

B-47 大腸菌ファージの不活化を基にした コンポスト型トイレにおける 病原ウイルスの挙動モデル

○風間 しのぶ^{1*}・溜池 成江²・中川 直子³・大瀧 雅寛¹

¹お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 (〒112-8610 東京都文京区大塚2-1-1)

²株式会社INAX 関東統括支社埼玉支社さいたま営業所 (〒331-0811 埼玉県さいたま市北区吉野町1-23-6)

³首都大学東京大学院都市環境科学研究科 (〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1)

* E-mail: g0870506@edu.cc.ocha.ac.jp

1. はじめに

コンポスト型トイレはおが屑を担体として利用し、尿尿を微生物の好気性分解により処理するため、水が不要である。また、処理後のオガ屑担体は肥料として用いることが可能なことから、資源循環と水環境改善の両面に貢献できる技術であると考えられる。下水インフラ設備が不要なため、特に途上国の衛生改善には、安価で導入できる有用な方法であるといえる¹⁾。しかし、コンポスト型トイレは尿尿を一旦おが屑担体槽内に溜めるため病原微生物残存の危険があり、おが屑交換時の人への直接暴露や、散布した肥料が土壌浸透した場合の地下水汚染による飲料水からの間接暴露が懸念される²⁾。従って生残性の強いウイルスの残存に特に注意する必要がある。既存の研究³⁾では、ファージと大腸菌の挙動が大きく異なっていることが報告されており、耐性が強いと考えられる病原ウイルスの糞便汚染指標として大腸菌群を使用することは難しいと考えられる。水系では大腸菌ファージが病原ウイルス指標として有効であると考えられている⁴⁾。大腸菌ファージは形状、核酸の違いなどにより数種類に分けられる⁵⁾が、多くの腸管系病原ウイルスの特徴が球状の RNA ウィルスであることから、水環境中や処理工程における挙動を示すモデルとして、同様の特徴をもつ大腸菌ファージが使われている⁶⁾。しかし、病原ウイルスも種類によっては耐性の違いがあると考えられる。そこで本研究では、大腸菌ファージをモデルウイルスとして用い、かつその相違性を評価するために DNA ファージ 2 種、RNA ファージ 2 種の多種類の大腸菌ファージを用いてその挙動を比較し、コンポスト型トイレ中での病原ウイルスの挙動を推定することとした。

2. 実験方法

(1) 微生物の測定方法

本実験ではおが屑サンプル中の微生物濃度変化を測定した。その際、おが屑担体中から抽出液を用いて液相へ抽出し、その液相中濃度を測定した⁷⁾。抽出液は 3 (w/v) %ビーフエキス溶液 (pH9.5) を用いた。ビーフエキス (MP Biomedicals) を 3 (w/v) %になるようイオン交換水に溶解し、2 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH9.5 になるよう調整後、10 mL ずつバイアル瓶に分注し、高温蒸気滅菌 (121℃ 20 分間) した。抽出液に秤量したオガ屑サンプルを投入し、3 分間試験管ミキサーにて攪拌して微生物を液中に抽出し、測定試料とした。

液相中の大腸菌ファージは以下の手順で測定した。あらかじめ Tryptic Soy Broth (Bacto) 液体培地を用いて宿主菌となる大腸菌を 37℃ にて培養した。孔径 0.45μm のメンブランフィルター (東洋濾紙㈱製、DISMIC-25CS) で濾過を行った測定対象試料を Tryptic Soy Agar (TSA) 培地による重層寒天法^{2) 8)}にて大腸菌ファージを検出した。本研究で使用した大腸菌ファージは T4、λ、Qβ 及び MS2 で *E. coli* (NBRC13168, 3301, 13965, 13168) をそれぞれの宿主菌として用いた。

(2) おが屑中での微生物の挙動

含水率を 30-66.5%、温度を 30-50℃ の間で変化させ、大腸菌ファージ (T4、λ、Qβ、MS2) および *E. coli* (NBRC3301) のおが屑中での挙動を比較した。使用済おが屑を 70℃ にて 3h 保持し、含水率を十分に低下させた後、イオン交換水で含水率を調節し、滅菌したバイアル瓶に 10 g の含水率調整済みのおが屑を入れ、大腸菌ファージまたは大腸菌の培養液を各 0.10 mL 投入し、葉さじで

