

膜処理によってもウイルスは除去される。膜による水処理においては、膜の孔径と粒子の大きさによるふるい作用と、膜の電荷と粒子の電荷の関係で除去される。ウイルスの除去においては、主に膜孔径がウイルスよりも小さな限外ろ過膜 (UF) を用いて除去することが可能であるとされている。しかし、膜孔径がウイルスよりも小さい場合でも、ウイルスを完全に除去することは困難であることが実験的に知られている。限外ろ過 (Urase et al., 1993)、ナノろ過 (Urase et al., 1996) においても、ほとんどのウイルスは除去されるものの、ごくわずかながら膜を透過するウイルスが存在する (残存率として  $10^{-5}$  から  $10^{-6}$ ) という報告がある。また、ウイルス粒子よりも大きな孔径をもつ精密ろ過膜 (MF) を用いる場合でも、水処理を継続する過程で膜面上に形成されるケーキ層によってウイルスが除去されることが知られている (Otaki et al., 1998.)。膜処理の利点は、ウイルス除去率の高さではなく、安定した除去が達成しやすいことにあると考えられる。また、後段において消毒を行う場合、膜処理によって得られた水に対しては一定の消毒効果が安定的に達成されると期待される。このことは、微生物学的安全性を確保するために重要な利点であると考えられる。

## 2) 浄水工程におけるウイルス不活化

### (ア) 塩素消毒

塩素消毒に対しては、腸管系ウイルスは大腸菌に比べて抵抗性があり、原虫類ほど強くはない (Sobsey 1989)。ポリオウイルスは凝集しやすい性質を持っているため、消毒剤が効きにくい可能性がある (Young et al., 1977)。クロラミンはウイルスに対してはあまり効果的な消毒剤ではなく、2mg/L では3時間程度の接触時間では90%の不活化にとどまることが報告されている (Shin et al., 1998)。

残留塩素の微生物抑制効果について、水道配水管に存在する残留塩素により大腸菌は速やかに不活化するものの、ウイルスにはあまり効果がないという実験結果が報告されている (Payment 1999)。

ノロウイルスについては、培養法が存在しないために消毒効果を推定することが困難である。また、ノロウイルスを25°Cにおいて遊離残留塩素0.5–1.0mg/L (注入率として3.75–6.25 mg/L) で30分接触させた場合に、ボランティアへの感染力が低下しなかったという報告がある (Keswick et al., 1985)。ただし、この研究ではウイルスの精製が不十分であった可能性があり、水道水のような清澄な水における不活化に直接この研究結果を適用するのは適切とは考えにくい。結局、塩素耐性については不明なところが多い。

### (イ) 紫外線消毒

紫外線による不活化において、ほとんどの場合ウイルスは一次反応的に減少することが知られている (Battigelli et al., 1993)。

同じ線量率、すなわち単位面積あたりに紫外線が当たる量が同じである場合、微生物の大きさが小さければそれだけ紫外線が当たる量は小さくなる。そのため、非常に小さいという特徴を持つウイルスは、紫外線による損傷を比較的受けにくいと考えられる。事実、リスク評価の観点から紫外線の照射線量を規格化する欧米における試みの中で、ウイルス学的安全性を確保するために照射量が大きく設定されている。紫外線消毒の施設基準などを検討する場合には、ウイルスの消毒をどの程度まで保障する必要があるのかを決めれば必要な線量が決定し、細菌や原虫の不活化は十分に達成されるものと予想される。たとえば、アメリカ合衆国の紫外線のガイドライン値の決定において、A型肝炎ウイルスの不活化率が参照されている (USEPA, 1989)。2log(99%)不活化のために21mJ/cm<sup>2</sup>, 3log不活化のために36mJ/cm<sup>2</sup>を必要としている。

最近になって、二本鎖DNAを遺伝子としてもつアデノウイルスが紫外線に対して最も抵抗力があることが分かってきた (Meng et al., 1996)。4log不活化するためには、アデノウイルス41型は111.8mJ/cm<sup>2</sup>, 同40型は124mJ/cm<sup>2</sup>の線量が必要であるとしている。3logの不活化を達成するために必要な照射線量は、エコーウ

イルス 1 型、同 11 型、コクサッキーウイルス B3 型、同 B5 型、およびポリオウイルス 1 型に対して、それぞれ 25、20.5、24.5、27、23mJ/cm<sup>2</sup>であったのに対し、アデノウイルス 2 型を 3log 不活化するためには 119 mJ/cm<sup>2</sup> を要したと報告している (Gerba C. et al., 2002)。さらに、アデノウイルス 40 型を 4log 不活化するためには 226mJ/cm<sup>2</sup>が必要であるとしている (Thurston-Enriquez et al., 2003)。なお、二本鎖 DNA を遺伝子としてもつ PRD-1 ファージは RNA 一本鎖ファージの MS2 よりも不活化されやすく、遺伝子だけでは不活化速度が決定されない (Meng et al., 1996)。

Q $\beta$  をモデルウイルスとして、水中の平均紫外線照射線量を正確に測定できることが分かっており (Kamiko et al., 1989)、生物線量計として用いられている。また、工学的には、ファージではなく細菌の *Bacillus subtilis* をモデル微生物として用いる利点もある (Sommer et al. 1993)。微生物の取り扱いが容易であり、大量に用意できるため、大規模な処理施設に対する投入実験においても比較的高濃度で実験を開始できるため、照射線量の測定可能域が広いという利点を挙げている。

#### (ウ) オゾンによる不活化

オゾン消毒については、その反応機構が非常に複雑であるために、複数の研究の比較をするのが困難な状況である。オゾン処理においては、オゾンを含む溶液とウイルスを混合するやり方と、オゾン発生装置で生成されたオゾンを反応槽に吹き込む方法があり、それぞれ一長一短がある。ここで問題となるのは、Ct 値として正確に測定するのが難しいことである。

水質にもよるものの、2log 不活化に必要な Ct 値は 1min $\cdot$ mg/L 以下であり、オゾンはウイルス不活化に有効である (Sobsey 1989)。また、オゾン消費物質を極力なくして行った研究では、大腸菌ファージ Q $\beta$  を 2log 不活化するために必要な Ct 値は 0.0001min $\cdot$ mg/L であったとしている (関谷ら、1993)。

