

(1) 感潮域における大腸菌ファージの挙動

FATE OF COLIPHAGES IN ESTUARY

神子直之\*、関谷毅史\*、土佐光司\*、長岡裕\*\*、大垣眞一郎\*

Naoyuki KAMIKO\*, Takeshi SEKIYA\*, Kohji TOSA\*, Hiroshi NAGAOKA\*\*, Shinichiro Ohgaki\*

ABSTRACT; Coliphage concentration and fecal coliform concentration in a river, estuary and sea in series were measured for seven times in a year. Three kinds of host cells, namely E. coli K12 F<sup>+</sup> (A/λ), E. coli B and E. coli C and application of RNase enabled to detect four groups of coliphages. Coliphage concentration ranged from 40 PFU/mL to 410 PFU/mL in the river, from 0 PFU/mL to 45 PFU/mL in the sea in using E. coli K12 F<sup>+</sup> (A/λ) strain. Coliphage counts obtained by other two strains were almost same as or slightly less than that obtained by E. coli K12 F<sup>+</sup> (A/λ). Correlation between coliphages and fecal coliform was low. Excluding the effect of the dilution of the river water by sea water using the value of electric conductivity, coliphages transported along the river could be assumed to be constant in number, while fecal coliform was sometimes decreased or increased. Viruses, like coliphages, are possibly transported along a river, being decreased in concentration only with the dilution by sea water.

KEYWORDS; Coliphage, FRNA phage, Fecal coliform, Estuary, Indicator microorganism.

1. はじめに

夏に人で賑わう海水浴場の水質管理は、糞便性大腸菌群数で行われている。海水浴場近くに汚濁を多く含む河川が流れ込んでいる場合は、海辺の安全性を維持するために河川に塩素注入を行い、病原性微生物を制御している場合がある。

指標細菌による安全性の管理が、同時にウイルス的安全性を保証しているかどうかは議論が分かれるところである。明確な結論が社会的に形成されるには、さらに多くの環境中のウイルスに関する研究の蓄積が必要とされている。

本研究は、大腸菌を宿主とするウイルスすなわち大腸菌ファージを、海水浴場へ塩素注入を経て流入する河川、感潮域、海水浴場において1年を通じて7回定量し、流下に伴う濃度変化、潮汐の影響、季節変動、塩素注入の効果等の影響している、複雑な系の現象の解析を試みたものである。

\* 東京大学工学部都市工学科 (Department of Urban Engineering, Tokyo Univ. )

\*\*武蔵工業大学工学部土木工学科 (Department of Civil Engineering, Musashi Inst. of Tech.)

## 2. 研究の背景

### 2.1. 水系におけるウイルスの重要性

都市化の進行に伴い使用水量が増し、水利用の高度化、再利用の推進等の社会的要求が高まりつつある。その際問題となるのは、現在まで有効に働いてきた衛生的安全性の指標である一般細菌、大腸菌群数、糞便性大腸菌群数等が果たして今後も有効であり続けるであろうか、ということである。すなわち、現在の指標が細菌であることから、水に含まれるウイルスの水質を表すとは限らない。事実、環境中から、更には、基準を満たしている飲料水から腸管系ウイルスが検出されたという報告がある。<sup>1) 2) 3)</sup>

もちろん、腸管系ウイルスが検出されたからと言って、それを衛生的安全性の評価に直接繋げられる現況ではない。すなわち、腸管系ウイルスの検出によりその健康影響を定量的に評価するには、疫学的研究の進歩を待たねばならない。(唯一例外的に危険性がはっきりしていて水系感染が立証されているのがA型肝炎ウイルスである<sup>4)</sup>。)しかし、「たった1単位の病原ウイルスでも人体への感染を成立する可能性があるとする立場が、ウイルス対策を考える時の前提となることが多い。<sup>5)</sup>」ので、その健康への影響の大きさを考えた場合、ウイルスの制御手法の開発は急務であると言わざるを得ない。

### 2.2. ウイルス指標としての大腸菌ファージ

腸管系ウイルスを制御することを考えた場合、環境中で腸管系ウイルスを監視する必要がある。しかし前に述べた様に、腸管系ウイルスは感染の成立する量が非常に小さいため、検出のために多量の水を濃縮する必要がある。また、それ自体が病原性を持つ可能性があるため実験者防護の設備が必要であること、培養細胞の維持を行う設備が必要であること、培養に時間がかかること(検出に数週間、同定に数週間)等、普通の実験室で日常的に検出を行うのは困難である。

