

(31) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討

陶山 明子^{1,2*}・諏訪 守²・鈴木 穰³・尾崎 正明²

¹東和科学株式会社 バイオ技術研究所 (〒739-0046広島県東広島市鏡山3-13-60)

²独立行政法人土木研究所 材料地盤研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

³独立行政法人土木研究所 水環境研究グループ (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

* E-mail: suyamaa@mail.towakagaku.co.jp

リアルタイムRT-PCR法により下水中のノロウイルスを迅速かつ高感度に定量できる手法の確立を目的に、1)下水試料に適したウイルス濃縮法、2) 検出限界値と測定値のばらつきの把握、3) ウイルスRNA抽出に用いる流入下水試料量の最適化、4) 逆転写反応の最適化を各々検討評価しノロウイルス検出効率の向上を試みた。その結果、ウイルス濃縮法ではポリエチレングリコール(PEG)沈殿法による回収率が最も高く、下水試料に適していた。安定した定量値を得るためにはリアルタイムPCR反応溶液あたり10コピー以上の濃度が必要であると考えられた。流入下水からのウイルスRNA抽出において抽出効率に及ぼす試料中のSS量の影響を明らかにした。逆転写反応ではプライマーおよびRNA添加濃度の最適化を図ることで、検出効率を高めることができた。

Key Words : Norovirus, collection and elution methods, real-time RT-PCR, collection ratio, quantitative analysis

1. はじめに

下水処理水が関与した病原微生物による集団感染を未然に防止するため、下水処理水の病原微生物に関する安全性確保が求められている。下水処理水の衛生学的安全性を評価するためには、下水中の極低濃度の病原微生物を、迅速・簡便・安全に検出できる方法の開発と、下水処理過程や環境水中での病原微生物の挙動を解明することが重要である。

特に、急性胃腸炎を引き起こすノロウイルスは、食中毒や水系感染症に起因する病原微生物の一種として近年大きく注目されており、その特徴は以下のとおりである。

- ・直径が38 nm¹⁾の正二十面体のウイルスで、1968年に胃腸炎集団発生の患者から発見された²⁾。
- ・感染したときの主な症状は、下痢、嘔吐、吐気、腹痛、発熱等である。潜伏期間は食後24～48時間で、症状の持続は1～3日程度である³⁾。
- ・60℃、30分の加熱では感染性を失わない⁴⁾。
- ・ノロウイルスに属するウイルスはGenogroup GI (GI)とGenogroup GII (GII)の2つの遺伝子群に分類され、さらにそれぞれは14種と17種の遺伝子型(genotype)に分類さ

れる⁵⁾。

- ・培養細胞および実験動物でウイルスを増やすことができないため、ウイルスを分離して特定する事が困難である⁵⁾。
- ・特に食品に含まれるウイルスを検出することが難しく^{6～8)}、食中毒の原因の究明や感染経路の特定を難しいものとしている。

感染者から排出されるノロウイルスは、様々な経路を通じ環境水中に排出されており、環境水中や下水中における調査が実施されるにつれ、その存在実態が徐々に明らかになりつつある^{9～11)}が、報告事例はまだ少ない。

定量評価の実施にあたっては、細胞培養法による感染性評価ができないことから、現状では分子生物学的手法(リアルタイムRT-PCR法¹²⁾)の活用により行われている。また環境水や下水試料を用いる場合、それらの性状の違いから、ウイルス濃縮や遺伝子抽出、定量検出等の測定工程は多岐に及んでおり、その回収率を含め信頼性に關し系統的に評価された事例は少ない。

本研究ではリアルタイムRT-PCR法により、下水試料中のノロウイルスを、迅速かつ高感度に定量できる手法を確立することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 濃縮方法

モデルウイルスとしてF特異大腸菌RNAファージQ β (NBRC20012)を用いた。ファージQ β は直径25 nmと小さく、一本鎖RNAを遺伝子として持ちエンベロープを持たないという性質がノロウイルスと類似していることからモデルウイルスとして選択した。

