

(24) Enzymatic Virus Elution 法を用いた 流入下水からのウイルス検出技術の開発

村田 有紗^{1*}・真砂 佳史¹・三浦 尚之¹・今井 崇博¹・大村 達夫¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

*E-mail: murata@water.civil.tohoku.ac.jp

濃縮後の下水試料中の有機物に対し、酵素による消化 (Enzymatic Virus Elution 法) を加えることで下水からの高効率なウイルス検出手法を開発した。前処理法として4種のウイルス濃縮法 (ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法、凍結乾燥法、超遠心分離法、陰電荷膜を用いた酸洗浄法) を検討し、3酵素を比較して使用する前処理法および酵素を決定した。その結果、50mLの試料をPEG沈殿法とリパーゼ (pH9.0) を用いたEVE法で処理した場合 (幾何平均値 16%)、従来のPEG沈殿法 (幾何平均値 2.5%) と比較してウイルス回収率が6.4倍向上した。PEG-EVE法は他の手法と比較してウイルス検出効率が良く、操作が比較的簡便でスケールアップも簡単なため、流入下水からのウイルス検出に非常に適した手法であると言える。

Key Words: raw sewage, virus concentration, polyethylene glycol precipitation, Enzymatic Virus Elution method

1. はじめに

近年、ノロウイルスをはじ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いる¹⁾²⁾。日本では、2006年に国立感染症研究所に報告されたウイルス性感染症の分離件数 1,460,095 件のうち、1,000,000 件以上を感染性胃腸炎が占めていた。しかし、このようなウイルス性感染症の発生件数は、指定された全国約 3,000 の小児科定点からの報告にもとづいている³⁾ため、成人の感染者や、感染成立後も症状を呈さない不顕性感染者を検知することができず、実際の感染者数を正確に把握できていないのが現状である。感染性胃腸炎の流行に対する有効な対策を講じるためには、まず感染者数の正確な把握が肝要であることは自明であり、患者検体からの病原微生物分離によらない感染症検知システムの構築は非常に重要である。

感染性胃腸炎の主要な原因である腸管系ウイルスは、感染者の腸管内で増殖し、糞便とともに排出されるため、糞便 1g 中に約 $10^2 \sim 10^6$ コピー⁴⁾と非常に高濃度で含まれることが知られている。糞便とともに排出されたウイルスは、下水道が発達した都市域ではその多くが下水処理場に流入するため、流入下水中のウイルスを測定することによりウイルス性胃腸炎の流行状況を把握することが可能であると考えられる。しかし、下水からのウイルス定量技術は検出感度が低い⁵⁾ため、流入下水からの高効率なウイルス検出手法が求められ

ている。

水試料からのウイルスの検出は大きく分けて培養細胞を用いるプラーク法と、ウイルス遺伝子を検出するPCR法などの分子生物学的手法に大別できる。しかし、感染性胃腸炎の主要な病原ウイルスの一つであるノロウイルスを初めとして培養方法が確立されていないウイルスが多いため、幅広い種のウイルスに共通に適用できる手法としては後者が適していると考えられる。後者の手法では、流入下水からのウイルス検出は試料の濃縮、遺伝子抽出、遺伝子の検出・定量という手順で行われる (図1)。下水試料の濃縮手法としては、陰電荷膜を用いた酸洗浄法⁷⁾やポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法⁸⁾、凍結乾燥法⁹⁾等が開発されている。一般に下水や下水汚泥のような環境試料からのウイルス検出感度は低いことが知られている⁶⁾が、その要因は現段階では明らかになっていない。Sanoら¹⁰⁾は、下水汚泥からのウイルス誘出に際し、酵素を用いて有機物を分解することでウイルス検出効率の向上を図った (Enzymatic Virus Elution (EVE) 法)。これは、下水汚泥の主な構成成分である細菌のペプチドグリカン層をリゾチームで分解し、汚泥フロックに吸着していると考えられるウイルスを液層に誘出する手法である。Sanoら¹⁰⁾によると、リゾチームを用いたEVE法を加えることにより、USEPAが行っている手法のおよそ4倍のウイルス回収率が得られた。この結果は、汚泥中

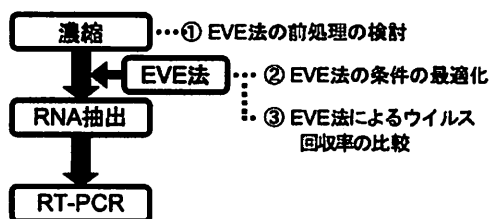


図 1. 流入下水からのウイルス検出手順と本研究の流れ

の有機物がウイルス濃縮や、その後に行う RNA 抽出や PCR の阻害要因となっていることを示唆するものである。そこで、流入下水に関してもウイルス濃縮後のペレットに対し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。

以上より本研究では、EVE 法を用いて流入下水からの高効率なウイルス検出技術の開発を行った。本技術は、試料の濃縮、酵素による有機物消化、遺伝子抽出、定量 PCR からなる (図 1)。この技術を開発するにあたり、初めに既存のウイルス濃縮手法を比較し、EVE 法を適用するための前処理法を決定した。次に、EVE 法に用いる酵素の選択や消化条件の最適化を行い、濃縮したペレットに最適化した EVE 法の処理を加えることでウイルス回収率の向上を図った。また、試料を冷凍保存する必要があったため、試料の凍結融解がウイルス回収率に及ぼす影響についても検討した。

2. 実験方法

(1) 流入下水試料

試料には、平成 20 年 5 月～平成 21 年 2 月の間に国内の A 下水処理場で採取した沈砂池流入水を用いた。試料は柄杓でよく攪拌してから角形フラスコに採取した。なお原則として試料は-20℃で冷凍保存した。

(2) 供試ウイルス

ウイルス回収率や検出濃度を比較するための添加ウイルスとして、ポリオウイルス 1 型 Sabin 株 (PV1) を用いた。ポリオウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される直径約 25nm の 1 本鎖 RNA ウィルスである。形状はノロウイルスと同じ正 20 面体構造をしており、エンベロープは持たない。培養系の確立されていないノロウイルスと異なり、培養により容易に添加ウイルスを得ることができるため、

本研究の添加実験に用いた。

(3) EVE 法の前処理としてのウイルス濃縮手順

EVE 法の処理を加えるためには、下水試料を固形状にするか、前もって濃縮しておく必要がある。本研究では EVE 法の前処理法の候補として、以下の 4 種の濃縮手法を選択した。

a) PEG 沈殿法

試料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℃で 12 時間ゆるやかに攪拌した。次に試料を 9,000×g、4℃で 30 分間遠心分離し、ペレットに滅菌超純水 1mL を加えてボルテックスした。これを 9,000×g、4℃で 10 分間遠心分離した後、上清 1mL をウイルス濃縮液とした。

b) 凍結乾燥法

試料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。

c) 超遠心分離法

試料を 160,000×g で 2 時間超遠心分離して得たペレットに滅菌超純水 1mL を加えて 4℃で 12 時間静置した。その後ペレットをボルテックスで分散させ、これをウイルス濃縮液とした。

d) 陰電荷膜を用いた酸洗浄法

手法は Katayama ら⁷⁾に従った。試料の濾過には、孔径 0.45μm、直径 90mm の混合セルロースエステル膜 (HAWP09000、ミリポア) を用いた。

(4) ウィルス RNA の抽出と定量

(3)で得た各ウイルス濃縮液からの 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 Applied Science) を用いて逆転写反応を行い、作製した cDNA を Light Cycler ST300 (Roche Applied Science) を用いて定量 PCR 法で定量した。プライマー、プローブはエンテロウイルス属を対象としたもの¹⁰⁾を用いた。また、定量 PCR にはライトサイクラー TaqMan マスター (Roche Applied Sciences) を用い、プライマー濃度はそれぞれ 600nM、プローブ濃度は 200nM とした。PCR の温度条件は 95℃10 分の熱変性後、95℃10 秒、54℃20 秒、72℃6 秒、72℃5 秒 (蛍光取得) のサイクルを 50 回繰り返した。

(5) ウィルス添加濃度と回収率の計算

ウイルス回収率の比較を行う実験では、濃縮前の試料に PV1 を約 2×10^6 copies 添加した。正確なウイルス回収率を得るためには、元々試料中に存在していたエ

エンテロウイルス濃度が影響を及ぼさないよう、十分な量の PV1 を添加する必要がある。そのため、ウイルス添加を行った場合の PV1 検出量が非添加試料中のエンテロウイルス検出量の 100 倍以上となるように添加濃度を決定した。添加したウイルス量および下水試料に元々存在していたエンテロウイルス量は、実験の度に上記の方法で定量した。

