

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310045
 研究課題名（和文） 環境微生物に由来する水中エンドトキシンの動態・制御とその健康リスクの同定
 研究課題名（英文） Determination and control of endotoxin derived from indigeneous bacteria/cyanobacteria in water and identification of health risk caused by endotoxin
 研究代表者：
 伊藤 禎彦 (ITO SADAHIKO)
 京都大学・地球環境学堂・教授
 研究者番号：10184657

研究成果の概要：

本研究では、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン濃度分布を調査し、下水処理放流水が水系内汚染源となりうること、またラン藻類の一種(*Synechococcus* 属)が水系内のエンドトキシンの変動に寄与する可能性を示した。浄水プロセスにおける挙動を調べた結果、高度処理された浄水中にも約 10 EU/mL のエンドトキシンが残存した。また、下水処理放流水相当の濃度で細胞生存率が約 80%に低下した他、遺伝子/タンパク質レベルで IL-8 の発現量が増大した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2007 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学（放射線・化学物質影響科学）

キーワード：エンドトキシン，環境微生物，免疫毒性，浄水処理

1. 研究開始当初の背景

塩素消毒は微生物の増殖能抑制に優れた効果を発揮する一方で、副生成物による健康影響問題が指摘されてきた。しかしながら、原水中に混入する多種多様な微生物は、浄水処理によりある程度除去されるものの、一部は増殖能を失った状態 (Viable but nonculturable; VBNC 状態または損傷状態) で水道水に残存している。本研究では、不活化された微生物が有する高分子化合物、特にグラム陰性細菌・シアノバクテリアの細胞外膜構成物質に起因する生物活性 (エンドトキシン) に着目する。エンドトキシンは強い免疫

反応を惹起する化学物質として知られており、医療現場（透析用水や製剤溶液）では個別に対策が進められている。本来、生体は微量のエンドトキシン曝露により自然免疫を獲得するとされているが、年々アレルギー疾患が増加している現代においては、攪乱された免疫システムが強いアレルギー症状を誘発する危険をはらんでおり、日常生活におけるエンドトキシン曝露量についても強い関心が集まっている。

従来、大気由来を曝露経路としたエンドトキシン曝露評価が進められてきており、サンプリング方法や抽出方法について知見が集

積されつつある。これに対して、水中エンドトキシンに関しては海外で一部調査測定例があるのみであり、環境水中の微生物群を反映したエンドトキシンの毒性評価は実施されていない。

2. 研究の目的

本研究では、環境水あるいは水道水中のエンドトキシンの活性量、ならびに消毒過程における活性量・処理特性の変化を定量的に把握し、水質管理におけるエンドトキシンの重要性を明らかにする。さらに、免疫反応を指標としたバイオアッセイ手法の確立を通してヒトへの健康リスクを同定するとともに、現行の塩素消毒について再考を試みる。具体的な検討項目を以下に示す。

- (1)各種水試料中の微生物存在量とエンドトキシン活性量の定量解析
- (2)浄水処理過程における微生物/エンドトキシン処理特性の把握
- (3)環境試料由来のエンドトキシン抽出・濃縮方法の確立
- (4)エンドトキシン・消毒剤を中心とした水中化学物質による健康リスクの同定

3. 研究の方法

(1) 各種水試料中の微生物存在量とエンドトキシン活性量の定量解析

Escherichia coli NBRC 3301, *Microcystis aeruginosa* NIES-44, *Synechococcus* sp. NIES-946 と NIES-957 を選定し、それぞれの細胞に由来するエンドトキシン量を求めた。増殖期にある各微生物の培養液を適宜サンプリングして培養液中の細胞数を培養法または顕微鏡観察により計数した。同時に、総エンドトキシン・遊離エンドトキシンの定量を行った。エンドトキシン活性はエンドポイント比色法（生化学工業）により測定した。総エンドトキシン活性は培養液全画分を使用し、遊離エンドトキシン測定は培養液を 14,000 rpm で 10 分間遠心分離後の上清画分を使用した。

また、琵琶湖淀川水系の各地点で採水を行い、試料中のエンドトキシン濃度と微生物量を測定した。採水は冬季に実施し、微生物（一般細菌数、従属栄養細菌数、全菌数）、総エンドトキシン、遊離エンドトキシン、TOC、紫外線吸光度、濁度、pH の各項目について測定を行った。

