

201134026A

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

水道の浄水処理および配水過程における微生物  
リスク評価を用いた水質管理手法に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24年3月

研究代表者 島崎 大 (国立保健医療科学院)

## 目 次

研究班の構成	1
I. 総括研究報告書	
水道の浄水処理および配水過程における微生物リスク評価を用いた 水質管理手法に関する研究	5
	島崎 大
II. 分担研究報告書	
1. 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査	21
	島崎 大
2. 浄水処理過程および配水過程における微生物リスク管理・ 低減手法に関する研究	27
	伊藤 禎彦、越後 信哉、大河内 由美子 古賀 伊織、周 りゃん、文 亮太
3. 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および 病原微生物感染リスク評価	43
	島崎 大、藤村 壮
4. 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)	61
	大瀧 雅寛
5. 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析	71
	春日 郁朗、大坂 幸弘
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷	87

## 研 究 班 の 構 成

### 研究代表者

国立保健医療科学院生活環境研究部 上席主任研究官 島 崎 大

### 研究分担者

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	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

### 研究協力者

京都大学大学院工学研究科	越 後 信 哉
	大河内 由美子
	古 賀 伊 織
	周 りゃん
	文 亮 太
国立保健医療科学院生活環境研究部	藤 村 壮
東京大学大学院工学系研究科	大 坂 幸 弘

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

水道の浄水処理および配水過程における微生物  
リスク評価を用いた水質管理手法に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

平成24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）

「水道の浄水処理および配水過程における微生物

リスク評価を用いた水質管理手法に関する研究」

平成 23 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生活環境研究部 上席主任研究官  
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 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

### 研究要旨

わが国の水道では、塩素消毒と残留塩素の保持、および、水道水中に病原生物や指標生物等をいっさい含むものでないことが義務づけられており、これにより水道水の安全性は確実に担保され、現在に至るまで水系感染症の予防に大きな役割を果たしてきた。しかしながら微生物リスク評価の面からすると、指標生物での評価が適当でない塩素耐性をもつ病原微生物（クリプトスポリジウムなど）が存在することなどにより、これらの遵守をもってしても、微生物リスクが「ゼロ」であると判断することはできない。本研究は、水道水質の安全性および快適性のさらなる向上のため、水道の浄水処理および配水過程における病原微生物等による微生物リスクの所在を定量的に明らかとすること、また、当該の微生物リスクを低減する上での適切な制御方法および水質管理手法を提案することを目的とする。本年度の主な成果は以下の通りである。

世界で唯一、定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)が水道の実務に導入されているオランダを対象として、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状や課題について文献調査を中心にまとめ、その意義について日本との比較において考察した。残留塩素濃度を低減した水道システムに起因する *Campylobacter jejuni* の年間感染リスク評価に資するため、水道原水中の大腸菌に対する *C. jejuni* の存在比率調査を進めるとともに、凝集沈殿処理・低濃度塩素消毒・オゾン処理の各プロセスによる大腸菌除去・不活化能の測定を実施した。また、浄水処理プラント実験および文献値における大腸菌の除去・不活化能のデータにより、異なる浄水処理方式や処理性能における病原性大腸菌 O157 によるヒトへの健康影響を DALY 値に基づいて推定した。オゾン-GAC 処理後にナノろ過処理を導入した処理水を用いて連続通水試験を実施し、微生物学的安定性を維持するために必要な残留塩素濃度を示した。配水過程での微生物学的水質管理を想定し、生物膜を形成した細菌に対する塩素消毒の不活化機構の検討を行うための実験手法の検討を行った。具体的には大腸菌を対象として、消毒処理後に Propidium monoazide(PMA)を添加して細菌の損傷部位を特定する分子生物学的手法、遠心分離を利用した生物膜剥離の定量方

法、および、T-RFLP 解析を利用した不活化定量分析法を確立し、次年度以降において様々な消毒条件での実験・分析を行うための基礎的知見を得ることができた。水道給配水系における細菌再増殖現象を評価する手法の検討と、給水栓の滞留・放流前後に伴う細菌再増殖現象の解析を行った。水道水中の低濃度細菌群集からの DNA 抽出方法を比較検討した結果、ポリカーボネートフィルターによる菌体捕捉と、ビーズ法を用いた市販キットによる DNA 抽出の組み合わせの回収率が高いことが明らかになった。また、HPC 単離株の分類手法として、二重標識 T-RFLP の適用可能性を検討し、実際に水道水から単離した株の分類に有用であることを確認した。実際の室内給水栓を対象として、滞留・放流に伴う細菌再増殖現象を観察した結果、滞留に伴って遊離残留塩素の低下、水温の上昇が進み、全菌数及び HPC が上昇することを明らかにした。しかし、2L 放水後には滞留前のレベルに速やかに戻ることから、細菌再増殖は局所的な場所で発生していることが推測された。また、滞留時間と全菌数の増加との関係から、再増殖する細菌群の平均倍加時間は、2.8h であることを示した。滞留・放流に伴う細菌群集構造の解析を行い、再増殖した細菌に由来すると推察されるフラグメントの抽出を行った。

