全34回の測定中27回ピコプランクトンの出現が見られ、その細胞数は $10^3\sim 10^5$ 個/mlの範囲であった。細胞数が大きな値を示したのは、平成15年9月の4回の測定中3回、平成16年8月の4回の測定中4回で 10^5 個/ml以上をカウントした。浄水場原水では、全34回の測定中26回ピコプランクトンの出現が認められ、その細胞数は $10^2\sim 10^5$ 個/mlの範囲であった。細胞数が大きな値を示したのは、平成16年8月23日で 10^5 個/mlに達した。同じ採水日の貯水池表層水と浄水場原水の

出現細胞数を比べると、浄水場原水出現細胞数は、貯水池表層水より1桁小さい値になる傾向を示した。

4-2 浄水処理過程におけるピコプランクトンの挙動と浄水濁度への寄与

浄水処理過程におけるピコプランクトンの挙動やピコプランクトン細胞数が濁度に及ぼす影響を把握することは水質管理上重要な事項であると考えられる。そこで、本研究では、水源湖沼でのピコプランクトンの大発生が問題となっている浄水場を対象として、各処理過程におけるピコプランクトン、濁度の除去特性について検討した。調査は、ピコプランクトンが出現する時期の平成15年4～10月で、1～2回/週の頻度で実施し、浄水場内の着水井(原水)、沈殿水、ろ過水のピコプランクトン細胞数、濁度を測定した。原水でピコプランクトン細胞数が 10^5 個/mLを超えた回数は、全36回の測定中10回、特に7月22日～10月27日の期間(多量存在期間)は、19回の測定中7回であった。各処理過程におけるピコプランクトンの挙動は、原水に対する残存率(%)で表すと、全期間では、凝集沈殿45.5%、ろ過水31.7%、多量存在期間では、凝集沈殿53.5%、ろ過水39.6%であった。全期間をとおしてピコプランクトン細胞数と濁度の間には相関が見られ、多量存在期間では比較的相関性の高い直線関係が見られた。その関係式は、濁度 $=1.3 \times 10^{-6}X+0.047(r^2=0.62)$ であった。

4-3 ジャーテストによるピコプランクトンの除去特性の評価

凝集沈殿処理におけるピコプランクトンの除去特性を把握するためジャーテストを行い、検討した。水道水源貯水池の表層水を原水として用いた。原水水質は、ピコプランクトン細胞数 1.4×10^4 個/mL、濁度6度であった。凝集沈殿処理はジャーテストで評価した。条件は急速攪拌15rpm、3分、緩速攪拌60rpm、15分、沈殿時間10分で、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム(PAC)を用いた。PACの添加濃度を変化させた系(I系)では、原水のpHを6.0に、pHを変化させた系(II系)では、PACの添加濃

度を5.0mgAl/Lに固定した。I系では、濁度はPACの添加濃度1.5～3.0mgAl/Lで急激に0.7まで低下したが、その後添加濃度を4.0～6.0mgAl/Lまで増加しても濁度の低下はほとんど見られなかった。一方、ピコプランクトン細胞数は、PAC添加濃度3.0mgAl/Lで、ピコプランクトンの除去率は約60%であったが、添加濃度6.0mgAl/Lまで増加させると、80%の除去率が得られた。このことは、凝集剤添加濃度が濁度除去を目的とした場合、ピコプランクトンは十分に除去できないと考えられる。II系では、濁度はpHの低下に伴い徐々に低下し、pH5.5で最も低い値を示した。一方、ピコプランクトン細胞数はpH6.0～7.5ではその除去率にほとんど変化がなく約60%であったが、さらにpHを低下させた場合(pH5.0)、約80%の除去率を示した。

4-4 粒状活性炭処理水へ漏出する微小動物の出現状況

高度浄水処理施設を導入している浄水場における粒状活性炭処理水への微小動物の漏出状況と給水栓への流出状況について検討した。

茨城県内の2つの浄水場(A:凝集沈殿+砂ろ過+粒状活性炭、B:凝集沈殿+オゾン+粒状活性炭+砂ろ過)を対象として、原水、粒状活性炭処理水、ろ過水の輪虫の個体数を測定した。調査期間は、A浄水場が平成13年4月～平成16年3月、B浄水場が平成13年4月～平成16年12月である。輪虫出現個数の季節変動は、A、B浄水場ともに輪虫が6～9月に多く存在する傾向が見られた。また、輪虫が粒状活性炭処理水で増加したことから、その発生は粒状活性炭層内で繁殖するものと考えられた。粒状活性炭処理水での輪虫の最大出現個数は、A浄水場ではそれぞれ11個/L(浄水4個/L)、138個/L(浄水129個/L)、B浄水場ではそれぞれ173個/L(浄水6個/L)、206個/L(浄水0.8個/L)であった。

D. 結論

有機物の指標として、過マンガン酸カリウム消費量は有機物が化学的に酸化する際

に消費する酸素量で評価する方法であることから、含有する物質に依存して安定性に欠け、かつ精度が保証できない検査方法である。これに対して、全有機炭素 (TOC) 計による有機物の測定は、有機物を完全に酸化分解して全炭素を直接的に計測する方法であることから、精度ならびにそのトレーサビリティが保証できることから有効である。水道原水および環境水における過マンガン酸カリウム消費量と TOC の関係を検討すると、TOC は過マンガン酸カリウム消費量の約 1/3 であると推定され、TOC として 3~4mg/l となる結果が得られた。しかしながら、水道水ではその値が TOC の検出下限値に近いことが明らかとなった。

今後、水道原水・環境水と水道水の全有機炭素量と過マンガン酸カリウム消費量の関係についてさらに調査を行い、統計的解析を行い水質基準値の見直しを進めていく。

塩化ビニルモノマーの生成量は、塩素との接触時間が長いほど、残留遊離塩素濃度が高濃度であるほど、また反応温度が高いほど、増加する傾向が認められた。また、塩化ビニルモノマー生成の反応は、トリハロメタン生成に比べ長時間直線的に延びる傾向が認められ、その反応速度は遅いと推測された。トリハロメタン生成では反応温度が 20℃ 以上となっても生成量に大きな変化は認められないが、塩化ビニルモノマー生成は温度による影響を受けやすいことが明らかとなった。水溶液の pH 値の影響については、中性からアルカリ性側の方が酸性よりも塩化ビニルモノマーの生成量は増加する傾向が見られた。水溶液の pH 値については、トリハロメタン生成と同様アルカリ性になるほど生成量が増加すると考えられる。残留遊離塩素濃度が検出される条件下では、塩化ビニルモノマーの生成量に大きな差は認められなかったが、有効塩素濃度が高いほど生成量が増加する傾向が見られた。一方、原水の汚濁成分に依存するとの結論には至らなかったが、少なくとも汚濁成分の一部から塩化ビニルモノマーが生成することが示唆された。今回の検討結果では、一例 (0.11 μg/L) を除いて、WHO

飲料水水質ガイドラインの指針値の 5 μg/L の 1/100 を超えることはなかった。また、一例においても指針値の 1/10 未満であった。

揮発性有機物の一つである塩化ビニルの検出状況を検討した結果、水道原水あるいは塩素処理水において僅かに検出され、実験的には生成は認められるが、実際の浄水工程の条件での生成は低濃度であると推定される。その存在濃度は非常に低いことから、我が国における検出状況について継続して監視していくことが必要であるものの、現時点で問題となる濃度ではないと評価した。

今回の検討で得られた結果では、塩化ビニルの生成原因物質の一部が汚濁性物質であることが示唆されていることも含め、浄水処理が十分に行われている限り問題となる濃度の生成が起こる可能性は低いと考えられる。しかし、生成原因物質を明らかにすることは、浄水処理をより適切に行うための情報を提供するものであり、水道水源を含めた水環境の清浄化に向けた取り組みの一環として、塩素消毒、塩素処理やオゾン処理等の処理における副生成物の把握と削減への貴重な情報を提供するものと考えられる。

カビ臭物質である 2-MIB およびジオスミンの発生源として、藻類だけではなく生活排水処理施設が考えられている。下水道終末処理施設 (2ヶ所) の放流水中の 2-MIB およびジオスミンの最高検出濃度は、13 ng/L、1 ng/L 以下 (n=1) であった。一方、農業集落排水処理施設では、それぞれ 37 ng/L、5 ng/L 以下であった。

平成 16 年 1~12 月までの 1 年間にわたる (頻度: 1 回/月) 相模川水系 10 地点のピコプランクトン出現状況は、各調査地点ともに夏季の高水温期 (6~9 月) に増加した。この期間においては細胞数が 10⁴ 個/ml 以上をカウントした地点は、6 地点あった。

平成 15 年 6~10 月 (頻度: 3~5 回/月)、平成 16 年 6~11 月 (頻度: 1~4 回/月) の期間、貯水池取水塔表層水および浄水場原水のピコプランクトンの出現頻度は、貯水池表層水で全 34 回の測定中 27 回、その

細胞数は $10^3 \sim 10^5$ 個/ml の範囲であった。浄水場原水では、全 34 回の測定中 26 回ピコプランクトンの出現が認められ、その細胞数は $10^2 \sim 10^5$ 個/mL の範囲であった。同じ採水日の貯水池表層水と浄水場原水の出現細胞数を比べると、浄水場原水出現細胞数は、貯水池表層水より 1 桁小さい値になる傾向を示した。

浄水処理過程におけるピコプランクトンの挙動やピコプランクトン細胞数が濁度に及ぼす影響を把握することは水質管理上重要な事項であると考えられる。平成 15 年 4 ~ 10 月で、1 ~ 2 回/週の頻度で、浄水場内の着水井（原水）、沈殿水、ろ過水のピコプランクトン細胞数、濁度を測定した。原水でピコプランクトン細胞数が 10^5 個/mL を超えた回数は、全 36 回の測定中 10 回、特に 7 月 22 日 ~ 10 月 27 日の期間（多量存在期間）は、19 回の測定中 7 回であった。各処理過程におけるピコプランクトンの原水に対する残存率（%）は、全期間においては凝集沈殿で 45.5%、ろ過水で 31.7%、多量存在期間では、凝集沈殿で 3.5%、ろ過水 39.6% であった。全期間をとおしてピコプランクトン細胞数と濁度の間には相関が見られ、多量存在期間では比較的相関性の高い直線関係が見られた。その関係式は、濁度 = $1.3 \times 10^{-6} X + 0.047$ ($r^2 = 0.62$) であった。

