

## 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：尾崎正明、諏訪守

### 【要旨】

19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、その検出濃度の向上を目的に、PEG 沈殿法ではポリエチレングリコール添加濃度の最適化および遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量、陰電荷膜法では膜への測定試料の SS 負荷量を各々変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を明らかにするとともに、それら濃縮法の違いによる検出濃度を評価した。また、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化についても検討した。さらに、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紫外線による不活化実験を行い消毒耐性を評価した。

その結果、ポリエチレングリコールの添加量は終濃度を 8%、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量は 0.5 $\mu$ g とすることで最大検出濃度が得られることを明らかにした。PEG 沈殿法による濃縮法では、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量をより低減させることで陰電荷膜法よりもノロウイルスの検出濃度を高められるものと考えられた。陰電荷膜への SS 負荷量は 1mg/枚以下で、ほぼ一定した検出レベルにとどまった。環境水の汚染実態や下水処理過程での除去効率などを把握するためには、これらの SS 負荷量を統一した上でウイルス遺伝子の抽出やウイルス濃縮を行う必要があるものと考えられた。ネコカリシウイルスを 3log 不活化するために必要な紫外線量は 20mJ/cm<sup>2</sup>程度であった。下水試料から分離したノロウイルスを紫外線照射することで、リアルタイム RT-PCR 法による定量値の減少傾向が示された。

キ - ワ - ド：ノロウイルス、リアルタイム RT-PCR 法、濃縮法、紫外線、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。19年度はノロウイルスを対象とし以下の研究を行った。

- 1) PEG 添加濃度、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化
- 2) 各種濃縮法による検出濃度の比較とその影響要因
- 3) 紫外線による不活化評価

### 2. 研究目的

#### 2.1 PEG 添加濃度、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化

ウイルス濃縮法の一つである PEG 沈殿法は、ポリエチレングリコール（PEG）を試料中に添加、遠心沈殿し沈渣を回収することでウイルス濃縮液を作成する。PEG 沈殿法を用いたノロウイルスの検出事例<sup>1)</sup>では PEG の添加濃度が 8%、カキからの検出では添加濃度が 8～20%という報告検討例<sup>2)</sup>があるものの、水試料からの検出に際し最適添加濃度の検討例はない。また、リアルタイム RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を定量する際には、抽出 RNA を逆転写（RT：Reverse Transcription）しなけ

ればならない。逆転写効率を向上させるために抽出 RNA 量の最適化を行った検討例<sup>1)</sup>もあるが極めて限られたものとなっている。このため、ノロウイルスの検出濃度の向上を目的として、水質性状の異なる試料を対象に PEG の最適添加濃度や逆転写反応に利用する抽出 RNA 量の最適化を検討した。

## 2.2 各種濃縮法による検出濃度の比較とその影響要因

水中のウイルスを安定的に定量するにあたり、濃縮を行う必要があると考えられる。代表的なウイルス濃縮法としては PEG やセルロースを添加する方法、陽電荷膜または陰電荷膜の利用による方法、あるいは超高速遠心分離器により沈殿させる方法などがある。しかし、陽電荷膜は現在製造販売されておらず、また、超高速遠心法では高価な遠心分離器が必要となる。このため比較的安価かつ操作の容易性から、ここでは、PEG 沈殿法、陰電荷膜法、さらには濃縮操作を行わない直接法の各種濃縮法により実下水試料中のノロウイルス濃度を測定し、その検出濃度から最適濃縮法の評価を行った。さらに、PEG 沈殿法では遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量、陰電荷膜法では膜への測定試料の SS 負荷量を各々変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を評価した。

## 2.3 紫外線による不活化評価

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、衛生学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<sup>3)</sup>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を紫外線照射しリアルタイム RT-PCR 法により定量し、その減少割合を把握した。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<sup>4)</sup>があることから、紫外線での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 PEG 添加濃度、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化

PEG 沈殿法による添加濃度の最適化は、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 161mg/L、処理水は 4.1mg/L であった。流入下水 25mL、処理水 250mL の試料中に PEG #6000 を終濃度が 4~15%、NaCl は終濃度約 0.2~0.8M 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。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 -、Omniscrypt 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。ノロウイルスの検出に用いたプライマ -、プロ - および反応条件は「ノロウイルスの検出法について」<sup>5)</sup>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。

逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化検討では、PEG 沈殿法、陰電荷膜法によって濃縮した試料中から抽出・精製した RNA を用いた。RNA を 0.2~1.0μg の範囲でランダムプライマ -、Omniscrypt RT Kit 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 に供しノロウイルス濃度を測定した。抽出 RNA 量は Spectrophotometer(NanoDrop 社製)により定量した。

### 3.2 各種濃縮法による検出濃度の比較とその影響要因

実験には上記 A 下水処理場の流入下水と活性汚泥処理プラントの二次処理水を用いた。PEG 沈殿法では試料中に 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。試料の濃縮水量と SS 濃度から SS 負荷量を算出し、ウイルス遺伝子抽出カラム

への濃縮試料の通水量を調整することでカラムへの SS 負荷量を変動させた。

陰電荷膜法<sup>6)</sup>による濃縮は、試料 100mL あたり 250mM の MgCl<sub>2</sub> を 1mL 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200mL で酸洗浄し、1.0mM の NaOH 10mL 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50μL 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。陰電荷膜への SS 負荷量は試料の SS 濃度と膜への通水量から算出した。なお、陰電荷膜法では公称孔径 0.45μm の膜に試料を通水・濃縮し、その誘出液が濃縮試料となるため、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量はゼロとして考えた。

直接法は 140μL の試料を遺伝子抽出カラムへ直接通水しウイルス遺伝子を捕捉させることで濃縮試料として考えた。

各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。

実験に使用した A 下水処理場の流入下水の SS 濃度範囲は、114 ~ 161mg/L、プラントの二次処理水では 4.1 ~ 10.8mg/L であった。

### 3.3 紫外線による不活化評価

不活化評価では、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超高速遠心処理 (140,000×G、3 時間) にてウイルスを精製した。このウイルスを 0 ~ 200mJ/cm<sup>2</sup> の範囲で紫外線 (UV 波長 254nm) 照射の後、ウイルス培養を行い細胞変性によりプラ - クを計数し不活化割合を把握した。実下水中のノロウイルスを用いた実験では、流入下水中から陰電荷膜法により濃縮・分離したノロウイルスを 0 ~ 50mJ/cm<sup>2</sup> の範囲で紫外線照射の後、逆転写反応を行いリアルタイム RT - PCR 法によってウイルス濃度を定量した。

## 4. 研究結果と考察

### 4.1 PEG 添加濃度、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化

PEG 沈殿法による PEG 添加濃度の最適化の検討結果を図 - 1 に示す。流入下水、処理水とも終濃度の 8% でノロウイルス (NVG2 型) の検出濃度比が最大となった。次いで 10%、6% の順となっており、水質性状とし

て SS 濃度などの異なる試料でも同様な傾向が見られた。カキの中腸腺からの検出では 12% とすることで回収量が高いとの報告<sup>2)</sup> もあり若干の違いがあった。検討対象試料が水と中腸腺であり、試料の性状が異なるため若干の違いが現れたものと推定される。よって、通常の水試料を PEG 沈法で濃縮を行う際には、終濃度を 8% とすることでノロウイルスの検出濃度が最大になると考えられた。

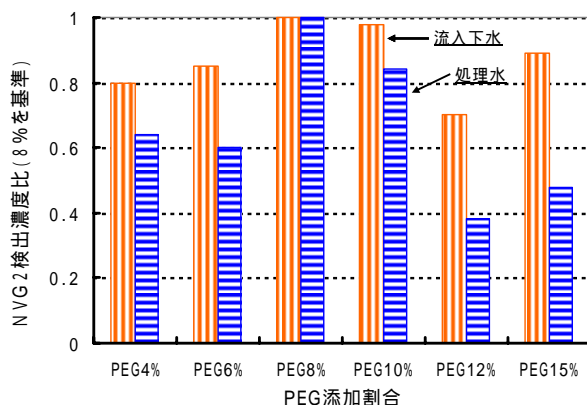


図 - 1 PEG 添加割合毎の NVG2 検出濃度比

逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化の検討結果を図 - 2、3 に示す。流入下水、処理水を PEG 沈殿法と陰電荷膜により濃縮した試料から抽出した RNA を 0.2 ~ 1.0μg の範囲内で逆転写反応させ cDNA を作成し、リアルタイム RT - PCR 法によりノロウイルス濃度を測定したものである。全てのケースで逆転写反応に用いる抽出 RNA 量を 0.5μg とすることでノロウイルスの最大検出濃度が得られた。PEG 沈殿法と陰電荷膜法による 2 通りでの濃縮 RNA を利用したが、ともに同様な傾向を示した。一般に酵素反応は基質濃度の増加とともに反応速度が増加するが、基質濃度が過剰になると反応速度は

