

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

水道の配水過程における
水質変化の制御および管理に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21年3月

研究代表者 島崎 大 (国立保健医療科学院)

研究班の構成

研究代表者

国立保健医療科学院水道工学部

生活衛生適正技術開発主任研究官 島崎 大

分担研究者

京都大学大学院工学研究科 教授

伊藤 禎彦

お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 准教授

大瀧 雅寛

東京大学大学院工学系研究科 助教

春日 郁朗

静岡県立大学環境科学研究所 教授

国包 章一

北海道大学大学院工学研究科 教授

船水 尚行

研究協力者

北海道大学大学院工学研究科

伊藤 竜生

国立保健医療科学院水道工学部

岩田 和隆

京都大学大学院工学研究科

大河内 由美子

東京大学大学院工学系研究科

中垣 宏隆

Suwat Soonglerdsongpha

前田 祐太

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

水道の配水過程における
水質変化の制御および管理に関する研究

平成20年度 総括研究報告書

平成21年3月

研究代表者 島崎 大 (国立保健医療科学院)

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道の配水過程における水質変化の制御および管理に関する研究」
平成 20 年度総括研究報告書

研究代表者 島崎 大 国立保健医療科学院水道工学部
生活衛生適正技術開発主任研究官
研究分担者 伊藤 禎彦 京都大学大学院工学研究科 教授
大瀧 雅寛 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 准教授
春日 郁朗 東京大学大学院工学系研究科 助教
国包 章一 静岡県立大学環境科学研究所 教授
船水 尚行 北海道大学大学院工学研究科 教授

研究要旨 水道水質の安全性や快適性のさらなる向上のためには、残留塩素の保持のみならず、配水管網における衛生状態の保持、さらには微生物の再増殖抑制や栄養源物質の除去といった前段の浄水処理に求められる浄水水質の要件についても満たされる必要がある。本研究では水道水の配水過程における化学的、微生物学的水質変化を最小限に抑えるための水質管理や管路維持管理のあり方、またそれを確保する上で必要となる浄水水質や処理システムの要件を明確にする事を目的とする。本年度の主な成果として、欧米諸国の水道事業を対象として、浄水処理および配水水質管理に関する情報源を検索し、消毒による指標微生物の不活化状況や、配水系統を通じた感染症の発生状況について情報の整理を行った。紫外線消毒による不活化機構について、異なる波長により大腸菌(*E. Coli*)および生物膜形成細菌(*Pseudomonas* 属菌)に与える損傷に相違が無いことを実験により確認した。また、ファージの感染性を用いた細菌の代謝機能試験、及び、異なる寒天濃度を用いた細菌の運動性・移動性試験の適用可能性について評価した。新規に生物活性炭を導入した浄水場を対象として、導入開始から 1 年間にわたり生物活性炭における硝化微生物と硝化活性のモニタリングを行い、前塩素処理の停止によって硝化微生物が定着する過程を捉え、硝化古細菌の定着と硝化能との関連性を推察した。浄水処理における AOC 除去特性について異なる浄水場における比較検討を行い、生物活性炭の使用期間ないし微生物叢の状態による影響を推察した。BrdU ラベル化法による従属栄養細菌の迅速検出法について、0.1~1000CFU/mL の範囲で標識 DNA 量に基づいて試料中の従属栄養細菌数を予測することが可能となった。また、実際の水道水試料に適用した場合の課題点について示した。生物膜モニタリング装置を用いた室内実験において、生物膜の抑制効果は次亜塩素酸ナトリウムよりも二酸化塩素が高く、キレート剤 EGTA も効果を有することが確認された。いずれの場合も添加停止に伴って速やかに生物膜中の細菌数は回復した。配水管網内および高架水槽内の微生物濃度をシミュレーションするモデルを用いて、原水中有機物濃度、微生物濃度、浄水中残留塩素濃度が管網内の微生物濃度に与える影響について検討した結果、残留塩素濃度が管網内の微生物増殖を決定していることが示唆された。

A. 研究目的

水道水質の安全性および快適性のさらなる向上のため、水道水の配水過程における化学的および微生物学的な水質変化を最小限に抑えるための水質管理や管路の維持管理のあり方、また、それを確保する上で必要となる浄水水質や浄水処理システムの要件につき明らかにする事を目的とする。特に研究期間内においては、配水管路での微生物再増殖の抑制と管理、また消毒及び生物処理による浄水水質の向上を中心とする。

B. 研究方法

1. 諸外国の水道における浄水処理、残塩保持及び配水水質管理の現状に関する調査

国外の水道水質に係る学術文献調査により、水道水における微生物学的安全性の定量的評価に関する EU の研究プロジェクトである **MicroRisk** の研究成果として報告された文献を選定した。当該文献より、①EU 加盟国における水道由来の水系感染症の発生、②英国、フランス、ドイツ、オランダの配水系統中における *E.Coli* の検出状況、③浄水および配水過程における *E.Coli* 検出率の比較、④配水過程の残留塩素保持の有無による *E.Coli* 検出率の比較についてまとめた。

2. 消毒技術に関する検討（消毒による微生物再増殖の制御方法の検討）

文献調査として、一般細菌、HPC（従属栄養細菌）、緑膿菌（*Pseudomonas* 属）に関する消毒処理方法の効果および測定法に関する既存の研究をまとめた。また、実験研究としては、消毒効果の評価方法として様々な方法の適用が可能かどうか4種類の手法を検討した。すなわち、①異なる培地を用いての培養検出法、②特定ファージを混合させその感染性から細菌の代謝機能を評価する方法、③異なる寒天濃度の栄養培地を用いて細菌の運動性および移動性を評価する方法、④遺伝子解析法（T-RFLP 法）によって微生物群集解析を行う方法とした。

