

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04680

研究課題名(和文) 病原ウイルスの水中存在形態と挙動に関連する懸濁物質・溶存有機物・医薬品の調査研究

研究課題名(英文) Study on the forms of pathogenic viruses present in surface water and their association with suspended solids, dissolved organic matter, and pharmaceuticals

研究代表者

三浦 尚之 (Miura, Takayuki)

国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官

研究者番号：70770014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、水道原水(表流水)に含まれるウイルスの存在形態を明らかにし、ウイルスの検出状況と関連する医薬品を調査した。表流水試料を孔径10 μmおよび0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過することで懸濁態と溶存態画分に分離し、それぞれの画分に含まれるウイルスをリアルタイムPCR法を用いて定量的に検出した。医薬品は、固相抽出により濃縮し、LC-MS/MS法により濃度を測定した。国内21カ所の浄水場の原水試料では、ロタウイルスAおよびトウガラシ微斑ウイルスは溶存態画分に多く存在し、その濃度はカルバマゼピンおよびスルファメトキサゾールの濃度と正に相関することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに表流水に含まれるウイルスは、その多くが細菌や粘土等の懸濁物質に吸着していると考えられてきたが、溶存態画分に多く含まれるウイルスも存在することがわかった。ヒトのふん便に高濃度で含まれるトウガラシ微斑ウイルスや小児における下痢症の原因として重要なロタウイルスはそれに該当し、水道原水における濃度は下水汚染を示す化学物質マーカーであるカルバマゼピンやスルファメトキサゾールの濃度と正に相関していた。これまでに水中の病原ウイルスと医薬品の濃度の相関を報告した研究はほとんどなく、化学物質マーカーがウイルス汚染の評価にも有用であることを示す重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, present forms of viruses in surface water used for drinking water production and pharmaceuticals associated with the occurrence of viruses were investigated. Surface water samples were fractionated by filtration through 10- and 0.45-μm-pore-size membranes, and viruses present in suspended and dissolved forms were quantitatively detected by using a real-time PCR method. Pharmaceuticals were concentrated with the solid-phase extraction and measured by using a LC-MS/MS method. Based on the analyses of raw water samples collected at 21 drinking water treatment plants all over Japan, we found that rotavirus A and pepper mild mottle virus were predominant in the dissolved fraction, and their concentrations were positively correlated with the concentrations of carbamazepine and sulfamethoxazole.

研究分野：公衆衛生微生物学

キーワード：水道水源 表流水 胃腸炎 ノロウイルス ロタウイルス トウガラシ微斑ウイルス カルバマゼピン
スルファメトキサゾール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管に感染すると、下痢、発熱、嘔吐、胃痛等の症状を引き起こすノロウイルス等の水中病原ウイルスによる感染性胃腸炎の流行が日本を含めた先進国でも問題となっている。感染者の糞便中に高濃度で排出されるウイルスは、既存の下水処理プロセスでは十分に除去・不活化することが困難であるため、下水処理放流水に含まれる形で表流水や地下水等の水道水源を汚染している^{1,2)}。その結果、国内においても簡易水道、貯水槽水道等の小規模の水道ではノロウイルスやロタウイルスによる集団感染がまれに発生している³⁾。

水道において病原細菌および原虫のリスクは、水質基準の一般細菌や大腸菌、および「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」によりそれぞれ管理されているが、ウイルスのリスクは代替指標である一般細菌と大腸菌を用いて管理されているのが現状である。ウイルスのリスクを適切に管理するためには、水道水源および浄水処理プロセスにおけるウイルスの挙動を理解することが不可欠である。水源流域における病原ウイルスの動態は、地域における感染症の発生状況によって遺伝子型や株が季節的にまたはランダムに変化すること、および水中においてウイルスが様々な懸濁物質へ吸着することから、非常に複雑であり、理解が十分に進んでいない。これまでに、水道原水中の濁度の上昇に伴い指標細菌やクリプトスポリジウム濃度が上昇することが報告されているが⁴⁾、表流水中のウイルスの存在形態や関連する化学物質に着目した調査研究はほとんど行われてこなかった。