病原細菌を監視するためには大腸菌が指標として用いられている。腸管系ウイルスの場合にも、それ自体を監視するより簡便に測定できる指標が求められている。大腸菌ファージは、大腸菌を宿主とするウイルスであり、下水中に多く存在することから、腸管系ウイルスの指標として有効に利用できないかと考えられている。なかでもF特異RNAファージは、多くの腸管系ウイルスと同じRNAを遺伝子として持っている事(大腸菌ファージの多くはDNAを持つ。)、その構造、大きさが多くの腸管系ウイルスと似ている事から、有望であると考えられている<sup>6)</sup>。

事実、大腸菌ファージは、指標、トレーサーとして非常に多くの魅力を備えている。それは、測定に日数がかからず(1日)、人体に無害であり、容易に増殖、死滅させて制御出来るということである。

大腸菌ファージを用いてウイルスの挙動を知る研究が多くなされている。例えば、活性汚泥プロセスにおける除去の主体が、汚泥とファージ相互の静電的關係によって説明でき、ポリオウイルスと比較を行い同機構である事を示した報告がある<sup>7)</sup>。また、多くの研究が、消毒操作への耐性等の面について、大腸菌ファージの方が大腸菌よりも病原ウイルスに近い性質を表す事を示している。しかし、病原ウイルス、大腸菌ファージ双方の環境中の挙動に不明な点が多く、有効な指標としての決め手に欠けている状況である。

大腸菌ファージが病原ウイルスともっとも異なる点は、その増殖の場として水系が考えられるという事である。病原ウイルスが人体内でしか増殖できないのに対し、大腸菌ファージは宿主となる大腸菌が存在するところで増殖できる可能性がある。

腸管系ウイルスに付随する困難さが伴う中で、Grabow et al.<sup>8)</sup>は沿岸域の多くの試料について腸管系ウイルス、様々な指標を定量して腸管系ウイルス検出とその他の指標の関係を調べている。その結果、大腸菌群と大腸菌ファージの両方が検出された時のみ、腸管系ウイルスが検出された。

わが国においてこのような指標微生物とウイルスの同時計測を行った研究報告は少ない。本研究において病原ウイルス自体を検出した訳ではないが、ウイルスの一種としての大腸菌ファージと指標細菌(糞便性大腸菌群)の検出・定量を行い、大腸菌ファージの指標としての有効性を調べたものである。

### 3. 調査方法

#### 3. 1. 調査の地域、時期

試料を採取した地域は、関東近郊の海水浴場およびそれに隣接して河口を持つ河川の下流域である。その河川の流域面積は約200km<sup>2</sup>、流域人口は約100万人である。上流域のごく一部を除いた流域の90%を越える地域において、下水道の普及率は41%、合併浄化槽、単独浄化槽の普及率はそれぞれ9%、39%である。(昭和61年度のデータによる。)

試料の採取場所は以下の通りである。河口と見なせるN橋下流側中央直下、河口から約1000m上流のM橋上下流側中央直下、河口から約2300m上流のL橋の上下流側中央直下、そして、河口部から海側へ突き出た堤防の突端(O地点)、P海水浴場、汚濁の影響を受けないと思われる外洋(Q地点)である。地点を模式的に図1に示す。

採取は1989年7月から1990年7月の間に7回行った。いずれの日も8:30~13:00の間に採取を行った。夏期の海水浴シーズンの晴天時の採取を2回行っているが、その際、自治体がM橋橋桁の中央から塩素を注入していた。

#### 3. 2. 採水方法

採水は表層水に対して行った。N橋、O地点においては、潮汐の影響で河川下層部の水質が表層水と大きく異なることが考えられるので、測定日によっては北原式採水器で中層水、下層水も採取した。河川においては表面流速(浮き子による)、水深を測定した。採取後直ちに水温、pH、残留塩素濃度(簡易法による)を測定した。

採取した試料は500mL滅菌済み密栓ボトルに入れ、クーラーボックスに水と共にに入れて実験室へ輸送した。塩素注入が予想される場合は、ボトル内に適量のチオ硫酸ナトリウムを予め入れておいた。

#### 3. 3. 定量方法

糞便性大腸菌群数の測定は、採水当日に、MFC培地混釈法または上水試験方法による疎水性格子付きメンブランフィルター法によった。

大腸菌ファージは当日前処理したものを翌日測定した。既報<sup>9)</sup>と同じ方法(二層寒天法)によったが、部分的に後で述べる変更を加えた。

前処理は以下の通りである。30mLの試料を0.45μmポアサイズのフィルターで濾過し、濾液を冷蔵庫で4℃で保存した。(濾液サンプル)

