

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26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
・総括研究報告書	5
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	
	島崎 大
・分担研究報告書	
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	23
	伊藤 禎彦、越後 信哉、浅田 安廣 周 靨、松館 圭太、山崎 翔平、中西 智宏
2．水道水における腸管出血性大腸菌 (<i>E.coli</i> O157:H7) を対象と した微生物リスクの試算	35
	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)	45
	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	59
	春日 郁朗
・研究成果の刊行に関する一覧表	71

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 講師 春 日 郁 朗

研究協力者

京都大学大学院工学研究科 国 包 章 一

越 後 信 哉

浅 田 安 廣

周 靨

松 館 圭 太

山 崎 翔 平

中 西 智 宏

国立保健医療科学院生活環境研究部 藤 村 壮

東京都水道局 金 見 拓

大阪市水道局 平 林 達 也

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。バイオフィー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ームを分類し、各フィルム層への消毒処理の影響を比較したところ、バイオフィー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。0.1 m/s 以下の水流によってバイオフィームの 90% 程度が剥離されるが、残存するバイオフィー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、残存バイオフィームは薄くなるが、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 0.2 mg/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> 一日当たり感染確率 (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。

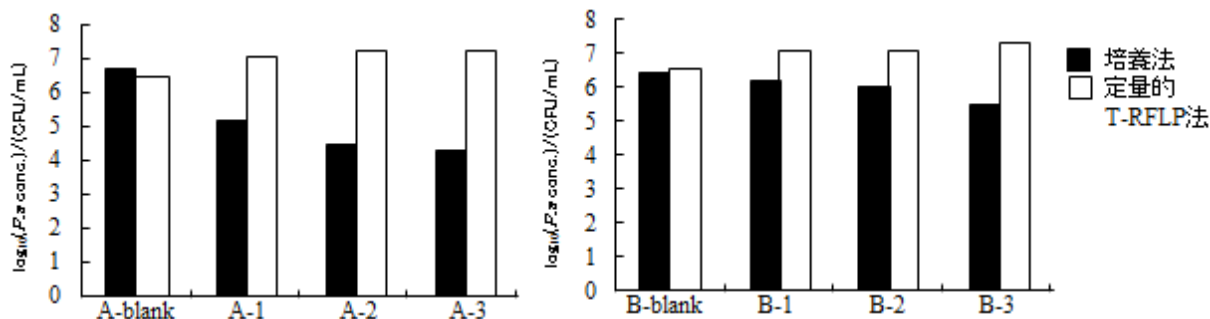


図1 塩素処理前後における *P. aeruginosa* 濃度の培養法と定量的 T-RFLP 法による結果

(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。

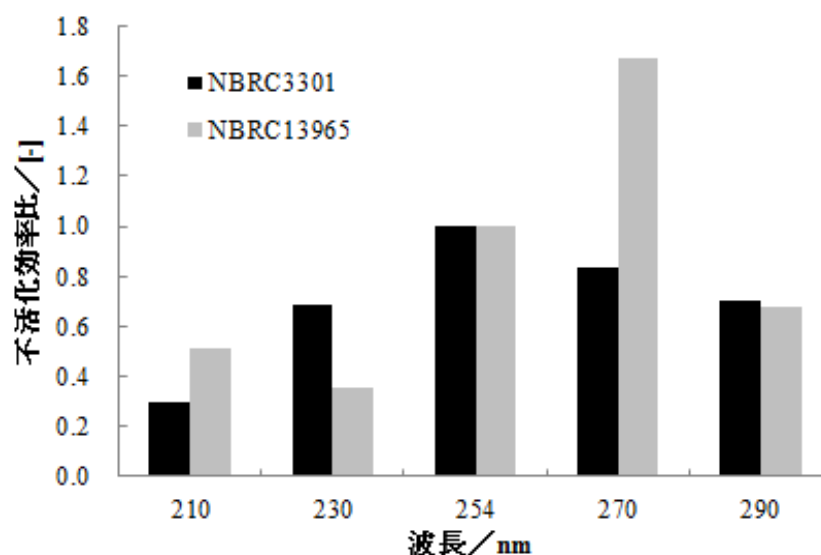


図 2 照射波長毎の大腸菌の不活化効果比 (254 nm との相対比)

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

厚生労働科学研究 平成 25 年度 報告
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

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，浅田安廣
周 靚，松館圭太
山崎翔平，中西智宏

研究要旨：新たに開発したカルキ臭低減型浄水処理プロセスについて，感染確率評価を行った．まず，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った．この結果，OH ラジカルは不活化効果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として把握しておくことが必要な事項として，樹脂充填高さや除去能の関係，細菌除去機構，pH による影響の 3 項目について検討を行った．その結果を踏まえて陽・陰イオン交換処理による微生物除去能を推定した．ついで，カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象として，*C. jejuni* による年間感染確率を求めた．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 2.07×10^{-11} 人⁻¹年⁻¹と推定され，許容感染リスク 10^{-4} 人⁻¹年⁻¹を十分に下回った．すなわち，開発したカルキ臭低減型浄水処理プロセスは，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．一方，陽・陰イオン交換処理については，両者とも微生物リスク低減に対する効果は限定的であり，感度分析の結果からも微生物リスク管理においてはその優先度は高くないことを示した．

A. 研究目的

オゾンと紫外線を併用した促進酸化(AOP)処理とイオン交換処理の連続処理によるカルキ臭低減能を強化した次世代型浄水処理プロセスを提案している¹⁾．これは塩素を注入してもカルキ臭の生成を最小限とすることが可能であるとともに，注入塩素量の最少化も狙ったものである．本研究では，*Campylobacter jejuni* を対象微生物として取り上げ，水道水に起因する定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment: QMRA)に取り組む．具体的には，琵琶湖・淀川水系を水源とし，原水中の *C. jejuni* 濃度を測定するとともに，類似した挙動を示す *E. coli* を指標として浄水処理プロセスにおける除去・不活化能データを集積し，*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．

B. 研究方法

本研究にて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．以下，方法の概略を示す．

1) 微生物濃度の測定

原水(淀川)の *E. coli* 濃度および C/E(*C. jejuni*/*E. coli*)比については，昨年と同じ実験方法²⁾でデータを蓄積した．

2) 凝集・沈殿

凝集・沈殿プロセスの *E. coli* 除去能については、昨年と同じ方法²⁾で追加調査を行い、データを蓄積した。

3) 促進酸化処理

a) OH ラジカルによる不活化効果の検証

オゾン/紫外線併用型の促進酸化処理を対象とする。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ラジカルは非常に酸化力が大きいため、促進酸化処理における不活化能を調べる際にはOHラジカルの不活化効果の有無を考慮する必要がある。

昨年度の研究³⁾によるセミバッチ式実験ではOHラジカルの不活化効果の有無を明らかにすることはできなかった。そこで、今年度では Hunt と Marinas⁴⁾の研究で用いられたリアクター(continuous-flow tubular reactor)や、Buffleら⁵⁾の研究や Gomesら⁶⁾の研究で用いられたCQFシステム(continuous quench-flow system)(図1)を参考にした連続式リアクター(図2)を用いて室内実験を行うこととした。まず、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。次いで、オゾンと紫外線単独処理による大腸菌不活化log数を足し合わせて、オゾン/紫外線処理での不活化log数と比較することでOHラジカルの不活化効果の有無を検証した。用いた紫外線ランプは、185および254nmの波長の紫外線を照射可能で、254nmの方が185nmより相対的に光強度が大きいものである。大腸菌とオゾンあるいは紫外線ランプの反応時間をポンプの流量によって変化させ、0.8秒～5秒程度の反応時間を数段階設定し、流出水をオゾン濃度測定用サンプルと大腸菌濃度測定用サンプルとして採取した。

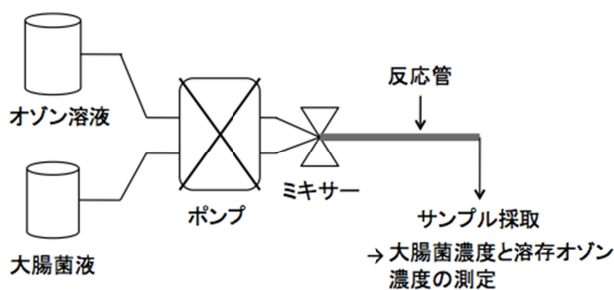


図1 CQF システムの概要

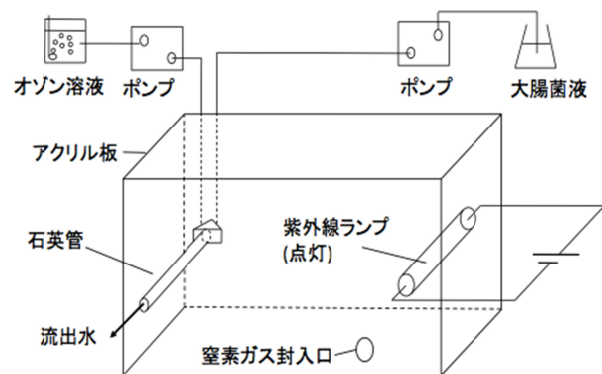


図2 リアクター概略

b) 促進酸化プロセスにおける *E. coli* 不活化能推定

促進酸化プロセスの *E. coli* 不活化能評価には、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* 添加実験を行い、*E. coli* 濃度および溶存オゾン濃度を測定した。これによりパイロットプラントにおける不活化log数とその変動を定量化できる。昨年度の研究³⁾ではパイロットプラントの1塔目での *E. coli* 不活化能を求めたが、オゾン発生機とUV照射機の位置の都合上、促進酸化処理よりもオゾン+UV処理に近い条件であった。その点を考慮し、今回は2塔目を使用して添加実験を行った。

4) イオン交換処理

a) イオン交換処理による *E. coli* の除去特性に関する実験的検討

イオン交換処理の処理特性として把握しておくことが必要な事項, すなわち樹脂充填高ささと除去能の関係, 細菌除去機構, pH による影響の3項目について検討を行った。

樹脂の充填高ささと細菌除去能の関係性を把握するためにカラム実験(図3)を行った。異なるカラムを2本連結させた。1本目のカラムは高さ75cmで, 下から10cm間隔で5個の採水口を取り付けてある。2本目のカラムは高さ50cmで, 採水口はない。2本のうち, 層厚として10, 20, 30, 40, 50, 100cmの箇所から採水した。採水時間は通水前のカラムに入っている水が全て交換され安定する, 通水後20, 30, 40分後にした。陽イオン交換樹脂にはダイヤイオンUBK16, 陰イオン交換樹脂にはダイヤイオンPA308(いずれも三菱化学製)を用いた。なお, A浄水場パイロットプラントの陽イオン交換塔の線速度と合わせて本実験の流量を設定し, 105.5 mL/minとした。

