

8.3 水環境中における病原微生物の消長に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平 18～平 22

担当チ - ム：材料地盤研究グループ（リサイクル）

研究担当者：岡本誠一郎、諏訪守、桜井健介

【要旨】

20年度は、水試料中のノロウイルスをリアルタイムRT-PCR法により定量するにあたり、陰電荷膜法による検出濃度の向上を目的に、MgCl₂の添加終濃度を変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を評価した。また、試料中のノロウイルス濃度の違いがPCR実測値に及ぼす影響を評価した。さらに、ノロウイルスの不活化効果を推定するための基礎データを得ることを目的に、ノロウイルス代替指標としてのネコカリシウイルスと下水試料から分離したノロウイルスの塩素消毒実験を行い、消毒耐性と遺伝子量の変動割合を評価した。

その結果、陰電荷膜による濃縮法においては試料中にMgCl₂を添加することで無添加と比較して検出濃度は若干向上したが、終濃度が2.5mM～25mMの範囲内において検出濃度に大きな違いはなく、検出濃度を向上させることができなかった。ウイルス濃度が異なる下水・河川水試料を用いて多重測定を行いPCR実測値に及ぼす影響を評価したが、低濃度域におけるPCR実測値の変動係数（相対標準偏差）は高濃度域に比較して大きくなることから、検出効率の高い濃縮法を選択する必要があると考えられた。塩素消毒によりネコカリシウイルスを3log不活化するために必要なCt値は40mg・min/L程度であった。下水試料から分離したノロウイルスを塩素消毒することにより、リアルタイムRT-PCR法による定量値に若干の減少傾向が示され、Ct値と遺伝子の減少量には弱い相関関係が見られた。

キ - ワ - ド：ノロウイルス、リアルタイムRT-PCR法、多重測定、塩素、不活化効果

1. はじめに

クリプトスポリジウム、ノロウイルス（NV）薬剤耐性菌などによる感染症が多発しており、大きな社会問題となっている。感染者などから排出されるこれらの病原微生物は様々な経路を経て最終的には公共用水域へ排出される。公共用水域の衛生学的安全性確保のため、病原微生物の消長を把握し汚染源を明らかにするとともに、対策手法の適正な評価にあたっては、迅速・簡便・安全に病原微生物の感染能力などを測定できる方法の開発が望まれている。

本課題では上記の要請を踏まえ、水環境中での薬剤耐性菌の汚染実態や耐性遺伝子の伝播特性を評価するとともに、分子生物学的手法（PCR：Polymerase Chain Reaction）を活用した感染能力を有する病原微生物の検出法の開発を目的としている。特にノロウイルスに関しては、現在のところ生死判定を行うことができない課題がある。このため、代替指標の利用を含め唯一の検出法であるリアルタイムPCR法を活用し生死判定手法の構築の可能性を検討する。

本研究で研究対象としている病原微生物は薬剤耐性大腸菌、クリプトスポリジウムであり、ウイルスはノロウ

イルスである。20年度はノロウイルスを対象とし以下の研究を行った。

- 1) 陰電荷膜法によるMgCl₂の添加終濃度が検出濃度に及ぼす影響
- 2) ノロウイルス濃度が異なる試料の多重測定によるPCR実測値の安定性評価
- 3) 代替指標やノロウイルスを利用した塩素消毒による不活化・遺伝子減少量の評価

2. 研究目的

2.1 陰電荷膜法によるMgCl₂の添加終濃度が検出濃度に及ぼす影響

水試料中のノロウイルスをリアルタイムRT-PCR法により定量するためのウイルス濃縮法には、ポリエチレングリコ-ル沈殿法（PEG沈殿法）や陰電荷膜法などがあるが、同一試料を用いた測定では、陰電荷膜法はPEG沈殿法に比較して検出濃度が低くなる結果が得られている¹⁾。一方、試料中のウイルス濃度が極めて低い場合や清浄な試料を濃縮する際には、濃縮水量を多くする必要があり、操作性の観点から陰電荷膜法の利用を余儀なくされることも想定される。大腸菌ファ-ジを利用した陰電

