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

片山 浩之* 嶋崎 明寛** 大垣 眞一郎*

Development of Virus Concentration Method Using Negatively Charged Membrane by Alkaline Elution after Acid Rinse

Hiroyuki KATAYAMA*, Akihiro SHIMASAKI**
and Shinichiro OHGAKI*

* Department of Urban Engineering, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

** Ministry of Land, Infrastructure and Transport, Kinki Regional Development Bureau, Minamifudo 808, Shiokoji Kudaru, Nishinotoindori, Shimogyo, Kyoto 600-8234, Japan

Abstract

A virus concentration method was developed utilizing the electrostatic interaction among viruses, multivalent cations and membranes. A negatively charged membrane was used to adsorb viruses from water samples through which diluted sulfuric acid (pH3.0-4.8) was then passed to remove cations from the membrane, followed by the elution of viruses with alkaline solution (pH10.5-12) or with beef extract solution (pH9.5). F-specific RNA phage Q β and poliovirus type I were used as model viruses and pure water, tap water and artificial seawater were used as samples. The method using a negatively charged membrane with acid rinse followed by alkaline elution showed the highest recovery yields among those tested for polioviruses including the 1MDS positively charged membrane, especially when applied to seawater. This method also has a potential advantage over conventional methods of using inorganic eluant such that there will be no inhibition of the subsequent virus detection by PCR.

Key words : negatively charged membrane, virus concentration, acid rinse, alkaline elution, poliovirus, Q β , seawater, quantitative RT-PCR

1. はじめに

現在の水道システムでは、水の微生物学的安全性のために水道水質基準項目として大腸菌群、一般細菌の2項目が指定されている。また、海水浴場の水浴の安全性のための基準として、糞便性大腸菌群の基準が設定されている。コレラなどの病原細菌による水系感染症は我が国においては長らく発生していないことなどから、病原細菌に対する防御策としてこの二つの指標が有効に機能していることがわかる。しかしながら現状では、ウイルスあるいは原虫類による水系感染の危険性については、必ずしも十分に抑制しているとは言えない。我が国の水道事業体は、クリプトスポリジウム等の原虫類に対する対策を進めているところであるが、一つの対応策として膜処理などの濁質管理が考えられている。しかしながらこの方法では、サイズの小さいウイルスに対する防御策として十分ではない可能性がある。そのため、水系感染する可能性がある腸管系ウイルスを測定し、水中での挙動に関する情報を集める必要がある。

ヒト腸管系ウイルスは、自然水系や飲料水中には非常に低濃度であるため、水環境中のウイルスモニタリングには安定した回収率と高い濃縮倍率をもつウイルス濃縮法が求められている。そのためには、ウイルス濃縮のメカニズムに関する知見が重要である。

ヒト腸管系ウイルスは中性の水中で陰電荷を帯びていることが多いことを利用し、多量の陽イオンを添加して陰電荷膜に親和させて吸着させる方法¹⁾や、酸性条件下²⁾でウイルスを吸着させる方法が開発されている。しかしながらこの方法は、吸着効率が高くてもウイルスを膜から誘出する回収率が低い傾向にあるとされている。陽電荷膜法³⁾は試料の前処理を必要としない濃縮法として、アメリカ合衆国をはじめとして広く用いられている⁴⁻⁹⁾。この手法は、陰電荷をもつウイルスを陽電荷をもつ膜に吸着させ、少量のビーフエキス溶液で誘出することによって濃縮するものである。陽電荷膜法の利点としては、操作の簡便性(=前処理が不要)に加えて、ろ過効率が陰電荷膜に比べて優れていること、回収率が高いこと、ウイルスの種類による回収率の違いが比較的小さ

* 東京大学大学院工学系研究科 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

** 国土交通省近畿地方整備局 〒600-8234 京都市下京区西洞院通塩小路下る南不動堂町808

いことなどが挙げられる。他にも、セルロース¹⁰⁾などの担体にウイルスを吸着し、誘出液でウイルスを回収する手法も提案されているが、フィルター法に比べて処理水量は少ない。

水中ウイルスの測定には、ウイルスゲノムをPCR (Polymerase Chain Reaction) 法で増幅して検出する方法が広く用いられるようになってきている。PCR 法でウイルスを検出する際の利点は、①実験操作が感染危険性から見て安全であること、②実験操作が簡単であること、③実験結果が短時間で得られること、④検出感度が高い^{11,12)}こと、などが挙げられる。また、培養ができない A 型肝炎ウイルスやノーウォーク様ウイルスなどは、PCR 法が唯一の現実的な測定方法である。

