

B-45 鉄コロイド吸着と泡沫分離を組み合わせた ウイルスの高効率濃縮法の開発

○小林 拓未¹・鈴木 祥広^{2*}・河野 智哉³・酒井 正博³・伊丹 利明³

¹宮崎大学大学院工学研究科 (〒889-2192宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地)

²宮崎大学工学部 (〒889-2192宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地)

³宮崎大学農学部 (〒889-2192宮崎市学園木花台西 1 丁目 1 番地)

* E-mail: Suzuki@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

我が国の衛生状況は改善され、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きている。しかしながら、微生物分析技術の進歩によって病原性ウイルスが次々と発見されはじめているため、これらの病原性ウイルスが原因となる水系感染症についての対策・評価が必要となってきている。

水系感染症を引き起こす病原性ウイルスは、一般的に、水環境中や飲料水中に低濃度で存在する。しかしながら、感染力は非常に強く、感染すると急性胃腸炎を引き起こすノロウイルスは、10~100個程度のウイルスで感染・発症させると報告されている¹⁾。また、病原性ウイルスは実験室内で培養することが容易でなく、種類によっては培養することが不可能なものも存在する。そのため、病原性ウイルスを正確に分析するためには、多量の環境水や水道水中から、ウイルスを濃縮する必要がある。

現在、タンポン法²⁾、陽電荷膜法³⁾、陰電荷膜を用いた酸洗浄法⁴⁾などの有効なウイルス濃縮法が確立されている。しかしながら、多量の水に適用できない、回収率がばらつく等の欠点がある。したがって、既存のウイルス濃縮法よりも、簡便で、処理時間の短く、高効率なウイルス濃縮法の開発が強く望まれる。

著者らが開発した泡沫分離法に注目した。泡沫分離法とは、界面活性剤物質を含む液体に気泡を供給すると、水面上に泡沫が生成される。この性質を利用した代表的な処理法である⁵⁾。泡沫分離法は、短時間で処理することが可能であり、低コストで、操作が簡便である。さらに、多量の水を処理でき、回収率も高いという特徴を有し、凝集フロックを極めて効率的に水中から泡沫へと分離・除去できる。

そこで本研究では、ウイルスの鉄コロイド吸着プロセスを組み合わせた新規のコロイド・泡沫分離法を考案し⁶⁾、本法の泡沫へのウイルス濃縮効果に関する基礎的検討を行なった。

2. 材料および方法

(1) 実験材料

本研究では、モデルウイルスとして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 MS2 (NBRC102619, MS2) を対象とし、宿主として大腸菌 (NBRC13965) を用いた。泡沫分離処理に必要な捕集剤兼気泡剤として、強い界面活性を示すタンパク質であるカゼイン (乳製、化学用和光純薬製) を用いた。標準溶液 (10,000mg/L) については、試薬を 0.01N の水酸化ナトリウム水溶液に溶解して作成した。鉄の標準溶液 (10,000mg/L) については、鉄系凝集剤である塩化第二鉄 (39%重量含有、高杉製薬製) を蒸留水で希釈して作成した。鉄イオンの錯化剤として、鉄キレート試薬である Deferoxamine mesylate (SIGMA 製) を使用した。標準溶液 (0.076mol/L) は蒸留水で希釈して作成した。

(2) 泡沫分離法

図1に本研究で用いた実験装置を示す。本装置は、気液接触塔 (内径2.6cm, 長さ100cm, 透明アクリル製)、気泡を供給するためのガラスボールフィルター (木下理化学工業製, G-4)、送気ポンプ、空気流量計 (小島製作所製)、泡沫吸引管、および泡沫回収ボトルからなる。人工河川水200mLに高濃度 (10^{10-11} PFU/mL) の MS2液を 1.0×10^5 PFU/mL になるように添加し、これを原水とした。

原水に鉄標準溶液を0, 0.5, 1.0, 3.0, および5.0mg/Lとなるように添加し, 3分間攪拌した。このプロセスにおいて鉄コロイドが生成される。その後, カゼインを10mg/Lになるように添加し, 1分間混合した。混合した後, 一定送気流量0.3L/minとし, 回分式の泡沫分離処理を行った。

