

B-46 ノロウイルス外套タンパク(NV-VLPs) を用いたノロウイルスの浄水処理性評価

○白崎 伸隆^{1*}・浦崎 稔史¹・小泓 誠¹・
松下 拓¹・松井 佳彦¹・大野 浩一¹

¹北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

1. はじめに

近年、分子生物学的なウイルス検出方法がめざましい発展を遂げつつあることに伴い、河川水、海水、下水中などに病原性ウイルスが混入していることは周知の事実となってきた。病原性ウイルスが混入しているこれらの水を水道水源として取水する場合、仮に浄水処理過程が不十分であれば、供給される水道水中にも病原性ウイルスが混入する可能性は十分に考えられる。

病原性ウイルスの中でもノロウイルスは、感染性胃腸炎を引き起こすウイルス性食中毒の重要な病原体であり、その感染事例が世界中で年々増加しているため、社会的な注目を集めている。しかしながら、ノロウイルスは未だに組織細胞による培養に成功していないため¹⁾、添加実験による浄水処理性の検討ができるだけのウイルス量を確保することは極めて困難であり、仮に確保できたとしても、感染の危険性を伴うため、取り扱いには特別な施設が必要となる。こういった問題から、ノロウイルスの浄水処理性についての検討はこれまでほとんどなされていない。その一方で、ノロウイルスRNA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、粒子形状が保証されたノロウイルスの外殻タンパク (NV-VLPs: Norovirus-Virus Like Particles) を多量に得る技術が確立されている²⁾。また、このNV-VLPsを用いて、ELISA法 (酵素免疫測定法) によるノロウイルスの定量法が確立されつつある³⁾。

そこで、本研究では、NV-VLPsを用いることで、ノロウイルス粒子の浄水処理性について詳細に検討することを目的とする。NV-VLPsは、野生のノロウイルスと構造的あるいは抗原的に等しいため⁴⁾、表面電位など浄水処理性に大きく寄与するであろう特性も同等と考えられる。また、内部にRNAを持たず感染性がないため、特別な施設を必要とせず安全にノロウイルス粒子の浄水処理性に

ついて検討することが可能となる。

2. 実験方法

(1) 使用したNV-VLPs、大腸菌ファージ

本研究では、我が国で分離されたノロウイルス (Chiba virus, Genogroup I, AB042808) の外套タンパク (直径35-39 nm) を組み替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って作成し、実験に使用した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQβおよびMS2 (直径24-26 nm) を使用し、NV-VLPsとの処理性の比較を行った。なお、大腸菌ファージは培養直後のものを実験に使用したため、粒子形状が保たれているものと考えられる。

(2) NV-VLPs、大腸菌ファージの定量法

NV-VLPsは、ノロウイルス抗原キット (NV-AD II, デンカ生研) を用いてELISA法により定量した。また、大腸菌ファージQβおよびMS2は、ブラック形成法 (感染性ファージを定量可) とリアルタイム定量RT-PCR法 (感染性ファージ+不活化ファージを定量可) にて定量した。なお、ブラック形成法は、Adams⁵⁾の方法に従って行った。一方、リアルタイム定量RT-PCR法では、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて大腸菌ファージのRNAを抽出し、これをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いて逆転写させ、cDNAを合成した。このcDNAをTaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems)、プライマー (タカラバイオ)、プローブ (Applied Biosystems)、Distilled waterと混合した後、ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) に供した。本研究で使用したプライマーおよびプローブの塩基配列

表-1. プローブとプライマーの塩基配列

Coliphage		Oligonucleotide sequences	Positions	References
Q β	Forward primer	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'	49-71	6)
	Reverse primer	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'	187-208	
	TaqMan probe	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'	147-169	
MS2	Forward primer	5'-GTC GCG GTA ATT GGC GC-3'	632-648	7)
	Reverse primer	5'-GGC CAC GTG TTT TGA TCG A-3'	690-708	
	TaqMan probe	5'-AGG CGC TCC GCT ACC TTG CCC T-3'	650-671	