従来のウイルス濃縮法は培養法によるウイルス検出を前提として開発されているため、必ずしも PCR 法によるウイルス検出に適した方法とは言えない。特に、陽電荷膜法などで誘出液に用いられているビーフェキス溶液は、再濃縮後に PCR 法によるウイルス検出を阻害するので、ウイルスの精製が必要となっている¹³⁻¹⁶⁾。そこで、有機物を含まない誘出液を用い、簡単に再濃縮が可能なウイルス濃縮法が待たれている。

陰電荷膜へウイルスが吸着するためには、陽イオンが吸着に必須であることから、ろ過原水中で陰電荷を帯びたウイルスのまわりに陽イオンがくっつき、その陽イオン-ウイルス複合体が吸着工程で陰電荷膜に吸着していると考えられる¹⁷⁾。また、ウイルス誘出にはアルカリ性の誘出液を用いることが多いが、アルカリ条件下ではウイルスは陰電荷を帯びており、陽イオンとウイルスは結合したままであると考えられる。陰電荷膜を用いた濃縮手法において、陽イオンをウイルスから除去すれば膜からのウイルスの回収が容易になると考えられる。

本研究では、誘出工程の前に陽イオンをウイルスから除去することを目的とした洗浄工程の導入を検討する。洗浄工程では、陽イオンおよびその他の誘出阻害物質を溶解し、ウイルスを不活化しないことおよびウイルスを誘出しないことが必要条件である。洗浄工程の条件に適した候補として、酸性の洗浄液を用いる酸洗浄を試みた。Q β をモデルウイルスとして用いる実験において、ウイルス濃縮操作におけるウイルスの挙動を調べている。また、ポリオウイルスを用いた実験では主にその回収率を評価し、既存の手法と比較した。

2. 方 法

2.1 対象としたウイルス

ウイルスの濃縮法の評価のために、モデルウイルスとして F 特異大腸菌 RNA フェージ Q β (古瀬博士 (当時東海大学医学部) より分与) と、弱毒ポリオウイルス 1 型 (Lsc, 2ab 株) (矢野博士 (東京都立衛生研究所) より分与) を用いた。フェージ Q β は、ブラック法によって活性のあるウイルス数を容易に測定でき、物理学的性質及び遺伝子配列に関する情報が豊富であることから取り扱いが容易であること、及び、RNA 一本鎖を遺伝子として持ち、23-25nm とサイズが小さく、エンベロープを持たないという物理化学的性質が、ヒト腸管系ウイルスの多くと共通していることから、濃縮手法の開発におけるモデルウイルスとして使用した。ポリオウイルスは一本鎖

RNA を持つエンテロウイルスに属し、水中ウイルスの研究に広く用いられているウイルスであり、他の研究との比較に適しているので使用した。

2.2 ブラック法

Q β は、宿主菌として E. coli K12 A/ λ (F⁺) を用いる方法¹⁸⁾を用いた。ポリオウイルスは、BGM 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞由来) を用いるブラック法¹⁹⁾によって測定した。

2.3 定量的 RT-PCR 法

内部蛍光プローブを用いる TaqManTM PCR 法 (PE Applied Biosystems) を用いてウイルスのゲノム RNA を定量する手法を開発した。0.2ml マイクロチューブに試料 100 μ l をとり、90°C で 10 分間加熱することによりウイルスのカプシドタンパクを変性し、RNA を水溶液中に分散させた。次に、TaqMan Gold RT-PCR kit (PE Applied Biosystems) を用いて one step RT-PCR を行った。ただし、温度条件は 48°C で 30 分の後、95°C 10 分に続いて、95°C 15 秒、60°C 45 秒を 35 サイクルとし、その他の詳細は付属のプロトコールに従った。使用したプライマーおよび TaqMan プローブの塩基配列を Table 1 に示す。また、ネガティブコントロール 8 本を試料と同時に毎回試験した。PCR 前後の PCR 反応チューブにおける蛍光強度を SDS7200 (PE Applied Biosystems) により測定し、ネガティブコントロールと有意の差 ($t < 0.001$) があるものを陽性と判定した。

Q β と蛍光強度の直線関係を調べた実験以降では、その直線関係に基づいて、RT-PCR の蛍光強度から Q β のゲノムの濃度を算出した。なお、Q β ゲノムを定量する際には、毎回濃度既知の Q β の希釈列を同時に RT-PCR に供し、その蛍光強度を検量線として用いた。

