

## (1) 報 文

---

- 1) リアルタイムPCR（インターカレーター法）を用いた  
ウイルス等の迅速検査について……………19
- 2) ウイルスのRT-PCR検査に用いる逆転写酵素の比較検討……………23
- 3) ろ紙吸光法による河川水質評価手法の検討について……………26

## リアルタイムPCR（インターカレーター法）を用いた ウイルス等の迅速検査について

小河正雄、岩崎友美\*、長岡健朗、吉用省三

\*大分臨床検査技師専門学校

### Rapid detection of Virus, Rickettsia and Chlamydia genes by using Real-Time PCR with intercalator method

Masao Ogawa, Tomomi Iwasaki, Kenro Nagaoka, Shozo Yoshimochi

Key words : ウイルス Virus、リアルタイムPCR Realtime-PCR、RT-PCR

#### 要旨

食中毒、バイオテロなどの感染症危機への対応が行政の課題となっており、患者の診断についてはより迅速で正確な検査が求められている。我々は、従来のPCR用プライマーを用いて各種病原体を検出するリアルタイムPCR条件を検討するとともに、その産物を用いた遺伝子のシーケンスやネステッドPCRの可能性を検討した。23種の病原体検出にインターカレーター法リアルタイムPCRが実施可能であり、シーケンスやネステッドPCRも実施可能であった。

#### はじめに

重症急性呼吸器症候群（SARS）やインフルエンザ（H5N1）、ノロウイルス感染症、麻疹等の感染症が社会的に注目され、これらの感染症危機に迅速に対応することが行政上の重要な課題となっている。特に、病原体の診断は、その後の感染症拡大防止対策実施の判断をするうえで、いっそうの迅速化が求められている。2005年12月に、当施設にリアルタイムPCR装置が導入されたが、この装置は、遺伝子の増幅、検出を同時に行なうことにより、短時間で病原体の診断を可能とする性能を有している。

リアルタイムPCR法には大きく2つの方法があり、一つは特異的な蛍光標識プローブを用いて検出するプローブ法で、もう一つは非特異的な蛍光色素で検出するインターカレーター法である。プローブ法は、特異性が高い長所を持つが、まだ開発途上で一部の病原体の検出にしか使えないことや、一般的に100bp以下の短い領域を増幅するので遺伝子解析ができない、標識プローブの合成費用が高価である等の短所がある。一方、インターカレーター法は、プローブ法に比べやや特異性が低い欠点はあるものの

の、従来のPCR用プライマーを用いて、従来のPCRと同様に増幅遺伝子の解析や、ネステッドPCRができる可能性を持っている。

我々は、従来使用しているPCR用プライマーを用いて各種病原体を検出するリアルタイムPCR条件を検討するとともに、リアルタイムPCR産物を用いて遺伝子のシーケンスやネステッドPCRの実施可能性を検討したので報告する。

#### 材料及び方法

##### 1 遺伝子の抽出

使用病原体は、表1のとおりである。RNAの抽出には、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を使用し、DNAの抽出には、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を使用した。

##### 2 逆転写反応

抽出したRNAは、次のような混合液を作成し、42℃で30分、99℃で5分反応させ、4℃で保存した。

蒸留水	4.65 $\mu$ l
5 $\times$ 1 <sup>ST</sup> Strand Buffer (Invitrogen)	4.1 $\mu$ l
10mM dNTPs (Toyobo)	1.5 $\mu$ l
0.1M DTT (Invitrogen)	1.5 $\mu$ l
Super Script II RT (Invitrogen)	1.5 $\mu$ l
40unit/ $\mu$ l RNase inhibitor (Toyobo)	1.0 $\mu$ l
3 $\mu$ g/ $\mu$ l Randam Primer (Invitrogen)	0.75 $\mu$ l
抽出RNA	15.0 $\mu$ l
合 計	30 $\mu$ l

### 3 リアルタイムPCR

逆転写反応で作成したc-DNA、又は抽出したDNAをEASY Dilution (TaKaRa)で10倍階段希釈し、次のとおり反応混合液を作成した。反応に用いたプライマーは表1のとおりである。

2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)	10.0 $\mu$ l
蒸留水	7.6 $\mu$ l
Forward primer (20 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
Reverse primer (20 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
鋳型DNA	2.0 $\mu$ l
合 計	20.0 $\mu$ l

リアルタイムPCRにはLightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) を使用した。通常のシャトルPCRの反応条件は、初期変性が95 $^{\circ}$ C 5秒で、PCR反応が95 $^{\circ}$ C 5秒及び60 $^{\circ}$ C 20秒を45サイクルである。その後、LightCycler の取扱説明書に従ってPCR産物の融解曲線分析を行なった。シャトルPCRでうまくリアルタイムPCRができない場合は、3ステップPCRを実施した。反応条件は、初期変性が95 $^{\circ}$ C 5秒で、PCR反応が95 $^{\circ}$ C 5秒及び55 $^{\circ}$ C 10秒、72 $^{\circ}$ C 20秒を45~50サイクルである。その後、融解曲線分析を行なった。

シーケンスを実施する場合や、ネステッドPCRを実施する場合は、リアルタイムPCR反応済みのキャピラリーのキャップをはずし、1.5mlのサンプルチューブのなかにキャピラリーを逆さに置き、3,000rpm 2分遠心して反応液を回収した。シーケンスはPCR産物を、MinElute PCR Purification Kit(QIAGEN)で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit(AB)でサイクルシーケンス反応を行なった。反応産物をCENTRI-SEP(PRI NCETON)で精製後、ABI PRISM310Genetic Analyzer(AB)により塩基配列を決定した。

