

研究助成実施報告書

助成実施年度	2022 年度
研究課題（タイトル）	感染力評価と外殻タンパク質損傷評価を併用した水道原水河川における病原ウイルスの存在実態の把握
研究者名※	白崎 伸隆
所属組織※	北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 環境工学分野 准教授
研究種別	研究助成
研究分野	都市環境工学
助成金額	150 万円
発表論文等	

※研究者名、所属組織は申請当時の名称となります。

() は、報告書提出時所属先。

大林財団 2022 年度研究助成実施報告書

所属機関名 北海道大学
申請者氏名 白崎 伸隆

研究課題	感染力評価と外殻タンパク質損傷評価を併用した 水道原水河川における病原ウイルスの存在実態の把握
<p>(概要) ※最大 10 行まで</p> <p>本研究では、ウイルスの外殻タンパク質の損傷を検出可能な PMAxx-Enhancer-PCR 法、並びに感染力評価手法の一つである ICC-PCR 法によるウイルス定量を適用することにより、水道原水における感染力を有する病原ウイルスの存在実態調査を実施した。その結果、対象とした水道原水河川においては、エンテロウイルス、ノロウイルス GI 遺伝子群、ノロウイルス GII 遺伝子群が最大で 10^{3-5} copies/L 程度存在していることが確認された。一方、PCR 法単独による定量において病原ウイルスが陽性となった幾つかの試料について、PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施したところ、外殻タンパク質の損傷によりほとんどのウイルスが感染力を失った状態で存在していることが示唆される場合とウイルスが感染力を有する状態で存在していることが示唆される場合の両方が確認された。また、ICC-PCR 法による定量を実施したところ、エンテロウイルスが感染力を有する状態で 10 MPN/L 程度存在する可能性があることが明らかとなった。</p>	

1. 研究の目的	(注) 必要なページ数をご使用ください。
<p>PCR 法を用いた水環境におけるウイルスの存在実態調査が広く行われるようになり、水道原水として利用されている日本の河川水においても、水系感染症を引き起こす多様な病原ウイルスが存在していることが周知の事実となっている。しかしながら、PCR 法は、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を検出・定量しているに過ぎず、ウイルスの感染力の有無については判別できないとされている。水道水を介して生じ得る病原ウイルスによる水系感染症を制御し、安全な水道水を将来に渡って安定的に供給するためには、感染力を有する病原ウイルスの存在実態を詳細に把握し、水系感染リスクを正確に評価することが重要である。そこで、本研究では、水試料中のウイルスを感染力を保持した状態で効率的に回収・濃縮可能なウイルス濃縮法、並びにウイルスの外殻タンパク質の損傷を検出可能な光反応性色素を用いた前処理と PCR 法を組み合わせた Propidium monoazide-PCR (PMA-PCR) 法の改良法である PMAxx-Enhancer-PCR 法によるウイルス定量を、水道原水として利用されている河川水に適用することにより、PCR 法単独にて定量された病原ウイルスについて、ウイルス粒子を構成する外殻タンパク質の完全性の観点から感染力の有無を議論することを目的とした。また、宿主細胞を用いたウイルス培養と PCR 法を組み合わせた Integrated cell culture-PCR (ICC-PCR) 法によるウイルス定量を適用することにより、水道原水河川における感染力を有する病原ウイルスの存在実態を明らかにすることを目的とした。</p>	

2. 研究の経過

(注) 必要なページ数をご使用ください。

本研究では、水系感染症の原因ウイルスとして世界保健機関（WHO）の飲料水水質ガイドライン及び米国環境保護庁（USEPA）の飲料水汚染物質候補リストに共通して掲載されているエンテロウイルス（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスを含む）及びカリシウイルス（ノロウイルス [GI 遺伝子群及び GII 遺伝子群を区別して定量]、サポウイルス）を対象とした。ウイルス濃度の定量には、エンテロウイルス、ノロウイルス GI 遺伝子群、ノロウイルス GII 遺伝子群、サポウイルスに特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイム定量 PCR 法を用いた。また、PCR 法単独によるウイルス定量において対象とした病原ウイルスが陽性となった幾つかの試料については、光反応性色素の一種である Propidium monoazide (PMA) の改良高純度試薬である PMAxx と PMA の反応向上試薬である PMA Enhancer for Gram Negative Bacteria を組み合わせた PMAxx-Enhancer-PCR 法を実施し、PCR 法単独にて定量されたウイルスについて、外殻タンパク質の完全性の観点から感染力の有無を議論した。加えて、エンテロウイルスについては、宿主細胞である BGM 細胞を用いた ICC-PCR 法を実施し、感染力を有するエンテロウイルスの存在実態を明らかにすると共に、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて評価した結果と比較することにより、感染力評価手法の代替としての PMAxx-Enhancer-PCR 法の有効性を議論した。

本研究では、水道原水として利用されている河川水（凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場の原水）を対象とし、病原ウイルスの存在実態調査を実施した。2023 年 4 月から 2024 年 3 月に実浄水場において採水した水道原水（河川水）30 L に、粉末活性炭を 100 mg/L になるように添加し、攪拌子を用いて 60 分間攪拌することにより、後段の UF 膜を用いたウイルス濃縮における濃縮阻害及びウイルス定量における定量阻害を引き起こすと考えられる水道原水中の溶解性有機物を除去した。この後、活性炭吸着処理水をメンブレンフィルター（膜材質 PTFE, 膜孔径 0.5 μm ）にてろ過することにより、水道原水中の懸濁質及び水道原水に添加した活性炭を除去し、得られた処理水 30 L を、予め乳タンパク質（ブロックエース）にてブロッキング処理したタンジェンタルフロー UF 膜（膜材質 再生セルロース, 分画分子量 1,000 kDa）を用いて 15 mL まで精製・減容した（UF 膜濃縮においては、冷却水循環装置を用いて試料を約 4 $^{\circ}\text{C}$ に維持した）。この後、0.01 M リン酸バッファー 15 mL, あるいは 0.01 M リン酸バッファーにヘキサメタリン酸ナトリウム（分散剤）、Tween 80（界面活性剤）、アンチフォーム A（発砲防止剤）をそれぞれ 0.01% (w/v), 0.5% (v/v), 0.001% (v/v) になるように添加した溶液 15 mL を UF 膜の表面に通水し、合計 30 mL をメンブレンフィルター（膜材質 酢酸セルロース, 膜孔径 0.45 μm ）にてろ過することにより、水道原水中に存在するウイルスを回収・濃縮した（濃縮試料）。また、0.01 M リン酸バッファー 30 mL, あるいは前述した試薬添加した 0.01 M リン酸バッファー 30 mL を UF 膜の通水方向とは逆の方向から UF 膜に通水し、メンブレンフィルター（膜材質 酢酸セルロース, 膜孔径 0.45 μm ）にてろ過することにより、UF 膜に残存したウイルスを回収した（逆洗試料）。濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法, PMAxx-Enhancer-PCR 法, ICC-PCR 法にて定量し、濃縮試料と逆洗試料の合計のウイルス量を求めることにより、水道原水におけるウイルス濃度を算出した。なお、ウイルス濃度の算出においては、濃縮工程におけるウイルスの回収率は 100%と仮定した。

