

B-10 水中 RNA ウイルスの陰電荷膜を用いた濃縮法への酸洗浄工程の導入

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

○嶋崎明寛

同上

片山浩之

同上

大垣真一郎

1. はじめに

近年、水道水源の水質の悪化や、水の再利用需要の高まりによって、下水で汚染されている可能性がある水を使用する機会が増加している。しかしながら、大腸菌群を用いた現行の病原微生物指標では、細菌に比べ消毒耐性を持つウイルスに関する安全性を確保できない可能性がある。病原ウイルスは環境中では非常に低濃度であり、また、検出が困難である。そのために環境中のウイルスに関する情報は不足しており、ウイルスの人の健康に関するリスクを評価することが困難となっている。

水中の低濃度のウイルスを測定する工程は、ウイルスの濃縮と定量の2つの工程からなる。ウイルス濃縮法は、膜や担体等にウイルスを吸着させた後、少量の誘出液でウイルスを誘出するというものであるが、未だ改良の余地を残している。ウイルスを検出する手法には、ウイルスを培養する手法（培養法）とウイルスゲノムをPCR (Polymerase Chain Reaction) を用いて検出する手法（PCR法）がある。PCR法は培養法に比して操作が簡便で短時間で検出が可能である。また、培養不可能なウイルスについてはPCR法が唯一の測定手法となる。通常のPCR法は検出を目的とし定量性は持たないが、定量性を持つPCR法が開発されつつあるので、PCR法は有力なウイルス測定手法であるといえる。

本研究では、ウイルスの濃縮・定量法の確立を目的として、大腸菌ファージQ β で効果があったといわれる¹⁾、陰電荷膜を用いたウイルス濃縮法(陰電荷膜法)に酸による洗浄工程(酸洗浄)を導入する手法を、ポリオウイルス1型ワクチン株に適用し最適化を行った。ウイルス測定には、培養法であるブラック形成法とRT-PCR法の2つを用いた。

陰電荷膜法には、ウイルスを吸着させることは容易であるが、膜からウイルスを誘出させることが困難であるという問題点がある。陰電荷膜にウイルスが吸着する機構は不明な点が多いが、水中で陰電荷に帯電しているウイルスと陰電荷膜の間に、添加した金属陽イオンが介在することで吸着していると考えられる。酸洗浄は、この金属陽イオンを流出させることで、ウイルスを誘出しやすくさせることを目的としている。また、一般にビーフエキスを誘出液として用いるが、ビーフエキスは再濃縮後にPCR反応を阻害するという問題を生じる。そこで、本研究では誘出液として再濃縮後PCRを阻害しない無機の高アルカリ溶液(NaOH溶液)を用い、ビーフエキスとの比較をおこなった。

2. 実験材料と方法

2.1 ポリオウイルス測定法

供試ウイルスとして、弱毒ポリオウイルスSabin 1型(Lsc、2ab)株を用いた。ウイルス検出には、アフリカミドリザルの腎細胞(BGM細胞)を用いたブラック形成試験(ブラック法)と、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法の2つの方法を用いた。

RT-PCRには、プライマー(パンエンテロー+ : cctccggccctgaatg, パンエンテロー- : accggatggccaatccaa)²⁾を用いた。本研究のRT-PCRには、TaqMan Gold RT-PCR Kit(PE Applied Biosystem)を使用した。試料は1 μ lを供じ、反応条件は、キット付属のプロトコールに従った。ただし、RNA抽出には、熱破碎(99 $^{\circ}$ C 5分 $\sim$ 4 $^{\circ}$ Cに急冷)を用いた。RT(逆転写)には、パンエンテローを用いた。温度条件は、RT: 42 $^{\circ}$ C 60分 $\sim$ 95 $^{\circ}$ C 5分 $\sim$ 4 $^{\circ}$ C, PCR条件は、95 $^{\circ}$ C 10分 $\sim$ (95 $^{\circ}$ C 1分, 55 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分) $\times$ 40サイクル $\sim$ 72 $^{\circ}$ C 6.5分 $\sim$ 4 $^{\circ}$ C保存とした。PCR

後の判定は、アガロースゲルによる電気泳動によりバンドが 197bp の位置に見られたものを陽性とした。

ブラック法では、底層に BGM細胞を培養した 6 穴プレートに試料 1 ml/穴を 90 分間接種し、寒天を上層後、37℃で 3 日ほど培養し、形成されるブラック数により試料のウイルス濃度を決定した。

本研究では、PCR 法による定量をおこなわなかったため、ウイルス濃度の定量はブラック法によった。

2. 2 ウイルス濃縮法

陰電荷膜法には、滅菌蒸留水にポリオウイルス高濃度原液を添加し、マグネシウムイオンを 25mM(ポリオウイルスを 100%吸着した濃度)に調整したものの原水とした。陰電荷膜は、HA膜(ミリポア社製、孔径 0.45 μ m、口径 47mm)を、フィルターホルダーに装着後オートクレーブ滅菌して用いた。原水 50ml を吸引ろ過した後、誘出前に酸を所定量流した(酸洗浄)。誘出液を流してそのろ液を回収し、ウイルス濃度を測定した。ろ加速度はすべての工程で約 100ml/分であった。

濃縮工程の最適化は、①ポリオウイルスの pH 感受性の実験、②酸による Mg^{2+} の誘出実験、③洗浄液量を 3 段階に変化させた濃縮実験、の各実験により行った。各実験の概略は以下のとおりである。

2. 3 ポリオウイルスの pH 感受性の実験

酸性側のウイルスの pH 感受性を調べる際のサンプルは、希硫酸の希釈列 2ml にポリオウイルス原液 10 μ l を加え、10 分後に等量の NaOH と TE バッファー 0.1ml で中和し、細胞維持液を加えて全量を 10ml とした。アルカリ性側のサンプルは、逆に 0.1N NaOH の 10 倍段階希釈列 2ml にポリオウイルスの原液 10 μ l を加え、1 分後に中和し、細胞維持液を加えて、全量を 10ml とした。また、比較のために中和後の液にポリオウイルス 10 μ l を加えて細胞維持液で全量を 10ml にしたものも測定した。ウイルス生残数はブラック法で測定し、ウイルスゲノムが検出可能な pH 値を知るために RT-PCR 法による測定をおこなった。

2. 4 酸によるマグネシウムイオンの誘出実験

マグネシウムイオンの流出特性は、塩化マグネシウムの高濃度溶液を MilliQ 水で希釈し 25mM に調整した原水 50ml を HA 膜に通した後に、 1.0×10^{-3} N H_2SO_4 を膜に通し(酸洗浄)、そのろ液を 50ml ずつコニカルチューブで分画した。原水のろ過、酸洗浄は、アスピレーターで吸引ろ過した。ろ過速度は約 100ml/min であった。なお、HA 膜は、オートクレーブ滅菌したものをを用いた。マグネシウムイオン濃度は、ICP 発光分析装置 (PERKIN ELMER OPTIMA 3000DV) を用いて測定した。

2. 5 濃縮実験

酸洗浄には、 1.0×10^{-3} N の希硫酸を使用した。酸洗浄量は、0, 50, 200ml の 3 段階とし、誘出操作には 2 つの NaOH 溶液(pH10.5, pH12)をそれぞれ用いた。また、酸洗浄をおこなわず、ビーフエキスを誘出液として用いたものを比較のために測定した。濃縮液のウイルス濃度は、ブラック法によった。

3. 実験結果と考察

3. 1 RT-PCR 法とブラック法の感度比較

RT-PCR 法によるウイルス原液の 10 倍希釈列の測定では、0.001PFU/tube 以上に相当する試料を陽性と判定し、それより下の希釈列の試料を陰性と判定した。

3. 2 ポリオウイルスの pH 感受性

ポリオウイルスの pH 感受性の実験結果は、図 1 のように、ウイルスを接触させた酸・アルカリの pH とブラック法によるウイルス生残数とで示した。サンプルの pH 値は、低いほうから順に、1.2, 2.0, 2.9, 4.0, 5.1, 8.0, 9.1, 10.4, 12.0, 12.9 であった。中

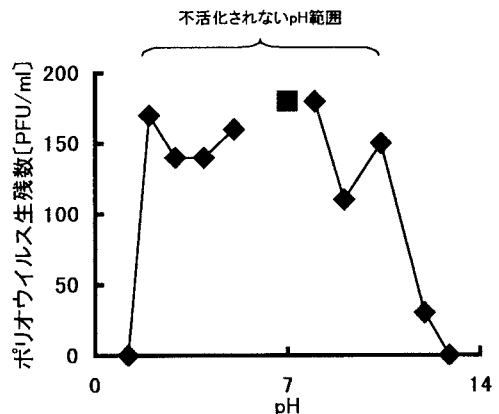


図1. 酸・アルカリ接触後のポリオウイルス生残数

和後にポリオウイルスを添加したサンプルは、pH7に表示した。ブラック法による生残数の測定結果によると pH2.0~pH10.4 の範囲でウイルスは不活化されていないといえる。RT-PCR 法では pH1.2~pH12.0 の範囲で中和後にウイルスを添加したサンプルと同じ希釈列で陽性と判定された。pH12.9 では、陰性と判定された。この結果により、ウイルスを不活化させない pH 値として、酸洗浄には pH3 の希硫酸を、誘出液は pH10.5 の NaOH を用いることとした。また、さらに高い pH 値についての知見を得るために pH12 の NaOH も用いた。

3. 3 マグネシウムイオン流出実験

Mg²⁺の流出状況は、図2のとおりである。Mg²⁺は、最初の 50ml 中で 500ml までの層流出量のうち 93%が流出した。200ml 以降は、分画した液の Mg²⁺濃度が検出限界と考えられる 0.001mM 以下であった。この結果、酸洗浄量は 200ml で十分と判断した。

3. 4 濃縮実験

回収率は、原水と誘出液のブラック法によるウイルス数

の比を用いた。酸洗浄量によるポリオウイルス回収率の変化は、図3のように、PH10.5, pH12 どちらの場合でも、洗浄量を増加させると、回収率は高くなった。

2つの希釈倍率から異なるウイルス濃度が算出された場合、その両者の平均をとってウイルス濃度とした。このことが、pH10.5 の酸洗浄をおこなった誘出液で回収率が 100%を超えた原因と考えられる。

ビーフェキスを誘出液として用いた既存の陰電荷膜法に比べ、誘出液に pH10.5 の NaOH を用いたサンプルはいずれも高い回収率を示した。また、洗浄量の増加に伴い回収率の増加が見られた。

4. まとめ

ウイルス濃縮法の一つである陰電化膜法に酸洗浄を導入し、無機の高アルカリ溶液を誘出液に用いる手法をポリオウイルスに対して適用した結果、pH3 の希硫酸 200ml で洗浄し、pH10.5 の NaOH で誘出した場合、ブラック法での判定においてビーフェキスをを用いた既存の手法に比べて高い回収率を示した。無機の高アルカリ溶液は、ビーフェキスと異なり再濃縮の際に PCR 反応を阻害しない。したがって、無機の高アルカリ溶液でウイルスを誘出する手法は、PCR 法で定量する際に使用できる有力な手法であるといえる。

参考文献

- 1) 片山浩之、大垣眞一郎、陰電荷膜を用いたファージ遺伝子の濃縮法の開発、第33回日本水環境学会年会講演集、p 498
- 2) Shieh Y-S C, et al 1995 Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction, Journal of Virological Methods, 54, pp 51-66

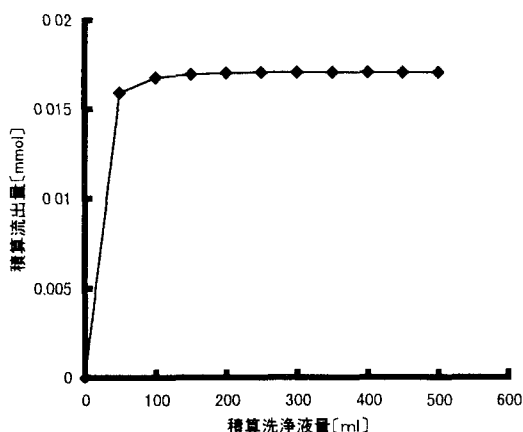


図2 酸洗浄によるマグネシウムの流出状況

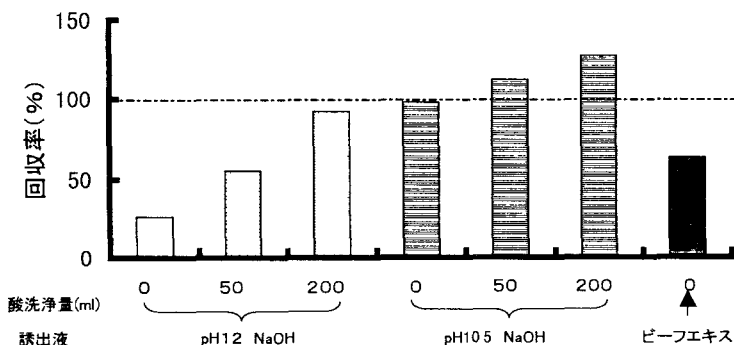


図3. 酸洗浄によるウイルス回収率の変化