

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

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

本研究では、我が国でも重篤な集団食中毒や水系感染事例のある腸管出血性大腸菌 O157:H7 を対象として、障害調整生存年数 DALY を指標として微生物リスク評価を行った。研究は、河川原水における腸管出血性大腸菌 O157:H7 の存在状況調査結果ならびに凝集沈殿砂ろ過と塩素消毒による大腸菌の除去性能評価実験を行いリスク評価を行った。河川原水中には特異的に腸管出血性大腸菌 O157:H7 抗体に反応する細菌細胞が平均 48.75cells/ml 存在し、凝集沈殿・砂ろ過では大腸菌の除去率が 0.5log 除去～4.12log 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、塩素消毒による不活化性能を調べた実験では、微生物の減衰を示す Chick モデルに当てはめることにより、接触 1 時間での不活化性能を 6.53log 不活化という結果を得た。これら実験結果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高い時ほど微生物リスクが低くなる傾向が見られた。また、水道水中濃度では通常の大腸菌検出試験では検出できないほどの存在量となるが、WHO の飲料水水質ガイドラインの目標値  $1.0 \times 10^{-6}$  DALY を超える事例も見られた。

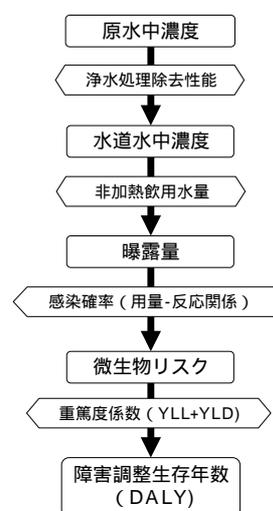
## A はじめに

我が国の水道では、塩素消毒と残留塩素の保持により水道水中の病原微生物や指標微生物をいっさい含まないことが義務付けられており、これによって水道水の安全性は確実に担保され水系感染症の予防に大きな役割を果たしてきた。諸外国においては浄水処理水中の病原微生物について定量的微生物リスク評価の手法が取り入れられている事例もあり、水道水の安全性を評価する上で大きな役割を果たしている。定量的微生物リスク評価は、原水中の病原微生物濃度や浄水処理による病原微生物の除去性能を加味した上で感染リスクを算定し、許容されるリスク範囲に適合することで水道水の安全性を評価するもので、水道水中に病原微生物が検出されないから感染リスクが「ゼロ」と判断を下す考えとは異なっている。

そこで本研究ではこれら諸外国の事例にもあるように、定量的微生物リスク評価手法を用いて、我が国でも食中毒等で重大な感染事例のある腸管出血性大腸菌 O157:H7(以下 *E. coli* O157:H7) を対象として微生物リスクの試算を行うことを目的とする。

## B 研究方法

微生物リスクの試算には、障害調整生存年数 DALY を指標として試算を行った。WHO は異なる要因によって発生する健康被害を比較するための指標として、この障害調整生存年数 DALY を提案している。DALY の基本的な原理はある要因によって発生した人への影響を、健康状態に応じて 0 (健康状態がまったくない状態) から 1 (死) までの値で重み付けをして評価することであり、健康被害を及ぼす個々の要因 (化学物質や病原微生物) に対して得た評価結果の大小を比較できる。障害調整生存年数 DALY の試算のフローは図 1 の通りである。



### (1) 原水中濃度

実際の河川原水中の *E.coli*O157:H7 の存在実態調査を行った。河川原水は近畿地方にある浄水場の原水について調査を行った。調査方法は *E.coli*O157:H7 に特異的に反応を示す蛍光標識された抗体によって染色し、蛍光顕微鏡によって観察し存在状況の調査を行った。また、生菌の指標として細菌細胞における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。調査方法の詳細は以下のとおりである。

- 1.5ml 用マイクロチューブに試料 1ml を分注し、ブロッキング試薬として 3% 牛血清アルブミン加 PBS 溶液を 10  $\mu$ l 添加し転倒混和した。
- 吸活性を有する細菌検出のための蛍光試薬 CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)を 20  $\mu$ l 注入した。
- O157 検出用の FITC 標識 O157 抗体液(KPL 社製)を 10  $\mu$ l 添加した。
- 試料を約 30 分ほど 37  $^{\circ}$ C でインキュベーションした。
- 染色した試料を孔径 0.2  $\mu$ m の黒色ポリカーボネートメンブレンフィルターに吸引ろ過して補足し、フィルターをスライドガラスに乗せカバーガラスで封入した。
- 作成したプレパラートを蛍光顕微鏡 (Olympus BX40,BX-FLA) を用いて WIB 励起 (励起波長 460-490nm、吸収波長 515nm) にて、緑色に染色された大きさが約 1 ~ 5  $\mu$ m 程度の桿菌形状の対象物を全視野により計数した。

### (2) 浄水処理による除去性能評価

#### (2)-1 凝集沈殿・砂ろ過による除去実験

凝集沈殿・砂ろ過による浄水処理による微生物除去性能を把握するため、図 2 のように実験を行った。

- 原水 (A 浄水場原水に A 浄水場沈砂池より採取した沈砂を添加して 10 度、30 度、100 度に調整) に高濃度大腸菌液 (*E.coli* K12) を原水初期濃度が約  $1.0 \times$

10<sup>6</sup>CFU/ml となるよう添加した。

- (b) ジャーテスト (急速攪拌(120rpm) : 1 分間、緩速攪拌(40rpm) : 10 分間、静置 : 10 分間) を行う。PAC 注入量については、最適注入率 (10 度 : 25mg/L、30 度 : 45mg/L (A 浄水場での実績)、100 度 : 80mg/L (ジャーテストにより設定)) と濁度変化に PAC 注入率が追従できない場合を想定した低注入率 (10 度 : 10mg/L、30 度 : 25mg/L、100 度 : 45mg/L) を設定して実験を行った。

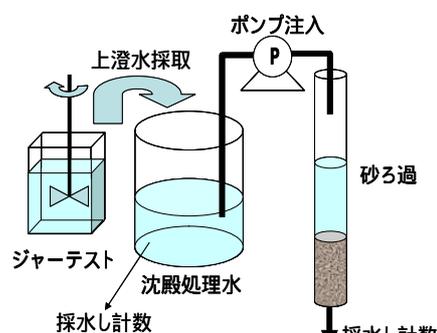


図2 浄水実験（凝集沈殿・砂ろ過）実験フロー

- (c) ジャーテストを行った上澄水を採水して、ポンプ注入にて砂ろ過装置 (カラム径 : 20mm、粒径 0.6mm 均等係数 1.5 のろ過砂を用いてる層厚 650mm とした) へ注入しろ過速度を日量 120m として急速砂ろ過を行った。
- (d) これら実験によって得られた原水、沈殿水、ろ過水の各処理水を採水し、XM-G 寒天培地 (日水製薬) を用いて 37 24 時間インキュベートした後大腸菌の計数を行い、除去性能を求めた。

## (2)-2 塩素による不活化実験

塩素消毒による大腸菌の不活化性能を把握するため、以下の手順によって実験を行った。

- (a) 振とう培養した高濃度大腸菌液を遠心分離し、PBS に再懸濁させた。
- (b) 純水に水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 程度になるよう pH 調整を行い、大腸菌懸濁液を添加して実験原水を作成した。
- (c) 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、マグネティックスターラーを用いて攪拌し接触させた。
- (d) 実験水は不活化速度を求めするため 5 分、10 分、15 分ごとに採水し、TSA 培地を用いて 37 24 時間インキュベートし生残した大腸菌を計数し、不活化性能を求めた。

