

厚生労働科学研究費補助金  
健康科学総合研究事業

健全な水循環を考慮した感染性微生物対策に関する研究

平成16年度 総括研究報告書

主任研究者	金子	光美
分担研究者	藤原	正弘
分担研究者	平田	強
分担研究者	遠藤	卓郎

平成17(2005)年4月

I. 総合研究報告書	
健全な水循環を考慮した感染性微生物対策に関する研究-----	3
金子 光美	
II. 分担研究報告	
1. 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発に関する研究-----	10
藤原 正弘	
2. クリプトスポリジウム対策としての紫外線消毒の実用-----	14
平田 強	
3. 紫外線照射による <i>Eimeria</i> および <i>Entamoeba</i> の不活化-----	26
遠藤 卓郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- なし

## 総括研究報告書

## 健全な水循環を考慮した感染性微生物対策に関する研究

主任研究者 金子 光美 立命館大学理工学部 客員教授

## 研究要旨

本研究は、水道原水を汚染する可能性のあるクリプトスポリジウム、ジアルジアの感染性微生物に対する、有効な不活化および除去技術の開発を行うものである。

クリプトスポリジウムのオーシストにおける暗回復プロセスについて、暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存し、紫外線照射量が  $4.5\text{mJ}/\text{cm}^2$  のときは 72 時間を要したが、紫外線照射線量が低くなるに従い、回復に必要とする時間も短くなる傾向が認められた。また、紫外線を照射した *C. parvum* では、紫外線ランプの種類（低圧ランプ、中圧ランプ）に関係なく、DNA の吸収スペクトルを考慮した補正紫外線照射線量に応じてピリミジン二量体が生成され、ピリミジン二量体数と感染力の喪失の程度が強く関係していると考えられた。Iowa 株と HNJ-1 株の間の紫外線感受性について、中圧紫外線と低圧紫外線で評価した結果、HNJ-1 株の紫外線感受性は Iowa 株に比べて約 1.2 倍感受性であることが明らかになった。したがって、米国を中心に行われている Iowa 株でのデータと分担研究者である平田（麻布大学環境保健学部）のデータを統合する場合、平田のデータは 1.2 倍感受性株で得られた値であるとして補正すれば、株差を排除できると考えられる。*Giardia*、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、*Cyclospora*、*Eimeria* に対し、紫外線照射による不活化実験を行なった結果、原虫種により感受性にかなりの隔りがあることが示された。また、オーシスト/シストへの濁質の付着は紫外線処理にとって重要な阻害作用を及ぼすことが示された

実験の結果、凝集沈澱処理においては凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度を最適化することで、より効率的な除去が見込めること、急速ろ過処理においては未ろ水や逆洗水に凝集剤を添加したり、複層ろ過を行うことにより、微粒子の流出量を低減できることが明らかとなった。

## 分担研究者氏名

藤原 正弘  
 (財団法人水道技術研究センター 理事長)  
 平田 強  
 (学校法人 麻布大学環境保健学部 教授)  
 遠藤 卓郎  
 (国立感染症研究所寄生動物部 部長)

## A. 研究目的

現在、経口感染により激しい下痢症状を引き起こす、クリプトスポリジウム等原虫類による水道水汚染が世界的に問題となっている。我が国でも平成 8 年夏に埼玉県越生町において、水道水中のクリプトスポリジウムにより、8,705 人（給水人口の約 63%）が発症するという集団感染事故が発生した。水循環系において、下水処理や畜産

排水の影響を受けている水域では、これら病原性原虫類によって汚染されている可能性が高く、また近隣に汚染源がない場合でも、野生動物の糞便を介して汚染される可能性がある。このような状況の中、病原性原虫類に対する抜本的な対策を、排水処理も含めて実施し、健全な水循環系を形成するとともに、国民が安心して利用できる安全な水道を確保することが急務となっている。

これら病原性原虫類は、病原性細菌類等と比べ塩素耐性が高いため、通常の塩素処理では不活化されず、また感染を成立させるために必要な生物数（最少感染量）が少ない。したがって、代替消毒技術の導入も含めた不活化技術の開発と、浄水処理過程

### 別添 3

において原虫類を確実に除去するための運転管理技術の開発が、現時点で最も必要な対策とされている。

本研究では、不活化技術については代替消毒技術の一つである紫外線の実用化に関する研究を行う。この紫外線を用いた原虫類の不活化技術が確立された場合、膜ろ過よりも低廉に、確実かつ維持管理の容易な処理装置として、上水道における安全性がさらに確保されることが期待される。さらには、排水処理に応用することにより、水循環系への負荷が軽減できるものとして期待される。

一方、浄水処理装置を適切に運転管理し、原虫類を効果的に除去することは、有効な消毒技術が確立されていない現在、最も必要な対策とされている。

本研究では、クリプトスポリジウムの代替粒子を使った除去実験を実規模の浄水処理実験施設において行い、凝集剤の種類、攪拌強度、ろ過速度、ろ過継続時間等について検討することにより、原虫類対策として最適な運転管理技術の確立を図る。

#### B. 研究方法

##### 1. 紫外線による原虫類の不活化

###### (1) 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

*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用い、低圧水銀ランプ ( $\lambda_{\max}=254\text{nm}$ )、中圧水銀ランプで紫外線 ( $\lambda_{\max}=254\text{nm}$ ) を照射し、光回復・暗回復実験を行った。また、フミン酸、カオリンを用いて、フミン/オーシスト混在系、カオリン/オーシスト混在系におけるクリプトスポリジウムの不活化実験を行った。

###### (2) 紫外線照射による腸管寄生性原虫類の不活化効果に関する研究

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、*Cyclospora*、*Eimeria* を用い、極大波長が  $254\text{nm}$  の  $5\text{W}$  低圧水銀ランプにて紫外線照射実験を行った。紫外線照射後のアイメリア (*Eimeria aceroulina*) を用いたトリ感染実験を行った。

###### (3) 海外情報の収集

海外における紫外線による原虫類研究成果に関して、不活化照射線量等の情報収集を行った。

##### 2. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

横浜市西谷浄水場の原水に粒径、比重、ゼータ電位をクリプトスポリジウムと類似させた PMMA (ポリメチルメタアクリレート) 製の代替粒子を  $1000\text{個/mL}$  程度添加し、2 段の急速攪拌、3 段の緩速攪拌を含む凝集沈澱・急速ろ過処理を行い、粒子除去性の向上策を検討した。

実験では、凝集操作条件、未ろ水や逆流水への凝集剤添加条件等を変化させて、濁度および微粒子除去性を比較した。

###### (倫理面への配慮)

動物実験を行う場合、実験は原虫類を専門に扱っている機関にて行う。機関内部には、倫理委員会が存在し、動物愛護上の問題が生じないように研究者に対し、指導している。

#### C. 研究結果

##### 1. 紫外線による原虫類の不活化

###### (1-1) 低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復

照射線量に比例して生成 ESS 数が増加し、両者に高い相関が認められることが再確認された。

どの紫外線照射量の場合も暗回復処理により ESS 数が顕著に減少し、72~96 時間ではどの照射線量の場合も残存 ESS 数は  $0.1\sim 0.4\text{ESS}/10^4\text{base}$  のレベルで安定している。暗回復が安定レベルに達するのに要する時間は紫外線照射線量に依存しており、紫外線照射線量  $4.5\text{mJ}/\text{cm}^2$  のときは 72 時間であったが、紫外線照射線量が低くなるに従って回復に要する時間も短くなり、紫外線照射線量  $2.25\text{mJ}/\text{cm}^2$  のときは 24 時間でほぼ安定レベルに達した。

暗回復処理 24 時間では、紫外線照射直後の ESS 数が  $1.48\text{ESS}/10^4\text{base}$  以上の場合、約  $1.0\text{ESS}/10^4\text{base}$  までしか回復できない。暗回復処理 48 時間では、紫外線照射直後の ESS 数が  $1.98\text{ESS}/10^4\text{base}$  以上の場合、約  $1.5\text{ESS}/10^4\text{base}$  までしか回復できない。これに対し、暗回復処理 72 時間では、紫外線照射線量  $0\sim 4.5\text{mJ}/\text{cm}^2$  の範囲において紫外線照射直後の ESS 数が増加するとともに、回復した ESS 数の増加が見られた。

平田と森田 (2004a) は、光回復できない不可逆的な ESS 数は紫外線照射線量に関係なく  $0.5\sim 1.0\text{ESS}/10^4\text{base}$  であると報告

### 別添 3

している。これに対して、今回の検討では、暗回復できない ESS 数はそれよりも少なく、 $0.1 \sim 0.4$  ESS/ $10^4$  base であった。数値そのものが試験方法の検出限界レベルであって確定的な結論を導出することは困難である。これを明らかにするには、より精度の高い評価方法の開発が必要である。

(1-2) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

#### ①紫外線照射線量と ESS 数の関係

LPUV および MPUV 共に、本研究の実験範囲内では生成 ESS 数が直線的に増加した。どちらの場合も紫外線照射線量と生成 ESS 数の間にはよい相関が得られたが、MPUV の単位線量当たりの生成 ESS 数は LPUV より約 16% 低かった。

本研究でも DNA 吸収スペクトルで補正した紫外線照射線量で評価すると回帰式は、  
LPUV:  $ESS_{UV} = 0.75D_w - 0.11$  ( $r^2 = 0.98$ )  
MPUV:  $ESS_{UV} = 0.75D_w - 0.07$  ( $r^2 = 0.93$ )

$D_w$  : 補正した紫外線照射線量 ( $mJ/cm^2$ )

となり、LPUV と MPUV の傾きに違いは認められず、単位線量当たりの生成 ESS 数が一致した。補正した紫外線照射線量と生成 ESS 数の回帰式を以下に示す。

$$ESS_{UV} = 0.75D_w - 0.10 \quad (r^2 = 0.97)$$

DNA 吸収スペクトルを考慮した紫外線照射線量で評価すれば、LPUV と MPUV で単位線量当たりの生成 ESS 数は一致し紫外線照射した *C. parvum* に生成される ESS 数を推定することができると考えられる。

#### ②ESS の光回復

LPUV および MPUV を照射した *C. parvum* を光回復処理すると、いずれも明らかな ESS 数の減少が確認できる。LPUV を照射した場合の残存 ESS 数は紫外線照射線量にかかわらず  $0.13 \sim 0.80$  ( $/10^4$  base) となった。また、MPUV を照射した場合の残存 ESS 数は紫外線照射線量にかかわらず  $0.18 \sim 0.51$  ( $/10^4$  base) となった。光回復後の残存 ESS 数はいずれの紫外線を照射した場合でも紫外線照射線量 (生成

ESS 数) に関係なくほぼ一定値 (平均で約  $0.4/10^4$  base) となった。、*C. parvum* では LPUV と MPUV で差は認められなかった。

ESS の回復数は生成 ESS 数が増加するに従って増加し、LPUV と MPUV で違いは認められなかった。LPUV と MPUV を合わせた結果の回帰式を以下に示す。

$$ESS_{rep} = 1.09ESS_{UV} - 0.65 \quad (r^2 = 0.97)$$

$ESS_{rep}$  : ESS の回復数 ( $/10^4$  base)

$ESS_{UV}$ : 紫外線照射による生成 ESS 数 ( $/10^4$  base)

また、傾きがほぼ 1 となったことから、回復処理後も残存する ESS 以外はほぼ 100% 修復している。

#### ③ESS の暗回復

LPUV および MPUV を照射した *C. parvum* を暗回復処理すると、いずれも ESS 数の減少が確認できる。暗回復後の残存 ESS 数に LPUV と MPUV による違いは認められなかった。光回復では、回復処理後に残存する ESS 数が紫外線照射線量に関係なくほぼ一定値であったのに対して、暗回復では生成 ESS 数が多いものほど残存 ESS 数が多くなった。

ESS 回復率は生成 ESS 数が増加するに従って直線的に低下した。

生成 ESS 数が約  $2.5$  ( $/10^4$  base) までは原点付近から生成 ESS 数の増加に従って、ESS の回復数も増加した。生成 ESS 数が約  $2.5$  ( $/10^4$  base) 以上の時は ESS の回復数が  $1.5 \sim 2.0$  ( $/10^4$  base) でほぼ一定となり、それ以上の回復は認められなかった。

光回復では、生成 ESS 数が約  $0.6$  ( $/10^4$  base) 以下の場合、回復処理しても ESS 数が減少しない。しかし、暗回復では生成 ESS 数が少ない程 ESS 回復率は高く、生成 ESS 数が約  $0.6$  ( $/10^4$  base) 以下の場合でも ESS を減少する傾向が認められた。

#### ④ESS 法とマウス感染法

紫外線照射によって一度感染力を喪失した *C. parvum* は光回復および暗回復処理しても感染力を取り戻せない (Morita *et al.*, 2002)。本研究の結果から、紫外線照射した *C. parvum* では、その後の光回復処理や暗回復処理により ESS 数が減少し、紫

### 別添 3

外線の主な損傷であるピリミジン二量体を明らかに修復している。しかし、どちらの回復処理を行っても全てのピリミジン二量体を修復することはなかった。

(1-3) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

低圧紫外線を用いた場合、HNJ-1 株では紫外線照射量の増加に伴い、感染性は指数関数的に減少している。また、紫外線線量  $1.0\text{mJ}/\text{cm}^2$  当たりの不活化  $1\log_{10}$  数は 2.02 となっており、これまでの低圧紫外線による不活化データとよく一致している。Iowa 株でも紫外線照射量の増加に伴う感染性の低下は指数関数に従っているが、紫外線線量  $1.0\text{mJ}/\text{cm}^2$  当たりの不活化  $1\log_{10}$  数は 1.71 となり、HNJ-1 株で見られた 2.01 よりもやや小さな値であった。このように、HNJ-1 株と Iowa 株間に感受性に差が認められ、HNJ-1 株の紫外線感受性は Iowa 株の 1.18 倍であった。

中圧紫外線を用いた場合、低圧紫外線の場合と同様、両株とも紫外線照射量の増加に伴う感受性の低下は指数関数に従っていた。紫外線線量は  $1.0\text{mJ}/\text{cm}^2$  当たりの不活化  $\log_{10}$  数は HNJ-1 株では 1.81、Iowa 株では 1.55 であり、HNJ-1 株の紫外線感受性は Iowa 株の 1.1 倍であった。

(2) 紫外線照射による腸管寄生性原虫類の不活化効果に関する研究

紫外線処理で問題となる要因の光回復、微生物間での紫外線感受性の差について検討を行った。光回復に関しては、実験対照として *Legionella* 属菌を用い  $0\sim 10\text{mJ}/\text{cm}^2$  の照射範囲において 1-log 程度の光回復が見られることを確認した。

クリプトスポリジウムと分類学的に近縁であるが紫外線暴露に対し防御機能を有することが想定される胞子虫類のオーシストを用いて紫外線感受性を検討した。本研究ではヒトに感染しないが、紫外線抵抗性を示し、実験モデルとして取り扱いが比較的容易と考えられる *Eimeria* を用いて評価を行った。評価では紫外線照射した *Eimeria acervulina* の嚢子を用いてトリへの感染実験を行った。投与嚢子数と排出嚢子数の関係を表す検量線を作成し、紫外線照射後の嚢子を投与したトリから一定の期間排出されたオーシスト数を計数すること

により消毒の効果を評価した。この実験系による評価の結果、 $8\sim 12\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 2-log 程度の嚢子の不活化効果が得られた。あわせて *Entamoeba histolytica* 栄養体への紫外線照射実験を行い、培養でその効果を判定したところ、 $2\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 3-log 程度の生育阻止効果が得られた。*Entamoeba* に対する紫外線の不活化効果は *Cryptosporidium*、*Giardia* と同等と考えられたが、*Eimeria* に対する効果は低く、2-log の嚢子を不活化するのに必要な線量は *Cryptosporidium*、*Giardia* の 8-10 倍に相当した。さらに、*Cyclospora* オーシストに対する不活化効果を検討した。評価方法としては、スポロシスト形成を指標とした。その結果、2-log のスポロシスト形成の阻止には