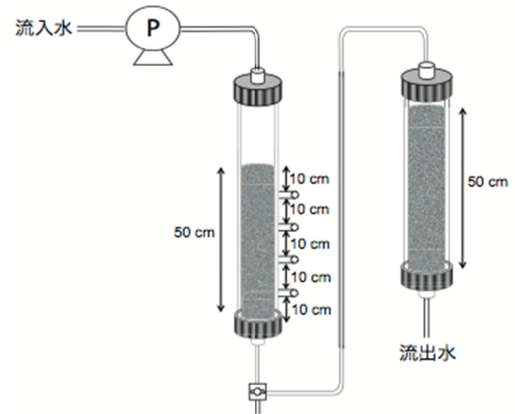


図3 本実験に使用するカラム

E. coli 除去の機構は主に, 重力沈降・慣性衝突・阻止作用・ブラウン運動による物理的な除去, イオン交換による吸着の2つが考えられる。除去機構を考察する際はイオン交換カラム内での *E. coli* 濃度変化を一次元移流拡散方程式で記述し, 定量的に評価した。まず, 主に大腸菌はイオン交換樹脂による吸着で除去されると仮定し, イオン交換カラムに大腸菌液を通水したときの大腸菌濃度変化を次式に示すモデルで表した。次に, このモデルを解くために必要なパラメータを実験などで設定した後, 数値解析を行い, カラムでの実験値と比較した。

[除去モデル]

$$\Delta x \left\{ \theta \frac{\partial C_E}{\partial t} + (1-\theta) \frac{\partial q_E}{\partial t} \right\} = \left(u C_E \Big|_{x=x} - D \frac{\partial C_E}{\partial x} \Big|_{x=x} \right) - \left(u C_E \Big|_{x=x+\Delta x} - D \frac{\partial C_E}{\partial x} \Big|_{x=x+\Delta x} \right)$$

C_E : 水中の大腸菌濃度(個/mL)

q_E : イオン交換樹脂内の大腸菌濃度(個/mL-R)

: 間隙率

u : カラム内の間隙における移流速度(cm/min)

D : *E. coli* のイオン交換カラム内移動における拡散係数(cm^2/min)

また, イオン交換処理が流入水 pH によって影響を与えるかを調べるため, 流入水 pH を 3, 5 の2段階に調整し, 調整なしの場合と *E. coli* 除去能を比較した。

b) イオン交換プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

実施設でのイオン交換処理を想定するため, 高さ50cmのガラスカラムを2本連結し, 線速度と層厚(1m)を実処理の場合と統一した上で *E. coli* の添加実験を行った。陽イオン交換樹脂にはダイヤイオンUBK16, 陰イオン交換樹脂にはPA308(いずれも三菱化学製)を用いた。

5) 塩素処理

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（遊離塩素濃度 0.05～0.15 mg/L）で *E. coli* の添加実験を行った。*E. coli* 添加後の遊離残留塩素濃度が上記範囲となるよう塩素注入量を調整した後、高濃度 *E. coli* 懸濁液をインライン注入し、定常状態に達した後（*E. coli* 注入開始 13 分経過後）、試料を複数回採取して残留塩素濃度を測定するとともに、生残 *E. coli* 濃度を測定した。

6) 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

以上で収集したデータに基づいて、カルキ臭低減型浄水処理プロセスを対象とした *C. jejuni* の年間感染確率を推定した。原水の *E. coli* 濃度および凝集・沈殿プロセスの *E. coli* 除去能および C/E 比については、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。急速砂ろ過処理の除去能は独自のデータ取得はせず、既往の調査結果を用いた。文献⁷⁾によると、前処理として凝集処理を行っている場合、急速砂ろ過処理による *E. coli* の除去能範囲は $0.4\log_{10}$ - $1.5\log_{10}$ で、平均値は $0.9\log_{10}$ である。したがって急速砂ろ過処理の除去能は最小値 $0.4\log_{10}$ 、最大値 $1.5\log_{10}$ 、最尤値 $0.9\log_{10}$ をパラメータとする三角分布を与えた。非加熱飲水量については昨年度と同様の PDF を設定した²⁾。一方、促進酸化プロセスにおける不活化能は³⁾で得た値を元に PDF を設定した。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 ($P_d = 1 - \exp(-0.686 \times D)$, D:用量)²⁾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。

C. 研究結果

1) 微生物濃度の測定

原水 *E. coli* 濃度は周⁸⁾、A 浄水場から提供されたデータ（2009 年 10 月～2013 年 12 月）を含めた計 73 個の原水データに対して分布形を当てはめた結果、ワイブル分布が適当と判断された。C/E 値の分布には不検出を除く 17 個のデータを使用して対数正規分布を当てはめた。

2) 凝集・沈殿

凝集沈殿処理は原水 *E. coli* 濃度と凝集・沈殿水 *E. coli* 濃度をランク法により得られた除去能に対して最も当てはまる最大極値分布を選択した。

3) 促進酸化処理

a) 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。オゾン / 紫外線処理における不活化効果のうちオゾンによる寄与と紫外線による寄与を求めその二つを合わせたものと、オゾン / 紫外線処理実験の結果を比較した結果、OH ラジカルは不活化効果に寄与しておらず、オゾン/紫外線処理の不活化能についてオゾン処理と紫外線処理の効果は相加的であると結論づけた。

b) 促進酸化プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

促進酸化処理の不活化能評価には、本年度行った A 浄水場パイロットプラントの 10 回の実験結果を用いた。この結果から最小値 $7.31\log_{10}$ 、最大値 $9.02\log_{10}$ 、最尤値 $7.65\log_{10}$ の三角分布が得られた。

4) イオン交換処理

a) イオン交換処理による *E. coli* の除去特性に関する実験的検討

樹脂の充填高ささと細菌除去能の関係性を把握するための実験結果を図 4 に示す。陰イオン交換処理では、樹脂充填高ささと *E. coli* 除去能の関係が線形的であることがわかる。陽イオン交換処理は陰イオン交換処理に比べて全体的に除去能が低く、充填高が変化しても除去能に大きな変化がない。陽イオン交換処理では *E. coli* と樹脂の間でイオン交換反応が起こっていないと考えられる。

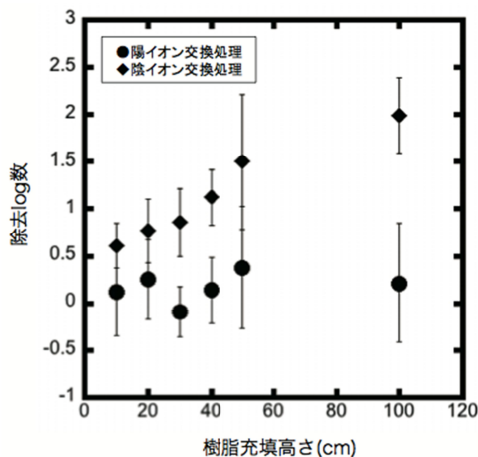


図 4 充填高と除去 log 数

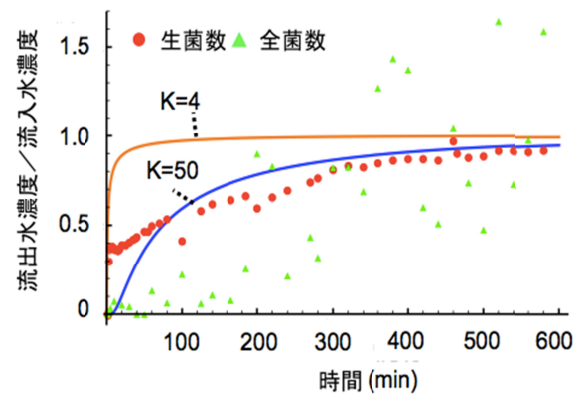


図 5 実験結果とモデルの比較

次に、陰イオン交換処理を取り上げ、陰イオン交換処理における *E. coli* 除去機構を検討した。イオン交換カラム内において *E. coli* が吸着除去される一次元移流拡散モデルを作成し、破過実験結果にあてはめた。図 5 に適合させた結果を示す。ここでは 2 種類の吸着平衡定数 K の値を示している。一方は回分実験で求めた $K = 4$ を用いて拡散係数 D を合わせたものである。もう一方は吸光度すなわち全菌数の経時変化に適合するように K を探索し、 $K = 50$ を与えたものである。図 5 からわかるように、 $K = 50$ のときの方が全菌数の経時変化にうまく適合した。 $K = 50$ という値は回分実験の結果に比べて大きな値である。これは回分実験に比べて除去能が大きいことを意味しており、吸着現象だけではなく物理的な捕捉等の現象もカラム内では起こっていると考えられる。

また、イオン交換処理が流入水 pH によって影響を受けるか調べるため、流入水 pH を 3 および 5 の 2 段階に調整し、調整なしのときと *E. coli* 除去能を比較した。その結果、各 pH で *E. coli* 除去能の範囲はほぼ変化しなかった。流入水 pH が変化してもイオン交換処理の *E. coli* 除去能に影響を及ぼさないとと言える。この原因としては、陽イオン交換処理では流入水の pH が 7 付近であれば流出水の pH は流入水とほぼ同じであるが、流入水 pH が 3 付近であれば流出水 pH は 7 に近づいていくことが挙げられる。一方、陰イオン交換処理では流入水 pH が 7 付近であれば流出水 pH が 4 付近に近づくが、流入水 pH が 3 では流出水 pH は変化しない。したがって、陽・陰イオン交換処理ともに処理過程で一定の pH に近づいていく。そのため、*E. coli* 表面のイオン変化はほとんどなく、表面の電荷量に影響がほとんどなくなるために除去能が変化しないと考えられる。

b) イオン交換プロセスにおける *E. coli* 不活化能の推定

QMRA で使用する陽・陰イオン交換処理ともに 15 個のデータを図 6 に示す。各採水時間に採水した流入水の *E. coli* 濃度の平均値と各採水時間における流出水 *E. coli* 濃度の平均値を用いて除去 log 数を求めている。陽イオン交換については除去 log 数が負となるデータが 4 個存在するが、流入水よりも流出水の *E. coli* 濃度が高くなるような現象は本来の浄水処理では考えにくいいため、最小値 0, 最大値 0.96 \log_{10} , 最尤値 0.25 \log_{10} をパラメータとする三角分布を与えた。陰イオン交換処理による除去能は 15 個のデータに対してロジスティック分布を当てはめた。

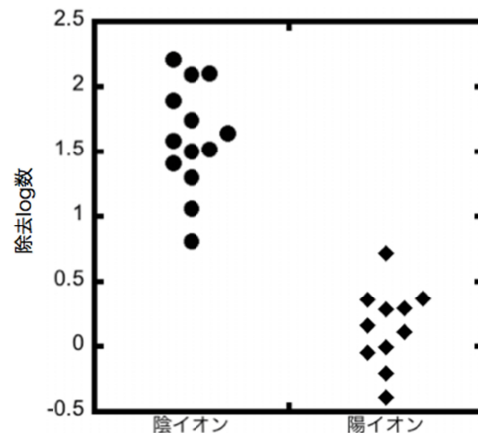


図6 QMRA に用いる除去 log 数

5) 塩素処理

カルキ臭低減型浄水処理プロセスでは塩素濃度を低減させることを想定しているため、塩素添加実験中の残留塩素濃度が 0.1 mg/L 付近のときに得られた 9 回の実験結果を用いる。その結果から、最小値 3.44 \log_{10} , 最大値 5.83 \log_{10} , 最尤値 4.03 \log_{10} をパラメータとする三角分布を与えた。

