

機関番号：32701

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20360243

研究課題名 (和文) 排水処理による新興病原微生物の制御に関する研究

研究課題名 (英文) Study on inactivation and removal efficacy of emerging infectious microorganisms in effluent waters

研究代表者

森田 重光 (MORITA SHIGEMITSU)

麻布大学・環境保健学部・准教授

研究者番号：50318888

研究成果の概要 (和文)：水系感染を起こしうるにもかかわらず、定量的な情報が少ない原虫およびウイルスを対象とし、畜産廃水処理場へ流入する廃水および放流水中の濃度を定量的に測定する手法を確立し、リスク評価上重要なパラメータを取得した。また、貝類中のウイルス濃度を測定した。さらに、畜産廃水処理場へ紫外線照射装置を導入し、実規模で病原微生物の不活化率を算出するとともに、不活化に及ぼす影響因子を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We determined concentrations of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw sewage and treated sewage effluent to calculate removal rates in swine sewage treatment plants. Removal rates calculated from the above average values were 2.14 log for *Cryptosporidium* oocysts and 2.42 log for *Giardia* cysts. It was clear that both protozoa could be effectively removed by sewage treatment.

Three years studies were carried out in the concentration of hepatitis E virus (HEV) in shellfish. The concentration of each virus was determined using real-time quantitative PCR after concentration of the water samples using negatively-charged membranes. HEV were detected in shellfish at the mouth of a river.

C. parvum oocysts and *B. subtilis* were evaluated for infectivity with infectivity assay after treatment by ultraviolet irradiation alone, contact with oxidizing agent alone, and contact with oxidizing agent after UV irradiation. The log reduction with combined treatment of oxidizing agent after UV irradiation was 1.7-100 times greater than the sum of the log reductions by these separate treatments under the same conditions. The results indicate that the combination of oxidizing agent after UV irradiation has a synergistic effect on microorganism inactivation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,300,000	3,690,000	15,990,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：新興病原微生物，原虫，ウイルス，紫外線

1. 研究開始当初の背景

先進国でも水を介した原虫やウイルスによる、いわゆる新興感染症が発生しており、深刻な衛生問題となっている。衛生施設の整った国では、ヒトから糞便とともに排泄された原虫やウイルスの多くは下水処理場へ流入する。そして下水処理場で処理された水は河川や海洋に放流される。また、人獣共通に感染する原虫やウイルスはウシやブタなどの商業動物からも排泄され、その排泄物は処理の後に河川等に放流され、一部は肥料として農地に還元される。

したがって、排水処理による除去・不活化が十分なされていないと、処理施設からの放流水が水道水源を汚染し、新たな集団感染をひき起こす可能性がある。

本研究を推進することを目的としてこれまでに実施した予備調査の結果から、わが国の下水中にもヒトの腸管系に障害を引き起こす原虫やウイルスが定常的に存在することが明らかとなっている。また、畜産廃水からは劇症肝炎を引き起こしうるE型肝炎ウイルスも検出される。

これまでも下水や放流水中の原虫濃度やウイルス濃度に関するデータは報告されているが、これら原虫やウイルスを分離・濃縮する際の損失を補正したデータはほとんど報告されていない。当研究室で実施した予備実験の結果から、一般的な原虫分離法（シヨ糖浮遊法）のクリプトスポリジウムの回収率は10～50%程度、ウイルス濃縮法（陽イオン添加陰電荷膜法）のポリオウイルスの回収率は30～60%程度であることが明らかとなっており、回収率を補正しないと実際の濃度の数分の1に過小評価してしまう可能性があると考えられる。

また、下水処理によるクリプトスポリジウムやジアルジアの除去率に関するデータもいくつか報告されているが、その値には0%～99%と幅がある。さらにウイルスの除去率に関するデータは原虫に比べると少なく、特にノロウイルスと同じカリシウイルス科に分類されるサポウイルスについては、環境中における濃度レベルに関するデータは報告されつつあるものの、下水処理による除去率に関するデータは報告されていない。

一方、E型肝炎ウイルスはA型肝炎ウイルスよりも感染した場合の死亡率が高く、特に妊婦が感染した場合の死亡率は20～40%と非常に高い。WHOの飲料水水質ガイドラインでも水系感染の可能性が指摘されているにもかかわらず、環境中における濃度レベルに関する情

