

る。

・選択的評価によるカテゴリー化は、特にカテゴリー領域への適用性が明確な場合有用である。また、その場合カテゴリーに加えるべき物質も容易に定められる。

OECD 事務局はこれらの勧告を踏まえたガイダンス文書を作成することとなった。OECD 事務局が、次回の SIAM に選択的評価文書を提出するスポンサーを募ったところ、カナダ、英国、ドイツが選択的評価文書を提出する意思を示した。

#### 国や地域の評価プログラムからの提出

今回の SIAM では、米国の国内評価プログラムから提出した (Cyclopropane carboxylic acid ; Lactic acid ; Methyl acetoacetate ; Sulfosuccinate category) の評価文書について審議した。会議では、これらの評価文書が SIDS 項目を満たしており、HPV 点検プログラムで利用できるとした。また、SIDS 項目以外の情報が記載されている場合は、それらの情報についても評価すべきであるとした。

OECD 事務局が、次回の SIAM に国や地域の評価文書を提出するスポンサーを募ったところ、米国が次回の SIAM もしくはそれ以前に国の評価文書を提出するという意思を示した。

#### 5) 国や地域の評価プログラムの評価文書を提出する方法について

今回の SIAM では、国や地域の評価プログラムの評価文書を HPV 点検プログラムに提出する方法について審議された。国や地域で評価が終わり、その評価結果が既に出版されているか否かに応じた提出・審議の手順が考えられた。会議では、本プログラム上で審議した結果、国や地域のプログラムと異なる結論が導き出された場合、出版済みの評価書については問題があるのではないかと指摘があった。OECD 事務局は、国や地域からの評価文書受け入れの経験を集積してから、改めて手順等を調整することとした。

#### 6) IUCLID5 を用いて作成した Dossier の提出方法について

2008 年にリリースされた IUCLID5 では、入力した情報を HTML ファイル形式で出力する。しかし、HTML ファイル形式の文書について、「ファイルを開けない」、「印刷がうまくできない」などの問題が指摘されていた。そこで OECD 事務局は HTML ファイル形式の文書を MS ワードで編集する方法を紹介した。今後は、ワード文書を回覧用ファイルとして用いることとなる。

#### おわりに

今回の SIAM では、2010 年以降の OECD の化学物質点検に関する専門家会議の報告を受け、選択的評価の導入や、国や地域の評価プログラムの報告書を基にした評価の導入などの可能性について審議された。日本も、2010 年以降の OECD の化学物質点検プログラムに貢献する方法として、国内の化審法評価や JP チャレンジプログラムの評価を効率よく提出していきける方法を模索していくべきであると考えられた。

#### 参照資料：

1. EC ( 2009 ) European Commission, Existing chemicals.  
<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/existing-chemicals/>
2. OECD (2009a) Draft Summary Record Twenty-eighth SIDS Initial Assessment Meeting (SIAM28). ENV/JM/SIAM/M(2009)1

3. OECD (2009b) OECD integrated HPV database. <http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/>
4. OECD (2009c) Screening Information Datasets (SIDS) for High Production Volume Chemicals in IUCLID format.  
[http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34379\\_31743223\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34379_31743223_1_1_1_1,00.html)
5. UNEP (2009) Chemicals Screening information dataset (SIDS) for high volume chemicals.  
<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDsids/sidspub.html>
6. 江馬 眞 (2006) : OECD の高生産量化学物質安全性点検プログラムとその実施手順. 化学生物総合管理, 2-1, 83-103
7. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006a) : OECD化学物質対策の動向 (第8報). 化学生物総合管理, 2-1, 147-162
8. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006b) : OECD化学物質対策の動向 (第9報). 化学生物総合管理, 2-1, 163-175
9. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006c) : OECD 化学物質対策の動向 (第11報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 124, 62-68
10. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007a) : OECD化学物質対策の動向 (第10報). 化学生物総合管理, 2-2, 286-301
11. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007b) : OECD化学物質対策の動向 (第12報). 化学生物総合管理, 3-1, 43-55
12. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007c) : OECD化学物質対策の動向 (第13報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 101-106
13. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2009) : OECD化学物質対策の動向 (第14報). 化学生物総合管理, 4-2, 225-236
14. 松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2006) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム : 第 18 回初期評価会議までの概要. 化学生物総合管理, 2-1, 104-135

表 1 第 28 回 SIAM で審議された化学物質と合意結果

CAS/ 物質カテゴリー	化学物質名	スポンサー	勧告	
			ヒト健康	環境
7664-38-2	Phosphoric acid	KO	LP	LP
109-59-1	2(1-Methylethoxy)ethanol	JP	LP	LP
1185-55-3	Trimethoxy(methyl)silane (MTMS)	US/ICCA	N/A	N/A
71-55-6	1,1,1-Trichloroethane	US/ICCA	N/A	N/A
2768-02-7	Vinyl trimethoxysilane (VTMS)	US/ICCA	N/A	N/A
物質カテゴリー	Oximino silanes			
2224-33-1	2-Butanone, O,O',O''-(ethenylsilyldiyl)trioxime	US/ICCA	N/A	N/A
22984-54-9	2-Butanone, O,O',O''-(methylsilyldiyl)trioxime			
1222-05-5	1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexa methylcyclopenta- $\gamma$ -2-benzopyran (HHCB)	NL/eu	N/A	N/A
1506-02-1 21145-77-7	1-(5,6,7,8-Tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexam ethyl-2-naphthyl)ethan-1-one (AHTN)	NL/eu	N/A	N/A
27176-87-0	Dodecylbenzenesulfonic acid	KO	LP	LP
13674-84-5	Tris(2-chloro-1-methylethyl)phosphate (TCPP)	IRE/eu	LP	-
13674-87-8	Tris[2-chloro-1-(chloromethyl)ethyl] phosphate (TDCP)	IRE/eu	LP	-
38051-10-4	2,2-bis(Chloromethyl)trimethylene bis(bis(2-chloroethyl)phosphate) (V6)	IRE/eu	LP	-
41267-43-0	Fluorescent-271	JP	FW	LP
544-92-3*	Copper cyanide	KO	LP	FW
物質カテゴリー	Alkyl phenate sulphides	UK/ICCA	N/A	N/A
68784-25-8 122384-86-5	Phenol, dodecyl-, sulfurized, carbonates, calcium salts			
68784-26-9	Phenol, dodecyl-, sulfurized carbonated, calcium salts, overbased			

CAS/ 物質カテゴリー	化学物質名	スポンサー	勧告	
			ヒト健康	環境
68815-67-8	Phenol, thiobis(tetrapropylene)-			
68855-45-8	Phenol, dodecyl-, sulfurized, calcium salts			
73758-62-0	Phenol, C12 & C18-30 alkyl derives, sulfurized, calcium salts, overbased			
122384-84-3	Phenol, C12 and C18-30 alkyl derives., sulfurized, calcium salts, overbased			
122384-85-4	Phenol, tetrapropylene-, sulfurized, calcium salts			
122384-87-6	Phenol, tetrapropylene-, sulfurized, carbonates, calcium salts, overbased			
3896-11-5	2-tert-butyl-6-(5-chloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol	JP/ICCA	LP	FW
17980-47-1	Isobutyl triethoxysilane	US/ICCA	N/A	N/A
物質カテゴリー	Mercapto esters	US/ICCA	N/A	N/A
107-96-0	Propionic acid, 3-mercapto-			
2935-90-2	Propanoic acid, 3-mercapto-, methyl ester			
物質カテゴリー	Thioglycolic acid and salts	BIAC/ICCA	FW	LP
68-11-1	Acetic acid, mercapto-			
5421-46-5	Acetic acid, mercapto-, monoammonium salt			

