

多摩川における感染力を有した腸管系ウイルスの動態解明

2020年

端 昭彦

富山県立大学工学部 環境・社会基盤工学科 講師

目次

1. 研究の背景	2
2. 材料と方法	3
2.1 HFUF を用いた微生物回収方法の検討	3
2.2 多摩川での試料採水	4
2.3 試料の濃縮	5
2.3.1 HFUF による一次濃縮操作	5
2.3.2 カートリッジ型陰電荷 MF 膜による一次濃縮操作	5
2.3.3 遠心式 UF ユニットによる二次濃縮操作	5
2.3.4 各種微生物の検査法	6
3. 結果と考察	9
3.1 HFUF による微生物回収方法の検討	9
3.2 濃縮操作による多摩川河川水中の大腸菌, FPH 回収率評価	10
3.3 多摩川河川水における大腸菌の不活化状況の推定	10
3.4 多摩川河川水からの感染力を有した FPH 遺伝子群の検出	11
3.5 多摩川河川水からの感染力を有した腸管系ウイルスの検出	12
3.6 RT-qPCR に伴う検出阻害が多摩川河川水中のウイルス検出に与える影響	13
3.7 CDDP 処理の有無による多摩川河川水中のウイルス定量値の差異	15
3.8 多摩川河川水を対象とした FPH の検出手法間の比較	17
4. まとめと今後の展望	20
5. 参考文献	21

1. 研究の背景

多摩川は流域に複数の下水処理場が位置しており、多摩川原橋地点においては河川流量の50%が下水処理水であると見積もられている(国土交通省 HP, 東京都の下水道事業の概要)。Haramoto ら(2005)は、多摩川における糞便性大腸菌群等の汚染指標微生物や、ノロウイルス(NoV)等の腸管系ウイルスの存在を報告しており、これらは下水処理場からの放流水に由来すると考えられる。これらの微生物の存在は、河川水利用に際して病原微生物感染のリスクを示唆するものである。多摩川は浄水水源としても機能しているほか、下流の東京湾にはお台場海浜公園等の親水空間が存在する。従って、多摩川河川水中の腸管系ウイルスは直接・間接的にヒトに摂取され、健康被害を引き起こす可能性がある。国内では水を介した病原微生物感染制御のため、河川水や水道水等について大腸菌、大腸菌群数に基づく基準が設定されているが、これらは腸管系ウイルスの制御には不適であると指摘されている(Hughes et al., 2017 など)。

水中のウイルス検出は一般にウイルス濃縮操作を経た後に行う。特に、検出に際しPCRを用いる場合は検水量が数 μL オーダーとなることもあり、高い濃縮倍率が求められる。近年は、環境水を対象とする場合、概ね10,000から100,000倍程度の濃縮倍率(数10から100Lを1mL程度まで減容)とするのが一般的である(Junter and Lebrun, 2017)。陰電荷精密ろ過(MF)膜を用いるウイルス濃縮法は、特にPCRによるウイルスに適した手法とされ(Katayama et al., 2002)、膜面積の広いものの使用や、後段での再濃縮操作等の工夫(Hata et al., 2015)により、環境水を100,000倍程度の倍率で濃縮することができる(端ら, 2013)。しかしながら、本法により少なくとも一部のウイルス(バクテリオファージ)が感染力を失うことも知られている(片山ら, 2002; Hata et al., 2016)。限外ろ過膜(UF膜)を用いたウイルス濃縮では、試料をろ過した後の保持液を濃縮液として回収する。中空糸UF膜(HFUF)は膜面積が広く、大容量の水試料を対象にした細菌、原虫、ウイルスの同時濃縮に適していると考えられている。アメリカ、CDCにて精力的な手法開発、ブラッシュアップが行われており(Hill et al., 2005; 2007; 2009; Liu et al., 2012; Mull and Hill, 2012)、最大100Lの清澄水試料(浄水など)やSS成分の多い環境試料に適用されてきている(Hill et al., 2009; Holowecky et al, 2009; Rajal et al., 2007; Gibson et al; 2011; Mull and Hill, 2012)。UFを用いる手法に関しては、ウイルスの不活化等の影響は報告されておらず、また、細菌の同時濃縮も可能であるため、環境水中のウイルスの感染力評価や、大腸菌などの指標細菌、抗生物質耐性菌の存在状況調査にも有用であると考えられる。

環境水中のウイルス検出・定量には定量RT-PCR(RT-qPCR)等の遺伝子検出技術が広く用いられている。しかしながら、RT-qPCRによるウイルス検出は、試料中に遺伝子さえ残存していれば感染力に関係なく陽性結果が出てしまう。塩素処理やオゾン処理といった化学的な水処理後や、長期の環境ストレスにさらされた後には、RT-qPCRによるウイルス定量値と、感染力を有したウイルス数に大きな差が生じる(Shin and Sobsey, 2008; de Roda Husman et al., 2009; de Abreu Corrêa et al., 2012)。多摩川流域の下水処理場ではオゾン処理等の高度処理が行われおり、処理水中の腸管系ウイルスは大半が不活化していると想定される。また、多摩川への流入後も、流下の過程で環境ストレスによる不活化が進行すると考えられる。従って、RT-qPCRによるウイルス定量データはリスクの過大評価要因となり、水の利用可能性を狭める可能性や、浄水処理において過剰な処理水準を要求する結果につながる可能性がある。感染力を有したウイルス検出に際しては、一般に感受性細胞による

培養法が用いられる。多くの細胞が用いられているが、それぞれの細胞が複数種のウイルスに対し感受性を持つ。環境水中には多様なウイルスが同時に存在していることが知られており、培養法の適用のみでは検出されたウイルス種の特異性は困難である。これらを鑑み、申請者らは、培養法と PCR 法を併用し、感染力を有したウイルスを特異的に定量する手法 (MPN-ICC-RT-PCR) を開発している (Hata et al., 2016)。また、培養法による水中ウイルスの検出にあたっては、ノロウイルスなど、細胞培養が困難なウイルスが存在する点 (Oka et al., 2018) や、環境中の細胞毒性物質、抗生物質耐性菌の存在等を考慮すると、環境水中のウイルスの培養法による検出は必ずしも容易ではない。

一方で PCR 法には、培養検出が困難、あるいは不可能な微生物も容易に検出可能であるという利点も有する。そこで、PCR の前処理として、不活化した微生物に由来する遺伝子を除去する、という手法が検討されてきている。これらの手法として、抗原抗体反応やその類似反応による、活性を有したウイルスの選別 (Sano et al., 2010; Yang et al., 2011; Walker et al., 2019)、DNase, RNase 等の核酸分解酵素の使用 (Pecson et al., 2009; de Abreu Corrêa et al., 2012; Walker et al., 2019)、PMA, EMA, cis-dichlorodiammineplatinum (CDDP) 等による PCR 阻害反応 (Fittipaldi et al., 2010; Prevost et al., 2016; Canh et al., 2019) などが存在する。PMA や EMA, CDDP は核酸に吸着し、PCR 反応を阻害する物質である。粒子サイズが小さいため、細胞膜やカプシド (ウイルスの外套タンパク) の損傷部位から微生物内部へ侵入が可能であり、これにより不活化した微生物中の核酸に吸着する。一方で、細胞膜・カプシドの損傷がない微生物の内部には侵入できない。したがって、核酸抽出操作の前段に PMA や EMA, CDDP による処理を行うことで、不活化した微生物に由来する遺伝子の増幅を妨げることができる。

以上を総括すると、通常の RT-qPCR により得られるウイルス濃度は、活性を持たないものを含む総ウイルス濃度と捉えることができる。一方で、MPN-ICC-RT-PCR によるウイルス定量値は感染力に基づくものとなる。さらに、CDDP-RT-qPCR により、感染力に基づく定量値に近い値が得られると期待できる。本研究では、多摩川においてこれらの手法を用いてウイルス濃度を調べることで、多摩川におけるウイルスの不活化度合いの評価を試みた。特に CDDP-RT-qPCR は環境水中のウイルスへの適用事例が限られており、その有効性については十分に明らかとなっていない。本研究では、FRNA フェージ (FPH) について、MPN-ICC-RT-PCR と CDDP-RT-qPCR の両者を適用することで、CDDP-RT-qPCR の有効性評価も試みた。また、ウイルス濃縮手法として、特に HFUF を用いた手法に着目し、その有効性についても検討した。

2. 材料と方法

2.1 HFUF を用いた微生物回収方法の検討

HFUF の孔径は細菌やウイルスよりも小さいため、デッドエンドで HFUF に試料を通水することで、膜ハウジング内に細菌、ウイルスを蓄積することができる。一定量の試料を通水した後、中空糸内に洗浄液を流すことで、ハウジング内に蓄積した細菌、ウイルスを回収できる。HFUF としては多様なものが入手可能であるが、特に医療透析で用いられているものは安価で利用可能である。そこで本研究では医療透析用の HFUF である APS25SA (旭化成) を用いた細菌・ウイルス同時濃縮手法を検討した。検討に際しては、水道水に添加した大腸菌 (IFO3301 株) および FPH の MS2 および Q β を濃縮操作に供し、後述のプレ



図1 河川水採水地点.

Site A-D, Y, Z: 採水地点; ①-⑨: 下水処理場

オートカウンティングにより定量することで、濃縮回収率を算出した。本研究では、HFUFの前処理としてのブロッキング操作の有無および、HFUFからの微生物回収段階での誘出剤の有無が微生物回収率に与える影響について調べた。以下に具体的な手法を示す。なお、HFUFへの導水及び内部水の引き抜き等の操作は全てロータリーポンプにより行った。

ブロッキングを行う系については、濃縮操作の前日に、HFUF内部を5%牛胎児血清(FBS)でみだし、これを一晩室温で静置した。HFUF内部の5%FBSは濃縮操作の直前に引き抜いた。

水道水20Lにチオ硫酸ナトリウムを加え、塩素を除去したのちに、対象微生物を添加し、全量をHFUFにてろ過した。ろ過後、HFUFハウジング内の保持液を引き抜いた。誘出操作を行わない系においては、本保持液を濃縮液とした。誘出操作を行う場合は、本保持液に対し、10% Tween 80, 1% NaPP, 1% antifoam Aの混合液を100倍希釈で添加し誘出液とした。誘出液はHFUF内で1分間程度循環させたのち全量を回収し、これを濃縮液とした。

2.2 多摩川での試料採水

図1に示す地点にて試料を採取し、各微生物項目を測定した。下水処理場から放流されたウイルスおよび細菌の流下過程での不活化進行を観察できるように、採水地点を選定した。Site Aは下水処理場⑤、⑥からそれぞれ1 km, 3 km下流に位置する地点で、これら処理場の影響を強く受けていると考えられる地点である。Site BはSite Aの10 km下流に位置する地点で、Site A-B間にては下水処理場からの放流水流入や、その他河川の流入もほとんどないと考えられる。また、Site Bの100 m下流にて野川が多摩川に合流する。Site CはSite Bの5 km下流、下水処理場⑦の2 km下流に位置する地点で本処理場の影響を強く受

ける地点だと考えられる。Site D は Site C の 5 km 下流に位置する地点で、Site C と Site D の間にも目立った流入はないと考えられる。一方で、Site D は河口に最も近く、東京湾や周辺運河の影響も想定される地点である。また、Site A よりさらに上流の地点として、Site Y、Site Z においても試料を収集した。Site Y、Site Z はそれぞれ下水処理場①及び②の直下、直上にあたる地点である。Site Z は本調査における最上流の地点であり、下水処理場の影響を受けない地点として想定した（処理場①は Site Z 上流に位置するが、放流口は Site Z の下流となる）。

調査は 2018 年 5 月 23 日、6 月 27 日、8 月 30 日、10 月 22 日、11 月 14 日、12 月 19 日、2019 年 2 月 15 日、3 月 19 日、5 月 24 日、7 月 17 日、11 月 28 日の計 11 回実施した。Site A, B, C, D については全ての調査日に採水、分析した。Site Y, Z については、2018 年 10 月 22 日、11 月 14 日、12 月 19 日のみの採水とし、また、分析も濃縮操作を伴わない培養法による微生物検出のみとした。すなわち、Site A-D で合計 44 試料を収集し、Site Y, Z では合計 6 試料を収集した。試料は各地点において、20 L のポリタンク及び 250 mL チューブそれぞれ 1 つずつが満水になるまで収集し、実験室へ持ち帰った。例外として、2018 年 5 月 23 日の試料に関しては、各地点で 20 L ポリタンク 2 つが満水になるまで採水した。また、Site Y, Z については 250 mL チューブへの採水のみとした。20 L ポリタンク内の試料は微生物濃縮操作および、続く微生物検出操作に供した。250 mL チューブ内の試料は濃縮を要さない微生物検出操作に供した。

2.3 試料の濃縮

2.3.1 HFUF による一次濃縮操作

20 L ポリタンクに収集した試料は、2.1 HFUF を用いた微生物回収方法の検討にて確立した手法による濃縮操作に供した。調査の前日に、HFUF 内を 5% FBS で満たし室温で静置することでブロッキングした。試料収集後、HFUF 内の 5% FBS を追い出し、デッドエンド方式で全量をろ過した。ろ過後、HFUF 内の保持液を回収、これに 10% Tween 80, 1% NaPP, 1% antifoam A の混合液を 100 倍希釈で添加し誘出液とした。誘出液は HFUF 内で 1 分間程度循環させたのち全量を回収し、これを濃縮液とした。本操作により概ね 100 mL 程度の濃縮液が得られた。なお、HFUF への導水は全てロータリーポンプにより行った。

2.3.2 カートリッジ型陰電荷 MF 膜による一次濃縮操作

2018 年 5 月 23 日に収集した試料 20 L については、カートリッジ型陰電荷 MF 膜 (opticap XL-2, Merck Millipore) によるウイルス濃縮操作に供した (Hata et al., 2014)。試料に塩化マグネシウムを終濃度 25 mM で添加し、これを MF 膜へ通水した。続いて、MF 膜に 0.5 mM 硫酸 (pH 3.0) 2 L 及び MilliQ 水 1 L を通水した。最後に 1 mM の水酸化ナトリウム水溶液 200 mL を通水し、ろ液を回収した。回収したろ液は 50 mM 硫酸 1 mL 及び 100×TE Buffer 2 mL と混合し、これを濃縮液とした。なお、本法はウイルスを対象とした手法であり、得られる濃縮液には大腸菌等の細菌は含まれないと考えられる。

2.3.3 遠心式 UF ユニットによる二次濃縮操作

一次濃縮液中のウイルスは遠心式 UF ユニット (Centricon plus-70, 分画分子量 100 kDa, Merck Millipore) による二次濃縮操作に供した。HFUF による一次濃縮液を対象とする場合

は、UF ユニットの目詰まり防止及び細菌の回収を目的とし、一次濃縮液を $5,000\times g$ で 5 分間の遠心操作に供した。得られた沈殿は細菌の DNA 抽出に供し、上澄液を二次濃縮に供した。二次濃縮操作はメーカーのプロトコルに従った。本法では、清澄な試料を対象とする場合は試料 100 mL を 0.5 mL 程度まで減容できるが、本調査での試料を対象とした場合、100 mL 程度の一次濃縮液に対し、得られる二次濃縮液量は 0.6 mL から 5.3 mL まで大きくばらついた。試料中に UF ユニットの目詰まりの原因となる物質が多く含まれた結果であると考えられる。

2.3.4 各種微生物の検査法

本調査では図 2 に示すような方法で試料を分析した。大腸菌は原水及び一次濃縮液を対象としてコロニー形成法（培養法）による検出に供し、その存在濃度及び濃縮回収率を評価した。濃縮回収率評価に際しては、大腸菌を細菌の代表と位置付けた。また、一次濃縮液から得られる沈殿を用い、定量 PCR (qPCR) による定量も試みた。コロニー形成法での定量値と PCR での定量値の比較から、試料中の大腸菌の不活化度合いの評価を試みた。

また、FPH についてはブラック形成法、MPN-ICC-PCR 法、RT-qPCR 法の 3 種の手法により定量した。ブラック形成法及び MPN-ICC-PCR 法は培養に基づく手法であり、感染力を有したファージのみが検出される。ブラック形成法は全ての FPH を一括で定量する手法であり、MPN-ICC-PCR 法及び RT-qPCR 法は FPH の各遺伝子群 (GI-GIV) を個別に定量する手法である。原水、一次濃縮液、二次濃縮液を対象にブラック形成法による検出に供し、その存在濃度及び各段階での濃縮回収率を評価した。また、二次濃縮液を対象に MPN-ICC-PCR 法、RT-qPCR 法による FPH の各遺伝子群の検出を試み、両者の比較により FPH 各遺伝子群の不活化度合いの評価を試みた。

その他のウイルスについては、二次濃縮液を用い RT-qPCR 法による遺伝子検出と Vero 細胞を用いた検出に供した。

RT-qPCR によるウイルス (FPH 含む) 検出に際しては、CDDP 処理も試みた。CDDP 処理を施すことで、従来の RT-qPCR よりもより感染力に近い定量値が得られると期待される。本調査では、CDDP 処理を伴う CDDP-RT-qPCR 及び CDDP 処理を施さない RT-qPCR によりウイルス遺伝子を定量した。CDDP-RT-qPCR での定量値を RT-qPCR や培養法での定量値と比較することで、その有効性評価を試みた。

なお、図 2 には抗生物質耐性遺伝子 (ARG) に関しても記しているが、詳細は Liu et al., (2020) を参照されたい。

(1) コロニー形成法による大腸菌の検出

コロニー形成法による大腸菌の検出に際しては、クロモカルト・コリフォーム培地 (Merck Millipore) を用いた。検査水量はシャーレ 1 枚あたりに形成するコロニー数が 30-300 となるように設定し、各水量について、シャーレ 2 連で測定した。大腸菌濃度が低いと想定される原水試料については、シャーレ 10 枚に試料を 5 mL ずつ撒き、計 50 mL でのコロニー形成能を調べた。試料はシャーレ内で培地と混合し、培地が固化したのち 39°C で一晚培養した。培養操作後、シャーレ上に形成した青～濃青色のコロニーを計数し、大腸菌数とした。

(2) 一次濃縮液沈殿からの DNA 抽出及び qPCR による大腸菌遺伝子検出

一次濃縮液の遠心操作により得られた沈殿は、FastDNA Spin Kit for Soil (フナコシ) を用いた DNA 抽出操作に供し、得られた DNA 抽出液を qPCR による大腸菌遺伝子検出に供した。PCR 阻害による影響を軽減する目的で、DNA 抽出液は Nuclease free water により 10 倍希釈し、無希釈および 10 倍希釈の DNA 抽出液のそれぞれを qPCR に用いた。プライマー及び TaqMan probe の配列は Bernasconi et al. (2007) のものを用い、サーマルサイクリング条件もこれに従った。PCR 反応液は、TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fischer Scientific) 12.5 μ L, フォワードプライマー 400 nM, リバースプライマー 400 nM, TaqMan プローブ 150 nM, DNA 抽出液 5 μ L を混合し 25 μ L としたものを用いた。検量線作成用のスタンダードには、増幅対象配列を含むプラスミド DNA を用いた。10 倍段階希釈によりスタンダード濃度を 1.0×10^1 から 1.0×10^5 copies/reaction とした反応液を qPCR に供した。

(3) ブラック形成法による FPH の検出

ブラック形成法による大腸菌の検出は、Mooijman et al., 2002 の手法に基づき、*Salmonella Typhimurium* WG49 を宿主として用いた単層法により行った。培地としてはトリプトン-グルコース寒天培地 (トリプトン 1%, グルコース 0.1%, 塩化ナトリウム 0.8%, 0.03% 塩化カルシウム, 0.015% 硫酸マグネシウム) に抗生物質としてカナマイシン及びナリジクス酸を混合して用いた。検査水量はシャーレ 1 枚あたりに形成するコロニー数が 10-100 となるように設定し、各水量について、シャーレ 2 連で測定した。FPH 濃度が低いと想定される原水試料については、シャーレ 10 枚に試料を 5 mL ずつ撒き、計 50 mL でのブラック形成能を調べた。試料はシャーレ内で培地及び対数増殖期の WG49 と混合し、培地が固化したのち 39°C で一晩培養した。培養操作後、シャーレ上に形成したブラックを計数し、FPH 数とした。

