PCR法を用いた凝集剤によるウイルス不活化機構の検討

岐阜大学工学部　　　　角田　裕樹
同上　　正会員　　松下　拓
同上　　正会員　　松井　佳彦
同上　　正会員　　井上　隆信

1　はじめに

ウイルスは消毒に対する抵抗性が強く、除去しにくいため、原水の汚染の程度や処理法によっては処理過程で生き残る可能性がある。そのため、水道水にウイルスが残存する可能性が指摘されている。ごく最近、アルミニウム系凝集剤にウイルスを不活化させる働きがあることが報告されているが[1]、そのメカニズムについては解明されていない。そこで本研究ではPCR法とプラック形成法を組み合わせ、アルミニウムフロック内外において、不活化されたウイルス不活化されていないウイルスを個別に定量し、ウイルスを不活化させているのがフロックを形成しているアルミニウムか、溶存しているアルミニウムかを検討する。これによりウイルス不活化のメカニズム解明に繋がる事項を検討することを目的とする。

2　実験方法

2－1　アルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化実験

Milli-Q水500mLに大腸菌ファージ(Qβ)を10^6PFU/mL程度になるように添加した。ここにアルミニウム系凝集剤を10mg-Al/L添加し、直ちにNaOH溶液にてpHを7.0に調整した。凝集剤は一般に浄水場で用いられているPAC(住友化学工業製、比重1.23、塩基度62.5%、Al_2O_3を重量比で10.3%含む)を用いた。これをパドル型攪拌器にて5分間急速攪拌(G値$194s^{-1}$)し、その後55分間緩速攪拌(G値$23s^{-1}$)し、ウイルスと接触させた。

2－2　フロック溶解法

アルミニウム系凝集剤の添加により形成されるフロックはpH9.5以上で溶解可能するため、フロック溶解あり/なしのそれぞれの場合にウイルス濃度を測定することにより、フロック内外のウイルス濃度を定量できる。ところが、高アルカリ域でフロックを溶解する操作によりウイルスが不活化される可能性があり、これを回避するためMatsuiらはビーフエキス(以下BEと略記)を共存させてフロックを溶解する方法を提案している[1]。本研究では、Matsuiらの方法に従い、アルミニウムフロックを溶解させた。

Milli-Q水にBEを12% (w/v)になるように添加しNaOHによりpH9.5に調整した。これをオートクレーブにて高圧蒸気滅菌(121℃, 20分)した。2-1で行った凝集60分後の試料20mLをこのBE溶液20mLと混合し、vortex攪拌することよりアルミニウムフロックを溶解した。vortex攪拌中の試料を経時的に採取し、遠心分離(4500×g、5分間)し、フロックと上澄みに分けた。上澄みのウイルス濃度を次項にて説明する2種類の方法にて測定した。なお実験は20℃の暗所にて行った。

2－3　ウイルス定量法

本研究ではプラック形成法とPCR法の2通りの方法によりウイルスの定量を行った。プラック形成法では原理上、感染性のあるウイルスが定量されるが、PCR法では不活化されたウイルスを含め、全ウイルス量が測定できる。この2つ測定結果を比較することのより不活化ウイルスを定量した。

2－3－1　プラック形成法

本研究では、宿主大腸菌として*Escherichia coil* K12F $^+$(A/λ)を用いた二層平板培養法(プラック形成法)によりウイルスを定量した。

2－3－2 RT-PCR法

本研究では、内部蛍光プローブを用いるTaqMan RT-PCR法を用いてウイルスのRNAを定量する手法を用いた。0.2mLマイクロチューブに試料100μLをとり、90℃で10分間加熱することのよりウイルスのカプシドタンパクを変性し、RNAを水溶液中に分散させた。次にTaqMan Gold RT-PCR kitを用いてOne Step RT-PCR法行った。48℃で30分加熱し逆転写反応を起こしc-RNAを合成し,次に95℃10分加熱しRNA分解した。その後、95℃15秒、60℃45秒のサイクルを55回行いRNAを増幅し、プローブの発光強度を測定することで全ウイルスの定量を行った。使用したプローブはTaqMan probe (5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3')で、リポーターとしてFAMを、クエンチャーとしてTAMRAを用いた。解析では、FAMの蛍光量の対数値を内部標準色素(ROX)の蛍光量の対数値で除した値を用いる(標準化)ことによって、各チューブ間の液量の違いから生ずる蛍光強度の誤差をなくした。また、各チューブのPCR前後の蛍光強度の差をとる(差分)ことによって、各チューブの汚れなどから生じる蛍光強度の誤差を小さくした。また、プライマーはQβ$^+$ (5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3')とQβ$^-$ (5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3')を用いた。

3 結果と考察

図1に不活化実験におけるPACのフロック溶解時間に伴うプラック形成法により測定したウイルス濃度の経時変化を示した。図中の●は60分凝集処理後のウイルスをBE溶液と接触させた場合であり、△は凝集処理を行っていないウイルスを接触させた場合である。凝集剤を添加しない場合、30時間までのBE溶液との接触においてウイルス濃度は変化せず、初期濃度の10^6PFU/mLであった。このことは、高pHのBE溶液との接触はウイルスを不活化させないことを意味する。一方、凝集処理後のウイルスで、5秒間のフロック溶解時間でウイルス濃度は3.3×10^1PFU/mLであり、初期濃度と比較すると極めて低い値となった。また、溶解時間が長くなるに従いウイルス濃度も増加した。これは5秒間濃溶解時間ではフロックが完全には溶解せず、溶解時間を延長することにより除々にフロックが溶解したことを意味する。5時間のフロック溶解時間ではウイルス濃度は2.4×10^4PFU/mLと最大になったが初期濃度の値では回復しなかった。これは、凝集剤によるウイルスの不活化効果によるものであると考えられる。

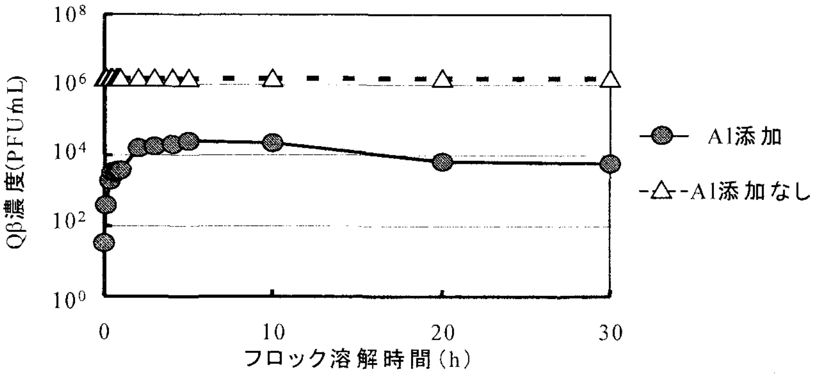

図1.フロック溶解時間に伴う回収されたQβ濃度の変化

4 おわりに

本研究では、アルミニウム系凝集剤のQβに対する不活化効果を調べ、以下の結果を得た。

1. フロック溶解時間5秒間ではフロックが完全には溶解せず、溶解時間を延長することにより除々にフロックが溶解した。
2. フロック溶解時間を5時間まで延長してもウイルス濃度は初期値まで回復しなかった。この事は、アルミニウム系凝集剤のウイルス不活化効果を意味している。

参考文献

1) Matsui, Y., Matsushita, T., Sakuma, S., Gojo, T., Mamiya, T., Suzuoki, H. and Inoue, T., Virus inactivation in aluminum and polyaluminum coagulation, *Environmental Science & Technology*, Vol.37, No.22, pp.5175-5180, 2003.