

平成 25 年度 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

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 講師

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。最終年度における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、オゾン/紫外線処理で生成する OH ラジカルが大腸菌の不活化効果に寄与するかの検証実験を行い、OH ラジカルは不活化に寄与していないと結論づけた。また、イオン交換処理による処理特性について検討を行い、陽・陰イオン交換処理による微生物除去能を推定した。*C. jejuni* による年間感染確率を求めたところ、処理プロセスの総合除去・不活化能は中央値 $18.14 \log_{10}$ 、年間感染確率は平均値 $2.07 \times 10^{-11} \text{人}^{-1} \text{年}^{-1}$ と推定され、許容感染リスク $10^{-4} \text{人}^{-1} \text{年}^{-1}$ を十分に下回ったため、低残留塩素下でも微生物学的に安全な水質を安定的に確保できると評価された。さらに年間感染確率に対して感度分析を行い、原水 *E. coli* 濃度が最も寄与率が大きく、処理プロセスにおいては凝集・沈殿処理が重要管理点であることを指摘した。

腸管出血性大腸菌 0157:H7 を対象として、従来型浄水処理プロセスにおける微生物リスク評価を行った。河川原水中には *E. coli* 0157:H7 抗体に特異的に反応する細菌が平均 48.75cells/ml 存在し、凝集沈殿・砂ろ過では大腸菌の除去率が $0.5 \log$ 除去～ $4.12 \log$ 除去という結果が得られ、原水濁度が高い時ほど除去率が高くなる傾向が見られた。また、

塩素消毒による大腸菌の不活化能力を卓上実験で行い、Chick モデルによる外挿により、接触 1 時間での不活化能力を推定した。これらを基に障害調整生存年数 DALY を指標とした微生物リスクを行った結果、濁度によらず微生物濃度が一定である場合には、原水濁度が低い、かつ、凝集処理が不十分であるほど微生物リスクが高くなり、WHO 飲料水水質ガイドラインの目標値 1.0×10^{-6} DALY を超える推定結果となるケースも見られた。

従属栄養細菌 (*Pseudomonas* 菌) の処理耐性等の評価を一度に行う手法として昨年度まで検討してきた分子生物学的手法である T-RFLP 法の定量的応用手法について、塩素消毒処理における不活化に適用できるか検討したところ、配水中の残留塩素濃度レベルの処理においては遺伝子損傷には至らないことから適用は難しいことが判明した。バイオフィルムを形成した従属栄養細菌 (*Pseudomonas* 菌) に対し、3 段階の異なる流速による剥離強度によってバイオフィルムを分類し、各フィルム層への消毒処理の影響を比較したところ、バイオフィルム状の細菌の不活化効果は浮遊状態より低下することがわかった。0.1m/s 以下の水流によってバイオフィルムの 90%程度が剥離されるが、残存するバイオフィルムの層厚は深部まで塩素が浸透しにくい状況であり、全体としての塩素耐性が最も高かった。一方、0.4 m/s 以上の水流では、99~99.9%程度が剥離され、残存バイオフィルムは薄くなるが、その場合は深部まで塩素が浸透する状況であり塩素耐性が低くなっていた。指標細菌である大腸菌 2 種類を用いて、紫外線消毒処理での 210~300 nm における照射波長毎の不活化効果および光回復効果の相違を検討した結果、254 nm より長波長光では、いずれの大腸菌においても光回復が起こり、254 nm と同様の不活化機構が働いていると考えられたが、より短波長光において、一方の大腸菌には光回復が起こらない不活化機構が生じていることが示され、光回復効果の少ない紫外線消毒方法の可能性が示唆された。

アニュラーリアクターを用いて水道配水系を模擬し、残留塩素の有無が細菌再増殖に及ぼす影響を調査した。残留塩素が 0.2mg/L 程度保持されていても、クーポン上の全菌数は 10^4 cells/cm² 程度まで増加することが明らかになった。一方、残留塩素を中和すると、クーポン上の全菌数は 10^5 cells/cm² 程度まで急激に増加した。定常状態における収支から、バルク水及びクーポン上の比増殖速度を求めたところ、それぞれ 14.2 (1/day)、0.14 (1/day) と、バルク水中の比増殖速度の方が大きかった。また、全菌の分布も、バルク水中に 71%、クーポン上に 29%とバルク水中の細菌再増殖の寄与の方が大きいことも推察された。クーポン上に形成された細菌群集構造を解析したところ、 α -Proteobacteria や β -Proteobacteria が主に優占していた。

