

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文発表

- 1) 廣戸裕子, 大瀧雅寛 (2006) 流水式紫外線照射装置における一般細菌を用いた生物線量計の実用性, 用水と廃水, Vol.48, No.11, pp.989-993.
- 2) 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) 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, p.606-607.
- 2) 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.
- 3) Dai Simazaki, Masako Takai and Shoichi Kunikane (2007) Effect of residual chlorine concentration and roughness of pipe wall surface on bacterial regrowth potential in the course of drinking water distribution, Proceedings of IWA 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (Sep. 9- 15, 2007, Tokyo, Japan)
- 4) 大瀧雅寛, 廣戸裕子 (2007) 紫外線量の化学光量計による計測, 第 10 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 136-137.
- 5) 王雪丹, 大瀧雅寛 (2007) オゾン処理における大腸菌損傷レベルの評価方法, 第 17 回日本オゾン協会年次研究講演会講演集, pp.95-97.
- 6) 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講演集, p.162.
- 7) 岩田和隆, 島崎大, 国包章一 (2008) 配水過程における微生物再増殖に対する管材質および残留塩素の影響, 第 59 回全国水道研究発表会講演集 (発表予定) .

研究成果の刊行物・別刷

[報 文]

流水式紫外線照射装置における 一般細菌を用いた生物線量計の実用性

Practicability as Biodosimeter of the Standard Plate Count Bacteria
in Flow UV Reactor

廣戸 裕子* 大瀧 雅寛*

流水式紫外線照射装置において、装置内において微生物が受ける紫外線量を測定する方法として、紫外線耐性が既知の微生物を投入する方法が提案されている。しかし、この手法は装置内に外部から微生物を投入しなくてはならないため、浄水場で稼働中の装置には適用するのは現実的に難しく、装置内紫外線量を継続的に測定するよりよい手法が求められている。原水中に存在する微生物が生物線量計としての役割を果たせれば、新たに微生物を装置内に投入することなく、装置内の紫外線量を測定することが可能になると考えられる。本研究では、原水中に存在する微生物として一般細菌を対象とし、実験室的に回分式と流水式によって生物線量計としての実用性を調べた。とくに計測の正確性を確保するために培養後の微生物数を十分に得ること、紫外線耐性およびその再現性に注目した。

一般細菌を含む原水として地下水を用いた。正確な装置内紫外線量を測定するため、生物線量計として実績のある大腸菌ファージQ β を用い、同時に紫外線を照射して実験を行った。紫外光源には低圧ランプを用い、回分式紫外線照射装置にはガラスシャーレを、流水式紫外線照射装置には二重円筒管を用いた。実験条件として、照射時間と流量を変えて一般細菌の生残率を測定した。また、紫外線照射後の一般細菌濃度はとくに低濃度になる場合が多いため、その測定法についても検討した。

結果として、低濃度の一般細菌測定法を確立することができた。回分式の実験結果に再現性がみられ、紫外線量に対して2段階による直線近似ができた。したがって、一般細菌の生物線量計としての利用可能性が示唆された。しかし、流水式においては、紫外線量が増加しているはずの場合でも、それに応じた紫外線量測定をするには至らないという課題が残った。

Key words : 紫外線, 流水式, 生物線量計, 一般細菌, 大腸菌ファージQ β

* Yuko HIROTO, Masahiro OTAKI, お茶の水女子大学大学院人間文化研究科人間環境科学専攻 〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1, Department of Human Environmental Science, Graduate School of Human and Science, Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610 Japan (E-mail : g0570515@edu.cc.ocha.ac.jp)

1. はじめに

一般的に広く利用されている塩素消毒は、トリハロメタン等の有害副生成物¹⁾や、塩素耐性をもつクリプトスポリジウム等の病原微生物の存在¹⁾²⁾など、さまざまな問題が指摘されており、塩素消毒の代替法が検討されている。塩素消毒の補完技術として、とくにクリプトスポリジウムやジアルジアの原虫対策として、「紫外線消毒ガイドライン」が(財)水道技術研究センターによって明確にされた。

紫外線消毒の特徴としては、有害副生成物生成の可能性が少なく、すべての微生物に有効であることが挙げられ、塩素消毒の有効な代替手法として考えられるが¹⁾³⁾、紫外線消毒の導入のさいには、紫外線消毒装置が十分な消毒効果を有しているのか、継続的に測定する方法の確立が必要であると考えられる。

紫外線強度の測定には紫外線照度計が一般的に用いられるが⁴⁾、これは装置内の一部分を継続的に測定するにすぎない。現在、装置内全体での必要紫外線量が確保されているのかを評価するための方法として、化学線量計³⁾⁵⁾や生物線量計が提案されている³⁾⁴⁾。化学線量計は、光反応性の化学物質を装置内に投入し、化学変化量によって照射紫外線量を測定するものであり、生物線量計は、大腸菌ファージQβ^{6)~8)}や芽胞菌⁷⁾⁹⁾などを装置に投入し、紫外線照射前後の濃度変化から微生物が受けた紫外線量を求める手法である。この方法は微生物に効果のある紫外線量を直接測定することができるという利点をもつ。しかし、この方法では指標となる微生物を装置内に投入する必要があるため、浄水場においては設置前の事前評価には適用できるものの、稼働中の装置を継続的に測定するには適用できないという欠点がある。

原水中に存在する微生物を生物線量計として利用することができれば、新たに微生物を装置内に投入することなく浄水場等でも広く応用できるのではないかと考えられる。

本研究では、水道水質基準項目の1つである一般細菌を生物線量計の指標微生物として利用することが可能であるかを検討した。生物線量計とし

て用いられている大腸菌ファージQβとの整合性をさまざまな条件下において検討した。

2. 実験方法

2.1 試料の調整

埼玉県大里郡寄居町の地下水を対象試料とし、大腸菌ファージQβ(以下、Qβとする)を濃度が10⁷PFU/ml程度となるように加え、よく攪拌したものを試料とした。地下水は平成17年12月2日から平成18年3月6日にわたって計11回採水した。

2.2 低濃度一般細菌の測定法

紫外線照射後に得られる一般細菌はとくに低濃度になったため、その測定法の検討も併せて行なった。

測定は、メンブレンフィルター法に準じて行なった。1~4,000mlの試料を真空ポンプで吸引ろ過し、微生物をろ紙上に捕集した(Millipore社製、セルロースアセテート膜、直径5cm、孔径0.45μm)。ろ紙を普通寒天培地に密着させ、37℃で24時間程度培養し、ろ紙上の一般細菌数を計数した。同法によって、0.005CFU/ml程度まで測定可能となる。

