

アリゾナ州の人工湿地におけるウイルスの低減効果の評価

山梨大学大学院 学生会員 ○伊藤 瑠璃子
アリゾナ大学 非会員 Walter Q. Betancourt
アリゾナ大学 非会員 Charles P. Gerba
山梨大学大学院 正会員 原本 英司

1. 目的

人工湿地法とは、湿地に生息する微生物や、ヨシをはじめとする植物の力を利用して水質浄化を図る汚水浄化システムである。これまでは有機物の除去を目的とした研究が中心であり、病原微生物の除去に着目した研究は限られてきた^{1,2)}。そこで、本研究では、米国アリゾナ州に位置し、人工湿地として高度処理工程に使用されている SWEETWATER で、病原微生物のうち、特にウイルスの低減効果を評価することを目的とした。

2. 方法

2. 1 採水及び水質項目の測定

採水は、2016年9月～10月に4回、2017年9月に6回と、合計10回行った。下水処理場から二次処理水が人工湿地へ流入する始点、湿地の中間点、終点の3地点で1Lずつ採取し、それぞれを流入水、中間水、流出水とした。また、下水処理場に流入する下水流入水も採取した。各試料の水質として、pH、温度、総溶解固形分、塩分、導電率、濁度を測定した。

2. 2 大腸菌の定量

Colilert-18 (IDEXX Laboratories) を用い、最確数法によって各試料の大腸菌の検出をした。外線照射時に青い蛍光を示したウェルを数え、その個数から最確数 (MPN : most probable number) を求めることで大腸菌の濃度を計測した。

2. 3 ウイルスの定量

陰電荷膜破碎型濃縮法³⁾に倣い、ウイルスの一次濃縮をした。2.5M MgCl₂ を1mL 添加した下水流入水100 mL 及び10 mL 添加した流入水、中間水、流出水1 L を混合セルロース膜 (孔径 0.8 µm、直径 90mm、Merck Millipore) で濾過し、そのセルロース膜を PBS

(一) 溶液 15mL 入りの 50mL 遠沈管内で破碎した。遠心分離によって上清と沈渣に別れた二層の上澄みをウイルス一次濃縮液とし、スポイトで回収した後、Centriprep YM-50 (Merck Millipore) にて二次濃縮液を回収した。その後、DNA 抽出及び RNA 抽出をした。RNA 抽出の際は、反応効率を求めるため、各試料もしくは試料の代わりに分子生物学用水を同量添加したチューブにマウスノロウイルス (S7-PP3 株) 高濃度原液を 1µL 添加した。その後、RNA 抽出液から逆転写反応によって cDNA 溶液を作成した。得られた cDNA 溶液は、アイチウイルス⁴⁾、エンテロウイルス⁵⁾、ノロウイルス GI⁶⁾、タバコモザイクウイルス⁷⁾、トウガラシ微斑ウイルス⁸⁾の定量 PCR 反応に、また、DNA 抽出液は、ヒトアデノウイルス⁹⁾、JC ポリオーマウイルス¹⁰⁾の定量 PCR 反応に供し、試料中の各ウイルスを定量した。

3. 結果及び考察

各ウイルスの陽性試料数及び陽性率を表1に示す。アイチウイルス、エンテロウイルス、タバコモザイクウイルス、トウガラシ微斑ウイルスは全ての下水流入水から検出された。また、アイチウイルス、エンテロウイルス、ヒトアデノウイルス、JC ポリオーマウイルスなどの病原ウイルスよりもタバコモザイクウイルスやトウガラシ微斑ウイルスなどの指標ウイルスの方が流入水中で陽性率が高く、90%以上であった。この2種類の指標ウイルスは、流出水ではタバコモザイクウイルスで30%、トウガラシ微斑ウイルスで100%の陽性率を示し、特にトウガラシ微斑ウイルスはこの人工湿地において低減されにくいウイルスであることが示唆された。

キーワード 人工湿地, ウイルス, 除去率

連絡先 〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11 B3-311 山梨大学大学院総合研究部 TEL : 055-220-8725

Email : eharamoto@yamanashi.ac.jp

次に、3 地点での各ウイルスの濃度を表 2 に示す。表 2 の網掛けの数値は、検出限界 1 copy/well 以下となった試料である。トウガラシ微斑ウイルス、タバコモザイクウイルス、ヒトアデノウイルス、JC ポリオーマウイルス、アイチウイルスの濃度推移の様子を図 1 に示す。エンテロウイルス、ノロウイルス GI は流入水から検出される回数が 2 回及び 0 回少なく、除去率を算定することは困難であった。表 2 及び図 1 に示すとおり、トウガラシ微斑ウイルスは、全ての測定日で流入水及び流出水中で最も高濃度で検出され、その除去率は平均 $0.33 \pm 0.52 \log$ ($n=10$) であった。このことから、このウイルスが低減されにくいウイルスである事が示唆された。また、表 2 に示すように、トウガラシ微斑ウイルスと同様、植物ウイルスであるタバコモザイクウイルスは、2017 年 9 月 15 日を除き、全ての流入水で検出されたが、図 1 に示すように、3 地点全てでトウガラシ微斑ウイルスよりも低濃度で、かつ流入水から流出水にかけて平均 $1.40 \pm 1.04 \log$ ($n=9$) の低減を示した。よって、タバコモザイクウイルスは、トウガラシ微斑ウイルスに比べ、この湿地におけるウイルスの低減の指標には適さないことが示唆された。また、全てのウイルスのうち、最も平均低減率が高か

