

都市沿岸海水中におけるF特異ファージおよび 指標細菌の分布

片山浩之¹・久山哲雄²・大垣眞一郎³

¹正会員 工博 東京大学講師 大学院新領域創成科学研究科環境学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

²正会員 工修 日本工営 環境事業部 (〒102-8539 東京都千代田区麹町5-4)

³フェロー会員 工博 東京大学教授 大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

東京湾および広島湾の海水中の指標微生物の濃度を測定した。F特異ファージ濃度を評価する手法として、宿主としてWG49を用いるブラック法が優れていることがわかった。東京湾において4時間間隔で試料を採取して調べた結果、すべての指標微生物の24時間の濃度変動は地点間、採取月間の濃度変動に比べて十分に小さいことがわかった。広島湾の生食用カキ捕獲海域においてすべての指標微生物の濃度が低いことがわかった。また、すべての海域において、F特異ファージは他の微生物指標に比べて濃度が低く、100pfu/100ml以下であることが多かった。電気伝導度、大腸菌群およびF特異ファージを東京湾において12ヶ月にわたって測定した結果、夏に電気伝導度が低く大腸菌群の濃度が高くなる傾向が見られた。

Key Words : coastal marine water, microbial indicators, F-specific phage, time course profiles,

1. はじめに

我が国において、水の微生物学的安全性の指標として、上水においては、大腸菌群、一般細菌が用いられており、塩素消毒と残留塩素の確保により安全性を保証している。環境中においては、それ以外に糞便性大腸菌群も指標として用いられている。しかしながら、水系感染を引き起こす可能性がある腸管系ウイルスを対象とした場合、指標細菌は腸管系ウイルスの存在を示す予測指標としては必ずしも適当でないことを多くの研究者が指摘している^{1)~4)}。その理由としては、腸管系ウイルスが、指標細菌に比して塩素や紫外線に対する高い消毒耐性を持つ⁵⁾ことや、淡水域、海水域における生残率が高い⁶⁾ことが挙げられる。

沿岸域における腸管系ウイルスは、汚染された水域での水泳または汚染された魚介類の摂取という曝露経路を通じて感染症を引き起こすことが知られている。海水浴が原因となるウイルス性感染症の定期的な統計データは日本にはないものの、少なからず発生している可能性がある。一方、生ガキが病因物質と考えられるウイルス感染症は毎年冬期を中心に

起こっており、食品衛生の分野において大きな問題となっている。1997年5月の食品衛生法改正によって小型球形ウイルス (SRSV : small round structured virus, またはNorwalk virus; NV) 等のウイルスも食中毒の原因物質として追加され、その結果として原因不明として記載される食中毒事例が大きく減少したことから、NVはこれまでも多くの食中毒を引き起こしていたと考えられる。

現在日本における沿岸域の微生物汚染に対しては、海水浴場は糞便性大腸菌群 (10³cfu/100ml以下)、カキ養殖場は大腸菌群 (70MPN/100ml以下) などの指標細菌によって規制されているが、ウイルスの安全性の観点からは不十分である可能性がある。また、腸管系ウイルスを直接検出するには、コストが高い、測定に時間がかかる、実験中に感染する可能性がある、などの問題がある。またNVなどのウイルスは培養できないなどの問題があり、腸管系ウイルスを定期的にモニタリングするのは現実的でない。

そこで、沿岸域のウイルス汚染をモニタリングするためのウイルス代替指標の確立が求められている。その中で大腸菌を宿主とする「大腸菌ファージ」はその定量が容易であり、結果が比較的迅速に得られ、

また人体に無害であることから、腸管系ウイルスの指標として有望視されている⁷⁾。特にF特異ファージは、腸管系ウイルスのエンテロウイルスやNVと同様にRNAを遺伝子として持ち、大きさも同程度であることから指標としての適性があると有望視されている。

Ketratanakul and Ohgaki⁸⁾は宿主菌のいない環境中でF特異ファージは病原ウイルスと同じ挙動をとることを示し、Sobsey⁹⁾はF特異ファージが消毒剤への抵抗性が細菌などに比べて大きく、腸管系ウイルスに近いことを示した。また、Dore and Lee⁹⁾はカキ中のF特異ファージ濃度の季節変動が、カキが原因と考えられるウイルス感染症事例数の季節変化に良く一致していることを示している。このようにF特異ファージがウイルス汚染の代替指標として有望であることを裏付ける研究は多くなされており、今後ともF特異ファージに対する期待は大きいであろう。

