

京都大学大学院工学研究科
都市環境工学専攻修士論文
Master's Thesis
Department of Environmental Engineering
Graduate School of Engineering
Kyoto University

論文題目 下水中 F-RNA Phage を用いた
紫外線処理における線量評価手法の検討

Title New Evaluation Tool of UV Fluence in Water
Reclamation Facility by F-RNA Phage in Sewage.

著者

田崎 翔太

Author

Shota Tasaki

平成 31 年 2 月 13 日 February 13 2019

目次

第 1 章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.2 研究の目的	2
第 2 章 先行研究についての文献考察	3
2.1 下水中の病原性ウイルスに関する知見	3
2.2 水中のウイルス消毒処理方法に関する知見	3
2.2.1 紫外線消毒	4
2.2.2 塩素及びオゾン消毒	5
2.3 紫外線照射量の測定方法に関する知見	5
2.3.1 化学線量計	5
2.3.2 生物線量計	5
2.3.3 物理線量計	6
2.3.4 物理シミュレーションによる推定	6
2.4 生物線量計に利用する微生物の知見	7
2.4.1 大腸菌	7
2.4.2 F 特異 RNA 大腸菌ファージ(FRNA ファージ)	7
2.4.3 大腸菌ファージ MS2(MS2)	8
2.5 水試料中のファージ定量法に関する知見	8
2.5.1 培養法による定量	8
2.5.2 PCR 法による定量	8
2.6 本章のまとめ	9
第 3 章 実験方法	10
3.1 概説	10
3.2 大腸菌ファージ MS2 の培養及び定量法	10
3.2.1 大腸菌・MS2 の培養方法	10
3.2.2 大腸菌ファージ MS2 濃度の測定方法	10
3.3 IC-RT-PCR 法による微生物定量法	12
3.3.1 必要試薬など	12
3.3.2 操作フロー	13
3.3.3 ファージ濃縮操作	13
3.3.3.1 事前準備	14
3.3.3.2 手順	14
3.3.3.3 濃縮を要さない検体中の F-RNA Phage 培養	14
3.3.3.4 簡易検査によるスクリーニング	14
3.3.4 RT-PCR によるタイピング	15
3.3.4.1 事前準備	15

3.3.4.2 手順.....	15
3.4 紫外線照射量測定試験	17
3.4.1 指標微生物の紫外線感受性試験装置の照射強度試験.....	18
3.4.1.1 必要試薬など.....	18
3.4.1.2 手順.....	18
3.4.2 指標微生物の紫外線感受性測定試験	19
3.4.3 紫外線照射装置の換算紫外線照射量(RED)測定試験	20
第4章 下水中 F-RNA Phage の紫外線感受性実態の把握	21
4.1 調査概要	21
4.2 MS2 の生物検量線の決定	21
4.2.1 概要	21
4.2.2 結果	22
4.3 下水中 F-RNA Phage の紫外線感受性試験	23
4.3.1 概要	23
4.3.2 紫外線照射量推定試験	24
4.3.3 結果及び考察	24
4.4 生物線量計として利用する場合の ERNA フェージの変動に関する考察.....	30
4.5 2 次処理水中 F-RNA Phage の紫外線感受性調査	31
4.5.1 概要	31
4.5.2 結果および考察	31
4.6 F-RNA Phage の生物線量計としての利用方法に関する考察	32
4.7 本章のまとめ	33
第5章 紫外線処理施設における F-RNA Phage を利用した UV 照射量評価.....	34
5.1 概要	34
5.2 パイロット施設における F-RNA Phage を利用した UV 照射量評価の検討	37
5.2.1 指標微生物 MS2 によるパイロット施設の RED 測定	37
5.2.1.1 概要.....	37
5.2.1.2 結果と考察	39
5.2.2 GI-F-RNA Phage を利用したパイロット施設の RED 測定	41
5.2.2.1 概要.....	41
5.2.2.2 結果と考察	41
5.2.3 GI-F-RNA Phage を利用した RED 推定の検討.....	44
5.2.4 流体モデル解析による RED 推定との比較.....	45
5.2.4.1 概要.....	45
5.2.4.2 結果と考察	45
5.3 濁度増加が処理性能に与える影響の検討	47
5.3.1 概要	47
5.3.2 結果と考察	48
5.4 実証施設における GI-F-RNA Phage を利用した UV 照射評価の検討	51

5.4.1 概要	51
5.4.2 結果と考察	52
5.5 本章のまとめ	54
第 6 章 結論	55
6.1 本研究で得られた成果	55
6.2 今後の課題	57
参考文献	58

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

水系感染症を引き起こす腸管系ウイルスはヒト腸管内で増殖し、感染者糞便から高濃度で排出され、下水処理場に流入する。下水処理によって除去・不活化されるものの、水中の腸管系ウイルスの除去・不活化には限界があり (da Silva et al., 2007; Flannery et al., 2012)、腸管系ウイルスについて、下水処理や下水再生処理における制御が重要となっている。

紫外線 (UV) 消毒は水中のウイルス消毒方法の 1 つで、近年下水への導入事例が増加してきている (Tanaka, 2018)。UV 照射装置は装置の設計や処理水質によってウイルス不活化性能が複雑に変化する (Otaki, 2018) ため、個々の UV 照射装置で性能試験を行うことが望ましい。UV 照射装置の性能試験には大腸菌ファージ MS2 の原水への添加による不活化試験が広く用いられているが、MS2 を処理原水に高濃度で添加する必要があるため、装置規模が大きくなると実施コストが跳ね上がり、現実的ではない。

大規模の UV 照射装置における UV 照射量測定の供試微生物候補としては、F 特異大腸菌 RNA ファージ (FRNA ファージ) の利用可能性が示唆されている (Lee et al., 2018.)。FRNA ファージは下水中に高濃度で存在することが知られており、UV 消毒に対して一定の耐性があることが報告されている Maite Muniesa et al., 2009)。一方で、生物線量計に利用するためには紫外線感受性を把握する必要があるが、変動性の問題などがあり、研究が進んでおらず知見は少ない。

また、本研究で利用した沖縄県 I 処理場の下水再生処理施設をでは、下水 2 次処理水を UF 膜ろ過後、UV 消毒する処理方式を採用している。この施設には、UV 照射装置の滞留時間が十数秒程度の小規模なパイロットプラントと、UV 照射装置の滞留時間が 5~10 分程度の実証プラントが設置されている。パイロットプラントは MS2 の不活化試験により装置性能が十分に検証されているが、実証プラントでは UV 照射性能の実測ができておらず、検討が不十分な状態である。

1.2 研究の目的

以上の背景から、装置性能測定のための供試微生物として FRNA ファージを利用するためには FRNA ファージの UV 感受性をこれまでより詳細に把握する必要がある、FRNA ファージの UV 感受性の変動を踏まえた利用方法を検討する必要がある。さらに、実規模の UV 照射装置において装置性能を実測する手法の検討が必要とされている。そこで、本研究では以下の 2 点の目標を設定した。

①下水中 FRNA ファージを用いた UV 照射量測定手法の検討

微生物を用いた UV 照射量測定を行うためには、使用する微生物の被 UV 照射量と不活化率の間に用量－反応曲線を作る必要がある。下水中に自然に存在する FRNA ファージに関して、UV 感受性の決定方法は知見が少ない。

そこで本研究では、以下の 4 つの点を目的として調査を実施した。

1. GI, GII, GIII の遺伝子群別に下水中 FRNAPH の UV 感受性を把握する。
2. FRNAPH の UV 感受性の地点差について把握する。
3. FRNAPH の UV 感受性の変動について把握する。
4. 換算 UV 照射量 (Reduction Equivalent UV Dose, RED) 推定の供試微生物として、FRNAPH の運用方法を検討する。

②FRNA ファージを用いた、実規模の下水再生処理施設における

UV 照射量測定の妥当性検討

沖縄県 I 処理場の下水再生処理施設を利用し、以下の 2 つの点を目的として調査を実施した。

1. パイロットプラントにおける UV 照射量測定に関して、供試微生物に FRNA ファージを用いた場合と従来の MS2 を用いた場合で比較検討を行い、実際の UV 照射装置の性能試験に FRNA ファージを適用することの妥当性を検討した。
2. 実証プラントにおいて、FRNA ファージを供試微生物とし、実際の UV 照射装置における紫外線照射量測定を試みた。

第2章 先行研究についての文献考察

2.1 下水中の病原性ウイルスに関する知見

ウイルスとは、宿主の細胞内のみで増殖できる偏性細胞内寄生性であり、宿主特異性を有する極微小な感染性の構造体で、タンパク質の殻とその内部に入っている核酸からなる。サイズは 10~300 nm であり、様々な形をとる。遺伝子として DNA あるいは RNA のいずれか一方の核酸を持ち、その周囲をカプシド (Capsid) と呼ばれるタンパク質の殻で覆われた構造を持っている。このような簡単な構造により、環境中で長く生存する (Gerba, 2007)。

単細胞生物や植物からヒトを含む高等生物までのすべての生物に対して、感染性を有するウイルスが存在すると考えられている。

水系感染に関するヒトのウイルスは、感染者から糞便とともに排出され、糞便もしくは糞便に汚染された水との接触によって感染および発症する恐れがある。現在では水環境中に 140 種以上のウイルスが存在すると考えられており、これらのほとんどが水系感染を引き起こす腸管系ウイルスであると考えられている (Ye et al., 2012)。また、一般的に腸管系ウイルスは他の水系感染に関する細菌に比べて環境中の生残性、塩素消毒耐性が高く、最小感染用量が少ないと言われている (WHO, 2011)。腸管系ウイルスの多くは胃腸炎等の症状を引き起こすが、加えていくつかのウイルスは、脳炎、新生児疾患、心筋炎、ウイルス性髄膜炎などを引き起こす (Gerba et al., 1985, 1996. Frankel et al., 1988.) が、症状が軽微もしくは無症状であるような不顕性感染も多い (Gentsch et al., 1992; Menon et al., 2010; Kimura et al., 2011)。

腸管系ウイルスはヒト腸管内で増殖し、感染者糞便から高濃度で排出され、下水処理場に流入する。下水処理によって除去・不活化されるものの、水中の腸管系ウイルスを完全に除去・不活化することは困難であり (da Silva et al., 2007; Flannery et al., 2012)、活性汚泥処理で 1-4 log 程度除去されると報告されている (Katayama et al., 2008. Kitajima et al., 2014)。また、合流式下水道雨天時越流水 (Combined Sewer Overflow: CSO)などを介して腸管系ウイルスが未処理のまま環境中へ排出されることも報告されている (Fong et al., 2010; Hata et al., 2014)。このことから、下水処理や下水再生処理における制御が重要なリスク因子となっている。

2.2 水中のウイルス消毒処理方法に関する知見

下水処理や下水再生処理において、消毒プロセスは病原微生物の破壊あるいは不活化のために用いられるプロセスである。消毒作用の重要な機構は①細胞壁の損傷、②細胞壁の透過性の変性、③原形質のコロイドとしての変質、④微生物の DNA あるいは RNA の変性、⑤酸素作用の阻害の 5 つである。紫外線 (UV)、塩素、オゾンを用いた消毒機構の比較を表 2.1 に示す。細菌は原虫とウイルスに比べ塩素や UV による消毒効果が高くなっているが、オゾンを用いた場合では他の病原微生物より高い CT 値や It 値が必要である。原虫は塩素消毒に対して高い耐性を有しており、細菌と比べ約 100 倍、ウイルスより約 2 倍のクロラミン CT 値が必要となっている (Montgomery, 1985; USEPA, 1999)。しかし、UV 消毒は原虫に対して有効であるあることが報告されていることから (Clancy et al., 2000; Craik

et al., 2000, 2001; Linden et al., 2002)、他の細菌やウイルスより IT 値（照射量）が低くなっている。ウイルスは他の病原微生物とくらべオゾンの CT 値が低くなっており、オゾン消毒が有効であることが分かる。

表 2.1 各消毒方法の機構(Tchobanoglous et al., 2003)

消毒手法	消毒機構
紫外線	1.微生物細胞内のRNAとDNAへの光化学的損傷（二重結合の形成）
	2.微生物内の核酸による240~280 nmの電磁波エネルギーの吸収
	3.RNAとDNAの増幅遺伝情報の不活化による細胞の増幅防止
塩素	1.酸化
	2.残留塩素との反応
	3.タンパク質の沈殿
	4.細胞壁の透過性の変質
	5.加水分解と機械的破壊
オゾン	1.接触酸化・細胞壁の破壊で細胞内物質の細胞外への漏洩
	2.オゾンの分解によるラジカル複製との反応
	3.核酸成分への損傷
	4.炭素窒素結合の切断

2.2.1 紫外線消毒

紫外線（UV）によるウイルス消毒は、厚生労働省が「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」を制定して以降浄水処理への導入が大きく進んだ(Tanaka, 2018)。2009年には下水道施設計画・設計指針と解説後編 2009年度版（社団法人日本下水道協会, 2009）に、UV消毒施設に関するガイドラインが制定された。そこでは、UV透過率は、70%以上を標準とすること、UVの照射量は、大腸菌群数が1cm³中3,000個以下になるよう定めなければならない等が制定された。現状、下水に対するUV消毒処理は、必要十分なUV照射量に設計する方法や、第三者的にそれを検証する方法、さらに70%を標準としたUV透過率を下回る原水に対応する方法等については整備が進んでいない（Kamiko, 2011）が、近年では低透過率の下水へのUV消毒の適用可能性が報告されている（Oguma et al. 2013）。

UV消毒では、微生物がUVの照射を受けることで、微生物のDNAに2重結合が生じたり、DNA鎖が断裂したりする。UVが細菌や原虫のDNAやウイルスのDNAやRNAに吸収され、隣接するDNAのチミンやRNAのウラシルが二量体を形成することが特に致命的に働き(R. Beukers et al.,1961. R. B. Setlow et al., 1962. R. B. Setlow ., 1963. D. Pettijohn et al.,1964. Miller et al., 1974.)、逆転写過程を阻害することで微生物は増殖できなくなり、不活化される。

UV消毒において透過率や濁度などの水質条件は重要な要素であり、UV処理の前に行われる処理が、後段のUV処理における病原微生物の不活化率に対する影響が大きいことが報告されている（Qualls et al., 1983; Christensen and Linden, 2003; Batch et al., 2004; Hijnen

et al., 2006; USEPA, 2006)。UV 処理の前段で処理されず残留した粒子により、UV が吸収、散乱、ブロックされることから病原微生物の不活化率が低下することが報告されている (Qualls et al., 1983)。また、下水由来の 7~10 μm 以上の粒子は、粒子に吸着した病原微生物への UV 照射をブロックすると報告している (Jolis et al., 2001)。

UV 消毒のメリットとして、照射装置が比較的小規模であり、滞留時間も短いため導入がしやすいことが挙げられる。また、下水や再生水に見られる重要な消毒副生成物の一つとして、*N*-ニトロソジメチルアミン (*N*-nitrosodimethylamine; NDMA) があり、発がん性を有する物質である。これらの消毒副生成物は水系感染を引き起こす病原微生物とともに再生水を特に飲用利用する際の人への健康リスクを高める (USEPA, 2002)。しかし、UV 消毒は消毒に用いられる程度の UV 線量では消毒副生成物はあまり生成されないことから、UV 消毒については消毒副生成物による汚染リスクは低いと考えられる。

2.2.2 塩素及びオゾン消毒

塩素やオゾンのような酸化剤による細胞壁の損傷、破壊、変性により、細胞は死に至る。塩素やオゾンなどの化学的酸化プロセスは消毒副生成物 (Disinfection By-Products; DBPs) を生成する。多くの消毒副生成物は、水中有機物の酸化によって生成した溶解性有機塩素化合物であることが報告されている (Cooper et al., 1983; Bauman and Stenstrom, 1990; Rebhun et al., 1997)。

2.3 紫外線照射量の測定方法に関する知見

UV 照射量の計測方法には、物理的方法、化学的方法、そして生物的方法がある。これらの計測手法は、系に到達する量を計るもの(物理的方法)と系に吸収される量をはかるもの(化学的方法と生物的方法)に分類される (Ono, 1996. Sasaki, 1995)。

2.3.1 化学線量計

化学線量計は吸収された光エネルギーを吸収係数(物質固有の波長ごとの吸収率)と、量子収率(濃度によって反応率が異なる)を基に、算定することによって UV 照射量を求めるものである (Hiroto, 2009)。化学線量計の測定手法としては、ヨウ化カリウムヨウ素酸線量計やシュウ酸鉄線量計など存在し、その線量測定のプロトコルが Bolton ら(2011)などによって示されている。

2.3.2 生物線量計

生物線量計は、UV に暴露された時の生物の反応を指標に用いるものである。生物指標としては DNA の損傷、皮膚の紅斑、さらには様々な指標生物の致死量、と多様である (Ono, 1996)。水処理装置の生物線量測定には通常 UV による微生物の不活化モデルを用いる。微生物の不活化モデルは標的論によって説明される (Kondo, 1984)。標的論では微生物に UV を照射したとき、微生物内の標的 (主に DNA または RNA) にヒットする確率と生残率を対応させる。標的に n 回ヒットした場合にある特定の微生物が不活化するとした場合、生残率とヒット数の関係は式 2.1 で表される (Otaki, 2000)。ウイルスは $n=1$ である場合がほと

んどであり、その場合の関係式は式 2.2-1 または式 2.2-2 のように表され、生物線量測定に用いられる。

$$\frac{N}{N_0} = 1 - (1 - e^{-D \cdot Dose})^n \quad \dots \text{式 2.1}$$

$$\frac{N}{N_0} = e^{-D \cdot Dose} \quad \dots \text{式 2.2-1}$$

$$\log_e \frac{N}{N_0} = -\frac{Dose}{D} \quad \dots \text{式 2.2-2}$$

N:照射後の濃度, No:照射前の濃度, n:致死ヒット数

Dose:UV 照射量, D:不活化速度定数

ウイルスの対数生残率と UV 照射量が直線関係になることを利用し、不活化速度定数が既知のウイルスの生残率を測定することで装置の UV 照射量を計算し、換算 UV 照射量 (Reduction Equivalent UV Dose, RED) として用いる。

生物線量計を用いるメリットとしては、複雑な装置の UV 照射量を物理線量計と比較して簡単に測れることである。一方で測定の限界として、生物線量計で測定できる照射量の範囲は微生物の初期濃度に依存し、照射量が大きく微生物濃度が検出下限を下回る場合には測定できない。

2.3.3 物理線量計

物理線量計とは、ある一定の波長域に分光特性をもつセンサーで受光した UV 量を物理量として測定するものである。受光部には例えば光ダイオードが使用され、一定の UV 吸収スペクトルを持つ物質をフィルターとして用いることにより分光特性を決定する。物理線量計を利用するメリットは、UV 量をリアルタイムで測定できることである(Ono, 1996)。これまで数多くの測定機器が開発されているが、機器の分光光度測定や校正光源、斜入射特性は測定機器ごとに異なり、測定値は絶対値ではなく同一実験内での相対値として扱うことが望ましいとの報告もされている(Tozawa, 1993)。

2.3.4 物理シミュレーションによる推定

物理シミュレーションによる推定は、数値流体力学 (computational fluid dynamics, CFD) モデルを利用して UV 照射量を解析する手法である。現在、CFD モデル解析は化学・生物・物理線量計による実測法の補助的な位置づけでの利用が主であり、CFD モデル解析の妥当性は個々の照射装置ごとに実測値による検証が必要である(Deguchi, 2018)。

物理シミュレーションによる推定では、CFD モデルによって照射槽内のウイルス粒子の流れを解析し、さらにランプの UV 強度、UV 透過率、水温などの因子により決定される槽内の UV 強度分布と合わせて計算することによりウイルス粒子が受ける UV 照射量を推定する。CFD モデルによる UV 照射量の推定の際には、装置の壁面を流れる短絡流の予測が

非常に重要である。短絡流に乗って流出する微生物は UV の被照射量が極端に低くなるため、微生物の全体的な不活化率を大きく減少させる (D. A. Lyn et al. 2005)。従って、UV 照射装置流水部のモデル化の精度がきわめて重要だが、モデル作成の手法については統一された方法が定まっておらず、個々の技術者によるところが大きいのが現状である。

2.4 生物線量計に利用する微生物の知見

2.4.1 大腸菌

大腸菌は、グラム陰性の桿菌で、乳糖(ラクトース)を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の細菌で、腸内細菌であることから糞便汚染の指標として用いられる。大腸菌は、上水(飲料水)や下水などの水質基準の分析項目として挙げられているため、UV 殺菌装置の性能を見る指標菌として使用されるケースがある。

USEPA(2006)の調査によると、大腸菌の UV 不活化速度定数は 0.79 mJ/cm^2 であり、ウイルスと比較して不活化曲線に若干の肩を持つことが知られている(図 2.1 Otaki, 1999.)。

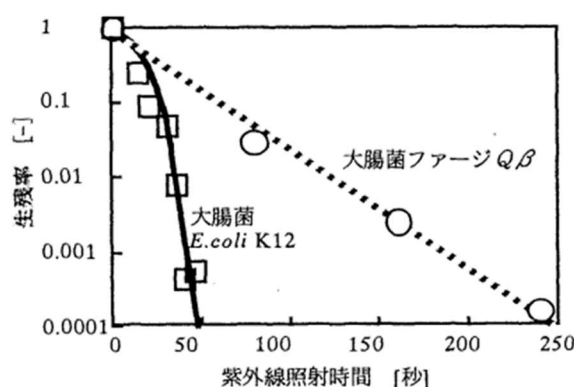


図 2.1 大腸菌と大腸菌ファージ Qβ の不活化曲線(Otaki, 1999.より抜粋)