*Cyclospora* は *Cryptosporidium* に近縁の胞子虫類に属し、ヒトへの病原性が知られている。スポロシスト形成を指標として紫外線の不活化効果を検討した発育は  $0\text{mJ}/\text{cm}^2$  の条件を 100% とした相対的な割合を求めた。不活化の直線は  $0\text{mJ}/\text{cm}^2$  を除いた結果より最小自乗法で算出し、 $y = e^{(-0.72 \times x + 2.5)}$  で表された。相関係数  $R^2$  値は 0.98 であった。その結果、 $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 2-log の発育阻止が観察された。

### (3) 海外情報の収集

昨年度に引き続き、原虫類の紫外線による不活化に関して、低圧・中圧ランプによる原虫類の不活化、光回復・暗回復、紫外線照射装置の性能予測モデル、紫外線の導入状況等に関して計 24 編の海外文献の要約を行い知見を得た。

### 2. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

(1) PAC 処理における凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度の比較検討

高水温期の実験では凝集剤注入率を変化させた場合、濁度、粒子数 ( $3\sim 10\ \mu\text{m}$ )、トレーサー数のいずれについても、注入率増加による効果が認められた。トレーサー除去率で見ると、1.2 倍の凝集剤注入率で通常注入率に比して  $0.3\log_{10}$  程度、2 倍では  $0.7\log_{10}$  程度、除去率が向上した。

低水温期の実験では、1.5 倍の凝集剤注入率では通常注入率に比して  $0.2\log_{10}$  程度の除去性向上が認められた。ただし、低

### 別添 3

水温期のトレーサー除去率は、通常注入率において高水温期よりも  $0.5 \log_{10}$  程度低くなり、注入率増加に伴う除去率の向上効果も低水温期では低調であった。

凝集剤注入率を増加させた場合、沈澱池からキャリーオーバーする微フロックが増加し、後段の急速ろ過池への負荷が増大することが懸念されたが今回の実験では、凝集剤注入率が急速ろ過池の損失水頭に与える影響は、特に認められなかった。

凝集 pH と沈澱処理性の関係では、高水温期、低水温期共に、 $\text{pH} = 6.8 \sim 7.3$  の中性付近で処理性が最も高くなることが確認された、PAC は最適な凝集 pH の範囲が中性域で比較的広いことが知られているが、その中にも、最適な凝集 pH 条件を探索することは、クリプトスポリジウムに対する安全性を高める上で有用であることが示唆された。

急速攪拌強度と沈澱処理性の関係では、 $G$  値 =  $200 \text{ s}^{-1}$  で処理性が最も高くなった。

#### (2) ろ層構成の比較検討

PAC、塩化第二鉄、塩化第二鉄+高分子凝集剤の何れにおいても、単層、 $\text{LV}=150 \text{ m/d}$  の条件では、初期漏出を除いて、50 時間のろ過時間中にトレーサー粒子の流出は見られなかった。

$\text{LV}=300 \text{ m/d}$  の高速ろ過では、ろ層を多層とした場合においても、ろ過後半のトレーサー粒子および濁度の流出が認められた。この時、PAC に比較して鉄系凝集剤の方が、粒子が漏出し始めるまでのろ過時間が長くなった。また、漏出開始後の濁度、粒子数も低く抑えられていた。ただし、粒子漏出時における値を比較すると、 $3 \sim 10 \mu\text{m}$  の粒子数は鉄系の場合 PAC に比して  $1/4 \sim 1/10$  に低減されていたのに対し、トレーサー粒子数では  $1/2$  程度の低減に留まっていた。これは、 $3 \sim 10 \mu\text{m}$  の粒子の中でも特に  $6 \mu\text{m}$  以上の粗大粒子の除去改善効果が相対的に高くなっていったためと考えられる。

2 層ろ過と 3 層ろ過の比較では、PAC 処理条件において、2 層よりも 3 層の方がトレーサー粒子等が流出し始めるまでのろ過時間を長くできることが明らかとなった。

#### (3) ろ材の凝集剤被覆に関する検討

高水温期の実験では、トレーサー数につ

いて単層の場合では顕著な低減効果は認められなかったが、複層では、再凝集注入率  $1 \text{ mg/L}$  以上の条件でろ過処理性の改善効果が認められた。その効果は凝集剤注入率が高いほど大きく、24 時間後のろ過水濁度では再凝集を行わない場合と比較して、80 % 以上の低減効果が認められた。

再凝集剤注入率  $3 \text{ mg/L}$  の場合、24 時間後の損失水頭には単層で  $1600 \text{ mm}$  に達していたのに対し、複層ではろ速が大きいにもかかわらず  $1000 \text{ mm}$  程度にとどまっておき、再凝集処理を行う場合には、複層ろ層がろ過池の効率的な運用面で有利であることが示された。

低水温期においては、単層の場合でも低減効果が認められ、初期漏出が認められる時間を除いたろ過開始後 3 時間以降の平均除去率 ( $\log$ ) で見ると、再凝集を行わない場合に対し、再凝集剤を  $1.0 \text{ mg/L}$  注入した場合、 $0.82 \log$  向上した。

逆洗水に添加した凝集剤によるろ材被覆の効果の検証では、高水温期において、単層、複層とも、粒子数及びトレーサー数について初期流出の抑制効果が顕著に現れた。特に、複層では初期流出のピークが全く現れず、ろ過継続後と同等の数値がろ過開始直後から維持された。

低水温期の実験では、凝集剤添加量については、逆洗用水への添加率を  $10 \text{ mg/L}$  から  $2 \text{ mg/L}$  に減少させても、流出抑制効果を維持させることができた。また、添加時間については、逆洗時間の前半だけの添加は効果がないが、逆洗終了前 2 分間の添加 (添加率  $5 \text{ mg/L}$ ) で十分な効果が認められた。凝集剤を添加することにより、ろ過開始直後のろ過水へのアルミニウムの漏出が懸念されたが、ろ過水中のアルミニウム濃度はろ過開始後 5 分では最大  $0.11 \text{ mg/L}$  検出されたが、ろ過開始後 30 分以降では凝集剤の添加の有無にかかわらず  $0.03 \sim 0.08 \text{ mg/L}$  であった。

#### D. 考察

##### 1. 紫外線による原虫類の不活化

(1-1) 低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復

DNA に生成したチミン二量体を修復する経路には、光で誘導される経路と光に依存しない経路の 2 つに分けられる。光回復は

### 別添 3

古細菌や真核生物、植物など、幅広い生物で確認されており(三谷他, 1989), 光回復酵素が 300~500 nm の光エネルギーを利用し, ピリミジン二量体の共有結合を解離することで修復する。一方, 暗回復は光エネルギーを必要とせず, これには, 損傷を受けた塩基の除去(除去修復), 損傷のない DNA 鎖部位を再編成して損傷のない DNA を再構築する経路(組換え修復), 損傷の存続を許容してでも DNA 分子全体を保全維持しようとする経路(SOS 修復)(志村, 1989), 不適正塩基対修正酵素が DNA の塩基配列を感知し, その配列のある鎖に誤った対を作っている塩基があるとその領域を除去する経路(ミスマッチ修復)がある(志村, 1989)。

また, 光回復において, 結合する塩基の比率は T-T:T-C:C-T:C-C=68:16:13:3 との報告があり(Mitchell *et al*, 1992) チミン二量体(T-T)の割合が多い。残存 ESS 数が生じる要因として, シトシン二量体(C-C)の修復が遅れていることも考えられる。

このほか, 残存 ESS 数が生じる理由として,

①複製を妨げる修復不可能な損傷, 例えば塩基が変化し, 除去されない損傷が生じる②損傷の生じた部位が互いに相対して位置している③損傷が密集して生じたために, 修復過程に必須な鋳型が存在しない(志村, 1989)④相接近した二量体が同時に修復作用を受け, 修復点が衝突するなどの異常によって, 修復エラーが起こって非修復性損傷を生じる(近藤, 1972)などが考えられる。

(1-2) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

#### ①紫外線照射線量と ESS 数の関係

*E. coli* と LPUV を照射した *C. parvum* の生成 ESS 数を比較すると, *C. parvum* の単位線量当たりの ESS 数は 0.7 (/10<sup>4</sup> base/mJ·cm<sup>2</sup>) であり, *E. coli* の 0.4 (/10<sup>4</sup> base/mJ·cm<sup>2</sup>) (Oguma *et al.*, 2001) の約 1.8 倍であり, *E. coli* よりも *C. parvum* は紫外線に感受性が高いことになる。紫外線はオーシスト壁を容易に透過し, スポロゾイトの核酸に損傷を引き起こす。これが, 紫外線が *C. parvum* に対して有効な消毒

方法となる理由と考えられる。

#### ②ESS の光回復

紫外線照射によって *C. parvum* に生じるピリミジン二量体には光回復で修復できる二量体とできない二量体がある。光回復で修復できない二量体は少量の紫外線照射で速やかに生じ, 紫外線照射線量の増加に伴って光回復で修復できる二量体が増加するものと考えられる。

#### ③ESS の暗回復

生成 ESS 数が少ない範囲のデータ数が少ないため推測に留まるが, 暗回復では光回復処理後に残存する ESS を修復する可能性があると考えられる。

#### ④ESS 法とマウス感染法

ピリミジン二量体数が減少しているにもかかわらず, *C. parvum* の感染力の回復が認められないのは, 光回復や暗回復では修復できずに残存するピリミジン二量体が DNA の完全な複製を阻害するためであると推測される。

(1-3) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

HNJ-1 株と Iowa 株はともに低圧紫外線、中圧紫外線のいずれに対しても、照射線量の増加に伴い指数関数で減少した。

(2) 紫外線照射による腸管寄生性原虫類の不活化効果に関する研究

原虫類は種によって紫外線耐性が異なり、紫外線消毒における線量の選択に注意が必要である

#### (3) 海外情報の収集

紫外線による原虫類の不活化を評価する際に、微生物にどれだけの紫外線量が有効に照射されているか、という紫外線照射装置の性能検証を精度良く行う必要がある。

#### 2. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

凝集沈澱処理においては、凝集剤注入率を増加させるほど粒子除去率が高くなることが示されたが、凝集剤注入率の増加は排水処理への負荷増大や運転コストの増大の要因ともなり得るため、実施への適用にあたっては、これらを考慮した上で、適正な注入率を検討する必要がある。



### 別添 3

また、急速ろ過処理におけるろ材の凝集剤被覆、複層ろ過、ろ過水中の微粒子の低減化に有効であることが示された。

### E. 結論

#### 1. 紫外線による原虫類の不活化

##### (1-1) 低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復

① *C. parvum* に低圧紫外線を照射すると、照射線量に比例して生成 ESS 数も増加した。

② 紫外線照射線量 4.5 mJ/cm<sup>2</sup> 以下における残存 ESS 数は紫外線照射線量に依存せず、0.1~0.4 ESS/10<sup>4</sup> base の範囲となった。この残存 ESS は ESS 法の測定誤差とも考えることができ、実際に残存した ESS の数とは必ずしも断定できないが、高度に回復することは明らかである。

③ 暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存し、紫外線照射線量 4.5 mJ/cm<sup>2</sup> のときは 72 時間であったが、紫外線照射線量が低くなるに従い、回復に必要とする時間も短くなった。

##### (1-2) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

紫外線照射により一旦喪失した感染力が回復しないのは、光回復および暗回復のいずれのプロセスでも一部のピリミジン二量体が修復されずに残存する結果、それらが DNA の複製阻害をもたらすことによるものと推測された。

##### (1-3) 中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復

HNJ-1 株の紫外線に対する感受性は Iowa 株の 1.19 倍(低圧紫外線の場合)、1.17 倍(中圧紫外線の場合)であり、紫外線の種類に関係なく一定であることが明らかになった。

##### (2) 紫外線照射による腸管寄生性原虫類の不活化効果に関する研究

紫外線は *Cryptosporidium*、*Giardia* および赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) に対しては極めて効果的な不活化処理であった。一方、*Cyclospora* あるいは *Eimeria* 等に対しては前者の 10 倍程度の照射線量が必要で原虫種により感受性にかなりの隔りがあること

が示された。

### (3) 海外情報の収集

原虫類の紫外線による不活化に関して、低圧・中圧ランプによる原虫類の不活化、光回復・暗回復、紫外線照射装置の性能予測モデル、紫外線の導入状況等に関して知見を得た。

#### 2. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

凝集沈澱処理においては、凝集剤注入率、凝集 pH、急速混和池攪拌強度を適切に設定することで、クリプトスポリジウム代替粒子の処理性をより向上できることが確認された。また、急速ろ過処理においては、凝集剤によるろ材被覆、複層ろ過の採用が、ろ過処理水質の改善や捨水時間を短縮手段として大いに期待できることが示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし。

#### 2. 学会発表

なし。

### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

特になし。

#### 2. 実用新案登録

特になし。

#### 3. その他

特になし。

## 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発に関する研究

分担研究者 藤原 正弘 財団法人 水道技術研究センター 理事長

## 研究要旨

本研究は、水道原水を汚染する可能性のあるクリプトスポリジウム等感染性原虫類に対する除去技術の開発を行うものである。実験の結果、凝集沈殿処理においては凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度を最適化することで、より効率的な除去が見込めること、急速ろ過処理においては未ろ水や逆洗水に凝集剤を添加したり、複層ろ過を行うことにより、微粒子の流出量を低減できることが明らかとなった。また、クリプトスポリジウム等原虫類の紫外線による不活化に関して文献調査を行った。

## A. 研究目的

現在、クリプトスポリジウム等原虫類による水道水汚染が世界的に問題となっている。わが国でも平成 8 年夏に埼玉県越生町において、水道水中のクリプトスポリジウムにより、給水人口の 63% である 8,705 人が発症するという集団感染事故が発生した。このような状況の中、感染性原虫類に対する抜本的な対策を実施し、国民が安心して利用できる、安全な水道を確保することが急務となっている。

本研究では凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発を行う。また、もう一つの有効技術である紫外線による不活化に関して文献収集を行うものである。

## B. 研究方法

## 1. 凝集沈殿・急速ろ過の運転管理技術の開発

横浜市水道局西谷浄水場の相模湖系表流水に、粒径、比重、ゼータ電位を *C. parvum* オーストに類似させた代替トレーサー粒子を 1000 個/mL となるように添加し、浄水処理実験を行った。

## (1) PAC 処理における凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度の比較検討

凝集剤に PAC を用いた場合について、凝集剤注入率を西谷浄水場における実注入率の 1~2 倍、凝集 pH を 6.3~8.4、急速攪拌強度 G 値を 100~500 s<sup>-1</sup> の間で変化させて、凝集沈殿処理実験及び急速ろ過処理を行い、トレーサー粒子の除去性を比較した。

## (2) ろ層構成の比較検討

低水温期に処理性が良好であった塩化第二鉄、塩化第二鉄+ノニオン系高分子凝集剤、及び PAC による凝集沈殿処理水を用い、単層ろ過（けい砂、LV = 150 m/d）、2 層ろ過（けい砂+アンスラサイト、LV = 300 m/d）、3 層ろ過（けい砂+アンスラサイト+ガーネット、LV = 300 m/d）の 3 条件のろ層構成について、各々のろ過処理性を比較検討した。

## (3) ろ材の凝集剤被覆に関する検討

凝集沈殿処理水に凝集剤を少量注入し、急速攪拌後急速ろ過処理を行う再凝集操作によるトレーサー除去性、及び凝集剤を添加した逆洗用水で逆洗を行うことによる、トレーサー粒子の初期漏出の低減効果に関する検討を行った。

再凝集実験においては、再凝集剤（PAC）注入率を 0~3 mg/L、再凝集混和池の攪拌強度（G 値）を 100~500 s<sup>-1</sup> の間で変化させて、凝集沈殿処理実験及び急速ろ過処理を行い、トレーサー粒子の除去性を比較した。ろ層構成は、単層ろ過（けい砂、LV = 120 m/d）、2 層ろ過（けい砂+アンスラサイト、LV = 240 m/d）の 2 条件とした。

