

流入下水からのウイルス濃縮手法の比較検討

東北大学大学院 学生員 ○三浦 尚之
東北大学 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 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、ノロウイルスを初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いる¹⁾。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モニタリングすることで、ウイルス性胃腸炎の流行状況の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(図 1)。下水中に存在するウイルスを高感度で検出するためには、試料を効率よく濃縮しなければならない。下水試料の濃縮手法として、陰電荷膜法²⁾やポリエチレングリコール(PEG)沈澱法³⁾、凍結乾燥法⁴⁾等が開発されているが、これらを比較し最適な手法を決定したという報告はなされていない。また濃縮の過程で、ウイルスの検出効率を低下させる要因は现阶段では明らかになっていない。Sano ら⁵⁾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状の試料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。

本研究では、流入下水試料を対象とした既存のウイルス濃縮手法を比較検討し最もウイルス検出効率の良い手法を決定した。さらに濃縮後の下水試料に 3 種の酵素を用いた処理を加えることでウイルス検出効率の向上を試みた。



図 1. 流入下水からのウイルス検出手順

2. 実験方法

2.1. 供試ウイルス及びウイルス添加濃度

ウイルス回収率及び検出濃度の比較には、ポリオウイルス 1 型 Sabin 株(PV1)を用いた。回収率の比較を行う場合は、濃縮前の試料 20~50mL あたり PV1 を 2×10^8 コピー添加した。

2.2. 比較したウイルス濃縮手法

本研究では以下 3 種の濃縮手法のウイルス回収率及びウイルス検出効率を比較した。

(1) PEG 沈澱法：試料 20mL 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, 上清を捨てて得た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, 上清を回収しウイルス濃縮液とした。

(2) 凍結乾燥法：試料 20mL 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) 陰電荷膜法：試料 20mL に塩化マグネシウムを 25mM になるよう添加し, 試料を孔径 0.45µm, 直径 90mm の混合セルロースエステル膜(HAWP09000, MILLIPORE)でろ過した。さらに 0.25mM 硫酸 200mL をろ過した後, 1.0mM 水酸化ナトリウム溶液 10mL で膜からウイルスを誘出し, ウイルス濃縮液とした。

2.3. ウイルス RNA の抽出と定量

2.2 で得た各濃縮液からの PV1 の RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使用した。その後 First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV) (Roche)を用いて逆転写反応を行い, 作成した cDNA を Light Cycler (Roche Applied Science)を用いて定量 PCR 法で定量した。プライマー, プロローブはエンテロウイルス属を対象としたものを用いた⁶⁾。従って, 下水試料中に存在していたエンテロウイルス(EV)の影響を受けずに回収率が得られていることを確認するため, ウ

Key Words : 流入下水, ウイルス濃縮, PEG 沈澱法, 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

ウイルス非添加試料中の EV 濃度も測定した。

2.4.1. 有機物の分解に用いた酵素と緩衝液

酵素の分解対象物質は、下水汚泥と牡蠣に対してそれぞれウイルス回収率改善に有効であったペプチドグリカン⁵⁾、油脂⁷⁾、および糞便の主成分の1つである繊維質とした。各物質の分解にはリゾチーム(ニワトリ卵白由来、最適 pH6.2, Sigma-Aldrich)、リパーゼ(ブタ膵臓由来、最適 pH 4.0-5.0, 和光純薬)、セルラーゼ(黒色アスペルギウス由来、最適 pH 5.0, Sigma-Aldrich)を用いた。また溶媒には、各酵素が活性を保持できる最適 pH 付近で緩衝能を有する緩衝液を選択した。なお、リパーゼは分解対象物質により最適 pH が変化するとされている⁸⁾ため、pH4.4 と pH9.0 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(表1)。

2.4.2. 流入下水を対象とした酵素処理

2.2 で説明した PEG 沈澱法において、ペレットを分散させる溶媒として滅菌超純水の代わりに、2.4.1 の酵素を添加した緩衝液を用いた。ペレットを十分にボルテックスした後、各酵素活性に最適な温度で2時間の酵素処理を行い、その後は既存の手法に従い濃縮液を作成した。

3. 結果と考察

表2に濃縮手法の比較結果を示した。PEG 沈澱法のウイルス回収率が最も大きかった。他の2手法のウイルス回収率が低かった原因として、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うため、これが 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、または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。PV1 非添加試料のウイルス検出濃度は PEG 沈澱法と凍結乾燥法で違いが見られず、2手法の検出感度には差が無いと言える。しかし陰電荷膜法は検出濃度

表1. 有機物の分解に用いた酵素、緩衝液、酵素添加量

酵素	酵素添加量(mg/mL)	緩衝液
リゾチーム	1.00	pH6.2 リン酸緩衝液
リパーゼ	3.50	pH4.4 酢酸緩衝液
		pH9.0 グリシン緩衝液
セルラーゼ	1.46	pH5.0 酢酸緩衝液

表2. 各濃縮手法のウイルス回収率と非添加試料中の EV 検出濃度

濃縮手法	試料数	ウイルス回収率(%)	エンテロウイルス検出濃度(copy/mL)
PEG 沈澱法	12	3.2	4.4x10 ³
凍結乾燥法	12	1.0	3.2x10 ³
陰電荷膜法	6	0.29	非検出

表3. 各酵素のウイルス回収率と非添加試料中の EV 検出濃度

添加した酵素	試料数	ウイルス回収率(%)	エンテロウイルス検出濃度(copy/mL)	
リパーゼ	pH4.4	6	0.32	2.2x10 ³
	pH9.0	6	17	8.9x10 ³
リゾチーム	6	2.8	1.9x10 ²	
セルラーゼ	6	6.0	2.8x10 ²	
酵素無し	6	4.7	1.0x10 ³	

が定量下限値以下であったため、下水試料からのウイルス検出には適していないことが分かった。

表3に、PEG 沈澱法に酵素処理を組み合わせたときの回収率を示した。pH9.0 の緩衝液中でリパーゼを用いて処理したときの回収率が全体の中で最も大きく、酵素処理を行わない場合と比較して 8.9 倍に改善された。また非添加試料の検出濃度も全体の中で最も高かった。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⁵⁾は下水汚泥中のウイルス検出に際し、リゾチームが回収率の向上に効果的であると報告したが、リパーゼについては検討していない。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の pH は、pH9.0 グリシン緩衝液が pH4.4 酢酸緩衝液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。

実験全体の PV1 添加濃度は、回収率が低い手法でも非添加試料の検出濃度の 100 倍以上であったため、試料中に存在していた EV の影響を受けずに回収率を測定できたと言える。

4. おわりに

流入下水中のウイルスの濃縮手法の比較より、PEG 沈澱法が最もウイルス回収率が大きかった。また、PEG 沈澱法での濃縮後にリパーゼと pH9.0 グリシン緩衝液を用いて有機物の分解を行うことで回収率が改善された。従って流入下水からのウイルス検出には、PEG 沈澱法とリパーゼによる処理が有効であると言える。

参考文献

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