表1 実験に用いた病原体及びプライマー

病 原 体	Forward Primer	Reverse Primer	PCR産物(bp)	参考文献
Norovirus Genogroup I	G1-SKF	G1-SKR	330	1
Norovirus Genogroup II	G2-SKF	G2-SKR	344	1
Adenovirus 6	Hexon Ad1 Primer-1	Hexon Ad2 Primer-2	482 161	2 3
Sapovirus	SV-F11 SV-F2	SV-R1 SV-R2	781 435	4 4
Astrovirus	82 b Mon269	Mon244 Mon270	410 449	5 6
Aichivirus	C94b C6261	264k C6779	266 519	7 7
Rotavirus group A	Beg9	VP7-1'	395	8
Rotavirus group C	G8NS1	G8NA2	352	9
Jpanese encephalytis virus	JE8K inner-S	JEER inner-C	326	10
West Nile virus	WN PA WN PC	WN PB WN PD	480-490 335	11 11
Dengue virus 1	D1s	D1c	490	12
Dengue virus 2	D2s	D2c	230	12
Dengue virus 3	D3s	D3c	320	12
Dengue virus 4	D4s	D4c	398	12
Inflenza virus AH1	AH1S	AH1R	450	13
Inflenza virus AH3	AH3S	AH3R	727	13
Inflenza virus AH5	248-270F	671-647R	424	14
Rabies virus	N1	N2	443	15
Human immunodeficiency virus 1	SK-145	SK-431	142	16
Measles virus	MHL1 MHL2	MHR1 MHR2	412 349	17 17
Chlamydia trachomatis	CM1	CM2	245	18
Coxiella burnetii	COM1 COM3	COM2 COM4	500 437	19 19
Orientia tsutsugamushi	KW3	KW4	168	20

## 結 果 考 察

病原体23種類について、プライマー30種類を用いて蛍光色素SYBR Green Iによるインターカレーター法でリアルタイムPCRを実施したところ、全例で検出、定量が可能であった。測定条件、及び産生されたPCR産物のTm値、プライマーダイマーと推測されるピークのTm値は表2のとおりである。増幅されたPCR産物は、最大で781bpであった。シャトルPCRで検出できた系はプライマーで15種類であり、3ステップPCRで検出できた系はプライマーで15種類であった。

ネステッドPCRはMeasles virus (麻疹ウイルス)について実施したが、1st PCR (プライマー: MHL1 / MHR1)でわずかに検出されたMeasles virusの遺伝子が、2nd PCR (プライマー: MHL2 / MHR2)でさらに増幅された様子が確認できた。シーケンスについては、Norovirus Genogroup I、Norovirus Genogroup II、Sapovirus、Astrovirus、Aichivirus、Measles virus、Orientia tsutsugamushiについて実施したが、いずれも良好に遺伝子配列を決定できた。

通常のPCR検査は3~4時間ほどかかるが、リアルタイムPCRは40~50分と短時間で結果が出る。今回の実験により23種の病原体の検出にリアルタイムPCRが実施可能であることが判明し、これらの感染症の早期診断が可能となったと思われる。検査の信頼性も、リアルタイムPCR産物の融解温度(Tm)を測定することにより、非特異的なPCR産物と明確に区別できた。一般に、目的のリアルタイムPCR産物のTm値は高温側に、非特異的なリアルタイムPCR産物のTm値は低温側に観察された。また、リアルタイムPCR産物のシーケンスにより、検査の信頼性は一層向上し、さらに遺伝子型の決定や、分子疫学的な解析が可能になった。データは示していないが、Tm値は同一検体の希釈列を同時に測定した場合は±0.1~0.3℃の範囲で誤差は少ないが、測定毎の誤差は±0.1~0.5℃とやや大きく変動するので、陽性対照と同時に測定することが望ましい。

通常、リアルタイムPCR用のプライマーは、効率の良い増幅のためには増幅サイズが80~150bpとなるように設計するのが望ましいとされている。ま

表2 リアルタイムPCR(インターカレーター法)の反応条件及びPCR産物のTm値

病 原 体	Forward Primer	Reverse Primer	PCR条件	Tm	参照Tm	
Norovirus Genogroup I	G1-SKF	G1-SKR	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	87.2	-
Norovirus Genogroup II	G2-SKF	G2-SKR	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	88.2	-
Adenovirus 6	Hexon Ad1	Hexon Ad2	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	88.4	84.4
Sapovirus	Primer-1	Primer-2	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	87.9	78.7
	SV-F11	SV-R1	95°C x5", 50°C x20", 72°C x30"	40cycle	89.7	75.5
Astrovirus	SV-F2	SV-R2	95°C x5", 60°C x20"	40cycle	90.0	-
	82 b	Mon244	95°C x5", 60°C x20"	40cycle	86.5	79.9
Aichivirus	Mon269	Mon270	95°C x5", 60°C x20"	40cycle	86.7	-
	C94b	264k	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	89.7	81.2
Rotavirus group A	C6261	C6779	95°C x5", 50°C x20", 72°C x30"	45cycle	90.3	87.3
	Beg9	VP7-1'	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	79.7	77.2
Rotavirus group C	G8NS1	G8NA2	95°C x5", 55°C x20", 72°C x30"	45cycle	79.5	76.2
Japanese encephalitis virus	JE8K inner-S	JEER inner-C	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	87.2	80.0
West Nile virus	WN PA	WN PB	95°C x5", 60°C x30"	40cycle	81.3	-
	WN PC	WN PD	95°C x5", 60°C x30"	40cycle	84.9	-
Dengue virus 1	D1s	D1c	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	85.4	-
Dengue virus 2	D2s	D2c	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	83.0	72.3
Dengue virus 3	D3s	D3c	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	85.0	78.9
Dengue virus 4	D4s	D4c	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	45cycle	86.7	-
Influenza virus AH1	AH1S	AH1R	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	55cycle	83.6	-
Influenza virus AH3	AH3S	AH3R	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	55cycle	82.3	-
Influenza virus AH5	248-270F	671-647R	95°C x5", 60°C x30"	45cycle	82.8	79.2
Rabies virus	N1	N2	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	55cycle	83.9	-
Human immunodeficiency virus 1	SK-145	SK-431	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	84.2	79.2
Measles virus	MHL1	MHR1	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	40cycle	85.7	74.1
	MHL2	MHR2	95°C x5", 55°C x10", 72°C x20"	40cycle	85.7	73.5
Chlamydia trachomatis	CM1	CM2	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	84.7	-
Coxiella burnetii	COM1	COM2	95°C x5", 60°C x30"	45cycle	84.8	79.0
	COM3	COM4	95°C x5", 60°C x30"	45cycle	84.6	76.8
Orientia tsutsugamushi	a'	b'	95°C x5", 60°C x20"	45cycle	81.5	-

た、増幅サイズが大きいと高速でPCRができない場合があるので、増幅サイズは300~400bp以内が良いとされている。今回の実験では、増幅サイズが400bp以上のプライマーペアが14組あり、最長の増幅サイズは、781bpであった。800bpぐらいまでの増幅サイズなら、インターカレーター法リアルタイムPCRは実施可能と推定される。増幅サイズが300~800bpのPCR産物が得られれば、検出した病原体の遺伝子型の決定や、分子系統樹による分子疫学の実施が可能である。

今回用いたプライマーや、そのPCR条件が必ずしも最適であるとは限らない。今後とも、プライマーやPCR条件を検討し、高速で正確な感染症診断が実施できるよう改良してゆきたい。

### 参 考 文 献

- 1) 篠原美千代他：「第48回日本ウイルス学会学術集会抄録」264 (2000)
- 2) Xu W, McDonough MC, Erdman DD : Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* , 38, 4114-4120 (2000)
- 3) 布目博子、菊地正幸、吉田靖宏、大木忠士、佐藤勇次、藤田晃三：結膜擦過検体におけるPCR法によるアデノウイルス検出, *札幌市衛研年報*, 24, 33-36 (1997)
- 4) 国立感染症研究所 ウイルス第2部、衛生微生物技術協議会レファレンス委員会：「ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)」, 67-69 (2003)
- 5) 国立感染症研究所 ウイルス第2部、衛生微生物技術協議会レファレンス委員会：「ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)」, 35-38 (2003)
- 6) JS Noel, TW Lee, JB Kurtz, RI Glass, and SS Monroe : Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing, *J. Clin. Microbiol.* , 33, 797-801 (1995)
- 7) 国立感染症研究所 ウイルス第2部、衛生微生物技術協議会レファレンス委員会：「ウイルス性下痢症診断マニュアル(第3版)」, 39-43 (2003)
- 8) Ushijima H, Koike H, Mukoyama A, Hasegawa A, Nishimura S, Gentsch J : Detection and serotyping of rotaviruses in stool specimens by using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification, *J. Med. Virol.* ,38, 292-297 (1992)
- 9) 葛谷光隆, 藤井理津志, 濱野雅子, 小倉肇 : 教育研修施設で発生したヒトC群ロタウイルスによる集団胃腸炎事例, *感染症学雑誌*, 77, 53-59 (2003)
- 10) 地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所編：「病原体検査マニュアル(日本脳炎)」 (2003)
- 11) 柴田伸一郎、平光良充、木戸内清、金田 誠一：RT-PCR法によるウエストナイルウイルス・日本脳炎ウイルスの同時検出による判別, *衛生微生物技術協議会第26回研究会講演抄録集*, 69 (2005)
- 12) 国立感染症研究所(レファレンス委員会), 地方衛生研究所全国協議会：「デングウイルス感染症診断マニュアル」(2000)
- 13) 森下高行, 中島節子 : PCR法によるインフルエンザ感染症の迅速診断--インフルエンザウイルスHA遺伝子のうがい液からの検出, *感染症学雑誌*, 66, 944-949 (1992)
- 14) 地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所編：「病原体検査マニュアル(高病原性鳥インフルエンザ)」(2006)
- 15) 地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所編：「病原体検査マニュアル(狂犬病)」(2001)
- 16) 国立予防衛生研究所 エイズ研究センター：「第2回HIV検出法(PCR)技術講習会資料」(1992)
- 17) 地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所編：「病原体検査マニュアル(麻疹)」(2003)
- 18) H. Yoshida, Y. Kishi, S. Shiga, and T. Hagiwara : Differentiation of Chlamydia Species by Combined Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Analysis, *Microbiol. Immunol.* , 42, 411-414 (1998)
- 19) 国立感染症研究所 (レファレンス委員会), 地方衛生研究所全国協議会：「リケッチア感染症診断マニュアル(Q熱)」(2001)
- 20) Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, Kanda T, Akahane S, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A. : Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of Rickettsia tsutsugamushi, *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 749-755 (1993)

# ウイルスのRT-PCR検査に用いる逆転写酵素の比較検討

小河正雄、赤坂隆弘\*

\*大分臨床検査技師専門学校

## Comparative study of reverse transcriptase used for RT-PCR of viruses

Masao Ogawa, Takahiro Akasaka

Key words : 逆転写酵素 Reverse transcriptase、ウイルス Virus、RT-PCR

### 要旨

RNAを遺伝子とするウイルスを検出するRT-PCRに使用する逆転写酵素について、比較検討を行なった。Super Script III RT (Invitrogen)は、従来から使用しているSuper Script II RT (Invitrogen)と同等の酵素活性があり、耐熱性が向上していた。Prime Script Reagent Kit (TaKaRa)は、従来の酵素よりやや酵素活性が低いが、キット化され扱いやすかった。