感染性試験、普通の PCR 法、および長鎖の増幅領域を対象とした PCR 法を用いてオゾンの消毒効果を調べた研究がある (Shin et al., 2003)。ここでは、感染性試験を適用できないノロウイルスに対する不活化効果について、他のウイルスの PCR 法の結果と感染試験の結果を比較することにより推定するアプローチを採用している。ノロウイルスがオゾンに強いという可能性は低いという結果が得られている。

#### D. 結論

ウイルス粒子は、通常の浄水工程においても除去されるが、濁度の連続監視などにより、常に一定以上の除去が達成されるような運転管理が望まれる。膜処理の利点は、ウイルス除去率の高さもさることながら、安定した除去が達成しやすいことにあると考えられる。

塩素消毒に対しては、腸管系ウイルスは大腸菌に比べて抵抗性があり、原虫類ほど強くはない。クロラミンはウイルスに対してはあまり効果的な消毒剤ではない。残留塩素の微生物抑制効果について、水道配水管に存在する残留塩素は大腸菌は速やかに不活化するものの、ウイルスにはあまり効果がないという実験結果が報告されている。紫外線による不活化において、ほとんどの場合ウイルスは一次反動的に減少することが知られている。また、アデノウイルスが紫外線に対して高い抵抗力があるという報告がある。オゾン消毒については、水質にもよるものの、2log 不活化に必要な Ct 値は 1min $\cdot$ mg/L 以下であり、オゾンはウイルス不活化に有効であると考えられる。

#### E. 参考文献

Shin GA, Sobsey MD (1998) Reduction of norwalk virus, poliovirus 1 and coliphage MS2 by

- monochloramine disinfection of water, WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 38 (12): 151-154.
- Otaki M, Yano K, Ohgaki S (1998) Virus removal in a membrane separation process, WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 37 (10): 107-116.
- Urase T, Yamamoto K, Ohgaki S 1996 Effect of pore structure of membranes and module configuration on virus retention JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE 115 (1): 21-29 JUN 26
- URASE T, YAMAMOTO K, OHGAKI S 1993 EVALUATION OF VIRUS REMOVAL IN MEMBRANE SEPARATION PROCESSES USING COLIPHAGE-Q-BETA WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 28 (7): 9-15
- Teunis PFM, Medema GJ, Kruidenier L, et al. 1997 Assessment of the risk of infection by Cryptosporidium or Giardia in drinking water from a surface water source WATER RESEARCH 31 (6): 1333-1346
- Masago Y, Katayama H, Hashimoto A, Hirata T. and Ohgaki S. (2002) Assessment of risk of infection due to Cryptosporidium parvum in drinking water, WATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 46 (11-12): 319-324
- Payment P (1999) Poor Efficacy of Residual Chlorine Disinfectant in Drinking Water to Inactivate Waterborne Pathogens in Distribution Systems, Can. J. Microbiol., 45: 709-715.
- Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. A. Bitsura, G. W. Gary, and J. C. Hoff. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 50:261-264.
- Young D. C. and Sharp D. G. (1977) Poliovirus Aggregates and Their Survival in Water, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 33: 168-177.
- Shin GA, Sobsey MD (2003) Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 69 (7): 3975-3978.
- Sobsey, M. D. 1989. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. Wat. Sci. Technol. 21:179-195.
- Battigelli D. A., Sobsey M. D. and Lobe D. C. 1993. The inactivation of Hepatitis A Virus and Other Model Viruses by UV Irradiation, Wat. Sci. Tech., 27: 339-342.
- Gerba C. P., Gramos D. M. and Nwachuku N. 2002. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light, Appl. Environ. Microbiol. 68:5167-5169.
- Meng Q. S. and Gerba C. P. 1996. Comparative Inactivation of Enteric Adenoviruses, Poliovirus and Coliphages by Ultraviolet Irradiation, Water Research, 30: 2665-2668.
- Thurston-Enriquez J. A., Haas C. N., Jacangelo J., Riley K. and Gerba C. P. 2003. Inactivation of Feline Calicivirus and Adenovirus Type 40 by UV Radiation, Appl. Environ. Microbiol. 69:577-582.
- Kamiko N. and Ohgaki S. (1989) RNA coliphage Q $\beta$  as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency, Wat. Sci. Tech., 21, (3) 227-231.
- US EPA. 1989. Guidance Manual for Surface Water Treatment Rule (SWTR).
- 関谷毅史、大垣眞一郎 (1993) 大腸菌ファージ Q $\beta$  を用いたオゾンのウイルス不活化に関する研究、水道協会雑誌、62 : 21-27.

#### F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権等

なし

分担研究報告書 6

## 水中ウイルスの検査法に関する検討

分担研究者 片山浩之

## 分担研究報告書

### 「水中ウイルスの検査法に関する検討」

主任研究者 国包章一 国立保健医療科学院水道工学部

分担研究者 片山浩之 東京大学大学院工学系研究科

#### 要旨

これまでに開発されているウイルス濃縮法について文献調査を行った。研究発表としては、ウイルスの測定法が培養法から PCR 法に移行しており、それに伴って新しいウイルス濃縮法が提案されている。また、PCR 法は比較的簡便な手法であり、水中ウイルスを広く測定することが可能であると考えられる。陰電荷膜を用いた酸洗浄法により、水道原水におけるウイルス濃度の実測が可能であり、大容量の浄水に対しては、陽イオン添加型酸洗浄法が有力な方法である。

#### A. 研究目的

水の安全性は、最終産物である水道水そのものの検査結果のみによって統計学的に確保するものでなく、HACCP（危害分析・重要管理点）の考え方に基づいて工程管理による安全性の確立を図るべきである。すなわち、消毒前の水あるいは浄水前の原水に含まれる可能性のあるウイルス濃度の分布についてデータを蓄積し、実施している消毒などの処理によるウイルス除去能を調べて安全性を確保することである。除去性能の評価と、濁度管理などの日常のモニタリングによってウイルス除去能を監視すること等により、安全を保つことができると考えられる。

