

界面活性剤による下水汚泥からの腸管系ウイルスの誘出

東北大学 学生員 川崎貴史
東北大学大学院 学生員 佐野大輔
東北大学大学院 正会員 大村達夫

1. 緒論

下水道システムの発達に伴い下水汚泥の発生量は年々増加しており、その処分量も増加しつつある。しかし処分地には限りがあるため、今後埋め立てによる処分は困難になることが予想される。そのような現状を受け、下水汚泥のコンポスト化などの有効利用が進んできている。下水汚泥には窒素や貴重な資源であるリンが含まれており、この資源を利用する意味でもコンポスト化は望ましい処分方法であり、今後いっそう下水汚泥の農地還元を主とする有効利用は進められていくと考えられる。

その一方で、下水汚泥中には病原微生物が存在している可能性が高く、中でもウイルスは下水汚泥から高頻度に検出される¹⁾。したがって、下水汚泥の有効利用を行う際には、下水汚泥中の病原ウイルス量を把握した上で、病原ウイルスの発生源としての適切な取り扱いが要求される。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方法が存在しない。その主たる原因は、汚泥フロックに吸着しているウイルスを効率的に誘出することが困難なことにある。そこで本研究では、下水汚泥中のウイルスが細菌外膜中のタンパク質に捕捉されているものと考え、界面活性剤溶液により膜構造を破壊することによって外膜に捕捉されたウイルスを液相へ誘出することを試みた。界面活性剤としてはイオン性の異なる4種類を使用し、下水汚泥からのウイルス誘出に対するそれぞれの界面活性剤の有効性を比較評価した。

表1. 使用した界面活性剤の種類と濃度

界面活性剤	種類	濃度 (% w/v)
SDS	陰イオン	10
コール酸ナトリウム	陰イオン	10
CTAB	陽イオン	1
TritonX-100	非イオン	10

2. 実験

供試ウイルスと汚泥サンプル

ウイルスは弱毒ポリオウイルス1型を使用した。汚泥は最終沈殿池からの返送汚泥を仙台市内の下水処理場から採取して使用した。

ウイルス誘出液

表1に示した界面活性剤をリン酸緩衝食塩水(PBS)に溶解させてウイルス誘出液とした。また、界面活性剤を溶解させないPBSをコントロールとして使用した。

ウイルス誘出操作

図1に示した操作手順によりウイルスを誘出させた。

ウイルスの定量

サンプル中のウイルスをBGM細胞を用いたブラック法²⁾およびMPN-PCR法によって定量した。ウイルス回収率は式(1)により算出した。

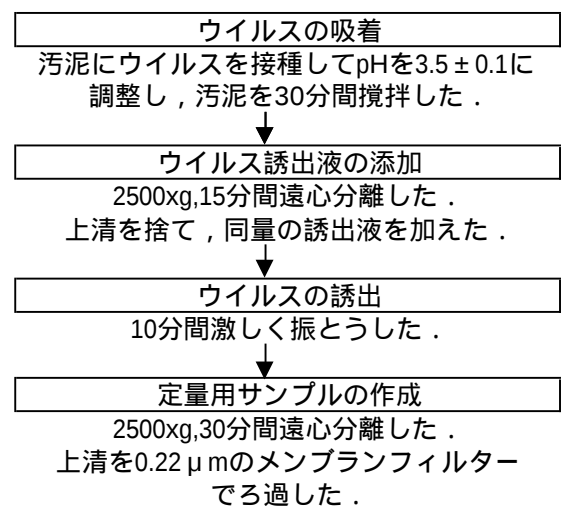


図1. ウイルス誘出操作

Key Words : ポリオウイルス, 下水汚泥, 界面活性剤, 脂質二重層, 定量検出

〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL : 022-217-7483

FAX : 022-217-7482

タンパク質濃度の測定

下水汚泥中の細菌外膜は脂質とリボ多糖による脂質二重層で構成され、タンパク質は脂質二重層にモザイク状にはめ込まれている。したがって、脂質二重層を破壊する際には細菌外膜中のタンパク質が誘出されと考えられる。そこで、界面活性剤使用により脂質二重層が破壊されたことを確認するために、ウイルスを接種しない汚泥を用いて図1の操作を行い、得られたサンプルのタンパク質濃度を測定した。ここでタンパク質濃度の測定は、牛血清アルブミンをタンパク質標準物質として Lowry 法により行った。

