

厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道水及び原水における化学物質等の実態を踏まえた水質管理の向上に資する研究」
令和4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	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
	増田貴則	国立保健医療科学院 統括研究官
	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 水質試験所
	佐藤啓貴	埼玉県企業局 水質管理センター
	田中宏憲	千葉県企業局 水質センター
	藤原俊一郎	京都市上下水道局 技術監理室 水質管理センター
	鳥居将太郎	東京大学 大学院工学系研究科
	Vu Duc Canh	東京大学 大学院工学系研究科
	佐野大輔	東北大学 大学院工学研究科
	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

研究要旨

本研究では、粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を適用することにより、水道原水における水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。その結果、対象とした水道原水 A においては、PCR 法単独による定量により、エンテロウイルス及びロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度存在していることが明らかとなった。これに対し、アデノウイルス、ノロウイルス、サポウイルスについては、いずれの採水日においても定量下限値以下であった。水道原水 A に高濃度で存在するエンテロウイルス（エンテロウイルス属に属するコクサッキーウイルス）及びロタウイルスについて、培養法の一つである ICC-PCR 法の適用可能性を検討した。ICC-PCR 法において、感染力を有するウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上存在する場合には、宿主細胞を用いた培養後に遺伝子濃度が増加することが確認された。従って、水道原水 A の濃縮試料に培養可能なエンテロウイルス株、あるいはロタウイルス株が 10^4 copies/mL 以上の濃度で含まれる場合には、ICC-PCR 法によって感染価を評価できる可能性が示された。

厳格な濁度管理（0.14 NTU 以下）を行っている国内の 4 つの浄水場から 12 カ月間にわたって採取した実水を用いて、遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5（CVB5）の不活化効率について検討した。その結果、CVB5 の塩素消毒はあまり水質に影響されない可能性があることがわかった。日本の濁度管理は、塩素消毒の効率をコントロールする間接的な役割を担っている可能性が示唆された。

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有用なトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）の検査方法を確立することを目的として、原水、ろ過水、浄水試料を用いた検査方法の評価を行った。Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit を用いた直接抽出・精製法を原水試料を用いて評価した結果、当該キットによる PMMoV の検出結果は陰電荷膜法による濃縮を行う方法と概ね一致しており（一致率は 93%）、PMMoV 濃度の測定値は当該キットの方が有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。また、ろ過水および浄水試料を用いた評価では、

当該キットを用いて 10^{3-4} copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を検出できること、陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量から当該キットを用いてウイルス RNA を抽出・精製することで、 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることが示された。

A. 研究目的

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遺伝子マーカー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、PMMoV の管理目標値を検討するためのリスク評価に必要なデータとして、水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態把握、塩素消毒における病原ウイルスの不活化を保証する水質の条件、および水道事業者の水質担当者が実施しやすい PMMoV 検査方法の確立を目的として、以下に示す 3 つの研究タスクを実施した。

- 1) 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査
 - 2) 遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価
 - 3) PMMoV 検査方法の評価
- これら 3 つのタスクの具体的な目的・概要を以下に示す。

A1. 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査

水試料中のウイルスを感染力を保持した状態で濃縮・回収可能な粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を適用すると共に、PMA-PCR 法の改良法である PMAxx-Enhancer-PCR 法¹⁾、並びに ICC-PCR 法によるウイルス定量を適用することにより、水道原水における感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態を明らかにすることを目的とした。

今年度は、粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を水道原水として利用されている河川水に適用し、PCR 法単独による水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。また、ウイルスの感染価評価に向けた PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法の適用可能性を検討した。

A2. 遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価

遊離塩素のウイルス不活化効果は pH によって異なることが広く知られており、USEPA ガイダンスマニュアルでは、温度と pH によって消毒剤濃度 × 接触時間 (CT) の推奨値を提示している²⁾。最近の研究では、pH と温度以外の水源水質 (塩化物濃度、濁度、水質マトリックスなど) もウイルス不活性化の効率に影響を与えるとされている³⁻⁵⁾。例えば、Wati ら (2019) は、CVB5 不活性化の効率は、濁度 20 NTU では、濁度 5 NTU 未満に比べ低くなることを報告している。しかし、このような効果は、日本の場合は濁度 0.1 度 (約 0.14 NTU) 以下、TOC 濃度が低いなど、浄水処理に関連する条件下でほとんど検証されていない。そこで、今年度は、厳格な濁度管理 (0.14 NTU 以下) を行っている国内の 4 つの浄水場から 12 カ月間にわたって採取した実水を用いて、遊離塩素によるコクサッキーウイルス B5 (CVB5) の不活化効率について検討した。

