

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」  
平成 19 年度分担研究報告書

消毒副生成物による健康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研究

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

## 研究要旨

本研究では、消毒副生成物の総括的な毒性評価指標として TOX に着目し、ハロ酢酸に関する *in vitro* バイオアッセイデータと慢性毒性試験の結果から、SRNOM 塩素処理水中の TOX に起因する毒性推定を試みた。その結果、SRNOM 塩素処理水の毒性はジクロロ酢酸またはクロロ酢酸と同程度であると推定された。ジクロロ酢酸水質基準の TOX 換算値に対して、一般水道水中ではその 4~5 倍の TOX 生成量が見込まれることから、改めて TOX を指標とした総括的な毒性評価の重要性を指摘した。また、微生物再増殖を表す指標としてエンドキシン濃度およびその形態に着目し、実際の給水栓水を用いた回分試験ならび連続通水試験を行った結果、微生物再増殖量が浮遊微生物濃度(=従属栄養細菌)として  $2\sim 5 \times 10^3$  cfu/mL を超えた場合に、遊離エンドキシン比率が顕著に低下(<70%)することを示した。さらに、DNA 合成活性に着目して従属栄養細菌定量の迅速化を試み、モデル微生物を用いた検討の結果、従属栄養細菌数測定に要する時間を 36 時間程度に短縮できる可能性を示した。

## A. 研究目的

消毒副生成物全体の毒性については、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、総括的な毒性評価手法が求められる。一方で、水中には生菌や不活化された微生物に起因する物質が存在しており、給配水過程における微生物再増殖を引き起こすとともに、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。現状のまま残留塩素濃度を低減すれば、再増殖微生物によるリスク増大は不可避であり、より厳密なリスクマネジメント手法が求められる。

そこで本研究では、有機ハロゲン化合物の総量を表す TOX(Total Organic Halides)を用いて毒性を総括的に把握し、TOX 濃度としての許容レベルを提示するとともに、米国 EPA で進められている塩素消毒水の総括的毒性評価を目的としたプロジェクトを紹介する。また、日本の給配水状況に適した微生物再増殖モニタリング手法を確立するため、グラム陰性細菌の細胞外膜を構成するリポ多糖が示す生物活性(エンドキシン)に着目し、微生物再増殖モニタリング指標としての適用可能性を検討するとともに、浄水中の従属栄養細菌数を迅速に測定するための手法について基礎的検討を加える。

## B. 研究方法

### 消毒副生成物による健康リスクの総括的評価に関する検討

平成 17 年度に報告した文献考察の成果と、昨年度までに実施した *in vitro* バイオアッセイ結果(染色体異常誘発試験および二段階/非二段階形質転換試験)との相関性を利用して、SRNOM 塩素処理水の毒性推定を試みた。また、米国 EPA で進められている塩素消毒水の総括的毒性評価を目的としたプロジェクトについてレビューを行った。

### 微生物再増殖指標としてのエンドキシンの有効性に関する検討

#### 1) 採水調査

昨年度までの研究成果から、エンドキシンは十分な消毒効果が達成されている水中ではほぼ遊離化した状

態で存在する傾向にあるのに対して、微生物が増殖状態にある場合には総エンドトキシン濃度の上昇ならびに遊離エンドトキシン比率の低下が確認されている。これらを踏まえて、実際の給水栓水を対象とした同化性有機炭素(AOC)濃度およびエンドトキシン濃度とその存在形態に関する調査を行い、エンドトキシンが衛生状態のモニタリング指標として適用可能か否かを検討した。調査地点は、京都市山ノ内浄水場(前塩素-凝集沈殿-急速ろ過-後塩素)の給水区域から 40 地点を選定した。TOC, AOC, E260, 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン, たんぱく質濃度, 全菌数, 従属栄養細菌数, 遊離塩素濃度, 結合塩素濃度の測定を行った。

## 2) 微生物再増殖実験(回分試験)

配管内滞留による水質条件悪化を想定し、上記採水試料 No.16-40 の 25 試料を対象としてチオ硫酸ナトリウム溶液の添加により残留塩素を中和して 20°C でインキュベートした。塩素中和後, 1 日後, 7 日後の従属栄養細菌数およびエンドトキシン濃度を測定した。

## 3) アニュラーリアクターを用いた模擬バイオフィーム形成実験

残留塩素濃度を低減した給配水環境を想定して、遊離残留塩素濃度を A) 0 mg/L, B) 約 0.1 mg/L の二段階に調整した水道水をアニュラーリアクターに通水した。残留塩素濃度の調整はチオ硫酸ナトリウム溶液添加により行った。PVC スライドを回転ドラムにセットし、通水速度は 8.3 mL/min, 回転速度は 84 rpm に設定した。流入水, 流出水をそれぞれ採取し、TOC, AOC, 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン, 従属栄養細菌数, ATP の経時変化を調べた。

また、PVC スライド 1-2 枚を定期的に取り出して、表面に形成されたバイオフィーム試料の回収を行い、バイオフィーム中の従属栄養細菌数を測定した。

## 従属栄養細菌に対する迅速定量法の予備的検討

モデル微生物として、*Pseudomonas fluorescens* P17 を用い、DNA 合成活性を指標とした従属栄養細菌定量を試みた。ハロゲン化 DNA アナログである 5-bromo-2'-deoxyuridine を添加した R2A 液体培地中で短時間培養し、DNA 複製に伴い取り込まれた BrdU を免疫学的手法により検出する。微生物濃度がおよそ  $10^2 \sim 10^6$  (cfu/mL) となるよう R2A 液体培地を用いて培養液の段階希釈を行った後に、微生物懸濁液の細胞数を測定するため R2A 寒天培地を用いて 20°C, 7 日間培養した。同時に、残りの培養液に対して BrdU を添加し、培養を行った。BrdU 濃度は 100, 500, 1000 nM の三段階に設定し、培養時間は 5 時間、培養温度は 20°C とした。

BrdU 標識 DNA の免疫学的検出は、Hamasaki らにより報告されている DNA プロットニング法<sup>1)</sup>を参考にして、96 穴マイクロプレート上での検出方法へと改変した。細胞内に取り込まれた BrdU をペルオキシダーゼ標識抗体を用いた抗原抗体反応により検出した。ペルオキシダーゼの基質として ABTS を使用し、基質添加から 2 時間経過した後に、マイクロプレートリーダーを用いて波長 405 nm (対照波長=490 nm) の吸光度を測定した。

また、実際の水道水試料を対象として、1) 未濃縮試料, 2) 遠心による 10 倍濃縮試料の各試料中の微生物を BrdU でラベル化し、同様の検出操作を行った。なお、BrdU 濃度は 1000 nM, 培養時間は 5 時間、培養温度は 20°C とした。

## C. 研究結果

### 消毒副生成物による健康リスクの総括的評価に関する検討

SRNOM 塩素処理水およびクロロ酢酸類の染色体異常誘発性試験により求めた D20 値, 形質転換試験により求めた形質転換率 0.1 超過濃度に対して、文献考察により得られたクロロ酢酸類の慢性毒性試験結果をそれぞれプロットした。その結果、SRNOM 塩素処理水の染色体異常誘発性はジクロロ酢酸と同程度、形質転換誘発性では二段階試験でクロロ酢酸とジクロロ酢酸の間、非二段階試験ではクロロ酢酸よりも強いという結果となった。総じて、SRNOM 塩素処理水の毒性はトリクロロ酢酸よりも強く、ジクロロ酢酸またはクロロ酢酸と同程度といえる。

表 1 SRNOM 塩素処理水の毒性の相対評価

	染色体異常誘発性 D20値 (mg Cl/L)	形質転換誘発性	
		二段階試験	非二段階試験
		誘発率0.1超過濃度 (mg Cl/L)	誘発率0.1超過濃度 (mg Cl/L)
クロロ酢酸 (MCA)	12	0.21	6.0
ジクロロ酢酸 (DCA)	25	8.3	36
トリクロロ酢酸 (TCA)	110	79	550
SRNOM塩素処理水	33	0.83	0.71

しかしながら、以上の結果は *in vitro* のバイオアッセイ結果から推定したものであり、動物個体に対する毒性に関して結論が得られたわけではない。TOX すなわち塩素処理水そのものを用いて *in vivo* 試験を行い、その毒性を評価する必要があると指摘できる。そこで、米国 EPA で現在進められている消毒処理水の総合的な毒性評価プロジェクトの枠組みを図 1 に示した。本プロジェクトでは発がん性のみならず、生殖/発生毒性，免疫毒性，神経毒性などの毒性も評価対象となっている点が注目に値すると言えよう。