#### 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、水道の浄水処理および配水過程における病原微生物等による微生物リスクの所在を定量的に明らかとすること、また、当該の微生物リスクを低減する上での適切な制御方法および水質管理手法を提案することを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1. 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダ国では世界で唯一、定量的微生物リスク評価に基づく水質基準が導入されており、また、当基準値を達成するため、各浄水場の処理プロセス単位で指標微生物の不活化能力の評価を実施している。同国の水道における浄水処理および配水水質管理に関する近年の状況、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状について文献調査を中心にまとめた。

##### 2. 浄水処理過程および配水過程における微生物リスク管理・低減手法に関する研究

###### (1) 高度浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物感染リスク評価

水道原水中の大腸菌濃度および *C. jejuni* の存在比、凝集・沈殿処理および塩素消毒の各プロセスによる大腸菌除去・不活化能を実測した。また、オゾン処理については、半回分試験およびプラント実験により得た不活化速度定数と実施設の流入水質や流動特性とを用いて、ADR 不活化モデルにより実施設の大腸菌不活化能を推定した。文献より得た急速砂ろ過プロセスによる除去能、非加熱飲料水摂取量、用量-反応関係と併せて、*C. jejuni* の年間感染確率を計算した。

## (2) 残留塩素濃度を最小化した浄水の微生物学的安定性に関する研究

有機物濃度や組成が異なる 3 種類の水試料を用いて、ビーカー試験により陰イオン交換処理による有機物除去特性を把握した。また、ガラスカラムを用いて連続陰イオン交換処理を行い、NF 処理水からの有機物除去を評価した。さらに、アニュラーリアクター(AR)を用いて NF 処理水および NF 処理+連続式イオン交換処理水の連続通水試験を行うことで、生物膜形成抑止に必要な遊離残留塩素濃度を調べた。

## 3. 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および病原微生物感染リスク評価

### (1) 浄水処理実験プラントを用いた大腸菌除去能力評価

国立保健医療科学院の浄水処理プラントを用いて凝集沈殿、砂ろ過の各浄水処理工程による微生物除去実験を行った。集中豪雨時の河川での急激な濁度変化を想定し、通常の低濁度(5度)から急激にピーク時の高濁度状況(300度)に変化させ、濁度を徐々に漸減させた。また、原水中の微生物は *E. coli* K12 を用い、濁度に比例して注入量を変化させた。PAC 注入量について 1 系は注入量を一定、2 系では注入量を濁度変化に追随するよう漸減させた。

### (2) 病原性大腸菌を想定した微生物リスク評価

我が国でも食品由来の感染事例のある腸管出血性大腸菌 0157(*E. coli* 0157:H7)を想定したリスク評価を行った。国内の調査事例に基づき、原水 1ml 中に *E. coli* 0157:H7 が  $1.0 \times 10^2$  cell 存在し、浄水処理による除去性は K12 株と同様であると仮定した。人への曝露量として、我が国で過去に行われたアンケート結果より非加熱飲水量を 0.321L/人・日とした。大腸菌 0157 の感染確率として、オランダ国立公衆衛生環境研究所(RIVM)によって示されている成人を対象にした指数モデルの用量反応関係から  $5.09 \times 10^{-3}$  を引用した。リスク評価の指標には障害調整生存年数 DALYs を用い、RIVM の算定による 1 感染当りの DALYs 値  $5.47 \times 10^{-2}$  を引用した。浄水処理に関する場合分けとして未処理の場合(Case1)と各浄水処理過程での除去率を変化させた場合(Case2~Case5)で段階的なリスク評価を行った。

## 4. 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)

### (1) T-RFLP 法による定量方法

濃度既知の生物マーカーを対象試料に投入することにより、T-RFLP の測定プロセスを経ても、対象微生物と生物マーカーの濃度の相関性が保たれると仮定した。具体的には、対象微生物である *P. aeruginosa* の初期試料溶液を希釈液(滅菌済みリン酸緩衝液)にて希釈し、 $5.9 \times 10^6$  CFU/mL、 $5.9 \times 10^5$  CFU/mL、 $5.9 \times 10^4$  CFU/mL の溶液を作成し、この試料へ 2 種類の設定濃度としたマーカー生物(*E. coli* 溶液)を投入することとした。設定濃度は、投入後に  $1.3 \times 10^5$  CFU/mL、 $1.3 \times 10^4$  CFU/mL となるように調整した。各々の試料に対して、DNA 抽出、PCR 増幅、制限酵素処理、電気泳動処理を行ったうえ、フラグメント解析に供した。