2.3 回分式紫外線照射実験

一般細菌の生物線量計としての可能性を検討するため、まず一般細菌の紫外線耐性を回分式による紫外線照射実験にて求めた。

紫外光源には20Wの低圧ランプ(東芝ライテック株製、GL20)を用いた。

試料200mlを内径5.5cm、高さ9.0cmのガラスシ

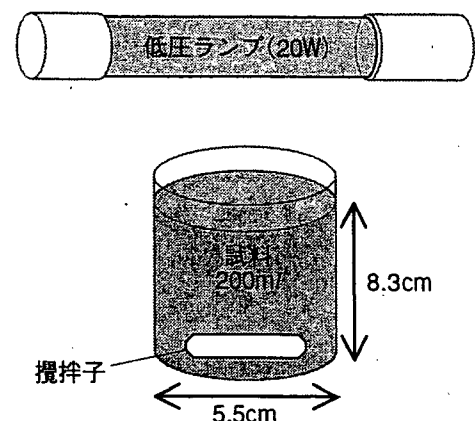


図1 回分式紫外線照射装置

ヤーレに入れ、攪拌させながら紫外線を照射した。回分式の実験装置を図1に示した。このときの水深は8.3cmであった。

紫外線照射前後の試料中の一般細菌濃度を測定した。4回の実験中、初期濃度を平均すると3.9CFU/mlであった。

試料の波長254nmにおける吸光度は0.024~0.030/cmで幅があり、試料内の平均紫外線量はそのつど変わっていた。そこで、Qβを生物線量計として用い、紫外線量の正確な値を算出した。投入後のQβの初期濃度の平均は 4.1×10^7 PFU/mlであった。

算定式には次式を用いた。

$$I = -k \times \ln(S_{uv}) \dots\dots\dots(1)$$

ここで、

I: 装置内平均紫外線量 (mJ/cm²)

k: 不活化反応速度定数 (mJ/cm²)

$$S_{uv}: \text{生残率} = \frac{\text{微生物濃度(照射後)}}{\text{微生物濃度(照射前)}} (-)$$

である。

Qβの場合 $k=5.9$ mJ/cm²であることがわかっている¹⁾。

Qβは宿主菌に*E. coli* K12(NBRC 13965)を用いた重層寒天培地法により測定した。培養時間は37℃で24時間とした。

2.4 流水式紫外線照射実験

Qβと一般細菌の濃度変化を比較することにより、回分式と同様に一般細菌が生物線量計として適用可能かについて検討した。

紫外光源には4Wの低圧ランプ(岩崎電気(株)製QCGL 4W-2)を用い、装置には、内管外径2.3cm、外管内径6.3cm、液層厚さ2cm、長さ16.5cmで容積450mlの二重円筒管装置を用いた。試料には、回分式と同様に地下水にQβを混合したものを用いた。

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1l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図2に示す。流量は150~2,000ml/minとし、流量を変化させて8回行なった。

装置通過前後の試料中の、一般細菌とQβの濃度を測定した。一般細菌は前述のメンブレンフィ

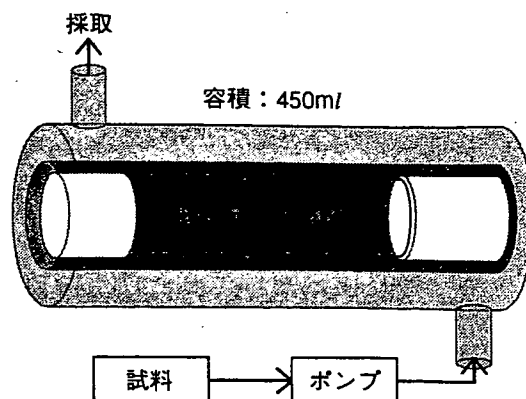


図2 流水式紫外線照射装置

ルター法に従い、ろ紙上に捕集し普通寒天培地で測定した。Qβは重層寒天培地法にて測定した。

なお、一般細菌の初期濃度の平均は3.7CFU/mlであり、Qβの初期濃度の平均は 5.0×10^7 PFU/mlであった。試料の波長254nmにおける吸光度は0.015~0.031/cmの範囲であった。

3. 結果と考察

3.1 回分式紫外線照射実験

回分式紫外線照射実験による一般細菌の生残率と紫外線量の関係を、図3に示す。

異なる日に採取した試料においても、プロット点は同じ傾向を示し、実験結果に再現性がみられた。同一水源においては、一般細菌は一定の紫外線耐性をもつことがわかった。また、2段階ではあるものの、不活化が一次反応で近似できるため、生物線量計への適用が可能であると考えられた。一般細菌の生残率が15mJ/cm²付近を境界として2段階に分かれたのは、一般細菌中に紫外線耐性の強い種がある割合で存在したためと考えられた。

今回の結果から、一般細菌の生残率と紫外線量の関係をつぎの2式で近似した。

$$I = -3.92 \times \ln(S_{uv}) \quad (S_{uv} > 1.26 \times 10^{-2})$$

$$I = -19.1 \times \ln(S_{uv}) + 64.2 \quad (1.26 \times 10^{-2} > S_{uv})$$

$$\dots\dots\dots(2)$$

3.2 流水式紫外線照射実験

流水式紫外線照射実験における各平均滞留時間と微生物の生残率の関係を、図4に示す。Qβの生残率は、平均滞留時間が増加するほど減少傾向

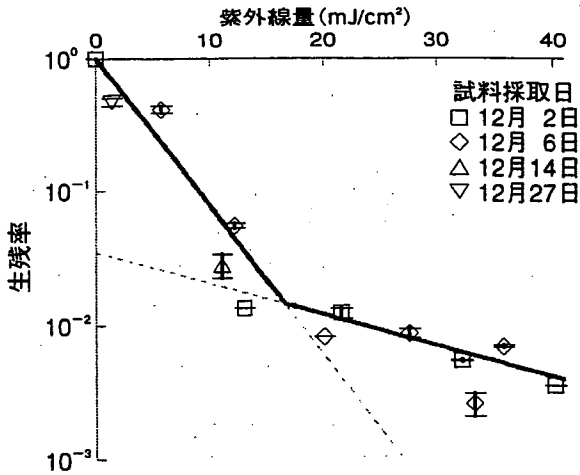


図3 回分式による紫外線照射後の一般細菌の不活化

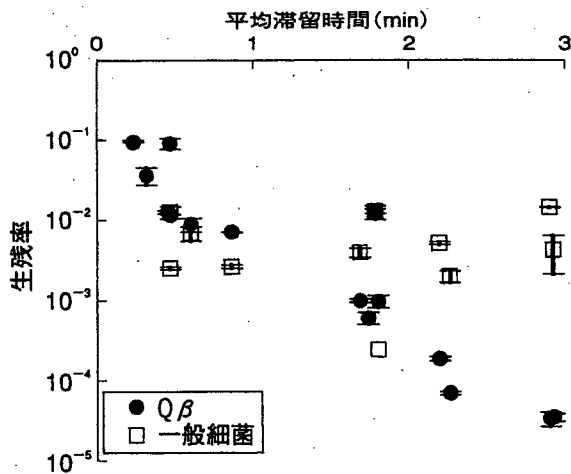


図4 流水式による紫外線照射後の一般細菌とQβの不活化

がみられたが、一般細菌はQβと比較してそれほどこの傾向が大きくみられなかった。

この結果から得られた生残率より各平均滞留時間ごとの装置内紫外線量を算出した。Qβは式(1)を用い、一般細菌は回分式の実験結果から得られた近似式(2)を用いた。

流水式による一般細菌、Qβのそれぞれの生残率から算出された紫外線量と、平均滞留時間の関係を図5に(a)にQβを、(b)に一般細菌を示す。

Qβの場合は、平均滞留時間が増すにつれ算出紫外線量も増加する結果となった。一般細菌は、紫外線量の算出結果が低平均滞留時間においてはQβと一致するものの、平均滞留時間を延ばしても1min以下と同程度の紫外線量しか示さなかつ

