オゾンによるウイルス不活化の速度と機構

原 田 宣 男* 川 合 生 子**
神 子 直 之*** 大 垣 眞一郎†

Kinetics and Mechanism of Virus Inactivation by Ozone

Nobuo HARATA*, Ikuko KAWAI**,
Naoyuki KAMIKO*** and Shinichiro OHGAKI†

* Ichikawa Koumuten Co., Ltd., 6-27, Kashimachou, Gifu 500-8518, Japan

** Matsusaka City Office, 1340-1, Tonomachi, Matsusaka, Mie 515-8515, Japan

*** Department of Urban and Civil Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University, 4-12-1, Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan

† Graduate School of Engineering, Tokyo University, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan

Abstract

As an alternative to chlorination, ozonation is being used for disinfecting water. However this high operation cost is a disadvantage so therefore basic information on determining an appropriate dosage of ozone for disinfection is required. In this study, coliphage Q-beta was used as a model virus and was inactivated by ozone in a batch or a flow-through reactor by adding ozone-absorbing substances and/or radical scavengers. The changes in residual ozone concentration and surviving coliphage concentration were measured. Equations expressing the process were formulated and the effectiveness of the monitoring method by PCR for disinfection performance was also discussed experimentally. As a result, the inactivation of coliphages was expressed as a summation of the direct effect of ozone and the indirect effect of radicals. PCR monitoring was assumed to overestimate the surviving coliphage concentration.

Key words: ozone disinfection, coliphage, PCR, radical scavenger

1. はじめに

塩素の代替消毒手法として、オゾンが用いられるようになってきている。しかし、塩素と同様に消毒副生成物の問題の可能性や、残効性少ないことと、オゾン生成に比較的多くのエネルギーを必要とする問題点がある。消毒効果を持続させるためには塩素との組み合わせ処理は避けられないが、その適正な運転のためには、水中のオゾン消費物質等の消毒効果への影響機構を把握しておく必要がある。

水質の衛生学的指標として採用されている指標細菌では、ウイルスを念頭においた水質評価を行うことはできない。しかし指標ウイルスの検出を培養細胞等で行う従来の方法では、数週間の時間を要するため、現場における管理手法としては現実的でない。近年、数時間で検出されるPCR法(Polymerase chain reaction)が開発されたが、遺伝子を直接検出するためその結果がウイルスの有害性である感染性と整合性があるかどうか疑問視さ

れている。

本研究はそれらのF特異RNA大腸菌ファージQβ(以下、Qβと略す)をモデルウイルスとして用い、培地成分等を代表的な水中共存物質として用いてウイルスに対してオゾン消毒への影響を調べ数式化することを行い、同時にウイルスに対する消毒効果の判定法としてのPCR法の有効性を検討したものである。

2. 実験方法

2.1 Qβ高濃度液の調製

宿主に大腸菌K12 F⁺ (IFO 13965)を用いて、Qβを増殖させ、Qβ濃度が $10^8 \sim 10^{11}$ (PFU $\cdot$ m⁻¹)程度の高濃度液を適正希釈して実験に供した。なお、高濃度液調製法は伸子ら¹⁾の方法に従った。ファージ増殖に用いた液体培地成分をTable 1に示す。

2.2 オゾン消毒

オゾン消毒は、回分式・連続式実験を精製水(比抵抗18 (Ω $\cdot$ cm⁻¹))を使用し行った。

* ㈱市川工務店 〒500-8518 岐阜市鹿島町6-27

** 松阪市役所 〒515-8515 三重県松阪市殿町1340-1

*** 茨城大学工学部都市システム工学科 〒316-8511 茨城県日立市中成沢4-12-1

† 東京大学大学院工学系研究科 〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1

各実験においてサンプルを経時的に採取し、インジゴカルミンによる吸光度法²⁾を用い残留オゾン濃度を測定した。同時に、サンプルにチオ硫酸ナトリウム溶液を適量添加してオゾンを消費させ、ブラック法、PCR法(連続式のみ)に供してQ β の検出を行った。

なお、精製水と、精製水に対し培地成分を添加した系について残留オゾン濃度測定を行った結果、培地成分がオゾン消費物質として働くことが確認された。

(1) 回分式実験

飽和して一定濃度になった高濃度オゾン溶液を精製水に適量注入することにより、オゾン溶液を調製し、そのオゾン溶液とQ β を緩やかに攪拌しQ β をオゾンに接触させた。装置の概略をFig. 1に示す。

