

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：82114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820257

研究課題名(和文) 下水再生水の紫外線消毒による病原微生物の感染リスク評価と適用管理手法に関する研究

研究課題名(英文) Study on the infection risk assessment of pathogen for reclaimed water by UV disinfection and its application management method

研究代表者

安井 宣仁 (Yasui, Nobuhito)

独立行政法人土木研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90547481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生水処理技術として紫外線消毒に着目し、対象病原微生物をノロウイルスとして、その消毒効果を把握した。得られた結果より、再生水の様々な利用用途、農業利用、親水利用、修景利用等の用途毎において、紫外線消毒によるノロウイルスの感染リスク評価を試みた。

その結果、水質性状の異なる処理水に紫外線消毒を行うと、ノロウイルスの消毒効果が水質により異なることが明らかとなった。また再生水のリスク評価を行った結果、紫外線消毒を行うことで、二次処理水を直接使用する際と比較して感染リスクが1/10～1/30程度低減することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to understand the disinfection effect of Norovirus using UV as the reclamation treatment technique. From the obtained study results, the infection risk of Norovirus by UV disinfection was examined in the various application of reclaimed water such as agricultural water use, recreational enhancement, and landscape water use.

When the UV disinfection to the treated sewage effluent of different water quality conducted, it was clarified that the disinfection effect of Norovirus differed by the water quality. From the result of the risk assessment in the reclaimed water which created UV disinfection, it turned out that the infection risk of Norovirus decreased from about 1/10 to 1/30, as compared with the case of using the treated sewage effluent directly.

研究分野：環境微生物学、衛生工学

キーワード：下水再生水 紫外線消毒 感染リスク評価 ノロウイルス

1. 研究開始当初の背景

現在の下水処理システムは、処理した水は環境中に放出するか一部施設内で再利用するなど留まっている。我が国における下水処理水の再利用水(以下、再生水と記す)は、図-1に示すように平成22年度で、年間2.01億m³と処理水量全体の1.4%の利用に過ぎない。国内では現状、飲料水やその他、農業用水等の水利用に関してはあまり問題視されていないが、東南アジア等の国内水源の少ない海外では、水不足は深刻な問題である。そのため、今後、国内外において再生水の利用可能性は拡大する見込みであると言える。再生水の利用促進を図る上では利用者に対する安全性評価、特に病原微生物の感染リスクに関する評価が必要である。

現在、欧米では、再生水の利用においては疫学調査や定量的病原微生物リスク評価(QMRA:Quantitative Microbiology Risk Assessment)に基づいた感染リスク評価による基準値の設定や検討が行われてきている。しかしながら、国内においては、どの程度、再生水の感染リスクを低減させるのが最も効果的なのか、また再生水処理技術として何が最適なのかといった、知見および検討がほとんど存在しないため、現状で再生水の利用において、特に病原微生物による感染リスクに関する明確な基準が設定されていない。

このような背景のもと、本研究では、再生水処理技術として紫外線消毒に着目し、再生水の利用用途毎の病原微生物の感染リスクを定量的病原微生物リスク評価手法により検討することで、効果的・効率的な紫外線消毒手法を確立し、その適用管理手法を構築する。

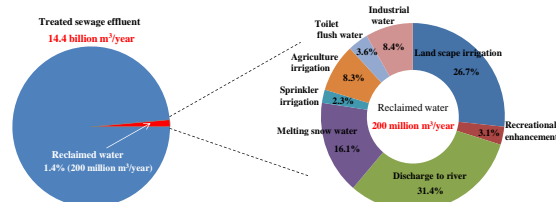


図-1 下水処理水の再利用状況

(平成22年度下水道白書より)