### (2) 消毒処理における損傷部位の推定方法

塩素および紫外線処理における対象細菌の受ける損傷部位の推定について、従来提案し

ていた複数の培地培養法に加え、生物膜損傷を検出する方法を開発し、その結果と比較することによって、より詳細な損傷部位の推定を行うことを検討した。具体的にはモデル細菌として大腸菌を用い、塩素処理後の濃度測定を選択培地および非選択培地で行い、その差から致命的損傷か非致命的損傷（損傷個所が致命的部分ではない損傷）の細菌濃度の推定を行った。さらに既存方法である propidium monoazide (PMA) 投入と PCR 増幅により細胞膜損傷菌の核酸を不活化させて PCR 非検出とさせる方法を改良し、検出感度の高い方法を提案し、塩素処理後の大腸菌にこの方法を適用して、複数培地培養法の結果と比較した。

## 5. 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析

### (1) 水道水中の低濃度細菌群集からの DNA 抽出方法の検討

*Pseudomonas fluorescens* P17 株 (ATCC49642) を用いて、3 種類の異なる濃縮、抽出方法による DNA 回収率の比較を行った。各濃縮・抽出処理によって得られた DNA 抽出液を用い、定量 PCR によって 16S rRNA 遺伝子コピー数を TaqMan PCR 法により定量した。なお、定量した 16S rRNA 遺伝子コピー数については、P17 株の 16S rRNA 遺伝子コピー数 (5) を用いて菌数に換算した。

### (2) HPC 単離株の OTU 分類手法の検討

水道水から単離した HPC 単離株 (黄色 : Y-1, Y-5, 白 : W-8, W-12, 赤 : R-13, R14 の計 6 株) の 16S rRNA 遺伝子の分析方法として、二重標識による Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) の適用を試みた。プライマーには、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした 27F と 907r を用い、それぞれのプライマーの 5' 末端を FAM、HEX で別々に標識した。PCR 増幅後、制限酵素 *HhaI* による消化を行い、キャピラリーシーケンサー ABI3100-Avant (Applied Biosystems) によるフラグメント分析を行った。

### (3) 給水栓における細菌再増殖現象と滞留時間との関係

2011 年 12 月 12 日から 16 日にわたって、大学実験室内の給水栓を対象として採水を行った。初めに、5L/min で 5 分間の放水を行った後、10L を採水した。次いで、給水栓を 24 時間使用停止とし、給水栓付近の水道水を滞留させた。その後、水道水を 5L/min で放水し、2L ずつ連続的に分取しながら計 20L を採水した。以後、使用停止時間を 24, 16, 8, 4 時間と変化させ、同様の採水を繰り返した。採水した試料については、水温及び遊離塩素濃度を測定すると共に、全菌数及び従属栄養細菌数 (Heterotrophic Plate Counts: HPC) を求めた。

### (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. 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダは、EU 諸国のなかでもとりわけ塩素消毒および残塩保持に依存しない水道シス

テムの構築に向けた取組みを進展させており、現在では浄水処理での塩素消毒がすべてオゾンやUVなどに置き換わり、また、国内すべての水道が残留消毒剤なしで配水されている。残留塩素を保持していないことから、特に給配水過程での汚染防止や、微生物再増殖の制御に着目した管路の衛生管理、配水の水質管理を実践している点も大きな特色である。水質管理については、オランダはEU飲料水指令より厳しい水質基準を定めており、例えば大腸菌の試験には100mlではなく300mlの試料水を用いる他、運転管理上の指標としてアエロモナス属菌 (<1,000CFU/100ml) や従属栄養細菌 (Colony count at 22°C: <100CFU/ml) の基準値を設定している。特に注目すべきは、2001年に改正された水道法において、定量的微生物学的リスク評価(QMRA: Quantitative Microbiological Risk Assessment)を導入した点である。ここでは、腸管系ウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジア等による水道水由来の病原微生物による感染リスクを年間 $10^{-4}$ 未満(給水人口1万人につき年間感染者1名未満)とすることを水質基準に定めており、表流水を使用する浄水場および病原微生物による汚染のおそれのある地下水を使用する浄水場を対象に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえて定量的な評価を行うことを求めている。

## 2. 浄水処理過程および配水過程における微生物リスク管理・低減手法に関する研究

### (1) 高度浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物感染リスク評価

得られたデータを用いて、原水のE. coli濃度、凝集・沈殿、急速砂ろ過、オゾン処理、塩素消毒の各プロセスにおける除去・不活化能、非加熱飲料水消費量、およびC/E比の各要素に対して確率密度関数を設定した。モンテカルロシミュレーションにより4段階の処理プロセスにおける総合除去・不活化能を計算した結果、中央値は12.7 log、平均値12.0 logであった。対象プロセスで処理された水道水を介した*C. jejuni*の年間感染確率は平均値 $2.00 \times 10^{-9}$  人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>、中央値 $1.72 \times 10^{-11}$  人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>と推定された。

