

C. 結果

(1) 原水

原水の濁度、大腸菌濃度、PAC 注入率を図 3 に示す。

設定濁度 300mg/L の時に 297.3mg/L～347.2mg/L (平均 319.4mg/L)、設定濁度 100mg/L の時に 121.3mg/L～103.2mg/L (平均 110.1mg/L)、設定濁度 50mg/L の時に 52.6mg/L～58.2mg/L (平均 55.3mg/L)、設定濁度 20mg/L の時に 19.7mg/L～24.9mg/L (平均 21.2mg/L) であった。設定濁度と実測に差があり、1系と2系で多少の差があるが、設定どおりの濁度急変時を再現できたと考えている。

なお、1系の濁度設定初期 (10:10～10:15) にカオリン注入装置の不具合で原水濁度 500mg/L を超える高濃度のカオリンの注入が生じた。

原水大腸菌濃度は、濁度と同様の濃度変動となるように注入量を設定したが、時間の経過と共に大腸菌原液の濃度の増加が観察された。大腸菌原液の濃度を測定した結果、実験開始時 (10:00) は 3.5×10^8 CFU/mL であるのに対し、実験終了時 (23:00) は 1.2×10^9 CFU/mL であり約 3.5 倍に増加していた。開始から終了まで大腸菌が比例的に増加したと仮定すると、原水の大腸菌濃度は、設定濁度 300mg/L で $4.2 \times 10^4 \sim 4.8 \times 10^4$ CFU/mL、設定濁度 100mg/L で $1.9 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^4$ CFU/mL、設定濁度 50mg/L で $1.3 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ CFU/mL、設定濁度 20mg/L で $1.1 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^4$ CFU/mL と推定される。

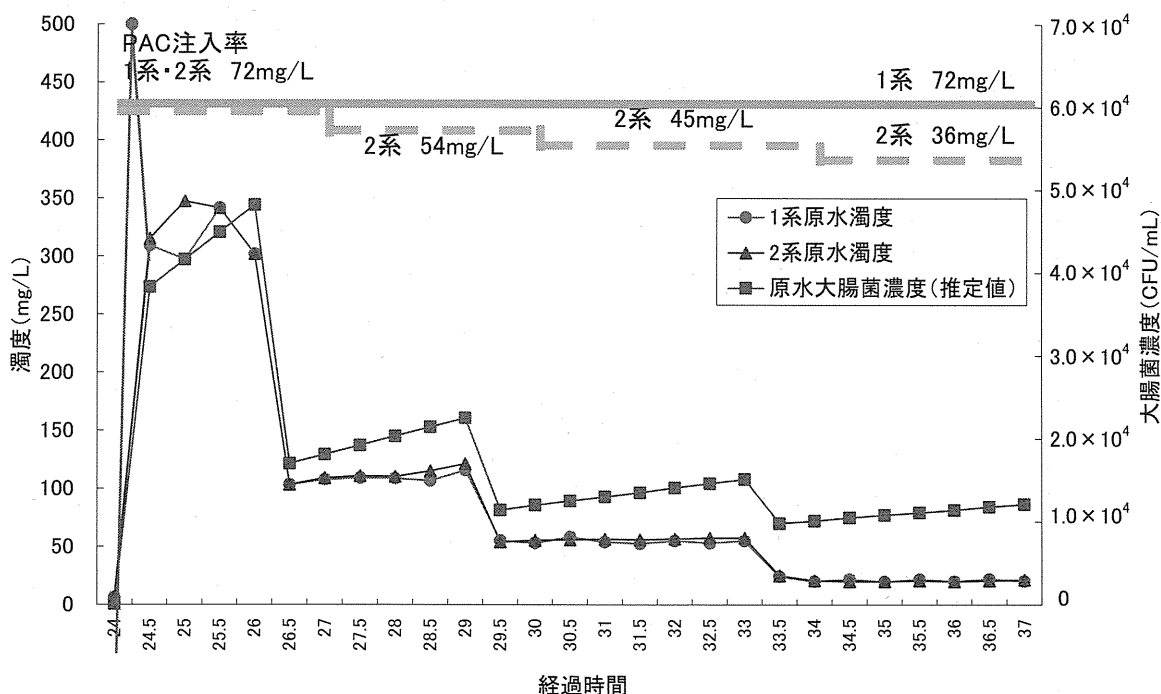


図 3 原水における濁度・大腸菌濃度・PAC 注入率の変化

(2) 凝集沈澱処理水

凝集沈澱処理水の濁度および大腸菌濃度を図4に示す。

1系の濁度は、原水高濁度 (>500mg/L) の影響からか、26:00 に 5.37mg/L まで上昇し、その後は実験終了まで低下した。1系の大腸菌濃度は、177CFU/mL~360CFU/mL の範囲で推移した。

2系の濁度は、28:00 に 3.05mg/L まで上昇し、29:30 まで 3mg/L 前後を推移、その後は実験終了まで1系よりも緩やかに低下した。2系の大腸菌濃度は、27CFU/mL~677CFU/mL で増加傾向にあった。

1系も2系も処理水濁度と大腸菌濃度の関連は無いと考えられる。

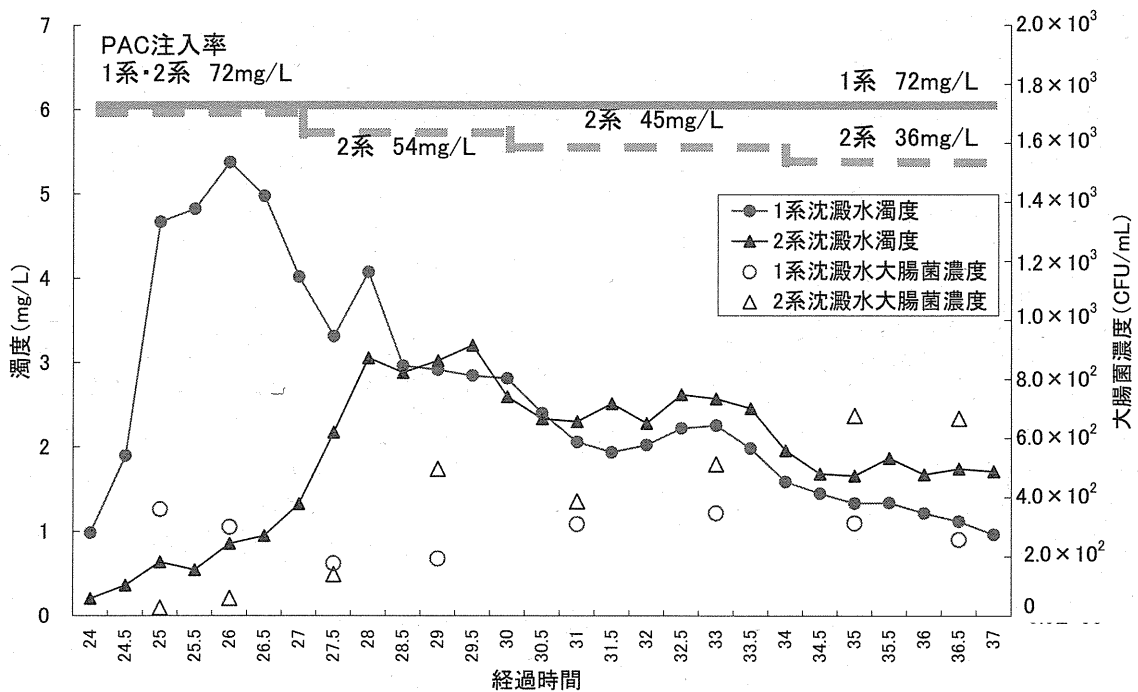


図4 凝集沈澱処理水の濁度・大腸菌濃度・PAC注入量

(3) 砂ろ過水

砂ろ過水の濁度および大腸菌濃度を図5に示す。

1系の濁度は原水高濁度 (>500mg/L) の影響からか、26:30 に No. 1 は 0.042mg/L、No. 2 は 0.034mg/L に上昇し、その後は低下した。1系の大腸菌も同様の影響で 25:00 に No. 2 で 0.67CFU/mL 検出された。また、No. 1 では 35:00 に 0.33CFU/mL、No. 2 では 26:00 および 35:00 に 0.33CFU/mL 検出された。その他の時間は不検出であった。

