

II-604

し尿成分によるFRNAファージの濃度測定への影響

東京大学工学部 正会員 神子直之 山本和夫 大垣眞一郎

1.はじめに

FRNAファージは、都市下水、下水処理水、河川水等より容易に検出される。そのため、ウイルスを念頭に置いた水系の衛生状態の指標として、FRNAファージをどのように適用すればよいか、議論がなされている。

FRNAファージの濃度は、都市下水において $10^2 \sim 10^4$ PFU $\cdot$ mL $^{-1}$ であり¹⁾²⁾³⁾、そのすべてが糞便由来であるとすると糞便における濃度は $10^8 \sim 10^9$ PFU $\cdot$ g $^{-1}$ になると計算されている³⁾⁴⁾。しかし、実際の糞便中の濃度はそれよりはるかに低い($0 \sim 10^2$ PFU $\cdot$ g $^{-1}$)と報告されており⁵⁾、筆者らによるし尿の測定結果⁶⁾もその報告を支持するものであった。

糞便中の低濃度と下水中の高濃度という不統一性の原因は明らかでなく、一つには下水管内でのファージの増殖、あるいは、糞便中の阻害物質によるファージ濃度の過小評価であろうと考えられる。前者については、適当な条件を満たせばファージ増殖が見られることが明らかになっている⁶⁾。

本研究は後者について、すなわち、糞便中の物質によるファージの検出阻害、濃度の過小評価について、FRNAファージQ β および対照としてDNAファージT4を用いて、実験的に検討したものである。

2.実験方法

首都圏のし尿処理場に搬送されて来るし尿を実験に用いた。当処理場の受け入れし尿は、浄化槽汚泥がほとんどであるが、生し尿を多く含む場合にのみ、受け入れピットに投入する直前にし尿を採取した。採取したし尿を、500mLのガラス製密閉容器に入れて氷冷しながら実験室へ運び、実験に供した。

し尿に対して次に記す前処理を行い、調整し尿を作成した。し尿の約50gを12,000 rpm、30分、4℃で遠心分離を行い、上澄みをポアサイズ0.45 μ mのフィルターで濾過して除菌を行った。その濾液に紫外線(波長254 nm)を照射(照射時間30分で紫外線量は120,000 μ Ws $\cdot$ cm $^{-2}$ となり、Q β が9log不活化する線量である。)し、し尿に含まれる野生の大腸菌ファージを不活化した。

Q β とT4両ファージの保存液(濃度は約 10^3 PFU $\cdot$ mL $^{-1}$)に対して従来⁷⁾の方法に従って定量操作を行ったが、上層寒天(プレート1枚当たり4 mL)に調整し尿を0.1 $\sim$ 0.5 mL添加したプレートも作製し、両ファージの計数値がどのような影響を受けるか調べ、プレート効率(efficiency of plating)(調整し尿を添加した場合のファージの計数値を、調整し尿を添加しない場合の計数値で除したものを)を計算した。なお、宿主菌株としては*E. coli* K12 A/ λ (P $^+$)を用いた。

3.実験結果と考察

図1に、紫外線照射時間30分の調整し尿を添加した実験結果を、図2に照射時間50分の実験結果を示す。照射時間が30分と50分のどちらにおいても、FRNAファージQ β は調整し尿の添加量に応じてプレート効率が小さくなっているのに対して、DNAファージT4は添加のプレート効率に変化が見られなかった。DNAファージの検出に影響せず、FRNAファージの検出に阻害を与える物質の存在が明らかである。30分と50分の両データに差がないことから、その物質は紫外線によって影響を受けにくい物質であり、紫外線照射によって生成されたものではないと推察される。

FRNAファージは、RNA分解酵素によって増殖阻害を受け、RNA分解酵素が1プレート当たり200 μ g添加されたプレート上にブラックを作らないことが知られている。し尿成分によるQ β のプレート効率の変化を、RNA分解酵素の濃度に換算して表すために、上層寒天にRNA分解酵素(RNase A, Sigma)を希釈して添加し、Q β 保存液の定量を行ってプレート効率の変化を調べた。

図3に、RNA分解酵素添加によるQ β のプレート効率への影響の実験結果を示す。添加量に応じてプレート効率は減少した。図3により、反応は一次反応的であると仮定できたため、図1と図2についても直線を仮定して回帰を行い、し尿の混入率が100%であるとした場合のプレート効率を計算したところ、図1と図2よりそれぞれ、

-2.8 log、-3.0 logとなり、平均が-2.9 logであった。同等のプレート効率となるRNA分解酵素濃度を計算したところ、 $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ となった。

し尿におけるFRNAファージ濃度の過小評価の程度は、 $Q\beta$ を用いた場合、上層寒天4 mLに試料を0.1 mL入れる測定においてし尿の混入率は0.025となるため、上の回帰で求めた値により $10^{-2.9 \times 0.025} = 0.85$ となり、15%程度の減少であると考えられる。よって、検出阻害物質はFRNAファージの検出にそれほど大きな影響を与えていない可能性が高い。しかし、検出を阻害すること、増殖を阻害することであり、野生のファージの場合に、増殖の阻害される程度が、 $Q\beta$ の場合よりも大きい可能性もあるので、さらに検討が必要であろう。DNAファージの測定に影響を与えず、FRNAファージの測定のみに影響する成分の存在が本研究で明らかになったが、それがFRNAファージの生態にどのような影響しているのかは、今後の課題である。

4.まとめ

- (1) 紫外線処理した調整し尿中には、 $Q\beta$ の検出を阻害し、T4の検出を阻害しない物質が含まれていた。
- (2) $Q\beta$ がし尿中において受ける増殖阻害は、RNA分解酵素濃度に換算すると $13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ であった。
- (3) $Q\beta$ を用いて調べた結果によれば、し尿中の阻害物質によってFRNAファージ濃度は15%低く計測される程度で、測定値に大きな影響を与えないことがわかった。
- (4) し尿中の阻害物質が野生のFRNAファージの挙動にどの程度影響しているかについては、さらに検討が必要であろう。

5.参考文献

- 1) Havelaar et al. (1985). F Specific RNA Bacteriophages in Sewage: Methodology and Occurrence. Wat. Sci. Tech., Vol.17, No.4/5, pp645-655
- 2) Ketatanakul, et al. (1989). Indigenous Coliphages and RNA-F-Specific Coliphages Associated with Suspended Solids in the Activated Sludge Process. Wat. Sci. Tech., Vol.21, No.3, pp73-78
- 3) 吉川(1993). 「都市河川水質から見た下水処理水消毒効果の評価」 東京大学卒業研究.
- 4) Havelaar (1986). F-Specific RNA Bacteriophages as Model Viruses in Water Treatment Processes. Thesis State University Utrecht, The Netherlands.
- 5) Havelaar et al. (1990). F-Specific RNA Bacteriophages and Sensitive Host Strains in Feaces and Wastewater of Human and Animal Origin. J. of Appl. Bacteriol., Vol.69, pp30-37
- 6) 神子、大垣(1994). 「大腸菌ファージのし尿中の挙動」 第28回日本水環境学会年會講演集, pp430-431
- 7) 神子、大垣(1993). 「自然水系における大腸菌ファージの挙動」 「環境微生物工学研究法（土木学会衛生工学委員会編）」 pp309-312. 技報堂出版.

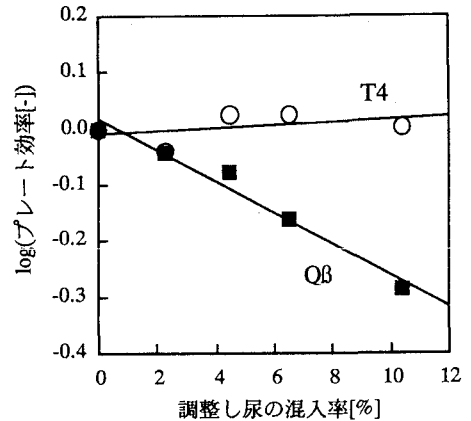


図1 ファージのプレート効率に及ぼす調整し尿の添加の影響（紫外線照射30分）

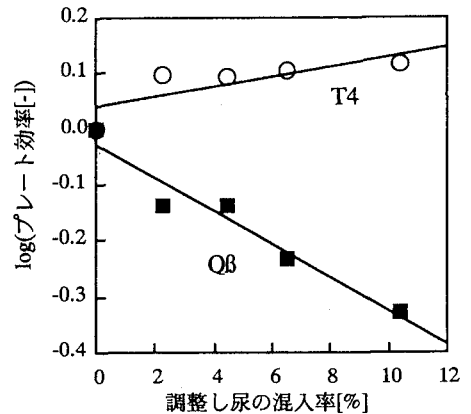


図2 ファージのプレート効率に及ぼす調整し尿の添加の影響（紫外線照射50分）

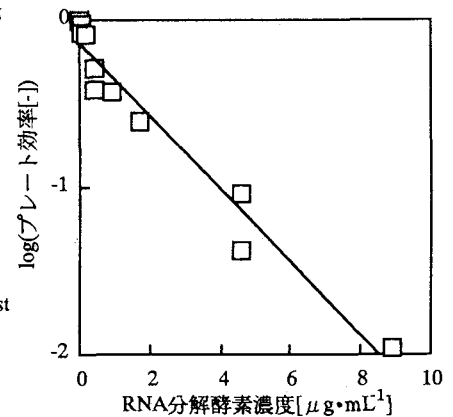


図3 $Q\beta$ のプレート効率に及ぼすRNA分解酵素の添加の影響