

ICC-PCR 法と PMAxx-PCR 法を併用した

水道原水における感染力を有する病原ウイルスの存在実態の把握

Elucidating the occurrence of infectious human enteric viruses in drinking water sources

using a combination of ICC-PCR and PMAxx-PCR methods

北海道大学大学院工学研究院 准教授 白崎伸隆

(研究計画ないし研究手法の概略)

1. はじめに

PCR 法を用いた水環境におけるウイルスの存在実態調査が広く行われるようになり、水道原水として利用されている日本の河川水においても、水系感染症を引き起こす多様な病原ウイルスが存在していることが周知の事実となっている (Haramoto *et al.*, 2012 ; Miura *et al.*, 2019). しかしながら、PCR 法は、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を検出・定量しているに過ぎず、ウイルスの感染力の有無については判別できないとされている (Fong and Lipp, 2005 ; Rodriguez *et al.*, 2009). 水道水を介して生じ得る病原ウイルスによる水系感染症を制御し、安全な水道水を将来に渡って安定的に供給するためには、感染力を有する病原ウイルスの存在実態を詳細に把握し、水系感染リスクを正確に評価することが重要である. そこで、本研究では、水試料中のウイルスを感染力を保持した状態で効率的に回収・濃縮可能なウイルス濃縮法、並びに光反応性色素を用いた前処理と PCR 法を組み合わせた PMAxx-Enhancer-PCR 法を水道原水として利用されている河川水に適用することにより、PCR 法単独にて定量された病原ウイルスの内、どの程度のウイルスが外殻タンパク質が損傷した状態、すなわち、感染力を失った状態で存在しているかを把握することを目的とした. また、ウイルスの感染力評価手法の一つである宿主細胞を用いたウイルス培養と PCR 法を組み合わせた ICC-PCR 法を適用することにより、水道原水河川における感染力を有する病原ウイルスの存在実態を明らかにすることを目的とした.

2. 実験方法

2.1 河川水からのウイルス回収・濃縮

凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場において 2023 年 4 月から 2024 年 3 月に採水した水道原水 (河川水) 30 L に、粉末活性炭を 100 mg/L になるように添加し、攪拌子を用いて 60 分間攪拌することにより、後段の UF 膜を用いたウイルス濃縮における濃縮阻害及びウイルス定量における定量阻害を引き起こすと考えられる水道原水中の溶存性有機物を除去した. この後、活性炭吸着処理水をメンブレンフィルター (膜孔径 0.5 μm) にてろ過することにより、水道原水中の懸濁質及び水道原水に添加した活性炭を除去し、得られた処理水 30 L を、予め乳タンパク質 (ブロックエース) にてブロッキング処理したタンジェントアルフローUF膜 (分画分子量 1,000 kDa) を用いて 15 mL まで精製・減容した (UF 膜濃縮においては、冷却水循環装置を用いて試料を約 4 $^{\circ}\text{C}$ に維持した). この後、0.01 M リン酸バッ

ファー15 mL,あるいは0.01 Mリン酸バッファーにヘキサメタリン酸ナトリウム(分散剤), Tween 80(界面活性剤),アンチフォーム A(発砲防止剤)をそれぞれ0.01% (w/v), 0.5% (v/v), 0.001% (v/v) になるように添加した溶液15 mLをUF膜の表面に通水し,合計30 mLを前述したメンブレンフィルターにてろ過することにより,水道原水中に存在するウイルスを回収・濃縮した(濃縮試料).また,0.01 Mリン酸バッファー30 mL,あるいは前述した試薬添加した0.01 Mリン酸バッファー30 mLをUF膜の通水方向とは逆の方向からUF膜に通水し,前述したメンブレンフィルターにてろ過することにより,UF膜に残存したウイルスを回収した(逆洗試料).濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法,PMAXx-Enhancer-PCR法,ICC-PCR法にて定量し,濃縮試料と逆洗試料の合計のウイルス量を求めることにより,水道原水におけるウイルス濃度を算出した.なお,ウイルス濃度の算出においては,濃縮工程におけるウイルスの回収率は100%と仮定した.

2.2 対象としたウイルスとその定量法

本研究では,水系感染症の原因ウイルスとしてWHO飲料水水質ガイドライン(WHO,2011)に掲載されているアデノウイルス及びロタウイルスを対象とした.