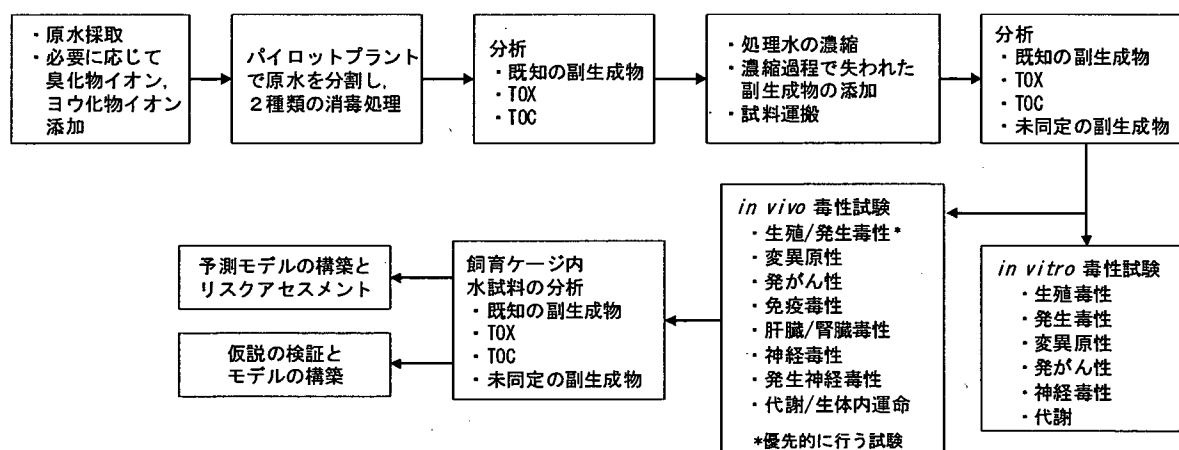


図 1 米国 EPA における消毒処理水の毒性評価フロー

## 微生物再増殖指標としてのエンドトキシンの有効性に関する検討

### 1) 採水調査

対象給水区域における浄水中 AOC 濃度は  $59.8 \pm 15.6 \mu\text{g/L}$  であった。いずれの採水地点においても、van der Kooij が提唱する塩素フリーな給配水システムにおいて微生物学的安定性を維持するとされる AOC 濃度<sup>2)</sup>、 $10 \mu\text{g/L}$  を大幅に上回っていた。また、LeChevallier らは残留塩素有りの配水システムでは AOC を  $50 \mu\text{g/L}$  未満に制御することで再増殖，特に大腸菌群の再増殖が抑制できると報告している<sup>3)</sup>が、本調査の結果からは 40 地点中 29 地点でこの値を上回る結果となった。

一方、総エンドトキシン濃度の測定結果は  $1.48 \pm 0.69 \text{ EU/mL}$ ，遊離エンドトキシン濃度は  $1.46 \pm 0.56 \text{ EU/mL}$  となり、遊離エンドトキシン比率(=遊離エンドトキシン/総エンドトキシン)は  $101 \pm 15 \%$  と計算された。

### 2) 微生物再増殖実験(回分試験)

残留塩素を中和した 25 試料のうち、6 試料で 7 日後の従属栄養細菌数が顕著に増加し、 $2.25 \times 10^3 \sim 4.65 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$  に達した。以下では、再増殖が確認された試料(再増殖+)と再増殖が起らなかった試料(再増殖-)の間で比較を行う。再増殖に影響する因子として給水栓水中の AOC 濃度および残留塩素濃度に着目したが、

AOC濃度は再増殖-試料では  $56.1 \pm 13.7 \mu\text{g/L}$ , 再増殖+試料では  $63.8 \pm 21.5 \mu\text{g/L}$  となり, 再増殖+試料で若干高い値を示したものの有意差は確認されなかった。残留塩素濃度についても再増殖+/再増殖-試料間における有意差は見られなかった。

続いて, 1 日後および 7 日後の総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン, 遊離エンドトキシン比率をそれぞれ図 2(a)および図 2(b)に比較した。1 日後には, 3 試料でわずかに従属栄養細菌数の増加が確認されたものの, エンドトキシン濃度およびその形態については再増殖+/再増殖-試料間における有意な差はなかった。しかしながら, 7 日経過後には再増殖+試料の総エンドトキシンは  $17.3 \pm 12.0 \text{ EU/mL}$  へと増大したのに対して, 再増殖-試料では  $1.35 \pm 0.25 \text{ EU/mL}$  とあまり変化が見られず, ノンパラメトリック検定による有意差 ( $p < 0.05$ ) が確認された。一方, 遊離エンドトキシンは再増殖+試料では  $3.03 \pm 1.37 \text{ EU/mL}$  とわずかに増加したが, 再増殖-試料では  $1.26 \pm 0.27 \text{ EU/mL}$  となり採水直後と比較してほとんど変化しなかった。さらに遊離エンドトキシン比率を比較すると, 再増殖-試料では  $93.4 \pm 11.2 \%$  とかなり高い値を示したのに対して, 再増殖+試料では  $23.1 \pm 13.1 \%$  と著しく低下した ( $p < 0.05$ )。これらの結果から, 7 日経過後の試料では微生物再増殖に伴い細胞結合型のエンドトキシンが増大していることがわかる。しかしながら, 再増殖した微生物数と総エンドトキシン濃度および結合エンドトキシン濃度の間には強い相関は見られなかった。

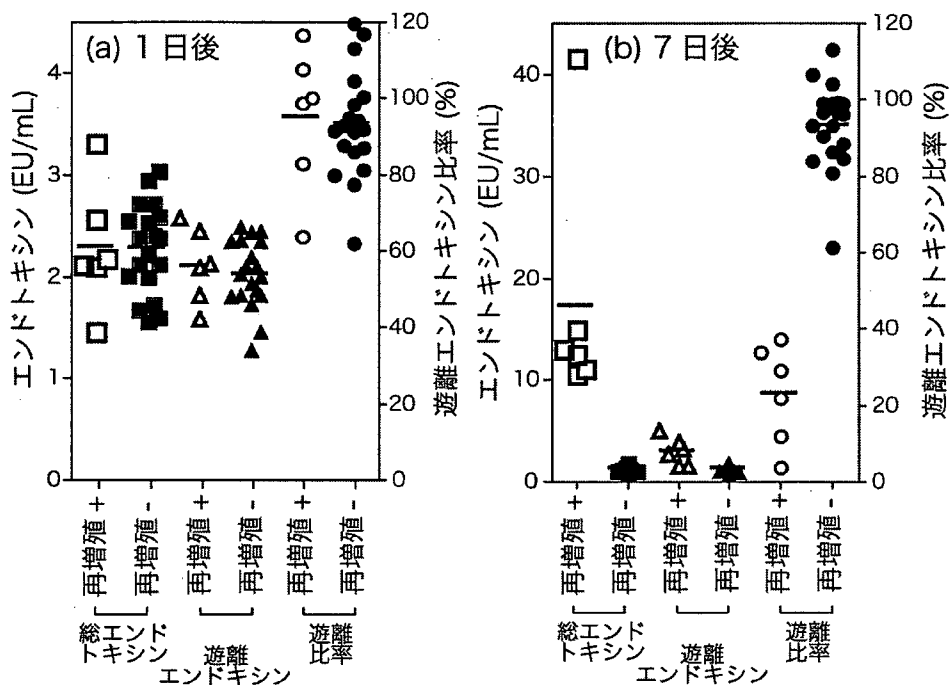


図 2 微生物再増殖の有無によるエンドトキシン濃度および形態の変化

### 3) アニュラーリアクターを用いた模擬バイオフィーム形成実験

残留塩素濃度  $0 \text{ mg/L}$  を想定したリアクター (以下,  $\text{Cl}=0$ ) については, 運転開始後 13 日目から残留塩素の中和を行った。残留塩素濃度  $0.1 \text{ mg/L}$  を想定したリアクター (以下,  $\text{Cl}=0.1$ ) は, 15 日遅れて運転を開始した。

各リアクターの流入水, 流出水中の HPC, 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン比率を図 3 にまとめて示す。まず HPC であるが,  $\text{Cl}=0$  では運転開始 30 日辺りまでは流入水・流出水で HPC の大きな差は見られず,  $10^3 \text{ cfu/mL}$  前後で推移した。その後, 55 日目以降からは流入水 HPC が変化していないのに対して, 流出水 HPC は経時的に増大した。総エンドトキシンに関しては, 20 日目以降で流出水濃度が流入水濃度をわずかに上回り, 55 日目以降では顕著な差が見られた。同時に遊離エンドトキシン比率についても 20 日目以降から流出水が流入水をわずかに下回り, 55 日目以降では平均的に 70% 未満となった。PVC スライド表面に形成されたバイオフィーム中の HPC (図 4) 増大は 49 日目以降に顕著になり, 107 日目まで継続していた。なお, 49 日目以降の流入水 TOC 濃度は  $1.37 \pm 0.14 \text{ mg/L}$ , 流出水 TOC 濃度は  $1.29 \pm 0.24 \text{ mg/L}$  であり, 有意差は確認されなかった。