3. 高度処理における微生物再増殖に関わる栄養源の低減条件の検討

(1) 生物活性炭における硝化微生物の定着過程の評価

新規に生物活性炭処理の運用を開始した浄水場 A を対象として、約一ヶ月間隔で生物活性炭処理槽（表層）から逆洗後の活性炭を採取した。当該浄水場では、2007年10月から運用を開始し、「着水井→凝集沈殿→オゾン酸化→生物活性炭→急速砂ろ過→配水池」という工程で処理が進められ、生物活性炭処理後に中塩素処理、急速砂ろ過後に後塩素処理による消毒が行われている。運転開始時より前塩素処理が行われていたが、2008年7月からは前塩素処理は停止されている。全細菌（Bacteria）、全古細菌（Archaea）、硝化細菌（AOB）、硝化古細菌（AOA）の定着状況をモニタリングすると共に、前塩素処理停止前後の生物活性炭試料を用いた硝化試験により、各時期における生物活性炭の硝化能を評価した。

(2) 生物活性炭処理における AOC 除去能と AOC 化学特性の評価

生物活性炭を導入している三箇所の浄水場を対象として、浄水工程（着水井、凝集沈殿

処理水、オゾン処理水、生物活性炭処理水、急速ろ過水、塩素処理後の浄水)における AOC 濃度の変化を調査した。また、各工程水に含まれる溶存有機物の樹脂分画を試みた。

4. 浄水中有機物と配水管路における微生物再増殖モニタリング手法に関する研究

(1) 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

モデル微生物を BrdU (1 μ M) を添加した R2A 液体培地中で 5 時間培養し、ラベリング反応を行った。滅菌培地をネガティブコントロールとして、免疫学的手法により標識 DNA 量を測定した。また、実際の給水栓水を残留塩素中和後に培養し、微生物再増殖量を培養法により確認するとともに、BrdU ラベル化反応に供した。

(2) 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

AOC 測定のための前処理方法として、ろ過除菌方法に関する検討を行った。ろ紙の材質はそれぞれ親水性ポリエーテルスルホン(PES)、親水性 PTFE、酸化アルミニウムであり、孔径はすべて 0.2 μ m のものを用いた。実際の現場調査として、冬季に A 市 B 浄水場 (急速ろ過処理水)・C 市 D 浄水場 (高度浄水処理水) の給水栓水を採取し、AOC、TOC、残留塩素、従属栄養細菌数を調べた。また、同じく冬季に C 市内浄水場の各プロセス処理水を採取し、同様の測定 (残留塩素除く) を行った。

5. 配水過程における微生物再増殖に対する消毒剤等の影響

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を添加することにより、全系統の試料水の遊離残留塩素濃度を 0.0mg/L 程度となるように調整し、41 日間連続的にアニュラーリアクターへ通水した。形成された生物膜の剥離状況および回復状況を調べるため、通水開始後 27~33 日目は、試料水中の残留濃度が系統 1 は 0.5mg/L 程度となるように EGTA を、系統 2 および 3 は 0.7mg/L 程度となるようにそれぞれ二酸化塩素、次亜塩素酸ナトリウムを添加したものを 7 日間通水した。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数と従属栄養細菌数を測定するとともに、試験片表面の細菌種の簡易同定を行った。一般細菌数の測定は上水試験方法に準じ、従属栄養細菌数は R2A 培地を用いて 20°C で 7 日間培養した。菌種を同定するにあたり、試験片表面試料から 1 白金耳を採取し、普通寒天培地に 37°C で 24 時間培養後、独立したコロニーを釣菌し再び普通寒天培地に 37°C で 18~20 時間培養し増菌させた後、増菌させた分離株各々についてバーミー法によるグラム染色を行った。そこでグラム陰性桿菌と判定できた分離株について、グラム陰性桿菌の同定が可能な API20E および API20NE キットを用いて菌種の簡易同定を行った。

6. モデルシミュレーションによる配水過程における微生物再増殖性および汚染事故発生時の健康リスク評価

先行研究において、原水→浄水処理→消毒→配水池→配水管網→(高架水槽)→水道水

までを一括して扱うシミュレーションモデルを構築している。基本的な構造は原水水質（過マンガン酸カリウム消費量、大腸菌群数）と浄水場出口での残留塩素濃度を入力条件とし、配水管網と高架水槽における塩素消費、微生物再増殖を計算することにより、給水栓における残留塩素濃度、微生物濃度を推算するものである。配水・給水系のパイプやタンクにおける微生物の増殖、塩素消費は液中と壁面の 2 者についてモデル化している。原水水質（過マンガン酸カリウム消費量、大腸菌群数）と浄水場出口での残留塩素濃度を入力条件とし、水道統計から定めた規模の大きな配水区を対象に、配水管網内と高架水槽における塩素消費および微生物再増殖のシミュレーション計算を行った。

（倫理面への配慮）

人体試料を用いた実験や動物実験等、倫理上問題となるような実験等は行っていない。

C. 研究結果

1. 諸外国の水道における浄水処理、残塩保持及び配水水質管理の現状に関する調査

1990 年から 2004 年の間、EU25 カ国のうち 10 カ国において、86 件の水系感染症が報告された。国別では、英国(34%)、フィンランド(14%)、フランス(8%)およびスウェーデン(8%)での報告が多かった。内 54 件について汚染源および原因の病原微生物が同定された。主な病原微生物はクリプトスポリジウムであり、全事例の 38%を占め、その大半は英国での事例であった。カンピロバクターおよびノロウイルスによる感染症は、82%が北欧諸国（フィンランドおよびスウェーデン）での事例であった。

