

環境水中のノロウイルス分析方法

東和環境科学株式会社 環境部 分析課 原 弘之

ノロウイルスは、ヒト等の腸管で増殖し、糞便とともに大量に排出され、環境水の汚染を引き起こす可能性があるため、リスク管理の重要性が増しています。2012年、下水道試験方法にノロウイルスの検査方法が整備され、定量分析が可能となりました。その分析方法を実例と合わせて紹介します。

はじめに

ノロウイルスは、感染性胃腸炎の代表的な原因ウイルスとして知られており、近年、冬季を中心に感染する患者が多数報告されています。貝類の摂取による感染のほか、ヒトからヒトへの感染も多く(図1)、重症化する場合があります。また、ヒトから排泄される糞便が、下水を通じて環境水を汚染している実態が確認されており、環境水中のノロウイルスの検査方法の確立が急務となっていました。

ノロウイルスは、細胞培養法による検出が困難であるため、分子遺伝学的手法を用いた検査方法の開発が進められてきました。そのようななか、当社では、リアルタイムRT-PCR法¹⁾によりさまざまな環境水中のノロウイルスの定量分析に取り組み、非常に高精度に検出することが可能となりました。本法は、ウイルス遺伝子を増幅させて検出する方法であり、2012年に「下水道試験方法」に採用されました。ここでは、その分析方法を実例とともに紹介します。

ノロウイルスに感染

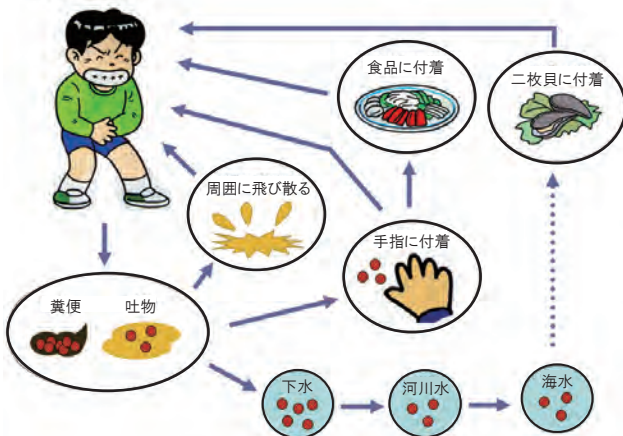


図1 ノロウイルスの感染経路

ノロウイルスの分析方法

(1)環境試料の濃縮

環境試料中のノロウイルスの濃度は、感染者から排泄される糞便中の濃度に比べて低濃度であり、測定には濃縮操作が必要となります。ウイルスの濃縮方法は多岐にわたりますが、代表的な方法は、ポリエチレングリコール沈殿法(以下、PEG沈殿法)、超高速遠心濃縮法(以下、

超遠心法)、陰電荷膜法、セルロース吸着・凝集法がよく知られています。これらの濃縮法において、添加回収率試験²⁾を行った結果を表1に示します。

表1 環境試料からの添加回収率試験結果(一例)

濃縮方法	流入水	処理水	汚泥類	河川水	海水
PEG沈殿法	41	67	23	66	65
超遠心法	30	30	3.3	38	31
陰電荷膜法	5.5	17	-	12	15
セルロース吸着・凝集法	-	16	-	31	35

PEG沈殿法は、すべての環境水で回収率がよいと推察され、また、濃縮を簡単に行える点が利点です。超遠心法は比較的高い回収率が得られるものの、超遠心分離機等の設備を要します。陰電荷膜法は前処理が簡単であるものの回収率が低く、セルロース吸着・凝集法は、浮遊物質の少ない試料については有効です。

(2)分析方法の流れ

リアルタイムRT-PCR法を用いた環境試料中のノロウイルスの分析方法を図2に示します。なお、本法は「下水道試験方法(2012年改定)」および「ノロウイルスの検出法について」(2007年5月14日 食安監発第0514004号)に準拠しています。

