

(38) 水道水および河川水中の腸管系ウイルスのモニタリングを目的とした新しい濃縮法の開発

Development of New Concentration Method for Monitoring of Enteric Viruses in Tap Water and River Water

原本英司*, 片山浩之*, 大垣眞一郎*

Eiji HARAMOTO*, Hiroyuki KATAYAMA*, Shinichiro OHGAKI*

ABSTRACT ; In order to detect enteric viruses from tap water and river water, a new virus concentration method was developed. Poliovirus type 1, LSc 2ab Sabin strain, was used as a model, and the concentration of poliovirus in water was determined by plaque assay using BGM cell line. We used a “cation-coated membrane,” a negatively charged membrane coated with multivalent cations, for adsorption of viruses. For many enteric viruses have negative charges in environmental samples, and they adsorb to a positively charged membrane. The procedure of rinsing this membrane by H_2SO_4 solution was applied for removing only multivalent cations, and poliovirus on the membrane was eluted by NaOH solution. By using a Millipore HA membrane and AlCl_3 solution, over 90% of poliovirus was recovered from both MilliQ water and tap water, while the recovery ratio from river water was low and unstable. This new method enables us to know the behavior of enteric viruses in tap water.

KEYWORDS ; concentration method, enteric virus, cation-coated membrane, tap water, river water

1. はじめに

20世紀半ば以降、我が国の衛生状況は格段に改善され、過去に猛威を奮ったコレラや赤痢などの病原性細菌による水系感染症の発生は抑制されるようになっている。しかし、以前は未知であった病原性ウイルスが微生物分析技術の進歩によって次々と発見されるようになり、これらのウイルスが起因となって生じる水系感染症に対するリスク評価を行うことが必要となってきた。

現在、我が国の水道水の水質基準¹⁾として定められている項目のうち、微生物に関する基準は一般細菌および大腸菌群の2項目のみであり、浄水場における塩素消毒処理と水道末端における残留塩素濃度の確保によって水道水の安全を保障している。特に、大腸菌群は糞便汚染に関する指標として有効であるとされており²⁾、大腸菌群が基準を満たす水道水には、病原性細菌だけではなくウイルスも存在していないと考えられていたため、現時点においてウイルスに関する水質基準は指定されていない。しかし、諸外国では水道水からウイルスを分離した事例が数多く報告されており³⁾⁻¹²⁾、水道水をはじめとした環境水中のウイルスに関する情報が不足している状況の中、我が国の水道水にはウイルスが含まれていないと断言することはできない。

水道水中のウイルスの挙動の把握を目的としたモニタリングを行う場合、使用するウイルス濃縮法には、①試料水を高い倍率で濃縮できること、②ウイルスを高い割合で回収できること、③ウイルスの回収率が安定していること、④濃縮操作が簡便であること、などが求められる。しかし、これらの条件をすべて満たすウイルス濃縮法が確立されていないのが実状である。

ウイルス濃縮法には、陽電荷膜法¹³⁾、陰電荷膜法¹⁴⁾、吸着法¹⁵⁾、限外ろ過法¹⁶⁾などがあるが、水道水や河川水の濃縮に対しては陽電荷膜法が最も多く用いられている。大部分の腸管系ウイルスの等電点は4~7

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

の範囲内にあるため¹⁷⁾、環境水中においてウイルスは陰電荷を帯びていることが多いと考えられる。陽電荷膜法では、陰電荷のウイルスを陽電荷を帯びた膜に吸着させ、pH 9 程度の少量のビーフェキス溶液でウイルスの誘出を行う。試料水の前処理が不要なために操作が簡便であるが、誘出液として用いるビーフェキス溶液が PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応を阻害することが知られており、PCR 法によってウイルスを検出する場合にはウイルスの精製が必要となる¹⁸⁾⁻²¹⁾。

陽電荷膜法と並び、陰電荷膜法もウイルスの濃縮に対して広く使用されている手法である。陰電荷膜法においては、ろ過原水に添加した陽イオンとウイルスが複合体を形成し、その複合体が陰電荷膜に吸着していると考えられている¹⁷⁾。アルカリ性溶液でウイルスを誘出する場合、陰電荷のウイルスと陽イオンとの結合が分解されていないため、陽イオンの存在が膜からのウイルスの誘出を困難にしている可能性がある。誘出操作の阻害となる陽イオンを膜から除去することを目的とし、誘出操作の前に酸性溶液を用いた膜の洗浄操作を行うことによって、ウイルス回収率が飛躍的に向上することが確かめられている²²⁾。したがって、酸洗浄操作を導入した陰電荷膜法が環境水中のウイルスの濃縮に対して有効となる可能性が高いが、ろ過原水に陽イオン溶液を添加する前処理操作が必要なため、多量の試料水の濃縮には適さない。

本研究においては、水道水および水道水源となる河川水中のウイルスを PCR 法によってモニタリングすることを前提とした濃縮法の開発を行った。本研究で開発した濃縮法は多量の試料水からのウイルス濃縮を目的としており、ろ過原水に陽イオンを添加する必要がないため、陰電荷膜法と比較して操作が簡便である。また、誘出液として無機のアルカリ性溶液である水酸化ナトリウム (NaOH) 溶液を用いており、ウイルス濃縮液を PCR 反応に供することが可能である。濃縮法の原理 (図 1) および操作手順は次の通りである。

ろ過ユニットに装着した陰電荷膜に陽イオン溶液を添加し、アスピレーターを用いて陽イオン溶液の吸引ろ過を行う。陰電荷膜に陽イオンが静電的引力で吸着して飽和することにより、膜は擬似的な陽電荷膜の状態となる (Step 1)。

