

琵琶湖疏水のエンドトキシン濃度は $1.16 \times 10^2 \sim 6.13 \times 10^2$ (EU/mL) と比較的低い値を示した。総エンドトキシンに対する遊離エンドトキシンの比率は試料間で大きく異なるが、特に水深の浅い琵琶湖疏水では遊離エンドトキシンが総エンドトキシンを上回るケースが多かったことから、紫外線による微生物細胞膜の損傷によりエンドトキシンの遊離化が進んだと考えられる。また、京都市内の水道水中のエンドトキシン濃度は 1.41 ~ 21.9 EU/mL の範囲にあり、浄水処理により琵琶湖疏水濃度の 1/10 程度に低下していたが、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 0.7 以上と高い値を示した。

続いて、異なる 3 手法による微生物計数結果と総エンドトキシンの関係を図 3 に示す。いずれの試料においても、標準平板培地 < R2A 平板培地 < DAPI 蛍光染色の順に微生物検出量が増大し、特に水道水試料中の DAPI 蛍光染色法による全菌数は約 1×10^5 (cells/mL) と計数された。しかし、各手法による微生物検出数が増大するにつれて、総エンドトキシンも増大する傾向にあるものの明確な相関は認められなかった。このように、エンドトキシンは VBNC 微生物も含めた "微生物汚染の可能性" を示す指標として有用である反面、水中微生物量の指標として代用することは困難である。その理由として、1) 環境水中には VBNC 微生物を始めとした種々の微生物 (LPS 構造を持たないグラム陽性細菌を含む) が共存しており、微生物種ごとにエンドトキシン活性を左右する Lipid A の組成が異なる点²⁾ とともに、2) 環境微生物群の細胞外膜の状態は多様であり遊離エンドトキシンの存在が大きく影響している点が挙げられる。

さらに、DAPI 蛍光染色による微生物計数結果に基づいて環境試料 (10^6 cells/mL) 中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性を試算すると、 1.13×10^{-3} (EU/cell) となった。前述の大腸菌一細胞当たりのエンドトキシン量と比較すると、環境水中の微生物群に起因する一細胞当たりのエンドトキシンは大腸菌の 1/5 程度の値を示すことが明らかとなった。

塩素処理によるエンドトキシン活性の変化

大腸菌懸濁液 (実験開始時の総エンドトキシン: 2.92×10^4 (EU/mL), 遊離エンドトキシン: 30.1 (EU/mL)) を塩素処理した場合の各エンドトキシン活性の変化を図 4 に示す。集菌・洗菌過程で培養液を除去しているため、塩素処理開始時には遊離エンドトキシンがほとんど存在しない状況である。塩素処理試料の大腸菌不活化を R2A 寒天培地を用いて調べたところ、0.5 時間後には塩素注入濃度 1.0 (mg Cl₂/L) 以上で、24 時間後には 0.5 (mg Cl₂/L) 以上で完全に不活化されていた。総エンドトキシン活性は塩素処理開始 0.5 時間後には塩素注入濃度 7.5 (mg Cl₂/L) までの範囲において塩素濃度に依存して増大し、最大 4.22×10^5 (EU/mL) と 14.5 倍の値を示した。一方、遊離エンドトキシンの顕著な増減は見られなかった。塩素処理開始 24 時間後には、総エン

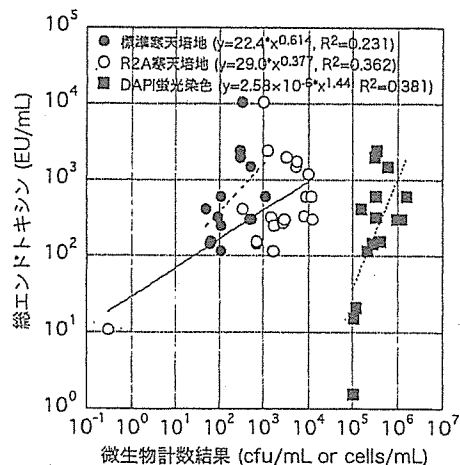


図 3 各手法で計数した環境微生物数と総エンドトキシンの関係

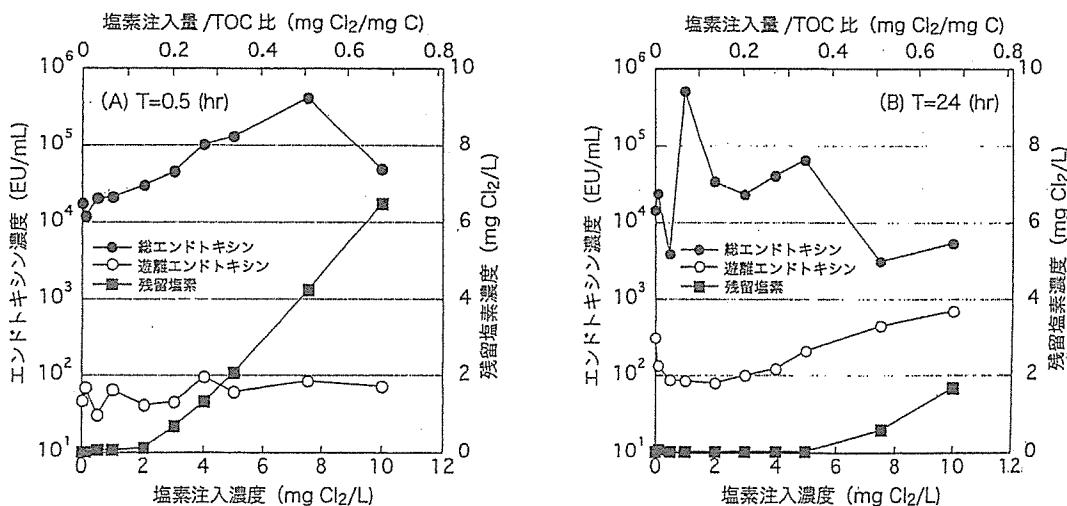


図 4 *E. coli* NBRC3301 懸濁液を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化 (A) 塩素処理開始 0.5 時間後, (B) 24 時間後