浄水工程におけるウイルスの除去能、あるいは水道原水として用いている水の中に含まれるウイルス濃度の分布を調べることは、水道水の安全性を確保するために重要な情報となると考えられる。そのためには、水中ウイルスの測定法を確立する必要がある。

#### B. 研究方法

国内外の水中ウイルスに関する文献調査を行った。

#### C. 研究と考察

##### 1) ウイルス濃縮法の開発の概略

ヒト腸管系ウイルスは、環境中では通常は低濃度であるため、水環境中のウイルスを測定するためにはウイルスを濃縮する必要がある。ウイルス濃縮法が満たすべき要件としては、1)さまざまな種類の大量の水を短時間で処理可能であること、2)測定対象のウイルスを安定した回収率と高い濃縮倍率で濃縮すること、3)簡便で経済的、4)凝集したウイルスや固体表面に付着しているウイルスも回収できること、が挙げられる。また、ウイルス濃縮のメカニズムが明らかであれば、安心して使用できると思われる。

古くは、ガーゼパッドを用いた方法が早くに開発されて (Melnick et al., 1954) 広く用いられてきた。河川水や下水処理水中にガーゼパッドを数日間放置しておいて回収し、アルカリ側に調整してパッドを絞ってウイルスを誘出する方法である。比較的少量の水に対する定性的な方法ではあるが、簡便さが魅力であり、現在

でも用途を限って使用されている。

その後、膜に吸着して誘出する方法が考案された (Cliver 1965)。水量に応じてスケールアップが可能であることや、ウイルスが極めて低濃度で存在する水に対しても適用可能なことや、膜ろ過液を回収することからウイルス濃縮液が無菌的であることなどから、ウイルス濃縮法の主流になってきている。目詰まりによりウイルス回収率が低下する問題などがあり、膜以外にもセルロース凝集法 (Yano et al., 1993) などが開発された。

セルロース凝集法は、親水化処理したセルロースをウイルスの吸着剤として用いる方法であり、矢野博士 (東京都立衛生研究所 当時) によって開発された (矢野ら、1986)。20L 程度の水にセルロースを投入し、攪拌の後、セルロースを回収する方法であるが、試料採取現場での作業が容易であるため、河川水等の調査には簡便な方法である。

膜を用いたウイルス濃縮法として、陽イオン添加と組み合わせた陰電荷膜法が開発され (Wallis et al., 1967)、その改良版ともいえる手法が次々と考案された。静電的に膜にウイルスを吸着させ、弱アルカリ性 (pH9.5 以下) のタンパク質系の有機物を含む溶液もしくは強いアルカリ (pH11.5) により吸着を阻害してウイルスを膜からはがして回収するという原理に基づく方法である (Gerba 1984)。

膜からのウイルス誘出液としてビーフエキス溶液を用いる方法 (Rao et al., 1969) が提案され、以後広く用いられるようになった。また、ビーフエキス溶液によってウイルスを回収した後、さらにウイルスを濃縮する方法として有機凝集法が開発され (Katzenelson 1976)、実用的なウイルス二次濃縮手法として広く用いられるようになった。

試料の前処理を必要としない濃縮法として陽電荷膜法が開発され (Sobsey and Jones, 1979)、アメリカ合衆国をはじめとして広く用いられるようになった。

従来のウイルス濃縮法は培養法によるウイルス検出を前提として開発されているため、特にビーフエキス溶液を用いた濃縮手法は必ずしも PCR 法によるウイルス検出に適した方法とはなっていない。そこで片山らが陰電荷膜を用いた酸洗浄法を開発し (Katayama et al., 2002, 片山ら、2002)、PCR 法と相性の良いウイルス濃縮法として提案している。また、原本らは大量の淡水試料からの濃縮法として、陽イオンを前もって陰電荷膜に添加する方法を開発し、水道水からウイルスを濃縮することに成功している (原本ら、2002、Haramoto et al., 2004)。

## 2) 水道において実用的なウイルス濃縮法

### (ア) セルロース凝集法

陰イオン交換体である DEAE セルロースにウイルスを吸着させて、その後に誘出を行う方法である (Yano et al., 1993)。標準的には、容量 20L のポリエチレン容器に水試料を採取し、DEAE セルロースおよび凝集剤を適量入れて攪拌し、セルロースを凝集させてウイルスを捕集し、セルロースを不織布バッグでろ過して回収する。この段階で持ち運びが可能であるため、試料採取現場ではこの段階までを行う。不織布で回収されたセルロースから、弱アルカリ性のビーフエキス溶液を用いてウイルスを回収する。

この手法は、ウイルス濃縮を採水地点においても容易に行うことができるという利点がある。衛生試験法 (2000 年、金原出版) および上水試験方法 (1993 年、日本水道協会) にウイルス濃縮法として詳しく方法が説明されている。

### (イ) 陽電荷膜法

陰電荷膜を用いる場合に必要な陽イオンの添加や pH の調整が不要で、中性の淡水試料を前処理不要で濃縮できる方法として陽電荷膜法が開発された (Sobsey and Jones, 1979)。この手法は、陰電荷をもつウイルス

を陽電荷をもつ膜に吸着させ、少量のビーフエキス溶液で誘出することによって濃縮するものである。陽電荷膜法の利点としては、操作の簡便性(=前処理が不要)に加えて、ろ過効率が陰電荷膜に比べて優れていること、回収率が高いこと、ウイルスの種類による回収率の違いが比較的小さいことなどが挙げられる。上水試験方法(1993年、日本水道協会)にウイルス濃縮法として詳しく方法が説明されている。

#### (ウ) 陰電荷膜を用いた酸洗浄法

陰電荷膜を用いたウイルス濃縮においては吸着に陽イオンを必要とすることから、誘出の前に陽イオンを除去するための洗浄工程の導入が試みられた(Katayama et al., 2002, 片山ら, 2002)。酸性の洗浄液を用いる酸洗浄では、ウイルスを不活化も誘出もせず、陽イオンを除去し、ろ過原水中に含まれていた阻害物質も誘出する可能性もある。

酸洗浄を導入した場合のウイルス濃縮法におけるウイルスの挙動を模式的に図1に示した。操作としては以下のことを行う。

##### ①吸着工程

水試料に 25mM となるように  $MgCl_2$  を加え、陰電荷膜(ミリポア社、HA 混合セルロース、孔径 0.45 $\mu m$ )に通す。

##### ②酸洗浄工程

pH3 の希硫酸溶液 200mL(47mm の平膜の場合)を膜に通す。

##### ③アルカリ誘出工程

ろ過ユニットに滅菌済み試験管を装着して、pH10.5 の水酸化ナトリウム溶液 5mL(47mm の平膜の場合)を膜に注ぎ、吸引圧をかけてろ液を回収する。ろ液を受ける試験管には、あらかじめ 0.1M  $H_2SO_4$  25 $\mu l$  と 100 倍 TE バッファー 50 $\mu l$  を入れておく。

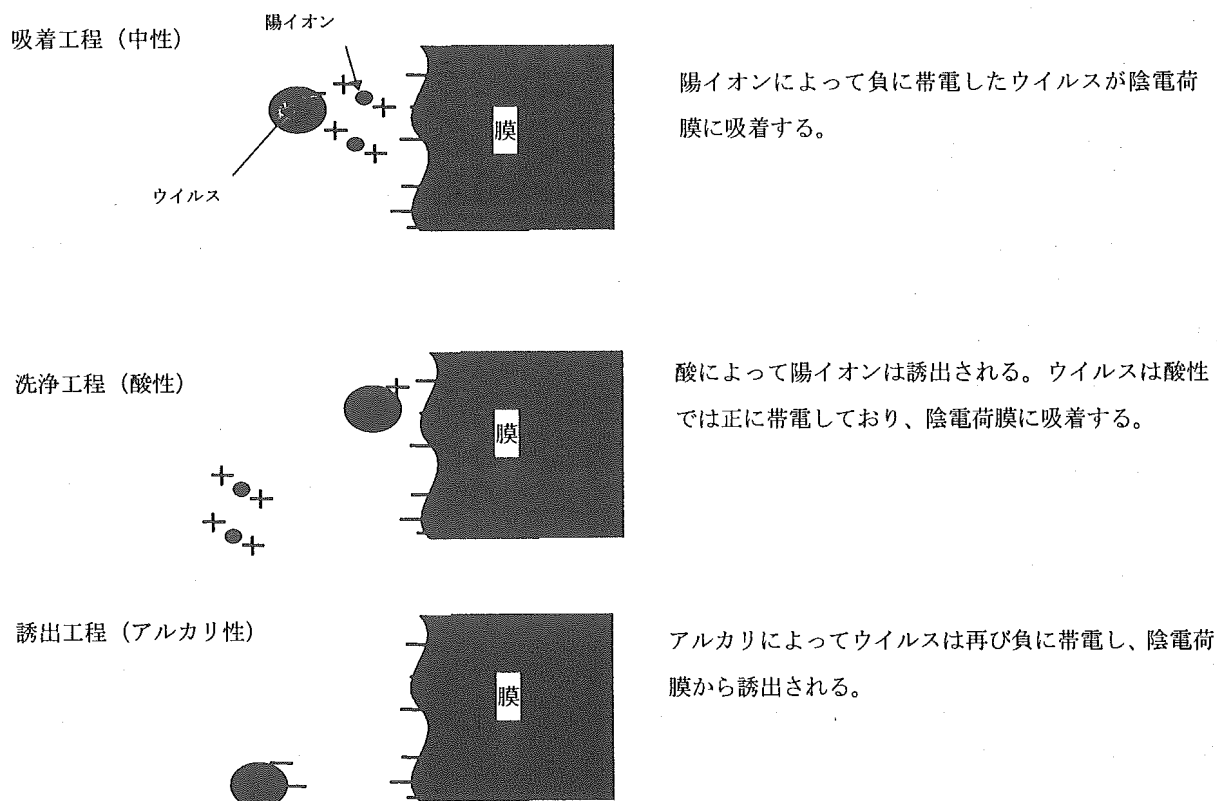


図1 酸洗浄の効果の説明



吸着工程において、陰電荷膜と陰電荷を帯びたウイルス粒子を陽イオンがつないでいる。洗浄工程の酸性条件下ではウイルス粒子は陽電荷を帯びるようになり、陽イオンは洗浄とともに流出していくと考えられる。また、陽電荷を帯びたウイルス粒子は、陰電荷膜に静電的相互作用で直接吸着しなおし、ウイルスはあまり誘出されない。酸洗浄に続く誘出工程において、アルカリ条件にすれば、ウイルス粒子は再び陰電荷を帯びることになるので、陰電荷膜から容易に誘出されると考えられる。

この手法は、誘出に無機アルカリ溶液を用いているため、後続の限外ろ過膜を用いた二次濃縮を容易に行うことができ (Katayama et al., 2002)、そのまま PCR 法を用いたウイルス検出を行うことができるという優れた特長を持っている。また、ポリオウイルスを用いて回収率を評価した場合に、高い回収率を示した。

### (エ) 陽イオン添加型酸洗浄法

酸洗浄法は、試料に陽イオンを添加する必要があるため、大量の水からウイルスを濃縮する際の操作性が課題として残っていた。そこで、多量の水試料からのウイルス濃縮を目的として、試料に添加する代わりに先に膜に陽イオンを添加する手法が開発された (原本ら, 2002, Haramoto et al., 2004)。

この手法の概要を図 2 に示した。陰電荷膜に前もって塩化アルミニウム溶液を通すことにより、陽イオンを膜に吸着させて擬似的な陽電荷膜を形成する。次に、水試料をそのまま通すと負に帯電したウイルスは膜に吸着する。酸洗浄においては先に添加された陽イオンが膜から離れるが、ウイルスは正に帯電して陰電荷膜と直接吸着している。最後に、アルカリ溶液を通すことによりウイルスは負に帯電して陰電荷膜から離れて回収される。水道水および河川水を対象にポリオウイルスを用いてこの手法を評価した結果、十分に高い回収率を示した (原本ら, 2002, Haramoto et al., 2004)。

以上のように、実際の水試料を対象とした場合にも十分に有効なウイルス濃縮手法であるといえる。今後の課題としては、より面積の広い膜の使用や目詰まり対策などによる最適化を行い、さらに大量の水に対しても適用可能にすることが望まれる。また、ノロウイルスやアデノウイルスなど、ポリオウイルス以外のウイルスを用いて回収率を評価することが望ましいと考えられる。

