

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

担当チーム：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】

21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、低濃度域試料を対象として検出濃度の精度向上を目的に、ウイルス検出精度に及ぼす分析水量とウイルス濃度の影響を評価した。また、ノロウイルスの不活化効果を推定するためにノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルスを選定し、塩素、紫外線消毒実験を行って、消毒レベルの違いによる遺伝子量の減少割合を評価した。クリプトスポリジウムに関しては、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量との比較評価を行うため、オーシストの不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。

その結果、分析水量を増加させることで PCR 実測値が高まり、多重測定による変動係数は小さくなることから、ウイルス濃度が低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には、分析水量を増加させて PCR 実測値の安定化を図ることが必要であることを明らかにした。また、試料中のウイルス濃度が極めて低い場合には、多重測定を行うことで分析水量が増加して検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上すると考えられた。塩素、紫外線消毒によりネコカリシウイルス遺伝子減少量を評価したが、各消毒法ともに両ウイルスの遺伝子の定量値に影響を及ぼすことが確認されたことや、類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。

キーワード：ノロウイルス、リアルタイム RT-PCR 法、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、現在のところ培養法による不活化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 法を活用した不活化判定手法を検討する。

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。21年度はノロウイルスやクリプトスポリジウムを対象とし以下の研究を行った。

- 1) 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価
- 2) ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量の評価と不活化効果の推定
- 3) クリプトスポリジウムの不活化実験

2. 研究目的

2.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

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¹⁾や実試料を用いた多重測定による PCR 実測値の評価では、低濃度域における実測値の変動係数が大きくなるという課題がある²⁾。非流行期における試料や高度処理水あるいは消毒後処理水を測定対象と

する場合には、安定した定量値を得るとともにリスク評価の観点から検出下限値を向上させる必要がある。このため、試料の分析水量増加や多重測定を行うことでPCR実測値の安定性と向上手法を評価した。

2.2 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

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、感染能力の有無を判定できない課題がある。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³⁾され水質基準等が提示されているが、上記課題もあり、ノロ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法を活用してノロウイルス不活化判定手法を検討する。検討にあたっては、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、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、FCVの塩素、紫外線実験による遺伝子減少量を評価した。

2.3 クリプトスポリジウムの不活化実験

消毒によるクリプトスポリジウムの不活化効果を判定するためには、マウスや細胞培養法による評価手法が用いられている。これらの手法により評価が進展しているが、実験動物や細胞培養の利用は操作の煩雑性や検出感度等の課題もあり、その適用は限定されたものとなっている。ここでは、分子生物学的手法の適用による不活化判定手法の検討を目的としており、リアルタイム RT-PCR法による遺伝子減少量との比較評価を行うため、オーストの塩素消毒による不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。

3. 研究方法

3.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

実験対象とした試料は流入下水、下水処理水、河川水であり、20 μ l の PCR 反応系における当初の PCR 実測値が tube あたり不検出から 1,000 コピー程度のものを 10 試料選定した。試料の濃縮は PEG 沈殿法とし、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 $^{\circ}$ C で 1 夜静置の後、10,000 \times 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。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 0.05mgSS/カラムになるよう統一した。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 0.5 μ g をランダムプライマー、Omniscript RT Kit (QIAGEN 社) を用い全量 20 μ L の系で逆転写反応を行い cDNA を作製した。PCR の反応系は 20 μ L と 100 μ L とすることで、cDNA の 2 μ L と 10 μ L を各々リアルタイム PCR に供した。PCR の反応系を 20 μ L と 100 μ L とすることで分析水量を変動させ、各々 10 試料を 20 回の多重測定を行うことで PCR 実測値の安定性の評価とともに、検出感度の向上を目指した。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ー、プローブおよび反応条件は、「ノロウイルスの検出法について」⁵⁾ 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 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

消毒による遺伝子減少量の評価では、ネコ腎臓細胞 (CRFK : Crandell-Reese feline kidney) により増殖させたネコカリシウイルス (FCV : Feline Calicivirus F-9 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 \times G、3 時間) にてさらに純度の高いウイルス精製液を作成した。このウイルス精製液に次亜塩素酸ナトリウムを添加、また、紫外線照射により遺伝子減少量の評価を行った。次亜塩素酸ナトリウムの添加濃度は 0~10mg/L とし、接触時間は 20 分間とした。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。紫外線照射ではウイルス精製液 0.4mL をシャーレに分注し、1mW/cm² にて 0~300 秒の照射を行った。各試料中のウイルスは、ウイルス遺伝子の抽出、精製、逆転写反応の後、リアルタイム

