

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22760408

研究課題名（和文） マウス分離株を代替指標としたヒトノロウイルスの浄水・下水処理による低減効果の解明

研究課題名（英文） Reduction of human norovirus during drinking water and wastewater treatment processes using murine norovirus as a surrogate

研究代表者

原本 英司（HARAMOTO EIJI）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：00401141

研究成果の概要（和文）：本研究では、近年その流行が社会的問題となっているヒトノロウイルスの水処理工程における低減効果を明らかにすることを目的とした。ヒトノロウイルスに近縁であるマウスノロウイルスを用いることにより、ウイルス定量操作における効率を補正してより正確な定量値を算出し、信頼できる低減効果を求めることが可能となった。この手法を適用した結果、国内の下水処理場においてノロウイルスは約 2 log (99%) 除去可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to determine the removal/inactivation efficiency of human noroviruses during water treatment processes. Murine norovirus was used as an internal control to adjust the concentration of human noroviruses obtained by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Based on the results of the survey conducted at a Japanese wastewater treatment plant, the removal ratio of human noroviruses was found to be approximately 2 log (99%).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：土壌・水環境

1. 研究開始当初の背景

腸管系ウイルスの 1 種であるノロウイルスは、核酸（1 本鎖 RNA）が直径 30～38nm の外套蛋白に覆われた構造をしている。核酸の遺伝子解析に基づき、ノロウイルスは GI～GV の 5 種類の遺伝子群に分類されており、そのうち GI, GII および GIV がヒトに感染し（ヒトノロウイルス）、GIII はウシ、GV はマウスに感染することが知られている。

ヒトノロウイルスはウイルス性胃腸炎の 90% 以上に関与しており、疫学的に非常に重要なウイルスである。汚染された水や食物を介して経口的に体内に侵入したヒトノロウイルスは、腸管内で大量増殖し、下痢や嘔吐、発熱等の症状を引き起こしながら糞便中に高濃度で排出される。そのため、下水処理場の流入水や放流水、河川、海水、さらには水道水等の様々な水環境中にヒトノロウイルス

スが広く存在することが明らかとなってきたおり、遊泳行為での誤飲や水道水の飲用を介したヒトノロウイルスの再感染の発生が懸念される。

ヒトノロウイルスは、動物細胞を用いた培養系が確立されていないため、その検出には定量PCR法が用いられることが一般的である。定量PCR法は高感度かつ特異的なウイルス核酸の検出が可能な点で優れているが、感染力を失ったウイルスも核酸が残存していれば検出してしまう可能性があり、感染リスクを評価する上で支障となっている。

ヒトノロウイルスの感染力を推定するため、ノロウイルスに比較的近縁であり、細胞培養系が確立されているネコカリシウイルスが代替として消毒実験等に用いられている。しかしながら、ネコカリシウイルスはネコの呼吸器に感染するウイルスであり、腸管組織に感染するノロウイルスとは性状が大きく異なる点に問題がある。また、ノロウイルスの外殻蛋白をカイコで発現させたウイルス様中空粒子 (VLP) も代替として使用されているが、検出感度が低い点および感染力の有無を判別できない点に問題がある。

2004年にマウスから分離されたマウスノロウイルスは、ヒトノロウイルスに非常に近縁な遺伝子群 (GV) に属し、マウス細胞を用いて容易に培養が可能である。そのため、現在、ヒトノロウイルスの最も有力な代替指標であると言える。

ヒトノロウイルスの水環境中での循環サイクルを遮断する上で、下水処理場や浄水場等のウイルスのコントロールポイントとなり得る施設でのウイルスの低減効果を明らかにすることは非常に重要であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、近年その流行が社会的問題となっているヒトノロウイルスの下水処理工程における低減効果を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、ヒトノロウイルスと同じカリシウイルス科ノロウイルス属に属し、細胞培養が可能なマウスノロウイルスを内標準物質として用いることにより、ウイルス定量操作における検出効率を補正し、より正確な定量値の算出を可能とすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 試料の採取

2011年1月～2012年2月の14ヶ月間にわたり、標準活性汚泥法を導入している国内の下水処理場において毎月1回の頻度で流入水と処理水 (塩素消毒前の2次処理水) を採取した。滅菌済みのポリ容器に満水まで試料を入れ、保冷して2時間以内に実験室まで輸送し、速やかに以下の操作に供した。

(2) ウイルスの濃縮

下水試料中のウイルスの濃縮には陰電荷膜破砕型濃縮法 (原本ら (2010) *水道協会雑誌*, 79(10):2-11) を用いた。流入水 100mL および処理水 2L に 2.5mol/L $MgCl_2$ 1mL あるいは 20mL を添加して十分に混合した後、陰電荷膜 (混合セルロース膜、直径 90mm, 孔径 0.8 μm , Millipore) で全量をろ過した。ろ過後の陰電荷膜をフィルターホルダーから剥がし、PET 溶液 (0.2g/L $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$, 0.3g/L $C_{10}H_{13}N_2O_8Na_3 \cdot 3H_2O$, 0.1mL/L Tween 80) 15mL とフットボール型攪拌子を入れた遠沈管内で激しく攪拌して膜を数 mm 四方以下に破砕した。スポイトを用いて溶液の全量を新しい遠沈管に移し入れて遠心 (2,000 $\times g$, 10分, 4 $^{\circ}C$) し、上清をウイルス濃縮液として回収した。

(3) RNA 抽出および逆転写反応

ウイルス濃縮液からの RNA 抽出には QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用いた。このとき、ウイルス濃縮液 140 μL に加えてマウスノロウイルス高濃度溶液 1.4 μL も RNA 抽出操作に供することにより、試料由来のウイルス RNA とマウスノロウイルス RNA の双方を含む RNA 抽出液 60 μL を得た。なお、反応阻害を受けていないコントロール試料は、ウイルス濃縮液の代わりに PCR-grade water 140 μL を RNA 抽出操作に供することによって作成した。

RNA 抽出液から 16 μL を分取し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いた逆転写反応 (25 $^{\circ}C$ 10分→37 $^{\circ}C$ 120分→85 $^{\circ}C$ 5分) によって cDNA 溶液 32 μL を得た。

(4) ノロウイルス GI および GII の定量 PCR

cDNA 溶液から 5 μL を分取し、PCR 反応液 20 μL (Premix Ex Taq (Probe qPCR)) (Takara Bio) 12.5 μL , プライマー (10 μM) 各 1 μL , TaqMan プローブ (5 μM) 1 μL , PCR-grade water 4.5 μL) と混合して定量 PCR を実行した。使用したプライマーと TaqMan プローブは、ノロウイルス GI および GII それぞれに特異的なものであり、その塩基配列は表 1 に示す通りである (Kageyama *et al.* (2003) *J. Clin. Microbiol.*, 41:1548-1557.)。定量 PCR 装置には Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 (Takara Bio) を使用し、95 $^{\circ}C$ で 30 秒間加熱した後、95 $^{\circ}C$ で 5 秒間と 56 $^{\circ}C$ で 30 秒間からなる PCR サイクルを 45 回繰り返した。検量線の作成には、人工合成オリゴ DNA (日本遺伝子研究所) の 10 倍段階希釈液を用いた。ネガティブコントロールには、cDNA 溶液の代わりに PCR-grade water を使用した。なお、1 試料につき 2 ウェルを定量 PCR に供した。

表1 ノロウイルス GI および GII 検出用のプライマーと TaqMan プローブの塩基配列

Geno-group	Function	Sequence (3'-5')
I	Forward primer	CGYGGATGCGNTTYCATGA
	Reverse primer	CTTAGACGCCATCATCATTYAC
	TaqMan probe	FAM-AGATYGGGATCYCCTGTCCA-TAMRA
II	Forward primer	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
	Reverse primer	TGCAGCCATCTTCATTACA
	TaqMan probe	FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-TAMRA

(5) マウスノロウイルスの定量 PCR

内標準物質として添加したマウスノロウイルスの定量 PCR には、表 2 に示すプライマーと TaqMan MGB プローブを使用した (Kitajima *et al.* (2010) *J. Virol. Methods*, 169:269-273.)。PCR 反応液中のプライマーとプローブの組成は、ノロウイルス GI および GII の場合と同じとした。PCR サイクルについても、伸長温度を 60°C に設定した以外はノロウイルス GI および GII の場合と同じとした。

表2 マウスノロウイルス検出用のプライマーおよび TaqMan MGB プローブの塩基配列

Function	Sequence (3'-5')
Forward primer	CCGCAGGAACGCTCAGCAG
Reverse primer	GGYTGAATGGGACGGCCTG
TaqMan MGB probe	FAM-ATGAGTGATGGCGCA-MGB-NFQ

(6) 試料中のノロウイルス GI および GII の濃度の算出

マウスノロウイルスの定量 PCR の測定結果を用い、コントロール試料中のウイルス濃度に対する下水試料中のウイルス濃度の割合を算出することにより、マウスノロウイルスの検出効率を求めた。この検出効率の値を用いて PCR チューブ中のノロウイルス GI および GII の濃度 (copies/well) を補正し、元の試料中の濃度 (copies/L) を算出した。