荷膜法による回収率の評価例では、膜へのファージ吸着率が95%以上との報告²⁾もあり、膜からの誘出効率を向上させることで検出濃度が高まる可能性がある。陰電荷膜法は試料中へMgCl₂などの陽イオンを添加することで膜へのウイルス吸着を促進させるため、陰電荷膜法の検出濃度の改善を目的として試料中に添加するMgCl₂濃度を変動させ、その影響を評価した。MgCl₂終濃度が低ければ膜へのウイルス吸着力が弱くなるが、膜からウイルスを誘出しやすく、終濃度が高ければ膜へのウイルス吸着力が強くなる分、誘出しにくくなることが想定されたためである。

2.2 ノロウイルス濃度が異なる試料の多重測定によるPCR実測値の安定性評価

リアルタイムRT-PCR法によるノロウイルスの定量では、コントロールDNAを検量線として利用することで試料中のウイルス濃度の算定を行う。コントロールDNAによる検量線の評価では、低濃度域における定量値のバラツキが若干大きくなる可能性が指摘²⁾されており、非流行期における試料や高度処理水を測定対象とした場合、定量値へ及ぼす影響が大きくなると考えられる。このため、ノロウイルス濃度の異なる実下水・河川水を用いて、多重測定を行い定量値へ及ぼす影響を評価した。

2.3 塩素消毒実験による不活化評価

ノロウイルスは、現在のところ培養細胞などにより増殖させられないため、感染能力(生死)の有無を判定できない課題がある。これらの課題も1つの要因となっており、衛生的安全性確保の観点から下水処理水の再利用水質基準等マニュアルが策定³⁾され水質基準等が提示されているが、ウイルス濃度の基準値の設定には至っていない。ここでは、唯一の検出法であるリアルタイムRT-PCR法を活用しノロウイルス生死判定手法の構築の可能性を検討する。検討にあたっては、ノロウイルスの不活化効果を推定するための基礎データを得ることを目的に、下水中から分離したノロウイルスの塩素消毒実験を行い、リアルタイムRT-PCR法によりその遺伝子量の変動割合を把握した。さらに、ノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルス(FCV)の適用に関しての提案⁴⁾があることから、塩素消毒実験による不活化効果をネコカリシウイルスにより評価した。

3. 研究方法

3.1 陰電荷膜法によるMgCl₂の添加終濃度が検出濃度

に及ぼす影響

本実験では、A下水処理場の流入下水と処理場内に設置された活性汚泥処理プラントの二次処理水を用いて評価した。この時の流入下水のSS濃度は162mg/L、処理水は0.48mg/Lであった。陰電荷膜法⁵⁾による濃縮は、試料に250mM~2.5MのMgCl₂を終濃度が2.5mM~25mMになるよう添加攪拌し、HA膜(公称孔径0.45μm、90mm)で試料をろ過した。0.5mMのH₂SO₄200mLで酸洗浄し、1.0mMのNaOH10mLをろ過してウイルスを誘出回収した。誘出液を50×TEバッファ-200μLと100mMのH₂SO₄50μLを入れた試験管に回収・中和し、誘出液をCentriprepYM-50(ミリポア社製)に入れ2,500rpm・10分間4で遠心処理を行いウイルス濃縮液を作成した。なお、陰電荷膜へのSS負荷量の違いは検出濃度に影響を及ぼすことから、全てのケースで1mg-SS/膜に統一した。

濃縮液中のウイルスは、リアルタイムRT-PCR法により定量を行った。ウイルス遺伝子の抽出は、ウイルス濃縮液からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)の抽出カラムを用いたグアニジン法とした。抽出したRNAに微量に含まれているDNAを除去するためDNaseI処理し、RNeasy MinElute Clean up Kit(QIAGEN社)でウイルスRNAを精製した。精製したウイルスRNA試料0.5μgをランダムプライマ-、Omniscript RT Kit(QIAGEN社)を用い全量20μLの系で逆転写反応を行いcDNAを作製し2μLをリアルタイムPCRに供した。精製RNA量はSpectrophotometer(NanoDrop社製)により定量した。ノロウイルスの検出に用いたプライマ-、プロ-ブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」⁶⁾に準じた。リアルタイムPCR反応のための試薬はQuantiTect Probe PCR Kit(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR装置はLightCycler(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を使用した。

3.2 ノロウイルス濃度が異なる試料の多重測定によるPCR実測値の安定性評価

実験ではB下水処理場の流入下水と処理水、その放流先河川のC河川水、さらにD下水処理場の流入下水と放流先河川のE河川水を用いて、各試料はPEG沈殿法で濃縮を行った。これらの試料は、濃度測定を行った際に1tubeあたりPCRの実測値が不検出~2000コピ-程度と検出濃度が広範囲に及んでいるため、実験の対象試料として影響評価に用いた。PEG沈殿法の濃縮では試料中にPEG#6000(終濃度8%)およびNaCl(終濃度0.4M)

を添加・攪拌し完全に溶解させた。4 で1夜静置の後、10,000×G、30分間遠心分離し沈渣を回収した。この沈渣をRNase-free水(遺伝子分解酵素を除去した水)に再浮遊させてウイルス濃縮液とした。ウイルス遺伝子抽出カラムへのウイルス濃縮液の通水量は、試料の濃縮水量とSS濃度からSS負荷量を算出し、SS負荷量が0.05mg-SS/カラムになるよう統一した上でウイルス遺伝子の抽出を行った。抽出・精製の後、逆転写反応を行いリアルタイムRT-PCR法により定量した。

実験に使用した流入下水のSS濃度は、160~220mg/L、処理水は0.8~2.7mg/L、河川水では5.7~15mg/Lであった。

3.3 塩素消毒実験による不活化評価

不活化の評価では、ネコ腎臓細胞(CRFK細胞)により増殖させたネコカリシウイルス(FCV:F9株)を用いた。細胞培養液の影響を取り除くため、ウイルス増殖液を限外ろ過膜により濃縮・精製した。精製した濃縮液を蔗糖液に重層して超高速遠心処理(141,000×G、3時間)にて形成されたウイルスバンドを回収して実験に供した。このウイルス精製液に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、不活化評価を行った。不活化実験は次亜塩素酸ナトリウムを高濃度添加として10~200mg/Lと低濃度添加として1~10mg/Lの2ケースで行った。接触時間は高濃度添加ケースで15~30秒、低濃度添加ケースでは15分間とし、各々混合接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和を行った。中和した試料はりん酸緩衝生理食塩水により10倍段階希釈し、CRFK細胞に各希釈ウイルス液を100μL接種、0.7%寒天細胞維持培地を添加し37にて炭酸ガスフラン器で培養を行った。72時間後、0.1%クリスタルバイオレット10%ホルマリン溶液で固定染色し、プラーク数を計測した。

実下水中のノロウイルスを用いた実験では、消毒対象試料中の有機物やSS濃度が塩素消毒効果に及ぼす影響を極力回避するため、陰電荷膜法により濃縮試料を作成した。流入下水から陰電荷膜法により濃縮・分離したノロウイルスに次亜塩素酸ナトリウムを3~10mg/L添加し、15分間混合接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和を行った。中和した試料は、ウイルス遺伝子を抽出・精製の後、逆転写反応を行いリアルタイムRT-PCR法により定量した。

4. 研究結果と考察

4.1 陰電荷膜法によるMgCl₂の添加終濃度が検出濃度

に及ぼす影響

陰電荷膜法によるMgCl₂の添加終濃度の違いが検出濃度に及ぼす検討結果を図-1に示す。流入下水、処理水とも無添加のケースと比較してMgCl₂を添加することで検出濃度は向上した。参考に他下水処理場試料のデータも併せて記載したが、終濃度が2.5mMと25mMで検出濃度が最大となるケースが多く見られた。既報の陰電荷膜法⁵⁾による濃縮では終濃度が25mMであるため、終濃度をそれよりも低くし、ウイルス誘出効率が高まることを期待したが、本実験の範囲内である2.5mM~25mMにおいて検出濃度の大幅な向上は見込めないものと考えられた。

試料中のウイルス濃度が極めて低い場合や清浄な試料を濃縮する際には陰電荷膜法が一般的に用いられるが、検出濃度が低くなるため、誘出効率改善のための影響因子を解明しPEG沈殿法による検出濃度に近づける課題があるものと考えられた。

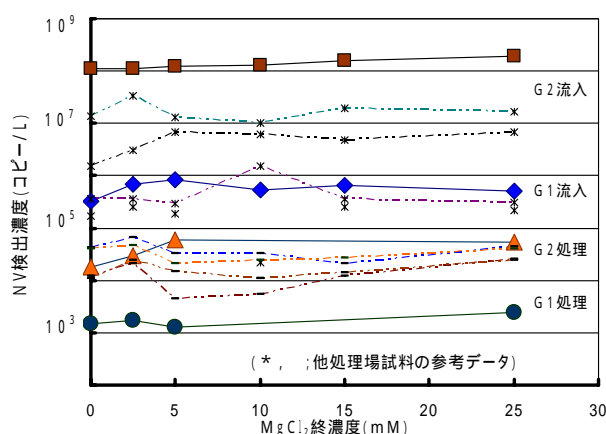


図-1 MgCl₂添加終濃度がNV検出濃度に及ぼす影響

4.2 ノロウイルス濃度が異なる試料の多重測定によるPCR実測値の安定性評価

多重測定によるPCR実測値の安定性評価では、B下水処理場の流入下水と処理水、その放流先河川のC河川水、さらにD下水処理場の流入下水と放流先河川であるE河川水の各濃縮試料を用いた。1濃縮試料あたり約20回の同時測定を実施したが、異常値と推定される値については、Grubbsの方法⁷⁾により棄却検定を行った。評価結果を表-1および図-2に示す。当初のPCR実測値が不検出であった河川水は多重測定を行っても不検出であった。各試料とも当初のPCR実測値と多重測定による平均値はほぼ一致した値となったが、その平均値と変動係数には強い相関関係が見られ、10コピ以下の実測値では変動係数は100%を超えたが、高濃度域では10%程度と

表 - 1 PCR実測値の安定性評価

	当初のPCR実測値 (コピー / tube)	多重測定の実測値範囲 と平均値 (コピー / tube)	標準偏差	変動係数 (%)
C河川水	0	0 (n = 19)	-	-
E河川水	0	0 (n = 19)	-	-
E河川水	4.05	0-7.41 (2.00) (n = 20)	2.35	118
C河川水	17.1	8.62-43.4 (25.8) (n = 20)	11.3	44
B流入下水	182	90.3-248 (178) (n = 20)	34.4	19
B流入下水	661	429-793 (561) (n = 18)	108	19
B処理水	36.5	14.8-55.0 (33.5) (n = 19)	10.1	30
B砂ろ過処理水	2.86	0-9.73 (2.15) (n = 20)	3.68	171
D流入下水	207	155-312 (212) (n = 20)	40.6	19
D流入下水	2,133	1,745-2,679 (2200) (n = 20)	250	11

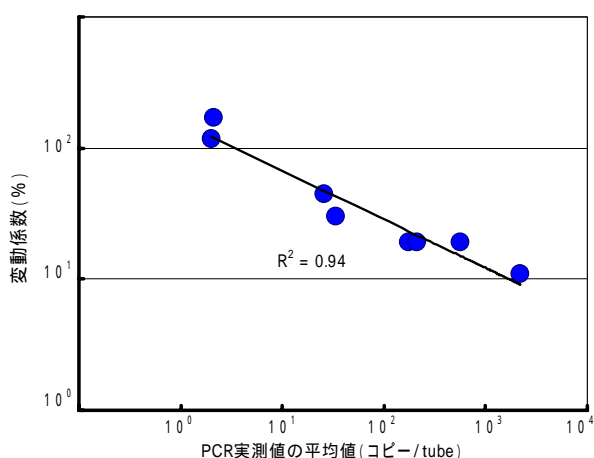


図-2 PCR実測値の平均値と変動係数の関係

なった。また、当初のPCR実測値が3~4コピー / tubeであった試料の多重測定結果では、20個のデータの内10~13個が不検出であったことから、極低濃度域試料を測定する場合には、陰性（検出限界値以下）と評価される可能性が高くなると考えられた。

