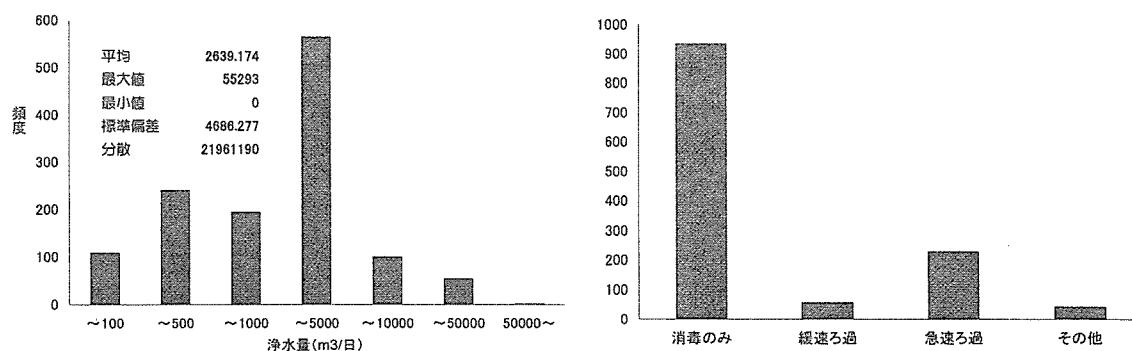


次に、原水水質について検討した。図一七に分布状況を示す。この結果から、過マンガン酸消費量は平均： $10^{0.61}$ 、標準偏差： $10^{0.35}$ の対数正規分布、大腸菌群数は平均： $10^{1.95}$ 、標準偏差： $10^{1.85}$ の対数正規分布に従うことが確認された。

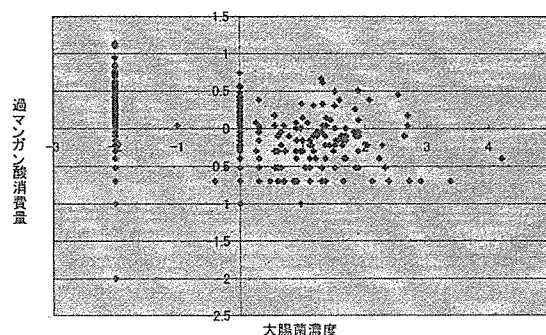
(c) 類型 III

類型 III について、浄水量、処理方式の分布を整理して図一八に示す。類型 III については浄水量平均1,300m³/day程度のシステムで、主要処理方式は消毒のみと特徴付けられた。

次に、原水水質について検討した。図一九に分布状況を示す。この結果から、過マンガン酸消費量は平均： $10^{-0.25}$ 、標準偏差： $10^{0.38}$ の対数正規分布、大腸菌群数は平均： $10^{-1.43}$ 、標準偏差： $10^{1.15}$ の対数正規分布に従うことが示された。



図一八 類型 III に分類された浄水場の浄水量, 処理方式



図一九 類型 III 浄水場原水水質

(d) 類型化のまとめ

2039 の浄水場を 3 種類に類型化し、それぞれの特徴を以下のように整理した：

規模と浄水方式

- 類型 I: 浄水量平均40,000m³/day程度の大規模システム。処理方式は急速ろ過方式。
- 類型 II: 浄水量平均3,000m³/day程度のシステム。主要処理方式は急速ろ過方式
- 類型 III: 浄水量平均1,300m³/day以下の小規模システム。主要処理方式は消毒のみ。

水質変動特性

- 類型 I: 過マンガン酸消費量: 平均： $10^{1.09}$ 、標準偏差： $10^{0.31}$ の対数正規分布
大腸菌群数: 平均： $10^{4.36}$ 、標準偏差： $10^{0.65}$ の対数正規分布
- 類型 II: 過マンガン酸消費量: 平均： $10^{0.61}$ 、標準偏差： $10^{0.35}$ の対数正規分布

大腸菌群数:平均: $10^{1.95}$, 標準偏差: $10^{1.85}$ の対数正規分布
 類型 III: 過マンガン酸消費量:平均: $10^{-0.25}$, 標準偏差: $10^{0.38}$ の対数正規分布
 大腸菌群数:平均: $10^{-1.43}$, 標準偏差: $10^{1.15}$ の対数正規分布

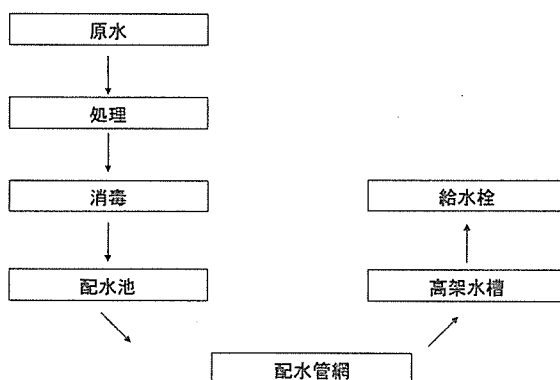
(2)原水質から給水質を予測するシミュレーションモデルの構築

(2-1) モデルの概要

原水の水質から給水栓水質を推定するためには、図—10に示すような、システムを構成する要素についてモデル化する必要がある。以下、本研究で実施したモデル化について記述する。

給水栓における水道水質にかかわるリスクの予測においては、病原微生物に関連するリスクと消毒副生成物等の化学物質に関連するリスクを検討する必要がある。本報告では病原性リスクに関するリスクを取り上げる。病原性微生物によるリスクは

- ① 原水中に含まれていた病原性微生物が処理/消毒過程、配水系において残留して、給水栓に到達することに起因する場合。昨年度の検討をもとに、検討対象の病原性微生物はカンピロバクター、ノロウィルス、クリプトスポリジウムとした。
- ② 配水系、水槽系における微生物の再増殖に主として起因する場合。検討対象はレジオネラを想定しているが、現段階で微生物の再増殖とレジオネラの定量的な関係が不明のため、本報告では、微生物の再増殖をシミュレーションの対象とした。



図—10 モデルの概要

(2-2)原水水質モデル

前章で実施した、浄水場の類型化の項で示した結果を再掲する。水質の変動は対数正規分布に従う。

表—1 原水水質モデル

	浄水量 (m ³ /day)	大腸菌群数 (MPN/100mL)	過マンガン酸カリウム消費量 (mg/L)
タイプ1	4.20×10^4	平均 2.94×10^4 標準偏差 4.78	平均 12.6 標準偏差1.99
タイプ2	3.16×10^3	平均 140 標準偏差 45	平均 3.98 標準偏差2.24
タイプ3	1.26×10^3	平均 25 標準偏差 5.62	平均 0.63 標準偏差 2.81

(2-3) 処理・消毒モデル

① 過マンガン酸カリウム消費量の除去率

原水と浄水の過マンガン酸消費量の関係を調べ、その除去率を統計的に定めることを試みた。図-11(a), (b), (c)に類型 I, II, III それぞれの原水と浄水の過マンガン酸カリウム消費量の関係を示す。