2. 研究の目的

表流水を水源とする国内 21 カ所の浄水場において原水試料を採取し、感染性胃腸炎の主な原因ウイルスであるノロウイルス GII およびロタウイルス A、ヒトのふん便に高濃度で含まれるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の存在形態を明らかにすることを目的とした。すなわち、試料を孔径の異なるろ過膜で分画することにより、土粒子、藻類、細菌等の懸濁物質が含まれる画分、および 0.45 μm 以下の溶存態画分に含まれるウイルスの濃度を測定した。さらに、溶存態画分に含まれるウイルスと類似した挙動を示すマーカーを明らかにするために、ヒト下水汚染を示すマーカーとして提案されているカルバマゼピン (CBZ, 抗てんかん薬)、ヒトおよび畜産動物に使用されるスルファメトキサゾール (SMX, 抗菌薬)、畜産や水産動物に使用されるスルファモノメトキシシン (SMM, 抗菌薬) を測定し、ウイルス濃度との関連を調べた。

3. 研究の方法

(1) 表流水試料の収集

2019 年 10 月、2020 年 1 月、10 月、2021 年 1 月、10 月、および 2022 年 1 月に河川、湖沼、ダムを水源とする国内 21 カ所の浄水場において、水道原水試料を収集した (N=126)。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。

(2) 試料の分画とウイルス遺伝子の測定

ウイルスの存在形態を明らかにするために、収集した水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。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 10^7 copies 添加・混合し、孔径 10 μm 、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 μm 、直径 90 mm の混合セルロースエステル (MCE) 膜 (HAWP09000, Merck) でろ過した。それぞれの膜を回収し、>10 μm および 0.45–10 μm 懸濁態画分とした¹⁾。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⁵⁾、溶存態画分とした¹⁾。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、ロタウイルス A、および PMMoV の RNA 濃度は、既往のプライマー・プローブ⁶⁻¹³⁾、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。

(3) 医薬品の測定

2020 年 10 月、2021 年 1 月、10 月、および 2022 年 1 月に収集した試料 (N=84) は、固相抽出-LC-MS/MS 法により 3 種の医薬品 (CBZ, SMX, SMM) 濃度を測定した。まず、PTFE 膜および MCE 膜でろ過した試料に、サロゲート (CBZ-d10, SMX-d4, SMM-d4) を添加した。次に、全自動固相抽出装置 (Aqua Trace ASPE899; GL Sciences) を用いて、200 mL の試料を固相 (Oasis HLB, 225 mg; Waters) に通水して濃縮した。超純水で固相を洗浄した後、窒素ガスで固相を乾燥させ、5 mL のメタノールで溶出した。この溶出液を窒素ガスの吹きつけによって完全乾固させた後、10%メタノール溶液で 0.5 mL に定容し、測定試料とした¹⁴⁾。

試料の分離は、分離カラムに Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm \times 100 mm; Waters) を使用し、Agilent 1290 infinity II (Agilent Technologies) により行った。移動相は、A 液が 0.1%ギ酸水溶液、

B液がメタノールとし、試料注入量は20 µLとした。MS/MSは3200 Qtrap (AB Sciex)を用い、正イオンモードのエレクトロスプレーイオン化法(ESI+)で測定した。定量下限値は、CBZが0.25 ng/L, SMXおよびSMMは0.50 ng/Lだった¹⁴⁾。

4. 研究成果

(1) プロセスコントロールウイルスの回収率

国内21カ所の浄水場で採水された原水試料のマウスノロウイルス回収率の幾何平均値は、>10 µm懸濁態画分が0.07%、0.45–10 µm懸濁態画分が0.62%、溶存態画分が15% (範囲: 1–80%)だった。このことから、分画におけるケーキろ過の影響が小さいこと、およびウイルス濃縮、RNA抽出、リアルタイムRT-PCRにおいてロスや阻害が小さいことが確認され、ウイルス遺伝子の定量検出結果が信頼できると判断した。

(2) 水道原水中のウイルスの存在形態

胃腸炎の非流行期である10月の採水試料では、ノロウイルスGIIは5–10%の試料から検出された(表1)。画分別の検出率は、>10 µm懸濁態画分が0%、0.45–10 µm懸濁態画分および溶存態画分がそれぞれ0–10%だった。一方で、流行期の1月の試料では、29–57%の試料で陽性だった。2021年1月は、全国の水道原水試料からの検出率は3年間で最も低かった。このシーズンでは、新型コロナウイルス感染症対策の影響により感染性胃腸炎の流行がほとんど認められなかった。2021年1月を除いた流行期の試料では、ノロウイルスGIIの検出率は、>10 µm懸濁態画分が14–24%、0.45–10 µm懸濁態画分が19–38%、溶存態画分が38–43%だった。また、ノロウイルスGIIの検出濃度の平均値は、>10 µm懸濁態画分が2.7–2.9 log₁₀ copies/L、0.45–10 µm懸濁態画分が3.6–3.7 log₁₀ copies/L、溶存態画分が3.68–3.8 log₁₀ copies/Lであり、0.45–10 µm懸濁態画分と溶存態画分で同程度だった(図1)。

ロタウイルスAは、2021年1月の試料を除いて、胃腸炎の流行期である1月の方が10月と比較して検出率が高い傾向が見られたが、非流行期においても比較的高い検出率だった(52–76%)。この原因としては、ヒトだけでなくウシやブタなどの動物由来のロタウイルスA株が水道原水試料には含まれていた可能性が考えられた。ロタウイルスAの検出濃度は、ノロウイルスGIIほど流行期と非流行期による違いが明白ではなく、溶存態画分で3.8–4.3 log₁₀ copies/Lだった(図1)。懸濁態画分からの検出濃度は、>10 µmが2.9–3.4 log₁₀ copies/L、0.45–10 µmが2.8–3.6 log₁₀ copies/Lであり、ロタウイルスAは溶存態画分に多く含まれることが示された。

PMMoVは、採水時期によらず高い検出率であり、81–100%の試料から検出された。ノロウイルスGIIの結果で新型コロナウイルス感染症対策の影響が見られた2021年1月の試料でも100%の試料から検出され、検出濃度も他の時期と同程度であることから(図1)、2021年1月に収集した水道原水試料は、他の試料と同様にふん便汚染の影響を受けていたことがわかる。PMMoVは、ロタウイルスAと同様に溶存態画分から最も高い濃度で検出された(4.8–5.5 log₁₀ copies/L)。

3年間に渡って全国の水道原水試料の各画分に含まれるノロウイルスGII、ロタウイルスA、PMMoVを調査した結果、ノロウイルスGIIは懸濁物質に吸着して存在する割合も高いこと、ロタウイルスAとPMMoVは溶存態画分に含まれる割合が高いことが明らかになった。

表1. 国内21浄水場原水のそれぞれの画分からのウイルス検出率

採水月	検出率 [%]			計
	>10 µm 懸濁態	0.45–10 µm 懸濁態	<0.45 µm 溶存態	
ノロウイルスGII				
2019/10	0	10	5	10
2020/01	24	19	38	48
2020/10	0	0	10	10
2021/01	0	10	19	29
2021/10	0	5	0	5
2022/01	14	38	43	57
ロタウイルスA				
2019/10	19	33	62	67
2020/01	62	71	81	81
2020/10	19	71	67	76
2021/01	24	57	71	71
2021/10	10	48	48	52
2022/01	29	48	76	76
PMMoV				
2019/10	33	38	81	81
2020/01	71	71	95	95
2020/10	67	90	90	100
2021/01	57	90	100	100
2021/10	33	76	76	81
2022/01	43	71	95	95