FW = The substance is a candidate for further work. (追加の調査研究作業が必要)

LP = The substance is currently of low priority for further work. (現状では追加作業の必要なし)

N/A=Not applicable (勧告が定められなかった)

\*初期リスク評価に合意が得られなかった。

ICCA は国際化学工業協会協議会による原案提出を示す。

eu は欧州連合でのリスク評価文書を基にしたことを意味する。

略号は、BIAC: 経済産業諮問委員会、IRE: アイルランド、JP: 日本、KO: 韓国、NL: オランダ、SE: スウェーデン、UK: 英国、US: 米国である。

【特集】

## OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 27 回初期評価会議概要

OECD High Production Volume Chemicals Programme:  
Summary of 27th SIDS Initial Assessment Meeting松本真理子<sup>1</sup>、宮地繁樹<sup>2</sup>、菅谷芳雄<sup>3</sup>、広瀬明彦<sup>1</sup>

1：国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター総合評価研究室

2：（財）化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所

3：（独）国立環境研究所環境リスク研究センター

Mariko Matsumoto<sup>1</sup>, Shigeki Miyachi<sup>2</sup>, Yoshio Sugaya<sup>3</sup>, Akihiko Hirose<sup>1</sup>1. Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center,  
National Institute of Health Sciences2. Chemicals Assessment and Research Center, Chemicals Evaluation and Research  
Institute

3. Research Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies

要旨：第 27 回の OECD 高生産量化学物質初期評価会議が、2008 年 10 月 14-16 日にカナダのオタワで開催された。この会議では計 35 物質の初期評価文書について審議され、すべての初期リスク評価結果が合意された。日本は、政府が原案を作成した Sodium *p*-toluenesulfonate (CAS: 657-84-1)、国際化学工業協会協議会 (ICCA) が原案作成した 1,3-Benzenediol (CAS: 108-46-3) および EU の評価文書をもとに作成された N-cyclohexylbenzothiazole-2-sulphenamide (CAS:95-33-0)の初期評価文書をドイツと共に提出した。本稿では、第 27 回初期評価会議の討議内容の概要を報告する。キーワード：経済協力開発機構、高生産量化学物質、SIDS 初期評価会議、リスク評価

Abstract : The 27th SIDS (Screening Information Data Set) Initial Assessment Meeting was held in Ottawa, Canada on 14th-16th October 2008. The initial assessment documents of 35 substances were discussed, and the conclusions of initial assessment for all substances were approved at the meeting. The Japanese Government submitted the initial assessment documents for three substances, sodium *p*-toluenesulfonate (CAS: 657-84-1) which was prepared by the Japanese Government, 1,3-benzenediol (CAS: 108-46-3) which was prepared by International Council of Chemical Association (ICCA) and N-cyclohexylbenzothiazole-2-sulphenamide (CAS: 95-33-0) which was prepared by Germany and the Japanese Government based on EU risk assessment. This paper reports the summary of the 27th SIDS Initial Assessment Meeting.

Keywords: OECD, HPV, SIDS Initial Assessment Meeting, Risk Assessment

t

## はじめに

経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) では、高生産量化学物質「(少なくとも加盟国の 1ヶ国において年間 1,000 トンを超えて生産または輸入されている化学物質 (HPV: High Production Volume Chemical)」に対し加盟各国の分担により、初期リスク情報を収集・評価する HPV 点検プログラムを行っている。加盟各国は企業と協力しつつ、それぞれ担当する化学物質のリスクの初期評価に必要なスクリーニング情報データセット (SIDS: Screening Information Data Set) の項目の情報収集や試験を行い、初期評価文書として、初期評価プロフィール (SIAP: SIDS Initial Assessment Profile)、初期評価レポート (SIAR: SIDS Initial Assessment Report) および網羅的資料集 (Dossier: SIDS Dossier) の 3 文書を作成し、初期評価会議 (SIAM: SIDS Initial Assessment Meeting) に提出して審議を受けている。

このプログラムは、1990 年の理事会決定に基づき、化学物質による有害な作用からヒトおよび環境を保護するとともに、各国の化学物質規制の体制整備・国際協調の場を提供する環境保健安全プログラムの一環として行なわれている。OECD の化学物質対策における HPV 点検プログラムの位置づけ、今までの成果および初期評価文書作成方法などの詳細は江馬 (2006) が報告している。日本政府が担当し結論および勧告が合意された化学物質の初期評価文書については、高橋他 (2006a, b, c; 2007a, b, c) が報告している。また、第 1 から第 18 回までの SIAM の概要については松本他 (2006) を参照されたい。

1993 年の第 1 回 SIAM から 2000 年 3 月の第 10 回 SIAM までは、加盟国政府が提案国となり審議を行ってきたが、1998 年秋に国際化学工業協会協議会 (ICCA: International Council of Chemical Association) が HPV 点検プログラムへの参加を表明し、第 11 回 SIAM (2001 年) から産業界が ICCA イニシアティブとして初期評価文書の作成に協力している。これらの ICCA イニシアティブの初期評価文書は、原則として担当国政府を通じて提出されているが、スポンサー国 (初期評価書文書原案作成を担当する単独または複数の国) が決まらない物質については、産業界が経済産業諮問委員会 (BIAC: Business and Industry Advisory Committee) を通じて直接、初期評価文書を提出することも可能である。

第 27 回 SIAM は 2008 年 10 月 14 日から 16 日までカナダのオタワで開催され、加盟国から 32 名、EC から 3 名、産業界から 20 名の 55 名が参加し、35 物質の初期評価文書についての審議が行われた。日本からは、政府専門家 (3 名)、オブザーバー (1 名) および産業界 (2 名) が出席した。本稿では第 27 回 SIAM での討議内容として、第 26 回 SIAM 以降の HPV 点検プログラムの進捗状況、初期評価文書の審議結果および本プログラムの全般的な懸案事項に関する討議内容について報告する。なお、本稿は第 27 回 SIAM の会議報告書を参照して作成した (OECD 2008a)。

## 1. 第 26 回 SIAM 以降の HPV 点検プログラム進捗状況

### (1) 初期評価文書の公開状況

SIAM で合意された初期評価文書は、既存化学物質政策についての方針決定機関である「既存化学物質タスクフォース」および化学物質の安全管理の全般的な方針を決定する「OECD 化学品委員会および化学品・農業・バイオテクノロジー作業部会合同会合 (Joint Meeting)」に提出して承認を得る。承認が得られた SIAP については、OECD が HPV データベース (OECD 2008b) を通じて公開している。Dossier は IUCLID (International Uniform Chemical Information Database) というデータベースを用いて作成されているが、出力方法をエクスポートファイルにすることによって、生データのやり取りが可能となる。SIAR および Dossier については国連環境計画 (UNEP: United Nations Environment Programme) が、またエク

スポーツファイルについては、OECD がそれぞれウェブサイトで公開している (UNEP 2008; OECD 2008c)。

第 26 回 SIAM で審議され合意された初期評価文書のうち Hexamethylcyclotrisiloxane (CAS: 541-05-9) については、カナダ環境省が環境影響の結論に対し異論を述べたため SIAR を修正することになったが、第 26 回 SIAM で合意されたそれ以外の SIAP は既存化学物質タスクフォースおよび Joint Meeting に提出された。また、第 26 回 SIAM 後に CDG (Committee Discussion Group: 電子掲示板) 上で合意された文書についても同様に、既存化学物質タスクフォースおよび Joint Meeting に提出された。

