

段階形質転換試験では、ラットおよびマウスで体重減少を示す摂取量から、その毒性の強さは、SRNOM 塩素処理水>MCA>DCA>TCA となると推定された。一方、ラットにおける LOAEL に基づいた評価では、その毒性の強さは、MCA>SRNOM 塩素処理水>DCA>TCA と推定された。

上記の手法により推定した SRNOM 塩素処理水による慢性毒性発現量は、用いたバイオアッセイ法により大きく変動し、いずれの慢性毒性に関しても染色体異常試験よりも形質転換試験において毒性が高く評価されることが示された。フミン質を塩素処理した時に生成する染色体異常誘発性物質は、加水分解に対して不安定である一方で、形質転換誘発性物質は水中有機物と塩素との反応により生成し、水中において比較的安定であると考えられる¹⁾²⁾ことから、SRNOM 塩素処理過程で染色体異常誘発物質が加水分解により低減し、形質転換誘発物質が生成・蓄積した結果、SRNOM 塩素処理水のクロロ酢酸類に対する相対的な毒性評価は、染色体異常試験については低く、2 段階形質転換試験あるいは非 2 段階形質転換試験において高く評価されたという解釈が可能となる。

これらの結果を総合すると、SRNOM 塩素処理水による慢性毒性は、クロロ酢酸と同程度かより強いと推定される。

表 2 相関から推定された SRNOM 塩素処理水の毒性 (mg-Cl/kg/day)

		体重減少 (ラット)	LOAEL (ラット)	体重減少 (マウス)
MCA		9.8	1.3	38
DCA		38	11	87
TCA		79	79	171
SRNOM塩素処理水	2段階	2.3	2.1	4.9
	非2段階	0.37	0.36	0.8

2) 塩素使用と免疫毒性との関連性に関する検討

水道水中のエンドトキシン濃度とヒト培養細胞を用いた免疫毒性画分のスクリーニング

本研究の結果から、原水中に混入したエンドトキシンは急速ろ過プロセスによりその大部分 (80 ~ 87 %) が除去されるものの、高度浄水処理後の水道水においても 10 EU/mL 程度の濃度で残存していることが明らかとなった。エンドトキシン活性の増減は増殖可能細菌数のそれとよく一致しているものの、オゾン処理および塩素消毒により増殖可能細菌が検出されなくなる状況においてもエンドトキシン活性は残存しており、不活化された微生物も含めた微生物管理の必要性が示唆された。

また、活性炭処理水中では総エンドトキシン・遊離エンドトキシン共に増大することが確認されたが、これらの結果はオゾン-活性炭処理プロセスにおける有機物、特に同化性有機炭素 (AOC) の挙動と合致する³⁾。すなわち、オゾン処理による有機物質変換により AOC が増大し、その後の活性炭処理により吸着除去された AOC を炭素源として活性炭上で微生物の再増殖が起きた結果として、活性炭流出水中のエンドトキシンが増大したと説明される。今回の結果は、Rapala らにより報告されている浄水処理過程における総エンドトキシンの挙動と同じ傾向を示している⁴⁾が、この論文では再生直後の活性炭流出水ではエンドトキシン増大が見られなかったことが同時に指摘されている。以上を総合すると、エンドトキシンに代表される水道水中の微生物由来物質を低減するためには、有機物管理、特に AOC 管理による微生物再増殖の制御に加えて、活性炭の適正管理も重要になると考えられる。

さらに、塩素消毒により SPC や HPC といった増殖可能菌数は減少するものの、総エンドトキシンはあまり除去されず、逆に遊離エンドトキシンは増大することが示された。この現象は、塩素処理により微生物細胞膜が損傷を受け、エンドトキシンの遊離化が進んだ結果と解釈される。これに反して図 4 からわかるように、例えば活性炭処理水といった微生物の再増殖が起りやすい水質となっている試料では、遊離エンドトキシンが総エンドトキシンに占める割合が低下することから、微生物細胞の状態 (増殖状態 or 不活化状態) とエンドトキシンの存在形態は密接に関連することが示唆された。

一方、ヒト表皮角化細胞を用いた細胞毒性試験の結果から、水道水中の高分子有機物画分は低分子親

水性有機物画分と比較して、高い細胞毒性を示すことが明らかとなった。また、浄水処理によりエンドトキシン活性が低減した後も若干の細胞毒性が残存していることから、活性炭処理後においてもなお、エンドトキシン以外の細胞毒性を示す物質群が残留することが示唆された。同時に、同程度のエンドトキシン活性を示す精製 LPS (*E. coli* B55:O5 由来) による細胞毒性と比較した結果から、原水および浄水の高分子有機物画分がより高い細胞毒性を示すことが明らかとなった。この理由として、前述の 1) エンドトキシン以外の細胞毒性物質群の存在可能性に加えて、2) 環境微生物に由来するエンドトキシンがヒト細胞に対してより強い毒性を示す可能性が指摘される。今後は、マイクロアレイ解析による免疫毒性評価のための指標の絞り込みを行う。

E. 結論

本研究では、クロロ酢酸類による形質転換試験結果ならびに前年度の文献調査により得られた慢性毒性試験データを活用し、未規制物質も含めた消毒副生成物全体の毒性推定を試みた。消毒副生成物模擬混合溶液としての SRNOM 塩素処理水による形質転換試験結果から求めた形質転換率 0.1 超過濃度と、クロロ酢酸類の慢性毒性試験データとの相関関係に基づいて毒性推定を行った結果、SRNOM 塩素処理水中の全有機ハロゲン化合物による毒性はクロロ酢酸と同程度かやや強いことが示された。また、SRNOM 塩素処理水の毒性は、染色体異常誘発性試験より形質転換試験においてより強く顕れることが示された。一方、塩素使用と免疫毒性との関連に着目して、代表的な免疫毒性物質であ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、原水および浄水中の有機物特性に基づいた分画・濃縮を行い、ヒト表皮角化細胞を用いて毒性画分のスクリーニングを行った。その結果、エンドトキシンは急速ろ過プロセスにより効率的に除去されるものの、高度浄水処理水中でも 10 EU/mL 程度が検出されることが示された。プロセスごとの除去特性を調べた結果、活性炭処理水ではエンドトキシンが増大することが示された。また、遊離エンドトキシンが総エンドトキシンに占める割合は微生物細胞の状態と密接に関連して変化することが示された。さらに、エンドトキシンが含まれる高分子有機物分画濃縮物による細胞毒性が確認される一方で、低分子親水性有機物分画濃縮物による細胞毒性は検出されなかった。この高分子有機物分画濃縮物による細胞毒性は、同じエンドトキシンレベルの大腸菌由来精製 LPS 曝露による毒性よりも強く評価されたことから、環境微生物に由来するエンドトキシンならびに共存物質の毒性評価を行う重要性が再認識された。

F. 健康危険情報 (該当なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh, S., Nakano, A., and Araki, T. (2006): Reevaluation of the toxicity of chlorinated water and the usefulness of MX as an index, *Journal of Water and Health*, 4, pp. 523-531
- 2) Itoh, S., Murakami, H., Fukuhara, M., and Nakano, A. (2007): Limitations of chlorine dioxide as an alternative disinfectant in comparison with chlorine from the viewpoint of mutagenicity, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 56 (2), pp. 95-104

2. 学会発表

- 1) 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦 (2006): 環境水中のエンドトキシン検出と塩素処理による微生物細胞からの生成評価, 京都大学環境衛生工学研究会第 28 回シンポジウム講演論文集, p. 181-184
- 2) 高橋恭介, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2007): 表皮角化細胞を用いた水中エンドトキ

シンの毒性評価, 第 41 回日本水環境学会年会講演集, p. 213

3) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦 (2007): 浄水処理過程における微生物およびその由来物質の挙動に関する研究, 第 58 回全国水道研究発表会 (発表予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(該当なし)

謝辞: エンドトキシン測定用試料の採水にご尽力いただいた, A 浄水場関係者各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) 伊藤禎彦, 仲野敦士, 荒木俊昭: 塩素処理水の染色体異常誘発性・形質転換誘発性の変化過程と強変異原物質 MX の指標性, 水環境学会誌, 26 (8), pp. 499-505, 2003.
- 2) 伊藤禎彦, 村上仁士, 福原勝, 仲野敦士: 塩素および酸化塩素処理水の染色体異常誘発性の生成・低減過程, 環境工学研究論文集, 40, pp. 201-212, 2003.
- 3) Polanska, M. *et al.*: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in flemish drinking water. *Wat. Res.*, 39, pp.2259-2266, 2005,
- 4) Rapala, J. *et al.*: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Wat. Res.*, 36, pp.2627-35, 2002