複数の給水区域からのデータが入手可能であった、フランス、オランダおよびドイツを対象として、2000～2003 年の浄水および配水過程（給水末端）での水質検査データを解析した。ドイツでは 13 の給水区域のうち 8 区域で、オランダでは 125 の給水区域のうち 118 区域で浄水処理の最終段階で塩素消毒剤を添加せず、残留塩素なしの配水を行っていた。一方、フランスでは 1,960 の給水区域すべてにおいて配水過程での残留消毒剤を保持していた。各国の浄水と配水系統での *E.Coli* 検出率を比較したところ、フランスでは浄水と配水過程での *E.Coli* 検出率が同じであったのに対して、ドイツとオランダでは配水過程の方が浄水よりも高い検出率であり、共に配水系統において水質劣化が生じていることが示唆された。フランスでの検出率は他国と比較して有意に高かった。当該のデータには多くの地域小規模水道が含まれており、給水区域の面積や人口密度、維持管理の状況等が影響したと考えられる。

配水系統での残留消毒剤保持の有無による *E.Coli* 検出状況を比較したところ、残留消毒剤を保持している配水系統では、ドイツ、フランス共に浄水と同程度の *E.Coli* 検出率であったが、オランダでは配水系統で増加した。一方、残留消毒剤なしの配水系統では、オランダでは浄水と同程度の検出率であり、ドイツでは配水系統で増加した。オランダおよびドイツの各データを *E.Coli* の平均濃度が低い順に並べ、累計給水人口 90%に相当する *E.Coli* 濃度を算出した。残留消毒剤の保持にかかわらず、*E.Coli* 濃度は配水系統において

高まっており、残留消毒剤なしの配水系統での濃度は、保持している場合と比較して 2~3 倍であった。

2. 消毒技術に関する検討（消毒による微生物再増殖の制御方法の検討）

文献調査においては、一般細菌や従属栄養細菌に対する各種消毒法の効果に関しては、定量的な考察を行っている先行研究が余り多く見つからず、今後も論文検索が必要であるが、これまでのレビュー結果からは、*Pseudomonas*などを対象とした場合、往々にして消毒耐性は大腸菌に比べると高い傾向がみられていた。

実験研究においては、大腸菌において既に実績のある異なる培地を用いての方法は *Pseudomonas* に対しても有効に用いることができることがわかった。紫外線照射をケーススタディとした結果、大腸菌で得られたものと同様の結果が得られた。また *Pseudomonas aeruginosa* を用いた結果から、大腸菌比べて UV 耐性が高いことが確認された。

ファージの感染性を用いての細菌の代謝機能評価については、紫外線消毒をケーススタディとして検討した結果、ファージの吸着速度および増殖速度の2つの観点からの評価方法が可能であることがわかった。

異なる寒天濃度を用いた細菌の運動性、移動性試験によって、*Pseudomonas* の個々の運動性、生物膜形成能などが測定できることが確認できた。紫外線消毒をケーススタディとして検討した結果、生物膜形成能に影響が大きい種が多く見られた。

T-RFLP 法については、その前処理段階である PCR による DNA 増幅において紫外線照射によって PCR 阻害が生じた。

3. 高度処理における微生物再増殖に関わる栄養源の低減条件の検討

(1) 生物活性炭における硝化微生物の定着過程の評価

調査対象の浄水場 A において、前塩素処理停止（2008 年 7 月）より前は、沈澱池処理水の段階でアンモニア性窒素はほぼ除去されていたが、逆に生物活性炭処理槽から微量のアンモニア性窒素が溶出することが常態化していた。前塩素処理停止後は、沈澱池処理水からアンモニア性窒素が検出されるようになったが、生物活性炭処理槽でほぼ全量のアンモニア性窒素が処理されていた。

全細菌、全古細菌の 16S rDNA を対象とした定量 PCR を行ったところ、全細菌の 16S rDNA は、運転開始直後から 10^6 gene copies/g-dry オーダーで検出された後、2008 年 11 月には 10^{10} gene copies/g-dry オーダーまで増加した。全古細菌の 16S rDNA については、2008 年 2 月までは定量下限以下になることがあるなど不安定であったが、それ以降は漸増し、2008 年 11 月には 10^9 gene copies/g-dry オーダーに達した。

AOA、AOB のアンモニア酸化酵素をコードした AOA-*amoA* 遺伝子、AOB-*amoA* 遺伝子を標的とした定量 PCR によるモニタリングを行った。前塩素処理停止前は AOA-*amoA* 遺伝子、AOB-*amoA* 遺伝子ともに定量下限以下であったが、前塩素処理停止直後の 7 月 28 日採取分から $10^6 \sim 10^7$ gene copies/dry-g 程度の AOA-*amoA* 遺伝子が検出され始め、その後ほぼ一定の

値に達した。

硝化能試験の結果について、前塩素処理停止前の試料では、48 時間の培養によってアンモニア性窒素が 2.5mgN/L 除去されるにすぎず、硝化活性は低い状態であった。一方、前塩素処理停止後の試料では、水温の低下した冬季の試料であるにもかかわらず、同じ培養時間内に検出下限以下にまでアンモニア性窒素が除去され、それに付随して硝酸が生成することが明らかになった。

(2) 生物活性炭処理における AOC 除去能と AOC 化学特性の評価

生物活性炭を導入する 3 つの浄水場を対象として、工程水の AOC 濃度を測定した。浄水場 B については、使用期間が 1 年と 5 年の生物活性炭処理水についても解析を行った。浄水場 A については、オゾン処理によって AOC 濃度が原水の AOC 濃度の約 4 倍にまで達した。増加した画分は、これまでにオゾン処理によって増加すると報告されている AOC-NOX 画分ではなく、主に AOC-P17 画分であった。しかし、生物活性炭で処理することにより、主に AOC-P17 画分が除去され、最終的な浄水の AOC 濃度は $28 \mu\text{gC-acetate/L}$ を示した。浄水場 B の浄水工程における AOC 濃度の変化は、既存の報告とは異なり、原水の AOC 濃度が最も高く $159 \mu\text{gC-acetate/L}$ を示した後、オゾン処理によっても AOC 濃度の増加は見られなかった。使用期間 1 年の生物活性炭に比べて、使用期間 5 年の生物活性炭の方が AOC 濃度の低減効果は高かった。AOC 濃度はろ過後に上昇し、最終的な浄水の AOC 濃度は $44 \mu\text{gC-acetate/L}$ であった。浄水場 C については、オゾン処理後に AOC-NOX 画分が増加したが、生物活性炭処理によって、AOC-NOX、AOC-P17 の双方の画分とも除去されていた。ろ過後には塩素処理の影響で AOC 濃度は増加した後、浄水の AOC 濃度は $121 \mu\text{gC-acetate/L}$ と他と比べて高い値を示した。

