

新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水および水道水源調査への適用

かた やま ひろ ゆき
片山 浩之
Hiroyuki KATAYAMA

I. ウイルス濃縮法の開発の歴史

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1950年代に、ガーゼパッドを用いた方法(タンボン法)が早くに開発されて¹⁾ 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²⁾。

その後、膜に吸着して誘出する方法が1965年に考案された³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾、膜以外にも、ガラスパウダー法⁶⁾、磁鉄鉱

凝集法⁷⁾、VFF (Vortex flow filtration) 法⁸⁾、セルロース凝集法⁹⁾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¹⁰⁾。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。

それぞれに目的に応じた長所があるが、膜を用いたウイルス濃縮法に比べて処理水量は少ない傾向にある。

II. 膜を用いたウイルス濃縮法の変遷

まず、陽イオン添加と組み合わせた陰電荷膜法が開発された¹¹⁾。試料に0.05MとなるようにMgCl₂を加え、これをニトロセルロース系のHA膜(Millipore, 孔径0.45μm)に通してウイルスを膜に吸着させた後、少量の誘出液でウイルスを膜からはがして回収するものである。つづいて、その改良版ともいえる手法が次々と考案された。異なる材質の陰電荷膜を用いる方法や、試料に陽イオンを添加する代わりにpHを3.5まで下げて膜に通すことによりウイルスを吸着する手法が考案され¹²⁾、380Lの水道水に適用された。また、誘出にはpH11.5のグリシン緩衝液を用いている。

これらの濃縮法の原理は以下のように説明されている。ウイルス粒子は中性域ではマイナスに帯電していることが多く、2価以上の陽イオン存在下もし

くは pH5 以下で陰電荷膜によく吸着すること、およびタンパク質系の有機物が多い場合にはあまり吸着しないという現象を利用する。すなわち、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方法である¹³⁾。

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¹⁴⁾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¹⁵⁾、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、Sobsey ら¹⁶⁾によって 1979 年に陽電荷膜法が開発され、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¹⁷⁻¹⁹⁾。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。陽電荷膜からの誘出においては、誘出液がアルカリ性であることから、ウイルス粒子は誘出操作時に陽電荷を帯びていることはなく、膜とウイルスが反発し合う静電状態を作っているとは考えられない。誘出機構は、ビーフエキス中に含まれる有機高分子によるウイルス吸着の競争阻害であると考えられるが¹³⁾、実態としてはウイルスの回収率を経験的に最適化した手法であると見ることができる。

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。これらの利点から、最も有力なウイルス濃縮法と考えられている。しかしながら、水中の塩濃度が高い場合にはウイルスが膜にあまり吸着しないことが知られており²⁰⁾、海水に対してはウイルスの回収率が低くなるという傾向がある。

Ⅲ. PCR 法とウイルス濃縮法の相性

水中ウイルスの測定法として、ウイルスゲノムを PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で増幅して検出する方法が 1990 年代から広く用いられるようになってきた。PCR 法でウイルスを検出する際の利

点は、1) 実験操作が感染危険性から見て安全であること、2) 実験操作が簡単であること、3) 実験結果が短時間で得られること、4) 検出感度が高い^{21, 22)}こと、などが挙げられる。また、培養ができないノロウイルスなどを対象とする場合には、PCR 法が唯一利用可能な測定方法である。

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、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。培養してウイルスを検出する場合は 1mL 程度の液量を用いることができるが、PCR 法では 200 μ L 程度から遺伝子を抽出して用いるため、ウイルスをさらに濃縮する必要がある。誘出液としてよく使用されるビーフエキス溶液の二次濃縮には、酸を加えて沈殿させる方法¹⁵⁾が有力であるが、PCR に対する阻害作用が見られる²³⁾。そこで、ゲルろ過により低分子の有機物を除去する²⁴⁾方法、ポリエチレングリコール (PEG) およびタンパク質凝集を組み合わせる方法²⁵⁾、グアニジンを用いた RNA 抽出法²⁶⁾、抗原抗体反応を用いた精製法²⁷⁾など、さまざまなウイルス精製法が開発された。

