

なお、陰イオン交換処理水の pH は約 3 であるため、水酸化ナトリウムを添加して pH を 6~7 に再調整した後に、AOC 測定菌株を植種した。

表 2 プラント運転条件

地点	特徴
流入水	急速砂ろ過水、流量：1.0 m ³ /h
酸化1塔目、2塔目	それぞれ150A×6300H (mm), HRT：6 min (向流接触) UV254 nmと185 nmが主波長の低圧水銀ランプ
酸化反応塔	200A×6000H (mm), HRT：11 min UV254 nmが主波長の低圧水銀ランプ
活性炭塔	400A×5500H (mm), 活性炭量：0.26 m ³ , SV：3.8 /h
陽イオン交換塔	350A×1900H (mm), 流量：0.20 m ³ /h, SV：2 /h 強酸性ゲル型陽イオン交換樹脂(100 L充填)
陰イオン交換カラム	40A×500H (mm), 流量：3.6 L/h, SV：7.2 /h 強塩基性ポラス型陰イオン交換樹脂(500 mL充填)

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

残留塩素を低減した給配水システム内での再増殖が懸念されるヒトに対する感染能を有する *Legionella* 属細菌のモニタリング強化を目的として、水道システムにおける *Legionella* 属細菌の存在実態を調査するとともに、感染能に影響を与える因子として水中の氨基酸欠乏の影響を調べた。

初めに、使用頻度が異なる給水栓計 10 箇所を対象として水道水を採取し、レジオネラ全菌数、レジオネラ生菌数、培養可能レジオネラ菌数、従属栄養細菌数、ならびに残留塩素濃度を測定した。レジオネラ生菌数は、EMA-PCR 法をベースとして Viable *Legionella* Selection Kit for PCR (タカラバイオ) により EMA 修飾した試料から DNA を抽出し、Cycleave PCR® *Legionella* (5S rRNA) Detection Kit Ver.2.0 (タカラバイオ) を用いたリアルタイム PCR により定量した。なお、レジオネラ全菌数の測定は同一試料を EMA 処理なしでリアルタイム PCR に供した。培養可能レジオネラ菌数は濃縮試料を酸処理した後、GVPC 平板培地に塗布して 37°C で 7 日間培養した。

続いて、既往文献で示唆されている氨基酸欠乏状態の誘導によるレジオネラの感染能の変化⁵⁾を調べるため、感染試験用レジオネラ懸濁液調製時の L-システイン濃度 (0~400 mg/L, 通常の培養試験では 400 mg/L) および低栄養条件暴露期間 (集菌後, PBS 中に懸濁) を変化させた *Legionella pneumophila* (JCM7571) 懸濁液を用いて、感染能評価を行った。レジオネラ感染能はヒト急性単球性白血球細胞 (THP-1) を分化させたマクロファージ細胞を用いた共培養系 (手順概略は図 4) により評価した。感染直後 (0 時間) および感染後 48 時間培養した細胞からそれぞれ回収したレジオネラ細菌数を BCYE 平板培地で測定し、細胞侵入率 (= 感染 0 時間の細胞内細菌数/感染試験に供した細菌数 × 100%) と細胞内増殖率 (= 感染 48 時間の細胞内細菌数/感染 0 時間の細胞内細菌数 × 100%) を求めるとともに、これらを合わせた総合的な感染指数 (= 感染 48 時間の細胞内細菌数/感染試験に供した細菌数) を比較した。

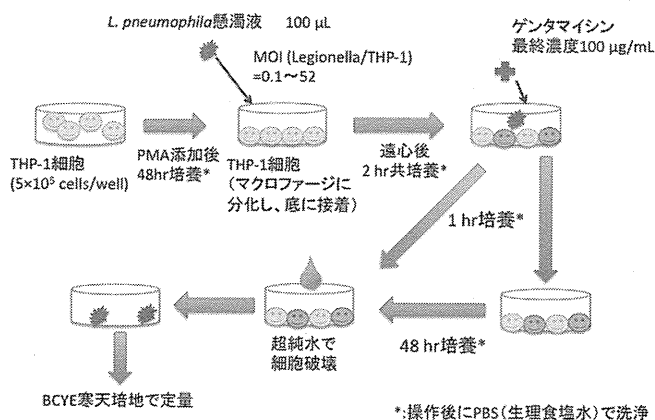


図 4 感染能評価のための共培養方法手順

C. 研究結果

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

計 3 回実験を行った結果を表 3 に示す。いずれの場合でも、*t*-ブタノール存在下でより大きな不活化効果が確認された。大腸菌初期濃度はスカベンジャー添加の有無で大きく変化しなかったことから、

t-ブタノールが存在する水に紫外線を照射することで、大腸菌の生育を阻害する物質が非意図的に生成されている可能性がある。このように、OH ラジカルの不活化効果を判定できなかったため、以下では分子オゾンによる不活化効果と OH ラジカルによる不活化効果を一体化させて扱うこととし、総合的な不活化速度定数 k_{total} を設定した。

表 3 OH ラジカルによる大腸菌不活化効果

採水時間(s)	不活化Log ₁₀ 数					
	スカベンジャーなし			スカベンジャーあり		
	Run-1	Run-2	Run-3	Run-1	Run-2	Run-3
0	0	0	0	0	0	0
10	-	-	4.60	-	-	>6.54
15	-	3.57	-	-	4.66	-
20	-	-	4.63	-	-	>6.54
30	2.77	4.15	5.14	>6.00	4.80	>6.54
50	4.15	-	-	>6.00	-	-

*ポンプ流量: 1.8 L/min (Run-1), 2.4 L/min (Run-2), 3.0 L/min (Run-3)

2) 促進酸化プロセスにおける大腸菌不活化能の推定

実験プラントを用いて収集した促進酸化プロセスにおける溶存オゾン濃度ならびに大腸菌不活化能に関するデータを表 4 に示す。昨年度実施したオゾン単独処理時には 1 番採水孔における溶存オゾン濃度が $0.057 \pm 0.031 \text{ mg/L}^2$ であったのに対して、促進酸化処理の場合の溶存オゾン濃度の平均は 0.01 mg/L とかなり低下していたことから、紫外線照射によりわずかながらも OH ラジカルが生成しオゾンが分解されている状態と判断した。一方、大腸菌の不活化能で見ると、オゾン単独処理の場合と比較して紫外線ランプ付近(1 番および 2 番採水孔)の不活化 log₁₀ 数が大幅に上昇しており、反応塔上部においては紫外線照射による不活化が支配的であり、この酸化塔上部では紫外線単独処理に、紫外線ランプが存在しない下部(図 3 参照)ではオゾンと OH ラジカルによる処理に近い状況と見なすことができる。

以上の仮定に基づいて、水深により 2 つのオゾンの分解速度定数を設定し、不活化モデル式(1)(2)に各パラメーターを代入して解析を行った。図 5 に例示したように、推定した溶存オゾン濃度とプラント実験実測値とが適合していることを確認した後、紫外線あるいはオゾン/OH ラジカルによる大腸菌の不活化速度定数の探索を行い、各 Run に対して表 5 に示す大腸菌不活化速度定数を得た。

続いて、これらの不活化速度定数を利用して、図 2 で想定した実施設酸化反応塔における大腸菌不活化能の推定を行った。ここで、実施設の dispersion number は昨年度と同様、実験プラントで得られた 0.037 を下限値²⁾、また実施設と形状

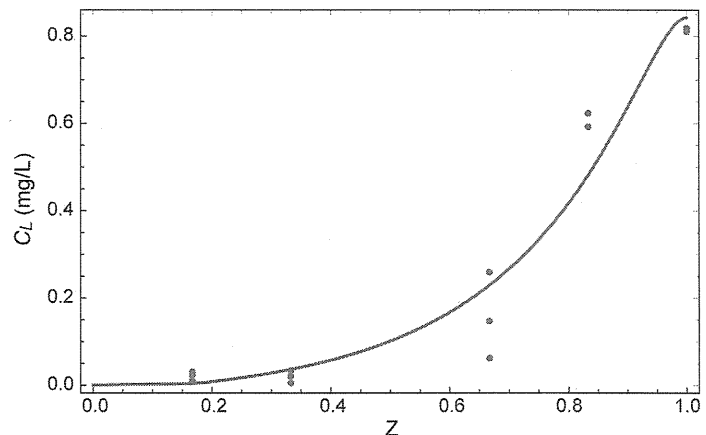


図 5 溶存オゾン実測濃度とモデル推定濃度の比較例

表 4 実験プラントを用いた促進酸化処理による大腸菌の不活化実験

採水孔	Run-1		Run-2		Run-3		Run-4	
	平均O ₃ 濃度 (mg/L)	不活化log数	平均O ₃ 濃度 (mg/L)	不活化log数	平均O ₃ 濃度 (mg/L)	不活化log数	平均O ₃ 濃度 (mg/L)	不活化log数
1	0.006	3.08	0.021	2.79	0.002	5.74	0.028	4.20
2	0.009	2.97	0.019	3.68	0.049	5.75	0.022	3.05
4	0.027	5.51	0.156	5.01	0.131	7.59	0.267	4.81
5	0.472	5.43	0.697	5.11	0.677	6.67	0.763	4.94

表 5 プラント実験で得た不活化速度定数

Run	k _{uv} (cm ² /mJ)	k _{total} (Lmg ⁻¹ s ⁻¹)
1	0.120	0.397
2	0.093	0.529
3	0.246	0.238
4	0.082	0.264

表 6 推定した実施設における大腸菌不活能

k _{uv} (cm ² /mJ)	k _{total} (Lmg ⁻¹ s ⁻¹)	不活化log数
0.120	0.397	3.88
0.093	0.529	3.31
0.246	0.238	5.98
0.082	0.264	3.05

が近い施設で推定された文献値 1.45⁶⁾を上限值とした幾何平均値 0.23 を用いることとした。その結果、推定された不活化 log₁₀ 数を表 6 に示す。

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

原水の *E. coli* 濃度、凝集・沈殿、急速砂ろ過、促進酸化の各処理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選定した PDF を表 7 に示す。各処理プロセスにおける除去・不活化能に対して与えた PDF に基づいてモンテカルロシミュレーションを行い、3 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。得られた総合除去・不活化能の分布を図 6 に示す。中央値は 8.52 log₁₀、平均値 8.55 log₁₀ が得られた。処理水中の *E. coli* 濃度の平均値は 3.28 × 10⁻⁵ *E. coli*/L、中央値は 3.50 × 10⁻⁷ *E. coli*/L と計算された。

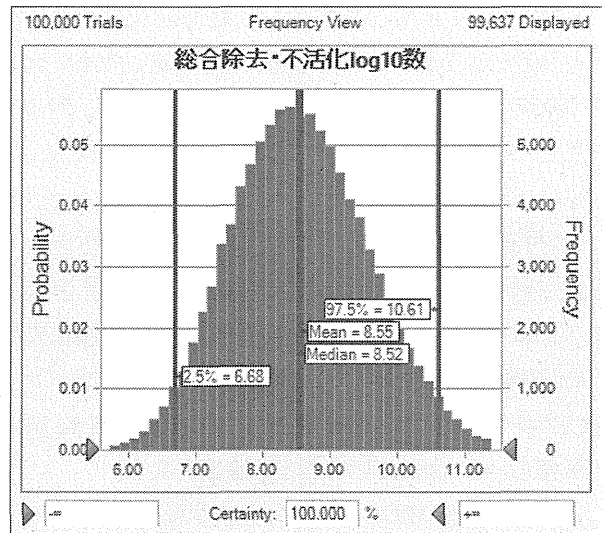


図 6 浄水処理総合除去・不活化能の推定結果

表 7 選定した PDF とパラメータ推定値のまとめ

要素	適合分布形	パラメータとその推定値
原水中 <i>E. coli</i> 濃度	対数正規分布	平均値:1451, 標準偏差:19403
凝集・沈殿	β 分布	最小値:0.65 最大値:5.25 α=6.23, β=7.51
急速砂ろ過	三角分布	最小値:0.5 最大値:2.9 最尤値:1.6
促進酸化処理	三角分布	最小値:4.7 最大値:8.9 最尤値:5.2
C/E 値	対数正規分布	平均値:4.46 × 10 ⁻³ , 標準偏差:3.51 × 10 ⁻¹
非加熱飲水量	指数分布	比率:3.06 × 10 ⁻³

この値に非加熱飲水量を乗じ、さらに河川水の C/E 比を用いることで *E. coli* 摂取量を *C. jejuni* 摂取量に換算した。続いて *C. jejuni* の用量-反応モデルを用いて年間感染確率を計算した。得られた QMRA 推定値をまとめて表 8 に示す。年間感染確率は平均値 1.68×10^{-5} 人⁻¹年⁻¹、中央値 1.28×10^{-8} 人⁻¹年⁻¹と推定された。最後に、*C. jejuni* 年間感染確率に対して感度分析を行った結果、図 7 に示すように寄与率が最も大きい要素は原水の C/E 比、続いて原水 *E. coli* 濃度となった。一方、今回対象とした 3 つの処理プロセスの中では、促進酸化処理の影響が最も大きいと評価された。表 7 に示したように、促進酸化処理の不活化 log₁₀ 数が 3.05~5.98 log₁₀ と大きな変動幅を有するためである。

表 8 QMRA による推定値

	P _{2.5}	中央値	平均値	P _{97.5}
総合除去・不活化log ₁₀ 数	6.68	8.52	8.55	10.61
水道水 <i>E. coli</i> 濃度(<i>E. coli</i> /100mL)	6.30×10^{-10}	3.50×10^{-7}	3.28×10^{-5}	1.42×10^{-4}
<i>E. coli</i> 摂取量(<i>E. coli</i> /日)	6.71×10^{-10}	6.44×10^{-7}	9.95×10^{-5}	3.95×10^{-4}
<i>C. jejuni</i> 摂取量(<i>C. jejuni</i> /日)	1.49×10^{-14}	5.12×10^{-11}	7.03×10^{-8}	1.22×10^{-7}
<i>C. jejuni</i> 一日当たり感染確率(人 ⁻¹ 日 ⁻¹)	1.02×10^{-14}	3.51×10^{-11}	4.82×10^{-8}	8.36×10^{-8}
<i>C. jejuni</i> 年間感染確率(人 ⁻¹ 年 ⁻¹)	3.73×10^{-12}	1.28×10^{-8}	1.68×10^{-5}	3.05×10^{-5}

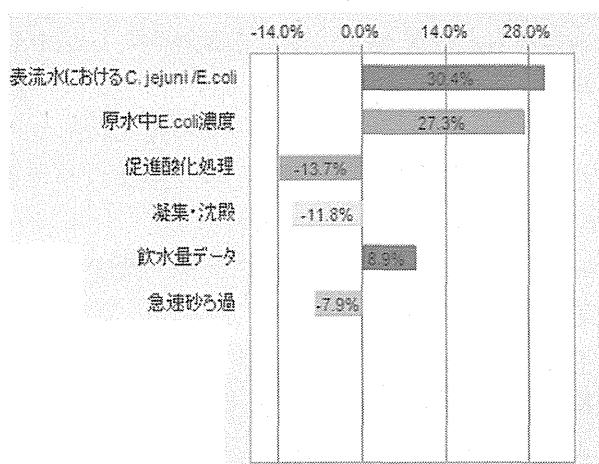


図 7 *C. jejuni* 年間感染確率に対する感度分析結果

カルキ臭低減型浄水処理プロセスによる AOC 除去特性

秋季 (10 月)、冬季 (11 月/1 月) の AOC 測定結果を図 8 に示す。右図の棒グラフは 2 回の測定平均と範囲を表している。冬季に GAC 処理により AOC 濃度の大幅な上昇が見られたため (原因不明)、提案するカルキ臭低減型プロセスの微生物学的安定性向上効果の優位性を現行の高度処理プロセスと比較することは困難であった。ただし、一般に冬季には生物活性炭の AOC 除去能が低下し、わずかな AOC 除去しか期待できないのに対して、カルキ臭低減型プロセスは水温の影響を受けにくく、一定の AOC 除去効果が得られたと評価できる。

