

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289182

研究課題名(和文) 宿主特異的ウイルス遺伝子マーカーを用いた水道水源中の糞便汚染源同定法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for microbial source tracking in drinking water sources using host-specific viral markers

研究代表者

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：00401141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水道水源および水道水試料中のウイルスを効率的に検出可能な手法を開発することを目的とし、主にナノセラム陽電荷膜を用いた濃縮法を対象に研究を実施した。まず、ナノセラム陽電荷膜をウイルスと原虫の同時濃縮に適用することを考案し、モデル微生物として大腸菌ファージQ とカラーシードを添加した水試料を用い、濃縮操作に適した誘出液および誘出方法を検討した。次に、ナノセラム陽電荷膜法を植物ウイルスの濃縮にも適用するため、トウガラシ微斑ウイルスと大腸菌ファージMS2を用いた濃縮回収率の測定実験を実施した。本研究により、糞便汚染指標となるウイルスを効率的に検出するための手法を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop methods for concentrating viruses in drinking water source and drinking water, mainly focusing a NanoCeram electropositive filter. Recovery test of F-specific RNA coliphage Qbeta and ColorSeed, a commercially available product containing Cryptosporidium and Giardia (oo)cysts, was conducted to develop a method for simultaneous concentration of viruses and protozoa in a single water sample. Furthermore, recovery of F-specific RNA coliphage MS2 and pepper mild mottle virus, a plant virus, using the NanoCeram electropositive filter was tested as well as methods using electronegative membrane filters. This study has successfully developed novel virus concentration methods that can be used for microbial source tracking using viruses.

研究分野：水環境工学

キーワード：ウイルス 濃縮法

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスやクリプトスポリジウム等の水系感染性の病原微生物は、感染者の糞便中に大量に排出されるため、下水処理を経ても一部は感染力を持ったまま環境中に放出され、水道水源に達する可能性がある。1996年に埼玉県越生町の町営水道を介して発生したクリプトスポリジウムの大規模アウトブレイクに代表されるように、水系感染性の病原微生物による健康被害は広範囲に及び可能性があり、現代においても十分には制御できていない課題である。

水道水を介した病原微生物の水系感染リスクを許容値以下に制御する上で、水道水源となる流域内における病原微生物の排出源とその負荷量、さらには、浄水処理工程での低減効果に関する知見が必要となるが、これらの知見は断片的にしか得られていないのが現状である。その要因の一つとして、特にウイルスに対して、水試料からの効率的な検出方法が確立されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、水道水源および水道水試料中のウイルスを効率的に濃縮して検出可能な手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 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

実験原水の調整

山梨県内で採取した下水2次処理水および河川水500mLに、モデル微生物としてF特異RNA大腸菌ファージQとカラーシード(不活化されたクリプトスポリジウムとジアルジアを各100個含む市販品, BTF)を添加したものを実験原水として用いた。

濃縮操作

ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法: 実験原水500mLをナノセラム陽電荷膜(直径47mm, Argonide)でろ過し、ろ液を回収した。誘出方法として、以下の3種類を検討し、誘出液には、界面活性剤含有ピロリン酸ナトリウム溶液(PET溶液, pH 7.3)、ビーフエキス(3%, pH 9.0)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))を使用した。

裏返し誘出法では、膜を上下反転させてフィルターホルダーに再度セットし、誘出液10mLをろ過した。ろ過した誘出液を回収し、半量を原虫濃縮液、半量をシリンジ(テルモ)に装着したDISMICフィルター(直径25mm, 孔径0.45 μ m, Advantec)でろ過してウイルス濃縮液とした。

シリンジ圧搾法では、誘出液10mLを添加した50mL遠沈管にろ過後の膜を入れて激しく攪拌した後、シリンジ(DISMICフィルター未装着)で溶液を押し出し、回収した。半量を原虫濃縮液、半量をシリンジに装着した

DISMICフィルターでろ過してウイルス濃縮液とした。

シャーレ削剥法では、直径60mmのシャーレにろ過後の膜と攪拌子、誘出液10mLを入れて約1分間攪拌し、溶液を回収した。半量を原虫濃縮液、半量をシリンジに装着したDISMICフィルターでろ過してウイルス濃縮液とした。