A3. PMMoV 検査方法の評価

令和 3 年度に実施された厚生労働科学研究費補助金「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」微生物 (ウイルス) 分科会の研究では、市販の核酸抽出・精製キットを用いて、水道水試料に 10^3 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を簡便に検査できることが示された⁶⁾。また、水道事業者が調査研究を目的としてろ過水や浄水試料中の PMMoV を測定するには、さらに低い濃度域も測定できる方法も望まれた。今年度は、当該キットを用いて国内 21 箇所の浄水場の原水試料中の PMMoV を測定し、当該キットの有用性を示すこと、および陰電荷膜法による濃縮と当該キットを組み合わせ、ろ過水や浄水試料に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることを示すことを目的とした。

B. 研究方法

B1. 水道原水において感染力を有する病原ウイルスの実態調査

(1) 水道原水への粉末活性炭と UF 膜を組み合わせたウイルス濃縮法の適用

2022 年 4 月から 12 月に凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している国内の浄水場において原水を採水した (水道原水 A)。水道原水 A (河川水; pH: 7.1-7.7, 濁度: 7.6-38.3 NTU, DOC: 1.5-3.0 mg/L, UV260: 0.05-0.10 cm⁻¹, アルカリ度: 30.0-39.4 mg-CaCO₃/L) 30 L に、予備検討において水試料中のウイルスを感染力を保持した状態で濃縮・回収可能であることが示された粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を適用し、濃縮試料と逆洗試料を作製した。濃縮試料及び逆洗試料のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量することにより、水道原水におけるウイルス濃度を算出した。測定対象は、アデノウイルス、エンテロウイルス (ポリオウイルス, コクサッキーウイルス, エコーウイルスを含む), ノロウイルス (GI 遺伝子群及び GII 遺伝子群を区別して定量), サポウイルス, ロタウイルス, PMMoV とした。

(2) ICC-PCR 法におけるウイルス接種濃度がウイルス増殖に与える影響

後述する水道原水における水系感染症ウイルスの存在実態調査結果を踏まえ、CVB5 Faulkner 株及び A 群ロタウイルス Wa 株を対象とし、ICC-PCR 法の適用可能性を検討した。具体的には、それぞれのウイルスの宿主細胞である BGM 細胞, MA104 細胞を用いた ICC-PCR 法を実施し、ウイルス接種濃度がウイルスの増殖に与える影響を評価した。すなわち、培養・精製した感染力を有する CVB5, あるいはロタウイルスを 10²⁻⁷ copies/mL 程度になるように宿主細胞培養用液体培地にて 10 倍段階希釈した後、宿主細胞に接種し、予め最適化した培養日数経過後の培養液のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した。

B2. 遊離塩素による CVB5 の不活性化に及ぼす水質の影響

(1) ウイルスの増殖・精製

本研究では、CVB5 Faulkner 株を使用した。

CVB5 は、BGM 細胞によって増殖され、密度勾配遠心分離によって精製した⁷⁾。精製したウイルスストックは、実験を行うまで -20°C で保存した。感染性 CVB5 は、96 ウェルプレート上の BGM 細胞を用いた最確数 (MPN) 法により計測した。サンプルは 1 希釈につき 5 ウェルで 10 倍で連続希釈した。陽性ウェルの数は顕微鏡でカウントし、R パッケージ {MPN} で解析した⁸⁾。

(2) 消毒試験に用いた水試料

A, B, C, D の水源は、それぞれ河川水, 伏流水, 河川水, 湖水である。サンプリング期間は 2021 年 2 月 24 日から 2022 年 2 月 28 日で、A 処理場と C 処理場で 20 サンプル, B 処理場で 7 サンプル, D 処理場で 14 サンプル, 合計 61 サンプルを採取した。これらの水サンプルは、消毒直前の工程水を採取した。水サンプルは輸送後、-20°C で保存し、解凍したサンプルを消毒実験に使用した。処理場 A および C から採取した塩素処理済みの水サンプルについては、実験前に室温で一晩静置することで脱塩素処理を行った。

