

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」
令和2年度分担研究報告書

指標ウイルスを用いたリスク管理方法の検討
－ 微生物（ウイルス）分科会 －

研究分担者	秋葉道宏	国立保健医療科学院 生活環境研究部
	片山浩之	東京大学 大学院工学系研究科
	白崎伸隆	北海道大学 大学院工学研究院
	三浦尚之	国立保健医療科学院 生活環境研究部
研究協力者	小田琢也	神戸市 水道局事業部 水質試験所
	佐野大輔	東北大学 大学院環境科学研究科
	門屋俊祐	東北大学 大学院工学研究科
	鳥居将太郎	東京大学 大学院工学系研究科
	瀧野博之	国立保健医療科学院 生活環境研究部

研究要旨

平成30年度から継続して表流水を水源とする国内21箇所の浄水場において原水試料を収集し、ノロウイルスGII、ロタウイルスA（RVA）およびトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）の汚染実態を調査した。3年間に渡る実態調査の結果、PMMoVは病原ウイルスよりも概ね高い濃度で原水に含まれ、ウイルス除去指標として有用であることをサポートするデータが蓄積された。PMMoVはノロウイルスGIIよりも濃度が高く、ノロウイルスGIIが陽性だった試料は、すべてPMMoVも陽性だった。また、PMMoVは、ほとんどの試料においてRVAよりも濃度が高かったが、一部の試料ではRVAの濃度の方が高かった。それらの試料が採水された水源上流域には都市が含まれないため、検出されたRVAの多くは動物由来と考えられた。RVAの遺伝子型を詳細に解析しヒト健康リスクを適切に評価することを目的として、RVAの遺伝子型特定領域を高感度に増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析する手法を新たに開発した。開発した手法を都市・畜舎排水が含まれる原水試料に適用したところ、ヒトだけでなくウシやブタに由来する複数の遺伝子型が検出され、それらが経時的に変化することが示された。

UF膜ろ過処理を実施している国内の浄水場におけるPMMoVの処理性を評価した。その結果、浄水場CのUF膜ろ過処理によるPMMoVの除去率は1.7→2.6 logであり、除去率の平均値は1.9 logだった。室内実験においてPMMoVの除去率は水系感染症ウイルスの除去率と同程度であったことから、実浄水場においてPMMoVが2 log程度除去される場合には、水系感染症ウイルスも同程度除去されるものと推察された。

ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験を実施し、高い塩素処理耐性を有するコクサッキーウイルスB5型の9 log不活化に必要な塩素処理のCT値は40 mg-Cl₂-min/L程度であることを明らかにした。これまでに調査対象とした浄水場A, B, Cにおいては、配水池出口に至るまでに少なくとも840–1,300 mg-Cl₂-min/LのCT値が確保されていることから、塩素処理により病原ウイルスの9 log不活化は達成されていると判断された。

多摩川、相模川のF特異RNA大腸菌ファージGI型の塩素耐性を評価し、同種内の遊離塩素耐性のばらつきを考慮した不活化モデルを作成した。GI型野生株の86%で、実験室株MS2, frよりも塩素耐性が高かった。また、MS2の8 log不活化が期待できるCT値では、GI型野生株の全体不活化率が5.3–5.6 logと算定された。環境水中のウイルスの消毒効果を推測する際は、種内の遊離塩素耐性のばらつきを算入した不活化モデルを採用すべきである。

A. 研究目的

水道における病原ウイルスのリスク管理に資するデータを蓄積し、指標ウイルスを用いたリスク管理方法を提案することを目的として、以下に示す5つの研究タスクを実施した。

1) 水源における病原ウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の濃度変動調査

2) 環境水中のロタウイルス A (RVA) 遺伝子型解析のための nested PCR アッセイの開発

3) 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV

PMMoV はヒトの糞便中に高濃度で含まれ、下水や下水処理水、河川水や地下水からも検出されることが報告されている植物ウイルスであるが¹⁾、水道水源における PMMoV の存在実態は十分に把握されていない。微生物分科会では、浄水処理プロセスにおける指標ウイルスとして検討している PMMoV の実態を明らかにすることを目的とし、平成 30 年度から継続して表流水を水源とする国内 21 箇所の浄水場において実態調査を行ってきた。今年度は、胃腸炎の非流行期 (2020 年 10 月) および流行期 (2021 年 1 月) に原水試料を収集し、感染性胃腸炎を引き起こすノロウイルス GII および RVA、そして PMMoV の濃度を調査した。

A2. RVA 遺伝子型解析のための nested PCR アッセイの開発

これまでの実態調査において、PMMoV よりも RVA 濃度が高い浄水場が数箇所確認された²⁾。RVA は遺伝的に多様であり、ウシやブタ等の動物に由来する株も含まれる。これまでに、臨床試料に含まれる RVA の遺伝子型を特定するために、VP7 (G 遺伝子型を決定)、VP6 (I 遺伝子型を決定)、および VP4 (P 遺伝子型を決定) の一部を増幅する PCR アッセイが開発されているが、検出感度の面から環境試料への適用は困難だった。環境試料からでも高感度に RVA 遺伝子型特定領域を増幅する nested PCR アッセイを新たに開発し、取得したアンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析することで、原水試料に含まれる RVA の遺伝子型分布を明らかにすることを目的とした。

A3. 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

これまでに、PMMoV を効果的に濃縮・回収可

の除去性評価

4) 塩素処理における病原ウイルスの不活化特性評価

5) ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅を考慮した不活化モデルの構築

これら5つのタスクの具体的な目的・概要を以下に示す。

A1. 水源における病原ウイルスおよび PMMoV の濃度変動調査

能なウイルス濃縮法を構築・適用することにより、実浄水場の凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-MF 膜ろ過処理における PMMoV の処理性を評価することに成功した³⁾。今年度は、UF 膜ろ過処理を実施している国内の浄水場における PMMoV の処理性評価を実施した。