(7) 下水処理工程におけるノロウイルス GI および GII の除去率の算出

ノロウイルス GI および GII のそれぞれについて、流入水と処理水のいずれからもウイルスが検出された採水月を選び出し、下水処理工程でのウイルスの除去率を算出した。

4. 研究成果

(1) マウスノロウイルスの検出効率

RNA 抽出の際に添加したマウスノロウイルスの定量結果を基に算出した検出効率は、平均 142.8% (87.9~243.3%, $n=28$) であった。このことより、RNA 抽出、逆転写反応および定量 PCR での反応阻害は、いずれの試料にお

いても無視できるものであると判断した。次節以降に示すノロウイルス GI と GII の濃度は、試料別の検出効率で補正した値を示している。

(2) 下水試料中のノロウイルス GI の濃度

表 3 に示すように、ノロウイルス GI は、流入水の 93% (13/14) および処理水の 79% (11/14) から検出され、陽性試料中の濃度はそれぞれ 3.37~6.96 log copies/L (平均 5.51 log copies/L) と 2.38~4.45 log copies/L (平均 3.52 log copies/L) であった。陽性率および濃度共に、冬期に高い値を示す傾向が認められ、疫学的な感染流行状況と同一のものであった。

表3 下水試料中のノロウイルス GI の濃度および除去率

Year	Month	Concentration (log copies/L)		Removal (log)
		Raw sewage	Treated sewage	
2011	Jan	6.92	4.45	2.46
	Feb	6.50	3.84	2.67
	Mar	6.21	4.09	2.12
	Apr	5.68	n. d.	n. d.
	May	5.17	3.82	1.35
	June	5.95	n. d.	n. d.
	July	3.37	n. d.	n. d.
	Aug	4.63	2.38	2.26
	Sep	n. d.	2.93	n. d.
	Oct	4.09	2.87	1.21
	Nov	5.13	3.15	1.98
	Dec	4.93	2.85	2.07
2012	Jan	6.96	4.14	2.82
	Feb	6.12	4.16	1.96
Total	Mean	5.51	3.52	2.09
	SD	1.08	0.70	0.51

n. d., not detected or not determined.

(2) 下水試料中のノロウイルス GII の濃度

表 4 に示すように、ノロウイルス GII は、流入水の 71% (10/14) および処理水の 36% (5/14) から検出され、陽性試料中の濃度はそれぞれ 6.10~7.70 log copies/L (平均 7.03 log copies/L) と 4.38~5.36 log copies/L (平均 4.84 log copies/L) であった。GI に比べ、GII の陽性率は低い値であったが、陽性試料中の濃度は平均で 1 log 以上高い値を示した。また、GI と同様に、陽性率と濃度は冬期に高い値を示す傾向が認められた。

表4 下水試料中のノロウイルス GII の濃度
および除去率

Year	Month	Concentration (log copies/L)		Removal (log)
		Raw sewage	Treated sewage	
2011	Jan	7.45	n. d.	n. d.
	Feb	7.41	n. d.	n. d.
	Mar	n. d.	n. d.	n. d.
	Apr	n. d.	n. d.	n. d.
	May	7.10	n. d.	n. d.
	June	n. d.	n. d.	n. d.
	July	6.38	n. d.	n. d.
	Aug	6.10	n. d.	n. d.
	Sep	n. d.	n. d.	n. d.
	Oct	6.31	4.38	1.94
	Nov	7.17	4.84	2.33
	Dec	7.33	4.42	2.91
2012	Jan	7.70	5.36	2.34
	Feb	7.40	5.19	2.20
Total	Mean	7.03	4.84	2.34
	SD	0.56	0.44	0.35

n. d., not detected or not determined.

(3) ノロウイルス GI および GII の除去率

流入水と処理水中の濃度測定結果から算出したノロウイルスの除去率は、GI が平均 2.09 log (1.21~2.82 log, $n = 10$), GII が平均 2.34 log (1.94~2.91 log, $n = 5$) となった。標準偏差は、GI (0.51 log) および GII (0.35 log) のいずれも小さい値であり、流入水中の濃度変動に関わらず、下水処理工程で常時 2 log (99%) 程度の安定したウイルスの除去が達成されていることが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 小田切美希栄, 原本英司, 北島正章, 坂本康: 陰電荷膜破碎型濃縮法を用いた環境水中の病原微生物の濃度変動解析, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月, 東京.
- ② 小田切美希栄, 原本英司: 下水および河川水を対象にした陰電荷膜破碎型ウイルス・原虫同時濃縮法の開発, 第 45 回日本水環境学会年会, 2011 年 3 月, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原本 英司 (HARAMOTO EIJI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 00401141

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし