

考察

F 特異大腸菌ファージは大きさ、構成が SRSV やエンテロウイルスに似ていることから、その下水処理工程における挙動は腸管系ウイルスの挙動に近いと考えられる。しかしながら、F 特異大腸菌ファージと腸管系ウイルスの排出源は異なると考えられることから、腸管系ウイルスの存在を示す指標としては有効でないと考えられる。

微生物濃度の季節変動は冬に流入の濃度が小さくなる傾向が見られた。また、塩素添加前の処理水の微生物濃度は特に季節変動が認められなかった。結果としては、冬季に下水処理工程における微生物数低減効果が小さくなっている可能性が示唆された。

従来健康関連微生物の指標である大腸菌群数と F 特異大腸菌ファージの間には、あまり高い相関は得られなかった。腸管系ウイルスと F 特異大腸菌ファージの相関について調べ、その指標性について検討する必要がある。

研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

D. 知的所有権の取得状況

なし

参考文献

1) 日本水道協会 (1993) 上水試験法

2) ISO (1997) 10705-1

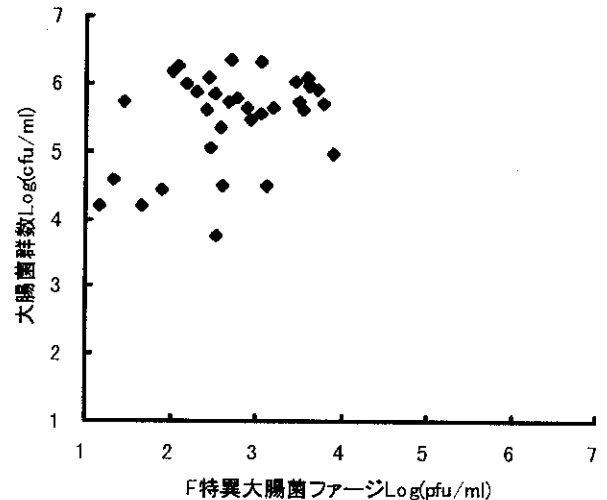


Fig.4 流入水における大腸菌群と腸菌ファージの相関

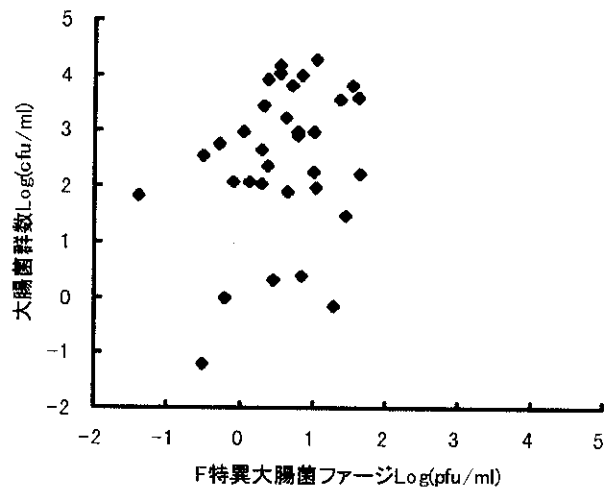


Fig.5 塩素消毒前の処理水における大腸菌群と腸菌ファージの相関

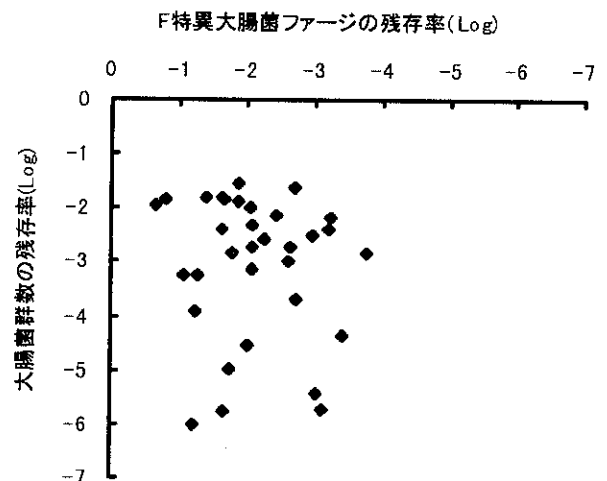


Fig.6 残存率における大腸菌群と腸菌ファージの相関

ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究

水中ウイルス検査の目的、意義、手法

—— 疫学調査、リスク評価、そして行政対応 ——

矢野一好、川本尋義

研究要旨

下水、河川水などの環境水を対象としてウイルス検索を行う目的と意義を考察した。目的は、大きく分けて「疫学調査」と「リスク評価」に分けられる。これら二つの目的に対する具体的な事例をあげ、将来にわたって、必要とされる水中ウイルス検査のあり方について考察した。

I. 目的

我が国における環境水を対象とした微生物検索は、1996年に立て続けに発生した水系感染事例を契機に注目されるようになってきた。すなわち、全国規模ともいわれた腸管出血性大腸菌 O157:H7 の集団感染事例を皮切りに、埼玉県越生町における水道水を介した原虫クリプトスポリジウムの集団感染事例、また、食中毒の原因物質として、小型球形ウイルスを含むウイルスが認知されたこと、さらには、「24時間風呂」におけるレジオネラ汚染が大きな社会問題となった。

このような背景にあって、我が国ではにわかに「環境微生物」問題が注目を浴びるようになった。これまでは、ごく一部の研究者が、ある地域の疫学調査、すなわち、当該地域でどのような種類の腸管系病原微生物が存在しているかを効率的に把握する目的で、下水などを試料として、微生物検索を行っていたに過ぎなかった。

環境微生物調査に関して歴史の浅い我が国では、マスコミや行政分野から、的確な情報提供が得られることが期待されている。

具体例をあげると、貝割れ大根と O157 事件、町全体が水を求めてパニックに陥るようなクリプトスポリジウム事例、また、レジオネラによる循環式浴槽水の汚染や、院内感染事例など、広域に迅速に対応しなければならないような事例が混在している。

本稿では、より正確な情報提供を行う意味でも、また、今後の行政対応として求められるであろう

「環境微生物調査のあり方」なども考慮し、水中ウイルスを中心とした環境微生物調査の目的、意義、そして行政対応について考察した。

II. 水中ウイルス検査の目的と意義

環境水を対象とした水中ウイルス検査の目的と意義、そして、検査手法などを整理し、表 1 に試案としてまとめた。

1. 疫学調査

ヒトの生活環境を取り巻く様々な水環境を対象としたウイルス検査の目的は、大きく分けて 2 つに分かれる。一つは、「疫学調査」である。「疫学調査」は、ヒトの生活環境における水環境中にヒトに対して病原性を有するウイルスがどの程度存在しているかを把握する調査、すなわち「感染源環境調査」と、いわゆる「感染症新法」の第 15 条に規定された「積極的疫学調査」の目的でウイルスの水系感染ルートを探る「感染経路調査」がある。

1.1 感染源環境調査

この調査の目的は、調査対象とした水系と関連している地域にどのような種類のウイルスが存在しており、当該地域住民に対して感染する可能性がどの程度あるか等を調査・解析することである。

この種の調査に用いられる代表的な試料は、下水である。下水中のウイルスは、下水道利用地域の住民がその時点で感染している腸管系ウイルスの種類を的確に反映している。その概要は、表 2 に示した。