また、我が国においてもF特異ファージはウイルス代替指標として注目されており、F特異ファージの指標性を検討した研究は多い。大垣ら¹⁰⁾は下水処理場の各処理工程の水、河川水、海水浴場の海水および湖沼水中に存在するF特異ファージの濃度を細菌指標と比較検討している。しかしながら、カキが生息している海域におけるF特異ファージの挙動は未だ把握されていない。

本研究では、沿岸域のウイルス汚染の指標としてF特異ファージを適用することの可否を検討するための基礎的知見の収集を目的として、沿岸域におけるF特異ファージの分布の地域特性、日中変動および季節変動を調べた。

2. 実験方法

(1) 大腸菌群の測定法

デスオキシコーレイト培地（栄研社製）45gを精製水1000mlに十分攪拌した後加温溶解したものを用いて、混釈法による重層培養法により測定した¹¹⁾。

(2) 大腸菌の測定法

クロモカルトコリフォーム寒天培地（MERCK社製）26.5gを精製水1000mlに十分攪拌した後加温溶解したものを使用し、混釈法による単層培養法によって測定した。

(3) F特異ファージの測定法

Salmonella Typhimurium WG49を用いた平板培養

法により測定した。WG49は、*Salmonella* Typhimurium WG45に大腸菌のF絨毛を組み込んだ宿主菌¹²⁾である。そのため、F特異ファージに感受性を持つが、体表面吸着大腸菌ファージには感受性を持たず、サルモネラファージには感受性を持つという特徴を有している。環境水中にサルモネラファージはほとんど存在しないので、WG49を用いた平板法により、環境水中から主にF特異ファージを検出することができる。

a) 液体培地

水1Lにトリプトン10g、グルコース1g、NaCl 8g、CaCl₂·2H₂O 0.3g、MgSO₄·7H₂O 0.15gを溶解し、高圧蒸気滅菌したものを液体培地として用いた。また、液体培地にナルジキシン酸0.1g、カナマイシン0.02gを加えたものを、WG49を培養するための培養液として用いた。

b) 寒天培地

重層寒天法の上層寒天培地は、液体培地1Lに粉末寒天7gを加え加熱溶解後、高圧蒸気滅菌し実験直前にナルジキシン酸0.1g、カナマイシン0.02gを培地に加えたものとした。下層寒天培地は、液体培地1Lに粉末寒天15gを加えたものを加熱溶解後、高圧蒸気滅菌しナルジキシン酸0.1g、カナマイシン0.02gを加え、測定の前日にシャーレに10mLずつ添加し、プレート全面にならして5℃で固化させておいたものを使用した。

単層寒天法用培地は、液体培地に粉末9gを加え加熱溶解後、高圧蒸気滅菌し実験直前にナルジキシン酸0.1g、カナマイシン0.02gを加えて使用した。

c) 宿主の培養法

培養液に保存していたWG49を適量（約100μL）添加し、よく攪拌した後37℃で3～4時間振とう培養を行う。濃度とラクトース非分解性細菌数の割合から、宿主菌液としての有効性を測定のたびに確かめた。

d) 宿主の適性確認法

培養したWG49は、McConkey agar (Difco) を用いて35～37℃で18～24時間培養すると、培地上に2種類のコロニー（赤・白）が形成する。赤いコロニーはラクトース分解性細菌のものであり、WG49が大腸菌のF絨毛を持っていることを意味する。白いコロニーはラクトース非分解性細菌のものであり、WG49が大腸菌のF絨毛のプラスミドを有していないことを意味する。この白いコロニー数が全体のコロニー数の8%以下であり、濃度が10⁸ (CFU/mL) であることが宿主菌として有効である条件とした。WG49のF絨毛の安定性は低く、培養の際には常に上記条件を確認した。

Table 1 Time of high and low tide of the sampling day

	Low tide time	High tide time
Aug 31, 1999	1: 26	7: 24
	13: 55	19: 44
Sep 21, 1999	0: 40	8: 10
	15: 29	20: 54

e) 単層平板培養法 (10ml~100mlの試料に対して用いる)

