

下水汚泥からのウイルス誘出を促進させる加水分解酵素の選択

東北大学大学院 学生員 ○佐野大輔
アジア工科大学 正会員 福士謙介
東北大学大学院 正会員 大村達夫

1. はじめに

下水道システムの発達や合併処理浄化槽設置の促進を受け、下水処理による下水汚泥発生量は増加の一途を辿っているが、下水汚泥の廃棄場所となる産業廃棄物最終処分場の用地確保はますます困難となることが予想されている。そのような背景のもと、コンポスト化等の下水汚泥の有効利用が促進されている。

それに対し下水汚泥中には病原微生物が存在することが知られており、特に病原ウイルスは他の環境中と比べて高頻度に下水汚泥から検出されることが報告されている¹⁾。これら病原ウイルスによる感染症の発生リスクを回避するため、下水汚泥中のウイルス量を正確に把握し、適切な取り扱いを行う必要性が生じる。

しかしながら、従来下水汚泥中のウイルスを正確に定量することは困難であった。これは下水汚泥中の病原ウイルスが汚泥フロックなどの固形分に吸着しており、そのようなウイルスを検出する有効な手段が存在しないこと、および固形分からウイルスを効率的に誘出する方法が存在しないことが原因であった。

そこで本研究では、下水汚泥中のウイルスを定量的に検出するための、下水汚泥からの効率的なウイルス誘出方法を確立した。下水汚泥中のウイルスは、疎水性効果や多価陽イオンを介したイオン結合などの引力によって汚泥フロックに捕捉されていると予想される。これらのウイルスを汚泥フロックから液相へ効率的に誘出するために、汚泥フロックを加水分解酵素で分解することによってウイルスを吸着せしめている引力を減少させることを試みた。

2. 実験方法

供試ウイルス及び下水汚泥サンプル

供試ウイルスとしては弱毒ポリオウイルス 1 型を用いた。また下水汚泥サンプルは、主に家庭排水を受容する仙台市内の下水処理場から返送汚泥を採取した。

ウイルス誘出液

加水分解酵素を混合したウイルス誘出液の種類を表1に示した。

下水汚泥からのウイルス誘出方法

下水汚泥からのウイルス誘出方法は USEPA²⁾ に従った。詳細は sano *et al*³⁾ に記した。

ウイルス定量方法

2-3 でサンプリングした上清を、0.22 µm のフィルターでろ過したものをウイルス定量用のサンプルとした。

サンプル中のウイルスは逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) によって検出した。ウイルスの核酸抽出には、A 型肝炎ウイルス用のキット (Sepsa-gene RV-R, 三光純薬) を用いた。RT および PCR においても、それぞれのキット (RT, 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV); PCR, PCR master;共にBoehringer Mannheim) を用いた。PCRにおけるプライマーには、Chapman の E1 と E2⁴⁾ を用いた。PCR における温度制御は、PCR Thermal cycler model TP-2000 (TAKARA biomedical) によって行った。反応温度は、94°C10分のあと、94°C1分、50°C1分、72°C1分を1サイクルとして40サイクルを

表1. 下水汚泥からのウイルス誘出に用いたウイルス誘出液

ウイルス誘出液	使用した酵素
R-1 (Control)	酵素なし
R-2	Lys*
R-3	Car**
R-4	Lys + Car
R-5	Chy†
R-6	Pa‡
R-7	Chy + Pa
R-8	Lys + Chy
R-9	Lys + Pa
R-10	Lys + Chy + Pa
R-11 (Reference)	10% beef extract solution §

*: リゾチーム (多糖分解酵素)

** : カルボキシルエステラーゼ (脂質分解酵素)

†: キモトリプシン (蛋白質分解酵素)

‡: パパイン (蛋白質分解酵素)

§: USEPA に採用されているウイルス誘出液

Key words: pathogenic virus, sewage sludge, enzyme

〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉06 TEL 022-217-7483 FAX 022-217-7482

行い、次に72°C15分、20°C5分を続けて行った。

PCR 後のサンプルを 1mg/L の濃度でエチジウムブロマイドが混合された 15%アガロースゲルで電気泳動に供し、その後紫外線を照射して目的DNAを検出した。定量的結果は最確値法（3-3-3法、上水試験法⁵⁾）により求めた。またウイルス誘出効率も、

$$\text{ウイルス誘出率(\%)} = \frac{\text{誘出されたウイルス量 (MPN/ml)}}{\text{汚泥に摂取したウイルス量 (MPN/ml)}} \times 100$$