(2) 浄水処理過程における微生物/エンドトキシン処理特性の把握

調査対象施設として、琵琶湖・淀川水系から取水している A 浄水場（中オゾン-急速ろ過-後オゾン-活性炭処理）を選定した。採水は 2006 年 11 月および 12 月に計 3 回行った。採水後 4 時間以内に(1)に記した各項目について測定を行った。

(3) 環境試料由来のエンドトキシン抽出・濃縮方法の確立

(2)と同時期に同じ A 浄水場にて採水を行った。洗浄後 250 °C で乾燥させたガラス繊維ろ紙を用いて各試料 5 L をろ過して夾雑物を除いた後、分画分子量 10,000（アドバンテック東洋）の限外ろ過膜を用いて高分子量画分の濃縮を行った。

(4) エンドトキシン・消毒剤を中心とした水中化学物質による健康リスクの同定

毒性評価にはヒト表皮角化細胞（以下、培養細胞）を使用した。段階希釈した *E. coli* 由来のエンドトキシン標準液、または(3)で調製した濃縮試料を培養細胞に曝露し、Cell Counting Kit-8（同仁化学）により生細胞数を測定した。続いて 1000 および 3000 ng/mL エンドトキシン溶液を 8 時間曝露後のヒト表皮角化細胞から Total RNA を抽出・精製し、DNA マイクロアレイ解析に供した。また、10 mgCl₂/L の次亜塩素酸ナトリウム-PBS 溶液を 15 分間曝露した細胞、塩素曝露後さらに上記条件でエンドトキシン曝露を行った細胞からも同様に Total RNA を調製した。DNA マイクロアレイは、IntelliGene HS Human Expression CHIP(タカラバイオ)を使用した。

最後に、河川水、24 時間塩素処理した後の河川水、および水道水を(3)と同様の方法により濃縮した試料を、ヒト表皮角化細胞に 48 時間曝露して生細胞数の変化を調べるとともに、培養液中に分泌されたインターロイキン 8(IL-8)を ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

(1) 各種水試料中の微生物存在量とエンドトキシン活性量の定量解析

本研究で対象としたそれぞれの菌株について、細胞数と総エンドトキシン間に得られた関係を図-1 に示す。いずれの菌株においても、総エンドトキシンの対数値は細胞数の対数値に比例して増大した。また、一細胞当たりのエンドトキシン量は、*M. aeruginosa* < *Synechococcus* sp. < *E. coli* の順に増大した。検討した微生物種のうち *Synechococcus* sp.については、ピーク時には 10⁵ cell/mL を超える密度で検出されるなど、季節により細胞数の変動が非常に大きいことから、環境水中のエンドトキシン変動に対して大きく寄与する可能性がある。

一方、各地点から採取した水試料中のエンドトキシン測定結果を表-1 に示す。琵琶湖および河川表流水のエンドトキシン濃度は、3.11×10²~2.43×10³ EU/mL の濃度範囲で分布した。また、下水処理施設放流水のエンドトキシン濃度は 1.08×10⁴ EU/mL と一般水環境中と比べて非常に高い値を示した。ここで、表流水のうち 2000 EU/mL 前後の高い値を示した地点、E3、E7 および E8 はいずれも下水処

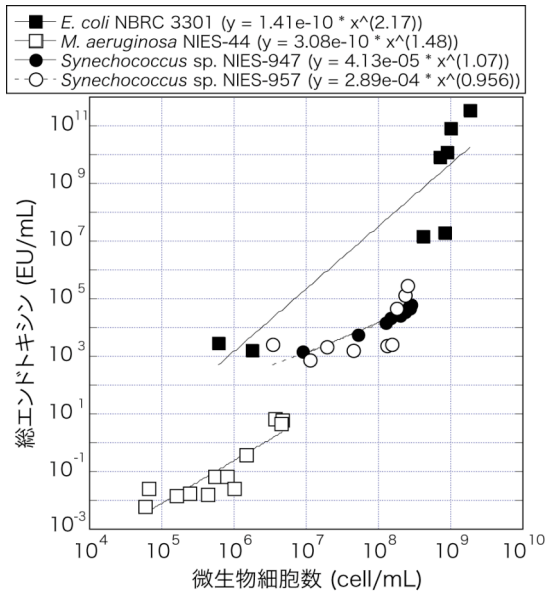


図-1 微生物細胞数と総エンドトキシン量の関係

理放流水の影響を強く受けうる地点であったことから、取水口が下水処理放流口近くに存在する場合には、原水中のエンドトキシン濃度が1オーダー程度増大する可能性がある。ゆえに、水資源の循環利用を推進していく上では、生菌数のみならずエンドトキシンなどの微生物由来化学物質にも着目して微生物管理を行うことが不可欠と考えられる。

(2) 浄水処理過程における微生物/エンドトキシン処理特性の把握

浄水処理過程における微生物計数結果ならびにエンドトキシン活性の変化と除去率を表-2に示す。ここでは3回調査を行った結果の平均値を示し、着水井におけるこれらの値を基準として単位処理プロセス毎の除去率を算出した。

着水井における総エンドトキシンの平均値は75.1 EU/mL、遊離エンドトキシンは38.7 EU/mLであり、表-2の結果から微生物、総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに凝集・沈殿処理により良好に除去されることがわかった。急速ろ過プロセスまでの平均累積

表-1 琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査結果

地点No.	水系	採水地点	総エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン (EU/mL)
E-1	琵琶湖南湖	大津港	4.28×10^2	2.20×10^2
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	3.31×10^2	2.30×10^2
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	2.43×10^3	3.30×10^2
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	3.11×10^2	2.25×10^2
E-5	宇治川	宇治橋	3.11×10^2	1.92×10^2
E-6	木津川	三川合流地点	6.21×10^2	1.77×10^3
E-7	宇治川	三川合流地点	2.03×10^3	8.26×10^2
E-8	桂川	三川合流地点	1.80×10^3	4.80×10^2
E-9	淀川	枚方大橋	1.51×10^3	2.87×10^2
E-10	淀川	豊里大橋	3.40×10^2	2.50×10^2
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	6.27×10^2	1.18×10^3
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	1.55×10^2	1.82×10^2
S-3	疏水分線	若王子橋	1.46×10^2	1.77×10^2
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	1.16×10^2	2.95×10^2
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	2.57×10^2	1.94×10^2
A-1		下水処理場放流水	1.08×10^4	1.26×10^3

除去率は総エンドトキシンで86.2%、遊離エンドトキシンでは79.5%であった。その後のオゾン処理により総エンドトキシンの累積除去率は91.2%に達したものの、遊離エンドトキシンは80.5%とあまり変化が見られなかった。さらに、後段に設置された活性炭処理水では総エンドトキシン、遊離エンドトキシンともに増大したことから、オゾン処理による有機物質変換により増大したAOCを炭素源として活性炭処理表面で微生物が再増殖し、流出水中のエンドトキシンが増大したと考えられる。最後に、塩素混和では総エンドトキシンはほとんど低減されず、遊離エンドトキシンはむしろ増大する傾向が確認され、高度浄水処理後の水道水においても10 EU/mL程度の濃度で残存することがわかった。このように、オゾン処理および塩素消毒により増殖可能細菌が検出されなくなる状況においてもエンドトキシン活性は残存しており、不活化された微生物も含めた微生物管理の必要性が示唆された。

水中およびそのエアロゾル中に混入したエンドトキシンが主原因と疑われる健康被害報告例と比較すると、本研究で得られた浄水中エンドトキシン濃度は極めて低く、安全濃度範囲にあると判断される。しかしながら、こうした重篤な健康被害以外にもアレルギー

表-2 浄水処理過程における微生物およびエンドトキシンの除去特性

採水地点	従属栄養細菌数(HPC)		総エンドトキシン		遊離エンドトキシン		遊離エンドトキシン比率
	測定値(cfu/mL)	除去率(%)	測定値(EU/mL)	除去率(%)	測定値(EU/mL)	除去率(%)	
取水(河川水)	22572		56.22		35.63		0.63
着水井	17534	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0	0.52
凝集剤添加前	22972	-31.0	78.16	-4.1	38.41	0.8	0.49
凝集沈殿後	1502	122.4	11.63	88.6	5.67	84.5	0.49
急速ろ過後	590	5.2	10.26	1.8	7.30	-4.2	0.71
オゾン処理後	0	3.4	6.645	4.8	7.04	0.7	1.06
活性炭吸着後	238	-1.4	10.98	-5.8	8.44	-3.6	0.77
塩素混和後	0	1.4	9.66	1.8	11.82	-8.7	1.22

一反応への関与を示唆する結果も存在するため、浄水中のエンドトキシン変動に影響を及ぼす因子、すなわち原水中の微生物や配水過程における変動などの情報蓄積を進めるとともに、水道水使用を想定した曝露量を把握することが必要と考えられる。

一方、遊離エンドトキシン比率はオゾン処理後の試料で0.59~1.48、さらに塩素消毒後の試料では0.86~2.36と非常に高い値を示したことから、水道水中ではその大部分が遊離エンドトキシンとして残存しており、遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す良い指標となることが示された。

(3) 環境試料由来のエンドトキシン抽出・濃縮方法の確立

分画分子量 10,000 の限外ろ過膜を使用することにより、浄水処理プロセスで採取した水試料中のエンドトキシン活性を損失なく濃縮でき、回収率は106~231%であった。急速ろ過後の試料やオゾン処理水では大幅に回収率が100%を超過したが、濃縮中に微生物が再増殖したためと考えられる。濃縮試料をオートクレーブ滅菌して、曝露試料として供した。オートクレーブ滅菌によるエンドトキシン活性の顕著な変化は、確認されなかった。

(4) エンドトキシン・消毒剤を中心とした水中化学物質による健康リスクの同定

E. coli 由来エンドトキシン、および着水・急速ろ過水・活性炭処理水の濃縮水をヒト表皮角化細胞に曝露し、細胞毒性試験を行った結果を図-2に示す。約10000 EU/mLのエンドトキシン濃度(表-1中の下水処理放流水がこの濃度に相当)において、*E. coli* 由来エンドトキシン曝露では約80%の細胞生存率を示した一方、実処理プラント濃縮試料を曝露した場合の細胞生存率は、着水の場合で約60%、急速ろ過水が約65%、活性炭処理水で

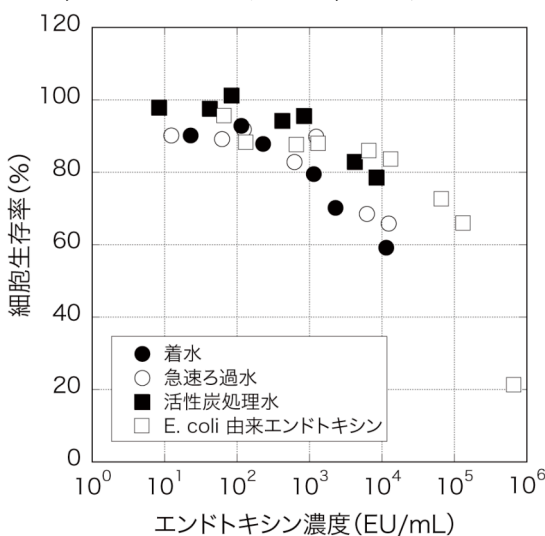


図-2 エンドトキシン曝露による細胞生存率の変化

は約78%となった。この結果は、実試料の高分子量画分にはエンドトキシン以外にも細胞毒性を示す物質群が共存している可能性、あるいは環境微生物群に由来するエンドトキシンがより強い毒性を示す可能性を示している。

続いて、*E. coli* 由来エンドトキシンを曝露した細胞から Total RNA を調製し、マイクロアレイ解析によりエンドトキシン曝露により発現量が変動する遺伝子群を調べた。その結果、炎症反応に関わる遺伝子群のうち IL-8 の発現量が曝露試料で約1.3倍に増大していることがわかった。IL-8 はケモカインの一種であり、炎症反応における主要なメディエーターであることが知られている。一方、10 mgCl₂/L の次亜塩素酸曝露後のマイクロアレイ解析の結果からは、IL-8 遺伝子の発現量増大は確認されず、代わりに IL-15 の発現量が1.5倍に増大した。さらに、次亜塩素酸+エンドトキシンの複合曝露では、IL-15 および IL-24 の産生量が約1.5倍に増加していたが、やはり IL-8 の発現量増大は認められなかった。

河川水、塩素処理後の河川水、水道水の濃縮試料をそれぞれ48時間曝露した後の培養液中 IL-8 濃度を図-3に比較した。ここで、河川水100倍濃縮試料のエンドトキシン濃度は 1.06×10^6 EU/mL であったのに対して、24時間塩素処理後の河川水100倍濃縮試料のエンドトキシン濃度は 1.10×10^5 EU/mL となり、塩素処理によりエンドトキシン濃度は約1/10まで低下した。曝露濃度を濃縮前の河川水相当、河川水の1/10倍相当、あるいは塩素処理後の河川水相当に設定した場合には、それぞれ細胞生存率が顕著に低下した。また、48時間曝露後の細胞当たりの IL-8 分泌量を比較したところ、曝露試料中のエンドトキシン濃度が高いほど、特に1000 EU/mL以上の濃度範囲で IL-8 分泌量が増大することが確認