ったウイルスはヒトアデノウイルスであり、その値は平均 $3.39 \pm 0.29 \log$ ($n=4$) であった。一方で、ヒトアデノウイルスと同様、核酸に DNA をもつ JC ポリオーマウイルスは、平均 $2.73 \pm 2.06 \log$ ($n=4$) の低減率を示し、平均低減率はヒトアデノウイルスに次いで 2 番目に高かった。特に、表 2 に示すように、2017 年 9 月 20 日では、その他の日で $2.06 \sim 2.44 \log$ の低減率であったのに対し、 $4.00 \log$ の低減率を示し、全てのウイルスの測定で最も大きい低減率だった。また、図 1 に示すように、アイチウイルスは、流入水から中間水にかけて $1.21 \log$ 、中間水から流出水にかけて $0.58 \log$ 低減したのに対し、ヒトアデノウイルスと JC ポリオーマウイルスは中間地点までに $3.77 \log$ 及び $3.15 \log$ の低減を示し、検出限界以下にまで濃度が低下した。このことから、ウイルスによっても人工湿地での低減の様子は異なり、ヒトアデノウイルスと JC ポリオーマウイルスは人工湿地の初期段階で除去されやすいウイルスであることが示唆された。また、大腸菌の濃度は、全ての日において、始点から中間点にかけて増加し、流入水の大腸菌濃度よりも流出水の大腸菌濃度の方が高く検出された。特に、2017 年 9 月 22 日の測定では、その傾向が強く現れ、流入水から中間水へは $5.0 \log$ の濃度増加、中間水から流出水へは $4.1 \log$ の濃度減少があり、始点から終点にかけて $0.9 \log$ の濃度増加があった。この原因として、流入水及び中間水の水温が 32.1°C と 24.1°C と高温であったために、始点から中間点にかけて大腸菌が増殖した可能性が示唆された。また、この人工湿地には多数の動物が生息しており、それらの糞の混入による大腸菌の濃度増加の影響も推察された。

表 1 各ウイルスの陽性試料数と陽性率

ウイルス	湿地 流入水	中間水	流出水	下水 流入水
アイチ ウイルス	5/10※ (50%)	3/10 (30%)	0/10 (0%)	6/6 (100%)
エンテロ ウイルス	2/10 (20%)	1/10 (10%)	2/10 (20%)	6/6 (100%)
ノロ ウイルス	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/6 (0%)
タバコモザ イク ウイルス	9/10 (90%)	4/10 (40%)	3/10 (30%)	6/6 (100%)
トウガラシ 微斑 ウイルス	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	6/6 (100%)
ヒトアデノ ウイルス	5/10 (50%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	4/6 (67%)
JC ポリオ ーマ ウイルス	3/10 (30%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/6 (50%)