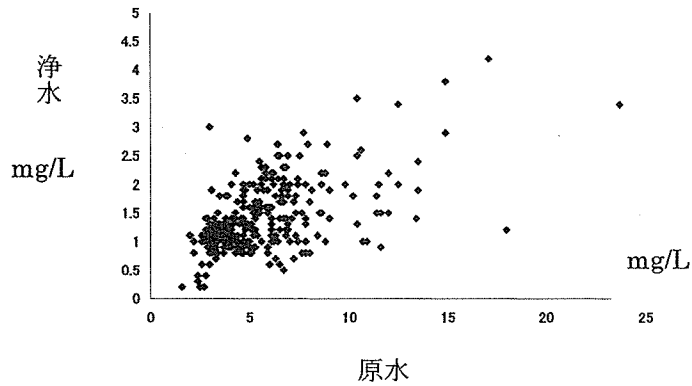


図-11(a) 類型 I 過マンガン酸消費量の関係

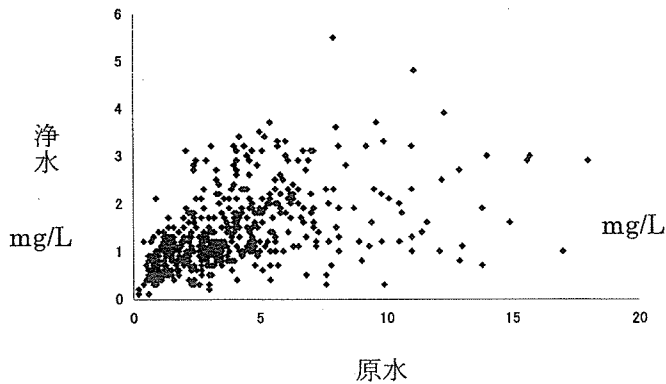


図-11(b) 類型 II 過マンガン酸消費量の関係

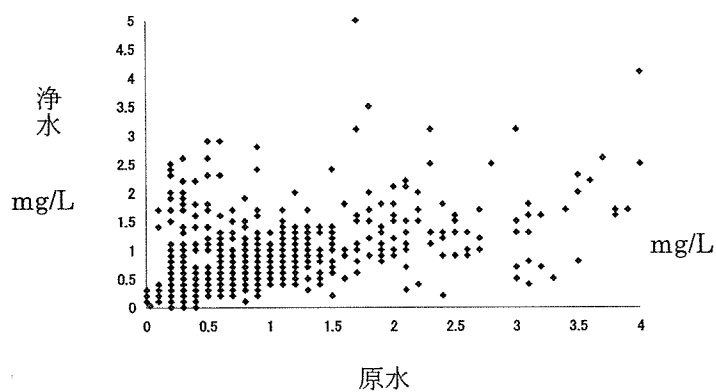


図-11(c) 類型 III 過マンガン酸消費量の関係

これらの図より類型 I と類型 II については原水と浄水の過マンガン酸消費量に一定の関係があることから、除去率を求めることが可能であると判断された。また、正規確率紙を使い、除去率の値の分布をプロット(図-12)してみたところ、類型 I, II について除去率は表-2のような正規分布

で記述可能であることが確認された。一方、類型 III については、原水と浄水中の過マンガン酸消費量に関係が見られず、値が上昇している浄水場なども散見された。そこで、シミュレーションでは除去率 0 とした。

表-2 過マンガン酸消費量の除去率

除去率	類型 I	類型 II	類型 III
平均	0.735	0.575	—
標準偏差	0.11	0.275	—

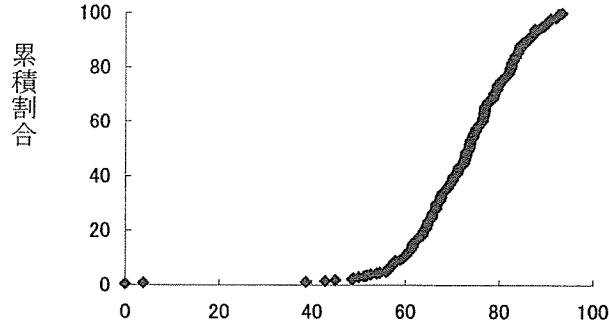


図-12 過マンガン酸カリウム除去率の累積度数分布

②病原性微生物の除去率

(a) 大腸菌群数と病原性微生物数の関係

文献1), 2), 3)により, 表-3のように大腸菌群数と病原性微生物菌数の関係を定めた。

表-3 大腸菌群数と病原性微生物数の関係

大腸菌群数:大腸菌	10 ² :1
大腸菌:細菌	10 ⁵ :1
大腸菌:ウイルス	10 ⁵ :1
大腸菌:原虫	10 ⁶ :1

次に, 処理方式(緩速ろ過, 急速ろ過, 塩素消毒)ごとの細菌, ウイルス, 原虫の除去率を文献により定めた^{4), 5)}(表-4)。なお, シミュレーションではモンテカルロ法により, 除去率の変動を考慮した。

表-4 病原性微生物の除去率

	緩速ろ過	急速ろ過	塩素消毒
細菌	22~97%	98~99.9%	99.9~99.99%
ウイルス	22~97%	98~99.9%	99.9~99.99%
原虫	-	2~2.5log	
		-	85~95%

(2-4) 配水池, 配水管網, 高架水槽モデル

①微生物再増殖モデル

塩素以外の消毒剤を考えると、配水過程や給水過程における微生物の再増殖の問題が挙げられる。その代表例としてレジオネラがある。レジオネラは通常はわずかではあるが自然水中によく見受けられ、飲料水の基準に適合する処理を施された水の中でも生殖し増殖が可能である。レジオネラは水道の浄水システムと配水システムの中で条件が整えば増殖することが可能である。水道水中で増えたレジオネラ菌の細菌は、散発的にあるいは少数が建物内に入り、配管や冷却システムに定着することが可能である。これらのことから消毒剤を変えたときの蛇口における水質を評価するために浄水、配水システムで微生物がどのように増殖するのかを知るためのモデルが必要になる。

本報告では Munavalli の論文⁶⁾ を参考に配水系モデル (図-13) を作成した。このモデルは配水システム中でのバクテリアの再増殖を表現するモデルとしてマルチコンポーネント反応輸送モデルを提案している。このモデルは、微生物増殖の現象は有機物と消毒剤の塩素との関係によって支配されることを前提に、流水部とパイプ壁での基本プロセス (例えば微生物増殖と不活化, パイプからの吸着と脱着, 基質利用, 消毒) について簡略された式を利用している。

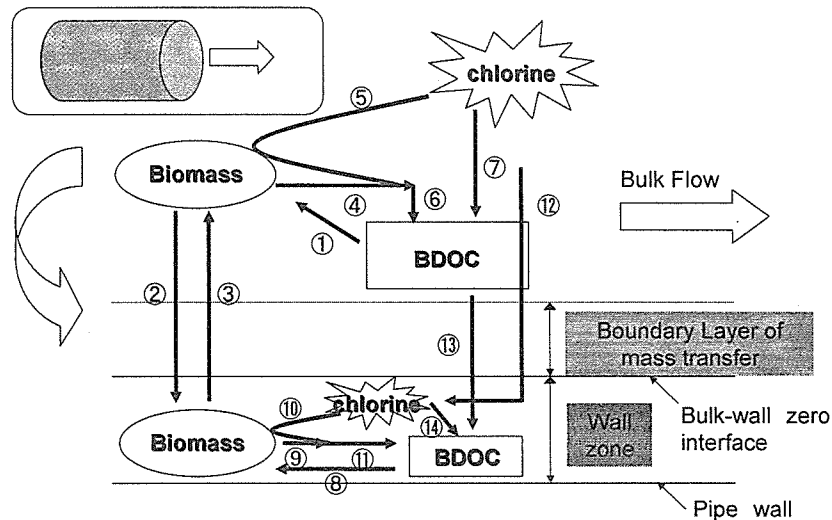


図-13 モデルの概要

流れ部の基本方程式:

$$\frac{\partial S_{bi}}{\partial t} + v_i \frac{\partial S_{bi}}{\partial x} = -\mu \frac{S_{bi}}{k_s + S_{bi}} (X_{bi} e^{-k_{inact} C_{bi}}) - \frac{k_{fbi} (S_{bi} - S_{wi})}{r_{hi}} + a(k_{mort} + k_{cl} c_{bi}) X_{bi}$$

$$\frac{\partial X_{bi}}{\partial t} + v_i \frac{\partial X_{bi}}{\partial x} = Y\mu \frac{S_{bi}}{k_s + S_{bi}} (X_{bi} e^{-k_{inact} C_{bi}}) + k_{shear} X_{wi} - (k_{mort} + k_{cl} c_{bi}) X_{bi} - k_{fix} X_{bi}$$

$$\frac{\partial C_{bi}}{\partial t} + v_i \frac{\partial C_{bi}}{\partial x} = -k_{b,li} C_{bi} - \frac{k_{fci} (C_{bi} - C_{wi})}{r_{hi}}$$

