

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00259

研究課題名（和文）水の微生物学的安全性の確立に向けた革新的ウイルス指標群の網羅的活用

研究課題名（英文）Comprehensive utilization of innovative virus indicators for microbial water safety

研究代表者

片山 浩之（KATAYAMA, HIROYUKI）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：00302779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：エンテロウイルスの不活化は、遺伝子型によって異なり、遊離塩素による不活化では遺伝子型ごとの差が最大15倍あったが、UV不活化は1.3倍以内だった。遊離塩素はカプシドタンパク質を標的とし、水質の影響は少ない。特定のウイルス指標としてFRNAファージ、PMMoV、crAssphageが有用であり、特にFRNAファージは感染性指標として適している。SARS-CoV-2の廃水中検出にはカプシド完全性RT-qPCRが効果的で、5検体が陽性であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水の微生物学的安全性の確保のためには、水中ウイルスの制御が中心的課題となっている。本研究では、水中ウイルスを直接的に測定する手法とともに、安全性を評価するための様々な指標の測定を組み合わせたリスク管理に向けた総合的な研究を実施した。また、新型コロナウイルスに対し、測定法を開発し、水中ウイルスの測定から得られる情報を社会に向けて発信する試みを実施し、水中ウイルス測定結果が感染流行状況を反映していることを示し、ついでに公衆衛生のリスク管理に役立つことを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：The inactivation of enteroviruses varies by genotype, with free chlorine inactivation showing up to a 15-fold difference among genotypes, while UV inactivation differences were within 1.3-fold. Free chlorine targets capsid proteins and is less influenced by water quality. Specific virus indicators such as FRNA phages, PMMoV, and crAssphage are useful, particularly FRNA phages as indicators of infectivity. Capsid-integrity RT-qPCR is effective for detecting SARS-CoV-2 in wastewater, with five samples testing positive.

研究分野：環境工学

キーワード：ウイルス 下水疫学 微生物起源解析 指標微生物 リスク評価

## 1. 研究開始当初の背景

水中微生物の専門家は他の指標等による管理を提唱しており、特にウイルスに対しては大腸菌ファージをはじめとして多くの指標が提案されてきている。世界保健機関 (WHO)からは、飲料水水質ガイドライン、Guidelines for safe recreational water environments、Potable reuse : Guidance for producing safe drinking-waterなどが発行されているが、ウイルスに対するリスク管理が不十分であることから、大腸菌ファージを指標として推奨する動きがある。水中ウイルスの感染リスクを制御するための研究と社会実装が両輪として進んでいる状況である。ただし、日本においては社会実装に向けた動きは乏しい。

また、クリプトスポリジウムなどの原虫類に対しては、特に水道において問題視されて対策が取られている(水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針、2007年、厚生労働省)が、対策の有効性についても定量的な議論はなされておらず、現在のリスクレベルは不明である。特に、原水のクリプトスポリジウム濃度について何も情報をインプットしない現行の一律の対策は効率的とは言えず、リスク管理に基づく対策が望まれる。

1990年代からPCRをはじめとする分子生物学的手法によるウイルス測定法が開発され、ウイルス濃縮法、精製法、定量法、定量阻害の評価方法、感染性の評価方法、あるいは次世代シーケンシング法など、多くの計測手法が開発されてきた。また、それに伴い、遺伝子型別FRNAファージやトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)など、ウイルスの挙動をモニタリングするための有力な指標も見つかってきており、ツールボックスが充実してきている。一方でそれらが生きているのかいないのかに関する識別は難しく、情報が限られているケースが増えている。培養法に基づく研究は指標論を展開するための根拠となるデータを蓄積する必要がある。

## 2. 研究の目的

指標論としては、水中ウイルスに対する大腸菌の有用性に対する限界を指摘する研究の集大成として、存在指標と挙動指標の分離が謳われた(IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology, Wat. Res., 1991)。その後、起源解析(Microbial Source Tracking, MST)の研究が盛んになり、糞便汚染の排出動物の特定する手法などが数多く開発された。

