

別刷

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14～16年度 総合研究報告書

研究成果の刊行物

主任研究者 金子 光美

平成17(2005)年 4月

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
III. 研究成果の刊行物・別刷	21
・ Efficacy of UV irradiation in inactivating <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts.	21
・ Photoreactivation of enterohemorrhagic <i>E. coli</i> , vre and <i>P. aeruginosa</i> following UV disinfection.	28
・ クリプトスポリジウム汚染と濁質管理の重要性	34
<別刷>	
・ 平成16年度 総括報告書	
・ 平成16年度 分担研究報告書	

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

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、暗回復が平衡に達する時間は紫外線照射線量に依存することが確認された。*C. Parvum*の紫外線による不活化に際し、基本的に水温、線量率（化学消毒剤の濃度に相当）は影響を与えないが、濁質分などの光の透過を妨げる物質が存在すると、効果が低下することが確認された。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と関係していると考えられる。海外で用いられることの多い Iowa 株と日本国内で用いられることの多い HNJ-1 株の間の紫外線感受性には、相関が確認された。紫外線による水系汚染微生物対策の有用性についても検討を実施した。

また、凝集沈殿ろ過実験の結果、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複層ろ過、再凝集、逆洗水への凝集剤添加によるろ材被覆効果により、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、病原性細菌類等に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。平成 13 年度までに行った研究では、 $1\text{mWs}/\text{cm}^2$ レベルの極少量の紫外線照射量で原虫類の感染性が著しく低下することが確認され、原虫類に対する有用な不活化技術として、紫外線消毒が水道界に

別添 3

導入できる可能性が強く示唆された。今後は濁度等の諸条件下での定量評価を行い、実用化に向けた研究に着手する。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

I 紫外線による原虫類の不活化

1. クリプトスポリジウムの不活化実験

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

① 供試オーシスト

供試 *C. parvum* オーシストは井関基弘博士（金沢大学医学部）より分与されたヒト分離由来の HNJ-1 株を麻布大学付設生物科学総合研究所で飼育している Scid マウス（CB-17.1/cr, 日本クレア）で継代維持しているものを用いた。供試 *C. parvum* オーシストは、マウスの糞便からスクロス密度勾配遠心分離法により精製分離し、150mM リン酸塩緩衝液中で保存したものを供試オーシスト懸濁液とした。

② 紫外線ランプ

紫外線照射には 5 W 低圧紫外線ランプ（QCGL5W-14 97D, 岩崎電気社製）を用いた。低圧紫外線ランプは 253.7 nm にピークを持ち、放出波長幅は極めて狭い。

③ 紫外線照射線量率の測定方法

紫外線の照射線量率は紫外線積算光量計（UIT-150 S254, ウシオ電機社製）を用いて測定した。本研究で用いた紫外線積算光量計は DNA 吸収スペクトルに近い分光感度を持っており、おおむね DNA に作用する波長域の光エネルギーを測定しているこ

とになる。

④ 紫外線照射

プラスチックシャーレ（φ56 mm）にオーシスト懸濁液（ 2.0×10^6 oocysts/mL）を 10 mL ずつ入れた。このときの水層厚は 4.0 mm である。これに 5W 低圧水銀ランプ（QCGL5W-14 97D, 岩崎電気社製）により、照射線量率 0.10 mW/cm^2 の紫外線を照射した。紫外線照射中はオーシスト懸濁液をマグネチックスターラーで常時緩やかに攪拌した。水槽表面における照射線量率は紫外線積算光量計（UIT-150-A, ウシオ電機社製）で計測し、水層中における紫外線の減衰が Lambert-Beer 則に従うと仮定して、水層厚 4.0 mm のオーシスト懸濁液に紫外線照射したときの平均線量を積分計算で求めた。紫外線照射線量は照射時間で制御した。

⑤ 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入れ、インキュベータ（20°C）内で静置した。静置時間は 24, 48, 72, 96 時間とした。

⑥ 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 -80°C のディープフリーザ中で凍結させてから室温に戻すという操作を 3 回繰り返した後、 95°C 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。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、小熊久美子博士（東京大学）から分与して頂いた。DNA 抽出液に UV エンドヌクレアーゼを添加して 37°C 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（100mM NaOH, 1mM 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, 日本ジーン社製）上で電気泳動した。泳動槽にはアルカリ緩衝液（30mM NaOH, 1mM EDTA）を満たし、0.5V/cm の電圧で 17 時間泳動した。DNA マーカーには 8GT（T4dC+T4dC/BglIII digest mixture, 和光純薬工業製）を用いた。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

