

201237020A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25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. 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 .....	21
	伊藤 禎彦、越後 信哉、大河内 由美子 中西 智宏、周 靚、野村 昌弘
2. 代替トレーサー粒子を用いた浄水処理による クリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価 .....	37
	島崎 大、藤村 壮
3. 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) .....	51
	大瀧 雅寛
4. 配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析 .....	63
	春日 郁朗、大坂 幸弘
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	77
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	81

## 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
		中 西 智 宏
		周 靚
		野 村 昌 弘
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24年度 総括研究報告書

平成25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 24 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。

カルキ臭低減を指向した次世代浄水処理プロセスにおける微生物リスク管理の高度化を目的として、 $O_3/UV$  酸化反応塔における大腸菌不活化能を推定するとともに、凝集・沈殿-急速砂ろ過- $O_3/UV$  処理された飲用水の *C. jejuni* 年間感染確率を推定した。また、カルキ臭低減型プロセスの AOC 除去特性を明らかにした。また、水道システムに存在する感染性レジオネラのモニタリングを目的とした基礎的検討を行い、残留塩素が十分に維持されているケースでも VBNC 化したレジオネラが存在していること、低栄養条件におかれることでレジオネラのヒト細胞に対する感染能が強まることを示した。耐塩索性病原微生物であるクリプトスポリジウムを対象として、クリプトスポリジウム代替トレーサー粒子の浄水処理による除去能力の評価実験を行ったところ、実験室規模の凝集沈殿-砂ろ過プロセスにおいて原水濁度が高い時ほど除去率が高くなる傾向が見受けられた。障害調整生存年数 DALY に基づく健康影響リスク評価を行ったところ、クリプトスポリジウムによる汚染濃度が一定である条件下では原水濁度が低い時ほどリスクが高まる傾向が見られ、特に低濁度時に PAC 注入率が不足する場合には、WHO 飲料水水質ガイドラインの目標値（年間  $10^{-6}$  DALYs/人以下）を満たさなかった。濃度既知のマーカー生物を投入する T-RFLP 法を用いた濃度定量法について、*Pseudomonas aeruginosa* 株をモデル微生物として用いた検証を

重ね、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。PVC 片上およびフロストガラス片上にバイオフィルムを形成させた *Pseudomonas* 菌を剥離強度によって分類する方法を確立した。塩素処理によって配水管中で剥離せずバイオフィルムの種となる可能性が高い部分は、いずれも致命的な損傷レベルであるものの、浮遊状態の菌や剥離しやすい部分に比べて不活化速度は約半分であった。塩素消毒処理において、同じ CT 値であっても、遊離塩素濃度 2.0 mg/L 以上では 1.0 mg/L 以下に比べてより膜損傷を与えやすいこと、3.0 mg/L では致命的な損傷を高く与えていることがわかった。10 か所の屋外・屋内給水栓から従属栄養細菌の単離を行い、16S rRNA 遺伝子を対象とした二重標識 T-RFLP によって分類を行った後、系統的に異なる 19 株を得た。塩素耐性試験では、塩素添加による消毒作用の影響を膜損傷とコロニー形成能から評価した。その結果、各菌株の不活化は Chick-Watson 式に従ったが、塩素消毒の影響は膜損傷よりもコロニー形成能に顕著に表れることが確認された。塩素耐性は単離株によって異なっており、*Mycobacterium* や *Methylobacterium* などに近縁な単離株が他の単離株よりも高い塩素耐性を持つことが示された。また、これらの単離株の水道水中での最大増殖量を評価し、塩素耐性と水道水中での増殖性から単離株の再増殖特性を分類した。浄水工程水における増殖性を評価したところ、各工程が単離株の増殖性に異なる影響を与えることが示された。

## 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. 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) カルキ臭低減型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

オゾン(O<sub>3</sub>)/紫外線(UV)処理のラボスケールリアクターを用いて OH ラジカルによる不活化効果を調べるとともに、プラント実験により得た大腸菌不活化速度定数と実施設の流入水質・流動特性を用いて、ADR 不活化モデルにより想定した実施設の大腸菌不活化能を推定した。原水中の大腸菌濃度、凝集・沈殿-急速砂ろ過- O<sub>3</sub>/UV 処理からなる浄水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) カルキ臭低減型浄水処理プロセスによる AOC 除去特性

従来型の O<sub>3</sub>-GAC 処理プロセスと、O<sub>3</sub>/UV 併用の促進酸化-陽/陰イオン交換処理からなるカルキ臭低減型浄水プロセスを対象として、秋季ならびに冬季における同化可能有機炭素の除去特性を調べた。オゾン注入率は 1.5 および 3.0 mg/L の二段階に設定した。

### (3) 水道システムにおけるレジオネラの存在状況とレジオネラ感染能に影響を与える因子の検討

給水栓水を採取し、レジオネラを対象として全菌数・生菌数・培養可能菌数をそれぞれ求めた。また、ヒト血球細胞由来のマクロファージを用いた共培養系により、L-システイン欠乏がレジオネラ感染能に及ぼす影響を調べた。

## 2. 代替トレーサー粒子を用いた浄水処理によるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価

水道原水の濁度を 10 度、30 度（A 浄水場原水）、100 度（脱塩素処理した科学院水道水にカオリンを添加）の 3 条件として、各濁度における PAC の最適注入（10 度：25mg/L、30 度：45mg/L、100 度：80mg/L）と注入不足（10 度：10mg/L、30 度：25mg/L、100 度：45mg/L）の 2 条件を設定し、除去率の比較を行った。原水にトレーサー粒子を約  $1.0 \times 10^6$  個/mL となるよう添加し、ジャーテスト（急速攪拌 120rpm を 1 分間、緩速攪拌 40rpm を 10 分間、静置 10 分間）による凝集・沈殿の後、上澄水を採取して急速砂ろ過（カラム径 20mm、ろ層厚 650mm、ろ過速度 120m/日）を行った。原水、沈殿水、ろ過水を採水して蛍光顕微鏡を用いてトレーサー粒子を計数し、微粒子数についても高感度濁度計を用いて計数を行った。

リスク評価では障害調整生存年数 DALY を年間健康影響度として用いた。ここでは、原水中のクリプト濃度のデータは A 浄水場で計測された過去 3 年分のデータを用い、実験により得られた除去率によって水道水中のクリプト濃度を推定した。試算方法は各データの平均値から算出する点推定と、原水濃度と除去率を三角分布に当てはめてモンテカルロシミュレーションによって算出する区間推定により行った。試算した水道水中クリプト濃度に、暴露量として非加熱飲用水量 0.321L/日・人 を乗じ、感染確率については指数モデルによる用量反応関係から  $4.0 \times 10^{-3}$ 、DALY 係数は既往の研究結果より  $1.03 \times 10^{-3}$  を用いた。

## 3. 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 法による定量方法の検討

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。対象微生物として *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) を、定量用のマーカー生物として大腸菌 *Escherichia coli* (NBRC13965) を用い、各々、高濃度溶液を準備した。*P. aeruginosa* の高濃度溶液を希釈して希釈列を調整し、マーカー生物の *E. coli* 溶液を所定濃度となるように投入した。各混合溶液を順次 T-RFLP 解析に供した。T-RFLP 解析の条件は昨年度と同様とした。

### (2) *P. aeruginosa* 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

PVC 片とフロストガラス片を生物膜形成材料とした。*P. aeruginosa* 培養液を各試験片に付着させ、培養して生物膜を形成させた後、所定の異なる遠心分離強度によって剥離させ分類し、TSA 寒天培地を用いて測定した。また、生物膜を形成させた各試験片を、所定濃度

の次亜塩素酸ナトリウム溶液と接触し、遠心分離と超音波による分散処理により剥離させた後、複数の培地培養法にて濃度測定を行い、損傷機構を推定した。

### (3) 異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

接触時間を正確に任意に設定することが可能な CQF (Continuous Quench-Flow) システムを利用した。大腸菌 *E. coli* の試料溶液 (約  $4.0 \times 10^7$  CFU/mL) を調整し、投入塩素濃度は 0.3 ~ 3 mg/L、反応時間は 2, 3, 6, 20 秒と設定した。*E. coli* は 3 種類の培地培養法にて濃度測定を行い、塩素消毒による損傷機構を推定した。

## 4. 配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析

### (1) 採水試料からの HPC の単離と同定

東京都内の屋外 9 か所 (主に公園)、屋内 1 か所の給水栓を対象とした連続採水を行った。各採水試料について、R2A 寒天培地上で HPC の単離を行った後、16S rRNA 遺伝子を対象として二重標識による Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) の分析を行った。

### (2) 塩素耐性試験

各単離株のストック菌液を調製し、初期生菌数が約  $1.0 \times 10^6$  cells/mL になるように希釈した後、所定の濃度条件になるよう次亜塩素酸ナトリウムを添加した。スターラーによる攪拌と所定の時間間隔でのサンプリングを行い、遊離塩素濃度を測定すると共に、塩素をただちに中和した後、菌数 (塗布法による HPC 計数、SYBR Green I/ PI による膜損傷性評価) の測定を行った。

### (3) 水道水中および浄水処理工程水中での増殖特性試験

単離株、*Pseudomonas fluorescens* P17 株、*Aquaspirillum* sp. NOX 株、大腸菌を対象として、大学実験室の水道水中での増殖特性試験を行った。水道水は、ろ過、加熱殺菌し、チオ硫酸ナトリウムによる塩素中和、無機栄養塩の添加を行い、期菌数が  $1.0 \times 10^3$  cells/mL になるよう植菌し、暗所、20°C で静置培養を行った。水道水中で増殖が確認された単離株等を対象として、浄水処理工程水 (原水、前段ろ過、オゾン処理水、BAC 処理水、浄水) における増殖性を比較した。