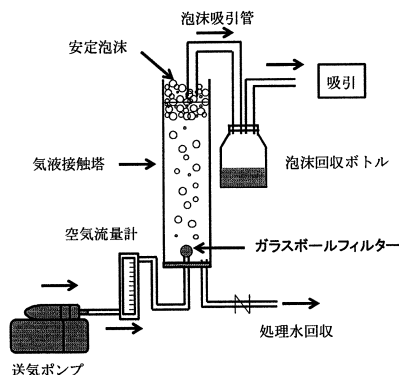


図1 回分式泡沫分離装置

(3) 鉄コロイド溶解法

泡沫分離処理で回収した泡沫液は, 全量を3000rpm, 20分の条件で遠心分離し, 上澄み液の残りを約1mLになるまで取り除き, 残り全量を1.5mL遠心チューブに移し, 12000rpm, 3分間の条件で再び遠心分離を行なった。分離後, 上澄み液と鉄コロイドをそれぞれ回収した。鉄コロイドは, 以下の条件で溶解した。(1) 酸溶解法: 0.5N HCl, 鉄キレート試薬, TE Buffer, 0.5N NaOH, (2) キレート溶解法: 鉄キレート試薬, TE Buffer, (3) ビーフエキスを溶解法: 6%ビーフエキス (w/v) pH 9.5 800μL。(1), (2) は全量800μLになるようにMilli-Q水で調整した。これらの溶液を鉄コロイド溶解液とした。

(4) プラーク法とリアルタイム定量RT-PCRによる検出

原水, 処理水, および泡沫液 (鉄コロイド溶液, 鉄コロイド溶解液, 上澄み液) は, プラーク法で感染性ファージの定量を行い, リアルタイム定量RT-PCRを用いてMS2の遺伝子数を測定した。プラーク法は, 0.6%上層寒天培地に大腸菌液200μLと各サンプル (原水, 処理水, 鉄コロイド液, 鉄コロイド溶解液, 上澄み液) 100μLを添加し, 十分に攪拌した後, 下層寒天培地に流し, 24時間, 37℃で培養し, プラークの計測を行なった。リアルタイム定量RT-PCRは, QIAamp MinElute Virus Spin kit (Qiagen) を用いて, MS2のRNAを抽出し, これをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い, cDNAを得た。cDNA, TaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems), プライマー, プロブおよびDistilled waterを混合した後, リアルタイムPCR装置7300

Real Time PCR System (Applied Biosystems) で検出を行なった。

3. 結果と考察

(1) プラーク法によるMS2の除去率と物質収支

図2に, プラーク法で検出した, 鉄コロイドを溶解しない場合における, 各鉄添加濃度のMS2の除去率を示す。カゼインのみ (鉄濃度: 0mg/L) の場合には, MS2の除去率が27%と低く, ほとんどのMS2が処理水に残留した。これに対して, 鉄添加区では, 鉄添加濃度が増加するとともにMS2の除去率が増加し, 3.0mg/L, 5.0mg/Lにおいて, MS2の除去率はそれぞれ96, 98%を示した。原水のプラーク数に基づいて, 処理後に回収した泡沫分離液の鉄コロイドと上澄み液, および処理水のプラーク数からMS2の物質収支を見積もった。図3に鉄添加濃度3mg/Lと5mg/Lの場合におけるMS2の物質収支を示す。泡沫分離液についてみると, 3mg/Lの場合, 上澄み液が約16%と最も高く, 鉄コロイドは約2%と著しく低かった。5mg/Lの場合では, 上澄み液はほぼ0%であり, 鉄コロイドは約9%であった。除去率から判断すると, 鉄添加濃度は, 5mg/Lが適切であった。しかしながら, いずれの場合においても, 原水に添加したはずのMS2の80~90%に相当分の収支がとれず, 不明となった。この原因として, MS2は鉄コロイドに吸着し, 泡沫分離液に濃縮回収されているものの, 鉄に吸着したMS2はプラークを形成できなかったのではないかと考えた。そこで, 鉄コロイドの各種溶解法による鉄コロイドからのMS2の回収率について検討した。

