

大腸菌ファージをウイルス指標にした、 浄化槽内でのウイルス活動形態

岩手県浄化槽検査センター 柿木明紘

1. はじめに

昨今、ノロウイルスを原因とした感染性胃腸炎が全国的に発生し問題となっている。これら、ヒト腸管系ウイルスは、ヒトの糞便より排出され、汚水を経由し生活環境から再度ヒトへ感染する可能性が示唆されている。

主にこの可能性として、下水処理場などの大規模施設からの処理水によるウイルス循環が取りざたされているが、さらに身近な人の活動領域に処理水を排出する浄化槽が汚染源となる可能性も否定できない。それを防ぐには、確実な装置内でのウイルスの除去・制御が必要となると思われる。下水道などでは、それらの豊富な知見が蓄積されているが、浄化槽のような小規模施設は処理方式の変遷が著しく、なおかつ様々な状態で使用されているため、その知見が多くは見出されていないのが現状である。

当調査では、環境水中に容易に存在し、安全かつ簡便に測定できる大腸菌ファージを用いて、様々な型式及び使用条件で実際に使用している浄化槽のウイルス活動形態と、浄化槽で主に用いられる好気処理法での実験槽における消長を調査した。

2. 大腸菌ファージの概要

大腸菌ファージ(以下、ファージ)は大腸菌に感染するウイルスであり(写真-1)、宿主菌内に限って増殖が可能である。ファージには DNA をもつものと RNA をもつものがあり、そのなかの大腸菌の F 絨毛に吸着し感染する F 特異 RNA ファージは、ヒトを含む動物の糞便が発生源とされている(図-1)。また、F 特異 RNA ファージは、感染した宿主に対する溶菌性を持ち、プラーク(溶菌斑)を形成する(写真-2)。それを用いたファージ定量法(プラークアッセイ)が確立されており、簡便に測定が可能である。なお、ウイルス指標として米国環境保護庁などが地下水の糞便汚染の指標として推奨している。

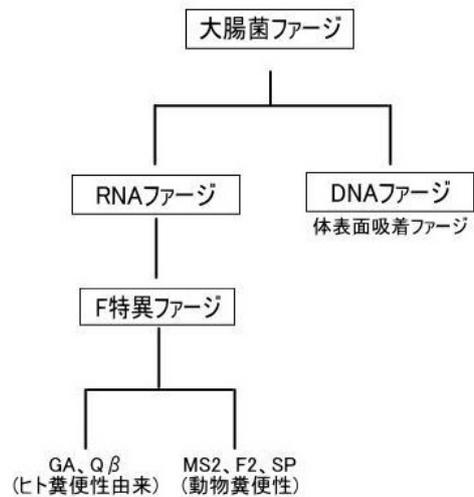


図-1 ファージ樹形

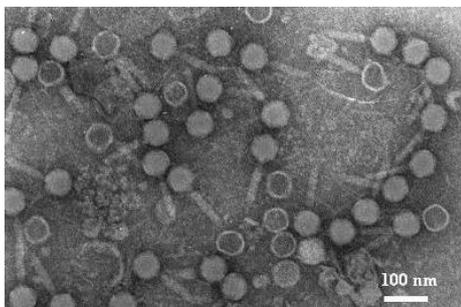


写真-1 λファージ電子顕微鏡写真
(広島県保健環境センター提供)



写真-2 寒天重層法でのプラーク

3. 実使用浄化槽におけるファージ形態(調査1)

ファージをウィルス指標にするにあたり、実使用上の浄化槽にファージがどれくらいの濃度で流入してきているのか調査した。また、流入したファージが浄化槽内の各単位装置を通過後どのような経過をたどるのかファージ濃度の変化も調査した。

(1) 調査方法

1) 対象施設

対象施設は、比較的ファージの流入が多いと思われる大型施設の農業集落排水処理施設、中型処理施設である病院施設、ケアホーム、保育園、そのほか小型合併浄化槽、尿尿が流入主体であるコンビニエンスストアと単独浄化槽を対象とした。

