

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01575

研究課題名(和文) 浄水処理過程におけるエンドトキシン高産生細菌の探索と制御に関する研究

研究課題名(英文) Exploring and controlling heterotrophic bacteria with high endotoxin activity in the course of drinking water purification process

研究代表者

島崎 大 (Simazaki, Dai)

国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官

研究者番号：60322046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：エンドトキシン(ET)は、水環境中に広く常在しているグラム陰性菌の細胞外膜に存在する。血液を介して人体内に入ると発熱等の健康への悪影響をきたす生理活性物質であり、透析治療を行う医療現場において関心が高まっている。当研究では、高度浄水処理を有する国内浄水場での浄水処理工程におけるET活性の挙動を精査し、生物活性炭から単離した各細菌のET産生能等を評価した。各浄水処理工程でのET除去特性を明らかにするとともに、浄水処理工程の運用条件等によるET制御の可能性、生物活性炭中の高ET産生細菌群の同定、ならびに、各細菌群のET産生能力や産生特性に関する有用な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物活性炭ろ過においてエンドトキシン産生の中心となる細菌群を同定し、水処理プロセスでの挙動を考慮した制御方法の提案をめざす点で有用性が高い。また、生物活性炭の水質変換機能と群集構造とを関連づける国内外の諸研究の中で、当研究成果はエンドトキシン産生に寄与する細菌を対象としており、新規性ならびに独創性が高い。当研究の成果は、水道水および医療用水の安全性と信頼性のさらなる向上に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Endotoxin (ET) is found in the extracellular membrane of Gram-negative bacteria, which are common in the water environment. ET is a physiologically active substance that could cause various adverse health impacts to human when it enters the human body through blood and is of increasing concern among medical professionals conducting dialysis therapies. In this study, we examined the behavior of ET activity in the course of advanced water purification process at several domestic water treatment plants, and also evaluated the ET producing capacity/characteristics of several bacterium isolated from biological activated carbon samples. As an outcome of this study, we identified several high ET-producing bacteria groups in biological activated carbon and their ET-producing ability/characteristics, clarified ET removal capability of each water treatment process, and the possibility of controlling ET by operating conditions of key water treatment processes.

研究分野：土木環境工学

キーワード：エンドトキシン 水道 浄水処理 生物活性炭 微生物群集構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エンドトキシン(ET)は、グラム陰性細菌の細胞外膜の構成成分であるリポ多糖に起因する生理活性物質であり、細菌が死滅した時に細胞外膜が溶解することで遊離する。血液を介して体内に入ると炎症やショックなどの症状を起こすこと、高圧蒸気滅菌や乾熱滅菌では不活性化しないことにより、医療や製薬の現場、とりわけ、大量の医療用水を使用する人工透析治療では、ET汚染に対して厳重な水質管理が求められる。本邦では透析用水や関連装置の水質汚染を制御する「清浄化」が推進され、日本透析医学会は2008年に透析用水や透析液中のET活性および生菌数に係る透析液水質基準を設定、2016年には透析用水作製装置の管理基準等を追加した全面改訂を行った。

一方、医療用水の元となる水道水については、国内外ともにETは水質管理項目として全く考慮されておらず、水道水中の汚染状況や、浄水処理による除去または生成の知見はごく限られている。国内の浄水場と医療機関を対象とした研究代表者らによる先行研究では、生物活性炭ろ過を経ることで水中のET活性が大幅に増加し、同程度の活性を保ったまま医療機関に到達し、医療に供されることが確認された。

また、研究代表者らは、水道の配水過程を模した実験装置を用い、形成された生物膜中に含まれるグラム陰性菌を単離、純粋培養によりET産生能を測定するとともに、遺伝子解析により菌種を同定した。その結果Betaproteobacteriaに属する*Pelomonas puraquae*のET産生能が著しく高く、給水末端にて高頻度で検出される*Methylobacterium aquaticum*と比較して、2-3桁高い産生能を持つことが判明した。