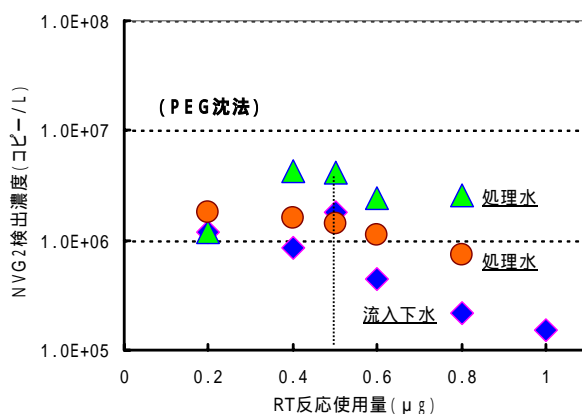


図 - 2 RT 反応使用量の違いによる検出濃度

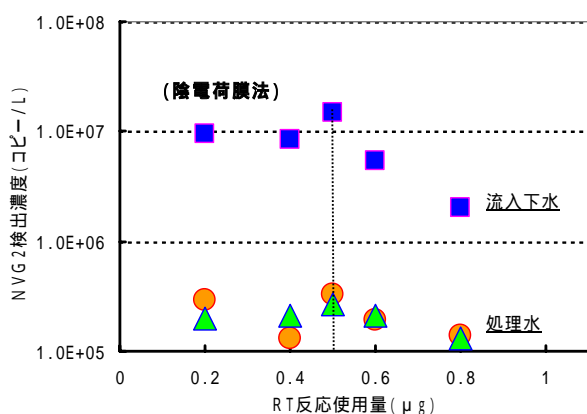


図 - 3 RT反応使用量の違いによる検出濃度

平衡に達し減少する。逆転写反応も逆転写酵素による酵素反応であるため同様の傾向を示したものと考えられた。なお、PEG 沈殿法と陰電荷膜法による検出濃度の違いや流入下水と処理水で検出濃度に逆転が生じているが、これは試料の採水日が異なるためである。

#### 4.2 各種濃縮法による検出濃度の比較とその影響要因

A 下水処理場の流入下水を用いた各種濃縮法による検出濃度の評価結果を図 - 4、5 に示す。図 - 4 は PEG 沈殿法によるもので遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量範囲を 0.05 ~ 1.0mg/カラムとした。併せて直接法による検出結果も示したが、抽出カラムへの SS 負荷量範囲は 0.007 ~ 0.02mg/カラム程度となった。図 - 5 は陰電荷膜法によるものであり、膜への SS 負荷量範囲を 0.25 ~ 6.0mg/枚 (膜口径 90mm) とした。PEG 沈殿法は全ての試料において遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量をより低減させることで検出濃度が高まる傾向が見られ、一部の試料では最大検出濃度が  $10^7$  コピ - /L レベルとなった。逆に抽出カラムへの SS 負荷量を増加させることで検出濃度は低下し 1.0mg/カラムの場合では  $10^6$  コピ - /L レベルとなった。直接法では PEG 沈殿法に比較して遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量が低いため、検出濃度が高く維持されていた。PEG 沈殿法は遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量をより低減させることで検出濃度が高まり、その濃度は直接法に近づくものと考えられた。陰電荷膜法は検出濃度に若干のバラツキが見られるものの、膜への SS 負荷量がほぼ 1mg/枚以下であれば検出濃度レベルはほぼ一定となっていた。しかし、PEG 沈殿法で最大検出濃度が  $10^7$  コピ - /L レベルであった同一試料を陰電荷膜法で濃縮し測定することで最大検出濃度は  $10^6$  コピ - /L レベルに低下した。また、全体的に PEG 沈殿法は陰電荷膜法に比べ最大検出濃度が高い傾向が見られた。さ