### 3) 培養法と PCR 法について

環境試料からウイルスを検出する手法は、細胞培養にウイルスを感染させてウイルスによる病変を観察する方法と、PCR をはじめとする分子生物学的手法によってウイルスの遺伝子を検出する方法がある。PCR 法による検出例は、1990 年代の後半に調査研究として広く行われるようになった。

PCR 法は、培養法に比べて感度が高いと言われているが、検査に供する水量が培養法の方が多いため、検出限界濃度はあまり差がないことも多い。また、ウイルスの種類によっては簡単に培養されない場合もあり、ノロウイルスの場合などのように PCR 法による検出しか検査方法がない場合もある。また、検査結果が得られるまでの時間については、PCR 法では 2 時間程度であるのに対し、培養法では短い方でも 1 週間程度を要する。

培養法による検出では、感染価をもつウイルスのみを検出するため、ウイルス陽性であるという検査結果とウイルスによる感染リスクとのあいだに明確な関連があると言える。一方、PCR 法による検査では、ウイルスが感染価を持たない場合でもウイルス陽性という検査結果を出してしまう可能性があるため、必ずしもウイルスによる感染リスクとの関係性が明確でない。特に、水道のように消毒を行った場合、PCR 法による測定では消毒の効果が検査結果に反映されないため、PCR 法による検査はあまり有効ではないと考えられる。

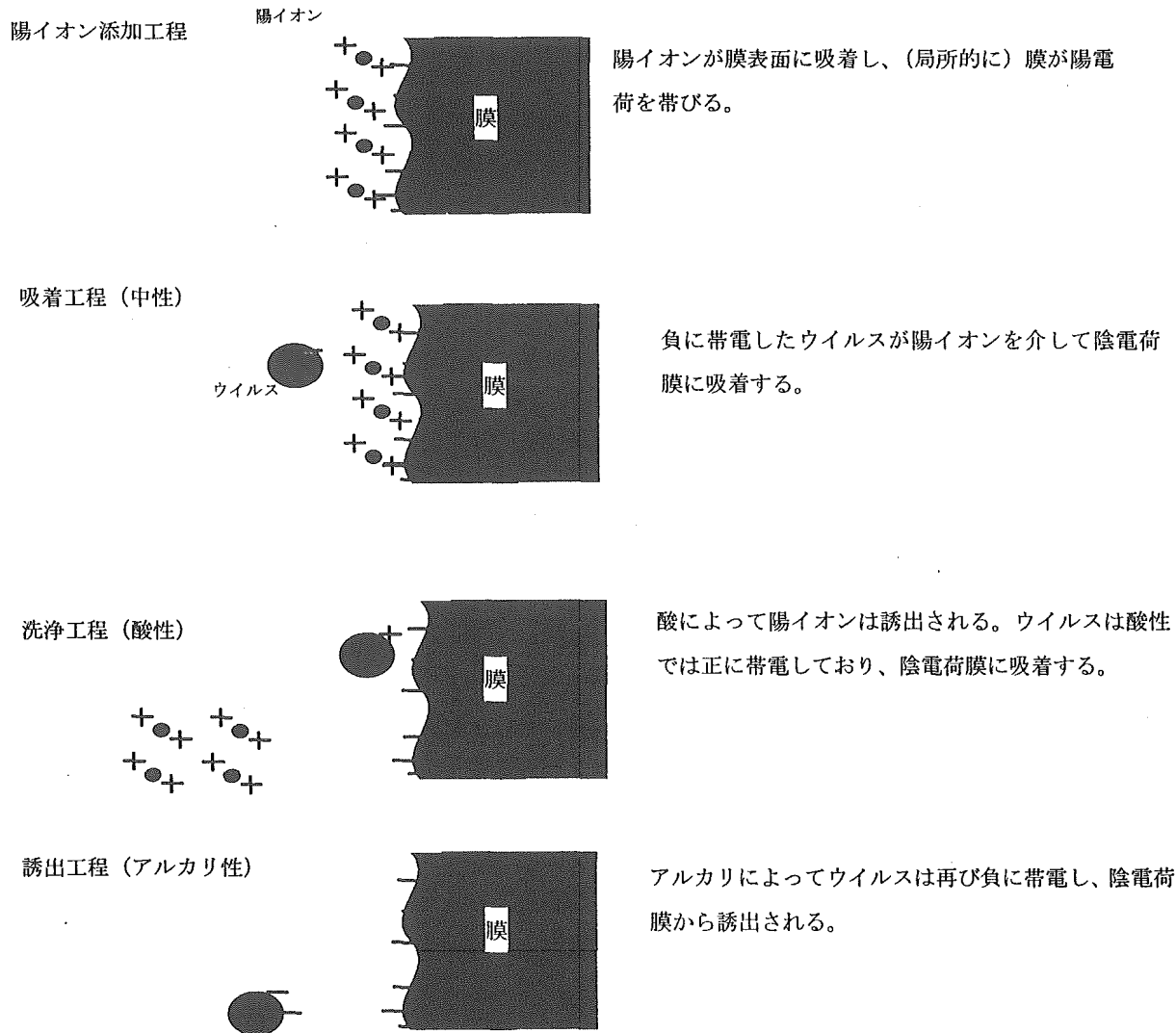


図2 陽イオン添加型酸洗浄法の説明

#### D. 結論

現在使われている有力なウイルス濃縮法として、1) セルロース凝集法、2) 陽電荷膜法、3) 陰電荷膜を用いた酸洗浄法、およびその変法である4) 陽イオン添加型酸洗浄法について、それぞれに長所があり、目的に応じて使い分けることが望ましい。

近年の水中ウイルス測定の研究発表では、ウイルスの測定法が培養法からPCR法に移行しており、それに伴って新しいウイルス濃縮法が提案されているという背景もある。また、PCR法は比較的簡便な手法であり、水中ウイルスを広く測定することが可能であると考えられる。陰電荷膜を用いた酸洗浄法により、水道原水におけるウイルス濃度の実測が可能であり、大容量の浄水に対しては、陽イオン添加型酸洗浄法が有力な方法である。