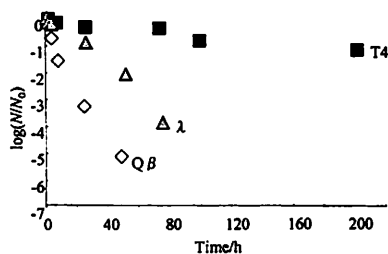


図-1 温度 37°C・含水率約 50%おが屑中での微生物挙動

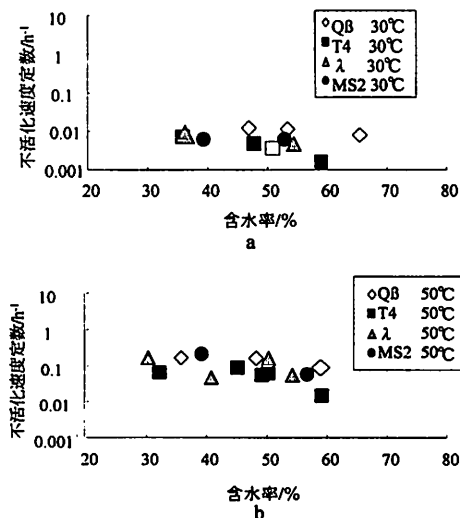


図-2 各温度・含水率における各微生物の不活化速度定数
a 温度約 30°C, b 温度約 50°C

1分間攪拌した。各所定時間毎におが屑を任意の4箇所から合計約0.2 gになるよう取出して抽出液に投入し、微生物を抽出した。大腸菌はコンパクトドライEC（日水製薬）を用いて測定し、大腸菌ファージの濃度測定は上記(1)に従い測定した。

3. 結果

これまでの実験結果から、おが屑中での微生物の挙動は一次反応に従うことが分かっており⁹⁾、反応時間 t および生残率の対数値 $\ln(N/N_0)$ でプロットすると(1)式で示す直線関係が得られることになる。

$$\ln(N/N_0) = -k_e t \quad (1)$$

$$\log(N/N_0) = -k_{10} \cdot t = -(k_e/2.30)t \quad (2)$$

N : 微生物濃度 (個/g) N_0 : 微生物初期濃度 (個/g)
 k_e : 不活化速度定数 (1/h) k_{10} : 速度定数 (1/h)
 t : 時間 (h)

2 (2)に述べた実験結果から経過時間ごとの微生物生残率を求めた。図-1 にその一例として温度 37°C, 含水率約 50%のおが屑中での微生物の挙動を示す。さらに不活化効率の指標として、得られた結果から不活化速度定数 k_e を算出し、比較した。温度 30°C 及び 50°C, 各含水率における各微生物の不活化速度定数を図-2 に示す。実験条件、微生物の違いによって不活化速度定数が大きく異なったため縦軸の不活化速度定数は対数表示とした。いずれの微生物においても 30°C 付近の低温時 (図-2a) よりも 50°C の高温時 (図-2b) で不活化速度定数が大きくなり不活化し易くなっており、また各温度で低含水率時より高含水率時で不活化速度定数が小さくなっており、不活化し難くなっていることが分かった。また、同条件における大腸菌ファージの挙動もその種類により不活化速度が大きく異なることが分かった。

4. 考察

実験で得られた不活化速度定数を用いて、人の糞便中の病原微生物が許容可能なリスク水準まで除去されるのにどの程度の時間が必要かを推定した。

コンポスト交換時における暴露評価を基にしたリスク評価が報告されており、その結果によれば許容可能なリスク水準を満たすためには、感染リスクが比較的高いとされているロタウイルスを基準とするとコンポスト型トイレに投入後約 11.5log の除去率が要求される^{7,10)}。これに従い、各ファージの速度定数を基にした場合の 11.5log 減少に要する日数を求めた。本研究で行った条件の中で最も不活化しにくい条件である温度約 30°C において許容可能なリスク水準まで除去されるために要する日数を計算して図-3 に示した。また、秩父市の一般家庭で稼働している実装置での約一年間の測定実績から温度約 32°C, 含水率 40-70%が一般的な条件であったので、実装置内の条件を点線で囲んだ。参照する速度定数によって許容可能リスクまで減少させるための日数が大きく異なることがわかった。実装置に近い条件の結果から 11.5log 除去されるのに要する日数は 15 日から 167 日と大きく異なった。次に、本研究にて使用した大腸菌ファージの中で最も不活化の速かった Q8 と最も遅かった T4, および病原細菌モデルとして *E.coli* の結果を基に作成したロタウイルスを許容可能リスクまで減少するために要する日数と温度、含水率の関係を図-4 にまとめた。