フィルター上の残渣は、試料と等量(30mL)のpH9.5の3%ビーフェキストラクト中でフィルターごと5分~30分(採水日によって異なる。)攪拌することにより誘出し、再び0.45μmフィルターで濾過し、濾液を4℃で保存した。(誘出サンプル)

試料採取と前処理を行った翌日、大腸菌ファージの定量操作を行った。6、7回目調査の際には変更を加えた方法も併用した。すなわち、従来4mLであった上層寒天(寒天濃度0.6%)に0.1mLの試料を混入していたのに対し、蒸留水の量を4分の3に減らし(寒天濃度0.8%)、試料を1mL混入した。この方法(1mL法)で低濃度域の感度が増し、1mLあたり1PFU(plaque forming unit=溶菌斑形成単位)の試料に対しても検出できるようになった。

大腸菌ファージの宿主菌として、E. coli K12 A/λ (P<sup>+</sup>)、E. coli B、E. coli Cの3種を用いた。各々の宿

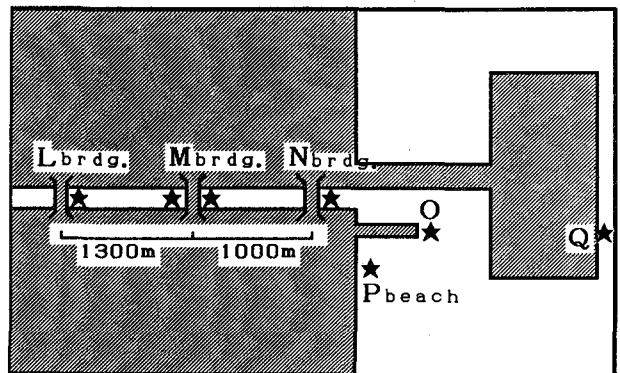


Fig. 1 Sampling Points (indicated by ★)

主菌は、検出できる大腸菌ファージの範囲を独自に持っていると考えられる。病原ウイルスの指標ウイルスとして有望視されている<sup>4)</sup> F特異RNA大腸菌ファージを検出するため、K12 A/λ (F<sup>+</sup>)を用いた際培地にRNA分解酵素を添加したもの（プレート1枚あたり0.2mg）と不添加のもの両者を作成した。便宜的に、E. coli K12 A/λ (F<sup>+</sup>)を宿主としRNA分解酵素不添加の培地で得られた溶菌斑をFファージ、同宿主でRNA分解酵素添加の培地のものをFDNAファージ、Fファージの値からFDNAファージの値を引いたものをFRNAファージ、E. coli Bを宿主とするものをBファージ、E. coli Cを宿主とするものをCファージとした。なお、同種の寒天培地を各2枚作成し、両者の溶菌斑の数を平均して濃度を求めた。

調査地点における大腸菌ファージ濃度が比較的低かったため、希釈無しで2枚の培地上に得られた溶菌斑の平均が1桁である事もあった。すなわち従来法で100[PFU/mL]以下、1 mL法で10[PFU/mL]以下の場合である。よって精度の悪いデータも含まれるが、オーダーの議論は可能であろうと考え、図表上に含めている。

他の水質項目（溶存性有機炭素、SS、電気伝導率等）はなるべく速いうちに測定した。

#### 4. 調査結果と考察

##### 4. 1. 結果の概況

各採水日の概況を表1に示す。表中の水温はL橋のもの、流量はL橋における表面流速と水深から求めたものである。2、3回目の際は河川全体から残留塩素が検出され（0.05-0.2mgCl/L）、河川滅菌を行っていた。測定地点の概況を表2に示す。電気伝導率によると各地点の海水の混入の割合はその時によって違うが、L橋では2%以下であり、N橋では下層部に塩水楔が形成されており、O地点では表層を高い割合で河川水が占めている事がわかる。

Table 1 Conditions of sampling days

date	Wat.temp.[°C]	Flow rate [m <sup>3</sup> /s]	
1 3, July 1989	18.2	6.5	no chlorination
2 25, July 1989	26.4	7.1	with chlorination
3 10, Aug. 1989	23.0	3.0	with chlorination
4 8, Nov. 1989	18.0	4.5	no chlorination
5 6, Dec. 1989	14.0	13.2	no chlorination
6 13, Mar. 1990	9.9	6.6	no chlorination
7 4, July 1990	22.2	5.3	no chlorination

Table 2 Sampling points

sampling points	distance from the river mouth [m]	electric conductivity [μS/cm]
L brdg. lower	2300	370- 740
M brdg. upper	1000	530- 3020
lower		<- Cl injected
N brdg. lower surface	0	1000- 7200
middle		11800-42500
bottom		27000-52000
point O surface	-300	6900- 8500
bottom		34800-44000
P beach		36200-51300
point Q		47000-52200