下水処理場の流入下水、二次処理水および高度処理水(嫌気-無酸素-好気法と凝集剤添加活性汚泥法の処理水を混合して急速ろ過を行ったもの)に対して既知量のファージQ β を添加し、5つの濃縮方法による回収率の検討をしたものである。得られた濃縮液に含まれるQ β 数は*E. coli* K12(F)株(NBRC13965)を宿主としたブラック法およびリアルタイムRT-PCR法によって測定し、回収率を算出した。

a) セルロース吸着・凝集法¹³⁾

DEAE-セルロースはD-6418(Sigma)を使用した。試料水20 Lを含む容器にスラリー状のDEAE-セルロース10 ml(乾燥重量0.5 g)を添加し、よく攪拌した。これにアニオン系高分子凝集剤10 mlを添加し、よく攪拌してDEAE-セルロースを凝集させた。凝集処理の終了した試料を不織布バッグでろ過してDEAE-セルロースを回収し、10 mlの牛肉エキス溶液(pH 9.5)を添加して15分混合し、ファージQ β を誘出させた。この誘出液を190シリンジフィルター(ナルジェヌンクインターナショナル社製、無界面活性剤セルロースアセテート膜、孔径0.2 μ m)でろ過した後、pH 7.0に補正しファージQ β 濃縮液とした。

b) 陽電荷膜法¹⁴⁾

試料水2 Lに塩酸を添加しpH 3.5に調整した後、AlCl₃溶液(終濃度0.05 mM)を添加し凝集塊を形成させた。これを陽電荷膜IMDS (CUNO)に通してファージQ β を捕捉した後、0.05 Mグリシン緩衝液(pH 11.5)でファージQ β を誘出させた。この誘出液を190シリンジフィルター(ナルジェヌンクインターナショナル社製、無界面活性剤セルロースアセテート膜、孔径0.2 μ m)でろ過した後、pH 7.0に補正しファージQ β 濃縮液とした。

c) 陰電荷膜法¹⁵⁾

試料水2 LにMgCl₂溶液(終濃度50 mM)を添加し、陰電荷膜HA (Millipore製)に通してファージQ β を捕捉した。この膜を希硫酸で洗浄し陽イオンを除去した後、NaOH溶液(pH 10.5)でファージQ β を誘出させた。この誘出液をpH 7.0に補正しファージQ β 濃縮液とした。

d) 超遠心法¹⁶⁾

試料水10 mlを粗遠心(3,000×g、20分)して上清を回収した。この上清を30%ショ糖を入れた遠心管に重層し、160,000×g、2時間遠心分離して沈殿を回収した。沈殿を

RNase-free水に再浮遊させてファージQ β 濃縮液とした。

e) ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法

試料水1 LにPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4 M)を添加して攪拌し完全に溶解させた。4℃で一夜静置した後、10,000×g、30分遠心分離して沈殿を回収し、RNase-free水1 mlに再浮遊させてファージQ β 濃縮液とした。

(2) リアルタイムRT-PCR法によるウイルスの定量

a) ウイルス遺伝子の抽出

ウイルス濃縮液からのウイルスのゲノムRNAの抽出にはQIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN)を使用した。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNase処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit (QIAGEN)を用いてRNAを精製した。

b) リアルタイムRT-PCR法

内部蛍光プローブを用いるTaqMan™ PCR法を用いてウイルスのゲノムRNAを定量した。すなわち上記で抽出したウイルスRNA 1 μ gからランダムプライマー(ヘキサマー)、Omniscript RT Kit (QIAGEN)を用いた逆転写反応によりcDNAを作製し、2 μ lをリアルタイムPCRに供した。リアルタイムPCRはQuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN)を用いて行った。使用したプライマーおよびプローブを表-1に示す。ファージQ β の検出は、片山らの報告¹⁵⁾に準じた。またノロウイルスの検出に用いたプライマー、プローブおよび反応条件は、食安監発第1105001号「ノロウイルスの検出法について」¹⁶⁾に準じた。リアルタイムPCR装置はLightCycler (Roche Diagnostics)を使用した。

(3) ノロウイルス濃度測定の検出限界値と測定値のばらつきの評価

リアルタイムRT-PCR法によるウイルス濃度測定では、低濃度において測定値のばらつきが大きい。下水処理水中のウイルス濃度は低濃度であるため、検出限界値と測定値のばらつきを把握し、検出感度の向上を図る必要がある。また、検出限界値未満の測定値においてもノロウイルスが存在する可能性に留意する必要がある⁶⁾。