### (2) 残留塩素濃度を最小化した浄水の微生物学的安定性に関する研究

陰イオン交換処理による有機物除去特性を調べた結果、連続式で陰イオン交換処理を行うことで、NF処理水のようにAOC濃度が比較的低い試料であってもAOC除去効果が得られることが判明した。また、NF処理水を用いて連続通水試験を行うことで、NF処理導入により生物膜形成を抑制するために必要な残留塩素濃度を0.1 mg/L未満にまで大幅低減できることを示した。

## 3. 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および病原微生物感染リスク評価

### (1) 浄水処理実験プラントを用いた大腸菌除去能力評価

大腸菌除去率は1系では96.90~99.28%、2系では93.30~99.92%となり、共に原水濁度が高いほど大腸菌除去率が高くなる傾向が見られた。本実験結果より、凝集沈殿処理による除去率を93.30~99.92%、砂ろ過による除去率を99.99%と評価した。

### (2) 病原性大腸菌を想定した微生物リスク評価

オランダにおける水道水質基準では、1年間の各種病原微生物による感染率が $10^{-4}$ 以下

と評価されることが明記されており、これに適合するケースは塩素消毒を行う Case4, Case5 のみとなった。また WHO の飲料水水質ガイドラインでは、1 人 1 年当りの病原微生物における感染リスクが  $10^{-6}$  DALYs 以下という目安値があり、これを満たす条件も塩素消毒を行う Case4, Case5 の場合のみであった。浄水処理における除去率の合計として、オランダの基準値には約 9log 除去、WHO のガイドラインには約 10log 除去が必要となることが示された。

#### 4. 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）

##### (1) T-RFLP 法による定量方法

モデル微生物として *P. aeruginosa* 株を用い、濃度既知のマーカー生物として *E. coli* を投入することにより、濃度範囲は限定的 ( $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL) であるものの、濃度の定量法を提案することができた。

##### (2) 消毒処理における損傷部位の推定方法

塩素処理においては、従来方法で膜損傷のみにより非致命的損傷となったと推定された細菌に対し、当推定方法によって、より高感度にその存在を確認することができた。また紫外線処理においては、改良方法によって示された結果は従来より言われている紫外線の不活化機構と矛盾しないものであった。

#### 5. 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析

##### (1) 水道水中の低濃度細菌群集からの DNA 抽出方法の検討

回収率が最も高いのは、Isopore メンブレンで濃縮し、FastDNA for soil で抽出するケースで、回収率は 6.7% であった。濃縮工程を遠心分離として、同じ FastDNA for soil で抽出したケースでは、回収率は 4.8% であり、②の結果と大差は見られなかった。一方、これまでに海洋などで適用事例のある Sterivex を用いて濃縮し、Sterivex 専用の抽出キットである PowerWater® Sterivex™ DNA Isolation Kit を用いた場合の回収率は 0.2% であった。

##### (2) HPC 単離株の OTU 分類手法の検討

大学実験室の水道水 200mL (5L/min で 5 分間放水後に採水) から単離した HPC (黄色の株: Y-1, Y-5、白色の株: W-8, W-12、赤色の株: R-13, R-14) を対象とした T-RFLP の結果により、黄色 (Y-1, Y-5)、赤色 (R-13, R-14) の株では、それぞれ 5' 末端と 3' 末端の断片長が株間で共通しており、同じ OTU の株であることがわかった。一方、白色の株 (W-8, W-12) については、HEX 標識した 3' 末端の断片長は同じであるものの、FAM 標識した 5' 末端の断片長は株間で異なった。このことから、見た目は同じであっても、OTU が異なる HPC が存在することが示された。

##### (3) 給水栓における細菌再増殖現象と滞留時間との関係

水温は、給水栓を 8-24 時間滞留させた前後で、15.2-18.0°C から 18.8-19.2°C まで上昇したが、4 時間の滞留による水温上昇は明確ではなかった。遊離塩素濃度は、滞留前には 0.27-0.36mg/L と十分な濃度が維持されていたが、24 時間の滞留により 0-0.07mg/L まで減少した。滞留時間が短くなるにつれ、減少幅は小さくなった。放水により水温の低下、遊

離塩素濃度の上昇が観察された。全菌数は、実験開始時には  $2.0 \times 10^2$  cells/mL であったが、24 時間滞留後には  $3.9 \times 10^3$  cells/mL に増加し、滞留中に細菌再増殖が生じたことが明らかになった。放水を行うと、全菌数はただちに減少し、2L 放水後には滞留前のレベルに戻った。再度、給水栓を 24 時間滞留させた後の全菌数は、1 回目の滞留と同程度 ( $3.6 \times 10^3$  cells/mL) まで増加し、給水栓における細菌再増殖現象には再現性が認められた。滞留時間を 16 時間にした場合も同程度の変化が確認されたが、8 時間の場合は  $0.7 \log$  の増加にとどまり、4 時間の滞留では増加は認められなかった。HPC も全菌数と同様の変化を示した。