を表-1に示す。

(3) 凝集沈澱処理

本研究では、回分式凝集沈澱処理によるNV-VLPs、大腸菌ファージの処理性を評価した。NV-VLPsを 10^{10} VLPs/mL、大腸菌ファージQ β およびMS2を 10^8 PFU/mLになるように添加した河川水（豊平川河川水；DOC 0.9 mg/L, OD₂₆₀ 0.027 cm⁻¹, 濁度 0.5 NTU）を原水とし、ピーカーに200 mL添加した。ここに、凝集剤（PACI；ポリ塩化アルミニウム、多木化学）を0.54, 1.08, 1.62 mg-AI/Lになるように添加し、直ちにHClにてpHを6.8に調整した。これを攪拌翼を用いてG値 200 s⁻¹にて2分間急速攪拌、20 s⁻¹にて28分間緩速攪拌し、20分間静置した。なお、試料は、原水、急速攪拌後、緩速攪拌後、静置後に採取し、NV-VLPsあるいは大腸菌ファージの濃度を定量した。

(4) 電気移動度の測定

河川水中におけるNV-VLPsおよび大腸菌ファージQ β 、MS2の表面電位特性を把握するために、電気移動度の測定を行った。分画分子量100,000のUF膜（YM-100, Millipore）にてろ過した河川水を、HClを用いてpH 6.8に調整した後、NV-VLPsを 10^{10} VLPs/mL、あるいはQ β 、MS2を 10^{10} PFU/mLになるように添加した。これらの試料の電気移動度をレーザーゼータ電位計（ELS-6000, 大塚電子）にて測定した。

3. 結果と考察

(1) NV-VLPsと大腸菌ファージの同時添加凝集沈澱処理における除去性の比較

凝集沈澱処理後のNV-VLPsと大腸菌ファージの除去率を図-1に示す。なお、図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ （ C_0 ：原水のNV-VLP濃度、あるいはファージ濃度、 C ：処理水のNV-VLPs濃度、あるいはファージ濃度）にて表記し、大腸菌ファージ濃度はPCR法にて定量した。図に示すように、凝集剤添加濃度を上げることにより、NV-VLPs、Q β 、MS2共に除去率が向上し、0.54 mg-AI/Lの凝集剤添加濃度では0.5 log以下の除去率であったのに対し、1.62 mg-AI/L

の凝集剤添加濃度においては2 log程度の除去率が得られた。また、図-2に示すように、凝集処理に影響を与える因子の一つと考えられる表面電位特性は、NV-VLPsと大腸菌ファージで異なる結果となったにも関わらず、凝集沈澱処理におけるNV-VLPsの処理性はQ β 、MS2とほぼ同程度となった。従って、NV-VLPsと大腸菌ファージの粒子サイズの違いなど、表面電位特性以外の因子も凝集処理性に寄与し、結果として除去率が同程度となった可能性が考えられた。

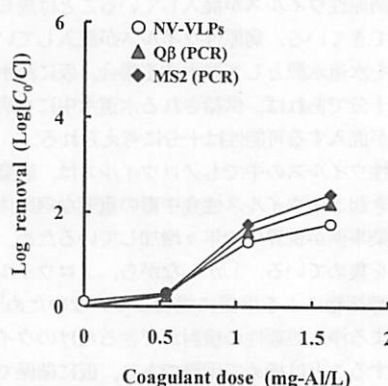


図-1. 凝集沈澱処理におけるNV-VLPsと大腸菌ファージの除去性の比較

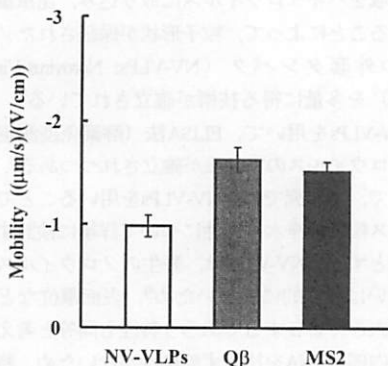


図-2. NV-VLPsと大腸菌ファージの表面電位の比較

(2) 大腸菌ファージQ β とMS2の凝集沈澱処理における除去性の比較

凝集沈澱処理過程における大腸菌ファージQ β とMS2の除去率を図-3に示す。なお、各大腸菌ファージ濃度はPCR法とブラック形成法にて定量した。また、凝集剤の添加濃度は1.08 mg-AVLとした。図に示すように、大腸菌ファージの感染性に関わらず全ファージ数が定量できるPCR法にて求められた除去率は、Q β とMS2の間ではほぼ同程度となり、1-1.5 log程度の除去率となった。これら2つのファージは共に直径24-26 nmの正20面体構造であり、図-2に示したように、河川水中における両ファージの表面電位特性もほぼ等しいため、凝集沈澱処理過程で同程度の除去率となったと推察される。これに対し、感染性ファージのみが定量できるブラック形成法にて求められた除去率は、凝集沈澱処理後にMS2が2 log程度であったのに対し、Q β は5 log程度と約3 logの差が生じた。従って、凝集沈澱処理における感染性ファージの処理性はQ β とMS2で大きく異なることが示唆された。また、PCR法とPFU法の間の除去率の違いはQ β で大きくなった。先に記述したように、PCR法では全ファージ数が定量されるのに対し、ブラック形成法では感染性ファージのみが定量されるため、これら2つの定量法によって得られた結果の差は、感染性のないファージ数を示すと考えられる。このことから、凝集沈澱処理において、Q β の不活化が大きく進行することが示唆された。また、Q β はMS2に比べて、凝集沈澱処理における不活化効果に対する感受性が高いと考えられた。

本研究で使用したNV-VLPsは、内部にRNAを持たず感染性がないため、凝集沈澱処理過程における感染性の消長については議論できないが、粒子としての挙動は、PCR法にて定量された大腸菌ファージQ β 、MS2と同程度であったため、凝集沈澱処理における物理的な浄水処理性は、Q β 、MS2と同程度である可能性が示唆された。

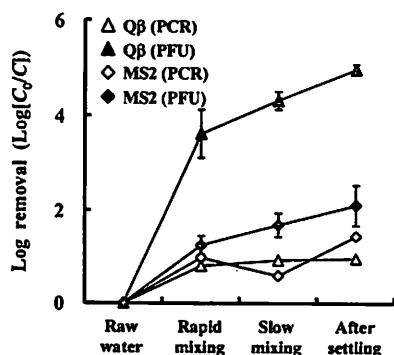


図-3. 凝集沈澱処理における大腸菌ファージの除去性の比較

4. まとめ

本研究では、ノロウイルスの外殻タンパク (NV-VLPs) と病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている2種類の大腸菌ファージを用いて、凝集沈澱処理における除去性の比較を行い、以下の知見を得た。

- (1) 凝集沈澱処理におけるNV-VLPsの除去率は、大腸菌ファージQ β 、MS2と同程度となった。
- (2) Q β とMS2の感染性ファージの除去率の差は、凝集沈澱処理過程における大腸菌ファージの不活化効果に対する感受性の違いに起因するものであると推察された。すなわち、Q β はMS2に比べ、凝集沈澱処理による不活化を受け易いと考えられた。

参考文献

- 1) Zheng D. P., Ando T., Fankhauser R. L., Beard R. S., Glass R. I. and Monroe S. S.: Norovirus classification and proposed strain nomenclature, *Virology*, Vol. 346, No. 2, pp. 312-323, 2006.
- 2) Jiang X., Wang M., Graham D. Y. and Estes M. K.: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein, *Journal of Virology*, Vol. 66, No. 11, pp. 6527-6532, 1992.
- 3) Parker T. D., Kitamoto N., Tanaka T., Huston A. M. and Estes M. K.: Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid, *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 12, pp. 7402-7409, 2005.
- 4) White L. J., Ball J. M., Hardy M. E., Tanaka T. N., Kitamoto N. and Estes M. K.: Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines, *Journal of Virology*, Vol. 70, No. 10, pp. 6589-6597, 1996.
- 5) Adams M. H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers, New York, NY, USA, pp. 450-454, 1959.
- 6) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎: 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発, *水環境学会誌*, Vol. 25, No. 8, pp. 469-475, 2002.
- 7) O'Connell K. P., Bucher J. R., Anderson P. E., Cao C. J., Khan A. S., Gostomski M. V. and Valdes J. J.: Real time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 1, pp. 478-483, 2006.