また、逆洗用水への凝集剤添加実験においては、凝集剤（PAC）添加率を 0~10 mg/L、添加時間を 0~10 分（逆洗時間 10 分）の間で変化させてトレーサー粒子の除去性を比較した。

## 2. 海外情報の収集

海外における紫外線による原虫類研究

#### 別添 4

成果に関して、主任研究者と共同して、不活化照射線量等の情報収集を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

##### (1) PAC 処理における凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度の比較検討

高水温期の実験では凝集剤注入率を変化させた場合、濁度、粒子数 (3~10 μm)、トレーサー数のいずれについても、注入率増加による効果が認められた。トレーサー除去率で見ると、1.2 倍の凝集剤注入率で通常注入率に比して 0.3 log<sub>10</sub> 程度、2 倍では 0.7 log<sub>10</sub> 程度、除去率が向上した。

低水温期の実験では、1.5 倍の凝集剤注入率では通常注入率に比して 0.2 log<sub>10</sub> 程度の除去性向上が認められた。ただし、低水温期のトレーサー除去率は、通常注入率において高水温期よりも 0.5 log<sub>10</sub> 程度低くなり、注入率増加に伴う除去率の向上効果も低水温期では低調であった。

凝集剤注入率を増加させた場合、沈澱池からキャリーオーバーする微フロックが増加し、後段の急速ろ過池への負荷が増大することが懸念されたが今回の実験では、凝集剤注入率が急速ろ過池の損失水頭に与える影響は、特に認められなかった。

凝集 pH と沈澱処理性の関係では、高水温期、低水温期共に、pH = 6.8~7.3 の中性付近で処理性が最も高くなることが確認された、PAC は最適な凝集 pH の範囲が中性域で比較的広いことが知られているが、その中であっても、最適な凝集 pH 条件を探索することは、クリプトスポリジウムに対する安全性を高める上で有用であることが示唆された。

急速攪拌強度と沈澱処理性の関係では、G 値 = 200 s<sup>-1</sup> で処理性が最も高くなった。

##### (2) ろ層構成の比較検討

PAC、塩化第二鉄、塩化第二鉄+高分子凝集剤の何れにおいても、単層、LV=150 m/d の条件では、初期漏出を除いて、50 時間のろ過時間中にトレーサー粒子の流出は見られなかった。

LV=300 m/d の高速ろ過では、ろ層を多層とした場合においても、ろ過後半のトレーサー粒子および濁度の流出が認められた。

この時、PAC に比較して鉄系凝集剤の方が、粒子が漏出し始めるまでのろ過時間が長くなった。また、漏出開始後の濁度、粒子数も低く抑えられていた。ただし、粒子漏出時における値を比較すると、3~10 μm の粒子数は鉄系の場合 PAC に比して 1/4~1/10 に低減されていたのに対し、トレーサー粒子数では 1/2 程度の低減に留まっていた。これは、3~10 μm の粒子の中でも特に 6 μm 以上の粗大粒子の除去改善効果が相対的に高くなっていったためと考えられる。

2 層ろ過と 3 層ろ過の比較では、PAC 処理条件において、2 層よりも 3 層の方がトレーサー粒子等が流出し始めるまでのろ過時間を長くできることが明らかとなった。

##### (3) ろ材の凝集剤被覆に関する検討

高水温期の実験では、トレーサー数について単層の場合では顕著な低減効果は認められなかったが、複層では、再凝集注入率 1 mg/L 以上の条件でろ過処理性の改善効果が認められた。その効果は凝集剤注入率が高いほど大きく、24 時間後のろ過水濁度では再凝集を行わない場合と比較して、80 % 以上の低減効果が認められた。

また、この時の損失水頭を見ると、再凝集剤注入率 3 mg/L の場合、24 時間後には単層で 1600 mm に達していたのに対し、複層ではろ速が大きいにもかかわらず 1000 mm 程度にとどまっており、再凝集処理を行う場合には、複層ろ層がろ過池の効率的な運用面で有利であることが示された。

低水温期においては、単層の場合でも低減効果が認められ、初期漏出が認められる時間を除いたろ過開始後 3 時間以降の平均除去率 (log) で見ると、再凝集を行わない場合に対し、再凝集剤を 1.0 mg/L 注入した場合、0.82 log 向上した。

逆洗水に添加した凝集剤によるろ材被覆の効果の検証では、高水温期において、単層、複層とも、粒子数及びトレーサー数について初期流出の抑制効果が顕著に現れた。特に、複層では初期流出のピークが全く現れず、ろ過継続後と同等の数値がろ過開始直後から維持された。

低水温期の実験では、凝集剤添加量の削減と添加時間の短縮を目的として、比較検討を行った。その結果、凝集剤添加量については、逆洗水への添加率を 10 mg/L か

#### 別添 4

ら 2 mg/L に減少させても、流出抑制効果を維持させることができた。また、添加時間については、逆洗時間の前半だけの添加は効果がないが、逆洗終了前 2 分間の添加(添加率 5 mg/L) で十分な効果が認められた。

凝集剤を添加することにより、ろ過開始直後のろ過水へのアルミニウムの漏出が懸念されたが、ろ過水中のアルミニウム濃度はろ過開始後 5 分では最大 0.11 mg/L 検出されたが、ろ過開始後 30 分以降では凝集剤の添加の有無にかかわらず 0.03~0.08 mg/L であった。

#### 2. 海外情報の収集

原虫類の紫外線による不活化に関して、計 24 編の海外文献の要約を行い、低圧・中圧ランプによる原虫類の不活化、光回復・暗回復、紫外線照射装置の性能予測モデル、紫外線の導入状況等に関して知見を得た。

#### D. 考察

##### 1. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

(1) PAC 処理における凝集剤注入率、凝集 pH、急速攪拌強度の比較検討

低水温期は濁度が低いため懸濁質に対して凝集剤の注入率が相対的に高くなり、生成したフロックの密度が小さくなること、水の粘性が大きくなること等によりフロックの沈降速度が小さくなるためトレーサー除去率が低下する。従って、低水温期においては、凝集剤注入率を増加させても沈澱処理水質の大幅な向上は期待できない。従って、業種剤注入率のみならず、後段の急速ろ過工程における処理性も加えて評価を行い、最終の浄水処理水質を管理する上で適切な運転管理計画を検討する必要があると考えられる。

##### (2) ろ層構成の比較検討

LV=300 m/d の高速ろ過の場合、2 層ろ過と 3 層ろ過の比較では、PAC 処理条件において、2 層よりも 3 層の方がトレーサー粒子等が流出し始めるまでのろ過時間が長くなった。これは、けい砂よりも粒径の小さいガーネット層によるろ過効果が寄与したものと考えられる。

##### (3) ろ材の凝集剤被覆に関する検討

再凝集操作は、ろ過水中のトレーサー粒子の低減化に有効であることが示されたが、損失水頭の上昇=逆洗頻度の増大を招いてしまうことが懸念される。再凝集処理の採用にあたっては、単層ろ過からより濁質捕捉容量の大きな複層ろ過への変更、逆洗水量の増大が浄水場全体の回収率に与える影響等を検討しておく必要がある。

一方で、逆洗水への凝集剤添加は粒子の初期漏出の低減化に有効であり、捨水工程をきわめて短くできることが期待されることから、浄水場全体の回収率を向上させる効果も期待できる。

#### 2. 海外情報の収集

紫外線による原虫類の不活化を評価する際に、微生物にどれだけの紫外線量が有効に照射されているか、という紫外線照射装置の性能検証を精度良く行う必要がある。

#### E. 結論

凝集沈澱処理においては、凝集剤注入率、凝集 pH、急速混和池攪拌強度を適切に設定することで、クリプトスポリジウム代替粒子の処理性をより向上できることが確認された。また、急速ろ過処理においては、凝集剤によるろ材被覆、複層ろ過の採用が、ろ過処理水質の改善や捨水時間を短縮手段として大いに期待できることが示唆された。

