

【報文】

低濃度オゾン水によるノロウイルスの不活化

山崎 謙治¹, 中室 克彦^{2*}

Inactivation of *Norovirus* by Low Levels of Dissolved Ozone

Kenji YAMAZAKI¹, and Katsuhiko NAKAMURO^{2*}

¹Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan

²Faculty of Science and Engineering, Setsunan University
17-8 Ikeda-Nakamachi, Neyagawa, Osaka 572-8508, Japan

This study was conducted to examine the inactivation efficacy of low levels of dissolved ozone against feline calicivirus (FCV) and *norovirus* in water. FCV was inactivated at a rate of greater than 99.9% within 30 seconds of treatment with a concentration over 0.133mg/l of initial dissolved ozone at 8 to 19°C. The initial dissolved ozone concentration of 0.174mg/l achieved 99.9% inactivation of *norovirus* after 30 seconds of exposure.

(Accepted 10 January 2012)

Key words : *Norovirus* (ノロウイルス)/Feline calicivirus (ネコカリシウイルス)/Low levels of dissolved ozone (低濃度オゾン水)/Inactivation efficacy (不活化効果).

緒 言

ノロウイルスは1968年にアメリカの小学校で集団発生した急性胃腸炎患者から発見されたウイルスで、その形態から小型球形ウイルス (small round structured virus; SRSV) と呼ばれ¹⁾, 2002年にはノロウイルスと正式に命名された。ノロウイルスは主として経口感染し、小腸粘膜上で増殖し、嘔吐・下痢などの胃腸炎症状を示す。ノロウイルス感染患者の糞便中には1g当たりおよそ10⁸個と大量のウイルスが排泄され、下水中へ流入する。ノロウイルスは他の病原ウイルスよりも塩素に対する抵抗性が高く²⁾, 下水処理水中に一部が残存し河川を経由して海域に至ることによって二枚貝などに蓄積される。これら二枚貝などをヒトが摂食することによって再び感染の原因

となると考えられている。

オゾンは非常に強い酸化作用を有するため、病原体に対する有効な消毒効果を発揮する³⁾。そのため、日本以外の多くの国で飲料水の殺菌に用いられている。しかし、オゾン水のノロウイルスに対する殺菌効果についての報告は少ない⁴⁻⁶⁾。また、ノロウイルスはヒトの腸管でのみ増殖が確認されており、培養細胞を用いた実験を行うことは困難である。そのためアメリカ合衆国環境保護庁 (US EPA) においてネコカリシウイルス (feline calicivirus; FCV) をノロウイルスの代替として用いることが認められている。

本研究においては、オゾン消費を考慮した低濃度オゾン水によるノロウイルスそのものの不活化効果について検討し、また同時にノロウイルスと同様のカリシウイルス科に属する培養可能な

¹大阪府立公衆衛生研究所感染症部 〒537-0025 大阪市東成区中道1丁目3番69号 ☎06-6972-1321

²摂南大学理工学部 〒572-8508 大阪府寝屋川市池田中町17番8号 ☎072-839-8084

FCV を用いて感染性の推移を検討し、ウイルスの不活化効果について評価を行った。

実験方法

1. 不活化実験供試ウイルス

被検ウイルスとして ATCC (American Tissue Culture Collection) より購入した FCV・F9 株 および genogroup II のノロウイルスを用いた。FCV はネコ腎臓 (CRFK) 細胞で増殖させたものを、またノロウイルスは急性胃腸炎患者糞便 10% 乳剤を用いた。予備実験において、FCV 増殖培養液 (イーグル MEM 培地; 日水製薬) を 1/1,000 量添加した実験水は 30 秒でオゾン濃度が 0.53mg/L から 0.17mg/L に低下したことから、FCV 培養液を透析して無機塩類などの低分子成分を除去した後に実験に供した。同様にノロウイルスは糞便乳剤に含まれる生体成分を透析により除去した後に用いた。すなわち、両ウイルスともに 1,500g で 30 分間遠心した上清を透析チューブ (透析用セルロース膜; 三光純薬㈱) に入れ、4℃ の Phosphate Buffered Saline (PBS) 中で 2 日間透析を行った後実験に供した。

2. オゾン処理実験水の調製

オゾン水は精製水生成器 DC-210 (オルガノ社) で生成した精製水 (TOC: 0.29mg/L) を原水とし、電解式オゾン水生成器 (アイ電子工業㈱製、電解式オゾン水生成器 AOD-TH、生成オゾン水濃度 0~4 mg/l) を用いて生成した。オゾン水を蒸留水 (和光純薬: pH6.1) で 5~50 倍程度に希釈し、1l のビーカーに入れ、マグネチックスターラーで攪拌を行い、溶存オゾン濃度計 (荏原実業㈱製、オゾンモニタ EL-55-RD、定量限界 0.001mg/l) に通水しながらオゾン濃度を測定した。試料水が 500ml になった時点のオゾン濃度をオゾン処理実験水の初期濃度とした。

3. ウイルスの不活化実験

2. で調製した 19℃ または 8℃ のオゾン処理実験水 500ml に FCV またはノロウイルスを 1/1,000 量の割合で加えて攪拌し、オゾンモニタに

通水しオゾン濃度を確認しながら経時的にその 1 ml を採取し、0.1N チオ硫酸ナトリウム液 0.1ml を入れた試験管に入れオゾンを消去した。

4. ウイルス力価の測定

オゾンと反応させた FCV は Hank's Balanced Salt Solutions (ハンクス液) で 10 倍階段希釈し、予め CRFK 細胞を培養した 96 穴マイクロプレートに各希釈反応液を 1 希釈当たり 4 穴に 50 μ l ずつ接種し、37℃ で 1 時間吸着させた。プレートに培養液 (イーグル MEM) 100 μ l を加え、37℃ で 5 日間培養した後、細胞変性効果 (cytopathogenic effect; CPE) の出現を指標としてウイルスの感染価 (tissue culture infectious doses 50; TCID₅₀) を測定した。ウイルス感染価の減少からオゾンの FCV 不活化効果を判定した。またオゾンと反応させたノロウイルスはハンクス液で 10 倍階段希釈し、希釈液 0.2ml から High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて 50 μ l の RNA を抽出し、ウイルス性下痢症診断マニュアル¹⁾ に準じた Seminested PCR 法で genogroup II の検出を行った。即ち、1st PCR にはプライマー G2-SKR (G II antisense; 5' CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT), COG2F (G II sense; 5' CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG) を用い、nested PCR には G2-SKR, G2-SKF (G II sense; 5' CNT GGG AGG GCG ATC GCA A) を用いた。逆転写用反応液 {0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理蒸留水 (和光純薬; pH6.1) 8 μ l, dNTP mix (TaKaRa; 各 2.5mM) 4 μ l, 10×Ex Taq 反応液 (TaKaRa) 2 μ l, G2-SKR (50pmol) 1 μ l, MuLV 逆転写酵素 (Applied Biosystems; 50U/ μ l) 0.5 μ l, RNase Inhibitor (TaKaRa; 40U/ μ l) 0.5 μ l} に RNA を 4 μ l 加え、ミネラルオイル (SIGMA) を 1 滴添加した後、42℃ で 30 分間反応させ cDNA を作成した。94℃ で 5 分間加熱し、逆転写酵素を不活化したあと 4℃ に冷却し、1st PCR 反応液 {DEPC 処理蒸留水 70.5 μ l, 10×Ex Taq 反応液 8 μ l, COG2F (50pmol) 1 μ l, Ex Taq (TaKaRa; 5 U/ μ l) 0.5 μ l} を加えて軽く遠心

した後、DNA Thermal Cycler (PERKIN ELMER) を用いてノロウイルス DNA を増幅した。PCR 反応は 94°C で 3 分加熱した後、94°C で 1 分、50°C で 1 分、72°C で 2 分を 40 サイクル行った。nested PCR は 2 μ l の 1st PCR 産物を nested PCR 反応液 (DEPC 処理蒸留水 77.5 μ l, 10 \times Ex Taq 反応液 10 μ l, dNTP mix 8 μ l, G2SKR (50pmol) 1 μ l, G2SKF (50pmol) 1 μ l, Ex Taq 0.5 μ l) に加え、ミネラルオイルを 1 滴添加した後、DNA を増幅した。PCR 反応は 94°C で 3 分加熱した後、94°C で 0.5 分、51°C で 1 分、72°C で 1 分を 35 サイクル行った。増幅されたノロウイルス DNA はアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりバンドの確認を行った。電気泳動により DNA が検出されなかったものをオゾンにより不活化されたものとして PCR detection unit (PDU) を測定した。この PDU の減少からオゾンのノロウイルス不活化効果を判定した。