2) サンプルングの方法

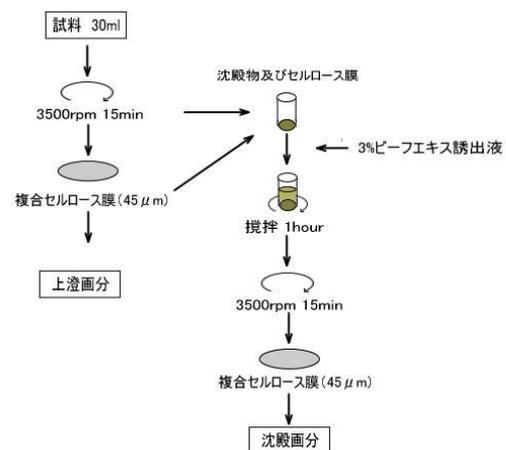
各調査におけるサンプルング方法は次の通り行った。(3)・1)の大腸菌ファージの流入量の調査では、流入ファージ濃度が均一化している原水ポンプ槽もしくは流量調整槽から採取したものを試料とし、家庭用小型合併浄化槽、単独浄化槽については一次処理中間水を試料とした。

(3)・2)単位装置間における消長の調査では、各単位装置通過後の移流水を移流口より採取した。なお、どちらの試料も槽内でのファージ増殖による調査への影響を考慮し、増殖温度以下である流入水温 25℃以下の施設を対象とした。

(2) 定量方法

1) 試料の前処理

汚水内には、夾雑物、SS、雑菌などが存在する。定量の阻害要因となるため前処理(図一2)を行い除去した。また、ファージにはそれら固形物に吸着した状態(吸着形態)と浮遊した状態(浮遊形態)で存在するため、分離、誘出する処理を行った。誘出液である 3%ビーフ溶液は、ビーフエキス粉末を蒸留水あたり 3%になるように溶解し、1N NaOH で pH11 に調整したものである。



図一2 前処理方法

2) 宿主菌(ホスト)

大腸菌ファージは、宿主菌の特性によって感染能が大きく異なる。フィールド上でのプラークアッセイでは、F因子を持ちF特異ファージと体細胞ファージを検出できる *Escherichia coli*(以下、*e.coli*) K-12 F⁺ A/λ を用いた。また、実験室でのファージ減少試験ではF因子を持たない *e.coli* DH5 を合わせて用いて、異なる宿主間によるファージの感染動態を調査した。これらを 37℃で培養し、OD₆₆₀ 0.4~0.6 の対数増殖期に達したものを使用した。

3) 培地

ホスト増殖用培地には、ポリペプトン 10g、酵母エキス 5g、塩化ナトリウム 1gにMgSO₄・7H₂O 0.2g、MnSO₄・4H₂O 0.05gを蒸留水 1Lに溶解し、1N NaOHでpH7.0±0.2 に調整した。重層法でファージを定量する際の培地は、上記の増殖用液体培地に下層寒天培地には 1.5g の寒天を添加し、上層寒天培地には 0.7gを添加し調整したものをを用いる。

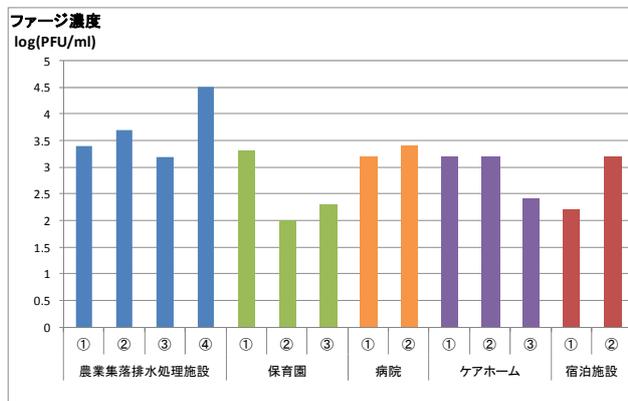
4) プラークアッセイ

寒天重層法により、ファージが作るプラークを計量する方法で行った。段階的に希釈した試料 0.1ml、宿主菌 0.3ml、CaCl₂溶液(CaCl₂・2H₂O 15gを 1000mlの純水に溶解したもの)0.2mlを混合し、上層用寒天培地を 4ml加え、予め下層寒天培地を流し込んだシャーレ上に重層し固めた。37℃で一晩培養後、出現したプラーク数を計測しファージを定量した。

