陽イオン添加型陰電荷膜濃縮法による水道水中のノーウォーク様ウイルスの検出

東京大学大学院工学系研究科　学生会員　○原本　英司
同　上　正会員　片山　浩之
同　上　フェロー会員　大垣　眞一郎

1. 研究の背景および目的

病原性ウイルスを含んだ水道水の摂取によって生じる水系感染症が注目されている。水道水中におけるウイルスの存在濃度は非常に低いものの、感染力が非常に強いと考えられており、微量でもその存在を無視することはできない。ウイルスの検出には多量の水道水を濃縮する必要があるため、濃縮操作の簡便性が求められる。

本研究では、水道水に添加したポリオウイルスに対して 100%近い回収率を示した濃縮法 [1]を用いることにより、水道水中のノーウォーク様ウイルスの検出を試みた。ノーウォーク様ウイルスは冬期における食中毒事例の主要な原因として知られており、生牡蠣などの食品による感染報告が最も多いが、その感染経路には不明な部分が多いため、本研究では水道水中の存在状況を調査した。

2. 陽イオン添加型陰電荷膜濃縮法の原理

本研究で用いたウイルス濃縮法（図 1）は多量の淡水の濃縮を目的として開発されたものであり、試料水に陽イオンを添加する前処理が不要なため、操作が非常に簡便である。また、ウイルスの誘出液として用いる NaOH は PCR 反応を阻害しないため、PCR 法を導入したウイルスの検出に適用することが可能である。

孔径 0.45μm の HA 膜（Millipore 社製）をフィルターホルダーに装着して陰電荷膜として用い、250mM $AlCl_3$ をろ過して膜に Al^{3+}を吸着させることで擬似的な陽電荷膜の状態を作り出す（Step 1）。通常、水道水中のウイルスは陰電荷を帯びていると考えられるため、ろ過した水道水中のウイルスを静電的引力によって膜に捕捉することができる（Step 2）。次に、pH 3.0 の 0.5mM H_2SO_4 で膜の洗浄を行い、誘出を阻害する Al^{3+}を膜から流出させる。pH の低下により等電点を越えて陽電荷となるウイルスは、膜の陰電荷と瞬間的に吸着し直すことで膜への吸着状態を維持できる（Step 3）。最後に、誘出液として pH 10.5 の 1.0mM NaOH を膜に通し、ウイルスを再び陰電荷に戻して膜から回収する（Step 4）。

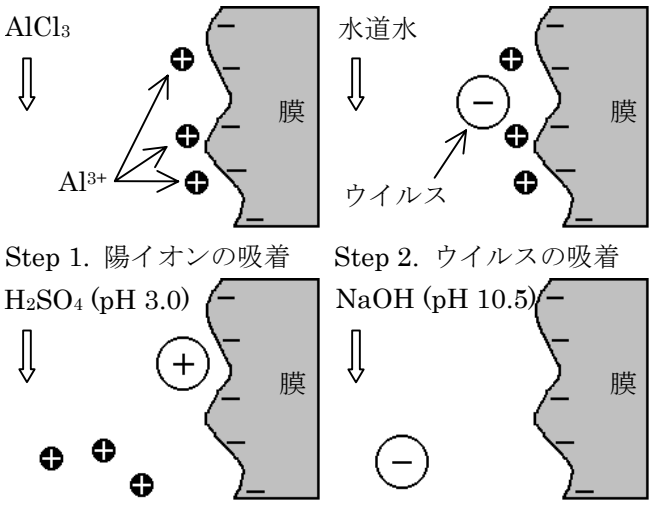

図 1. 本研究で用いたウイルス濃縮法の原理

表 1. 水道水の濃縮水量および測定した水質項目

項目	平均	（最小 － 最大）
濃縮水量	358.4L	（99.5L － 511.3L）
水温	14.4℃	（10.7℃ － 20.6℃）
pH	7.1	（6.8 － 7.5）
残留塩素濃度	0.7ppm	（0.5ppm － 0.9ppm）

3. 実験方法（図 2）

1）水道水の濃縮

2002 年 1 月 25 日～3 月 21 日の期間中、東京大学工学部 14 号館にて水道水 100～500L の濃縮操作を計 29 回行った。測定した水質項目は表 1 に示した。

濃縮操作の手順は次の通りである。250mM $AlCl_3$ 80～100mL を吸着させた口径 293mm の HA 膜で水道水 100～500L をろ過し、0.5mM H_2SO_4 4000mL で酸洗浄を行い、1.0mM NaOH 200mL でウイルスを誘出した（1 次濃縮）。次に、250mM $AlCl_3$ 2.0mL を吸着させた口径 47mm の HA 膜で 1 次濃縮液をろ過し、0.5mM H_2SO_4 200mL で酸洗浄、1.0mM NaOH 5.0mL でウイルスの誘出操作を行い（2 次濃縮）、Centriprep YM-50（Millipore 社製）で約 1mL に遠心濃縮した（3 次濃縮）。

キーワード：ノーウォーク様ウイルス、水系感染症、水道水、濃縮法、PCR 法
連絡先：〒113-8656　東京都文京区本郷 7-3-1　E-mail：haramoto@env.t.u-tokyo.ac.jp