試料と等量の単層寒天培地10mlあたり1mlの割合で宿主の培養液を加え、37℃に加温した試料を混釈平板として静置凝固させた後、37℃で18~24時間培養した。得られた全てのプレートのブラック(溶菌斑)の合計をファージ数とした。

f) 重層平板培養法

試料およびその10倍希釈列10mlを下層寒天培地の入ったシャーレに添加し、宿主を混合した上層寒天をシャーレに3~5ml添加し、混釈平板として静置凝固させた後、37℃で18~24時間培養した。30~300のブラックが形成された希釈倍率のプレートの平均値(通常は3枚のプレートを用いた)からファージ濃度(単位はPFU/mL)を算出した。

(4) 宿主に*E. coli* K12を用いた従来法との比較

F特異ファージを測定する方法として、宿主にWG49を用いた方法と宿主に*E. coli* K12を用いた従来法¹⁰⁾との比較検討を行った。それぞれの宿主に対して、F繊維を持たない菌を宿主として対照試験を行ない、ブラック法によるブラック形成数を比較した。F特異ファージはF繊維を有する宿主に対してはブラックを形成するが、F繊維を有しない宿主に対してはブラックを形成しない。従来法では宿主として*E. coli* K12F⁺と*E. coli* K12F⁻を用いて得られるブラッ

ク数の差としてF特異ファージ数を算出し⁸⁾、新しい方法では*Salmonella* Typhimurium WG49と*Salmonella* Typhimurium WG45を宿主として用いて得られたブラック数の差としてF特異ファージ数を算出した。試料としては、1999年1月に東京湾の台場海浜公園と葛西海浜公園で採取した海水を用いた。

(5) 日内の微生物数の変動

東京湾の台場にて、1999年8月31日(晴れ、先行晴天日数6日)および同年9月21日(午後4時ごろから雨29mm、先行晴天日数3日)に、4時間間隔で試料採取を行ない、その微生物濃度を測定することにより日内変動を調べた。F特異ファージ、大腸菌および大腸菌群を測定した。すべての試料は採取後24時間以内に測定した。水温、pH、SSおよび電気伝導度も合わせて測定した。なお、測定日の潮の干満をTable 1に示す。

(6) 試料の冷蔵保存による微生物数への影響

広島湾において試料を採取したものを輸送して測定するため、試料を24時間以上にわたって冷蔵保存した場合の影響を調べる必要がある。そこで、本研究で測定対象とする指標微生物について、東京湾の台場において1999年1月に採取した海水を4℃に冷蔵保存し、1日ごとに経時的に測定し、微生物濃度がどのように変化するかを調べた。

(7) 海水中の指標微生物の測定

東京湾および広島湾において、表層の海水を採取し、大腸菌群、大腸菌およびF特異ファージを測定した。水温、pH、SSおよび電気伝導度についても合わせて測定した。広島湾においては1998年11月から1999年3月まで、東京湾においては1998年11月から1999年10月まで、月1回試料を採取した。Fig. 1に測定場

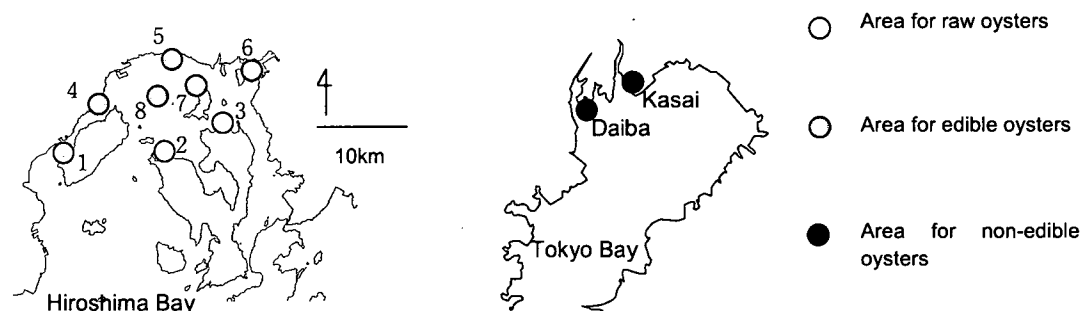


Fig. 1 Location of sampling points

Table 2 Comparison of host strains for F-specific phages

Host strain	Sampling point	Phage concentration (PFU/100ml)			ratio of F specific phages
		Total	no F-pili control	F specific phage	
<i>E. coli</i> K12 F+	Daiba	710	143	567	80%
	Kasai	477	167	310	65%
<i>S. typhimurium</i> WG49	Daiba	105	8	97	92%
	Kasai	332	5	327	98%