6) 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、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 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。得られた総合除去・不活化能の分布を図 7 に示す。中央値 18.14 \log_{10} , 平均値 18.09 \log_{10} が得られた。QMRA による推定値をまとめたものを表 2 に示す。年間感染確率は平均値として 2.07×10^{-11} /人/年 (中央値 0) が得られた。

C. jejuni 年間感染確率に対して感度分析を行った結果を図 8 に示す。年間感染確率に対する寄与率が最も大きい要素は原水中 *E. coli* 濃度であった。これは、測定された *E. coli* の濃度のばらつきが数オーダーレベルに達するためである。その次に寄与率の大きい要素は表流水中 C/E 値であった。これは河川水中 *E. coli* 濃度が年間を通して大きな変化がない一方で、*C. jejuni* 濃度が採水された季節によって約 1~2 オーダー変化するためである。一方、カルキ臭低減型浄水処理プロセスの中では凝集・沈殿処理の影響が最も大きいと評価された。凝集・沈殿処理の除去能は原水 *E. coli* 濃度と凝集沈殿水 *E. coli* 濃度をランク法によってペアリングし除去能を算出する。原水 *E. coli* 濃度は採水ごとに変化が大きく、凝集沈殿水 *E. coli* 濃度は原水ほどの変動幅を持たないため、結果として凝集沈殿処理は変動幅が大きくなってしまふ。そのため凝集沈殿処理の寄与率が大きくなると考えられる。

表1 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	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> 一日当たり感染確率 (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}

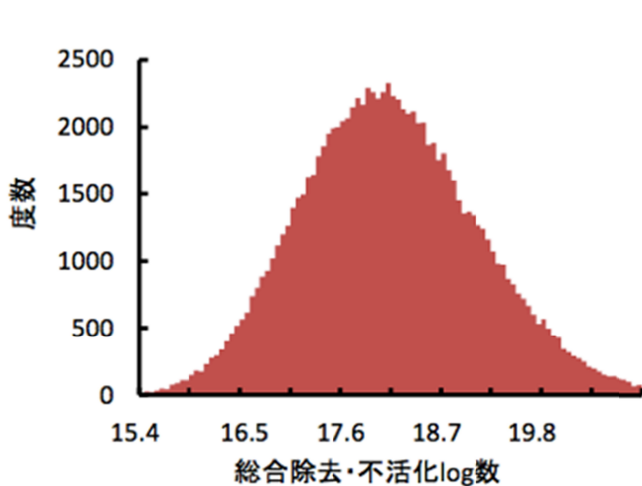


図7 総合除去・不活化能の結果

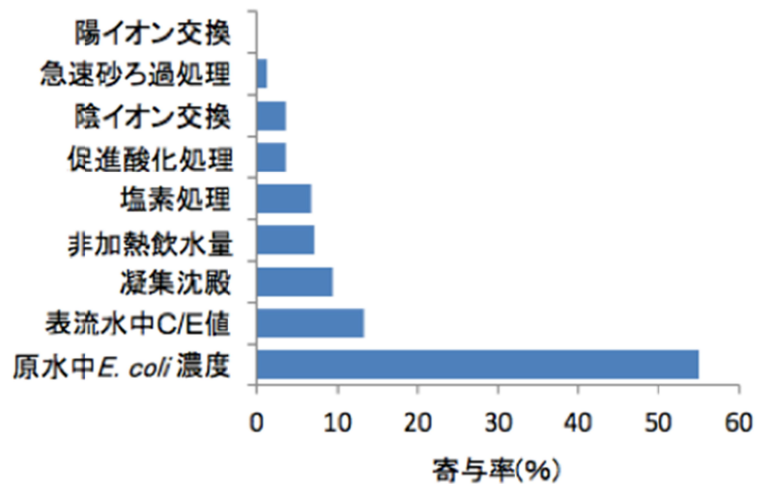


図8 年間感染確率に対する感度分析

D. 考察

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。

昨年度行った OH ラジカルの不活化効果を確認するためのセミバッチ式実験からは、OH ラジカルの不活化効果について明らかにすることができなかった。今年度は、オゾン / 紫外線処理の大腸菌不活化能における OH ラジカルの寄与は、実際上考慮する必要は無いと結論づけることができた。この成果はカルキ臭低減化処理プロセスを合理的にモデル化する上で重要な知見を提供している。

一方、今後の課題としては、促進酸化処理における不活化能がパイロットプラントでの実測値を用いただけになっている。実施設での除去能を推定した上で、処理水の年間感染確率を再評価する必要がある。オゾン / 紫外線処理は実施設に導入された例はなく、その大腸菌不活化能の評価は室内実験結果、パイロットプラントでの実験結果と数理モデルを用いて推定するべきものである。実際に昨年度³⁾はこのような手法により実施設スケールでの不活化能を推定した。また、年間感染確率に対する不確実性分析を行い、今後知見の収集が必要な事項を提示する予定である。

E. 結論

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ると結論づけた。

イオン樹脂の充填高さとの細菌除去能の関係性を考察した結果、陰イオン交換処理では、樹脂充填高さとの *E. coli* 除去能の関係が線形的であった。陽イオン交換処理の除去能は低く、*E. coli* と樹脂の間でイオン交換反応が起こっていないと考えられた。

陰イオン交換処理における *E. coli* 除去機構を検討した結果、吸着現象だけではなく物理的な捕捉等の現象もカラム内では起こっていると考えられた。

提案した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 2.07×10^{-11} / 人 / 年 (中央値 0) が得られた。これは許容リスクレベル 10^{-4} / 人 / 年を大きく下回り、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る。ただし、本研究の範囲ではパイロットスケールでの結果を示しており、実施設では結果に差が生じる可能性があることは注意しなければならない。

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指摘した。一方、陽・陰イオン交換処理ともに除去能は小さく、リスク管理上の重要度は低いことを指摘した。

参考文献

- 1) Echigo, S., et al.: Reduction of chlorinous odor by the combination of oxidation and ion-exchange treatment, J.Wat. Supply: Res. Technol.-Aqua, 2013 (in press).
- 2) 伊藤禎彦, 越後信哉, 大河内由美子, 周靚, 野村昌弘, 中西智宏: 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, 厚生労働科学研究補助金 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, pp.21-33, 2013.
- 3) 中西智宏: 水道水の微生物的安全性に対するオゾン / 紫外線処理の効果に関する研究, 京都大学卒業論文, 2013.
- 4) Hunt, N. K. and Marinas, B. J.: Kinetics of *Escherichia coli* with ozone, Wat. Res., Vol. 31, pp. 1355-1362, 1997.
- 5) Buffle, M. O., Schumacher, J., Salhi, E., Jekel, M. and von Gunten, U.: Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: application to disinfection and pharmaceutical oxidation, Wat. Res., Vol. 40, pp. 1884-1894, 2006.

- 6) Gomes, A. C. , Nunes J. C. and Simões, R. M.: Determination of fast ozone oxidation rate for textile dyes by using a continuous quench-flow system, J. Hazard. Mater., Vol. 178, pp. 57-65, 2010.
- 7) Wim, A.M.H., Madema, G.J.: Elimination of micro-organisms by water treatment processes, IWA Publishing, London, UK, pp.38, 2010.
- 8) 周靚: 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.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1 . 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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 . 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) 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.
- 4) 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.
- 5) 浅田安廣, 大河内由美子, 伊藤禎彦, 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講演集, 71, 2013.
- 6) 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.
- 7) 周靚, 松館圭太, 伊藤禎彦, 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, 平成 25 年度全国会議 (水道研究発表会) 講演集, 566-567, 2013.

- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 松館圭太, 周靚, 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 |

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 1.0×10^{-6} DALY を超える事例も見られた。

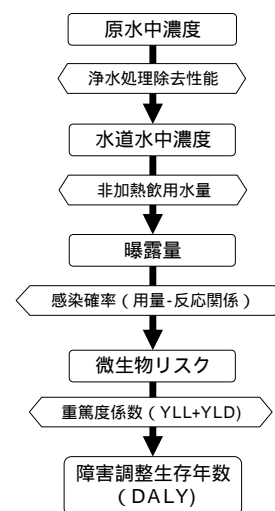
A はじめに

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。

- (a) 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 μ l 添加し転倒混和した。
- (b) 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 μ l 注入した。
- (c) O157 検出用の FITC 標識 O157 抗体液(KPL 社製)を 10 μ l 添加した。
- (d) 試料を約 30 分ほど 37 $^{\circ}$ C インキュベーションした。
- (e) 染色した試料を孔径 0.2 μ 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。
- (f) 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 μ 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。

- (a) 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 $1.0 \times$

10⁶CFU/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。

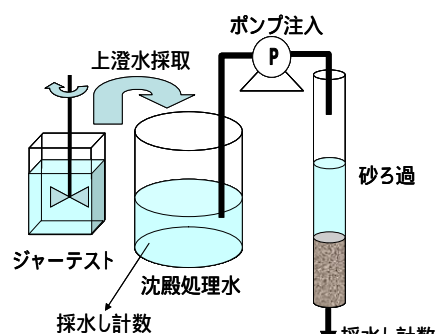


図2 浄水実験（凝集沈殿・砂ろ過）
実験フロー

- (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¹⁾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²⁾より 5.09×10^{-3} を用いる。

(5) DALY 係数

既往の研究結果³⁾より 5.47×10^{-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)	7.27×10^6	1.34×10^6	5.07×10^5	2.18×10^5	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。

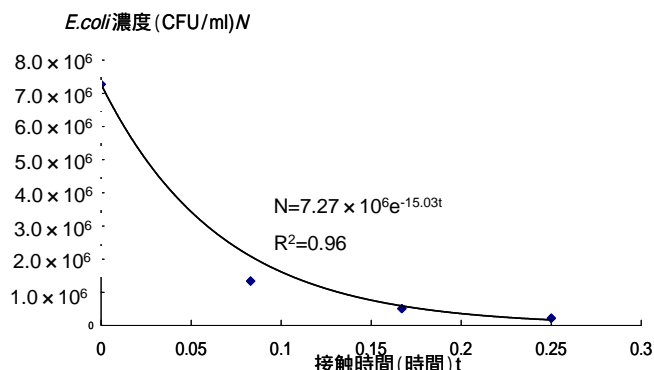


図 4 Chick モデルに当てはめた
塩素接触時間と E.coli 濃度の関係

(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)	4.54×10^{-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}

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 1.0×10^{-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

平成 25 年度 分担研究報告書
分担研究テーマ： 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(お茶の水女子大学)

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ている。まず多種の細菌の集合である従属栄養細菌(*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。結果として配管中の残留塩素濃度レベルの処理においては遺伝子レベルの損傷には至らないことから、遺伝子検出法である T-RFLP の適用は難しいことがわかった。不活化処理前後の試料に培養工程を入れることによって、培養後濃度を定量的 T-RFLP によって定量するなどの前処理を導入すれば適用は可能ではないかと考えられる。

次にバイオフィームを形成した従属栄養細菌(*Pseudomonas* 菌)に対し、異なる水流(3段階を設定)による剥離強度によってバイオフィームを分類し、各フィルム層への消毒処理の影響を比較検討した。その結果、バイオフィームになることにより浮遊状態よりは不活化効果が低下することがわかった。さらに異なる水流下で残存したバイオフィームへの処理効果を比較したところ、0.1 m/s 以下の水流によってバイオフィームの 90%程度が剥離されるが、残存するバイオフィー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、残存バイオフィームは薄くなるが、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ー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。

病原微生物に対しては、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、一方の大腸菌において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。

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。本研究では昨年度まで配水管中で増殖が問題となる従属栄養細菌を対象とし、培養検出が不可能な細菌を定量的に把握する方法として T-RFLP 法を応用する手法について、濃度既知のマーカー生物として大腸菌を対象試料に投入し、その T-RFLP ピーク面積の比を求めることにより、対象微生物の濃度推定を行う方法を検討した結果、*Pseudomonas* 菌に対して T-RFLP 法の定量的測定方法が可能であると示唆された。そこで本年度は、この定量的測定方法が、配管中の残留塩素濃度レベルの塩素処理において、濃度変化の検出に適用できるかを検討し、消毒処理評価への適用可能か検討した。

またバイオフィーム形成従属栄養細菌のモデル細菌として *Pseudomonas* 菌を用いて、バイオフィーム状での塩素消毒による不活化効果を検討した。アニュラーリアクターを用いて管内水流を模擬し、その剪断力による剥離によって生じる残存バイオフィームにおける消毒処理耐性を検討した。

紫外線処理として、最も一般的に用いられる紫外線波長は 253.7 nm の単一光であり、この波長については多種の微生物に対する不活化効果および回復効果などは、詳しく調べられてきた。この波長光以外の検討事例としては、多波長型光源である中圧紫外線ランプを用いたものがある。このランプは 200~500 nm で幅広い照射波長域を持っており、この光源における不活化効果や回復効果は検討事例が多い。しかし多波長光を同時に照射させた場合の複合効果を見ているだけであり、波長毎にこれらの効果に関して詳細に検討した例は非常に少ない。そこで本研究では、紫外光を波長毎に照射できる分光照射器を用いることによって、大腸菌の不活化効果と処理後の光回復効果を詳しく検討することとした。この検討結果によって回復効果の少ない消毒方法の提案に結びつけると考えた。

B. 研究方法

今年度は T-RFLP 法の定量的検出方法の塩素処理への適用および生物膜状の従属栄養細菌への塩素処理効果の検討のいずれについても単離株 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) を用いて検討した。紫外線処理による照射波長光の影響の相違についての検討においては 2 種類の大腸菌株 (NBRC13965 および NBRC3301) を用いて行った。

B.1 T-RFLP 法の定量的検出方法の不活化評価への適用について

本方法で用いた T-RFLP の定量的検出方法は、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ことを利用した方法である。本年度は、塩素処理前後の試料に対して、この定量的検出方法を適用し、濃度変化を評価できるのかについて検討した。

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 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 10^6 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。

この試料に対し塩素処理を実行した。短い接触時間での塩素処理実験の再現性を確保するため CQF (Continuous Quenching Flow) システムを用いた。Fig.B.1 にその概要図を示す。

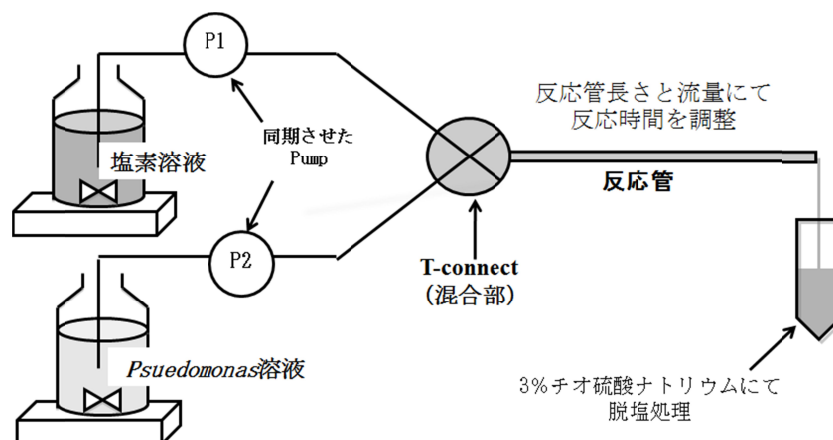


Fig. B.1 CQF システムによる塩素処理装置の概要

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た。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。反応管出口より流出した反応液を予め 3% チオ硫酸ナトリウムを入れておいた採水管にて採取し、採取と同時に塩素反応を停止させることにより反応管内での滞留時間を反応時間として計算した。

1 つの実験条件にて 3 回繰り返し行ったが、塩素濃度が変化するため、実験の度に CT 値は若干変動した。2 回に分けて、実験条件を設定した。

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) (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、高濃度溶液を準備した。初期試料の濃度は約 10^7 CFU/mL であり、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。

以下に T-RFLP 法の詳細を示す。

T-RFLP 解析について

準備した混合溶液を順次 T-RFLP 解析に供した。各条件はこれまでと同様とした。

DNA 抽出

各々の試料溶液 60 mL を遠心分離をした(11000 rpm, 4℃, 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.

PCR 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'-CCGTC AATTC 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℃:30秒 52℃:30秒 72℃:1分) \times 30 サイクル 72℃:10分とし, 反応終了後の庫内は 4℃ 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.

制限酵素処理

PCR 産物 100 ng を, 制限酵素 *Hha* (TaKaRa)を用いて消化した(37℃, 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℃ で 2 分間熱変性させた後, 氷冷した.

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.

実験の流れを Fig. B.2 に示した.

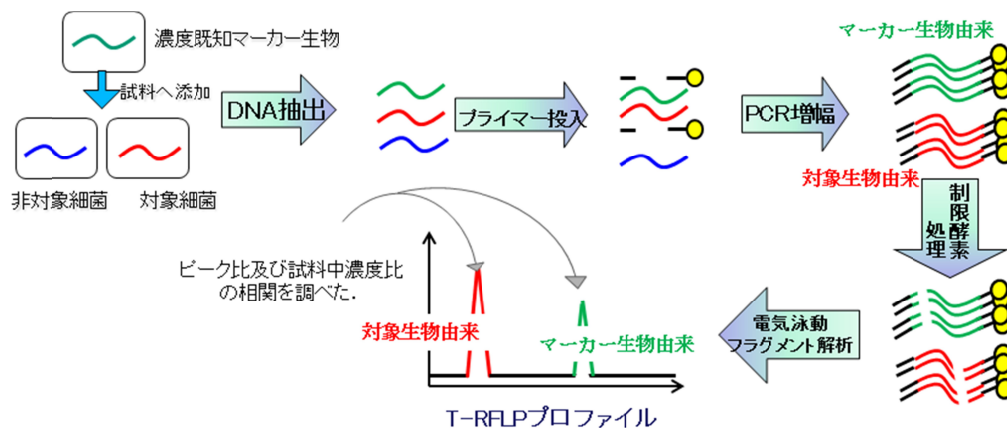


Fig. B.2 定量的 T-RFLP の測定法の流れ.

B.2 *Paeruginosa* 生物膜 (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

本方法は *Paeruginosa* を用いてガラスやPVC上に生物膜を形成させ, 付着強度による分類を調べるために, 異なる強度の遠心分離の適用を試みるものである. また付着強度毎に塩素処理による *Paeruginosa* の不活化効果を調べた.

1) 使用細菌株について

本研究では, B.1 と同様に *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) (以下 *P. aeruginosa* と示す) を使用した.

2) バイオフィーム形成方法および形成細菌量測定方法

配水管の枝管材料である PVC 片をバイオフィーム形成材料とした。滅菌した栄養液体培地 TSB (Tryptic Soy Broth) に *P. aeruginosa* を接種し 30 °C で 24 時間培養した。培養液を滅菌済みペトリ皿 (90 mm) に移し、そこに滅菌した PVC 片 (20 mm × 30 mm) 必要枚数投入し、さらに 25 °C で 1 時間培養し菌を付着させた。その後、バクテリアが付着した PVC 片を別に用意した滅菌済み TSB 入ペトリ皿に移動し 25 °C で 24 時間培養してバイオフィームを形成させた。

形成したバイオフィーム中の *P. aeruginosa* 量は、バイオフィーム形成 PVC 片を 20 mL PBS を封入した遠心管に移動し 10,832 g × 10 分間の遠心分離により、PVC ディスク上の付着菌を全て剥離し PBS 液相に移した。PBS 液相に移した細菌を、栄養寒天培地 TSA を用いた希釈平板法にて測定した。培養条件は 37 °C で 18~24 時間とした。30~300 のコロニーが得られた希釈倍率のペトリ皿を採用し平均値を濃度とした。単位は CFU (colony forming unit)/mL とした。

3) アニュラーリアクターでの水流による剥離

上記 2) にて作成したバイオフィーム形成片をアニュラーリアクター (BioSurface Technologies corp.) に設置し、回転数 10, 50, 100 rpm にて回転させた。回転継続時間を 1, 10, 30 分とし、それぞれの継続時間後に形成片を取り出して、残存バイオフィーム中の *P. aeruginosa* 量を上述の方法にて測定し、各回転数における残存バイオフィーム量の推移を測定した。

用いたアニュラーリアクターにおける各回転数において相当する流速と設定継続時間を表 B.1 にまとめた。

表 B.1 アニュラーリアクターによるバイオフィーム剥離実験の実験条件

回転数 (rpm)	流速 (m/s)	継続時間 (min)
10	0.089	0, 1, 10, 30
50	0.44	0, 1, 10, 30
100	0.89	0, 1, 10, 30

4) 残存 *P. aeruginosa* バイオフィームに対する塩素処理による不活化実験

アニュラーリアクターにバイオフィーム形成片を設置し、いずれの回転数においても回転継続時間 10 分に固定し、水流による剥離を行わせた。バイオフィームが残存する PVC 片を取り出し、用意した塩素溶液に投入し塩素に接触させた。塩素溶液は、滅菌済みリン酸緩衝液 200 mL に、1 分後の残留遊離塩素濃度が 1.0 mg/L となるよう次亜塩素酸ナトリウム溶液を投入し用意した。塩素濃度は DPD 法で測定した。アニュラーリアクターから取り出した PVC 片を、上記の塩素溶液 10 mL に投入して所定時間静置した。溶液は撹拌子にて撹拌し、均一に塩素接触が起こる様にした。塩素処理前後の PVC 片上のバイオフィーム中の生残 *P. aeruginosa* 濃度を上述 2) の方法にて測定した。