RT-PCR法により定量を行った。カリシウイルスの検出に用いたプライマーは、Erwin Duizerらの方法⁶⁾に準じた。

3.3 クリプトスポリジウムの不活化実験

不活化実験では、*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株を用いた。免疫不全マウスのふん便から回収したオーシストをショ糖密度勾配遠心法により精製を行った。精製を行ったオーシストに有効塩素濃度が 20mg/L となるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、1~2 時間接触させた後、チオ硫酸ナトリウムにて中和した。中和した試料は感染性評価のため、Intestine407 細胞に接種した。接種後 24 時間培養を行った後、オーシストの増加が認められたものを陽性とし MPN 表にあてはめ、オーシスト数を求め不活化割合を算出した。

4. 研究結果と考察

4.1 試料の分析水量増加や多重測定による PCR 実測値の安定性と向上手法の評価

評価結果を表-1、2 および図-1、2 に示す。n=20 (同一試料の同時・多重測定) における PCR の平均実測値は 20 μ l から 100 μ l 系とすることで高まった。また、今回の実験範囲内における PCR 実測平均値から求めた換算濃度と変動係数には相関関係が見られ、20 μ l 系と 100 μ l 系では同一試料での換算濃度に大差はないものの、全体的に 100 μ l 系では変動係数が低下する傾向が明らかとなった。

PCR の実測値の大部分が 0 (N.D.) となった試料では、PCR の反応系が 20 μ l と 100 μ l でともに変動係数は 200%程度であった。20 μ l 系で得られた N.D.を含む実測値の平均値は 2~3 コピー/キャピラリーカラム (tube) であり、100 μ l 系では実測値の平均値が 6~23 コピー/tube に上昇したものの変動係数や N.D.の数は 20 μ l 系の定量結果と大差が見られなかった。20 μ l 系の実測値の平均値が 4 コピー/tube 程度となることで、100 μ l 系では実測値の N.D.の数が少なくなるとともに変動係数は低下した。20 μ l と 100 μ l でともに実測値の上昇とともに N.D.の数や変動係数は減少傾向が顕著となり、PCR の実測値が 1,000 コピー/tube 以上であれば変動係数は 3.7~7.7%までに収束した。

同一試料を 20 μ l と 100 μ l 系で同時・多重測定を行うことで、変動係数などに及ぼす影響を評価したが、20 μ l を 100 μ l 系に変更することで PCR の実測値は高まるため、変動係数の低下に一定の効果があり、安定した定量値が得られることが明らかとなった。

本評価結果から 20 μ l 系での平均実測値が 4 コピー/tube 程度の試料であれば、100 μ l 系での測定とすることで PCR の実測値に含まれる N.D.値が少なくなり、変動係数も大幅に低下した。しかし、20 μ l の反応系において実測値が 2 コピー/tube 程度では、100 μ l の反応系としても、変動係数等に改善効果が見られなかったことから、極低濃度試料に対しては、何らかの改善策を考慮しなければならない。図-3 には tube 中に含まれる cDNA 量の違いが実測値に与える影響として、遺伝子分析量の比較概念図を示した。今回の評価結果では PCR 実測値の平均値 (n=20) が約 8 コピー/20 μ l tube であれば N.D.値の数が減少していることから、20 μ l の反応系に 100 コピー程度存在すれば、PCR 反応に供する 1 回分 (n=1) の分析水量が 2 μ l であることから、PCR 実測値は 10 コピー程度となり、実測値に大きな影響は及ぼさないと考えられた。それ以下の低濃度においては PCR の実測値の変動係数が大きくなり、特に、極低濃度試料では PCR の実測値において N.D.の評価となる可能性が高まるため、極低濃度試料の測定においては、極力分析水量を多くするための多重測定等の概念を取り入れることが必要と考えられた。また、多重測定を行うことで分析水量が増加するため検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上する。

表-2 は得られた実測値から分析に利用した水量・遺伝子量から換算した各試料の検出濃度を算出したものである。PCR 実測値の変動係数が高い試料では、20 μ l と 100 μ l 系の検出濃度に 2 倍程度の違いが見られたが、変動係数が低くなることで 20 μ l と 100 μ l 系の検出濃度の