ウイルスの濃縮対象とするろ過原水をこの膜に通し、ウイルスの膜への吸着を行う。陽イオンを架橋とすることにより、ろ過原水中で陰電荷を帯びているウイルスを静電的引力で膜に捕捉することができる (Step 2)。次に、酸性溶液を用いた膜の洗浄操作により、ウイルスの誘出を阻害すると考えられる陽イオンを膜から除去する。このとき、pH の低下によって等電点を越えて陽電荷を帯びるウイルスは、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、少量のアルカリ性溶液を膜に通してウイルスを再び陰電荷に戻し、静電的斥力によってウイルスを膜から誘出する (Step 4)。

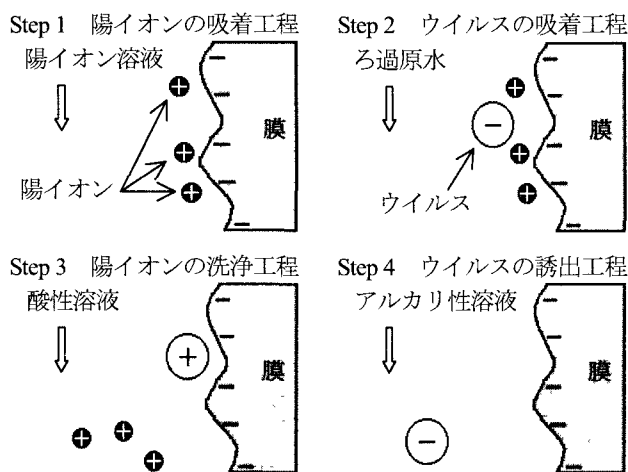


図1 本研究で開発したウイルス濃縮法の原理

2. 実験方法

2.1 使用したモデルウイルス

本研究では、東京都立衛生研究所の矢野一好博士より分与されたポリオウイルス 1 型ワクチン株 (LSc 2ab 株) をモデルウイルスとして用いて濃縮法の最適化を行った。ポリオウイルスはピコルナウイルス科のエンテロウイルス属に分類される直径 25~30nm の球状粒子で、遺伝情報として 1 本鎖 RNA を有してい

る²³⁾。他の多くの腸管系ウイルスとの形状の類似性より、ポリオウイルスを用いて開発した濃縮法が腸管系ウイルス全般に対して有効となることが期待される。保存株のポリオウイルス濃度は $10^6 \sim 10^7$ PFU/mL であった。

2.2 濃縮法の最適条件の検討

濃縮法の最適化は、陽イオンの種類、陰電荷膜の種類、酸洗浄液量、誘出液量の4項目について行った。濃縮法の評価は、基本的にはポリオウイルスの回収率（ろ過原水中のウイルス数に対する誘出液中のウイルス数の割合）を算出することによって行っている。ろ過原水は、高圧蒸気滅菌（121℃、15分間）した MilliQ 水にポリオウイルスを $10^2 \sim 10^3$ PFU/mL の濃度になるように添加したものを使用した。誘出液は、あらかじめ等量の 0.1M 希硫酸 (H_2SO_4) 溶液および TE Buffer を注入しておいた滅菌済み試験管（容量 50mL）をろ過ユニットに装着して回収し、誘出液として用いる NaOH 溶液によるウイルスの不活化を最小限に抑えた。膜は、口径 47mm のものをろ過ユニット（Advantec 社製）に装着し、高圧蒸気滅菌して使用した。試料中のポリオウイルス濃度は、アフリカミドリザルの腎臓細胞由来である BGM 細胞（Buffalo Green Monkey Kidney）を宿主としたブラック法²⁴⁾によって定量した。6穴プレート（Costar 社製）内に増殖させた BGM 細胞をリン酸緩衝食塩溶液（PBS）で洗浄し、1穴につき試料 1mL を添加した。インキュベーター（37℃、 CO_2 濃度 5%）内で 90～120 分間静置してウイルスを細胞に吸着させた後、1穴につき寒天 3mL を添加して 36～48 時間培養させた。培養終了後、1% ニュートラルレッド溶液で 6 時間程度染色することにより、形成したブラックを計数した。試料は、細胞維持液を用いて 10 倍段階希釈した。複数の希釈段階から異なるウイルス濃度が得られた場合はその平均値を採用した。

(1) 陰電荷膜の検討

陰電荷膜の候補として、HA 膜（ニトロセルロースとセルロースアセテートの混合セルロース膜、公称孔径 0.45 μ m, Millipore 社製）と GF/F 膜（ホウケイ酸ガラス繊維膜、公称孔径 0.7 μ m, Whatman 社製）の2種類を考え、それぞれの膜を使用した場合におけるポリオウイルスの膜への吸着率と膜からの回収率を測定し、陰電荷膜としての適性を調べた。250mM 塩化アルミニウム ($AlCl_3$) 溶液 2.0mL を透過させた膜でポリオウイルスを添加した MilliQ 水 40mL をろ過し、pH 3.0 の 0.5mM H_2SO_4 溶液 200mL で酸洗浄、pH 10.5 の 1.0mM NaOH 溶液 5.0mL でウイルスの誘出を行った。膜を透過した MilliQ 水（ろ過原水）を滅菌済み試験管（容量 50mL）を用いて回収し、その中に含まれる膜に吸着しなかったウイルスの割合から膜へのウイルスの吸着率を算出した。比較のため、1MDS 膜（公称孔径 0.45 μ m, Cuno 社製）を用い、NaOH 溶液でウイルスを誘出する陽電荷膜法による測定も行った。陽電荷膜法においては、1MDS 膜でポリオウイルスを添加した MilliQ 水 40mL をろ過し、pH 10.5 の NaOH 溶液 5.0mL を用いてウイルスの誘出を行った。