2. 研究の目的

前項の状況に鑑みて、研究代表者は、生物活性炭に棲息する細菌叢のうちET産生に寄与する細菌群の制御に注目した。本研究は、生物活性炭ろ過を有する国内の浄水場を対象として、生物活性炭中のET産生能が高い細菌群を同定すること、水道原水から浄水処理工程、給水末端に至るまでの当該細菌群の挙動を明らかにすること、浄水処理システムの運用条件等による当該細菌群の制御の可能性を探ることを通じ、水道水ならびに医療用水に含まれるETを低減するための方策の提示を目的とした。

3. 研究の方法

(1)国内浄水場における試料採取

2018年7月から2021年12月の期間において、高度浄水処理プロセスを有する国内の複数の浄水場にて原水、処理工程水、浄水、生物活性炭逆洗水および生物活性炭試料を採取した。生物活性炭試料は、滅菌生理食塩水中でボルテックス(1分間)と超音波処理(40W、1分間)を3回繰り返し行い、活性炭抽出液を得た。生物活性炭逆洗水および生物活性炭抽出液は、孔径5 μ mの滅菌済フィルターでろ過した。

(2)ET活性値の測定

ET活性値は、カプトガニ血球抽出試薬を使用した比濁時間分析法(トキシノメーターミニ、富士フィルム和光純薬)または比濁時間分析-生物蛍光発光法(ルミニッツ-ET、東亜ディーケーケー)により定量した。本研究では、各試料を14,000rpm・10分間遠心分離した上澄みの測定値を遊離ET活性値(細菌の細胞外に存在する溶存性のET活性値)、遠心分離を行わずに測定した値を総ET活性値(細菌の細胞内および細胞外に存在するET活性値の合計)、総ET活性値から遊離ET活性値を減じた値を結合ET活性値(細菌の細胞内および細胞外に存在する懸濁性のET活性値)と定義した。

(3)従属栄養細菌数・全菌数の測定

(1)の各試料を対象に、生菌の指標として従属栄養細菌数(HPC)を、生菌および死菌の指標として全菌数を測定した。前者には平板培養法(R2A寒天培地、日本BD)を用い、20のインキュベーター内で7日間静置培養した。後者は蛍光色素(SYBR Green I、タカラバイオ)により試料を染色、37のインキュベーター内で10分間静置した後、蛍光顕微鏡(BX61、オリンパス)により蛍光観察、直接計数した。

(4)従属栄養細菌の単離と同定

(1)で得られた生物活性炭抽出液ならびに生物活性炭逆洗水を、R2A寒天培地に塗布し、20のインキュベーター内にて画線培養を繰り返して単離菌を得た。16S rRNA遺伝子を対象としたコロニーPCR、遺伝子配列解析ならびにBLASTデータベース検索により菌種を同定した。

(5)各単離菌のET産生能力およびET産生特性の評価

(3)で得られた各単離菌を、R2A 液体培地に添加、20 で振盪培養した。培養 7 日間後の培養液の ET 活性値を比濁時間分析 - 生物蛍光発光法にて、全菌数を蛍光染色 (SYBR Green I、タカラバイオ) およびフローサイトメータ (Cytomics FC500、ベックマン・コールター) にて測定した。各細菌の ET 生成能力は、ET 活性値を全菌数で除して算出した。一部の単離菌を対象として、R2A 液体培地または滅菌水道水に 10^4 cells/mL 程度となるように植菌し、20 で振盪培養を行い、対数増殖期、定常期、ならびに、死滅期における全菌数、遊離 ET 活性値、結合 ET 活性値をそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) 浄水場の高度浄水処理工程における ET 活性値の挙動