(4) MPN-ICC-PCR 法による FPH 各遺伝子群の検出

二次濃縮液を用いた MPN-ICC-PCR 法により、FPH 各遺伝子群の濃度を感染力に基づき定量した。二次濃縮液の適量を 10 倍段階希釈し、3 連 4 段階とした。各希釈段階をトリプトン-グルコース液体培地及び対数増殖期の WG49 と混合し、39°C で一晩培養した。培養操作後の試料 2 μ L を 95°C で 5 分間の熱処理に供し、ファージ内部の RNA を放出させ、これを RNA 抽出液とした。得られた RNA 抽出液を用い、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用いた RT-PCR による FPH 各遺伝子群の RNA 検出を試みた。プライマー及び TaqMan probe の配列は Wolf et al. (2010) のものを用い、サーマルサイクリング条件もこれに従った。RT-PCR 反応液は、2 \times QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix 10 μ L, QuantiTect RT Mix 0.2 μ L, フォワードプライマー 400 nM, リバースプライマー 400 nM, TaqMan プローブ 150 nM, RNA 抽出液 2 μ L を混合し 20 μ L としたものを用いた。なお、Wolf et al. (2010) においては、各遺伝子群を同一の反応液内で同時に個別検出する Multiplex PCR 系が想定されているが、本調査では、1 反応液で 1 遺伝子群の検出を試みる simplex PCR とした。RT-PCR においては、Ct 値が 35 を下回った場合に陽性と判定し、各希釈段階での陽性率をもとに、MPN 表 (Blodgett, 2010) を用いて各遺伝子群の濃度を決定した。

(5) Vero 細胞を用いた腸管系ウイルス検出

二次濃縮液中の感染力を有した腸管系ウイルスの検出を目的とし、Vero 細胞による IC-RT-PCR を試みた。エンテロウイルス、アイチウイルスの実験室株を用いた試験において、これらウイルスは Vero 細胞に接種することにより感染し、増殖、RT-PCR により容易に検出が可能となることが確かめられている。河川水試料への適用に際しては、まず二次濃縮液数 10 μ L を Vero 細胞に摂取し、1 週間程度の培養操作に供した。次いで、培養操作後の細胞上清をろ過操作により精製し、新たな Vero 細胞に摂取し、さらに 1 週間程度の培養操作に供した。2 度の培養操作後、細胞上清から RT-PCR によるエンテロウイルス、アイチウイルスの検出を試みた。なお、ここでの RNA 抽出および RT-PCR 条件は、(4) MPN-ICC-PCR 法による FPH 各遺伝子群の検出と同様とし、プライマー、プローブ配列は Katayama et al. (2002) 及び Kitajima et al. (2013) のものとした。

(6) CDDP 処理

ウイルス (FPH 含) の RT-qPCR による遺伝子検出に際しては、CDDP 処理による不完全ウイルス粒子由来の RNA 排除を試みた。CDDP 処理法は Canh et al. (2019) に準じた。まず、CDDP 粉末を DMSO に溶解し、100 mM とした。次いで、二次濃縮液 140 μ L に対し、10%デオキシコール酸ナトリウム (SD) を 1.4 μ L を加え (終濃度 0.1%)、39°C で 30 分静置した。次いで 100 mM CDDP 1.4 μ L を加え (終濃度 1 mM)、30°C で 30 分静置することで CDDP 処理を完了した。本 RNA 抽出液を続く RNA 抽出操作および RT-qPCR に供した。

(7) RT-qPCR によるウイルス遺伝子の検出

CDDP 処理を加えた二次濃縮液及び CDDP 処理を加えていない二次濃縮液のそれぞれを RNA 抽出操作に供し、続いて RT-qPCR によるウイルス遺伝子検出操作に供した。RNA 抽出操作に先立ち、二次濃縮液約 140 μ L にネズミノロウイルス (MNV) の高濃度原液を 2 μ L 加え、この混合液を QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen) による RNA 抽出操作に供し、60 μ L の RNA 抽出液を得た。得られた RNA 抽出液は Nuclease free water で 10 倍希釈し、無希釈及び 10 倍希釈した RNA 抽出液を RT 反応及び qPCR に供した。すなわち、CDDP 処理を加えた試料及び加えていない試料それぞれについて、無希釈および 10 倍希釈の RNA 抽出液を作成し、それぞれ別個に RT-qPCR に供した。なお、Site A から D で採水し、得た濃縮液は全 48 試料であるが、2018 年 8 月 30 日の Site D および 11 月 14 日の Site B における濃縮液は、輸送の過程でロスが生じたため、RNA 抽出操作には供していない。

RT 反応は High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific) により行った。続く qPCR では、GI-及び GII-NoV (Kageyama et al., 2003)、アイチウイルス (AiV) (Kitajima et al., 2013)、トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) (Haramoto et al., 2013)、GI-, GII-, GIII-, および GIV-FPH (Wolf et al., 2010)、および RNA 抽出の前段で添加した MNV (北島ら, 2008) の検出を試みた。qPCR の条件は (2) 一次濃縮液沈殿からの DNA 抽出及び qPCR による大腸菌遺伝子検出と同様とした。

(8) MNV を用いた検出効率評価

無希釈及び 10 倍希釈した RNA 抽出液を対象に、二次濃縮液に添加した MNV の RT-qPCR による検出を試みた。得られた定量値と陽性コントロールからの定量値の比較から、下式

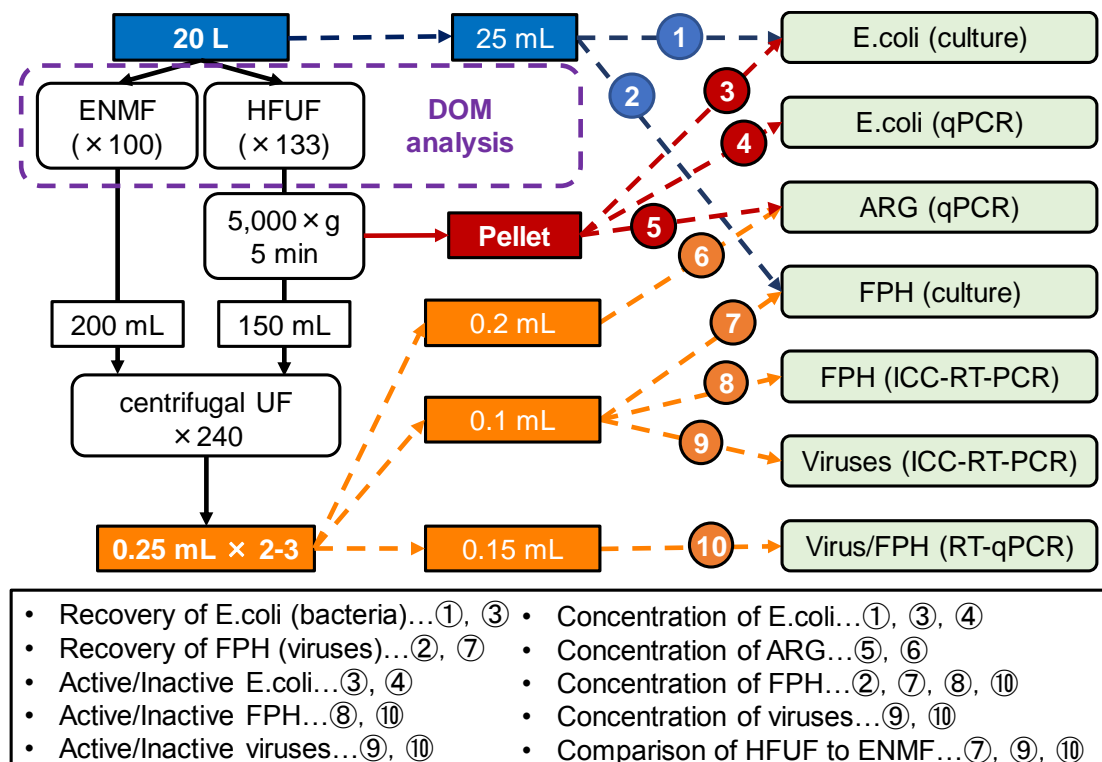


図2 河川水試料の濃縮手順及び得られる結果

に基づき、MNVの検出効率を算出した。

$$R = \log_{10} \left(\frac{C_{\text{sample}}}{C_{\text{pos}}} \right)$$

ここで、 R は検出効率、 C_{sample} は試料からのMNV検出濃度、 C_{pos} は陽性コントロールからのMNV検出濃度である。なお、陽性コントロールとしてはNuclease free waterにMNVを添加し得たRNA抽出液を使用した。検出効率が-1.0を下回る場合、検出効率は顕著に低下していると判断される(Hata et al., 2011)。なお、このような検出効率の低下は試料中の阻害物質により、RNA抽出やRT-qPCRの効率が低下することで生じる。本調査においては無希釈及び10倍希釈したRNA抽出液をRT-qPCRに供することによるRT-qPCR阻害の軽減も試みた。なお、希釈操作はRNA抽出後に行うため、RT-qPCRの効率改善には寄与するが、RNA抽出効率の改善には寄与できない。

3. 結果と考察

3.1 HFUFによる微生物回収方法の検討

HFUFによる微生物回収方法を検討する目的で、水道水試料に添加した大腸菌、FPH MS2およびQ β の回収試験を実施した。HFUFの前処理(ブロッキング)、通水後のHFUF洗浄(elution)手法について検討した。

添加微生物の回収結果を表1にまとめた。ブロッキングを行わない場合はいずれの微生物種についても30%程度未満の低回収率となった。ブロッキング及び洗浄操作を行った場合、いずれの微生物種についても65%を越える回収率が得られた。大腸菌に関しては、洗浄操作を行わない場合により高い回収率となったが、洗浄操作の有無による回収率の差異(70.2%及び66%)は有意でなかった。また、MS2、Q β ファージについては洗浄操作を行う

