

## B-4 ナノセラム陽電荷膜を用いた環境水中からのウイルス及び原虫同時濃縮法の開発

○古屋 崇志<sup>1\*</sup>・原本 英司<sup>2</sup>・坂本 康<sup>2</sup>

<sup>1</sup>山梨大学大学院医学工学総合教育部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

<sup>2</sup>山梨大学大学院総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

\* E-mail: g13mr004@yamanashi.ac.jp

### 1. はじめに

水環境中に低濃度で存在するウイルスを検出するためには、濃縮操作が必須である。濃縮には正または負に帯電した膜で試料水をろ過してウイルスを吸着させた後、少量の誘出液で回収する手法が広く用いられている。近年、アルミナ繊維製のナノセラム膜(Argonide)を用いた陽電荷膜法が開発され、高いウイルス吸着性能を持ち、塩分濃度や pH が高い水に対しても安定した性能を示すことが報告されている<sup>1,2)</sup>。また、試料水をろ過した際に、ウイルス以外の病原微生物(原虫など)も膜に吸着していると考えられるため、ウイルスと同時にこれらの病原微生物も濃縮して検出することができれば作業効率の点から非常に有用となる。

筆者らの研究グループでは、ナノセラム膜を用いた同時濃縮法(ナノセラム膜同時濃縮法)の開発を試みたが、ろ過後のナノセラム膜からの原虫の誘出に課題が残った<sup>3)</sup>。そこで、本研究では、ナノセラム膜同時濃縮法の改良を目的とした。濃縮法の誘出液や誘出方法の改善を行い、回収率の向上を試みた。

### 2. 実験方法

#### (1) 試料水の採取

試料水として 2014 年 5 月～2014 年 8 月に、山梨県内で富士川と藤川の河川水を採取した(計 15 試料)。

#### (2) 実験原水の調整

濃縮法による回収率を評価するためのモデル微生物として、ウイルスには F 特異 RNA 大腸菌ファージ Q $\beta$ 、原虫にはクリプトスポリジウムとジアルジアを 1 本あたり各 100 個含有しているカラーシード(BTF)を用いた。

試料水 500mL に Q $\beta$  を  $10^5 \sim 10^6$  plaque-forming units (PFU)/mL の濃度で含む高濃度原液 100 $\mu$ L とカラーシード 1 本を実験に応じて片方、又は両方添加したものを実験原水とした。

(3) ナノセラム膜を用いた Q $\beta$  及び原虫の同時濃縮操作  
ナノセラム膜(直径 47mm)をフィルターホルダーに装着し、実験原水 500mL を吸引ろ過することで Q $\beta$  と原虫を膜に吸着させた。

#### a) 誘出液

誘出液には、界面活性剤添加ピロリン酸ナトリウム希釈液(PET 溶液, pH : 7.5)、ビーフェキス(3% w/v, pH 9.0, MP Biomedicals)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-), pH : 7.3)の 3 種類を用いた。

#### b) 誘出法

##### ・裏返し誘出法

実験原水をろ過した後、膜を裏返して誘出液 10mL を吸引ろ過し、ろ液を遠沈管に回収した。DISMIC フィルター(孔径 0.45  $\mu$ m, Advantec)でろ液の半量をろ過し、ウイルス濃縮液を得た。残りのろ液は、原虫検出に用いた。

##### ・シリンジ圧搾法

実験原水をろ過した後、攪拌子と誘出液 10mL を入れた遠沈管に膜を入れて破碎し、懸濁液をシリンジに移し、誘出液を押し出して回収した。回収した誘出液を 2000  $\times$ g で 10 分間遠心し、上清を DISMIC フィルターでろ過してウイルス濃縮液を得た。沈渣は原虫の検出に用いた。

##### ・シャーレ削剥法

実験原水をろ過した後、攪拌子と誘出液 10mL を入れたシャーレに膜を入れて攪拌することで膜表面を削った。遠沈管に回収した懸濁液を 2000  $\times$ g で 10 分間遠心し、上清を DISMIC フィルターでろ過してウイルス濃縮液を得た。沈渣は原虫の検出に用いた。

#### (4) 陰電荷膜破砕型濃縮法

ナノセラム膜同時濃縮法と並行して、既存の同時濃縮法である陰電荷膜破砕型濃縮法<sup>4)</sup>による Qβ と原虫の回収率を測定した。陰電荷膜には孔径 0.8μm の混合セルロース膜(直径 47mm, Merck Millipore)を用いて実験原水 500mL を吸引ろ過した。誘出液には PET 溶液を 15mL 使用した。