(2) 陽イオン溶液の検討

陽イオン溶液の検討は、ポリオウイルスの膜への吸着率と膜からの回収率を調べることによって行った。陽イオン溶液の候補として、既存の陰電荷膜法で多用される塩化マグネシウム ($MgCl_2$) 溶液 (2.5M Mg)、 $AlCl_3$ 溶液 (250mM Al)、ポリ塩化アルミニウム (PAC) 溶液 (350mM Al) の3種類を考えた。陰電荷膜には HA 膜、ろ過原水にはポリオウイルスを添加した MilliQ 水 40mL を用いた。陽イオン溶液の添加量は、 $MgCl_2$ 溶液が 1.6mL、 $AlCl_3$ 溶液が 2.0mL、PAC 溶液は 10.0mL とした。HA 膜に陽イオン溶液およびろ過原水を透過させ、pH 3.0 の H_2SO_4 溶液 200mL で酸洗浄、pH 10.5 の NaOH 溶液 5.0mL でウイルスの誘出を行った。ろ過後の原水を滅菌済み試験管（容量 50mL）で回収し、その中に含まれるウイルスの割合から膜へのウイルスの吸着率を算出した。ろ過後の酸洗浄液をねじ口瓶（容量 250mL）で回収して酸洗浄操作におけるウイルスの流出率を求めた。実験は、 $MgCl_2$ 溶液を用いて2回、 $AlCl_3$ 溶液を用いて4回、PAC 溶液を用いて1回を行った。また、 $AlCl_3$ 溶液と PAC 溶液に関しては、ろ過原水量を 500mL に増加させた場合における膜への吸着率と回収率を測定し、ろ過水量の増大に対する影響を検討した。

(3) 酸洗浄液量の検討

酸性溶液を用いた膜の洗浄操作は、ウイルスの吸着状態を維持しながら誘出操作を阻害する陽イオンの

みを膜から流出させることを目的として行う。既存の研究²²⁾において、HA 膜に吸着したマグネシウムイオンが pH 3.0 の H₂SO₄ 溶液による酸洗浄操作で流出し、ポリオウイルスの回収率に向上が見られることが明らかとなっているが、アルミニウムイオンに対する酸洗浄操作の有効性は不明であるため、本研究で確認を行った。250mM AlCl₃ 溶液 2.0mL を HA 膜でろ過し、この膜でポリオウイルスを添加した MilliQ 水 40mL をろ過した。H₂SO₄ 溶液 (pH 3.0) による酸洗浄量は、0mL (酸洗浄操作なし)、50mL、200mL、500mL の 4 段階に設定し、ウイルスは NaOH 溶液 (pH 10.5) 5.0mL で誘出した。

(4) 誘出液量の検討

膜に吸着したウイルスの誘出には pH 10.5 の NaOH 溶液を用いた。NaOH 溶液は PCR 反応を阻害しないため、PCR 法によるウイルスの検出を前提とした本研究の濃縮法に適した誘出液である。ここでは、20.0mL の NaOH 溶液を 2.5mL または 5.0mL 単位で 7 回に分けて膜に添加して吸引ろ過し、膜を透過した NaOH 溶液を滅菌済み試験管 (容量 50mL) で回収してウイルス濃度の測定に供することにより、膜への誘出液の添加量とポリオウイルスの膜からの回収率との関係を調べた。HA 膜に 250mM AlCl₃ 溶液 2.0mL およびポリオウイルスを添加した MilliQ 水 40mL を通し、H₂SO₄ 溶液 (pH 3.0) 200mL による酸洗浄の後、7 回に分けて誘出操作を行った。それぞれの誘出液は別々の滅菌済み試験管 (容量 50mL) を用いて回収した。

2.3 陰電荷膜の口径を拡張させた場合のポリオウイルス回収率の測定

本研究では、濃縮法の最適条件の検討は口径 47mm の陰電荷膜を用いて行ったが、水道水や河川水などの環境水を濃縮してウイルスの検出を試みる場合、多量の試料水のろ過が必要となることが考えら

表 1 HA 膜の口径の違いによる各濃縮関連項目の比較

項目	口径 47mm	口径 90mm	口径 293mm
有効膜面積	9.6cm ² (1.0)	43.0cm ² (4.5)	518cm ² (54.0)
ろ過原水	40mL (1.0)	40mL (1.0)	1800mL (45.0)
250mM AlCl ₃ 溶液	2.0mL (1.0)	8.0mL (4.0)	80mL (40.0)
H ₂ SO ₄ 溶液 (pH 3.0)	200mL (1.0)	200mL (1.0)	2000mL (10.0)

れるため、口径の小さな膜を使用することは効率的ではない。そこで、多量の環境水からのウイルスの濃縮には膜の口径を拡張させることで対応することとし、具体的には口径 293mm の膜の使用を想定する。しかし、口径の小さな膜で高いウイルス回収率が得られた条件が口径のより大きな膜に対しても適用可能であるかどうかは不明である。そこで、口径 47mm、90mm、293mm の 3 種類の HA 膜を使用してポリオウイルス回収率を測定し、口径 47mm の膜の有効面積 (9.6cm²) に換算した場合のそれぞれの膜における誘出液量とウイルス回収率との関係を調べ、膜の口径の拡張可能性について検討した。3 種類の膜の有効面積の関係および濃縮操作の条件は表 1 の通りであり、口径 47mm の膜を基準とした場合の他の 2 種類の膜における濃縮項目の比を括弧内に示している。それぞれの膜について数段階の誘出液量を設定し、ウイルス回収率を測定した。

2.4 水道水および河川水からのポリオウイルス回収率の測定

MilliQ 水をろ過原水に用いて最適化された本研究の濃縮法を水道水と河川水に対して適用し、これらの試料水からの回収率を測定することで濃縮法の効果を調べた。水道水は東京都水道局金町浄水場から給水されている東京大学工学部 14 号館で採水し、チオ硫酸ナトリウムを 50mg/L となるように注入して残留塩素を中和して使用した。河川水は東京都水道局玉川浄水場における水道原水を使用した。試料水は高圧蒸気滅菌後、ポリオウイルスを 10²~10³PFU/mL の濃度になるように添加した。口径 47mm の HA 膜で 250mM AlCl₃ 溶液 2.0mL をろ過し、所定量のろ過原水を通してウイルスを膜に吸着させた。pH 3.0 の H₂SO₄ 溶液 200mL で酸洗浄を行い、pH 10.5 の NaOH 溶液 5.0mL でウイルスを誘出した。水道水のろ過水量は、40mL、50mL、150mL、500mL、1000mL の 5 段階、河川水は、50mL、150mL、300mL、500mL、1000mL の 5 段階に設定した。

2.5 試料水の種類および陽イオンの添加がろ過速度に与える影響の検討

河川水を濃縮する場合、目詰まりなどによるろ過速度の低下が原因で H₂SO₄ 溶液や NaOH 溶液との接触時間が増大し、ウイルスが不活化して回収率が低下することが考えられる。ろ過速度の低下は可能な限り避ける必要のある現象である。そこで、MilliQ 水、水道水、河川水の 3 種類の試料水のろ過速度を測定し、HA 膜への AlCl₃ 溶液の添加の有無によるろ過速度の違いを比較した。河川水に関しては、HA 膜（公称孔径 0.45μm）よりも口径の大きい RA 膜（公称孔径 1.2μm, Millipore 社製）または SM 膜（公称孔径 5.0μm, Millipore 社製）を HA 膜の上に重ねた場合のろ過速度も測定した。膜を重ねることにより、河川水中の浮遊物質が孔径の大きな上の膜（RA 膜または SM 膜）で除去され、ろ過速度が向上する可能性がある。一方、膜を重ねない場合と同様に、ウイルスは下部の HA 膜で吸着、誘出することが可能であると期待される。なお、ろ過速度はアスピレーター吸引圧を最大にして測定した。

3. 実験結果

3.1 濃縮法の最適条件の検討結果

(1) 陰電荷膜の検討結果

陰電荷膜である HA 膜と GF/F 膜、陽電荷膜である 1MDS 膜を用いた場合のウイルスの膜への吸着率と回収率を表 2 に示した。HA 膜を用いた場合、ろ過原水中のウイルスの全量が膜に吸着し、誘出工程において平均 94%（81～114%）のウイルスが回収された。GF/F 膜でも 100% のウイルス吸着率を得ることができたが、回収率（65%）は HA 膜よりも低く、膜には 30% 以上のウイルスが捕捉されたままであると考えられる。回収率の高さを考えると、HA 膜は本研究の濃縮法に適した陰電荷膜であると判断できる。また、1MDS 膜で捕捉したウイルスを NaOH 溶液で誘出した場合、膜へのウイルスの吸着率は 66%、回収率は 35% と求まり、擬似陽電荷膜を用いた本研究の濃縮法よりも濃縮効率が劣っていることが分かった。

表 2 膜の種類によるウイルスの濃縮状況の比較

膜	平均吸着率	平均回収率	試料数
HA 膜	100%	94%	4
GF/F 膜	100%	65%	1
1MDS 膜	66%	35%	2

(2) 陽イオン溶液の検討結果

ろ過原水量が 40mL の場合の陽イオン溶液の検討結果を図 2 に示した。図には、ろ過原水中のポリオウイルス数を基準とし、各工程（吸着工程、酸洗浄工程、誘出工程）において膜に捕捉されていると考えられるウイルスの割合を示している。陽イオンにアルミニウムイオンを用いた場合（AlCl₃ 溶液、PAC 溶液）のウイルスの膜への吸着率が 100% であったのに対し、マグネシウムイオンを用いた場合の吸着率は 71% と低かった。MgCl₂ 溶液を用いた場合はウイルスの回収率（15%）も良好ではなく、既存の陰電荷膜法で有効であった MgCl₂ 溶液は本研究の濃縮法には適さないことが分かった。

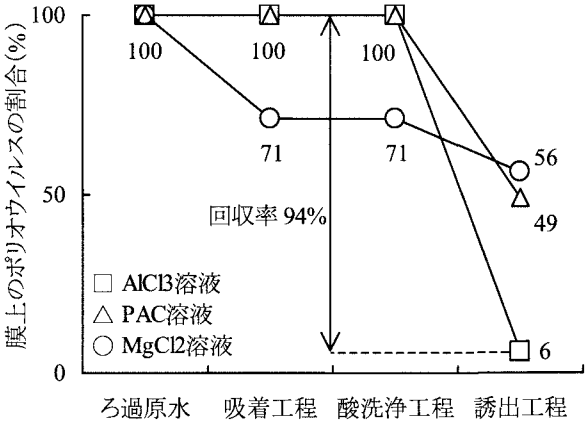


図 2 陽イオン溶液によるウイルスの膜上での挙動の比較

AlCl₃ 溶液と PAC 溶液を比較した場合、膜へのウイルスの吸着率は共に 100% であったが、ウイルスの誘出率において AlCl₃ 溶液（94%）が PAC 溶液（51%）よりも優