(3) 消毒試験

ウイルス原液 (50 µL) を試験水 (20 mL) に添加し、フラスコ内で静かに攪拌した。試験水は、19.6±1.4°C, 10 mM リン酸緩衝液 (1 mL) (和光, 日本) により緩衝された pH 7.0 に維持した。次に、塩素原液を試験水中に添加し、初期濃度 0.6 mg/L とした。25 秒ごと (0 秒, 25 秒, 50 秒, 75 秒) に 0.5 mL ずつ採取し、チオ硫酸ナトリウム (5 µL, 5000 mg/L) と混合して残留遊離塩素を中和した。採取したサンプルは、ウイルス測定に使用した。すべての実験は二回ずつ実施した。ガラス器具は、実験前に 50 mg/L の次亜塩素酸ナトリウムで一晩浸し、Milli-Q 水ですすいで塩素消費を抑制した。遊離塩素濃度は、DR890 色差計 (HACH, USA) の N,N-diethyl-p-phenylenediamine 比色法を用いて測定した。不活化速度定数 (k) (mg⁻¹.min⁻¹.L) は、Chick-Watson モデル ($N/N_{T0} = e^{-kCT}$) に適合させて推定した。

B3. PMMoV 検査方法の評価

(1) 原水試料を用いた核酸抽出・精製キットの評価

2022 年 10 月および 2023 年 1 月に国内 21 箇所

の浄水場)において原水試料(N=42)を採水した。これまでの実態調査⁹⁾と同様に、国内の主要な河川流域をカバーするように北海道から九州・沖縄地方の浄水場を選定した。試料は、冷蔵状態で国立保健医療科学院に輸送した。

試料 1 L に含まれる PMMoV は、プロセスコントロールとして MNV を添加した後に、陰電荷膜法⁹⁾により濃縮した。回収したウイルス濃縮液のうち 1 mL から、NucliSENS mini MAG (bioMérieux) を用いてウイルス RNA を抽出・精製した。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は、Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid (WETNA) Kit を検討した。すなわち、40 mL (阻害が大きい場合には 4 mL) の原水試料に MNV をおよそ 10^7 copies 添加・混合し、キットを用いて 40 μ L の RNA 溶液を精製した。MNV 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。

(2) 陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた測定方法の評価

国内 21 箇所の浄水場において、2023 年 1 月にろ過水と浄水試料(それぞれ N=21)を採水した。浄水場 D, E, L, T のろ過水試料については、Promega WETNA Kit を用いたウイルス RNA の直接抽出・精製法と陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量(10 mL)から当該キットを用いて RNA を抽出・精製する方法を比較した。ろ過水試料の体積は、Promega WETNA Kit で直接抽出する試料は 40 mL、陰電荷膜法で濃縮する試料は 1 L とした。試料 1 L から得られたウイルス濃縮液全量から RNA を抽出することで、原理的には水試料中に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できる方法となる。さらに、本方法を 8 箇所の浄水場(A, C, F, J, K, M, P, Q)で採水されたろ過水と浄水試料(1 L)に適用した。上述したリアルタイム RT-PCR 法を用いて、MNV および PMMoV 濃度を定量した。

C. 結果及び考察

C1. 水道原水において感染力を有する病原ウイル

スの実態調査

(1) 水道原水 A におけるウイルスの存在実態

粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法を適用し、水道原水 A におけるウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した(図 1)。対象とした水道原水においては、エンテロウイルス及びロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度存在していることが明らかとなった。これに対し、アデノウイルス、ノロウイルス、サポウイルスについては、いずれの採水日においても定量下限値(10^{2-3} copies/L)以下であった。従って、水道原水 A においては、エンテロウイルス及びロタウイルスを PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法を用いた評価の対象ウイルスとすることが妥当であると判断された。一方、PMMoV は、対象とした水系感染症ウイルスに比べて 10 倍以上高い 10^{6-7} copies/L 程度の高濃度で存在していることが明らかとなった。加えて、PMMoV については、濃縮工程を経ることなく濃度定量が可能であったことから、直接定量した場合の濃度と濃縮後に定量した場合の濃度を比較することにより、濃縮工程における PMMoV の回収率を算出した。その結果、PMMoV の回収率は 30%程度であったことから、粉末活性炭吸着と UF 膜濃縮を組み合わせたウイルス濃縮法は、PMMoV についても効果的に濃縮可能であることが示された。

