

VII-2

下水汚泥からのウイルス誘出における多糖分解酵素の有効性

東北大学 学生員○佐野大輔 東北大学 正会員 福士謙介
東北大学 正会員 熊谷幸博 東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

病原性ウイルスは感染者の糞便から高濃度で検出されるが、これらは下水と共に下水処理場へ流入する。そのような病原性ウイルスの大部分は、下水処理プロセスにおいて下水汚泥によって捕獲されていることが、これまでの研究により明らかになっている¹⁾。下水汚泥からの検出例のある病原性ウイルスを表-1に示す。これらの多くは汚泥中のポリマーマトリックス内に強固に吸着し²⁾、そのすべてを検出のために液相に誘出することは極めて困難である。

しかしながら、下水汚泥の大部分は一般廃棄物として埋め立て処分されており、それらに含まれている病原性ウイルスを定量的に把握することは、公衆衛生上必要不可欠である。

以上のような理由から、汚泥中の病原性ウイルスを定量する新たな方法の開発が切望されている。

2. 汚泥からのウイルス検出の問題点

汚泥中のポリマーマトリックス内のウイルスは、検出のために液相に誘出させなければならない。しかし汚泥中では、ウイルスが生物フロックの成長過程でポリマーマトリックス内に取り込まれて存在する可能性がある。そのためUSEPA（米国環境保護庁）により採用されている10%ビーフエキスを溶液を用いた方法³⁾が、汚泥中のポリマーマトリックス内からのウイルスの誘出に対して効果的であると判断できない。現に著者による実験では、下水汚泥へスパイクされたウイルスの10%ビーフエキスを溶液による誘出効率率は34.6%にとどまっている³⁾。そのことに対する改善策はこれまでも行われてきているが、その多くは超音波などの物理的な力を利用したものであり、決定的な誘出方法とはなっていない。汚泥中のウイルスの定量を目指すには、ウイルスの感染価に影響を与えることなく、ポリマーマトリックス内に取り込まれたウイルスを効率的に検出する手段の開発が必要不可欠である。

表-1. 汚泥の種類と検出されたウイルス

汚泥の種類	ウイルスの型
消化汚泥	ポリオウイルス1, 2, 3型
	レオウイルス コクサッキー B ₅
	エコーウイルス7, 22/23
生汚泥	ポリオウイルス1, 2, 3, 型
	アデノウイルス1,2型
	レオウイルス2, コクサッキーB ₅

3. 多糖分解酵素によるウイルス誘出

汚泥中のポリマーマトリックスの主成分は細胞外多糖と細胞外タンパク質、および核酸である。したがって、これらを選択的に分解できればポリマーマトリックスの分解が達成できると考えた。

その中でも多糖は、その電気的な性質から汚泥中では直鎖として存在することが推測される。また、腸管系の病原性ウイルスの外殻はタンパク質により構成されているので、多糖を分解してもウイルスの不活化を生じない。したがってポリマーマトリックスを分解してウイルス誘出の効率を上げるには、細胞外多糖を選択的に分解することが望ましい。

そこで今回は、多糖中の β -1,4-グルコシド結合を選択的に切断するセルラーゼに着目し、セルラーゼを用いて汚泥中のウイルスの効率的な誘出が可能であるかを検討した。

4. 本研究の目的

本研究では、まずBGM細胞（アフリカミドリザル腎臓細胞）を用いたブラック法が、ウイルス感染価を決定する手法として十分な信頼性を有しているかを統計的に検討した。さらに、完全な病原性ウイルスの回収を目指し、セルラーゼを用いて生物フロックを分解することによるウイルスの効率的な誘出方法の可能性を検討した。なお、ウイルス感染価はブラック形成単位（PFU）で表した。また、テストウイルスとして弱毒ポリオウイルス1型(Lsc,2ab株)を用いた。

5. 実験方法

汚泥サンプルは、仙台市内の下水処理場の汚泥サンプル採取口から採取し、4℃で冷蔵保存した。実験はサンプル採取日から4日以内に行った。ウイルスの汚泥中の固形分への吸着実験、および汚泥中からのウイルス誘出実験は、USEPAに採用されている方法に従った³⁾。ウイルスの固形分への吸着実験の際に生じた上清を上清サンプル①とした。固形分表面にファンデルワールス力で吸着したウイルスの除去を目的として、ウイルス誘出実験に先立って滅菌蒸留水による固形分の洗浄を2回連続して行った。具体的には、ウイルス吸着実験後のペレットと滅菌蒸留水とを遠心管内で手によって2分間混合し、2500×g、15分間遠心分離する操作を2回続けて行った。その際生じた2つの上清を、生じた順に上清サンプル②、③とした。汚泥中からのウイルス誘出実験において、10%ビーフエキスを溶液に添加する酵素には、*Trichoderma reesei*由来のセルラーゼを用いた。また、実験後の誘出液をウイルス誘出液サンプルとした。BGM細胞を用いたブラック法は常法⁴⁾に従った。以上のすべての操作は、東北大学工学部土木工学科内のP2レベルバイオハザード実験室内の安全キャビネット内で行った。