アデノウイルス及びロタウイルスの定量には,それぞれのウイルスに特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイム定量PCR法を用いた.また,PCR法単独によるウイルス定量においてアデノウイルス及びロタウイルスが陽性となった幾つかの試料については,光反応性色素の一種であるPropidium monoazide(PMA)の改良高純度試薬であるPMAXxとPMAの反応向上試薬であるPMA Enhancer for Gram Negative Bacteriaを組み合わせたPMAXx-Enhancer-PCR法を実施し,PCR法単独にて定量されたウイルスの内,どの程度のウイルスが外殻タンパク質を損傷しているかを議論した.加えて,ロタウイルスについては,宿主細胞であるMA104細胞を用いたICC-PCR法を実施し,感染力を有するロタウイルスの存在実態を明らかにすると共に,PMAXx-Enhancer-PCR法にて評価した結果と比較することにより,感染力評価手法の代替としてのPMAXx-Enhancer-PCR法の有効性を議論した.

(実験調査によって得られた新しい知見)

3. 結果と考察

3.1 PCR法単独によるウイルスの存在実態調査

実浄水場において採水した水道原水(河川水)中のウイルスを濃縮した後,濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量することにより,水道原水におけるウイルス濃度を算出した.結果を図-1に示す.アデノウイルスについては,2023年4月から2024年3月(2024年1月~3月は毎月2回の採水)のいずれの採水日においても定量下限値($10^{2.5}$ copies/L)以下であった.一方,ロタウイルスについては,2023年4月から2024年3月の全15試料の内,13試料で濃度がPCR法における定量下限値($10^{2.5}$ copies/L)を上回り,陽性となった(陽性率87%).また,陽性となった試料中のロタウイルス濃度は $10^{3.5-4.3}$ copies/Lであった.予備検討段階で採水及びウイルス濃縮を実施した試料(前述した実浄水場において2023年1月から3月に採水した水道原水中のウイルスを濃縮した後,-80°Cにて凍結保存した濃縮試料及び逆洗試料)についても同様の評価を実施したところ,アデノウイルスについては2試料で,ロタウイルスについては3試料で陽性となり,陽性となった試料中のアデノウイルス及びロタウイルスの濃度はそれぞれ $10^{3.9-4.7}$ copies/L, $10^{4.2-4.7}$

copies/L であった。従って、対象とした水道原水においては、採水時期による濃度変動が見られるものの、アデノウイルス及びロタウイルスが最大で 10^5 copies/L 程度存在していることが確認された。

3.2 PMAxx-Enhancer-PCR 法によるウイルスの定量

PCR 法単独においてアデノウイルス及びロタウイルスの両方、あるいはいずれかが陽性となった 2023 年の 1 月から 3 月、2024 年の 1 月から 3 月に採水した試料について、PMAxx-Enhancer-PCR 法を実施した。結果を図-1 に示す。PMAxx と反応向上試薬を併用した前処理を実施することにより、得られたアデノウイルスの濃度は定量下限値 ($10^{3.5}$ copies/L) 以下となり、PCR 法単独にて得られた濃度と比べて ≥ 0.4 – ≥ 1.2 log の差異が確認された。従って、PCR 法単独にて定量されたアデノウイルスの内、58–93%以上は、PMAxx がウイルス粒子内部まで透過可能な状態、すなわち、ウイルス粒子を構成する外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。同様に、ロタウイルスについても、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は定量下限値 ($10^{2.5-3.5}$ copies/L) 以下となり、PCR 法単独にて得られた濃度と比べて ≥ 0.8 – ≥ 1.9 log の差異が確認された。従って、PCR 法単独にて定量されたロタウイルスの内、84–99%以上は、ウイルス粒子を構成する外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。