また、冬季にオゾン注入率を 2 段階に設定して処理を行った結果、オゾン注入率 1.5 mg/L の場合には AOC 除去能は小さかったものの、3.0 mg/L に増大させることにより安定して高い AOC 除去能が得られ、処理水の平均 AOC は約 50 μgC/L となった。従来型の O₃-GAC 型の高度浄水処理プロセスを対象とした調査結果では冬季の AOC は 100 μgC/L 超であった⁷⁾ことから、今回の促進酸化処理の導入により AOC 除去能は向上したと判断される。一昨年度に報告したオゾン-GAC 後

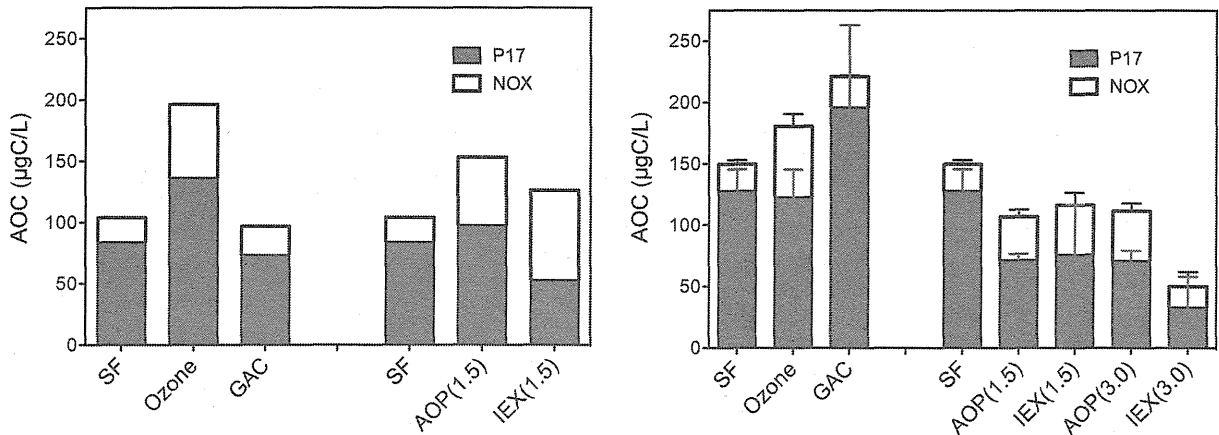


図8 カルキ臭低減型プロセスによるAOC除去特性(左:秋季(10月), 右:冬季(11月/1月))

にナノろ過処理システムを増設した場合の処理水AOCと同等の除去効果が得られた⁸⁾。

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

各水道水試料の残留塩素濃度とレジオネラ全菌数, レジオネラ生菌数の関係を図9に示す。塩素が十分に残留している場合でも, PCR法では全ての試料からレジオネラ属生菌が検出された。レジオネラ全菌数の濃度範囲は $3.8 \times 10^2 \sim 5.1 \times 10^3$ copies/L, 生菌数の濃度範囲は $4.2 \times 10^2 \sim 2.4 \times 10^3$ copies/Lとほぼ同じレベルで検出された。なお, 今回の採水試料では培養可能なレジオネラは検出されなかった。そのため, 図中に示したレジオネラ生菌は全てが viable but nonculturable (VBNC)状態にあるとみなされる。

次に, *L. pneumophila* 懸濁液調製時に添加するL-システイン濃度を変化させて誘導したアミノ酸欠乏状態が, レジオネラ感染能に与える影響を図10(a)に示す。L-システインは人工培地を用いたレジオネラの検出には必須とされているが, 添加濃度により大きく細胞内生存率が変化する結果となった。今回試した濃度範囲では25 mg/Lにおいて最も高い細胞内生存率が得られたが, 細胞侵入率には変化が見られなかった。一方, 低栄養条件暴露の期間が感染能に与える影響を図10(b)に示す。10日間低栄養条件下においたレジオネラ懸濁液を感染させた場合に, 300%の細胞内増殖が見られた。しかし同様に, 細胞侵入率には変化が見られなかった。さらに, これらを組み合わせることで異なるアミノ酸欠乏状態を誘導し, 感染能を調べた結果を表9に示す。システイン25 mg/Lの培地で調製したレジオネラ懸濁液をさらに8日間低栄養条件におくことで, 細胞内

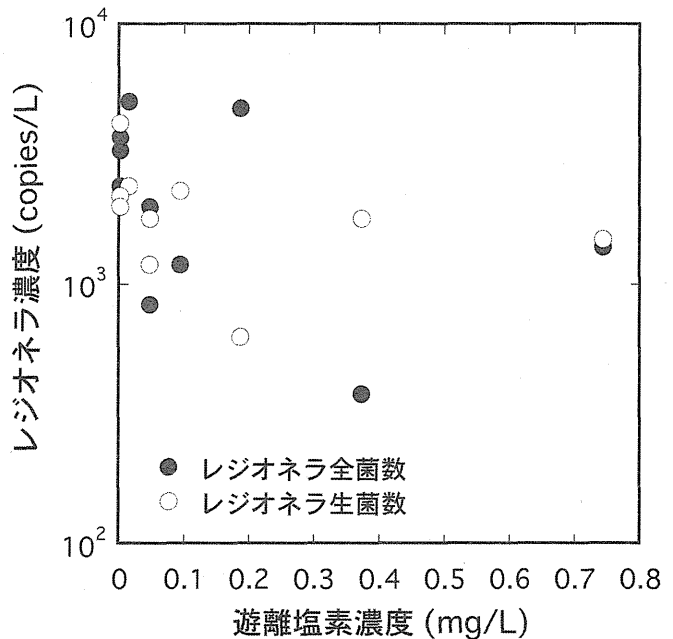


図9 水道水試料の遊離残留塩素濃度とレジオネラ存在状態

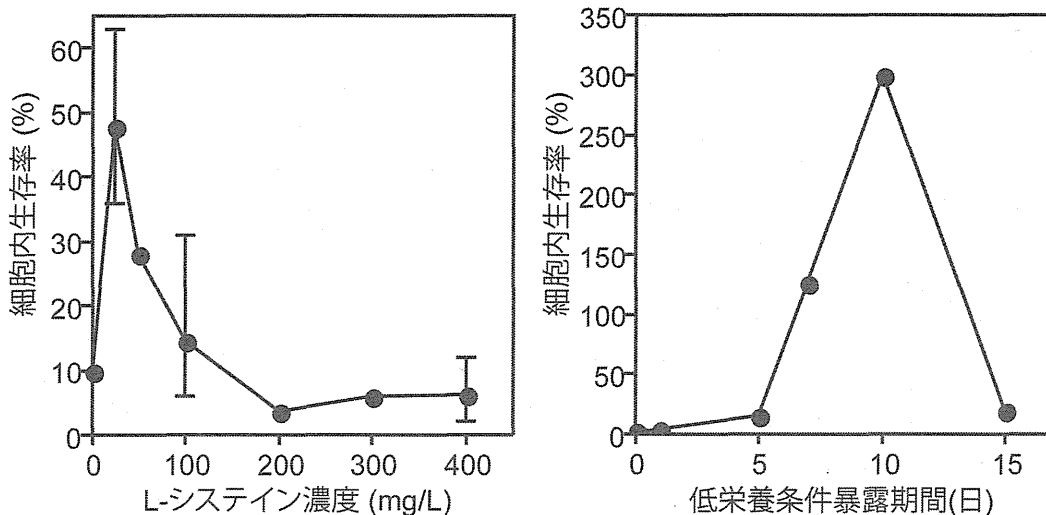


図 10 アミノ酸欠乏の誘導がレジオネラ細胞内生生存率に与える影響

(a):レジオネラ懸濁液調製時のシステイン添加濃度の影響, (b)低栄養条件暴露期間の影響

表 9 アミノ酸欠乏の誘導がレジオネラ感染能に与える影響

培養条件	添加細菌数 (CFU/well)	感染0時間後細胞内菌数 (CFU/well)	感染48時間後細胞内菌数 (CFU/well)	細胞侵入率 (%)	細胞内生生存率 (%)	感染指数
システイン400 mg/L	8.0E+06	6.7E+05	5.0E+04	8.3	7.5	0.63
システイン25 mg/L	3.2E+07	2.8E+06	1.9E+06	8.9	68.2	6.04
システイン400 mg/L+低栄養8日	1.2E+06	5.8E+04	4.0E+04	5.0	68.5	3.41
システイン25 mg/L+低栄養8日	2.2E+03	1.1E+02	7.6E+02	4.9	708	34.85

増殖が700%超まで上昇し、結果として感染指数も大幅に上昇した。

D. 考察

本研究ではカルキ臭低減を目的として、促進酸化処理を軸と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の推定を行うとともに、微生物学的安定性を左右するAOCの除去特性を調べた。特に、オゾン/紫外線処理を中心にプラント実験を実施して収集したパラメータと、構築した不活化モデルを用いて、想定した実施設における大腸菌の不活化能を推定した。参考までに推定した実施設の溶存オゾン濃度および大腸菌濃度を図11に示すが、溶存オゾ

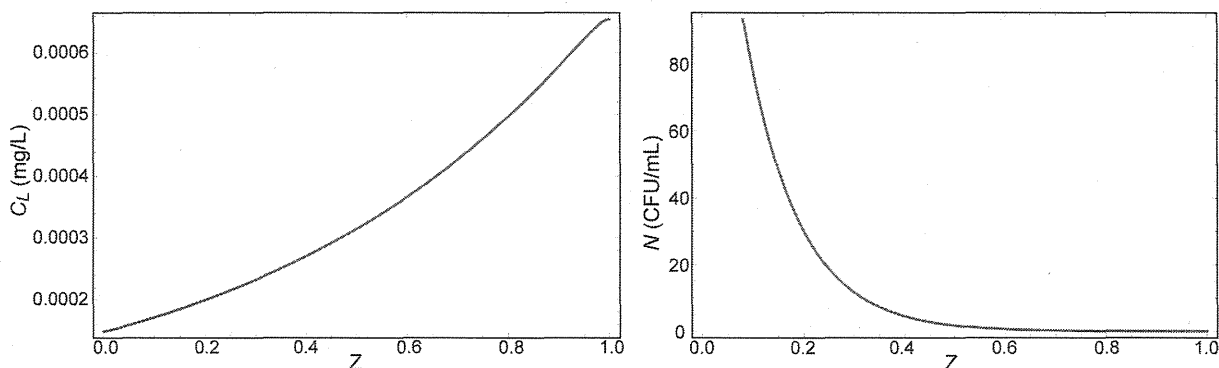


図 11 想定した実施設におけるオゾン濃度/大腸菌濃度の推定結果(左:オゾン濃度, 右:大腸菌濃度)

ン濃度は紫外線照射により分解されてほとんど残存しておらず、想定した運転条件下では大腸菌は主に紫外線と OH ラジカルにより不活化されているとみなされる。OH ラジカルがどれくらい不活化に寄与しているかは未だ結論が得られていないが、表 6 によるとオゾンと OH ラジカルによる総合的な不活化速度定数 k_{total} よりも紫外線による不活化速度定数 k_{UV} の増大が不活化能向上に寄与していることは明白であり、想定した酸化反応塔では紫外線による不活化が支配的であったと推測される。

また、*C. jejuni* の年間感染確率を推定する際に想定した浄水処理プロセスは、凝集-沈殿、急速砂ろ過、オゾン/紫外線併用の促進酸化処理の 3 ステップであるが、表 8 に示したように、平均値、中央値、97.5 パーセンタイル値のいずれも国際的に提唱されている許容リスクレベル 10^{-4} 人⁻¹年⁻¹を下回っており、本研究で想定したプロセスで安全レベルを確保できると言える。さらに、促進酸化を軸としたカルキ臭低減型プロセスを実現するには、促進酸化処理の後段に陽/陰イオン交換処理ならびに塩素消毒を行うため、年間感染確率はさらに低下し安全性が確保されると期待できる。

一方、AOC 除去についてはオゾン注入率が 3 mg/L の条件においてのみ、比較的安定した除去が確認された。当研究室で同時に実施しているカルキ臭や TOC 測定結果を参照すると、オゾン注入率 1.5 mg/L であっても十分な低減効果が見られており、注入率を上げて大きな改善効果は得られていない⁹⁾。なお本実験では、いずれの測定回においても陽イオン交換後に試料水 pH が 3 付近に低下しており、その後 pH を再調整することなくそのまま陰イオン交換樹脂に通水している。そのため、本来安定除去されるはずの AOC_{NOX} 成分の主要構成物質であるカルボキシル化合物の解離が起こりにくい条件であり、これが注入率 1.5 mg/L 条件におけるイオン交換処理により AOC_{NOX} 成分の除去が見られない原因と考えられる。ただし、注入率条件 3.0 mg/L では AOC_{NOX} 成分の除去効果が得られていることから、注入率を上げることで生成する低分子有機物の質が変化しているという上記の推測が支持される。

最後に、給水栓試料を対象としてレジオネラの存在実態を調査した結果、浄水処理の最終プロセスである塩素消毒によりレジオネラ細菌は培養検査法では陰性となっているものの、残留塩素が十分に維持されている状態においても致命的な膜損傷を必ずしも受けているわけではなく、水道システム内で VBNC 状態となって広く存在していることが判明した。こうした VBNC 状態にあるレジオネラは少なくともアメーバに対する弱いながらも感染能を持っていること、またアメーバ内で増殖することにより感染能を回復することが知られており¹⁰⁾、残留塩素の消失など水質の悪化に伴って給配水システム内においても容易に増殖する危険性がある。また、アミノ酸、特に L-システイン欠乏状態に陥ったレジオネラ細胞は、ヒト細胞に感染後に強い増殖力を発揮することも判明した。これまでに低栄養条件暴露により徐々にレジオネラの VBNC 化が進むこともわかっているため、培養法による検査では水道システムに存在するレジオネラの感染性を適正に評価できないことが改めて確認される結果となった。給配水過程においてバイオフィーム内に存在する VBNC 細胞、あるいはアメーバ体内を介した VBNC 細胞等の感染能やそれらの変化を反映できるモニタリング手法が必要と考えられる。

E. 結論

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。特に、オゾン/UV の促進酸化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想定した実施設酸化反応塔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 $8.55 \log_{10}$ と計算された。得られたデータに基づいて推定した年間感染確率の平均値 $1.68 \times 10^{-5} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ 、中央値 $1.28 \times 10^{-8} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ であり、提唱されている許容感染リスク $10^{-4} \text{ 人}^{-1} \text{ 年}^{-1}$ を十分に下回る値が得られた。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 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 mg/L に増大させた場合には一定の効果が得られ、特に水温が低下する冬季については従来型のオゾン-GAC 処理よりも安定かつ高い AOC 除去を達成できることを示した。

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、特にアミノ酸欠乏条件がレジオネラ感染能の上昇を誘導することからも、水道システム内の感染性レジオネラとその感染能変化に対応可能なモニタリング手法の必要性を改めて確認した。

F. 健康危険情報

特になし

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、pp.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, pp.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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

参考文献

- 1) Kim, J. H., Tomiak, R. B., and Mariñas, B. J.: Inactivation of *Cryptosporidium* oocysts in a pilot-scale ozone bubble-diffuser contactor –I: Model development, *J. Environ. Eng.*, Vol. 128, pp.522-532, 2002.
- 2) 周靨: 高度浄水処理プロセスにおける定量的微生物リスク評価に関する研究, 京都大学大学院工学研究科修士論文, 2012.
- 3) 伊藤禎彦: 定量的感染リスク評価の感度分析における非加熱飲料水消費量データの影響, 用水と廃水, Vol. 52, No. 8, pp.55-65, 2010.
- 4) Echigo, S., Itoh, S., Ishihara, S., Aoki, Y., and Hisamoto, Y.: Reduction of chlorinous odor by the combination of oxidation and ion-exchange treatment, *Proceedings of The 9th International Symposium on Water Supply Technology*, 2012.
- 5) Fernandez-Moreira, E., Helbig, J. H. and Swanson, M. S.: Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes, *Infect. Immun.*, Vol.74, No.6, pp.3285-95, 2006.
- 6) Tang, G., Adu-Sarkodie, K., Kim, D., Kim, L. H., Teefy, S., Shukairy, H. M., and Mariñas, B. J.: Modeling *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation and bromate formation in a full-scale ozone contactor, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 39, pp.9343-9350, 2005.
- 7) Ohkouchi, Y., Ly, B. T., Ishikawa, S., Aoki, Y., Echigo, S., and Itoh, S.: A survey on levels and seasonal changes of assimilable organic carbon (AOC) and its precursor in drinking water, *Environ. Technol.*, Vol. 32, Nos. 13-14, 2011.
- 8) Ohkouchi, Y., Yata, Y., Bun, R., and Itoh, S.: Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration, The 9th International Symposium on Water Supply Technology, CD-ROM, 2012.

- 9) 井尻智之: 促進酸化処理とイオン交換処理の組み合わせによる水道水中のカルキ臭と消毒副生成物の制御, 京都大学大学院工学研究科修士論文, 2013.
- 10) Steinert, M., Emody, L., Amann, R. and Hacker, J.: Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.63, No.5, pp.2047–2053, 1997.

分担研究報告書 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

研究代表者 島崎 大
研究協力者 藤村 壮

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

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
研究協力者 国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野 藤村 壮

研究要旨

耐塩素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、簡易実験装置によるクリプトスポリジウムの代替トレーサー粒子（クリプトレーサー 1 号）の浄水処理による除去能力評価実験を行い、除去能力に伴う水系感染リスク評価を行った。実際の河川原水について濁度と凝集剤注入率を変化させて処理状況の変化を確認した。除去率は $1.91\log \sim 6.69\log$ （参考値）という結果であり、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。また、リスク評価については、この実験結果と原水中クリプトスポリジウム濃度のデータについて平均値から求めた点推定値と三角分布を当てはめたモンテカルロシミュレーションによる区間推定値によって水道水中クリプトスポリジウム濃度を求め、障害調整生存年数 DALY による評価を行った。本試算では原水濁度が低い時ほどリスクが高くなる傾向が見られ、特に低濁度時に PAC 注入率が不足している場合においては、WHO 飲料水水質ガイドラインに示されている目標値を満たすことができないという結果であった。

A 研究目的

我が国の水道では、塩素消毒と残留塩素の保持によって病原微生物や指標微生物に対して十分な不活化ならびに再増殖の抑制に寄与している。しかしながら、近年ではクリプトスポリジウム等の耐塩素性病原微生物による大規模な集団感染事例も発生し水道水の安全性確保のための対応が求められている。我が国では、「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」に基づき、濁度管理の徹底などによりその安全性を確保しているが、欧米の一部諸外国においては定量的微生物リスク評価による水道水質の安全性を明示している事例がある。

そこで本研究は、耐塩素性病原微生物であるクリプトスポリジウムを対象とした微生物リスク評価を行うことを目的とする。リスク評価の方法としては、実際の浄水処理工程を想定した簡易実験装置を用いてクリプトスポリジウムを模した代替トレーサー粒子（クリプトレーサー 1 号）の除去性能評価実験を行い、得られた実験結果と既往の研究結果を用いてリスク評価を行う。

B 研究方法

(1) 実験概要

実験の基本フローは図1の通りである。原水にクリプトスポリジウムを想定した擬似トレーサー粒子（クリプトレーサー1号）を添加し、ジャーテストによる凝集・沈殿をおこない、上澄水を採取して急速砂ろ過を行う。原水、沈殿水、ろ過水を採水してクリプトレーサー粒子を計数し処理工程における除去性能を評価する。また、浄水処理に関する指標データとして原水、沈殿水、ろ過水の濁度、微粒子数を計測する。

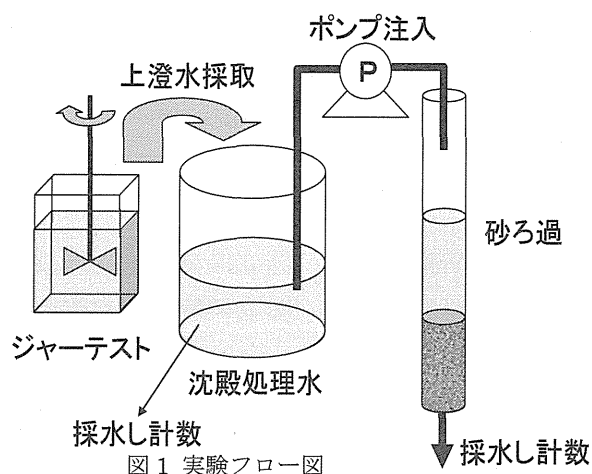


図1 実験フロー図

浄水処理の条件設定としては原水濁度を 10 度、30 度、100 度の各状況に変化させ、またこれら濁度において PAC 注入率を変化させ除去性能の比較を行った。

(2) 実験条件

・原水

原水は関東地方にある A 浄水場原水（河川表流水）の濁度 10 度、30 度を用いた。また高濁度原水を想定して国立保健医療科学院の水道水を脱塩素処理した水とカオリンで調整した 100 度の水の 3 パターンで実験を行った。原水に関する主な水質項目は表 1 の通りであった。

表 1 各サンプルの水質

サンプル	濁度	pH	電気伝導度 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	アルカリ度 (mg/L)	全有機炭素(TOC) (mg/L)
10度(河川水)	10	7.62	243	53.9	1.7
30度(河川水)	32	7.03	142	35.5	4.1
100度(調整水)	96	7.20	127	44.7	0.9

・PAC 注入率

最適な注入条件として、濁度 10 度時には 25mg/L、30 度時には 45mg/L を設定した。これは実際に原水の提供を頂いた A 浄水場での PAC 注入率である。また、PAC 注入率による除去性の違いを確認するために低注入条件についても設定し濁度 10 度時には 10mg/L、濁度 30 度時には 25mg/L として濁度変化に PAC 注入が追従できない場合を想定した。濁度 100 度時には低注入率を 45mg/L、最適条件としてジャーテストから得られた沈殿処理水濁度の結果より 80mg/L を設定条件とした。

- ・代替トレーサー粒子（クリプトトレーサー1号）

クリプトスポリジウムを想定した擬似トレーサー粒子（クリプトトレーサー1号）を濃度 10^6 個/L程度となるよう原水に添加した。この際、濁度による濃度変化は想定しておらず、全ての濁度で一定のトレーサー濃度として濁度および PAC 注入率別の除去性能を確認することとした。

- ・ジャーテスト

ジャーテストは急速攪拌（120rpm）を1分間、緩速攪拌（40rpm）を10分間、静止・沈降を10分間として、上澄み水を傾斜法により採水した。

- ・急速砂ろ過

砂ろ過実験用カラム（内径 20mm）に、有効径 0.6mm 均等係数 1.5 の砂層を 650mm 敷き詰めて砂ろ過装置を作成し（図2参照）、採水した沈殿処理水を約 120m/day のろ過速度でろ過した。急速砂ろ過の継続時間は約3時間程度行い、30分毎にろ過水を採水した。



