

海水中に存在する腸管系ウイルスと指標微生物の測定

東京大学大学院工学系研究科 正会員 ○片山 浩之
国土交通省 嶋崎 明寛
東京大学大学院工学系研究科 フェロー 大垣 眞一郎

1. 研究の背景と目的

海水浴などのレクリエーションによって下痢になるリスクが疫学的に知られている。その原因の一つとして、腸管系ウイルスによる感染症があげられるが、海水浴場等の海水中のウイルスの挙動についてはあまり知られていない。また、海水浴の水質基準として糞便性大腸菌群数が用いられているが、ウイルスに関する安全性を確保できているか疑問が残る。環境中に低濃度で存在するウイルスを検出するためには、多量の試料水を濃縮する必要があるが、海水からウイルスを効果的に濃縮する手法は確立されていない。

本研究では、沿岸海域におけるウイルスモニタリング手法の確立を目的として、濃縮手法の最適化と実際の海水中のウイルスモニタリングを試みた。著者らはこれまでに海水に添加したポリオウイルスを効果的に回収する手法を開発した¹⁾が、この手法を海水中の野生のウイルスの測定に用い、その有効性を調べた。ウイルス検出手法としては、近年広く用いられて PCR 法に加えて、細胞に接種して培養した後に PCR を行なう Cell Culture PCR 法を試みた。

ウイルスの検出結果と指標微生物の測定結果から、指標微生物の有効性を考察した。

2. 沿岸域でのウイルス汚染調査

神奈川県江ノ島海岸と東京都のお台場・葛西の海水を対象とし、海水を採取した。地点と採水日を表 1 に示した。腸管系ウイルスと糞便性大腸菌群および FRNA フェージを測定した。糞便性大腸菌群数は、デスオキシコーレイト培地を用いた重層寒天法で測定した。FRNA フェージ濃度は宿主に *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC12484) を用いたブラック法²⁾で測定した。

海水の処理方法

図 1 に海水からウイルスを検出するために用いた手法を示す。採取した海水 2L を陰電荷膜(ミリポア HA、口径 90mm、孔径 0.45 μ m)に通した後、 1.0×10^{-3} N の希硫酸 (pH3.0) 200ml で酸洗浄をおこない、 1.0×10^{-3} N の水酸化ナトリウム溶液 (pH 10.5~10.8) 10ml を用いて誘出した。誘出液は、TE バッファーと希硫酸を用いて中和し、 -20°C で保存した。このウイルス濃縮法では、酸洗浄によって海水に含まれる陽イオンを膜から流し、ウイルスは誘出工程におけるアルカリ溶液中で負に帯電したウイルスを陰電荷膜からはがして回収する¹⁾。この手法はこれまでに、海水 50ml を原水とした場合には添加したポリオウイルスの約 90% を回収している³⁾。得られた濃縮液に対して、遠心式フィルターユニット (Millipore Centriprep Concentrator 50) を用いて、2500rpm、 4°C 、10 分で遠心分離後に膜を透過した液層を

表 1 採水地点と採水日 (2000 年 8 月~2001 年 1 月)

採水地点	採水日
江ノ島西浜	8/22, 8/23, 8/24, 11/23, 12/22, 1/6
江ノ島東浜	8/22, 8/23, 8/24, 11/23, 12/22, 1/6
台場	11/23, 12/7, 12/29, 1/8
葛西	11/19, 12/7, 12/29, 1/8

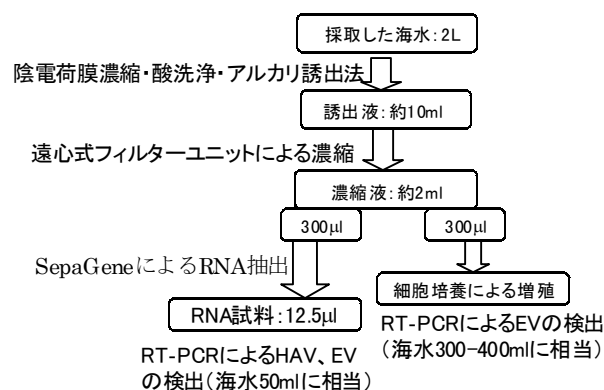


図 1 海水からウイルスを検出する手法の概略

表 2 A 型肝炎ウイルスとエンテロウイルス検出用のプライマーとプローブの塩基配列

名称	塩基配列 5' → 3'
Panentero+(444-450)	CCTCCGGCCCCCTGAATG
Panentero-(621-638)	ACCGGATGGCCAATCCAA
TaqMan Probe	(FAM)CCGACTACTTTGGGGT CCGTGTTTC (TAMRA)'
HAV+	CAGCACATCAGAAAGGTG'
HAV-	CTCCAGAATCATCTCCAAC

表 3 海水 1L を原水としたときのポリオウイルス回収率

採水地点	回収率(%)
西浜	73
台場	68
葛西	61

キーワード 腸管系ウイルス、海水、濃縮法、F 特異大腸菌フェージ、糞便性大腸菌群
連絡先: 〒113-8656 東京都文京区 7-3-1 Email: katayama@env.t.u-tokyo.ac.jp