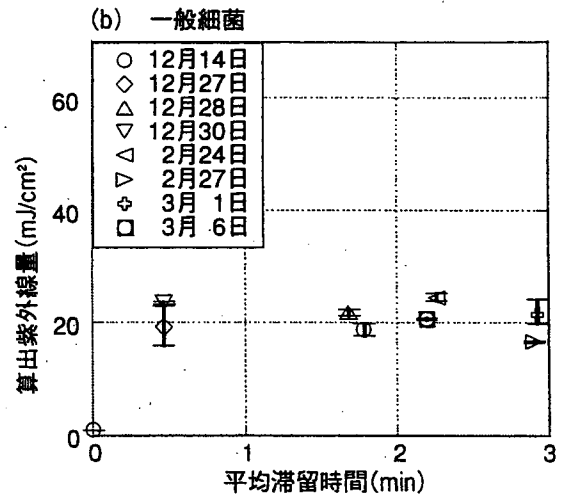
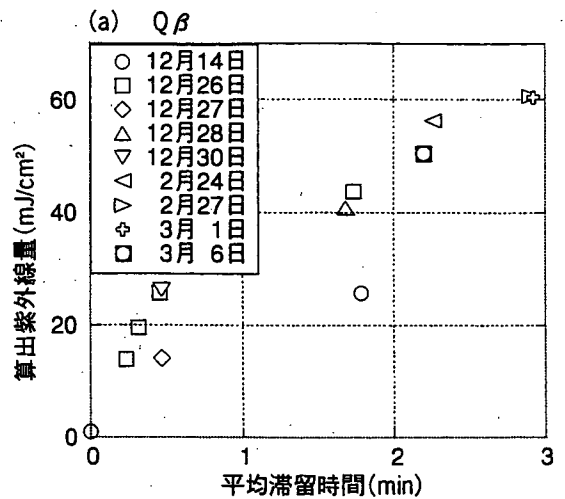


図5 微生物の生残率より算出した紫外線量(流水式)

た。

一般細菌がQβと一致する結果となったのは紫外線量20mJ/cm²のときであったが、一般細菌の生残率からは紫外線量20mJ/cm²が確保されていることは測定できても、それ以上の紫外線量の測定には不向きであるといえる。

このような結果になった原因としては、一般細菌はろ紙上に捕集した数に差がみられ、かつ計数した個体数が少ないことが考えられる。滞留時間が大きく、不活化率が大きな条件ではこの傾向が高くなり、紫外線量の信頼性が著しく低下していた。したがって、生物線量計として適用するためには、この点を改善して再度実験を行なう必要がある。

また、20mJ/cm²以下の紫外線量に対する測定
の正確性、および今回与えた以上の紫外線量域
において一般細菌がどのような反応を示すかについ
て、今後の検討課題といえる。

4. まとめ

流水式紫外線照射実験では、Q β の結果から20
mJ/cm²以上の紫外線量だと判断できる場合にお
いても、一般細菌の生残率は20mJ/cm²程度であ
ると示していたため、生物線量計として課題が残
った。この原因を考えると、20mJ/cm²以上の紫
外線量域では、一般細菌の生残率が小さくなり、
生残率から紫外線量を求める式においては傾きが
小さかったため、感度が悪くなるためと考えられ
た。また、今回実験したさいに照射した紫外線量
より、多くの紫外線量を与えた場合、さらに紫外
線耐性の高い種が存在する可能性が考えられた。

低い生残率の条件下において、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、一般細菌が回分式および流水式紫
外線照射装置においても生物線量計として用いら
れる可能性が示された。

本研究では、同一の地下水を試料として用いた
が、応用可能な範囲を調べるためには他の水道水
源においても一般細菌が同様に紫外線感受性を示
すか確認する必要がある。

また、その他の検討事項としては、今回の一般
細菌は紫外線耐性が高く、20mJ/cm²以上の紫外
線量域での生物線量計としての感度が低かったた
め、他の指標微生物で生物線量計として適当なも

のを検討する必要があると考えられた。

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。

—参考文献—

- 1) 金子光美編著：水質衛生学，p.282～283，295～305，
346～358，技報堂出版，東京(1996)。
- 2) C. N. Haas, J. B. Rose, C. P. Gerba：水の微生物リスク
とその評価(金子光美監訳)，p.65～66，技報堂出版，東
京(2001)。
- 3) Willy J. Masschlein：紫外線による水処理と衛生管理
(海賀信好訳)，p.51～55，68～77，技報堂出版，東京
(2004)。
- 4) Austrian Standards Institute：ÖNORM M 5873-1，
(2001)。
- 5) R. O. Rahn, M. I. Stefan, J. R. Bolton：The
Iodide/Iodate actinometer in UV disinfection：
characteristics and use in the determination of the
fluence rate distribution in UV reactors, Proceeding of
AWWA Water Quality Technology Conference, Salt
Lake City(2000)。
- 6) N. Kamiko, S. Ohgaki：RNA Coliphage Q β as a
Bioindicator of the Ultraviolet Disinfection Efficiency,
Water Science and Technology, 21(3)227～231(1989)。
- 7) R. Sommer, T. Haider, A. Cabaj, W. Pribil, M.
Lhotsky：Time dose reciprocity in UV disinfection of
water, *Water Science and Technology*, 38(12)145～150
(1998)。
- 8) 佐藤敦久：水処理—その新しい展開—，p.168～173，
技報堂出版，東京(1992)。
- 9) H. Mamane-Gravetz, K. G. Linden：UV disinfection
of indigenous aerobic spores：implications for UV
reactor validation in unfiltered waters, *Water Research*,
38(12)2898～2906(2004)。

(原稿受付日；2006年 6月23日)

(原稿受理日；2006年 8月30日)

(30) 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

大河内 由美子¹・石川 卓¹・高橋 恭介²・伊藤 禎彦¹

¹ 京都大学大学院工学研究科都市社会工学専攻 (〒 615-8540 京都市西京区京都大学桂 C クラスター)

² 住友重機械工業株式会社 (〒 237-8555 神奈川県横須賀市夏島町 19)

* E-mail: yohkouchi@urban.env.kyoto-u.ac.jp

微生物由来化学物質であるエンドトキシンに着目し、濃度変動に寄与する因子の検討を行った。グラム陰性細菌およびシアノバクテリアに由来するエンドトキシン量を比較した結果、*Synechococcus* sp. の季節変動に伴って原水中のエンドトキシン量が増減することが示唆された。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査の結果から、下水処理施設からの放流水がエンドトキシン増大に影響を与えること、また環境微生物群に由来する一細胞当たりのエンドトキシンは比較的高いことを示した。さらに、浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性を調べ、活性炭処理後に濃度が増大するもの、高度浄水処理水中の残存エンドトキシンは十分に低濃度であること、またオゾン処理や塩素消毒により遊離エンドトキシン比率が増大することを示した。