表1 水中ウイルスの検査目的、検査対象、検査手法及び行政ニーズ（試案）

目的	事例	手法	試料水量	行政対応
疫学調査	感染源環境調査 環境水 下水 等	PCR 培養	少量	検出を期待 流行予測
	感染経路調査 環境水 飲料水 プール水 雑用水 等	PCR 培養	適宜	検出を期待 感染ルート の解明
リスク評価	安全確認(予防対策) 環境水 水道原水 飲料水 等	培養	多量	不検出を期待 リスクアセ スメント
	水処理技術指針 浄水処理 下水 上水 等	培養	多量	不検出を期待 汚染防止対 策・新技術 の開発

表2 下水に流入してくる最大ウイルス量の試算¹⁾

算出基準： ロタウイルス感染者の最大排出ウイルス量を 10^{11} / 糞便1g
全員感染と仮定 糞便150g / 人 / 1日 → 下水300 L で希釈 糞便濃度：0.5g / 下水1,000 mL ↓ ウイルス量： 10^{11} / 下水2,000 mL ↓ 10^7 / 下水0.2 mL となる

ウイルス感染者の糞便から最も多量に排出されるといわれているロタウイルスを例にとる。ロタウイルス感染者が糞便とともに排出する最大ウイルス量を 10^{11} 粒子とする。しかも、下水利用者全員がロタウイルスに感染していると仮定する。このような条件では、 10^{11} 粒子のウイルスがヒト1

人が1日に排出するといわれている糞便150gと共に、平均的な下水排出量である300 Lの排水で希釈されて下水処理場に流入する。この時点での糞便濃度は、下水1 L中0.5gとなり、ウイルス量に換算すると下水2 L中のウイルス量は 10^{11} となる。このウイルス量をウイルス分離試験に用い

る一般的な試料水量である0.2mLに換算すると、 10^7 粒子にもなり試料水を濃縮することなく容易に検出できる。もちろん、現時点でロタウイルスが培養細胞等で容易に分離できないという現実はある。また、下水利用者全員が同じウイルスに感染することもあり得ない。このような非現実的な条

件を除去して考えても、下水からウイルスを検出することは比較的容易であることがわかる。

すなわち、疫学調査の一環として感染源環境調査を行う場合は、下水を対象として調査すればよい。実態調査事例を表3に示した。

表3 首都圏で採取した下水からのウイルス検出状況²⁾

試料水	ウイルス検出率 (%)	試料数 (件)	試験水量 (mL)	調査年次
生下水	80.6	838	0.4	1967-92
沈殿汚泥	81.7	1,417	0.4	1967-92
二次処理下水	19.4	438	0.4	1967-92
下水放流水	10.2	489	0.4	1967-92

1.2 感染経路調査

もう一つの疫学調査の目的は、感染経路の調査である。あるウイルス性疾患の集団発生があり、

その原因が水系であると推定された場合は、考えられる水系から技術を駆使して当該ウイルスを検出することになる。

表4 米国における水系感染患者数 (1920~1992年)³⁾

病因微生物 (症状)	調査年次区分				合計患者数
	1920-40	1941-60	1961-70	1971-92	
細菌類					
赤痢	3,308	8,951	1,666	9,097	23,022
カンピロバクター				5,233	5,233
サルモネラ		31	16,706	2,370	19,107
病原大腸菌			188	1,243	1,431
チフス	13,761	1,945	104	282	16,092
エルシニア				103	103
慢性胃腸炎				94	94
コレラ				17	17
アメーバ	1,416	36	39	4	1,495
野兎病		6			6
レプトスピラ		9			9
パラチフス		19			19
皮膚炎				31	31
藍藻類				21	21
ウイルス					
ウイルス性胃腸炎				12,699	12,699
A型肝炎	28	930	903	781	2,642
ポリオ		16			16
原虫					
ジアルジア			176	26,654	26,830
クリプトスポリジウム				16,668	16,668
原因不明胃腸炎	176,725	54,439	26,546	80,734	338,444
合計	195,238	66,382	46,328	156,031	463,979

表5 水道水の腸管系ウイルス汚染調査事例⁴⁾

検出ウイルス	陽性率	試料数	試料容量	場所及び年次
P	7.8%	553		フランス1960~62
CA	3.1	65		ルーマニア1962~71
CA, E, P	14.1	64		ロシア1968~71
P3	4.3	23	950 /	アメリカ1975
CA16, P2	0.3	975	400 /	ブラジル1976~86
未同定	25.7	74		インド1978
P	100	31		カナダ1978~79
不検出	0	119	140,000 /	アメリカ1979
ロタ	55.8	113	9.8~756 /	アメリカ1979~80
AD 他	18.8	32		豪州1979~80
P	6.8	74		カナダ1980
レオ	30	10		スペイン1980
未同定	2.7	111	21,239 /	イスラエル1980~81
不検出	0	265	135,000 /	イギリス1980~83
CB, AD	100	7		中国1982
不検出	0	65	1,900 /	ミズリー1982
不検出	0	102	51,000 /	オランダ1982
P	7.1	155		カナダ1983
ロタ	18.2	22	20~99 /	コロンビア1983~84
未同定	33.3	18	65~756 /	メキシコ1984
CB	61.9	21	20 /	メキシコ1984
不検出	0	72	1,000 /	パリ1984~85
ロタ	30	20		コロンビア1986
レオ	0.2	464		南アフリカ

P: ポリオウイルス CA: コクサッキーA群ウイルス
 CB: コクサッキーB群ウイルス AD: アデノウイルス
 検出ウイルス欄の数字は血清型別を示す

しかし、我が国ではこのような事例において、的確に原因調査が行われ、感染経路が特定できた事例はそれほど多くないであろう。その主な理由は、後の項で述べるように、少ないウイルス量（1粒子程度の経口摂取）で感染が成立すること、患者の病原が確定した時点で、関与したと考えられる水系の水は既に消費されてしまっていることが多いこと、そして、最も大きな要因は、大量の水に混入している微量のウイルスを検出する方法がないことである。

米国における水系感染の実態を表4に、諸外国における飲料水からのウイルス検出状況を表5にまとめた。この結果からみても前述の想定は理解できる。

ウイルスの水系感染を疑う感染事例が発生した場合に、その感染源と思われる水系からの的確にウイルスを検出する方法の開発は、感染症新法の精神に照らしても、早急に解決しなければならない大きな課題の一つであると考えられる。

2. リスク評価

ヒトの生活環境を取り巻く様々な水環境を対象としたウイルス検査の目的のもう一つは、「リスク評価」である。リスク評価はさらに二つの目的に分かれる。一つは、「安全確認（予防対策）」であり、もう一つは、リスクを低く抑えるための「水処理技術指針」の確立である。

2.1 安全確認

我が国では、これまで環境水のウイルス汚染について十分な関心が払われてきたとは言い難い。むしろ、環境水がウイルス汚染されていること自体、究明されていなかった。そして、これまでの認識は、水環境、特にヒトが口にする水は、当然のことながらウイルスを含む病原微生物が混入してはならないという前提が暗黙のうちに了承されていた。極論すれば、ヒトが口にする水は、無菌でなければならないという認識が当然のこととして先行していた。