2.4.2 F 特異 RNA 大腸菌ファージ (FRNA ファージ)

大腸菌ファージは、細菌に感染するウイルスであり、細菌の持つ F 繊毛に感染するレピウイルス科のウイルスを F 特異大腸菌ファージ (F ファージ) と呼ぶ。F ファージは保有する核酸の種類に応じて FRNA ファージと FDNA ファージに分類される。FRNA ファージは一本鎖 (+) RNA をもち、ノロウイルスやアイチウイルスなどの腸管系ウイルスとその大きさ (直径約 20~30 nm 程度) や構造 (正二十面体) が類似している。さらに人への危険性がなく、培養や検出が容易である。FRNA ファージは血清学的方法で GI-GIV の 4 種類の遺伝子群に分類され、GI は MS2、GII は GA、GIII は Qβ、GIV は SP がそれぞれ代表株である。ヒト糞便性 (GII および GIII) または動物糞便性 (GI および GIV) が報告されており、(Havelaar et al., 1990. Hsu et al., 1995) 下水中に高濃度で存在する。

UV 感受性は $GI < GII < GIII (< GIV)$ となる傾向が報告されており (Maite Muniesa et al., 2009)、下水 2 次処理水を対象とした UV 消毒実験により UV 照射装置の性能試験に利用できる可能性が示唆されている (Lee et al., 2018.) が、実際の処理装置を用いた研究は少なく、知見が不足している。

2.4.3 大腸菌ファージ MS2(MS2)

MS2 は GI タイプの FRNA ファージを代表するファージであり、単離された MS2 はウイルス処理実験のモデルウイルスとして特に頻繁に用いられている (Matsui et al., 2003. Matsushita et al., 2005, 2006, 2011. Zhu et al., 2005. Fiksdal and Leiknes, 2006. Mayer et al., 2008. Shirasaki et al., 2010.)。

MS2 の不活化速度定数は $7.96\text{mJ}/\text{cm}^2$ 程度 (USEPA, 2006) であり、UV 消毒に対して非常に高い耐性を持つことが知られている。そのため、UV 消毒試験において、MS2 は $Q\beta$ (不活化速度定数: 約 $5.90\text{mJ}/\text{cm}^2$, USEPA, 2006) と並んでよく用いられている (Lee, 2015)。一方で、MS2 は処理原水に高濃度での添加が必要なため、実規模装置では利用できないなどの問題もある。

2.5 水試料中のファージ定量法に関する知見

2.5.1 培養法による定量

培養によるブラック法 (Plaque assay) は、水中からのウイルス検出に広く用いられる手法である。適当に希釈したウイルスを含む試料を単層培養細胞上に接種し、寒天培地中で培養すると、最初にウイルスの感染を受けた細胞の周囲の細胞がウイルスの増殖に伴い順次感染し死滅する。数日間培養後、細胞層をニュートラルレッド等で染色すると、生細胞のみ染色されるため、死滅した細胞の周辺部が白抜きで見える。これをブラックと呼び、ブラック数を計数することで、試料中のウイルス濃度を算出する。この手法は、ノロウイルスをはじめ、細胞への感受性が発見されていないウイルスが存在するため、培養法によってすべてのウイルスを検出することはできないという問題点を有している。ブラック法は、安価であり実際に水中において感染力のあるウイルスを直接測定することができる利点がある。しかし、培養が必要となるため、濃度測定までに時間が長くなることや、効果的に増殖ができる細胞が確立されていないノロウイルスなどは濃度を測定することができない。

2.5.2 PCR 法による定量

PCR 法 (Polymerase Chain Reaction, PCR) は分子生物学的手法を用いた測定法であり、ウイルスの濃度測定に多く用いられている。PCR 法では、ターゲットとしたウイルスの遺伝子の特異的に増幅させて濃度を測定する。RNA しか有さないようなウイルスの場合には、PCR の前に逆転写酵素を用いて RNA から cDNA を合成させて PCR を行う。この方法は、RT (Reversetranscription) -PCR と呼ばれる。PCR 法によるウイルス濃度測定手法は、培養法と比べて迅速性や特異性、検出感度において優れている。しかし、感染力を保持していないウイルス由来の遺伝子も検出されてしまう欠点があり、感染力の有無を評価することができないため、特に消毒プロセスにおけるウイルスの不活化の評価に用いることができない。

そこで、近年では感染力のあるウイルスを測定するため、感染力の無いウイルスと有るウイルスを分けて測定する手法 (Nuanualsuwan et al., 2002. Baert et al., 2008) や PCR 法に用いる増幅領域を比較的長くする手法 (Shin et al., 2008) などが考案されている。

PCR 法によって感染力のあるウイルスを測定する手法の中で、本研究で用いた IC-RT-PCR 法(Hata et al., 2016)は PCR 法と培養法と組み合わせることにより感染力のある FRNA ファージを測定する手法である。IC-RT-PCR 法では FRNA ファージを含む試料で MPN 法の希釈列を作成・培養し、陽性率を PCR 法によって測定する。IC-RT-PCR 法は従来の培養法と PCR 法の組み合わせで測定する手法のため、他の感染力のあるウイルスの測定法と比較して実験操作が簡単であるという利点がある。一方で、定量には MPN 法を用いるため、測定の精度には限界がある点に注意が必要である。

2.6 本章のまとめ

本章では水中のウイルスの UV 消毒に関する知見を中心として水中ウイルスに関する知見、他のウイルス消毒方法に関する知見などの周辺情報を含めて文献調査を行った。以下に、得られた知見をまとめた。

下水中には様々な病原性ウイルスが存在し、中でも腸管系ウイルスはヒト腸管内で増殖し、感染者糞便から高濃度で排出され、下水処理場に流入する。これらのウイルスの制御が下水処理や下水再生処理において重要である(2.1)。ウイルスの主要な消毒方法として、UV 消毒、塩素消毒、オゾン消毒がある。UV 消毒は、設置場所を取らない、下水や再生水に見られる NDMA などの消毒副生成物を生成せず、処理水の汚染リスクが少ないなどの理由から近年下水処理に利用が広がってきている(2.2)。

UV 処理装置の性能試験には生物線量計や物理モデルシミュレーションが良く用いられる(2.3)。生物線量計による照射性能評価には MS2 が良く用いられるが、MS2 は処理原水に高濃度での添加が必要なため、実規模装置では利用できない。下水中に高濃度で検出される FRNA ファージが指標微生物として期待されるが、FRNA ファージを生物線量計で利用することに関する研究は少なく、知見が不足している(2.4)。

以上のことから、本研究では下水中 FRNA ファージを用いた生物線量計測定の方法を検討し、実施に適用することを試みた。

UV 照射前後の各微生物の濃度測定には(2.5)の方法を用いた。

第 3 章 実験方法

3.1 概説

本章では、本研究で用いた基本的な実験方法について説明する。

3.2 大腸菌ファージ MS2 の培養及び定量方法

大腸菌ファージ MS2 の培養・分析は、大腸菌ファージ測定法 (Otaki, 東大都市工版)、Ueshino(2004)の方法を参考に行った。大腸菌ファージ MS2 は F 特異 RNA ファージの 1 単離株であり、F 繊毛を持つ大腸菌 (F+の大腸菌) を宿主として増殖する。本研究では、F+の大腸菌の 1 つである *E.coli* K12F+(A/λ)によって MS2 の培養及び定量を行った。

3.2.1 大腸菌・MS2 の培養方法

1.培養液の作成

超純水 (以下 Milli-Q) に表 3.1 の組成で LB broth base(Wako)および $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を溶解させ、培養液を用意した。121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌した後空気放冷した。

2.宿主菌(大腸菌)の培養

復元した *E.coli* K12 を上記の培養液 9mL あたり 0.2~1.0mL 程度添加し、対数増殖期に達するまで 30~37℃で 3~4 時間恒温振とう器にて培養した。

3.MS2 の培養

E.coli K12 を 1.で示した培養液 100mL あたり 2.5~5.0mL 加え、対数増殖期に達するまで、37℃で 3~4 時間振とう培養を行い、復元した MS2 を 2.5~5.0mL 添加し、再び 37℃で 18~24 時間振とう培養した。

その後、ガラス繊維ろ紙 (GF/C、孔径 0.7 μm 、Whatman 社製)、滅菌済みのメンブレンフィルター (口径 47mm、孔径 0.45 μm 、セルロース混合エステル、Advantec 社製) の順に全量をろ過し、高濃度の MS2 原液を得た。MS2 濃度はおよそ $10^9 \sim 10^{10}$ PFU(Plaque Forming Unit)/mL 程度になった。

MS2 原液は実験に使用するまで遮光して 4℃で保存した。長期間保存する場合は、グリセロールまたはジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて-80℃で凍結保存した。グリセロールと DMSO はそれぞれ最終濃度が 20%、7%になるように調整した。

3.2.2 大腸菌ファージ MS2 濃度の測定方法

重層寒天培地法を用いて MS2 濃度を測定した。宿主菌を添加した寒天平板上で試料を重層し培養することにより、生育増殖した宿主菌がファージにより溶菌し、透明な円形状の溶菌斑(プラーク)が形成される。1 個のプラークは 1 個のファージに由来するため、遺伝的には純粋とされている。

試料 1mL を重層させて培養する「1mL 法」を主に用いたが、UF 膜ろ過水など MS2 濃度が極めて低いと思われる試料に関しては、Grabow ら(1986)の方法を参考に試料 10mL ずつ 5 枚のシャーレで培養する「50mL 法」を用いた。検出下限値は、「1mL 法」では 1(PFU/mL)、

「50mL 法」では 0.02(PFU/mL)である。

この方法で使用する寒天培地の組成を表 3.1 に示した。寒天培地は 121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌を行い、実験に使用した。「50mL 法」では、下層培地を用いず、2 倍濃度の上層培地を試料と同量使用した。

表 3.1 培養液および重層寒天培地の組成

	培養液	上層培地	下層培地
	g/1000mL-Milli - Q		
LB Broth Base	20	20	20
Bacto Agar	—	8	11
CaCl₂·2H₂O	1	1	1

50mL法用の上層培地は2倍濃度とした

重層寒天培地法の基本的な手順は以下の通りである。

1. 実験開始前に下層寒天培地 10mL を滅菌済みのシャーレに流し込み、室温で固化させた。
2. 1mL 法では、シャーレにプラーク数が 30～300 の範囲になるように適当に希釈した試料 1mL を滅菌済みプラスチックピペットで添加した。各希釈倍率につき 2 枚ずつシャーレを準備した。また 50mL 法では、5 枚のシャーレにそれぞれ試料 10mL に流し込み、2 倍濃度の上層寒天培地 10mL を流し込んで攪拌した。
3. *E.coli* K12 を混ぜ、攪拌した上層培地 10mL で試料を重層し、試料が均一になるように素早く攪拌して固化させた。
4. 37℃で 18~24 時間培養した。
5. 1mL 法では、同じ希釈倍率の 2 枚のプラーク数の平均を取り、その中で 30~300 の範囲にあるものを採用し、PFU(Plaque Forming Unit)/mL として求めた。また 50mL 法では、5 枚のシャーレの合計から PFU/50mL を求め、PFU/mL に換算した。

3.3 IC-RT-PCR 法による微生物定量法

FRNAPH の定量は、Hata(2015), Hata ら(2016)

3.3.1 必要試薬など

- シャーレ

47 mm のフィルターが収まるサイズのものを使用する。

- WG49

- 液体培地 , 2×液体培地

表 3.2 の組成に従い作成した。トリプトン、グルコース、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウムを加えたのち 121℃, 15 分間加熱滅菌処理する。培地が冷えた後にカナマイシン、ナリジキシン酸を加えた。

- 寒天培地

液体培養後の結果のスクリーニングに使用。表 3.2 の組成に従い作成した。

- HV 膜 (Millipore、親水性 PVDF、孔径 0.45 μm、口径 47 mm、HVLP04700)

孔径 0.2 μm、PTFE 製の JG 膜でも同様のファージ回収が期待できるが、ろ過流 gal の点で HV 膜を使用した。

- 250 mM AlCl₃ 溶液

試料の濃縮操作に用いる塩化アルミニウム 6 水和物 6.025 g を Milli-Q 水 50 mL 程度に溶解したのち、100 mL にメスアップして作成した。

- 硫酸

pH 調整に用いた。

- 水酸化ナトリウム水溶液

pH 調整に用いた。

表 3.2 培地の組成

Component	Unit	Liquid Agar	2× Liquid Agar	Solid agar
Milli-Q	mL	500	500	500
Trypton	g	5	10	5
Glucose	g	0.5	1.0	0.5
NaCl	g	4	8	4
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0.3 g/mL)	mL	0.5	1.0	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.15 g/mL)	mL	0.5	1.0	0.5
Bacto Agar	g	-	-	5.5
Kanamycin (20 g/L)	mL	0.5	1.0	0.5※
Nalidixic Acid (100 g/L)	mL	0.5	1.0	0.5※
Liquid media with well grown WG49	mL	-	-	20※

Nalidixic acid, Kanamycin, WG49 は滅菌後に混合した。

※シャーレに撒く直前に混合した。

3.3.2 操作フロー

濃縮手法は検査水量が 1000 mL を越えるような場合に使用した。検査水量が少ない場合には次項に示す手法を用いた。例えば、対象試料が 1-0.1 PFU/L 程度と想定される場合には、図 3.1 のようなフローで定量した。検査水量 1000 mL, 100 mL, 10 mL, 1 mL の 4 段階でそれぞれ 3 連でのファージ検出を試みた。ここで、1000 mL 試料は濃縮後に、10 mL 以下の試料は直接液体培地と混合し、ファージを培養した。培養後、簡易検査につき各検体中でのファージ増殖の有無を確認し、増殖が見られた試料を対象にタイピング RT-PCR を実施した。ここで得られた陽性率を MPN 表と照合することで、各 FRNA ファージ遺伝子型について感染力を有した粒子濃度を推定した。

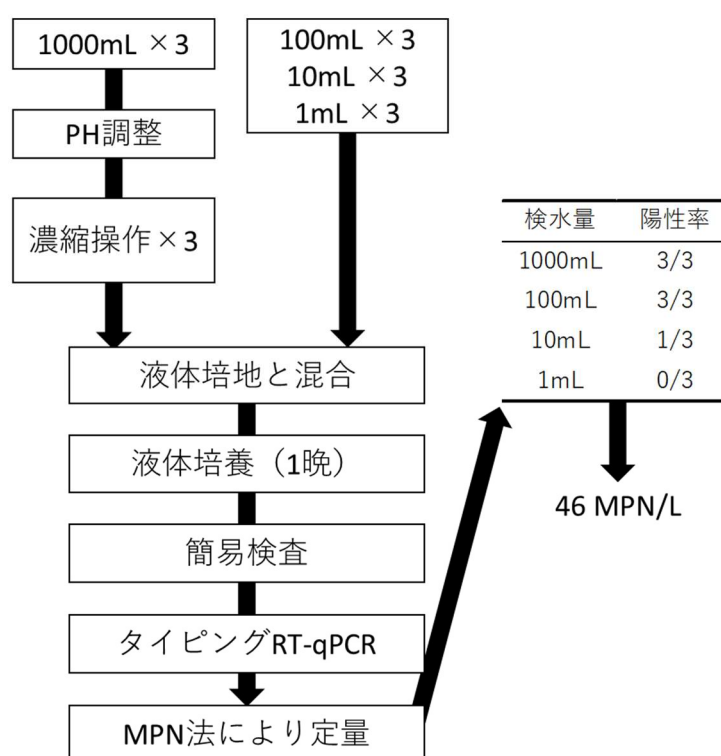


図 3.1 操作フローと定量のイメージ

3.3.3 ファージ濃縮操作

本濃縮手法は検査水量が 1000 mL を越えるような場合に使用した。検査水量が少ない場合には次項 3.3.4 に示す手法を用いた。試料に凝集剤（塩化アルミニウム）と宿主(WG49)を添加し、ろ過、ろ過後の膜を培養操作に供した。WG49 を凝集剤と共に添加し、予め WG49 とファージを接触させておくことで、1) 低濁質試料におけるファージの捕捉効率の向上、2) ファージの感染効率の向上、が期待できると考えられる。操作手順を以下に示す。

3.3.3.1 事前準備

液体培地適量に WG49 を添加し、6 時間程度振盪培養した。濃縮操作開始直前に試料 pH を 5.0 ± 0.3 程度に調整した。シャーレに液体培地 10 mL 程度を加えた。

3.3.3.2 手順

1. 目的とする容量の試料に対し、250 mM 塩化アルミニウム水溶液及び WG49 培養液を 100mL あたり 200 μ L ずつの割合で加え、数秒撹拌した。
2. 試料を HV 膜に通水した。
3. 通水後の膜をシャーレ内の液体培地に浸漬した。この際、膜の両面が液体培地にしっかりと浸かるように注意した。
4. シャーレを 37° C で一晩の培養に供した。
5. 培養後の試料は 20 μ L 程度を 96 well プレートに分取した。

3.3.3.3 濃縮を要さない検体中の FRNA ファージ培養

本手法は 20 mL 以下程度の小容量検体に用いた。検体を直接液体培地と混合し、FRNA ファージの培養を行った。手順を以下に示す。

1. 必要数、必要量の液体培地を適切な滅菌済み容器に移し、WG49 培養液を検体 100mL あたり 200 μ L ずつの割合で混合した。
2. WG49 培養液添加後の液体培地に必要量の試料を添加し、よく混合したのち 37° C で一晩の培養に供した。

3.3.3.4 簡易検査によるスクリーニング

Kott (1966) の手法を用いることで培養操作終了後に、F ファージ増殖の有無を判定可能である。本手法においては FRNA ファージに加え FDNA ファージも陽性判定されるため、簡易検査で陽性であっても RT-PCR で陰性となる場合もある。手順を以下に示す。

1. カナマイシン，ナリジキシン酸，WG49 を加えた寒天培地をシャーレに撒き，固化させた。
2. 各検体を 2 μ L ずつ寒天培地に滴下した。
3. シャーレを 37° C で一晩の培養操作に供した。
4. 培養後、F ファージ陽性検体はブラックを形成した。

3.3.4 RT-PCR によるタイピング

RT-qPCR によるタイピングに供した。各検体につき、陽性/陰性が判別できれば良く、陽性の場合にはファージ濃度は充分高いため、RNA 抽出や RT-qPCR の効率についてはそれほど重要ではない。そこで、特に RNA 抽出についてはキット等を用いず、熱処理によりカプシドを変性させるのみでおこなった。実験手順を以下に示す。

3.3.4.1 事前準備

- プライマー, TaqMan プローブ

Wolf ら (2008) の系 (表 3.3) を用いた。TaqMan プローブを用い、Multiplex PCR で測定した。

- 逆転写キット, マスターミックス

iTaq™ Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad 製) を用いた。

表 3.3 FRNA ファージ検出用のプライマー, TaqMan プローブ

Virus		Sequence (5' → 3')	length (mer)	Product size (bp)
GI (MS2)	Forward	GTCCTGCTCRACCTTCCTGT	19	82
	Reverse	CGGCTACCTACAGCGATAG	20	
	Probe	FAM-CAWGGTAGCGTCTCGCTAAAGACATTA-MGB-NFQ	27	
GII (GA)	Forward	TCTATGTATGGATCGCACTCG	22	111
	Reverse	GTAGGCAAGTCCATCAAAAGTC	21	
	Probe	FAM-TGCTGTCCGATTTCACGTCTATCTTCA-MGB-NFQ	27	
GIII (Qβ)	Forward	GYGGTGCYACAACRACGAAT	20	77
	Reverse	GWGGSGTACACKCTTGCG	18	
	Probe	FAM-TACGGYCATCCGTCCTTCAAGTTTGA-MGB-NFQ	25	

Thermal cycling: 95°C 10 m → 50 cycles of 95°C 15 s and 58°C for 60 s

Reference: Wolf et al. 2008.