ウイルス回収率は、操作の過程でウイルスの損失が無く全てのウイルスが定量されたときに PCR チューブ内に含まれる PV1 の copy 数と、実際の定量結果の比で算出した。

(6) EVE 法の手順

(3)の各濃縮法で得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、各酵素活性に最適な温度で 2 時間の酵素処理を行った。その他は上記の手法と同様に処理した。酵素として、下水汚泥¹⁰⁾と牡蠣¹²⁾に対してそれぞれ有効だったリゾチーム（ニワトリ卵白由来、Sigma-Aldrich）とリパーゼ（ブタ膵臓由来、和光純薬）、および糞便の主成分の 1 つである繊維質を分解するセルラーゼ（黒色アスペルギウス由来、Sigma-Aldrich）を用いた。溶媒には、各酵素の最適 pH 付近で緩衝能を有する緩衝液を選択した。リパーゼは分解対象物質により最適 pH が変化する¹³⁾ことから、pH4.4 と pH9.0 の 2 種の緩衝液を用いた。各酵素の添加量は、今回用いた下水中の SS 濃度の実測値（150mg/L）と供試量より試料中の SS 量を算出し、SS 全量が分解対象物質であると仮定した場合でも分解が可能となるように設定した。各酵素の量および用いた緩衝液を表 1 に示す。

(7) 試料の冷凍保存がウイルス回収率に及ぼす影響 および濃縮液中の SS の希釈効果

本研究で使用した試料は採取後すぐに-20℃で冷凍保存した。凍結融解がウイルス回収率に及ぼす影響を調べるため、採取日に冷凍せず速やかに濃縮した試料と、採取日から 1 週間冷凍した後融解した試料 50mL を PEG 沈殿法で濃縮し、RNA 抽出、定量 PCR を行いウイルス回収率を求めた。また、濃縮液の SS 負荷量がウイルス回収率に及ぼす影響を調べるために、RNA 抽出に供する濃縮試料の濃度を、SS 量が 1mg/RNA 抽出カラム、0.1mg/RNA 抽出カラムとなるように滅菌超純水で希釈し、これらについても同様にウイルス回収率を求めた。

(8) EVE 法の前処理法の検討

EVE 法の前処理法である(3)の 4 手法の検出効率を比較するため、PV1 添加流入下水試料からのウイルス

表 1. EVE 法に用いた酵素、酵素添加量、酵素活性、緩衝液

酵素	酵素添加量 (mg/mL)	酵素活性 (unit/mg)	緩衝液
リパーゼ (ブタ膵臓由来)	3.5	25.9	酢酸緩衝液 (pH4.4) グリシン 緩衝液 (pH9.0)
リゾチーム (ニワトリ卵白由来)	1.0	50,000	リン酸緩衝液 (pH6.2)
セルラーゼ (黒色アスペルギウス由来)	146	0.57	酢酸緩衝液 (pH5.0)

回収率を求めた。超遠心分離法は機器の制約上最大で 20mL までしか濃縮できなかったため、全ての手法で濃縮する試料の量を 20mL とした。

(9) EVE 法に用いる酵素と緩衝液の決定

(6)で挙げた 3 種の酵素を比較するため、PV1 添加下水試料を、下水からの検出法として最も広く用いられている PEG 沈殿法で濃縮し、各酵素で処理した場合のウイルス回収率を求めた。酵素による分解の効果を明確にするため、試料の量を 50mL に増やした。

(10) 各前処理手法への EVE 法の適用

(9)で最も効果的だった酵素および緩衝液を用い、各濃縮手法に EVE 法を組み合わせた時のウイルス回収率を求めた。試料の量は超遠心分離法に合わせ 20mL とした。なお、陰電荷膜を用いた酸洗浄法は回収率が低く、また操作過程でペレットを生成しないため除外した。

(11) 回収率の比較

(7), (8), (9), (10)で得た回収率の比較には、ノンパラメトリックな検定法である Wilcoxon の順位検定、Steel 法および Steel-Dwass 法を用いた。有意水準は 5% とした。

3. 結果および考察

(1) 試料の冷凍保存がウイルス回収率に及ぼす影響

表 2 に、冷凍なしの下水試料と 1 週間冷凍保存後に融解させた試料を PEG 沈殿法で濃縮した時のウイルス回収率を示した。冷凍せずに濃縮した試料のウイルス回収率が幾何平均値 3.4% であったのに対し、1 週間

冷凍した試料のウイルス回収率は幾何平均値 11% となり、冷凍保存すると 3.2 倍回収率の有意な向上が見られた ($P<0.05$)。試料を冷凍することでウイルス回収率が向上する理由として、ウイルスが吸着していた試料中の有機物に含まれていた水分が凍結することで体積が増加し、融解した際に固形分を破壊してウイルス粒子を液相に放出したことが考えられる。また、RNA 抽出カラムあたりに含まれる SS の量を 1mg、0.1mg とするように希釈した試料では、冷凍した試料と冷凍しなかった試料とのウイルス回収率を比較してそれぞれ 4.2 倍、5.8 倍の差がみられ ($P<0.05$)、冷凍試料の濃縮液は希釈倍率が大いほど回収率が向上することが示された。陶山ら¹⁴⁾は、RNA 抽出に供する濃縮液の SS 負荷量の増加に伴いウイルス検出効率が低下することを示し、原因の一つとして試料中の夾雑物が RNA 抽出の阻害になることを挙げている。したがって、濃縮液を希釈することで凍結融解により細くなった有機物も共に希釈されたため、RNA 抽出阻害が低減されウイルス回収率の向上につながったと考えられる。しかし、濃縮液を希釈することによりウイルス検出量は減るため、検出感度は低下する。そのため、検出効率の観点からは、実試料からのウイルス検出を行う場合には濃縮液の希釈は行わない方が良いと言える。

(2) EVE 法の前処理としての濃縮手法の比較

図 2 に、本研究で検討した 4 つの前処理手法で 20mL の下水試料をそれぞれ濃縮した場合のウイルス回収率を示す。4 手法の中では超遠心分離法の回収率が幾何平均値 34% と最も高かった ($P<0.05$)。この手法では、遠心分離によりほぼ全てのウイルス粒子をペレットに回収できるため、高い回収率が得られたと考えられる。また、遠心分離で沈殿しない分子量の小さな有機物や、水溶性の物質が上清とともに除去されるため、RNA 抽出や PCR の阻害も低減されたと考えられる。凍結乾燥法も全てのウイルスをペレット中に濃縮することができるが、下水中に含まれる揮発性の物質を除く全ての物質をウイルスと共に濃縮してしまうため、RNA 抽出や PCR で阻害を引き起こしたと考えられる。また陰電荷膜を用いた酸洗浄法は、下水中のフロックに吸着したウイルス粒子がアルカリ洗出の際孔径 $0.45\mu\text{m}$ の膜を通り抜けられなかったか、または濃縮液に回収された有機物が RNA 抽出や PCR を阻害した可能性が考えられる。PEG 沈殿法は、1 回目の遠心分離後の上清中にウイルスが存在しないことは確認してあるため、ペレット分散後の 2 回目の遠心分離で十分にペレットからウイルス粒子を分離回収できていなかったか、2 度目の遠心分離で得た上清中の物質が RNA 抽出や PCR を阻害した可能性が考えられる。

表 2. 冷凍保存がウイルス回収率に及ぼす影響。

試料	n	ウイルス回収率%		
		希釈無し (SS2.3mg/抽出 カラムに相当)	SS1mg /抽出カラム	SS0.1mg /抽出カラム
冷凍無し	3	3.4 (1.5)	3.8 (1.6)	3.1 (1.2)
冷凍	3	11 (0.4)	16 (0.2)	18 (0.2)

