

令和元～3年度厚生労働科学研究（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」  
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	北澤弘美	(公社) 日本水道協会 工務部
	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
	板持雅恵	富山県衛生研究所 ウイルス部
	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、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。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 PMMoV よりも RVA 濃度が高かった 7 地点の浄水場原水試料に適用したところ、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<sub>10</sub> copies/L だった。

凝集-MF 膜ろ過処理を実施している国内の浄水場 Y における PMMoV の処理性を評価した。その結果、ウイルスの除去率は 0.6–1.5 log であり、5 回の採水において得られた平均値は 1.0 log だった。この値は、浄水場 Y の凝集-MF 膜ろ過処理を模した室内実験において得られた PMMoV の除去率と同程度であったことから、実浄水場におけるウイルスの除去率を室内実験により再現できることが示された。また、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。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–>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、pH 7.0 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 mg-Cl<sub>2</sub>·min/L 程度であったのに対し、pH 8.0 においては、100 mg-Cl<sub>2</sub>·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（pH 7.1–7.2）を用いた場合の 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 840–1,300 mg-Cl<sub>2</sub>·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。

2002–2018 年に富山県内の下水処理場の流入水、河川水中から検出されたコクサッキーウイルス B3 型（CVB3）、CVB4、CVB5、エコーウイルス 11 型（E11）の野生株、およびそれぞれの基準株を用いて、遊離塩素、紫外線、およびオゾンによる処理性を評価した。その結果、基準株からの遺伝的な変異に伴い遊離塩素耐性やオゾン耐性も株間で異なることが明らかになった。遊離塩素では基準株と比して 2.3 倍、オゾンでは 2 倍程度高い耐性を有す株が存在した。実験室株データを用いて遊離塩素及びオゾンによるウイルス不活化効率を推定する際は、実プラントの除去率が過大評価される可能性が示された。また、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。さらに、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 10<sup>3</sup> 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た。令和元年度から令和 3 年度にかけては、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 PMMoV の濃度変動調査
- 2) 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

3) 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

4) 凝集-MF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

5) 実浄水場の UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性評価

6) 塩素処理における病原ウイルスの不活化特性評価

7) 遊離塩素、紫外線、オゾン処理によるウイルスの不活化効率

8) 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

9) 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

10) 水道水中の PMMoV 検査方法の検討

これら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

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<sup>1, 2)</sup>、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。水源における PMMoV の実態を明らかにすることを目的とし、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た。2018 年 1 月から 2021 年 1 月にかけて胃腸炎の非流行期（9-10 月）および流行期（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 の濃度およびその関係を調査した。

#### A2. 原水の RVA 遺伝子型解析

表流水を取水する一部の浄水場において PMMoV よりも RVA 濃度が高い原水試料が確認されたため<sup>3)</sup>、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<sup>4)</sup>。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。

#### A3. 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<sup>5, 6)</sup>、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。

#### A4. 凝集-MF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性

これまでに室内実験において、代表的な物理的処理である凝集沈澱-砂ろ過処理、MF 膜ろ過処理、凝集-MF 膜ろ過処理、および UF 膜ろ過処理における PMMoV の除去率と水系感染症ウイルスの除去率の間に高い相関関係が認められた。また、PMMoV の除去率は、水系感染症ウイルスの除去率と同程度、あるいはやや低く<sup>7, 8)</sup>、水系感染症ウイルスの凝集沈澱-砂ろ過処理性、膜ろ過処理性を評価する上での挙動指標としての PMMoV の有効性が示された。本研究タスクでは、これまでに構築したウイルス濃縮法を適用することにより、凝集-MF 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。また、実浄水場の処理工程水を用いた凝集-MF 膜ろ過処理の室内添加実験を実施し、室内実験の有効性を評価した。

#### A5. 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<sup>9)</sup>。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。

#### A6. 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)<sup>10,11)</sup>、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<sub>2</sub>·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)<sup>12)</sup> 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。

#### A7. ウイルス遺伝子型内の耐性分布幅を考慮した遊離塩素、紫外線、オゾン処理の不活化評価

消毒剤のウイルスに対する不活化効果は、これまで基準株を対象に評価されてきた<sup>13-15)</sup>。ウイルスは核酸変異率が極めて高い<sup>16)</sup>ため、野生のウイルス株は基準株と遺伝的に乖離しており、不活化速度に差がある可能性がある。USEPA の Contaminant Candidate List 4 (CCL4) に掲載されているエンテロウイルスの野生株を対象に、野生株と基準株の消毒剤 (遊離塩素、紫外線、オゾン) への耐性の違い、および種内や遺伝型内での分布幅を評価することを目的とした。

#### A8. 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。

#### A9. 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<sup>17)</sup>、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<sup>18)</sup>。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<sup>12)</sup>。必要 CT 値は、Sobsey et al.<sup>19)</sup> 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<sup>13)</sup>。CVB5 は、塩素消毒において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。

#### A10. 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 を検査する場合においては、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<sup>10,11)</sup>、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. 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 (5 L) を収集した。試料の採水は、2018 年 1 月、9 月、2019 年 1 月、10 月、2020 年 1 月、10 月、および 2021 年 1 月に実施し、計 147 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<sup>11)</sup>。すなわち、試料 1 L

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  $\mu\text{m}$ 、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  $\mu\text{m}$ 、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  $\mu\text{m}$  懸濁態画分とした<sup>11)</sup>。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<sup>11,20)</sup>。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. 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。

#### B3. 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、B1 に記載した国内 21 箇所の浄水場の協力を得て、原水に加えて、ろ過水および浄水試料 (原水は 5–10 L、ろ過水・浄水は 10–20 L) を収集した。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。

ろ過水および浄水試料に含まれる PMMoV は、陰電荷膜法<sup>20)</sup>により濃縮した。すなわち、試料 1 L 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 50 mM となるように添加・混合した。続いて、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ 、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のちに、膜を回収した<sup>2)</sup>。回収した膜から、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、B1 に記載した原水試料と同様にリアルタイム RT-PCR 法により定量した。

#### B4. 凝集-MF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性

##### (1) 使用したウイルスの培養および定量

PMMoV pepIwate-Hachiman1 株、ヒトノロウイルスの代替として広く用いられているマウスノロウイルス I 型 CW1 株、水系感染症ウイルスの代替として広く用いられている大腸菌ファージ MS2 をそれぞれ、*Nicotiana benthamiana*, RAW264.7 細胞、大腸菌を用いて培養し、実験に使用した。QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いてウイルスの RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。この後、合成した cDNA を、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems), Distilled water, それぞれのウイルスに特異的なプライマー・プローブと混合した後、リアルタイム定量 PCR 装置 (Applied Biosystems 7,300, Applied Biosystems) に供することにより、ウイルス濃度を定量した。

##### (2) 実浄水場の浄水処理工程水へのウイルス濃縮法の適用

実浄水場における PMMoV の処理性を評価するため、これまでに構築したウイルス濃縮法を適用し、浄水場 Y の原水および浄水処理工程水 100–2,000 L における PMMoV の濃度を定量した。2018

年 5 月, 7 月, 11 月, 2019 年 1 月, 7 月に浄水場 B 内において原水 100–200 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前塩素処理水 100–200 L, マンガン接触ろ過水 (凝集-MF 膜ろ過前水) 100–400 L, および浄水 (凝集-MF 膜ろ過水; 膜材質: PVDF, 膜孔径: 0.1  $\mu\text{m}$ ) 100–2,000 L を, ポンプを用いて 4–6 L/min の初期流束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  $\mu\text{m}$ ) に通水した。通水後, 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) 合計 2 L を用いてウイルスを回収し, 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 2,500  $\times$  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・濃縮した (二次濃縮[上澄み])。一方, 凝集フロックについては, pH 9 の 0.15 M リン酸バッファーを添加し, 溶解した (二次濃縮[フロック])。二次濃縮[上澄み]試料および二次濃縮[フロック]試料それぞれの PMMoV を定量することにより, 浄水場 Y の原水, 前塩素処理水, マンガン接触ろ過水, 浄水の PMMoV 濃度を算出し, 除去率 (Log 除去率 (Log[C<sub>0</sub>/C]; C<sub>0</sub>: 処理前の PMMoV 濃度, C: 処理後の PMMoV 濃度)) を算出した。

#### B5. 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, 膜ろ過流束: 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 の初期流束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  $\mu\text{m}$ ) 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 のビーフエ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エキス溶液の 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、溶液中のビーフエキスを凝集した。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 PMMoV の除去率 (Log 除去率 (Log[C<sub>0</sub>/C]; C<sub>0</sub>: 原水の PMMoV 濃度, C: 処理後の PMMoV 濃度)) を算出した。

#### B6. 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<sup>-1</sup>, アルカリ度: 11.6 mg-CaCO<sub>3</sub>/L, 2021 年 7 月採水; pH: 7.1, 濁度: 0.08 NTU, DOC: 0.4 mg/L, UV260: 0.012 cm<sup>-1</sup>, アルカリ度: 14.3 mg-CaCO<sub>3</sub>/L) に、培養・精製した CVB5 を 10<sup>5</sup> 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-Cl<sub>2</sub>/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[N<sub>0</sub>/N]; N<sub>0</sub>: 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。

#### B7. ウイルス遺伝子型内の耐性分布幅を考慮した遊離塩素、紫外線、オゾン処理の不活化評価

##### (1) エンテロウイルス株の分離

2002-2018 年にかけて富山県内の下水処理場の流入水、河川水中から分離したエンテロウイルス B を 30 株 (CVB3: 8, CVB4: 9, CVB5: 12, E11: 1) 用いた。各株の全ゲノム配列は、ディープシーケンスにより決定した。

##### (2) ウイルスの培養、精製、感染価測定

分離株を BGM 細胞により培養し、濃縮した後、塩化セシウムを使用した等密度勾配遠心<sup>21)</sup>により精製した。感染価は、96 穴プレートを用いた 5 連 MPN 法<sup>22)</sup>により測定した。

### (3) 消毒試験

本研究では、野生株に加え、CVB3, CVB5, E11の基準株の計 33 株を消毒試験に供した。遊離塩素および UV<sub>254</sub> 消毒試験は回分式で実施した。1 試験では、経時的に 4 試料（初期濃度測定用を含める）を採取した。本試験を各消毒剤および各ウイルス株に対して 2 連で実施した。遊離塩素試験では、初期遊離塩素濃度を 0.3 mg/L 程度とした。全ての試験において、試験終了時に遊離塩素濃度が 83%以上維持されていることを確認した。紫外線照射には低圧水銀ランプを用いた。オゾン試験は連続流式反応槽（Continuous quench flow system）にて実施し、手法は Torii et al. under review（論文発表 1）に従った。消毒試験では、ウイルス分散媒として 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）を使用した。水温は 22 ± 1 °C であった。初期濃度は 5 × 10<sup>3</sup> - 10<sup>5</sup> MPN/mL であった。

### B8. 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 をホストとして用いたブラック法により F フェージを検出した。滅菌済み爪楊枝を用いて現れたブラックを単離した。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

ブラック懸濁液 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<sup>23)</sup>、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、単離株のウイルス種が GI であったもの<sup>24)</sup>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<sup>25)</sup>。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<sup>-1</sup>)

$k_z$ : 株  $z$  の不活化速度定数 (mg<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> L)

