

ウイルス様粒子と新規イムノ PCR 法を併用したヒトノロウイルスの膜ろ過処理性評価

北海道大学大学院 正会員 ○白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦

1. はじめに

ヒトノロウイルスによる水系感染症は、医学・薬学の進歩や上下水道設備の普及により衛生状態が改善された我が国を含む先進諸国においても未だ散発しており、水道水を媒体とした水系感染症の報告もなされている。従って、ヒトノロウイルスによる水系感染症を制御していくためには、浄水処理におけるヒトノロウイルスの処理性を詳細に把握した上で、効果的な処理を実施していくことが重要となる。しかしながら、ヒトノロウイルスは、生体外での効率的な培養法が未確立であることから¹⁾、培養可能な病原性ウイルスの浄水処理性の評価に広く用いられる添加実験を行うことが極めて困難であるため、培養可能な病原性ウイルスに比べて浄水処理性に関する知見がほとんど得られていないのが現状である。その一方で、ヒトノロウイルス遺伝子の構造タンパク質領域をバキュロウイルスに取り込み、昆虫細胞で発現させることによって、野生のヒトノロウイルスと構造的・抗原的に同等であるウイルス様粒子 (rNV-VLPs) を多量に作製することが可能となった²⁾。これにより、ヒトノロウイルスの培養法の確立を待つことなく、容易に添加実験を行うことができるようになり、物理的な浄水処理過程におけるヒトノロウイルス粒子の処理性が徐々に明らかになりつつある³⁾。しかしながら、rNV-VLPsの定量に広く用いられる酵素免疫測定法 (ELISA) の検出感度の低さから、高度且つ高効率な処理が期待される膜ろ過処理におけるヒトノロウイルス粒子の処理性を正確に評価することができないという問題もあった。

そこで、本研究では、rNV-VLPs 定量の高感度化が期待できる新規のイムノ PCR 法を構築し、rNV-VLPs とイムノ PCR 法の併用により、次世代の浄水処理技術として期待される膜ろ過処理におけるヒトノロウイルス粒子の処理性を評価した。また、ヒトノロウイルスの代替指標ウイルスとしての大腸菌ファージの可能性について議論した。

2. 実験方法

(1) rNV-VLPsの作製

本研究では、我が国で分離されたヒトノロウイルス (Chiba virus, Genogroup I, 直径 35–39 nm) の rNV-VLPs を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によ

り作製し、実験に使用した。

(2) イムノPCR法の構築

本研究では、抗原抗体反応の特異性と PCR 法の高感度性を組み合わせたイムノ PCR 法を構築し、rNV-VLPs の定量に使用した。rNV-VLPs の IgM 抗体をマイクロプレートに固定化し、ここに、抗原である rNV-VLPs を含む試料を添加することにより、試料中の rNV-VLPs と IgM 抗体を反応させた。その後、ビオチン化した IgG 抗体を添加し、rNV-VLPs と反応させ、IgM 抗体-rNV-VLPs-ビオチン化 IgG 抗体の複合体を形成させた。更に、ビオチンと強固に結合する性質を有するストレプトアビジンを添加し、ここに、ビオチン化した DNA タグを添加することにより、ストレプトアビジンを介してビオチン化 IgG 抗体とビオチン化 DNA タグを結合させた。制限酵素を用いて複合体の DNA タグを切断した後、DNA タグ濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した。

(3) 膜ろ過処理

本研究では、精密ろ過膜 (MF膜)、限外ろ過膜 (UF膜)、凝集-MF膜処理における rNV-VLPs、水系感染症ウイルスの代替指標ウイルスとして広く用いられている大腸菌ファージ Q β 及び MS2 の処理性を評価した。精製した rNV-VLPs を 10¹¹ VLPs/mL、Q β 及び MS2 を 10⁸ PFU/mL になるように同時添加した豊平川河川水 (北海道札幌市) を実験原水とした。実験原水を pH6.8 に調整した後、MF膜処理 (膜材質; PVDF, PTFE, ミックスセルロース (MC), 膜孔径; 0.1 μ m) あるいは UF膜処理 (膜材質; 再生セルロース (RC), 分画分子量; 1 k, 10 k, 100 kDa) を行った。また、実験原水をスタティックミキサーを用いて凝集処理 (pH 6.8, 凝集剤; PACl, 添加濃度; 1.08, 1.62 mg-Al/L) させた後、MF膜処理 (PVDF) を行った。実験原水及び膜ろ過処理水を採取し、それぞれの rNV-VLPs、Q β 、MS2 濃度を定量することにより、除去率を算出した。なお、rNV-VLPs 濃度の定量には、イムノ PCR 法を、Q β 及び MS2 濃度の定量にはリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いた。

3. 実験結果と考察

(1) rNV-VLPsの基本特性

作製した rNV-VLPs の電子顕微鏡写真を図-1 に示す。図より、

キーワード: イムノ PCR 法, ウイルス様粒子, 大腸菌ファージ, ヒトノロウイルス, 膜ろ過処理

連絡先: 〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門 E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

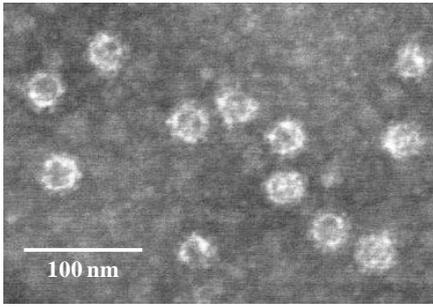


図-1. 作製したrNV-VLPsの電子顕微鏡写真

粒子状に自己組織化された rNV-VLPs が確認された。また、観察された rNV-VLPs の直径は約 40 nm であり、野生のヒトノロウイルスの直径と同程度であった。従って、作製した rNV-VLPs の構造は、野生のヒトノロウイルスと同程度であると判断した。