()内は幾何標準偏差。

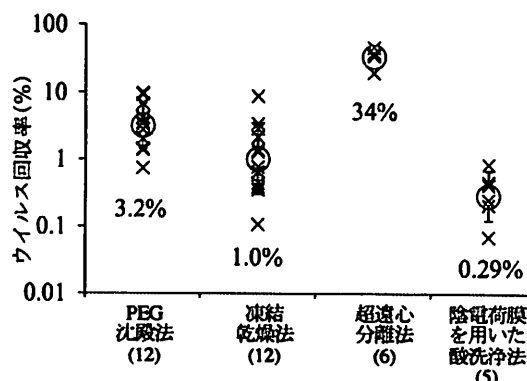


図 2. 下水試料 20mL に対する濃縮回収率の比較。() 内は試料数, ×はウイルス回収率, ○は幾何平均値, エラーバーの長さは幾何標準偏差を示す。

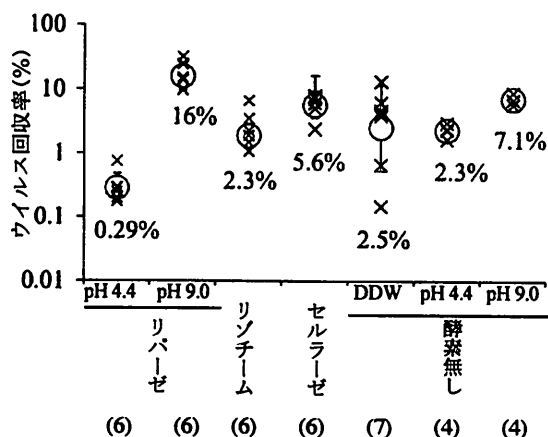


図 3. 下水試料 50mL から PEG 沈殿法で得たペレットに対する EVE 法に使用する酵素の比較。緩衝液の pH の比較。() 内は試料数, ×はウイルス回収率, ○は幾何平均値, エラーバーの長さは幾何標準偏差を示す。

(3) EVE 法の条件の最適化

図 3 に、50mL の試料を PEG 沈殿法のみで濃縮した場合と、PEG 沈殿法に 3 種の酵素を用いた EVE 法を組み合わせた場合のウイルス回収率を示す。pH9.0 の

緩衝液中でリパーゼを用いてペレットを処理した場合のみウイルス回収率が有意に向上し ($P<0.05$, 幾何平均値 16%), PEG 沈殿法のみでウイルス濃縮を行った場合 (同 2.5%) の 6.4 倍であった。このことより、PEG 沈殿法による濃縮試料において、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ることが示唆された。

Sano ら¹⁰⁾は汚泥からのウイルス誘出にはリゾチームがもっとも有効に働いたと報告したが、本研究の結果からは、流入下水からのウイルス誘出には効果が見られなかった。活性汚泥由来の細菌が多く含まれている汚泥と比較して、流入下水中では細菌濃度が低いいためこのような違いが見られたと考えられる。また、Sano ら¹⁰⁾はリパーゼによる EVE 法については検討していないことから、汚泥からのウイルス検出にもリパーゼによる油脂の分解が効果的である可能性もある。

リパーゼと共に用いる緩衝液については、pH9.0 (同 16%) ではウイルス回収率の改善に寄与したのに対し、pH4.4 では回収率の幾何平均値が 0.29%と PEG 沈殿法よりも低かった。ペレットを分散させる緩衝液の pH の違いによる回収率への影響を確認するために、リパーゼを添加しない各緩衝液中に PEG 沈殿法で得たペレットを分散させてウイルス回収率を評価したところ、ウイルス回収率は pH4.4 の酢酸緩衝液 (同 2.3%) と中性の滅菌超純水 (同 2.5%) では同程度であったのに対し、pH9.0 のグリシン緩衝液では 7.1%となった。ウイルス濃縮液の溶媒としてアルカリ性のグリシン緩衝液を用いる手法は存在する¹⁵⁾が、PEG 沈殿法の溶媒としては PBS (pH7.4) や超純水が用いられる例も多い。しかし、これらの溶媒を比較した報告は著者の知る限り存在しない。本研究より、通常の PEG 沈殿法のペレットを分散させる溶媒としてグリシン緩衝液 (pH9.0) を用いることで回収率が向上することが示された。

(4) 各濃縮手法への EVE 法の適用

図 4 に、陰電荷膜を用いた酸洗浄法以外の 3 つの前処理手法で試料 20mL から得たペレットに対しリパーゼ (pH9.0) による EVE 法の処理を行った時の操作全体のウイルス回収率を示す。PEG 沈殿法では(2)と同様にウイルス回収率の有意な改善が見られた ($P<0.05$) が、凍結乾燥法と超遠心分離法は、共に EVE 法を組み合わせることによりウイルス回収率が低下した。PEG 沈殿法で濃縮した試料に対して EVE 法が効果的に働いた理由として、リパーゼによる油脂の分解によりペレット中に残っていたウイルスの誘出が促進され、2 回目の遠心分離の際上清に回収されるウイルス量が多くなったためであると考えられる。また、他の 2 手法では EVE 法で用いたリパーゼが RNA 抽出に供する試

