

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：23201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K13857

研究課題名(和文) 自然水中における腸管系ウイルスの不活化要因の解析

研究課題名(英文) Factors affecting inactivation of enteric viruses in the natural water body

研究代表者

端 昭彦 (Hata, Akihiko)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：70726306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：河川水等の環境水試料を対象に、水試料中のウイルス、細菌同時濃縮手法として、中空糸UF膜を用いた手法を確立した。これを用い、幅広い水試料を対象に、ウイルスの定量を試みた。定量に際しては活性に基づく定量法と遺伝子数に基づく定量法を適用し、両者の比較により不活化率の推定を試みた。ウイルスの不活化率は夏季や消毒剤の存在時に高くなる傾向にあった。特にこれらの条件下では、遺伝子定量に基づくウイルス定量値は感染リスク評価に際し過大評価を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水中の病原ウイルスに由来する感染リスクを管理する上では、感染力を有したウイルスの存在状況やウイルスの不活化度合いの評価が重要となる。現在、遺伝子検出技術を用いた水中ウイルスの定量が幅広く行われているが、本技術では感染力を失ったウイルスも検出されてしまう。本研究では、感染力を有したウイルスの定量に主眼を置き、このための手法開発・適用を試みた。感染力評価と遺伝子検出を併用することで、ウイルスの不活化評価も可能であると考えられ、これらにより感染力を有したウイルスの存在状況やウイルス不活化に影響する環境条件等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A hollow fiber ultrafiltration-based virus/bacteria concentration method was established. The method was applied to water samples to quantify viruses there. For the quantification, genome-based and infectivity-based assays were applied. The degree of virus inactivation was estimated by comparing the virus concentrations determined by these two assays. Viruses tended to be more inactivated in summer or in the presence of disinfectants. Under these conditions, genome-based virus quantification assays can overestimate the risk of infection.

研究分野：環境工学

キーワード：腸管系ウイルス 健康関連微生物 大腸菌 不活化率 水環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管系ウイルスは、水中の未規制リスク因子であり、感染者に対し、胃腸炎に始まる諸症状をもたらす。感染者糞便より高濃度で排出された腸管系ウイルスは、下水処理場などのし尿処理施設を介して、あるいは直接水環境へ放流される。従って、糞便汚染された水環境中での親水行為や、汚染された水を原水とした浄水利用の際には、腸管系ウイルス感染のリスクが懸念される。これらの水系感染リスクの管理においては、下水処理、浄水処理での腸管系ウイルスの低減機構を把握するほか、水環境での腸管系ウイルスの動態把握が重要となる。ウイルスの検出法として、PCR 等により遺伝子を同定するものおよび、ウイルスを感受性細胞に摂取し、培養するもの(培養法)の2種が良く用いられる。特に定量 PCR (qPCR) は多くの利点を持ち、広く用いられている。しかしながら、PCR 法ではウイルスの感染力の有無を判定できない。このため、qPCR での定量値は、特にウイルスの不活化が進行している場合、感染リスクを過大評価するものとなる。このような PCR 法の特性は一般にリスク評価上の欠点だと捉えられるが、qPCR はウイルス不活化の影響を受けにくく、不活化したものも含めたウイルス総量を反映できると捉えることもできる。一方で培養法によるウイルス検出は感染力に基づくものであり、感染リスクに直結したデータを得ることができる。水環境中や水処理過程でのウイルス減衰メカニズムは、物理的除去と不活化の2種に大別できる。物理的除去はろ過や希釈、拡散等、ウイルス粒子そのものが消失するとみなせるものである。一方で、不活化は消毒剤や環境ストレスによりウイルスが感染力を喪失するものである。多くの場合、不活化が生じててもウイルス遺伝子は残存する。このため、ウイルス定量において、PCR 法は主に物理的除去にのみ影響を受け、培養法は除去・不活化両者の影響を受ける。従って、同一種のウイルスについて、PCR 法と培養法両方で定量することで、除去率と不活化率を別個に評価可能となる。しかしながら、対象とするウイルスを特異的に定量出来る PCR 法に対し、従来の培養法は使用する細胞に感受性を持つ全てのウイルスが非特異的に検出されてしまう。従って、ウイルスの除去・不活化率評価のためには、感染力を有したウイルスを特異的に定量できる手法が必要となる。

2. 研究の目的

本研究では、水中の腸管系ウイルスおよび FRNA フェージについて、総量および感染力を有したものを定量する。これらを通じてウイルスの感染リスクの変動要因および不活化要因を解析していくことを目的とする。qPCR によるウイルス定量値はリスクを過大評価するものである。このため、qPCR のみを用いると、水処理過程において過剰な処理が要求される結果につながるほか、本来ならば利用可能な水の利用を制限する結果につながり得る。また、従来の培養法は特異性に問題があり、特定のウイルス種についての感染リスク評価や不活化率評価には適さない。そこで新規の感染力評価手法によるウイルス種特異的な定量法についても検討する。

