

## (30) 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

大河内 由美子<sup>1\*</sup>・石川 卓<sup>1</sup>・高橋 恭介<sup>2</sup>・伊藤 禎彦<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 京都大学大学院工学研究科都市社会工学専攻 (〒615-8540 京都市西京区京都大学桂 C クラスター)

<sup>2</sup> 住友重機械工業株式会社 (〒237-8555 神奈川県横須賀市夏島町 19 )

\* E-mail: yohkouchi@urban.env.kyoto-u.ac.jp

微生物由来化学物質であるエンドトキシンに着目し、濃度変動に寄与する因子の検討を行った。グラム陰性細菌およびシアノバクテリアに由来するエンドトキシン量を比較した結果、*Synechococcus* sp. の季節変動に伴って原水中のエンドトキシン量が増減することが示唆された。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査の結果から、下水処理施設からの放流水がエンドトキシン増大に影響を与えること、また環境微生物群に由来する一細胞当たりのエンドトキシンは比較的高いことを示した。さらに、浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性を調べ、活性炭処理後に濃度が増大するもの、高度浄水処理水中の残存エンドトキシンは十分に低濃度であること、またオゾン処理や塩素消毒により遊離エンドトキシン比率が増大することを示した。

**Key Words :** total endotoxin, free endotoxin, environmental bacteria, aquatic environment, water treatment process

### 1. はじめに

現行の水道水質基準では、微生物指標として一般細菌数および大腸菌数が設定されており、塩素消毒剤を注入・残留させることで病原性細菌の増殖能を抑制し、感染リスクを低下させている。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、一部は不活化された状態や増殖能が低下した状態 (Viable but nonculturable; VBNC 状態) に移行して浄水中に残存しており、配水過程における再増殖やバイオフィーム形成などの問題を引き起こすことが指摘されている<sup>1),2)</sup>。また、微生物は増殖・代謝に伴い、多種類の毒素を生産する。これらの毒素は物理的・化学的特性が多様性に富んでおり、顕れる健康影響も多岐にわたることが知られている。微生物に由来する毒素のうち、シアノトキシンの一種、microcystin-LR に関して知見の集積が進められ、暫定的な飲料水質ガイドライン値が提示されている<sup>3)</sup>。一方で、他の多くの毒素に関する知見は大幅に不足しているのが現状である。

こうした背景を踏まえて、本研究では微生物、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 (リポ多糖; LPS) に起因する生理活性物質 (以下、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ことが知られている。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考えられるが、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新たな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とアレルギー反応との関連<sup>4),5)</sup>に強い関心が持たれている。ここで、エンドトキシンは microcystin や anatoxin 等に代表される他のシアノトキシンと比較して幅広い微生物種で普遍的に存在すること、また分子量が 10 ~ 20 kDa と非常に大きいこと<sup>6)</sup>から、水環境中あるいは浄水処理過程における挙動も大きく異なる予想される。

そこで本研究では、シアノバクテリアを含む数種類の微生物を対象として一細胞当たりのエンドトキシン量を把握することで、水道水源のエンドトキシン増大に寄与する微生物種を探索するとともに、水道水源におけるエンドトキシン活性量および存在形態を明らかにする。また、浄水処理過程におけるエンドトキシン除去特性ならびに浄水中での存在形態を詳細に検討する。

### 2. 実験方法

- (1) 微生物細胞に由来するエンドトキシンの定量  
微生物細胞に由来するエンドトキシン量を明らか

にするため、グラム陰性菌として *E. coli* NBRC 3301 を、またシアノバクテリアとして *Microcystis aeruginosa* NIES-44, *Synechococcus* sp. NIES-946 (採取地:霞ヶ浦) ならびに NIES-957 (採取地:琵琶湖) を選定した。*E. coli* NBRC 3301 については、Nutrient broth を用いて 36°C・120 rpm の条件で振盪培養を行った。また、*M. aeruginosa* NIES-44 は CB 培地<sup>7)</sup> を、*Synechococcus* sp. NIES-946 および NIES-957 は C 培地<sup>7)</sup> をそれぞれ用いて、20°C・50 μE/m<sup>2</sup>sec の条件下で静置培養した。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計数するとともに、総エンドトキシン・遊離エンドトキシンの定量を行った。なお、*E. coli* NBRC 3301 株および *Synechococcus* sp. では、0.2 μm 孔径の黒色フィルター上に細胞を捕集した後に、それぞれ DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole, 同仁化学研究所) 蛍光染色後の UV 励起下顕微鏡観察 (全菌数測定法)、および直接 G 励起下顕微鏡観察を行うことにより、細胞計数を行った。一方、*M. aeruginosa* NIES-44 は上水試験方法で採用されているプランクトン計数盤 (MPC-200, 松浪硝子工業) を用いて計数<sup>8)</sup> を行った。エンドトキシン活性は、カプトガニ血球抽出成分 LAL (エンドスペース ES-50M, 生化学工業) を使用したエンドポイント比色法 (トキシカラー DIA-MP, 生化学工業) により測定し、*E. coli* O113:H10 由来のエンドトキシン標準品を用いて検量線を作成した。本研究では水中エンドトキシンの存在形態を反映した実測を目的として、総エンドトキシン活性は培養液全画分を使用していかなる抽出操作も加えず測定を行った。遊離エンドトキシン測定は培養液を 14,000 rpm で 10 分間遠心分離することにより、微生物細胞とともに結合エンドトキシンを沈降させた上清画分を使用した。測定には、全てエンドトキシンフリーのプラスチック器具を使用した。なお、エンド

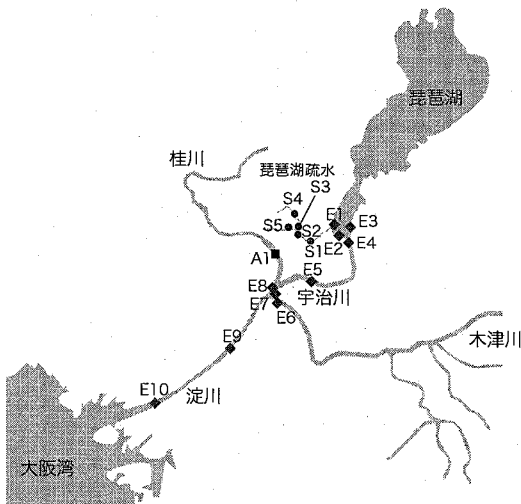


図-1 採水地点 (琵琶湖・淀川水系)

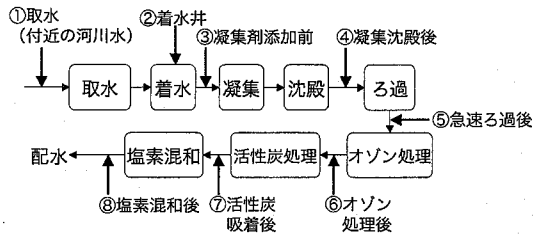


図-2 A 浄水場の処理フローと採水場所

キシン濃度は EU/mL で表記した。

## (2) 琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査

図-1 に示す琵琶湖淀川水系 (琵琶湖疏水を含む) 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 (2005 年 12 月～2006 年 2 月) に実施し、降雨による影響を除外するため雨天日および翌日を避けて採水日を決定した。採水瓶は予め 250°C、2 時間の熱処理によりエンドトキシンを不活化して使用し、採水後の試料は 4°C で運搬後、4 時間以内に下記の各項目について測定を行った。

### 1) 微生物試験:

- 一般細菌数 (SPC/ 標準平板計数; 37 °C, 24 時間)
- 従属栄養細菌数 (HPC/R2A 平板計数; 20 °C, 7 日間)
- 全菌数 (DAPI 染色計数)

### 2) 一般水質項目:

- 全有機炭素 (TOC-5000A, 島津製作所)
- 紫外線吸光度 (MultiSpec-1500, 島津製作所)
- pH
- 濁度 (O.D. 660)

### 3) 総エンドトキシン, 遊離エンドトキシン

## (3) 浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性

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 浄水場を選定した。本施設は、急速ろ過後にオゾン-活性炭処理を行う高度浄水処理施設である。採水は、2006 年 11 月および 12 月に計 3 回行った。浄水処理フローならびに採水場所を図-2 に示す。採水試料は、4°C 保冷下で運搬し、採水後 4 時間以内に 2. (2) に記した各項目について測定を行った。

## 3. 実験結果と考察

### (1) 微生物細胞に由来するエンドトキシンの定量

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-3 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。各菌株で求め

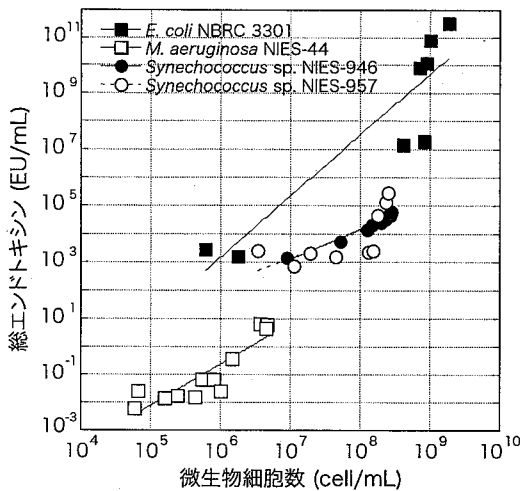


図-3 微生物細胞数と総エンドトキシン量の関係

られた回帰式を以下に示す。

<*E. coli* NBRC3301>

$$y = 1.41 \times 10^{-10} \cdot x^{2.17} \quad (R^2 = 0.835) \quad (1a)$$

<*M. aeruginosa* NIES-44>

$$y = 3.08 \times 10^{-10} \cdot x^{1.48} \quad (R^2 = 0.793) \quad (1b)$$

<*Synechococcus* sp. NIES-946>

$$y = 4.13 \times 10^{-5} \cdot x^{1.07} \quad (R^2 = 0.963) \quad (1c)$$

<*Synechococcus* sp. NIES-957>

$$y = 2.89 \times 10^{-4} \cdot x^{0.956} \quad (R^2 = 0.458) \quad (1d)$$

ここで、 $x$  : 1mL 中の各微生物細胞数 (cell/mL),  $y$  : 総エンドトキシン濃度 (EU/mL) である。

これらの回帰式を用いて、細胞数  $10^7$  cell の時の一細胞当たりエンドトキシン量を算出すると、*M. aeruginosa* NIES-44 では  $7.06 \times 10^7$  EU/cell であるのに対して、*Synechococcus* sp. NIES-946 の場合には  $1.28 \times 10^4$  EU/cell と約 180 倍高い値を、さらに *E. coli* NBRC 3301 の場合には  $2.18 \times 10^1$  EU/cell と 300000 倍以上高い値をそれぞれ示した。*Synechococcus* sp. NIES-957 は、NIES-946 と同程度のエンドトキシン活性を示した。Rapala らは、3 種類のグラム陰性細菌に加えて、*Microcystis* sp. 6 株、*Oscillatoria* sp. 5 株、*Anabaena* sp. 6 株、*Aphanizomenon* sp. 5 株、*Nodularia* sp. 4 株を対象として細胞乾燥重量当たりのエンドトキシンを比較し、*Microcystis* sp. および *Nodularia* sp. が相対的に高いエンドトキシン活性を示すものの、*E. coli* ATCC 11775 ( $1.4 \times 10^5$  EU/mg) との比較では、非常に弱いエンドトキシン活性を示すこと、それ故にシアノ

バクテリアの大量発現現象はエンドトキシン活性の変動にほとんど影響しないと結論づけている<sup>9)</sup>。しかしながら、本研究の結果からは検討した微生物種のうち、*Synechococcus* sp. が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と考えられる。その理由として、*Synechococcus* sp. に由来する一細胞当たりエンドトキシン含有量は *E. coli* NBRC 3301 の約 1/1700 と比較的小さいものの、*Microcystis* sp. との比較では、相対的に高い活性を示したことが挙げられる。さらに、*Synechococcus* sp. は夏季の琵琶湖において繁殖することが知られているピコ植物プランクトンの代表株であり、ピーク時には  $10^5$  cell/mL を超える密度で検出される<sup>10)</sup> など、季節により細胞数の変動が非常に大きいことが第二の理由として挙げられる。

ここで、Rapala らの報告と同様、本研究でも *E. coli* との比較で  $1/10^5$  倍未満の非常に低いエンドトキシン活性を示した *M. aeruginosa* であるが、LPS を精製することにより乾重量当たりのエンドトキシン活性が *E. coli* の約 1/60 程度まで増強するとの報告もある<sup>11)</sup>。*M. aeruginosa* を始めとした多くのシアノバクテリアは、寒天状基質によりその細胞膜が覆われているため、エンドトキシン活性がマスキングされている可能性が高い。すなわち、塩素などの薬剤注入によりエンドトキシン活性の増強が起こりうると考えられるため、別途詳細な検討を行う必要があるだろう。

## (2) 環境水中のエンドトキシンの定量

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  $3.11 \times 10^2 \sim 2.43 \times 10^3$  EU/mL の濃度範囲で分布した。一方、下水処理施設放流水のエンドトキシン濃度は  $1.08 \times 10^4$  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 はいずれも下水処理放流水の影響を強く受けうる地点であった。これらの結果より、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と考えられる。

Narita らは、活性汚泥の自己酸化過程において汚泥構成微生物から 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (KDO) が放出され、親水性有機物濃度が増大すると報告している<sup>12)</sup>。KDO は種々の微生物に由来する LPS において保存的に存在するコア領域の成分で、Lipid A に隣接している化合物である<sup>13)</sup>。さらに、バイオアッセイの結果から親水性有機物放出に伴って細胞毒性が増大することを示している<sup>14)</sup>。これらの知見に基づくと、下水処理施設からの放流水が水環境中のエンドトキシン濃度に与える影響は非常に大きいと考えられるため、水資源

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	採水日	総エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン (EU/mL)	遊離エンドトキシン比率
E-1	琵琶湖南湖	大津港	2005.12.19	4.28×10 <sup>2</sup>	2.20×10 <sup>2</sup>	0.514
E-2	琵琶湖南湖	なぎさ公園	2005.12.19	3.31×10 <sup>2</sup>	2.30×10 <sup>2</sup>	0.695
E-3	琵琶湖南湖	矢橋	2005.12.19	2.43×10 <sup>3</sup>	3.30×10 <sup>2</sup>	0.136
E-4	瀬田川	瀬田唐橋	2006.2.9	3.11×10 <sup>2</sup>	2.25×10 <sup>2</sup>	0.723
E-5	宇治川	宇治橋	2006.2.9	3.11×10 <sup>2</sup>	1.92×10 <sup>2</sup>	0.617
E-6	木津川	三川合流地点	2005.12.27	6.21×10 <sup>2</sup>	1.77×10 <sup>3</sup>	>1
E-7	宇治川	三川合流地点	2005.12.27	2.03×10 <sup>3</sup>	8.26×10 <sup>2</sup>	0.407
E-8	桂川	三川合流地点	2006.3.21	1.80×10 <sup>3</sup>	4.80×10 <sup>2</sup>	0.267
E-9	淀川	枚方大橋	2005.12.27	1.51×10 <sup>3</sup>	2.87×10 <sup>2</sup>	0.19
E-10	淀川	豊里大橋	2006.1.23	3.40×10 <sup>2</sup>	2.50×10 <sup>2</sup>	0.735
S-1	琵琶湖第一疏水	洛東高校前	2006.2.9	6.27×10 <sup>2</sup>	1.18×10 <sup>3</sup>	>1
S-2	琵琶湖疏水	蹴上	2006.1.11	1.55×10 <sup>2</sup>	1.82×10 <sup>2</sup>	>1
S-3	疏水分線	若王子橋	2006.1.11	1.46×10 <sup>2</sup>	1.77×10 <sup>2</sup>	>1
S-4	疏水分線	一乗寺西橋	2006.1.11	1.16×10 <sup>2</sup>	2.95×10 <sup>2</sup>	>1
S-5	琵琶湖疏水	冷泉橋	2006.1.11	2.57×10 <sup>2</sup>	1.94×10 <sup>2</sup>	0.755
A-1		下水処理場放流水	2005.12.16	1.08×10 <sup>4</sup>	1.26×10 <sup>3</sup>	0.117

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。

ここで、2. (2) で述べた異なる3手法を用いて計数した各試料の微生物計数結果に基づいて、微生物数計数結果と総エンドトキシンの関係を図-4に示す。いずれの試料においても、標準平板培地 < R2A 平板培地 < DAPI 蛍光染色の順に微生物検出量が增大した。しかし、微生物検出数が增大するにつれて、総エンドトキシンも増大する傾向にあるものの、明確な相関は認められなかった。このように、エンドトキシンは VBNC 微生物も含めた " 微生物汚染の可能性 " を示す指標として有用である反面、水中微生物量の定量的指標として代用することは困難であると考えられる。その理由として、環境水中には VBNC 微生物を始めとした種々の微生物(LPS

構造を持たないグラム陽性細菌を含む)が共存しており、微生物種ごとにエンドトキシン活性を左右する Lipid A の組成が異なる<sup>13)</sup>点が挙げられる。

さらに、DAPI 蛍光染色による全菌数測定結果に基づいて、環境試料 (10<sup>6</sup> cell/mL) 中の微生物一細胞当たりエンドトキシン量を試算すると、5.37 × 10<sup>-4</sup> EU/cell となった。前項で検討を加えた *E. coli* NBRC 3301 の一細胞当たりエンドトキシン量は、10<sup>6</sup> cell/mL の場合には 1.47 × 10<sup>-3</sup> EU/cell と算出されることから、環境水中の微生物群に起因する一細胞当たりのエンドトキシンは大腸菌の 37% 程度と比較的高い値を示すことが明らかとなった。この全菌数測定結果には、ピコ植物プランクトン等の小型シアノバクテリア (長径 3 μm 以下) も含まれているが、本調査は冬季に実施したため、ピコ植物プランクトン数は非常に低い値で推移しており、検出されたエンドトキシン活性はほぼグラム陰性細菌に由来すると思われる。既存の調査研究結果からは HPC の明確な季節変動は確認できず<sup>10)</sup>、むしろ降雨などの気象条件や、前述した下水処理施設放流口の位置といった採水地点などの要因に大きく影響されるため、本研究ではグラム陰性細菌によるエンドトキシンの季節的な変動は考慮せず、高温期のピコ植物プランクトンの大量発生に由来するエンドトキシン量の増大について検討を加える。

今回の調査ではピコ植物プランクトンの実測を行っていないため、以下では報告されている瀬田川における測定値<sup>15)</sup>に基づいて試算を行う。本研究で採水を行った2月にはピコ植物プランクトンは平均 5.7 × 10<sup>3</sup> cell/mL であったのに対して、8月には 4.9 × 10<sup>5</sup> cell/mL とピークに達している。ここで、ピコ植物プランクトンが全て *Synechococcus* sp. であると仮定して、前節で算出した

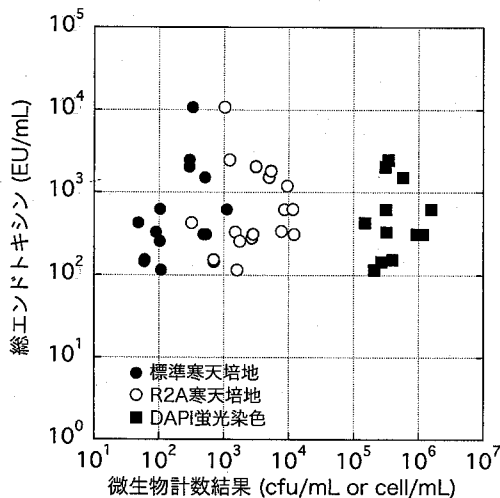


図-4 環境微生物数と総エンドトキシン量の関係

*Synechococcus* sp. NIES-946 の回帰式 (1c) を用いると、*Synechococcus* sp. に由来するエンドトキシン量は 0.430 EU/mL (2 月), 50.5 EU/mL (8 月) とそれぞれ試算された。なお、淀川中流域におけるピコ植物プランクトン実測値も、高温期には  $10^5$  cell/mL を超える濃度で検出されており<sup>16)</sup>、湖沼のみならず河川表流水を原水とする場合においても、ピコ植物プランクトンに由来する原水中エンドトキシンの増大が起こりうると判断される。

### (3) 浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性

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ている。また、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下記の式で算出した。

$$R_{p(i)} = \frac{C_{p(i-1)} - C_{p(i)}}{C_{p(i)}} \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $R_{p(i)}$  : プロセス  $i$  における除去率 (%),  $C_{p(i)}$  :  $i$  番目のプロセスにおける濃度 ( $i = 2 \sim 7$ ) である。

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 であった。表-2の結果から、各手法で測定した微生物計数 (SPC・HPC・DAPI)、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除去率は、総エンドトキシンで 86.2% (78.1 ~ 92.8%) であったのに対して、遊離エンドトキシンでは 79.5% (65.1 ~ 95.5%) となり、遊離エンドトキシンの方が大きな変動幅を示した。一方、微生物計数結果から算出される平均累積除去率は、SPC で 90.3%、HPC で 91.9%、全菌数では 82.0% となった。

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では

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することが示された。この結果をオゾン-活性炭処理プロセスにおける有機物、特に同化性有機炭素 (AOC) の挙動<sup>17)</sup>を踏まえて考えると、オゾン処理による有機物質変換により AOC が増大し、その後の活性炭処理過程で吸着除去された微生物が豊富な AOC を炭素源として再増殖した結果として、活性炭流出水中のエンドトキシンが増大したと考えられる。今回の結果は、Rapala らにより報告されている浄水処理過程における総エンドトキシンの挙動と同じ傾向を示している<sup>9)</sup>が、この論文の中では再生直後の活性炭流出水ではエンドトキシン増大が見られなかったことが同時に指摘されている。以上を総合すると、エンドトキシンに代表される水道水中の微生物由来物質を低減するためには、有機物管理、特に AOC 管理による微生物再増殖の制御に加えて、活性炭の適正管理も必要不可欠と考えられる。

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、むしろ遊離エンドトキシンは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 程度の濃度で残存していた。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。

浄水中のエンドトキシン濃度は、1970年代から Sykora ら<sup>18)</sup>、Jorgensen ら<sup>19)</sup>を始めとした多くの研究者により報告されている。これらの測定値の中には ng/mL 単位で表記されたものも多く、本研究の結果との単純な比較は困難である。前述の Rapala らは、複数の浄水処理施設を対象として総エンドトキシンの測定を行い、本研究の結果とほぼ同程度の 3 ~ 15 EU/mL の範囲に分布すると報告している<sup>9)</sup>。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は複数例あるが<sup>20), 21)</sup>、このうち bath-water fever

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	一般生菌数(SPC)		従属栄養細菌数(HPC)		全菌数(DAPI)*		総エンドトキシン		遊離エンドトキシン	
	測定値(cfu/mL)	除去率(%)	測定値(cfu/mL)	除去率(%)	測定値(cells/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)	1144		22572		8.96E+05		56.22		35.63	
着水井 ( $p_1$ )	1359	0.0	17534	0.0	8.45E+05	0.0	75.11	0.0	38.73	0.0
凝集剤添加前 ( $p_2$ )	1481	-9.0	22972	-31.0	9.91E+05	-17.3	78.16	-4.1	38.41	0.8
凝集沈殿後 ( $p_3$ )	255	90.2	1502	122.4	2.01E+05	93.5	11.63	88.6	5.67	84.5
急速ろ過後 ( $p_4$ )	63	14.1	590	5.2	1.35E+05	7.9	10.26	1.8	7.30	-4.2
オゾン処理後 ( $p_5$ )	0	4.7	0	3.4	1.05E+03	15.8	6.645	4.8	7.04	0.7
活性炭吸着後 ( $p_6$ )	5	-0.4	238	-1.4	2.28E+04	-2.6	10.98	-5.8	8.44	-3.6
塩素混和後 ( $p_7$ )	0	0.4	0	1.4	5.07E+03	2.1	9.66	1.8	11.82	-8.7

表中の各数値は、3回実施した調査測定結果の平均値で表した。

\* 急速ろ過後試料までの全菌数については2回の調査結果の平均値、オゾン処理以降については1回の調査結果のみを表記

の集団発生事例（フィンランド）においてのみ、発生時の水中エンドトキシン濃度が測定され、発症患者宅の蛇口水エンドトキシン濃度が0.2～1.0 µg/mLの範囲にあったことが報告されている。単純な濃度比較は困難であるが、一般的に用いられている換算係数、1 ng = 5～10 EUを使用すると、この報告値は1000～10000 EU/mLに相当する。この値に比べれば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、アレルギー反応への関与を示唆する結果も存在する<sup>22)</sup>ものの、吸入以外の曝露形態による健康影響は調べられていないため、確実に安全と言えるエンドトキシンの濃度範囲は未知と言えよう。今後は、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。

#### (4) エンドトキシンの存在形態の変化

浄水処理過程における遊離エンドトキシン比率（= 遊離エンドトキシン / 総エンドトキシン）と従属栄養細菌数（HPC）の変化を図-5に示す。急速ろ過プロセス以前の試料では、遊離エンドトキシン比率が0.36～0.96の範囲に分布した。これに対して、表-2に示したようにオゾン処理および塩素混和を行った全ての試料でHPCは0 cfu/mLとなり、その時の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、その大部分が遊離エンドトキシンとして水中に残存していることが示された。ここで、塩素消毒は細胞膜構

造にダメージを与えて細胞透過性を破壊するとともに、細胞内の核酸や酵素に作用して微生物を不活化すると考えられている<sup>9)</sup>。また、オゾン処理についても消毒効果の残留性こそないものの微生物を不活化する強い酸化力を有することから、オゾン処理および塩素消毒により損傷を受けた細胞膜からLPS複合体が放出されることで、遊離エンドトキシンの増大を招いたと考えられる。このように、十分な微生物不活化効果が達成されている場合には遊離エンドトキシン比率が増大する反面、HPCが検出される試料、すなわち増殖可能な細菌が存在する試料では、微生物細胞膜を構成する結合エンドトキシンの割合が増加することにより、遊離エンドトキシン比率が相対的に低下したと考えられる。本研究で検討を行った試料は数が限られているものの、以上の結果から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りうることを示唆される。

なお、本研究では遊離エンドトキシン活性が総エンドトキシン活性を上回る現象が複数の試料で確認された。この逆転現象を説明する理由として、1) 残存する微生物細胞などの懸濁性物質によりLAL試薬とエンドトキシン活性部位が妨害されたことによる見かけの総エンドトキシン活性の低下に加えて、2) 塩素によるLPS複合体の遊離化・低分子化により、遊離エンドトキシンとLAL試薬との反応性が増大している可能性も挙げられる。以上の点から、存在形態の違いがエンドトキシンが示す生理活性に及ぼす影響も含めたさらなる検討が求められる。

#### 4. 結論

本研究では、水道水源におけるエンドトキシン濃度の変動要因として微生物叢の変化に着目し、グラム陰性細菌およびシアノバクテリアに由来するエンドトキシンの定量を行った。その結果、*Synechococcus* sp.の季節変動に起因して、エンドトキシン量が増減することが示唆された。また、琵琶湖・淀川水系におけるエンドトキシン調査の結果から、下水処理施設からの放流水がエンドトキシン増大に影響を与えることを指摘した。環境微生物群に由来する一細胞当たりのエンドトキシンは、*E. coli*の場合の約37%であり、比較的高いことが明らかになった。さらに、浄水処理過程におけるエンドトキシンの除去特性を調べた結果、急速ろ過プロセスにより良好に除去されるものの、活性炭表面における微生物の増殖により活性炭処理後のエンドトキシンが増大すること、しかしながら浄水中エンドトキシン濃度は既往研究で報告されている健康被害発生時濃度と比較して、十分に低濃度であることが明らかになった。ま

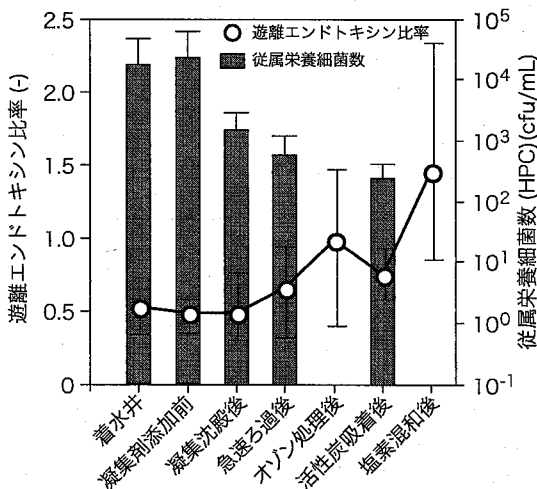


図-5 浄水処理過程における遊離エンドトキシン比率および従属栄養細菌数の変化

図では、3回の調査で得られた平均値と測定値の範囲を示している。

た、オゾン処理や塩素消毒といった微生物不活化操作により遊離エンドトキシンが増大したことから、遊離エンドトキシン比率は微生物不活化効果を表す指標となりうることを示唆された。

謝辞：本研究の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業，H17-健康-一般-025，代表者 国包章一）および文部科学省科学研究費補助金（基盤（B），18310045，代表者 伊藤禎彦）によるものである。また、採水に当たり、ご尽力いただいたA浄水場関係者各位に深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Percival S.L., Walker J.T. and Hunter P.R.: Microbiological aspects of biofilms and drinking water, CRC Press, 2000.
- 2) LeChevallier M.W., Schulz W. and Lee R.G.: Bacterial nutrients in drinking water, Applied and Environmental Microbiology, 57, pp. 857-862, 1991.
- 3) Chorus I. and Bartram J.: Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, World Health Organization, 1999.
- 4) Reed C.E. and Milton D.K.: Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 108, pp. 157-166, 2001.
- 5) Thorne P.S., Kulhankova K., Yin M., Cohn R., Arbes S.J., Jr. and Zeldin D.C.: Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 172, pp. 1371-1377, 2005.
- 6) Petsch D. and Anspach F.B.: Endotoxin removal from protein solutions, Journal of Biotechnology, 76, pp. 97-119, 2000.
- 7) (社) 日本水道協会：上水試験方法 2001年版，日本水道協会，2001.
- 8) 国立環境研究所微生物系統保存施設：培地リスト，[http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home\\_j.htm](http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm), 2006.11.15 accessed.
- 9) Rapala J., Lahti K., Rasanen L.A., Esala A.L., Niemela S.I. and Sivonen K.: Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment, Water Research, 36, pp. 2627-2635, 2002.
- 10) 阪神水道企業団管理部水質試験所：調査試験年次報告（通第53号），2004.
- 11) Bernardova K., Babica P., Marsalek B. and Blaha L.: Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides

from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga, Journal of Applied Toxicology (*in press*), DOI: 10.1002/jat.1257.

- 12) Narita H., Isshiki I., Funamizu N., Takakuwa T., Nakagawa H. and Nishimura S.I.: Organic matter released from activated sludge bacteria cells during their decay process, Environmental Technology, 26, pp. 433-439, 2005.
- 13) Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. and et al.: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, FASEB Journal, 8, pp. 217-225, 1994.
- 14) Narita H., Funamizu N., Takakuwa T. and Kunimoto M.: Role of hydrophilic organic matter on developing toxicity in decay process of activated sludge, Water Science and Technology, 52, pp. 63-70, 2005.
- 15) 滋賀県琵琶湖・環境科学研究センター：瀬田川プランクトン調査結果速報（第1報～第39報，2006年），[http://www.lberi.jp/root/jp/06db/bkjhplankton\\_setagawa.htm](http://www.lberi.jp/root/jp/06db/bkjhplankton_setagawa.htm), 2007.1.10 accessed.
- 16) 大阪府水道部水質管理センター：水質試験成績並びに調査報告（第42集），pp. 448-451, 2003.
- 17) Polanska M., Huysman K. and van Keer C.: Investigation of assimilable organic carbon (AOC) in Flemish drinking water, Water Research, 39, pp. 2259-2266, 2005.
- 18) Sykora J.L., Keleti G., Roche R. and Volk D.R.: Endotoxins, algae and *limulus* amoebocyte lysate test in drinking water, Water Research, 14, pp. 829-839, 1980.
- 19) Jorgensen J.H., Lee J.C. and Pahren H.R.: Rapid detection of bacterial endotoxins in drinking water and renovated wastewater, Applied and Environmental Microbiology, 32, pp. 347-351, 1976.
- 20) Muittari A., Rylander R. and Salkinoja-Salonen M.: Endotoxin and bath-water fever, Lancet, 2, pp. 89, 1980.
- 21) Fields B.S., Haupt T., Davis J.P., Arduino M.J., Miller P.H. and Butler J.C.: Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin, Journal of Infectious Diseases, 184, pp. 1289-1292, 2001.
- 22) Torokne A., Palovics A. and Bankine M.: Allergic (sensitization, skin and eye irritation) effects of freshwater cyanobacteria-experimental evidence, Environmental Toxicology, 16, pp. 512-516, 2001.

(2007.5.25 受付)

Factors associated with endotoxin fluctuation in aquatic environment  
and characterization of endotoxin removal in water treatment process

Yumiko OHKOUCHI<sup>1</sup>, Suguru ISHIKAWA<sup>1</sup>, Kyosuke TAKAHASHI<sup>2</sup>  
and Sadahiko ITOH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Urban Management, Graduate School of Engineering, Kyoto University  
<sup>2</sup>Sumitomo Heavy Industries, Ltd.

Endotoxins are well known as bacterial agents to cause strong immunity reaction in human. In this study, several factors associated with increase of endotoxins in aquatic environment were examined. It was suggested that the fluctuation of endotoxic activities could be affected by cell numbers of *Synechococcus* sp. by comparison with endotoxic activities from different cyanobacterial strains. In Lake Biwa – Yodo River basin, the endotoxic activities ranged from 311 to 2,430 EU/mL, and the effluent from sewage treatment plant were considered to be a major source of endotoxin contamination. The endotoxic activity per an indigenous bacterial cell in aquatic environment was calculated as  $5.37 \times 10^{-4}$  EU/cell. The removal of endotoxins in water treatment process was also characterized. It was found that endotoxins were increased after activated carbon adsorption process with bacterial regrowth, and that free endotoxin were increased by chlorination. The ratios of free endotoxins to total endotoxins reflected the bacterial cell damages by chlorination or ozonation.