別添 3

ソフトウエア (Quantity One, BIORAD 社製) で解析した。これらのシステムにより DNA の蛍光がピクセルの集合として認識され、蛍光強度の泳動距離分布が得られる。各試料 DNA については、総 DNA のちょうど 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た。DNA マーカーの泳動結果から泳動距離と DNA 塩基数の二次回帰式を求め、それによって各サンプルの 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 *et al.*, 1969)。

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

単位塩基あたりの ESS 数を (2) 式 (Freeman *et al.*, 1986) に従って算出した。

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

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。

(1-2) 塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒-水道におけるクリプトスポリジウム対策

① 供試オーシスト

(1-1) 「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。

A) 濁質/オーシスト懸濁液の調製

(A-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。

(A-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。

(A-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。

(A-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。

(A-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。

B) 紫外線照射

$\phi 36 \text{ mm}$ のシリコンコーティングプラスチックビンに 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/cm^2 、脱囊試験による評価実験系では 1.0 mW/cm^2 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/cm^2 (約 3 log 不活化相当線量)、脱囊試験では 230 mJ/cm^2 (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。

C) 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

別添 3

た。詳細は既報 (志村他, 2001, Morita *et al.*, 2002) を参照されたい。

D) 脱囊試験

Woodmansee (1987) らの脱囊法を改良した方法 (Morita *et al.*, 2002) を用いた。この方法は脱囊したスポロゾイト数から脱囊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囊を排除できると考えられている。

(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

① 供試 *C. parvum* オーシスト

(1-1) 「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, 2×10^7 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 mW/cm², MPUV ランプを用

いた照射では 0.95~1.40 mW/cm² とした。紫外線照射線量 (mJ/cm²) は紫外線照射線量率 (mW/cm²) 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 mW/cm² とし, インキュベータ内で試料水温を 20°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 mW/cm² 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。

(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

別添 3

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、 1×10^4 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 (/10⁴ base)

ESS_{UV} : 紫外線照射による生成 ESS 数 (/10⁴ base)

(1-4) *Cryptosporidium parvum* HJN-1 オーシストに対する不活化力の中圧紫外線と低圧紫外線の比較

①供試 *C. parvum* オーシスト

(1-1) 「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

(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」と同じ紫外線ランプを用いた。

③紫外線照射線量率の測定方法

LPUV、MPUV の照射線量率は、紫外線積算光量計 (UIT-150S254, ウシオ電機) を用いて測定した。

④感染性の測定. B-17/Icr, CLEA Japan Inc) を使用した。新たな飼育環境に適応させるために 1 週間予備飼育して 6 週齢とした後、感染試験に供した。動物は麻布大学動物実

別添 3

験委員会の審査を受け、信頼性のある不活化定量値が得られる必要最小限の匹数で行った。

紫外線照射群及び対象群(紫外線非照射) 試料溶液中のオーシスト数を血球計算盤法で計数し、所定の濃度となるように5倍希釈して4~5段階の段階希釈列を調整した。投与量は500 μ L/匹とし、各希釈段階当たり5匹のマウスに経口ゾンデで胃内投与した。投与後に死亡したマウスはなかった。投与4週間後に1日分の糞便を回収し、シヨ糖浮遊法で生成した後、間接蛍光抗体染色した、すなわち、撥水ペンで円を描いたセルロースアセテート製メンブランフィルター(孔径3.0 μ m 直径25mm、ADVANTEC)を150mM PBSに浸してから吸引ろ過器にセットし、150mMPB、1%BSA、0.1%NGSをそれぞれ1mLずつ滴下し吸引ろ過した。その後、シヨ糖浮遊法で精製した後、試料溶液を約1mL滴下して洗浄した。その後、1次抗体(Hydrofluor Combo Kit, Strategic Diagnostics)を100 μ L滴下し、洗浄した。そして、二次抗体を100 μ L滴下して、25分間反応させ50mMPB、1%BSA、0.1%NGSで洗浄した後、エタノールグリセリン溶液で脱水した。最後にフィルターを2%DABCOグリセリン封入液一滴のせたスライドガラスに載せ、さらに、2%DABCOグリセリン封入液を1滴のせて、カバーガラスをのせ、プレパレートとした。これを落射蛍光顕微鏡(BX-60, OLYMPUS)のB励起で観察し、アップグリーン色に染色されたオーシストが確認されたものを感染陽性とした。この段階で陰性のマウスについてはさらに1週間飼育した後再検査した。再検査でも、オーシストが確認されなかったマウスは感染陰性とした。