A4. 塩素処理における病原ウイルスの不活化特性評価

日本の水道原水中の水系感染症ウイルス濃度 (10^5 個/L 程度)^{4,5)}と WHO が示す飲料水中のウイルス許容濃度 (10^{-5} 個/L) を考慮した場合、浄水処理により 10 log のウイルス低減が必要な場合がある。凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-MF 膜ろ過処理において期待されるウイルスの低減率は 1-2 log 程度であることから、ウイルス低減の大部分 (最大 9 log) を後段の塩素消毒に依存することになる。水系感染症ウイルスの中で高い塩素処理耐性を有することが知られているコクサッキーウイルス B5 型⁶⁾を対象とし、ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験を実施することにより、コクサッキーウイルス B5 型の 9 log 不活化に必要な塩素処理条件 (CT 値; C: 遊離塩素濃度 × T: 接触時間) を明らかにすることを目的とした。

A5. ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅を考慮した不活化モデルの構築

環境水中のウイルスの不活化率を推測する場合、遊離塩素への感受性のばらつきを考慮することが重要と考えられるが、そのような不活化推測モデルは提案されていない。下水処理水の影響を受ける多摩川、相模川から 1 本鎖 RNA ウイルスの 1 種である F 特異 RNA フェージ GI 型を単離

し、実験室株と塩素耐性を比較した。また、GI 型内の遊離塩素耐性のばらつきの情報を1次不活化モデルに算入し、GI 型全体の不活化率が推測できるモデルを作成した。

B. 研究方法

以下にタスクごとの研究方法の概要を示す。より詳細な方法は、研究分担者による研究報告書を参照されたい。

B1. 水源における病原ウイルスおよびPMMoVの濃度変動調査

河川、湖沼、ダムを水源とする国内21箇所の浄水場の協力を得て、水道原水試料(5L)を収集した。試料の採水は、2020年10月および2021年1月に実施し、計42検体を収集した。対象は、国内の主要な河川流域をカバーする北海道から九州・沖縄地方の浄水場とした。試料は、冷蔵状態で国立保健医療科学院に輸送し、採水から48時間以内に分析に供した。

病原ウイルスおよびPMMoVの汚染レベルを調査することに加えて、ウイルスの存在形態に関する知見も蓄積するために、試料を孔径の異なるろ過膜を用いて分画し、懸濁態と溶存態画分に含まれるウイルスを測定した⁵⁾。すなわち、試料1LにマウスノロウイルスS7-PP3株をおよそ 10^8 copies 添加・混合し、孔径10 μm 、直径90 mmの親水性PTFE膜(JCWP09025, Merck)でろ過し、回収したろ液を孔径0.45 μm 、直径90 mmの親水性混合セルロースエステル膜(HAWP09000, Merck)でろ過した。それぞれの膜を回収し、 $>10 \mu\text{m}$ および0.45–10 μm 懸濁態画分とした⁵⁾。続いて、回収したろ液を陰電荷膜法により10 mLまで濃縮し、溶存態画分とした^{5,7)}。回収したそれぞれの画分から、NucliSENS mini MAG (bioMérieux)を用いてウイルスRNAを抽出・精製した。

マウスノロウイルス、ノロウイルスGII, RVA, およびPMMoVのRNA濃度は、既往のプライマー・プローブ、RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific), およびLightCycler 480 System II (Roche Diagnostics)を用いたリアルタイムRT-PCR法により定量した。

B2. RVA 遺伝子型解析のための nested PCR アッセ

イの開発

塩基配列データベース GenBank から RVA の遺伝子型特定領域である VP7, VP6, および VP4 の配列をそれぞれ 14~33 配列取得し、アライメントを行った後、保存領域を対象に Primer 3 を用いて増幅塩基長 209~272 bp の 8 つのプライマーセットを設計した。検討には、2019年4月から9月に掛けて毎月収集した水道原水試料(都市および畜舎の排水を含む河川水, RVA 濃度 4.1~5.5 log₁₀ copies/L)から濃縮・抽出した RNA 試料を用いた。次に、増幅が確認されたプライマーセットの外側に、nested PCR の 1st PCR 用のプライマーを設計し、水道原水試料(サンプルセット1:都市および畜舎の排水を含む河川水, N=12, サンプルセット2:PMMoVよりもRVA濃度が高かった河川、ダム、湖沼水, N=19)に適用しながら検出感度を評価した。Nested PCR の条件は、1st および 2nd PCR とともにアニーリング 55°C で 35 サイクルによる増幅を行うこととした。

サンプルセット1から取得した VP7, VP6, および VP4 のアンプリコン(N=43)について、アダプター配列を付加し、DNA ライブラリーを調整したのち、FASMAC 社に MiSeq 解析を委託した。得られた配列データは、CLC Genomics Workbench を用いて Similarity スコア 97% で OTU クラスタリングを行い、決定した OTU 配列について BlastN で検索し、遺伝子型・近縁配列を特定した。また、構築された OTU 配列について、参照配列とともに MEGA X を用いて系統解析を行った。

B3. 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

これまでに構築したウイルス濃縮法を適用し、浄水場 C の原水あるいは浄水処理工程水 4-2,000 L における PMMoV の濃度を定量した。2020年7月、10月、2021年3月に浄水場 C 内において原水 4 L、凝集-繊維ろ過水(UF 膜ろ過前水) 4 L、チオ硫酸ナトリウムのインライン添加により残留塩素を中和した UF 膜ろ過水 1,000 L あるいは 2,000 L を、専用ハウジングに收容されたナノセラム陽電荷膜(膜孔径: 2 μm)に通水した。通水後、膜に吸着したウイルスを脱着させるウイルス溶出液として pH 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス溶液(0.05 M グリシン含有) 350 mL を添加し、1分

間浸漬させた。その後、未使用のビーフエキス溶液 150 mL をポンプを用いて膜に通水することにより、ハウジング内のビーフエキス溶液と共に回収した。この溶出操作を未使用のビーフエキス溶液を用いて更に3回繰り返し、合計2 Lのビーフエキス溶液にウイルスを濃縮した(一次濃縮)。pHをHClにて3.5に調整した後、攪拌することにより、溶液中のビーフエキスを凝集した。これを遠心分離することにより、上澄水と凝集フロックを分離した。上澄水については、タンジェンタルフローUF膜(分画分子量: 300 kDa)を用いて20 mLまで精製・濃縮し、更にメンブレンフィルター(膜孔径: 0.45 μm)にてろ過した(二次濃縮[上澄み])。一方、凝集フロックについては、pH9の0.15 M リン酸バッファーを添加し、溶解した。これを遠心分離した後、上澄水 20 mL の pH を HCl にて 7.0 に調整し、更にメンブレンフィルター(膜孔径: 0.45 μm)にてろ過した(二次濃縮[フロック])。二次濃縮後の試料(二次濃縮[上澄み]及び二次濃縮[フロック])のPMMoV濃度を当該ウイルスに特異的なプライマー及びプローブを用いたリアルタイム定量PCR法で定量することにより、浄水場Cの原水、凝集-繊維ろ過水及びUF膜ろ過水のPMMoV濃度を算出した。また、PMMoV濃度から浄水場CにおけるPMMoVの除去率(Log除去率(Log[C_0/C]); C_0 : 原水の濃度, C : 処理後の濃度)を算出した。

B4. 塩素処理における病原ウイルスの不活化特性評価

病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いことが報告されているコクサッキーウイルス B5 型を用いた室内実験を実施した。4°Cに調整した pH7 の 0.01 M リン酸バッファーに、培養・精製したコクサッキーウイルスを 10^5 PFU/mL 程度になるように添加したものを実験原水とし、角型タンクに 70 L 添加した。ここに、初期塩素濃度が 0.9 mg- Cl_2/L 程度になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、直ちに2台の攪拌機(攪拌翼)を用いてそれぞれ 150 rpm にて攪拌した。塩素添加前の原水及び塩素添加後の塩素処理水を経時的に採水し、塩素処理水については、チオ硫酸ナトリウムにより残留塩素を中和した後、必要に応じてタンジェンタルフローUF膜(分画分子量: 1,000 kDa)

を用いて 70 mL まで濃縮し、それぞれの試料の感染性を有するコクサッキーウイルス濃度をプラック形成法にて定量することにより、塩素処理におけるコクサッキーウイルスの不活化率(Log不活化率(Log[N_0/N]); N_0 : 原水の感染性を有するコクサッキーウイルス濃度, N : 処理後の感染性を有するコクサッキーウイルス濃度)を算出した。なお、濃縮を実施した場合には、不活化率の算出の際に濃縮による回収率(29%)を考慮した。

B5. ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅を考慮した不活化モデルの構築

(1) F フェージの単離

フィールド調査を多摩川、相模川にて実施し、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 を宿主として用いたプラック法により F フェージを検出した。滅菌済み爪楊枝を用いて現れたプラックを単離した。単離された F 特異フェージは 750 μL の 1 mM リン酸緩衝液に懸濁し、以降の操作まで 4°C で保存した。

(2) RT-qPCR による単離株の遺伝型タイピング

プラック懸濁液 2 μL を 95°C で 5 分間熱処理し、RNA 抽出を実施した。次に、RNA 抽出物にプライマー、プローブ⁸⁾、逆転写酵素、Mastermix (Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen))を加えて、Singleplex One-Step RT-qPCR を実施した。

単離株のすべてに対し GI のプライマーセットを用いた RT-qPCR を実施した。RT-qPCR に供されたサンプルの Threshold cycle (Ct) 値が 20 以下の場合には、単離株のウイルス種が GI であったもの⁹⁾とみなした。遺伝型タイピングはすべて1連で実施した。

(3) 野生株フェージの塩素消毒試験

遺伝型タイピングにより遺伝子型が GI 型と判明した野生株(多摩川: 18 株, 相模川: 17 株)、および GI 型の実験室株である MS2, fr を対象に、遊離塩素消毒試験を実施した。なお、各株の消毒試験は 2 連で実施した。

(4) 反応速度定数の解析

遊離塩素消毒によるウイルスの不活化速度は以下に示す Chick-Watson モデルにフィッティン

グした。確率密度関数のパラメータ推定、確率密度の Kolmogorov-Smirnov 検定、赤池情報量基準 (AIC) の算出には R パッケージ “fitdistrplus” を使用した¹⁰⁾。なお本研究では、不活化速度定数 k が従う確率分布について対数正規分布、ガンマ分布の 2 種類を仮定した。

不活化速度定数 k が 0 より大きい値をとり、対数正規分布にしたがう場合、不活化速度定数の確率密度関数は $f(k)$ と表せる。また、全体不活化率 N/N_0 は以下となる。

$$\frac{N}{N_0} = \int_0^{\infty} \frac{N_z}{N_{z,0}} \cdot f(k) dk = \int_0^{\infty} e^{-CTk} \cdot f(k) dk$$

$N_z/N_{z,0}$: 株 z の生残率

CT: CT 値 (mg sec L⁻¹)

k_z : 株 z の不活化速度定数 (mg⁻¹ sec⁻¹ L)

C. 結果及び考察

以下にタスクごとの研究結果の概要を示す。より詳細な結果は、研究分担者による研究報告書を参照されたい。

C1. 水源における病原ウイルスおよび PMMoV の濃度変動

ノロウイルス GII は、胃腸炎の非流行期 (2020 年 10 月) に 2 試料の溶存態画分からのみ検出され (検出率は 10%)、濃度は 3.2–4.1 log₁₀ copies/L だった。胃腸炎の流行期 (2021 年 1 月) には 24% の試料から検出され、濃度の幾何平均値は 3.8 log₁₀ copies/L だった。2021 年 1 月は、3 年間で最も検出率が低く (2019 年 1 月: 62%, 2020 年 1 月: 48%)、濃度の幾何平均値も最も低かった。この理由としては、新型コロナウイルス感染症対策の結果、水源流域におけるノロウイルスによる感染性胃腸炎の患者数も減少し、原水に含まれるノロウイルス濃度が低減したことが挙げられる。実際に、2020–2021 年冬季は、ノロウイルスやロタウイルスの検出報告数が全国的に過去最低のレベルとなっていた¹¹⁾。

