

VII-60 日光による不活化に着目した河川中の病原ウイルスの挙動に関する研究

東北大学 学生員 ○阿部欽章 三浦尚之

東北大学 正会員 渡部 徹

1. はじめに

近年、下水処理水や河川水からウイルスが検出された事例が多数報告されており⁽¹⁾⁽²⁾、下水処理水の放流口が河川である場合、河川の水利用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。このリスクを正確に評価するためには、河川におけるウイルスの挙動を明らかにする必要がある。これまでに、水環境中でのウイルスの不活化には、温度、硬度、懸濁物質、pH、日光（特にUV）、伝導度、微生物、有機物、塩化物など多くの因子が影響することが報告されている。このうち pH、伝導度、塩化物、硬度、TOC については、通常の河川では年間変動は小さいと考えられる。よって、本研究では不活化影響因子を温度、懸濁物質、日光（UV）の3項目に絞り、河川中のウイルスの不活化について明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

懸濁物質として SS 33.5mg/L を含む河川水(これを RW とする)と、フィルター(Millipore Millex-FG 0.22 μ m Filter Unit)処理して SS を除去した河川水(これを FRW とする)を 15mL 遠心管(CORNING Centrifuge Tubes)に 9mL ずつ分注する。RW と FRW で1セットとし、2セット用意する(図1)。そのうち1セットは暗条件で実験するためアルミホイルで包む。計4本の遠心管におおよそ 10000PFU/mL の濃度に調整したウイルス (Poliovirus-1) 液を 1mL ずつ注入する。この遠心管を恒温水槽(AZ ONE CB-301)に入れ、温度を一定 (4, 10, 20℃) に保ちながら日光を当てる(図2)。日光中の UV を携帯型紫外線自動測定器 (FUJI ZEROX UV caremate) により測定する。1時間ごとの積算値を測定し記録する。実験に使用した 15mL 遠心管により減衰される紫外線量は1時間の積算値で 2.2(J/cm²)と測定された。ゆえに、全ての実験において紫外線測定器による計測値からこの値を引いた。

日光 (UV) によるウイルスの不活化を定量的に評価するため、実験開始前後と実験途中にサンプリングする。このうち、実験開始時のサンプルは、遠心管にウイルスを注入した直後にサンプリングする。サンプルは 2.5mL シリンジで採取し、フィルター処理 (プラーク試験に用いる細胞に毒性を示す物質を除去するため) しながら、ろ液を別の 15mL 遠心管に注入する。これをウイルス感染価測定用サンプルとし、直ちに-20℃で冷凍保存する。ウイルスの感染価は BGM 細胞を用いたプラーク法⁽³⁾により測定する。

サンプルは、濁質の有無、日光照射の有無によって、4種類に区分した(表1)。それぞれのサンプルのウイルス濃度を比較することにより、濁質へのウイルス吸着量、UV による不活化効果、そして、濁質の存在による UV 遮蔽効果等につ

いて、定量的な議論が可能となる。

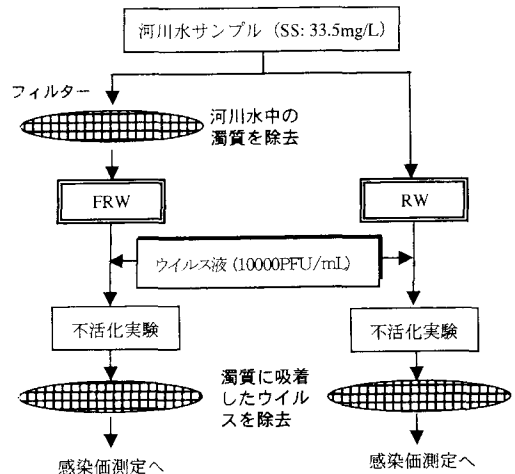


図1 実験手順

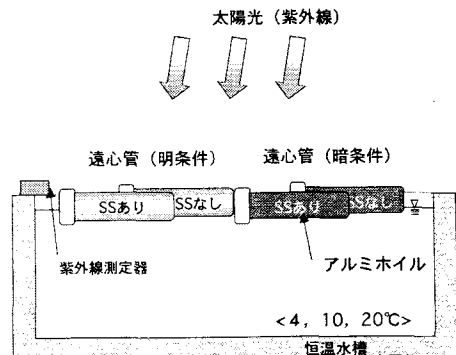


図2 実験装置

表1 サンプルの種類と評価方法

日射の条件	懸濁物質の有無	
	有り	無し
明条件	RW(L)	FRW(L)
暗条件	RW(D)	FRW(D)

各条件での結果に関する評価の観点

- ・RW(L)：最も河川環境に近いケースでの不活化
- ・FRW(L) - FRW(D)：日光のみによるウイルス不活化効果（懸濁物質による影響なし）
- ・RW(L) - FRW(L)：懸濁物質によるウイルス不活化効果への影響
- ・FRW(D) - RW(D)：懸濁物質へのウイルス吸着量

3. 結果および考察

a) 温度によるウイルス不活化への影響

まず、日光照射下で懸濁物質も存在し、最も河川環境に近い条件 RW(L)でのウイルス不活化を評価する。図3に、20℃、10℃、4℃での UV 積算値(J/cm²)とウイルス生存率 RW(L)/RW(L)₀を示した。ここで、RW(L)₀は実験開始時におけるウイルス初期濃度である。この図に示すように、UV 積算値が増加するにしたがってウイルス生存率は指数的に減少した。このウイルス死滅過程を定量的に議論するために、以下の指数関数により近似した。

$$S = \exp(-k \cdot I)$$

ここで、S:生存率、I:UV 積算値(J/cm²)、k:不活化係数(cm²/J)である。各温度条件下での不活化係数は、20℃で $k=0.076$ 、10℃で $k=0.053$ 、4℃で $k=0.038$ となり、日光照射による水中ウイルスの不活化は、温度が高い程、促進されることが分かる。なお、ウイルスを 90%不活化するのに必要な紫外線量は、4℃、10℃、20℃でそれぞれ、60.6 J/cm²、43.4 J/cm²、30.3 J/cm²と見積もられた。20℃の場合の 30.3 J/cm²の紫外線量は、夏の2時間程度の日光照射に相当する。