Key Words : total endotoxin, free endotoxin, environmental bacteria, aquatic environment, water treatment process

1. はじめに

現行の水道水質基準では、微生物指標として一般細菌数および大腸菌数が設定されており、塩素消毒剤を注入・残留させることで病原性細菌の増殖能を抑制し、感染リスクを低下させている。しかしながら、原水中に混入する多種多様な微生物は、浄水処理によりある程度除去されるものの、一部は不活化された状態や増殖能が低下した状態 (Viable but nonculturable; VBNC 状態) に移行して浄水中に残存しており、配水過程における再増殖やバイオフィーム形成などの問題を引き起こすことが指摘されている^{1,2)}。また、微生物は増殖・代謝に伴い、多種類の毒素を生産する。これらの毒素は物理的・化学的特性が多様性に富んでおり、顕れる健康影響も多岐にわたることが知られている。微生物に由来する毒素のうち、シアノトキシンの一種、microcystin-LR に関して知見の集積が進められ、暫定的な飲料水質ガイドライン値が提示されている³⁾。一方で、他の多くの毒素に関する知見は大幅に不足しているのが現状である。

こうした背景を踏まえて、本研究では微生物、特にグラム陰性細菌・シアノバクテリアの細胞外膜構成物質 (リポ多糖; LPS) に起因する生理活性物質 (以下、エンドトキシン) に着目する。エンドトキシンは強い免疫反応を惹起することが知られている。本来、生体は微量のエ

ンドトキシン曝露により自然免疫を獲得すると考えられるが、年々アレルギー疾患が増加している現代においては、攪乱された免疫システムが新たなアレルギー症状を誘発する危険をはらんでおり、日常生活におけるエンドトキシン曝露とアレルギー反応との関連^{4,5)}に強い関心が持たれている。ここで、エンドトキシンは microcystin や anatoxin 等に代表される他のシアノトキシンと比較して幅広い微生物種で普遍的に存在すること、また分子量が 10 ~ 20 kDa と非常に大きいこと⁶⁾から、水環境中あるいは浄水処理過程における挙動も大きく異なると予想される。

そこで本研究では、シアノバクテリアを含む数種類の微生物を対象として一細胞当たりのエンドトキシン量を把握することで、水道水源のエンドトキシン増大に寄与する微生物種を探索するとともに、水道水源におけるエンドトキシン活性量および存在形態を明らかにする。また、浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性ならびに浄水中での存在形態を詳細に検討する。

2. 実験方法

- (1) 微生物細胞に由来するエンドトキシンの定量
微生物細胞に由来するエンドトキシン量を明らか

にするため、グラム陰性菌として *E. coli* NBRC 3301 を、またシアノバクテリアとして *Microcystis aeruginosa* NIES-44, *Synechococcus* sp. NIES-946 (採取地: 霞ヶ浦) ならびに NIES-957 (採取地: 琵琶湖) を選定した。*E. coli* NBRC 3301 については、Nutrient broth を用いて 36°C・120 rpm の条件で振盪培養を行った。また、*M. aeruginosa* NIES-44 は CB 培地⁷⁾ を、*Synechococcus* sp. NIES-946 および NIES-957 は C 培地⁷⁾ をそれぞれ用いて、20°C・50 μE/m²sec の条件下で静置培養した。増殖期にある各微生物の培養液を適宜サンプリングして培養液中の細胞数を計数するとともに、総エンドトキシン・遊離エンドトキシンの定量を行った。なお、*E. coli* NBRC 3301 株および *Synechococcus* sp. では、0.2 μm 孔径の黒色フィルター上に細胞を捕集した後に、それぞれ DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, 同仁化学研究所) 蛍光染色後の UV 励起下顕微鏡観察 (全菌数測定法)、および直接 G 励起下顕微鏡観察を行うことにより、細胞計数を行った。一方、*M. aeruginosa* NIES-44 は上水試験方法で採用されているプランクトン計数盤 (MPC-200, 松浪硝子工業) を用いて計数⁸⁾ を行った。エンドトキシン活性は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスピーシー 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) により測定し、*E. coli* O113:H10 由来のエンドトキシン標準品を用いて検量線を作成した。本研究では水中エンドトキシンの存在形態を反映した実測を目的として、総エンドトキシン活性は培養液全画分を使用していかなる抽出操作も加えず測定を行った。遊離エンドトキシン測定は培養液を 14,000 rpm で 10 分間遠心分離することにより、微生物細胞とともに結合エンドトキシンを沈降させた上清画分を使用した。測定には、全てエンドトキシンフリーのプラスチック器具を使用した。なお、エンド

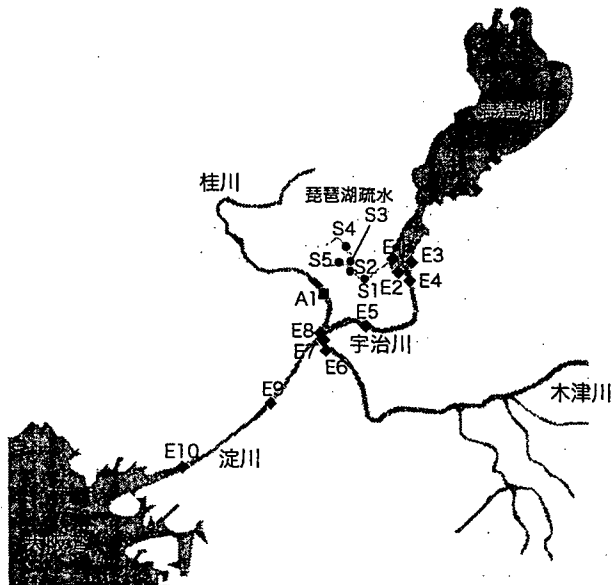


図-1 採水地点 (琵琶湖・淀川水系)

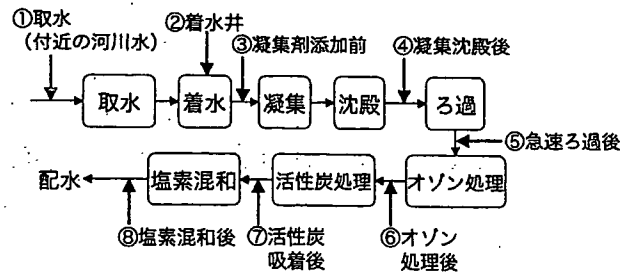


図-2 A 浄水場の処理フローと採水場所

キシンの濃度は EU/mL で表記した。

(2) 琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査

図-1 に示す琵琶湖淀川水系 (琵琶湖疏水を含む) の各地点で採水を行い、試料中のエンドトキシン濃度と微生物量を測定した。採水は冬季 (2005 年 12 月～2006 年 2 月) に実施し、降雨による影響を除外するため雨天当日および翌日を避けて採水日を決定した。採水瓶は予め 250°C、2 時間の熱処理によりエンドトキシンを不活化して使用し、採水後の試料は 4°C で運搬後、4 時間以内に下記の各項目について測定を行った。

1) 微生物試験:

- 一般細菌数 (SPC/ 標準平板計数; 37 °C, 24 時間)
- 従属栄養細菌数 (HPC/R2A 平板計数; 20 °C, 7 日間)
- 全菌数 (DAPI 染色計数)

2) 一般水質項目:

- 全有機炭素 (TOC-5000A, 島津製作所)
- 紫外線吸光度 (MultiSpec-1500, 島津製作所)
- pH
- 濁度 (O.D. 660)

3) 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン

(3) 浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性

調査対象施設として、琵琶湖・淀川水系から取水している A 浄水場を選定した。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場所を図-2 に示す。採水試料は、4°C 保冷下で運搬し、採水後 4 時間以内に 2. (2) に記した各項目について測定を行った。

3. 実験結果と考察

(1) 微生物細胞に由来するエンドトキシンの定量

本研究で対象としたそれぞれの菌株について、細胞数と総エンドトキシン間に得られた関係を図-3 に示す。いずれの菌株においても、総エンドトキシンの対数値は細胞数の対数値に比例して増大した。各菌株で求め

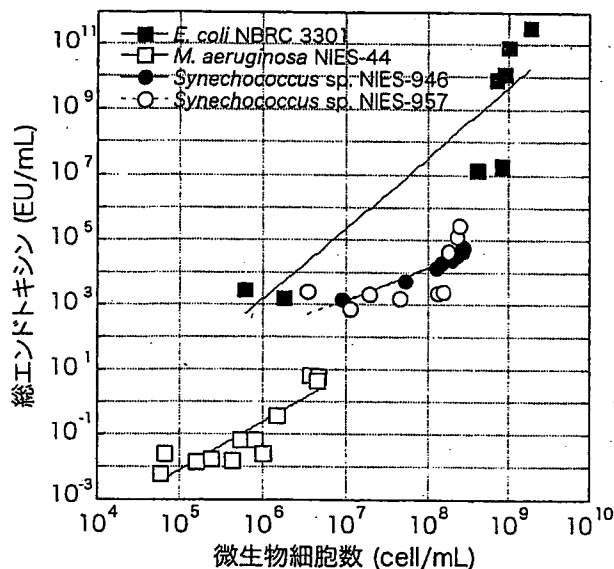


図-3 微生物細胞数と総エンドトキシン量の関係

られた回帰式を以下に示す。

<E. coli NBRC3301>

$$y = 1.41 \times 10^{-10} \cdot x^{2.17} \quad (R^2 = 0.835) \quad (1a)$$

<M. aeruginosa NIES-44>

$$y = 3.08 \times 10^{-10} \cdot x^{1.48} \quad (R^2 = 0.793) \quad (1b)$$

<Synechococcus sp. NIES-946>

$$y = 4.13 \times 10^{-5} \cdot x^{1.07} \quad (R^2 = 0.963) \quad (1c)$$

<Synechococcus sp. NIES-957>

$$y = 2.89 \times 10^{-4} \cdot x^{0.956} \quad (R^2 = 0.458) \quad (1d)$$

ここで、 x : 1mL 中の各微生物細胞数 (cell/mL), y : 総エンドトキシン濃度 (EU/mL) である。

これらの回帰式を用いて、細胞数 10^7 cell の時の一細胞当たりエンドトキシン量を算出すると、*M. aeruginosa* NIES-44 では 7.06×10^7 EU/cell であるのに対して、*Synechococcus* sp. NIES-946 の場合には 1.28×10^4 EU/cell と約 180 倍高い値を、さらに *E. coli* NBRC 3301 の場合では 2.18×10^1 EU/cell と 300000 倍以上高い値をそれぞれ示した。*Synechococcus* sp. NIES-957 は、NIES-946 と同程度のエンドトキシン活性を示した。Rapala らは、3 種類のグラム陰性細菌に加えて、*Microcystis* sp. 6 株、*Oscillatoria* sp. 5 株、*Anabaena* sp. 6 株、*Aphanizomenon* sp. 5 株、*Nodularia* sp. 4 株を対象として細胞乾燥重量当たりのエンドトキシンを比較し、*Microcystis* sp. および *Nodularia* sp. が相対的に高いエンドトキシン活性を示すものの、*E. coli* ATCC 11775 (1.4×10^5 EU/mg) との比較では、非常に弱いエンドトキシン活性を示すこと、それ故にシアノ

バクテリアの大量発生現象はエンドトキシン活性の変動にほとんど影響しないと結論づけている⁹⁾。しかしながら、本研究の結果からは検討した微生物種のうち、*Synechococcus* sp. が環境水中のエンドトキシン変動に対して大きく寄与する可能性があると考えられる。その理由として、*Synechococcus* sp. に由来する一細胞当たりエンドトキシン含有量は *E. coli* NBRC 3301 の約 1/1700 と比較的小さいものの、*Microcystis* sp. との比較では、相対的に高い活性を示したことが挙げられる。さらに、*Synechococcus* sp. は夏季の琵琶湖において繁殖することが知られているピコ植物プランクトンの代表株であり、ピーク時には 10^5 cell/mL を超える密度で検出される¹⁰⁾ など、季節により細胞数の変動が非常に大きいことが第二の理由として挙げられる。

ここで、Rapala らの報告と同様、本研究でも *E. coli* との比較で $1/10^5$ 倍未満の非常に低いエンドトキシン活性を示した *M. aeruginosa* であるが、LPS を精製することにより乾重量当たりのエンドトキシン活性が *E. coli* の約 1/60 程度まで増強するとの報告もある¹¹⁾。*M. aeruginosa* を始めとした多くのシアノバクテリアは、寒天状基質によりその細胞膜が覆われているため、エンドトキシン活性がマスキングされている可能性が高い。すなわち、塩素などの薬剤注入によりエンドトキシン活性の増強が起こりうると考えられるため、別途詳細な検討を行う必要があるだろう。

(2) 環境水中のエンドトキシンの定量

各地点から採取した水試料中のエンドトキシン測定結果を表-1 に示す。琵琶湖および河川表流水のエンドトキシン濃度は $3.11 \times 10^2 \sim 2.43 \times 10^3$ EU/mL の濃度範囲で分布した。一方、下水処理施設放流水のエンドトキシン濃度は 1.08×10^4 EU/mL と一般水環境中と比べて非常に高い値を示した。ここで、表流水のうち 2000 EU/mL 前後の高い値を示した地点、E3、E7 および E8 はいずれも下水処理放流水の影響を強く受けうる地点であった。これらの結果より、取水口が下水処理放流口近くに存在する場合には、原水中のエンドトキシン濃度が 1 オーダー程度増大する可能性があると考えられる。

Narita らは、活性汚泥の自己酸化過程において汚泥構成微生物から 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO) が放出され、親水性有機物濃度が増大すると報告している¹²⁾。KDO は種々の微生物に由来する LPS において保存的に存在するコア領域の成分で、Lipid A に隣接している化合物である¹³⁾。さらに、バイオアッセイの結果から親水性有機物放出に伴って細胞毒性が増大することを示している¹⁴⁾。これらの知見に基づくと、下水処理施設からの放流水が水環境中のエンドトキシン濃度に与える影響は非常に大きいと考えられるため、水資源