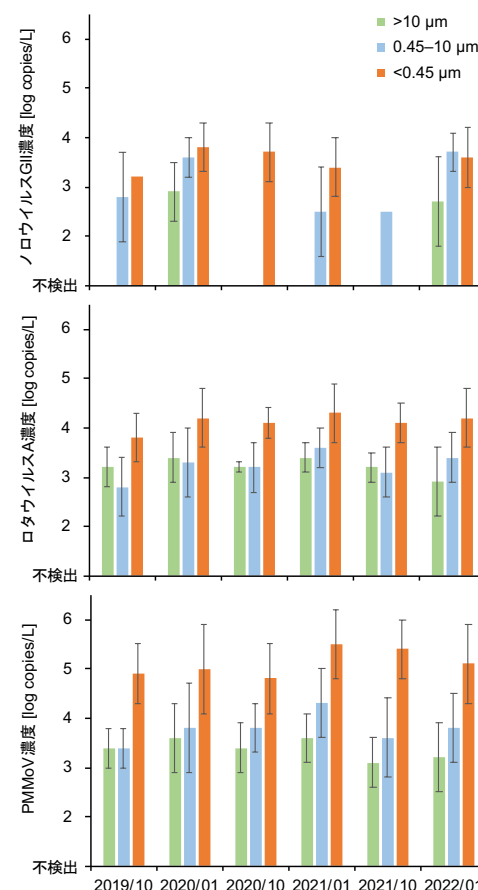


図1. 国内21浄水場原水のそれぞれの画分からのウイルス検出濃度の平均値 (エラーバーは、標準偏差を示す)

(3) 水道原水中のウイルスと関連する医薬品
予備検討として 2019 年度に収集した原水試料 (N=42) を用いて、ヒト下水汚染を示すマーカーである CBZ を測定したところ、0.29–9.3 ng/L の濃度で検出され、2019 年 10 月よりも 2020 年 1 月の方が濃度が高い傾向が見られた ($P<0.05$, ウィルコクソンの符号付き順位検定)。また、PMMoV 濃度と関連を調べたところ、PMMoV と CBZ 濃度との間に正の相関が認められた ($R=0.56$, $P<0.01$)。この予備検討結果を踏まえて、2020 および 2021 年度は、CBZ に加えて、ヒト・動物用医薬品である SMX および動物用医薬品の SMM を測定し、2 年間の再現性を検証することとした。

2020 年 10 月および 2021 年 1 月の試料では、CBZ および SMX は、81–90% の試料からそれぞれ最大 21, 42 ng/L の濃度で検出された (表 2)。SMM は、24–29% の試料から最大 10 ng/L の濃度で検出された。溶存態画分のロタウイルス A および PMMoV 濃度と CBZ および SMX 濃度との間には、それぞれ有意な正の相関が認められ ($R=0.6-0.8$, $P<0.01$)、排出源から浄水場取水地点までの表流水中において挙動が類似している可能性が示された。

2021 年 10 月および 2022 年 1 月の試料からは、CBZ と SMX の検出率は 86–95%、それぞれの濃度の最大値は 20, 40 ng/L であり、2020 年度と同様の傾向だった (表 2)。SMM は、10–33% の試料において最大 6.0 ng/L の濃度で検出された。溶存態画分の PMMoV 濃度と CBZ および SMX 濃度との間には、それぞれ有意な正の相関が認められ ($R=0.6-0.8$, $P<0.01$)、再現性が確認された。

以上の結果から、溶存態画分に含まれる割合が多いロタウイルス A と PMMoV は、下水や畜産排水等の排出源から浄水場取水地点までの表流水中において下水汚染マーカーとして提案されている医薬品と同様に流下している可能性が示唆された。

表 2. 国内 21 浄水場原水中の医薬品測定結果

採水月	検出率 [%]	濃度 [ng/L]		
		最小値	最大値	幾何平均値
CBZ				
2020/10	90	0.40	9.9	1.6
2021/01	90	0.39	21	2.4
2021/10	95	0.31	9.2	1.8
2022/01	95	0.34	20	2.1
SMX				
2020/10	81	0.84	42	4.0
2021/01	86	1.2	42	7.2
2021/10	86	0.52	40	4.9
2022/01	90	0.60	23	5.4
SMM				
2020/10	24	0.53	1.8	1.0
2021/01	29	0.74	10	3.3
2021/10	33	0.93	6.0	1.5
2022/01	10	0.77	1.0	0.90

<引用文献>

- 1) Miura T, Gima A, Akiba M. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food Environ Virol.* 11(1), 9-19, 2019.
- 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), e00710-00721, 2021.
- 3) 厚生労働省. 水質汚染事故等の発生状況. <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kikikanri/03.html> (アクセス日: 2022 年 6 月 21 日)
- 4) Swaffer BA, Vial HM, King BJ, Daly R, Frizenschaf J, Monis PT. Investigating source water *Cryptosporidium* concentration, species and infectivity rates during rainfall-runoff in a multi-use catchment. *Water Res.* 67, 310-320, 2014.
- 5) 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), 1033-1039, 2002.
- 6) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J Virol Methods.* 169(2), 269-273, 2010.
- 7) Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *J Virol Methods.* 123(1), 1-7, 2005.
- 8) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 41(4), 1548-1557, 2003.
- 9) Pang XL, Lee B, Boroumand N, Leblanc B, Preiksaitis JK, Yu Ip CC. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol.* 72(3), 496-501, 2004.
- 10) Pang X, Cao M, Zhang M, Lee B. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 172(1-2), 85-87, 2011.
- 11) Miura T, Schaeffer J, Le Saux JC, Le Mehaute P, Le Guyader FS. Virus type-specific removal in a full-scale membrane bioreactor treatment process. *Food Environ Virol.* 10(2), 176-186, 2018.
- 12) Haramoto E, Kitajima M, Kishida N, Konno Y, Katayama H, Asami M, Akiba M. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 79(23), 7413-7418, 2013.
- 13) Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SWL, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan

Y. RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. PLOS Biol. 4:e3, 2006.

- 14) 瀧野博之, 三浦尚之, 小坂浩司, 秋葉道宏. 遺伝子・化学物質マーカーの測定に基づく琵琶湖・淀川水系のふん便汚染評価. 水環境学会誌, 2022 (印刷中).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 瀧野博之, 三浦尚之, 小坂浩司, 秋葉道宏	4. 巻 45
2. 論文標題 遺伝子・化学物質マーカーの測定に基づく琵琶湖・淀川水系のふん便汚染評価	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miura T., Gima A., Tokuyasu M., Akiba M.
2. 発表標題 Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources
3. 学会等名 20th Symposium on Health-Related Water Microbiology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦尚之, 儀間ありさ, 徳安真理奈, 秋葉道宏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第56回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦尚之
2. 発表標題 水環境におけるノロウイルスの挙動と養殖カキを原因とする食中毒対策
3. 学会等名 農林水産省令和元年度食品安全に係る科学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦尚之
2. 発表標題 バイオアッセイの未来 - 水道水源におけるウイルス汚染の観点から
3. 学会等名 第23回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦尚之，門屋俊祐，瀧野博之，佐野大輔，秋葉道宏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦尚之，門屋俊祐，瀧野博之，佐野大輔，秋葉道宏
2. 発表標題 水道水源におけるロタウイルスの遺伝的多様性解析
3. 学会等名 ウイルス性下痢症研究会第32回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦尚之, 瀧野博之, 門屋俊祐, 三浦耀平, 佐野大輔, 秋葉道宏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022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	越後 信哉 (Echigo Shinya) (70359777)	京都大学・地球環境学堂・教授 (14301)	

	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
研究協力者	小坂 浩司 (Kosaka Koji) (60370946)	国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席主任研究官 (82602)	
研究協力者	瀧野 博之 (Takino Hiroyuki)	国立保健医療科学院・生活環境研究部・研究生 (82602)	

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
---------	---------