

宿主特異的ウイルス遺伝子マーカーを用いた甲府盆地河川水中の糞便汚染源の解析

山梨大学 学生会員 ○中谷航己

山梨大学大学院 (現・中日本ハイウェイ・メンテナンス中央株式会社) 非会員 山田貴大

山梨大学大学院 非会員 Bikash Malla

山梨大学大学院 正会員 原本英司

1. 目的

水環境中において、病原微生物などは糞便とともに排出される。水環境中の糞便汚染源には下水処理場や浄化槽などからのヒト由来の糞便汚染、家畜飼育施設からの排水や野生動物の糞便汚染が存在する。これらの病原微生物によって水系感染症の発生リスクが高まると考える。そのため糞便汚染源を把握することは水系感染症のリスクを把握し、適切な対策を行う上で重要である。現在、糞便汚染の指標として大腸菌群が用いられているが、水環境中の糞便汚染及びその影響を正確に評価できるとは限らない。本研究では、糞便汚染の解析のため、環境水中のウイルス検出を行い、汚染源の詳しい情報を得ることを試みた。

2. 研究方法

2.1 試料の採取

甲府盆地に流れる河川計 20 地点分(環境基準点 5 3 地点より抜粋)の採水を行い河川サンプルとした。20 地点を 2 回採水した(採水日 2017 年 10/27~12/20)。

糞便汚染源のサンプルはヒトのサンプルとして下水処理場にて下水流入水・処理水、ウシのサンプルとして牧場での牛糞、ブタのサンプルとして豚舎排水を用いた。

採水、下水流入水・処理水、豚舎排水は、全てオートクレーブにて滅菌したポリ容器(1L)に満水になるまで入れて密栓した後、クーラーボックスで保存して運搬した。

ウシの糞便サンプルはプラスチックスプーンを用いて採取し、50ml 遠沈管に入れて運搬した。

2.2 水試料の濃縮方法

河川水、下水処理水は 2L、下水流入水、豚舎排水は 100mL を AA 膜(混合セルロース膜 孔径: $0.8\mu\text{m}$, 直径 90mm)を用いてろ過した。病原微生物の濃縮方法として陰電荷膜破碎型濃縮法を行った(原本ら,2010)次に上清(ウイルス)だけを回収し Centrepip YM-50 を使い 2 次濃縮を行った。

2.3 定量 PCR を用いた定量方法

濃縮液をそれぞれ DNA 抽出、RNA 抽出を行った。抽出した RNA を 2 本鎖の cDNA に合成するため、逆転写反応を行った。

その後、汚染源サンプルを定量 PCR にかけて、適切なプライマー及びプローブを決定した。マーカーの決定は感度、特異度、正確度から最適なものを選択した。ここでの感度とは、陽性と考えられるサンプルを陽性であると検出した割合のことであり、特異度は陰性だと考えられるサンプルを検出できなかった割合のこととした。また、正確度は、感度において正確に検出したサンプル数と、特異度において正確に検出できなかったサンプル数の合計を、全サンプルで割った数値とした。

次に、決定したプライマー及びプローブを用いて河川水試料の定量 PCR を行った。

2.4 コリラート法を用いた定量方法

河川サンプルと下水処理水は原水と 10^2 倍希釈したもの 2 つ、下水流入水・豚舎排水は 10^4 倍希釈 10^6 倍希釈したもの 2 つを用意した。上述した各試料 100ml にコリラート試薬を加えて混和した後、定量トレイ(QI トレイ, IDEXX Laboratories, WOT100)に添加し、 180°C に温度設定したシーラーで密封した。このトレイをインキュベーターにて 37°C で 24 時間培養した。培養後定量トレイに紫外線を照射し、青色の蛍光したウェルを

計数し、最確数表によって大腸菌濃度を算出した。

結果と考察

大腸菌についてはすべての試料から検出された。下水流入水、豚舎排水はどちらも高い濃度で大腸菌が検出された。

河川水試料における大腸菌濃度についてある地点で1回目と2回目の濃度変動が大きいところがあったが、これは採水日前の天候による影響が考えられる。

高い数値を示している地点については上流に家畜施設があるなど、様々な仮説が考えられるが、大腸菌濃度だけでは正確な判断がしづらい。

よって、ウイルス検出を用いた糞便汚染源の解析が必要である。

謝辞

本研究は、環境研究総合推進費(課題番号 5-1603)および科学研究費補助金基盤研究(B)(課題番号 26289182, 17H03332)により実施した。

参考文献

原本英司、片山浩之、浅見真理、秋葉道宏、国包章一：河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発,水道協会雑誌,Vol.79,10,2～11(2012)

キーワード 糞便汚染源 ウイルス

連絡先 〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11 B3-309 山梨大学大学院環境動態研究室 TEL 055-220-8725
E-mail t14ce044@yamanashi.ac.jp