ものの両者の差がバイオフィーム形成に伴う消費有機物量と考えられる。

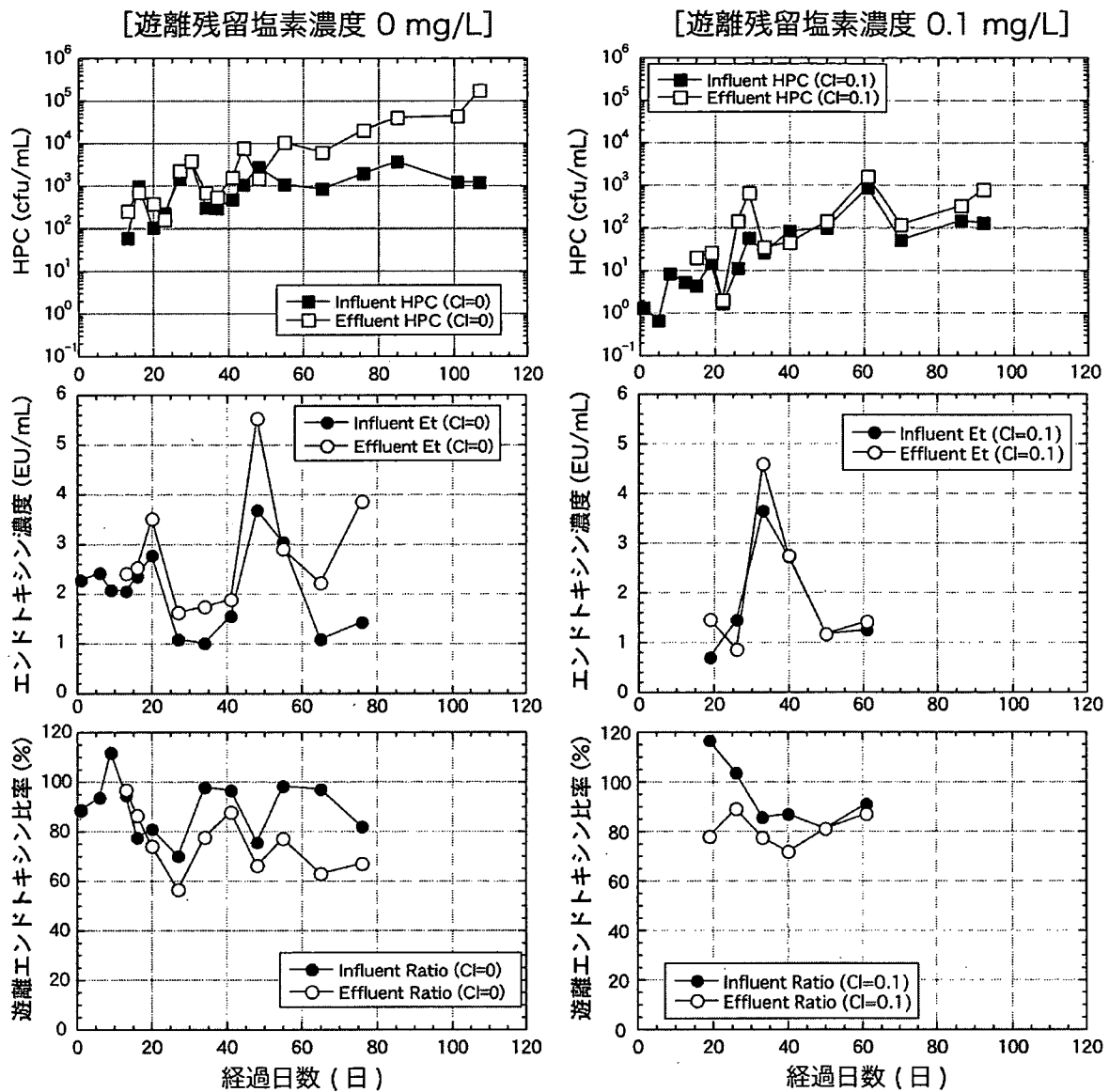


図3 アンヌラーリアクター運転期間中の微生物指標の経時変化

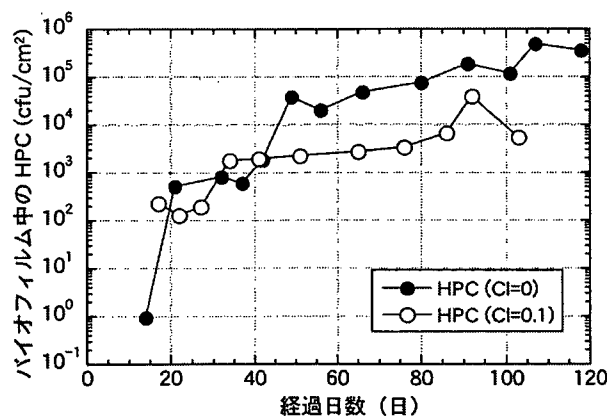


図4 バイオフィーム中の HPC の経時変化

一方、CI=0.1では22日目以降で流出水 HPC が流入水 HPC をわずかに上回るようになったが、その差は CI=0

の場合と比較するとわずかであった。図 4 に示したバイオフィーム中の HPC も緩やかに増加しているものの、CI=0 よりも 1 オーダー低い値で推移した。遊離エンドトキシン比率についてもデータ数が少ないため確実ではないものの、流出水ではわずかに低下していた。CI=0.1 の場合には、期間中の流入水 TOC 濃度は  $1.34 \pm 0.23$  mg/L、流出水 TOC 濃度は  $1.38 \pm 0.27$  mg/L となり、CI=0.1 ではリアクター内における TOC 消費は確認されなかった。

### 従属栄養細菌に対する迅速定量法の予備的検討

HPC と波長 405 nm における吸光度 (=BrdU 標識 DNA 量) との関係を図 5 に示す。この図から、5 時間培養後の *P. fluorescens* P17 の BrdU 標識 DNA 量は、R2A 平板培地により求めた P17 株細胞数の対数値に比例することがわかる。また、BrdU 濃度が高いほど低濃度 HPC 領域において大きな吸光度の傾きが得られること、また高濃度 HPC 領域では吸光度が逆に低下してしまうこと、そのため BrdU 濃度により定量可能な HPC 範囲が変化することが判明した。ここで、水道水中の微生物濃度を想定すると、今回検討を行った BrdU 濃度のうち 1000 nM が最も適していると考えられ、この時の定量可能 HPC の上限は  $10^3$  cfu/mL 付近であった。一方、BrdU 濃度を 500 nM、100 nM まで減少した場合には、定量可能 HPC 範囲はそれぞれ  $10^5$ 、 $10^7$  cfu/mL 付近まで広がった。

続いて、BrdU 濃度を 1000 nM に固定して、プロトコルの再現性を確認した結果を図 6 に示す。2 回の測定において、 $\Delta$  吸光度 /  $\Delta \log$ (微生物数) (=図中の傾き) は約 0.1 となり、再現性が確認されたとと言える。この実験結果から、0.1 cfu/mL 相当の細胞数濃度でも定量可能であったことから、本手法は浄水中に存在する低濃度の従属栄養細菌に対しても適用可能と考えられる。ただし、y 切片に相当するバックグラウンド値が測定回ごとに大きく変動することが確認された。

