

B-3 親水活動による感染リスク評価に向けた 東京湾沿岸域の降雨後ウイルス汚染実態調査

浅見 達也^{1*}・柴田 智世¹・片山 浩之¹・古米 弘明²

¹ 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)

² 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)

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

1. はじめに

沿岸海域の汚染は、親水活動を介して人々に健康リスクをもたらす。中でも病原微生物の水系感染は曝露一回あたりのリスクが大きく、下痢症等による健康影響を直ちに引き起こす。そのため、感染リスクを適切に評価し、管理する必要がある。細菌や原虫のみならず腸管系ウイルスによる感染リスクも、その感染力の強さゆえに考慮しなければならない。東京湾沿岸域は市民の親水活動の場であり、トライアスロン等スポーツ競技での利用も想定される。したがって、腸管系ウイルスの感染リスクを評価・管理するために、当沿岸域のウイルス汚染の実態を把握することが望ましい。

腸管系ウイルスは糞口感染し、感染したヒトの消化器系器官中で複製された後、高濃度で糞便と共に排泄される。そのため、下水中にはウイルスが高濃度で含まれている。東京では合流式下水道が利用されており、降雨後には合流式下水道雨天時越流水(CSO)が発生する。CSOは未処理の下水を環境水中に放出するため、CSO発生後には東京湾内のウイルス汚染がより深刻になり、したがってその感染リスクはより大きくなると考えられる。よって、リスク管理の観点から、降雨後

の汚染状況の把握がより重要である。

そこで本研究では、2014年6月上旬の降雨開始日から1, 2, 3, 5, 8, 13日後に東京湾内の4地点において試料を採取してウイルス濃度の測定を行い、汚染の実態の経時的な評価を試みた。また、ウイルスの鉛直分布も考慮するため、各試料採取地点について深さ方向の3層におけるウイルス濃度も測定した。

2. 方法

(1) 降雨状況および試料採取

2014年6月5日から6月18日にかけて、総降雨量247 mm、時間最大降雨量16 mm/hrの降雨が東京23区域において観測された(気象庁、大手町観測所)(図1)。時間最大降雨量は6月7日に記録された。また、同地点において同年5月28日以降6月4日までの期間に降雨は観測されなかった。

6月5日の降雨観測後1, 2, 3, 5, 8, 13日後(6月6, 7, 8, 10, 13, 18日)に東京湾内の4地点(隅田川河口、目黒川河口、測線観測地点、お台場)で合計57試料をウイルス濃度測定のために採取した。各採水地点の位置関係を図2に示す。船側に固定した鉄パイプを鉛直方向に下ろし、異なる水深にチューブの先端を固定してアスピレーター(WJ-20, SIBATA)により吸引することにより、水面下0.5 m(表層)、3 m(中層)、5 m(低層)の試料を同時に採取した。なお、測線観測地点では鉄パイプを下ろしたまま船を測線上に航行させ、その間アスピレーターで海水を吸引し続けることによって試料を得た。

(2) ウィルス濃縮

採取した試料を、Katayama et al. (2002)による陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法を大容量試料に適用したHata et al. (2011)にしたがって濃縮した。一次濃縮として、試料採取時にアスピレーターと接続させたカ

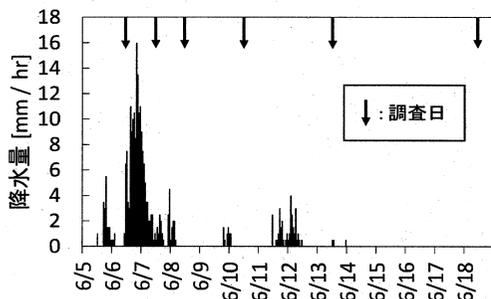


図 1. 試料採取期間中の降雨状況
(気象庁のデータより作成)

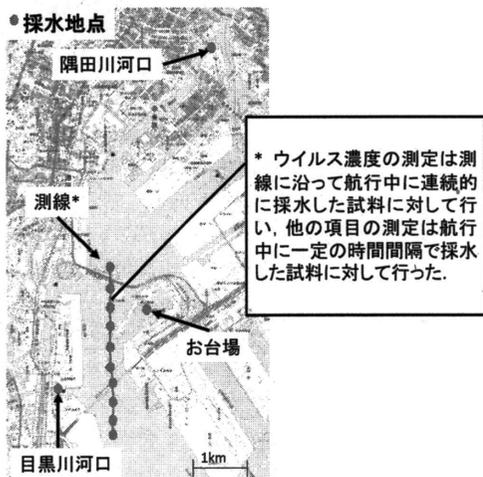


図2. 採水地点

ートリッジ型陰電荷 MF 膜(Opticap XL2, 孔径 0.5 μm , Millipore)にウイルスを吸着させ、東京大学で、pH 3.0 に調整した H_2SO_4 溶液 2 L および Milli-Q 水 1 L を通水して膜を洗浄した後、pH 10.5 に調整した NaOH 溶液 200 mL を膜に通水し、ウイルスを誘出した。得られた一次濃縮液に対して遠心式限外ろ過ユニット(Centricon plus-70, 分画分子量 30,000 Da, Millipore)を用いて二次濃縮操作を施した。以上の操作により、2.9 - 98.9 L の試料から約 1 mL の濃縮液を得た。

