

## 緩速ろ過システムによるウイルスの除去機能の評価

岐阜大学大学院工学研究科 非会員 ○田中大貴 岐阜大学工学部 非会員 山本真帆  
岐阜大学流域圏科学研究センター 非会員 廣岡佳弥子 正会員 李富生

### 1. 研究の背景と目的

ヒト腸管系ウイルスは細菌と比較すると浄水処理プロセスで不活化および除去されにくく、長時間生残することが知られている<sup>1)</sup>。また、河川などの水道水源水域からのヒト腸管系ウイルスの検出事例や国内外の水道水中からの検出事例が報告されている<sup>2)</sup>。

病原性を有するヒト腸管系ウイルスの汚染から水道水を守るためには、原水となる水道水源水域中のウイルスの動態を把握すると同時に、水処理過程におけるウイルスの除去機能の評価することが大変重要となってくる。

そこで本研究では、ヒト腸管系ウイルスの代替指標として大腸菌ファージに着目し、これらが生物膜の働きによって汚濁物質を除去する緩速ろ過システムの処理過程でどのような挙動を示すかを調査し、緩速ろ過システムによるウイルスの除去機能の評価を行った。

### 2. 実験方法

1) サンプルの採水：河川水を原水とする緩速ろ過浄水システム内で、2009年9月、10月、11月の3回にわたって採水を行った。採水地点は、緩速ろ過池の流入原水、汚砂かきとり後にろ過開始30日と60日後の緩速ろ過池の砂上水および3日、30日、60日の緩速ろ過水の6ヶ所とした。(図1)

2) 大腸菌ファージの検出手順：大腸菌ファージは平板培養法と分子生物学的手法の2種類の 방법으로検出した。平板培養法では、ブラック形成法に基づいて定量し、1mLあたりのブラック形成数(PFU)を求めた。宿主大腸菌としてWG49とWG5を用いた。大腸菌ファージのうち、F特異RNAファージは大腸菌のF繊毛にしか吸着できないため、これを有するWG49を用いた。ただし菌体表面吸着ファージも同時に検出されるため、F特異RNAファージの増殖を阻害するRNA分解酵素(RNase A)を添加しない系と添加した系の差からF特異RNAファージを求めた。菌体表面吸着ファージはF繊毛の有無に関係なく大腸菌の細胞壁に吸着するので、F繊毛を持たないWG5を宿主大腸菌として濃度を求めた。生死判別せずにウイルス総量を評価する手法として、Real time PCR法を用いた測定を行った。サンプル500mLに250mM-MgCl<sub>2</sub> 2.5mLを添加後、Millipore社のHA膜(直径90mm, 孔径0.45μm)でろ過し大腸菌ファージを膜に吸着させた。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200mL (pH3.0のもの)で膜を洗浄しMgイオンを脱着させた後にNaOH 10mL (pH10.5のもの)で大腸菌ファージを誘出した。次いで、Centriprep YM-50 (Millipore社)を用いた遠心操作によって誘出液を500μLまで濃縮した。この濃縮サンプルからboiling法<sup>3)</sup>でRNAを抽出し、抽

出液をOne Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Takara社)を用いたインターカレーター法によるReal time PCRに供した。PCRには、F特異RNAファージの中で、ヒト糞便由来であるQβと動物糞便由来であるMS2の2種類に特異的なプライマーセット<sup>4,5)</sup>を用いて定量を行った。ただし、9月のサンプルに対してはQβだけの定量とした。

### 3. 結果

平板培養法による大腸菌ファージの定量結果を図2に示す。F特異RNAファージは9月の緩速原水、30日経過後砂上水で検出された(0.02PFU/mL)が、9月のそれ以外の地点と10月及び11月では検出されなかった。菌体表面吸着ファージ濃度は10月の緩速原水で最大(0.08PFU/mL)であり、9月のろ過開始30日経過後の砂上水と10月の緩速原水、30日後の砂上水、60日後の砂上水、11月の30日後の砂上水、60日後のろ過水においても検出された。すなわち、ろ過前(緩速原水、砂上水)には、菌体表面吸着ファージは毎月の調査で検出され、F特異RNAファージは9月のみ検出された。また、11月の60日経過後のろ過水を除き、ろ過後水ではほとんどファージは検出されなかった。

Real time PCR法による大腸菌ファージの定量結果を図3に示す。Qβが10月の緩速原水、ろ過開始3日経過後、30日経過後及び60日経過後のろ過水、11月の全地点で検出された。Qβはろ過前に検出されないとき(9月)とされたとき(10月、11月)があり、また、ろ過前に検出されたときにはろ過後もほぼ同程度の濃度で検出された。一方、MS2は全調査時期の全ての調査地点で未検出の結果となった。

### 4. 考察

本研究で対象とした河川水を流入原水とする緩速ろ過システムには、活性のある大腸菌ファージは10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup>[PFU/mL]程度で流入しているが、ほとんどの場合緩速ろ過処理により不活化または除去されることがわかった。大腸菌ファージと同程度の大きさであるヒト腸管系ウイルスが、流入水中に存在した場合にも同様の挙動を示す可能性があることが示唆された。

11月のみ、ろ過開始60日後の砂ろ過池でろ過後の菌体表面吸着ファージがろ過前に比べて減少しなかったことは、ろ過継続時間が長くなることによりろ過表面付近のろ過抵抗に伴う剥離や生物膜の中で菌体表面吸着ファージが大腸菌に寄生し再増殖して漏出したことが考えられる。

また、緩速ろ過後も活性を持つ菌体表面吸着ファージが検出されたことから、その挙動についてさら

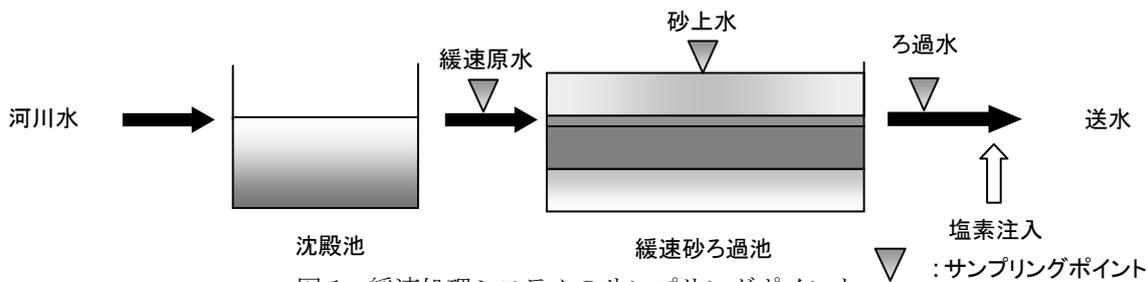


図1 緩速処理システムのサンプリングポイント

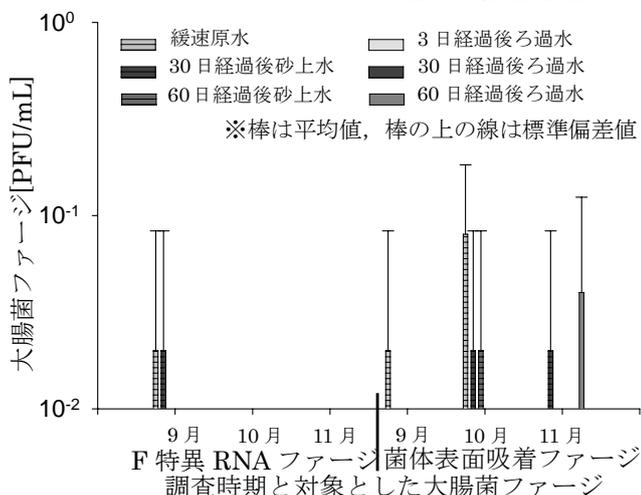


図2 緩速処理システムにおける大腸菌ファージ濃度 (平板培養法)

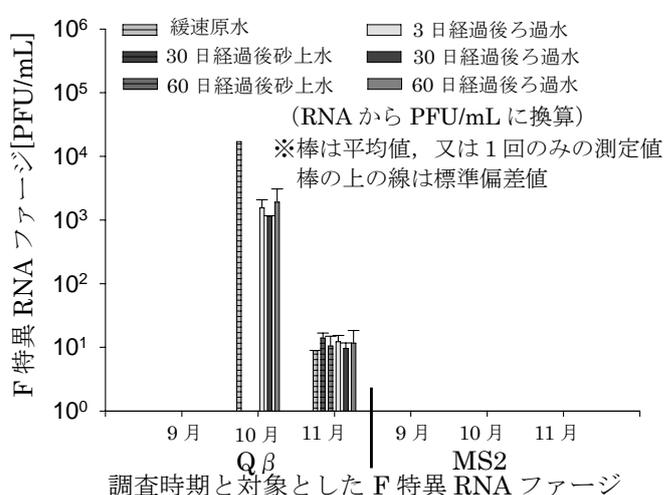


図3 緩速処理システムにおけるF特異RNAファージ濃度 (Real time PCR法)

に調査を継続していく必要がある。

平板培養での10月と11月の結果では、活性のあるF特異RNAファージは検出されなかったが、活性の有無を判別せずに全量をPCR法で測定しているF特異RNAファージQβは検出されている。これは流入原水に存在した活性のないQβが、ろ層に抑止されずにろ水に漏出した可能性がある。

一方で活性のあるF特異RNAファージが検出された9月においてQβは検出されなかったが、これは検出された活性のあるF特異RNAファージはQβではなく、F特異RNAファージGAなどの存在を示している可能性がある。

ろ過前に検出されたQβはろ過後もほとんど減少しなかった(図3)。これは平板培養で検出された活性のあるファージが砂ろ過によって減少したこと(図2)と一致しない。このため、緩速ろ過処理による活性のあるファージの減少について、生物膜や砂層による吸着や抑止などの物理的な除去のほか、ファージの不活化がろ層内で生起しているのか確認する必要がある。

また、MS2が検出されていないことから、本研究で対象とした緩速ろ過システムに流入するF特異RNAファージは主にヒト糞便由来のものであることがわかった。

### 5. まとめ

河川水を原水とする緩速ろ過システムによる大腸菌ファージ濃度の除去性を調査し、ろ過前後の試料水に活性を持つ大腸菌ファージとF特異RNAファージ

Qβが存在すること、それらはヒト糞便由来が主であることが示唆された。水道水を介したヒト腸管系ウイルスからの健康リスクを評価するためには、水道原水中での存在実態および処理工程での除去挙動に関しての知見の更なる蓄積が重要であると考えられる。

### 【参考文献】

- 1) IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology: Bacteriophages as model viruses in water quality control, *Wat. Res.*, Vol. 25, pp. 529-545, 1991.
- 2) 矢野一好：水環境におけるウイルス汚染の実態, *水環境学会誌*, Vol. 29, pp. 124-129, 2006.
- 3) Katayama *et al.* : Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater, *Applied Environ. Microbiology*, Vol. 68, pp. 1033-1039, 2002.
- 4) 白崎伸隆：凝集MF膜処理におけるウイルスの除去, 岐阜大学学位論文, p 11, 2005
- 5) Kevin P. *et al.*: Real-time Fluorogenic Reverse Transcription-PCR Assays for Detection of Bacteriophage MS2, *Applied Environ. Microbiology*, Vol. 72, No.1, pp. 478-483, 2006.