



Title	大腸菌ファージ測定法に関する一考察
Author(s)	角田, 智子; 品田, 司; 田畑, 信一
Description	第3回衛生工学シンポジウム (平成7年11月9日 (木) -10日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 2 測定・評価 . 2-2
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 3, 95-100
Issue Date	1995-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7890
Type	departmental bulletin paper
File Information	3-2-2_p95-100.pdf



2-2 大腸菌ファージ測定法に関する一考察

(株)西原環境衛生研究所 ○角田 智子
品田 司
田畑 信一

1. はじめに

現在、水の衛生学的評価として、一般細菌や大腸菌群などが測定されている。しかし、近年、水系ウイルスが注目されはじめ、その測定に際し、比較的検出の容易な代替指標として大腸菌ファージ（以下 コリファージ）を用いる試みがなされてきている。

しかし、河川水などの自然環境水や下水の高度処理水などには、その存在量が少ないと予想される。コリファージを、水の衛生学的評価の指標として用いるためには、定量性が問題となろう。

これまでに、コリファージの測定法について、2, 3の知見を得たので、その結果を報告する。

なお、調整水の実験で用いたコリファージおよび実験に用いた宿主の大腸菌は、ファージQβ（以下、Qβ）と、E. coli k-12 F⁺(A/λ)である。これらは、東京大学工学部 大垣眞一郎教授から分与いただいたものである。

2. 実験概要

- 1) 水処理評価指標としてのコリファージの妥当性を検討した。精製水を用いて作製した、リン酸緩衝液（pH7）中にQβを添加（約10⁸ PFU/ml）し、これを試験水として、塩素（NaClO）添加、紫外線照射、オゾン酸化、紫外線併用オゾン酸化、膜ろ過処理の5方式による処理を行った。その処理水中のQβ濃度を寒天重層法（PGYC培地）¹⁾により測定し、残存率を求めた。
- 2) 下水高度処理水等のコリファージ濃度が希薄な水の評価することを目的として、寒天重層法よりも試料水を多く用いる、直接ブラック法²⁾による測定法の検討を行った。
- 3) 下水二次処理放流水は、試料の濃度を調整せずに、そのままコリファージの測定が可能（560～2600 PFU/100ml）であるが、河川表流水（表-1）や、紫外線照射やオゾン酸化、膜ろ過処理などの高度処理を施した下水では、コリファージ濃度が希薄となるため（例：図-1 下水二次処理放流水の紫外線照射処理と微生物量）、直接ブラック法でも正当な評価が難しいので、試料水の濃縮操作が処理性評価には必要となる。

表-1 河川水中のコリファージ数
(例：UF膜ろ過装置より採水)

試料	コリファージ濃度
流入原水	Av. 36 (PFU/100ml)
逆洗排水	Av. 48.5 (PFU/100ml)
循環水	8~33 (PFU/100ml) Av. 19.7 (PFU/100ml)
透過水	0 (PFU/100ml)

そこで、Qβの濃縮方法の検討を、セルロース吸着・凝集法³⁾、陽電荷フィルター法（膜孔径0.45μm、直径47mmの陽電荷平膜、吸引ろ過、誘出液：3%ピ-フェキストラクト）、MF膜ろ過法（ニトロセルロース系平膜、直径20mm、膜孔径0.01μm、N₂ガス加圧200kPa、誘出液：3%ピ-フェキストラクト）、UF膜循環法（ホリエーテルスホン中空糸、膜表面積0.26m²、分画分子量150,000 Dalton、試験水溶媒：3%ピ-フェキストラクト）の4方法について行った。