(3) ウイルス濃度の測定および検出阻害の判定

二次濃縮液に対し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Sciences)を用い、ウイルス粒子から RNA を抽出した。さらに、RNA 抽出液に対し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) および GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) を用いて逆転写を行い、cDNA を得た。これらの cDNA に対し、酵素系として TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を用い 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) による real-time PCR を行った。以上の操作により、トウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)、アイチウイルス(AiV)、ノロウイルス GI, GII (NoV GI, GII)の濃度を定量した。

また、検出阻害の評価を行うために、全ての二次濃縮試料および Milli-Q 水にマウスノロウイルス(MNV)を同量添加し、濃度を定量した。この時、試料における MNV 濃度が対照である Milli-Q 水における濃度の 10% 未満であった場合、検出阻害ありと判定した。

なお、PMMoV, AiV, NoV GI, GII, MNV の定量に用いたプライマー及びプローブについては、それぞれ Zhang et al. (2006), Kitajima et al. (2013), Kageyama et al. (2003), 北島ら. (2008)を参照した。

3. 結果および考察

表 1 にウイルスの陽性率を示す。PMMoV の陽性率は他のウイルスの陽性率に比べて高くなった。また、場所別に陽性率を見ると、隅田川河口におけるウイルスの陽性率は他の場所に比べて高くなった。隅田川河口以外の地点では、測線観測地点における PMMoV の陽性率を除き、全てのウイルスの陽性率が 50% を下回った。ウイルス検出阻害が見られた試料の割合は隅田川河口で 25% (3/12)、目黒川河口で 83% (10/12)、測線観測地点で 83% (15/18)、お台場で 93% (14/15) であった。

本研究では検出阻害が多く見られ、定量的な議論が困難であった。ウイルス汚染の実態をより正確に把握するためには検出阻害を回避することが重要である。

隅田川河口におけるウイルスおよび大腸菌濃度の経時的な変化を図 3 に示す。6 日の試料に関しては検出阻害が見られたため、ウイルス濃度が定量できていない。一方で、7 日および 8 日の挙動を比較すると、PMMoV 濃度が 7 日に高くなったのに対し、AiV 濃度は 8 日に高いという結果が得られた。また、AiV の濃度は 8 日から 10 日にかけて下降したが、他のウイルスでは濃度の下降が見られなかった。また、いずれのウイルスについても、中層・低層における濃度が表層に比べて大きくなる傾向が見られた。濃度の最大値は NoV GI, GII に比べて AiV は 1 log 以上、PMMoV は 2 log 以上大きくなった。大腸菌濃度は表層における濃度が高い状態から、中層における濃度が高い状態、低層における濃度が高い状態への移行が見られた。

測線観測地点における PMMoV および大腸菌濃度の経時的な変化を図 4 に示す。PMMoV の濃度は 18 日になっても下降する傾向が見られなかった。また、隅田川河口とは異なり、濃度は高い順に表層、中層、低層となる傾向が見られた。大腸菌濃度は 8 日以降に下降する傾向を示し、PMMoV 同様、表層、中層、低層の順に濃度が高くなる傾向を示した。

PMMoV の挙動はこれらの 2 地点間で異なっていた。ウイルス汚染の空間的な特性は降雨分布や汚濁流出源に影響されると考えられるため、今後は流出解析や 3 次元流動解析を用いて結果の解釈を行うのが望ましい。

PMMoV 濃度と大腸菌濃度の経時的な傾向を比較すると、PMMoV の残留期間が大腸菌よりも長いことが分かる。これは、降雨後のウイルス汚染が細菌汚染よ

表 1. 各ウイルスの陽性率 (%)

ウイルス	隅田川	目黒川	測線	お台場	全体
PMMoV	75	42	50	20	46
AiV	67	0	22	7	23
NoV GI	75	0	14	7	23
NoV GII	75	8	22	0	25