原虫類の紫外線による不活化に関して、低圧・中圧ランプによる原虫類の不活化、光回復・暗回復、紫外線照射装置の性能予測モデル、紫外線の導入状況等に関して知見を得た。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

特になし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

別添4

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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 平田 強 学校法人 麻布大学環境保健学部 教授  
協力研究者 森田 重光 麻布大学環境保健学部 講師

研究要旨

本分担研究は3つの課題で構成されている。

研究課題1「低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復」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) 法で定量化した。得られた結果は次のとおりである。

① *C. parvum* に低圧紫外線を照射すると、照射線量に比例して生成 ESS 数が増加し、紫外線照射時間と生成 ESS 数の回帰式は  $y = 0.68x - 0.06$  (相関係数  $R = 0.993$ ) となり、両者間に高い相関が認められた。

② 紫外線照射線量  $4.5 \text{ mJ/cm}^2$  以下における残存 ESS 数は、紫外線照射線量に関係なく  $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  の範囲であり、定量下限値レベルであった。

③ 暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存し、紫外線照射量が  $4.5 \text{ mJ/cm}^2$  のときは 72 時間を要したが、紫外線照射線量が低くなるに従い、回復に必要とする時間も短くなる傾向が認められた。

研究課題2「塩中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と DNA 損傷の光回復・暗回復」では、低圧ランプ及び中圧ランプによるクリプトスポリジウムオーシストの不活化に関して検討した。得られた結果は次のとおりである。

① 紫外線を照射した *C. parvum* では、紫外線ランプの種類（低圧ランプ、中圧ランプ）に関係なく、DNA の吸収スペクトルを考慮した補正紫外線照射線量に応じてピリミジン二量体が生成され、ピリミジン二量体数と感染力の喪失の程度が強く関係していると考えられた。

② また、*C. parvum* は光回復および暗回復処理によりピリミジン二量体を明らかに修復したが、紫外線照射した *C. parvum* は光回復および暗回復処理を行っても感染力の回復は認められていない。ピリミジン二量体数が減少しているにもかかわらず、*C. parvum* の感染力の回復が認められないのは、光回復や暗回復では修復できずに残存するピリミジン二量体が DNA の複製を阻害するものと推測された。

研究課題3「*Cryptosporidium parvum* の紫外線感受性に関する株差の評価」では、クリプトスポリジウムオーシストの Iowa 株と HNJ-1 株差による紫外線感受性について検討した。得られた結果は次のとおりである。

① HNJ-1 株の紫外線感受性は Iowa 株に比べて約 1.2 倍感受性であることが明らかになった。したがって、米国を中心に行われている IOWA 株でのデータと分担研究者である平田（麻布大学環境保健学部）のデータを統合する場合、平田のデータは 1.2 倍感受性株で得られた値であるとして補正すれば、株差を排除できると考えられる。

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書分担研究課題 1：低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復

分担研究者 平田 強 学校法人 麻布大学環境保健学部 教授

## A. 研究目的

紫外線照射した *C. parvum* に可視光を照射あるいは暗所に静置すると ESS 数が減少すなわち DNA が回復することはすでに明らかにされており (Oguma et al, 2002, Morita et al, 2002), 光回復実験に関してはすでに紫外線照射線量 0~4.0mJ/cm<sup>2</sup> の範囲内であれば可視光照射 2 時間で回復が平衡に達する。しかし暗回復については、平成 15 年度の報告でもピリミジン二量体の一部が単量体に復帰する (回復する) ことが半定量的に確認されているものの (平田と森田, 2003a, 2004a), 24 時間で回復平衡に達しているか否かはいまだ明らかになっていない。そこで今年度は、暗所静置時間を 24, 48, 72, 96 時間とし、暗回復が平衡に達する時間を ESS 法で評価することを試みた。

## B. 研究方法

## (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) 紫外線照射方法

φ56 mm のプラスチックシャーレにオーシスト懸濁液 ( $2.0 \times 10^6$  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<sup>2</sup> 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。

## (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<sup>2</sup> 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℃ 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。

## (4) 暗回復処理

紫外線照射後直ちにアルミホイルでぐるんで遮光し、20℃ の消灯したインキュベーター内に 24 時間静置した。

## (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

#### 別添 4

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。

#### (倫理面への配慮)

動物実験を行う場合, 実験は原虫類を専門に扱っている機関にて行う。機関内部には, 倫理委員会が存在し, 動物愛護上の問題が生じないように研究者に対し, 指導している。

#### C. 研究結果

照射線量 ( $R$ ) に比例して生成 ESS 数 ( $y$ ) が増加した。回帰式は  $y = 0.68x - 0.06$  (相関係数  $R = 0.993$ ) となり, 両者に高い相関が認められることが再確認された。

どの紫外線照射量の場合も暗回復処理により ESS 数が顕著に減少し, 72~96 時間ではどの照射線量の場合も残存 ESS 数は  $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  のレベルで安定している。暗回復が安定レベルに達するのに要する時間は紫外線照射線量に依存しており, 紫外線照射線量  $4.5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  のときは 72 時

間であったが, 紫外線照射線量が低くなるに従って回復に要する時間も短くなり, 紫外線照射線量  $2.25 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  のときは 24 時間でほぼ安定レベルに達した (なお, この安定レベルでの ESS 数は本研究で用いた ESS 数測定法の検出下限値以下であり, 数値そのものの信頼性は低い)。 *E. coli* に紫外線を照射した後に暗回復処理したとき, 生残率が安定レベルに達するのに要する時間は室温で 60 時間との報告があり (Harm, 1968), 本実験でもほぼ同様の時間で安定レベルに達したものと考えられる。

暗回復処理 24 時間では, 紫外線照射直後の ESS 数が  $1.48 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  以上の場合, 約  $1.0 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  までしか回復できない。暗回復処理 48 時間では, 紫外線照射直後の ESS 数が  $1.98 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  以上の場合, 約  $1.5 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  までしか回復できない。これに対し, 暗回復処理 72 時間では, 紫外線照射線量  $0 \sim 4.5 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  の範囲において紫外線照射直後の ESS 数が増加するとともに, 回復した ESS 数の増加が見られた。

平田と森田 (2004a) は, 光回復できない不可逆的な ESS 数は紫外線照射線量に関係なく  $0.5 \sim 1.0 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  であると報告している。これに対して, 今回の検討では, 暗回復できない ESS 数はそれよりも少なく,  $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  であった。修復を必要とする DNA の損傷の種類として, 塩基消失, 塩基変更, 不正確塩基, ヌクレオチドの欠失/挿入, ピリミジンの結合, 主鎖切断, 主鎖の架橋, 3'-デオキシリボース断片があげられているが (Lodish *et al.*, 2001), 光回復が二量体にしか有効でないのに対し, 暗回復で修復し得る DNA 損傷の種類が多い (近藤, 1972) ことから考えて, 妥当な結果なのかもしれないが, 数値そのものが試験方法の検出限界レベルであって確定的な結論を導出することは困難である。これを明らかにするには, より精度の高い評価方法の開発が必要である。

#### D. 考察

DNA に生成したチミン二量体を修復する経路には, 光で誘導される経路と光に依存しない経路の 2 つに分けられる。光回復は古細菌や真核生物, 植物など, 幅広い生物で確認されており (三谷他, 1989), 光回復酵素が  $300 \sim 500 \text{ nm}$  の光エネルギーを利用



#### 別添4

し、ピリミジン二量体の共有結合を解離することで修復する。一方、暗回復は光エネルギーを必要とせず、これには、損傷を受けた塩基の除去（除去修復）、損傷のないDNA鎖部位を再編成して損傷のないDNAを再構築する経路（組換え修復）、損傷の存続を許容してでもDNA分子全体を保全維持しようとする経路（SOS修復）（志村，1989）、不適正塩基対修正酵素がDNAの塩基配列を感知し、その配列のある鎖に誤った対を作っている塩基があるとその領域を除去する経路（ミスマッチ修復）がある（志村，1989）。

また、光回復において、結合する塩基の比率は T-T:T-C:C-T:C-C=68:16:13:3 との報告があり（Mitchell *et al* , 1992）チミン二量体（T-T）の割合が多い。残存 ESS 数が生じる要因として、シトシン二量体（C-C）の修復が遅れていることも考えられる。なぜなら、T-TのほかC-TもC-Cも開裂修復するが、その効率比は、1:0.5:0.1と推定されており、開裂速度はT-T、T-C、C-Cの順に低下する（近藤，1972）ためである。暗回復においても、T-T、T-C、C-Cの修復効率や速度に差が生じ、72時間では修復しきれない損傷部位があるとも考えられる。

このほか、残存 ESS 数が生じる理由として、

①複製を妨げる修復不可能な損傷、例えば塩基が変化し、除去されない損傷が生じる②損傷の生じた部位が互いに相対して位置している③損傷が密集して生じたために、修復過程に必須な鋳型が存在しない（志村，1989）④相接近した二量体が同時に修復作用を受け、修復点が衝突するなどの異常によって、修復エラーが起こって非修復性損傷を生じる（近藤，1972）などが考えられる。

#### E. 結論

- ① *C. parvum* に低圧紫外線を照射すると、照射線量に比例して生成 ESS 数も増加した。紫外線照射時間と生成 ESS 数の回帰式は  $y = 0.68x - 0.06$  となり、相関係数  $R = 0.993$  と相関性が高かった。
- ② 紫外線照射線量  $4.5 \text{ mJ/cm}^2$  以下における残存 ESS 数は紫外線照射線量に依存せず、 $0.1 \sim 0.4 \text{ ESS}/10^4 \text{ base}$  の範囲となった。この残存 ESS は ESS 法の測定

誤差とも考えることができ、実際に残存した ESS の数とは必ずしも断定できないが、高度に回復することは明らかである。

- ③ 暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存し、紫外線照射線量  $4.5 \text{ mJ/cm}^2$  のときは72時間であったが、紫外線照射線量が低くなるに従い、回復に必要とする時間も短くなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- ・ 貝森繁基，森田重光，平田 強（2004.3）紫外線照射した *Cryptosporidium parvum* オーシストにおけるDNAの損傷と光・暗回復，第38回日本水環境学会年会，札幌。
- ・ 杉本ひとみ，橋本 温，森田重光，平田強（2004.3）下水から単離した *Cryptosporidium* オーシストの遺伝子型の解析，第38回日本水環境学会年会，札幌市。
- ・ 森田重光，平田 強（2004.3）電子線による微生物不活化に及ぼす汚泥の影響，第38回日本水環境学会年会，札幌市。
- ・ 橋本 温，杉本ひとみ，森田重光，平田強（2004.5）Nested PCR-ダイレクトシーケンス法による相模川の *Cryptosporidium* の遺伝子型判別，全国水道研究発表会，京都市。
- ・ 橋本 温，杉本ひとみ，森田重光，平田強（2004.9）河川から単離したクリプトスポリジウムオーシストの遺伝子解析，土木学会全国大会，豊田市。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。

分担研究課題 2：中圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 オーシストの不活化と  
DNA 損傷の光回復・暗回復

分担研究者 平田 強 学校法人 麻布大学環境保健学部 教授

## A. 研究目的

塩素は水処理において使用されている最も一般的で有効な消毒剤であり、水道では唯一の消毒剤として使用されている。しかし、近年、塩素に著しい耐性を示す *Cryptosporidium* による水系感染症の発生 (Atherton *et al.*, 1995; Fox and Lytle, 1996) を契機に、塩素耐性の病原微生物に対する安全性の確保が問われている。

*Cryptosporidium* は孢子虫類のкокシジウム目に属する寄生性原虫で、環境中では長径 4~6  $\mu\text{m}$  のオーシストの形態をとる。また、強固で厚いオーシスト壁を持つため、塩素に著しい耐性を示す。このため、一般の水道の消毒で用いられている塩素濃度および接触時間では不活化は事実上期待できず (志村ら, 2000), 塩素消毒を補完する消毒法として、オゾンや紫外線処理などが検討されている。中でも紫外線消毒は消毒副生成物が生じず、ランニングコストが安価、維持管理が容易であるなどのメリットを有する。

*Cryptosporidium parvum* に対する低圧紫外線 (LPUV) の不活化力を実験動物や培養細胞を用いて判定した結果、2  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 1.7 log (MDCK 細胞, Shin *et al.*, 2001), 1  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 2.0 log (SCID マウス, Morita *et al.*, 2002) 不活化されたと報告されている。また、中圧紫外線 (MPUV) では、3  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 3.4 log (CD-1 マウス, Clancy *et al.*, 2000), 1  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 3.8 log (HCT-8 細胞, Zimmer *et al.*, 2003) 不活化されたと報告されており、極めて低い照射線量で *C. parvum* を不活化出来ることが明らかとなってきている。欧米ではすでに一部の上水施設で紫外線消毒装置が導入されており、塩素消毒を補完する消毒方法として非常に有効であると考えられている。また、下水処理では塩素消毒の副生成物である有機塩素化合物や残留塩素による人体や放流先の生態系に及ぼす影

響に対する関心の高まりから、紫外線による消毒法の実用化が進んでおり、わが国でも一部の施設で稼動している。

紫外線が生物を不活化する作用機序は生物の核酸が紫外線を吸収し、光産物 (DNA 損傷) を生成することによる。核酸は 220~300 nm (UV-B, UV-C) の波長域を吸収し、核酸塩基のピリミジンやプリンが光化学反応を起こすことで DNA 損傷をもたらす。DNA 損傷の大部分がピリミジン二量体であり、ピリミジン二量体にはシクロプタン型ピリミジン二量体 (CPD) と (6-4) 光産物がある (Harm, 1980)。シクロプタン型ピリミジン二量体は隣り合ったピリミジン塩基 (チミン:T またはシトシン:C) の 6 位の炭素と 5 位の炭素どうしが共有結合して生じ、ピリミジン二量体のうち、約 80% を占める。結合する塩基の比率は、T-T:T-C:C-T:C-C=68:16:13:3 との報告がある (Mitchell *et al.*, 1992)。一方、(6-4) 光産物は隣り合ったピリミジン塩基の 6 位の炭素と 4 位の炭素が共有結合して生じ、ピリミジン二量体の約 20% の割合を占める (Mitchell and Nairn, 1989)。これらの損傷は DNA の複製を阻害する結果、不活化を招く。しかし、生物は紫外線によって受けた損傷を光回復や暗回復によって修復する機構を持っている。光回復は古細菌や真核生物、植物など、幅広い生物で確認されており (三谷, 嶋, 1989), 光回復酵素が 300~500 nm の光エネルギーを利用し、ピリミジン二量体の共有結合を解離することで修復する。一方、暗回復は光エネルギーを必要とせず、主に損傷部位の除去または組替えて修復する。このような修復作用により、紫外線による消毒効果が低減する恐れがあることから、紫外線消毒で十分な効果を得るためには光回復および暗回復の評価が重要となる。

Oguma *et al.* (2002) は、LPUV を照射した *E. coli* (IFO 3301) は DNA レベルで

#### 別添 4

もコロニー形成能 (CFA) でも光回復したが, MPUV ランプを用いて 200~580 nm の紫外線を照射した *E. coli* は DNA レベルでも CFA でも有意な光回復は見られないと報告している。また, Zimmer and Slawson (2002) は, MPUV 照射した *E. coli* (ATCC 11229) は CFA において, 有意な光回復および暗回復は認められず, MPUV は回復を抑制する点で LPUV より有利であると報告している。しかし, 回復能力は生物種や株間で異なり (Liltved and Landfald, 1996; 土佐ら, 1997; Sommer *et al.*, 2000), 指標細菌や病原微生物に対しては個々に回復現象を評価することが望ましい。

LPUV ランプから放出される 254 nm の紫外線を *C. parvum* に照射し, Endonuclease Sensitive Site (ESS) 法で評価をすると, 光回復および暗回復することが確認されている (Oguma *et al.*, 2002, Morita *et al.*, 2002) が, データ数は少なく, 再現性が良好でない。また, MPUV ランプから放出される広域な波長の紫外線を照射した *C. parvum* の回復についてはまだ検討されていない。そこで, 本研究では MPUV 照射により生成されたピリミジン二量体数とその光回復および暗回復の有無および程度を ESS 法で評価した。また, LPUV でも実験を行い, 生成されたピリミジン二量体数とその光回復および暗回復について MPUV と比較検討した。