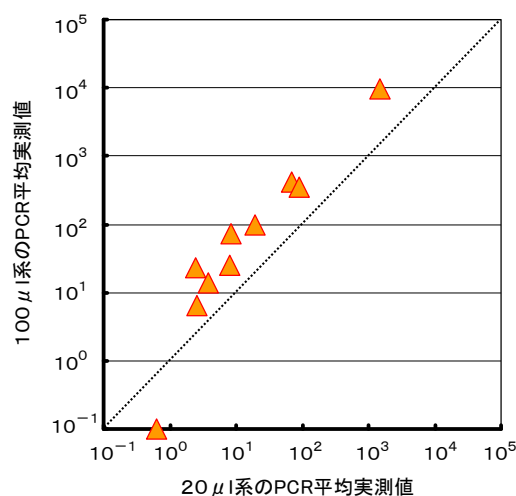


図-1 20 μ lと100 μ l系の実測値の比較

表－1 異なる分析水量における多重測定の結果

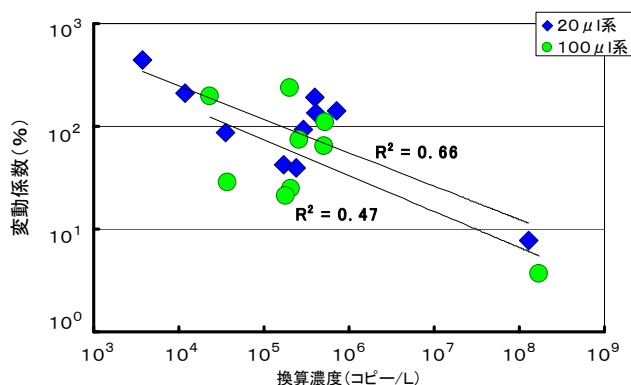
Sample	20 μ l 系での多重測定				100 μ l 系での多重測定			
	実測値範囲と平均・中央値 (コピー/20 μ l tube)	n=20の 内 0の個数	標準 偏差	変動係数 (%)	実測値範囲と平均・中央値 (コピー/100 μ l tube)	n=20の 内 0の個数	標準 偏差	変動係数 (%)
Sample A	0 - 12.7, (0.63), (0)	19	2.83	447	0, (0), (0)	20	—	—
Sample B	0 - 14.9, (2.41), (0)	16	5.05	210	0-152, (23.1), (0)	15	45.1	196
Sample C	0 - 17.3, (2.61), (0)	15	4.98	191	0-63.5, (6.46), (0)	15	15.3	237
Sample D	0 - 17.68, (3.83), (0.61)	10	5.43	142	0 - 55.7, (14.0), (7.71) ※	2	15.3	109
Sample E	0 - 39.4, (7.97), (0)	11	10.8	136	0-68.1, (25.1), (23.6)	3	18.5	74
Sample F	0 - 26.6, (8.38), (8.07)	6	7.88	94	6.9-163, (72.0), (62.1)	0	47.0	65
Sample G	0-53.3, (19.0), (15.8)	4	16.3	86.2	54.2-157, (98.8), (91.2)	0	28.4	28.7
Sample H	17.3-124, (67.5), (63.7)	0	28.8	42.7	255-672, (417), (436)	0	102	24.5
Sample I	36.4-161, (90.9), (79.7)	0	36.2	39.8	238-523, (351), (337)	0	73.6	20.9
Sample J	1,279-1,761, (1,499), (1,475)	0	115	7.7	8,860-10,200, (9,505), (9,480)	0	354	3.7

※n=18

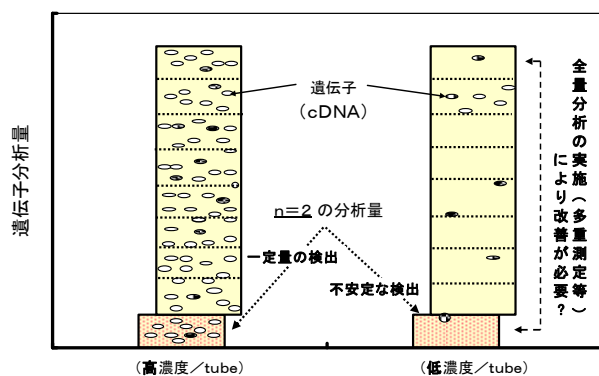
表－2 PCR平均実測値からの換算濃度

Sample	換算濃度 (コピー/L)		濃度比 ②/①
	20 μ l 系 ①	100 μ l 系 ②	
Sample A	3.7E+03	—	—
Sample B	1.2E+04	2.3E+04	1.92
Sample C	4.0E+05	2.0E+05	2.00
Sample D	7.1E+05	5.2E+05	0.73
Sample E	4.1E+05	2.6E+05	0.63
Sample F	2.9E+05	5.1E+05	1.76
Sample G	3.5E+04	3.7E+04	1.06
Sample H	1.7E+05	2.1E+05	1.24
Sample I	2.4E+05	1.8E+05	0.75
Sample J	1.3E+08	1.7E+08	1.31