### (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. 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) カルキ臭低減型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

プラント実験により求めた  $O_3$  および OH ラジカルによる総合作用または UV による大腸菌不活化速度定数を利用して、想定実施設の  $O_3$ /UV 酸化反応塔における大腸菌不活性能 3.05 ~ 5.98  $\log_{10}$  を得た。モンテカルロシミュレーションにより上記 3 ステップの処理プロセス



における総合除去・不活化能を計算した結果、中央値は  $8.52 \log_{10}$ 、平均値  $7.57 \log_{10}$  となった。また、対象プロセスで処理された水道水の *C. jejuni* の年間感染確率は平均値  $1.68 \times 10^{-5} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ 、中央値  $1.28 \times 10^{-8} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$  と推定された。

#### (2) カルキ臭低減型浄水処理プロセスによる AOC 除去特性

オゾン注入率  $1.5 \text{ mg/L}$  では十分な AOC 除去効果が見られなかったものの、注入率を  $3.0 \text{ mg/L}$  に増大させた場合にはイオン交換処理による AOC 除去能が向上し、処理水の平均 AOC は約  $50 \text{ } \mu\text{gC/L}$  まで低減可能であった。

#### (3) 水道システムにおけるレジオネラの存在状況とレジオネラ感染能に影響を与える因子の検討

残留塩素が十分に残存する給水栓水試料を含む全ての試料で viable but nonculturable (VBNC) 状態にあるレジオネラが  $10^2\text{-}10^3 \text{ copies/L}$  のレベルで検出された。また、L-システイン欠乏条件においたレジオネラでは、マクロファージ細胞内生存率が大幅に上昇し、結果として感染能が強まることがわかった。

### 2. 代替トレーサー粒子を用いた浄水処理によるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価

各実験条件において、PAC 注入率と原水濁度が高いほどトレーサー粒子と  $3\sim 7 \mu\text{m}$  微粒子の除去率が高くなる傾向が見られた。また、両者の関係には比較的高い相関性があることが示された。当実験結果より各条件における 1 人あたりの年間健康影響度を算出したところ、原水濁度が上がるにつれて年間健康影響度の値は低くなる傾向が見られた。WHO 飲用水水質ガイドラインでは、クリプト等病原微生物による年間健康影響度の値として  $1.0 \times 10^{-6} \text{ DALYs}$  を推奨しており、原水濁度 10 度で PAC 注入量  $10 \text{ mg/L}$  と低濁度で PAC 注入量が不十分であった場合には、この推奨値を超過する結果となった。

### 3. 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 法による定量方法の検討

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との相関性を確認したところ、ほぼ同じ回帰直線式で表現できた。この式を変形して、T-RFLP プロファイルピーク値の比およびマーカー生物濃度から、対象微生物の濃度を算出する式を導出した。

#### (2) *P. aeruginosa* 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

生物膜を遠心分離強度に基づく付着強度の違いによって分離することが可能であった。生物膜のうち付着強度が強く剥離しにくい部分においては、遊離塩素による不活化効果が浮遊状態の約半分ほどとなった。

#### (3) 異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

同じ CT 値であっても反応させた遊離塩素濃度の違いによって各培地の不活化率に有意差があるかを調べたところ、遊離塩素濃度  $1.0 \text{ mg/L}$  以下に対して、 $2.0 \text{ mg/L}$  以上では有意に高い膜損傷を与えること、また、 $3.0 \text{ mg/L}$  では核酸や必須代謝機能の致死的損傷を有意に

高く与えることが推定された。

#### 4. 配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析

##### (1) 採水試料からの HPC の単離と同定

6-FAM 標識したフォワードプライマーと、HEX 標識したリバースプライマーを用いて、単離した株の 16S rRNA 遺伝子を T-RFLP で解析し、単離株を 19 種類の OTU に分類した。これら 19 株は 14 種類の属に大きく分類されることが明らかになった。

##### (2) 塩素耐性試験

ほぼすべての株について、膜損傷速度定数  $k$  の値は遊離塩素濃度によらずほぼ同程度であり、Chick-Watson 式に従っていることが確認された。HPC11 株 (*Methylobacterium* 属近縁) と HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) の死滅速度定数がそれぞれ 0.015, 0.019 L/mg min (全濃度のプロットを合算して算出) と、他の株と比べて著しく高い塩素耐性を有していることが確認された。また、塩素耐性をコロニー形成能で評価した場合、膜損傷よりも顕著な影響が出るということが明らかになった。HPC13 株 (*Mycobacterium* 属近縁) の場合、HPC 試験で得られる死滅速度定数の方が膜損傷速度定数よりも 3.6-5.5 倍ほど高かった。

##### (3) 水道水中および浄水処理工程水中での増殖特性試験

水道水中での増殖特性試験の結果、19 株中 8 株 (HPC2 株、HPC4 株、HPC5 株、HPC6 株、HPC11 株、HPC12 株、HPC15 株、HPC19 株) 及び P17 株、NOX 株が増殖した。浄水工程水では、菌株によって最大増殖量、比増殖速度、最大増殖量の半値に達するまでの時間が異なることが明らかになった。比増殖速度  $\mu$  は、P17 株、NOX 株では 0.17-0.24 ( $\text{h}^{-1}$ ) であったのに対し、今回単離した株では 0.016-0.092 ( $\text{h}^{-1}$ ) と 2-10 倍程度の差があった。

#### D. 考察

##### 1. 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

推定した年間感染確率の平均値は  $1.68 \times 10^{-5}$  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。カルキ臭低減型プロセスを実現する際にはイオン交換処理と塩素消毒プロセスが追加されるため、さらに安全な水供給が達成されると考えられる。一方、AOC 除去能については、活性炭の AOC 除去能が低下する低水温期においても、カルキ臭低減型プロセスではより安定な除去が可能と考えられる。また、オゾン注入率を 3.0 mg/L に上げた場合に AOC 除去率が向上した理由として、オゾン注入率を上げることにより有機物がよりイオン交換に適した低分子有機物へと変換された結果と推測できる。

##### 2. 代替トレーサー粒子を用いた浄水処理によるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価

実験結果ならびにリスク評価試算結果より、原水濁度が低濁度であるほどトレーサー粒子の除去率が低下し、また凝集剤注入量が不十分な場合には除去性能が低くなる傾向が見

られた。平常時においては濁度変化に応じた適切な PAC 注入率を保つことで微生物リスクを抑えることができると考えられる。しかし、仮に低濁度時に突発的な高濃度クリプトスポリジウム汚染がある場合には、浄水処理で除去しきれず微生物リスクの急激な上昇が考えられるため、水質管理を重点的に行う必要があるといえる。これには、従来の濁度管理による監視方法に加えて、クリプトスポリジウムの粒子径  $5\mu\text{m}$  と同程度の微粒子数の変移を監視することでクリプトスポリジウムの除去性を推測することが考えられる。

### 3. 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 法による定量方法の検討

濃度既知のマーカー生物を投入する T-RFLP 法による濃度定量について検証を重ね、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。今後は、複数種の従属栄養細菌を含む試料の定量分析が可能かを調べ、その後、塩素消毒処理前後の定量分析手法の確立を目指す。

#### （2）*P. aeruginosa* 生物膜の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

生物膜のうち付着強度の弱い部分の不活化効果は浮遊状態の菌と同等であったが、付着強度の高い部分はそれに比べて半減していた。遊離塩素による不活化機構の相違について、付着強度の弱い所で若干の亜致死的損傷細菌の存在が確認されたが、付着強度の強い部分ではいずれも致死的損傷であったことが示唆された。

#### （3）異なる塩素濃度における塩素処理の及ぼす損傷レベルの相違の検討

CT 値が同じでも、不活化効果が異なることが確かめられた。そこで Chick-Watson モデルを仮定し、3種の培地の結果から得られる不活化率、それぞれにおいて係数を求め、各投入濃度における任意の CT 値における推定残存率を求めたところ、例えば CT 値が  $0.2\text{mg}\cdot\text{min}/\text{L}$  の場合では、膜損傷を与えられる作用は、致死的な損傷を与える作用に比べて 10 倍多く与えていると考えられた。

### 4. 配水過程における再増殖微生物の塩素耐性と増殖特性解析

#### （1）採水試料からの HPC の単離と同定

HPC の単離株を分類する際に二重標識 T-RFLP を用いた結果として、*Mycobacterium* 属近縁株が 3 株、*Brevundimonas* 属近縁株が 2 株、*Bacillus* 属近縁株が 3 株単離され、同じ属に近縁であっても遺伝子レベルで差異が確認された。単離株の一部には、既存の研究にて検出、単離された株が含まれた。

#### （2）塩素耐性試験

単離株の塩素処理による膜損傷の程度には差異が見られ、塩素処理による膜損傷速度定数は既存の報告ともほぼ整合した。また、塩素消毒の影響は膜損傷よりもコロニー形成能に顕著に表れることが確認された。膜損傷性とコロニー形成能で差異が見られた要因としては、膜を損傷せずに消毒剤が細胞内に侵入することで不活化していることが推察された。

#### （3）水道水中および浄水処理工程水中での増殖特性試験

水道水から検出される従属栄養細菌の塩素耐性や増殖特性は一様ではなく、塩素耐性が高く、水道水中で増殖する株、塩素耐性は低いものの最大増殖量は大きい株等、差異が見られた。水道水中の細菌群の増殖を支える基質が浄水処理においてどのように除去、生成されているのかを評価するために、実際の浄水工程水中を用いて単離株の増殖性を評価したところ、オゾン処理や塩素処理によって増殖が促進される傾向や、生物活性炭処理によって増殖が抑制される傾向が確認されたが、処理の影響は株によって異なることも確認された。