しかしながらこれらの方法は操作が煩雑であり、各段階においてウイルスを回収しきれない可能性がつきまとう。さらに、これらの方法でウイルス検出阻害は克服できても、ウイルス濃縮に対する阻害物質への対策にはなっていない。ビーフエキス溶液を用いた濃縮手法は PCR 法によるウイルス検出に適した方法ではないといえる。

Ⅳ. 新しいウイルス濃縮法 (酸洗浄法) の開発

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、ろ過原水中で陰電荷を帯びたウイルス粒子のまわりに陽イオンがくっつき、その陽イオン-ウイルス粒子複合体が吸着工程で陰電荷膜に吸着していると考えられる¹³⁾。また、誘出工程にはアルカリ性の誘出液を用いることが多いが、アルカリ条件下ではウイルス粒子は陰電荷を帯びており、陽イオン-ウイルス粒子複合体が維持されていると考えられる。そこで、誘出工程の前に陽イオン-ウイルス粒子複合体を分解することを目的とした洗浄工程の導入を検討した^{28, 29)}。酸性の洗浄液を用いる酸洗浄では、陽イオン-ウイル

ス粒子複合体を構成している陽イオンに加えて、ろ過原水中に含まれていた阻害物質も誘出する可能性がある。また、ウイルスを不活化しないことおよびウイルスを誘出しないことも、洗浄工程の必要条件である。

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。

①吸着工程

淡水からウイルスを濃縮する場合は、25mM MgCl₂を加え、膜に通す。海水からウイルスを濃縮する場合は、MgCl₂を添加する必要はない。

②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。

③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50μL

を入れておく。

吸着工程において膜とウイルス粒子を陽イオンがつかないでいる。酸洗浄では、吸着工程において陰電荷を帯びていたウイルス粒子は、洗浄工程の酸性条件下では陽電荷を帯びるようになり、陽イオン-ウイルス粒子複合体は分解され、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す可能性が高く、ウイルスはあまり誘出されないと期待できる。酸洗浄に続く誘出工程において、アルカリ条件にすれば、ウイルス粒子は膜と同じ陰電荷を帯びることになるので、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、限外ろ過膜を用いた二次濃縮を容易に行うことができ、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、精製水のみならず海水からも高い回収率を示した。たとえば、東京湾の海水に存在するノロウイルスがこの手法により検出された²⁸⁾ことか