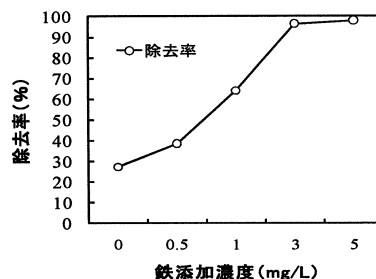


図2 各鉄添加濃度におけるMS2の除去率

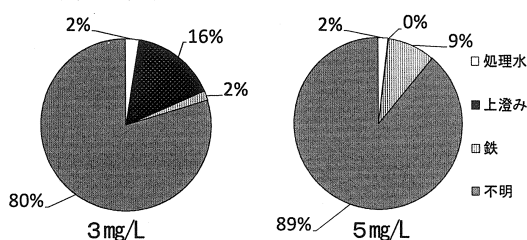


図3 鉄3mg/Lと5mg/LのMS2の物質収支

キレート溶解法では、処理しなかった場合のプラーク数とほぼ一致し、鉄コロイドからMS2の回収は認められなかった。また、ビーフエキス溶解法においても溶解液のプラーク数は、未処理のコロイド液とほぼ同等であった（図4）。キレート溶解法およびビーフエキス溶解法は、いずれの場合にもコロイドが完全には溶解せず残留した。これらの結果から考察すると、鉄コロイドの溶解が不完全なために鉄コロイド吸着あるいは包括されたMS2は、回収できなかったか、溶解する過程でMS2が不活化され、プラーク法では測定することができなかったと考えられる。なお、酸溶解法は、HClによってMS2が不活化すると考えられるため、プラーク法による測定は行なわなかった。

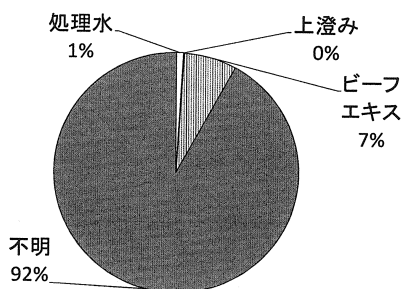


図4 プラーク法におけるビーフエキス溶解法によるMS2の物質収支

(2) リアルタイム定量RT-PCRによるMS2の物質収支

泡沫分離法によるMS2の除去と濃縮効果について、リアルタイム定量RT-PCRを用いたMS2の遺伝子のコピー数からも検討を行った。MS2の除去率は、99%と極めて高く、プラーク数による結果と一致した。3つの鉄コロイド溶解法を比較すると、ビーフエキス溶解法が最も高かった。しかしながら、3つの鉄コロイド溶解法で処理したいずれの場合においても、鉄コロイド溶解液からはそれほど高いコピー数は、検出されなかった。原水中のコピー数に基づいて、処理後に回収した鉄コロイドの各溶解液と上澄み液、および処理水の遺伝子数からMS2の物質収支を見積もった（表1）。今回検討した鉄コロイド溶解法では、鉄コロイドに高濃度に濃縮していると推定されるMS2の遺伝子の回収はそれほど効果的でないことがわかった。

今後の展開として、別途の鉄コロイド溶解法を開発し、鉄コロイドからのMS2の回収と濃縮効果について検討する予定である。

表1 リアルタイム定量RT-PCRにおける各鉄溶解を用いた場合のMS2の物質収支

	処理水	上澄み	鉄溶解液	不明
(1)0.5N HCl	0.5%	0.0%	0.0%	99.5%
(2)鉄キレート試薬	0.5%	0.0%	0.2%	99.3%
(3)ビーフエキス	0.5%	0.0%	0.3%	99.2%

4. まとめ

(1) 鉄コロイド・泡沫分離法によって、モデルウイルスである大腸菌ファージ MS2 は、水中から極めて効率的に除去（99%）できた。

(2) MS2は鉄コロイドに吸着・包括され、泡沫液中に分離・濃縮された可能性が極めて高い。

(3) MS2は極少量の鉄コロイドに濃縮されている可能性が強く示唆されたが、プラーク法では確認することができなかった。

(4) 3つの鉄コロイド溶解法によるMS2の溶脱を検討したが、プラーク法とリアルタイム定量RT-PCR法のいずれの方法においてもMS2の効果的な溶脱・回収は認められなかった。

謝辞

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」の支援を受けて行われたものである。関係者各位に深く感謝いたします。

参考文献

- 金子 光美 (2006) 水道の病原微生物対策, 183-218
- ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案) (2003) 高度処理会議, 65-72.
- 片山 浩之, 嶋崎 明寛, 大垣 眞一郎 (2002) 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, 25, 469-475
- Kono, T., R. Savan, M. Sakai and T. Itami (2004) Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification, Journal of Virological Methods, 115, 59-65.
- 鈴木 祥広, 丸山 俊朗 (2000) タンパク質溶液の泡沫生成に及ぼす pH ならびに共存物質の影響, 水環境学会誌, 23, 108-115
- 鈴木 孝彦, 河野 智哉, 米加田 徹, 酒井 正博, 伊丹 利明, 鈴木 祥広 (2009) 海洋性ウイルスの泡沫への濃縮機能を利用した高感度検出法の開発, 土木学会第 64 回年次学術講演会講演概要集, 67-68