#### E. 参考文献

- Clover D. O. (1965) Factors in the Membrane Filtration of Enteroviruses. *Appl. Microbiol.* 13: 417-425.
- Gerba C. P. (1984) Applied and Theoretical aspects of Virus Adsorption to Surfaces, *Advances in Applied Microbiology*, 30, 133-168.
- Haramoto E., Katayama H. and Ohgaki S. (2004) Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of

- a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Fresh Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 2154-2160.
- Katayama H., Shimasaki A. and Ohgaki S. (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Sea Water, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1033-1039.
- Katzenelson E., Fattal B. and Hostovesky T. (1976) Organic Flocculation: An Efficient Second-Step Concentration Method for the Detection of Viruses in Tap Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 32, No.4, pp.638-639.
- Melnick J. L., J. Emmons, E. M. Opton and J. H. Coffey (1954) Coxsackie viruses from sewage, *Amer. J. Hyg.*, 59: 185-195.
- Rao N. U. and N. A. Labzoffsky (1969) A Simple Method for the Detection of Low Concentration of Viruses in Large Volumes of Water by the Membrane Filter Technique, *Can. J. Microbiol.* 15: 399-403.
- Sobsey M. D. (1974) Methods for Detecting Enteric Viruses in Water and Wastewater, In: *Viruses in Water*, G. Berg et al., Ed., American Public Health Association, Washington D. C.
- Sobsey M. D. and Jones B. L. (1979) Concentration of Poliovirus from Tap Water Using Positively Charged Microporous Filters, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 37, No.3, pp.588-595
- Wallis C. and Melnick J. L. (1967) Concentration of Enteroviruses on Membrane Filters, *Jour. of Virology*, 1, pp.472-477
- Yano K., Yoshida Y., Shinkai T. and Kaneko M. (1993) A Practical Method for the Concentration of Viruses from Water Using Fibriform Cellulose and Organic Coagulant, *Wat. Sci. Tech.*, 27, No.3-4, pp.295-298.
- 原本英司, 片山浩之, 大垣眞一郎 (2002) 水道水および河川水中の腸管系ウイルスのモニタリングを目的とした新しい濃縮法の開発、*環境工学研究論文集*、第 39 巻, pp355-364
- 片山浩之、嶋崎明寛, 大垣眞一郎 (2002) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発、*水環境学会誌*、第 25 巻、469-475.
- 矢野一好、林志直、薮内清、田口文章 (1986) 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 第五報 フィルターによるポリオウイルスの濃縮、*用水と廃水*, 28, pp.183-191.
- 日本薬学会 編 (2000) *衛生試験法・注解*、金原出版株式会社
- 厚生省生活衛生局水道環境部 監修 (1993) *上水試験方法*

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権等

なし

分担研究報告書 7

水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策の  
今後のあり方に関する検討

主任研究者 国包章一

分担研究者 遠藤卓郎、片山浩之、西尾 治、矢野一好

## 分担研究報告書

### 「水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策のあり方に関する検討」

主任研究者 国包章一 国立保健医療科学院水道工学部  
分担研究者 遠藤卓郎 国立感染症研究所寄生動物部  
片山浩之 東京大学大学院工学系研究科  
西尾 治 国立感染症研究所感染症情報センター  
矢野一好 東京都健康安全研究センター微生物部

#### 要旨

水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策のあり方につき整理した。さらに、ウイルス汚染に関する飲料水危機管理ホームページに盛り込むべき事項として、予防保全と危機管理対策の確立、飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が発生した場合の対処方法、及び、水中ウイルスに関する基礎情報の3つを取り上げ、それぞれの概要についても整理した。このうち水中ウイルスに関する具体的な情報の詳細については、本研究の他の分担研究報告書で取りまとめている。水道や小規模給水施設でウイルス感染事故が万一起きた場合には、被害状況や原因ウイルスの特性等に合わせて、速やかに適切な措置を取るようしなければならない。また、水道事業体では、予防保全の考え方に基づいて施設の運転管理を適切に行うとともに、平素から不測のウイルス汚染事故に備えて万全の体制を整備しておくことが重要である。

#### A. 研究目的

水道水がウイルスによって高濃度に汚染された場合には、重大な健康影響がもたらされることが懸念される。最近では、小規模水道やその他飲用井戸等小規模給水施設において、ノロウイルスによる集団感染が時々発生している。このような水道水等飲料水のウイルスによる汚染事故の発生に備えて関連情報を系統的に整備し、それを水道・衛生行政担当機関、衛生検査機関、水道事業体等のほか、広く一般国民にも提供することは、適切な健康危機管理対策を確立する上で極めて重要である。

そのため、本研究では、水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策のあり方について総合的に検討し、汚染事故の未然防止に必要な情報や、万一汚染事故が起きた場合の適切な対処方法等につき明らかにすることを目的とした。本研究の成果が広く活用されることにより、水道水等飲料水のウイルス汚染による健康被害の未然防止、並びに、その微生物学的安全性の向上に寄与することが大いに期待される。

#### B. 研究方法

本研究では、以下のことにつき検討した。

- 飲料水のウイルス汚染に係る危機管理の重要性と今後の危機管理対策のあり方
- ウイルス汚染に関する飲料水危機管理ホームページに盛り込むべき事項
  - ・予防保全と危機管理対策の確立
  - ・飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が発生した場合の対処方法

## ・水中ウイルスに関する基礎情報

これらの検討は、主として文献調査により、また、必要に応じて他の分担研究とのフィードバックも頻繁に行った。

なお、本研究全般にわたって文献 1～3 を参考とした。

## C. 結果と考察

### 1. 飲料水のウイルス汚染に係る危機管理の重要性と今後の危機管理対策のあり方

水道水等飲料水のウイルス汚染に起因する感染症に対しては、これまで必ずしも十分な対策が講じられていなかった。その主な原因の一つには、水中ウイルスに関して正しい情報がまとまった形で提供されていなかったことが挙げられる。これには、水中におけるウイルスの存在に関して、科学的な解明が十分に進んでいなかったことも大いに関係している。しかし、近年では、分子生物学的な研究が急速に進歩したことにより、水中ウイルスに関する新たな知見もかなり豊富に蓄積されるようになってきている。例えば、従来であれば、検査技術が未熟であったために満足に行えなかった病原微生物の検出や同定が的確に行えるようになり、水中におけるウイルスの挙動についてもより正確な情報が得られるようになってきている。そして、蓄積されつつあるこれらの知見から、水系感染症における病原体としてのウイルスの重要性が、今日再認識されるようになってきている。

