

B-69 環境水中の糞便汚染指標としてのブタコブウイルスおよびウシコブウイルス

稲葉 愛美^{1*}・片山 浩之²・Tran Thi Viet Nga³・端 昭彦²・古米 弘明¹

¹東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

²東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

³Institute of Environmental Science and Engineering, University of Civil Engineering (55 Giai Phong Street, Hanoi, Vietnam)

* E-mail: m_inaba@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

水中に存在する微生物学的リスク因子を把握し、適切な処理を行うことは、安全な水利用において極めて重要である。水系感染の原因となる病原微生物の多くは、ヒトだけでなく動物の糞便に由来している。現在、大腸菌群や *Escherichia coli* が糞便汚染の指標細菌として用いられており、糞便汚染の有無を評価するのに有効とされている。しかし、これらの指標細菌は、原水となるほとんどの環境水中に存在し、その起源もさまざま、微生物学的リスクを把握するための指標としては不十分である。ゆえ、コストや安定的な供給が可能な畜産動物による糞便汚染の有無および、起源追跡のための新たな指標が必要であると考えられる。

ピコルナウイルス科コブウイルス属には、ヒトが宿主であるアイチウイルス (AiV) ブタコブウイルス (PkoV)、ウシコブウイルス (BkoV) の 3 種が属している (Reutor et al. 2011)。AiV は、病原性は低く、下水流入水に高濃度で存在することから (Kitajima et al. 2010)、高頻度で不顕性感染し環境中に豊富に放出されている可能性が示唆されている。

同様に、PkoV はブタに特有の常在ウイルスであり、BkoV は牛以外の動物では確認されず、胃腸炎を含めた疾病との関連が確認されていないことから、ウシ特有の常在ウイルスであり、ともにさまざまな国と地域に幅広く分布していることが示唆されている。

このように、AiV と同様の特徴を示す PkoV と BkoV は、放出起源が明らかであり、水環境中に広く、高濃度に存在している可能性から、畜産動物の糞便汚染の有無と起源追跡に有効な指標となると考えられる。

本研究では、異なる地域での PkoV と BkoV の

水中における存在を確認することで、さまざまな地域における糞便汚染の有無、および起源追跡のウイルス指標としての有効性を評価することを目的とした。そこで、ベトナム・ハノイ市と日本の荒川流域を対象とし、畜産糞便汚染レベルが高い試料からの PkoV と BkoV の検出を行った。

2. 材料および方法

(1) 畜産関連廃水試料の採取

ベトナム・ハノイ市郊外において、豚飼育小屋の廃水 (St.1)、ブタ飼育小屋からの廃水流入があるアヒルの飼育池の水 (St.2: ブタ飼育小屋からの廃水流入口、St.3: 流入口なし)、河川水を利用したアヒル飼育池の水を (St.4)、雨季の 2010 年 6 月および、乾季の 2011 年 1 月、3 月の計 3 回、採取した (図 1)。また、日本の荒川流域において、養豚場の畜産廃水が直接流入している河川 1 地点から、2010 年 12 月と 2011 年 1 月に計 2 回、採取した (図 2、St. A)。

(2) 大腸菌群 (Total coliform、TC) と *Escherichia coli* (EC) の測定

a) ハノイ市の畜産関連廃水試料

採取試料 1 mL を濾過した滅菌済みフィルター (Analysis Monitor, Millipore) にクロモカルトコリフォーム培地 (寒天不含有) (Merck, USA) を濾過後、37 °C、24 時間培養した。