#### 4.2. 糞便性大腸菌群数の流下方向における変化

糞便性大腸菌群数の流下方向の濃度変化を図2に示す。値は表層水のものである。L橋からN橋まで、塩素注入を行っていた2回目のM橋下流側だけで例外的に非常に低い濃度であった他は、毎回濃度が比較的一定しており、採水日毎の変動よりも流下方向の変動の方が小さかったことがわかる。2回目のM橋下流側で例外的に低い濃度であったことは、注入された塩素の河川における混合が充分でなく、塩素の効果の高いところからたまたま採水したことによると思われる。

#### 4.3. 大腸菌ファージ濃度の流下方向における変化

河川表流水における各回の各大腸菌ファージ濃度の概況を表3に示す。大腸菌ファージ濃度は検出限界以下のものから $10^2$ PFU/mLのオーダーであった。生下水や下水処理場における調査<sup>10)</sup>のうち生下水のデータと比較すると、吸着濃度(誘出濃度)の割合(15-34%)、FファージのうちFRNAファージの占める割合(39%)が同等の値である事がわかる。吸着率{誘出濃度/(誘出濃度+濾液濃度)}に関しては、水中の様々な因子により影響を受けると考えられ、値のばらつきが大きく、統一的な議論は出来ない。以下では誘出率100%を仮定して、誘出濃度と濾液濃度の和をその地点の大腸菌ファージ濃度として扱う。

表層水における流下方向の濃度変化を図3に示す。Fファージは河川中で濃度の変化がほとんど無い。FDNAファージとCファージはほぼ一定しているが、塩素注入のあった

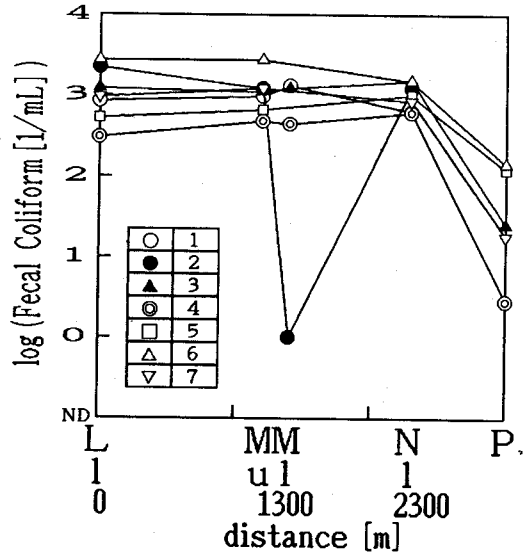


Fig 2 Concentration of fecal coliform

Table 3 Coliphage concentration in the river water

		range [PFU/mL]		average [PFU/mL]	SD [PFU/mL]	adsorption ratio [%]
		Min.	Max.			
F phage	filt.	0	390	93	95	31
	elut.	5	90	42	21	
	total	40	410	135	94	
FDNA phage	filt.	0	190	61	60	30
	elut.	0	110	26	27	
	total	5	220	86	63	
FRNA phage	filt.	0	210	36	47	39
	elut.	0	50	19	16	
	total	0	230	56	48	
B phage	filt.	10	260	74	59	15
	elut.	0	60	13	13	
	total	15	260	87	59	
C phage	filt.	5	280	82	54	22
	elut.	0	55	23	14	
	total	10	290	105	55	