結 果

オゾンによるウイルス不活化

オゾンは酸化力が強いいため一般に短時間にオゾン濃度が減衰しやすい。そのため、低濃度オゾン水によるノロウイルスに対する正確な不活化濃度を決定する目的で、用いる精製水、ウイルス添加による培地由来のオゾン消費を把握するとともに FCV およびノロウイルスに対するオゾンの不活化実験を行った。

1. 低濃度オゾン処理実験水の減衰曲線

実験に用いる精製水のオゾン消費を把握するために、水温 19°C におけるオゾンの減衰曲線を検討した。Fig. 1 にウイルスを添加せず初期オゾン濃度 0.26 および 0.114 mg/l のオゾン処理実験水の水温 19°C における減衰曲線を示す。初期オゾン濃度が 0.26 mg/l のオゾン水では 5 分後に 92.3% のオゾンが残存することを認めた。同様に初期濃度 0.114 mg/l の実験水では 5 分後に 87.7% が残存することを示した。

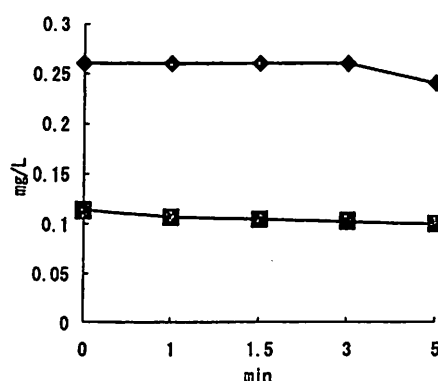


Fig.1. Ozone decay in ozonated distilled water

2. ウイルス添加低濃度オゾン処理実験水の減衰曲線

オゾン処理実験水にウイルス液を添加した時のウイルスおよびこれに含まれる培地に由来するオゾン消費を検討した。

Fig. 2 のように供試 FCV 液を 1/1,000 量の割合で加えた水温 19°C の初期オゾン濃度 0.05~0.45 mg/l を含有する実験水のオゾン濃度は 30 秒以内にいずれも急激な減衰を示し、その後緩やかに減少した。オゾン初期濃度が低いほど減衰率がやや高い傾向が認められた。同様に水温 8°C の実験水では供試 FCV 液添加後のオゾン濃度減衰はやや緩やかであり、水温 19°C におけるオゾン減衰率に比べ、30 秒以内における急激な減衰は認められなかった。

これらウイルス液を添加した低濃度オゾン水の結果は、精製水のみによるオゾン消費に基づく減衰よりもはるかに大きく、とくに反応初期の減衰が大であることを認めた。この原因は、供試

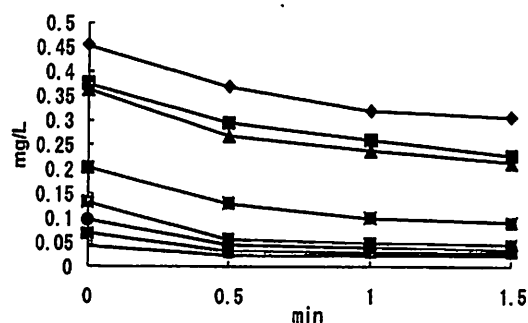


Fig.2. Ozone decay in ozonated distilled water with feline calicivirus at 19°C

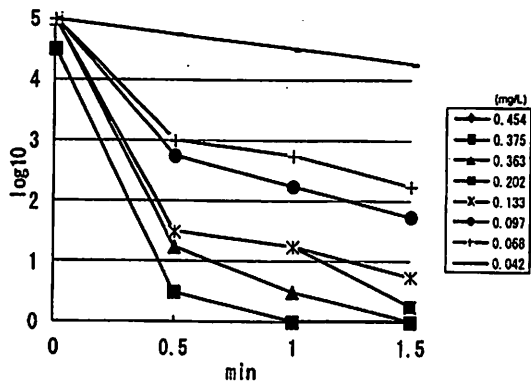


Fig.3. Inactivation efficacy of different initial concentrations of dissolved ozone on feline calicivirus at 19 °C

FCV液をリン酸緩衝液で透析することによって、培地組成成分を除去したにもかかわらず、ウイルス添加によるオゾン消費を示したことから、減衰の大きい初期のオゾン消費はウイルス自身によるオゾン消費に起因することが考えられた。