分担研究報告書 3

給配水過程における健康リスクと消毒技術に関する検討

分担研究者 西村 和之

給配水過程における健康リスクと消毒技術に関する検討

分担研究者 県立広島大学生命環境学部 西村和之

研究要旨

本研究は、「塩素消毒なしの水道」を実現する為に必要な家畜糞尿や生活排水の持つ健康影響微生物の負荷量推定のための実態調査と「管理ミスによる汚染事故は必ず起こる」事を前提にした最終バリアーとしての消毒処理の管理指標についての検討を目的としている。

本年度は、昨年度に引き続き、広島県の西城川水系を対象地域としたクリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ菌族や *Ba. Cereus* の存在量を調査し、流出負荷量推定の為の基礎データを収集した。また、代替消毒剤として二酸化塩素に着目し、処理対象水中に有機物が共存する場合を考慮した二酸化塩素による感染性微生物の消毒効果の把握を行った。得られた結果は以下であった。

- 1) 河川水から直接、人型のクリプトスポリジウム・オーシストが検出された。
- 2) 調査対象流域の流出負荷量を推定した結果、約 270 頭の肉牛が飼育されている流域面積約 42km² の比和川流域から最大 48 個/s、同じく約 300 頭の牛が飼育されている 131km² の西城川流域から最大 50 個/s のヒト型のオーシストが流出していると算定された。
- 3) 昨年同様にレジオネラ菌族やセレウス菌は検出していないが、不検出の原因は、DNA 抽出に用いた試料水量が少なすぎる事が最も可能性が高い。
- 4) 水道水が生活排水に汚染された場合、十分な接触時間や添加濃度が得られない場合には、二酸化塩素処理により AOC が増加する可能性があることが示唆された。
- 5) 生活排水に起因する有機物は、二酸化塩素の大腸菌に対する消毒効果において接触時間の影響をより大きくする可能性が示された。

A 研究目的

本研究は、給配水過程における健康リスクと消毒技術に関する検討を行うものであり、1) 実態調査による家畜糞尿や生活排水の持つ健康影響微生物の負荷量把握と2) 室内実験等により二酸化塩素処理の管理指標を定める為の基礎的情報の収集を目的としている。

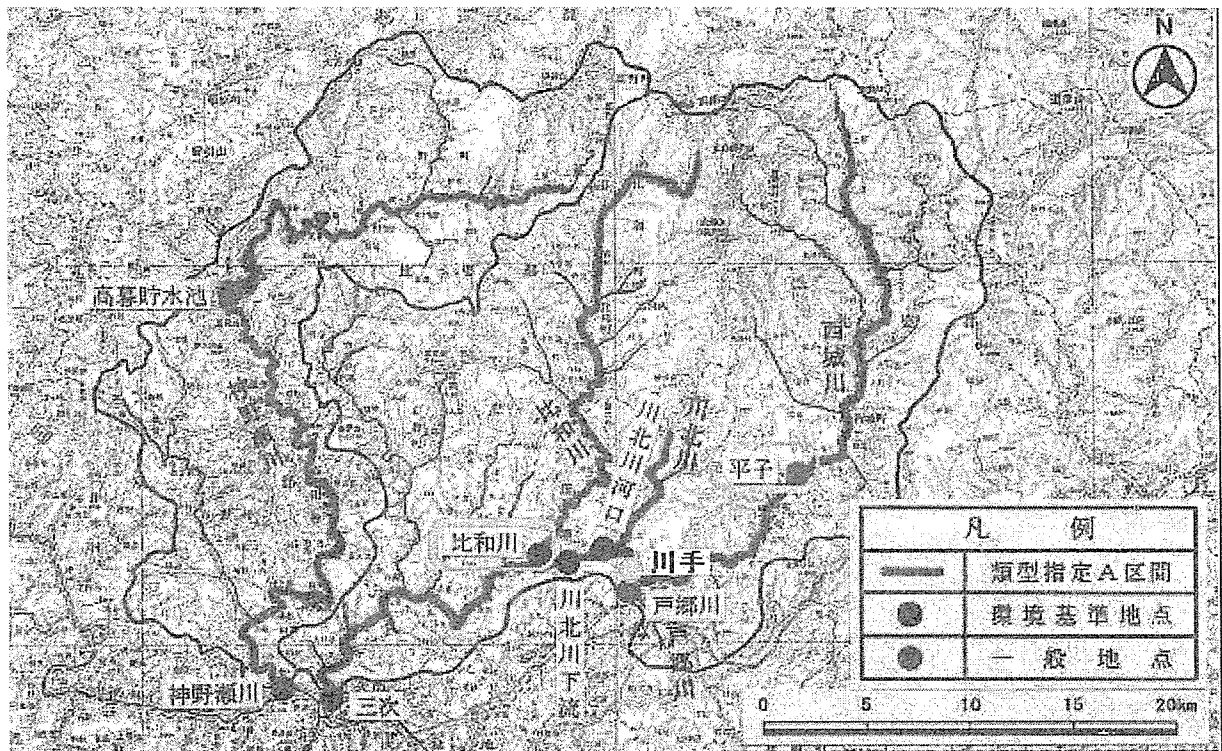
本年度は、昨年度に引き続き、広島県の西城川水系を対象地域としたクリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ菌族や *Ba. Cereus* の存在量を調査し、流出負荷量推定の為の基礎データを収集した。また、昨年度実施した文献調査において、過去の飲料水を原因とする感染性微生物による発祥事例は、上水処理操作のミスや漏水等の人為的な維持管理上の不備等を原因としていたことから、「塩素消毒なしの水道」を実現する為には、「管理ミスによる汚染事故は必ず起こる」事を前提にした最終バリアーとしての代替消毒手法についての検討が必須であると判断された。この事から、処理対象水中に有機物が共存する場合を考慮した二酸化塩素による感染性微生物の消毒効果の把握を行った。感染性微生物として本年度は比較対象となる野生株の大腸菌を用いた。

B 研究方法

1. 西城川水系における感染性微生物の存在量調査

1) 調査地点の概要

本年度は、当初予定していた夏季調査が行えなかったが、初冬より、平成18年11月16日、12月12日および平成19年2月28日の計3回、西城川の本支流から直接河川水を採水した。調査地点は、下図に示すように、旧西城町と旧庄原市の行政境界である「平子」、庄原市旧市街部下流の「川手」と旧比和町のほぼ全域を流下している比和川の河口の3地点とした。



本年度の調査地点の概要は、以下のようになる。

平子地点：流域面積、227km²、人口4,983人（2000年）であり、乳牛172頭、肉牛578頭、豚1470頭（H16年度）の家畜が飼育されている。

川手地点：流域面積、131km²、人口2,037人（2000年）であり、乳牛178頭、肉牛122頭、豚430頭（H16年

度)の家畜が飼育されている。

比和川河口地点：流域面積、42km²、人口 2,817 人 (2000 年) であり、肉牛 270 頭 (H16 年度) の家畜が飼育されている。

2) 調査項目及び測定方法

*一般水質項目

試料水は西城川水系の河川水とし、直接ポリタンクで採水した。一般水質項目として水温、濁度、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素、リン酸態リンを測定した。水温と濁度以外の測定方法は、Hach 社製多項目水質分析計 DR-2400 を用い、標準マニュアルに従って測定した。

*感染性微生物

感染性微生物として、昨年同様にクリプトスポリジウム・オーシスト、レジオネラ属菌及び Ba. Cereus (セレウス菌) を昨年と同様の手法により検出した。

クリプトスポリジウムの検査方法のフローを次図に示す。なお、本年度は、顕微鏡計数法と RNA 計数法により定量し、DNA に着目したホモロジー検索を行う事により検出されたオーシストの遺伝子型を調べた。前処理として中空糸膜を用いて 200 L の試料水を濃縮し、濃縮試料を 2 分割して顕微鏡観察法と *hsp 86* 領域に基く RNA 検出法を用いて定量した。また、オーシストが検出された場合、別の 20~40 L の試料水を濃縮したものを特異的熱ショック蛋白遺伝子 (*hsp70*) をターゲットとした PCR 増幅を行い、増幅産物のホモロジー解析を行う事により遺伝子型の検討を行った。

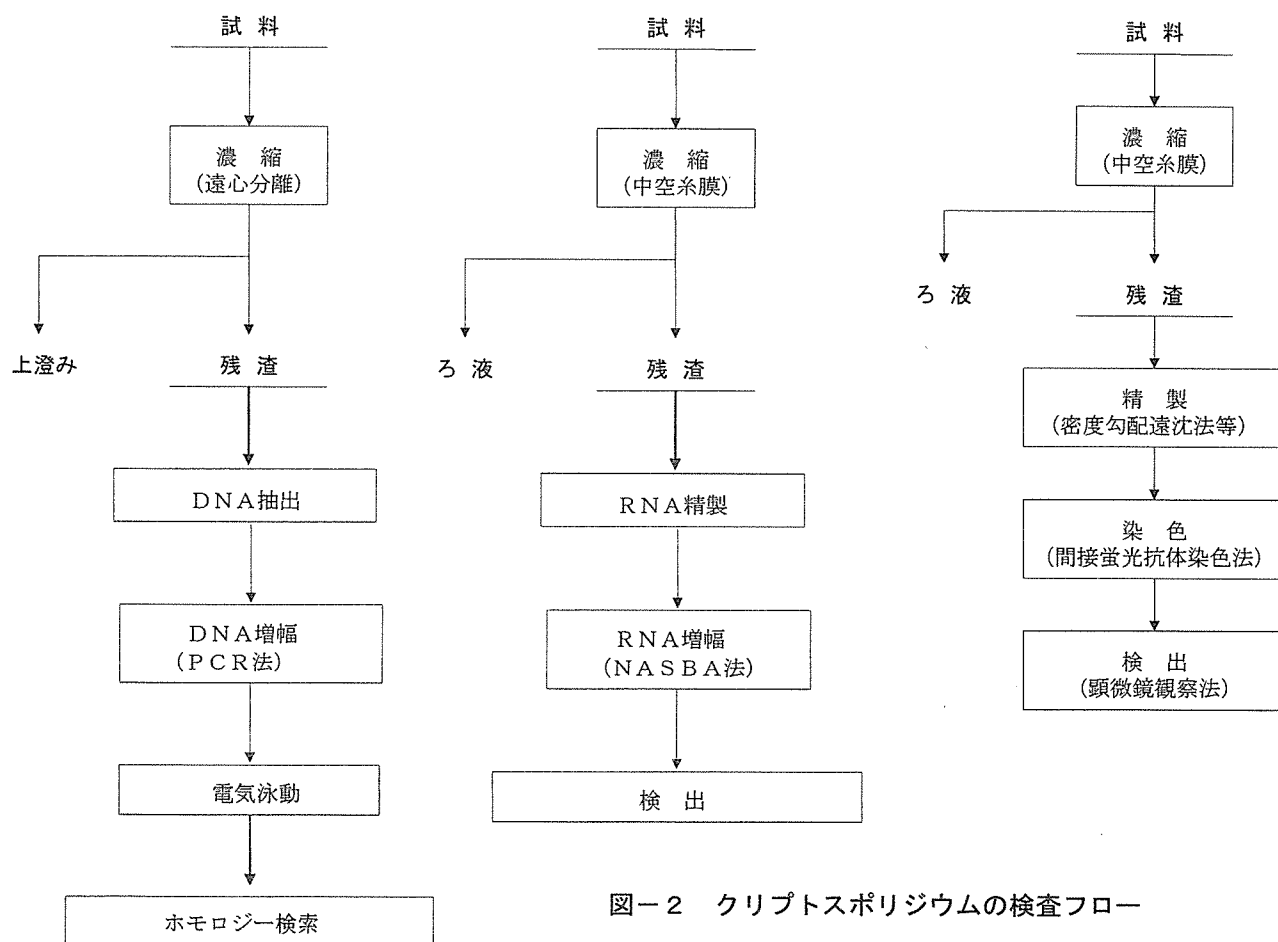


図-2 クリプトスポリジウムの検査フロー

レジオネラ菌族の検出は、試料水 500 ml を 5,000rpm で遠心濃縮を行った後に 0.22 μm メンブレンフィルターでろ過して捕集して DNA を抽出し、CycleavePCR® Legionella Detection Kit (タカラ製) により行った。

Ba. Cereus (セレウス菌) の検出は、レジオネラ菌族と同様の操作で DNA を抽出し、Bacillus cereus (CRS gene) PCR Detection Kit (タカラ株) を用いて行った。

2. 二酸化塩素処理の管理指標に関する検討

1) AOC の測定

水中の有機物質量として AOC に着目し、AOC 測定の為の標準菌株 *Pseudomonas fluorescens* (ATCC49642) と *Spirillum sp.* (ATCC49643) を取得し kooij らの定法に準拠して AOC の検出を行った。

2) 指標菌株

二酸化塩素による消毒効果等の評価の為の指標微生物として、水道に起因する感染事故例で着目された *Salmonella enterica* (NBRC100797) を取得して実験に用いた。また、レジオネラ菌族については、共生アメーバ *Acanthamoeba castellanii* (ATCC30234) を用いて野生株の単離を試みているが、未だ取得できていない。なお、本年度は、比較対象として、生活排水処理水中に現存する野生の大腸菌に対する消毒効果を把握した。

3) 管理指標に関する検討

*消毒効果の把握

二酸化塩素による消毒効果の基礎データとして、Ct 値による評価を行った。処理対象水は、排水処理水による水道水の汚染を想定し、本年度は生活排水処理水について実施した。

*二酸化塩素による有機物の処理性

水中の有機成分に対する二酸化塩素の影響を把握する為に、生活排水処理水の二酸化塩素処理を行い、TOC、E₂₆₀、E₃₇₀ 及び AOC を測定した。

C 研究結果

1. 西城川水系における感染性微生物の存在量調査

本年度の調査は、11月、12月と2月に各1回実施した。各回のサンプリング業況と一般的な水質分析結果を表-1に示す。

一般的な水質個目の結果は、「生活環境の保全に関する環境基準」のA類型に指定されている通りに清浄な河川であることを示していた。なお、本年度は降雪が少なく、調査日前に顕著な降雨も求められなかった。

クリプトスポリジウム・オーシストの検出結果を表-2に示す。

本調査では、顕微鏡観察法では、オーシスト添加回収試験におけるオーシストの回収率が7~15%と低く100L相当の試料中からであっても顕微鏡観察法ではクリプトスポリジウム・オーシストは検出できなかった。一方、*hsp86* をターゲットとするRNA検出法では、川手地点では1回(平成18年12月実施)、比和地点では、2回(平成18年11月および12月)、クリプトスポリジウムの検出が認められ、平子地点では、3回ともクリプトスポリジウムの検出は認められなかった。なお、顕微鏡観察における回収率があまり良くない点は、河川水100Lを直接濃縮していることから濁質による影響を排除するために、密度勾配遠心法による精製の後に免疫磁気ビーズによる精製を行っている為であると考えられる。

また、オーシストが検出された試料について別途 *hsp70* をターゲットとした PCR によりホモロジー解析を行った結果を図-3、表-3と表-4に示す。

電気泳動で得られたバンドを用いたホモロジー解析の結果、12月12日の平子地点と11月16日の比和川橋の試料からは *Cryptosporidium parvum* ヒト型 (*Homo sapiens*) と100%の相同性が認められた。また、12月12日比和川橋の試料からは *C. parvum* ヒト型 (*Homo sapiens*) と *C. parvum* ウシ型 (*Bovine*) との存在が示唆された。

調査時における西城川の水量は、川手地点の水位のテレメーター値から、11月16日が1.8m³/s、12月12日が2.5m³/s、2月28日が4.9m³/sと算出され、これらは、2002年の平水位の83~98%であった。

次に、レジオネラ菌属や腸管系微生物等のその他の感染性微生物の検出結果を表-5に示す。

表-5に見る通り、分子生物学的手法に基づく感染性微生物の検出結果は、何れの試料であってもレジオネラ菌族及びセレウス菌は不検出であった。この結果は、昨年同様であり、DNA抽出に用いた試料水量が500mlでは少ない可能性が考えられた。なお、レジオネラ菌族については、野生株の単離を目的として共生アメーバ

A. castellanii を用いた増菌を検討しているが十分な成果は得られなかった。

表-1 サンプル情報と一般的な水質

サンプリング箇所	西城 平子(ゆめの橋) 川 地点	西城 川手(庄原大橋) 川 地点	比和 比和川橋 川 地点
サンプリング日	2006年11月16日	2006年11月16日	2006年11月16日
サンプリング開始時間	11時 11分	13時 30分	14時 05分
サンプリング終了時間	11時 28分	13時 45分	14時 21分
天候	曇り	曇り	曇り
気温	12.2 °C	11.3 °C	12.0 °C
水温	9.7 °C	10.7 °C	10.9 °C
pH値	7.18	6.87	6.90
採水量	200L	200L	200L
濁度	1.1	3.1	3.2
TOC	0.4	0.6	1.0
NO ₃ -N	1.0	1.1	1.1
NO ₂ -N	0.001	0.004	0.002
NH ₄ -N	0.03	0.07	0.04
PO ₄ -P	0.14	0.18	0.09