検出限界値の検討では、陰性コントロール(水、すな

表-1 使用したプライマーおよびプローブ

対象ウイルス		プライマー		プローブ
ファージQ β		Q β +	Q β -	Q β probe
ノロウイルス	GI型	COG1F	COG1R	RING1-TP(a)とRING1-TP(b)を混合
	GII型	COG2F	COG2RとALFPを混合	RING2AL-TP

わちノロウイルス0コピー)を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイムPCRによる多重測定($n=20$)を行った。さらに実験の結果得られた検出限界値のコピー数のノロウイルス遺伝子(DNA)を用いて同様に多重測定を行った。

定量限界値の検討では、2、5、10コピー/リアルタイムPCR反応液のノロウイルスGI型およびGII型遺伝子(DNA)を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイムPCRによる多重測定($n=18$)を行い、相対標準偏差(RSD)を調べた。

使用したノロウイルス遺伝子(DNA)は、260 nmの吸光度を測定し、次式から濃度を算出した。

$$\text{ノロウイルス遺伝子 (DNA) 濃度 (コピー数/}\mu\text{L)} \\ = [\text{260 nmの吸光度}] \times 50 \times 10^9 \times 6.02 \times 10^{23} / \text{ノロウイルス} \\ \text{遺伝子の塩基数/660}$$

注) 50 : 260nmの吸光度の測定値と二本鎖DNA濃度変換のファクター

660 : 一塩基対の平均分子量 (pg/pmol)

(4) ウイルスRNA抽出に用いる流入下水試料量の最適化

ウイルスRNA抽出に使用しているQIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) では lysis bufferによってウイルス粒子を溶解した後カラムによるRNA回収を行うが、SSの多い試料の場合にはカラムが目詰まりしてRNA回収率が低下することが予想される。本実験では下水処理場の流入下水を対象としてウイルスRNA抽出量をもっとも高くなる試料量を検討した。あらかじめノロウイルスが存在していることを確認した流入下水を試料として使用した。

SS既知(128 mg/L)の流入下水5~500 mlをPEG沈殿法により濃縮し、800 μ lのRNase-free水に再浮遊させた。流入下水500 mlの場合は1.6 mlのRNase-free水に再浮遊させた。ウイルスRNA抽出はQIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) に添付のマニュアルに準じたが、1検体あたりカラムを2本使用した。

ウイルスRNA抽出量の評価は、抽出したウイルスRNAを用いてリアルタイムRT-PCRを行い、ノロウイルス濃度の測定結果から抽出効率を判定した。

(5) 逆転写反応の最適化

リアルタイムRT-PCR法では、ランダムプライマー(ランダムヘキサマー、ランダムノナマーなど)またはオリゴdTプライマーを逆転写反応に使用することができる。使用するプライマーやその添加濃度により逆転写効率は影響を受ける、という報告¹⁷⁾がある。そこで、逆転写効率の向上を目的として、同一試料を用いてプライマー

の種類および濃度の違いによる逆転写反応の効率を評価した。さらに、逆転写反応に関与する逆転写酵素の反応効率を向上させるため、鋳型として添加するウイルスRNA濃度の最適化を検討した。

プライマーの検討実験では、A下水処理場二次処理水から抽出したウイルスRNA 1 μ gと各プライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN)を用いた逆転写反応を行い、cDNAを作製してリアルタイムPCRを行い、ノロウイルス濃度が高いものほど逆転写効率が良いと判定した。プライマーとしてランダムヘキサマー、ランダムノナマーおよびオリゴdTプライマーを用い、各々終濃度1 μ Mあるいは10 μ M添加した。

抽出RNA最適濃度の検討実験では、A下水処理場二次処理水から抽出したRNA 0.05 μ g、0.1 μ g、0.5 μ g、1 μ gとランダムヘキサマー(終濃度1 μ M)、Omniscript RT Kitを用いた逆転写反応によりcDNAを作製し、リアルタイムPCRを行い、ノロウイルス濃度を測定した。