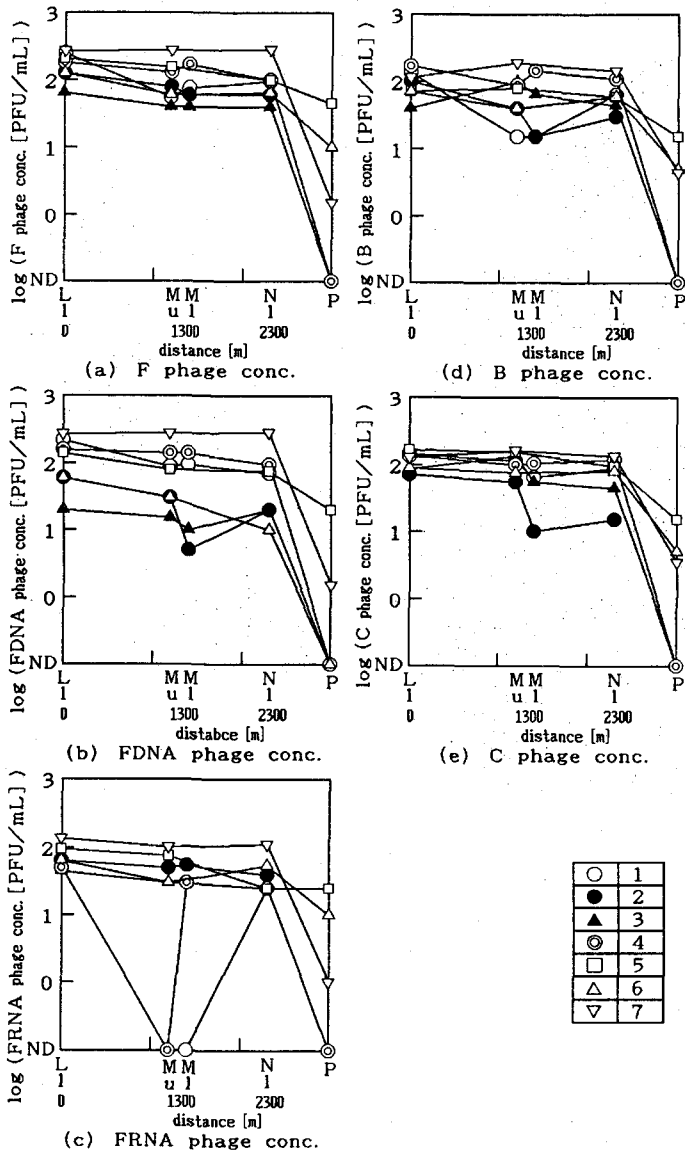


Fig. 3 Concentration of coliphages

2、3回目のM橋上下流間での濃度の減少が顕著である。FRNAファージの濃度は検出されている場合はほぼ一定した値になっているが、検出されない場合がある。P海水浴場における濃度はどのファージも検出限界に近いかそれ以下であった。海水の流れの状況により河川水の混入比が異なるための変動であると考えられる。4、5、で考察を加える。Q地点ではほとんど大腸菌ファージを検出できなかった。

#### 4. 4. 糞便性大腸菌群数と大腸菌ファージ濃度の比較

糞便性大腸菌群数と大腸菌ファージ濃度の関係は図4に示す通りである。糞便性大腸菌群数が他と比べて特別低かった2回目M橋上流側のデータ以外は、大腸菌ファージ濃度が糞便性大腸菌群数の1/1000~1/1程度に入っている。相関が余り高くなく、互いに独立した値を取っているのがわかる。塩素注入が行われていたデータを他のデータと比べると、大きな差は無いが、FDNAファージでは糞便性大腸菌群数に対するよりも塩素の効果が大い傾向があることがわかる。