### はじめに

RNAを遺伝子とするウイルスをPCRで検出する場合、逆転写酵素でRNAを相補的なDNA (c-DNA)に変換する必要がある。標準的な方法として、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課より通知された「ノロウイルスの検出法について」(平成15年11月5日付け食安監発第1105001号)で示された方法で逆転写を行なっている。しかし、その後、改良もしくは新しく開発された逆転写酵素が市販されたため、従来から使用している逆転写酵素と比較検討した。

### 材料及び方法

逆転写酵素は、Super Script II RT、Super Script III RT、及びPrime Script Reagent Kitを使用した。ウイルス材料として、Noro virus GII/4 が検出された便(2006年11月15日に採取)1件を用いた。便からQIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて、ウイルスRNAを抽出した。

逆転写反応に用いた混合液は、それぞれ次のとおりである。

1) Super Script II RT		
5×1st Standard Buffer		2.0 $\mu$ l
10mM dNTPs		0.5 $\mu$ l
0.1M DTT		0.5 $\mu$ l
Super Script II RT		0.5 $\mu$ l
40 units/ml RNase inhibitor		0.5 $\mu$ l
3 $\mu$ g/ml Random Primer		0.25 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O		0.75 $\mu$ l
抽出RNA		5.0 $\mu$ l
Total		10.0 $\mu$ l
2) Super Script III RT		
5×1ST Standard Buffer		2.0 $\mu$ l
10mM dNTPs		0.5 $\mu$ l
0.1M DTT		0.5 $\mu$ l
Super Script III RT		0.5 $\mu$ l
40 units/ml RNase inhibitor		0.5 $\mu$ l
3 $\mu$ g/ml Random Primer		0.25 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O		0.75 $\mu$ l
抽出RNA		5.0 $\mu$ l
Total		10.0 $\mu$ l
3) Prime Script Reagent Kit		
5×Prime Script Buffer		2.0 $\mu$ l
Prime Script RT Enzyme Mix I		0.5 $\mu$ l

Random 6 mers (100 μM)	0.5 μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	2.0 μl
抽出RNA	5.0 μl
Total	10.0 μl

逆転写の反応条件は、反応温度を37°C、42°C、50°Cの3通り、反応時間を15分、30分、50分の3通り、合わせて9通りの組み合わせで逆転写を行なった。反応終了後、72°C15分で逆転写酵素を不活化し、4°Cに保存した。

逆転写反応により作成されたc-DNAの量は、リアルタイムPCR法で定量した。リアルタイムPCRに用いた混合液は次のとおりである。

2×Premix Ex Taq (TaKaRa)	10.0 μl
dH <sub>2</sub> O	5.5 μl
25 μM COG2F (Forward primer)	0.3 μl
25 μM ALPF (Forward primer)	0.3 μl
25 μM COG2R (Reverse primer)	0.3 μl
5 μM RING2-Tp(Taq Man probe)	1.6 μl
c-DNA	2.0 μl
Total	20.0 μl

リアルタイムPCRの反応条件は、初期変性が95°C30秒を1サイクル、シャトルPCRが変性95°C5秒、アニーリング/伸長60°C30秒を50サイクルであり、装置はLightCycler (Roche Diagnostics)を用いた。

### 結果

各酵素のおおまかな性質を知るために温度、時間の組み合わせ9通りの条件について各1件ずつc-DNAの生成を比較した例を図1に示した。c-DNAの量は、リアルタイムPCRの増幅曲線が立ち上がるサイクル数 (Crossing Point: Cp) と直線関係にあるので、Cp値で比較した。Cp値が低いほど、多くのc-DNAが生成されたことを示す。Super Script II RTは、温度では37°C、時間では30分で最もc-DNAが多く生成された (表1)。Super Script III RTは、温度では37°C、時間では30分と50分で最も多くc-DNAが生成された (表2)。Prime Script Reagent Kitは、温度では37°C、時間では50分で最も多くc-DNAが生成された (表3)。全体的には、温度では37°C又は42°Cの条件で、時間では30分又は50分で、c-DNAが多く生成される傾向が認められた。

そこで、反応温度を37°C及び42°C、反応時間を30分の条件で各2件ずつ逆転写を行ない、検量線を用いて生成されたc-DNA量を測定し、従来の標準法 (Super Script II RTで42°C、30分反応) で生成されたc-DNA量との比を求めた (図2)。反応温度の比較では、いずれの酵素とも37°Cの方が、42°Cより約1.1倍多くのc-DNAが生成された。酵素の比較では、Super Script II RTとSuper Script III RTはほぼ同等の酵素活性があり、Prime Script Reagent Kitは、標準法の60%の酵素活性であった。

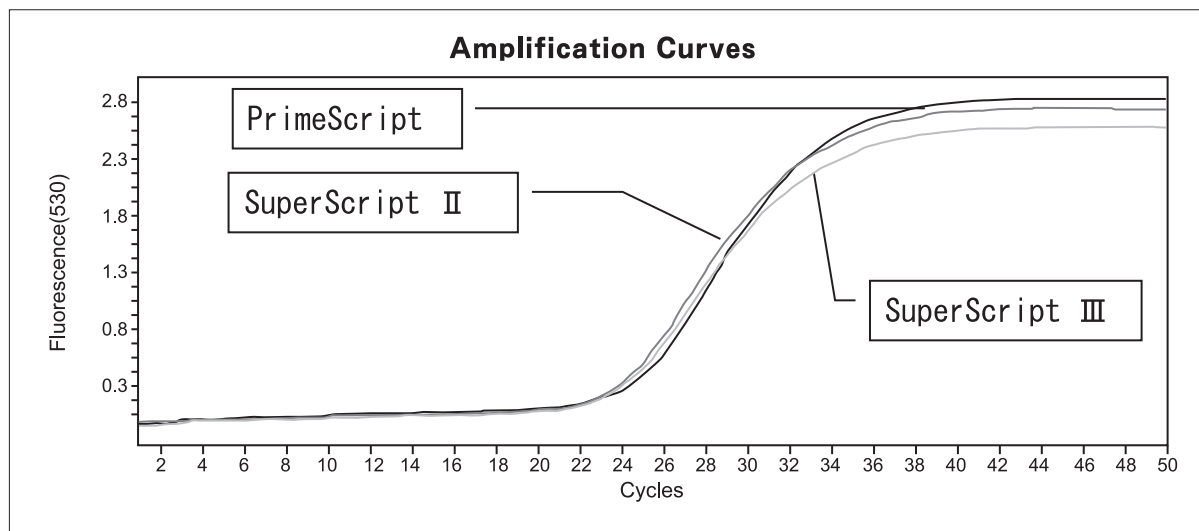


図1 逆転写反応を42°C、30分行って作成されたc-DNAの、リアルタイムPCR増幅曲線

表1 SuperScript IIにより逆転写され生成されたc-DNAの量 (Cp値)

温度	時間		
	15分	30分	50分
37°C	22.87	22.51	24.65
42°C	23.05	22.79	23.01
50°C	23.13	23.66	23.07

表2 SuperScript IIIにより逆転写され生成されたc-DNAの量 (Cp値)

温度	時間		
	15分	30分	50分
37°C	22.80	22.62	22.62
42°C	23.12	22.90	22.75
50°C	22.85	22.73	22.77

表3 PrimeScriptにより逆転写され生成されたc-DNAの量 (Cp値)

温度	時間		
	15分	30分	50分
37°C	23.35	23.91	23.23
42°C	24.07	23.71	23.84
50°C	24.16	23.51	23.66

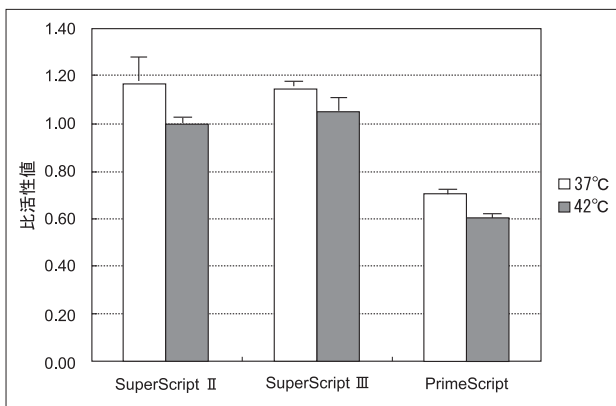


図2 逆転写酵素活性の比較

SupreScript IIで42°C、30分逆転写して測定したノロウイルスc-DNA量を1として、37°C又は42°Cで30分逆転写したc-DNA量を、それぞれの酵素で比較した。

考 察

Super Script II RTはノロウイルス検出の標準法に使用される酵素で、42°C、30分から2時間反応するように指定されている。Super Script III RTは、複雑な2次構造のあるRNAやより長いc-DNAを合成するためにSuper Script II RTにポイントミューテーションを入れて、50°Cや55°Cの高温に耐えるよう改良された酵素である。今回の実験でも、Super Script III RTの50°Cの反応は、42°Cの反応と同等か、それ以上の酵素活性が認められた。一方、Prime Script Reagent Kitは、42°Cにおいても複雑な2次構造のあるRNAや長いc-DNAを正確に合成することのできる酵素を、リアルタイムRT-PCR用に最適化したキットである。今回の実験において、これらの酵素は逆転写で標準的に使われている42°Cよりも37°Cでc-DNAが多く合成された。理由として2つのことが考えられた。まず、対象としたノロウイルスのPCR産物は98bpで短いため長いc-DNAを必要とせず、高温を必要としなかったと思われる。もうひとつは、これらの酵素はマウス白血病ウイルス(M-MLV)由来であるため、マウスの体温である37°Cがもともとの至適温度であったと思われる。ノロウイルスのリアルタイムPCR等比較的短いDNAを増幅する場合、37°Cで逆転写するのも検出感度を上げる方法の一つであろう。

Super Script III RTの酵素活性は、Super Script II RTと同等か、50°Cではそれ以上認められ、また、販売価格も同一であるので、Super Script III RTをSuper Script II RTの換えて使用しても問題ないと思われる。一方、Prime Script Reagent KitはSuper Script II RTよりも酵素活性が低かった。他の2製品と比べPrime Script Reagent Kitだけが、緩衝液とdNTP、逆転写酵素とRNase inhibitorがプレミックスされた仕様となっているので、酵素活性に影響したのかもしれない。この製品は、逆転写に必要な試薬がキット化されているので試薬の管理がしやすく、プレミックスされているので反応液調整が簡単で、操作ミスの減少が期待できる。培養ウイルスの定量や同定など、必ずしも高感度を必要としないリアルタイムRT-PCRに向いていると思われた。



## ろ紙吸光法による河川水質評価手法の検討について

金並和重、松田千晴、宮崎博文

### Investigation of the river water quality assessable technique by Filter Absorbance Method

Kazushige Kinnami, Chiharu Matsuda, Hirofumi Miyazaki

Key words : ろ紙吸光法 filter absorbance method、総吸光度 total absorbance、藻類指標 algae index、紫外吸光指数 ultra-violet absorbance index