ドトキシン活性が塩素注入濃度 1.0mg Cl₂/L) において 5.14×10^5 (EU/mL) に達したものの、残留塩素が検出される濃度範囲では活性低下が見られた。その反面、遊離エンドトキシン活性は塩素注入濃度に伴い増大し、699 (EU/mL) まで増大した。

これらの結果を総合すると、塩素処理により細胞膜が損傷を受けて不活化されるのに対して、LPS が微生物細胞膜に結合した状態のまま高いエンドトキシン活性を示すように変化することになる。この生物活性の増強は、エンドトキシンの活性部位とされる Lipid A の露出量増加または LPS の低分子化などにより起こると考えられる。塩素処理をさらに継続すると、結合エンドトキシンの一部が水中に放出されて遊離エンドトキシン化する一方で、一部の結合エンドトキシンが不活性化される。残留塩素が検出される条件下では総エンドトキシン活性が低下する反面、遊離エンドトキシン活性は顕著に増加する点が特徴的であり、遊離エンドトキシンが塩素による不活性化を受けにくい可能性も指摘できる。

また、宇治川から採取した河川水 (実験開始時の総エンドトキシン: 538 (EU/mL), 遊離エンドトキシン 147 (EU/mL)) を同様に塩素処理した場合の 24 時間後の各エンドトキシン活性を図 5 に示す。前述の対数増殖期の大腸菌懸濁液と比較して、環境微生物群は種々のストレスにより細胞膜に損傷を受けるため、表 1 に示したように遊離エンドトキシンの割合が元来高くなっている。しかしながら、塩素処理により総エンドトキシン活性は全ての試料において低下したのに対して、遊離エンドトキシン活性は全ての試料で増加し、塩素注入濃度 1.5 (mg Cl₂/L) 以上の範囲では総エンドトキシン活性を上回る値が得られた。これらの結果は、塩素処理により細胞膜に結合した状態のエンドトキシンが遊離エンドトキシン化すること、すなわち浄水処理プロセスならびに給配水過程においては溶存態有機物画分に活性の多くが存在することを示しており、実際の水道水からのエンドトキシン検出結果とも一致する。また、本実験の結果より、塩素注入量を適正化することで各形態毎のエンドトキシン活性増大を制御可能であることが示唆されるが、浄水処理プロセスにおける遊離エンドトキシンの挙動は明らかにされておらず、今後は除去特性も考慮したうえで微生物由来の有機物制御を行う必要がある。

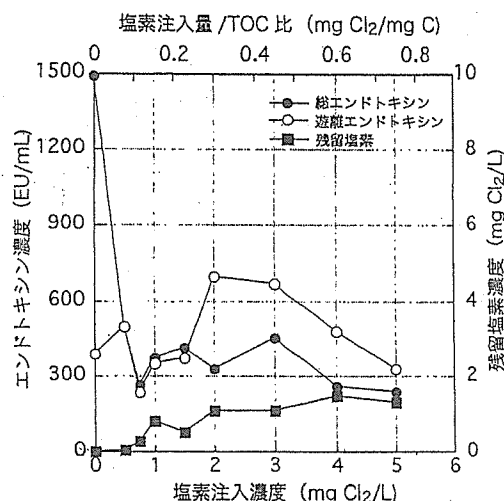


図 5 河川水を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化

4. 本研究の結論

本研究では、モデル微生物として大腸菌細胞に由来するエンドトキシン活性を定量的に調べるとともに、琵琶湖・淀川水系における各地点の環境水、ならびに水道水中のエンドトキシン活性を調べた。その結果、下水処理放流水は 10000 (EU/mL) を超える高いエンドトキシン活性を示すこと、処理水放流口付近では環境水中の濃度も 10 倍程度増大することがわかった。また、環境水中の微生物一細胞当たりのエンドトキシン活性は、 1.13×10^{-3} (EU/cell) と計算された。さらに、大腸菌または環境水試料を塩素処理した場合のエンドトキシン活性の変化を調べたところ、塩素により細胞膜が損傷を受けて微生物が不活化されるのに対して、エンドトキシン活性は逆に増強されうること、塩素処理によりエンドトキシンの遊離化が促進されることを示した。なお、本調査は冬季に実施したものであるが、琵琶湖では春～夏季にかけて藍藻類やピコプランクトンが繁殖することが知られており、これらの微生物細胞に由来するエンドトキシン活性も報告されていることから³⁾、原水中・水道水中のエンドトキシン活性の季節変動の把握が今後の課題として挙げられる。

参考文献

- 1) Reed, C. E., Milton, D. K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(2), p.157-66, 2001
- 2) Rietschel, E. T. *et al.*: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*, 8(2), p.217-25, 1994.
- 3) Rapala, J. *et al.*: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment.