表 1 HFUF 法による水道水 20 L からの微生物回収率

Blocking	Elution	E. coli		MS2		Q β	
×	×	31.0% ± 25.1%	(N = 6)	27.1% ± 10.2%	(N = 3)	16.6% ± 10.8%	(N = 3)
○	×	70.2% ± 39.4%	(N = 10)	54.3% ± 12.4%	(N = 5)	48.5% ± 20.7%	(N = 5)
○	○	66.0% ± 38.2%	(N = 12)	65.0% ± 27.0%	(N = 6)	82.9% ± 16.5%	(N = 6)

場合のほうが高回収率であった。以上を鑑み、多摩川での調査での HFUF を用いた微生物濃縮に際しては、ブロッキング及び洗浄操作を行うこととした。

3.2 濃縮操作による多摩川河川水中の大腸菌，FPH 回収率評価

Site A-D で収集した 44 試料について、濃縮過程での大腸菌，FPH 回収率を測定した。大腸菌に関しては、HFUF による一次濃縮での回収率を、FPH については HFUF 及び続く遠心式 UF ユニットを経た濃縮工程全体での回収率を測定した。なお、一次濃縮液中の FPH 濃度は回収率測定に十分でなかった。原水中での検出濃度が極端に低かった試料を除くと、大腸菌，FPH についてそれぞれ 43 試料，41 試料で回収率が測定できた。大腸菌の回収率は $65.4 \pm 40.1\%$ (1.7% - 178.0%) となり、FPH の回収率は $58.1 \pm 52.4\%$ (2.0% - 218.1%) となった。いずれも平均回収率は 50% を越えており、既往の手法と遜色なかったが (Cashdollar and Wymer, 2013)、回収率値のばらつきが大きかった。原水や濃縮液中の微生物濃度が十分でない場合、プレートカウンティングでの定量値はばらつく傾向にあるほか、FPH に関しては二次濃縮操作での目詰まりが深刻となる試料もあり、これらが回収率のばらつきに寄与したと考えられる。また、2018 年 5 月採水の試料については、カートリッジ型陰電荷 MF 膜による一次濃縮も試みた。本手法を適用した際の二次濃縮液からの FPH 回収率は 4 試料全てで 1% を下回った。陰電荷膜によるウイルス濃縮については、特に FPH の回収率が低くなるケースが報告されているほか (端ら, 2012)、一部の FPH が不活化することも報告されており (片山ら, 2002; Hata et al, 2016)、特に FPH の濃縮回収率には適さないと考えられる。

3.3 多摩川河川水における大腸菌の不活化状況の推定

2018 年 5 月から 11 月に採取した試料に関して、qPCR による遺伝子定量値とコロニー形成法 (培養法) による定量値を比較した (図 3)。試料中に不活化した大腸菌の割合が多い場合、qPCR による定量値は培養法による定量値よりも大きくなると期待される。測定対象とした 24 試料中 23 試料 (96%) で両手法による定量値の差は $1 \log_{10}$ (10 倍) 未満であった。11 月に Site D で採取した試料でのみ両者の差異が $1 \log_{10}$ を越えており、qPCR での定量値が培養法での定量値を $1.4 \log_{10}$ 上回っていた。これらの結果は、多摩川河川水における大腸菌は、地点、季節によらずほとんど不活化していないことを示唆している。本研究では、多摩川における微生物の不活化要因として、河川へ流入する前の下水処理や流下過程での環境ストレス (太陽光、水温) 等の影響を想定していたが、大腸菌に対してはこれらの要素はほとんど不活化に影響していないと考えられる。

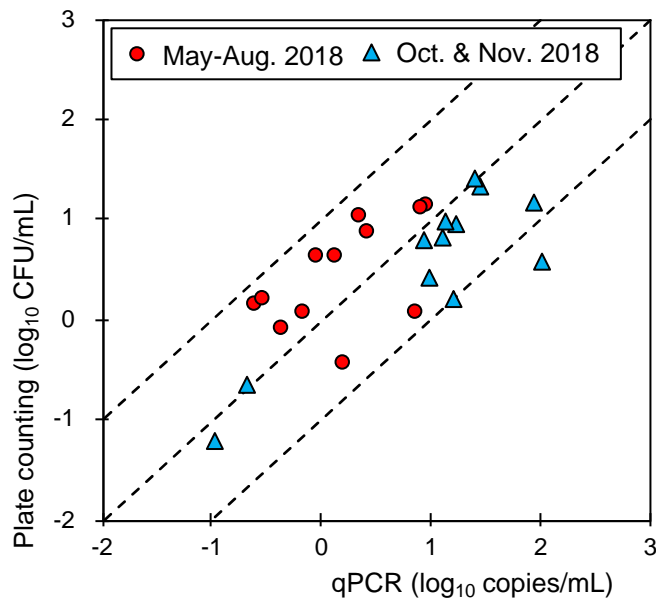


図3 qPCR法(横軸)及び培養法(縦軸)による河川水試料中の大腸菌定量結果

3.4 多摩川河川水からの感染力を有したFPH遺伝子群の検出

二次濃縮液を用い、FPHの各遺伝子群(GI-GIV)について、MPN-ICC-PCR法により感染力に基づく濃度を定量した。各地点での各遺伝子群の検出濃度を図4にまとめた。陽性率では、GIが全ての試料で陽性となり最大であった。次いでGIIが各地点で82-91%の陽性率、さらにGIIIが各地点で55-73%の陽性率で検出された。一方で、GIVはSite Dの1試料でのみ陽性となった(各地点につきN=11)。以下に、GI-GIII群について、不検出試料における濃度を検出下限値(試料により変動)とした場合の解析結果について記す。

全試料からの検出濃度の幾何平均値は、GIが最も高く($2.7 \pm 0.7 \log_{10}$)、GIIが $1 \log_{10}$ ほど低い値($1.5 \pm 1.4 \log_{10}$)、GIIIがさらに $1 \log_{10}$ ほど低い値($0.3 \pm 1.4 \log_{10}$)となった。GIVを除く各遺伝子群の地点間での検出濃度の差異については、Site B及びSite Dがそれぞれ他地点よりも低濃度、高濃度となる傾向にあり、GI及びGIIIについてはSite Dでの検出濃度がSite Bでの検出濃度よりも有意に高くなった(Friedman検定, $p < 0.05$)。また、対象地域全域について、GIはGII、GIIIよりも有意に高濃度で検出され、また、GIIIはGI、GIIよりも有意に低濃度で検出される傾向にあった(Friedman検定, $p < 0.05$)。ただしSite Dにおいては、2試料でGIIIが 10^3 MPN/L以上の濃度で検出されており、GIIとの濃度差は有意でなかった(Friedman検定, $p < 0.62$)。

FPH各遺伝子群について、Site Bで低濃度となる傾向が見られた。Site A、Site B間の濃度差は有意でないものの、Site AからSite Bへの流下の過程でFPHの希釈、もしくは不活性化が生じていた可能性が考えられる。また、Site Dは他地点よりも高FPH濃度となる傾向にあった。Site Dは他地点よりも電気伝導度が高く、東京湾からの海水の影響が強い地点だと考えられる。東京湾沿岸域には複数の下水処理場が分布している。これらのことから、特に微生物学的水質の面では、Site Dは多摩川流域よりも東京湾沿岸域の下水処理水の影響を強く受ける地点であると考えられる。

遺伝子群ごとの検出傾向として、陽性率、検出濃度共にGIが最も高く、次いでGII、さらにGIIIがこれらに続く形となり、GIVはほとんど検出されなかった。一般にヒト由来の

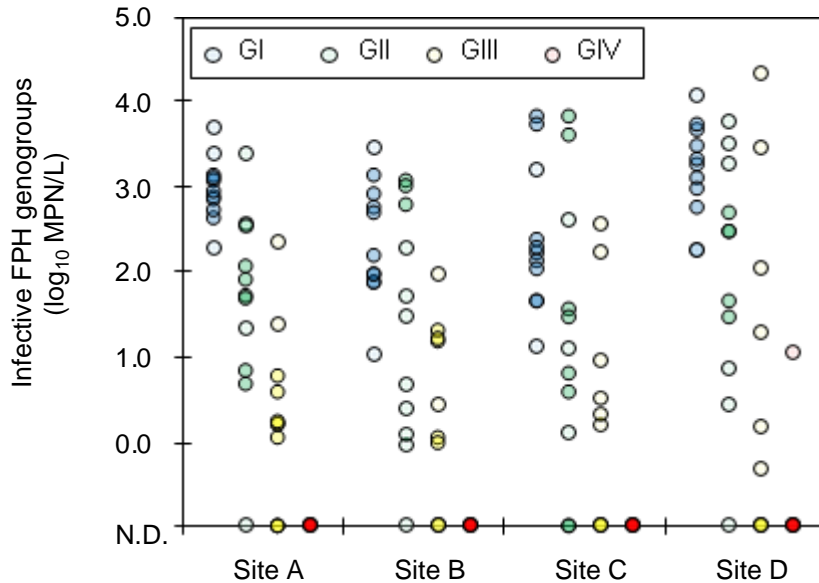


図4 各地点での FPH 各遺伝子群検出濃度 (log₁₀ MPN/L)
縦軸上の”N.D.” は不検出を示す。

汚水が中心となる下水においては、GII、GIII が高濃度となり、GI がこれに続く形となる (Hata et al., 2013; Haramoto et al., 2015)。しかしながら、GI は特に下水処理での除去されにくく、また、GIII は特に除去されやすいため、下水処理水においては GI が高濃度となり、GIII が低濃度となりやすい (Hata et al., 2013; Haramoto et al., 2015)。また、GIV が検出されることは非常に稀である (Lee et al., 2019)。以上より、多摩川流域では、下水処理水が主要な微生物流入源となっていることが示唆された。一方で、Site D においては比較的 GIII が高濃度で検出された試料や GIV が陽性となる試料が存在したことから、未処理、あるいは処理不十分な下水が混入していた可能性も考えられる。Site D は東京湾海水の影響が強いと考えられるが、東京湾沿岸域には、流入河川を経由するものを含め、多数の下水処理場からの排水が流入する。これら処理場は多くが合流式であり、激しい降雨時には一部の下水が十分な処理を経ずに放流される (合流式下水道雨天時越流水, CSO)。また、潮汐の影響により微生物が長期間滞留する可能性も考えられる。本調査は基本的に晴天時に行なったため、CSO の影響は考えにくいだが、これらの要因が Site D の微生物学的水質に影響した可能性がある。

3.5 多摩川河川水からの感染力を有した腸管系ウイルスの検出

二次濃縮液を用い、Vero 細胞を用いた腸管系ウイルスの培養を試みた。いくつかの試料については、ウイルス感染を示唆する細胞変性効果とみられる変化が細胞を起こしたが、培養上清を RT-PCR に供した結果、いずれの試料についてもエンテロウイルス、アイチウイルス陰性であった。FPH に関してはウイルス濃縮液から感染力を有したものを高回収率で検出できていることから、ウイルス濃縮の過程で腸管系ウイルスが不活化したことは考えにくい。腸管系ウイルスは一般に、一つの種が多様性に富む集団から構成される。基本的に実験室株として用いられるものは実験室細胞に容易に感染し、高効率で増殖するものであると考えられる。これらを考慮すると、環境中のウイルス株は実験室株と比較し、Vero 細胞との親和性が低かった可能性が考えられる。また、特に多量の濃縮液を接種した場合、

培地中で細菌類の増殖が観察された。細菌の混入を防ぐ目的で、試料の接種前には遠心操作を施していたほか、培地には抗生物質を添加していた。従って、遠心操作後も上清に残ってしまった少数の抗生物質耐性菌が増殖したものと考えられ、これがウイルスの増殖を妨げた可能性もある。これらを踏まえ、培養操作によらない感染力を有したウイルス濃度推定手法として、CDDP-RT-qPCRを適用することとした。

3.6 RT-qPCRに伴う検出阻害が多摩川河川水中のウイルス検出に与える影響

RT-qPCRによるウイルス検出に際しては、試料中の阻害物質により、RNA抽出やRT-qPCRの効率が低下し、ウイルス濃度の過小評価が引き起こされる(Hata et al., 2011)。このような検出阻害の影響を評価するため、本調査においてはRNA抽出の直前に、二次濃縮液にMNVを添加し、これをRT-qPCRにより定量した。また、無希釈及び10倍希釈したRNA抽出液をRT-qPCRに供することによるRT-qPCR阻害の軽減も試みた。なお、希釈操作はRNA抽出後に行うため、RT-qPCRの効率改善には寄与するが、RNA抽出効率の改善には寄与できない。

図5にて、無希釈及び10倍希釈RNA抽出液でのMNVの検出効率を比較した。無希釈のRNA抽出液を使用した場合、MNVの検出効率(回収率)は対象とした50試料中14試料で10%を下回り、これらのうち1試料は1%未満(0.24%)であった。RNA抽出液の希釈により、これら14試料のうち4試料の検出効率は10%を上回ったが、一方で1試料は希釈後に検出効率が10%を下回った。また、無希釈RNA抽出液での検出効率が30%を下回った試料は23試料であったが、これらのうち、希釈後に検出効率が2倍以上向上したものは9試料のみであり、ほとんどの試料でRNA抽出液の希釈が検出効率の向上をもたらさなかったと判断できる。従って、HFUF及びこれに続く遠心式UFにより試料を濃縮した場合、RNA抽出効率の低下が生じやすいことが示唆された。UF濃縮に際しては数nm以上の懸濁物質全てが回収対象となるため、これらの物質がRNA抽出効率に影響したと

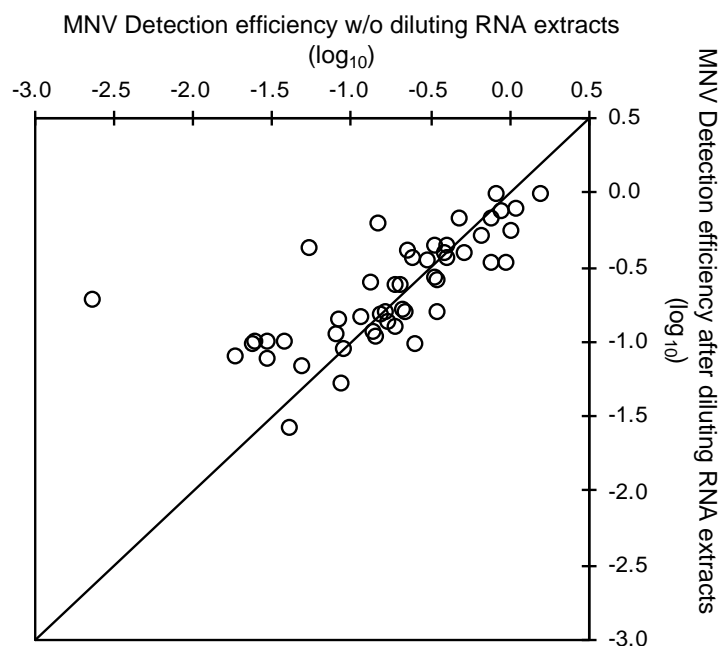


図5 無希釈(横軸)及び10倍希釈(縦軸)RNA抽出液でのMNV検出効率

考えられる。また、本調査では4試料を陰電荷MF膜による一次濃縮操作にも供している。これら4試料でのMNV検出効率は0.24%から15%であり、全てについて、希釈操作により検出効率が2倍以上向上した。従って、陰電荷MF膜による濃縮法はRT-PCR効率の低下をもたらしやすいことが示唆される。同様の結果は先行研究においてもみられている(Hata et al., 2017など)。また、同試料をHFUFで濃縮した際のMNV検出効率は22%から110%であり、濃縮手法が大きく検出効率に影響する可能性も示唆された。この点に関しては今後さらなる検討が必要であろう。

本調査では、損傷したウイルス由来の遺伝子を排除する目的で、RNA抽出の前段でCDDP処理も施している。図6において、CDDP処理を施したRNA抽出液及びCDDP処理を施していないRNA抽出液でのMNV検出効率を比較した。ほとんどの試料で、CDDP処理を施した場合の方が高い検出効率を示した。また、両者の検出効率の差は有意であった(t検定, $p < 0.01$)。本調査では、CDDP処理によるMNVのRNAの排除を防ぐ目的で、CDDP処理系においては、CDDP処理ののちにMNVを添加しRNA抽出を試みた。従って、CDDP処理の有無での検出効率の変化はCDDPによるものではないと考えられる。MNV検出効率の低下は、RNA抽出効率及びRT-qPCR効率の低下によってもたらされたと考えられる。先述のようにRNA抽出効率は、濃縮液中の懸濁物質がRNA抽出に際し用いるシリカメンブレンの目詰まりにより低下すると考えられ、また、RT-qPCRは疎水性の溶存物質により低下すると考えられる(Hata et al., 2017)。CDDP処理に際して添加したSDは界面活性剤であり、懸濁物質を分散させ、シリカメンブレンの目詰まりを防いだ可能性や、疎水性の溶存物質に作用し、RT-qPCR効率の低下を防いだ可能性が考えられる。これらを踏まえると、本調査で適用したCDDP処理は、損傷したウイルス由来の遺伝子を排除することで、ウイルス定量値を低下させる作用及び、検出効率の向上によりウイルス定量値を上昇させ

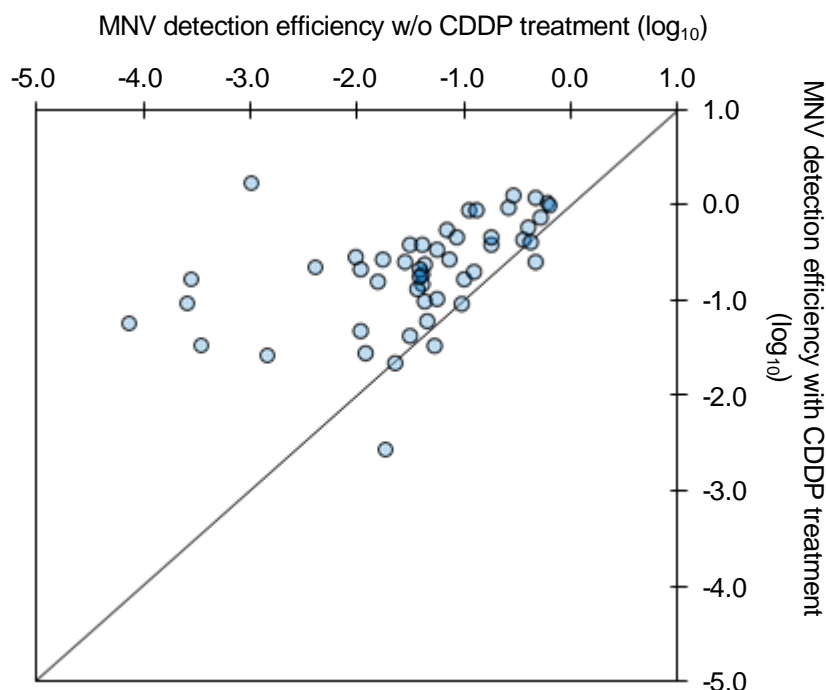


図6 CDDP処理を施したRNA抽出液(縦軸)及びCDDP処理のないRNA抽出液(横軸)でのMNV検出効率。いずれについても無希釈RNA抽出液での値を使用した。

る作用があると考えられる。CDDP 処理適用時のウイルス定量値の解釈に際しては、これらの点に留意する必要がある。

3.7 CDDP 処理の有無による多摩川河川水中のウイルス定量値の差異

本調査では、FPH の各遺伝子群を含め、8 種のウイルスを RT-qPCR 及び CDDP-RT-qPCR による検出に供した。CDDP-RT-qPCR 法はカプシドの損傷により不活化した FPH に由来する遺伝子を除外して定量する手法である。すなわち、CDDP-RT-qPCR 法では、RT-qPCR 法よりもより感染力に基づく定量法 (MPN-ICC-PCR 法) に近い定量値が得られると期待される。表 2 に両手法により得られた各ウイルスの陽性試料数をまとめた。なお、GIV-FPH は全ての試料で陰性だったため、表 2 からは除外した。手法を問わず、PMMoV は全試料で陽性となった。その他のウイルスは、GII-NoV を除きいずれも CDDP-RT-qPCR 適用時により高い陽性率を示した。CDDP-RT-qPCR での結果を基にすると、GI-FPH, GII-FPH, AiV が 42 試料中それぞれ 41 試料 (98%), 37 試料 (88%), 34 試料 (81%) と比較的高頻度で検出された。また、特に本調査でリスク因子として想定していた GI-NoV および GII-NoV は 18 試料 (43%), 5 試料 (12%) (RT-qPCR では 9 試料で陽性、陽性率 21%) で陽性であり、検出頻度は他のウイルスよりも低かった。

図 7 にて、RT-qPCR 及び CDDP-RT-qPCR により得られた各ウイルスの定量値を比較した。定量値の観点からでは、CDDP-RT-qPCR 適用時には RT-qPCR 適用時と同等もしくはより高い定量値が得られる傾向にあった。しかしながら、GI-FPH については RT-qPCR 適用時により定量値が高くなる傾向にあった。また、GII-NoV は両手法で陽性となったのは 3 試料のみであったが、これらについては手法間での定量値の差異は見られなかった。CDDP-RT-qPCR 適用時に陽性率、検出濃度共に高くなる傾向は添加回収した MNV においても見られており、MNV 同様に CDDP 処理時に使用した SD の影響が大きいと考えられる。GI-FPH については CDDP 処理により定量値が低下したことから、当初の目的通り、損傷を受けたウイルスを排除することができたと考えられる。一方で他のウイルスについては CDDP 処理自体の効果は顕著でない。検出手法間での定量値の差異がほとんど見られない試料も多く見られたが、これらに関しては手法間での検出効率に差がなく、また、CDDP 処理により排除されるウイルスが存在しなかったと考えることもできる。FPH に関しては MPN-ICC-PCR による検出も試みており、手法間での検出傾向の差異については次項にて改めて記述する。

表 2. CDDP 処理の有無に応じた各ウイルスの陽性試料数

CDDP [※]	GI-NoV		GII-NoV		PMMoV		AiV		GI-FPH		GII-FPH		GIII-FPH	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Total (N = 42)	9	18	9	5	42	42	20	34	39	41	32	37	3	27
Site A (N = 11)	1	6	2	1	11	11	5	10	11	11	8	11	0	8
Site B (N = 10)	2	3	2	0	10	10	5	6	8	10	7	7	0	4
Site C (N = 11)	3	3	3	1	11	11	5	8	11	10	7	9	1	7
Site D (N = 10)	3	6	2	3	10	10	5	10	9	10	10	10	2	8

※A: without CDDP treatment; B: with CDDP Treatment

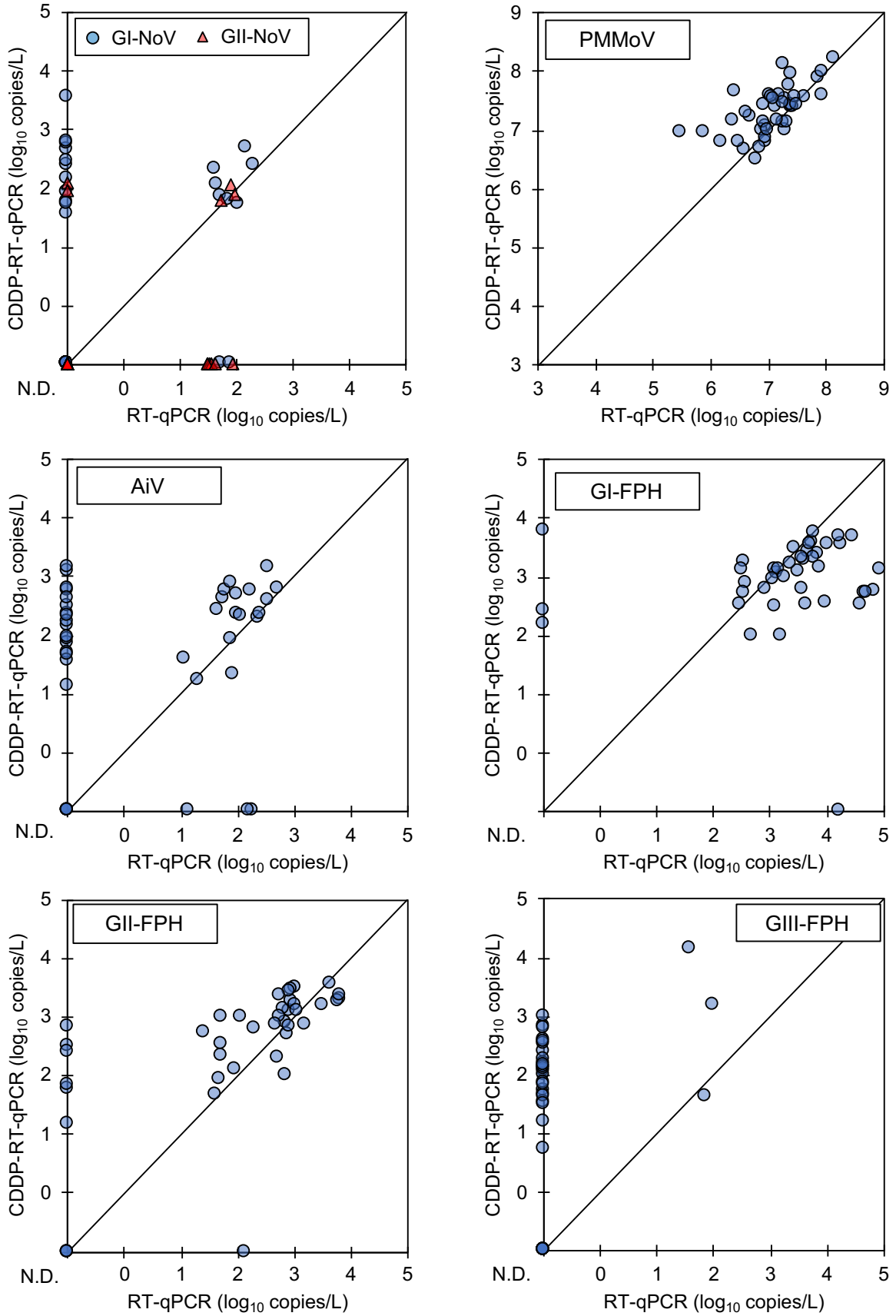


図7 RT-qPCR および CDDP-RT-qPCR による各ウイルス定量値の比較。
軸上の "N.D." は不検出を意味する。

表 3. 各ウイルス定量値の最大値, 75%値, 50%値, 25%値, 最小値 (全 42 試料)

	GI-NoV	GII-NoV ^{※1}	PMMoV	AiV	GI-FPH ^{※1}	GII-FPH	GIII-FPH
Maximum	3.4E+03	9.0E+01	1.6E+08	1.4E+03	9.0E+04	3.5E+03	1.4E+04
75%	1.0E+02	N.D.	3.6E+07	4.2E+02	8.9E+03	1.5E+03	1.6E+02
50%	N.D. ^{※2}	N.D.	2.4E+07	1.8E+02	3.8E+03	6.7E+02	4.5E+01
25%	N.D.	N.D.	9.6E+06	2.5E+01	1.2E+03	1.1E+02	N.D.
Minimum	N.D.	N.D.	3.2E+06	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

^{※1}RT-qPCR での定量値に基づく値. 他のウイルスについては CDDP-RT-qPCR での定量値に基づく値を採用した.

^{※2}N.D.: 不検出 (Not detected)

また, 表 3 において, 全試料を対象に, 各ウイルスの検出濃度をまとめた. ここでは基本的に CDDP-RT-qPCR により得られた定量値を示しているが, RT-qPCR での陽性率や検出濃度が高い傾向にあった GII-NoV 及び GI-FPH に関しては RT-qPCR での定量値を示した. PMMoV は 3.2×10^6 copies/L から 1.6×10^8 copies/L と高濃度で検出された. 75%値での評価では, GI-FPH が次いで高濃度 (8.9×10^3 copies/L) であったが, これは PMMoV と比較すると 4,000 分の 1 程度である. また, GII-FPH, AiV も概ね 10^2 copies/L から 10^3 copies/L 程度の比較的高濃度で検出される傾向にあった. GIII-FPH は最大値では 10^4 copies/L を越える濃度で検出されたが, 陽性率は低く, 散発的に検出されていたと言える. GI-NoV も最大値や 75%値では AiV 等と大きな差は見られなかったが, 陽性率が低く, 散発的に検出されていたと言える. また, GII-NoV は陽性率, 検出濃度共に他のウイルスよりも低かった.

3.8 多摩川河川水を対象とした FPH の検出手法間の比較

本調査では, FPH 各遺伝子群の定量法として, MPN-ICC-PCR 法, CDDP-RT-qPCR 法, RT-qPCR 法の 3 手法を用いた. これらのうち, MPN-ICC-PCR 法は感染力に基づく定量法であり, RT-qPCR 法は不活化したものも含め, 試料中の FPH 遺伝子全てを対象とする手法である. ここでは, FPH 各遺伝子群について, 検出手法ごとの定量値を Friedman 検定により比較し, ウイルスの感染力評価手法としての CDDP-RT-qPCR の有効性について検討した. 対象試料は, 3 手法全てで陽性結果が得られたものとした. GI-FPH については, MPN-ICC-PCR 法と RT-qPCR 法の間有意な差が見られたが ($N = 38, p < 0.01$), MPN-ICC-PCR 法と CDDP-RT-qPCR 法の差異は有意でなかった ($p = 0.15$). また, CDDP-RT-qPCR 法と RT-qPCR の差異は有意であった ($p < 0.01$). GII-FPH については, RT-qPCR 法と CDDP-RT-qPCR 法の差異が有意でなく ($N = 27, p = 0.79$), 一方で MPN-ICC-PCR 法と他 2 手法の差異は有意であった ($p < 0.01$). また, GIII-FPH については, 特に RT-qPCR での陽性試料数が 3 と極端に少なかったため, このような比較は行わなかった.