#### D. 考察

##### 1. 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダでは全ての水道システムが塩素消毒および残留消毒剤に依存しておらず、また、水道水由来の病原微生物による感染リスクを年間  $10^{-4}$  未満とすることを水質基準に定めており、病原微生物による汚染のおそれのある原水を使用する浄水場を中心に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえた定量的なリスク評価を実施している。当該のリスク評価手法は、わが国の水道の浄水処理および配水過程において、病原微生物等による微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上で参考になると考えられる。

##### 2. 浄水処理過程および配水過程における微生物リスク管理・低減手法に関する研究

###### (1) 高度浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物感染リスク評価

推定した *C. jejuni* 年間感染確率の平均値は  $2 \times 10^{-9}$  人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup>、かつ中央値、97.5 パーセントイル値ともに U.S. EPA が提唱する許容感染リスク  $10^{-4}$  人<sup>-1</sup>年<sup>-1</sup> に対して十分に小さい値が得られたことから、本研究で対象とした処理プロセスにより十分安全な水道水が得られると評価できる。

###### (2) 残留塩素濃度を最小化した浄水の微生物学的安定性に関する研究

連続式陰イオン交換処理により、NF 処理水の AOC 濃度変動に大きく寄与する AOC<sub>P17</sub> 成分に対する除去効果が確認されたことから、本処理は流入 AOC 濃度上昇に伴う NF 処理水の AOC 変動の抑制手段となりうる。また、残留塩素濃度を 0.05 mg/L 程度に最小化する場合には、NF 処理と陰イオン交換処理の併用が微生物学的安定性の向上に対して有効手段となるだろう。

##### 3. 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および病原微生物感染リスク評価

原水が高濁度であるほど大腸菌除去率が高くなる傾向が確認され、これより凝集沈殿処理による大腸菌除去は濁質成分と共沈する機構が主であると推定される。また、濁度除去率と大腸菌除去率の間には高い相関関係があり、効果的な大腸菌除去のためには所定以上の濁質成分および凝集剤注入量を要することが示唆された。

病原性大腸菌を想定した微生物リスク評価では、オランダの基準や WHO のガイドラインを満たすために浄水処理で 9~10log 程度の除去性能が必要であることが示された。また、

浄水処理による除去率によってはクリプトスポリジウムと同等かそれ以上の健康影響度があるものと推定された。リスク評価の設定条件においては病原微生物の原水中濃度など不確実な要素があるため、引き続きの検証が必要である。

#### 4. 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）

##### (1) T-RFLP 法による定量方法

限られた濃度範囲 ( $10^4 \sim 10^5$  CFU/mL) ではあったが、T-RFLP プロファイルの *P. aeruginosa* ピーク値と *E. coli* のピーク値の比と、マーカー生物 (*E. coli*) 濃度によって、対象微生物の濃度が求められることが分かった。本方法をさらに検討して、濃度適用範囲を広げることができれば、複数種の微生物群の消毒処理耐性やその後の増殖能力を一度に解析することが可能であることが示唆された。

##### (2) 消毒処理における損傷部位の推定方法

当推定方法は、従来から提案されている PMA-PCR 法に比べて、濃度変化を高感度に検出することができることが示された。また紫外線処理においては、一般的に言われている核酸損傷による不活化機構と矛盾しない結果を、PMA-TSA、TSA、DESO 法によって示すことができた。すなわち、致命的な損傷を受けているが膜損傷を受けたという菌は検出できなかった。今後は大腸菌ではなく、従属栄養細菌である *P. aeruginosa* 菌を対象に PMA 投入法を適用していく予定である。

#### 5. 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析

##### (1) 水道水中の低濃度細菌群集からの DNA 抽出方法の検討

ポリカーボネートフィルターによる菌体捕捉と、ビーズ法を用いた市販キットによる DNA 抽出の組み合わせの回収率が高いことが明らかになった。一方、海洋などで使用実績のある方法での回収率は非常に低かった。濃縮、DNA 抽出の方法により結果が大きく異なる可能性が示された。

##### (2) HPC 単離株の OTU 分類手法の検討

今回適用した二重標識 T-RFLP では、従来の 5' 末端側の情報のみならず 3' 末端側の情報も加味できるため、より高い精度で HPC の分類が可能になると期待できる。実際、見た目には同じ白色のコロニーである W-8、W-12 について、3' 末端の断片長は同じであったが、5' 末端側の断片長に差異が見られ、識別することができた。一方、黄色 (Y-1、Y-5)、赤色 (R-13、R-14) のコロニーについては、両末端の断片長が一致し、同じ OTU であることの信頼性が高まった。

##### (3) 給水栓における細菌再増殖現象と滞留時間との関係

実際の水道給水栓を対象として細菌再増殖の実態を観察した結果、滞留時間が 8-24 時間の場合には全菌数の上昇が、16-24 時間の場合には HPC の上昇が確認された。ただし、HPC の最大値は 570 CFU/ml であるため水質管理上の問題は生じない。細菌の再増殖条件としては、遊離残留塩素濃度の低下が第一に寄与していると考えられるが、滞留に伴う水温上昇

も細菌の増殖活性を高めていることが推察された。対数増殖期に相当する滞留時間 4 時間から 16 時間までの間の傾きを取り、比増殖速度を計算すると 0.22(1/h) という値が得られた。T-RFLP の解析の結果、相対ピーク強度に着目することで、特に 75bp, 332bp のフラグメントが、再増殖した細菌に由来する可能性が推察された。

## E. 結論

わが国の水道では、塩素消毒と残留塩素の保持、および、水道水中に病原生物や指標生物等をいっさい含むものでないことが義務づけられており、これにより水道水の安全性は確実に担保され、現在に至るまで水系感染症の予防に大きな役割を果たしてきた。しかしながらこれらの遵守をもってしても、微生物リスクが「ゼロ」であると判断することはできない。本研究では、水道水質の安全性および快適性のさらなる向上のため、水道の浄水処理および配水過程における病原微生物等による微生物リスクの所在を定量的に明らかにすること、また、当該の微生物リスクを低減する上での適切な制御方法および水質管理手法を提案することを目的として、本年度においては以下の結論を得た。

- (1) 世界で唯一 QMRA が水道の実務に導入されているオランダ国を対象として、浄水処理および配水水質管理に関する近年の状況、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状について文献調査を中心にまとめた。当該のリスク評価手法は、水道における微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上で大いに参考になると考えられる。
- (2) オゾン処理された高度浄水処理水の飲用による *C. jejuni* の年間感染確率を推定した。また、NF 処理や陰イオン交換処理といった物理化学処理技術を対象として、微生物学的に安定な水質確保技術としての適用可能性を示した。
- (3) 原水濁度が高い時ほど大腸菌除去率が高くなる傾向が確認され、これより凝集沈殿処理による大腸菌除去は濁質成分と共沈する機構が主であると推定された。また、濁度除去率と大腸菌除去率の間には高い相関関係があり、効果的な大腸菌除去のためには所定以上の濁質成分および凝集剤注入量を要することが示唆された。
- (4) 病原性大腸菌を想定した微生物リスク評価では、オランダの基準や WHO のガイドラインを満たすために浄水処理で 9~10log 程度の除去性能が必要であることが示された。また、浄水処理での除去率によってはクリプトスポリジウムと同等かそれ以上の健康影響度があるものと推定された。
- (5) T-RFLP プロファイルの *P. aeruginosa* ピーク値と *E. coli* のピーク値の比と、マーカー生物 (*E. coli*) 濃度によって、対象微生物の濃度が求められることが分かった。本方法をさらに検討して、濃度適用範囲を広げることができれば、複数種の微生物群の消毒処理耐性やその後の増殖能力を一度に解析することが可能であることが示唆された。
- (6) PMA 投入および TSA 培地測定を利用して、塩素処理における大腸菌の損傷箇所を推定したところ、膜損傷は受けているが致命的損傷に至っていない大腸菌の存在を確認するこ

とができた。当方法は従来から提案されている PMA-PCR 法に比べて濃度変化を高感度に検出することができることが示された。また紫外線処理においては、PMA-TSA、TSA、DESO 法によって一般的に言われている核酸損傷による不活化機構と矛盾しない結果を示すことができた。

(7) 水道水中の低濃度細菌群集からの DNA 抽出方法を比較検討した結果、アイソポアメンブレンで菌体を捕捉し、FastDNA for soil で DNA を抽出する手法の回収率が高いことが明らかになった。また、二重標識 T-RFLP を適用することで、HPC 単離株の分類をより詳細に行うことができることが示された。

(8) 給水栓の滞留・放流に伴う細菌再増殖現象を観察した結果、滞留に伴って遊離残留塩素の低下、水温の上昇が進み、全菌数及び HPC の上昇が認められた。しかし、2L 放水後には滞留前のレベルに速やかに戻ることから、細菌再増殖は局所的な場所で発生していることが推測された。全菌数の増加と滞留時間との関係から推測した結果、再増殖する細菌群の比増殖速度は 0.22(1/h) と見積もられた。また、滞留・放流に伴う細菌群集構造の解析から、再増殖細菌に由来すると推察されるフラグメントを抽出した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sadahiko Itoh, Bruce A. Gordon, Philip Callan and Jamie Bartram (2011) Regulations and perspectives on disinfection by-products: importance of estimating overall toxicity, *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, Vol.60, No.5, pp. 261-274.
- 2) Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Suguru Ishikawa, Yusuke Aoki, Shinya Echigo, and Sadahiko Itoh (2011) A survey on levels and seasonal changes of assimilable organic carbon (AOC) and its precursors in drinking water, *Environmental Technology*, Vol. 32, No. 14, pp. 1605-1613.
- 3) 伊藤禎彦 (2011) オランダの水道事情, *空気調和・衛生工学*, Vol.85, No.9, pp.9-16.

