

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19676

研究課題名（和文）ノロウイルス流行予測のための、下水からノロウイルスを選択的に濃縮する技術の開発

研究課題名（英文）Development of Immunoprecipitation-qPCR to Measure Infective Viruses in Environmental Water

研究代表者

井原 賢（Ihara, Masaru）

京都大学・工学研究科・特定助教

研究者番号：70450202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：抗体を用いて下水からウイルスを選択的に濃縮する技術の開発を目的とした。バクテリオファージMS2を用いて検討を行った。培養したMS2を抗MS2抗体を添加して免疫沈降した。回収したMS2量を逆転写-qPCRによって定量した。その結果、抗体の投入量に依存して、MS2の回収量が増加した。抗MS2抗体はファージQは免疫沈降させないことを確認した。さらに、免疫沈降によって培養可能なMS2を回収できていることを培養法によって確認した。抗体濃縮によって下水中のノロウイルスも濃縮できることを逆転写-qPCRで確認した。これらの結果から、免疫沈降で感染性のあるウイルスが選択的に濃縮可能である可能性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水でのウイルスモニタリングによる市中感染状況の把握は、市中での感染症流行抑制のための有効な方法として注目を集めているが、下水からのウイルス濃縮方法には改善の余地がある。本研究では、モデルウイルスを用いた実験によって、抗体を用いた免疫沈降によって下水中の感染性のあるウイルスを選択的に濃縮できる可能性を示すことができた。この技術は、ノロウイルスに限らず他のウイルスへも応用可能である。今後、大量の下水試料へ対応可能なスケールアップが実現できれば、下水中の様々なウイルスの選択的、高効率な濃縮の実現の可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a method for selectively concentrating a virus from sewage using an antibody. The method was developed by using bacteriophage MS2. The cultured MS2 was immunoprecipitated by adding an anti-MS2 antibody. The amount of MS2 recovered was quantified by reverse transcription (RT)-qPCR. As a result, the amount of MS2 recovered increased depending on the amount of antibody input. Anti-MS2 antibody did not precipitate bacteriophage Q. Furthermore, it was confirmed by the culture method that culturable MS2 could be recovered by immunoprecipitation. Then we confirmed by reverse RT-qPCR that norovirus in sewage could also be concentrated by immunoprecipitation. From these results, it was demonstrated that the infectious virus could be selectively concentrated by immunoprecipitation.

研究分野：水中健康関連微生物、環境毒性学

キーワード：ウイルス 下水 抗体 免疫沈降 MS2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的にノロウイルスは感染性胃腸炎および食中毒の主要な原因である。日本でも冬季になると感染性胃腸炎患者数が急増し、時には死者を出すこともあり社会的な関心は非常に高い。市中の感染症の流行状況を把握するためには、下水処理場に集積してくる下水中の感染症ウイルスを測定することが有効な手段である。下水処理場は顕性感染者だけでなく不顕性感染者の糞便も流入するので、集水地域でのノロウイルス感染状況の実態を把握するには理想的な調査対象である。

水中のノロウイルスの定量は、ウイルスを濃縮した後、遺伝子増幅反応(Polymerase chain reaction: PCR)によって定量する。ウイルス濃縮はこれまで、ウイルス粒子の凝集や電氣的吸着、沈殿を利用した方法が用いられてきたが、これらの方法では下水中の様々な有機物が混入してしまい、回収率の低下やその後のPCRの阻害が問題となる場合がある(図1)。既存のウイルス濃縮方法とは異なる原理に基づいた、ウイルスを選択的に濃縮できる方法が必要である。また、ウイルスのゲノムをPCRで検出する場合、感染性のないウイルスまでも定量してしまう課題がある。ウイルス濃縮段階で、感染性のあるウイルス粒子を選択的に濃縮できる方法が長い間求められてきた。

感染性のあるウイルス粒子を選択的に濃縮する方法の候補の一つに、抗体を用いたウイルス濃縮がある。ウイルス粒子表面のタンパクを認識する抗体でウイルス粒子を免疫沈降することで、選択的にウイルスを濃縮するアイデアである。抗体の認識部位が保存されているウイルスは、感染性を有しているウイルス粒子であることが期待できる。このアイデアそのものは古くからあるが、これまで概念はきちんと実証されていない。つまり、下水中から感染性のあるウイルスを抗体を用いて回収できるかどうかは、きちんと検証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、まず初めに、モデルウイルスであるバクテリオファージMS2を用いて抗体による免疫沈降で下水中の感染性のあるMS2が濃縮可能であることを証明する。このことによって抗体による感染性ウイルスの回収が可能であることの実装する。そして、抗体濃縮によって下水からノロウイルスを回収可能であることも証明する。

