

B-44 低濃度試料における ノロウイルス検出感度の向上に関する検討

○安井 宣仁^{1*}・桜井 健介¹・岡本 誠一郎¹・諏訪 守¹

¹独立行政法人土壌研究所つくば中央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)

* E-mail: yasui55@pwri.go.jp

1. はじめに

現在の都市における水利用システムは大量取水、大量排水の「一過型」であるといえ、今後予想される水資源の量的不足と質的悪化に対応するためにも「新たな水利用システム」の開発を行う必要がある¹⁾。その一つとして下水処理水の再利用システムが挙げられる。下水処理水の再利用に関しては、特に処理工程における腸管系ウイルスの挙動が重要であるが、これらは十分に把握されていない²⁾。腸管系ウイルスの中でも、近年、感染症が多発しているノロウイルス (以下、NVという) が評価対象ウイルスの一つとして挙げられる。

NVは培養細胞や実験動物で増殖する手法が確立されていない³⁾。現行ではNVの検出定量にはリアルタイムRT-PCR法が主に用いられており⁴⁾、下水試料、患者糞便、カキなどの食品からNVを検出する様々な方法が検討されている⁵⁾。しかしながら、下水処理水の再生水 (以下、再生水という) などのウイルス低濃度試料からNVを定量する場合、検出法の制約からリアルタイムRT-PCR法では定量下限値が高くなり安定した定量値が得られない可能性がある。

今後、再生水の利用拡大が期待される中、的確に再生水の病原微生物リスクを評価する上で低濃度試料におけるNV検出感度の向上が必要である。

本報告では、既報⁶⁾の下水試料における最適化された定量手法に加え、検出感度の向上を目的にビーズ粉砕処理による前処理、リアルタイムPCR反応における反応量の影響および微生物添加による各手法について評価を行った。

2. 実験方法

(1) NVの定量方法

NVの濃縮および濃縮液のRNA抽出、逆転写反応までの工程は既報の文献⁷⁾に従った。濃縮方法はポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法とし、濃縮液中のウイルス

RNA抽出はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)を用い抽出し、DNase処理を行い、RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN)によりRNAを精製した。精製したRNA試料0.5μgをOmniscript RT Kit (QIAGEN)とRandom Primer(Promega)を用い全量20μLの系で逆転写を行いcDNA溶液を得た。得られたcDNAを2μLまたは10μLをリアルタイムPCRに供し、全量20μLまたは100μLの系でNVG1群(NVG1)、NVG2群(NVG2)の定量を行った。プライマー、プローブおよびリアルタイムPCR反応条件は文献⁸⁾に従った。リアルタイムPCR装置はLightCycler DX400 (Roche Diagnostics社製)を用いた。安定した定量値を得るために、定量下限値はリアルタイムPCR実測値が10copies/tubeとした⁹⁾。測定は1検体2回測定を行い平均値を定量値とし、濃縮倍率を考慮しIL中のNVコピー数とした。

(2) 試料

NV検出感度向上の構築のため、NVが通年検出されるA処理場の流入下水を試料水とし、ウイルス低濃度試料として河川水 (A川, B川)、湖沼水 (C湖, D湖)の環境水も用いた。

(3) ビーズ粉砕処理による前処理の検討

濃縮試料中からウイルスRNAの抽出効率を向上させるため、RNA抽出の前処理方法としてビーズ粉砕処理を評価した。FastRNA® Pro Soil-Direct Kit (MP-Biomedicals)に添付されているRNApro Soil Lysis SolutionおよびLysing Matrix E tube (ビーズ入りチューブ)を用い、濃縮後試料をチューブに供し粉砕処理を行い、ビーズ粉砕工程と通常工程の違いによるNV定量値を比較した。実験には2010年5月、6月に採水した環境水を用いた。

(4) リアルタイムPCR反応量の変化による 検出感度の影響

実験には7月に採水したA, B河川水, C湖沼水を用いた。これらの試料は、20μLのPCR反応系における通常の測定工程による測定結果で、全てNVG1が定量下限値以下となった試料である。これらの試料の測定において、

リアルタイムPCRに供する量を通常の20μLから10μLに増加させ、PCR反応容量を20μL系から100μL系に変更させることで、NVの検出感度の影響について検討した。

(5) 微生物添加による検出感度向上に関する検討

本検討では試料中に添加した微生物へのウイルス付着効果により濃縮効率を高め、検出感度向上の有無を評価した。実験には、NVが確実に存在しかつ原生動物や他の微生物が影響しない状態の水が必要となるため、流入下水を0.2μmのメンブレンフィルターでろ過した試料を用いた。使用微生物種は文献¹⁰で用いられた*Klebsiella oxytoca*株(ATCC 13182株)、環境水中にも多く存在する*Pseudomonas aeruginosa*株(ATCC 10145株)とした。予め24時間培養させた純菌株の高濃度溶液0.55mLを550mLの試料に投入し24時間培養後、通常の方法で濃縮、RNA抽出を行いNVを定量した。各微生物の培養温度は*Klebsiella*株が37°C、*Pseudomonas*株は30°Cとした。また、比較対照としての微生物未添加試料では4°C、30°C、37°Cで24時間保存後にNVの定量を行った。微生物投入時ならびに24時間培養後の微生物濃度は寒地培地を利用した平板培地法にて測定を行った。

微生物添加および未添加試料のNV定量値の差を把握するために1検体5回測定し、統計的手法により有意差を判定した。

3. 実験結果および考察

(1) ビーズ粉碎処理による前処理の検討

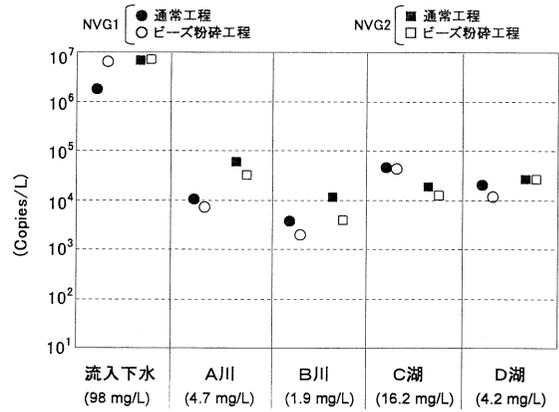
ビーズ粉碎処理の有無によるNV検出濃度の測定結果について図-1に示す。流入下水はビーズ粉碎の前処理を行うことで、通常工程と比較してNVG1は定量値が約3.6倍増加し検出感度が向上したがNVG2では顕著な向上効果が確認されなかった。

環境水ではビーズ粉碎処理を行ってもNVG1、NVG2とも定量値に顕著な向上効果が確認されなかった。これは、流入下水などの比較的SS濃度が高い試料の場合には、ビーズ粉碎の前処理を行うことでSSに付着したウイルスの分離効率が高まるが、環境水などはSS濃度が流入下水よりも低濃度であることから、検出濃度の向上効果に差が現れたものと推定された。なおNVG1とNVG2の検出感度の違いについては、今後の検討課題とする。

(2) リアルタイムPCR反応量の変化による

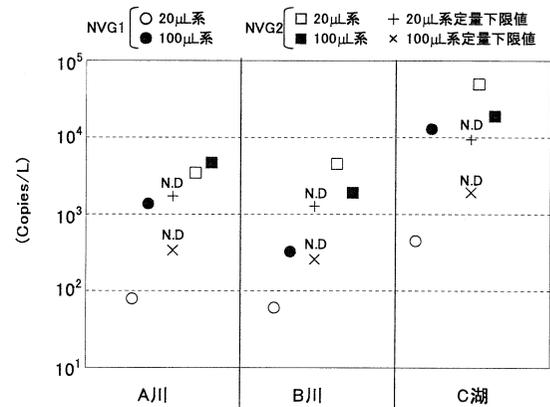
検出感度の影響

図-2にNVの定量結果を示す。20μL系ではNVG1はすべての試料で定量下限値以下（PCR実測値が10copies/20μL以下）であったが100μL系に拡張することで約30～60copies/100μLとなり検出感度が3～5倍程度向上した。NVG2は双方の反応系で検出され、20μL系から100μL系にリアルタイムPCR反応量を増やしても定量値に顕著な



*括弧内の値は試料のSS濃度を示す。

図-1 ビーズ粉碎処理の有無によるNV検出濃度の違い



N.D. 定量下限値 (PCR実測値=10copies/tube未満)

定量下限値 (Copies/L)

20μL系 A川: 1.7×10³, B川: 1.3×10³, C湖: 9.5×10²

100μL系 A川: 3.4×10², B川: 2.6×10², C湖: 1.9×10²

図-2 20μL系と100μL系でのNV検出濃度の違い

差が確認されなかった。このことからNVG1などが比較的低濃度試料の測定においては、100μL系とすることで定量値が得やすくなるものと考えられた。また、通常のリアルタイムPCR反応量の20μL系で定量下限値となる試料に対して、反応量を100μL系にすることで定量下限値を小さくできることから、不検出と評価されたデータの信頼性の向上に繋がるものと考えられる。

(3) 微生物添加による検出感度向上に関する検討

微生物投入時の各微生物濃度は、*Klebsiella*が1.4×10⁵(CFU/mL)、*Pseudomonas*が6.0×10⁵(CFU/mL)、24時間後の濃度は*Klebsiella*が4.5×10⁶(CFU/mL)、*Pseudomonas*が3.5×10⁶(CFU/mL)であったことから、24時間培養で微生物が増殖していることが確認された。また使用した流入下水のNVG1、NVG2の濃度は4.2×10⁵(copies/L)、2.8×10⁵(copies/L)であった。

図-3にNVG1, NVG2の濃度を示す。図中のプロットは5回測定の実験値を示している。各々の検出濃度に有意な差があるか統計的手法により判定を行った。まず、微生物の培養温度がウイルスの定量値に与える影響を把握するため、4-37℃、24時間で保存した試料（微生物未添加試料）のウイルス濃度を測定した。Kruskal-Wallis検定（ノンパラメトリック法）により、有意水準5%でNVG1（統計量 $H=12.5>5.78$, $P<0.05$ ）、NVG2（統計量 $H=9.98>5.78$, $P<0.05$ ）の双方とも差が認められた。従って、保存温度の違いによりNVG1, NVG2の定量値に影響を及ぼすことが示唆された。次に微生物添加試料と未添加試料との差を統計的手法により評価した。一般的に微生物等の分析を行う際、採水後直ちに分析が行えない場合、試料を4℃で保存するため、4℃保存した微生物未添加試料のデータと比較した。Mann-Whitney検定（ノンパラメトリック法）により、Pseudomonasを添加した試料の場合、有意水準5%（統計量 $U=0<2$, $p<0.05$ ）でNV定量値に差があることが示唆され、検出感度向上の有効な前処理になりうる可能性があるものと考えられた。Klebsiellaを添加した試料では、有意水準5%（統計量 $U=5>2$, $P>0.05$ ）であり、微生物未添加試料と比較しNV定量値に差がないと考えられた。

なお、本検討においては、試料をろ過したほぼ純粋系での実験であり、ろ過によるNV検出濃度の減少が見られたことから、他の微生物の混在系による評価を加える必要がある。

4. まとめ

本報告では、下水試料における最適化された定量手法に加え、NV検出感度の向上を目的にビーズ粉碎処理による前処理、リアルタイムPCR反応における試料量の影響および微生物添加による各手法について評価を行った。得られた結果を以下に示す。

- RNA抽出時において、ビーズ粉碎の前処理を行った結果、比較的SS濃度の高い流入下水では通常工程と比較してNVG1は定量値が約3.6倍増加し検出感度が向上したが、環境水のようなSS濃度が低い試料では、有効でない可能性が示された。
- 低濃度試料の測定においては、PCRの反応容量を20μL系から100μL系とすることで定量値が得やすくなるものと考えられた。また、100μL系とすることで定量下限値を小さくできることから、不検出と評価されたデータの信頼性の向上に繋がるものと考えられる。
- 濃縮の前処理法としてPseudomonas株の添加は、NVの検出感度向上の有効的な手法になりうる可能性があるものと考えられた。

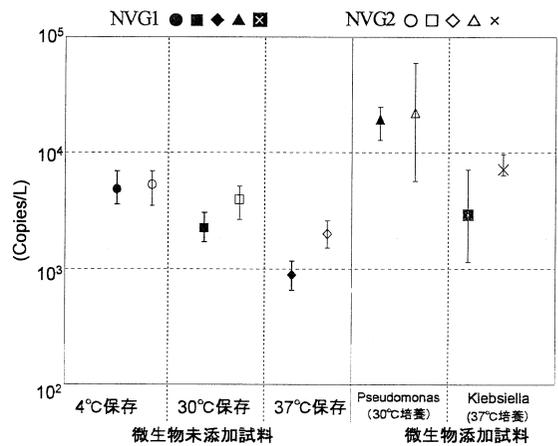


図-3 微生物未添加・添加時のNV検出濃度変化

参考文献

- 1) 田中弘明, 21世紀都市代謝系としての下水道への期待 (2009) 新都市, Vol.63, No.9, pp.16-22
- 2) 下水道におけるウイルス対策に関する調査委員会報告書 (2010)
- 3) 片山和彦 (2004) 感染発症動向調査週報, 国立感染症研究所, 第11号
- 4) Kagayama T, Kojima M, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino F.B., Takeda N, and Katayama K. (2003) Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, Journal of Clinical Microbiology, Vol.41, No.4, pp.1548-1557
- 5) 福田伸治, 桑山勝, 高尾信一, 島津幸枝, 宮崎佳都夫 (2004) 最確法を用いたカキのノロウイルスの遺伝子の定量, 広島県保健環境センター研究報告, No.12, pp.33-36
- 6) Aoki Y, Suto A, Mizuta K, Ahiko T, Osaka K and Matsuzaki Y. (2010), Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients, Journal of Hospital Infection, Vol.75, No.1, pp.42-46
- 7) 諏訪守, 岡本誠一郎, 桜井健介 (2010) ノロウイルスの除去率に及ぼす下水処理法の影響因子, 下水道協会誌, 日本下水道協会, vol.47, No.571, pp.103-111
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2007) ノロウイルスの検出法について
- 9) 陶山明子, 諏訪守, 鈴木穰, 尾崎正明 (2006) 下水試料からのノロウイルス定量法の検討, 環境工学研究論文集, 土木学会, 第43巻, pp.255-261
- 10) 秋葉哲哉, 田中達也, 新井輝義, 林志直, 森功次, 野口やよい, 永野美由紀, 吉田靖子, 矢野一好 (2008) 細菌添加培養処理によるカキなどからのノロウイルス検出率の向上, 食品衛生学誌, 日本食品衛生学会, Vol.49, No.6 pp.407-410

謝辞：本研究の一部は独立行政法人科学技術振興機構、CREST 戦略的創造研究推進事業「21世紀型都市水循環系の構築のための水再生技術の開発と評価」の助成を受けて実施した。