

平成 27 年度「水質管理における微生物リスク評価関連調査」報告書

国立保健医療科学院 生活環境研究部 水管理研究領域

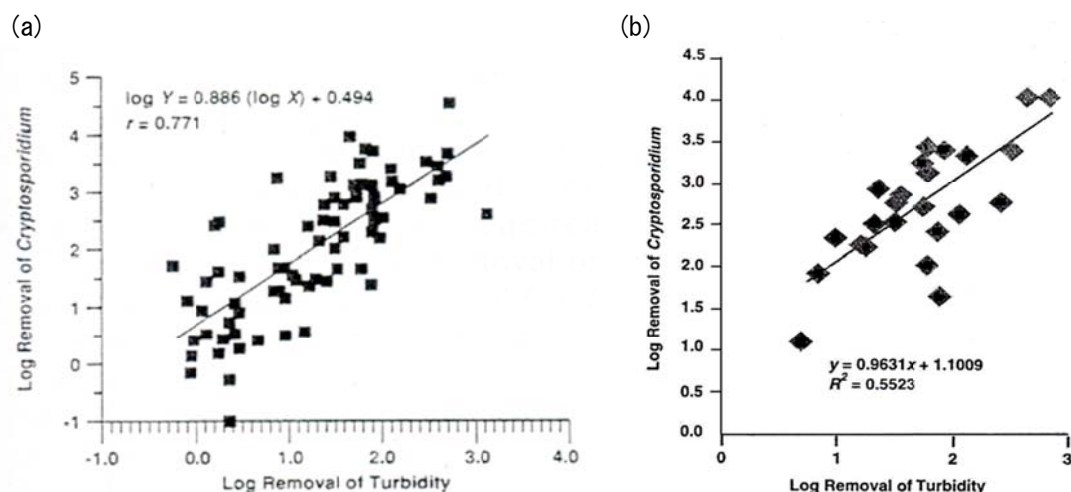
1 調査内容

H23-25 年度厚生労働科学研究「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」における成果等をふまえ、国内外の微生物リスク評価を用いた水質管理手法に関する情報を収集し、我が国の水質管理への適用に資する技術的知見を整理する。

2 水道クリプトスポリジウム対策等における濁度管理の意義

2-1 クリプトスポリジウム暫定対策指針以降におけるろ過水濁度管理の科学的背景と根拠

1996 年に埼玉県越生町で水道水を介したクリプトスポリジウムによる集団感染が発生、8812 名の患者が発生した事例を契機に、同年には、厚生労働省による「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」が策定され、1998 年、2001 年に改定された後、2007 年には「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」が通知された。また、2000 年には「水道施設の技術的基準を定める省令」において、原水に耐塩素性病原生物が混入するおそれがある場合にはろ過等の設備を設置すべきことが規定、ろ過池出口の水の濁度を常に 0.1 度以下に管理することが示された。この濁度設定の根拠として、「米国水道協会白書及び過去にクリプトスポリジウム禍に見舞われた経験があるミルウォーキー市において、公衆衛生上のリスクの観点から目標とすべきとされている数値等を参考とした」とされている¹⁾。この科学的背景の一つは、海外の研究事例において、濁度の除去率とクリプトスポリジウムの除去率との間に相関が見られていることである。例えば、LeChevallier ら²⁾ (図 2-1(a)) および Nieminski ら³⁾ (図 2-1(b)) による研究事例が知られており、両者の log 除去率の間に相関性が確認されている。

図 2-1 通常処理におけるクリプトスポリジウムおよび濁度除去率の相関性^{2,3)}

一方で、水道原水中にクリプトスポリジウムが 10L あたり 1 オーシスト存在することを想定した場合には、人への健康リスクレベルから判断して、浄水処理において 2log の除去率を確保することが必要であると試算されている⁴⁾。

表 2-1 浄水処理レベルによるクリプトスポリジウム感染リスクの計算例⁴⁾

原水中のオーシスト濃度	1 個/10L			
上水処理における除去率	3 log	2.5 log	2 log	無処理
水道水中の濃度	10^{-4} 個/L	3×10^{-4} 個/L	10^{-3} 個/L	10^{-1} 個/L
飲用日量	1L/日			
曝露量/日	10^{-4} 個/日	3×10^{-4} 個/日	10^{-3} 個/日	10^{-1} 個/日
1 オーシスト摂取による感染確率	4×10^{-3}			
DALYs/case 1 感染あたりの健康影響度	1.03 $\times 10^{-3}$ DALYs (発症率 71%を採用)			
1 日あたりの感染率 (年間)	4×10^{-7} /日 (1.5×10^{-4} /年)	1.3×10^{-6} /日 (4.7×10^{-4} /年)	4×10^{-6} /日 (1.5×10^{-3} /年)	4×10^{-4} /日 (1.5×10^{-1} /年)
1 人あたりの年間健康影響度	1.5×10^{-7} DALYs	4.8×10^{-7} DALYs	1.5×10^{-6} DALYs	1.5×10^{-4} DALYs

表 2-1 に示すように、浄水処理における除去率が 2log である時の飲料水中の濃度は 10^{-3} [オーシスト/L] となり、非加熱飲水量を 1[L/日] と仮定した場合の年間健康影響度は 1.5×10^{-6} [DALYs/人/年] と計算される⁴⁾。この値は、WHO 飲料水水質ガイドライン第 3 版以降の推奨値である 1.0×10^{-6} [DALYs/人/年] より高いものの、水道水中の臭素酸の摂取により生じうる腎細胞がんリスク(年間発生率 10^{-5})に由来する年間健康影響度 1.4×10^{-6} [DALYs/人/年] とほぼ同程度であり⁵⁾、受入れ可能なリスクレベルと判断される。

先の図 1-1(a), (b) より、クリプトスポリジウムを 2log 除去するには、濁度除去率の目安として安全側で 2log 程度が必要となる。これは、原水濁度が 10 度である場合に、ろ過水濁度を 0.1 度まで低減することに相当している。暫定対策指針が策定された当時は、このような健康影響リスクを考慮し、また、わが国の水道事業体において「適正な管理のもとで」「技術的に可能なレベル」¹⁾として、ろ過水濁度の常時 0.1 度以下を設定したと判断される。

しかしながら、ろ過水濁度を常時 0.1 度以下に保ったとしても、これは、クリプトスポリジウムによる健康影響度が常時 1.5×10^{-6} [DALYs/人/年] 以下であることを保証していない点に留意する必要がある。例えば、以下の場合において健康影響度が増大する可能性がある。

- ① 水道原水が低濁度、原水中クリプトスポリジウムが高濃度となることで、凝集沈殿ならびに砂ろ過処理におけるクリプトスポリジウムの除去率が、「要求レベル」を満たさなくなる場合
- ② クリプトスポリジウムの 1 オーシスト摂取による感染確率、あるいは、1 感染あたり健康影響度が、より厳しい側に再評価される場合
- ③ 個人や集団における非加熱飲水量が増加する場合

①について、所定の健康影響度を確保するためには、浄水中に残留するクリプトスポリジウムの許容濃度が決定される。このため、原水中のクリプトスポリジウム濃度に応じて、浄水処理の過程におけるクリプトスポリジウム除去率の「要求レベル」は刻々と変化する。とりわけ、原水が低濁度である条件下でクリプトスポリジウムの汚染が発生する場合、ろ過水濁度 0.1 度を常時確保したとしても、クリプトスポリジウム除去率の「要求レベル」に達しない可能性がある。

②については、WHO 飲料水水質ガイドライン第 4 版以降、クリプトスポリジウム 1 オーシスト摂取あたり感染確率が 20%と評価されており⁶⁾、それまでの 0.4%から大幅に引き上げられている。具体的には、2009 年に公開された WHO 背景報告書において、ヒトへのボランティア実験によるデータにより UCP 株と Moredun 株を 1 個摂取した時の感染確率が 40%と評価（ただし、partial immunity に基づく評価）されており、このデータを考慮した結果、既往の感染確率 0.4%から感染確率 20%に変更された（図 2-2）⁷⁾。

また、③については、越生町でのクリプトスポリジウム集団感染事例において、患者の発生数と外気温の上昇との間に関連が見られており、外気温の上昇に伴う非加熱飲水量の増加が引き金となったことが疑われている。

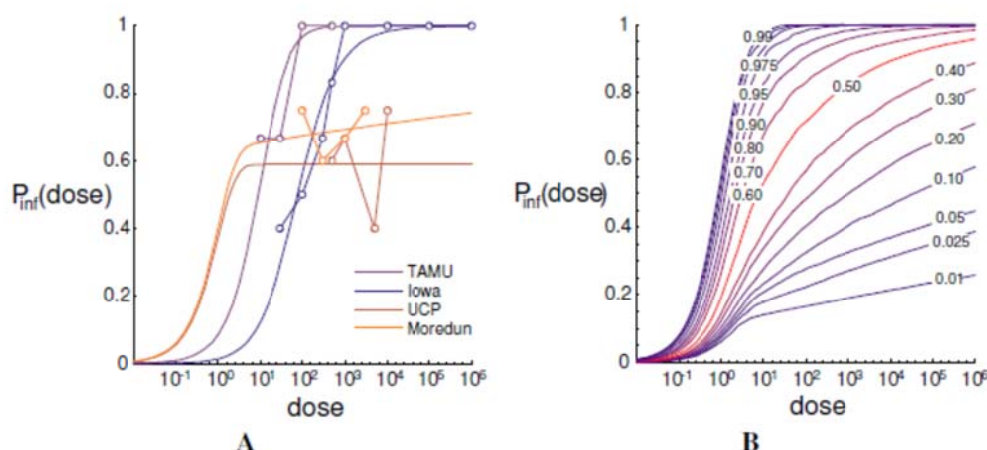


図 2-2 クリプトスポリジウム 4 株の用量反応曲線⁷⁾

以上のことから、適正な運転管理のもとでろ過水濁度 0.1 度を常時確保する濁度管理を行うことは、クリプトスポリジウムによる健康影響リスクを確実に低減する効果があるものの、健康リスクレベルの面からは十分とまらない場合がある。このような濁度管理に加えて、さらなる健康リスク低減のために、定量的微生物リスク評価（Quantitative Microbial Risk Assessment: QMRA）の手法が有効であると考えられる。

2-2 水道水質管理の向上に果たす濁度管理の役割

そもそも、水道の浄水処理において懸濁物質の除去は基本中の基本であることは論を待たない。懸濁物質には、粘土質や藻類などの目に見える「濁り」だけでなく、目に見えない健康関連微生物（原虫、細菌）やウイルスが含まれており、濁度を指標とする懸濁物質の除去は、水道水の安全性を確保する上で必須である。

例えば WHO は、飲料水水質ガイドライン第 4 版において、高濁度は微生物を消毒作用から守り、細菌

の増殖を促し、塩素要求量を著しく増加させること、消毒、適切な残留消毒剤の維持、および必要に応じて、効果的に消毒を行うために可能な限り濁度を低くする前処理は、安全な飲料水供給を確保するために必須の要素であることを明記しており、地表水（および地表水の影響を受ける地下水）を水源とする浄水システムにおいて、消毒前の濁度が 0.3 NTU 未満を達成できれば、懸濁物質に吸着する病原体に対して有効なバリアを有するとしている。さらに、病原の除去や消毒効果の確保のため、消毒前の濁度として平均 0.2NTU 以下（常時 0.5NTU 未満）を推奨している⁶⁾。また、紫外線消毒に特化した条件ではあるものの、ドイツは消毒前の水の濁度として 0.3FNU 未満⁸⁾、フランスは 0.5FNU 未満⁹⁾を基準値として定めている（1FNU = 1NTU = 1.1～1.2 度）。

以上の基準値や推奨値は、わが国の水道クリプトスポリジウム対策における、ろ過水濁度 0.1 度以下よりもいくぶん緩やかであるものの、水道事業体の日常の水質管理において、適正な消毒効果や浄水処理性能を確保する上で、高水準の濁度管理が肝要であることを示していると言えよう。

最後に、わが国の地表水を原水とする浄水場出口で測定した濁度の最高値は、平成 16 年度から 24 年度の間、徐々に改善されている事を指摘したい（図 2-3）¹⁰⁾。このことから、水道クリプトスポリジウム対策を通じて、国内の水道事業体における濁度管理ならびに水質管理は、漸次、高水準に移行していると言えるのではないだろうか。

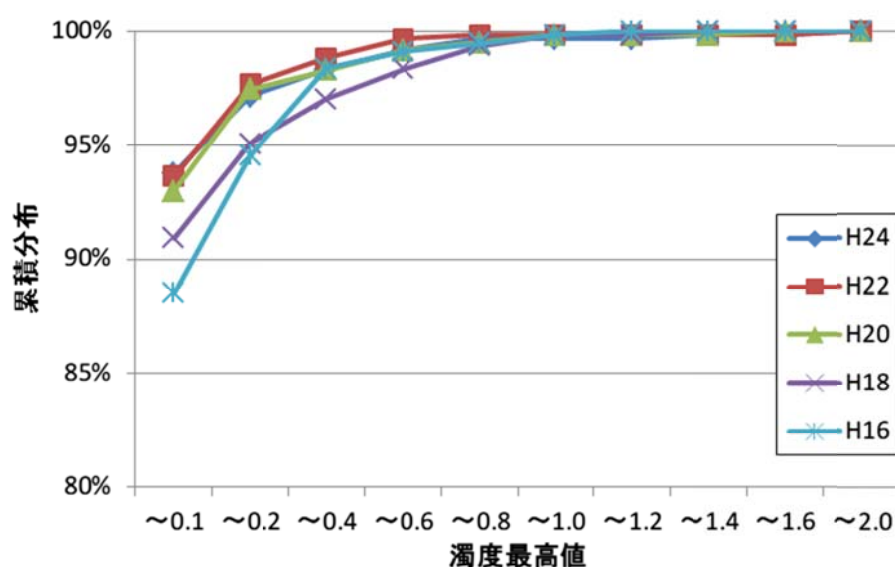


図 2-3 地表水を原水とするわが国の浄水場出口における濁度最高値の推移¹⁰⁾

（国立保健医療科学院 島崎大・秋葉道宏）

参考文献

- 1) 厚生労働省，水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針等に関する質疑回答集，2002.
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/jouhou/suisitu/c3.html>
- 2) Mark W. LeChevallier, *et al.*, Examining relationships between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity, Jour. AWWA., 54-60, 1992.