2系の濁度は 28:00 に 0.007mg/L まで上昇し、29:30 まで 0.007mg/L 前後を推移、その後は1系よりも緩やかに低下した。2系の大腸菌は 29:00 および 35:00 に No. 1 で 0.33CFU/mL 検出された。その他の時間は不検出であった。

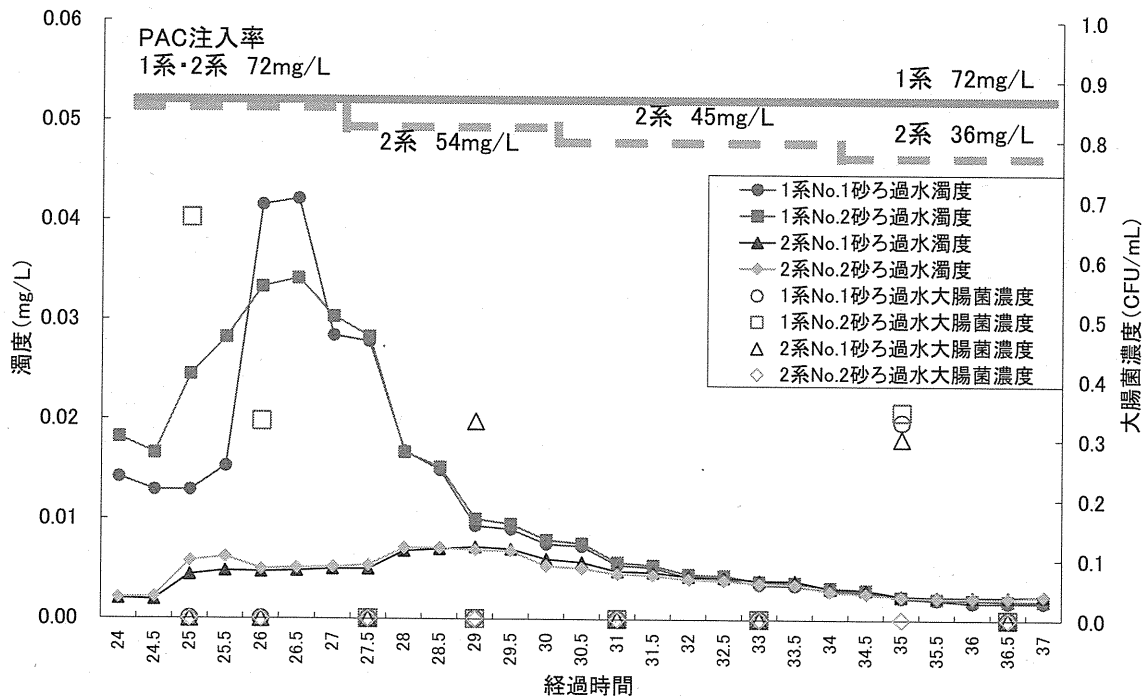


図5 砂ろ過処理水の濁度・大腸菌濃度・PAC注入力

(4) 各浄水処理工程の大腸菌除去率

プラント実験で得られた大腸菌濃度と大腸菌除去率の結果を表5に示す。大腸菌除去率については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。この傾向については、本プラント実験と濁度・PAC注入量を同一条件とし、微生物注入量を濁度変化によらず一定としたジャーテスト実験においても同様の傾向を示した。ジャーテスト実験の結果を表6に示す。

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。

表5 各浄水処理水における大腸菌濃度と大腸菌除去率

共通事項			1系						2系					
経過時間	原水濁度	原水大腸菌濃度 (CFU/ml)	沈澱水大腸菌濃度 (CFU/ml)	凝集沈殿大腸菌除去率 (%)	No.1砂ろ過水大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.1砂ろ過大腸菌除去率 (%)	No.2砂ろ過水大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.2砂ろ過大腸菌除去率 (%)	沈澱水大腸菌濃度 (CFU/ml)	凝集沈殿大腸菌除去率 (%)	No.1砂ろ過水大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.1砂ろ過大腸菌除去率 (%)	No.2砂ろ過水大腸菌濃度 (CFU/ml)	No.2砂ろ過大腸菌除去率 (%)
25	319.4	3.50×10^4	3.60×10^2	98.97	0	100	0.67	99.81	2.70×10^1	99.92	0	100	0	100
26	319.4	4.16×10^4	3.00×10^2	99.28	0	100	0.33	99.89	6.00×10^1	99.86	0	100	0	100
27.5	110.1	1.70×10^4	1.77×10^2	98.96	0	100	0	100	1.40×10^2	99.18	0	100	0	100
29	110.1	2.03×10^4	1.93×10^2	99.05	0	100	0	100	4.97×10^2	97.55	0.33	99.93	0	100
31	55.3	1.20×10^4	3.10×10^2	97.42	0	100	0	100	3.87×10^2	96.78	0	100	0	100
33	55.3	1.41×10^4	3.47×10^2	97.54	0	100	0	100	5.13×10^2	96.36	0	100	0	100
35	21.2	1.01×10^4	3.13×10^2	96.90	0.33	99.90	0.33	99.89	6.77×10^2	93.30	0.33	99.95	0	100
37	21.2	1.11×10^4	2.57×10^2	97.68	0	100	0	100	6.67×10^2	93.99	0	100	0	100

表6 ジャーテスト実験による濁度除去率と大腸菌除去率

初期濁度	300	100	100	50	50	20	20	5	5
PAC注入率(mg/L)	72	72	54	72	45	72	36	72	36
処理水濁度	0.377	0.272	0.223	0.216	0.491	0.148	0.594	0.093	0.213
濁度除去率(%)	99.87	99.73	99.78	99.57	99.02	99.26	97.03	98.14	95.74
初期大腸菌濃度(CFU/ml)	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5	1.13×10^5
処理水大腸菌濃度(CFU/ml)	3.20×10^2	4.27×10^2	3.60×10^2	5.20×10^2	1.65×10^3	8.93×10^2	5.33×10^3	1.95×10^3	5.86×10^3
大腸菌除去率(%)	99.72	99.62	99.68	99.54	98.54	99.21	95.28	98.27	94.81

D. 考察

①大腸菌除去性評価

実験結果より、凝集沈殿処理水の濁度と大腸菌濃度の関係を図6に示す。両者の間には相関がほとんど見られず、沈殿処理水濁度によって大腸菌濃度の傾向を把握することが難しいことがわかった。次に凝集沈殿処理水の濁度除去率と大腸菌除去率の関係を図7に示す。凝集沈殿処理による濁度除去率と大腸菌除去率の間には高い相関があることがわかる。また、原水濁度と濁度除去率との間にも相関が認められるため、原水が高濁度であるほど大腸菌の除去率が高まることが示された。以上のことより、凝集沈殿処理による大腸菌除去は、大腸菌が単独で凝集沈殿するのではなく濁質成分に取り込まれてフロックを形成し共沈する機構が主であることが推察される。

また、ジャーテストの実験結果を図8に示す。プラント実験同様、濁度除去率と大腸菌除去率に高い相関性が見られた。これらの実験結果より、凝集沈殿処理における大腸菌除去性は、処理水濁度よりも濁度除去率を指標とする方が適切であることが示唆された。

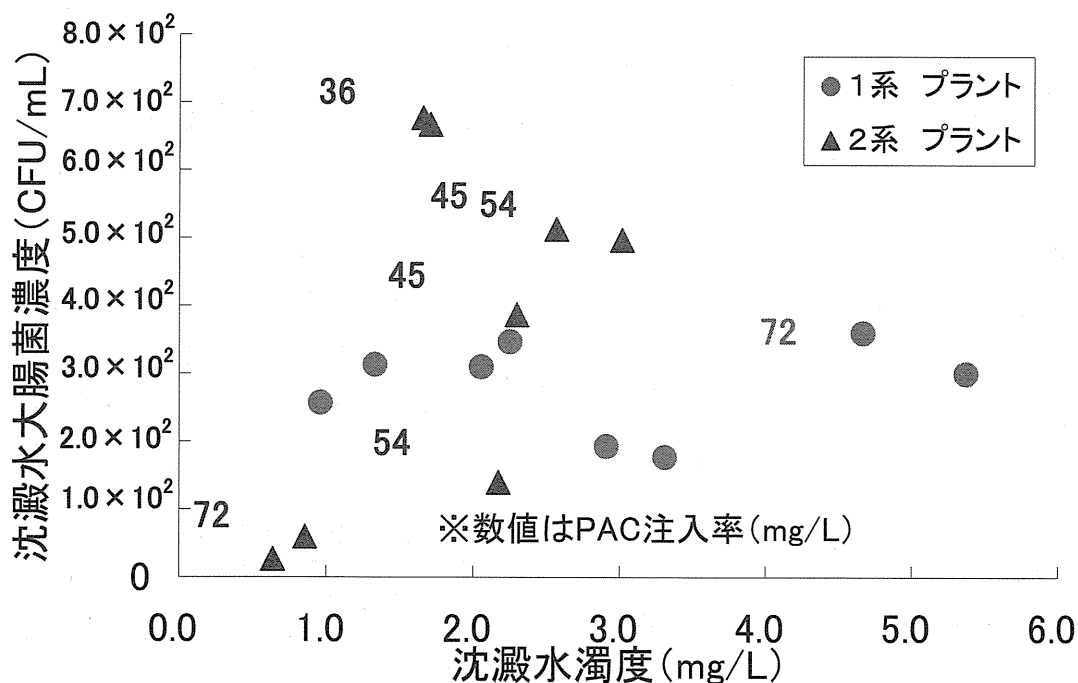


図6 沈殿水濁度と大腸菌除去率の関係

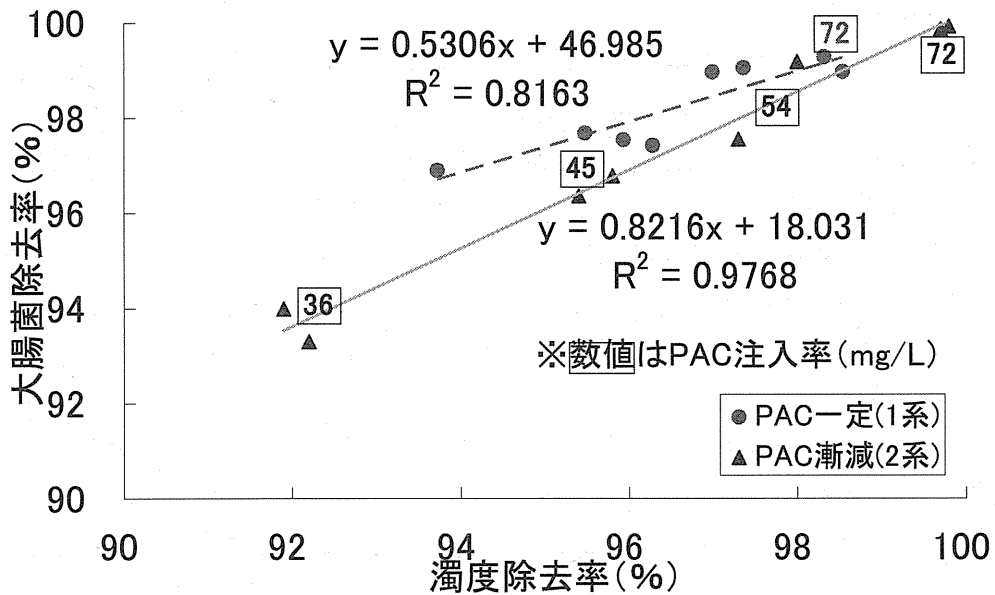


図7 濁度除去率と大腸菌除去率の関係
(プラント実験)

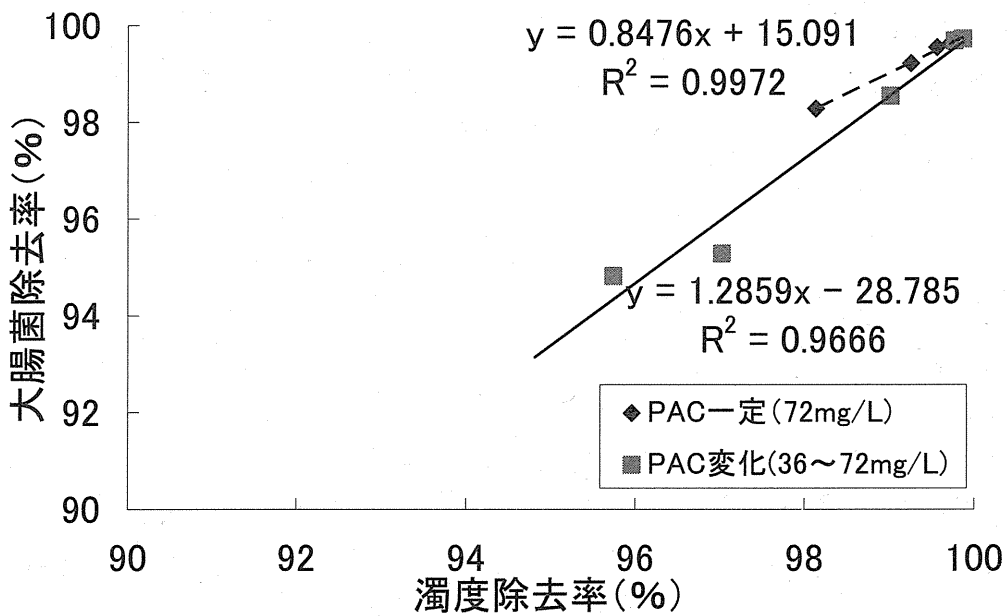


図8 濁度除去率と大腸菌除去率の関係
(ジャーテスト実験)

②病原微生物感染リスク評価

(1)病原微生物に関する諸条件

浄水処理実験で用いた微生物 *E. coli* K12 株は病原性等を持っていないため、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。近年、自然河川中のような低温・貧栄養な環境においても、生きてはいるが通常の培地では培養させることが困難な状態 (VBNC) として *E. coli* 0157:H7 が検出された事例があり、1ml 中に 1.0×10^2 から 1.0×10^3 cell 存在するという報告がある¹⁾。ここでは原水 1ml 中に 1.0×10^2 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。また、曝露量に関連する事項としては、我が国で過去に行われたアンケート結果²⁾より非加熱飲用量を 0.321L/人・日とした。大腸菌 0157 の感染確率については、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 5.09×10^{-3} を引用した³⁾。

(2)浄水処理に関する諸条件

浄水処理による除去性に関して、下記の通り各浄水処理工程による場合分けを行った。なお、塩素消毒に関する除去率は既往の研究結果より 99.999% (5log 除去) の数値を引用した⁴⁾。