3.3.4.2 手順

1. iTaq™ Universal Probes One-Step Kit の手順に従い、表 3.4 の組成で反応液を作成した。
2. 96 well プレートに検体を 2 µL 加えた。
3. 96 well プレートを 95°C、5 分間の熱処理に供し、RNA 抽出を行った。
4. 96 well プレート中の検体に、RT-qPCR 反応液を 18 µL ずつ加えた。
5. リアルタイム PCR 機器 (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems 製) を用い、50 °C 30 分 → 95 °C 15 分のアニーリングの後、94 °C 15 秒 → 58 °C 60 秒 (40 サイクル) の反応に供した。
6. 結果を確認し、陽性率から MPN 法で検体中の濃度を計算した。

表 3.4 RT-qPCR 反応液の組成

component	Volume(μ L)
Forward primer(10 μ M)	0.8
Rverse primer(10 μ M)	0.8
TaqMan Probe(5 μ M)	0.4
iTaq universal probes reaction Mix(2X)	10
iScript reverse transcriptase	0.5
Pure water	5.5
Total	18

3.4 紫外線照射量測定試験

紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準(2012)の方法を参考に、紫外線照射量測定試験を行った。試験は以下の流れで実施した。

1. 指標微生物の紫外線感受性試験に用いる装置の実紫外線照射強度を測定するため、化学線量計を用いた紫外線照射照射量試験を実施した。
2. 1.の装置を用いて、指標微生物の紫外線感受性測定試験を実施した。この結果から、指標微生物の紫外線に対する不活化速度定数を求めた。
3. 紫外線照射装置において、指標微生物の不活化性能試験を実施し、その結果と 2.で求めた不活化速度定数を用いて、紫外線照射装置の換算紫外線照射量（Reduction Equivalent UV Dose, RED）を求めた。

1.および 2.で用いた装置の概要を図 3.2 および表 3.5 に示す。

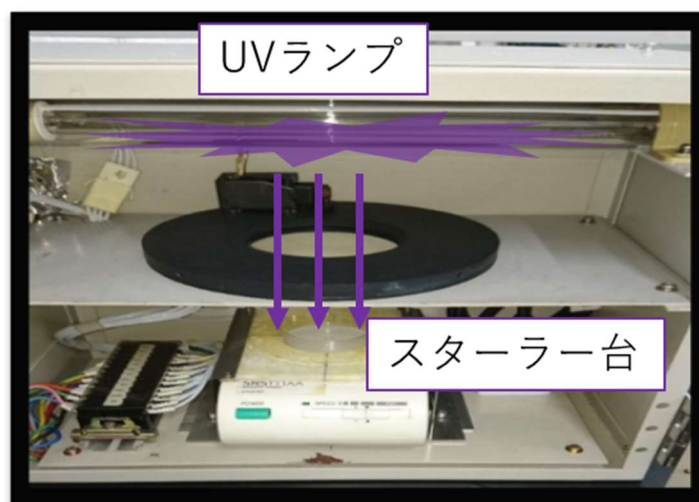


図 3.2 紫外線感受性試験装置

表 3.5 紫外線感受性試験装置仕様

項目	内容
使用ランプ	8W低圧水銀ランプ(岩崎電気製, GL-8-2)
ランプ灯数	2灯
シャーレ	上部 ; $\Phi 60$ mm、液面 ; $\Phi 55$ mm、下部 ; $\Phi 56$ mm, KORD-Valmark製
シャッター	1-999sでタイマーにより開閉

3.4.1 指標微生物の紫外線感受性試験装置の照射強度試験

ヨウ化カリウム混合物を用いた化学線量計で紫外線感受性試験装置の波長 254nm における照射強度を測定した。岩崎電気(2012)の方法を参考に、以下の方法で実施した。

3.4.1.1 必要試薬など

- 0.6M ヨウ化カリウム
- 0.1M ヨウ素酸カリウム
- 0.01M 四ホウ酸ナトリウム十水和物
- Milli-Q 水
- シャーレ
- 撈拌子

3.4.1.2 手順

1. Milli-Q 水 100mL を適当な滅菌容器に測りとり、ヨウ素酸カリウム、四ホウ酸ナトリウム十水和物をそれぞれ 0.1M, 0.01M となるように加え、よく撈拌し溶解させた。
2. ヨウ化カリウムを 0.6M となるように加え、手早く撈拌して溶解させたあと、直ちにシャーレに 10 mL ずつ分注し、アルミ箔で遮光した。
3. シャーレに撈拌子を入れて紫外線感受性試験装置のスターラー台にセットし、0, 5, 10, 15s ずつ紫外線を照射した。各照射時間条件ごとに 2 回ずつ行い、照射後は直ちにアルミ箔で遮光した。
4. 紫外線照射後の試料の波長 352nm における吸光度を測定し、結果から液表面の紫外線照射強度を得た。吸光度の測定には蛍光測定装置 (Aqualog, HORIBA 製) を用いた。

液表面の紫外線照射量の計算は次式 3.1(岩崎電気, 2012)により行った。

$$\Phi = \frac{M}{E} = \frac{\frac{Abs \cdot V \cdot NA}{\varepsilon}}{\frac{Dose \cdot Area \cdot \lambda}{h \cdot c}}$$

$$Dose = Abs \times \frac{V \cdot NA \cdot h \cdot c}{\Phi \cdot \varepsilon \cdot Area \cdot \lambda}$$

$$= 23.4 \times \frac{V}{Area} \times Abs$$

$$= 23.4 \times \frac{10}{21.2} \times Abs$$

$$= 11.0 \times Abs$$

		係数	単位
量子収率	Φ	0.73	—
変化した物質数	M	—	—
吸収された光子数	E	—	—
吸光度 _{352nm}	Abs	—	cm ⁻¹
線量溶体量	V	10	cm ³
アボガドロ数	NA	6.02×10^{23}	mol ⁻¹
モル吸収係数	ε	2.76×10^7	cm ³ ・mol ⁻¹ ・cm ⁻¹
紫外線照射量	$Dose$	—	mJ・cm ⁻²
液表面積	$Area$	21.1	cm ²
波長	λ	2.54×10^{-5}	cm
プランク定数	h	6.63×10^{-31}	mJ・s
光速	c	3.00×10^{10}	cm・s ⁻¹

・・・式 3.1

さらに、式 3.2(Bolton et al., 2003)に従い、試料内の平均紫外線照射量を算出した。

$$Dose_{avg} = WF \times RF \times PF \times Dose_{surface}$$

$$= \frac{1 - 10^{al}}{al \cdot \ln(10)} \times 0.975 \times 0.985 \times Dose_{surface}$$

WF:試料の吸光による原水

RF:試料水面での反射

PF:シャーレ表面での線量率のばらつき

・・・式 3.2

3.4.2 指標微生物の紫外線感受性測定試験

微生物の紫外線感受性は、同じ微生物株であっても培養条件や保存条件、継代培養によって変化する場合がありますため、紫外線照射装置の照射量試験を実施する際には前もって使用する指標微生物の紫外線感受性の測定が、紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準(2012)によって定められている(JWRC, 2012)。本研究では同基準の方法に従い指標微生物の紫外線感受性測定試験を実施した。

手順

1. 指標微生物を含む試料を適量用意し、10mL ずつシャーレに分注した。
2. 試料を分注したシャーレに攪拌子を入れ、スターラーで攪拌しながら紫外線を照射した。照射時間は 0s(Blank)を含めて 4 条件以上で対象微生物に合わせて適切な時間を設

定した。

3. 紫外線照射後の対象微生物の濃度を適切な方法で測定し、紫外線照射量に対する log 不活化率として微生物の不活化曲線を得た。なお、紫外線照射量は照射時間に比例することを利用し、3.4.1 の結果から推定した。
4. 式 3.3(参考:Otaki, 2018)を用いて、得られた不活化曲線から指標微生物の不活化速度定数を決定した。

$$2.3 \times \log_{10} \frac{N}{N_0} = -\frac{\text{Dose}}{D} \quad \dots \text{式 3.3}$$

N:照射後の濃度, No:照射前の濃度

Dose:紫外線照射量, D:不活化速度定数

3.4.3 紫外線照射装置の換算紫外線照射量 (RED) 測定試験

3.4.2 で不活化速度定数を決定した指標微生物を用いて、紫外線照射装置の RED を測定した。実験方法は紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準(2012)を参考にして、以下の方法で行った。

手順

1. 紫外線照射装置の通水前後で適量の試料を採水した。
2. 試料中の指標微生物濃度を 3.4.2 と同様の方法で測定した。
3. 2 の結果から紫外線照射による指標微生物の不活化率を計算した。
4. 式 3.3 を用いて、紫外線照射量(Dose)を計算し、これを使用した指標微生物による紫外線照射装置の RED 測定値とした。

第4章 下水中 F-RNA Phage の紫外線感受性実態の把握

4.1 調査概要

下水中に存在する F-RNA Phage (FRNA フェージ) について、紫外線 (UV) に対する感受性を把握するため、回分式の UV 照射試験を実施した。下水サンプルは大津市内 3 処理場 (A 処理場, B 処理場, C 処理場) 及び沖縄県糸満市内処理場 (I 処理場) の計 4 処理場を対象として採取した。I 処理場では下水処理の後段に UV を利用した下水再生処理設備が設置されており、流水式装置における FRNA フェージの不活化試験を実施できる (5 章で実施)。2 章でも述べた通り、FRNA フェージを生物線量計に利用するためには UV 感受性を把握する必要があるが、変動性の問題などがあり、研究が進んでおらず知見は少ない。

そこで、本章では以下の点を目的として調査を実施した。

- GI, GII, GIII の遺伝子群別に下水中 FRNA フェージの UV 感受性を把握する。
- FRNA フェージの UV 感受性の地点差について把握する。
- FRNA フェージの UV 感受性の変動について把握する。
- 換算 UV 照射量 (Reduction Equivalent UV Dose, RED) 推定の供試微生物として、FRNA フェージの運用方法を検討する。

4.2 MS2 の生物検量線の決定

4.2.1 概要

FRNA フェージの UV 感受性試験において、FRNA フェージへの実 UV 照射量を測定するため、本研究では MS2 を用いた生物線量計を用いた。MS2 を用いた生物線量計では FRNA フェージを含む試料に MS2 を高濃度で添加して UV 照射量を高照射量まで測定できる。一方で、MS2 の UV 感受性について、培養時のホスト菌や培地等の実験条件の差異を含む理由からばらつきが生じる場合があることが報告されている (Gabriel Chevretils et al., 2006, USEPA. 2006.)。

したがって、4.2 では、本研究の実験条件における MS2 の UV 感受性を、ヨウ化カリウムを用いた化学線量計によって決定した。実験方法は岩崎電気(2012)の方法に従った。

使用した宿主菌および MS2 は、*E. coli* K12F+(A/λ) (NBRC13965) と Bacteriophage MS2 (NBRC102619) を用いた。Ueshino (2004) の方法に従い *E. coli* K12F++(A/λ) をホスト菌として LB 培地・10mL 遠沈管で MS2 を培養し、 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU/mL 程度の MS2 培養液を得た。培地成分を限外ろ過膜を用いてリン酸緩衝液で置換し、さらにリン酸緩衝液で MS2 濃度が $10^7 \sim 10^8$ PFU/mL 程度になるように希釈し、実験に供した。MS2 の測定には *E. coli* K12 F+ をホストとして用いた重層寒天培地法を用いた。

実験装置の写真を図 4.1 に、詳細な実験条件を表 4.1 に示す。

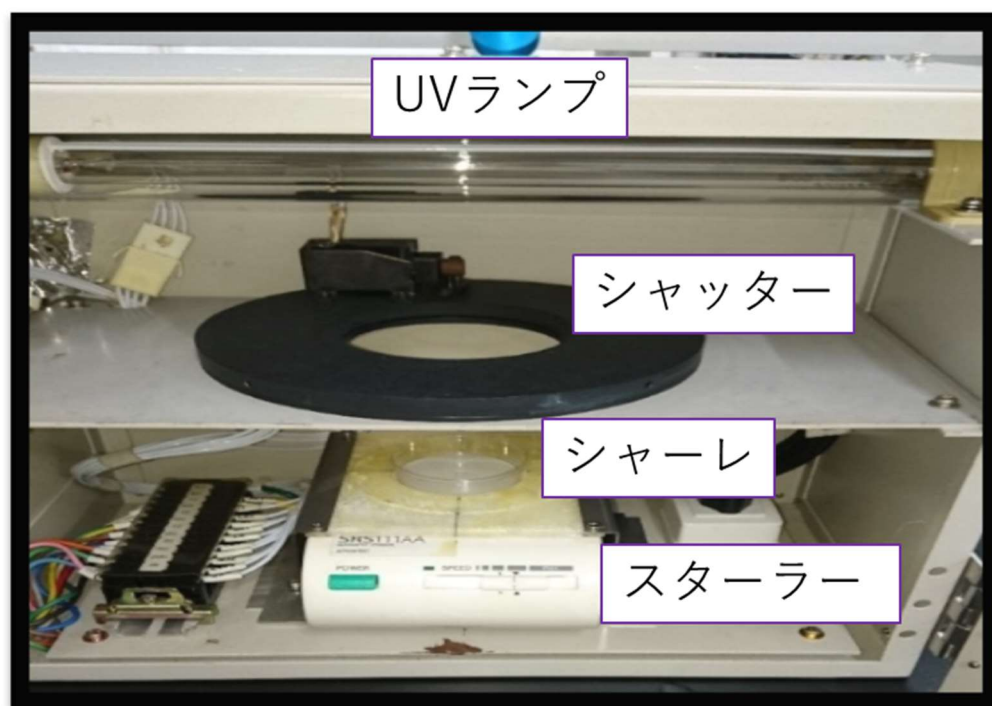


図 4.1 実験装置写真

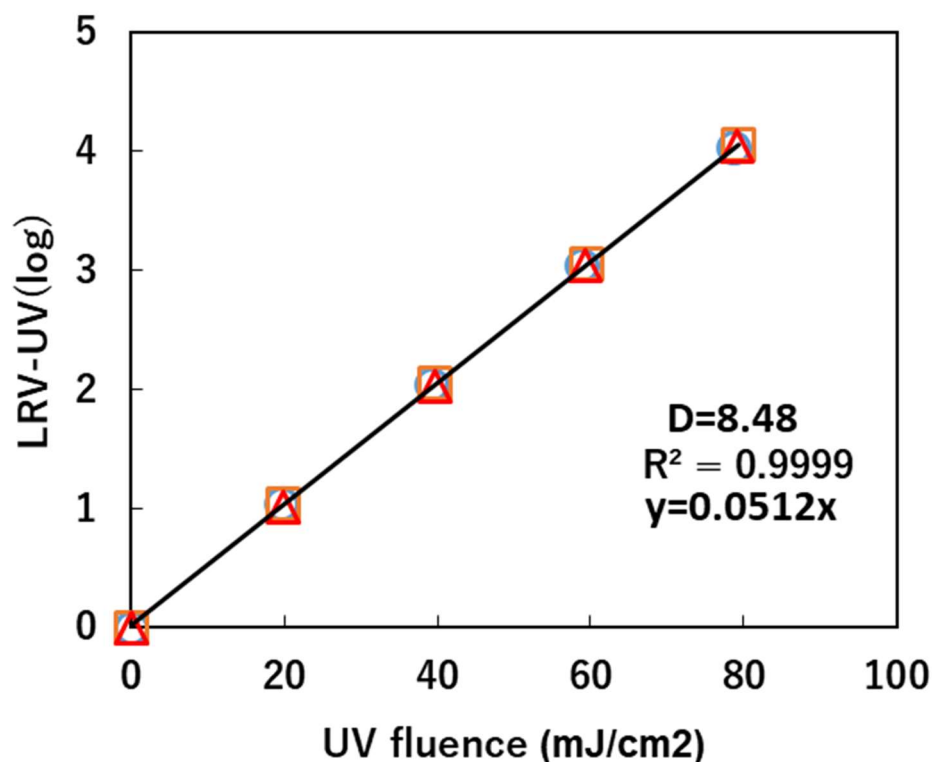
表 4.1 MS2 の UV 感受性推定試験条件

項目	内容	備考
紫外線ランプ	岩崎電気製 (GL-8-2)	波長 …254 nm
指標微生物	大腸菌ファージMS2	宿主菌 ; <i>E. coli</i> (NBRC番号 : 102619)
試験水	MilliQ水	
試料分光透過率	98.30%	波長 …254 nm,
		セル長…10 mm,
		測定器…蛍光測定装置 (Aqualog) (HORIBA)
照射時間	0, 30, 60, 90, 120 s	シャッターにて制御
試験水の水量	10 ml	ペトリ皿内の水層厚 ; 0.50 cm

4.2.2 結果

MS2 の UV 感受性試験結果を、化学線量計による UV 照射量(UV fluence)推定値に対する MS2 の対数不活化率 (LRV-UV) として図 4.2 に示した。MS2 の不活化速度定数は $D=8.48 \text{ mJ/cm}^2$ となり、宿主菌として本研究と同様に *E.coli* K12 を用いた場合とほぼ同等の値となった(Gabriel Chevretils et al., 2006. Sommer R. et al., 1998, 2001)。

結果より、MS2 は UV 照射量 80 mJ/cm^2 程度以下では直線的にほぼ一定の速度で不活化されることが確認できた。



白抜き丸・四角・三角プロット：N=1~3 の各 MS2 対数不活化率

黒実線：全プロットの線形回帰

図 4.2 MS2 の対数不活化率と UV 照射量

4.3 下水中 F-RNA Phage の UV 感受性試験

4.3.1 概要

2017 年 11 月から 2018 年 12 月にかけて、対象とした 4 処理場(A 処理場, B 処理場, C 処理場, I 処理場)の流入下水を採水し、UV 感受性試験に供した。実施日を表 4.2 に示す。実験方法は UV 照射装置 JWRC 技術審査基準(2012)に準拠し、岩崎電気(2012)の方法を参考に実施した。

流入水試料は 360 mL を滅菌済み容器（マイティパック, 360 mL, マルエム）へ採水した。採水した試料は 0.45 μ m フィルターでろ過し、懸濁粒子を取り除いた後、ただちに試験に供した。また、I 処理場試料については採水後遮光を施し、保冷したまま輸送し、48 時間以内に実験に供した。

UV 照射時間は 30 s, 60 s, 90 s とし、照射前の濃度と比較して GI-FRNA ファージ, GII-FRNA ファージ, GIII-FRNA ファージそれぞれについて対数除去率を算出した。FRNA ファージ(GI, GII, GIII)の測定には IC-PCR 法により WG49 を宿主として実施した。

4.3.2 UV 照射量推定試験

4.3.1 の試験において、試料への実 UV 照射量を測定するため、MS2 を用いた生物線量計による UV 照射量推定試験を実施した。

4.3.1 において $0.45 \mu\text{m}$ でろ過した試料を 100 mL 取り分け、高濃度の MS2 を添加したものを 4.3.1 と同様の照射条件で UV 感受性試験に供した。結果より、それぞれの試料において、UV 照射時間 30 s, 60 s, 90 s でのシャーレ内の平均照射量を得た。

MS2 の測定には *E. coli* K12 F+ を宿主として用いた重層寒天培地法を用いた。

MS2 の不活化率から UV 照射量への換算は次式 4.1 により行った(Otaki, 2018)。MS2 の不活化速度定数は 4.2 の結果 ($D=8.48\text{mJ}/\text{cm}^2$) を用いた。

$$\text{UV fluence (mJ}/\text{cm}^2) = -D_{\text{MS2}} (\text{mJ}/\text{cm}^2) \times 2.3 \log_{10} \frac{\text{照射後の MS2 濃度 (PFU/L)}}{\text{照射前の MS2 濃度 (PFU/L)}} \quad (\text{式 4.1})$$

表 4.2 感受性試験実施日

調査月	2017					2018								
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A処理場	○	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-	-
B処理場	○	-	○	○	○	-	-	-	○	-	-	-	-	-
C処理場	○	-	○	○	○	-	-	-	○	-	-	-	-	-
I処理場	-	2※	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○

○：実施，※：別日に 2 回実施

4.3.3 結果及び考察

対象とした 4 下水処理場について、それぞれ UV 照射量に対する GI, GII, GIII-FRNA フェージの対数除去率を図 4.3～図 4.6 に示した。それぞれの UV 不活化速度定数 D_{mean} を表 4.3 にまとめた。また、 $0.45 \mu\text{m}$ 膜ろ過処理後の試料の UV 透過率を表 4.4 に示した。 D_{mean} は試験ごとの不活化速度定数の平均値を表す。なお、GIII-FPH は UV 照射後に検出下限を下回る場合があったため、検出された UV 照射条件のみプロットし、また解析に用いた。

UV 感受性は GI タイプがもっとも低く ($D_{\text{mean}}=8.15\sim8.66 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)、次いで GII タイプ ($D_{\text{mean}}=7.05\sim7.55 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)、感受性が最も高いのは GIII タイプ ($D_{\text{mean}}=4.97\sim5.59 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) となった。

下水中の FRNA フェージにおいて、UV 感受性は $\text{GI}<\text{GII}<\text{GIII}$ となる可能性が報告されており (Suntae Lee et al., 2018, Maite Muniesa et al., 2009)、本調査においても同様の結果を得た。

RNA フェージの UV 感受性については、RNA 鎖のウラシルの含有率が原因となっている可能性が指摘されている。UV による RNA ウイルスの不活化は UV 照射によるウラシル 2 量体の形成によって感染力を失うことで起こる (Miller RL et al., 1974)。さらに、GI, GII, GIII-FRNA フェージのそれぞれ最も主要なフェージである MS2(GI), GA(GII), Q β (GIII)のウラシルのモル含有率は Q β (30%)>GA(28%)>MS2(24%) であり、これらの単離株の感受性は純水系において Q β >GA>MS2 (Kohsuke FURUSE et al., 1967)であり、ウラシル含有率と一致する。したがって、下水中に存在する GI, GII, GIII-FRNA フェージにおいて、それぞれ主要なフェージの影響が大きく現れ、UV 感受性が GI<GII<GIII となったのではないかと考えられる。

