

B-1 下水処理工程におけるF特異RNA 大腸菌ファージの遺伝子群別の挙動解析

○原本 英司^{1*}・藤野 紗妃²・小田切 美希³

¹山梨大学大学院総合研究部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

²山梨大学工学部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

³山梨大学大学院医学工学総合教育部（〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11）

* E-mail: eharamoto@yamanashi.ac.jp

1. はじめに

F特異RNA大腸菌ファージ（F-RNAファージ）は、粒径などの性状がヒト腸管系ウイルスと類似しており、培養が容易であることから、水処理工程や水環境においてヒト腸管系ウイルスが示す挙動の代替指標として広く用いられている。しかしながら、F-RNAファージの4種類の遺伝子群（I～IV群）はそれぞれ異なる環境耐性を有し、一般にI群の耐性が最も高いことが報告されている^{1,2)}。水中にはこれらの遺伝子群が混在しているため、遺伝子群を区別することなく包括的にF-RNAファージを指標として用いることの妥当性を検討する必要がある。

本研究では、下水試料から得られたF特異大腸菌ファージ（Fファージ）のブラックの遺伝子群を決定することにより、下水処理工程でF-RNAファージの各遺伝子群が示す挙動の差異を定量的に明らかにすることを目的とした。指標微生物とヒト腸管系ウイルスも測定することにより、ヒト腸管系ウイルスの代替指標としてF-RNAファージの各遺伝子群を用いることの有効性を検討した。

2. 実験方法

(1) 下水試料の採取

標準活性汚泥法が導入されている国内の下水処理場において、2011年3～12月の10ヶ月間に毎月1回の頻度で流入水と曝気槽流出水、2次処理水、返送汚泥を採取した。

(2) Fファージの定量およびブラックの単離

必要に応じて10倍段階希釈した試料1mLまたは5mLを用い、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49を宿主菌としたブラック法³⁾によってFファージを定量した。シ

ヤーレ上に形成したFファージのブラックを1試料あたり8個単離し、滅菌MilliQ水500μLに溶解した。

(3) Fファージのブラックの同定

a) F-RNAファージの遺伝子群別の逆転写定量PCR

ブラック溶解液から10μLを分取し、加熱処理によって核酸抽出液を得た後、High capacity cDNA reverse transcription kit（Life Technologies）を用いた逆転写反応に供した。F-RNAファージのI群に特異的な定量PCR（40サイクル）⁴⁾に供し、Ct値（蛍光強度が指数関数的に増加しているサイクル数）を決定した。その際、Ct値が20以下の場合にはそのブラックはI群に属すると判断し、以降の作業は行わなかった。一方、Ct値が20を超える場合には他の遺伝子群がより優占している可能性を考え、II、III、IV群の順に同様の手順で定量PCR⁵⁾を実行した。

b) F-DNAファージの定量PCR

I～IV群のいずれに対しても20以下のCt値を示さなかったブラック溶解液に対し、核酸抽出液を用いてF-DNAファージの定量PCR（40サイクル）⁶⁾を実行した。その後、F-RNAファージの各遺伝子群とF-DNAファージの中で最も小さいCt値（ただし、30以下）を示したものをそのブラックを形成したファージであると判断した。

(4) 流入水および2次処理水中の指標微生物およびヒト腸管系ウイルスの定量

指標微生物として、クロモカルト・コリフォーム寒天培地（Merck Millipore）を用いた培養法によって大腸菌群と大腸菌を測定した。

ヒト腸管系ウイルスの濃縮には、混合セルロース膜（孔径0.8μm、直径90mm、Merck Millipore）を用いた陰電荷膜破碎型濃縮法⁷⁾を採用し、流入水100mLまたは2次処理水2Lを15mLに減容した。QIAamp DNA mini kit