図2 砂ろ過装置の形状

- ・トレーサー粒子の計数

原水・沈殿処理水・ろ過水を採水して、トレーサー粒子を陰圧ろ過にて孔径 $0.8\mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブレンフィルター（ADVANTEC 東洋）に捕捉し、蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX-40, BX-FLA）を用いて U 励起（励起波長 330-385nm, 吸収波長 420nm）によって全視野計数を行った。トレーサー粒子は図3のように $5\mu\text{m}$ 前後で青光りする球形粒子である。

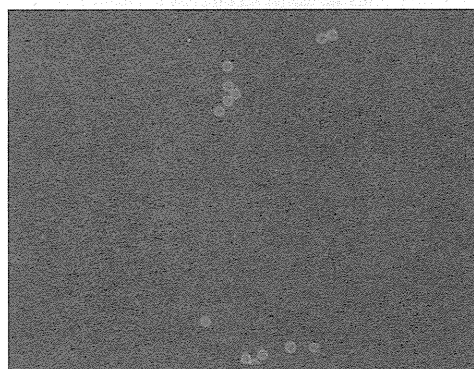


図3 クリプトトレーサー粒子の形状
U 励起(330~385nm), $\times 400$ 倍

- ・水中微粒子数の計数

浄水処理性能の評価指標として、処理水中の微粒子数の計測を行った。計測方法は高感度濁度計（日本電色工業 NP 500T）を用いて、 $\sim 0.5\mu\text{m}$ 、 $0.5\mu\text{m}\sim 1.0\mu\text{m}$ 、 $1.0\mu\text{m}\sim 3.0\mu\text{m}$ 、 $3.0\mu\text{m}\sim 7.0\mu\text{m}$ 、 $7.0\mu\text{m}\sim 12.0\mu\text{m}$ 、 $12.0\mu\text{m}\sim 15.0\mu\text{m}$ 、 $15.0\mu\text{m}\sim$ 、の微粒子径別の計数を行った。

(3) リスク評価

得られた実験結果と既往の研究データを基に、クリプトスポリジウム水系感染リスク評価を行った。リスク評価は障害調整生存年数 DALY を指標として算定を行った。算定のフローは図 4 の通りである。なお本研究では、用いる各データの平均値から求めた点推定評価と、各データを分布形状に当てはめ、それらを基にしたモンテカルロシミュレーションによる区間推定評価にてリスク評価を行った。

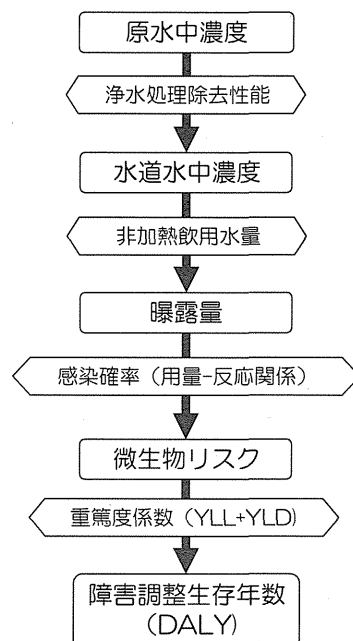


図 4 リスク評価フロー

・原水中濃度

A 浄水場原水において計測された近年 3 ヶ年分のクリプトスポリジウム検出データを用いる。最小値、最大値、平均値を用いて三角分布に当てはめた。(図 5 参照)

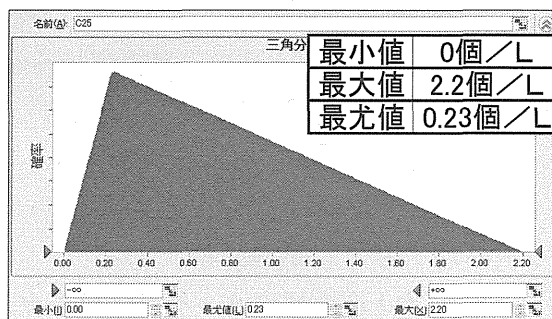


図 5 原水中クリプトスポリジウム濃度の三角分布

・浄水処理除去性能

今回得られた実験データをクリプトスポリジウムの除去性能として、原水濁度 10 度、30 度については測定データを用い、原水濁度 100 度については実験結果では不検出(ND)であったことから、後述の微粒子除去率とトレーサー除去率の関係(図 10 参照)から計算上で類推した値を用いる。区間推定法については最小値、最大値、最尤値を三角分布に当てはめた。

・水道水中クリプトスポリジウム濃度

上記原水中濃度と各条件別の除去率の三角分布からモンテカルロシミュレーションにより 10 万回の計算を行い、得られた計算結果から 5 パーセンタイル値と 95 パーセンタイル値を求めた。

・非加熱飲用水量

既往の研究でのアンケート結果¹⁾より 1 人 1 日 0.321L を用いた。

・感染確率

既往の研究結果²⁾より、指数モデルによる用量反応関係から 4.0×10^{-3} を用いた。

・重篤度計数(DALY 係数)

既往の研究結果³⁾より、 1.03×10^{-3} を用いた。

C 結果

(1) 実験結果

以上の実験条件にて実験を行った結果、処理水濁度、クリプトレーサーlog除去率、クリプトレーサーの粒子径 $5\mu\text{m}$ の含まれる $3\sim 7\mu\text{m}$ 微粒子log除去率は表2の通りであった。

表2 処理水濁度、クリプトレーサーlog除去率、 $3\sim 7\mu\text{m}$ 微粒子log除去率の結果

原水濁度	PAC 注入率 (mg/L)	処理水濁度		クリプトレーサーlog除去率			3~7 μm 微粒子log除去率		
		沈殿 処理後	ろ過後	沈殿 処理後	ろ過後	全体	沈殿 処理後	ろ過後	全体
10度 (河川水)	10	1.15	0.16	0.46	1.51	1.97	0.60	1.22	1.83
	25	0.67	0.11	0.81	2.27	3.08	1.39	0.77	2.16
30度 (河川水)	25	0.62	0.14	1.48	2.53	4.00	1.80	1.24	3.03
	45	0.41	0.11	1.73	2.78	4.51	2.17	1.52	3.69
100度 (調整水)	45	0.22	0.15	1.71	— (ND)	— (ND)	1.87	2.12	3.99
	80	0.15	0.02	1.59	— (ND)	— (ND)	2.36	3.17	5.52

※ろ過水データは、30分毎データ(n=6)の平均値

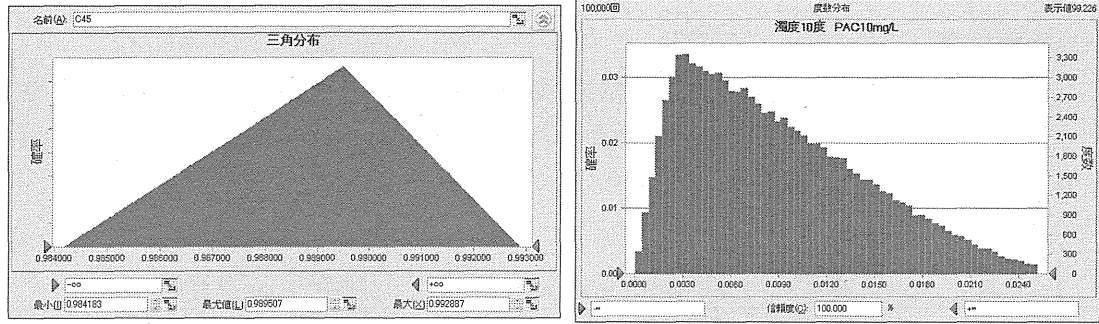
全ての濁度条件において、PAC注入率が高いほど処理水濁度と微粒子数は低く、クリプトレーサーの除去率は高くなり、浄水処理性が向上している傾向が見られた。また、原水濁度が高くなるほど検出されるクリプトレーサーの数は減少していく傾向が見られた。濁度100度の時にはPAC注入率によらず不検出(ND)という結果であり、これはクリプトレーサー粒子が原水中の濁質成分によって凝集ろ過の際に捕捉されるため、濁質分量の多い高濁水では除去率が高くなる結果となったと考えられる。