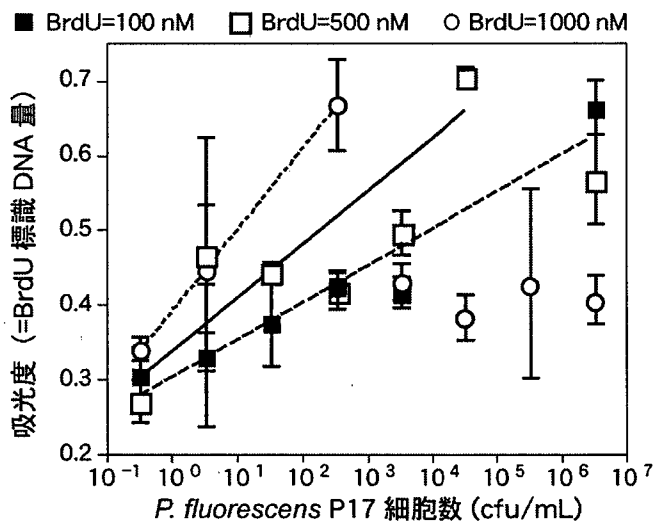


図 5 P17 株細胞数と BrdU 法で得られた吸光度の関係

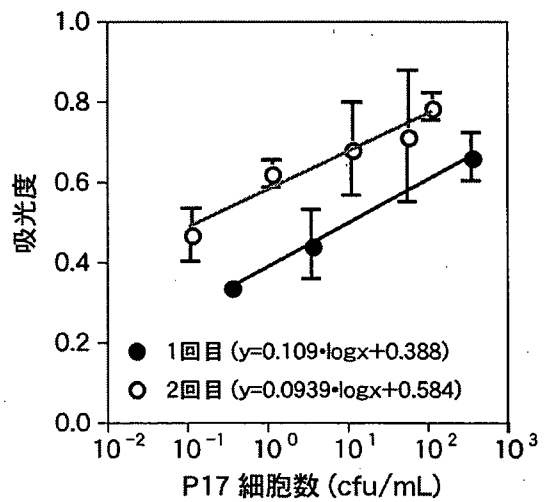


図 6 BrdU 法の再現性の比較

最後に、実際の水道水に対して本手法を適用した結果を表 2 に示す。未濃縮水道水試料の HPC は 1 未満であり、検出限界以下であった。一方、得られた吸光度を図 6 で算出した P17 株の回帰式を用いて換算したところ、未濃縮試料で 1.0 cfu/mL、10 倍濃縮試料では 16.2 cfu/mL 相当となった。この結果から、本手法は水道水のような極めて低濃度 HPC 試料に対しても適用可能であることが示唆される。

表 2 BrdU 法による水道水中の HPC 測定結果 (P17 換算値)

試料	HPC (cfu/mL)	吸光度	P17換算値 (cfu/mL)
未濃縮水道水	< 1	0.679±0.0448	1.0
濃縮水道水(×10)	N.D.	0.792±0.104	16.2

#### D.考察

##### 消毒副生成物による健康リスクの総括的評価に関する検討

表 1 で示したように SRNOM 塩素処理水中の TOX による毒性は、トリクロロ酢酸よりも強くジクロロ酢酸あるいはクロロ酢酸と同程度とみなすことができる。また、当研究室における過去の研究結果から、他の化学物質と比較して塩素処理水の有害性は、相対的にイニシエーション活性の方がプロモーション活性よりも強いことを指摘している<sup>5)</sup>。そこで表 1 中の染色体異常誘発性の結果を重視し、SRNOM 塩素処理水がジクロロ酢酸と同程度の毒性を有すると仮定して考察を進めることとした。

ジクロロ酢酸の基準値は、生涯にわたる発がんリスク増分  $10^{-5}$  を根拠として 0.04 mg/L に設定されている。これを塩素重量に変換すると 0.022 mg-Cl/L (=22.0 µg-Cl/L) となる。一方、水道水の一般的な TOX の生成量は 80 ~ 100 µg-Cl/L であり、その毒性がいかにか大きいかかわかる。水質基準の設定リスクレベル  $10^{-5}$  に照らして考えると、TOX は現状の 1/4 から 1/5 しか許容できないことになり、TOX を指標とした消毒副生成物リスクの総括的評価の重要性が改めて認識されたといえる。

##### 微生物再増殖指標としてのエンドキシンの有効性に関する検討

今回得られた調査結果から、現状の AOC 濃度のまま残留塩素濃度を低減した場合には、給配水過程における微生物の再増殖は不可避と考えられる。なお、AOC が TOC に占める割合は 2.02~7.15% (平均値 3.47%) に分布し、TOC を指標とした現状の有機物管理手法は、微生物再増殖制御を目的とした場合には十分でないと考えられる。なお、CI=0 のアニュラーリアクターでは、バイオフィーム形成に伴い流出水 TOC が流入水 TOC に対して平均的に 0.08 mg/L 低下していた。今回、バイオフィーム形成後の流入水・流出水 AOC 濃度結果が得られていないため比較検討を行っていないが、このわずかな TOC 濃度の低下がバイオフィームによる AOC 消費量に相当すると考えられるため、今後はこの観点からも定量的な検討を加える必要があるだろう。

昨年度の調査結果と同様、給水栓水中のエンドキシンは大部分が遊離エンドキシンとして存在していた。また高度浄水処理水中のエンドキシン濃度(約 10 EU/mL)と比較すると、今回調査した通常処理水中のエンドキシン濃度はかなり低いことが判明した。また、回分試験により 7 日後に再増殖 HPC が  $2 \times 10^3$  cfu/mL 以上となった試料では遊離エンドキシン比率が明確に低下した。さらにアニュラーリアクター内のバイオフィーム形成に伴って流出水中の HPC が増大し、流出水 HPC と流入水 HPC の差が  $5 \times 10^3$  cfu/mL となった 55 日目以降で、遊離エンドキシン比率が平均的に 70%未満となった。以上の結果を総合すると、遊離エンドキシン比率の低下(< 70%)を指標とすることにより、数 1000 cfu/mL を超える著しい微生物再増殖に関しては検出可能と判断できる。

なお、バイオフィーム中の蓄積微生物量は、壁面付着微生物と水中浮遊微生物量の増殖量/不活化・死滅量、浮遊微生物の壁面付着量と壁面からの剥離量の収支式により表される。ここでは、バイオフィーム中の HPC 測定結果を利用してバイオフィームの微生物蓄積速度を求め、残留塩素濃度の影響を検討する。CI=0 リアクターにおけるバイオフィーム蓄積速度は  $0.078 \text{ day}^{-1}$  となったのに対して、CI=0.1 リアクターにおけるそれは  $0.040 \text{ day}^{-1}$  と約半分の値を示した。Pederson は残留塩素濃度 0.1mg/L の水道水をバイオフィームリアクターに通水して PVC 表面に付着する全菌数の変化を調べ、その倍加時間が 11 日であることを報告している<sup>4)</sup>。微生物蓄積速度に換算すると、 $0.063 \text{ day}^{-1}$  となり、今回得られた結果は非常に近いものとなった。以上から、0.1 mg/L といった低濃度の残留塩素濃度はバイオフィーム形成を抑制できないものの、その蓄積速度を低下させる効果は確認された。ただし、今回の運転期間中には CI=0.1 リアクターのバイオフィームが定常に達しておらず、残留塩素が最終的なバイオフィーム形成量に影響するかどうかは確認できていない。

## 従属栄養細菌に対する迅速定量法の予備的検討

モデル微生物増殖に伴い新たに合成される DNA の BrdU 標識により、36 時間程度で増殖微生物数の予測が可能となり、検出下限も 0.1 cfu/mL 相当であったことから、迅速かつ高感度な再増殖モニタリング方法になりうるかと期待される。今後、水道水中の再増殖微生物量を測定するための条件検討を進める価値があるだろう。ただし、バックグラウンド値が測定ごとに大きく変動するため、測定回が異なる結果を比較するためには補正が必要となる。予備的検討を進めた結果、パラホルムアルデヒドを用いた固定化操作が吸光度に大きく影響することが確認されたため、滅菌培地に BrdU のみを添加した試料に対して同様の操作を行い、得られた吸光度をバックグラウンドとして差し引くことで、測定値を補正することが可能と考えられる。また場合によっては、ペルオキシダーゼ基質である ABTS 溶液を要時調製に切り替えるといった工夫も有効であろう。

さらに、実際の水道水中の HPC を定量するためには、色々な微生物濃度の水道水を用いて HPC 濃度と本手法による吸光度の関係をあらかじめ求めておく必要がある。この際、多くの水道水の HPC は従来培養法では検出限界以下となることを考えると、メンブレン濃縮などにより培養法の HPC 検出感度を高めるといった工夫が必要になると考えられる。

## E. 結論

本研究では、消毒副生成物の総括的な毒性評価指標として TOX に着目した。ハロ酢酸に関する *in vitro* バイオアッセイデータと慢性毒性試験の結果から、SRNOM 塩素処理水中の TOX に起因する毒性推定を試みた結果、SRNOM 塩素処理水の毒性はジクロロ酢酸またはクロロ酢酸と同程度であると推定された。ジクロロ酢酸と同程度の毒性を有すると仮定し、水道水中の TOX 生成量とジクロロ酢酸の水道水質基準の設定リスクレベルを比較し、TOX の許容レベルが現状の 1/4～1/5 であることを示した。TOX を指標とした総括的な毒性評価の重要性が改めて認識されたと言える。

また、微生物再増殖を表す指標としてエンドトキシン濃度およびその形態に着目した。実際の給水栓水を用いた回分式再増殖試験ならびにアニュラーリアクター連続通水試験を実施した結果、微生物再増殖の結果として浮遊微生物濃度(=従属栄養細菌)が  $2\sim 5 \times 10^3$  cfu/mL を超えた場合に、遊離エンドトキシン比率が顕著に低下(<70%)することを示した。このように、水道水中のエンドトキシン形態の変化は微生物再増殖がある程度進んだ状態に対しては指標となりうる。ただし、微生物汚染初期の段階に対しては他のモニタリング手段が必要と考えられる。そこで、DNA 合成活性に着目して従属栄養細菌定量の迅速化を試み、モデル微生物を用いた検討の結果、従属栄養細菌数測定に要する時間を 36 時間程度に短縮できる可能性を示した。