流水式 UV 装置における生物線量計としての一般細菌の妥当性

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ○廣戸裕子, 大瀧雅寛

Validity of the Standard Plate Count Bacteria as Biosimulator in Flow UV Reactor, by Yuko HIROTO, Masahiro OTAKI (Dept. of Human Environmental Science, Ochanomizu Univ.)

1. はじめに

運転中の紫外線装置において、消毒線量を実測する方法として原水中の一般細菌を生物線量計として利用する方法を試みた。既に生物線量計として用いられることの多い大腸菌フェージとの整合性を、流水式装置を用いて様々な条件下において検討した。

2. 実験方法

紫外線源には低圧水銀灯を用いた。流水式装置には、容積 450 ml の二重円筒管装置を用い、回分式には内径 5.5 cm のガラスシャーレを用いた。井戸水に、大腸菌フェージ Q β を少量加え、よく攪拌したものを試料とした。

回分式不活化実験では、試料をビーカーに入れ、攪拌させながら紫外線を照射した。実験装置を Fig. 1 に示した。Q β を生物線量計として用いて線量を測定した。なお、算定式は

UV fluence = $-5.9 \times \ln(S_{UV})$ mW \cdot s \cdot cm $^{-2}$ を用いた¹⁾。

流水式不活化実験では、装置内を試料で満たし、定常流を仮定するため、紫外線を照射しながら試料を 1 L 程度流下させた後に試料を採取した。流水式の実験装置を Fig. 2 に示した。

紫外線装置通過前後の試料中の、Q β と一般細菌を測定した。Q β は重層寒天培地法を用い、37 $^{\circ}$ C で 24 時間程度培養した。一般細菌は直径 5 cm、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターで試料を吸引ろ過し、普通寒天培地にのせ、37 $^{\circ}$ C で 24 時間程度培養し、コロニー数を計数した。

試料の 254 nm における吸光度はいずれの場合も約 0.03 cm $^{-1}$ であった。Q β の初期濃度は 4.0×10^7 PFU \cdot ml $^{-1}$ であった。一般細菌の初期濃度は 3.8 CFU \cdot ml $^{-1}$ であった。

3. 実験結果と考察

回分式による不活化実験の結果を Fig. 3 に示した。縦軸には生残率を対数で表し、Q β によって算出した UV 量を横軸に表した。一般細菌の生残率は UV 量が 20 mW \cdot s \cdot cm $^{-2}$ 付近を境界として二段階の減少を見せた。これは、一般細菌中に UV 耐性の強い種がある割合で存在したためと考えられる。

Fig. 4 に流水式による Q β 、一般細菌のそれぞれの不活化結果から算定した UV 量と、平均滞留時間の関係を示した。Q β の場合は平均滞留時間が増すにつれ算定 UV 量も増加する結果となった。一般細菌は結果に大きくばらつきが見られるが、UV 量の算出結果が Q β と一致する点も見られた。結果がばらつく原因として、一般細菌はろ紙上に捕集した細菌数に差が見られ、かつ個体数が少ないことが多かった。特に平均滞留時間が 4.4 min では個体数の少なさとばらつきが出ていたため、微生物測定法の信頼性が非常に低い。よって、滞留時間が大きく、不活化率が大きな条件では、その点を改善して再度実験を行う必要がある。

4. まとめ

一般細菌は、回分式実験により、不活化率から UV 量を算定する式を求めることが出来た。その再現性も十分にありと考えられた。流水式への適用においては、不活化率が大きい条件でデータの信頼性が低下するという課題が残るが、この点を改善することにより、一

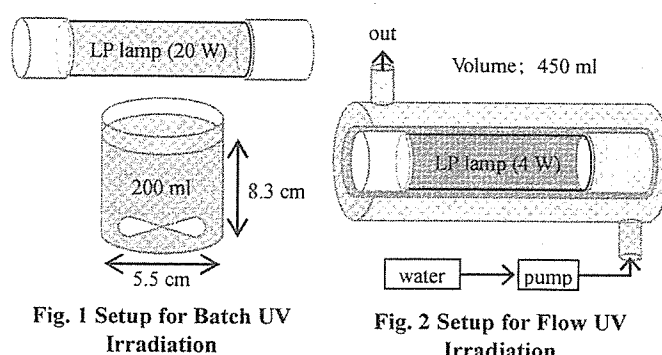


Fig. 1 Setup for Batch UV Irradiation

Fig. 2 Setup for Flow UV Irradiation

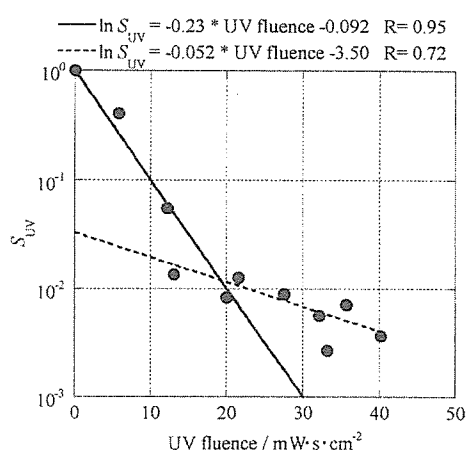


Fig. 3 Inactivation after UV irradiation by Batch

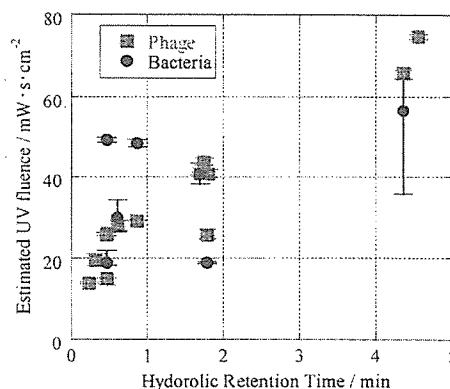


Fig. 4 Estimation of UV in Flow Reactor

般細菌が流水式においても生物線量計としても用いられる可能性が示された。

参考文献

- 1) KAMIKO N. OHGAKI S. RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency. Wat. Sci. Tech., 21, (3) 227-231, 1989.
- 2) KAMIKO N. et al. Photoreactivation kinetics of the fecal indicator bacteria in the released effluent. Proceedings of 1st Asia International Conference of IUVA, Singapore, 2002.