表-1 琵琶湖淀川水系におけるエンドトキシン調査結果

地点No.	水系	採水地点	採水日	総エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン比率
E-1	琵琶湖南湖	大津港	2005.12.19	4.28×10 ²	2.20×10 ²	0.514
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	2005.12.19	3.31×10 ²	2.30×10 ²	0.695
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	2005.12.19	2.43×10 ³	3.30×10 ²	0.136
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	2006.2.9	3.11×10 ²	2.25×10 ²	0.723
E-5	宇治川	宇治橋	2006.2.9	3.11×10 ²	1.92×10 ²	0.617
E-6	木津川	三川合流地点	2005.12.27	6.21×10 ²	1.77×10 ³	>1
E-7	宇治川	三川合流地点	2005.12.27	2.03×10 ³	8.26×10 ²	0.407
E-8	桂川	三川合流地点	2006.3.21	1.80×10 ³	4.80×10 ²	0.267
E-9	淀川	枚方大橋	2005.12.27	1.51×10 ³	2.87×10 ²	0.19
E-10	淀川	豊里大橋	2006.1.23	3.40×10 ²	2.50×10 ²	0.735
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	2006.2.9	6.27×10 ²	1.18×10 ³	>1
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	2006.1.11	1.55×10 ²	1.82×10 ²	>1
S-3	疏水分線	若王子橋	2006.1.11	1.46×10 ²	1.77×10 ²	>1
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	2006.1.11	1.16×10 ²	2.95×10 ²	>1
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	2006.1.11	2.57×10 ²	1.94×10 ²	0.755
A-1		下水処理場放流水	2005.12.16	1.08×10 ⁴	1.26×10 ³	0.117

の循環利用を推進していく上では、生菌数のみならずエンドトキシンなどの微生物由来化学物質にも着目して微生物管理を行うことが不可欠と考えられる。

ここで、2. (2) で述べた異なる3手法を用いて計数した各試料の微生物計数結果に基づいて、微生物数計数結果と総エンドトキシンの関係を図-4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た。しかし、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、水中微生物量の定量的指標として代用することは困難であると考えられる。その理由として、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¹³⁾ 点が挙げられる。

さらに、DAPI 蛍光染色による全菌数測定結果に基づいて、環境試料 (10⁶ cell/mL) 中の微生物一細胞当たりエンドトキシン量を試算すると、5.37 × 10⁻⁴ EU/cell となった。前項で検討を加えた *E. coli* NBRC 3301 の一細胞当たりエンドトキシン量は、10⁶ cell/mL の場合には 1.47 × 10³ EU/cell と算出されることから、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 37% 程度と比較的高い値を示すことが明らかとなった。この全菌数測定結果には、ピコ植物プランクトン等の小型シアノバクテリア (長径 3 μm 以下) も含まれているが、本調査は冬季に実施したため、ピコ植物プランクトン数は非常に低い値で推移しており、検出されたエンドトキシン活性はほぼグラム陰性細菌に由来すると考えられる。既存の調査研究結果からは HPC の明確な季節変動は確認できず¹⁰⁾、むしろ降雨などの気象条件や、前述した下水処理施設放流口の位置といった採水地点などの要因に大きく影響されるため、本研究ではグラム陰性細菌によるエンドトキシンの季節的な変動は考慮せず、高温期のピコ植物プランクトンの大量発生に由来するエンドトキシン量の増大について検討を加える。

今回の調査ではピコ植物プランクトンの実測を行っていないため、以下では報告されている瀬田川における測定値¹⁵⁾に基づいて試算を行う。本研究で採水を行った2月にはピコ植物プランクトンは平均 5.7 × 10³ cell/mL であったのに対して、8月には 4.9 × 10⁵ cell/mL とピークに達している。ここで、ピコ植物プランクトンが全て *Synechococcus* sp. であると仮定して、前節で算出した

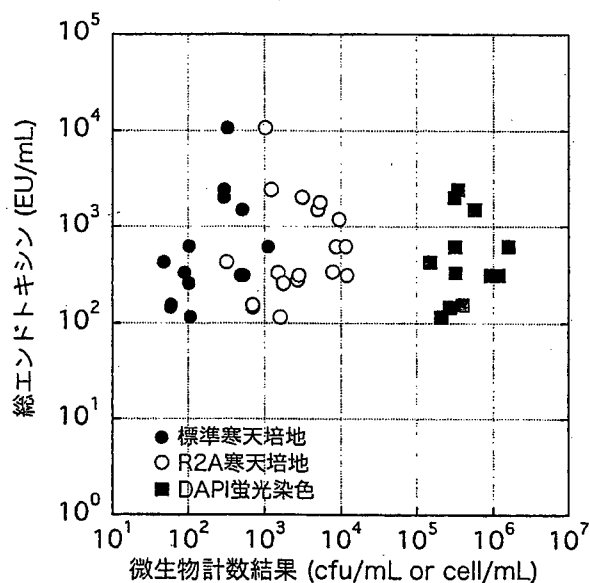


図-4 環境微生物数と総エンドトキシン量の関係

Synechococcus sp. NIES-946 の回帰式 (1c) を用いると、*Synechococcus* sp. に由来するエンドトキシン量は 0.430 EU/mL (2月), 50.5 EU/mL (8月) とそれぞれ試算された。なお、淀川中流域におけるピコ植物プランクトン実測値も、高温期には 10^5 cell/mL を超える濃度で検出されており¹⁶⁾、湖沼のみならず河川表流水を原水とする場合においても、ピコ植物プランクトンに由来する原水中エンドトキシンの増大が起こりうると判断される。

(3) 浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性

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-2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。また、着水井におけるこれらの値を基準として、単位処理プロセス毎の除去率を下記の式で算出した。

$$R_{p(i)} = \frac{C_{p(i-1)} - C_{p(i)}}{C_{p(i)}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $R_{p(i)}$: プロセス i における除去率(%), $C_{p(i)}$: i 番目のプロセスにおける濃度 ($i = 2 \sim 7$) である。

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。表-2の結果から、各手法で測定した微生物計数 (SPC・HPC・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。

急速ろ過プロセスまでの平均累積除去率は、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%) となり、遊離エンドトキシンの方が大きな変動幅を示した。一方、微生物計数結果から算出される平均累積除去率は、SPC で 90.3%, 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。この結果をオゾン-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¹⁷⁾ を踏まえて考えると、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過程で吸着除去された微生物が豊富な AOC を炭素源として再増殖した結果として、活性炭流出水中のエンドトキシンが増大したと考えられる。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⁹⁾ が、この論文の中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必要不可欠と考えられる。

最後に、塩素混和では総エンドトキシンはほとんど低減されず、むしろ遊離エンドトキシンは増大する傾向が確認され、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た。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。

浄水中のエンドトキシン濃度は、1970年代から Sykora ら¹⁸⁾、Jorgensen ら¹⁹⁾ を始めとした多くの研究者により報告されている。これらの測定値の中には ng/mL 単位で表記されたものも多く、本研究の結果との単純な比較は困難である。前述の Rapala らは、複数の浄水処理施設を対象として総エンドトキシンの測定を行い、本研究の結果とほぼ同程度の 3 ~ 15 EU/mL の範囲に分布すると報告している⁹⁾。水中およびそのエアロゾル中に混入したエンドトキシンが主原因と疑われる健康被害報告は複数例あるが^{20), 21)}、このうち bath-water fever