以上の結果から、ノロウイルス添加によるオゾン消費について解析した結果、オゾン処理1.5分後のオゾンは約7割残留することを示した。

3. オゾンによるFCVに対する不活化効果

Fig. 3に示すように水温19°Cにおいてオゾンの初期濃度0.042~0.454mg/lの実験水に添加されたFCVはオゾン濃度0.133mg/l以上では30秒以内に99.9%以上感染価が減少することを示した。またオゾン濃度0.097mg/lでは99.9%以上不活化されるのに1.5分間を必要とした。これより濃度の低いオゾン初期濃度ではFCVの有効な不活化効果は認められなかった。また反応時間を5分まで延長してもオゾンによる不活化効果が上昇することは認められなかった(未発表)。同様に水温8°Cにおいてオゾンの初期濃度0.042~0.88mg/lの実験水に添加されたFCVはオゾン濃度0.17mg/l以上では30秒以内に99.9%以上の感染価が減少した。またオゾン濃度0.092mg/lにおいては99.9%以上不活化するために1分間を必要とした。これより低いオゾン初期濃度ではFCVに対する有効な不活化は認められなかった(Fig. 4)。

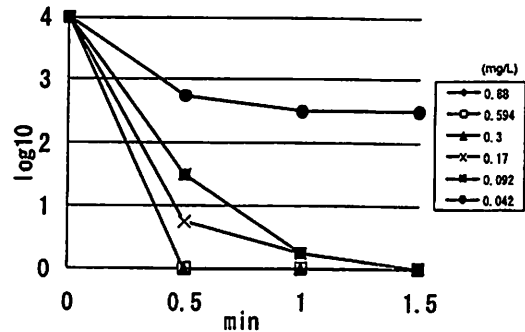


Fig.4. Inactivation efficacy of different initial concentrations of dissolved ozone on feline calicivirus at 8 °C

以上のFCVに対するオゾンによる不活化に関する検討結果から、オゾンの初期濃度が0.097mg/l(19°C)で1.5分後および0.092mg/l(8°C)で1分後にFCVを99.9%以上不活化することを認めた。

4. オゾンによるノロウイルスの不活化効果

Fig. 5に示すように水温19°Cにおいて0.086~0.612mg/lのオゾン初期濃度実験水に添加されたノロウイルスはオゾン濃度0.174mg/lにおいては30秒以内にPDUを99.9%以上減少させ、0.408mg/lと0.612mg/lのオゾン濃度においては検出限界以下までPDUを減少させた。またオゾン初期濃度0.113mg/l以下ではノロウイルスに対する有効な不活化効果は認められなかった。

以上の検討結果から、臨床株であるヒト糞便由来のノロウイルスに対しては初期オゾン濃度

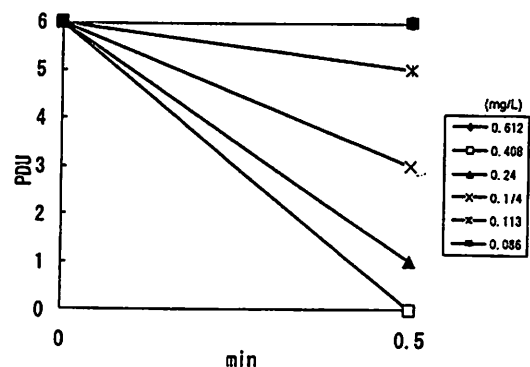


Fig.5. Inactivation efficacy of different initial concentrations of dissolved ozone on Norovirus at 19 °C

0.174mg/l 以上 (19°C) において30秒以内に99.9%不活化することを示した。

考 察

オゾンによるウイルス不活化効果が初めて報告されたのは1953年のことであり⁸⁾, それ以後多くのウイルスについて調べられているがノロウイルスについてはほとんど報告されていない。ノロウイルスの代替として用いられるFCVは8~19°Cの水温の変動範囲内であればオゾン初期濃度がほぼ0.1mg/l以上あれば約3割はオゾン濃度の減衰はあるものの1分以内に99.9%以上不活化されることが考えられた。Shinら⁴⁾はFCVがオゾン濃度0.03mg/lで1分以内に不活化されたと報告した。低温の方が不活化効果の高いことがA型肝炎ウイルス, ポリオウイルスで報告されている⁹⁾。中室ら¹⁰⁾は本研究と同じオゾン原水およびオゾンモニタを用いた研究で, レジオネラ属菌でFCVと同等の効果を得るにはオゾン初期濃度0.017mg/lで十分であると低濃度オゾンの有効性を報告した。彼らの用いた実験水はpH7.2であり, われわれはpH6.1であったが, pH6から8の間でオゾンの効果に差はほとんど認められていない⁹⁾。従ってFCVはレジオネラ属菌よりも5倍程度オゾンに抵抗性であると考えられる。

ノロウイルスは初期オゾン濃度0.174mg/lで30秒以内に不活化されたが, Thurston-Enriquezらは0.37mg/lで5分間を必要とした⁵⁾。またLimら⁶⁾はマウスノロウイルスを不活化するのに初期オゾン濃度1mg/lで2分間を必要とした。われわれがマウスノロウイルスを用いて行った成績では, 初期オゾン濃度0.1mg/lで30秒以内に不活化されFCVと同様であった(未発表データ)。このような違いは用いたウイルスの精製度によりオゾンの消費量が異なることによるものと考えられた。今回予試験において, 透析を行なうことによって, オゾン消費が約7割減少するものを約2割減少にとどめることができたため, よりオゾン消費物質の少ない条件でノロウイルス不活化実験を実施できたと考える。

PCRによるウイルス不活化効力測定において

しばしば問題にされるのはウイルス外被たんぱく質による核酸の保護, および short target PCR (300bp以下)による分解された核酸のPCRによる増幅¹¹⁾である。オゾンによるウイルスの核酸への攻撃はウイルスたんぱく質と同等もしくはより直接的であると考えられている¹²⁾こと, また本研究で用いたプライマーは300bp以上を増幅(G I; 381bp, G II; 387bp)することから, 本研究においてはオゾンによってノロウイルスRNAが破壊されているため, あるいは破壊された断片RNAが存在しても, この断片RNAからDNAが増幅されることはなかったことが考えられた。ポリオウイルスを用いた実験でPDUの減少よりもTCID₅₀の減少の方が早いと報告された⁴⁾ことから, 本研究でFCVとノロウイルスのオゾン抵抗性におよそ1.5倍の差がみられたのは, オゾン濃度に依存しているよりはウイルス検出法の違いに依存していると考えられた。

上水処理過程における塩素処理は, 発がん性を有するトリハロメタンなどの塩素消毒副生成物を発生することによる人体影響や環境汚染が問題となっている。しかし, オゾン処理では, オゾン反応副生成物の毒性はほとんどなく, 安全であるため, ヨーロッパ諸国では古くから水道の浄水処理に用いられており, また我が国においてもオゾン処理が導入されており, 高度浄水が供給されている。そのため, 一般に浄水場におけるオゾン処理時のオゾン注入率は1mg/lで接触時間約10~20分間処理されていることから, オゾン処理が導入されている水道においては, ノロウイルス汚染に対する安全性が確保されているものと考えられる。

謝 辞

本研究は, 河川整備基金助成事業(助成番号: 19-1214-003)および日本医療・環境オゾン研究会オゾン水研究部会助成金によって実施した。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) Kapikian, A. Z., Almeida, J. D., Stott, E. J. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with

- acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10, 1075-1081.
- 2) Keswick, B. H., Satterwhite, T. K., Jhonson, P. C., DuPont, H. L., Secor, S. L., Bitsura, J. A., Gary, G. W., Hoff., J. C. (1985) Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 261-264.
 - 3) Sobsey, M. D. (1989) Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Technol.*, 21, 179-195.
 - 4) Shin, G. A., Sobsey, M. D. (2003) Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3975-3978.
 - 5) Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., Gerba, C. P. (2005) Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.*, 39, 3650-3656.
 - 6) Lim, M. Y., Kim, J. M., Lee, J. E., Ko, G. (2010) Characterization of ozone disinfection of murine norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1120-1124.
 - 7) 国立感染症研究所ウイルス第二部編：ウイルス性下痢症診断マニュアル（第3版），平成15年
 - 8) Smorodintseva, O. A. (1953) Experimental data on application of chloridation of air in influenza. *Tr. Akad. Med. Nauk. Sssr. Mosc. Inst. Grudn. Khir.*, 28, 231-241.
 - 9) Herbold, K., Flehmig, B., Botzenhart, K. (1989) Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2949-2953.
 - 10) 中室克彦, 土井 均, 肥塚利江, 枝川亜希子 (2009) 低濃度オゾン水の *Legionella* に対する殺菌効果, 防菌防霉, 37, 407-412.
 - 11) Ngazoa, E. S., Fliss, I., Jean, J. (2008) Quantitative study of persistence of human norovirus genome in water using TaqMan real-time RT-PCR. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 707-715.
 - 12) Roy, D., Wong, P. K., Engelbrecht, R. S., Chian, E. S. (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 718-723.