図 8 においても, GI-GIII-FPH について, 各地点での MPN-ICC-PCR と, RT-qPCR, CDDP-RT-qPCR の定量値を比較した. また, 表 4 において, GI-GIII-FPH について, 各地点での MPN-ICC-PCR と, RT-qPCR, CDDP-RT-qPCR の定量値の比をまとめた. 特に, MPN-ICC-RT-PCR と RT-qPCR の定量値の比は, RT-qPCR での定量値が不活化したものも含めた総ウイルス濃度とみなせる場合, ウイルスの不活化率 (infectivity index) を示すと考えられる

(Hata et al., 2016). 例えば infectivity index が $-1 \log_{10}$, $-2 \log_{10}$ であった場合, それぞれ RT-qPCR で検出されたウイルスのうち 90%, 99%が不活化していたと見なすことができる. Site A-Site B 間では, 下水処理放流水等の流入がないと考えられることを踏まえると, 両地点間での infectivity index の差異は, 流下に伴う不活化に起因すると考えられる. GI-FPH の infectivity index は, Site A では 11 試料中 9 試料が $-1 \log_{10}$ 以上であった (不活化率 90% 以上) のに対し, Site B では 8 試料中 5 試料で $-1 \log_{10}$ 未満であり, 流下に伴う不活化の影響が示唆された. 一方で, Site B - Site C 間を比較すると, infectivity index が $-2 \log_{10}$ 未満 (99%超の不活化率) の試料数が 8 試料中 1 試料から, 11 試料中 3 試料となっており, こちらでも流下に伴う不活化が生じている可能性がある. しかしながら, Site B - Site C 間では 下水処理放流水の流入があるほか, RT-qPCR での陽性率は Site C の方が高いため, 採水日によっては流下に伴う不活化よりも横流入による水質の変化が強く影響していた可能性も考えられる. また, Site D については, ほとんど (9 試料中 6 試料) の試料で infectivity index が $-1 \log_{10}$ 未満であり, Site B よりも GI-FPH の不活化が顕著でなかったことが示唆された. 先述のように, Site D は東京湾の影響が強いと考えられる地点であり, 他の地点とは水質状況が大きくこととなると考えられる. GII-FPH の infectivity index は, Site A - Site C で大きな差異は見られなかった. 一方で, Site D においては, infectivity index が $-2 \log_{10}$ 以下となるものと $-1 \log_{10}$ を超えるものが混在しており, これにより, 採水日による水質の差異が大きかったことが示唆された. また, GIII-FPH については, 特に RT-qPCR での陽性試料数が少なかったため, ほとんどの試料で infectivity index が算出できなかった. ただし, 先述の結果より, RT-qPCR の定量値は検出効率低下の影響を受けていることが示唆されており, ここで示した infectivity index は真値を過大評価している可能性があることにも留意が必要である.

MPN-ICC-PCR と CDDP-RT-qPCR での定量値を比較すると, GI-FPH についてはほとんど (85%, 41 試料中 35 試料) で両者の比が $-1 \log_{10}$ を上回った. RT-qPCR との比較においては, infectivity index が $-1 \log_{10}$ を上回った試料が 39 試料中 23 試料 (59%) であったことを踏まえると, CDDP 処理により不活化したウイルス由来の遺伝子が効率的に排除することができたと判断できる. 一方で, GII-FPH については, CDDP-RT-qPCR 適用時と RT-qPCR 適用時で目立った差異は見られなかった. GIII-FPH については, RT-qPCR 適用時との比較は困難であるものの, 特に Site B-D において, 90% (10 試料中 9 試料) で MPN-ICC-PCR と CDDP-RT-qPCR での定量値の比が $-1 \log_{10}$ を上回った. このことから, CDDP-RT-qPCR により感染力を有したウイルス数に近い定量値が得られていたと判断できる.

これらの結果より, CDDP 処理の適用により, GI-FPH および GIII-FPH については不活化したウイルス由来の遺伝子が効率的に排除され, 続く RT-qPCR にて感染力に近い値が得られたと考えられるが, 一方で GII-FPH については, CDDP 処理で不活化したウイルス由来の遺伝子が効率的に排除できなかったことが示唆された. このような差異の原因として, カプシドが CDDP の侵入を許すようになるまでの損傷具合がウイルス種によって異なることや, 環境ストレスや下水処理によって受けるダメージがウイルス種により異なることが考えられる. また, GIII-FPH については, MPN-ICC-PCR と CDDP-RT-qPCR での定量値の比が $-2 \log_{10}$ 以下となる試料も見られたことも考慮すると, CDDP-RT-qPCR は感染力を有したウイルス数を過大評価することがあると言え, その適用や, 得られるデータの解釈について, 今後さらに検討していく必要がある.

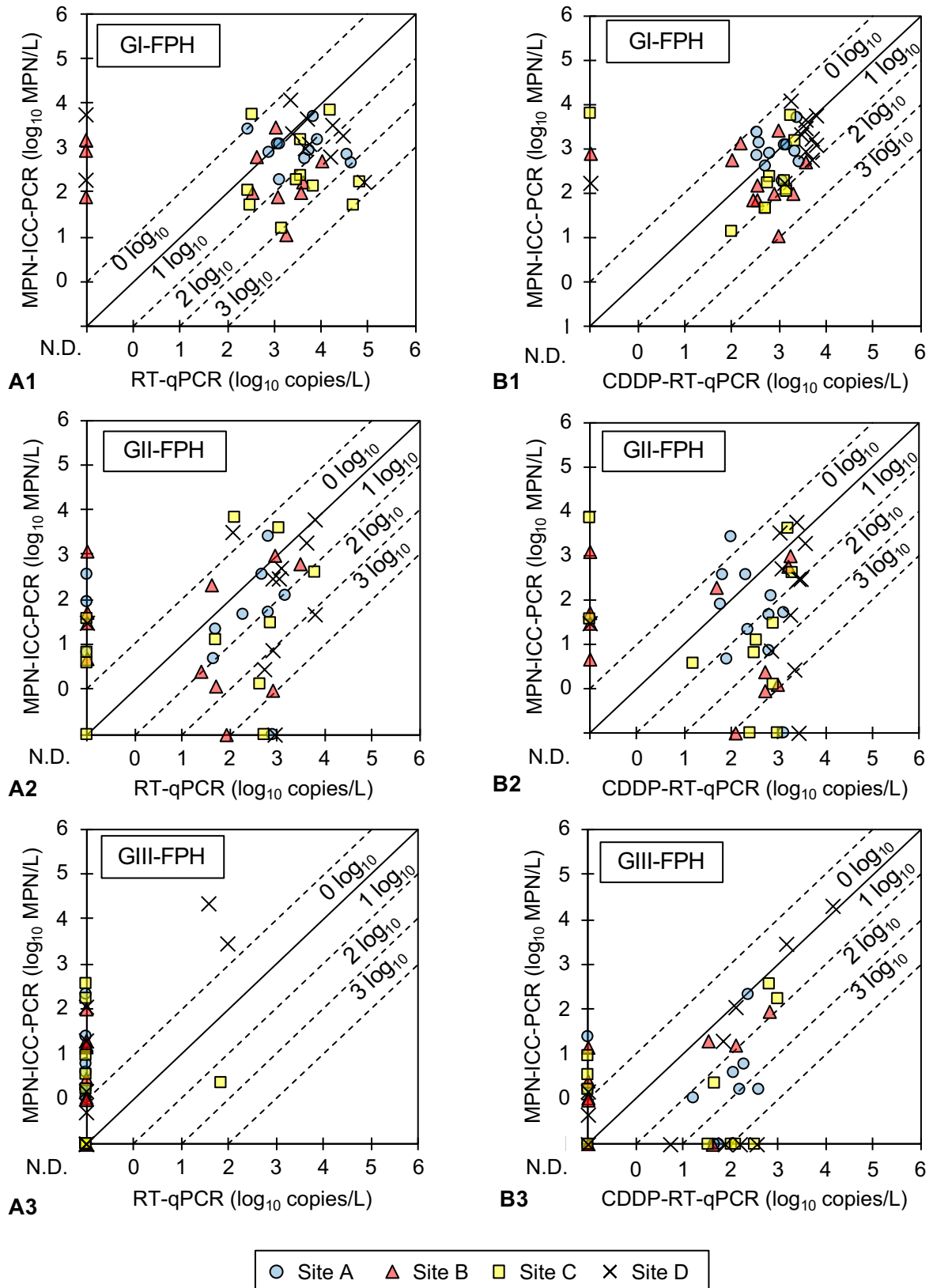


図8 GI-GIII-FPHのMPN-ICC-PCRによる定量値と、RT-qPCR (A1-A3)、CDDP-RT-qPCR (B1-B3)による定量値の比較。軸上の“N.D.”は不検出を意味する。

表 4 GI-GIII-FPH の MPN-ICC-PCR による定量値と、RT-qPCR, CDDP-RT-qPCR (B1-B3) による定量値の比.

GI-FPH (RT-qPCR)					GI-FPH (CDDP-RT-qPCR)				
	Site A	Site B	Site C	Site D		Site A	Site B	Site C	Site D
>-1 log ₁₀	9	3	5	6	>-1 log ₁₀	11	8	6	10
>-2 log ₁₀	1	4	3	2	>-2 log ₁₀		2	4	
>-3 log ₁₀	1	1	2	1	>-3 log ₁₀				
>-4 log ₁₀			1		>-4 log ₁₀				

GII-FPH (RT-qPCR)					GII-FPH (CDDP-RT-qPCR)				
	Site A	Site B	Site C	Site D		Site A	Site B	Site C	Site D
>-1 log ₁₀	4	4	3	6	>-1 log ₁₀	6	3	3	5
>-2 log ₁₀	3	1	2		>-2 log ₁₀	4		3	3
>-3 log ₁₀		1	1	3	>-3 log ₁₀		3	1	1
>-4 log ₁₀					>-4 log ₁₀				

GIII-FPH (RT-qPCR)					GIII-FPH (CDDP-RT-qPCR)				
	Site A	Site B	Site C	Site D		Site A	Site B	Site C	Site D
>-1 log ₁₀				2	>-1 log ₁₀	1	3	2	4
>-2 log ₁₀			1		>-2 log ₁₀	4		1	
>-3 log ₁₀					>-3 log ₁₀	1			
>-4 log ₁₀					>-4 log ₁₀				

4. まとめと今後の展望

本研究では多摩川にて特にウイルスの感染力に着目し微生物学的水質調査を行った。HFUF 及び遠心式 UF を用いた手法により、ウイルスや大腸菌の活性を損なうことなく微生物の濃縮が実現できた。また、試料中の大腸菌及び FPH の測定により、細菌、ウイルスの濃縮回収率評価も実現できた。多摩川試料中においては、大腸菌の不活化はほとんど起こっていないことが示唆された。河川水中の感染力を有した腸管系ウイルスの定量に関し、細胞培養の適用は困難であった。一方で、FPH に関しては既往の MPN-ICC-PCR 法により、感染力を有したものを遺伝子群別に定量することができた。HFUF を用いた濃縮手法は、RT-qPCR 前段の RNA 抽出での効率を低下させやすいことが示唆され、これにより RT-qPCR での定量値の信頼性が損なわれると考えられた。また、特に FPH について、CDDP 処理により、従来の RT-qPCR よりも感染力に基づく濃度に近い定量値を得ることができたが、MPN-ICC-PCR 法による定量値とは乖離が見られる場合もあった。また、CDDP 処理は不活化したウイルス由来の遺伝子を排除するのみでなく、RNA 抽出効率も向上させることが示唆されたため、特に腸管系ウイルスに対しては、その有効性の評価が困難であった。これらを踏まえ、今後はさらに CDDP 処理の有効性や利用可能性を評価していく必要があると言える。特に RT-qPCR での定量値の信頼性の問題から、多摩川河川水中のウイルスの不活化率推定は困難であったが、流下に伴い不活化が生じていることを示唆する結果も得られている。RNA 抽出に際し SD を用いることで RNA 抽出効率を改善できる可能性が示唆されており、今後はこの点に関しても検討していく必要がある。

多摩川河川水からは低頻度ながら、ウイルス性胃腸炎の主要因である GI-, GII-NoV が検出された。これらは CDDP-RT-qPCR によっても検出されており、水利用に際しての感染リ

スクが懸念される。PMMoV は他のウイルスよりも 1,000 倍以上高い濃度で検出される傾向にあり、特に NoV など低濃度のリスク因子の動態を推測するにあたって有用であると考えられる。また、FPH についても、感染力評価が容易であり、遺伝子群により水中での濃度、水処理への耐性が異なるため、リスク推定に有用な指標となることが期待される。

多摩川河口部は東京湾海水の影響を強く受けており、微生物学的水質の面でも、水質変動が大きいなど他の地点と異なっていた。2019 年の台風 19 号による浸水被害時にも話題になったように、多摩川流域や東京湾沿岸域においては激しい降雨時に一部の下水が処理不十分なまま放流されてしまう（合流式下水道雨天時越流水, CSO）。CSO 発生時には、単純にウイルス濃度が増加するのみでなく、感染力を有したウイルスの割合も増加することが考えられ、今後は CSO の影響についても評価していく必要があるだろう。

5. 参考文献

1. Bernasconi, C., Volponi, G., Picozzi, C., Foschino, R., 2007. Use of the *tna* operon as a new molecular target for *Escherichia coli* detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6321–5.
2. Blodgett R. 2010. Bacteriological analytical manual, appendix 2. Most probable number from serial dilutions. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>.
3. Canh, V.D., Kasuga, I., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Viability RT-qPCR Combined with Sodium Deoxycholate Pre-treatment for Selective Quantification of Infectious Viruses in Drinking Water. *Food Environ. Virol.* 11, 40-51.
4. Cashdollar, J.L., Wymer, L., 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: A review and meta-analysis of recent studies. *J. Appl. Microbiol.* 115, 1–11.
5. de Abreu Corrêa, A., Carratala, A., Barardi, C.R.M., Calvo, M., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6450–6457.
6. de Roda Husman, A.M., Lodder, W.J., Rutjes, S.A., Schijven, J.F., Teunis, P.F.M., 2009. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1050–1057.
7. Gibson, K.E., Schwab, K.J., 2011. Tangential-Flow Ultrafiltration with Integrated Inhibition Detection for Recovery of Surrogates and Human Pathogens from Large-Volume Source Water and Finished Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 385–391.
8. Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2005. Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan 71, 2403–2411.
9. Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., 2013. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7413–8.
10. Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 520, 32–38.
11. Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in

- water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4336–43.
12. Hata, A., Matsumori, K., Kitajima, M., Katayama, H., 2014. Concentration of Enteric Viruses in Large Volumes of Water Using a Cartridge-Type Mixed Cellulose Ester Membrane. *Food Environ. Virol.* 7, 7–13.
 13. Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4244–4252.
 14. Hata, A., Inaba, M., Katayama, H., Furumai, H., 2017. Characterization of Natural Organic Substances Potentially Hindering RT-PCR-Based Virus Detection in Large Volumes of Environmental Water. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13568–13579.
 15. Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Amburgey, J.E., 2005. Development of a Rapid Method for Simultaneous Recovery of Diverse Microbes in Drinking Water by Ultrafiltration with Sodium Polyphosphate and Surfactants 71, 6878–6884.
 16. Hill, V.R., Kahler, A.M., Jothikumar, N., Johnson, T.B., Hahn, D., Cromeans, T.L., 2007. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4218–25.
 17. Hill, V.R., Control, D., Amburgey, J.E., Control, D., Carolina, N., 2009. Comparison of Hollow-Fiber Ultrafiltration to the USEPA VIRADEL Technique and USEPA Method 1623. *J. Environ. Qual.* 38(2), 822-825.
 18. Holowecky, P. M., James, R. R., Lorch, D. P., Straka, S. E., Lindquist, H. D. A., 2009. Evaluation of ultrafiltration cartridges for a water sampling apparatus. *J. Appl. Microbiol.* 106, 738-747.
 19. Hughes, B., Beale, D.J., Dennis, P.G., Cook, S., Ahmed, W., 2017. Cross-comparison of human wastewater-associated molecular markers in relation to fecal indicator bacteria and enteric viruses in recreational beach waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–16.
 20. Junter, G.A., Lebrun, L., 2017. Cellulose-based virus-retentive filters: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1–35.
 21. Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1548–1557.
 22. Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1033–1039.
 23. Kitajima, M., Hata, A., Yamashita, T., Haramoto, E., Minagawa, H., Katayama, H., 2013. Development of a reverse transcription-quantitative pcr system for detection and genotyping of aichi viruses in clinical and environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3952–3958.
 24. Lee, S., Suwa, M., Shigemura, H., 2019. Occurrence and reduction of F-specific RNA bacteriophage genotypes as indicators of human norovirus at a wastewater treatment plant. *J. Water Health* 17, 50–62.
 25. Liu, M., Hata, A., Katayama, H., Kasuga, I., 2020. Consecutive ultrafiltration and silica adsorption for recovery of extracellular antibiotic resistance genes from an urban river. *Environ.*

- Pollut. 260, 114062.
26. Liu, P., Hill, V.R., Hahn, D., Johnson, T.B., Pan, Y., Jothikumar, N., Moe, C.L., 2012. Hollow-fiber ultrafiltration for simultaneous recovery of viruses, bacteria and parasites from reclaimed water. *J. Microbiol. Methods* 88, 155–161.
 27. Mooijman, K. A, Bahar, M., Muniesa, M., Havelaar, A.H., 2002. Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *J. Virol. Methods* 103, 129–36.
 28. Mull, B., Hill, V.R., 2012. Recovery of diverse microbes in high turbidity surface water samples using dead-end ultrafiltration. *J. Microbiol. Methods* 91, 429–433.
 29. Oka, T., Stoltzfus, G.T., Zhu, C., Jung, K., Wang, Q., Saif, L.J., 2018. Attempts to grow human noroviruses, a sapovirus, and a bovine norovirus in vitro. *PLoS One* 13, e0178157.
 30. Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5544–54.
 31. Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Res.* 91, 68–76.
 32. Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J., Wuertz, S., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Res.* 41, 1411–22.
 33. Sano, D., Pintó, R.M., Omura, T., Bosch, A., 2010. Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environ. Sci. Technol.* 44, 808–12.
 34. Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42, 4562–8.
 35. Walker, D.I., Cross, L.J., Stapleton, T.A., Jenkins, C.L., Lees, D.N., Lowther, J.A., 2019. Assessment of the Applicability of Capsid-Integrity Assays for Detecting Infectious Norovirus Inactivated by Heat or UV Irradiation. *Food Environ. Virol.* 11, 229–237.
 36. Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E., 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1388–1394.
 37. Yang, W., Gu, A.Z., Zeng, S., Li, D., He, M., Shi, H., 2011. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *J. Microbiol. Methods* 84, 447–53.
 38. 片山浩之, 嶋崎昭寛, 大垣眞一郎. 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.
 39. 北島 正章, 遠矢 幸伸, 松原 康一, 原本 英司, 宇田川 悦子, 片山 浩之, 大垣眞一郎, 2008. 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明. *環境工学論文集.* 45, 361–370.
 40. 端昭彦, 稲葉愛美, 片山浩之, 古米弘明. 2012. 震災後の石巻沿岸域における腸管系ウイルス及び指標微生物の検出と検出阻害評価. *土木学会論文集 G (環境).* 68(7).III_285-III_296.

41. 国土交通省．東京都の下水道事業の概要．<https://www.mlit.go.jp/common/000028961.pdf>
(2020年4月8日閲覧)

多摩川における感染力を有した腸管系ウイルスの動態解明
(研究助成・学術研究 VOL. 49—NO. 345)

著 者 端 昭彦

発行日 2020年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>