(2) リスク評価

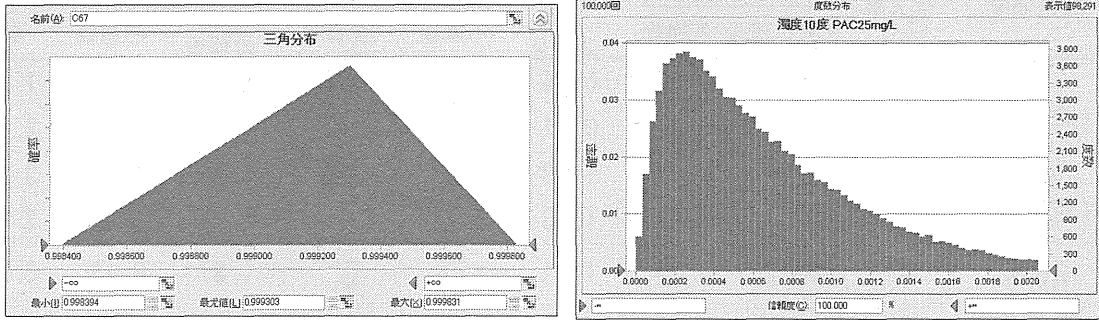
リスク評価を行うにあたり、先述のとおりA浄水場における原水中クリプトスポリジウム濃度測定結果と、実験により得られたトレーサー粒子の除去率を用いて水道水中濃度を試算した。点推定法ではデータの平均値を用い、区間推定法では三角分布にデータを当てはめ、シミュレーションソフト(ORACLE Crystal Ball)を用いて10万回のモンテカルロシミュレーションを行い試算した。トレーサー除去率の分布ならびに水道水中濃度のシミュレーションによる度数分布結果を図6に、水道水中クリプトスポリジウム濃度の算出結果を表3に示す。

また、算出した水道水中濃度に対して、非加熱飲用水量、1オーシスト摂取による感染確率、1ケース当りの健康影響度をかけることにより、各条件による年間健康影響度DALYの値を算出した。点推定による1人あたりの年間健康影響度の結果は表4、区間推定による1人あたりの年間健康影響度の結果は表5のとおりである。

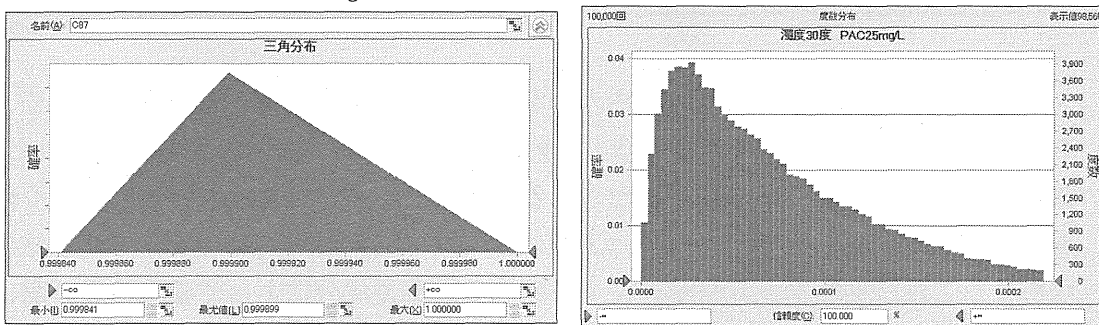
(a) 濁度 10度 PAC 注入率 10mg/L



(b) 濁度 10度 PAC 注入率 25mg/L



(c) 濁度 30度 PAC 注入率 25mg/L



(d) 濁度 30度 PAC 注入率 45mg/L

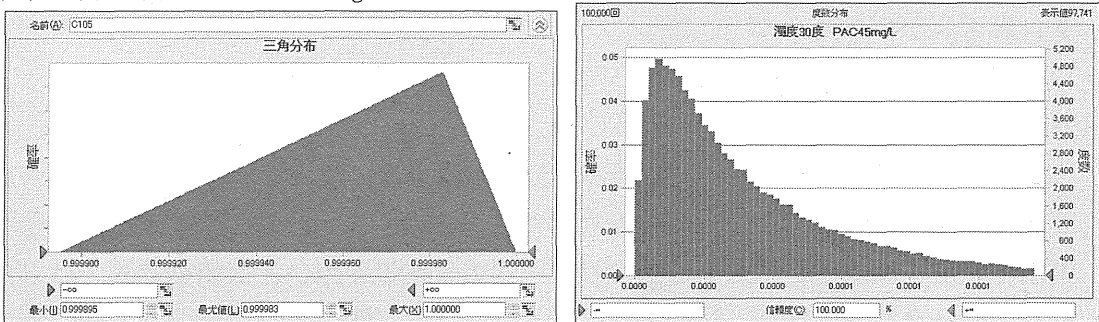


図6 各実験条件における浄水処理除去性能の三角分布 (左) とモンテカルロシミュレーションによる水道水中濃度の度数分布図 (右)

表3 各条件別の log 除去率と水道水中濃度

		10度		30度		100度	
		10mg/L	25mg/L	25mg/L	45mg/L	45mg/L	80mg/L
log 除去率	点推定 (平均値)	1.97	3.08	4.00	4.51	4.91 (参考値)	6.69 (参考値)
	区間推定 最小値	1.80	2.79	3.80	3.98	—	—
	区間推定 最大値	2.15	3.77	4.06	4.93	—	—
	区間推定 最尤値	1.98	3.16	3.99	4.76	—	—
水道水中濃度 (個/L)	点推定	2.43×10^{-3}	1.86×10^{-4}	2.18×10^{-5}	8.49×10^{-6}	2.71×10^{-6}	4.52×10^{-8}
	区間推定 5 $^{\circ}$ -センタイル値	1.70×10^{-3}	1.03×10^{-4}	9.32×10^{-6}	3.34×10^{-6}	—	—
	区間推定 95 $^{\circ}$ -センタイル値	1.99×10^{-2}	1.66×10^{-3}	1.76×10^{-4}	9.48×10^{-5}	—	—

表4 点推定による1人あたり年間健康影響度

原水濁度	10度		30度		100度	
	10mg/L	25mg/L	25mg/L	45mg/L	45mg/L	80mg/L
PAC注入量	10mg/L	25mg/L	25mg/L	45mg/L	45mg/L	80mg/L
原水中クリプト数 (個/L)	0.226					
浄水処理における除去率	1.97	3.08	4.00	4.51	4.91 (参考値)	6.69 (参考値)
水道水中の濃度 (個/L)	2.43×10^{-3}	1.84×10^{-4}	2.24×10^{-5}	7.01×10^{-6}	2.71×10^{-6}	4.52×10^{-8}
飲用水量 (L/日)	0.321					
曝露量 (個/日)	7.81×10^{-4}	5.98×10^{-5}	7.18×10^{-6}	2.25×10^{-6}	8.70×10^{-7}	1.45×10^{-8}
1オーダー摂取による感染確率	0.004					
1日あたりの感染リスク(日)	3.12×10^{-6}	2.39×10^{-7}	2.87×10^{-8}	9.00×10^{-9}	3.48×10^{-9}	5.80×10^{-11}
年間の感染リスク(年)	1.14×10^{-3}	8.73×10^{-5}	1.05×10^{-5}	3.28×10^{-6}	1.27×10^{-6}	2.12×10^{-8}
1感染あたりの健康影響度 DALYs/case	0.00103					
1人あたりの年間健康影響度	1.17×10^{-6}	8.99×10^{-8}	1.08×10^{-8}	3.38×10^{-9}	1.31×10^{-9}	2.18×10^{-11}