初期評価文書の公式発表は、UNEP のスタッフ入れ替えのため滞っており、公式発表総数は第 24 回 SIAM 開催時と同様 398 物質であった。OECD 事務局は UNEP からの公式発表を待つ間、OECD のウェブサイト上で合意された文書を公開することを伝えた。現在、約 140 物質の初期評価文書が OECD のウェブサイトから入手可能となっている。公開については、UNEP が行っているように SIAP・SIAR を Dossier にあわせて一つのファイルにするのではなく、二つのファイルを圧縮形式で公開している。

SIAM における環境影響とヒト健康影響についての勧告は、FW (The substance is a candidate for further work) または LP (The substance is currently of low priority for further work) として示されている。FW は「今後も追加の調査研究作業が必要である」、LP は「現状の使用状況においては追加作業の必要はない」ことを示す。しかし、勧告の記載については、Joint Meeting で削除することが合意されており、近い将来の SIAM から記載がなくなる予定である。今回の SIAM では勧告を定めるか否かはスポンサーの選択に任せられた。

## (2) 最終版の初期評価文書提出状況について

SIAM が終了した後、スポンサー国または産業界は SIAM での審議をもとに最終版の初期評価文書 (SIAR、Dossier およびエクスポートファイル) を作成し、SIAM 後 3 ヶ月を目途に OECD 事務局に提出することになっている。最終版の初期評価文書の提出が 6 ヶ月以上滞っている場合、スポンサー国または産業界は状況説明と提出予定期日を示す必要がある。OECD 事務局は初期評価文書の最終化にあたって問題が生じている場合も連絡をするよう伝えた。

## (3) IUCLID 使用者グループエキスパートパネル会議の報告

IUCLID 5 が公開されてから初めての使用者グループエキスパートパネル会議が、2008 年 9 月 23 日・24 日にパリの OECD 本部で行われた。会議では次のような考えがまとめられた。

- ・ (工業用化学物質以外の規制でも使用できるようなソフトウェアにするなどの) 使用者の要求に応えるために、ユーザーインターフェースや機能を更に開発していくこと。
- ・ 新しい使用者のために使用方法の演習教材を更に充実させていくこと。
- ・ データ入力方法についてのガイダンス文書を更に充実させていくこと。

OECD 事務局は、これらの提案を進めるために優先順位を定める必要があるとした。特に関係者は、更なる開発のために、どのような施設が農薬・殺虫剤の情報を収集・提出するためのツールとして使用しているかを知りたいと述べた。IUCLID 5 の所有者である欧州化学物質庁 (ECHA: European Chemicals Agency) はエキスパートパネルの要求を考慮していくとした。ECHA が対応できない優先順位の要求については、エキスパートパネルに返し、資金調達なども含め再度審議することとなる。次回のエキスパートパネルは、使用者が IUCLID 5 の経験を積む時間と、ECHA が変更内容の計画を立てる時間を取った後の近い将来に予定されている。

## 2. 第27回 SIAM での審議状況

### (1) 初期評価文書の審議結果

初期評価文書の審議は、スポンサー国または産業界が初期評価文書の原案をCDGに掲載し、CDG上で行う事前討議（コメントの提出、コメントへの返答、コメントに応じたSIAPの修正）およびSIAMでの対面討議で行われる。第27回SIAMでの初期評価文書の審議は、CDGでの事前討議を基に修正したSIAPを用いて行われた。日本は、日本政府が原案を作成したSodium *p*-toluenesulfonate (CAS: 657-84-1)、ICCAが原案作成した1,3-Benzenediol (CAS: 108-46-3)、および日本政府とドイツがEUの評価文書をもとに作成したN-cyclohexylbenzothiazole-2-sulphenamide (CAS: 95-33-0)の初期評価文書を提出した。今回の会議では、35物質(37CAS)の初期評価文書が審議され、すべての初期リスク評価結果が合意された(表1)。中でも、次の物質については通常の審議と異なる点があったため特筆する。

#### 1) 1,3-Benzenediol (CAS: 108-46-3)

1,3-Benzenediol (CAS: 108-46-3)については、HPV点検プログラムと国化学物質安全性計画(IPCS: International Programme on Chemical Safety)の国際簡潔評価文書(CICAD: Concise International Chemical Assessment Document)プログラムによる重複作業を防ぐための試みとして、CICADをSIARとして提出することに合意が得られていたが(松本他 2006)、スポンサーである日本/ICCAが、CICADの評価結果と異なる評価を行ったため、今回のSIAMでは独自に作成された初期評価文書が審議された。今回のSIAMで初期評価内容に合意が得られたが、Dossierに記載されていない情報があったため、SIAM後に詳細データを回覧することになった。

#### 2) 物質カテゴリー: Nickels and nickel compounds (CAS: 3333-67-3, 7440-02-0, 77185-4-9, 7786-81-4, 12122-15-5, 12607-70-4, 13138-45-9)

デンマーク: eu (注: この記号は欧州連合でのリスク評価文書を基にしたことを意味する)が担当した物質カテゴリー(Nickels and nickel compounds)は第24回SIAMで審議され、ヒト健康影響についてのみ合意された(松本他 2007)。今回は環境影響について再審議され合意が得られた。合意された環境影響についての初期評価文書は既存化学物質タスクフォースの承認を得た後に、ヒト健康影響についての初期評価文書に結合される。

#### 3) Antimony(III)oxide(Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)(CAS: 1309-64-4)

スウェーデン: euが担当したAntimony(III)oxide(Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (CAS: 1309-64-4)は環境中でSenarmonite (CAS: 12412-52-1) および Valentinite (CAS: 1317-98-2) の構造で存在することがあり、これら3つのCAS番号で示される物質の曝露や毒性影響の差についての情報がないことから、前述の2つのCAS番号が初期評価文書に追記されることになった。

### (2) HPV 点検プログラムにおける全般的な議題

#### 1) Dossier の化学物質用途の記述について

化学物質の用途は SIDS 項目の一つであり、一般的な用途、消費者製品としての使用方法および製造方法を記載することになっている。しかし、近年カテゴリー評価を用いた場合に、化学物質の放出や曝露の可能性を推論しにくいという問題が生じている。そこで、今回の SIAM に先立って、Dossier の用途記載方法を修正するための案が報告された。アメリカ、カナダ、日本が事前にコメントを提出した。ほとんどのコメントは修正案を支持するものであり、最近行われた既存化学物質タスクフォースでも修正案に合意が得られた。第 27 回 SIAM も修正案を支



持したが、Dossier は入力しやすい形式であるとともに、化学物質の環境放出の可能性について個別に分類できることが必要であるとした。次回の SIAM では、米国とカナダの事例を参考にした HPV 点検プログラムのマニュアル修正文書および、より詳細なマニュアルのガイダンスが紹介される予定である。

## 2) CSR/SIAR プラグイン機能について

IUCLID5 は OECD の HPV 点検プログラムだけでなく、欧州連合における REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) でも使用されている。今回の SIAM では IUCLID5 に入力したデータから必要な情報を抜き出して、SIAR または CSR (Chemical Safety Report ; REACH で使用) を作成するプラグイン機能の開発について報告された。現時点では CSR を作成するためのプラグイン機能のみが開発されており、SIAR を作成するためのプラグイン機能を作成するには別に資金が必要である。第 27 回 SIAM は、SIAR 作成のプラグイン機能は大変有用であるとしたが、SIAR 用に資金を提供する前に、CSR プラグイン機能の使用経験を集積すべきであるとした。または、CSR プラグイン機能で作成したレポートから不要な部分を削除することによって、SIAR を作成することも可能であるとした。