(2) 連続式実験

Q β 高濃度液を精製水に適量添加した試料に対し、オゾンガスを連続的に供給し、緩やかに攪拌しながらQ β をオゾンに暴露させた。オゾン注入方法は、関谷らの実験方法³⁾を改良した。

2.3 ブラック法

二層寒天法¹⁾により行った。この方法による検出限界は10 (PFU $\cdot$ m l^{-1})である。

2.4 PCR法^{4,5)}

検出感度を上げるため、RT-PCRの後に再度PCRを行うMultiplex PCR(以下、M-PCRと略す)法を用いた。

プライマーの選定、PCR反応時間・温度は片山の方法⁶⁾に従った。電気泳動後、写真上で陽性・陰性の判定を行った。

なお、オゾン暴露を受けていないQ β の検出限界はRT-PCR法で 9.03×10^2 (PFU $\cdot$ m l^{-1})、M-PCR法で 9.03×10^{-2} (PFU $\cdot$ m l^{-1})であった。

Table 1 Composition of phage broth

Polypepton	1.0g
Yeast Extract	0.5g
NaCl	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.005g
Glucose	0.15g

(for pure water 100 ml)

Fig. 1 Experimental set-up for batch reaction

Fig. 2 Experimental set-up for continuous ozonation

3. オゾン回分式実験

オゾン処理施設は注入するオゾン濃度を設定し、連続的にオゾンガス暴露させる方式が用いられているが、その反応機構は不明な点が多い。すなわちオゾンの消毒効果はpH・温度・濁度・有機物濃度・硬度・アルカリ度・色度などの水質因子の影響を受けるとされているが、その詳細は解っていない^{7,8)}。

関谷らの方法³⁾に従って、回分型反応槽でQ β に対するオゾン消毒の実験を行った。ただし、実際のオゾン処理に供される水が有機物成分等を含んでいることを考え、ファージ用液体培地を代表的な有機物として添加した。初期オゾン濃度を複数設定し、Q β 濃度変化への影響を調べた。

3.1 実験方法

高濃度液調製時に用いた液体培地および、Q β を含む試料に高濃度オゾン溶液を各量添加して、Q β 濃度の系時変化を調べた。

培地成分濃度はTOC濃度に換算し、経時的に採水し、残留オゾン濃度、生残Q β 濃度を測定した。

各RUNの初期条件をTable 2に示す。

3.2 実験結果と考察

残留オゾン濃度は、どのRUNについても最初の測定時まで急激に減少し、その後、一定速度で減少する傾向がみられた(Fig. 3)。なお、↓は検出限界以下を示す。

オゾン消費物質が存在せず、オゾンの自己分解反応だけで残留オゾン濃度が減少する場合と比較すると、減少速度の傾きは増加していることがわかる。

オゾンによるQ β の不活化は、オゾン消費物質を含まない系に関して1次反応に従わないとの報告がある^{3,9)}。Fig. 4より、オゾン消費物質が存在する場合でも、オゾンによるQ β の不活化は、1次反応に従わないことは明らかである。特に、初期オゾン濃度が高いほど急激に不活化は進行した。生残Q β 濃度は最初の測定時まで

Table 2 Initial condition of batch Experiment

Run	Initial Ozone concentration [mg $\cdot$ l $^{-1}$]	Initial Q β concentration [PFU $\cdot$ m l^{-1}]	TOC [mg $\cdot$ l $^{-1}$]
1-1	0.96	8.50×10^4	5.38
1-2	1.85	3.30×10^4	7.04
1-3	5.06	3.30×10^4	7.04
1-4	12.8	3.10×10^5	7.45

Fig. 3 Change of ozone concentration (1)

Fig. 4 Change of Qβ concentration (1)

急激に減少し、その後、残留オゾンが存在するにもかかわらず、著しい減少は見られなかった。

このことから、初期オゾン濃度が比較的小さく、回分式でのQβの不活化は、初期の接触段階ではオゾンから生成されるラジカルにより進行し、その後、ラジカルが培地成分に含まれるラジカスカベンジャー (Radical Scavenger) により消費されるため、その後の不活化は進行しなかったことが示唆された。