b) 荒川流域の畜産関連廃水試料

大腸菌群と EC は、クロモカルトコリフォーム寒天 (Merck, USA) を用いた単層寒天法で、37 °C、24 時間培養した。

(3) Somatic phage (SMP) および F+specific phage (FRNA) の測定

SMP の測定には、*E. coli* WG5 を、また、FRNA の測定には、*Salmonella typhimurium* WG49 を

宿主としたブラック法を用いた。

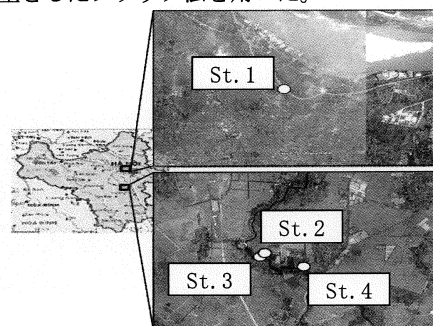


図1 ハノイ市周辺の試料採取地点

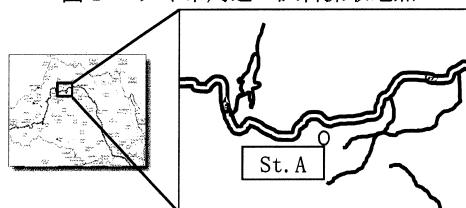


図2 荒川流域の試料採取地点

(4) ウイルス濃縮

ウイルス濃縮方法は、片山ら(2002)の陰電荷膜吸着法・酸洗浄・アルカリ誘出を用いた。

a) 採取試料のウイルス一次濃縮

ハノイ市で採取した畜産関連廃水試料 30 mL、また、荒川流域で採取した畜産関連河川水試料 500 mL に対し終濃度が 25 mM となるように 2.5 M $MgCl_2$ を添加後、それぞれ直径 47 mm と 90 mm の HA 膜 (孔径 0.45 μm , Millipore) で全量を濾過した。濾過したフィルターを 200 mL の 0.5 mM H_2SO_4 (pH 3.0) を濾過し、1 mM NaOH (pH 10.5 - 10.8) でウイルスを誘出し、100 mM H_2SO_4 (pH 1.0) および 100x Tris-EDTA buffer (pH 8.0) で中和した。

b) ウイルス二次濃縮

一次濃縮液は、Centriprep YM-50 を用いて約 650 μL の二次濃縮液を回収した。二次濃縮液は、次の処理を行うまで、 $-80^\circ C$ で保存した。

(5) ウイルス DNA の抽出、およびウイルス RNA の抽出と逆転写反応

ウイルス DNA の抽出とウイルス RNA の抽出は、それぞれ 200 μL と 140 μL の二次濃縮試料から、QIAmp DNA Mini Kit と QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) を用いた。抽出 RNA は、cDNA 合成のために逆転写反応に供し、PCR による定量および検出実験に用いた。

(6) real-time PCR によるウイルスの定量

cDNA、または DNA の濃度は、ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いた real-time PCR で、AiV、エンテロウイルス (EV)、ノロウイルス GI (NV GI)、GII (NV GII)、およびアデノウイルス (AdV) を既報に従い定量した (Katayama et al. 2002, Kitajima et al. 2010)。

(7) RT-PCR による PkoV および BkoV の検出

得られた cDNA を鋳型として、RT-PCR を行い、PkoV と BkoV の検出を行った。PkoV は、Yu ら (2009)、BkoV は、山下ら (2003) の方法に従った。

3. 結果

(1) 微生物測定および real-time PCR 法による畜産関連廃水からのウイルスの検出の結果

採取した試料における、TC、EC、SMP、FRAN の測定結果、および AiV、EV、NV GI、NV GII、AdV の定量結果を図 3 および図 4 に示す。

ハノイ市周辺の畜産関連廃水の TC および EC は、 $2.5 \times 10^6 - 5.8 \times 10^8$ CFU/L および $3.5 \times 10^5 - 4.0 \times 10^7$ CFU/L でそれぞれ検出され、全試料で比較的高いレベルの糞便汚染が確認された。特に直接的な畜産廃水試料である St.1 の TC と EC の濃度は、他の試料に比べ高かった。また、St.2 および St.3 では、2011 年 1 月の採取時はブタが飼育されていたが、アヒルは飼育されておらず、他 2 回の採取試料に比べ TC、EC 濃度が低かった。一方、2010 年 6 月 (雨期) と 2011 年 3 月 (乾期) の試料における時期的な違いに変化は見られなかった。

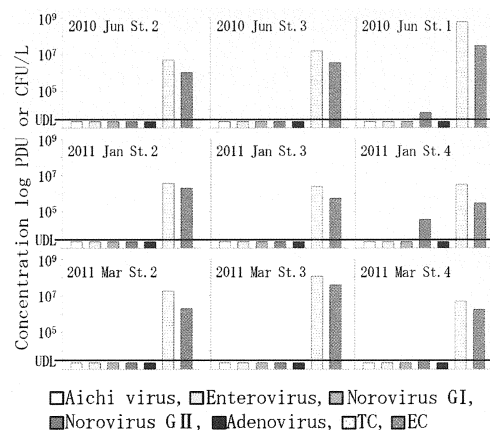


図3 ハノイ市・畜産廃水試料のウイルスおよび TC, EC 濃度



図4 荒川流域・畜産廃水関連河川水試料のウイルスおよび TC, EC, SMP, FRNA 濃度

荒川流域の養豚場畜産廃水が直接流入してい

る河川水の TC、EC は、それぞれ 2.0×10^6 - 3.3×10^6 CFU/L と 1.5×10^5 - 6.5×10^5 CFU/L であった。また、SMP および FRNA は、 5.5×10^4 - 7.5×10^5 CFU/L と 3.1×10^4 - 9.1×10^5 CFU/L であった。SMP と FRNA の測定結果は、2010 年 12 月では FRNA が高く、2011 年 1 月では SMP が高かった。

ハノイ市周辺から採取した畜産関連廃水において検出されたウイルス濃度は、2010 年 6 月の St.1、2011 年 1 月および 3 月の St.4 で NV GII が、それぞれ、 6.7×10^3 PDU/L、 3.7×10^4 PDU/L、 3.1×10^3 PDU/L であり、AiV、EV、NV GI、および AdV は、検出限界以下であった。St.2 および St.3 では、3 回採取した試料いずれからも、対象とした全てのウイルスが、検出限界以下であった。

荒川流域の養豚場畜産廃水が直接流入している河川水 St.A において、2010 年 12 月のウイルス濃度は、AiV が 3.1×10^2 PDU/L、EV が 1.6×10^5 PDU/L、NV GII が 3.3×10^2 PDU/L であった。NV GI と AdV は、検出限界以下であった。また、2011 年 1 月のウイルス濃度は、EV が 2.1×10^5 PDU/L であった。他の対象ウイルスは検出限界以下であった。2 回の採取試料中のウイルス濃度は、EV が他のウイルスに比べ高かった。

(2) PkoV および BkoV の検出結果

畜産関連廃水からの PkoV および BkoV の検出結果を表 1 に示す。ベトナム・ハノイ市の畜産関連廃水からは、3 回採取した試料の全てから PkoV が検出された。BkoV は、St. 4 の河川水を利用したアヒル飼育池の水からのみ検出された。

荒川流域の養豚場畜産廃水が直接流入している河川水において、PkoV は 2010 年 12 月に採取した試料から検出されたが、2011 年 1 月に採取した試料からは検出されなかった。BkoV は、両方の試料から検出されなかった。

表 1 PkoV および BkoV の検出結果

採取日	地点	ウイルス検出結果	
		PkoV	BkoV
2010 Dec.	荒川 A	+	—
2011 Jan.	A	—	—
2010 Jun.	ハノイ 1	+	—
	2	+	—
	3	+	—
2011 Jan.	2	+	—
	3	+	—
	4	+	+
2011 Mar.	2	+	—
	3	+	—
	4	+	+

4. 考察

本研究において、コブウイルス属の PkoV および BkoV の水環境中におけるウイルス指標としての有効性を評価する第一段階として、ハノイ市周辺の畜産関連廃水、および荒川流域の養豚場廃水が直接流入している河川水からの PkoV および BkoV の検出を試みた。

ハノイ市周辺の畜産関連廃水では、全ての試料から PkoV が検出された。St. 1、St.2、および St.3 は、閉鎖された地点で試料を採取した。即ち、St. 1 は、ブタ由来の糞便汚染、St.2 および St.3 は、ブタとアヒル由来の糞便汚染があり、他の生物による糞便汚染がない試料である。これら 3 地点の試料において、PkoV 以外の検出対象ウイルスは、St.1 において NV GII のみ検出された。NV GII はブタの糞便から検出されるという報告があり、ブタ由来であると考えられる (Wolf et al. 2009)。コブウイルス属は、宿主特異性が非常に高く、それぞれの宿主以外からの検出例はない。今回検出された PkoV は、飼育されていたブタの糞便に由来するものと考えられ、関連した糞便汚染のみを正確に示し、PkoV の検出がブタ由来の糞便汚染の有無の評価に有効である可能性を示した。一方で、河川水を利用した St.4 では、PkoV、BkoV、NV GII が検出された。検出されたウイルスは、アヒル由来ではなく、利用した河川水に存在していたと考えられ、ハノイ市周辺の河川水に PkoV および BkoV が存在することを示していると考えられる。

荒川流域の養豚場廃水が直接流入している河川水における 2 回の試料採取において、2010 年 12 月に採取した試料から PkoV および AiV、EV、NV GII が検出され、2011 年 1 月に採取した試料から EV が検出された。一方、2 回の採取試料から BkoV は検出されなかった。この結果は、養豚場畜産廃水中に PkoV が存在し、河川水が畜産糞便による汚染を受けていることを示した。また、AiV、EV および EV の検出は、採取河川がヒト由来の糞便汚染を受けていることを示している。

本研究において、荒川流域とハノイ市の異なる地域の畜産廃水および関連河川水から PkoV と BkoV が検出された結果は、環境水中に検出可能なウイルス量が存在することを示し、PkoV と BkoV がさまざまな地域において、糞便汚染の有無や起源追跡のウイルス指標として有効性があることが示された。

今回用いた PkoV および BkoV の検出方法は、限定的な遺伝子情報から確立されているため、その検出感度は十分ではなく、また、検出できていない対象が存在する可能性がある。今後、遺伝子情報を蓄積していき、高感度かつ定量的な検出方法を確立し、環境水中における存在量および挙動を明らかにすることで、PkoV および BkoV のウイルス指標としての有効性を更に評価することが求められる。

謝辞：本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「気候変動に適応した調和型都市圏水利用システムの開発」の助成を受けて実施した。

参考文献

Katayama et al. *Appl. Environ. Microbio.*, 68(3), 1033-1039, 2002.
Yu et al. *Eme. Inf. Dis.*, 15(6), 823- 825, 2009.
Yamashita et al. *J. Gen. Virol.*, 84(11), 3069-3077, 2003.
Wolf et al. *Vet. Microbiol.*, 133(1-2), 184-189, 2009.
Reuter et al. *Rev. in Med. Virol.*, 21, 32-41, 2011.