(実測値はn=20の平均値、E～Jの濃度比平均値1.1)



図－2 換算濃度と変動係数の関係



図－3 遺伝子分析量の比較概念図

違いは平均で 1.1 倍程度となり、大差が無いことが明らかとなった。

以上のことから、試料中のウイルス濃度が極めて低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には多重測定により分析水量を増加させ、安定した PCR 実測値を得る必要がある。

4.2 ノロウイルス代替指標を対象とした塩素、紫外線消毒による遺伝子減少量評価と不活化効果の推定

塩素、紫外線消毒によるネコカリシウイルス遺伝子の減少量の評価結果を図－4、5 に示す。過年度までに得られたノロウイルスの結果についても併せてプロットした。塩素消毒による Ct 値や紫外線量を高めることで、ネコカリシウイルスの遺伝子量は減少傾向を示しており、Ct 値や紫外線量と遺伝子減少量には相関関係が見られ、消毒によりノロウイルスとネコカリシウイルスの遺伝子の定量値が減少することが確認された。さらに、ネコカリシウイルスの遺伝子減少量と生残率の関係について整理したものを図－8、9 に示すが、塩素消毒での Ct 値は 0～200mg・min/L、紫外線消毒では 0～60mWs/cm² の範囲内のものである。減少量と生残率の評価においては Ct 値や線量に若干の違いがあるとともに、データ数は限定されるが、ともに相関関係が示されており、1log 程度の遺伝子減少量が得られれば生残率は 5～7log 程度低下することが明らかとなった。

ネコカリシウイルスの不活化実験⁷⁾ では、3log の不活化に必要な塩素消毒の Ct 値は 40～50mg・min/L、紫外線照射量においては 20mWs/cm² 程度である (図－6、7)。同様の実験例でもほぼ同じ結果が得られている^{8) 9)}。塩素消毒の Ct 値や紫外線量を高めることでネコカリシウイルスの不活化効果が確認されたが、同じく代替指標としてのマウスノロウイルスを用いた塩素消毒の不活化評価結果では、Ct 値が 2mg・min/L 程度で 4log 以上との