#### 要旨

大野川水系の9地点の試料をろ紙吸光法により測定した結果、総吸光度についてはSS及び濁度、藻類指標についてはSS、COD、濁度及びクロロフィルa、紫外吸光指数についてはSS、COD及び濁度とそれぞれ高い相関があることが確認された。一方、BOD等他の一般項目については測定限界域にあり、本法との明確な相関を確認するには至らなかった。

また、本法の測定精度は高く、試料ろ紙を長期保存しても測定値の変化が見られないことから、本法は有用な水質評価法の一つであることが判明した。

#### 目 的

現在、環境水の汚濁の評価指標として、「水質汚濁に係る環境基準について」（昭和46年12月28日環境庁告示第59号）で定められたBOD（生物化学酸素要求量）が代表的に用いられている。

しかしながら、実際、人間が感じる環境水の汚濁は、BODで表した汚濁の尺度よりもむしろ、透視度、SS（浮遊物質）、濁度等で表した汚濁の尺度との関係が深く、特に、BOD値1ppm以下の清澄域においては、BOD法による正確な水質評価は困難であると考えられている<sup>1)</sup>。

一方、十数年前から国土交通省において検討されてきた環境水中の汚濁物質の質を評価できる「ろ紙吸光法」が、近年、河川や湖沼における新たな水質評価法として注目されている。

本法は、ろ紙上に捕集した汚濁物質の吸光度を測定することにより、総吸光度、藻類指標、紫外吸光指数を求め、総吸光度からは濁り、藻類指標からは藻類の現存量、紫外吸光指数からは有機物の現存量をそれぞれ把握する方法である（以下、総吸光度、

藻類指標、紫外吸光指数を総称して「三指標」という<sup>2, 3, 4)</sup>。

また、平成15年度の国土交通省の河川水質調査において、大分県を代表する一級河川である大野川の水質が全国第1位になったが、この調査結果はBOD値による評価に基づいたものであり、より正確に河川の汚濁の状態を把握するためには、本法により総合的な観点から判断してみる必要があると考えられる。

以上のことから、BOD法では正確に水質評価が困難と考えられる清澄域の大野川水系において本法により水質評価を行うとともに、水質評価法としての本法について検証することを目的として調査を行った。

#### 調 査 方 法

##### 1 ろ紙吸光法の原理

ろ紙吸光法は試料水をガラス繊維ろ紙でろ過し、ろ紙上に残った汚濁物質を積分球付き紫外可視分光光度計で波長ごとに反射光を測定し、それを吸光度曲線で表現する方法であり、次の指標を得ることが

できる。

- ①総吸光度 (TA : total absorbance) :  
濁りを表す指標。波長400～800nm (可視光部)の吸光度の積分値。
- ②藻類指標 (AI : algae index) :  
藻類の存在を表す指標。クロロフィルaによる吸収ピークである670nmの吸光度から、濁りによる吸光度のバックグラウンドである750nmの吸光度を差し引き、100倍したものの。
- ③紫外吸光指数 (UVAI : ultra-violet absorbance index) :  
有機物の指標。有機物の一部は波長240～300nmの紫外線を吸収する性質がある。240nmと300nmにおける吸光度を結ぶ直線と、その間の吸光度曲線で囲まれる面積を求めたもの。

## 2 測定方法

- ①試料の入った採水ビンを数回転倒させ、懸濁物質を均一にする。
- ②試料水をろ過器で吸引ろ過する (ろ紙 : ADVANTEC GS-25 size47mm)。
- ③試料ろ紙を105～110℃で2時間乾燥させた後、デシケーターの中で保管する。
- ④積分球付き紫外可視分光光度計で測定する。

## 3 調査概要

### 3.1 調査地点(図1) : 大野川水系(中上流)9地点

大野川 (犬飼、猿飛橋)、茜川 (福門大橋)、野津川 (吉四六大橋)、三重川 (下赤嶺橋)、奥嶽川 (岩戸橋)、緒方川 (共栄橋)、稲葉川 (萬里橋)、玉来川 (常盤橋)

### 3.2 調査時期

平成18年7月～平成19年1月 (4回)

### 3.3 調査項目

①総吸光度 (TA) ②藻類指標 (AI) ③紫外吸光指数 (UVAI) ④電気伝導度 (EC) ⑤浮遊物質 (SS) ⑥生物化学的酸素要求量 (BOD) ⑦化学的酸素要求量 (COD) ⑧濁度 ⑨クロロフィル ⑩全有機炭素 (TOC)

## 結 果

### 1 ろ紙吸光法の測定精度

本法における測定精度を確認するため、3個の同一試料 (犬飼大橋 (平成18年9月分)) について、それぞれ試料ろ紙を作成し三指標の測定を行った。その後、作成した試料ろ紙を凍結保存 (80日間、-20℃) し、再度、三指標の測定を行った。

結果について、試料ろ紙の三指標の測定値の統計



図1 大野川水系調査地点図

的な変動は表1のとおりで、変動係数は1.42~1.97%であった。凍結保存後の試料ろ紙の三指標の測定値の統計的な変動は表2のとおりで、変動係数は2.16~2.33%であった。凍結保存前後の試料ろ紙の三指標の測定値の統計的な変動（凍結保存後ーろ紙作成後/ろ紙作成後\*100）は表3のとおりで、変動は1.57~3.30%であった。

表1 試料ろ紙の三指標の測定値の統計的な変動(n=3)

	No. 1	No. 2	No. 3	総平均	標準偏差	変動係数 (%)
総吸光度	157.67	153.79	153.34	154.93	2.38	1.54
藻類指標	10.88	10.58	10.48	10.65	0.21	1.97
紫外吸光指数	4.29	4.18	4.20	4.22	0.06	1.42

表2 凍結保存後の試料ろ紙の三指標の測定値の統計的な変動(n=3)

	No. 1	No. 2	No. 3	総平均	標準偏差	変動係数 (%)
総吸光度	163.99	158.69	157.50	160.06	3.46	2.16
藻類指標	10.76	10.39	10.29	10.48	0.24	2.33
紫外吸光指数	4.19	4.01	4.12	4.11	0.09	2.21

表3 凍結保存前後の試料ろ紙の三指標の測定値の統計的な変動(n=3)

	No. 1	No. 2	No. 3	総平均
総吸光度	4.01	3.18	2.71	3.30
藻類指標	1.15	1.77	1.79	1.57
紫外吸光指数	2.33	4.00	1.95	2.76

## 2 三指標と一般項目との相関及び水質測定結果

三指標と一般項目との相関係数を表4、各調査地点における三指標及び一般項目の水質測定結果を表5に示す。

総吸光度についてはSS及び濁度、藻類指標についてはSS、COD、濁度及びクロロフィルa、紫外吸光指数についてはSS、COD及び濁度と高い相関があったが、紫外吸光指数についてはBOD及びTOCとの相関はみられなかった。

また、今回の調査で比較的汚濁が少なかった岩戸橋（奥嶽川）及び汚濁が多かった下赤嶺橋（三重川）の三指標図を図2、また、三指標図の代表的なパターンを図3に示す。総吸光度が高く、紫外吸光指数、藻類指標が低い場合は無機性の濁りの状態、藻類指標も高いときは植物性プランクトンが増殖した富栄養化状態、紫外吸光指数も高いときは生活排水等の

有機性汚濁が流入している状態といえることから、両地点における汚濁の主要因は無機性の濁りであると考えられる。

表4 三指標と一般項目との相関

	総吸光度	藻類指標	紫外吸光指数
EC	0.082	0.424	0.097
SS	0.906	0.705	0.884
BOD	0.201	0.582	0.109
COD	0.596	0.836	0.663
濁度	0.885	0.735	0.894
クロロフィルa	0.303	0.740	0.195
TOC	0.145	0.511	0.392

## 考 察

今回の調査結果から、試料ろ紙の作成については再現性があり、また、試料ろ紙の長期保存も可能であることが確認された。

また、三指標と一般項目との相関係数については、濁度、COD等多数の項目で相関が確認された一方、BOD等一部の項目では相関が確認されなかった。これは、データ数が少ないこと及び今回の調査地点の水質濃度の低い地点が多く、これらの測定限界域にあるためであると考えられる。

なお、三指標図を作成することにより、調査地点における汚濁の質（無機性汚濁、有機性汚濁、富栄養化状態等）を視覚的に判定することが可能であることがわかった。

以上のことから、本法はBOD等の一般的な水質評価法と同様に有用な水質評価法の一つになり得るものである。

表5 三指標及び一般項目の水質測定結果

河川名	地点名	採水費	総吸光度	藻類指標	紫外線光指数	EC(ms/m)	SS(mg/l)	BOD(mg/l)	COD(mg/l)	濁度(度)	クロロフィルa (ug/l)	TOC(mg/l)
大野川	犬飼大橋	7/19	183.19	9.42	3.91	13.1	8	<0.5	2.4	4.3	0.7	0.8
		9/6	154.93	10.65	4.22	13.5	5	0.7	2.3	3.3	1.5	0.8
		11/8	69.21	4.65	2.41	15.1	1	0.6	1.7	2.3	0.5	0.5
	猿飛橋	7/19	69.97	7.71	1.63	14.8	2	0.8	1.3	1.7	1.9	<0.5
		7/19	237.22	11.23	4.24	12.8	15	0.9	3.3	5.0	1.5	0.6
		11/8	80.18	4.59	2.31	13.4	3	0.6	1.8	3.4	0.4	0.6
		1/17	120.05	8.15	2.19	15.1	5	0.5	1.5	2.4	1.6	<0.5
茜川	福門大橋	7/19	179.92	14.91	6.55	14.1	16	0.7	3.9	8.2	1.5	1.3
		11/8	45.18	3.51	2.03	16.1	1	0.6	1.8	1.5	0.3	0.8
		1/17	92.19	10.20	2.39	15.7	3	0.8	2.2	2.1	3.4	0.7
三重川	下赤嶺橋	7/19	122.72	11.29	3.77	17.4	7	2.4	4.3	2.3	3.1	1.4
		11/8	65.06	10.28	3.28	23.8	3	2.4	4.1	1.9	3.8	2.1
		1/17	189.31	18.41	3.40	20.2	7	5.5	5.4	4.4	7.9	1.5
奥獄川	岩戸橋	7/19	21.80	1.58	2.12	8.4	1	0.5	1.4	0.6	0.4	<0.5
		9/6	23.75	3.59	1.69	9.3	<1	<0.5	1.5	0.5	1.1	0.8
		11/8	19.10	1.99	2.05	11.3	<1	0.6	1.1	0.6	0.3	0.5
		1/17	15.15	2.33	0.94	9.9	<1	<0.5	0.9	0.5	0.9	<0.5
緒方川	共栄橋	7/19	133.86	9.48	4.10	12.7	6	1.0	2.7	2.9	2.0	1.2
		11/8	46.74	5.76	2.31	14.8	1	0.9	1.6	1.7	0.5	0.7
		1/17	66.03	10.45	2.22	14.2	3	0.9	1.9	1.7	3.8	0.5
稲葉川	万里橋	8/3	161.12	8.64	4.05	11.3	8	0.5	2.2	3.7	1.5	0.7
		11/8	70.38	5.83	2.24	13.8	3	1.1	2.1	2.6	0.5	0.8
		1/17	64.02	4.93	2.28	14.6	3	1.1	2.1	1.9	1.7	0.8
玉来川	常盤橋	8/3	322.66	14.74	5.35	13.9	15	0.7	3.1	7.4	1.9	0.8
		11/8	69.19	3.96	2.74	15.3	3	0.6	1.7	2.6	0.4	0.6
		1/17	120.36	7.20	2.34	15.3	6	0.9	2.0	2.8	1.4	0.5
野津川	吉四六大橋	7/19	141.04	8.28	4.31	15.4	8	0.9	2.7	4.1	—	1.2
		11/8	49.49	4.41	2.04	18.8	1	0.7	2.0	1.6	0.4	0.8
		1/17	51.17	7.86	2.13	17.7	2	0.9	2.3	1.3	2.2	0.9