以上のような状況に鑑み、水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策を講じる上では、次のような点に十分配慮することが当面重要であると考えられる。

- ①正しい科学的な情報の積極的な発信
- ②関連情報の収集・整理と研究の推進
- ③必要に応じた規制の見直し

これらのうち最も重要と考えられるのは情報発信である。これに関しては、厚生労働省が中心となって、水中ウイルスに関する危機管理ホームページを早急に作成して公開し、都道府県や水道事業者の担当者はもとより、飲用井戸の設置者、さらには一般国民が、その情報を容易に利用できるようにすることが必要であると考えられる。このホームページに盛り込むべき事項としては、予防保全と危機管理対策の確立、飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が発生した場合の対処方法、及び、水中ウイルスに関する基礎情報が挙げられる。水道水等飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が発生した場合に、速やかに適切に対処することができるよう、あらかじめ十分な予防保全措置を講じるとともに、危機管理体制を確立しておくことは、都道府県や水道事業者にとって最も重要なことである。また、水中ウイルスに関する最新の正しい科学的情報を関係者はもとより一般国民が広く共有することによって、水道水等飲料水のウイルス汚染による感染症発生の未然防止や、万一、飲料水のウイルス汚染に起因する感染症が発生した場合における適切な健康危機管理が可能となるものと期待される。

ウイルス汚染に関する飲料水危機管理ホームページに盛り込むべき事項については、以下に示すとおりである。

なお、今日、水中ウイルスに関しては、消毒による不活化効果、残留塩素に対する耐性、水中における生残等、その挙動に関して未解明の点が多く残されている。これらの点に関しては、今後さらに調査研究を推進することが必要である。また、上記のようにして作成したウイルス汚染

に関する飲料水危機管理ホームページでは、これらの調査研究による成果を積極的に盛り込むよう心がけることが重要である。

## 2. ウイルス汚染に関する飲料水危機管理ホームページに盛り込むべき事項

ここでは、水道水等飲料水のウイルス汚染に起因する感染症の発生に焦点を当てた飲料水健康危機管理ホームページを新たに作成して公開し、都道府県や水道事業者の担当者や、その他関係者の用に供することを想定して、それに盛り込むべき内容につき以下のように整理した。

### 2. 1 予防保全と危機管理対策の確立

水道水等飲料水のウイルス汚染に起因する感染症の発生を防ぐためには、予防保全と危機管理対策の確立が不可欠である。これらのうちでも特に予防保全は、ウイルス汚染に起因する感染症の未然防止を図る上で極めて重要である。また、万一、水道水等飲料水のウイルス汚染が原因と疑われる感染症が発生した場合に備えて、都道府県や水道事業者においてあらかじめ適切な危機管理マニュアルを策定し、それに合わせて危機を想定した訓練等を日常的に行うことなども重要である。したがって、これらのことについて、ホームページ上でその望ましいあり方について解説しておくことが必要であり、その主な内容として下記のようなことが考えられる。

#### (1) 危機管理マニュアルの策定

マニュアルに盛り込むべき事項：目的、対象範囲、危機管理の手順、危機管理体制の整備、状況把握、緊急措置、原因究明、関係機関との連携、プレス発表・広報、報告・記録、緊急連絡先リスト、参考事例等

#### (2) 原水の保全と監視

水道水源保護条例の制定、水道水源保全地区の指定、汚染源地図の作成、集水域のパトロール、水源及び原水水質監視等

#### (3) 水道システムにおける対応

浄水施設の機能評価、浄水施設の改善、水質管理の強化、水安全計画の策定と実施、試料の保存等

#### (4) 危機を想定した訓練の実施

内容、方法、規模、実施頻度、関係者等への事前周知

### 2. 2 飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が発生した場合の対処方法

水道水等飲料水のウイルス汚染に関して十分な未然防止対策が講じられていたとしても、時として汚染事故が実際に発生することはどうしても避けられない。そのため、水道水等飲料水のウイルス汚染に起因することが疑われる感染症が、万一発生した場合の対処方法として、体制整備、状況把握、緊急措置、原因究明及び改善措置、関係機関との連携、プレス発表・広報、報告・記録等のあり方につき、適切なガイダンスを提示しておく必要がある。その主な内容としては、下

記のようなことが考えられる。

これらのうち特に異常事態発生直後の初動体制の確立は、その後の対処の成否を大きく左右するものである。状況がまだ十分に把握できず、また体制が十分に整えられない中で、的確な状況判断とそれに基づく適切な措置が求められる。そのため、医療機関との連携など、すみやかな協力体制の確立が図れるよう事前に備えておくとともに、随時、シミュレーションや模擬訓練等を行うことも重要である。

#### (1) 体制整備

対策本部等の設置、担当者の役割分担の明確化、指揮命令系統及び情報処理系統の明確化等

#### (2) 状況把握

被害者の特定と被害程度の確認、被害者の分布状況の把握とその行動記録の作成、今後における被害拡大の可能性の予測、想定される原因の考察等

#### (3) 緊急措置

浄水処理の強化、取水もしくは給水の停止等

#### (4) 原因究明及び改善措置

危害因子の同定、汚染源及び汚染原因の確認、汚染原因の除去、水道システムの改善等

#### (5) 関係機関との連携

衛生行政機関、保健所、衛生研究所、医療機関等との連携（通報、情報交換、役割分担の確認等）等

#### (6) プレス発表、広報等

##### ①手段

プレス発表：テレビ（有線を含む）、ラジオ、新聞等

広報：インターネット、回覧板、投げ込みチラシ、宣伝カー、緊急放送システム（防災無線など）、コンビニの活用等

##### ②内容

危害の内容、今後の見通しを含めた危害の程度と広がり、水道事業者等当事者による緊急措置と対策実施状況、水道利用者による危害の回避手段（煮沸、飲用回避等）、疾病関連情報（症状と程度、治療方法等）、相談窓口案内等