謝辞

本研究は、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金「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」により実施した。

1-G-17-4

表皮角化細胞を用いた水中エンドトキシンの毒性評価

京都大学大学院工学研究科 ○高橋恭介, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤禎彦

Evaluation of the Toxicity of Endotoxin in Water using Human Keratinocytes, by Kyosuke TAKAHASHI, Kentaro KOBAYASHI, Yumiko OHKOUCHI, Sadahiko ITOH(Dept. of Eng., Kyoto Univ.)

1. はじめに

現在、水質基準の対象となっている化学物質は発がんなどの重篤なエンドポイントをもつものである。しかし今後、より安全な水道水の供給を目指すために、生体恒常性を攪乱することで健康状態からの乖離を引き起こす物質についても知見を集積する必要があると考えられる。本研究では、微生物細胞外膜構成物質であるエンドトキシン(LPS)を一例としてとりあげ、毒性評価を行う。塩素やオゾンによる酸化処理を受けると、エンドトキシンは微生物から水中へと放出されて除去されにくくなるため、水道水中に残存するエンドトキシン活性やそれが誘発する生理活性を評価することが重要である。本研究では、特にヒト表皮角化細胞を用いることにより、水中エンドトキシンの経皮曝露を想定した免疫毒性発現について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 LPS 曝露による細胞毒性試験・マイクロアレイ解析

正常ヒト成人乳房表皮角化細胞に *E. coli* O55:B5 由来 LPS を 10, 100, 1000 ng/mL の濃度で 4 時間および 100 ng/mL で 24 時間曝露した。また、LPS 濃度 0~50 µg/mL の範囲で 24 時間の曝露を行い、Cell counting kit-8(同仁化学製品)を用いて細胞毒性を調べた。次に、RNeasy Mini Kit(QIAGEN), amino-allyl RNA amplification kit(Sigma Genosys)を用いて Cy 色素で標識した aRNA を調製し、AceGene® Oligo Chip 30K IChip Version(DNA チップ研究所)上でハイブリダイゼーションを行った。洗浄・乾燥後、Scan Array Express(Perkin Elmer)および DNASIS Array Express(HitachiSoft)を用いて蛍光スポットの定量化および遺伝子発現の数値化を行った。

2.2 浄水処理水の分画濃縮および曝露試験

A 浄水場の各浄水処理過程における処理水を採水し、分画分子量 10000 の限外ろ過膜を用いてエンドトキシンを含む高分子化合物を分画濃縮、OASIS HLB カートリッジ(Waters)を用いて親水性成分、疎水性成分への分画濃縮を行った。これらの分画を用いて上記と同様に曝露試験を行った。

3. 実験結果

3.1 LPS 曝露による細胞毒性試験・マイクロアレイ解析

各濃度の LPS を曝露し、アレイ解析を行った結果を図 1 に示す。LPS 1000 ng/mL, 4 時間の曝露を行った細胞において IL-12A の発現強度が 2.8 倍程度に増大した。IL-12A は Th1 細胞の分化を誘導し、Th1 が過剰優位になると自己免疫疾患を引き起こすといわれている。一方、樹状細胞やマクロファージなどの細胞において LPS 曝露により産生増大すると報告されている IL-1β, IL-6, TNF-α などの炎症性サイトカインには、際立った発現比の増大が認められなかった。LPS の活性を抑制する BPI 様物質の発現比増加も同時に見られたため、その作用によって炎症性サイトカインの発現が抑制された可能性もある。

3.2 浄水処理水の分画濃縮および曝露試験

各サンプルの濃縮分画の細胞毒性を調べた。高分子化合物分画中のエンドトキシン濃度を表 1 に、24 時間曝露による細胞生存率の変化を図 2 に示す。着水井>急速ろ過後>粒状活性炭吸着後と、浄水処理が進むにつれて細胞毒性は低減した。また、各サンプルとも同程度の活性を示す濃度の *E. coli* 由来 LPS よりも強い細胞毒性を示した。この結果は、エンドトキシン以外にも強い細胞毒性を示す物質群が原水中に存在しており、浄水処理、特に活性炭処理によりその大部分が除去されているものの、若干の毒性物質群が残留することを示唆している。一方、親水性成分分画については強い細胞毒性が見られなかったため、高分子化合物分画が細胞毒性において大きな寄与を示していると推定された。細胞毒性の変化と比較して免疫毒性がどのような変化を示すかについて、マイクロアレイ解析を行うことが必要であると考えられる。

4. まとめ

1) 1000 ng/mL(13000 EU/mL 相当), 4 時間の曝露条件において

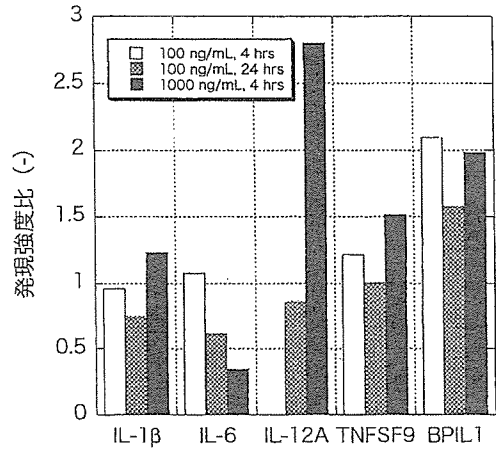


図 1 各遺伝子の発現強度比変化

表 1 高分子化合物分画のエンドトキシン濃度

採水箇所	着水井	ろ過後	オゾン後	活性炭後
エンドトキシン濃度 (EU/mL)	97.4	26.4	9.96	18.5

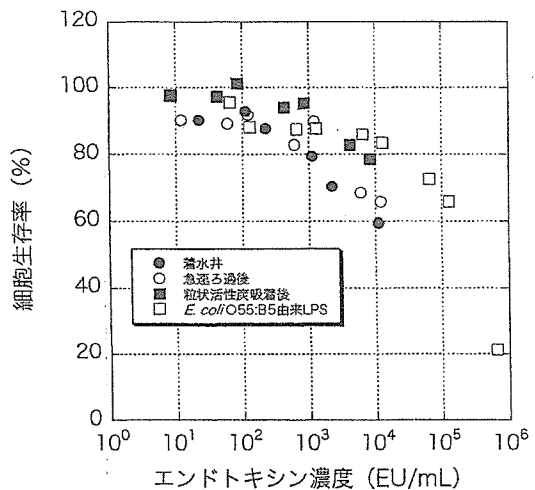


図 2 高分子化合物分画および LPS の細胞毒性

炎症性サイトカイン IL-12A の発現増大が確認された。
2) エンドトキシンを含む高分子化合物分画において強い細胞毒性が見られた。

謝辞

採水にご協力いただいた A 浄水場関係者各位に深謝いたします。

参考文献

Rapala, J., et al.(2002) Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, *Wat. Res.*, 36, 2627-2635.
Uematsu S, Akira S(2006) Toll-like receptors and innate immunity, *J. Mol. Med.*, 84, 712-715.

口頭
3/15 (木) 午後

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

○大河内由美子（京都大学大学院） 石川卓（京都大学）
高橋恭介（京都大学大学院） 伊藤禎彦（京都大学大学院）

1. はじめに

現行の水道水質基準では病原性微生物に関する項目として、1) 一般細菌数、2) 大腸菌の2項目が設定され、末端給水栓において残留塩素を保持することが定められている。浄水処理の最終段階で塩素消毒を行うことにより、微生物による健康リスクを制御しているわけであるが、不活化された微生物をはじめとした微生物に由来する化学物質群は浄水中に残存しているのが現状である。これらの物質のうち、グラム陰性細菌やシアノバクテリアの細胞外膜構成成分であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) は、生体内で強い免疫反応を惹起することが知られており、この生物活性 (エンドトキシン) に対して医療・製薬現場では個別に対策が取られている。近年、高濃度エンドトキシンを吸入することにより呼吸器系炎症のリスクが高まることが指摘され、日常生活におけるエンドトキシン曝露とアレルギー疾患発症との関連が注目されつつあるものの、水中に存在するエンドトキシン活性量やヒトへの曝露状況に関する知見はごく限られている²⁾。

さらに、浄水中のエンドトキシンは配水過程における微生物の再増殖、あるいは水源におけるシアノバクテリアの大量発生などにより増大する可能性がある。本研究では、浄水処理過程ならびに水道水中におけるエンドトキシンの活性量・存在形態を詳細に調べ、エンドトキシンの除去特性と水道水中濃度を明らかにする。

2. 採水調査および実験方法

2.1 採水調査について

調査対象施設は、琵琶湖・淀川水系から取水しているA浄水場である。本施設は、急速ろ過後にオゾン・活性炭処理を行う高度浄水処理施設である。採水は、2006年11月および12月に計3回行った。浄水処理フローならびに採水ポイントを図1に示す。採水容器は、予め250°C、2時間の乾熱滅菌処理によりエンドトキシン汚染を除去したガラス瓶を使用した。塩素消毒された試料のうち一部の試料については、比較対照として残留塩素除去操作を行った試料（チオ硫酸ナトリウム 0.05g を入れてオートクレーブ滅菌したガラス瓶に採水）についても測定を行った。

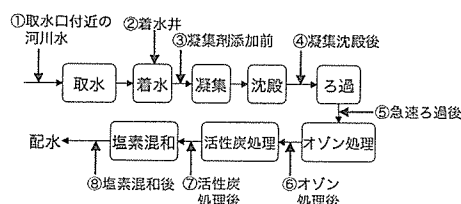


図1 対象施設の処理フローと採水ポイント

2.2 測定方法

採水試料は4°C保冷下で持ち帰り、4時間以内に以下に示す各項目の測定を行った。

- 1) 微生物試験：一般細菌数（標準平板計数；37°C、24時間）、従属栄養細菌数 (R2A 平板計数；20°C、7日間)、全菌数（蛍光染色計数；DAPI(4',6'-ジアミノ-2-フェニルインドール二塩酸塩)
- 2) 全有機炭素 (TOC)、紫外線吸光度 (E260)、pH、濁度
- 3) 総エンドトキシン、遊離エンドトキシン