- 3) Eva C. Nieminski, *et al.*, Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by conventional treatment and direct filtration, Jour. AWWA., 96-106, 1995.
- 4) 眞柄泰基, WHO 新飲料水水質ガイドラインと改正水質基準の経緯と今後の展望, 第 46 回日本水環境学会セミナー講演資料集, 35-45, 2003.
- 5) 眞柄泰基, WHO 飲料水水質ガイドラインの改定の意義, 水環境学会誌, 27(1) , 2004.
- 6) WHO, Guideline for drinking-water quality, 4th edition, 2011.
http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/dwq_guidelines/en/
- 7) WHO, Risk Assessment of Cryptosporidium in Drinking Water, 2009.
http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_HSE_WSH_09.04_eng.pdf
- 8) ドイツガス水道協会, DVGW Standard W 294-2: UV Devices for the Disinfection for Drinking Water Supply, 2006.
- 9) フランス共和国官報, 2012.
- 10) 日本水道協会, 水道統計（水質編）平成 16 年度～24 年度, 2005-2013.

3 定量的微生物リスク評価法の適用と世界的動向

3-1 はじめに

浄水濁度の目標を 0.1 度以下にすることは、1996 年、「水道におけるクリプトスポリジウム暫定対策指針」（その後 1998 年、2001 年改訂）に由来する。その後、2007 年に「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」が発表され、紫外線による対策も可とされ、濁度 0.1 度の記述も維持された。ろ過水濁度を 0.1 度以下とすることは、当初、浄水処理が適正に行われているかを判断する目安として暫定的に設定したものであり、以下のような問題もある。

- ・ 0.1 度を基準値であるように扱う。
- ・ PAC の過剰注入傾向を招く。
- ・ ピコプランクトンによる濁度上昇への対応に右往左往する。
- ・ 紫外線導入後もマルチバリアとして 0.1 度も堅持する。

浄水濁度 0.1 度という目標設定は水道水の安全確保に一定の役割を果たしてきたが、そろそろ、微生物的安全性を定量的に評価し管理する段階へと歩を進めたいものである。本稿では原水中に検出される濃度に対し、浄水処理で確保すべき除去・不活化能を定量的に求める手法を示す。

3-2 原水中濃度と必要除去・不活化能の計算

3-2-1 定量的微生物リスク評価法の適用

関東地方 A 県の水道事業体が原水とする河川水中のクリプトスポリジウム、ジアルジア濃度の分布を図 3-1、図 3-2 に示す。ともに測定期間は 1999 年 8 月から 2013 年 3 月であり、クリプトスポリジウムは 219 回測定され、ND を 109 回（49.8%）含み、その平均値は 2.5 oocysts/10 L であった。ジアルジアの測定回数は 152 回で、うち 131 回が ND（86.2%）で、平均値は 0.3 cysts/10 L であった。これらのデータは、定期調査に加えて、汚染が検出された時の集中調査による結果を含んでいる。このため濃度分布は実際よりも過大であり、以下は安全側の評価を行っているといえる。

図 3-1、図 3-2 のデータを、横軸に濃度、縦軸に確率をとり、ともに対数目盛で描いたものが図 3-3 である。これは、相補累積分布(Complementary Cumulative Distribution Function; CCDF)とよばれ、これによって出現頻度の低いデータ（高濃度域データ）を拡大して見ることができる。なお、ND の割合である 49.8%、86.2%は、濃度 1 oocysts および cysts/10 L のプロット位置に現れている。

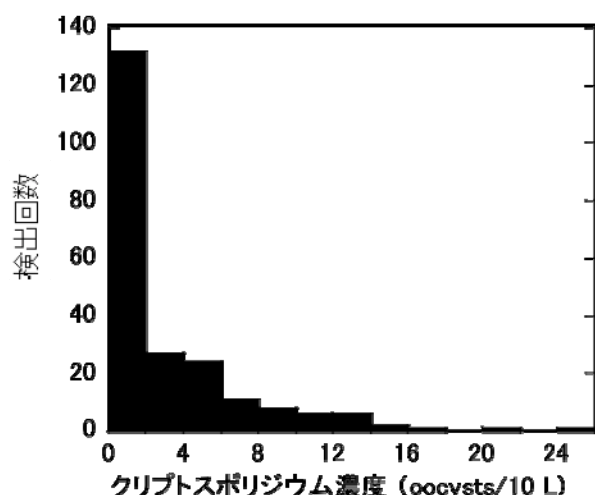


図 3-1 河川水中クリプトスポリジウム濃度
測定例（関東地方 A 県）

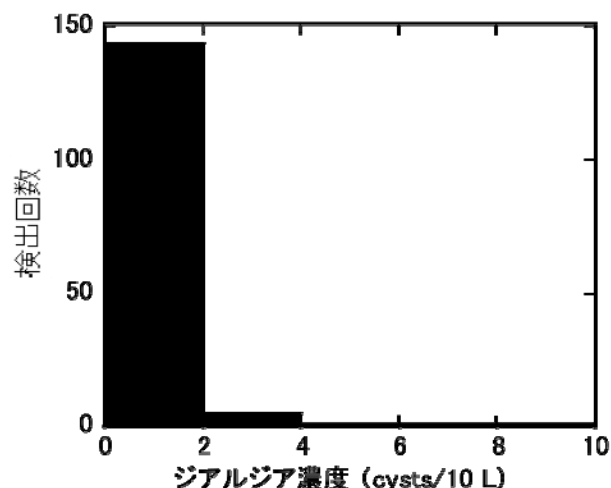


図 3-2 河川水中ジアルジア濃度測定例（関
東地方 A 県）

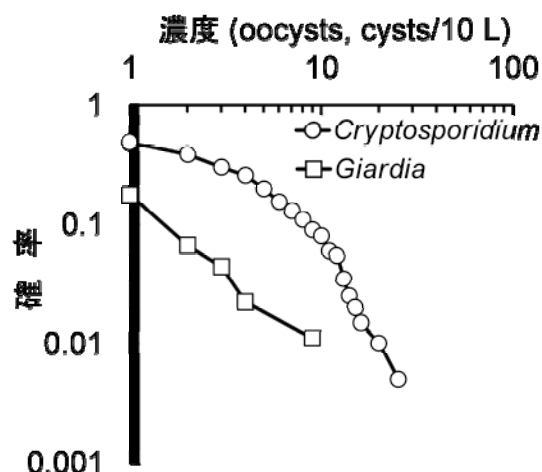


図 3-3 水道原水における濃度分布（関東地方 A 県）

この水道原水から安全な水道水を得るのに必要な除去・不活化能を評価してみる。図 3-4 は、その手順を示したもので、許容年間感染確率 10^{-4} /人/年からスタートしている。これは定量的微生物リスク評価(Quantitative Microbial Risk Assessment; QMRA)の一般的な手順¹⁾である。クリプトスポリジウムおよびジアルジアの用量・反応モデル式は、それぞれ $P_d = 1 - \exp(-4.005 \times 10^{-3} \times D)$ 、 $P_d = 1 - \exp(-1.99 \times 10^{-2} \times D)$ (D : 摂取量)を使用した。非加熱飲料水消費量は、2009 年に大阪市が行った調査結果²⁾を用い、平均値 327 mL/日をもつ指数分布として表した。

モンテカルロシミュレーションによって必要除去・不活化能の分布を得、その 90, 97.5 パーセントイル値を示したものが表 3-1 である。ND を得た比率はジアルジアの方が大きい、97.5 パーセントイル値は近い値となった。この原水を利用する場合、クリプトスポリジウムおよびジアルジアに対して、 $3.97 \log_{10}$ および $3.85 \log_{10}$ の除去・不活化能を確保できれば、ほぼ安全な水道水を生産できるといえる。

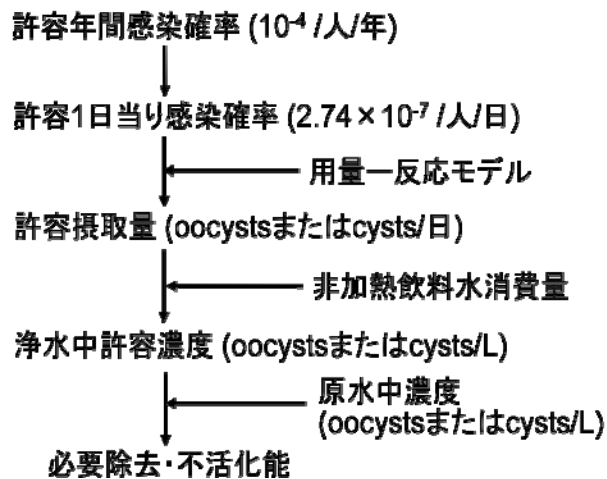


図 3-4 浄水処理による必要除去・不活化能の計算方法

表 3-1 必要除去・不活化能の計算結果

	90 パーセンタイル	97.5 パーセンタイル
クリプトスポリジウム	3.55 log ₁₀	3.97 log ₁₀
ジアルジア	3.01 log ₁₀	3.85 log ₁₀

また、WHO 飲料水水質ガイドライン第 4 版では、もはや感染確率 10^{-4} /人/年ではなく、障害調整生存年数 10^{-6} DALY /人/年を目標値とすることを推奨している。目標値を DALY に変更した場合の必要除去・不活化能の計算結果を表 3-2 に示す。97.5 パーセンタイル値はクリプトスポリジウムで 3.27 log₁₀、ジアルジアで 2.55 log₁₀ となり、やや緩和されることがわかる。

表 3-2 必要除去・不活化能の計算結果

	97.5 パーセンタイル
クリプトスポリジウム	3.27 log ₁₀
ジアルジア	2.55 log ₁₀

水処理のユニットプロセスによる細菌，ウイルス，原生動物に対する除去・不活化能はいくつかの資料^{3,4)}にまとめられている。それらを参照し、必要なユニットプロセスを選択したり組み合わせれば良いことになる。

3-2-2 点推定による方法

上記ではモンテカルロシミュレーションを行ったが、初めは各項目を定数として扱った点推定 (Point Estimate) を行っても良い。

図 3-5 を例題として考えてみる。クリプトスポリジウムの濃度が 5 oocysts/10 L である水道原水があったとし、これを安全な水道水にするにはどうすればよいかという問題である。

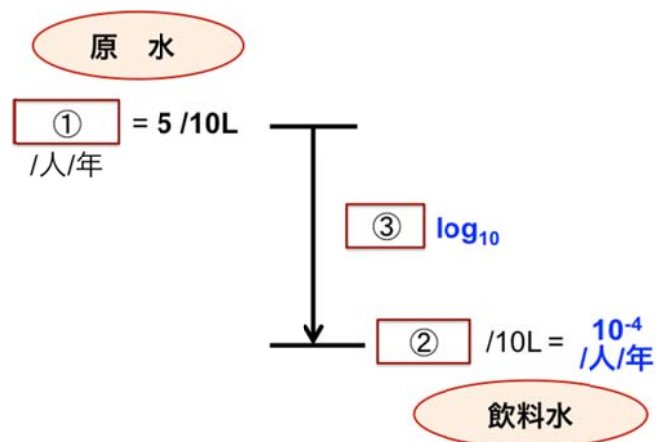


図 3-5 クリプトスポリジウムに対する必要除去・不活化能の試算例題

非加熱飲料水消費量は、ここでは 300 mL/人/日に固定して計算を進める。5 oocysts/10 L である水道原水を無処理で飲用すると、非加熱飲料水消費量 300 mL/人/日の場合、年間感染確率は 2.0×10^{-4} 人/年 (①) と計算される。これに対し安全な水道水とは 10^{-4} 人/年レベルであるが、これに相当するクリプトスポリジウム濃度は 0.0023 oocysts/10 L (②) である。これはクリプトスポリジウムに関する水質基準値に相当する値といえる。すなわち、5 を 0.0023 以下に低減できれば良い。除去・不活化 $\log_{10}$ 数で表記すれば $3.3 \log_{10}$ (③) となる。これを達成するのに必要な浄水処理ユニットプロセスを選択、あるいは組み合わせて導入すればよいのは上述と同じである。

このような QMRA 手法には、次のような活用方法もある (図 3-6 参照)。ある浄水場が、クリプトスポリジウムに対して $3 \log_{10}$ の除去・不活化能をもつことがわかっているとする。許容水道水中濃度は 0.0023 oocysts/10 L であるから、この場合、水道原水中濃度が 2.3 oocysts/10 L までは耐えられることになる。つまり、原水中濃度が 2.3 oocysts/10 L 以下であることを確認できていれば、「濁度 0.1 度」に依らず、ピコプランクトンが発生しようと高濁度原水が流入しようと安心していけばよいのである。