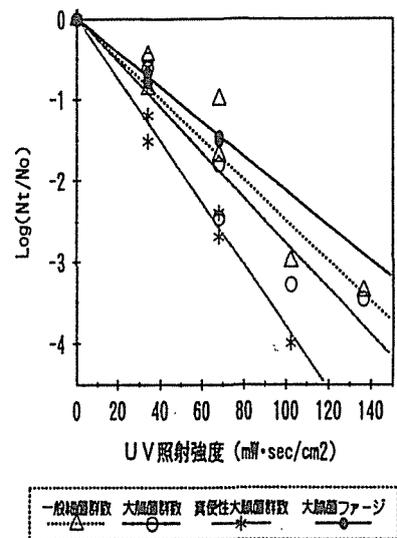


図-1 紫外線照射量と微生物量

3. 結果

1) 水処理評価指標としてのコリファージの妥当性

Qβ試験水に5種の処理を各々行い、処理の前後でQβ濃度を測定した結果(図-2~4)、膜ろ過処理を除いた各処理水中のQβの残存率について、それぞれの処理条件に応じたほぼ連続的な値が得られた。これは、一般細菌や大腸菌群と同様の不活性化傾向を示しており、コリファージが水処理方法の指標となり得ることを示していると考えられる。

膜ろ過処理では、使用した膜の孔径と処理水中のQβ残存率との間に明確な関係は見られず、Qβの大きさ(約0.02μm)以下の公称孔径(0.01μm)の膜においては捕捉率が100%となった。しかし、浦瀬等⁴⁾はUF膜(分画分子量が20,000~40,000 Dalton)でもQβが透過してしまうことを指摘しており、膜処理法の処理性評価にコリファージを指標として用い得るかは、更なる検討が必要である。

2) 直接ブラック法によるコリファージの測定

1)と同様に調整したQβ試験水を用いて、直接ブラック法と寒天重層法でQβ数を測定した結果、直接ブラック法は寒天重層法とほぼ同等の値を示し、直接ブラック法が寒天重層法と同様に用いられることが分かった。直接ブラック法は、サンプル量が100ml(10ml/7°レト, 107°レト合計値)であり、寒天重層法(最大量は、5ml/7°レト, 107°レト平均値)に比べて定量性の向上を図ることが出来る。

3) コリファージの濃縮法

直接ブラック法でも正当な処理性評価が難しい濃度の希薄な試料水において、コリファージの濃縮・回収操作の検討を以下の4種について行った。

3)-1 セルロース吸着・凝集法での濃縮実験

上水試験方法に記載されている、セルロース吸着・凝集法を準用して行った。この方法では、濃縮回収率が平均1%程度と、非常に低い値を示した(表-2)。よって、この結果が、操作中のどこに起因するものなのかを調べるため、操作手順(表-3)を追って、セルロース添加量, 凝集剤添加率, 凝集剤選定, の各検討を行った。