(2) ICC-PCR 法におけるウイルス接種濃度がウイルス増殖に与える影響

宿主細胞を用いた培養前後における培養液の CVB5 濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した(図 2)。培養前の CVB5 接種濃度(添加後の濃度) 10^{4-7} copies/mL においては、いずれの場合も培養により RNA 濃度が増加し、培養日数 3 日で 10^{10-11} copies/mL 程度に達した。一方、接種濃度 10^{2-3} copies/mL においては、培養による RNA 濃度の増加は見られなかった。従って、感染力を有する CVB5 が 10^4 copies/mL 以上存在する場合には、宿主細胞を用いた培養後に RNA 濃度の増加が確認できることが明らかとなった。また、上述したように、RNA 濃度の増加が確認できる場合においては、接種濃度に関わらず 10^{10-11} copies/mL 程度まで RNA 濃度が増加することから、増殖の有無、すなわち、感染性の有無の判別が容易であり、培

養前に比べて増殖が確認された試料を陽性とする MPN 法の適用が可能であると判断された。

同様の検討をロタウイルスについても実施したところ、CVB5 の場合と同様に、感染力を有するロタウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上存在する場合には、宿主細胞を用いた培養後に RNA 濃度の増加が確認できることが明らかとなった (図 2)。また、RNA 濃度の増加が確認できる場合においては、初期濃度に関わらず 10^{8-9} copies/mL 程度まで RNA 濃度が増加することが確認されたことから、MPN 法の適用が可能であると判断された。

以上の結果から、定量対象試料において培養可能なコクサッキーウイルスを含むエンテロウイルス属のウイルス、あるいはロタウイルスの濃度が 10^4 copies/mL 程度以上である場合には、ICC-PCR 法によりウイルスの感染性の有無を評価できるものと考えられた。実際に、本研究で対象とした水道原水 A の濃縮試料 (1,000 倍濃縮後の試料) においては、エンテロウイルス、あるいはロタウイルスの濃度が 10^4 copies/mL 以上の場合も確認されたことから、ICC-PCR 法を用いることにより、感染価評価が可能であることが示唆された。

C2. 遊離塩素による CVB5 の不活性化に及ぼす水質の影響評価

塩素消毒の不活性化速度定数は、A 処理場 ($K_A = 8.2 \pm 3.0$)、B 処理場 ($K_B = 9.4 \pm 2.2$)、C 処理場 ($K_C = 6.7 \pm 2.5$)、D 処理場 ($K_D = 7.5 \pm 3.5$) であり、サンプル間で有意差はなかった。この結果は、試験した飲料水サンプル間で塩素化の効率が比較的類似していることを示している。本研究における 4-log 不活性化の CT 値は $1.06 \sim 1.28$ mg.min/L であり、 1.02 mg.min/L¹⁰⁾ および $1.15 \sim 1.19$ mg.min/L¹⁾ と報告した以前の研究と一致した。これらの先行研究は、今回の研究と同様の条件 (CVB5 Faulkner 株, pH=7, 水温=20°C) で行われたが、実際の飲料水の代わりに PB バッファーが使用された。したがって、CVB5 に対する塩素消毒の効率は、試験した飲料水と PB バッファーと同様であったと考えられる。このことは、今回の試験で使用した飲料水の水質が塩素消毒の効率を阻害していないことを示唆しているのかもしれない。