総エンドトキシン活性の測定は水試料の全画分を用いて、また遊離エンドトキシンの測定は、14,000 rpm、10分間遠心分離した後の上清を用いた。エンドトキシン測定用の試料は-80°Cで保存した。エンドトキシン活性の測定は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスペー ES-50M, 生化学工業) を使用したエンドポイント比色法 (トキシカラー DIA-MP, 生化学工業) により行った。

3. 実験結果と考察

本研究では、エンドトキシンをその存在形態ごとに測定しており、総エンドトキシンから遊離エンドトキシンを差し引いた値を微生物細胞に結合した状態で存在する結合エンドトキシン量と考えることとする。

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。

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

表1 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	
	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

*ただし、取水～急速ろ過後試料の全菌数については2回の調査結果の平均値、オゾン処理以降の試料については1回のみ調査で得られた結果を示している。

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。これらの結果から、遊離エンドトキシンの除去率は全菌数のそれとよく一致しているのに対して、総エンドトキシンの除去率は寒天培地を用いて計数した増殖可能菌数のそれと全菌数のその中間に位置することが示された。

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。従来の研究から、オゾン処理により浄水中の生物同化性有機炭素(AOC)は増加し、その後の活性炭処理によりAOCは吸着除去されることが知られている³⁾。これを踏まえて考えると、表1からオゾン処理により微生物が不活化されるものの、活性炭に吸着した有機物を炭素源として活性炭上で微生物が再増殖し、エンドトキシン増大に寄与していると考えられる。今回の結果は、Rapalaらが調査した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⁾。この中に、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おり、本研究で得られた結果とも合致する。最後に、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。

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2に示す。急速ろ過以後の試料では、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。さらに、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から、微生物細胞の状態(増殖状態/不活化状態)とエンドトキシンの存在形態は密接に関連していることが示された。

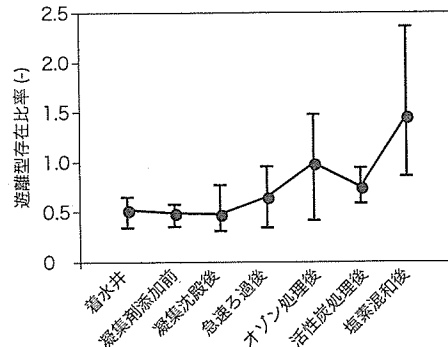


図2 浄水処理過程におけるエンドトキシン存在形態の変化

4. おわりに

本研究では、A浄水場を対象として浄水処理過程における微生物量およびエンドトキシン活性量の変化を調べ、エンドトキシンの除去特性を明らかにした。特に、活性炭処理プロセスで微生物の再増殖が起こりエンドトキシンが増大すること、また遊離エンドトキシンの存在比率は微生物細胞の状態を反映し、浄水処理後の試料ではそのほとんどが遊離エンドトキシンとして存在することを示した。今後は、これらの結果を踏まえて、エンドトキシンを指標とした給配水過程における微生物モニタリングに取り組む予定である。

謝辞：試料をご提供いただいたA浄水場関係者各位に深謝する。

参考文献：1) Reed, C. E., Milton, D. K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108 (2), pp.157-66, 2001, 2) Anderson, W.B. *et al.*: A review of drinking-water-associated endotoxin, including potential routes of human exposure. *Can. J. Microbiol.*, 48, pp.568-83, 2002, 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.

配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響

国立保健医療科学院水道工学部 ○高井 正子
島崎 大
国包 章一

1. はじめに

水道法では微生物学的な安全確保の視点から塩素消毒と残留塩素保持が義務づけられているが、その一方で塩素消毒剤由来の異臭味や消毒副生成物等により、過剰注入とならないよう、塩素剤の注入率を低減することも求められている。国内の各水道事業体においては、塩素剤の注入率低減化について様々な取り組みが行われており、高度浄水処理の導入による浄水水質の改善に加えて、残留塩素濃度のオンラインモニタリングや塩素消費シミュレーション、塩素剤の多点注入等による注入率のきめ細かな制御により、一定の成果を上げている。しかし、残留塩素濃度を下げることによって、消毒効果が弱まり、配水過程における微生物再増殖のポテンシャルは増大する。残留塩素濃度の低減を図るとともに、末端給水栓においても微生物学的に安定した水質の水道水を提供する必要がある。本研究では、異なる残留塩素濃度における微生物再増殖性の相違について実験的検討を行った。

2. 実験方法

生物膜モニタリング装置であるアニュラーリアクターを用いて、管路内における微生物の付着・増殖を疑似的に再現した。アニュラーリアクターは、ガラス製の円筒容器と回転ドラムで構成され、回転ドラムの外壁には試験片 20 枚を着脱できるようになっている。

原水として国立保健医療科学院水道水を使用し、チオ硫酸ナトリウムまたは次亜塩素酸ナトリウムを添加することにより、各系統の試料水の遊離塩素濃度がそれぞれ 0.0mg/L、0.1mg/L、0.5mg/L 前後となるように調整し、44 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した。ただし、通水開始後 34 日目は、全ての系統において一時的に遊離塩素濃度を 1.0～1.2mg/L に上げ、形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べた（図. 1）。流入量を 10mL/分に設定し、滞留時間を約 100 分（容積約 1L）とした。試験片の材料はポリカーボネイトとした。回転ドラムを 180rpm の速度で回転させ、流速 50cm/秒、内径 20mm に相当する給水管内の状況を再現した。各試料水の水温は 20℃前後に維持した。流入水、流出水および試験片表面に付着した微生物を週 2 回の間隔でサンプリングし、各系統の流入水、流出水および試験片表面における一般細菌と従属栄養細菌を測定した。測定は上水試験方法に準じ、従属栄養細菌は R2A 培地を用いて 20℃で 7 日間培養した。