報は極めて少なく、また、廃水処理による除去率や消毒剤耐性の有無に関する情報は皆無である。

以上の背景に鑑み、水系感染を起こしうるにもかかわらず、関連する情報が少ない原虫およびウイルスを対象とし、感染リスクの低減化に資することできるデータの取得および技術開発を目的として本研究を行う。

2. 研究の目的

(1) *Cryptosporidium* や *Giardia* による水環境の汚染は水質衛生上の深刻な問題である。

これまでの濃度レベルに関する研究では、試料をシヨ糖浮遊法や免疫磁気ビーズ法などの何らかの精製工程を経てから抗体染色法で染色し、顕微鏡観察して計数する方法が用いられている。しかし、これらの精製工程では夾雑物が除去されるがオーシストやシストも損失する。したがって、試料中の濃度レベルを定量的に評価するためには損失分を補正する必要があるが、これまでに回収率で補正したデータはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、回収率を算出して精製工程における損失を補正する定量方法を開発した。そして、病原性原虫類の発生源のうち、既往報告の少ない畜産排水処理施設に着目し、開発した定量法を用いて2つの県の畜産排水処理施設で畜産排水および処理水中の *Cryptosporidium* オーシストおよび *Giardia* シストの濃度レベルを調査した。さらに、これらの畜産排水中と処理水中の濃度比から畜産排水処理による両原虫の除去率を算出した。

(2) HEV は流行性肝炎ウイルスの一つで、経口的に体内に取り込まれると腸管上皮細胞に感染し、血液に侵入後、体内を循環する過程で肝臓に到達し、肝細胞で増殖して再び血液に侵入し、ウイルス血症を引き起こすと考えられている。また、事実上合併症を引き起こさないA型肝炎ウイルスとは異なり、胆汁分泌停止などの重篤な症状を示す。特に妊婦が感染すると急性劇症肝炎を引き起こし、その死亡率は20%以上に達すると報告されている。

本研究では、養豚廃水の処理施設へ流入する廃水および処理水と、処理水が流入する河川水を対象として、HEV の濃度レベルを調査し、得られた結果から養豚廃水処理システムによる HEV の除去率を評価した。さらに、その河川の河口域（汽水域）に生息する貝類中の濃度レベルを調査し、濃縮係数を算出した。

(3) 紫外線消毒は、消毒薬剤の残留、塩素処

理によるトリハロメタン、オゾン処理による臭素酸イオンなどの副生成物の問題がなく、微生物・ウイルスの種類を問わずに殺菌・不活化効果を示す。さらに、新たな耐性菌をつくり出すことがないと言われている。

通常、消毒に用いられる低圧紫外線ランプは内部に水銀が封入されている。そのため、ランプが破損した場合に水銀が飛散し、紫外線消毒を行っている水・食品を介してヒトや動植物が水銀に曝露されてしまう可能性がある。ヒトが水銀を大量曝露すると急性中毒が起き、嘔吐・腹痛・下痢・神経障害などの症状がみられる。慢性化すると興奮・気質の変化などの過敏症状や手指のふるえが現れる。重篤化すると、腎障害を起こすこともある(喜多村 他., 1976)。

そこで本研究では、水銀を使用していないエキシマランプと、低圧紫外線ランプと同様の発光スペクトルを持つ冷陰極管紫外線ランプを用いた不活化実験を行った。紫外線や塩素に耐性を持つことから消毒剤による不活化実験において生物線量計としてしばしば用いられている *B. subtilis* 芽胞と、比較的高い紫外線感受性を示す *E. coli* を用いた両ランプの不活化力評価、また、光回復酵素を持つ *E. coli* での回復実験を行い、両ランプを使用した紫外線消毒後の回復能力を比較評価した。さらに、養豚廃水処理施設からサンプリングした試料を用いて、自然環境中の *E. coli* の紫外線感受性について検証した。

また、塩素あるいは過酸化水素と微生物を接触させた後に紫外線を照射した場合、発現する不活化効果が相加的であるのかあるいは相乗的であるのかを定量的に評価した。

3. 研究の方法

(1) *Cryptosporidium* や *Giardia* については、EPA の Method1643 に準拠して濃縮精製した。なお、回収率トレーサーとして ColorSeed を用いた。シヨ糖密度勾配遠心法において、用いるシヨ糖液の比重とオーシストおよびシストの回収率との関係の評価するため、比重別での回収率を調査した。供試試料として、畜産処理施設の畜産排水を用いた。本実験で使用したシヨ糖液の比重は 1.16~1.30 である。

(2) 養豚廃水および環境水試料の 1 次濃縮には、Katayama *et al.* (2003) が開発した陰電荷膜吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法を用いた。濃縮液のウイルス核酸を QIAamp Viral RNA Mini Kit のスピンプロトコールに従って抽出した。

RNA 抽出液を逆転写反応し、インキュベーターには PCR サーマルサイクラーを用い、25°C で 10 分間、37°C で 120 分間の cDNA 生成プロ

セスに続き、85°C で 5 秒間の加熱により逆転写酵素を失活させ、その後 4°C に冷却した。定量分析には ABI PRISM 7500 Sequence Detection System を使用した。

TaqMan PCR 法により HEV が検出された貝、養豚廃水および環境水試料について、Li *et al.* (2005) が開発した Nested-PCR 法を用いて定性分析を行い、その結果得られた HEV-RNA の ORF2 領域に位置する 378bp の増幅産物をシーケンシングした。

(3) 供試微生物として枯草菌と大腸菌を用いた。またランプとしては、低圧紫外線ランプ、冷陰極管紫外線ランプ、エキシマランプを用いた。

不活効力は培養法を用いた。また、紫外線照射後の暗回復と光回復の程度を同じく培養法で評価した。

一方で、酸化剤を添加した後に紫外線を照射する促進酸化の効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 原虫に関する研究

① 各比重 (1.16~1.30) のシヨ糖液で精製した。本実験では全て同一の試料を用いたためスパイクした ColorSeed と試料由来の原虫が精製工程で同じ挙動をとるならば、回収率で補正した濃度は一定になるはずである。*Cryptosporidium* オーシスト濃度範囲は 474~514 oocysts/10 mL (Avg±SD: 492±16.7) となり、全ての比重において約 500 oocysts/10 mL となった。

一方、*Giardia* シスト濃度は 382~2,770 cysts/10 mL (Avg±SD: 826±868) となり、大きくばらついた。比重 1.24~1.30 では約 400 cysts/10 mL、比重 1.20 および 1.22 では約 700 cysts/10 mL、そして比重 1.16 では 2,770 cysts/10 mL となり、比重が小さくなるほど補正した *Giardia* シスト濃度が高くなった。

ColorSeed の *Cryptosporidium* オーシストは全ての比重において 80% 以上回収することができるが、*Giardia* シストでは比重 1.24 付近から回収率が向上し、比重 1.26 以上のときに回収率が 80% 以上となった。この結果から、*Giardia* シストをシヨ糖浮遊法で精製して定量する場合は、シヨ糖液の比重を 1.26 とする必要があることが明らかとなった。

② *Cryptosporidium* オーシストは全ての試料から検出された。排水中の濃度レベルは 2,000~960,000 oocysts/L (幾何平均値: 63,000 oocysts/L)、各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 12,000 oocysts/L (幾何平均値)、処理施設 B で 50,000 oocysts/L (幾何平均値)、処理施設 C で 120,000 oocysts/L、処理施設 D で 160,000 oocysts/L、処理施設 E で 120,000 oocysts/L (幾何平均値)、処理施

設 F で 650,000 oocysts/L (幾何平均値) であり, 調査対象の全農場でクリプトスポリジウム症が蔓延していることが示唆された。

処理水中の濃度レベルは 12~99,000 oocysts/L (幾何平均値: 450 oocysts/L) であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 120 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 110 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 99,000 oocysts/L, 処理施設 D で 12 oocysts/L, 処理施設 E で 380 oocysts/L (幾何平均値), 処理施設 F で 54,000 oocysts/L (幾何平均値) となり, 処理施設 C および処理施設 F では他の施設に比べ非常に高濃度で検出された。両処理施設の処理水中の濃度レベルは他の処理施設の濃度レベルに比べ, 2~3 オーダー程度高かった。処理施設 C では採水時にバルキングが生じていたため, 沈殿槽での沈降作用が損なわれ, *Cryptosporidium* オーシストが処理水中に高濃度に残存したものと考えられる。また, 処理施設 F では曝気槽で定期的にバルキングが生じており, その影響を受けているものと推測された。

③ *Giardia* シストは全ての排水から検出され, 濃度レベルは 3,900~1,100,000 cysts/L (幾何平均値: 100,000 cysts/L) であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 23,000 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 160,000 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 730,000 cysts/L, 処理施設 D で 49,000 cysts/L, 処理施設 E で 44,000 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 F で 570,000 cysts/L (幾何平均値) であり, ジアルジア症も全ての農場で蔓延していることが示唆された。また, 下水試料の場合, 流入排水中の *Cryptosporidium* オーシスト濃度よりも *Giardia* シスト濃度が約 10 倍高くなる傾向が見られるが, 畜産排水ではほぼ同じ濃度レベルであった。

処理水中の濃度範囲は 0.0~66,000 cysts/L (幾何平均値: 320 cysts/L) であった。各処理施設における濃度レベルは処理施設 A で 75 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 B で 230 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 C で 66,000 cysts/L, 処理施設 D で 0.0 cysts/L, 処理施設 E で 66 cysts/L (幾何平均値), 処理施設 F で 25,000 cysts/L (幾何平均値) となった。

Cryptosporidium オーシスト濃度と同様に, 処理施設 C および処理施設 F の処理水中の濃度レベルは他の処理施設の濃度レベルに比べ, 2~3 オーダー程度高かった。

④ 処理施設 D では放流水中の *Giardia* シストが不検出であったため, 検出下限値より除去率を算出した。*Cryptosporidium* オーシストの除去率の範囲は 0.0691~4.14 log₁₀, 算術平均値は 2.14 log₁₀ であった。同様に, *Giardia*

シストの除去率の範囲は 0.846~4.00 log₁₀, 算術平均値は 2.42 log₁₀ であった。処理施設 C の *Cryptosporidium* オーシストの除去率が 0.0691 log₁₀, 処理施設 F の除去率が 1.08 log₁₀ と低くなったが, 前述したバルキングの影響を受けたためであると考えられる。両原虫の除去率を見てみると, 処理施設 C と処理施設 F 以外では概ね 2~3 log₁₀ の除去率が得られた。

(2) HEV に関する研究

① 調査した 26 試料中 10 試料から HEV が検出されたが, 巻貝類やアサリ類からは検出されず, 牡蠣・イガイ類からのみ検出された。濃度レベルは N.D.~9.2×10² PDU・wet-g⁻¹ であり, 河川水中における濃度レベルと同様に冬期に高い傾向が認められた。また, 河川水中に常に浸漬している貝よりも, 潮干帯に生息する貝中の濃度レベルの方が明らかに高かった。コロイドの形態をとる化学物質の貝類による濃縮係数は, 潮干帯に生息する場合, 特に高くなることが知られているが, HEV の場合も同様の傾向を示した。

牡蠣・イガイ類の中腸腺中の濃度と河川水中濃度との比から算出した濃縮係数は 10,000 以上となることもあり, 可食部に占める中腸腺の割合から算出した可食部への濃縮係数も 100 以上となることを確認した。このことから, 極めて低い濃度レベルの HEV をモニタリングするための生物として, 牡蠣・イガイ類が有効である可能性が示唆された。

② HEV は塩基配列によって G I から G IV に分類されているが, これまでに報告されている G I および G II の株は, ほぼすべてヒト由来であり, アフリカ諸国やアジア諸国, メキシコ等の衛生状態の悪い地域から分離されている (Lu *et al.*, 2005)。現在までにブタ, イノシシ等から検出された HEV はすべて G III または G IV に属している (Michitaka *et al.*, 2007; Tei *et al.*, 2003)。また, ブタには G I および G II が感染しないことが報告されている (Meng *et al.*, 1998b; Platt *et al.*, 1998)。先進諸国で感染したヒトから分離された G III および G IV の一部は, HEV に汚染されたブタやイノシシ等の肉を摂取することによりヒトへ伝播したことが明らかとなっている (Li *et al.*, 2005; Yazaki *et al.*, 2003)。

本研究で検出された HEV の遺伝子型は, すべて G III であった。G III の系統樹をみると, 本研究で分離された HEV 株を含め, 系統樹全体において分離された地域および宿主が混在している。また, 養豚廃水から検出された HEV のうち, 同一処理施設から検出された HEV の相同性は, 採取日に約 1 年の隔たりがあっても非常に高く (平均 94.2%), 各農場では同一株による感染が繰り返されているものと推測された。河川水から検出された HEV 株は, 付

近に位置する処理施設の流入水および処理水から検出された HEV 株と 95.0%以上の高い相同性を示すことから、廃水処理に問題が生じ、河川に流入したものと考えられた。また、貝類、その周囲の河川水から検出された HEV の塩基配列の相同性も非常に高く(平均 96.2%)、貝類が生息する河川水中の HEV が濃縮されていることが確認された。

(3) 紫外線消毒に関する研究

①冷陰極管紫外線ランプの微生物不活化力を *B. subtilis* を用いて評価した。紫外線線量 10.0 mJ/cm² から 30.0 mJ/cm² の間で紫外線の不活化力を評価した。1 log₁₀ 不活化に 9.9 mJ/cm², 2 log₁₀ 不活化に 14.6 mJ/cm², 3 log₁₀ 不活化に 19.2 mJ/cm², 4 log₁₀ 不活化に 23.8 mJ/cm² を要した。また、5.0 mJ/cm² より少ない紫外線線量ではまったく不活化されなかった。このことから、紫外線照射線量 5.0 mJ/cm² 付近までは消毒遅滞期であると考えられた。その後は、紫外線線量の増加とともに不活化 log₁₀ 数は増加した。この結果は、低圧水銀ランプの不活化力とほぼ同じ結果であった。

E. coli の不活化 log₁₀ 数の関係は、紫外線線量 2.0 mJ/cm² から 15.0 mJ/cm² の間で紫外線の不活化力を評価した。1 log₁₀ 不活化に 4.4 mJ/cm², 2 log₁₀ 不活化に 7.0 mJ/cm², 3 log₁₀ 不活化に 9.6 mJ/cm², 4 log₁₀ 不活化 12.1 mJ/cm² を要した。低紫外線線量領域と高紫外線線量領域に消毒遅滞期が生じていることがわかる。高紫外線線量領域の消毒遅滞期はそれ以上紫外線照射線量を増加しても生残率が低下しなくなる部分を指す。試料中に消毒剤への耐性が異なる微生物が存在する場合、それぞれの不活化速度が異なるため、消毒遅滞期が生じると考えられている。

また、紫外線消毒の対象となる生物を考えると、ウイルスは一つの損傷で不活化されるが、細菌や原虫のように生物的に複雑化すると不活化に要する損傷の数が増加する。すなわち、横軸に紫外線線量、縦軸に生残率の対数値をプロットすると、ウイルスの場合は直線的に不活化されるが、細菌・原虫の場合は shoulder 部分のある不活化曲線を示すことが多い。これらの結果から、本実験においても消毒遅滞期が生じたと考えられた。

②紫外線照射線量と *B. subtilis* 芽胞の不活化 log₁₀ 数の関係は 1 log₁₀ 不活化に 9.8 mJ/cm², 2 log₁₀ 不活化に 14.5 mJ/cm², 3 log₁₀ 不活化に 19.3 mJ/cm², 4 log₁₀ 不活化 24.0 mJ/cm² を要した。

紫外線照射線量と不活化 log₁₀ 数から回帰直線を引くと、5.0 mJ/cm² より少ない紫外線線量では不活化されない直線となった。このことから、冷陰極管紫外線ランプと同様に、

紫外線照射線量 5.0 mJ/cm² 付近までは消毒遅滞期であると考えられた。各不活化 log₁₀ 数に達するために要する不活化紫外線線量は、冷陰極管紫外線ランプとほぼ同様であることから、エキシマランプの *B. subtilis* 芽胞不活化力は、低圧紫外線ランプと変わらないことを確認した。

紫外線照射線量と *E. coli* の不活化 log₁₀ 数の関係を紫外線照射線量と不活化 log₁₀ 数から回帰直線を求めると、1 log₁₀ 不活化に 4.7 mJ/cm², 2 log₁₀ 不活化に 7.0 mJ/cm², 3 log₁₀ 不活化に 9.4 mJ/cm², 4 log₁₀ 不活化に 11.7 mJ/cm² を要した。

エキシマランプが *E. coli* の各不活化 log₁₀ 数に達するために要する不活化紫外線線量は、冷陰極管紫外線ランプで得られたデータとほぼ同様である。このことから、エキシマランプの *E. coli* 不活化力は、低圧紫外線ランプと変わらないことを確認した。

③光回復の有無を調べるため、可視光照射線量と生残率の関係を評価した。両ランプの紫外線不活化力評価結果から得られたデータを元に、1 log₁₀, 2 log₁₀, 3 log₁₀ 不活化線量を目安に紫外線を照射した後、可視光を照射した。

冷陰極管紫外線ランプで得られた不活化 log₁₀ 数の結果は、1.30 log₁₀ 不活化後の 180 mJ/cm² 可視光照射で 0.72 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射で 0.55 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射で 0.50 log₁₀ に回復した。2.09 log₁₀ 不活化後、180 mJ/cm² 可視光照射は 1.48 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射は 1.08 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射は 0.89 log₁₀, 3.62 log₁₀ 不活化後の 180 mJ/cm² 可視光照射は 1.27 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射は 0.96 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射は 0.86 log₁₀ となった。

エキシマランプでは 1.01 log₁₀ 不活化後、180 mJ/cm² 可視光照射で 0.90 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射は 0.58 log₁₀ に回復しており、720 mJ/cm² 可視光照射後も 0.58 log₁₀ で平衡に達した。また、1.73 log₁₀ 不活化後の 180 mJ/cm² 可視光照射は 1.11 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射は 0.99 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射は 0.84 log₁₀, 2.50 log₁₀ 不活化後の 180 mJ/cm² 可視光照射は 1.50 log₁₀, 360 mJ/cm² 可視光照射は 1.09 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射は 1.05 log₁₀ であった。さらに、5.20 log₁₀ 不活化後、360 mJ/cm² 可視光照射は 2.68 log₁₀, 720 mJ/cm² 可視光照射後も 2.19 log₁₀ に上昇した。

両ランプとも初期の不活化 log 数が 3 log₁₀ 付近までは全回復条件下で 1 log₁₀ 前後まで回復している。回復率で比較すると、冷陰極管

ランプでは 57.4~76.2 %, エキシマランプでは 42.5~58.0 %回復しており, 両ランプ間に差が見られた。これは, エキシマランプの 251 nm 以外の発光波長が *E. coli* の光回復機構に損傷を与えていることが原因であるのではないかと推定される。今後, バンドパスフィルターを用いた 251 nm 以外の紫外線の回復能力への影響を評価する必要があると考えられた。

また, 本実験で行った全ての紫外線照射線量で光回復が認められたが, どの条件においても *E. coli* の生残率が 0.32 以上になることはなかった。

以上の結果から, エキシマランプが持つ発光波長に光回復機構を破壊する波長が含まれていること, また全実験条件において最大でも 76.2 %までしか光回復しないことを確認した。

④暗所静置時間と生残率の関係を Fig. 7 に示す。両ランプの紫外線不活化力評価結果から得られたデータを元にし, 1 log₁₀, 2 log₁₀, 3 log₁₀ 不活化線量を目安に紫外線を照射した後, 一定時間暗所に静置した。

冷陰極管紫外線ランプでは, 1.30 log₁₀ 不活化後, 6 時間暗所静置すると 1.20 log₁₀ に, 24 時間暗所静置すると 1.43 log₁₀ となった。同様に, 2.09 log₁₀ 不活化後は 6 時間暗所静置で 2.21 log₁₀, 24 時間暗所静置で 2.40 log₁₀, 3.62 log₁₀ 不活化後は 6 時間暗所静置で 3.31 log₁₀, 24 時間暗所静置で 3.69 log₁₀ となった。

エキシマランプでは, 0.90 log₁₀ 不活化後の 6 時間暗所静置で 1.14 log₁₀ に, 24 時間暗所静置で 1.27 log₁₀ となった。同様に 1.73 log₁₀ 不活化後は 6 時間暗所静置で 2.12 log₁₀, 24 時間暗所静置で 2.55 log₁₀, 2.50 log₁₀ 不活化後は 6 時間暗所静置で 3.92 log₁₀, 24 時間暗所静置で 3.90 log₁₀ となった。

二つのランプを比較すると, どちらも明確な回復現象は見られなかった。また, 24 時間暗所静置後の培養結果では全実験条件において暗所静置前不活化 log₁₀ 数よりも不活化が進んでいる。その結果, 紫外線照射後に暗所静置を行っても *E. coli* の培養性は回復しないことを確認した。

⑤自然環境中の *E. coli* は, 純粋株の *E. coli* とは異なる紫外線感受性を持つ可能性がある。そのため, 愛知県内の養豚廃水施設の流入水をサンプリングし, 流入水中に含まれる *E. coli* を濃縮して試料とした。冷陰極管紫外線ランプとエキシマランプを用い, それぞれ *E. coli* 純粋株 (IF03301) での実験と同一の条件下で実験を行った。

実廃水中の *E. coli* は 8.0 mJ/cm² 付近までは純粋株の *E. coli* (IF03301) とほぼ同じ

ロットとなっている。その後の 10.0 mJ/cm² 照射時は 3.26 log₁₀ 不活化, 15.0 mJ/cm² 照射時は 3.66 log₁₀ 不活化しており, 10.0 mJ/cm² から 15.0 mJ/cm² にかけては不活化がほとんど進んでいない。

エキシマランプでの紫外線照射線量と生残率の関係を Fig. 8-2 に示す。純粋株の *E. coli* (IF03301) では, 15 mJ/cm² まで直線的に不活化が進んでいるが, 実廃水中の *E. coli* は 10.0 mJ/cm² 照射以降から tailing が生じ, 不活化速度は低下している。

実廃水中の *E. coli* と純粋株の *E. coli* (IF03301) の実験結果を比較すると, 実廃水に含まれる自然環境に存在する *E. coli* は純粋株とは異なる紫外線感受性を持つことが確認できた。自然環境中の *E. coli* は純粋株と同様の紫外線感受性を持つ株と, 紫外線に耐性を持つ株の 2 種類が存在するため, tailing が見られると考えられた。

⑥塩素+紫外線で *B. subtilis* の不活化した場合, 紫外線線量 5.0 mJ/cm² までにはほとんど不活化されなかったが, それ以上の線量になると相対感染力は指数関数的に減少し, 1 log₁₀ 不活化線量は 12.0 mJ/cm² となった。また, 塩素処理の場合も 50.0 mg·min/L まではほとんど不活化されなかったが, その後, CT 値が増加するにつれて相対感染力は指数関数的に減少し, 1 log₁₀ 不活化 CT 値は 120 mg·min/L となった。

塩素単独処理と紫外線単独処理の不活化 log₁₀ 数の和と塩素+紫外線処理の不活化 log₁₀ 数とを比較したところ, 塩素濃度 1 mg/L, 紫外線照射線量 12.0 mJ/cm² 程度では紫外線処理と組み合わせても相乗効果は発現しなかった。本研究では *B. subtilis* は初期塩素濃度 30.0 mg/L, 紫外線照射線量 12.0 mJ/cm² では相乗効果が見られなかったものの, 同塩素濃度のまま紫外線照射線量を 20.0 mJ/cm² とすると, わずかながら相乗効果がみられるようになり, 塩素+紫外線の組み合わせでも相乗効果がみられることを確認した。また, 紫外線を照射した後に塩素と接触させても相乗効果が得られなかったことから, 促進酸化によって相乗効果が発現したものと考えられた。

⑦過酸化水素+紫外線による *B. subtilis* の不活化を調べたところ, 過酸化水素単独では 50.0 mg/L と高濃度にしても全く不活化されなかった。

過酸化水素濃度 5.0 mg/L 未満, 紫外線線量 12.0 mJ/cm² 以下の場合には 0.5 log₁₀ 以下の相乗効果しか得られなかったが, 過酸化水素濃度 5.0 mg/L 以上, 紫外線線量 12.0 mJ/cm² 以

上とすると $1 \log_{10}$ 以上の相乗効果が認められた。

また、紫外線線量を一定としたとき、過酸化水素濃度を 30.0, 50.0 mg/L と高くしていても相乗効果は大きくならず、過酸化水素濃度が 5.0 mg/L 以上であれば、相乗効果は紫外線線量に依存して大きくなった。つまり、同条件下では、過酸化水素に吸収された紫外線線量にのみ依存してヒドロキシラジカルが発生し、相乗効果が発現しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1 Morita, S., Tanimoto, J., Urakami, I., Katayama, H., Ohgaki, S., Itoh, S. and Hirata T. : Detection of HEV in environmental water, *Proceedings of World Water Congress of the International Water Association*, in CD/7pp. (2008)
- 2 森田重光 : E 型肝炎ウイルスの分布と廃水処理による環境放出の制御, *PIG JOURNAL*, 1, 18-21 (2008)
- 3 森田重光 : E 型肝炎ウイルスの分布と廃水処理による環境放出の制御, *PIG JOURNAL*, 1, 18-21 (2008)
- 4 橋本温, 森田重光, 平田強 : FISH-蛍光抗体染色法を併用したクリプトスポリジウムの判別の容易化, *日本水環境学会誌*, 5, 267-272 (2009)

他 3 件

[学会発表] (計 14 件)

- 1 森田重光, 岩崎好夏, 小杉沙織, 石井孝明, 平田強 : *Cryptosporidium* および *Giardia* の定量法に関する研究, 第 42 回日本水環境学会, 名古屋 (2008)
- 2 Morita, S., Tanimoto, J., Urakami, I., Katayama, H., Ohgaki, S., Itoh, S. and Hirata T. : Detection of HEV in environmental water, *World Water Congress of the International Water Association*, Vienna (2008)
- 3 森田重光, 小熊久美子, 片山浩之, 平田強 : 畜産廃水処理による E 型肝炎ウイルス (HEV) の除去, 第 43 回日本水環境学会, 山口 (2009)
- 4 Morita, S. and Oguma, K. : Behavior of Adenovirus, Sapovirus and Hepatitis E virus in Aquatic Environment, *International Water Association-ASPIRE Conference*, Taipei (2009)

5 in Japan, *19th Symposium of Japan-Korea Water Environment*, Hiroshima (2010)

- 6 森田重光, 伊藤貢, 松原康一, 伊東正吾 : 豚舎および畜産排水処理施設の空気からの PCV2 ゲノムの検出, PCC 豚病症例検討会, 相模原 (2010)
- 7 森田重光 : 組み合わせ処理による促進酸化効果, 第 56 回日本水環境学会シンポジウム, 京都 (2010)
- 8 大槻弥緒, 大瀧雅寛, 出口憲一郎, 浦上逸男, 小熊久美子, 森田重光 : 海水中に含まれる微生物の促進酸化処理, 第 44 回日本水環境学会, 札幌 (2011)
- 9 岸田直裕, 森田久男, 浅見真理, 秋葉道宏, 原本英司, 森田重光 : 水道水源における水系感染性ウイルスの濃度変動とその影響因子, 第 44 回日本水環境学会, 札幌 (2011)
- 10 森田重光, 伊東正吾, 片山浩之, 岸田直裕, 秋葉道宏, 伊藤貢 : 養豚環境における豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) の移行について, 第 44 回日本水環境学会, 札幌 (2011)

他 4 件

[図書] (計 1 件)

紫外線照射 -水への応用-, 技法堂 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田重光 (MORITA SHIGEMITSU)
麻布大学・環境保健学部・准教授
研究者番号 : 50318888

(2) 研究分担者

橋本温 (HASHIMOTO ATSUSHI)
国立阿南工業高等専門学校・准教授
研究者番号 : 30332068
2008 年度分担研究者

小熊久美子 (OGUMA KUMIKO)
東京大学・大学院工学系研究科・講師
研究者番号 : 00361527
2009 年度~2010 年度分担研究者

水口萌子 (MINAKUCHI MOEKO)
筑波大学・大学院生命システム医学専攻・
博士後期課程 3 年
2008 年度~2010 年度研究協力者