生物活性炭処理前後（オゾン処理水、生物活性炭処理水）の AOC 濃度を比較して、生物活性炭における AOC 除去率を算出したところ、AOC 除去率が最も高かったのは浄水場 C で 73% を示した。浄水場 B では、使用期間 1 年の生物活性炭処理で 14%、使用期間 5 年の生物活性炭処理で 55% の除去率を示し、使用期間の違いによって除去率に差異が見られた。一方、浄水場 A の生物活性炭は使用期間が約 1 年であるにもかかわらず、除去率は 53% を示し、浄水場 B の使用期間 1 年の生物活性炭よりも高い除去能があることが示された。

2008 年 9 月に採水した浄水場 A の工程水（原水、オゾン処理水、生物活性炭処理水）を樹脂により分画処理したところ、すべての原水、オゾン処理水、生物活性炭処理水のいずれでも、70-80% が疎水性、20-30% が親水性であることが明らかになった。

4. 浄水中有機物と配水管路における微生物再増殖モニタリング手法に関する研究

(1) 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

BrdU 標識 DNA の定量方法の確立として、抗原抗体反応において酵素基質として使用する ABTS 溶液を要時調製に切り替えたが、測定値の変動は抑制できなかった。そこで、続いてネガティブコントロールを設定し、測定値の補正を試みた。既往の結果では、測定回毎にブランク値が大きく変動していたが、今回設定したネガティブコントロール値を用いて補

正を行うことで、ブランク値を大幅に低下させることが可能になった。なお、1000CFU/mL を超える領域では、吸光度値の低下が見られたため、これ以降の検討では定量可能範囲の上限を 1000 CFU/mL とした。

実際に水道水試料への適用を試みたところ、全域で高度浄水処理水が供給されている C 市の採水試料では、残留塩素中和後の全ての試料で従属栄養細菌の再増殖が確認された。急速ろ過処理水が供給されている A 市の採水試料の一部では再増殖が起こらなかった。C 市給水栓水試料中の再増殖微生物の比増殖速度は 10 月末では 0.068 hr^{-1} 以上 (倍加時間 $\leq 10.2 \text{ hr}$)、12 月上旬では 0.087 hr^{-1} 以上 (倍加時間 $\leq 7.7 \text{ hr}$) と計算された。

(2) 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

AOC 測定前処理のフィルターろ過による除菌方法について、PES フィルターおよび親水性 PTFE フィルターを用いた場合には有機物の溶出が示唆されたが、酸化アルミニウムフィルターを用いた場合には大きな有機物濃度の変化は見られず、洗浄した無機化合物フィルターによるろ過除菌が適切であることが示された。

A 市給水栓水および C 市給水栓水において、両配水区とも給水栓水中で平均 $0.3 \text{ mgCl}_2/\text{L}$ を下回らない高いレベルの残留塩素が検出され、従属栄養細菌数も 1CFU/mL 未満と十分に不活化されていた。夏季の給水栓水中平均 AOC 濃度 (A 市) が $59.8 \pm 15.6 \mu\text{gC}/\text{L}$ であったのに対して、冬季は高度浄水処理が導入されている C 市の平均値が $136.0 \pm 36.2 \mu\text{gC}/\text{L}$ 、急速ろ過方式の A 市で $173.9 \pm 43.5 \mu\text{gC}/\text{L}$ と、ともに有意に高い値を示した。一方、浄水処理方式による冬季の AOC 濃度の差異はわずかであった。また、AOC-NOX 成分は季節変動が小さいのに対して、AOC-P17 成分は冬季に大幅に増大していることがわかった。特に、C 市 D 浄水場での採水調査では、凝集沈殿後および砂ろ過後の試料で AOC 濃度の低減が確認されたが、最終処理水の AOC 濃度は原水とほぼ同じレベル (約 $150 \mu\text{gC}/\text{L}$) が残存しており、浄水処理プロセスによる AOC 濃度低減効果は確認されなかった。オゾン処理後または塩素処理後の試料で AOC-NOX 成分の割合増大が確認されたものの、全体を通して AOC-P17 成分が占める割合が非常に大きいことも明らかになった。

5. 配水過程における微生物再増殖に対する消毒剤等の影響

(1) 試験片表面の細菌数

試験片表面の細菌数は、一般細菌、従属栄養細菌いずれも通水開始後 20 日前後で定常状態に達しており、定常期における細菌数はそれぞれ $1.0 \times 10^3 \sim 6.8 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ 、 $3.4 \times 10^4 \sim 5.6 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ であった。

EGTA 添加 1 週間後の系統 1 の細菌数は、一般細菌数が $5.2 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ から $6.2 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ (最大 $2.6 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ まで減少) に、従属栄養細菌数が $3.8 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ から $2.9 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ (最大 $1.4 \times 10^4 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ まで減少) と、いずれも 1log 程度減少した。EGTA の添加を停止すると、一般細菌数は EGTA 添加中と同程度の $2.0 \times 10^2 \sim 7.2 \times 10^2 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ で推移し、従属栄養細菌数は 1 週間後に定常期と同程度の $5.7 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ となった。