表-2 浄水処理過程における微生物およびエンドトキシンの除去特性

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(河川水)	1144		22572		8.96E+05		56.22		35.63	
着水井 (p_1)	1359	0.0	17534	0.0	8.45E+05	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0
凝集剤添加前 (p_2)	1481	-9.0	22972	-31.0	9.91E+05	-17.3	78.16	-4.1	38.41	0.8
凝集沈殿後 (p_3)	255	90.2	1502	122.4	2.01E+05	93.5	11.63	88.6	5.67	84.5
急速ろ過後 (p_4)	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 (p_5)	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 (p_6)	5	-0.4	238	-1.4	2.28E+04	-2.6	10.98	-5.8	8.44	-3.6
塩素混和後 (p_7)	0	0.4	0	1.4	5.07E+03	2.1	9.66	1.8	11.82	-8.7

表中の各数値は、3回実施した調査測定結果の平均値で表した。

* 急速ろ過後試料までの全菌数については2回の調査結果の平均値、オゾン処理以降については1回の調査結果のみを表記

の集団発生事例（フィンランド）においてのみ、発生時の水中エンドトキシン濃度が測定され、発症患者宅の蛇口水エンドトキシン濃度が0.2～1.0 μg/mLの範囲にあったことが報告されている。単純な濃度比較は困難であるが、一般的に用いられている換算係数、1 ng = 5～10 EUを使用すると、この報告値は1000～10000 EU/mLに相当する。この値に比べれば本研究で得られた浄水中エンドトキシン濃度は極めて低く、安全濃度範囲にあると判断される。しかしながら、こうした重篤な健康被害以外にも、アレルギー反応への関与を示唆する結果も存在する²²⁾ものの、吸入以外の曝露形態による健康影響は調べられていないため、確実に安全と言えるエンドトキシンの濃度範囲は未知と言えよう。今後は、浄水中のエンドトキシン変動に影響を及ぼす因子、すなわち原水中の微生物や配水過程における変動などの情報蓄積を進めるとともに、水道水使用を想定した曝露量を把握することが必要と考えられる。

(4) エンドトキシンの存在形態の変化

浄水処理過程における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）と従属栄養細菌数（HPC）の変化を図-5に示す。急速ろ過プロセス以前の試料では、遊離エンドトキシン比率が0.36～0.96の範囲に分布した。これに対して、表-2に示したようにオゾン処理および塩素混和を行った全ての試料でHPCは0 cfu/mLとなり、その時の遊離エンドトキシン比率はオゾン処理後の試料で0.59～1.48、さらに塩素消毒後の試料では0.86～2.36と非常に高い値を示したことから、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。ここで、塩素消毒は細胞膜構

造にダメージを与えて細胞透過性を破壊するとともに、細胞内の核酸や酵素に作用して微生物を不活化すると考えられている¹⁾。また、オゾン処理についても消毒効果の残留性こそないものの微生物を不活化する強い酸化力を有することから、オゾン処理および塩素消毒により損傷を受けた細胞膜からLPS複合体が放出されることで、遊離エンドトキシンの増大を招いたと考えられる。このように、十分な微生物不活化効果が達成されている場合には遊離エンドトキシン比率が増大する反面、HPCが検出される試料、すなわち増殖可能な細菌が存在する試料では、微生物細胞膜を構成する結合エンドトキシンの割合が増加することにより、遊離エンドトキシン比率が相対的に低下したと考えられる。本研究で検討を行った試料は数が限られているものの、以上の結果から遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す良い指標となりうることを示唆される。

なお、本研究では遊離エンドトキシン活性が総エンドトキシン活性を上回る現象が複数の試料で確認された。この逆転現象を説明する理由として、1) 残存する微生物細胞などの懸濁性物質によりLAL試薬とエンドトキシン活性部位が妨害されたことによる見かけの総エンドトキシン活性の低下に加えて、2) 塩素によるLPS複合体の遊離化・低分子化により、遊離エンドトキシンとLAL試薬との反応性が増大している可能性も挙げられる。以上の点から、存在形態の違いがエンドトキシンが示す生理活性に及ぼす影響も含めたさらなる検討が求められる。

4. 結論

本研究では、水道水源におけるエンドトキシン濃度の変動要因として微生物叢の変化に着目し、グラム陰性細菌およびシアノバクテリアに由来するエンドトキシンの定量を行った。その結果、*Synechococcus* sp.の季節変動に起因して、エンドトキシン量が増減することが示唆された。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査の結果から、下水処理施設からの放流水がエンドトキシン増大に影響を与えることを指摘した。環境微生物群に由来する一細胞当たりのエンドトキシンは、*E. coli*の場合の約37%であり、比較的高いことが明らかになった。さらに、浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性を調べた結果、急速ろ過プロセスにより良好に除去されるものの、活性炭表面における微生物の増殖により活性炭処理後のエンドトキシンが増大すること、しかしながら浄水中エンドトキシン濃度は既往研究で報告されている健康被害発生時濃度と比較して、十分に低濃度であることが明らかになった。ま

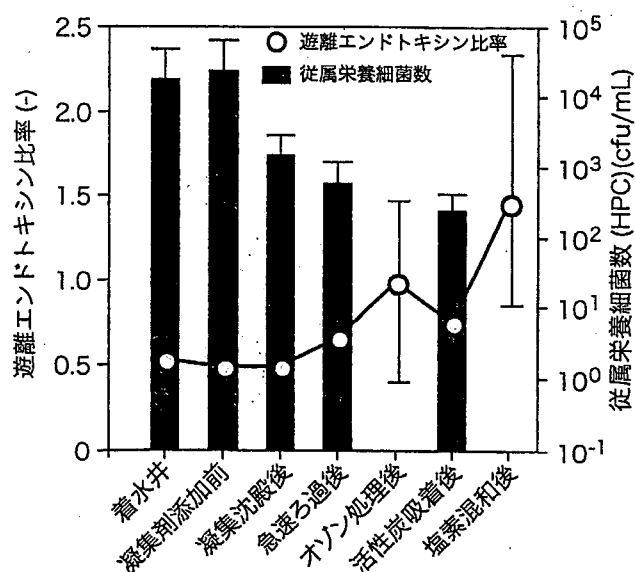


図-5 浄水処理過程における遊離エンドトキシン比率および従属栄養細菌数の変化
図では、3回の調査で得られた平均値と測定値の範囲を示している。

た、オゾン処理や塩素消毒といった微生物不活化操作により遊離エンドトキシンが増大したことから、遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す指標となりうることが示唆された。