また、UV 感受性の地点差に関して、大津市内 3 処理場(A, B, C 処理場)と沖縄県 I 処理場では大きな違いは見られなかった。

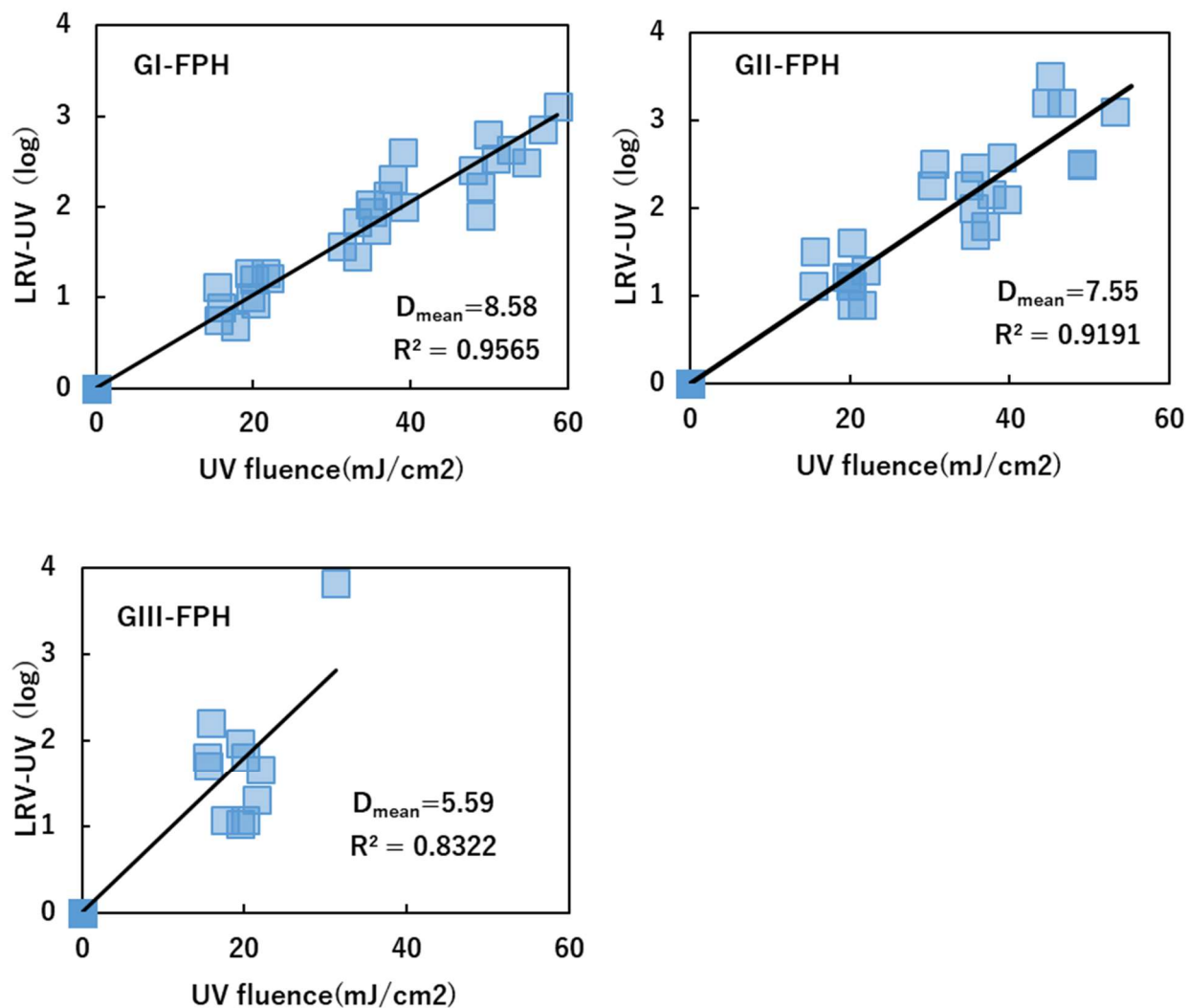
UV 消毒を下水再生処理に適用する場合、70mJ/cm²を超えるような高照射量の装置が利用される場合がある(B-dash 評価書, 2018, 「下水処理の高度再生造水システムに関する実証事業」)。このような高照射量の装置に対し、GI, GII, GIII の遺伝子群のうち、生物検量線の指標微生物としてより適切なのは GI-FRNA フェージと考えられる。

表 4.3 各処理場における GI, GII, GIII-FRNA フェージの不活化速度定数

	D _{mean} (mJ/cm ²)		
	GI	GI	GIII
A処理場	8.58	7.55	5.59
B処理場	8.15	7.51	5.17
C処理場	8.66	7.05	4.97
I処理場	8.59	7.66	5.09

表 4.4 各実験日程の UV 透過率 (%)

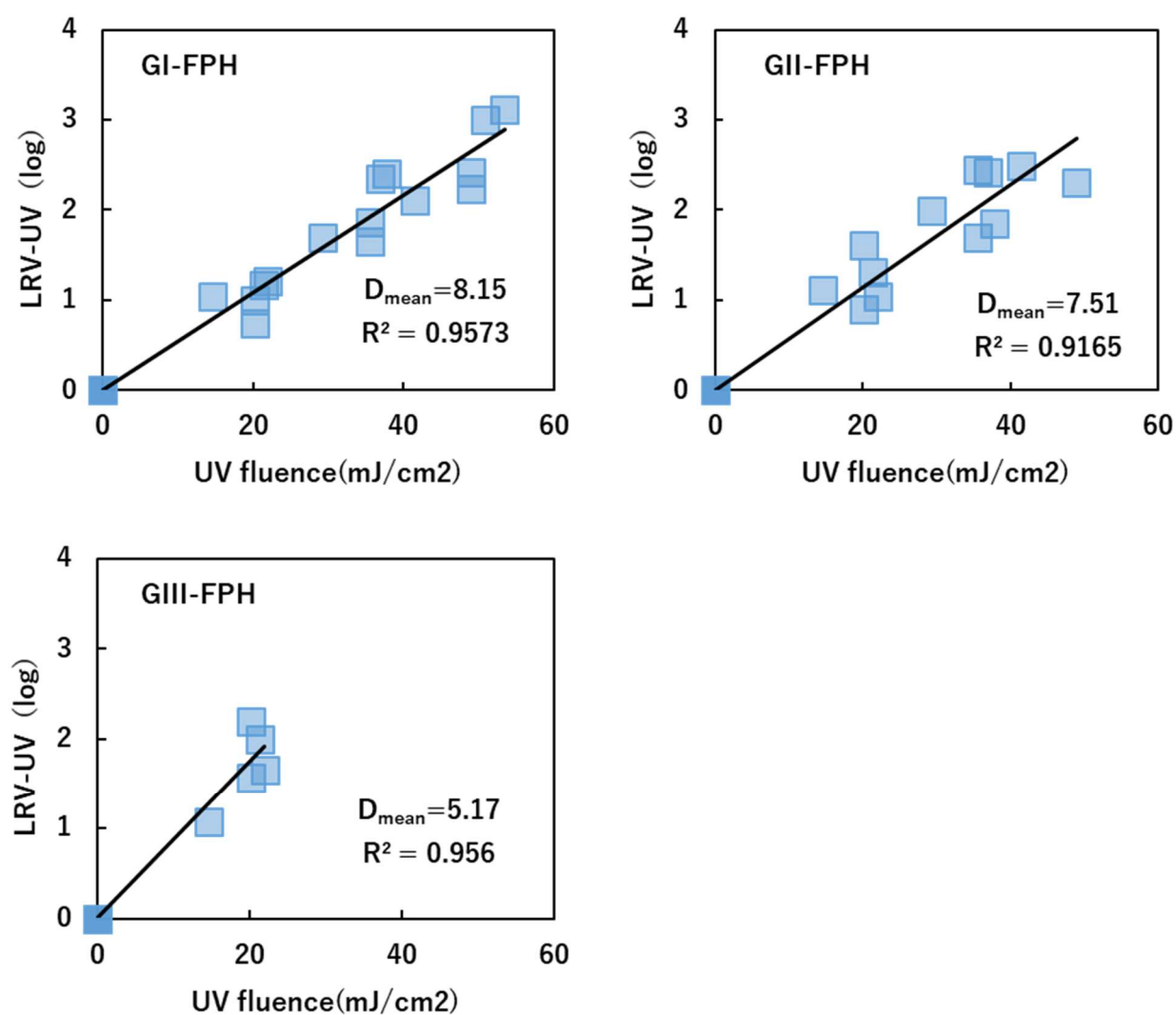
調査月	2017				2018									
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A処理場	55	-	55.8	58.2	59.5	57.6	65	64.5	60.8	65.4	72.2	-	-	-
B処理場	57	-	54.8	61.7	64.3	-	-	-	49.8	-	-	-	-	-
C処理場	61.6	-	62.1	58.4	66.8	-	-	-	66.1	-	-	-	-	-
I処理場	-	50.9, 50.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63.0	-	62.1



※GIII-FPH は UV 照射後に検出下限を下回る場合があったため、検出された条件のみ
用いた

D_{mean} は試験ごとの不活化速度定数の平均値を表す

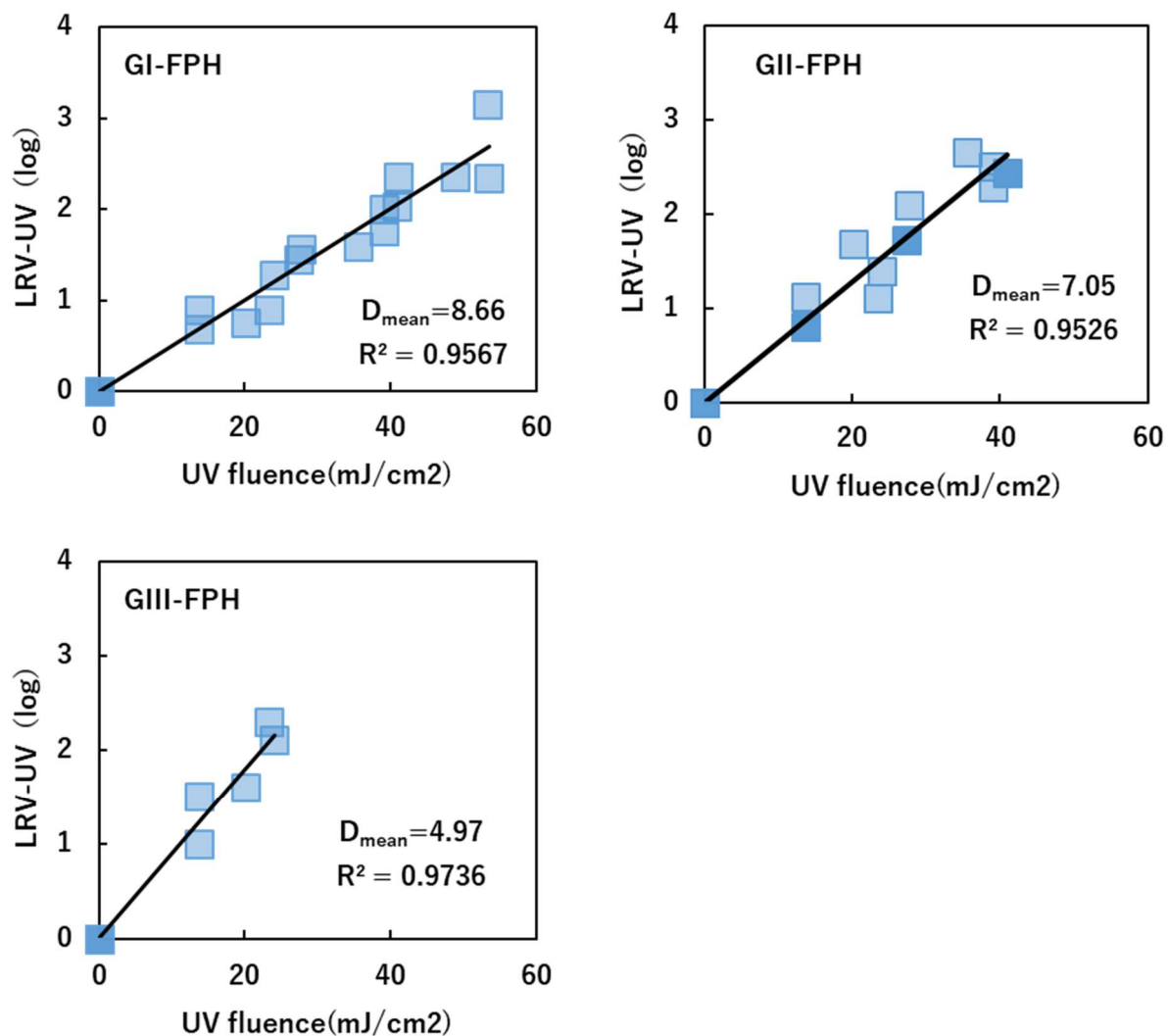
図 4.3 A 処理場における下水中 FRNA フェージの UV 感受性試験結果



※GIII-FPH は UV 照射後に検出下限を下回る場合があったため、検出された条件のみ
用いた

D_{mean} は試験ごとの不活化速度定数の平均値を表す

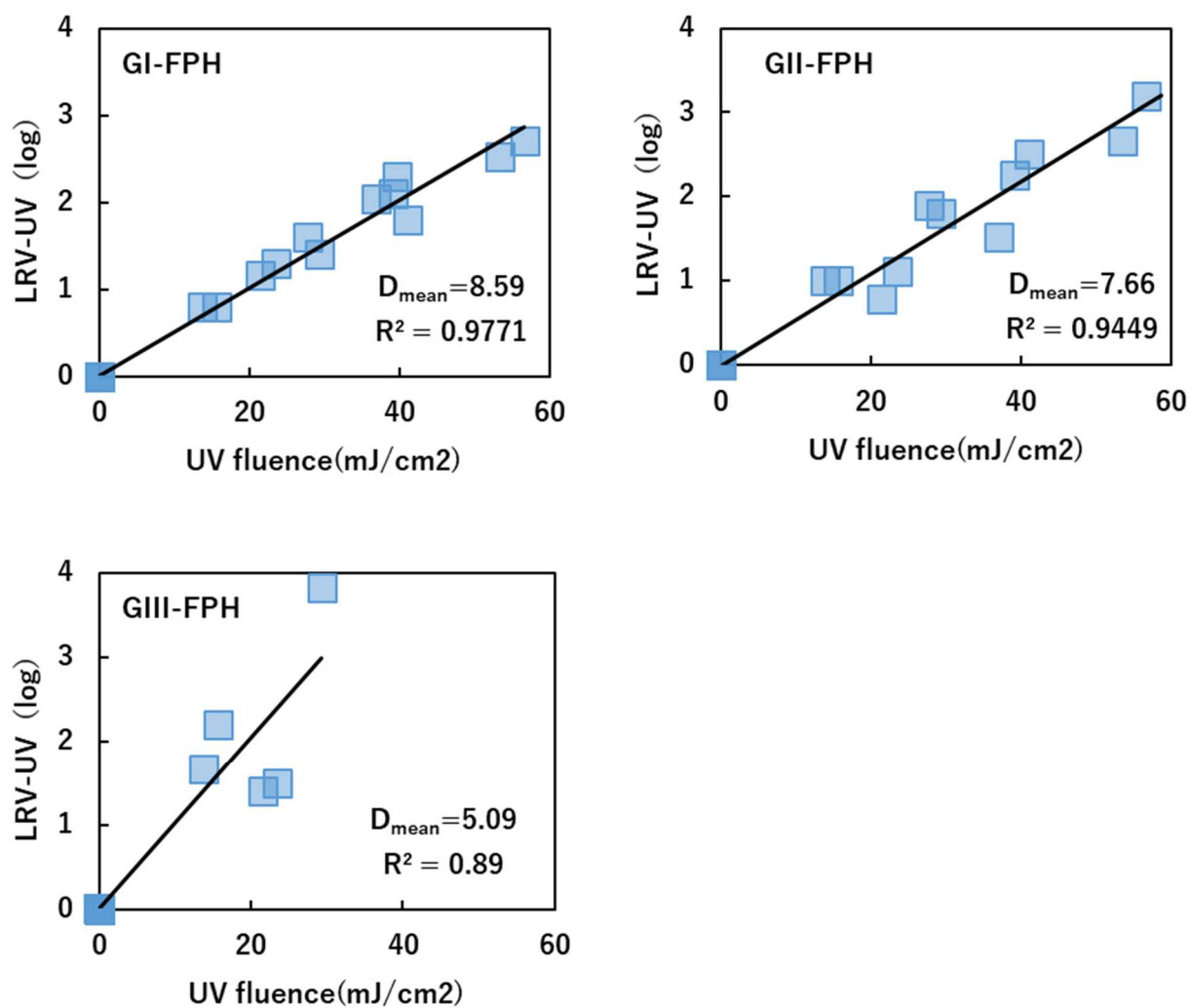
図 4.4 B 処理場における下水中 FRNA フェージの UV 感受性試験結果



※GIII-FPH は UV 照射後に検出下限を下回る場合があったため、検出された条件のみ
用いた

D_{mean} は試験ごとの不活化速度定数の平均値を表す

図 4.5 C 処理場における下水中 FRNA フェージの UV 感受性試験結果



※GIII-FPH は UV 照射後に検出下限を下回る場合があったため、検出された条件のみ
用いた

D_{mean} は試験ごとの不活化速度定数の平均値を表す

図 4.6 I 処理場における下水中 FRNA フェージの UV 感受性試験結果

4.4 生物線量計として利用する場合の F-RNA Phage の変動に関する考察

4.3 の結果より下水中の FRNA フェージの UV 照射量に対する不活化率は MS2 単離株と比較してばらつきが大きいことが確認できた。したがって、FRNA フェージを生物線量計の供試微生物として UV 照射量を推定する際にはこのばらつきの取り扱いが重要である。

ここでは FRNA フェージを MS2 の代替微生物として生物線量計の供試微生物に利用する場合の方法について考察する。

本実験で対象とした 4 処理場(A, B, C, I 処理場)において、GI, GII, GIII の遺伝子群別にそれぞれの不活化速度定数 D の信頼度 95%の信頼区間として図 4.7 に示した。GI-FRNA フェージは平均からの信頼区間が一定して小さかった。一方で GII-FRNA フェージ, GIII-FRNA フェージは平均からの信頼区間が大きくなる場合があった。このことから、GI, GII, GIII の遺伝子群では GI タイプが最も UV 感受性の変動が小さい可能性が示唆された。生物検量線の供試微生物は再現性の高さが重要なため (JWRC, 2012)、再現性の観点から GI タイプが GI, GII, GIII の遺伝子群の中で生物検量線の供試微生物として適切だと考えられる。

また、不活化速度定数 D が高く推定されるほど実際の装置性能を評価する際に利用する換算 UV 照射量(Reduction Equivalent UV Dose, RED)測定値は大きく推定される。RED が本来よりも大きく推定された場合、実際には設計 RED を満たしていない装置において目標 RED を達成したとみなされてしまうリスクがある。したがって、不活化速度定数がばらつく可能性がある以上、生物検量線の供試微生物として利用する際には信頼区間の下限値での利用が、より安全側での利用方法だと考えられる。

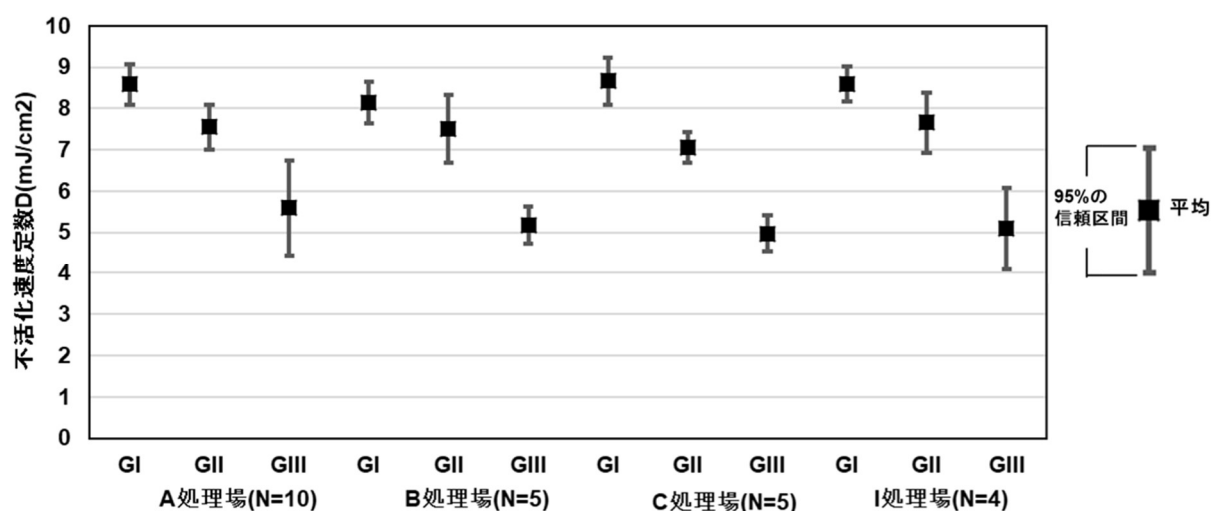


図 4.7 FRNA フェージの不活化速度定数変動

4.5 2 次処理水中 F-RNA Phage の UV 感受性調査

4.5.1 概要

2 次処理水中の FRNA ファージについて 2018 年 10 月~12 月に各 2 回ずつ UV 感受性試験を実施した。A, I 処理場を対象とし、2 次処理水試料は 360 mL を滅菌済み容器（マイティーパック, 360 mL, マルエム）へ採水した。採水した試料は 0.45 μ m フィルターでろ過し、懸濁粒子を取り除いた後、ただちに試験に供した。また、I 処理場試料については採水後遮光を施し、保冷したまま輸送し、48 時間以内に実験に供した。

UV 照射時間は 10 s, 20 s, 30 s とし、照射前の濃度と比較して GI-FRNA ファージ, GII-FRNA ファージ, GIII-FRNA ファージそれぞれについて対数除去率を算出した。

FRNA ファージ(GI, GII, GIII)の測定には IC-PCR 法により WG49 を宿主として実施した。なお、検出下限を下回ったデータは精度向上のため解析に用いず、除外した。

4.5.2 結果および考察

対象とした A, I 両処理場について、GI, GII-FRNA ファージの UV 照射量に対する対数除去率として図 4.8 に示した。なお、GIII-FRNA ファージについては UV 照射時間 10s の時点で濃度が検出下限を下回ったため、除去率が得られなかった。また、各実験日程での UV 透過率を表 4.5 に示した。

GI, GII-FRNA ファージの不活化速度定数 D は両処理場ともに下水中の FRNA ファージの不活化速度定数と近い値となった。これは第 4 章 4.4 の図 4.7 で 1 度示した下水中の FRNA ファージの不活化速度定数 D の 95%信頼区間内であり、GI, GII-FRNA ファージの UV 感受性は下水処理の前後でほとんど変化しない可能性が示唆された。

表 4.5 各実験日程の UV 透過率 (%)

調査月	2018		
	10	11	12
A処理場	-	74.2	71.2
I処理場	75.4	-	78.9

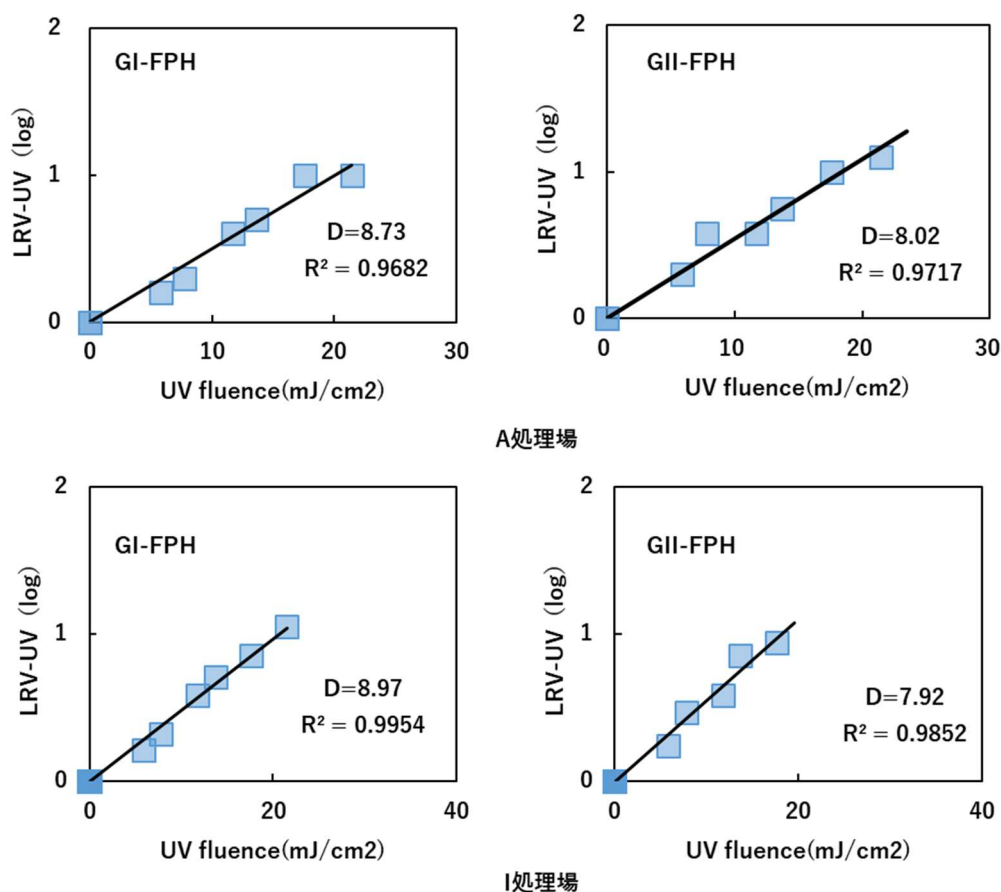


図 4.8 2次処理水中 FRNA ファージの UV 感受性結果

4.6 FRNA ファージの生物線量計としての利用方法に関する考察

本章の結果より、FRNA ファージの生物線量計としての特徴に以下のことが考えられる。

- GI, GII, GIII の遺伝子群の内、GI-FRNA ファージが最も UV 感受性が低く、高照射量の装置への利用に適している。
- GI, GII, GIII の遺伝子群の内、GI-FRNA ファージが最も UV 感受性の変動が低い可能性があり、生物検量線の指標微生物としてより適している。また、安全側での運用という観点から、UV 照射装置への適用の際には、不活化速度定数 D は 95%信頼区間の下限値を利用するのが望ましいと考えられる。
- 20mJ/cm² 程度までの UV 照射量では、GI, GII-FRNA ファージの UV 感受性は下水処理の前後でほとんど変化しない可能性が示唆された。

これらのことから、FRNA ファージを生物検量線として利用する場合には、GI-FRNA ファージを利用し、不活化速度定数 D は 95%信頼区間の下限値で UV 照射量を計算することがより適切と考えられる。

4.7 本章のまとめ

本章では下水中に存在する FRNA ファージについて、UV に対する感受性を把握するため、大津市内 3 処理場（A 処理場, B 処理場, C 処理場）及び沖縄県糸満市内処理場（I 処理場）の計 4 処理場を対象として調査を行った。その結果から、GI, GII, GIII の遺伝子群別に下水中 FRNA ファージの UV 感受性を得た。さらに、FRNA ファージの FRNA ファージ UV 感受性の変動について考察した。また、換算 UV 照射量 (Reduction Equivalent UV Dose, RED) を推定する生物検量線の供試微生物として、FRNA ファージの運用方法を検討した。本章で得られた知見を以下にまとめた。

1. 下水試料中の FRNA ファージに対する UV 感受性試験より、GI, GII, GIII の遺伝子群のうち、UV 感受性は $GI < GII < GIII$ となることが示された。それぞれ主要なファージの UV 感受性 ($MS2(GI < GA(GII) < Q\beta(GIII))$) と一致することから、UV 感受性は主要なファージの影響を大きく受けているものと考えられた。
2. UV 消毒を下水再生処理に適用する場合には $70\text{mJ}/\text{cm}^2$ を超えるような高照射量の装置が利用される場合がある。このような高照射量の装置に対して、UV 感受性が $GI < GII < GIII$ となったことから、GI, GII, GIII の遺伝子群のうち、生物検量線の指標微生物としてより適切なのは GI-FRNA ファージと考えられた。
3. 下水試料中の FRNA ファージに対する UV 感受性試験の結果より、対象とした 4 処理場 (A 処理場, B 処理場, C 処理場, I 処理場) において、GI, GII, GIII の遺伝子群全てで UV 感受性に大きな差は見られなかった。
4. 下水試料中の FRNA ファージに対する UV 感受性試験の結果より、下水試料中 FRNA ファージの UV 感受性は、実験ごとにある程度ばらつくことが確認された。ばらつきを信頼度 95% の区間として表すと、GI, GII, GIII の遺伝子群では GI タイプが安定して区間が狭くなる傾向があった。そのため、GI-FRNA ファージが生物検量線の供試微生物としてより利用しやすいと考えられた。
5. 2 次処理水中の FRNA ファージに対する UV 感受性試験の結果から、 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 程度までの UV 照射量では GI, GII-FRNA ファージの UV 感受性は下水処理の前後でほとんど変化しない可能性が示唆された。
6. 以上のことから、FRNA ファージを生物検量線として利用する場合には、GI-FRNA ファージを利用し、不活化速度定数 D は 95% 信頼区間の下限値で UV 照射量を計算することがより適切と考えられた。

第 5 章 紫外線処理施設における F-RNA Phage を利用した UV 照射量評価

5.1 概要

第 4 章では下水中 FRNA ファージの紫外線感受性試験を行い、GI, GII, GIII の遺伝子群別に FRNA ファージの不活化速度定数を把握した。さらに、紫外線 (UV) 照射装置の RED 測定に用いるための利用方法について検討し、GI-FRNA ファージの利用可能性が示唆された。

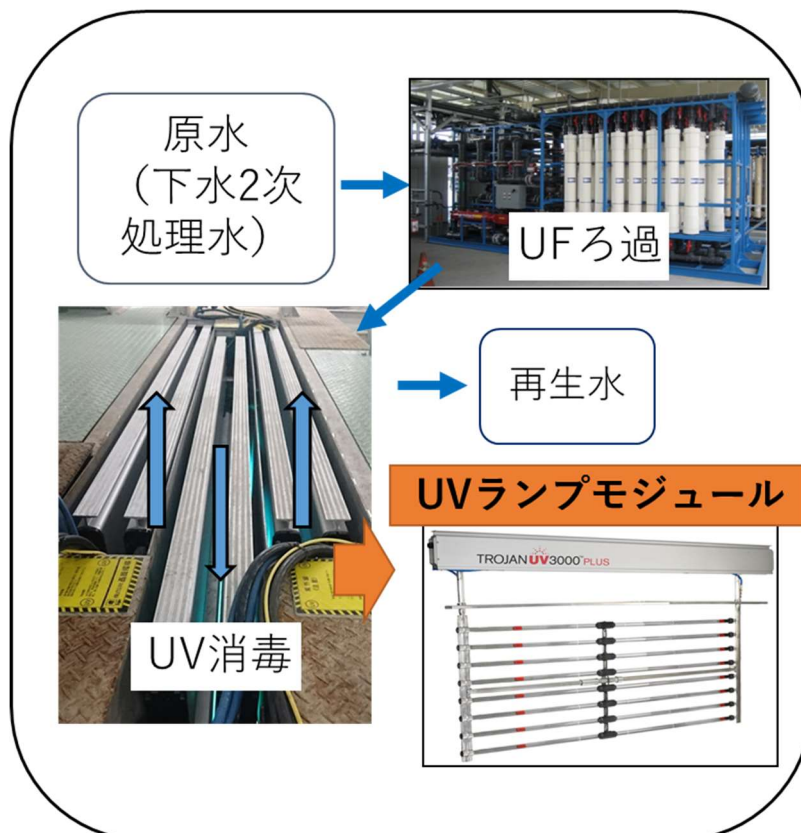
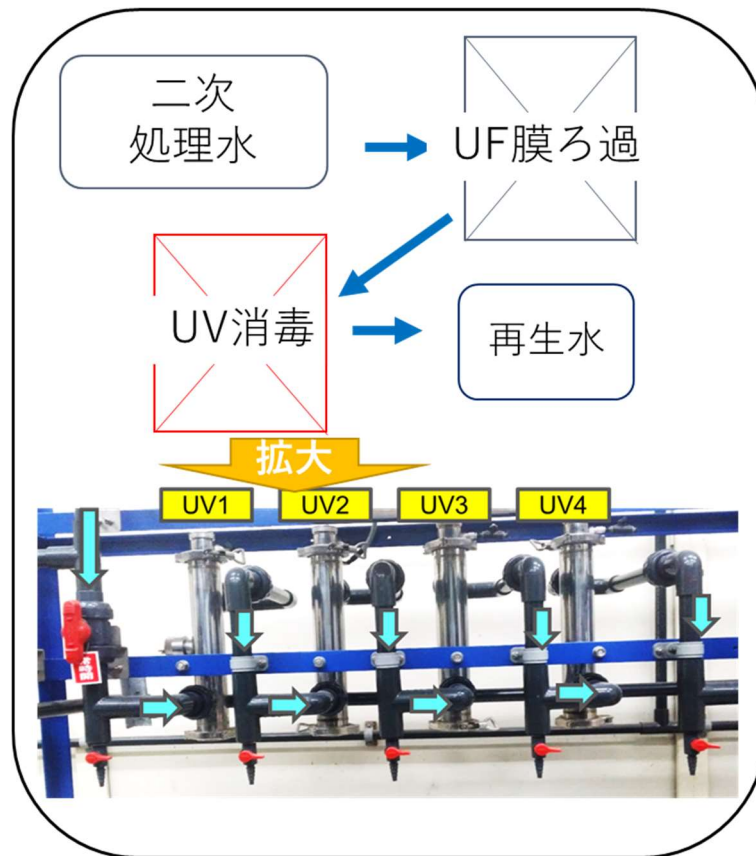
本章では、沖縄県 I 処理場にある限外ろ過 (UF) 膜と紫外線消毒を適用した下水再生水処理実験施設を利用し、実験施設での GI-FRNA ファージによる RED 測定方法について検討した。I 処理場の装置概要を図 5.1 および表 5.1 に示す。I 処理場では処理流量 10 m³/day のパイロットプラントと 1000 m³/day の実証プラントが設置されている。これらの施設では下水再生利用基準の「title22」(State of California, 2014.)および WHO(2006)をもとに UV 照射装置の紫外線照射量が RED=85mJ/cm² となるように運転することが規定されている (B-dash 評価書, 2018.)。

パイロットプラントは I 処理場の下水 2 次処理水を原水とし、前段に UF ろ過処理、後段に UV 消毒処理のシステム構成である。パイロットプラントの UV 照射装置は滞留時間が十数秒程度の小規模な閉鎖管路内照型を採用しており、MS2 を用いた RED 測定試験が実施可能である。したがって、4 章のラボ実験で UV 照射量測定の供試微生物として有効性が示唆された GI-FRNA ファージについて、パイロットプラントでも従来の指標微生物である MS2 との比較試験が可能であり、ラボ実験から流水式の UV 照射装置に拡張して GI-FRNA ファージの有効性を検討できる。

実証プラントはパイロットプラント同様、下水 2 次処理水を原水とした UF ろ過処理・UV 消毒処理の 2 段階処理システムである。実証プラントは滞留時間 5~10 分程度の開水路浸漬型の UV 照射装置が設置されており、実際の下水処理施設に近い規模で試験が可能である。実証プラントでは MS2 の添加実験が実施困難なため、現在までに装置性能が実測によって検討できていないという問題がある。

以上より、以下の目的を設定した。

- パイロットプラントを用い、従来法である MS2 の添加試験と比較することで、流水式装置における下水中 GI-FRNA ファージを用いた UV 照射量測定の妥当性について検討する。(5.2.1- 5.2.3)
- パイロットプラントを用い、CFD モデル解析との比較により下水中 GI-FRNA ファージを用いた UV 照射量測定の妥当性を検討する。(5.2.3- 5.2.4)
- GI-FRNA ファージを実証プラントの UV 照射量測定に適用し、装置性能の評価を試みる。(5.4)



上：パイロットプラント，下：実証プラント
図 5.1 I 処理場下水再生施設の処理フロー

表 5.1 UV 処理装置の概要

上：パイロットプラント，下：実証プラント

形式	密閉管路内照式
システム構成	直列 4 連
UV ランプ	低圧水銀ランプ, 岩崎電気製 (QGL-8W-22) , 2.0W
Trojan UV3000plus(Trojan製)	
UV ランプ	低圧水銀ランプ, 250W
システム構成	直列 3 連 (平常時は 2 列点灯)
保護管	石英ガラス
調光制御	出力を 60-100% の範囲で調節可能

5.2 パイロット施設における F-RNA Phage を利用した UV 照射量評価の検討

I 処理場のパイロットプラントを用いて、流水式装置における下水中 GI-FRNA ファージを用いた UV 照射量測定の妥当性について検討した。実験・考察のフローを図 5.2 に示す。

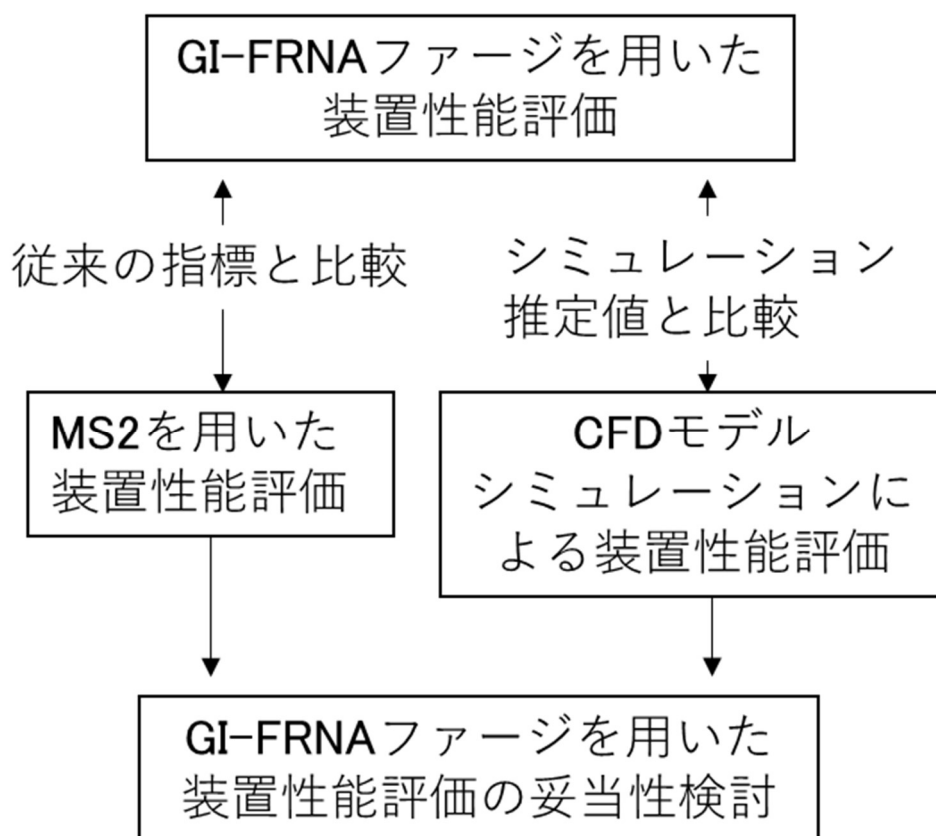


図 5.2 実験・考察のフロー

5.2.1 指標微生物 MS2 によるパイロット施設の RED 測定

5.2.1.1 概要

パイロットプラントの紫外線照射装置について、指標微生物である MS2 を用いて RED を測定した。この指標微生物は、USEPA (2006)、カリフォルニア州 (2014)、水道技術センターなどの UV 消毒マニュアルでは、UV 照射装置の RED を求める方法として標準的に使われている。実施日程を表 5.2 に示す。実験方法は Lee (2015) を参考にし、以下の手順で実施した。また、詳細な実験条件を表 5.3 に示す。

1. *E.coli* K12F+(A/λ) を宿主菌として LB 培地で MS2 を培養し、 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU/mL の培養液を得た。この培養液をパイロットプラントの原水タンクに UV 照射直前の MS2 濃度が $10^4 \sim 10^5$ PFU/mL 程度となるように添加した。
2. パイロットプラントを流量 2, 4, 6 (L/min) となるように運転し、4 連の UV 照射装置 (UV1, UV2, UV3, UV4) のそれぞれの処理後に 360 mL を滅菌済み容器 (マイティーパック、

360 mL, マルエム)で採水した。試料は採水後速やかに遮光し、保冷したまま輸送した。

3. 採水から 48 時間以内に *E.coli* K12F+(A/λ) を宿主菌として LB 培地を用いたブラック法で測定し、4 連の UV 照射装置通過後の試料からの不活化率を算出した。さらに、4 章で決定した MS2 の不活化速度定数($D=8.48\text{mJ}/\text{cm}^2$)を用いて RED を推定した。

表 5.2 MS2 による RED 測定試験実施日程

試験実施日	紫外線透過率(%)	流量条件(L/min)		
		6	4	2
2017/12/18	75.5	○	—	—
2018/9/4	81.5	○	○	○
2018/10/30	82.0	○	○	○
2018/12/12	78.6	○	○	○

表 5.3 MS2 による RED 測定試験条件

項目	内容	備考
紫外線ランプ	岩崎電気製 (QGL-8W-22)	波長 …254 nm
試料分光透過率	74-82%	波長 …254 nm,
		セル長…10 mm,
		測定器…蛍光測定装置 (Aqualog)
		(HORIBA)
流量	2, 4, 6 L/min	装置容量約680mL

5.2.1.2 結果と考察

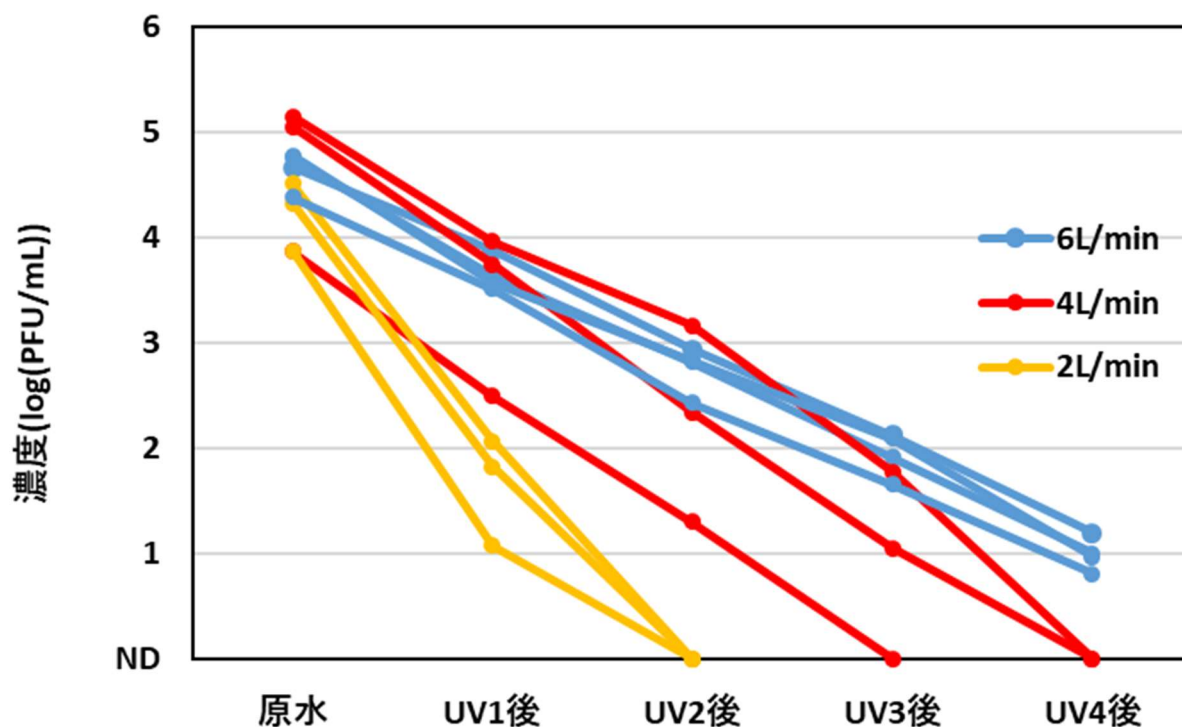
各装置通過後・各流量における MS2 の濃度測定結果を図 5.3 に示す。

各装置通過後・各流量における RED 値として結果を図 5.4 に示す。なお、図 5.4 は濃度測定時に検出された試料のみをプロットした。

図 5.4 より、流量 6L/min では、RED は UV 1 本目後で平均 18.7 mJ/cm^2 であり、UV2 本目 (35.3 mJ/cm^2), 3 本目 (50.5 mJ/cm^2), 4 本目 (68.2 mJ/cm^2) と通水した UV ランプモジュールの本数にほぼ比例して増加した。流量 4L/min も RED は同様に比例して増加した。

