

## 酵素処理による下水試料中のウイルス濃縮技術の検討

東北大学大学院 学生員 ○村田 有紗  
 東北大学大学院 正会員 真砂 佳史  
 東北大学大学院 学生員 三浦 尚之  
 東北大学大学院 学生員 今井 崇博  
 東北大学大学院 正会員 大村 達夫

### 1. はじめに

近年、ノロウイルスをはじめとする腸管系ウイルスによる感染性胃腸炎の流行が問題となっており、感染者数低減のための対策が求められている。腸管系ウイルスは感染者の糞便 1g 中に約  $10^5 \sim 10^6$  コピーと高濃度で含まれており<sup>1)</sup>、それらは糞便と共に排出され、下水処理場へ流入する。従って、流入下水中のウイルスを定量することで、ウイルス性胃腸炎の流行状況の定量的な把握が可能になると考えられる。流入下水からのウイルス検出は、多くの場合試料の濃縮、遺伝子抽出、PCR 法による検出・定量という手順で行われる。下水試料の濃縮手法として、陰電荷膜法<sup>2)</sup>やポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法<sup>3)</sup>、凍結乾燥法<sup>4)</sup>等が開発されている。全ての手法で、濃縮の過程でウイルスの検出効率が低下することが知られているが、その要因は現段階では明らかになっていない。Sano ら<sup>5)</sup>は、下水汚泥からのウイルス誘出に際し、リゾチームにより有機物を分解することで検出効率が向上したと報告した。これは汚泥中の有機物が RNA 抽出や PCR の阻害物質であることを示唆するものである。流入下水に対しても、ウイルス濃縮後のペレットに、酵素による有機物の消化を追加することで、ウイルス検出効率の向上が期待できると考えた。

以上の背景より、本研究では酵素を用いることで流入下水からのウイルス検出効率の向上を図った (図 1)。まず酵素分解の前処理として用いる試料濃縮法を決定した。次に分解に用いる酵素の選択、消化条件の最適化を行い、濃縮ペレットを最適化された条件下で処理することでウイルスの検出効率を調べた。

### 2. 実験方法

#### 2.1. 供試ウイルス及び濃縮手法比較法の概要

濃縮手法評価は、下水試料に添加したポリオウイルス 1 型 Sabin 株(PV1)を各手法で濃縮後 RT-qPCR 法<sup>6)</sup>により定量し、回収率を比較することで行った。

#### 2.2. 試料の前処理のためのウイルス濃縮手順

下水試料の前処理法の候補として、以下 4 種の濃縮手法を選択した。

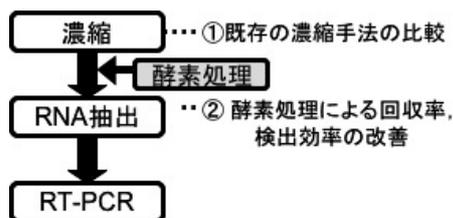


図 1. 一般的な流入下水からのウイルス検出手順と酵素処理を加えたウイルス検出手順

#### (1) PEG 沈殿法

試料にポリエチレングリコール#6000 (関東化学)、塩化ナトリウムをそれぞれ濃度が 8%、2.3%となるように添加し、4°Cで 12 時間ゆるやかに攪拌した。次に試料を 9,000×g、4°Cで 30 分間遠心分離し、ペレットに滅菌超純水 1mL を加えボルテックスした。これを 9,000×g、4°Cで 10 分間遠心分離した後、上清をウイルス濃縮液とした。

#### (2) 凍結乾燥法

試料を真空凍結乾燥した後、パウダー状になった試料に滅菌超純水 1mL を加えてボルテックスし、これをウイルス濃縮液とした。

#### (3) 超遠心分離法

試料を 160,000×g で 2 時間超遠心分離して得たペレットを滅菌超純水 1mL に分散させ、ウイルス濃縮液とした。

#### (4) 陰電荷膜法

手法は Katayama ら<sup>2)</sup>に従った。試料の濾過には孔径 0.45μm、直径 90mm の混合セルロースエステル膜 (HAWP09000、ミリポア) を用いた。

### 2.3. 酵素処理の手順

2.2 の各濃縮法で得たペレットを分散させる際、滅菌超純水の代わりに酵素を添加した緩衝液を添加し、各酵素活性に最適な温度で 2 時間の酵素処理を行った。その後は既存の濃縮法と同様に処理した。