(2) イムノPCR法によるrNV-VLPsの定量

構築したイムノPCR法によるrNV-VLPsの定量範囲を把握するため、rNV-VLPsを豊平川河川水にて段階希釈した後、イムノPCR法により定量した。結果を図-2 に示す。図より、 10^6 - 10^{11} VLPs/mLの濃度範囲において、rNV-VLPs濃度とCt値の間に直線性が得られた。また、ELISAによるrNV-VLPsの定量限界は約 10^8 VLPs/mLであったことから、本研究で構築したイムノPCR法を用いることにより、rNV-VLPsの検出感度を 100 倍程度向上させることが可能となった。

(3) 膜ろ過処理におけるrNV-VLPsの処理性

膜ろ過処理におけるrNV-VLPsの除去率を図-3 に示す。図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 ; 原水のウイルス濃度, C ; 膜ろ過処理水のウイルス濃度) にて表記した。図より、MF膜処理単独では、いずれの材質のMF膜を用いた場合であっても、rNV-VLPsの除去率は0.5 log以下であった。これは、rNV-VLPsの直径(約40 nm)が、MF膜の膜孔径(0.1 μm) よりも小さく、また、rNV-VLPsとMF膜表面の間に作用する電気的相互作用、あるいは疎水性相互作用によるrNV-VLPsの吸着除去効果が小さいことによるものであると考えられた。これに対し、UF膜処理においては、分

画分子量10及び100 kDaの膜を用いた場合、約2 logのrNV-VLPsの除去率が得られた。また、1 kDaの膜を用いた場合においては、米国環境保護局の要求値である4 log (99,99%) の除去率が達成された。加えて、MF膜処理の前処理として凝集処理を導入することにより、MF膜処理単独では除去できなかったNV-VLPsを効果的に除去することができ、UF膜処理(1 kDa) と同等の高い除去率が得られた。これは、前段の凝集処理によってMF膜の膜孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され、フロックに吸着、あるいは捕捉されたrNV-VLPsが、後段のMF膜処理によって効果的に抑止されたためであると推察された。以上の結果から、インライン凝集-MF膜処理は、ヒトノロウイルス粒子の除去に有効であることが示唆された。

膜ろ過処理における rNV-VLPs, Q β , MS2 の除去率を比較したところ、いずれの膜ろ過処理においても、rNV-VLPs の除去率は、Q β 及びMS2 の除去率よりも低くなった。従って、大腸菌ファージQ β 及びMS2 は、ヒトノロウイルス粒子の安全側の指標とは成り得ない可能性が考えられた。

4. 結論

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) rNV-VLPs と新規イムノPCR法の併用により、ヒトノロウイルス粒子の膜ろ過処理性を評価することができた。
- (2) UF膜処理(1 kDa)及びインライン凝集-MF膜処理により、約4 logのヒトノロウイルス粒子の除去率が得られた。
- (3) 膜ろ過処理において、大腸菌ファージQ β 及びMS2は、ヒトノロウイルス粒子の安全側の指標とは成り得ない可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Donaldson *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**(Mar), 231 -241, 2010
- 2) Jiang *et al.*, *J. Virol.*, **66**(11), 6527-6532, 1992.
- 3) Shirasaki *et al.*, *Water Res.*, **44**(5), 1307-1316, 2010.

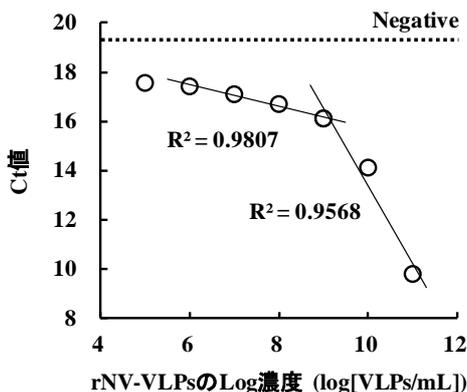


図-2. 新規イムノPCR法によるrNV-VLPsの定量

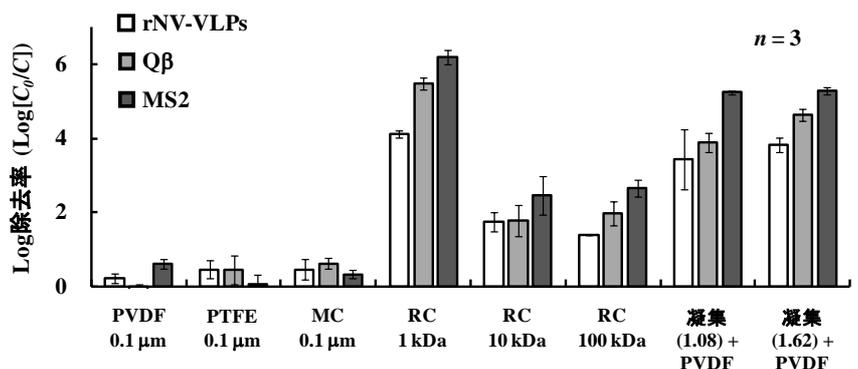


図-3. 膜ろ過処理におけるrNV-VLPs, Q β , MS2の処理性