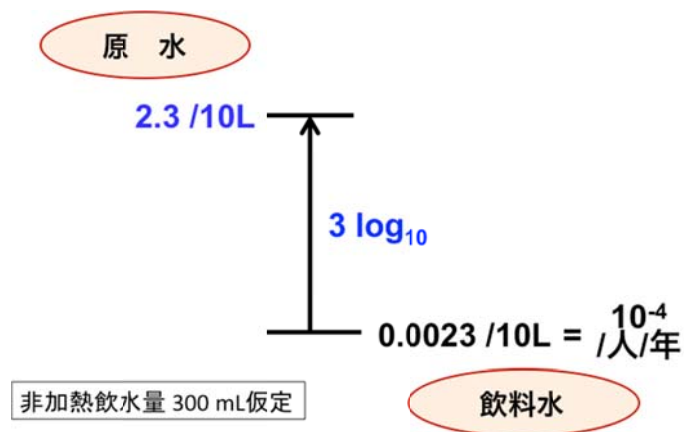


図 3-6 クリプトスポリジウムに対する安全確保の考え方の例

以上の例は各数値を定数として扱うもので点推定とよばれる。点推定からスタートし、データが整えば、やがてモンテカルロシミュレーションへ移行すればよいだろう。

3-3 世界的動向

3-3-1 QMRA の導入

昨年度の本検討会資料で提示したように、世界的にみて、QMRA 手法の実務への導入は、オランダを筆頭にアメリカ、カナダ、オーストラリアなどで進んできた。WHO も、水道事業者や行政担当者が実務に導入するための「QMRA に関する WHO Guidebook」の編纂を進めている。

3-3-2 水源への排出状況の把握

オランダの研究グループは、クリプトスポリジウムなどの排出に関する世界モデル (GloWPa-Crypto version L1) を構築しようとしている。図 3-7 はその結果である⁵⁾。このモデルには、家畜からの排出、表流水への流出、環境中での生残過程が含まれている。これによって、高濃度が出現するホットスポット（欧州、ニュージーランド、中国東部、米国など）や、季節変化を把握しようとしている。また、クリプトスポリジウムの世界総排出量は 1×10^{17} oocysts/year（2010 年）であるとし、その 42% は衛生施設の未整備が原因であるとしている⁶⁾。

なお、図 3-7 にはわが国の情報が表示されていないが、同研究グループに対して、厚生労働省水道課に集められた水道原水中のクリプトスポリジウムおよびジアルジア濃度に関するデータ（浄水中データ含む）⁷⁾を提供した。

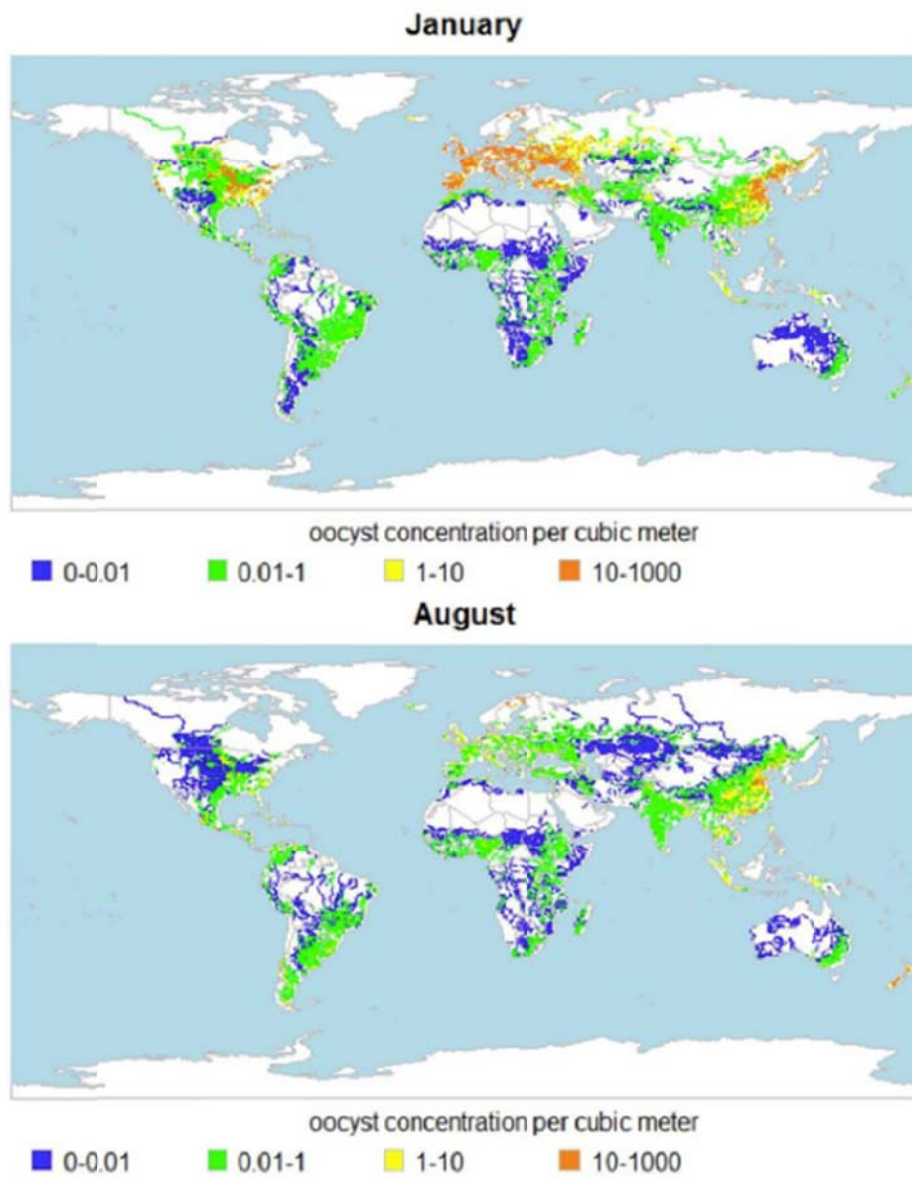


図 3-7 畜産由来クリプトスポリジウムオーシストの表流水中濃度(oocysts/m³)⁵⁾

3-4 おわりに

定量的微生物リスク評価のための方法論は整備され、使用可能なレベルにある。この場合、水質基準項目に相当するのは、「年間感染確率 10^{-4} /人/年、または障害調整生存年数 10^{-6} DALY /人/年以下であると評価できること」となる。

(京都大学 伊藤禎彦)

参考文献

- 1) 伊藤禎彦、上月康則、山崎慎一、藤原拓、西村文武、山本裕史、橋本温、樋口隆哉、山中亮一、大谷壮介共著; よくわかる環境工学, 236p., 理工図書, 2015.
- 2) 小松良光, 近藤才寛, 田川克弘; インターネットアンケートに基づく蛇口からの非加熱飲水量の調査およびデータ解析, 水道協会雑誌, Vol. 82, No. 3, pp. 16-25, 2013.
- 3) Medema, G., Loret, J. F., Stenstrom, T.-A., Ashbolt, N. eds.; MICRORISK, Quantitative Microbial Risk Assessment in the Water Safety Plan, pp.4.1-4.64, 2006.
- 4) Hijnen, W. A. M., Medema, G.; Elimination of Microorganisms by Water Treatment Processes, IWA Publishing, London, UK, 102pp., 2010.
- 5) Vermeulen, L. C., van Hengel, M., Hofstra, N., Kroeze, C., Medema, G. J.; Global Modeling of *Cryptosporidium* from Livestock Manure in Surface Water, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology Proceedings, pp.393-396, Lisbon, Portugal, 13-19 September 2015.
- 6) Hofstra, N., Vermeulen, L. C.; Consequences of Deficient Access to Sanitation and Wastewater Treatment for Global Human *Cryptosporidium* Emissions to Surface Water, 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology Proceedings, pp.422-424, Lisbon, Portugal, 13-19 September 2015.
- 7) 伊藤禎彦, 河合香織, 浅田安廣, 周靚; 「濁度 0.1 度」から卒業する方法～原水中原虫濃度と必要除去・不活化能～, 平成 27 年度全国会議 (全国水道研究発表会) 講演集, pp.626-627, 2015.

4 大腸菌を用いた各消毒処理による不活化実験における大腸菌種および測定法について

大腸菌はグラム陰性の腸内細菌であり、糞便汚染指標として用いられるだけでなく、水処理中の消毒方法の評価方法のモデル細菌として用いられている。これは浄水処理および下水処理における消毒プロセスの管理手法として大腸菌もしくは大腸菌群がモニタリングされていることから、消毒処理における大腸菌の殺菌効率を把握しておくことが、運用面から考えて効率的であるからと考えられる。

しかし昨年度の報告書にもまとめたように、既報における大腸菌実験方法には統一性がなく、結果が安全側の評価に基づいたものなのかどうかについては、検証する必要があるといえる。特に使用大腸菌種や測定培地について、これまでの使用状況のまとめだけでなく、実際に実験により、安全側の評価となる選択方法について検討する必要がある。

そこで本年度は、既報論文研究の更なる調査を進め、使用される大腸菌種および使用培地について情報の蓄積を行うとともに、それらの結果を基に塩素消毒方法に焦点を絞って、大腸菌種による耐性の相違、測定培地による評価結果の相違について実験による検証を行った。

4-1 文献調査について

4-1-1 実験方法による分類

昨年度の調査した文献（26 編）に加えて、和文誌を中心に文献収集を行い更に（15 編）を加えて、その結果をまとめることにした。この中から大腸菌を扱った論文 35 編に注目し、実験方法をまとめた。図 4-1 にその分類を示す。

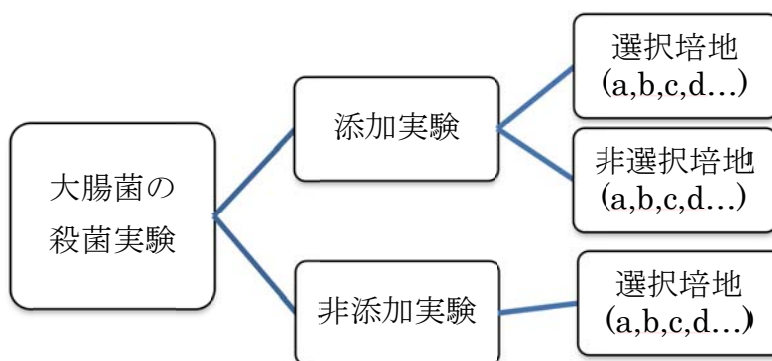


図 4-1 大腸菌の殺菌実験方法の分類

図 4-1 に示すように、大腸菌の殺菌実験は、まず大きく添加実験と非添加実験に分けられる。添加実験とは、種類が特定されている大腸菌、もしくは環境水等から予め選択培養し単離した大腸菌を清澄水等に添加して実験に供する方法を示す。一方、非添加実験とは対象試料水中に元々存在する大腸菌を他の菌も共存した状態で殺菌実験に供することを示す。

添加実験および非添加実験において、使用されている大腸菌の測定培地で分類すると、添加実験では選択培地と非選択培地が用いられ、非添加実験では選択培地のみが用いられていた。ここでいう選択培地とは、特定の菌種のみを生育しコロニー数を測定する培地を意味し、非選択培地は菌種を特定せず多種類の菌種を発育させ、そのコロニー数にて濃度を測定する培地を意味する。

添加実験においては既知の大腸菌のみを添加するため、大腸菌の選択能をもつ選択培地を用いる必要性はない。しかし調査対象となった文献調査では選択培地を用いて実験を行っている例も数例見

られた。一方、非添加実験においては多種の菌が混在するため、大腸菌の挙動を把握するために、必然的に大腸菌選択能をもつ選択培地が用いられていた。

以下に、添加実験および非添加実験において用いられた培地と大腸菌種について報告する。

4-1-2 各消毒実験（大腸菌の添加実験）における使用培地について

各消毒処理の研究において、大腸菌の添加実験に使用されていた選択培地について表 4-1 にまとめた。塩素処理を行った 5 編の研究論文で用いられていた培地は、研究論文毎に全て異なっており、デソキシコーレイト寒天培地、LB 寒天培地、EC(コンパクトドライ)、m-FC agar 培地、TLYD agar (TLY agar plus sodium deoxycholate)培地の 5 種類であった。

紫外線照射 (UV) 処理を行った9編の研究論文ではデソキシコーレイト寒天培地、LB寒天培地、EC (コンパクトドライ)、クロモカルト寒天培地、Endo agar 培地、Colinstant Chromogenic Mediumの6種類が用いられていた

オゾン処理、おがくず処理、および家庭用漂白剤を扱った研究では、それぞれにおいていずれもデソキシコーレイト寒天培地であった。パルス電圧処理を扱った研究ではLB液体培地であった。

表4-1 大腸菌の添加殺菌実験で使用された選択培地のまとめ

処理方法	選択培地	論文数 (本)
塩素	デソキシコーレイト寒天培地	1
	LB 寒天培地	1
	EC(コンパクトドライ)	1
	m-FC agar	1
	TLYD agar	1
UV	デソキシコーレイト寒天培地	2
	LB 寒天培地	2
	EC(コンパクトドライ)	1
	クロモカルト寒天培地	1
	Endo agar	2
	Colinstant Chromogenic Medium	1
おがくず	デソキシコーレイト寒天培地	1
パルス電圧	LB 液体培地	1
家庭用漂白剤	デソキシコーレイト寒天培地	1

次に非選択培地を用いていた論文研究について表4- 2にまとめた。

塩素素処理を行った6編の研究では、Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar (以下TSA) 培地、TLY agar (tryptic soy broth containing lactose, yeast extract, and agar)培地の3種が使われている。UV 処理では 7編の研究にて、5 種の培地が用いられ、PDA 培地、ペプトン培地、TSA、ブイヨン液体培地、nutrient brothであった。オゾン処理を扱った2編はいずれもTSA培地であった。電気分解処理においては標準寒天培地、フェントン様反応系処理においては、B1 寒天培地が用いられていた。

表 4-2 大腸菌の添加殺菌実験で使用された非選択培地のまとめ

処理方法	非選択培地	論文数 (本)
塩素	Nutrient Agar	2
	TSA 培地	3
	TLY agar	1
UV	PDA 寒天培地	1
	ペプトン培地	1
	TSA 培地	3
	ブイヨン液体培地	1
	nutrient broth	1
オゾン	TSA 培地	2
電気分解	標準寒天培地	1
フェントン様 反応系	B1 寒天培地	1

4-1-3 各消毒実験（大腸菌の非添加実験）における使用培地について

最後に大腸菌の非添加試料を用いた消毒処理実験研究について表 4-3 にまとめた。塩素処理を行った 6 編の研究では用いられていた培地は 5 種で、デソキシコーレイト寒天培地、m-TEC 寒天培地、Membrane lactose glucuronide 寒天培地、Fuchsin Basic Sodium Sulfite 寒天培地、m-FC 寒天培地であった。UV 処理では Fuchsin Basic Sodium Sulfite Agar、m-FC 寒天培地の 2 種の培地が用いられていた。オゾン処理においては、m-TEC 寒天培地、lauryl sulphate 寒天培地の 2 種類、超高压水中衝撃波処理においてはデソキシコーレイト寒天培地であった。

表 4-3 大腸菌の非添加殺菌実験で使用された選択培地のまとめ

処理方法	選択培地	論文数 (本)
塩素	デソキシコーレイト寒天培地	2
	m-TEC agar	1
	Membrane lactose glucuronide agar	1
	Fuchsin Basic Sodium Sulfite Agar	1
	m-FC agar	1
	不明	1
UV	Fuchsin Basic Sodium Sulfite Agar	1
	m-FC agar	1
オゾン	m-TEC agar	1
	lauryl sulphate agar	1
超高压水中 衝撃波	デソキシコーレイト寒天培地	1

4-1-4 使用大腸菌について

添加実験を扱った論文 (24本) 中で使用された大腸菌の種類は, 14 種類あった. それぞれ「株種」, 「登録名 (保存機関名/番号)」, 「論文数」, 「別登録名」の項目に分けてまとめた. 表4-4 に示す.

表4-4 使用大腸菌のリスト

種	登録番号名		論文数 (本)	別登録番号名	
	保存機関 名	番号		保存機関 名	番号
	CGMCC	1.3373	1		
	ATCC	11229	2		
	ATCC	11775	3	IAM	12119
	ATCC	15597	1		
K-12	ATCC	23631	1		
K-12	ATCC	47076	2	MG	1655
	IAM	1016	1		
K-12	IFO	3301	3	NBRC	3301
K-12	JCM	20135	2	IAM	1264
F2	NBRC	13965	2		
	NBRC	3972	2		
K-12	D 5 Hα		1		
	JK 114		1		
	JM 103		1		

表4-4 より, 最も多かった種はK-12であった. K-12 は1922 年に人の糞便から分離され Stanford 大学で保存されていたもので, 遺伝子操作などの実験で広く利用されている大腸菌株である. また登録名が異なっても, 同じ性質の大腸菌が存在する. 今回調べた中では, ATCC 11775とIAM 12119, ATCC 47076とMG 1655, IFO 3301とNBRC 3301, JCM 20135とIAM 1264 が同一であった. D 5 Hα, JK 114, JM 103 に関しては保存機関名がわからなかった.

以下に保存機関についてもまとめた.

CGMCC ... China General Microbiological Culture Collection, 中国普通微生物菌种保藏管理中心

ATCC ... American Type Culture Collection, 1925年米国で設立, 世界最大の微生物保存機関

IAM ... Institute of Applied Microbiology, 東京大学分子細胞生物学研究所, 2007年に理研BRC-JCMに移管

IFO ... (財) 発酵研究所, 2002年に(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源課(NBRC)に移管

JCM ... Japan Collection of Microorganisms, 理研BRC微生物材料開発室

4-1-5 文献調査まとめ

主な処理方法についてまとめると塩素処理では全11 種, UV処理では全 13 種と様々な測定方法が用いられていたことがわかった。

添加実験, 非添加実験のいずれにおいても, 特定の培地の使用は見られず, 様々な種類が使用されていたことがわかった。また使用大腸菌においても全 14 種と様々な種類が使用されていたことがわかった。すなわち, 大腸菌を用いた殺菌方法の評価データがあっても安全側の評価(大腸菌の耐性が高く, 殺菌効果が低くでる測定方法)であるかは確証がないことから, どの様な方法であれば安全側の評価であるか検討する必要があると考えられた。

4-2 異なる培地および大腸菌種を用いた塩素殺菌実験

文献調査の結果を基に, 塩素処理実験(添加殺菌実験)を実施し, 調査対象論文にて使用されていた5つの培地(選択培地: EC(コンパクトドライ), デソキシコーレイト寒天培地, m-FC agar, 非選択培地: Nutrient Agar, TSA培地), および添加殺菌実験にて使用頻度が相対的に高かった3種の大腸菌(*E.coli* (NBRC 3301), *E.coli* (NBRC 13965), *E.coli* (NBRC 3972))を用いて, 塩素処理実験(添加殺菌実験)を行い, 安全側の評価方法を探ることとした。

4-2-1 実験方法

4-2-1-1 大腸菌の種類について

大腸菌は以下に示す3種類の菌株を用いて実験に供した。

<i>E.coli</i> (NBRC3301) :	論文にて再頻出のK-12として使用
<i>E.coli</i> (NBRC13965) :	K-12とは別種の菌株として使用
<i>E.coli</i> (NBRC3972) :	抗菌製品のJIS評価規格(抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果, JIS Z 2801 : 2010)にて指定されている菌株

4-2-1-2 使用培地について

選択培地 3 種(コンパクトドライEC(以下EC), デソキシコーレイト寒天培地(以下DESO), m-FC agar)と非選択培地 2 種(Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar(以下TSA))の全 5 種を大腸菌濃度測定に用いた。培地作成方法は以下のとおり。

【選択培地】

- ① EC : コンパクトドライ「ニッスイ」EC(株日水製薬)
製品には培地を含む不織布が用意されており調製など準備は不要。
- ② DESO : デスオキシコーレイト寒天培地(栄研化学株式会社)
デスオキシコーレイト培地 18 g を精製水400 mL に加え加温溶解し, ねじ口瓶に入れて48℃で保温して使用した。
- ③ m-FC : mFC AGAR (Difco)
mFC agar 10.4 g を精製水 200 mL に加え加温溶解し, ねじ口瓶に入れ, 高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)を行った後, 48℃で保温して使用した。

【非選択培地】

- ④ Nutrient : Nutrient Agar (Difco)
Nutrient Agar 9.2 g を精製水 400 mL に加え加温溶解し, ねじ口瓶に入れ, 高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)を行った後, 48℃で保温して使用した。

⑤ TSA : Tryptic Soy Agar (Difco)

Tryptic Soy Agar 16 g を精製水 400 mL に加え加温溶解し、ねじ口瓶に入れ、高圧蒸気滅菌 (121℃, 20分) を行った後、48℃で保温して使用した。

4-2-1-3 塩素殺菌実験について

各大腸菌の懸濁液から滅菌ループを用いて固化させたTSA寒天上に塗布し、37℃で24時間恒温槽内に静置した。各大腸菌の形成コロニーを滅菌ループで釣菌し、滅菌済みリン酸緩衝液 120 mL に懸濁させ、大腸菌濃度約 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL の懸濁液を作成した。

5 %次亜塩素酸ナトリウム（キシダ化学製）400 μ L を、純水100 mL に加えて攪拌し、塩素原液とした。この塩素原液を、滅菌済みリン酸緩衝液36 mL に約200～400 μ L加えて攪拌し、一旦遊離塩素濃度を測った。

この塩素溶液の濃度が、大腸菌懸濁液と反応させた際に設定遊離塩素濃度の 2倍となるように、滅菌済みリン酸緩衝液を加えて調整した。遊離塩素濃度はDPD 法を用いて測定した。遊離塩素濃度は変化しやすいため、滅菌済みリン酸緩衝液に塩素原液を加えてから約 3 分後に遊離塩素測定を行い、濃度を確認した直後の塩素溶液を実験に用いることとした。

①培地間の比較実験

大腸菌に塩素処理を行った際の培地間の培養能力を比較する実験を行った。大腸菌は *E.coli* (NBRC3972) を用いた。

上記の方法にて用意した設定濃度の2倍とした塩素溶液 3.5 mL に等量の大腸菌懸濁液を投入し攪拌した。3 分後に滅菌済み3%チオ硫酸ナトリウム70 μ Lを投入し脱塩素した後、速やかに大腸菌濃度測定を行った。培地は4-2-1-2で示した選択培地 3 種 (EC, DESO, m-FC) と非選択培地 2 種 (Nutrient, TSA)を用いて計測した。この実験は計 5 回行った。

②大腸菌種間の比較実験

3 種の大腸菌の塩素耐性を比較する実験を行った。4-2-1-1に示した3種の大腸菌懸濁液を用意し、上記の方法にて用意した設定濃度（初期塩素濃度で0.5 mg/L）の2倍の塩素溶液3.5 mL に等量の大腸菌懸濁液を投入し攪拌した。1 分後に滅菌済み3%チオ硫酸ナトリウム70 μ Lを投入し脱塩素した後、速やかに大腸菌濃度測定を行った。培地はECを用いて計測した。

4-2-2 実験結果

5 回の実験結果を 4-2-1～4-2-5 に示した。塩素処理前の大腸菌初期濃度を 5 種の培地で測定した結果で比較すると、いずれの場合でも培地間に差が生じていた。選択培地（EC, DESO, m-FC）は非選択培地と比べて初期濃度が低い傾向があった。即ち、塩素投入前の段階においても大腸菌には選択培地による選択性で検出不可となるような VBNC 状態の菌の存在があることが考えられる。非選択培地間（Nutrient, TSA）の初期濃度差はほとんどなかった。

この結果から各条件での各培地測定における生残率を求め、図 4-2-6～4-2-10 に示した。

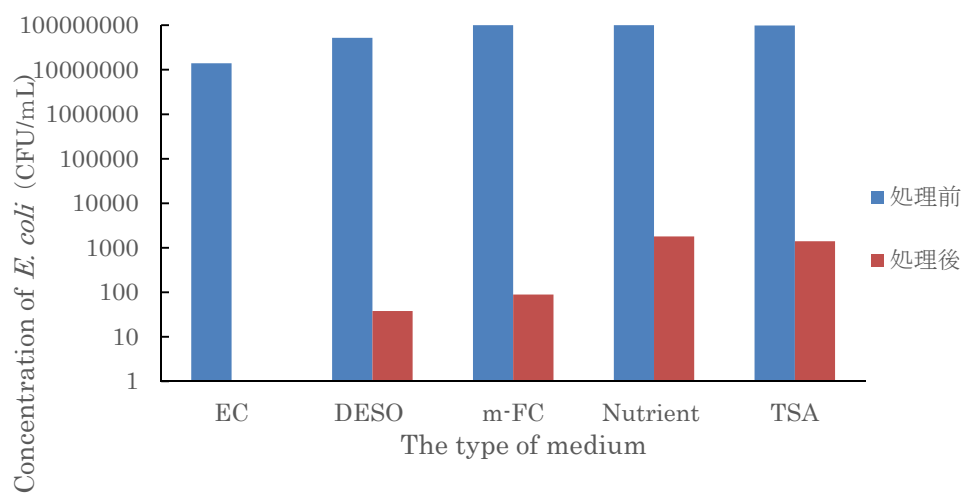


図 4-2-1 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）濃度測定結果
（初期塩素濃度 1.5 mg/L，接触時間 3 min.，1 回目）