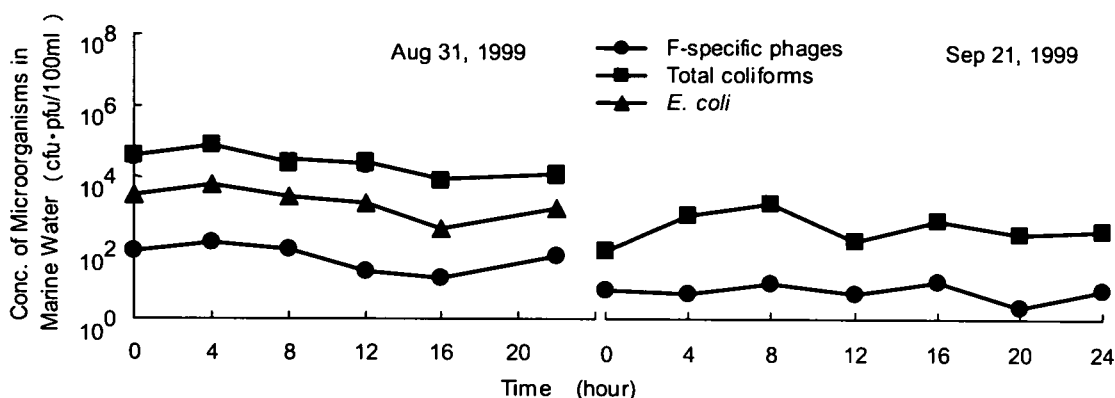


Fig.2 Daily profiles of levels of indicators in seawater (Daiba)

所を示した。広島湾においては、生食用カキを捕獲してよいエリア3ヶ所(図中の白丸)と、加熱用カキを捕獲してよいエリア5ヶ所(図中のグレーの丸)において試料を採取した。また、東京湾においては台場および葛西(図中の黒丸)の2地点から試料を採取した。広島湾において採取された試料は、冷蔵して東京大学に運び、可及的速やかに(試料採取後72時間以内)測定した。

3. 結果および考察

(1) 宿主によるファージ測定値の比較

Table 2に結果を示す。*E. coli*を宿主とした場合には、F繊維毛のない宿主(*E. coli* K12F⁻)を用いた対照実験においても、F繊維毛を有する宿主(*E. coli* K12F⁺)で測定されたファージの20%から35%にあたるファージが測定されているのに対し、サルモネラを用いた場合にはF繊維毛のない宿主(WG45)からはほとんどファージが測定されていないことがわかる。F繊維毛のない宿主から測定されたファージは、宿主

の体表面を経由して感染していると考えられる。海外の測定結果からも、大腸菌の体表面から感染するファージよりもサルモネラの体表面から感染するファージの方が環境水中に少ないことが知られている³⁾。このことから、大腸菌を宿主として用いた場合にはF特異ファージの測定値は誤差を多く含むことになりやすいと考えられる。また、WG49を宿主として単独で用いた値の9割以上がF特異ファージであることが確かめられた。以上より、F繊維毛を経由して宿主に感染するファージを測定するためには、宿主としてWG49を用いる方法が優れていることがわかった。

(2) 日内変動

4時間ごとに試料を採取して微生物濃度を測定した結果をFig.2に示した。F特異ファージ、大腸菌群および大腸菌のすべての微生物指標は、おおむね1log程度の範囲で変動していることがわかった。この結果から、これらの微生物指標の測定において1log以上の変動が見られた場合は、1日より長い時間単位の濃度変動を表していると言える。

Table 3 Water temperature in marine water

Month	Water temperature (°C)	
	Hiroshima Bay	Tokyo Bay
Nov/1998	18.3	16.0
Dec/1998	16.5	9.3
Jan/1999	11.5	11.8
Feb/1999	10.8	11.3
Mar/1999	12.3	13.0

Table 4 pH values of each sampling site

	Ave	Min	Max
Hiroshima Bay	7.8	7.4	8.4
Diaba	7.3	7.0	7.6
Kasai	7.3	7.1	7.5

Table 5 Electric conductivity (Nov 1998 - Mar 1999)

Station	Conductivity (mS/cm)		
	Mean	Min	Max
Hiroshima Bay	61	53	68
Daiba	52	45	56
Kasai	40	34	53

