

### 3. 水環境中の病原ウイルスに対するオゾン処理性の評価

鬼丸 祐二  
平林 達也  
今中 壮一

#### 1. はじめに

ウイルスは他生物の細胞を利用して自己を複製する感染性の粒子であり、遺伝情報がコードされた核酸(DNA または RNA) およびそれを内包するタンパク質の殻(カプシド)から構成される。その大きさは一般的な動物の細胞(6 ~ 30 μm) や細菌(0.5 ~ 5 μm) より小さく、直径 20 ~ 300 nm 程度である。

ウイルスはその他の微生物と異なり、宿主細胞に感染しなければ自己を増殖させることができないことから、ヒトの病原ウイルスが水系に混入した場合であっても、病原ウイルスが水環境で増殖することはないと考えられるが、環境中の諸条件に耐え、長期間生存し得ることが報告されている<sup>1)</sup>。また、今般の新型コロナウイルスの感染拡大状況から、病原ウイルスの基礎特性を調べた上で水環境中の病原ウイルスの存在実態を把握し、水道水の安全性を担保するために、その浄水処理性を明らかにする必要があると考えられた。

このため、まず本市浄水場のオゾン処理工程における病原ウイルスの処理性を評価することを目的に、モデルウイルスを用いた添加実験を行った。

#### 2. 水環境中の病原ウイルスについて

水系伝播する病原ウイルスは、胃腸炎や肺炎などヒトに多大な健康被害を及ぼすため、浄水施設において適切に処理される必要がある。水環境中の各種病原ウイルスは、ヒトや家畜などの宿主を介し放出され、水環境中に広く分布していることが WHO から報告されている<sup>2)</sup>。その内容を表-1 にまとめた。

同ガイドラインには微生物学的水質の検証のためのガイドライン値として「大腸菌または糞便性大腸菌群が試料 100 mL 中に検出してはならない」事が示されている。一方、ウイルスの検出には濃縮等の煩雑な操作を要し、簡便な検査方法がないことから、ウイルスそのものに対するガイドライン値は設定されていない。

表-1 水環境中の病原ウイルスの例

ウイルス名	核酸の種類	エンベロープ膜	検出方法	主な健康影響	主な棲息場所
アデノウイルス	2本鎖DNA	無	PCR	胃腸炎、肺炎	下水、水源
アストロウイルス	1本鎖RNA	無	PCR	下痢	下水、水源
ノロウイルス	1本鎖RNA	無	PCR、抗体反応	嘔吐、下痢	家庭排水、下水
エンテロウイルス	1本鎖RNA	無	PCR、細胞培養	心筋炎、小児麻痺	下水、水源、食品
A型肝炎ウイルス	1本鎖RNA	無	PCR	A型肝炎	糞便汚染された食品
E型肝炎ウイルス	1本鎖RNA	無	PCR	E型肝炎	下水
ロタウイルス	2本鎖RNA	無	PCR	脱水症状、嘔吐	下水、水源

#### 3. 調査方法

##### 3. 1 モデルウイルスの選定

表-2 には代表的なウイルスの特徴とモデルウイルスの例を示している。病原ウイルスの浄水処理性を評価するためには、病原ウイルスそのものを実験に用いることが最も理想的である。しかしながら、浄水処理水中の病原ウイルス濃度は極めて低く、直接の濃度定量が困難である上に、さらにはヒトへの感染リスクを考慮しなければならないことから、実際の調査において病原ウイルスを使用することは容易ではない。このため、直接定量が可能な濃度に培養でき、かつ、バイオセーフティーレベル 1 (BSL1) で取り扱いが可能なバクテリオファージ Q $\beta$  をモデルウイルスとして実験を行った。なお、バクテリオファージ Q $\beta$  は F 繊毛をもつ大腸菌に感染するノンエンベロープ型の 1 本鎖 RNA ウィルスであり、後述するブラーク法により感染能をもつウイルスのみを定量することが可能である。

表-2 ウィルスの特徴とモデルウィルスの例

ウイルス名	核酸の種類	宿主	エンベロープ膜	取扱施設レベル	定量方法
新型コロナウイルス	1本鎖RNA	ヒトなど	有	BSL3	PCR
ノロウイルス	1本鎖RNA	ヒトなど	無	BSL2	PCR
モデルウィルスの例	核酸の種類	宿主	エンベロープ膜	取扱施設レベル	定量方法
マウス肝炎ウイルス	1本鎖RNA	マウス	有	BSL2	PCR、細胞感染価
唐辛子微斑ウイルス	1本鎖RNA	唐辛子	無	BSL1	PCR
バクテリオファージφ6	2本鎖RNA	シュードモナス属	有	BSL1	PCR、ブラーク法
バクテリオファージQβ	1本鎖RNA	F繊毛大腸菌	無	BSL1	PCR、ブラーク法

### 3. 2 バクテリオファージ Qβ の培養および定量

バクテリオファージ Qβ の培養および定量については、永井らの報告<sup>3)</sup>に基づき次のように行った。

#### 3. 2. 1 宿主大腸菌 K-12 株の増殖曲線の確認

バクテリオファージ Qβ (NBRC20012) は宿主大腸菌の対数増殖期に感染する性質をもつため、宿主大腸菌 K-12 株 (NBRC3301) の増殖曲線の確認を行った。

K-12 株の培養には、表-3 に組成を示す滅菌済の 702medium を用いた。50mL 遠沈管に K-12 株溶液を 0.01mL と 702medium を 10mL 添加し、200rpm 37℃で 24 時間振とう培養を行い、前培養液を作製した。さらに、50mL 遠沈管に前培養液を 0.5mL と 702medium を 5mL 添加したものを複数準備し、200rpm 37℃で振とう培養を行い、紫外可視分光光時計 UV-1650PC (島津製作所製、測定波長 600nm、測定間隔 30 分) にて吸光度を測定し、K-12 株の増殖曲線を作成した。

K-12 株の増殖曲線を図-1 に示す。なお、この図に表す縦軸は 600nm での吸光度、横軸は培養時間である。その結果、培養開始後すぐに対数増殖期を迎えること、この増殖期間は 3 時間ごろまで続くことが確認された。そのため、以降の実験において、バクテリオファージ Qβ を K-12 株に感染させるタイミングは、K-12 株の振とう培養開始 30 分後とした。

#### 3. 2. 2 ブラーク法によるバクテリオファージ Qβ の定量

寒天培地上で宿主菌とともにファージを培養すると、感染した宿主菌のみが溶菌され、培地表面に透明な斑点 (ブラーク) が現れる。このブラークを計数することにより、ファージの定量が可能となるため、モデルウィルスであるバクテリオファージ Qβ について、二重平板培地を用いてブラークの検出を試みた。

まず二重平板培地として、702medium に寒天 0.7% を添加した上層寒天培地および 702medium に寒天 1.5% を添加した下層寒天培地を作成し、滅菌後に下層寒天培地のみをシャーレに注ぎ入れ、通風乾燥させた。次に、50mL 遠沈管に K-12 株前培養液を 0.03mL と 702medium を 0.4mL 添加し、200rpm 37℃で 30 分間振とう培養を行った。さらに、この培養液にバクテリオファージ Qβ の希釈溶液 0.01mL と 50℃で保温された上層寒天培地 4mL を添加し軽く攪拌したのち、下層寒天培地上に注ぎ入れ、よく混和させた。その後、この培地を 37℃の恒温槽にて 24 時間静置培養すると、図-2 のようにブラークを観察することができた。検出されたブラーク数から PFU (Plaque-Forming Unit) /mL を算出し、バクテリオファージ Qβ を定量した。

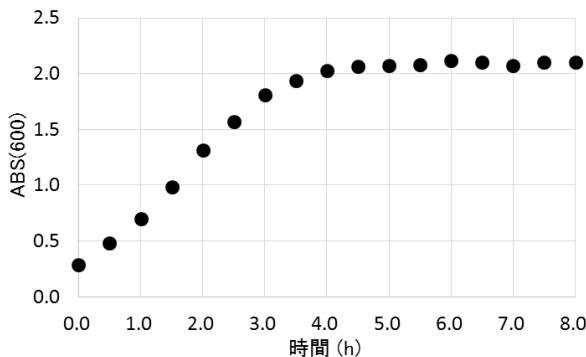


図-1 大腸菌 K-12 株の増殖曲線



図-2 バクテリオファージ Qβ のブラーク

#### 3. 2. 3 バクテリオファージ Qβ の大量培養

浄水処理実験を行うにあたり、高濃度のバクテリオファージ Qβ を含む試料水が必要であるため、液体培地を用いてバクテリオファージ Qβ の大量培養を行った。

3. 2. 2 の方法により上層寒天培地にバクテリオファージ Qβ のブラークを生成させ、その培地上に

702medium を 1mL 添加した後、コンラージ棒を用いてブラークを上層寒天培地ごと剥がし取り、4 本の 1.5mLtube に回収した。回収した培地を試験管ミキサーでよく攪拌した後、遠心分離 (10000g、10 分) を行い、各 tube 内の上清をセルロースアセテート膜 (孔径 0.45μm) にてろ過し、約 1mL のバクテリオファージ Q $\beta$  溶液を回収した。その翌日、50mL 遠沈管に K-12 株前培養液を 0.4mL と 702medium を 10mL 添加し、200rpm 37°C で 30 分間振とう培養を行った後、バクテリオファージ Q $\beta$  溶液を 0.2mL 添加して 200rpm 37°C で 24 時間振とう培養を行った。その後、前述と同様の方法で培養液の遠心分離とろ過を行い、バクテリオファージ Q $\beta$  高濃度溶液 (2~3×10<sup>11</sup>PFU/mL) を調製した。

### 3. 3 オゾン処理実験

オゾン発生装置として㈱ラウンドサイエンス製 WAT-08 を用い、5L の砂ろ過処理水に濃度が 5×10<sup>7</sup>PFU/mL 程度となるようバクテリオファージ Q $\beta$  高濃度溶液を添加し、攪拌したものを供試水とした。オゾンガスを毎分約 0.2mg/L で注入し、オゾン接触時間毎 (0、1、2、5、10 分) に採水し、直ちに溶存オゾン濃度を測定し、チオ硫酸ナトリウムにより残留オゾンを除去した分析用試料のうち 1mL を用いてブラーク法で定量した。実験は 3 回行い、オゾン接触時間 0 分の試料を基準として各接触時間におけるバクテリオファージ Q $\beta$  の低減率を対数減少値 (LRV, Log<sub>10</sub> Reduction Value) として算出した。また、対照実験として酸素ガスを通気し、バクテリオファージ Q $\beta$  の低減率を同様に算出した。なお、バクテリオファージ Q $\beta$  の初期濃度が 5×10<sup>7</sup>PFU/mL 程度であること、ブラーク計数時の定量下限が 30PFU/mL であることから、本調査においては最大 6.2log までの低減率の評価が可能であった。

### 4. 結果と考察

オゾン処理実験について、オゾン接触時間とバクテリオファージ Q $\beta$  低減率の関係を図-3 に示す。また、本市の浄水処理におけるオゾン処理では、溶存オゾン濃度と接触時間の積である CT 値に基づく溶存オゾン濃度制御を行っていることから、実験系における CT 値とオゾン接触時間との関係も図示し、オゾン処理工程における処理性を評価した。

対照実験の結果、10 分間酸素ガスを通気させても低減率に変化がなかったことから、バクテリオファージ Q $\beta$  は酸素ガスの曝気により不活化されないことがわかった。一方、オゾンガスを通気させた系では、被処理水中に含まれる培養液成分等のオゾン消費成分の影響により、オゾン通気後 2 分までは溶存オゾンがほぼ検出されなかつたが、オゾン通気 1 分後で 4.7log、2 分後には 5.4log 不活化されていた。このことから、バクテリオファージ Q $\beta$  はオゾンと速やかに反応し、溶存オゾンの有無によらず、不活化効果が得られることがわかった。また、オゾン接触 5 分後におけるオゾン CT 値は 0.2mg-O<sub>3</sub>/L・min、10 分後には 0.8mg-O<sub>3</sub>/L・min と本市の後オゾン処理におけるオゾン CT 値の目標値 2.5mg-O<sub>3</sub>/L・min には満たなかつたものの、低減率は 6.0~6.1log となっており、本市の浄水処理におけるオゾン処理工程でバクテリオファージ Q $\beta$  が少なくとも 6 log は不活化されることが確認された。

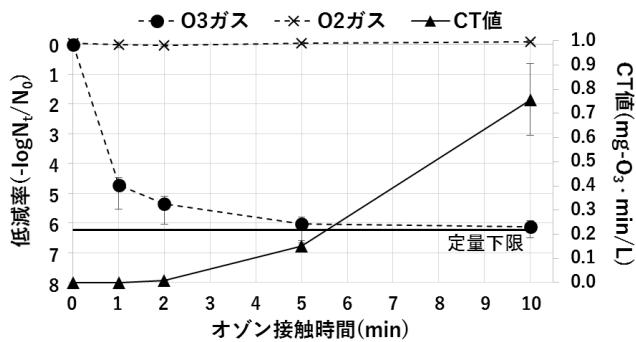


図-3 バクテリオファージ Q $\beta$  のオゾン処理性

### 5. まとめ

本調査の結果、オゾン処理実験について、バクテリオファージ Q $\beta$  はオゾン接触後速やかに不活化反応が起り、10 分間の反応では約 6 log が不活化された。そのため、水環境中の病原ウイルスがバクテリオファージ Q $\beta$  と同程度の処理性であると仮定すると、本市の浄水処理におけるオゾン処理工程において、病原ウイルスは同様に 6 log 程度の不活化が起こると推定された。

## 6. おわりに

WHOは病原ウイルスの浄水処理目標について、例としてロタウイルスを挙げ、その濃度を  $10^{-5}$  個/L以下にすることが望ましいという計算結果を報告している<sup>2)</sup>。また最近の研究によると、水環境中にはロタウイルス等の病原ウイルスが最大  $10^5$  個/L程度存在することが報告されている<sup>4)</sup>。これらの事実を鑑みると、浄水処理において最大  $10\log$  の病原ウイルスの除去・不活化が要求される。本調査では、本市の浄水処理におけるオゾン処理工程において少なくとも  $6\log$  のウイルスが不活化されることを確認したが、オゾン処理以外の浄水処理過程についてもウイルスの低減率を算出し、浄水処理フロー全体として  $10\log$  以上の処理性があることを確認する必要があると考えている。

さらに、新型コロナウイルスの世界的な感染拡大により、以前よりはるかに世間のウイルスへの関心は高い状態にあることから、水道事業者として、安心・安全な水道水を供給するために、水環境中の病原ウイルスに関して、今後も継続的に知見の収集を行い、水道水の安全性に関する情報の発信を行う予定である。

## 7. 参考文献

- 1) SR.Seitz, JS.Leon, KJ.Schwab, et al., Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.77(19), pp. 6884-6888, 2011.
- 2) 国立保健医療科学院, WHO 飲料水水質ガイドライン第4版(日本語版), 第7章, 第11章, 2012.
- 3) 永井利郎, 山崎福容, バクテリオファージの取扱法, 微生物遺伝資源利用マニュアル, 2019.
- 4) T.Miura, A.Gima, M.Akiba, Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking Water Sources. *Food and Environmental Virology*, Vol.11(1), pp. 9-19, 2019.