サンプリング箇所	西城 平子(ゆめの橋) 川 地点	西城 川手(庄原大橋) 川 地点	比和 比和川橋 川 地点
サンプリング日	2006年12月12日	2006年12月12日	2006年12月12日
サンプリング開始時間	11時 00分	13時 25分	13時 55分
サンプリング終了時間	11時 14分	13時 40分	14時 06分
天候	曇りのち雨	曇り	曇り
気温	7.6 °C	10.9 °C	10.9 °C
水温	7.4 °C	8.7 °C	7.8 °C
pH値	6.84	6.98	6.75
採水量	200L	200L	200L
濁度	1.3	3.1	2.3
TOC	0.8	1.1	0.5
NO ₃ -N	1.4	1.5	1.0
NO ₂ -N	0.002	0.006	0.003
NH ₄ -N	0.02	0.05	0.06
PO ₄ -P	0.18	0.13	0.03

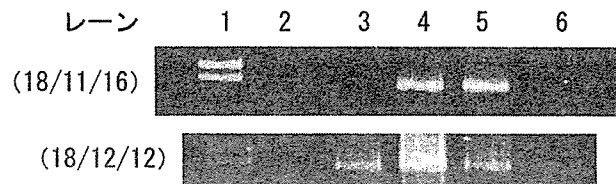
サンプリング箇所	西城 平子(ゆめの橋) 川 地点	西城 川手(庄原大橋) 川 地点	比和 比和川橋 川 地点
サンプリング日	2007年2月28日	2007年2月28日	2007年2月28日
サンプリング開始時間	12時 15分	14時 05分	14時 35分
サンプリング終了時間	12時 25分	14時 20分	14時 55分
天候	晴	晴	晴
気温	9.1 °C	9.6 °C	8.8 °C
水温	7.7 °C	9.2 °C	9.0 °C
pH値	6.98	7.05	7.05
採水量	200 L	200 L	200 L
濁度	1.4	3.3	3.0
TOC	0.4	0.6	0.3
NO ₃ -N	1.4	1.2	1.1
NO ₂ -N	0.002	0.004	0.004
NH ₄ -N	0.03	0.07	0.04
PO ₄ -P	0.5	0.11	0.11

表-2 クリプトスポリジウム・オーシストの検出結果

単位：個/100L

	平成 18 年 11 月実施		平成 18 年 12 月実施		平成 19 年 2 月実施	
	顕微鏡 観 察法	RNA 検出法	顕微鏡 観 察法	RNA 検出法	顕微鏡 観 察法	RNA 検出法
平子	0 (14%)	0	0 (11%)	0	0 (21%)	0
川手	0 (15%)	0	0 (8%)	1	0 (17%)	0
比和	0 (12%)	2	0 (7%)	5	0 (19%)	0

顕微鏡観察法の括弧はオーシスト 100 個添加時の回収率



レーン1 λ/HindⅢ 2 西城川 平子地点 3 西城川 川手地点
4 比和川 比和川橋地点 5 P.C. (オーシスト5個) 6 N.C.

図-3 電気泳動結果

表-3 PCR 試験結果

	西城川 平子地点	西城川 川手地点	比和川 比和川橋地点
採水日	平成 18 年 11 月 16 日		
濃縮量 (L)	40	20	40
HSP 70	陰性	陰性	陽性
採水日	平成 18 年 12 月 12 日		
濃縮量 (L)	40	40	40
HSP 70	陰性	陽性	陽性

表-4 (1) HSP70のホモロジー解析結果 (H16. 11. 16)

ホスト		Accession NO. (GeneBank 参照)	ホモロジー (%)
<i>C. parvum</i>	Homo sapiens	AF401503	100
		AF401505	
		AF401504	99.9
		AF401506	
	Bovine	AF221528	98.4
		AJ310881	
	Pig	AF221533	92.4
	Red kangaroo	AF221531	95.8
	Ferret	AF221532	97.1
	Dog	AB089291	98.5
Mouse	AF221530	98.3	
-	U11761	98.1	
-	U69698	98.4	
<i>C. canis</i>	Coyote	AY120920	83.3
<i>C. felis</i>	Cat	AF221538	82.7
<i>C. wairi</i>	Guinea pig	AF221536	96.6
<i>C. meleagridis</i>	Homo sapiens	AF329189	94.5
		AF402280	94.7
		AF402281	
		AF402283	
	AF402284	94.8	
turkey	AF221537	94.5	
<i>C. baileyi</i>	quail	AF221539	85.3
<i>C. serpentis</i>	Amazon tree boa	AF221541	80.1
<i>C. muris</i>	bovine	AF221542	80.2
	mouse	AF221543	79.3
<i>Plasodium falciparum</i>	-	M19753	73.9

表-4 (2) 西城川 川手地点の HSP70 のホモロジー解析結果 (H16.12.12)

ホスト		Accession NO. (GeneBank 参照)	ホモロジー (%)
<i>C. parvum</i>	Homo sapiens	AF401503 AF401505	100
		AF401504 AF401506	99.9
		AF221535	99.8
		AF221528 AJ310881	98.4
	Bovine	AF221533	92.4
	Pig	AF221531	95.8
	Red kangaroo	AF221532	97.1
	Ferret	AB089291	98.5
	Dog	AF221530	98.3
	Mouse	U11761	98.1
<i>C. canis</i>	Coyote	U69698	98.4
		AY120920	83.3
<i>C. felis</i>	Cat	AF221538	82.7
<i>C. wrairi</i>	Guinea pig	AF221536	96.6
<i>C. meleagridis</i>	Homo sapiens	AF329189	94.5
		AF402280 AF402281 AF402283	94.7
		AF402284	94.8
		AF221537	94.5
	turkey	AF221539	85.3
<i>C. baileyi</i>	quail	AF221541	80.1
<i>C. serpentis</i>	Amazon tree boa	AF221542	80.2
<i>C. muris</i>	bovine	AF221543	79.3
	mouse	M19753	73.9
<i>Plasodium falciparum</i>	-	M19753	73.9

表-4 (3) 比和川 比和川橋地点の HSP70 のホモロジー解析結果 (H16.12.12)

ホスト	Accession NO. (GeneBank 参照)	ホモロジー (%)			
		クローン1	クローン2	クローン3	
<i>C. parvum</i>	Homo sapiens	AF401503 AF401505	100	98.4	99.9
		AF401504 AF401506	99.9	98.5	99.9
		AF221535	99.8	98.6	99.8
		AF221528 AJ310881	98.4	100	98.4
	Bovine	AF221533	92.4	92.2	92.4
	Pig	AF221531	95.8	95.5	95.8
	Red kangaroo	AF221532	97.1	96.9	97.1
	Ferret	AB089291	98.5	99.4	98.5
	Dog	AF221530	98.3	98.5	98.3
	Mouse	U11761	98.1	99.6	98.1
<i>C. canis</i>	Coyote	U69698	98.4	99.6	98.4
		AY120920	83.3	85.2	83.3
<i>C. felis</i>	Cat	AF221538	82.7	84.2	82.7
<i>C. wrairi</i>	Guinea pig	AF221536	96.6	98.2	96.6
		AF329189	94.5	96.2	94.5
<i>C. meleagridis</i>	Homo sapiens	AF402280 AF402281 AF402283	94.7	96.3	94.7
		AF402284	94.8	96.4	94.8
		AF221537	94.5	96.1	94.5
		turkey	AF221539	85.3	84.9
	<i>C. baileyi</i>	quail	AF221541	80.1	81.5
<i>C. serpentis</i>	Amazon tree boa	AF221542	80.2	81.3	80.2
<i>C. muris</i>	bovine	AF221543	79.3	81.3	79.3
	mouse	M19753	73.9	74.6	73.9
<i>Plasodium falciparum</i>	-	M19753	73.9	74.6	73.9

表-5 感染性微生物の検出結果

	平子	川手	比和川
レジオネラ菌族			
H18.11.16	不検出	不検出	不検出
H18.12.12	不検出	不検出	不検出
H19.2.28	不検出	不検出	不検出
セレウス菌			
H18.11.16	不検出	不検出	不検出
H18.12.12	不検出	不検出	不検出
H19.2.28	不検出	不検出	不検出

