

VII-23

Enzymatic Virus Elution 法および逆転写-PCR 法による下水汚泥中の腸管系ウイルスの定量的検出

東北大学大学院 学生員○佐野大輔 正会員 福士謙介
正会員 大村達夫

1. はじめに

ポリオウイルスやエンテロウイルスに代表される病原性を持つ腸管系ウイルスは、主に家庭排水を受容する下水処理場から産出される下水汚泥から、他の環境中と比べて高頻度に検出される¹⁾。これらのウイルスは、人間に感染、増殖した後排出されて下水に混入し、下水処理過程において下水汚泥フロックによって捕捉されているものと考えられる。下水汚泥中のウイルスは長期間その感染能力を保持することが知られているので、下水汚泥の廃棄やコンポスト化などの有効利用を行う際、下水汚泥の不適切な取り扱いによってこれらのウイルスによる感染症の流行が起こる可能性がある。この病原ウイルスによる感染症発生のリスクを適正に評価するためには、下水汚泥中のウイルスの数を正確に把握する必要がある。しかしながら、汚泥フロックなどの固形分に吸着しているウイルスを検出する有効な手段が存在しないので、下水汚泥中のウイルスを定量的に検出することは困難であった。

本研究では、汚泥中のウイルスを定量的に検出するための、下水汚泥からの効率的なウイルス誘出方法を確立した。下水汚泥中のウイルスは、疎水性効果や多価陽イオンを介したイオン結合などの引力によって汚泥フロックに捕捉されていると予想される。これらのウイルスを汚泥フロックから液相へ効率的に誘出するために、汚泥フロックを酵素で分解することによってウイルスを吸着せしめている引力を減少させることを試みた。

2. 実験方法

供試ウイルス（ポリオウイルス 1 型）をサンプル汚泥（仙台市内の下水処理場から返送汚泥を採取）に接種し、ウイルスを汚泥に吸着させた。その後遠心分離を行い、ベレットをウイルス誘出液中に分散させて十分混合した。もう一度遠心分離を行い、今度は上清をサンプリングし、上清中に誘出されたウイルスの量を求めた。誘出されたウイルスの、汚泥に接種されたウイルスに対する比を求め、全部で 9 種類のウイルス誘出液の結果を評価した。

9 種類のウイルス誘出液を表 1 に示した。汚泥フロックを加水分解する酵素としては 3 種類（リゾチーム、

表1. 下水汚泥からのウイルス誘出に用いた
ウイルス誘出液

ウイルス 誘出液	使用した酵素（溶媒）
R-1	酵素なし（MC*）
R-2	リゾチーム（MC）
R-3	キモトリプシン（MC）
R-4	パバイン（MC）
R-5	キモトリプシン+パバイン（MC）
R-6	リゾチーム+キモトリプシン（MC）
R-7	リゾチーム+パバイン（MC）
R-8	リゾチーム+キモトリプシン+パバイン（MC）
R-9	10% beef extract solution**

*: MEM (Minimum essential medium) とCER

(cation exchange resin) の混合液、

** : USEPA に採用されているウイルス誘出液

キモトリプシンおよびパバイン）を用いた。リゾチームは細菌細胞壁の構成物質であるペプチドグリカン分解するものである。キモトリプシンとパバインは、汚泥固形分の約 60% を占める蛋白質を分解する酵素（プロテアーゼ）である。二つのプロテアーゼはどちらも比較的広い基質特異性を有しているが、キモトリプシンはタンパク質中の芳香族アミノ酸のカルボキシル基側でペプチド結合をよく切断する傾向があり、パバインにはリジンおよびアルギニンが存在するペプチド結合をよく切断する傾向がある。これらリゾチーム、キモトリプシン、パバインのウイルス誘出液中における活性は、それぞれ 4.7×10^8 , 3.8×10^4 , 1.9×10^4 units l⁻¹ とした。これらの活性は、汚泥フロック中の有機物質（ペプチドグリカンもしくはタンパク質）を分解するのに十分なものである。また、汚泥フロックの分解と誘出されたウイルスの再吸着を防ぐ目的で、陽イオン交換樹脂（CER, IRP-88, SIGMA）を 10 meq l⁻¹ の濃度で添加した。この CER は、汚泥フロックの凝集やウイルスの吸着を促進すると考えられる多価陽イオンを回収するものである。

下水汚泥からのウイルス誘出方法は、USEPA (1992)²⁾ に準拠した。具体的には、はじめにサンプル汚泥 100ml に対し供試ウイルスを約 10² PFU ml⁻¹

表2. ウイルス誘出効率

ウイルス 誘出液	使用した酵素	ウイルス誘出効率 (%)	試行回数
R-1	-	N. D. [§]	2
R-2	lys**	28	3
R-3	chy [†]	2	3
R-4	pa [‡]	25	3
R-5	chy + pa	26	2
R-6	lys + chy	22	3
R-7	lys + pa	29	3
R-8	lys + chy + pa	31	3
R-9*	-	7	2

*: USEPA に採用されているウイルス誘出液, **: リゾチーム

†: キモトリプシン, ‡: パパイン, §: not detected

の濃度で添加し、pH を 3.5 ± 0.1 に調整、0.05M $AlCl_3$ を 1ml 添加してから 30 分間撹拌することによってウイルスを汚泥フロクに吸着させる。遠心分離 (2,500 $\times g$, 15 分) の後のペレットをウイルス誘出液 100ml 中に分散させ、37℃で 30 分間 magnetic stirrer で撹拌した。もう一度遠心分離 (2,500 $\times g$, 30 分) した後、上清をサンプリングし、0.22 μm フィルター (Millipore) でろ過したものをサンプルとした。

サンプル中のウイルスは逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法 (Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) によって検出した。ウイルスの核酸抽出には、A 型肝炎ウイルス用のキット (Sepa-gene RV-R, 三光純薬) を用いた。RT および PCR においても、それぞれのキット (RT, 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV); PCR, PCR master; 共に Boehringer Mannheim) を用いた。それぞれの手順については、キットに付属の取扱説明書に従った。PCR におけるプライマーには、Chapman の E1 と E2³⁾ を用いた。これらのプライマーを用いると、ポリオウイルスからは 194 塩基の増幅産物が得られる。PCR における温度制御は、PCR Thermal cycler model TP-2000 (TAKARA biomedical) によって行った。反応温度は、94℃10 分のあと、94℃1 分、50℃1 分、72℃1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルを行い、次に 72℃15 分、20℃5 分を続けて行った。

PCR 後のサンプルを 1mg l⁻¹ の濃度でエチジウムブロマイドが混合された 1.5% アガロースゲルで電気泳動に供し、その後紫外線を照射して目的 DNA を検出した。定量的結果は最確値法 (3-3-3 法, 上水試験法⁴⁾) により求めた。

ウイルス誘出効率は、以下の式によって算出した。

$$\text{ウイルス誘出率(\%)} = \frac{\text{誘出されたウイルス量 (MPN/ml)}}{\text{汚泥に摂取したウイルス量 (MPN/ml)}} \times 100$$

3. 実験結果

表 2 に、下水汚泥からのウイルス誘出効率を示した。最も高いウイルス誘出効率は、リゾチーム、キモトリプシン、パパインをすべて入れた場合 (R-8) であり、31% に達していたが、R-2、および R-4 から R-7 までの他の誘出液におけるウイルス誘出効率の間に有意な差は存在しなかった (有意水準 0.05 における t 検定)。従って、使用した 3 つの酵素の間には、下水汚泥からのウイルス誘出に対して相乗効果はなかったと言える。

リゾチーム (R-2) とパパイン (R-4) の間にも、有

意水準 0.05 で有意差は検出されなかった。一方、R-9 (10% ビーフエキス溶液, USEPA によって採用されているウイルス誘出液) のウイルス誘出効率は 7% であり、R-2 および R-4 との間には十分な有意差が見られた。R-2 と R-9 との間の有意差は、BGM 細胞を用いたブラック法によるウイルス定量においても確認されている (結果は不掲載)。以上のことから、リゾチームもしくはパパインを用いたウイルス誘出は、USEPA に採用されている方法に比べて約 4 倍のウイルスが下水汚泥から誘出されており、優れた汚泥からのウイルス誘出方法であると言える。

4. 結論

加水分解酵素であるリゾチームもしくはパパインを用いた場合、下水汚泥からのウイルス誘出効率は 25% を越えており、これは USEPA に採用されている方法に比べて約 4 倍のウイルス誘出効率であった。

5. 参考文献

- 1) 矢野ら. 1996. 首都圏で採取した環境水からのウイルス分離状況 (1985-1995). 東京都立衛生研究所研究年報 47 別冊, 265-269.
- 2) USEPA. 1992. Appendix H, Method for the recovery and assay of enteroviruses from sewage sludge, Environmental regulations and technology. EPA/625/R-92/013, 117-145.
- 3) Rotbart, H. A. and Romero J. R. 1995. Laboratory diagnosis of enteroviral infections, chapter 17, Human enterovirus infections, American society of microbiology, 401-418.
- 4) 日本水道協会. 1993. 上水試験法, 475-480.