らに、陰電荷膜法でも膜への測定試料の SS 負荷量を増加させることで検出濃度が低下する傾向が見られた。

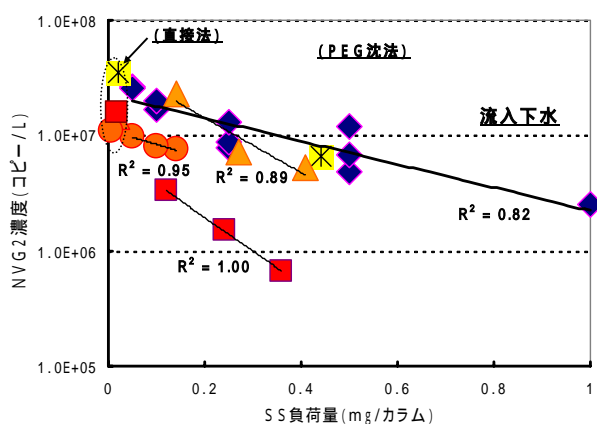


図 - 4 抽出カラムへのSS負荷量がNV検出濃度に及ぼす影響

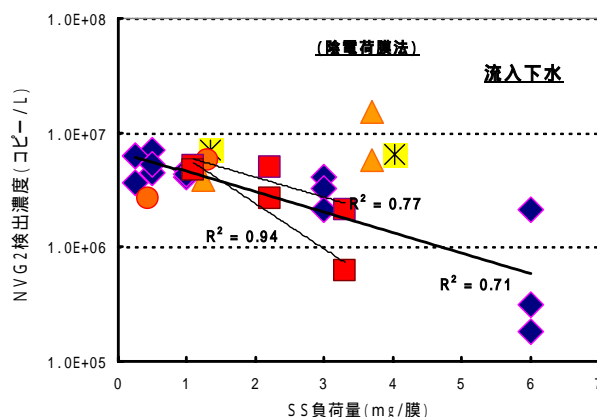


図 - 5 陰電荷膜法のSS負荷量がNV検出濃度に及ぼす影響

二次処理水を用いた各種濃縮法による検出濃度の評価結果を図 - 6、7 に示す。図 - 6 は PEG 沈殿法によるもので遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量範囲を 0.02 ~ 1.0mg/カラムとした。直接法は 0.0006 mg/カラムとした。図 - 7 は陰電荷膜法によるものであり、膜への SS 負荷量範囲を 0.25 ~ 6.0mg/枚とした。PEG 沈殿法では遺伝子抽出カラムへの SS 負荷量をより低減させることで検出濃度が高まり、また、陰電荷膜法では膜への SS 負荷量をほぼ 1mg/枚以下とすれば検出濃度レベルはほぼ一定レベルであることから、流入下水での評価結果を裏付けるものとなった。同一試料での最大検出濃度も PEG 沈殿法が陰電荷膜法に比較して高かった。しかし、直接法では定量限界値以下となり、一定量以上の濃度でなければ直接法により処理水中のノロウイルスを定量することは難しいと考えられた。

以上の結果から、PEG 沈殿法は遺伝子抽出カラムへの

濃縮試料のSS 負荷量を低減させることで、陰電荷膜法に比較してノロウイルスの検出濃度を高められるものと考えられた。また、ウイルス遺伝子抽出カラムに対する濃縮試料のSS 負荷量や膜に対する試料のSS 負荷量は、ノロウイルスの検出濃度に及ぼす影響が大きいことが明らかとなった。このため、水環境中での汚染実態や下水処理過程での除去効率などを把握するためには、これらの負荷量を統一した上で遺伝子抽出やウイルス濃縮を行う必要があるものと考えられた。

