

「セルロース吸着・凝集法」による水中ノロウイルスの検出実験

林 志直, 秋場 哲哉, 森 功次, 野口やよい, 永野 美由紀, 新開 敬行, 仲真 晶子, 矢野 一好

「セルロース吸着・凝集法」による水中ノロウイルスの検出実験

林 志直*, 秋場 哲哉*, 森 功次*, 野口やよい*, 永野 美由紀*, 新開 敬行*, 仲真 晶子*, 矢野 一好**

「セルロース吸着・凝集法」が水中のノロウイルス検出に適用可能か否かについて実験的に検討した。患者ふん便から検出されたノロウイルスGII/4を純水に添加し、DEAE-セルロースに吸着させた。ウイルス吸着率は86.8%であった。ビーフエキストラクト、グリシン緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液によるウイルス誘出率を比較すると、それぞれ81.9%, 82.2%, 96.2%, 96.6%であった。吸着率・誘出率ともに水中のノロウイルス検出に適用する良好な結果であった。

キーワード：ノロウイルス、DEAE-セルロース、水

はじめに

ノロウイルス(*Norovirus:NoV*)は乳幼児から高齢者まで幅広い年齢層に感染し、嘔吐・下痢・腹痛等の胃腸炎症状を示す。ヒトからヒトへの直接感染の他に、ウイルスに汚染された食品や水に起因する集団事例も発生しているが、水からのノロウイルス検査法は定まっていない。当センターでは水中ウイルスの検査法として「セルロース吸着・凝集法」¹⁾を開発し、採水現場での簡便な検体処理を可能とした。今回は、この方法を水中のノロウイルス検出に適用することを試みたので報告する。

材料と方法

1. ウイルス

2008年4月に都内で発生した胃腸炎集団事例の患者ふん便から検出されたNoVを使用した。ウイルスが検出された患者糞便の10%乳剤をリン酸緩衝液(日本製薬)により作製し、3,000 rpm 10分の遠心分離上清をノロウイルス液とした。ウイルス液に含まれる遺伝子コピー数は 1.8×10^9 コピー/mLであり、ウイルスのカプシッド領域の遺伝子型²⁾はGII/4であった。

2. DEAE - セルロース

水中ウイルスの吸着剤として陰イオン交換体であるDEAE - セルロース(関東化学)を使用した。このセルロースはあらかじめ酸・アルカリ処理により活性化した¹⁾。

3. 高分子凝集剤

ウイルスが吸着したセルロースを凝集させるためにアニオン系高分子凝集剤T212(市川毛織)を使用した。凝集剤は純水で0.02%に調製し、試料水に対する添加量は200 ppmとした¹⁾。

4. 試料水

実験には、純水装置(ミリポアMilli-Q A10)で作製した

純水を使用した。

5. ウイルス誘出液

4種類のウイルス誘出液を作製した。ビーフエキストラクト誘出液は、ビーフエキストラクト(Difco)を純水で5%濃度に溶解し、塩化ナトリウムを1%濃度に添加後、水酸化ナトリウム溶液でpH値を9.0に補正したのち滅菌し4°Cで保存した。グリシン緩衝液(pH 9)は、0.1Mグリシン溶液と0.1 M NaOHを4:1の割合で混合し、塩化ナトリウムを1%の割合に添加した。ホウ酸緩衝液(pH 9)は、0.1 Mホウ酸溶液と0.1 M塩化カリウム溶液の等量混合液63 mLに対して、0.1 M炭酸ナトリウム溶液37 mLを混合し、塩化ナトリウムを1%の割合で添加した。炭酸緩衝液(pH 9)は、0.1 M炭酸水素ナトリウム溶液と0.05 M 炭酸ナトリウムを9:1の割合で混合し、塩化ナトリウムを1%の割合に添加して調製した。緩衝液の作製に用いた試薬は、和光純薬製品を用いた。

6. DEAE - セルロースによるウイルスの吸着・誘出

ウイルス吸着・誘出実験は、矢野らの方法¹⁾で行った。DEAE - セルロースを0.03%に加えた純水49 mLに、ノロウイルス液1 mLと凝集剤(200 ppm)を加えた後に混和した。試料を3,000 rpm, 10分間遠心分離後に上清100 μ Lを採取し、添加ウイルス遺伝子量と遠心上清中のウイルス遺伝子量の差をウイルス吸着量とした。

ウイルスを吸着させたDEAE - セルロースを、遠心分離によって沈殿物として得た。上清を除去し、4種類のウイルス誘出液を50 mLずつ加えて良く攪拌した後に、再度遠心分離して上清中に誘出したウイルス遺伝子量を測定し、「誘出ウイルス量/吸着ウイルス量」をウイルス誘出率として算出した。

7. NoV遺伝子の定量

NoV遺伝子の定量は、厚生労働省通知法(平成15年11月5

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部

日付食安監発第1105001号) のリアルタイムPCR法³⁾により実施した。

結果と考察

ウイルス吸着率は81.9%から92.6%の範囲にあり、平均86.8%であった(表1)。この値は、矢野らが精製水とポリオウイルスを用いた実験での吸着率82.5%とほぼ一致した。したがって、「セルロース吸着・凝集法」は、水中のノロウイルスをセルロース担体に効率よく捕捉できることが明らかとなった。

ウイルス誘出実験では、純水(陰性対象)と4種類の誘出液それぞれ3試料ずつ合計15試料について実験を行った。対照とした純水によるウイルス誘出は全く認められなかったが、4種類のウイルス誘出液によるウイルス誘出率は72.7%から110.3%に分布した。誘出液それぞれの平均値はビーフエキストラクト81.9%、グリシン緩衝液82.2%、ホウ酸緩衝液96.2%、炭酸緩衝液96.6%であった。どの誘出液を用いても約80%以上のウイルス誘出率であったが、最も良好な誘出率を示したのは炭酸緩衝液であった(表2)。したがって、「セルロース吸着・凝集法」による水中からのノロウイルス検出には、炭酸緩衝液をウイルス誘出液に用いるのが良

表1. ノロウイルスを用いたウイルス吸着実験

No.	未吸着ウイルス量 コピー数 $n \times 10^7 / \text{mL}$	吸着率 (%)
1	12.5	86.3
2	7.7	91.5
3	14.3	84.2
4	8.8	90.3
5	9.5	89.6
6	6.7	92.6
7	6.7	92.6
8	16.5	81.9
9	16.5	81.9
10	13.4	85.3
11	16.5	81.9
12	8.2	90.9
13	15.4	83.1
14	15.4	83.1
15	12.5	86.3

平均吸着率：86.8%

添加ウイルス量： 1.8×10^9 コピー / mL

表2. 4種類の誘出液によるウイルス誘出率の比較

No.	誘出液	誘出ウイルス量 コピー数 $n \times 10^8 / \text{mL}$	誘出率 (%)	平均値 (%)
1		<10	—	
2	陰性対照： 純水	<10	—	—
3		<10	—	
4		6.1	78.0	
5	ビーフ エキストラクト	6.1	78.0	81.9
6		7.1	89.6	
7		6.1	78.0	
8	グリシン 緩衝液	5.7	72.7	82.2
9		7.6	96.0	
10		7.1	89.6	
11	ホウ酸 緩衝液	8.1	102.9	96.2
12		7.6	96.0	
13		8.7	110.3	
14	炭酸 緩衝液	6.6	83.6	96.6
15		7.6	96.0	

いことが示された。

今回は「セルロース吸着・凝集法」について50 mLの実験スケールで評価を行った。水に含まれる実際のウイルス量は実験スケールに比べてはるかに少ないことから、今後20 L程度まで試料水量を増やし、かつウイルス量も少なくして評価を行う必要がある。実験スケールではあるが、「セルロース吸着・凝集法」による水中のノロウイルス検出は十分可能であると考えられた。

文献

- 1) 矢野一好, 吉田靖子, 新開敬行, 他: 水道協会雑誌, 60, 10-23, 1986.
- 2) Okada, M., Ogawa, T., Kaiho, I., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 4391-4401, 2005.
- 3) Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1548-1557, 2003.

Detection of *Norovirus* from water by DEAE-cellulose method

Yukinao HAYASHI*, Tetsuya AKIBA*, Kouji MORI*, Yayoi NOGUCHI*, Miyuki NAGANO*, Takayuki Shinkai*,
Akiko NAKAMA* and Kazuyoshi YANO*

Norovirus is a causative agent of water-born gastroenteritis. Previously, we reported DEAE-Cellulose method to concentrate and detect enteric viruses from water samples. In this report, we tried to detect *Norovirus* from water by this method.

By using *Norovirus* GII/4 obtained from the feces of gastroenteritis patient in Tokyo, it was shown that adsorption rate of *Norovirus* to DEAE-cellulose was 86.8% on the average. Ellution rates of *Norovirus* from DEAE-cellulose by beef extract solution, glycine buffer, borate buffer and carbonate buffer were 81.9%, 82.2%, 96.2% and 96.6%, respectively. Carbonate buffer was effective to elute *Norovirus* from DEAE-cellulose. Totally, DEAE-Cellulose method is promising to recover *Norovirus* from water samples.

Keywords: *Norovirus*, DEAE-cellulose, water

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan