

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5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
	齊藤巧介	神奈川県企業庁 水道水質センター
	佐藤啓貴	埼玉県企業局 行田浄水場
	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
	Miaomiao Liu	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 膜濃縮の組み合わせ条件を改良した濃縮法と PMAx-Enhancer-PCR 法及び 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 A 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調査を実施した。PCR 法単独によるウイルス定量では、採水時期による濃度変動が見られたものの、アデノウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度、トウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) が 10^{6-7} copies/L 程度存在していることが確認された。水系感染症ウイルスが陽性となった幾つかの試料について、ICC-PCR 法による定量を実施したところ、エンテロウイルス及びロタウイルスが感染力を有する状態でそれぞれ 10 MPN/L 程度、1-3 MPN/L 程度存在する可能性があることが明らかとなった。また、エンテロウイルスの定量においては、PMAxx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法との陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAxx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

河川の増水時の水質変動において、微生物リスクがどのように影響を受けているかを定量的に把握することを目的として、濁度に加え、大腸菌の迅速測定による水質変動把握を実現するため、 β -glucuronidase (GUS) 活性を測定する手法の妥当性を検討した。流入下水に対して、培養法と GUS 活性に非常に高い相関がみられたため、リアルタイムに近い水中の大腸菌測定が可能であることを確認した。次年度以降、水道原水の水質変動の把握に用いることが可能と考えられる。

研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関で共通のろ過水試料に含まれる PMMoV 濃度を測定し比較した。PMMoV 濃度がおよそ 10^5 , 10^4 , 10^3 copies/L のオーダーで含まれるように調整した高濃度、中濃度、低濃度試料は、それぞれの機関で概ね同様の測定濃度だった。同一濃度の試料では、測定濃度の差は最大でもおよそ 1 log であったことから、ろ過水における PMMoV の管理目標値として「 10^4 copies/L のオーダー以下」と設定することは、検査方法の測定精度の点からも実情に合うと考えられた。

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に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 の管理目標値を設定するために必要な、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、河川の増水時の水質変動において微生物リスクがどのように影響を受けるかの定量的把握、PMMoV 検査方法の測定精度の把握を目的として、以下に具体的な目的・概要を示す3つの研究タスクを実施した。

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

本研究では、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、改良し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 法単独に加え、PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法によるウイルス定量を実施することにより、感染力を有する水系感染症ウイルスの存在実態調査を実施した。

A2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

水道水の微生物学的安全性は、水道水質基準において大腸菌が検出されないことと規定されているが、大腸菌の不在だけでは水中のウイルス、原虫類に対する安全性は不十分であることが知られている。また、一般的に我が国では水中ウイルス濃度は原虫類より高く、水系感染リスクは相対的に大きい。

定量的微生物リスク評価では、モンテカルロ法により微生物濃度を確率密度に応じてランダムに設定して1日ごとのリスクを繰り返し計算し、合計して年間感染確率を算出している。年間感染

確率は、多くの場合、極端に微生物濃度の高い日によってほとんどを占められていることが分かっており²⁾、水系感染においては異常事態におけるリスク管理が重要であると考えられる。

そこで、本研究では河川の増水時の水質変動において、微生物リスクがどのように影響を受けているかを定量的に把握することを目的とする。

A3. PMMoV 検査方法の測定精度の評価

ウイルス分科会では、定量的微生物リスク評価に基づき、ろ過水における PMMoV の管理目標値として 10^4 copies/L のオーダー以下を提案した³⁾。これまでに水試料から核酸を直接抽出・精製する市販のキットを用いて、原水、ろ過水、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^{4,5)}。今年度は、検査方法の測定精度にも基づいた管理目標値を設定するために、研究分担者と研究協力者が所属する7機関において共通のろ過水試料に含まれる PMMoV を測定し、測定値のばらつきの範囲を明らかにすることを目的とした。

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

改良し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、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ため、PMAxx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法によるウイルス定量を実施した。2023年1月から12月に浄水場において採水した水道原水 A (pH: 6.8–7.3, 濁度: 5.7–35.2 NTU, DOC: 1.4–5.7 mg/L, UV260: 0.05–0.19 cm^{-1} , アルカリ度: 30.6–45.2 mg-CaCO₃/L) 30 L を 10 L ずつ3つに分け、活性炭吸着処理を実施した。この後、活性炭吸着処理水をメンブレンフィルター (膜孔径: 0.45 μm) にてろ過し、得られた処理水 30 L を 10 L ずつ3つに分けた後、UF 膜濃縮を3つの UF 膜を用いて約 4 °C (低水温条件) で実施することにより、それぞれ 5 mL、すなわち、3つの膜の合計 15 mL (10 L × 3 → 5 mL × 3) まで精製・減容した。この後、0.01 M リン酸バッファー 5 mL、あるいはヘキサメタリン酸ナトリウム (分散剤; 最終濃度: 0.01% [w/v])、Tween 80 (界面活性剤; 最終濃度: 0.5% [v/v])、アンチフォーム A (発砲防止

剤；最終濃度:0.001% [v/v]) を添加した 0.01 M リン酸バッファー5 mL (試薬添加条件) をそれぞれの UF 膜の表面に通水し (合計 15 mL: 5 mL × 3), 合計 30 mL をメンブレンフィルター (膜孔径:0.45 μm) にてろ過することにより, 水道原水中に存在するウイルスを回収・濃縮した (濃縮試料). また, 0.01 M リン酸バッファー10 mL, あるいは前述した試薬添加した 0.01 M リン酸バッファー10 mL (試薬添加条件) を UF 膜の通水方向とは逆の方向からそれぞれの UF 膜に通水し (合計 30 mL: 10 mL × 3), メンブレンフィルター (膜孔径:0.45 μm) にてろ過することにより, UF 膜に残存したウイルスを回収した (逆洗試料). 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, PMAxx-Enhancer-PCR 法, ICC-PCR 法にて定量し, 濃縮試料と逆洗試料の合計のウイルス量を求めることにより, 水道原水におけるウイルス濃度を算出した. なお, ウイルス濃度の算出においては, 濃縮工程におけるウイルスの回収率は 100%と仮定した.

B2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

水質変動については, 迅速に測定可能な水質パラメータとして濁度が広く用いられている. 本研究では, 濁度に加え, Coliminder (VWM Solutions, Vienna) を用いて大腸菌の迅速測定を実施した. 本手法は, β-glucuronidase (GUS) 活性を測定することにより, リアルタイムに近い水中の大腸菌測定を実現したものである^{6,7)}.

Coliminder の測定精度を調べるため, 下水流入水を用いてリン酸緩衝液による希釈列を作成し, 培養法との比較を行った. 培養法としては, Chromocult Coliform Agar を用い, 青紫のコロニーを大腸菌としてカウントした.

B3. PMMoV 検査方法の測定精度の評価

研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関において, PMMoV が含まれる共通のろ過水試料を分析し, 濃度の測定値を比較した. 2024 年 1 月に国内の浄水場において採水されたろ過水試料に, 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加えることで PMMoV を添加した. 調製した試料原液 (PMMoV 濃度およそ 10⁵ copies/L のオーダー) を「高濃度試料」とし, ろ過水試料で 10 倍, 100 倍希釈したものをそれぞれ「中濃度試料」, 「低濃度試料」と呼ぶこととした.

試料は国立保健医療科学院において調製し, 研究分担者と研究協力者が所属する 6 機関に冷蔵状態で送付した.

以下の試薬・キット等を 7 機関で共通して用いることとし, それ以外の消耗品, リアルタイム PCR 装置 (研究分担者による詳細研究報告書を参照) はそれぞれの機関で保有するものを使用した. 高濃度, 中濃度, 低濃度試料それぞれ 40 mL から Promega Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit のプロトコールにしたがって核酸を抽出した. 核酸抽出は, 3 併行で実施した. リアルタイム PCR で核酸試料を測定する際は, 抽出核酸試料原液と 10 倍希釈液をそれぞれ 1 ウェルずつ試験することとし, 原液と 10 倍希釈液の測定値を比較することで, RT-PCR 阻害の有無を評価した.

【共通で用いた試薬・キット】

- ・核酸抽出キット: Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit (A2991, Promega)
- ・リアルタイム RT-PCR 試薬キット: One Step PrimeScript III RT-qPCR Mix (RR600A, タカラバイオ株式会社)
- ・プライマー, TaqMan プローブ: PMMV-FP1-rev, PMMV-RP1, PMMV-Probel
- ・検量線用のポジティブコントロール: Strings DNA Fragments (直鎖, 2 本鎖, 塩基長 590 bp, Thermo Fisher Scientific)

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

2023 年 1 月及び 2 月に採水した原水については低水温条件にて, 3 月から 12 月に採水した原水については試薬を添加した低水温条件にて濃縮を実施し, 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 (図 1). 昨年度報告した 2022 年 4 月から 12 月のウイルス濃度の傾向と同様に, 対象とした水道原水においては, 採水時期による濃度変動が見られたものの, エンテロウイルス及びロタウイルスが 10³⁻⁵ copies/L 程度の濃度で存在していることが確認された. また, 2023 年 1 月, 2 月, 4 月, 12 月に採水した原水においては, アデノウイルス, ノロウイルスの両方, あるいはいずれかが陽性となり, 特に, アデノウイルスについては, 10³⁻⁵ copies/L 程度の濃度で存在する場合があることが

明らかとなった。これに対し、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。一方、PMMoV については、昨年度報告した傾向と同様に、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確認された。

(2) PMAXx-Enhancer-PCR 法及び ICC-PCR 法による水系感染症ウイルスの定量

PCR 法単独によるウイルス定量においてエンテロウイルス及びロタウイルスが陽性となった 2023 年 1 月、2 月、3 月の試料について、PMAXx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した (表 1)。1 月、2 月の試料においては、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて定量した場合、いずれのウイルスも定量下限値以下の値となり、PCR 法単独にて得られた濃度と比べて大きな差異が確認された。従って、これらの試料中に存在するエンテロウイルス及びロタウイルスのほとんどは、PMAXx がウイルス粒子内部まで透過可能な状態、すなわち、外殻タンパク質の損傷により感染力を失った状態である可能性が示唆された。一方、3 月の試料においては、ロタウイルスについては、定量下限値以下の値となったのに対し、エンテロウイルスについては、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は、PCR 法単独にて得られた濃度と同程度の値となった。従って、3 月の試料中に存在するエンテロウイルスは、外殻タンパク質の損傷が無く、感染力を有する完全体の状態である可能性が示唆された。

同一の試料について、ICC-PCR 法による定量を実施した (表 1)。エンテロウイルスについては、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度が定量下限値以下の値となった 1 月、2 月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた濃度も定量下限値以下の値となった。一方、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度が PCR 法単独にて得られた濃度と同程度の値となった 3 月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果も陽性となり、エンテロウイルスが感染力を有する状態で 10^1 MPN/L 程度存在することが明らかとなった。また、PMAXx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法で定量下限値は大きく異なるものの、両定量法間の陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAXx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

一方、ロタウイルスについては、いずれの試料

においても、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて得られた濃度は定量下限値以下の値となったのに対し、1 月及び 3 月の試料においては、ICC-PCR 法にて得られた結果は陽性となり、ロタウイルスが感染力を有する状態で $10^{0.1-0.4}$ MPN/L、すなわち、1-3 MPN/L 程度存在することが明らかとなった。上述したように、両定量法間で定量下限値が大きく異なることから、PMAXx-Enhancer-PCR 法にて得られた定量下限値以下の値と ICC-PCR 法にて得られた濃度の大小関係を議論することはできないことから、ロタウイルスの感染力評価手法の代替としての PMAXx-Enhancer-PCR 法の有効性については、更なる検討が必要であると考えられた。

C2. 水系感染リスク管理の向上に向けた水道原水の微生物濃度変動の評価

結果を図 2 に示す。下水流入水に存在する大腸菌について、培養法による計測数と、GUS 活性が非常に高い相関を示していることが確認できた。

今後は水道原水となる地表水を対象として、大腸菌の連続監視を実施するとともに、同時に採水して培養法に依る大腸菌測定、ウイルス濃度の測定などを実施し、リスク評価につながる知見を得る予定である。

C3. PMMoV 検査方法の測定精度の評価

PMMoV の検査方法は、1) ウイルス核酸の抽出・精製と 2) リアルタイム RT-PCR によるウイルス遺伝子数の定量の大きく分けて 2 つの作業から構成されるが、測定精度を考慮して PMMoV の管理目標値を設定するために、水道事業体を含む 7 機関間での PMMoV 測定値のばらつきを調査した (表 2)。それぞれの機関において、「高濃度試料」、「中濃度試料」、「低濃度試料」は、概ね、 10^5 、 10^4 、 10^3 copies/L のオーダーで測定された。機関 D では業務の都合により試料送付から 3 週間以上経過してからの測定であったため、PMMoV の分解と核酸抽出阻害により測定濃度が低くなったと考えられた。そのため、「中濃度試料」と「低濃度試料」では、3 併行のうち定量値が得られない試料もあった。機関 E では、それぞれの濃度で作業者を変更したため、作業者による差も測定濃度の差に含まれたと考えられた。

7 機関における「高濃度試料」の測定値は、 $7.0 \times 10^4 \sim 8.0 \times 10^5$ ($4.8-5.9 \log$) copies/L の範囲であり、最小値と最大値ではおよそ 1 log の差が見られた。機関 D の測定値を除いた場合、「中濃度試

料」は $1.7 \times 10^4 \sim 6.7 \times 10^4$ (4.2–4.8 log) copies/L の範囲であり、最小値と最大値の差は 0.6 log だった。「低濃度試料」では、 $1.4 \times 10^3 \sim 9.2 \times 10^3$ (3.1–3.9 log) copies/L の範囲であり、最小値と最大値では 0.8 log の差が見られた。試料送付から 1 週間程度以内に核酸抽出・精製が行われた場合には、中濃度、低濃度試料におけるばらつきの範囲は 1 log 未満だった。したがって、ろ過水における PMMoV の管理目標値を「 10^4 copies/L のオーダー以下」と設定することは、採用する検査方法の精度を考慮しても現実的であると考えられた。ただし、機関内における作業による測定濃度の差が見られたため、キットを用いた核酸・抽出精製操作にある程度習熟する必要がある。核酸抽出・精製やリアルタイム PCR の操作、データの解釈について、研修等を実施することも検討する必要がある。

リアルタイム RT-PCR による定量は、遺伝子の増幅曲線（蛍光強度）が閾値の線（threshold line）と交わるサイクル数（Ct 値）を測定し、濃度の常用対数値を X 軸に、Ct 値を Y 軸にプロットした検量線を用いて行われる。Bustin らによるリアルタイム PCR による定量に関するガイドライン⁸⁾では、測定精度の評価において変動係数（CV）は、Ct 値ではなくコピー数や濃度に対して算出すべきとされている。本研究では、Ct 値との間に直線関係が成立する濃度の常用対数値について変動係数を求めることとした。それぞれの機関において 3 併行で実施した併行精度（変動係数）は、「高濃度試料」が 0.1–6.3%、「中濃度試料」が 1.9–8.9%、「低濃度試料」が 1.5–9.7% だった。また、3 併行のうち、1 試料でのみ測定濃度が 50% 以上低い（1 Ct 以上大きい）場合も見られたため、市販のキットを用いた核酸抽出・精製におけるばらつきもあることがわかった。今後は、リアルタイム PCR を用いた遺伝子数の測定における精度の評価に関して、合理的な方法を検討する必要がある。

E. 結論

水道原水 A においては、PCR 法単独にて定量されたアデノウイルス、エンテロウイルス、ロタウイルスが 10^{3-5} copies/L 程度、また、トウガラシ微斑ウイルスが 10^{6-7} copies/L 程度存在していることが確認された。

PCR 法単独によるウイルス定量においてエンテロウイルス及びロタウイルスが陽性となった試料について、ICC-PCR 法による定量を実施した

ところ、エンテロウイルス及びロタウイルスが感染力を有する状態でそれぞれ 10 MPN/L 程度、1–3 MPN/L 程度存在する可能性があることが明らかとなった。エンテロウイルスの定量においては、PMAxx-Enhancer-PCR 法と ICC-PCR 法の間の陽性/陰性の結果が一致したことから、エンテロウイルスの感染力評価手法の代替として PMAxx-Enhancer-PCR 法を活用できる可能性が示唆された。

流入下水に存在する大腸菌を用いて Coliminder の有用性が確認されたため、次年度において水道原水を対象とした調査に用いることが可能と判断された。

PMMoV 濃度がおよそ 10^5 , 10^4 , 10^3 copies/L のオーダーで含まれるように調製した高濃度、中濃度、低濃度試料は、研究分担者と研究協力者が所属する 7 機関で概ね同様の測定濃度だった。同一濃度の試料では、測定濃度の差は最大でもおよそ 1 log であったことから、ろ過水における PMMoV の管理目標値として「 10^4 copies/L のオーダー以下」と設定することは、検査方法の測定精度の点からも現実に即していると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura, T., Kadoya, S., Miura, Y., Takino, H., Akiba, M., Sano, D., Masuda, T. (2024). Pepper mild mottle virus intended for use as a process indicator for drinking water treatment: present forms and quantitative relations to norovirus and rotavirus in surface water. *Water Research*, accepted.
- 2) Canh, V. D., Torii, S., Singhopon, T., Katayama, H. (2023). Inactivation of coxsackievirus B5 by free chlorine under conditions relevant to drinking water treatment. *Journal of Water and Health*, 21(9). <https://doi.org/10.2166/wh.2023.178>

2. 学会発表

- 1) 富士萌笑, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 塩素処理におけるウイルスの高不活化率の評価: 濃縮法を組み合わせた大容量実験系の適用. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024/3/6–8.
- 2) 山口耕平, 白崎伸隆, 松下拓. 感染力評価と外殻タンパク質損傷評価を併用したオゾン

処理におけるヒトサポウイルスの不活化特性の把握. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 2024/3/6-8.

- 3) 三浦尚之, 前田暢子, 東城まゆみ, 吉田伸江, 小坂浩司, 増田貴則. 全国の水道原水における PMMoV 遺伝子マーカーと医薬品の実態調査. 第 58 回日本水環境学会年会, 福岡, 同講演集, 146, 2024/3/6-8.
- 4) 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におけるヒトサポウイルスの除去・不活化特性の把握. 第 60 回環境工学研究フォーラム, 山口, 2023/11/29-12/1.
- 5) 浅川高志, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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 30 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2023/11/9-10.
- 6) 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力評価: 活性炭吸着と UF 膜ろ過を組み合わせたウイルス濃縮法の構築と適用. 第 30 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2023/11/9-10.
- 7) 三浦尚之, 白崎伸隆, 片山浩之, 増田貴則, 松井佳彦. 水道におけるウイルスのリスク管理の国際動向と PMMoV 遺伝子マーカーの有用性. 令和 5 年度全国会議 (水道研究発表会), 東京, 同講演集, 694-695, 2023/10/18-20.
- 8) 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する代替指標性と実浄水工程における処理性. 第 26 回日本水環境学会シンポジウム, 吹田, 2023/9/20-22.

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. and Koriki, S. (2020). 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.

- 2) 真砂佳史, 大垣眞一郎, 片山浩之, 橋本温, 平田強. (2000). 相模川流域の水供給におけるクリプトスポリジウム起因のリスク評価, 土木学会第 55 回年次学術講演会, VII-78
- 3) 三浦尚之. (2023). 水道におけるウイルスのリスク管理の国際動向と水源流域, 浄水処理, 排水処理プロセスにおける PMMoV 遺伝子マーカーの実態, 厚生労働省令和 5 年度第 1 回水道における微生物問題検討会, 資料 3.
- 4) 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. (2022). 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.
- 5) 増田貴則, 三浦尚之, 小田琢也, 佐藤啓貴, 田中宏憲, 藤原俊一郎, 佐野大輔, 門屋俊祐, 三浦耀平. (2023). トウガラシ微斑ウイルス検査方法の評価および検査運用方法の検討, 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) 「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 年度研究報告書, 50-58.
- 6) Burnet, J.B., Dinh, Q.T., Imbeault, S., Servais, P., Dorner, S., & Prévost, M. (2019). Autonomous online measurement of B-D-glucuronidase activity in surface water: is it suitable for rapid E. coli monitoring? *Water Research*, 152, 241-250.
- 7) Burnet, J.B., Habash, M., Hachad, M., Khanafer, Z., Prévost, M., Servais, P., Sylvestre, E., & Dorner, S. (2021). Automated targeted sampling of waterborne pathogens and microbial source tracking markers using near-real time monitoring of microbiological water quality. *Water (Switzerland)*, 13(15), 2069.
- 8) Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55(4), 611-622.

