

(34) 大腸菌ファージを用いた水のウイルス的安全性の管理手法

MANAGEMENT OF VIRAL RISK IN WATER BY COLIPHAGE

神子直之^{*}、山本和夫^{*}、大垣眞一郎^{*}

Naoyuki KAMIKO^{*}, Kazuo YAMAMOTO^{*}, Shinichiro OHGAKI^{*}

ABSTRACT: Indicator function of coliphage in regard to viral pollution control was investigated. Concentration of coliphage in night soil was in the range from less than 10 to 10^6 PFU $\cdot$ mL $^{-1}$. In sewage, coliphage concentration ranged from 10^2 to 10^3 PFU $\cdot$ mL $^{-1}$. Calculation based on the concentration in sewage showed that coliphage concentration in night soil should be $1\sim 10^5$ times more than in actual night soil. In diluted night soil, coliphages didn't multiply but they could multiply in diluted night soil when easily assimilable organic matter for host bacteria was added. Suppression of FRNA phage multiplication by RNase was also investigated. RNase inactivated FRNA phage Q β only at the moment of infection. Some ingredient in night soil decreased efficiency of plating of Q β by about 15% but did not affect T4 concentration measurement. Coliphage in night soil must multiply after diluted and added some organic matter in sewer pipes. Coliphage concentration, greatly affected by organic matter in the environment, can be assumed to be an indicator for sewage pollution rather than night soil pollution. Both DNA phage and FRNA phage can be applied to the indicators of viral removal in water treatment process, and only FRNA phage can be applied in wastewater treatment process because DNA phage tends to multiply in wastewater treatment process.

KEYWORDS: Coliphage, FRNA phage, indicator, night soil, sewage

1.はじめに

水の衛生面の安全性の監視は、種々の指標細菌によって行われている。すなわち、水道水については一般細菌と大腸菌群、下水処理水では大腸菌群、海水浴場の海水は糞便性大腸菌群で、それぞれ基準が定められており、監視指標として有効に機能して来たと考えられている。

しかし、下水処理水放流点下流からの上水原水の取水、下水処理水の再利用の拡大等、水利用の高度化により、従来考えられていなかった汚濁を新たに視野に入れる必要がある。

病原ウイルスは、その様な新たな汚濁の一つであると考えられる。従来の指標による監視では、ウイルス的安全性を必ずしも保証できない。現に諸外国において、基準に合格した給水栓水から病原ウイルスが検出されたとの報文も見られる^{1~3)}。

大腸菌ファージが、環境水中に広く存在し簡便に測定できるウイルスであることから、病原ウイルスに対応する指標として有効に活用できないか、という議論がある。しかし、次に挙げる3点の理由により、指標として確立されるに至っていない。

- 1) 環境水中において病原ウイルス濃度と大腸菌ファージ濃度に相関があるかどうか、明らかになっていない。
- 2) 大腸菌ファージ濃度の由来が不明で、指標としてどのような意義があるのか明らかでない。
- 3) ヒトの腸管から排出され環境水中で濃度が減少するのみの病原ウイルスに対し、宿主菌である大腸菌が存在する環境水中で増殖の可能性がある大腸菌ファージを用いて、病原ウイルス起因のリスクを監視できるかどうかは明らかになっていない。

筆者らは先に、FRNA ファージの純粋株であるQ β およびDNAファージの単離株に関して、純粋株の宿主菌を用

^{*}東京大学工学部都市工学科、Department of Urban Engineering, Faculty of Engineering, The University of Tokyo

いてそれらの増殖の条件について検討を行った⁴⁾。その結果、DNAファージは、宿主菌が資化し易い有機物を添加すると増殖し、FRNAファージQ β は、加えて水温が25℃より高かった時にのみ増殖することを示した。

本研究においては、引き続いて、大腸菌ファージによってウイルス的安全性を管理する手法の開発を目指し、主に尿中の野生の大腸菌ファージおよび野生の宿主菌に関して、下水管中における増殖の可能性についての実験的検討を行った。さらに、野生の大腸菌ファージをどのように指標として環境水に適用するべきであるかを考察した。

2. 大腸菌ファージの発生と増殖およびその指標としての意義

2.1. 実験方法

(1) 尿尿および生下水中の大腸菌ファージ濃度の測定⁶⁾ 6)

尿尿については、首都圏近郊の尿尿処理場の受け入れ尿尿を、処理場搬入時に採取した。当処理場の受け入れ尿尿は、浄化槽汚泥がほとんどであるが、生尿尿を多く含む場合にのみ受け入れピットに投入する直前に4回(試料I、II、III、IV)尿尿を採取した。採取した尿尿を、500mLの容器に入れて氷冷しながら実験室へ運び、大腸菌ファージ濃度を調査した。

生下水を、都内二箇所の下水処理場において採取し、実験に供した。採取回数は、処理場Aにおいて5回(試料A1～A5)、処理場Bでは1回(試料B)である。

大腸菌ファージ濃度の測定は、既報⁷⁾の方法によった。前処理は、濾過誘出法⁸⁾を用いた。宿主菌を二種(*Escherichia coli* K12 A/ λ (F⁺)と*E. coli* C)用い、*E. coli* K12 A/ λ (F⁺)のプレートにおいてはRNA分解酵素(Sigma, RNase A)をプレート一枚あたり200 μ g (上層寒天中で50 μ g $\cdot$ mL⁻¹)添加してFRNAファージの増殖を抑制したものも作成し、三種(*E. coli* K12 A/ λ (F⁺)で検出できるFファージ、FファージのうちRNA分解酵素添加により検出が阻害されるFRNAファージ、*E. coli* Cにより検出できるCファージ)⁵⁾の大腸菌ファージを測定した。なお、プレート一枚あたりの試料添加量は0.1mLであり、検出限界は10PFU $\cdot$ mL⁻¹である。プレートにおける定量限界は一般に、プレートあたり30と考えられるが、本論文ではプレートあたり1ブラックすなわち、10PFU $\cdot$ mL⁻¹までのデータを示した。

(2) 希釈尿尿における大腸菌ファージの濃度変化⁵⁾

上記(1)で濃度を測定した尿尿を段階的に希釈し、一部には資化しやすい有機物としてファージ定量用液体培地⁷⁾を10倍希釈になるように加え、定温(20、25、30、37、40℃)で培養した。約一日後(21～25時間後)の大腸菌ファージ濃度を測定した。

(3) RNA分解酵素によるFRNAファージQ β の増殖阻害

FRNAファージQ β と宿主菌*E. coli* K12 A/ λ (F⁺)によるファージー宿主系に、RNA分解酵素を加え、FRNAファージの増殖に対するRNA分解酵素の阻害の機構について調べた。用いたRNA分解酵素は野生の大腸菌ファージ検出と同じSigmaのRNase Aである。

1) RNA分解酵素添加のプレート効率への影響

濃度が既知のQ β を、上層寒天中の濃度で0.05～10 μ g $\cdot$ mL⁻¹のRNA分解酵素と混ぜて、宿主菌とともにプレートし、ブラックの形成値を求め、Q β 濃度で除してプレート効率を求めた。

2) RNA分解酵素によるQ β の不活化

Q β をファージ定量用液体培地に入れ、RNA分解酵素濃度が20 μ g $\cdot$ mL⁻¹になるように添加し、定温(37℃)で保持してQ β の濃度変化を調べた。

3) RNA分解酵素存在下におけるQ β の増殖

ファージ定量用液体培地中に、RNA分解酵素濃度が2 μ g $\cdot$ mL⁻¹あるいは、20 μ g $\cdot$ mL⁻¹になるように添加し、宿主菌およびQ β を入れて、Q β の増殖に及ぼすRNA分解酵素の影響を調べた。

(4) 尿尿成分によるQ β およびT4の増殖阻害⁹⁾

尿尿の溶解性成分が大腸菌ファージの増殖に及ぼす阻害作用について調べた。FRNAファージの純粋株Q β およびDNAファージ純粋株T4のプレート効率に及ぼす尿尿成分の影響を調べることで、阻害作用を定量した。

尿尿を遠心分離(12,000 rpm、30分、4℃)後、公称孔径0.45 μ mの膜で濾過し、SSと細菌を除去した。この尿

尿の濾液自体が野生の大腸菌ファージを含み、Q β のブラック、T4のブラックのみを数えることができないため、あらかじめ紫外線を照射して濾過尿に含まれる野生の大腸菌ファージを不活化した。紫外線照射量は、照射時間30分で120,000 $\mu\text{W}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-2}$ であり、Q β を9log不活化する強さである¹⁰⁾。濃度が既知のQ β およびT4のプレートに、紫外線処理した調整尿を段階的に添加し、両者のプレート効率の減少を調べた。

2.2.実験結果

(1) 尿尿および生下水中の大腸菌ファージ濃度の測定

尿尿中の大腸菌ファージ濃度を、Table 1に示す。観察された大腸菌ファージのブラックは非常に小さくて見にくいので、計数がしずらく、計数の精度は低いと考えられる。Cファージが最も多く $4.7\times 10^3\sim 6.5\times 10^6$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、Fファージが $6.3\times 10\sim 1.2\times 10^5$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、FRNAファージは10未満 $\sim 2.4\times 10^4$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ であったが、どれも試料により非常にばらついている。精度の低さに加え、試料自体が浄化槽汚泥を含んでいる可能性があること、尿尿の収集が月に1回か2回程度なので、ヒトからの排出後さまざまな時間が経過した尿尿が含まれていることによると思われる。

生下水中の濃度は、Table 2に示す通りであった。Fファージの濃度は $1.8\times 10^3\sim 4.7\times 10^3$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、FRNAファージが $3.3\times 10^2\sim 1.9\times 10^3$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ 、Cファージが $1.9\times 10^3\sim 8.9\times 10^3$ PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ であり、尿尿中の濃度ほどばらついていない。オーダー的には同じであるため、ほぼ一定していると考えられる。

(2) 希釈尿尿における野生の大腸菌ファージの濃度変化

希釈尿尿における濃度変化の結果を、資化しやすい有機物を添加しない場合についてTable 3に、添加した場合についてTable 4に示す。表中の横の列は試料中の尿尿の占める割合であり、表中の数字は、21～25時間の培養後に、ファージ濃度が培養開始時の濃度の何倍になったかの常用対数を示している。表中の「-」は、不検出であったことを示し、おこなわなかった欄にはNTと表示した。

培地を添加せず、尿尿をそのままあるいは希釈して培養した場合 (Table 3(a)～(c)) は、ファージの増殖は20℃から40℃の範囲において、ほとんど見られなかった。尿尿は多くの有機物を含むが、これらの条件では宿主菌となり得る細菌がファージを増殖させないことがわかる。細菌にとって利用しやすい大腸菌ファージ定量用培地を尿尿あるいは希釈尿尿に添加した場合 (Table 4(a)～(c)) は、水温が20℃の場合はどのファージ濃度も変化が少な

Table 1 Concentration of bacterial indicators and coliphages in night soil

		I	II	III	IV
Coliform Group [mL^{-1}]		1.1×10^7	1.8×10^6	NT	7.6×10^5
Fecal Coliform [mL^{-1}]		1.0×10^7	NT	NT	1.5×10^6
Coliphages [PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$]	F phage	1.2×10^5	5.9×10^3	6.3×10	3.7×10^2
	FRNA phage	2.4×10^4	ND	4.0×10	1.2×10^2
	C phage	6.5×10^6	6.2×10^3	4.7×10^3	7.9×10^4

NT: not tested, ND: not detected (under detection limit)

Table 2 Concentration of bacterial indicators and coliphages in raw sewage

		A1	A2	A3	A4	A5	B
Coliform Group [mL^{-1}]		NT	1.5×10^6	NT	NT	NT	3.8×10^6
Coliphages [PFU $\cdot\text{mL}^{-1}$]	F phage	2.1×10^3	1.9×10^3	1.8×10^3	4.7×10^3	3.1×10^3	3.5×10^3
	FRNA phage	NT	NT	3.7×10^2	3.3×10^2	3.4×10^2	1.9×10^3
	C phage	2.6×10^3	8.9×10^3	1.9×10^3	6.0×10^3	3.0×10^3	5.8×10^3

NT: not tested

Table 3 Concentration changes of coliphages in diluted night soil without addition of easily assimilable organic matter : Numbers in the tables indicate log(concentration after one day incubation / initial concentration). NT: not tested, -: not detected after one day (lower than detection limit)

(a) F phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil				
		1	1/10	1/100	1/1000	1/10000
20	I	-1	0	0	0	0
	II	-1	NT	NT	NT	NT
	IV	-1	-	-	-	NT
25	IV	-1	-	-	-	NT
30	IV	0	0	-	-	NT
37	II	-1	NT	NT	NT	NT
	IV	0	-	-	-	NT
40	IV	-1	-	-	-	NT