2.4 モデルウイルスの pH 感受性

ウイルスの濃縮において適用可能な pH の範囲を調べるため、pH2 から pH12 までのさまざまな pH 条件を水酸化ナトリウムおよび硫酸を用いて作成した。Q β 高濃度液の pH 緩衝作用を低減するため、MilliQ 水によって 10⁷ 倍の希釈を行ったものを供試し、ウイルスの添加による pH への影響が 0.03 以下であることを確認した。さまざまな pH 条件下でウイルスを 10 分間静置し、中和した。ただし、ポリオウイルスのアルカリ側の耐性に関しては、アルカリ誘出に要する時間を考慮して、接触時間を 1 分とした。ブラック法によってそのブラック形成能の低下の程度を定量した。また、RT-PCR で検出することを前提とした場合はウイルスの失活にとらわれないきびしい条件でウイルスを誘出できる可能性がある。そこで、ウイルスゲノム RNA の高 pH 域に対する耐性を調べるため、定量的 PCR 法によって、PCR 法による検出におけるウイルス数の低減の程度を定量した。

Table 1 Sequences of the primers and the probe

name	Region	Sequence (from 5' to 3')
Q β +	49—71	TCAAGCCGTGATAGTCGTTCCCTC
Q β —	187—208	AATCGTTGGCAATGGAAAGTGC
Q β Probe	147—169	CGAGCCGCGAACACAAGAATTGA

2.5 陰電荷膜を用いた濃縮手法の開発

(1) ウイルス濃縮に使用した膜

ウイルス濃縮におけるウイルス回収率等の基礎的データを収集するため、陰電荷膜として口径47mmのHA膜(ミリポア社製, ニトロセルロースとセルロースアセテートの混合セルロース膜, 公称孔径 $0.45\mu\text{m}$)を滅菌したものを用いた。また, 比較の対象としては, 世界的に広く用いられている陽電荷膜1 MDS (CUNO, Meriden Conn)を用い, 陽イオンを添加せず, ビーフエキス溶液で抽出する常法²⁰⁾に従ってウイルス濃縮を行った。

(2) 陰電荷膜へのウイルスの吸着

淡水からウイルスを濃縮する場合は, 終濃度50mMとなるように4 M MgCl_2 を試料に加え, ろ過速度は約 $100\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で膜に通した。ただし, ポリオウイルスを膜に吸着させる場合は, ろ液にウイルスが漏出していないことを確認して MgCl_2 の終濃度を25mMとした。海水(Sea salts, Sigma)からウイルスを濃縮する場合は, 陽イオンの添加は行わなかった。ろ液を回収してブラック法を行った。ウイルスの膜への吸着率は, $(1 - \text{ろ液中 } Q\beta \text{ 濃度} / \text{投入 } Q\beta \text{ 濃度}) \times 100$ とした。

(3) 酸洗浄による陽イオンの除去

$Q\beta$ の場合は, pH4.8の希硫酸溶液500mlを5 mlから100mlに分画して膜に通し, 各分画に含まれるマグネシウムイオン濃度をフレームレス原子吸光度計で測定した。ポリオウイルスに対しては, pH3の希硫酸溶液500mlを膜に通し, そのろ液を分画して採取した。ろ液に含まれるマグネシウムイオンをICP発光(PerkinElmer, OPTIMA3000DV)により測定した。また, ろ液に含まれる $Q\beta$ をブラック法により測定し, 酸洗浄時に流出する $Q\beta$ の量を評価した。

(4) ウイルスの誘出

0.1M H_2SO_4 25mlと100倍TEバッファ50mlを入れた滅菌済み試験管をろ過ユニットに装着して, pH10.5の水酸化ナトリウム溶液5 mlを膜上に注ぎ, 吸引圧をかけてろ液を試験管内に回収した。また, 比較のために, ビーフエキス3%溶液(pH9.5) 5 mlを用いる誘出も合わせて行った。回収したろ液に含まれるウイルス濃度をブラック法もしくは定量的RT-PCR法によって測定し, 投入したウイルス量のうち濃縮液として回収された比率を求めた。

3. 結果

3.1 定量的RT-PCR法の開発

TaqMan RT-PCR法における蛍光強度の増加分とウイルス濃度の関係をFig. 1に示した。蛍光強度は実験のたびに異なる絶対値を示すので, ここでは同時に測定したネガティブコントロールの値の平均値($n=8$)で除して標準化して示した。一定の濃度範囲では, PCRによる蛍光強度の増加分(dRn)が $Q\beta$ の濃度の対数で直線的に近似できる($R^2=0.9878$)ことがわかった。

3.2 濃縮に用いるpH域の決定

ウイルスが酸性およびアルカリ性にさらされた場合の測定値に与える影響をFig. 2に示す。 $Q\beta$ はpH5程度以下において, 酸性が強くなることに伴うブラック数の低下がみられる。一方, ポリオウイルスはpH2においてもブラック数の低下が見られなかった。このことから