表 1. PCR 法単独, PMAx-Enhancer-PCR 法, ICC-PCR 法による水系感染症ウイルスの定量結果

採水日	エンテロウイルスのlog濃度		
	PCR単独 Log [copies/L]	PMAxx-Enhancer-PCR Log [copies/L]	ICC-PCR Log [MPN/L]
1/13	3.8	≤2.5	≤-0.3
2/27	4.1	≤2.5	≤-0.3
3/24	4.5	4.0	1.1

採水日	ロタウイルスのlog濃度		
	PCR単独 Log [copies/L]	PMAxx-Enhancer-PCR Log [copies/L]	ICC-PCR Log [MPN/L]
1/13	4.4	≤2.5	-0.1
2/27	4.2	≤2.5	≤-0.3
3/24	4.7	≤3.5	0.4

表 2. 各機関による PMMoV 濃度測定結果

機関	高濃度試料		中濃度試料		低濃度試料	
	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]	平均濃度 [copies/L]	平均濃度 [log copies/L]
A	2.3×10^5	5.4	1.7×10^4	4.2	$1.4 \times 10^{3*}$	3.1*
B	3.3×10^5	5.5	3.5×10^4	4.5	3.5×10^3	3.5*
C	5.9×10^5	5.8	5.9×10^4	4.8	6.9×10^3	3.8
D	1.3×10^5	5.1	$1.5 \times 10^{4**}$	4.2**	$1.2 \times 10^{3*}$	3.1*
E	7.0×10^4	4.8	3.8×10^4	4.5	5.3×10^3	3.7
F	3.1×10^5	5.5	4.7×10^4	4.7	7.3×10^3	3.9
G	8.0×10^5	5.9	6.7×10^4	4.8	9.2×10^3	3.9

*: 定量下限以下を含む参考値として示した.

** : 3 試料中, 1 試料で得られた濃度を示した.

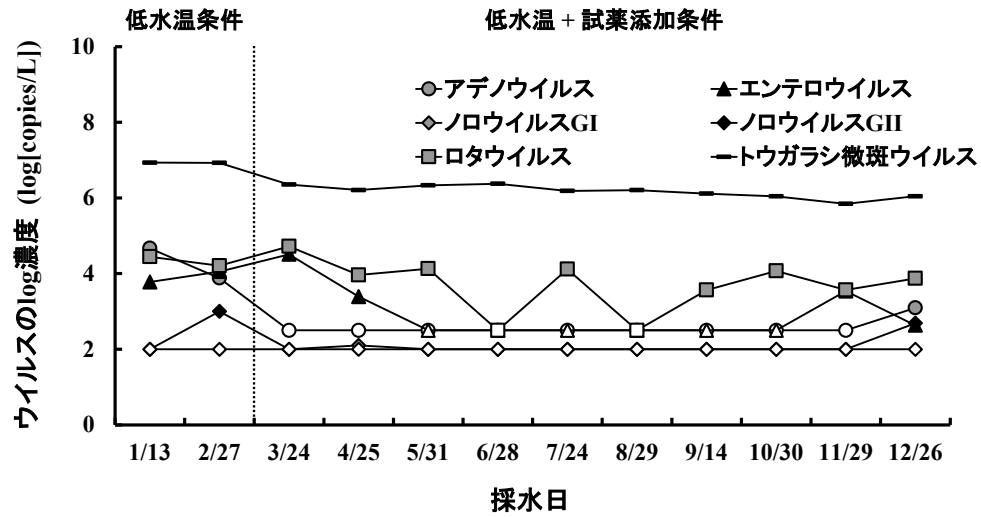


図 1. 水道原水 A におけるウイルス濃度 (PCR 法単独による定量, 図中の白抜きは定量下限値以下を示しており, 定量下限値をプロット)

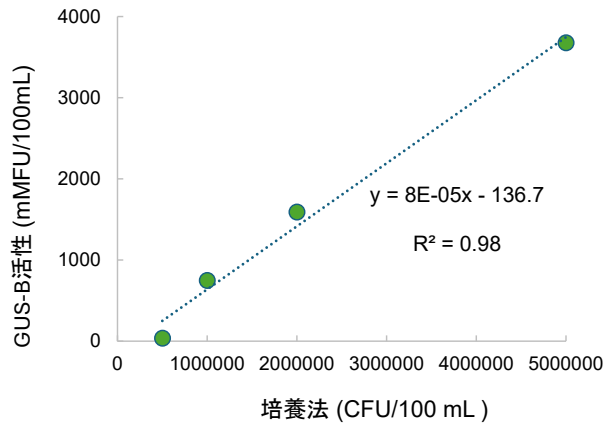


図 2. GUS-B 活性と培養法 E. coli の相関