水道の浄水処理および配水過程において微生物リスクを低減する上での適切な水質指標として、原水における病原微生物の存在濃度、浄水処理における懸濁物質の物理的除去と消毒効果、配水過程における微生物学的清浄度を、水質管理手法として、浄水処理における懸濁物質の除去効率および微生物不活化効率の監視、配水過程における微生物学的清浄度の監視を挙げた。

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．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

対象とするカルキ臭低減型浄水処理プロセスは凝集・沈殿処理、急速砂ろ過処理、促進酸化処理、陽イオン交換処理、陰イオン交換処理、塩素処理の六つのステップから構成される。微生物濃度は、水道原水（河川水）の *E. coli* および *C. jejuni* を測定した。凝集・沈殿処理後の *E. coli* 濃度を測定し、除去能を求めた。促進酸化処理では、OH ラジカルの不活化効果の有無を検証するため、オゾンと紫外線それぞれ単独処理と、オゾン/紫外線処理の各条件での大腸菌不活化効果を評価した。促進酸化プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定のために、A 浄水場に設置されているパイロットプラントの気液向流式オゾン接触塔を用いて *E. coli* 添加実験を行った。イオン交換処理については、除去特性を把握するための基礎実験と、層厚 1m での除去能を定量化する実験を行った。塩素処理は、A 浄水場に設置されているパイロットプラントの塩素接触槽を用いて、低濃度の残留塩素条件で *E. coli* の添加実験を行った。以上より収集したデータに基づき、カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした *C. jejuni* の年間感染確率をモンテカルロシミュレーションにより推定した。

2．水道水における腸管出血性大腸菌（*E. coli* O157:H7）を対象とした微生物リスクの試算

実際の河川原水を対象として、*E. coli* O157:H7 に特異的に反応を示す蛍光標識抗体により染色し、蛍光顕微鏡観察により *E. coli* O157:H7 存在状況の調査を行った。同時に呼吸活性の有無を判別する方法として CTC による染色を同時に行った。凝集沈殿・砂ろ過による除去性評価では、B 浄水場原水に沈砂池より採取した沈砂を添加して原水濁度を 10 度、30 度、100 度に調整し、大腸菌培養液(*E. coli* K12)を初期濃度が約 1.0×10^6 CFU/ml となるよう添加した。各濁度に対して 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、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、ろ過水の各処理水を採水し、XM-G 寒天培地を用いて 37 24 時間培養し大腸菌を計数した。塩素消毒による除去性評価では、高濃度の大腸菌培養液 (*E. coli* K12) に対して次亜塩素酸ナトリウム水溶液を初期濃度 0.5mg/L となるよう添加し、スターラーを用いて攪拌し接触、5 分、10 分、15 分ごとに採水した後、TSA 培地を用いて 37 24 時間培養し生残した大腸菌を計数した。

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、実験により得ら

れた除去率の平均値から算出する点推定により行った。試算した水道水中 *E. coli* O157:H7 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より 5.09×10^{-3} 、DALY 係数は既往の研究結果 5.47×10^{-2} 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 法の定量的検出方法の不活化評価への適用

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) を用い、約 10^6 CFU/mL 程度の高濃度溶液を準備し、CQF (Continuous Quenching Flow) システムによる塩素処理実験を行った。塩素濃度が混合後に約 0.5 ~ 1.5 mg/L となる様に塩素溶液を調節し、実験毎に反応管出口での塩素濃度を測定した。また管内の滞留時間は反応管長さや流量調節によって 15 秒に固定した。採水した試料中の *P. aeruginosa* 濃度を、培養培地による濃度測定法と T-RFLP の定量的検出法にて測定した。T-RFLP の定量的検出に用いる定量用のマーカー微生物として大腸菌 *Escherichia coli* (NBRC13965) を用い、塩素処理前後の *P. aeruginosa* 溶液への投入後濃度は約 10^5 CFU/mL であった。T-RFLP 解析の条件は昨年度までと同様とした。

（2）バイオフィルムの付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

配水管の枝管材料である PVC 片をバイオフィルム形成材料とした。滅菌した栄養液体培地 TSB (Tryptic Soy Broth) に *P. aeruginosa* を接種して 30℃ で 24 時間培養し、滅菌した PVC 片の表面に付着させバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム形成後の PVC 片をアニュラーリアクターに設置し、回転数 10, 50, 100 rpm、回転継続時間を 1, 10, 30 分として、それぞれの継続時間後に形成片を取り出し、残存バイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量を測定した。また、バイオフィルムが残存する PVC 片を取り出し、1 分後の残留遊離塩素濃度が 1.0 mg/L となるよう調整した次亜塩素酸ナトリウム溶液 10 mL に投入して所定時間静置した。塩素処理前後の PVC 片上バイオフィルムの *P. aeruginosa* 濃度を測定した。

