Ⅱ－653　セルロース吸着・凝集法の大腸菌ファージへの適用

東京大学大学院　学生員　神宮　誠
横浜国立大学工学部　正会員　神子　直之
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]。指標としての可能性を示すためにも、同一の環境条件下における大腸菌ファージと病原性ウイルスとの挙動を比較する必要がある。そのためにも水中の病原性ウイルスや大腸菌ファージの濃縮方法の確立が必要である。セルロース・吸着凝集法は試料水の水質に関係なく、特別な器具や大がかりな機材を必要としない水中ウイルスの濃縮方法である[2]。この方法は大量の水中に混入している微量のウイルスが水中では通常マイナスに帯電した状態で浮遊、あるいは固形物に吸着していることに着目し、試料水中に陰イオン交換体であるＤＥＡＥ－セルロース（以下セルロース）を直接添加して、ウイルスをセルロースに吸着させる。その後、ウイルスの吸着したセルロースと試料水中に混入している有機固形物を高分子凝集剤で凝集させ、生成したフロックをナイロンメッシュで回収して、フロックからウイスルを誘出させる。しかし腸管系ウイスルの回収、濃縮には有効であるが、ＦＲＮＡファージの誘出率が低いと言われている。そのため、セルロース吸着・凝集法におけるファージの吸着・誘出の問題点を明らかにするために大腸菌ファージＱβをモデルにして検討した。

２．実験方法

２－１　試料のろ過方法　液体培地に入った大腸菌ファージＱβ（以下Ｑβ）を試験管に入った滅菌済み超純水に投入し、試料原液とした。乾燥セルロースを試料原液に入れた後に、凝集剤を適量投入し試料とした。０．４５μｍのメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過を行った。凝集したフロックの一部は試験管内壁に付着しているので、超純水で内壁を洗浄しフロックを全て膜上に落とし、試料をろ液とろ過残留物（フロック）に分けた。フロックに吸着されたＱβはビーフエキスによって誘出した。試料原液、ろ液、誘出液中のＱβをプラック法で測定した。

２－２　セルロース添加量と吸着率に関する実験　Ｑβの吸着率に影響を与える因子として試料あたりのセルロース添加量（ｍｇ／ｍｌ）を設定し、０．２～２０ｍｇ／ｍｌの範囲でセルロースを試料に添加した。今回はファージ濃度、凝集剤添加量は一定とし、吸着率を次のように定義した。

吸着率（％）＝（試料原液中Ｑβ濃度－ろ液中Ｑβ濃度）÷試料原液中Ｑβ濃度×１００

２－３　セルロース添加量と誘出率に関する実験　試料に添加されたセルロースは吸引ろ過により１００％回収されビーフエキスのはいった試験管中に移されたと仮定した。ビーフエキスあたりのセルロース添加量を１．３～４０ｍｇ／ｍｌに設定し、誘出率を次のように定義した。

誘出率（％）＝誘出液中Ｑβ濃度÷（試料原液中Ｑβ濃度－ろ液中Ｑβ濃度）×１００

２－４　ｐＨと誘出率に関する実験　誘出率に影響を与える因子としてビーフエキスのｐＨを設定し、ｐＨ＝６～１０の範囲で実験を行った。試料原液１０ｍｌにセルロースを０．０１ｇ添加した後に５％ビーフエキス５ｍｌで誘出した。

２－５　ＮａＣｌ濃度と誘出率に関する実験　誘出率に影響を与える因子としてビーフエキスのＮａＣｌ濃度を設定し、０～５％の範囲でＮａＣｌを添加した。試料原液１０ｍｌにセルロースを０．０１ｇ添加した後に５％ビーフエキス５ｍｌで誘出した。

３．実験結果と考察

３－１　セルロース添加量と吸着率に関する実験結果と考察　図１は試料原液あたりのセルロース添加量とＱβ吸着率の関係を示したものである。試料原液あたりのセルロース添加量が５ｍｇ／ｍｌ以上で吸着率は１００％近くなったが添加量１ｍｇ／ｍｌ以下では吸着率は不安定であった。ポリオウイルスはセルロース添加量０．０３％（乾燥重量）でほぼ１００％吸着されることから、ポリオウイルスと大腸菌ファージＱβとではセルロースへの吸着力が異なる事が分かる。