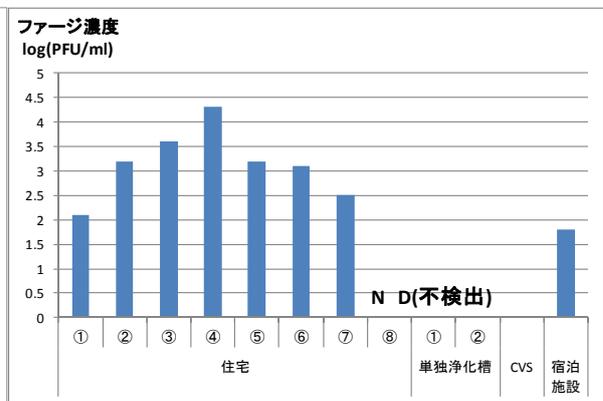
(3) 調査結果

1) 大腸菌ファージ流入量

調査の結果、ほとんどの調査対象施設で処理対象人員数に関わらずファージの流入が確認された(図一3、図一4)。一方、単独浄化槽①、②やコンビニエンスストア(CVS)などの流入汚水がし尿主体の施設ではファージが検出されなかったこれは、ファージのアンモニアなどによる不活化などの報告があり、その影響ではないかと考えられる。なお、大～中型施設ではファージは、試料の上澄画分に多く存在し、遊離形態による検出が 90%を占めた。一方、小型合併浄化槽では吸着形態による検出が 80%を占めている。これは、糞便で排出された直後、ファージは大部分は吸着形態で存在するが、大～中型浄化槽の長大な管路を流下し槽内に経る間に破碎し、細分化され遊離形態になるものと思われる。



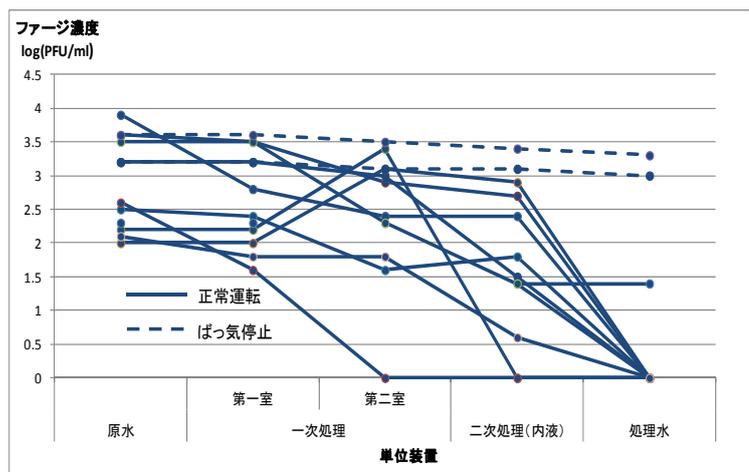
図一3 施設ごとのファージ濃度①



図一4 施設ごとのファージ濃度②

2) 単位装置間における大腸菌ファージ濃度の消長

次に浄化槽各単位装置におけるファージの濃度の消長を調査した(図一5)。一次処理におけるファージには際立った減少はみられず、増加に転じる施設もあるなど除去という性能はあまりないものと思われる。なお、一次処理装置によるファージの減少は、循環装置が無い浄化槽では減少率が低くなることから、これは循環水による槽内ファージの希釈による減少が考えられる。一次処理以降をみると、正常運転時(ばっ気がされている場合)二次処理内液中でも流入比



図一5 単位装置におけるファージの消長

平均 7%程度まで大幅に減少し、二次処理通過後の処理水ではほぼ 0%となった。また、二次処理装置が停止している場合（ばっ気停止）では、処理水でも流入比 54%のファージが残存していることから二次処理における好気処理が除去に重要な役割を果たしているといえる。

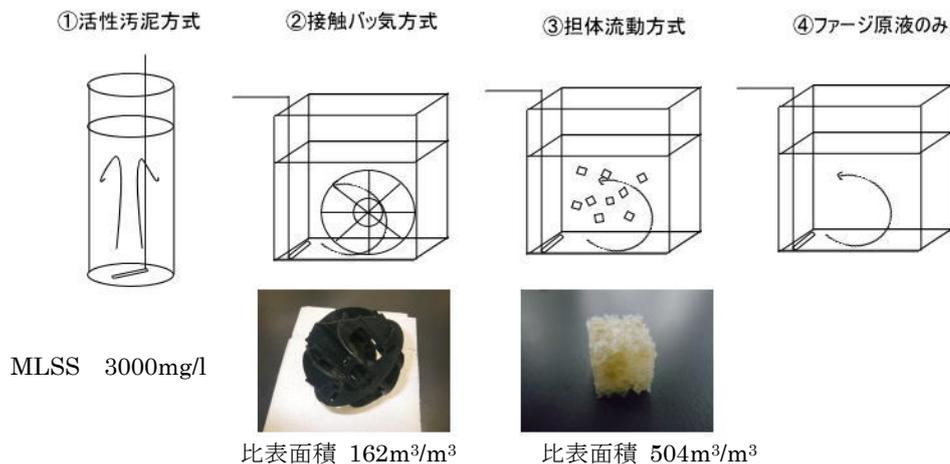
4. 実験槽による好気処理方式別でのファージ消長(調査2)

浄化槽単位装置間におけるファージ消長の調査で好気処理での減少が顕著に現れるため、実際の浄化槽で用いられている処理方式ごとの実験槽を作成した。そこにファージ液を投入し、その減少過程を調査した。

(1) 実験槽の種類と実験方法

実際の二次処理装置と近い条件を満たすように以下の BOD 面積負荷、ばっ気強度を設定した(図—6)。水温は 20℃とした。

- ① 活性汚泥法(MLSS 3000mg/l)
- ② 接触バツ気法(BOD面積負荷 4.7g/m³・日、ばっ気強度 3.3m³/m³・時)
- ③ 担体流動法(BOD面積負荷 9.4g/m³・日、ばっ気強度 15m³/m³・時)
- ④ ファージ原液のみ



図—6 二次処理装置モデル

これに、人工下水(ペプトン 12g、グルコース 6g、リン酸二水素カリウム 0.85gを蒸留水 1Lに溶解した人口下水を流入濃度BOD200mg/lに調整したもの)を用いて一定の処理性能まで馴養運転を行ったのち調査した。なお、投入した汚水の初期ファージ濃度は宿主菌*e.coli* K-12 F⁺ A/lで 1.4×10⁴ PFU/ml、また、*e.coli* DH5で 8.2×10² PFU/mlである。