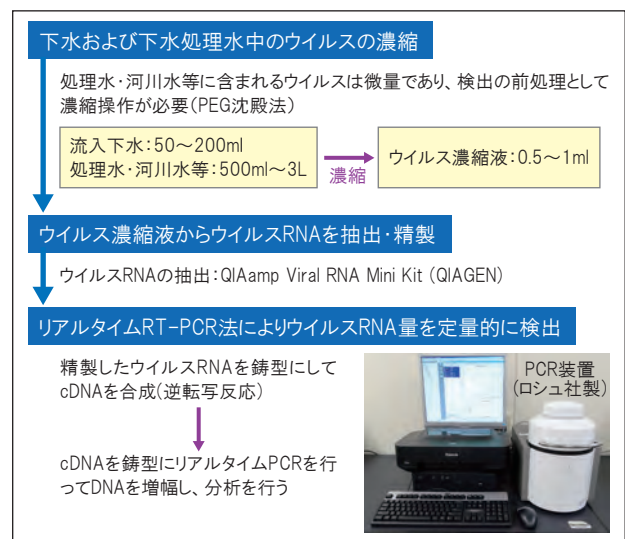
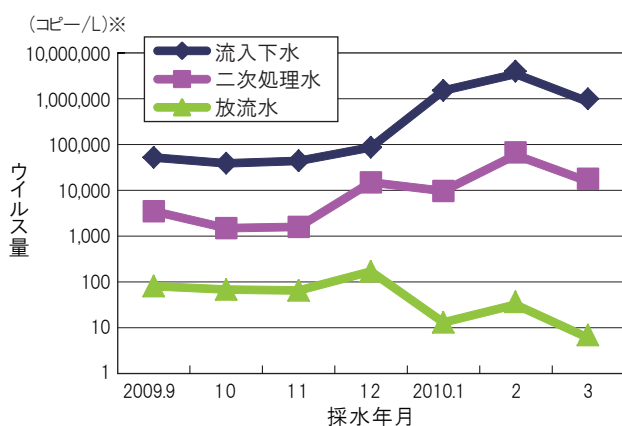


図2 ノロウイルスの分析方法の流れ(一例)

ノロウイルス定量分析の実施例

(1) 下水関係

下水処理場の各工程水におけるノロウイルスの検出結果を図3に示します。試料は、流入下水、二次処理水および放流水の3試料とし、前処理方法としてPEG沈殿法を採用しました。



(※コピー/L:環境試料1L中のノロウイルスの複製遺伝子の量)

図3 下水処理場の各工程水におけるノロウイルスの検出結果

ノロウイルスの検出量は、流入下水では38,600～3,500,000コピー/L、二次処理水では1,500～59,100コピー/L、放流水では6～170コピー/Lであり、流入下水→二次処理水→放流水と処理が進むにしたがい、ウイルスが除去されていることが確認されました。

なお、ウイルスの除去率は、最も低かった2009年10月において、以下のとおり99.9%となっており、その他の月ではこれ以上の除去率でした。

<2009年10月における下水処理によるノロウイルスの除去率>

$$100 - \left(\frac{55 \text{ コピー/L (放流水のウイルス量)}}{38,600 \text{ コピー/L (流入下水のウイルス量)}} \right) \times 100 = 99.9\%$$

(2) 河川水・海水関係

河川水および海水におけるノロウイルスの検出結果を図4に示します。調査は、秋季から冬季にかけて3回行い、某河川の上流部と下流部の河川水、および海水の3試料を採取しました。前処理方法は、PEG沈殿法を採用しました。

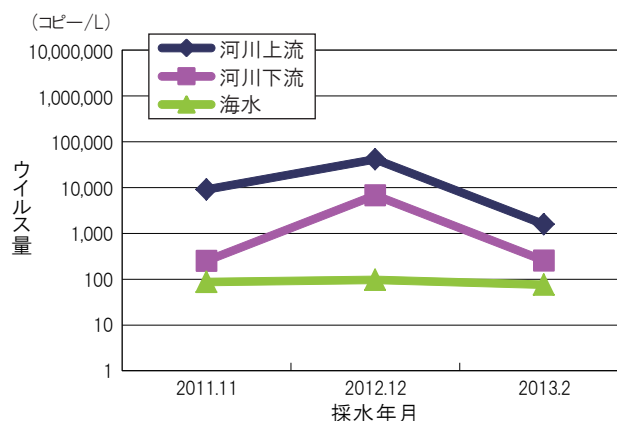


図4 河川水及び海水におけるノロウイルスの検出結果

ノロウイルスの検出量は、河川上流では1,600～42,000コピー/L、河川下流では250～6,800コピー/L、海水では76～96コピー/Lとなりました。

ノロウイルスは、冬季において、河川水および海水中にも下水放流水と同程度もしくはそれ以上存在していることがわかりました。

おわりに

本技術は、下水処理工程におけるウイルス除去効果や自然界におけるウイルスの存在有無の確認、およびリスク評価などに役立つと考えています。

下水処理水やその放流先の公共用水域における衛生的な安全性を担保するうえで、ウイルスの実態把握が不可欠となりますので、本技術を活用していきたいと思えます。

(注)

1)リアルタイムRT-PCR法

(RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

PCR法ではRNAを測定することができないため、得られたウイルスのRNAをもとに、はじめにcDNA(complementary DNA, 相補的DNA)を合成する(逆転写反応という)。次に、その合成したcDNAを鋳型としてPCRを行い、DNAを増幅して定量分析を行う。

2)添加回収率試験

人為的に作成した大腸菌Qβ(大腸菌を宿主としたRNAウイルス)を事前に既定量試料に加え、各分析方法において、添加量のうちどれくらい検出(回収)されるかを調べる試験。

例)添加量を1,000とし、分析値として算出された量を500とすると、回収率は50%となる(500/1000×100=50%)。