(b) FRNA phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil				
		1	1/10	1/100	1/1000	1/10000
20	I	-	0	-	-	-
	II	-2	NT	NT	NT	NT
	IV	-	-	-	-	NT
25	IV	-	-	-	-	NT
30	IV	-	-	-	-	NT
37	II	-1	NT	NT	NT	NT
	IV	0	-	-	-	NT
40	IV	-1	-	-	-	NT

(c) C phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil				
		1	1/10	1/100	1/1000	1/10000
20	I	0	0	0	0	0
	II	-2	NT	NT	NT	NT
	IV	0	0	0	0	NT
25	IV	0	0	0	1	NT
30	IV	0	1	1	0	NT
37	II	-1	NT	NT	NT	NT
	IV	0	1	1	0	NT
40	IV	0	0	2	0	NT

Table 4 Concentration change of coliphages in night soil with addition of easily assimilable organic matter:

Numbers in the tables indicate log(concentration after one day incubation / initial concentration). NT: not tested, -: not detected after one day (lower than the detection limit)

(a) F phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil			
		1	1/10	1/100	1/1000
20	II	-1	-1	0	-
	III	0	-	-	-
25	III	-	-	3	3
30	III	-1	1	3	2
37	II	-1	0	0	0
40	III	-	5	2	4

(b) FRNA phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil			
		1	1/10	1/100	1/1000
20	II	-	-1	-	-
	III	1	-	-	-
25	III	-	-	2	3
30	III	0	1	-	2
37	II	0	1	-	-
40	III	-	6	2	-

(c) C phage

Temperature [°C]	Sample	Dilution ratio of night soil			
		1	1/10	1/100	1/1000
20	II	-1	-1	1	0
	III	0	0	-1	-
25	III	0	0	2	1
30	III	0	0	4	2
37	II	0	1	2	2
40	III	0	4	1	3

いが、水温が25℃以上の時希釈された尿尿において、3種のどのファージについても2log以上の増殖が見られた場合があった。希釈しない尿尿の場合に増殖しなかった試料についても、希釈をすることによって多くのファージの増殖が見られた。このような、資化しやすい有機物を添加した場合 (Table 4) にのみファージの顕著な増殖の可能性があるという結果は、生下水を用いておこなった同種の実験⁴⁾の結果と一致している。そのため、Table 3

と4における結果の相違は、試料の差に起因するものではないと考えられる。

(3) RNA分解酵素によるFRNAファージQ β の増殖阻害

RNA分解酵素添加による、Q β のプレート効率の変化をFig. 1に示す。8.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のRNA分解酵素により、プレート効率が2log減少した。野生のFRNAファージ測定のために添加する50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ は、Fig. 1の結果から外挿すると、Q β で評価した場合、10log以上のプレート効率の減少を起こしていることがわかる。RNA分解酵素によるQ β の不活化の結果をFig. 2に示す、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のRNA分解酵素による不活化は、27時間で1log程度であった。Fig. 1の結果を外挿すると、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ では4log以上のプレート効率の減少が生じていると算定されるのに比べて、RNA分解酵素存在下でのQ β 濃度の減少は、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、27時間の条件で1logと、小さなものであった。すなわち、RNA分解酵素は、ブラック形成を阻害するが、単にQ β 粒子と共存するだけではゆるやかな不活化しか起こさないことがわかる。

RNA分解酵素存在下でのQ β の増殖の結果をFig. 3に示す。RNA分解酵素を混入しない (Control) 場合、30分経過後から徐々に濃度が増大し、120分で5log程度の増殖が見られた。RNA分解酵素濃度が2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ の場合 (Run 1)、120分で2log程度の増殖が見られた。RNA分解酵素20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ の場合 (Run 2) 増殖は120分の間まったく