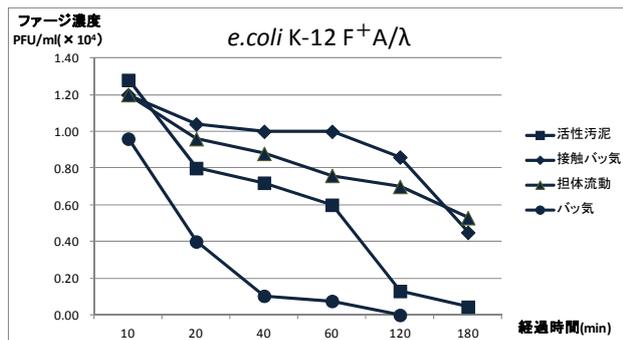
(2) 定量方法

3. (2) の定量方法と同じである。

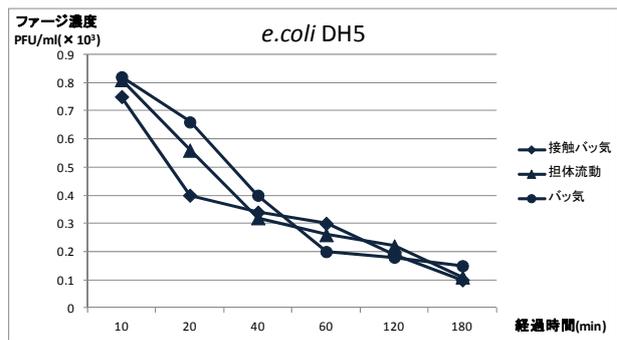
(3) 実験結果

ファージ液投入後のファージ消長の結果が以下である。*e.coli* K-12 F⁺ A/lを宿主菌とした結果(図—7)をみると各処理方式においてファージの減少が見られるものの活性汚泥法に比べ生物膜法による減少は非常に緩慢であった。また、ファージ原液のみのバツ気によるファージ濃度の減少がもっとも著しいという結果が見られた。

また、異なる宿主菌 *e.coli* DH5 における結果(図—8)でも検出オーダーは低いものの同様に緩やかな減少が見られる。特に、投入初期段階 10、20min で急速に減少し、その後は緩やかに減少していく傾向があった。



図一七 好気処理方式別のファージ消長①



図一八 好気処理方式別のファージ消長②

5. まとめ

今回の調査においては、大腸菌ファージが浄化槽の使用条件にかかわらず、様々な濃度で流入していることが分かった。しかしながら、し尿が流入主体の浄化槽ではファージが検出されないなど、いまだ調査が必要な点があるといえる。これは次回への課題としたい。また、実験槽におけるファージの除去調査では各処理方式でもファージの減少は確認できたが、生物処理を介さないファージ液のみをばつ気した際の減少のほうが大きいという結果になった。水中におけるファージの消長は、好気度で左右されるという報告があり、また嫌気上では宿主菌とともに再度増殖するなどの性質がある。生物膜法上、表層が好気でも深部は嫌気となっている事が多く、それがファージの消長に影響を与えていると考えられる。それについても合わせて調査する必要があると思われる。いずれにしても、ファージの除去に対しては好気的な処理が重要であることが今回の調査で分かった。また、十分な好気処理の効果を与えるためにも一定の滞留時間が必要であり、二次処理での完全な除去を目指すのであれば十分な滞留時間の確保も必要であるといえる。

今回の調査においてウイルス指標として一般的に身近に存在する大腸菌ファージを用いた。近年、感染性胃腸炎を引き起こしている病原性ヒト腸管ウイルスなどの挙動を調査するのであればそのウイルスそのものを直接定量し調査すればいいのだが、一般的に練度や感染リスクを有し、また費用なども多く掛かる。大腸菌ファージを用いた方法では多くの水系に適用することができ、検出も簡便である。実際のウイルスとの関連についてはいまだ未知数なところが多いが、それを見出すためにも、これら知見の集積が重要と思われる。今後も継続してその挙動を調査していきたいと思う。

6. 謝辞

本調査において、青森大学薬学部の上家勝芳博士には実験株 *e.coli* DH5 の分与をはじめ、実験法などをご教授して頂きました。また、広島県保健環境センターより貴重な写真資料を提供して頂きました。ここで、謝意を表します。

7. 参考文献

- 1)大垣眞一郎・橋本光雄(浄化槽研究 1989)；生活環境水系中に存在する大腸菌ファージの定量
- 2)神子直之・山本和夫・大垣眞一郎(環境工学論文集 第 31 巻 1994)：大腸菌ファージを用いた水のウイルス的安全性の管理手法
- 3)海野肇・金台東・浅見和弘(水処理技術 1996)：ヒト腸管系ウイルスの廃水処理系における挙動
- 4)金子光美(平成 6 年度 科学研究費補助金一般研究 C)：浄化槽におけるウイルスの除去・制御