Fig. 1 Normalized fluorescent intensity and concentration of $Q\beta$
dRn: normalized reporter signal
NTC: no template control

Fig. 2 Remaining ratio of viruses after incubation under various pH condition

$Q\beta$ は比較的酸に弱く, ポリオウイルスは酸性に強いことがわかった。アルカリに対する耐性は, 両ウイルスともpH11程度以上において測定値が低下する傾向がみられ, $Q\beta$ とポリオウイルスの間であまり差は見られなかった。

$Q\beta$ の濃縮においては, ウイルス回収率を向上するためにさらに高いpHにおけるウイルス誘出を検討するため, 高いpH域にさらされた場合におけるウイルスゲノムのRT-PCRによる測定値への影響を調べた。 $Q\beta$ ゲノムのアルカリ耐性の実験結果もFig. 2に示した。1 Nおよび0.1Nの水酸化ナトリウム溶液にさらされた場合は, $Q\beta$ がRT-PCR法によって検出されなくなったが, 0.01Nの水酸化ナトリウム溶液(pH11.9)にさらされた場合は, 濃度換算でアルカリにさらされていない $Q\beta$ の73%という値が得られた。実際の濃縮ではアルカリ条件における接触時間が短いので, アルカリとの接触による影響はこれよりも小さいと考えられるので, RT-PCR法によって $Q\beta$ を検出する場合には, 0.01N水酸化ナトリウム溶液を用いることとした。

3.3 $Q\beta$ の陰電荷膜に対する吸着

Table 2に原液の $Q\beta$ 濃度測定値とろ液に含まれる $Q\beta$ 濃度測定値, およびそこから得られる吸着率を示した。吸着率は, 陰電荷を帯びたHA膜を用いた場合は, すべての場合においてほぼ100%の $Q\beta$ が膜に吸着していることがわかる。一方, 陽電荷をもつ1 MDS膜の場合

Table 2 Adsorption efficiency of Qβ to the membranes

Type of membrane	Type of Sample	Sample volume [ml]	Conc. of Qβ [PFU ml ⁻¹] in sample	Volume of filtrate tested [ml]	Conc. of Qβ [PFU ml ⁻¹] in filtrate	Adsorption ratio
HA negatively charged membrane	MilliQ water ^a	40	2.0 × 10 ¹⁰	40	8.0 × 10 ²	>99.9%
		50	1.1 × 10 ¹⁰	1.0 × 10 ⁻⁵	0	>99.9%
		40	5.6 × 10 ⁶	0.1	0	>99.9%
		40	5.6 × 10 ⁶	1	0	>99.9%
	Tap Water ^b	1000	5.6 × 10 ⁶	50 ^c	1	>99.9%
		1000	5.6 × 10 ⁶	50 ^c	198	>99.9%
	Seawater	50	1.2 × 10 ³	10	0	>99.9%
		50	1.2 × 10 ³	10	0	>99.9%
1MDS positively charged membrane	MilliQ water	40	1.5 × 10	40	0	>99.9%
	Seawater	50	1.2 × 10 ³	10	56	51.8%

a: MilliQ water was added with 0.1 ml of Qβ stock solution and final concn. of 50 mM MgCl₂
b: Tap water was added with 5 mg/l of Na₂S₂O₃, followed by a spike of Qβ stock solution and final concn of 50 mM MgCl₂
c: Final fraction of 50ml was collected and tested

は、精製水に対してはほぼ100%の吸着率を示したものの、海水に対しては51.8%の吸着率であった。海水からウイルスを濃縮する場合には、陰電荷膜の方が陽電荷膜よりも膜面上に効率よくウイルスを捕捉できることがわかった。

3.4 酸洗浄の効果

(1) 陽イオンおよびウイルスの挙動

酸洗浄時におけるマグネシウムイオンの流出特性をFig. 2に示す。pH4.8においてもpH3においても、最初に1 mM程度の濃度でMgイオンが流出し、酸洗浄液量の増加とともに濃度が低下している。200ml程度においてMgイオンの定量限界に近い濃度まで下がった。なお、各分画の液量がMgイオンの流出特性に影響を及ぼしている可能性がある。

ポリオウイルス濃縮のためのpH3における実験では、マグネシウムの添加濃度は26.0mM、そのろ液のマグネシウム濃度は24.0mMであった。ウイルス吸着工程における添加液量は50mlなので、マグネシウムのろ過による減少量は0.10mMolと算出された。一方、流出したMgイオンの積算量は各分画のMgイオン濃度とその液量の積の和として求められ、0.085mMolと算出された。分画時の液量およびろ過による液量の誤差、Mgイオン濃度測定の影響なども考慮する必要があるが、酸洗浄によって陰電荷膜から流出したMgイオン量は、吸着工程で膜に吸着したMgイオン量にほぼ等しいと考えられる。