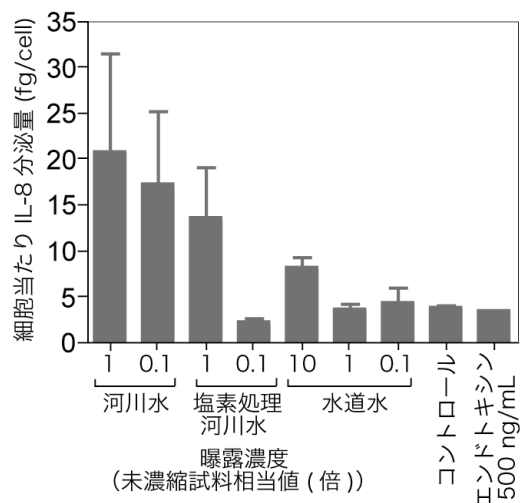


図-3 河川水/水道水濃縮試料を曝露した場合における IL-8 分泌量の変化

され、エンドトキシンを含む高分子量画分の曝露により炎症反応誘発が増強される可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) 但馬智之, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 次亜塩素酸の培養細胞に対する毒性評価を目的としたアッセイ条件の検討, 環境衛生工学研究, Vol.23, No.3, 2009 (*in press*), 査読無
- 2) Ohkouchi, Y., Ly, B. T., and Itoh, S.: Detection of bacterial regrowth in water distribution system using endotoxin as an alternative indicator, *Adv. Asian Environment. Eng.(in press)*, 査読有
- 3) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦: 水環境におけるエンドトキシンの変動要因と浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性, 環境工学研究論文集, Vol. 44, pp.247-254, 2007, 査読有
- 4) Ly, B. T., Kusano, T., Ohkouchi, Y., and Itoh, S.: Primary investigation of affected factors and indicated parameters for bacterial regrowth in drinking water distribution system –A case study in Kyoto city, *The 14th Seminar of JSPS-MOE Core University Program on Urban Environment*, pp.187-198, 2007, 査読無
- 5) 石川卓, 小林憲太郎, 高橋恭介, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中エンドトキシンに対するシアノバクテリアの寄与に関する研究, 環境衛生工学研究, Vol.21, No.3, pp.47-50, 2007, 査読無
- 6) 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦: 環境水中のエンドトキシン検出と塩素処理による微生物細胞からの生成評価, 環境衛生工学研究, Vol.20, No.3, pp.181-184, 2007, 査読無
- 7) Itoh, S., Nakano, A., and Araki, T.: Reevaluation of the toxicity of chlorinated water and the usefulness of MX as an index, *J. Water Health*, Vol.4, pp.523-531, 2006, 査読有
- 8) 越後信哉, 伊藤禎彦, 夏井智毅: 染色体異常誘発性からみた浄水プロセスにおけるオゾン/塩素処理の評価, 環境工学研究論文集, Vol.43, pp.599-604, 2006, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Ohkouchi, Y., Takahashi, K., Itoh, S.: The Effect of Chlorination on Endotoxic Activity and Immunotoxicity to Human Keratinocyte, Micropol & Ecohazard 2007, 5th IWA Specialised Conference on Assessment and Control of Micropollutants/ Hazardous

Substances in Water, 2007年6月, フランクフルト

- 2) 大河内由美子, 石川卓, 高橋恭介, 伊藤禎彦: 浄水処理過程における微生物およびその由来物質の挙動に関する研究, 第58回全国水道研究発表会, 2007年5月, 釧路市
- 3) 高橋恭介, 小林憲太郎, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 表皮角化細胞を用いた水中エンドトキシンの毒性評価, 第41回日本水環境学会年会, 2007年3月, 東大阪市
- 4) 大河内由美子, 高橋恭介, 小寺恵介, 伊藤禎彦: 環境水中のエンドトキシン存在形態に関する研究, 第40回日本水環境学会年会, 2006年3月, 名古屋市

[図書] (計 1 件)

- 1) 伊藤禎彦, 越後信哉: 水の消毒副生成物, 技報堂出版, 325p, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 禎彦 (ITOHO SADAHIKO)
京都大学・地球環境学堂・教授
研究者番号: 10184657

(2)研究分担者

越後 信哉 (ECHIGO SHINYA)
京都大学・地球環境学堂・准教授
研究者番号: 70359777
大河内 由美子 (OHKOUCHI YUMIKO)
京都大学・地球環境学堂・助教
研究者番号: 00391079