3. 結果と考察

表. 1 に流入水の水質を示す。水温以外の水質項目については、使用した水道水の水質によるが、特に微生物再増殖性の指標となる AOC 濃度は平均 199 μ g/L であり、国内の他の測定例と比べて高く、微生物が比較的再増殖しやすい水質であったといえる。

試験片表面の従属栄養細菌密度は、図. 2 に示すように、いずれの残留塩素濃度においても、通水開始当初は増加していくものの、15～20 日以降は変動が小さくなり、定常期に達した。増殖期における試験片表面の従属栄養細菌増加速度は残留塩素濃度 0.0mg/L が最も早く、残留塩素により

表. 1 流入水の水質試験結果
(平均値)

水温	19.6℃
pH	7.95
TOC	1.35mg/L
AOC*	199 μ g/L
NO ₃ -N	2.4mg/L
NO ₂ -N	0.036mg/L
PO ₄	0.28mg/L

※給水栓から直接採水

配水過程における微生物再増殖に及ぼす残留塩素濃度の影響

微生物膜の増殖が抑制されていた。定常期（16～27日）における試験片表面の従属栄養細菌密度は、残留塩素濃度 0.0mg/L で $6.5 \times 10^5 \sim 3.1 \times 10^6$ CFU/cm² であり最も大きかった。0.1mg/L と 0.5mg/L の場合は、それぞれ $6.4 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ CFU/cm²、 $3.5 \times 10^2 \sim 5.7 \times 10^3$ CFU/cm² となった。残留塩素濃度 0.5mg/L では変動が大きく、不安定な微生物膜が形成されたといえる。

流出水中の微生物については、試験片表面で増殖した微生物が剥離したものと考えられる。図. 3に示すように、残留塩素濃度 0.0mg/L、0.1mg/L の場合は、試験片表面と同様に 15～20日 で定常期に達し、定常期（16～30日）の従属栄養細菌濃度はそれぞれ $3.4 \times 10^3 \sim 8.0 \times 10^5$ CFU/ml、 $1.6 \sim 4.2 \times 10^3$ CFU/ml であった。残留塩素濃度 0.5mg/L では増減を繰り返しているが、20日目を除き、他の残留塩素濃度における値以下を示し、最高で 2.3×10^3 CFU/ml であった。

35日目は、試験片表面、流出水中ともに残留塩素濃度を高めた影響を受け減少しているが、一時的なものであり5日前後で回復した。また、この時、試験片表面、流出水ともに従属栄養細菌では最大で 2log 程度下がったが、一般細菌では最大で 4log 程度下っており、従属栄養細菌は塩素濃度の変化による影響が一般細菌に比べて小さいといえる。

4. まとめ

- 微生物の付着量および流出水中濃度は、15～20日 で定常期に達した。
- 定常期における従属栄養細菌の付着量は、残留塩素濃度 0.0mg/L の場合に比べて、0.1mg/L では 2log 程度、0.5mg/L では 3log 程度抑制された。定常期における従属栄養細菌の流出水中濃度は、残留塩素濃度 0.0mg/L の場合に比べて、0.1mg/L、0.5mg/L とともに 2log 程度抑制された。
- 残留塩素濃度を 1.0～1.2mg/L として1日中通水することにより微生物の付着量および流出水中の微生物濃度は減少したが、5日前後で元の数値まで回復した。

【参考文献】(社)日本水道協会：酸化・消毒剤注入量の低減化に関する研究報告書（3年間のまとめ）、平成15年3月

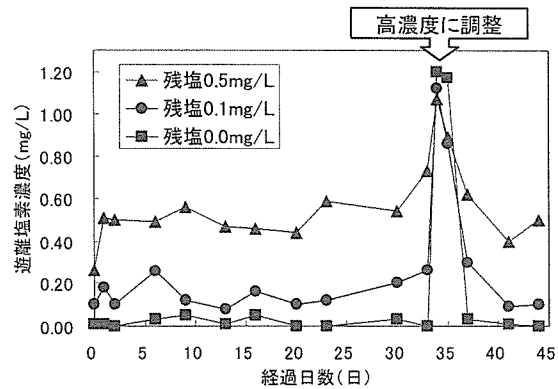


図. 1 各系統の遊離塩素濃度

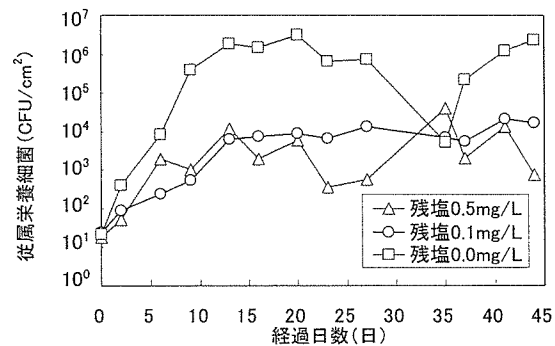


図. 2 従属栄養細菌経日変化 (試験片表面)

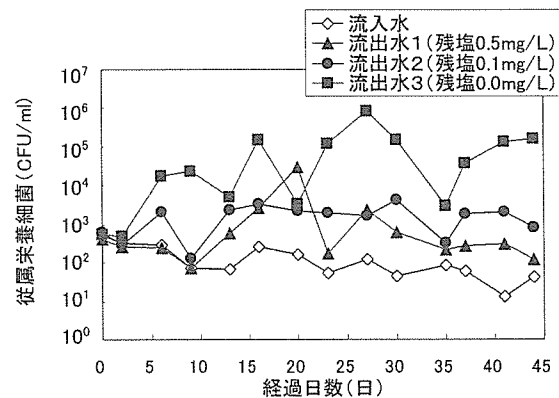


図. 3 従属栄養細菌経日変化 (流入水・流出水)

(8-46) 流出クリプトスポリジウム・オーシスト量算出のための予備的調査

○西村 和之(県立広島大学) 国包 章一(国立保健医療科学院)

1. はじめに

様々な調査により、各地の水道原水中にクリプトスポリジウム・オーシストが存在することが明らかとなっているが、検出感度等の点で定量的な把握が十分で無い事が指摘されている¹⁾。従来の手法を用いた場合でも、定期調査の実施等によりデータの蓄積が図れるならば、原水を持つクリプトスポリジウムに関するリスクの把握は可能である。しかしながら、感度の高い手法が活用されるならば、少ない労力でリスク管理に必要な情報が得られることになる。本調査は、家畜糞尿中に排出されたオーシスト数^{2, 3)}が、取水点等へ到達する割合等の算出根拠を得るために、迅速性や感度において優れている PCR 法を活用した検出法⁴⁾による定量を比較的清浄な河川を対象として行った。

2. 調査地点および調査方法

調査は 2006 年 11 月、12 月に実施した。調査地点は、酪農地帯を流れる一級河川江の川水系に属する「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西城川の 1) 平子(ゆめの橋)、2) 川手(庄原大橋)と比和川の 3) 比和川橋とした。試料は、河川水 200L をポリタンクで採水後、実験室内でポリエチレン製 MF 中空糸膜モジュール(孔径 0.1 μm 、有効濾過面積 4,000 cm^2 、三菱レイヨン製)を用いて V 底遠心容器(175ml 用)に濃縮した⁵⁾。濃縮試料は 2 分割し、一方は、公定法に定められているショ糖密度勾配遠心法と免疫磁気ビーズ法による精製を経て蛍光抗体染色法により顕微鏡観察を実施した。残りの一方は、クリプトスポリジウム・オーシストの遺伝子(RNA)を抽出し、東和科学(株)製 *C. parvum* 検出キットを用いて NASBA 法により *hsp* 86 領域を増幅し定量を行った。また、別途に採水した 40L の試料を用いたクリプトスポリジウム・オーシストの遺伝子(DNA)、を抽出し、*hsp*70 領域を対象として PCR 増幅した後、塩基配列を決定し、ホモロジー検索による遺伝子型の同定を行った。

3. 結果および考察

顕微鏡観察法と RNA 検出法による定量結果の一部を表-1 に示す。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、RNA 検出法では、2 地点、3 試料で 1~5 個/100L のオーシストが検出された。また、*hsp*70 を対象遺伝子とした遺伝子解析を行った。図-1 に電気泳動の結果を示すが、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

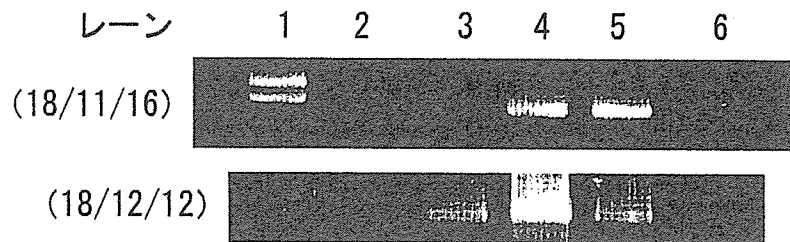
ト型 (*Homo sapiens*) と 100%の相同性が認められた。また、12月12日比和川橋の試料からは *C. parvum* ヒト型 (*Homo sapiens*) と *C. parvum* ウシ型 (*Bovine*) との存在が示唆された。

このように、PCRに基づく手法を用いることにより、比較的清浄な河川水に存在するクリプトスポリジウム・オーシスト量と遺伝子型の把握が可能であると判断された。

表1 顕微鏡法および核酸検出法による検出結果 (単位: 個/100L)

		西城川 平子地点	西城川 川手地点	比和川 比和川橋地点
H18/11/16	顕微鏡観察法	0	0	0
	RNA 検出法 ¹⁾	0	0	2
H18/12/12	顕微鏡観察法	0	0	0
	RNA 検出法 ¹⁾	0	1	5

1) RNA 検出法はコピー数に基づく定量法



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1 電気泳動結果

まとめ

本調査で利用した PCR 法に基づく手法は、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。

1)保坂 三継:原虫類によるわが国水環境の汚染状況、水環境学会誌、Vol.26, No.1、2003

2)更科孝夫、坂井宏明、津島良典、長沢秀行、田辺茂之、宇塚雄次、健康牛のクリプトスポリジウム汚染の実態調査、用水と廃水、Vol.44(4)、291-294、2004

3)佐伯晋吾ら：兵庫県下のクリプトスポリジウムの汚染実態調査ーと畜場搬入牛のオーシスト排出状況ー、日本獣医公衆衛生学会誌、53、25-29、2000

4)原弘之ら、平成18年度全国飲料水検査研究発表会、2006

5) U.S.EPA: USEPA Method 1623 *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, GC. EPA 821-R99-006, 1999