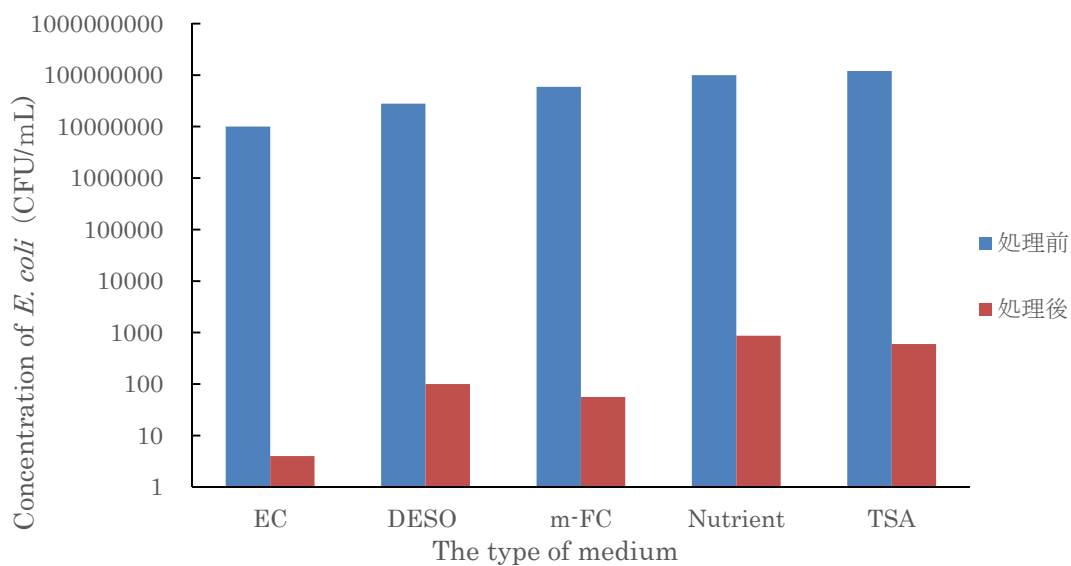


図 4-2-2 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）濃度測定結果
（初期塩素濃度 0.6 mg/L，接触時間 3 min.，1 回目）

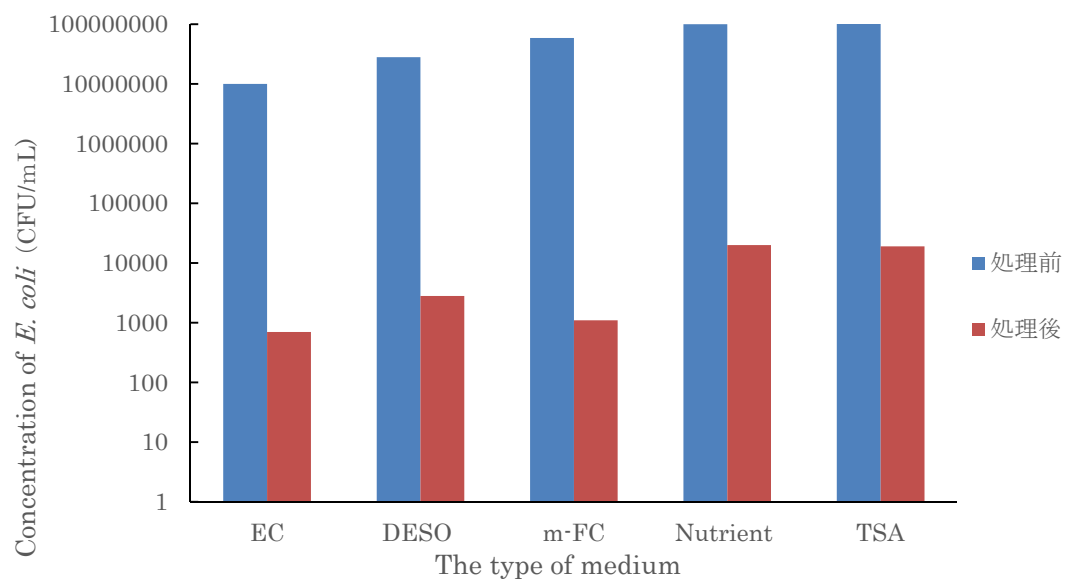


図 4-2-3 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）濃度測定結果
（初期塩素濃度 0.6 mg/L，接触時間 3 min.，2 回目）

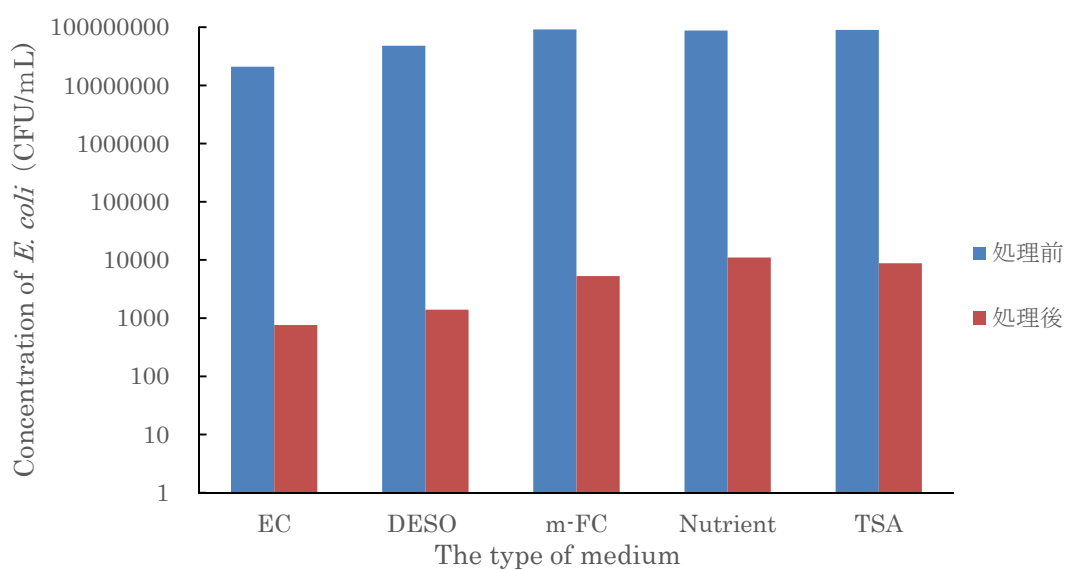


図 4-2-4 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）濃度測定結果
（初期塩素濃度 0.5 mg/L，接触時間 3 min.，1 回目）

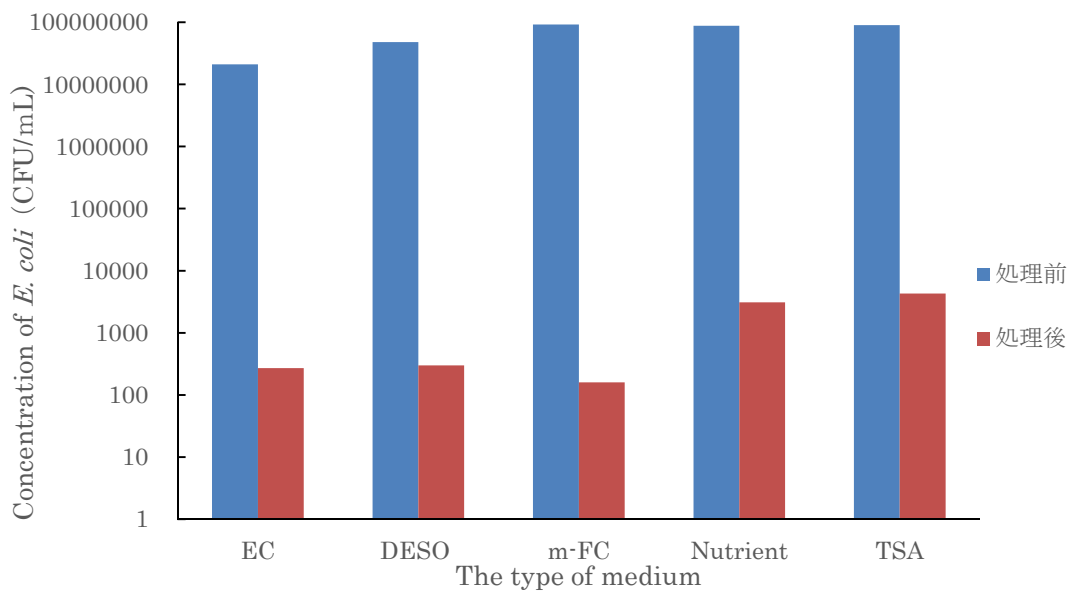


図 4-2-5 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）濃度測定結果
（初期塩素濃度 0.5 mg/L，接触時間 3 min.，2 回目）

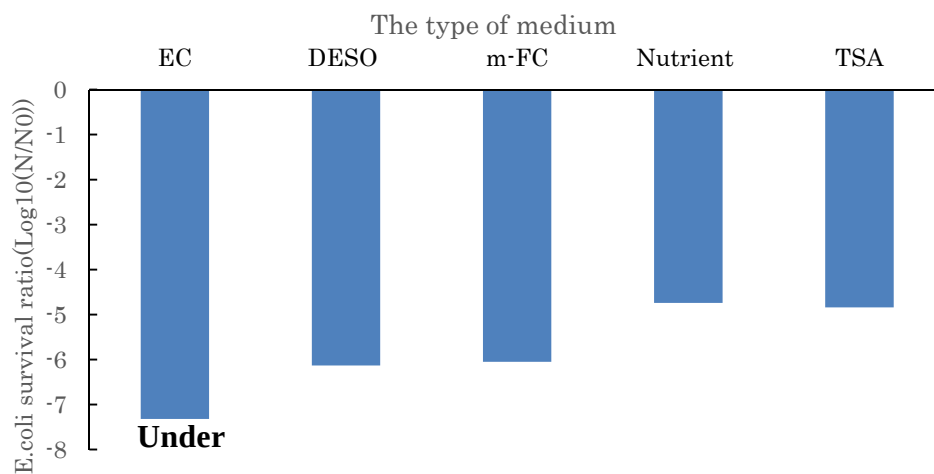


図 4-2-6 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）の生残率
（初期塩素濃度 1.5 mg/L，接触時間 3 min.，1 回目）

図中の under は，これ以下の生残率となったことを示す．

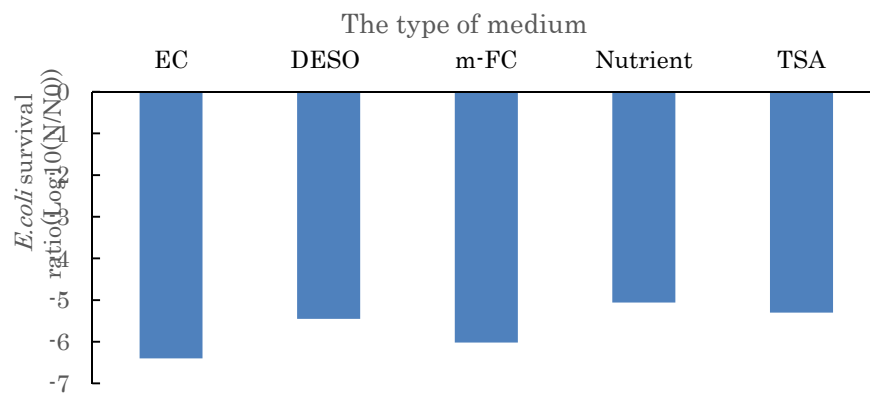


図 4-2-7 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）の生残率
（初期塩素濃度 0.6 mg/L, 接触時間 3 min., 1 回目）

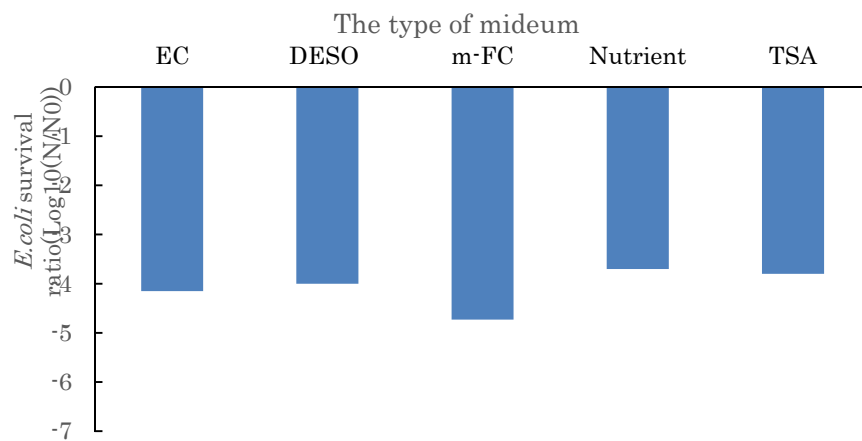


図 4-2-8 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）の生残率
（初期塩素濃度 0.6 mg/L, 接触時間 3 min., 2 回目）

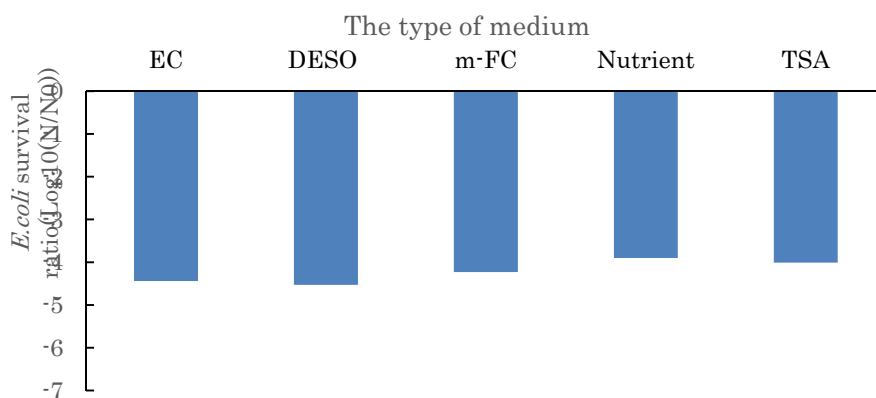


図 4-2-9 5種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）の生残率
（初期塩素濃度 0.5 mg/L, 接触時間 3 min., 1 回目）

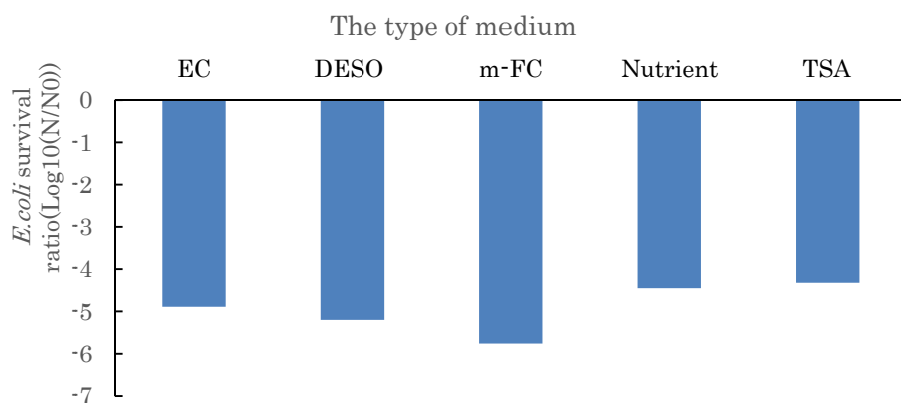


図 4-2-10 5 種の測定培地による塩素処理前後の大腸菌（NBRC3972）の生残率
（初期塩素濃度 0.5 mg/L，接触時間 3 min.，2 回目）

いずれの実験においても生残率は、選択培地の方が非選択培地よりも低い生残率となり、殺菌効果が高く評価される結果となっていた。今回の条件においては、非選択培地と選択培地間には最大で 25 培の差が生じていた。塩素処理後の大腸菌には、選択培地において検出不可となる VBNC 状態の大腸菌がある程度存在し、その存在によってこの差が生じたと考えられる。また選択培地間の差も、条件によって傾向がばらつくことが確認され、どの選択培地を選ぶかによって結果が異なることが示唆された。

一方、非選択培地間の差はいずれの場合でも、ほとんど同じであった（最大でも 1.7 倍の差）。このことから、非選択培地はどちらを選んでも、測定結果に差が生じにくいことが推定される。

以上より塩素処理実験（添加殺菌実験）を行う上で、選択培地を用いた場合は生残率が低くなる傾向があり測定結果にばらつきが起りやすいが、非選択培地では生残率が選択培地よりも高く、かつ培地間の差が見られず結果のばらつきが生じにくい。従って、非選択培地の方が安全側に、かつ安定した殺菌効果の評価となると考えられた。

次に 3 種の大腸菌を用いた実験結果を図 4-2-11 に示す。

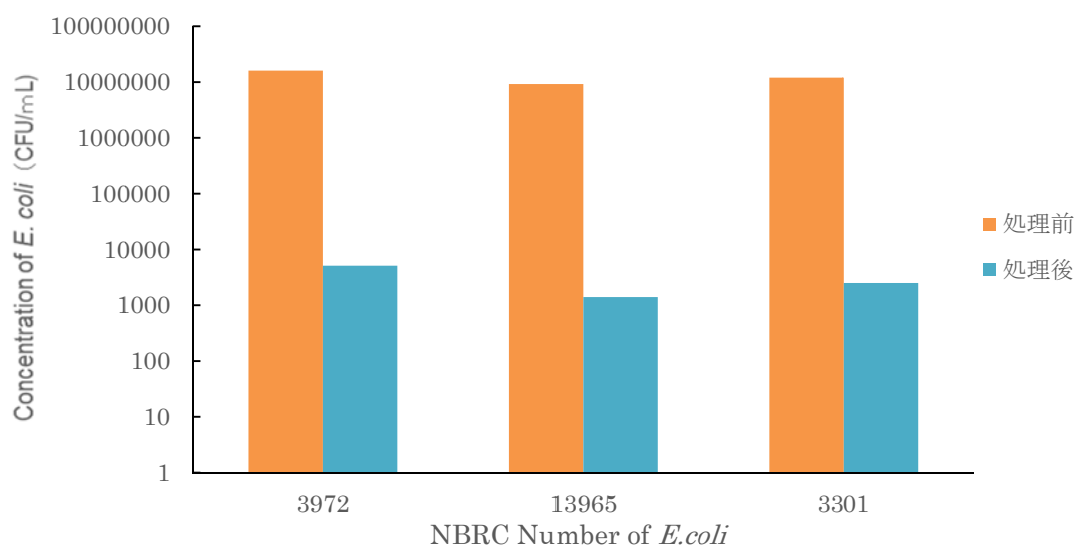


図 4-2-11 塩素処理前後の 3 種の大腸菌（NBRC 3972,13965,3301）の濃度

(初期塩素濃度 0.5 mg/L, 接触時間 1 min.)

この結果をもとに, 各大腸菌での生残率を求め, 図 4-2-12 に示した.

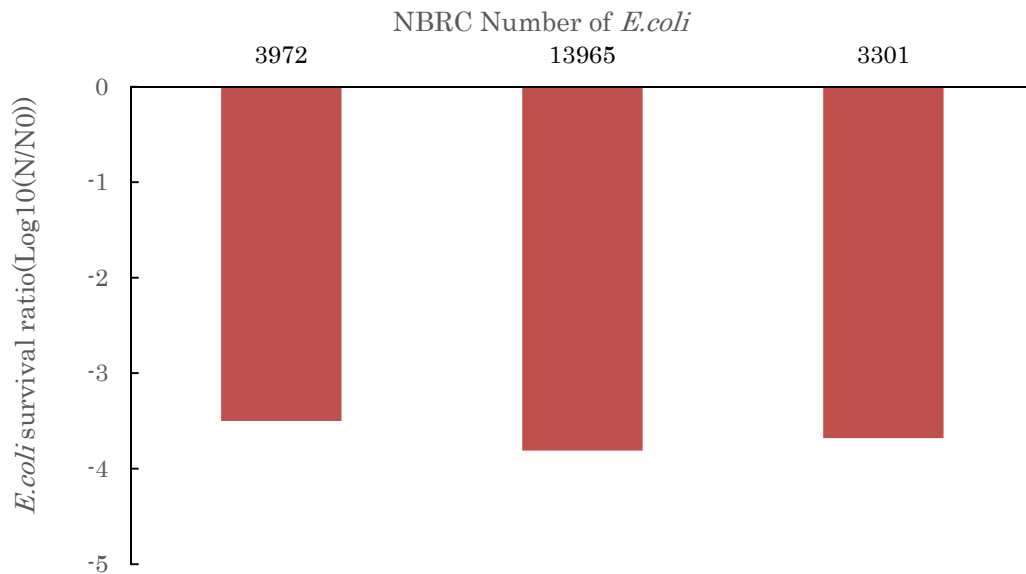


図 4-2-12 塩素処理前後の 3 種の大腸菌 (NBRC 3972,13965,3301) の生残率
(初期塩素濃度 0.5 mg/L, 接触時間 1 min.)

図 4-2-12 に示されるように, 3 種の大腸菌の生残率は, 高い順から *E. coli* NBRC 3972 > 3301 > 13965 となっていたが, その差はさほど大きく無く, 最大 2.0 倍程度であった. 以上のことから, この 3 種の大腸菌の塩素耐性はあまり差が無いと言える. ただし抗菌製品の評価方法 (JIS 規格) にて指定されている菌株の耐性がわずかながら最も高いといえ, この菌を使用して評価することがこの 3 種の中では最も良いのではないかと考えられる.

4-3 まとめ

文献調査より大腸菌の殺菌実験方法を調べたところ, 処理方法ごとに使用大腸菌種及び使用培地は異なっており, 統一した方法による評価が望まれることがわかった. 2 種の非選択培地, 3 種の選択培地を用いた大腸菌の塩素殺菌実験では, 非選択培地間の生残率に差が見られず, かつ殺菌効果が低く評価されたことから, 安全側の評価として適する培地であると考えられた. また異なる 3 種の大腸菌間の塩素耐性を調べたところ, 大きな差が見られなかったが, 抗菌製品の評価方法 (JIS 規格) にて指定されている菌株の耐性がわずかながら最も高く, 評価に供するに適していると考えられた.

(お茶の水女子大学 大瀧雅寛)

参考文献

(17) ~ (35) の文献については昨年度報告書においても参考文献としたものである.)

- 1) 矢崎萌(2010)「紫外線と塩素の併用処理における大腸菌の損傷レベルの定量的解析」平成22年度 卒業論文
- 2) 佐野満実子(2010)「塩素消毒処理における大腸菌の不活化機構の解明」平成21年度 卒業論文

文

- 3) 団野皓文, 宮里満, 石黒悦爾(1983)「紫外線照射による農産物の貯蔵に関する研究 III. 2. 3の微生物に対する紫外線殺菌」鹿兒島大學農學部學術報告
- 4) 中村 宗一郎ら(1989)「懸濁粒子化した糞便性大腸菌群の粒子サイズ別塩素消毒効果」環境技術, 18(7), pp.414-417
- 5) 窪 華奈子, 大瀧雅寛(2004)「様々な消毒処理による大腸菌の不活化機構の相違点の解析」平成16年度 お茶の水女子大学 卒業論文
- 6) 森 美怜, 中野 政之, 芥川 正武, 高橋 章, 池原 敏孝, 木内 陽介(2005)「紫外発光LEDの大腸菌への影響」電子情報通信学会技術研究報告. MBE, MEとバイオサイバネティックス
- 7) 紙谷喜則 アブドゥルスディイッサザカリア 大重絢香 許斐勝大 木村主幸 守田和夫(2009)「電気分解技術を利用した無菌水の製造-第1報: 製造原理と殺菌効果」農業生産技術管理学会誌
- 8) 佐々木裕輝 船山齊(2010)「大腸菌・枯草菌の光殺菌特性」秋田工業専門学校研究紀要
- 9) 岡洋佑 村本裕二 清水教之 加藤雅士(2011)「高電界パルスを用いた大腸菌の殺菌」電子情報通信学会技術研究報告
- 10) 山口沙耶香 鈴木実(2011)「超高压水中衝撃波を用いた大腸菌群の殺菌に関する研究」廃棄物資源循環学会研究発表会講演集22(0), pp.240-240
- 11) 臼井宗一、大場君枝(2012)「洗浄、消毒における微生物の除菌効果に関する検討」岐阜女子大学紀要 pp.97-100
- 12) 高橋 直樹, 松橋 仁, 西村 修, 須藤 隆(2012)「性能評価型浄化槽における大腸菌群の除去特性について」土木学会論文集G(環境) 68(7), pp.429-434
- 13) 水野雄太, 柿井一男、西田達郎、荷方稔之(2013)「フェントン様反応系における大腸菌の殺菌特性」日本生物工学会大会講演要旨集 65, 224
- 14) 吉村 隆充, 楊 英男, 張 振亜(2013)「自然環境条件で酸化チタン光触媒を用いた水環境中の病原微生物の殺菌」日本生物工学会大会講演要旨集 65, 224,
- 15) 喜多 諒、小熊久美子、酒井宏治、滝沢 智(2014)「紫外線発光ダイオード(UV-LED)を用いた環状外照式水消毒装置の開発と評価」土木学会論文集G(環境) 70(7), pp.1-8
- 16) 若林健史 中山洋平 緒方頼昌(2014)「紫外線励起酸素種と紫外線による殺菌システムの効果の検討」日本歯周病学会会誌
- 17) 王 雪丹ら(2007)「オゾン処理における大腸菌損傷レベルの評価方法」第17回日本オゾン協会年次研究講演会講演集, 17, pp.95-97
- 18) Haas, C. N., & Engelbrecht, R. S. (1980). Chlorine dynamics during inactivation of coliforms, acid-fast bacteria and yeasts. *Water Research*, 14, pp.1749-1757.
- 19) Haas, C. N., & Karra, S. B. (1984). Kinetics of microbial inactivation by chlorine - I. Review of results in demand-free systems. *Water Research*, 18(11), 1443-1449.
- 20) LeChevallier, M. W., Hassenauer, T. S., Camper, a. K., & McFeters, G. a. (1984). Disinfection of bacteria attached to granular activated carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(5), 918-923.
- 21) Finch, G. R., Smith, D. W., & Stiles, M. E. (1988). Dose—response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. *Water Research*, 22(12), 1563-1570.
- 22) Rubuli. (1988). Inactivation of particle-associated coliforms by chlorine and monochloramine. *Appl Environ Microbiol*, 54(2), 507-512.
- 23) Kouame, Y., & Haas, C. N. (1991). Inactivation of *E. coli* by combined action of free chlorine and monochloramine. *Water Research*, 25(9), 1027-1032.
- 24) Tyrrell, S. A., Rippey, S. R., & Watkins, W. D. (1995). Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents, using chlorine and ozone. *Water Research*, 29(11), 2483-2490.
- 25) Momba, M. N. B., Cloete, T. E., Venter, S. N., & Kfir, R. (1999). Examination of the behaviour of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water. *Water Research*, 33(13), 2937-2940.
- 26) Smeets, P. W. M. H., van der Helm, a W. C., Dullemont, Y. J., Rietveld, L. C., van Dijk, J. C., & Medema, G. J. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone under bench-scale plug flow and

