

VII—33

河川における病原ウイルスの不活化と輸送に関する研究

東北大学 学生員○阿部欽章

東北大学 正会員 渡部 徹 大村達夫

1. はじめに

水系感染が懸念されているウイルスは、主に人間の腸管に感染し、大量に増殖して糞便とともに下水中に流入する。その後、一定の処理がなされてから河川等に放流される。しかし、下水処理水からもウイルスが検出されていることから、生残したウイルスが河川に流入している可能性は否定できず、河川を介して流域内にウイルス感染症が伝播する危険性がある。このリスクを評価するためには、河川におけるウイルスの消長や挙動を明らかにする必要がある。

水中では、ウイルスは完全に分散しているというよりも、大なり小なり集塊化していると見てよい²⁾。ウイルスが集塊化したり濁質に付着、埋棲すると、周囲のストレスから保護され不活化時間が長くなることが知られている。また、濁質への付着は河川水中でのウイルスの輸送にも影響を与えることから、濁質はウイルスの挙動に関する重要な因子といえる。そこで、本研究では、河川におけるウイルスの挙動解明の第一歩として、遊離状態にあるウイルスの不活化と、ウイルスの濁質への付着について明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 材料

a. 供試ウイルス液

実験用のウイルスとして弱毒ポリオウイルス1型(Lsc,2 ab株)を用いた。ウイルスの培養は、BGM細胞で増殖させることにより行い、3回凍結融解させた後、遠心分離した上清を10mLシリンジと0.2 μ mメンブレンフィルターでろ過したものを供試ウイルス液（濃度はおおよそ10⁶PFU/mL）とした。

b. 希釈液

プラーク法によりウイルス量を測定する場合、サンプルをそのまま細胞に接種すると浸透圧による細胞溶解が起こる。そのため、サンプルはウイルス量測定前に希釈液（MEM①（日水製薬、05900）溶液500mL（粉末状のMEM①4.7gを蒸留水500mLに溶解させ、オートクレーブで121℃、15分間高圧滅菌したもの）に牛胎児血清（MITSUBISHI KASEI）5mL、7.5%重炭酸ナトリウム溶液（GIBCO BRL）7.5mL、200mM L-グルタミン溶液（GIBCO BRL）5mL、抗生物質-抗真菌剤（GIBCO BRL）5mLを添加したもの）で適当な濃度に希釈した。

2.2 ウイルスの不活化実験

a. 精製水中での不活化実験

ビーカーに精製水500mLと攪拌子を入れ、オートク

レーブで121℃、15分間滅菌した。その後室温になるまで放置し、供試ウイルス液0.5mLを入れてウイルス溶液を作製した。ウイルスの集塊化を防ぐためにマグネティックスターラーで攪拌（373 rpm）した。実験は25℃で行った。ウイルスの感染価が測定できなくなるまで（25PFU/mL程度）継続してサンプリングを続けた。サンプリングにはシリンジを用い、細胞へ毒性を示す物質を除くために0.22 μ mフィルターでろ過したのち、希釈液で希釈し、-20℃で冷凍保存した。後日、BGM細胞を用いたプラーク法によりウイルス量を定量した。

b. 濁質を除去した河川水中での不活化実験

0.22 μ mフィルターでろ過して濁質を除去した河川水99mL、攪拌子、供試ウイルス液1mLをビーカーに入れ、スターラーで攪拌した。以降aと同様である。（現在、ウイルス定量を行っている段階であり、その結果は発表時に示す。）

2.3 ウイルスの濁質への吸着実験

吸着実験の流れを図1に示す。河川水サンプルは仙台市の河川から採取した。サンプル(SS:18.6mg/L)は、濁質濃度を上昇させるためロータリーエバポレーターで真空濃縮（25℃、約7時間、1000mLを185mLに濃縮、計算上のSS:100.5 mg/L）した。また、河川水サンプルおよび濃縮後のサンプルをそれぞれ0.22 μ mフィルターでろ過し、濁質が存在しないサンプルも用意した。以上の4サンプルをそれぞれ遠心管に9mLずつ注入した。供試ウイルス液を精製水で1000倍に希釈した。これを遠心管に1mLずつ接種し、ローテーターで30、60、120分と時間を変えて攪拌した（13 rpm）。攪拌後、2.2-aと同様の方法で希釈まで行い、ウイルス感染価を測定した。不活化実験も含め、以上の全ての操作はP2レベル実験室内の安全キャビネット内で行った。

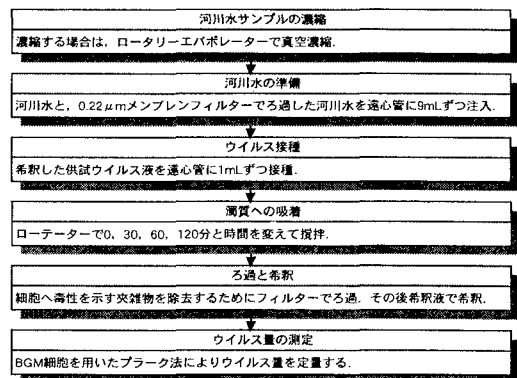


図1 吸着実験の流れ（上段：処理名、下段：操作内容）

3. 実験結果および考察

3.1 ウイルスの不活化実験

ポリオウイルス1の不活化実験の結果を図2に示す。ポリオウイルス1の感染価がおおよそ10分の1になるまでには、約33日かかった。どのあたりから減少し始めているかを検討するため、0～24時間までのウイルス量(平均値 $10^{2.6}$ 、標準偏差 $10^{0.16}$ [PFU/mL])を初期濃度と考え、この濃度よりも各時間のウイルス量が有意に減少しているかどうかの片側検定を行ったところ、603時間(約25日)から減少していることが示された(有意水準5%)。603時間までは不活化の遅滞期と考えられ、これ以降から不活化しているといえる。このことから、ポリオウイルス1は不活化されるまでに非常に長い期間を要し、水中では安定性が高いことが分かる。したがって、例えばポリオウイルス1が河川に放流された場合、実際の河川では多くのストレス(物理力、紫外線、温度等)を受けることを考慮しても、下流までほとんど不活化せずに流下する可能性が高い。よって、河川におけるウイルスの消長や挙動を明らかにするためには、ウイルスの濁質への吸着が重要なポイントになる。

次に、603時間以降の不活化過程について考察する。微生物の減衰は一般的に、 $N=N_0e^{-kt}$ (または対数表記で $\log N=-0.43kt+\log N_0$)で表される。ここで、 N はウイルス濃度(PFU/mL)、 k は不活化速度定数、 N_0 は初期ウイルス濃度である。このモデルを603時間以降のデータに適合させたものを図3に示す。その結果、不活化速度定数は0.0053となり、603時間以降は約131時間でウイルス濃度は半減することが分かった。

3.2 ウイルスの濁質への吸着実験

吸着実験の結果を図4、図5に示す。図4は河川水をもそのまま使用した実験結果で、図5は河川水を濃縮して実験した結果である。図4では、攪拌時間、実験条件(A, B)の違いによる吸着量の差は認められなかった。これは、濁質の量に対してウイルス量が多かったためであると考えられる。一方、図5では、実験条件A, Bで吸着量にはっきりと差が出ている。Aが少ないのは、濁質に吸着したウイルスが、フィルターした際に濁質と共に除去されるためである。攪拌時間による吸着量の差は認められない。このため、ウイルスは河川水に注入された直後に濁質に

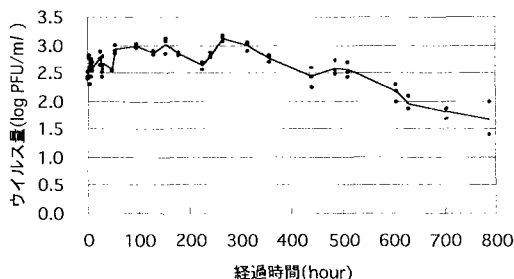


図2 各時間におけるウイルス量の平均値の推移

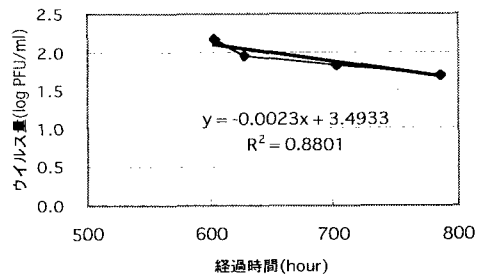


図3 不活化実験結果のモデルへの適合(603時間以降)

吸着したものと考えられる。また、その吸着は13rpm程度の緩い攪拌では剥離しなかった。各時間のAとBと比較して求めた吸着率を表1に示す。60minだけは高い値を示しているが、全体の4分の1程度のウイルスが吸着した。

4. おわりに

今後、他のサンプルで同様の吸着実験を重ねることで、河川水中での濁質とウイルスの吸着をモデル化していく予定である。

参考文献

- 1) 矢野一好：水環境学会誌, Vol.26, No.1, 2003.
- 2) 金子光美：水の消毒, (財)日本環境整備教育センター, 1997.

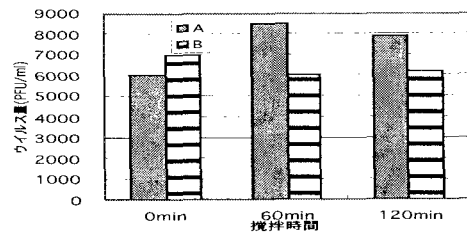


図4 河川水を使用した吸着実験(SS: 18.6 mg/L)の結果 (A: 河川水, B: 0.22 μm フィルターでろ過した河川水)

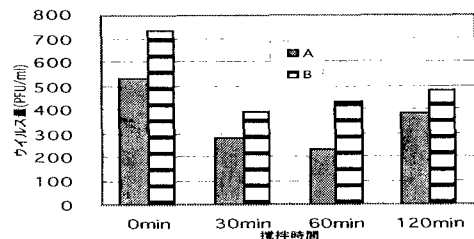


図5 濃縮河川水(SS:100.5 mg/L)を使用した吸着実験の結果 (A, Bは図4と同様である)

表1 濃縮河川水を使用した実験におけるウイルスの濁質への吸着率

攪拌時間(min)	0	30	60	120
吸着率(%) (B-A)/B×100	27	28	46	21