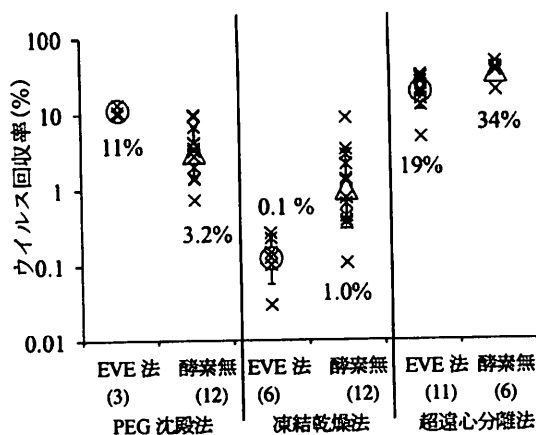


図 4. 試料 20mL に対し各濃縮手法にリパーゼを用いた EVE 法を組み合わせた時のウイルス回収率の比較。○内は試料数, ×はウイルス回収率, ○は EVE 法を組み合わせた場合の回収率の幾何平均値, △は EVE 法を組み合わせない場合の回収率の幾何平均値 (比較のため図 2 を再掲), エラーバーの長さは幾何標準偏差を示す。

料中に存在しているのに対し、PEG 沈殿法では 2 回目の遠心分離により水に溶けないリパーゼを除去することができる。したがって、超遠心分離法や凍結乾燥法にリパーゼを用いた EVE 法を追加することで回収率が低下したのは、リパーゼが RNA 抽出を阻害していたためである可能性が考えられる。

(5) ウイルス検出効率の比較

(1)の結果より、20mL の試料の濃縮には超遠心分離法を単独で用いると最も高い回収率が得られることが分かった。しかし、当研究室の超遠心分離機では 20mL 以上の試料に対して適用できないという制限があった。一方 50mL の試料に対しては、PEG 沈殿法にリパーゼを用いた EVE 法 (PEG-EVE 法) を pH9.0 の条件で行うことで高い回収率が得られた。そこで、試料 20mL に対する超遠心分離法と試料 50mL に対する PEG-EVE 法の検出感度を比較した。定量下限値 10copies/PCR tube に相当する下水中のウイルス濃度を本研究で得た回収率を加味して算出した結果、超遠心分離法 (試料 20mL) では 5.0×10^2 copies/mL, PEG-EVE 法 (試料 50mL) では 4.3×10^2 copies/mL となり、後者の方がウイルスの定量下限値が低いことが分かった。また、超遠心分離法の供試量を増やすのは機器の制約上難しいが、PEG-EVE 法は簡単にスケールアップをすることが可能である。さらに、PEG 沈殿法の操作は簡便な上に、特殊な装置を必要としないことから、超遠心分離法に比べ実用性が高い手法であると言える。以上より、ウイルス検出効率と実用性のどちらの面でも、

流入下水からのウイルス検出にはリパーゼおよびグリシン緩衝液 (pH9.0) を用いた PEG-EVE 法が良いことが示された。

4. 結論

本研究では、流入下水からの高効率なウイルス検出手法である PEG-EVE 法を新たに開発した。従来の手法で濃縮した下水試料 50mL に対し酵素による消化処理を追加した結果、PEG 沈殿法で得たペレットに対しリパーゼを用いた消化処理 (pH 9.0) を加えると、ウイルス回収率は 16% となり、現在下水からのウイルス検出に広く用いられている PEG 沈殿法と比較して回収率が 6.4 倍に改善された ($P < 0.05$)。また、EVE 法の処理を加えるのに最も適していた前処理法は PEG 沈殿法であった。PEG-EVE 法は、他の手法と比べて検出感度が最も優れていただけでなく、スケールアップが容易であることや、操作が簡便であるという利点もある。従って本研究で開発したリパーゼを用いた PEG-EVE 法は、これまで検出感度が低いとされていた下水からのウイルス検出技術として非常に適した手法であるといえる。