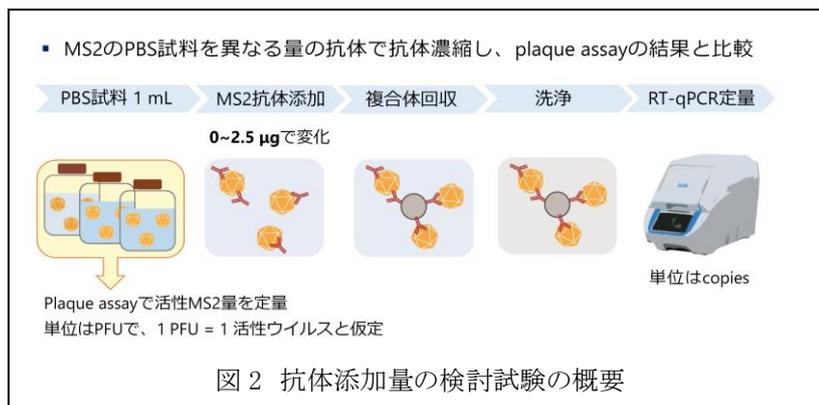
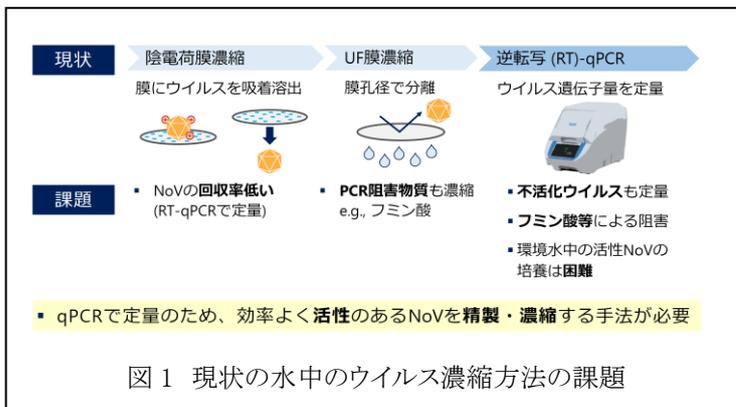
3. 研究の方法

以下の3つの研究項目を実施した。

- ①抗体の添加量の検討:MS2ファージを用いて
- ②抗体の活性MS2に対する特異性の検証
- ③抗体濃縮による下水中の活性MS2の回収
- ④抗体濃縮による下水中のノロウイルスの回収

研究項目①の概要は以下のとおり。

実験の概要を図2に示す。初めに、バクテリオファージMS2を培養した。これをリン酸緩衝液(PBS)1mL中に異なる濃度で添加して、MS2溶液を得た。MS2溶液中の培養可能なMS2量“活性MS2”と定義する)は培養法でプラーク数をカウントすることで把握した。MS2溶液に市販の抗MS2抗体(Anti-Enterobacterio Phage MS2 coat protein, Merck社)を0.0025 μ g、0.025 μ g、0.25 μ g、および2.5 μ gを添加して免疫沈降を行った。ネガティブコントロールとして、抗体を添加していない系も容易した。一般的な条件で抗体とMS2を反応させた後、プロテインAセファロースとプロテ



イン G セファロース(ともに Abcam 社)の混合液を添加して、抗体-MS2 複合体を沈降回収した。TBST で洗浄した。この時洗浄液も回収した。洗浄後に、SDS と Tween20 を含む溶出液で MS2 を抗体から回収した。