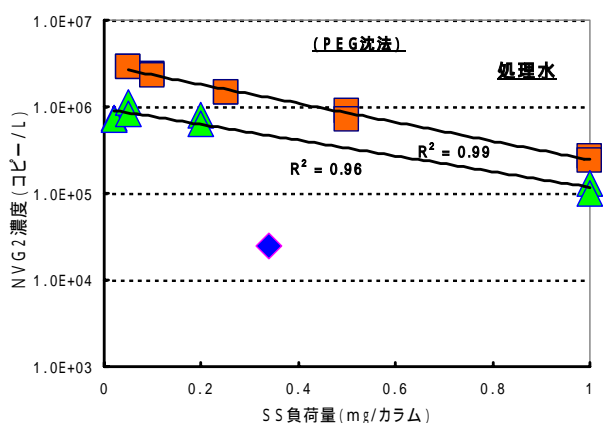


図 - 6 抽出カラムへのSS 負荷量がNV 検出濃度に及ぼす影響

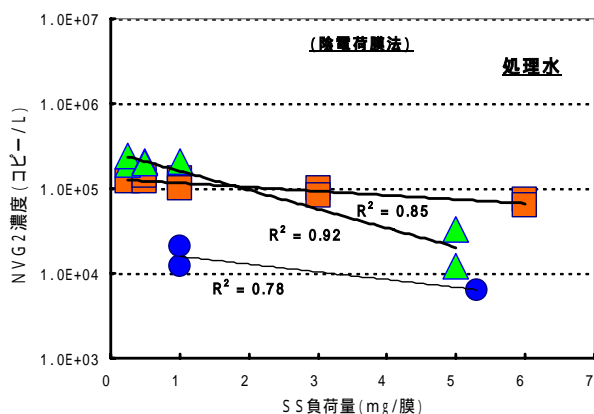


図 - 7 陰電荷膜へのSS 負荷量がNV 検出濃度に及ぼす影響

### 4.3 紫外線による不活化評価

紫外線の実験結果を図 - 8、9 に示す。ネコカリシウイルスを 2 ~ 3log 不活化させるための紫外線量は 12 ~ 20mJ/cm<sup>2</sup> 程度必要であった。同様の実験例では 25 mJ/cm<sup>2</sup> で 3log 以上、11.7mJ/cm<sup>2</sup> で 3log との報告<sup>7)</sup> <sup>8)</sup> もあり、12 ~ 20mJ/cm<sup>2</sup> 程度の紫外線量により 3log の不活化効果が得られるものと考えられた。また、他の腸管系ウイルスとしてエコ - ウイルス、コクサッキー - ウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルスを 3log 不活化

させるための紫外線量は 20.5 ~ 27 mJ/cm<sup>2</sup>、アデノウイルスは 119 mJ/cm<sup>2</sup> と報告<sup>9)</sup> されている。これらネコカリシウイルスを含めた腸管系ウイルスの紫外線耐性は、アデノウイルスを除けばほぼ同レベルであると考えられた。

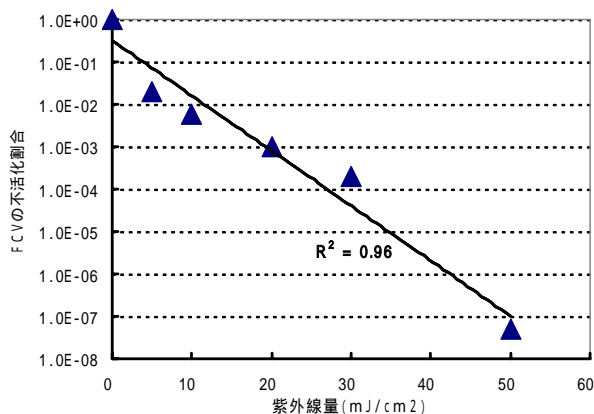


図 - 8 紫外線照射によるFCVの不活化割合

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 による定量結果を示した。30mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線量により定量値は約 0.24log、50mJ/cm<sup>2</sup> では約 0.35log 減少した。紫外線照射がノロウイルスの遺伝子に影響を及ぼしているため定量値の減少傾向が示されたものと考えられるが、30mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線量により 3log の感染力の減少効果が推定されるとの報告<sup>8)</sup> もある。カリシウイルス科に属するネコカリシウイルスとノロウイルスは、形態や遺伝子の構造が類似、さらに、他の腸管系ウイルスでも 20 ~ 30mJ/cm<sup>2</sup> 程度の紫外線量により 3log の不活化効果が得られているため、ノロウイルスでも同様の不活化効果があると推定される。しかしながら今回の結果から、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、紫外線照射による

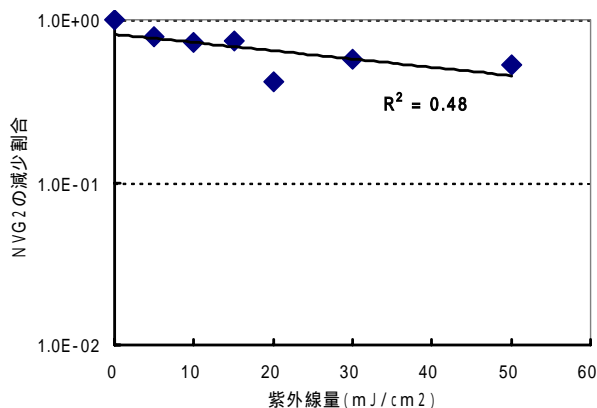


図 - 9 紫外線照射によるNVの減少割合

ウイルス濃度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、感染能力の評価を完全なものとするため、他の消毒法として塩素やオゾンなどに関しても検討を加える必要がある。

