

VII-60

Enzymatic Virus Elution 法（EVE 法）による下水汚泥からの腸管系ウイルス誘出

東北大学大学院 学生員○佐野大輔
正会員 福土謙介
正会員 大村達夫

1. はじめに

下水汚泥の処分や有効利用をする際、処理に携わる人の罹患を避けるために、病原菌の除去もしくは不活化は避けて通ることはできないプロセスの一つである。特にポリオウイルスや夏風邪の原因ウイルスであるコクサッキーウイルスなどの病原性を持つ腸管系ウイルスは、他の環境にくらべて高濃度に下水汚泥中に存在することが報告されており¹⁾、これらの除去もしくは不活化は重要課題である。

下水汚泥中の病原ウイルスの除去や不活化処理、およびその評価を行うためには、下水汚泥中の病原ウイルスの存在量を正確に把握する必要がある。しかしながら現段階では、下水汚泥中の病原ウイルスを正確に定量する手法が存在しないため、今後下水汚泥の有効利用が普及していく際に大きな妨げとなることが予想される。そのため、下水汚泥中の病原ウイルスの正確な定量方法の開発が切望されている。

汚泥フロックによる病原ウイルスの捕獲の機構は、汚泥フロック自体がヘテロな構造物であるために、明らかにされていない。疎水性相互作用、van der Waals 力、電気二重層力および溶媒和力等が同時に作用し合うことにより、汚泥フロックの極近傍にウイルスが安定するものと考えられる。このように安定したウイルスは、汚泥フロックの成長に伴い、汚泥フロックの一部として取り込まれる可能性がある。汚泥フロックのマトリックスを形成する細胞外ポリマーの組成の約60%がタンパク質であり²⁾、さらにウイルスの構造が核酸をタンパク質で覆ったものであることを鑑みれば、このことは容易に想像できる。どの位の量のウイルスが汚泥フロックに取り込まれるかを推定するのは困難であるので、正確な定量を目指すためには、汚泥フロック表面および内部に存在するウイルスを同時に回収する必要がある。さらにその際、ウイルスの感染価を測定する上で信頼性の高い組織細胞を用いたブラック法を可能にするためには、ウイルスの感染能力を奪うことなく回収を行うことが必須となる。

本研究は、汚泥中の病原ウイルスの定量方法の開発を最終目的とし、多糖分解酵素混合液を用いてウイルスの活性に影響を与えずに汚泥中の多糖を寸断することにより、汚泥フロックを分解してウイルスの下水汚泥からの誘出を促進することを目的とした。

2. 実験方法

実験には、弱毒ポリオウイルス I 型（以下単にウイルスと記す）を用いた。また、汚泥サンプルは H 処理場の最終沈澱池からの返送汚泥を用いた。

実験のフローを図1に示した。汚泥へのウイルス吸着処理では、ウイルス感染価が 10^2 PFU/mL にな

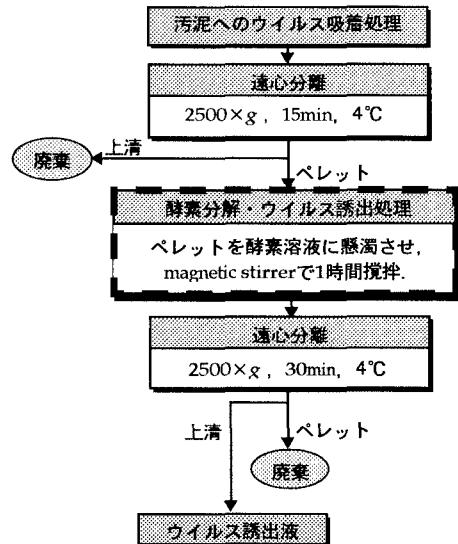


図1. 実験方法のフロー。対照実験は、点線部の処理で酵素を含まない溶液および10%ビーフエキス溶液で行うことにより行った。

表1. 実験に使用した酵素

酵素名 (EC)	至適 pH	活性
セルラーゼ (3.2.1.4)	4.5 ～6.0	β -1,4-グルコシド結合をendo型に加水分解
β -D-グルコシダーゼ (3.2.1.21)	5.0	β -1,4-グルコシド結合をexo型に加水分解
リゾチーム (3.2.1.17)	6.0 ～8.0	細胞壁中のペプチドグリカンを二糖単位で加水分解
α -D-ガラクトシダーゼ (3.2.1.22)	6.5	α -1,4-ガラクトシド結合をexo型に加水分解
ラミナリナーゼ (3.2.1.6)	5.0	β -1,3-グルコシド結合をendo型に加水分解

るようにウイルス懸濁液を汚泥に添加した。汚泥へのウイルス吸着処理および汚泥からのウイルス誘出処理の方法はEPA³⁾に従った。酵素分解・ウイルス誘出処理において用いた多糖分解酵素混合液（以下、酵素溶液）中の酵素を表1に示した。この処理の際、汚泥バルク中の多価陽イオン（ Mg^{2+} , Ca^{2+} など）を回収して汚泥フロックの脆弱化を行う目的で、陽イオン交換樹脂（Cation exchange resin ; CER ; AMBERLITE IRP-88）を10g/Lの濃度で添加した。

Key Words : 下水汚泥, 多糖分解酵素, 腸管系ウイルス

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 TEL 022-217-7483 FAX 022-217-7482