二酸化塩素添加 1 週間後の系統 2 の細菌数は、一般細菌数が $1.0 \times 10^3 \text{ CFU}/\text{cm}^2$ からほぼ 0

CFU/cm²に、従属栄養細菌数が 1.3×10^5 CFU/cm² から 1.9×10^1 CFU/cm² (最大 6.7×10^0 CFU/cm² まで減少) と 4log 程度減少した。一方、次亜添加 1 週間後の系統 3 の細菌数は、一般細菌数が 1.1×10^3 CFU/cm² から 6.3×10^0 CFU/cm² と 3log 弱程度減少、従属栄養細菌数が 4.4×10^4 CFU/cm² から 1.6×10^3 CFU/cm² と 1log 程度の減少にとどまった。消毒剤の添加停止後 2 日目には、系統 2、3 いずれも一般細菌数、従属栄養細菌数ともに定常期の細菌数まで回復した。

(2) 流入水・流出水中の細菌数

流入水中の一般細菌数は $0 \sim 1.3 \times 10^1$ CFU/mL、従属栄養細菌数は $0 \sim 1.2 \times 10^1$ CFU/mL で推移した。試験片表面同様、流出水中の一般細菌数および従属栄養細菌数は通水開始後 20 日前後で定常状態に達しており、定常期の細菌数はそれぞれ $1.3 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$ CFU/mL、 $3.0 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$ CFU/mL であった。

EGTA 添加 1 週間後の系統 1 の細菌数は、一般細菌数が 2.7×10^2 CFU/mL から 5.1×10^1 CFU/mL (最大 2.0×10^0 CFU/mL まで減少) と 1log 弱程度減少、従属栄養細菌数が 1.2×10^5 CFU/mL から 5.2×10^3 CFU/mL (最大 4.5×10^3 CFU/mL まで減少) と 2log 弱程度減少した。また、EGTA の添加を停止すると、一般細菌数は添加中と同程度の $6.7 \times 10^1 \sim 9.6 \times 10^1$ CFU/mL で推移し、従属栄養細菌数は 1 週間後に定常期と同程度の 1.0×10^5 CFU/mL まで回復しており、試験片表面の細菌数と同様の結果であった。

二酸化塩素添加 1 週間後の系統 2 の細菌数は、一般細菌数が 7.2×10^2 CFU/mL からほぼ 0 CFU/mL に、従属栄養細菌数が 1.3×10^5 CFU/mL から 1.7×10^1 CFU/mL と 4log 程度減少した。一方、次亜添加 1 週間後の系統 3 の細菌数は、一般細菌数が 1.3×10^2 CFU/cm² から 2.0×10^0 CFU/mL (最大 0 CFU/mL まで減少) と 2log 程度減少、従属栄養細菌数が 3.0×10^4 CFU/mL から 2.5×10^2 CFU/mL と 2log 程度の減少であった。また、消毒剤の添加停止後 2 日目には、系統 2、3 いずれも一般細菌数、従属栄養細菌数ともに定常期の細菌数近くまで回復し、試験片表面の細菌数と同様の結果であった。

(3) 試験片表面の細菌種

系統 1 については、API20E と API20NE の同定結果は異なっているが、いずれも *Pseudomonas* 属の細菌であった。また、EGTA 添加の有無によらず、細菌種は変化しなかった。系統 2 については、二酸化塩素添加前は *Stenotrophomonas maltophilia* が同定され、添加中に同定されたのは *Brevundimonas vesicularis* であった。また、添加を停止すると再び *Stenotrophomonas maltophilia* が同定されたこと。系統 3 については、次亜添加の有無にかかわらず、同定された細菌種は *Stenotrophomonas maltophilia* であった。

6. モデルシミュレーションによる配水過程における微生物再増殖性および汚染事故発生時の健康リスク評価

(1) 微生物濃度の経日変化

今回対象とした管網では、約 15 日程度で微生物濃度は定常に達した(計算初期値として、管網内の微生物量をゼロとした)。シミュレーションでは浄水の残留塩素濃度をゼロから

2mg/L の範囲で変化させて計算を行ったが、残留塩素濃度が極めて低レベルの場合 (0.005mg/L 以下) にのみ、微生物の増殖が見られた。

(2) 定常状態に達した後の水道水中微生物濃度

管網内分布の特徴を検討したところ、管網内の比較的上流部で微生物濃度が最大となっているという計算結果であった。また、配水池から最初のパイプにおける微生物濃度の増加が著しくなっていた。下流部での微生物濃度変化幅は相対的に小さい結果であった。

(3) 水道水中微生物濃度に与える原水中有機物濃度および塩素注入率の影響

有機物濃度が高いほど、水中微生物濃度が高く、かつ濃度のピークが流下過程の早い段階で生じていることがわかった。また、管網内で微生物の増殖がみられるような残留塩素濃度が低レベルの場合には、残留塩素濃度の大小が微生物濃度に大きな影響を与えていない結果となった。

(4) 原水中微生物濃度の影響

原水中微生物濃度を約 1 桁変化させた場合、原水中微生物濃度は管網内の微生物濃度にほとんど影響を与えていないという計算結果となった。

D. 考察

1. 諸外国の水道における浄水処理、残塩保持及び配水水質管理の現状に関する調査

特にドイツとオランダにおいては、配水系統での残留消毒剤の保持によらず、浄水と比較して配水系統で *E. Coli* 検出率が増加しており、また平均濃度や検出率は同程度であった。この結果をもって、当該文献の著者らは、配水過程における残留塩素の保持のみでは水道水の安全性を確保する上では不十分であるとして、水道の配水系統における維持管理の徹底、すなわち、漏水率の低減やクロスコネクションの防止、管路補修時の汚染防止といった技術的対策を講じることで、残留消毒剤の保持に関わらず、高度な安全性が確保できると結論づけている。また、特に残留消毒剤無しの場合には、*E. Coli* を糞便汚染指標として有効に活用できるため、水道原水に塩素耐性を有する病原微生物が存在する場合に利点となるとの見解を示している。配水過程における残留消毒剤の位置づけについては、再汚染モニタリング指標としてのみ考慮されており、再汚染時のバリアや微生物再増殖抑制としての意義は考慮されていない点に留意する必要がある。