2. 研究の目的

下水処理水再利用の促進を図る上で、再生水処理技術として紫外線消毒を適用した際の病原微生物の感染リスク低減効果を明らかにし、その適用管理手法を構築する。具体的には、季節変動や水質変動による原水中の病原微生物濃度等の不確定要素を考慮した病原微生物の感染リスクを定量的病原微生物リスク評価手法により検討することで、効果的・効率的な紫外線消毒手法を確立するものである。本研究で得られる成果は、国内外における再生水の指針類に対して、紫外線消毒による感染リスク低減効果とその運転管理手法および新たな再生水の感染リスク評価の考え方を提案できる可能性がある。

3. 研究の方法

下水および下水処理水を試験水として用いた。対象病原微生物は、下水ならびに処理水から通年を通して検出されるノロウイルスを対象病原微生物と設定した。

本研究では以下の項目について検討を行った。

(1) 増幅域を拡張した Log-target RT-PCR 法による評価方法の検討

紫外線照射によるノロウイルスの消毒効果を把握するために、試験水中に指標微生物として大腸菌 phage MS2(以下、MS2 と記す)を添加し、照射前後のノロウイルスならびにMS2の遺伝子濃度を定量した。なおノロウイルスは、細胞培養、動物感染等によるウイルスの感染性を評価する手法が確立していないため、直接感染性を評価することが出来ない。一般的にノロウイルスの検出には、遺伝子定量により検討が行われているが、主流となっている検出方法では、ノロウイルスの増幅対象領域が数百 bp である。そこで、本研究では増幅域の異なるプライマーを用いた Long-target-RT-PCR(LI-RT-PCR 法)によりPCR反応を実施し、PCR産物を2%のアガロース電気泳動にて検出を行った。濃度の定量は逆転写反応(RT 反応)より得られた鋳型DNA(cDNA)を3連の希釈したcDNAをPCR反応に供し、泳動後の陽性数からMPN法により濃度を算出した。図-2にノロウイルスならびにMS2の遺伝子定量方法のフロー図を示す。

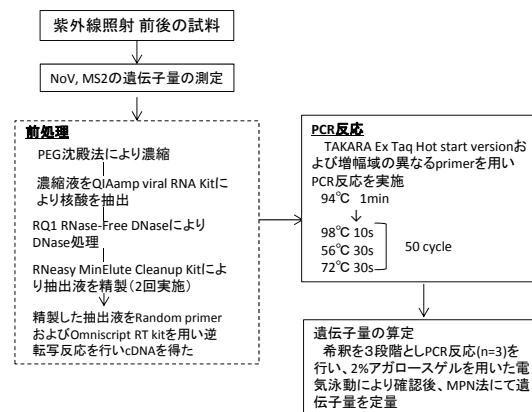


図-2 ノロウイルス、MS2の遺伝子定量方法のフロー図

(2) 実下水・下水処理水を用いた紫外線消毒実験

本研究項目では、(1)で確立した検出手法を用い、回分式の紫外線照射装置を用い、照射前後のノロウイルス濃度、MS2濃度を定量した。なおMS2はNBRC102619の純菌株を用いた。宿主菌には*E. coli* *k12* (NBRC106373)を用い培養したMS2を試験水に投入した。MS2は感染性が評価可能であるため、遺伝子定量に加え、重層寒天培地法により定量を実施した。

① 試験水

実験に用いた試験水は、2014年2月に採水した標準活性汚泥法を採用しているA下水処理場の処理水、および2014年5月に採水したB下水処理場の流入下水を試験水として用いた。また、水質性状（浮遊物質濃度(SS)、濁度、紫外線透過率(吸光度))の異なる試験水を作成し実験に用いた。試験水の水質性状を表-1に示す。試験水 No. 1、No. 2は凝集剤としてポリ塩化アルミニウムを添加し、凝集沈殿を行い、沈殿後の上澄水を試験水として用いた。

表-1 実験に用いた試験水の水質

試験水 No.	試験水	SS (mg/L)	濁度 (度)	Abs ₂₅₄ (cm ⁻¹) (紫外線透過率:%)
1	PAC(10mg-Al/L) 添加 流入下水	2.0	5.8	0.273 (53.3%)
2	PAC(4mg-Al/L) 添加 流入下水	34.5	47.2	0.608 (24.7%)
3	ろ過(20μm) 流入下水	34.6	87.8	0.856 (13.9%)
4	流入下水	173	196	1.024 (9.5%)
5	二次処理水	5.8	3.3	0.153 (70.3%)

② 添加用の大腸菌 phage MS2 の作成

本試験では、NoVの紫外線照射による除去特性と同時にMS2を試験水に添加しNoVの除去性と比較検討を行った。試験水の添加用のMS2は文献に従い高濃度溶液を作成し、培地成分を除くために分画分子量=30kDaの限外ろ過膜(アミコンウルトラ-15、ヤマト科学)を用い、3000rpm、15分間の遠心を行った。その後、滅菌済みリン酸緩衝液で洗浄し、再度同条件で遠心し、洗浄後に濃縮液を回収し、添加用の高濃度液(4×10⁹ PFU/mL)を得た。

③ 紫外線照射装置

紫外線照射実験は回分式にて行い、上部より照射した。紫外線ランプは6Wの低圧紫外線ランプ(UL0-6DQ、ウシオ電機社製)を用いた。乾熱滅菌済みのガラスシャーレ(φ9cm、水深(d)=4.2cm)に試験水270mLを添加した。2mmの石英ガラスで蓋をし、マグネチックスターラーにて攪拌し、所定の時間、紫外線を照射した。図-2に実験装置の概略図を示す。

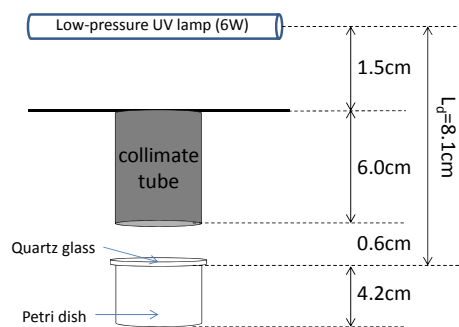


図-2 回分式紫外線照射装置

④ 紫外線量の算出方法

紫外線照度の測定は、紫外線積算光量計(UIT-250、ウシオ電機社製)および化学光量計を用い、石英ガラス表面からガラスシャーレ底面までの紫外線照度を測定し、式(1)を数値積分により平均紫外線照度(I_{avg})を算出した。式(1)に照射時間を掛け紫外線量を求めた。

$$I_x = \alpha(L_d + d)^{-\beta}$$

$$I_{avg} = \frac{1}{d} \int_0^d I_x \cdot \exp(-2.34 \text{Abs}_{254} \cdot x) dx \quad (1)$$

ここで、I_xはランプ表面からガラスシャーレ底面までの距離 xcmでの紫外線照度、dは水深(4.2cm)、L_dは紫外線ランプからガラスシャーレ表面までの距離(8.1cm)、Abs₂₅₄は試験水の波長254nmでの吸光度(cm⁻¹)である。

(3) 紫外線消毒によるノロウイルスの感染リスク評価と適用管理の提案

(2)の実験項目において得られた結果を用い、紫外線消毒後の試験水を再生水として利用した場合のノロウイルスの感染リスク評価を試みた。評価方法は以下の通りである。

① 利用用途の決定

紫外線消毒により得られた試験水を下記の用途に利用することを想定。

- ・農業用水
- ・親水用水(水浴)
- ・修景用水
- ・トイレ水洗用水

② 曝露シナリオの設定

利用用途毎の曝露量、曝露頻度はウイルスの安全性からみた下水処理の再生処理方法検討マニュアル(案)(高度処理会議、平成13年7月)を基に表-2に示すように設定した。

③ 評価方法

設定した曝露シナリオに基づき、障害調整生存年数(DALYs)を指標とした定量的微生物リスク評価(QMRA)によりDALYsを算出し、紫外線消毒後の再生水が利用可能か判定した。計算方法の詳細は安井ら(農業利用を想定したUF膜処理による下水再生水の定量的微生物リスク評価：ノロウイルスを対象とした事例的研究, 2013, 環境工学研究論文集, 第50巻, III_657)の文献に基づき算出した。

④ 適用管理の提案

③の評価結果に基づき、紫外線消毒を再生水の処理技術として利用する場合の適用管理に関して提案した。

表-2 利用用途毎の曝露量・曝露頻度

再生水の 利用用途	リスク 対象者	曝露形態	1回あたりの曝露量 (ml/回)	年間曝露量 (回/年)
農業用水	従事者	農業作業時の誤飲	0.3	27.2
親水用水(水浴)	利用者	手についた水の 経口間接摂取	30	8
修景用水	利用者	ミストを吸い込む	1	10
トイレ水洗面水	利用者	しぶきが口に入る	0.02	3

4. 研究成果

(1) 増幅域を拡張した Log-target RT-PCR 法による評価方法の検討

ノロウイルスの遺伝子定量において、本研究で検討した LT-RT-PCR 法によって一般的に定量されている範囲の増幅域 90bp を拡張した、170bp, 308bp での評価が可能であった。また MS2 についても 100~1000bp までの増幅域での評価が可能であり、LT-RT-PCR 法による定量方法を確立することが出来た。

(2) 実下水・下水処理水を用いた紫外線消毒実験

図-3、4 に一例として試験水毎の各増幅域での標的 RNA の減少割合を示す。実験結果より、ノロウイルスは各増幅域において、試験水の水質が異なることで、同一の紫外線量でも標的 RNA 減少割合が異なる傾向が確認され(有意水準 $\alpha=0.01$ で有意な差があると判定)、濁度が大きい試験水ほど、各増幅域での標的 RNA 減少割合が小さくなる傾向が確認

- ◆ PAC=10mg-Al/L添加下水(試験水 No.1)
- ▲ 20 μ mろ過流入下水(試験水 No.3)
- PAC=4 mg-Al/L添加下水(試験水 No.2)
- × 流入下水(試験水 No.4)
- + 二次処理水(試験水 No.5)

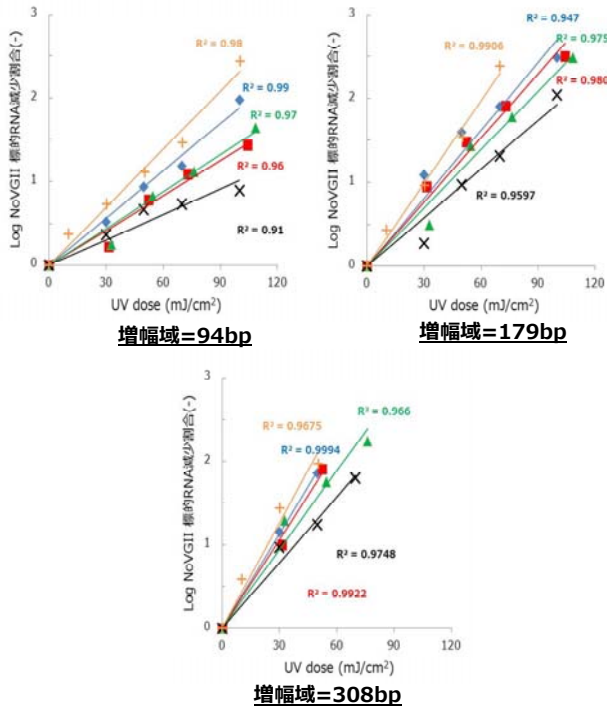


図-3 試験水毎の各増幅域での標的 RNA 減少割合 (ノロウイルス)

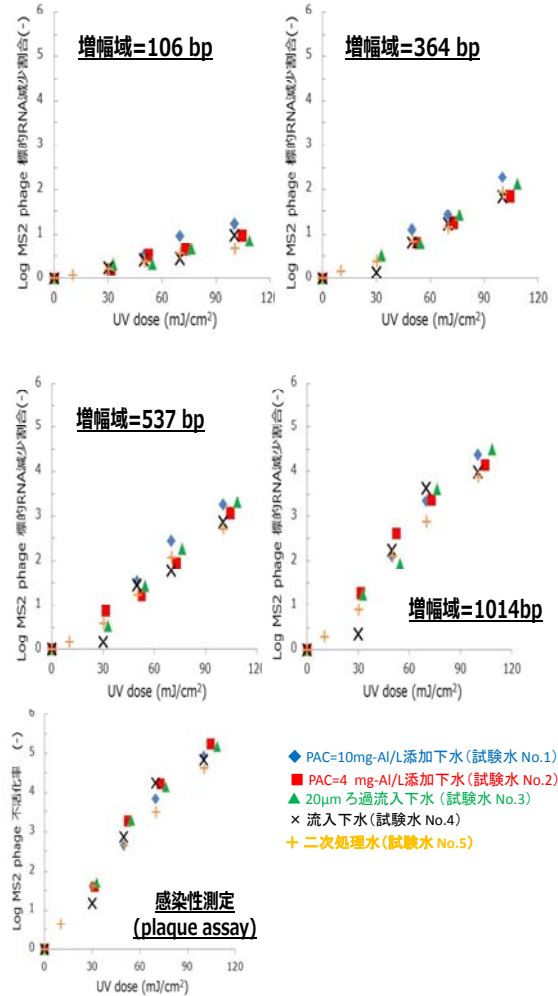


図-4 試験水毎の各増幅域での標的 RNA 減少割合 (MS2)

された。一方、MS2 は試験水の違いによる標的 RNA 減少割合、不活化率に有意な差は確認されなかった。(有意水準 $\alpha=0.01$)

上記の結果から、試験水の水質の違いによる影響を把握するために、紫外線による標的 RNA 減少割合が、実験を行った範囲において、紫外線量に比例すると仮定し、吸光度(UV254)と RNA 減少速度の関係を検討した結果、ノロウイルスは吸光度(UV254)が大きくなるにつれ(=紫外線透過率が低下)、標的 RNA 減少速度が低下する傾向が確認された。

一方、MS2 は吸光度の変化(=水質の変化)に依らず、全ての増幅域で減少速度が一定であった。これらの違いは、ノロウイルスは濁質に吸着または埋もれた状態で存在していることが考えられたため、濁質の増加に伴い、紫外線の効果が低下する傾向があったと考えられた。

(3) 紫外線消毒によるノロウイルスの感染リスク評価と適用管理の提案

(2)の実験項目における結果を踏まえて、紫外線消毒により得られた試験水を表-2 に示す、各利用用に用いた際のノロウイルスの感染リスク評価を行った。評価にあたり、ノ

ロウイルスは増幅域を拡張することで遺伝子減少割合が増加する傾向があり、MS2 も同様で、増幅域を拡張することで感染性試験の結果に近づく傾向が確認された。この結果より、本検討では増幅域 308bp での結果を用いて、感染リスク評価を試みた。

図-5 に各試験水を原水として用いた際の紫外線消毒後の再生水の利用時の平均値の障害調整生存年数の相対値を示す。図-5 は、二次処理水を未処理のまま使用した際と比較した相対値を示している。従って、二次処理水の相対値=1 と比較して、値が1未満の場合は、紫外線照射によってノロウイルスの感染リスクが低減していることを示す。これより、平均紫外線量を $40\text{mJ}/\text{cm}^2$ (標準偏差 $=10\text{mJ}/\text{cm}^2$ を加味し、線量分布は正規分布に従うと仮定) と想定した場合、親水利用に用いる場合では二次処理水を原水とした場合でも、紫外線消毒なし (未処理) と比較して感染リスクの低減効果が $1/5$ 未満であったことから、安全性の観点から新水用水として利用する際は、後段の追加処理または平均紫外線量を $40\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上に設定することが望ましいと考えられた。農業用水、修景用水、トイレ水洗用水の利用時は、二次処理水を直接利用するよりも、紫外線消毒を行うことで、リスクが $1/10\sim 1/30$ 程度、減少することが分かった。

また、本検討結果において紫外線照射前の原水を流入下水とした場合においても、紫外線照射後に二次処理水と同等のリスクレベルであった。また凝集剤 (PAC 添加)、ならびに $20\mu\text{m}$ ろ過程度の簡易処理を行い、紫外線を照射することで、二次処理水を直接利用するよりも、リスクが $1/5\sim 1/2$ 程度、感染リスクが低減することが明らかとなった。

以上より、二次処理水に平均紫外線量 $=40\text{mJ}/\text{cm}^2$ で紫外線消毒を行うことでノロウイルスの感染リスクが低減可能であると考えられ、病原微生物リスクを低減させることを目的とした再生水処理技術として、紫外線消毒の利用価値は高いと考えられた。また、災害時等を想定した際に、通常の二次処理水の濃度レベルが得られない場合においても凝集剤添加等の前処理と組み合わせ紫外線消毒を行うことで、ノロウイルスの感染リスクを低減できる可能性があると考えられた。

(4) 今後の展開

本研究においては、下水再生水の処理技術としての紫外線消毒に着目し、病原微生物に対する消毒の有効性と感染リスクの低減効果について検討を行い、その有効性を具体的に明らかとした。今後はより精度高くノロウイルスの感染リスクを評価するとともに、ノロウイルス以外の病原微生物にも焦点を充て検討していくことが重要であると考えられる。将来的には本研究で得られた成果が再生水の利用促進に繋がるように研究を発展していくことが今後必要である。

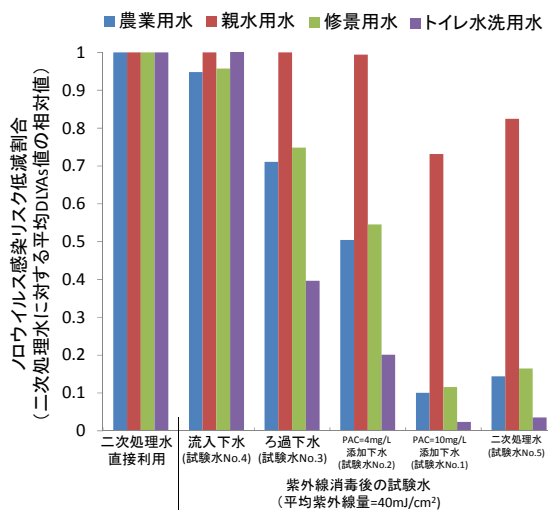


図-5 試験水を原水として用いた際の紫外線消毒後の再生水の利用時のノロウイルス感染リスク低減割合

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 安井宣仁、諏訪守、桜井健介、津森ジュン、鈴木穰、水質性状の異なる下水を対象とした紫外線消毒によるノロウイルス遺伝子への影響評価、第 49 回日本水環境学会 年会、2015 年 3 月 16-18 日、金沢大学
- ② 安井宣仁、諏訪守、桜井健介、津森ジュン、下水処理水を対象とした紫外線照射におけるノロウイルスの除去特性、第 17 回日本水環境学会シンポジウム、2014 年 9 月 8-10 日、滋賀県立大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 宣仁 (YASUI, Nobuhito)
 独立行政法人土木研究所 材料資源研究グループ (リサイクルチーム)・研究員
 研究者番号：9 0 5 4 7 4 8 1