しかし、飲用水たりとも無菌でない場合があり、

病原微生物に感染する危険性（リスク）があることをある程度容認しなければならない時代になったといっても過言でない。ここで、強調しておくが、決して今までの水が無菌であって、これからの水が汚染水であるということを意味しているのではない。

かつては、水道水を飲用することによって「ガン」になるなどという認識は皆無であったが、今では、水道水中に含まれる発ガン物質の一つである「トリハロメタン」に許容濃度が設定されたごとく、微生物分野においてもこのような社会的合意が必要な時代に直面している。

2.1.1 許容リスクの設定

現在、米国においては、表6に示したような感染確率が提案され議論されている。すなわち、ヒトがある水を利用することによって何らかの感染症に罹る確率を年間1万人に1人に抑えようという提案である。言い換えれば、年間1万人に1人が水系感染することは容認（許容）しようという合意である。

このような合意を形成するには、いわゆるリスクアセスメントといわれるステップを経る必要がある。その段階を要約すると表7に示した金子の見解がある。

表6 リスクアセスメントの合意（許容リスク）²⁾

感染確率/年	健康被害の実感
10% (1人/10人)	家族に発生
1% (1人/100人)	知人に発生
0.1% (1人/1,000人)	生活地域（町内会）で発生
0.01% (1人/10,000人)	知らない人に発生

表7 リスクアセスメント（危険性評価）の手順²⁾

<p>目標</p> <p>危険性の存在と程度を知り、危険性の許容レベルの設定と制御の指針（法的、行政的、工学的、衛生学的）を与える。</p>
<p>ステップ</p> <p>①危険あるいは悪影響をもたらすものの事実確認 急性影響（把握は容易）・慢性影響（把握は困難）</p> <p>②リスク評価：有害物の量とヒトが受ける悪影響の確率</p> <p>③社会的評価：許容できるリスク基準の検討 どの程度のリスクを受け入れられるかの判断</p>

（金子、水の消毒、1997）

すなわち、リスクアセスメントの手順は、危険や悪影響を及ぼすものの把握に始まり、実際の程度の被害を受けているのかを認識し、その認識に立って許容できるリスクを提案・合意する過程を踏む必要がある。この議論は、別に譲るとして本題である水中ウイルス検査の意義をリスク評価の面から議論する。

2.1.2 リスク評価のためのウイルス検査

ここでいう水中ウイルス検査には、前述の議論を深めることによって設定されたリスクを評価するためという目的がある。

したがって、ここで対象となる試料水は、混入しているウイルス量が非常に少ないと思われる環境水全般である（図1）。

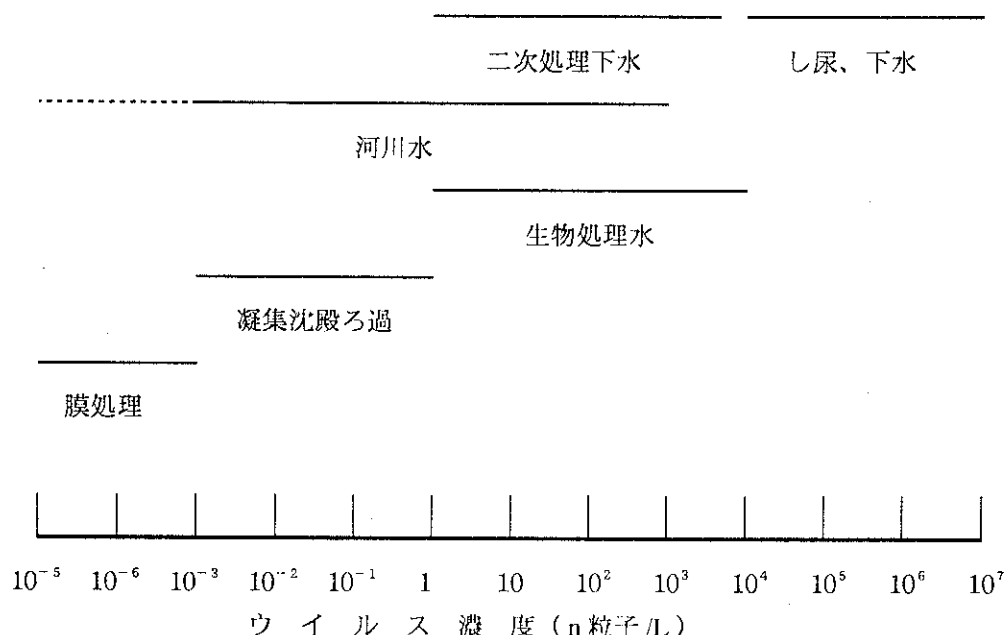


図1 環境水中のウイルス濃度の目安（金子、水の消毒、1997）²⁾

様々な環境水のリスクを評価するには、許容できる感染確率の設定（表6）、設定した感染確率で感染が成立すると考えられるウイルス量の推定（表8）及び最少量のウイルスを検出するために使用する試料水の量（表9）を設定する必要がある。

表8には、感染確率を1%と0.01%に設定した場合の最小感染単位の推定値を微生物ごとに示した。細菌類に比較して、ウイルスや原虫は非常に少ない量で感染が成立することが想像できる。

リスクを評価するには、このように少ない量のウイルスを一定の試料水から検出しなければならない。飲用水など用水ごとに経口摂取するであろう水量が異なるので、用水ごとの経口摂取水量を試案として推定し表9にまとめた。飲用水を例に

して、ヒトが1年間飲み続けてウイルスに感染する確率を0.01%、すなわち、 10^{-4} 以下に抑えられていることを保障するに要する試料水量を試算した。試料水中のウイルス量は当然、季節等の要因で変動するものと思われるが、ここでは、年間を通じて一定のウイルス汚染があるという前提で試算した。検査頻度は、毎日検査すれば1日摂取水量が被検試料水の単位になるが、実際的でないので、毎月1回試験する前提で試算した。すなわち、1日摂取水量の30倍量の試料水から、 10^{-4} リスクの最小感染単位（約0.006単位：表8）のウイルスを検出する前提で計算した。試算結果は、表9のごとく飲料水で6トンという莫大な水量になった。 10^{-4} リスクの評価を行うには、このような多量の試料水を対象として毎月検査し、年間に1度もウ

ウイルスが検出されないことを確認しなければならない。6トンという数値は非現実的な数値と思われるが、ウイルスそのものを指標として安全確認を行うために必要な試験水量である。事実、諸外国ではこのような水量で試験を行っているところも

ある(表5)。我が国にとっては、早急に解決しなければならない課題の一つである。

さらに、重要なことは、混入しているウイルスに生育活性があるか否かの判定である。検査の依頼側が求める結果は、「ウイルスがないことの

表8 病原微生物の最小感染単位の推定⁵⁾

病原微生物	感 染 確 率	
	1%	0.01%
<i>Campylobacter</i>	1.4	0.014
<i>almonella</i>	4.3	0.042
<i>Salmonella typhi</i>	263	2.6
<i>Shigella</i>	10	0.097
<i>Vibrio cholera</i>	1428	13
Poliovirus 1	0.67	0.0067
Echovirus 12	0.59	0.0058
Rotavirus	0.03	
<i>Giardia lamblia</i>	0.5	0.0050

表9 年間感染確率 10^{-4} 以下を保障し得る試験水量* (試算)