陰電荷膜破碎型同時濃縮法(Electronegative membrane vortex (EMV)法): 実験原水500mLに2.5M MgCl₂を5mL添加し、混合セルロース膜(直径47mm, 孔径0.8 μ m, Merck Millipore)でろ過し、ろ液を回収した。膜をフィルターホルダーから剥がし、PET溶液10mLとフットボール型攪拌子を入れた遠沈管内で破碎した。濁質を別の遠沈管に移し入れ、PET溶液5mLを用いて同様の操作を繰り返し、濃縮液15mLを得た。2,000 \times g, 10分間, 4 $^{\circ}$ Cの条件で遠心し、上清をDISMICフィルターでろ過したものをウイルス濃縮液とした。また、沈渣をPBS(-)で懸濁させたものを原虫濃縮液とした。

モデル微生物の定量

実験原水、ろ液およびウイルス濃縮液中のQの濃度は、*Salmonella typhimurium* serovar WG49を宿主に用いたブラック法によって定量した。膜へのQの吸着率は、原水とろ液中のファージ量から膜に吸着しなかったファージの割合を算出することで求めた。Qの回収率は、実験原水中のファージ量に対する誘出液中のファージ量の割合から求めた。

原虫濃縮液中のクリプトスポリジウムとジアルジアは、Dynabeads GC-combo (Invitrogen)を用いた免疫磁気ビーズ法、EasyStain (BTF)を用いた直接蛍光抗体染色法に供した後、プレパラートを作製し、蛍光顕微鏡(Olympus)により定量した。各原虫の回収率は、実験原水への添加量を100個とみなし、蛍光顕微鏡による計数結果より算出した。

(2) 水中ウイルス濃縮法によるトウガラシ微斑ウイルスの濃縮回収率の測定

実験原水の調整

MilliQ水(オートクレーブ滅菌)、滅菌水道水(チオ硫酸ナトリウム濃度50mg/L, オートクレーブ滅菌)および山梨県内で採取した河川水500mLに、モデル微生物としてF特異RNA大腸菌ファージMS2とトウガラシ微斑ウイルス(Pepper mild mottle virus, PMMoV)を添加したものを実験原水として用いた。

濃縮操作

ナノセラム陽電荷膜法: 実験原水500mLをナノセラム陽電荷膜(直径47mm)でろ過した後、誘出液5mLをろ過して回収し、ウイルス濃縮液とした。誘出液には、ビーフエキス-グリシン溶液(1.5%ビーフエキス, 0.05M グ

リシン, 0.01% Tween80, pH 9.0) またはポリリン酸ナトリウム溶液 (1%ポリリン酸ナトリウム, 0.001% Antifoam Y-30 Emulsion, 0.5% Tween80) を使用した。

EMV 法: 実験原水 500mL に 2.5M MgCl₂ を 5mL 添加し, 混合セルロース膜 (直径 47mm, 孔径 0.8 μm) でろ過した。膜をフィルターホルダーから剥がし, PET 溶液 10mL とフットボール型攪拌子を入れた遠沈管内で破砕した。濁質を別の遠沈管に移し入れ, PET 溶液 5mL を用いて同様の操作を繰り返し, ウイルス濃縮液 15mL を得た。

酸洗浄型陰電荷膜法: 実験原水 500mL に 2.5M MgCl₂ を 5mL 添加し, 混合セルロース膜 (直径 47mm, 孔径 0.45 μm) でろ過した。さらに, 0.5mM H₂SO₄ 200mL をろ過した後, 1.0mM NaOH 5mL をろ過し, あらかじめ 100mM H₂SO₄ 25 μL を入れておいた遠沈管を用いてろ液を回収し, ウイルス濃縮液とした。

モデル微生物の定量

実験原水に添加した高濃度原液およびウイルス濃縮液中の Q と PMMoV の濃度は, RNA 抽出と逆転写反応に供した後, 定量 PCR によって測定した。それぞれの回収率は, 実験原水への添加量に対する誘出液からの回収量の割合から求めた。