## 5. まとめ

19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、その検出濃度の向上を目的に、PEG 沈殿法ではポリエチレングリコール添加濃度の最適化および遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量、陰電荷膜法では膜への測定試料の SS 負荷量を各々変動させウイルス検出濃度に及ぼす影響を明らかにするとともに、それら濃縮法の違いによる検出濃度を評価した。また、逆転写反応に用いる抽出 RNA 量の最適化についても検討した。さらに、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紫外線による不活化実験を行い、ネコカリシウイルスの消毒耐性の評価とともに、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、リアルタイム RT - PCR 法による定量値から、その減少割合を把握した。以下に結果を示す。

- 1) PEG 沈殿法による PEG の添加濃度は、流入下水、処理水とも終濃度を 8% とすることでノロウイルスの検出濃度が最大となった。
- 2) 全量 20 $\mu$ L の系における逆転写反応では、抽出 RNA 量を 0.5 $\mu$ g とすることでノロウイルスの検出濃度が最大となった。
- 3) PEG 沈殿法は、遺伝子抽出カラムへの濃縮試料の SS 負荷量を低減させることで、陰電荷膜法に比較してノロウイルスの検出濃度を高められるものと考えられた。
- 4) ウイルス遺伝子抽出カラムに対する濃縮試料の SS 負荷量や膜に対する試料の SS 負荷量は、ノロウイルスの検出濃度に及ぼす影響が大きいことが明らかとなった。
- 5) 濃縮操作を行わない直接法は、一定量以上の濃度でなければウイルスを定量することは難しいと考えられた。
- 6) ネコカリシウイルスを 3log 不活化するために必要な紫外線量は 20mJ/cm<sup>2</sup> 程度であった。
- 7) 下水試料から分離したノロウイルスを紫外線照射することで、リアルタイム RT - PCR 法による定量

値の減少傾向が示された。

## 参考文献

- 1) 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.
- 2) 野田衛、岡本玲子、有田知子、伊藤文明、池田義文、西尾治 (2007) カキからのノロウイルス検出におけるアミラ - ゼ処理の有用性(2)、第 55 回日本ウイルス学会学術集会抄録集,161.
- 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) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 (2003) ノロウイルスの検出法について.
- 6) 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 (2007) 下水中の腸管系ウイルスの検出方法.
- 7) 笠井久会、吉永守 (2007) ネコカリシウイルスを指標としたカキのノロウイルス浄化法について、第 55 回日本ウイルス学会学術集会抄録集,390.
- 8) J. Iwasaki, et al. (2007) Inactivation Effect of Ultraviolet Radiation on Norovirus(NV), 14<sup>th</sup> International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 392.
- 9) Charles P. Gerba, et al. (2002) Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light, Applied and Environmental Microbiology, 68(10), 5167-5169.

## STUDY OF THE FATE OF PATHOGENS IN WATER ENVIRONMENT

**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 is to clarify the antibiotic resistance to bacteria in a water environment by investigating the concentration of antibiotic resistant bacteria in treated wastewater, etc. Additionally, molecular biology technology (particularly the Polymerase Chain Reaction method) is adopted as the pathogen detection method, because it is important to develop a measuring method to detect trace levels of pathogenic microorganisms (such as *Norovirus* and *Cryptosporidium*).

In FY2006, we evaluated various concentration methods to improve the quantification to measure *Norovirus* in a water sample by the real-time RT-PCR method. Moreover, the optimization of the amount of extraction RNA used for the reverse transcription reaction was examined. In addition, the disinfection resistance to ultraviolet rays of the *Feline Calicivirus* for the *Norovirus* substitution index and *Norovirus* separated from a wastewater sample was evaluated.

As a result, based on the Polyethylene glycol sedimentation concentration method, it was thought that the detection quantification value of the *Norovirus* was improved by decreasing the SS loading dose of the concentrated sample against the gene extraction column. And, if the amount of extraction RNA used for the reverse transcription reaction was assumed to be 0.5 $\mu$ g, the detection concentration of the *Norovirus* became the maximum. Three-log inactivation of the *Feline Calicivirus* can be done by irradiating it with ultraviolet rays of 20mJ/cm<sup>2</sup>. The *Norovirus* separated from wastewater was irradiated in ultraviolet rays, showing a tendency for the concentration quantity value obtained by the real-time RT-PCR method to decrease.

**Key words:** *Norovirus*, Real-time PCR method, Concentration method, Ultraviolet rays, Inactivation