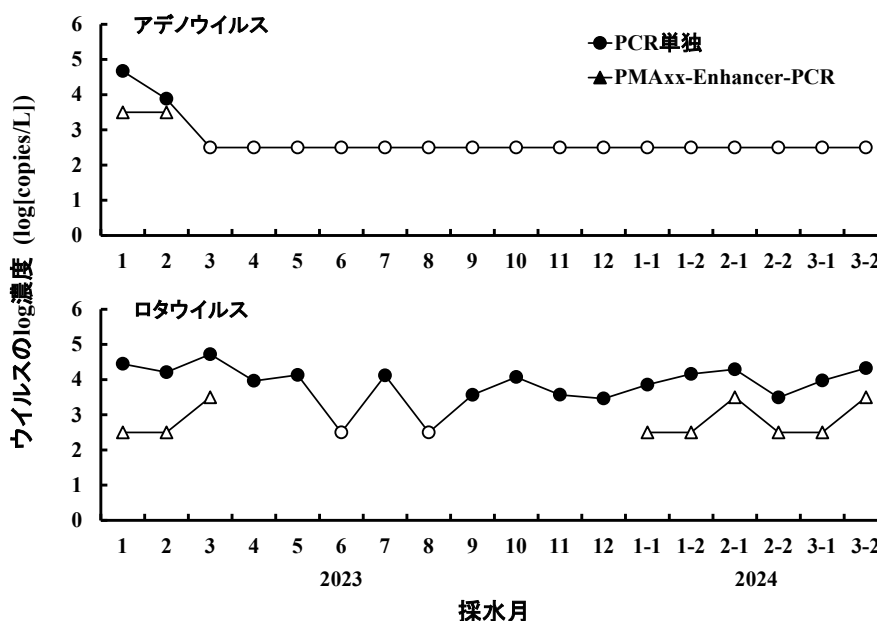


図-1. PCR法単独, PMAxx-Enhancer-PCR法にて定量した水道原水におけるウイルス濃度 (図中の白抜きは定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

3.3 ICC-PCR 法によるウイルスの定量

PCR 法単独においてロタウイルスが高濃度で定量された 2023 年の 1 月から 3 月に採水した試料について、ICC-PCR 法を実施した。結果を図-2 に示す。上述したように、いずれの試料においても、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は定量下限値以下の値となったのに対し、1 月及び 3 月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果は陽性となり、ロタウイルスが感染力を有する状態で $10^{0.1-0.4}$ MPN/L、すなわち、1–3 MPN/L 程度存在すること

が明らかとなった。PMAxx-Enhancer-PCR法とICC-PCR法で定量下限値は大きく異なるため、PMAxx-Enhancer-PCR法にて得られた定量下限値以下の値とICC-PCR法にて得られた濃度の大小関係を議論することはできないことから、ロタウイルスの感染力評価手法の代替としてのPMAxx-Enhancer-PCR法の有効性については、更なる検討が必要であると考えられるものの、対象とした水道原水においては、ロタウイルスが感染力を有する状態で1-3 MPN/L程度存在する可能性があることが明らかとなった。

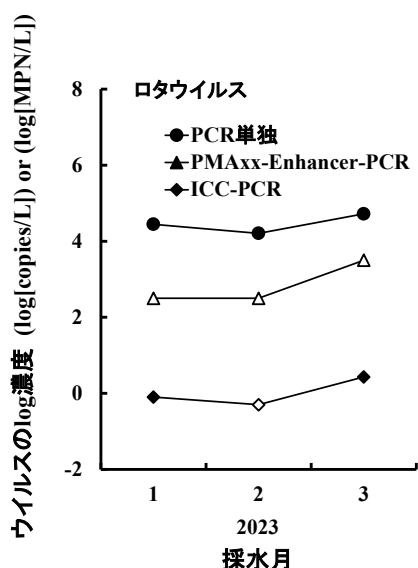


図-2. ICC-PCR法にて定量した水道原水におけるウイルス濃度
(図中の白抜きは定量下限値以下を示しており、定量下限値をプロット)

4. 結論

対象とした水道原水においては、PCR法単独にて定量されたアデノウイルス及びロタウイルスが最大で 10^5 copies/L程度存在していることが確認された。一方、PMAxx-Enhancer-PCR法にて定量した場合においては、いずれのウイルスも定量下限値以下となった。従って、PCR法単独にて定量されたアデノウイルス及びロタウイルスの内、58-99%以上は、ウイルス粒子を構成する外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。これに対し、ICC-PCR法によるロタウイルスの定量を実施したところ、ロタウイルスが感染力を有する状態で1-3 MPN/L程度存在する可能性があることが明らかとなった。

参考文献

- Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Katayama, H., Asami, M. and Akiba, M. Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms. *Food and Environmental Virology* 4(3), 93-101, 2012.
- Miura, T., Gima, A. and Akiba, M. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food and Environmental Virology* 11(1), 9-19, 2019.
- Fong, T.T. and Lipp, E.K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69(2), 357-371, 2005.

4. Rodriguez, R.A., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75(2), 297-307, 2009.
5. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.

(発 表 論 文)

国際学術雑誌への投稿準備中