除菌処理は、サンプルを0.2 μ mメンブレンフィルター（Millipore）でろ過後、1%の濃度で抗生物質-抗真菌剤（GIBCO BRL）を添加することにより行った。ウイルス感染価の測定は、BGM細胞を用いたブラック法によって行った。ウイルス回収率は、式（1）によって算出した。

酵素溶液によって汚泥中の糖が溶出していることを確認するために、同様の実験をウイルスの添加をせずにを行い、それによって得られたサンプルに対し、フェノール硫酸法によって糖濃度を測定した。汚泥からの糖溶出率は、式（2）によって算出した。

$$\text{ウイルス回収率 (\%)} = \frac{\text{ウイルス誘出液のウイルス感染価}}{\text{ウイルス摂取時の汚泥のウイルス感染価}} \quad (1)$$

$$\text{糖溶出率 (\%)} = \frac{\text{ウイルス誘出液の糖濃度}}{\text{汚泥サンプルの糖濃度}} \quad (2)$$

3. 実験結果

表2に、酵素溶液を用いた場合と対照実験とのウイルス誘出率の比較を示した。これによると、ウイルス誘出効率には増減があるものの、酵素溶液を用いた場合、対照実験と同程度もしくはそれ以上の誘出効率を示している。

また表3に、酵素溶液を用いた場合と対照実験との糖溶出率の比較を示した。これによると、10%ビーフエキス溶液による処理ではほとんど糖が溶出していないが、酵素溶液もしくはCER溶液（酵素を添加していない溶液）を用いることにより汚泥全体の糖の約60%が液相に溶出していることがわかる。酵素溶液とCER溶液との間にはほとんど差はないが、これはCERによるイオン交換の結果、 K^+ の濃度が増加し、電気二重層の厚さが増して斥力が増した結果、液相に多糖が溶出してきたと考えられる。

4. 考察

酵素溶液およびビーフエキス溶液によるウイルス誘出処理は、ウイルス誘出の機構がそれぞれ異なっている。従来の方法であるビーフエキス溶液による処理においては、溶液中のポリペプチドが高分子添加剤（分散剤）として作用し、汚泥中のコロイド（ウイルスを含む）間の斥力を増大させることによりウイルスを液相中で安定化し、さらにポリペプチドが汚泥フロック表面の吸着サイトを占有することによってウイルスの再吸着を防ぐという機構に依っていると考えられる。それに対し酵素溶液による処理は、汚泥フロックを多糖分解酵素によって積極的に分解し、汚泥フロックの形成要因となる多糖ポリマーの濃度を減少させることによって、ウイルスを含むフロックの分散を行うことによってウイルスを液相に誘出させる。同時にバルク中の多価陽イオンをCERによって回収することにより、コロイド表面陰荷電の中和を抑え、ウイルスの液相における安定化を行うものである。

酵素分解処理によって液相に糖が溶出していることは、表3から明らかである。2回の実験共に約50倍の糖溶出率を示している。さらに、半透膜を用いた実験により、酵素処理を行うことによってCERのみの処理に比べて分解された糖が液相に溶出してい

表2. ウイルス回収率の比較

試行	ウイルス回収率 (%)		
	酵素-CER溶液	CER溶液	10%ビーフエキス溶液
①	23	14	3.4
②	2	0	0
③	20	9.4	3.5

表3. 糖溶出率の比較

試行	糖溶出率 (%)		
	酵素-CER溶液	CER溶液	10%ビーフエキス溶液
①	62.6	56.8	1.26
②	61.3	55.9	1.28

ることが明らかにされている（未掲載）。つまり、多糖分解酵素によって多糖ポリマーが分解され、汚泥フロックの脆弱化につながっていると言える。

さらに、酵素溶液による処理におけるウイルス誘出率が、3回の実験共に最も高い値を示している（表2）ことは、次の重要な知見を与える。すなわち汚泥フロック中のウイルスは、積極的な汚泥フロックの分解によって液相に誘出することができ、さらに従来のビーフエキス溶液によるフロックの分散によるウイルス誘出よりも回収効率が高いということである。

しかしながら、今回の実験においては汚泥フロックの分解は十分ではない。汚泥フロックの構成成分は、前述したように約6割がタンパク質であり、フロック形成要因となっているのは多糖ポリマーのみではない。したがって、多糖のみを分解しても十分な分散状態が得られにくいと思われる。

以上のことから、本研究においては酵素の作用による汚泥フロックの分解がウイルス誘出を促進したが、添加した酵素によっても分解されない多糖やフロックの凝集に関わるタンパク質が存在したために、汚泥フロックの分解が十分には進まなかった。今後、蛋白質分解酵素の使用やビーフエキス溶液との併用を視野に入れて研究を進めていきたい。

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、吉田靖子博士に感謝いたします。また、本研究の一部は戦略的基礎研究事業（（財）科学技術振興事業団）の助成により行われたことを報告いたします。

参考文献

- 1) 矢野一好ら. 1996. 東京都立衛生研究所研究年報 47 別冊. p.265-269.
- 2) M.F.Dignacら. 1998. Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. Wat.Sci.Tech. vol.38. p.45-53.
- 3) EPA. 1992. Environmental Regulations and Technology. Appendix H. Method for the Recovery and Assay of Enteroviruses from Sewage Sludge. p.117-145.