3. 結果および考察

(1) 諸種の濃縮方法によるファージQ β の回収

ファージQ β 量がセルロース吸着・凝集法による回収率に及ぼす影響を検討した。試料水にファージQ β を添加して、乾燥重量0.5 gのDEAE-セルロースを用いて濃縮を行った結果を表2に示す。ファージQ β 添加量が増加する程、セルロース吸着・凝集法による回収率は低下した。その原因として、ファージQ β 添加量(10^6 PFU以上)に対してセルロース担体量が少なかつたためであると考え、セルロース担体量を1 gに増加して回収試験を行った。セルロース添加量とファージQ β 回収率の関係について図-1に示す。セルロース添加量を増やすと回収率は低下した。ファージQ β 誘出液10 mlに対して担体が過剰になり、誘出効率が低下したためと考えられた。

また、誘出時間を長くすることで誘出効率が増加するこ

表2 セルロース吸着・凝集法によるファージQ β の回収率

試料	操作	ファージ数 (PFU/20 L)		
二次処理水	濃縮前	4.8×10^5	2.4×10^6	4.3×10^{11}
	濃縮後	2.7×10^5 [56%]	5.0×10^5 [21%]	2.5×10^{10} [5.9%]
高度処理水	濃縮前	4.0×10^4	2.1×10^6	1.3×10^{12}
	濃縮後	3.9×10^4 [98%]	1.6×10^5 [7.7%]	5.7×10^{10} [4.3%]

[] 内は回収率

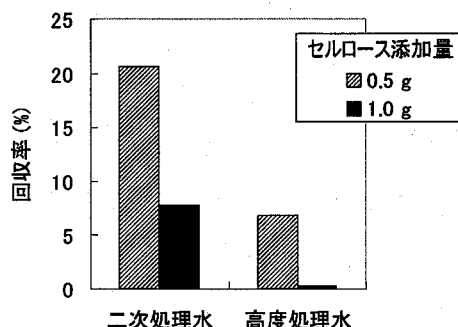


図-1 セルロース添加量とファージ Qβ 回収率の関係
(ファージ Qβ 添加量: 10^6 PFU)

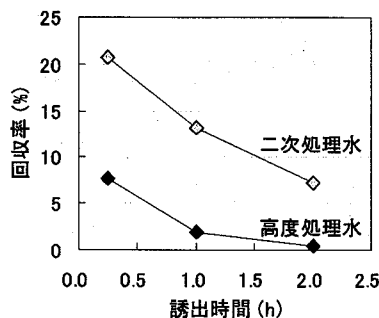


図-2 ファージ Qβ 誘出時間が回収率に及ぼす影響
(ファージ Qβ 添加量: 10^6 PFU, ファージ Qβ 量はブラック法で測定した)

とを予想し、ファージ Qβ 誘出時間が回収率に及ぼす影響を検討した (図-2)。ファージ誘出時間を増加すると、ブラック法で測定した場合の回収率は低下した。しかし、リアルタイム RT-PCR 法で測定した場合の回収率は一定であり、誘出時間の影響は認められなかった。ブラック法で測定した場合の回収率の低下は、pH 9.5 の誘出液に長時間曝されたことによりファージ Qβ の感染力が低下したことに起因すると考えられた。リアルタイム RT-PCR 法ではファージ RNA を検出するため、感染力を失っているファージも検出することから、回収率の低下は認められなかったと推測された。

以上の結果より、ファージ Qβ 量が増加する程、セルロース吸着・凝集法による回収率は低下することが明らかとなった。

次に表-3 にセルロース吸着・凝集法以外の各種ウイルス濃縮方法によるファージ Qβ の回収率を示した。ファージ Qβ は試料水に 10^6 PFU 添加した。

陽電荷膜法および陰電荷膜法においてファージ Qβ の回収率は 0.6 ~ 5.5 % と低かった。この理由として、膜からほとんど誘出できていないこと、若しくは濃縮操作時に酸性またはアルカリ性にさらされることにより宿主への感染力が低下したことが推測される。これらの膜へのファージ吸着率は陰電荷膜法で 95 % 以上、陽電荷膜法で 99 % 以上であったため、誘出操作を改善することで回収率の向上が期待される。

PEG 沈殿法は超遠心法よりも高い回収率を示した。これは PEG を添加することでより低い遠心力で効率良くファージを回収できたことを示している。さらに PEG 沈殿法については、流入下水 200 mL、2 次処理水および高度処理水 1 L に対して、 10^4 、 10^{10} PFU のファージをそれぞれ添加し回収率を検討したが、すべてにおいて 60 % 前後の高い回収率を示した。

したがって、以降の実験では PEG 沈殿法によりウイル

表-3 各種濃縮法によるファージ Qβ の回収率

濃縮法	回収率 (%)		
	流入下水	二次処理水	高度処理水
陽電荷膜法	0.7	23	13
陰電荷膜法	5.5	1.7	0.6
超遠心法	59	30	20
PEG 沈殿法	60	67	84

ス濃縮を行った。

(2) ノロウイルス濃度測定の検出限界値と測定値のばらつきの評価

低濃度試料に対応した安定した測定値を得るために、まずリアルタイム PCR における検出限界値と測定値のばらつきを明らかにした。検出限界値は、ブランク (水、すなわち ノロウイルス 0 コピー) を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイム PCR による多重測定 ($n=20$) を行い、平均測定値、標本標準偏差を求めた。その結果を表-4 に示す。ノロウイルス GI 型検出用プライマーおよびプローブを使用した場合、20 個の測定値のうち 5 個が 0 より大きい値 (0.7695 から 2.607) を示した。ノロウイルス GII 型は、20 個の測定値のうち 15 個が 0 より大きい値 (0.2710 から 2.148) を示した。検出限界値は下水試験方法¹⁸⁾を参照して、以下の式から算出した。

$$xL = x_b + k\sigma_B \quad (k=3)$$

検出限界値 xL 、平均値 x_b 、標準偏差 σ_B

表-4 に示した測定結果から得られた平均値、標準偏差を上式に代入し、ノロウイルス GI 型の検出限界値: 2.63 コピー/リアルタイム PCR 反応液、ノロウイルス GII 型の検出限界値: 2.46 コピー/リアルタイム PCR 反応液、が

表4 陰性コントロール (0 コピー)の多重測定結果 (n=20)

使用したプライマー及び プローブ	測定値平均 (コピー) []内は測定値の範囲	標本標準偏差
ノロウイルス GI 型 検出用	0.375 [0 - 2.607]	0.75
ノロウイルス GII 型 検出用	0.595 [0 - 2.148]	0.62

表5 リアルタイム PCR 法によるノロウイルス遺伝子測定の相対標準偏差(RSD) (n=18)

使用した プライマー及び プローブ	ノロウイルス遺伝子 コピー数 (コピー/リアルタイム PCR 反応液)	標本標準 偏差	RSD (%)
ノロウイルス GI 型 検出用	2	1.71	107
	5	8.63	68
	10	5.53	29
ノロウイルス GII 型 検出用	2	1.18	63
	5	2.24	42
	10	2.71	29

得られた。

検出限界値 (GI型 : 2.63コピー、GII型 : 2.46コピー) を下回るコピー数である2コピーのノロウイルス遺伝子についてリアルタイムPCRによる多重測定 (n=18) を行った結果、測定値が検出限界値より大きい値を示したのはGI型で0個、GII型において1個の測定値だけであった。したがって、検出限界値を下回る数値が出力されるがノロウイルスが存在するという場合にはブランク信号とは区別できないため、不検出と判断した。

次に、測定値のばらつきの評価を行った。2、5、10コピー/リアルタイムPCR反応液のノロウイルスGI型およびGII型遺伝子 (DNA) を用いて、同一人、同一装置、同時測定でリアルタイムPCRによる多重測定 (n=18) を行い、相対標準偏差 (RSD) を算出することで測定値のばらつきを評価した。評価結果を表-5に示す。ノロウイルスGI型およびGII型とも10コピーの場合に最小のRSD値(29%)を示した。ウイルスの定量分析において、リアルタイムRT-PCR法による測定値の信頼性についての統一された判断基準は定まっていない。遺伝子組換え作物の検査においてはリアルタイムPCR法による検査の精度管理ではガイドライン草案での併行精度は25%以下とされており¹⁹⁾、ノロウイルス遺伝子がリアルタイムPCR反応液あたり10コピー存在すると、これらの基準値とほぼ同程度となった。

以上の結果より定性的な評価では26コピー、安定した定量的評価には10コピー以上の濃度が必要であると考え

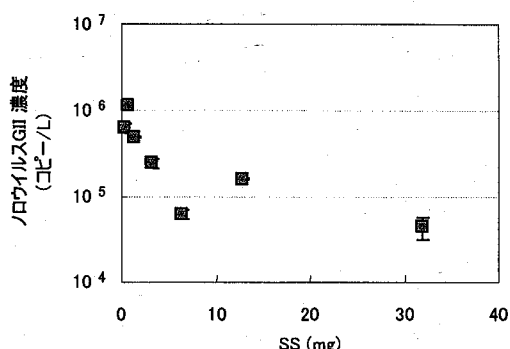


図3 SS 負荷量とノロウイルス検出濃度の関係

えられた。

(3) ノロウイルスRNA抽出に用いる下水試料量の最適化

下水処理場の流入下水を対象としてノロウイルスRNA抽出量が最も高くなる試料量を検討した。あらかじめノロウイルスが存在していることを確認した流入下水を試料として使用した。SS既知(128 mg/L)の流入下水5~500 mlをPEG沈殿法により濃縮しRNase-free水に再浮遊させ、1検体につき2本のカラムを使用してウイルス抽出を行った。抽出カラム1本あたりのSS負荷量は、各々0.32 mg(試料量5 ml)~32 mg(試料500 ml)の範囲であった。SS負荷量とノロウイルス検出濃度の関係について整理したものを図-3に示す。ウイルス検出濃度は10⁴~10⁶コピー/Lとなっており、SS負荷量の増加に伴い、検出濃度は徐々に低下した。SS負荷量が0.32~0.64 mgの範囲であればウイルスの検出濃度は10⁵コピー/L程度であり、大きな低下は見られなかった。ウイルス検出濃度の低下は、カラム中のRNA吸着担体に対して、流入下水中に含まれる様々な夾雑物質がRNAと担体の吸着を阻害するためと考えられる。

PEG沈殿法による濃縮では、SS負荷量の増加がPEG沈殿法における回収率とRNA抽出効率に影響を及ぼしているが、SS負荷量を考慮することで、ウイルス検出濃度に及ぼす影響を回避できるものと考えられた。

(4) 抽出RNAの逆転写効率の向上

リアルタイムRT-PCR法では、ランダムプライマー(ランダムヘキサマー、ランダムノナマーなど)またはオリゴdTプライマーの使用により鋳型RNAの逆転写を行うが、ノロウイルス検出のための最適なプライマーやその添加濃度および抽出RNAの添加濃度は明らかでない。このため、各種プライマーや添加濃度を変え、逆転写反応の効率を評価した。まず、逆転写反応に及ぼすプライ

表6 プライマーが逆転写反応に及ぼす影響

逆転写反応に使用したプライマー 〔 () 内は終濃度〕	ノロウイルス 濃度 (コピー/μL)
ランダムヘキサマー (1 μM)	1.48×10^2
ランダムヘキサマー (10 μM)	3.30×10^2
ランダムノナマー (10 μM)	2.90×10^2
オリゴdTプライマー (1 μM)	2.30×10^1
ランダムヘキサマー (10 μM) + オリゴdTプライマー (1 μM)	3.47×10^1
ランダムノナマー (10 μM) + オリゴdTプライマー (1 μM)	8.83×10^0

マーの影響結果を表6に示す。

ランダムヘキサマーを終濃度1 μM添加した場合はノロウイルスGI型が 1.48×10^2 コピー/μL検出されたが、同一試料を用いてランダムヘキサマーを10倍量(終濃度10 μM)添加して逆転写反応を行った場合、ノロウイルスGI型は 3.30×10^2 コピー/μL検出され、検出感度は約2.2倍向上した。またランダムノナマーを終濃度10 μM添加して逆転写反応を行った場合も 2.90×10^2 コピー/μL検出され、検出感度は約2倍向上した。これは添加量が多いほどランダムプライマーが抽出遺伝子と効率よく結合して逆転写反応を開始できるためであると考えられる。

一方、オリゴdTプライマー(終濃度1 μM)を使用した場合は 2.30×10^1 コピー/μLと16%程度のウイルス量しか検出できなかった。これは、ランダムプライマーを用いた逆転写反応ではRNA分子の数箇所逆転写反応が開始されるが、オリゴdTプライマーを用いると3'末端のみから逆転写反応が開始されるため、反応効率に差が生じたと考えられた。

よって、終濃度10 μMのランダムヘキサマーを逆転写反応に用いることで反応効率が向上ため、検出感度を高めることができた。

次に逆転写酵素の反応基質となる抽出RNA濃度の最適化を検討した。逆転写反応液に添加した抽出RNA濃度とノロウイルス検出濃度との関係を図4に示す。抽出RNAを1.0 μg添加ではノロウイルスGI型は 9.55×10^1 コピー/μL検出されたが、添加する抽出RNAの濃度を0.05 μg、0.1 μg、0.5 μgとした場合、それぞれ 1.02×10^2 コピー/μL、 1.88×10^2 コピー/μL、 4.13×10^2 コピー/μL検出された。抽出RNA濃度の増加に伴い逆転写効率が向上し、抽出RNA濃度0.5 μgで逆転写効率が最大となり1.0 μgでは逆転写効率が低下することが明らかとなった。一般に酵素反応においては基質濃度の増加とともに反応速度が増加する

が、基質濃度が過剰になると反応速度は平衡に達し減少する。逆転写反応も逆転写酵素による酵素反応であるため同様の傾向を示した。

今回の結果から、添加する抽出RNAの最適濃度を0.5 μgとすることで1.0 μgを添加した場合と比較して検出感度は約4.3倍向上させられることを明らかにした。

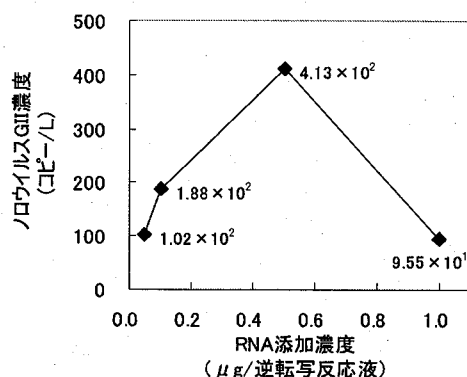


図4 RNA添加濃度とノロウイルス検出濃度との関係

4. まとめ

本研究では、リアルタイムRT-PCR法を利用したノロウイルス定量検出法の確立を目的として各種濃縮方法でのウイルス回収率、検出・定量限界値の把握、流入下水試料量の最適化、逆転写効率の最適化に関し、各々評価検討を行った。以下に得られた結果を示す。

- 1) PEG沈殿法は、他の濃縮方法と比較してウイルス回収率が高く、ウイルス量の変動に対しても安定した回収率が得られた。
- 2) 安定した定量値を得るために必要な遺伝子量は、リアルタイムPCR反応溶液あたり10コピーであると考えられた。
- 3) 流入下水試料をPEG沈殿法により濃縮する場合、SS負荷量の多少により抽出されるRNA量に影響を及ぼすことを明らかにした。
- 4) 逆転写反応に適したプライマーと鋳型RNAの最適添加量を明らかにし、検出効率を高めることができた。

参考文献

- 1) Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad B.V., Estes MK: Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles, *J. Virol.*, Vol. 76, No.8, pp.4044-4055, 2002.
- 2) Kapikian A.Z., Wyatt R.G., Dolin R., Thornhill T.S., Kalica A.R., Chanock

- R.M.: Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *J Virol*, Vol.10, No.5, pp.1075-1081, 1972.
- 3) 武田直和: 序 : ノロウィークウイルス(NV)性下痢症の概要. 日本臨牀, Vol.60, No.6, pp.1138-1142, 2002.
 - 4) Dolin R., Blacklow N.R., DuPont H., Buscho R.F., Wyatt R.G., Kasel J.A., Hornick R., Chanock R.M.: Biological properties of Norwalk agent of acute infectious nonbacterial gastroenteritis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Vol.140, No.2, pp.578-583, 1972.
 - 5) 片山和彦: ノロウイルス感染症, 感染症発生動向調査週報 2004 年第 11 週号, Vol.6, No.11, pp.14-19, 2004.
 - 6) 西尾 治: 厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業 食品中の微生物汚染状況の把握と安全性の評価に関する研究 平成 15 年度総括・分担研究報告書 平成 13~15 年度総合研究報告書, 2004.
 - 7) 野田 衛, 西尾 治, 秋山美穂, 国井悦子, 山本美和子, 藤井彰人, 池田義文, 平崎和孝, 松本 勝, 萩野武雄: 2002/03 年~2003/04 年流行期の市販カキにおけるノロウイルスの定量的汚染調査, 広島市衛生研究所年報, Vol.23, pp.62-69, 2004
 - 8) 野田 衛, 西尾 治, 秋山美穂, 国井悦子, 山本美和子, 藤井彰人, 池田義文, 平崎和孝, 松本 勝, 萩野武雄: ノロウイルス検出率に及ぼすカキ検査個体数の影響, 広島市衛生研究所年報, Vol.23, pp.70-73, 2004
 - 9) 佐野大輔, 植木 洋, 渡辺 徹: 水中病原ウイルスによる水環境汚染の実態, モダンメディア, Vol.52, No.4, pp.23-32, 2006
 - 10) 山本俊夫, 島津智浩, 遠藤善宏, 白石廣行, 影山 努: 宮城県内の牡蠣養殖海域に流入する河川水中のノロウイルスの定量, 水環境学会誌, Vol.28, No.8, pp.515-522, 2005.
 - 11) Haramoto E., Katayama H., Oguma K., and Ohgaki S.: Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, No. 5, pp.2403-2411, 2005
 - 12) Kageyama T., Kojima S., Shinohara M., Uchida K., Fukushi S., Hoshino F.B., Takeda N., Katayama K.: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR, *J. Clin. Microbiol.*, Vol.41, No.4, pp.1548-1557, 2003.
 - 13) Yano, K. et al.: A practical method for the concentration of viruses from water using fibriform DEAE-cellulose and organic coagulant, *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 27, pp.17-21, 1993.
 - 14) 高度処理会議: ウイルスの安全性からみた下水処理水の再生処理法検討マニュアル(案), pp.65-72, 2003.
 - 15) 片山浩之他: 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, Vol. 25, No.8, pp. 469-475, 2002.
 - 16) 食安監発第 1105001 号: ノロウイルスの検出法について
 - 17) (株)キアゲン: リアルタイム PCR 成功のための重要なファクター, (株)キアゲン配布資料, 2002.
 - 18) 下水試験方法上巻 1997 年版, 社団法人日本下水道協会, pp.46-49, 1997
 - 19) 扇谷陽子, 相澤博, 大川一美, 藤田晃三: ラウンドアップ・レディ・大豆の定量PCRによる含有率測定~定量限界の検討~, 札幌市衛研年報, Vol.31, pp.41-47, 2004.

(2006.5.26受付)

Establishment of Norovirus Detection Method from Wastewater Sample

Akiko SUYAMA^{1,2}, Mamoru SUWA², Yutaka SUZUKI³ and Masaaki OZAKI²

¹Towakagaku Co., Ltd.

²Public Works Research Institute, Material and Geotechnical Engineering Research Group

³Public Works Research Institute, Water Environment Research Group

The aim of this study is to adapt techniques of molecular biology (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)) to Norovirus detection methods due to the importance of developing a rapid and highly sensitive method for quantitative detection of Norovirus from wastewater. We evaluated the efficiency of the Norovirus detection method for the following processes: 1) Various collection and elution methods, 2) Clarification of sensitivity and detection limit values, 3) Optimization of the collection sample volume suitable for the sewage influent sample, and 4) Optimization of the reverse transcription efficiency of the extracted Norovirus RNA. From the results, for the polyethylene glycol precipitation method, collection and elution methods were investigated and suitable methods for influent, effluent and tertiary effluent were proposed. In the polyethylene glycol precipitation method of inflow sewage, a high collection ratio was observed at the sample volume of about 10 ml. The reverse transcription efficiency was increased by adjusting the addition concentration of primer and RNA. The concentration of the Norovirus cDNA of a necessary 10 copies per reaction tube to obtain a stable value measured by the real-time RT-PCR method was clarified.