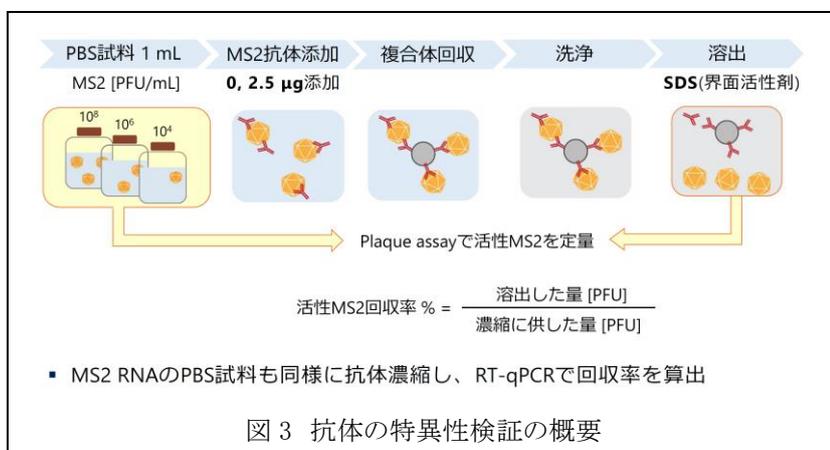
最初の MS2 溶液、免疫沈降後の溶出液から RNA を抽出した。RNA 抽出には QIAamp RNA viral kit (Qiagen)を用いた。RNA から逆転写反応によって cDNA を作成し、qPCR を行って MS2 の RNA を定量した。抗体添加量を変化させた時に MS2 の回収率がどのように変化するかを検証した。また、最初の MS2 溶液をブランクアッセイで活性 MS2 量を測定した結果と比較して、抗体濃縮によって活性 MS2 がどれくらい回収できるのかも検証した。

研究項目②の概要は以下のとおり。

抗体は、抗原を認識するだけでなく非特異的に他のタンパク質や核酸を結合して沈降してしまう可能性がある。抗 MS2 抗体を用いて活性 MS2 を特異的に濃縮できるかどうかを検証した。

実験の概要を図 3 に示す。初めに、抗 MS2 抗体の活性 MS2 に対する特異性を検証した。具体的には、MS2 を培養して PBS1mL 中に異なる濃度に希釈して、MS2 溶液を得た。MS2 溶液中の培養可能な MS2 量(“活性 MS2”)とを培養法でプラーク数をカウントして測定した。MS2 溶液を 2.5µg の抗 MS2 抗体、プロテイン A/G セファロースを添加して複合体を回収した。TBST で洗浄した。洗浄後に、SDS と Tween20 を含む溶出液で MS2 を抗体から回収した。そして溶出液から培養法で MS2 を培養してプラーク数をカウントした。最初の MS2 溶液中のプラーク数と免疫沈降後の MS2 プラーク数を比較することで、活性 MS2 の回収率を算出した。

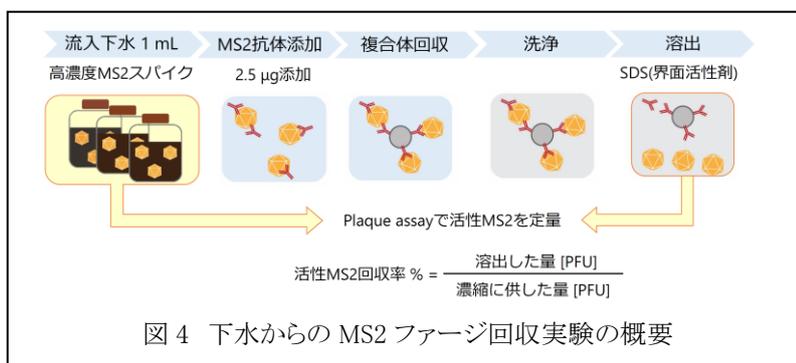
次に、MS2 の RNA を抗 MS2 抗体が認識するかどうかを検証した。MS2 から抽出した RNA を PBS1mL で懸濁した。2.5µg の抗 MS2 抗体、プロテイン A/G セファロースを添加して複合体を回収した。TBST で洗浄した。この時洗浄液も回収した。洗浄後に、SDS と Tween20 を含む溶出液で MS2 を抗体から回収した。最初の MS2 RNA 溶液、免疫沈降後の溶出液から逆転写反応によって cDNA を作成し、qPCR を行って MS2 の RNA を定量した。



研究項目③の概要は以下のとおり。

実験の概要を図 4 に示す。MS2 を培養して流入下水1mL 中に異なる濃度に添加して、MS2 下水溶液を得た。MS2 下水溶液中の培養可能な MS2 量(“活性 MS2”)を培養法でプラーク数をカウントすることで測定した。MS2 下水溶液を 2.5µg の抗 MS2 抗体、プロテイン A/G セファロースを添加して複合体を回収した。TBST で洗浄した。洗浄後に、SDS と Tween20 を含む溶出液で MS2 を抗体から回収した。そして溶出液から培養法で MS2 を培養してプラーク数をカウントした。最初の MS2 溶液中のプラーク数と免疫沈降後の MS2 プラーク数を比較することで、活性 MS2 の回収率を算出した。

比較対象として、流入下水 100mL に培養した MS2 を添加して、従来の陰電荷膜法で MS2 を回収して、活性 MS2 の量を培養法で測定した。抗体濃縮と陰電荷膜法での活性 MS2 の回収率を比較した。