また、初期オゾン濃度により不活化量が変化したのはラジカルは、オゾンが分解する過程で生成されるため、初期オゾン濃度が低ければラジカル生成量も減少するためと考えられる。

オゾンに対するウイルスの耐性はCt値で評価している。しかし、このように短時間で反応が終了し、不活化がオゾンではなくラジカルによるものとする場合、生存率をCt値によって予測することはできないことがわかった。

4. オゾン連続式実験

回分式で得られた結果を、より実際に近い系で調べるために、オゾンを連続的に吹き込む系で実験を行った。

代表的な共存物質として回分式実験と同様、ファージ液体培地、およびラジカスカベンジャーとして重炭酸塩を混和して、オゾン消毒を行った。オゾン注入方法は、水面下8 cmから、散気管により流量100 (ml・min⁻¹)、オゾン濃度4 %オゾンを注入した。

4.1 培地成分による影響

4.1.1 実験方法

液体培地添加によるQβ不活化への影響を調べた。

培地成分濃度はTOC濃度に換算し、精製水に対し、TOC濃度が10, 20, 100, 200, 1,000, 10,000 (mg・l⁻¹) になるよう液体培地を添加した。Qβはすべての系において同量添加し、経時的に採水し、残留オゾン濃度、生残Qβ濃度を測定した。

初期Qβ濃度 2.11×10^5 (PFU・ml⁻¹)、TOC濃度10,000 (mg・l⁻¹) の場合 pH=6.5であった。各RUNの初期条件をTable 3に示す。

4.1.2 実験結果及び考察

実験の結果、TOC濃度が減少するに従い残留オゾン濃度が増加していることから、培地成分がオゾン消費物質として残留オゾン濃度を低下させていることが再度確認され (Fig. 5)、オゾン消費物質添加量によりQβ生存率に変化が見られることが確認できた (Fig. 6)。

従来Qβ不活化を評価する場合、オゾン濃度と接触時間の積であるCt値で評価を行うが、実験からも明らかのようにQβの不活化はCt値だけでは決定できていない (Fig. 7)。

以上の結果から、生残Qβ濃度の変化は、オゾン消費物質による残留オゾン濃度の減少だけでは説明できないことがわかった。

4.2 重炭酸塩による影響

4.2.1 実験方法

Table 3 Initial condition of each run

Run	TOC [mg・l ⁻¹]	Run	TOC [mg・l ⁻¹]
2-1	10000	2-4	100
2-2	1000	2-5	20
2-3	200	2-6	10
Control	Pure Water

Fig. 5 Change of ozone concentration (2)

Fig. 6 Change of Qβ concentration (2)

Fig. 7 Qβ Survival versus Ct value

RSとして重炭酸塩 (NaHCO_3) を用い、RSがQβ不活化に及ぼす影響について調べた。

NaHCO_3 添加量10, 10,000 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) の系に対し経時的に採水し、Qβ不活化の影響を調べた。実験は4.1同様、液体培地を加えており、初期Qβ濃度は 6.83×10^5 ($\text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)であった。

各RUNの初期条件をTable 4に示す。

4.2.2 実験結果及び考察

NaHCO_3 を添加した系においても、各Runにおける残留オゾン濃度の増加速度は一定であり、 NaHCO_3 添加量によって傾きが大きく異なった (Fig. 8)。また、Qβ不活化に関しては、 NaHCO_3 添加に伴うラジカルの減少により、Qβの不活化が抑制されることが確認された (Fig. 9)。

5. 反応式の推定

5.1 オゾン連続暴露系における反応式の推定

従来のオゾンの運転管理指標は、オゾン濃度とオゾン接触時間の積であるCt値である。

実験の結果、オゾン消費物質を含む系に対するオゾンのQβに対する不活化は、同量のオゾンガスを連続的に暴露させた場合、培地成分を含まない場合に比べ減少す

Table 4 Initial Condition of each run

Run	TOC [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]	NaHCO_3 [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
2-7	10	10
2-8	10	10000

Fig. 8 Change of ozone concentration (3)

Fig. 9 Change of Qβ concentration (3)

る傾向が見られ、Ct値で整理しても生残率の予測を行うことはできなかった。

また、オゾン消費物質とRSを同時に添加した系については、RSによるQβの不活化の阻害が確認された。このことよりQβの不活化は残留オゾン濃度のみで決定されず、オゾン消費物質濃度及び、ラジカスカベンジャーの影響を考慮しなければならないことが明らかになった。

