

下水汚泥中のウイルス検出と定量方法の開発

東北大学 学生員○佐野大輔 東北大学 正会員 福士謙介
 東北大学 正会員 熊谷幸博 東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

我が国の長年の懸念事項である都市域の水不足の解決策の一つとして地域内もしくは建造物内の污水处理施設の設置が検討されているが、そのことは同時に、水処理によって生じた汚泥が現在よりも広範囲から発生することを意味する。下水汚泥には病原ウイルス、とくに腸管系のウイルスが存在する¹⁾。汚泥からの検出例のあるウイルスを表-1に示す。これらの多くは固形物表面ないしは内部に強固に吸着し²⁾、そのすべてを液相に誘出することは極めて困難である。

本研究では、完全な病原ウイルスの回収を目指し、多糖分解酵素を用いて生物フロックを分解することによる固形物由来のウイルスの効率的な誘出方法の可能性を検討した。なお、ウイルス検出方法としてはBGM細胞を用いたブラック法を採用し、テストウイルスとして弱毒ポリオウイルス1型(Lsc,2ab株)を用いた。また、ウイルス感染価をブラック形成単位(PFU)で表した。

表-1. 汚泥の種類と検出されたウイルス¹⁾

汚泥の種類	ウイルスの型
消化汚泥	ポリオウイルス1, 2, 3型
	レオウイルス コクサッキー B ₅
	エコーウイルス7, 22/23
生汚泥	ポリオウイルス1, 2, 3, 型
	アデノウイルス1, 2型
	レオウイルス2, コクサッキーB ₅

2. 汚泥からのウイルス検出の問題点

汚泥中の固形分に付着しているウイルスは、検出のために液相に誘出させなければならない。しかし汚泥中では、ウイルスが生物フロックの成長過程で固形相に取り込まれて液相から離れた位置に付着して存在する可能性がある。そのためU.S.EPAにより採用されている10%ビーフエキスを溶液を用いた方法が、汚泥中の固形相からのウイルスの誘出に対して効果的であると判断できない。そのことに対する改善策はこれまでも行われてきているが、その多くは超音波などの物理的な衝撃を利用したもの³⁾であり、ウイルス感染価の

低下が懸念される。汚泥中のウイルスの定量を目指すには、ウイルスの感染価に影響を与えることなく、固相に取り込まれたウイルスを効率的に検出する手段の開発が必要不可欠である。

3. 多糖分解酵素によるウイルス誘出

汚泥中の細胞外ポリマーの主成分は細胞外多糖と細胞外タンパク質、および核酸である。したがって、これらを選択的に分解できれば生物フロックの分解が達成できると考える。

その中でも多糖は、その電気的な性状から汚泥中では直鎖として存在することが推測される。また、分解してもウイルスの不活化は生じない。なぜならウイルスの外殻はタンパク質からなるカプシドか、もしくは脂質2重層からなるエンベロープであるからである。したがって生物フロックを分解してウイルス誘出の効率を上げるには、細胞外多糖を選択的に分解することが望ましい。

細胞外多糖は、汚泥中の細菌による代謝生成物と下水中に含まれていた多糖（主にセルロース）によって構成されている。そのうち汚泥中の細菌による代謝生成物は、その構成が解明されていないために今回の分解対象として望ましくない。そこで今回は、生物フロックの生成に貢献していると考えられているセルロースに着目し、セルラーゼを用いて汚泥中のセルロースの選択的な分解を行い、ウイルス誘出を試みる。

4. 実験方法

スパイク実験用のウイルスは、弱毒ポリオウイルス1型(Lsc,2ab株)を用いた。供試ウイルス液の感染価は、 3.08×10^7 PFU/mLであった。

汚泥サンプルは、仙台市内のH下水処理場の汚泥サンプル採取口から、返送汚泥を500mLずつ2回に分けて採取した。実験室に持ち帰って30mLずつ50mL遠心管(FALCON FRAGILE 2070)に分注し、-30℃で冷凍保存した。実験に際し、凍結保存された汚泥サンプルは、37℃の恒温槽内で急速融解して使用した。汚泥サンプルの乾燥固形物量の平均値は、0.64%であった。

