

酵素を用いた流入下水からのウイルス誘出手法の比較検討

東北大学

○菅野 未聖

東北大学大学院 正会員

真砂 佳史

東北大学大学院 フェロー会員

大村 達夫

1. はじめに

水中病原微生物を原因とする感染症は、上下水道が整備されたことによって、ほぼ抑圧されたと言っても過言ではない。しかしながら、ノロウイルスのように塩素耐性が強くまた感染力も強い病原ウイルスを原因とする感染症は依然として多数発生している。我が国では現在、「感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律」で感染症発症者数の集計観察や報告が行われている。しかし、このシステムでは感染したが発症しなかった場合や、発症したが病院にかからない場合などの漏れが多数存在しており、正確な感染症発生の把握には至らない部分もある。ウイルス感染症の中でも感染者の糞便中にウイルスが含まれるものについては、下水を監視しウイルスを検出することでより正確な感染症発生の把握を行うことが出来ると考えられる。しかしながら下水からのウイルス回収率は濃縮の過程でウイルス検出効率が低下することが分かっており、環境水中にはごく薄い濃度でしか存在しないウイルスをより効率良く検出することが出来る手法の開発が求められている。

流入下水からのウイルス検出において、下水試料から夾雑物の少ないウイルス試料を得ることは検出率向上のために非常に重要である。村田ら¹⁾によるとポリエチレングリコール(PEG)沈殿法²⁾に加え、酵素を用いたウイルス誘出手法(Enzymatic Virus Elution (EVE)法)を行うことで、下水に含まれるウイルスの検出効率が向上したと報告している。本研究では村田らによる研究で下水からのウイルス回収率が最良であったリパーゼの他に、奥村ら³⁾による牡蠣の中腸腺試料からのウイルス検出効率の高かったアミラーゼ、さらにプロテアーゼを用いたPEG-EVE法によるウイルス検出効率を検討することで、下水からのウイルス回収効率の向上を図った。

2. 実験方法

2. 1. 供試ウイルス及びウイルス添加濃度

ウイルス回収率の比較のため、平成24年1月16日にA浄化センターで採取した下水試料50mLにポリオウイルスI型Sabin株を 5×10^8 copy添加した。

2. 2. PEG沈殿法

試料50 mL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%となるよう加え、4℃で一晩緩やかに攪拌した。次に遠心管に移した試料を $9,000 \times g$, 4℃で30分間遠心分離し、上清を捨てて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 $9,000 \times g$, 4℃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. 3. ウイルスRNAの抽出と定量

濃縮したウイルス試料からQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。実験操作は付属のプロトコルに従った。RNA抽出後、iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)を用いて逆転写反応(RT)を行い、cDNAを作成した。作成したcDNAはSsoFast Probes Supermix (Bio-Rad)を用い、定量PCR法で定量した。使用したプライマーおよびプローブはMonpoehoら⁴⁾によるエンテロウイルス属を対象としたものを用いた。

2. 4. PEG-EVE法

PEG沈殿法で濃縮し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、各酵素活性に適した温度(表1)で1時間酵素処理を行った。

2. 4. 1. 有機物の分解に用いた酵素と緩衝液

酵素の分解対象は、下水(村田ら, 2009)と牡蠣試料(奥村ら, 2008)のそれぞれ対してウイルス回収効率に有効であった油脂、多糖に加え、タンパク質とした。各物質の分解にはリパーゼ(ブタ膵臓由

表 1 各酵素の反応温度

酵素	反応温度
リパーゼ	37℃
α -アミラーゼ	50℃
プロテアーゼK	

表 2 有機物分解に用いた酵素、緩衝液、酵素添加量

酵素	酵素添加量	緩衝液
リパーゼ	0.2 mg	pH9.0 グリシン緩衝液
α -アミラーゼ	0.0375 mg	pH7.5 リン酸緩衝 生理食塩水
プロテアーゼK	0.0023mL	pH8.0 トリス塩酸

表 3 緩衝液と pH

pH	緩衝液
3.0	グリシン-塩酸緩衝液
5.0	クエン酸-リン酸緩衝液
7.0	リン酸緩衝液
9.0	グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液
11.0	リン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液

来，和光純薬，4.4 units/mg，最適 pH9.0)， α -アミラーゼ（枯草菌由来，和光純薬，20 units/mg 以上，最適 pH5.3～9.9)，プロテアーゼ K (QIAGEN, 600 mAU/mL 以上，最適 pH7.5～12) を使用した．また各酵素の溶媒として，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．各酵素の添加量は下水中の SS がすべて対象物質であったと仮定した場合に十分な量とした（表 2）．

2. 5. pH の検討

酵素は加えずに pH の異なる緩衝液を用いてペレットを分散させることでウイルス濃縮液を作成し，2.3.と同様の実験手法で定量を行った．この際用いた緩衝液とその pH を表 3 に示す．

3. 結果と考察

表 4 に各酵素の回収率を示した．プロテアーゼ K で処理したときの回収率が最も大きく，酵素処理を行わない場合の約 2 倍となり，村田らによる報告の中で最も回収率の高かったリパーゼよりも大きな回収率を得た．したがって，流入下水試料からのウイルス検出率の改善に有効な分解対象物は，タンパク質であることが分かった．

表 4 各酵素の回収率

酵素	試料数	ウイルス回収率(%)
リパーゼ	3	0.014
アミラーゼ	3	0.012
プロテアーゼ K	3	0.028
酵素なし	3	0.014

表 5 各 pH での回収率の比較

pH	試料数	ウイルス回収率 (%)
3.0	3	0.10
5.0	3	0.24
7.0	3	検出しなかった
9.0	3	0.23
11.0	3	検出しなかった

表 5 に pH ごとの回収率を示した．pH5.0 および 9.0 で他よりも高い回収率が見られたが，pH7.0，11.0 ではほぼウイルスを検出することが出来なかった．pH11.0 の緩衝液に関しては緩衝液をペレットに注いだ段階で溶液に泡立ちが見られ，ボルテックスした後も他に比べて泡切れが悪かったことから，pH11.0 のような強アルカリ条件においては，ウイルス自体のタンパク質の変成や加水分解が起こったため，ウイルスを回収することが出来なかったと考えられる．またペレットの分散溶媒として pH7.0 のリン酸緩衝液を用いた場合，ウイルスの回収がほぼ全くだけなかったが，その原因は明らかではない．

4. おわりに

プロテアーゼ K を用いた EVE 法を PEG 沈殿法に併せて行い，有機物を分解することで下水試料からのウイルス回収率が改善された．また，pH を弱酸性あるいは弱アルカリ性に変化させることにより，回収率が向上した．

参考文献

- 1) 村田ら，2009，環境工学研究論文集，46，197-204.
- 2) Gillan *et al.*, 1988. *Environmental Microbiology*, 54, 1983-1988.
- 3) 奥村ら，2008，環境工学研究論文集，45，179-186.
- 4) Monpocho *et al.*, 2000, *BioTechniques*, 29, 88-93.