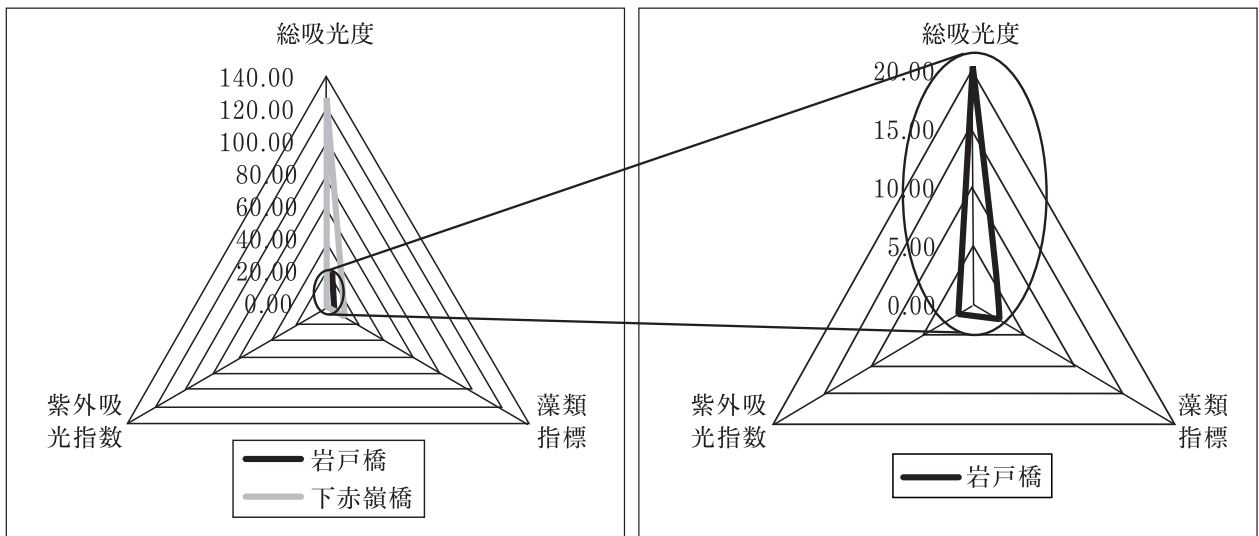


図2 岩戸橋及び下赤嶺橋の三指標図

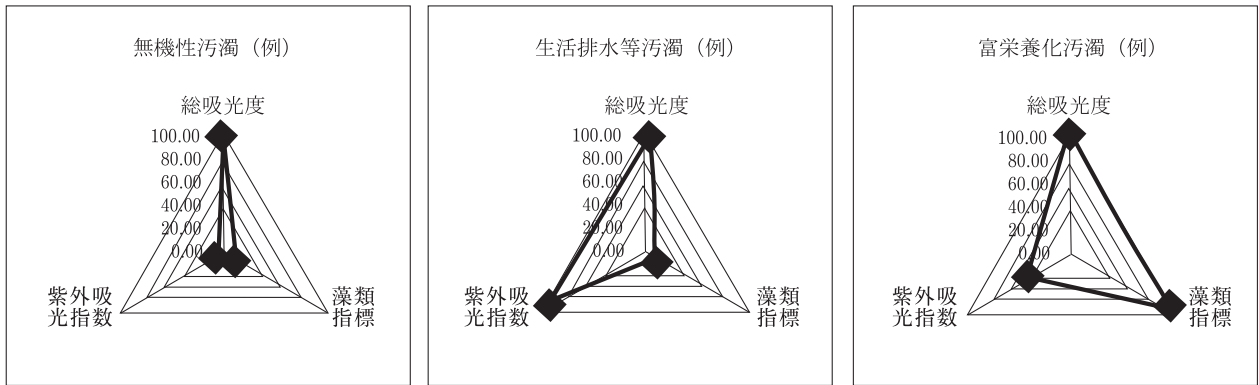


図3 三指標図の代表的なパターン

参 考 文 献

- 1) 中村圭吾、宮崎敦美、島谷幸宏：ろ紙吸光法による清流河川の推定透明度に関する研究，環境システム研究，27 (1999)
- 2) 藪田顕彦、中村圭吾、島谷幸宏：ろ紙吸光法によるクロロフィルa測定の有効性について，環境システム研究，27，p.805-810 (1999)
- 3) (社)日本河川協会編：「1996日本河川水質年鑑」，p.1003-1010 (1998)，山海堂
- 4) 古賀唯雄、高倉香：新しい水質指標ろ紙吸光法を用いた水質評価，国土交通研究会，(2003)