３－２　セルロース添加量が誘出率に関する実験結果と考察　図２はビーフエキスあたりのセルロース添加量とＱβ誘出率の関係を示したものである。図１に示したように試料原液あたりのセルロース添加量が５ｍｇ／ｍｌ以上でＱβはほぼ１００％吸着されたが、そのときのデータは図２のビーフエキスあたりのセルロース添加量が１０ｍｇ／ｍｌ以上の範囲のものである。この場合の誘出率は１％以下であった。同様に図１に示した試料原液あたりのセルロース添加量１ｍｇ／ｍｌ以下の範囲のデータは、図２のビーフエキスあたりのセルロース添加量１０ｍｇ／ｍｌ以下の範囲のデータであり誘出率は不安定であった。実験条件が多少異なるがビーフエキスあたりのセルロース量が０．０３％の時にポリオウイルスの誘出率は９０％以上であると報告されている[2]。このことからポリオウイルスとＱβとでは誘出率に大きな差があることが分る。

３－３　ｐＨと誘出率に関する実験結果と考察　セルロースとポリオウイルスの間に働く引力には相互的疎水作用と電気的引力が影響している[3]。疎水性相互作用はＮａＣｌや$NaNO_3$を添加する事によって弱められ[3]電気的引力はｐＨによって変化する。図３は試料原液１０ｍｌにセルロースを０．０１ｇ添加した後に５ｍｌの５％ビーフエキスで誘出した時のｐＨと誘出率の関係を示したものである。ビーフエキスへのＮａＣｌ添加量を０％、１％の２系を設定した。誘出率は不安定であるがｐＨ≒９において相対的に高い値を示した。

３－４　ＮａＣｌ濃度と誘出率に関する実験結果と考察　図４は試料原液１０ｍｌにセルロースを０．０１ｇ添加後に５％ビーフエキス５ｍｌで誘出した時のｐＨ＝９におけるビーフエキスへのＮａＣｌ添加量と誘出率の関係を示したもである。誘出率は最大で１８％になった。

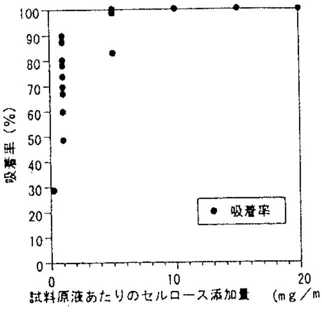

図1　試料原液あたりのセルロース添加量と吸着率

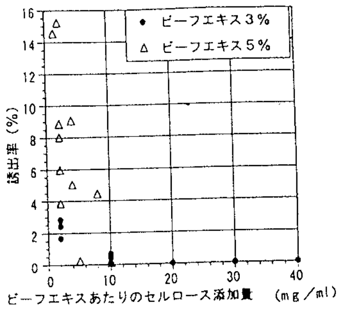

図２　ビーフエキスあたりのセルロース添加量と誘出率

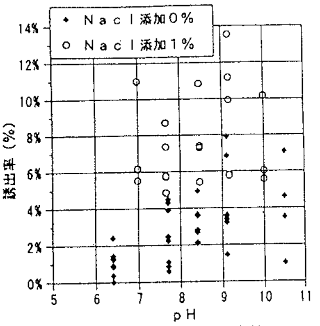

図３　ｐＨと誘出率（%）

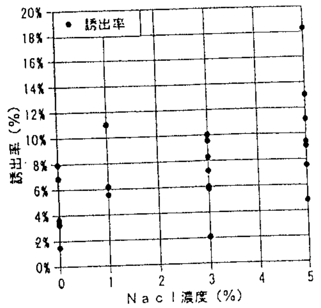

図４　Ｎａｃｌ濃度と誘出率

４．まとめ

セルロース吸着凝集法を大腸菌ファージに適用した。試料原液あたりのセルロース添加量を多くした場合、吸着率は高くなった。しかし、吸着率を１００％にすると誘出率は１％以下という結果になった。一方、試料原液あたりのセルロース添加量を少なくすると、誘出率はあがらないが吸着率、誘出率ともに不安定であった。

参考文献　１）大垣　眞一郎「ウイルス指標としてのバクテリアファージ」：水処理（佐藤敦久編）：技報堂出版、p.33-p.42,1992　２）矢野　一好：セルロース吸着・凝集法による水中ウイルス試験方法の検討：水道協会雑誌平成３年５月第６８０号 pp.10-23　３）金　台東、矢野　一好：活性汚泥に移行したポリオウイルスの誘出条件について：水環境学会誌　第１７巻第８号PP.509-516､1994