### 2. 学会発表

- 1) Sadahiko Itoh, Bruce A. Gordon, Philip Callan, Jamie Bartram (2011) 消毒副生成物の規制とその展望-水の安全性の全体評価の重要性-, 第 62 回全国水道研究発表会講演集, pp. 642-643.
- 2) 大河内由美子, 矢田祐次郎, 伊藤禎彦 (2011) ナノろ過処理を適用した浄水の微生物学的安定性に関する研究, 第 62 回全国水道研究発表会講演集, pp. 662-663.
- 3) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦 (2011) 血清学的調査による *Campylobacter jejuni*

の感染-発症割合推定に基づいた障害調整生存年数の定量化, 環境衛生工学研究, Vol. 25, No. 3, pp.128-131.

- 4) Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Yujiro Yata, Suguru Ishikawa, and Sadahiko Itoh (2011) Application of nanofiltration to reduce assimilable organic carbon to the acceptable level for biologically stable drinking water with minimized chlorine residual, The 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology.
- 5) Yasuhiro Asada, Yumiko Ohkouchi, Jinji Song, Liang Zhou, and Sadahiko Itoh (2011) Estimation of Illness-to-infection ratio of *Campylobacter jejuni* based on seroepidemiological survey for improving Disability Adjusted Life Years, The 16th International Symposium on Health-Related Microbiology; WaterMicro 2011.
- 6) 藤村壮, 能岡勉, 小田嶋慎, 倉田知司, 島崎大, 伊藤雅喜, 秋葉道宏(2012) 濁度急変時の凝集沈殿処理における大腸菌除去と濁度除去の相関性に関する考察, 第46回日本水環境学会年会, 580.
- 7) 藤村壮, 能岡勉, 小田嶋慎, 倉田知司, 島崎大, 伊藤雅喜, 秋葉道宏(2012) 濁度急変時の浄水処理における大腸菌除去能力評価および微生物リスク評価, 第63回全国水道研究発表会(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

水道の浄水処理および配水過程における微生物  
リスク評価を用いた水質管理手法に関する研究

平成23年度 分担研究報告書

平成24年3月

分担研究報告書 1

諸外国の水道等における  
微生物リスク評価手法の現状調査

研究代表者 島崎 大

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）  
「水道の浄水処理および配水過程における微生物リスク評価を用いた  
水質管理手法に関する研究」  
平成 23 年度分担研究報告書

## 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

研究代表者 国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野 島崎 大

### 研究要旨

世界で唯一、定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)が水道の実務に導入されているオランダ国を対象として、浄水処理および配水水質管理に関する近年の状況、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状について文献調査を中心にまとめ、その意義についてわが国との比較において考察した。

### A. 研究目的

諸外国の水道や国際機関における微生物リスク評価の導入に関する現状について文献調査を中心に取りまとめ、わが国の水道の実情に鑑みて、浄水処理および配水過程において病原微生物等による微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上での一助とすることを目的とする。

### B. 研究方法

水道における病原微生物等に由来する微生物リスクの評価に関して、オランダ国では世界で唯一、定量的微生物リスク評価に基づく水質基準が導入されており、また、当基準値を達成するため、各浄水場の処理プロセス単位で指標微生物の不活化能力の評価を実施している<sup>1)</sup>。ただし、オランダでは全ての水道が残留塩素なしで配水されており、また、気候や原水の条件などわが国とは大いに事情が異なっている。ここでは、同国の水道における浄水処理および配水水質管理に関する近年の状況、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状について文献調査<sup>1-4)</sup>を中心にまとめた。

### C. 結果

オランダは、EU 諸国のなかでもとりわけ塩素消毒および残塩保持に依存しない水道システムの構築に向けた取組みを進展させており、現在では浄水処理での塩素消毒がすべてオゾンや UV などに置き換わり、また、国内すべての水道が残留消毒剤なしで配水されている<sup>2)</sup>。そのような水道システムを可能としている背景として、第一に、良好な水道水源を確保していることが挙げられる。西部を除く国土の大半の地域で地下水（バンクフィルトレーションを含む）から取水しており、それらは帯水層に長い年月浸透しており、微生物学的に安全な水質であるため、ほとんどの場合は消毒の必要がないとしている。国土の 4.4%に相当する水源の周辺地域には用途制限がかけられており、取水井周辺は水道会社の所有となっている。

一方、首都アムステルダムやハーグ等の都市が位置する西部では、地下水に塩分が含まれるためライン川やムーズ川などの表流水を取水している。マルチバリアの観点から、表流水はいったん前処理した後に砂丘に浸透させる、あるいは、貯水池に滞水して汚濁を軽減させた後に浄水処理に供している。

浄水処理においては、消毒副生成物の存在が明らかになった 1970 年代後半より徐々に塩素処理を取り止めており、代わりにオゾン-粒状活性炭処理や UV 処理を導入している<sup>3)</sup>。その他、凝集沈澱、急速ろ過、緩速ろ過、膜処理（UF および RO）、促進酸化処理（オゾン-過酸化水素またはオゾン-UV）の組み合わせにより、浄水水質の化学的および微生物学的な安全性と安定性を確保している。

残留塩素を保持していないことから、特に給配水過程での汚染防止や、微生物再増殖の制御に着目した管路の衛生管理、配水の水質管理を実践している点も大きな特色である。EU 諸国の中でもオランダの水道の漏水率は際だって低く平均 3%未満であり、配水管工事時などにおける衛生状態の確保について厳格な作業手順を定めている。また、配水過程での微生物再増殖を抑えるため、浄水処理の過程では生物処理および物理化学処理の組合せにより同化性有機炭素（AOC: Assimilable Organic Carbon）を大幅に低減し、さらに生物膜形成能の低い PVC やアスベストセメントを使用した水道管への布設替えを推進している<sup>1)</sup>。

水質管理については、オランダは EU 飲料水指令より厳しい水質基準を定めており、例えば大腸菌の試験には 100ml ではなく 300ml の試料水を用いる他、運転管理上の指標としてアエロモナス属菌 (<1,000CFU/100ml) や従属栄養細菌 (Colony count at 22°C: <100CFU/ml) の基準値を設定している。特に注目すべきは、2001 年に改正された水道法において、定量的微生物学的リスク評価 (QMRA: Quantitative Microbiological Risk Assessment) を導入した点である<sup>1,4)</sup>。ここでは、腸管系ウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジア等による水道水由来の病原微生物による感染リスクを年間  $10^{-4}$  未満（給水人口 1 万人につき年間感染者 1 名未満）とすることを水質基準に定めており、表流水を使用する浄水場および病原微生物による汚染のおそれのある地

下水を使用する浄水場を対象に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえて定量的な評価を行うことを求めている。表流水を使用する浄水場を対象として行われた最近の QMRA の結果によれば、上記の感染リスクを確保するためには原水中のクリプトスポリジウムを最大 6.5log、カンピロバクターを最大 8.6log まで除去することが必要であると、また、各種浄水処理の組み合わせにより、それ以上の除去レベルが確保できるとしている（下図）。

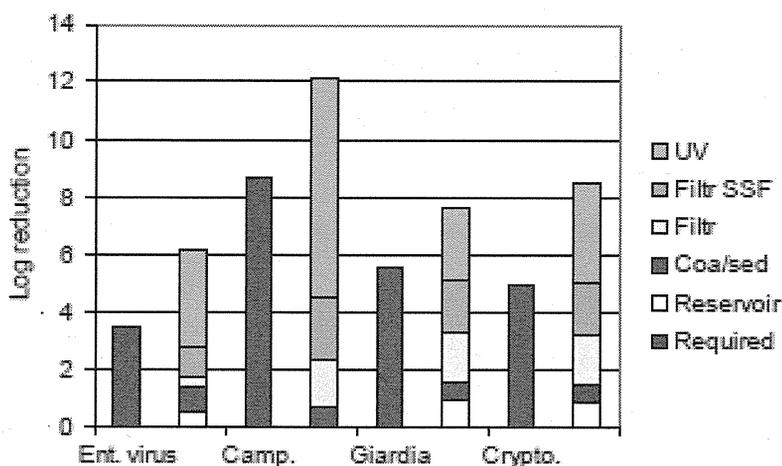


図 オランダ国 A 浄水場における QMRA に基づいた病原微生物の不活化・除去性能に関する要求能力（左）および実証能力（右）<sup>1)</sup>

#### D. 考察

オランダを含め、EU 各国においては消毒副生成物の生成や残留消毒剤による臭気等の問題に対してより大きな関心が寄せられており、日本のように残留塩素の保持が義務づけられている国は少数である。特に、スペインやポルトガルを除いては年間を通じて冷涼である気候に属するため、微生物の再増殖性が比較的低い可能性が考えられる。しかしながら、同国を含めた EU 各国において、残留消毒剤の保持に関わらず浄水から大腸菌が所定の割合で検出され、一部には配水過程での汚染が示唆されている<sup>4)</sup>点に留意する必要がある。

その中で、オランダでは上述のように全ての水道システムが塩素消毒および残留消毒剤に依存しておらず、また、水道水由来の病原微生物による感染リスクを年間  $10^{-4}$  未満（給水人口 1 万人につき年間感染者 1 名未満）とすることを水質基準に定めており、病原微生物による汚染のおそれのある原水を使用する浄水場を中心に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえた定量的なリスク評価を実施している。