- full-scale hydraulic conditions. *Water Research*, 40(17), 3239–48.
- 27) Winward, G. P., Avery, L. M., Stephenson, T., & Jefferson, B. (2008). Chlorine disinfection of grey water for reuse: Effect of organics and particles. *Water Research*, 42(1-2), 483–491.
 - 28) Murphy, H. M., Payne, S. J., & Gagnon, G. a. (2008). Sequential UV- and chlorine-based disinfection to mitigate *Escherichia coli* in drinking water biofilms. *Water Research*, 42(8-9), 2083–2092.
 - 29) Guo, M., Hu, H., Bolton, J. R., & El-Din, M. G. (2009). Comparison of low- and medium-pressure ultraviolet lamps: Photoreactivation of *Escherichia coli* and total coliforms in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 43(3), 815–821
 - 30) Vélez-Colmenares, J. J., Acevedo, a., & Nebot, E. (2011). Effect of recirculation and initial concentration of microorganisms on the disinfection kinetics of *Escherichia coli*. *Desalination*, 280(1-3), 20–26
 - 31) Kollu, K., & Örmeci, B. (2012). Effect of particles and bioflocculation on ultraviolet disinfection of *Escherichia coli*. *Water Research*, 46(3), 750–760.
 - 32) Wang, X., Hu, X., Wang, H., & Hu, C. (2012). Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. *Water Research*, 46(4), 1225–1232.
 - 33) Anastasi, E. M., Wohlsen, T. D., Stratton, H. M., & Katouli, M. (2013). Survival of *Escherichia coli* in two sewage treatment plants using UV irradiation and chlorination for disinfection. *Water Research*, 47(17)
 - 34) Yamada, N., Suzumura, M., Koiwa, F., & Negishi, N. (2013). Differences in elimination efficiencies of *Escherichia coli* in freshwater and seawater as a result of TiO₂ photocatalysis. *Water Research*, 47(8), 2770–2776
 - 35) Du, Z., Nandakumar, R., Nickerson, K. W., & Li, X. (2015). Proteomic adaptations to starvation prepare *Escherichia coli* for disinfection tolerance. *Water Research*, 69, 110–9

5 高度浄水処理工程における全菌数・生菌数のフローサイトメーターを用いた通年調査

5-1 概要

水道水中の細菌数は「一般細菌」(水質基準)、「従属栄養細菌(Heterotrophic Plate Counts: HPC)」(水質管理目標設定項目)によって監視されている。これらの指標は、水道水中での細菌の動態を評価する上で重要だが、一般細菌で24時間、HPCで7日間もの培養が必要である。また、コロニーを形成できる細菌は全体の一部であることも事実であり、培養法で水中の細菌全体を把握すること自体に限界がある。このような状況を鑑みると、仮に原水の糞便汚染、処理不良による細菌除去の悪化、給配水系における塩素消失に伴う細菌再増殖などが突発的に生じた場合、現行指標ではその変動をリアルタイムに追跡することは実質的に不可能であり、初動対応の遅れが懸念される。

近年、水環境中の細菌数の迅速測定法として、フローサイトメーター(Flow cytometer: FCM)が活用されている。FCMでは、微小流路に核酸を染色した細菌を流しながら、個々の細胞にレーザーを照射して蛍光や散乱光の情報を収集することで、迅速かつ正確に細菌数を測定することができる。また、蛍光試薬を工夫することで、細胞の膜損傷性(生死判別)を評価することもできる。本研究では、これまでに高度浄水処理施設を対象として、各処理工程水中の全菌数及び生菌数の日内変動について評価を行ってきた。今回は、同一の高度浄水処理施設において通年調査を行い、処理工程水中の全菌数及び生菌数の年内変動について整理した結果を報告する。

5-2 実験方法

M 浄水場において、各工程(原水→凝集沈殿→オゾン→生物活性炭→急速砂ろ過→浄水)の各処理水を採水した。採水日は、2015年1月(14日、16日、23日、30日)、2月(10日、19日)、3月(11日、30日)、4月(8日、21日、30日)、7月(10日、13日、21日、28日)、8月(17日、31日)、9月(11日、24日)、10月(7日、15日)の計21回である。通常、塩素は生物活性炭の後と急速砂ろ過の後に注入されているが、1月14日～3月11日、7月28日～9月24日の採水については、凝集沈殿処理前に前塩素処理が実施されていた。前塩素平均注入率は冬季が1.1 mg/L(ブレイクポイント注入)、夏季が0.6 mg/Lであった。試料の残留塩素を中和した後、全菌数と生菌数を卓上型FCM(Accuri C6, BD社)で測定した。全菌数の染色にはSYBR® Green I(Life Technologies社)、生菌と死菌の判別にはSYBR® Green IとPropidium Iodide(Life Technologies社)を用いた。暗所、37°Cで10分間染色した後、無希釈で50 µlを測定に供した(測定時間: 約1.5分)。本機器の定量下限値は1000 cells/mLである。

5-3 結果及び考察

図5-1(a)に、各処理工程水中の全菌数の通年変動を示す。全菌数(平均値±標準偏差)は、

原水が $2.0 \times 10^6 \pm 9.7 \times 10^5$ cells/mL (変動係数 CV : 48%)、凝集沈殿水が $6.9 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^5$ cells/mL (CV : 22%)、オゾン処理水が $1.4 \times 10^4 \pm 3.9 \times 10^3$ cells/mL (CV : 29%)、BAC 処理水が $1.3 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^4$ cells/mL (CV : 39%)、急速砂ろ過処理水が $1.2 \times 10^4 \pm 4.5 \times 10^3$ cells/mL (CV : 38%)、浄水が $1.3 \times 10^3 \pm 1.0 \times 10^3$ cells/mL (定量下限未満は 1000 cells/mL として計算) であった。各処理における平均 $\log_{10}$ 除去率は、凝集沈殿 $0.47 \log_{10}$ 、オゾン $1.7 \log_{10}$ 、急速砂ろ過 $1.1 \log_{10}$ であり、浄水までの間で更に $0.95 \log_{10}$ 低減していた。高度浄水処理工程全体では、全菌数は平均して $3.2 \log_{10}$ 低減していた。特に、オゾン処理では、全菌数の除去率が最も高く、現行のオゾン処理の条件下でも細菌細胞が溶菌していることが示唆される。オゾン処理は異臭味対策だけではなく、細菌リスク制御に資するセイフティバリアになっていると考えられる。後段の BAC 処理水では、BAC から流出する細菌によって、全菌数がオゾン処理水中の約 10 倍に増加していた。給配水系の細菌の主な起源は BAC 処理にあることが確認された。

図 5-1(b)に、各処理工程水中の生菌数の通年変動を示す。原水中の生菌数(平均値±標準偏差)は、 $7.4 \times 10^5 \pm 3.3 \times 10^5$ cells/mL (変動係数 CV : 45%) であり、全菌数に対する平均比率は 37% であった。凝集沈殿処理水中の生菌数は、冬季の前塩素実施期間中の平均値が 1.8×10^4 cells/mL とそれ以外の時期(平均値 2.6×10^5 cells/mL)と比較して低い値を示した。これは冬季の前塩素注入率が高いために、生菌数が大幅に低下したためと考えられる。オゾン処理水中の生菌数は、全採水日において定量下限未満であった。塩素処理後の急速ろ過水や浄水中においても全採水日において定量下限未満であることを考慮すると、オゾンによる細菌不活化効果は塩素と同様に高いことが推測される。各処理における平均 $\log_{10}$ 除去率は、凝集沈殿 : $0.61 \log_{10}$ 、オゾン : $2.3 \log_{10}$ 以上、急速砂ろ過 : $1.7 \log_{10}$ 以上であり、高度浄水処理工程全体では、生菌数は平均して $2.9 \log_{10}$ 以上低減していた。BAC 処理水では、7 月～10 月の平均値が、1 月～4 月の平均値の 5.4 倍高く、水温の影響などを反映していることが推察された。

残留塩素を保持しないオランダの水道水中の全菌数、生菌数は、共に 10^5 cells/mL オーダーであることが報告されている (Prest et al., 2014)。今回の調査における浄水の全菌数、生菌数は、オランダと比較して $2 \sim 3 \log_{10}$ 以上低いことが明らかとなり、潜在的な細菌リスクもそれに比例して低く管理されていることが推察された。

5-4 結論

FCM を活用することにより、高度浄水処理工程における全菌数及び生菌数の年内変動に関する知見を得ることができた。迅速な初動を実現するためには、“平常”と“異常”を短時間に把握すること重要である。今回の知見は、平常時の全菌数あるいは生菌数の年内変動の平均値とその変動幅を理解する一助になると考えられる。原水から浄水に至る各工程において平常時の変動幅を超えるような値が計測された場合には、原水の細菌汚染や処理トラブルをまずは疑い、初動として予防策(塩素注入率の強化など)をとることが潜在的

なリスクを回避するためには有用と考えられる。

今後は給配水系における細菌数評価にも FCM を適用し、原水から給水末端までの細菌数動態を明らかにすると共に、FCM により得られたデータを QMRA に活用することなどを検討する予定である。

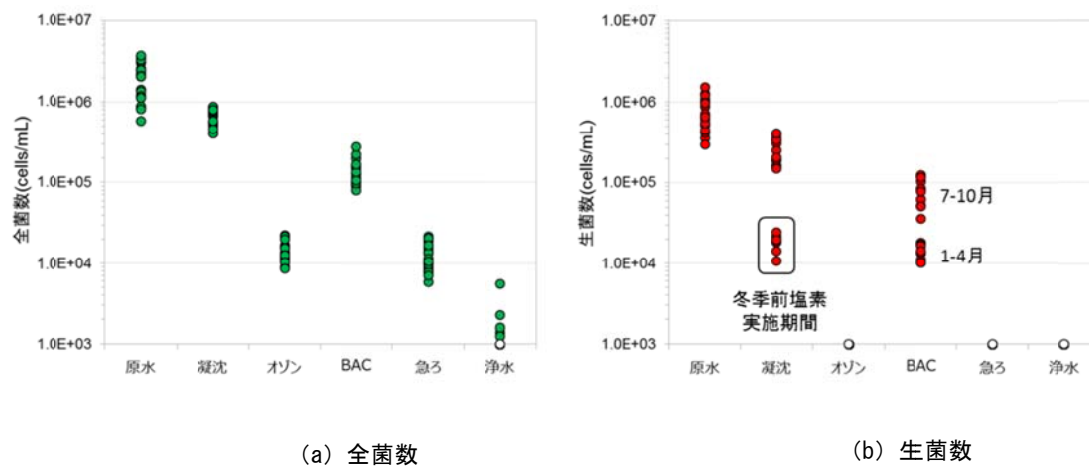


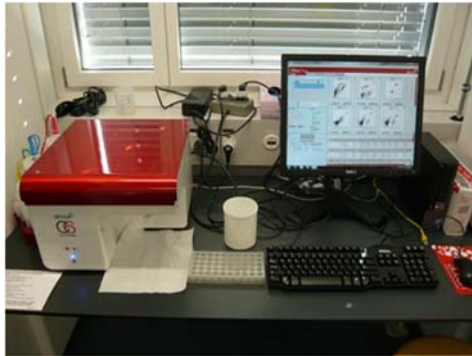
図 5-1 全菌数 (a) 及び生菌数 (b) の通年変動 (白抜きは FCM 定量下限以下を示す)

(東京大学 春日郁朗)

参考文献

Prest et al., Water Research, Vol.63, pp.179-189, 2014.

フローサイトメーターを活用した 浄水処理工程の細菌管理の高度化



東京大学大学院工学系研究科
都市工学専攻 水環境制御研究室

講師 春日郁朗

1

研究の背景

- 水道水質の細菌指標(培養法)
 - 大腸菌・・・糞便汚染指標
 - 一般細菌/従属栄養細菌(HPC)
 - 浄水工程における細菌除去・消毒効果
 - 給配水系等における水道施設の清潔さ



指標	培養温度	培養時間	基準/目標値
一般細菌(水道水質基準)	36±1℃	24時間	100 CFU/mL
従属栄養細菌(水質管理目標設定項目)	20℃	7日間	2,000 CFU/mL

2

培養法の課題

- 培養できる細菌は全体のごく一部
 - 生きているがコロニーを作らない細菌が多い
- 結果を得るまでに長時間を要する

原水の細菌汚染、浄水処理の一時的不良、
給配水系での非定常な細菌再増殖



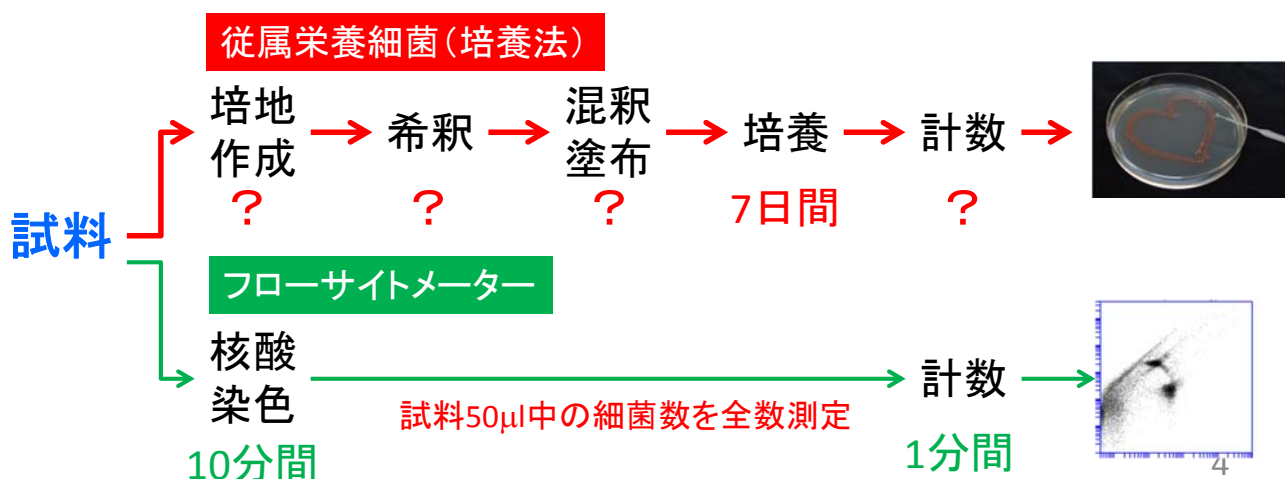
- 素早い対応をとることは現状では不可能
- 細菌現存量を迅速に把握できれば予防措置をとれる

