

LAMP 法による下水中のノロウイルス検出

宮崎大学大学院 学生員 ○成松 将吾, 宮崎大学工学部 正会員 鈴木 祥広
宮崎大学大学院 非会員 米加田 徹, 宮崎大学農学部 非会員 伊丹 利明
東京大学大学院 正会員 片山 浩之

1. 背景と目的

ノロウイルス (Norovirus, NV) は, 小型球形ウイルス (SRSV) またはノーウォーク様ウイルスと呼ばれ, 主に冬期に流行する胃腸炎や食中毒の主な原因ウイルスとなっている. NV はヒトのふん便を排出源として, 下水, 河川水, さらに海水からも検出された事例が報告されている¹⁾. しかしながら, これら環境水中には NV は希薄濃度でしか存在しないため, NV の遺伝子解析による検出あるいは定量の前処理として, サンプルの高濃度濃縮が必要となる. したがって, 検出までに至る過程において労力を必要とし, 下水処理場や河川等の水域の連続モニタリングによる NV 調査は困難となる場合が多い. ところが最近になって, 簡便かつ高効率に環境水から NV を濃縮する方法が開発され²⁾, 排水, 特定水源や水域の NV 調査が可能になりつつある.

そこで本研究では, ヒトのし尿が絶えず集水される下水処理場の下水流入水を調査対象とし, 前処理法には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²⁾, NV の検出方法には新規の遺伝子増幅法である Real time Reverse Transcription・Loop-mediated Isothermal Amplification (リアルタイム RT-LAMP) 法を用いて, 簡便な NV モニタリング手法について検討した.

2. 材料と実験方法

2.1 流入下水の濃縮・RNA 抽出

宮崎県の2つの下水処理場から流入下水を採水した. 流入下水は採水後直ちに実験室に持ち帰り実験に供した. 流入下水は, 目あい 500 μ m のメッシュでろ過して大型の浮遊物や夾雑物等を取り除き, これを実験用原水とした. 下水試料は 500ml として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によって, NV を濃縮回収した. 試料 500ml に濃度が 25mM になるように塩化マグネシウムを添加した. カチオンのイオンを添加された陰電荷のメンブレンフィルター (90mm, セルロース混合エステル膜, HA type pore size 0.45 μ m) を用いて吸引ろ過し, フィルターにウイルスを吸着させた. つづいて, 酸で洗浄するため, pH3 に調整した希硫酸 200ml をフィルターに通水した. ろ過ユニットに滅菌済み試験管を装着して, pH10.5 の水酸化ナトリウム 20ml を注ぎ, 吸引してろ液を試験管に回収した. 試料を速やかに pH 調整するため, ろ液を回収する試験管には, あらかじめ 0.1M の硫酸 100 μ l と 100 倍 TE バッファー 200 μ l を添加した. 得られた 20ml の溶離液は, さらに限外ろ過チューブ (Centriprep YM-50, Millipore) を用いて約 1.75ml に濃縮した. この濃縮サンプル水から高純度 RNA 抽出キット (High Pure RNA Tissue Kit, Roche) を用いて RNA を抽出した. フローを図 1 に示す.

2.2 RT-LAMP 法による NV の検出法

NV-G1 および G2 検出試薬キット (栄研化学社製) を用いて RNA 抽出液を調整した. NV-G1 および G2 タイプそれぞれのプライマーを用いて RT-LAMP 反応を行い, 反応時に副産物として生産されるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物) の濁度によって NV-G1 または G2 が検出される. 検出は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-200, TERAMECS) で行った. 反応温度 63°C で反応時間 60 分以内に濁度が 0.1 度以上に増加した試料をウイルス検出の陽性と判定した. また, エンドポイントの 0.1 度に到達時間するまでに要した時間 (min) を

キーワード: LAMP 法, ノロウイルス, 陰電荷膜酸洗浄・アルカリ誘出法, 流入下水

連絡先: 〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1, TEL.0985-58-7339, FAX.0985-58-7344

Threshold time (Tt) と定義した. 図 2 に結果例を示す. NV の定量性についての評価は, 濃度は 500ml 濃縮サンプルを $10^0 \sim 10^4$ 段階で希釈を行い, 検出陽性の下限値の希釈区を検出限界値として LDU (LAMP detectable units) /500ml と定義して表すことにした. それぞれの希釈濃度について 2 連で検出を行い, 本研究では二つのサンプルのうち一つでも検出された場合, 陽性と判定した.