そこで、オゾン消費物質濃度及び、ラジカスカベンジャーの影響を考慮したQβ不活化反応速度理論式の推定を行った。

推定の際、以下のような仮定を行った。

- 1) 残留オゾン濃度の増加速度は一定である。
 - 2) オゾン消費物質濃度をTOC濃度で与える。
 - 3) TOC, ラジカスカベンジャー濃度は接触時間 t (min) によらず一定である。
 - 4) オゾンは、Qβ, オゾン消費物質の双方と反応し消費される。
 - 5) ラジカルは、Qβ, ラジカスカベンジャーの双方と反応し消費される。
- 3)について、厳密に言えばTOC濃度、ラジカスカ

ベンジャー濃度は接触時間により変化するが、その変化は少ないと考えられるため、 t によらず一定であるとした。

接触時間 t における $Q\beta$ 濃度 N ($\text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$) の変化速度が、オゾンによる不活化と、ラジカルによる不活化の和で表されるとしたとき反応速度は

$$-\frac{dN}{dt} = \left(k_1 [O_3] \frac{[N]}{[B] + j_1 [N]} \right) + \left(k_2 [O_3] \frac{[N]}{k_3 [B] + [RS] + j_2 [N]} \right) \quad (1)$$

である。なお、 $[B]$ はオゾン消費物質濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、 $[RS]$ はラジカスカベンジャー (RS) 濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、 $[O_3]$ は残留オゾン濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、 k_1 はオゾン反応の速度定数 (min^{-1})、 k_2 はラジカル反応の速度定数 (min^{-1})、 $k_3 [B]$ はオゾン消費物質中の RS 濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)、 j_1 、 j_2 は濃度換算係数 (—) である。 $[N]$ の寄与は $[B]$ 、 $[RS]$ に比べ微少であるため(1)式は以下のように簡略化される。

$$-\frac{dN}{dt} = \left(k_1 [O_3] \frac{[N]}{[B]} \right) + \left(k_2 [O_3] \frac{[N]}{k_3 [B] + [RS]} \right) \quad (2)$$

仮定より、 $[O_3] = kt$ (k : 残留オゾン濃度の速度定数 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)) を導入すると(2)式は

$$-\frac{dN}{dt} = k [N] \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t \quad (3)$$

これを N について解くと

$$-\frac{dN}{N} = k \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t \, dt$$

$$-\ln[N] = \frac{1}{2} k \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t^2 + C$$

ここで C は積分定数である。

$t = 0$ の時 $[N] = [N_0]$ (N_0 : 初期 $Q\beta$ 濃度 ($\text{PFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)) であるとする

$$-\ln \frac{[N]}{[N_0]} = \frac{1}{2} k \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t^2$$

$$\frac{N}{N_0} = \exp \left(-\frac{1}{2} k \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t^2 \right) \quad (4)$$

前述の実験結果を用いて、モデル式の妥当性を確かめるために各係数の値を求めた。

オゾン消費物質として用いた液体培地中に含まれるラジカスカベンジャー以外にラジカスカベンジャーが存在しない場合、 $[O_3]$ は以下のように表される。

$$[O_3] = kt \quad \text{ただし} \quad k = a[B]^b \quad \text{と仮定した}$$

残留オゾン濃度と接触時間より各 slope を求め、これを $[B]$ の関数とし、係数を求めると (Fig. 10)

$$k = 0.0921[B]^{-0.356}$$

となる。ラジカスカベンジャーを考慮した場合、 k が以下のような関数形で表されることとした。ただし、オゾン消費物質中に含まれるラジカスカベンジャー以外にラジカスカベンジャーが存在しない場合、 $l_1/l_2 + l_3 = 1$ である。

$$k = \left(\frac{l_1}{[RS] + l_2} + l_3 \right) 0.0921[B]^{-0.356}$$

$[RS] = 0, 10, 10,000 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の時の、オゾン濃度の増加速度から定数の値を求めると

Fig. 10 Relationship between parameters for the determination of constants (1)