8.3 水環境中における病原微生物の消長に関する研究

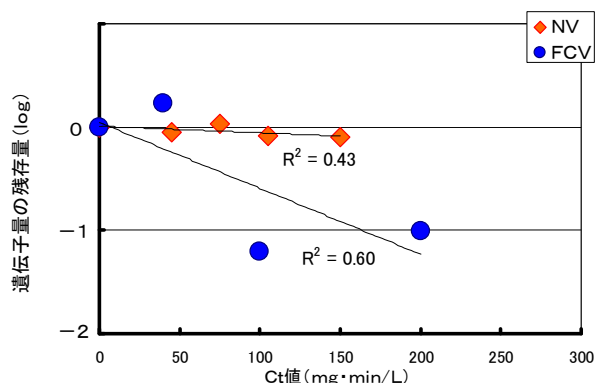


図-4 塩素消毒のCt値と遺伝子減少量の関係

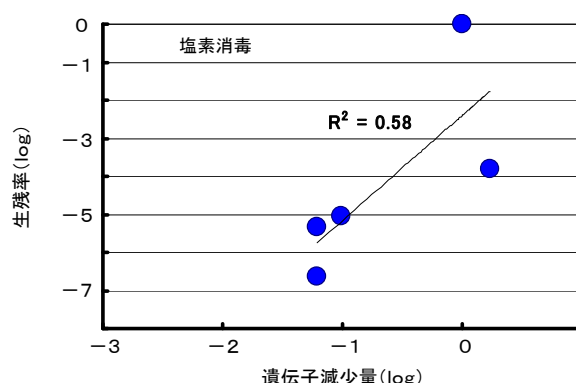


図-8 FCVの遺伝子残存量と生存率の関係

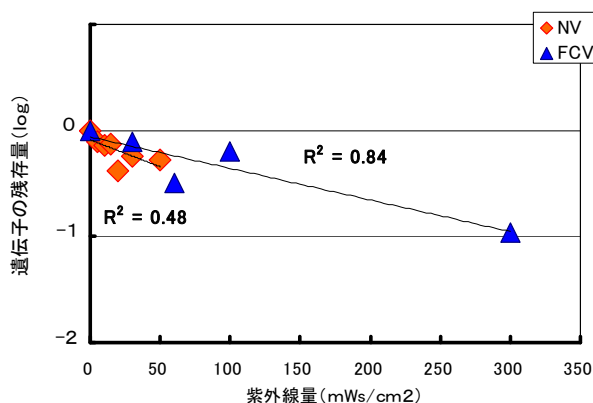


図-5 紫外線照射量と遺伝子残存量の関係

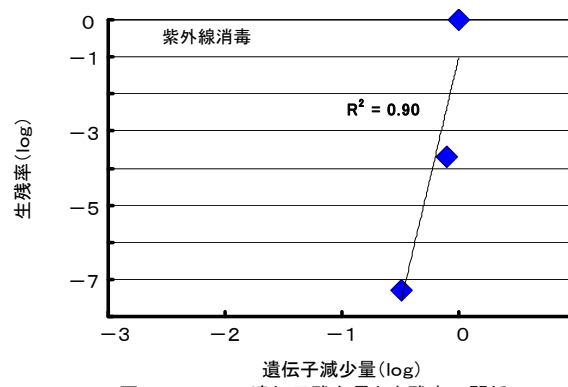


図-9 FCVの遺伝子残存量と生存率の関係

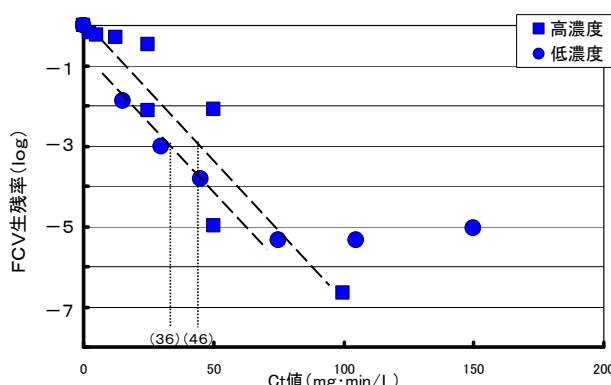


図-6 塩素消毒のCt値とFCVの生存率

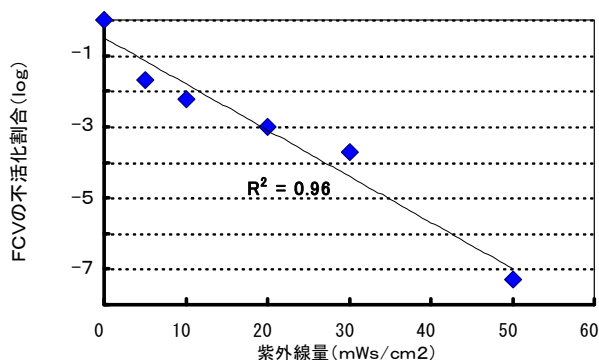


図-7 紫外線照射によるFCVの生存割合

報告例がある¹⁰⁾。また、他の腸管系ウイルスとしてエコーウイルス、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 20.5~27mWs/cm²、アデノウイルスは 119mWs/cm²と報告されている¹¹⁾。このため、これらネコカリシウイルスや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推定される。

以上のことから、塩素、紫外線消毒によりノロウイルスとネコカリシウイルスの遺伝子の定量値に影響を及ぼすことが確認されたことや、類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。一方、ネコカリシウイルスや腸管系ウイルスの不活化効果を把握するためには、細胞培養法による評価となるため、大腸菌により培養が容易なファージを利用した評価手法についても検討する必要がある。

4.3 クリプトスポリジウムの不活化実験結果

塩素消毒後のオーシストを 10²~10⁴オーシスト数に調整しIntestine407細胞に接種、24時間培養後のオーシスト数の増加が見られたものを陽性としMPN表にあてはめ、オーシスト数を求めた。対照でのオーシスト数は