4. 研究成果

(1) 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

ナノセラム陽電荷膜および混合セルロース膜への Q の吸着率を表 1 に示す。ナノセラム陽電荷膜への Q の吸着率は, 河川水と下水 2 次処理水のいずれに対しても安定した高い値を示し, ウイルスの吸着に適していることが示唆された。一方, 混合セルロース膜への吸着率は大きく変動し, 非常に低い値を示すこともあった。

表 1 ナノセラム陽電荷膜および混合セルロース膜への Q の吸着率

試料	吸着率 (%) (平均 ± 標準偏差)	
	ナノセラム陽電荷膜	混合セルロース膜
	河川水 (n = 4)	95.8 ± 4.8
下水 2 次処理水 (n = 2)	88.0 ± 8.5	14.5 ± 20.5

ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法および EMV 法による河川水からの Q と原虫の回収率を表 2 に示す。ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法による Q の平均回収率は, 誘出液に PET 溶液を用いた場合が 37.0%, ビーフエキスをを用いた場合が 47.0%, PBS(-) を用いた場合が 36.3% となり, 誘出液の種類によって回収率に大きな差は認められず, EMV 法による平均回収率 (43.3%) と同程度であった。

一方, EMV 法と比較して, ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法による原虫の回収率は大幅に低く, 最大でもクリプトスポリジウムは 28%, ジアルジアは 4% であった。また, 下水 2 次処理水に対しても原虫は同様に低い回収率を示した (表 3)。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た。

ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法による Q の回収率には誘出液の種類によって差が見られ, ビーフエキスによる平均回収率が平均 41.5% と高く, EMV 法による平均回収率 (33.5%) と同程度であった。

これらの結果より, ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法は Q の濃縮回収には有効であり, ウイルスに対しても有効となることが示唆されたものの, 原虫に対しては膜からの誘出方法に改善が必要であると判断された。

表 2 ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法および EMV 法による河川水からの Q と原虫の回収率

濃縮法	誘出液	回収率 (%) (平均 ± 標準偏差)		
		Q (n = 4)	クリプト スポリジ ウム (n = 5)	ジアル ジア (n = 5)
		ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法	PET 溶液 ビーフエキス PBS(-)	37.0 ±24.6 47.0 ±17.6 36.3 ±22.0
EMV 法	PET 溶液	43.3 ±18.8	76.0 ±9.7	27.0 ±9.8

表 3 ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法および EMV 法による下水 2 次処理水からの Q と原虫の回収率

濃縮法	誘出液	回収率 (%) (平均 ± 標準偏差)		
		Q (n = 2)	クリプト スポリジ ウム (n = 2)	ジアル ジア (n = 2)
		ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法	PET 溶液 ビーフエキス PBS(-)	8.5 ±4.9 41.5 ±2.1 11.0 ±9.9
EMV 法	PET 溶液	33.5 ±6.4	67.5 ±6.4	54.0 ±7.1

誘出液にビーフエキスをを使用し, 3 種類の誘出方法によるモデル微生物の回収率を測定した結果を表 4 に示す。Q の平均回収率は, すべての誘出方法で約 10% であり, 誘出方法の間で回収率の差は見られなかった。

一方、原虫に対しては、シャーレ削剥法による回収率が他の2種類の誘出方法より高い値を示しており、平均回収率はクリプトスポリジウムが60.7%、ジアルジアが28.5%であった。この結果より、ナノセラム陽電荷膜同時濃縮法での誘出方法として、シャーレ削剥法が適していることが明らかとなった。

表4 異なる誘出方法を用いたナノセラム陽電荷膜同時濃縮法による河川水からのQと原虫の回収率

誘出方法	回収率(%) (平均±標準偏差)		
	Q (n=3)	クリプトスポリジウム (n=6)	ジアルジア (n=6)
裏返し誘出法	9.7 ±2.5	12.7 ±8.2	9.3 ±3.9
シリンジ	10.0	14.2	3.3
圧搾法	±5.0	±4.9	±2.9
シャーレ削剥法	9.7 ±4.5	60.7 ±14.8	28.5 ±5.8