(2) Qβの流出

Table 3に、酸洗浄時のQβ流出量を示す。500mlの酸洗浄時の各分画に含まれるQβの合計を流出量として示している。精製水を原水とした場合のQβの流出率は

Fig. 3 Profile of magnesium ion in the filtrates of acid rinse

1%以下であり、Qβは酸で膜が洗浄されている間にも膜に留まっていることがわかった。酸洗浄におけるQβの流出はきわめて少量であり、ウイルス濃縮の回収率を引き下げる要因にはならないといえる。一方、海水を原水とした場合は、酸洗浄において57.1%のQβが流出しており、酸洗浄によって回収率が低下する可能性があることがわかった。

(3) 酸洗浄がウイルス回収率に与える影響について

精製水を原水とした場合のろ過原水及び濃縮液のQβ濃度の実測値とそれぞれの液量、および投入したQβ量と回収されたQβ量の比を回収率としてTable 4に示した。水酸化ナトリウム溶液 (pH10.5) によって誘出す

Table 3 Desorption ratio of Qβ during rinsing the membrane with acid solution

Type of Sample	Volume of acid [ml]	Amount. of Qβ [PFU] on the membrane	Volume of filtrate tested [ml]	Amount. of Qβ [PFU] in filtrate	Desorption ratio
MilliQ water	500	5.6 × 10 ⁶	500	5.0	<0.1%
	500	5.2 × 10 ⁶	500	4.7 × 10 ⁴	0.89%
Sea water	500	5.8 × 10 ³	1	3.3 × 10 ³	57.1%

Table 4 Recovery of Q β from 40ml of pure water and the concentrating condition

Eluting medium	Volume of acid rinse [ml]	Number of sample	average	min-max
NaOH	500	4	9.4%	2.0%–22%
	0	4	2.0%	0%–7.2%
Beef Extract	500	3	20%	14%–25%
	0	2	0%	0%
1MDS		1	40%	40%

る場合、酸洗浄によって Q β の回収率は 2.0% から 9.4% に向上した。ビーフエキス溶液 (pH9.5) によって誘出した場合は、0% から 20% に回収率が向上した。いずれの誘出液を用いた場合にも、酸洗浄によって回収率が向上したことがわかる。ただし、得られた回収率 (9.4% および 20%) は、陽電荷膜 1 MDS を用いた従来法の回収率 40% に比べて低かった。

次に、より強いアルカリ条件である 0.01N の水酸化ナトリウム (pH12.0) によって誘出し、Q β のゲノム RNA を定量的 RT-PCR 法を用いて測定して回収率を評価した。その結果を **Table 5** に示す。酸洗浄を行わなかった場合 (酸洗浄液量 = 0 ml) は、1% から 6% という低い回収率であった。酸洗浄液量を 5 ml から 100ml の範囲とした場合では、Q β の回収率は 43% と高い回収率を示すことがあったものの、2% という低い回収率の場合もあり、回収率が大きく変動した。酸洗浄液量を 500ml から 1,000ml とした場合の回収率は、平均 35%、最小値 22% および最大値 57% で、3 倍の範囲の変動で比較的安定していた。また、原水の液量を 1,000ml に増加した場合の回収率は 19% であり、原水液量を増加させても回収率はあまり下がらないことがわかった。**Table 4** における酸洗浄・アルカリ誘出による Q β 回収率は 9.4% であったことと比較すると、pH10.5 から pH12 にすることによって Q β の回収率が向上したと考えられる。

精製水を原水とした場合のポリオウイルスの濃縮回収率を **Table 6** に示す。水酸化ナトリウム溶液 (pH10.5–10.8) を誘出液に用いた場合は、ポリオウイルスの回収率は 33% から 95% と大きく向上している。ビーフエキス溶液を誘出液に用いた場合は、酸洗浄を行った場合と行わなかった場合にあまり差はないが、それぞれ 83% および 79% と高い回収率を示した。また、陽電荷膜 1 MDS を用いたポリオウイルスの回収率は 50% であった。これらの結果から、陰電荷膜を用いる酸洗浄・アルカリ誘出法は従来法に比べて同等以上の回収率を示しているといえる。

3.5 海水に対する適用

海水を原水とした場合の Q β の濃縮回収率を **Table 7** に示す。水酸化ナトリウム溶液およびビーフエキス溶液を誘出液として用い、酸洗浄による効果を調べた。すべての場合において回収率はあまり高くなかった (13% 以下)。また、酸洗浄を行うことによって Q β の回収率は必ずしも向上しなかった。その理由としては、**Table 2** に示されているように、酸洗浄で Q β が膜から流出している可能性が考えられる。