存在指標の役割をさらに糞便汚染指標と微生物の到達の二つに分け、指標には、1) 糞便汚染を示す、2) 病原微生物の移動を示す、3) 病原微生物が除去・不活化されたことを示す、という3つの役割がある。大腸菌は病原細菌に対してそのすべての役割を果たしてきたため、大腸菌がいなければ安全、という単純化された指標として用いられてきた。ウイルスに対してはそのような単純な指標は存在しないことがこれまでの研究で明らかになってきており、3つの役割を様々な指標によって分担しながら丁寧に水の安全性を確保していく必要がある。さらに、近年は分子生物学的手法により遺伝子を検出することが一般的になってきたため、検出されたものが生きているのかいないのかについて、情報が欠落するようになってきている。この点についても十分に注意を払う必要があると考え、それを指標の第4の役割とする。ウイルスの感染性については、Viability

(RT-)qPCR 法による測定が提案されている。その有用性について、指標論の中に位置づけて検討する必要がある。

水処理、リスク管理の観点から、ウイルス指標を活用するステージを想定し、その際に必要な具体的な測定項目を提案することを目的とする。その際、現在のウイルス指標に足りないものについても検討を行い、新規ウイルス指標を開発する。

### 3. 研究の方法

消毒法について：

水の消毒においてウイルスがどの程度不活化するのか、また、それをどのように保証するのが妥当であるか、との観点から、塩素消毒を中心に評価した。対象としてはコクサッキーB5 ウイルスが最も塩素体制が高いため、主たる対象とした。比較として、紫外線消毒、オゾン消毒を用いた。また、様々な種類の浄水処理を施した資料を対象として塩素消毒の効果に水質が与える影響についても評価した。

ウイルス指標について：

FRNA ファージや crAss ファージについて、微生物の起源解析に有用な情報を得るための検討を行った。また、FRNA ファージの遺伝子型別の定量法の開発を行い、膜吸着培養 PCR 法を確立した。

新型コロナウイルスについて：

研究期間中に流行が始まった新型コロナウイルスについて、従来の測定法ではうまく検出できなかったため、新たに PEG 沈殿法など様々な手法を組み合わせで検討した。

### 4. 研究成果

消毒によるエンテロウイルスの不活化動態は、多くの場合、ある遺伝子型の単一実験室株を用いて研究されている。エンテロウイルスの環境変異株は、対応する実験室株とは遺伝的に異なるが、この遺伝的差異が不活化にどのように影響するかは十分に理解されていない。ここでは、9 種類のコクサッキーウイルス B3 (CVB3)、10 種類のコクサッキーウイルス B4 (CVB4) および 2 種類のエコーウイルス 11 (E11) について、遊離塩素と紫外線照射 (UV) による不活化動態を評価した。遊離塩素による不活化動態は、遺伝子型依存性 (すなわち、感受性: CVB5 < CVB3::CVB4 < E11) および遺伝子群依存性であり、試験したウイルス間で最大 15 倍の差が認められた。対照的に、UV 不活化動態にはわずかな (最大 1.3 倍) 差異しか認められなかった。UV による不活化は主にゲノムのサイズと組成に依存し、これは試験したすべてのウイルスで同様であった。一方、遊離塩素はウイルス capsid タンパク質を標的としており、これはジェノグループや遺伝子型によって決定的な違いを示した。最後に、観察された不活化速度定数のばらつきを拡張 Chick-Watson モデルに統合し、エンテロウイルスコンソシアムの全体的な不活化を推定した。その結果、不活化速度定数の分布と各遺伝子型の存在量が、エンテロウイルスコンソシアムの不活化率を正確に推定するために不可欠なパラメータであることが明らかになった。

塩素消毒は、飲料水処理施設において病原性ウイルスを不活性化するために一般的に適用されている。しかし、ウイルスの塩素消毒における水質の役割については十分に検討されていない。本研究では、厳格な濁度管理 (0.14 NTU 以下) のもと、国内 4 カ所の