##### ③対象（広報の場合）

一般家庭、公共施設、学校、病院、食品製造工場、大規模店舗等

#### (7) 報告、記録等

報告：厚生労働省ほか関係行政機関への報告等



記録：水道事業体等の内部における記録等

## 2. 3 水中ウイルスに関する基礎情報

水中ウイルスに関する基礎情報は、ウイルス汚染に関する飲料水健康危機管理対策の確立を図る上で必須であり、これらの情報をデータベースとしてホームページ上で公開し、関係者が広く情報を共有することが重要である。

データベースに盛り込むべき事項としては、ウイルスに関する基礎知識、主な水中ウイルスに関するファクトシート、ウイルスによる過去の水系感染事例、水系ウイルス感染に関する健康リスク評価の考え方、水中ウイルスの浄水処理による除去の可能性と水道システムにおける挙動、水中ウイルスの検査法、水中ウイルスを対象とした飲料水健康危機管理に係る関連法規、水中ウイルスに関するその他関連情報源情報等が挙げられる。これらのそれぞれの概要は下記のとおりである。

なお、このうち(1)～(6)については、それぞれ分担研究報告書において詳細に検討して整理した結果を取りまとめているので、それらを参照されたい。

### (1) ウイルスに関する基礎知識

ウイルスの基本的特性、水中での一般的な挙動、水系感染が問題となるウイルス、汚染源等

### (2) 主な水中ウイルスに関するファクトシート

#### ①対象ウイルス：

ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、アデノウイルス

[その他参考として取り上げるべきウイルス(=最近重大な社会問題となっているウイルス)]

コイヘルペスウイルス、SARS コロナウイルス、トリインフルエンザウイルス

#### ②記載項目

概要、ヒトへの健康影響、環境中での挙動、感染経路、わが国における感染実態、飲料水との関連性、検査法、予防、治療等

### (3) ウイルスによる過去の水系感染事例

#### ①対象事例

水系感染が疑われた国内外におけるウイルス感染症発生事例、その他飲料水からのウイルス検出事例等

#### ②記載項目

出典、国・地域、時期、場所、被害状況、水系感染の判断根拠及び推定汚染源、対応・対策、その他重要事項等

### (4) 水系ウイルス感染に関する健康リスク評価の考え方

水道水のウイルス汚染による水系感染症発生リスクに関する基本的考え方等

(5) 水中ウイルスの浄水処理による除去の可能性と水道システムにおける挙動  
凝集沈澱・急速砂ろ過及び膜ろ過による除去の可能性、塩素、紫外線及びオゾンによる消毒が水中ウイルスの除去に及ぼす効果、水道水中におけるウイルスの生残等

(6) 水中ウイルスの検査法

試料採取方法、濃縮法、培養法及び PCR 法、不活化したウイルスの取り扱い方法、調査事例等

(7) 水中ウイルスを対象とした飲料水健康危機管理に係る関連法規等

水道法、水道法施行令、水道法施行規則、水質基準、施設基準、飲料水健康危機管理実施要領、その他関連通知等

(8) 水中ウイルスに関するその他関連情報源情報

WHO 図書及びホームページ掲載情報、一般図書等

#### D. 結論

水道水等飲料水のウイルス汚染に係る危機管理対策の確立を図る上で重要と考えられる事項につき整理した。これらのうち水中ウイルスに関する具体的な情報の詳細については、本研究の他の分担研究報告書で取りまとめている。水道や小規模給水施設でウイルス感染事故が万一起きた場合には、被害状況や原因ウイルスの特性等に合わせて、速やかに適切な措置を取るようしなければならない。また、水道事業者では、予防保全の考え方に基づいて施設の運転管理を適切に行うとともに、平素から不測のウイルス汚染事故に備えて万全の体制を整備しておくことが重要である。

#### E. 参考文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課地域保健室：健康危機管理情報システム検討会報告書、平成 14 年 3 月 (2002)
- 2) 厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課長：飲料水健康危機管理実施要領について (通知)、平成 9 年 4 月 10 日、衛水第 162 号 (1997)
- 3) 財団法人水道技術研究センター：水質汚染事故に係る危機管理実施要領策定マニュアル (1999)

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

- 1) 遠藤卓郎：第 6 章緊急時の対応、金子光美編著、水道の病原微生物対策、丸善、pp.239-247(2006).

#### H. 知的所有権の取得状況

該当なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 1. 論文発表

- 1) 矢野一好：腸管系ウイルスによる水質汚染と食品汚染、水環境学会誌、Vol.29, pp.124-129(2006).
- 2) 片山浩之：水環境および飲料水におけるノロウイルス汚染、水環境学会誌、Vol.29, pp.135-138(2006).
- 3) 片山浩之：第4章ウイルス 4.2 水道における検出例と事故例、4.3 水道水中のウイルス検出技術、4.4 予防対策、金子光美編著、水道の病原微生物対策、丸善、pp.194-218(2006).
- 4) 遠藤卓郎：第6章緊急時の対応、金子光美編著、水道の病原微生物対策、丸善、pp.239-247(2006).
- 5) 丸山 務監修、西尾 治・中村明子・古田太郎著、ノロウイルス現場対策、幸書房(2006).
- 6) 齋藤博之、佐藤寛子、阿部真理子、石塚志津子、原田誠三郎、鈴木紀行、北嶋哲彦、高橋治、川村之聡、金恵美子、堀内和之、永須昭夫、渡邊 稔、小杉真吾、伊藤善信：簡易水道が原因と考えられたノロウイルスの流行－秋田県、病原微生物検出情報、Vol.26, pp.150-151(2005).
- 7) 田村 務、西川 真、飯田和久、新井田良平、柴竹美和子、角田由紀子、西尾 治、飲料水が原因のノロウイルスによる食中毒事例－新潟県、病原微生物検出情報、Vol.26, pp.330-331(2005).
- 8) 徳竹由美、小林正人、秋山美穂、愛木智香子、西尾 治、井戸水からノロウイルスが検出された食中毒事例、感染症学雑誌(印刷中).

### 2. 学会発表

なし