これまで、水質特性 (全有機炭素 [TOC], アルカリ性, 硬度, イオン強度, 濁度など) が塩素消毒の効率に影響を及ぼす可能性があるという理論的に考えられてきた。しかし、今回の研究の結果、飲料水のこれらのパラメータは、特に濁度レベルが制御された日本の飲料水 (<0.1 度) では、遊離塩素による消毒の効率に影響を与える重要な要因ではない可能性があることが示された。実際、いくつかの先行研究では、AdV2, CVB5, E1, MNV のウイルス不活化率は、イオン強度レベルの高い飲料水において高いことが報告されている¹¹⁾。さらに、カルシウム硬度として CaCO_3 (0-150 mg/L) は、遊離塩素による AdV の不活性化に影響しないことが判明し、アルカリ度が 150, 200, 300 mg/L と増加しても AdV2 に対する塩素除去効率に影響しないことが報告された¹²⁾。以前の研究では、TOC 濃度の異なる飲料水 (1.9, 2.2, 18 mg/L) を比較した場合、TOC の増加と不活性化率の低下との関連は観察されなかった¹¹⁾が、今回の研究では、TOC の増加による不活性化率の低下は観察されなかった。

なお、本研究では、飲料水の温度と pH を制御しているため、これらの因子が塩素消毒の効率に及ぼす影響は不明である。一般に、ウイルスの不活性化速度は、温度の低下や pH の上昇に伴って低下することが知られている。実際、先行研究において、5°C の緩衝液中で CVB5 が $4 \log_{10}$ 減少するのに必要な CT 値は、pH 7 では 7.4 mg.min/L であったが、pH 8 では 10 mg.min/L となることが報告された³⁾。また、飲料水中の CVB5 の遊離塩素による不活性化を 15°C で調べたところ、 $3 \log_{10}$ のウイルス減少に必要な CT 値は、pH が 7 から 8 に上がるにつれて 1.0 mg.min/L から 1.6 mg.min/L に増加することがわかった。これらのことから、水温と pH が飲料水中のウイルスの塩素消毒不活性化率に、より強く影響する可能性が示唆された。日本の濁度管理は、遊離塩素消毒の不確実性を低減する間接的な役割を果たし、水系ウイルスのリスク低減に寄与していると考えられる。

C3. 水道水の PMMoV 検査方法の評価

(1) 原水試料を用いた核酸抽出・精製キットの評価

2022 年 10 月に採水された原水試料を陰電荷膜法で濃縮した結果、MNV 回収率は 3 試料で 5.7–9.3%だったが、それ以外の 18 試料では 10–51%であり、比較的良好な回収率だった。PMMoV は、浄水場 D および U を除いた 19 の試料から 3.2–5.9 copies/L の濃度で検出された（検出率は 90%）。Promega WETNA Kit では MNV 回収率が 10–132% だった。PMMoV は、上記の浄水場 D および U に加えて浄水場 M も不検出だった（検出率は 86%）。PMMoV の検出濃度は、4.0–6.4 copies/L であり、Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。

2023 年 1 月の試料では、陰電荷膜法による MNV 回収率は 1 試料で 5.6%だったが、残りの 20 試料では 11–50%であり、10 月の試料と同程度だった。Promega WETNA Kit の MNV 回収率は 3.2–150% であり、一部の試料（浄水場 H）では回収率が 10% 未満となる場合も確認された。PMMoV は、浄水場 C および D を除いて、両法による検出・不検出の結果が一致していた。PMMoV の検出濃度も 10 月の試料と同程度であり、Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.05$ ）。

10 月と 1 月の採水試料を合わせて比較した結果（図 3）、PMMoV 検出結果の一致率は 93% であり、検出濃度は Promega WETNA Kit の方が陰電荷膜法よりも有意に高かった（対応のある t 検定、 $P < 0.01$ ）。以上の結果から、Promega WETNA Kit は、水道原水中の PMMoV の測定にも有用であることが示された。ただし、試料 40 mL から抽出・精製する際には、抽出・精製効率の低下に注意する必要がある。抽出 RNA の原液に加えて 10 倍希釈液をリアルタイム RT-PCR に供するなど、抽出・精製や RT-PCR における阻害を評価することが重要である。

(2) 陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた測定方法の評価

浄水場 D, E, L, T から収集したろ過水試料を用いて、Promega WETNA Kit を用いた直接抽出・精製法と陰電荷膜法に当該キットを組み合わせ

た方法の評価した（表 1）。MNV 回収率は、それぞれの測定方法で、38–116%、66–139% であり、良好な回収率だった。PMMoV の検出濃度は、浄水場 E のろ過水試料では、WETNA Kit の方が 1 オーダー高く測定されたが、それ以外の試料では、2 倍の範囲内（リアルタイム PCR における 1 サイクルに相当）であり、同程度だった。

次に、陰電荷膜法に Promega WETNA Kit を組み合わせた方法を 8 箇所の浄水場で採水されたろ過水、浄水試料に適用した（表 2）。MNV 回収率は、ろ過水試料で 24–113%、浄水試料で 25–69% だった。PMMoV は、 $7.0 \times 10^1 \sim 6.0 \times 10^3$ copies/L の濃度で 10 試料から検出された。以上の結果から、陰電荷膜法と Promega WETNA Kit を組み合わせた方法を用いることで、PMMoV が $10^3 \sim 10^4$ copies/L のオーダーで含まれる試料では、直接抽出・精製法と同程度の測定値が得られること、および PMMoV が 10^2 copies/L のオーダーで含まれる試料でも測定できることが示された。この方法を用いることで、管理目標値の候補（ 10^4 copies/L）よりも 2 オーダー低い濃度域のデータも得られるため、水道事業体において浄水処理プロセスの PMMoV 除去効率の測定や PMMoV を用いたウイルスのリスク管理の実施につながることを期待される。令和 5 年度は、Promega WETNA Kit を用いた直接抽出法・精製法や陰電荷膜法と組み合わせた方法で、水道事業体において PMMoV を測定し、データを蓄積する予定である。

E. 結論

水道原水 A においては、PCR 法単独にて定量されたエンテロウイルス及びロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度存在していることが明らかとなった。

ICC-PCR 法において、感染力を有するウイルスが 10^4 copies/mL 程度以上存在する場合には、宿主細胞を用いた培養後に遺伝子濃度の増加が確認されたことから、定量対象試料において培養可能なウイルス濃度が 10^4 copies/mL 程度以上である場合には、ICC-PCR 法によりウイルスの感染性の有無を評価できるものと考えられた。従って、本研究で対象とした水道原水 A の濃縮試料の内、エンテロウイルス、あるいはロタウイルスの濃度が 10^4 copies/mL 以上であることが確認された試料については、ICC-PCR 法を用いることにより、ウイ

ルスの感染性の有無を評価できることが示唆された。

浄水の塩素消毒によるウイルスの不活性化率に水質はあまり影響しない可能性があり、水温や pH が塩素消毒の効率に影響する可能性が高いことを示す証拠となる。

水道事業体において実施可能な PMMoV の検査方法を確立することを目的として、市販の核酸抽出・精製キット (Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit) の有用性を評価した。原水試料を用いた評価では、陰電荷膜法による濃縮を行う方法と PMMoV の検出結果は概ね一致しており (一致率は 93%)、当該キットによる PMMoV 濃度の測定値は有意に高かった (対応のある t 検定, $P < 0.01$)。また、ろ過水および浄水試料を用いた評価では、当該キットを用いて、陰電荷膜法により得られたウイルス濃縮液全量 (10 mL) からウイルス RNA を抽出・精製することで、試料に 10^2 copies/L のオーダーで含まれる PMMoV を測定できることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Hu, Q., Matsushita, T., Matsui, Y., Takagi, H., Oka, T. Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. *Water Research* 236, 119951, 2023.
- 2) Miura, T., Kadoya, S., Takino, H., Sano, D., Akiba, M. Temporal variations of human and animal Rotavirus A genotypes in surface water used for drinking water production. *Frontiers in Microbiology* 13, 912147, 2022.

2. 学会発表

- 1) Shirakawa, D., Shirasaki, N., Yamashita, R., Matsumura, T., Koriki, S., Matsushita, T., Matsui, Y. Investigating virus reduction efficiencies in coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration by a combination of

full-scale studies and lab-scale experiments. IWA World Water Congress & Exhibition, Copenhagen, Denmark, 11-15 September 2022.

- 2) 白川大樹, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルスの存在実態の把握: PMAx-Enhancer-PCR 法による調査. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 3) 浅川高志, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 培養困難なヒトノロウイルスの浄水処理性評価に向けた高感度に定量可能な革新的ウイルス様粒子の創製. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 4) 平岩竜士, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス粒子の状態変化はウイルスの凝集沈澱-砂ろ過処理性にどの程度影響するのか?. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 5) 福井健暉, 川上悟史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 水道原水に存在する病原ウイルスの感染価評価: 活性炭と UF 膜を組み合わせたウイルス濃縮法の構築と適用. 第 57 回日本水環境学会年会, 松山, 2023/3/15-17.
- 6) 三浦尚之, 瀧野博之, 前田暢子, 東城まゆみ, 佐野大輔, 秋葉道宏, 増田貴則. 流入下水および表層水試料からの新型コロナウイルス RNA 検出手法の検討. 第 57 回日本水環境学会年会講演集, 372, 2023.
- 7) 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価. ウイルス性下痢症研究会第 33 回学術集会, 長崎, 2022/11/12.
- 8) 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦. 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理工程におけるヒトサポウイルスの未知動態の解明. 第 29 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2022/11/3-4.
- 9) 白川大樹, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 低圧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除去性評価 令和 4 年度日本水道協会全国会議 (水道研究発表会), 名古屋, 2022/10/19-21.
- 10) 三浦尚之. 水道水源における病原微生物汚染

とリスク管理. 第 25 回日本水環境学会シンポジウム講演集, 83-84, 2022.

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) Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., 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) US EPA. Guidance Manual for Compliance with the Filtration and Disinfection Requirements for Public Water Systems Using Surface Water Sources, 1991.
- 3) 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.
- 4) Szczuka, A., Horton, J., Evans, K.J., DiPietri, V.T., Sivey, J.D., Wigginton, K.R. Chloride enhances DNA reactivity with chlorine under conditions relevant to water treatment. *Environ. Sci. Technol.* 56, 13347–13356, 2022.
- 5) Wati, S., Robinson, B.S., Mieog, J., Blackbeard, J., Keegan, A.R. Chlorine inactivation of coxsackievirus B5 in recycled water destined for non-potable reuse. *Journal of Water and Health* 17, 124–136, 2019.
- 6) 秋葉道宏, 三浦尚之, 小田琢也, 佐野大輔, 門屋俊祐, 三浦耀平, 瀧野博之. 原水におけるロタウイルスの遺伝子型分布および水道水におけるトウガラシ微斑ウイルスの実態と検査方法の検討, 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3年度研究報告書, 47-57, 2022.
- 7) Torii, S., Furumai, H., Katayama, H. Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater. *Science of The Total Environment* 756, 143067, 2021.
- 8) Ferguson, M., Ihrle, J.. MPN: Most Probable Number and Other Microbial Enumeration Techniques, 2019.
- 9) 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.
- 10) Torii, S., Corre, M.-H., Miura, F., Itamochi, M., Haga, K., Katayama, K., Katayama, H., Kohn, T. Genotype-dependent kinetics of enterovirus inactivation by free chlorine and ultraviolet (UV) irradiation. *Water Research* 220, 118712, 2022.
- 11) Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Hill, V.R. Effects of Source Water Quality on Chlorine Inactivation of Adenovirus, Coxsackievirus, Echovirus, and Murine Norovirus. *Appl Environ Microbiol* 76, 5159–5164, 2010.
- 12) Page, M.A., Shisler, J.L., Mariñas, B.J.. Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Research* 43, 2916–2926, 2009.

表1. ろ過水試料の MNV 回収率と PMMoV 濃度比較

浄水場	WETNA (Promega)*		陰電荷膜法+WETNA (Promega)*	
	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]
D	51	7.6×10^3	123	1.4×10^4
E	38	1.5×10^4	77	1.4×10^3
L	89	1.7×10^3	139	1.4×10^3
T	116	5.2×10^3	66	9.1×10^2

*Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid (WETNA) Kit

表2. ろ過水, 浄水試料の MNV 回収率と PMMoV 濃度

浄水場	ろ過水試料		浄水試料	
	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]	MNV 回収率 [%]	PMMoV 濃度 [copies/L]
A	71	1.9×10^2	45	6.5×10^2
C	34	不検出	25	7.4×10^1
F	113	1.3×10^2	69	2.0×10^2
J	53	7.0×10^2	47	7.0×10^1
K	41	不検出	30	不検出
M	38	不検出	31	不検出
P	24	7.5×10^1	57	6.0×10^3
Q	65	不検出	47	4.4×10^2

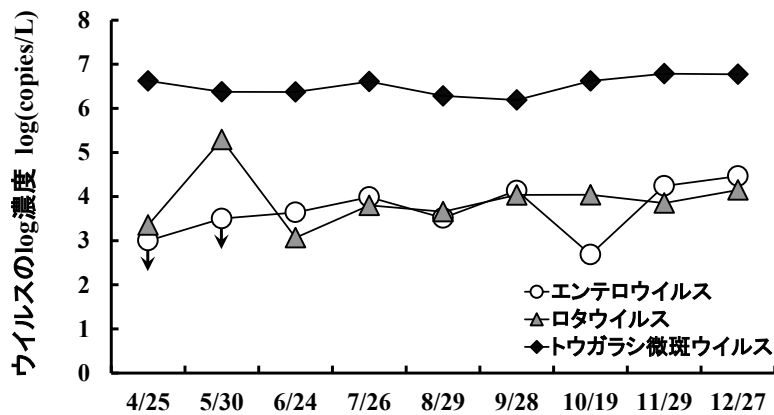


図1. 水道原水 A におけるウイルス濃度 (図中の矢印は定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

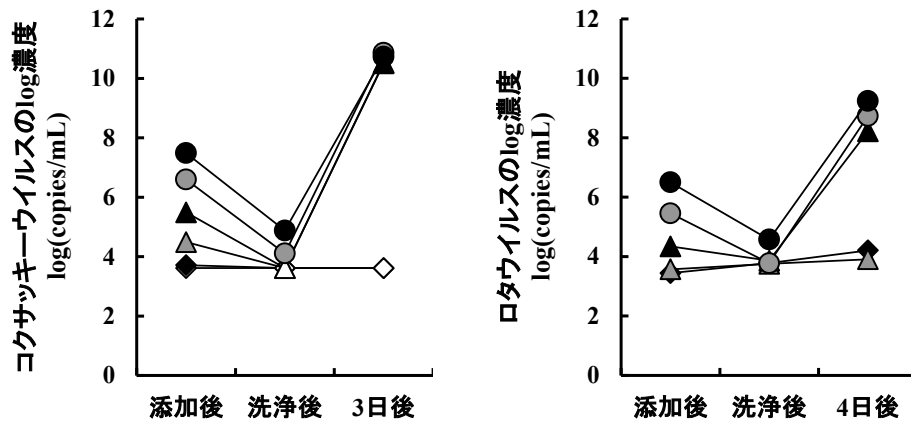


図2. ICC-PCR法におけるウイルス接種濃度（添加後の濃度）がウイルスの増殖に与える影響（図中の白抜き値は定量下限値以下であり，定量下限値をプロット）

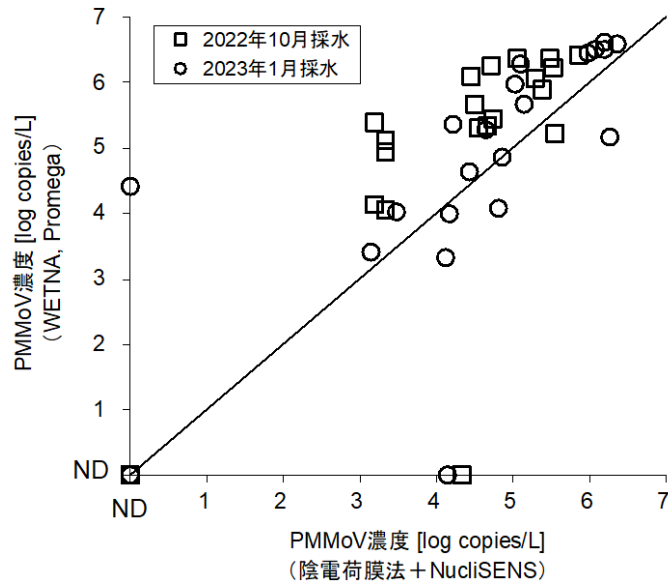


図3. 原水試料中のPMMoV濃度測定値の比較. 2022年10月, 2023年1月に採水した試料（それぞれN=21）について，検討した二つの方法の測定値を比較する単純プロットを作成した.