実験の流れを Fig. B.3 に示す。

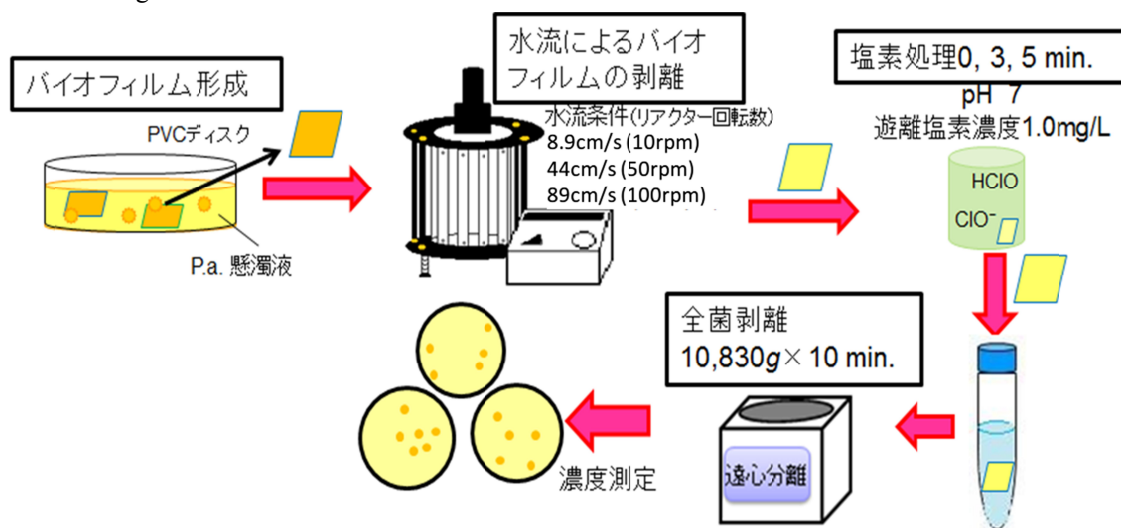


Fig. B.3 アニュラーリアクターによるバイオフィームの剥離と塩素処理実験の流れ

B.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 種とした。各株は、栄養寒天培地 (Tryptic Soy Agar) にて 37 °C でコロニーを形成させ、適量を鈎菌し、PBS 溶液に懸濁させて、対象試料とした。この時各大腸菌株の濃度は $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL となった。

各試料を 1 cm × 1 cm の石英セルに 2 mL 投入し、小型分光器 (島津製作所製, SPG-120UV) から出射する各波長光を照射した。石英セル内の試料は小型のマグネチック攪拌子を用いて実験中は絶えず攪拌した。照射した波長光は 210, 230, 254, 270, 290 nm とした。

各照射波長光の照射量は、化学線量計 (KI/KI O₃ 溶液) を用いて測定したが、照射量算定に用いた各波長の量子収率は既報 1) を参考にした。

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 (東芝製, 6W) 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 6 mm 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 0.1 mL ずつ採取し濃度測定を行った。

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、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については C.2 に、異なる照射波長光による不活化効果の違いについては C.3 に示す。

C.1 T-RFLP 法の定量的検出方法の不活化評価への適用について

各 3 回ずつ合計 6 回の実験結果について表 C.1 にまとめた。各 CT 値は、反応管出口にて実測した塩素濃度と接触時間 15 秒 (= 0.25 min.) として算出した。生残率は各処理後の濃度を処理前の濃度で除して求め、対数値にて表記した。

表 C.1 各混合溶液の各蛍光ピーク値とピーク比

サンプル	CT 値 (mg・min./L)	<i>Paeruginosa</i> 濃度 (CFU mL ⁻¹) (培養測定)	<i>Paeruginosa</i> log (生残率)	T-RFLP 定量用に投入した <i>E.coli</i> 濃度 (CFU/mL)
実験 1 回目				
処理前 (A-blank)		5.3×10^6		
処理後-1 (A-1)	0.21	1.6×10^5	-1.52	4.4×10^5
処理後-2 (A-2)	0.29	2.4×10^4	-2.34	
処理後-3 (A-3)	0.30	1.7×10^4	-2.49	

実験 2 回目				
処理前 (B-blank)		3.3×10^6		
処理後-1 (B-1)	0.13	1.8×10^6	-0.26	3.6×10^5
処理後-2 (B-2)	0.20	1.1×10^6	-0.48	
処理後-3 (B-3)	0.28	3.7×10^5	-0.95	

また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 Fig. C.1 に示した。

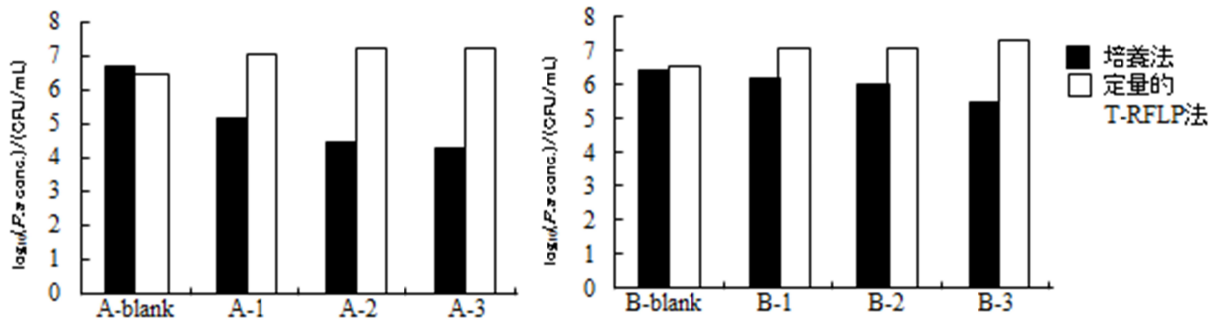


Fig. C.1 不活化実験前後における *P. aeruginosa* 濃度の培養法および定量的 T-RFLP 法による結果

C.2 *P.aeruginosa* 生物膜 (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

本研究では、PVC 片に形成した *P. aeruginosa* のバイオフィルムをアニュラーリアクターにおける各水流条件にて剥離させ、残存したバイオフィルムに対する塩素処理の効果を検討した。

1) アニュラーリアクターでの水流による剥離

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際の、残存バイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量の変化を Fig. C.2 に示した。図に示されるとおり、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ていることがわかる。

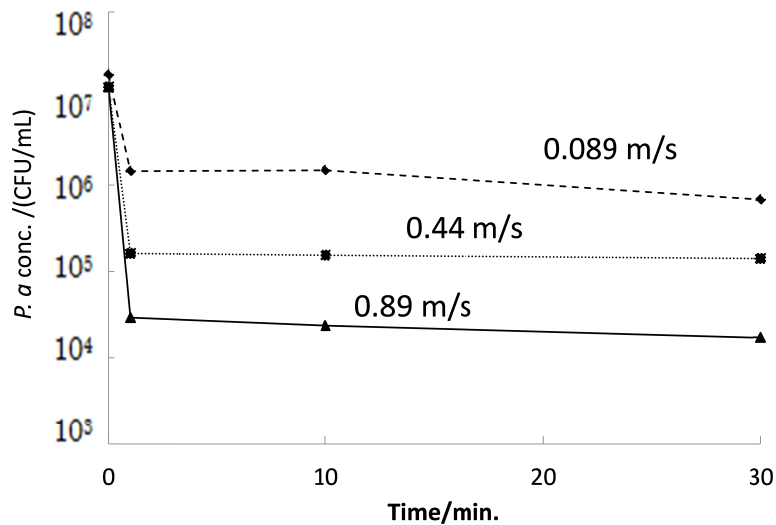


Fig. C.2 各流速下における残存バイオフィルム中の *P. aeruginosa* 量の経時変化

2) 残存 *P. aeruginosa* バイオフィルムに対する塩素処理による不活化実験

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を Fig.C.3 に示す。

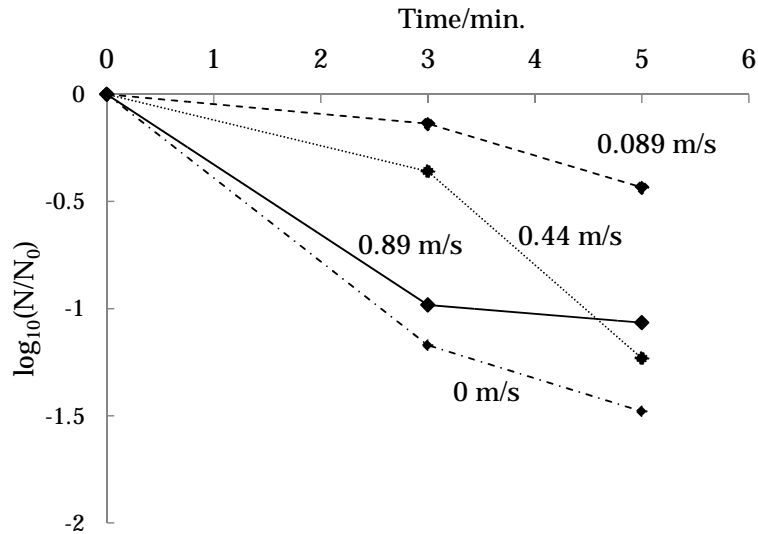


Fig. C.3 各流速下における剥離後の残存バイオフィルムにおける塩素処理の効果

流速 0 m/s は、形成させて剥離させなかったバイオフィルムを意味する。この状態での不活化効果が最も高かった。一方、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。

C.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

Fig. C.4 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した。

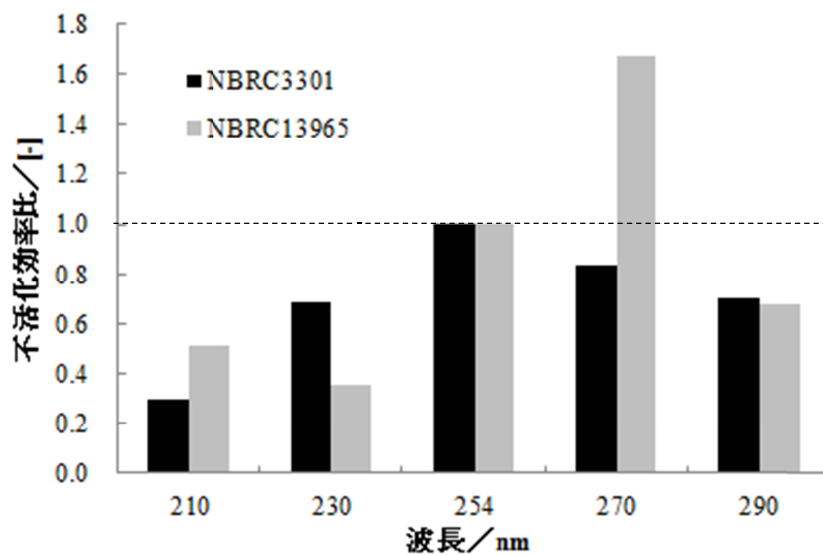


Fig. C.4 波長毎の不活化効果比 (254 nm との相対比)

Fig. C.5 および C.6 に、それぞれの大腸菌株における可視光照射下での濃度変化を示す。これらの図を比較すると、NBRC3301 株は光回復効果が高い株であることがわかる

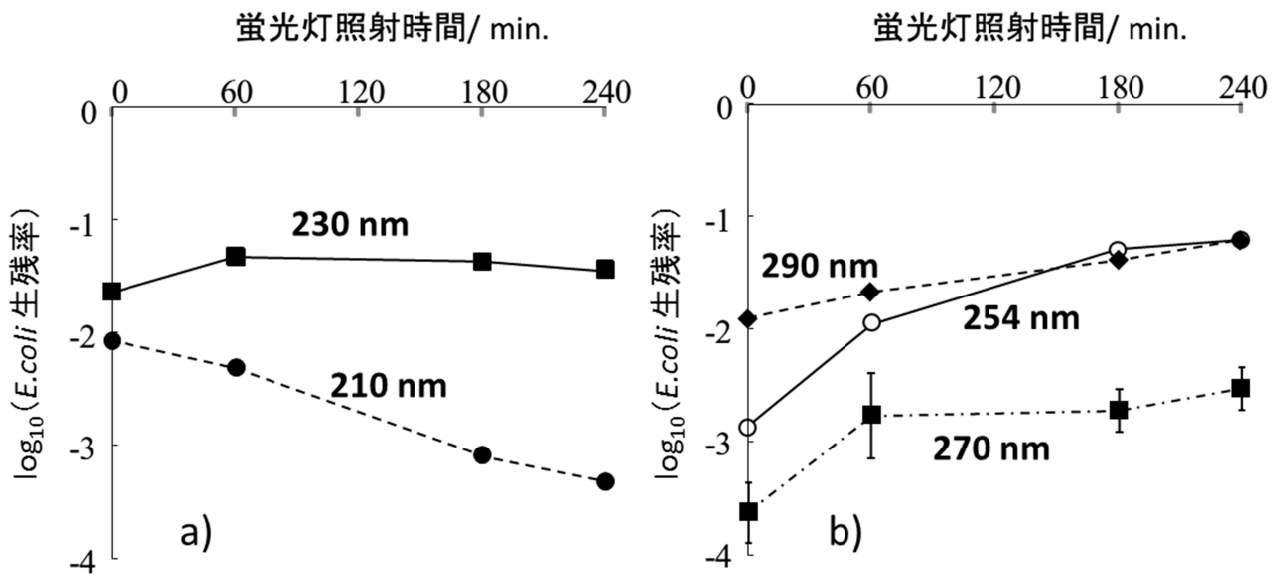


Fig. C.5 NBRC13965 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

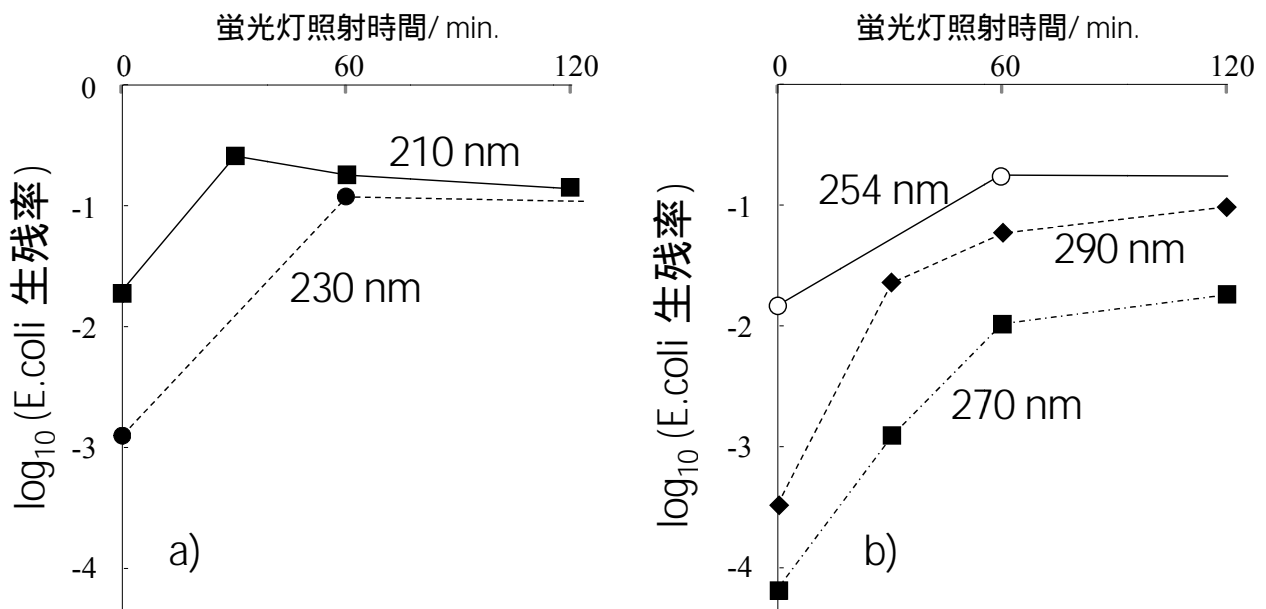


Fig. C.6 NBRC3301 株における各波長光による不活化後の蛍光灯照射下での濃度変化
a) 210 nm と 230 nm による不活化後, b) 254 nm, 270 nm, 290 nm による不活化後

D. 考察

D.1. T-RFLP 法の定量的検出方法の不活化評価への適用について

Fig. C.1 の結果からわかることは、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いことである。また塩素処理を行った試料については定量的 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。

Fig. D.1 に今回の実験結果と昨年度の実験結果を合わせた図を示す。

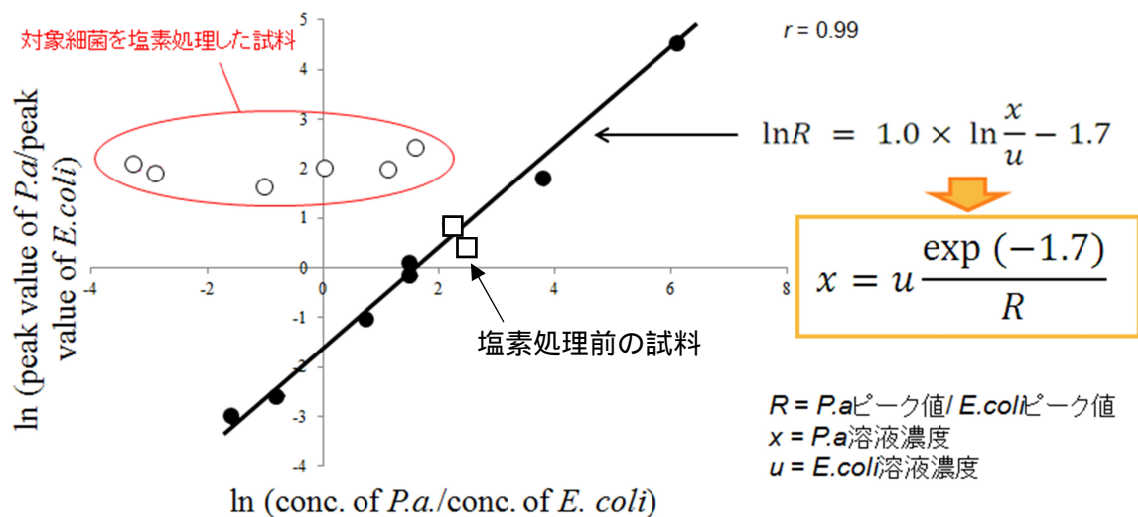


Fig. D.1 対象微生物とマーカーについての定量的 T-RFLP におけるピーク比と培養法による濃度比
 ●：昨年度データ，○：塩素処理後のデータ（今年度），□：塩素処理前のデータ（今年度）

対象微生物(*P. aeruginosa*)濃度およびマーカー生物(*E. coli*)濃度の組合せは昨年度と今年度では異なる条件であったが、図に示されるように、塩素処理前データは、昨年度データから得られる相関に合致していたことから、図中の相関式が違う条件下でも成立することが確認できた。

塩素処理後の試料に関しては、図中の相関式からは外れる結果になっていることがわかる。Fig. C.1に見られる様に、塩素処理前試料に比べて生残濃度が低くなっているにも関わらず T-RFLP ピークが高く出ているのは、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ており、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。

いずれにしても塩素処理後の試料においては、定量的 T-RFLP 法によって残存 *P. aeruginosa* 濃度を定量することは困難であることがわかった。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。

D.2. *Paeruginosa* 生物膜（バイオフィーム）の付着強度の違いによる分類とその不活化効果の検討

Fig. C.3 に示される様に、0 m/s の場合は、形成させたバイオフィームに対する塩素処理の効果を示したものである。Fig. C.2 に示す様に、0.089 m/s という低い流速下によって剥離する菌量は、0 m/s の場合の 90%にあたる事がわかる。従って、低流速でも剥離するような非常に付着強度の弱い菌が全体の 90%を占めており、この上層の不活化率が全体の不活化率を示すことになる。Fig.C.3 に示される様に、0 m/s の場合が最も不活化効果が高かったのは、この剥離しやすい上層のバイオフィームに対しては、塩素の浸透が起りやすく、不活化効果が現れやすかったためと考えられる。

Fig. D.2 には既報における浮遊状態の *P. aeruginosa* に塩素処理を行った場合の結果を示した。図中の TSA が示すデータが、今回の実験方法と同じ測定条件のものである。今回の塩素処理は遊離塩素 1.0 mg/L 条件下で行ったものであり、Fig.D.2 における同条件下での不活化効果と今回の 0 m/s の場合比較すると、今回は不活化効果が低くなっている。従って、剥離しやすい上層のバイオフィームにおいては塩素の浸透が起りやすいといえども、浮遊状態よりは塩素処理の効果が若干低く抑えられる効果があると考えられた。

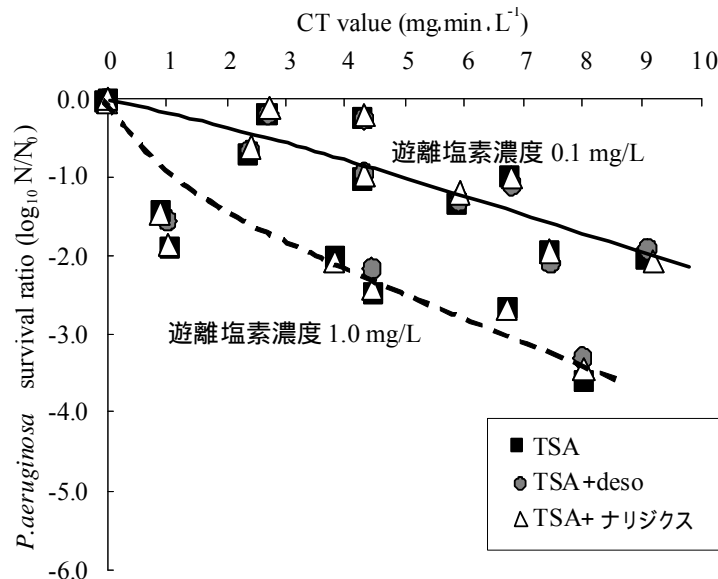


Fig. D.2 塩素投入後の浮遊状態の *P. aeruginosa* の濃度変化 (pH 7)
(平成 21 年度厚労科研分担研究報告書より)

0.089 m/s の流速下では, Fig.C.2 の結果から PVC 上に残存している菌は剥離前の状態の 10%程度であり, 0.44 m/s の流速下で残存する菌が 1%程度であるのに対し, 10 倍ほど多いことがわかる. この条件での残存バイオフィームでの不活化効果が最も低いことが示されているが, これは, このバイオフィーム状態においては塩素が深部にまで浸透せず, 塩素の効果が抑制されることになったバイオフィーム層の残存率が高く, かつバイオフィーム全体に占める割合も高いことから, 全体の不活化効果が低くなったと考えられた.