Fig. 11 Relationship between parameters for the determination of constants (2)

$$k = \left(\frac{14.5}{[RS] + 39.8} + 0.636 \right) 0.0921[B]^{-0.356}$$

となる。 $[RS] = 10,000 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の時、 $[RS] \rightarrow \infty$ として簡略化し、(4)式に実験値を代入して、 k_1 を求めると

$$\frac{-2 \ln[N]/[N_0]}{kt^2} = \frac{k_1}{[B]} \quad k_1 = 26.6$$

となる。同様に、 $[RS] = 0$ の時、(4)式に実験値を代入し、 $1/[B]$ の関数とし係数を求めると (Fig. 11)

$$\frac{-2 \ln[N]/[N_0]}{kt^2} = \frac{1}{[B]} \frac{k_1 k_3 + k_2}{k_3}$$

$$\frac{k_1 k_3 + k_2}{k_3} = 72.2 \quad \frac{k_2}{k_3} = 45.6$$

となる。 $[RS] = 10 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の実験値を用い、 k_2 、 k_3 を求めると

$$k_2 = 36.6 \quad k_3 = 0.803$$

となり、すべての係数が求められる。本実験において(4)式は以下のように表せる。

$$\frac{[N]}{[N_0]} = \exp \left(-\frac{1}{2} \left(\frac{14.5}{[RS] + 39.8} + 0.636 \right) 0.0921[B]^{-0.356} \right. \\ \left. \left(\frac{26.6}{[B]} + \frac{36.6}{0.803[B] + [RS]} \right) t^2 \right) \quad (5)$$

ブラック法による実測値と(5)式を用いた計算値の比較を Fig. 12 および 13 に示す。

オゾン消費物質およびラジカスカベンジャーを含む系に関しても実験値と計算値が多少ずれてはいるが、 $Q\beta$

	Observed Value	Calculated Value
Run 2-3	—○—	-----
Run 2-4	—△—	-----
Run 2-5	—□—	-----
Run 2-6	—▽—	-----

Fig. 12 Comparison of observed value (plots) and calculated value (lines) of $Q\beta$ inactivation (ozone-consuming substances)

Fig. 13 Comparison of observed value (plots) and calculated value (lines) of $Q\beta$ inactivation (radical scavenger)

生残率の減少傾向はよく表せている。ブラック法の検出限界以下の $Q\beta$ 生残率が不明であるため、生残率が低い場合の整合性を確認することはできないが、生残率が高い場合は実験値と計算値が比較的一致していることから、理論式自体は妥当性が高く、実験を行った系の $Q\beta$ の予測が可能となった。

5.2 オゾン処理施設への適用

実際のオゾン処理施設でオゾンによる不活化を取り扱う場合、オゾン消費物質および RS を考慮した不活化の評価が必要となってくることは実験から明らかである。

オゾン処理施設への反応式の適用に関しては、多くの

オゾン処理施設は処理水を流動させオゾンと接触させているため、連続式のオゾン吹き込みといえ、(4)式の適用が可能である。

式の各係数は水質因子（オゾン消費物質濃度・ラジカルスカベンジャー濃度）によって決定され、残留オゾン濃度もオゾン気泡の径、水面までの接触距離、単位時間オゾン注入量によって定めることができよう。99.99%不活化を想定した場合、各係数が求められているならば、生残率 (N/N_0) = 0.0001 の場合の、残留オゾン濃度を計算により求め、適切なオゾン注入量を定めることができる。

6. Multiplex PCR による判定

6.1 オゾン消費物質を含む系における M-PCR による判定

オゾン消費物質を含む Run2-5, 2-6 について M-PCR を適用し $Q\beta$ 遺伝子の検出を行った。

ブラック法と M-PCR 法を比較すると、ブラック法では $Q\beta$ が確認されなかったサンプルに対して M-PCR 法では陽性と判定されており、誤陽性の問題が明らかになった (Table 5)。また陰性と判断された系があることから、すべてのサンプルに対して陽性となるわけではなく、オゾンによる $Q\beta$ の反応は、不活化後にも進行して

Table 5 Result of M-PCR (1) (ozone-consuming substances)

well	residual ozone concentration [mg·L ⁻¹]	Ct value [mg·min·L ⁻¹]	surviving $Q\beta$ [PFU·mL ⁻¹]	M-PCR result
1	0	0	2.11×10^5	+
2	0.116	0.582	1.73×10^4	+
3	0.130	0.648	5.40×10^3	+
4	0.299	2.99	3.01×10^3	+
5	0.402	4.02	L	+
6	0.521	7.82	L	+
7	0.667	10.0	L	—
8	0.683	13.7	L	—
9	0.807	16.1	L	—
10	0.780	19.5	L	—
11	0.976	24.4	L	—
—	0.944	28.3	L	N
—	1.15	34.4	L	N