Case1: 未処理の場合

Case2: 凝集沈殿 93.30% (1.2log) 除去、砂ろ過 99.99% (4log) 除去、塩素消毒なしの場合

Case3: 凝集沈殿 99.92% (3.1log) 除去、砂ろ過 99.99% (4log) 除去、塩素消毒なしの場合

Case4: 凝集沈殿 93.30% (1.2log) 除去、砂ろ過 99.99% (4log) 除去、塩素消毒 99.999% (5log) 除去の場合

Case5: 凝集沈殿 99.92% (3.1log) 除去、砂ろ過 99.99% (4log) 除去、塩素消毒 99.999% (5log) 除去の場合

(3) リスク評価指標

リスク評価の指標には障害調整生存年数 DALYs の概念を用いた。DALYs は損失生存年数 (YLL) と障害生存年数 (YLD) の合計値で表したものであり、表 7、8 に示す RIVM が算定した数値として、1 感染当りの DALYs 値 5.47×10^{-2} を引用した⁵⁾。

表7 *E.coli* O157 各症状における健康影響数と継続日数⁵⁾

Outcomes	Severty	Duration	Burden of disease per case in DALYs
Watery diarrhoea	0.067	3.4days	0.0006
Bloody diarrhea	0.39	5.6days	0.006
Death from diarrhea	1	13.2yrs	13.2
HUS	0.93	21days	0.05
Death from HUS	1	26.2yrs	26.2
ESRD	-	-	8.7
Death from ESRD	1	34yrs	34

表8 *E.coli* O157 各症状における YLL.YLD の計算値と DALYs 値⁵⁾

Outcomes	Disease burden(DALY) per 1000 symptomatic cases of(gastroenteritis)
Watery diarrhoea	1000x53%(watery diarrhoea)x0.067x0.009=0.3
Bloody diarrhea	1000x47%(bloody diarrhoea)x0.39x0.015=2.8
Death from diarrhea	1000x2.7x10 ⁻⁴ (mortality)x13.2=3.5
HUS	1000x10 ⁻² (HUS)x0.93x0.057=0.5
Death from HUS	1000x10 ⁻² x1.04x10 ⁻¹ (mortality)x26.2=27.3
ESRD	1000x10 ⁻² x1.18x10 ⁻¹ (ESRD)x8.7=10.2
Death from ESRD	1000x10 ⁻² x1.18x10 ⁻¹ x2.52x10 ⁻² (mortality)x34=10.1
total	54.7

(4) 結果

リスク評価の結果を表9に示す。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 のみとなる。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10⁻⁶DALYs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 の場合のみである。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。

表9 *E.coli* O157 を対象にした水道由来の微生物リスク評価結果

		Case1	Case2	Case3	Case4	Case5
原水中濃度(cells/L)		1.00 × 10 ⁵				
浄水処理	凝集沈殿(%)	0	93.30 1.2log除去	99.92 3.1log除去	93.30 1.2log除去	99.92 3.1log除去
	砂ろ過(%)	0	99.99 4log除去	99.99 4log除去	99.99 4log除去	99.99 4log除去
	塩素消毒(%)	0	0	0	99.999 5log除去	99.999 5log除去
	浄水処理除去率合計	0	5.2log除去	7.1log除去	10.2log除去	12.1log除去
水道水中濃度(cells/L)		1.00 × 10 ⁵	6.70 × 10 ⁻¹	8.00 × 10 ⁻³	6.70 × 10 ⁻⁶	8.00 × 10 ⁻⁸
飲用水量(L/日)		3.21 × 10 ⁻¹				
暴露量/日		3.21 × 10 ⁴	2.15 × 10 ⁻¹	2.57 × 10 ⁻³	2.15 × 10 ⁻⁶	2.57 × 10 ⁻⁸
感染確率		5.09 × 10 ⁻³				
1感染当りDALYs値		5.47 × 10 ⁻²				
1日当りの感染率 (年間感染率)		1.63 × 10 ² (5.96 × 10 ⁴)	1.09 × 10 ⁻³ (4.00 × 10 ⁻¹)	1.31 × 10 ⁻⁵ (4.77 × 10 ⁻³)	1.09 × 10 ⁻⁸ (4.00 × 10 ⁻⁶)	1.31 × 10 ⁻¹⁰ (4.77 × 10 ⁻⁸)
1人当りの 年間健康影響度(DALYs)		3.26 × 10 ³	2.19 × 10 ⁻²	2.61 × 10 ⁻⁴	2.19 × 10 ⁻⁷	2.61 × 10 ⁻⁹

表10にクリプトスポリジウムを対象とした既存の健康影響リスク評価例⁶⁾を示す。クリプトスポリジウムでは耐塩素性による消毒効果の低さ等から、浄水処理による除去率が2log~3logと低い値であるが、*E.coli* O157については除去率が5.2log~12.1logと高い数字となる。一方でクリプトスポリジウムでは原水中濃度と1オーシスト摂取による感染確率と、*E.coli* O157の1cell当りの感染確率は同程度であるが、クリプトスポリジウムでは1感染当りの健康影響度(DALYs/case)の値が 1.03×10^{-3} となっているのに対して、*E.coli* O157についてはHUS(溶血性尿毒症症候群)やESRD(末期腎疾患)による損失生存年数(YLL)が高いことなどがあり 5.47×10^{-2} と比較的高い値となっている。浄水処理による除去率によっては、*E.coli* O157の健康影響度はクリプトスポリジウムと同等かそれ以上になることも考えられる。

表10 クリプトスポリジウムによる健康影響リスク評価⁶⁾

原水中のオーシスト濃度	1個/10ℓ			
浄水処理における除去率	3 log	2.5 log	2 log	無処理
水道水中の濃度	10^{-4} 個/ℓ	3×10^{-4} 個/ℓ	10^{-3} 個/ℓ	10^{-2} 個/ℓ
飲用水量/日	1ℓ/日			
曝露量/日	10^{-4} 個/日	3×10^{-4} 個/日	10^{-3} 個/日	10^{-2} 個/日
1オーシスト摂取による感染確率	4×10^{-5}			
DALYs/case 1感染当りの健康影響度	1.03×10^{-3} DALYs (発症率71%を採用)			
1日当りの感染率 (年間)	4×10^{-7} /日 (1.5×10^{-7} /年)	1.3×10^{-6} /日 (4.7×10^{-7} /年)	4×10^{-6} /日 (1.5×10^{-7} /年)	3×10^{-5} /日 (1.5×10^{-7} /年)
1人当りの年間健康影響度	1.5×10^{-7} DALYs	4.8×10^{-7} DALYs	1.5×10^{-6} DALYs	1.5×10^{-4} DALYs

E. 結論

本実験結果より、高原水濁度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測される。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。今後様々な条件下での実験や実際の浄水場での水質データに基づいた検証などを通じて、除去機構のさらなる解明や、浄水処理における微生物除去の管理指標の提案につなげたい。

上記条件下で算定したリスク評価においては、オランダの基準やWHOのガイドラインを満たすためには、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察される。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、引き続き今後も検証を続けていく。

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

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.

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. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- 1) 谷佳津治、那須正夫 河川中の大腸菌 0157 *Microbes and Environments* Vol. 14, No2, 101-105 1999
- 2) 大瀧雅寛 生活工学研究第4巻第2号(2002), p222-227 お茶の水女子大学生活科学部生活工学研究会
- 3) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* 0157 in steak tartare in the Netherlands RIVM report 257851003/2001 p81
- 4) 金子光美 水道の病原微生物対策 p172
- 5) Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality RIVM report 734301022/2003 p30-32
- 6) 「WHO 新飲料水水質ガイドラインと改正水質基準の経緯と今後の展望」、第46回日本水環境学会セミナー講演資料集、p.35-45,2003

付録 浄水処理実験プラントの運転条件

設定項目	単位	設定値				
原水濁度	度	5	20	50	100	300
濁質原液 注入率	mL/min	24	100	200	400	1500
濁質原液 濃度	mg/L	8000				
微生物 濃度	CFU/mL	-	2.3×10^3	5.8×10^3	1.2×10^4	3.5×10^4
微生物原液 注入率	mL/min	-	0.10	0.16	0.33	1.00
微生物原液 濃度	CFU/mL	3.5×10^8				
急速攪拌機	rpm	126				
周波数 設定値	Hz	33.7				
緩速攪拌機	rpm	8.5				
周波数 設定値	Hz	35				
地下水流量	L/min	24				
凝集沈殿 流入流量	L/min	10.0				
砂ろ過 流入流量	L/min	3.2				
膜流速	m/日	1.84				
膜ろ過流量	L/min	3.2				
沈殿汚泥 引抜時間	汚泥引抜(120sec) 1回/日					
砂ろ過洗浄 時間	空気洗浄(330sec) → 気水洗浄(70 sec) → 逆洗浄(400 sec) 洗浄回数: 1回/日					
膜ろ過洗浄	ろ過継続時間 180分 (逆洗間隔) 逆洗水量 15 L/min					

分担研究報告書 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)

研究分担者 大瀧 雅寛

平成 23 年度 分担研究報告書
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)

研究分担者 お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科 大瀧雅寛

研究要旨

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）において、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的とし、多種の細菌の集合である従属栄養細菌の処理耐性等の評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について検討した。今年度は特に T-RFLP 法を用いた定量法の検討を進めた。モデル微生物として *Pseudomonas aeruginosa* 株を用い、濃度既知のマーカー生物を投入することにより、濃度範囲が限定的ながらも、濃度の定量法を提案することができた。これらの結果を利用すれば T-RFLP 法を用いて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となると考えられた。

また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 測定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。結果として、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、改良方法によって、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。今回の結果を利用して、大腸菌だけでなく従属栄養細菌に適用することにより、配水管中での細菌増殖抑制に効果的な消毒方法について、より確実に考察できるものと考えられる。

A. 研究目的

本分担研究では、配水過程での生物膜形成といった再増殖が問題となる微生物を対象として、各種消毒処理方法（塩素、紫外線照射など）によって、不活化および再増殖を抑制させるための条件を、明らかにすることを目的としている。本研究では配水管中で増殖が問題となる従属栄養細菌を主な対象微生物としているが、どの種が消毒処理耐性が高いのか、また増殖能が高いのかについて把握することは重要な情報となると考えている。しかし、多種の細菌の集合である従属栄養細菌を一つ一つ調べるのは大変な労力と手間がかかる。そこで今回は、これらの評価を一度に行う手法として T-RFLP 法を応用する手法について検討することにした。T-RFLP 法は広範な細菌群集を検出できる方法として近年幅広く利用されている分子生物学的手法の一つであるが、定量法としては活用されていない。そこで今回単種の *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) を用いて、T-RFLP 法による定量的測定方法を検討することにした。具体的には濃度既知のマーカー生物を対象試料に投入することにより、対象微生物の濃度推定を行う方法を検討した。

また塩素や紫外線処理による損傷個所の推定には、モデル細菌として扱いやすい大腸菌を用いて検討した。従来より複数の培養培地による濃度測定を行い、その差から損傷部位を推定する方法が扱われているが、より直接的に細胞膜損傷を検出する方法として提案されている propidium monoazide (PMA) 投入を用いることを検討し、更に測定感度を上げる方法を提案することを目的とした。

B. 研究方法

今年度はいずれの研究課題についても単離株を用いて検討した。T-RFLP 法による定量的検出方法の検討については *Pseudomonas aeruginosa* を用い、消毒処理による損傷個所の推定には大腸菌を用いた。

B.1 T-RFLP 法による定量方法の検討について

本方法は T-RFLP を用いた定量方法について、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するものである。

1) 使用細菌株について

本研究では、対象微生物として *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) (以下 *P. aeruginosa* と示す) を使用することとした。液体培地 (Tryptic Soy Broth, 以下 TSB と示す) 中にて冷蔵保存してある *P. aeruginosa* を、滅菌済みシャーレに固化させておいた状態の Tryptic Soy Agar (以下 TSA) 培地上に滅菌ループで画線したのち、37 °C のインキュベータ内にて 18~24 時間静置して培養した。形成されたコロニーを滅菌ループで釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 10 mL に懸濁したものを初期試料溶液とした。このとき初期試料の濃度は約 10^8 CFU/mL 程度であった。なお、*P.aeruginosa* の培養は毎回実験前日から当日にかけて行った。

定量用のマーカー微生物として大腸菌 *Escherichia coli* (NBRC13965) (以下 *E.coli* と示す) を用いた。大腸菌は *P. aeruginosa* と同様の方法で培養し、高濃度溶液を作成した。すなわち TSB 中にて冷蔵保存してある *E.coli* を固化させた TSA 培地上に滅菌ループで画線したのち、37°C のインキュベータ内にて 18~24 時間静置して培養した。形成されたコロニーを滅菌ループで釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 10 mL に懸濁したものを初期試料溶液とした。このとき初期試料の濃度は約 10^7 CFU/mL であった。

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、 5.9×10^6 CFU/mL, 5.9×10^5 CFU/mL, 5.9×10^4 CFU/mL の溶液を作成し、この定量検出を試みることにした。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 1.3×10^5 CFU/mL, 1.3×10^4 CFU/mL となるように調整した。それぞれの混合溶液の命名と各生物の濃度の関係を表 1 に示した。

表 1 各混合溶液中の *E.coli* 濃度と *P.aeruginosa* 濃度

混合溶液名	<i>P.aeruginosa</i> 濃度	<i>E.coli</i> 濃度
Mixture I	5.9×10^6 CFU/mL	
Mixture II	5.9×10^5 CFU/mL	1.3×10^5 CFU/mL
Mixture III	5.9×10^4 CFU/mL	
Mixture IV	5.9×10^6 CFU/mL	
Mixture V	5.9×10^5 CFU/mL	1.3×10^4 CFU/mL
Mixture VI	5.9×10^4 CFU/mL	

2) T-RFLP 解析について

①DNA 抽出

各々の試料溶液 60 mL を遠心分離をした (11000 rpm, 4 °C, 10 min) 後、上澄みを捨て、滅菌済みリン酸緩衝液 5 mL を加え混合攪拌した。これを再び同条件にて遠心分離した。再び上澄みを捨て、滅菌済みリン酸緩衝液 1 mL を加え混合攪拌し同条件にて遠心分離して、上澄みを捨てた溶液を DNA 抽出試料とした。DNA の抽出には ISOPLANT (NIPPON GENE) を使用し、抽出工程はキットのプロトコルに従った。

②PCR 増幅

DNA 抽出を行った試料 1 μ L を PCR Master Mix 50 μ L に加え、サーマルサイクラーにて PCR 増幅を行った。その際、試料の他に滅菌水に対しても同時に PCR 増幅を行い、試薬に異常がないか確認した。プライマーとして 27f (5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 907r (5' -CCGTCAATTC MTTTRAGTTT-3') を用いた。なお、T-RFLP の解析用にフォワードプライマー 27f の 5' 末端を蛍光色素 6-FAM (6-carboxyfluorescein) で標識した。DNA ポリメラーゼには TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を用い、付属の試薬を用いて PCR Master Mix を調整した。温度条件は (94°C:30 秒 \rightarrow 52°C:30 秒 \rightarrow 72°C:1 分) \times 30 サイクル \rightarrow 72°C:10 分とし、反応終了後の庫内は 4 °C を保った。PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製し、40 μ L に濃縮した。その後、NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies) を用いて DNA 濃度を測定した。

③制限酵素処理

PCR 産物 100 ng を、制限酵素 *Hha I* (TaKaRa) を用いて消化した (37°C, 6 時間)。この消化産物 2 μ L に Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) 17 μ L, サイズマーカー GeneScan 1200LIZ 1 μ L を加え、95°C で 2 分間熱変性さ

せた後、氷冷した。

④電気泳動処理およびフラグメント解析

キャピラリー電気泳動は、ABI PRISM®310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を使用し、GeneMapper™v3.0 (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。

B.2 消毒処理における損傷部位の推定方法の検討

単離株の塩素および紫外線処理における損傷部位の推定を複数培地培養による定量的検出方法に加え、生物膜損傷を検出できる propidium monoazide (PMA) を用いた方法の改良方法を検討し適用した。両方法の結果を比較し、より確実な損傷部位の推定を試みた。

1) 使用細菌株について

本研究では、対象微生物として *Escherichia coli* (NBRC13965) (以下 E.coli と示す) を使用した。

2) 塩素による不活化実験

TSA 培地上にて 37 °C, 24 時間培養してできた E.coli 株のコロニーをループで釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 100 mL に懸濁して大腸菌溶液とした。ここで濃度は約 1.0×10^7 CFU/mL となった。遊離塩素濃度が約 1.0 mg/L および 0.1 mg/L となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入し、所定時間接触後に採水し、濃度を測定した。遊離塩素濃度の測定は、ポータブル吸光光度計 DR/890 (HACH 社製) を用いて DPD 法により測定した。

3) 紫外線による不活化実験

塩素実験と同様の方法にて作成した大腸菌溶液 21 mL を滅菌シャーレに入れ、低圧 UV ランプで紫外線を照射した。照射線量率は、 0.3 mW/cm^2 とした。設定照射時間後、試料を採水し濃度測定を行った。

4) 濃度測定法

①複数培地培養法

各不活化処理を施した E.coli 濃度を特定の細菌を検出できる選択培地および非選択培地を用いて細胞膜の損傷などを推定した。非選択培地として Tryptic Soy Agar (以下 TSA) を用いた。選択培地としてはデスオキシコール酸塩培地 (以下 DESO), Compact Dry EC (以下 C-EC) を用いた。それぞれの測定結果と推定される損傷については以下のとおりである。

TSA : 非選択培地。代謝能力の有無を見る

DESO : グラム陰性菌様細胞膜の変容、もしくは乳糖代謝能力の有無を見る

C-EC : 特定酵素の代謝能力の有無を見る

②PMA 投入法

各不活化処理を施した E.coli 溶液に PMA を投入した後、定量的 PCR 法および TSA 培地培養法にて濃度測定を行った。また PMA を投入しない試料についても、定量的 PCR および TSA 培地法によって濃度測定を行い、PMA 投入の場合と比較した。この時、各測定値によって以下のことが推定される。

PCR : 核酸損傷菌の有無を見る。ただし検出できる核酸部位は全体の極一部であるため、感度は低い。

PMA+PCR : 細胞膜損傷の有無を PCR 法にて確認できる。既存研究よりも PMA 投入量は低い。

PMA+TSA : 細胞膜損傷の有無を TSA 法にて確認できる。投入 PMA 量は健常 E.coli には作用しない濃度を設定。

PMA 投入においては、可視光照射を行って DNA と不可逆的に結合させる必要がある。ただし紫外線照射による不活化処理の場合、可視光照射によって不活化した細菌が光回復するため、紫外線照射後の不活化量の測定に重大な影響を及ぼすことになる。そのため可視光照射の際に、細菌の光回復に寄与する波長を遮断するために特定色のセロファンを溶液と可視光ランプの間に配置して、光回復を阻止した。

C. 研究結果

T-RFLP 法による定量的検出方法の検討についての結果については C.1 に、消毒処理による細菌の損傷個所の推定については C.2 に示す。

C.1 T-RFLP 法による定量方法の検討について

1) *P. aeruginosa* 及び生物マーカー (*E.coli*) の PCR 増幅結果

Fig.1 に *E.coli*, *P. aeruginosa* の混合溶液について抽出 DNA を PCR 増幅した後の電気泳動後の写真を示した。Fig.1 において *P.aeruginosa* と *E.coli* のどちらもバンドが検出されており、用いたプライマー-27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')と 907r(5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3')が共通のプライマーとして PCR 増幅に用いることができると確認された。

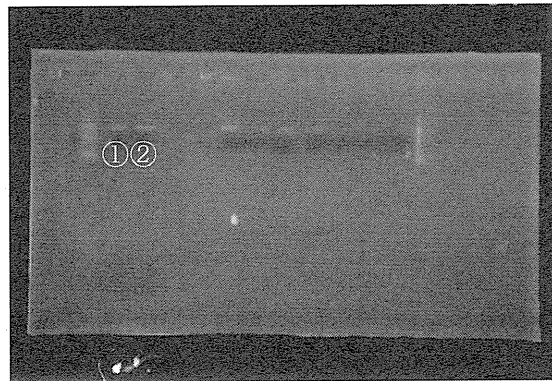


Fig.1 PCR 増幅後の電気泳動結果 ① : *P. aeruginosa*, ② : *E.coli*

2) *P. aeruginosa* および生物マーカー (*E.coli*) の T-RFLP プロファイル結果

Fig.2 に *P. aeruginosa* の T-RFLP プロファイル結果を Fig.3 に *E.coli* の T-RFLP プロファイル結果を示す。 *P. aeruginosa* のピークが現れる T-RF 長は約 149 bp であり、生物マーカー (*E.coli*) は約 368 bp であることから、異なる T-RF 長にて検出されることが確認された。

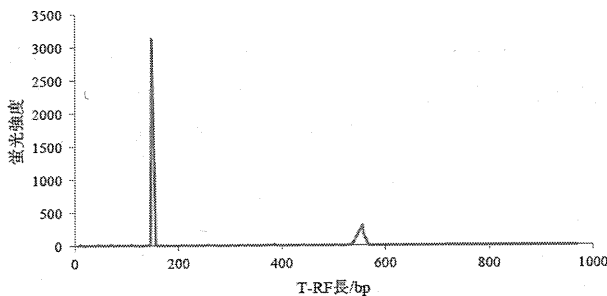


Fig.2 *P. aeruginosa* の T-RFLP プロファイル結果

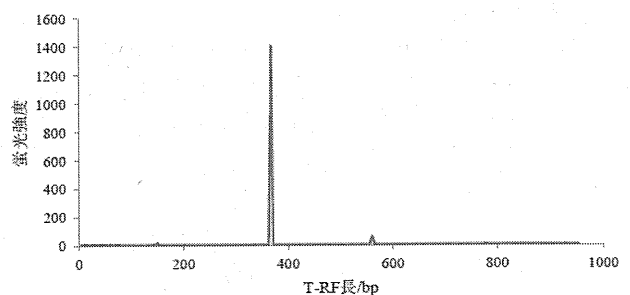


Fig.3 *E.coli* の T-RFLP プロファイル結果

3) *P. aeruginosa* と生物マーカー (*E.coli*) 混合溶液の T-RFLP プロファイル結果

P. aeruginosa と生物マーカー (*E.coli*) 混合溶液 6 種類 (Mixture I ~VI) の T-RFLP プロファイルを得た。例として Mixture I および Mixture II の T-RFLP プロファイルを Fig.4 と Fig.5 に示した。

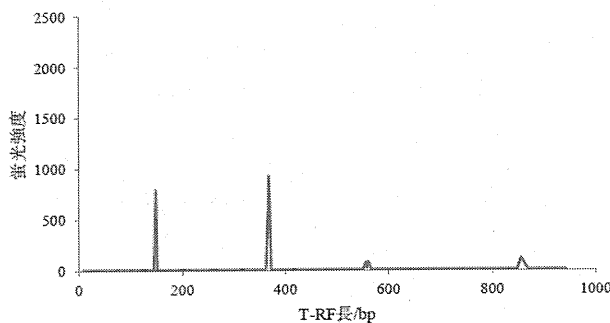


Fig.4 Mixture I の T-RFLP プロファイル

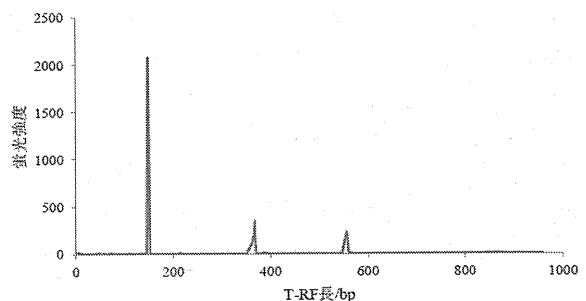


Fig.5 Mixture II の T-RFLP プロファイル

また混合溶液 6 種類 (Mixture I~VI) の T-RFLP プロファイルから得られた各生物毎のピーク値を TABLE 1 および TABLE2 にまとめた。

TABLE1 各混合溶液 (マーカー生物 (*E.coli*) 濃度 1.3×10^5 CFU/mL) の各蛍光ピーク値とピーク比

混合溶液名	<i>P. aeruginosa</i> 濃度	ピーク値 (<i>P. aeruginosa</i>)	ピーク値 (<i>E. coli</i>)	ピーク比 (<i>P. aeruginosa</i> / <i>E. coli</i>)
Mixture I	5.9×10^6 CFU/mL	2,081	349	5.963
Mixture II	5.9×10^5 CFU/mL	791	924	0.856
Mixture III	5.9×10^4 CFU/mL	113	1,498	0.0754

TABLE2 各混合溶液 (マーカー生物 (*E.coli*) 濃度 1.3×10^4 CFU/mL) の各蛍光ピーク値とピーク比

混合溶液名	<i>P. aeruginosa</i> 濃度	ピーク値 (<i>P. aeruginosa</i>)	ピーク値 (<i>E. coli</i>)	ピーク比 (<i>P. aeruginosa</i> / <i>E. coli</i>)
Mixture IV	5.9×10^6 CFU/mL	2,747	29	94.7
Mixture V	5.9×10^5 CFU/mL	578	878	0.658
Mixture VI	5.9×10^4 CFU/mL	307	287	1.07

C.2 消毒処理における損傷部位の推定方法の検討

本研究では、大腸菌をモデル細菌にして各消毒処理 (塩素および紫外線照射) による大腸菌の濃度変化を 5 つの方法 (PCR, PMA-PCR, TSA, PMA-PCR, DESO 法) にて濃度測定を行うことにより損傷箇所の推定を行った。

1) 塩素による不活化実験

塩素投入により大腸菌の不活化実験を行い、5 種類の的方法にて濃度測定を行った。結果を Fig.6 に示した。この実験の投入塩素濃度は 1.1~1.2 mg/L であった。この図から PCR と PMA-PCR での濃度測定結果には差がなく、かつ濃度変化を起こしていないことがわかった。また DESO 法と PMA-PCR 法の濃度変化はいずれも TSA による濃度変化よりも高く、かつ PMA-TSA の濃度変化が最も大きいことがわかった。

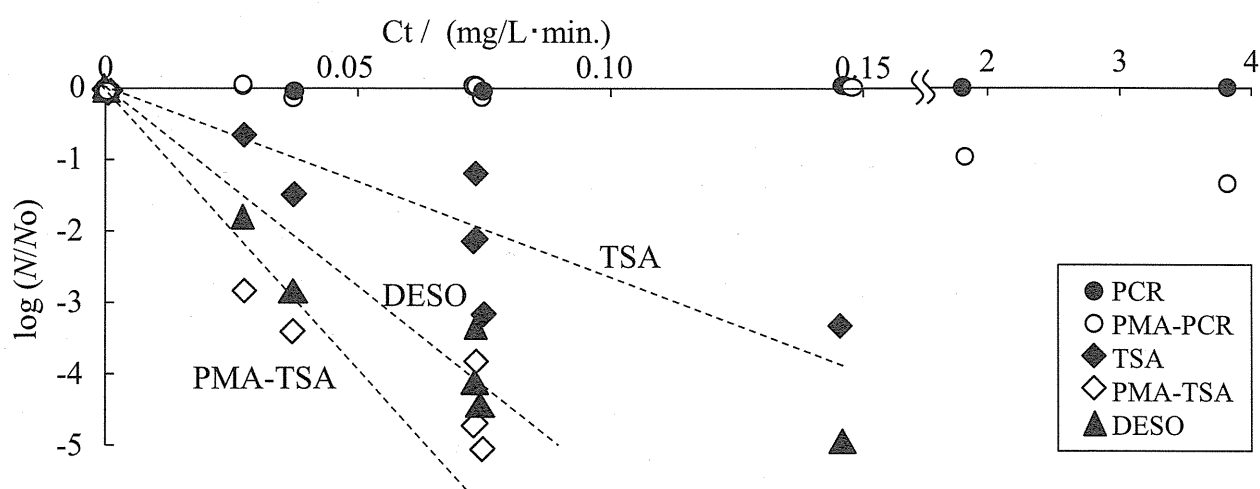


Fig. 6 塩素 (投入濃度 1.2~1.3 mg/L) による大腸菌不活化の際の濃度変化。
PCR, PMA-PCR, TSA, PMA-PCR, DESO にて濃度測定

2) 紫外線による不活化実験

紫外線照射により大腸菌の不活化実験を行い、5 種類の的方法にて濃度測定を行った。結果を Fig.7 に示した。

この実験の紫外線照射強度は 0.3 mJ/cm^2 であった。この図から PCR と PMA-PCR での濃度測定結果には差がなく、かつ濃度変化を起こしていないことがわかった。また塩素と異なり、TSA 法、DESO 法、PMA-TSA 法では濃度減少は見られたが、3つの方法に差は見られなかった。

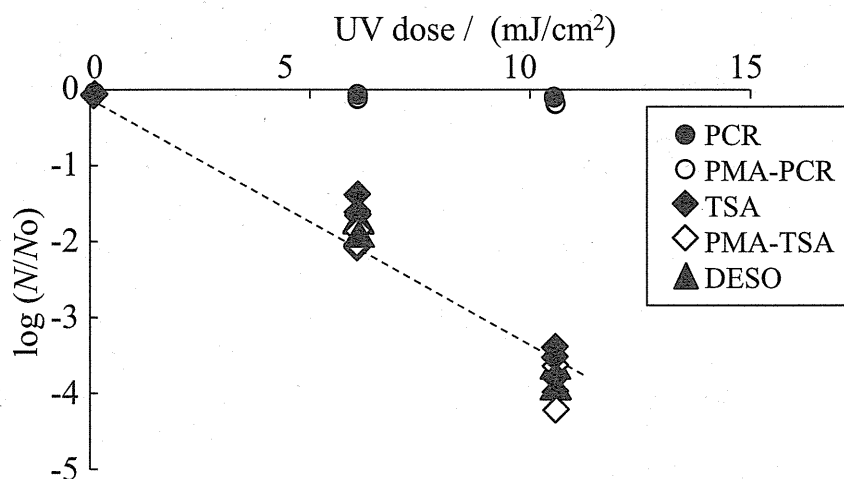


Fig. 7 紫外線照射（照射強度 0.3 mJ/cm^2 ）による大腸菌不活化の際の濃度変化。
PCR, PMA-PCR, TSA, PMA-PCR, DESO にて濃度測定

D. 考察

D.1 T-RFLP 法による定量方法の検討について

Fig.8 に、マーカー生物(*E.coli*)のピークに対する対象試料(*P. aeruginosa*)のピーク比と、それぞれの濃度比との関係を示した。この図は両対数のグラフとして表示していることに注意されたい。この図においては、Mixture V のデータ点が他のデータの相関から外れてしまっているが、その他のデータは、良い相関を持っていることが判る。以上のことから Mixture V についてはデータの信頼性が低いとして考察から除外することとした。結果、投入したマーカー生物 (*E.coli*) 溶液の濃度が異なっても、同じ回帰直線で表すことができると考えられた。

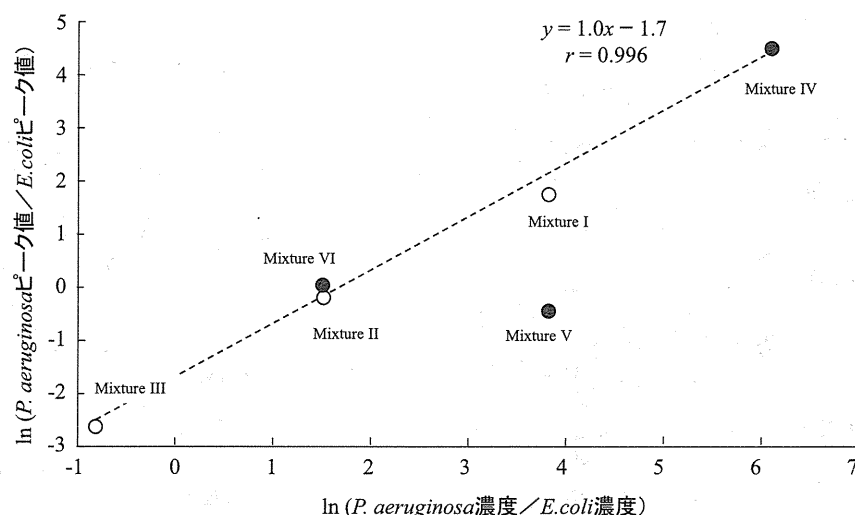


Fig.8 混合溶液中の生物濃度比と各生物の T-RFLP プロファイルピーク値の比の関係

以上のことから *P. aeruginosa* ピーク値とマーカー生物 (*E.coli*) ピーク値の比とマーカー生物 (*E.coli*) 溶液濃度から、対象とする生物の濃度を求めることができると考え、回帰直線から濃度を求める式を求めた。下式(1)は、データの回帰直線を表す式である。その式を変形したものが(2)式である。この式(2)によって、

T-RFLP プロファイルの各ピーク値と、マーカー生物として投入した *E.coli* の溶液濃度から、求めたい試料中の *P. aeruginosa* 濃度を求めることができることになる。

$$\ln R = 1.0 \ln \frac{x}{u} - 1.7 \quad (1)$$

$$x = uRe^{1.7} \quad (2)$$

R : *P. aeruginosa* ピーク値 / マーカー生物 (*E.coli*) ピーク値
x : *P. aeruginosa* 濃度, u : *E.coli* 濃度

上記(2)式は、今回用いた *P. aeruginosa* と *E.coli* という微生物種の組み合わせで、かつマーカー生物 (*E.coli*) の濃度が $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲で、対象微生物の濃度が $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲で成立する式である。従って、この範囲外の濃度で存在する場合、また対象とする微生物が *P. aeruginosa* 以外である場合には別の式が成立すると考えられるため、今後はより多くの濃度の組み合わせ、別の生物種の組み合わせなどについて検討していく必要があると考えられる。

D.2 消毒処理における損傷部位の推定方法の検討

1) 塩素による不活化実験

Fig.6 に示すとおり、TSA 培地での濃度減少が見られているにも関わらず PCR では濃度変化が見られなかった。これは PCR のターゲット領域が全核酸のごく一部であるために、ターゲット領域に損傷が見られる位の損傷は受けていないことを示している。CT 値の低い領域 (0.15 mg/L/min.) では PMA-PCR の濃度変化は無かったが、高 CT 値では PMA-PCR での濃度が減少している。これは膜損傷を受けた影響だと考えられるが、いずれにしても TSA に比べて、不活化を調べるには感度が低い方法であると言わざるを得ない。一方、PMA-TSA は、TSA よりも早い不活化速度を持っていることがわかる。TSA と PMA-TSA の差は、膜損傷を受けているが増殖はできる、という損傷を受けている菌が、PMA の投入により増殖できなくなったことを示す。即ち致命的でないが、膜損傷を受けた菌というものを定量的に示していることを示唆する。PMA-PCR と PCR の差から論じるよりも、感度が非常に高いことがわかる。

DESO 培地での不検出は、膜損傷か乳糖代謝機能の損傷を示す。今回の DESO 培地での測定による濃度変化よりも、PMA-TSA での測定濃度変化の方が減少速度が大きかったことから、DESO 培地での不検出はほぼ膜損傷を受けたものを示しており、かつ PMA-TSA では DESO で検出できない軽度の膜損傷を受けた菌の存在まで検出していると考えられる。

今回の実験は pH のコントロールは考えずに、ほぼ 7 付近で行った。塩素処理においては pH によって、消毒能力の異なる次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンの濃度比が代わり、消毒機構にも影響を及ぼすと考えられる。今後は、pH を変化させてみて、PMA-TSA、TSA および DESO 法による濃度変化の差違について検討を進めていく必要がある。

2) 紫外線による不活化実験

Fig.7 に示すとおり、TSA 培地での濃度減少が見られているにも関わらず PCR では濃度変化が見られなかった。紫外線照射による不活化機構は、核酸損傷によるものであることが判っているが、PCR ではその核酸損傷は検出できていない。これは塩素による不活化実験のところで述べたように、PCR のターゲット領域が全核酸のごく一部であるために、ターゲット領域に損傷が見られる位の損傷には至っていないことを示している。

TSA と DESO と PMA-TSA 法を比べてみると、この 3 者にはほとんど差が見られなかった。このことから膜損傷をしていて、かつそれが致命的でないような大腸菌の存在はないことがわかる。これは従来より言われている紫外線照射による不活化機構が核酸損傷にのみ依るという説明と矛盾しない。

今回提案した PMA-TSA は、従来から使われている PMA-PCR 法よりも、より高感度に膜損傷菌の確認ができると考えられる。今後は紫外線+オゾンなどの AOP や、紫外線の照射波長を代えてみて、消毒機構に差が生じないかといった点について検討する必要がある。

塩素処理にしても紫外線処理にしても、今回の結果から大腸菌については、反応機構を調べることができることが判った。今後は従属栄養細菌を対象として、まずは *P. aeruginosa* を対象に損傷箇所の特定を行っていく予定である。

E. 結論

これまで定量的分析法としては用いられなかった T-RFLP 法を用いて、モデル細菌 (*P. aeruginosa*) の濃度を、試料溶液に濃度既知の生物マーカー (今回は大腸菌) を分析前に投入することにより、定量する方法を検討した。結果として、限られた濃度範囲ではあったが、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判った。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。

次に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、PMA 投入および TSA 培地測定を利用して、確認することができた。この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。即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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿予定 (Inactivation mechanisms of *E. coli* measured by PMA pretreatment combining growing media)

2. 学会発表

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し