## 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) カルキ臭低減型浄水処理プロセスを想定し、想定した  $O_3$ /UV 酸化反応塔における大腸菌不活化能を推定するとともに、凝集・沈殿-急速砂ろ過- $O_3$ /UV 処理された飲用水の *C. jejuni* 年間感染確率を推定した。また、カルキ臭低減型プロセスの AOC 除去特性を明らかにした。
- (2) 水道システムでは残留塩素が十分に維持されているケースでも VBNC 化したレジオネラが存在していること、低栄養条件におかれることでレジオネラのヒト細胞に対する感染能が強まることを示した。
- (3) 凝集沈殿・砂ろ過の室内実験において、原水濁度が低濁度であるほどクリプト代替トレーサー粒子の除去率が低下し、また、凝集剤注入量が不十分な場合には除去性能が低下する傾向が見られた。
- (4) クリプトスポリジウムの粒子径 ( $5\mu\text{m}$  程度) と同程度の微粒子数を高感度微粒子計を用いて監視することで、クリプトスポリジウムの浄水処理による除去性能をモニタリングできる可能性が示唆された。
- (5) 濃度既知のマーカー生物を投入する T-RFLP 法による濃度定量について検証を重ね、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。
- (6) 生物膜を形成した菌体を剥離強度によって分類する方法を確立した。塩素処理によって配水管中で剥離せず生物膜の基となる可能性が高い部分について、損傷レベルはいずれも致死性であるものの、不活化速度は浮遊状態の菌や剥離しやすい部分に比べ

て約半分であることがわかった。

- (7) 屋外・屋内の 10 か所の給水栓から単離同定された従属栄養細菌 19 株に対して塩素耐性試験を行った結果、*Mycobacterium* 属や *Methylobacterium* 属に近縁な株が他よりも高い塩素耐性を持っていることが確認された。また、塩素による細菌の不活化効果は膜損傷よりもコロニー形成能により顕著に表れることが確認され、これは既存の知見とも整合していた。
- (8) 単離株の水道水中での増殖性と塩素耐性とを併せて評価することで、単離株の多様な再増殖特性を分類することができた。さらに、浄水処理工程水中における単離株の増殖性を評価したところ、オゾン処理や塩素処理によって増殖が促進される傾向や、生物活性炭処理によって増殖が抑制される傾向が確認された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 浅田安廣、大河内由美子、伊藤禎彦 (2012) 疫学調査に基づいた *Campylobacter jejuni* 感染における感染-発症割合の推定、水環境学会誌、Vol. 35, No. 9, pp. 135-142.
- 2) Yumiko Ohkouchi, Satoshi Tajima, Masahiro Nomura, and Sadahiko Itoh (2012) Comparison of inflammatory responses in human cells caused by lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and from indigenous bacteria in aquatic environment, Journal of Environmental Science and Health, Part A, Vol. 47, pp. 1966-1974.
- 3) 大河内由美子、矢田祐次郎、文亮太、伊藤禎彦 (2012) ナノろ過膜処理を適用した浄水の細菌再増殖特性の評価、用水と廃水、Vol. 54, No. 12, pp. 39-46.
- 4) Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Suguru Ishikawa, Yoshihiro Kawano, and Sadahiko Itoh (2013) Determination of an acceptable assimilable organic carbon (AOC) level for biological stability in water distribution systems with minimized chlorine residual, Environmental Monitoring and Assessment, Vol. 185, pp. 1427-1436.

### 2. 学会発表

- 1) 大河内由美子、矢田祐次郎、文亮太、伊藤禎彦 (2012) ナノろ過処理水の微生物再増殖特性に関する研究、第 63 回全国水道研究発表会講演集、p. 528-529.
- 2) Sadahiko Itoh (2012) Effect of the Ratio of illness to infection of *Campylobacter* on the uncertainty of DALYs in drinking water, 21st KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, CD-ROM.
- 3) Liang Zhou, Sadahiko Itoh (2012) Concentration interpolation method for data below detection limit in Quantitative Microbial Risk Assessment, 21st KAIST-KU-NTU-NUS

Symposium on Environmental Engineering, CD-ROM.

- 4) 浅田安廣、大河内由美子、伊藤禎彦 (2012) 環境水中の *Campylobacter jejuni* 存在実態解明に向けた分離および定量手法の確立、環境衛生工学研究、Vol.26, No.3, pp.144-147.
- 5) 周靨、越後信哉、大河内由美子、伊藤禎彦 (2012) 高度浄水処理プロセスのカンピロバクター感染確率評価における感度分析と不確実性分析、第15回日本水環境学会シンポジウム講演集、p.227-228.
- 6) Y. Ohkouchi, Y. Yata, R. Bun, and S. Itoh (2012) Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration, The 9th International Symposium on Water Supply Technology, CD-ROM.
- 7) L. Zhou, S. Echigo, Y. Ohkouchi, and S. Itoh (2012) Quantitative microbial risk assessment of drinking water treated with advanced water treatment process, The 9th International Symposium on Water Supply Technology, CD-ROM.
- 8) 浅田安廣、大河内由美子、伊藤禎彦 (2012) 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* に対する分離方法の探索ならびに血清型調査、第5回日本カンピロバクター研究会抄録集、p.34.
- 9) 浅田安廣、大河内由美子、伊藤禎彦 (2013) 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* の定量における増菌培養法の比較、第47回日本水環境学会年会、p.71.
- 10) 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、p.530-531.
- 11) 藤村壮、島崎大、秋葉道宏、石川力也、平岩雅貴、西原昌弘 (2013) 代替トレーサー粒子を用いた浄水処理によるクリプトスポリジウム除去性能評価およびリスク評価、第47回日本水環境学会年会、p.519.
- 12) Mawatari S., Otaki M. (2012) Development of quantitative analysis of heterotrophic bacteria by T-RFLP method, Proc. of Water and Environment Technology Conference 2012
- 13) 曹雪、大瀧雅寛 (2013) バイオフィーム状態の細菌に対する塩素処理の不活化効果、第47回日本水環境学会年会、p.189.
- 14) 大坂幸弘、春日郁朗、栗栖太、古米弘明 (2012) 給水栓における滞留に伴う水質変化と細菌再増殖との関係、第63回全国水道研究発表会、p.512-513.
- 15) Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2012) The influence of drinking water stagnation on water quality and microbial growth at faucet, Water and Environment Technology Conference 2012, 30-1B-01, p.41.
- 16) 大坂幸弘、春日郁朗、栗栖太、古米弘明 (2013) 給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性および増殖特性の評価、第47回水環境学会年会、p.297.

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24年度 分担研究報告書

平成25年3月



分担研究報告書 1

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

研究分担者	伊藤	禎彦
研究協力者	越後	信哉
	大河内	由美子
	中西	智宏
	周	靚
	野村	昌弘

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

研究分担者:京都大学大学院 伊藤禎彦

研究協力者:京都大学大学院 越後信哉, 大河内由美子

中西智宏, 周靚, 野村昌弘

**研究要旨:**本研究では、カルキ臭低減能を強化した次世代型浄水処理施設を想定し、QMRA 手法の導入による微生物リスク管理の高度化を図るとともに、微生物学的安定性の観点から AOC の除去特性を調べた。また、給配水過程における再増殖が懸念されるレジオネラ属細菌のモニタリング手法の基礎的検討として、水道システムに存在するレジオネラ属細菌の実態把握ならびに感染性の変化に寄与する因子を調べた。オゾン/UV 処理プロセスを対象として、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条件を用いて、ADR 不活化モデルにより実施設における大腸菌不活化能を推定した。凝集・沈殿-急速砂ろ過-促進酸化処理プロセスの総合除去・不活化能は、中央値は  $8.52 \log_{10}$ 、平均値  $8.55 \log_{10}$ 、年間感染確率の平均値  $1.68 \times 10^{-5} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ 、中央値  $1.28 \times 10^{-8} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$  と推定され、提唱されている許容感染リスク  $10^{-4} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$  を十分に下回った。一方、カルキ臭低減型浄水処理プロセスによる AOC 除去はオゾン注入率  $1.5 \text{ mg/L}$  では十分な除去効果が見られなかったものの、注入率を  $3.0 \text{ mg/L}$  に増大させた場合には一定の効果が得られた。また、水道システムにおけるレジオネラ存在状況を調べた結果、残留塩素が十分に維持されているケースでも VBNC 化したレジオネラが存在していること、また低栄養条件、特にアミノ酸の欠乏がレジオネラ感染能の上昇を誘導することを示した。

## A. 研究目的

浄水中には生菌や不活化された微生物が存在し、給配水過程においてごく微量に残存する同化可能有機炭素(AOC)を炭素源として微生物が再増殖する現象が確認されている。現状では、十分な濃度の残留塩素を維持することで、浄水処理後に残存する病原微生物の十分な不活化ならびに再増殖現象を抑制している。そのため、残留塩素濃度の低減に先だって、浄水処理プロセスにおける必要十分な処理能の確保と配水過程における再増殖微生物の管理を行うためのより厳密な微生物マネジメント手法の適用が求められる。

本研究では、水系感染症を引き起こす代表的な病原微生物である *Campylobacter jejuni* を対象とし、水道水に起因する定量的微生物リスク評価に取り組む。具体的には琵琶湖・淀川水系を水源とする現行の高度浄水処理施設、またはカルキ臭低減能を強化した次世代型浄水処理施設を想定し、各処理プロセスにおける除去・不活化能データを集積し、対象配水区域における *C. jejuni* 年間感染確率を求めることで、微生物学的安全性の評価を行う。同時に、新しい浄水処理プロセスによる AOC 除去特性や微生物再増殖性の変化を把握し、微生物学的安定性の観点から達成可能な水質の評価を行う。

また、配水過程における再増殖微生物としてレジオネラ細菌を取り上げ、配水処理過程での微生物リスク管理の強化を目的とした基礎的検討を行う。

## B. 研究方法

### カルキ臭低減型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

#### 1) OH ラジカルによる不活化効果の検証

促進酸化処理プロセスでは、分子オゾンの分解によりヒドロキシル(OH)ラジカルが生成する。OH ラジカ

ルによる大腸菌不活化効果については議論が続けられており、統一的な知見が得られていないため、本研究では初めにラジカルスカベンジャーである *t*-ブタノール (10 mM) の存在/非存在下において、ラボスケール UV リアクター (図 1) を用いて大腸菌不活化能を比較することにより、OH ラジカルによる不活化効果の推定を試みた。用いた紫外線ランプは、185 および 254 nm の波長の紫外線を照射可能で、254 nm の方が 185 nm より相対的に光強度が大きいものである。

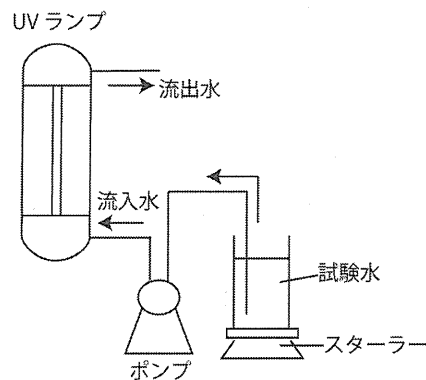


図 1 ラボスケール UV リアクター

## 2) 促進酸化プロセスにおける大腸菌不活化能の推定

本研究ではオゾン/紫外線併用型の促進酸化処理を対象とする。しかし、浄水場で実際に稼働中のオゾン/紫外線処理反応塔は実在しない。そこで、対象浄水場におけるオゾン単独処理のプラントに紫外線ランプを導入した形式の反応塔を想定した。図 2 に想定した反応塔の概略を図示する。反応塔の断面は円形を仮定し、半径を 4.46 m、水面高さを 6 m とした。また、表 1 に想定した反応塔の諸元を記す。

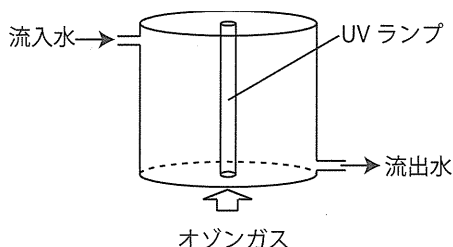


図 2 想定した実施設の酸化反応塔概略図概略図

この想定した反応塔内部の水深  $Z$ (m) おける溶存オゾン濃度および大腸菌濃度は、昨年度報告した ADR 不活化モデル式<sup>1)</sup> をベースとして新たに構築した以下のモデル式で表すこととした。

一方、実施設における大腸菌不活化能を推定するためには、実施設の運転条件や流入水質、流動特性を考慮する必要がある。そこで、実験プラントの気液向流式オゾン接触塔を用いて大腸菌添加実験を行い、大腸菌濃度および溶存オゾン濃度を測定し、オゾンおよび OH ラジカルによる不活化速度定数ならびに紫外線による不活化速度定数を得るとともに、構築した不活化モデルの適用性を検証した。用いた実験プラントは図 3 に示すカルキ臭低減型プロセスのうち、酸化 1 塔目である。1 m 間隔で計 5 つの採水孔があり、紫外線ランプは上部から 1 番採水孔の約 15 cm 下方までに設置されている。

表 1 想定した反応塔の諸元

物理量 (単位)	値
半径 (m)	4.39
断面積 (m <sup>2</sup> )	60.6
水面高さ (m)	5.9
処理水流量 (m <sup>3</sup> /h)	$7.66 \times 10^3$
接触時間 (min)	2.8
オゾンガス流量 (m <sup>3</sup> /h)	644
気液比	0.15
オゾン注入率 (mg/L)	0.25
オゾンガス濃度 (mg/L)	1.67
ランプ発光長 (m)	5.9

### [ADR 不活化モデル]

オゾン濃度の式 (式 1) :

$$d \frac{\partial^2 C_L}{\partial Z^2} - \frac{\partial C_L}{\partial Z} + \frac{k_L a L}{U_L} \left( \frac{C_G}{m} - C_L \right) - \frac{k_D L}{U_L} C_L = 0$$

$$d \frac{d \left( \frac{C_G}{m} \right)}{dZ} - \frac{k_L a L}{m U_G} \left( \frac{C_G}{m} - C_L \right) = 0$$

大腸菌濃度の式 (式 2) :

$$d \frac{\partial^2 N}{\partial Z^2} - \frac{\partial N}{\partial Z} - \frac{Lk_{total}}{U_L} C_L N - \frac{Lk_w I}{U_L} N = 0$$

$$I(r) = \frac{P/L}{2\pi r} \exp(\sigma_w(r-r_L))$$

ここで、 $C_L$ : 溶存オゾン濃度 (mg/L),  $C_G$ : 気相中のオゾン濃度 (mg/L),  $z$ : 無次元化した水深,  $L$ : 水面高さ (m),  $d$ : dispersion number,  $U_L$ : 処理水の流速 (m/s),  $U_G$ : オゾンガス流速 (m/s),  $k_{La}$ : 総括オゾン移動容量係数 (1/s),  $k_D$ : オゾン分解速度定数 (1/s),  $m$ : ヘンリー定数,  $N$ : 微生物濃度 (CFU/mL),  $k_{total}$ : オゾンと OH ラジカルによる大腸菌不活化速度定数 ( $Lmg^{-1}s^{-1}$ ),  $k_{UV}$ : 紫外線による大腸菌不活化速度定数 ( $cm^2/mJ$ ),  $L$ : ランプの有効発光長 (cm),  $I$ : 波長 254 nm の紫外線照射率 ( $mW/cm^2$ ),  $P$ : 波長 254 nm の紫外線総出力 (mW),  $\sigma_w$ : 試料水の吸光係数 (1/cm),  $r_L$ : ランプのスリーブ半径 (cm)

### 3) カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした定量的微生物リスク評価

1), 2) で収集したデータに基づいて、促進酸化処理を軸としたカルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象として、*C. jejuni* の年間感染リスクを推定した。ただし、本来の同プロセスは凝集・沈殿-急速砂ろ過-オゾン/紫外線による促進酸化の各処理に加えて、陽/陰イオン交換と塩素消毒の各処理から構成されるが、今年度は促進酸化処理プロセスまでを取り上げた。

原水の *E. coli* 濃度および凝集・沈殿プロセスの大腸菌除去能および C/E 比<sup>2)</sup>については、今年度蓄積したデータも追加して適切な確率密度関数(PDF)を設定し直した。急速砂ろ過プロセスにおける除去能、非加熱飲水量については昨年度と同様の PDF を設定した<sup>2)</sup>。一方、促進酸化プロセスにおける不活化能は 2) で得た値を元に PDF の設定を行った。これらを統合してモンテカルロシミュレーションにより 10 万回の計算を行った。得られた *C. jejuni* の一日当たり摂取量に対して、用量-反応モデル<sup>3)</sup> ( $P_d = 1 - \exp(-0.686 \times D)$ ,  $D$ : 用量) を適用して一日感染確率と年間感染確率を算出した。PDF の適合およびモンテカルロシミュレーションには、Crystal Ball (Decisionoering 社) を使用した。

### カルキ臭低減型浄水処理プロセスによる AOC 除去特性

カルキ臭前駆物質の低減除去に効果が確認されているオゾン/UV 処理+イオン交換処理のプロセス<sup>4)</sup>を対象として、AOC の除去特性を調べた。採水は、2012 年 10 月, 11 月, 2013 年 1 月に各 1 回実施した。調査対象プロセスは以下の 2 通りであり、ともに急速砂ろ過 (SF) 水を処理している。対象プロセスの概要図と運転条件を図 3, 表 2 にそれぞれ示す。

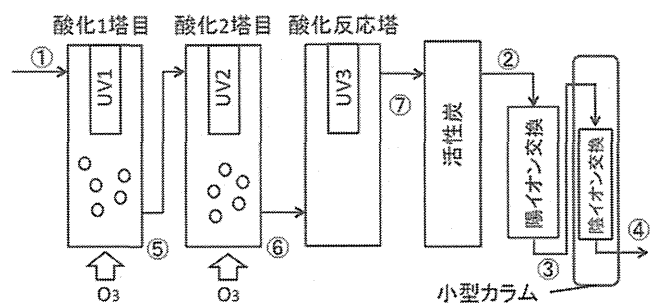


図 3 カルキ臭低減型プロセス

(A) 1.5 mg-O<sub>3</sub>/L O<sub>3</sub> 処理 + GAC 処理 (採取サンプル: O<sub>3</sub> 後, GAC 後)

(B) 1.5 mg-O<sub>3</sub>/L O<sub>3</sub>/UV 処理 + 陽イオン交換処理 + 陰イオン交換処理 (活性炭処理なし)

(C) 3.0 mg-O<sub>3</sub>/L O<sub>3</sub>/UV 処理 + 陽イオン交換処理 + 陰イオン交換処理 (活性炭処理なし)

(B/C の採取サンプル: O<sub>3</sub>/UV(AOP)後 (図 3 の⑦), 陰イオン交換(IEX)後 (同④))