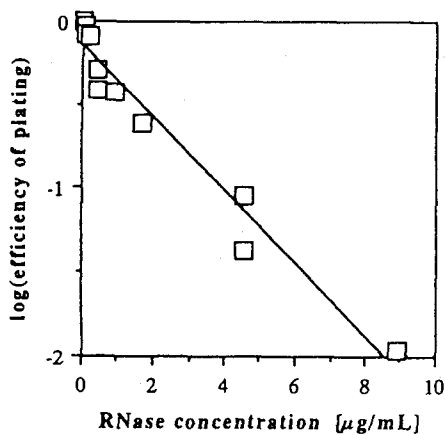


Fig. 1 Effect of RNase addition on the efficiency of plating of Q β

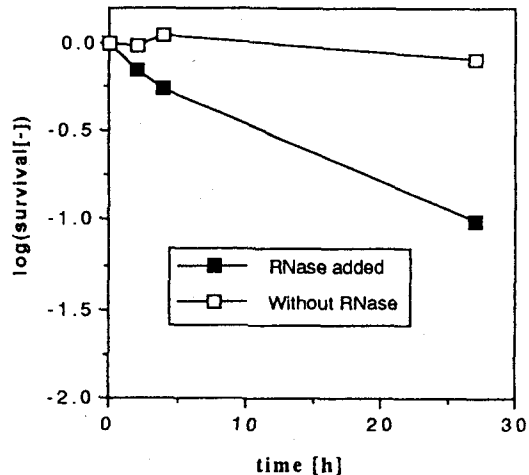


Fig. 2 Inactivation of Q β by RNase

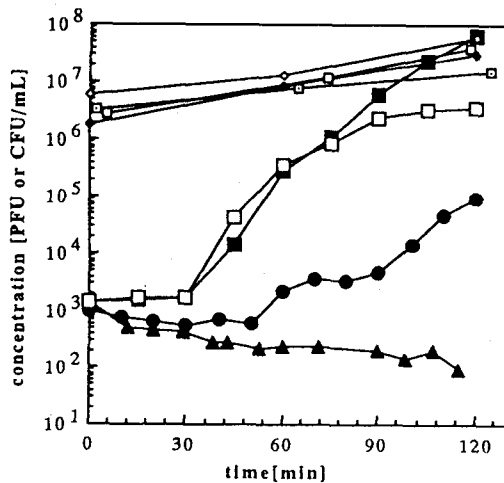


Fig. 3 Effect of RNase addition on Q β multiplication

	RNase Conc. [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Coliphage	Host bacteria
Control	0	■	□
Run 1	2	●	◇
Run 2	20	▲	□
Run 3	20 (added at 45 min)	□	◇

見られず、逆に1log程度の不活化が進行した。この不活化速度は、Fig. 2で示した実験結果と比べて非常に大きく、Q β が宿主菌に感染する際に不活化されていることがわかる。培養開始後45分の時点でRNA分解酵素が20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ になるように加えた場合 (Run 3)、添加直後はQ β 濃度が増大するが、添加45分後以降、すなわち培養開始後90分以降は濃度があまり増大しなかった。これは、Run 2の結果と一致し、RNA分解酵素添加によってQ β が直接的に不活化されたのではなく、Q β の宿主菌に対する新たな感染が妨げられたことを示している。

これらFig. 1~3の結果により、Q β のRNA分解酵素によるプレート効率への影響は、以下の機構によると考えられる。すなわち、RNA分解酵素は、Q β 粒子と共存するだけではQ β をゆっくりと不活化するだけであり、Q β が宿主菌に対して感染する時に不活化している。そのため、RNA分解酵素添加により、プレート効率が減少する。

(4) 尿尿成分によるQ β およびT4の増殖阻害

尿尿成分によるQ β およびT4のプレート効率への影響は、Fig. 4に示す通りである。紫外線照射時間が30分と50分のどちらにおいても、FRNAファージQ β は調整尿尿の添加量に応じてプレート効率が小さくなっているのに対して、DNAファージT4は添加のプレート効率に対する影響が見られなかった。DNAファージの検出に影響せず、FRNAファージの検出に阻害を与える物質が存在することが、明らかである。

Fig. 4について直線を仮定して回帰を行い、外挿して尿尿の混入率が100%であるとした場合のプレート効率を計算したところ、紫外線照射時間が30分、50分の場合それぞれ、 $-2.8 \log$ 、 $-3.0 \log$ となり、平均が $-2.9 \log$ であった。同等のプレート効率となるRNA分解酵素濃度を計算したところ、 $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ となった。 $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ のRNA分解酵素添加は、Fig. 1より3logのプレート効率の減少が見られること、Fig. 3のRun 1とRun 2の間の値であることとの比較を行うと、尿尿中でのFRNAファージの宿主菌への感染は、非常に低い確率でしか起こらないと考えられる。

尿尿中に、FRNAファージの感染を阻害する物質が存在するので、濃度測定において過小評価をしていることが考えられる。その程度は、Q β を用いた場合、上層寒天4 mLに試料を0.1 mL入れる測定において尿尿の混入率は0.025となるため、上の回帰で求めた値により $10^{-2.9 \times 0.025} = 0.85$ となり、15%程度の減少であると考えられる。よって、検出阻害物質はFRNAファージの検出にそれほど大きな影響を与えていない可能性が高い⁶⁾。