## 参考文献

- 1) Hamasaki, K *et al.*: Individual cell growth rates of marine bacteria, measured by bromodeoxyuridine incorporation, *Aquat. Microb. Ecol.*, Vol. 35, pp.217-27, 2004
- 2) van der Kooij, D.: Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth, *J. Am. Water Works Assoc.*, Vol. 84, pp.57-65, 1992
- 3) LeChevallier, M. W. *et al.*: Bacterial nutrients in drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 57, pp.857-62, 1991
- 4) Pedersen, K.: Biofilm development on stainless-steel and PVC surfaces in drinking water, *Water Res.*, Vol. 24, No. 2, pp. 239-43, 1990.
- 5) Simmons, J. E. *et al.*: Component-based and whole-mixture techniques for addressing the toxicity of drinking-water disinfection by-product mixtures, *J. Toxicol. Environ. Health A*, Vol.67, pp.741-54, 2004

## F. 健康危険情報

特になし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦 (2007): 水環境におけるエンドトキシンの変動要因と浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性, 環境工学研究論文集, 44, pp.247-253

### 2. 学会発表

- 1) 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講演集, p.622-623
- 2) 大河内由美子, 浅田安廣, 伊藤禎彦 (2008) : DNA 合成量に基づいた従属栄養細菌の迅速定量に関する基礎的検討, 第 42 回日本水環境学会年会, p.162

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得                    該当なし
2. 実用新案登録            該当なし
3. その他                    該当なし

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

厚生労働科学研究（地域健康危機管理研究事業）平成19年度分担研究報告書  
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基礎的検討事項として、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に必要な情報を得ることと2) 塩素に依存しない水道システムにおいて有効な消毒処理の要件を見出すことを目的として実施した。本年度の研究テーマの一つは、クリプトスポリジ *Cryptosporidium*、レジオネラ菌族と *Ba. Cereus* の3種の健康影響微生物に着目した水源河川の実態調査に基づく健康影響微生物の負荷量を推定するための原単位の算出であるが、河川中の *Cryptosporidium* の現存量の内、底泥中の存在量が多いという指摘があることから、河川水中濃度と共に底泥中のオーシスト量の把握を行った。また、*Salmonella* を指標菌として二酸化塩素消毒の処理条件を明らかにすると共に不活化評価を行う上で留意すべき点について調べた。

得られた結果を以下に列記する。

- 1) 河川水中からの *Cryptosporidium* の検出結果は、昨年と同様に最大5個/80Lであったことから、調査地点である約270頭の肉牛が飼育されている流域面積約42km<sup>2</sup>の比和川流域における原単位は、最大48個/sのヒト型またはウシ型のオーシストが流出していると結論づけられた。
- 2) 底泥中のオーシストは、同じく富士洲橋の底泥100gから3個、2回目の調査では50gから1個のオーシストがRNA法により検出されており、その遺伝子型はウシ型とヒト型であった。以上のことからRNA法による定量値を得る場合には100gの底泥試料が必要であり、定性的なモニタリング結果のみを必要とする場合には、50gの底泥量があれば検出できると判断された。
- 3) レジオネラ菌族と *Ba. Cereu* に関しては、菌数濃縮等の前処理を行わなければ分子生物学的手法を活用した定量法は適用できないと判断された。
- 4) 次亜塩素処理および二酸化塩素処理による *S. enterica* の不活化条件は、計数用培地に係わらず99%不活化を確保する為には、二酸化塩素の方が次亜塩素酸ナトリウムよりも3倍程度大きなCT値を必要としていた。
- 5) 消毒剤の種類によらず消毒処理により1桁程度多い微生物数がデソキシコール酸耐性のみを失うものと判断されたことから、CT値を求めるために用いた培地が異なる場合、99%不活化に要する値は2倍程度の差が生じるものと評価された。
- 6) デソキシコール酸耐性を有するグラム陰性の腸内微生物で食中毒の原因微生物に対する安全性を確保する場合には、CT値の評価に用いる培地などを考慮して評価を行う必要があると考えられる。
- 7) 生活排水処理水等が1/10溶程度混入した場合、二酸化塩素を用いて99%不活化を達成する為には、Deso培地で評価した場合で10倍、TSA培地で評価した場合は外挿値ではあるものの50倍大きなCT値が必要であった。

## A 研究目的

本研究では、将来的に残留塩素に依存しない水道を実現させることが出来るか否か？に関する基礎的検討事項として、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に必要な情報を得ることと2) 塩素に依存しない水道システムにおいて有効な消毒処理の要件を見出すことを目的として実施した。本年度の研究テーマの一つは、*Cryptosporidium*、レジオネラ菌族と *Ba. Cereus* の3種の健康影響微生物に着目した水源河川の実態調査に基づく健康影響微生物の負荷量を推定するための原単位の算出であるが、河川中の *Cryptosporidium* の現存量の内、底泥中の存在量が大いと言う指摘があることから、河川水中濃度と共に底泥中のオーシスト量の把握を行った。

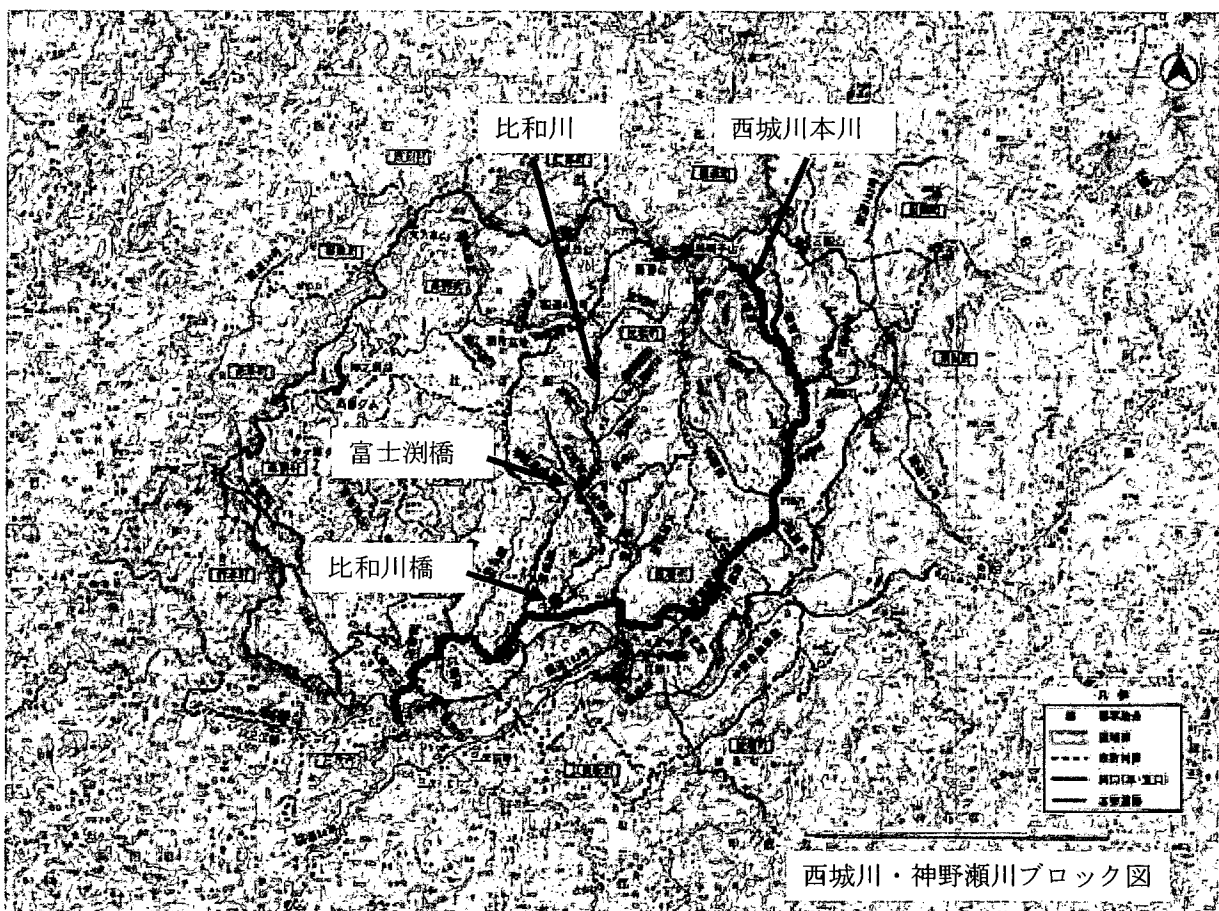
また、*Salmonella* を指標菌として二酸化塩素消毒の処理条件を明らかとすると共に不活化評価を行う上で留意すべき点について調べた。