図 1 に、浄水場 A における 2018 年 7 月～2019 年 3 月の期間の ET 活性値を示す。原水中の総 ET 活性値は、46.1 EU/mL～308.6 EU/mL であった。浄水の総 ET 活性値は 2.3EU/mL～13.5EU/mL であり、原水からの除去率は 86%～98%の範囲であった。オゾン処理水の総 ET 活性値は 4.6 EU/mL～18.7 EU/mL となった。生物活性炭ろ過後の総 ET 活性値は 10.4 EU/mL～42.2 EU/mL であり、最大で 2.6 倍、前段ろ過から増加していた。前段ろ過、オゾン処理、生物活性炭ろ過および後段ろ過後に遊離 ET の比率が増加した。各月における処理工程水の総 ET 活性値は、2018 年 7 月から 2019 年 1 月の間は特に見られなかったが、2 月から 3 月にかけて大幅な増加傾向がみられた。また、2 月から 3 月にかけての原水中の総 ET 活性値の増加に伴い、工程水の総 ET 活性値も増加する傾向がみられた。原水、生物活性炭ろ過、前段ろ過及び浄水において、全菌数と ET 活性値には比較的強い相関があることが判明した (表 1)。

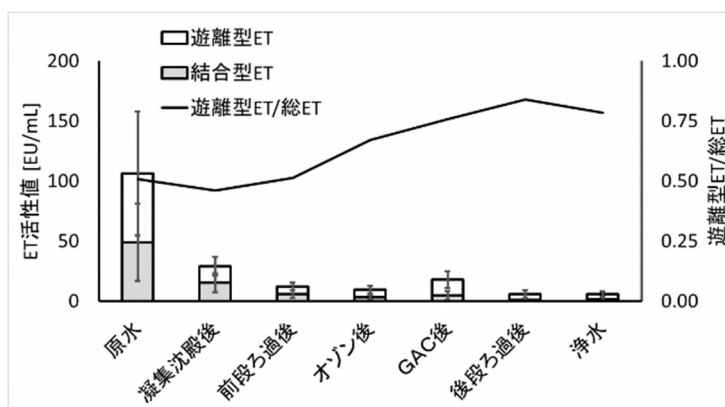


図 1 浄水場処理工程における ET 活性値の挙動

表 1 従属栄養細菌・全菌数と ET 活性値との相関

		原水	凝集沈殿	前段ろ過	オゾン	GAC	後段ろ過	浄水
HPC	総ET	0.80	0.20	0.62	-0.22	0.41	0.20	-0.07
	遊離ET	0.76	0.01	0.63	-0.35	0.41	0.28	-0.05
	結合ET	0.64	0.48	0.18	-0.03	0.39	0.04	0.00
全菌数	総ET	0.71	0.04	0.17	-0.20	0.73	0.93	0.82
	遊離ET	0.77	0.13	0.01	-0.18	0.68	0.82	0.67
	結合ET	0.44	0.38	0.26	-0.15	0.78	0.95	0.52

(2) 従属栄養細菌の単離と同定

生物活性炭試料ならびに逆洗水試料より単離菌 187 株が得られ、23 属の細菌種が同定された。このうち 13 属は Betaproteobacteria 綱に属しており、試料中から高頻度で検出された。中でも *Herminiimonas* および *Polaromonas* は調査期間を通じて頻繁に検出された。他の綱に属する細菌種の検出頻度は低かった。

(3) 各単離菌の ET 産生能力および増殖能力

各単離株の細菌あたり ET 活性値は、 $3.1 \times 10^{-8} \sim 4.6 \times 10^{-2}$ EU/cell の範囲となり、細菌種によって最大 6 桁の差異があることが判明した。相対的に高い ET 産生能力 (培養 7 日間後の菌液中総 ET 活性値が 10^{-2} EU/cell 以上) を有する細菌は、*Aquabacterium*, *Arenimonas*, *Herbaspirillum*, *Pelomonas*, *Piscinibacter*, *Roseateles* 属の近縁種であった。一方、*Chromobacterium*, *Chryseobacterium*, *Polaromonas* 属等については、細菌あたりの ET 産生能力は低いものの、増

殖能力が高かった（培養7日間後の細菌濃度が 10^8 cells/mL 以上）ことで、菌液中の ET 活性値が著しく増大した。このような増殖能力が高い細菌種も、生物活性炭における ET 産生への寄与が大きいと推察された（表2）。