#### B. 研究方法

##### ① 供試 *C. parvum* オーシスト

分担研究課題「低圧紫外線による *Cryptosporidium parvum* の DNA の暗回復」と同じオーシストを用いた。

##### ② 紫外線ランプ

LPUV 照射には 5 W LPUV ランプ (QCGL5W-14 97D, 岩崎電気) を, MPUV 照射には 330 W MPUV ランプ (B410MW, 荏原製作所) を用いた。LPUV ランプは 253.7 nm にピークを持ち, 放出波長幅は極めて狭い。一方, MPUV ランプから放出される波長は 200 nm から 350 nm 以上まで広域に渡る。

##### ③ 紫外線照射線量率の測定方法

LPUV および MPUV の照射線量率は紫

外線積算光量計 (UIT-150 S254, ウシオ電機) を用いて測定した。MPUV ランプの放出波長は広域に渡るが, 本研究で用いた光量計は DNA 吸収スペクトルに近い分光感度を持つため, DNA に作用する波長域とほぼ同様な光エネルギーを測定していることになる。

##### ④ 可視光線照射線量率の測定方法

可視光線の照射線量率は 360 nm 付近で測定した。測定には紫外線強度計 (UVR-1, トプコン) を用いた。

##### ⑤ 紫外線照射

紫外線照射には 5W LPUV ランプまたは 330 W MPUV ランプを組み込んだ紫外線照射装置 (荏原製作所) を用いた。φ56 mm プラスチックシャーレに 10 mL の滅菌水道水を入れた後,  $2 \times 10^7$  個の *C. parvum* オーシストを懸濁し, マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら試料の上方より紫外線を照射した。試料液表面での紫外線照射線量率は LPUV ランプを用いた照射では  $0.10 \text{ mW/cm}^2$ , MPUV ランプを用いた照射では  $0.95 \sim 1.40 \text{ mW/cm}^2$  とした。紫外線照射線量 ( $\text{mJ/cm}^2$ ) は紫外線照射線量率 ( $\text{mW/cm}^2$ ) と照射時間 (s) の積とした。

1 照射条件につき, 3つの *C. parvum* オーシスト懸濁液を紫外線照射した。1つは紫外線照射直後の試料として 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。また, 残りのうち 1つは光回復処理を, 1つは暗回復処理を行った。

##### ⑥ 回復処理

###### (A) 光回復処理

紫外線照射後の *C. parvum* オーシスト懸濁液をマグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら, 上方から 15 W 蛍光灯 (メロウホワイト FL15N, 東芝) を用いて可視光線を照射した。試料表面における可視光線の照射線量率を  $0.05$  または  $0.10 \text{ mW/cm}^2$  とし, インキュベータ内で試料水温を  $20^\circ\text{C}$  に維持した。光回復処理は 2 時間とした。光回復処理後, 試料を 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。なお, 本研究では可視光線照射線量率  $0.05$  または  $0.10 \text{ mW/cm}^2$  の 2 通りの実験を行ったが, どちらの線量率でも十分な回復が生じており, 回復率に違いがないことを確認している。

#### 別添 4

##### (B) 暗回復処理

紫外線照射後の *C. parvum* オーシスト懸濁液をアルミ箔で遮光した 15 mL のポリプロピレン製遠沈管に移した。インキュベータ内で試料水温を 20°C に維持し、24 時間静置した。

##### ⑦ ESS 法

##### (A) ESS 法の原理

UV エンドヌクレアーゼはピリミジン二量体に特異的に作用し、一本鎖切断を引き起こす酵素である。Endonuclease Sensitive Site (ESS) 法では紫外線照射した DNA を UV エンドヌクレアーゼ処理し、一本鎖切断が引き起こされた箇所を ESS とする。UV エンドヌクレアーゼ処理した DNA をアルカリ条件で電気泳動することにより、二本鎖 DNA が一本鎖に解離し、ESS 数に応じて DNA が断片化される。従って、ESS 数が多いサンプルほど電気泳動後のバンドがスミアになる。電気泳動後、ゲルの蛍光画像からサンプル DNA の蛍光強度と相対移動距離の分布が得られる。蛍光強度はサンプル DNA の量を反映するため、蛍光強度を積分した値はサンプル DNA の総量となる。総 DNA の中央値にあたる移動距離をサンプル DNA の代表値とし、マーカークの移動距離と DNA 塩基数の関係式からサンプル DNA の塩基数中央値 ( $L_{med}$ ) を算出する。 $L_{med}$  と (1) 式 (Veatch and Okada, 1969) から損傷 DNA を断片化した時の塩基数平均値 ( $L_n$ ) を求める。

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

$L_n$  : 塩基数平均値

$L_{med}$  : 塩基数中央値

また、1 塩基当たりの ESS 数は (2) 式 (Freeman *et al* 1986) から求めることができる。

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

$L_{n(+uv)}$  : 紫外線照射したサンプル DNA の  $L_n$

$L_{n(-uv)}$  : 紫外線未照射のサンプル DNA の  $L_n$

##### (B) 測定および解析方法

紫外線照射と光回復および暗回復処理を

行った試料を遠心濃縮 (1,050×g, 15 min) した後、沈渣を 3 回凍結融解 (-80°C 15 分, 80 °C) し、*C. parvum* オーシスト壁を破碎した。DNA 抽出キット (Genomic-tip, QIAGEN) を用いて *C. parvum* から DNA を抽出 (平均 DNA サイズ: 100 k base) し、抽出 DNA を膜濃縮キット (Centricon, Millipore) で遠心濃縮した。抽出 DNA は UV エンドヌクレアーゼ緩衝液 (30 mM Tris(pH 8.0), 40 mM NaCl, 1 mM EDTA) で 3 回遠心洗浄し、ESS 測定に供した。

UV エンドヌクレアーゼ (*Micrococcus luteus* 由来) を抽出 DNA に添加し、37°C で 45 分間反応後、アルカリダイ (最終濃度が 100 mM NaOH, 1 mM EDTA, 2.5% Ficol, 0.05% bromocresol green) を加え、反応を止めた。0.5% アルカリアガロースゲル (0.5% Agarose H (日本ジーン), 30 mM NaOH, 1 mM EDTA) にサンプルを 1 ウェルごとに添加し、アルカリ緩衝液 (30 mM NaOH, 1 mM EDTA) で満たした電気泳動槽を用いて 0.5 V/cm で 17 時間電気泳動した。また、マーカークとして 8GT

(T4GT7+T4GT7/*Bgl* II digest mixture, WAKO) をサンプルと同条件で電気泳動した。泳動後のゲルは 0.5 μg/mL のエチジウムブロマイド溶液 (WAKO) に浸漬し、5 時間染色した。染色後、ゲルの蛍光画像を CCD カメラ (GelDoc 2000, BIORAD) で取り込み、画像解析ソフトウェア

(Quantity One, BIORAD) を用いて解析した。ゲルの蛍光画像を解析する上で用いるバックグラウンドはサンプル泳動レーンをはさむ両隣の泳動レーン (サンプルを流していない) の平均値とした。総 DNA の中央値にあたる移動距離をマーカークの移動距離と DNA 塩基数の関係式に挿入し、サンプル DNA の  $L_{med}$  を算出した。この値から (1) 式と (2) 式を用いて、1 塩基当たりの ESS 数を算出し、 $1 \times 10^4$  塩基当たりの ESS 数で示した。また、ESS 回復率は (3) 式から求めた。

$$ESS_r = 1 - \frac{ESS_t}{ESS_{UV}} \quad (3)$$

$ESS_r$  : ESS 回復率

$ESS_t$  : 回復処理後の ESS 数 (/10<sup>4</sup> base)

$ESS_{UV}$ : 紫外線照射による生成 ESS 数 (/10<sup>4</sup> base)