

## 9716 海水処理用高圧系逆浸透濾過膜による微生物等の濾過能に関する研究

助成研究者：脇山 博之 (防衛医科大学校 微生物学講座)  
共同研究者：奥村 敦 (防衛医科大学校 微生物学講座)  
四ノ宮 成祥 (防衛医科大学校 微生物学講座)

災害等の緊急時に、安全な飲料水を大量に確保するためには十分な水源と浄水器が必要であるが、砂漠地帯や離島においては河川や湖沼が水源として利用できないため、海水を水源とする海水淡水化装置（以下、海淡装置）を必要とする。現在実用化が試みられている海淡装置は設置型のものが中心であるが、過去の災害等の教訓では、緊急時にはむしろ移動型のものが要求される。最近、我が国で移動型大型浄水装置が開発された。この浄水装置の浄化処理過程は主に逆浸透濾過によるものであるが、淡水処理（低圧系）のみを目的としており、現在のところ移動型海淡装置の開発は試みられていない。本研究は、海水処理用高圧系逆浸透ろ過膜による微生物等の濾過能について検討することを目的とした。実験に先立ち、予備実験として淡水処理用低圧系逆浸透ろ過膜による実験を行った。

野外における飲料用処理水の水質評価については、我が国においては現在のところ法律上の規制がないため、必要に応じ独自の判断が必要になる。研究対象微生物は、非病原性微生物と病原性微生物に分けて検討した。非病原性微生物はサイズの大きい順から細菌（非病原性の大腸菌）、ファージ（λファージ）およびプラスミド（pBlue-script SK phagemid(-)）を、また病原性微生物はポリオウイルスとエンドトキシンを対象とした。低圧系の実験では、大腸菌、λファージおよびプラスミドともに100%の濾過能であった。ポリオウイルスは、低圧系の実験では99.9%以上、高圧系の実験では100%、の濾過能であった。一方、エンドトキシンは、低圧系の実験では99.68%、高圧系の実験では99.54%、の濾過能が得られた。また、高圧系によるNaCl濾過能は99.65%であった。高圧系逆浸透濾過膜に関しては病原性微生物の検討に留まったが、低圧系の場合と同様に良好な微生物の濾過率が得られた。また、NaCl濾過能もエンドトキシンの濾過能とほぼ一致した。このことは高圧系逆浸透濾過膜が安定した機能を有していることを示しており、プラスミド程度の小さなDNAに対しても同様な濾過能を有すると考えられた。

砂漠国でない我が国においても、渇水時や災害時には海水を水源として利用する必要性が生じる可能性が高い。今回我々は、海水処理用高圧系逆浸透濾過膜による微生物等の濾過能について検討し、低圧系の場合と同様に十分な濾過能が得られた。とくに離島等においては緊急時に移動型の装置の必要性が高く、今後の実用化が期待される。



## 9716 海水処理用高圧系逆浸透濾過膜による微生物等の濾過能に関する研究

助成研究者：脇山 博之 (防衛医科大学校 微生物学講座)  
共同研究者：奥村 敦 (防衛医科大学校 微生物学講座)  
四ノ宮 成祥 (防衛医科大学校 微生物学講座)

### 1. 研究目的

平成7年の阪神大震災直後の被災現地における深刻な飲料水不足は記憶に新しい。緊急時に、安全な飲料水を大量に確保するためには十分な水源と浄水器が必要であるが、砂漠地帯や離島においては河川や湖沼が水源として利用できないため、海水を水源とする海水淡水化装置（以下、海淡装置）を必要とする。実際、この海淡装置は世界的にみるとサウジアラビア等の砂漠国を中心にして、また国内においては沖縄県等を中心に実用化が試みられている<sup>1, 2)</sup>。

逆浸透濾過は、注射用蒸留水作成時等臨床でも活用されている方法であるが<sup>3, 4)</sup>、元々海淡用に開発された方法である<sup>5, 6)</sup>。本研究は、海水処理用高圧系逆浸透ろ過膜による微生物等の濾過能について検討することを目的とした。なお実験に先立ち、予備実験として淡水処理用低圧系逆浸透ろ過膜による実験を行った。

### 2. 研究方法

#### 2.1 実験の手順

実験室内で、低圧系または高圧系逆浸透濾過膜を用いて、微生物等を濾過した。実験の様子をFig. 1に示した。以下にその実験手順を示す。1) あらかじめ滅菌処理した低圧系または高圧系逆浸透濾過膜を、実験室用器材（以下、装置）内にセットした。2) 微生物等を適当量（300cc程度）の溶液（培養液等）に懸濁し、装置に注入した（注入した液を以下、原水）。3) 窒素ガス加圧（低圧系：10kg/cm<sup>2</sup>以下、高圧系：40kg/cm<sup>2</sup>程度）により得られた濾液を採取したが、この際比較対象として原水も回収した。4) 対象とした各微生物等の特性を考慮した検出法により、原水あるいは濾液中の微生物等の濃度を測定した。5) 逆浸透濾過膜による各微生物等に対する濾過能を算定し、安全性を評価・判定した。

(a) Membrane for high pressure- (b) Experimental view  
type reverse osmosis

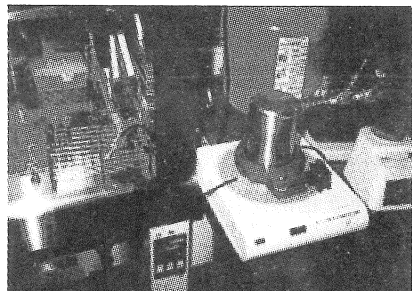
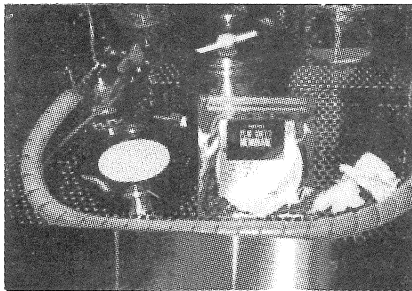


Fig. 1 Experiment for exclusion of microorganisms by reverse osmosis

## 2.2 非病原性微生物等の実験

予備実験として、低圧系逆浸透濾過膜を用いて、大腸菌（非病原性）、λファージおよびプラスミド等の非病原性微生物等を濾過した。

### 2.2.1 大腸菌の実験

大腸菌は、通常の培養法により検出した。

### 2.2.2 λファージの実験

λファージは、大腸菌を宿主細胞とするプラークアッセイ法により検出した。

### 2.2.3 プラスミドの実験

Fig. 2に実験法（In vivo excision法）の概要を、またFig. 3には簡単な実験手順を示したが、プラスミドはDNAあるいはヘルパーファージのカプシドに包まれた粒子の状態で検出した。すなわちプラスミドDNAについては、pBleuscript SK phagemid(-)を予め組み込んだ変異型λファージをヘルパーファージとともに大腸菌に同時感染させ、大腸菌の中でヘルパーファージの作用により変異型λファージから切り出されたpBleuscript SK phagemid(-)のDNAを抽出し、ゲル電気泳動法により検出した。一方、ヘルパーファージのカプシドに包まれたプラスミド粒子については、同様の処理により得られた粒子（pBleuscript SK phagemid(-)のDNAは変異型λファージから切り出されると同時にヘルパーファージの空のカプシドに包みこまれる）を別の大腸菌に感染させ、抗生物質のアンピシリンを含む培地で大腸菌を培養することによりプラスミド粒子の存在の有無を確認した。この場合、pBleuscript SK phagemid(-)には予めアンピシリン耐性遺伝子が組み込まれているためプラスミド粒子が感染した大腸菌はコロニーが出現するが、プラスミド粒子が感染していない大腸菌についてはアンピシリンが培地中に含まれるためコロニーが出現しない。

以上の方法を用いることにより、プラスミドをDNAあるいはヘルパーファージのカプ

シドに包まれた粒子の状態を検出した。

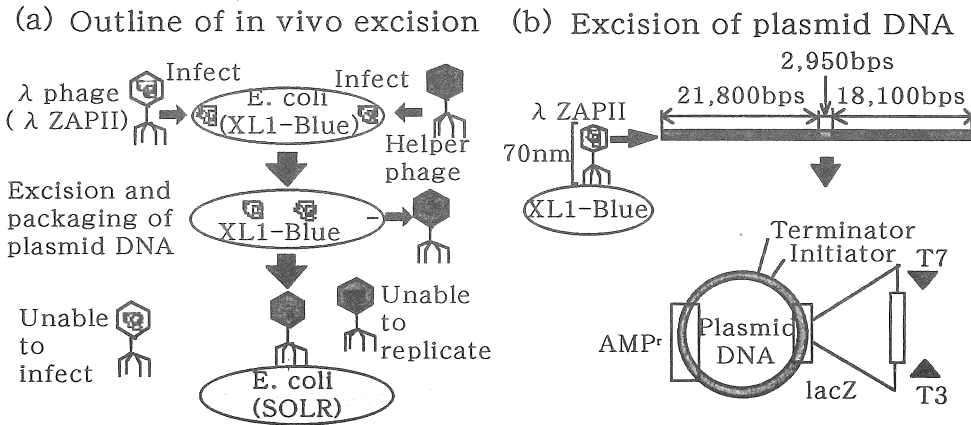


Fig. 2 In vivo excision method

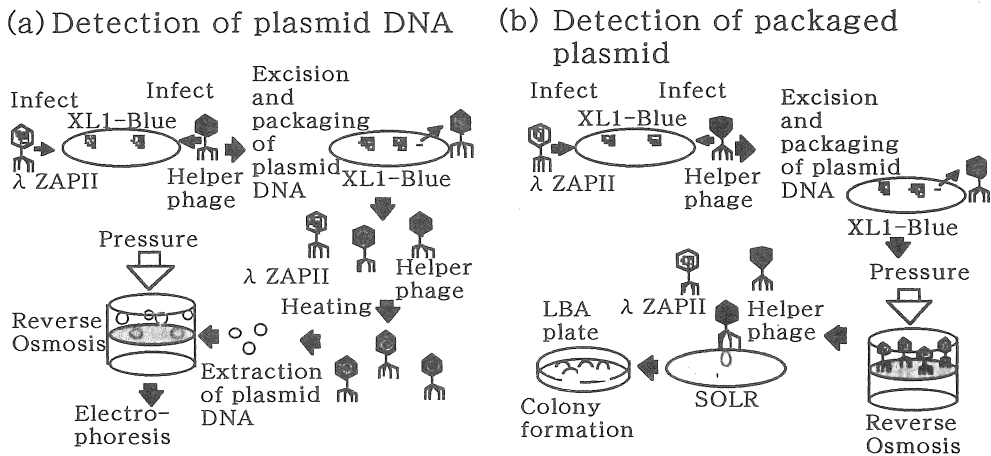


Fig. 3 Experimental procedures to detect plasmid

### 2.3 病原性微生物等の実験

低圧系または高圧系逆浸透濾過膜を用いて、ポリオウイルスおよびエンドトキシン等の病原性微生物等を濾過した。

#### 2.3.1 ポリオウイルスの実験

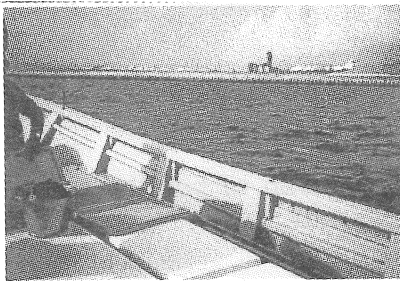
ポリオウイルスの宿主細胞としてHeLa細胞を用いた。低圧系の実験においては、培養用の培地に溶解したポリオウイルスを用いて濾過実験を行い、TCID<sub>50</sub>法およびプラークアッセイ法で検出した。一方、高圧系の実験においては、東京湾で採取した海水にポリオ

ウイルスを添加して濾過実験を行い、TCID<sub>50</sub>法で検出した。

### 2.3.2 エンドトキシンの実験

エンドトキシン濃度は、カプトガニライゼートを用いた比色定量法により定量した。すなわち濾過前後の各サンプルを段階希釈し、ES-6セット（生化学工業）を用いてマイクロプレートリーダーで比色・定量した（A<sub>405</sub>測定）。低圧系の実験においては、水道水中に既に含まれている微量のエンドトキシンを用いて濾過実験を行った。一方、高圧系の実験においては、東京湾において採取した海水中のエンドトキシンを用いて濾過実験を行った。また、高圧系の実験においては、Hand Refractometer「S/Mill」（Atago社）を用いて、濾過前後のNaCl濃度も測定した。Fig. 4に海水のサンプリングの様子を示した。

(a) View of the collection of salt water



(b) Bottle for sampling of salt water

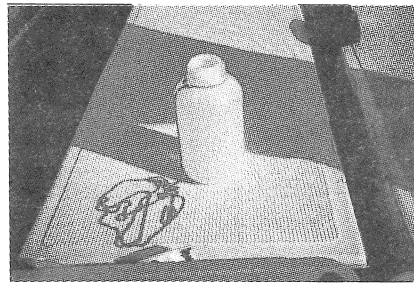
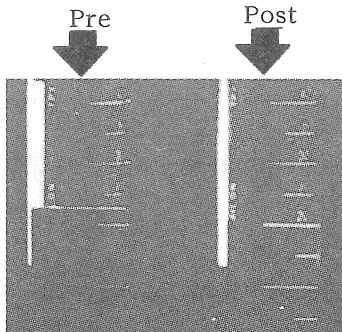


Fig. 4 Collection of salt water

## 3. 研究結果

### 3.1 非病原性微生物等の実験

(a) View of the liquid at pre- and post-treatment by reverse osmosis



(b) Plaque assay of  $\lambda$  phage

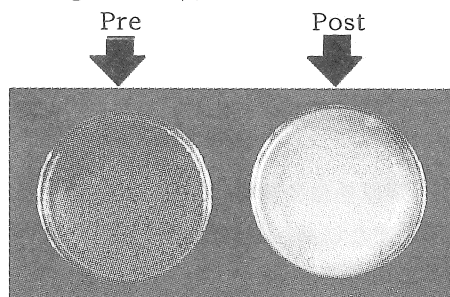
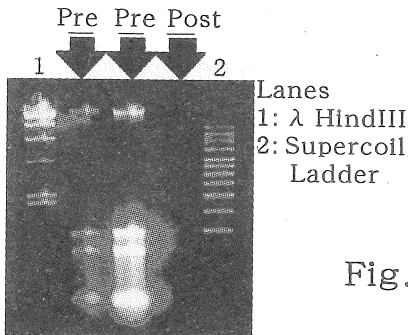


Fig. 5 Exclusion of  $\lambda$  phage by reverse osmosis

大腸菌、λファージおよびプラスミドともに100%の濾過能であった。Fig. 5に、濾過前後の溶液の肉眼的性状とλファージによるプラークアッセイの結果を示した。また、Fig. 6にプラスミドの実験結果を示した。

(a) Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA



(b) Ampicillin resistant colonies

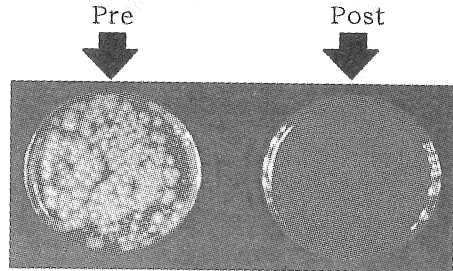


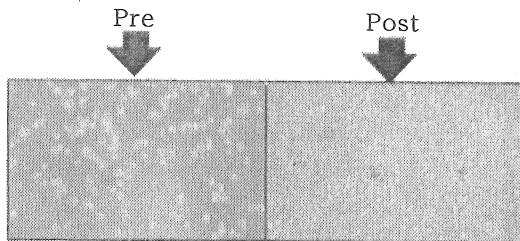
Fig. 6 Exclusion of plasmid by reverse osmosis

### 3.2 病原性微生物等の実験

#### 3.2.1 ポリオウイルスの実験

低圧系の実験では、ポリオウイルスは99.9%以上の濾過能であった。一方、高圧系の実験では、100%のポリオウイルス濾過能が得られた。Fig. 7にポリオウイルスの実験結果を示した。

(a) Detection of poliovirus by TCID<sub>50</sub> method



(b) Detection of poliovirus by Plaque assay

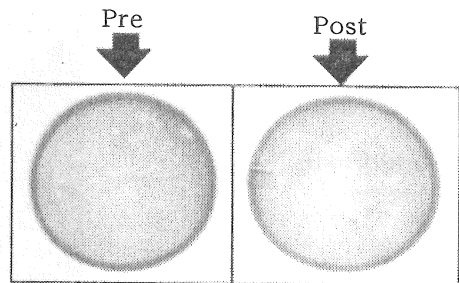


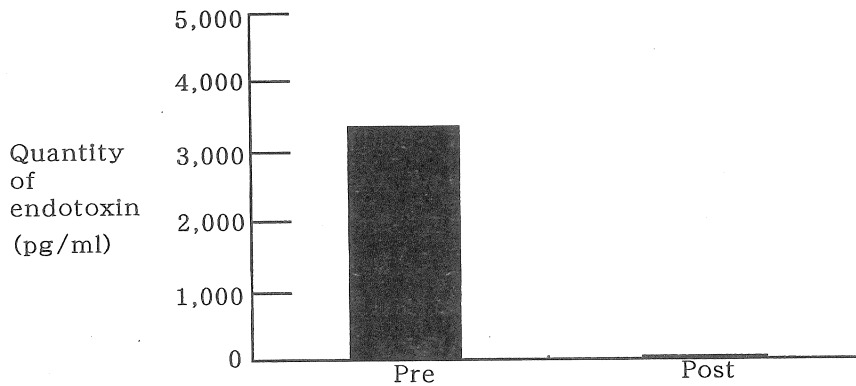
Fig. 7 Exclusion of poliovirus by reverse osmosis

#### 3.2.2 エンドトキシンの実験

Fig. 8にエンドトキシンの実験結果を示した。低圧系の実験では、原水中には1ml当た

り3,423pgのエンドトキシンが存在していたが、濾過後には11pg/mlの濃度に減少した。従って99.68%の濾過能が得られた。一方、高圧系の実験では、原水中のエンドトキシン濃度は43,827pg/ml（海水100ml中に4.4ug存在）であったのに対し、濾液中の濃度は200.5pg/mlであった。このことから濾過能は99.54%と算定された。また、NaClの濾過能については、海水中のNaCl濃度が2.9%であったのに対し、濾液中のNaCl濃度は0.1%であった。従ってNaCl濾過能は99.65%であった。

(a) Exclusion of endotoxin by low pressure-type reverse osmosis



(b) Exclusion of endotoxin by high pressure-type reverse osmosis

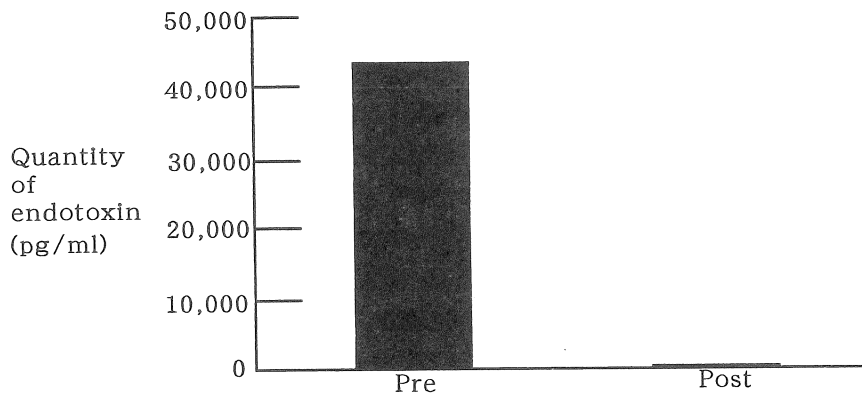


Fig. 8 Exclusion of endotoxin by reverse osmosis



#### 4. 考察

野外における飲料用処理水の水質評価については、我が国においては現在のところ法律上の規制がないため、必要に応じ独自の判断が必要になる。今回研究対象とした微生物等は、非病原性微生物と病原性微生物に分けて検討した。

非病原性微生物については、サイズの大きい順から、細菌（非病原性の大腸菌）・ファージ（λファージ）・プラスミド（pBleuscript SK phagemid(-)）を対象とし、病原性微生物については、ポリオウイルスおよびエンドトキシンを対象とした。

ポリオウイルスを対象とした理由は、サイズの小さいピコルナウイルスに属するウイルスであるため逆浸透濾過膜の機能測定対象として適していること、かつ経口（水系）感染微生物の代表的なものの一つであることからであった。一方、エンドトキシンを対象とした理由は、グラム陰性細菌の細胞壁のLPSの構成成分として発熱やショック等の内毒素作用を引き起こすため代表的な病原性物質の検討対象候補であるということだけでなく、元々水道中に微量含まれており実験室内での実験はもとより野外等の大規模な実験に際しても測定対象として利用しやすいためであった。エンドトキシンは飲用しても胃液で不活化されるため人体に実害はないが（但し静注は危険）、1nm程度とサイズが小さいため、より大きなサイズの微生物等は理論的に通過しないという意味で、濾過能の指標として優れていると考えられた。

高圧系逆浸透濾過膜に関しては病原性微生物の検討に留まったが、低圧系の場合と同様に良好な微生物の濾過率が得られた。また、NaCl濾過能もエンドトキシンの濾過能とほぼ一致した。このことは高圧系逆浸透濾過膜が安定した機能を有していることを示しており、プラスミド程度の小さなDNAに対しても同様な濾過能を有すると考えられた。

#### 5. 今後の課題

現在実用化が試みられている海淡水装置は設置型のものが中心であるが、過去の災害等の教訓では、緊急時にはむしろ移動型のものが要求される。最近、我が国で移動型大型浄水装置（車載型かつヘリ空輸可能）が開発された。この浄水装置の浄化処理過程は主に逆浸透濾過によるものであるが、残念ながら淡水処理（低圧系）のみを目的としており、現在のところ移動型海淡水装置の開発は試みられていない。

砂漠国でない我が国においても、渇水時や災害時には海水を水源として利用する必要性が生じる可能性が高い。今回我々は、海水処理用高圧系逆浸透濾過膜による微生物等の濾過能について検討し、低圧系の場合と同様に十分な濾過能が得られた。とくに離島等においては緊急時に移動型の装置の必要性が高く、今後の実用化が期待される。

#### 6. 文献等

- 1) 中尾真一、化学工学；55、（1991）676

- 2) 中尾真一、海水誌；44、（1990）235
- 3) 太田嘉治、上原秀樹、澤田晃一、金属；臨増、（1991）110
- 4) 北小路学、中村武夫、棚田成紀、京谷庄二郎、西岡豊、医学と生物学；126、（1993）25
- 5) 木村尚史、造水技術；14、（1988）13
- 6) 木村尚史、公害と対策；24、（1988）14

Exclusion of Microorganisms in Salt Water by a High Pressure Type Reverse  
Osmosis Membrane

Hiroyuki Wakiyama, Atsushi Okumura, Nariyoshi Shinomiya  
National Defense Medical College, Department of Microbiology

Summary

In any emergency, it is essential to supply safety drinking water for suffering people. To supply safety drinking water, a sufficient amount of fresh water (FW) and a water purifier are needed. However, FW is not available in deserts or some small islands. Thus, a desalination apparatus is needed. Some trials are on going on desalination plants in desert countries like Saudi Arabia, and in domestic islands like Okinawa. Although there are no trial for mobile one in Japan until now, there might be critical needs in the near future. This study addresses the problem of estimating the microbiological quality of the water after treatment by high pressure-type reverse-osmosis (HPRO) by using endotoxin and poliovirus as markers. As preliminary experiments, those treated by low pressure-type reverse-osmosis (LPRO) were analysed for its water quality by using *E. coli*,  $\lambda$  phage and plasmid as markers.

After collecting approximately 300ml of sea water, the quantity of the endotoxin in the water was checked before (WB) and after (WA) the HPRO treatment. Removal of endotoxin was 99.54% in WA. Removal of NaCl by HPRO was 99.65% which was similar to that of endotoxin. Poliovirus, added to salt water, was completely removed in WA. In preliminary experiments, 100% of *E. coli*,  $\lambda$  phage and plasmid, and over 99.6% of poliovirus and endotoxin were removed by LPRO. These results suggest that there could be efficient removal of microorganisms by HPRO to the same level of RPRO.

Even in a non-arid country like Japan, there would be much benefit for people living on small islands during the the dry season to utilize salt water or during disaster. Thus, mobile HPRO systems are need in Japan and the practical systems should be developed in the near future.