*:500mL当り

2. 二酸化塩素処理の管理指標に関する検討

生活排水処理水と二酸化塩素が反応した場合の有機物の挙動を検討した。

平均TOC濃度8.9mgC/Lの採水日の異なる生活排水処理水について塩素と二酸化塩素として各々1~5mg/Lとなるように次亜塩素酸ナトリウム溶液と二酸化塩素溶液を加えて0~60秒間の処理を行った。結果を図-4に示す。

E₂₆₀をみると、塩素処理では塩素濃度や接触時間と共に減少する傾向にあるが、二酸化塩素処理では二酸化塩素濃度に係わらず、一度僅かながら増加した後一定になる傾向を示している。一方、AOC/AOC₀を見ると、消毒剤に係わらず、一度増加した後一定になる傾向を示している。一度増加する処理時間は消毒剤や濃度に係わらず同じであるが、増加幅は二酸化塩素の方が大きく、より低い消毒剤濃度で大きな増加を示す傾向にある。また、増加後の一定値は、塩素処理の場合、塩素剤濃度に係わらず初期値(AOC₀)程度であるが、二酸化塩素処理では消毒剤濃度が大きいほど初期値よりも低くなる傾向を示していた。なお、ここで示したAOCは*P. fluorescens*による物であるが、*S. sp.*による結果も同様の傾向を示していた。

次に、生活排水処理水中に現存する野生の大腸菌に対する二酸化塩素による消毒効果を調べた結果を図-5に示す。

実験に用いた生活排水処理水は、TOCが9.4mg/L、E₂₆₀が0.126(OD)であった。大腸菌は、予め生活排水よりCHROMagar(関東化学(株))により単離して実験室内で保持している野生株を用いた。

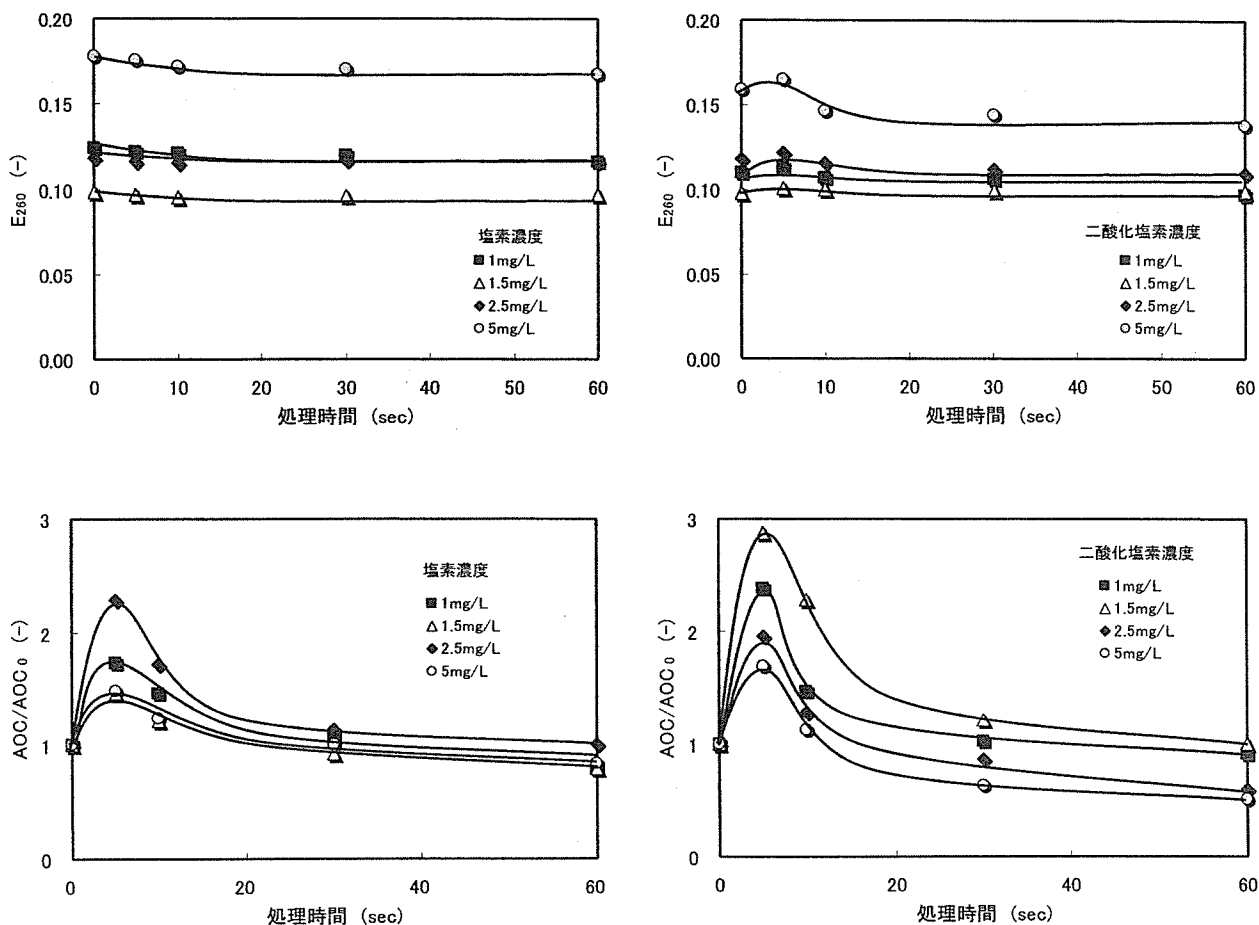


図-4 塩素処理と二酸化塩素処理による有機物の挙動

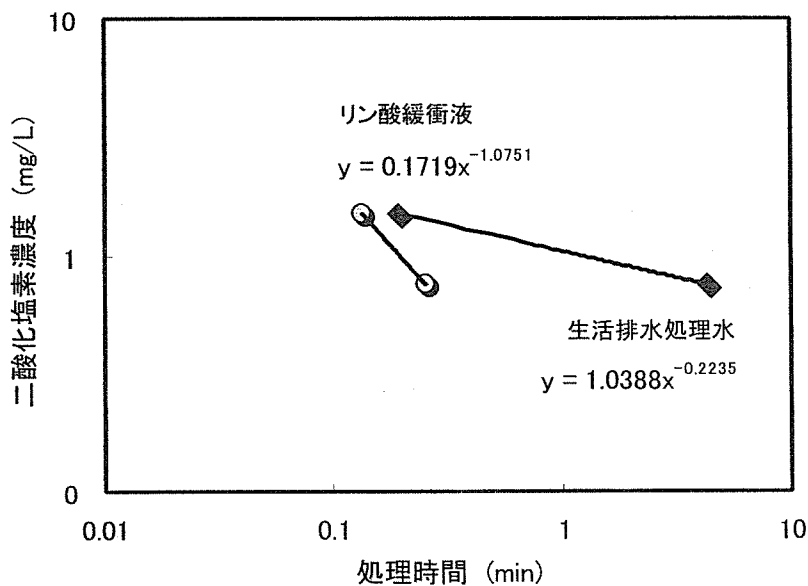


図-5 二酸化塩素による大腸菌99%不活化に必要な接触時間

二酸化塩素濃度と処理時間の関係は、リン酸緩衝液を用いたコントロールでは両者の対数値の傾きが略1を示し、Ct値が二酸化塩素による消毒処理の操作因子になる事を示しているが、生活排水処理を用いた結果は、傾きが1を大きく下回り、接触時間をより長く取らなければ十分な消毒効果が得られないと言う結果となった。

D考察

1. 西城川水系における感染性微生物の存在量調査

本年度の調査では、河川水から直接、人型のクリプトスポリジウム・オーシストが検出された。得られた結果から流域の流出負荷量を推定した結果、約270頭の肉牛が飼育されている流域面積約42km²の比和川流域から最大48個/s、同じく約300頭の牛が飼育されている131km²の西城川流域から最大50個/sのヒト型のオーシストが流出していると算定された。以上のように、PCR法に基づく分子生物学的手法は、試料量が多いが試料当たり1オーシストから検出可能であり、濃度の低い河川水中であっても遺伝子型を含めて検出することができることから、これらの手法を活用した調査を実施することにより、放牧地の様な面的な負荷源からの流達オーシスト量の算出に利用可能な情報が得られると考えられる。

一方、本年度の調査結果は、昨年同様にクリプトスポリジウム・オーシスト以外の感染性微生物を検出していない。レジオネラ菌族やセレウス菌の不検出の原因は、DNA抽出に用いた試料水量が少なすぎる事が最も可能性が高いことから、効率的な抽出方法を含めて次年度の検討課題とした。

2. 二酸化塩素処理の管理指標に関する検討

水道水が生活排水に汚染された場合を想定して、二酸化塩素が生活排水中に存在する有機物に及ぼす影響を検討した。得られた結果は、十分な接触時間や添加濃度が得られない場合には、二酸化塩素処理によりAOCが増加する可能性があることを示唆していた。従って、これらの結果は、配水中に生じる汚染の程度をどの程度に見積もるか？や管理目標とする病原性微生物に対するAOCの意味を明らかにすることにより、汚染があった場合でも問題となるAOCに達しないようする為に必要とする二酸化塩素濃度を定める為の情報となると考えられる。

一方、二酸化塩素処理における病原性微生物に対するAOC等の有機物の共存の影響を把握するために、生活排水処理水を対象とした野生株の大腸菌に対する不活化実験を行った。得られた結果は、二酸化塩素の大腸菌に対する消毒効果において、接触時間がより大きく影響する可能性がある事を示していた。これは、AOCの一時的増加にみるような、生活排水処理中に存在する有機物等の質的变化や二酸化塩素の消費が消毒効果に対して影響を及ぼしてうる事を示唆している。従って、生活排水由来の有機物質が共存する条件下における*Salmonella*やレジオネラ菌族等に対する二酸化による消毒効果を把握することにより、管理目標とする病原性微生物に対するAOC等の意味が明らかとなると考えられる。

E結論

広島県庄原市の水道原水である西城川を研究対象地域として、1)水道原水が持つ感染性微生物による健康影響リスクの把握を目的とした調査と2)処理対象水中に有機物が共存する場合を考慮した二酸化塩素による感染性微生物の消毒効果の把握を行った。得られた結果を以下に列記する。

- 1) 河川水から直接、人型のクリプトスポリジウム・オーシストが検出された。
- 2) 調査対象流域の流出負荷量を推定した結果、約270頭の肉牛が飼育されている流域面積約42km²の比和川流域から最大48個/s、同じく約300頭の牛が飼育されている131km²の西城川流域から最大50個/sのヒト型のオーシストが流出していると算定された。
- 3) 昨年同様にレジオネラ菌族やセレウス菌は検出していないが、不検出の原因は、DNA抽出に用いた試料水量が少なすぎる事が最も可能性が高い。
- 4) 水道水が生活排水に汚染された場合、十分な接触時間や添加濃度が得られない場合には、二酸化塩素処理によりAOCが増加する可能性があることが示唆された。

5) 生活排水に起因する有機物は、二酸化塩素の大腸菌に対する消毒効果において接触時間の影響をより大きくする可能性が示された。

以上のように、PCR 法に基づく分子生物学的手法は、試料量は多いが試料当たり 1 オーシストから検出可能であり、濃度の低い河川水中であっても遺伝子型を含めて検出することができることから、これらの手法を活用した調査を増やすことにより、放牧地の様な面的な負荷源からの流達オーシスト量の算出に利用可能な情報が得られると考えられる。一方、レジオネラ菌族やセレウス菌等の他の感染性微生物に関しては、遺伝子の効率的な抽出方法を含めて次年度の検討課題とした。

また、有機物の共存下における二酸化塩素処理において、過去の汚染事故で原因が特定された頻度の高いサルモネラ菌とアメーバとの共存により増殖可能な特徴から、塩素消毒に対する耐性が高く低い有機物濃度での増殖が可能なレジオネラ菌族を指標微生物とした不活化について次年度に検討することとした。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

特になし

H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

消毒技術に関する検討
(消毒代替技術間の消毒機構の比較及び
それら代替技術の管理手法の開発)

分担研究者 大瀧 雅寛

消毒技術に関する検討

（消毒代替技術間の消毒機構の比較及び、それら代替技術の管理手法の開発）

分担研究者 大瀧雅寛 お茶の水女子大学大学院人間文化研究科 助教授

研究要旨

紫外線消毒法およびオゾン消毒法によって細菌に与えられるダメージについて、大腸菌をモデル細菌として検討した。紫外線消毒法においては、光回復によって損傷レベルを比較する方法を試みたが、1,000~0.1 mW/cm²の範囲では、大腸菌の光回復能への光強の影響は見られなかった。オゾン溶解水による消毒では、低 pH 域においては、オゾン分解が抑制され残留オゾン濃度が高くなるが、このような状況では、外膜損傷だけで増殖可能なような損傷レベルの低い細菌を、誤陰性としてしまう可能性が高いことがわかった。オゾン曝気による消毒では、外膜損傷に関して最も効果が高いが、それと同程度に酵素生成能力および増殖能力に関しても抑制能力を発揮していることがわかった。これは気泡中の高濃度オゾンによる作用と考えられる。pH が低い場合は、溶液中の残存オゾンが高くなり、不活化率の向上が見られた。この場合はオゾン溶解水の場合のように誤陰性としてしまう可能性は低いといえる。

A. 研究目的

浄水処理における塩素消毒法の役割の一つとして残留塩素による、消毒効果の残存性が挙げられる。つまり消毒処理を受けた病原微生物が配管中にて回復する、もしくは再増殖することがあったとしても、残留塩素によってそのリスクを抑制できるという特徴を持つ。従って、塩素以外の消毒方法のうち残存性を有さない消毒方法を選択した場合、消毒処理後の病原微生物の回復可能性および再増殖可能性について留意しておく必要がある。本研究では、塩素代替消毒法として紫外線消毒法とオゾン消毒法に焦点を絞った。両消毒法とも残存性が殆どないため、ここではこれら消毒処理後の病原菌の回復可能性について検討を行う。具体的には細菌へ及ぼす損傷の度合いを様々な観点から比較評価し、各消毒方法が病原細菌に与える損傷および消毒処理後の挙動を類推するための知見を得ることが本研究の目的である。

紫外線消毒法に関しては、昨年度は消毒処理後の大腸菌の暗回復について検討した。そこで本年度は、照射強度が異なる条件において、大腸菌へ

与えられる損傷レベルの差違を、光回復速度を比較して調べた。

オゾン消毒に関しては、紫外線照射と同様に大腸菌の損傷レベルに関して、異なる大腸菌測定法を併用し、各条件における測定結果の差違を解析することにより、大腸菌に与えるオゾン消毒の損傷レベルを推定することを試みた。

B. 研究方法

1) 紫外線処理後の大腸菌の光回復実験

大腸菌（NBRC3301）を用いて濃度約 10⁶ CFU/ml のリン酸緩衝液を作成し、紫外線を照射した。光源として低圧水銀ランプ（20W 東芝殺菌ランプ）およびパルスキセノンランプ（岩崎電気社製）を使用した。試料 20 mL をシャーレ（直径 5.7 cm）に入れて、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。パルスキセノンランプは低圧水銀ランプのおよそ 1 万倍の光強度を持つ。またその出力は微調整が難しい。そのため、試料とランプの間に、金網（一枚あたり 33% の減光）を数枚設置し、光強度を調節した。光強度は金網を設置しない場合を 100% とすると、36%、7.8% となるよう

表1 各測定方法の名称とその特徴

名称	略称	特徴
Tryptic Soy Agar 培地	TSA	代謝能力をもつ大腸菌数の測定となる
コンパクトドライ™EC	C-EC	β-グルクロダーゼを持つ大腸菌数の測定となる。
デスオキシコレート培地 (デスオキシコール酸Na抜き)	No-Deso	乳糖分解能力を持つ大腸菌数の測定となる
デスオキシコレート培地	Deso	乳糖分解能力を持ち、デスオキシコール酸Na耐性のある大腸菌数の測定となる

に設定した。それぞれの条件にて大腸菌不活化速度を測定し、各強度条件とも大腸菌が99%不活化となるように照射回数を設定した。なおそれぞれの条件での紫外線強度は、ヨウ素酸カリウムとヨウ化カリウムを利用した化学線量計¹⁾にて測定した。

紫外線による不活化処理後、大腸菌溶液に蛍光灯光を照射した。蛍光灯の光強度は光回復の指標となる365nmの線量率で測定した。

2) オゾン処理による大腸菌の損傷レベルの推定

2-1) オゾン溶解水による大腸菌の不活化実験

オゾン発生装置(RZ-100N)を用いて発生させたオゾンを、pHを調整したリン酸緩衝液に通気して、オゾンを溶解させた。pHは6, 7, 8の3段階とした。充分通気して溶解させた後、高濃度の大腸菌(ATCC3301)溶液を溶解させ、大腸菌濃度の変化を測定した。

