

## 河川における病原ウイルスの挙動評価のための基礎的実験

東北大学大学院 学生員 阿部欽章, 藤倉雅浩  
東北大学大学院 正会員 渡部 徹, 大村達夫

## 1. はじめに

水系感染が懸念されているウイルスは、主に人間の腸管に感染し、大量に増殖して糞便とともに下水中に流入する。その後、一定の処理がなされてから河川等に放流されるが、放流水からもウイルスが検出されていることから<sup>1)</sup>、生残したウイルスが河川に流入している可能性は否定できず、河川の水利用を介して流域内にウイルス感染症が伝播する危険性がある。このリスクを評価するためには、河川におけるウイルスの消長や挙動を明らかにする必要がある。

水中では、ウイルスは完全に分散しているというよりも、大なり小なり集塊化していると見てよい<sup>2)</sup>。ウイルスが集塊化したり濁質に付着、埋棲すると、周囲のストレスから保護され不活化時間が長くなることが知られている。また、濁質への付着は河川水中でのウイルスの輸送にも影響を与えることから、濁質はウイルスの挙動に関する重要な因子といえる。そこで、本研究では、河川におけるウイルスの挙動解明の第一歩として、遊離状態にあるウイルスの不活化と、ウイルスの濁質への付着について明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験方法

## 2.1 材料

## a. 供試ウイルス液

実験用のウイルスとして弱毒ポリオウイルス1型(Lsc,2 ab株)を用いた。ウイルスの培養は、BGM細胞で増殖させることにより行い、3回凍結融解させた後、遠心分離した上清を10mLシリンジと0.2 μmメンブレンフィルターでろ過したものを供試ウイルス液(濃度はおおよそ10<sup>6</sup>PFU/mL)とした。

## b. 希釈液

ブランク法によりウイルス量を測定する場合、サンプルをそのまま細胞に接種すると浸透圧による細胞溶解が起こる。そのため、サンプルはウイルス量測定前に希釈液(MEM(日水製薬,05900)溶液500mL(粉末状のMEM 4.7gを蒸留水500mLに溶解させ、オートクレーブで121℃,15分間高圧滅菌したもの)に牛胎児血清(MITSUBISHI KASEI)5mL、7.5%重炭酸ナトリウム溶液(GIBCO BRL)7.5mL、200mM L-グルタミン溶液(GIBCO BRL)5mL、抗生物質-抗真菌剤(GIBCO BRL)5mLを添加したもの)で適当な濃度に希釈した。

## 2.2 ウイルスの不活化実験

## a. 精製水中での不活化実験

ビーカーに精製水500mLと攪拌子を入れ、オートクレーブで121℃,15分間滅菌した。その後室温になるまで放置し、供試ウイルス液0.5mLを入れてウイルス溶液を作製した。ウイルスの集塊化を防ぐためにマグネティックスターラーで攪拌(373 rpm)した。実験は25℃で行った。ウイルスの感染価が測定できなくなるまで(25PFU/mL程度)継続してサンプリングを続けた。サンプリングにはシリンジを用い、細胞へ毒性を示す物質を除くために0.22 μmフィルターでろ過したのち、希釈液で希釈し、-20℃で冷凍保存した。後日、BGM細胞を用いたブランク法によりウイルス量を定量した。

## b. 濁質を除去した河川水中での不活化実験

0.22 μmフィルターでろ過して濁質を除去した河川水99mL、攪拌子、供試ウイルス液1mLをビーカーに入れ、スターラーで攪拌した。以降aと同様である。

## 2.3 ウイルスの濁質への吸着実験

河川水サンプルは仙台市の河川から採取した。サンプル(SS:18.6mg/L)は、濁質濃度を上昇させるためロータリーエバポレーターで真空濃縮(25℃,約7時間,1000mLを185mLに濃縮,計算上のSS:100.5 mg/L)した。また、河川水サンプルおよび濃縮後のサンプルをそれぞれ0.22 μmフィルターでろ過し、濁質が存在しないサンプルも用意した。以上の4サンプルをそれぞれ遠心管に9mLずつ注入した。供試ウイルス液を精製水で1000倍に希釈した。これを遠心管に1mLずつ接種し、ローターで30,60,120分と時間を変えて攪拌した(13 rpm)。攪拌後、2.2-aと同様にウイルス感染価を測定した。不活化実験も含め、以上の全ての操作はP2レベル実験室内の安全キャビネット内で行った。

## 3. 実験結果および考察

## 3.1 ウイルスの不活化実験

ポリオウイルス1の精製水中での不活化実験の結果を図1に示す。ウイルスの感染価がおおよそ10分の1になるのに、約33日かかった。このことから、ポリオウイルス1は不活化されるまでに非常に長い期間を要し、水中では安定性が高いことが分かる。したがって、例えばポリオウイルス1が河川に放流された場合、実際の河川では多くのストレス(物理力,紫外線,温度等)を受けることを考慮しても、下流までほとんど不活化せずに流下する可能性が高い。

Key words: 水系感染症, 病原ウイルス, 河川中での不活化, 濁質への吸着

〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉06 東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 TEL 022-217-7484

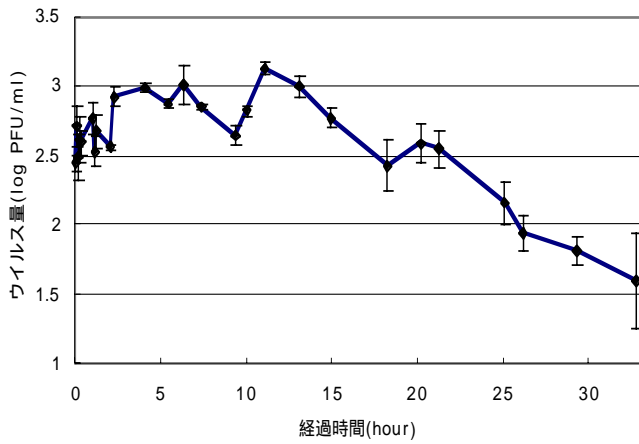


図1 精製水におけるウイルス量の経時変化

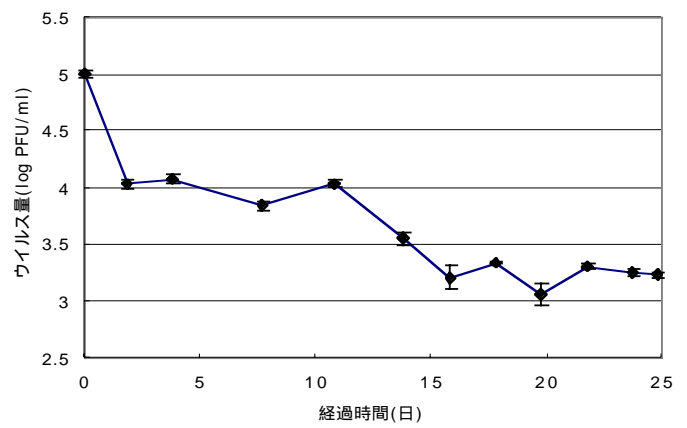


図2 濁質を除去した河川水におけるウイルス量の経時変化

微生物の減衰は一般的に、 $N=N_0e^{-kt}$ （または対数表記で  $\log N = -0.43kt + \log N_0$ ）で表される。ここで、 $N$  はウイルス濃度(PFU/mL)、 $k$  は不活化速度定数(1/日)、 $N_0$  は初期ウイルス濃度である。初期ウイルス濃度と比較してウイルスが減少し始めた約18日以降をこのモデルに適合させた結果( $R^2=0.91$ )、不活化速度定数は0.16となり(95%信頼区間で  $0.13 < k < 0.20$ )、18日目以降は約14日でウイルス濃度が1/10になることが分かった。

