

「持続可能な水利用を実現する革新的な技術とシステム」
平成23年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

大村達夫

東北大学大学院工学研究科・教授

迅速・高精度・網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発

§ 1. 研究実施体制

(1) 大村グループ

- ① 研究代表者: 大村 達夫 (東北大学大学院工学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発
 - ・ 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

(2) 押谷グループ

- ① 主たる共同研究者: 押谷 仁 (東北大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 水監視による感染症流行検知システム構築

(2) 渡部グループ

- ① 主たる共同研究者: 渡部 徹 (山形大学農学部、准教授)
- ② 研究項目
 - ・ リスク評価に基づいた監視項目, 体制の確立

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

A. 病原微生物の網羅的同定・絶対定量技術開発

研究開始にあたり、遺伝子解析に必要な実験機器類(パイロシーケンサー、ハイスループット定量PCR装置、アコースティックソルビライザー等)を整備した。また、平成24年1月より研究対象地域の浄化センターにて流入下水の定期採取を開始し、採取した下水試料中のウイルス濃縮技術開発に着手した。技術開発に向けた課題抽出のため、現在下水からのウイルス検出に広く用いられているポリエチレングリコール沈殿法によるウイルス濃縮において、濃縮過程の反応条件を変化させてウイルス回収率を測定した。その結果、反応液のpHや温度が回収率に大きく影響していることが明らかとなった。また、濃縮試料の希釈により回収率の格段の改善が見られたことから、試料濃縮の後段の操作である遺伝子定量を大きく阻害していることがわかった。このような回収率および遺伝子検出阻害の低減のため、酵素反応による有機物消化を利用した検出技術について、実験条件の検討を開始した。

B. リスク評価に基づいた監視項目、体制の確立

各種水源からの病原微生物の検出のための実験環境(リアルタイムPCR解析システム等)と研究体制(プロジェクト教員の雇用)を整備した。下水からカキ養殖域にかけての定期的な病原微生物モニタリングの計画(場所、頻度など)について検討を行った。

一次感染のリスク評価のためのDose-responseモデルについて、既存のモデルの情報を整理し、水監視システムでの有効性について検討を始めた。さらに、感染症の二次感染(人から人への感染伝播)のリスクについて、国内外における過去の集団感染事例を収集した。また、研究対象地域における過去の感染症発生事例のデータ収集も開始した。感染症の拡大のシミュレーションに必要な対象地域の人口規模などに関する既存情報の検索とともに、次年度以降に行うアンケート調査の方法についても検討を始めた。

C. 迅速な病原微生物スクリーニング技術開発

本課題で提案している新規スクリーニング技術の基礎的知見の収集を行った。この技術をrRNA直接定量法として確立するために、蛍光標識オリゴヌクレオチドDNAプローブと人工合成RNAを用いて、まず分子量分角膜の選定を行った。最も本技術に適すると選定された膜は、RNAの回収率が70%以上でかつプローブの通過率が99.5%以上と優れた分画能を有していた。次に、この膜を用いて反応溶液中のプローブとRNAの量、反応溶液の組成、反応時間、ろ過方法等の条件の最適化を行った。その結果、プローブ/RNA比は50(mol/mol)、反応溶液中のNaCl濃度は200mM、反応時間は15分、ろ過方法は吸引により-15kPaで行うことが最適であることを見出した。また、反応温度をコントロールすることで、本技術が2塩基ミスマッチでも識別可能な特異性の高い手法であることが明らかとなった。この最適化した実験条件により、人工合成RNAによる

モデルコミュニティの定量を行ったところ、既知値と定量値の間に高い相関($R^2 = 0.99$)が示された。また、本技術のスループット性と感度はほぼ検出機器として用いる装置に委ねられるため、複数の装置のデモンストレーションを行ったが、現在までにスループット性と感度がどちらも満足できる装置の選定には至っていない。したがって、本装置が迅速モニタリングの骨幹をなすことを考慮すると、H24年度においては装置の選定を研究に支障を来さない範囲で速やかに検討することとし、高感度かつハイスループット技術の確立を目指す。

D. 水監視による感染症流行検知システム構築

本研究課題では、地域における病原体別下痢症サーベイランスおよび水監視から得られた病原体検出状況をもとに感染症流行検知システムを構築する事を目標としている。平成23年度は、東北大学医学系研究科倫理委員会からの研究施行の認可のもと、パイロットプロジェクトとして仙台市内の2外来小児科医療機関における小児下痢症サーベイランスを行った。H23年11月からH24年3月末までに、同医療機関を下痢症にて受診した小児から得られた便もしくは迅速診断キット残液を検査対象とした。これらの検体からウイルス遺伝子を抽出した後、conventional PCR もしくは real time PCR にてノロウイルス、ロタウイルスおよびアデノウイルスの検出およびウイルス遺伝子型の同定を行った。H24年3月末までに検討が終了した78例中、GIIが43件(55%)、ロタウイルスが3件(3.8%)、アデノウイルスが4件(5.1%)検出された。遺伝子解析が可能であったノロウイルス陽性検体12件中、11件がGII/4、1件がGII/7であった。一方、アデノウイルスでは、下痢症をおこす41型が1件のみで、呼吸器感染症を起こす2型、3型、および12型が検出された。平成24年度は、このパイロットプロジェクトのシステムを応用し環境サンプリングを行う松島町の医療機関を定点としたサーベイランスを実施する予定である。また、環境から検出されたウイルスとの相同性を確認し、人と環境でのウイルス循環について検証する。