壁面部の基本方程式：

$$\frac{dS_{wi}}{dt} = -\mu \frac{S_{wi}}{k_s + S_{wi}} (X_{wi} e^{-k_{inact} C_{wi} / k_{r2}}) + a(k_{mort} + \frac{k_{cl} C_{wi}}{k_{r1}}) X_{wi} + \frac{k_{fsbi} (S_{bi} - S_{wi})}{r_{hi}}$$

$$\frac{dX_{wi}}{dt} = Y\mu \frac{S_{wi}}{k_s + S_{wi}} (X_{wi} e^{-k_{inact} C_{wi} / k_{r2}}) + k_{fix} X_{bi} - (k_{mort} + \frac{k_{cl} C_{wi}}{k_1}) X_{wi} - k_{shear} X_{wi}$$

$$\frac{dC_{wi}}{dt} = -\frac{k_{w21i} C_{wi}}{r_{hi}} + \frac{k_{fcl} (C_{bi} - C_{wi})}{r_{hi}}$$

なお、 S_b はバルク側の有機物量、 X_b はバルク側の菌体量、 C_b は塩素量

S_w は壁側の有機物量、 X_w は壁側の菌大量、 C_w は塩素量である。

これらの方程式を図-14のように差分化して、コード化した。

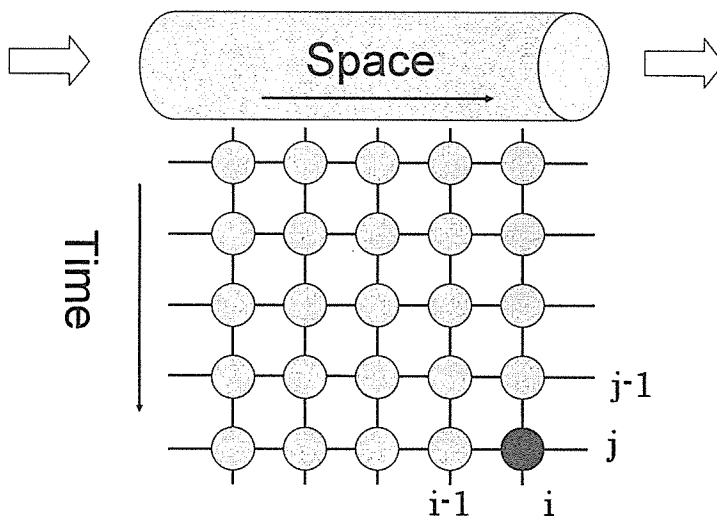


図-14 差分化のスキーム

② 過マンガン酸カリウム消費量とBDOCの関係

配水管網における微生物再増殖を検討するためには、生物分解可能な有機物量 (BDOC) の値を知る必要がある。そこで、本研究では、過マンガン酸消費量→TOC→BDOCの順に推定する方法を用いた。

すなわち、平成14年度厚生科学研究・分担研究報告書「WHO飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究」⁷⁾によると、過マンガン酸カリウム消費量とTOCの間に次のような相関が見られることが知られている。

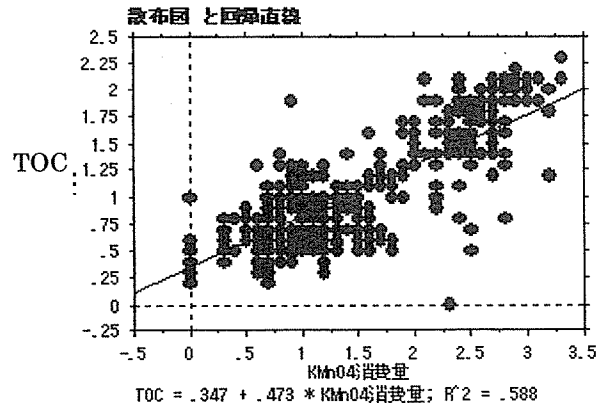


図-15 過マンガン酸カリウム消費量とTOCの相関

すなわち、浄水では

$$Y=0.47X+0.35 \quad (R^2=0.588)$$

Y : TOC (mg/L) X : 過マンガン酸消費量 (mg/L)

という関係が存在している。

また、Munavali ら⁶⁾によれば、BDOC=30% of TOC と報告されている。

③大腸菌群数と一般細菌数の関係：

シミュレーションでは、微生物の再増殖量の推算を行う。このため、処理モデルで求められる大腸菌群数値から他栄養細菌を推算する必要がある。そこで、統計データより、一般細菌数と大腸菌群数の関係を整理した。結果を図-16に示す。

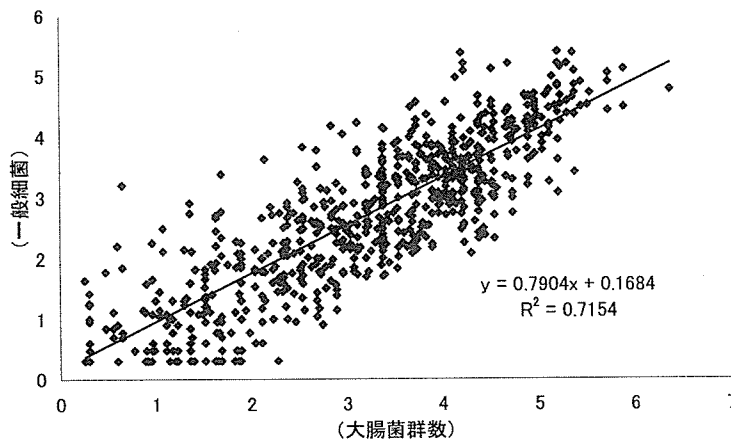


図-16 大腸菌群数と一般細菌

図の結果より、大腸菌群数と一般細菌の関係がオーダーで同じになったので大腸菌群数≒一般細菌と考えることとする。また、一般細菌の除去率は原水と浄水の関係を見ると原水で平均 1215、浄水で平均 1.125 であることから浄水場においておおよそ 3log 除去されるものとした。

(2-5)シミュレーション結果

① 配水管網の設定

配水区規模の設定

類型ごとに配水区の大きさが異なることから、まず、給水量と配水人口の関係を整理した(図-17)。次に、人口と面積の関係を整理した(図-18)。これらの関係を用いて、類型ごとに人口、配水区面積を表-5のように定めた。

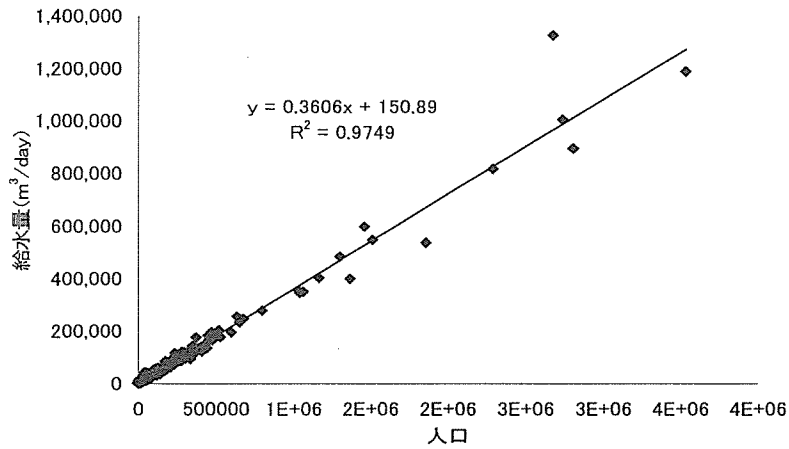


図-17 配水人口と給水量の関係

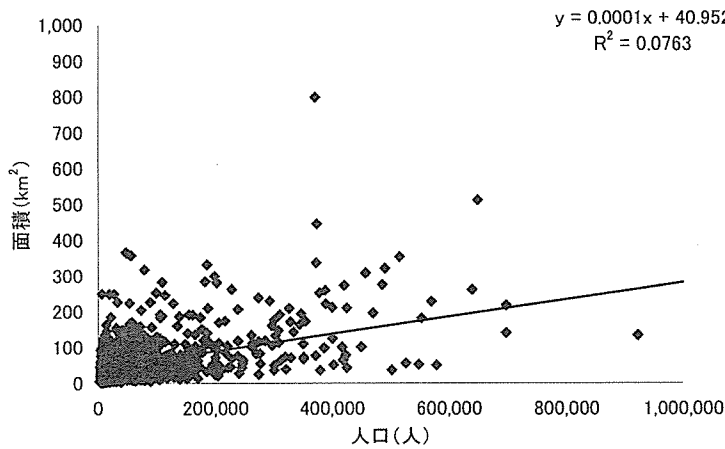


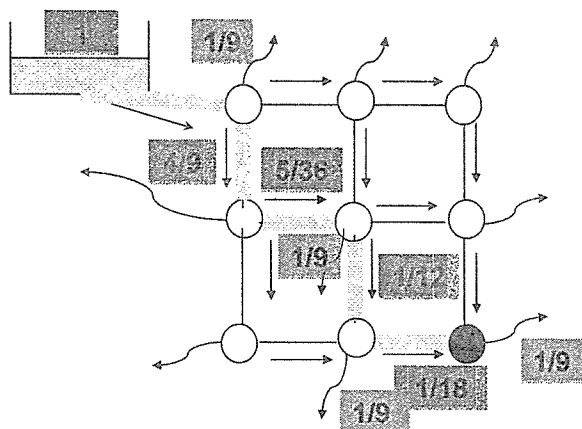
図-18 人口と面積の関係

表-5 各類型に設定した配水区面積

	面積(km ²)
類型Ⅰ	8
類型Ⅱ	5
類型Ⅲ	4

配水管網の設計:

次に、シミュレーションのための配水管網を設計するために図—19のような正方形の管網を設定することとした。



図—19 配水管網の構造

次に、図中の9つの節点に人口を等配分した。また、消火用水も次のように考慮した。

1. 配水池の受持つ計画給水人口が 50000 人以下のものについては、原則として、配水池容量の設計にあたって、消火用水量を加算する。
2. 配水管の受持つ給水区域内の計画給水人口が 100000 人以下のものについては、原則として、配水管管径の設計にあたって、消火用水量を加算する。

また、各管路の直径の推算では、次のような方針によった。管径の計算ではヘーゼン・ウィリアムス式（流量係数 110 とした）を用いた。

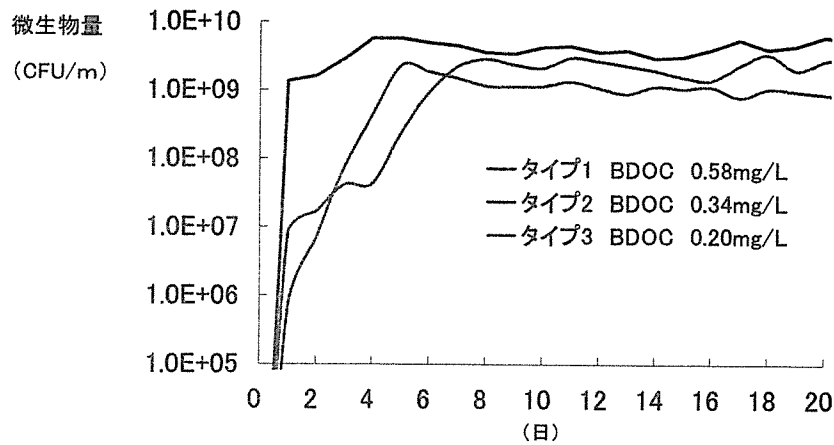
1. 管路の動水圧は、平常時においては、その区域に必要な最小動水圧以上になるよう、かつ水圧の分布ができるだけ均等になるように決定する。
2. 管径の算定にあたっては、配水池、配水塔及び高架タンクの水位はいずれも低水位をとる。

② 塩素の残留効果がない場合の微生物再増殖のシミュレーション

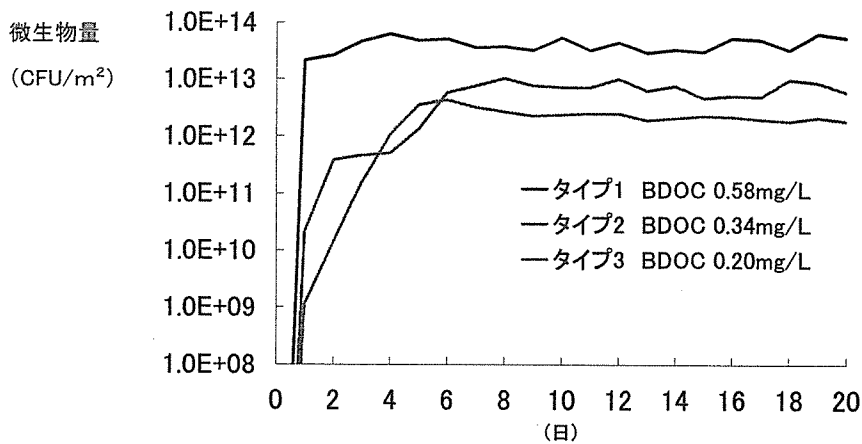
シミュレーションでは、原水モデル→処理/消毒モデル→配水池+配水管網+高架水槽モデルを用い、モンテカルロ法により、乱数を発生させることにより、原水水質の変動、処理効率の変動を表現した。

壁面付着微生物量の経日変化

はじめにパイプ壁面付着微生物量（図—20）、高架水槽壁面付着微生物量（図—21）の経日変化の計算結果を示す。計算結果より、パイプの壁における微生物量は約 1 週間程度で安定することがわかった。また、その後長期的なシミュレーションを行っても大きな変化は見られなかった。浄水場の規模により 3 つのグループに類型化して、シミュレーションしているが、規模と原水水質との相関があり、大規模（グループ I）ほど、配水池に供給される浄水中の BDOC の値が高くなっている。しかし、この有機物濃度の差は壁面付着微生物量に大きく影響しない結果となっている。



図—20 パイプ壁面付着微生物量の経日変化

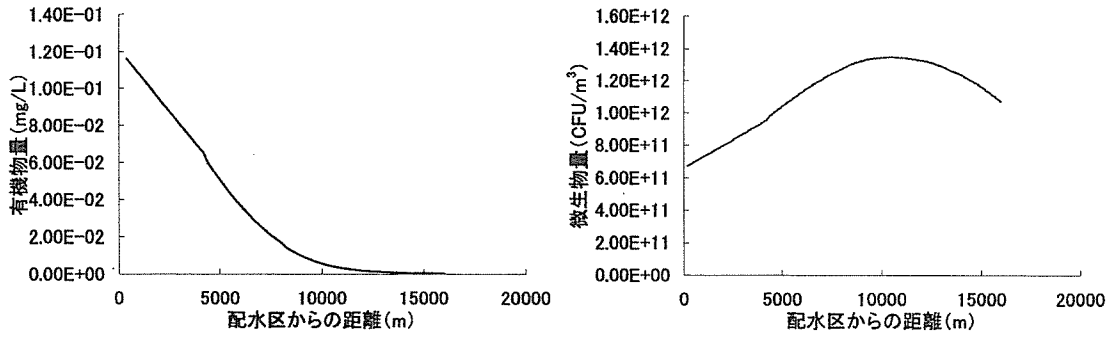


図—21 高架水槽壁面付着微生物量の経日変化

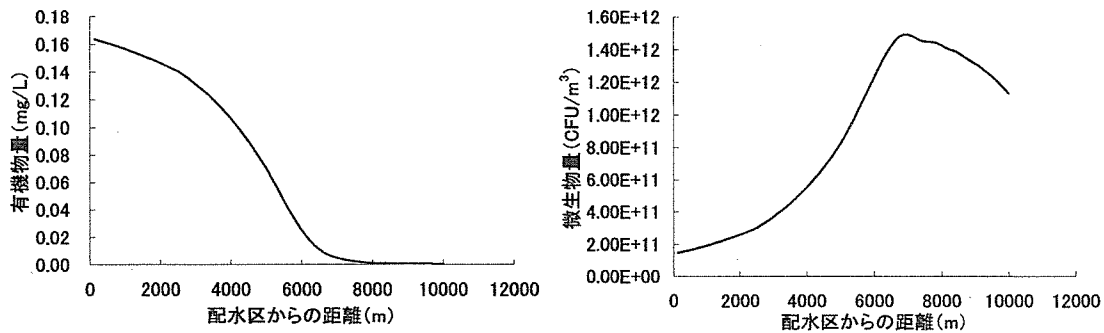
パイプ内の有機物、微生物量の変化

次に、配水管網内の微生物量がほぼ一定になった後の、管網内の有機物濃度、微生物濃度の空間分布の計算例を図—22（類型 I）～24（類型 III）に示す。管網規模の大きな類型 I の場合、配水池から約 10,000m～15,000m の位置で生物分解可能な有機物はほぼ消費され、その地点で微生物濃度が最大値を示している。

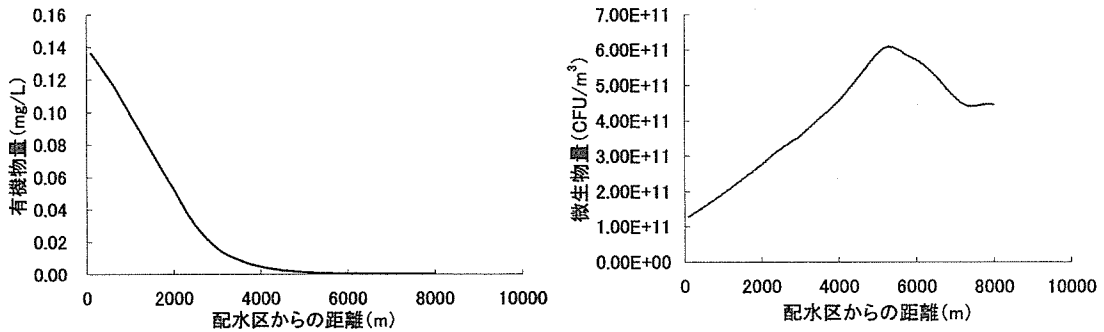
他の類型においても、同じような傾向を示しているが、類型 II、類型 III と規模が小さくなるに従い、原水水質が良くなり、配水池に供給される浄水中の有機物レベル、一般細菌数も低くなることから、有機物濃度がゼロ、微生物濃度が最大となる地点は配水池により近い場所となっている。



図—22 配水管網内の有機物濃度, 微生物量(類型 I)



図—23 配水管網内の有機物濃度, 微生物量(類型 II)



図—24 配水管網内の有機物濃度, 微生物量(類型 III)

③ 病原微生物によるリスク評価(現状評価)

病原性微生物による健康リスクの推算を実施した。各類型ごとに、原水モデル+処理/消毒モデルに加え、配水管網内で病原微生物濃度の変化が無いと仮定して、モンテカルロシミュレーションを実施した。暴露のシナリオとしては、1人1日2L摂取すると仮定した。対象微生物は前年度の検討から、カンピロバクター、ノロウイルス、クリプトスポリジウムとした。

シミュレーションでは50年間の感染リスクとDALYの期待値を計算した。感染リスクは大腸菌群数、過マンガン酸カリウム消費量の原水質を日々変化させ、1日の感染リスクを求めた。50年間でそれぞれ1人が1回以上感染する確率を求めた。

$$\text{感染リスク} = 1 - \Sigma (1 - P(D))$$

$$\text{DALYs} = \Sigma P(D) \times \text{感染リスク}$$

また感染リスクを計算するときに使用したそれぞれの病原性微生物の用量反応式を表-6に示す。

表-6 用量反応式

病原性微生物	方程式	パラメータ
カンピロバクター	$P(D)=1-(1+D/\beta)^{-\alpha}$ Beta-poisson	$\alpha = 0.145$ $\beta = 7.59$
ノロウイルス	$P(D)=1-e^{-(D/\kappa)}$ Exponential	$\kappa = 14.5$
クリプトスポリジウム		$\kappa = 35.2$

シミュレーション結果

本報告では現状の評価，すなわち，現状の原水水質データ+塩素消毒を行っているとして，DALY値の推算を行った。結果を図-24～26に示す。なお，図中の点線はWHOの許容値（ 1.0×10^6 DALY/year/person）を示している。また，図中棒の上端は5%値，下端は95%値，箱の上端は25%値，下端は75%値を示している。計算では，50年間のDALYの期待値を算出し，その対数値を取ることで比較を行った。

WHOの許容値と推算結果を比較すると，カンピロバクター，ノロウイルス，クリプトスポリジウムのすべてにおいて許容値内であることがわかる。これにより今回構築したモデルはある程度現状を評価できるものではないかと推測された。ただし，今回の結果の数値をどのように評価するかには課題が残っている。

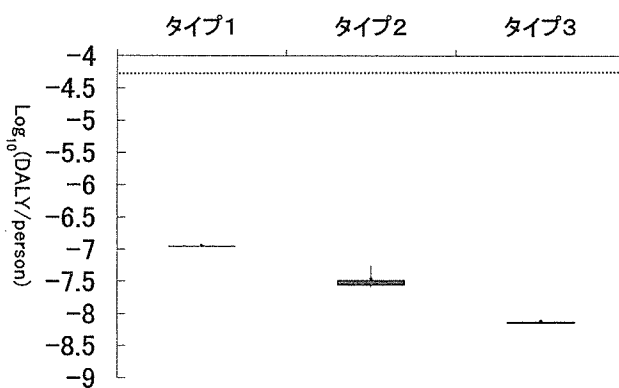


図-24 カンピロバクターによるリスクの推算結果

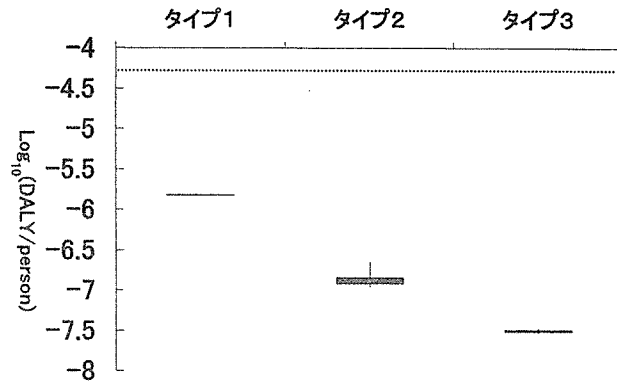


図-25 ノロウイルスによるリスクの推算結果

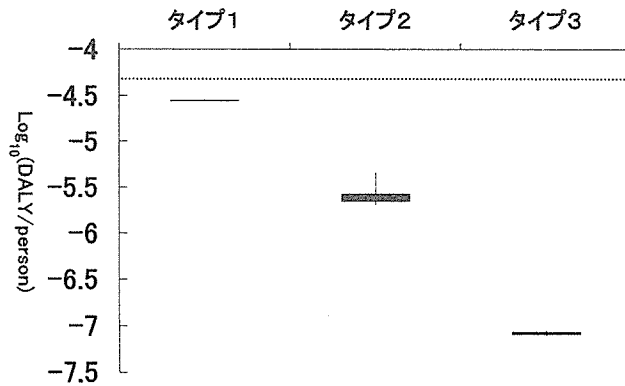


図-26 クリプトスポリジウムによるリスクの推算結果

今後の研究計画

2007年度はこれまで開発したシミュレーションモデルを用い、類型化した3つの規模の異なるシステムについて、下記の検討を行う予定である。

(1) 長期シミュレーションによる残留塩素非依存系の健康リスク評価

- ・ 平常時、火災時、制限給水時(時間給水、減圧給水等)、事故時について各要因の健康リスクへの寄与を定量的に評価
- ・ それぞれの生起確率を用いて50~100年スケールでの健康リスクの総合化を図る