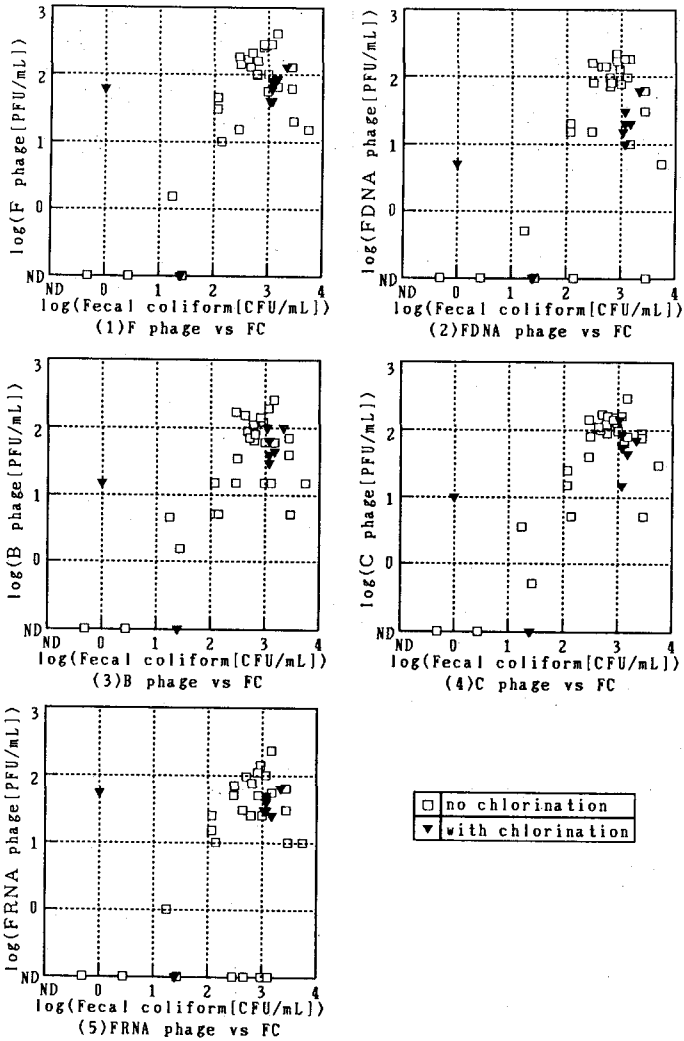


Fig.4 Correlation of fecal coliform and coliphages

#### 4.5. 海水の混合の影響

採水日毎の結果について、海水による希釈の影響を考える。採水場所の中で最上流であり海水の混入が最も少ないと見なせるL橋での海水の混入比を0、河川水の混入していない海水中の大腸菌ファージ濃度を0と仮定して、海水で希釈される前の見かけの大腸菌ファージ濃度を求める事が出来る。その様な補正を行った結果を図5に示す。1、2回目は海水のデータを含まないため除外し、3~7回目の採水日の結果の例を示す。横軸は海水における値を1、L橋における値を0として無次元化した電気伝導率、縦軸は糞便性大腸菌群数、大腸菌ファージ濃度の電気伝導率による補正值である。海水の混合の程度を表すために、横軸を無次元化した電気伝導率としたため、データは必ずしも流下方向に沿ったものになっていない。

大腸菌ファージ濃度が比較的高かった第5回目、検出限界が向上した第7回目の結果からは、大腸菌ファージ濃度の補正值、糞便性大腸菌群数の補正值共にほぼ一定している事がわかる。第6回目の結果では、大腸菌ファージが検出された場合にはほぼ一定値であり、糞便性大腸菌群数が海水の混入に伴い増加傾向であったことがわかる。逆に第3、4、7回目の結果で見られるように、糞便性大腸菌群は海水の混入が

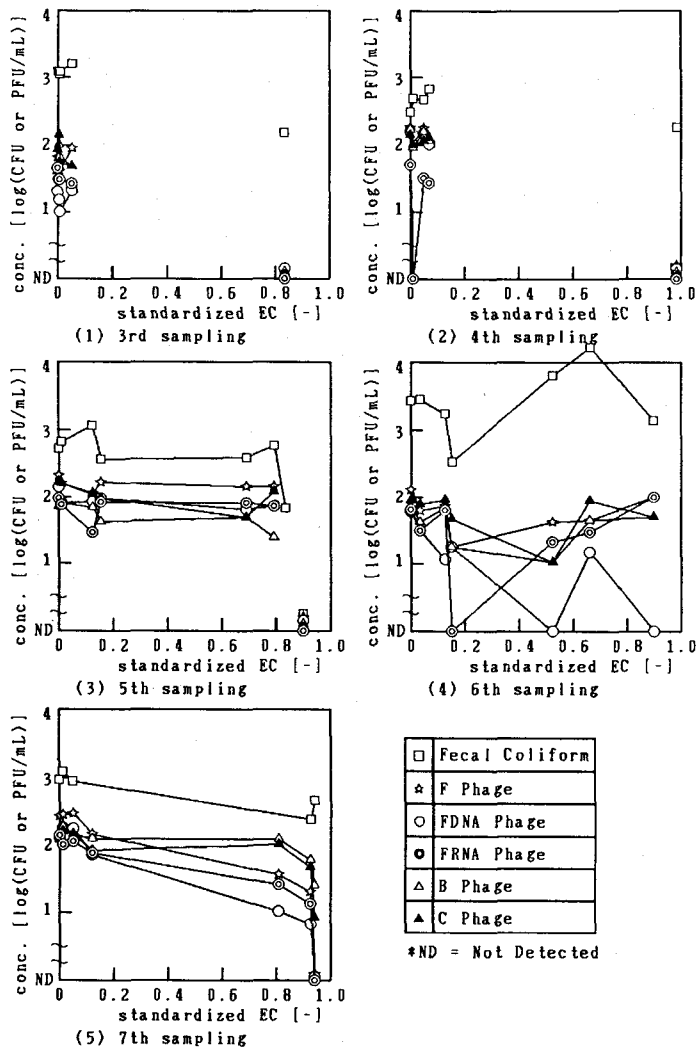


Fig. 5 Concentration of microorganisms excluding the effect of the dilution by sea water