用 水	想定した状況	試験水量
飲料用水	生水として1日200mL飲む。 月間総量を200mL×30日=6 L	6 t
遊泳用水	プール、海水浴等で誤飲する 水量を1回100mL×半月15日=1.5 L	1,500 L
河川水	飲用水の原水と仮定し、浄水過程で99%除去 1日 2L×30日×残存率0.1=6 L	6 t
養殖海域海水	カキの養殖、 カキが 20L/時濃縮×24(日)×30(月)=15 t	15,000 t

*：各水系とも年間を通じて同レベルのウイルス汚染であることを前提とした想定条件で計算した水量の中に0.006単位以下のウイルスを検出しなければならないので、試験水量は計算水量の1,000倍とした。検査頻度は月に1回とした。

保障」である。微生物検査の宿命は、何らかの微生物が検出された場合は、確実にその微生物が試料中に存在したことを保障できるが、不検出であった場合には、検査目的とした微生物が試料中に存在していなかったことを保障しかねることである。この課題は、リスク評価を行うに際して避けて通れない難関であることを特筆し、今後の課題とする。

2.1.3 代替指標の設定

前述の課題解決の一つの方策として「代替指標」の設定がある。水系の微生物汚染に関しては、日常監視が必要であることはいままでのない。この目的で、代替指標が検討され、一般的には糞便汚

染の指標となる「大腸菌群」が多用されている。

大腸菌群は、検査法が簡単であること、一般的な水系に混入している量は、ウイルスに比較して5万～10万倍の量である(表10)ことから、理に叶った代替指標とされてきた。何ら人為的な水処理を施していない自然水では、まことに好都合な指標菌であるが、塩素処理をはじめとする何らかの水処理が施された水系では、その処理に対する除去・不活化効率がウイルスと異なった場合は、指標菌としての特性が失われる。

2.2 水処理技術指針

リスク評価を目的とした水中ウイルス試験のもう一つの目的に「水処理技術指針」の提供がある。

すなわち、ある環境水中のウイルス量を一定のリスク以下に抑えるための水処理技術の提供である。処理性能を評価する水処理方法によって、指標となる微生物種も異なるので、ここでは、最少の議論にとどめる。

例えば、塩素処理等の化学処理によってウイルスを不活化しようとする場合は、可能な限り塩素耐性が強いウイルスを使用すべきである。また、膜ろ過等の性能試験には、粒子が最も小さいウイルスを使用すべきと考える。

表10 各種試料中のウイルス濃度と大腸菌群数の比較²⁾

試料	ウイルス量	大腸菌群数	濃度比率
排泄物	200/g	13×10^6 /g	1 : 65,000
下水	500/100mL	46×10^6 /100mL	1 : 92,000
汚染表流水	1/100mL	5×10^4 /100mL	1 : 50,000

(金子、水の消毒、1997)

3. 魚介類のウイルス汚染実態とリスク評価

水中ウイルスがヒトに及ぼす健康影響について、飲用水などの水系を中心に議論したが、我が国の現状では、幸い、水中のウイルスがヒトの生活に危害を及ぼしているという実感がない。

現実的に、水中ウイルスがヒトに対して健康被害を及ぼしていると思われる事例は、魚介類のウイルス汚染である。

水環境中の腸管系ウイルスは、図2に示したごとく、感染者の糞便から多量に排泄され、下水や

河川などの水環境を経由しながら、最終的に海洋に達する。海洋に達するウイルス量は、河川流域で追加される場合もあるが、時間の経過と共に減少する場合もある。いずれにしても、海洋に達したウイルスが、魚介類に蓄積されるとウイルス量も増加する。そして、その魚介類をヒトが生で食することによってウイルス感染が生じる。外見的には食品媒介性のウイルス感染と見受けられるが、魚介類がウイルスを蓄積する過程からみると、水系感染の範疇に入る。

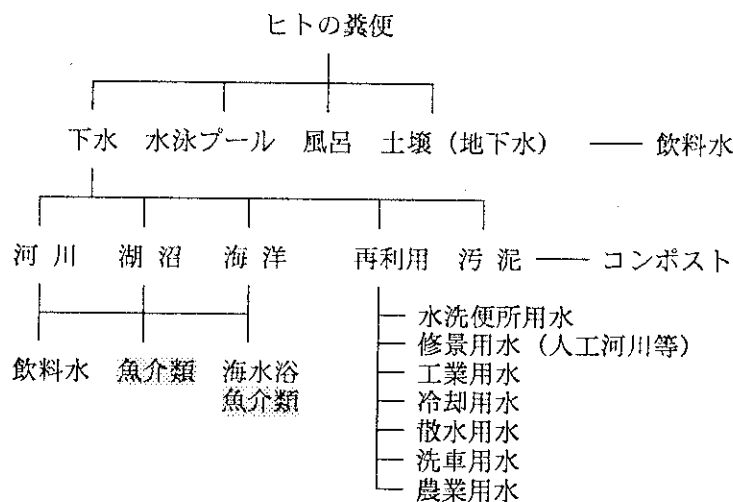


図2 腸管系ウイルスの環境中での挙動

3.1 魚介類のウイルス汚染実態

我が国においては、食中毒の原因物質として、ウイルスが認知されてから、魚介類が蓄積したウ

イルスが原因と思われるウイルス性胃腸炎も食中毒事例として取り扱われるようになった。このような法的整備を背景に、魚介類のウイルス汚染実

態も積極的に調査されるようになってきた。

表11には、諸外国における報告例をまとめた。また、我が国における調査結果もカキの消費地域を中心に調査が開始され、魚介類のウイルス汚染実態が明らかにされつつある。表12に示した調査事例は、首都圏で市販されている貝類からのウイルス検出を試みたものである。ウイルスの平均検出率は、32%であり、一般消費者の予想をはるかに超える実態が判明した。この結果ですら、前述のごとく、現状では有効と思われる試験方法によ

って実施された結果であり、将来、試験方法が改良されれば、更に詳細な実態が判明するものと考ええる。

魚介類、特に生カキからウイルスが検出されれば「即、ヒトに対して健康被害あり」と考えがちであるが、貝類を食した場合の感染リスクを文献からみると、表13に示したごとく、感染確率は、ウイルスの検出率とウイルス量によって異なり、350~22,000人に1人の感染確率であると考えられている。

表11 貝類を中心とした食品からのウイルス検出状況⁶⁾

試料	ウイルス検出状況等	場所・地域	調査年次
カキ	2.8 PFU/個	米国	1977
カキ	大腸菌(-)	日本産(テキサス)	1975
カキ	11%(146/1327)	ミシシッピ	1980
カキ	4.9%(51/1043)	ミシシッピ	1980
カキ	10%	米国	1982
カキ	10%(7/70)	米国	1973
イガイ	20%(2/20)	米国	1973
イガイ	0.3-249PFU/g	ニュージークランド	1982
ハマグリ	26PFU/100g	日本産	1981
牛肉	0-195PFU/5g	市販品	1970
カニ	3-12PFU/100g	ニューヨーク	1984
貝類	50% 468件	ウェールズ	1987
貝類	45% 202件	南アフリカ	1987