表4で原虫に対して高い回収率を示したシャーレ削剥法を対象に、誘出液の種類を変えた場合のモデル微生物の回収率を測定した結果を表5に示す。比較のため、ビーフエキスをを用いた裏返し誘出法による回収率も測定した。シャーレ削剥法によるQの平均回収率は、ビーフエキスを誘出液に用いた場合が27.7%と最も高く、PET溶液では15.3%、PBS(-)では3.0%となった。裏返し誘出法による平均回収率は17.0%であり、PBS(-)を除いて、シャーレ削剥法と裏返し誘出法は同程度の回収率を示すことが分かった。

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、誘出液にPET溶液を用いた場合に55.7%、ビーフエキスでは69.0%、PBS(-)では64.7%となった。また、ジアルジアの場合、PET溶液では39.0%、ビーフエキスでは57.0%、PBS(-)では42.3%となり、クリプトスポリジウム、ジアルジア共にいずれの誘出液を用いても十分に高い回収率で濃縮可能であることが分かった。一方、裏返し誘出法による原虫の平均回収率は、クリプトスポリジウムが14.7%、ジアルジアが3.7%と低い値を示した。

これらの結果より、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示唆された。また、Qに対しては、安定して回収するための誘出操作の改善が求められるが、最大回収率は十分に高い値を示していたため、一般にウイルス濃縮法の回収率は大きく変動する傾向にあることを踏まえると、シャーレ削剥法はウイルス濃縮法として十分に適していると判断される。

表5 異なる誘出方法と誘出液を用いたナノセラム陽電荷膜同時濃縮法による河川水からのQと原虫の回収率

誘出方法	誘出液	回収率(%) (平均±標準偏差)		
		Q (n=3)	クリプトスポリジウム (n=3)	ジアルジア (n=3)
シャーレ削剥法	PET溶液	15.3 ±17.9	55.7 ±22.0	39.0 ±10.4
	ビーフエキス	27.7 ±38.4	69.0 ±2.7	57.0 ±13.5
	PBS(-)	3.0 ±2.7	64.7 ±4.0	42.3 ±5.5
	裏返し誘出法	17.0 ±11.3	14.7 ±11.6	3.7 ±1.5

(2) 水中ウイルス濃縮法によるトウガラシ微斑ウイルスの濃縮回収率の測定

3種類の濃縮法によるMilliQ水、水道水および河川水からのPMMoVの回収率を表6に示す。ウイルス濃縮液からウイルスが検出されなかった場合には、1コピー/反応を仮の濃度として用いて回収率を算出した。

MilliQ水と水道水からのPMMoVの平均回収率は、EMV法を用いた場合に最も高い値を示し、MilliQ水では35.2%、水道水では75.2%となった。酸洗浄型陰電荷膜法による平均回収率は、EMV法よりも低かったものの、2種類の誘出液を用いたナノセラム陽電荷膜法のいずれよりも高い値を示した。一方、河川水からの回収率は、いずれの濃縮法においても低い値を示した。この傾向は、MS2を用いた実験においても同様のものであった(データ省略)。

表6 ウイルス濃縮法による水試料からのPMMoVの回収率

濃縮法	誘出液	回収率(%) (平均±標準偏差)		
		MilliQ水 (n=6)	水道水 (n=6)	河川水 (n=18)
ナノセラム陽電荷膜グリシ法	ビーフエキス-グリシン溶液	14.0 ±10.0	0.6 ±0.9	5.3 ±5.2
	ポリリン酸ナトリウム溶液	10.0 ±6.7	3.2 ±4.4	11.9 ±11.4
EMV法	PET溶液	35.2 ±30.9	75.2 ±48.2	2.6 ±3.3
	酸洗浄型陰電荷膜法	22.9 ±16.6	11.3 ±5.4	1.6 ±1.5

また、2次濃縮において使用される遠心式フィルターユニット (Centriprep YM-50, Merck Millipore) による回収率は、PMMoV が $81.8 \pm 26.9\%$ ($n = 6$), MS2 が $164.8 \pm 73.3\%$ ($n = 5$) となり、2次濃縮操作においてMS2と同様にPMMoVを効率的に濃縮可能であることが明らかとなった。

これらの結果は、既存のウイルス濃縮法は、腸管系ウイルスと同様に植物ウイルスであるPMMoVに対しても有効であり、これらの手法を用いることにより、水環境中において糞便汚染指標ウイルスとなり得る植物ウイルスの動態を解析可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Andri T. Rachmadi, Jason R. Torrey, Masaaki Kitajima: Human polyomavirus: advantages and limitations as a human-specific viral marker in aquatic environments, *Water Research*, Vol. 105, pp. 456-469, 2016. [査読あり]
DOI: 10.1016/j.watres.2016.09.010
2. 原本英司, 渡辺亮, 森田久男, 岸田直裕, 秋葉道宏, 坂本康: バクテロイデス遺伝子マーカーを用いた河川水中のふん便汚染源解析, *用水と廃水*, Vol. 58, pp. 589-595, 2016. [査読あり]

[学会発表](計9件)

1. 森山一葉, 長田留衣, 山田貴大, 原本英司, 坂本康: F特異DNA大腸菌ファージの遺伝子型検出による水環境中の糞便汚染源解析, 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日, 熊本大学(熊本県・熊本市).
2. Eiji Haramoto: Indicators of viral contamination of water, *5th Food and Environmental Virology Conference*, September 14, 2016, Hotel Sakurai (Kusatsu, Gunma).
3. 山田貴大, 原本英司, 坂本康: ナノセラム陽電荷膜法によるトウガラシ微斑ウイルスの濃縮回収率の測定, 第50回日本水環境学会年会, 2016年3月18日, アスティとくしま(徳島県・徳島市).
4. Eiji Haramoto, Naohiro Kishida, Hisao Morita, Mari Asami, and Michihiro Akiba: Pepper mild mottle virus and tobacco mosaic virus as potential viral indicators of human fecal contamination in river water, *18th International Symposium on*

Health-Related Water Microbiology, September 17, 2015, Lisbon (Portugal).

5. 山田貴大, 古屋崇志, 原本英司, 坂本康: 水中ウイルス濃縮法によるトウガラシ微斑ウイルスの回収率の測定, 第49回日本水環境学会年会 2015年3月16日, 金沢大学(石川県・金沢市).
6. 古屋崇志, 原本英司, 坂本康: 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, 第51回環境工学研究フォーラム, 2014年12月21日, 山梨大学(山梨県・甲府市).
7. 渡辺亮, 黒川恵未, 原本英司, 森田久男, 岸田直裕, 浅見真理, 秋葉道宏, 坂本康: 微生物遺伝子マーカーを用いた水道水源河川中の糞便汚染源解析, 第51回環境工学研究フォーラム, 2014年12月21日, 山梨大学(山梨県・甲府市).
8. Makoto Watanabe, Saki Fujino, Eiji Haramoto, Kei Nishida, and Yasushi Sakamoto: Analysis of fecal contamination of environmental water in the Kofu basin and the Tamagawa River using host-specific *Bacteroidales* and F-specific RNA coliphage genetic markers, *Water and Environment Technology Conference 2014*, June 29, 2014, Waseda University (Tokyo).
9. Takashi Furuya, Eiji Haramoto, Kei Nishida, and Yasushi Sakamoto: Development of a method for simultaneous concentration of viruses and protozoa in water using NanoCeram electropositive filter, *Water and Environment Technology Conference 2014*, June 29, 2014, Waseda University (Tokyo).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原本 英司 (HARAMOTO, Eiji)
山梨大学・大学院総合研究部・准教授
研究者番号: 00401141

(2) 研究分担者

端 昭彦 (HATA, Akihiko)
京都大学・工学研究科・特別研究員 (PD)
研究者番号: 70726306

北島 正章 (KITAJIMA, Masaaki)
北海道大学・工学研究院・助教
研究者番号: 30777967

岸田 直裕 (KISHIDA, Naohiro)
国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官
研究者番号: 10533359