過去に土木研究所が測定を行った試料⁸⁾のPCRの実測値について整理したものを図-3に示す。同一試料をPEG沈殿法と陰電荷膜法で濃縮を行い、そのPCRの実測値を比較したものである。PEG沈殿法ではウイルス遺伝子抽出カラムへのSS負荷量を0.05、0.1mgとし、それに対応する陰電荷膜法では膜へのSS負荷量を0.5、1.0mgとした。複数の下水処理場の流入下水、処理水、さらに河川水の測定結果であるが、全体的に、陰電荷膜法に比較してPEG沈殿法の実測値が高い傾向を示している。特に、陰電荷膜法での実測値が不検出（10⁻¹上のプロット）の試料でもPEG沈殿法ではそれら多数の試料で実測値が得られている。また、陰電荷膜法によるG1型の実測値で10⁰~10¹コピー / tubeの試料において、PEG沈殿法

ではその多くが10¹~10²コピー / tubeであった。

濃縮試料中のウイルス濃度の違いにより測定精度が大きく左右される可能性のあることが明らかとなった。このため、リアルタイム RT-PCR法によりノロウイルスを定量する上でPCRの実測値を極力高めることは、測定精度の向上に資すると考えられることから、ウイルスの検出効率の高い濃縮法の適用や、PCR実測値が低濃度と想定される試料の測定では多重測定を実施することで、より実態に近い定量値を得る必要があるものと考えられた。

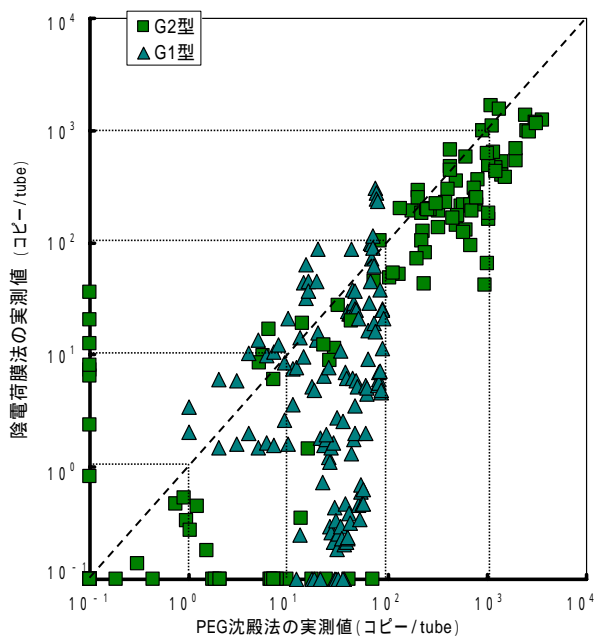


図-3 PEG沈殿法と陰電荷膜法のPCR実測値の比較⁸⁾

4.3 塩素消毒実験による不活化評価

塩素消毒の実験結果を図-4、5に示す。ネコカリシウイルスを3log不活化させるためのCt値は、低・高濃度の添加ケースにおいて36~46mg・min/L必要であった。両

ケ - スでは、Ct 値とウイルス生残率の関係において回帰直線の傾きはほぼ同一であり、3log の生残率に対する Ct 値に若干の違いはあるが、低・高濃度域における不活化効果に大差はないと考えられた。

