

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26420540

研究課題名(和文)水道原水・医療用水中のエンドトキシン活性ならびに生成能の存在状況に関する研究

研究課題名(英文)Occurrence of endotoxin activity and its formation potential in water source and water for healthcare

研究代表者

島崎 大(Simazaki, Dai)

国立保健医療科学院・生活環境研究部水管理研究領域・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水道水中に残存するエンドトキシン活性は、とりわけ透析治療を行っている医療機関で懸案となっている。本研究では、国内の複数の浄水場および供給先の医療施設を対象として、エンドトキシン活性の存在状況と水処理における消長について調査を行った。凝集沈殿および砂ろ過・膜ろ過はエンドトキシン活性を大幅に低減する効果がみられた。酸化処理である塩素処理およびオゾン処理の効果は限定的であった。一方、生物活性炭ろ過はエンドトキシン活性の増大に寄与していた。医療施設内の水道管内での細菌再増殖によって、エンドトキシン活性が増大する事例が確認された。

研究成果の概要(英文)：Occurrence of residual endotoxin activity (ET) in tap water is a matter of great concern to medical professionals conducting dialysis therapy in healthcare facilities (HCFs). This study was performed to determine the occurrence and fate of the ET at selected Japanese drinking water purification plants and HCFs. Chemical coagulation and sedimentation, rapid sand filtration, and membrane filtration were highly effective to decrease ET. Moderate decreases in bound-ET and limited decreases in free-ET were observed by chlorination and ozonation. Bacterial activated carbon filtration was a major cause of significant increases in endotoxin activity during the course of drinking water purification process. Microbial regrowth on the premises, from water tanks to faucets at HCFs could also contribute to ET increases in tap water.

研究分野：水道工学、衛生工学

キーワード：エンドトキシン 浄水処理 水道水 透析用水 浄水場 医療施設

## 1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンは、グラム陰性細菌の細胞外膜の主要構成成分である、リポ多糖に起因する生理活性物質である。生きた細菌の細胞外膜からは容易には遊離せず、細菌が死滅した時に、細胞が溶解・分解されることにより遊離する。飲用による人体への影響は認められないものの、強い免疫反応を惹起する物質であり、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。

ことに、熱耐性であり通常の高圧蒸気滅菌や乾熱滅菌では不活性化しないことから、医療や医薬品製造の現場においては、エンドトキシン汚染に対する厳重な水質管理が求められる。とりわけ、極めて大量の医療用水を使用する人工透析では、厳格な水質要件が常時満たされる必要がある。国内では、エンドトキシン活性値を指標として透析用水や関連装置等の「清浄化」の取り組みが行われており、近年、日本透析医学会ならびに日本臨床工学技士会による水質基準値が提案され、随時改正されている。後者を例に挙げると、透析用水中のエンドトキシン活性値は0.01（目標値0.001）EU/mL未満と定められており、これは現行のISOによる国際基準である0.25EU/mL未満よりも格段に厳しい。

一方、医療用水の元となる水道水については、国内外ともに水質基準として全く考慮されていないことはもとより、エンドトキシンによる水道原水の汚染の状況や、浄水処理による除去または生成についての知見も、限られているのが現状である。淀川水系の高度浄水処理が導入されている浄水場を対象とした大河内らの研究によれば、水道原水である河川水中の濃度は311～2,430EU/mLであり、下水処理水の放流による影響が疑われること、凝集沈殿・砂ろ過・オゾン処理により約2割にまで低減するものの、後段の生物活性炭処理ならびに塩素処理により増加すること、高度浄水処理を経た浄水中の値は約10EU/mL前後であることが示された。しかしながら、国内の他の水源水域や、異なる浄水処理方式におけるエンドトキシン活性の存在状況および挙動については定かではない。

## 2. 研究の目的

以上の状況に鑑みて、当研究代表者は、わが国の水道原水や医療用水におけるエンドトキシン活性ならびに生成能の所在に注目した。本研究では、浄水場の水道原水、浄水および医療用水におけるエンドトキシン活性値の存在状況や、異なる浄水処理を経た挙動を明らかにすること、また、消毒処理等による細菌の死滅に伴うエンドトキシン活性の生成能あるいは分解性を明らかにすることで、水道水および医療用水に含まれるエンドトキシン活性を低減する上での方向性を提示することを目的とした。