RVA は、胃腸炎の非流行期・流行期に関わらず比較的高い頻度で検出されたが (それぞれ、76, 67%)、流行期の検出率はノロウイルス GII と同様に 3 年間で最も低かった (2019 年 1 月: 76%, 2020 年 1 月: 81%)。しかしながら、濃度の幾何平均値はこれまでと同程度であり (4.4 log₁₀ copies/L),

非流行期においても比較的高かったことから (3.9 log₁₀ copies/L), 収集した原水試料には季節によらずウシやブタ等の動物由来の RVA 株も含まれていたことが考えられた。

PMMoV は、胃腸炎の非流行期・流行期に関わらず、全ての原水試料に高濃度 (4.8–5.5 log₁₀ copies/L) で含まれていた。これまでの調査における検出率および濃度の幾何平均値は、平成 30 年度は 86–100% および 4.8–5.4 log₁₀ copies/L, 令和元年度は 81–95% および 4.9–5.1 log₁₀ copies/L であり、3 年間における調査結果の再現性が高いことが確認された。また、PMMoV の濃度は、懸濁態よりも溶存態画分の方が 1 log₁₀ 程度高く、大部分が溶存態画分に含まれていたことも、これまでの調査結果と同様の傾向だった。

PMMoV とノロウイルス GII または RVA の濃度の関係を調べるために、2018 年 1 月以降に採水されたすべての試料 (N=147) について濃度をプロットした (図 1)。その結果、PMMoV は、水源においてノロウイルス GII よりも濃度が高く、ノロウイルス GII が陽性だった試料はすべて PMMoV が陽性だった。一方で RVA に対しては、大部分の試料で PMMoV の方が高い濃度で検出されたが、一部の試料では RVA の濃度が高かった。このような試料が採水された浄水場は、3 年間の調査で 7 箇所に限られており、特徴として水源上流域に都市が含まれていなかった。このことから、リアルタイム RT-PCR によってこれらの試料から検出された RVA 株の多くは動物由来と考えられた。PMMoV がヒト病原ウイルスよりも高濃度で原水に含まれるという指標ウイルスに求められる条件をさらに検証するために、環境試料を対象とした RVA 遺伝子型解析手法を新たに開発した。

C2. RVA 遺伝子型解析のための nested PCR アッセイの開発

(1) VP7, VP6, および VP4 遺伝子を対象としたプライマーの設計

2019 年 4 月から 9 月に掛けて毎月収集した水道原水試料から濃縮・抽出した RNA 試料を用いて、RVA の遺伝子型特定領域を対象に設計した 8 つのプライマーセットを試験した。その結果、ヒト RVA の VP7, ヒトおよび動物の VP6, ヒト RVA の VP4 の 4 つで増幅が確認された。この 4 つのプ

ライマーセットの外側に 1 st PCR 用のプライマーセットを設計し、nested PCR アッセイとした。すなわち、ヒトの VP7 について A および B、ヒトの VP6 について C、動物の VP6 について D、ヒトの VP4 について E および F の計 6 つの nested PCR アッセイを開発した。

(2) 検出感度の評価

開発した 6 つの nested PCR アッセイの検出感度をサンプルセット 1（都市および畜舎の排水を含む河川水）を用いて調べた結果、A を除いた B～F の 5 つのアッセイで増幅が認められた。RVA による胃腸炎の流行のピーク時を含み、濃度が最も高い 4～6 月の試料では、B～F のアッセイすべてで増幅が確認された。また、C、D、E のアッセイでは、全ての試料からアンプリコンを得ることに成功した。

次に B～F のアッセイの検出感度をサンプルセット 2（PMMoV よりも RVA 濃度が高かった試料：畜舎や集落の排水を含む河川、ダム、湖沼水）を用いて試験した結果、それぞれのアッセイで増幅が認められた。RVA 濃度が最も低い試料（2.9 \log_{10} copies/L）でも B～E の 4 つのアッセイで増幅が確認され、リアルタイム RT-PCR と同程度の検出感度だった。しかしながら、次に濃度が低い 2 試料（3.0 および 3.6 \log_{10} copies/L）では、全てのアッセイで増幅されなかった。当該試料では、プライマーとミスマッチがある RVA 株が含まれていた可能性が考えられた。

(3) 配列解析

サンプルセット 1 から取得した VP7、VP6、および VP4 のアンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析した結果、ヒトおよび動物に由来する複数の遺伝子型が検出された。図 2 には、一例として VP7 のアンプリコンについて構築された OTU 配列に基づく系統樹を示した。VP7 の塩基配列によって決定される G 遺伝子型としては、ヒトでは G8、G3、G2 の 3 つの遺伝子型が検出され、動物ではブタの G5 および G4、ウシの G6 および G10 が検出された。

表 1 には、VP4 のアンプリコン解析によって特定された P 遺伝子型の検出割合を 2019 年 4 月から 2020 年 3 月に採水された試料別に示した。ヒ

トの野生株としては、P[8]、P[6]、P[4]、P[9]の 4 つの遺伝子型が、ワクチン株としては、RotaTeq に由来する P[5]および P[8]の遺伝子型が検出された。ヒト RVA 株の配列に基づき設計したプライマーセットであるが、P[6]のブタ、P[5]のウシに近縁な配列も検出された。検出頻度が最も高かった遺伝子型は、国内においてヒトでの流行が認められている P[8]¹²⁾であり、12 月および 3 月を除いた 10 試料において 22～100%の配列割合で検出された。VP6 のアンプリコン解析では、ヒト、ブタ、ウシに加えて、ウマの I 遺伝子型も検出された。

以上のように、VP7、VP6、および VP4 を対象に新たに開発した nested PCR アッセイと次世代シーケンサー解析を組み合わせることによって、水道原水に含まれる RVA の実態が明らかになった。すなわち、都市および畜舎の排水が含まれる原水には、遺伝的に多様な RVA 株が含まれており、ヒトに由来する野生株およびワクチン株、動物ではブタ、ウシ、ウマに由来する株が検出され、それらが経時的に変化していた。本手法を用いて、PMMoV よりも RVA 濃度が高かった試料（サンプルセット 2）を解析することで、遺伝子型の検出割合に基づきヒト健康リスクを適切に評価すること、および PMMoV の指標ウイルスとしての有用性をさらに検証することが可能となる。次年度は、上記に取り組む予定である。

C3. 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

浄水場 C において上述した濃縮法を適用し、PMMoV の処理性を評価した（図 3）。原水における PMMoV 濃度は $10^{0.3-1.3}$ copies/mL となり、濃縮との組み合わせにより定量可能な程度の濃度で存在していることが明らかとなった。また、凝集-繊維ろ過水における PMMoV 濃度は $10^{-0.9-0.7}$ copies/mL となり、いずれの採水日においても原水と比べて濃度の低減が確認された。従って、凝集-繊維ろ過処理はウイルスの除去に有効であることが示された。また、得られた除去率は、0.6-1.1 log（平均: 0.7 log）であった。UF 膜ろ過水（浄水）における PMMoV 濃度は $10^{<-3.5-1.3}$ copies/mL となり、凝集-繊維ろ過水（UF 膜ろ過前水）に比べて濃度の低減が確認された。従って、UF 膜ろ過処理はウイルスの除去に有効であることが示された。

また、得られた除去率は、1.7→2.6 log（定量下限値以下であった試料を除いた平均: 1.9 log）であり（凝集-繊維ろ過後と UF 後の差）、昨年度までに報告した凝集沈澱-砂ろ過処理及び凝集-MF 膜ろ過処理における PMMoV の除去率（平均: 1.6 log 及び 1.0 log）に比べて高い値であった。これまでに実施した UF 膜ろ過処理の室内実験において、PMMoV の除去率は、水系感染症ウイルスの除去率と同程度であったことから¹³⁾、PMMoV が UF 膜ろ過処理により 2 log 程度除去される浄水場 C においては、水系感染症ウイルスも同程度除去されるものと推察された。

C4. 塩素処理における病原ウイルスの不活化特性評価

コクサッキーウイルス B5 型の 9 log 不活化に必要な塩素処理条件を明らかにするため、70 L の大容量での室内実験を実施した。塩素処理におけるコクサッキーウイルスの不活化率を図 4 に示す。濃縮法と組み合わせることにより、最大 9.5 log 以上のコクサッキーウイルスの不活化率が確認され、9 log 不活化に必要な CT 値は 40 mg-Cl₂-min/L 程度であることが明らかとなった。

これまでに PMMoV の除去性を評価した浄水場 A（凝集沈澱-砂ろ過処理によって 1.6 log の除去率）、B（凝集-MF 膜ろ過処理によって 1.0 log の除去率）、C（UF 膜処理によって 1.9 log の除去率）においては、配水池出口に至るまでに少なくともそれぞれ 920, 840, 1,300 mg-Cl₂-min/L の CT 値が確保されていることから、物理的処理の後段で実施されている塩素消毒によって病原ウイルスの 9 log 不活化は達成されていると判断された。また、上述したように、これらの浄水場においては、1 log 以上のウイルス除去が期待できることから、浄水処理全体で 10 log の病原ウイルス低減が達成されているものと判断された。

C5. ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅を考慮した不活化モデルの構築

(1) 遊離塩素消毒試験

実験室株 MS2, fr と多摩川、相模川で単離された GI タイプの野生株計 35 株の消毒試験を行い、算出した各株の 4 log の不活化に必要な CT 値を図 5 に示す。相模川の GI 株の不活化速度定数は、

多摩川の GI 株より有意に低かった（Wilcoxon 順位和検定: $P < 0.05$ ）。

対数正規分布とガンマ分布でいずれがより実験で得られた分布に近いかを AIC により判断した。多摩川では、対数正規分布、ガンマ分布を仮定した際の AIC はそれぞれ、-107.4, -106.9 であった。相模川ではそれぞれ、-113.8, -113.2 であった。したがって、いずれの河川においても対数正規分布の方がより適合することが示唆された。

不活化速度定数が対数正規分布にしたがう際のパラメータは、多摩川、相模川でそれぞれ(μ, σ)=(-2.18, 0.15), (-2.33, 0.07)と推定された。なお、Kolmogorov-Smirnov 検定における P 値が両者とも 0.05 以上であり、対数正規分布に従い得ることが示唆された。

(2) 耐性分布幅が種の全体不活化率の推定に及ぼす影響

4 log, 8 log 不活化に必要な CT 値は、それぞれ 90, 197（多摩川）、98, 201（相模川）mg sec L⁻¹と予測された。GI 種の実験室株である MS2 の不活化率に基づいた水質管理は、環境中の多様な GI 種の不活化を過大評価することが示唆された。また、その乖離は想定する不活化率が高いほど小さくなることが示唆された。実際の環境サンプルの不活化率の推測の際には、種内の遊離塩素耐性のばらつきに関する情報を算入すべきである。

E. 結論

ウイルスの表流水中存在形態に関する情報も収集しながら、平成 30 年度から継続して全国の水道水源における病原ウイルスおよび PMMoV の汚染実態を調査した。3 年間に渡る実態調査の結果、ノロウイルス GII が陽性だったすべての試料では、PMMoV も陽性であり、かつ PMMoV 濃度が高かった。PMMoV は、ほとんどの試料において RVA よりも濃度が高かったが、都市排水が含まれないと考えられる一部の水源では、RVA の濃度の方がわずかに高かった。以上の結果から、PMMoV は表流水を水源とする浄水場のウイルス除去指標として有用であることをサポートするデータが蓄積された。

RVA の遺伝子型特定領域 (VP7, VP6, VP4) を高感度に増幅する nested PCR アッセイを開発し

た。RVA 濃度が低い原水試料でも増幅が確認され、リアルタイム RT-PCR と同程度の感度だった。アンプリコンを次世代シーケンサーを用いて解析した結果、ワクチン株である RotaTeq に由来する配列も含め、ヒトおよび動物に由来する複数の遺伝子型が検出された。本手法を PMMoV よりも RVA の濃度が高かった水道原水試料に適用することで、水源における RVA 汚染実態の理解が進み、PMMoV の有用性がさらに示されることが期待される。

浄水場 C において、PCR 法にて評価した UF 膜ろ過処理による PMMoV の除去率は 1.7→2.6 log であり、定量下限値以下であった試料を除いた除去率の平均値は 1.9 log であった。PMMoV が UF 膜ろ過処理により 2 log 程度除去される浄水場 C においては、水系感染症ウイルスも同程度除去されるものと推察された。

高い塩素処理耐性を有するコクサッキーウイルス B5 型の 9 log 不活化に必要な塩素処理の CT 値は 40 mg-Cl₂·min/L 程度であることが明らかとなった。本研究でこれまでに対象とした浄水場 A, B, C においては、塩素消毒として配水池出口に至るまでに少なくとも 840–1,300 mg-Cl₂·min/L の CT 値が確保されていることから、塩素処理により病原ウイルスの 9 log 不活化は達成されていると判断された。また、浄水処理全体で 10 log の病原ウイルス低減が達成されているものと判断された。

塩素処理済み 2 次処理水が流量の多くを占める多摩川、相模川にて F 特異 RNA フェージ GI 型株を単離し、遊離塩素消毒試験を実施した。その結果、(i) 多摩川では、野生株 18 株中の 13 株、相模川では 17 株すべてで塩素耐性は、実験室株 MS2 と比べて有意に高かった。また、(ii) 実験室株 MS2 の 8 log 不活化が期待できる CT 値で、多摩川、相模川に存在する GI 型フェージを消毒した場合、全体不活化率は、それぞれ 5.6 log, 5.3 log にとどまることが推測された。したがって、実験室株 MS2 に基づく不活化効果の推定では、実際の不活化率を 2.4–2.7 log 程度過大評価する可能性がある。一般に、ウイルスの消毒効果を議論する際に実験室株を用いた実験の知見が用いられることを考慮すると、実際の環境サンプルの不活化率の推測の際には、種内の遊離塩素耐性のばらつきに関する情報を算入すべきである。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Koriki, S. Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Research*, 186, 116409, 2020.
- 2) 鳥居将太郎、片山浩之。ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅が全体不活化率の推定に及ぼす影響。土木学会論文集 (G), 76, III_423–III_429, 2020.
- 3) Torii S, Itamochi M, Katayama H, Inactivation kinetics of waterborne virus by ozone determined by a continuous quench flow system. *Water Research*, 186, 116291, 2020.
- 4) Canh, V.D., Furumai, H., Katayama, H. Effect of viral genome property on the efficiency of viability (RT-)qPCR. 土木学会論文集 (G), 76, III_189–III_196, 2020.
- 5) Canh, V.D., Torii, S., Furumai, H., Katayama, H., 2020. Application of Capsid Integrity (RT-)qPCR to Assessing Occurrence of Intact Viruses in Surface Water and Tap Water in Japan. *Water Research*, 189, 116674, 2020.

2. 学会発表

- 1) 白崎伸隆, 松村拓哉, 白川大樹, 高力聡史, 松下拓, 松井佳彦。膜ろ過浄水施設におけるウイルスの処理性評価：陽電荷膜と限外ろ過膜を組み合わせたウイルス濃縮法の適用。第 23 回日本水環境学会シンポジウム (オンライン開催), 2020/9/9–10.
- 2) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsumura, T., Koriki, S., Matsushita, T. and Matsui, Y. Evaluation of virus reduction efficiency in coagulation-microfiltration by a full-scale study and lab-scale experiments. *Water and Environment Technology Conference Online*

2020, 7-8 November 2020.

- 3) 白川大樹, 山下玲菜, 高力聡史, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 凝集沈澱-砂ろ過処理におけるウイルスの除去性-実浄水処理場における調査および室内添加実験の実施による評価-. 令和2年度水道研究発表会 (開催中止による誌上発表), 2020/11/18-20.
- 4) 瀧野博之, 三浦尚之, 小田琢也, 佐野大輔, 秋葉道宏. 浄水試料からのウイルス RNA 回収率向上に向けた検討. 令和2年度水道研究発表会 (開催中止による誌上発表). 論文集, 610-611, 2020.
- 5) 鳥居将太郎, 片山浩之. ウイルス種内の遊離塩素耐性分布幅が全体不活化率の推定に及ぼす影響. 第57回環境工学研究フォーラム (オンライン開催), 2020/12/9-11.
- 6) Canh, V.D., Furumai, H., Katayama, H. Effect of viral genome property on the efficiency of viability (RT-)qPCR. 第57回環境工学研究フォーラム (オンライン開催), 2020/12/9-11.
- 7) 松村拓哉, 白川大樹, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 低圧膜ろ過処理におけるウイルスの除去性: 実浄水処理場における調査および室内添加実験の実施による評価. 第55回日本水環境学会年会 (オンライン開催), 2021/3/10-12.
- 8) 高橋大河, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ウイルスの水道水質基準制定に向けた塩素処理の有効性評価: ヒト腸管系ウイルスおよびヒトコロナウイルスの不活化特性の把握. 第55回日本水環境学会年会 (オンライン開催), 2021/3/10-12.
- 9) 三浦尚之, 門屋俊祐, 瀧野博之, 佐野大輔, 秋葉道宏. 次世代シーケンス解析による水道原水中ロタウイルスの遺伝的多様性評価. 第55回日本水環境学会年会 (オンライン開催), 講演集, 250, 2021.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む.)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

I. 参考文献

- 1) Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M. Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water Res.* 144, 1-12, 2018.
- 2) 秋葉道宏, 三浦尚之, 北澤弘美, 小田琢也, 佐野大輔. 水源における病原ウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスの汚染実態調査, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」令和元年度研究報告書, 33-44, 2020.
- 3) 松井佳彦, 白崎伸隆, 松下拓. 凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価, 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 「化学物質等の検出状況を踏まえた水道水質管理のための総合研究」令和元年度研究報告書, 45-53, 2020.
- 4) Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Katayama, H., Asami, M. and Akiba, M. Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms. *Food and Environmental Virology* 4(3), 93-101, 2012.
- 5) Miura, T., Gima, A. and Akiba, M. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food and Environmental Virology* 11(1), 9-19, 2019.
- 6) U.S. Environmental Protection Agency. Six-Year Review 3 Technical Support Document for Microbial Contaminant Regulations, EPA 810-R-16-0210, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2016.
- 7) Katayama, H., Shimasaki, A., and Ohgaki, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol.* 68(3), 1033-1039, 2002.

- 8) Wolf, S., Hewitt J. and Greening, G.E. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1388–1394, 2010.
- 9) Haramoto, E., Fujino, S. and Otagiri, M. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.*, 520, 32–38, 2015.
- 10) Delignette-Muller M.L. and Dutang, C. *fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions*, *J. Stat. Softw.*, 64, 1–34, 2015.
- 11) 国立感染症研究所. 病原微生物検出情報, ノロウイルス等検出状況 2020/21 シーズン (2021年3月31日現在報告数, <https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-noro.html>)
- 12) 藤井克樹. ロタウイルスワクチン導入後の流行株の変化, *病原微生物検出情報*, 40(12), 204–205, 2019.
- 13) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Research*, 115, 29–39, 2017.

表 1. RVA VP4 のアンプリコン解析によって特定された P 遺伝子型の検出割合[%]

採水 年月	P[8] Human	P[5] RotaTeq	P[6] Porcine	P[8] RotaTeq	P[6] Human	P[4] Human	P[9] Human	P[5] Bovine	Undeter mined
2019/4	96.8	0	0	0	0	2.0	1.3	0	0
5	97.8	0	0	0	0	0	1.8	0	0.4
6	73.4	19.3	0.6	0	0	2.1	0	3.7	1.0
7	31.1	32.2	34.6	0	0	0	0	0	2.0
8	100	0	0	0	0	0	0	0	0
9	42.2	0	54.5	2.9	0	0	0	0	1.6
10	86.4	0	2.14	0	1.4	0	0	0	3.8
11	89.1	0	10.9	0	0	0	0	0	0
12	0	0	66.7	0	0	0	0	0	33.3
2020/1	22.2	64.4	12.1	0	0	0	0	0	1.3
2	53.2	0	45.2	0	0	0	0	0	1.6
3	0	84.9	8.4	0	0	0	0	0	6.7

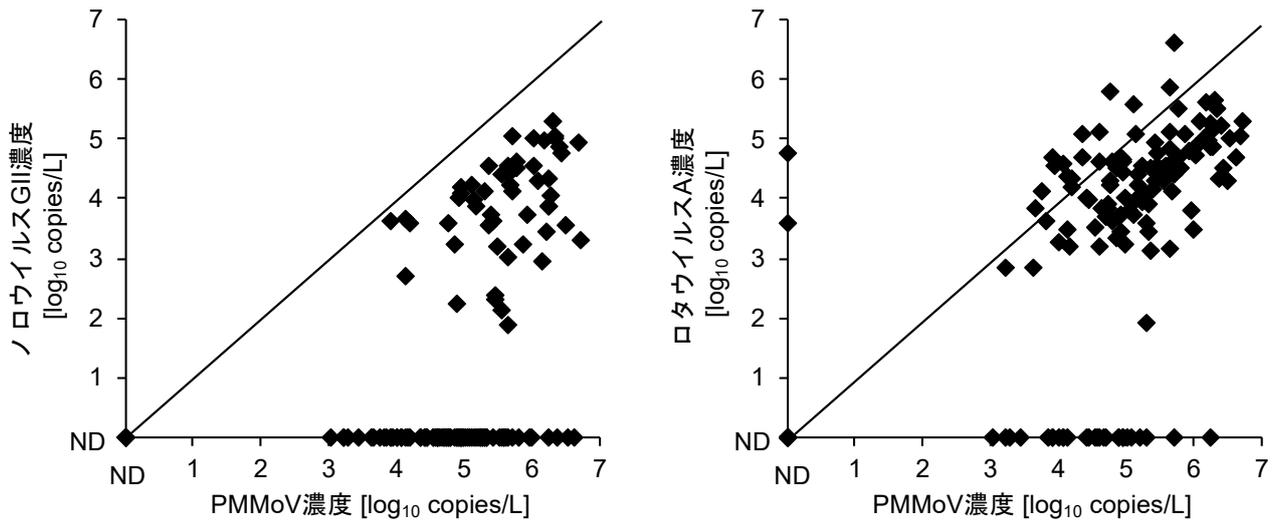


図 1. 水道原水中の病原ウイルスと PMMoV 濃度の関係。2018 年 1 月から 2021 年 1 月に採水された合計 147 試料のデータをプロットした。

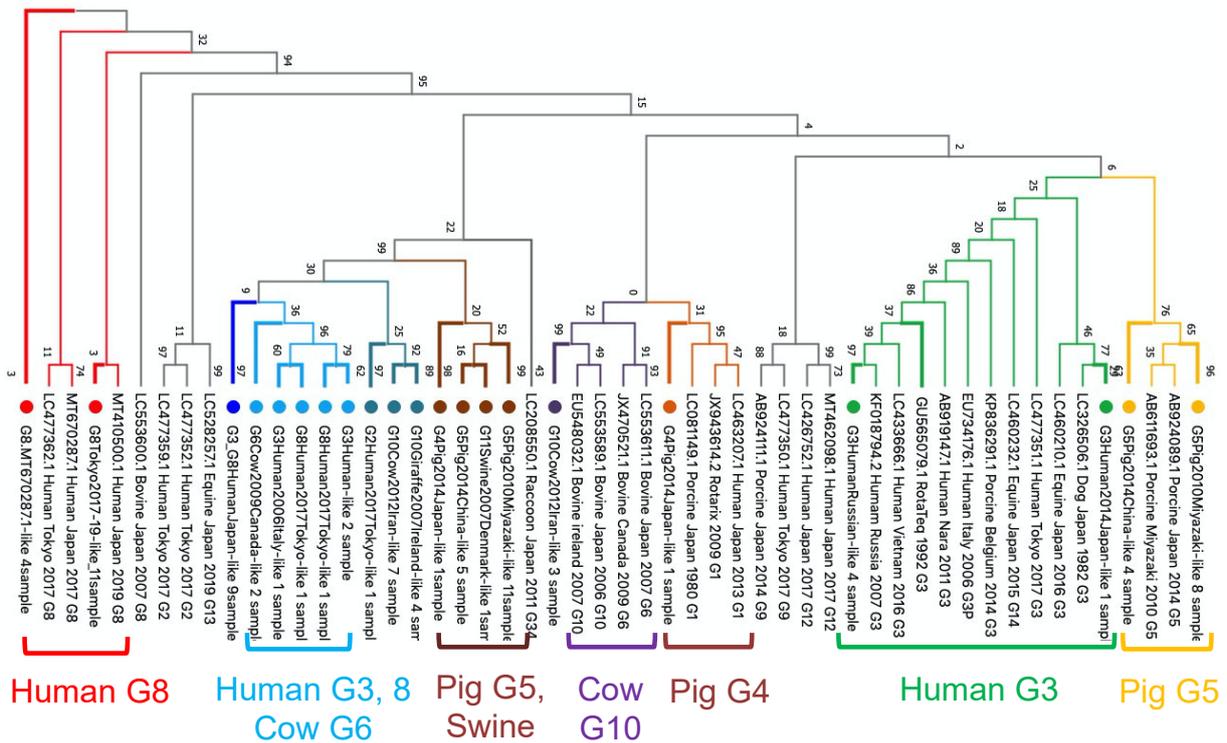


図 2. RVA VP7 のアンプリコンについて構築された OTU 配列に基づく系統樹。●: サンプルの OTU 配列を含む。"x" sample はその枝に x 個のサンプル OTU 配列が含まれることを意味する。

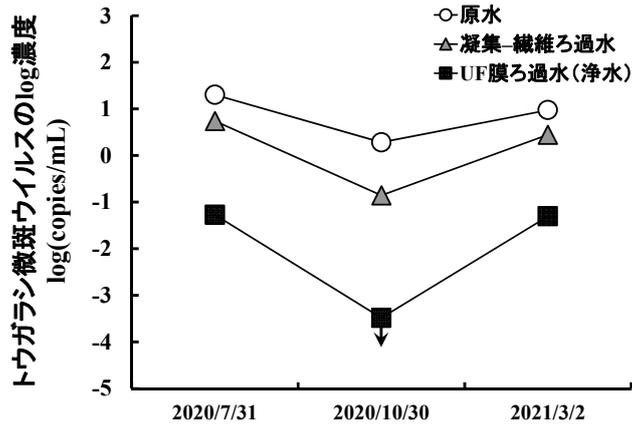


図3. 浄水場Cの各処理工程水におけるPMMoV濃度

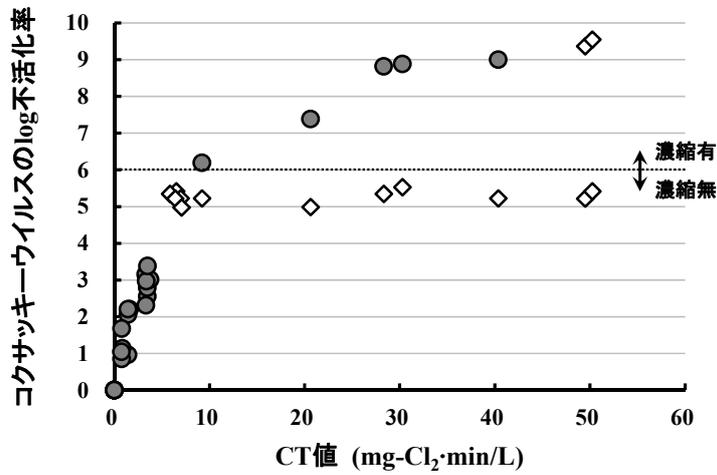


図4. 塩素処理におけるコクサッキーウイルスの不活化特性. 白抜きのは値は定量下限値以下であったため, 定量下限値をプロットした.

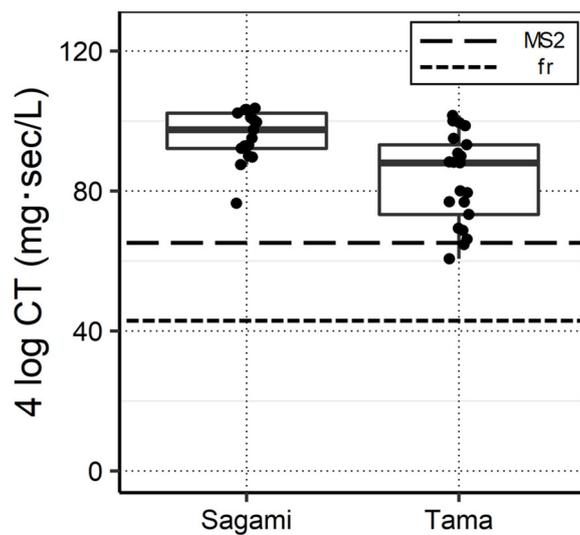


図5. 多摩川, 相模川で検出されたF特異RNA大腸菌ファージGI株の4 log CT値. 各河川の野生株は黒丸, 実験室株MS2を長破線, frを短破線で表示した.