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) の不活化効率を検討した。その結果、CVB5 の塩素消毒は水質の影響を受け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制御に間接的な役割を果たしている可能性がある。

現在までに、糞便汚染の発生源特異的な指標となりうる微生物がいくつか提案されている。バクテロイデス属の 16S リボソーム RNA 遺伝子マーカーは、水環境における優位性と発生源特異性から、最も広く適用されている。F 特異的バクテリオファージ (FPH) サブグループ、特に FRNA ファージ遺伝子群は、汚染源特異的なウイルス指標として知られている。これらは培養ベースと分子アッセイの両方で定量できるため、環境中のウイルス不活化を推定する指標としても有用である。ペッパー・マイルド・モットル・ウイルス (PMMoV) と crAssphage は、ヒトの糞便中に頻繁に存在するため、ヒトに特異的なウイルス汚染の指標としても有用である可能性がある。本研究では、市営および養豚場からの排水の影響を受けた 5 地点で採取した 108 の表流水サンプルを用いて、FPH サブグループ、PMMoV、crAssphage の感染源特異的な糞便汚染およびウイルス不活化の指標としての適用性を評価することを目的とした。FPH サブグループ、PMMoV、crAssphage の宿主特異性を、Bacteroidales 属の 16S リボソーム RNA 遺伝子マーカーなどの他の微生物指標とともに主成分分析 (PCA) で評価した。FRNA ファージゲノグループの生存率 (感染性指標) は、感染性に基づくアッセイと分子アッセイによって決定された数を比較することによって推定された。PCA は全情報の 58.2% を説明し、微生物をブタおよびヒトの糞便汚染に関連すると考えられるグループとその他のグループの 3 つに分類した。ブタ糞便汚染に特異的な微生物として、Genogroup IV (GIV) -FRNA ファージの感染性遺伝子と遺伝子が、ヒト糞便汚染に特異的な微生物として、GII-FRNA ファージと crAssphage の遺伝子が同定された。しかし、PMMoV、感染性 GI-FRNA ファージ、FDNA ファージはヒトおよびブタの糞便汚染に特異的ではないことが示唆された。FRNA ファージの遺伝子群、特に GIV-FRNA ファージは、日本の暖かい時期 (7 月から 11 月) に高い不活性化を示した。複数の FRNA ファージ遺伝子群や他のウイルスの感染力指数を比較することで、自然環境や水処理によるウイルスの不活性化についてさらなる知見が得られる可能性がある。