## 3. 研究の方法

## (1) 試料の採水

国内の11箇所の浄水場（表1）の原水、処理工程水、浄水とその浄水を受水する3箇所の医療施設（表2）の貯水槽水、給水栓水等採取し、採水当日のうちに冷蔵便にて輸送、到着後すみやかにET活性値および従属栄養細菌の測定に供した。

表1 調査対象の浄水場の原水種別及び処理フロー

浄水場	原水	処理フロー		
A	河川水	凝集沈殿	急速ろ過	塩素消毒
B	A浄水 地下水	塩素消毒		
C	湖沼水	凝集沈殿	中オゾン 後オゾン	急速ろ過 粒状活性炭 塩素消毒
D	河川水	凝集沈殿	急速ろ過	塩素消毒
E	湖沼水	生物処理	凝集沈殿	急速ろ過 粒状活性炭 塩素消毒
F	河川水	凝集沈殿	中オゾン 後オゾン	急速ろ過 粒状活性炭 塩素消毒
G	湖沼水	凝集沈殿	緩速ろ過・急速ろ過	塩素消毒
H	地下水	急速ろ過	塩素消毒	
I	河川水	凝集沈殿	急速ろ過	オゾン 粒状活性炭 急速ろ過 塩素消毒
J	河川水	凝集沈殿	急速ろ過	オゾン 粒状活性炭 塩素消毒
K	河川水	凝集沈殿	急速ろ過	オゾン 粒状活性炭 再凝集 塩素消毒

表2 調査対象の医療施設の原水及び給水フロー

医療施設	原水	給水フロー	
a	水道水	B浄水*	貯水槽 給水栓
b	地下水	地下水処理水	貯水槽 給水栓
	水道水	C・D浄水*	
c	地下水	地下水処理水	貯水槽 給水栓
	水道水	F浄水*	

\*表1の各浄水場より受水

## (2) 分析方法

## エンドトキシン活性値

エンドトキシン活性の測定は、リムルス試験法（比濁時間分析法）により行った。リムルス試薬入り反応試験管（和光純薬工業 透析用LALミニ）に各試料を0.3mL添加、試験管ミキサーで10秒間静かに混和した後、測定器（和光純薬工業 トシキノメーターミニ）に挿入した。結果の解析には専用ソフトウェア（和光純薬工業 トキシマスターIVD4ミニ）を用い、ゲル化判定しきい値は92%とした。定量範囲は当該のリムルス試薬に記載されている0.001～0.25EU/mLと設定し、この範囲を超えた試料については超純水で希釈した後に再度測定した。また、この範囲を下回る試料は全て不検出とした。なお、試料の全画分の測定値を総ET活性値、試料を14,000rpmで10分間遠心分離することにより細胞膜等に結合したETを沈降させた、上清画分の測定値を遊離ET活性値、両者の差分を結合ET活性値と定義した。

#### 従属栄養細菌数

上水試験方法に準じた測定を行った。すなわち、R2A 培地を用いた平板混釈法によりプレートを作成し、培養温度は 20℃、培養期間は 7 日間とした。各試料は 10 倍希釈法によりリン酸緩衝希釈水で段階希釈し、1 枚当たり 30~300 個のコロニーが形成されるように調整した。1 試料につき同一の希釈倍率となるプレートを作成し、3 枚の平均値を従属栄養細菌数とした。

#### (3) 塩素消毒実験

給配水過程を模した連続通水実験において当研究代表者が単離した従属栄養細菌のうち、エンドトキシン高産生株および低産生株を各 1 株用いた。各菌株を振盪培養(R2A 液体培地, 20℃, 7 日間)して細菌原液を調整した。PBS500mL をメスフラスコに採り初期 pH7.0 となるよう調整した後、細菌原液と次亜塩素酸ナトリウム(最終濃度 1.0mg/L)を添加して攪拌、所定の接触時間にてメスフラスコから無菌的に採水し、遊離 ET 活性値、総 ET 活性値、遊離残留塩素濃度、pH、従属栄養細菌数(HPC)を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 水道原水・浄水処理工程・浄水における ET 活性値の存在状況と挙動

各浄水場の原水の総 ET 活性値は、地下水では 0.03~0.2EU/mL と非常に低かった一方で、表流水では 46.6~236.7EU/mL 検出された。浄水の総 ET 活性値は、地下水を原水とする H 浄水場のみ 0.1EU/mL と低かったが、その他の浄水場では 0.8~24.1EU/mL であった。原水と比較した減少率は 66.0~98.8% であった。処理工程水は、ほとんどの浄水場の凝集沈殿処理もしくは凝集沈殿/ろ過処理において、ET 活性値の減少率が原水と比較して 80~90%以上であった。ただし、オゾン・活性炭処理を導入している C, F, I, J, K 浄水場や、活性炭処理を導入している E 浄水場では、前段処理水と比較し総 ET 活性値が上昇しており、とりわけ遊離 ET 活性値が上昇した(図 1)。これは、オゾン処理や塩素処理において微生物が破壊されることで細胞膜から遊離 ET が放出されたことと、活性炭ろ過槽内で増殖した微生物に由来して増加したことによると考えられる。

オゾン処理を持たない E 浄水場、オゾン処理を持つ I 浄水場ともに、活性炭ろ過は微生物の流出によって総 ET が上昇しており、

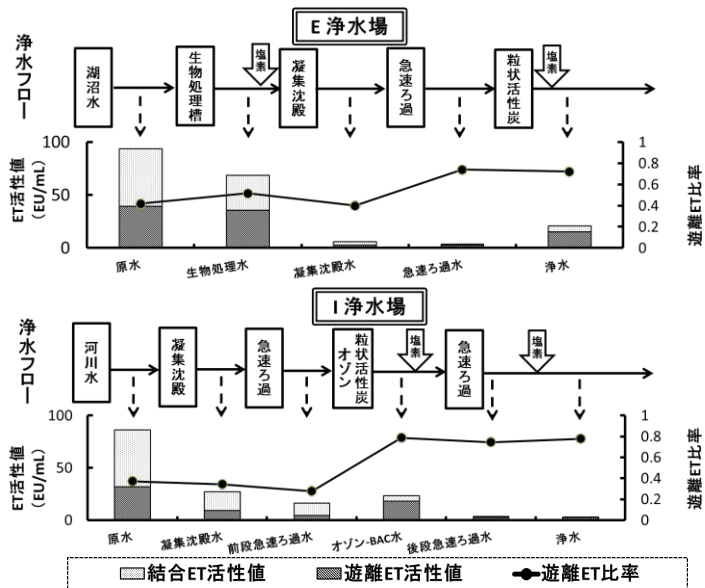


図 1 E・I 浄水場の処理工程における ET 活性値の挙動 (学会発表 7)

また、E 浄水場では後塩素処理により、I 浄水場ではオゾン処理により、結合 ET の大部分が遊離 ET に移行したものと推定された。また、I 浄水場ではオゾン・粒状活性炭処理後の後段ろ過により、K 浄水場では再凝集により、いずれも ET 活性値が低減しており、各処理プロセスともエンドトキシン制御に有効と考えられた。なお、従属栄養細菌数と ET 活性値との関連性を調べたところ、地表水を原水とする原水では両者に高い相関が見られた ( $R^2=0.972$ ) が、浄水では相関が見られなかった ( $R^2=0.003$ )。

##### (2) 医療施設内における ET 活性値の存在状況と挙動

各医療施設の給水栓水の総 ET 活性値は、2~36 EU/mL であった。a, c 病院の結果より、浄水場から医療施設へ配水される過程では、ET 活性値の大きな上昇は見られなかった。しかし、a 病院では、給水栓水の結合 ET 活性値が高く、従属栄養細菌数も増加していたことから、細菌が配管内で増殖し、結合 ET が給水栓水に流出したと考えられる(図 2)。その一方で、b 病院では処理水から貯水槽の過程で ET 活性値が増加する傾向が認められたものの、ここでは貯水槽内で C・D 浄水場の浄水を 1 割程度混合しており、特に C 浄水場の総 ET 活性値が 22.2EU/mL と高かったことから、その割合が低くても影響を大きく受けたと考えられる。このため、透析治療を行う医療機関においては、給水施設の衛生管理の徹底ならびに受水する水道水の ET 活性値に十分注意を払うことが求められる。

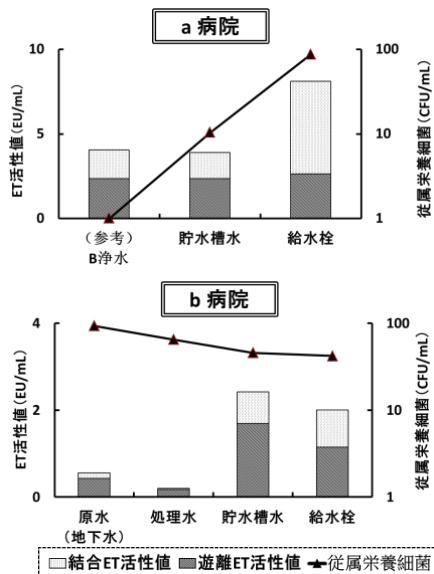


図2 a及びb病院の給水工程におけるET活性値の変動 (学会発表7)

