

都市沿岸海域における水系感染性ウイルスの測定

Determination of enteric viruses in urban coastal sea water

環境工学研究室 田中愛、大瀧雅寛

Ai TANAKA, Masahiro OTAKI

1. はじめに

我が国では、細菌由来の水系感染症は大幅に抑制されているが、原虫やウイルス等によるリスクが顕在化している。しかしながら、環境水中に存在する水系感染性ウイルスは非常に低濃度であることなどから、測定が困難であり環境水中におけるウイルスの挙動を示す十分な知見が得られていないのが現状である。本研究ではウイルス汚染の状況を調査するため、沿岸海域において採水を行い、海水から高いウイルス回収率を得るとの結果が得られているウイルス濃縮手法「陰電荷膜吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法」¹⁾を用いて試料を濃縮し、水系感染性ウイルスであるエンテロウイルスを測定した。同時にその他の指標微生物を測定した。

2. 実験方法

稲毛海岸(千葉県)、台場・葛西(東京都)、江ノ島西浜・東浜(神奈川県)の5地点において、2001年2月から2002年1月まで合計61試料の採水を行った。各試料に対して、指標微生物、ウイルス、残留塩素、水温、pHを測定した。TABLE1に採水地点、採水日を示す。

2.1 指標微生物測定法

指標微生物として大腸菌群、糞便性大腸菌群、FRNAフェージを測定した。前者二項目は、デスオキシコートレイト培地を用いた重層寒天法により測定し、FRNAフェージは宿主に *Salmonella typhimurium* WG49 を用いたブラック法²⁾により測定した。指標微生物測定の際は、海水試料は前処理なしで測定に供した。

2.2 海水の処理方法

海水 2L を HA 膜 (ミリポア社、口径 90mm、孔径 0.45 μ m) に通し、ウイルスを吸着させた。その後、pH3 の希硫酸溶液 200ml を洗浄液として膜に通した。誘出工程では、pH10.5 程度の 1mM NaOH 溶液 10ml を同じ膜に通し、濾液を回収して中和した。本手法はこれまでに海水 1L を原水とした場合には添加したポリオウイルスの約 70% を回収している。¹⁾ 手法の概要を Fig.1 に示す。この濃縮液を、遠心式フィルターユニット (ミリポア社製、Centriprep Concentrator 50) で 2 次濃縮した。

2.3 Cell Culture PCR

2 次濃縮した試料 300 μ l に BGM 細胞の細胞維持液 700 μ l を加えて 1ml とし、BGM 細胞に接種した。RT-PCR を行う前にこの操作を行うことで、ウイルスの感染力の有無を検出することができる。2 日間培養後、上澄みを回収し、核酸抽出を行った。核酸抽出キットは SepaGene RV-R(三光純薬)を用い、付属の説明書の短時間法に従った。抽出後の最終容量は 12.5 μ l とし、DNase I 処理を行った後、直ちに逆転写反応を行った。逆転写後の総量 30 μ l のうち 5 μ l を PCR による検出に用いた。従って以上の操作において、1 検体あたり約 300~400ml の海水を検査していることになる。TABLE 2 に、用いたプライマーおよび TaqMan プローブの塩基配列を示す。PCR 後の判定は、TaqMan プローブの蛍光強度およびアガロースゲル電気泳動により行った。

TABLE 1. Sampling Site and Date

Site	Date (02/2001~01/2002)							
Inage	01/2/27	3/29	4/29	6/29	7/4	7/12	7/18	
	8/2	8/9	8/16	8/24	9/6	10/30	11/22	
	12/12	02/1/16						
Kasai	01/2/27	3/29	4/29	6/29	7/4	7/18	8/2	
	8/16	9/6	10/30	11/15	12/12	02/1/16		
Daiba	01/2/27	3/29	4/29	6/29	7/4	7/12	7/18	
	8/2	8/9	8/16	8/24	9/6	10/30	11/15	
	11/22	12/12	02/1/16					
*Enoshima	01/2/28	7/25	8/30	9/13	10/24			
	11/28	12/19	02/1/16					
	※Nishihama and Higashihama							

TABLE 2. Base Sequences of primer and probe for Enterovirus

Virus	
Name	Base Sequences 5' → 3'
Pantentero+	CCTCCGGCCCCCTGAATG
Pantentero-	ACCGGATGGCCAATCCAA
TaqMan Probe	(FAM)CCGACTACTTTGGG'] CCGTGTTC(TAMRA)'

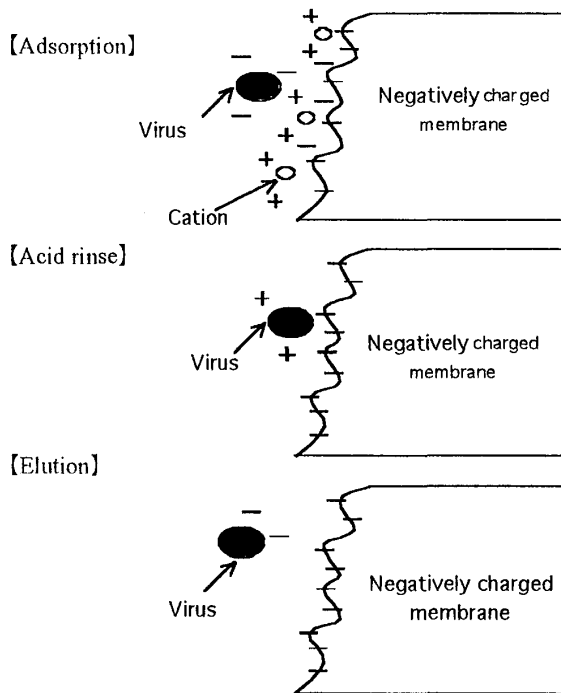


Fig. 1 Concentration method

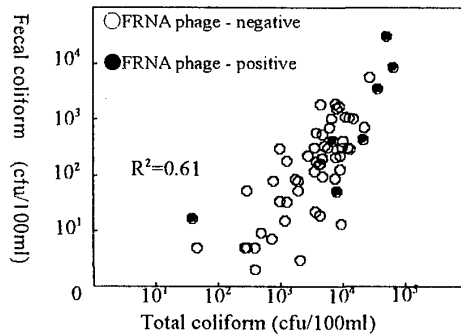


Fig.2 Results of determination of indicator microorganisms

結果と考察

Fig. 2 に全採水地点の指標微生物数の関係を示す。大腸菌群は糞便性大腸菌群の約 100 倍であった。FRNA ファージは大腸菌群・糞便性大腸菌群が高濃度の時に検出される傾向にあった。TABLE 3 に各地点における測定結果を示す。採水期間中、全試料においてエンテロウイルスは検出されなかった。2000 年度においては同様の手法を用いて、夏季の江ノ島でエンテロウイルスが検出されている¹⁾。エンテロウイルスは夏季に流行が見られることが分かっている。Fig. 3 より、2000 年度における患者からのエンテロウイルス分離報告数が、2001 年度の約 2 倍であった。このことから、ウイ

ルスの挙動は疫学的知見と一致し、指標微生物とは関係が見られない可能性があるということが示唆された。

今後も定期的な採水を行い、ウイルスおよび指標微生物に関するデータを蓄積する必要があると言える。

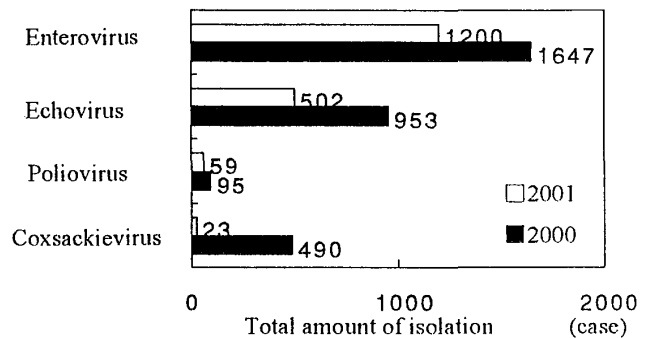


Fig. 3 Annual report of enterovirus isolation from human sources³⁾

謝辞

本研究のため、実験室、機器等を使わせて頂き、実験に協力頂いた東京大学大学院工学系研究科都市工学科の大垣教授、片山講師を始め皆様の配慮に感謝致します。

参考文献

- 1) Katayama *et al.*, Development of a Virus Conc. Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Sea Water, *Appl. Environ. Microbiol.*
- 2) ISO 10705-1, Water Quality-Detection and Enumeration of Bacteriophages Part1
- 3) Agents Surveillance Report, National Institute of Infectious Diseases

既発表論文

- 1) 飲水量について—アンケート調査の結果から(2000)第 3 回日本水環境学会シンポジウム講演集,p159-158—0.1p
- 2) パルスキセノンランプ及び低圧ランプによる水中微生物不活化速度の比較評価(2000) 第 37 回環境工学フォーラム講演集,p73-75—0.1p
- 3) ウイルスの分類について(2001)生活工学研究 Vol.3,No.2—0.1p
- 4) 沿岸海域における腸管系ウイルスと指標微生物の測定(2002)第 36 回日本水環境学会年次講演集(2002 年 3 月発表予定)—0.1p
- 5) 年沿岸海域における水系感染性ウイルスの測定(2002)生活工学研究 Vol.4,No.1—0.1p(本稿) 合計 0.5p

Table3. Result of determination enteric virus and indicator microorganisms

Site	Tot.colif. (cfu/100ml)	Fecal colif. (cfu/100ml)	Detection rate of virus	
	Ave.(Min.-Max.)	Ave.(Min.-Max.)	01/2001~02/2002	08/2000~01/2001 ※ 1)
Inage	8400(40-51200)	2600(2-32000)	0/16	No Data
Kasai	9800(2000-36000)	700(13-3500)	0/13	0/4
Daiba	10000(730-68000)	960(7-8100)	0/16	0/4
Nishihama	6000(400-22600)	280(5-710)	0/8	2 / 6
Higashihama	3800(300-12700)	100(5-300)	0/8	2 / 6