次に濁質を除去した河川水中での不活化実験の結果を図2に示す。ウイルス濃度は実験開始初期から急激に減少し、約2日で1/10になり、それ以降徐々に不活化した。この急激な減少は、衰弱したウイルスが先に不活化したためと考えられる。また、精製水と異なり、河川水には微量ながら塩素や金属イオン等が含有しており、これらが不活化を促進させた要因の1つであると考えられる。

精製水の結果と同様に、約2日目以降をモデルに適合させた結果( $R^2=0.80$ )、不活化速度定数は0.10となり(95%信頼区間で  $0.06 < k < 0.14$ )、2日目以降は約23日でウイルス濃度が1/10になることが分かった。

### 3.2 ウイルスの濁質への吸着実験

吸着実験の結果(SS:100.5mg/L)を図3に示す。濁質があるサンプルのウイルス量が少ないのは、濁質に吸着したウイルスが、フィルターした際に濁質と共に除去されるためである。攪拌時間による吸着量の差は認められない。このため、ウイルスは河川水に注入された直後に濁質に吸着したものと考えられる。また、その吸着は13rpm程度の緩い攪拌では剥離しなかった。各時間ごとに算出したウイルスの濁質への吸着率を表1に示す。60minだけは高い値を示しているが、全体の30%程度のウイルスが濁質に吸着した。図4に、同様の実験でSSが異なるサンプルの結果をまとめて示す。図より、SSとウイルスの濁質への吸着率には比例関係が見られた。

### 4. おわりに

今後、他のサンプルで同様の実験を重ねるとともに、SSを固定してウイルス濃度を变化させる実験を行うことで、河川水中での濁質とウイルスの吸着をモデル化していく予定である。

#### 参考文献

- 1) 矢野一好：水環境学会誌，Vol.26, No.1, 2003.
- 2) 金子光美：水の消毒，(財)日本環境整備教育センター，1997.

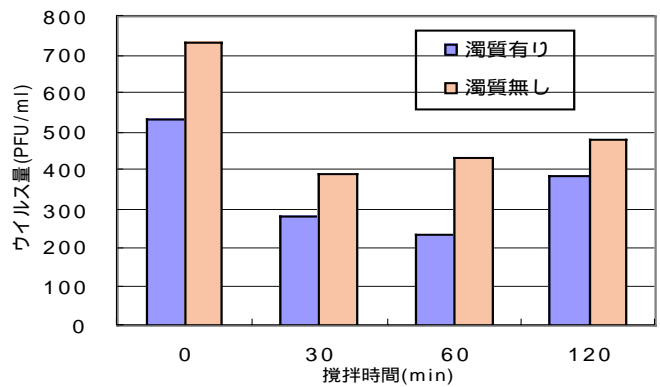


図3 吸着実験の結果(SS: 100.5 mg/L)

表1 濃縮河川水を使用した実験におけるウイルスの濁質への吸着率

攪拌時間(min)	0	30	60	120	平均
吸着量(PFU/mL)	200	108	200	100	152
吸着率(%)	27	28	46	21	30.5

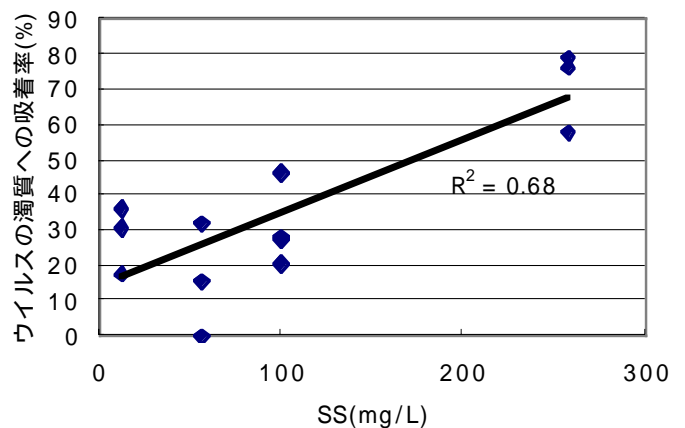


図4 SS-ウイルスの濁質への吸着率関係