## 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

本年度は比和川に限定した調査を行っており、秋季10月5日と冬季2月5日に調査を行った。調査地点は、下図に示すとおり、昨年来検出率の高い比和川が西城川に合流する直前の比和川橋と旧比和町市街地下流の富士淵橋とした。



図一1 西城川と取水点の位置図

#### 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2Lの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

感染性微生物は、平成18年度と同様に *Cryptosporidium*、レジオネラ属菌及びセレウス菌 (*Ba. Cereu*) を対象とした。

採水は20Lのポリタンクを用いて200L行いクリプトスポリジウム用の試料とし、底泥は、採泥器の利用を予定していたが、採水地点は源流部に近い比較的大きな石の多い地形であったことから、移植ゴテで表面をバットにかき取り400g程度を試料とした。また、レジオネラ菌族と *Ba. Cereu* 用の試料は、別のポリタンクに2L採水した。

### \* *Cryptosporidium* の測定方法

従前と同様に、採水した河川水80Lを中空糸膜による濃縮の後にショ糖沈殿法と磁気ビーズ法を併用した精製を行い、PCR法を活用したRNA検出法により定量した。また、残りの20Lについて *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。同時に、別の試料100Lを中空糸膜濃縮とショ糖沈殿法と磁気ビーズ法を併用した精製の後に顕微鏡観察を行った。

一方、底泥試料は、適正な試料量を把握する為に、採泥した試料を5g、10g、50g、100gに分割し、凍結融解を5回繰り返す事により細胞を破壊し、除タンパクの後に磁性ビーズ法による核酸の抽出を行い、PCR法による核酸増幅を行って、DNAは *hsp70* をターゲットとするホモロジー解析、RNAは東和环境科学(株)製キットを用いて定量した。また、同量に分割した別の汚泥試料についてショ糖沈殿法による精製を行った後に顕微鏡観察を行った。

### \* レジオネラ菌族と *Ba. Cereu* の DNA 抽出

昨年までの検討では、試料水量500mlからであっても検出できなかったことから、本年度は試料水1.5Lについて5,000rpmの遠心分離を15分間行い、沈渣をDNA抽出用試料とした。DNAの抽出は、Qiagen製DNA抽出キットDNeasyにより行い、検出はCycleavePCR® Legionella Detection Kit (タカラ製) と *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) 指標菌株

二酸化塩素による消毒効果等の評価の為に指標微生物として、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。*S. enterica* は、予めLB培地で24時間増菌培養を行った後に5,000rpm、10minで遠心濃縮を行い、沈渣をリン酸緩衝溶液に再懸濁させたものを-80℃でストックして実験に供した。なお、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を単離し、それに対する消毒効果を合わせて把握した。

### 2) 管理指標に関する検討

#### \* 塩素消毒と二酸化塩素消毒による不活化試験

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。二酸化塩素は、次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸ナトリウムから調整したものを用い、濃度の分析はハック社製の水質分析計DR-2400により行った。ここで示した実験実施時点では、HPLCによる分離分析を行っていないことから、次亜塩素酸イオンや塩素酸イオンの共存は未確認である。また、処理対象水は、排水処理水による水道水の汚染を想定し、生活排水処理水を微生物試験用のリン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈して実施した。

#### \* *S. enterica* 計数用培地

*S. enterica* 及び大腸菌に対する二酸化塩素による不活化の評価は、菌数計測に用いられる培地の特性により消毒効果の判定結果に違いが生じる可能性が示されていることから、指標菌として用いる *S. enterica* の菌数計数用培地の特性を把握した。

*S. enterica* の計数用培地として、以下に示す寒天培地を用いた塗布法によりコロニー数を計数した。

a) Tryptic Soy Agar (TSA 培地)、Difco: カゼイン製ペプトンや大豆ペプトンを含む非常に広範囲の微生物の

培養が可能な寒天培地（標準寒天や普通寒天よりも多くの微生物種を培養できる）

- b) Desoxycholate Agar（デソキシコレート寒天培地）：デソキシコール酸によりグラム陽性微生物の生育が抑制される。
- c) コンパクトドライ「ニッスイ」SL：サルモネラ菌の簡易定性キット、リジン脱炭酸能を見ている、本来は定性用であるが、適正な希釈倍率であればコロニー計数は可能

### 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、10月、2月に各1回実施した。各回のサンプリング状況と一般的な水質分析結果を表-1に示す。

表-1 サンプリング状況と一般的な水質分析結果

平成19年10月6日		
サンプリング箇所	比和川 比和川橋地点	比和川 富士淵橋地点
サンプリング日	2007年10月5日	2007年10月5日
サンプリング開始時間	13時 25分	14時 20分
サンプリング終了時間	13時 45分	14時 33分
天候	晴	晴
気温	26.6 °C	28.6 °C
水温	22.8 °C	21.7 °C
採水量	240L	240L
濁度	3.2	3.2
TOC	1.2	1.1
NO <sub>3</sub> -N	1.3	1.1
NO <sub>2</sub> -N	0.002	0.002
NH <sub>4</sub> -N	0.05	0.04
PO <sub>4</sub> -P	0.2	0.1
平成20年2月5日		
サンプリング箇所	比和川 比和川橋地点	比和川 富士淵橋地点
サンプリング日	2008年2月5日	2008年2月5日
サンプリング開始時間	10時 21分	11時 14分
サンプリング終了時間	10時 43分	11時 37分
天候	曇り	晴/曇り
気温	2.7 °C	2.1 °C
水温	3.8 °C	3.2 °C
採水量	220 L	220 L
濁度	3.2	3.2
TOC	0.9	0.9
NO <sub>3</sub> -N	1.0	1.0
NO <sub>2</sub> -N	0.002	0.002
NH <sub>4</sub> -N	0.04	0.04
PO <sub>4</sub> -P	0.1	0.1

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の清浄な河川であることを示していた。なお、本年の2月中は断続的な降雪があり、2月の調査時には地表には雪が残り河川水量も多かった。

*Cryptosporidium* の検出結果を表-2に示す。

本年度の調査では、富士淵橋において河川水約80Lから1～5個のオーシストをRNA法により検出した。また、2月の調査では公定法である顕微鏡観察法によっても1個のオーシストが検出された。一方、昨年度の調査では高頻度に検出された比和川橋では、何れの手法でも河川水中からオーシストを検出することは無かった。2月の調査の結果は出ていないが、河川水中から検出されたオーシストは、*hsp70* をターゲットとするホ

モロジ－解析によりウシ型 (*Bovine*) であると推定された。

表－2 顕微鏡法およびRNA法による検出結果とホモロジー解析による同定

検出法		地点		2007/10/6				
				河川水量	底泥サンプル量			
					80L	5g	10g	50g
RNA法	比和川橋	0個	0個	0個	0個	0個		
	富士洲橋	1個	0個	0個	0個	3個		
顕微鏡観察法	比和川橋	0個	0個	0個	0個	0個		
	富士洲橋	0個	0個	0個	0個	0個		
HSP70による同定結果	比和川橋	—	—	—	—	—		
	富士洲橋	<i>C.parvum</i> ウシ型	—	—	<i>C.parvum</i> ウシ型	<i>C.parvum</i> ウシ型 ヒト型		
検出法		地点		2008/2/5				
				河川水量	底泥サンプル量			
					73L	5g	10g	50g
RNA法	比和川橋	0個	0個	0個	0個	1個		
	富士洲橋	5個	0個	0個	1個	3個		
顕微鏡観察法	比和川橋	0個	0個	0個	0個	0個		
	富士洲橋	1個	0個	0個	0個	0.5個		
HSP70による同定結果	比和川橋	検出中						
	富士洲橋							

一方、底泥中のオーシストは、比和川橋の底泥では100gから0～1個、富士洲橋の底泥100gからは3個、50gからは0～1個がRNA法により検出され、2月の調査では顕微鏡観察法によっても底泥100gを2回観察した時に0個と1個のオーシストを検出した。底泥中から検出されたオーシストは、hsp70によるホモロジー解析からウシ型 (*Homo sapiens*) とヒト型 (*Bovine*) と推定された。

レジオネラ菌族と *Ba. Cereu* の検出結果を表－3に示す。

この二種の微生物について過去2回の調査では検出されていない理由は、遺伝子抽出に用いた試料量が500mlと少ないことによると考えられた。このことから、本年度は3倍量の1500mlの試料水からDNA抽出キットDNeasy(Qiagen)によりDNAの抽出を試みた。しかしながら、今回の調査でも何れの微生物も検出されなかった。