表12 首都圏で市販されている貝類からのウイルス検出事例

品名	検体数 (件)	検出率 (%)	検出ウイルスの内訳			
			SRSV	A型肝炎	ロタ	その他
シジミ	26	58	8 (31)			10 (38)
ハマグリ	24	21		1 (4)		4 (17)
カキ	31	39	5 (17)			7 (23)
アサリ	22	27		1 (5)		7 (32)
アカガイ	15	27	1 (7)		3 (20)	1 (7)
ウバガイ	14	43	1 (7)	1 (7)		4 (29)
ホタテガイ	14	21	2 (14)			2 (14)
ナミガイ	10	30	2 (20)			2 (20)
バカガイ	14	14				2 (14)
イガイ	8	13		1 (13)		
トリガイ	8	13				1 (13)
タイラギ	7	43	1 (14)			2 (29)
マテガイ	4	50				2 (50)
ミルガイ	3	33				1 (33)
その他	4	25				1 (25)
合計	204	32	20 (10)	4 (2)	3 (20)	46 (23)

()内の数値はウイルス別の検出率%。SRSV：小型球形ウイルス
(藤田 他：第99回東京都衛生局学会、1997)

表13 腸管系ウイルスによって汚染された貝類を生食した場合のリスク⁷⁾

調査場所	種類	陽性率	試料数	ウイルス量	感染確率
ミシシッピ	カキ	9.1%	22	0.18	1/22,000
ニューヨーク	アサリ	40	5	8.0	1/9,400
ニューヨーク	カキ	25	8	31.0	1/350
ノースカロライナ	アサリ	23.1	13	3.8	1/4,500
テキサス	カキ	20	10	7.6	1/9,000

ウイルス量はPFU/100gの平均値
 感染確率：例) 1/22,000は、喫食者22,000人あたり1人が感染する可能性がある。

4. ウイルスの感染リスクに関する指針と基準

水中に混入してくる病原微生物がヒトに対して健康被害をもたらすことがないように、という意図を持った行政対応手段に、指針値と基準値の設定がある。行政分野においては、周知の事実であるが、検査部門においては、必ずしもこの二つの用語が正しく理解されているとは言い難い面があると思う。ここで、あらためて、水中ウイルスに関する指針と基準について解説する。

4.1 指針値の設定

水中ウイルスの感染リスクに関する指針値の設定は、WHOを中心に議論され具体化が進められている。現状では「レジオネラ、ウイルス、原虫が飲料水に含まれてはならない」といった程度である。指針値は、実現可能か否かは別として、あるべき理想の姿を表現したものである。本研究チームがSRSVの指針値を設定するとすれば、「ヒトが直接口にする水及び食品中にはSRSVが存在してはならない」ということになる。この場合は、試験水量や試験方法を限定する必要がない。

検査あるいは生産部門では、このような指針値を目安に、既存の試験方法のうちから一つ、あるいは数種類を選んで試験することになる。その結果については、あくまでガイドライン、すなわち、指針であって行政処分等を伴うものではない。

4.2 基準値の設定

基準値の設定は、検査項目と検査方法を細かく明記して提案されるもので、その結果については、ほとんどの場合が法的な拘束力を持つことになる。

従って、基準に定められる項目は、試験方法が簡便で、特殊な設備や技術を必要とせず、どこで実施しても同じような結果が得られるものになっ

ている。このような観点から、水の微生物基準として古くから用いられているのが「大腸菌群」である。もちろん、試験方法や試験水量が細かく規定されており、どこでやっても同じ結果が得ることを前提に設定されている。しかし、現在では、前述のごとく、大腸菌群の指標性については議論のあるところであるが、ここでは省略する。

前項に示した指針値の設定と同様、仮に、本研究チームがSRSVの基準値を設定するとすれば、「〇〇試料については、〇L又は〇gについて、△△法によって試験した結果、不検出であること」という基準になると考えられる。目標となる病原微生物そのものについて基準値の設定ができれば、行政対応等が速やかに行えるが、現状ではSRSVの検査そのものが前述のごとく「特殊な設備や技術を必要とせず、どこで実施しても同じような結果が得られる」ものになっていない。したがって、当面は代替指標の設定に努力すべきと考える。

V. 文献

- 1) 金子光美：水の消毒、(財)日本環境整備教育センター、1997、東京
- 2) 矢野一好：水環境のウイルスと食品衛生、フードケミカル、p29-36、1997.
- 3) Anne, C. Moore, Barbara, L. et al., J. AWWA, 86, 87-99, 1994.
- 4) 金子光美 監訳：飲料水の微生物学、技報堂出版、1993.
- 5) Rose, J. B., C. P. Gerba: Wat. Sci. Technol., 23, 2091, 1991.
- 6) USEPA: Survey of Virus Isolation Date from Environmental Samples, 82-86, 1985.
- 7) NRC, National Research Council: Risk Assessment in the Federal Government Managing the Process, National Academy Press, 1983.

ウイルス性食中毒原因の遺伝子検査標準法確立と全国行政対応整備に関する研究 環境水からのウイルス濃縮方法の検討

矢野一好、宇田川悦子、川本尋義

研究要旨

本報は、水中ウイルスを手軽に濃縮できる実用的な方法について検討し「セルロース吸着・凝集法」と名付けて提案するものである。本法の原理は、試料水中に陰イオン交換体である DEAE-セルロースを直接添加 (0.03%) し、水中ウイルスを吸着させる。その後、アニオン系有機凝集剤でセルロースを凝集させ、凝集塊をナイロンメッシュで回収して、ピーフエキストラクト溶液でセルロースからウイルスを誘出させるものである。本法を用いて、精製水、河川水及び下水処理水50mlに添加したポリオウイルスの濃縮実験を行った結果、ウイルスの吸着率は80%以上であった。また、ウイルスの回収率は、50mL容量の実験で平均99.9%、20L容量の実験で平均42.9%であった。また、本報に従って濃縮した河川水から、PCR法によって SRSV (小型球形ウイルス) も検出することが可能である。

I 緒言

水中ウイルスの濃縮方法に関する研究は、1960年代から本格的に研究が開始され、ポリエチレングリコール等による凝集法¹⁾、メンブランフィルターや限外ろ過膜によるろ過法^{2)~4)}、そして水中ウイルスの電気的特性を利用したゼータプラスフィルター法^{5)~7)}へと発展してきた。しかし、これらの方法は、対象とする試料水の水質の違いによって、ウイルスの回収率が大きく変動する。また、ウイルスの濃縮に大掛かりな機材が必要なため、実用性に欠ける面がある。本報は、このような背景を基に、試料水の水質に関係なく、しかも特別な器具や大掛かりな機材を必要としない実用的な水中ウイルスの濃縮方法について検討し、「セルロース吸着・凝集法」と名付けて提案するものである。本法の原理は、大量の水中に混入している微量のウイルスが水中では通常マイナスに荷電した状態で浮遊、あるいは固形物に吸着していることに着目し、試料水中に陰イオン交換体である DEAE-セルロースを直接添加して、ウイルスを DEAE-セルロースに吸着させる。その後、ウイルスの吸着した DEAE-セルロースと試料水中に混入している有機固形物を高分子凝集剤で凝集させ、生成したフロックをナイロンメッシュで回収して、セルロースフロックからウイルスを誘出さ

せるものである。

II. 材料と方法

1. ウイルス

基礎実験には、取扱いが容易なことと下水等の水系から高率に分離されるウイルスであることから、弱毒ポリオウイルス1型 (Lsc、2ab株) を使用した。ウイルスは、BGM細胞 (ミドリザル腎細胞由来) で増殖させ、遠心分離した上清を使用ウイルス液とした。ウイルスの感染価は約 10^7 PFU/mLであった⁸⁾。

2. DEAE-セルロース

水中ウイルスの吸着剤として、陰イオン交換体である DEAE-セルロース (以下、セルロースと略記) を使用した。セルロースは、できるかぎり繊維の長さが長いグレードのもの (シグマ社 D-64186) を用意し使用に先立って活性化処理した。

3. セルロースろ過袋

セルロースを活性化する際の袋として、また試料水に添加したセルロースを回収するための袋として、不織布で作ったナイロンメッシュ (セルキャッチャー: 日研生物) を使用した。

4. 高分子凝集剤

セルロースと試料水中に混入している有機固形物を凝集させる目的でアニオン系高分子凝集剤

(以下、凝集剤と略記)を使用した。凝集剤は、あらかじめ精製水で200mg/L濃度に溶解し、冷蔵保存した。

5. 試料水

実験には、精製水、水道水、二次処理下水、河川水、雑用水及び海水を使用した。二次処理下水は、都市下水を活性汚泥法によって処理した放流水を、河川水は、都市部を流れる3本の河川から採取したものをを用いた。雑用水は、二次処理下水をさらに凝集沈澱、砂ろ過処理し、活性炭ろ過したのち塩素処理したものである。海水を除く各試料水の平均的な水質を表1に示した。

表1 実験に使用した試料水の水質

水質項目	水道水	処理下水	河川水	雑用水
濁度	0	10	14	1.6
色度	1	28	36	19
pH	7.0	7.2	7.2	6.6
7ル別度		110	32	101
電気電導率		645	255	781
有機物	1.6	14	4	12
7メニ7性窒素		13	0	14

単位：mg/L

6. ウイルス誘出液

ビーフエキストラクトは、DIFCO社製のビーフエキストラクトを精製水で所定濃度に溶解し、1%濃度に塩化ナトリウムを添加後、水酸化ナトリウム溶液でpH値を9.0に補正したのち滅菌し4℃で保存した。グリシン緩衝液は、M/10グリシン溶液8に対して、M/10水酸化ナトリウム溶液を2の割合で混合し、塩化ナトリウムを1%の割合に添加して調製した(pH9)。ホウ酸緩衝液は、M/10ホウ酸溶液とM/10塩化カリウム溶液を等量混合したもの63mLに対して、M/10炭酸ナトリウム溶液を37mLの割合で混合し、塩化ナトリウムを1%の割合に添加した(pH9)。炭酸緩衝液はM/10炭酸水素ナトリウム溶液9に対して、M/20炭酸ナトリウム溶液を1の割合で混合し、塩化ナトリウムを1%の割合に添加して調製した(pH9)。

7. 抗生物質混合液

滅菌したリン酸緩衝食塩液(PBS)1mLに対して、Ampicillin 30mg、Kanamycin 40mg、Streptomycin 40mg、Amikacin 2mgを無菌的に溶解し、20mLずつ分注して-20℃で凍結保存した。

8. 実験系の容量

基礎的な条件検討は50mL容量で、実用価値の検討は20L容量の実験系で行った。

9. ウイルスの定量

BGM細胞を用いたブラック形成法により測定し、PFU単位で表示した。細胞は、6穴のプラスチックプレート(コースター社:3406)に単層培養しPBSで洗浄後、10倍段階希釈した試料を1希釈当たり1mLずつ2穴に接種し、常法⁹⁾に従ってブラックを形成させた。

10. セルロースへのウイルス吸着要因の検討

セルロースへのウイルス吸着要因として、ウイルス量、セルロース添加量、凝集剤添加濃度の3要因を選出し、それぞれの要因に3水準を設けて9通りの組合せで実験した。要因解析は、実験結果から得られたウイルスの吸着率を基に分散分析表¹⁰⁾を作成し、ウイルスの吸着効果を左右する最大要因と水準の組合せを選択することにより行った。

11. セルロース添加量の検討

精製水、二次処理下水及び河川水50mLずつを試料水として、一定量のポリオウイルスを添加し、セルロース添加量を変化(0.015~0.24%)させた条件でウイルスの吸着率を求めた。

12. ウイルス誘出要因の検討

所定濃度のウイルスを添加した精製水、河川水及び二次処理下水50mLにセルロース及び凝集剤を添加し、遠心分離して沈澱物を集めた。沈澱物には、4種類の誘出液を50mLずつ添加しよく攪拌したのち、再度遠心分離して上清中に誘出したウイルス量を測定した。

III. 結果

1. セルロースによるウイルス吸着要因の検討

表2にまとめたとおり設定要因B(セルロース添加量)で有意差が認められ、セルロースが水中ウイルスの吸着に有効であることがわかった。その効果は変動値から推測すると、添加するセルロースの量が多ければ多いほど効果的であること

表2 セルロースによるウイルス吸着実験と吸着要因分析（精製水）

1. 実験構成

要因	Aウイルス量 (PFU/mL)	Bセルロース添加量 (g)	C凝集剤濃度 (0.02mg/L, mL)
水 準	A 1 180,000	B 1 0	C 1 0.5
	A 2 1,800	B 2 0.5	C 2 0.05
	A 3 18	B 3 1.0	C 3 0.005

2. 実験データ

実験 番号	組み合わせ			残存ウイルス量 (PFU/mL)	吸着率 (%)
	A	B	C		
1	1	1	1	180,000	0
2	1	2	2	590	99.7
3	1	3	3	1,600	99.1
4	2	1	3	2,100	0
5	2	2	1	180	90.2
6	2	3	2	0	100
7	3	1	2	270	0
8	3	2	3	22	87.9
9	3	3	1	2	98.9

3. 分散分析表

要因	自由度	平方和	不偏分散	分散比
A	2	25.53	12.76	1.14
B	2	1,8484.21	9,242.11	823.83**
C	2	30.85	15.43	1.37
誤差	2	22.44	11.22	

4. 変動値（吸着率の平均値に対して作用する割合）

要因	Aウイルス量	Bセルロース添加量	C凝集剤濃度
水	A 1 2.28	B 1 - 63.97	C 1 - 0.93
	A 2 - 0.56	B 2 28.61	C 2 2.58
準	A 3 - 1.73	B 3 35.36	C 3 - 1.66

表3 セルロースによるウイルス吸着実験と吸着要因分析（河川水）

1. 実験構成

要因	Aウイルス量 (PFU/mL)	Bセルロース添加量 (g)	C凝集剤濃度 (0.02mg/L, mL)
水 準	A 1 120,000	B 1 0	C 1 0.5
	A 2 1,200	B 2 0.5	C 2 0.05
	A 3 12	B 3 1.0	C 3 0.005

2. 実験データ

実験 番号	組み合わせ			残存ウイルス量 (PFU/mL)	吸着率 (%)
	A	B	C		
1	1	1	1	61,000	48.7
2	1	2	2	620	99.5
3	1	3	3	330	99.7
4	2	1	3	910	23.5
5	2	2	1	17	90.2
6	2	3	2	1	98.6
7	3	1	2	46	99.9
8	3	2	3	2	98.3
9	3	3	1	4	96.6

3. 分散分析表

要因	自由度	平方和	不偏分散	分散比
A	2	212.98	106.49	0.77
B	2	5,883.60	2,941.80	21.14**
C	2	257.45	128.73	0.92
誤差	2	278.37	139.19	

4. 変動値（吸着率の平均値に対して作用する割合）

要因	Aウイルス量	Bセルロース添加量	C凝集剤濃度
水	A 1 1.95	B 1 - 36.16	C 1 0.62
	A 2 - 6.69	B 2 18.09	C 2 6.22
準	A 3 4.47	B 3 18.06	C 3 - 6.84

がわかった。具体的な数値でみると、セルロース無添加の場合は実験値の平均値よりウイルスの吸着率を63.97%低下させる方向に作用し、セルロースを0.5g添加すればウイルスの吸着率を平均値に対して28.61%、1.0g添加すれば35.36%それぞれ上昇させる方向に作用することが判明した。

河川水を試料水として行った実験の結果も精製水の場合と同様に解析して表3にまとめた。分散

比、変動値ともに精製水の場合より低い値であったが、河川水中のウイルス吸着にセルロースの添加が有効であることがわかった。

2. セルロース添加量の検討

試料水中に添加するセルロースの至適濃度を求めるために、精製水、二次処理下水及び河川水に添加したウイルスの吸着率と、セルロース添加量の関係をみた(表4)。

表4 各種試料水におけるセルロース添加量とウイルス吸着率

試料水	添加ウイルス量 (PFU)	セルロース 添加量(%)	ウイルス吸着率 (%)
精製水	16,000	0.015	56.3
		0.03	82.5
		0.06	86.9
		0.12	83.8
		0.24	80.6
二次処理 下水	7,600	0.015	80.3
		0.03	85.5
		0.06	90.8
		0.12	97.4
		0.24	94.7
河川水	6,400	0.015	82.8
		0.03	95.2
		0.06	93.3
		0.12	95.3
		0.24	95.5

試料水量：各50mL、凝集剤(200mg/L)：1mL添加

ウイルスの吸着率は、56.3~97.4%の範囲となり、試料水別にみると精製水よりも河川水や二次処理下水のほうが高い傾向にあった。また、セルロースの添加量別にみると、セルロース添加量が増えるに従ってウイルスの吸着率も上昇する傾向はあったが、セルロース添加量0.015%と0.03%の間で大きな差がみられたのみで、0.03%以上に添加してもあまり大きな変動はなかった。つまり、

実験に使用した程度の水質の試料水を対象として水中ウイルスの濃縮を行うには、セルロース添加量は0.03%程度でよいことがわかった。

3. ウイルス誘出液の選択

ウイルスを吸着させたセルロースから効率よくウイルスを誘出させるために、4種類の誘出液を使用して誘出液の選択実験を行った。

ウイルスの誘出率は、表5に示したとおり57.4

～113.2%の範囲になった。誘出液の種類別にウイルスの誘出率をみると、試料水の種類によって若干の差はあるが、ビーフエキストラクトが最高で

あり、次いでグリシン緩衝液であった。したがって、以下の実験にはビーフエキストラクトを誘出液として使用した。

表5 セルロースに吸着させたウイルスの誘出液の選択実験

試料水	誘出液の種類	pH 値	誘出率%
精製水	グリシン 緩 衝 液	9	79.7
	ビーフエキストラクト	9	89.2
	ホウ酸 緩 衝 液	9	72.4
	炭酸 緩 衝 液	9	57.4
河川水A	グリシン 緩 衝 液	9	81.9
	ビーフエキストラクト	9	94.7
	ホウ酸 緩 衝 液	9	99.5
	炭酸 緩 衝 液	9	86.8
河川水B	グリシン 緩 衝 液	9	92.4
	ビーフエキストラクト	9	102.5
	ホウ酸 緩 衝 液	9	91.8
	炭酸 緩 衝 液	9	89.2
二次処理 下水	グリシン 緩 衝 液	9	106.8
	ビーフエキストラクト	9	113.2
	ホウ酸 緩 衝 液	9	92.6
	炭酸 緩 衝 液	9	96.4

添加ウイルス総量：240,000 PFU/50mL セルロース添加量：0.03%
凝集剤 (200mg/L)：1mL 添加 実験系：50mL 容量

4. セルロース吸着・凝集法の実用化

1) 種々の試料水によるウイルスの回収実験

セルロース吸着・凝集法の実用性を検討するために、種々の試料水を用いてウイルスの回収実験を行った(表6)。

ウイルスの回収率をみると、最低11.1%から最高69.0%であり、海水を試料水とした場合に大きな変動が認められた。このことから、本法は塩濃度が高い試料水中のウイルスの濃縮には不适当であることがわかった。また、添加ウイルスの濃度別に回収率をみると、一部の例外はあるが、高濃度のウイルスを添加した場合に高い回収率が認めら

れた。

2) ウイルスの検出限界

セルロース吸着・凝集法によるウイルスの回収限界を求めるために、ウイルス添加量を極端に低くして回収実験を行った(表7)。

実験の結果、ウイルスの回収率に変動が認められたが、試料水20L当たり3PFUのウイルス量でも5回の実験のうち1回、30PFUなら5回のうち3回はウイルスの検出が可能であった。

3. セルロース吸着・凝集法の具体的手順

以上の実験結果を基に、セルロース吸着・凝集法を実用化するための手順を図1にまとめた。

表6 種々の試料水に添加したウイルスの回収実験

試料水	添加ウイルス 総量 (PFU)	回収ウイルス 総量 (PFU)	回収率%
河川水A	350,000	110,000	32.5
	35,000	9,800	28.2
河川水B	450,000	190,000	42.3
	45,000	15,000	34.8
河川水C	380,000	270,000	69.0
	38,000	12,000	30.7
二次処理 下水	340,000	110,000	29.1
	34,000	5,500	46.1
雑用水	400,000	120,000	52.4
	40,000	7,800	36.0
水道水	520,000	100,000	47.9
	52,000	16,000	51.0
精製水	500,000	170,000	60.0
	50,000	14,800	41.0
海水	530,000	530	11.0
	53,000	270	23.0

添加ウイルス総量：240,000 PFU/50mL セルロース添加量：0.03%

凝集剤 (200mg/L)：1mL 添加 実験系：20 L 容量

最終濃縮量：50mL に回収

試料水の採取には、ポリエチレン製の成型容器が多用されてきたが、本法においては、持ち運びの利便性を考慮して、ソフトタイプのものを折りたたんで運搬することとした。セルロースの添加量は、乾燥重量で6g/20L以上、ゲル状の場合 50mL程度を添加する。試料水の攪拌は、タンクごと軽くゆする程度で十分である。凝集剤は、セルロースの凝集状態を見ながら10mLを目安にして徐々に添加する。セルロースの回収には、ナイロンメ

ッシュ（不織布：平均孔径20 μ m）を使用して回収する。回収したセルロースは、よく脱水したのち適当な容器に格納し実験室に搬入する。実験室では、3~5%濃度のビーフエキストラクト（pH9、1% NaCl添加）10mL/試料水20L程度をナイロンメッシュの上から添加して、よくもみほぐしてウイルスを誘出させる。誘出液は、除菌の目的でpH補正をする前に、孔径0.22 μ m程度のメンブランフィルターでろ過する。このろ液を必