表 3 MilliQ 水 500mL からのウイルスの濃縮状況

陽イオン溶液	平均吸着率	平均回収率	試料数
AlCl ₃ 溶液	96%	86%	4
PAC 溶液	83%	38%	1

れていた。ろ過原水量が 500mL に増加した場合においても、 AlCl_3 溶液を用いた際のウイルスの膜への吸着率（96%）と回収率（86%）は PAC 溶液よりも高く（表 3）、PAC 溶液よりも AlCl_3 溶液の方が陽イオン溶液として適していることが分かった。なお、すべての陽イオン溶液を用いた場合において、酸洗浄操作で膜から流出するウイルスは存在しなかった。

(3) 酸洗浄液量の検討結果

酸洗浄液量を変化させた場合のポリオウイルスの回収率を図 3 に示した。酸洗浄操作を行わない場合の回収率は平均 82%（71～89%）であったが、200mL の酸洗浄操作の導入で平均 94%（81～114%）、500mL の酸洗浄操作で平均 98%（85～110%）に向上した。一方、酸洗浄液量が 50mL の場合は回収率に向上が見られなかった。酸洗浄操作は、50mL では不十分であるが、200mL 以上であれば十分であると判断できる。

(4) 誘出液量の検討結果

分画して回収した各誘出液（2.5mL または 5.0mL）中のウイルス数がろ過原水（40mL）中のウイルス数に対して占める割合を図 4 に示した。図は 2 回の測定の実験結果を示している。膜に添加したろ過原水中のウイルスの 60% が最初の 2.5mL の誘出液中に流出し、続く 2.5mL の誘出液で 13% のウイルスが回収された。5.0mL の誘出液で 73% のウイルスが回収されたことになる。しかし、その後の 15.0mL の誘出液で回収されたウイルスの割合は 5% 以下であり、5.0mL 以降はウイルスがほとんど誘出されていないことが分かる。誘出液量が多い場合にはアルカリによるウイルスの不活化が問題となることがあり、また、PCR 法に供することのできる液量には限りがある²⁵⁾。このことより、5.0mL の誘出液量が最適であると考えられる。

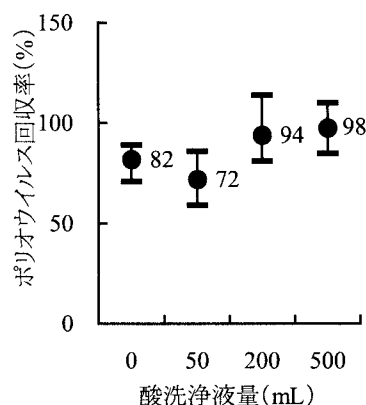


図 3 酸洗浄液量と回収率の関係

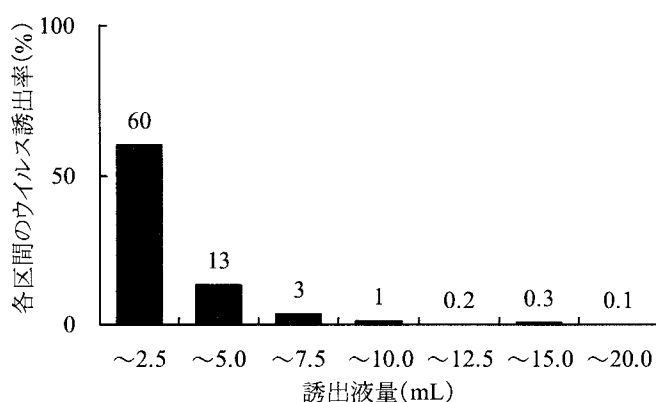


図 4 NaOH 溶液によるウイルスの誘出状況

3.2 陰電荷膜の孔径を拡張させた場合のポリオウイルス回収率の測定結果

膜の有効面積比を用いて口径 90mm と 293mm の膜を透過した誘出液量を口径 47mm の膜あたりの透過量に換算し、口径の異なる 3 種類の膜によるポリオウイルス回収率の平均値を比較した結果を図 5 に示した。図より、膜の口径が変わることによるウイルス回収率の変化はほとんど生じないと判断できる。膜の口径に関係なく、口径 47mm の膜あたりの誘出液量に換算して 5.0mL 程度までの範囲内では、誘出液量の増加と共に回収率が向上する傾向が見られ、

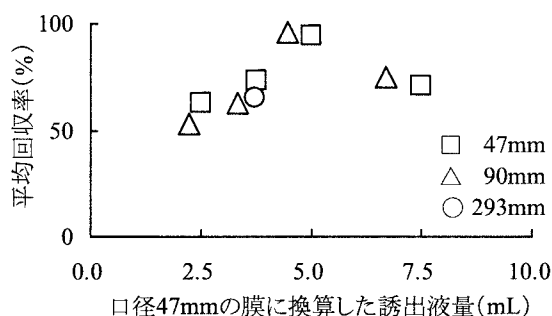


図 5 膜の口径を変化させることによる回収率の比較

5.0mL の誘出液量で 100%近い回収率が得られている。一方、誘出液量が 7.5mL になると回収率が低下しており、アルカリとの接触時間の増加によるポリオウイルスの不活化がその原因の 1 つとなっている可能性がある。口径 293mm の膜を用いた測定は 1 回しか行っていないが、他の 2 種類の口径の膜の場合と同程度の回収率が得られている。このことより、膜面積の増加に合わせて濃縮条件を拡大することで、本研究の濃縮法を口径の大きな膜を用いたウイルス濃縮に適用することが可能であると考えられる。

3.3 水道水および河川水からのポリオウイルス回収率の測定結果

水道水および河川水からのポリオウイルス回収率の測定結果を図 6 に示した。水道水からは 100%前後の高いポリオウイルス回収率が得られ、ろ過水量が増加することによる回収率の低下傾向は見られなかった。水道水 1000mL からの回収率は 74%および 114%と求まっており、有効膜面積が 50 倍以上の口径 293mm の HA 膜を使用することによって、少なくとも 50L 以上の水道水から高い回収率でウイルスを濃縮できると考えられる。一方、河川水からのポリオウイルス回収率は、いくつかの試料で 100%近い値が得られたものの、50%を下回る試料が半分以上を占めた。MilliQ 水や水道水からは高い回収率が得られた本研究の濃縮法であるが、河川水に対しては安定した高い回収率を示す手法とは判断されなかった。

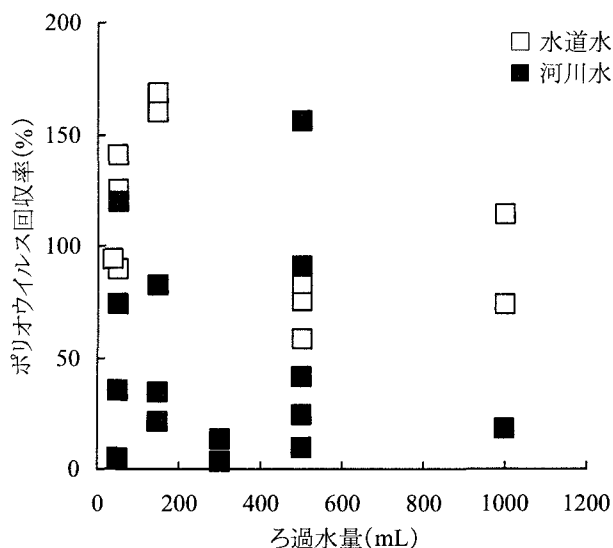


図 6 水道水および河川水からのポリオウイルス回収率

3.4 試料水の種類および陽イオンの添加がろ過速度に与える影響の検討結果

MilliQ 水、水道水および河川水 500mL のろ過に要する時間を表 4 に示した。HA 膜に $AlCl_3$ 溶液を添加しない場合、MilliQ 水と水道水のろ過速度に大きな差は見られなかったが、河川水のろ過速度は半分程度に低下した。これは、主に河川水中の浮遊物質の存在が原因となって生じていると考えられる。水道水を用いた場合、 $AlCl_3$ 溶液を HA 膜に添加することによるろ過速度の低下はあまり生じなかったが、河川水のろ過速度は約 17 分の 1 に低下した。このことより、アルミニウムイオンの HA 膜への添加が河川水のろ過速度に大きな影響を与えていることが分かった。アルミニウムイオンが膜上で凝集反応を起こし、ろ過速度の低下が生じていると考えられる。試料水のろ過速度がほぼ 0 にまで低下した場合においても、酸洗浄を行う過程でろ過速度が飛躍的に上昇する現象が観察されており、浮遊物質よりも陽イオンが膜の目詰まりの大きな要因となっていることが考えられる。

$AlCl_3$ 溶液を添加しない場合のろ過速度よりは遅かったものの、孔径の大きな膜 (RA 膜, SM 膜) を重ねることで河川水のろ過速度が大きく向上した。しかし、HA 膜の上に孔径 5.0 μ m の SM 膜を重ねた場合のポリオウイルスの平均回収率は 19% (4~39%) と低く、膜を重ねることによる回収率の改善は見られなかった。したがって、本研究の濃縮法による河川水からのウイルス回収率を膜の重ね合わせの導入によって向上させることはできないと言える。

表4 MilliQ 水、水道水、河川水 500mL のろ過速度の測定

試料水	陰電荷膜	AlCl ₃ 溶液の添加	ろ過時間	平均ろ過速度	(速度比)
MilliQ 水	HA 膜 (公称孔径 0.45μm)	なし	63 秒	476mL/分	(1.00)
水道水	HA 膜	なし	56 秒	536mL/分	(1.13)
	HA 膜	あり	76 秒	395mL/分	(0.83)
河川水	HA 膜	なし	122 秒	246mL/分	(0.52)
	HA 膜	あり	2149 秒	14mL/分	(0.03)
	HA 膜+RA 膜(公称孔径 1.2μm)	あり	536 秒	56mL/分	(0.12)
	HA 膜+SM 膜(公称孔径 5.0μm)	あり	170 秒	176mL/分	(0.37)

4. 考察

本研究で開発した濃縮法は、既存の陰電荷膜法で多用されるマグネシウムイオン (MgCl₂ 溶液) よりもアルミニウムイオン (AlCl₃ 溶液および PAC 溶液) を用いた場合に良好な回収率を示した。既存の陰電荷膜法においては、ろ過原水中で陽イオンとウイルスの複合体を形成させた後に膜への吸着を行っている¹⁷⁾。一方、本研究の濃縮法では、陽イオンを飽和させた陰電荷膜にウイルスが吸着することになる。両手法の大きな違いにはウイルスと陽イオンとの接触時間が挙げられ、接触時間が短い本研究の濃縮法の場合、2 価のマグネシウムイオンでは十分なウイルスの吸着効果が得られなかった可能性がある。それに対し、アルミニウムイオンは 3 価であるために高い吸着率を示したと考えられる。