※10 試料のうち 5 試料陽性

表 2 3 地点における各ウイルス濃度

採取日	試料	各ウイルス濃度 (log copies/L)						
		アイチウイルス	エンテロウイルス	ノロウイルス GI	タバコモ ザイク ウイルス	トウガラ シ微斑 ウイルス	ヒトアデ ノ ウイルス	JC ポリオ ーマ ウイルス
2016/9/20	流入水	<2.36	<2.36	<2.36	4.19	6.16	5.37	4.47
	中間水	<2.83	<2.83	<2.83	<2.83	4.73	<2.90	<2.90
	流出水	<2.96	<2.96	<2.96	<2.96	5.11	<3.02	<3.02
2016/9/22	流入水	4.71	3.06	<2.29	3.41	5.88	5.22	4.04
	中間水	<2.41	<2.41	<2.41	<2.41	5.88	<2.48	<2.48
	流出水	<2.91	<2.91	<2.91	<2.91	4.88	<2.98	<2.98
2016/9/27	流入水	<2.35	<2.35	<2.35	4.26	5.84	5.25	4.66
	中間水	<2.34	3.19	<2.34	<2.34	5.44	<2.41	<2.41
	流出水	<3.18	4.48	<3.18	<3.18	5.80	<3.25	<3.25
2016/10/3	流入水	<2.72	<2.72	<2.72	4.52	5.95	5.46	<2.79
	中間水	<2.42	<2.42	<2.42	<2.42	5.42	<2.48	<2.48
	流出水	<2.90	<2.90	<2.90	<2.90	5.77	<2.97	<2.97
2017/9/14	流入水	<2.45	<2.45	<2.45	2.77	5.39	5.26	<2.52
	中間水	<2.37	<2.37	<2.34	3.01	5.36	<2.44	<2.44
	流出水	<2.33	<2.33	<2.33	3.15	5.07	<2.39	<2.39
2017/9/15	流入水	3.16	<2.23	<2.23	<2.23	4.78	<2.30	<2.30
	中間水	<2.10	<2.10	<2.10	<2.10	6.79	<2.17	<2.17
	流出水	<2.25	2.25	<2.25	<2.25	4.93	<2.32	<2.32
2017/9/18	流入水	2.54	<2.39	<2.39	2.88	5.45	<2.45	<2.45
	中間水	<2.29	<2.29	<2.29	<2.29	4.66	<2.36	<2.36
	流出水	<2.37	<2.37	<2.37	3.00	5.45	<2.43	<2.43
2017/9/19	流入水	2.76	<2.50	<2.50	3.76	6.23	<2.57	<2.57
	中間水	3.31	<2.26	<2.26	3.72	5.96	<2.33	<2.33
	流出水	<2.47	<2.47	<2.47	<2.47	5.19	<2.54	<2.54
2017/9/20	流入水	3.29	<2.50	<2.50	3.95	5.72	<2.57	5.58
	中間水	3.31	<2.31	<2.31	3.07	5.54	<2.38	<2.38
	流出水	<2.51	<2.51	<2.51	3.38	5.27	<2.58	<2.58
2017/9/21	流入水	<2.14	2.78	<2.14	3.16	4.85	<2.20	<2.20
	中間水	<2.10	<2.10	<2.10	<2.10	4.44	<2.17	<2.17
	流出水	<2.33	<2.33	<2.33	<2.33	5.43	<2.40	<2.40

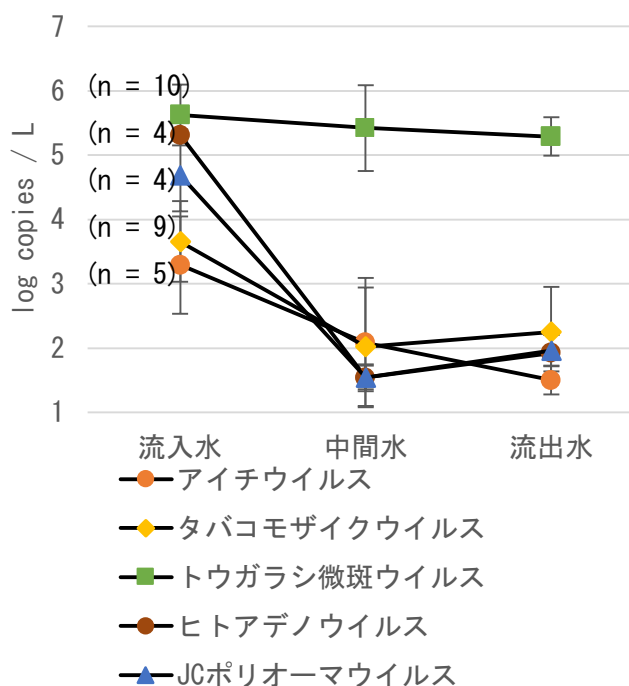


図 1 各ウイルスの濃度推移

参考文献

- 1) Quiñónez-Díaz et al. (2001) J. Environ. Sci. Health. 36, 1311-1320.
- 2) Rachmadi et al. (2016) Sci. Total. Environ. 542, 976-982.
- 3) 原本ら(2010) 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, 79,10, 2-11
- 4) Kitajima et al. (2013) Development of a Reverse Transcription-Quantitative PCR System for Detection and Genotyping of Aichi Viruses in Clinical and Environmental Samples. Appl Environ Microbiol 79, 13, , 3952-3958
- 5) Gregory et al. (2006) Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 72 (6), 3960-3967
- 6) Kageyama et al. (2003) Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 41 (4):1548-1557.
- 7) Balique et al. (2013) Tobacco Mosaic Virus in the Lungs of Mice following Intra-Tracheal Inoculation. PLoS Biol. 8 (1) e54993
- 8) Zhang et al. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. PLoS Biol. 4 (1), e (3)
- 9) Heim et al. (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. J. Med. Virol. 70 (2), 228-239.
- 10) Pal et al. (2006) Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. J. Virol. Methods. 135, 32-42

4. 結論

アリゾナ州の人工湿地である SWEETWATER では、トウガラシ微斑ウイルスは比較的除去されにくいウイルスであり、この人工湿地によるウイルスの低減における指標ウイルスとして適していることが示唆された。また、ウイルスによっても低減の様子は異なり、アイチウイルスは始点から終点にかけて緩やかに低減する一方で、ヒトアデノウイルス及び JC ポリオーマウイルスは、人工湿地の中間地点までに低減されやすいウイルスであることが示唆された。さらに、人工湿地内での大腸菌の挙動はウイルスとは異なっており、人工湿地での大腸菌の低減効果はみられなかった。