供試ウイルス液とウイルス誘出液の希釈液、重層用寒天は、文献4)に従って調整した。

酵素はセルラーゼ（SIGMA C-8546）を用いた。

ビーフエキス溶液は文献5)に従って調整した。酵素の添加は、オートクレーブ後十分温度が下がったのを確認して添加した。

汚泥からのウイルス誘出方法は、文献4)に従った。以下、その概要を示す。

30mLの汚泥サンプル3本を、オートクレーブ済み200mLビーカーに移し、pHを5M HClか5M NaOHを用いて4.5～6.0に調整する。0.05M $AlCl_3$ を1mL添加した後、汚泥サンプル30mLに対し、10倍希釈した供試ウイルス液0.3mLを加える。スターラーで30分攪拌し、ウイルスを汚泥の固形分に吸着させる。続いて50mL遠心管3本に30mLづつ分注し、それらを2500g、15分、4℃で遠心分離する。上清を捨て、ビーフエキス溶液を遠心管に加えて固形分と混合した後、オートクレーブ済み200mLビーカーに移し入れて1時間インキュベーター（NAPCO Water-Jacketed CO_2 Incubator）内で静置する。つづいて5分間スターラーで攪拌した後、再び50mL遠心管3本に30mLづつ分注し、それらを2500g、30分、4℃で遠心分離する。上清をオートクレーブ済み200mLビーカーに移し、固形分は捨てる。上清を10mLシリンジ（TERUMO SS-10ES）と0.2 μ mメンブレンフィルター（MILLIPORE MILLEX-FG）でろ過し、ろ過液9mLに対し1mLの抗生物質を添加してウイルス誘出液とする。

ウイルス検出方法は、文献4)に従って行った。以下にその概要を示す。

ウイルス誘出液を 10^{-4} まで希釈する。6穴プラスチックプレート（NUNC 152795）に増殖したBGM細胞をPBS（日本製薬、05913）で洗浄した後、希釈したウイルス誘出液を1穴あたり1mL接種する。90分間の吸着時間をおいた後、ウイルス誘出液を捨て、重層用寒天で重層する。24時間インキュベーター内で静置した後、1穴あたり1mLのニュートラルレッド溶液（GIBCO BRL 1005161）を添加する。3時間後にニュートラルレッドを捨て、さらに6、9、12、15、24時間後にプラスチックプレートに形成されたブラックの数を測定する。

5. 実験結果

ビーフエキストラクト溶液にセルラーゼを添加

した場合と添加しない場合について、そのウイルス誘出液の感染価(PFU/mL)を求めた。その結果を表-2に示す。なお、感染価は全サンプルの平均値として求めた。

表-2. 酵素使用時と不使用時におけるウイルス誘出液の感染価と回収率

	感染価 (PFU/mL)	標準偏差 (PFU/mL)	回収率 (%)
供試ウイルス液	3.1×10^7		
酵素使用時	8.8×10^6	6.4×10^6	28.5
酵素不使用時	1.1×10^7	8.0×10^6	34.6

酵素使用時と不使用時において、感染価が同じであるかを検定した結果、1%の危険率で同じであるという結論に達した。したがって、セルラーゼ0.1gの添加では、ウイルス誘出の効率向上は見られなかった。

6. おわりに

今回の実験では酵素の効果を証明することができなかったが、今後酵素の選択、使用量、使用方法等について検討し、酵素によるウイルス誘出効率向上の実現可能性を模索していきたい。

謝辞

この研究を進めるにあたりご援助をいただいた（財）科学技術振興事業団、そしてご指導および助言をいただいた東京都立衛生研究所の矢野一好博士に感謝いたします。

参考文献

- 1) A. L. Nielsen and B. Lydholm. 1979. Methods for the Isolation of Virus from Raw and Digested Wastewater Sludge. Water Res. 14:175-178.
- 2) O. C. Pancorbo, P. R. Scheuerman, S. R. Farrah, and G. Bitton. 1980. Effect of Sludge Type on Poliovirus Association with and Recovery from Sludge Solids. Can. J. Microbiol. 27:279-287.
- 3) J. S. Glass, R. J. Van Sluis, and W. A. Yanko. 1978. Practical Method for Detecting Poliovirus in Anaerobic Digester Sludge. Appl. Environ. Microbiol. 35:983-985.
- 4) 日本薬学会編. 1990. 衛生試験法・注解. ウイルス試験. pp.1833-1841.
- 5) EPA. 1992. Environmental Regulations and Technology. Appendix H. Method for the Recovery and Assay of Enteroviruses from Sewage Sludge. p.117-145.