陽イオンの膜からの除去を目的とした H₂SO₄ 溶液 (pH 3.0) を用いた酸洗浄操作を 200mL 以上行うことで回収率に向上が見られた。その際、ウイルスの膜からの流出がまったく見られなかったことから、陰電荷を帯びていたウイルスが陽電荷となって膜と直接的に吸着していると考えられる。NaOH 溶液 (pH 10.5) 5.0mL で誘出を行うことにより、ほぼ全量のウイルスを回収することが可能となった。陰電荷膜としては、Millipore 社製の HA 膜 (公称孔径 0.45μm) が最適であると判断された。

以上の実験結果より、口径 47mm の陰電荷膜を用いる場合、表 5 に示した濃縮条件が最適であると判断された。この最適濃縮条件は主に 40mL 程度の少量の MilliQ 水をろ過原水に用いて求められたものであるが、MilliQ 水 500mL (4 試料) から平均 86% (表 3) のポリオウイルス回収率が得られた条件でもある。また、1000mL の MilliQ 水 (1 試料) から高い回収率が得られており、ろ過水量の増加への対応が可能な条件であると言える。この最適濃縮条件は水道水に対しても有効であり、ろ過水量とは無関係に安定した高い回収率が得られ、開発した濃縮法が水道水からのウイルス検出に対して有効となる可能性が示唆された。しかし、河川水に対する回収率は低い値が多くを占め、河川水には適用できない条件であることが分かった。

表5 口径 47mm の膜に対する最適濃縮条件

項目	最適濃縮条件
陰電荷膜	HA 膜 (公称孔径 0.45μm)
陽イオン溶液	250mM AlCl ₃ 溶液 2.0mL
酸洗浄液	H ₂ SO ₄ 溶液 (pH 3.0) 200mL
誘出液	NaOH 溶液 (pH 10.5) 5.0mL

河川水の回収率が低い範囲に集中している原因としては、①浮遊物質などの濁質によって膜の物理的な目詰まりが生じ、酸洗浄液や誘出液が透過できない部分が生じてしまったこと、②膜へのアルミニウムの添加で生じるウイルスの吸着可能面が河川水中に存在する陰電荷を帯びた物質によって埋め尽くされ、ウイルスとアルミニウムイオンの直接的な吸着が起きなくなったこと、③アルミニウムイオンの凝集作用によって生じる膜の目詰まりがウイルスの誘出を困難にしてしまうこと、などが考えられる。これらの問題への対策としては、使用する陽イオンの種類を変えることなどにより、河川水から高い回収率を示す濃縮条件を検討することが求められる。表 4 に示したように、河川水のろ過に要する時間は AlCl₃ 溶液の添加によって大幅に増加する。操作の後半にはろ過速度が回復するものの、酸洗浄操作において H₂SO₄ 溶液と接触する時間が MilliQ 水や水道水と比較して長いため、膜に吸着しているウイルスが不活化してしまった

ことも回収率低下の要因として考えられる。

本研究においては、誘出液に無機のアルカリ性溶液である NaOH 溶液を使用しており、PCR 法によってウイルスを検出することが可能である。PCR 法でウイルスの検出を行う場合、ウイルス遺伝子 (RNA または DNA) のみが存在していれば良いことになるため、ウイルスの活性の有無は問題とはならない。逆に言えば、PCR 法で検出されたウイルスの感染価を知ることはできないことになる。ウイルスの感染価の有無を知る方法として、ウイルスに感受性のある動物細胞に試料を接種し、感染力を有しているウイルスが細胞内で大量に増殖することを利用してウイルスの検出を行う Cell Culture PCR 法²⁶⁾があるが、この方法で検出可能なウイルスは細胞に感受性を持つものに制限される。そのため、多くのウイルスに関しては、PCR 法によって感染価を知ることはできない。環境水中におけるウイルスの挙動には不明な部分が多く、ウイルスの摂取によって生じる水系感染症の実態を把握することは非常に重要である。感染価を失っているウイルスを摂取しても感染することはないため、環境水中に感染価のないウイルスが存在していても健康に悪影響が生じることはない。PCR 法でウイルスの検出を行い、その結果を使用してウイルスの感染リスクを評価する場合は、より安全側に立った視点でリスク評価を行うことになる。

本研究の濃縮法は水道水中のポリオウイルスの濃縮に対して効果があり、ポリオウイルスと形状が類似していることを考慮すれば、ノーウォーク様ウイルス (Norwalk-like virus) やロタウイルス (Rotavirus)、アデノウイルス (Adenovirus) などの他の多くの腸管系ウイルスに対して濃縮法が有効となる可能性が高い。今後は、定量可能な別のウイルスを用いて回収率の測定を行い、腸管系ウイルス全般への濃縮法の適用可能性を検討する必要がある。さらに、実際の水道水を濃縮し、PCR 法によってウイルスの検出を行うことにより、水道水中のウイルスの存在状況を調査することが求められる。

5. まとめ

本研究では、水道水および河川水中のウイルスを検査するための新しい濃縮法として、陰電荷膜に陽イオンを吸着させた擬似陽電荷膜で試料水中のウイルスを吸着し、酸性溶液による膜の洗浄操作で陽イオンを流出させ、少量のアルカリ性溶液でウイルスを誘出する手法を開発した。得られた知見を以下に示す。

- 1) 最適濃縮条件の検討を行った結果、陰電荷膜に口径 47mm の HA 膜 (公称孔径 0.45 μ m)、陽イオン溶液に 250mM AlCl₃ 溶液 2.0mL、酸洗浄液に pH 3.0 の 0.5mM H₂SO₄ 溶液 200mL、誘出液に pH 10.5 の 1.0mM NaOH 溶液 5.0mL を用いた場合、MilliQ 水 40mL から平均 94% (81~114%) のポリオウイルス回収率が得られた。また、500mL、1000mL の MilliQ 水からも高い回収率が求まった。
- 2) 開発した濃縮法を多量の試料水に対して適用する場合、口径の大きな膜を用いることによって対応した。口径 47mm の HA 膜で得られた最適濃縮条件を膜の有効面積比に合わせて拡張することにより、口径 47mm 以上の膜に対しても口径 47mm の膜の場合と同等のポリオウイルス回収率が得られた。
- 3) MilliQ 水に対して得られた最適濃縮条件は水道水を濃縮する場合にも有効であり、水道水から 100% 近いポリオウイルス回収率が得られた。また、ろ過水量が増加しても回収率に低下傾向は見られず、開発した濃縮法が多量の水道水からのウイルス濃縮に対して有効となる可能性が高いことが分かった。一方、河川水からは安定した高い回収率が得られず、濃縮条件の再検討が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) 日本水道協会 (1993) 上水試験方法 解説編, 東京.
- 2) Engelbrecht R.S. (1978) Chlorine-Resistant Indicator : in Indicators of Viruses in Water and Food, Ann Arbor Sci., 243-265.
- 3) AWWA (1979) Viruses in Drinking Water, Committee Report, J. AWWA, 71:441-444.
- 4) Keswick B.H., Gerba C.P., Rose J.B., and Tranzos G.A. (1985) Detection of Rotavirus in Treated Drinking Water, Wat. Sci. Tech., 17:1-6.
- 5) Payment P., and Trudel M. (1985) Detection and Health Risk Associated with Low Virus Concentration in Drinking Water, Wat. Sci. Tech., 17:97-103.

- 6) Rose J.B., Gerba C.P., Singh S.N., Toranzos G.A., and Keswick B. (1986) Isolating Viruses from Finished Water, *J. AWWA*, January, 56-61.
- 7) Toranzos G.A., Hanssen H., and Gerba C.P. (1986) Occurrence of Enteroviruses and Rotaviruses in Drinking Water in Columbia, *Wat. Sci. Tech.*, **18**:109-114.
- 8) Grabow W.O.K., Taylor M.B., and Villiers J.C. (2001) New Methods for the Detection of Viruses : Call for Review of Drinking Water Quality Guidelines, *Wat. Sci. Tech.*, **43**:1-8.
- 9) Martins M.T., Sanchez P.S., Marques E., Monteiro C.K., and Molina A.G. (1986) Ten Year Survey of Salmonella and Enterovirus in Raw and Treated Waters in the Great Sao Paulo Area, Brazil, *Wat. Sci. Tech.*, **18**:53-60.
- 10) Melnick J.L., and Gerba C.P. (1982) Viruses in Surface and Drinking Waters, *Environ. Intl.*, **7**:3-7.
- 11) Berg G. (1984) Criteria Document for Waterborne Disease, Office of Criteria and Standards, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- 12) Akin E. (1984) Occurrence of Viruses in Treated Drinking Water in the United States, *Wat. Sci. Tech.*, **17**:689-700.
- 13) Sobsey M.D., Wallis C., Hendersen M., and Melnick J.L. (1979) Concentration of Enteroviruses from Large Volume of Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**:588-595.
- 14) Wallis C., and Melnick J.L. (1967) Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, *J. Virology*, **1**:472-477.
- 15) Vilagines P., Sarrette B., Danglot C., and Vilagines R. (1982) A New Large Scale Technic for Quantitative Recovery of Enteroviruses by Adsorption on Suspended Glass Powder : Application to Surface and Drinking Waters of the Paris Area, *Wat. Sci. Tech.*, **14**:281-290.
- 16) Bicknell E.A., Dziewulski D.M., Sturman L.S., and Belfort G. (1985) Concentration of Seeded and Naturally Occurring Enteroviruses from Waters of Varying Quality by Hollow Fiber Ultrafiltration, *Wat. Sci. Tech.*, **17**:47-62.
- 17) Gerba C.P. (1984) Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces, *Adv. Appl. Microbiol.*, **30**:133-168.
- 18) Abbaszadegan M., Huber M.S., Gerba C.P., and Pepper I.L. (1993) Detection of Enteroviruses in Groundwater with the PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:1318-1324.
- 19) Shieh Y.S., Wait D., Tai L., and Sobsey M.D. (1995) Methods to Remove Inhibitors in Sewage and Other Fecal Wastes for Enterovirus Detection by The Polymerase Chain Reaction, *J. Virol. Methods*, **54**:51-66.
- 20) Schwab K.J., Leon R.D., and Sobsey M.D. (1995) Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for the Detection of Enteroviruses, Hepatitis A Virus, and Norwalk Virus by Reverse Transcription-PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:531-537.
- 21) Jaykus L.A., Leon R.D., and Sobsey M.D. (1996) A Virion Concentration Method for Detection of Human Enteric Viruses in Oysters by PCR and Oligoprobe Hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:2074-2080.
- 22) Katayama H., Shimasaki A., and Ohgaki S. (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**:1033-1039.
- 23) 植竹久雄 編 (1979) ウイルス学, 第4版, 理工学社, 東京.
- 24) Keswick B.H., Gerba C.P., Secor S.L., and Cech I. (1982) Survival of Enteric Viruses and Indicator Bacteria in Groundwater, *J. Environ. Sci. Health*, **17**:903-912.
- 25) Ma J.M., Gerba C.P., and Pepper I.L. (1995) Increased Sensitivity of Poliovirus Detection in Tap Water Concentrates by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, *J. Virol. Methods*, **55**:295-302.
- 26) Reynolds K.A., Gerba C.P., and Pepper I.L. (1996) Detection of Infectious Enteroviruses by an Integrated Cell Culture-PCR Procedure, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:1424-1427.