

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3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	東京大学 大学院工学系研究科
	三浦耀平	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

本研究では、浄水処理プロセスにおけるウイルス除去を示す遺伝子マーカーとして、トウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）の有効性を示すことを目的として、これまでに原水においてPMMoVよりも高濃度で検出される場合が見られたロタウイルスA（RVA）の遺伝子型分布（宿主動物）を明らかにした。PMMoVよりもRVA濃度が高かった7地点の浄水場原水試料からは、ウシやブタのRVA遺伝子型が高頻度で検出された。また、一部ではヒトの遺伝子型が優占した試料も確認され、遺伝子型を解析し宿主動物を特定することが重要であることが示された。国内21箇所の浄水場において3年間に渡ってろ過水および浄水試料（それぞれN=105）を収集し、PMMoVの実態を調査した。PMMoVは、ろ過水で4.8–43%、浄水で9.5–48%の試料から検出され、濃度の最大値はろ過水、浄水ともに $3.4 \log_{10}$ copies/Lだった。UF膜ろ過処理を実施している国内の浄水場におけるPMMoVの除去率を評価した。昨年度及び今年度実施した合計5回の採水において、浄水場ZのUF膜ろ過処理によるPMMoVの除去率は $1.7 \rightarrow 2.6 \log$ であり、除去率の平均値（定量下限値以下の値を除く）は $2.1 \log$ となったことから、UF膜ろ過処理のウイルス除去への有効性が示された。

塩素消毒における病原ウイルスの不活化を保証するCT値を検討することを目的として、高不活化率を評価可能な大容量の実験系を用いることにより、塩素消毒の対象となる水（塩素処理対象水）の水質の差異がコクサッキーウイルスB5型（CVB5）の不活化率に与える影響を評価した。その結果、塩素処理対象水のpHは、CVB5の不活化に大きく影響し、pH7.0のリン酸バッファーを用いた場合においては、 $9 \log$ 不活化に必要なCT値は $40 \text{ mg-Cl}_2 \cdot \text{min/L}$ 程度であったのに対し、pH8.0においては、 $100 \text{ mg-Cl}_2 \cdot \text{min/L}$ 程度のCT値が必要であることが明らかとなった。一方、実際の塩素消毒が行われている実浄水場の砂ろ過水（pH7.1–7.2）を用いた場合のCVB5の不活化率は、pH7.0のリン酸バッファーを用いた場合と概ね同程度であったことから、塩素処理対象水（濁度が管理されている水）のpHが同程度の場合においては、水質の差異がウイルスの不活化に与える影響は小さいものと判断された。本研究でこれまでにPMMoVの除去性を評価した浄水場X、Y、Z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 $840\text{--}1,300 \text{ mg-Cl}_2 \cdot \text{min/L}$ のCT値が確保されていることから、塩素処理対象水の水質の差異を考

慮した場合であっても、浄水場で実施されている塩素消毒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、塩素耐性が高いことが報告されるエンテロウイルスを幅広く調査し、遊離塩素耐性の高いウイルスを同定した。その後、水道水質がウイルスの不活化に与える影響を調査し、年間を通じて 8 log の不活化を達成するために必要な遊離塩素 CT 値の推定を行った。

水道事業者の水質担当者がろ過水や浄水中の PMMoV を検査することを想定し、PMMoV を添加した水道水試料を用いて検査方法を検討した結果、40 mL の試料から 40 µL の核酸を抽出・精製するキットを用いることで、水道水に 10³ copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を検出できることがわかった。

A. 研究目的

微生物（ウイルス）分科会では、水道における病原ウイルスのリスク管理方法として、浄水処理プロセスにおけるウイルス除去の指標としてトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）を用いること、および塩素消毒による病原ウイルスの不活化を保証するパラメータとして CT 値（C: 遊離塩素濃度 × T: 接触時間）を用いることを検討している。今年度は、浄水処理プロセスにおけるウイルス除去遺伝子マーカーとしての PMMoV の有効性、塩素消毒における病原ウイルスの不活化を保証する条件、および水道事業者の水質担当者が実施しやすい PMMoV 検査方法を示すことを目的として、以下に示す 6 つの研究タスクを実施した。

1) PMMoV よりもロタウイルス A（RVA）濃度が高かった原水試料に含まれる RVA の遺伝子型解析

2) 表流水を水源とする国内 21 箇所の浄水場におけるろ過水および浄水中の PMMoV の実態調査

3) 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV 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) 水質による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評価

6) 水道水中の PMMoV 検査方法の検討

これら 6 つのタスクの具体的な目的・概要を以下に示す。

A1. 原水の RVA 遺伝子型解析

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。これまでに本研究グループで行った調査研究の結果、原水（表流水）中において PMMoV は、ノロウイルス GII および RVA よりも概ね高い濃度で検出されること^{2,3)}、地下水からは最大 10² copies/L のオーダーで検出される場合があることが示された^{2,4)}。また、表流水を取水する浄水場において PMMoV よりも RVA 濃度が高い原水試料が確認されたため²⁾、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³⁾。今年度は、開発した手法を用いて、PMMoV よりも RVA 濃度が高かった原水試料中の RVA 遺伝子型を解析し、汚染源となる宿主動物を明らかにすることを目的とした。

A2. ろ過水・浄水の PMMoV 実態調査

これまでに、実規模の浄水場において採水されたろ過水や給水栓水試料から PMMoV の検出報告はあるが^{5,6)}、国内の複数の浄水場における実態は調査されてこなかった。PMMoV は塩素処理によって遺伝子数がわずかにしか減少しないことが知られており、前塩素処理や中間塩素処理を実施している浄水場においてもウイルス除去遺伝子マーカーとして利用できると考えられる。本研究タスクでは、国内 21 箇所の浄水場から原水、ろ過水、浄水試料を収集し、PMMoV の実態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

昨年度までに、PMMoV を効果的に濃縮・回収可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 の処理性評価に成功し

ており、1-2 log 程度の除去率が得られることを報告している⁷⁾。また、UF 膜ろ過処理を実施している実浄水場における PMMoV の処理性評価についても実施しており、限られた採水回数ではあるものの、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) の除去率が得られている。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調査を継続し、PMMoV の処理性を明らかにすることを目的とした。

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)^{8,9)}、粒子除去工程 (凝集沈澱-砂ろ過処理, 凝集-MF 膜ろ過処理, UF 膜ろ過処理) において期待されるウイルスの低減率 (1-2 log 程度)、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、最大 9 log のウイルス低減を後段の塩素消毒により達成する必要があるものと考えられる。このような状況を踏まえ、昨年度は、ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験系を構築・適用することにより、pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた場合、40 mg- Cl_2 -min/L 程度の CT 値で塩素処理耐性の高いコクサッキーウイルス B5 型 (CVB5)¹⁰⁾ を 9 log 不活化できることを報告している。今年度は、pH 8.0 のリン酸バッファー及び実際の塩素消毒が行われている実浄水場の砂ろ過水を用いた大容量の塩素処理実験を実施し、CVB5 の 9 log 不活化に必要な塩素処理条件を明らかにすることを目的とした。

A5. 水質による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評価

都市河川では、上流都市の下水処理水が下流都市の水道水源として利用され、下水処理水の非意図的間接利用が行われており¹¹⁾、通常の水道であっても、下水の飲用再利用と同様の安全確保が望ましい。下水再生水のリスク管理に先進的に取り組むアメリカ (例: カリフォルニア州) では、流入下水に対して、12 log のウイルス低減が必要であることを示している¹²⁾。例えば、下水処理として標準活性汚泥法 (2 log 程度)、浄水処理において凝集沈澱・砂ろ過 (2 log 程度) を行っている場

合、8 log のウイルス除去が消毒にて達成されなければならない。したがって、消毒工程におけるウイルスの正確な不活化予測は極めて重要である。

遊離塩素消毒で達成できるウイルス不活化率は、原水の水温、pH に応じて推測がされている。例えば、USEPA では、目標不活化率を達成するために必要な CT 値を定め、遊離塩素によるウイルス不活化率を保証している¹⁰⁾。必要 CT 値は、Sobsey et al.¹³⁾によるリン酸緩衝液 10 mM 中の A 型肝炎ウイルスの不活化実験で得られた CT 値に安全率 3 を乗じた値となっている。これまで、水質変動はこの安全率によって保証されることが明らかにされている一方で、特定の遊離塩素耐性を有すウイルス種 (CVB5) は、安全率を掛けた CT 値をもっても目的の不活化率が達成されないことが明らかとなった¹⁴⁾。CVB5 は、塩素消毒においてももっとも消毒耐性が高いウイルスとして認知されている。

本研究タスクでは、まず、計 34 株のエンテロウイルスのウイルス株 [コクサッキーウイルス B3 (CVB3) : 9 株, CVB4: 10 株, CVB5: 13 株, エコーウイルス 11 (E11) : 2 株] を対象とし、実験室条件で様々なエンテロウイルスの遊離塩素耐性を明らかにした。その後、遊離塩素耐性の高いウイルスについて、実際の水道水中での不活化率を調査した。その後、実際の水質データから水温の変動を考慮してウイルス学的安全性を担保するための CT 値を推定した。

A6. 水道水中の PMMoV 検査方法の検討

検出結果が浄水処理プロセスにおけるウイルスの除去を確認する指標としてろ過水や浄水の PMMoV を検査する場合には、PMMoV 濃度がリスク評価に基づき設定された目標値以下であることを確認する。飲料水中に許容されるウイルス濃度 (10^5 個/L) 以下にリスクを管理するために、例えば、日本の水道原水における水系感染症ウイルスの濃度^{8,9)}、粒子除去工程に期待される低減率、および塩素消毒で達成される不活化率を考慮すると、ろ過水や浄水における PMMoV 濃度の目標値は 10^4 copies/L と試算される。本研究タスクでは、水道事業者の水質担当者が簡便に検査できる方法で、水道水試料に 10^3 copies/L の濃度で含まれる PMMoV が検出できる感度を有する

方法を選定することを目的とした。

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. 原水の RVA 遺伝子型解析

2018年1月から2020年10月に掛けて国内21箇所の浄水場から収集した原水試料のうち、PMMoVよりもRVA濃度が高かった試料(N=19)を対象にRVAの遺伝子型を特定する領域(VP7およびVP4)をnested PCRにより増幅した。Nested PCRの条件は、1stおよび2nd PCRともにアニーリング55°Cで35サイクルによる増幅を行った。

取得したVP7およびVP4のPCR産物(アンプリコン)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、BlastNで特定した近縁配列とともにMEGA Xを用いて系統解析を行った。

B2. ろ過水・浄水の PMMoV 実態調査

ろ過水や浄水におけるPMMoVの実態を明らかにするために、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、原水、ろ過水および浄水試料(原水は5–10L、ろ過水・浄水は10–20L)を収集した。対象浄水場は、これまでの実態調査と同様に、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。試料の採水は、2020年1月、10月、2021年1月、10月、2022年1月に実施し、それぞれ105検体を収集した。試料は、冷蔵状態で国立保健医療科学院に輸送した。

試料に含まれるPMMoVは、陰電荷膜法¹⁵⁾により濃縮した。すなわち、試料1LにプロセスコントロールとしてマウスノロウイルスS7-PP3株をおよそ 10^8 copies 添加・混合し、塩化マグネシウムを原水は25 mM、ろ過水・浄水は50 mMとなるように添加・混合した。続いて、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)でろ過しウイルスを膜に吸着させ、0.5 mMの希硫酸を200 mLろ過することで酸洗浄を行った。原水試料は、1 mMの水酸化ナトリウム水溶液を10 mLろ過し、誘出したウイルスを含むろ液をウイルス濃縮液とした。ろ過水および浄水試料は、水酸化ナトリウム水溶液をろ過せずに膜を回収した⁴⁾。回収したウイルス濃縮液および膜から、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。

B3. 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

UF膜ろ過処理を実施している実浄水場におけるPMMoVの除去性を評価するため、本研究で構築したウイルス濃縮法を適用し、浄水場Z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。2021年7月及び10月に浄水場Z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(浄水;膜ろ過方式:クロスフローろ過、膜ろ過流速:1.4 m/d、膜材質:酢酸セルロース、膜の分画分子量:150 kDa)100–2,000 Lを、ポンプを用いて5–6 L/minの初期流速にて専用ハウジングに収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、ハウジング内に残った試料水を破棄し、ここに、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回繰り返す(2回目の溶出時の浸漬時間は15分、3回目及び4回目の溶出時の浸漬時間は30分)、合計2 L

のビーフェキス溶液にウイルスを濃縮した（一次濃縮）。ウイルスを濃縮したビーフェキス溶液の pH を HCl にて 3.5 に調整した後、攪拌子を用いて 400 rpm にて 30 分間攪拌することにより、溶液中のビーフェキスを凝集した。これを 2,500 × g にて 15 分間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、pH 9.0 の 0.15 M リン酸バッファーを添加し、160 rpm にて 10 分間振とうすることにより、凝集フロックを溶解した。これを 4,000 × g にて 10 分間遠心分離した後、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 濃度を定量することにより、浄水場 Z 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。濃度の定量には、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 法を用いた。また、PMMoV 濃度を基に、浄水場 Z におけるト PMMoV の除去率 (Log 除去率 (Log[C₀/C]; C₀: 原水の PMMoV 濃度, C: 処理後の PMMoV 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

塩素処理における病原ウイルスの不活化特性を評価するため、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 CVB5 Faulkner 株を用いた大容量の塩素処理実験を実施した。4 °C に調整した pH 8.0 の 0.01 M リン酸バッファー、あるいは、凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している浄水場 D において採水した前/中間塩素添加の無い砂ろ過水 (2021 年 2 月採水 ; pH: 7.2, 濁度: 0.09 NTU, DOC: 0.5 mg/L, UV260: 0.007 cm⁻¹, アルカリ度: 11.6 mg-CaCO₃/L, 2021 年 7 月採水 ; pH: 7.1, 濁度: 0.08 NTU, DOC: 0.4 mg/L, UV260: 0.012 cm⁻¹, アルカリ度: 14.3 mg-CaCO₃/L) に、培養・精製した CVB5 を 10⁵ 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 0.9–1.1 mg-Cl₂/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（塩素処理終了時まで攪拌を継続すると共に、タンクの側面及び底面を保冷材で覆うことにより低水温条件を維持した）。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 CVB5 濃度をブ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 CVB5 の不活化率 (Log 不活化率 (Log[N₀/N]; N₀: 原水の感染性を有する CVB5 濃度, N: 処理後の感染性を有する CVB5 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（リン酸バッファーを用いた場合 26%, 砂ろ過水を用いた場合 22%）を考慮した。

B5. 水質による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評価

(1) ウイルス分離と精製、定量

2002 年から 2018 年にかけて、富山県内の下水処理場の流入下水から分離されたウイルスを使用した。分離されたウイルスの中和反応試験により、CVB3, CVB4, CVB5, E11 と判明した株からランダムに計 30 株を得た。それぞれの実験室株 CVB3 Nancy 株, CVB4 J.V.B 株, CVB5 Faulkner 株, E11 Gregory 株も調査対象とした。ウイルス株は超遠心により精製し実験に供した。

ウイルス濃度は MPN 法¹⁶⁾ (4 希釈段階, 5 連) により定量した。96 穴プレート上に希釈されたサンプルを 150 μL 接種し、37°C で 6 日間まで培養した。各希釈段階で細胞変性効果が表れたウェル数から統計的に元サンプルのウイルス濃度を定量した。

(2) エンテロウイルス 34 株の消毒試験

遊離塩素消毒試験は、回分式試験により実施した。50 mL ビーカーに 0.30 ± 0.04 mg/L の遊離塩素入りリン酸緩衝液 20 mL を用意した。ウイルス精製液 30 μL を投入後、30 – 90 秒ごとに 1 mL ずつ過剰量のチオ硫酸ナトリウムを含むチューブに

採取した。全ての遊離塩素濃度試験終了後の遊離塩素濃度は初期濃度と比べて 81%以上維持されていた。初期濃度と終濃度の平均を有効塩素とした。各ウイルス株に対してそれぞれ 2 回または 3 回ずつ実施した。

(3) 実際の水道水を使用した CVB5 の消毒試験

実験に使用する水道水試料を浄水場 α ($n = 7$), 浄水場 β ($n = 5$), 浄水場 γ ($n = 6$), 浄水場 δ ($n = 7$) より採取した。各浄水はリン酸緩衝液を 1 mM 加えることで pH を 7 に調整した。その後、リン酸緩衝液ではなく各浄水を使用すること以外は(2)と同様に試験を実施した。対象ウイルスは CVB5 実験室株とした。

(4) 不活化速度の解析

不活化速度の解析には、ウイルス不活化割合が消毒剤曝露量に対して擬一次反応で進むと仮定した Chick-Watson model を使用した。

$$\frac{N_T}{N_0} = e^{-kCT} \quad (1)$$

N_T : 時刻 T におけるウイルス濃度 (MPN/mL)

N_0 : 時刻 0 におけるウイルス濃度(MPN/mL)

C : 遊離塩素濃度(mg/L)

k :不活化速度定数 ($\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{L}$)

B6. 水道水の PMMoV 検査方法の検討

水道事業者の水質担当者がろ過水や浄水に含まれる PMMoV を検査することを想定し、簡便な前処理方法を検討した。すなわち、水試料に含まれるウイルスの濃縮操作を行わずに、水試料からウイルス RNA を直接抽出・精製するキットとして、Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, bioMérieux NucliSENS, および Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit を比較した(表 1)。Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit の 3 つのキットは、Qiagen QIAvac Connecting System および Qiagen QIAvac 24 Plus を吸引ポンプ (XX5510000, Millipore) に接続して使用した。bioMérieux NucliSENS は、専用の磁気ビーズプロセッサ miniMAG を使用した。国立保健医療科学院の実験室で採取した給水栓水試料 (pH 6.6–7.2, 電気伝導度 17.8–28.2 mS/m) に 40 g/mL のチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加することで残留塩素を除去し

たのち、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した流入下水試料を添加し PMMoV 濃度がおおよそ 10^6 copies/L となるように調製した。続いて、残留塩素を除去した給水栓水試料を用いて 10 倍連続希釈系列を作製し、PMMoV が 10^5 , 10^4 , および 10^3 copies/L の濃度で含まれる水道水試料とした。キットの推奨プロトコールを参考にして、Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, bioMérieux NucliSENS は 5 mL の水道水試料から、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit は 40 mL の水道水試料からウイルス RNA を抽出・精製した(表 1)。精製後の RNA 試料の体積は、Qiagen RNeasy Midi Kit は 200 μL , Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit および bioMérieux NucliSENS は 100 μL , Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit は 40 μL とした。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。

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. 原水の RVA 遺伝子型解析

2018 年 1 月から 2020 年 10 月の実態調査の結果、PMMoV よりも RVA の濃度が高かった原水試料は 19 試料あり、7 地点の浄水場で採水されていた(浄水場 A, C, D, G, O, R, U)。浄水場 D, G, U の一部の試料では、RVA の G 遺伝子型を決定する VP7 のアンプリコンが取得できなかったが、P 遺伝子型を決定する VP4 のアンプリコンはすべての試料から取得でき、MiSeq を用いた配列解析に供した。その結果、すべてのアンプリコンから RVA の配列が検出され、多くの配列について遺伝子型が特定された。図 1 には、各地点、あるいは各試料における G および P 遺伝子型の配列割合を示した。複数の試料において遺伝子型の検出傾向が同様であった浄水場 A, C, R は、それぞれの遺伝子型の配列数を合算し、割合を算出した(図 1 A)。同じ地点でも試料によって傾向が異な

った浄水場 G および U は、試料別に結果を示した (図 1 B).

浄水場 A, C, D, O, R では、すべての試料からウシやブタの遺伝子型が検出された。G 遺伝子型では、ウシの G10 が最も多く、試料中において 55–65% の割合で検出された (図 1 A)。また浄水場 C および R の原水試料からは、ウシの G6 が検出された。G10 および G6 は、それぞれ主に乳牛および肉牛から検出されることが報告されている¹⁷⁾。P 遺伝子型では、ウシの P[5] が最も多く (21–43%)、浄水場 O および R ではブタの P[23] が 24–25% の割合で検出された。検出されたウシやブタに由来する配列は、中国、タイ、米国などで報告された配列に近縁だった。また、浄水場 A, C, O, R では、ヒトの患者では報告がまれな P[14] が 8.3–21% の割合で検出され、当該原水試料がヒトの糞便によっても汚染されていることが示された。また、どの地点においても、RVA の遺伝子型が決定されない配列が 26–66% 検出された。これらは GenBank に登録のない配列であることから、ヒトよりも動物由来の配列が多く含まれていると推測された。

浄水場 G および U において 2018 年 9 月に採水された試料からは、ヒトでの検出報告が多い P[8]¹⁸⁾ が優占して検出された (34–63%, 図 1 B)。当該試料の採水日の天候は、いずれも雨だった。浄水場 G においては、2018 年 1 月および 2019 年 1 月の採水日の天候はそれぞれ晴れおよび曇りであり、ブタの遺伝子型が優占していたが、雨天時はヒト糞便に汚染される場合があることがわかった。以上の結果から、PMMoV よりも RVA の濃度が高い地点においては、主にウシやブタに由来する RVA の汚染が確認された。また、本研究で開発した nested PCR アッセイにより得られ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、RVA の遺伝子型、すなわち排出源となる宿主動物を特定することが可能となり、水源における糞便汚染の実態把握につながることを示された。

C2. ろ過水・浄水の PMMoV 実態調査

国内 21 箇所の浄水場から収集したろ過水および浄水試料中の PMMoV は、2021 年 10 月採水の試料において検出率が低かったが (それぞれ 4.8%,

9.5%)、それ以外の時期では検出率が概ね同程度で、ろ過水では 29–43%、浄水では 38–48% だった (表 2)。また、原水では 2021 年 10 月を除いて 95–100% の試料から PMMoV が検出された。当該期間に収集したろ過水および浄水試料からは、PMMoV が最大で $3.4 \log_{10} \text{ copies/L}$ の濃度で検出された。

図 2 には、浄水場別に原水、ろ過水、浄水試料中の PMMoV 検出濃度の平均値を示した。水源に都市排水が含まれる浄水場 E, F, I, J, N においては、PMMoV は原水から 10^6 copies/L のオーダーで検出されたが、高度処理が導入されている浄水場 J および N では、ろ過水や浄水試料ではほとんど不検出だった。また、高度処理が導入されていない浄水場 E, F, I のろ過水や浄水試料中の PMMoV 濃度は最大で $3.2 \log_{10} \text{ copies/L}$ であり、平均して $3 \log_{10}$ 程度除去されていた。

C3. UF 膜ろ過処理を実施している実浄水場における PMMoV の除去性

浄水場 Z において前述した濃縮法を適用し、PMMoV の処理性を評価した (図 3)。2021 年 7 月及び 10 月に採水した原水における PMMoV 濃度はそれぞれ $10^{1.9} \text{ copies/mL}$, $10^{1.2} \text{ copies/mL}$ となり、昨年度報告した原水濃度と同程度であった。また、凝集–繊維ろ過水における PMMoV 濃度はそれぞれ $10^{1.5} \text{ copies/mL}$, $10^{1.6} \text{ copies/mL}$ となり、凝集–繊維ろ過処理における PMMoV の除去率はそれぞれ 0.4 log, -0.4 log であった。昨年度報告した 3 回の採水において得られた除去率を合わせると、合計 5 回の採水において得られた除去率は、-0.4–1.1 log (平均: 0.5 log) であり、凝集–繊維ろ過処理によるウイルス除去は限定的、あるいはほとんど期待できないことが確認された。一方、2021 年 7 月及び 10 月に採水した UF 膜ろ過水 (浄水) における PMMoV 濃度はそれぞれ $10^{-0.7} \text{ copies/mL}$, $10^{-1.0} \text{ copies/mL}$ 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。また、UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去率はそれぞれ 2.2 log, 2.6 log となり、昨年度報告した 3 回の採水において得られた除去率 (1.7→2.6 log) と同程度であった。昨年度及び今年度実施した合計 5 回の採水において得られた除去率は、1.7→2.6 log (定量下限値以下であった試料を除いた平均: 2.1

log) であり (UF 後と繊維ろ過後の除去率の差), UF 膜ろ過処理のウイルス除去への有効性が示された。

C4. 塩素処理対象水の水質の差異が CVB5 の不活化に与える影響

塩素処理対象水の水質の差異が CVB5 の不活化に与える影響を評価するため, 昨年度実施した pH 7.0 のリン酸バッファーに加えて, pH 8.0 のリン酸バッファー及び実際の塩素消毒が行われている実浄水場の砂ろ過水を用いた大容量の塩素処理実験を実施した。pH 7.0 及び pH 8.0 のリン酸バッファーを用いた塩素処理における CVB5 の不活化率を図 4 に示す。pH 7.0 においては, 9 log 不活化に必要な CT 値は 40 mg-Cl₂·min/L 程度であったのに対し, pH 8.0 においては, 100 mg-Cl₂·min/L 程度の CT 値が必要であったことから, 塩素処理対象水の pH が CVB5 の不活化に大きく影響することが明らかとなった。pH 7.0 と pH 8.0 においては, 次亜塩素酸(HOCl)と次亜塩素酸イオン(OCl⁻)の存在比が異なり, pH 8.0 においては, HOCl に比べて消毒効果の低い OCl⁻の占める割合が大きいことから, pH 7.0 の場合に比べて 9 log 不活化に必要な CT 値が大きくなったと考えられた。

実浄水場の砂ろ過水を用いた塩素処理における CVB5 の不活化率を図 5 に示す。本研究で使用した pH 7.1-7.2 の砂ろ過水においては, いずれの場合も 20 mg-Cl₂·min/L 程度の CT 値で 7-8 log, 40 mg-Cl₂·min/L 程度の CT 値で 8-9 log の CVB5 の不活化率が確認された。また, 得られた不活化率は, pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた場合の不活化率と概ね同程度となったことから, 塩素消毒対象水 (濁度が管理されている水) の pH が同程度の場合においては, 水質の差異が CVB5 の不活化に与える影響は小さいものと判断された。

本研究で実施した塩素処理においては, CT 値の増加と共に CVB5 の不活化速度が低下する現象, すなわち, テーリング現象が確認された。テーリング現象の要因を明らかにするためには, 更なる検討が必要である。

上述したように, pH 7.0 の塩素処理条件に比べて消毒効果の低い pH 8.0 の条件下においても, 100 mg-Cl₂·min/L 程度の CT 値で CVB5 の 9 log 不活化が達成されることが明らかとなった。昨年度

報告したように, 本研究でこれまでに PMMoV の除去性を評価した浄水場 X, Y, Z 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, 塩素処理を実施する対象水の水質の差異を考慮した場合であっても, 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。

C5. 水質による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評価

(1) エンテロウイルス 34 株の消毒試験

各株の 4log 不活化に必要な CT 値を図 6 に示す。CVB3, CVB4, CVB5, E11 でそれぞれ 0.60~1.08, 0.46~1.34, 0.69~2.4, 0.16~0.28 mg min L⁻¹であった。CVB5 内における 4-log 不活化 CT 値の差は最大 3.4 倍であった。遊離塩素感受性は遺伝子型により有意差が認められ, CVB5 < CVB3 ~ CVB4 < E11 の順であった。また, CVB5 実験室株が属する Genogroup A の株の 4-log 不活化 CT 値は Genogroup B より有意に低かった。同様に, CVB4 J.V.B 株の属する Genogroup A に比べ, Genogroup B では遊離塩素感受性が低く, 2 つの Genogroup 間に有意差が認められた (p<0.05)。以上の結果から, エンテロウイルスの遊離塩素感受性は, カプシド蛋白をコードするゲノム配列の類似性により分類されたゲノムグループまたは遺伝子型に依存することが示唆された。

これらより, 遺伝型 CVB5 に属するエンテロウイルスはほかの遺伝型に比べて, 遊離塩素耐性が高いこと, また, CVB5 の株間でも遊離塩素耐性に違いがあることが明らかとなった。また, 遊離塩素耐性がカプシド領域の遺伝配列と関連する可能性が示唆された。

(2) 実際の水道水を使用した CVB5 の消毒試験

各浄水場 (α, β, γ, δ) における CVB5 Faulkner 株の不活化速度係数は 9.0 ± 2.7, 9.9 ± 1.7, 7.6 ± 1.7, 8.5 ± 1.3 mg⁻¹ min⁻¹ L であった。pH, 水温を除く水質成分が不活化速度係数に及ぼす影響は 1.3 倍と比較的小さいことが示唆された。

(3) 浄水処理の異なる 4 浄水場における CT 値の算出・比較

実測より推定した不活化速度定数 k を各浄水場

ごとでプールし、それぞれを対数正規分布としてパラメータを推定した。その後、年間を通じて 8 log の不活化を達成するために必要な CT 値を推定した。推定結果を図 7 に示す。実験室株の 8 log (99.99999%) 不活化に必要な CT 値は、2.6-4.2 mg・min/L となった。

さらに野生株の塩素耐性は、実験室株の 2.3 倍であると仮定して CT 値を算出したところ、6.0-9.7 mg・min/L となった。実測値の結果からは、処理方式が異なっても 4 浄水場間で CT 値に大きな違いは見られなかった。

また、上記の結果に水温を考慮した場合の必要 CT 値の推定結果を表 3 に示す。先行研究より、水温が低くなるほどウイルスの不活化が遅くなることが知られている。例えば、USEPA は 10 度水温が下がるごとに必要な CT 値が 2 倍となると推定している。ここでは、各浄水場の過去 10 年分の水温データを参照し、最低水温においても 8 log 不活化を達成するために必要な CT 値を推定した。その結果、最大値は 27.5 mg min L⁻¹であった。これは、残留塩素濃度が 0.5 mg/L の場合、1 時間の接触で 8 log が達成されることを示唆している。

C6. 水道水の PMMoV 検査方法の検討

PMMoV 濃度を 10⁶, 10⁵, 10⁴, および 10³ copies/L に調製した水道水試料から Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, bioMérieux NucliSENS, および Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit の 4 つのキットを用いてウイルス RNA を抽出・精製し、リアルタイム RT-PCR で PMMoV 濃度を定量した。その結果、10⁶ copies/L の試料では、どのキットでも同様の定量検出結果が得られたが、Qiagen RNeasy Midi Kit は 10⁵ copies/L の試料で他のキットと比較して検出濃度が低下し、10⁴ copies/L 以下では検出されなくなった (図 8)。10⁴ copies/L の試料では、Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit と bioMérieux NucliSENS で不検出となる試料がそれぞれ 3/6 検体、5/6 検体確認されたが、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit では 3/3 検体で陽性となった。さらに 1 オーダー濃度が低い 10³ copies/L の試料では、Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit では 2/4 検体で陽性となったが、検出濃度としては 10⁴ copies/L のオーダーとなった。Promega

Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit は、検出濃度にばらつきが見られたが 10³ copies/L の試料でも 3/3 検体で陽性となった。

本研究では、国立保健医療科学院の給水栓水試料を用いて RNA 抽出・精製キットの検出感度を比較したが、予備検討においては国内 21 箇所の浄水場の浄水試料に PMMoV を添加し、Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて水質の違いが PMMoV の検出濃度に与える影響も調査した。その結果、リアルタイム RT-PCR における Ct 値の平均値は 33.0、標準偏差は 0.54 であり、最大値と最小値の差は 2.3 Ct だった。Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit は、シリカメンブレンカラムを用いた精製を行う点で Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit と精製の基本原理は同一であり、水質の影響は同程度であると推測される。しかしながら、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit では検出感度向上のために二次精製を行うため、検出濃度のばらつきが大きくなる可能性もある。今後は、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit を用いて水質による影響を調査するとともに、水道事業者の水質担当者による評価を通じて、当該キットを用いた PMMoV 検査方法の有用性および有効性を検証する必要がある。

E. 結論

PMMoV よりもロタウイルス A の濃度が高い原水試料に含まれたロタウイルス A の遺伝子型を解析した結果、すべての地点からウシやブタの遺伝子型が高頻度で検出され、動物による汚染が顕著であることがわかった。一方で 2 箇所の浄水場では、雨天時に採水された試料においてヒトのロタウイルス A 遺伝子型が優占して検出され、ヒト糞便による汚染も明らかになった。ロタウイルス A の遺伝子型を解析することで汚染源となる宿主動物を特定できること、およびその重要性が示された。

国内 21 箇所の浄水場から収集したろ過水および浄水試料中の PMMoV は、ろ過水で 4.8-43%、浄水で 9.5-48%の試料から検出された。濃度の最大値はろ過水、浄水試料ともに 3.4 log₁₀ copies/L だった。

浄水場 Z において実施した合計 5 回の採水において、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 2.1 log であった。

塩素処理対象水の pH は、CVB5 の不活化に大きく影響し、pH 8.0 においては、9 log 不活化に必要な塩素処理の CT 値は 100 mg-Cl₂·min/L 程度であることが明らかとなった。pH 7.1-7.2 の砂ろ過水を用いた場合の塩素処理における CVB5 の不活化率は、pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた場合と概ね同程度であったことから、塩素消毒対象水（濁度が管理されている水）の pH が同程度の場合においては、水質の差異が不活化に与える影響は小さいものと判断された。昨年度報告したように、本研究でこれまでに対象とした浄水場 X, Y, Z 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、塩素処理対象水の水質の差異を考慮した場合であっても、浄水場で実施されている塩素消毒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。

CVB5 はほかのエンテロウイルスの遺伝型と比べて塩素耐性が高かった。また、CVB5 内では実験室株と比べて野生株の方が塩素耐性が高かった。水温を考慮して 8 log 不活化に必要な CT を推定した結果、浄水場 α で 27.5 mg · min/L となった（例：残留塩素濃度 0.5mg/L の場合には、約 1 時間の接触時間でウイルスを 8 log (99.99999%) 不活化が可能）。

PMMoV を添加した水道水試料を用いて PMMoV の検査方法を検討した結果、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit を用いることで 40 mL の試料から 40 μL の RNA を抽出・精製することができ、PMMoV 濃度を 10³ copies/L に調製した試料の 3/3 検体で PMMoV が陽性となった。今後は、水道事業者の水質担当者による評価を通じて、本検査方法の有用性および有効性を検証する必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura, T., Takino, H., Gima, A., Haramoto, E., Akiba, M. Recovery of nucleic acids of enteric

viruses and host-specific *Bacteroidales* from groundwater by using an adsorption-direct extraction method. *Appl Environ Microbiol.* 87(18), e00710-21, 2021.

- 2) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., Matsumura, T. and Koriki, S. Evaluation of reduction efficiencies of pepper mild mottle virus and human enteric viruses in full-scale drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration. *Water Research* 213, 118160, 2022.

2. 学会発表

- 1) 三浦尚之, 門屋俊祐, 瀧野博之, 佐野大輔, 秋葉道宏. 水道水源におけるロタウイルスの遺伝的多様性解析. ウイルス性下痢症研究会第 32 回学術集会抄録集, 20-21, 2021.
- 2) 三浦尚之, 瀧野博之, 門屋俊祐, 三浦耀平, 佐野大輔, 秋葉道宏. 浄水処理におけるウイルス除去遺伝子マーカーとしてのトウガラシ微斑ウイルスの実態調査. 第 56 回日本水環境学会年会講演集, 256, 2022.
- 3) Hu, Q., Shirakawa, D., Shirasaki, N., Takagi, H., Oka, T., Matsushita, T. and Matsui, Y. (2022) Evaluating the efficacy of drinking water treatment processes to remove and inactivate human sapovirus: Application of *in vitro* cell-culture method. 第 56 回日本水環境学会年会, 富山大学, 2022/3/16-18 (新型コロナウイルスの影響によりオンライン開催).

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) 秋葉道宏, 三浦尚之, 小田琢也, 佐野大輔, 門屋俊祐, 瀧野博之. 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2年度研究報告書, 35-47, 2021.
 - 4) Miura, T., Takino, H., Gima, A., Haramoto, E., Akiba, M. Recovery of nucleic acids of enteric viruses and host-specific *Bacteroidales* from groundwater by using an adsorption-direct extraction method. *Appl Environ Microbiol.* 87(18), e00710-21, 2021.
 - 5) Asami, T., Katayama, H., Torrey, J.R., Visvanathan, C., Furumai, H. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Res.* 101, 84-94, 2016.
 - 6) Canh, V.D., Torii, S., Furumai, H., Katayama, H. Application of capsid integrity (RT-)qPCR to assessing occurrence of intact viruses in surface water and tap water in Japan. *Water Res.* 189, 116674, 2021.
 - 7) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., Matsumura, T. and Koriki, S. Evaluation of reduction efficiencies of pepper mild mottle virus and human enteric viruses in full-scale drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration. *Water Research* 213: 118160, 2022.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) Soller, J.A., Eftim S.E. and Nappier, S.P. Comparison of predicted microbiological human health risks associated with de facto, indirect, and direct potable water reuse. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 13382–13389, 2019.
 - 12) Title 22 and 17 California Code of Regulations, Regulations related to recycled water state water resources control board. Division of Drinking Water. July 16, 2015, 2015.
 - 13) Sobsey, M.D., Fuji T. and Shields, P.A. Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Sci. Technol.*, 20, 385–391, 1988.
 - 14) Cromeans, T.L., Kahler A.M. and Hill, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 1028–1033, 2010.
 - 15) Katayama H, Shimasaki A, 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), 1033-9, 2002.
 - 16) Meister, S., Verbyla, M.E., Klinger M. and Kohn, T. Variability in disinfection resistance between currently circulating Enterovirus B serotypes and strains. *Environ. Sci. Technol.*, 52, 3696–3705, 2018.
 - 17) Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS.

Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. Vet Res Commun. 33, 1-23, 2009.

行株の変化, 病原微生物検出情報, 40(12), 204-5, 2019.

18) 藤井克樹. ロタウイルスワクチン導入後の流

表 1. PMMoV 添加水道水試料を用いて比較した RNA 抽出・精製キット

キット名称 (メーカー)	RNeasy Midi Kit (Qiagen)	QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)	NucliSENS Lysis Buffer, Magnetic Extraction Reagents (bioMérieux)	Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (Promega)
使用器具	QIAvac Connecting System, QIAvac 24 Plus (Qiagen), 吸 引ポンプ, 遠心分 離機	QIAvac Connecting System, QIAvac 24 Plus (Qiagen), 吸 引ポンプ, 遠心分 離機	miniMAG (bioMérieux)	QIAvac Connecting System, QIAvac 24 Plus (Qiagen), 吸 引ポンプ, 遠心分 離機
タンパク質 変性剤	グアニジン塩	グアニジン塩	グアニジン塩	プロテアーゼ
核酸吸着材	シリカメンブレン カラム	シリカメンブレン カラム	磁性シリカビーズ	シリカメンブレン カラム
サンプル体積 [mL]	5	5	5	40
精製 RNA 体積 [μL]	200	100	100	40
作業時間 [時間]	およそ 1	およそ 1	およそ 1	およそ 2

表 2. 国内 21 浄水場の原水, ろ過水, 浄水試料の PMMoV 検出状況

採水月	原水		ろ過水		浄水	
	検出率 [%]	濃度の範囲 [log ₁₀ copies/L]	検出率 [%]	濃度の範囲 [log ₁₀ copies/L]	検出率 [%]	濃度の範囲 [log ₁₀ copies/L]
2020 年 1 月	95	不検出-6.4	43	不検出-3.3	48	不検出-3.3
2020 年 10 月	100	3.6-5.8	29	不検出-2.6	38	不検出-2.8
2021 年 1 月	100	4.4-6.7	29	不検出-3.2	38	不検出-2.9
2021 年 10 月	81	不検出-6.3	4.8	不検出-3.0	9.5	不検出-2.3
2022 年 1 月	95	不検出-6.3	33	不検出-3.4	48	不検出-3.4

表 3. 水温を考慮した必要 CT 値

実験条件	浄水場 α		浄水場 γ		浄水場 δ		浄水場 β	
	最高	最低	最高	最低	最高	最低	最高	最低
水温	31.1	3.5	25.9	3.8	27.5	4.4	21.4	10.8
必要な CT 値	27.5 mg・min/L		24.7 mg・min/L		17.8 mg・min/L		15.5 mg・min/L	

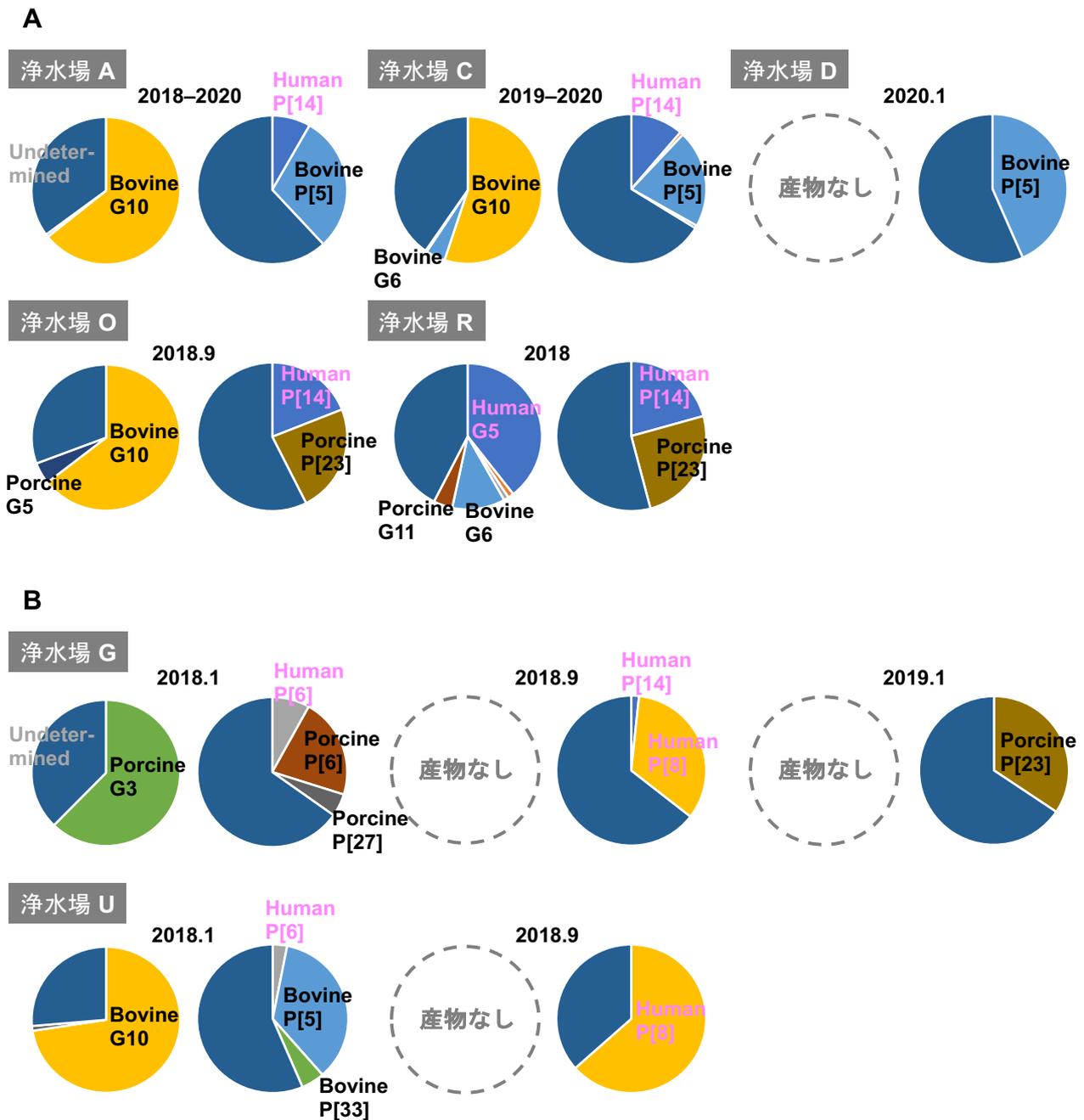


図1. PMMoV よりも RVA 濃度が高かった原水試料から検出された RVA の G および P 遺伝子型分布。それぞれの遺伝子型に分類された RVA の OTU 配列数割合を示した。近縁配列の報告がない RVA の配列は、“undetermined”として合算した。浄水場 A, C, R については、検出された遺伝子型の傾向が複数の試料で同様であったため、それぞれの試料から検出された配列数を合算した。浄水場 G および U については、試料別に示した。

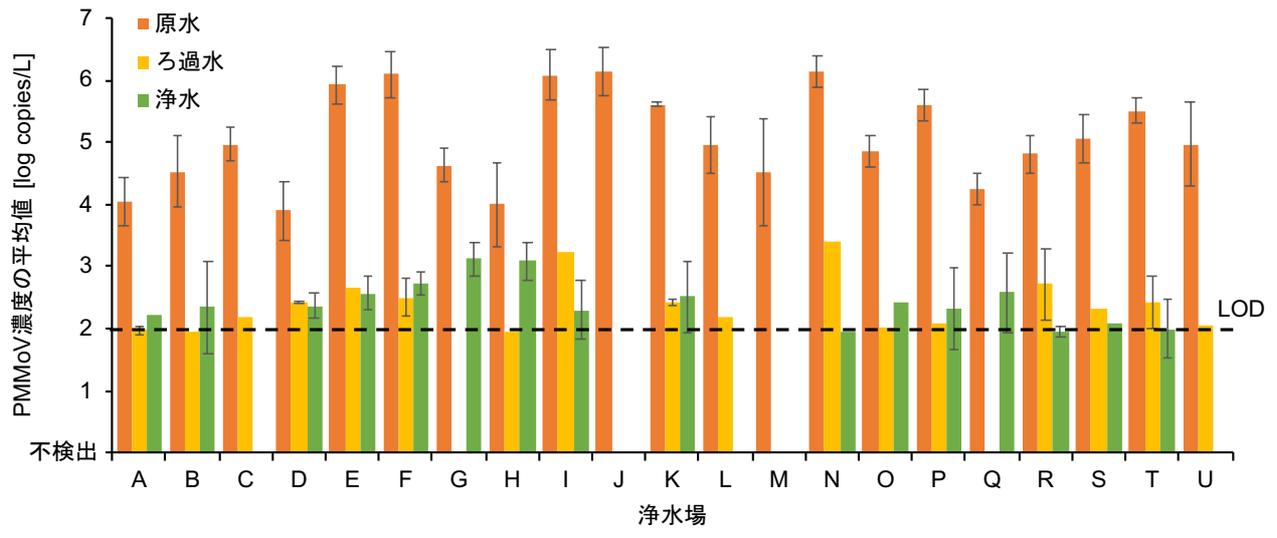


図2. 国内21浄水場の原水、ろ過水、浄水試料中のPMMoV濃度の平均値. 2020年1月, 10月, 2021年1月, 10月, および2022年1月に採水した試料(それぞれN=5)について, 検出濃度の平均値を示した. エラーバーは, 標準偏差を示した. 検出下限はおよそ2 log₁₀ copies/L.

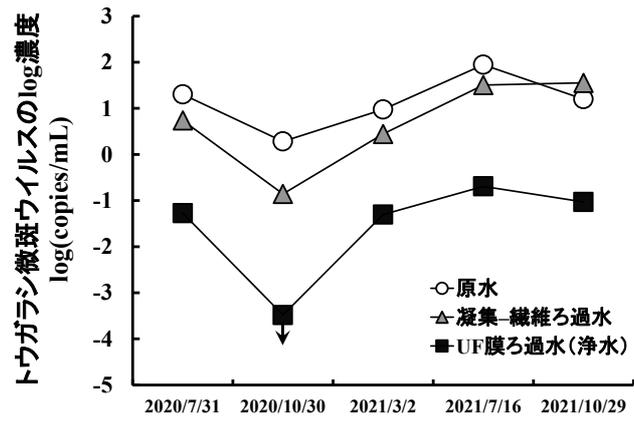


図3. 浄水場Zの各処理工程水におけるPMMoV濃度

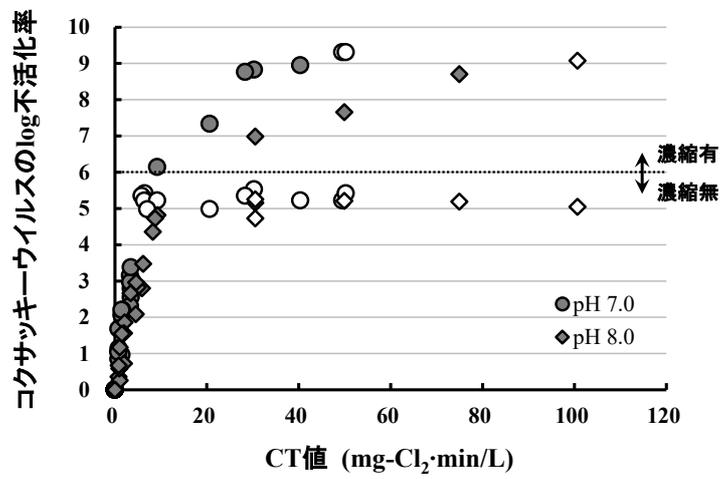


図4. リン酸バッファーを用いた塩素処理におけるCVB5の不活化特性. 白抜きの値は定量下限値以下であったため, 定量下限値をプロットした.

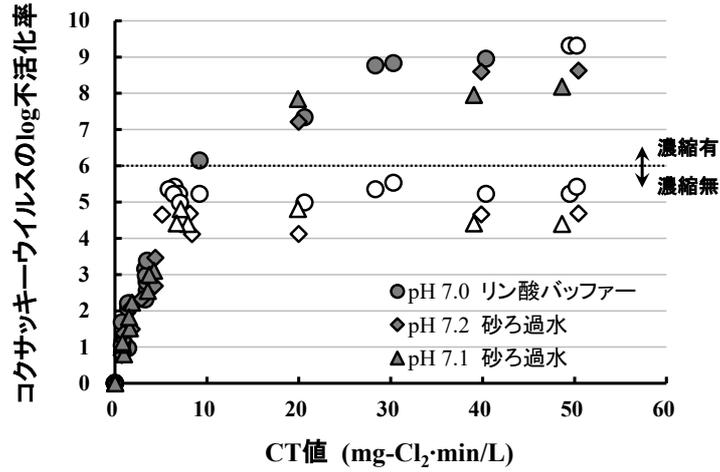


図5. 塩素処理対象水の水質の差異が CVB5 の不活化に与える影響. 白抜きの値は定量下限値以下であったため、定量下限値をプロットした.

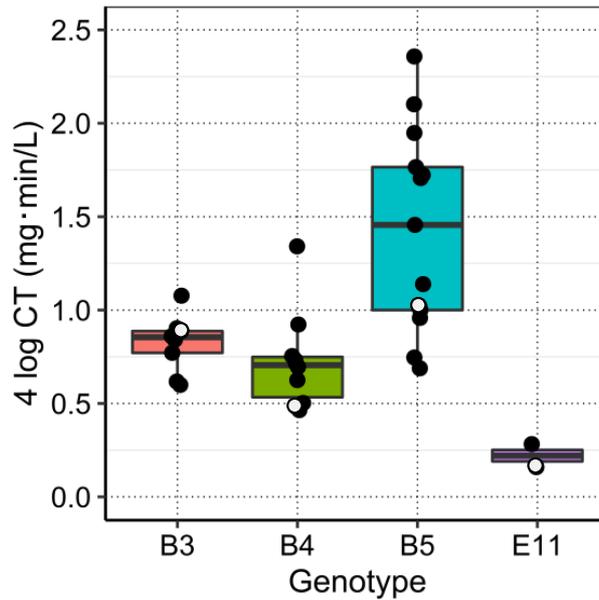


図6. 各株の 4 log の不活化に必要な CT 値. 黒丸は野生株のデータを示し、白丸は各遺伝型に対応する実験室株のデータを示した.

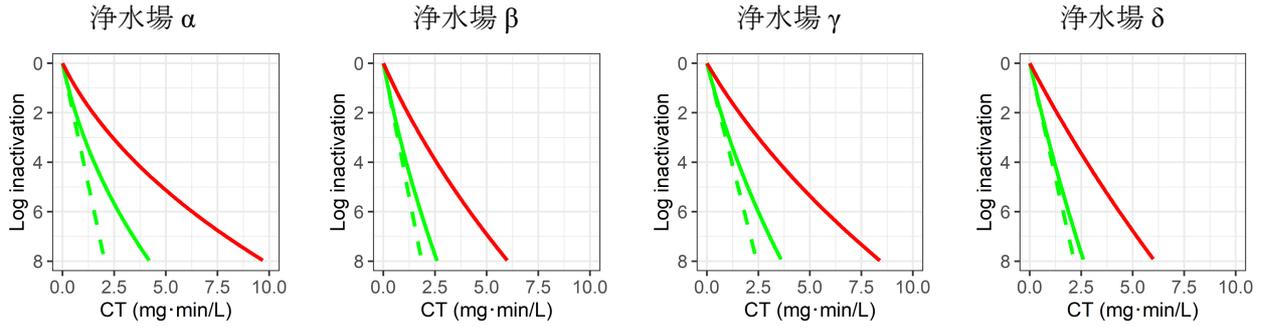


図 7. 年間を通じて 8 log の不活化を達成するために必要な CT 値. 緑点線: 実験室株-実測値の平均. 緑実線: 実験室株で対数正規分布を仮定. 赤実線: もっとも耐性の高かった株(CVB5.8)で対数正規分布を仮定.

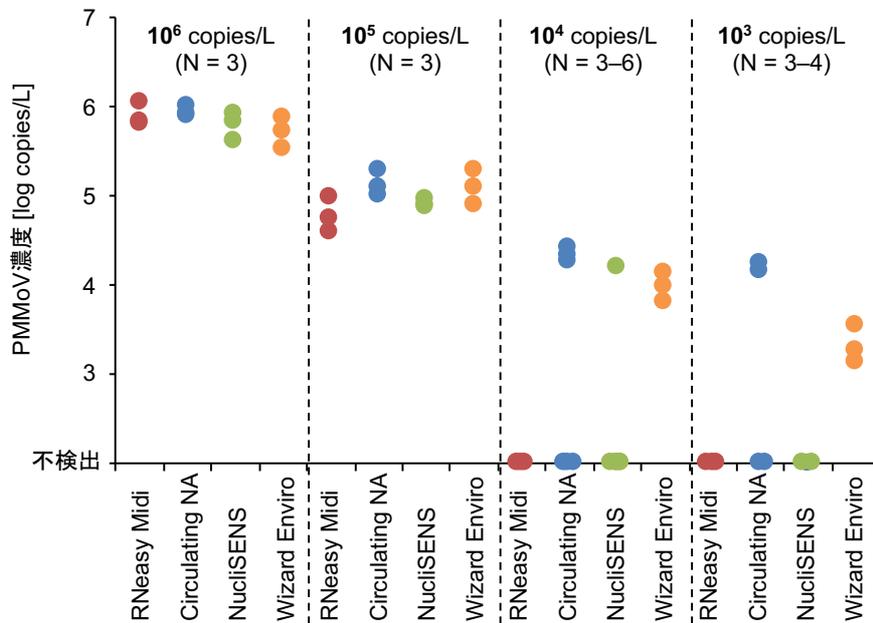


図 8. PMMoV 添加水道水試料を用いた RNA 抽出精製キットの比較. PMMoV 濃度が 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ copies/L となるように調製した水道水試料から, Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, bioMérieux NucliSENS, および Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit の 4 つのキットを用いてウイルス RNA を抽出・精製し, リアルタイム RT-PCR で PMMoV 濃度を定量した.