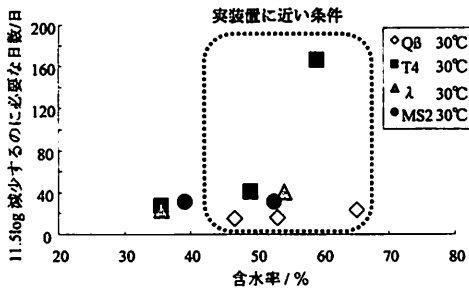


図-3 温度約 30℃における各微生物の許容可能なリスク水準まで除去されるために要する日数

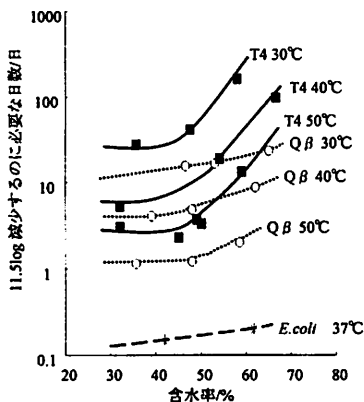


図-4 各モデル微生物の反応速度定数に従う場合の 11.5log 不活化に要する日数

挙動モデルの基にした微生物が T4, QB の場合では, *E. coli* をモデルとした場合に比べ高温低含水率であっても長い日数が必要とされることがわかる。また, T4, QB の場合共, 温度, 含水率に影響されることがわかり, T4 の場合はどの温度においても含水率が 50%を超えると必要日数が急激に増加し, QB の場合よりも含水率に大きく影響されていた。

多くの腸管系病原ウイルスはその大きさ, 形状, 核酸が RNA である等 QB や MS2 に良く似た特徴を持っており, その挙動も同様である可能性が高いと考えられている。これらの腸管系病原ウイルスが QB のような耐性を持つのであれば各温度, 含水率におけるデータを結んだ曲線上方部が安全域になると考えられる。しかし, 腸管系病原ウイルスが T4 のような強い耐性を持つとすれば, 同条件下における QB と T4 の値の間領域はグレーゾーンであり, QB の結果を指標として用いることは過小評価となる。特に耐性が強いことで知られている T4⁽¹⁾ のような強い耐性を持つ病原ウイルスが存在する可能性を考慮し, 安全性を評価する必要があると考えられる。

5. まとめ

本研究でウイルスモデルとして使用した大腸菌ファージのおが屑中での挙動は温度含水率の条件変化によって大きく異なった。従って, おが屑の安全性を評価する場合は両条件とも考慮しなければならないと考えられる。また, ファージの種類によっても挙動が大きく異なることがわかった。多くの腸管系病原ウイルスは QB や MS2 に良く似た特徴を持っており, その挙動も同様である可能性が高いと考えられる。しかし, 腸管系病原ウイルスが QB よりも強い耐性を持つ場合, 安全性確保にはより厳しい基準が必要となると考えられる。

参考文献

- 1) Miguel Angel Lopez Zavala, Naoyuki Funamizu and Tetsuo Itakura: Modeling of aerobic biodegradation of feces using sawdust as a matrix, *Water Research*, Vol.38, No.5, pp.1327-1339, 2004
- 2) M.Otaki, N.Nakagawa, F.Akaishi and K.Kubo: The fate of microorganisms in the composting toilet from the view point of hygienic risk, *Proc. 12th International Dry Toilet Conference*, Tampere, Finland August 16-19, 2006
- 3) Masahiro Otaki, Naoko Nakagawa, Shinobu Kazama, Fumiko Akaishi and Shizue Tameike: Hygienic risk assessment and control in using composting toilet, *The 5th International Symposium on Sustainable Sanitation*, pp.163-170, 2007
- 4) 金子光美: 水質衛生学, 技報堂出版, 1997
- 5) Jacquelyn G. Black (林英生, 岩本愛吉, 神谷茂, 高橋秀実 監訳): ブラック微生物学, 丸善株式会社, 2003
- 6) Mark D.Sobset, David A. Battigelli, Thomas R. Handzel and Kellongg J Schwab: Male-specific coliphages as indicator of viral contamination of Drinking water, *AWWA Research Foundation and American Water Works Association*, 1995
- 7) 大瀧雅寛, 中川直子, 伊藤由美子: バイオトイレにおける病原微生物の挙動及び二次感染リスク評価, 第 57 回土木学会年次学術会講演要旨集, VII-281, 2002
- 8) 神子直之, 大垣眞一郎: 環境微生物工学研究法 技報堂出版 土木学会衛生工学委員会編, 1993
- 9) Masahiro Otaki: The fate of pathogenic microorganisms in composting toilet and risk assessment, *Proceedings of the 1st International Symposium on Sustainable Sanitation*, Japan Science and Technology Agency, pp.41-48, 2003
- 10) N.Nakagawa, Hana Oe, Masahiro Otaki and Katsuyoshi Ishizaki: Application of microbial risk assessment on residentially-operated bio-toilet, *Journal of Water and Health*, Vol.4, 79-486, 2006
- 11) 金丸周司, 有坂文雄: T4 ファージの注射針複合体, *生物物理*, Vol. 43, No. 1, pp.21-24, 2003