3. 結果および考察

溶出したタンパク質濃度の測定結果を図2に示した。測定結果よりタンパク質濃度の平均値の差を有意水準 0.05 で F 検定した結果、いずれの種類の界面活性剤についても、誘出液として界面活性剤を使用したときと PBS を使用したときのタンパク質濃度に有意差が認められた。このことより界面活性剤は脂質二重層を破壊することが示された。

次に、ウイルス回収率の結果を表2に示した。ウイルス接種時の汚泥のウイルス感染

価は1回目は 870 PFU/ml と 4300MPN/ml であり、2回目は 1400 PFU/ml であった。ブラック法による定量結果から得られたウイルス回収率の最大値はコール酸ナトリウムの 50%であった。MPN-PCR 法による定量結果から得られたウイルス回収率の最大値は SDS の 56%であった。SDS、CTAB、TritonX-100 は BGM 細胞に阻害作用を示し、ブラック法による定量への適用は困難であった。その中でも SDS は MPN-PCR 法による定量では界面活性剤の中で最もウイルスを誘出させたが、ブラック法ではそれほどウイルスを誘出しなかった。このことから、SDS が強いタンパク変性作用を持つためにウイルスのカプシドタンパク質を変性させウイルスの感染能力を奪ったことが示唆される。MPN-PCR 法による定量結果から SDS、コール酸ナトリウム、CTAB は下水汚泥からウイルスを誘出させるのに効果があった。また、コール酸ナトリウムについては、ブラック法と MPN-PCR 法の両方においてウイルスの誘出が確認された。

4. 結論

4 種類の界面活性剤のうち SDS、コール酸ナトリウム及び CTAB は下水汚泥からウイルスを誘出させる効果があった。その中でもコール酸はブラック法と MPN-PCR 法の両方でウイルスが定量可能であったので、実際の検出への適応性において優れていると考えられた。

5. 参考文献

- 1) 矢野一好, 林志直, 藪内清, 田口文章: 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究第1報, 下水のウイルス学的実態調査, 用水と廃水, Vol.27, No.5, pp.39-45, 1985.
- 2) 日本水道協会: 上水試験方法解説編, 1993 年版, pp.604-605.

$$v = a / b \times 100$$

(1)

v : ウイルス回収率 (%)

a : ウイルス誘出液のウイルス濃度 (PFU/ml , MPN/ml)

b : ウイルス摂取時の汚泥のウイルス濃度 (PFU/ml , MPN/ml)

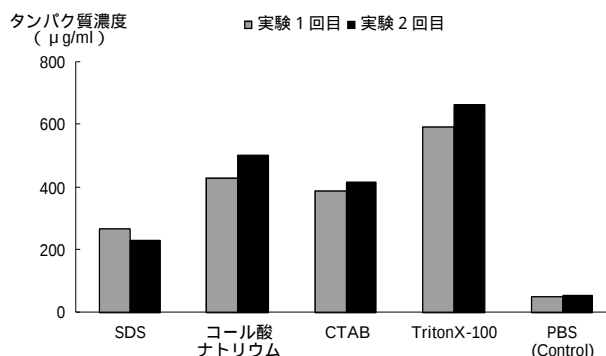


図2. タンパク質濃度の測定結果

表2. ウイルス回収率の結果

	ウイルスの回収率 (%)		
	ブラック法		MPN-PCR法
誘出液	実験 1 回目	実験 2 回目	実験 1 回目
SDS	*	5	56
コール酸ナトリウム	31	50	22
CTAB	*	*	22
TritonX-100	*	*	1
PBS	1	1	1

*: 界面活性剤がBGM細胞に阻害作用を示した。