(3) 冷蔵保存による影響

冷蔵保存期間中に1日ごとの微生物濃度変化をFig. 3に示す。図より、微生物濃度は4日の間比較的安定していることがわかる。F特異ファージの変動が大きかったが、冷蔵保存中に増加することは考えにくい。測定誤差が表れていると考えられる(標準偏差0.41log)。大腸菌と大腸菌群は減少傾向にあるが、4日間の冷蔵期間を経ても減少の程度は0.8log以下であった。以上のような冷蔵保存による影響は、同一試料を測定した場合の誤差レベル(0.2~0.5log程度)に比べて特に大きな値ではないと考えられるので、広島から輸送された試料の実験結果については冷蔵保存による影響がなかったものとして取り扱うこととした。なお、冷蔵期間中の海水のpHは7.0-7.7(平均7.4)と安定しており、電気伝導度は常に53mS/cmと安定した値であった。

(4) 場所ごとの比較

海水の水温、pHおよび電気伝導度の測定結果をTable 3、Table 4およびTable 5にそれぞれ示した。12月に生食用カキ捕獲海域では東京湾よりも7.7°C高い場所があったが、それ以外では採水地点で大きな開きは認められなかった(Table 3)。広島湾の

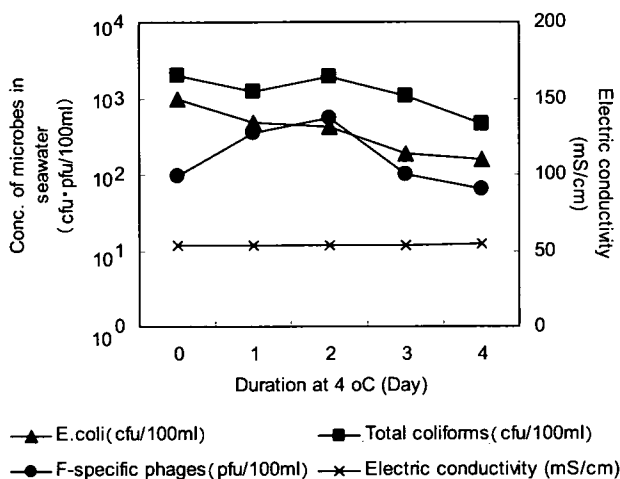


Fig.3 Fate of microbes after collection

海水は東京湾の海水に比べてpHが高い傾向にあった(Table 4)が、微生物の生残性には影響を与えない範囲であったと考えられる。一方、電気伝導度については(Table 5)、生食用および加工用カキ捕獲海域では、平均値がそれぞれ62 (mS/cm)、60 (mS/cm)であったのに対し、東京湾では同じ時期の平均値が台場と葛西でそれぞれ52 (mS/cm)、40 (mS/cm)であった。台場は埋立地に囲まれており、葛西は河口にあたるので、ともに広島湾の採水地点に比べて陸地から来る水の割合が高かったことを示していると考えられる。

Fig. 4に採水地点ごとの微生物濃度の分布を示した。なお、微生物濃度の代表値として、最大値、最小値および検出限界(1pfu/100ml)以下の値を除いたデータの幾何平均値をプロットしている。図から、海水中の大腸菌濃度、大腸菌群濃度については、生食用カキ捕獲海域で値が最も低く、加熱用カキ捕獲海域と台場で同程度の値をとり、葛西で最も高い値をとることが分かる。一方、F特異ファージについては、生食用および加熱用カキ捕獲海域からほとんど検出されなかったが、同じ時期に台場では30 (pfu/100ml)、葛西からは59 (pfu/100ml)の濃度(幾何平均値)で検出された。F特異ファージは他の微生物指標に比べて濃度が低く、特にカキ養殖海域では非常に低いことが分かった。このことから、都市域からの汚濁負荷があまり大きくない海域ではF特異ファージが検出されないことも予想され、指標微生物として用いることは困難である可能性がある。

