

II. その他の予算による研究
[リサイクルチーム]

1. 病原性微生物の同定方法および挙動に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 11～平 17

担当チーム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：尾崎正明、諏訪守、陶山明子

【要旨】

Cryptosporidium オーシストの感染能力を迅速かつ簡易に測定するため、細胞培養法による顕微鏡観察および ELISA 法の適用性に関し評価を行った。その結果、細胞培養法はマウスによる感染試験法と比較して、迅速かつ簡易に測定は行えるが、顕微鏡観察では 1 視野で観察されるオーシスト数にバラツキが大きく、また、ELISA 法でもセルシート上でのバラツキが吸光度測定に大きな影響を及ぼすと考えられた。ウイルスに関しては、セルローズ・吸着凝集法およびポリエチレングリコール法によるウイルス濃縮法の最適化の検討を行うとともに、下水処理過程でのノロウイルスの除去率を求めた。

キーワード：*Cryptosporidium*、細胞培養法、ウイルス、リアルタイム PCR 法

1. はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水の病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生的安全性を評価するためには、下水中の極低濃度の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

本課題では上記の要請を踏まえ、分子生物学的手法（特に PCR (Polymerase Chain Reaction) 法) により、下水中・環境水中のウイルスおよび原虫を、迅速かつ高感度に検出できる手法を提案し、また下水処理過程や環境中でのウイルスおよび原虫の挙動を解明することを目的としている。本研究で研究対象としている病原ウイルスは *Norovirus*、原虫は *Cryptosporidium* であり、本年度は以下の研究を行った。

1) *Cryptosporidium* オーシストの感染能力を測定するため、細胞培養法による顕微鏡観察および ELISA 法の適用性に関し評価を行った。

2) ウイルスの検出にあたり、セルローズ・吸着凝集法およびポリエチレングリコール法によるウイルス濃縮法の最適化の検討を行うとともに、下水処理過程でのウイルスの除去率を測定した。

2. 研究目的

2.1 細胞培養法によるオーシストの感染能力把握実験

オーシストの感染能力を測定するために様々な方法

が提案されている。その中でもマウスによる感染試験では、動物への感染有無を把握できることから、脱囊法や染色法と比較して精度は高いと考えられる。しかし、実験動物を扱うため、その維持管理、操作性、費用、倫理面などの観点から、現在では細胞培養法による評価手法が注目されている。

本実験の目的は、細胞培養法によりオーシストの感染能力を測定するため、顕微鏡観察および ELISA 法の適用性について評価を行うことである。

2.2 ウイルス

下水中のウイルスは通常、低濃度であることから、検出の前処理として濃縮・誘出操作が必要となる。また、細胞培養法で検出ができないノロウイルスについては、リアルタイム PCR 法により下水処理過程での消長を含めその実態を明らかにすることが求められている。

本実験の目的は、セルローズ・吸着凝集法およびポリエチレングリコール法によるウイルス濃縮法の最適化を検討し、その検討結果から得られた成果を基にノロウイルスの定量検出を行い、下水処理過程での除去率を求めるものである。

3. 実験方法

3.1 細胞培養法による顕微鏡観察および ELISA 法の適用性

実験に使用したオーシストは、*C.parvum* HNJ-1 であり、大阪市立大学より分与されたものである。また、

細胞培養法に用いた細胞はヒト回盲腸管由来細胞の HCT-8 株である。

細胞は、以下の方法により準備した。細胞をPBSで洗浄を行いトリプシン液で37°C、5分間処理しフラスコ底部から細胞を剥離、その浮遊液を1,000rpm、10分間遠心沈殿させ、上澄液を捨て維持培地を加え浮遊させた。10⁵個程度の細胞に維持培地6mLを加え、37°C、5%炭酸ガスのCO₂インキュベーター内でウエル内に入れたカバーガラス上で培養し、4~7日毎に継代して被服率85%のセルシートになった状態の細胞を用いた。

感染方法は、細胞から維持培地を取り除いた後、新たに維持培地を加え、オーシストを細胞表面に添加して接着させた。これを37°C、5%炭酸ガスのCO₂インキュベーター内に静置して、2時間接着後にPBSで表面を洗浄し、接着しなかったオーシストを除去した。

感染後は、再度細胞維持培地を添加して37°C、5%炭酸ガスのCO₂インキュベーター内で48時間まで培養を行った。

培養後の感染能力の測定は、以下のように行った。

顕微鏡観察では、維持培地を除去してPBSで洗浄の後、メタノールで細胞を固定、染色キットを用いてオーシストの蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡でオーシストをカウントした。

ELISA法では、固定した細胞を免疫染色し、プレートリーダーで吸光度を測定することでオーシスト数を定量した。

表1 使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ファージQβ		Qβ+	Qβ-	Qβ probe
ノロウイルス	G1型	COG1F	COG1R	RING1-TP (a) と RING1-TP (b) を混合
	G2型	COG2F	COG2R と ALFP を	RING2AL-TP
エンテロウイルス		FEV1	REV1	EVP1
		FEV1	REV2	EVP2

3. 2 ウィルス濃縮法

実下水処理場の流入下水、二次処理水および三次処理水(嫌気-無酸素-好気法と凝集剤添加活性汚泥法の処理水を混合して急速ろ過を行ったもの)に対して既

知量のファージQβを添加して、以下に示す各種濃縮法によりウィルスを回収し、ウィルス濃縮液とした。得られた濃縮液に含まれるQβ数はブラック法およびリアルタイムPCR法によって測定し、回収率を算出した。

3. 2. 1 セルロース吸着・凝集法¹⁾

セルロース吸着・凝集法によるウィルスの濃縮にはウォーターコンセル((株)日研生物医学研究所)を使用した。すなわち試料水20Lを含む容器にスラリー状のDEAE-セルロース10ml(乾燥重量0.5g)を添加し、よく攪拌した。これにアニオン系高分子凝集剤10mlを添加し、よく攪拌してDEAE-セルロースを凝集させた。凝集処理の終了した試料を不織布バッグでろ過してDEAE-セルロースを回収し、10mlの牛肉エキス溶液(pH9.5)を添加して15分混合し、ウィルスを誘出させた。この誘出液をメンブランフィルター(0.2μm)でろ過した後、pH7.0に補正しウィルス濃縮液とした。

3. 2. 2 ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法

試料水1LにPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4M)を添加して攪拌し完全に溶解させた。4°Cで一夜静置した後、10,000×g、30分遠心分離して沈殿を回収し、RNase-free水1mlに再浮遊させてウィルス濃縮液とした。

3. 3 リアルタイムPCR法によるウィルスの定量的検出

3. 3. 1 リアルタイムPCR法

内部蛍光プローブを用いるTaqMan™PCR法を用いてウィルスのゲノムRNAを定量した。すなわち上記で抽出したウィルスRNA1μgをランダムプライマー(ランダムヘキサマー)、Omniscript RT Kit(QIAGEN)を用いた逆転写反応によりcDNAを作製し、2μlをリアルタイムPCRに供した。リアルタイムPCRはQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN)を用いて行った。使用したプライマーおよびプローブを表1に示す。

ファージQβの検出は、片山らの報告²⁾に準じた。またノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」に準じ、エンテロウイルスの検出はNi jhuisらの報告³⁾に準じた。リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティッ

クス社) を使用した。また、ウイルス濃縮液 1 ml からのウイルスのゲノム RNA の抽出には QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) を使用した。抽出した RNA に微量に含まれている DNA を除去するため DNase I 処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN) を用いて RNA を精製した。

4. 実験結果と考察

4. 1 細胞培養法による顕微鏡観察および ELISA 法の適用性

細胞培養法による顕微鏡観察結果を図-1 に示す。細胞に 2 時間感染させ洗浄を行った後に細胞表面に残存した平均オーシスト数は、10 視野あたり 210 個程度であった。培養時間の経過とともに観察されるオーシスト数は減少し、24 時間後では平均で 7 個となった。これは、オーシスト内のスポロゾイトが細胞に侵入することで、細胞表面に存在していたオーシストが減少したものと推定される。

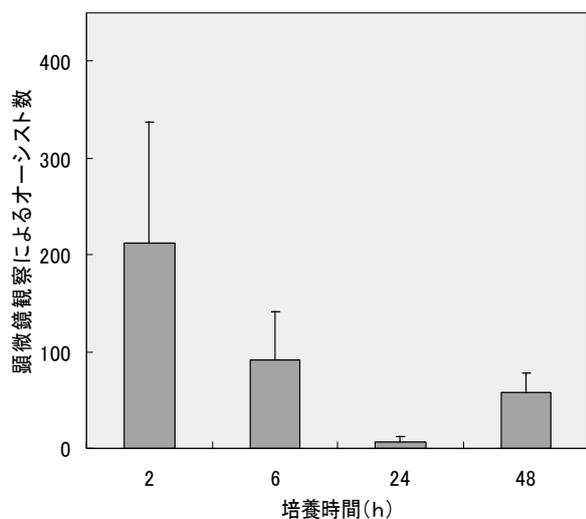


図-1 培養時間経過によるオーシスト数の推移

しかし、48 時間後には平均で 58 個のオーシストが観察されており、細胞内で生活環を進行させた新たなオーシストが細胞表面に出現したものと考えられた。マウスによる感染試験と比較すれば、短期間で感染能力の把握が行えるものと考えられる。一方、グラフ上の棒線は平均値に対する標準偏差を示したが、バラツキが大きい結果となった。この原因は細胞の不均一性が 1 要因とも推定されることから、均一性に富んだ細

胞の作成は今後の課題であると考えられた。

ELISA 法での測定では、上記顕微鏡観察結果から 48 時間後には細胞内で生活環を進行させた新たなオーシストが細胞表面に出現したものと考えられたため、オーシストを細胞へ接種してから 48 時間の細胞培養を行い、免疫測定と吸光度測定によるオーシスト数の定量を行った。細胞培養法による ELISA 法の適用結果を図-2 に示す。

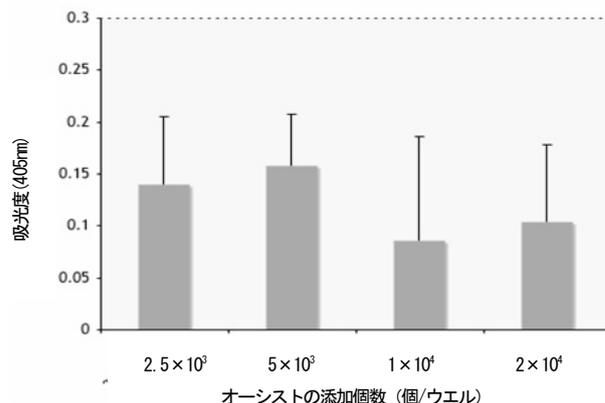


図-2 ELISA 法によるオーシスト添加濃度と吸光度の関係

オーシストの細胞接種量を $2.5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個とし実験を行ったが、全てのケースで吸光度の増加が認められることから組織培養法による ELISA 法によっても感染能力を測定できることが明らかとなった。しかし、ELISA 法は、顕微鏡観察では検出が難しい細胞内へ潜り込んだオーシストの検出や機械的に吸光度の測定を行えるため、顕微鏡観察と比較して客観的により定量精度の高い結果が得られるものと予想されたが、オーシスト接種量と吸光度との関係は、かならずしも比例関係ではなく、接種量の増加に伴い吸光度は若干低下する傾向が見られた。また、グラフ上の棒線は平均値に対する標準偏差であるが、バラツキが大きい結果となった。これらの原因は先にも述べたが細胞の不均一性によること、細胞量とオーシスト接種量のアンバランスによるものと推定されることから、今後、均一性に富んだ細胞の作成や細胞量と接種量の良好な関係を明らかにする必要があると考えられる。

4. 2 ウイルス濃縮法の最適化

4. 2. 1 セルロース吸着・凝集法

セルロース吸着・凝集法の回収率に与えるファージ Q β 量の影響を検討した。試料水にファージ Q β を添加して、乾燥重量 0.5 g の DEAE-セルロースを用いてウイルス濃縮を行った結果を表 2 に示す。ファージ添加量が増加する程、セルロース吸着・凝集法による回収率は低下した。その原因として、ファージ Q β 添加量 (10^6 PFU 以上) に対してセルロース担体量が少なかったためであると考え、セルロース担体量を 1 g に増加して回収試験を行った (図 3)。

表 2 セルロース吸着・凝集法によるファージ Q β の回収率

操 作	ファージ数 (PFU/20 L)					
	二次処理水			三次処理水		
濃縮前	4.8×10^5	2.4×10^6	4.3×10^{11}	4.0×10^4	2.1×10^6	1.3×10^{12}
濃縮後	2.7×10^5	5.0×10^5	2.5×10^{10}	3.9×10^4	1.6×10^5	5.7×10^{10}
	[56 %]	[21 %]	[5.9 %]	[98 %]	[7.7 %]	[4.3 %]

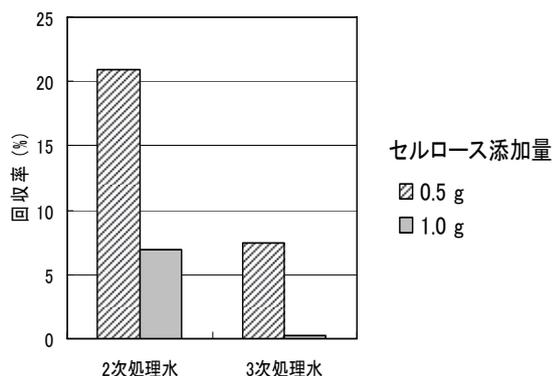


図 3 セルロース添加量がファージ Q β の回収率に及ぼす影響
(ファージ Q β 添加量 : 10^6 PFU)

その結果、セルロース添加量を増やすと回収率は低下した。ウイルス誘出液 10 ml に対して担体が過剰になり、誘出効率が低下したためと考えられる。

誘出時間を増加することで誘出効率が上がることを予想し、次にウイルス誘出時間が回収率に及ぼす影響を検討した (図 4)。

ファージ誘出時間を増加すると、ブラック法で測定した場合の回収率は低下した。一方、図には示していないがリアルタイム PCR 法で測定した場合の回収率は

一定であり、誘出時間の影響は認められなかった。

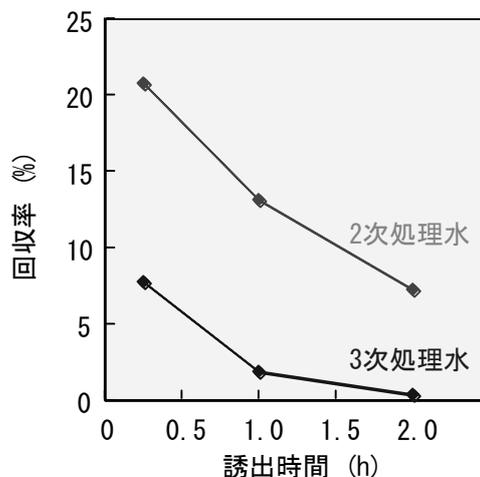


図 4 ウイルス誘出時間がファージ Q β の回収率に及ぼす影響
(ファージ Q β 添加量 : 10^6 PFU
ファージ Q β 量はブラック法で測定した)

これは、pH 9.5 の誘出液に長時間曝されたことによりウイルス感染力が低下したことを示している。一方、リアルタイム PCR 法ではファージ遺伝子を検出するため、感染力を失っているファージも検出することから、回収率の低下は認められなかったと推測した。

以上の結果より、セルロース吸着・凝集法はファージ量 10^5 PFU 以下の試料水に適していると考えられる。

4. 2. 2 ポリエチレングリコール沈殿法

ポリエチレングリコール沈殿法により、ウイルス回収率を評価した。

流入下水、200ml、2 次処理水、3 次処理水 1L に対して、 10^4 、 10^6 、 10^{10} PFU のファージをそれぞれ添加したが、すべてにおいて 60 % 前後の高い回収率を示した。

したがって、以降の実験ではポリエチレングリコール沈殿法によりウイルス濃縮を行った。

4. 3 リアルタイム RT-PCR 法による下水試料中のウイルスの定量

2004 年 6 月および 2005 年 1 月、2 月において週 1 回、A 下水処理場の流入下水 200 ml、2 次処理水および 3 次処理水 1L を対象として、リアルタイム RT-PCR 法により、Norovirus G1 型、Norovirus G2 型の定量的検出を行った (表 3)。

冬季（2005年1月、2月）のウイルス量は夏季（2004年6月）よりも非常に多かった。夏季において流入ノロウイルス濃度が低い場合には処理水中にウイルスは検出されないが、冬季にノロウイルス濃度が高濃度となることで急速ろ過を行った三次処理水中にもウイルスは残存していた。

表3 A 下水処理場のウイルス量

採水月	試料	ノロウイルス量 (コピー/L)	
		G1型	G2型
2004年6月	流入下水	3.2×10^1	3.3×10^2
	2次処理水	ND	ND
	3次処理水	ND	ND
2005年 1,2月	流入下水	6.0×10^4	5.0×10^3
	2次処理水	1.9×10^4	1.1×10^3
	3次処理水	1.6×10^4	5.1×10^2

ND：検出限界（5コピー/L）以下

冬季の三次処理まで行った場合のウイルス平均除去率は、70～90%程度であった。測定法の異なる他の腸管系ウイルスを対象とした活性汚泥法での除去率⁴⁾との比較では、若干低い除去率を示した。今後、データの蓄積を図り、これらの要因を解明する予定である。

4. 4 ノロウイルスの分子系統解析

ノロウイルスに属するウイルスはG1型とG2型の遺伝子群に分類され、さらにそれぞれは14種類と17種類の遺伝子型に分類されている。

A 下水処理場の流入下水試料においてノロウイルスの遺伝子型を判別し分子系統解析を行うため、capsid領域を標的としたRT-PCR (primer set : G1-SKF & G1-SKR, G2-SKF & G2-SKR) を行い、PCR産物をクローニングし、塩基配列を決定した。

その結果、流入下水中には複数の遺伝子型のノロウイルスが存在していること、また採水日ごとに検出される遺伝子型が異なっていることが明らかとなった。

5. まとめ

本年度は、細胞培養法によるオーシストの感染能力を測定するため、顕微鏡観察およびELISA法の適用性について評価を行った。また、ウイルスに関しては、セルロース・吸着凝集法およびポリエチレングリコール法によるウイルス濃縮法の最適化を検討し、その検

討結果から得られた成果を基にノロウイルスの定量検出を行い、下水処理過程での除去率を求めた。以下に結果を示す。

- 1) 細胞培養法による顕微鏡観察およびELISA法により、オーシストの感染能力の有無を判定できるため、マウスを用いた感染試験と比較すれば、短期間で感染能力の把握が行えるものと考えられた。
- 2) ポリエチレングリコール法によるウイルスの濃縮では、セルロース・吸着凝集法に比較して、試料中のウイルス量の変動に対しても安定した回収率を得られることが明らかとなった。
- 3) 流入下水中のノロウイルス濃度は、夏季と冬季で大きな違いがあった。その結果、夏季には処理水中にノロウイルスが検出されなかったが、高濃度のウイルスが流入する冬季では、処理水中への残存が測定された。
- 4) ノロウイルスの分系統解析を行ったが、流入下水中には複数の遺伝子型が存在しており、また採水日ごとに検出される遺伝子型が異なっていた。

今後は、接種量と増殖量の相関関係の把握、環境水中へ放流されたオーシストの経時的な感染能力減衰割合を細胞培養法により把握するとともに、測定精度向上のための課題を解決する予定である。また、ウイルスに関しては、リアルタイムPCR法を活用した消毒による不活化効果の推定手法の構築、さらに、発生源調査を行う上で迅速かつ簡便な遺伝子型の判定法の開発を試みる予定である。

参考文献

- 1) Yano, K. et al. (1993). A practical method for the concentration of viruses from water using fibriform DEAE-cellulose and organic coagulant. Wat. Sci. Tech., 27: 17-21.
- 2) 片山浩之他 (2002). 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. 水環境学会誌, 25(8): 469-475.
- 3) M. Nijhuis, N. van Maarseveen, R. Schuurman, S. Verkuijlen, M. de Vos, K. Hendriksen and A.M. van Loon. (2002). Rapid and Sensitive

Routine Detection of All Members of the Genus Enterovirus in Different Clinical Specimens by Real-Time PCR. J. Clinical. Microbiol. Vol. 40(10) p. 3666-3670.

- 4) ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案), 平成13年7月, 高度処理会議.