表－3 感染性微生物の検出結果

	平成19年10月6日	
	比和川	富士洲橋
レジオネラ菌	不検出	不検出
セレウス菌	不検出	不検出
	平成20年2月5日	
	比和川	富士洲橋
レジオネラ菌	不検出	不検出
セレウス菌	不検出	不検出

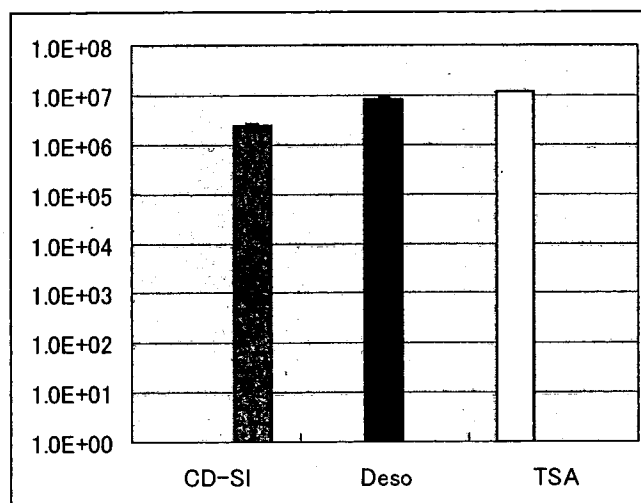
試料水1500mL当り

## 2. 二酸化塩素処理の管理指標に関する検討

### 1) *S. enterica* 計数用培地による計数値について

微生物計数用のリン酸緩衝溶液 (pH7.2) で  $1.0 \times 10^7$  cfu/ml 程度に希釈した *S. enterica* を3種の培地により計数し結果を評価した。

得られた結果は、図－2に示すように、コンパクトドライ SL (CD-SI) で平均  $2.3 \times 10^6$ 、デソキシコール寒天培地 (Deso) で  $8.1 \times 10^6$ 、TSA 培地 (TSA) で  $1.1 \times 10^7$  cfu/ml (各 n=4) であった。計数培地に係わらず、得られた計数値はオーダー的には同一であ



図－2 3種の培地による計数値

ったが、スチューデントのt検定の結果からは、何れも95%で優位差ありと判定されたことから、計数培地の違いによる差は、培地組成による選択性の差を表すものと判断された。

### 2) 塩素による不活化試験による計数用培地の評価

定法により調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いた消毒処理実験を行った。塩素濃度は、遊離塩素濃度として0.1mg/Lとし、接触時間を0～120秒まで5段階に変えた場合の残存微生物数を前述の3種の培地で計数した。

結果を図-3に示す。得られた結果は、デソキシコレート寒天培地とコンパクトドライSLではほぼ同じ傾向を示す一方、TSA培地による計数結果は、前2者よりも高い計数値を示していた。TSA培地による計数値とデソ培地やコンパクトドライによる計数値との差がデソキシコール酸による阻害やリジン脱炭酸能の失活を受けた微生物数を表すと考えると、次亜塩素酸ナトリウムにより最大1桁程度の微生物数がデソキシコール酸耐性やリジン脱炭酸能のみを失うものと考えられた。

なお、得られたデータから99%不活化に要するCT値を求めると、TSA培地を用いた場合は9.8mg・s/L、コンパクトドライSLを用いた場合は5.0mg・s/L、デソキシコレート寒天培地を用いた場合は4.7mg・s/Lとなり、文献値よりも1桁程度高い値となった。

### 3) 二酸化塩素処理による不活化試験

定法により調製した二酸化塩素溶液を用いた消毒処理実験を行った。二酸化塩素濃度は、0.1から0.3mg/Lとし、接触時間を段階的に変化させた場合に残存する微生物数を前述の2種の培地を用いた塗沫法によるプレートカウントで計数した。計数結果から、99%除去に要する接触時間を計算した結果を図-4にまとめる。なお、比較のために実施した次亜塩素酸ナトリウムによる塩素処理実験の結果も合わせて示した。

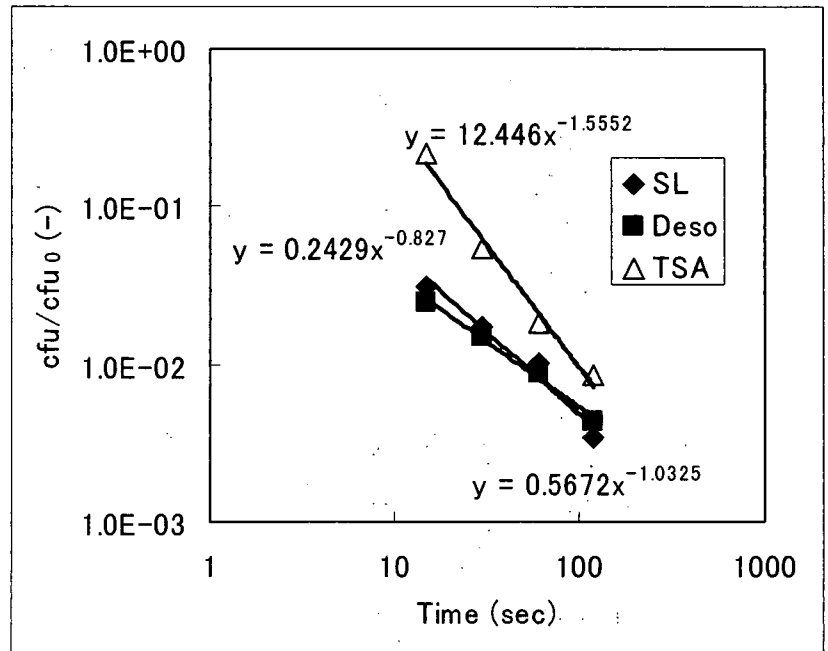


図-3 3種の培地による不活化時間の評価

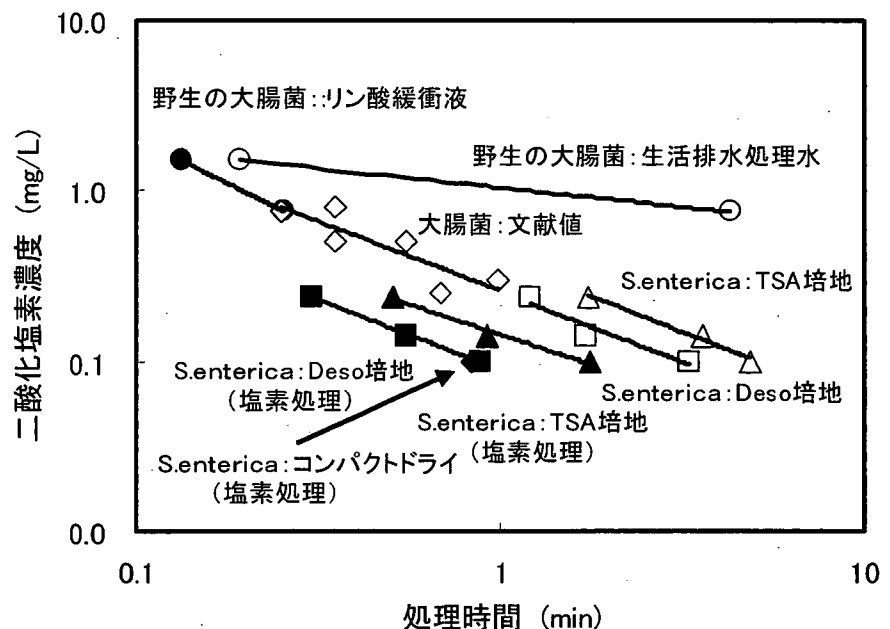


図-4 99%不活化時の二酸化塩素濃度と処理時間の関係



TSA 培地で評価した 99%不活化に要する CT 値は、二酸化塩素では  $28.2\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  であり次亜塩素酸ナトリウムでは  $8.5\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  であった。また、デソキシコレート寒天培地で評価した場合の CT 値は、各々、 $17.3\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  と  $4.7\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  であり、何れの培地で評価しても二酸化塩素の方が次亜塩素酸ナトリウムよりも 3 倍程度大きな CT 値を必要としていた。一方、デソキシコレート寒天培地による計数值と TSA 培地による計数值との差がデソキシコール酸による阻害のみを受けた微生物数を表すと考えると、いずれの消毒剤であっても消毒処理により 1 桁程度多い微生物数がデソキシコール酸耐性のみを失うものと考えられ、CT 値を求めるために用いた培地が異なる場合には 2 倍程度の差が生じるものと言える。