SSと採水場所および採水時期の関係をFig. 5に示す。SSは16~549 (mg/l)の範囲にあり、おおむね

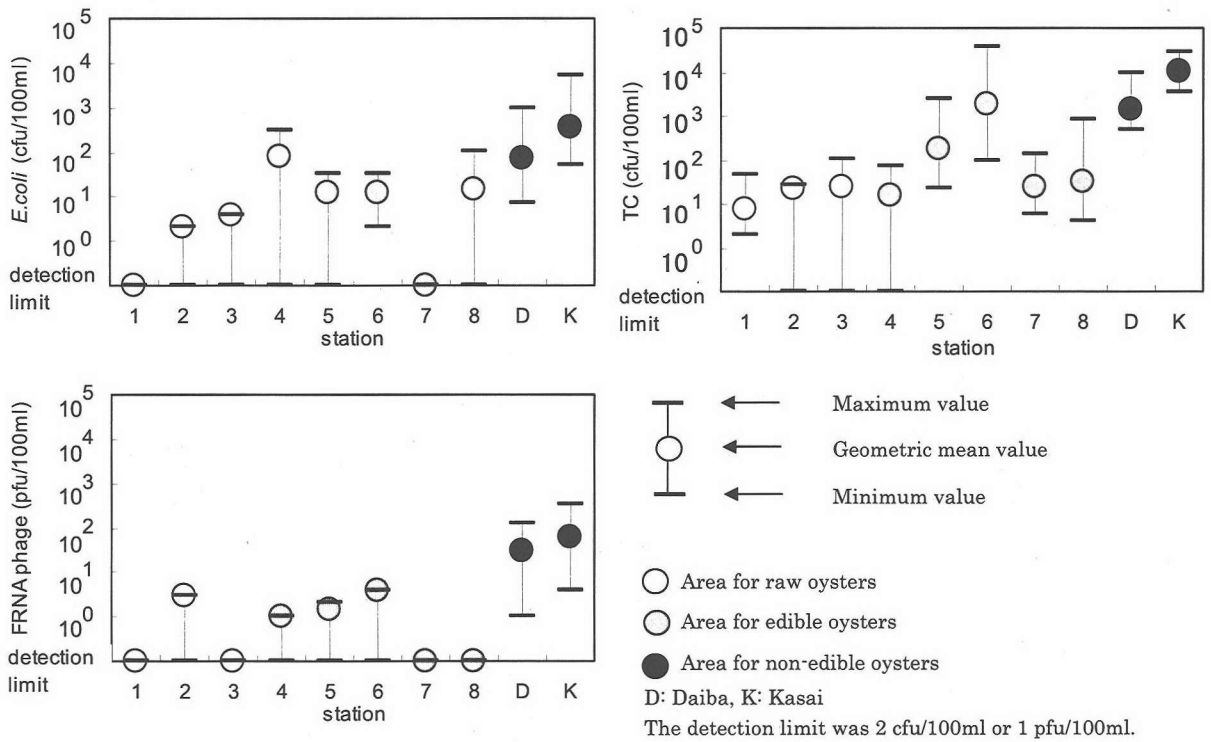


Fig.4 Levels of microbes in Hiroshima Bay and Tokyo Bay (Nov 1998 – Mar 1999)

100 (mg/l) 以下であったが、19% (12試料) は100 (mg/l) 以上、6.4% (4試料) は200 (mg/l) 以上の値を示した。場所および採水時期とこれらの指標との間には特別な傾向は見られず、雨天時に特に大きいという傾向も見られなかった。SS濃度100 (mg/l) 以上の水においても特に濁りがあるとは限らないことから、無機物質のコロイドの影響を大きく受けている可能性が示唆された。

(5) 季節変化

東京湾の台場および葛西における12ヶ月にわたる海水水質の季節変化をFig. 6, Fig. 7およびFig. 8に示した。海水の水温は10℃から30℃の間で推移している (Fig. 6)。また、冬季の電気伝導度は50mS/cm程度あったのに対し、春季には20mS/cm程度まで低下していること (Fig. 7) から、淡水の流入が増加した結果と考えられる。微生物指標については、電気伝導度の低い4月および6-8月に他の月より高い値が得られている (Fig. 8)。一方、台場と葛西の2地点で電気伝導度は大きく異なるものの微生物指標には大きな違いがないことから、電気伝導度のみで微生物の指標とすることは難しいと考えられる。

疫学的にウイルスの感染流行には季節変動がある

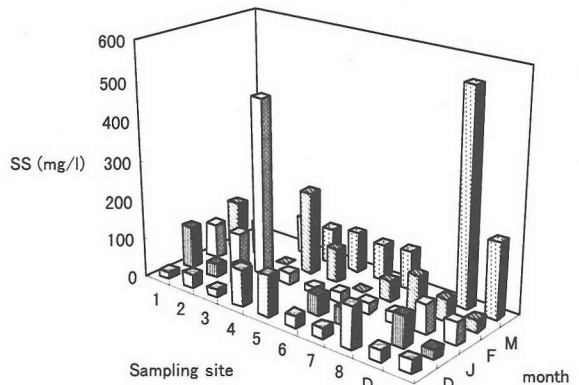


Fig.5 Profile of suspended solid against sampling site and month (Nov 1998 - Mar 1999)