表-2 セルロース吸着・凝集法濃縮結果

凝集剤	回収率(%)
アニオン系	0.75
"	0.65
"	1.32
"	1.06
"	0.38
"	0.87
"	3.70

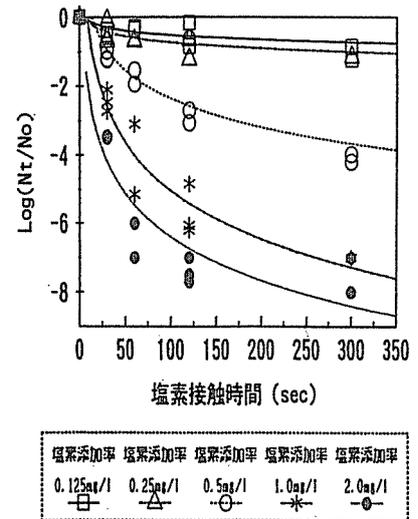


図-2 塩素接触時間とファージQβ残存率

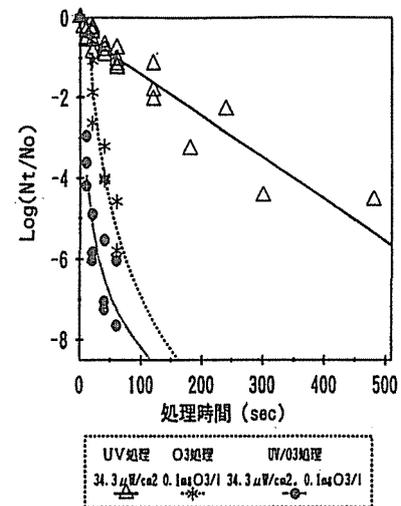


図-3 UV, O₃, UV/O₃処理における処理時間とファージQβ残存率

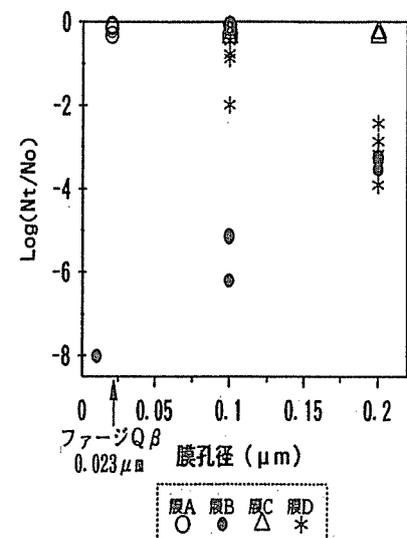


図-4 ろ過膜孔径とファージQβ残存率

表-3 セルロース吸着・凝集法手順

- ①. 試料水の採取 (20ℓ)
- ②. DEAE-セルロース約50ml添加
- ③. ナイロンブラシによる攪拌 (約15秒)
- ④. 凝集剤5～8ml程度加える (セルロースの凝集状況を見ながら)
- ⑤. ナイロンブラシによる攪拌 (約15秒)
- ⑥. セルロースの回収 (ナイロンメッシュで検液を1～2分程度かけてろ過)
- ⑦. 自然脱水 (約3分間)
【適当な密閉容器に納め、保冷して試験室に搬入】
- ⑧. セルロースをよく絞り、絞り液を3,000×g, 10minで遠心
- ⑨. 沈さとセルロースを合わせる。
- ⑩. 10mlの誘出液 (3%ビーフェキスを加え、よく揉みほぐしてQβを誘出)
- ⑪. 0.45μmの除菌フィルターで、誘出液をろ過。
(ろ過が困難な場合は、あらかじめ遠心分離)
- ⑫. 1/10N 塩酸でpH7に調整。
- ⑬. 以上の操作を終えたものをQβ分離試験用検液として重層法により測定

3)-1-1 セルロース添加量の検討実験

セルロースの添加量が、Qβの吸着率にどの程度影響を及ぼすのかを検討した。

Qβ試験水にセルロースを添加し、攪拌。試料を3,000×g, 10minで遠心分離。上清を重層寒天法によりファージ数測定。

サンプル水に対して 0～3,000mg/ℓのセルロース添加率の範囲で行った結果 (表-4)、600mg/ℓ以上の添加を行えば、Qβの濃度に関係なく吸着率は100%となった。

3)-1-2 凝集剤添加率の検討実験

セルロース添加量の検討結果より、セルロースを600mg/ℓ添加し、上水試験方法の通り、アニオン系高分子凝集剤を0mg～5mg/ℓ添加してQβの吸着率を検討した。

Qβ試験水に、セルロースを添加し、攪拌。次に、凝集剤を加え、攪拌。試料を3,000×g, 10minで遠心分離。上清を重層寒天法によりファージ数測定。

結果 (表-5) は、凝集剤添加率が1～5mg/ℓの範囲で、吸着率が50%程度にとどまった。セルロースのみの添加では、吸着率が100%に達しており、アニオン系凝集剤によって、ファージの吸着阻害が起きていると考えられた。

3)-1-3 凝集剤の選定実験

Qβを吸着したセルロースを凝集させるのに、アニオン系以外の凝集剤を用いて、それぞれの吸着率をみる実験を行った。

実験方法は、3)-1-2と同様に行った。

吸着率は、カチオン系凝集剤がほぼ100%程度、ノニオン系が約70%、アニオン系が50%強の値となった (表-6)。しかし、回収操作を続けて行った場合、回収率はどの凝集剤でも3%未満と、低い値となった。

表-4 セルロース添加量の検討結果

セルロース添加率 (mg/ℓ)	Qβ濃度 (PFU/ml)	吸着率 (%)
0(Qβ原水)	21	—
300	9	57
600	0	100
900	0	100
1500	0	100
0(Qβ原水)	1780	—
300	14.3	92
600	0	100
1200	0	100
3000	0	100
0(Qβ原水)	36300	—
300	0	100
600	0	100
1200	0	100
3000	0	100

表-5 凝集剤添加率の検討結果

凝集剤添加率 (mg/L)	Qβ濃度 (PFU/ml)	吸着率 (%)
0(Qβ原水)	794	—
0.5	466	41.3
1.0	331	58.3
2.0	279	64.9
5.0	406	48.9

表-6 凝集剤の選定結果

凝集剤	吸着率 (%)	回収率 (%)
強アニオン	54.1	—
"	64.4	—
ノニオン	62.7	—
"	79.0	—
低カチオン	100	—
"	97.9	0
"	100	0.07
中カチオン	100	0
"	97.5	—
"	100	—
"	97.8	0.33

セルロース凝集法について、セルロース添加量の検討、凝集剤添加率の検討及び凝集剤の選定実験を行った結果、吸着率を100%とする操作条件を得ることが出来た。しかし、回収率は悪く、セルロースに吸着させたQβの誘出方法を改善する必要があることが分かった。

3)-2 平膜によるろ過濃縮実験

3)-2-1 メンブレンフィルターを用いた濃縮実験

孔径 0.01 μmの膜を用いて、Qβ試験水のろ過を行った。表-7に示すようにQβの濃縮回収率は、平均で 19.8%、最高値で 28% という結果が得られた。また、誘出液中へのQβの回収を促進させるために、超音波をかける試みを行った。しかし、誘出液への回収率は、4.6% と更に低い値であった。この誘出率の低下の要因として、超音波によるウイルスの不活性化が考えられた。

表-7 膜孔径 0.01 μmのメンブレンフィルターを用いた濃縮結果

サンプル名	Qβ個数	回収率(%)
Qβ原水	1100000	—
Qβ誘出液	268000	24.4
Qβ原水	175000	—
Qβ誘出液	12500	7.1
Qβ原水	45000	—
Qβ誘出液	12600	28.0

セルロース吸着・凝集法に比べ、回収率は上がったが、その向上は十分とはいえなかった。

3)-3 陽電荷フィルターを用いた濃縮実験

上水試験方法に記載されている、ウイルスの陽電荷フィルターによる濃縮法を準用して、Qβの濃縮を試みた。その結果(表-8)、ろ過速度 100ml/min以下 においてフィルターを二枚重ねた場合、吸着率は、ほぼ100% となったが、回収率は、2%以下 と非常に低かった。よって、誘出液調整の検討を行った。

誘出液の塩濃度を 1, 5, 10% とし、誘出時間を 2, 3, 10, 20分として組み合わせの実験を行ったところ、誘出液の塩濃度 5%、誘出時間 10分で、回収率約 20%という高い値が得られた(表-8)。

しかし、この方法の問題点として、誘出液による振とう誘出の際、フィルターのはく離がある。これは、ファージのプラーク形成数に誤差を生じさせる可能性が高いので、検討が必要である。

表-8 ゼータプラスフィルターを用いた濃縮結果

ゼータプラスフィルター 使用枚数 (Qβろ過数)	ビーフェキス 成分条件	誘出時間 (分)	吸着率 (%)	回収率 (%)
2枚 (2*10 ⁵ 個ろ過)	—	2	100	—
2枚 (9*10 ⁵ 個ろ過)	3%, pH9, 1% NaCl	2	94	0.2
3枚 (2*10 ⁵ 個ろ過)	—	2	100	—
3枚 (9*10 ⁵ 個ろ過)	3%, pH9, 1% NaCl	2	100	0.2
2枚 (1*10 ⁵ 個ろ過)	3%, pH9, 1% NaCl	10	—	13.7
"	" , 5% NaCl	10	—	16.4
"	" , 10% NaCl	10	—	15.1
2枚 (1.8*10 ⁴ 個ろ過)	3%, pH9, 1% NaCl	2	95	0.0
"	"	10	95	0.1
"	3%, pH9, 5% NaCl	2	95	3.3
"	"	10	95	10.3
1枚 (6.7*10 ⁴ 個ろ過)	3%, pH9, 5% NaCl	3	—	16.9
"	"	10	—	25.0
"	"	20	—	17.3
"	3%, pH9, 5% NaCl	3	98	16.7
"	"	10	98	19.8
"	"	20	98	17.0
"	3%, pH9, 10%NaCl	3	98	10.8
"	"	10	98	12.7
"	"	20	98	17.4

3)-4 UF膜循環法

右図に示した装置（膜面積 0.26 m²）で、循環水量 3.5 l/min, 膜入口圧力 0.2kg/cm², 膜出口圧力 0.18kg/cm², 透過水量 0.5 l/min, の条件のもとで、濃縮槽内水量が常に300ml となるよう運転した。運転は逆洗を、透過水量約5 lごとに行い、原水タンクが空になった時点でコックAを閉じ、同時にコックBを開け、濃縮槽内水量が50ml となったところで弁Cを閉じ、循環ポンプを止める。更に弁Dを閉じて透過水により逆洗を行い、濃縮槽内水量が300ml に達した時点で、逆洗ポンプを停止。次に、コックDのみを開けて循環ポンプを運転し、1分間濃縮液を循環後、サンプリングを行った。

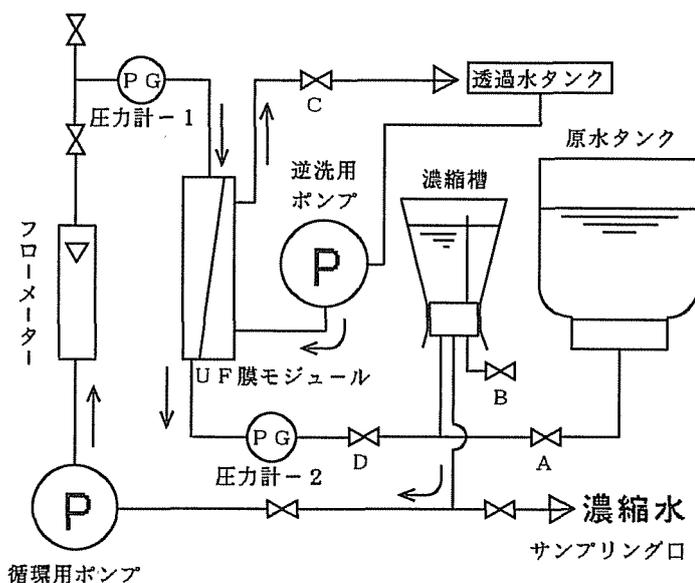


図-5 UF膜実験装置

0.03%ビーフェキスのQβ試験水 30 lを0.3 lに100倍まで濃縮した結果、ファージ濃縮度の値に多少ばらつきがあるものの、溶液濃縮倍率とファージ濃縮度の間で、ほぼ比例関係が得られた(図-6)。また、透過水にはファージが検出されなかった。UF膜循環法によるろ過濃縮方法は、前述の他の濃縮方法にはない、平均で80%程度の高い回収率が得られることが今回の実験から分かった。

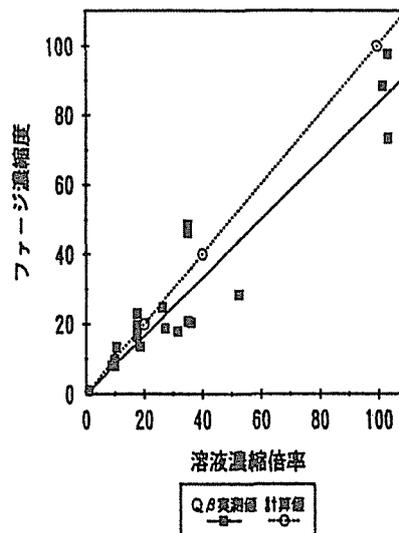


図-6 ビーフェキスQβ試験水の100倍濃縮実験ファージ濃縮度と溶液濃縮倍率

4. まとめ

- ① 調整水を試験水とした場合、塩素, UV, O₃, UV/O₃処理では、大腸菌や一般細菌と同様の不活性化傾向がみられた。以上のことから、これらの処理性の評価にコリファージを用いることが可能であると確認できた。
- ② 直接ブラック法は、寒天重層法とほぼ同じ値が得られ、寒天重層法の代替測定法となり得ることが分かった。
- ③ 下水高度処理水や河川水のようにコリファージ濃度の希薄水の評価においては、濃縮操作が必要となるが、セルロースや陽電荷膜に吸着したコリファージの誘出が困難であり、コリファージの濃縮方法については、UF膜循環法がよいことが分かった。
- ④ 実際の下水放流水や環境水などには、バクテリアやかび等が存在しており、そのため、コリファージの測定培養において、バクテリア等のコロニーが形成され、ファージ数の確認が妨害される場合がある。このような場合には、コリファージの濃縮操作を行うことにより、それらも濃縮されることになるため、ファージ数の確認が非常に困難となるので、なんらかの処理操作が必要となる。

以上のことから、コリファージの測定手順をフローチャートにすると、次のように示されるであろう。

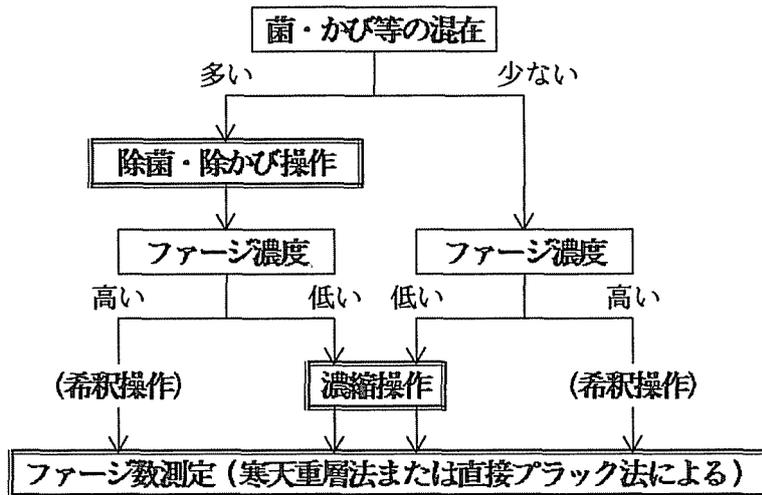


図-7 コリファージの測定手順

コリファージを水の衛生学的評価指標として用いるためには、今後の課題として、試料水中のバクテリア・かび等を除くための前処理操作、また、希薄な水を対象としての濃縮操作の確立が必要であると考ええる。

《参考文献》

- 1) 神子直之, 大垣眞一郎: ウイルス不活性化手法の大腸菌ファージによる評価, 環境微生物工学研究法, 技報堂出版 1993年版
- 2) Grabow, Coubrough: Practical Direct Plaque Assay for Coliphages in 100-ml Samples of Drinking Water, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1986, p. 430-
- 3) 上水試験方法 1993年版 p. 549-
- 4) 浦瀬太郎, 山本和夫, 大垣眞一郎: 限外ろ過膜ウイルス透過率に関する数値シミュレーション, 土木学会第47回年次学術講演会概要集p. 836-