

分担研究報告書 6

水中ウイルスの検査法に関する検討

分担研究者 片山浩之

分担研究報告書

「水中ウイルスの検査法に関する検討」

主任研究者 国包章一 国立保健医療科学院水道工学部

分担研究者 片山浩之 東京大学大学院工学系研究科

要旨

これまでに開発されているウイルス濃縮法について文献調査を行った。研究発表としては、ウイルスの測定法が培養法から PCR 法に移行しており、それに伴って新しいウイルス濃縮法が提案されている。また、PCR 法は比較的簡便な手法であり、水中ウイルスを広く測定することが可能であると考えられる。陰電荷膜を用いた酸洗浄法により、水道原水におけるウイルス濃度の実測が可能であり、大容量の浄水に対しては、陽イオン添加型酸洗浄法が有力な方法である。

A. 研究目的

水の安全性は、最終産物である水道水そのものの検査結果のみによって統計学的に確保するものでなく、HACCP（危害分析・重要管理点）の考え方に基づいて工程管理による安全性の確立を図るべきである。すなわち、消毒前の水あるいは浄水前の原水に含まれる可能性のあるウイルス濃度の分布についてデータを蓄積し、実施している消毒などの処理によるウイルス除去能を調べて安全性を確保することである。除去性能の評価と、濁度管理などの日常のモニタリングによってウイルス除去能を監視すること等により、安全を保つことができると考えられる。

浄水工程におけるウイルスの除去能、あるいは水道原水として用いている水の中に含まれるウイルス濃度の分布を調べることは、水道水の安全性を確保するために重要な情報となると考えられる。そのためには、水中ウイルスの測定法を確立する必要がある。

B. 研究方法

国内外の水中ウイルスに関する文献調査を行った。

C. 研究と考察

1) ウイルス濃縮法の開発の概略

ヒト腸管系ウイルスは、環境中では通常は低濃度であるため、水環境中のウイルスを測定するためにはウイルスを濃縮する必要がある。ウイルス濃縮法が満たすべき要件としては、1)さまざまな種類の大量の水を短時間で処理可能であること、2)測定対象のウイルスを安定した回収率と高い濃縮倍率で濃縮すること、3)簡便で経済的、4)凝集したウイルスや固体表面に付着しているウイルスも回収できること、が挙げられる。また、ウイルス濃縮のメカニズムが明らかであれば、安心して使用できると思われる。

古くは、ガーゼパッドを用いた方法が早くに開発されて (Melnick et al., 1954) 広く用いられてきた。河川水や下水処理水中にガーゼパッドを数日間放置しておいて回収し、アルカリ側に調整してパッドを絞ってウイルスを誘出する方法である。比較的少量の水に対する定性的な方法ではあるが、簡便さが魅力であり、現在

でも用途を限って使用されている。

その後、膜に吸着して誘出する方法が考案された (Cliver 1965)。水量に応じてスケールアップが可能であることや、ウイルスが極めて低濃度で存在する水に対しても適用可能なことや、膜ろ過液を回収することからウイルス濃縮液が無菌的であることなどから、ウイルス濃縮法の主流になってきている。目詰まりによりウイルス回収率が低下する問題などがあり、膜以外にもセルロース凝集法 (Yano et al., 1993) などが開発された。

セルロース凝集法は、親水化処理したセルロースをウイルスの吸着剤として用いる方法であり、矢野博士 (東京都立衛生研究所 当時) によって開発された (矢野ら、1986)。20L 程度の水にセルロースを投入し、攪拌の後、セルロースを回収する方法であるが、試料採取現場での作業が容易であるため、河川水等の調査には簡便な方法である。

膜を用いたウイルス濃縮法として、陽イオン添加と組み合わせた陰電荷膜法が開発され (Wallis et al., 1967)、その改良版ともいえる手法が次々と考案された。静電的に膜にウイルスを吸着させ、弱アルカリ性 (pH9.5 以下) のタンパク質系の有機物を含む溶液もしくは強いアルカリ (pH11.5) により吸着を阻害してウイルスを膜からはがして回収するという原理に基づく方法である (Gerba 1984)。

膜からのウイルス誘出液としてビーフエキス溶液を用いる方法 (Rao et al., 1969) が提案され、以後広く用いられるようになった。また、ビーフエキス溶液によってウイルスを回収した後、さらにウイルスを濃縮する方法として有機凝集法が開発され (Katzenelson 1976)、実用的なウイルス二次濃縮手法として広く用いられるようになった。

試料の前処理を必要としない濃縮法として陽電荷膜法が開発され (Sobsey and Jones, 1979)、アメリカ合衆国をはじめとして広く用いられるようになった。

従来のウイルス濃縮法は培養法によるウイルス検出を前提として開発されているため、特にビーフエキス溶液を用いた濃縮手法は必ずしも PCR 法によるウイルス検出に適した方法とはなっていない。そこで片山らが陰電荷膜を用いた酸洗浄法を開発し (Katayama et al., 2002, 片山ら、2002)、PCR 法と相性の良いウイルス濃縮法として提案している。また、原本らは大量の淡水試料からの濃縮法として、陽イオンを前もって陰電荷膜に添加する方法を開発し、水道水からウイルスを濃縮することに成功している (原本ら、2002, Haramoto et al., 2004)。

2) 水道において実用的なウイルス濃縮法

(ア) セルロース凝集法

陰イオン交換体である DEAE セルロースにウイルスを吸着させて、その後に誘出を行う方法である (Yano et al., 1993)。標準的には、容量 20L のポリエチレン容器に水試料を採取し、DEAE セルロースおよび凝集剤を適量入れて攪拌し、セルロースを凝集させてウイルスを捕集し、セルロースを不織布バッグでろ過して回収する。この段階で持ち運びが可能であるため、試料採取現場ではこの段階までを行う。不織布で回収されたセルロースから、弱アルカリ性のビーフエキス溶液を用いてウイルスを回収する。

この手法は、ウイルス濃縮を採水地点においても容易に行うことができるという利点がある。衛生試験法 (2000 年、金原出版) および上水試験方法 (1993 年、日本水道協会) にウイルス濃縮法として詳しく方法が説明されている。

(イ) 陽電荷膜法

陰電荷膜を用いる場合に必要な陽イオンの添加や pH の調整が不要で、中性の淡水試料を前処理不要で濃縮できる方法として陽電荷膜法が開発された (Sobsey and Jones, 1979)。この手法は、陰電荷をもつウイルス

を陽電荷をもつ膜に吸着させ、少量のビーフエキス溶液で誘出することによって濃縮するものである。陽電荷膜法の利点としては、操作の簡便性(=前処理が不要)に加えて、ろ過効率が陰電荷膜に比べて優れていること、回収率が高いこと、ウイルスの種類による回収率の違いが比較的小さいことなどが挙げられる。上水試験方法(1993年、日本水道協会)にウイルス濃縮法として詳しく方法が説明されている。

(ウ) 陰電荷膜を用いた酸洗浄法

陰電荷膜を用いたウイルス濃縮においては吸着に陽イオンを必要とすることから、誘出の前に陽イオンを除去するための洗浄工程の導入が試みられた(Katayama et al., 2002, 片山ら, 2002)。酸性の洗浄液を用いる酸洗浄では、ウイルスを不活化も誘出もせず、陽イオンを除去し、ろ過原水中に含まれていた阻害物質も誘出する可能性もある。

酸洗浄を導入した場合のウイルス濃縮法におけるウイルスの挙動を模式的に図1に示した。操作としては以下のことを行う。

吸着工程

水試料に 25mM となるように MgCl₂ を加え、陰電荷膜(ミリポア社、HA 混合セルロース、孔径 0.45um)に通す。

酸洗浄工程

pH3 の希硫酸溶液 200mL(47mm の平膜の場合)を膜に通す。

アルカリ誘出工程

ろ過ユニットに滅菌済み試験管を装着して、pH10.5 の水酸化ナトリウム溶液 5mL(47mm の平膜の場合)を膜に注ぎ、吸引圧をかけてろ液を回収する。ろ液を受ける試験管には、あらかじめ 0.1M H₂SO₄ 25μl と 100 倍 TE バッファー 50μl を入れておく。

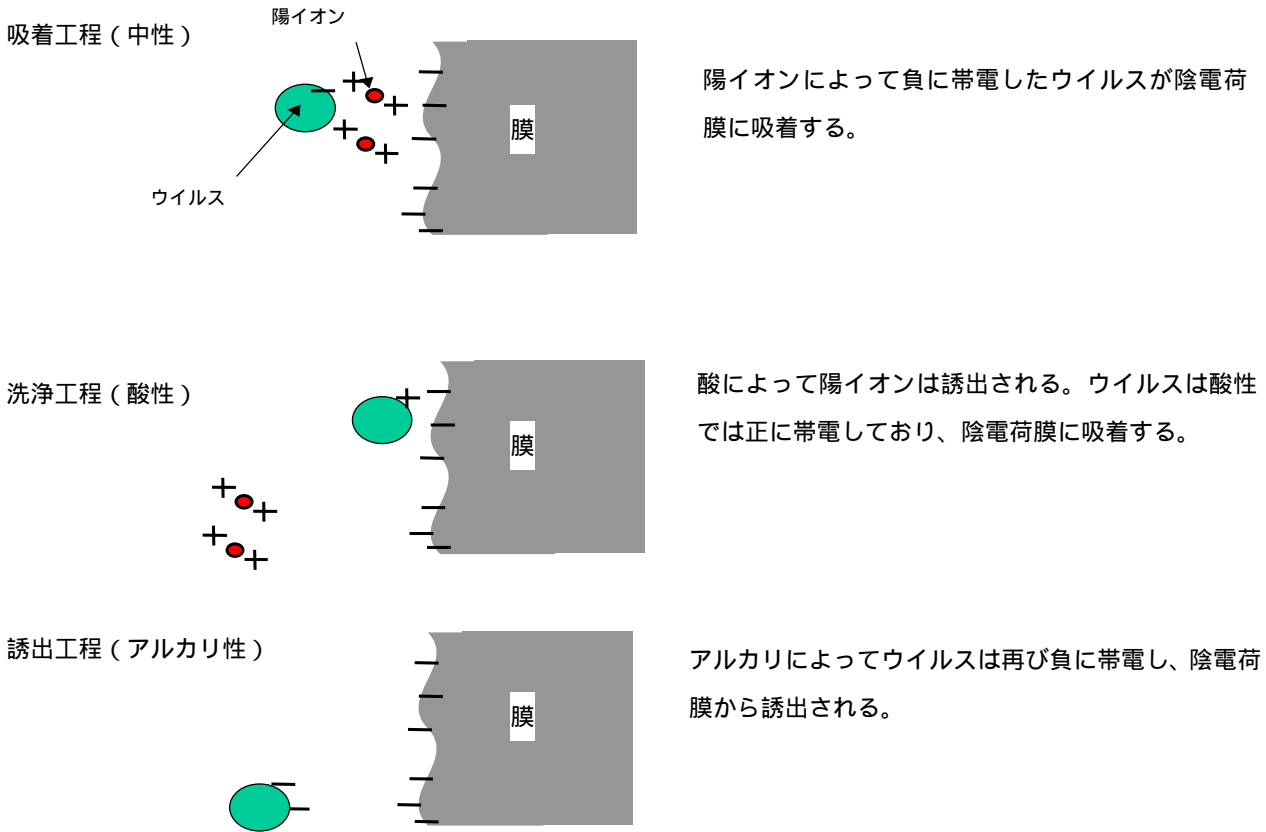


図1 酸洗浄の効果の説明

吸着工程において、陰電荷膜と陰電荷を帯びたウイルス粒子を陽イオンがつかないでいる。洗浄工程の酸性条件下ではウイルス粒子は陽電荷を帯びようになり、陽イオンは洗浄とともに流出していくと考えられる。また、陽電荷を帯びたウイルス粒子は、陰電荷膜に静電的相互作用で直接吸着しなおし、ウイルスはあまり誘出されない。酸洗浄に続く誘出工程において、アルカリ条件にすれば、ウイルス粒子は再び陰電荷を帯びることになるので、陰電荷膜から容易に誘出されると考えられる。

この手法は、誘出に無機アルカリ溶液を用いているため、後続の限外ろ過膜を用いた二次濃縮を容易に行うことができ (Katayama et al., 2002) そのまま PCR 法を用いたウイルス検出を行うことができるという優れた特長を持っている。また、ポリオウイルスを用いて回収率を評価した場合に、高い回収率を示した。

(エ) 陽イオン添加型酸洗浄法

酸洗浄法は、試料に陽イオンを添加する必要があるため、大量の水からウイルスを濃縮する際の操作性が課題として残っていた。そこで、多量の水試料からのウイルス濃縮を目的として、試料に添加する代わりに先に膜に陽イオンを添加する手法が開発された (原本ら、2002、Haramoto et al., 2004)。

この手法の概要を図 2 に示した。陰電荷膜に前もって塩化アルミニウム溶液を通すことにより、陽イオンを膜に吸着させて擬似的な陽電荷膜を形成する。次に、水試料をそのまま通すと負に帯電したウイルスは膜に吸着する。酸洗浄においては先に添加された陽イオンが膜から離れるが、ウイルスは正に帯電して陰電荷膜と直接吸着している。最後に、アルカリ溶液を通すことによりウイルスは負に帯電して陰電荷膜から離れて回収される。水道水および河川水を対象にポリオウイルスを用いてこの手法を評価した結果、十分に高い回収率を示した (原本ら、2002、Haramoto et al., 2004)。

