

紫外線消毒によるノロウイルスの不活化とその効果の推定手法

李 善太・諏訪 守・重村浩之

1. はじめに

ノロウイルス (Norovirus; NoV) は、感染力が非常に強く、下痢症や重篤な胃腸炎を引き起こすヒト病原ウイルスである。下水処理場には、NoVによる感染性胃腸炎の感染者から排出されるNoVが高濃度で流入するため、下水処理場において適切に消毒処理を行い、放流水の水質管理をしていくことが重要と考える。NoVは現在、分子生物学的手法のPCR法 (Polymerase Chain Reaction; PCR) が濃度測定に多く用いられている。PCR法は検出対象のウイルス遺伝子をターゲットとして、その遺伝子濃度を測定することから迅速性や特異性において優れているが、感染力のないウイルスの遺伝子も測定してしまう欠点があり、この手法だけでは消毒効果を把握できない。

本稿では、消毒によるNoVの不活化推定手法の提案を目的に、F特異RNAファージを用いて推定することを試みたので、その研究成果について報告する。

2. ウイルスの不活化効果と遺伝子低減効果

図-1に紫外線消毒によるウイルスの不活化および遺伝子低減効果とウイルス検出手法の関係を示す。紫外線消毒はウイルス遺伝子へ直接作用することにより遺伝子を損傷させてウイルスを不活化 (ウイルスの感染性を失わせること) させるが、NoVは培養細胞による培養法 (人工的な環境下で増殖させ、感染力の有るウイルスの濃度を測定する手法) が確立されていないため不活化効果の定量が困難である。一方、紫外線照射量をより多くすることでPCR法の検出対象としている遺伝子部位もより多くのウイルスで損傷されるため、PCR法によるNoVの遺伝子低減効果 (感染性の有無は関係なく、PCR法の検出対象としている遺伝子部位の濃度が低減された効果) の定量は可能である。しかし、より多くの紫外線を照射し、

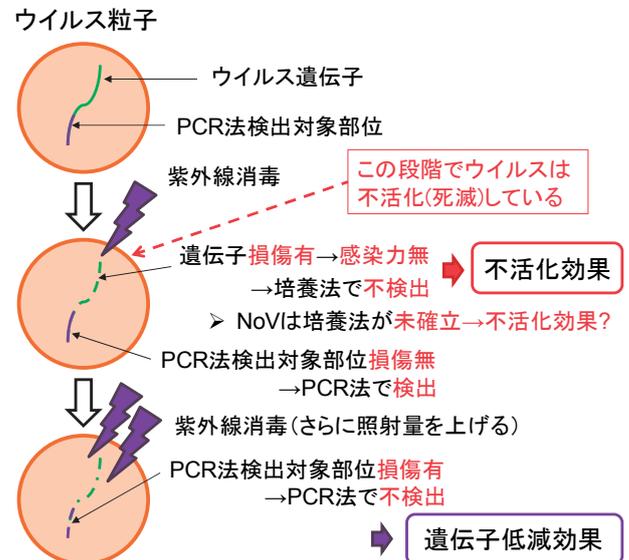


図-1 紫外線消毒によるウイルスの不活化および遺伝子低減効果とウイルス検出手法の関係

PCR法の検出対象としている遺伝子部位まで損傷させ、測定値をさらに低減させることは、不活化の観点から過剰となる。そのため、下水処理場において目標とすべき消毒レベルを設定するためには、不活化効果を基に設定することが望ましいと考えられる。そこで、新たなNoVの不活化推定手法を構築し、その手法に基づいて消毒レベルを把握する必要がある。

3. F特異RNAファージを用いた推定手法

大腸菌ファージは、大腸菌に感染するウイルスであり、その中でもF特異RNAファージ (F-specific RNA bacteriophage; FRNAPH) は、大きさ (直径約20~40 nm) や構造 (正二十面体) がNoVと同じだが、人への危険性がなく、培養法による定量が可能である。また、FRNAPHは、NoVと同様に下水処理場において高頻度で検出されていることから、本研究ではFRNAPHに注目した。図-2にFRNAPHからNoVの不活化効果を推定する方法の概要を示す。FRNAPHは、培養法とPCR法を組み合わせたIC-PCR法 (Integrated Culture-PCR; IC-PCR) により感染力を有するFRNAPH濃度を定量することが可能