2. 消毒技術に関する検討 (消毒による微生物再増殖の制御方法の検討)

異なる培地を用いた方法において 3 種の培地の結果が同じになったのは、紫外線照射の殺菌機構が DNA 損傷によるものであり、細胞膜に特異な変化を与える又は特定の代謝機構が損なわれるものではないということからも説明される。ただし 2 種の非選択培地に若干の違いが見られており、実験回数を増やして、再現性を含めて今後検証していく必要がある。また、大腸菌の耐性試験結果と比べると、緑膿菌 (*Pseudomonas* 属) は紫外線耐性が高いことが示唆された。

細菌ファージを用いた感染試験方法では、紫外線照射が増えるに従ってファージが感染

出来なくなった大腸菌数の推定値が増えたことがわかる。また、代謝機能を有し活性化した大腸菌の存在数も、紫外線への曝露線量が増加するに従って低下したことがわかった。

消毒後の細菌の運動性の評価については、UV 照射前後におけるコロニー径の比率（比率が小さいほど UV 照射後の運動性が低くなったことを示す）を比較したところ、同じ紫外線照射条件において運動性の減少率には大きな差が生じた。*Pseudomonas* 菌の種類によってその特徴は異なるが、6 種のうち 3 種は、寒天濃度が高いほど比率が小さくなるという傾向を示した。これは個々の運動性の減少よりも、生物膜形成能力の減少の度合いが高いことを示していると考えられる。

以上のいずれの方法も、他の消毒方法に対して適用が可能であると考えられる。

3. 高度処理における微生物再増殖に関わる栄養源の低減条件の検討

(1) 生物活性炭における硝化微生物の定着過程の評価

全細菌、全古細菌ともに前塩素処理の停止の前後で、生物活性炭から抽出した遺伝子コピー数に大きな変動はなく、前塩素処理による定着阻害は見られなかった。このことから、前塩素処理とは関係なく、生物活性炭には急速に微生物が定着しうることが示された。ただし、今回の検出対象は DNA であり、死菌の DNA も解析に入っている可能性がある。従って、活性の議論とは直接関連しないことに注意する必要がある。

一方、硝化微生物については、前塩素処理の影響が顕著に現れた。前塩素処理を停止することにより、従来、硝化を担うと考えられた AOB ではなく、AOA が活性炭に定着したという知見は新規性が高い。前塩素処理停止前後の硝化能の変化を見ても、前塩素処理停止前は十分な硝化が進行していなかったが、前塩素処理を停止した後は、水温の下がった 12 月であるにもかかわらず、完全な硝化が進行することが確認された。この硝化能の発現に、AOA が関与している可能性は高い。別途調査した浄水場 B の生物活性炭（使用 1 年間）における AOA-*amoA* 遺伝子コピー数と比較すると、浄水場 A の生物活性炭で確認された AOA-*amoA* 遺伝子コピー数はほぼ同程度であった。AOB-*amoA* 遺伝子については、前塩素処理を停止しても検出されなかったが、その理由としては実際に定着していなかったということと、使用したプライマーの検出対象範囲の問題が推測される。実際に AOB が存在していても、使用した AOB-*amoA* 遺伝子プライマーにミスマッチがあれば増幅されない可能性はある。今後は、AOB の 16S rDNA を対象とした解析も含め、実際に AOB が AOA と比べて存在量が少ないのかどうか、検討する予定である。

(2) 生物活性炭処理における AOC 除去能と AOC 化学特性の評価

3 箇所の浄水場の浄水工程における AOC の濃度変化を比較したところ、それぞれ異なる傾向を示した。特に、オゾン処理水については、浄水場 A では AOC-P17 画分が増加したのに対して、浄水場 B では AOC の増加は見られなかった。一方、浄水場 C では、オゾン処理によって増加した画分は AOC-NOX であり、既存の報告と一致していた。これらの差異の理由についてはまだ明らかではないが、水質条件の影響や溶存有機物の特性の差異などが考えられる。生物活性炭における AOC の低減については、処理場による差異、使用期間による

差異などが確認された。これらの差異の要因は、生物活性炭に付着する微生物の多様性・機能の差異に由来すると考えられる。今後は、微生物学的視点から AOC の除去に関する微生物群集の解析を進めたい。

溶存有機物の分画実験では、オゾン処理、生物活性炭処理を行っても、親水性、疎水性の割合に大きな変化は見られなかった。オゾン処理によって、親水性画分の割合が増加することを予想したが、組成比が大きく変わるほどの変化はないことが推測される。今後は、それぞれの画分の AOC を測定するなどして、AOC と称される有機物の化学特性に関する知見を得ることを検討したい。

4. 浄水中有機物と配水管路における微生物再増殖モニタリング手法に関する研究

(1) 再増殖微生物モニタリング手法に関する検討

BrdU ラベリング-免疫学的検出の一連のプロトコルを通して、ネガティブコントロールを適切に設定することにより、測定値の安定性向上を図ることができたと考えられる。ただし、既往結果と比較すると得られた回帰式の傾きが若干低くなっている。この原因は未解明であるが、試験に供した *P. fluorescence* P17 株の増殖ステージの違い、すなわち増殖速度の違いに起因している可能性がある。

本法を実際の給水栓水に適用した結果、A 市給水栓水、C 市給水栓水ともに、約 0.1~1000 CFU/mL の範囲で従属栄養細菌数の増加に伴って BrdU 標識 DNA 量も増大する傾向が確認された。ただし、両者の相関は試料ごとにまちまちであり、現在のところ一定の関係性は得られていない。要因としては、a) BrdU 標識効率の低下、b) 細胞固定化率の低下、c) 前処理効率の低下、d) 抗体標識酵素活性の低下の各ステップが挙げられる。また、現在のプロトコルでは抗体を標識している酵素（ペルオキシダーゼ）と基質（ABTS 溶液）との反応は室温で行っているため、室温低下の影響を受けている可能性も考えられる。今後は、安定した酵素活性を得るために温度制御下で呈色反応を行うとともに、反応阻害がどのステップで起こっているかを特定する必要がある。更には、BrdU 標識後の細胞から標識核酸を抽出して試験に供することが望ましいと考えられる。

(2) 浄水中同化可能有機炭素に関する検討

AOC 測定前の殺菌方法として、Standard Methods と同様 70 °C、30 分の加熱処理を行ったが、原水試料あるいは生物活性炭後の試料等の一部で試験菌株以外の微生物増殖が確認されたことから、試料中に多くの微生物が存在する場合にはこの条件では十分な殺菌ができていなかったと考えられる。本研究で試みたフィルターによる除菌は、微生物が多く存在する試料に対して有効な前処理方法となりうる。

採水調査の結果、冬季に給水栓水中の AOC が増大する傾向が確認されたが、浄水場出口の AOC を測定していないため、この季節変動が原水の水質変動によるものか、あるいは低水温により配水過程で消費される AOC 量が減少したためかは特定できていない。しかし、サンプリング時期は異なるものの、B 市 D 浄水場の塩素混和後試料の AOC 濃度は末端給水栓水の値と同程度であったことから、低水温となる冬季には配水過程における AOC 消費はほ

とんど見られず、原水水質の変動が最終処理水の AOC 増大に寄与していると推察される。また、AOC-P17 成分が高濃度で残存し AOC の大部分を占めていたことから、水質改善策を考える際には主にカルボン酸から構成される AOC-NOX 成分よりむしろ AOC - P17 成分を構成する低分子量有機物、例えばアミノ酸、糖類、アルコール、芳香族酸等の除去を中心に考える必要があるだろう。

一方、高度浄水処理過程で AOC 除去に重要な役割を果たすとされている生物活性炭であるが、今回の測定結果では明確な除去効果は得られなかった。活性炭流出水中の従属栄養細菌数も他の浄水場データ（数千～数万 CFU/mL）と比較して極端に低い値を示していたことから、活性炭層内の微生物叢が未成熟であったことが強く示唆される。低水温期であることも重なった結果として、最終処理水の AOC 濃度は原水とほとんど変わらない濃度を示した。また、データは示していないが、プロセスごとの AOC 変化の傾向は 2 回の測定で必ずしも同一ではなかった。これらの結果は、処理水中に残存している高分子物質をも含む生分解性有機物画分(BOM: Biodegradable Organic Matter) から新たに AOC が生成することを示している。AOC は易分解性有機物画分を測定対象としており、低濃度まで測定可能であることから微生物学的安定性の指標として用いられる。そのため、日本のように比較的給配水時間の短い配水システム内における微生物学的安定性の指標としては非常に有用と考えられる一方、浄水処理による微生物学的安定性を論じる際には、AOC のみならず BOM にも着目した評価が望ましいことが示唆された。

5. 配水過程における微生物再増殖に対する消毒剤等の影響

形成済み生物膜に対し EGTA を一時的に添加すると、生物膜剥離効果により試験片表面中の細菌数は 1log 程度減少し、流出水中の細菌数も 1~2log 程度減少した。また、EGTA の添加を停止すると、一般細菌数は添加中と同程度で推移し、従属栄養細菌数は定常期の水準まで回復するのに 1 週間程度要しており、EGTA には添加停止後も微生物再増殖を抑制する効果があると考えられる。同様に、形成済み生物膜に対し二酸化塩素または次亜塩素酸ナトリウムを添加すると、いずれの消毒剤においても細菌数は大きく減少し、また、その消毒効果は二酸化塩素の方が次亜塩素酸ナトリウムよりも高かった。しかし、消毒剤の添加停止に伴い、細菌数は定常期の水準まで急速に回復したことから、生物膜中の細菌群は、消毒剤により完全に死滅せず、培地での増殖性を失う程度に損傷していた可能性がある。

生物膜中の細菌種については、EGTA 添加の有無にかかわらず同一種であったことから、EGTA は細菌種を変化させることなく、生物膜の剥離させる作用があると考えられる。消毒剤の影響については、二酸化塩素を添加すると、添加前とは異なる *Brevundimonas vesicularis* が同定され、添加を停止すると添加前と同一の *Stenotrophomonas maltophilia* が同定されたことから、二酸化塩素添加の有無により細菌種が変化する可能性がある。一方、次亜塩素酸ナトリウムについては、添加の有無にかかわらず、同定された細菌種は *Stenotrophomonas maltophilia* であった。いずれの消毒剤においても、消毒剤添加前と添

加停止後に *Stenotrophomonas maltophilia* が同定されていることから、*Stenotrophomonas maltophilia* は消毒剤により完全には死滅せず、培地での増殖性を失う程度の損傷しか受けていなかった可能性が示唆される。

6. モデルシミュレーションによる配水過程における微生物再増殖性および汚染事故発生時の健康リスク評価

今回のシミュレーション結果によって、残留塩素濃度が管網内の微生物増殖を決定していることが示された。すなわち、管網内における残留塩素濃度変化の計算精度がシミュレーションの可否を決定することになると考えられる。このことから、シミュレーション結果に大きな影響を与える、①残留塩素の減少速度係数の影響の検討、および、②残留塩素濃度減少に有機物の影響の考慮が必要である。また、残留塩素濃度変化計算の妥当性の検証も求められる。以上の計算上の課題を解決することにより、有機物、配水区規模に応じた適正な塩素注入率の決定が行えると考えられる。

