

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18206056

研究課題名（和文）病原微生物のソーストラッキングを用いた公共財としての水の安全確保

研究課題名（英文） Development of Safety Management of Public Water Using Microbial Source Tracking

研究代表者

大垣 眞一郎 (OHGAKI SHINICHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号 20005549

研究成果の概要：

総合的な病原微生物対策のために必要ではあるが未解決の課題群に取り組み、以下の成果を上げた。

紫外線照射により不活化した大腸菌の海水中での挙動を解明するため、NaCl 溶液、MgCl<sub>2</sub> 溶液、CaCl<sub>2</sub> 溶液中における光回復の程度を調べた。その結果、全ての溶液中で、高い塩濃度では光回復が抑制された。光回復抑制の機構は、細胞膜内外における陽イオンの電位差が浸透圧を生み出し、光回復酵素の生成が阻害されたからだと考えられる。

紫外線消毒の効率を上げるための試みとして、銀の併用によるウイルスの不活化効果の測定を行った。銀イオン 0.05ppm 存在下における低圧紫外線による不活化では、大腸菌およびファージ Q は銀存在下で不活化速度が大きくなり紫外線と銀の相乗効果が見られるが、ポリオウイルスおよびマウスノロウイルスに対しては銀の影響は見られなかった。

湖沼等において発生する藍藻類の異常増殖を抑制する新たな手法としての中圧及び低圧の紫外線照射処理において、藍藻類が生産する毒素ミクロキスティンの放出に関する研究を行った。その結果、紫外線照射によって藻類が破壊される影響よりも藻類が減少する影響が卓越し、水中のミクロキスティン濃度の上昇が抑制されることを見出した。

水道の給配水管路等において形成される生物膜などで増殖するレジオネラ属菌およびシュードモナス属菌に対して、銀を用いた消毒を試みた。その結果、菌体あたりに吸着する銀の量をパラメータとすることで消毒効果を定式化することが可能であることを見出した。

ウイルス粒子の選択的な濃縮を行う手法として Mg を用いる方法が適していることが分かった。また、ノロウイルスの塩素消毒耐性は他の腸管系ウイルスと同等以下であり、十分な塩素消毒が施された配水システムにおいてはノロウイルスが感染力を保ったまま末端給水栓まで到達する可能性は低いことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2007 年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2008 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
年度			
年度			
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

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：水の安全、病原微生物、ウイルス、遺伝子、指標微生物

## 1. 研究開始当初の背景

アメリカ合衆国や日本などの先進国において、1990年代にクリプトスポリジウムによる大規模な水系感染が発生したことにより、水中病原微生物に関するパラダイムが転換した。すなわち、塩素の存在と大腸菌群の不在で水の安全性を宣言できていた時代が終わり、水系感染を引き起こしうるすべての微生物について安全であることの根拠を求められる時代に突入したのである。実務的にはクリプトスポリジウムへの対策が急務とされたが、学術的観点からはあらゆる病原微生物に対する関心が高まっており、2004年にWHOから出されたGuidelines for drinking water quality 3edにおいても、総合的な病原微生物対策の必要性が説かれている。なかでもウイルスに対する水の安全性については、もともと情報が不足していることに加え、安全を確保するための筋道が不明瞭であることが問題視されている。

安全な水供給において、水源から水処理、配水等における水質監視を効果的に行うことが重要であり、そのためのスキームとしてのHACCPの考え方の導入と、個別の監視方法の開発を統合的に進める必要がある。

## 2. 研究の目的

科学的知見の獲得・蓄積を通じて、ウイルスを含めた水の微生物学的安全性をいかに確保するか、その最善策を提示することを目指す。

最終的には、HACCP(危害分析・重要管理点)の考え方に基づいた水の安全性、すなわち「どこで」「何を」を測って制御可能なバリアをどのように管理すれば安全であると言えるのかを提言する。さらに、測定法によっては不活化している微生物を検出することを考えれば、「どのように」測るのかについても明らかにする。

個別の研究課題は以下の通りである。

- (1) 紫外線消毒における光回復等に関する実験的検討
- (2) 藍藻類の異常増殖を抑制するための紫外線照射処理の有効性
- (3) 生物膜抑制としての銀および銅の有効性の評価
- (4) 水中ウイルス濃縮・測定法の開発及び評価
- (5) マウスノロウイルスの測定法の開発及びその指標性の評価

## 3. 研究の方法

(1) 紫外線処理した微生物の自然環境中における消長の把握を目的とし、紫外線照射により不活化した大腸菌の、NaCl溶液、MgCl<sub>2</sub>溶液、CaCl<sub>2</sub>溶液中における光回復の程度を調べた。紫外線消毒の効率を上げるための試みとして、銀の併用によるウイルスの不活化効果の測定を行った。

また、紫外線消毒において、あらたな有毒化学物質として着目されているNDMAの分解が可能かどうかを調べるため、ガスクロマトグラフィーを用いた検出方法の検討を行った。

(2) 湖沼等において発生する藍藻類の異常増殖を抑制する新たな手法としての中圧及び低圧の紫外線照射処理において、藍藻類が生産する毒素ミクロキスティンの放出に関する研究を行った。

(3) 水道の給配水管路等において形成される生物膜などで増殖するレジオネラ属菌およびシュードモナス属菌に対して、銀を用いた消毒を試みた。

(4) 水中ウイルスの測定においてPCR法を用いるが、その前段階の濃縮においては裸のRNAではなく完全なウイルス粒子を選択的に回収することが望ましい。ここでは4種類の1次濃縮法によるポリオウイルスRNAの回収率を測定し、外套蛋白に保護されていないウイルス核酸が濃縮法によって回収されるかを定量した。また、ポリオウイルス粒子の回収率も測定し、RNAの回収率と比較した。

また、エンベロープを持たない水系感染性のウイルスとしてコイヘルペスウイルスを対象として、水からの濃縮・検出法について調べた。

(5) ノロウイルスは、下水処理場や浄化槽での処理を経た後も処理水中に一部が残存し、河川へ達すると考えられる。ヒトノロウイルスに汚染された河川水を水道水源として利用した場合、ヒトノロウイルスによる水道水の汚染と水道水の摂取によるヒトへの健康被害の発生が懸念される。

2003年にその存在が初めて報告されたマウスノロウイルスは、形態学的にも遺伝学的にもヒトノロウイルスに類似したウイルスであり、ノロウイルス属のGVに分類されている。そして、このマウスノロウイルスは、細胞培養により感染力の測定が可能であり、細胞培養が可能でヒトノロウイルスの中でヒトノロウイルスに最も近縁なウイルスであることから新たな代替指標として急速に注目を集めている。

上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルス

スの感染力価と遺伝子数の消長を測定した。比較のため、塩素消毒実験で広く用いられているポリオウイルスと感染者糞便から精製したヒトノロウイルスを使用し、水道水中のヒトノロウイルスに対する塩素消毒の有効性を検証した。

#### 4. 研究成果

(1) 紫外線処理した微生物の自然環境における消長の把握を目的とし、紫外線照射により不活化した大腸菌の、NaCl 溶液、MgCl<sub>2</sub> 溶液、CaCl<sub>2</sub> 溶液中における光回復の程度を調べた。その結果、2log の光回復 (リン酸緩衝溶液) を基準とすると、全ての溶液中である濃度までは光回復したが、高濃度になると光回復が抑制された。光回復抑制の機構は、細胞膜内外における陽イオンの電位差が浸透圧を生み出し、光回復酵素の生成が阻害されたからだと考えられる。

紫外線消毒の効率を上げるための試みとして、銀の併用によるウイルスの不活化効果の測定を行った。銀イオン 0.05ppm 存在下における低圧紫外線による不活化と紫外線単独処理を比較した場合、大腸菌およびファージ Q は銀存在下で不活化速度が大きくなり紫外線と銀の相乗効果が見られるが、ポリオウイルスおよびマウスノロウイルスに対しては銀の影響は見られないという結果を得た。

また、紫外線消毒において、あらたな有毒化学物質として着目されている NDMA の分解が可能かどうかを調べるため、ガスクロマトグラフィを用いた検出方法の検討を行った。

(2) 湖沼等において発生する藍藻類の異常増殖を抑制する新たな手法としての中圧及び低圧の紫外線照射処理において、藍藻類が生産する毒素ミクロキスティンの放出に関する研究を行った。その結果、紫外線照射によって藻類が破壊される影響よりも藻類が減少する影響が卓越し、水中のミクロキスティン濃度の上昇が抑制されることを見出した。

(3) 水道の給配水管路等において形成される生物膜などで増殖するレジオネラ属菌およびシュードモナス属菌に対して、銀を用いた消毒を試みた。その結果、菌体あたりに吸着する銀の量をパラメータとすることで消毒効果を定式化することが可能であることを見出した。また、銀と銅を併用することにより、消毒効果が向上することが示された。

(4) 水中ウイルスの測定において PCR 法を用いるが、その前段階の濃縮においては裸の RNA ではなく完全なウイルス粒子を選択的に

回収することが望ましい。ここでは 4 種類の 1 次濃縮法によるポリオウイルス RNA の回収率を測定し、外套蛋白に保護されていないウイルス核酸が濃縮法によって回収される可能性を明らかにした。また、ポリオウイルス粒子の回収率も測定し、RNA の回収率と比較した。酸洗浄法に陽イオンとして Mg イオンを用いた場合、MilliQ 水、水道水、下水処理水および海水から高い粒子の回収率が得られた。RNA の平均回収率に比べ、粒子の平均回収率は 6.6 ~ 14.9 倍高かった。同様に Al イオンを用いた場合、RNA よりも粒子の方が高い回収率を示したが、平均回収率の差は 1.4 ~ 4.2 倍と小さく、RNA が回収されやすい手法であった。これらのことから、ウイルス粒子の選択的な濃縮を行う手法として Mg を用いる方法が適していることが分かった。

また、エンベロープを持たない水系感染性のウイルスとしてコイヘルペスウイルスを対象として、水からの濃縮・検出法について調べた。その結果、ヒト腸管系ウイルスに比べて低い回収率 (16 ± 11%, n = 8) ではあるものの、塩化アルミニウムを用いるウイルス濃縮法が優れていることを見出した。

(5) 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価と遺伝子数の消長を測定した。比較のため、塩素消毒実験で広く用いられているポリオウイルスと感染者糞便から精製したヒトノロウイルスを使用し、水道水中のヒトノロウイルスに対する塩素消毒の有効性を検証した。その結果、ノロウイルスの塩素消毒耐性は他の腸管系ウイルスと同等以下であり、十分な塩素消毒が施された配水システムにおいてはノロウイルスが感染力を保ったまま末端給水栓まで到達する可能性は低いことが示唆された。

#### 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)

E Haramoto, M Kitajima, H Katayama, T Ito and S Ohgaki (2009) Development of virus concentration methods for detection of koi herpesvirus in water, *Journal of Fish Diseases* 32, 297-300 (査読有り)

北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2008) 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明 *環境工学研究論文集*, 第45巻., 361-370. (査読有り)

Hiroshi Sakai, Kumiko Oguma, Hiroyuki Katayama and Shinichiro Ohgaki (2007) Effects of Low or Medium Pressure UV Irradiation on the Release of

Intracellular Microcystin, Water Research, 41, 3458 - 3464. (査読有り)

Myoung Goo Hwang, Hiroyuki Katayama and Shinichiro Ohgaki (2007) Inactivation of Legionella pneumophila and Pseudomonas aeruginosa: Evaluation of the Bactericidal ability of silver cations Water Research, 41, 4097 - 4104. (査読有り)

Eiji Haramoto, Hiroyuki Katayama, Kumiko Oguma, and Shinichiro Ohgaki (2007) Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods, Journal of Virological Methods. 142(1-2):169-173. (査読有り)

Hiroshi Sakai, Kumiko Oguma, Hiroyuki Katayama and Shinichiro Ohgaki (2007) Effects of low- or medium-pressure ultraviolet lamp irradiation on Microcystis aeruginosa and Anabaena variabilis, Water Research, 41(1), 11-18. (査読有り)

黄 明九・片山浩之・大垣眞一郎 (2006) 銀及び銅の曝露に対する Legionella pneumophila の細胞内生存特性 環境工学研究論文集、第 43 巻、237-243 (査読有り)

[学会発表](計 9 件)

松森克人, 片山浩之, 遠矢幸伸, 大垣眞一郎(2009) カートリッジ型陰電荷膜を用いた大容量の水試料からのウイルス濃縮法の開発 第 43 回日本水環境学会年会講演集、於山口、2009 年 3 月 17 日

Eiji Haramoto, Masaaki Kitajima, Hiroyuki Katayama, Shoichi Kunikane, and Shinichiro Ohgaki. 2008. One year monthly monitoring of sapoviruses and other viruses at a wastewater treatment plant in Japan. 6th IWA World Water Congress and Exhibition. 663181. (September 7-12, 2008, Austria Center, Vienna, Austria)

片山 浩之・端 昭彦・春日 郁郎・真名垣 聡・大垣 眞一郎 (2008) 降雨後の東京湾沿岸域におけるウイルス及び指標微生物の消長、土木学会年会講演要旨集、於仙台、2008 年 9 月 11 日

松森克人、北島正章、片山浩之、遠矢幸伸、大垣眞一郎 (2008) 浄水処理工程におけるウイルス除去率の評価を目的としてウイルス測定法の開発 第 59

回全国水道研究発表会講演集、pp484-485. 於仙台、2008 年 5 月 28 日

松原康一, 原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2008) 空気中からの下水由来腸管系ウイルスの回収・検出法の開発 第 42 回日本水環境学会年会講演集、p424. 於名古屋、2008 年 3 月 19~21 日

昔宣希, 遠矢幸伸, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2008) 紫外線消毒によるマウスノロウイルスの不活化及び銀併用による相乗効果の評価 第 42 回日本水環境学会年会講演集、p165. 於名古屋、2008 年 3 月 19~21 日

北島正章, 遠矢幸伸, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2008) 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価および遺伝子数の消長 第 42 回日本水環境学会年会講演集、p266. 於名古屋、2008 年 3 月 19~21 日

酒井宏治・小熊久美子・片山浩之・大垣眞一郎(2007) 低圧・中圧紫外線ランプ照射処理が細胞内マイクロキスティン放出へ及ぼす影響 第 58 回全国水道研究発表会講演集、pp244-245. 於釧路、2007 年 5 月 23 日

伊崎堅太郎、片山浩之、小熊久美子、大垣眞一郎 (2007) 紫外線照射後の Escherichia coli の光回復に及ぼす塩分の影響、第 41 回日本水環境学会年会講演集、p286. 於大阪、2007 年 3 月 15~17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大垣 眞一郎 (OHGAKI SHINICHIRO)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号: 20005549

(2) 研究分担者

滝沢 智 (TAKIZAWA SATOSHI)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号: 10206914

(H20 年度辞退)

佐藤 弘泰 (SATO HIROYASU)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授  
研究者番号: 90251347

片山 浩之 (KATAYAMA HIROYUKI)  
東京大学・大学院工学系研究科・准教授  
研究者番号: 00302779

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

(3) 連携研究者

滝沢 智 (TAKIZAWA SATOSHI)  
東京大学・大学院工学系研究科・教授  
研究者番号：10206914  
(H20年度)