以下の式によって算出した。

3. 実験結果及び考察

図 1 に、11 種類のウイルス誘出液に関する結果を示した。

最もウイルス誘出率が高かったのは、多糖分解酵素（リゾチーム）と 2 種の蛋白質分解酵素（キモトリプシンとパパイン）を同時に用いた場合で、31%に達していた。しかしながら図 1 中に黒棒で示された 7 種類のウイルス誘出液の間には、有意水準 0.05 の t 検定によって有意差は認められなかった。また脂質分解酵素及び蛋白質分解酵素の一つ（キモトリプシン）を単独で用いた場合には、ウイルス誘出率が明らかに低かった。以上の結果から、多糖分解酵素（リゾチーム）と蛋白質分解酵素の一つ（パパイン）は単独で用いても約 30%のウイルス誘出率が得られ、組み合わせても変化はないことが明らかであった。

同じ蛋白質分解酵素であるキモトリプシンとパパインの間の明らかな違いは、基質特異性の違いが反映されたと考えられる。

キモトリプシンは蛋白質中の芳香族アミノ酸に特異性の高い酵素であるのに対し、パパインはアルギニンおよびリジンに特異性の高い酵素である。芳香族アミノ酸は 3 種類あるが、そのうち 2 つは疎水性アミノ酸であり、疎水性結合の形成に寄与している場合には酵素の接触及び加水分解の触媒が難しいと考えられる。同様な理由で、脂質分解酵素のウイルス誘出率も低かったと考えられる。

また図 1 中の白棒は USEPA によって採用されている従来法（10%ビーフエキス溶液）による結果であるが、そのウイルス誘出率は 7%であり、多糖分解酵素（リゾチーム）と蛋白質分解酵素の一つ（パパイン）を用いることにより従来法と比べて約 4 倍のウイルス誘出率が得られた。

4. 結論

多糖分解酵素（リゾチーム）もしくは蛋白質分解酵素の一つ（パパイン）を用いることにより、約 30%のウイルス誘出率が得られた。このウイルス誘出率はUSEPAによって採用されている方法に比べて約4倍の効率であった。

5. 参考文献

- 1) 矢野ら. 1996. 首都圏で採取した環境水からのウイルス分離状況（1985-1995）. 東京都立衛生研究所研究年報**47**別冊, 265-269.
- 2) USEPA. 1992. Appendix H, Method for the recovery and assay of enteroviruses from sewage sludge, Environmental regulations and technology. EPA/625/R-92/013, 117-145.
- 3) Sano *et al.*, 1999. Enumeration of Enteric Viruses in Municipal Sewage Sludge with Enzymatic Virus Elution Method. Asian Waterqual '99. 7th IAWQ Asia-Pacific Regional Conference. Conference Preprint, Volume 2, p.1053-1058.
- 4) Rotbart, H. A. and Romero J. R. 1995. Laboratory diagnosis of enteroviral infections, chapter 17, Human enterovirus infections, American society of microbiology, 401-418.
- 5) 日本水道協会. 1993. 上水試験法, 475-480.

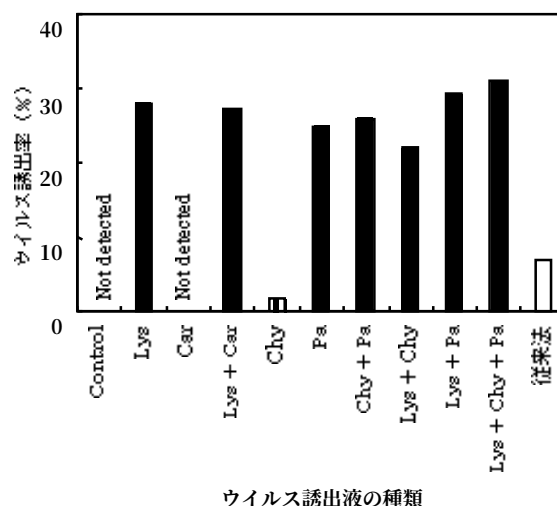


図1. ウイルス誘出率の比較