表 4 海水からのウイルスおよび指標微生物の測定結果

場所	季節	ウイルス陽性数/検体数			糞便性大腸菌群数 [CFU/100ml]		FRNA フェージ [PFU/100ml]
		HAV (50ml)	EV (50ml)	EV, Cell Culture PCR (700 ml)	平均 (最小 - 最大)		最小 - 最大
江ノ島	夏	0/6	0/6	4/6	215	(19 - 4000)	0
	冬	0/6	0/6	0/6	8	(0 - 172)	0-3
東京湾	冬	0/8	0/8	0/8	62	(4 - 1800)	0-2

捨て、管底にのこった液層を回収する再濃縮を行なった。滅菌 MilliQ 水 10ml を加え同じ操作を繰り返し、最終的に得られた約 1.5ml~2.0ml を回収した。一部は直接 RNA を抽出してエンテロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス (HAV) を RT-PCR 法によって測定し、一部は Cell Culture PCR 法によってエンテロウイルスを測定した。

Cell Culture PCR

濃縮した試料 300 μ l に BGM 細胞の細胞維持液 700 μ l を加えて 1ml とし、BGM 細胞に接種した。2 日間培養後、上澄みを回収し、核酸抽出して RT-PCR を行ない、ウイルスを検出した。

核酸抽出および RT-PCR

Cell Culture PCR 法の場合も以下に示す同じ方法を核酸抽出に用いた。核酸抽出キット SepaGene RV-R (三光純薬) を用い、キット付属の説明書の短時間法に従った。試料 300 μ l から核酸抽出をおこない、最終容量は一部の実験をのぞいては 12.5 μ l とし、DNase I 処理を行った後、直ちにランダムプライマーを用いた逆転写反応をおこなった。逆転写後の総量 30 μ l のうち 5 μ l を PCR による検出に用いた。以上の操作において、濃縮後に直接 RT-PCR を行なう場合には 1 検体あたり約 50ml の海水を検査していることになる。また、Cell Culture PCR の場合は、300~400ml の海水を検査していることになる。

表 2 に用いたプライマーおよび TaqMan プローブの塩基配列をそれぞれ示した。温度時間条件は、RT 反応: 42 $^{\circ}$ C 60 分 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 分 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C、PCR 反応: 95 $^{\circ}$ C 10 分 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C 1 分, 55 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分) \times 40 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 6.5 分とした。PCR 反応後の結果判定は、TaqMan プローブの蛍光強度およびアガロースゲル電気泳動によりおこなった。

1L の海水からのウイルス回収率の確認

本研究で用いたウイルス濃縮手法は、50ml の海水を原水とした場合には高い回収率を示している³⁾が、試料が増えた場合のウイルス回収率を確かめる必要がある。そこで、1 月に採水した 3 地点の海水 1L にポリオウイルスを添加し、再濃縮後のポリオウイルスを BGM 細胞を用いたブラック法によって測定して回収率を算出した。

3. 実験結果と考察

海水 1L からのポリオウイルス回収率を表 3 に示した。海水からの濃縮、再濃縮後の回収率は 60%~70% 付近であった。このことから、再濃縮においてもウイルスが回収されていること、海水の液量が 1L まで増えてもこのウイルス濃縮法は高い回収率を維持していることが分かった。

海水中からの腸管系ウイルスの検出状況、および指標微生物として測定した糞便性大腸菌群数および FRNA フェージの測定結果を表 4 に示した。濃縮液から培養を行わずに直接 RNA 抽出をおこなって RT-PCR による測定したものについて、エンテロウイルスと A 型肝炎ウイルスはともにすべて陰性であった。一方、各濃縮液に対して 2 つずつ (海水約 700ml に相当) Cell Culture RT-PCR 法をおこなったところ、夏季の江ノ島の 6 試料中 4 試料からエンテロウイルスが検出されたが、冬季の江ノ島および東京湾からは検出されなかった。江ノ島の夏の海水ではエンテロウイルスの検出結果が測定法によって異なるが、Cell Culture RT-PCR 法は直接 RNA 抽出する場合に比べてウイルス試験に供する液量が大きいことがその原因であると考えられる。また、感染価のあるウイルスは細胞培養中で増殖して PCR 法によって検出されるが、不活化したウイルスは培養中に増えないので PCR 法で検出されない。直接 RNA 抽出を行なった場合は検出されずに培養後に検出されたことから、検出されたエンテロウイルスは感染力を持つウイルスであったといえる。

糞便性大腸菌群数による水浴場基準では水浴に適していると判定される試料からも、ウイルスが検出される場合 (18 試料中 3 試料) があつた。一方、FRNA フェージは 100ml 中に最大でも 3PFU であり、75% が不検出であった。FRNA フェージはエンテロウイルスより濃度が高いとは言えず、海水におけるウイルスの存在指標としては適していないことが示唆された。また、冬季には東京湾からもエンテロウイルスが検出されなかったことから、エンテロウイルスは冬季より夏季の方が環境中に多く存在していることが示唆され、このことは夏季に流行が見られるというエンテロウイルスに関する疫学的な知見と一致している。

参考文献

- 1) 片山浩之、大垣眞一郎 (1999) 第 33 回日本水環境学会年会講演集、p498
- 2) ISO 10705-1, Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages Part 1
- 3) KATAYAMA et al. (2000) Proc. of 1st World Water Congress of IWA, 7, pp95-96