

多様化する感染症に応じた下水処理水の高度な消毒手法の構築に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 27～平 29

担当チーム：材料資源研究グループ
(資源循環担当)

研究担当者：重村浩之、諏訪守、李善太

【要旨】

本研究では、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的とした。その結果、8種類の抗生物質に耐性を持つ抗生物質耐性大腸菌は、耐性を持たない大腸菌より同一の不活化効果を得るためにより多くの紫外線照射量が必要であることが分かった。また、下水処理水中の溶存物質、懸濁物質が通常の二次処理水の変動レベルであれば紫外線消毒によるウイルス不活化効果への影響は少ないことが分かった。さらに、F特異 RNA フェージの不活化効果からノロウイルスの不活化速度定数を推算した結果、2~3 log の不活化に必要な紫外線照射量は 35~53 mJ/cm² となり、F特異 RNA フェージの利用によりノロウイルスの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。

キーワード：抗生物質耐性大腸菌、紫外線消毒、ノロウイルス、F特異 RNA フェージ

1. はじめに

新たな水資源として下水処理水の利用促進や、公共用水域の衛生学的安全性を担保する上で水系感染リスクを低減させる必要があるが、新興ウイルスの出現や再興感染症としての抗生物質耐性菌（以下、耐性菌）の出現と蔓延が世界的に問題視されてきている。これらの問題解決のため、医療関係学会から構成される創薬促進検討委員会・抗微生物薬適正使用推進委員会が「世界的協調の中で進められる耐性菌対策」として国へ、耐性菌対策に取り組むように提言している¹⁾。耐性菌の存在は、医療機関だけでなく、下水、下水処理水などから国内問わず海外においても検出報告例^{2),3),4),5)}がある。また、健常者の糞便試料の内 80.5%に耐性菌が存在しており、それら単離された細菌の 98%が大腸菌であったとの報告例もある⁶⁾ことに加え、下水および下水処理水から検出される大腸菌の内、20~60%が耐性大腸菌である⁵⁾ことも明らかとなっている。健常者および保菌者から排出されるであろう、耐性菌が下水道に流入する可能性が高いことから、下水処理場にて適切に除去・不活化する必要があると考えられる。

現在、下水処理場の多くで塩素消毒（次亜塩素酸ナトリウム使用施設数: 1076 施設）⁷⁾が行われている。耐性菌対策においては消毒の強化が考えられるが、塩素消毒強化に伴い耐性大腸菌の存在割合が増加する傾向が報告されている⁸⁾。細菌の細胞膜やウイルスの表面タンパク質が細胞内への消毒剤の影響を阻

止し耐性を有することが考えられるが、紫外線消毒では細胞内の遺伝子へ直接作用することから、塩素消毒に耐性を有する細菌やウイルスに対し有効な手段となり得る可能性がある。約 6 mJ/cm² の紫外線照射による大腸菌の不活化効果は、3 log とされ⁹⁾、耐性大腸菌に対しても紫外線照射による不活化効果が期待されるが、耐性大腸菌に対する紫外線による不活化および光回復の影響は、現状では明確になっていない。下水処理場では一部、放流先の生態系および水産資源の保全の観点から、塩素消毒から紫外線消毒の導入例も増えつつあり、耐性大腸菌に対する紫外線消毒の不活化効果と光回復に関する知見の集積が必要であると考えられる。

近年、紫外線ランプの高出力化に伴い、比較的処理水量が多い下水処理場への利用拡大が期待されている。しかし、水中の濁質や溶存物質等は、従来から広く一般的に用いられている低圧水銀ランプを用いた紫外線消毒による病原微生物への消毒効果に影響を及ぼすことが知られている。そのため、近年、開発が進んできている高出力型の紫外線ランプにおいても、これらの物質がどの程度影響を及ぼしているのか把握する必要がある。

ノロウイルス (Norovirus; NoV) は、感染力が非常に強く、年齢や性別を問わずに幅広い人に感染し、下痢症や重篤な胃腸炎を引き起こすことから、現在世界的に最も注目を集めているヒト病原ウイルスである¹⁰⁾。しかし、NoVは未だに効率よく増殖させる

ことのできる培養細胞が確立されていないため、現在行われている多くの研究では分子生物学的手法のPCR (Polymerase Chain Reaction; PCR) を濃度測定に多く用いている^{10), 11)}。PCRはターゲットとしたウイルス遺伝子の濃度を測定することから迅速性や特異性において優れているが、感染力の有無を区別できない欠点がある。そのため、PCRでは紫外線消毒による不活化効果の評価が困難である。このことから、下水処理場において適切に消毒処理を行い、放流水の水質管理をしていくことが重要であるが、消毒処理におけるNoVの不活化効果の評価できないことから、目標とすべき消毒レベルの設定が困難である。そのため、新たなNoVの不活化推定手法を構築し、不活化効果を得るための消毒レベルを把握する必要がある。

本課題は、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的に、①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価、②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価、③ウイルス不活化評価技術の提案を行った。①については、新たなリスク要因としての抗生物質耐性大腸菌を対象として低圧紫外線ランプならびに中圧紫外線ランプを用い、紫外線照射における不活化と可視光による光回復の影響を評価した。②では、低圧紫外線装置と高出力型紫外線装置を用いて、下水処理水を原水とした連続通水による長期運転下での紫外線消毒実験を実施し、溶存物質、濁度、SSなどが紫外線の消毒効果へ及ぼす影響を把握した。③では、大きさや構造がNoVなどのヒト病原ウイルスと類似しており、人への危険性がなく培養や検出が容易であるF特異RNAフェージ(FRNAPH)遺伝子群を用いてNoVの不活化効果を推定する手法を検討した。

2. 研究方法

2. 1 抗生物質耐性大腸菌の紫外線消毒

2. 1. 1 試験水と抗生物質耐性大腸菌の準備

試験水は標準活性汚泥法を採用しているA下水処理場の二次処理水をメンブレンフィルター(公称孔径: 0.2 μ m、材質: ニトロセルロース)でろ過を行い無菌状態にしたものを用いた。作成した試験水に同下水処理場の流入下水より分離した抗生物質耐性大腸菌を添加し、紫外線照射実験に供した。実験に用いた試験水の水質は、COD_{Cr} = 8 mg/L、TOC = 3.45

mg/L、溶解性総窒素 = 14.5 mg/L、波長 255 nm の紫外線透過率 = 80%であった。

クロモカルトコリフォーム寒天培地(Merck Millipore)を用いA下水処理場の流入下水より検出された大腸菌、約50コロニーを釣菌した。その後、トリプトソイブイオン培地に接種し、35°Cで3~4時間培養し、培養液をミューランヒントS寒天培地に塗布した後、抗生物質を含有したディスク(KBディスク: 栄研化学)を平板培地上に貼付後に35°Cで18時間培養した。培養後に、平板上に形成された大腸菌が増殖せずに透明に形成された円(阻止円)の直径を測定し、その大きさから耐性の有無を判定した。判定基準はClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)の実施基準に基づいたKBディスクの手引きを参照した。判定した大腸菌は、IDテスト(グラム陰性桿菌の同定キット、EB-20「ニッスイ」)により同定した。抗生物質は、イミペネム(IPM)、アンピシリン(ABPC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)、セフジニル(CFDN)、テトラサイクリン(TC)、レボフロキサシン(LVFX)の8種類である。これら8種類の抗生物質は、日本国内における出荷量・額および尿排出率から推定した体外排出量や毒性の観点から、ヒト用抗生物質の上位にランキングされる^{12), 13)}こと、および腸内細菌の大腸菌に抗菌作用を有することから選定した。

2. 1. 2 紫外線照射実験

耐性大腸菌の紫外線照射による不活化効果の評価するために図-1に示す回分式紫外線照射装置を用い、所定の時間紫外線を照射、照射前後の耐性大腸菌濃度を算定し評価した。

8種類の抗生物質の内、ABPC、CFDN、KM、TC、ST、GMの6剤に耐性を持つ大腸菌(以下、6剤耐性大腸菌)と8種類全てに耐性を持たない大腸菌(以下、0剤耐性大腸菌)を流入下水より検出・同定し添加用の耐性大腸菌とした。また、比較対象として8種類の抗生物質に無耐性であった大腸菌であるATCC25922株の純菌も実験に供した。

消毒実験に供するため、ミューランヒントS寒天培地で培養し増菌させたが、試験水の水質性状が大きく変化することを防ぐために4000 rpmで10分間の遠心沈殿処理し、得られた沈渣を滅菌ミリQ水で洗浄したものを添加用の耐性大腸菌とし、試験水中の濃度が10⁵ CFU/mLとなるように調整した。なお、耐性大腸菌の添加前、添加後に再度、抗生物質耐性

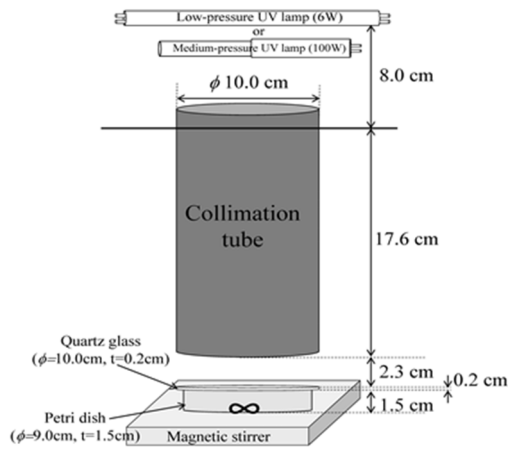


図-1 回分式紫外線照射装置

の有無および大腸菌の同定を行った。

紫外線消毒実験では、試験水を滅菌シャーレ（直径(φ) = 9 cm、水深(d) = 1.5 cm）に耐性大腸菌添加済みの試験水 80 mL を充填した。石英ガラス(0.2 cm)で蓋をし、マグネチックスターラーにて攪拌、所定の時間、上部より紫外線を照射し、照射前後での耐性大腸菌濃度を定量した。紫外線ランプは、発光長 = 10 cm の 6 W の低圧紫外線ランプ (UL0-6DQ、ウシオ電機社製) および、発光長 = 4 cm の 100 W の中圧紫外線ランプ (UM-102、ウシオ電機社製) を用いた。紫外線光量計 (本体:UIT-250、受光部:UVD-254、ウシオ電機社製) を用い、石英ガラスで蓋をした試験水表面で紫外線照度を測定した。本実験では、紫外線光量計の読み値(IR)で、低圧紫外線ランプ使用時は $IR = 0.17\sim 0.18 \text{ mW/cm}^2$ 、中圧紫外線ランプ使用時は、 $IR = 1.20\sim 1.28 \text{ mW/cm}^2$ に設定した。実験開始前に紫外線ランプの照度を安定させるために 30 分間ウォームアップした後に、実験を行った。

所定の時間、紫外線を照射した試験水は、クロモカルトコリフォーム寒天培地による平板培養法にて 37°C、22 時間培養した後、耐性大腸菌濃度を定量した。紫外線照射前後のシャーレ上に形成したコロニー数をカウントし、式(1)に従って試料の生残率を算出した。

$$S_t = \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

S_t は紫外線照射時間 t における生残率 (-)、 N_t は紫外線照射時間 t における耐性大腸菌濃度 (CFU/mL)、 N_0 は紫外線照射前の初期耐性大腸菌濃度 (CFU/mL) である。

2. 1. 3 光回復実験

低圧・中圧紫外線照射後、生残率が概ね $10^{-2}\sim 10^{-5}$ の試料に対して、可視光照射による光回復実験を行った。紫外線照射後の試料を遮光ボトルに保存し、速やかに滅菌シャーレ (φ: 9 cm、d: 1.5 cm) に 80 mL 充填した後、石英ガラス(0.2 cm)で蓋をし、マグネチックスターラーで攪拌しながら可視光を照射した。照射時間は、0、10、30、60、90 分間とし、実験中に水温の上昇等を防ぐために可視光が照射可能なインキュベーター (人工気象器、LPH-350SP、日本医化器機製作所) 内に試料を置き、20°C 一定条件で光回復実験を行った。

可視光照射は、自然光 (太陽光) に極力近づくように設計された 40 W および 20 W のバイタライトを用い、上部および四方から紫外線照射後の試料に可視光を照射した。デジタル照度計 (DT-1309、CEM 社製) を用い、実験中の照度値を常時モニタリングした。本実験中の照度は、815~817 lux であった。

可視光を所定時間照射した試料は、遮光ボトルに保存し、速やかに耐性大腸菌濃度を定量した。また光回復実験と同時に、暗回復の影響を把握するために可視光なしの条件下で 0~90 分間攪拌した試料の耐性大腸菌濃度の定量も行った。さらに、紫外線照射後の試料を用い暗回復実験を行った結果、耐性大腸菌の回復が確認されなかった。従って本研究における暗回復効果は無視できるものと判断した。

なお、紫外線照射直後および光回復後において耐性大腸菌の抗生物質感受性の再確認として、各試料からランダムに 50 個程度のコロニーを釣菌し、抗生物質に対する感受性を評価したが、添加当初と比較して変化は確認されなかった。

2. 1. 4 紫外線量の算定

低圧紫外線ランプは、中心波長 = 254 nm の単一の紫外線を放射するため、紫外線量の算定は、試験水表面での紫外線光量計の読み値と試験水の波長 254 nm の吸光度から、ランベルト・ベール法則に従い深さ方向に対する紫外線照度の減衰を考慮した平均紫外線量として表すことが可能である。しかしながら、中圧紫外線ランプは、複数の波長の紫外線が放出されていることから、ランプ自体が発光波長分布を有している。また、紫外線光量計の受光部においても受光分布があるなど、紫外線量の算定が非常に複雑である。中圧紫外線ランプ使用時には、以下の事項を勘案して紫外線量を算定することで、低圧紫外線ランプと比較できると考えられる。

- ・紫外線ランプ発光波長分布

- ・試料の吸光度分布
- ・使用した紫外線光量計の受光分布
- ・大腸菌の紫外線感受性分布

低圧および中圧紫外線ランプでの耐性大腸菌の不活化を的確に評価するために本研究では、双方の紫外線ランプともに文献¹⁴⁾を参考に総相対殺菌有効放射照度(I_{erf} : Total relative germicidal effective irradiance)を式(2)、(3)、(4)を用い算出した。算出した I_{erf} に紫外線照射時間を掛け合わせた、総相対殺菌有効放射照度 ($\text{mW}/\text{cm}^2 \cdot \text{s} = \text{mJ}/\text{cm}^2$) として低圧、中圧紫外線照射における耐性大腸菌の不活化を評価した。

$$I_{\text{erf}} = \int I_R \times f_p \times L_\lambda \times \frac{(1 - e^{-2.3A_\lambda \cdot d})}{2.3A_\lambda \cdot d} \times A_{\text{DNA}}(\lambda) \quad (2)$$

$$f_p = \frac{\int RLE(\lambda) d\lambda}{\int \frac{RLE(\lambda)}{R(\lambda)} d\lambda} \quad (3)$$

$$L_\lambda = \frac{RLE(\lambda)}{\int RLE(\lambda) d\lambda} \quad (4)$$

ここで、 f_p 、 L_λ は補正係数(-)、 I_R は紫外線光量計の読み値 (mW/cm^2)、 A_λ は波長 λ における吸光度 (cm^{-1})、 $RLE(\lambda)$ は波長 λ における紫外線ランプのエネルギー比(-)、 $R(\lambda)$ は波長 ($\lambda = 255 \text{ nm}$) を1とした際の各波長の紫外線光量計の相対値(-)、 $A_{\text{DNA}}(\lambda)$ は波長 λ におけるDNAの波長感受性割合(-)、 d は水深 (1.5 cm) である。

I_{erf} は、Microsoft Excel 2010 を用い便宜的に波長 $\lambda = 5 \text{ nm}$ 間隔とし、波長 $\lambda = 200 \sim 400 \text{ nm}$ の領域を数値積分により算定した。低圧紫外線ランプ使用時は、単一波長の紫外線を放射するので、 $RLE(\lambda = 254 \text{ nm}) = 1$ 、 $R(\lambda = 254 \text{ nm}) = 1$ となり、式(2)、(3)の f_p 、 L_λ は1となる。

2. 1. 5 光回復速度定数の算定

光回復の回復過程は、Dulbecco¹⁵⁾により、一次反応式が提唱されており、多くの光回復の実験結果において実測値の傾向を表していることが知られている¹⁶⁾。しかしながら、紫外線量を大きくした際の試料に対する光回復過程がモデル式に従わず、光回復の開始時期に生残率の上昇がモデル式よりも遅れる現象が報告されている¹⁷⁾。Sanzら¹⁷⁾は、これらの現象を説明するために、式(5)で示される二次反応式を提唱している。式(5)は1838年にVerhulstにより生物学的人口増加における予測式として示された式であり、Sanzら¹⁷⁾はこの式を微生物の光回復予測式に適用した。

$$\frac{dS}{dt} = k_1 \cdot (S_m - S) \cdot S$$

$$S = \frac{S_m}{1 + \left(\frac{S_m}{S_0} - 1\right) \cdot e^{-k_1 \cdot S_m \cdot t}} \quad (5)$$

$$S = \frac{S_m}{1 + \left(\frac{S_m}{S_0} - 1\right) \cdot e^{-k_1 \cdot S_m \cdot t}} \quad (5)$$

S は可視光照射時間 t 分後の耐性大腸菌の生残率、 S_0 は紫外線照射直後の耐性大腸菌の生残率、 S_m は最大光回復生残率、 k_1 は光回復速度定数 (1/min) である。なお、最大光回復生残率は可視光照射90分後の耐性大腸菌濃度より算出した値を用いた。

本実験においては、耐性大腸菌の光回復の定式化として式(5)を用い低圧および中圧紫外線照射後の可視光照射による光回復速度を評価した。

2. 2 連続通水による長期運転での紫外線消毒実験

2. 2. 1 流水式紫外線照射装置の概略

本研究では、紫外線ランプの出力が異なる2種類の内照式の紫外線照射装置を用いた。従来広く一般的に用いられている紫外線ランプである低圧水銀灯 (65W-1灯)を用いた照射装置 (低圧装置) と、近年、開発が進んできている高出力型の紫外線ランプ (60W-1灯)を用いた装置 (高出力装置)を用いた。

低圧装置は、内径108 mm、照射有効長1023 mm、装置容積8.7 L、高出力装置は、内径108 mm、照射有効長508 mm、装置容積4.3 Lである。低圧装置、高出力装置ともに紫外線ランプは65W、60Wとほぼ同出力であるが、高出力装置は、低圧装置の約半分程度の大きさであるため、装置をコンパクト化できる、または従来の低圧装置と同じ装置形状にすると出力が120W程度に拡張できる特徴を有している。

2. 2. 2 採水方法

A下水処理場の二次処理水を砂ろ過した処理水を紫外線消毒の原水として使用した実験装置を図-2に示す。調査期間は平成28年6月~平成29年1月であり、紫外線照射装置に24時間連続的に通水し、採水ポートより適宜、紫外線照射後の試料を採水した。なお低圧装置への通水した系をRUN-1、高出力装置の系をRUN-2と設定した。

水質変動に伴う紫外線消毒の効果を把握するために、2カ月間隔で通水流量を段階的に減少させた。流量を変化させる際には、紫外線ランプスリーブの濁質等の汚れを一度、酸-アルカリにより洗浄を行った。採水間隔は毎週1回実施し、同流量で採水回数 $n = 7 \sim 8$ (総数 $n = 32$)とした。装置流入側に流量センサー (FD-Q50C, KEYENCE社製) を取り付

表-1 試験水の水質

水質項目	試験水 (n = 10)
SS (mg/L)	1.3~6.7
pH	6.4~7.4
UV254 (Abs)	0.093~0.125
UV254 (%)	75~81
濁度 (NTU)	0.1~2.8
COD _{cr} (mg/L)	11~27
T-N (mg/L)	15~22
T-P (mg/L)	3.5~5.2

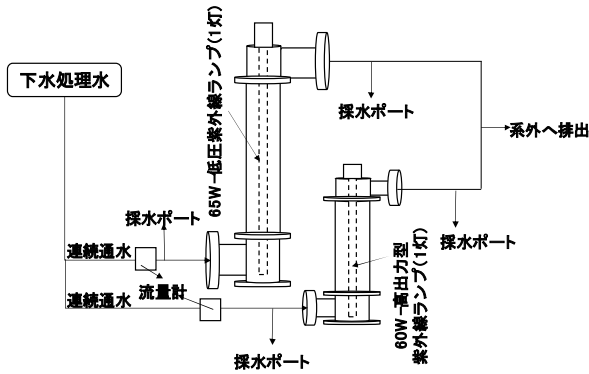


図-2 長期連続通水実験装置概略

け、24時間1分間置にデータ取得を行った。

2. 2. 3 測定項目および定量方法

本調査における対象病原微生物は野生株のFRNAPH、大腸菌、大腸菌群とし、大腸菌および大腸菌群は、クロモカルトコリフォーム寒天培地(Merck Millipore)を用いた平板法により、FRNAPHは、宿主菌として *E.coli* *kl2+(A/λ)*を用いた重層寒天培地法にて定量した。

一般水質としてSS、濁度、COD_{cr}、全窒素、全リン、波長254nmの紫外線吸光度の測定を行った。SSは下水試験方法¹⁸⁾に準拠し測定した。pHおよび濁度は、ポータブルpH計(LAQUAact、堀場製作所)、高感度濁度計(TR-55、笠原理化)を用い定量した。COD_{cr}、全窒素、全リンの測定はHACH社製の試薬を用い吸光光度計(DR-3900、HACH)により定量した。

2. 3 NoVの不活化効果の推定

2. 3. 1 試験水の採水

A下水処理場内に設置されている活性汚泥処理装置の処理水を試験水として用いて紫外線照射実験を行った。2017年11月から2018年1月の間に5回採水した試験水の水質を表-1に示す。なお、n数が10となっている理由としては、2.3.2で示すFRNAPHの高濃度液を用いた添加実験をそれぞれの試験水において実施しており、その時の試験水の水質測定も行っているためn数が2倍となっている。なお、FRNAPHの高濃度液添加後の水質変動はなかったことを確認している。不活化効果に影響するSSおよび濁度がそれぞれ1.3~6.7 mg/Lと0.1~2.8 NTUとばらついているが、最も影響する紫外線(254 nm)の透過率は75~81%と大きな差はなかったため、紫外線消毒における試験水間の水質の差は大きくないと考えられる。

2. 3. 2 紫外線消毒実験

図-3に示す光化学反应用装置(ウシオ電機)を用いて回分式紫外線消毒実験を実施した。紫外線ランプは6Wの低圧紫外線ランプ(ULO-6DQ、ウシオ電機)を用い、実験開始前に照度を安定させるために30分以上のウォームアップを行った。図-3の光化学反应用装置を4つ用いて試験水をそれぞれ600 mL入れた後、それぞれ所定の時間、紫外線を照射し、照射前後でのFRNAPH遺伝子群とNoVの濃度を定量した。しかし、実験で用いた試験水(活性汚泥処理装置の処理水)には、感染力を有する野生株のFRNAPH遺伝子群が紫外線消毒後に全て検出されるほど高濃度に存在していない。そのため、2.3.3の3)で示す高濃度に培養させたFRNAPH遺伝子群を添加した紫外線消毒実験も行った。試験水に2.3.3の3)で培養および精製した高濃度のFRNAPH GIからGIVのそれぞれの遺伝子群を初期濃度で約10⁷⁻⁸ MPN/Lとなるように添加し、添加なしと同様な条件にて紫外線消毒実験を行った。

各試験水を用いた紫外線消毒実験における紫外線照射量は、実験直後にヨウ素/ヨウ素酸イオンによる指標化学物質を用いた化学線量計により算定した¹⁹⁾。

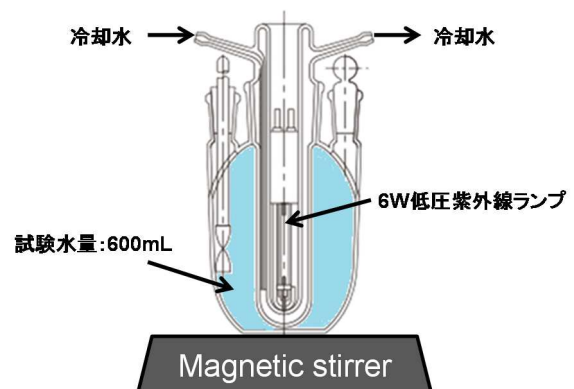


図-3 光化学反应用装置の概要

紫外線照射量の算定方法は参考文献¹⁹⁾に準拠し、式(6)にて各照射時間での紫外線照射量を求めた。

$$\text{UV fluence} \left(\frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2} \right) = \left[\left\{ \frac{(A_{352} - \text{Ablank}_{352})}{\varepsilon} \times V \right\} / \phi \right] / \text{Area} \quad (6)$$

ここで、UV fluenceは紫外線量 (mJ/cm²)、A₃₅₂は任意の照射時間での波長 352 nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度 (cm⁻¹)、A_{blank352}は紫外線照射前の波長 352 nm のヨウ素/ヨウ素酸イオンの吸光度 (cm⁻¹)、εはヨウ素/ヨウ素酸イオン溶液のモル吸光係数 (27600 M⁻¹ s⁻¹)、Vは容積 (600 mL)、φは量子収率 (-)、Areaは紫外線照射面積 (456 cm²) である。

2. 3. 3 FRNAPH の定量および高濃度 FRNAPH 液の作製

1) 感染力を有する FRNAPH の定量

感染力を有している GI~IV の FRNAPH 遺伝子群の定量には Integrated Culture-PCR (IC-PCR)^{20,21)}を用いた。この方法では、宿主菌の Typhimurium WG49 (以下、WG49) を用いて、試料中に存在する感染力の有る FRNAPH を液体培養し、PCR 法により増殖を確認する方法である。定量には MPN 法を用いており、0.01~100 mL までの試料を 10 倍段階の 3 連で培養することで定量値を得ており、単位は MPN/L として整理した。本実験での検出下限値は 3 MPN/L (約 0.5 log[MPN/L]) である。

2) FRNAPH 遺伝子の定量

GI~GIVのFRNAPH遺伝子群の遺伝子定量にはリアルタイムRT-qPCR法 (PCR) を用いた。まず、ポリエチレングリコールを用いたウイルス濃縮法によりサンプルを濃縮した。試験水および紫外線照射後のサンプル50~200 mLにポリエチレングリコール (PEG#6000、終濃度: 8%) とNaCl (終濃度: 0.4 M) を添加して攪拌し、完全に溶解させた。4°Cで1夜静置後、10000×Gで30分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣をRNase-free waterを用いて再懸濁させてウイルス濃縮液とした。ウイルス濃縮液からの核酸抽出は、QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (QIAGEN) およびQIAcube (QIAGEN) にて抽出した。なお、ウイルス濃縮液をRNA抽出カラムに通水し遺伝子を捕捉させる際、検出感度にバラツキが生じないように抽出カラム1本あたりのSS負荷量が0.05 mg-SS以下となるようにウイルス濃縮液の通水量を調整した。抽出したRNAは、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてRT反応を行い、cDNAを得た。この合成したcDNAをTaqMan[®]プローブを用いたPCRにより定量した。

TaqMan[®]Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて、QuantStudio[™] 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) により検出した。FRNAPH遺伝子群のプライマー、TaqManプローブの配列およびアニーリング温度はWolfら²²⁾の報告を参考にした。PCRにおける検出下限値は約1000 copies/L (約3 log[copies/L]) 程度となる。

RNA抽出効率およびRT-qPCR阻害の影響を把握する目的でRNA抽出に用いる濃縮後のサンプルにマウスノロウイルス (MNV) 高濃度液を添加して回収率を評価した²³⁾。なお、da Silva ら¹¹⁾は、回収率が10%を下回った場合は検出阻害が生じたと判断し、1%を下回った場合は深刻な検出阻害が生じたと判断すると報告している。本研究で行った全てのサンプルの回収率は、17~181% (中央値: 72%、n=50) であり大きな検出阻害は見られなかったため、ここではPCRによる定量値において回収率による補正は行っていない。

3) 高濃度 FRNAPH 液の作製

試験水中に存在する感染力を有したFRNAPH遺伝子群が紫外線消毒後において検出率が低いことが考えられたため、人為的に高濃度に培養した高濃度FRNAPH液を作製し、実験に用いた。2.3.3の1)で示したIC-PCRによる試験水中のFRNAPH濃度測定において、FRNAPHのGI~GIVの遺伝子群がそれぞれ高濃度で検出された液体培地を用い、宿主菌のWG49を含む新たな液体培地にGI~GIVの遺伝子群をそれぞれ添加した。この混合液を37°Cで24時間培養してGI~GIVのFRNAPH遺伝子群をそれぞれ再増殖させた。宿主菌を取り除くため、2000 rpm、4°Cで10分間遠心分離し、その上澄液を0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過した。なお、高濃度のFRNAPH液を紫外線消毒実験用試験水に直接添加すると、培地成分により試験水の水質性状が変化するため、試験水に添加する直前にAmiconUltra-15 (分画分子量100 kDa、Millipore) を用いて培地成分を除いた。作製したGI~GIVそれぞれの高濃度FRNAPH液において、他の遺伝子群は不検出あるいは低濃度になっていることを確認している。

4) NoV 遺伝子の定量

NoVはGIとGII遺伝子群を対象にして、2.3.3の2)と同様な手法により遺伝子濃度を定量した。NoV GIとGIIのプライマーとTaqManプローブの配列およびアニーリング温度はKageyamaら¹⁰⁾の報告を参考に

した。

5) 相関分析

本研究では、紫外線消毒実験における FRNAPH 遺伝子群の IC-PCR と PCR により得られた不活化効果と遺伝子低減効果の関係と、FRNAPH 遺伝子群と NoV との遺伝子低減効果の関係を調べるために、PASW Statistic 18 (SPSS) を用いて Pearson の相関分析を行った。

3. 研究結果

3. 1 抗生物質耐性大腸菌の紫外線消毒実験結果

3. 1. 1 紫外線照射による耐性大腸菌の不活化

1) 低圧紫外線照射

低圧紫外線ランプ照射による、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌 (ATCC25922) の生残率を図-4 に示す。図中の横軸は総相対殺菌有効放射照度 (I_{eff}) と照射時間 (s) の積で表される総相対殺菌有効放射線量 (mJ/cm^2) とし、縦軸は生残率とした。また、図中の回帰直線は不活化速度を表している。

0 剤・6 剤耐性大腸菌、純菌ともに概ね総相対殺菌有効放射線量に比例して不活化されている傾向が確認され、0 剤耐性大腸菌ならびに純菌の不活化はほぼ同様であり、90%不活化 (生残率=0.1) に要する総相対殺菌放射線量は、約 $1.4 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ であることが分かった。一方、6 剤耐性大腸菌は紫外線照射初期 ($0\sim 3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) では、純菌および 0 剤耐性大腸菌とは異なり、紫外線に対する抵抗を示しており、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約 $4.2 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ であった。0 剤耐性大腸菌および純菌よりも $3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ほど低圧紫外線ランプ照射に対して耐性を有していることが確認された。

0 剤耐性大腸菌および純菌は紫外線照射初期においては紫外線に対する抵抗を示しておらず、6 剤耐性大腸菌はいわゆる「肩」を持つ反応であった。また、0 剤・6 剤耐性大腸菌および純菌ともに総相対殺菌放射線量が $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上、生残率が 0.00001 (5Log) 以下になると、テーリング現象が確認された。紫外線照射におけるテーリング現象はしばしば報告されている。この現象が生じる明確な理由は定かではないが、紫外線耐性が全て同一な微生物であることが明らかの場合でもテーリング現象は生じる可能性があり、微生物同士の凝集により、単独で存在している微生物よりも見かけの紫外線耐性が大きくなる部分が生じることで起こりうると考えられている²⁴⁾。本実験においても同様な現象が生じたと考えられた。

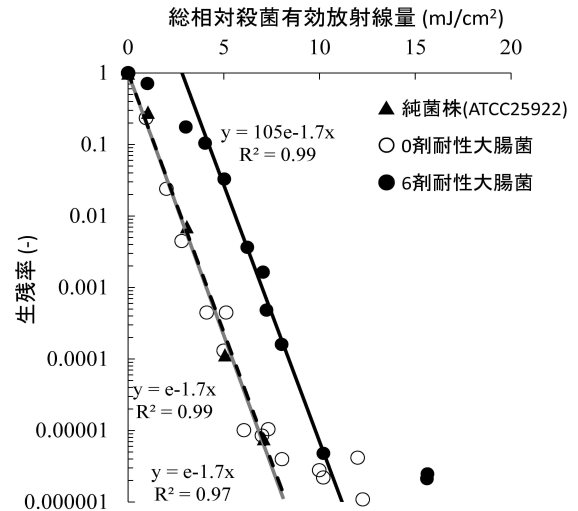


図-4 低圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌 (0剤, 6剤耐性大腸菌) および純菌大腸菌の不活化

図-4 より低圧紫外線ランプ照射時における、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌と純菌の不活化速度の違いを評価した。総相対殺菌放射線量が $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上でテーリング現象が確認されたため、 $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上のデータを除外し、総相対殺菌放射線量と生残率が一次反応であると仮定し不活化速度を算出した。6 剤耐性大腸菌は「肩」の存在が確認されたため、 $0\sim 3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ および $10 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。すなわち図中の回帰直線の傾きが不活化速度定数となる。その結果、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌ともに不活化速度は $1.7 (\text{cm}^2/\text{mJ})$ と顕著な差は確認されなかった。既往の研究結果⁹⁾によれば、コリメート試験による低圧紫外線照射における *Escherichia coli* は、「肩」を持たない反応であり、90%不活化に要する紫外線量は約 $1.8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 、不活化速度は紫外線量と生残率に比例し、約 $1.4 (\text{cm}^2/\text{mJ})$ と報告されており、本研究で検討した 0 剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は既往の研究結果とほぼ同様であった。

2) 中圧紫外線照射

中圧紫外線照射時における 0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌、純菌 (ATCC25922) の生残率を図-5 に示す。0 剤耐性大腸菌および 6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に、生残率は総相対殺菌有効放射線量に比例している傾向が確認された。0 剤耐性大腸菌および純菌は、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が約 $1.5\sim 1.8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ で、低圧紫外線ランプ照射時とほぼ同等であった。一方、6 剤耐

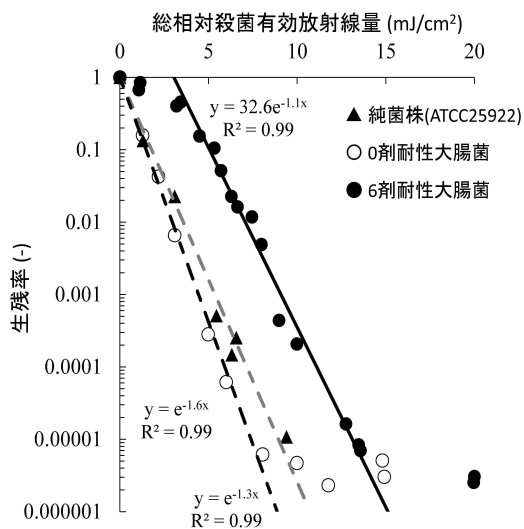


図-5 中圧紫外線ランプ照射による抗生物質耐性大腸菌(0剤, 6剤耐性大腸菌) および純菌大腸菌の不活化

性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量は約 6.9 mJ/cm²であり、中圧紫外線ランプを用いた際は、低圧紫外線ランプと同程度の不活化を得るためには、約 1.5 倍の紫外線量が必要となることが明らかとなった。

低圧紫外線ランプ照射時と同様に、各耐性大腸菌および純菌の不活化速度を把握するために、不活化速度を算出した。生残率が 0.00001 (5 log) 以下でテーリング現象が確認されたため、テーリング現象が確認された以降のデータを除き、総相対殺菌有効放射線量と生残率が比例すると仮定して不活化速度を算出した。なお 6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同様に照射初期で「肩」を持つ反応が確認されたため、総相対殺菌有効放射線量で 3 mJ/cm² 未満 10 mJ/cm² 以上のデータを除外し不活化速度を算出した。その結果、0 剤耐性大腸菌および純菌の不活化速度は低圧紫外線ランプ照射時と比較し、1.3~1.6 (cm²/mJ) でほぼ同等であった。6 剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時とは異なり、不活化速度が 1.1 (cm²/mJ) であり、低圧紫外線ランプ照射時よりも 67%程度、不活化速度が低下した。

中圧紫外線ランプは、低圧紫外線ランプの主波長である 254 nm 以外の紫外線、主に波長 200~400 nm の紫外線を放射する。本研究では、中圧紫外線ランプ照射における耐性大腸菌の不活化には、紫外線光量計、試料吸光度分布、ランプの発光波長分布 (エネルギー分布)、DNA 波長感受性分布を全て考慮し

た、式(2)における総相対殺菌放射線量を算定し、照射時間を乗じた総相対殺菌放射線量で評価し、低圧紫外線ランプ照射時と比較した。式(2)を用いることで、紫外線の不活化に寄与する波長のエネルギー全てを勘案して不活化を評価することができ、中圧紫外線ランプ照射時は、低圧紫外線照射時よりも、波長 254 nm 以外の他波長の紫外線が不活化に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、0 剤耐性大腸菌および純菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射時と比較して、90%不活化に要する紫外線量ならびに不活化速度が同程度であったのに対して、6 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時の方が、不活化速度が速く、90%不活化に要する総相対殺菌放射線量が小さかった。

以上より、0 剤耐性大腸菌、6 剤耐性大腸菌ともに波長 254 nm 以外の紫外線が不活化に及ぼす影響が小さかった可能性が考えられた。また、6 剤耐性大腸菌の不活化速度が、0 剤耐性大腸菌とは異なり、中圧紫外線ランプ照射時に低下したのは、波長 254 nm 以外の波長の紫外線の寄与以外にも、式(2)からも判断できるように DNA の紫外線に対する波長感受性が異なるためではないかと考え、不活化速度差異について微生物の薬剤耐性機構や我々の既往の研究結果⁸⁾から推察した。

微生物の薬剤耐性機構は、主に①外膜透過孔の減少による薬剤の不透過、②取り込んだ薬剤の菌体外への排出、③不活化酵素の産出などが知られている²⁵⁾。また既往の研究結果⁸⁾では、塩素消毒後に 1 剤あるいは 2 剤以上の抗生物質に耐性を有する多剤耐性大腸菌の割合が上昇する報告がある。すなわち、抗生物質に対する耐性を有している大腸菌は、上記①~③の作用が生じている可能性が考えられ、特にその内①の作用による耐性大腸菌の細胞膜が変質した事で、6 剤耐性大腸菌は、0 剤耐性大腸菌、純菌とは表面タンパク質の DNA の変質により、結果として紫外線に対する抵抗や感受性が変化したのではないかと推察した。しかしながら、本研究では厳密に 6 剤耐性大腸菌の遺伝情報等の解析がなされていないため、これらはあくまでも推察の領域である。

3. 1. 2 可視光照射による耐性大腸菌の光回復

0 剤耐性菌、6 剤耐性菌の可視光照射による光回復の結果を図-6 に示す。図中の横軸は照射時間 (min) とし、縦軸は光回復後の生残率とした。また式(5)におけるモデル式より算出した可視光照射時間 t 分での生残率を実線および破線で図中に示した。式(5)に

おける光回復のモデル式の計算値と実測値では、総相対殺菌有効放射線量が小さい場合、光回復の回復初期で実測値の間に若干の乖離が生じていたが、概ね本研究で検討した光回復の予測式と実測値との間に整合性が確認された。

1) 0 剤耐性大腸菌の光回復

低圧紫外線ランプ照射後（図-6 (a)）における光回復量は、総相対有効殺菌放射線量 10 mJ/cm^2 程度では、概ね 3 log （1000 倍）光回復する傾向が確認されたが、 12 mJ/cm^2 以上照射することで、 1 log 程度に抑制された。

中圧紫外線ランプ照射後（図-6 (b)）は、 3 mJ/cm^2 の低放射線量では 2 log 不活化されるが、90 分の可視光ランプ照射後は 7 割程度、耐性菌濃度が回復した。低圧紫外線ランプ照射時と同様に 10 mJ/cm^2 程度では、約 3 log 光回復することが確認されたが、 15 mJ/cm^2 以上照射することで、光回復が 1 log 程度

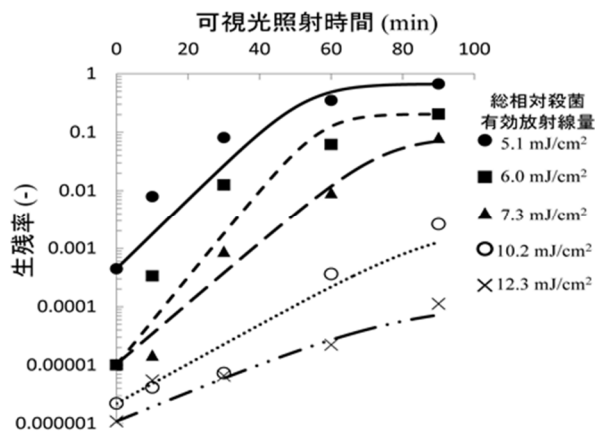
に抑制された。

2) 6 剤耐性大腸菌の光回復

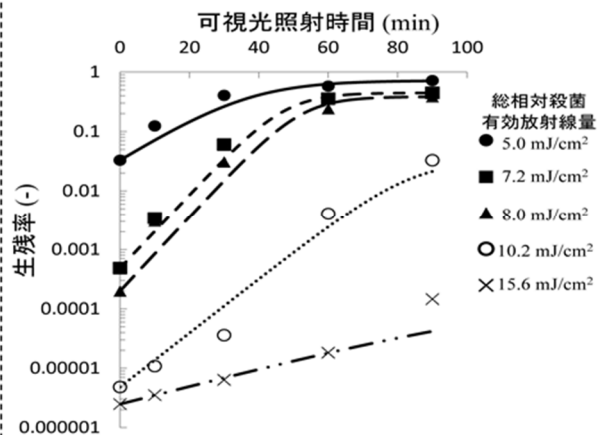
低圧紫外線ランプによる 8 mJ/cm^2 までの照射では、可視光ランプ照射後 90 分で紫外線照射初期の濃度の 4~8 割程度回復する傾向が確認された。 10 mJ/cm^2 照射すれば 6 剤耐性大腸菌を 5 log 不活化可能であったが、可視光ランプ照射により 3 log 光回復し、 15 mJ/cm^2 照射することで光回復を 1 log 程度に抑制できることが確認された。

中圧紫外線ランプ照射後の光回復は、低圧紫外線ランプ照射時と同様の傾向を示しており、 10 mJ/cm^2 以下では紫外線照射初期濃度の 4~8 割程度まで回復した。一方 10 mJ/cm^2 を超える照射量であっても 20 mJ/cm^2 未満では、中圧紫外線ランプで 5 log 程度不活化可能であるが、光回復により約 3 log 回復する傾向が確認され、 20 mJ/cm^2 の照射で光回復を 1 log に抑制できることが確認された。

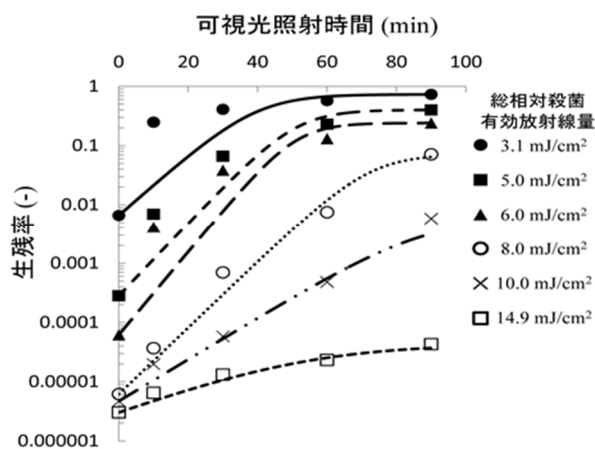
(a): 低圧紫外線ランプ照射時後の0剤耐性大腸菌の光回復



(c): 低圧紫外線ランプ照射時後の6剤耐性大腸菌の光回復



(b): 中圧紫外線ランプ照射時後の0剤耐性大腸菌の光回復



(d): 中圧紫外線ランプ照射時後の6剤耐性大腸菌の光回復

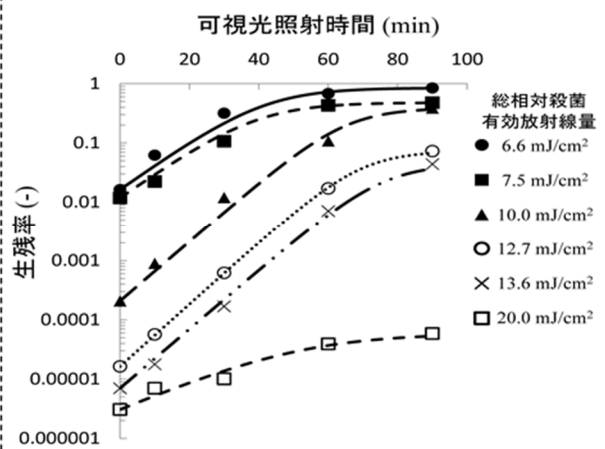


図-6 低圧・中圧紫外線ランプ照射後の0剤, 6剤耐性大腸菌の光回復

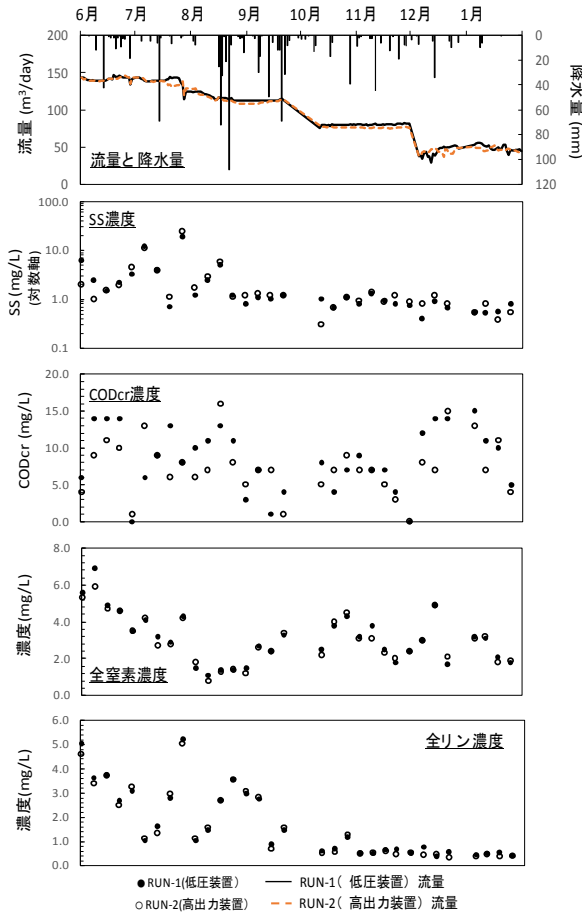


図-7 調査期間中(2016/6~2017/1)の流入原水の水質変動

3. 2 連続通水による長期運転での紫外線消毒実験結果

3. 2. 1 一般水質データ

調査期間中の流入原水の流量変動、SS濃度、CODcr濃度、全窒素濃度、全リン濃度を図-7に示す。併せて採水当日の降水量を棒グラフで示した。同様に図-8には紫外線照射後の水質を示す。調査期間中を通して、原水、処理水ともにSS濃度の変動係数(CV)は150~170%、CODcrのCVは50%、全窒素および全リンのCVは80%程度で原水中の水質変動が大きかった。一方、紫外線照射前後で顕著な水質の変化は確認されなかった。なおpHは調査期間中では、照射前後で大きな変化はなく、概ねpH = 6.4~7.2の範囲で推移していた。

3. 2. 2 大腸菌群、大腸菌、FRNAPH濃度

図-9に低圧装置(RUN-1)、図-10に高出力装置(RUN-2)の紫外線照射前後の大腸菌、大腸菌群、野生株のFRNAPH濃度を示す。各図より、流入原水中の大腸菌群濃度は概ね 10^3 CFU/mL、大腸菌は約 10^1 ~ 10^2 CFU/mLで推移しており、FRNAPHは数~数

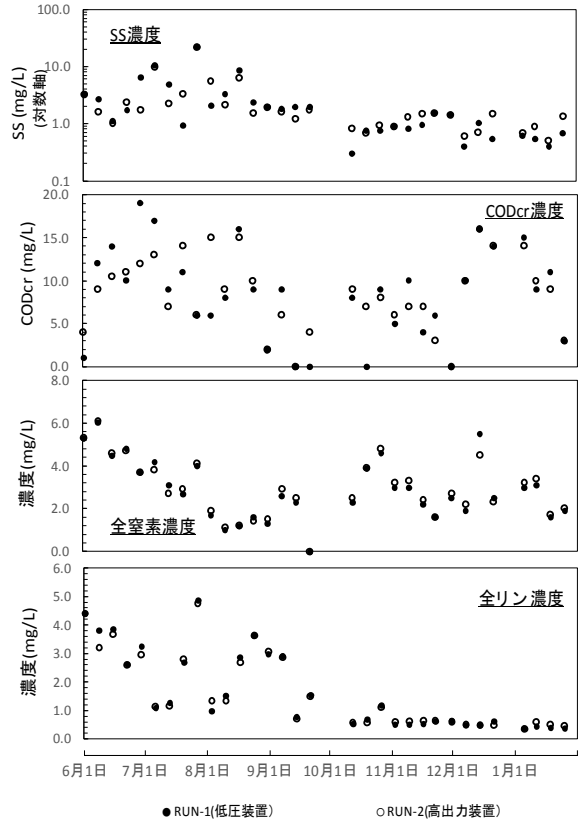


図-8 調査期間中(2016/6~2017/1)の紫外線照射後の処理水の水質変動

十 PFU/mLで検出され、検出率は96.8%であった。

低圧装置における処理水中の大腸菌群の検出率は100%で、その平均不活化率は約1.7 logであった。同様に大腸菌の検出率は78%であり、平均不活化率は約2.2 logであった。一方、高出力装置では、大腸菌群の平均不活化率は1.2 log(検出率100%)、大腸菌は約1.8 log(検出率97%)であった。

本調査で使用した低圧装置と高出力装置とは、容積が異なるため、装置内の平均滞留時間に違いが生じるが、装置内の流動特性、すなわち装置内の混合拡散状態と滞留時間分布が同一であると仮定した。式(7)より双方の装置の紫外線照射前後の大腸菌および大腸菌群濃度から、同一条件における不活化効果の違いを評価した。

$$\frac{C_{t-L}}{C_{0-L}} = \frac{(I_{avg-L}/65W) \cdot V_L \cdot Q}{D_{10}} \quad (7)$$

$$\frac{C_{t-H}}{C_{0-H}} = \frac{(I_{avg-H}/60W) \cdot V_H \cdot Q}{D_{10}}$$

ここで、 C_{0-H} 、 C_{0-L} は高出力および低圧装置の微生物初期濃度、 C_{t-H} 、 C_{t-L} は高出力および低圧装置の紫外線照射後の微生物濃度、 I_{avg-H} 、 I_{avg-L} は高出力および

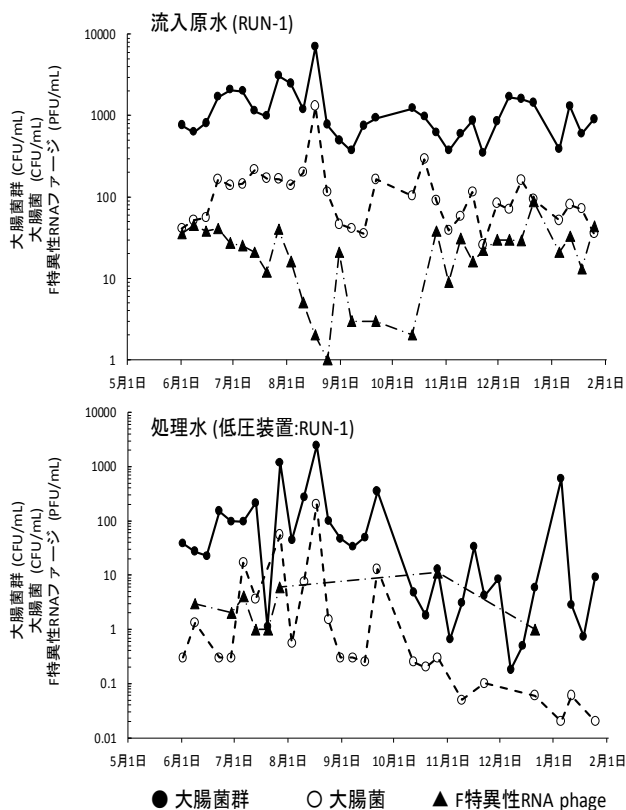


図-9 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、FRNAPH の濃度推移 (低圧装置)
(不検出のデータは図に表示していない)

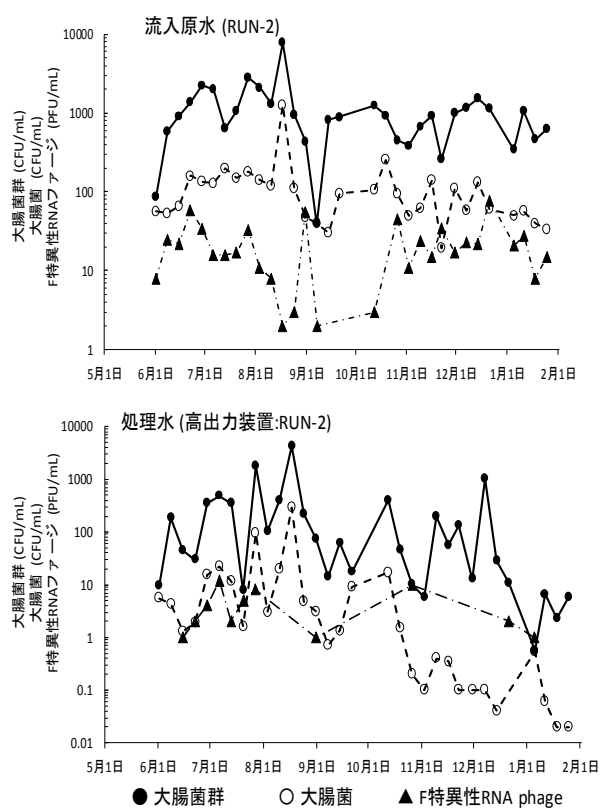


図-10 紫外線照射前後の大腸菌群、大腸菌、F RNAPH の濃度推移 (高出力型装置)
(不検出のデータは図に表示していない)

び低圧装置の平均紫外線照度、 V_H 、 V_L は高出力および低圧装置の容積、 Q は流量、 D_{10} は対象微生物が 1 log 不活化するのに必要な紫外線量である。

式(7)において双方の装置における出力 W 数が異なるため、単位 W 数あたりの平均紫外線照度 (I_{avg}) の比が直接不活化率に対応している。また式(7)の D_{10} は対象となる微生物が 1 log 不活化するのに必要な紫外線量となるため、同微生物で比較した場合は同値となる。

以上より、高出力装置による大腸菌群の不活化効果は低圧装置に比較して 1.4 倍、大腸菌では 1.7 倍と試算された。

原水中の FRNAPH は低濃度であったが約 95%と高い検出率であり、概ね数 PFU/mL~90 PFU/mL の範囲で推移していた。低圧装置の処理水においては調査期間中の検出率は 28.3%、高出力装置で 38.5% (不検出のデータも考慮) であり、平均除去率は各々、1.1 log、1.0 log であった。高出力装置の FRNAPH に対する紫外線消毒効果は装置内流動特性が同一であると仮定し、式(7)で示した試算と同様に算出すると、低圧装置の約 2 倍の消毒効果であると試算された。

また、水質変動による消毒効果への影響として、原水中の SS (0.2~30 mg/L)、 COD_{Cr} (0.1~17 mg/L)、全窒素 (0.5~7.5 mg/L) および全リン (0.2~5.4 mg/L) の変動が大きかったにもかかわらず、処理水中の FRNAPH は 1~10 PFU/mL の間であり、安定的に不活化されていた。このため、通常の二次処理水の水質変動範囲であれば紫外線消毒によるウイルスの消毒効果への影響は小さいことが考えられた。

3. 3 NoV の不活化効果の推定結果

3. 3. 1 紫外線消毒による不活化効果

紫外線消毒による試験水中に存在する野生株の FRNAPH 遺伝子群 (添加なし) の不活化効果を IC-PCRにより定量し算出した結果 (図-11の○), GIV が最も高く、GIII、GII、GIの順であり、GIが最も紫外線に対する耐性が強かった。紫外線照射量を増加させることで、全てのFRNAPH遺伝子群の不活化効果においてテーリング現象が見られた。テーリングした値を除外した近似曲線から不活化速度定数 ($y = k_i x$ の傾き: k_i) を求めると、GIは0.060、GIIIは0.071、GIIIは0.100、GIVは0.117であった。人為的に高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を用いて添加した紫外

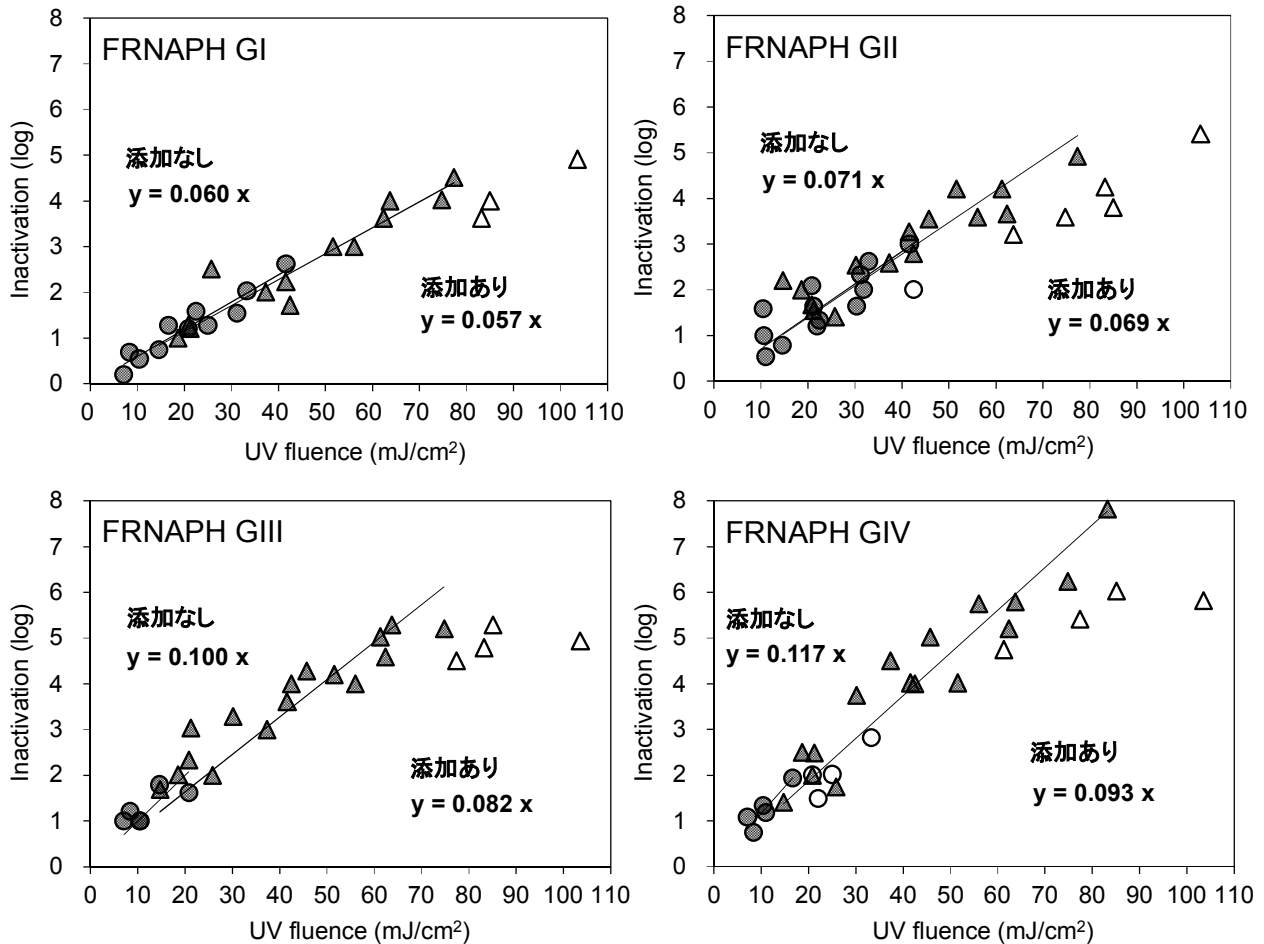


図-11 紫外線消毒実験における感染力を有したFRNAPH遺伝子群の不活化効果の比較

(○：添加なし、△：添加あり、白抜き：テーリング時の除去率と判断して近似曲線を求める際に除外した値、紫外線消毒後に検出下限以下であった不活化率は除外している)

線消毒実験では(図-11の△)、添加なしと同様にGIVの紫外線感受性が最も高く、GIII、GII、GIの順であり、GIが最も低かった。同じくテーリングした値を除外した近似曲線より添加したFRNAPH遺伝子群の不活化速度定数(k_i)を求めると、GIは0.057、GIIは0.069、GIIIは0.082、GIVは0.093となり、添加なしと比べて大きな差は無かった。

下水処理水を用いた膜と紫外線処理を組み合わせた処理プロセスにおいて、紫外線消毒でGIが最も紫外線に対する耐性が強く(k_i : 0.044)、その次がGII(k_i : 0.050)であったことが報告されている²¹⁾。また、下水処理場の最初沈澱池越流水中に存在するFRNAPH遺伝子群の紫外線感受性を評価した結果、GIが最も低く(k_i : 0.041)、GII(k_i : 0.055)、GIII(k_i : 0.072)、GIV(k_i : 0.094)の順であり²¹⁾、本研究での結果と同様であった。しかし、不活化速度定数(k_i)は先の報告例²¹⁾と比較して今回の方がやや高くなっ

ていた。これは紫外線照射効果に影響する紫外線(254 nm)透過率などが異なるためであることが推察される。一方、人為的に高濃度に培養して添加したFRNAPH遺伝子群の不活化効果と、元々試験水中に存在していたFRNAPH遺伝子群の不活化効果に大きな差は無かったことから、高濃度のFRNAPH遺伝子群液を用いることで紫外線消毒によるよりの確な不活化効果の評価が可能であると考えられた。

3. 3. 2 紫外線消毒による遺伝子低減効果

紫外線消毒による野生株のFRNAPH遺伝子群(添加なし)の遺伝子低減効果をPCRにより定量し算出した結果(図-12の○)、GIVが最も高く、GII、GIの順であり、近似曲線により遺伝子低減速度定数($y = k_r x$ の傾き: k_r)を求めると、GIVは0.015、GIIIは0.010、GIは0.006であった。人為的に高濃度に培養したFRNAPH遺伝子群を用いて添加した紫外線消毒実験では(図-12の△)、PCRにより定量出来なかったGIVを除き、添加なしと同様にGIの遺伝子低減効果が最

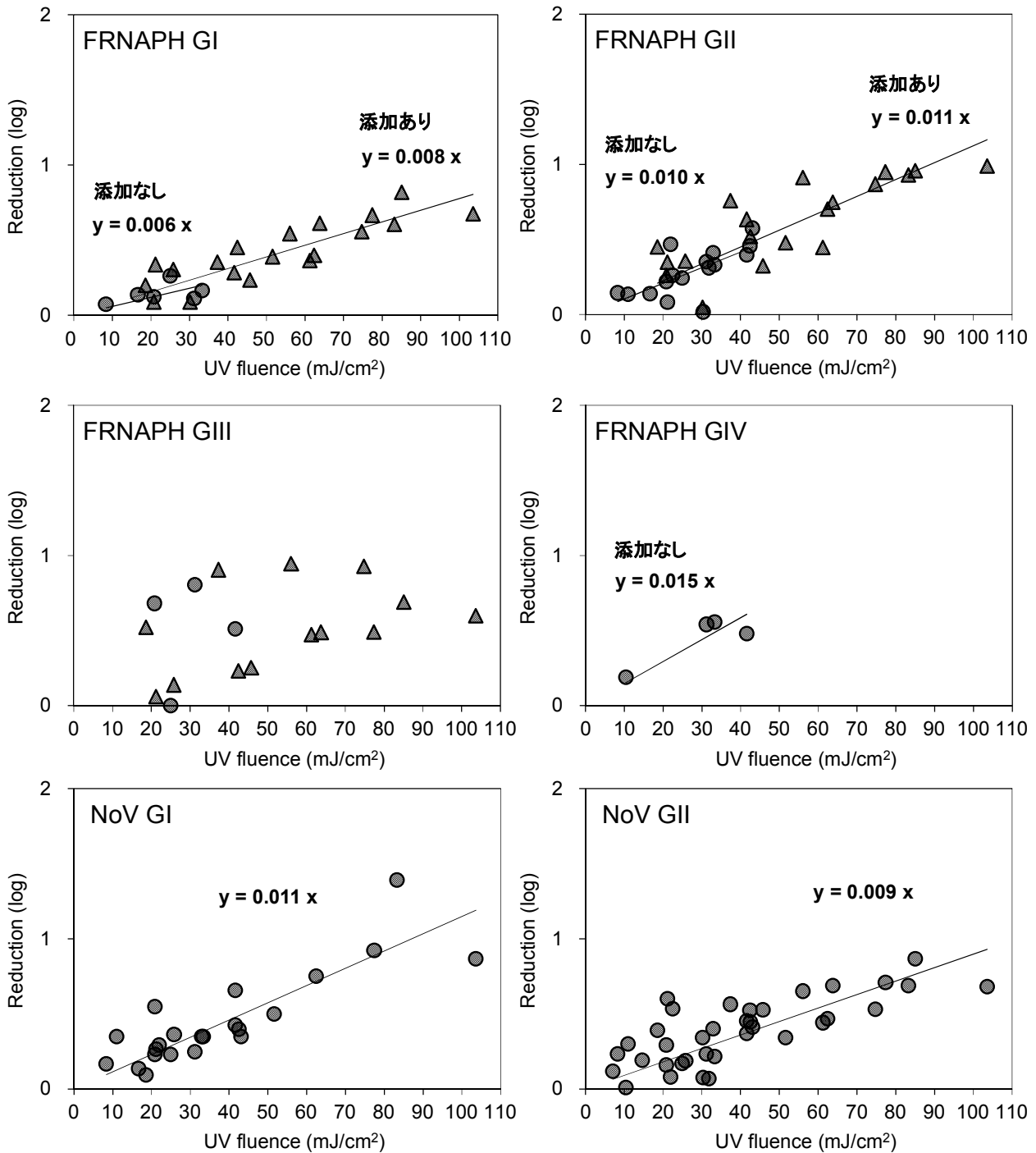


図-12 紫外線消毒実験におけるFRNAPH遺伝子群とNoVの遺伝子低減効果の比較 (○: 添加なし, △: 添加あり)

も低く (k_r : 0.008)、次いでGII (k_r : 0.011)であった。一方、添加なしと添加ありの紫外線消毒実験におけるGIIIの遺伝子低減効果は紫外線照射量の増加により線形に向上せず、近似曲線を引くことができなかったため遺伝子低減速度定数を求めることはできなかった。紫外線消毒における試験水中に存在するNoVの遺伝子低減効果は (図-12)、NoV GIとGIIともに紫外線照射量を増加させることで線形に向上

する傾向が見られた。そこで、近似曲線から遺伝子低減速度定数 (k_r) を求めると、NoV GIは0.011、NoV GIIは0.009であり、NoV GI遺伝子の方が紫外線感受性が高かった。

遺伝子低減速度定数 (k_r) が求められたFRNAPH GI、GII、GIVにおいて不活化速度定数 (k_i) と比較すると、不活化速度定数 (k_i) が遺伝子低減速度定数 (k_r) より6~10倍高くなっていたが、その関係を見るとGI

< GII < GIVと紫外線感受性については同じ傾向を示していた。このことは、紫外線消毒における遺伝子低減効果は、感染力を含めた不活化効果の結果を反映している可能性が考えられる。紫外線によるウイルスの不活化機構は直接遺伝子に作用して感染力を失わせる。しかし、PCRでは検出対象としている遺伝子の増幅領域が短いため、対象とした増幅領域部分の遺伝子が紫外線により損傷しない限りPCRにより検出されてしまう。そのため、紫外線照射前後においてPCRによる遺伝子濃度がほとんど減少しないことも報告されている^{26), 27)}。一方、紫外線照射量を増加させることによりPCRの検出に用いる増幅領域の遺伝子部分にも損傷が生じることで遺伝子濃度が減少することも報告されている^{28), 29)}。本研究でも紫外線照射量を増加させることで線形に遺伝子濃度が減少する傾向が確認されており(図-12のFRNAPH GI、GII、GIV、NoV GI、NoV GII)、紫外線消毒による遺伝子低減効果は不活化効果を反映している可能性が示唆された。また、紫外線によりNoV GIの遺伝子の方がNoV GIIと比べてより減少しやすい傾向があることが報告されている²⁸⁾。本研究の結果においても紫外線消毒による遺伝子低減速度定数 (k_r) がNoV GIIと比べてNoV GIの方が大きかったことから、既報の研究結果と合致していた。

3. 3. 3 紫外線消毒によるNoVの不活化効果の推定

1) 遺伝子低減効果から不活化効果の推定

遺伝子低減効果から不活化効果の推定を行うため、FRNAPHのそれぞれの遺伝子群においてIC-PCRにより得られた不活化効果とPCRにより得た遺伝子低減効果の関係を評価した(表-2)。FRNAPH GIとGIIの不活化効果と遺伝子低減効果との相関係数が0.88と0.71であり有意な相関関係を示した($p < 0.01$)。しかし、GIIIにおいては相関関係が見られなかった。また、GIVはn数が少なかつたため相関分析は行っていない。

FRNAPH GIとGIIの結果から、紫外線消毒による不活化効果と遺伝子低減効果の間に有意な相関関係が示されたことから、遺伝子低減効果から不活化効果を推定できる可能性が考えられる。そこで、FRNAPH GIとGIIの遺伝子低減速度定数 (k_r) からそれぞれの不活化速度定数 (k_i) を求めるための倍率を調べた結果(表-3)、添加なしでGIは10倍、GIIは7.1倍、添加ありでGIは7.1倍、GIIは6.3倍であった。添加なしでは45 mJ/cm²以上の紫外線照射量での不活化効果が反映できなかったことや(45 mJ/cm²以上

表-2 FRNAPH 遺伝子群の IC-PCR (不活化効果) と PCR (遺伝子低減効果) との相関関係

FRNAPH	相関係数 (n数)			
	GI	GII	GIII	GIV
IC-PCR vs PCR	0.88** (n=22)	0.71** (n=34)	0.22 (n=14)	-

**:<0.01

表-3 FRNAPH GI と GII における遺伝子低減効果から不活化効果の計算倍率

	FRNAPH GI		FRNAPH GII	
	添加なし	添加あり	添加なし	添加あり
遺伝子低減速度定数(k_r)	0.006	0.008	0.010	0.011
↓ × 倍率	↓ × 10	↓ × 7.1	↓ × 7.1	↓ × 6.3
不活化速度定数(k_i)	0.060	0.057	0.071	0.069

では全て検出下限値以下であったため不活化効果の評価ができなかった)、安全側の評価とするとFRNAPH GIの7.1倍とGIIの6.3倍が妥当と考えられた。

2) FRNAPH の不活化効果から NoV の不活化効果の推定

紫外線消毒によるNoVの不活化効果を推定するため、同じ測定手法であるPCRで得たFRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の関係を評価した(表-4)。NoV GIとGIIともにFRNAPH GIおよびGIIと有意な相関関係が得られた(相関係数: 0.54~0.86)。NoV GIはFRNAPH GIIと最も相関があり(相関係数: 0.55、 $p < 0.01$)、NoV GIIはFRNAPH GIと最も相関があった(相関係数: 0.86、 $p < 0.01$)。紫外線消毒においてFRNAPH (GIとGII) とNoVの遺伝子低減効果の間に相関関係が得られたことから、これらの不活化効果の間にも相関関係がある可能性が示唆される。また、3.3.3の1)での結果で遺伝子低減効果と不活化効果の間には相関関係があったことから、NoVにおいても遺伝子低減効果と不活化効果に相関関係がある可能性が考えられる。そこで、NoVにおいても遺伝子低減効果と不活化効果に相関関係があるとの前提の上、FRNAPHにおける遺伝子低減効果から、上記の不活化速度定数の倍率を用いてNoVの不活化効果を推算した(表-5)。推算されたNoVの不活化速度定数 (k_i) は、NoV GIは0.078 (FRNAPH GIから) と0.069 (FRNAPH GIIから) であり、NoV GIIは0.064

(FRNAPH GIから)と0.057 (FRNAPH GIIから)であった(表-5)。これらの不活化速度定数 (k_i) から NoVを1 log不活化するために必要な紫外線照射量を求めると、NoV GIは12.8~14.4 mJ/cm²、NoV GIIは15.6~17.6 mJ/cm²が必要である結果となった。これらの結果から、下水処理水中のNoVを2~3 log以上不活化させるための紫外線照射量は、35~53 mJ/cm²以上必要であることが推算された。

4. まとめ

本研究では、代替消毒法として紫外線消毒の効果を新たなリスク要因の観点から評価するとともに、分子生物学的手法によるウイルス不活化評価技術の提案を目的に、①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価、②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価、③ウイルス不活化評価技術の提案について検討を行った。得られた結果を以下にまとめる。

「①新たな指標に基づく紫外線消毒法の評価」

- 1) 低圧紫外線ランプ照射による不活化速度は、0、6 剤耐性大腸菌とも 1.7 (cm²/mJ) 程度であり、1 log の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0 剤耐性大腸菌で約 1.4 mJ/cm²、6 剤耐性大腸菌で約 4.2 mJ/cm²であった。
- 2) 中圧紫外線ランプ照射による不活化速度は、0 剤耐性大腸菌は低圧紫外線ランプ照射時と同程度で 1.3~1.6 (cm²/mJ) であった。6 剤耐性大腸菌は、低圧紫外線ランプ照射時と異なり、不活化速度が 1.1 (cm²/mJ) であった。中圧紫外線ランプ照射において 1 log の不活化に要する総相対殺菌有効放射線量は、0 剤耐性大腸菌で約 1.5 mJ/cm²、6 剤耐性菌で約 6.9 mJ/cm²であった。
- 3) 紫外線照射後の光回復においては、0 剤耐性大腸菌は、低圧・中圧紫外線ランプ照射で 10 mJ/cm² 以下では、約 3 log 光回復することが確認されたが、15 mJ/cm² 以上照射することで、光回復が 1 log 程度に抑制された。
- 4) 6 剤耐性大腸菌の光回復は、低圧紫外線ランプ照射で 10 mJ/cm² とすれば 5 log の不活化が可能であったが、可視光ランプ照射により 3 log 光回復し、15 mJ/cm² の照射で光回復を 1 log 程度に抑制できることが確認された。中圧紫外線ランプ照射時は、20 mJ/cm² で 5 log 程度の不活化が可能であり、光回復も 1 log 程度に抑制できることが確認された。
- 5) 6 剤耐性大腸菌の 3 log 不活化効果を見込む場合、

表-4 FRNAPH と NoVs との相関関係

FRNAPH (PCR)	相関係数 (n数)			
	GI	GII	GIII	GIV
NoV GI (PCR)	0.54* (n=19)	0.55** (n=24)	-	-
NoV GII (PCR)	0.86** (n=24)	0.77** (n=33)	-	-

*:<0.05, **:<0.01

表-5 FRNAPH から NoV の不活化効果の推定

FRNAPH	NoV GI		NoV GII	
	GI	GII	GI	GII
遺伝子低減速度定数(k_i)	0.011	0.011	0.009	0.009
↓ × 倍率	↓ × 7.1	↓ × 6.3	↓ × 7.1	↓ × 6.3
推算した不活化速度定数(k_i)	0.078	0.069	0.064	0.057
1 log不活化に必要な紫外線照射量(mJ/cm ²)	12.8	14.4	15.6	17.6

低圧紫外線ランプ照射時では 15 mJ/cm² 以上、中圧紫外線ランプ照射時では 20 mJ/cm² 以上の照射量が必要であることが分かった。

「②処理水質が消毒効果へ及ぼす影響評価」

- 1) 高出力装置による大腸菌群の不活化効果は、装置内滞留時間を考慮すると低圧装置と比較して 1.4 倍、大腸菌では 1.7 倍向上すると試算された。
- 2) 原水中の SS、COD_{cr}、全窒素および全リンの変動が大きかったにもかかわらず、処理水中の FRNAPH は 1~10 PFU/mL の間であり、安定的に不活化されていた。このことから、本調査期間中における下水処理水の溶存物質、SS の濃度範囲内では、紫外線消毒によるウイルスの消毒効果への影響は少ないことが分かった。

「③ウイルス不活化評価技術の提案」

- 1) 紫外線消毒による FRNAPH 遺伝子群の不活化効果は、GIV が最も高く、GIII、GII、GI の順であり、GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。
- 2) 紫外線消毒による FRNAPH 遺伝子群の遺伝子低減効果は不活化効果と同じく、GIV が最も高く、GII、GI の順であり、GI が最も紫外線に対する耐性が強かった。
- 3) FRNAPH GI と GII において、IC-PCR により得られ

た不活化効果とPCRにより得た遺伝子低減効果の間に有意な相関関係を示したことから、遺伝子低減効果から不活化効果を推定できる可能性が示唆された。

- 4) FRNAPH遺伝子群とNoVの遺伝子低減効果の関係を評価した結果、NoV GIとGIIともにFRNAPH GIおよびGIIと有意な相関関係を示したことから、FRNAPH遺伝子群を用いてNoVの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。
- 5) FRNAPH遺伝子群を用いてNoVの不活化速度定数(k_i)を推算した結果、下水処理水中のNoVを2~3 log以上不活化させるためには35~53 mJ/cm²以上の紫外線照射量が必要とであることが示された。このことから、FRNAPH遺伝子群の利用によりノロウイルスの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 創薬促進検討委員会・抗微生物薬適正使用推進委員会:「提言第2弾, 世界的協調の中で進められる耐性菌対策」、
<http://www.kansensho.or.jp/news/gakkai/pdf/1603_resistant_bacteria_measures_02.pdf> [参照 2018年6月8日]
- 2) Trevors, J.T.: “Survival of Echerichia coli donor, recipient and trans conjugant cells in soil”, *Water, Air, and Soil Pollution*, 34(4), pp.409–14, 1987
- 3) Reinthaler, F.F. et al: “Antibiotic resistance of E.coli in sewage and sludge”, *Water Research*, 37, pp.1685–90, 2003.
- 4) 清野敦子他:「金目川, 鶴見川, 多摩川における薬剤耐性大腸菌の分布」、*水環境学会誌*, (27) 11, pp.693–8, 2003
- 5) 岡本誠一郎他:「水環境中における病原微生物の消長に関する研究」、平成22年度下水道関係調査研究年次報告書, 土木研究所資料, 第4212号, pp.103–11, 2011
- 6) Korzeniewska, E.: “Emission of bacteria and fungi in the air from wastewater treatment plants - a review”, *Front Biosci (Schol Ed)*, pp.393-407, 2011
- 7) 公益社団法人 日本下水道協会:「平成25年度版 下水道統計」、第70号、CD-R、2015
- 8) 諏訪守他:「下水処理水における抗生物質大腸菌の実態」、*下水道協会誌論文集*, 54(652)、pp.89–96, 2017
- 9) Hijnen, W.A. et al: “Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review”, *Water Research*, 40, pp.3–22, 2006
- 10) Kageyama, T. et al: “Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR”, *J. Clin. Microbiol.*, 41(4), pp.1548–1557, 2003
- 11) da Silva, A. K. et al: “Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, pp.7891–7897, 2007
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute: “CLSI Approved Standard Tenth ed.”, M2–A10, 2009
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute: “CLSI Approved Standard Tenth ed.”, M100–S19, 2009
- 14) Linden, K.G. et al: “Disinfection Efficiency and Dose Measurement of Polychromatic UV Light”, *AWWA Research Foundation*, pp.37–43, 2003
- 15) Dulbecco, R.: “Photoreactivation”, *Radiation Biology*, 2, pp.455–486, 1955
- 16) 鹿嶋田浩二他:「紫外線照射水処理における光回復の評価」、*水環境学会誌*, 18(1), pp.44–50, 1995
- 17) Sanz, E. et al: “Modelling of reactivation after UV disinfection: Effect of UV-C dose on subsequent photoreactivation and dark repair”, *Water Research*, 41, pp.3141–3151, 2007
- 18) 公益社団法人 日本下水道協会:「下水試験方法 上巻」、CD-ROM、2012
- 19) Rahn, R., O. et al: “Quantum yield of the iodide-iodate chemical actinometer: dependence on wavelength and concentrations”, *Photochem. Photobiol.*, 78, pp. 146–152, 2003
- 20) Hata, A. et al: “Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, pp. 4244–4252, 2016
- 21) Lee, S. et al: “Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes”, *Environ. Technol.*, in press
- 22) Wolf, S. et al: “Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR”, *J. Virol. Methods*, 149, pp. 123–128, 2008
- 23) Kitajima, M. et al: “Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses”, *J. Virol. Methods*, 169, pp. 269–273, 2010
- 24) 平田強編他:「紫外線照射 ー水の消毒への適用性ー」、

技報堂出版、pp.43–44, 2008

- 25) 橋本一他:「病原菌の薬剤耐性 機構の解明とその対策」、学会出版センター、pp.6–10、1993
- 26) Flannery, J. et al: “Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters”, *Water Res.*, 47, pp. 5222–5231, 2013
- 27) Qiu, Y. et al: “Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada”, *J. Appl. Microbiol.*, 119, pp. 1729–1739, 2015
- 28) Barrett, M. et al: “Detection, fate and inactivation of pathogenic norovirus employing settlement and UV treatment in wastewater treatment facilities”, *Sci. Total Environ.*, 568, pp. 1026–1036, 2016
- 29) Lee, J. et al: “Inactivation and UV disinfection of murine norovirus with TiO₂ under various environmental conditions”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, pp. 2111–2117, 2008

A STUDY ON ADVANCED DISINFECTION TECHNOLOGY IN TREATED SEWAGE CORRESPONDING TO DIVERSIFYING INFECTIOUS DISEASES

Research Period : FY2015-2017

Research Team : Materials and Resources
Research Group

Author : SHIGEMURA Hiroyuki

SUWA Mamoru

LEE Suntae

Abstract : This study estimates the inactivation of antibiotic resistant *Escherichia coli* and norovirus (NoV) by ultraviolet (UV) disinfection. For evaluating the inactivation of norovirus, we used the F-specific RNA bacteriophage (FRNAPH) genotypes determined by the two different quantification methods: polymerase chain reaction (PCR) assay, which can detect FRNAPH genotypes genomes; integrated culture-PCR assay, which can detect infectious FRNAPH genotypes.

The six antibiotics (ampicillin, gentamicin, cefdinir, kanamycin, tetracycline, sulfamethoxazole-trimethoprim)-resistance *E. coli* require higher UV fluence for the 3 log inactivation as compared with non-antibiotic resistant *E. coli*. The amount of dissolved matter and suspended solids in the secondary effluent of wastewater treatment plant is unaffected by the inactivation of viruses by UV disinfection in this study. More than 35–53 mJ/cm² of UV fluence was needed for a 2–3 log reduction of NoV by calculating the inactivation-genome reduction of FRNAPH genotypes. This suggests that FRNAPH genotypes could be used as an indicator of NoV inactivation by UV disinfection.

Key words : antibiotic-resistance *E. coli*, ultraviolet disinfection, norovirus, F-specific RNA bacteriophage