## 3) OECD HPV点検プログラムの発展について

US チャレンジプログラムでは、化学物質の有害性の特徴を示す文書 (HC : Hazard Characterizations) を公開しており (EPA 2008)、第 26 回 SIAM は HC を SIAR の代わりに OECD の HPV 点検プログラムに提出することを承認した。HC の文書には生産量、用途および曝露についての情報は含まれていないので、HPV 点検プログラムに提出する際には情報の追加が必要とされる。第 27 回 SIAM では、HC を OECD へ提出する際の手続き方法についての案が報告され、次のアウトラインに合意が得られた。

### 米国から提出する場合

- ・ HC が公表前の場合、米国は HC 草案を SIAM に提出し SIAM での審議をもとに HC の最終文書を作成する。EPA は修正済み HC をウェブサイトで公開する。OECD は SIAR を公開し HC の文書を参照できるようにする。HC には、どこの部分が OECD での審議の結果を反映したもので、どこの部分が US チャレンジプログラム特有の評価かを示す。もしくは、米国が同じ有害性評価の結論を含む 2 セットの文書を US チャレンジプログラム用と、OECD のプログラム用に別々に作成する。
- ・ HC が公表されている場合、SIAM での審議をもとに米国が文書を修正し、修正文書を EPA のウェブサイトで公開するか、または通常の HPV 点検プログラムの文書と同様に OECD 事務局に提出し、出版の手続きを取る。

### 米国以外の国から提出する場合

HC を HPV 点検プログラムに提出したい国は事前に EPA に連絡し、もし有害性について HC と異なる結論に至る場合は、SIAM 前に協議により問題を解決するよう努力する。スポンサー国は HC を本プログラムに提出するために不足している情報の追加を行う。もし、使用方法についての情報がスポンサー国内にない場合は、米国の製造者から情報が得られるかもしれない。SIAM で合意が得られた場合、スポンサー国は修正文書を OECD 事務局に提出する。

### 産業界から提出する場合

HC を OECD の HPV 点検プログラムに提出したいスポンサー（会社および会社のコンソーシアム）は EPA に事前に連絡し、もし有害性について HC と異なる結論に至る場合は、SIAM 前に協議により問題を解決するよう努力する。SIAM で合意が得られた場合、スポンサーは修正文書を OECD 事務局に提出する。

米国は HC を作成するにあたっては、産業界から提出される Dossier に加え、文献検索も行う予定であった。BIAC は HC を HPV 点検プログラムに提出するためのスポンサーを見つける努力をするとともに、今後も有害性情報の提供を続けるよう努めるとした。

#### 4) OECD HPV 点検プログラムにおける選択的評価の使用について

OECD の HPV 点検プログラムの未評価物質の審議を効率よく終えるために、特定のエンドポイントのみを評価する手法（選択的評価：Targeted assessment）の導入の可能性について審議された。選択的評価は、環境影響またはヒト健康影響について入手可能な全ての情報から、有害性評価に最も関連の強い一つもしくは複数のエンドポイントに焦点を絞って評価する手法である。カナダはカナダ環境保護法 1999（CEPA 1999: Canadian Environmental Protection Act 1999）で行われているリスク評価を例に評価手法を紹介した。また、欧州化学物質庁（ECHA: European Chemicals Agency）は EU が準備している REACH の添付書 XV Dossier を紹介し、特定の有害性、例えば PBT（残留性・蓄積性・有害性のある物質）または CMR（発がん性・変異原性・生殖毒性のある物質）などに対して、どのように選択的評価が行われるかを紹介した。

OECD 事務局は HPV 点検プログラム内でどのように選択的評価が使用されていくかのアウトラインを提示した。

- ・ OECD の既存点検プログラムにおける選択的評価とは、限定的な数の有害なエンドポイントのみの（すなわち SIDS 項目を満たさない）有害性の評価と定義される。
- ・ 選択的評価は、より決定的な手法がまとまるまでは、non-HPV に限定して適用すべきであり、OECD 加盟国にとって有用なものであるためには、リスク評価、分類と表示およびリスク削減などの目的に関連するエンドポイントが評価されるべきである。
- ・ 有害性の初期評価について結論が導けるあらゆるエンドポイントが評価対象となる。SIDS 項目のエンドポイントから結論を導くためには、HPV 点検プログラムで示されている最小限の情報を満たしている必要がある。
- ・ SIDS 項目でないエンドポイントを用いた選択的評価も可能であり、生体濃縮などの SIDS 項目でないエンドポイントだけで評価することも予想され得る。
- ・ 結論を導き出した根拠となるエンドポイントの情報はすべて記載すべきであり、そのほかのエンドポイントについては、情報を収集していないことを明記する。
- ・ 物質カテゴリーの場合も選択的評価も同様に行うことができるが、カテゴリーの正当性を示す根拠（例えば物理化学的性質）となるエンドポイントの結果が必要とされる。
- ・ 選択的評価を行った場合、文書の読者がフルの初期評価文書と異なることを理解できるように記されている必要がある。また、結論を導き出したエンドポイントをリストに示す必要がある。こういった免責事項は SIAP の上部および SIAR のカバーページに示される。
- ・ 評価文書は SIAP, SIAR, Dossier と同じ形式を使用し、必要な情報のみを入力する。SIAR としての目的を満たすのであれば、別のタイプのレポートが使われることも可能である。
- ・ 選択的評価は、初期評価文書と同様の手順を用い SIAM で審議され得るが、異なる議題として審議される。選択的評価における評価文書は、OECD から公開されるとともに、UNEP から公表され得る。

- ・ 選択的評価の文書作成におけるスポンサーシップについても、OECD のデータベースにより公開され、プログラムへの貢献としてカウントされる。しかし、統計的にはフルの初期評価文書の提出と、選択的評価の評価文書の提出は分けて処理される。

SIAMはOECDが示したアウトラインにほぼ合意したが、次のような勧告がなされた。

- ・ 選択的評価を行うことを正当とする理由を明記する必要がある。
- ・ 入手可能な全ての有害性情報を限定的な範囲で示すべきである。

OECD の HPV 点検プログラムでは、日本の化審法のスクリーニング試験として要求されていない生殖発生毒性試験結果が必要とされる。今後、選択的評価による評価文書が受け入れられることになると、化審法のみで評価された物質を選択的評価の評価文書として OECD に提出し得ると考えられた。OECD 事務局は選択的評価手法についての文書を修正し、回覧することになった。最終草案は 2009 年 4 月の既存化学物質タスクフォースまでに準備される。さらに、OECD 事務局はカナダ、ECHA および英国とともに選択的評価の文書例を、第 28 回 SIAM に試験的に提出できないか検討することになった。

#### 5) 優先順位設定ツールを用いた評価方法について

OECD の HPV 点検プログラムの未評価物質の審議を効率よく終えるために、評価すべき物質の優先順位をつけるためのツール（優先順位設定ツール：Priority setting tools）を用いた物質選定の利用を検討した。カナダは国内物質リストに掲載されている化学物質（23,000 物質）のカテゴリ化と優先順位の設定方法について紹介した。カナダでは、難分解・高蓄性の性質および急性・慢性の水生毒性が環境影響の優先順位を定める基準とされ、ヒト健康影響では、曝露の可能性および物質特有の毒性（Inherent toxicity）が基準とされている。また、米国は化学物質アセスメント・管理計画（ChAMP: Chemical Assessment and Management Program）の中での HPV および年間 25,000 ポンド以上生産している中生産量化学物質（MPV: Moderate production volume chemical）に対する優先順位付け方法を報告した。また、REACH の添付書 IV には有害性が低いと考えられる化学物質のリストが掲載されている。