要に応じて pH 補正、あるいは抗生物質処理を行いウイルス検出用の試料とする。

表7 水道水に添加したウイルスの回収限界

添加ウイルス PFU/20 L	回収ウイルス総量 PFU/10mL	回収率 %
360	60	16.7
	60	16.7
	50	13.9
	30	8.3
	20	5.6
30 (計算値)	10	33.3
	10	33.3
	10	33.3
	<10	-
	<10	-
3 (計算値)	10	333
	<10	-
	<10	-
	<10	-
	<10	-

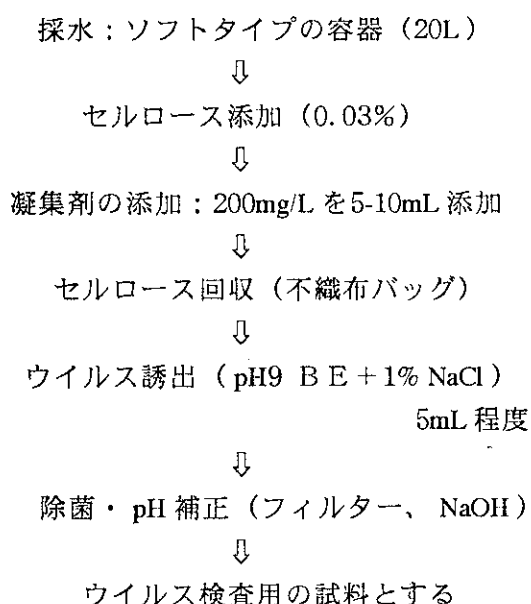


図1 セルロース吸着凝集法のウイルス濃縮手順

IV. 考察

基礎実験の結果から、セルロースへのウイルスの吸着は、水中ウイルスがマイナス荷電していることに起因して、高率に行われているものと推測された。この吸着作用は、精製水に添加したウイルスよりも河川水や下水に添加したウイルスの場合が強い結果になった。このことは、単純にウイルス粒子とセルロースの関係だけでなく、試料水に混入している有機固形物等が相乗的に作用してウイルス吸着が起こっていることを裏付けているものとする。また、河川水や下水に添加したウイルスのセルロースへの吸着率が高い原因は、凝集剤の添加も関係していると考えられる。つまり、プラスに荷電した粒子が試料水中に混入していたと仮定すると、当然ウイルスを吸着することになる。しかし、セルロースのみの添加ではプラス荷電している粒子を捕捉しない。そこで、アニオン系の凝集剤が仲立ちとなってプラス荷電している粒子を捕捉し、かつ大きなフロックを形成することになるものと推測される。

一方、セルロースの添加量は、一定量（0.03%）以上であれば、実験に使用した範囲の試料水中のウイルスが捕捉できると思われる。セルロースへのウイルス吸着の原理から考えると、添加量が多ければ多いほどウイルスの吸着率がよくなるはずである。しかし、実験の結果からみると、セルロースの添加量を増やしてもウイルスの吸着率はそれほど上昇しない。この現象については、今後の検討課題であると同時に、どのような水質の試料水にどの程度のセルロースを添加すれば、水中ウイルスを効率よく捕捉できるか、その指標を簡単な水質検査項目（例えば電気伝導率）で代用できないか等について検討する必要がある。

セルロースに吸着させたウイルスを効率よく誘出させるには、3~5%濃度のビーフエキストラクト（pH9、1% NaCl添加）が有効であった。グリシン緩衝液や炭酸緩衝液もウイルスの誘出に有効であるので、濃縮液を使用する試験方法によって使い分ければよいと思われる。

誘出液に係るもう一つの問題点は、誘出液中の細胞毒性物質をいかにして除去するかということである。すなわち、現状の誘出方法は、セルロースを丸ごと誘出液でもみほぐすため、ウイルス以

外の吸着物質が同時に誘出され、ウイルス分離用の細胞に対して非特異的な細胞変性を起こす場合が多い。この対策として、ウイルスを吸着させたセルロースを一度カラムに充填して、緩衝液の濃度を変化させながら誘出させ、ウイルス分画のみをウイルス分離用の検体とする方法等が考えられる。しかし、PCR法などに使用する場合は、誘出液をそのまま超遠心分離して沈査から核酸抽出を行うことができる。

セルロース吸着・凝集法は、かなり幅広い水質の試料水（水道水、河川水、下水、雑用水等）に混入しているウイルスの濃縮に適用できると思われるが、塩濃度の高い水（海水等）については不適当であった。この原因は、試料水中のイオン化した物質がセルロースへのウイルス吸着を妨害したからであろうと推測する。

セルロース吸着・凝集法によるウイルスの検出限界は、水道水中に添加した微量のウイルスについて実験した結果、3 PFU/20Lのウイルス量でも検出が可能であることがわかった。実際にウイルス検査を必要とする試料水に混入しているウイルス量を1 PFU/L以上と仮定すれば、本法で十分対応できるものと考ええる。また、大容量の試料水の場合、ウイルスの回収率が低下する可能性があるため、その対応策としては、20L単位の水量を繰り返し本法で濃縮し、同じ不織布バッグにセルロースを回収すればよいと考ええる。

セルロース吸着・凝集法の実用化にあたって、実際の作業現場を想定して手順を図1に示した。水中ウイルスの検査を特殊な検査としないで、日常検査の感覚で行うには、採水現場での作業を簡略化することが第一であると考え、特殊な器具や機械を必要としない本法を考案した。

V. 文献

- 1) E. Bizziagos, C.J. Passagot, J. M. Crance, R. Deloince : Concentration of Hepatitis A Virus, *Water Res.*, 21, 6, 683-686 (1987)
- 2) P. Payment, M. Trudel : Wound Fiberglass Depth Filters as Less Expensive Approach for The Concentration of Viruses from Water, *Can. J. Microbiol.*, 34, 271-272 (1988).
- 3) G. A. Tofranzos, G. W. Erdos, S. R. Farrah : Virus Adsorption to Microporous Filters Modified by In Situ Precipitation of Metallic Salts, *Water Sic. Technol.*, 18, 141-148 (1986).
- 4) S. R. Farrah, D. R. Preston: Concentration of Viruses from Water by Using Cellulose Filters Modified by Situ Precipitation of Ferric and Aluminium Hydroxides, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1502-1504 (1985).
- 5) B. N. Guttman, T. Hostovsky, L. M. Arnon : A Comparison of Current Methods of Poliovirus Concentration from Tap Water, *Water Res.*, 19, 85-88 (1985).
- 6) B. N. Guttman, J. Catalano-Sherman: Effect of Humic Materials on Virus Recovery from Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1260-1264 (1985).
- 7) N. N. Guttman, J. Catalano-Sherman: Humic Acid Interference with Virus Recovery by Elwtropositive Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 556-561 (1986).
- 8) 矢野一好、吉田靖子ほか：ゼータプラスフィルターによる水中ウイルス試験方法の検討，水道協会雑誌，59，10-15 (1990).
- 9) J. C. Block, L. Schwartzbrod: Viruses in Water Systems Detection and Identification, p95, Translated from The French by Luke A. Burke (New York)
- 10) 鳥居敏雄，高橋正，土肥一郎：推計学，pp 161～324，東京大学出版会，東京 (1968) .
- 11) D. M. Sobsey, S. E. Oglesbee, D. A. Wait: Evaluation of Methods for Concentrating Hepatitis A Virus from Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1457-1463 (1985).