凝集沈殿処理におけるピコプランクトンの除去特性を把握するため、水道水源貯水池の表層水を原水としてジャーテストを行った。pH を一定にした条件では、濁度は PAC の添加濃度 1.5 ~ 3.0 mgAl/l で急激に 0.7 まで低下したが、その後添加濃度を 4.0 ~ 6.0 mgAl/l まで増加しても濁度の低下はほとんど見られなかった。一方、ピコプランクトン細胞数は、PAC 添加濃度 3.0 mgAl/l で、ピコプランクトンの除去率は約 60% であったが、添加濃度 6.0 mgAl/l まで増加させると、80% の除去率が得られた。このことは、凝集剤添加濃度が濁度除去を目的とした場合、ピコプランクトンは十分に除去できないと考えられる。一方、濁度は pH の低下に伴い徐々に低下し、pH 5.5 で最も低い値を示

した。pH 6.0 ~ 7.5 ではその除去率にほとんど変化がなく約 60% であったが、さらに pH を低下させた場合（pH 5.0）、約 80% の除去率を示した。

2 つの浄水場（A：凝集沈殿 + 砂ろ過 + 粒状活性炭、B：凝集沈殿 + オゾン + 粒状活性炭 + 砂ろ過）を対象として、原水、粒状活性炭処理水、ろ過水の輪虫の個体数を測定した。輪虫出現個数は、A、B 浄水場ともに輪虫が 6 ~ 9 月に多く存在する傾向が見られた。また、輪虫が粒状活性炭処理水で増加したことから、その発生は粒状活性炭層内で繁殖するものと考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Nishimura, S. Iizuka, N. Kibune and M. Ando, Study of 1,4-dioxane in the total diet using the market-basket method. *J. Health Sci.*, 50, 100-107, 2004.
- 2) T. Umemura, Y. Kitamura, K. Kanki, S. Maruyama, K. Okazaki, T. Imazawa, T. Nishimura, R. Hasegawa, A. Nishikawa and M. Hirose, Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate, *Cancer Sci.*, 95, 393-398, 2004.
- 3) 金志勲, 許春蓮, 秋葉道宏, 宮川徹也, 千葉信男, 西村修, 西村哲治, 安藤正典, 水道水源における同化性炭素の動態に関する基礎的研究, *水道協会雑誌*, 第 73 巻 第 11 号 p11-p18, 2005.

2. 学会発表

- 1) 秋葉道宏, 安藤正典, 西村哲治, 新垣和一; 水道水の官能試験法に関する一考察, 第 55 回全国水道研究発表会, p654-655, 京都, 2004.
- 2) 金志勲, 中野和典, 宮川徹也, 秋葉道宏, 千葉信男, 西村修, 西村哲治, 安藤正典; 塩素処理による藻類由来同化性有機炭素の除去性の解析, 第 55 回全国水道研究発

- 表会, p568-569, 京都, 2004.
- 3) 宮川徹也, 安藤正典, 西村修, 秋葉道宏, 西村哲治; 全国の水道における同化性有機炭素の調査, 第 55 回全国水道研究発表会, p562-563, 京都, 2004.
 - 4) 島崎大, 相澤貴子, 西村哲治, 安藤正典, 国包章一, 眞柄泰基; 水道原水及び浄水における臭素酸イオンの実態調査, 第 55 回全国水道研究発表会, p618-619, 京都, 2004.
 - 5) 眞柄泰基, 安藤正典, 秋葉道宏, 西村哲治; 水道水質基準としての有機物の指標化に関する研究, 第 55 回全国水道研究発表会, p632-633, 京都, 2004.
 - 6) 西本尚文, 西村哲治, 高木博夫, 加藤信弥, 大石克則, 嶋田俊夫, 並木繁夫, 塩出貞光, 嶋津治希, 中野淑雄, 安藤正典; 水質基準改正等に伴う検査方法の検討 (IV) -1,4-ジオキサンの検査方法-, 第 55 回全国水道研究発表会, p640-641, 京都, 2004.
 - 7) 嶋田俊夫, 西村哲治, 高木博夫, 加藤信弥, 大石克則, 並木繁夫, 塩出貞光, 西本尚文, 嶋津治希, 中野淑雄, 安藤正典; 水質基準改正等に伴う検査方法の検討 (VI) -かび臭物質の検査方法-, 第 55 回全国水道研究発表会, p644-645, 京都, 2004.
 - 8) 加藤信弥, 西村哲治, 高木博夫, 大石克則, 嶋田俊夫, 並木繁夫, 塩出貞光, 西本尚文, 嶋津治希, 中野淑雄, 安藤正典; 水質基準改正等に伴う検査方法の検討 (VII) -フェノール類の検査方法-, 第 55 回全国水道研究発表会, p646-647, 京都, 2004.
 - 9) 中野淑雄, 西村哲治, 高木博夫, 加藤信弥, 大石克則, 嶋田俊夫, 並木繁夫, 塩出貞光, 西本尚文, 嶋津治希, 安藤正典; 水質基準改正等に伴う検査方法の検討 (IV) -水道用資機材等の浸出液の検査方法-, 第 55 回全国水道研究発表会, p650-651, 京都, 2004.
 - 10) 田原麻衣子, 中島彩子, 斉藤貢一, 中澤裕之, 西村哲治; 化学物質の光化学反応の解明に向けた光安定性評価法の開発, 第 10 回創薬工学シンポジウム, 東京, 2004.
 - 11) Maiko Tahara, Ayako Nakajima, Jun-ichi Kimura, Tetsuji Nishimura, Yoshihiro Yoshimura, Hiroyuki Nakazawa; Elucidation of photodynamic action for ketoprofen., The XIth International symposium on luminescence spectrometry-detection techniques in biomedical and environmental analysis., p141, Beijing, China, 2004.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

分担研究報告書

最新の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究
－微生物分科会－

主任研究者 真柄 泰基 北海道大学 創成科学研究機構 特任教授
分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部長