1-8: sampling site in Hiroshima bay,

ことが一般的に知られているが、F特異ファージには特に顕著な季節変動がみられなかったことから、F特異ファージをウイルスの存在指標として用いることは難しい⁷⁾ という知見を支持する結果となった。一方で、排出源の類似性、物理化学的性質の類似性から、ウイルスとファージの挙動には相関性が期待できる。F特異ファージのウイルス指標としての適用性については、他の微生物指標の併用も含めて、

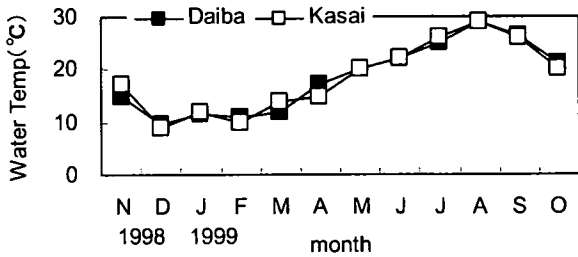


Fig. 6 Seasonal profile of water temperature

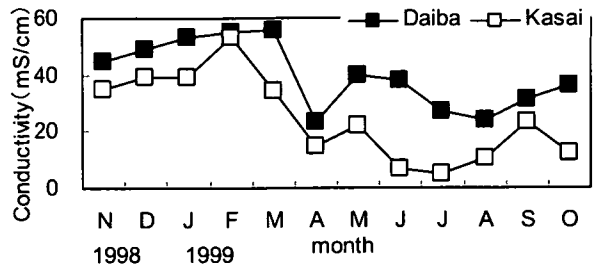


Fig. 7 Seasonal profile of electric conductivity

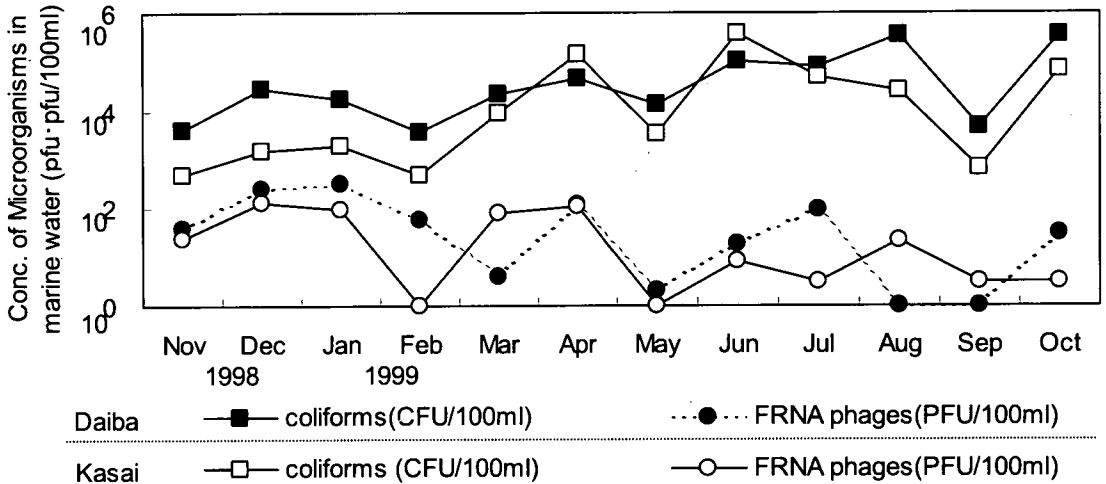


Fig. 8 Seasonal profiles of indicators in marine water

さらなる検討が必要である。

4. 結論

都市沿岸海域において、指標微生物の測定を行ない、以下のことがわかった。

- (1) ウイルスの代替指標として有望視されているF特異ファージを測定する手法として、宿主としてWG49を用いる方法が優れていることがわかった。
- (2) 東京湾において4時間間隔で試料を採取して調べた結果、大腸菌群、大腸菌およびF特異ファージの日間濃度変動はおおむね1log以下であることがわかった。このことから、これらの指標微生物の濃度変動が1log以上であった場合の測定結果は、1日より長い時間単位の濃度変動を表していると言えることがわかった。
- (3) 東京湾の海水を冷蔵保存して経時的に微生物濃