（3）異なる紫外線波長光における不活化効果と回復能への影響の検討

大腸菌は NBRC13965 と NBRC3301 の 2 種とし、 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL の高濃度菌液を用意した。各試料を 1cm × 1cm の石英セルに 2mL 投入し、小型分光器から出射する各波長光を照射した。照射した波長光は 210、230、254、270、290nm とした。各照射波長光によって 99 ~ 99.9% 程度不活化させた大腸菌試料に対し、蛍光灯による可視光照射を石英セルの両透過面から行った。石英セルと蛍光灯の距離は 6mm とした。可視光照射時は絶えず送風機による空冷にて定温を維持した。照射時間毎に試料から 0.1mL ずつ採取し濃度測定を行った。

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

アニュラーリアクターを用いて実際の水道配水系を模擬して、残留塩素の有無が細菌再増殖に与える影響を評価した。特に、残留塩素が消失した場合に、どのような細菌群がど

のように再増殖するのかについて詳細に解析した。

アニュラーリアクターは 2 連で運転し、ポリカーボネート製のクーポンを用いた。回転速度は 15rpm とした。Run 1 では、残留塩素を中和せずに直接アニュラーリアクターに通水した。Run 2 ではチオ硫酸ナトリウムで事前に残留塩素を中和した後にアニュラーリアクターに通水した。アニュラーリアクター内の平均的な滞留時間は 100 分となるように、通水流量を 10mL/秒に設定し、Run 1、Run 2 とともに約 1 か月運転した。アニュラーリアクターの流入水、流出水、クーポンを定期的にサンプリングし、流入水・流出水の水温、遊離残留塩素濃度、同化性有機炭素濃度 (Assimilable Organic Carbon : AOC) を測定した。細菌現存量は、フローサイトメーターを用いて分析した。全菌数は、SYBR Green I で染色した。生菌数/死菌数は膜損傷性に基いて定義し、SYBR Green I と Propidium Iodide で二重染色した。クーポン上で再増殖する細菌群集の構造を、16S rRNA 遺伝子を標的とした Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) とアンプリコンシーケンシングで評価した。

(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 . 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

原水の *E.coli* 濃度、凝集・沈殿、急速砂ろ過、促進酸化、陽・陰イオン交換、塩素処理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 比の各要素は上記実験で得た値を元に確率密度関数(PDF)を設定した。選定した PDF とパラメータをまとめたものを表 1 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、6 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。中央値は $18.1 \log_{10}$ となった。QMRA による推定値をまとめたものを表 2 に示す。年間感染確率の平均値として 2.07×10^{-11} 人⁻¹年⁻¹ (中央値 0) が得られた。

表 1 選定した確率密度関数とパラメータ推定値

要素	適合分布形	パラメータおよび推定値
原水中 <i>E.coli</i> 濃度	ワイブル分布	
凝集・沈殿処理	最大極値分布	
急速砂ろ過処理	三角分布	最小値:0.4, 最尤値: 0.9, 最大値:1.5
促進酸化処理	三角分布	最小値:7.31, 最尤値: 7.65, 最大値:9.02
陽イオン交換処理	三角分布	最小値:0, 最尤値: 0.25, 最大値:0.96
陰イオン交換処理	ロジスティック分布	
塩素処理	三角分布	最小値:3.44, 最尤値: 4.03, 最大値:5.83
C/E 値	対数正規分布	平均値: 1.87×10^{-4}
非加熱飲水量	指数分布	比率: 3.06×10^{-3}

表2 QMRAによる各推定値

	P _{2.5}	中央値	平均値	P _{97.5}
総合除去・不活化 log ₁₀ 数	16.32	18.14	18.09	20.22
水道水 <i>E.coli</i> 濃度 (<i>E.coli</i> /100mL)	1.35 × 10 ⁻²¹	7.08 × 10 ⁻¹⁷	1.32 × 10 ⁻¹⁴	7.31 × 10 ⁻¹⁴
<i>E.coli</i> 摂取量 (<i>E.coli</i> /日)	1.76 × 10 ⁻¹⁷	1.26 × 10 ⁻¹²	4.38 × 10 ⁻¹⁰	2.02 × 10 ⁻⁹
<i>C.jejuni</i> 摂取量(<i>C.jejuni</i> /日)	5.88 × 10 ⁻²²	5.76 × 10 ⁻¹⁷	8.28 × 10 ⁻¹⁴	1.97 × 10 ⁻¹³
<i>C.jejuni</i> 一日あたり感染確率 (人 ⁻¹ 日 ⁻¹)	0	0	5.68 × 10 ⁻¹⁴	1.35 × 10 ⁻¹³
<i>C.jejuni</i> 年間感染確率 (人 ⁻¹ 年 ⁻¹)	0	0	2.07 × 10 ⁻¹¹	4.94 × 10 ⁻¹¹

