

II-603 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

東京大学大学院	学生員 神宮 誠
東京大学工学部	正会員 神子 直之
東京大学工学部	正会員 山本 和夫
東京大学工学部	正会員 大垣眞一郎

1. はじめに 水の需要が増加するにつれて、水の高度利用が進められてきた。それにともない水の安全性の確保も必要になってきている。そのため、自然水系中での病原性ウイルスの生態メカニズムのより深い理解が必要である。しかし、水中の病原性ウイルスの濃度は存在したとしても非常に低く、種類も多く、検出にも時間がかかる。また、病原性ウイルスの直接測定は、通常の水質分析室では行えない。そこでFRNAファージが注目されてきている。その構造と大きさがA型肝炎ウイルスの属するエンテロウイルス属に類似しているので、自然水系中における病原性ウイルスの存在を示す指標としての可能性があるからである¹⁾。しかし、その反面、自然環境中では増殖しない病原性ウイルスに対し、ファージは増殖をする可能性があるなど異なる点もある²⁾。また、ファージの下水管中や河川中での挙動には未だに不明な点が多い。本研究では、大腸菌ファージQβとT4の不活化速度に温度と有機物が与える影響を調べた。ファージをとりまく環境の例として有機物と温度を変えた系を設定した。

2. 実験手法

2.1 温度の影響を比較する実験 試験管に滅菌純水（逆浸透膜、活性炭、イオン交換膜、分画分子量20000の限外ろ過膜、ポアサイズ0.22μmの精密ろ過膜を経た純水）を10mL入れた。その中に大腸菌ファージQβとT4の濃度を適度に調節した液体培地を0.1mL入れ、これを試料とした。試料を設定温度（37℃、20℃、4℃）のインキュベーターの中に入れ、測定時のみ取り出す。ファージの測定は、二層寒天法によった。

2.2 有機物濃度の影響を調べる実験 ファージの入った液体培地を有機物とした。滅菌純水で、順次希釈してTOC濃度を変えていく。それをそれぞれ試料とした。また、ファージの入った液体培地を濃縮洗浄し、それを希釈したものを低TOC濃度試料とした。有機物として生下水をろ過したものを原液とする実験も行った。滅菌済みの試験管の中に、原液を滅菌純水で10倍、100倍、1000倍希釈したものを入れた。そのなかに大腸菌ファージQβとT4を入れ、これを試料とした。この時、下水希釈水のTOC濃度に影響しないように、投入するファージの濃度は、洗浄濃縮の後、希釈して十分低くすることに注意する。温度を37℃に設定し、ファージの不活化速度をはかった。なお、本実験のTOC濃度のほとんどは計算値である。

表1 実験の種類

	有機物の種類とTOC濃度(mgC/l)	
	液体培地	下水
Qβ	0.01~1000	0.06~60
T4	0.01~1000	0.06~60

3. 実験結果と考察

3.1 温度比較実験の結果と考察 ファージ濃度の常用対数値を縦軸にとり、経過時間を横軸にした結果を図1に示す。濃度変化は図上で直線になり、1次反応と仮定することができる。よって、濃度と時間の関係は次式で表せる。 $dC/dt = -K'C$ これより $t=0$ の時、初期濃度 $C=C_0$ で解くと $\ln(C/C_0) = -K't$ となる。さらに、 $K'=2.3K$ として式を変形すると $\log(C/C_0) = -Kt$ となる。本実験では、Kを不活化係数としている。温度が低くなるにつれて、不活化係数も小さくなる。温度依存性があるといえる。次に不活化係数と温度の関係をアレニウスの式で表したものを図2に示す。アレニウスの式 $\log K = \log A - B/T$ （K：不活化係数 A、B：比例定数 T：絶対温度）37℃、20℃、4℃におけるK値を求め、直線回帰を行いA、Bを求めた。その結果、この実験条件（37℃、滅菌純水中にTOC濃度 1.29×10^{-4} mgC/L程度）では、T4の方が、Qβよりも温度の影響を受けやすい。

