

クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用化

分担研究者 麻布大学環境保健学部教授

平田 強

協力研究者 麻布大学環境保健学部講師

森田 重光

概要

本分担研究は2つの課題で構成されている。

研究課題1「紫外線を照射したクリプトスポリジウムオーシストにおける DNA レベルの明・暗回復」では、紫外線の照射によってオーシストの DNA に生成されるピリミジン二量体の数と、その光回復と暗回復による修復の定量化を試みた。ピリミジン二量体の数は ESS (endonuclease sensitive site) 法で定量した。得られた結果は次のとおりである。ピリミジン二量体の生成数は紫外線照射線量にほぼ比例して増加し、それらのピリミジン二量体は、光回復、暗回復のいずれのプロセスでも容易に修復された。光回復処理では、修復されずに残存する二量体数が、処理前の二量体数に関係なく、ほぼ一定となる傾向が認められた。その一定値を超える数のピリミジン二量体が生成されている場合は、その超過分に相当する数の ESS が修復された。暗回復では、紫外線照射線量が 0~3 mJ/cm²の間では、修復された二量体の数が暗回復処理前の二量体の数に依存し、紫外線照射線量の多いものほど、修復される二量体数が増える傾向が認められた。しかし、紫外線照射線量が 3 mJ/cm²を超えると増加傾向がなくなり、修復される二量体の数がほぼ一定となった。暗回復プロセスで修復できる二量体の数に上限があって一定値となったのか、暗回復プロセスが 24 時間では完了していないのか、更に検討する必要がある。

研究課題2「クリプトスポリジウムオーシストの紫外線による不活化に及ぼす共存物質の影響」では、クリプトスポリジウムオーシストへの付着性が高いフミンとカオリンを選んで、その共存の影響をマウス感染試験および脱嚢試験で評価した。その結果、フミンがオーシスト壁に付着した系では付着していない系に比べて不活化力が低下する傾向があるが、その程度は小さく、不活化 log 数で約 20%程度の低下であること、カオリンでもオーシスト壁に付着すると不活化力が小さくなる傾向が認められたが、不活化 log 数の低下はフミンの場合よりも更に小さく、約 10%程度であること、したがって、フミンやカオリンがオーシストと混在する系では、フミンやカオリンが水中に分散している場合であっても、その一部がオーシスト壁に付着している場合であっても、その影響は不活化 log 数で 20%かそれ以下にとどまる可能性が高いことが示唆された。

2-1

UVを照射したクリプトスポリジウムオーシストに
おけるDNAレベルの明・暗回復

UV を照射したクリプトスポリジウムオーシストに おける DNA レベルの明・暗回復

分担研究者 麻布大学環境保健学部 平田 強

協力研究者 麻布大学環境保健学部 森田 重光

1. 研究目的

紫外線照射によって一旦感染性を喪失したクリプトスポリジウムのオーシストは、明暗いずれの回復プロセスでも感染性を取り戻すことがない (Morita *et al.*, 2002)。一方で、紫外線によって生じたピリミジン二量体は、光回復・暗回復のいずれの回復プロセスでも明らかに修復される (Oguma *et al.*, 2001)。

ピリミジン二量体の光回復・暗回復については、昨年度の分担研究でも検討したが、画像解析装置の精度の問題から、再現性・定量性が十分ではなかった。そこで本年度は、新たな画像解析装置を使用して、DNA レベルの光回復・暗回復の定量を試みた。

2. 研究方法

2. 1 供試オーシスト

麻布大学付置生物科学総合研究所で Scid マウス (C.B-17./Icr, 日本クレア) を用いて継代維持している *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストを実験に供した。オーシストはマウスの糞便からショ糖密度勾配遠心法で分離・精製し、0.15M リン酸塩緩衝液中で保存した。精製後 1 ヶ月以内に試験に供した。

2. 2 紫外線照射

φ56 mm のプラスチックシャーレにオーシスト懸濁液 (2.0×10^6 oocysts/mL) を 10 mL を入れた。水層厚 4.0 mm のオーシスト懸濁液における紫外線線量率の減衰はわずか 2% であったため、オーシスト懸濁液表面の紫外線線量率を水層全体の紫外線線量率とみなした。オーシスト懸濁液を入れたシャーレを 5W 低圧水銀ランプ (QCGL5W-14 97D, 岩崎電気社製) の直下に置き、照射線量率 0.10 mW/cm^2 の紫外線を照射した。照射線量率は紫外線積算光量計 (UTI-150-A, ウシオ電機社製) で計測し、紫外線照射線量は照射時間で制御した。

2. 3 光回復処理

紫外線照射後直ちに 15W 蛍光灯ランプ (FL15N 白色蛍光灯ランプ, 東芝製) を用いて蛍光灯光線を照射した。蛍光灯光線の照射線量率は UV-A 領域用紫外線線量計 (UVR-2+UD36, TOPCON 製) による 360 nm 照射線量率で 0.05 または 0.10 mW/cm^2 とし、2 時間連続照射した。蛍光灯光線を照射している間は水温を 20°C に維持し、マグネチックスターラーで常時緩やかに攪拌した。

2. 4 暗回復処理

紫外線照射後直ちにアルミホイルでくるんで遮光し、 20°C の消灯したインキュベーター内に 24

時間静置した。

2. 5 ESS 法

ESS 法は小熊ら (2001) の方法に準拠した。すなわち、オーシスト懸濁液を液体窒素中に 3 分間浸漬して凍結させた後、95℃で 5 分間融解してオーシスト壁を破壊し、DNA 抽出キット (Genomic-tip, Qiagen 社製) で DNA を抽出した。DNA 抽出液に UV エンドヌクレアーゼを添加して 37℃で 45 分間反応させ、ピリミジン二量体の部分に切断を生じさせた。反応後、アルカリ染色剤 (100 mM NaOH, 1 mM EDTA, 2.5% Ficoll, 0.05% BCG) を添加し、0.5% アルカリアガロースゲル (Agarose H, 日本ジーン製) 上で電気泳動した。泳動槽にはアルカリ緩衝液 (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) を満たし、0.5 V/cm の電圧で 17 時間泳動した。DNA マーカーとして 8GT (T4dC+T4dC/BglII digest mixture, 和光純薬工業製) を用い、試料 DNA と同一ゲル上で泳動した。電気泳動後のゲルは、エチジウムブロマイド溶液に 5 時間浸漬して染色した後、画像処理装置 (Gel Doc 2000 システム, BIORAD 社製) で読み取り、解析ソフトウェア (Quantity One, BIORAD 社製) で解析した。

これらのシステムにより DNA の蛍光をピクセルの集合として認識させ、泳動距離と蛍光強度の関係図 (蛍光強度分布) を得た。各試料の DNA の総蛍光強度のちょうど 1/2 (すなわち、全 DNA の 1/2) が通過した泳動距離を当該試料の泳動距離中央値とし、DNA マーカーの泳動結果から得た泳動距離と DNA 塩基数の二次回帰式を用いて、各サンプルの DNA の泳動距離中央値を塩基数中央値 (L_{med}) に換算した。ここで、 L_{med} と DNA 断片数により平均化した塩基数平均値 L_n との間には (1) 式が成り立つ (Veatch and Okada, 1969)。

$$L_n = 0.6 \times L_{med} \quad (1)$$

単位塩基あたりの ESS 数は (2) 式 (Freeman *et al.*, 1986) により算出した。

$$\frac{ESS}{base} = \frac{1}{L_{n(+UV)}} - \frac{1}{L_{n(-UV)}} \quad (2)$$

ここで、 $L_{n(+UV)}$: 紫外線照射群の L_n

$L_{n(-UV)}$: 紫外線非照射群の L_n

なお、UV エンドヌクレアーゼは、Carrier and Setlow (1970) の方法に従って *Micrococcus luteus* から抽出したものを、東京大学工学部小熊久美子博士から提供していただいた。

3 結果と考察

3. 1 紫外線照射線量と生成 ESS 数の関係

紫外線照射線量と、生成した ESS の数との関係を図 1 に示す。紫外線照射線量が増加するにし

たがって、ESS 数が直線的に増加した。紫外線単位照射線量当たりの ESS 生成数は $0.61 \text{ ESS}/10^4 \text{ base/mJ cm}^{-2}$ であり、*E. coli* の $0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base/mJ cm}^{-2}$ (Oguma *et al.*, 2001) の 1.5 倍であった。このことは、クリプトスポリジウムのオーシストでは、*E. coli* よりも、紫外線が DNA に到達しやすい（光の透過性が高い）ことを示唆している。クリプトスポリジウムのオーシストの径は $4\text{-}6 \mu\text{m}$ であるが、微粒子計で測定すると $2 \mu\text{m}$ かそれ以下の径の粒子として認識されることから、クリプトスポリジウムのオーシストの光透過性が高いことが推察される。この高い光透過性が、クリプトスポリジウムが紫外線に対して高い感受性を有する理由の一つになっている可能性がある。

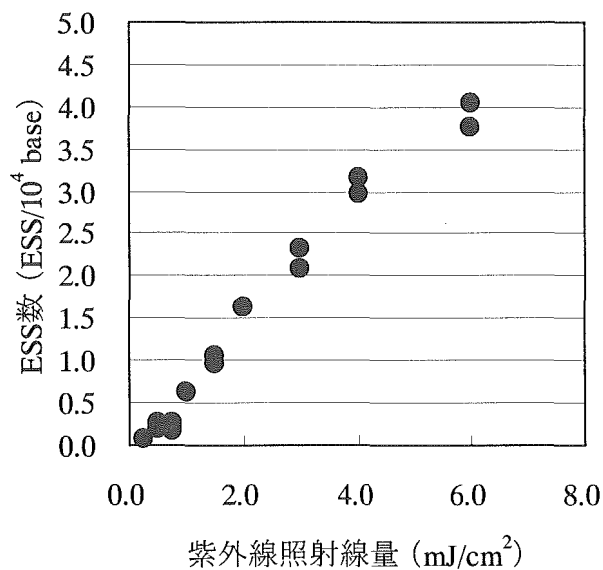


図1 紫外線照射線量と ESS 生成数との関係

3. 2 ESS の光回復

紫外線照射線量と蛍光灯光線照射後の ESS 数との関係を図 2 に示す。光回復処理における蛍光灯光線の照射時間は 2 時間で一定、照射線量率は 0.05 と 0.10 mW/cm^2 の 2 通りとしたが、ESS の修復の数や率に、蛍光灯光線の線量率の影響は認められなかった。したがって、今回の光回復処理条件は、生じる光回復を十分に発現させるものであったと判断してよいと考えられる。

図 2 から、ESS は蛍光灯光線を照射することによって明らかに修復された。蛍光灯光線照射後に残存する ESS の数は、紫外線照射によって生じた ESS 数に関係なく、いずれも $0.80 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以下にまで減少した。すなわち、紫外線照射によって $0.80 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ を超える ESS が生じた場合、その超過分がすべて修復されたと解釈できる。

紫外線照射直後の ESS 数と修復率との関係を図 3 に示す。紫外線によって生じた ESS 数が $3 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 程度までは、紫外線照射直後の ESS 数が多くなるにつれて修復率も高くなる傾向が顕著で、 $3 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以上では 90% 超の高い修復率が維持された。

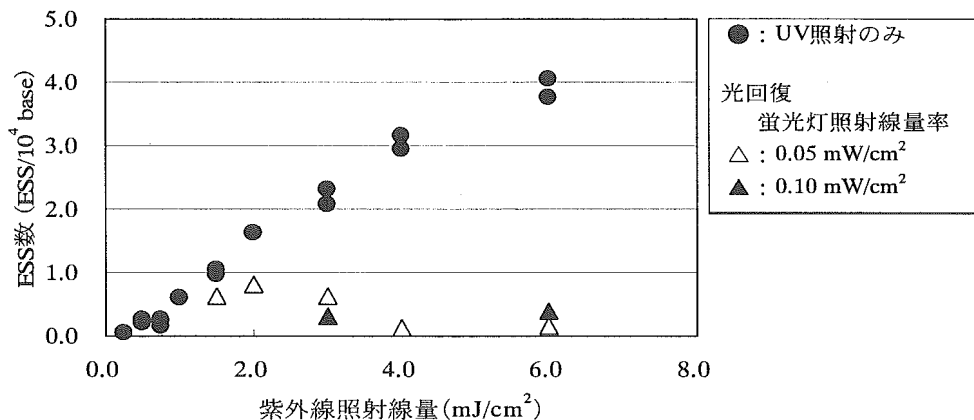


図2 紫外線照射線量と光回復後の ESS 残存数との関係

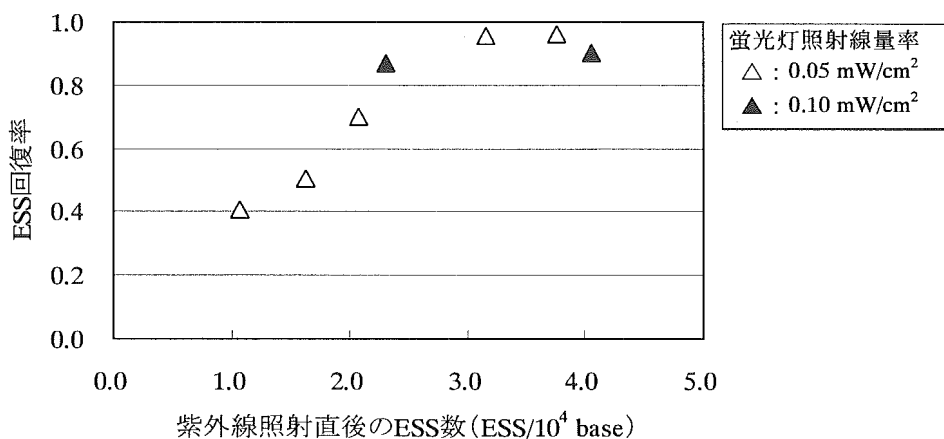


図3 紫外線照射直後の ESS 数と回復率との関係

紫外線照射直後の ESS 数と光回復した ESS 数との関係を図4に示す。紫外線照射によって生じた ESS 数にほぼ比例して、修復された ESS の数が増加した。紫外線照射によって生じた ESS の数 (E_{uv}) と修復された ESS 数 (E_r) との回帰式を(3)式に示す。

$$E_r = 1.169E_{uv} - 0.8714 \quad (R^2=0.9823) \quad (3)$$

昨年度の分担研究では、光回復処理後の残存 ESS 数は、紫外線を 0.5 mJ/cm^2 照射したときも 1.0 mJ/cm^2 照射したときも、ともに約 $0.55 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ で平衡になり、それ以上は修復されなかった (Morita *et al.*, 2002)。本年度の研究で得られた(3)式では、紫外線照射による ESS 生成数が $0.75 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ のときに、修復された ESS 数がちょうど 0 になる。すなわち、紫外線による ESS 生成数が $0.75 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以下の場合には光回復処理しても ESS はほとんど修復されないが、 $0.75 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 以上の ESS が生成している場合は、その超過分のほとんどが修復される。このことは、紫外線照射によって生じる ESS に、光回復プロセスで修復できるものと修復できないものが

あって、光回復プロセスで修復できない ESS は少量の紫外線で速やかに生成されているとの仮説が成立しうること示唆している。修復できない ESS の数は、昨年度と今年度の研究成果から、紫外線照射線量にかかわらず 0.5~1.0 ESS/10⁴ base であるといえよう。そして、この修復できない ESS の生成が、紫外線を照射したオーシストで感染性が全く回復しない理由の一つとなっていると推測される。

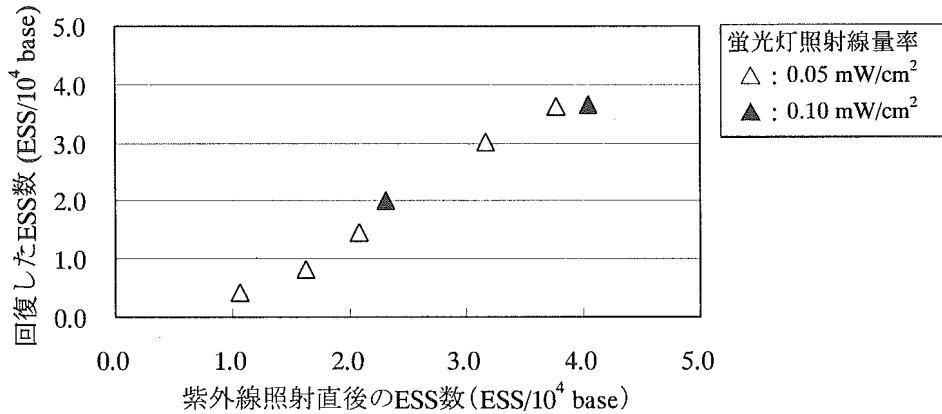


図4 紫外線照射直後の ESS 数と光回復した ESS 数との関係

3. 3 ESS の暗回復

紫外線照射線量と暗回復処理後の残存 ESS 数の関係を図5に示す。光回復の場合と異なり、紫外線照射線量の多いものほど（したがって紫外線によって生成した ESS の数の多いものほど）、暗回復処理後に残存する ESS 数も多い傾向が認められた。

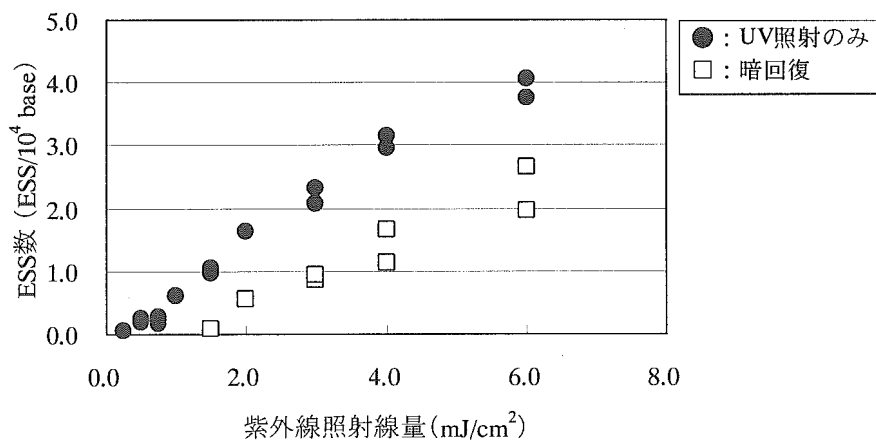


図5 紫外線照射線量と暗所静置後の ESS 数との関係

紫外線照射直後の ESS 数と、暗回復プロセスによる修復率の関係を図6に、紫外線照射直後の ESS 数と修復された ESS の数の関係を図7に示す。紫外線照射によって生じた ESS の数が多いも

のほど、暗回復率が小さくなる傾向があった（図6）。回復した ESS の数で見ると、紫外線照射による ESS 生成数が約 $3 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ までは徐々に増加し、ESS 生成数が約 $3 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ を超えると、回復処理後の残存 ESS 数が $1.5 \sim 2 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ 程度の値でほぼ一定値となった（図7）。暗回復の最大値が ESS 数で $1.5 \sim 2 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ なのか、それとも、24 時間では反応時間が不足して ESS の修復数が $1.5 \sim 2 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ にとどまっただけなのか、再検討が必要である。

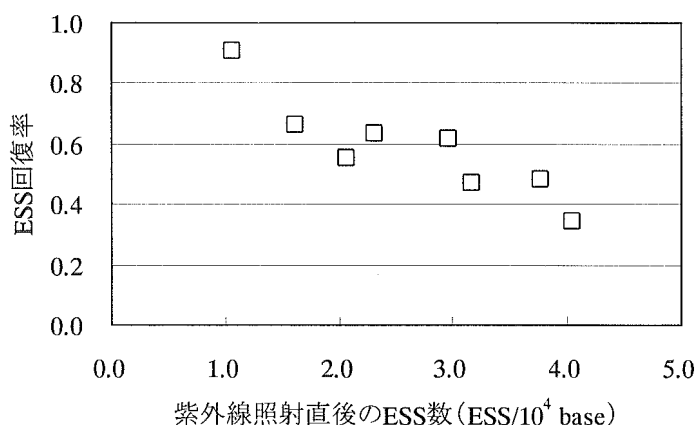


図6 紫外線照射直後の ESS 数と回復率との関係

4 結論

本分担課題では、クリプトスポリジウムオーシストにおける紫外線照射によるピリミジン二量体の生成と、可視光照射による単量体への修復（光回復）ならびに暗所での単量体への修復（暗回復）の程度を、ESS 法で計測したピリミジン二量体の数で評価した。その結果、

- (1) 紫外線照射線量にほぼ比例してピリミジン二量体数が増加する。
- (2) ピリミジン二量体は光回復でも暗回復でも明らかに修復される。
- (3) 光回復では、光回復反応がほぼ完結していたと考えられるが、すべてのピリミジン二量体が修復されるのではなく、紫外線照射線量に関係なくほぼ一定値（ $0.5 \sim 1.0 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$ ）のピリミジン二量体が修復されずに残る。
- (4) 暗回復では、紫外線照射によって生じたピリミジン二量体数に比例にして、回復処理後に残存するピリミジン二量体数が多くなる。しかし、暗回復処理時間が 24 時間の一条件のみであり、酵素反応が完了していない可能性がある。

このように、本研究により、クリプトスポリジウムのオーシストにおける光回復、暗回復プロセスによるピリミジン二量体の修復量を相当程度定量することができた。暗回復については、反応時間の延長が修復 ESS 数の増加をもたらすかどうか、更に詳細に検討する必要がある。

参考文献

- Carrier, W. L. and Setlow, R. B. (1970) Endonuclease from *Micrococcus luteus* which has activity toward ultraviolet irradiated deoxyribonucleic acid: purification and properties, *J. Bacteriol.*, Vol. 102, 178-186
- Freeman, S. E., Blackett, A. D., Monteleone, D. C., Setlow, R. B., Sutherland B. M. and Sutherland, J. C. (1986) Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: application of pyrimidine dimers, *Analytical Biochem.*, Vol. 158, 119-129
- Harm, W. (1980) Biological effects of ultraviolet radiation, Cambridge University Press, New York, 31-39
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N. and Fujiwara, M. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, No. 11, 3029-3032
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T. and Ohgaki, S. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during ultraviolet light inactivation and photoreactivation, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, No. 10, 4630-4637
- 小熊久美子, 片山浩之, 三谷啓志, 大垣眞一郎 (2001) エンドヌクレアーゼ・センシティブ・サイト法による *Escherichia coli* の紫外線不活化および光回復の評価, 水環境学会誌, Vol. 8, No. 8, 534-538
- Ransome, M. E., Whitmore, T. N. and Carrington, E. G. (1993) Effects of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*, *Wat. Suppl.*, Vol. 11, 75-89
- Veatch, W. and Okada S. (1969) Radiation-induced breaks of DNA in cultured mammalian cells, *Biophys.*, Vol. 9, 330-346

2-2

クリプトスポリジウムオーシストの紫外線による不活化に
及ぼす共存物質の影響

クリプトスポリジウムオーシストの紫外線による 不活化に及ぼす共存物質の影響

分担研究者 麻布大学環境保健学部 平田 強

協力研究者 麻布大学環境保健学部 森田 重光

1. 研究目的

各種消毒剤の消毒効果は一般に、水中の共存物質や微生物表面の付着物質の影響を受ける。特に、微生物表面に付着しやすい性質を持った物質が共存すると、それらが対象微生物の外表面に付着し、消毒剤の効果を減弱させるおそれがある。これまで、浄水汚泥と河川濁質を用いて、クリプトスポリジウムのオーシストの紫外線による不活化に及ぼす懸濁物質共存の影響を評価してきたが、本年度は、オーシストへの付着性が高いと考えられるフミンおよびカオリンを用いて、その影響を脱嚢試験およびマウス感染試験で評価した。なお、本実験は、麻布大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. 研究方法

2. 1 供試オーシスト

研究課題1と同じオーシストを用いた。

2. 2 濁質/オーシスト懸濁液の調製

(1) 溶存フミン/オーシスト混在系

フミン酸（和光純薬工業製）を0.01M水酸化ナトリウム溶液に溶解したのち、塩酸でpHを8.0に調整した。これにオーシストを添加し、直ちに紫外線を照射した。

(2) 非付着性フミン/オーシスト混在系

フミン酸を0.01M水酸化ナトリウム溶液に溶解した後、塩酸でpH5.5に調整しフミン粒子を成長させた。1時間エージングした後、オーシストを添加し、直ちに紫外線を照射した。

(3) 付着性フミン/オーシスト混在系

pH8.0に調整したフミン酸溶液にオーシストを添加し、塩酸でpHを5.5に調整してから1時間エージングしてオーシスト壁にフミンを付着させた。エージング後、直ちに紫外線を照射した。

(4) 非付着性カオリン/オーシスト混在系

ピロリン酸ナトリウムを添加したカオリン（粒子径 $<1.0\mu\text{m}$ ）懸濁液にオーシストを添加し、直ちに紫外線を照射した。

(5) 付着性カオリン/オーシスト混在系

ピロリン酸ナトリウムを添加しないカオリン懸濁液にオーシストを添加し、1時間エージングしてオーシスト壁にカオリンを付着させた後、紫外線を照射した。

2. 3 紫外線照射

φ36 mm のシリコンコーティングプラスチックピンに 2.2 の方法で調製した濁質/オーシスト懸濁液を 30 mL 入れ、上方から 5W 低圧水銀ランプ (QCGL5W-14 97D, 岩崎電気社製) で紫外線を照射した。試料とランプの距離を調整して、水層表面における照射線量率が、感染試験による評価実験系では 0.10 または 0.20 mW/cm², 脱嚢試験による評価実験系では 1.0 mW/cm² となるように設定した。すべての実験で、水層全体の混合状態が完全混合に近づくように、紫外線を照射している間、マグネチックスターラーで連続的に強制攪拌した。

フミンやカオリンなど、紫外線の吸収や透過妨害をもたらす物質が共存すると深さ方向に紫外線線量率が減衰する。そこで、紫外線照射に供する試料ごとに 254 nm 吸光度を測定し、紫外線線量率が深さ方向に指数関数的に減衰すると仮定して、実質紫外線照射線量の水層全体の平均値を算出し、それに照射時間を乗じて、各試料の平均紫外線照射線量とした。平均紫外線照射線量は、感染試験では 1.5 mJ/cm² (約 3 log 不活化相当線量), 脱嚢試験では 230 mJ/cm² (約 2 log 不活化相当線量) となるように照射時間を制御した。紫外線照射線量率は紫外線積算光量計 (UTI-150-A, ウシオ電機社製) で計測した。

2. 4 マウス感染試験

希釈した濁質/オーシスト懸濁液を 6 週齢の Scid マウスに経口投与し、投与 4 週後に糞便へのオーシストの排泄の有無を蛍光抗体染色法で調べ、MPN 法で感染力を求めた。詳細は既報 (志村他, 2001, Morita *et al.*, 2002) を参照されたい。

2. 5 脱嚢試験

Woodmansee (1987) らの脱嚢法を改良した方法 (Morita *et al.*, 2002) を用いた。この方法は脱嚢したスポロゾイト数から脱嚢率を算出する方法であり、化学的刺激に対する単なる物理的反応による脱嚢を排除できると考えられている。

3. 結果と考察

3. 1 フミン/オーシスト混在系

清水系における水層全体の平均紫外線照射線量と脱嚢で見た生残率との関係を図 1 に、フミン/オーシスト混在系における平均紫外線照射線量と生残率との関係を図 2 に示す。また、清水系における平均紫外線照射線量と相対感染力との関係を図 3 に、フミン/オーシスト混在系における平均紫外線照射線量と相対感染力との関係を図 4 に示す。

清水系において平均紫外線照射線量を 230 mJ/cm² としたときの脱嚢で見た不活化 log₁₀ 数は 1.91 log₁₀, 平均紫外線照射線量を 1.5 mJ/cm² としたときのマウス感染性で見た不活化 log₁₀ 数は 2.97 log₁₀ となり、フミンが溶存状態で共存している系の不活化 log₁₀ 数 (それぞれ 1.98 log₁₀ および 2.99 log₁₀) と一致した。また、フミンがオーシスト壁に付着すると不活化力が小さくなる傾向は認められたものの、脱嚢およびマウス感染性のいずれで見た場合も、清水系にくらべて、不活化 log 数で約 20% 程度減少したに過ぎなかった。

以上の結果から、フミンがオーシストとほぼ均一に混合している状態では、紫外線の単位線量当たりの不活化力は清水系における値とほぼ一致し、濁質を透過しても単位線量当たりの不活化力は変化しないと考えてよいことが明らかとなった。また、オーシスト壁にフミンが付着することによる局所的な遮蔽効果は小さいと考えられた。

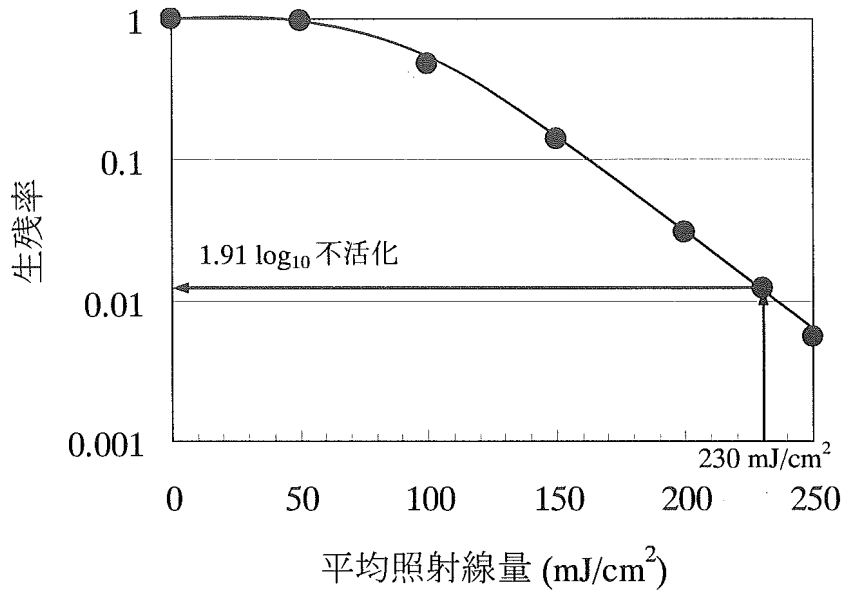


図1 清水系における平均紫外線照射線量と生存率との関係（脱囊試験）

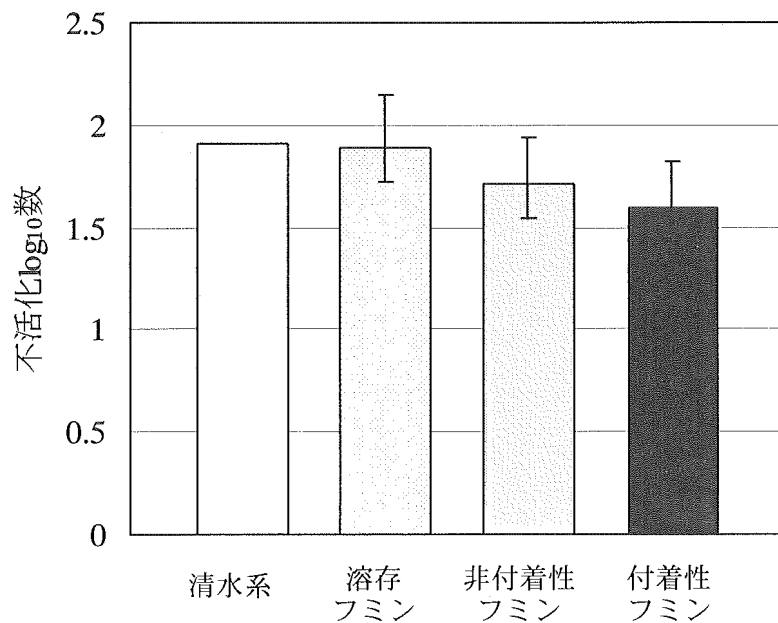


図2 紫外線不活化に及ぼす共存フミンの影響（脱囊試験）

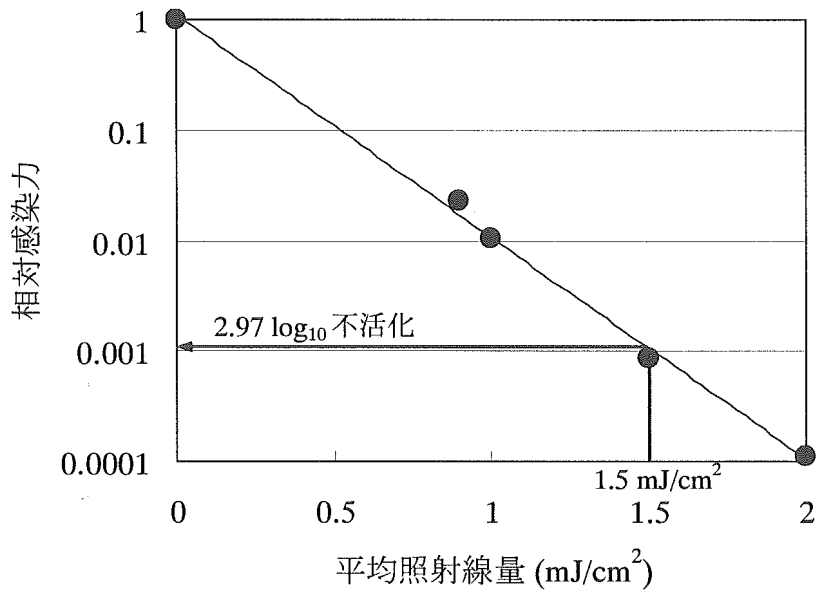


図3 清水系における平均紫外線照射線量と相対感染力との関係（マウス感染試験）

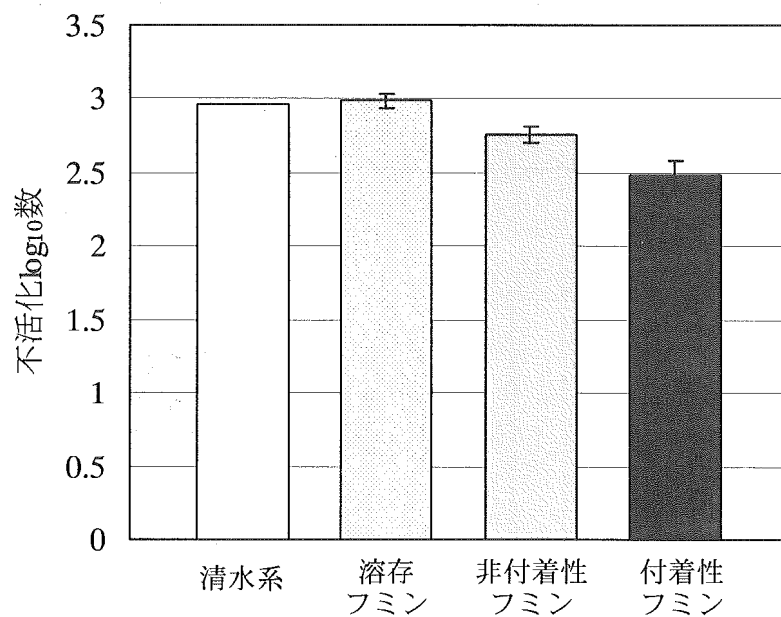


図4 紫外線不活化に及ぼす共存フミンの影響（マウス感染試験）

3. 2カオリン/オーシスト混在系

フミン/オーシスト混在系における水層全体の平均紫外線照射線量と生残率との関係を図5に、平均紫外線照射線量と相対感染力との関係を図6に示す。

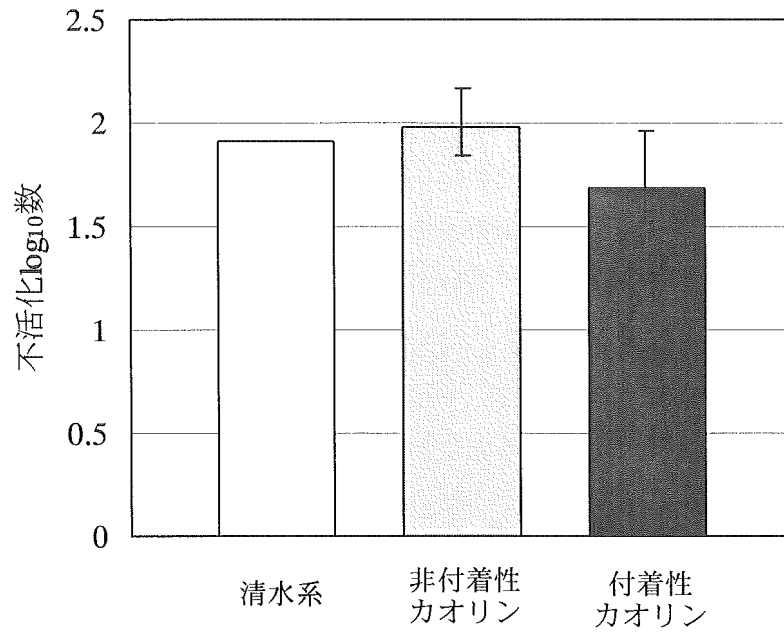


図5 紫外線不活化に及ぼす共存カオリンの影響（脱糞試験）

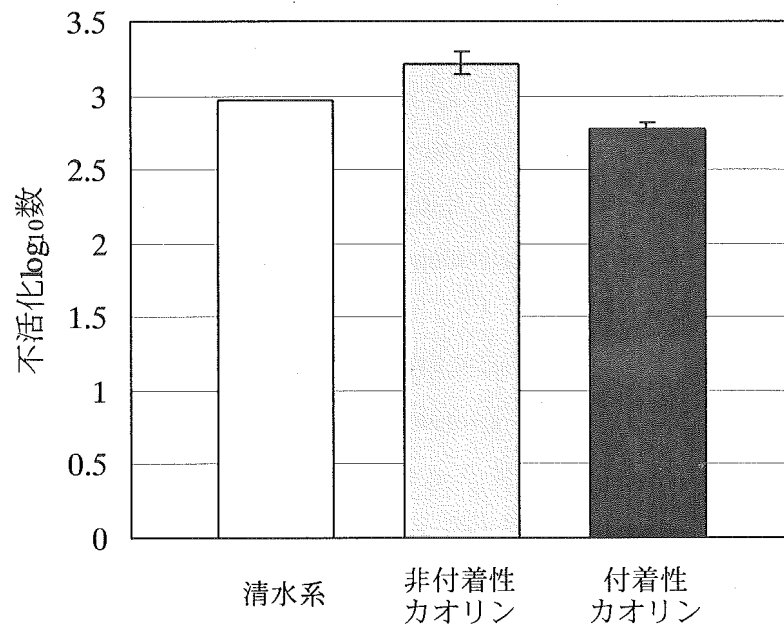


図6 紫外線不活化に及ぼす共存カオリンの影響（マウス感染試験）

非付着性のカオリンが共存する場合、不活化 \log_{10} 数は清水系における値よりもわずかに大きくなったが、カオリン粒子による紫外線の散乱が影響しているかどうかは判断できないレベルである。また、カオリンがオーシスト壁に付着すると不活化力が小さくなる傾向はフミンの場合と同

じように認められたものの、脱囊および感染性のいずれで見た場合も清水系にくらべ不活化 log 数で約 10%程度減少したに過ぎなかった。

4 結論

フミンがオーシスト壁に付着すると、付着していない系に比べて、不活化力が低下する傾向があるが、その程度は小さく、単位紫外線照射線量当たりの不活化 log 数で 20%程度である。また、カオリンでも、オーシスト壁に付着すると不活化力が小さくなる傾向が認められるが、不活化 log 数の低下はフミンの場合よりも更に小さく、10%程度である。したがって、フミンやカオリンがオーシストと混在する系では、フミンやカオリンが水中に分散している場合であっても、その一部がオーシスト壁に付着している場合であっても、その影響は不活化 log 数で 20%程度か、それ以下にとどまる可能性が高いことが示唆された。

参考文献

- Carrier, W. L. and Setlow, R. B. (1970) Endonuclease from *Micrococcus luteus* which has activity toward ultraviolet irradiated deoxyribonucleic acid: purification and properties, *J. Bacteriol.*, Vol. 102, 178-186
- Freeman, S. E., Blackett, A. D., Monteleone, D. C., Setlow, R. B., Sutherland B. M. and Sutherland, J. C. (1986) Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in nonradioactive DNA by alkaline gel electrophoresis: application of pyrimidine dimers, *Analytical Biochem.*, Vol. 158, 119-129
- Harm, W. (1980) Biological effects of ultraviolet radiation, Cambridge University Press, New York, 31-39
- Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N. and Fujiwara, M. (2002) Efficacy of UV irradiation in inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 68, No. 11, 3029-3032
- Oguma, K., Katayama, H., Mitani, H., Morita, S., Hirata, T. and Ohgaki, S. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during ultraviolet light inactivation and photoreactivation, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, No. 10, 4630-4637
- 小熊久美子, 片山浩之, 三谷啓志, 大垣眞一郎 (2001) エンドヌクレアーゼ・センシティブ・サイト法による *Escherichia coli* の紫外線不活化および光回復の評価, 水環境学会誌, Vol. 8, No. 8, 534-538
- Ransome, M. E., Whitmore, T. N. and Carrington, E. G. (1993) Effects of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*, *Wat. Suppl.*, Vol. 11, 75-89
- 志村有通, 竹馬大介, 森田重光, 平田 強 (2001) 塩素の *Cryptosporidium parvum* オーシスト不活化効果とその濃度依存性, 水道協会雑誌, Vol. 70, No. 1, 26-33
- Shin, G. A., Linden, K. G., Arrowood, M. J. and Sobsey, M. D. (2001) Low-pressure UV inactivation and DNA repair potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, No. 7,

3029-3032

Veatch, W. and Okada S. (1969) Radiation-induced breaks of DNA in cultured mammalian cells, *Biophys.*, Vol. 9, 330-346

Woodmansee, D. B. (1987) Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves, *J. Protozool.*, Vol. 34, 398-402

Zimmer, J. L., Slawson, R. M. and Huck, P. M. (2003) Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation, *Wat. Res.*, Vol. 37, 3517-3523

第3編

紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査

紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査

分担研究者 財団法人 水道技術研究センター 藤原 正弘

1. はじめに

現在、浅井戸や湧水、伏流水を水源とし、塩素消毒のみによる浄水方式の水道事業体においては、クリプトスポリジウムの汚染のおそれがあると判断された場合、クリプトスポリジウムの暫定対策指針により、急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等のろ過施設を導入しなければならない。厚生労働省による調査では、平成15年4月現在、全国の水道事業体におけるクリプトスポリジウム対策対象施設は4,316あり、そのうち対策済みの施設は2,515と58%に過ぎない状況にある。特に簡易水道や専用水道のように規模が小さく、財政力も弱い事業体においては未整備率が50%以上となっており、ろ過技術に替わる、あるいは消毒の強化のための新しい技術の導入が求められている。

水道における感染性微生物に対する浄水方式としては、急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過が導入されており、消毒方式として塩素処理、オゾン処理、二酸化塩素処理等が実用化されている。また耐塩素性の感染性微生物に対しては、浄水処理として膜ろ過等のろ過方式が、消毒方式としてはオゾン処理が用いられている。しかし近年水道において紫外線(UV)を用いた消毒方法への関心が高まっている。これはUVが、塩素やオゾン処理のような消毒副生成物を生成することなく、耐塩素性の微生物に対しても不活化の効果があることが認められてきたからである。

アメリカ環境保護局(US-EPA)においては、2003年6月に「紫外線消毒ガイダンスマニュアル」のドラフトが提案されている。US-EPAでは、飲料水の微生物汚染の規制を強化するため、長期第2段階表流水浄水処理強化規則(LT2ESWTR)を策定中である。これは水源のクリプトスポリジウム濃度に基づき、一部の水道事業体に対して浄水処理の強化を求めるものである。UV消毒は、水道施設がこれらの対策を実施していくうえで必要な方法のひとつと考えられている。アメリカでは、クリプトスポリジウムの不活化にUV処理が有効であるとの判断により、20箇所以上の浄水場で実施施設を用いた実験が行われて、現在では30以上の施設において実施を前提とした試験運転が行われている。

我国においてもこの感染性微生物対策研究委員会をはじめ、e-Waterプロジェクトの第2研究グループや、日本水道協会において紫外線照射によるクリプトスポリジウム対策についての調査が行われているところである。

今年度も平成14年度に引き続き、海外における紫外線による原虫類の不活化に関する文献調査を実施し、実施施設におけるUVの使用状況、UV装置の建設コストや維持管理コスト、UVによる微生物の不活化等に関する情報を整理したので、ここにその概要について報告する。

2. 平成 15 年度に調査した文献リスト

平成 15 年度に調査した文献は次ページの表-1 に示す 24 編である。

1993 年 1 編

1998 年 2 編

2000 年 3 編

2001 年 2 編

2002 年 3 編

2003 年 11 編

2004 年 2 編