(2) 残留塩素系と非残留塩素系の比較

- ・ 平常時について、残留塩素系と非残留塩素系についてDALY値を用いた比較
- ・ シミュレーション対象は各類型から選択

(4) 給配水系の構造・消毒法と健康リスクの関係

参考文献

- 1) 厚生科学審議会生活環境水道部会水質管理専門委員会
- 2) APSU: Quantitative health risk assessment 2.2006
- 3) 金子光美: 水環境学会誌 No. 29 (2006)
- 4) 金子光美 飲料水の微生物学 p298, p 327~354
- 5) Review paper Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and

Giardia , Journal of Japan Society on Water Environment(Vol29 2006)

6) G.R.Munavalli, M.S.Mohan Kumar: Dynamic simulation of multi-component reaction transport in water distribution systems, water research, 2004

7)平成14年度厚生科学研究・分担研究報告書「WHO 飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究」

分担研究報告書 2

消毒副生成物によるリスクの総括的評価および塩素使用と
免疫毒性の関連に関する検討

分担研究者 伊藤 禎彦

研究協力者 大河内 由美子、高橋 恭介、石川 卓

厚生労働科学研究
「残留塩素に依存しない水道の水質管理手法に関する研究」
分担研究報告書

消毒副生成物によるリスクの総括的評価および塩素使用と免疫毒性の関連に関する検討

分担研究者 京都大学大学院工学研究科 伊藤 禎彦
研究協力者 京都大学大学院工学研究科 大河内由美子, 高橋恭介, 石川卓

研究要旨

消毒副生成物全体の総括的な毒性評価を目的として、昨年度の染色体異常試験に引き続き、クロロ酢酸類およびSRNOM塩素処理水投与による形質転換試験を行った。また、クロロ酢酸類の動物実験データ(慢性毒性試験)結果ならびに形質転換試験結果との相関性に基づいて、SRNOM塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の毒性推定を試みた結果、染色体異常誘発試験と比較して形質転換試験において毒性が高く評価されること、またその毒性は未知の成分も含めて平均的にクロロ酢酸と同程度かやや強いと判断された。一方、塩素使用と免疫毒性との関連に関する基礎検討として、強い免疫毒性物質として知られるエンドトキシンの浄水処理過程における挙動を調べるとともに、水試料中の有機物特性に基づいた分画・濃縮により、毒性画分のスクリーニングを行った。これらの結果、エンドトキシンは急速ろ過プロセスにより大部分が除去されるものの高度浄水処理水中にも残存していること、微生物細胞の状態とエンドトキシンの存在形態には密接な関係が見られること、さらには浄水中のエンドトキシンが含まれる高分子有機物画分にヒト細胞に対する細胞毒性が確認されることが明らかとなった。

A. 研究目的

消毒副生成物の染色体異常誘発性に対するトリハロメタンやハロ酢酸など個別物質の寄与率は、それぞれ高く見積もっても数%であり、非常に小さいことが明らかになっている。すなわち、消毒副生成物全体の毒性に対して、現在規制されている物質以外のものの毒性が大半を占めていると考えられ、包括的な毒性評価が求められる。一方で、原水中、および浄水処理プロセスや水道水中には、生菌や不活化された微生物、あるいはそれらが放出した物質が存在しており、消毒剤の使用によるこれらの物質の化学変化と免疫毒性の関係が指摘されている。本研究では、塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物(TOX)の毒性をバイオアッセイの結果から推定することを試みるとともに、微生物(グラム陰性細菌・シアノバクテリア;不活化されたものを含む)の細胞外膜構成物質に起因する生物活性(エンドトキシン)に着目し、浄水処理過程における挙動を調べる。エンドトキシンはヒトの細胞においてもToll-likeレセプターを介して強い免疫反応を惹起する化学物質である。

B. 研究方法

1) 消毒副生成物によるリスクの総括的評価に関する検討

形質転換試験によるSRNOM塩素処理水の毒性評価

9種類のハロ酢酸化合物を対象として、形質転換試験を行った。試験は、マウス線維芽細胞、BALB/3T3A31-1-1を用いて行い、予め3-メチルコラントレンを作用させてイニシエーション処理を行った後に試料投与を行う2段階形質転換試験、またイニシエーション処理を行わずに直接試料投与を行う非2段階形質転換試験を並行して実施した。非2段階形質転換試験の実施により、発がん過程におけるイニシエーション・プロモーションの両活性を併せ持つ物質を検出することが可能になり、発がん性に関する総合的な指標となりうる。投与濃度は、プロモ酢酸で0.05, 0.1, 0.3, 0.5 mg/L, クロロ酢酸およびトリプロモ酢酸では1, 3, 5, 10 mg/L, ジプロモ酢酸で3, 5, 10, 30, 50 mg/L, これら以外のハロ酢酸では10, 30, 50, 100 mg/Lに設定した。37℃, 5% CO₂下で試料曝露・培養を2週間行った後、メタノールによる細胞固定な

らびにギムザ染色により標本を作成し、この標本を顕微鏡により観察して形質転換巣（フォーカス）の出現率を形質転換率として算出した。

また、消毒副生成物の総括的な毒性評価を行うため、以下の方法で消毒副生成物模擬混合溶液を調製した。Suwannee River Natural Organic Matters (SRNOM) を、International Humic Substance Society (IHSS) より購入し、水酸化ナトリウム抽出を行った後、pH 7.0、リン酸緩衝液濃度 100 mM、TOC=1000 mg-C/L となるように調製した。さらに、初期塩素濃度が 1500 mg-Cl₂/L となるように次亜塩素酸ナトリウムを加え、暗所・20 °C で 24 時間静置した。以下、この塩素処理水を SRNOM 塩素処理水と称する。

調製した SRNOM 塩素処理水を蒸留水により希釈し、上記の方法により 2 段階形質転換試験、非 2 段階形質転換試験をそれぞれ行った。投与濃度（培養液中最終濃度）は、TOC で 10 ~ 1000 mg C/L、TOX で 0.321 ~ 32.1 mg Cl₂/L である。

形質転換試験結果に基づいた SRNOM 塩素処理水の毒性推定

当研究室で形質転換試験を実施したハロ酢酸類 9 種のうち、動物実験によるリスク評価が行われているクロロ酢酸類 3 種 (MCA, DCA, TCA) を対象として、バイオアッセイ結果と動物実験結果との相関関係を求めた。動物実験結果は、前年度行った文献考察の成果を用いた。

2) 塩素使用と免疫毒性との関連性に関する検討

浄水処理過程におけるエンドトキシンの挙動

調査対象施設として、琵琶湖・淀川水系から取水を行っている A 浄水場を選定した。本施設は、急速ろ過プロセスに加えてオゾン-活性炭処理を併用した高度浄水処理施設である。採水は 2006 年 11 月～12 月に計 3 回実施し、1) 取水口付近の河川、2) 着水井、3) 凝集剤添加前、4) 凝集沈殿後、5) 急速ろ過後、6) オゾン処理後、7) 活性炭吸着塔流出水、8) 塩素混和後の計 8 箇所 (図 1 参照) を対象とした。各試料は 4°C 保冷下で持ち帰り、4 時間以内に以下の各項目の測定に供した。

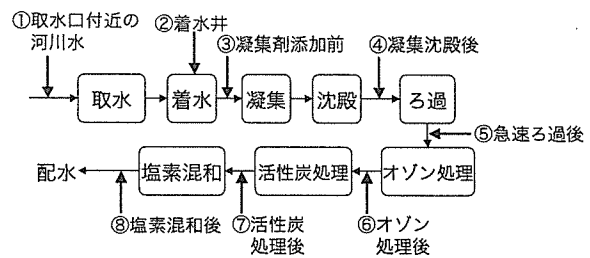


図 1 A 浄水場における採水地点

- ・微生物量 (一般生菌数 (標準平板)・従属栄養細菌数 (R2A 平板)・全菌数 (DAPI 蛍光染色))
- ・TOC, E260, 濁度, pH
- ・総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン

ヒト培養細胞を用いた免疫毒性画分のスクリーニング

本研究では、水中物質の経皮曝露による免疫毒性発現を想定し、正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocyte; NHEK (B), Adult Breastskin, クラボウ) をアッセイ細胞として選定した。まず、エンドトキシン試料として *E. coli* B55:O5 由来の精製リポ多糖 (LPS; Aldrich) をエンドトキシンフリー水で溶解し、予め 96well マイクロプレートに播種・24 時間の前培養を行った NHEK に所定濃度となるよう曝露した。曝露濃度は 0 ~ 50 µg-LPS/mL とした。別途、この LPS 溶液のエンドトキシン活性を測定した結果から、この曝露濃度は 0 ~ 6.5 × 10⁵ EU/mL に相当すると考えられる (1 ng-LPS=13 EU 換算)。曝露時間は 48 時間とし、曝露終了後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories) を用いて生細胞数の測定を行った。

続いて、京都大学吉田キャンパス内の実験室水道水 3L の分画と濃縮を図 2 に示す方法で行った。各試料を 1) 高分子

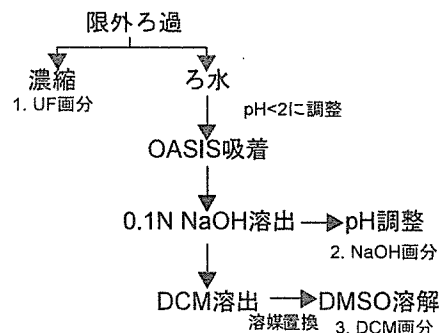


図 2 分画・濃縮方法

有機物画分, 2) 低分子親水性有機物画分, 3) 低分子疎水性有機物画分の3種類に分画し, それぞれの画分の濃縮を試みた。高分子有機物画分は, 分画分子量 10,000 の限外ろ過膜を使用して濃縮を行った。さらに, 予め酢酸エチル/メタノールでコンディショニングしておいた OASIS HLB カートリッジ (Waters) に対して, pH<2 に調整したろ液を通水し, 低分子有機物群を吸着させた後に, 0.1N NaOH 溶液により親水性画分の溶出を行った。カートリッジの通気乾燥を行った後に, ジクロロメタンにより疎水性画分の抽出を行い, 抽出物の溶媒を DMSO に置換した。調製した試料をエンドトキシンフリー水により適宜希釈した後に, 上記方法と同様に NHEK (B) に曝露し, 48 時間後の細胞生存率を測定した。さらに, 前述の A 浄水場 3 地点 (2) 着水井, 5) 急速ろ過後, 7) 活性炭吸着塔流出水) において採取した水試料 (5L) に対して, 上記と同様の手法で分画・濃縮ならびに細胞毒性試験を行った。

C. 結果

1) 消毒副生成物によるリスクの総括的評価に関する検討 形質転換試験による SRNOM 塩素処理水の毒性評価

SRNOM 塩素処理水の形質転換試験結果を図 3 に示す。2 段階/非 2 段階の両試験ともに, TOC=1000 および 500 mg-C/L (培養液中の TOX 濃度換算値は, それぞれ 32.1 mg-Cl/L, 16.1 mg-Cl/L) の試料を投与した系では, 試験期間終了までに細胞が死滅していた。形質転換試験においては, 試料曝露期間が 2 週間と長いため, より低濃度において細胞毒性作用が現れたと考えられる。

この結果に基づいて, 形質転換率が 0.1 を超過する TOX 濃度を算出した。その結果, 2 段階形質転換試験では 0.83 mg-Cl/L, 非 2 段階形質転換試験では 0.71 mg-Cl/L と同程度の値が得られた。これらの値は, 昨年度報告した SRNOM 塩素処理水による染色体異常誘発試験結果 (D₂₀=33.3 mg-Cl/L) と比較して非常に低い濃度であり, SRNOM 塩素処理水の毒性は形質転換試験において高く評価されることが示された。

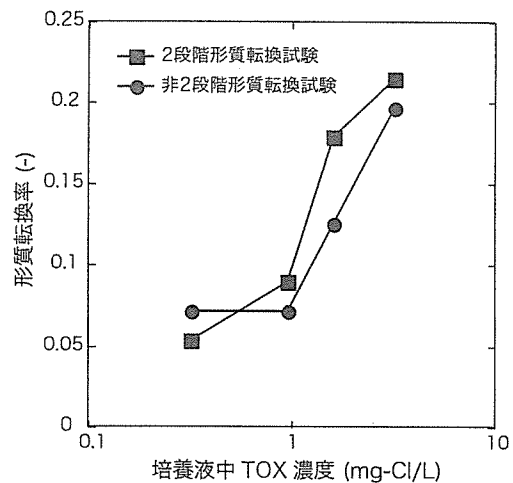


図 3 SRNOM 塩素処理水の形質転換試験結果

2) 塩素使用と免疫毒性との関連性に関する検討

浄水処理過程におけるエンドトキシンの挙動

浄水処理過程における微生物計数結果ならびにエンドトキシン活性の変化を表 1 に示す。ここでは 3 回調査を行った結果の平均値を示している。着水井における総エンドトキシンの平均値は 75.1 (EU/mL), 遊離エンドトキシンは 38.7 (EU/mL) であった。着水井におけるこれらの値を基に, 各プロセスにおける除

表 2 浄水処理過程における微生物量・エンドトキシン量の変化

採水地点	一般生菌数(SPC)		従属栄養細菌数(HPC)		全菌数(DAPI)*		総エンドトキシン		遊離エンドトキシン	
	測定値(cfu/mL)	除去率(%)	測定値(cfu/mL)	除去率(%)	測定値(cells/mL)	除去率(%)	測定値(EU/mL)	除去率(%)	測定値(EU/mL)	除去率(%)
取水口付近河川	1144		22572		8.96E+05		56.22		35.63	
着水井	1359	0.0	17534	0	8.45E+05	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0
凝集剤添加前	1481	-9.0	22972	-31.0	9.91E+05	-17.3	78.16	-4.1	38.41	0.8
凝集沈殿後	255	90.2	1502	122.4	2.01E+05	93.5	11.63	88.6	5.67	84.5
急速ろ過後	63	14.1	590	5.2	1.35E+05	7.9	10.26	1.8	7.30	-4.2
オゾン処理後	0	4.7	0	3.4	1.05E+03	15.8	6.645	4.8	7.04	0.7
活性炭吸着後	5	-0.4	238	-1.4	2.28E+04	-2.6	10.98	-5.8	8.44	-3.6
塩素混和後	0	0.4	0	1.4	5.07E+03	2.1	9.66	1.8	11.82	-8.7

去率をそれぞれ算出した。これらの結果から、各手法で測定した微生物計数（一般細菌数 (SPC)・従属栄養細菌数 (HPC)・全菌数 (DAPI)), 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシンともに凝集・沈殿処理により良好に除去されることがわかった。急速ろ過プロセスにおける平均除去率は、総エンドトキシンで 86.2% (78.1 ~ 92.8%) であったのに対して、遊離エンドトキシンでは 79.5% (65.1 ~ 95.5%) と若干低い値を示した。一方、微生物計数結果から算出される平均除去率は、一般細菌数で 90.3%, 従属栄養細菌数 (HPC) で 91.9%, 全菌数では 82.0% となった。

その後のオゾン処理により総エンドトキシンの累積除去率は 91.2% に達したものの、遊離エンドトキシンでは 80.5% とあまり変化が見られなかった。さらに、後段に設置された活性炭処理水では総エンドトキシン, 遊離エンドトキシンともに増大することが示された。

さらに、総エンドトキシン中の遊離エンドトキシンが占める割合の変化を図 4 に示す。急速ろ過後の試料では、その大部分が遊離エンドトキシンとして水中に残存していることが示された。しかし、凝集剤添加前あるいは活性炭処理後といった微生物の再増殖が起こりやすい状況にある試料では、遊離エンドトキシンの比率が低下することが示された。