各希釈段階でのオーシスト投与数、供試マウス匹数および感染陽性マウス次いで1中圧紫外線による匹数データから、Hurley and Roscoe(1983)のMPN計算法を用いて1MPN発現オーシスト数を求め、(4)式から相対感染力(Ir)を算出した。

$$Ir = \frac{MPN_a}{MPN_0} (4)$$

ここで、MPNa:紫外線照射群の1MPN発現オ

ーシスト数、

MPN₀:紫外線非照射群の1MPN発現オーシスト数

2. ジアルジア等の不活化実験

① 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)

赤痢アメーバの栄養体は試験管培養で継代されている *E. histolytica* HM-1:IMSS cl-6株を用いた(Diamondら、1972)。培養液はBI-S-33培地を使用した(Diamondら、1978)。培養液中の栄養体を滅菌10mMリン酸緩衝液(pH7.4、以下PBS)で2回遠心洗浄後に10mlのPBSに10³ないし10⁴/mlとなるよう再浮遊し、紫外線照射実験に供した。照射後の栄養体は15分間氷上に静置した後に15mL遠心管に入れ、遠心濃縮した。栄養体増殖能の検定は試験管培養で行い、紫外線照射後に生残した栄養体の定量はMPN法を採用した。試験の手技ならびにMPNの計算法は、*Giardia*の培養評価法に準じて行った。

② アイメリア (*Eimeria acervulina*)

Eimeria 嚢子は感染ニワトリの糞便より、飽和食塩水浮遊法を用いて精製した。紫外線照射に用いた嚢子は30°Cで48~60時間培養した後の成熟嚢子を用いた。嚢子は10mLの滅菌脱イオン水に10⁵/mlの濃度で懸濁し、紫外線照射実験に供した。照射後の嚢子はシリンジを用いて1mlの懸濁液としてニワトリに投与した。投与時の濃度は10⁴/mlおよび10⁵/mlの2段階とした。トリは1ケージに3羽ずつ入れ、同じ照射線量かつ同じ希釈段階の嚢子を2ケージのトリに投与した。嚢子の排出がピークとなる投与後4~8日の期間に糞便を回収し、嚢子の排出数を求めた。トリの飼育ケージは糞便の回収機構を有し、かつ食糞の防止措置が施されたケージ(武田薬品)を使用した。1つのケージに3羽のトリを入れて飼育したが、トリ間の感染が防がれており、飼育形態は測定結果に影響しないものと考えられる。糞便は3羽分が混合されており、期間中の1羽あたりの嚢子排出数を平均として算出した。嚢子排出数は改良型McMaster算定盤を用いて顕微鏡下で求めた。手順は以下の通りである。糞便の総重量を測定した後に糞便をよく攪拌し、3本の50ml試験管に10ないし20gずつ糞便を分取した。分取した糞便は30°Cで48~60時間培養した後、4°Cで保存した。保存した糞便は脱イオン水で最終液量

別添 3

を 40ml に調整し、十分に懸濁した。懸濁後に 180 μ l を 820 μ l の飽和食塩水と混合してから 150 μ m のフィルターでろ過した。ろ過液をよく混合し、算定盤に十分量のろ過液を入れ、3 分以上静置した。100 倍の倍率で明視野観察を行い、嚢子を計数した。計数を容易にする目的でコンデンサーを意図的に下げる、あるいは紫外線励起による自家蛍光の観察を補助的に適用した。最終的に、計数值、希釈率、糞便量等より 1 羽あたりの嚢子排出数を求めた。

③ Cyclospora

Cyclospora は継代培養が確立されておらず、実験材料としては患者便から分離する以外に方策は無い。当該研究においてはヒト由来の Cyclospora のオーシストを入手する機会を得た。

④ 紫外線照射試験

紫外線ランプは極大波長が 254 nm の 5 W 低圧水銀ランプ(ニッポ電機)を 2 本用いた。クランプで固定したランプの直下約 40cm に浮遊液 10mL を入れた 60 \times 15 mm シャーレ(Corning430166)を置き(水層: 4.7 mm)、0.10mW/cm² の強度で所定の線量を照射した。照射線量測定には紫外線積算光量計 UIT-150-A +UVD-S254(ウシオ電機)を使用した。

⑤ 寄生虫卵の自家蛍光観察

寄生虫卵はホルマリン固定された以下の試料を用いた。*Taenia taeniaformis*(ネコ条虫)、*Ascaris suum*(ブタ回虫)、*Schistosoma japonicum*(日本住血吸虫)、*Clonorchis sinensis*(肝吸虫)。蛍光顕微鏡は Axiophoto2(Zeiss)を用いた。蛍光フィルターは紫外線励起フィルター(02UV フィルター、G365:FT395:LP420)、青色光励起フィルター(09B フィルター、BP450-490:FT510:LP520)、緑色光励起フィルター(15G フィルター、BP546/12:FT580:LP590)を用いた。写真撮影は D1X デジタルカメラ(Nikon)を用いた。いずれの試料も無染色で観察を実施した。

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、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。

II. 凝集沈澱・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* オーシ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) 鉄系及び有機高分子凝集剤を含む各種凝集剤の処理性評価

PAC (A1203 = 10%)、硫酸ばんど (A1203 = 10%)、塩化第二鉄 (FeCl₃ = 38%)、ポリシリカ鉄 (PSI)、有機高分子凝集剤(ポリアクリルアミド系)の各種凝集剤を用いて、凝集沈澱及び急速ろ過処理実験を行い、トレーサー粒子の除去性を比較した。

(2) 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⁻¹ の間で変化させて、凝集沈澱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。

(3) 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 による凝集沈澱処理水を用い、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。

(4) ろ材の凝集剤被覆に関する検討

凝集沈澱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⁻¹ の間で変化させて、凝集沈澱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

別添 3

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。

（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

I 紫外線による原虫類の不活化

1. クリプトスポリジウムの不活化実験

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

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 0.1~0.4 ESS/10⁴ 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 mJ/cm² 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 mJ/cm² 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。

紫外線照射直後の ESS 数と回復した ESS 数との関係を図 6 に示す。暗回復処理 24 時間では、紫外線照射直後の ESS 数が 1.48

ESS/10⁴ base 以上の場合、約 1.0 ESS/10⁴ 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 ESS/10⁴ base 以上の場合、約 1.5 ESS/10⁴ 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 0~4.5 mJ/cm² 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 0.5~1.0 ESS/10⁴ 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、0.1~0.4 ESS/10⁴ 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。

（1-2）塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒-水道におけるクリプトスポリジウム対策

1. フミン/オーシスト混在系

清水系において平均紫外線照射線量を 230 mJ/cm² としたときの脱囊で見た不活化 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、脱囊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。

2. カオリン/オーシスト混在系

非付着性のカオリンが共存する場合、不活化 log₁₀ 数は清水系における値よりもわ

別添 3

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。

(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

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。LPUV および MPUV の回帰式を以下に示す。

$$\text{LPUV: ESS}_{\text{UV}} = 0.72D - 0.11 \quad (r^2 = 0.98) \quad (4)$$

$$\text{MPUV: ESS}_{\text{UV}} = 0.61D - 0.07 \quad (r^2 = 0.93) \quad (5)$$

D : 紫外線照射線量 (mJ/cm²)

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 ($r^2=0.9753$ および $r^2=0.9335$) 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。

紫外線を用いた不活化研究において、紫外線照射線量の算出方法はランプの放出エネルギーを物理的に測定する紫外線照射線量率計 (Clancy *et al.*, 2000b; Mofidi *et al.*, 2001) や、特定の化学物質が吸収した線量を算出する化学線量計 (Linden and Darby, 1998), 指標生物の不活化の度合いから生物が吸収した線量を算出する生物線量計 (Kamiko and Ohgaki, 1989) など、研究者によって様々である。また, Zimmer *et al.* (2002) や Craik *et al.* (2001) は紫外線照射線量率計での測定値を DNA 吸収スペクトルで補正した紫外線照射線量で評価している。ここで、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、

$$\text{LPUV: ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.11 \quad (r^2 = 0.98) \quad (6)$$

$$\text{MPUV: ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.07 \quad (r^2 = 0.93) \quad (7)$$

D_w : 補正した紫外線照射線量 (mJ/cm²)

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。

$$\text{ESS}_{\text{UV}} = 0.75D_w - 0.10 \quad (r^2 = 0.97) \quad (8)$$

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、(8) 式を用いることで、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。

ESS が約 0.3 (/10⁴ base) 生成されるごとに感染力が 1/10 に減少しており、ピリミジン二量体数と感染力の喪失の程度が強く関連している。

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 0.13~0.80 (/10⁴ base) となった。これは、同じ HNJ-1 株オーシストで行った Oguma *et al.* (2001), Morita *et al.* (2002) の結果と同様であった。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 0.18~0.51 (/10⁴ 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 0.4/10⁴ base) となった。*E. coli* では、LPUV を照射した場合は ESS の減少が認められたが、MPUV を照射した場合は ESS 数の減少は認められないとされているが (Oguma *et al.*, 2002), *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。

$$\text{ESS}_{\text{rep}} = 1.09\text{ESS}_{\text{UV}} - 0.65 \quad (r^2 = 0.97) \quad (9)$$

ESS_{rep} : ESS の回復数 (/10⁴ base)

ESS_{UV} : 紫外線照射による生成 ESS 数 (/10⁴ base)

(9)式から、生成 ESS 数が約 0.6 (/10⁴ base) 以下では、回復処理しても ESS 数

別添 3

が減少しない。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 1.5~2.0 ($/10^4$ 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(9)式から、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。

(1-4) *Cryptosporidium parvum* HJN-1 オーシストに対する不活化力の中圧紫外線と低圧紫外線の比較

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. ジアルジア等の不活化実験

紫外線処理で問題となる要因の光回復、濁質の付着による遮蔽効果ならびに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。一方、同等の条件でジアルジア嚢子を用いて回復能を検討したところ、回復はほとんど見られないことが示された。

次いで、濁質の付着に伴う遮蔽効果についての検討した。擬似の付着濁質として *Giardia* 嚢子の精製に用いられる磁気ビーズを使用した。嚢子へのビーズの付着は必ずしも一様ではなく、ほぼ完全に周囲を覆われるものからまばらに付着するものまで多様であった。嚢子へのビーズの付着による遮蔽効果は顕著で、紫外線による不活化効果は著しく低減した。本実験条件では反応液自体の濁度はほとんど影響されておらず、浮遊濁質によるフィルター効果は生じていないことを確認した。このような条件であっても、付着物の遮蔽効果は紫外線の不活化能を著しく減ずることが示された。

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孢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

別添 3

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、8~12mJ/cm² 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、2mJ/cm² 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 の嚢子を生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 10 mJ/cm² 程度の線量が必要であった。本原虫に対しての不活化効果は、先の *Giardia* シストでの実験に比べて不活化には 10 倍程度強い線量が必要であり、これは *Eimeria* オーシストとほぼ同等の結果であった。

耐塩素性微生物は水道を介した大規模集団感染を引き起こすことから、代替消毒法として紫外線の利用が注目されている。紫外線は *Cryptosporidium* ならびに *Giardia* に対して大変効果的であることが、本研究を含めて複数の報告がなされている。紫外線の水道への導入は経済的、かつ容易であることから、我が国では特に簡易水道等の小規模な水道での利用に期待が寄せられているが、マルチプルバリアの原則からはずれた固液分離を伴わない安易な導入につながる懸念がある。本研究ではわが国の水道事情に則して紫外線消毒の利点と欠点を検討しており、これまでに *Giardia* シストは 1 mJ/cm² で 2-log 程度の不活化が達成されることを試験管培養法で確認した。一方、トリに感染する *Eimeria* オーシストでは 8 mJ/cm² で 2-log 程度の嚢子の不活化効果が感染実験で得られたが、不活化に必要な照射線量には大きな開きが認められ、ヒトに感染する原虫類の紫外線耐性を評価する必要が指摘されていた。

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。*Cyclospora* はわが国に定着する原虫ではないが世界的には広がりを見せるもので、水系汚染の原因としても知られており今後の挙動に関心が寄せられている。本原虫のオーシストは塩素耐性であることが示されており、水道水の安全性確保に向けては紫外線を用いた不活化処理したい病原性微生物の 1 つと言える。しかしながら、*Cyclospora* は継代培養が確立されておらず、実験材料としては患者便から分離する以外に方策は無い。当該研究においてはヒト由来の *Cyclospora* のオーシストを入手する機会を得て、紫外線による不活化効果の検討を行なった。遺伝子解析により、患者由来の原虫が *C. cayetanensis* であることを確認し実験に供した。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 mJ/cm² 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 mJ/cm² 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 R² 値は 0.98 であった。その結果、10 mJ/cm² で 2-log の発育阻止が観察された。

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等に関して計 74 編の海外文献の要約を行い知見を得た。

II 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

(1) 鉄系及び有機高分子凝集剤を含む各種凝集剤の処理性評価

高水温期においては、硫酸ばんど以外、何れの凝集剤を用いても、凝集沈澱処理で 1.5 log₁₀ 程度、単層ろ過処理で 1.5~2.5 log₁₀ 程度のトレーサー除去率が期待できることが分かった。この時、PAC と PAC 以外の無機凝集剤、あるいは無機凝集剤と高分子凝集剤併用の有無等の間で、処理性について有意な差は認められなかった。高水温は、一般的に凝集沈澱、ろ過処理にとって好条件であり、PAC 単独処理によっても十分な処理性能が発揮さ

別添 3

れたため、他凝集剤との明確な差が現れなかったものと考えられた。

低水温期においては、PAC を用いた凝集沈澱処理で約 $1 \sim 1.5 \log_{10}$ 、単層ろ過処理で $2 \sim 3 \log_{10}$ 程度のトレーサー粒子除去率が期待できることが分かった。また、高分子凝集剤併用の有無により、処理性に有意な差が認められた。特に、PAC に比べ塩化第二鉄と高分子凝集剤を併用した場合、凝集沈澱と単層ろ過の一連の処理の合計で $1 \log_{10}$ 程度、トレーサー粒子の除去率を向上させることができた。

(2) 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、沈澱池からキャリア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^{-1} で処理性が最も高くなった。

(3) 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。

(4) 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らず、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。

別添 3

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、逆洗用水への添加率を 10 mg/L から 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。

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。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。

(1-2) 塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒-水道におけるクリプトスポリジウム対策

①フミン/オーシスト混在系

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。

②カオリン/オーシスト混在系

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。

(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

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 (10^4 base/mJ \cdot cm $^{-2}$) であり、*E. coli* の 0.4 (10^4 base/mJ \cdot cm $^{-2}$) (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。*C. parvum* のスポロゾイトは厚いオーシスト

別添 3

壁に保護され、化学消毒剤に対しては著しい耐性を示すが、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こと、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。

(1-4) *Cryptosporidium parvum* HJN-1 オーシストに対する不活化力の中圧紫外線 と低圧紫外線の比較

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. ジアルジア等の不活化実験

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

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、紫外線導入状況等に関して知見を得た

II. 凝集沈澱・急速ろ過の運転管理技術の開発

(1) 鉄系及び有機高分子凝集剤を含む各

種凝集剤の処理性評価

PAC に比べ塩化第二鉄と高分子凝集剤を併用した場合にトレーサー粒子の除去率を向上した要因として、①鉄系凝集剤によるフロック比重の増大、②高分子凝集剤の架橋作用によるフロックサイズおよび強度の増大、③原水中の被凝集粒子の表面電位やサイズと無機凝集剤水和物の荷電やサイズとの関係等が推察された。

(2) 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。

(3) 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。

(4) ろ材の凝集材被覆に関する検討

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。

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

低圧紫外線により *C. parvum* の DNA 上に生成されたピリミジン二量体数を ESS 法で定量した。また、紫外線照射後の暗回復処理時間を変化させ、ピリミジン二量体が修復されるために必要な時間および修復の程度を評価した。その結果をまとめると、以下の通りである。

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 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 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。

(1-2) 塩素消毒の補完技術としての紫外線消毒-水道におけるクリプトスポリジウム対策

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。

(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

本研究では、MPUV 照射によって *C. parvum* HNJ-1 株のオーシストに生成されたピリミジン二量体と、その光回復および暗回復の有無と程度を ESS 法で評価した。また、LPUV ランプを用いて同様に実験し、生成されたピリミジン二量体とその光回復および暗回復について比較検討した。その結果、以下の知見が得られた。

① 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、LPUV と MPUV で単位線量当たりの生成 ESS 数は一致し、補正紫外線照射線量 (D_w) と生成 ESS 数 (ESS_{UV}) の関係について次式を得た。

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

② MPUV 照射によって生じた ESS は、LPUV 照射したものと同様に、光回復および暗回復のいずれのプロセスでも減少した。

③ 光回復後の残存 ESS 数は、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 $0.4/10^4 \text{ base}$) となる傾向が認められた。

④ 紫外線照射によって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り、修復できない二量体は少量の紫外線照射で速やかに生成され、紫外線照射線量の増加に伴って修復できる二量体が増加するものと考えられた。

⑤ 暗回復では光回復とは異なり、生成 ESS 数が多いものほど、暗回復後の残存 ESS 数が多くなる傾向が認められた。

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。

(1-4) *Cryptosporidium parvum* HJN-1 オーシストに対する不活化力の中圧紫外線と低圧紫外線の比較

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. ジアルジア等の不活化実験

紫外線は *Cryptosporidium*、*Giardia* およ

別添 3

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。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ことから、紫外線照射装置の浄水場等への導入に際してはこれらを十分考慮する必要がある。

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。

II 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

- ・杉本ひとみ, 森田重光, 平田 強, 本山 信行, 森岡崇行, 藤原正弘 (2002.5) 紫外線による *Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化に及ぼす濁質の影響, 第 53 回全国水道研究発表会, 前橋市
- ・浪越 淳, 森田重光, 平田 強, 小熊久美子, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2002.5) 紫外線処理した *Cryptosporidium parvum* オーシストの光回復, 暗回復の ESS 法による評価, 第 53 回全国水道研究発表会, 前橋市
- ・Hirata T, Morita S, Takizawa H, Jimbo Y and Komatsu K (2002.4) Micron-pore membrane filtration system for removing protozoa from water at lowest trans-membrane pressure. IWA International Conference
- ・Hirata T, Morita S, Sugimoto H, Takizawa H,

and Endo T(2002. 10): Efficacy of Low-Pressure Ultraviolet Irradiation for inactivating *Cryptosporidium parvum* oocysts in Turbid Water. IUVA First Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies, Singapore.

- ・Izumiyaka S, Yagita K, Hirata T, Fujiwara M and Endo T(2002. 10): Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by ultraviolet irradiation IUVA First Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies, Singapore.
- ・瀧澤 博美, 貝森 繁基, 森田 重光, 荻原 喜久美, 平田 強, 藤原 正弘 (2003.3) 紫外線の *Cryptosporidium parvum* 不活化力の細胞培養法による評価, 第37回日本水環境学会年会, 熊本市.
- ・森田重光, 杉本ひとみ, 平田 強 (2003.3) 放射線による *Cryptosporidium parvum* の不活化. 第37回日本水環境学会年会, 熊本市.
- ・森田重光, 平田 強 (2003.9) 紫外線の原虫不活化効果, 第6回日本水環境学会シンポジウム, 神戸.
- ・猪又明子, 橋本 温, 保坂三継, 平田 強 (2003.9) わが国の水道原水並びに浄水における原虫汚染の実態, 第6回日本水環境学会シンポジウム, 神戸.
- ・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.

別添 3

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。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morita S, Namikoshi A, Hirata T, Oguma K, Katayama H, Ohgaki S, Motoyama N and Fujiwara M	Efficacy of UV irradiation in inactivating <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts.	Applied and Environmental Microbiology	68(11)	5387-5393	2002
Tosa K, Yasuda M, Morita S and Hirata T	Photoreactivation of enterohemorrhagic E. coli, vre and P. aeruginosa following UV disinfection.	Journal of Water and Environment Technology	1(1)	19-24	2003
平田 強	クリプトスポリジウム 汚染と濁質管理の重要 性	水道協会雑誌	71(6)	1-8	2002

報告書

著者氏名	報告書名	出版年
金子 光美	平成 16 年度 総括報告書	2005
藤原 正弘 (財団法人水道技術研究センター)	平成 16 年度 分担研究報告書	2005