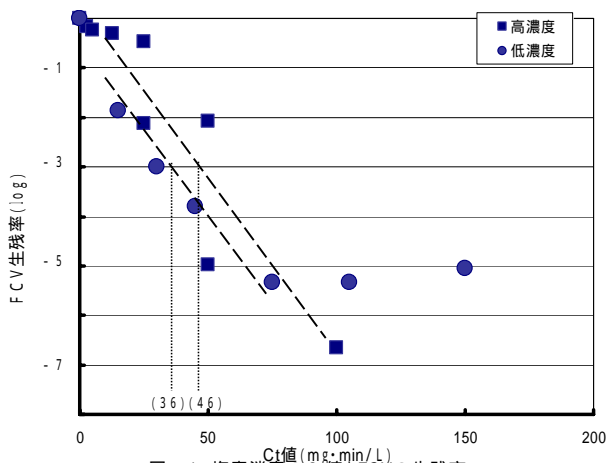


図 - 4 塩素消毒の Ct 値と F CV の生残率

ノロウイルスでは、不活化割合を把握することができないため、リアルタイム RT - PCR による遺伝子量の変動の推移を示した。Ct 値の範囲を 45 ~ 150mg·min/L とした実験ケ - スにおいて、ウイルス遺伝子の最大減少量は 20% 程度であったが Ct 値と遺伝子の減少量には弱い相関関係が見られた。

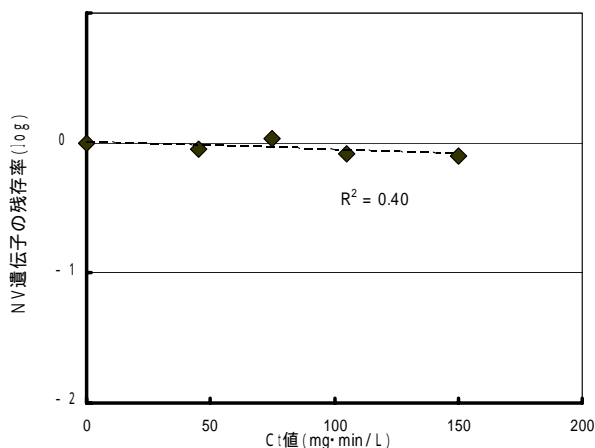


図 - 5 塩素消毒の Ct 値と NV 遺伝子の残存率

紫外線照射によるウイルス遺伝子量の減少割合を 19 年度に把握したが、照射量と遺伝子量の減少割合にも弱い相関関係が見られた。

一方、下水処理場における消毒レベルは塩素消毒では平均で 40mg·min/L 程度、紫外線量の平均は 40mJ/cm² である^{9) 10)}。一概に比較はできないが、これらの消毒レベルを消毒実験結果にあてはめた場合の遺伝子減少量は紫外線消毒で約 50%、塩素消毒では約 10% となり、消毒方式が異なることにより、遺伝子減少量に違いが見られた。紫外線照射ではウイルス遺伝子へ直接影響を及ぼすが、塩素消毒では薬剤が直接に遺伝子ではなく、ウイルス表面のタンパク質へ作用すると推定されるため、遺伝子の減少量に明確な違いが現れるものと考えられた。

Ct 値が 40mg·min/L 程度の塩素消毒によりネコカリシウイルスは 3log の不活化効果が得られており、同じカリシウイルス科に属するノロウイルスは形態や遺伝子の構造がネコカリシウイルスと類似していることや、マウスノロウイルスを用いた塩素消毒による不活化評価結果もあり¹¹⁾、同様の不活化効果があると推定される。しかし、データ数や実験対象としたウイルス種も限られたものであるため、今後、更なる詳細な検証が必要である。このため、ネコカリシウイルスを含め他の腸管系ウイルスなどを利用し、塩素消毒によるウイルス遺伝子量の減少割合をリアルタイム RT - PCR 法で定量し、その割合がノロウイルスとどの程度一致するのかを比較検討する必要があると考えられた。また、下水処理場において塩素、紫外線消毒に次いで導入事例¹⁰⁾の多いオゾン消毒などについても検討を加える必要がある。

5 . まとめ

20 年度は、水試料中のノロウイルスをリアルタイム RT - PCR 法により定量するにあたり、陰電荷膜法による検出濃度の向上を目的に、MgCl₂ の添加濃度を変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を評価した。また、試料中のノロウイルス濃度の違いが PCR 実測値の精度に及ぼす影響を評価した。さらに、ノロウイルスの不活化効果を推定するための基礎データを得ることを目的に、ノロウイルス代替指標としてのネコカリシウイルスと下水試料から分離したノロウイルスの塩素消毒実験を行い、消毒耐性と遺伝子量の変動割合を評価した。以下に得られた結果を示す。