さらに 0.44 m/s, 0.89 m/s と相対的に大きな流速下では, せん弾力が高くなり剥離効果が高いため, 残存菌が 10 分の 1, 100 分の 1 と少なくなるに従って, フィルム層が薄くなり深部にまで塩素が浸透しやすく, 全体の不活化効果が高まったと考えられた.

Fig. D.3 に各バイオフィーム層に対する塩素処理の効果を模式的に表した図を示す.

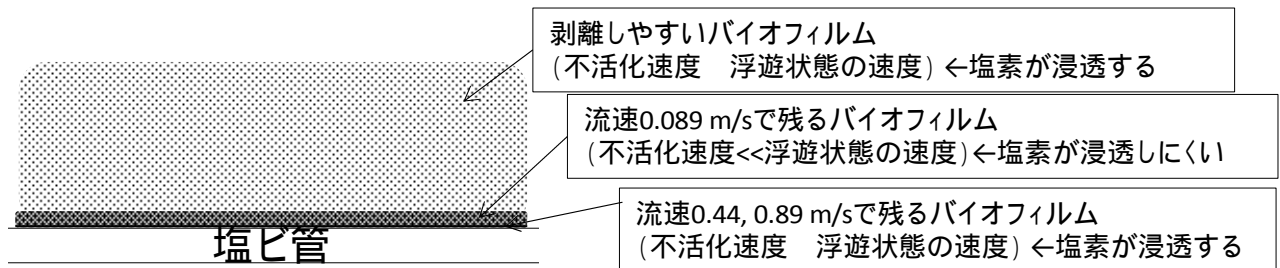


Fig. D.3 各バイオフィーム層の塩素処理耐性からみた特徴

D.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

Fig.C.4 に示したように不活化効果に対しては, 大腸菌の NBRC13965 株では 270 nm が最も高い効果となっており, 230 nm が低くなっている. 一方大腸菌の NBRC3301 株では 254 nm が最も高い効果であり, 210 nm において効果が低くなっている. 同じ大腸菌でも株により波長毎の感受性の相対比が異なっていることがわかった. 不活化効果が核酸 (DNA) の吸収スペクトルの相対比と似た傾向であるのは 13965 株である. 従って 3301 株においては核酸の吸収だけでは説明できない不活化機構が働いている可能性も考えられる.

Fig. C.5 と C.6 を比較すると, 大腸菌の NBRC3301 株はいずれにおいても光回復効果が高い株であることがわかる. 波長光毎に見てみると, 254 nm 以上の波長光 (254, 270, 290 nm) においては, 3301 株でも 13965 株においても光回復効果が見られた. 従って 270 nm と 290 nm による不活化メカニズムは, これまで解明されてきた 254 nm 光による不活化機構と同じであると推定された.

一方, 短い波長光における傾向は株によって異なっていた. すなわち 210 nm および 230 nm の波長光にお

いては NBRC3301 株では光回復現象が明確に見られたが、NBRC13965 株では見られなかった。従って NBRC3301 株では、いずれの波長光照射でも 254 nm 照射光と同様に核酸塩基の二量体形成による不活化機構が働いているが、NBRC13965 株では、210 および 230 nm の波長光によって二量体形成以外の不活化機構が働いていた可能性が考えられた。

しかしこの仮説は Fig.C.4 に示した波長毎の不活化効果の傾向から推考される仮説と合致しないため、この点矛盾しない説明が今後の検討課題となる。

13965 株に関しては、どの波長光においても、光回復効果が相対的に低くなってしまい、正確な議論がしづらくなっている。従って、この株においては、不活化率を高めに設定した上で光回復実験を行う必要があると考えられる。

E. 結論

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。

バイオフィルムを形成した従属栄養細菌 (*Pseudomonas* 菌) においては、0.1 m/s 以下の流速下においてバイオフィルムの 90%程度が剥離される。そこで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であると考えられた。

病原微生物に対しては、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、一方の大腸菌において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。

参考文献

- 1) Marc-Olivier Buffle et al. (2006) Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: Application to disinfection and pharmaceutical oxidation, *Wat. Res.*, 40, pp.1884 – 1894

F 健康危険情報 特になし

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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

2. 学会発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況 特になし

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 25 年度分担研究報告書

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

研究分担者 東京大学大学院工学系研究科 春日郁朗

研究要旨

残留塩素が低減化した時に、実際の水道水の生物学的安定性がどのように変容するのかを明らかにすることは重要な課題である。そこで本研究では、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 のや β -Proteobacteria が主に優占していた。

A. 研究目的

残留塩素の低減化が進められる中、水道給配水系における細菌再増殖リスクが高まることが懸念されている。残留塩素低減化を達成しつつ、生物学的に安定な水道水質の維持を達成するためには、細菌再増殖を適切に監視、制御する手法の確立が求められている。そのためには、再増殖する細菌の生理・生態を理解することが欠かせないが、我が国では水道水中の細菌再増殖や細菌現存量を、「一般細菌」に加えて「従属栄養細菌 (Heterotrophic Plate Count: HPC)」(平成 20 年 4 月から水道水質管理目標値に追加：暫定目標値 2000 CFU/mL) で評価しているのが現状である。しかし、HPC の指標性・有用性については、十分な知見が蓄積されていない。

そこで、本研究では、再増殖細菌の生理・生態特性に基づいた細菌再増殖の評価手法・制御策に資する基礎的な知見を得ることを目的とする。今年度は、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。

B. 研究方法

1. アニュラーリアクターの運転条件

図 1 にアニュラーリアクターの構成を示す。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。この回転速度は、直径 10cm の管路における約 10cm/秒の流水に相当するせん断応力をクーポンに与える。原水は、東京大学実験室の水道水（水温：10～12℃、遊離残留塩素：0.2～0.3mg/L）を用いた。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/分に設定し、Run 1、Run 2 とともに約 1 か月運転した。

2. サンプルング及び水質分析

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ルングした。クーポン表面で増殖した細菌は、滅菌済みスクレーパーで物理的に回収し、リン酸緩衝液中で懸濁し、超音波処理（5W, 2 分間）して分散させた。

3. 水質

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。AOC の測定は、上水試験方法に従い、*Pseudomonas fluorescens* P17 株、*Aquaspirillum* sp. NOX 株を試料に同時に添加し、最大増殖量を酢酸当量の収率（P17： 4.1×10^6 CFU/ μ gC、NOX： 1.2×10^7 CFU/ μ gC）を用いて炭素濃度に換算した。

4. 細菌現存量

細菌現存量は、フローサイトメーター（Accuri C6、BD）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づいて定義し、SYBR Green I と Propidium Iodide で二重染色した。

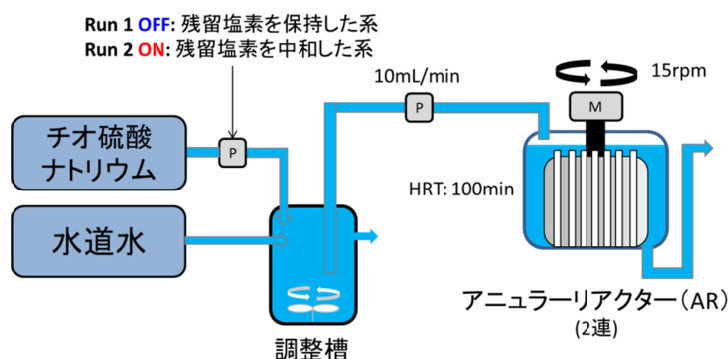


図 1 アニュラーリアクターの構成

5. 細菌群集構造

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。

C. 研究結果

1. 残留塩素を保持した系 (Run 1)

(1) 水質

アニユラーリアクター流出水中の遊離残留塩素濃度は、運転期間中を通して 0.18 ~ 0.24mg/L を示した。特に外部から残留塩素を追加することなく、リアクター内の残留塩素を保持することができた。培養 1 か月後の流入水・流出水中の AOC はともに 36 $\mu\text{gC/L}$ であり、差は見られなかった。

(2) 細菌現存量

図 2 に流入水、流出水中の全菌数濃度の結果を、図 3 にクーポン上の全菌数と生菌数の結果を示す。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。細菌群集構造については、クーポン上の付着量が少ないために分析することができなかった。

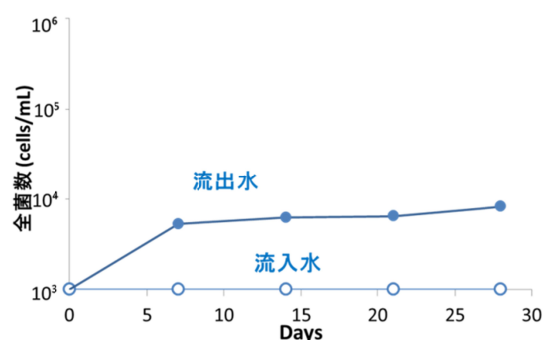


図 2 流入水・流出水中の全菌数
(Run 1: 残留塩素を保持)

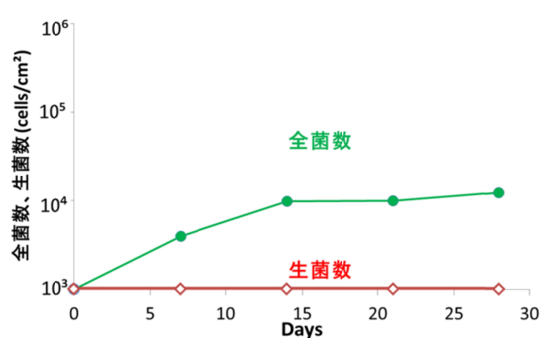


図 3 クーポン上の全菌数・生菌数
(Run 1: 残留塩素を保持)