2.3.考察

実験結果における、生下水中の大腸菌ファージの濃度を用い、処理水量、処理人口より大腸菌ファージの下水への排出負荷量 (一人一日あたり排出PFU数) を計算すると、Table 5のようになる。

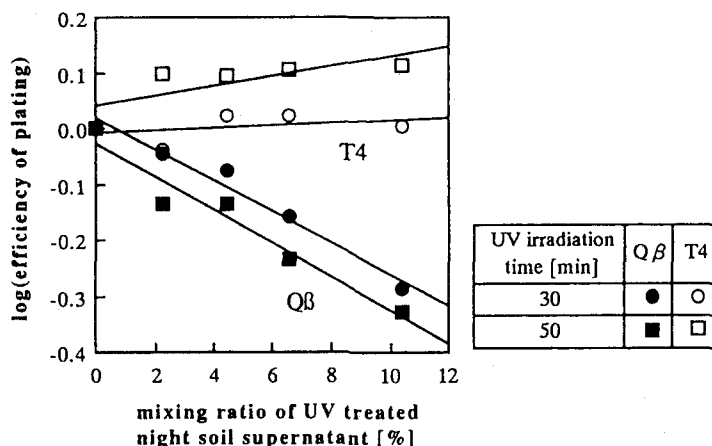


Fig. 4 Effect of UV treated night soil supernatant on the efficiency of plating of phages

Table 5 Coliphage load calculated from coliphage concentration in raw sewage

(PFU·day⁻¹·capita⁻¹)

	A	B
F phage	1.8x10 ⁹	2.6x10 ⁹
FRNA phage	2.2x10 ⁸	1.5x10 ⁹
C phage	2.9x10 ⁹	4.3x10 ⁹

生尿尿中の大腸菌ファージ濃度の測定結果はTable. 1であり、尿尿の排出量を一人10³mLと仮定すると、Fファージで10¹~10⁵、FRNAファージで10¹~10⁴以上、Cファージで1~10³倍、計算値が測定値を上回っている。

大腸菌ファージの生下水における濃度が、尿尿としての排出される量から算出できるのであれば、大腸菌ファージを尿尿汚染の指標であると位置付けることができる。しかし、生下水における濃度は、尿尿由来のファージの量だけでは説明できないほど大きいので、尿尿汚染を示す直接的な指標とはならないと考えられる。

このように、尿尿における大腸菌ファージ濃度と生下水における濃度の整合性が取れない理由として、次に述べる二つの可能性が考えられる。

- 1) 大腸菌ファージが、下水管を流れる間に増殖している。
- 2) 尿尿における大腸菌ファージの濃度測定において、尿尿中の検出阻害物質のために、濃度を過少評価している。

1) の流下に伴う下水管内での増殖については、希釈尿尿の定温培養の結果 (Table 3, 4)、水温が25℃より高く、ファージ定量用液体培地を添加した場合にのみ、野生の大腸菌ファージの増殖が見られた。

また、2) の濃度の過少評価については、Fig. 4に示すように、DNAファージT4のプレート効率を減少させなかったためDNAファージ濃度測定に影響せず、FRNAファージQβに対するプレート効率減少から算定した限り、FRNAファージ検出において15%程度に過ぎなかった。生尿尿と生下水の濃度差は、よって、1) の増殖に起因するものであることが、実験的に示されたと考えられる。

既報¹⁾ の通り、大腸菌ファージの単離株の増殖は、DNAファージとFRNAファージの両者とも、宿主菌が資化しやすい有機物の存在下でしか起こらなかった。しかも、FRNAファージQβの、純粋株の宿主菌における増殖には、それに加え25℃より高い水温が必要であった。

下水管内は、有機物が豊富であり、水温は河川水と比較すれば高い。下水管内部には付着性の生物膜があり、生物膜内の宿主菌濃度についての情報はないが、生下水中に10⁶ CFU·mL⁻¹の大腸菌群が常時検出されることを考えると、局所的には高濃度で宿主菌が維持されていて、大腸菌ファージが増殖していると考えても無理はない。

以上より、大腸菌ファージは下水管内で増殖していると考えられる。大腸菌ファージの指標としての意義は、尿尿による汚染を直接的に反映しているのではなく、下水による汚染を示していると結論付けることができる。

3. 大腸菌ファージの安全性管理への適用

3.1. 病原ウイルスによる環境中のリスクの所在

水系感染とは、飲用および皮膚への接触により病原微生物、ウイルスがヒトに感染することである。

上下水道が整備され、高度な水利用の求められている都市域において、水系感染が成立する可能性のある水は、i) 浄水処理を経た飲料水、ii) 下水処理および高度処理を経た再生利用水、iii) 海水浴場等の水浴場水、等である。

水系感染の可能性のある病原ウイルスは、ヒトの腸管から糞便とともに排出され、環境中で減衰して行く。

感染成立のリスクには、病原ウイルスの、上に示した人為接触水中の濃度が直接的に効いてくると考えられるが、病原ウイルス濃度測定は一部可能であるものの、一般に難しく、時間、費用を要し、精度が悪い。

病原ウイルスを感染者だけが排出していると考えれば、その濃度には、非常に大きな変動があることは明らかである。そのような変動の大きい汚濁に関して、しかも病原ウイルスのように測定に時間がかかる場合には、その汚濁度に対応した制御を行うことは不可能である。また、たった一つのウイルス粒子が感染を成立させる最小量であると言われているので、常に、起こり得る最大のリスクに対する制御を保証しておくことが必要である。

まず、i)飲料水、ii)再生利用水の両者は、水利用の前段に制御のプロセスが存在している。その制御プロセスへのインプットの起こり得る最大値、すなわち、観測された流入ウイルス濃度の最大値を、水利用における安全値まで浄化することが、制御プロセス、すなわち処理プロセスにおいて保証できればよい。

iii)海水浴場等の水浴場水については、河川への直接塩素注入による制御が行われている例もあるが、一般には、上流部での処理水、下水等の流入に対して、河川の自然浄化作用によるリスクの低減が考えられるのみである。そのため、流域の下水道普及率の増加や浄化槽等を良好に維持管理すること以外には制御の方法が無い。

3.2.大腸菌ファージの指標としての適用

前に述べたように、大腸菌ファージは糞便からの排出より下水管中での増殖が主であると考えられることから、屎尿汚染よりはむしろ下水汚染の指標である。下水汚染の指標であるウイルスの一種を用いて、病原ウイルスに関する安全性の管理を行うには、以下に述べる方法が考えられる。

まず、病原ウイルスは、非常に変動が大きいので、最大濃度に対応した制御を行う必要がある。そのため、安全な水を保証できるウイルス除去率を設定し、大腸菌ファージの処理制御プロセスにおける除去率を求めて、病原ウイルスの同処理制御プロセスにおける除去率を直接的に推定することができる。ただし、次の二点が確かめられなければならない。

- 1) 環境中で増殖し得ない病原ウイルスの代替である大腸菌ファージが、対象とする処理制御システムで増殖しないこと。
- 2) 病原ウイルスと大腸菌ファージの、対象とする処理制御システムにおける除去率が同程度であること。

1) については、既報⁴⁾の通り、宿主菌が資化しやすい有機物が無い条件であれば大腸菌ファージは増殖しない。そのため、浄水処理システムの監視の場合には、1)の条件を満たしていると考えられる。一方で、DNAファージの濃度が、砂濾過や活性炭濾過プロセスにおいて増大し、その原因は大腸菌によるDNAファージの放出であろう¹¹⁾との示唆もあり、この点に関しては、さらに今後の検討が必要である。

下水処理システム監視の場合、資化しやすい有機物が豊富であるため、大腸菌ファージの増殖が起こる可能性がある。しかし、FRNAファージは水温が25℃より低い場合には増殖しないため、ウイルス除去率を求める指標として有効であると考えられる。DNAファージに関しては、処理システムへ流入後、生物膜中の宿主菌に感染して増殖する可能性、加えて、溶原性の大腸菌ファージが溶菌を起こし増殖する可能性も存在するため、ウイルス除去率の監視指標として用いるには問題がある。

2) についてのデータは、消毒剤耐性に関するもの以外は少ない。大腸菌ファージのうち、DNAファージT4とFRNAファージQ β の、SSが除去された生下水中における不活化過程を調べた研究²⁾はある。

以上より、飲料水と再生利用水の、ウイルス的安全性管理については、処理システムにおける大腸菌ファージの除去率を監視することで処理制御システムの安全性を確保することができる、と考えられる。すなわち、日常的なウイルス的安全性の確保に大腸菌ファージを用いることができる。

水浴場水に関して、飲料水、再生利用水と同様に、大腸菌ファージの除去率でウイルス的安全性管理を行うには、対象とする処理制御システムを河川等の水系全体とする必要がある。すなわち、水系への下水処理場の放流負荷量等すべての排出負荷量を求めることが必要となる。その上で、水浴場水中の大腸菌ファージ濃度を測定して水系における除去率を算定し、同水系における病原ウイルスの除去率を推定することにより、安全性を評価できると考えられる。

4.まとめ

(1) 本研究における実験結果

尿尿および下水処理場流入生下水における大腸菌ファージ濃度を測定したところ、生下水中の大腸菌ファージ濃度から計算される一人一日排出ファージ量は、尿尿中濃度から計算したよりも大きい値であった。

尿尿に含まれる野生の大腸菌ファージおよび野生の宿主菌により、大腸菌ファージの増殖条件を求めた。その結果、純粋株による実験結果と同様、宿主菌に対する資化しやすい有機物を添加し、水温を25℃以上とした場合に、大腸菌ファージは増殖した。

(2) 大腸菌ファージの指標としての意義

上記(1)の結果より、大腸菌ファージは、下水管の中で、増殖していると考えられる。

よって、大腸菌ファージの指標としての意義は、尿尿による汚染を直接的に表している訳ではなく、下水管内において増殖したその結果としての、下水汚染を表していると考えられることができる。

(3) 大腸菌ファージの指標としての利用方法

野生の大腸菌ファージは、宿主菌が資化しやすい有機物の濃度が低い場合には増殖しないため、物理化学処理を主体とした浄水処理システムにおける除去率の監視指標として用いることが可能であると考えられる。

下水処理システムに関しては、宿主菌にとって資化しやすい有機物の濃度が高いので、水温が低い場合に増殖しないFRNAファージを、病原ウイルスの除去率の監視指標として利用できると考えられる。DNAファージは、FRNAファージと異なり、水温が25℃以下の場合にも増殖する可能性があるため、指標として適当でない。

5.参考文献

- 1) Keswick, B. H., C. P. Gerba, J. B. Rose and G. A. Tranzos(1985). Detection of Rotavirus in Treated Drinking Water. *Water Science and Technology*, Vol. 17, No. 10, pp1~6
- 2) Guttman-Bass, N., and B. Fattal.(1985). Analysis of Tap Water for Viruses: Results of a Survey. *Water Science and Technology*, Vol. 17, No. 10, pp89~96
- 3) Toranzos, G. A., H. Hanssen and C. P. Gerba(1986). Occurrence of Enteroviruses and Rotaviruses in Drinking Water in Columbia. *Water Science and Technology*, Vol. 18, No. 10, pp109~114
- 4) 神子直之、大垣眞一郎(1993)「FRNAファージの増殖特性とウイルス指標としての有効性」水環境学会誌、第16巻、第10号、pp723~731
- 5) 神子直之、大垣眞一郎(1994)「大腸菌ファージのし尿中における挙動」第28回日本水環境学会年会講演集、pp430~431
- 6) 吉川和身(1993).「都市河川水質から見た下水処理水消毒効果の評価」東京大学卒業研究
- 7) 神子直之、大垣眞一郎 (1993)「ウイルス不活化手法の大腸菌ファージによる評価」『環境微生物工学実験法(土木学会衛生工学委員会編)』, pp233~236, 技報堂出版
- 8) 神子直之、大垣眞一郎 (1993)「自然水系における大腸菌ファージの消長」『環境微生物工学実験法(土木学会衛生工学委員会編)』, pp309~312, 技報堂出版
- 9) 神子直之、山本和夫、大垣眞一郎 (1994)「し尿成分によるFRNAファージの増殖阻害」土木学会第49会年次学術講演会講演概要集, 2B, pp1208~1209
- 10) Kamiko, N. and S. Ohgaki(1989) RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency *Water Science and Technology*, Vol. 21, No. 3, pp227~231
- 11) McFeters, Gordon A.(ed.) (1990)「飲料水の微生物学(金子光美監訳)」技報堂出版
- 12) 神宮誠、神子直之、山本和夫、大垣眞一郎 (1994)「大腸菌ファージの不活化速度に影響を与える因子について」土木学会第49会年次学術講演会講演概要集, 2B, pp1206~1207