研究項目④の概要は以下のとおり。

流入下水から抗体を使ってノロウイルスの濃縮を検討した。具体的には、食品からのノロウイルス検出の公定法であるパンソルビン・トラップ法¹⁾で使用されているヒト免疫グロブリン製剤 (HDM Labs Inc. 製; Human Gamma Globulin)を用いた。粉末を TBST バッファーに溶かし、1%免疫グロブリン製剤を調整した。ヒト免疫グロブリン製剤は複数人からのヒト血清から免疫グロブリンを抽出したものであり、ポリクロナルである。流入下水 1mL に免疫グロブリン 2.5µg となるように 1%免疫グロブリン製剤を添加して、MS2 と同様に免疫沈降を行った。SDS と Tween20 を含む溶出液でウイルスを抗体から回収し、RNA を抽出

し、RNA から逆転写反応によって cDNA を作成し、qPCR を行って GII ノロウイルスの RNA を定量した。一方、もともとの流入下水1mL から直接 RNA を抽出し、逆転写しqPCR を行い、もともとの下水中のノロウイルスを定量した。もともとのノロウイルス量と抗体で回収されてノロウイルス量から、GIIノロウイルスの回収率を算出した。

4. 研究成果

①抗体の添加量の検討

モデルウイルス MS2 フェージを用いて、ウイルスの免疫沈降方法の検討を行った。抗 MS2 抗体の添加量を変化させた時の MS2 の回収量がどのように変化したかを図 5 に示す。縦軸は、免疫沈降後の溶出液から RT-qPCR して得られた RNA コピー数を示している。ネガコンとして抗体を添加せずに免疫沈降の操作をした時の回収率も併せて示す。また、実験に用いた MS2 溶液中の MS2 の量を培養法 (plaque assay) でカウントしたプラーク数 (4.9×10^8 PFU) も合わせて図示している。抗体の添加量が増えるにつれて、回収される MS2 量が増えていることがわかる。抗体が 2.5 μ g の時、回収量が最大となり繰り返し試験の平均で 7.8×10^9 copies であった。1 PFU = 1 copy と仮定すると、抗体濃縮-RT-qPCR の結果は、培養法で測定した MS2 量より 1.2-log 高い。この原因として、MS2 溶液中で MS2 が凝集し、1 PFU \neq 1 活性ウイルスとなっていた可能性、および MS2 溶液中にフリーの MS2 の RNA が存在しており、抗体やセファロースビーズが RNA を非特異的に吸着した可能性が考えられる。

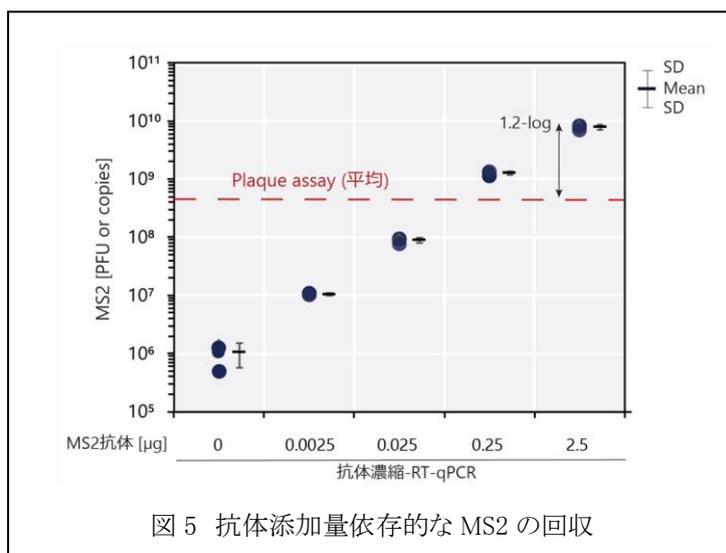


図 5 抗体添加量依存的な MS2 の回収

②抗体の活性 MS2 に対する特異性の検証

MS2 を培養して 10^4 PFU/mL、 10^5 PFU/mL、および 10^6 PFU/mL の MS2 溶液に対して抗 MS2 抗体で免疫沈降を行った。抗体がない場合にはいずれの濃度の MS2 溶液も改修率は 0.01% 未満であったが、抗体を添加した場合は 50~98% の回収率が得られた。抗体特異的に、MS2 が回収できることが確認できた。特に、免疫沈降後の溶出液から、培養可能な MS2 を回収できることを培養法で示したのは重要な成果である。

次に、MS2 の RNA を抗 MS2 抗体が認識するかどうかを検証した。その結果、抗 MS2 抗体によるフリーの RNA の回収率は 0.01% 未満となった。さらに、抗 MS2 抗体は、他のウイルス例えば Q β フェージは免疫沈降させないことを確認した。これらの結果から、抗 MS2 抗体は MS2 を特異的に認識していることが示された。

③抗体濃縮による下水中の活性 MS2 の回収

流入下水からの抗体濃縮による MS2 の回収率は繰り返し試験の平均で 12% であった。PBS からの回収率 50~98% に比べ低い回数率であった。PBS に比べて流入下水からの回収率が低下した原因として、下水中では添加した抗 MS2 抗体が凝集したり、下水中の有機物が MS2 と抗体の結合を物理的に阻害した可能性が考えられる。比較として従来の陰電化膜法による MS2 の濃縮も実施した。その結果、回収率はわずか 0.54% であった。陰電化膜法で回収率が低下した原因として、陰電化膜法では濃縮過程で酸やアルカリを使用するために MS2 が不活化した可能性も考えられる。これらの結果から、活性ウイルスを下水から回収するためには、従来の陰電化膜法よりも抗体濃縮法が優れている可能性が示唆された。

以上の成果から、抗体濃縮によって感染性のあるウイルスを免疫沈降である程度回収できることを実証できた。重要な点は、免疫沈降の特異性は、抗体の特異性で決まることである。良い抗体が入手できれば、下水から感染性のあるウイルスを特異的に回収できる。

④抗体濃縮による下水中のノロウイルスの回収

流入下水1mL から抗体を使ってノロウイルスの濃縮を検討した。ヒト免疫グロブリン製剤で免疫沈降した場合は、もともとの流入下水中のノロウイルスの 37% が回収できていた。同じ流入下水サンプルに対

して陰電荷膜法で濃縮してノロウイルスを RT-qPCR で定量したところ、回収率は平均で 4.3%だった。

下水でのウイルスモニタリングによる市中感染状況の把握は、市中での感染症流行抑制のための有効な方法として注目を集めているが、下水からのウイルス濃縮方法には改善の余地がある。本研究では、モデルウイルスを用いた実験によって、抗体を用いた免疫沈降によって下水中の感染性のあるウイルスを選択的に濃縮できる可能性を示すことができた。この技術は、ノロウイルスに限らず他のウイルスへも応用可能である。今後、大量の下水試料へ対応可能なスケールアップが実現できれば、下水中の様々なウイルスの選択的、高効率な濃縮の実現の可能性はある。

<引用文献>

1. 東方美保, 川畑光政, 斎藤博之. パンソルビン・トラップ法による食品検体からのノロウイルスの回収検討(第1報). 福井県衛生環境研究センター年報 7, 69-72 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 于再治	4. 巻 -
2. 論文標題 琵琶湖南湖におけるウイルスの長期モニタリング及び抗体によるウイルス濃縮の基礎検討	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 2018年度京都大学環境工学コース 特別研究	6. 最初と最後の頁 1-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 奥野義規、井原賢、山下尚之、田中宏明	4. 巻 -
2. 論文標題 琵琶湖南湖流域における下水中のノロウイルス遺伝子解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 第53回日本水環境学会年会 要旨集	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 于再治	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of immunoprecipitation-qPCR to measure infective viruses in environmental water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 2020年度京都大学都市環境工学専攻 修士論文	6. 最初と最後の頁 1-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中宏明	
2. 発表標題 顕在化する水循環系のバイオリスク対応のための技術開発	
3. 学会等名 第15回下水文化研究発表会	
4. 発表年 2019年	

1. 発表者名 奥野義規、井原賢、山下尚之、田中宏明
2. 発表標題 琵琶湖南湖流域における下水中のノロウイルス遺伝子解析
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 于再治、白坂勇也、田村太一、林東範、端昭彦、山口武志、山下尚之、井原賢、田中宏明
2. 発表標題 琵琶湖南湖におけるウイルス濃度の長期モニタリング
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 于再治、西田光希、張浩然、杉江由規、張浩、朴耿洙、趙博、井原賢、田中宏明
2. 発表標題 下水処理場における簡易処理発生時の病原ウイルス濃度変動の解明
3. 学会等名 第 23 回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 于 再治、奥野 義規、趙 博、 二瓶 義明、田中 宏明、井原 賢
2. 発表標題 水中の活性ウイルスの定量を目的とした抗体によるウイルス濃縮の基礎検討
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP
<https://ihara-lab.jp/>

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
---------	---------