次に、海水からポリオウイルスを濃縮した場合の回収

Table 5 Recovery yields of Q β with 0.01N NaOH (pH12) and the volume of acid rinse, determined by quantitative RT-PCR

Volume of acid rinse [ml]	Number of sample	Geometric mean	min max	1000ml ^a
0	8	3.9%	1%–6%	N. D. ^b
5–100	7	12%	2%–43%	10.0%
500–1000	6	35%	22%–57%	19.0%

^a: Sample volume of 1000 ml was applied

^b: No data

Table 6 Recovery of poliovirus from 40ml of pure water and the concentrating condition

Eluting medium	Volume of acid rinse [ml]	Virus input ^d		Virus recovered		recovery
		vol [ml]	concn [pfu/ml]	vol [ml]	concn [pfu/ml]	
NaOH ^b	500				5400	95%
NaOH	0				1900	33%
BE ^c	500	40	710	5	4700	83%
BE	0				4500	79%
1MDS ^d	0				2900	50%

^a: MgCl₂ was added to pure water at final concentration of 25mM Mg²⁺

^b: 10mM NaOH, pH 10.5–10.8, was used for elution

^c: 3% Beef extract solution, pH 9.5, was used for elution

^d: No cation was added.

Table 7 Recovery of Q β from 40ml of seawater and the concentrating condition

Eluting medium	Volume of acid rinse [ml]	Number of sample	average	min-max
NaOH ^a	500	12	13%	7.1%–22%
	0	1	8%	
BE ^b	500	1	4%	
	0	1	7%	
1MDS ^c	0	1	0.4%	

10mM NaOH, pH 10.5–10.8, was used for elution

3% Beef extract solution, pH 9.5, was used for elution

No cation was added.

Table 8 Recovery of poliovirus from 50ml of seawater and the concentrating condition

Eluting medium	Volume of acid rinse [ml]	Number of sample	average	min-max
NaOH ^a	500	2	89%	82%–95%
	0	2	38%	34%–42%
BE ^b	500	1	94%	
	0	1	42%	
1MDS ^c	0	1	6%	

^a: 10mM NaOH, pH 10.5–10.8, was used for elution

^b: 3% Beef extract solution, pH 9.5, was used for elution

^c: No cation was added.

率を Table 8 に示す。水酸化ナトリウム溶液およびビーフエキス溶液のいずれを誘出液として用いた場合にも、酸洗浄によって回収率は大きく向上した (38%→89%, 42%→94%)。一方、1 MDS を用いた場合には、6% という低い回収率であった。これらの結果から、海水を対象とする場合には、陰電荷膜によってウイルスを濃縮し、酸洗浄を用いることが適していることがわかる。海水の液量を1,000m^lに増加させた場合のウイルス回収率を Table 9 に示す。液量を1,000m^lにした場合にも、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は、安定して50%以上のポリオウイルスを回収した。

4. 考 察

中性の水中のウイルスは、多価の陽イオン存在下では陰電荷膜に吸着することは広く知られており、Gerba¹⁷⁾はその機構を疎水性結合と陽イオンによる架橋作用で説明できるとしている。本研究で開発された酸洗浄は、陽イオンによる架橋作用をウイルス誘出の阻害要因として捉え、誘出工程の前段で陽イオンを除去することを試みたものである。陽イオンとともにウイルスも膜から流出してしまうことが懸念されるが、ウイルスが膜から流出していないことを実験的に確認した (Table 3)。また、酸洗浄によってウイルスの回収率が向上することを示した (Table 4, 5, 6, 8)。以上の実験結果は、ウイルス濃縮における pH 条件とウイルスの等電点を考慮すると、次のように説明できる (Fig. 4)。吸着工程においては、ウイルスと膜の陰電荷を陽イオンが中和して吸着すると考えられる。酸洗浄では、吸着工程において陰電荷を帯びていたウイルスは、洗浄工程においては陽電荷を帯びようになり、陽イオンとウイルスの結合はなくなりやすくなり、陽イオンは酸性条件下で流出していくと考えられる。また、陽電荷を帯びたウイルスは、陰電荷膜に静電的相互作用で直接吸着し、結果としてウイルスはあまり流出しなかったと考えられる。誘出工程においては、アルカリ条件下でウイルスは陰電荷を帯びて膜の陰電荷と反発し、ウイルスを膜から誘出することを容易にしたと考えられる。

なお、本研究で用いたポリオウイルス及び Q β の等電点はそれぞれ7.5及び5.3である。この等電点からは、ポリオウイルスは中性において必ずしも陰電荷を帯びていないと考えられるが、一方では酸性条件下もしくは多価の陽イオン共存下において吸着率が高い²⁾ことから、静電的相互作用が吸着に寄与していると考えられる。ウイルスの膜への吸着メカニズムについては不明な部分があると言える。ただし、吸着工程におけるウイルス捕捉率は誘出工程におけるウイルス回収率に比べて十分に高く、ウイルス濃縮法の開発という観点からは重要性は低いと考えられる。

PCR 法によるウイルス検出を前提とすれば、活性のあるウイルスではなくウイルスゲノムを濃縮し、それを測定できればよいことになる。ウイルスゲノムを濃縮する手法を試みた研究²¹⁾もあるが、回収率が不明であり、濃縮法として評価することが不可能であった。ここで開発したウイルス濃縮法は、定量的 RT-PCR 法を用いて回収率を評価しており、他のウイルス濃縮法との比較が可能となった。ウイルスではなくウイルスゲノムを濃縮する

Table 9 Recovery yields of polioviruses from 1,000m^l of seawater by alkaline elution after acid rinse

Initial concn in seawater [pfu/ml]	concn of the eluate (5ml) [pfu/ml]	recovery
1.7×10^2	1.7×10^4	50%
	1.8×10^4	53%
	1.7×10^4	50%
	2.1×10^4	62%
1.3×10^2	1.6×10^4	62%
	1.9×10^4	73%
	1.8×10^4	69%
	1.9×10^4	73%
Average		62 %
Standard Deviation		10%

Adsorption

(pH neutral, Viruses are negatively charged)

Acid Rinse

(pH low, Viruses are positively charged)

Elution by Alkali

(pH high, Viruses are negatively charged)

Fig. 4 Schematic of electro-static interaction among a virus, cation and a negatively charged membrane

手法の利点としては、ウイルスの外套タンパクを壊してもよいことになり、ウイルスの活性維持を無視した条件を用いてもウイルスを濃縮できることが挙げられる。この点については、Q β の回収率は pH10.5 における 9.4% (Table 4) から 35% (Table 5) に向上しており、実験結果からも支持されている。

ポリオウイルスと Q β を比較すると、ポリオウイルスの方が高い回収率を示している (Table 4, 6, 7, 8)。既存の研究においてもファージの回収率はポリオウイルスに比べて低くなることが知られている。Table 5 に示した回収率 35% は、ファージの回収率としては高い方であると評価できる。ただし、環境水から実際にファージを測定する場合には、濃縮するよりも検試水量を大きくする方が実用的である可能性がある。

本研究では、pH12 における誘出の回収率について、Q β について測定したが、ポリオウイルスについては調べていない。ポリオウイルスに関しては、pH10.5 の誘出液で十分な回収率が得られているので、より高い pH 域における実験を行わなかった。また、ポリオウイルスは回収率が高いことから酸洗浄工程において流出していないと

考えられる。

ポリオウイルスの陰電荷膜による濃縮実験では、酸洗浄を行なうことによって回収率が安定して向上している。また、ウイルスの検出法として細胞培養によるブラック法をているが、誘出液はアルカリ溶液でもビーフエキス溶液でも差がないという結果が得られた。PCR法ではビーフエキス溶液は再濃縮後に阻害作用があると言われており¹⁶⁾、アルカリ誘出がまさる。

本研究においては、口径の小さい膜におけるウイルス濃縮について、比較的少ない液量の濃縮を行って回収率を評価している。今後は、水中ウイルス側底に必要な大容量(～1,000L)の水に対して膜面積の大きな装置を用いてウイルス濃縮した場合の回収率を調べる必要がある。また、水道原水となる河川水などの試料に適用して濃縮回収率の違いを調べ、さらに他の腸管系ウイルスに適用した場合の回収率などを評価する必要がある。さらに、ウイルスの再濃縮および精製に関しても、さらなる手法の改善およびその評価が必要である。

5. ま と め

水中ウイルスを陽イオン存在下で陰電荷膜に吸着し、硫酸酸性溶液で膜を洗浄して陽イオンを取り除き、ついでアルカリ溶液(pH10.5-12.0)もしくはビーフエキス溶液(pH9.5)を用いてウイルスを膜から誘出する方法を開発した。F特異RNAファージQ β およびポリオウイルス1型をモデルウイルスとして用い、水道水および人工海水を試料として用いた。

陰電荷を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法は、ポリオウイルスの濃縮において回収率が高く(82-95%)、Q β に対し手も従来の陽電荷膜法と同程度の回収率(35%)を示した。また、海水空のポリオウイルスの濃縮において、従来の陽電荷膜を用いる方法(6%)に比べ非常に高い回収率(89%)を示した。