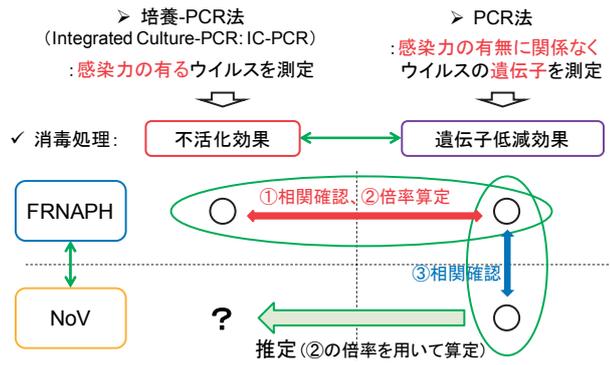


図-2 FRNAPHからNoVの不活化効果の推定方法の概要

であり¹⁾、この手法により紫外線消毒での不活化効果を把握することができる。また、PCR法によりFRNAPHの遺伝子濃度を定量することで、消毒での遺伝子低減効果も把握することが可能である。このことから、両方の測定手法を組み合わせることで不活化効果と遺伝子低減効果との関連性を把握することが可能である。さらに、PCR法でのみ検出可能なNoVにおいて、同様のPCR法により定量されるFRNAPHとの関連性が示された場合、IC-PCR法により不活化効果の定量が可能なFRNAPHを用いて、NoVの不活化効果を推定できると可能性があると考えられる。

なお、NoVとFRNAPHの消毒への耐性の違いについては、現状においては明確にはなっておらず、今回の検討においては、両者の消毒への耐性が同レベルと仮定して検討を行うこととした。

4. 検討方法

4.1 紫外線消毒実験

A下水処理場で採取した処理水を試験水として、回分式紫外線消毒実験を実施した。所定の時間紫外線を照射し、照射前後でのFRNAPHとNoVの濃度を定量した。しかし、実験で用いた試験水には、感染力を有するFRNAPHが紫外線消毒後に全て検出されるほど高濃度に存在していない。そのため、試験水中のFRNAPHを人為的に高濃度に培養させ、約 10^6 MPN/100mLとなるように試験水に添加して同様の消毒実験を実施した。

4.2 FRNAPH及びNoVの定量方法

本研究では、FRNAPHの遺伝子群のうちNoVの代替指標として最も注目されているGII遺伝子群を分析対象とした。また、NoVは人に感染性を持ち日本国内の下水処理場で最も検出頻度および

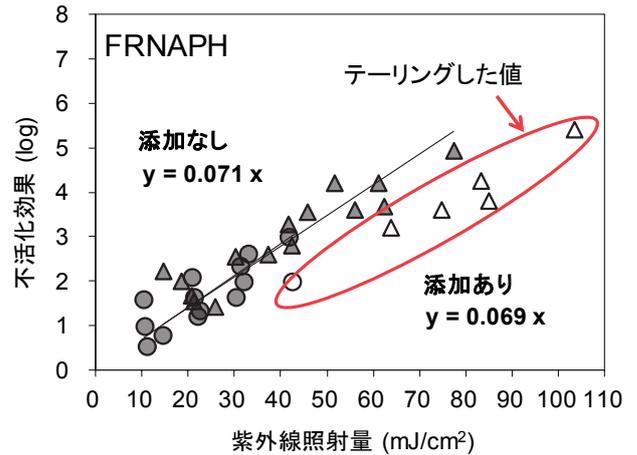


図-3 紫外線消毒実験における感染力を有したFRNAPHの不活化効果の比較

(●○ : 添加なし、▲△ : 添加あり、log除去 = $\log(\text{消毒前の濃度}/\text{消毒後の濃度})$ 、例) 1 log = 90%除去、2 log = 99%除去、3 log = 99.9%除去…)

濃度が高いGII遺伝子群を分析対象とした。FRNAPHはIC-PCR法¹⁾による感染力を有しているFRNAPHの濃度、PCR法²⁾によるFRNAPHの遺伝子濃度の2つの手法により定量した。NoVはPCR法³⁾によりNoVの遺伝子濃度を定量した。

5. FRNAPH不活化効果の定量

FRNAPH添加なしの場合の紫外線消毒によるFRNAPHの不活化効果をIC-PCR法により定量し算出した結果(図-3の●○)、紫外線照射量を増加させることで、全てのFRNAPHの不活化効果においてテーリング現象(水中の粒子による遮蔽効果により、紫外線照射量を増加させても不活化が進まない現象)が見られた。テーリングした値(図-3の○)を除外した近似直線から不活化速度定数($y = kx$ の傾き: k)を求めると、0.071であった。人為的に高濃度に培養したFRNAPHを添加した紫外線消毒実験では(図-3の▲△)、添加なしと同様にテーリング現象が見られた。同じくテーリングした値(図-3の△)を除外した近似直線より添加したFRNAPHの不活化速度定数(k)を求めると、0.069となり、添加なしと比べて大きな差は無かった。

6. FRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の定量

FRNAPH添加なしの場合の紫外線消毒によるFRNAPHの遺伝子低減効果をPCR法により定量し算出した結果(図-4左グラフの●)、近似直線により遺伝子低減速度定数($y = k_r x$ の傾き: k_r)

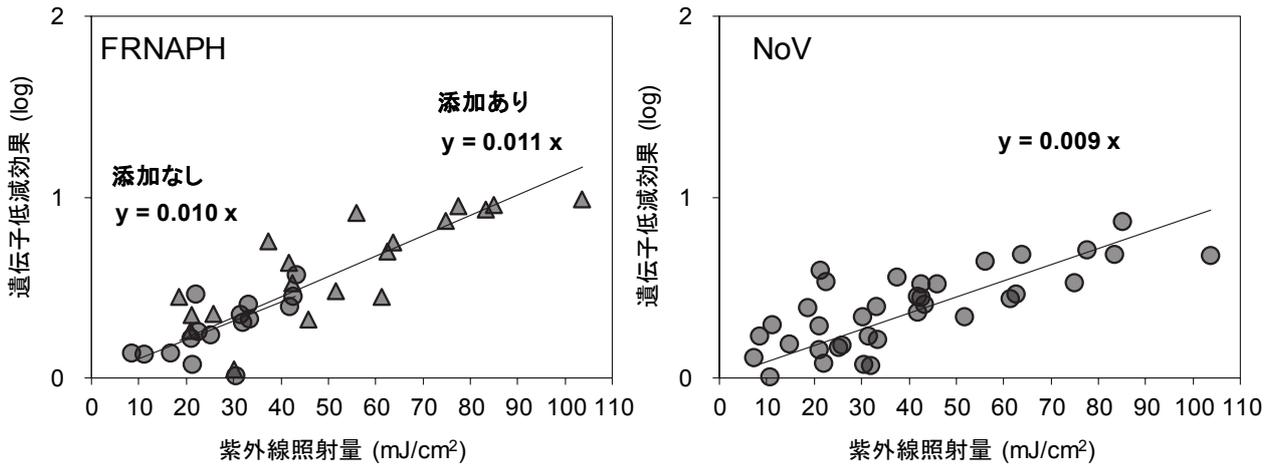


図-4 紫外線消毒実験におけるFRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の比較 (●：添加なし、▲：添加あり)

を求めると、0.010であった。人為的に高濃度に培養したFRNAPHを用いて添加した紫外線消毒実験の結果(図-4左グラフの▲)、 k_r は0.011であり、添加なしと比べて大きな差は無かった。

紫外線消毒によるNoVの遺伝子低減効果は(図-4右グラフ)、紫外線照射量を増加させることで線形に向上する傾向が見られた。そこで、近似直線から遺伝子低減速度定数(k_r)を求めると、0.009であった。

一方、FRNAPHとNoVの遺伝子低減効果において、30 mJ/cm²以下の紫外線照射量では、0 logに近い値が多く確認された。この理由としては、図-1で示したように紫外線照射量を増加してもPCR法の検出対象としている遺伝子部位まで損傷されなかったことから遺伝子低減効果が低かったことが考えられる。しかし、35 mJ/cm²以上の紫外線照射量ではPCR法の検出対象としている遺伝子部位まで損傷されたことから、0 logに近い値はなく遺伝子低減効果が上昇したと考えられた。

7. NoVの不活化効果の推定

7.1 遺伝子低減効果と不活化効果の関係整理

遺伝子低減効果から不活化効果の推定を行うため、FRNAPHにおいてIC-PCR法により得られた不活化効果とPCR法により得た遺伝子低減効果の関係を整理した。その結果、FRNAPHの不活化効果と遺伝子低減効果との相関係数が0.71であり有意な相関関係を示した(表-1)。次に、FRNAPHの遺伝子低減速度定数(k_r)から不活化速度定数(k_i)を求めるための倍率を調べた結

表-1 FRNAPHの不活化効果(IC-PCR)と遺伝子低減効果(PCR)との相関関係

| 相関係数 (n数) | |
|---------------|-------------------------|
| FRNAPH | 遺伝子低減効果(PCR) |
| 不活化効果(IC-PCR) | 0.71 (n = 34, P < 0.01) |

表-2 FRNAPHの遺伝子低減効果(PCR)から不活化効果(IC-PCR)の計算倍率

| | FRNAPH | |
|--------------------|---------|---------|
| | 添加なし | 添加あり |
| 遺伝子低減速度定数(k_r) | 0.010 | 0.011 |
| ↓ × 倍率 | ↓ × 7.1 | ↓ × 6.3 |
| 不活化速度定数(k_i) | 0.071 | 0.069 |

果(表-2)、FRNAPH添加なしで7.1倍、添加ありでは6.3倍であった。この倍率の中で、添加ありの6.3倍が安全側の評価となる可能性があると考えられ、こちらを採用した。

7.2 NoVの不活化効果の推定

紫外線消毒によるNoVの不活化効果を推定するため、同じ測定手法であるPCR法で得たFRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の関係を整理した。その結果、NoVとFRNAPHの遺伝子低減効果の間に有意な相関関係が得られた(表-3)。そこで、前項のFRNAPHにおける遺伝子低減効果から不活化速度定数への計算倍率(表-2、添加あり：6.3倍)を用いてNoVの不活化速度定数(k_i)を推算した(表-4)。推算されたNoVの不活化速度定数(k_i)は0.057であり、不活化速度定数(k_i)からNoVを1 log(90%)不活化するため

に必要な紫外線照射量 ($1/k_i$) を求めると、 17.6mJ/cm^2 が必要である結果となった(表-4)。冬季のNoVの流行時における下水処理場でのNoV濃度は非流行期の夏季と比べて100~1000倍(2~3log)程度高い。そのため、目標水質を非流行期の濃度レベルに設定すると、2~3log(99~99.9%)以上の低減効果が得られる消毒条件を設定する必要がある。上記の推定結果から、下水処理水中のNoVを2~3log以上不活化させるための紫外線照射量を計算すると、 $17.6 \times 2 \sim 3 = 35 \sim 53\text{mJ/cm}^2$ 以上必要であることが推算された。

8. まとめ

本研究では、FRNAPHを用いて紫外線消毒によるNoVの不活化効果の推定を試みるとともに、下水処理水中のNoVを2~3log以上不活化させるための紫外線照射量を推算した。その結果、FRNAPHにおいて、IC-PCR法により得られた不活化効果とPCR法により得た遺伝子低減効果の間に有意な相関関係を示したことから、遺伝子低減効果から不活化効果を推定できる可能性が示唆された。また、NoVとFRNAPHの遺伝子低減効果の間に有意な相関関係を示したことから、NoVとFRNAPHの消毒への耐性が同等という仮定のもと、FRNAPHを用いてNoVの不活化効果を推定できる可能性が示唆された。FRNAPHを用いてNoVの不活化速度定数 (k_i) を推算した結果、下水処理水中のNoVを2~3log以上不活化させるためには $35 \sim 53\text{mJ/cm}^2$ 以上の紫外線照射量が必要であることが考えられた。

公共用水域の衛生学的安全性を担保するため、病原性ウイルスであるNoVの不活化効果の推定手法を構築することで、水系感染リスクを低減させるため下水処理場における的確な消毒レベルの設定において有用な情報を提供できると考えられる。

表-3 FRNAPHとNoVの遺伝子低減効果の相関関係

| 相関係数 (n 数) | |
|---------------|-----------------------------|
| 遺伝子低減効果(PCR) | NoV |
| FRNAPH | 0.77 ($n = 33, P < 0.01$) |

表-4 FRNAPHからNoVの不活化効果の推定

| | NoV |
|--|---------|
| 遺伝子低減速度定数(k_i) | 0.009 |
| ↓ × 倍率(FRNAPH添加あり) | ↓ × 6.3 |
| 推算した不活化速度定数(k_i) | 0.057 |
| 1 log不活化に必要な紫外線照射量 $x (\text{mJ/cm}^2) = 1/k_i$ | 17.6 |

一方、ウイルスの消毒効果は消毒に用いる試料の水質によりその効果が大きく異なる。そのため、今後、同様な検討を様々な水質の試料を用いて行いデータを蓄積することで、より汎用性のある推定手法となることが考えられる。また、NoVとFRNAPHの消毒への耐性が同等かどうか、解明することも課題として残っている。

参考文献

- 1) Hata, A. et al.,: Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters, Appl. Environ. Microbiol., Vol.82, pp.4244-4252, 2016
- 2) Wolf, S. et al.,: Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR, J. Virol. Methods, Vol.149, pp.123-128, 2008
- 3) Kageyama, T. et al.,: Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR, J. Clin. Microbiol., Vol.41, No.4, pp.1548-1557, 2003

李 善太



土木研究所先端材料資源研究センター材料資源研究グループ資源循環担当 研究員、博士(工学)
Dr. Suntae LEE

諏訪 守



土木研究所先端材料資源研究センター材料資源研究グループ資源循環担当 主任研究員、博士(工学)
Dr. Mamoru SUWA

重村浩之



土木研究所先端材料資源研究センター材料資源研究グループ資源循環担当 上席研究員
Hiroyuki SHIGEMURA