

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)
事後評価用資料

研究課題：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

課題番号：H23-健危-一般-006

研究代表者：所属機関 国立保健医療科学院生活環境研究部水管理研究分野

氏名 島崎 大

研究分担者：所属機関 京都大学大学院工学研究科

氏名 伊藤 禎彦

所属機関 お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科

氏名 大瀧 雅寛

所属機関 東京大学大学院工学系研究科

氏名 春日 郁朗

所属機関 静岡県立大学環境科学研究所

氏名 国包 章一

1 研究目的

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」であると科学的に判断することはできない。

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本研究の目的とする。

2 研究方法

1) 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダ国では世界で唯一、定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbiological Risk Assessment: QMRA)に基づく水質基準が導入されており、また、当基準値を達成するため、各浄水場の処理プロセス単位で指標微生物の不活化能力の評価を実施している。同国の水道における浄水処理および配水水質管理に関する近年の状況、微生物リスク評価における指標細菌や水質指標、浄水処理プロセスにおける不活化能力評価など、実務への導入に関する現状について文献調査を中心にまとめた。

2) 浄水処理プロセスにおける微生物リスク評価の適用

次世代型浄水処理プロセスにおけるカンピロバクターを対象とした定量的微生物リスク評価

当次世代型浄水処理プロセスは、カルキ臭低減を主たる目的としており、凝集沈殿、急速砂ろ過、促進酸化(O₃/UV)、陽・陰イオン交換、低濃度塩素処理から構成される。原水である淀川河川水を対象として、大腸菌 *E. coli*濃度およびC/E比 (*C. jejuni* / *E. coli*)比のデータを蓄積した。

パイロットプラント(図1)での凝集沈殿-急速砂ろ過-促進酸化実験により*E. coli*不活化速度定数と流入水質・流動特性を把握し、室内での促進酸化実験でオゾン、OHラジカル、紫外線による不活化速度定数を算出した上、不活化モデル(ADRモデル)により実処理規模での不活化能力を推定した。イオン交換は室内実験により*E. coli*除去能と変動特性を把握し、一次元移流拡散方程式により除去機構を推定した。塩素処理はパイロットプラントの塩素接触槽を用いた*E. coli*不活化実験の繰り返しにより、不活化速度定数を算出した。非加熱水道水の飲用量は、A市における2009年度アンケート調査結果を参照した。

以上から得られた各データ群に対し、必要に応じて検出限界以下データに対する濃度補間、ランク法によるデータペアリング、ならびにブートストラップサンプリングにより適切なデータ対を生成した上、適合度の高い確率密度関数をあてはめた。モンテカルロシミュレーションにより10万回の繰り返し計算を行い、非加熱水道水の飲用による*C. jejuni*の一日当たり摂取量を算出した。*C. jejuni*の用量 - 反応モデル ($Pd = 1 - e^{-0.686 \times D}$, D: 用量) より一日感染確率ならびに年間感染確率を推定した。



図1 次世代型浄水処理パイロットプラント

凝集沈殿・砂ろ過処理における病原性大腸菌およびクリプトスポリジウムを対象とした微生物感染リスク評価

室内実験により、病原性大腸菌およびクリプトスポリジウムの凝集沈殿および砂ろ過による除去能力を評価した。実験では前者の代替微生物として無毒性の*E. coli* K12株を、後者は代替粒子としてトレーサー粒子（（公財）水道技術研究センター クリプトレーサー1号）を用いた。原水としてB浄水場の河川水原水を用い、沈砂池またはカオリンにより濁度を10, 30, 100度に調整した。凝集剤であるPACの注入率をそれぞれ最適注入、低注入となるよう設定し、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）による凝集・沈殿の後、上澄水を採取して急速砂ろ過（カラム径20mm、ろ層厚650mm、ろ過速度120m/日）を行った。原水、沈殿水、ろ過水を採水して、*E. coli* K12株は培養法により、トレーサー粒子は蛍光顕微鏡により計数した。微粒子数についても高感度濁度計を用いて計数を行った。さらに、*E. coli* K12株については、屋内での塩素消毒実験により不活化能力を評価した。高濃度の大腸菌懸濁液に、残留塩素濃度0.5mg/Lとなるよう次亜塩素酸ナトリウム水溶液を添加し、所定の接触時間を経過したのち、ただちに残留塩素を消去し、培養法により計数を行った。

各微生物の原水中の濃度推定について、クリプトスポリジウムはB浄水場における近年3年間の実測値を用いた。病原性大腸菌*E. coli* O157:H7はC浄水場の河川水原水を採水し、特異的に反応を示すFITC標識O157抗体（KPL社製）によって染色し、蛍光顕微鏡によって観察することで実測を行った。また、呼吸活性の有無を判別するCTC染色を同時に行い生菌の指標とした。

得られた各データを元に、非加熱水道水の飲用による感染リスクを算出し、障害調整生存年数DALYを指標としたリスク評価を行った。非加熱飲用水量として、国内で過去に行われたアンケート結果である0.321L/日/人を、感染確率として、指数モデルによる用量反応関係より、*E. coli* O157:H7は 5.09×10^{-3} [case/cell]、クリプトスポリジウムは 4.0×10^{-3} [case/oocyst]を、DALY係数として*E. coli* O157:H7は 5.47×10^{-2} [DALYs/case]、クリプトスポリジウムは 1.03×10^{-3} [DALYs/case]を用いた。

3) 不活化機構を考慮した消毒による微生物再増殖の制御方法の検討

病原微生物の指標菌として大腸菌*E. coli*を用い、消毒処理として塩素処理、紫外線処理を取りあげた。塩素処理に関して、複数培地での同時検出による方法によって損傷部位を推定する手法を用いた。この方法を接触塩素濃度0.3~3.0 mg/Lの範囲での不活化実験に適用した。この様な高濃度接触条件に対応するため、本研究では接触時間を正確に、かつ任意に設定することが可能な、CQF（Continuous Quench-Flow）システムを採用した。紫外線処理に関しては、*E. coli* 2種（NBRC3301株および13965株）を用いて、一般に使われる254 nmだけでなく、210~290 nmの紫外線波長光を照射し、各波長の不活化効果と光回復

効果について比較検討することで、光回復効果の少ない消毒方法の探索を行った。

従属栄養細菌については、指標菌として*Pseudomonas aeruginosa*株を用い、T-RFLP法の定量的適用法の開発、ならびに、バイオフィーム状の細菌に対する塩素消毒効果の検証を行った。前者では、任意の濃度に調整した*P. aeruginosa*菌液試料に濃度既知のマーカーストックとして大腸菌*E. coli*を投入し、最終的に得られるピーク値比較から*P. aeruginosa*の濃度定量を試みた。後者では、ポリ塩化ビニル片上に形成させた生物膜を異なる遠心分離強度によって剥離させ、剥離強度ごとに塩素消毒処理の効果を比較した。また遠心分離強度と水流によるせん断力との相関関係も合わせて評価した。

4) 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析

実際の給水末端における水道水の滞留と細菌再増殖との関係性を評価するために、給水末端において、水道水を一定時間人為的に滞留させ、滞留前後と放水過程における残留塩素、水温、微生物量の変化をモニタリングした。次いで、東京都内の屋外9か所（主に公園）、屋内1か所の給水栓を対象として、従属栄養細菌を単離同定して、16S rRNA遺伝子解析に基づいた多様性を評価すると共に、個別の株について、水道水中での増殖特性と膜損傷に着目した塩素耐性に関するデータを蓄積した。更に、これらの株を用いて、高度浄水処理施設の各工程水中における増殖ポテンシャルを求め、高度処理が給水末端で再増殖しうる細菌群の制御にどのように貢献しているのかを検証した。

また、アニユラーリアクターを用いて実際の水道配水系を模擬し、残留塩素の有無が細菌再増殖や群集構造に与える影響を評価した。

5) 微生物リスクを低減する上での適切な水質指標および水質管理手法の検討

1)~4)の成果に基づき、加えて、研究協力者である水道事業者の実務者の意見も参考に、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水質管理手法について取りまとめた。

（倫理面への配慮）

人体試料を用いた実験や動物実験等、倫理上の配慮が必要となる実験や調査は実施していない。

3 研究結果

1) 諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダは、EU諸国のなかでもとりわけ塩素消毒および残塩保持に依存しない水道システムの構築に向けた取組みを進展させており、現在では浄水処理での塩素消毒がすべてオゾンやUVなどに置き換わり、かつ、国内すべての水道が残留消毒剤なしで配水されている。残留塩素を保持していないことから、特に給配水過程での汚染防止や、微生物再増殖の制御に着目した管路の衛生管理、配水の水質管理を実践している点も大きな特色で

ある。水質管理については、オランダはEU飲料水指令より厳しい水質基準を定めており、例えば大腸菌の試験には100mlではなく300mlの試料水を用い、運転管理上の指標としてアエロモナス属菌 (<1,000CFU/100ml) や従属栄養細菌 (Colony count at 22 : <100CFU/ml) の基準値を設定している。特に注目すべきは、2001年に改正された水道法において定量的微生物リスク評価を導入した点である。具体的には、腸管系ウイルス、クリプトスポリジウム、ジアルジア等による水道水由来の病原微生物による感染リスクを、年間 10^{-4} 未満 (給水人口1万人につき年間感染者1名未満) とすることを水質基準に定めており、表流水を使用する浄水場や病原微生物による汚染のおそれのある地下水を使用する浄水場を対象に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえて定量的な評価を行うことを義務づけている。

2) 浄水処理プロセスにおける微生物リスク評価の適用

次世代型浄水処理プロセスにおけるカンピロバクターを対象とした定量的微生物リスク評価
表1に原水や各浄水処理プロセスにおいて推定された確率密度関数とパラメータ値を、表2に次世代型浄水処理プロセスにより供給された非加熱水道水の飲用による*C. jejuni*への感染リスク推定値を示す。当該の浄水処理プロセス全体として

の総合的な*C. jejuni*の除去・不活可能性は、平均値 $18.09 \log_{10}$ 、中央値 $18.14 \log_{10}$ と評価され、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。

凝集沈殿・砂ろ過処理における病原性大腸菌およびクリプトスポリジウムを対象とした微生物感染リスク評価

C浄水場の河川原水中における*E. coli* O157:H7の濃度は $14.3 \sim 109$ [cells/ml]であった。ただし、全ての細胞でCTCによる蛍光は確認されず、いずれも呼吸活性を有しなかった。

各実験条件において、原水濁度およびPAC注入率が高いほど、*E. coli* K12株あるいはトレーサー粒子の除去率が高くなる傾向が見られた。また、両者の関係には比較的高い相関性があることが示された。凝集沈殿および砂ろ過による除去能力は*E. coli* O157:H7は $0.5 \sim 4.12 \log_{10}$ 、クリプトスポリジウムは $1.97 \sim 6.69 \log_{10}$ の範囲であった。当実験結果から、1人あたりの年間健康影響度を算出したところ、*E. coli* O157:H7のは $3.56 \times 10^{-8} \sim 1.48 \times 10^{-4}$ [DALYs/人/年]、クリプトスポリジウムは $2.1 \times 10^{-11} \sim 1.17 \times 10^{-6}$ [DALYs/人/年]と推定された。特に、原水濁度が低い場合やPAC注入量が不十分な場合に健康影響度は高値を示した。表3に非加熱水道水の飲用による*E. coli* O157:H7による健康影響度の推定結果を示す。

表1 選定した確率密度関数およびパラメータ推定値

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	
C/E値	対数正規分布	平均値: 1.87×10^{-4}
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
非加熱飲水量	指数分布	比率: 3.06×10^{-3}

表2 定量的微生物リスク評価による非加熱水道水の飲用による*C. jejuni*感染確率の推定

評価項目	$P_{2.5}$	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}

表3 異なる原水濁度および凝集沈殿処理条件における*E. coli* O157:H7感染による健康影響度の推定

原水濁度 PAC 注入率(mg/L)	10 度		30 度		100 度	
	10	25	25	45	45	80
原水中 <i>E. coli</i> 濃度(cells/L)	4.88 × 10 ⁴					
凝集沈殿・砂ろ過除去率(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 <i>E. coli</i> 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
非加熱飲用水量(L/人/日)	0.321					
1日あたり曝露量(cells/人/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
1 暴露あたり感染確率(case/cells)	5.09 × 10 ⁻³					
1日あたり感染確率(case/人/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
年間感染確率(case/人/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 感染あたり DALY(DALYs/case)	5.47 × 10 ⁻²					
年間健康影響度(DALYs/人/年)	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) 不活化機構を考慮した消毒による微生物再増殖の制御方法の検討

大腸菌*E. coli*への塩素処理において、同じCT値を設定した場合の遊離塩素(0.3~3.0mg/L)への接触による、細菌への損傷レベルの相違について検討した結果、同じCT値であっても、遊離塩素濃度で2.0 mg/L以上では、1.0 mg/L以下に比べて、より膜損傷を与えやすいことと、3.0 mg/Lでは、1.0 mg/L以下に比べて致命的な損傷を高く与えていると考えられ、接触する塩素濃度によって損傷レベルが異なることが確認できた。

大腸菌*E. coli*への紫外線処理においては、不活化後の光回復傾向が大腸菌株によって相違が生じていた。共通していることは230 nm以上の照射光による不活化後の光回復が見られたということである。210 nm波長光では、3301株では光回復が見られたが、13965株では見られなかった(図2)。

混合溶液中の生物濃度(*P. aeruginosa* / *E. coli* 比)と各生物のT-RFLPプロファイルのピーク値の比との相関性を確認したところ、ほぼ同じ回帰直線式で表現できた。この式を変形して、T-RFLPプロファイルピーク値の比およびマーカー生物濃度から、対象微生物の濃度を算出する以下の式(1)を導出した。

$$P.aeruginosa濃度x = E.coli濃度 \times \text{ピーク比} R \times e^{1.7} \quad (1)$$

PVC片にて形成させたバイオフィームについて、アナニュ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ー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ームの不活化効果が最も低くなっていた。

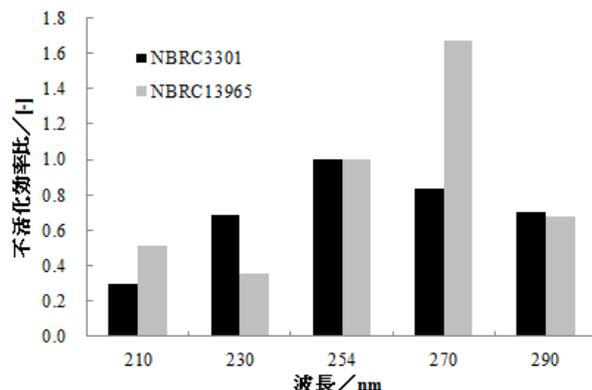


図2 異なる大腸菌株における紫外線照射による波長毎の不活化効率比(254nmとの相対比)

4) 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析 給水末端における水道水の滞留と細菌再増殖との関係

室内給水栓を対象として、滞留・放流に伴う細菌再増殖現象を観察した結果、滞留に伴って遊離残留塩素の低下、水温の上昇が進み、全菌数及びHPCが上昇することを明らかにした。しかし、2L放水後には滞留前のレベルに速やかに戻った。また、滞留時間と全菌数の増加との関係から、再増殖する細菌群の平均倍加時間は、2.8hであることを示した。

給水末端で検出される従属栄養細菌の多様性評価

屋内外の給水栓を対象として細菌群を単離した上で、16S rRNA遺伝子解析を行った結果、単離株は19種類の系統的分類群に分別された。各分類群の代表株19株の系統解析を行った結果、これらは*Sphingopyxis*属、*Roseomonas*属、*Burkholderia*属、*Sediminibacterium*属、*Methylobacterium*属、*Aquabacterium*属、*Lysobacter*属、*Sphingomonas*

属など14種類の属に属することが示された。

給水末端で検出される従属栄養細菌の再増殖特性と塩素耐性の評価

残留塩素を除去した水道水中において単離株を培養し、最大増殖量を評価した。また、単離株の懸濁液を遊離塩素で処理し、膜損傷速度定数を求めた。両者の関係を図3に示す。その結果、HPC5 (*Burkholderia*属近縁)、HPC12 (*Aquabacterium*属近縁)、HPC15 (*Lysobacter*属近縁)など塩素耐性は比較的低い一方で最大増殖量が多い単離株や、HPC11 (*Methylobacterium*近縁)のように塩素耐性が極端に高いものなど、従属栄養細菌の水道水中での増殖性と塩素耐性は一様ではなく、株によって様々であることが明らかになった。

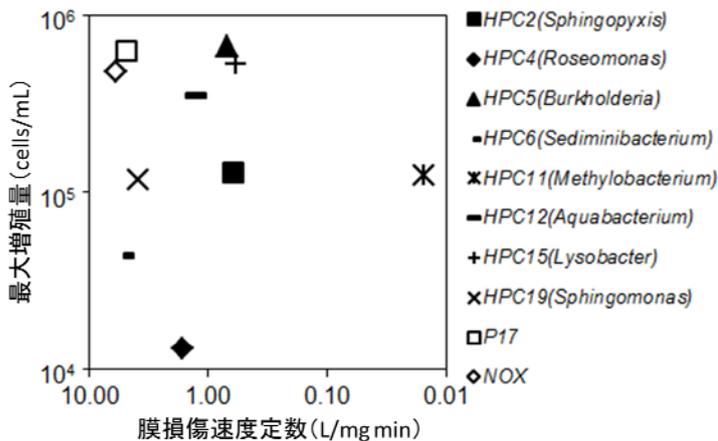


図3 給水末端における単離株の水道水中での最大増殖量および塩素接触に対する膜損傷速度定数

高度浄水処理の細菌再増殖制御の評価

浄水工程水（原水、前段ろ過水、オゾン処理水、生物活性炭処理水、浄水）中における単離株の増殖特性を評価した。その結果、株によって最大増殖量、比増殖速度、最大増殖量の半値に達するまでの時間が異なることが明らかになった。また、オゾン処理や塩素処理によって増殖が促進される傾向や、生物活性炭処理によって増殖が抑制される傾向が確認された。

残留塩素の有無が細菌再増殖に及ぼす影響

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10⁴ 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10⁵ 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。

5)微生物リスクを低減する上での適切な水質指標および水質管理手法の検討

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および水質管理手法として、以下を考慮する必要があると考えられた。

[水質項目]

原水における病原微生物の存在濃度

- ・病原性大腸菌
- ・カンピロバクター
- ・耐塩素消毒性原虫 (クリプトスポリジウム、ジアルジア)
- ・腸管系ウイルス等

浄水処理における懸濁物質の物理的除去

- ・濁度
- ・微粒子 (1~5 μ m)

浄水処理における消毒効果

- ・消毒剤の接触濃度および接触時間 (遊離残塩、結合残塩、オゾン等)

- ・紫外線照射強度および照射時間

配水過程における微生物学的清浄度

- ・残留塩素濃度
- ・従属栄養細菌

- ・耐塩素性指標菌 (*Methylobacterium* 等)

[水質管理手法]

浄水処理における懸濁物質の除去効率の監視

- ・濁度除去率
- ・微粒子除去率

浄水処理における微生物の不活化効率の監視

- ・消毒剤等の平均接触濃度
- ・CT値
- ・各プロセスにおける指標微生物濃度

配水過程における微生物学的清浄度の監視

- ・残留塩素濃度
- ・従属栄養細菌

- ・耐塩素性指標菌 (*Methylobacterium* 等)

4 考察

1)諸外国の水道等における微生物リスク評価手法の現状調査

オランダでは水道水由来の病原微生物による感染リスクを年間10⁻⁴未満とすることを水質基準に定めており、病原微生物による汚染のおそれのある原水を使用する浄水場を中心に、水道水源の汚染状況および浄水処理過程での除去性能をふまえた定量的なリスク評価を実施している。ただし、オランダでは全ての水道システムが塩素消毒および残留消毒剤に依存しておらず、また、気候や原水の条件などわが国とは大いに事情が異なっている点には留意する必要がある。また、世界保健機構(WHO)も、微生物リスク評価を活用した水質管理ならびに意思決定を推進しており、飲料水、下廃水再利用、レクリエーション水を対象とした定量的微生物リスク評価の普及啓発を目的として、2014年中をめどに実務者向けのツールである "Use of Quantitative Microbial Risk Assessment for Water Safety Management" を公開する予定である。当該の微生物リスク評価手法は、わが国の水道の浄水処理および配水過程において、今後、病原微生物等による微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上での大きな参考になると考えられる。

2) 浄水処理プロセスにおける微生物リスク評価の適用

次世代型浄水処理プロセスにおけるカンピロバクターを対象とした定量的微生物リスク評価
得られた年間感染確率は、オランダ国の水道水質基準である 10^{-4} [感染/人/年]をはるかに下回っており、当該の次世代型浄水処理プロセスは、低濃度の残留塩素下でも安全性の高い水道水を生産できると考えられる。ただし、促進酸化処理における不活化能の推定はパイロットプラントでの実測値を用いたのみとなっている。室内実験結果とモデルを用いて実施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。また、年間感染確率に対する感度分析を行い、当該の浄水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。

凝集沈殿・砂ろ過処理における病原性大腸菌およびクリプトスポリジウムを対象とした微生物感染リスク評価

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。とりわけ、原水が低濁度かつ凝集剤の注入率が不十分となる場合には、WHO飲料水水質ガイドラインで推奨される 1.0×10^{-6} [DALYs/人/年]を上回る可能性が示唆された。

大腸菌やクリプトスポリジウムは、原水中の濁質成分に捕捉されて共沈し除去されると考えられる。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こりうるため、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) 不活化機構を考慮した消毒による微生物再増殖の制御方法の検討

接触塩素濃度によって大腸菌*E. coli*への損傷レベルが異なることが確認できた。特に再増殖抑制のための致死的な損傷を与えるには、高濃度で塩素と接触させることが有効であると考えられた。またChick-Watsonモデルを仮定し、各投入濃度もしくは各損傷レベルの不活化率が推定できた。紫外線処理では同じ大腸菌でも株が異なると、波長毎の不活化効果傾向や光回復が異なっており、病原微生物への影響も均一には考えられないことが示唆された。

濃度既知のマーカー生物を投入するT-RFLP法による濃度定量について検証を重ね、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せず、一様に高い値となった。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。

バイオフィーム状細菌(*P. aeruginosa*)の塩素耐性について、0.1m/s以下の水流によって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、0.4m/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。

4) 配水過程における再増殖微生物の増殖特性解析

給水末端から単離された細菌群の種類は、これまでの報告例とも一致しており、給水末端で検出される一般的な細菌群のライブラリーを構築できたと考えられる。特に大きな成果の一つとして、これらの系統的に異なる細菌群の増殖特性や塩素耐性が大きく異なることを示した点が挙げられる。例えば、塩素耐性については、大腸菌*E. coli*の膜損傷速度定数が8.0[L/mg min]であるのに対し、HPC11株(*Methylobacterium*属近縁)の膜損傷速度定数は0.015[L/mg min]であり、著しく高い塩素耐性を有していると推察される。また、生物活性炭処理はすべての単離株の増殖量を低減させることから、細菌再増殖制御に有用であることも確認された。特に塩素耐性が高いことが確認されたHPC11株(*Methylobacterium*属近縁)の最大増殖量が生物活性炭処理によって低減されたことは、配水過程の水質管理だけでなく、浄水プロセスの運転管理も細菌再増殖制御に有効であることを示唆するものである。また、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。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。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が示唆された。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。

5) 微生物リスクを低減する上での適切な水質指標および水質管理手法の検討

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。このうち、病原性大腸菌やカンピロバクター、クリプトスポリジウムなどを直接かつ日常的に監視することは困難である。従って、本研究における微生物リスク評価手法と同様に、大腸菌*E. coli*、あるいは、嫌気

性芽胞菌、腸球菌などの代替指標微生物を用い、原水中における病原微生物との存在比や、浄水処理プロセスでの除去性を、個々の浄水場において日常的に把握することが求められる。また、消毒剤の接触濃度および接触時間については、原水の水量や水質が時々刻々と変動するため、モニタリングの箇所や頻度を各浄水場の実情に応じて工夫する必要がある。配水過程については、既往の残留塩素濃度や従属栄養細菌に加えて、配水システムや給水末端で検出される、耐塩素性あるいは再増殖性が高い指標菌 (*Methylobacterium* 等) の測定を考慮に入れることが望ましい。

各データを水道事業体において蓄積することで、定量的な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に展開できると考えられる。

5 自己評価

1) 達成度について

実施期間を通じて本研究の目的である「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」は概ね達成できたと考える。すなわち、

オランダにおける定量的微生物リスク評価に基づいた水質基準および水質管理の現状と課題を概観し、WHOや諸外国も当該の評価手法の推進や導入に着手していることから、わが国の水道においても大いに参考となることを示した。

わが国の浄水処理プロセスを対象とした微生物リスク評価の実施により、次世代型浄水処理プロセスでは水質のさらなる向上のみならず微生物リスクを大幅に低減可能であること、通常の浄水処理プロセスでは消毒処理に加えて凝集沈殿・砂ろ過処理における濁度制御が微生物リスクに多大な影響を及ぼし、場合によっては、WHO飲料水水質ガイドラインにおけるDALYs推奨値を超過する可能性があることを示した。

消毒処理による微生物の制御について、既往の知見ではCT値（消毒剤濃度と接触時間の積）が同じである場合には同程度の不活化効率であるとされていたものの、本研究での検討により、大腸菌を高濃度の消毒剤に接触した場合には、致死的な損傷を生じる割合が高まること、特に、配水過程での微生物の再増殖を抑制するためには、高濃度での塩素消毒を行うことが有効であることを示した。

給水末端における微生物再増殖について、残留塩素が消失した場合には、細菌再増殖が数時間以内に容易に生じることを明らかにした。分離同定された各細菌種の増殖特性や塩素耐性は多様であり、このような細菌群を従属栄養細菌として一括して捉えるのではなく、生理特性の異なる細菌群に応じた水質管理や対策が重要であることを示した。例として、塩素耐性が極めて高い分離株の最大増殖能は生物活性炭処理後の浄水において低減されており、生物活性炭処理

が当該の細菌の再増殖制御に有効であることを示した。

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。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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、微生物リスクが「ゼロ」であると科学的に判断することは適切ではない。水質検査に供する水量は全給水量のごく一部であることや、大腸菌等の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）の存在がその根拠である。

従って、残留塩素保持および指標細菌不検出の遵守などに依存してきたわが国の微生物リスク管理のあり方については、改めて検討する余地があり、本研究において用いた定量的微生物リスク評価の方法論は、わが国の水道の浄水処理および配水過程において、今後、病原微生物等による微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上での大きな参考になると考えられる。さらに、WHOや欧米各国においても同手法の推進が検討されており、わが国の水道の実情に鑑みて実施された本研究の成果は、国際的にも意義深いものとして位置づけられる。

また、本研究で得られた以下の成果は学術的な意義や新規性を有しており、国内外の学術誌への論文投稿や学術会議での口頭発表などを通じた成果の公表を行っているところである。

次世代型浄水処理プロセスでは、カルキ臭低減や生物同化性有機炭素の低減のみならず、カンピロバクターに係る微生物リスクを大幅に低減可能であること

通常の浄水処理プロセスでは消毒処理に加えて凝集沈殿・砂ろ過における濁度制御が病原性大腸菌やクリプトスポリジウムに係る微生物リスクに多大な影響を及ぼし、特に、水道原水が低濁度である場合の病原微生物汚染に際して濁度管理が肝要であること

大腸菌*E. coli*を同じCT値の条件下で塩素消毒した場合、より高濃度で消毒を施すと、致死的な損傷を生じる大腸菌*E. coli*の割合が高まること

水道の給水末端において再増殖する従属栄養細菌の増殖特性や塩素耐性は多種多様であり、塩素耐性が極めて高い細菌種が存在すること

3) 今後の展望および課題について

本研究により得られた成果を、わが国の水道行政や水道事業における水質管理の実務に如何に適用していくか大きな課題である。具体的には、水道原水や浄水処理の各プロセスにおいて病原微生物や代替指標の濃度、物理的除去効果や消毒効果に関する水質項目を定期的に監視し、微生物リスク評価に供するデータを蓄積することで、個々の浄水場における微生物リスクの所在の把握や、リスク低減に係る重要管理点の抽出など、本研究における成果に基づいた、より高度な水質管理手法に展開することが可能となる。また、浄水処理での塩素消毒の強化、ならびに、生物活性炭処理や促進酸化法などの高度処理による給配水過程での微生物再増殖制御の可能性については、プラント規模の実験等を通じて、より実際に即した運転管理方法の提言へ展開できる。

4) 研究実施における効率性について

定期的に研究班会議を開催し、研究代表者、研究分担者、研究協力者（東京都水道局・大阪市水道局）、研究事業調整官、厚労省健康局水道課の間での討議により、目的ならびに期待される成果の方向性を明確に定めることで、効率的な研究の推進に努めた。

また、浄水処理実験における砂ろ過装置には研究代表者の既往の研究で用いた活性炭ろ過塔を改修して用いる、微生物再増殖の連続実験には研究代表者の保有する実験装置や消耗品を提供する、複数の研究者が用いる試薬や消耗品をまとめて発注して購入価格を縮減するなど、当該研究期間における研究予算を有効かつ効率的に活用して成果を上げることができた。

6 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」であると科学的に判断することはできない。本研究では、水道水質の安全性および快適性のさらなる向上のため、水道の浄水処理および配水過程における病原微生物等による微生物リスクの所在を定量的に明らかにすること、また、当該の微生物リスクを低減する上での適切な制御方法および水質管理手法を提案することを目的として、以下の結論を得た。これらは、わが国において微生物リスク制御を軸とした水道の水質管理を推進するにあたり、将来的な水質指標や水質管理手法の立案などに際して、基礎的な知見として活用できるものと期待される。

オランダ国の水道を対象として、定量的微生物リスク評価実務への導入に関する現状と課題について文献調査を中心に明らかにした。世界保健機構(WHO)も微生物リスク評価を活用した水

質管理ならびに意思決定の手法を推進しており、当該の微生物リスク評価手法は、水道における微生物リスクの所在やリスク低減の方策を検討する上で大いに参考になると考えられた。

カルキ臭除去を主目的とした凝集沈殿、急速砂ろ過、促進酸化(O_3/UV)、活性炭とか、陽・陰イオン交換、低濃度塩素処理から構成される次世代型浄水処理プロセスは、低濃度の残留塩素下でも微生物学的に十分に安全である水質の水道水を供給できる可能性が示された。

通常の浄水処理において、原水濁度によらず微生物濃度が同程度である場合には、原水濁度が低いほど凝集沈殿および砂ろ過における除去性能が低下するため、感染リスクが高まる傾向が示された。濁度や微粒子の除去能力に注視して浄水運転管理を行い、かつ、塩素消毒を徹底することで、微生物リスクの面から水道水の安全性を確保できることが確認された。

大腸菌*E. coli*に対する塩素処理では、致死的な損傷を与えるには、同じCT値（濃度と接触時間の積）でも高濃度での接触が有効であった。紫外線処理では、同じ大腸菌でも株が異なると、照射波長ごとの不活化効果や光回復の傾向が異なっており、病原微生物への不活化において留意すべきであることが示唆された。

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、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では、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、一方、所定以上の水流によってバイオフィームの層厚は薄くなる場合に、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。

実際の給水末端において滞留水中の残留塩素が消失した場合には、細菌の再増殖が短時間に容易に生じることが明らかになった。アニユラーリアクターを用いた模擬水道配水系において、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が示唆された。

給水末端で検出される細菌群は系統的に多様なだけでなく、水道水中での再増殖特性や塩素耐性も大きく異なっていた。このことは、水質条件によって生理特性の異なる細菌群が優占する可能性を示唆しており、単に細菌群をHPCとして一括して捉えるのではなく、個別の生理・生態に応じて対策を検討することが重要と考えられた。

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。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。

7 研究発表

1) 国内

口頭発表	27件
原著論文による発表	2件
それ以外（レビュー等）の発表	2件

そのうち主なもの

論文発表

- ・岸田直裕，島崎大，小坂浩司，小菅瑠香，秋葉道宏，林謙治．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 2013; **60**(9): 1-7.
- ・大河内由美子，矢田祐次郎，文亮太，伊藤禎彦．ナノろ過膜処理を適用した浄水の細菌再増殖特性の評価．用水と廃水 2012; **54**(12): 39-46.
- ・浅田安廣，大河内由美子，伊藤禎彦．疫学調査に基づいた*Campylobacter jejuni*感染における感染-発症割合の推定．水環境学会誌 2012; **35**(9): 135-142.

学会発表

- ・大坂幸弘，春日郁朗，栗栖太，古米弘明．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；2013.11.23-25；鹿児島．同講演集．89．
- ・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；2013.11.19-21；札幌．同講演集．391-392．
- ・藤村壮，島崎大，秋葉道宏．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；2013.10.23-25；郡山．同講演集．642-643．
- ・曹雪，大瀧雅寛．バイオフィルム状態の細菌に対する塩素処理の不活化効果．第47回日本水環境学会年会；2013.3.11-13；大阪．同講演集．189．
- ・周靨，越後信哉，大河内由美子，伊藤禎彦．高度浄水処理プロセスのカンピロバクター感染確率評価における感度分析と不確実性分析．第15回日本水環境学会シンポジウム；2012.9.10-11；佐賀．同講演集．227-228．

2) 海外

口頭発表	14件
原著論文による発表	7件

それ以外（レビュー等）の発表 1件

そのうち主なもの

論文発表

- ・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).
- ・Kazama S., Otaki M. Quantitative analysis of the inactivation mechanisms of *Escherichia coli* by a newly developed method using propidium monoazide. Journal of Water and Environment Technology 2013; **11**(6): 507-517.
- ・Yumiko Ohkouchi, Bich Thuy Ly, Suguru Ishikawa, Yoshihiro Kawano, Sadahiko Itoh. Determination of an acceptable assimilable organic carbon (AOC) level for biological stability in water distribution systems with minimized chlorine residual. Environmental Monitoring and Assessment, 2013; **185**: 1427-1436.

学会発表

- ・Asada, Y, Ohkouchi Y, Matudate K, Echigo S and Itoh S. Structure analysis of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide associated with Guillain-Barré syndrome in source water for estimating disability adjusted life years. The 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology; 2013 Sep 15-20; Florianopolis; Brazil. Abstracts of 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. USB flash drive.
- ・Yukihiro Osaka, Ikuro Kasuga, Futoshi Kurisu, Hiroaki Furumai. Chlorine resistance and growth potential of drinking water bacteria. The 5th International Conference on Microbial Ecology and Water Engineering; 2013 Jul 7-10; Michigan; USA.12927.
- ・Y. Ohkouchi, Y. Yata, R. Bun, S. Itoh. Chlorine requirement for biologically stable drinking water after nanofiltration. The 9th International Symposium on Water Supply Technology; 2012 Nov 20-22; Yokohama; Japan.CD-ROM.
- ・Mawatari S., Otaki M. Development of quantitative analysis of heterotrophic bacteria by T-RFLP method. Water and Environment Technology Conference 2012; 2012 June 29-30; Tokyo: Japan. 29-1A-03.