2. 水道水における腸管出血性大腸菌 (*E.coli* O157:H7) を対象とした微生物リスクの試算
 水道原水中の *E.coli* O157:H7 濃度として、平均 14.3~109 (cells/ml) という計数結果を得た。濁度やアンモニア態窒素の上昇に伴う *E.coli* O157:H7 の上昇は確認できなかった。また、計数された全ての *E.coli* O157:H7 細胞で CTC による蛍光発光は観察されなかった。

実験結果に対して障害調整生存年数 DALY を指標とした微生物リスクを算出した。算出結果は表3のとおりである。

表3 濁度・PAC 注入率別の年間健康影響度 (DALY) の算出結果

	10度		30度		100度	
	10	25	25	45	45	80
原水中濃度(cells/L)	48750					
浄水除去率(log10)	0.5	2.58	2.07	3.22	3.11	4.12
塩素不活化率(log10)	6.53					
水道水中濃度(cells/L)	4.54 × 10 ⁻³	3.78 × 10 ⁻⁵	1.22 × 10 ⁻⁴	8.67 × 10 ⁻⁶	1.12 × 10 ⁻⁵	1.09 × 10 ⁻⁶
曝露量/日	1.46 × 10 ⁻³	1.21 × 10 ⁻⁵	3.93 × 10 ⁻⁵	2.78 × 10 ⁻⁶	3.58 × 10 ⁻⁶	3.50 × 10 ⁻⁷
感染確率	5.09 × 10 ⁻³					
感染確率(1日)	7.43 × 10 ⁻⁶	6.18 × 10 ⁻⁸	2.00 × 10 ⁻⁷	1.42 × 10 ⁻⁸	1.82 × 10 ⁻⁸	1.78 × 10 ⁻⁹
感染確率(1年)	2.71 × 10 ⁻³	2.26 × 10 ⁻⁵	7.30 × 10 ⁻⁵	5.17 × 10 ⁻⁶	6.66 × 10 ⁻⁶	6.51 × 10 ⁻⁷
1感染当りのDALY	5.47 × 10 ⁻²					
1人当たり年間健康影響度	1.48 × 10 ⁻⁴	1.23 × 10 ⁻⁶	3.99 × 10 ⁻⁶	2.83 × 10 ⁻⁷	3.64 × 10 ⁻⁷	3.56 × 10 ⁻⁸

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 法の定量的検出方法の不活化評価への適用

塩素処理前および処理後の試料について、培養測定法にて測定した結果と T-RFLP の定量的適用法にて求めた濃度の結果を図1に示した。

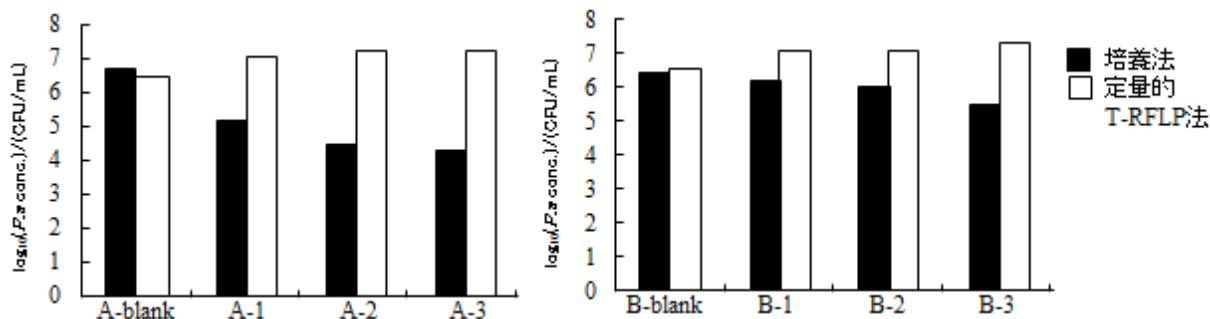


図1 塩素処理前後における *P. aeruginosa* 濃度の培養法と定量的 T-RFLP 法による結果

(2) バイオフィルム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 片にて形成させたバイオフィルムについて、アニュラーリアクターにて各流速下で運転した場合、回転運転を開始して 1 分後には、いずれの運転条件においてもほぼ定常状態に達した。各流速下にて残存したバイオフィルムに対する塩素処理を行った結果、非常に低い流速下 (0.089 m/s) による剥離にて残存したバイオフィルムの不活化効果が最も低くなっていた。