3. 研究の成果

(注) 必要なページ数をご使用ください。

2023年4月から2024年3月に実浄水場において採水（2024年1月～3月は毎月2回の採水）した水道原水中のウイルスを濃縮した後、濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量することにより、水道原水におけるウイルス濃度を算出した。結果を図-1に示す。エンテロウイルスについては、全15試料の内9試料で濃度がPCR法における定量下限値（ $10^{2.5}$ copies/L）を上回り、陽性となった（陽性率60%）。また、陽性となった試料中のエンテロウイルス濃度は $10^{3.4-4.6}$ copies/Lであった。一方、ノロウイルスについては、全15試料の内GI遺伝子群は3試料、GII遺伝子群は7試料で濃度がPCR法における定量下限値（ $10^{2.0}$ copies/L）を上回り、陽性となった（それぞれ陽性率20%、47%）。また、陽性となった試料中のノロウイルスGI遺伝子群及びGII遺伝子群の濃度はそれぞれ $10^{2.1-3.1}$ copies/L、 $10^{2.5-3.7}$ copies/Lであった。これに対し、サポウイルスについては、いずれの採水日においても定量下限値（ $10^{2.5}$ copies/L）以下であった（図なし）。従って、対象とした水道原水においては、採水時期による濃度変動が見られるものの、エンテロウイルスが最大で 10^5 copies/L程度、ノロウイルスGI遺伝子群が最大で 10^3 copies/L程度、ノロウイルスGII遺伝子群が最大で 10^4 copies/L程度存在していることが確認された。なお、前述した実浄水場において2023年1月から3月に採水した水道原水中のウイルスを濃縮した後、 -80 °Cにて凍結保存した濃縮試料及び逆洗試料についても同様の評価を実施したところ、エンテロウイルスについては3試料、ノロウイルスGII遺伝子群については1試料で陽性となり、陽性となった試料中のエンテロウイルス及びノロウイルスGII遺伝子群の濃度はそれぞれ $10^{3.8-4.5}$ copies/L、 $10^{2.7}$ copies/Lであった（図-1）。

PCR法単独においてエンテロウイルス、あるいはエンテロウイルス及びノロウイルスの両方が陽性となった2023年の1月から3月、2024年の1月から3月に採水した試料について、PMAxx-Enhancer-PCR法を実施した。結果を図-1に示す。PMAxx-Enhancer-PCR法にて定量した場合、エンテロウイルスについては、PCR法単独において陽性となった9試料の内4試料で定量下限値（ $10^{2.5-3.5}$ copies/L）以下の値となった。また、ノロウイルスGI遺伝子群については、2試料の内1試料、ノロウイルスGII遺伝子群については、7試料の内3試料で定量下限値（ $10^{2.0-3.0}$ copies/L）以下の値となった。従って、これらの試料中に存在するエンテロウイルス及びノロウイルスのほとんどは、PMAxxがウイルス粒子内部まで透過可能な状態、すなわち、外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。これに対し、エンテロウイルスについては、PCR法単独において陽性となった9試料の内5試料がPMAxx-Enhancer-PCR法においても陽性となり、PMAxx-Enhancer-PCR法にて得られた濃度とPCR法単独にて得られた濃度の差異は0.0–0.9 logに留まった。また、ノロウイルスGI遺伝子群については、2試料の内1試料、ノロウイルスGII遺伝子群については、7試料の内4試料がPMAxx-Enhancer-PCR法においても陽性となり、PMAxx-Enhancer-PCR法にて得られた濃度とPCR法単独にて得られた濃度の差異は0.3–0.6 logに留まった。従って、これらの試料中には、外殻タンパク質の損傷が無く、感染力を有する完全体の状態のエンテロウイルス及びノロウイルスが存在している可能性が示唆された。

PCR法単独においてエンテロウイルスが高濃度で定量された2023年の1月から3月に採水した試料について、ICC-PCR法を実施した。結果を図-2に示す。PMAxx-Enhancer-PCR法にて得られた濃度が定量下限値（ $10^{2.5}$ copies/L）以下の値となった1月、2月の試料においては、ICC-PCR法にて得られた濃度も定量下限値（ $10^{0.3}$ MPN/L）以下の値となった。一方、PMAxx-Enhancer-PCR

法にて得られた濃度が PCR 法単独にて得られた濃度と同程度の値となった 3 月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果も陽性となり、エンテロウイルスが感染力を有する状態で 10^1 MPN/L 程度存在することが明らかとなった。また、PMAxx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法で定量下限値は大きく異なるものの、両定量法間の陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAxx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

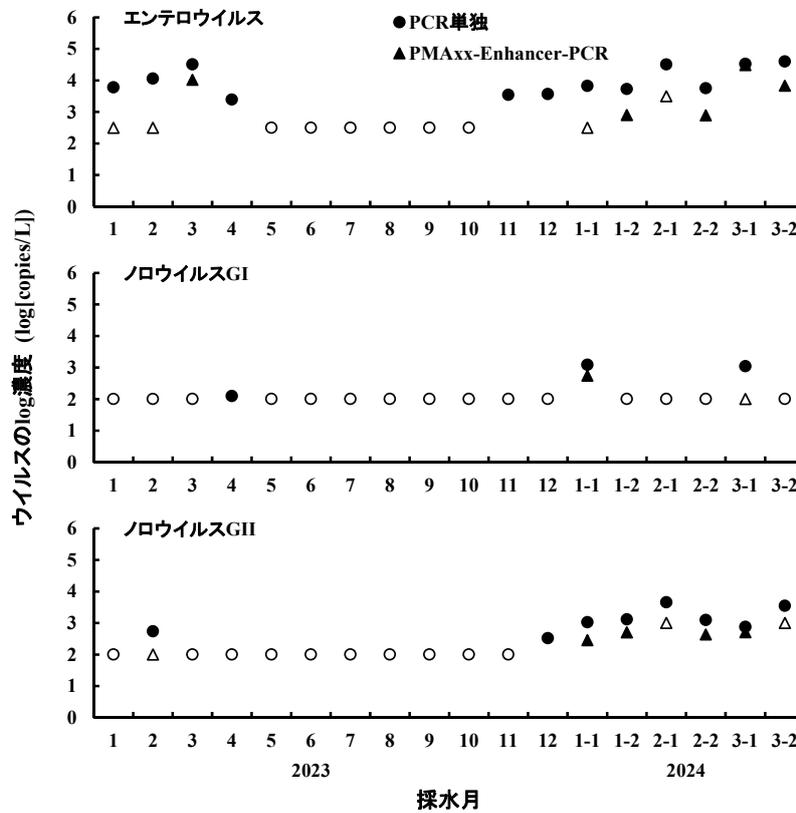


図-1. PCR法単独, PMAxx-Enhancer-PCR法にて定量した水道原水におけるウイルス濃度 (図中の白抜きは定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

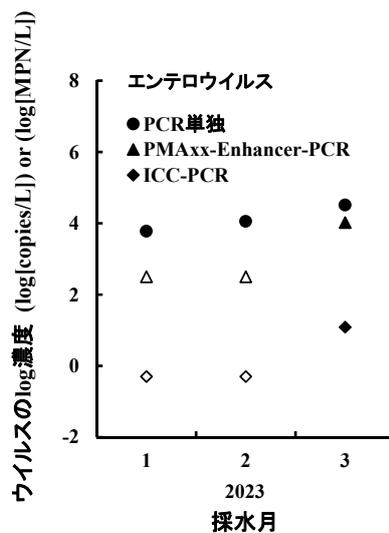


図-2. ICC-PCR法にて定量した水道原水におけるウイルス濃度 (図中の白抜きは定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

4. 今後の課題

(注) 必要なページ数をご使用ください。

本研究では、30 L の水道原水中に存在する病原ウイルスを 30 mL まで 1,000 倍濃縮した後にウイルス定量に供したが、より低濃度の感染力を有する病原ウイルスを定量するためには、大容量の水道原水を対象とし、ウイルス濃縮を実施する必要がある。従って、大容量の水道原水からのウイルス回収・濃縮に適したウイルス濃縮法の改良・構築が今後の課題である。安全な水環境・水道を維持していくためには、本研究で用いた手法を改良・最適化すると共に、地域を考慮した複数の水道原水（河川水、湖沼水、地下水）を対象とし、日本国内の水道原水における感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態を詳細に把握することが重要である。