

B-47 リアルタイムLAMP法とリアルタイムPCR法によるノロウイルスの検出

○成松 将吾^{1*}・米加田 徹²・伊丹 利明³・岩切 章⁴・
山本 正悟⁴・片山 浩之⁵・鈴木 祥広⁶

¹宮崎大学大学院工学研究科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

²宮崎大学大学院農学工学総合研究科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

³宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

⁴宮崎県衛生環境研究所 (〒889-2155 宮崎県宮崎市学園木花台西2-3-2)

⁵東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1)

⁶宮崎大学工学部 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

* E-mail: tgc710u@student.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

ノロウイルス (Norovirus, NV) は、直径 27~40nm であり、小型球形ウイルス (SRSV) またはノーウォーク様ウイルスと呼ばれ、主に冬期に流行する胃腸炎や食中毒の主な原因ウイルスとなっている。NV はヒトのふん便を排出源として、下水、河川水、さらには海水からも検出された事例が報告されている¹⁾。しかしながら、これら環境水中には NV は希薄濃度でしか存在しないため、NV の遺伝子解析による検出あるいは定量の前処理として、サンプルの高濃度濃縮が必要となる。したがって、検出までに至る過程において労力を必要とし、下水処理場や河川等の水域の連続モニタリングによる NV 調査は困難となる場合が多い。ところが最近になって、簡便かつ高効率に環境水から NV を濃縮する方法が開発され²⁾、排水、特定水源や水域の NV 調査が可能になりつつある。

そこで本研究では、ヒトの尿が絶えず集水される下水処理場の下水流入水を調査対象とし、前処理法には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³⁾、NV の検出方法には新規の遺伝子増幅法である Real time Reverse Transcription - Loop-mediated Isothermal Amplification (リアルタイム RT-LAMP) 法を用いて、簡便な NV モニタリング手法について検討した。また、現在 NV の検出法として一般的に用いられているリアルタイム PCR 法との検出感度の比較を行った。

2. 材料と実験方法

(1) 流入下水の採水と濃縮²⁾

2つの下水処理場から流入下水を採水した。サンプリング期間は2007年8月~2008年7月の12カ月とした。流入下水は採水後直ちに実験室に持ち帰り実験に供した。流入下水は、目あい500 μ mのメッシュでろ過して大型の浮遊物や夾雑物等を取り除き、これを実験用原水とした。下水試料は500mlとして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によって、NVを濃縮回収した。試料500mlに濃度が25mMになるように塩化マグネシウムを添加した。カチオンのイオンを添加された陰電荷のメンブランフィルター (90nm, セルロース混合エステル膜, HA type pore size 0.45 μ m) を用いて吸引ろ過し、フィルターにウイルスを吸着させた。つづいて、酸で洗浄するため、pH3に調整した希硫酸200mlをフィルターに通水した。ろ過ユニットに滅菌済み試験管を装着して、pH10.5の水酸化ナトリウム20mlを注ぎ、吸引してろ液を試験管に回収した。試料を速やかにpH調整するため、ろ液を回収する試験管には、あらかじめ0.1Mの硫酸100 μ lと100倍TEバッファー200 μ lを添加した。得られた20mlの溶離液は、さらに限外ろ過チューブ(Centrprep YM-50, Millipore)を用いて約1.75mlに濃縮した。この濃縮サンプル水から高純度RNA抽出キット (High Pure RNA Tissue Kit, Roche) を用いてRNAを抽出した。

(2) リアルタイムLAMP法によるNVの検出

NV-G IおよびG II検出試薬キット（栄研化学社製）を用いてRNA抽出液を調整した。NV-G IおよびG IIタイプそれぞれのプライマーを用いてRT-LAMP反応を行い、反応時に副産物として生産されるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物）の濁度によってNV-G IまたはG IIが検出される。検出はLoopampリアルタイム濁度測定装置（LA-200, TERAMECS）で行った。反応温度63℃で反応時間60分以内に濁度が0.1度以上に増加した試料をウイルス検出の陽性と判定した。また、エンドポイントの0.1度に到達するまでに要した時間（min）をThreshold time（T_h）と定義した。濃度は500ml濃縮サンプルを10⁰～10⁴段階で希釈を行い、陽性検出の下限値の希釈区を検出限界値としてLDU（LAMP detectable units）/500mlと定義して表すことにした。それぞれの希釈濃度について2連で検出を行い、本研究では二つのサンプルのうち一つでも検出された場合、陽性と判定した。

(3) リアルタイムPCR法によるNVの検出³

500ml濃縮サンプルを10⁰～10⁴希釈したサンプルをLAMP法にて検出した後、同一の希釈サンプルを用いてリアルタイムPCR法でも検出を行った。RT反応調整液を加えサーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems）にてcDNAを得た。NV-G IおよびG IIタイプ各種プライマーおよびプローブを用いて、リアルタイムPCR装置（7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems）で検出を行った。検出感度の比較は2007年11月～2008年3月まで行った。また、NVは10コピー以上の増幅が認められたものを陽性と判定した。

(4) ろ過と未ろ過の下水中のNV検出

NVの環境水中での存在形態が、懸濁物質付着か単独な状態で存在しているのか調査を行った。2つの下水

処理場から採水した流入下水を目あい500μmのメッシュでろ過したのち、GF/C（孔径12μm, Whatman）ろ紙でろ過し、懸濁物質を除去した。回収したろ液（以下、ろ過下水とする）200μlを、5℃と25℃の培養庫で24時間振とうさせた。各サンプルからRNA抽出し、リアルタイムPCR法で検出を行いコピー数を求めた。また、GF/Cろ過しなかった下水（未ろ過下水）についても並行して実験を行い、コピー数を比較した。同様の実験を3回繰り返した。

3. 結果・考察

(1) リアルタイムLAMP法によるNV検出

2つの下水処理場（A処理場、B処理場）から流入下水を採水して検出を行った。図1にリアルタイムLAMP法による下水中のNV検出結果を示す。A処理場ではG Iタイプ（A-G I）が1月～4月に高濃度に検出された。特に2月、3月は10² LDU/500mlとG Iタイプが高濃度に存在していることが分かった。また、G IIタイプ（A-G II）は11月に10² LDU/500mlと高濃度に検出された。B処理場では、G Iタイプ（B-G I）がA処理場と同様に1月～4月に高濃度に検出され、2月、3月に10² LDU/500mlと高濃度にG Iタイプが存在していることがわかった。G IIタイプ（B-G II）は、10² LDU/500mlと高濃度に検出された月はなかったが、10⁰ LDU/500ml、すなわちRNA抽出原液では頻りに検出された。

(2) リアルタイムLAMP法とリアルタイムPCR法の検出感度の比較

リアルタイムPCR法による下水処理場でのNV検出の結果を図2に示す。2007年11月～2008年3月において比較を行った。G Iタイプは、A処理場での12月のサ

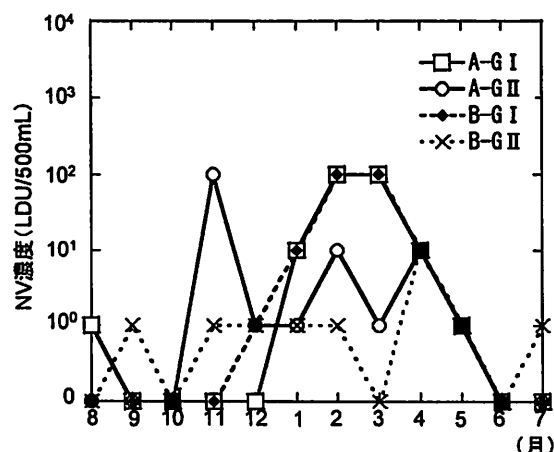


図1 リアルタイムLAMP法による下水中のNV検出

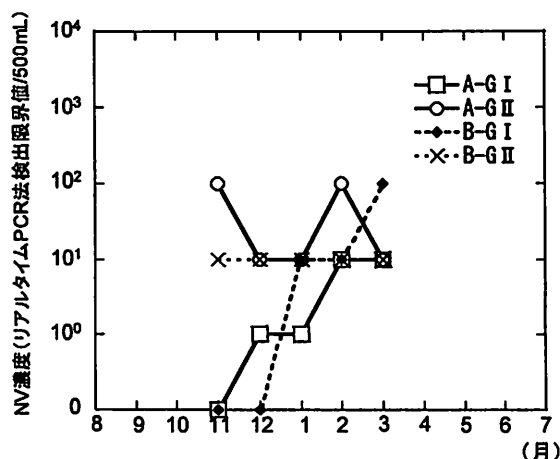


図2 リアルタイムPCR法による下水中のNV検出

サンプルを除き、すべてのサンプルでリアルタイム LAMP 法がリアルタイム PCR 法と比較して、10 倍検出限界値が高いか、もしくは同等の検出限界値を示した。一方で GII タイプは A 処理場での 11 月のサンプルを除き、すべてのサンプルで、リアルタイム PCR 法がリアルタイム LAMP 法と比較して 10 倍高い検出限界値を示した。

(3) NV コピー数と Tt との相関性の検討

リアルタイム LAMP 法での NV 検出試薬キット付属の Positive Control (PC) 希釈の実験によって、PC 希釈濃度と Tt との間に、相関性が見られることが分かっている⁹⁾。そこで、本研究で使用した流入下水サンプルを対象として、リアルタイム PCR 法の検出による NV コピー数とリアルタイム LAMP 法の検出による Tt との関係について検討した。図 3 に NV コピー数と Tt との関係を示す。GI タイプ、GII タイプともに、NV コピー数が多い場合 Tt は短く、NV コピー数が少ない場合には Tt が長いといった傾向がみられたものの、その相関係数は GI、GII それぞれ、 $R=0.350$ 、 $R=0.230$ と低い結果となった。

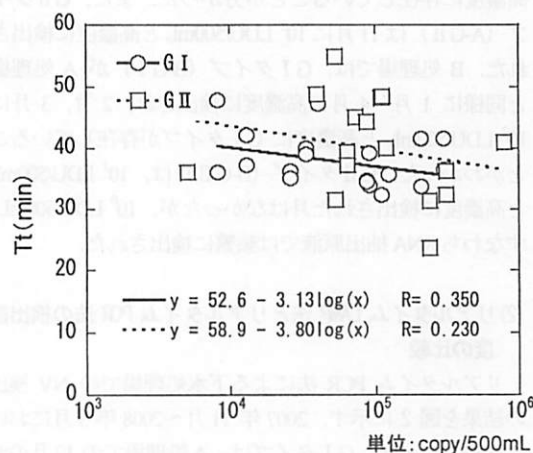


図 4 NV コピー数と Tt の関係

(4) ろ過と未ろ過の下水中の NV 検出

ろ過と未ろ過の試料を、それぞれ 5℃ と 25℃ で 24 時間振とうさせた後、リアルタイム PCR 法で NV の検出を行った。図 4 に、5℃ と 25℃ の各温度において、未ろ過下水から検出された NV のコピー数を 100% としたときの、ろ過下水から検出された NV のコピー数の比率を示している。ろ過と未ろ過の試料で比較した結果、5℃ と 25℃ のいずれもろ過下水のサンプルから高濃度に検出された。またろ過下水は、25℃ よりも 5℃ において高濃度に存在していた。以上のことから、NV は水域中に単独な状態で存在しているか、少なくともろ過孔径 1.2 μm 以下の懸濁物質に付着している可能性が示唆された。また、24 時

間振とうさせたろ過サンプルは、25℃ よりも 5℃ で高濃度に存在していた。

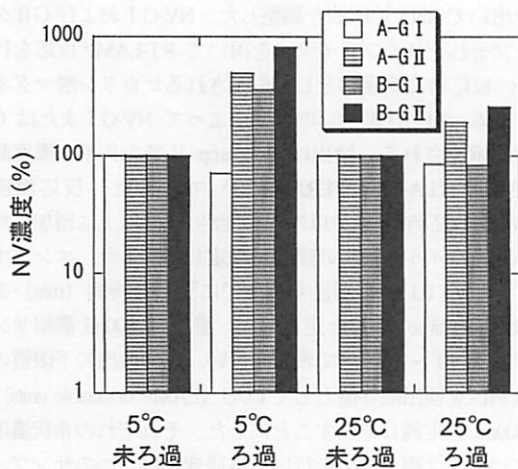


図 4 ろ過と未ろ過の下水中の NV 検出

4. まとめ

流入下水から、冬期にかけて 10^1 LDU/500mL 以上と NV が高濃度に検出された。NV は冬期に流行しやすいことが知られており⁹⁾、本研究の NV 調査は類似した傾向を示した。リアルタイム LAMP 法により、簡便に NV モニタリングが可能である。リアルタイム LAMP 法とリアルタイム PCR 法の検出感度比較より、リアルタイム LAMP 法は GI タイプで、リアルタイム PCR 法は GII タイプで、それぞれ感度が高かった。NV は水域中に単独な状態で存在しているか、少なくともろ過孔径 1.2 μm 以下の懸濁物質に付着している可能性が示唆された。また、NV は、24 時間振とうさせたろ過サンプルは、25℃ よりも 5℃ で高濃度に存在していた。

参考文献

- 1) 片山浩之:水環境および飲料水におけるノロウイルス汚染, 水環境学会誌, Vol.29, pp.135-138, 2006.
- 2) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎: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, pp.469-475, 2002.
- 3) <http://www.mhlw.go.jp/> (厚生労働省) .
- 4) Suzuki, Y., Narimatsu, S., Furukawa, T., Mekata, T., Kano, T., Sakai, M., Itami, T. and Katayama, H: Removal of Noroviruses from Municipal Wastewater by Foam separation using Dispersed Air-Bubbles and Surface-Active Substance. Separation Science and Technology, Vol.3385, 2008. 印刷中.
- 5) <http://www.nih.go.jp/niid/> (国立感染症研究所) .