Fig. 14 Result of M-PCR detection (1)

Table 6 Result of M-PCR (2) (radical scavenger)

well	residual ozone concentration [mg·L ⁻¹]	Ct value [mg·min·L ⁻¹]	surviving Qβ [PFU·mL ⁻¹]	M-PCR result
1	0	0	6.82×10^5	+
—	0.103	0.516	2.04×10^5	N
—	0.114	0.569	2.81×10^4	N
2	0.270	2.70	4.00×10^2	+
3	0.288	2.88	7.49×10^4	+
4	0.495	7.42	1.25×10^2	+
5	0.569	8.53	L	+
6	0.630	12.6	L	+
7	0.725	14.5	L	—
8	0.659	16.5	L	+
9	0.944	23.6	L	—
10	0.738	22.1	L	+
11	1.05	31.4	L	—

核酸の損傷を生じさせていることが明らかになった。

誤陽性に関しては、Qβ がオゾンにより損傷を受け、宿主細胞へ吸着・感染できない場合でも、プライマーで挟まれた増幅部分が損傷していなければ PCR 反応には影響がないためと考えられる。そのため、その後の反応の進行に従い PCR の結果が陰性となった場合には不活化されていることが明らかであり、かなり安全側の評価手法として有効であることがわかった。

誤陽性に関しては、オゾン消費物質濃度差による影響は確認できない。これは、ブラック法の検出限界が $10 \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ であり、それ以下の濃度差が不明なためである。

そこで前述した不活化理論式を用いた計算値より求めた Qβ 濃度を用いて比較を行った。

その結果 (Fig. 14), TOC 濃度差による遺伝子検出への影響は見られず、陽性の検出限界濃度は、図中に帯で示す通り約 $1.0 \times 10^{-5} \sim 10^{-1} \text{ (PFU} \cdot \text{mL}^{-1})$ であった。これは、オゾン暴露を受けてない Qβ を用いた、希釈終点法による M-PCR の検出限界値 (約 $1.0 \times 10^{-1} \text{ (PFU} \cdot \text{mL}^{-1})$) を含んでいる。

6.2 オゾン消費物質・ラジカスカベンジャーを含む系における M-PCR による判定

オゾン消費物質とラジカスカベンジャーを同時に含む Run2-7, 2-8 について M-PCR による Qβ 遺伝子検出を行った。

ブラック法と M-PCR 法を比較すると、ラジカスカベンジャーが多量に存在する場合でも、ブラック法では Qβ が確認されなかったサンプルに対して、M-PCR 法では陽性と判定されており、誤陽性の問題が明らかになった (Table 6)。

誤陽性に関しては、ブラック法の検出限界以下の Qβ 濃度が不明であるため、計算式より求めた Qβ 濃度を用いて比較を行った (Fig. 15)。

結果、ラジカスカベンジャーの濃度差による影響は見られず、陽性の検出限界濃度は、約 $1.0 \times 10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ (PFU} \cdot \text{mL}^{-1})$ であった。NaHCO₃ を添加していない系と比較すると、陽性と判断される Qβ 濃度は低下しており、誤陽性と判断されやすいことが明らかになった。

回分式実験結果より、Qβ 不活化はラジカルによる影響が大きいと考え、NaHCO₃ が発生したラジカルと

Fig. 15 Result of M-PCR detection (2)

Fig. 16 Mechanism of Qβ inactivation by ozone

瞬時に反応するため、ラジカルによる Qβ 不活化は抑制され、核酸の損傷までには至らない。

つまり、ラジカスカベンジャーを含む系においては、ラジカルが多量に消費されるため、ラジカルによる Qβ の損傷が減少する (Fig. 16)。これにより、ブラック法による検出では、キャプシドに損傷を受けた Qβ は宿主細胞 (大腸菌) へ吸着・感染ができなくなり測定されないが、核酸部分への損傷が少ないため、M-PCR 検出では遺伝子が増幅され、陽性と判断されたと考えられる。オゾン消費物質を含む系において、陽性の検出限界が下がっているならば、オゾン消費物質として用いた液体培地中のラジカスカベンジャーによるものと考えられる。