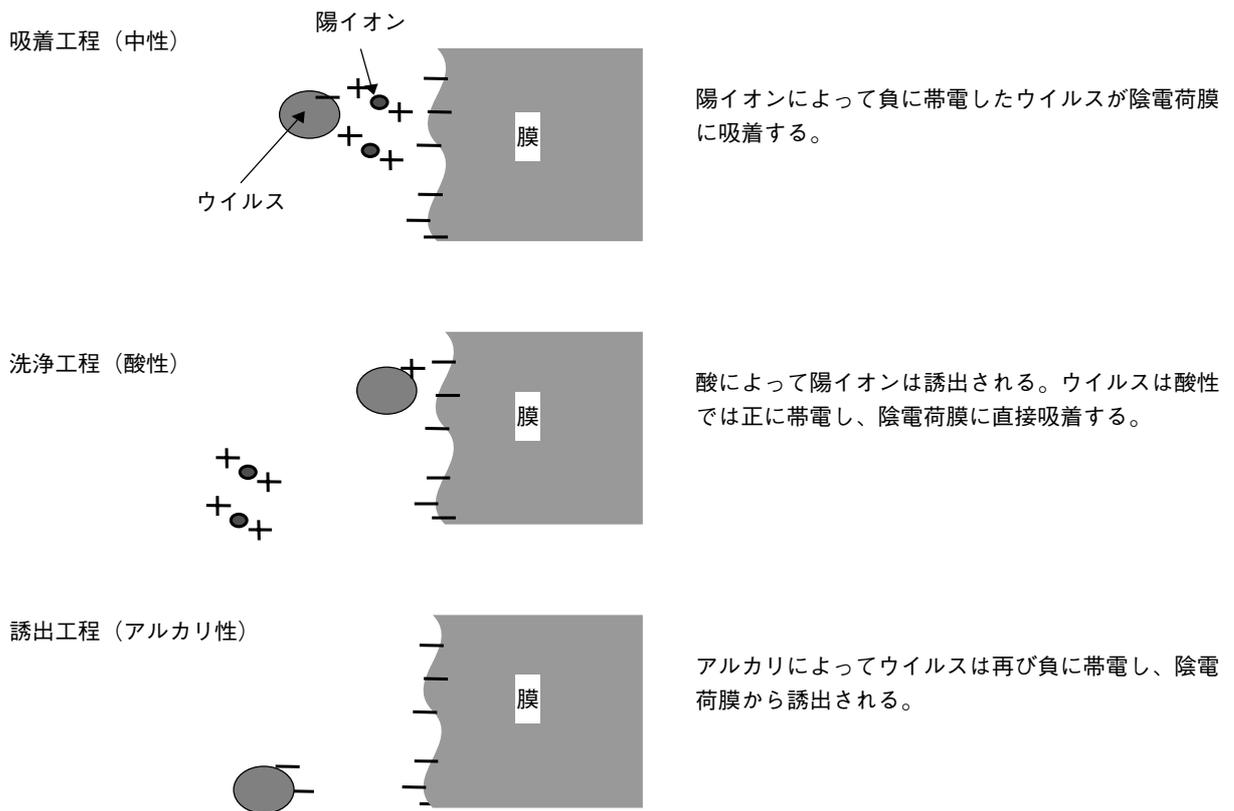


図1 酸洗浄の効果の説明

ら、この手法は海水に適用可能であると同時にPCR法によるウイルス検出にも適した方法であることが示された。

V. 大量の水からウイルスを濃縮する方法

酸洗浄法は、陽電荷膜法の二つの弱点、すなわちPCR法との相性が悪いことおよび海水からのウイルス回収率が低いことを克服しているが、試料に陽イオンを添加する必要がある。そのため、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を開発した^{30, 31)}。

開発した手法の概要を図2に示した。陰電荷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^{30, 31)}。