また、6L/min, 4L/min, 2L/min の UV1 本目後の RED を比較すると、それぞれ 18.7 mJ/cm^2 , 24.1 mJ/cm^2 , 48.2 mJ/cm^2 となっており、流量にほぼ逆比例して増加した。

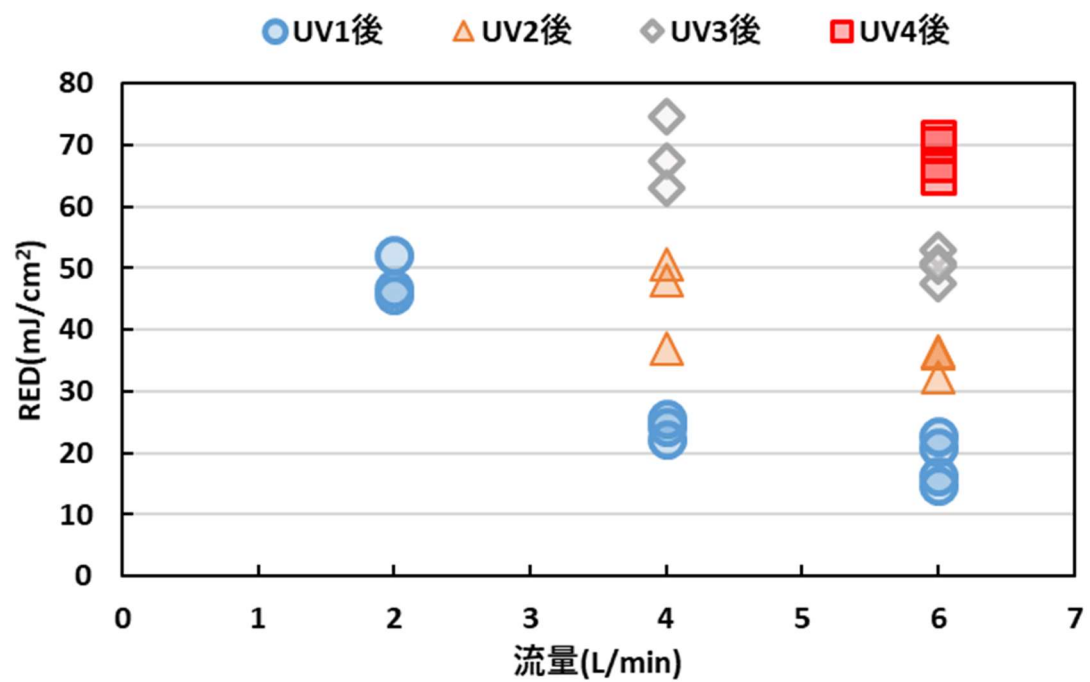
本試験では、MS2 の添加試験により最大で 74 mJ/cm^2 まで装置の RED 値を推定できた。



6 L/min: n=4, 2, 4 L/min: n=3

UV1-4 後 : UV モジュール 1 本目から 4 本目それぞれを
処理水が通過した直後に採水したサンプルを表す

図 5.3 MS2 の濃度測定結果



6 L/min: n=4, 2, 4 L/min: n=3

UV1-4 後 : UV モジュール 1 本目から 4 本目それぞれを
処理水が通過した直後に採水したサンプルを表す

図 5.4 MS2 による RED 測定試験結果

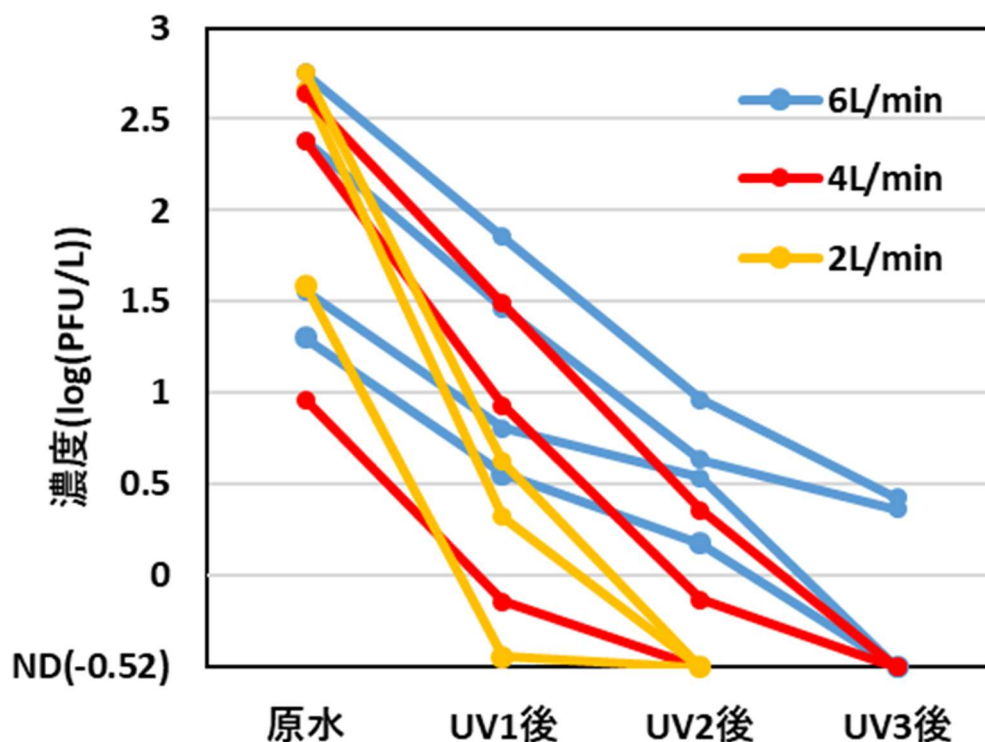
5.2.2 GI-F-RNA Phage を利用したパイロット施設の RED 測定

5.2.2.1 概要

パイロットプラントの UV 照射装置について、第 4 章で UV 照射量試験の供試微生物として有効な可能性が示唆された下水にもともと含まれる GI-FRNA ファージを用いて RED を推定した。実施は 5.2.1 と同じ日程で実施した。なお、GI-FRNA ファージに MS2 も含まれるので、MS2 添加による GI-FRNA ファージの測定値への影響を避けるため、念のため、5.2.1 の実験前に試験を実施した。パイロットプラントを 5.2.1 と同様に流量 2, 4, 6(L/min)となるように運転し、4 連の UV 照射装置の 1-3 本目までをそれぞれの処理後に 4L を滅菌済み容器（マイティーパック, 1.8 L, マルエム）で採水した。UV4 本目については、事前の調査により検出されないことが確認されていたため除外した。試料は採水後速やかに遮光し、保冷したまま輸送した。試料は採水から 48 時間以内に WG49 を宿主菌とした IC-RT-PCR 法(Hata et al., 2016)で測定した。検水量は 1L, 100mL, 10mL, 1mL で実施した。

5.2.2.2 結果と考察

実験原水と 4 連の UV 照射装置をそれぞれ通過後の GI-FRNA ファージ濃度測定結果を図 5.5 に示す。原水中の GI-FRNA ファージ濃度は高い場合で 2.4-2.8 log(PFU/L)程度、低い場合で 1.3 log(PFU/L)前後だった。6L/min, 2L/min の条件で、濃度 1 log(PFU/L)を下回ったあたりからテーリングが生じるサンプルが発生し始め、4L/min においても検出下限値に近づくとテーリングする傾向がみられた。GI-FRNA ファージを UV 照射量測定に利用する際には、低濃度におけるテーリングの影響に注意する必要があると考えられる。



青点・線：6L/min, 赤点・線：4L/min, 黄点・線：2L/min

6 L/min: n=4, 2, 4 L/min: n=3

UV1-4 後：UV モジュール 1 本目から 4 本目それぞれを

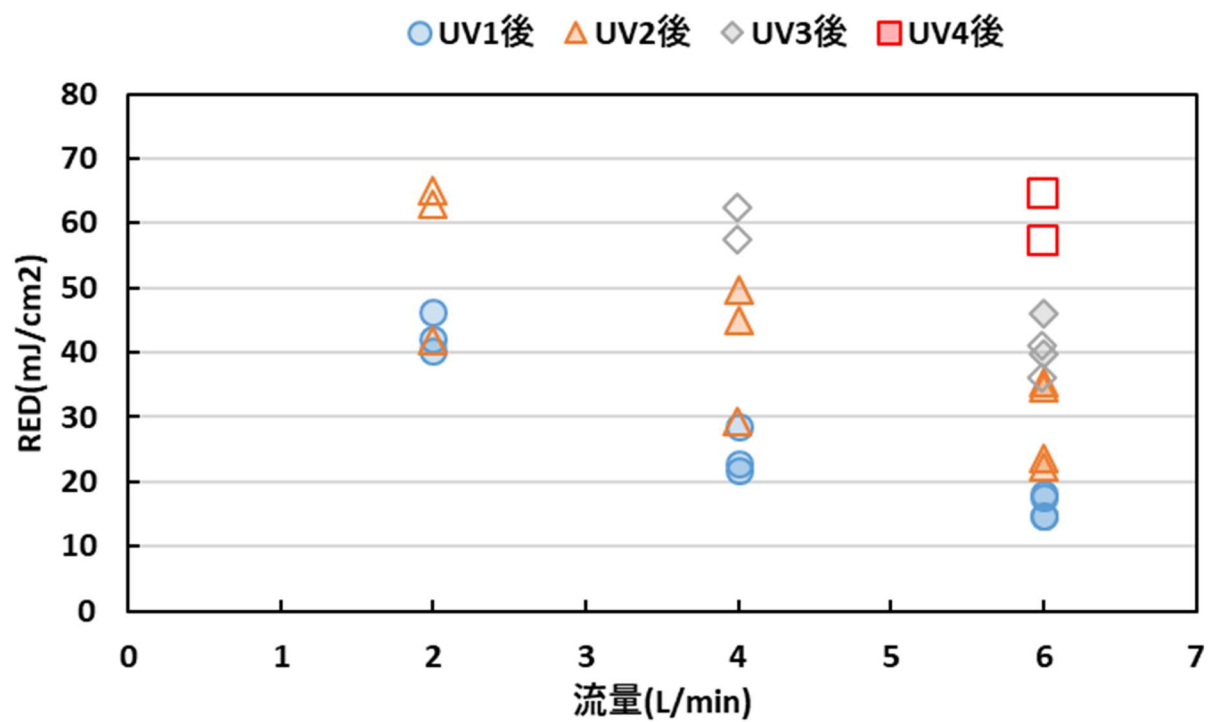
処理水が通過した直後に採水したサンプルを表す

図 5.5 各採水地点における GI-FRNA フェージの濃度

各装置通過後・各流量における GI-FRNA フェージを用いた RED 値計算結果を図 5.6 に示す。GI-FRNA フェージの不活化速度定数 D は、第 4 章で妥当性を確認した I 処理場における平均値 ($D=8.59 \text{ mJ/cm}^2$) を用いた。検出下限を下回った採水地点については、測定値を測定法の下限值 ($-0.52 \log(\text{PFU/L})$) で代用して暫定的に RED を算出した。

UV 1 本目において、RED が流量にほぼ逆比例し (6L/min: 15.5 mJ/cm^2 , 4L/min: 23.1 mJ/cm^2 , 2L/min: 40.1 mJ/cm^2)、MS2 と同様の傾向を示した。

GI-FRNA フェージが検出されたサンプルからは、RED は最大で 49.6 mJ/cm^2 (4L, UV2 後) までを実測により確認できた。本施設の処理フローにおいて、B-dash 評価書(2018)では、I 浄化センターに設置した実証規模の UF+UV 再生水処理施設での UV 処理における必要 UV 照射量は 85 mJ/cm^2 と定められており、GI-FRNA フェージを用いた RED 測定では、およそその半分の RED までは測定できることが確認できた。



白抜き：検出下限までの除去率で暫定的に RED を算出

6 L/min: n=4, 2, 4 L/min: n=3

UV1-4 後：UV モジュール 1 本目から 4 本目それぞれを

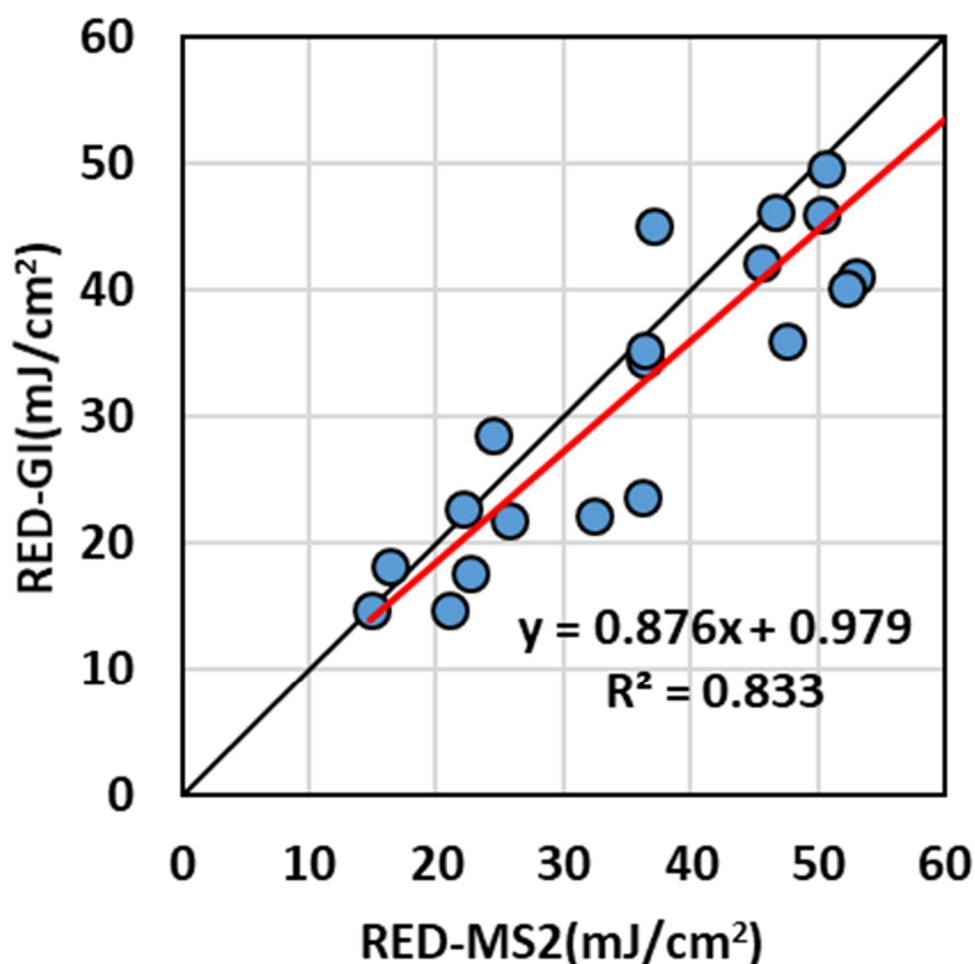
処理水が通過した直後に採水したサンプルを表す

図 5.6 GI-FRNA フェージによる RED 測定結果

5.2.3 GIF-RNA Phage を利用した RED 推定の検討

流水式装置における GI-FRNA フェージを利用した RED 推定の妥当性を検証するため、MS2 と GI-FRNA フェージにそれぞれによる RED 測定結果を比較した。パイロットプラントの UV 照射装置の「MS2 を用いた RED 測定結果 (RED-MS2, 5.2.1)」に対する、「GI-FRNA フェージを用いた RED 測定結果 (RED-GI, 5.2.2)」として図 5.7 に示す。パイロット施設の紫外線照射装置において、RED-GI は全体的に RED-MS2 よりも低くなる傾向が見られた。線形回帰線の傾きから RED が大きくなるほどこの傾向がより顕著になることが分かった。高 UV 照射量では GI-FRNA フェージの中で特に UV 耐性の高い種が生残し、GI-FRNA フェージの除去率が低下することで RED も減少している可能性が考えられる。

また、RED-GI と RED-MS2 の間に高い相関が確認された。この結果より、流水式の UV 照射装置において、下水中の GI-FRNA フェージを従来の指標微生物 MS2 の代替として RED 測定試験に利用できる可能性が示唆された。



黒実線： $y=x$ ，赤実線：線形回帰線

図 5.7 GI-FRNA フェージと MS2 の RED 試験結果の比較

5.2.4 流体モデル解析による RED 推定との比較

5.2.4.1 概要

I 処理場のパイロットプラントでは、物理流体モデル(CFD モデル)による RED 解析が行われている。パイロットプラントの UV 照射装置は、現在までに CFD モデル解析による RED 推定の妥当性が報告されている(Deguchi et al., 2018)。GI-FRNA フェージによる RED 測定の妥当性について検討するため、GI-FRNA フェージを用いた RED の実測値とモデル推定値を比較した。

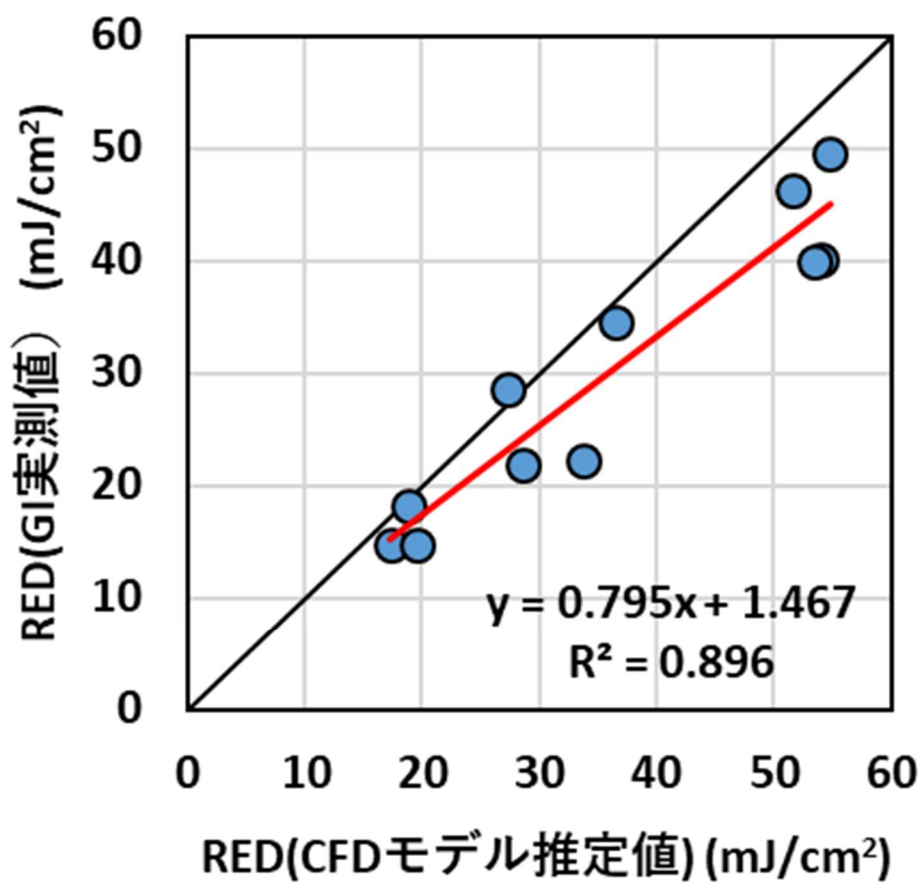
CFD モデル解析は出口ら（2018）によって実施された。モデル解析の条件を表 5.4 に示す。

表 5.4 CFD モデル解析条件

項目	解析条件
CFD解析モデル	標準k- ϵ
要素数	1,391.14
粒子数	3,158
P-CFD解析手順	JWRC審査基準に準拠
照射槽内反射率	0%
供試微生物	GI-FRNAPH
供試微生物の 不活化速度定数	D0=8.13 , Ds=0 (実測値)
流量	各実験条件にて 2,4,6L/min
254nmUV透過率	各実験条件にて (75~82%)

5.2.4.2 結果と考察

GI-FRNA フェージを用いて算出した RED 値について、実測値 (RED-GI) に対するモデル推定値 (RED-CFD) として図 5.8 に示す。5.2.3 の MS2 との比較と同様に、モデル推定値に対して実測値が低くなる傾向が確認された。線形回帰線の傾きより 5.2.3 と同様に RED が大きくなるほどこの傾向がより顕著になっており、高 UV 照射量では GI-FRNA フェージの中で特に UV 耐性の高い種が生残し、GI-FRNA フェージの除去率が低下することで RED も減少している可能性が考えられた。また、実測値とモデル推定値が強く相関することが確認され、下水中の GI-FRNA フェージを RED 測定に利用できる可能性が示唆された。



黒実線： $y=x$ ，赤実線：線形回帰線

図 5.8 GI-FRNA フェージによる RED 実測値と CFD モデル解析 RED 値の比較

5.3 濁度増加が処理性能に与える影響の検討

5.3.1 概要

I 処理場の紫外線処理装置では処理原水に UF 膜ろ過した 2 次処理水を用いている。一方で、近年は下水の簡易処理放流に対して UV 処理を活用するための研究も進んでいる (Kamiko, 2011)。UV 照射量に影響を与える因子としては、UV 透過率が大きな要因であると分かっているが、濁度が UV 照射量に与える影響は知見が少ない。