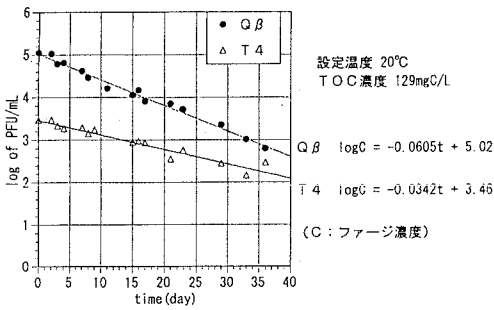


図1 不活化速度が1次反応に従っている例

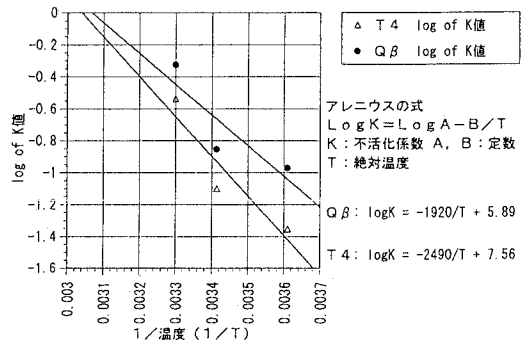


図2 絶対温度とk値の関係

3. 2 有機物濃度の影響の結果と考察 図3はT O C濃度と不活化係数Kの関係を示したものである。今回の実験では、T O C濃度のほとんどは、希釈に用いた滅菌純水のT O C濃度を0.00mgC/Lと仮定して計算した計算値である。そのため、厳密な濃度比較はできない。しかし濃縮洗浄した試料以外は、液体培地を希釈してできた試料なので希釈倍率の差による濃度の相对比较はできると考える。その結果より以下のことが言える。

- ①T O C濃度が1mgC/Lの前後では、Q βとT 4の不活化係数に大きな変化がある。
- ②T O C濃度が薄くなると、培地と下水の時の不活化速度に差がなくなる。
- ③T O C濃度1mgC/L以上のところにおいて、培地では不活化速度に差がないが、下水ではQ βとT 4の不活化速度に差がでる。
- ④培地希釈水中も下水中も、Q βの不活化速度はT 4の不活化速度よりも速い。

4. 4 結論

- 1) 温度が高いほど、不活化係数は大きくなる。
- 2) T O C濃度が1mgC/L前後で、不活化係数に大きな変化がある。
- 3) Q βの方がT 4よりも温度の影響を受けにくい。
- 4) F特異RNA ファージは、太陽光、熱、pH、紫外線、及びクロラミンなどの多くの消毒剤に相対的に抵抗性があることが知られている。しかし、今回の全実験（4℃、20℃の培地希釈水中、37℃の培地希釈水中、ろ過下水中）においては、RNAファージQ βの不活化係数のほうがDNAファージT 4よりも大きい。
- 5) 培地希釈水中よりも下水中の方が、Q βとT 4の不活化係数の差が大きい。

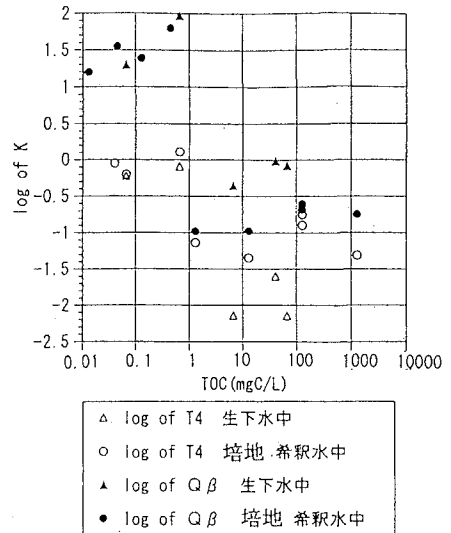


図3 T O C濃度と不活化係数K

参考文献

- 1)大垣眞一郎「ウイルス指標としてのバクテリオフージ」、水処理（佐藤敦久編）、技報堂出版、p. 33-p. 42, 1992 2)IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology :Bacteriophages as Model Viruses in Water Quality Control. Wat. Res., Vol. 25, No. 5, pp529-545, 1991