表5 区間推定による1人あたりの年間健康影響度

原水濁度	10度				30度			
	10mg/L		25mg/L		25mg/L		45mg/L	
パーセンタイル値	5% (低濃度側)	95% (高濃度側)	5% (低濃度側)	95% (高濃度側)	5% (低濃度側)	95% (高濃度側)	5% (低濃度側)	95% (高濃度側)
水道水中の濃度 (個/L)	1.70×10^{-3}	1.99×10^{-2}	1.03×10^{-4}	1.66×10^{-3}	9.32×10^{-6}	1.76×10^{-4}	3.34×10^{-6}	9.48×10^{-5}
飲用水量 (L/日)	0.321							
曝露量 (個/日)	5.46×10^{-4}	6.40×10^{-3}	3.31×10^{-5}	5.33×10^{-4}	2.99×10^{-6}	5.65×10^{-5}	1.07×10^{-6}	3.04×10^{-5}
1オーダー摂取による感染確率	0.004							
1日あたりの感染リスク(日)	2.19×10^{-6}	2.56×10^{-5}	1.32×10^{-7}	2.13×10^{-6}	1.20×10^{-8}	2.26×10^{-7}	4.29×10^{-9}	1.22×10^{-7}
年間の感染リスク(年)	7.98×10^{-4}	9.34×10^{-3}	4.84×10^{-5}	7.77×10^{-4}	4.37×10^{-6}	8.24×10^{-5}	1.57×10^{-6}	4.44×10^{-5}
1感染あたりの健康影響度 DALYs/case	0.00103							
1人あたりの年間健康影響度 (DALYs)	8.22×10^{-7}	9.62×10^{-6}	4.98×10^{-8}	8.01×10^{-7}	4.50×10^{-9}	8.49×10^{-8}	1.61×10^{-9}	4.58×10^{-8}

D 考察

得られた実験結果より、計数されたトレーサー粒子 log 除去率と微粒子カウンターで計測されたクリプトレーサーの粒子径 $5 \mu m$ の含まれる $3 \sim 7 \mu m$ の微粒子数除去率とクリプトレーサー除去率の関係を図7に示す。

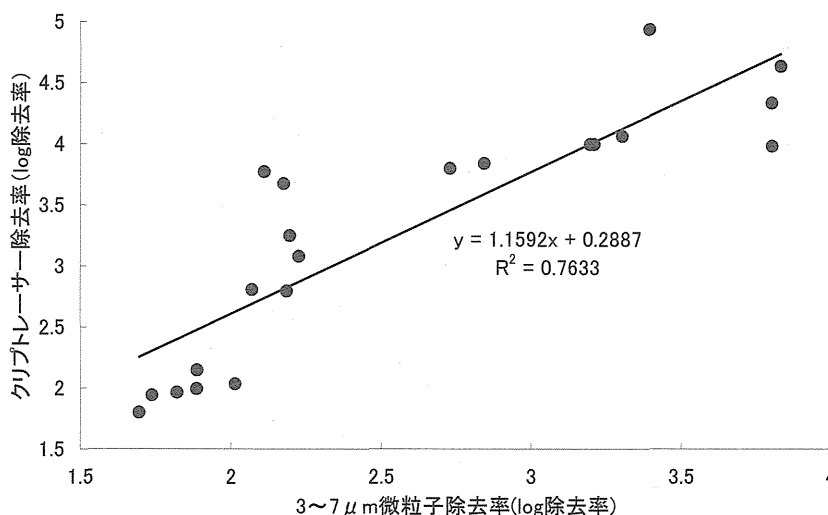


図7 微粒子(3~7 μm)除去率とクリプトレーサー除去率の関係

このグラフより、3~7 μm の微粒子除去率とクリプトトレーサーの除去率に比較的高い相関性があることがうかがえる。クリプトスポリジウムに対する水質管理方法として、現状でのろ過水の濁度管理を徹底することと共にクリプトスポリジウムの粒子径(5 μm 程度)と同程度の微粒子数を監視することで、クリプトスポリジウムの浄水処理による除去性能を推測することが可能ではないかと考えられる。また、このトレーサー粒子の除去率と3~7 μm の水中微粒子の相関関係による近似式より原水100度のトレーサー粒子除去率を求めると、濁度100度PAC注入率45mg/Lの場合では4.91log除去、PAC注入率80mg/Lの場合では6.69log除去という参考値が算出された。この除去率を用いて濁度100時におけるリスク評価を行った。

次に試算したリスク評価結果について、WHO飲料水水質ガイドラインによれば、クリプトスポリジウムなどの病原微生物による1人あたりの年間健康影響度(DALY)の目標値として 1.0×10^{-6} DALYを提案している。原水濁度10度でPAC注入率10mg/Lと低濁度でPAC注入量が不十分であった場合には除去性能が発揮されず目標値を満たすことができなくなるという結果であった。また、濁度10度でPAC注入率が適正であった場合でも区間推定で取り得る値によっては、ガイドライン値付近のリスクが考えうるという結果であった。また、図8のとおり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。

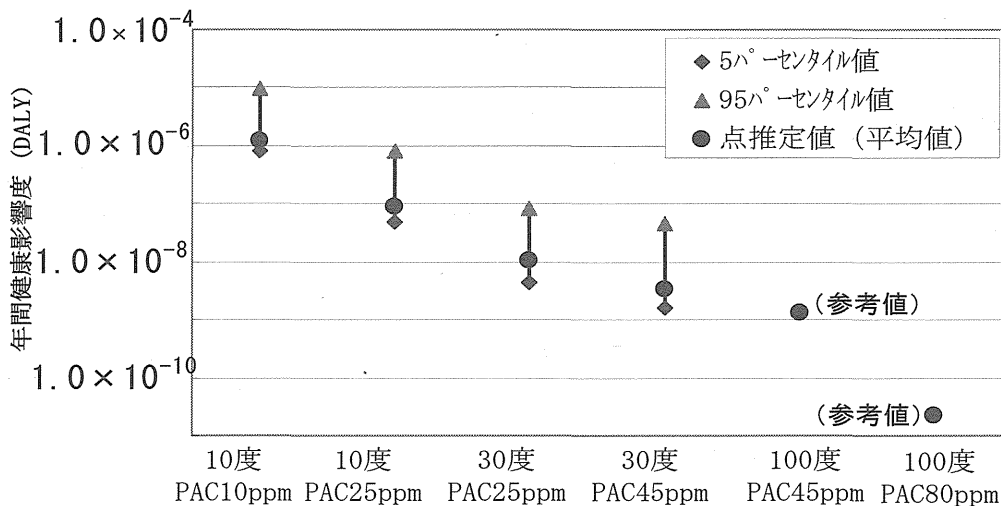


図8 各条件における1人あたりの年間健康影響度(DALY)

E 結論

以上の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。

今後の研究課題としては、原水中のクリプトスポリジウム濃度のデータ数を蓄積し、除去性能についても、原水濁度の変化による影響や凝集剤注入率による処理性の違いなど実験パターンを増やすことにより実験データを蓄積することによって、より信頼性のあるリスク評価につながるものと考えている。

F 健康危険情報

なし

G 学会発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

H 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

参考文献

- 1) 大瀧雅寛 非加熱飲用水量アンケート調査の結果報告 生活工学研究 第 4 巻第 24 号 2002.
- 2) Haas CN, Crockett CS, Rose JB, Gerba CP, Fazil AM. Accessing the risk posed by oocysts in drinking water. J Am Water Works Assoc 1996;88(9)
- 3) A. H. Havelaar, J. M. Melse RIVM report 734301022/2003 Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality.