

## *B. fragilis* ファージの指標性に関する研究

### *Application of Bacteroides fragilis phage as an alternative indicator of sewage pollution*

森田重光

麻布大学大学院環境保健学研究科

Shigemitsu Morita

Graduate school of environmental health, Azabu university

**Abstract.** Knowledge of the level of water pollution by viruses and protozoa is important for risk assessment. However, it takes high level techniques and a long time to quantify these microorganisms. Hence, we examined whether *Bacteroides fragilis* phage, easy to quantify and regularly detected in raw sewage, can be used as indicator organisms for viruses and protozoa.

Adenovirus, Sapovirus, Cryptosporidium, Giardia, and *Bacteroides fragilis* phage in raw sewage flowing into a waste water treatment plant and in the effluent were quantified to determine correlations between the concentrations. The analysis found that the concentrations of *Bacteroides fragilis* phage were correlated with those of Adenovirus, Cryptosporidium, and Giardia and the result suggested that *Bacteroides fragilis* phage can be used as indicators for the microorganisms.

In addition, removal rates by the waste water treatment were calculated from the concentrations of the microorganisms in the raw sewage and the effluent. The calculation showed a correlation between the removal rate of Adenovirus and that of *Bacteroides fragilis* phage.

Although the present scarcity of available data does not warrant a definitive conclusion, *Bacteroides fragilis* phage seems to be able to serve as an indicator for Adenovirus.

#### 1. 研究の目的

ウイルス及び原虫による水環境の汚染レベルや下水処理による除去率を知ることはリスク評価上重要であるが、これらの微生物を定量するためには高度な技術と長時間を要する分析作業が必要である。これまでにF特異大腸菌ファージや体表面吸着大腸菌ファージの糞便汚染に対する指標性などが検討されているが、これまでの研究から、これらのファージには指標性がないと考えられている。

そこで、我々は定量が容易で下水中から定常的に検出される *Bacteroides fragilis* ファージのウイルス (Adenovirus, Sapovirus) 及び原虫 (Cryptosporidium,

Giardia) に対する指標性について検討した。

#### 2. 方 法

##### 2.1 試料

標準活性汚泥法で処理している下水処理場で流入下水（または最初沈殿池出口水）と放流水を採取した。流入下水は4 L、放流水は42 L採取した。なお、放流水中には塩素が含まれることから、試料採取時にチオ硫酸ナトリウムで塩素を中和した。

##### 2.2 微生物の定量

###### 2.2.1 ウイルス

下水試料、養豚場排水試料及び環境水試料の一次

濃縮は、陰電荷膜吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法を用いた。すなわち、各試料に対し終濃度 25 mM となるように  $\text{MgCl}_2$  を添加した後、セルロースアセテート混合エステル製メンブレンフィルター（孔径  $0.45\ \mu\text{m}$  ; Millipore）を用いて吸引ろ過をおこない、水中のウイルスをフィルターに吸着させた。続いてそのフィルターを 0.5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 3.0) を用いて洗浄し、最後に 1 mM NaOH (pH 10.8) 10 mL を用いてフィルターに吸着したウイルスを遠沈管内に誘出した。遠沈管内には中和液として 50  $\mu\text{L}$  の 100 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  及び 100  $\mu\text{L}$  の 100x Tris-EDTA をあらかじめ入れておいた。なお、濁質の多い流入生下水、最初沈殿池出口水、養豚場排水処理水及び一部の環境水試料は初めに GF/D (Whatman) を用いてろ過し、そのろ液を一次濃縮に供した。さらに、より濁質の多い養豚場排水流入水は 3,000 rpm で 15 分間遠心分離の後、上清を GF/F (Whatman) を用いてろ過し、そのろ液を一次濃縮に供した。

1 次濃縮の結果得られた濃縮液 10 mL は遠心式フィルターユニットである Centriprep YM-50 (Millipore) を用いた 2 次濃縮に供した。1 次濃縮液の全量をサンプルコンテナに移し 3,000 rpm で 10 分間遠心の後、ろ液を捨て、さらに 3,000 rpm で 5 分間遠心して 1 mL を得た。

つづいて、濃縮液中のウイルス核酸を QIAamp DNA mini kit (Qiagen) あるいは QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) のスピンプロトコールに従って抽出した。いずれの試料も DNA 抽出供試量は 200  $\mu\text{L}$ 、RNA 抽出供試量は 140  $\mu\text{L}$  であり、それぞれ抽出液 200  $\mu\text{L}$  及び 60  $\mu\text{L}$  を得た。RNA 抽出液 60  $\mu\text{L}$  のうち、10  $\mu\text{L}$  を逆転写反応液 10  $\mu\text{L}$  と混合した。