OECD 事務局は HPV 点検プログラム内での優先順位付け方法や優先順位が低いとされる物質（保留物質：set aside chemicals）をどのように評価するかなどのアウトラインを提示した。

- ・ 保留物質を設定するための基準は、現在までの HPV 点検プログラムで使用されている LP や FW を定める基準や、国や地域で使用されている基準を使用することが可能と考えられる。
- ・ 保留物質の評価には、物理化学的性質や環境運命や経路などの情報は不要であると考えられる。
- ・ 保留物質について SIDS 項目の情報がない場合、(Q)SAR アプリケーションツールボックスがデータギャップを補完するためのツールとして有用である。
- ・ SIDS 項目ではないが、優先順位を定める基準に関係するエンドポイント（例えば生体濃縮性など）については記載が必要である。
- ・ 文書については定型書式を設けず、国や地域で使用されている書式を用いる。決定された優先順位については、その設定根拠について OECD 事務局が定型句を用いて表示する。しかし、国や地域のプログラムで精査されない文書用に、基本的なガイダンスは作成され得る。
- ・ 有害性が低いと考えられた保留物質であっても、全てのエンドポイントについて再評価する候補物質となり得ることを、優先順位設定根拠と共に記載する。また、国や地域のプロ

グラムとHPV点検プログラムでの免責事項の基準についての相違点などを記載する必要があるかもしれない。

- ・ HPV点検プログラム内での手順については、次の二つが考えられる。①保留物質または保留物質カテゴリーについての文書は、SIAMで審議されるが異なる議題として審議され、合意された文書はJoint Meetingで承認を得た後、背景文書と共にOECDより出版される。②保留物質または保留物質カテゴリーについての文書を精査する代わりに、国や地域の評価手法を把握し、もしその基準を満たしている場合はそのまま承認する。ただし、OECDによる優先順位決定根拠の記載が必要であり、その決定を公表することが可能である。背景文書については、OECDから公開されるか、または国や地域の公表を参照できるようにする。
- ・ 有害性が低いとされる保留物質の文書は、OECD加盟国、会社、または会社のコンソーシアムがスポンサーとして提出することができる。保留物質の文書作成におけるスポンサーシップについてもOECDのデータベースにより公開され、プログラムへの貢献としてカウントされる。しかし、統計的にはフルの初期評価文書の提出と、保留物質文書の提出は分けて処理される。
- ・ 保留物質について新しい情報が入手され、その有害性に懸念が感じられた場合は、フルの初期評価文書を作成するためのスポンサーが必要となる。または、選択的評価を用いるという方法も可能である。

SIAMIはOECDが示したアウトラインにほぼ合意したが、次のような勧告がなされた。

- ・ 保留物質の設定基準は厳格なものであり、その基準は限定的な数まで減らすことが可能である。
- ・ 優先順位の決定を環境影響とヒト健康影響で分けて定められるかの可能性を調査すべきである。
- ・ OECDの活動が国による優先順位設定を承認するだけに限定されるべきではない。

OECD 事務局は選択的評価手法についての文書を修正し、回覧することになった。最終草案は 2009 年 4 月の既存化学物質タスクフォースまでに準備される。さらに、OECD 事務局はカナダ、米国、EC および英国とともに保留物質の文書例を第 28 回 SIAM に試験的に提出できないか検討することになった。

#### 6) SIAM 前・SIAM 後の CDG 上での審議について

第 18 回 SIAM で米国・日本/ICCA が提出し合意された物質カテゴリー：Short Chain Alkyl Methacrylate (CAS: 97-63-2, 97-86-9, 97-88-1, 688-84-6) については、環境影響について新しい情報が得られたので、修正 SIAP が CDG 上に提出され合意が得られた。第 18 回 SIAM では、Ethyl methacrylate (CAS: 97-63-2)、iso-Butyl methacrylate (CAS: 97-86-9) および n-Butyl methacrylate (CAS: 97-88-1) は LP、2-Ethylhexyl methacrylate (CAS: 688-84-6) は FW と合意されたが、今回これらの化学物質の生体濃縮性の可能性が低いことが新たに分かったので、本カテゴリーの環境影響は LP と結論された。修正 SIAP は第 27 回 SIAM で合意された SIAP と共に既存化学物質タスクフォースに提出される。

#### おわりに

OECD の HPV 点検プログラムでは、2005 年から 2010 年の間に 1,000 物質の評価を終えることを目標としており、2005 年から 2008 年 6 月までには、386 物質が審議された。しかし残

りの 624 物質中 188 物質については、スポンサーが決まっておらず、プログラムの効率化が要求されている。今回の SIAM では、未評価物質の審議を効率よく終えるために、選択的評価や優先順位設定ツールの使用などの新しい評価手法導入の可能性について審議された。また、米国の HC を HPV 点検プログラムに提出するためのアウトラインが紹介され、HPV 点検プログラムへの貢献が期待された。

#### 参照資料：

1. EPA (2008) HPV Chemical Hazard Characterizations.  
[http://iaspub.epa.gov/opthpv/hpv\\_hc\\_characterization.get\\_report](http://iaspub.epa.gov/opthpv/hpv_hc_characterization.get_report)
2. OECD (2008a) Draft Summary Record for SIAM 27. EXCH\_SIAM\_M(2008)2\_draft
3. OECD (2008b) OECD integrated HPV database. <http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/>
4. OECD (2008c) Screening Information Datasets (SIDS) for High Production Volume Chemicals in IUCLID format.  
[http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en\\_2649\\_34379\\_31743223\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34379_31743223_1_1_1_1,00.html)
5. OECD (2008d) Series on Testing and Assessment / Adopted Guidance and Review Documents. No 88: Report of a Workshop on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)  
[http://www.oecd.org/document/30/0,3343,fr\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3343,fr_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html)
6. UNEP (2008) Chemicals Screening information dataset (SIDS) for high volume chemicals.  
[http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD\\_SIDS/sidspub.html](http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD_SIDS/sidspub.html)
7. 江馬 眞 (2006) : OECD の高生産量化学物質安全性点検プログラムとその実施手順. 化学生物総合管理, 2-1, 83-103
8. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006a) : OECD化学物質対策の動向 (第8報). 化学生物総合管理, 2-1, 147-162
9. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006b) : OECD化学物質対策の動向 (第9報). 化学生物総合管理, 2-1, 163-175
10. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2006c) : OECD 化学物質対策の動向 (第11報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 124, 62-68
11. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007a) : OECD化学物質対策の動向 (第10報). 化学生物総合管理, 2-2, 286-301
12. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007b) : OECD化学物質対策の動向 (第12報). 化学生物総合管理, 3-1, 43-55
13. 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞 (2007c) : OECD化学物質対策の動向 (第12報). 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 101-106
14. 松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞 (2006) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 18 回初期評価会議までの概要. 化学生物総合管理, 2-1, 104-134
15. 松本真理子, 川原和三, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2006) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 21 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 2-1, 135-146
16. 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞 (2007) : OECD 高生産量化学物質点検プログラム：第 24 回初期評価会議概要. 化学生物総合管理, 3-2, 180-189

表 1 第 27 回 SIAM で審議された化学物質と合意結果

CAS/ 物質カテゴリー	化学物質名	スポンサー	勧告	
			ヒト健康	環境
80-07-9	Sulfone, bis(p-chlorophenyl)	SE/ICCA	FW	FW
108-46-3	1,3-Benzenediol	JP/ICCA	LP	LP
物質カテゴリー	Nickels and nickel compounds	DK:eu		FW
3333-67-3	Nickel carbonate			
7440-02-0	Nickel			
7718-54-9	Nickel chloride			
7786-81-4	Nickel sulfate			
12122-15-5	2:3 basic carbonate			
12607-70-4	1:2 basic carbonate			
13138-45-9	Nickel nitrate			
109-60-4	Propyl acetate	US/ICCA	N/A	N/A
657-84-1	Sodium p-toluenesulfonate	JP	LP	LP
1309-64-4 12412-52-1 1317-98-2	Antimony (III) oxide (Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	SE:eu	FW	LP
10361-37-2	Barium chloride	KO	LP	LP
物質カテゴリー	Acid Chloride Category	US/ICCA	N/A	N/A
760-67-8	Hexanoyl chloride, 2-ethyl-			
764-85-2	Nonanoyl chloride			
3282-30-2	Propanoyl chloride, 2,2-dimethyl-			
40292-82-8	Neodecanoyl chloride			
物質カテゴリー	Linear alkylbenzene alkylate bottoms	US/ICCA	N/A	N/A
68515-32-2	Benzene, mono-C12-14-alkyl derivs., fractionation bottoms			
68515-34-4	Benzene, mono-C12-14-alkyl derivs., fractionation bottoms, light ends			
68855-24-3	Benzene, C14-30-alkyl derivs.			
84961-70-6	Benzene, mono-C10-13-alkyl derivs., distn. Residues			
85117-41-5	Benzene, mono-C10-14-alkyl derivs., fractionation bottoms			

CAS/ 物質カテゴリー	化学物質名	スポンサー	勧告	
			ヒト健康	環境
94094-93-6	Benzene, mono-C10-13-alkyl derivs., fractionation bottoms, heavy ends			
129813-62-3	Benzene, mono-C10-13-alkyl derivs., fractionation bottoms, light ends			
151911-58-9	Benzene, mono-C12-13-branched alkyl derivs., fractionation bottoms			
95-33-0	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolsulfenamide	JP+DE:eu	LP	FW
物質カテゴリー	Ethyl silicates			
78-10-4	Silicic acid, (H4SiO4), tetraethyl ester	US/ICCA	N/A	N/A
11099-06-2	Silicic acid, ethyl ester			
68412-37-3	Silicic acid (H4SiO4), tetraethyl ester, hydrolyzed			
物質カテゴリー	Hydroperoxides			
80-15-9	Hydroperoxide, 1-methyl-1-phenylethyl-	US/ICCA	N/A	N/A
3425-61-4	Hydroperoxide, 1,1-dimethylpropyl-			
物質カテゴリー	Methyl mercaptans Category			
74-93-1	Methanethiol	US/ICCA	N/A	N/A
5188-07-8	Methanethiol, sodium salt			
10039-54-0	Bis(hydroxylammonium) sulphate	DE:eu	LP	FW
25167-70-8	Pentene, 2,4,4-trimethyl-	DE:eu	LP	FW

FW = The substance is a candidate for further work. (追加の調査研究作業が必要)

LP = The substance is currently of low priority for further work. (現状では追加作業の必要なし)

N/A=Not applicable (勧告が定められなかった)

ICCA は国際化学工業協会協議会による原案提出を示す。

eu は欧州連合でのリスク評価文書を基にしたことを意味する。

略号は、DE:ドイツ、DK: デンマーク、JP: 日本、KO: 韓国、SE: スウェーデン、US: 米国である。

## Evaluation of norovirus removal performance in a coagulation–ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus virus-like particles

N. Shirasaki, T. Matsushita, Y. Matsui, T. Urasaki, A. Oshiba and K. Ohno

### ABSTRACT

Norovirus (NV) is a prototype strain of a group of human caliciviruses responsible for epidemic outbreaks of acute gastroenteritis worldwide. Because of the lack of a cell culture system or an animal model for this virus, studies on drinking water treatment such as separation and disinfection processes are still hampered. In the present study, we investigated NV removal performance as particles during a coagulation–ceramic microfiltration (MF) process by using recombinant NV virus-like particles (rNV-VLPs), which are morphologically and antigenically similar to native NV. We also experimentally investigated the behaviors of two widely accepted surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q $\beta$  and MS2, for comparison with the behavior of rNV-VLPs. More than 4-log removal was observed for rNV-VLPs with a 1.08 mg-Al/L dose of polyaluminium chloride in the coagulation–ceramic MF process. This high removal ratio of rNV-VLPs satisfies the U.S. Environmental Protection Agency requirement of 4-log removal or inactivation. In addition, the removal ratios of Q $\beta$  and MS2 were approximately 2-log and 1-log, smaller than the ratio of rNV-VLPs. Accordingly, both bacteriophages have the potential to become appropriate surrogates for native NV in the coagulation–ceramic MF process, and, of the two, Q $\beta$  is the more conservative surrogate.

**Key words** | coagulation–ceramic microfiltration, ELISA, norovirus, real-time RT-PCR, virus-like particles

N. Shirasaki (corresponding author)  
T. Matsushita  
Y. Matsui  
T. Urasaki  
A. Oshiba  
K. Ohno  
Division of Built Environment,  
Graduate School of Engineering,  
Hokkaido University,  
N13W8,  
Sapporo 060-8628,  
Japan  
E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

### INTRODUCTION

Ceramic microfiltration (MF) membranes have attracted attention in the field of drinking water treatment because they can withstand extreme acidity and alkalinity and higher operating pressures than polymeric or other inorganic membranes. These properties of ceramic membranes allow the use of strong acids and bases for chemical cleaning, application of high pressure for hydraulic backwashing, and operation at a high filtration flux. However, ceramic MF membranes alone cannot remove pathogenic waterborne viruses efficiently, because the membrane pore sizes are not small enough to remove viruses. To compensate for this disadvantage, a coagulation process has sometimes been used as a pretreatment before ceramic

MF. In fact, coagulation–ceramic MF systems have already been applied to the treatment of drinking water in Japan, and our research group has showed these systems to be useful for virus removal by using the bacteriophages Q $\beta$  and MS2 as surrogates for pathogenic waterborne viruses (Matsui *et al.* 2003; Matsushita *et al.* 2005; Shirasaki *et al.* 2009a,b).

Among the pathogenic waterborne viruses, norovirus (NV; formerly known as small round structural virus and Norwalk-like virus) is one of most important human pathogens, causing epidemic and acute gastroenteritis worldwide. Although it has been 30 years since NV was first identified, studies of this virus, including experiments in the field of drinking water treatment, are still hampered by



the lack of a cell culture system or an animal model (Zheng *et al.* 2006). Accordingly, the removal performance of NV in the drinking water treatment process has not been investigated fully. In recent years, expression of the NV genome in a baculovirus expression system has resulted in the production of recombinant NV virus-like particles (rNV-VLPs) (Jiang *et al.* 1992) that are morphologically and antigenically similar to native NV (White *et al.* 1996). In the present study, we used rNV-VLPs to investigate the removal performance of NV in a coagulation–ceramic MF process. We also experimentally investigated the behaviors of the bacteriophages Q $\beta$  and MS2 for comparison with the behavior of rNV-VLPs, and evaluated their suitability as surrogates for NV. This study represents the first attempt to apply rNV-VLPs to the evaluation of the removal performance of NV in a drinking water treatment process.

## MATERIALS AND METHODS

### Source water, coagulant, and MF membranes

Water was sampled from the Toyohira River (Sapporo, Japan; water quality shown in Table 1) on 12 June 2008. Two commercial aluminium coagulants, polyaluminium chloride (PACl 250A; 10.5% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, relative density 1.2 at 20°C; Taki Chemical Co., Ltd., Hyogo, Japan) and alum (8.1% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, relative density 1.3 at 20°C; Taki Chemical Co., Ltd.), were used for the coagulation process. A flat type of ceramic MF membrane (nominal pore size 0.1  $\mu$ m, effective filtration area 0.0007 m<sup>2</sup>; NGK Insulators, Ltd., Nagoya, Japan), which was installed in an acrylic-resin casing, was used.