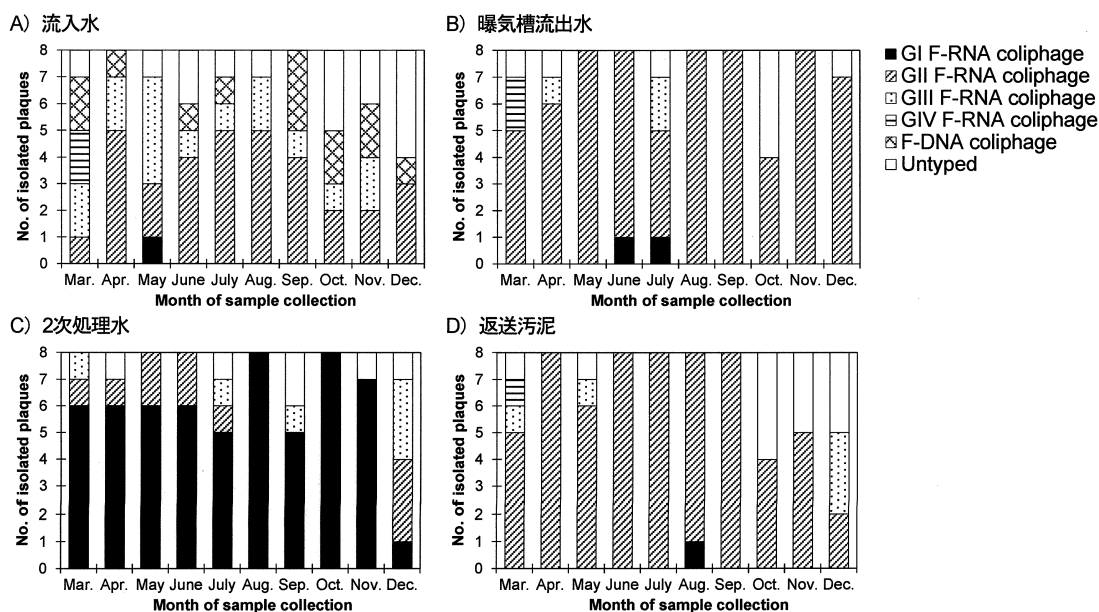


図-1 下水試料から単離したFファージのブラックの同定

(Qiagen) を用いてDNAを抽出し、定量PCR[®]によってヒトアデノウイルスを定量した。また、QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) を用いたRNA抽出とHigh capacity cDNA reverse transcription kitを用いた逆転写反応に供した後、定量PCR[®]によってノロウイルス (遺伝子群I (GI) , II (GII)) , ヒトエンテロウイルス¹⁰⁾ , ヒトコサウイルス¹¹⁾およびサリウイルス¹²⁾を定量した。

3. 実験結果

(1) 下水試料から単離したFファージのブラックの同定

Fファージはすべての下水試料から検出され、流入水、曝気槽流出水、2次処理水および返送汚泥中の濃度は、それぞれ 3.20 ± 0.24 , 2.60 ± 0.25 , 0.51 ± 0.55 , 3.30 ± 0.22 $\log_{10}$ plaque-forming units (PFU)/mL (各n=10) であった。

図-1に示すように、F-RNAファージII群は、下水流入水 (41%) , 曝気槽流出水 (81%) および返送汚泥 (76%) から単離したブラックの中で最も優占して存在していた。一方、2次処理水中においては、II群 (13%) よりもI群 (73%) の方が優占していた。F-RNAファージの4種類の群およびF-DNAファージのいずれにも同定されなかったブラックが41個 (13%) あり、定量PCR系の反応の広範さの向上の必要性が示唆された。

(2) 下水試料中のF-RNAファージの各遺伝子群の濃度

1試料あたりのブラック単離数が8個と少なかったため、F-RNAファージの各遺伝子群とF-DNAファージの濃度は、Fファージの年間平均濃度と年間単離ブラック数に占め

る割合を基に算出した。

図-2に示すように、流入水中の年間平均濃度は、F-RNAファージII群が $2.82 \log_{10}$ PFU/mLで最も高く、III群、F-DNAファージ、IV群、I群の順であった。II群は、曝気槽流出水 ($2.51 \log_{10}$ PFU/mL) と返送汚泥 ($3.19 \log_{10}$ PFU/mL) においても高濃度で存在していた。一方、2次処理水においては、I群の年間平均濃度が $0.37 \log_{10}$ PFU/mLで最も高かった。F-DNAファージは、流入水以外からの試料からは検出されなかった。

(3) 下水処理工程におけるF-RNAファージの各遺伝子群と他の微生物の低減率の比較

流入水と2次処理水中の濃度を基に、下水処理工程における微生物の年間平均低減率を算出した。ヒト腸管系ウイルスの低減率の算出には、両試料共に陽性を示した

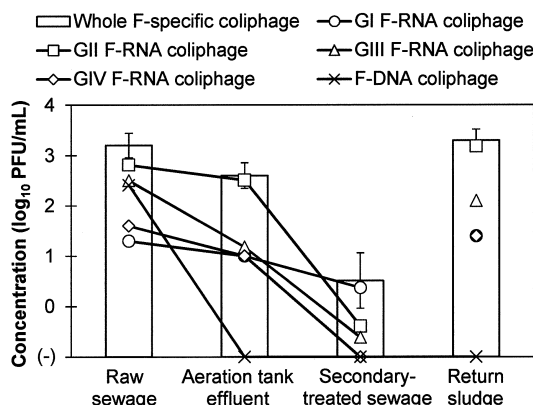


図-2 下水試料中におけるF-RNAファージの各遺伝子群およびF-DNAファージの年間平均濃度

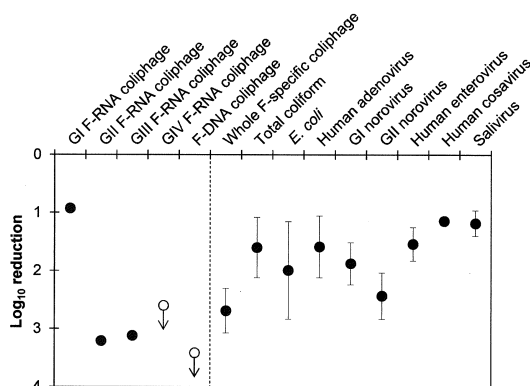


図-3 下水処理工程におけるF-RNAファージの各遺伝子群および他の微生物の年間平均低減率

調査月の結果のみを用いた。

図-3に示すように、F-RNAファージII～IV群とF-DNAファージに比べ、I群の低減率は0.93 log₁₀と大幅に低い値を示した。6種類のヒト腸管系ウイルスの低減率は平均1.14～2.43 log₁₀であり、大腸菌群（平均1.60 log₁₀）や大腸菌（平均1.99 log₁₀）、ブラック法で測定したFファージ（平均2.69 log₁₀）よりも低い場合があった。この結果より、下水処理工程におけるヒト腸管系ウイルスの低減効果を把握および監視するための指標として、F-RNAファージI群が適していることが示唆された。これは、ウイルス濃縮法と定量PCRを用いてF-RNAファージの各遺伝子群の低減率を測定した既存の研究の結果¹³⁾と整合性のあるものであった。

4. まとめ

本研究により、感染価を有したF-RNA大腸菌ファージの各遺伝子群が下水処理工程において異なる挙動を示すことが明らかとなった。ヒト腸管系ウイルスの低減率を把握ならびに監視するための指標として、I群を用いることが有効となる可能性が示された。今後は、高度処理や浄水処理、水環境中においてヒト腸管系ウイルスが示す挙動の代替指標として、F-RNAファージを遺伝子群別に測定することの有効性を検討する必要がある。

謝辞：本研究は、文部科学省グローバルCOEプログラム（H05）の補助により実施した。試料の採取にご協力頂いた下水処理場の関係者に深謝する。

参考文献

1) Muniesa M., Payan A., Moce-Llivina L., Blanch A.R. and Jofre J.: Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water, *Water*

Research, Vol. 43, No. 6, pp.1559-1564, 2009.

- 2) Nappier S.P., Aitken M.D. and Sobsey M.D.: Male-specific coliphages as indicators of thermal inactivation of pathogens in biosolids, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 4, pp.2471-2475, 2006.
- 3) Schaper M., Durán A.E. and Jofre J.: Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 8, pp. 3702-3707, 2002.
- 4) Anonymous: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages-part 1. Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. ISO 10705-1, International Organization for Standardization, 1995.
- 5) Wolf S., Hewitt J., Rivera-Aban M. and Greening G.E.: Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, *Journal of Virological Methods*, Vol. 149, No. 1, pp. 123-128, 2008.
- 6) Haramoto E., Kitajima M., Katayama H., Asami M., Akiba M. and Kunikane S.: Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan, *Water Research*, Vol. 43, No. 15, pp. 3759-3764, 2009.
- 7) 原本英司, 片山浩之, 浅見真理, 秋葉道宏, 国包章一: 河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発, 水道協会雑誌, Vol. 79, No. 10, pp. 2-11, 2010.
- 8) Heim A., Ebnet C., Harste G. and Pring-Akerblom P.: Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR, *Journal of Medical Virology*, Vol. 70, No. 2, pp. 228-239, 2003.
- 9) Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushima S., Hoshino F.B., Takeda N. and Katayama K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 4, pp. 1548-1557, 2003.
- 10) Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S.: Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 3, pp.1033-1039, 2002.
- 11) Stöcker A., Souza B.F.C.D., Ribeiro T.C.M., Netto E.M., Araujo L.O., Corrêa J.L., Almeida P.S., de Mattos A.P., Ribeiro H.C. Jr., Pedral-Sampaio D.B., Drosten C. and Drexler J.F.: Cosavirus infection in persons with and without gastroenteritis, Brazil, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 4, pp. 656-659, 2012.
- 12) Haramoto E., Kitajima M. and Otogiri M.: Development of a reverse transcription-quantitative PCR assay for detection of salivirus/klassevirus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 79, No. 11, pp. 3529-3532, 2013.
- 13) Hata A., Kitajima M. and Katayama H.: Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 114, No. 2, pp. 545-554, 2013.