謝辞：本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業，H17-健康-一般-025，代表者 国包章一）および文部科学省科学研究費補助金（基盤(B)，18310045，代表者 伊藤禎彦）によるものである。また、採水に当たり、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) Percival S.L., Walker J.T. and Hunter P.R.: Microbiological aspects of biofilms and drinking water, CRC Press, 2000.
- 2) LeChevallier M.W., Schulz W. and Lee R.G.: Bacterial nutrients in drinking water, Applied and Environmental Microbiology, 57, pp. 857-862, 1991.
- 3) Chorus I. and Bartram J.: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, World Health Organization, 1999.
- 4) Reed C.E. and Milton D.K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 108, pp. 157-166, 2001.
- 5) Thorne P.S., Kulhankova K., Yin M., Cohn R., Arbes S.J., Jr. and Zeldin D.C.: Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 172, pp. 1371-1377, 2005.
- 6) Petsch D. and Anspach F.B.: Endotoxin removal from protein solutions, Journal of Biotechnology, 76, pp. 97-119, 2000.
- 7) (社) 日本水道協会：上水試験方法 2001年版，日本水道協会，2001.
- 8) 国立環境研究所微生物系統保存施設：培地リスト，http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm, 2006.11.15 accessed.
- 9) Rapala J., Lahti K., Rasanen L.A., Esala A.L., Niemela S.I. and Sivonen K.: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, Water Research, 36, pp. 2627-2635, 2002.
- 10) 阪神水道企業団管理部水質試験所：調査試験年次報告（通第53号），2004.
- 11) Bernardova K., Babica P., Marsalek B. and Blaha L.: Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga, Journal of Applied Toxicology (*in press*), DOI: 10.1002/jat.1257.
- 12) Narita H., Isshiki I., Funamizu N., Takakuwa T., Nakagawa H. and Nishimura S.I.: Organic matter released from activated sludge bacteria cells during their decay process, Environmental Technology, 26, pp. 433-439, 2005.
- 13) Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. and et al.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, FASEB Journal, 8, pp. 217-225, 1994.
- 14) Narita H., Funamizu N., Takakuwa T. and Kunimoto M.: Role of hydrophilic organic matter on developing toxicity in decay process of activated sludge, Water Science and Technology, 52, pp. 63-70, 2005.
- 15) 滋賀県琵琶湖・環境科学研究センター：瀬田川プランクトン調査結果速報（第1報～第39報，2006年），http://www.lberi.jp/root/jp/06db/bkjhlplankton_setagawa.htm, 2007.1.10 accessed.
- 16) 大阪府水道部水質管理センター：水質試験成績並びに調査報告（第42集），pp. 448-451, 2003.
- 17) Polanska M., Huysman K. and van Keer C.: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water, Water Research, 39, pp. 2259-2266, 2005.
- 18) Sykora J.L., Keleti G., Roche R. and Volk D.R.: Endotoxins, algae and *limulus* amoebocyte lysate test in drinking water, Water Research, 14, pp. 829-839, 1980.
- 19) Jorgensen J.H., Lee J.C. and Pahren H.R.: Rapid detection of bacterial endotoxins in drinking water and renovated wastewater, Applied and Environmental Microbiology, 32, pp. 347-351, 1976.
- 20) Muittari A., Rylander R. and Salkinoja-Salonen M.: Endotoxin and bath-water fever, Lancet, 2, pp. 89, 1980.
- 21) Fields B.S., Haupt T., Davis J.P., Arduino M.J., Miller P.H. and Butler J.C.: Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin, Journal of Infectious Diseases, 184, pp. 1289-1292, 2001.
- 22) Torokne A., Palovics A. and Bankine M.: Allergenic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria-experimental evidence, Environmental Toxicology, 16, pp. 512-516, 2001.

(2007.5.25 受付)

Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment
and characterization of endotoxin removal in water treatment process

Yumiko OHKOUCHI¹, Suguru ISHIKAWA¹, Kyosuke TAKAHASHI²
and Sadahiko ITOH¹

¹Dept. of Urban Management, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Sumitomo Heavy Industries, Ltd.

Endotoxins are well known as bacterial agents to cause strong immunity reaction in human. In this study, several factors associated with increase of endotoxins in aquatic environment were examined. It was suggested that the fluctuation of endotoxic activities could be affected by cell numbers of *Synechococcus* sp. by comparison with endotoxic activities from different cyanobacterial strains. In Lake Biwa – Yodo River basin, the endotoxic activities ranged from 311 to 2,430 EU/mL, and the effluent from sewage treatment plant were considered to be a major source of endotoxin contamination. The endotoxic activity per an indigenous bacterial cell in aquatic environment was calculated as 5.37×10^{-4} EU/cell. The removal of endotoxins in water treatment process was also characterized. It was found that endotoxins were increased after activated carbon adsorption process with bacterial regrowth, and that free endotoxin were increased by chlorination. The ratios of free endotoxins to total endotoxins reflected the bacterial cell damages by chlorination or ozonation.

(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、原水の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

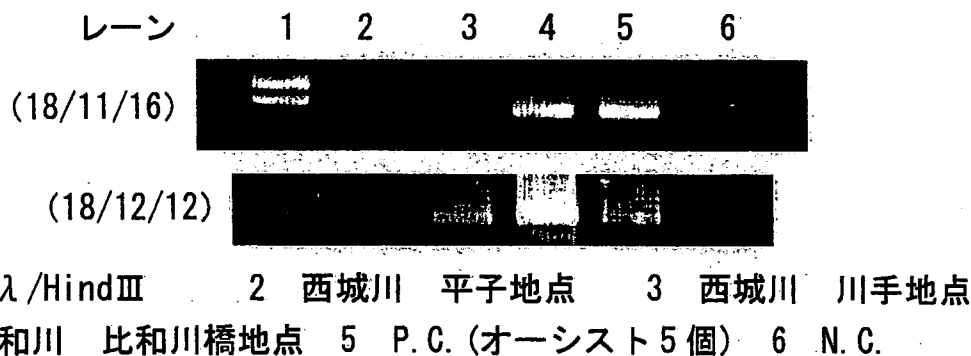


図1 電気泳動結果

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

(8-54) 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消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。

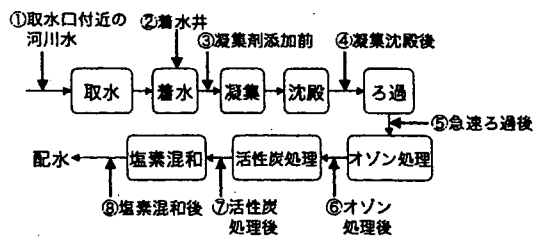


図 1 対象施設の処理フローと採水ポイント

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'-ジアミジノ-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面分を用いて、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 (エンドスピーシー 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。

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回のみの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。

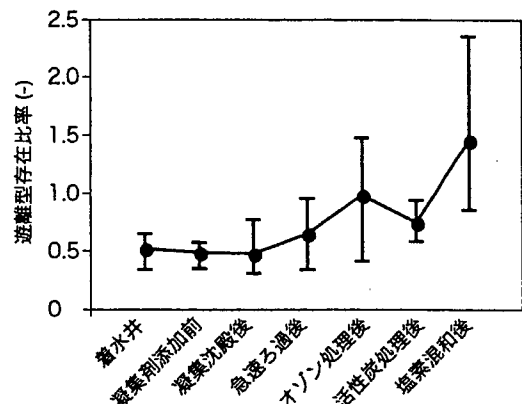


図2 浄水処理過程におけるエンドトキシン存在形態の変化

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.