ここでは、I 処理場パイロットプラントの UV 照射装置に対し、濁度の増加が RED に与える影響について検討した。実験手順を以下に示す。

1. *E.coli* K12F+(A/λ) を宿主菌として LB 培地で MS2 を培養し、 $10^9 \sim 10^{10}$ PFU/mL の培養液を得た。この培養液をパイロットプラントの処理原水に 1L あたり約 1mL を添加した。MS2 濃度は $10^6 \sim 10^7$ PFU/mL 程度となった。
2. パイロットプラントの UV 照射装置の処理原水に I 処理場の初沈越流水を添加し、濁度が 0NTU(Blank), 10NTU, 30NTU, 60NTU となるように調整した。吸光度は表 5.5 の通りになった。
3. パイロットプラントの UV 照射装置に流量 4 L/min で通水し、4 連の UV 照射装置それぞれの処理後に 360 mL を滅菌済み容器（マイティパック, 360 mL, マルエム）で採水した。試料は採水後速やかに遮光し、保冷したまま輸送した。
4. 採水から 48 時間以内に *E.coli* K12F+(A/λ) を宿主菌として LB 培地を用いたブラック法で測定し、4 連の UV 照射装置通過後の試料からの不活化率を算出した。さらに、4 章で決定した MS2 の不活化速度定数 ($D=8.48 \text{ mJ/cm}^2$) を用いて RED を推定した。

また、それぞれの実験条件について出口ら（千代田工販, 2018）が CFD モデル解析を用いて RED のモデル推定値を解析した。

解析は表 5.6 の条件で実施された。なお、水中の懸濁粒子が RED 推定値に与える影響は紫外線強度分布の時間変化予測が技術的に困難なため、無視して計算された。

表 5.5 各濁度における 実測 RED/モデル推定 RED

濁度	0NTU	10NTU	30NTU	60NTU
比	0.81	0.78	0.70	0.70

表 5.6 CFD モデル解析条件

項目	解析条件
CFD解析モデル	標準k- ϵ
要素数	1,391.14
粒子数	3,158
P-CFD解析手順	JWRC審査基準に準拠
照射槽内反射率	0%
供試微生物	MS2
供試微生物の 不活化速度定数	D0=8.48, Ds=0 (実測値)
流量	各実験条件にて 4L/min
254nmUV透過率	0NTU 10NTU 30NTU 60NTU 73.6% 69.5% 62.8% 53.5%

5.3.2 結果と考察

原水および1～4本目の紫外線照射装置通過後におけるMS2の濃度測定結果を図5.9に示す。1～4本目の紫外線照射装置通過後におけるREDを、実測値とモデル推定値それぞれについて図5.10に示す。全ての採水地点において、REDに関してCFD推定値が実測値を上回る傾向が確認された。

また、CFDモデル解析では主な紫外線阻害因子としてUV透過率を解析条件に用いるが、濁度条件は無視して解析を行う。そこで、濁度条件が実測のREDに与える影響を検討するため、モデル解析によるRED推定値と比較することで吸光度が実測REDに与えた影響を排除することを試みた。

各濁度条件ごとに「モデル解析によるREDに対する実測によるREDの比」をとり、表5.7に示した。REDの比は、濁度の増加とともに小さくなる傾向が確認され、流水式装置において下水に含まれる懸濁粒子がREDに影響を与える可能性が示唆された。水中の懸濁物質のUV阻害効果はバッチ式のコリメートビーム試験によって確認されており、(Christensen et al., 2003, Örmeci et al., 2002, Walters et al., 2014) 流水式装置でも同様の傾向となる可能性が示唆された。

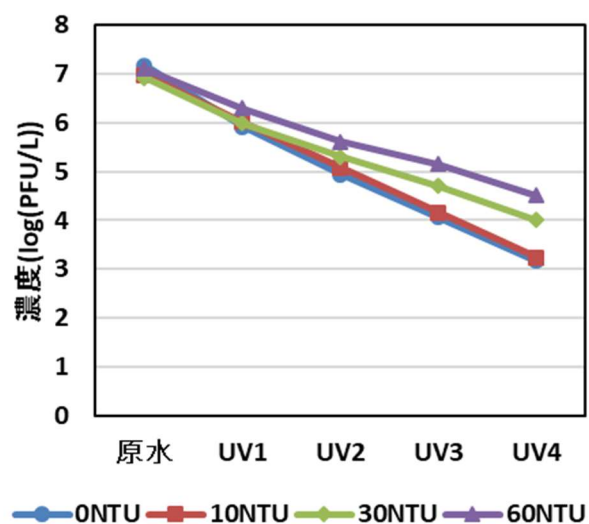
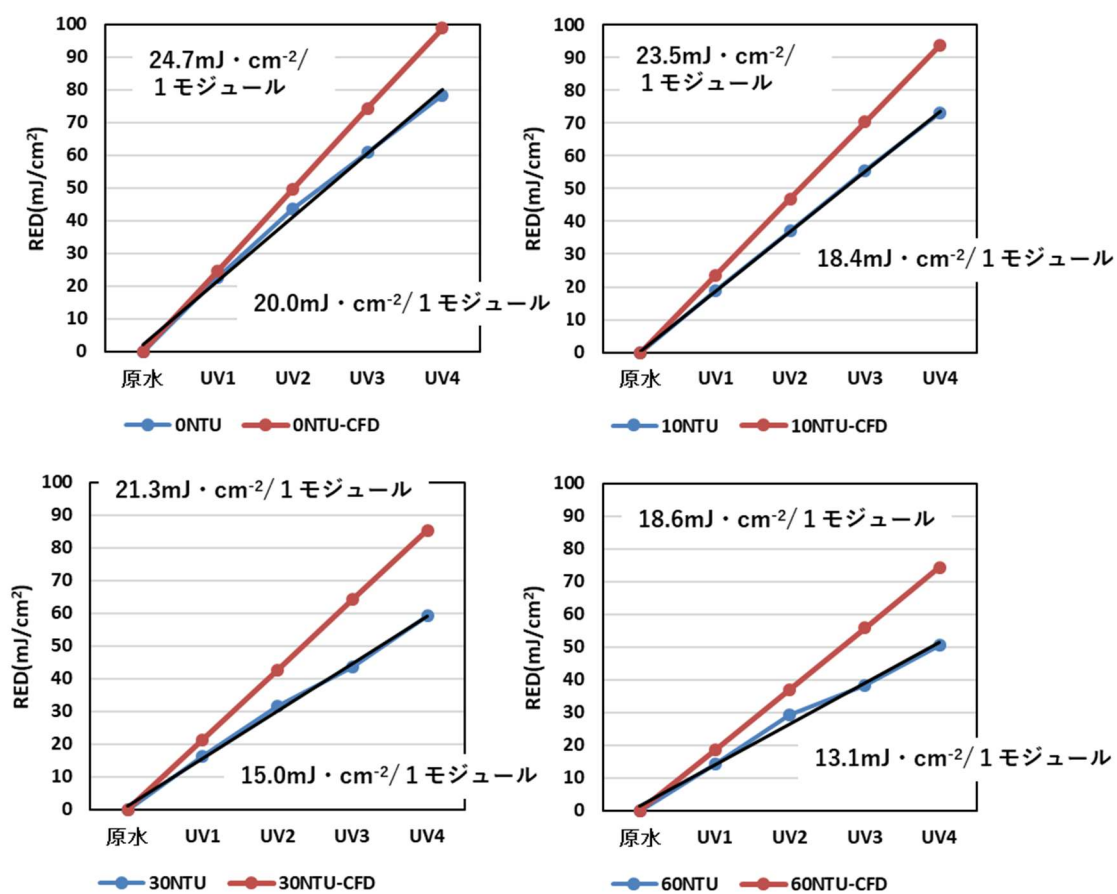


図 5.9 MS2 の濃度測定結果



黒線：線形回帰線

図 5.10 各濁度における RED (CFD 推定値) 及び RED (実測値)

表 5.7 各濁度における 実測 RED/モデル推定 RED

濁度	0NTU	10NTU	30NTU	60NTU
比	0.81	0.78	0.70	0.70

5.4 実証施設における GI-F-RNA Phage を利用した UV 照射量評価の検討

5.4.1 概要

実証施設の紫外線照射装置に対して、GI-FRNA ファージを供試微生物とした RED 測定試験を実施した。I 処理場の 2 次処理水およびその UF ろ過処理水を原水として、流量を 1000m³/day, 800m³/day, 600m³/day に調整して UV 照射装置に通水し、4L を滅菌済み容器（マイティパック, 1.8 L, マルエム）に採水した。試料は採水後速やかに遮光し、保冷したまま輸送した。試料は採水から 48 時間以内に WG49 を宿主菌とした IC-RT-PCR 法 (Hata et al., 2016) で測定した。検水量は 1L, 100mL, 10mL, 1mL で実施した。得られた GI-FRNA ファージの不活化率から、第 4 章で求めた I 処理場における不活化速度定数の平均値 ($D=8.59 \text{ mJ/cm}^2$) を用いて RED を計算した。詳細な実験条件を表 5.8 に示す。

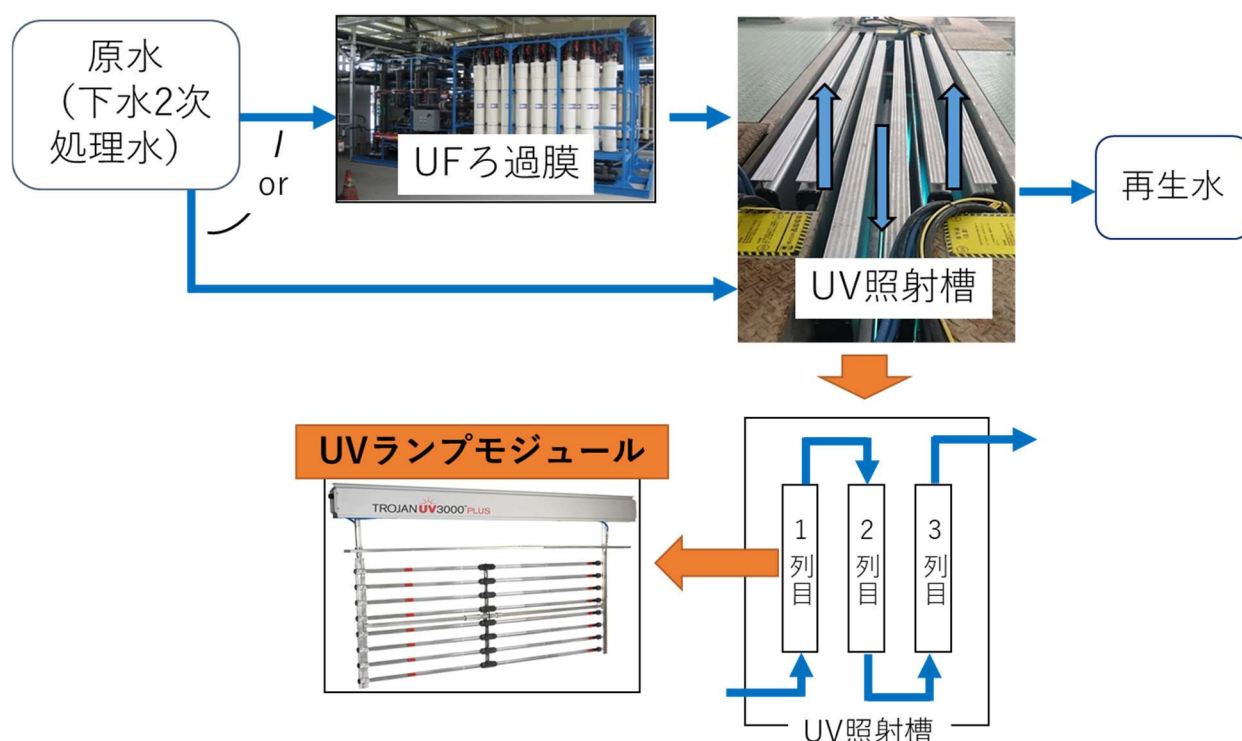


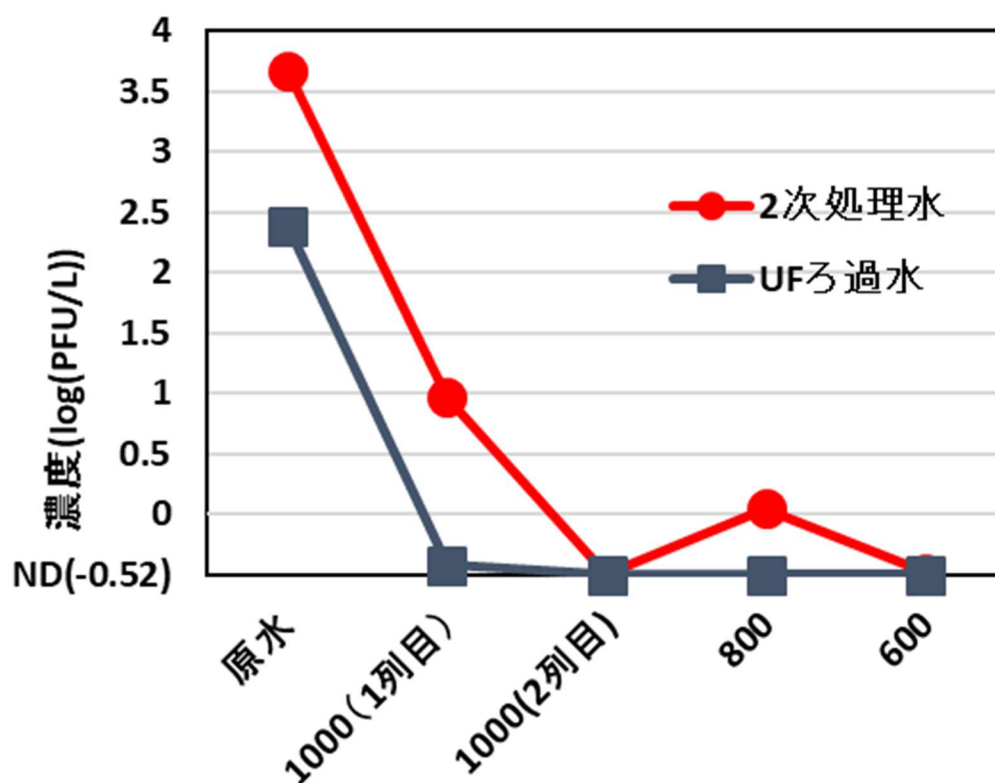
図 5.11 実験装置概要

表 5.8 実験条件

原水および透過率	2 次処理水: 75.5%			
	UFろ過処理後の 2 次処理水: 78.3%			
採水地点		1000m ³ /day	800m ³ /day	600m ³ /day
	UV1列目	○	○	○
	UV2列目	○	—	—
出力	最大出力の60%			

5.4.2 結果と考察

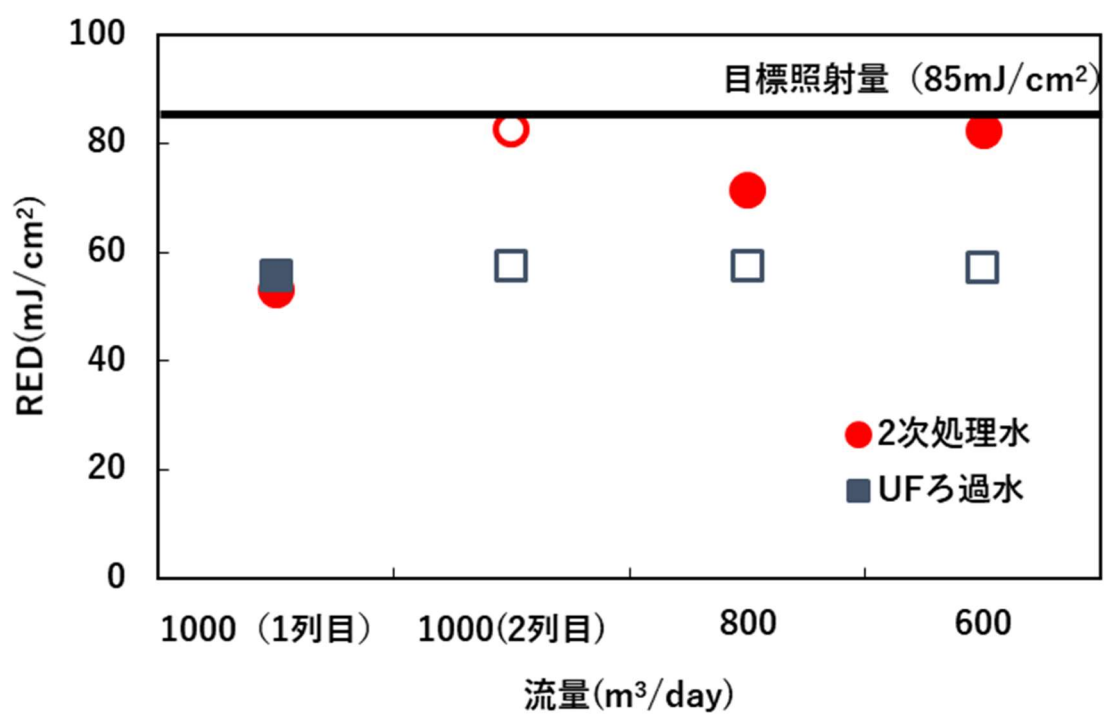
各採水点における GI-FRNA フェージの濃度を図 5.12 に、RED 測定値を図 5.13 に示す。装置通水後に ND となった条件の RED 測定値は $ND = -0.52 \log(PFU/L)$ (定量法の下限值) として計算した。UF ろ過水では流量 1000m³/day-UV 照射ラック 1 列目後に GI-FRNA フェージが検出され、RED=52.8 mJ/cm² の出力を確認できた。UF 膜を通していない 2 次処理水については各流量の UV ラック 1 列目通水後に GI-FRNA フェージが検出され、1000, 800, 600 m³/day で、それぞれ RED=50.4, 67.7, 82.0 mJ/cm² の出力を確認できた。本施設の処理フローにおいて、B-dash 評価書(2018)では 1000m³/日の流量で、UV ラック 2 列で、紫外線処理における必要照射量は 85 mJ/cm² と定められている。今回の結果からは最大（出力 60%, UV1 列の点灯、流量 600 m³/day の運転条件）で必要照射量の約 96%までを実測により確認できた。さらに高照射量までを測定するためには、試料の濃縮法を工夫するなどして検出下限を下げる又は 2 次処理水よりも GI-FRNA フェージが高濃度で存在する原水を利用する必要があると考えられる。



1000(1列目), 800, 600 m³/day : UV モジュール 1 つ目まで通水,

1000 m³/day (2列目): UV モジュール 2 つ目まで通水

図 5.12 各採水地点における GI-FRNA フェージの検出濃度



1000(1列目), 800, 600 m³/day : UV モジュール 1 つ目まで通水,

1000 m³/day (2列目): UV モジュール 2 つ目まで通水

白抜き : 検出下限値までの除去率で暫定的に RED を算出

図 5.13 各採水地点における RED 測定値

5.5 本章のまとめ

本章では、GI-FRNA フェージを供試微生物とした RED 測定の妥当性を検討するため、下水再生実証施設の紫外線照射装置を利用して実験を行った。さらに、従来の MS2 添加による RED 測定ができない大規模の施設において GI-FRNA フェージを用いた RED 測定を試みた。本章で得られた知見は以下のとおりである。

1. パイロットプラントの流水式の UV 照射装置において、GI-FRNA フェージによる RED 測定値と MS2 による RED 測定値が相関することが確認された。この結果より、流水式装置の RED 測定において、GI-FRNA フェージが MS2 の代替微生物として利用できる可能性が示唆された。
2. パイロットプラントの流水式の UV 照射装置において、GI-FRNA フェージによる RED 実測値と CFD モデルシミュレーションによる RED 推定値が相関することが確認された。この結果より、GI-FRNA フェージを流水式装置の RED 測定に利用できる可能性が示唆された。
3. パイロットプラントの流水式の UV 照射装置において、濁度 60 NTU 以下では CFD モデルシミュレーションによる RED 推定値に対する MS2 による RED 実測値の比は濁度の増加によって減少する傾向が確認された。CFD モデルシミュレーションでは濁度影響を無視するため、この比の減少は水中の懸濁粒子が RED に実測値に影響を与えたことが原因だった可能性がある。
4. 実証プラントの UV 照射装置において、GI-FRNA フェージによる RED 測定を実施した結果、下水 2 次処理水を原水として、最大で $RED=82.0\text{mJ}/\text{cm}^2$ の照射量を実測できた。さらに高照射量までを測定するためには、試料の濃縮法を工夫するなどして検出下限を下げる又は 2 次処理水よりも GI-FRNA フェージが高濃度で存在する原水を利用する必要があると考えられる。

第 6 章 結論

6.1 本研究で得られた成果

本研究では、UV 照射量測定 of 供試微生物として「下水中に自然に存在する FRNA フェージ」の利用方法を検討するため、下水処理水および下水 2 次処理水を試料として FRNA フェージの UV 感受性試験をラボで実施した。さらに、UV 照射量測定に利用する場合に妥当と考えられる FRNA フェージの不活化速度を検討した。

また、流水式の紫外線照射装置に対して FRNA フェージを用いた UV 照射量測定試験を実施し、FRNA フェージを用いた UV 照射量測定の妥当性を検証した。さらに、実規模の UV 処理装置において、FRNA フェージを用いて UV 照射量測定を実施し、装置の性能を評価した。以下に得られた成果をまとめた。

◆ 第 4 章

7. 下水試料中の FRNA フェージに対する UV 感受性試験より、GI, GII, GIII の遺伝子群のうち、UV 感受性は $GI < GII < GIII$ となることが示された。それぞれ主要なフェージの UV 感受性 ($MS2(GI) < GA(GII) < Q\beta(GIII)$) と一致することから、UV 感受性は主要なフェージの影響を大きく受けているものと考えられた。
8. UV 消毒を下水再生処理に適用する場合には $70\text{mJ}/\text{cm}^2$ を超えるような高照射量の装置が利用される場合がある。このような高照射量の装置に対して、UV 感受性が $GI < GII < GIII$ となったことから、GI, GII, GIII の遺伝子群のうち、生物検量線の指標微生物としてより適切なものは GI-FRNA フェージと考えられた。
9. 下水試料中の FRNA フェージに対する UV 感受性試験の結果より、対象とした 4 処理場(A 処理場, B 処理場, C 処理場, I 処理場)において、GI, GII, GIII の遺伝子群全てで UV 感受性に大きな差は見られなかった。
10. 下水試料中の FRNA フェージに対する UV 感受性試験の結果より、下水試料中 FRNA フェージの UV 感受性は、実験ごとにある程度ばらつくことが確認された。ばらつきを信頼度 95% の区間として表すと、GI, GII, GIII の遺伝子群では GI タイプが安定して区間が狭くなる傾向があった。そのため、GI-FRNA フェージが生物検量線の供試微生物としてより利用しやすいと考えられた。
11. 2 次処理水中の FRNA フェージに対する UV 感受性試験の結果から、 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 程度までの UV 照射量では GI, GII-FRNA フェージの UV 感受性は下水処理の前後でほとんど変化しない可能性が示唆された。
12. 以上のことから、FRNA フェージを生物検量線として利用する場合には、GI-FRNA フェージを利用し、不活化速度定数 D は 95% 信頼区間の下限値で UV 照射量を計算することがより適切と考えられた。

◆ 第 5 章

※ここでは、GI-FRNA フェージを用いた RED 実測値を「GI-RED」と表記する。

MS2 を用いた RED 実測値を「MS2-RED」と表記する。

GI-FRNA フェージを用いた CFD モデル解析による RED のシミュレーション推定値を「C-GI-RED」と表記する。

MS2 を用いた CFD モデル解析による RED のシミュレーション推定値を「C-MS2-RED」と表記する。

5. 密閉型流水式の紫外線照射装置において、GI-RED と MS2 による RED 測定値が高い相関を示すことが確認された。この結果より、流水式装置の RED 測定において、GI-FRNA フェージが MS2 の代替微生物として利用できる可能性が示唆された。
6. 密閉型流水式の紫外線照射装置において、GI-RED と C-GI-RED が相関することが確認された。この結果より、GI-FRNA フェージを流水式装置の RED 測定に利用できることが示唆された。
7. 密閉型流水式の紫外線照射装置において、濁度 60 NTU 以下では MS2-RED と C-MS2-RED の差は濁度の影響を受けないことが確認された。CFD モデル解析では濁度影響を無視するため、今回の実験条件において水中の懸濁粒子は RED 実測値に影響を与えないことが確認された。
8. 大規模の開水路型紫外線照射装置において GI-RED を測定した結果、下水 2 次処理水を原水として、最大で RED=78.0mJ/cm² の照射量を実測できた。さらに高照射量までを測定するためには、試料の濃縮法を工夫するなどして検出下限を下げる又は 2 次処理水よりも GI-FRNA フェージが高濃度で存在する原水を利用する必要があると考えられる。

6.2 今後の課題

本研究で得られた成果を踏まえ、下水中に自然に存在する GI-FRNA フェージを用いた UV 照射量測定方法の構築に向けて、今後の課題を以下に示した。

- FRNA フェージの UV 感受性試験において、本調査では結果のばらつきを全て FRNA フェージの UV 感受性変動と仮定して解析したが、FRNA フェージの定量に MPN 法を用いているため、測定法の誤差が変動に大きく寄与している可能性がある。今後、より精度の高い測定手法を検討し、FRNA フェージの UV 感受性変動を精査する必要がある。
- FRNAPH の UV 感受性試験において、本調査では GI, GII, GIII の 3 つの遺伝子群に分けて試験を実施し、GI, GII, GIII の UV 感受性に差があることを確認した。UV 感受性について更に詳細な検討をするため、今後 GI, GII, GIII に遺伝子型解析を行い、それぞれの遺伝子群にどのようなフェージが含まれているのかを検討する必要がある。
- FRNAPH の UV 感受性試験において、流入下水中試料と 2 次処理水試料を比較したが、2 次処理水試料では初期濃度が低かったため、テーリングしている可能性がある。今後、試料の濃縮法を検討するなどして濃縮した 2 次処理水試料でも同様の傾向を示すか確認する必要がある。
- I 処理場の実証プラントにおいて、GI-FRNA フェージを用いて紫外線照射量を測定したが、最大でも施設の目標照射量の 92%までしか測定できなかった。今後、さらに高照射量までを測定するために、試料の濃縮法を検討するなどして検出下限を下げる等の工夫が必要である。
- I 処理場の実証プラントにおいて、CFD モデル解析が行われておらず、実測値との比較ができなかった。今後、CFD モデル解析を実施し、実測値との比較検討を行う必要がある。

参考文献

- 1) Akihiko Hata, Seiya Hanamoto, Yuya Shirasaka, Naoyuki Yamashita, Hiroaki Tanaka. 2016. Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters. *Appl Environ Microbiol.*(82),4244–4252.
- 2) B-dash 評価書, 2018, 下水処理水の高度再生造水システムに関する実証事業
- 3) B-dash 評価書. 2018. 下水処理の高度再生造水システムに関する実証事業
- 4) Baert, L., Wobus, C. E., Coillie, E. V., Thackray, L. B., Debevere, J. and Uyttendaele, M. Detection of Murine Norovirus 1 by Using Plaque Assay, Transfection Assay, and Real-Time Reverse Transcription-PCR before and after Heat Exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74(2) 543-546.
- 5) Batch, L. F., Schulz, C. R. and Linden, K. G. 2004. Evaluating water quality effects on UV disinfection of MS2 coliphage, *Journal of the American Water Works Association*, Vol. 96, (7), 75-87.
- 6) Bauman, L. C. and Stenstrom, M. K. 1990. Removal of organohalogen precursors in reclaimed wastewater-I. *Water Research*, Vol. 24, (8), 949–955.
- 7) Bolton, J.R., Linden, K.G., 2003. Standardization of methods for fluence (UV dose) determination in bench-scale UV experiments. *Journal of Environmental Engineering-Asce* 129 (3) , 209-215.
- 8) Bolton, James R., Mihaela I. Stefan, Ping-Shine Shaw, and Keith R. Lykke. 2011. Determination of the quantum yield of the ferrioxalate and KI/KIO₃ actinometers and a method for the calibration of radiometer detectors. *Journal of photochemistry and photobiology. A, Chemistry*. Vol.222. 166-169.
- 9) Christensen, J. and Linden, K.G. 2003. How particles affect UV light in the UV disinfection of unfiltered drinking water, *Journal of the American Water Works Association*, Vol. 95, (4), 179–189.
- 10) Christensen, J., Linden, K.G., 2003. How particles affect UV light in the UV disinfection of unfiltered drinking water. *Journal American Water Works Association* 95 (4) ,179-189
- 11) Clancy, J. L., Bukhari, Z., Hargy, T. M., Bolton, J. R., Dussert, B. W. and Marshall, M. M. 2000. Using UV to Inactivate *Cryptosporidium*. *Journal of the American Water Works Association*, Vol. 92,(9). 97-104.
- 12) Cooper, W. J., Villate, J. T., Ott, E. M., Slifker, R. and Parsons, F. Z. 1983. Formation of Organohalogen Compounds in Chlorinated Secondary Wastewater Effluent. 1983. pp. 483-497, in Jolley, R. L. (eds.) *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 4, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- 13) Craik, S. A, Finch, G. R., Bolton, J. R. and Belosevic, M. 2000. Inactivation of *Giardia*

- muris cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. *Water Research*, Vol. 34, (18). 4325-4332.
- 14) Craik, S. A, Weldon, D., Finch, G. R., Bolton, J. R. and Belosevic, M. 2001. Inactivation of cryptosporidium parvum oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. *Water Research*, Vol. 35, (6) 1387–1398.
 - 15) D. Pettijohn, P. Hanawalt. 1964. Evidence for repair-replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. *J. Mol. Biol.* (9). 395-410.
 - 16) Fiksdal, L. and Leiknes, T. 2006. The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water, *Journal of Membrane Science*, Vol. 279(1–2) 364371.
 - 17) Flannery, J., S. Keaveney, P. Rajko-Nenow, V. O'Flaherty, and W. Doré. 2012. Concentration of Norovirus during Wastewater Treatment and Its Impact on Oyster Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (9): 3400-3406
 - 18) Fong, T. T., M. S. Phanikumar, I. Xagorarakis, and J. B. Rose. 2010. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (3): 715-723
 - 19) Frankel-Cnrat, H., Kimball, P.C. Levy, J.A. 1988. *Virology*, 2nd ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
 - 20) Gabriel Chevretils, Éric Caron, Harold Wright, Gail Sakamoto, Pierre Payment, Benoit Barbeau and Bill Cairns. 2006. UV Dose Required to Achieve Incremental Log Inactivation of Bacteria, Protozoa and Viruses. *IUVA News / Vol. 8 No. 1*, 38-45
 - 21) Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and M. K. Bhan. 1992. Identification of Group A Rotavirus Gene 4 Types by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 30 (6):1365-1373
 - 22) Gerba, C. P. 2007. Virus Occurrence and Survival in the Environmental Waters. *Human Viruses in Water*, Chapter 5
 - 23) Gerba, C.P., Rose, J.B. Hass, C.H. 1994. Waterborne Disease, Who is at Risk? Proceedings of the American Water Works Association's Water Quality Technology Conference, San Francisco, American Water Works Association, Denver, CO.
 - 24) Gerba, C.P., Singh, S.N. and Rose, J.B. 1985. Waterborne Viral Gastroenteritis and Hepatitis. *CRC Critical Reviews in Environmental Control* (15), 213-236
 - 25) Hiroto Y., Otaki M., 2009, 中圧ランプに対応した化学線量計. *IWASAKI 技報*. 第 20 号
 - 26) Hata A, Hanamoto S, Shirasaka Y, et al. Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82,4244–4252.
 - 27) Hata, A., H. Katayama, K. Kojima, S. Sano, I. Kasuga, M. Kitajima, H. Furumai. 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Science of the Total Environment*. 468-469: 757-763
 - 28) Havelaar, A. H., W. M. Pot-Hogbeem, K. Furuse, R. Pot, and M. P. Hormann. 1990. F-

- specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *Journal of Applied Bacteriology*. 69 (1) 30-37.
- 29) Hijnen, W. A. M., Beerendonk, E. F. and Medema, G. J. 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Research*, Vol. 40(1), 3-22.
 - 30) Hsu, F. C., Y. S. C. Shieh, J. Van Duin, M. J. Beekwilder, and M. D. Sobsey. 1995. Genotyping Male-Specific RNA Coliphages by Hybridization with Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (11) 3960-3966.
 - 31) Jolis, D., Lam, C. and Pitt, P. 2001. Particle effects on ultraviolet disinfection of coliform bacteria in recycled water, *Water Environment Research*, Vol. 73,(2), 233-236.
 - 32) Katayama, H., E. Haramoto, K. Oguma, H. Yamashita, A. Tajima, H. Nakajima, and S. Ohgaki. 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research*. 42: 1441-1448
 - 33) Kenichiro DEGUCHI, Takahito SUGIMOTO, Sinichi NAGAMATSU, Shota TASAKI, Dongbum Im, Hiroaki Tanaka.2018. 再生水における紫外線照射装置 P-CFD 解析の妥当性検証. 第 21 回日本水環境学会シンポジウム講演集. 276-277
 - 34) Kimura, H., Nagano, K., Kimura, N., Shimizu, M., Ueno, Y., Morikane, K. and Okabe, N. 2011. Anorovirus outbreak associated with environmental contamination at a hotel. *Epidemiology and Infection*, Vol. 139(2). 317-325.
 - 35) Kitajima, M., B. C. Iker, I. L. Pepper, and C. P. Gerba. 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes--identification of potential viral indicators. *Science of the Total Environment*. 488-489: 290-296
 - 36) Kohsuke FURUSE, Toshizo SAKURAI and Itaru WATANABE. 1967. 種々の RNA フェージに対する紫外線の影響. *Department of Molecular Biology*. 17(4), 159-164
 - 37) Kondo S. 1984. 分子放射線生物学 学会出版センター.
 - 38) Kumiko OGUMA, Mika KOSHIO, Jenyuk LOHWACHARIN, and Satoshi TAKIZAWA. 2017. 水中の懸濁粒子が紫外線消毒効率に及ぼす影響. *水環境学会誌* Vol.40(2), 59-65
 - 39) Linden, K. G., Shin, G. A., Faubert, G., Cairns, W. and Sobsey, M. D. 2012. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. *Environmental Science and Technology*, Vol. 36, No(11). 2519-2522.
 - 40) Maite Muniesa, Andrey Payan, Laura Moce-Llivina, Anicet R. Blanch, Juan Jofre. 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *water research*. 43, 1559-1564
 - 41) Masahiro Otaki. 2018. RED (換算紫外線照射量) の不思議 (～その使い方と注意点～). 一般社団法人 日本紫外線水処理技術協会 Newsletter(9), 2-5
 - 42) Matsui, Y., Matsushita, T., Sakuma, S., Gojo, T., Mamiya, T., Suzuoki, H. and Inoue, T. 2003. Virus Inactivation in Aluminum and Polyaluminum Coagulation, *Environmental Science Technology*. Vol. 37.(22) 5175-5180.

- 43) Matsushita, T., Matsui, Y. and Shirasaki, N. 2006. Analysing mass balance of viruses in a coagulation-ceramin microfiltration hybrid system by a combination of the polymerase chain reaction (PCR) method and the plaque forming units (PFU) method. *Water Science and Technology*, Vol. 53(7) 199-207.
- 44) Matsushita, T., Matsui, Y., Shirasaki, N. and Kato, Y. 2005. Effect of pore size, coagulation time, and coagulant dose on virus removal by a coagulation-ceramin microfiltration hybrid system. *Desalination*. Vol. 178,(1-3) 21-26.
- 45) Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K. 2011. Virus inactivation during coagulation with aluminum coagulants, *Chemosphere*, Vol. 85, (4) 571–576.
- 46) Mayer, B. K., Ryu, H. and Abbaszadegn, M. 2008. Treatability of U.S. Environmental Protection Agency Contaminant Candidate List Viruses: Removal of Coxsackievirus and Echovirus using Enhanced Coagulation, *Environmental Science and Technology*, Vol. 42, (18) 6890-6896.
- 47) Menon, V. K., S. George, S. Ramani, J. Illiyaraja, R. Sarkar, A. K. Kuruvilla, and G. Kang. 2010. Genogroup IIb norovirus infections and association with enteric symptoms in a neonatal nursery in southern India. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (9): 3212-3215
- 48) Miller RL, Plagemann PG. 1974. Effect of ultraviolet light on mengovirus, formation of uracil dimers, instability and degradation of capsid, and covalent linkage of protein to viral RNA. *J Virol*. 13(3),729-39
- 49) Montgomery, J. M. 1985. *Water Treatment Principles and Design*, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York
- 50) Nuanualsuwan, S. and Cliver, D. O. 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of Virological Methods*, Vol. 104. 217-225.
- 51) Oguma, K., Jatuwat Sangsanont, Hata, A., Inaba, M., Katayama, K., 2013. 災害時利用を想定した簡易下水消毒方法の検討, 第 47 回日本水環境学会講演集, pp-281
- 52) Qualls, R. G., Flynn, M. P. and Johnson, J. D. 1983. The role of suspended particles in ultraviolet disinfection, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, Vol. 55, (10). 1280-1285.
- 53) R. B. Setlow , J. K. Setlow . 1962. Evidence that ultraviolet-induced thymine dimers in DNA cause biological damage. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (48). 1250-1257.
- 54) R. B. Setlow, P. A. Swenson , W. L. Carrier. 1963. Thymine dimers and inhibition of DNA synthesis by ultraviolet irradiation of cells. *Science*. (142). 1464-1466.
- 55) R. Beukers , W. Berends .1961. The effects of U. V-irradiation on nucleic acids and their components. *Biochem. Biophys. Acta*. (49) 181-189.
- 56) Rebhun, M., Heller-Grossman, L. and Manka, J. 1997. Formation of Disinfection Byproducts during Chlorination of Secondary Effluent and Renovated Water. *Water Environment Research*, Vol. 69, (6). 1154-1162.
- 57) Shin, G. A. and Sobsey, M. D. 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of

- water. *Water Research*, Vol. 42,(17) 4562-4568.
- 58) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. and Ohno, K. 2010. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Research*, Vol. 44, (5) 1307-1316.
 - 59) Sommer, R., Haider, T., Cabaj, A., Pribil, W. and Lhotsky, M. 1998. Time dose reciprocity in UV disinfection of water, *Water Sci. Technol.*, 38(12), 145-150.
 - 60) Sommer, R., Pribil, W., Appelt, S., Gehringer, P., Eschweiler, H., Leth, H., Cabaj, A. and Haider, T. 2001. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation, A comparative approach, *Wat. Res.*, 35(13), 3109- 3116.
 - 61) State of California. 2014. California Department of Public Health ,Regulations Related to Recycled Water.
 - 62) Suntae Lee, Shota Tasaki, Akihiko Hata, Naoyuki Yamashita and Hiroaki Tanaka. 2018. Evaluation of virus reduction at a large-scale wastewater reclamation plant by detection of indigenous F-specific RNA bacteriophage genotypes. *Environmental Technology*. online, 02 Mar 2018.
 - 63) Suntae Lee. 2015.限外ろ過膜を用いた下水再生プロセスにおけるウイルス除去に関する研究. 京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 博士論文
 - 64) Tchobanoglous, G., Burton, F. L. and Stensel, H. D.2003. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th ed., McGraw-Hill, New York.
 - 65) Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R., 2005. Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Research* 39 (15) , 3487-3500.
 - 66) US Environmental Protection Agency (USEPA). 1999. *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*, U.S. Environmental Protection Agency, EPA 815-R-99-014, Cincinnati, OH.
 - 67) US Environmental Protection Agency (USEPA). 2002 US Environmental Protection Agency, *Integrated Risk Information System (IRIS)*, Office of Research and Development (ORD), National Center for Environmental.
 - 68) US Environmental Protection Agency (USEPA). 2006. *Ultraviolet Disinfection Guidance Manual* EPA 815-D-03-007, Office of water.
 - 69) USEPA. 2006. *UV Disinfection Guidance Manual For the Final LT2ESWTR*.
 - 70) United States Environmental Protection Agency. 2006. *Ultraviolet Disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule*.
 - 71) W.O.K. Grabow, P. Coubrough. 1986. Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in 100-ml Samples of Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept, 430-433.
 - 72) WHO. 2011. *Guidelines for Drinking-water Quality* 4th edition.
 - 73) Walters, E., Graml, M., Behle, C., Mueller, E., Horn, H., 2014. Influence of particle association and suspended solids on UV inactivation of fecal indicator bacteria in an

- urban river. *Water Air and Soil Pollution* 225 (1) , 1822
- 74) Wolf S, Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE. 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish, application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *J Virol Methods*. 149(1),123-128.
- 75) World Health Organization(WHO). 2006. Guidelines for the Safe Use of Water, Excreta and Graywater VolumeII : Wastewater Use in Agriculture, Geneva, Switzerland.
- 76) Ye, X. Y., X. Ming, Y. L. Zhang, W. Q. Xiao, X. N. Huang, Y. G. Cao, and K. D. Gu. 2012. Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. *Current Microbiology*. 65 (3): 244-253.
- 77) Zhu, B., Dennis, A. C. and Chellam, S. 2005. Comparison of electrocoagulation and chemical coagulation pretreatment for enhanced virus removal using microfiltration membranes, *Water Research*, Vol. 39, (13) 3098-3108.
- 78) da Silva, A. K., F. S. Le Guyader, J. C. Le Saux, M. Pommepuy, M. A. Montgomery, and M. Elimelech. 2008. Norovirus Removal and Particle Association in a Waste Stabilization Pond. *Environmental Science and Technology*. 42 (24): 9151-9157
- 79) Örmeci, B., Linden, K.G., 2002. Comparison of UV and chlorine inactivation of particle and non-particle associated coliform. *Water Science and Technology, Water Supply* 2, 403-410.
- 80) 岩崎電気株式会社 研究開発部. 2012. 指標微生物の紫外線感受性試験方法
- 81) 戸沢均, 1993. UV 測定機器の動向. *J. Illum. Engng. Inst. Jpn.* Vol.87 (3), 124-127
- 82) 公益財団法人水道技術研究センター. 2012. 紫外線照射装置 JWRC 技術審査基準
- 83) 佐々木政子, 1995, 太陽紫外線(UVA、UVB)の地上計測技術の進歩-帯域分光型放射計による測定, 太陽紫外線防御研究委員会学術報告, 5(1), 75-84.
- 84) 社団法人日本下水道協会. 2009. 下水道施設計画・設計指針と解説 後編 2009 年度版
- 85) 小野 雅司, 紫外線の簡易測定, *Journal of Environmental Conservation Engineering*, vol 25 (11), 681-686
- 86) 上篠 絵美子. 2004. 下水処理水のオゾン消毒における大腸菌ファージの不活化速度, 東京大学新領域創成科学研究科環境工学専攻修士論文
- 87) 神子 直之. 2011. 下水処理の 1 要素技術としての紫外線照射. 一般社団法人 日本紫外線水処理技術協会 Newsletter(5), 2-5
- 88) 大瀧 雅寛, 鹿島田 浩二, 石渡 淳, 赤井田 悟史, 大垣 眞一郎. 1997. 紫外線照射処理および紫外線-光触媒処理における細菌の光回復. *環境工学研究論文集・第 34 巻*, 75-82
- 89) 大瀧 雅寛, 大腸菌ファージ測定法, 東大都市工版
- 90) 大瀧 雅寛. 1999. 紫外線照射による水中病原微生物の不活化. *生活工学研究* 第 1 巻第 2 号, 66-71.
- 91) 大瀧 雅寛. 生物線量計の原理とその応用～微生物で光を測る～. 2000. お茶の水女子大学 *生活工学研究*. 2(2). 30-33.

- 92) 端 昭彦, 2015, 感染力を有した FRNA フェージの定量的タイピング手法
- 93) 田中 利明. 2018. 紫外線照射装置の認定取得及び導入の推移. 一般社団法人 日本紫外線水処理技術協会 Newsletter(9), 6-9