E. 結論

本年度の研究による成果の概要は以下のとおりである。水道水質の安全性および快適性のさらなる向上のためには、水道水の配水過程における化学的および微生物学的水質変化を最小限に抑えるための水質管理や管路の維持管理のあり方について明確にする事が必要であり、来年度以降、それらを確保する上で必要となる浄水水質や浄水処理システムの要件について引き続き調査研究および知見のとりまとめを進める計画である。

- (1) EU 諸国のうちドイツとオランダにおいては、配水系統での残留消毒剤の保持によらず、浄水と比較して配水系統で大腸菌 (*E. Coli*) の検出率が増加する事例が見られた。水道の配水系統における維持管理の徹底（漏水率低減、クロスコネクション防止、管路補修時の汚染防止等）が重要であることが示された。
- (2) 病原微生物以外の一般細菌や従属栄養細菌に対する各種消毒法の効果に関しては、定量的な考察を行っている先行研究が余り多く見つからず。今後も論文検索が必要である。これまでのレビュー結果からは、*Pseudomonas* 属菌などを対象とした場合、往々にして消毒耐性は大腸菌に比べると高い傾向がみられた。
- (3) 異なる培地を用いた消毒作用機構の推定方法は、既往の大腸菌における結果と同様、*Pseudomonas* 属菌に対しても有効に用いることができた。
- (4) ファージの感染性を用いた細菌の代謝機能評価について、紫外線消毒を適用したところ、ファージの吸着速度および増殖速度の2面より評価が可能であることがわかった。
- (5) 異なる寒天濃度を用いた細菌の運動性および移動性試験によって、*Pseudomonas* 属菌の個々の運動性、生物膜形成能などが測定できることが確認された。紫外線消毒を適用した場合、生物膜形成能に影響が大きい種が多く見られた。
- (6) 硝化微生物の活性炭への定着には前塩素処理が影響を与えていることが示され、前塩素処理を停止することにより、硝化古細菌の *amoA* 遺伝子が $10^6 \sim 10^7$ gene copies/dry-g 程

度検出されるまで定着が進行した。前塩素処理停止前後の硝化能を比較すると、停止後の方が硝化能は向上しており、硝化古細菌の定着との関連が推測された。

- (7) 浄水場によって、浄水工程における AOC 濃度の変化の傾向は異なり、原水に含まれる有機物の差異、処理条件などが AOC 濃度に影響を与えていることが推測された。同じ浄水場における使用期間の異なる生物活性炭を比較したところ、使用期間 5 年の生物活性炭の方が、使用期間 1 年の生物活性炭よりも除去性能は高いことが明らかになった。
- (8) BrdU ラベル化法による従属栄養細菌の迅速検出法について、0.1~1000 CFU/mL の範囲では標識 DNA 量に基づいて試料中の従属栄養細菌数を予測することが可能となった。また、適切なネガティブコントロールを設定することにより、測定回毎に変動するブランク値を安定させることができた。
- (9) BrdU ラベル化法を水道水試料に適用した結果、同じ濃度範囲で標識 DNA 量と従属栄養細菌数との間に相関が確認されたが、試料ごとにその関係性は大きく変動し、いずれかの反応ステップにおいて阻害されたと考えられるため、検出方法についてはさらに検討を重ねる必要がある。
- (10) 各浄水処理プロセス水ならびに給水栓水中の AOC 濃度を調べた結果、特に冬季の試料中には高濃度の AOC が残存していること、成分別にみると AOC-P17 成分の占める割合が非常に高いこと、また高度浄水処理の AOC 低減効果は限定的であることが示された。この理由として、当該浄水処理場の生物活性炭層内の微生物叢が未成熟であったことが考えられる。
- (11) 微生物が多く存在する試料の AOC 測定前処理方法としては、無機化合物フィルターを用いたろ過除菌が適切であった。
- (12) 生物膜モニタリング装置を用いた室内実験により、生物膜の抑制効果は次亜塩素酸ナトリウムよりも二酸化塩素が高く、キレート剤 EGTA も効果を有することが確認された。いずれの場合も添加停止に伴って速やかに生物膜中の細菌数は回復した。
- (13) 配水管網内および高架水槽内の微生物濃度をシミュレーションするモデルを用いて、原水中有機物濃度、微生物濃度、ならびに、浄水中残留塩素濃度が管網内の微生物濃度に与える影響について検討した結果、残留塩素濃度が管網内の微生物増殖を決定していることが示された。

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

- 1) 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と細菌種に及ぼす

管材質及び残留塩素の影響, 第 59 回全国水道研究発表会講演集, 490-491.

- 2) Sadahiko Itoh, Yuki Yoshimura, Tomoyuki Okada (2008) Components of estrogenic effect in chlorinated drinking water, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on Environmental Engineering (CD-ROM).
- 3) Yumiko Ohkouchi, Ly Bich Thuy, Sadahiko Itoh (2008) Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, Proceedings of The 17th Joint KKNN Symposium on Environmental Engineering (CD-ROM).
- 4) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2008) 従属栄養細菌の迅速定量を目的としたプロモデオキシウリジンラベル化 DNA の定量方法に関する基礎的検討, 環境衛生工学研究, Vol. 22, No. 3, pp.124-27.
- 5) Kasuga, I., Saito, H., Kurisu, F. and Furumai, H. (2008) Characterization of actively respiring bacterial community responding to organic matter in biological drinking water treatment, The 12th International Symposium on Microbial Ecology, PO02-0151.
- 6) 中垣宏隆, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2009) 高度浄水処理用生物活性炭へのアンモニア酸化細菌及び古細菌の定着過程, 第 43 回日本水環境学会年会講演要旨集 (発表予定).
- 7) 大瀧雅寛, 溝添倫子, 林紗綾佳 (2009) 紫外線および二酸化塩素処理における大腸菌の細胞損傷レベルの測定, 第 60 回全国水道研究発表会講演集 (発表予定).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

健康安全・危機管理対策総合研究事業

水道の配水過程における
水質変化の制御および管理に関する研究

平成20年度 分担研究報告書

平成21年3月