大腸菌の測定は4通りの培地による培養法とした。各培養法の特徴を表1にしめす。これらの測定法によって得られた結果から、測定法毎の不活化率を求めて比較した。

2-2) オゾン曝気による大腸菌の不活化実験

オゾン発生装置(RZ-100N)を用いて発生させたオゾンを、pHを5, 7, 9に調整したリン酸緩衝液に通気させながら、上記と同様の高濃度大腸菌溶液を溶解させ、大腸菌濃度の変化を測定した。オゾンの生成量はメーカー仕様では、60 mg/hであった。大腸菌の測定は、表2に述べられる4通りの方法を用いて行った。それぞれの測定法に

よって得られた結果から、測定法毎の不活化率を求めて比較した。

C. 研究結果

1) 紫外線処理後の大腸菌の光回復実験

図1に各光強度による不活化後の大腸菌の光回復を示す。図に示される様にパルスキセノンランプの光強度を3段階に変えても、その光回復現象に相違は無いことがわかった。またパルスキセノンランプに比べて、光強度が10,000分の1程度と弱い場合においても、光回復現象に相違はみられなかった。この結果、光強度の違いを10,000倍ほど変えても、光回復能力への影響は見られないことがわかった。

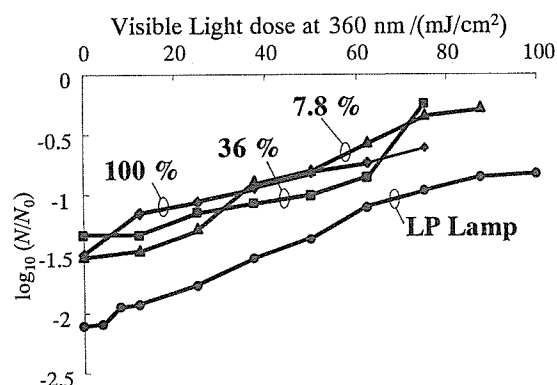


図1 各強度の紫外線照射後の光回復 (パルスランプおよび低圧水銀ランプ)

2) オゾン処理による大腸菌の損傷レベルの推定

2-1) オゾン溶解水による大腸菌の不活化実験

それぞれのpHにおいて、溶存オゾン濃度が変化した。その結果を図2に示す。

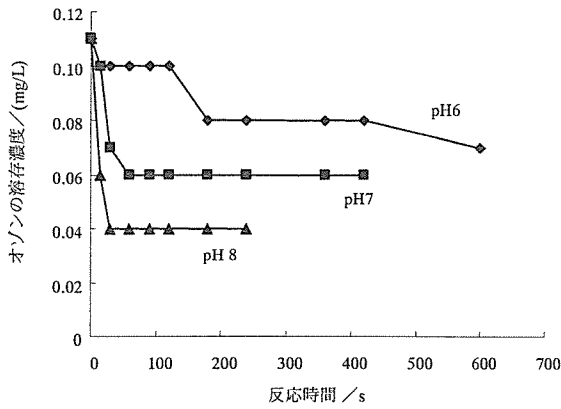


図2 オゾン溶解水中の残留オゾン濃度変化

それぞれの pH 条件における大腸菌の不活化実験結果を図3に示す。この実験では大腸菌の測定法として、デソキシコレート培地, TSA 培地, コンパクトドライ培地の3つを用いて, その結果を比較した。

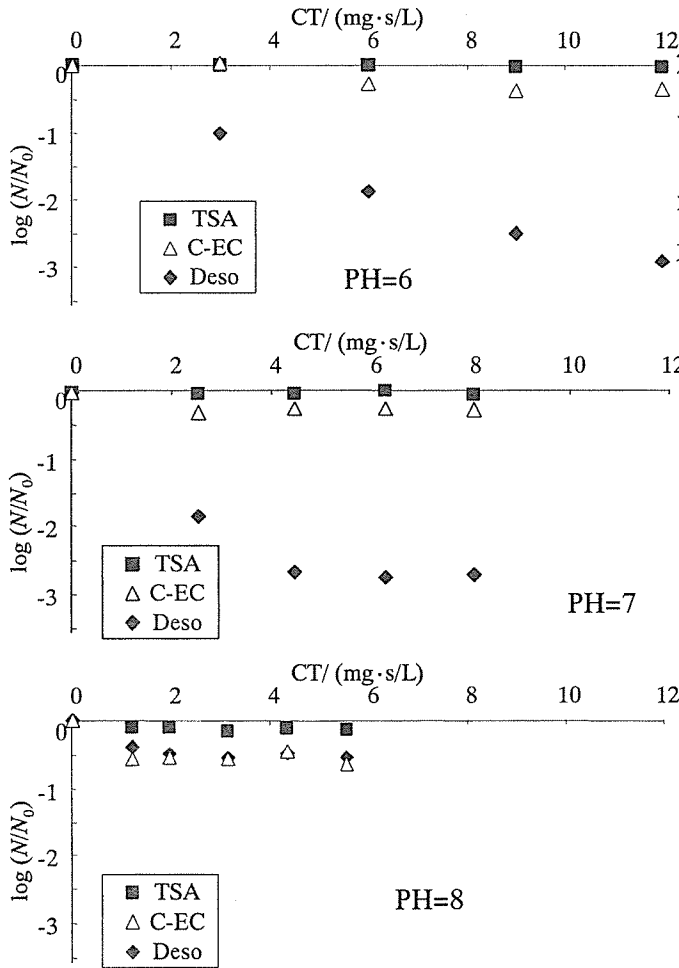


図3 各 pH における大腸菌の不活化 (測定法3種)

図3で特徴的に見られることは, pH6,7におけ

るオゾン不活化において Deso による測定では, 効率的に不活化されているという結果となるが, 別の測定法である TSA および C-EC 法では, 殆ど不活化が見られないという点である。一方, pH8 では Deso 測定法において不活化率が低くなったが, C-EC 測定法での不活化率が若干上昇し, Deso との差が見られなくなるという結果となった。

2-2) オゾン曝気による大腸菌の不活化実験

図4にオゾン曝気による大腸菌の不活化実験を行った結果を示す。この実験では表1に示す4種の培地全てで測定を行った。この実験では結果として, オゾン溶解水の場合に比べ各測定法による不活化程度の差が少なくなっていた。また pH 5の方が, pH 7に比べて不活化速度が高くなっていた。またどちらの pH においても, 4種測定法を比較するとデソキシコレート培地 (no-Deso) が最も不活化速度が小さく, デソキシコレート培地 (Deso) が最も不活化速度が大きいという結果となった。

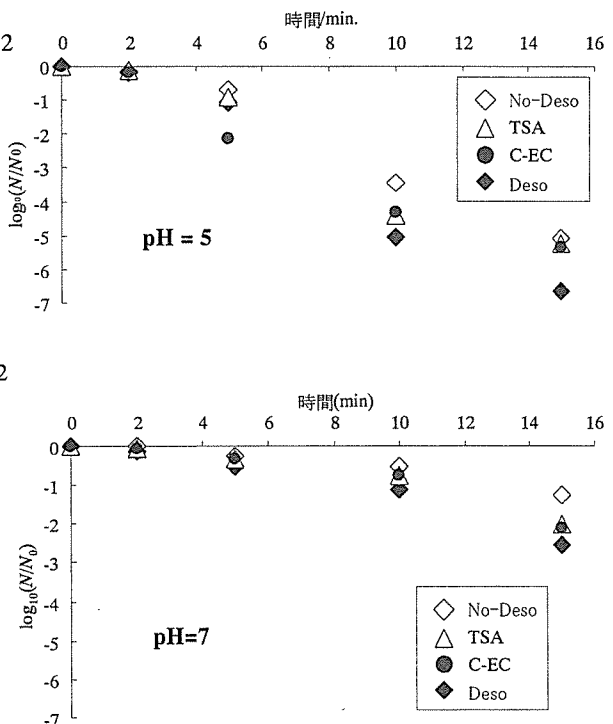


図4 オゾン曝気による大腸菌の不活化実験結果 (pH 5および pH 7)