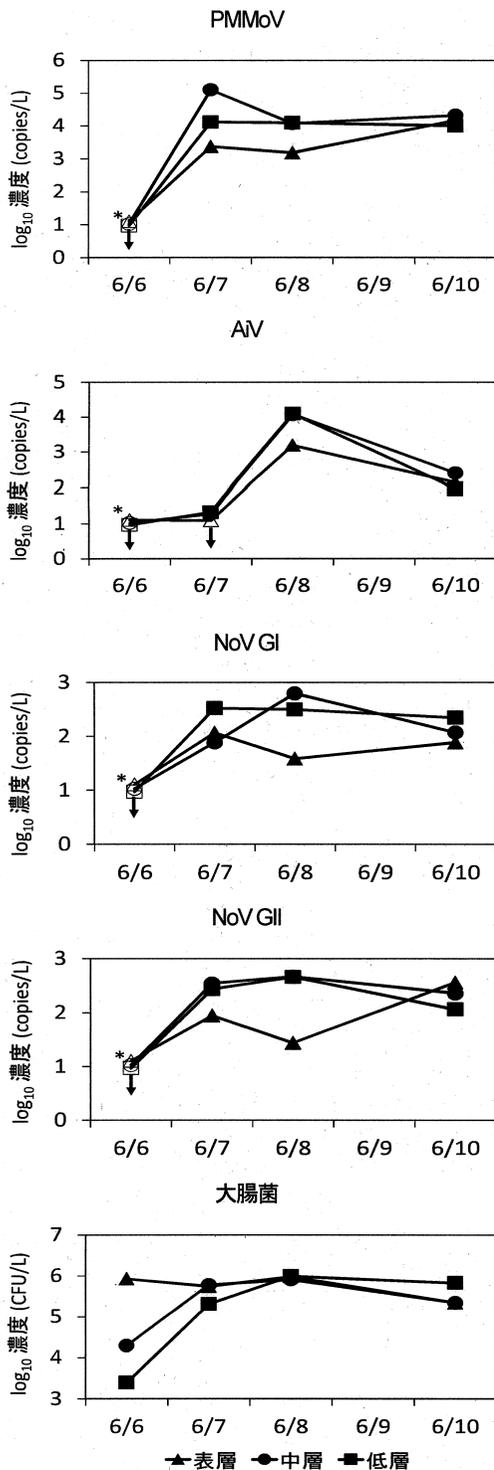


図3. 隅田川河口におけるウイルスおよび大腸菌濃度 (白抜きプロットは定量不可能を, 下向き矢印は不検出を, アスタリスクは検出阻害をあらわす)

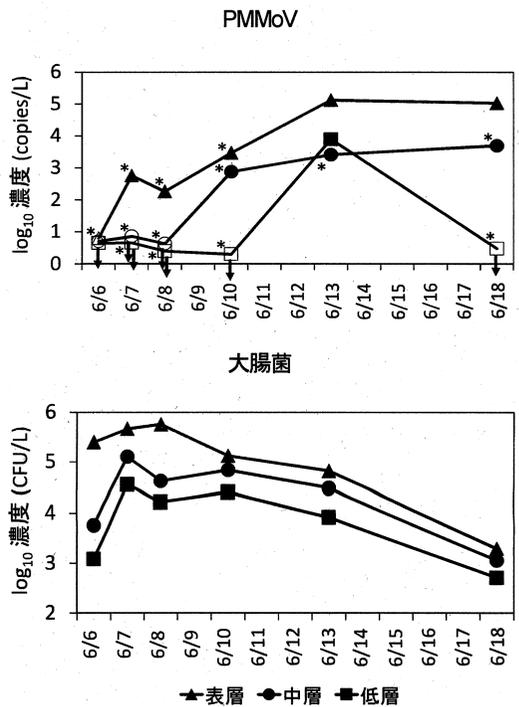


図4. 測線観測地点のウイルスおよび大腸菌濃度 (白抜きプロットは定量不可能を, 下向き矢印は不検出を, アスタリスクは検出阻害をあらわす) (大腸菌濃度は測線上 10 試料の幾何平均値)

りも長く持続することを示唆している。我が国においては、水浴場の微生物学的水質基準はふん便性大腸菌群数により規制されている。しかし、本研究の結果はこうした基準だけではウイルス由来の感染リスク管理には不十分であることを示していると考えられる。

PMMoV や AiV は環境水中における濃度が他のウイルスに比べて高く (Rosario et al. 2009; Hata et al. 2014), 検出が比較的容易であるため、ウイルス指標となることが期待されている。本研究では PMMoV の陽性率および濃度が他のウイルスよりも高く、AiV の陽性率は NoV GI, GII と同程度であった。さらに、PMMoV 濃度には下降傾向が見られなかったことから、水環境中で安定的であり、安全側の指標として機能すると考えられる。

参考文献

- 気象庁. (<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etm/index.php>)
- Katayama et al. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3), 1033-1039.
- Hata et al. (2011). *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3), 4336-4343.
- Zhang et al. (2006). *PLoS Biology*, 4(1): e3.
- Kitajima et al. (2013). *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(13), 3952-3958.
- Kageyama et al. (2003). *J. Clin. Microbiol.*, 41, 1548-1557.
- 北島ら. (2008). *環境工学研究論文集*, 45, 361-370.
- Rosario et al. (2009). *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(22), 7261-7267.
- Hata et al. (2014). *Sci. Total. Environ.*, 468, 757-763.