キーワード 下水汚泥 病原性ウイルス セルラーゼ BGM細胞 ブラック法
東北大学工学部土木工学科環境水質分野 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 TEL 022(217)7483

5. 実験結果および考察

供試ウイルス液から12個のサンプルを抽出し、BGM細胞を用いたブラック法によってウイルス感染価を求めた。その結果、全サンプル数の91%が、ウイルス感染価の平均値 $\pm 17.5\%$ の範囲に含まれていた。この平均値 $\pm 17.5\%$ という値は、Standard Methodsに採用されている生物試験（9217B）の精密度を示すために用いられているものである。したがって、BGM細胞を用いたブラック法は、サンプルのウイルス感染価を求める手法として信頼性が高いと言える。

10%ビーフエキスを溶液にセルラーゼを添加した場合と添加しない場合について、汚泥中の固形分からのウイルス誘出効率を比較した。比較のための実験は3回繰り返した。その結果を表-2に示す。

表-2の結果をもとに、10%ビーフエキスを溶液にセルラーゼを添加した場合と添加しない場合のウイルス誘出液のウイルス感染価に有意な差が生じるかを検定（ t 検定）した結果、1%の危険率で有意な差は生じなかった。その理由としては、以下の2つが考えられる。

1つは、最初沈殿池から発生する下水汚泥に含まれるセルロースの大部分は自然環境に由来するものであるために、そのようなセルロースはセルラーゼの作用を受けにくいリグノセルロースの状態で存在した可能性があることである。

もう1つは、今回の実験で使用する汚泥サンプルには、分解されてウイルス誘出に影響を与えるのに十分な量のセルロースが含まれていなかった可能性があることである。下水汚泥中に含まれるセルロースの大部分は自然環境に由来するものなので、汚泥中のセルロース含有量は、下水の発生源に大きく依存する。さらに、下水網が農村部よりも都市部において発達してきたことを考えあわせると、下水汚泥中のセルロース含有量が十分でなかった可能性は高いと言える。

6. 結論

BGM細胞を用いたブラック法は、サンプル中のウイルス感染価を決定する手法として信頼性の高い手法であった。

10%ビーフエキスを溶液にセルラーゼを添加した場合と添加した場合のウイルス誘出液のウイルス感染価は、1%の危険率で有意な差は生じなかった。すなわち、10%ビーフエキスを溶液に添加された状態のセルラーゼは、汚泥中の固形分からのウイルス誘出に対して影響を与えなかった。

謝辞

この研究を進めるにあたりご指導および助言をいただいた東京都立衛生研究所の矢野一好博士に心より感謝いたします。また、この研究を進めるにあたりご援助をいただいた（財）科学技術振興事業団に感謝いたします。

参考文献

- 1) A. L. Nielsen and B. Lydholm. 1979. Methods for the Isolation of Virus from Raw and Digested Wastewater Sludge. Water Res. 14:pp.175-178.
- 2) O. C. Pancorbo, P. R. Scheuerman, S. R. Farrah, and G. Bitton. 1980. Effect of Sludge Type on Poliovirus Association with and Recovery from Sludge Solids. Can. J. Microbiol. 27:pp.279-287.
- 3) 土木学会東北支部. 1997. 平成9年度 東北支部技術研究発表会 講演概要. pp.768-769.
- 4) 日本薬学会編. 1990. 衛生試験法・注解. ウイルス試験. pp.1833-1841.
- 5) Environmental Protection Agency. 1992. Appendix H. Method for the Recovery and Assay of Enteroviruses from Sewage Sludge in Environmental Regulations and Technology. pp.117-145.

表-2. 上清サンプルおよびウイルス誘出液におけるウイルス感染価

試行	汚泥サンプル 総乾燥 固形物量 (%)	供試 ウイルス液 感染価 (PFU/mL)	セルラーゼ	上清 ① 感染価 (PFU/mL)	上清 ② 感染価 (PFU/mL)	上清 ③ 感染価 (PFU/mL)	ウイルス 誘出液 感染価 (PFU/mL)
1	0.62	3.9×10^4	使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	1.1×10^4
			不使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	1.3×10^4
2	0.59	2.9×10^4	使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	1.0×10^4
			不使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	0.90×10^4
3	0.65	3.7×10^4	使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	0.98×10^4
			不使用	$10 >$	$10 >$	$10 >$	1.0×10^4