150000 個に比較して、20mg/L・1 時間消毒でのオーシスト数は9200 個と算出されたことから、不活化率は約94%と見積もられた。また、2 時間作用後の不活化率は約92%であったことから既存の報告値^{12) 13)}とほぼ一致するものであった。しかし、細胞培養により感染性の有無を評価する場合、培養操作の煩雑性やオーシスト数が低濃度であると顕微鏡観察の作業性から、高効率な手法の検討が必要となると考えられた。今後、mRNAを指標とした感染性評価を検討する予定である。

5. まとめ

21 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、低濃度域試料を対象として検出濃度の精度向上を目的に、ウイルス検出濃度に及ぼす分析水量とウイルス濃度の影響を評価した。また、ノロウイルスの不活化効果を推定するためにノロウイルス代替指標としてネコカリシウイルスを対象として塩素、紫外線消毒実験を行い、消毒レベルの違いによる遺伝子量の減少割合を評価した。クリプトスポリジウムに関しては、リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子減少量を比較評価するため、オーシストの不活化割合を細胞培養法により把握し基礎データを得た。以下に得られた結果を示す。

- 1) ウイルス濃度が極めて低い環境水や消毒後処理水を測定する場合には、20 μ L から 100 μ L 系へ変更することや多重測定により分析水量を増加させ、安定した PCR 実測値を得ることが必要である。
- 2) 多重測定を行うことで分析水量が増加するため検出限界値の低濃度化に繋がることから、N.D.と評価されたデータの信頼性が向上する。
- 3) 塩素、紫外線消毒によりネコカリシウイルス遺伝子減少量を評価したが、各消毒法ともに遺伝子の定量値を減少させることが確認され、遺伝子減少量と生残率との間には相関が見られた。
- 4) 類似あるいは他の腸管系ウイルスの不活化評価事例から勘案するとノロウイルスの消毒耐性は、それら他のウイルスと大差がないと考えられた。
- 5) 塩素消毒によるクリプトスポリジウムの不活化効果を細胞培養法で評価したが、Ct 値が 1,200～2,400mg・min/L の範囲において約 1log と見積もられた。

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) 諏訪守、岡本誠一郎、桜井健介 (2009), 各種下水処理法によるノロウイルス除去率の評価と測定技術の課題, 第 12 回日本水環境学会シンポジウム講演集,239-240.
- 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 (2007)、ノロウイルスの検出法について.
- 6) Duizer E, et al. (2004) Inactivation of caliciviruses, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4538-4543.
- 7) 土木研究所資料第 4157 号(2009)、平成 20 年度下水道関係調査研究年次報告書集.
- 8) 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.
- 9) T.Iwasaki, et al. (2007) Inactivation Effect of Ultraviolet Radiation on Norovirus (NV), 14th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 392.
- 10) 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.
- 11) Charles P. Gerba, et al. (2002) Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5167-5169.
- 12) (社) 日本水道協会、クリプトスポリジウム—解説と試験方法—
- 13) (社) 日本水環境学会、第 51 回日本水環境学会セミナー (2000)、病原性微生物による水系感染症の現状と対策、講演要旨集.

STUDY OF THE FATE OF PATHOGENS IN WATER ENVIRONMENTS

Budget: Grants for operating expenses

Research Period: FY2006–2010

Research Team: Material and Geotechnical
Engineering Research Group
(Recycling Team)

Authors: Seiichiro OKAMOTO

Mamoru SUWA

Kensuke SAKURAI

Abstract: In recent years, outbreaks of water-borne diseases 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, and to develop a molecular biology technique, the polymerase chain reaction method, to be used to detect pathogens of trace levels (such as *Norovirus* and *Cryptosporidium*).

In FY2009, the influence of the difference of the concentration and volume of analysis sample on *Norovirus* detection concentration by real time RT-PCR was evaluated. In addition, the ratio of the decrease of the *Feline Calicivirus* gene caused by chlorination and ultraviolet-ray disinfection as the *Norovirus* substitution index was evaluated.

The results showed that it was necessary to increase the analysis volume of samples and to conduct multiple measurements, for the decreased variation coefficient of the PCR actual measurement values if the concentration of *Norovirus* was low in the samples. We confirmed that both the chlorine and ultraviolet-ray disinfection methods lowered the detected values of genes of both the *Feline Calicivirus* and *Norovirus*. Therefore, the resistance of *Norovirus* to disinfection was estimated to be similar to that of *Feline Calicivirus*.

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