次に、定法により調製した二酸化塩素溶液を用い、TOC  $7.5\text{mg}/\text{L}$  の生活処理水（本学の排水処理施設の滅菌前処理水）を微生物試験用のリン酸緩衝液（pH 7.2）で 1/10 倍に希釈した模擬汚染水を調整し消毒処理実験を行った。二酸化塩素濃度は、 $1.0\text{mg}/\text{L}$  とし、接触時間を段階的に変化させた場合に残存する微生物数を前述の 2 種の培地を用いた塗沫法によるプレートカウントで計数した。計数結果から、99%除去に要する接触時間を計算した。結果を図-5にまとめる。

TSA 培地による評価では、15 分間の接触時間を与えても 99%の不活化を行うことが出来なかったが、得られた回帰式から 99%不活化に要する

CT 値を求めると、Deso 培地で評価した場合は  $59.9\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  であったが、TSA 培地で評価した場合は  $484.8\text{mg} \cdot \text{s}/\text{L}$  と 8 倍大きな CT 値を与える必要があると判断された。

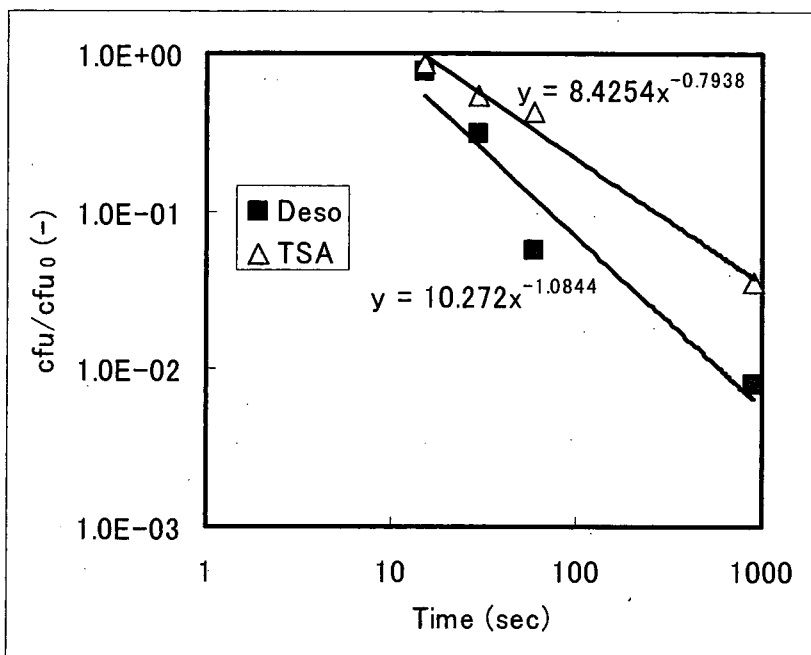


図-5 模擬汚染水における二酸化塩素処理による不活化評価

## 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

水道原水が持つ *Cryptosporidium*、レジオネラ菌族と *Ba. Cereus* の 3 種の感染性微生物による健康影響リスクを評価するために、これら 3 種の微生物の河川水中での現存量を把握し、原単位の算出を行った。また、河川中の *Cryptosporidium* の現存量は、水中よりも底泥中の存在量が多いという指摘があることから、河川水中濃度と共に底泥中のオーシスト量の把握を行った。

本年度の調査では、富士洲橋において河川水 80L から 1 個のオーシストを RNA 法により検出した。また、*hsp70* をターゲットとするホモロジー解析により検出されたオーシストはウシ型であると推定されたことから、約 270 頭の肉牛が飼育されている流域面積約  $42\text{km}^2$  の比和川流域における原単位は、最大  $48\text{個}/\text{s}$  のヒト型またはウシ型のオーシストが流出していると結論づけられる。

一方、底泥中のオーシストは、同じく富士洲橋の底泥 100g から 3 個、2 回目の調査では 50g から 1 個のオーシストが RNA 法により検出されており、その遺伝子型はウシ型とヒト型であった。以上のことから RNA 法による定量値を得る場合には 100g の底泥試料が必要であり、定性的なモニタリング結果のみを必要とする場合には、50g の底泥量があれば検出できると判断された。

レジオネラ菌族と *Ba. Cereu* に関しては、3 年間に渡り市販のキットを用いた DNA の抽出と定量を試みたが、河川水中から直接微生物量を把握することは出来なかった。従って、*Cryptosporidium* の場合では分子生物学的

手法を活用した定量法は、河川中のような希薄な濃度域であっても十分活用できることが認められたものの、レジオネラ菌族や *Ba. Cereu* に関しては必ずしも適用できず、菌数濃縮等の前処理が必要であると判断された。

## 2. 二酸化塩素処理の管理指標に関する検討

塩素に依存しない水道システムにおいて有効な消毒処理の要件を見出すことを目的として、*Salmonella* を指標菌とした二酸化塩素消毒の処理条件を調べた。

標準寒天や普通寒天よりも多くの微生物種を培養できる Tryptic Soy Agar (TSA 培地)、デソキシコール酸によりグラム陽性微生物の生育が抑制される Desoxycholate Agar (Deso 培地) およびリジン脱炭酸能によりサルモネラ菌を検出するコンパクトドライ「ニッスイ」SL 簡易定性キット (CD-SL) による *S. enterica* の増菌特性を調べた結果、何れの培地を用いて計数しても計数値のオーダー的には略同一であった。しかしながら、スチューデントの *t* 検定の結果からは、何れも 95% で優位差ありと判定されたことから、計数培地の違いによる差は、培地組成による選択性の差を表すものと判断された。

次に、次亜塩素処理および二酸化塩素処理による *S. enterica* の不活化条件を微生物計数用リン酸緩衝液を用いて検討した結果、計数用培地に係らず 99% 不活化を確保する為には、二酸化塩素の方が次亜塩素酸ナトリウムよりも 3 倍程度大きな CT 値を必要としていた。また、何れの消毒剤であっても消毒処理により 1 桁程度多い微生物数がデソキシコール酸耐性のみを失うものと判断されたことから、CT 値を求めるために用いた培地が異なる場合、99% 不活化に要する値は 2 倍程度の差が生じるものと評価された。以上の結果から、デソキシコール酸耐性を有するグラム陰性の腸内微生物で食中毒の原因微生物に対する安全性を確保する場合には、CT 値の評価に用いる培地などを考慮して評価を行う必要があると考えられる。

一方、生活排水処理水等により水道水が汚染された場合を想定し、生活排水処理水を 1/10 に希釈した模擬汚染水に対する二酸化塩素による 99% 不活化条件を検討した結果、Deso 培地により評価した場合で 10 倍、TSA 培地で評価した場合は外挿値ではあるものの 50 倍大きな CT 値を与えなければ 99% 不活化が行えない結果となった。従って、塩素無し水道を実現した場合、汚染事故等を想定した高濃度の消毒剤を注入できる緊急設備を備える必要があると考えられる。

## E 結論

### まとめ

昨年度までと同様に西城川水系を調査対象として水道水源が持つ感染性微生物に関するリスク量を推定する為、水源域に負荷された微生物量がどの程度上水施設に到達しうるかを算出するための基礎データを収集した。本年度は、河川水と共に底泥中の現存量を測定するために必要な試料量を把握すると同時に実測を行った。

その結果、底泥試料から分子生物学的手法により *Cryptosporidium* を検出する場合、定性的に確認するならば 50 g あれば十分であるが、RNA 法により活性を持つと判断されるオーシスト数を定量する場合には、100 g 以上の試料が必要であると判断された。一方、レジオネラ菌族や *Ba. Cereu* に関しては、源流部に近い本調査の場合、市販の分子生物学的キットでは 1.5 L 程度の試料であっても検出することは困難であり、試料の濃縮方法や遺伝子の抽出方法等を含めて検討しなければならないと判断された。

次に、次亜塩素酸ナトリウムのような従来から用いられてきた消毒剤が所謂、異臭問題を引き起こし飲料水としての水道離れを誘発していることから、代替消毒剤として二酸化塩素に着目し、二酸化塩素消毒の処理条件を明らかにすると共に二酸化塩素処理が AOC に及ぼす影響について検討し、残留塩素に依存しない水道を構築した場合の配水池以降の水道水質について考察を行っている。本年度は、*S. enterica* を指標微生物に選定した不活性化実験を行った。

その結果、不活化に必要な CT 値を得る為には、大腸菌と同様に評価用の培地特性を考慮した実験を行う必要があり、文献データの収集・整理においてもその点を考慮する必要が明らかとなった。また、1/10 程度

の汚染であっても生活排水が混入した場合、99%不活化に要するCT値は10倍以上大きくなることから、塩素なし水道であっても緊急的に高濃度の消毒剤を注入する設備が必要であると考えられた。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### 1.論文発表

なし

### 2.学会発表

西村和之、国包章一（2007）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、第58回全国水道研究発表会講演集、606-607

## H 知的財産権の出願・登録状況

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