この手法を用い、多摩川の水100～500mLからノロウイルスをはじめとするさまざまなウイルスを検出することに成功した³²⁾。多摩川は中流域からは

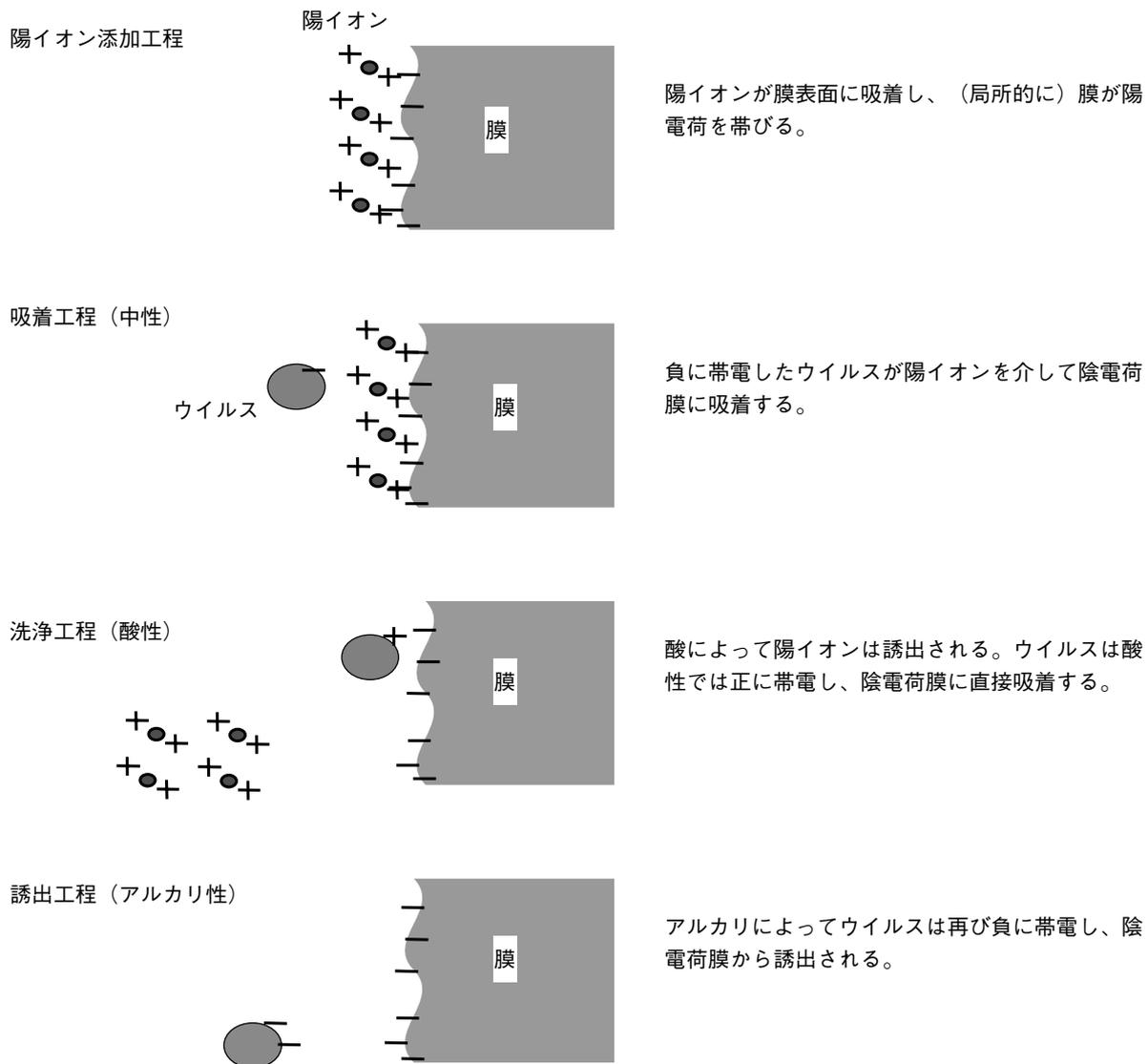


図2 陽イオン添加型酸洗浄法の説明

かなりの割合で下水処理水を含んでおり、他の調査研究に比べて少ない検査水量にもかかわらず、高い頻度でウイルスが検出されることにつながったと考えられる。特に、冬季はノロウイルスが存在していることが分かった。また、アデノウイルスは年間を通じてよく検出されており、エンテロウイルスは検出頻度が比較的低かった。A型肝炎ウイルスは一度も検出されなかったが、TTウイルスはまれに検出されることがあった。

また、大量の水道水（100～500L）にこの手法を適用し、98試料中10試料からノロウイルスがPCR法によって検出された³⁰⁾。この研究では得られたウイルス濃縮液の半量ずつをノロウイルスG1およびG2の検出のために用いたため、他のウイルスは調べられていない。検査結果から年間平均のウイルス濃度を推定すると、2,800L中に1個となった。塩素消毒によるウイルスの不活化や、ウイルス1個を摂取した場合の感染確率などを評価できないために、水道水を飲むことによる年間感染リスクは計算できないが、かなり小さくなるものと考えられる。なお、測定した当時は凝集沈殿・急速砂ろ過による通常の浄水処理が行われていたが、現在ではオゾン・活性炭の高度処理が加わっているため、ウイルス濃度はさらに低くなっていると考えられる。

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ている。

文 献

- 1) Melnick J. L., J. Emmons, E. M. Opton and J. H. Coffey.: Cocksackie viruses from sewage, *Amer. J. Hyg.*, **59** : 185-195, 1954.
- 2) Matsuura K., Mitsuhiro Ishikura, Hiromu Yoshida, Takashi Nakayama, Sumiyo Hasegawa, Shuji Ando, Hitoshi Horie, Tatsuo Miyamura, and Takashi Kitamura.: Assessment of Poliovirus Eradication in Japan : Genomic Analysis of Polioviruses Isolated from River Water and Sewage in Toyama Prefecture, *Appl. Envir. Microbiol.* **66** : 5087-5091, 2000.
- 3) Cliver D. O.: Factors in the Membrane Filtration of Enteroviruses. *Appl. Microbiol.* **13** : 417-425, 1965.
- 4) Hill W. F., Elmer W. Akin and William H. Benton.: Detection of viruses in water : A review of methods and application, *Water Research*, **5** : 967-970, 1971.
- 5) Sobsey M. D.: 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, 1974.
- 6) Lucena F., A. Bosch, J. Jofre and L. Schwartzbrod.: Identification of viruses isolated from sewage, riverwater and coastal seawater in Barcelona, *Water Research*, **19** : 1237-1239, 1985.
- 7) Bitton G., L. T. Chang, S. R. Farrah and K. Clifford.: Recovery of Coliphages from Wastewater Effluents and Polluted Lake Water by the Magnetite-Organic Flocculation Method, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41** : 93-96, 1981.
- 8) Paul J. H., S. C. Jiang and J. B. Rose.: Concentration of Viruses and Dissolved DNA from Aquatic Environments by Vortex Flow Filtration, *Appl. Envir. Microbiol.* **57** : 2197-2204, 1991.
- 9) Yano K., Yoshida Y., Shinkai T. and Kaneko M.: 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, 1993.
- 10) 矢野一好, 林志直, 藪内清, 田口文章: 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** : 183-191, 1986.
- 11) Wallis C. and Melnick J. L.: Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, *Jour. of Virology*, **1** : 472-477, 1967.
- 12) Sobsey M. D., C. Wallis, M. Hendersen and J. L. Melnick.: Concentration of Enteroviruses from Large volume of Water, *Appl. Microbiol.* **26** : 529-534, 1973.
- 13) Gerba C. P.: Applied and Theoretical aspects of Virus Adsorption to Surfaces, *Advances in Applied Microbiology*, **30** : 133-168, 1984.
- 14) Rao N. U. and N. A. Labzoffsky.: 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, 1969.
- 15) Katzenelson E., Fattal B. and Hostovesky T.: Organic Flocculation : An Efficient Second-Step Concentration Method for the Detection of Viruses in Tap Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32** (4) : 638-639, 1976.
- 16) Sobsey M. D. and Jones B. L.: Concentration of Poliovirus from Tap Water Using Positively Charged Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37** (3) : 588-595, 1979.
- 17) Logan K. B., Scott G. E., Seely N. D. and Primrose S. B.: A Portable Device for the Rapid Concentration of Viruses from Large Volumes of Natural Freshwater, *Journal of Virological Methods*, **3** : 241-249, 1981.
- 18) Nupen E. M. and Bateman B. W.: The Recovery of Viruses from Drinking-water by Means of an In-line Electropositive Cartridge Filter, *Wat. Sci. Tech.*, **17** : 63-69,

- 1985.
- 19) Reynolds K. A., Rose J. B. and Giordano A. T.: Comparison of Methods for the Recovery and Quantitation of Coliphage and Indigenous Bacteriophage from Marine Waters and Sediments, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, No.3-4, pp.115-117, 1993.
 - 20) Lukasik J., Troy M. Scott, Diane Andryshak, and Samuel R. Farrah.: Influence of Salts on Virus Adsorption to Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 2914-2920, 2000.
 - 21) Puig M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones.: Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Water by Nested PCR Amplification, *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2963-2970, 1994.
 - 22) Kopecka H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal, and Lopez-Pila.: Detection of Naturally Occurring Enteroviruses in Water by Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction, and Hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 1213-1219, 1993.
 - 23) Sobsey M. D.: Enteric Virus Detection in Water by Nucleic Acid Methods, AWWA Research Foundation, 1996.
 - 24) Abbaszadegan, M., M. S. Huber, C. P. Gerba, and I. L. Pepper.: Detection of Enteroviruses in Groundwater with the Polymerase Chain Reaction, *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1318-1324, 1993.
 - 25) Schwab K. J., R. De Leon, and M. D. Sobsey.: Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for Detection of Enteroviruses, Hepatitis A Viruses, and Norwalk Viruses by Reverse Transcription-PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** : 531-537, 1995.
 - 26) Shieh Y. -S. C., Wait D., Tai L. and Sobsey M. D.: Method to Remove Inhibitors in Sewage and Other Fecal Wastes for Enterovirus Detection by the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Virological Methods*, **54** : 51-66, 1995.
 - 27) Schwab K. J., R. De Leon and M. D. Sobsey.: Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR, *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 2086-2094, 1996.
 - 28) Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S.: 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, 2002.
 - 29) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎: 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, 2002.
 - 30) 原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎: 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, 2002.
 - 31) Haramoto E., Katayama H. and Ohgaki S.: 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, 2004.
 - 32) Haramoto E.,*H Katayama, K Oguma, and S Ohgaki.: Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in Tamagawa River in Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** : 2403-2411, 2005.