- 1) MgCl₂ の添加濃度を変動させ陰電荷膜法による検出濃度を評価したが、検討の範囲内において検出濃度の大幅な向上は見込めなかった。
- 2) PCR 実測値の濃度レベルが低いと、ウイルスの定量精度に及ぼす影響が大きくなる可能性が示された。

- 3) PCR実測値が低濃度と想定される試料の測定では、多重測定を実施することで、より実態に近い定量値を得る必要があるものと考えられた。
- 4) 塩素消毒によりネコカリシウイルスを 3log 不活化するために必要なCt値は40mg・min/L程度であった。
- 5) 下水試料から分離したノロウイルスを塩素消毒することで、リアルタイム RT-PCR 法による定量値に若干の減少傾向が示され、Ct 値と遺伝子の減少量には弱い相関関係が見られた。

参考文献

- 1) 諏訪守、岡本誠一郎、尾崎正明、陶山明子(2009)下水処理のノロウイルス除去効果とその検出濃度及ぼす濃縮法の影響、下水道協会誌論文集投稿中。
- 2) 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 43,255-261。
- 3) 国土交通省地域整備局下水道部・国土交通省国土技術政策総合研究所(2005) 下水処理水の再利用水質基準等マニュアル。
- 4) Antimicrobials Division U.S.EPA, CONFIRMATORY VIRUCIDAL EFFECTIVENESS TEST, Using Feline Calicivirus As Surrogate for Norovirus.
- 5) Hiroyuki Katayama, Eiji Haramoto et al. (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plant in Japan, Water Research,42,1441 - 1448.
- 6) 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。
- 7) 藤森利美著、分析技術者のための統計的方法、第2版・改訂増補、(社)日本環境測定分析協会。
- 8) 土木研究所、未公表資料。
- 9) 平成16年度版下水道統計(2006)(社)日本下水道協会。
- 10) 平成17年度版下水道統計(2007)(社)日本下水道協会。
- 11) 北島正章、松原康一、他(2008) 上水道の塩素消毒におけるマウスノロウイルスの感染力価および遺伝子数の消長、第42回日本水環境学会年会講演集、(社)日本水環境学会。

8.3 水環境における病原微生物の消長に関する研究

Abstract: In recent years, outbreaks of water-borne disease have become a public health problem in Japan. In order to prevent outbreaks of infectious diseases caused by pathogenic microorganisms contained in water bodies, it is necessary to ensure that the natural water is safe with respect to pathogenic microorganisms. The aim of this study was to clarify the antibiotic resistance of bacteria in the water environment by investigating the concentration of antibiotic-resistant bacteria in treated wastewater, etc. A molecular biology technique (the polymerase chain reaction method) was used to detect pathogens, because it is important to develop a measuring method to detect trace levels of pathogenic microorganisms (such as *Norovirus* and *Cryptosporidium*).

In FY2007, the concentration of MgCl₂ added was changed to improve the detection concentration by the negatively charged filter method to measure *Norovirus* in water samples by real-time RT-PCR, and the influence on *Norovirus* detection concentration was evaluated. Moreover, the difference of the concentration of *Norovirus* included in the samples was used to evaluate the influence on the actual measured PCR value. In addition, the resistance of *Feline Calicivirus* to chlorination disinfection for the *Norovirus* substitution index and *Norovirus* separated from a wastewater sample was evaluated.

As a result, the detection concentration of *Norovirus* was not improved in the concentration method by the negatively charged filter even if the concentration of MgCl₂ added was changed. It was necessary to select the concentration method with high detection efficiency, because the coefficient of variation of the PCR actual measurement value rises when the concentration of *Norovirus* is low. Three-log inactivation of *Feline Calicivirus* can be done by chlorinating it with a Ct value of about 40 mg·min/L. The *Norovirus* separated from wastewater was chlorinated, and showed a tendency for the concentration quantity obtained by real-time RT-PCR to decrease.

Key words: *Norovirus*, Real-time PCR method, Multiple measurements, Chlorination, Inactivation