フローサイトメーター (Flow Cytometer: FCM) の活用

3

研究目的

- フローサイトメーターを活用して、水道水中の細菌現存量・生死状態を迅速に評価する。
 - 高度浄水工程における細菌除去の時間変動
 - 工程管理や事故対応へのFCMの適用可能性



4

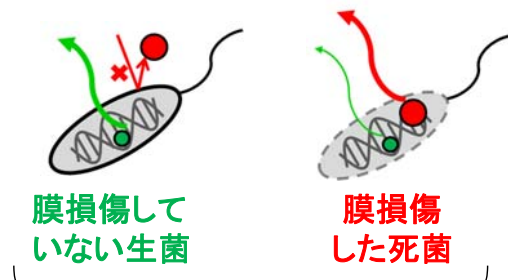
フローサイトメーター (Flow Cytometer: FCM)

① 細菌核酸(DNA)の染色 (培養に依存しない)

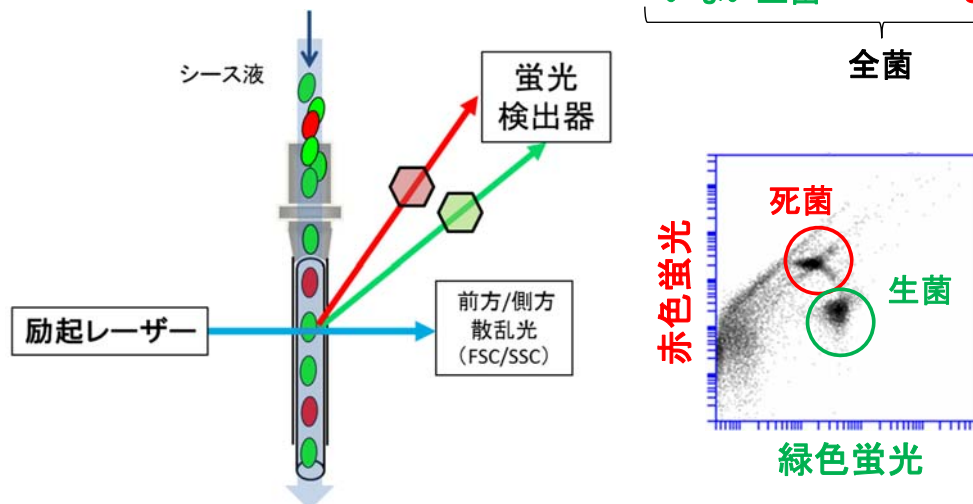
膜損性に基づいた生菌・死菌の判別

● SYBR Green I

● Propidium Iodide (PI)

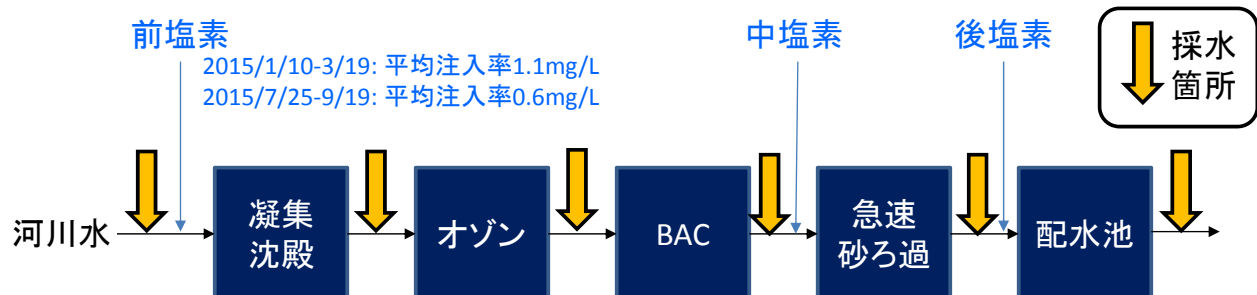


② 一細胞レベルでの計数



5

M浄水場 工程水通年調査



- 採水日 (2015年)
(N=21)

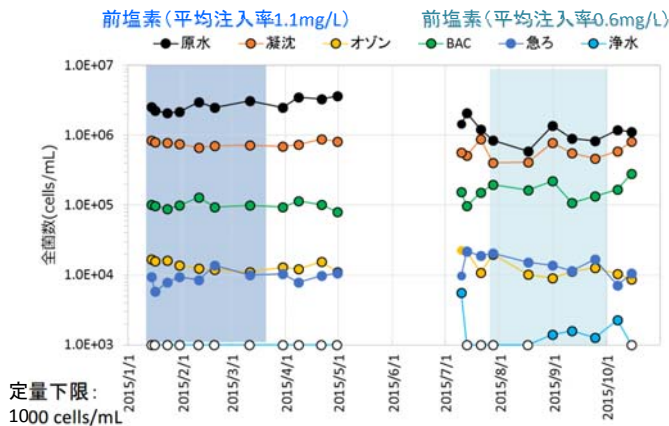
月	日
1月	14日、16日、23日、30日
2月	10日、19日
3月	11日、30日
4月	8日、21日、30日
7月	10日、13日、21日、28日
8月	17日、31日
9月	11日、24日
10月	7日、15日

赤字は前塩素実施期間中

6

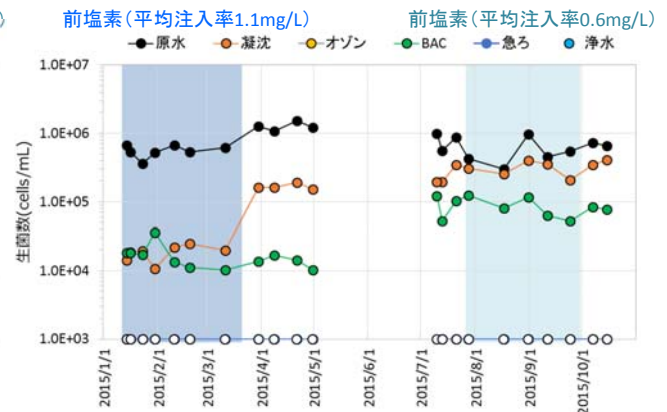
全菌数・生菌数の変動(全データ N=21)

全菌数



- 凝集沈殿 ↓
- オゾン処理 ↓
- BAC処理 ↑
- 急速砂ろ過 ↓
- 浄水 ↓

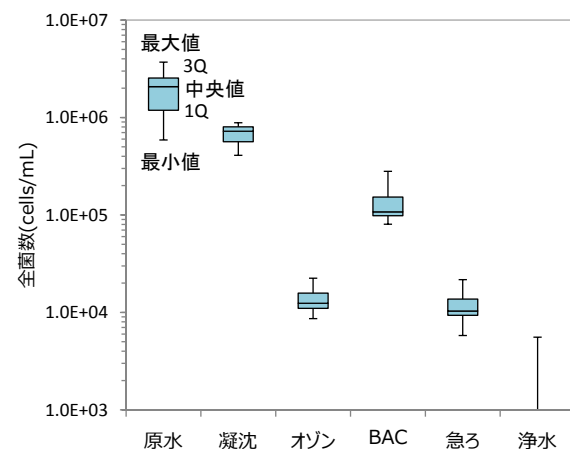
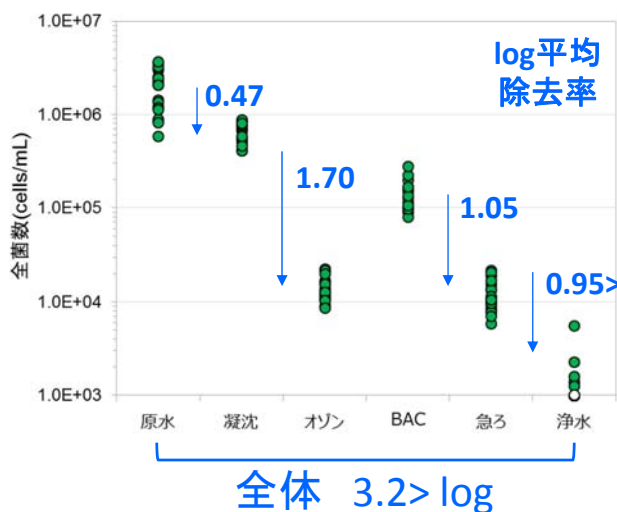
生菌数



- 凝集沈殿処理水: 冬季の前塩素実施期間中は少ない(⇒注入率の低い夏季の前塩素実施期間は、大きな変化はない)
- オゾン処理水: すべて定量下限以下(セーフティバリアとしての機能)
- BAC処理水: 夏季以降、増加傾向
- 浄水: すべて定量下限以下

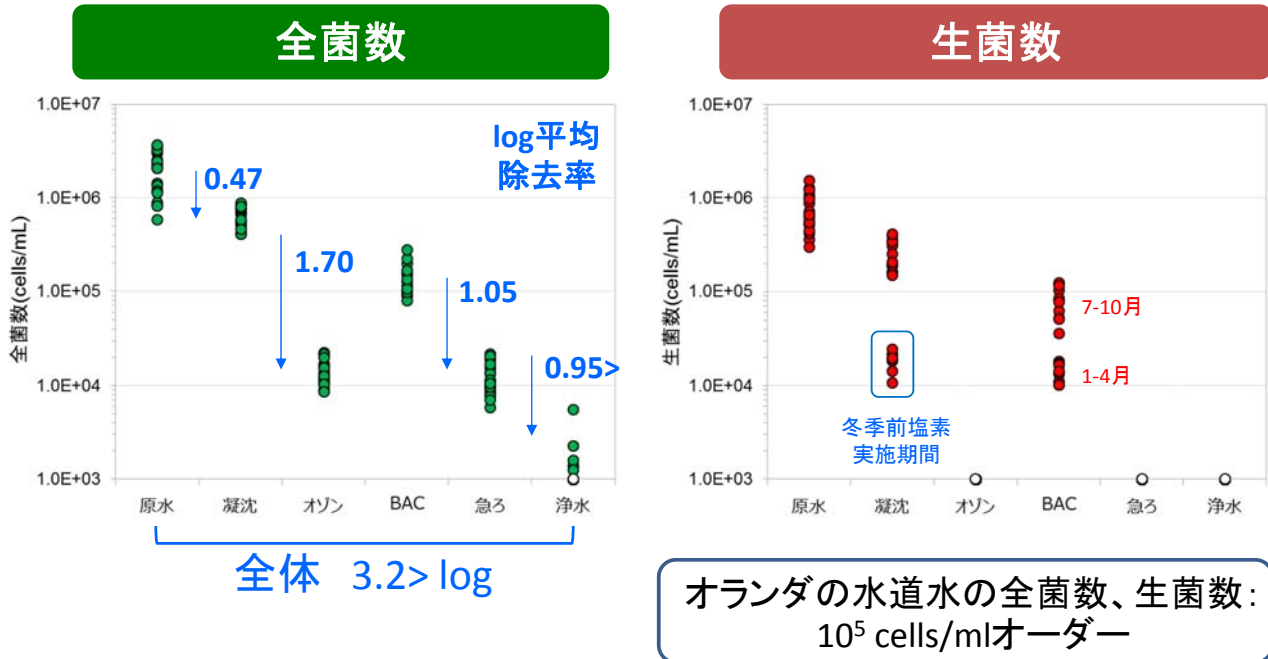
全菌数・生菌数の変動(全データ N=21)

全菌数



- 各工程による全菌数の平均的な除去率、変動性を可視化
→QMRAにおける活用
- オゾン処理による全菌数減少が最も大きい
→現状のオゾン処理の条件は、原水由来の細菌リスクの低減にも有効

全菌数・生菌数の変動(全データ N=21)



- オゾン、塩素消毒により、生菌数は常時定量下限以下に制御
- ブレークポイント処理の場合、凝集沈殿処理水中の生菌数も大きく低減
- 7-10月の方が、1-4月よりもBAC処理水中の生菌数が多い

9

結論と展望

- 浄水処理工程水中の細菌量、膜損傷状態を**迅速に評価**するためにFCMは有用である。

原水、浄水処理工程水、給配水中の細菌現存量、生死状態をFCMで迅速評価

サンプリング頻度Up
測定自動化

基礎データを蓄積

- 異常状態の早期検出
- 予防的な対応(残留塩素など)
- 迅速な事故対応
- 戦略的な糞便汚染の確定試験

- 平均的な浄水処理の細菌除去率
- 平均的な水道水中の細菌数

- 浄水工程管理への適用
- 給配水系の水質監視の高度化

Cf. 海外の動向

スイス衛生局は2012年に水道水を含む水試料中の全菌数をFCMによって測定する方法をRecommended test method (No.333)に登録

10