以上のように、実際の水試料を対象とした場合にも十分に有効なウイルス濃縮手法であるといえる。今後の課題としては、より面積の広い膜の使用や目詰まり対策などによる最適化を行い、さらに大量の水に対しても適用可能にすることが望まれる。また、ノロウイルスやアデノウイルスなど、ポリオウイルス以外のウイルスを用いて回収率を評価することが望ましいと考えられる。

3) 培養法と PCR 法について

環境試料からウイルスを検出する手法は、細胞培養にウイルスを感染させてウイルスによる病変を観察する方法と、PCR をはじめとする分子生物学的手法によってウイルスの遺伝子を検出する方法がある。PCR 法による検出例は、1990 年代の後半に調査研究として広く行われるようになった。

PCR 法は、培養法に比べて感度が高いと言われているが、検査に供する水量が培養法の方が多いため、検出限界濃度はあまり差がないことも多い。また、ウイルスの種類によっては簡単に培養されない場合もあり、ノロウイルスの場合などのように PCR 法による検出しか検査方法がない場合もある。また、検査結果が得られるまでの時間については、PCR 法では 2 時間程度であるのに対し、培養法では短い方でも 1 週間程度を要する。

培養法による検出では、感染価をもつウイルスのみを検出するため、ウイルス陽性であるという検査結果とウイルスによる感染リスクとのあいだに明確な関連があると言える。一方、PCR 法による検査では、ウイルスが感染価を持たない場合でもウイルス陽性という検査結果を出してしまう可能性があるため、必ずしもウイルスによる感染リスクとの関係性が明確でない。特に、水道のように消毒を行った場合、PCR 法による測定では消毒の効果が検査結果に反映されないため、PCR 法による検査はあまり有効ではないと考えられる。

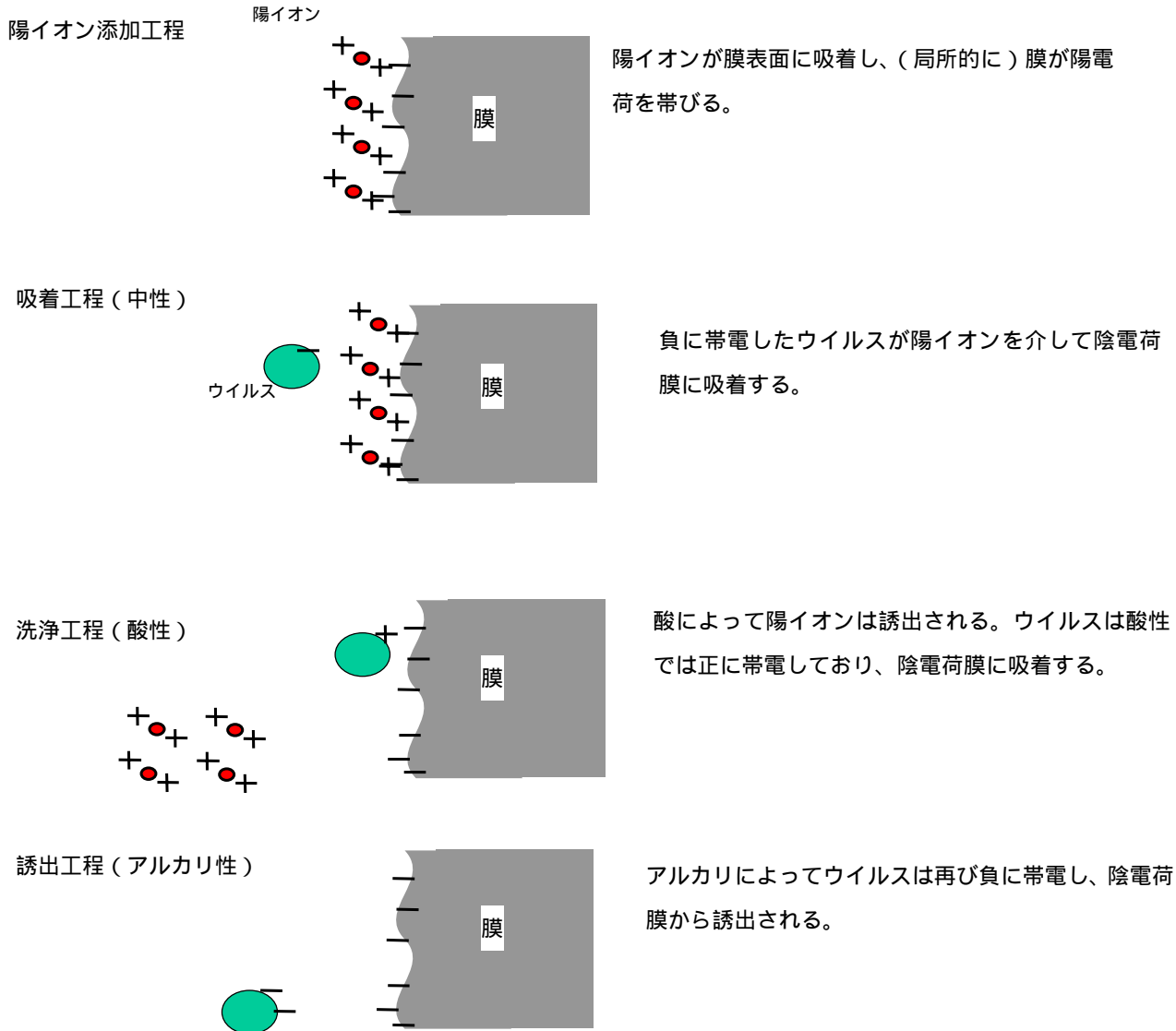


図2 陽イオン添加型酸洗浄法の説明

D. 結論

現在使われている有力なウイルス濃縮法として、1)セルロース凝集法、2)陽電荷膜法、3)陰電荷膜を用いた酸洗浄法、およびその変法である4)陽イオン添加型酸洗浄法について、それぞれに長所があり、目的に応じて使い分けることが望ましい。

近年の水中ウイルス測定の研究発表では、ウイルスの測定法が培養法からPCR法に移行しており、それに伴って新しいウイルス濃縮法が提案されているという背景もある。また、PCR法は比較的簡便な手法であり、水中ウイルスを広く測定することが可能であると考えられる。陰電荷膜を用いた酸洗浄法により、水道原水におけるウイルス濃度の実測が可能であり、大容量の浄水に対しては、陽イオン添加型酸洗浄法が有力な方法である。

E. 参考文献

Cliver D. O. (1965) Factors in the Membrane Filtration of Enteroviruses. *Appl. Microbiol.* 13: 417-425.

Gerba C. P. (1984) Applied and Theoretical aspects of Virus Adsorption to Surfaces, *Advances in Applied Microbiology*, 30, 133-168.

Haramoto E., Katayama H. and Ohgaki S. (2004) Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of

- a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Fresh Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2154-2160.
- Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S. (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Sea Water, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.
- Katzenelson E., Fattal B. and Hostovesky T. (1976) Organic Flocculation: An Efficient Second-Step Concentration Method for the Detection of Viruses in Tap Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 32, No.4, pp.638-639.
- Melnick J. L., J. Emmons, E. M. Opton and J. H. Coffey (1954) Coxsackie viruses from sewage, *Amer. J. Hyg.*, 59: 185-195.
- Rao N. U. and N. A. Labzoffsky (1969) A Simple Method for the Detection of Low Concentration of Viruses in Large Volumes of Water by the Membrane Filter Technique, *Can. J. Microbiol.* 15: 399-403.
- Sobsey M. D. (1974) Methods for Detecting Enteric Viruses in Water and Wastewater, In: *Viruses in Water*, G. Berg et al., Ed., American Public Health Association, Washington D. C.
- Sobsey M. D. and Jones B. L. (1979) Concentration of Poliovirus from Tap Water Using Positively Charged Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 37, No.3, pp.588-595
- Wallis C. and Melnick J. L. (1967) Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, *Jour. of Virology*, 1, pp.472-477
- Yano K., Yoshida Y., Shinkai T. and Kaneko M. (1993) A Practical Method for the Concentration of Viruses from Water Using Fibriform Cellulose and Organic Coagulant, *Wat. Sci. Tech.*, 27, No.3-4, pp.295-298.
- 原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2002) 水道水および河川水中の腸管系ウイルスのモニタリングを目的とした新しい濃縮法の開発、*環境工学研究論文集*、第 39 巻, pp355-364
- 片山浩之、嶋崎明寛, 大垣眞一郎 (2002) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発、*水環境学会誌*、第 25 巻、469-475.
- 矢野一好、林志直、藪内清、田口文章 (1986) 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 第五報 フィルターによるポリオウイルスの濃縮、*用水と廃水*, 28, pp.183-191.
- 日本薬学会 編 (2000) *衛生試験法・注解*、金原出版株式会社
- 厚生省生活衛生局水道環境部 監修 (1993) *上水試験方法*

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権等

なし