表 2. ノーウォーク様ウイルス検出用の Primer および TaqMan Probe（片山和彦博士らによる論文未発表の情報）

型	種類	名称	塩基配列	鎖長
G1	Forward Primer	COG1F	5’ - CGYTGGATGCGNTTYCATGA - 3’	20
	Reverse Primer	COG1R	5’ - CTTAGACGCCATCATCATTYAC - 3’	22
	TaqMan Probe	RING1 - TP	5’ - TET - AGATYGCGATCYCCTGTCCA - TAMRA - 3’	20
G2	Forward Primer	COG2F	5’ - CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG - 3’	26
	Reverse Primer	COG2R	5’ - TCGACGCCATCTTCATTCACA - 3’	21
	TaqMan Probe	RING2 - TP	5’ - FAM - TGGGAGGGCGATCGCAATCT - TAMRA - 3’	20

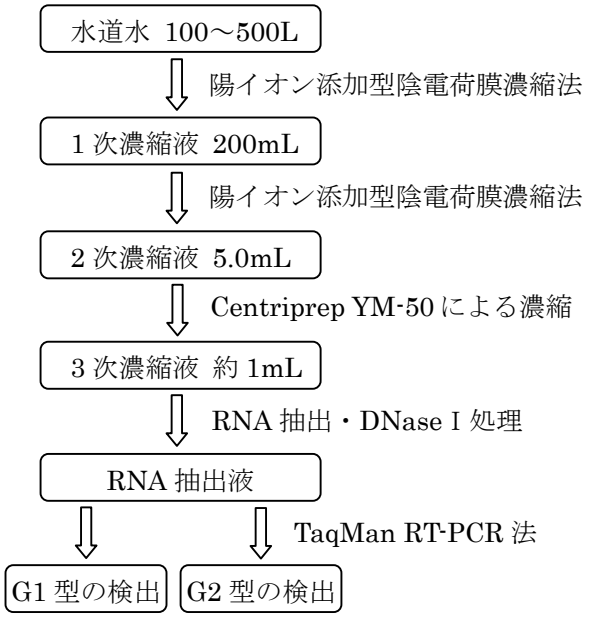

図 2. 水道水中のノーウォーク様ウイルスの検出手順

2）PCR 法によるノーウォーク様ウイルスの検出

3 次濃縮液 1mL から 300μL を分取して SepaGene RV-R（三光純薬社製）による RNA 抽出に供したのち、DNase I 処理（37℃30 分→75℃5 分→4℃）を行った。逆転写反応（42℃60 分→99℃5 分→4℃）によって得られる cDNA 溶液 30μL を 5μL ずつに分けて PCR 反応（50℃2 分→95℃10 分→（95℃15 秒→56℃1 分）×50 →4℃）に供した。試料の半分をノーウォーク様ウイルス G1 型、残りの半分を G2 型の検出に用いた。使用した Primer および TaqMan Probe は表 2 に示した通りである。残りの濃縮液についても同様の操作を行った。

4. 実験結果および考察

TaqMan RT-PCR 法による判定の結果（表 3）、29 試料中 2 試料についてノーウォーク様ウイルス G2 型が陽性と判定された（陽性率 6.9%）。陽性を示した 2 試料の濃縮水量は 446.5L と 505.0L であり、それぞれの型について 9 本のマイクロチューブを用いて PCR 反応を行ったため、陽性と判定されたマイクロチューブ内では濃縮前の水道水 25L 程度を検査していることになる。このことより、水道水 25L 中に少なくとも 1 個体以上のウイルスが存在していたと考えられる。一方、ノーウォーク様ウイルス G1 型はすべての試料において陰性と判定された。

疫学的には G1 型よりも G2 型の方が多く検出される傾向にあり、G2 型のみが検出された本研究の結果もその傾向と一致していると言える。すなわち、水道水を介することでノーウォーク様ウイルスの水系感染が実際に生じている可能性があることになり、ウイルスに関する基準値を持たない現行の水道水質基準ではウイルスに対する安全性を保証できないことになる。

しかし、検出されたウイルスの感染力の有無については不明であり、水道末端に達するまでにウイルスが不活化していることも考えられる。その場合、ウイルスの摂取が健康に影響を及ぼすことはない。ウイルスが検出されなかった試料に関しては、濃縮操作の途中でウイルスを破棄している可能性などがあるため、ウイルスが存在しなかったとは必ずしも言い切れないことになる。

本研究において、正常な浄水処理工程を経た水道水中にノーウォーク様ウイルスが存在することが示され、同時に陽イオン添加型陰電荷膜濃縮法がノーウォーク様ウイルスに対して有効であることが明らかとなった。今後は、他の腸管系ウイルスのモニタリング調査も並行して行い、ウイルスによる水道水の汚染に関する情報を蓄積する必要がある。

表 3. 水道水中のノーウォーク様ウイルスの検出結果

型	陽性試料数 / 試料数	陽性率	総検査水量
G1	0 / 29	0.0%	50～250L
G2	2 / 29	6.9%	50～250L

参考文献

1）原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎（2002）陽イオンを利用した水道水および河川水からのウイルス濃縮法の開発, 第 36 回日本水環境学会年会講演集, p423.