研究要旨

水質基準では毎月 100ml の水の大腸菌を調べており、一度も検出されないことが規定されている。そこで、微生物 (大腸菌) の測定値と水中の (大腸菌) 濃度の関係について検討した。そこで、日本の 8 河川 9 定点における年間の大腸菌群の濃度 (日本河川水質年鑑より) をもとに、対数値の標準偏差を求めたところ 0.66 (\log_{10}) 程度であった。これから、真の大腸菌濃度の平均値は 0.12cfu/100ml 以下であることといえる。

クリプトスポリジウム等に関する暫定対策刺針が出されてより、耐塩素性病原微生物の検査が行われている。しかしながら、蛍光抗体染色ならびに DAPI による核染色の結果に基づいて原虫類の検出が行われている実態が存在し、本検査法の精度を向上させなければならない。それには微分干渉顕微鏡の操作法に不慣れなこと、あるいはクリプトスポリジウム・オーシストおよび、ジアルジア・シストの微細構造に対する認識の低さが原因しているものと考えられる。そこで、これら原虫類の微細構造と微分干渉顕微鏡の操作法についてのマニュアルを作成した。

水道における微生物学的安全性に係る研究の一環として PCR-DGGE 法による水試料中の細菌叢の解析について検討している。従来の細菌学的検査は培養法と生化学的性状に基づいて行なわれてきたが、細菌叢を解析するには多数のコロニーに対する操作が要求され多大な労力が必要であり、加えて残留塩素の存在下では培養法での検出が制限され、わが国の上水における細菌叢の解析はほとんどなされていなかった。PCR-DGGE 法は GC クランプつきユニバーサルプライマーを用いて PCR と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行い、複数の配列が混在する PCR 産物から塩基配列の違いを 1 つ 1 つのバンドとして分離解析する分子生物学的手法である。これを水道水中の細菌群に応用すると、細菌の培養・釣菌・生化学解析を経ることなく、直接的に細菌叢の解析が可能である。本研究では調査研究を開始するにあたって基礎的資料の集積と応用に向けた泳動マーカーの開発を行なった。あわせて、原水と給水栓水における微生物叢の対比および浄水場内の各処理工程における微生物叢の質的变化についての検証を試みた。

A. 研究目的

水安全計画 (Water Safety Plans) は原水から蛇口に至る全ての工程における危害因子の洗い出しとその排除手段の確立・設備ならびに、運転管理の徹底により上水 (給水栓水) の安全を確保しようとするもので、微生物汚染問題は、この計画に沿って対策されるべきものである。水道水に係る微生物汚染は以下の 2 つの経路が想定される。

すなわち、外部からの混入 (原水への混入、配

管等の断裂等による混入) および内部での発生 (病原性を有する従属栄養細菌等) である。

これまでの微生物汚染は 1) の汚染を中心に対応してきたもので、もっぱら糞便由来の病原微生物を危害因子として想定してきた。そのため、現行の水質基準には糞便汚染の指標として大腸菌 (ならびに一般細菌) の測定が義務付けられている。しかしながら、レジオネラ属菌類を代表とする従属栄養細菌の中にも病原性を有するものが知られており、水道においてもそ

の対策は必須である。

そこで、従属栄養細菌、腸管系ウイルス及び耐塩素性微生物について、水道における挙動を把握するための検査法、試料の保存方法及びその動態に関する研究等について研究を行うこととした。

B. 研究方法

本研究を実施するため大学、国立試験研究機関、水道事業者等の研究協力者を含めた分科会を作成し、研究を実施した。平成16年度は水道における微生物にかかる課題として、大腸菌とその測定値の意義、水道における耐塩素性病原微生物検査における試験精度の向上および従属栄養細菌の検出状況とその細菌叢の構造について研究した。

1) 大腸菌とその測定の意義

水道水中の大腸菌についての測定資料がないため、河川水中の大腸菌群数の測定資料を用いて統計的な解析を行った。

2) 耐塩素性微生物検査における試験精度の向上

クリプトスポリジウム等に関する暫定対策指針により、耐塩素性病原微生物の検査が行われてきた。すなわち、蛍光抗体染色法により陽性となった粒子の内部構造を観察し、それぞれの原虫に特有な微細構造を確認する。その際、微細構造をより良く観察するために微分干渉顕微鏡が用いられる。あわせて、DAPIによる核染色を施すことで核の数や位置の確認、あるいは植物プランクトンとの区別のために、G 励起下で嚢子内の細胞に赤い自家蛍光が無いことを確認するなどをもって補助的な判定の根拠とする。

しかしながら、蛍光抗体染色ならびに DAPI による核染色の結果に基づいて原虫類の検出が行われている実態が存在し、本検査法の精度を底上げすべき状況にあるものと判断される。この原因としては微分干渉顕微鏡の操作法に不慣れなこと、あるいはクリプトスポリジウム・オーシストおよび、ジアルジア・シストの微細構造に対する認識の低さが原因しているものと考えられる。微分干渉顕微鏡の操作法とこれら原虫の微細構造について詳説することとした。

3) PCR-DGGE 法適用に向けた泳動マーカーの開発

①試料採取、濃縮

末端給水栓水は研究所内の蛇口から 5 分間の捨水後に採水した。蛇口水をピーカーに受けて流水状態を保ち、ピーカーからチュービング

ポンプにより孔径 0.2 μm の混合エステルフィルター(直径 142 mm)に約 50 L の水を送水し、加圧濾過した。濃縮後のフィルターをハイブリバッグ(コスモバイオ)に入れ、精製水を適量加え、フィルター表面をバッグ越しになぞり濃縮物を剥離させ、50 ml 遠心管に濃縮物を回収した。

原水の採水は荒川水系からポリタンク容器(10L)を用いて採水した。試料の濃縮は前述の給水栓水と同じ方法とし、約 4 L の原水試料から濃縮物を得た。家庭用浄水器の活性炭層由来の微生物は、1 年間個人宅で使用した装置から次の手順で取り出した。フィルターハウジングを開封し、内部の中空糸フィルター(フィルター径 0.1 μm)の一部を火炎滅菌したピンセットで折り取って 50ml 遠心管に移し、滅菌水を加えて激しく振盪した。この製品では活性炭層を通過した上水が中空糸フィルター外部から内部に向かって濾過されており、フィルターの外部に付着していた微生物は活性炭層を経由している。蛇口のバイオフィームの採取は個人宅の蛇口より行なった。蛇口の内部へ滅菌綿棒を差し込んでよく拭き、綿棒に付着したバイオフィームを約 5ml の精製水に懸濁し、全量を核酸抽出に用いた。同様に、浴槽のバイオフィームの採取は個人宅の浴槽の配管を滅菌綿棒でよく拭き、約 5 ml の精製水に懸濁し、全量を核酸抽出に用いた。

②核酸抽出

各試料を遠心濃縮(7,000 \times G、10 分間)して沈渣を得た。これを TE 緩衝液(10 mM Tris - 1 mM EDTA pH8.0)、1 M NaCl、Triton X-100 0.5%で 200 μl に再懸濁し、75 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間の不活化処理を行なった。続いて Lysozyme を 0.4mg/ml となるよう添加して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間細胞壁を溶解し、さらに Proteinase K を 0.1mg/ml となるよう添加して 50 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間細胞を溶解した。再度、75 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加温し、Proteinase 阻害剤の PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride, Sigma) を 0.5mM となるよう添加して激しく攪拌した。10,000 \times G の条件で 1 分間遠心分離し、上清を PCR の鋳型とした。

③PCR

PCR は基本的に石井ら(2000)の方法に従った。具体的には GC クランプつきプライマーの GC-341F (5' - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCGCCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3'、アンダーラインの配列が GC クランプ)と 907R (5' - CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT - 3'、R=Aor G)を用いて PCR を行なった(Muyzer

ら、1995) サイクル数は鋳型量に合わせて計 30 サイクルから 40 サイクルの間で調整し、最も良好な産物が得られるようにした。産物は 2% アガロースゲル電気泳動で確認し、SYBR Gold 染色によりバンドの存在を確認した。

④ DGGE

泳動装置は D-code DGGE complete system (BioRad) を用いた。変性剤濃度勾配ゲルの作成は基本的に付属の手順書に従った。要点を記すと以下の通りである。20%ならびに 60% のホルムアミド (Sigma) を含む 6% のポリアクリルアミドゲル溶液 (BioRad) を用意し、それぞれに 10% APS を 144ul と TEMED 14.4ul を添加してから濃度勾配作成用の専用注入装置を用いて 2 液を混合しながらゲル板に注入、4 時間の固化後に泳動を行なった。泳動条件は 1 × TAE 緩衝液 (BioRad) 中で 60℃、70V 定電圧とし、16 時間泳動した。泳動後は SYBR Gold (Molecular Probes) で染色し、VisiBlue トランスイルミネータ (UVP) を用いて観察、写真撮影 (Doc-it、UVP)、ならびにバンドの切り出しを行なった。切り出したバンドはホルムアミドと尿素を除くために 100ul の滅菌精製水ですすぎ、再度 100ul の滅菌精製水で懸濁してから上清 1ul を再 PCR の鋳型とした。産物は再度 DGGE で分離して 1 本のバンドであることを確認した後に塩基配列決定を行なった。分離が不十分であった場合は再度切り出し操作を行なった。

⑤ 塩基配列決定

PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製した。配列決定用試薬は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V1.1 (Applied Biosystems) をメーカーの指示に従って用いた。塩基配列決定には ABI 310 (Applied Biosystems) を使用した。取得したデータの処理は SeqMan II

(Lasergene、DNASTar) を用いた。GenBank データベース上で得られた配列の Blast 検索を行ない、配列がおおむね 98% 以上の一致率で種属名が明らかな場合は、試料番号に種属名を併記した。アライメントの作成は PileUp (GCG Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys) を使用した。アライメントの修正ならびに印刷は GeneDoc (Version 2.6, Nicholas et al., 1997) を使用した。系統樹の作成は MEGA2 (Version 2.1, Kumar et al., 2001) を用いて NJ 法で行なった。 *Synechococcus elongatus* (D83715) は光合成細菌の分岐を確認するための比較対照として用いた。塩基配列決定のプライマーは前述の 907R と

seq20_341f (5' - CCG CCT ACG GGA GGC AGC AG -3') を使用した。

⑥ 従属栄養細菌の培養による検出

PGY 培地あるいは R2A 培地の寒天平板を用いて各試料水より従属栄養細菌の培養検出を行なった。培養温度は 20℃ で 7 日間または 42℃ で 2 日間とした。出現したコロニーは形態が異なるものを選択してグラム染色 (ファイバー G セット F、日水製薬) と塩基配列決定に供した。塩基配列決定では seq20_341f と 907R プライマーを使用した。