### B9. 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<sup>22)</sup>（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  $\alpha$  ( $n = 7$ ), 浄水場  $\beta$  ( $n = 5$ ), 浄水場  $\gamma$  ( $n = 6$ ), 浄水場  $\delta$  ( $n = 7$ ) 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 ( $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1} \text{L}$ )

## B10. 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$ , Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit および bioMérieux NucliSENS は 100  $\mu\text{L}$ , Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit は 40  $\mu\text{L}$  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. 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、胃腸炎の非流行期に 10–24%の試料から検出され、濃度は 2.9–3.2  $\log_{10}$  copies/L だった。胃腸炎の流行期には 48–81%の試料から検出され、濃度の幾何平均値は 3.8–4.6  $\log_{10}$  copies/L だった。2021 年 1 月は、3 年間で最も検出率が低く (24%), 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考えられた。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<sup>26)</sup>。

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、67–

81%, 76–86%), 2021年1月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(67%)。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 log<sub>10</sub> copies/L), 非流行期においても比較的高かったことから(3.9–4.3 log<sub>10</sub> 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、81–100%の原水試料に高濃度(4.5–5.5 log<sub>10</sub> copies/L)で含まれていた。また、PMMoV の濃度は、懸濁態よりも溶存態画分の方が1 log<sub>10</sub> 程度高く、大部分が溶存態画分に含まれていた。3年間の調査結果の再現性は高く、上記の傾向が確認された。

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. 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2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2A)。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2B)。

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2A)。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<sup>27)</sup>。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]<sup>28)</sup> が優占して検出された(34–63%, 図2B)。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。

### C3. 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  $3.4 \log_{10}$  copies/L の濃度で検出された。

図 3 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  $3.2 \log_{10}$  copies/L であり、平均して  $3 \log_{10}$  程度除去されていた。

### C4. 凝集–MF 膜ろ過処理における PMMoV の除去性

#### (1) 実浄水場における PMMoV の処理性

浄水場 Y 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 4）。PCR 法にて評価した原水における PMMoV 濃度は  $10^{0.4-2.1}$  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高濃度で PMMoV が存在していることが明らかとなった。また、前塩素処理水及びマンガン接触ろ過水における PMMoV 濃度はそれぞれ  $10^{0.3-2.1}$  copies/mL、 $10^{-0.1-1.7}$  copies/mL となり、原水と比べて濃度の低減は確認されなかった。本研究で PMMoV の定量に用いた PCR 法は、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を検出・定量の標的としていることから、前塩素処理及び塩素添加を伴うマンガン接触ろ過処理においてウイルスが不活化した場合であっても標的の遺伝子の一部が残存していれば検出・定量されるため、これらの処理におけるウイルスの不活化効果を過小評

価している可能性がある。従って、PCR 法にて評価された前塩素処理及びマンガン接触ろ過処理における除去率（低減率）の解釈には注意が必要である。一方で、マンガン接触ろ過処理による PMMoV 濃度の低減が確認されなかったことから、マンガン接触ろ過処理によるウイルスの物理的な除去効果は期待できないものと推察された。これに対し、浄水、すなわち、凝集–MF 膜ろ過水における PMMoV 濃度は  $10^{-1.1-0.6}$  copies/mL となり、マンガン接触ろ過水（凝集–MF 膜ろ過前水）に比べて濃度の低減が確認された。従って、凝集–MF 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、 $0.6-1.5 \log$ （平均:  $1.0 \log$ ）であった（マンガン後と MF 後の差）。

二次濃縮後の試料に人工的にマウスノロウイルス及び MS2 を添加し、滅菌蒸留水に添加した場合との PCR 法による定量結果を比較することにより、PCR 阻害性（遺伝子抽出工程・逆転写反応・PCR 反応における阻害性）を評価した。二次濃縮[ブロック]の試料においては、添加したマウスノロウイルス及び MS2 の定量効率、滅菌蒸留水に添加した場合（定量効率: 100%）に比べて幾分低下したものの、30–60%程度の値となった。一方、二次濃縮[上澄み]の試料においては、添加したマウスノロウイルス及び MS2 の定量効率は、二次濃縮[ブロック]の試料に添加した場合に比べて大きくなり、50–80%程度の高い値となった。以上の結果から、本研究においては、PMMoV 濃度の定量における阻害の影響は小さく、上述した浄水場 B における PMMoV 濃度の定量結果、更には、評価された PMMoV の除去率は妥当であると判断した。

#### (2) 実浄水場における水系感染症ウイルスの処理性の推定

上述したように、計 5 回の採水において得られた除去率の平均値（マンガン後と MF 後の差）は  $1.0 \log$  となった。また、これまでに実施した凝集–MF 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、あるいはやや低かったことから<sup>2)</sup>、PMMoV が凝集–MF 膜ろ過処理により  $1.0 \log$  除去される浄水場 Y においては、水系感染症ウイルスは少なくとも  $1.0 \log$  程度除去されるものと推察された。一方

で、浄水場 Y における物理的処理（凝集-MF 膜ろ過処理）によるウイルスの除去率は 1 log 程度であり、昨年度報告した凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している浄水場 X の場合と同様に、水道水の微生物学的安全性の確保においては、塩素処理に大きく依存していることが確認された。従って、塩素処理における水系感染症ウイルスの処理性の詳細な把握、並びに、物理的処理におけるウイルス除去の高度・高効率化に向けた取り組みの重要性が再確認された。

#### C5. 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 5）。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  $10^{1.9}$  copies/mL,  $10^{1.2}$  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  $10^{1.5}$  copies/mL,  $10^{1.6}$  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  $10^{-0.7}$  copies/mL,  $10^{-1.0}$  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。

#### C6. 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 6 に示す。pH 7.0 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、pH 8.0 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<sup>-</sup>) 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<sup>-</sup> 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 7 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  $20 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  程度の CT 値で 7-8 log,  $40 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  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、 $100 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  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,  $1,300 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  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。

C7. ウイルス遺伝子型内の耐性分布幅を考慮した遊離塩素、紫外線、オゾン処理の不活化評価  
各株の 4 log 不活化に必要な遊離塩素 CT 値は CVB3, CVB4, CVB5 では 0.5–2.4 mg・min/L の範囲であったが、E11 は 0.5 mg・min/L 以下であり、コクサッキーB 型が塩素に耐性が高いことが示された。エンテロウイルス全体では、4 log 不活化に必要な遊離塩素 CT 値が 0.14–2.4 mg・min/L であり、株間で最大 17 倍以上の差が観察された。また、遊離塩素耐性が高いことで知られる CVB5 に関して、基準株より 2.3 倍耐性の高い野生株の存在も明らかになった。また、遊離塩素耐性は CVB5 > CVB3 ≈ CVB4 > E11 であり、塩素耐性が遺伝子型に依存することが示唆された。一方で、4 log 不活化に必要な UV<sub>254</sub> 線量は 23–30 mJ/cm<sup>2</sup> と、互いに最大 1.3 倍程度の差であり、分布幅は遊離塩素より小さかった。4log 不活化に必要なオゾンの CT 値は塩素に比べて非常に小さく、0.10–0.45 mg・sec/L で、エンテロウイルス内で 4.5 倍程度の差があった。以上から、多様なウイルスが含まれる環境水を消毒する際には、特に、遊離塩素において、耐性分布幅を算入した不活化予測モデルを使用する必要がある。

C8. 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 8 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 ( $\mu$ ,  $\sigma$ ) = (-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<sup>-1</sup> 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大き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。

C9. 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 9 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<sup>-1</sup> 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 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) における CVB5 Faulkner

株の不活化速度係数は  $9.0 \pm 2.7$ ,  $9.9 \pm 1.7$ ,  $7.6 \pm 1.7$ ,  $8.5 \pm 1.3 \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ L}$  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 10 に示す。実験室株の  $8 \log (99.99999\%)$  不活化に必要な CT 値は、 $2.6\text{-}4.2 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  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、 $6.0\text{-}9.7 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  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  $27.5 \text{ mg min L}^{-1}$  であった。これは、残留塩素濃度が  $0.5 \text{ mg/L}$  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。

### C10. 水道水の PMMoV 検査方法の検討

PMMoV 濃度を  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ , および  $10^3 \text{ copies/L}$  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、 $10^6 \text{ copies/L}$  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  $10^5 \text{ copies/L}$  の試料で他のキットと比較して検出濃度が低下し、 $10^4 \text{ copies/L}$  以下では検出されなくなった (図 11)。  $10^4 \text{ copies/L}$  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  $10^3 \text{ copies/L}$  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  $10^4 \text{ copies/L}$  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  $10^3 \text{ copies/L}$  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

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。

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  $3.4 \log_{10}$  copies/L だった。

浄水場 Y において、PCR 法にて評価した凝集–MF 膜ろ過処理による PMMoV の除去率は 0.6–1.5 log であり、除去率の平均値は 1.0 log であった。この値は、浄水場 Y の凝集–MF 膜ろ過処理を模した室内実験において得られた PMMoV の除去率と同程度であったことから、実浄水場におけるウイルスの除去率を、室内実験により再現できることが示された。

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  $100 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  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  $840\text{--}1,300 \text{ mg-Cl}_2\cdot\text{min/L}$  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。

水環境中に存在するエンテロウイルスの遺伝子型内では、UV<sub>254</sub> 耐性に大きな違いは見られなかった一方で、遊離塩素やオゾンの耐性は大きく異なることが明らかになった。実際の水環境中には多様なウイルスが含まれるため、その耐性分布幅を算入した不活化予測モデルを使用する必要がある。

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。

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  $27.5 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$  となった（例：残留塩素濃度  $0.5 \text{ mg/L}$  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  $10^3$  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) 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.
- 6) 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.
- 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.
2. 学会発表
- 1) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Yamashita, R., Koriki, S., Matsumura, T., Matsushita, T., Matsui, Y. Evaluation of virus removal efficiency in an actual drinking water treatment plant by using a novel virus concentration method and pepper mild mottle virus as a process indicator. *Water and Environment Technology Conference 2019, Suita, Japan*, 13–14 July 2019.
- 2) Torii S, Itamochi M, Katayama H. Intra-Enterovirus B and intratypic variability in free chlorine resistance. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, O3-4-12, 2019.
- 3) 鳥居将太郎, 板持雅恵, 片山浩之. 同種ウイルスの遊離塩素消毒耐性分布幅を考慮した不活化予測モデルの提案. 令和元年度水道研究発表会, 8-37, 2019.
- 4) 松村拓哉, 高力聡史, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 凝集-膜ろ過処理を導入した実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価. 第 27 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2019/11/8–9.
- 5) Torii S, Itamochi M, Katayama H. Variability of free chlorine resistance among *Enterovirus B* strains leads to insufficient inactivation in drinking water, 20th International Symposium on Health Related Water Microbiology, Vienna, Austria, 2019.
- 6) 三浦尚之, 儀間ありさ, 徳安真理奈, 秋葉道宏. 水道原水中ウイルスモニタリングのための効率的なウイルス濃縮方法の検討. 第 56 回環境工学研究フォーラム講演集. B35, 2019.
- 7) 三浦尚之, 徳安真理奈, 前田暢子, 吉田伸江, 越後信哉, 秋葉道宏. 全国の水道原水における腸管系ウイルスおよびトウガラシ微斑ウイルスの存在実態調査. 第 54 回日本水環境学会年会講演集, 386, 2020.
- 8) 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 外来遺伝子を封入した人工合成ウイルス様粒子の創製: 培養困難なノロウイルスの浄水処理性評価への適用. 第 54 回日本水環境学会年会, 盛岡, 2020/3/16–18.
- 9) 鳥居将太郎, 板持雅恵, 片山和彦, 片山浩之.



- エンテロウイルス野生株の遊離塩素、紫外線、オゾン処理に対する耐性分布幅の評価。第 54 回水環境学会年会, 1-E-12-1, 2020.
- 10) 鳥居将太郎, 片山浩之. CQFS を用いたオゾン処理によるウイルス不活化速度の解析. 日本オゾン協会 第 29 回年次研究講演会, 2020.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 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) 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 Res.* 115: 29-39, 2017.
  - 8) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Res.* 120: 460-469, 2018.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.
  - 13) Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1028-1033, 2010.
  - 14) Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.* 39, 3650-3656, 2005.
  - 15) Gerba, C.P., Gramos, D.M., Nwachuku, N., Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5167 LP - 5169, 2002.
  - 16) Sanjuan, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Manky, L.M., Belshaw, R. Viral mutation rates, *J. Virol.* DOI:10.1128/JVI.00694-10.
  - 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Torii, S., Hashimoto, T., Do, A.T., Furumai, H., Katayama, H. Impact of repeated pressurization on virus removal by reverse osmosis membranes for household water treatment. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 910–919, 2019.
- 22) Meister, S., Verbyla, M.E., Klinger, M., Kohn, T. Variability in disinfection resistance between currently circulating Enterovirus B serotypes and strains. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3696–3705, 2018.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) Delignette-Muller M.L. and Dutang, C. *fitdistrplus: An R Package for Fitting Distributions*, *J. Stat. Softw.*, 64, 1–34, 2015.
- 26) 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>)
- 27) Dhama K, Chauhan RS, Mahendran M, Malik SVS. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun.* 33, 1-23, 2009.
- 28) 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), 204-5, 2019.

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 <sub>10</sub> copies/L]	検出率 [%]	濃度の範囲 [log <sub>10</sub> copies/L]	検出率 [%]	濃度の範囲 [log <sub>10</sub> 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	

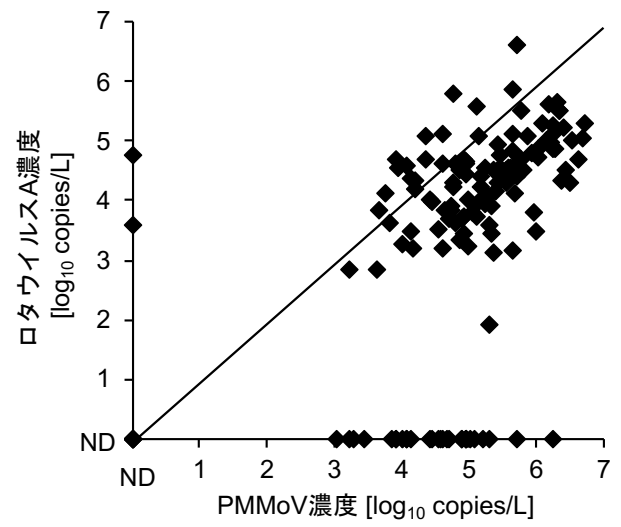
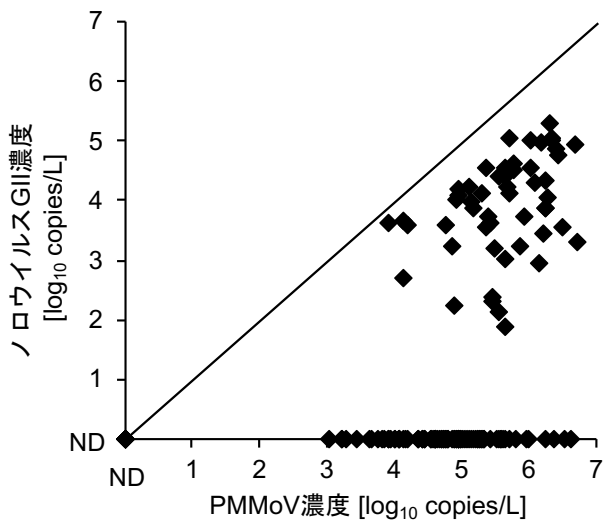


図1. 水道原水中の病原ウイルスと PMMoV 濃度の関係. 2018年1月から2021年1月に採水された合計147試料のデータをプロットした.

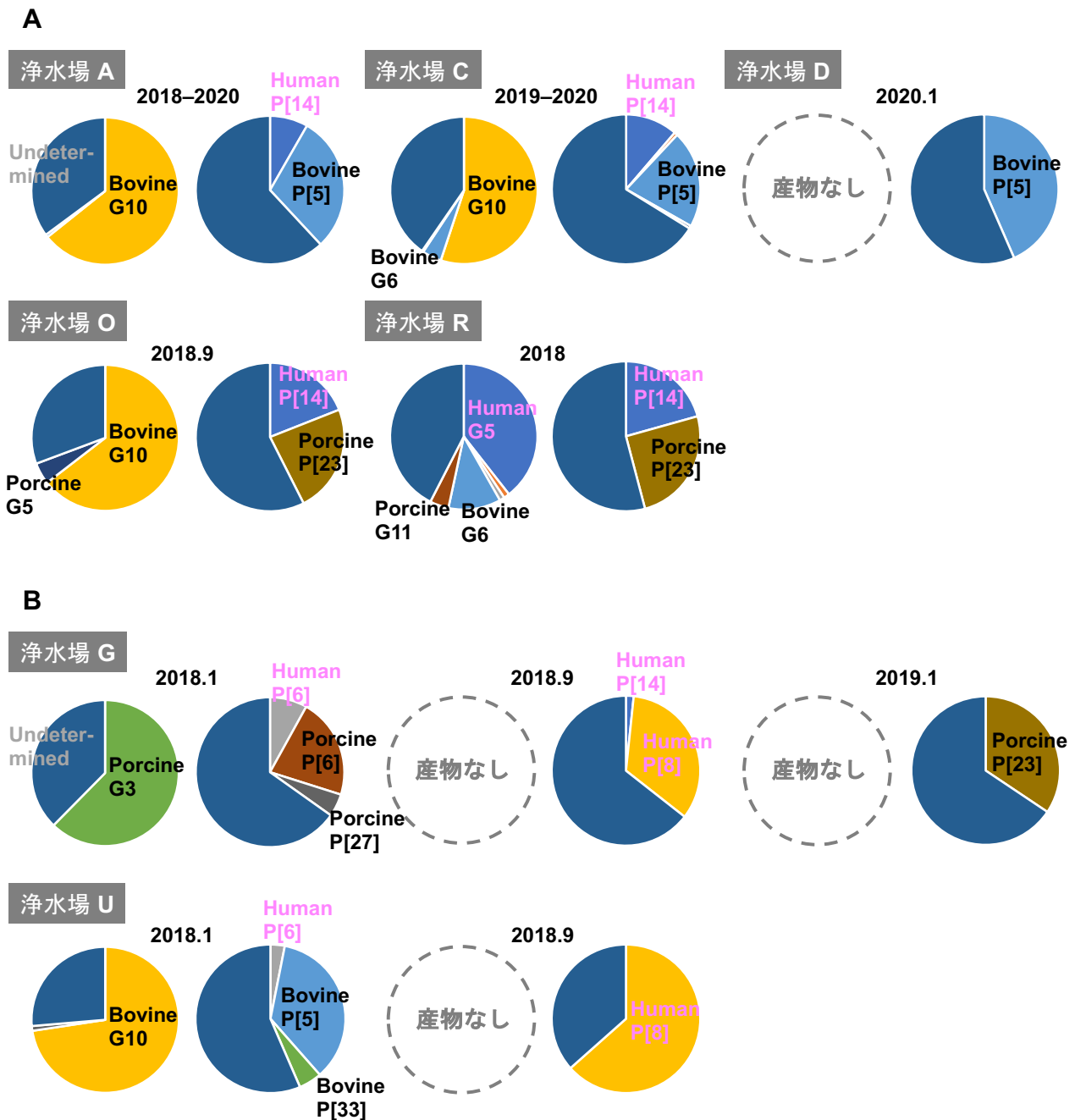


図2. PMMoV よりも RVA 濃度が高かった原水試料から検出された RVA の G および P 遺伝子型分布。それぞれの遺伝子型に分類された RVA の OTU 配列数割合を示した。近縁配列の報告がない RVA の配列は、“undetermined”として合算した。浄水場 A, C, R については、検出された遺伝子型の傾向が複数の試料で同様であったため、それぞれの試料から検出された配列数を合算した。浄水場 G および U については、試料別に示した。

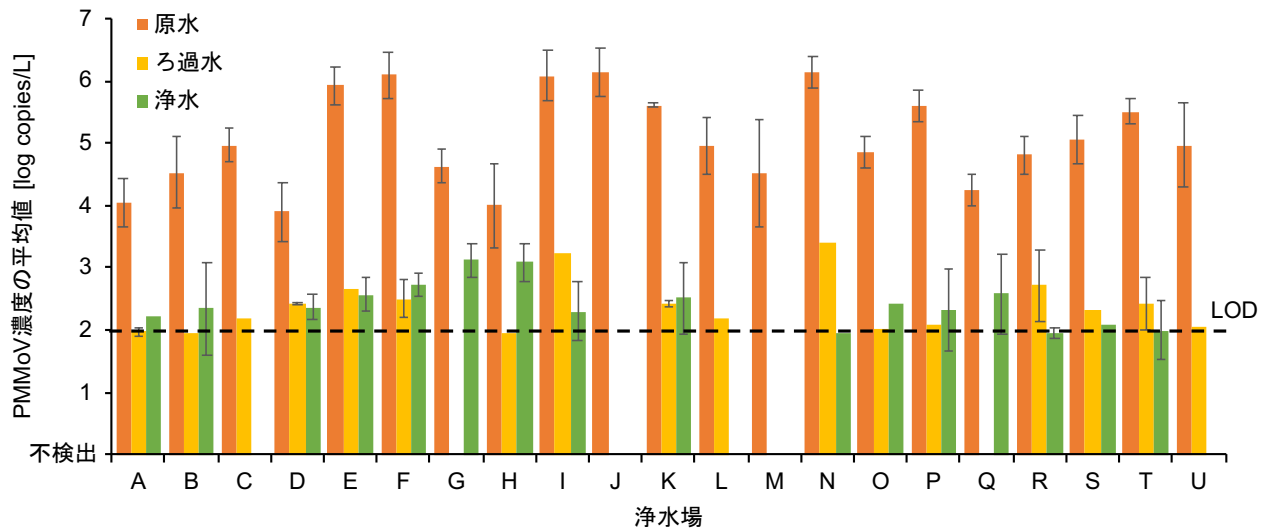


図3. 国内21浄水場の原水, ろ過水, 浄水試料中のPMMoV濃度の平均値. 2020年1月, 10月, 2021年1月, 10月, および2022年1月に採水した試料(それぞれN=5)について, 検出濃度の平均値を示した. エラーバーは, 標準偏差を示した. 検出下限はおよそ $2 \log_{10}$  copies/L.

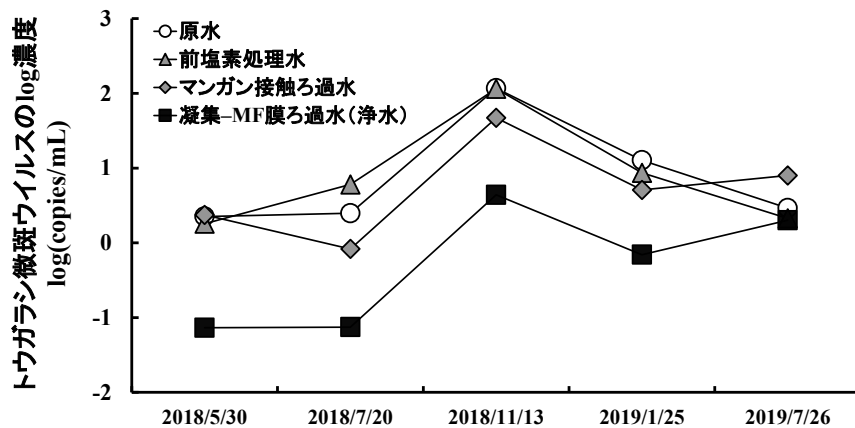


図4. 浄水場Yの各処理工程水におけるPMMoV濃度

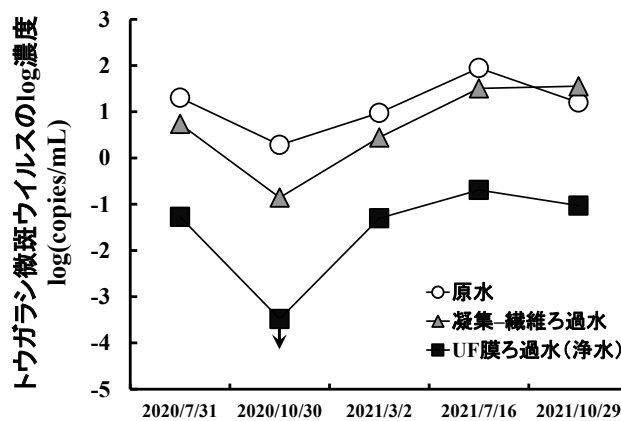


図5. 浄水場Zの各処理工程水におけるPMMoV濃度

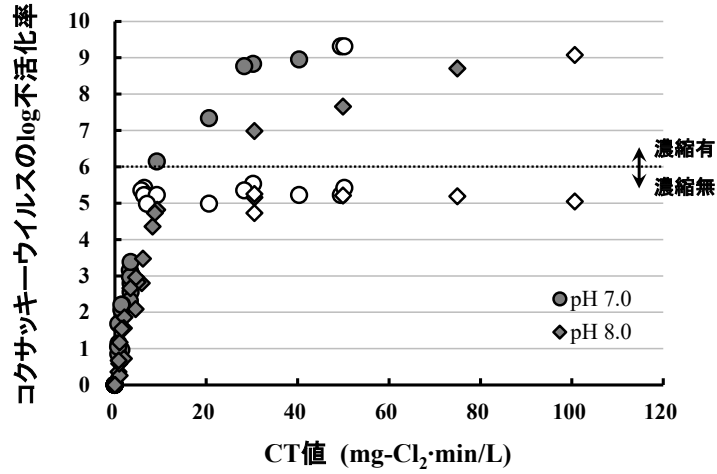


図6. リン酸バッファーを用いた塩素処理における CVB5 の不活化特性. 白抜きのは値は定量下限値以下であったため、定量下限値をプロットした.

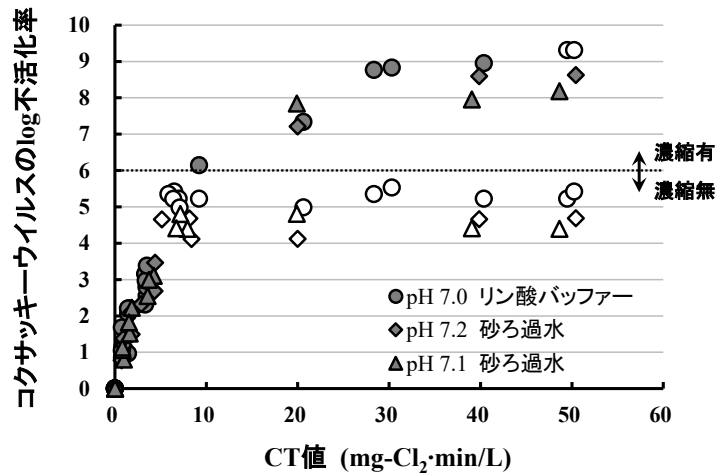


図7. 塩素処理対象水の水質の差異が CVB5 の不活化に与える影響. 白抜きのは値は定量下限値以下であったため、定量下限値をプロットした.



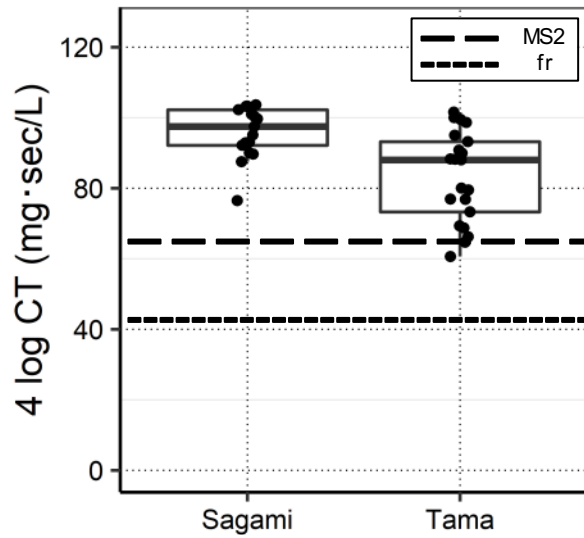


図 8. 多摩川, 相模川で検出された F 特異 RNA 大腸菌ファージ GI 株の 4 log CT 値. 各河川の野生株は黒丸, 実験室株 MS2 を長破線, fr を短破線で表示した.

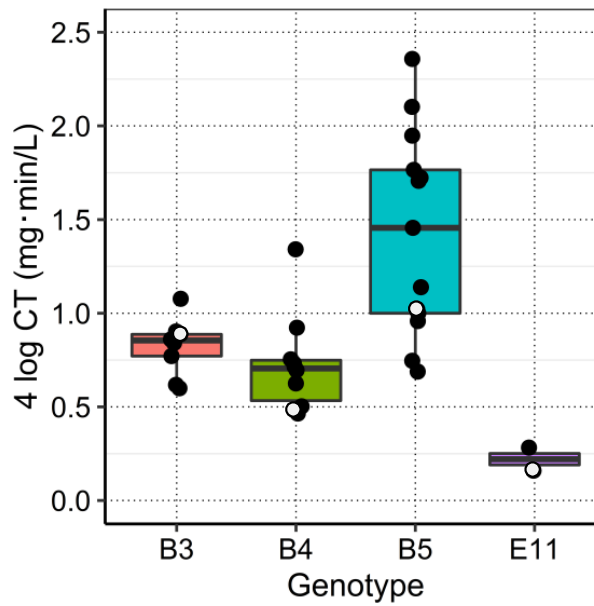


図 9. 各株の 4 log の不活化に必要な CT 値. 黒丸は野生株のデータを示し, 白丸は各遺伝型に対応する実験室株のデータを示した.

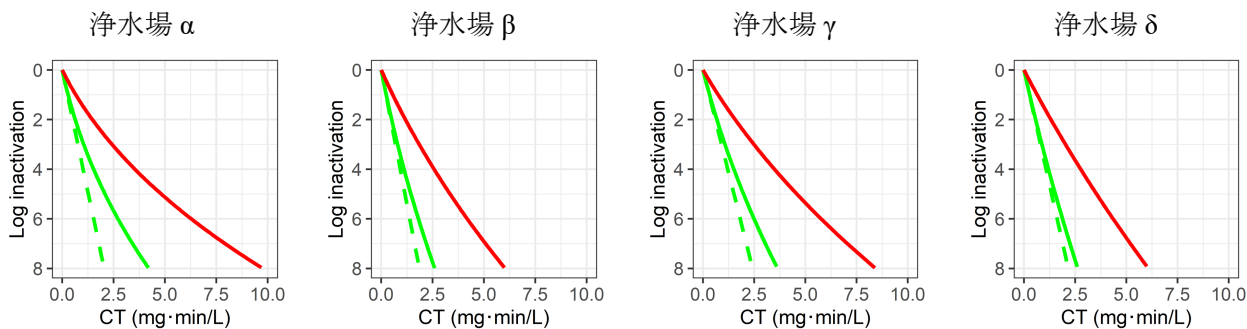


図 10. 年間を通じて 8 log の不活化を達成するために必要な CT 値. 緑点線: 実験室株-実測値の平均. 緑実線: 実験室株で対数正規分布を仮定. 赤実線: もっとも耐性の高かった株(CVB5.8)で対数正規分布を仮定.

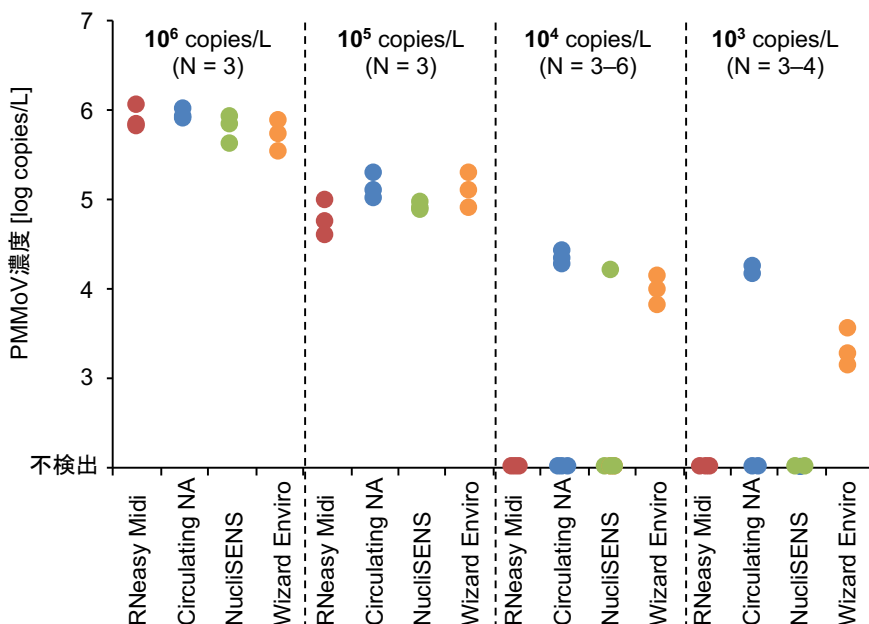


図 11. PMMoV 添加水道水試料を用いた RNA 抽出精製キットの比較. PMMoV 濃度が  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  copies/L となるように調製した水道水試料から, Qiagen RNeasy Midi Kit, Qiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, bioMérieux NucliSENS, および Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit の 4 つのキットを用いてウイルス RNA を抽出・精製し, リアルタイム RT-PCR で PMMoV 濃度を定量した.