3. 研究の方法

第一に水試料中のウイルス濃縮手法を検討した。検討の際の評価基準として、十分な濃縮倍率が得られること、十分なウイルス回収率が得られること、ウイルスの感染力を失わないこと、後段の遺伝子検出等との相性、の4点を設定した。

濃縮手法の検討ののち、幅広い水試料に対し手法を適用すると共に、ウイルスの遺伝子および感染力の定量を試みた。感染力に基づくウイルス定量法として、培養操作によるウイルス増殖後に PCR によりウイルス種の判別・定量を行う MPN-ICC-RT-PCR 法に加え、不活化したウイルス由来の遺伝子を排除できると期待される、CDDP-RT-qPCR の2手法を比較検討した。

4. 研究成果

水試料中のウイルス、細菌同時濃縮手法として、中空糸 UF 膜を用いた手法を検討した。検討に際しては、細菌、ウイルス回収率の観点から UF 膜の前処理法及び洗浄液の組成について検討した。最適化の結果、いずれの微生物種についても不活化することなく 65%以上を回収可能な手法を確立できた。また、本手法により河川水 20 L を 1 mL 程度まで減容することが可能だった(濃縮倍率 20,000 倍程度)。しかしながら、本法を特に夾雑物の多い環境試料に適用した際に、後段の RNA 抽出操作および RT-qPCR において効率が低下しやすくなることが明らかとなった。特に RT-qPCR での効率の低下により、添加ウイルスの検出濃度が期待値の 0.01%となるような事例も生じたため、この点の改善にも取り組んだ。RNA 抽出操作の前処理として、界面活性剤を使用することで RT-qPCR 効率の改善を達成できた。

開発した手法を用い幅広い水試料を収集、分析した。感染力評価手法として、F フェージについては既に確立した MPN-IC-RT-PCR 法を適用した。他の腸管系ウイルスについては、培養細胞を用いた増殖法を検討したが、試料の接種により細胞が損傷し、明確なウイルス増殖が確認できな

かった。試料中の抗生物質耐性菌やその他夾雑物の影響と考えられ、この点の改善は容易でなかった。このため、代替手法として、CDDP-RT-qPCR 法を適用した。特に夏季において、ウイルス不活化率の推定値が大きくなる傾向が見られた。同様に、消毒剤の存在時に不活化率の推定値が大きくなる傾向が見られた。水温や紫外光といった環境ストレスの大小、消毒剤がウイルスの不活化をもたらしていることを示唆する結果であり、特にこれらの影響が大きい水試料を対象に、RT-qPCR 等の遺伝子定量技術に基づくリスク調査を行う場合には感染リスク過大評価されると言える。また、細胞培養法の代替手法として検討した CDDP-RT-qPCR は、特にウイルスの不活化が進行している試料において、得られる定量値が実際の感染力を有したウイルス量を過大評価することを示唆する結果が得られた。特にウイルスの感染力や感染リスクを議論するにあたっては、CDDP-RT-qPCR による定量値の取り扱いには注意が必要であると言える。検討した前処理は RT-qPCR の効率低下には効果的であったが RNA 抽出効率の低下には効果が見られなかった。RNA 抽出効率の低下は、特に RT-qPCR 法と CDDP-RT-qPCR 法の比較によりウイルス不活化率を推定する際には大きく影響しないと考えられるが、ウイルス存在量の測定やこれを元にしたリスク評価の際には深刻な過小評価要因となり得る。今後は RNA 抽出効率の安定化のための研究にも取り組む必要があると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Miaomiao, Hata Akihiko, Katayama Hiroyuki, Kasuga Ikuro	4. 巻 260
2. 論文標題 Consecutive ultrafiltration and silica adsorption for recovery of extracellular antibiotic resistance genes from an urban river	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 114062 ~ 114062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2020.114062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Akihiko, Furumai Hiroaki, Katayama Hiroyuki	4. 巻 174
2. 論文標題 Sequential treatment using a hydrophobic resin and gel filtration to improve viral gene quantification from highly complex environmental concentrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 115652 ~ 115652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2020.115652	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T. Yonetani, A. Hata, Y. Matsui, L. A. Ikner, C. P. Gerba, H. Katayama
2. 発表標題 Validation of ceramic membrane filtration for removing enteric viruses in tertiary treated wastewater
3. 学会等名 IWA Water Reuse 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Z. Yu, Y. Okuno, Y. Shirasaka, T. Tamura, A. Hata, D. Im, T. Yamaguchi, M. Ihara, N. Yamashita, H. Tanaka
2. 発表標題 Higher occurrence of norovirus GII during summer and autumn in the southern part of Lake Biwa, Japan
3. 学会等名 20th International Symposium on Health Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------