D. 考察

1) 紫外線処理後の大腸菌の光回復実験

今回用いた大腸菌に関して、光強度による光回復現象への影響は見られなかったが、過去のデータとの相違が見られた。同大腸菌は、2年前に低圧水銀ランプによる不活化および光回復実験を行っているのだが、同じ大腸菌株にも関わらず紫外線耐性が低く、かつ光回復速度も小さくなっていることがわかった。(図5および図6参照)この理由については定かではないが、不活化速度と光回復速度の間に何らかの因果関係が存在することが示唆される。この因果関係についての解明は今後の検討課題である。

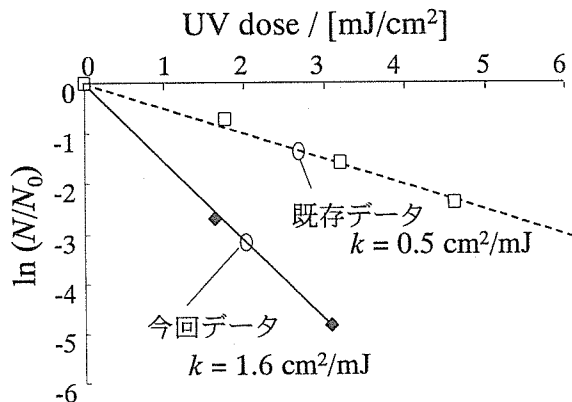


図5 大腸菌 (NBRC3301) の不活化速度比較
(2年前の既存データと今回のデータ)

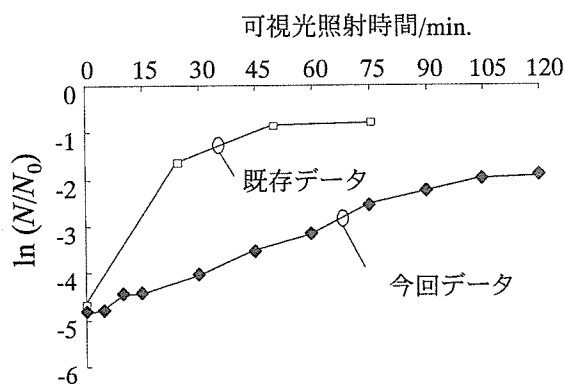


図6 大腸菌 (NBRC3301) の光回復比較
(2年前の既存データと今回のデータ)

2) オゾン処理による大腸菌の損傷レベルの推定

2-1) オゾン溶解水による大腸菌の不活化実験
オゾンは高いpH領域で、水溶液中の水酸化物

イオンと反応し、分解が促進される。図7には主要な反応式を示した。pHが高いとオゾン濃度は減少するが、活性ラジカル種による反応機構も働くと考えられる。

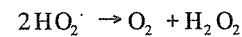
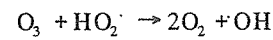
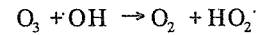
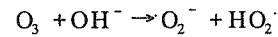
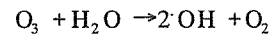


図7 オゾン分解の主反応式

表1にまとめた各測定法によって得られる大腸菌の不活化について、その測定メカニズムから考えて、次のような損傷によるものと推定した。

Deso法：外膜の損傷によるもの。

C-EC法：βグルクロニダーゼ酵素生成能の損傷

TSA法：代謝能力(酵素生成能力)の損傷

No-Deso法：乳糖分解能力損傷

従って、図3の結果から次の考察を行った。即ち残留オゾンによる大腸菌の不活化は、外膜に損傷を与える程度には効果的であるが、大腸菌が特異的に産生する酵素β-グルクロニダーゼの生成能力の抑制もしくは代謝能力を抑制するほどの殺菌力は有していないと考えられる。しかしアルカリ側のpH8において、Deso法での不活化率が悪くなったのは、オゾンの自己分解が進み、残留オゾン濃度が減少したために、外膜損傷が低減したためと考えられる。しかし一方でC-EC法での不活化率が上がったのは、オゾン分解に伴って生成する活性ラジカルの強い酸化力によって、β-グルクロニダーゼ酵素の生成能力が損傷されたためと考えられる。

図8にCT値6 mg·s/Lにおける各pHでの、各推定損傷機構による不活化程度を示す。pH8となると、各損傷機構の差が小さくなり、損傷数は

少なくなるものの、より重度の損傷の割合が増すことが考えられる。

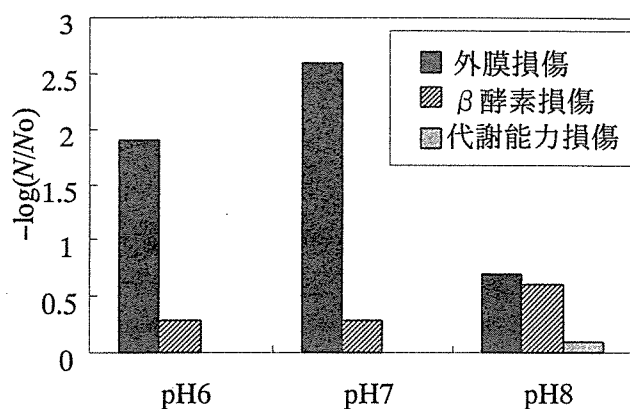


図8 CT 値 6 mg·s/Lにおける推定不活化機構

以上のことから、pH 変化に伴うオゾン消毒メカニズムの変化によって細菌への損傷度合いが異なることがわかった。また Deso 法による大腸菌の不活化測定では、特に中性から低 pH にわたって、損傷レベルが低く増殖可能な細菌を、誤陰性と判断してしまう可能性が高いことがわかった。

2-2) オゾン曝気による大腸菌の不活化実験

溶存オゾンによる大腸菌の不活化実験結果と同様に考察を行った。オゾン曝気における不活化には、気泡中の高濃度オゾンに接触することによる殺菌が大きく作用しているのではないかと考えられる。この状況では大腸菌の不活化において、外膜損傷に関して最も効果が高いが、それと同程度に、酵素生成能力および増殖能力に関して抑制能力を発揮していることがわかる。また乳糖分解能力に関して抑制能力が発揮されていることがわかる。即ちこの殺菌方法によると損傷レベルは致命的なものに近いと考えられる。

図9に反応時間 10 分における各 pH での、各推定損傷機構による不活化程度を示す。この図では不活化率は異なるものの、各推定不活化機構の割合はあまり変わっておらず、この pH 域内では、不活化機構は変化しないのではないかと考えられる。pH5 の場合が pH7 に比べて不活化効率が良い理由としては、図5に示すように、低 pH に

おいては溶液中のオゾン自己分解が進まず残留オゾン濃度が高いため、効率が良くなったと考えられる。

オゾン曝気による不活化処理においても上記でも述べたような、損傷レベルが低く増殖可能な細菌を、誤陰性としてしまう可能性があるが、その割合は溶存オゾンの場合に比較して小さいことがわかった。

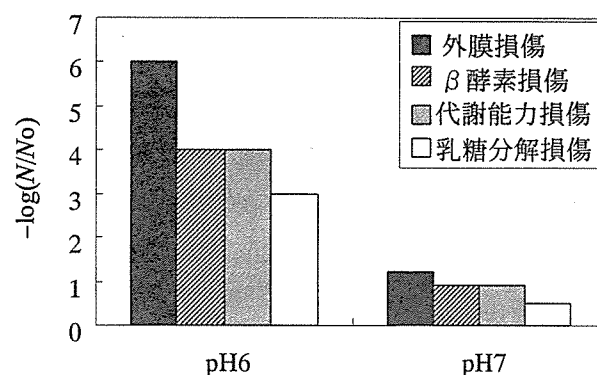


図9 反応 10 分における推定不活化機構

E. 結論

紫外線消毒法およびオゾン消毒法によって細菌に与えられるダメージについて、大腸菌をモデル細菌として検討した。

紫外線消毒法においては、光回復によって損傷レベルを比較する方法を試みたが、0.1~1,000 mW/cm² の範囲では、大腸菌の光回復能への光強の影響は見られなかった。しかし保存株への紫外線耐性が低く変わったと同時に光回復能力も抑制されており、この点の相関性が考えられた。

オゾン消毒法においては、4種の培養測定法の結果を比較することによって、不活化機構の推定を行った。

オゾン溶解水による消毒では、pH が中性から低 pH 域においては、オゾン分解が抑制され残留オゾン濃度が高くなるが、このような状況では、外膜損傷だけで増殖可能なような損傷レベルの低い細菌を、誤陰性としてしまう可能性が高いことがわかった。オゾン分子による反応では、外膜損傷には効果があるもの、代謝能力の抑制や酵素生成能力の抑制には至らないような弱い不活化力しか発揮できないためと考えられた。一方 pH