本研究では TaqMan PCR 法を用いて AdV40/41 DNA, SaV cDNA 及び HEV cDNA の検出をおこなった。定量は 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

## 2.2.2 原虫

流入下水を入れたポリタンクを転倒させながら試料を十分に混合した後にポリプロピレン製遠沈管（以下遠沈管）8 本に 50 mL ずつ分注し、ここにトレーサー懸濁液を 625  $\mu\text{L}$  ずつ添加してボルテックスミキサーで攪拌した。その後、遠心分離（1,500  $\times g$ ,

15 分間、4  $^{\circ}\text{C}$ ）し、上清 25 mL をアスピレーターで吸引除去した。

放流水は試料を入れた各タンクにトレーサー懸濁液を 5 ~ 10 mL ずつ添加し、よく混合した後、その全量を酢酸セルロース製外圧型中空糸限外ろ過膜モジュール (DAICEN MEMBRANE-STSTEMS, LTD) へ加圧ポンプを用いて通水しろ過した。ろ過後、モジュール内の液量が 100 mL 程度になるまで空気を圧送し、残った溶液を用いて膜表面に捕捉された物質を洗浄した。そして、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した。その後、モジュール内へカプセル誘出液を約 100 mL 注入して振盪洗浄し、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した。さらにモジュール内に精製水を約 100 mL ずつ 2 回に分けて注入し、その洗浄液を 2 本の遠沈管に分注した。これらの操作で得られた計 8 本の遠沈管を遠心分離し、沈渣を 2 本の遠沈管にまとめた。そして再び遠心分離し、上清を吸引除去して 1 本の遠沈管に沈渣をまとめた。

試料中に存在する *Cryptosporidium* オーシストや *Giardia* シストは夾雑物に吸着あるいは抱合されている可能性があるため、流入生下水及び放流水を出力 300 W の超音波洗浄機 (ULTRASONIC GENERATOR, SHARP 製) に 3 分間かけて、夾雑物からオーシスト及びシストを遊離させた。

超音波処理を行った試料を直ちにボルテックスミキサーで攪拌した後、内径 2 mm のシリコンチューブを先端につけたシリンジを用いて各遠沈管の底へシヨ糖溶液（比重 1.20）を全量が 50 mL となるまで慎重に注入し界面を形成させた。これらの遠沈管を遠心分離した後、液面から界面下 7.5 mL までの溶液をシリコンコーティングしたパスツールピペットを用いて新しい遠沈管に分取した。これに PBS (+) を加えて全量を 50 mL とした後、遠心分離して上清を吸引除去する操作を繰り返す、シヨ糖を除去した。

精製した試料をボルテックスミキサーで良く攪拌した後、複数枚（1 試料につき十数枚程度）のセルロースアセテート製メンブレンフィルター（孔径  $3.0\ \mu\text{m}$ , 直径 25 mm, ADVANTEC TOYO 製）を用いて吸引ろ過した。フィルターの縁には撥水ペン (DAKO Pen DAKO 製) を用いて円を描き、さらにその内側に直径約 1.5 cm の円を描いた。試料をろ過した後、10 mL の PBS で洗浄し、半数のフィルターに

0.4  $\mu\text{g/mL}$  DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride n-Hydrate) 染色液を100  $\mu\text{L}$  滴下した。反応時間は3分間とし、その後2 mLのPBSで洗浄した。

全てのフィルターにPBSで3倍希釈した *Cryptosporidium*, *Giardia* 用直接染色抗体試薬 (Easy Stain™ C & G FITC, BTF, LTD) を80  $\mu\text{L}$  滴下し、暗所、室温、湿潤条件下で45分間反応させた。反応後、2 mLの洗浄液 (Easy Stain™ Fixing Buffer) で洗浄し、30%及び90%エタノール-グリセリン溶液をそれぞれ500  $\mu\text{L}$  ずつ吸引してフィルターを脱水した。脱水後、フィルターを2% DABCO (1,4-Diazabicyclo [2,2,2] octane) グリセリン封入剤を滴下したスライドガラスにのせ、カバーガラスをかけてプレパラートとした。

ノマルスキー微分干渉装置付き落射蛍光顕微鏡 (BX-60, OLYMPUS 社製) を用いてプレパラートにした試料を観察した。まず、B励起光下200倍で観察し、アップルグリーン色の蛍光を発する4~6  $\mu\text{m}$  あるいは9~15  $\mu\text{m}$  の類円形または楕円形の蛍光粒子を検索した。該当した蛍光粒子は400倍及び1,000倍の微分干渉像で *Cryptosporidium* オースストあるいは *Giardia* シストであるか否かの判定を行った。

#### 2.4 *Bacteroides fragilis* ファージ

BPRM (*Bacteroides* Phage Recovery Medium) 寒天の上に、溶解したssBPRM培地2.5 mLにつき1 mLの試料を添加してよく攪拌した溶液を重層した。そして36℃の嫌気ジャーの中で44時間培養し、プラー

クを計数した。

#### 2.5 除去率の算出

生下水中の微生物濃度と放流水中の微生物濃度の比から除去率を算出した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 ウイルス濃度

流入下水中のAdenovirus及びSapovirus濃度を図1に示す。AdenovirusもSapovirusも冬期に高い傾向を示したが、放流水については特に季節的な傾向は見られず、データの多くが検出下限値以下の値であった。

流入下水中のAdenovirus及びSapovirus濃度を図2に示す。*Bacteroides fragilis* ファージ濃度とAdenovirus濃度との間には相関 ( $r^2 > 0.90$ ) が認められたが、Sapovirus濃度と*Bacteroides fragilis* ファージ濃度との間には相関が認められなかった。

データ数が少ないので断定的な結論はだせないが、*Bacteroides fragilis* ファージはAdenovirusの指標となる可能性があると考えられる。

#### 3.2 原虫濃度

流入下水中の*Cryptosporidium* オーススト及び*Giardia* シスト濃度を図3に示す。冬期(1, 2月)に欠測となったため季節変動について言及することは困難であるが、*Cryptosporidium* オースストも*Giardia* シストも11月から12月にかけて増加し、3月から5月にかけて減少していることから(流入下水中の4

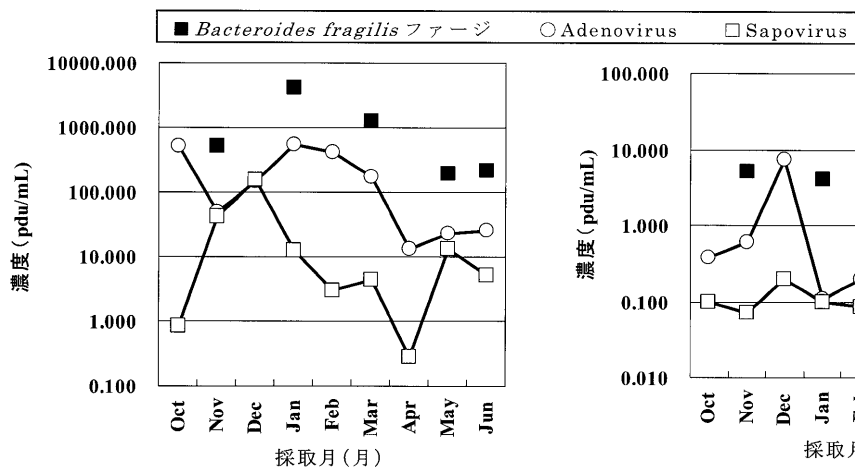


図1 流入下水中のウイルス濃度

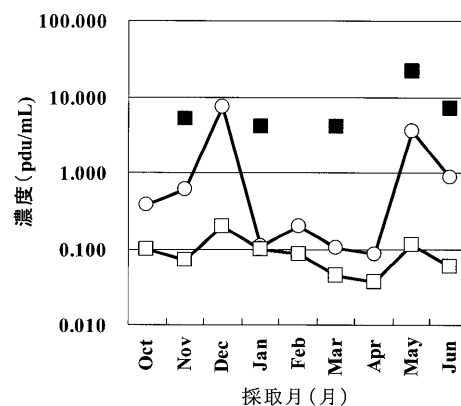


図2 放流水中のウイルス濃度

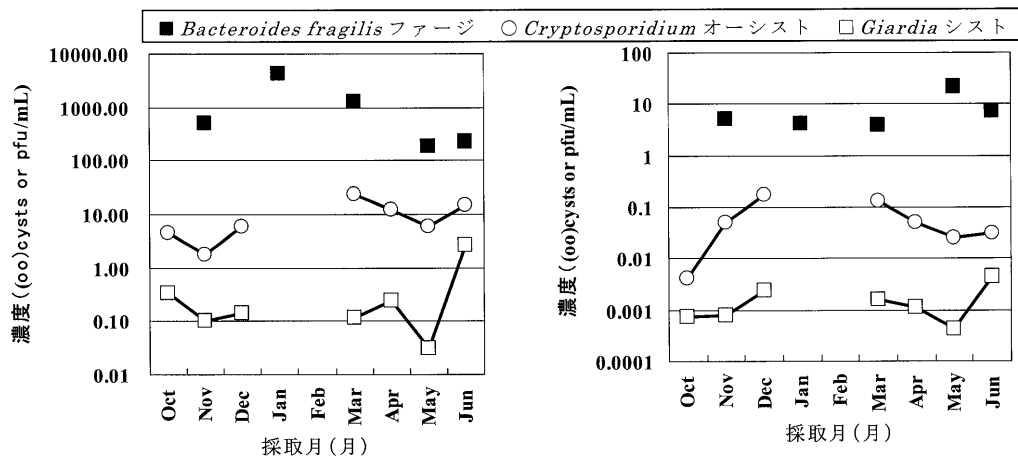


図3 流入下水中の原虫濃度

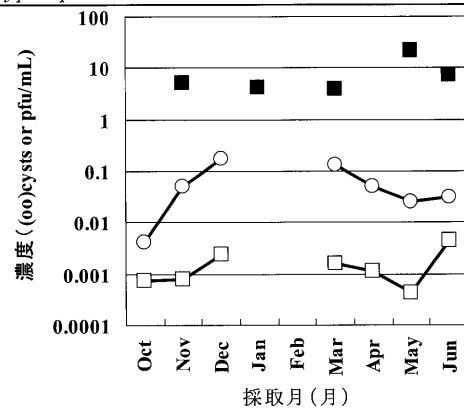
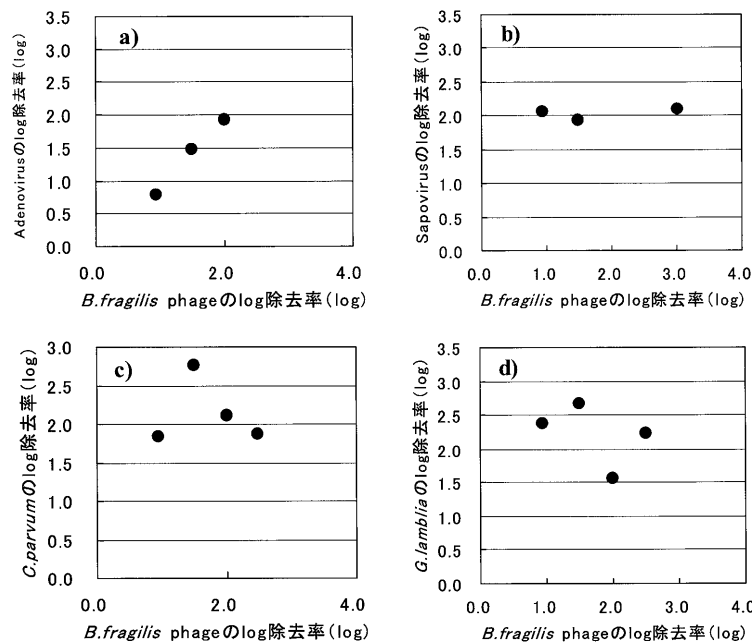


図4 放流水中の原虫濃度

図5 *Bacteroides fragilis* ファージの log 除去率と原虫、ウイルスの log 除去率との関係、a) vs. Adenovirus, b) vs. Sapovirus, c) vs. *Cryptosporidium* オーシスト, d) vs. *Giardia* シスト

月の *Giardia* シスト濃度を除く) 冬期に高くなる可能性がある。

放流水中の *Cryptosporidium* オーシスト及び *Giardia* シスト濃度を図4に示す。流入下水と同様に冬期(1, 2月)に欠測となったため季節変動について言及することは困難であるが, *Cryptosporidium* オーシストも *Giardia* シストも10月から12月にかけて増加し, 3月から5月にかけて減少していることから冬期に高くなる可能性がある。

流入下水中の *Bacteroides fragilis* ファージ濃度と *Cryptosporidium* オーシスト濃度, *Giardia* シスト濃度

との間には相関 ( $r^2 > 0.90$ ) が認められたが, 放流水中の濃度では相関が認められなかった。

ウイルスの場合と同じくデータ数が少ないので断定的な結論はだせないが, *Bacteroides fragilis* ファージ濃度は流入下水中の *Cryptosporidium* オーシスト及び *Giardia* シスト濃度の指標となる可能性があると考えられる。

### 3.2 除去率

下水処理による *Bacteroides fragilis* ファージの除去率とウイルス, 原虫の除去率との関係を図5に示す。

*Bacteroides fragilis* ファージの除去率と Adenovirus の除去率との間に相関が見られた。この結果から下水処理による *Bacteroides fragilis* ファージの除去性は Adenovirus に近いものと考えられる。

#### 4. 要 約

環境水中におけるウイルス及び原虫濃度、下水処理によるウイルス及び原虫除去に関する *Bacteroides fragilis* ファージの指標性を評価したところ現在まで

に以下の知見が得られた。

1. 流入下水中の Adenovirus, Cryptosporidium オースト, Giardia シストの指標となりうる。
2. 下水処理による除去性は Adenovirus に近いものと考えられる。

#### 参考文献

- Rosa, A. *et al.*, *J. Virol. Meth.*, 93, 127-136 (2001)  
Anonymous, ISO/DIS 10705-4 (1999)