### (3) 従属栄養細菌単離株の塩素消毒によるET活性値の消長

従属栄養細菌の単離株2株とも、細菌数自体は塩素との接触直後にほぼゼロとなるものの、総ET活性値は接触後2時間まで上昇し続け、初期ET活性値の3~5倍に達した。その後は緩やかな減少に転じ、48時間後には初期ET活性値の1/2~1/3程度まで低減した。遊離ET活性値も同様の挙動を示し、増減の程度は総ET活性値よりも緩やかであった(図3)。この傾向は、河川水を用いた塩素処理実験と同様であり、水道水中に残存する従属栄養細菌に由来するET活性には、塩素の酸化反応によって数時間以内に速やかに付加される部分、数日間かけて不活性化される部分、ほとんど反応せずに安定する部分の存在することが確認された。

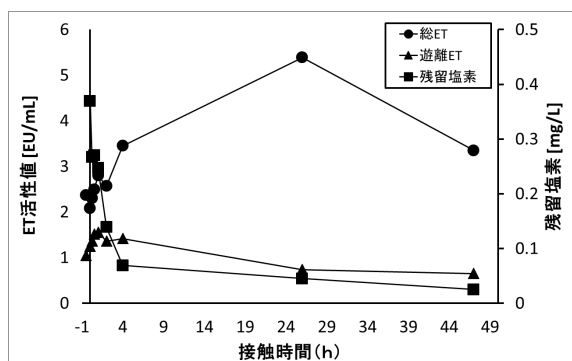


図3 高ET産生従属栄養細菌株の塩素消毒におけるETの挙動 (学会発表6)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) D. Simazaki, M. Hirose, H. Hashimoto, S. Yamanaka, M. Takamura, J. Watanabe, M. Akiba: Occurrence and fate of endotoxin activity at drinking water purification plants and healthcare

facilities in Japan, Water Research, accepted. (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

- 1) D. Simazaki, N. Utsuki, H. Sukegawa, T. Gushiken, M. Akiba: Fate of Endotoxin Activity in the course of Drinking Water Purification Process, IWA World Water Congress and Exhibition 2018, 2018.
- 2) 島崎大, 秋葉道宏: 水道の高度浄水処理におけるエンドトキシン活性の消長, 第76回日本公衆衛生学会総会, 2017.
- 3) 橋本久志, 高村光輝, 渡部純也, 島崎大, 秋葉道宏: 高度浄水処理工程におけるエンドトキシン活性の挙動に関する研究, 第67回全国水道研究発表会, 2016.
- 4) 島崎大, 秋葉道宏: 浄水処理工程および医療用水におけるエンドトキシン活性の存在状況と挙動, 第75回日本公衆衛生学会総会, 2016.
- 5) 島崎大, 秋葉道宏: 国内の水道原水および医療用水等におけるエンドトキシン活性の季節変化, 第61回日本透析医学会学会集会・総会, 2016.
- 6) 島崎大, 里見翔, 三谷駿太, 小沼晋, 齋藤利晃, 秋葉道宏: 浄水処理の凝集沈殿・砂ろ過・塩素消毒過程におけるエンドトキシン活性の挙動, 第50回日本水環境学会年会, 2016.
- 7) 廣瀬正晃, 山中駿司, 島崎大, 秋葉道宏: 水道原水・処理工程水・医療用水におけるエンドトキシン活性の存在状況に関する研究, 第66回全国水道研究発表会, 2015.
- 8) 島崎大, 秋葉道宏: 国内の水道原水・浄水処理工程・医療用水等におけるエンドトキシン活性の挙動, 第60回日本透析医学会学会集会・総会, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島崎 大 (SIMAZAKI, Dai)

国立保健医療科学院・生活環境研究部水管理研究領域・上席主任研究官

研究者番号: 60322046

### (2) 研究分担者

秋葉 道宏 (AKIBA, Michihiro)

国立保健医療科学院・統括研究官

研究者番号: 00159336