ヒト培養細胞を用いた免疫毒性画分のスクリーニング

精製 LPS による細胞毒性効果を図 5 に示す。結果は、曝露濃度 0 ng-LPS/mL の時の生細胞数を 100% とした細胞生存率で表している。細胞生存率は 1000 ng-LPS/mL 以上の濃度範囲において濃度依存的に低下した。この 1000 ng-LPS/mL はエンドトキシン活性値で約 13000 EU/mL に相当し、これは昨年度報告したように下水処理施設からの放流水と同レベルである。50% の細胞が死滅する LPS 濃度を IC₅₀ 値と定義すると、IC₅₀=1.61 × 10⁴ ng/mL (=2.96 × 10⁵ EU/mL) と求められた。

一方、分画・濃縮を行った水道水試料による細胞毒性効果を図 6 に示す。NaOH で溶出した低分子親水性有機物画分では、細胞毒性効果がほとんど見られなかったのに対して、高分子有機物画分を曝露した細胞では細胞生存率の低下が確認された。1000 倍濃縮した高分子有機物画分のエンドトキシン活性は 771 EU/mL であったことから、最も高い曝露濃度（試料水 10mL 当量）でも培養液中エンドトキシン濃度は 77.1EU/mL に過ぎないと試算される。これらの結果から、水道水中の高分子有機物画分の中にはエンドトキシンのみならず、細胞毒性効果を誘発する物質群が存在している可能性が示された。

さらに、A 浄水場 3 地点 (2) 着水井, 5) 急速ろ過後, 7) 活性炭吸着塔流出水) において採取した水試料の高分子有機物画分による細胞毒性試験結果を図 7 に示す。着水井 > 急速ろ過後 > 活性炭処理水の順で毒性が低減する傾向が得られたが、活性炭処理後の水試料でもなお、8.4 × 10³ EU/mL の高濃度（培養液中濃度:500 倍濃縮相当）においては明確な細胞毒性 (p < 0.01) を示した。一方、前述の水道水分画・濃縮試料と同様、低分子親水性有機物画分については強い細胞毒性が確認されなかった。

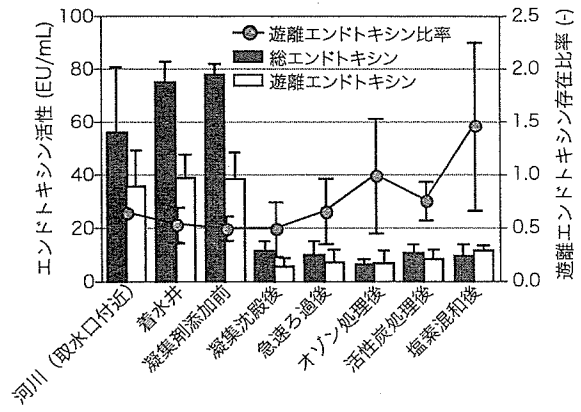


図 4 浄水処理過程におけるエンドトキシンの挙動

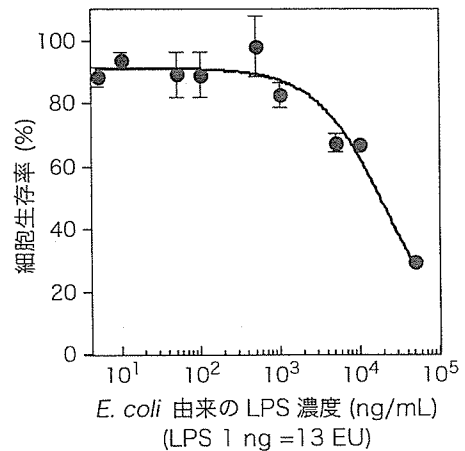


図 5 精製 LPS 曝露による細胞毒性

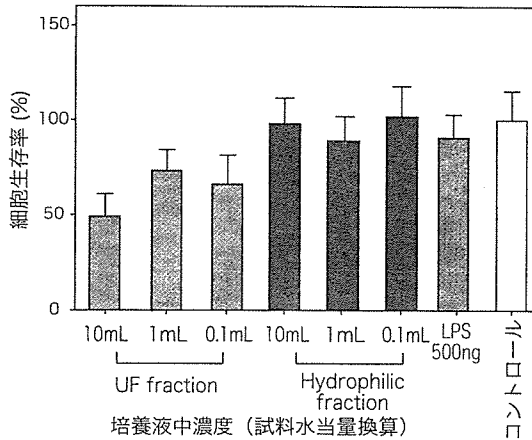


図6 水道水分画・濃縮試料による細胞毒性

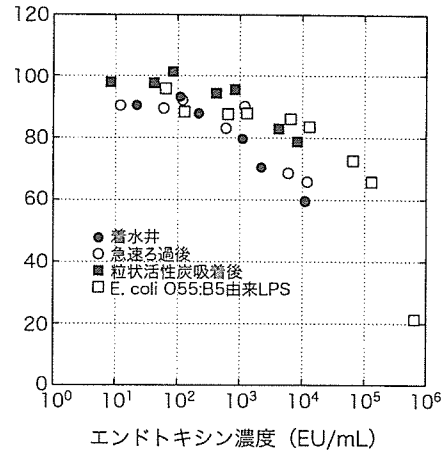


図7 浄水場試料の高分子有機物分画による細胞毒性

D. 考察

1) 消毒副生成物によるリスクの総括的評価に関する検討

SRNOM 塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物の毒性推定

昨年度実施した文献考察で得られた動物実験によるクロロ酢酸類に関する毒性評価データと、2段階形質転換試験、非2段階形質転換試験との相関性について検討を行い、SRNOM 塩素処理水の全有機ハロゲン化合物の毒性推定を試みた。なお、本研究ではSRNOM 塩素処理水についてバイオアッセイを行っているため、TOX 成分以外の物質による毒性もあわせて検出していることになるが、ここではSRNOM 塩素処理水の毒性がTOX 成分のみによるものと仮定して推定を行った。

2段階形質転換試験・非2段階形質転換試験結果は、個別物質について行った形質転換試験結果から算出したクロロ酢酸類の形質転換率0.1超過濃度を使用した。これらと慢性毒性試験の結果とをプロットし、2段階形質転換試験のプロットを図8(A)に、非2段階形質転換試験のプロットを図8(B)に示した。染色体異常試験の場合と同様に、動物実験の結果はmg-Cl/kg/dayに換算している。これらのプロットについて、原点を通過させる線形近似直線を求めた結果、これらの相関係数は全て0.9以上であり、2段階形質転換試験および非2段階形質転換試験の結果と慢性毒性試験の結果には相関があると仮定できると判断した。したがってこの仮定に基づき、SRNOM 塩素処理水の形質転換率0.1超過濃度を用いて、それぞれの近似直線の式よりF344ラット試験において体重減少が見られる摂取量およびLOAEL値、ならびにB6C3F1マウス試験において体重減少が見られる摂取量の推定を行った。結果を表2に示す。2

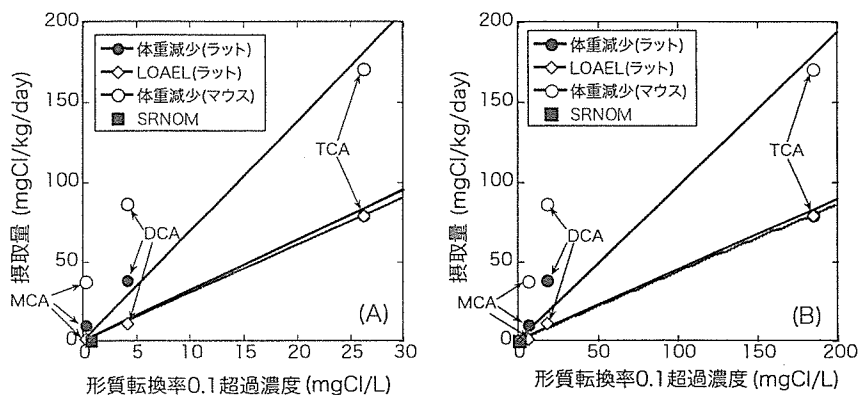


図8 慢性毒性試験と形質転換試験との相関関係
(A): 2段階形質転換試験 (B): 非2段階形質転換試験