この方法の原理は、陰電荷膜、ウイルスおよび陽イオンの静電的相互作用から説明することが可能であった。また、この方法は、有機物を含まない誘出液を用いているので、ウイルス検出においてPCR法を阻害しないという特徴が期待できるという利点も合わせてもっている。

以上より、陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出法は、海水からのウイルス濃縮手法として有力な手法であるといえる。

謝 辞

東京都立衛生研究所の矢野一好博士には、ウイルス培養法などについて幅広くご指導いただいた。深く謝意を表す。

(原稿受付 2002年2月28日)

(原稿受理 2002年5月29日)

参 考 文 献

- Wallis C. and Melnick J.L. (1967) Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, *Jour. of Virology*, **1**, 472-477.
- Sobsey M.D., C. Wallis, M. Hendersen and J.L. Melnick. (1973) Concentration of Enteroviruses from Large volume of Water, *Appl. Microbiol.*, **26**, 529-534.
- Sobsey M.D. and Jones B.L. (1979) Concentration of Poliovirus from Tap Water Using Positively Charged Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 588-595.
- Logan K.B., Rees G.E., Seely N.D. and Primrose S.B. (1980) Rapid Concentration of Bacteriophages from Large Volumes of Freshwater: Evaluation of Positively Charged, Microporous Filters, *Journal of Virological Methods*, **1**, 87-97.
- Logan K.B., Scott G.E., Seely N.D. and Primrose S.B. (1981) A Portable Device for the Rapid Concentration of Viruses from Large Volumes of Natural Freshwater, *Journal of Virological Methods*, **3**, 241-249.
- Nupen E.M. and Bateman B.W. (1985) The Recovery of Viruses from Drinking-water by Means of an In-line Electropositive Cartridge Filter, *Wat. Sci. Tech.*, **17**, 63-69.
- Reynolds K.A., Rose J.B. and Giordano A.T. (1993) Comparison of Methods for the Recovery and Quantitation of Coliphage and Indigenous Bacteriophage from Marine Waters and Sediments, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 115-117.
- Shri S.N. and Gerba C.P. (1983) Concentration of Colophage from Water and Sewage with Charge-Modified Filter Aid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 232-237.
- Sobsey M.D., S.E. Oglesbee, D.A. Wait and A.I. Cuenca (1985) Detection of Hepatitis A Virus in Drinking Water, *Wat. Sci. Tech.*, **17**, 23-38.
- Yano K., Yoshida Y., Shinkai T. and Kaneko M. (1993) A Practical Method for the Concentration of Viruses from Water Using Fibriform Cellulose and Organic Coagulant, *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 295-298.
- Puig M., J. Jofre, F. Lucena, A. Allard, G. Wadell, and R. Girones. (1994) Detection of Adenoviruses and Enteroviruses in Polluted Water by Nested PCR Amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2963-2970.
- Kopecka H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal, and Lopez-Pila. (1993) Detection of Naturally Occurring Enteroviruses in Water by Reverse Transcription, Polymerase Chain Reaction, and Hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1213-1219.
- Abbaszadegan, M., M.S. Huber, C.P. Gerba, and I.L. Pepper. (1993) Detection of Enteroviruses in Groundwater with the Polymerase Chain Reaction, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1318-1324.
- Jaykus L.A., R. De Leon, and M.D. Sobsey. (1996) A Virion Concentration Method for Detection of Human Enteric Viruses in Oysters by PCR and Oligoprobe Hybridization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2074-2080.
- Schwab K.J., R. De Leon, and M.D. Sobsey. (1995) Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for Detection of Enteroviruses, Hepatitis A Viruses, and Norwalk Viruses by Reverse Transcription-PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 531-537.
- Shieh Y.-S.C., D. Wait, L. Tai and M.D. Sobsey. (1995) Method to Remove Inhibitors in Sewage and Other Fecal Wastes for Enterovirus Detection by the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Virological Methods*, **54**, 51-66.
- Gerba C.P. (1984) Applied and Theoretical aspects of Virus Adsorption to Surfaces, *Advances in Applied Microbiology*, **30**, 133-168.
- 片山浩之, 大瀧雅寛, 大垣眞一郎 (1997) UV照射により不活化されたRNAファージのRT-PCR法による定量, 環境工学研究論文集, **34**, 83-91.
- 矢野一好, 林志直, 藪内清, 田口文章 (1986) 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 第五報 フィルターによるポリオウイルスの濃縮, 用水と廃水, **28**, 183-191.
- APHA, AWWA, WEF 編 (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, pp.9-115-9-119.
- Yang F. and Xu X. (1993) A New Method of RNA Preparation for Detection of Hepatitis A Virus in Environmental Sample by the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Virological Methods*, **43**, 77-84.