## (3) 非加熱飲用水量

我が国で過去に行われたアンケート結果<sup>1)</sup>を用いて、0.321L/日・人を用いる。

## (4) 感染確率

成人を対象とした指数モデルによる用量反応関係<sup>2)</sup>より  $5.09 \times 10^{-3}$  を用いる。

## (5) DALY 係数

既往の研究結果<sup>3)</sup>より  $5.47 \times 10^{-2}$  DALY/case を用いる。

## C 研究結果

### (1)実験結果

#### (1)-1 河川原水中調査の結果

上記方法にて、採水日時が異なる4つのサンプルについて河川水中の *E.coli*O157:H7 の存在状況を調査した結果は表1のとおりである。FITC 標識された特異的に *E.coli*O157:H7 抗原に反応を示す抗体にて染色を行い図3に示すような 1~5 μm 程度の桿菌形状の細菌数を計数し平均 14.3 ~ 109 (cells/ml) という計数結果を



図3 蛍光顕微鏡で観察された *E.coli*O157:H7

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、CTC による細胞の呼吸活性の有無については、計数された全ての *E.coli*O157:H7 細胞で CTC による蛍光発光が観察できなかったため、今回得られた *E.coli*O157:H7 の計測数は呼吸活性が無い細菌数という結果となった。

表1 河川原水における水質性状と *E.coli*O157:H7 の存在状況

	水温 ( )	濁度	アンモニア態窒素 (mg/L)	<i>E.coli</i> O157:H7 (cells/ml)
サンプル1	6.5	5	0.05	109
サンプル2	6.7	6	0.05	38.7
サンプル3	6.6	4	0.06	14.3
サンプル4	6.4	30	0.19	33

*E.coli*O157:H7はn=3による平均値

#### (1)-2 凝集沈殿・砂ろ過による除去実験結果

凝集沈殿・砂ろ過による処理水濁度、大腸菌の除去率 (log 除去率) の結果は表2のようになった。

表2 凝集沈殿・砂ろ過における処理水濁度と大腸菌除去率の実験結果

原水濁度	PAC注入率 (mg/L)	処理水濁度		大腸菌除去率(log除去率)		
		沈殿後	砂ろ過後	沈殿後	砂ろ過後	全体
10度	10	7.15	0.22	0.16	0.34	0.50
	25	0.39	0.06	1.49	1.09	2.58
30度	25	0.47	0.19	1.29	0.78	2.07
	45	0.21	0.09	2.48	0.74	3.22
100度	45	0.27	0.16	2.82	0.29	3.11
	80	0.18	0.02	2.88	1.24	4.12

濁度 10 で PAC 注入量が不足している場合では凝集不良となり、沈殿水濁度が高くなり大腸菌の除去率も低い結果となった。その他の条件については、PAC の最適注入条件ではろ過出口水濁度が 0.1 度以下となり、低注入条件では 0.1 度を上回る結果となり、大腸菌の除去率は 2.07 ~ 4.12log 除去という結果が得られ、原水濁度が高いほど大腸菌の除去率が高くなる傾向が見られた。

### (1)-3 塩素不活化実験の結果

塩素消毒による、大腸菌の不活化実験により、接触時間ごとの大腸菌濃度と初期濃度に対する大腸菌除去率（log 除去率）は表 3 のようになった。

表 3 塩素接触時間ごとの微生物生残数の推移（pH7.6、水温 19.5、初期塩素濃度 0.5mg/L）

接触時間 (min)	0	5	10	15	60
大腸菌濃度 (CFU/ml)	$7.27 \times 10^6$	$1.34 \times 10^6$	$5.07 \times 10^5$	$2.18 \times 10^5$	2.16 (参考値)
初期濃度に対する 大腸菌除去率(log除去率)		0.73	1.16	1.52	6.53 (参考値)

実験条件：原水pH7.6、水温19.5、初期塩素濃度0.5mg/L

接触時間 15 分までは実験により大腸菌濃度を観測しデータを得たが、接触時間 60 分については、得られた実験結果から推測した参考値である。今回得られた大腸菌濃度の実験結果を用いて、大腸菌の不活化による減衰の傾向を Chick モデルに当てはめて算出した。Chick モデルは以下の式で表現される。

$$N=N_0 e^{-kt}$$

N: その時に存在する微生物濃度

$N_0$ : t=0 時の微生物濃度

k: 速度定数

t: 時間

今回得られた実験結果を用いてこの Chick のモデルに当てはめると図 4 のように表現される。

この関係式から、塩素接触時間

1 時間後（塩素注入から浄水池

出口の標準滞留時間を想定）の塩素消毒の不活化性能として 6.53log という参考値を得た。

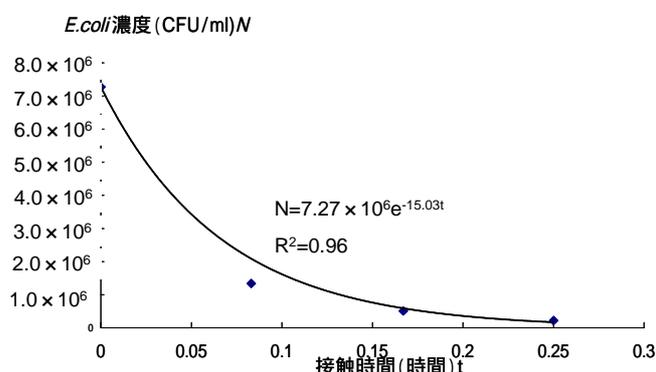


図 4 Chick モデルに当てはめた  
塩素接触時間と E.coli 濃度の関係

### (2) リスク算定結果

上記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 4 のとおりである。

表 4 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)	$4.54 \times 10^{-3}$	$3.78 \times 10^{-5}$	$1.22 \times 10^{-4}$	$8.67 \times 10^{-6}$	$1.12 \times 10^{-5}$	$1.09 \times 10^{-6}$
曝露量/日	$1.46 \times 10^{-3}$	$1.21 \times 10^{-5}$	$3.93 \times 10^{-5}$	$2.78 \times 10^{-6}$	$3.58 \times 10^{-6}$	$3.50 \times 10^{-7}$
感染確率	$5.09 \times 10^{-3}$					
感染確率(1日)	$7.43 \times 10^{-6}$	$6.18 \times 10^{-8}$	$2.00 \times 10^{-7}$	$1.42 \times 10^{-8}$	$1.82 \times 10^{-8}$	$1.78 \times 10^{-9}$
感染確率(1年)	$2.71 \times 10^{-3}$	$2.26 \times 10^{-5}$	$7.30 \times 10^{-5}$	$5.17 \times 10^{-6}$	$6.66 \times 10^{-6}$	$6.51 \times 10^{-7}$
1感染当りのDALY	$5.47 \times 10^{-2}$					
1人当たり年間健康影響度	$1.48 \times 10^{-4}$	$1.23 \times 10^{-6}$	$3.99 \times 10^{-6}$	$2.83 \times 10^{-7}$	$3.64 \times 10^{-7}$	$3.56 \times 10^{-8}$

## D 考察

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  $1.0 \times 10^{-6}$  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。

## E まとめ

本研究では *E.coli*O157:H7 を対象として障害調整生存年数 DALY を指標として微生物リスク評価を行い、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時ほどリスクが低下する傾向が見られた。また、濁度変化等に注視して浄水運転管理を行い、塩素消毒を徹底することで微生物リスクの観点からも水道水の安全性が保たれることが確認された。しかしながら、本研究で行った検討内容でも今後も熟慮する項目があり、河川原水中の *E.coli*O157:H7 の存在実態調査や観察された *E.coli*O157:H7 の感染能力の確認、濁度や凝集剤注入量、塩素濃度などより細密な実験条件設定による除去性能データの蓄積を行い、より信頼性のあるリスク評価を行うことが今後の検討課題として挙げられる。

## 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、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) を対称とした微生物リスクの試算 第 64 回全国水道研究発表会, pp.642-643 .

H 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

参考文献

- 1)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生活科学部生活工学研究会
- 2) Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* 0157 in steak tartare in the Netherlands RIVM report 257851003/2001 p81
- 3)Quantifying public health risk in the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality RIVM report 734301022/2003 p30-32