表2 生物活性炭および逆洗水より同定された単離菌の属・綱・検出数および ET 産生能力

属	綱	検出数	ET 活性 [EU/mL]	全菌数 [cells/mL]	ET 産生能 [EU/cell]
<i>Acidovorax</i>	Betaproteobacteria	6	$1.38 \times 10^4 \sim 1.96 \times 10^4$	$4.59 \times 10^8 \sim 7.47 \times 10^8$	$2.19 \times 10^{-5} \sim 4.01 \times 10^{-5}$
<i>Aquabacterium</i>	Betaproteobacteria	15	$1.94 \times 10^3 \sim 9.53 \times 10^4$	$8.33 \times 10^5 \sim 3.05 \times 10^8$	$1.62 \times 10^{-4} \sim 4.03 \times 10^{-2}$
<i>Arcicella</i>	Cytophagia	2	$3.00 \times 10^2 \sim 4.00 \times 10^2$	$1.01 \times 10^8 \sim 1.23 \times 10^8$	$2.98 \times 10^{-6} \sim 3.26 \times 10^{-6}$
<i>Arenimonas</i>	Gammaproteobacteria	1	2.06×10^5	8.43×10^6	2.45×10^{-2}
<i>Bacillus cereus</i> group	Bacillales	1	2.09×10^4	7.29×10^7	1.78×10^{-4}
<i>Bosea</i>	Alphaproteobacteria	1	4.11×10^4	1.57×10^8	1.33×10^{-4}
<i>Bradyrhizobium</i>	Alphaproteobacteria	1	4.11×10^4	4.93×10^6	8.33×10^{-3}
<i>Chromobacterium</i>	Betaproteobacteria	1	1.38×10^5	2.47×10^8	5.61×10^{-4}
<i>Chryseobacterium</i>	Flavobacteriia	7	$4.40 \times 10^3 \sim 1.14 \times 10^5$	$8.37 \times 10^7 \sim 4.74 \times 10^8$	$1.19 \times 10^{-5} \sim 3.31 \times 10^{-4}$
<i>Flavobacterium</i>	Flavobacteriia	11	$2.60 \times 10^1 \sim 2.04 \times 10^4$	$2.65 \times 10^7 \sim 2.07 \times 10^8$	$3.84 \times 10^{-7} \sim 4.04 \times 10^{-4}$
<i>Herbaspirillum</i>	Betaproteobacteria	3	$2.68 \times 10^4 \sim 7.53 \times 10^5$	$6.74 \times 10^6 \sim 9.89 \times 10^7$	$2.71 \times 10^{-4} \sim 1.02 \times 10^{-2}$
<i>Herminiimonas</i>	Betaproteobacteria	30	$1.12 \times 10^4 \sim 1.90 \times 10^5$	$1.08 \times 10^7 \sim 9.76 \times 10^7$	$2.73 \times 10^{-4} \sim 5.88 \times 10^{-3}$
<i>Ideonella</i>	Betaproteobacteria	2	$1.83 \times 10^4 \sim 1.86 \times 10^4$	$2.57 \times 10^8 \sim 4.20 \times 10^8$	$4.35 \times 10^{-5} \sim 7.25 \times 10^{-5}$
<i>Janthinobacterium</i>	Betaproteobacteria	2	$9.26 \times 10^4 \sim 1.01 \times 10^5$	$3.15 \times 10^8 \sim 3.48 \times 10^8$	$2.66 \times 10^{-4} \sim 3.21 \times 10^{-4}$
<i>Massilia</i>	Betaproteobacteria	1	5.01×10^4	1.15×10^8	4.36×10^{-4}
<i>Mucilaginibacter</i>	Sphingobacteriia	10	$5.00 \times 10^0 \sim 7.98 \times 10^4$	$1.30 \times 10^8 \sim 2.97 \times 10^8$	$3.10 \times 10^{-8} \sim 6.14 \times 10^{-4}$
<i>Pelomonas</i>	Betaproteobacteria	4	$2.28 \times 10^4 \sim 1.52 \times 10^5$	$3.17 \times 10^6 \sim 1.19 \times 10^7$	$7.08 \times 10^{-3} \sim 4.60 \times 10^{-2}$
<i>Piscinibacter</i>	Betaproteobacteria	11	$4.80 \times 10^3 \sim 2.14 \times 10^5$	$9.16 \times 10^5 \sim 4.09 \times 10^8$	$2.44 \times 10^{-4} \sim 1.68 \times 10^{-2}$
<i>Polaromonas</i>	Betaproteobacteria	56	$3.70 \times 10^3 \sim 3.43 \times 10^5$	$1.64 \times 10^7 \sim 2.06 \times 10^8$	$3.66 \times 10^{-5} \sim 4.09 \times 10^{-3}$
<i>Roseateles</i>	Betaproteobacteria	13	$2.00 \times 10^3 \sim 8.47 \times 10^4$	$3.47 \times 10^5 \sim 6.03 \times 10^7$	$3.68 \times 10^{-4} \sim 1.87 \times 10^{-2}$
<i>Rugamonas</i>	Gammaproteobacteria	1	6.79×10^4	8.43×10^6	1.12×10^{-3}
<i>Sphingopyxis</i>	Sphingobacteriia	5	$3.00 \times 10^2 \sim 4.73 \times 10^4$	$3.43 \times 10^6 \sim 3.02 \times 10^7$	$5.23 \times 10^{-5} \sim 8.04 \times 10^{-3}$
<i>Undibacterium</i>	Betaproteobacteria	3	$9.50 \times 10^3 \sim 1.74 \times 10^4$	$5.79 \times 10^7 \sim 7.54 \times 10^7$	$1.55 \times 10^{-4} \sim 2.31 \times 10^{-4}$

(4) 各単離菌の対数増殖期・定常期における ET 産生特性

各単離菌を R2A 液体培地で振盪培養したところ、いずれの細菌も、対数増殖期では全菌数の増加に伴い ET 活性値も指数的に増大した。多くの場合、定常期以降も培養液中の ET 活性値の増加

は継続しており、細菌が死滅した後の細胞外膜の溶解等に由来して ET 活性値が増大し続けると考えられた。一方、滅菌水道水で振盪培養した場合、大半の細菌は全菌数および ET 活性値ともに増加は見られなかったが、一部の細菌 (*Aquabacterium*, *Arenimonas*, *Bradyrhizobium*, *Herminiimonas*) は全菌数ならびに遊離 ET 活性値、結合 ET 活性値が増大した(図 2)。

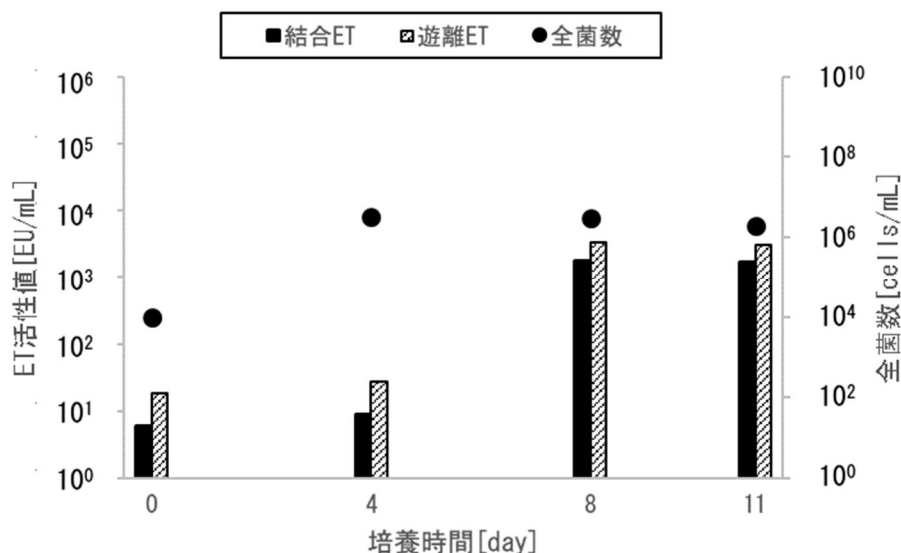


図 2 滅菌水道水中にて培養した *Aquabacterium* の ET 活性値および全菌数の推移

(5) 高度浄水処理における ET 産生制御手法の検討

生物活性炭処理は、浄水処理工程における ET 活性値の増大に寄与すること、中でも、生物活性炭内に棲息する一部の細菌種が極めて高い ET 産生能力を有することが明らかになった。また、生物活性炭処理にて増大する ET 活性値の大部分は遊離 ET 活性値であった。このことから、生物活性炭処理後に化学凝集および後段砂ろ過を行うことが、浄水中の ET 活性値を再び低減する上で有効であると考えられた。加えて、高度浄水処理の運用条件と ET 活性値の挙動について相関性を比較したところ、生物活性炭の入替え期間を短縮することや、オゾン注入率を低減することも、ET 活性値の低減に有効となる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 中川卓哉, 島崎大, 春日郁朗, 秋葉道宏	4. 巻 91
2. 論文標題 国内高度浄水場処理工程におけるエンドトキシンの除去・不活化特性調査ならびに生物活性炭単離細菌のエンドトキシン産生特性調査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 水道協会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dai SIMAZAKI, Kousei FUTAMI, Kodai ICHIMARU, Taiki KUMAGAI, Susumu KONUMA, Toshiaki SAITO, Michihiro AKIBA	4. 巻 18
2. 論文標題 Fate of sulfate in the course of Japanese drinking water purification plants - Implications for dialysis therapy -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Water Environmental Technology	6. 最初と最後の頁 54-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2965/jwet.19-079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中川卓哉, 島崎大, 春日郁朗, 秋葉道宏
2. 発表標題 国内高度浄水処理工程における粒状活性炭単離細菌のエンドトキシン産生特性調査
3. 学会等名 令和2年度全国水道会議 (第72回全国水道研究発表会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dai SIMAZAKI
2. 発表標題 Occurrence and fate of endotoxin in the course of advanced water purification process
3. 学会等名 The 4th International Forum on Asian Water Environment Technology (IFAWET-4) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島崎大, 小坂浩司, 秋葉道宏
2. 発表標題 水道の高度浄水処理過程におけるエンドトキシン活性の挙動
3. 学会等名 日本オゾン協会第30回年次研究講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島崎大, 秋葉道宏
2. 発表標題 浄水場から医療施設に至るエンドトキシン活性・生菌数・全菌数の挙動
3. 学会等名 第66回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島崎大, ジャンタラカセムチョティワット, 秋葉道宏, 中川卓哉, 春日郁朗
2. 発表標題 浄水場の粒状活性炭ろ過槽から単離した従属栄養細菌のエンドトキシン産生特性
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島崎大, 秋葉道宏
2. 発表標題 浄水場の活性炭ろ過槽におけるエンドトキシン高産生細菌の単離と同定
3. 学会等名 第65回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川卓哉, 島崎大, 春日郁朗, 秋葉道宏
2. 発表標題 浄水処理におけるエンドトキシン活性の挙動ならびに粒状活性炭中エンドトキシン産生細菌の毎月調査
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島崎 大, 秋葉 道宏
2. 発表標題 国内の浄水場におけるエンドトキシン活性・全菌数・生菌数の挙動
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川卓哉, 島崎大, 春日郁朗, 秋葉道宏
2. 発表標題 浄水処理工程におけるエンドトキシン活性の経月変化ならびに粒状活性炭単離菌のエンドトキシン生成能の評価
3. 学会等名 令和元年度全国水道会議(第71回水道研究発表会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Dai SIMAZAKI, Takuya NAKAGAWA, Ikuro KASUGA, Michihiro AKIBA
2. 発表標題 Endotoxin-producing Capability of Heterotrophic Bacteria in Granular Activated Carbon Filters for Advanced Water Purification Process
3. 学会等名 8th IWA Microbial Ecology and Water Engineering Specialist Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	春日 郁朗 (Kasuga Ikuro) (20431794)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授 (12601)	
研究分担者	秋葉 道宏 (Akiba Michihiro) (00159336)	国立保健医療科学院・その他部局等・特任研究官 (82602)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中川 卓哉 (Nakawaga Takuya)	仙台市水道局・給水部・技師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------