

Cellulase Enzymatic Virus Elution (CEVE) 法による 下水処理水からの効率的なウイルス回収技術の開発

東北大学 正会員 佐野大輔
同上 学生員 ○今井崇博
同上 正会員 大村達夫

1. はじめに

水環境を汚染するヒト病原ウイルスとしては、冬季に広く被害をもたらして話題となるノロウイルスを筆頭に 100 種を超すウイルスが知られている。これらのヒト病原ウイルスには、他にもエコーウイルス、コクサッキーウイルス、ロタウイルス、エンテロウイルス及びアデノウイルス等が含まれており、これらのウイルスが人に感染した場合には、下痢、嘔吐及び発熱といった症状を引き起こす。

これらの病原ウイルスの感染ルートには河川や海域等の水環境が密接に関係しており、ウイルス感染症被害を未然に防ぐための対策を講ずるには、病原ウイルスの水環境中における動態を明らかにすることが重要である。しかしながら、水環境中に存在する病原ウイルスは非常に低濃度で存在するので、RT-PCR 法やブラック法などを用いたウイルス検出を行う前段階において、数十から数百 L の水サンプルからウイルス濃縮を行う必要がある。現行の主な濃縮法であるポリエチレングリコールによる濃縮は、1 度に濃縮できるサンプル量が 1L 程度であり、ウイルスが強度に希釈された河川や海域から採取したサンプルでは十分なウイルス量を回収できない場合がある。ポリエチレングリコールによる濃縮の他にもフィルターを用いた濃縮方法が用いられているが、フィルターからのウイルス誘出効率が低いことが問題となっており、大量の水環境サンプルから高効率でウイルス濃縮が可能となる技術開発が急務となっている。

以上のような背景から、本研究ではセルロースフィルターと Enzymatic Virus Elution Method¹⁾ (EVE 法) を組み合わせた Cellulase EVE 法 (CEVE 法) を開発した。CEVE 法は、サンプルをセルロースフィルターでろ過し、セルロースフィルターに吸着されたウイルスを加水分解酵素であるセルラーゼを用いて誘出する方法である。EVE 法は物理的な力を加えずにウイルスを回収でき、さらに検出の際に PCR の増幅阻害やブラック法での毒性反応が見られないという特長がある。これまでに EVE 法に関しては、下水汚泥サンプルからのウイルス誘出に対して実績があるが²⁾、水環境サンプルからのウイルス回収に適用した例はない。本研究では、下水処理水からのウイルス濃縮に CEVE 法を用い、その濃縮効率を濃縮サンプル中の大腸菌ファージ濃度により評価したので、その内容を以下にまとめる。

2. 実験方法

2.1 サンプリング

用いた下水処理水試料は 2005 年 12 月から 2006 年 4 月にかけて岩手県内の下水処理場から採取した。この処理場は膜分離活性汚泥法とオキシデーションディッチ法 (以下 OD) の 2 種類の処理方法で流入原水を処理している。採取したサンプルは、OD 処理水及び膜分離活性汚泥処理水である。

2.2 ウイルス濃縮方法

本研究では、CEVE 法による濃縮 (以下 CEVE)、CEVE 法にポリエチレングリコール濃縮を組み合わせた濃縮 (以下 CEVE+P) 及び、原水サンプルを直接ポリエチレングリコール濃縮に供した濃縮法 (以下 PEG) の 3 種類を設定し、各方法の濃縮効率を比較、検討した。

2.2.1 CEVE 法によるウイルス濃縮方法

本研究で考案した CEVE 法は、水サンプルをセルロースフィルターでろ過し、セルロースフィルターを加水分解酵素であるセルラーゼを用いて分解することで、フィルターに吸着したウイルスの誘出を促進する方法である。まずサンプル水 10L をヴァイロソープディスク (Cuno, 64085-03-1MDS-W) でろ過し、ろ過後のフ

表 1 濃縮液中大腸菌ファージ濃度 (PFU/ml)

	OD処理水				膜分離活性汚泥法処理水		
	CEVE	CEVE+P	PEG	原水	CEVE	CEVE+P	原水
Average	3.76×10^2	2.31×10^3	8.00×10^2	2.4	2.57×10^1	2.00×10^2	0.3
SD	1.97×10^2	1.36×10^3	2.81×10^2	1.9	3.09×10^1	2.22×10^2	0.5
Trial number	8	8	5	8	8	8	8

CEVE: CEVE法によるウイルス濃縮

CEVE+P: CEVE法及びポリエチレングリコールによるウイルス濃縮

PEG: ポリエチレングリコールによるウイルス濃縮

フィルターを 100ml のセルラーゼ入り EVE buffer に浸し、手袋を着用した手で 4 回絞った。その後 Magnetic Stirrer で 30 分攪拌し、再度手袋を着用した手でフィルターをよく絞り、残った誘出液をウイルス抽出液とした。

2.2.2 ポリエチレングリコールによる濃縮

CEVE 法で濃縮したサンプル、及び原水サンプル 400ml をそれぞれポリエチレングリコールを用いて濃縮した。CEVE 法で濃縮されたサンプル 100ml、及び原水サンプル 400ml にそれぞれポリエチレングリコール 6000 (Kanto, 32829-02) を 8% (W/V) になるように加え、4℃以下で一晩攪拌後、全量を 9,000×g で 30 分遠心分離した。上清を吸引除去し沈査を 4ml の 0.15M リン酸 buffer (pH 9.0) 中に懸濁させた。その後、懸濁液を 9,000×g で 10 分間遠心分離し、その上清をウイルス抽出液とした。

2.3 ブラック法による大腸菌ファージの定量

濃縮液中の大腸菌ファージ定量には *Salmonella Typhimurium* WG49 を用いたブラック法²⁾を行った。

3. 実験結果及び考察

RT-PCR 法などの分子生物学的手法やブラック法などのファージ定量には定量検出限界が存在するので、ウイルス濃縮においては最終的な濃縮サンプル中のウイルス濃度を高めることが極めて重要である。表 1 に OD 処理水、及び膜分離活性汚泥処理水からの濃縮サンプル中における大腸菌ファージ濃度を示す。OD 処理水中の大腸菌ファージ濃度は 2.4PFU/ml であったが、CEVE+P では 2.31×10^3 PFU/ml まで濃縮された。一方、CEVE における大腸菌ファージ濃度は 3.76×10^2 PFU/ml であり、PEG よりも低い値となった。CEVE はポリエチレングリコールによる濃縮の前処理として行うことが効果的であると言える。膜分離活性汚泥法処理水に関しては、CEVE 及び CEVE+P を行ったところ、原水サンプルの大腸菌ファージ濃度は 0.3PFU/ml と低い値であったが、濃縮サンプル中の大腸菌ファージ濃度はそれぞれ 2.57×10^1 PFU/ml、 2.00×10^2 PFU/ml であった。

CEVE+P は OD 処理水を 960 倍、膜分離活性汚泥法処理水を 660 倍まで濃縮することが可能であり、非常に有効な濃縮方法であると言える。CEVE 法によるセルロースフィルターからのウイルス回収の際には、セルラーゼによるフィルター繊維の分解だけでなく、フィルター表面上におけるウイルス粒子とセルラーゼの競合吸着が生じていると考えられる。ウイルス粒子はフィルター表面に非特異的な吸着によりトラップされているのに対し、セルラーゼはセルロース繊維に対して特異的に吸着することが可能であるため、フィルター表面への吸着はウイルス粒子よりもセルラーゼが優占しうる。この吸着特異性の違いにより、セルラーゼがセルロースフィルター上のウイルス粒子と置換し、その結果ウイルスが効率的に液相へ誘出されることが考えられる。

今回はサンプル試料に下水処理水を用いたが、この濃縮方法はウイルス濃度が強度に希釈されている河川水や海水からのウイルス濃縮にも適用可能であると考えられる。

4. 参考文献

- (1) D. Sano *et al.*, (2003) *Water Res.* **37**: 3490-3498.
- (2) K. A. Mooijman *et al.*, (2002) *J. Virol. Methods*, **103**: 129-136.