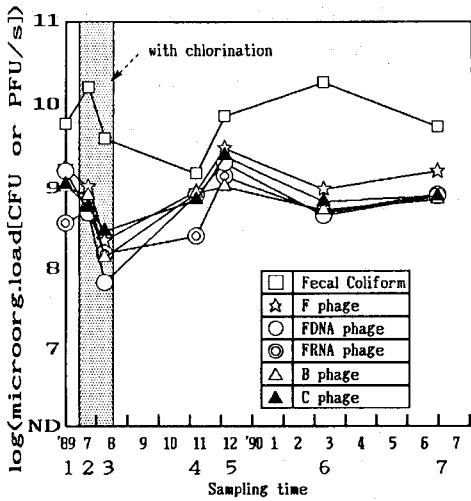
増すにつれてゆるやかに減少している場合もあった。よって、糞便性大腸菌群数はゆるやかに増加・減少しながら、大腸菌ファージはほとんど増殖・減衰せずに、調査した河川感潮域にある濃度で流入し、海水により希釈されて海岸域での濃度が決まっていると考えられる。

第3、4回目の結果で、基準化電気伝導率の値が1に近い場合（P海水浴場のデータである）、大腸菌ファージの補正値が0[PFU/mL]であるのは、濃度が従来法（プレートあたりの試料0.1mL）の検出限界（10[PFU/mL]）以下で検出できなかったためであり、大腸菌ファージの補正濃度が図に示されているように大きく減少しているとは必ずしも言えない。

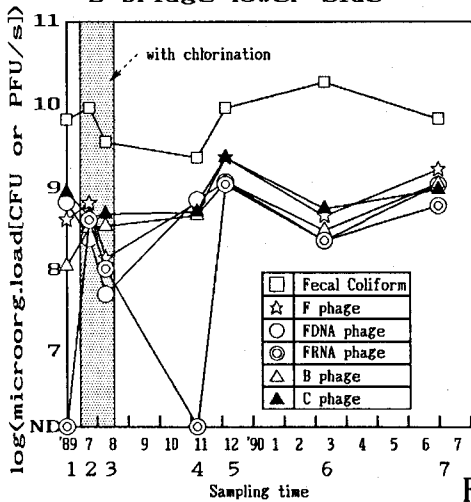
#### 4. 6. 大腸菌ファージ濃度の季節変動と塩素注入の影響

潮汐の影響を多く受けないと考えられる地点における大腸菌ファージ濃度について検討する。大腸菌ファージ濃度とL橋における流量を用いて、各回の大腸菌ファージ負荷量を計算する事が出来る。L橋下流側とM橋上流側の結果を図6に示す。2、3回目は塩素注入のためか、上流でも残留塩素が検出されたため除外して考える。南アフリカにおける研究で、河川水の大腸菌ファージ濃度と腸管系ウイルス濃度は



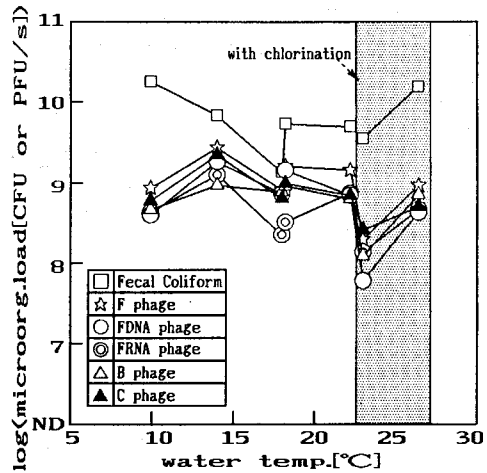


(1) Seasonal variation at L bridge lower side

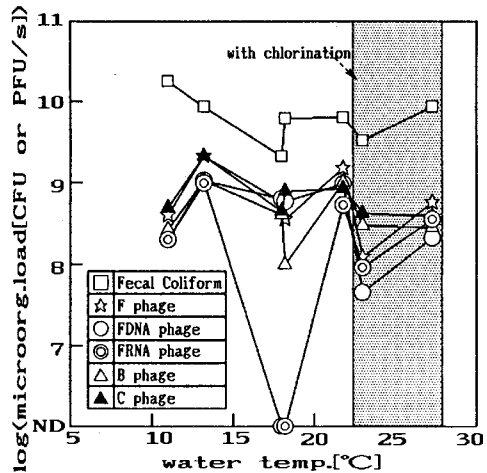


(2) Seasonal variation at M bridge upper side

Fig.6 Seasonal variation of microorganism load



(1) at L bridge lower side



(2) M bridge upper side

Fig.7 Relationship between microorganism load and water temperature

同様の季節変動を示し、温かい時期には濃度が低く、寒い時期に濃度が高かったという報告がある<sup>11)</sup>。今回の結果からはその様な季節変動の傾向は見られなかった。同じ結果を、横軸を水温にして図7に示す。この図から示唆されるのは、塩素注入をしていなかった時の大腸菌ファージ負荷量が比較的一定していて、塩素注入をしていた時期の負荷量に比べて高い事である。糞便性大腸菌群数にはその様な変化が見られなかった。

#### 4. 7. 腸管系ウイルス指標としての大腸菌ファージの有効性

大腸菌ファージを自然水系中での病原ウイルスの挙動のモデルとして使用する最大の懸念は、病原ウイルスが水中では決して増殖しないのに対し、大腸菌ファージの場合は水中の大腸菌を宿主として増殖する可能性があるという点にある。

今回の調査において、糞便性大腸菌群については、その時の汚濁の状況に応じて増殖、減衰する可能性

があること、一方大腸菌ファージはウイルスであるため代謝を持たず、特異な宿主でしか増殖できないこと、それゆえ様々な環境の変化に影響を受けにくいことから、一定して流下してきていたことが示されたと考えられる。

ウイルスの一種である大腸菌ファージが自然水系で増殖をしないならば、その挙動が病原ウイルスのそれと近いものであると考えられる。明らかな大腸菌ファージの増殖が見いだせなかった本調査の範囲で海岸域のウイルス的安全性を考えた場合、大腸菌ファージの結果から、病原ウイルスの濃度がこの水系に流入している濃度と海水による希釈の程度によって決まるであろうことが予想される。本調査における感潮域へ流入する糞便性大腸菌群数、大腸菌ファージ濃度についての検討は今後の課題である。

## 5. まとめ

1年間(7回)にわたり、海水浴場と付近に流入する感潮河川の感潮域に対し大腸菌ファージ濃度を測定し、次の結果を得た。

(1) 宿主菌として3種のE. coliを用いたが、E. coli K12 A/λ (F<sup>+</sup>)が中では最も多くの大腸菌ファージを検出できた。

(2) 糞便性大腸菌群と大腸菌ファージ濃度の相関は低かった。

(3) 海水浴場付近での大腸菌ファージは、感潮域で増加・減少せず、河川水の海水による希釈の程度で決まっている事がわかった。

(4) 季節変動のパターンは明確でなかった。

大腸菌ファージを腸管系ウイルスのモデルウイルスと考えると、本調査の対象とした感潮域での腸管系ウイルス濃度が、河川から流入する濃度と海水による希釈で決まっていると考えることができる。

## [参考文献]

- 1) Keswick, B. H., Gerba, C. P., Rose, J. B. and Tranzos, G. A. (1985), Detection of Rotavirus in Treated Drinking Water. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 17, No. 10, p1
- 2) Guttman-Bass, N. and Fattal, B. (1984), Analysis of Tap Water for Viruses: Results of a Survey. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 17, No. 10, p89
- 3) Toranzos, G. A., Hanssen, H. and Gerba, C. P. (1986), Occurrence of Enteroviruses and Rotaviruses in Drinking Water in Colombia. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 18, No. 10, p109
- 4) Havelaar, A. H., Butler, M., Farrah, S. R., Joffre, J., Marquez, E., Ketratanakul, A., Martins, M. T., Ohgaki, S. and Zaiss, U. (1990), Bacteriophages as Model Viruses in Water Quality Control. (in press)
- 5) 金子光美(1986), 水道水の微生物汚染. 水質汚濁研究. Vol. 9, No. 8, p478
- 6) Havelaar, A. H. (1987), Bacteriophages as Model Organisms in Water Treatment. *Microbiol. Sci.*, Vol. 1. 4, No. 12
- 7) Ketratanakul, A., Ohgaki, S. and Yano, K. (1990), Comparative Study on Adsorption Mechanisms of RNA-F-specific Coliphages and Poliovirus in Activated Sludge Process. *Wat. Sci. Tech.* (in Press)
- 8) Grabow, W. O. K., Idema, G. K., Coubrough, P. and Bateman, B. W. (1989), Selection of Indicator Systems for Human Viruses in Polluted Seawater and Shellfish. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21, No. 3, p111
- 9) 大垣眞一郎, Ketratanakul, A., 橋本光雄(1989), 生活環境水中に存在する大腸菌ファージの定量. 浄化槽研究. Vol. 1, No. 1, p19
- 10) Ketratanakul, A. and Ohgaki, S. (1989), Indigenous Coliphages and RNA-F-Specific Coliphages As associated with Suspended Solids in the Activated Sludge Process. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21, No. 3, p 73
- 11) Geldenhuys, J. C. and Pretorius, P. D. (1989), The Occurrence of Enteric Viruses in Polluted Water. Correlation to Indicator Organisms and Factors Influencing Their Numbers. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 21, No. 3, p105