C. 研究結果および考察

1) 大腸菌とその測定意義

現行の水質基準では大腸菌ならびに一般細菌の測定が義務付けられている。大腸菌に関しては 100ml の試料水から不検出であることと定められているが、100ml から検出されなかったからといって、その日に給水する浄水に大腸菌が一切含まれないことを保証しているものではない。原水の濃度、浄水処理工程の管理状況の把握、残留塩素濃度の確認などにより総合的に大腸菌が不在である蓋然性を主張することは可能であるが、測定値に基づいて大腸菌が不在であるという主張はできない。そこで、測定値から統計学的に導き得ることができる範囲について検討した結果は次のようである。

環境試料水中の微生物濃度は、一般的に対数正規分布するとされていることから、濃度の平均値と濃度の分散 (もしくは標準偏差) の 2 つのパラメータによって濃度分布を表すことができる。しかし、水道水中の大腸菌濃度の分布についての知見はない。そのため、河川等の原水における大腸菌群の分布を例として以下の検討を行った。日本河川水質年鑑によれば日本の 8 河川 9 定点における年間の大腸菌群の分布様式は対数正規分布をとり、その対数値の標準偏差は 0.66 (\log_{10}) 程度であった。

試料 100ml から大腸菌が不検出であったという計測結果が意味するところは、水中に大腸菌が全く存在しないことではなく、真の値が高い確率である値を下回ることである。以下では、真の値に関して定量的に議論することを試みた。

最初に全ての測定において異常値が存在せず、一定の対数正規分布に従う試料から採取しているものと仮定した。次に、測定して得られた値はもっぱら試料の採取におけるサンプリング誤差に起因しているものと仮定すると、大腸菌の濃度が検出限界濃度 (この場合 1 cfu/100ml) よりも低い場合には常に検査結果

は不検出となる。また、それより大きい場合には必ず検出されるものとした。換言すれば、検査精度は一定で、従って試料中の菌の濃度は必ず結果に反映するものとした。

これらの仮定の下では、繰り返し測定して一度も検出限界を超えない試料における大腸菌の真の濃度は、検出限界よりも低いところにある可能性が高いと考えられる。そこで、繰り返しの試験において全て大腸菌が不検出だった場合、一定の確率で真の大腸菌濃度のとりうる最大値を推定することが可能となる。

これらの諸条件をもとに、すべての検査において大腸菌が不検出であった結果から保証可能な大腸菌の濃度は以下のように計算される。全ての試験において不検出であったことを一定の出現確率（年間の検査回数を月1回、週1回、毎日1回として）を下回ったとみなして計算すると、対数正規分布における上側確率、すなわち 1/12 (8.3%)、1/52 (1.9%) あるいは、1/365 (0.27%) の値は、平均値（上側確率 50%）からそれぞれ標準偏差（ σ ）の 1.38 倍、2.07 倍、2.78 倍ずつ大きいものと計算される。したがって、年平均濃度（分布の中央値）は、

毎月不検出で	$1.38 \times 0.66 = 0.91 \log_{10}$ 以上
毎週不検出で	$2.07 \times 0.66 = 1.41 \log_{10}$ 以上
毎日不検出で	$2.78 \times 0.66 = 1.81 \log_{10}$ 以上

それぞれ検出限界よりも低いことになる。

以上の計算結果を実際の濃度として表現すると、100ml から毎日不検出の場合の年平均値は、検出限界が 1 個/100ml であることから、 $1 \text{ [個/100ml]} \times 10^{-1.8} = 0.0146 \text{ 個/100ml}$ 未満ということになり、同様に計算すると 290ml から毎週不検出あるいは 840ml から毎月不検出と等価といえることが明らかとなった。現行の規定では、毎月 100ml の試料水中の大腸菌を検査し、不検出であることが水質基準として定められている。先の計算に従うと、この検査によって保証されている真の大腸菌の濃度は、平均値 $1 \text{ [cfu/100ml]} \times 10^{-0.9} = 0.12 \text{ [cfu/100ml]}$ 未満であることとなる。これは、「365 日のうち 335 日以上の不検出」と同じ保証濃度と等価であることになる。

連続的に安定した水質データが得られている場合、サンプリング頻度を減らすことができると考えられる。一方、ある測定時に警告値以上の値が出た場合には、経験的にサンプリング頻度を上げる対応が取られている。これまでの測定では警告値以上かどうかの判定が定性的になされてきたが、その頻度や定量的な意味については検討されずに終わっている。例えば、大腸菌は不検出という規定の中で、大腸菌を 1

個検出した場合と 10 個検出した場合で対応が同じであってよいものか検討の余地がある。直感的には違ってしかるべきと考えられるが、現状では同じ取り扱いとなっているものと思われる。仮に、図 1 の中段のような頻度変更を行った場合、どのような安全性が担保されるのかは不明である。

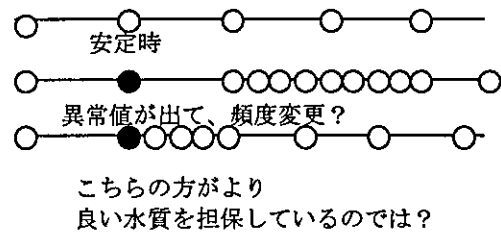


図 1 測定頻度の変更方式

リスク管理の観点から病原微生物濃度の閾値を決めておく。この閾値は後に説明する超過確率の年間平均値と組み合わせて基準の厳しさを規定するものである。閾値単独で意味を持たない。一例として、仮に現行の水質基準から閾値を 1cfu/100ml とすることも可能である。ある測定値が得られた場合、真の微生物濃度の平均値は得られた測定値とある標準偏差での対数正規分布に従うと考えることができる。すなわち、測定値から得られた超過確率をその測定日から次の測定の前日までの代表値とみなせば、代表値にその間の日数を掛け合わせて、それらの年間の総和を年間の日数 (365 日) で割れば超過確率の年間平均値が得られる。

これまでの大腸菌の規制 (= 検出してはならない) に代わり、超過確率の年間平均値を規制対象とすることについて考察する。大腸菌 1 個検出と 10 個検出の場合、それぞれ閾値の超過確率を決定できるので、おのずと異なった扱いが可能である。また、図 2 に模式的に示したように、異常値と思われるような高い濃度が得られたとしても間隔を空けずに試料を採取して調べることにより、真の濃度が低い場合には、異常値の年間平均値に与える寄与を低く抑えることができる。すなわち、検査頻度の変更は図 1 の下段のようなタイミングと頻度が推奨され、これにより安全性の確認が可能となるものと考えられる。

大腸菌とその測定値の意義について検討したが、水道水における大腸菌の測定値が無いため、河川水中の大腸菌群の測定値を用いたため、水道水におけるデータを用いてさらに詳細な検討が必要であり、次年度以降の検討課題にしたい。

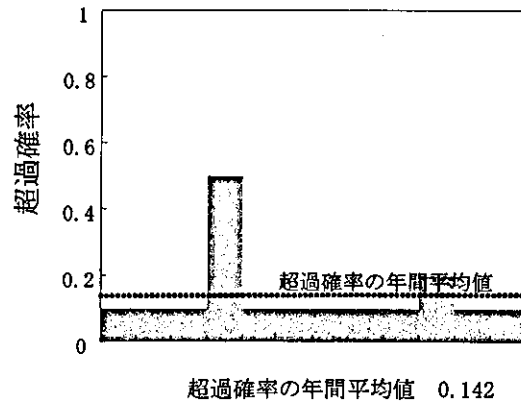
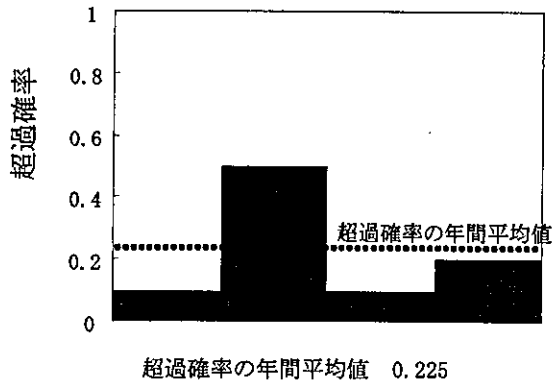


図2 超過確率の年間平均値

2) 耐塩素性微生物検査における試験精度の向上

蛍光顕微鏡と微分干渉顕微鏡の測定精度を高めるための調整方法については次のようである。

蛍光顕微鏡で観察する蛍光抗体染色像の観察において、入手可能な蛍光抗体染色試薬は非特異反応が少ないが、自然界の多様性から染色された粒子のすべてがクリプトスポリジウムのオーシストあるいはジアルジアのシストとは限らない。蛍光抗体試薬はオーシストあるいはシストの表在抗原を認識(結合)するもので、緑色の染色像は必ずドーナツ型となる。

DAPI による核染色において次のことに注意しなければならない。すなわち、新鮮な(活性を保持している)クリプトスポリジウムのオーシストあるいはジアルジアのシストでは DAPI が浸透しないため、核は染色されない。環境中のオーシスト/シストは失活したものも少なくないものと考えられ、しばしば核の染色像が得られる。DAPI による核染色を確実にする目的で試料の熱処理が行われることがあるが、内部構造の変形は避けられない。

植物プランクトンは細胞内にクロロフィルやフィコビリ系色素を含有することから、植物細胞は G 励起下で赤色の蛍光を発することで、原虫と区別することができる。

微分干渉顕微鏡の調整には熟練をようするので、次の点には特に注意を払う必要がある。

- ①ケーラー照明法に準じた光源の調整を行う
- ②被写界深度を浅くして(コントラストを弱めて)、やや暗めの照明で観察する
- ③焦点をずらしながら(擬似断層像として)観察する(被写界深度が深いと擬似断層効果が得られず、クリプトスポリジウムのオーシストや

ストの内部構造が観察できない。

微分干渉像によって検査対象のクリプトスポリジウムやジアルジアの判定はシスト壁に包まれた中の微細構造を観察し、その特徴から「本物」と「ニセモノ」を区別しなくてはならない。クリプトスポリジウムのオーシストでは、シスト壁越しに 4 匹のスポロゾイトを確認することが必要となり、ジアルジアではシスト内に立体配置している各種の微細構造(4 個の核、軸糸(索)、鞭毛あるいは曲刺など)の確認が求められる。

ジアルジアではシスト内に立体配置している各種の微細構造(4 個の核や軸糸)、鞭毛あるいは曲刺などと呼ばれる構造)の確認が求められる。しかしながら、被写界深度が深い状態では特徴的な微細構造は観察できない。被写界深度を浅く設定し、ピントをずらしながら観察すると、特徴的な構造が観察できる。