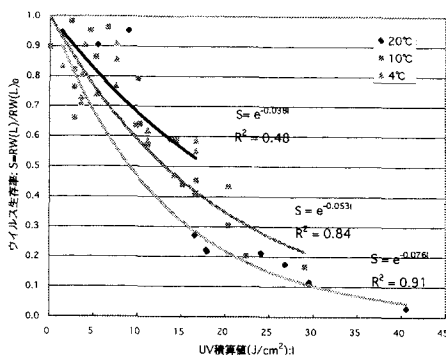


図3 河川水中でのUV 積算値とウイルス生存率の関係

b) 懸濁物質へのウイルスの吸着

河川水中の懸濁物質は、ウイルスを吸着させるとともに、日光を遮断することにより、ウイルス不活化効果を低下させる。暗条件でのウイルス濃度差 FRW(D)-RW(D)は、紫外線の影響を無視できるため、SS へのウイルス吸着量と言い換えることができる。このウイルスの SS への吸着量は、経過時間 (UV 積算量) と相関が見られず、その平均値は 20℃で 68.9(PFU/mL)、10℃で 43.4(PFU/mL)、4℃で 38.4(PFU/mL)であった。これらの3つの平均値およびその分散をもとに、温度による吸着量の違いを検討したが、3つの温度条件でウイルス吸着量には統計学的に有意な差は認められなかった (有意水準 5%)。

単位 SS あたりの吸着量は、20℃で 2.3×10^3 (PFU/mg-SS)、10℃で 1.4×10^3 (PFU/mg-SS)、4℃で 1.3×10^3 (PFU/mg-SS)となった。Shiao ら⁵⁾は、Poliovirus-1 の silicate minerals への吸着量は、 $64.2 \times 10^4 \sim 89.5 \times 10^4$ (PFU/mg-minerals)と報告しており、本研究で使用した河川水中の懸濁物質は、silicate minerals と比較して10分の1程度の量のウイルスしか吸着しなかった。

c) 懸濁物質のウイルス不活化への影響

次に、懸濁物質存在下での日光によるウイルス不活化効果の低下について考察する。図4には、20℃での紫外線(UV)積算値(J/cm²)と、RW(D)-RW(L)または FRW(D)-FRW(L)で計算されるウイルス濃度差(PFU/mL)の関係を示す。表1に示したように、RW(D)-RW(L)はウイルスの不活化に対する日光の影響を表す。前述の懸濁物質へのウイルス吸着については、RW(D)、RW(L)ともに同程度の量が吸着するため、両者の差を指標にするこの評価では無視できる。一方、FRW(D)-FRW(L)は物質が存在していないためウイルスの不活化に対する日光のみの影響を評価できる。図4に示すように、RW(D)-RW(L)の場合の近似直線の傾き (22.2) は、FRW(D)-FRW(L)の場合の傾き (24.2) よりも小さく、確かに、懸濁物質の存在により日光が遮られ、ウイルス不活化効果が低下したことが分かる。4℃および 10℃の場合にもこれと同様の結果が得られた (表2)。

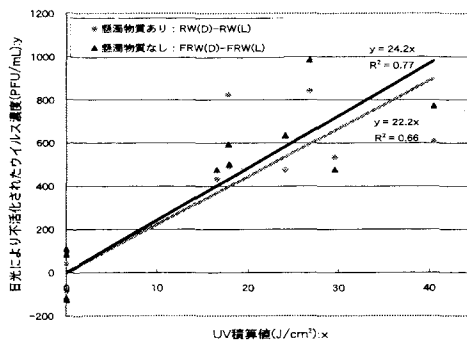


図4 懸濁物質の有無の条件下でのウイルスの不活化 (20℃)

表2 懸濁物質の有無の条件下でのウイルスの不活化

(x:UV 積算値 J/cm², y:日光により不活化されたウイルス濃度 PFU/mL)

温度	サンプル	回帰直線	R²
20℃	RW(D)-RW(L)	$y=22.2x$	0.66
	FRW(D)-FRW(L)	$y=24.2x$	0.77
10℃	RW(D)-RW(L)	$y=15.8x$	0.86
	FRW(D)-FRW(L)	$y=16.7x$	0.76
4℃	RW(D)-RW(L)	$y=15.6x$	0.28
	FRW(D)-FRW(L)	$y=17.8x$	0.60

参考文献

- 1) 矢野一好(2003):ウイルス性水系感染症とその対策, 環境技術, 32(6), 445-452.
- 2) S.C. Jiang and W. Chu(2004): PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers, *Jour. of Applied Microbiology*, 97, 17-28.
- 3) Kimberly Denis-Mize, G. Shay Fout, Daniel R. Dahling and Donna S. Francy(2004): Detection of human enteric viruses in stream water with RT-PCR and cell culture, *Journal of Water and Health*, 02.1
- 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) Shiao H. Lo and Otis J. Sproul(1977): Polio-virus adsorption from water onto silicate minerals, *Water Research*, Vol.11, 8, 653-658.