#### (5) モデル微生物の定量

##### a) Qβ の定量

実験原水及びウイルス濃縮液を 10 倍段階希釈した試料 1mL を用い、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 を宿主菌としたブラック法<sup>5)</sup>によって Qβ を定量した。

##### b) クリプトスポリジウム及びジアルジアの定量

原虫濃縮液を免疫磁気ビーズ法(Dynabeads GC-Combo, Invitrogen)と直接蛍光抗体染色法(EasyStain, BTF)に供し、プレパラートを作製した。プレパラート上の原虫を蛍光顕微鏡(Olympus)で計数した(B及びG励起下)。

##### c) Qβ 及び原虫の回収率の算出

Qβ の回収率は、試料水 500mL 中のウイルス量に対する濃縮液中のウイルス量の割合から算出した。原虫の回収率は、実験原水へのカラーシードの添加量を勘案することによって算出した。

### 3. 実験結果及び考察

#### (1) 異なる誘出液による Qβ 及び原虫の回収率の測定結果

既報<sup>3)</sup>の測定結果も含め、3 種類の誘出液と裏返し誘出法を用いてナノセラム膜同時濃縮法の回収率を測定した結果を図-1 に示す。ナノセラム膜同時濃縮法による Qβ の平均回収率は、PET 溶液が 37%、ビーフエキスが 47%、PBS(-)が 36%(各 n=6)となり、誘出液の種類による有意差はなく(t検定,  $P > 0.05$ )、陰電荷膜破砕型濃縮法による平均回収率(43%)と同等の値であった。

一方、陰電荷膜破砕型濃縮法と比較して、ナノセラム膜同時濃縮法による原虫の回収率は有意に低く(t検定,  $P < 0.05$ )、最大でもクリプトスポリジウムは 28%、ジアルジアは 4%(各 n=6)であった。これは、アルミナ繊維に原虫が絡め捕られ、膜からの誘出が困難になったためであると推察され、裏返し誘出法が原虫の誘出方法として適していないことが示唆される。

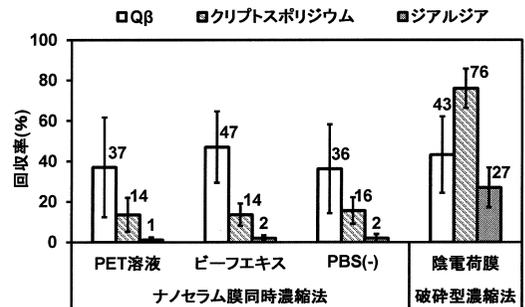


図-1 裏返し誘出法による Qβ と原虫の回収率(n=6)

#### (2) 異なる誘出法による Qβ 及び原虫の回収率の測定結果

ビーフエキスと 3 種類の誘出法を用いてナノセラム膜同時濃縮法の回収率を測定した結果を図-2 に示す。クリプトスポリジウムの平均回収率は、裏返し誘出法が 13%、シリンジ圧搾法が 14%、シャーレ削剥法が 61%(各 n=6)となり、有意差が認められた(t検定,  $P < 0.05$ )。ジアルジアの平均回収率も同様の傾向を示し、裏返し誘出法が 9%、シリンジ圧搾法が 3%、シャーレ削剥法が 29%とシャーレ削剥法の回収率が有意に高く(t検定,  $P < 0.05$ )、シャーレ削剥法が誘出法として適していることが示唆された。これは、膜繊維中に絡め取られていた原虫が、撈拌子を用いて膜表面を削ることで膜から誘出されやすくなったことが考えられる。また、シリンジ圧搾法では、膜をシリンジで押しつぶす際に、原虫が膜繊維に絡め捕られたまま押しつぶされ、十分に誘出されなかったことが推察される。

一方、Qβ の平均回収率は全ての誘出法で 10%となり、誘出法の間で差はなかった。裏返し誘出法では、3(1)の実験結果と同条件にもかかわらず Qβ の回収率が低下していたため、Qβ の安定した回収ができていないことが示唆された。

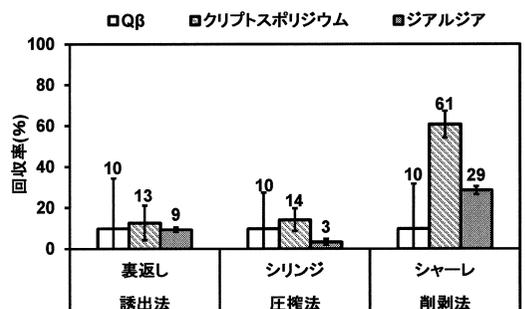


図-2 異なる誘出法による原虫の回収率 (誘出液:ビーフエキス)(n=6)

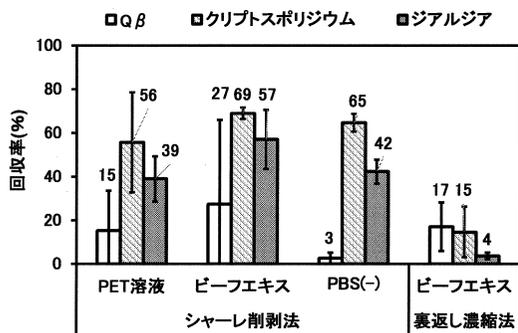


図-3 シャーレ削剥法による Qβ と原虫の回収率(n=3)

### (3) シャーレ削剥法による Qβ 及び原虫の回収率の測定結果

3 種類の誘出液とシャーレ削剥法を用いてナノセラム膜同時濃縮法の回収率を測定した結果を図-3 に示す。シャーレ削剥法による Qβ の平均回収率は、PET 溶液が 15%、ビーフエキスが 27%、PBS(-)が 3%(各 n = 3)となり、誘出液の種類による有意差は認められなかった(t 検定,  $P > 0.05$ )。また、シャーレ削剥法による Qβ の最大回収率は 72%、最低回収率は 1%であったため、Qβ を安定して回収できる誘出操作の改善が求められる。

一方、シャーレ削剥法による原虫の平均回収率は、クリプトスポリジウムの場合、PET 溶液が 56%、ビーフエキスが 69%、PBS(-)が 65%、ジアルジアの場合、PET 溶液が 39%、ビーフエキスが 57%、PBS(-)が 42%(各 n = 3)となり、いずれの原虫共に誘出液の種類による有意差は認められなかった(t 検定,  $P > 0.05$ )。シャーレ削剥法による原虫の平均回収率は、ビーフエキスを用いた裏返し誘出法の場合と比較して有意に高かった(t 検定,  $P < 0.05$ )。この結果から、原虫の回収には誘出液より誘出法が重要な要素であることが推察された。

## 4. まとめ

本研究で開発したナノセラム膜同時濃縮法は、誘出操作にシャーレ削剥法を用いることで、原虫に対して十分に高い回収を示した。今後は、Qβ の定量方法にリアルタイム PCR も併用すると共に、Qβ の安定した回収のため誘出操作の改善や誘出操作の併用を試みる必要がある。また、モデル微生物の濃度を低くした場合の回収率の測定やビーフエキスの濃度、pH を変えて回収率の向上を図ると共に、水環境中のウイルス、原虫への適用性を評価することが求められる。

謝辞: 本研究は、科学研究費補助金 (25249074, 26289182) の助成により実施した。

### 参考文献

- 1) Ikner, L. A., Gerba, C. P., Bright, K. R.: Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review, *Food and Environmental Virology*, 4(2), pp. 41-67, 2012.
- 2) Bennett, H. B., O' Dell, H. D., Norton, G., Shin, G., Hsu, F.-C., Meschke, J. S.: Evaluation of a novel electropositive filter for the concentration of viruses from diverse water matrices, *Water Science and Technology*, 61(2), pp. 317-322, 2010.
- 3) 古屋崇志, 原本英司, 西田継, 坂本康: ナノセラム陽電荷膜を用いたウイルス・原虫同時濃縮法の開発, 第 48 回日本水環境学会年会講演集, p. 422, 2014.
- 4) 原本英司, 片山浩之, 浅見真理, 秋葉道宏, 国包章一: 河川水からのウイルス及び原虫の同時濃縮法の開発, 水道協会雑誌, 79(10), pp. 2-11, 2010.
- 5) Anonymous: Water quality, Detection and enumeration of bacteriophages-part 1, Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. ISO 10705-1, International Organization for Standardization, 1995.