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) のゲノムは世界中の廃水から検出されている。本研究の主な目的は、廃水中のインタクトな SARS-CoV-2 を選択的に検出するためのカプシド完全性 RT-qPCR の適用性を検討することである。3 種類のカプシド完全性試薬、すなわちエチジウムモノアジド (EMA、0.1-100  $\mu\text{M}$ )、プロピジウムモノアジド (PMA、0.1-100  $\mu\text{M}$ )、およびシスジクロロジアミンプラチナ (CDDP、0.1-1000  $\mu\text{M}$ ) を、SARS-CoV-2 の代用として用いたマウス肝炎ウイルス (MHV) の異なる形態 (フリーゲノム、インタクト、熱不活性化を含む) に対する効果について試験した。100  $\mu\text{M}$  濃度の CDDP が、RT-qPCR (CDDP-RT-qPCR) による感染性 MHV の選択的検出のための最も効率的な試薬として同定された。CDDP-RT-qPCR 法と RT-qPCR 法単独を比較し、首都圏で採取された 16 検体の生排水から SARS-CoV-2 を検出した。CDDP-RT-qPCR 法では 5 検体が SARS-CoV-2 陽性であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Meuchi Yuno, Nakada Miu, Kuroda Keisuke, Hanamoto Seiya, Hata Akihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Applicability of F-specific bacteriophage subgroups, PMMoV and crAssphage as indicators of source specific fecal contamination and viral inactivation in rivers in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0288454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0288454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Canh Vu Duc, Torii Shotaro, Singhopon Tippawan, Katayama Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Inactivation of coxsackievirus B5 by free chlorine under conditions relevant to drinking water treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Water and Health	6. 最初と最後の頁 1318 ~ 1324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wh.2023.178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hata Akihiko, Meuchi Yuno, Liu Miaomiao, Torii Shotaro, Katayama Hiroyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Surfactant Treatment for Efficient Gene Detection of Enteric Viruses and Indicators in Surface Water Concentrated by Ultrafiltration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food and Environmental Virology	6. 最初と最後の頁 8 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12560-022-09543-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yasui Midori, Ikner Luisa, Yonetani Takashi, Liu Miaomiao, Katayama Hiroyuki	4. 巻 87
2. 論文標題 Effects of surface hydrophobicity on the removal of F-specific RNA phages from reclaimed water by coagulation and ceramic membrane microfiltration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Water Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2166/wst.2023.133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Shotaro, Corre Marie-Helene, Miura Fuminari, Itamochi Masae, Haga Kei, Katayama Kazuhiko, Katayama Hiroyuki, Kohn Tamar	4. 巻 220
2. 論文標題 Genotype-dependent kinetics of enterovirus inactivation by free chlorine and ultraviolet (UV) irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 118712 ~ 118712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2022.118712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Canh Vu Duc, Torii Shotaro, Yasui Midori, Kyuwa Shigeru, Katayama Hiroyuki	4. 巻 791
2. 論文標題 Capsid integrity RT-qPCR for the selective detection of intact SARS-CoV-2 in wastewater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 148342 ~ 148342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2021.148342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Canh Vu Duc, Torii Shotaro, Furumai Hiroaki, Katayama Hiroyuki	4. 巻 189
2. 論文標題 Application of Capsid Integrity (RT-)qPCR to Assessing Occurrence of Intact Viruses in Surface Water and Tap Water in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 116674 ~ 116674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2020.116674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Shotaro, Miura Fuminari, Itamochi Masae, Haga Kei, Katayama Kazuhiko, Katayama Hiroyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Impact of the Heterogeneity in Free Chlorine, UV <sub>254</sub> , and Ozone Susceptibilities Among Coxsackievirus B5 on the Prediction of the Overall Inactivation Efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 3156 ~ 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.0c07796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Shotaro, Miura Fuminari, Itamochi Masae, Haga Kei, Katayama Kazuhiko, Katayama Hiroyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Impact of the Heterogeneity in Free Chlorine, UV254, and Ozone Susceptibilities Among Coxsackievirus B5 on the Prediction of the Overall Inactivation Efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology	6. 最初と最後の頁 3156 ~ 3164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.est.0c07796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Shotaro, Furumai Hiroaki, Katayama Hiroyuki	4. 巻 756
2. 論文標題 Applicability of polyethylene glycol precipitation followed by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction for the detection of SARS-CoV-2 RNA from municipal wastewater	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 143067 ~ 143067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2020.143067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Canh Vu Duc, Torii Shotaro, Furumai Hiroaki, Katayama Hiroyuki	4. 巻 189
2. 論文標題 Application of Capsid Integrity (RT-)qPCR to Assessing Occurrence of Intact Viruses in Surface Water and Tap Water in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 116674 ~ 116674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2020.116674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀧野博之, 三浦尚之, 秋葉道宏
2. 発表標題 高度浄水処理プロセス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挙動調査
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原本 英司 (Haramoto Eiji) (00401141)	山梨大学・大学院総合研究部・教授  (13501)	
研究分担者	端 昭彦 (Hata Akihiko) (70726306)	富山県立大学・工学部・准教授  (23201)	
研究分担者	三浦 尚之 (Miura Takayuki) (70770014)	国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官  (82602)	
研究分担者	林 豪士 (Hayashi Tsuyoshi) (80824648)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官  (82603)	
研究分担者	鳥居 将太郎 (Torii Shotaro) (30939476)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------