2. 残留塩素を中和した系 (Run 2)

(1) 水質

アニユラーリアクターに流入する前にチオ硫酸ナトリウムで残留塩素を中和した以外は、同一の条件でアニユラーリアクターを運転した。培養 1 か月後の流入水・流出水中の AOC は、43 $\mu\text{gC/L}$ から 20 $\mu\text{gC/L}$ に減少しており、アニユ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。P17、NOX それぞれの寄与を個別に評価すると、主に AOC-NOX が大きく減少していることが明らかになった。

(2) 細菌現存量

図4に流入水、流出水中の全菌数濃度の結果を、図5にクーポン上の全菌数と生菌数の結果を示す。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。運転開始12日後のクーポンをSYBR Green I/PIで二重染色し、蛍光水深レンズで非破壊的に観察した結果を図6に示す。観察の結果、細菌群はいわゆる生物膜状にクーポンに付着しているのではなく、分散した状態で付着していることが明らかになった。

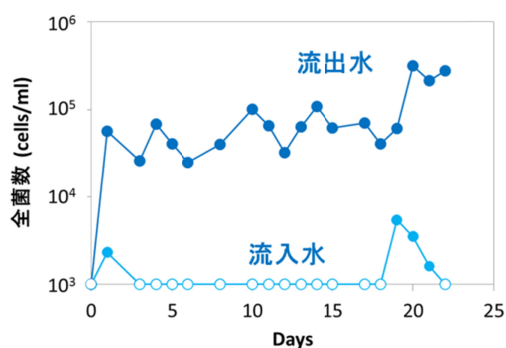


図4 流入水・流出水中の全菌数
(Run 2: 残留塩素を中和)

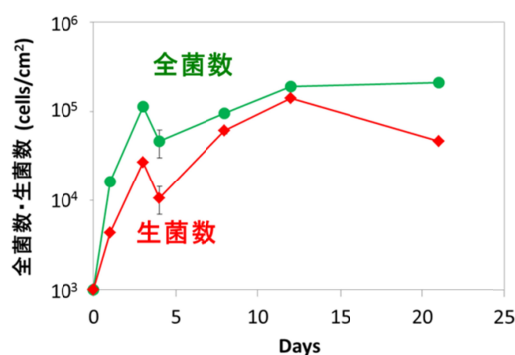


図5 クーポン上の全菌数・生菌数
(Run 2: 残留塩素を中和)

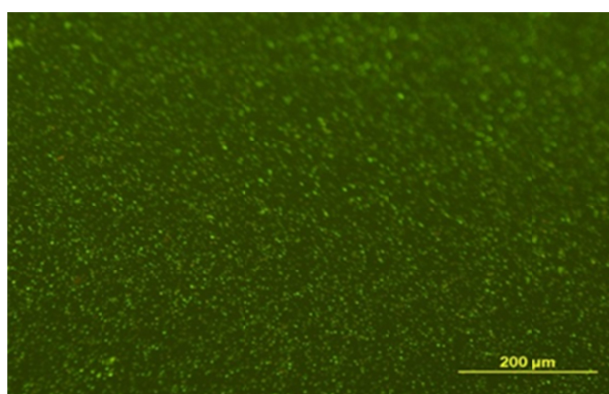


図6 クーポン表面に付着する細菌群
(運転開始12日後)

(3) 比増殖速度の推定

流入水、流出水中の全菌数、クーポン上の全菌数のデータをもとに、バルク水中、クーポン上で再増殖する細菌群の比増殖速度の推定を試みた。バルク水中、クーポン上での細菌現存量の収支式を(1)式、(2)式に示す。なお、バルク水からクーポンへの細菌の付着につ

いては、生物膜形成のごく初期のみに影響するという既存の知見からここでは考慮しなかった^{1,2)}。

$$\text{バルク水中の収支式} \quad V \frac{dX}{dt} = Q(X_{in} - X) + \mu_{bulk}XV + \beta X_b A \quad (1)$$

$$\text{クーポン上の収支式} \quad A \frac{dX_b}{dt} = \mu_{biofilm}X_b A - \beta X_b A \quad (2)$$

ここで

V : バルク水容積 (mL)

Q : 流量 (mL/day)

X : バルク水中の全菌数 (cells/mL)

μ_{bulk} : バルク水中の比増殖速度 (1/day)

A : クーポン表面積の合計 (cm^2)

X_b : クーポン上の全菌数密度 (cells/cm^2)

$\mu_{biofilm}$: クーポン上の比増殖速度 (1/day)

β : クーポンからの剥離係数 (1/day)

クーポン上への細菌の付着の時系列データより、 β を推定したところ 0.14 (1/day)という値が得られた。実測値とモデル式に基づいた理論値の比較を図7に示す。

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求めたところ、バルク水中の比増殖速度 (μ_{bulk})は 14.2 (1/day)、クーポン上の比増殖速度 ($\mu_{biofilm}$)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。また、定常状態における細菌現存量の評価したところ、バルク水中に存在する細菌は全体の 71%、クーポン上に存在する細菌は全体の 29%であり、多くの細菌はバルク水中に存在していることが明らかになった。

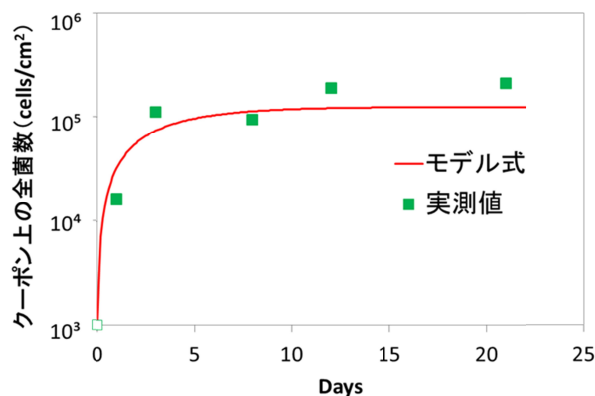


図7 クーポン表面における細菌再増殖の実測値と理論値との比較

(4) 細菌群集構造

図8にクーポン上に発達した細菌群集の構造を T-RFLP により評価した結果を示す。運転開始4日後には、AとBの2種類のフラグメントが観察されたがAの方が強度は大きかった。その後、運転開始18日後には新たにフラグメントCが観察されると共に、400bp以上に微細なフラグメントが出現し始めている。22日後には、主なフラグメントはAとCのみとなり、多様なフラグメントの強度が相対的に大きくなっていった。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を図9に示す。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。

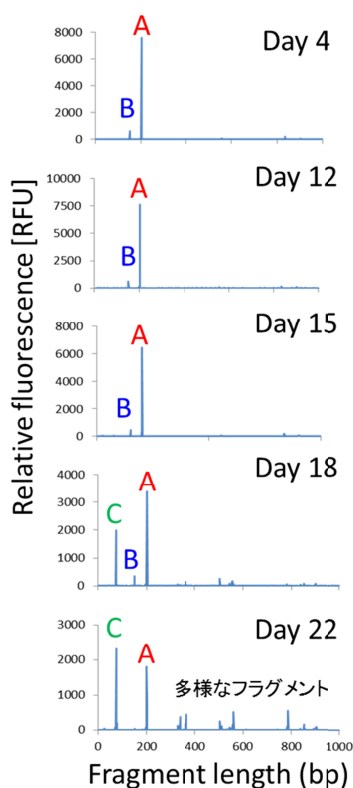


図8 クーポン表面

における細菌群集構造の遷移

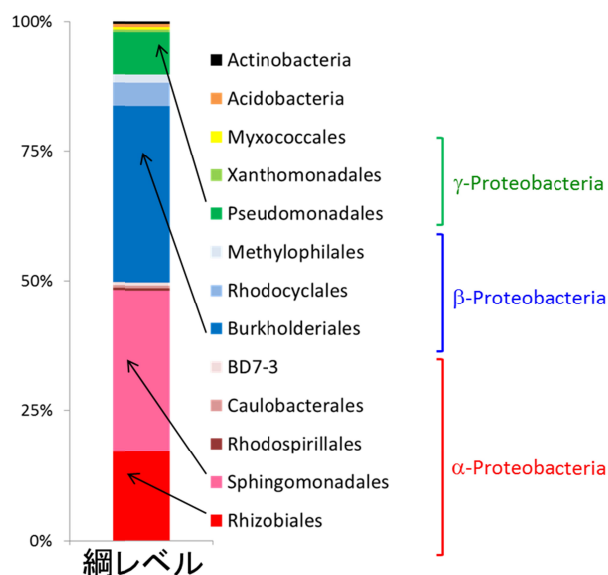


図9 運転開始22日後の

16S rRNA 遺伝子組成

D. 考察

実際の水道水を用いてアニュラーリアクターを運転し、残留塩素を保持した場合と除去した場合に生じる細菌再増殖現象を評価した。

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。本研究では便宜的に生菌、死菌という分類をしているが、これはあくまで膜損傷の程度に基づいて操作的に定めているだけであり、完全に死滅しているとは一概に言いきれない。今回は、細菌現存量が少なく、詳細な分析ができなかったが、残留塩素に耐性のあるこれらの細菌群の生理・生態については更なる知見を得る必要がある。

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る³⁾。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⁴⁾。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。本課題研究の平成 23 年度の成果として、給水末端における細菌群の比増殖速度を 0.22 (1/h) と推定したが、今回得られたバルク水中の比増殖速度とオーダーは等しい。このことは、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。今回は、1 か月程度の短期間の結果であったが、この後、クーポン上の群集構造は安定するのか、更に生物膜状に遷移していくのか、細菌組成と付着形態の点から更に継続的な調査を行う必要がある。シーケンシングにより群集組成を解析した結果、*Proteobacteria* が大半を占めていた。特に、 α -*Proteobacteria* と β -*Proteobacteria* で全体の 90% を占めており、これらが実際の水道水中で細菌再増殖を引き起こす主な細菌群であることが明らかとなった。残留塩素を保持した Run 1 でもわずかながら細菌再増殖が観察された。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

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た。

残留塩素を中和した系では、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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 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. [Honorable Mention Best Poster Award]
- 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, 平成 25 年度水道研究発表会, pp.598-599.
- 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

< 参考文献 >

- 1) Bott, T.R. and Miller, P.C. (1983) Mechanisms of biofilm formation on aluminum tubes. J. Chem. Tech. Biotech., 33 (B), 177-184.
- 2) Melo, L.F. and Vieira, M.J. (1999) Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration. Bioprocess Eng., 20 (4), 363-368.
- 3) Liu, G., van der Mark, E.J., Verberk, J.Q.J.C. and van Dijk, J.C. (2013) Flow cytometry total cell counts: A field study assessing microbiological water quality

and growth in unchlorinated drinking water distribution systems. *BioMed Res. Int.*, 595872.

- 4) Manuel, L., Nunes, O.C. and Melo, L.F. (2006) Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Wat. Res.*, 10, 1016-1027.

研究成果の刊行に関する一覧表

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 靚, 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)