7. 結 論

水質因子を考慮したオゾン消毒について、モデルウイルスとして F 特異 RNA 大腸菌ファージ Qβ を用い、実験的考察を試みた。また、ブラック法と Multiplex PCR 法の比較を行うことにより、オゾン消毒の不活化評価手法としての PCR 法の有効性の実験的検討を行った。

本研究での実験及び考察を通じて明らかになった点を以下に示す。

1) 回分式実験において、オゾン消費物質 (液体培地) を含む系のオゾンによる F 特異 RNA 大腸菌ファージ Qβ の不活化は急激な不活化の後、不活化速度が低下する。これは Ct 値の 1 次反応では説明できず、不活化はラジカルの寄与が大きいといえる。

2) 連続式実験においても、オゾンによる F 特異

RNA 大腸菌ファージ Q β の不活化は、残留オゾン濃度の減少を考慮しても Ct 値では説明できない。オゾン消費物質およびラジカルスカベンジャー (NaHCO₃) は F 特異 RNA 大腸菌ファージ Q β の不活化を阻害する。

3) 連続式オゾン暴露系において、F 特異 RNA 大腸菌ファージ Q β の不活化反応式を求めると、接触時間 t における Q β 濃度 N [PFU $\cdot$ m⁻¹] の変化速度は、オゾンによる不活化と、ラジカルによる不活化の和で表される。

$$-\frac{dN}{dt} = \left(k_1 [O_3] \frac{[N]}{[B]} \right) + \left(k_2 [O_3] \frac{[N]}{k_3 [B] + [RS]} \right)$$

[B] : オゾン消費物質濃度 (mg $\cdot$ l⁻¹)

k_1 : 反応速度定数

[RS] : RS 濃度 (mg $\cdot$ l⁻¹)

k_2 : 反応速度定数

[O₃] : 残留オゾン濃度 (mg $\cdot$ l⁻¹)

k_3 : 換算係数

また、Q β 生残率 ($[N]/[N_0]$) とオゾン接触時間 t [min] の関係で求めると

$$\frac{[N]}{[N_0]} = \exp \left(-\frac{1}{2} k \left(\frac{k_1}{[B]} + \frac{k_2}{k_3 [B] + [RS]} \right) t^2 \right)$$

[N₀] : 初期 Q β 濃度 (PFU $\cdot$ m⁻¹)

k : 残留オゾン濃度速度定数 (mg $\cdot$ l⁻¹ $\cdot$ min⁻¹)

と表現できる。実験結果より各係数を求め、数値的に Q β 生残率を得ることが可能となった。

4) F 特異 RNA 大腸菌ファージ Q β に対して、PCR 法、Multiplex PCR 法での検出限界の有意差および、Multiplex PCR の誤陽性の問題が改めて確認された。

Multiplex PCR 法は、かなり安全側の大腸菌ファージ Q β の不活化評価手法として有効であることが明らかになった。Multiplex PCR の誤陽性に関しては、オゾン消費物質による影響は見られないが、ラジカルスカベンジャー (NaHCO₃) が陽性判定に与える影響は著しい。

(原稿受付 2003年4月4日)

(原稿受理 2003年10月10日)

参考文献

- 1) 神子直之, 大垣眞一郎 (1993) ウィ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, pp223-236, 技報堂出版.
- 2) 杉光英俊 (1996) オゾンの基礎と応用, 光琳, pp119-224.
- 3) 関谷毅史, 大垣眞一郎 (1994) 大腸菌ファージ Q β を用いたオゾンのウィルス不活化に関する研究, 水道協会雑誌, 62(701), 21-27.
- 4) Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. and Weiner, A.M. (1990) MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, Fourth Edition, 株式会社トッパン.
- 5) Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. and Zoller, M. (1992) Recombinant DNA, Second Edition, pp69-86, 丸善株式会社.
- 6) 片山浩之 (1997) 水中 RNA ウィルスの RT-PCR 法による定量に関する研究, 平成 8 年度 東京大学博士論文.
- 7) 佐藤敦久 (1992) 水処理 その新しい展開, pp69-84, 技報堂出版.
- 8) 金子光美 (1997) 水の消毒, pp32-189, 日本環境整備教育センター.
- 9) 大垣眞一郎, 関谷毅史 (1990) オゾンの消毒効果, 水質汚濁研究, 13(12), 801-805.