度を調べた結果、4日程度の範囲であれば、大腸菌群および大腸菌の低減は0.8log程度の範囲であることがわかった。

- (4) 広島湾の生食用カキ捕獲海域、加熱用カキ捕獲海域、および東京湾における指標微生物濃度を測定した。その結果、生食用カキ捕獲海域においてすべての指標微生物の濃度が低いことがわかった。また、すべての海域において、F特異ファージは他の微生物指標に比べて濃度が低かった。
- (5) 大腸菌群、大腸菌およびF特異ファージを東京湾において12ヶ月にわたって測定し、電気伝導度の低い4月および6-8月に他の月より高い値が得られた。

謝辞：広島県保健環境センターおよび同センターの福田伸治博士には、試料の採取および広島湾に関する情報提供をいただいた。ここに深く謝意を表す。

- 1) Gantzer, C., Maul A., Audic J. M., and Schwartzbrod L.: Detection of Infectious Enterovirus, Enterovirus Genomes Somatic Colifages, and Bacterioides Fragilis Phages in Treated Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4307-4312, 1998.
- 2) Geldenhuys, J. C., and Pretorius P.D.: The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Wat. Sci. Tech.*, 21, 105-109, 1989.
- 3) Havelaar, A. H., Van Olphen M., and Drost Y. C.: F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2956-2962, 1993.
- 4) Merrett, H., Pattinson, C., Stackhouse, C. and Cameron, S.: The incidence of enteroviruses around the Welsh Coast-a one year intensive survey, p.345-351. In D. Wheeler, M. Richardson, and J. Bridges (ed), *Watershed 89: the future of water quality in Europe*, vol. II. Pergamon Press, Oxford, England 1989.
- 5) Sobsey, M. D.: Inactivation of Health-related Microorganisms in Water by Disinfection Processes, *Wat. Sci. Tech.*, 21, 179-195, 1989.
- 6) Lechevallier, M W., Abbaszadegan, M., Camper, A. K., Hurst, C. J., Izaguirre, G., Marshall, M. M., Naumovitz, D., Payment, P., Rice, W., Rose, J., Schaub, S., Slifko, T. R., Smith, D. B., Smith, H. V., Sterling, C. R., and Stewart. M.: Emerging Pathogens-viruses, protozoa, and algal toxins, *AWWA Committee Report*. 91, issue9, pp110-121, 1999.
- 7) IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology: Bacteriophages as Model Viruses in Water Quality Control, *Water Reseach*, 25, 529-545, 1991.
- 8) Ketranakul, A. and Ohgaki, S.: Indigenous coliphages and RNA-F-specific coliphages associated with suspended solids in the activated sludge process, *Wat. Sci. and Tech.*, 21(3), 73-78, 1989.
- 9) Dore, W. J. and Lees, D. N.: Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2830-2834, 1995.
- 10) 大垣真一郎, Ketranakul A., 橋本光雄 : 生活環境中に存在する大腸菌ファージの定量, 浄化槽研究, 1, 1, p.19, 1989.
- 11) 日本水道協会 : 上水試験方法, 1993.
- 12) Havelaar, A. H. and Hogeboom, W. M.: A Method for the Enumeration of Male-specific Bacteriophage in Sewage, *Journal of Applied Bacteriology*, 56, 439-447, 1984.

(2002. 9. 24 受付)

SEASONAL AND DAILY PROFILES OF F-SPECIFIC PHAGES AND INDICATOR BACTERIA IN URBANIZED COASTAL MARINE WATER

Hiroyuki KATAYAMA, Tetsuo KUYAMA and Shinichiro OHGAKI

The levels of microbial indicators including total coliforms, *E. coli* and F-specific phages in Tokyo bay and Hiroshima bay were examined. The plaque assay using WG49 as a host strain was proved to be superior for estimation of levels of F-specific phages in marine water. The samples with 4-hour interval were assayed and found that variation within 24 hours for all indicators was small enough compared to those among sampling stations or sampling seasons. All indicators tested were found smallest in the area for raw edible oysters in Hiroshima bay. The levels of F-specific phages were lowest among indicators tested. The coliforms were abundant in the summer season with lower electric conductivity in Tokyo bay.