### Preparation of rNV-VLPs

Subgenomic cDNA fragments of NV (AB042808, GI/4, Chiba407/1987/JP) genome were artificially synthesized.

**Table 1** | Water quality of the Toyohira River

pH	7.2
DOC (mg/L)	0.76
OD260 (cm)	0.019
Turbidity (NTU)	0.63
Alkalinity (mg-CaCO <sub>3</sub> /L)	17.2

The fragments contained the entire second and third open reading frames of the NV genome. The cDNA was subcloned into a baculovirus transfer vector, and then the transfer vector was transfected into silkworm cells. The expressed rNV-VLPs were separated from the cell lysate by centrifugation and dialysis.

### Quantification of rNV-VLPs

rNV-VLPs were detected by using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (NV-AD (II), Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Optical densities at 450 nm and 630 nm in a 96-well microplate were measured with a microplate reader (MTP-300, Corona Electric Co., Ltd., Ibaraki, Japan). The rNV-VLP concentration detection limit with the ELISA kit was approximately 10<sup>8</sup> VLPs/mL.

### Preparation of bacteriophages

F-specific RNA bacteriophages Q $\beta$  (NBRC 20012) and MS2 (NBRC 102619) were obtained from the NITE Biological Research Center (NBRC, Chiba, Japan). The bacteriophages Q $\beta$  and MS2 are widely used as surrogates for pathogenic waterborne viruses because of their morphological similarities to hepatitis A viruses and polioviruses, which are important viruses to remove during drinking water treatment. The genomes of these two bacteriophages each contain a single molecule of linear, positive-sense, single-stranded RNA, which is encapsulated in an icosahedral protein capsid with a diameter of 24–26 nm. Each bacteriophage was propagated for 22–24 h at 37°C in *Escherichia coli* (NBRC 13965) obtained from NBRC. The bacteriophage culture solution was centrifuged (2,000  $\times$  g, 10 min) and then passed through a membrane filter (pore size 0.45  $\mu$ m, hydrophilic cellulose acetate; Dismic-25cs, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan). The filtrate was purified by using a centrifugal filter device (molecular weight cutoff 100,000, regenerated cellulose; Amicon Ultra-15, Millipore Corp., Billerica, MA, USA) to prepare the bacteriophage stock solution.

### Quantification of bacteriophages

Viral RNA of the bacteriophages was quantified by real-time RT-PCR. Viral RNA was extracted from 200  $\mu\text{L}$  of sample with a QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen K. K., Tokyo, Japan) to obtain a final volume of 20  $\mu\text{L}$ . The extracted RNA solution was added to a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan) for the RT reaction, which was conducted at 25°C for 10 min, 37°C for 120 min, and 85°C for 5 s, followed by cooling to 4°C in the thermal cycler (Thermal Cycler Dice Model TP600, Takara Bio Inc., Shiga, Japan). The cDNA solution was then amplified by a TaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems Japan Ltd.), 400 nM of each primer (HQ-SEQ grade, Takara Bio Inc.), and 250 nM of TaqMan probe (Applied Biosystems Japan Ltd.). The oligonucleotide sequences of the primers and the probes are shown in Table 2. Amplification was conducted at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min in an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Japan Ltd.).

The standard curve for the real-time RT-PCR method was based on the relationship between the infectious bacteriophage concentration of a freshly prepared stock solution measured by the plaque forming unit (PFU) method (Adams 1959) and the number of cycles of PCR amplification.

### Coagulation–ceramic MF process

Batch coagulation experiments were conducted with 400 mL of river water in glass beakers at 20°C. rNV-VLPs, QB, and MS2 were simultaneously added to the beakers at approximately  $10^{11}$  VLPs/mL and  $10^8$  PFU/mL,

respectively, and mixed with an impeller stirrer. PACl or alum was injected into the water as the coagulant at a dose of 0.54 or 1.08 mg-Al/L. The pH of the water was immediately adjusted to, and maintained at, 6.8 using HCl or NaOH. The water was stirred rapidly for 2 min ( $G = 200 \text{ s}^{-1}$ ) and then slowly for 28 min ( $G = 20 \text{ s}^{-1}$ ). The water was then left at rest for 20 min to allow the generated aluminium floc particles to settle. The supernatant was fed through a ceramic MF membrane by a peristaltic pump at 83 L/(m<sup>2</sup>·h). The raw water ( $C_0$ ; before coagulant dosing) and the MF permeate ( $C$ ; after 15, 30, 60, 90, and 120 min of filtration) was collected for quantification of the rNV-VLPs, QB, and MS2.

### Electron microscopy

rNV-VLPs were observed with an electron microscope. Ten microlitres of rNV-VLP stock solution was put on a 400-mesh copper grid with a collodion membrane (Nissin EM Corp., Tokyo, Japan) and adsorbed to the grid for 1 min. Excess solution on the grid was drained from the side of the grid with filter paper, and rNV-VLPs were negatively stained with 10  $\mu\text{L}$  of 2% phosphotungstic acid (pH 5.5) for 45 s. After the excess stain was drained off, the grid was examined with a transmission electron microscope (TEM, H-7650, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan). Particle diameter of rNV-VLPs was expressed as the mean and standard deviation of any 10 particles on the electron micrograph.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Characteristics of the rNV-VLPs produced

Figure 1 shows an electron micrograph of rNV-VLPs. The presence of particles was confirmed on the electron

**Table 2** | Oligonucleotide sequences of the primers and the probes used in real time RT-PCR quantification of QB and MS2

Viruses		Oligonucleotide sequences	Positions	References
QB	Forward primer	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'	49–71	Katayama <i>et al.</i> (2002)
	Reverse primer	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'	187–208	
	TaqMan probe	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'	147–169	
MS2	Forward primer	5'-GTC GCG GTA ATT GGC GC-3'	632–648	O'Connell <i>et al.</i> (2006)
	Reverse primer	5'-GGC CAC GTG TTT TGA TCG A-3'	690–708	
	TaqMan probe	5'-AGG CGC TCC GCT ACC TTG CCC T-3'	650–671	

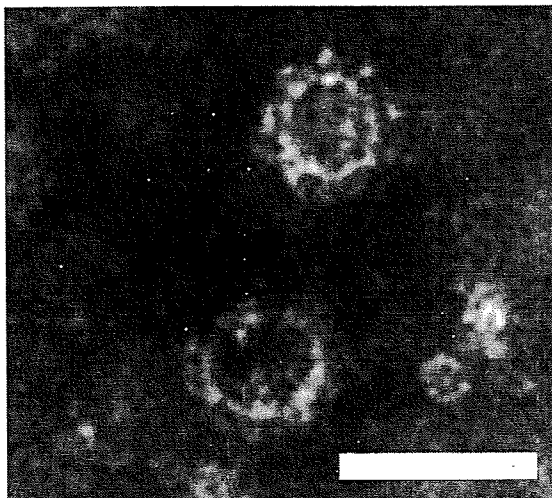


Figure 1 | Negatively stained electron micrograph of rNV-VLPs. Scale bar, 50 nm.

micrograph, and rNV capsid proteins spontaneously self-assembled into VLPs during expression. The rNV-VLP particle diameter was  $35.7 \pm 3.2$  nm, measured by randomly choosing 10 particles on the electron micrograph. This value roughly corresponds to the particle diameter (approximately 38 nm) previously reported for native NV (Someya *et al.* 2000). This result suggests that rNV-VLPs were successfully produced by the baculovirus-silkworm expression system, and were morphologically similar to native NV.

