

第 375 回雑誌会

(July. 13, 2022)

(1) Evaluation of a virus concentration method based on ultrafiltration and wet foam elution for studying viruses from large-volume water samples

Fores.E., Rusinol.M., Itarte.M., Puchol.S.M., Calvo.M., Mas.S.B

Science of the Total Environment, 829, 154431, (2022).

Reviewed by R.Nakamura

ウイルス感染症の多くは、未処理または不適切に処理された下水放流水との曝露によって生じる。ウイルスは、水環境中に極低濃度で存在する。そのため、検出・定量のために大量の水を高濃度に濃縮することが必要である。本研究では、多様な水環境中からウイルスを高濃度に濃縮することを目的として、Wet Foam Elution 技術を利用した、LVC(large volume concentration)法の特性を評価した。LVC 法とは、デットエンド限外濾過(DEUF)と、溶出液中にあらかじめ CO₂ を注入しておく Wet Foam Elution 技術を組み合わせたもので、微生物の抽出過程で CO₂ が粘性の強いマイクロバブルを形成し、マイクロバブルとフィルター表面との接触面積が液体のみの場合と比較して、著しく向上するため、数秒で高濃度の溶出液を得ることができる技術である。また、LVC 法の二次濃縮には、遠心限外濾過(CeUF)を行った。回収率はウイルス(HAdV, PhiX174, MS2, CVB5)をスパイクすることで、プラーク法と PCR 法によって評価した。最適溶媒の決定後に海水 (50 L)、地下水 (100 L)、および河川水 (10 L) に対して本法を適用した。

LVC 法における最適な溶媒を決定するために、Tris 溶出液と PBS 溶出液を比較した。Tris 溶出液の各ウイルス回収率は、HAdV:19.2%, CVB:155.9%, PhiX174:270.9%, MS2:106.0%であった。また、PBS 溶出液の各ウイルスの回収率は、HAdV:2.1%, CVB:135.7%, PhiX174:27.2%, MS2:107.3%であった。そして、平均回収率から Tris 溶出液を最適な溶媒として選択した。LVC 法によって、原水 10L を 20~75mL に濃縮することが可能であった。次に、LVC 法後に二次濃縮(LVC+CeUF)を行い、既存のスキムミルク凝集法(SMF 法)と比較をした。LVC+CeUF における MS2 の回収率は、 $22.91 \pm 12.47\%$ であった。SMF 法では MS2 の回収率は $8.97 \pm 0.07\%$ であった。LVC+CeUF は、SMF 法よりも高い MS2 回収率を示した。LVC+CeUF 法によって、原水 10L を 200~300 μ L に濃縮することが可能であった。海水、地下水、河川水に対して LVC+CeUF 法を適用したところ、HAdV が、海水で $2.14 \sim 2.39 \times 10^2$ Genome Copies/L, 地下水で $4.67 \sim 4.67 \times 10^2$ GC/100L, 河川水で $2.33 \times 10^1 \sim 3.47 \times 10^3$ GC/L で存在した。実環境中に存在するウイルスを検出することが可能であった。本法で得たウイルスゲノムは、遺伝子解析にも適用可能であり、環境サンプルから多数のウイルスが確認された。以上のことから LVC 法は、ウイルスゲノムを高感度に検出・定量することが可能である。

(2) 塩分と太陽光が下水由来の指標微生物の消長に及ぼす影響評価

鈴木元彬, Chomphunut Poopipattana, 古来弘明

土木学会論文集 G(環境), Vol.76, No.7, III_411-III_421, (2021).

レビュー:石丸剛士

東京港沿岸地域では、降雨時に未処理下水がそのまま公共用水域に流出する可能性があることから、合流式下水道雨天時潮流水 (Combined Sewer Overflow) が問題となっている。CSO による糞便汚染を測る指標として、主に大腸菌や腸球菌、糞便性大腸菌群が使用されており、太陽光や塩分濃度は、指標微生物の消長に影響する。しかし、下水由来の指標微生物の塩分と太陽光による不活化影響について国内での調査研究事例がない。そこで本研究では、東京港に処理水を放流する下水処理場の流入下水を対象に 3 種類の指標細菌類 (大腸菌、糞便性大腸菌群、腸球菌) と 2 種類のウイルスの指標 (F 特異大腸菌ファージ、体表面吸着ファージ) について塩分と太陽光による不活化影響を調査した。明条件では、0, 5, 10, 20PSU の 4 段階の塩分濃度を設定した。暗条件では、0, 10, 20PSU の 3 段階の塩分濃度を用意した。そして、各条件において、24 時間おきに計 6 回採水し、指標微生物濃度を測定した。光は、太陽光に近いメタルハライドランプ (波長域 300-800nm) を一定の強さで照射した。大腸菌と腸球菌はクロモカルトコリフォーム培地法、糞便性大腸菌群はデソキシコーレート培地法で 24 時間培養後、コロニーを計数した。F 特異大腸菌ファージは *Salmonella typhimurium* WG49 を用いた単離法で計数した。体表面吸着ファージは、*E.coli* WG5 を用いた重層法で、プラークを計数した。また、不活化影響については、不活化係数を算出し、各細菌、条件ごとの実験結果を用いた重回帰分析を行って、判断した。

その結果、光のない暗条件では F 特異大腸菌ファージのみ、塩分濃度の増加とともに濃度が減少した。一方で、大腸菌や糞便性大腸菌群は濃度の増加傾向も見られ、植種源とした下水に含まれる溶存有機物などの基質による増殖の影響も観察された。また、明条件での実験では、体表面吸着ファージを除く 4 つの指標微生物で太陽光による不活化が確認された。中でも大腸菌や糞便性大腸菌群、F 特異大腸菌ファージは、塩分濃度が高いほど不活化の影響が大きかった。今回の実験によって、塩分影響下での太陽光による不活化の影響の大きさは、大腸菌>糞便性大腸菌群>腸球菌>F 特異大腸菌ファージ>>体表面吸着ファージであることがわかった。指標ごとに塩分や太陽光による不活化影響が異なることから、糞便汚染の把握において複合して指標を測定する意義が示唆された。CSO の影響を大きく受けた沿岸水域では、不活化だけでなく有機基質濃度に依存した増殖も考慮する必要性が考えられる。