(3) 異なる紫外線波長光における不活化効果と回復能への影響の検討

図 2 に大腸菌の NBRC13965 株と NBRC3301 株の照射波長毎の不活化効果を 254 nm 光の効果との相対比で示す。

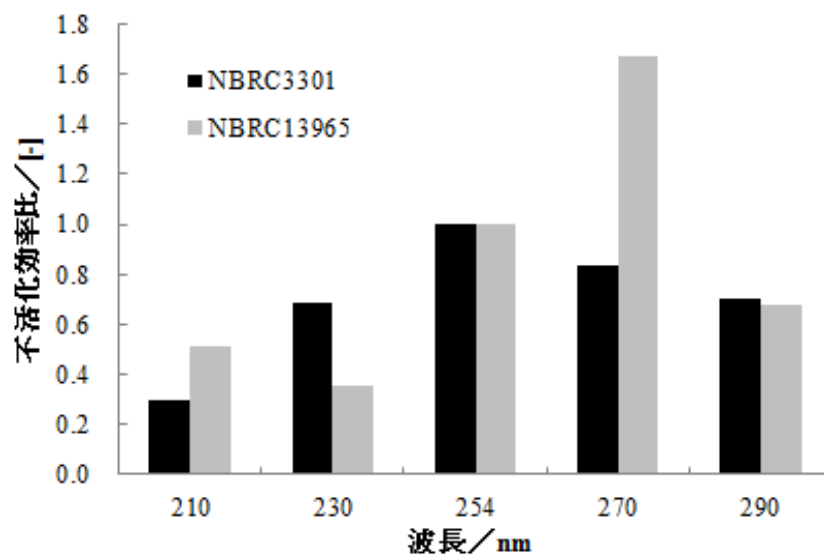


図 2 照射波長毎の大腸菌の不活化効果比 (254 nm との相対比)

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

残留塩素を保持した系 (Run 1) では、流入水中の全菌数は、運転期間を通じて定量下限未満であったが、流出水中の全菌数は、運転開始 1 週間後より 10^4 cells/mL 程度に増加し、そのレベルを維持した。一方、クーポン上の全菌数は運転開始 2 週間後にかけて増加し、最終的に 10^4 cells/cm² オーダーで安定化した。しかし、生菌数は運転期間を通じて定量下限未満であった。

残留塩素を中和した系 (Run 2) では、アニュラーリアクター内で AOC が消費されていることが推察された。流入水中の全菌数は、運転期間を通じてほぼ定量下限未満であることが多かったが、流出水中の全菌数については、運転開始 1 日後には 10^4 cells/mL オーダーに急増し、最終的には 10^5 cells/mL オーダーに達した。一方、クーポン上の全菌数も運転開始直後から増加傾向を示し、約 2 週間後以降 10^5 cells/cm² オーダーで安定化した。Run 1 とは異なり、全菌数の 20~70% が生菌数として定着していることが確認された。運転後期を定常状態と仮定し、バルク水中及びクーポン上での比増殖速度を推定したところ、バル

ク水中は 14.2 (1/day)、クーポン上は 0.14 (1/day) と推定され、バルク水中に比べてクーポン上での比増殖速度は 1/100 程度であることが示された。運転開始 22 日後の試料の 16S rRNA 遺伝子組成をシーケンシングによって解析した結果、大半は Proteobacteria 門に近縁な細菌群によって占められており、全体の 50% は α -Proteobacteria、40% は β -Proteobacteria、9% は γ -Proteobacteria であった。 α -Proteobacteria は、Rhizobiales 綱、Sphingomonadales 綱に近縁な細菌群が優占していた。 β -Proteobacteria は、Burkholderiales 綱に近縁な細菌群が優占していることが明らかになった。

D. 考察

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/紫外線処理における OH ラジカルの不活化効果の有無を検証した結果、オゾン/紫外線処理で生成が促進される OH ラジカルは不活化効果に寄与していないことを示した。すなわち、オゾン/紫外線処理の不活化能は、オゾン処理と紫外線処理の効果が相加的であるとして評価できた。得られた年間感染確率から、カルキ臭低減型処理プロセスは、低残留塩素下でも十分に安全な水道水を生産することができると評価できた。また、年間感染確率に対する感度分析を行い、凝集・沈殿処理が重要管理点であることを指摘した。