3. 結果と考察

2 つの下水処理場 (A 処理場, B 処理場) から流入下水を採水して検出を行った. 図 3 に下水処理場での NV 検出結果を示す. A 処理場では G1 タイプ (A-G1) が 8 月に検出され 10^0 LDU/500ml であった. それ以外の月では検出されなかった. また G2 タイプ (A-G2) は 11 月, 12 月に検出された. 特に 11 月では 10^2 LDU/500ml であり, NV が高濃度に存在したことが分かった.

B 処理場では G1 タイプ (B-G1) が 12 月に 10^0 LDU/500ml で検出された. それ以外の月では検出されなかった. G2 タイプ (B-G2) も高濃度で検出された試料はなかったが, 9 月, 11 月, 12 月に検出され, 冬期になって頻繁に検出された. NV は冬期に流行しやすいことが報告されており³⁾, 本研究の NV 調査の結果は類似した傾向を示した.

4. まとめ

2 つの下水処理場の流入下水について NV の検出を行った結果, A 処理場では G2 タイプが 11 月に高濃度で検出された. また B 処理場では, 冬期に G2 タイプが頻繁に検出された. 本研究で提案した, 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と RT-LAMP 法を組み合わせた NV 検出法によって, 下水処理場の流入下水の NV モニタリングが簡便に行えることが明らかとなった.

参考文献

- 1) 片山浩之 (2006) 水環境および飲料水におけるノロウイルス汚染, 水環境学会誌, 29, 135-138.
- 2) 片山浩之, 嶋崎明寛, 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, 469-475.
- 3) <http://www.nih.go.jp/niid/> (国立感染症研究所).

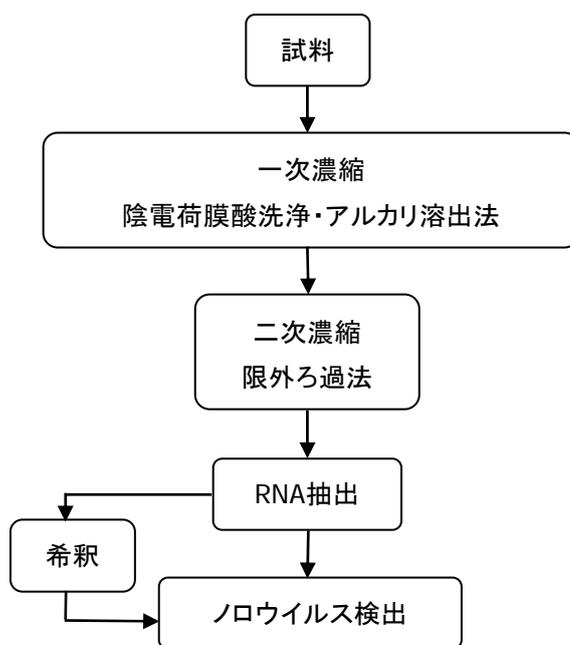


図 1 ノロウイルス検出フロー図

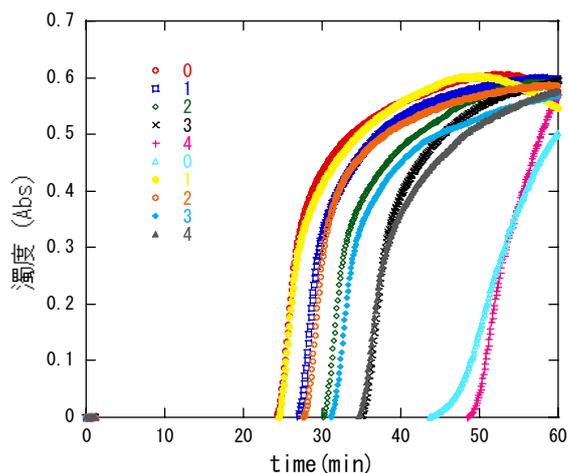


図 2 リアルタイム LAMP おける反応時間と濁度の関係

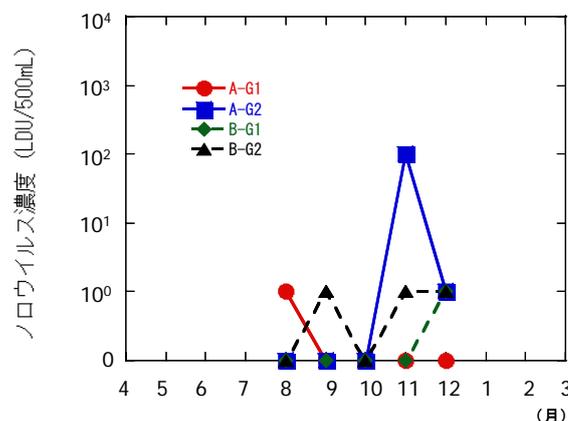


図 3 月毎の NV 調査結果