謝辞：本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費補助金（基盤研究 (S)、課題番号 19106009）および文部科学省の科学技術振興調整費戦略的研究拠点育成事業「サステイナビリティ学連携研究機構構想」の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Inouye S., Yamashita K., Yamadera S., Yoshikawa M., Kato N., and Okabe N.: Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents, *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 181, pp. 270-274, 2000.
- 2) Manula L., Kalso S., von Bonsdorff C. H. and Ponka A.: Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak, *Epidemiology and Infection*, Vol. 132, pp. 737-743, 2004.
- 3) Kim S.H., Cheon D.S., Kim J.H., Lee D.H., Jheoung W.H., Heo Y.J., Chung H.M., Jee Y. and Lee J.S.: Outbreaks of Gastroenteritis That Occurred during School Excursions in Korea Were Associated with Several Waterborne Strains of Norovirus, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.43, pp.4836-4839, 2005.
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター：IDWR 年別一覧表, <http://idsc.nih.go.jp/idwry/data/report-Jb.html>, 2007.
- 5) Chan M. C.W., Sung J. J.Y., Lam R. K. Y., Chan, P. K. S., Lee N. L. S., Lai R. W. M. and Leung W. K.: Fecal Viral Load and Norovirus associated Gastroenteritis, *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 12, pp. 1278-1280, 2006.
- 6) Shieh Y.S.C., Wait D., Tai L. and Sobsey M. D.: Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by polymerase chain reaction, *Journal of Virological Methods*, Vol. 54, pp.51-66, 1995.
- 7) Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S.: Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, pp.1033-1039, 2002.
- 8) Gillan D. L. and Theodore G. M.: Polyethylene Glycol Precipitation for Recovery of Pathogenic Viruses, Including Hepatitis A Virus and Human Rotavirus, from Oyster, Water, and Sediment Samples, *Environmental Microbiology*, Vol. 54, pp. 1983-1988, 1988.
- 9) Gajardo R., Bouchriti N., Pinto R. M. and Bosch A.: Genotyping of Rotaviruses Isolated from Sewage, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.61, pp.3460-3462, 1995.
- 10) Sano D., Fukushi K., Yoshida Y. and Omura T.: Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR, *Water Research*, Vol. 37, pp. 3490-3498, 2003.
- 11) Monpocho S., Dehee A., Mignotte B., Schwarzbrod L., Marechal V., Nicolas J. C., Billaud S. and Ferre V.: Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-qPCR, *BioTechniques*, Vol. 29, pp. 88-93, 2000.
- 12) 奥村千恵, 真砂佳史, 佐野大輔, 植木洋, 大村達夫: Enzymatic Virus Elution 法によるカキ中腸腺からのウイルス誘出技術の開発, 環境工学論文集, Vol.45, pp. 179-186, 2008.
- 13) 八木龍彦: 酵素ハンドブック, 第 3 版, 朝倉書店, pp.514-515, 2008.
- 14) 陶山明子, 諏訪守, 鈴木稔, 尾崎正明: 下水試料からのノロウイルス定量法の検討, 環境工学論文集, Vol.43, pp. 255-261, 2006.
- 15) Landry F.E., Vaughn M. J., Thomas Z. M. and Vical J. T.: Efficiency of Beef Extract for the Recovery of Poliovirus from Wastewater Effluents, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.36, pp.544-548, 1978.

(2009.5.22 受付)

Enzymatic Virus Elution Method for Detection of Enteric Viruses in Raw Sewage

Arisa MURATA¹, Yoshifumi MASAGO¹, Takayuki MIURA¹,
Takahiro IMAI¹ and Tatsuo OMURA¹

¹ Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

A new method for viruses recovery from raw sewage, which is consisted of virus concentration followed by virus elution by enzymatic virus elution (EVE) method, was developed. Four virus concentration methods (polyethylene glycol (PEG) precipitation, ultracentrifugation, freeze drying and negatively-charged membrane filtration method) and three enzymes (lysozyme, lipase and cellulase) were evaluated for pellet preparation and EVE method, respectively. PEG precipitation followed by digestion with lipase at pH 9.0 was the most effective for recovering viruses from raw sewage, which showed 6.4 times higher recovery (geometric mean = 16 %, n = 6) than that of conventional PEG method. (geometric mean = 2.5 %, n = 7) Since the PEG-EVE method does not need any additional instruments or specific skills, this method can be applied as a standard method for enteric viruses in raw sewage.