上記の各項について、蛍光顕微鏡、微分干渉顕微鏡や内部構造を理解させるための電子顕微鏡像等に加え、さらに詳細な試験手順を記載した試験方法マニュアルを作成した。

3) PCR-DGGE 法適用に向けた泳動マーカーの開発

PCR では蛇口水での PCR 増幅が弱い傾向にあったが、DGGE で複数のバンドを検出することが可能であった(図 3)。レーンごとに観察されたバンドの数が明らかに異なっており、微生物叢が多様であるのか、限られているのかを読み取ることが可能であった。原水と活性炭由来では多数のバンドが検出され、一方上水では限られていた。蛇口バイオフィームでは PCR 産物が得られず、風呂バイオフィームでは DGGE のバンドの本数が少なかったが、これは

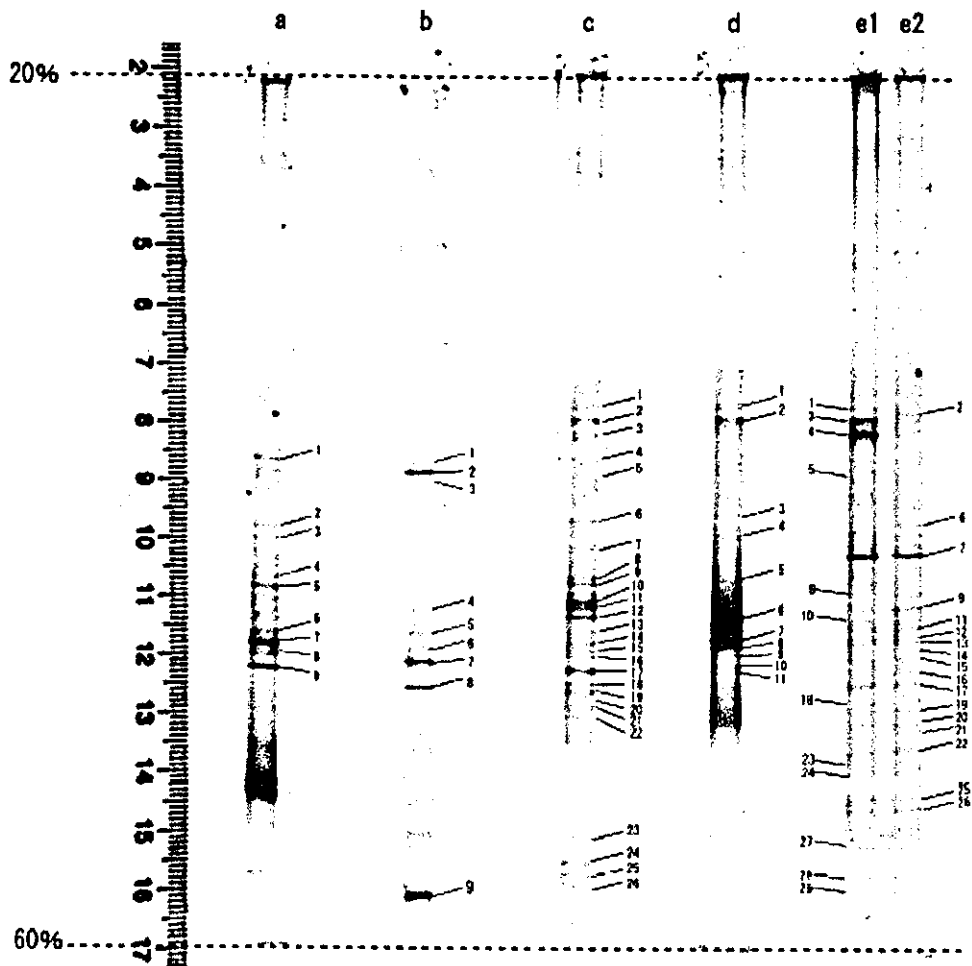


図3 PCR-DGGE 法による試料中の細菌叢解析

a: 蛇口水、b: 風呂バイオフィーム個人宅1、c: 浄水器活性炭、d: 風呂バイオフィーム個人宅2、e: 原水、e1 とe2 は基本的に同じである
バンドに記した番号は以降の塩基配列の解析と対応している

ほとんどバイオフィームのない配管を対象にしたことに起因したと考えられた。蛇口バイオフィームと風呂バイオフィームは試料採取方法の検討が今後の課題となった。

DGGE ゲルから個々のバンドを切り出して塩基配列決定を行なった。得られた配列の同源性検索の結果を見ると、データベースの登録配列と100%一致しない配列が多数存在し、生物の多様性を表しているものと考えられた。

各試料より従属栄養細菌の培養を行った。得られたコロニーを外観から分け、代表的なコロニーからDNA抽出とPCR増幅を行い、塩基配列を得た。培養から得た塩基配列でもデータベースの登録配列と100%一致しない配列が多数存在していた。PGY培地での検出では比較的産生色素が強く観察され、R2A培地と比べて外観の区別がつけ易い傾向が認められた。

得られた塩基配列から系統樹を作成した(図4)。必ずしもDGGEで直接取得された配列と培養法のコロニーから得た配列は完全には一致しないが、近縁の種は分離されており、2つの方法はおおむね対応が取れていると考えられた。完全一致しない理由は、生物の多様性が配列取得の頻度をはるかに上回っていることに由来すると推測され、多数の微生物の一括検出を可能とするPCR-DGGE法の必要性和優位性が改めて認識された。ただし例外的に、培養で検出されなかったグループの存在が認められた(図4下部)。A1のphytoplanktonを中心とした集団では培養検出された配列が近傍に存在しないが、近縁に葉緑体E1が認められ、恐らく光合成細菌等がPGY、R2A培地では検出されないことに対応していると考えられた。また、3箇所(A6-A7-A8、B1-B2-B3、D4-D7-D8)