酵素として、下水汚泥<sup>5)</sup>と牡蠣<sup>7)</sup>に対してそれぞれ有効だったリゾチーム (ニワトリ卵白由来, Sigma-Aldrich) とリパーゼ (ブタ膵臓由来, 和光純薬)、および糞便の主成分の 1 つである繊維質を分解するセルラーゼ (黒色アスペルギウス由来, Sigma-Aldrich) を用いた。溶媒には、各酵素の最適 pH 付近で緩衝能を有する緩衝液を選択した。リパーゼは分解対象物質により最適 pH が変化する<sup>8)</sup>ため、pH4.4 と pH9.0 の 2 種の緩衝液を用いた。各酵素の添加量は対象物質を十分に分解できる量とした。

#### 2.4. ウイルス濃縮手法の比較

2.2 の 4 手法の検出効率を比較するため、PV1 添加流入下水試料からのウイルス回収率を求めた。超遠心分離法は最大で 20mL までしか濃縮できないため、全ての手法で濃縮する試料の量を 20mL とした。

#### 2.5. 流入下水中の有機物分解に有効な酵素の決定

2.3 で挙げた 3 種の酵素を比較するため、下水からの検出法として最も広く用いられている PEG 沈殿法で濃縮した PV1 添加下水試料に酵素処理を加え、ウイルス回収率を求めた。酵素による分解の効果を明確にするため、試料の量を 50mL に増やした。

#### 2.6. 各濃縮手法への酵素処理の適用

2.5 で最も効果的だった酵素を用い、各濃縮手法に酵素処理を組み合わせた時のウイルス回収率を求めた。試料の量は

Key Words : 流入下水, ウイルス濃縮, PEG 沈殿法, 酵素

連絡先 〒 980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 TEL.022-795-7483 FAX 022-795-7482

超遠心分離法に合わせ 20mL とした。なお、陰電荷膜法は回収率が低く、また操作過程でペレットを生成しないため除外した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1. 既存のウイルス濃縮手法の比較

図 2 左側に、4 種の濃縮手法のウイルス回収率を示す。4 手法のうち、超遠心分離法のウイルス回収率が最も大きかった。この手法では、分子量の小さな有機物は上清に残り除去されるため、RNA 抽出や PCR の阻害を低減したと考えられる。凍結乾燥法はウイルスと共に下水中の有機物も濃縮されてしまい、RNA 抽出や PCR で阻害を引き起こしたと考えられる。また陰電荷膜法は、下水中のフロックに吸着したウイルス粒子が膜を通り抜けられなかったか、膜を通り抜けた有機物が PCR 阻害を引き起こしたと考えられる。PEG 沈殿法は、2 回目の遠心で得たペレットにウイルス粒子が残っており、濃縮液に誘出されなかった可能性が考えられる。

#### 3.2. 有機物分解に最適な酵素の選択

図 3 に、PEG 沈殿法と 3 種の酵素による有機物消化を組み合わせた時のウイルス回収率を示す。pH9.0 の緩衝液中でリパーゼを用いて処理した場合、ウイルス回収率が最もよく、PEG 沈殿法の 6.4 倍となった。すなわち流入下水試料において、ウイルスの検出効率の改善に有効な分解対象物質は油脂であったことになる。Sano ら<sup>5)</sup>は、リパーゼを用いた汚泥由来有機物の分解については検討していないが、本研究の結果より、汚泥からのウイルス検出にもリパーゼが効果的である可能性がある。またリパーゼと共に用いる緩衝液は、pH9.0 の方が pH4.4 よりもウイルス回収率の改善に寄与していたことが分かった。リパーゼを添加しない緩衝液中に PEG 沈殿法のペレットを分散させた手法では、pH9.0 の回収率が pH4.4 や中性の滅菌超純水より高かった。したがって、濃縮液の溶媒をアルカリ性にする事で、有機物からのウイルス誘出が促進されると考えられる。

#### 3.3. 酵素処理を加えるウイルス濃縮法の決定

図 2 右側に、陰電荷膜法以外の 3 つの濃縮手法に、リパーゼ (pH 9.0) による消化を組み合わせた時のウイルス回収率を示す。凍結乾燥法と超遠心分離法では、酵素処理を組み合わせるとウイルス回収率が低下したが、PEG 沈殿法ではウイルス回収率の改善が見られた。PEG 沈殿法で濃縮した試料に酵素処理が効果的に働いた理由として、ペレット中に残っていたウイルスの誘出が促進され、通常の PEG 沈殿法よりも濃縮されるウイルス量が多くなったためであると考えられる。

#### 3.4. 最適なウイルス濃縮手法の決定

20mL の試料の濃縮には超遠心分離法を単独で用いると良いことが分かった。しかし、超遠心分離法で濃縮できる試料の量は 20mL が限界であるのに対し、PEG 沈殿法はスケールアップが容易であった。しかし 50mL の試料の濃縮に PEG 沈殿法と酵素処理を組み合わせると回収率が 16% となり、超遠心分離法 (試料 20mL) よりもウイルスの検出感度が良いことが分かった。また、PEG 沈殿法の操作は簡便で、比較的短時間で濃縮ができるため、超遠心分離法に比べ実用性があると言える。以上よりウイルス検出効率と実用性を考慮すると、流入下水からのウイルス検出には PEG 沈殿法に酵素処理を加えた手法を用いるのが良いと言える。

### 4. おわりに

本研究では、流入下水からのウイルス検出効率の向上を図るため、従来のウイルス検出手法に酵素処理を加えた。その

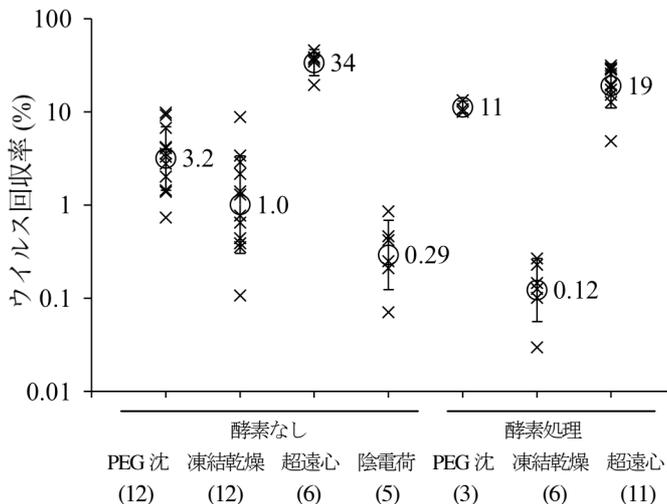


図 2. 各濃縮手法およびそれらに酵素処理を組み合わせたときの回収率。○内は試料数, ×はウイルス回収率, ○は幾何平均値, エラーバーの長さは幾何標準偏差を示す。

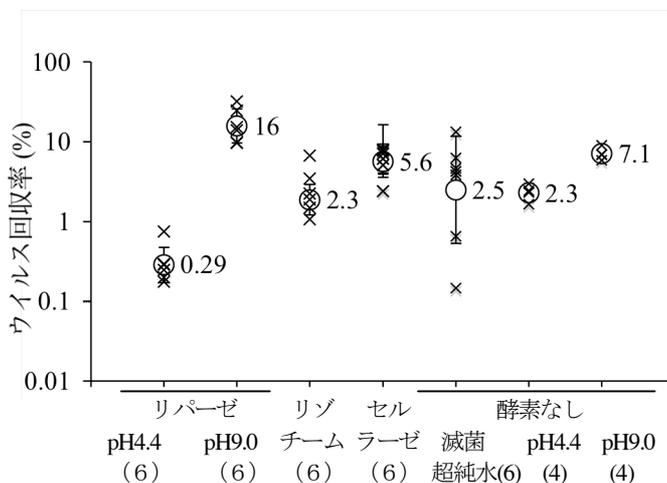


図 3. PEG 沈殿法で得たペレットに各酵素、緩衝液を用いて酵素処理を行ったときの回収率。○内は試料数, ×, ○, エラーバーの長さは図 1 と同様。

結果、PEG 沈殿法で得たペレットに対しリパーゼを用いた消化処理 (pH 9.0) を加えると、回収率が 16% となり、現在下水からのウイルス検出に広く用いられている PEG 沈殿法と比較して回収率が 6.4 倍に改善された。また、酵素処理を加えるのに最も適していたのは PEG 沈殿法であった。PEG-酵素処理法は、他の手法と比べて検出感度が最も優れており、また操作の簡便さ及びスケールアップの容易さの面でも優れていた。以上より、本研究では、流入下水からのウイルス検出に際して、下水中の有機物を酵素で分解することで、ウイルス検出効率を向上させることができたと言える。

### 参考文献

- Chan, M.C.W. *et al.*, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1278-1280
- Katayama, H. *et al.*, 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1033-1039
- Gillan, D.L. *et al.*, 1988. *Environ. Microbiol.*, 54, 1983-1988
- Gajardo, R. *et al.*, 1995. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3460-3462
- Sano, D. *et al.*, 2003. *Water Res.*, 37, 3490-3498
- Monpocho *et al.*, 2000. *BioTechniques*, 29, 88-93
- 奥村ら, 2008. 環境工学論文集, 45, 179-186
- 八木ら, 2008. 酵素ハンドブック第 3 版, 朝倉書店, 514-515