### Removal performance in the coagulation–ceramic MF process with PACl

Figure 2 shows the change in the removal ratio ( $\log[C_0/C]$ ) of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 with filtration time in the coagulation–ceramic MF process with PACl. Because the diameters of rNV-VLPs ( $35.7 \pm 3.2$  nm), Q $\beta$ , and MS2 (24–26 nm) are smaller than the nominal pore size of the ceramic MF membrane (0.1  $\mu$ m), no removal (<0.2-log) of rNV-VLPs or either bacteriophage was observed without coagulation pretreatment (data not shown). In contrast, the coagulation–ceramic MF process effectively removed rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 at PACl doses of 0.54 (Figure 2a) and 1.08 mg-Al/L (Figure 2b). In addition, an effect of the coagulant dose (0.54 mg-Al/L vs. 1.08 mg-Al/L) on the removal of rNV-VLPs and both bacteriophages was observed: the filtration time-averaged removals of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 were only 1.6-log, 0.5-log, and 0.9-log, respectively, at the coagulant dose of 0.54 mg-Al/L, whereas with the dose of 1.08 mg-Al/L, the removals were > 2.9-log, 2.4-log, and 3.3-log for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2, respectively. This dose effect was most likely due to an increase in floc size with the increased coagulant dose. Increasing the coagulant dose from 0.54 to 1.08 mg-Al/L increased the size of the aluminium floc particles with adsorbed/entrapped rNV-VLPs or bacteriophages, and subsequently increased the amount of aluminium floc particles that settled out from the suspension during the

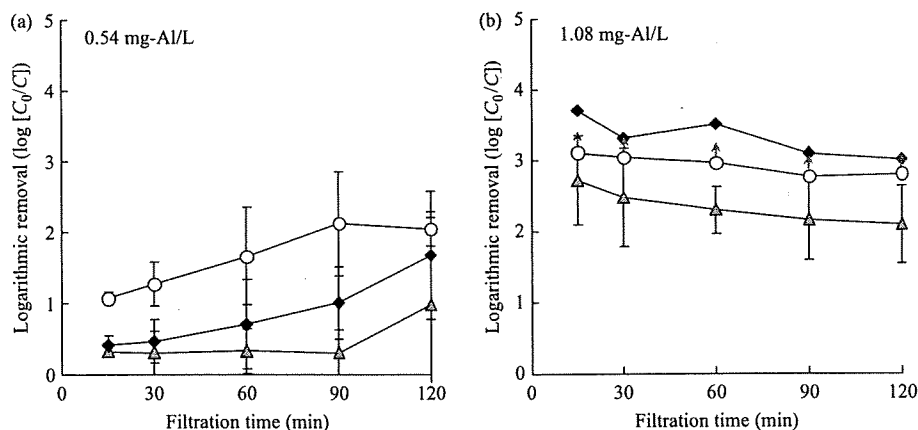


Figure 2 | rNV-VLPs, Q $\beta$  and MS2 removal by a coagulation–ceramic MF process with PACl coagulant at doses of (a) 0.54 mg-Al/L and (b) 1.08 mg-Al/L. Circles, triangles, and diamonds represent rNV-VLPs, Q $\beta$  and MS2, respectively. The arrows indicate values greater than those that could be estimated accurately by ELISA.

settling process. Consequently, the amount of aluminium floc particles that passed through a ceramic MF membrane was decreased, leading to a difference in the removal ratios of the rNV-VLPs and the two bacteriophages between PACl doses of 0.54 and 1.08 mg-Al/L.

The removal ratios of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 gradually increased with filtration time at the PACl dose of 0.54 mg-Al/L. Ultimately, 2.0-log, 1.0-log, and 1.7-log removals were obtained for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2, respectively, at the end of the 2-h filtration. As described above, because the size and amount of aluminium floc particles that settled out from suspension were probably smaller with a PACl dose of 0.54 mg-Al/L than with one of 1.08 mg-Al/L, many of the aluminium floc particles were fed into the ceramic MF membrane and accumulated on the membrane surface as a cake layer during the MF process. This cake layer would act as a barrier to rNV-VLPs and both bacteriophages, causing the removal ratios of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 to gradually increase with the growth of the cake layer at the PACl dose of 0.54 mg-Al/L.

In contrast, the removal ratios of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 gradually decreased with filtration time at the PACl dose of 1.08 mg-Al/L. Our research group has demonstrated that the number of virus particles in the MF compartment increases with filtration time in the coagulation–ceramic MF system (Shirasaki *et al.* 2007). Although the experimental procedures of the present study and our previous study (Shirasaki *et al.* 2007) differed in terms of the coagulation process (batch coagulation vs. in-line coagulation), rNV-VLPs and both bacteriophages also probably accumulated in the MF compartment with filtration time in the present study. Accordingly, the concentrations of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 in the MF permeate increased with the accumulation of rNV-VLPs and both bacteriophages in the MF compartment. In addition, because many of the aluminium floc particles had settled out from suspension during the settling process prior to the MF process with the 1.08 mg-Al/L PACl dose, the effect of the cake layer was probably smaller than with the 0.54 mg-Al/L PACl dose. The combination of these two phenomena caused the leakage of the rNV-VLPs and the two bacteriophages into the MF permeate, decreasing their removal ratios with filtration time.

The removal performance for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 with the 1.08 mg-Al/L PACl dose at the end of the filtration (2 h) was still higher than that with the 0.54 mg-Al/L PACl dose, although the removal ratios decreased with filtration time as described above. Therefore, a PACl dose of 1.08 mg-Al/L was more effective for the removal of rNV-VLPs and both bacteriophages than the dose of 0.54 mg-Al/L in the coagulation–ceramic MF process.

#### Removal performance in the coagulation–ceramic MF process with alum

Figure 3 shows the change in the removal ratio of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 with filtration time in the coagulation–ceramic MF process with alum. The coagulation–ceramic MF process effectively removed rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 at alum doses of 0.54 (Figure 3a) and 1.08 mg-Al/L (Figure 3b). In addition, an effect of the coagulant dose (0.54 mg-Al/L vs. 1.08 mg-Al/L) on the removal of rNV-VLPs and of both bacteriophages was also observed with alum: the filtration time-averaged removals of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 were only 1.9-log, 0.9-log, and 2.3-log, respectively, at the 0.54 mg-Al/L coagulant dose, whereas the 1.08 mg-Al/L dose achieved time-averaged removals of > 3.1-log, 1.3-log, and 3.1-log for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2, respectively.

The removal ratios of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 gradually increased with filtration time at the 0.54 mg-Al/L alum dose, probably owing to the aluminium floc particles accumulating on the membrane surface as a cake layer during the MF process. Ultimately, removals of 2.3-log, 1.0-log, and 2.7-log were obtained for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2, respectively, at the end of the 2-h filtration. In contrast, the removal ratios of rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 gradually decreased with filtration time at the 1.08 mg-Al/L alum dose, for the same reason as in the PACl experiment, described above.

The removal performance for rNV-VLPs, Q $\beta$ , and MS2 with the 1.08 mg-Al/L alum dose at the end of the filtration (2 h) was also higher than that with the 0.54 mg-Al/L alum dose, as in the PACl experiments. Accordingly, the alum dose of 1.08 mg-Al/L was more effective for removal of rNV-VLPs and both bacteriophages than the 0.54 mg-Al/L alum dose in the coagulation–ceramic MF process.