2. 水道水における腸管出血性大腸菌 (*E. coli* O157:H7) を対象とした微生物リスクの試算

本研究で算出した障害調整生存年数 DALY を見てみると、原水濁度が高いほど DALY の値が低くなる傾向が見られ、PAC 注入量の違いによっても除去性能に約 1 log 程度の違いが現れ DALY の値に大きな影響が現れた。大腸菌は原水中の濁質成分に捕捉されるような形で除去されると考えられるため、微生物濃度が濁度によらず一定である場合には濁度が高い時ほど微生物除去率が高くなることで微生物リスクが低下する傾向があり、また、低濁度時の原水に高濃度汚染などが発生した場合には微生物リスクに対する注意が必要である。今回の試算結果で得られた水道水中濃度を見てみると、どの条件でも通常の大腸菌検出試験を行っている場合では大腸菌は検出されない結果が得られると考えられるが、障害調整生存年数 DALY を指標とした場合、WHO の飲料水水質ガイドラインで示されている病原微生物による障害調整生存年数 DALY の目標値 1.0×10^{-6} DALY を上回る結果が低濁度で PAC 注入量が低い場合などに現れた。

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 法の定量的検出方法の不活化評価への適用

塩素処理前の試料に対しては定量的 T-RFLP 法による推定濃度は培養法による濃度値と合致しているものの、塩素処理を行った試料に対しては合致しなかった。また塩素処理を行った試料の定量的 T-RFLP 法による推定濃度は、塩素処理前の推定濃度に比べて一様に高い値となっていた。後者では、塩素処理によって対象微生物 (*P. aeruginosa*) の細胞膜に損傷が生じ、DNA 抽出過程における DNA 抽出率が高くなったためと考えられる。塩素処理などの

不活化処理後の試料に、生物の培養過程を挟み残存生物数の違いを判別し易い工夫をする必要がある。

(2) バイオフィルムの付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

0.1m/s 以下の水流によってバイオフィルムの 90%程度が剥離されるが、残存するバイオフィルムの層厚は深部まで塩素が浸透しにくい状況であり、全体としての塩素耐性が最も高かった。一方、0.4m/s 以上の水流では、99~99.9%程度が剥離され、残存バイオフィルムは薄くなるが、その場合は深部まで塩素が浸透する状況であり塩素耐性が低くなっていた。以上のことから水流による剥離によってバイオフィルム状細菌への塩素処理の効果が変わることが確認できた。

(3) 異なる紫外線波長光における不活化効果と回復能への影響の検討

254 nm より長波長光では、いずれの大腸菌においても光回復が起こり、254 nm と同様の不活化機構が働いていると考えられたが、より短波長光において、一方の大腸菌では光回復が起こらない不活化機構が生じていることが示唆され、回復効果の少ない紫外線消毒方法の可能性が示唆された。

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

0.2mg/L 程度の遊離残留塩素濃度が保持されている場合、残留塩素を中和した場合と比較すると 1/10 程度であるが、バルク水及びクーポン上での細菌再増殖が観察された。しかし、クーポンに付着している細菌のほとんど全ては膜損傷を受けた状態にあることも示唆された。残留塩素を中和すると、顕著な細菌再増殖がバルク水中、クーポン上で生じることが明らかになった。細菌再増殖現象は、流入水・流出水中の AOC 濃度の変化にも反映されていた。バルク水中の全菌数は 10^5 cells/ml 程度に達したが、これは残留塩素を用いていないオランダの水道水中の全菌数とほぼ同程度であった。

定常状態におけるクーポン上の比増殖速度は 0.14 (1/day) と見積もられた。この値は、既存研究において PVC 上の比増殖速度 (0.15 1/day) や HDPE 上の比増殖速度 (0.14 1/day) の推定値ともほぼ一致していた。一方、バルク水中の比増殖速度は HRT とほぼ同程度の 14.2 (1/day) = 0.59 (1/h) を示した。従来、細菌再増殖では生物膜形成が重視されてきたが、残留塩素が消失すると数時間程度の滞留がある場合には浮遊状態での細菌再増殖も顕著に生じる可能性があることを示唆している。実際、アニュラーリアクターにおいて、バルク水中に存在する細菌は全体の 71% とストックとしても多かった。残留塩素を低減化した場合、いかに水道水の滞留を無くすかが重要と考えられる。

残留塩素を中和した系でクーポン上に形成された細菌群集は経時的に変化したが、顕微鏡観察の結果からいわゆる生物膜状態をとらずにクーポンに付着していることが推測された。残留塩素を保持した系で再増殖した細菌群と、残留塩素を中和した系で増殖した細菌群がどのような関係にあるのか、今後明らかにして、配水過程において注視すべき細菌群の生理・生態について更なる知見を蓄積したい。

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して、最終年度においては以下の結論を得た。

- (1) 次世代型カルキ臭低減化処理プロセスの総合除去・不活化能は中央値 $18.14 \log_{10}$ と評価され、*C. jejuni* による年間感染確率は平均値 $2.07 \times 10^{-11} \text{人}^{-1} \text{年}^{-1}$ (中央値 0) が得られた。これは許容リスクレベル $10^{-4} \text{人}^{-1} \text{年}^{-1}$ を大きく下回り、カルキ臭低減型処理プロセスは、低残留塩素下でも十分に安全な水道水を生産することができると考えられた。また、年間感染確率に対する感度分析を行った結果、凝集・沈殿処理が重要管理点であることを明かにした。
- (2) 通常の凝集沈殿・砂ろ過・塩素消毒処理において、原水濁度によらず微生物濃度が同等である場合には、原水濁度が高いほど DALY 値が低くなる傾向が見られた。また、凝集剤である PAC の注入量が不十分となる場合にも、除去能力が約 1log 程度低下することで、DALY 値に大きな影響を及ぼした。低濁度の原水に対して突発的な高濃度の病原微生物による汚染が発生した場合には、濁質の不足により病原微生物が十分には除去されない可能性が起りうるため、浄水処理工程の濁度管理に十分に留意する必要があることが示された。
- (3) 定量的 T-RFLP 法について、消毒処理における不活化に適用できるか検討したところ、配管中の残留塩素濃度レベルの処理においては、対象細菌の遺伝子レベルの損傷には至っていないことや、対象細菌の細胞膜損傷による DNA 抽出工程への影響から、本方法の適用は難しいことがわかった。
- (4) バイオフィルムを形成した従属栄養細菌では、 0.1 m/s 以下の流速下においてバイオフィルムの 90%程度が剥離され、残存するバイオフィルムの層厚は深部まで塩素が浸透しにくく不活化効果が低くなることがわかった。一方、 0.4 m/s 以上の水流によって、99~99.9%程度が剥離され、その時に残存バイオフィルムの層厚は低くなっているため、深部まで塩素が浸透し不活化しやすい状況に至ると考えられた。
- (5) 大腸菌 2 種類を用いて、紫外線消毒処理での 210~300 nm における照射波長毎の不活化効果および光回復効果の相違を比較した結果、254 nm より長波長光では、いずれの大腸菌においても光回復が起こり、254 nm と同様の不活化機構が働いていると考えられた。一方、より短波長光においては、片方の大腸菌で光回復が起こらない不活化機構が生じており、回復効果の少ない紫外線消毒方法の可能性が示唆された。

- (6) アニュラーリアクターを用いて水道配水系における細菌再増殖を評価したところ、残留塩素を保持した水道水と比較して、残留塩素を中和した水道水では顕著な細菌再増殖が観察され、クーポン上の全菌数が 10^5 cells/cm² 程度まで増加し、生菌数も同時に増加する様子が観察された。クーポン上で増殖する細菌群の比増殖速度は 0.14 (1/day) 程度であり、バルク水中で増殖する細菌群の比増殖速度の 1/100 程度であった。クーポン上の細菌群集構造は経時的に遷移し、徐々に複雑になっていった。特に、*α-Proteobacteria* や *β-Proteobacteria* が優占していた。
- (7) 水道の浄水処理および配水過程において微生物リスクを低減する上での適切な水質指標として、原水における病原微生物の存在濃度、浄水処理における懸濁物質の物理的除去と消毒効果、配水過程における微生物学的清浄度を、水質管理手法として、浄水処理における懸濁物質の除去効率および微生物不活化効率の監視、配水過程における微生物学的清浄度の監視を挙げた。各データを水道事業体において蓄積することで、定量的微生物リスク評価手法に基づいた高度な水質管理や、配水過程での微生物再増殖制御を目的とした運転管理に展開できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itoh, S. Effect of the Ratio of Illness infection of *Campylobacter* on the Uncertainty of DALYs in Drinking Water, Journal of Water and Environment Technology, 11 (3), 309-324, 2013.
- 2) 岸田直裕, 島崎 大, 小坂浩司, 小菅瑠香, 秋葉道宏, 林 謙治 (2013) 銅を用いた水中の微生物の不活化技術 日本公衆衛生雑誌, 60(9), 1-7.
- 3) Kazama S. and Otaki M. (2013) Quantitative analysis of the inactivation mechanisms of *Escherichia coli* by a newly developed method using propidium monoazide, J. of Water and Environment Technology, 11(6), pp.507-517
- 4) Ohkouchi, Y., Yata, Y., Bun, R., Itoh, S. Chlorine Requirement for Biologically Stable Drinking Water After Nanofiltration, Water Science and Technology-Water Supply, 2014 (in press).
- 5) Zhou, L., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Quantitative Microbial Risk Assessment of Drinking Water Treated with Advanced Water Treatment Process, J. Wat. Supply: Res. Technol.-Aqua, 2014 (in press).

2. 学会発表

- 1) Nakanishi, T., Zhou, L., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Effect of ozonation

- and ultraviolet light treatment on the microbial safety of drinking water, Conference Proceedings, 22nd KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, 2013.7.2-3, Seoul, Korea.
- 2) Asada, Y., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Investigation of methods for isolation and quantitation of *Campylobacter jejuni* in water environment, Conference Proceedings, 22nd KAIST-KU-NTU-NUS Symposium on Environmental Engineering, 2013.7.2-3, Seoul, Korea.
 - 3) Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai (2013) Chlorine resistance and growth potential of drinking water bacteria, The 5th International Conference on Microbial Ecology and Water Engineering, 12927.
 - 4) 浅田安廣, 大河内由美子, 越後信哉, 伊藤禎彦, 糖鎖構造解析に基づいた河川水中 *Campylobacter jejuni* のシアル酸含有リポオリゴ糖保有実態, 環境衛生工学研究, 27 (3), 208-211, 2013.
 - 5) Asada, Y., Ohkouchi, Y., Matudate, K., Echigo, S., Itoh, S. Structure analysis of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide associated with Guillain-Barré syndrome in source water for estimating disability adjusted life years, Conference Proceedings, Water Micro 2013, 2013.9.15-20, Florianopolis, Brazil.
 - 6) Zhou, L., Nakanishi, T., Matsudate, K., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor, Water Micro 2013, 2013.9.15-20, Florianopolis, Brazil.
 - 7) 周靚, 松館圭太, 伊藤禎彦 (2013) 浄水処理ユニットプロセスにおける微生物除去・不活化能の定量化法, 第64回全国水道研究発表会講演集, 566-567, 2013.
 - 8) 大坂幸弘, 春日郁朗, 栗栖太, 古米弘明 (2013) 膜損傷とコロニー形成能を指標とした給水末端から単離された従属栄養細菌の塩素耐性評価, 第64回全国水道研究発表会講演集, pp.598-599.
 - 9) 藤村壮, 島崎大, 秋葉道宏 (2013) 水道水における腸管出血性大腸菌(*E. coli* O157:H7)を対象とした微生物リスクの試算, 第64回全国水道研究発表会講演集, pp.642-643.
 - 10) Zhou, L., Nakanishi, T., Matsudate, K., Echigo, S., Ohkouchi, Y., Itoh, S. Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor, Asian Core Program 第3回包括シンポジウム, 京都大学宇治キャンパス, 2013.10.28-29.
 - 11) 周靚, Infection Risk Assessment of *Campylobacter jejuni* in Drinking Water Treated with Water Treatment Process Reducing Chlorinous Odor (カルキ臭低減型浄水処理プロセスにおける*Campylobacter jejuni*の感染リスク評価に関する研究), 八大学工学系連合会「博士学生交流フォーラム」, 京大桂キャンパス船井記念講堂, 2013.11.8.
 - 12) 浅田安廣, 大河内由美子, 松館圭太, 伊藤禎彦, 障害調整生存年数推定を目的とした

河川水中*Campylobacter jejuni*の実態調査，第16回日本水環境学会シンポジウム講演集，391-392，2013.

- 13) 浅田安廣，大河内由美子，越後信哉，伊藤禎彦，河川水中*Campylobacter jejuni*に対するギラン・バレー症候群発症関連菌株の推定，第50回環境工学研究フォーラム講演集，116-118，2013.
- 14) 大坂幸弘，春日郁朗，栗栖太，古米弘明（2013）水道水中の細菌再増殖に与える水温および残留塩素の影響評価，第29回日本微生物生態学会大会，p.89.
- 15) 松館圭太，周 靨，越後信哉，伊藤禎彦，カルキ臭低減型浄水処理プロセスにおける陽・陰イオン交換処理による細菌除去，第48回日本水環境学会年会，2014（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