

1. 水環境とウイルス

片山 浩之

日越大学 環境工学プログラム

東京大学 大学院工学系研究科 都市工学専攻

水環境中のウイルスに関する研究は、PCR法の発達に伴い大いに進展がみられた。現在では、ノロウイルスをはじめ、様々なウイルスが河川、海水、下水処理や浄水処理において測定可能になってきており、河川水中にノロウイルスが1000copy/L程度は存在しうることがわかってきている。一方で、定量性のさらなる向上については課題が残っている。また、水浴における感染リスクについては規制が遅れており、科学的知見に基づく管理体制を構築していく必要がある。

1. はじめに

水環境におけるウイルスといえば糞便経口感染経路を有する腸管系ウイルスが主たる対象であるが、インフルエンザウイルスも自然宿主である鳥の間では水系感染していると考えられる。コイヘルペスやエビに病気を引き起こすウイルスなど、経済的に重要な水系感染性のウイルスは他にもあるが、それらは養殖において産業的に問題となるウイルスであり、水環境のウイルスとして対象となりにくい。ここではヒト腸管系ウイルスを中心に記述する。

ウイルスが水中に存在する可能性については早くから知られていた¹⁾が、水を飲むことによって感染することがはっきり示されたのは1955年のインドにおける肝炎の水系感染であるとされており²⁾、水道由来の水系感染症が広く認識されるようになった。

2. 水中ウイルス測定法の発展

1) ウイルス検出法

感染者由来の試料に比べ、水中のウイルス濃度は一般的に非常に低いため、測定法も限られてくる。電子顕微鏡や抗原抗体反応などは高濃度の試料を準備する必要があり、

環境水中のウイルスでは濃度が不十分である。そのため、当初は培養法が唯一の測定方法であった。環境試料からのウイルスの分離は技術的に難しく、下水や河川水におけるウイルスの存在を示すことおよびその同定に注力する一方、定量的な議論は限られていた。

1985年のPCR法の発明により、状況が大きく変わった。それまでは、ウイルスの種類に応じて細胞培養およびブラック法のための特別なレシピが必要なことも多く、研究室ごとのノウハウに頼る部分も大きかったが、PCR法はウイルスの種類に関係なくほぼ同じ技術で測定できる利点がある。環境中には様々なウイルスが存在するため、多種類のウイルスを測定することが望まれていたが、それが可能になった。さらに、試料の処理においても、1試料当たりのウイルス測定作業がそれほど大変でなくなったため、多くの試料を測定することが可能となってきたことも重要である。すなわち、測定に要する技術的・労力的障壁が低くなったと言える。また、リアルタイムPCR法も開発され、現在では環境試料のウイルスの定量法としても広く認められるようになっている。

一方で、PCR法においては、ウイルスゲノムを検出しているだけにすぎず、感染性の有無を確認できていないことの限界を指摘する意見も根強い。実際に、PCRによる陽性だけではリスク因子が存在することの証明にならない³⁾ことは広く認識されており、塩素消毒が実施されている水道水からウイルスゲノムが検出されて⁴⁾も、不活化したウイルスのゲノム断片を検出しているだけの可能性も十分にあるため、リスク管理につなげた議論は難しい。これは、環境試料の検出において、一般的に指摘されることである。

そこで、PCRの前処理として、いくつかの方法が考え

連絡先

〒113-8656

東京都文京区本郷7-3-1

東京大学大学院工学系研究科 都市工学専攻

TEL/FAX: 03-5841-6271

E-mail: katayama@envt.u-tokyo.ac.jp

られている。感染性のないウイルスを排除することにより、感染性のあるウイルス粒子だけを選択的にPCRで検出する手法である。前処理としては、エチジウムモノアザイド(EMA)、プロピディウムモノアザイド(PMA)、RNase処理、あるいは細胞表面吸着処理などが用いられている⁵⁾。これらの手法は、熱によるウイルス不活化試験においては、想定通りに感染性のあるウイルスを選択的に検出する傾向があるが、それ以外の消毒方法では、程度の差こそあれまだまだ誤陽性(感染価がないのに陽性)を示してしまう⁶⁾。また、多くの論文はベンチスケールの消毒を扱っており、環境試料への適用例は限られている。

PCR法が与えたインパクトとしては、ノロウイルスに関する研究に対しては特筆すべきものがある。従来は培養法による測定が主体であったため、培養法が確立されていない状況では、糞便試料から電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察は行われていたが、環境水試料の試験は行われていなかった。ノロウイルスは培養が困難であるため、なかなか保存的領域の遺伝子配列が得られなかった中、日本から幅広くノロウイルスを検出するプライマーの塩基配列が発表された⁷⁾。ここではプライマーとともに定量PCR用のプローブの塩基配列も示されており、幅広いノロウイルスを定量できるため、環境試料の測定に広く使われている^{8,9)}。

最近では、メタゲノム解析を用いた環境ウイルス研究への応用も始まっている。これまでの成果の例としては、例えばトウガラシ微斑ウイルス(PMMoV)が糞便・下水に多く含まれるという発見があった¹⁰⁾。その後、多くの地域・試料からPMMoVが高い濃度で検出されており、環境水試料を測定するうえでよい指標になると考えられている。例えば、浄水場における処理工程でウイルスの除去能を調べることなどが可能である¹¹⁾(後述)。

2) ウイルス濃縮法

ウイルスの濃縮法については詳細は以前にまとめた文章¹²⁾に譲るが、ここでは簡便に記述する。

水中のウイルスについては、古くは、ガーゼパッドを用いた方法(Hanging Pad法、日本ではタンポン法という略称も用いられている)が早くに開発されて¹⁾広く用いられてきた。河川水や下水処理水中にガーゼパッドを一晩から数日間放置しておいて回収し、アルカリ側に調整してパッドを絞ってウイルスを誘出する方法である。比較的少量の水に対する定性的な方法ではあるが、簡便さが魅力であり、現在でも用途を限って使用されている¹³⁾。

膜を用いる方法は、試験対象とする水量をはっきりと記述でき、かつ、大容量の水に適用可能なウイルス濃縮法である。孔径はウイルスよりも大きく細菌よりも小さいMF膜を用い、吸着して誘出する方法が考案された^{14,15)}。その後、1979年に陽電荷膜法が開発され¹⁶⁾、水道水などの淡水からウイルスを濃縮する方法は確立されていく。水量

に応じてスケールアップが可能であり、そのため極めて低濃度でウイルスが存在する水に対しても適用可能であり、さらに得られるウイルス濃縮液はMF膜のろ液であるためほぼ無菌的であるという長所がある。

なお、ウイルスよりも孔径の小さいUF膜を用いる例もある。膜面への蓄積を抑制するために循環流を利用するVFF(Vortex flow filtration)法¹⁷⁾や、原虫や細菌も同時に濃縮してしまう方法¹⁸⁾なども開発されている。膜以外にも、ガラスパウダー法^{19,20)}、ガラスウール法²¹⁾、磁鉄鉱凝集法²²⁾、セルロース凝集法²³⁾などが開発された。それぞれに目的に応じた長所があるが、膜を用いたウイルス濃縮法に比べて処理水量は少ない傾向にある。

これらのウイルス濃縮法は、ウイルスを細胞培養により測定することを前提として開発されたものが多い。そのため、ウイルス濃縮法においてもPCR法への対処が課題となった。従来のウイルス濃縮法においては、後段のウイルス検出における細胞培養に支障がないようにと、ビーフエキス等の培養に用いられる試薬によりウイルスを回収することが多かったが、(RT-)PCRに対する阻害作用が見られる²⁴⁾ことがわかってきた。そこで、酸・アルカリを用いたウイルス濃縮法が開発された²⁵⁾。回収したウイルス濃縮液に対して限外ろ過膜を用いた二次濃縮を容易に行うことができ、そのままPCR法を用いたウイルス検出を行うことができるという優れた特長を持っている。また、海水からも高い回収率を示し、東京湾の海水に存在するノロウイルスの検出にも成功している。

3) ウイルスの環境水試料の測定における現状

多くの研究機関で、様々な方法でウイルス濃縮・精製を行い、定量値が発表されている。試料の水質等により、あるいは同時に測定する試料に対して同一の方法で測定するのか、試料ごとに最適手法を用いるのかなど、一概に最適法を決めることは難しいのが現状である。

一方、ウイルスの測定法が様々な水試料に適用され、また大容量の水試料に適用されるなどの場合、ウイルス検出阻害が改めて問題となってきた²⁶⁾。遺伝子抽出段階、あるいは逆転写反応などの段階で環境由来の物質が反応を妨げていると考えられる。今のところ、このような阻害に対し、常に有効な回避手段は見つかっていない。そのため、陽性コントロールを使用して、ウイルスの回収率を測定することが推奨されている²⁷⁾。もともとの水試料、ウイルス濃縮後、遺伝子抽出後、cDNAに転写後、などのタイミングで陽性コントロールを入れることが可能である。これらの陽性コントロールは、すべて測定するのは大変であるが、コントロールを試料に入れておくことは比較的安価で容易であるので、測定するしないにかかわらず、陽性コントロールを適宜ステップごとに添加することが推奨される。

4) 微生物起源解析

水環境の調査では、糞便汚染の検出のため、大腸菌などの腸管系細菌が指標として広く使用されている。しかし、これらはほぼすべての温血動物から排出されるため、また、温暖な地域においては土壌などにおいて増殖する場合があるため、水質管理上、必ずしも問題視する必要のない場合がある。そこで、水質管理のために、大腸菌だけに頼るのではなく、排出源の動物が特定できるような指標を測定すべきであるという微生物起源解析 (Microbial Source Tracking, MST) という考え方がある。MSTでは様々な手法が用いられているが、中でもウイルスは特に宿主域がはっきりしているため、このような管理に有用な情報を与えうるとして注目を集めている⁴⁹⁾。ヒトに感染するウイルスを水の安全管理のための測定対象に加え、ウイルスの存在は感染リスクそのものを示すものとして用いるだけでなく、水の安全管理に資するための情報として使っていくような考え方である。今後の応用が期待される分野である。

3. 水中ウイルスの挙動

1) 下水および下水関連の水試料

PCRの定量性が受け入れられることに伴い、下水をはじめとする環境試料の定量値も発表されるようになった。例えば、日本の下水処理場では、下水処理場に流入するノロウイルス濃度は、冬に高く、夏に低い傾向がある²⁸⁾。一般的に下水処理場では微生物を用いた活性汚泥法による処理が行われているが、その処理効率は季節によらず2 Log (99%除去)程度であった。また、より高度な下水処理法である膜を用いた微生物処理 (Membrane Bioreactor, MBR) においては高いウイルス除去率が得られており、世界各国の文献から得られた推定値としては、GII ノロウイルスに対して3.35Log、エンテロウイルスに対して2.71Logの除去としている²⁹⁾。

下水道においては、雨水が下水管に流入する合流式下水道の場合に、未処理下水が環境中に放出されることがある。例えば、東京では年間30回程度、このようなことが起こるとされているので、それほど激しい雨でなくても未処理下水が環境中に放出されるという現象が起こっていると考えべきである。下水道整備が比較的遅れた地方都市においては、分流式下水道が採用されているため、雨水は下水管に入らない構造になっているが、実際には雨天時に下水処理場への流入量が増加する現象がみられており、場合によっては注意が必要である。

もちろん言うまでもなく、未処理下水が環境中に放流されれば、病原微生物による感染リスクが高まる。例えば東京湾における調査では、雨天後にウイルス濃度が急上昇する現象がみられている³⁰⁾。2020年にはまさにここで調査されたお台場海域で、トライアスロンなどの水浴を含む競技が行われる予定であるが、2010年にデンマークで行わ

れたトライアスロン大会において、降雨後に微生物濃度が上昇し (100 mlあたり大腸菌 1.5×10^4)、その影響を受け、838人の遊泳者のうち実に42%が体調不良をとった事例もある³¹⁾。

水浴に伴う感染リスクを制御するための総合的な対策が必要であるが、その効果をどのように検証するか、環境ウイルスに関する研究とともに、指標菌や海域の水質モデルの精緻化など、総合的な研究が必要であろう。

2) 河川水等

河川水においても、水中ウイルスの存在はいろいろと調べられている。世界各国のデータのうち、論文の中で最大濃度がはっきりしているものを選定して表に示す (表1)。ウイルス濃度の測定においては、濃縮回収率や酵素反応阻害などがあるが、最大濃度は、「少なくともその濃度までは存在することがあり得る」ということを示す濃度でもある。

ここには日本の水道水源のデータも含まれているが、ノロウイルス濃度として、1000copy/Lにはなりえる、ということが示されている。表流水を水源として利用する水道においては、少なくともそのような濃度のウイルスは原水中に存在することがあり得ることを前提に、処理などにおける安全対策を講ずる必要があることが示されたと言える。

3) 水道における除去効率

水道においては、大腸菌の不在を持って微生物学的に安全と判定していたが、クリプトスポリジウムによる大規模な感染流行³⁸⁾を契機に、実際には非常に低ながらも感染リスクは存在すると認識されるようになった。ウイルスについても、大腸菌よりも塩素耐性が高いことからリスクがゼロとは言えないと考えられる。許容可能なリスクレベルとしては、1980年代から議論はあるものの、現実的には年間の感染確率として1万人に一人以下であれば許容する、という議論に落ち着いてきている³⁹⁾。

技術的にも、現在では病原微生物ごとに定量的リスク評価を行うことができるようになってきた⁴⁰⁾が、その方法としては、処理前の原水の病原微生物濃度の測定と、処理における病原微生物の除去効率の推定によって行われている⁴¹⁾。中でも、ウイルスは河川水などの水道原水において我が国でも比較的高い濃度で存在するため、その管理には十分な注意が必要である。

浄水場における浄水処理において、ウイルスがどの程度除去できるのかについては、しっかりしたデータが得られていないが、PMMoVを用いた調査により、除去率が実測できるようになってきており¹¹⁾、今後の水道の安全性のために活用されることが期待されている。

表1 表流水において観察されたノロウイルス・サポウイルスの最大濃度

Virus	Country	No. of samples tested (% positive)	Max conc (unit/L)	Reference
Norovirus GI	Japan	64 (53)	1600	(Haramoto et al., 2005) ³²⁾
	Brazil		8140	(Victoria et al., 2010) ³³⁾
	Japan	64 (13)	33000	(Haramoto et al., 2012) ⁸⁾
	Singapore	93 (20)	2160	(Liang et al., 2015) ³⁴⁾
Norovirus GII	Japan	64 (44)	7000	(Haramoto et al., 2005) ³²⁾
	Germany	41 (32)	27000	(Hamza et al., 2009) ³⁵⁾
	Brazil		3720	(Victoria et al., 2010) ³³⁾
	Thailand	24 (13)	790	(Hata et al., 2011) ²⁶⁾
	Japan	64 (1)	340	(Haramoto et al., 2012) ⁸⁾
	Singapore	93 (48)	15500	(Liang et al., 2015) ³⁴⁾
Norovirus GIV	Japan	48 (31)	15000	(Kitajima et al., 2009) ³⁶⁾
Sapovirus	Japan	36 (64)	100	(Haramoto et al., 2008) ³⁷⁾
	Japan	64 (3)	820	(Haramoto et al., 2012) ⁸⁾

4) ボトル水中のノロウイルス

ヨーロッパのブランドのミネラルウォーター 1L からノロウイルスの遺伝子を検出したという報告⁴²⁾ から、大きな議論が巻き起こった。ポリオウイルス等を用いて水中の生残性を調べ、PCR法と培養法によって検出結果が異なることを示してゲノム検出だけではリスクの過大評価につながることを示した研究³⁾、ミネラルウォーターの製造企業の研究者らが追試においてウイルスゲノムが検出できなかったという調査結果を発表し⁴³⁾、さらにはそもそもの調査結果の信憑性について紙上で公開討論を行っている⁴⁴⁾。そこでは、当初に検出したとしているウイルスゲノムの配列を示すように求めているが、これまでに遺伝子配列を提出できていない。そのことから、当初ミネラルウォーターから検出したとしていたものは、実は実験室内における遺伝子の混入（コンタミ）だったのであらうとされている。ただ、これを契機に微生物学的安全性の重要性が広く認識され、ヨーロッパの食品系の大企業においては微生物学的安全管理が大幅に向上した。

4. 水の安全性に向けた規制の動向

1) 飲用水に対する水質基準

水系感染症はおもに糞便経口経路により感染し、ウイルスに限らず細菌や原虫による疾患も管理対象となる。水道の普及により脅威は低下していくが、そこでは大腸菌群を指標菌として管理する体系が整えられ、一定の成果を上げてきていると言える。少なくとも、疫学的に検出可能な形

での脅威としては、しっかりとした水道であれば問題ないという疫学調査の結果が発表されている⁴⁵⁾。

現状としては、大腸菌がないことを根拠にウイルス学的に安全である、とは言えないが、一方で、何の根拠もなくリスクがあるとも言えない、という状態である。特に、我が国においては水道の蛇口において残留塩素がなければならないとされており、そのため塩素消毒頼みの水質管理に陥りがちである。オランダなどでは、水道に残留塩素を入れずに配水するため、病原微生物のリスク管理については非常に先進的であり、年間の感染確率1万人に一人という値をそのまま水道水質基準としている。わが国においても、今後のリスク管理の改善が望まれる。

下水の再利用においても、ウイルスのリスクについては広く認識されており、例えば最も厳しいとされるカリフォルニア州の規制では、飲用を前提に地下水涵養する場合には12Logのウイルス除去が可能な処理を行うべきだとしている²⁹⁾。このように、浄水においても下水再利用においても、処理ごとのウイルス除去能が重要なファクターになってきており、その評価が今後は重要になってくると考えられる。

2) 水環境のウイルスに関する課題

水浴基準などについては、国内外ともに課題が多い。アメリカなどにおいては、大腸菌や腸球菌が水浴基準として用いられており、ウイルスに対する基準は制定されていないのは日本と同じであるが、基準値を満たした場合の感染

リスクについては明示されており、1回の水浴当たり3.6%の感染確率を受容していることになる。

大腸菌などの指標細菌はウイルスとは塩素耐性などの挙動が異なるため、ウイルスのリスク管理については疑問が残っている。日本では下水処理においては、大腸菌群しか規制がないことから塩素消毒が一般的であるが、それではウイルスに対する効果は限定的と考えられる⁴⁶⁾。そのため、大腸菌が不在でもウイルスが存在する可能性がある。

環境水中のウイルスに対する指標としては、大腸菌ファージは早くから注目され、研究が進められてきた⁴⁷⁾。水中における挙動がウイルスに似ていることが期待され、ウイルスの消長を表す指標としては評価されている。また、近年においても、ウイルス自体はPCR法などによって測定するのに対し、ファージは宿主菌の培養が容易であるため、ブラック法により感染価を有するファージの数を測定することができる点など、効果的に活用することが可能となってきた。特にF特異大腸菌ファージは、一本鎖RNAを有した小型の球形のウイルスであり、多くの腸管系ウイルスと特徴を共有していることから指標として有望視されてきた。最近、F特異大腸菌ファージを遺伝型別に測定する方法も開発されており⁴⁸⁾、今後の活用が期待される。

ただ、一方で、環境水中におけるウイルスの存在を示す指標としてはウイルス濃度との相関が不十分であるとされており⁴⁷⁾、ファージが一定濃度以下であれば安全というようになりやすい形で水質基準を設定するようなことは難しいのが現状である。たとえば下水などにおいてもファージの存在状況は地域差があり、なかなか規制という形で導入するには難がある。

5. おわりに

水中ウイルスの測定については、PCR法の出現とともに様変わりし、多くのデータが利用可能となってきた。一方で、感染性の有無や定量性の確からしさをどのように確保するかなど、課題も出てきている。さらに、水系感染を防ぐための社会の仕組みとして、水質基準や処理法の確立など、まだまだ総合的な対策が必要である。

参考文献

- 1) Melnick, J. L., Emmons, J., Opton, E. M. & COFFEY, J. H. Coxsackie viruses from sewage; methodology including an evaluation of the grab sample and gauze pad collection procedures. *Am. J. Hyg.***59**, 185-195 (1954).
- 2) Bosch, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int. Microbiol.***1**, 191-6 (1998).
- 3) Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C. & Poincare, H. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? *Appl. Environ. Microbiol.***69**, 3965-3969 (2003).
- 4) Haramoto, E., Katayama, H. & Ohgaki, S. Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.***70**, 2154-2160 (2004).
- 5) Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N. & Gantzer, C. The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. *Food Environ. Virol.* (2016). doi:10.1007/s12560-016-9248-2
- 6) Kim, K., Katayama, H., Kitajima, M., Tohya, Y. & Ohgaki, S. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Sci. Technol.***63**, 502-507 (2011).
- 7) Kageyama, T. et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.***41**, 1548-1557 (2003).
- 8) Haramoto, E. et al. Occurrence of Viruses and Protozoa in Drinking Water Sources of Japan and Their Relationship to Indicator Microorganisms. *Food Environ. Virol.***4**, 93-101 (2012).
- 9) Katayama, H. et al. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.***42**, 1441-1448 (2008).
- 10) Rosario, K., Symonds, E. M., Sinigalliano, C., Stewart, J. & Breitbart, M. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.***75**, 7261-7267 (2009).
- 11) 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).
- 12) 片山浩之. 新たなウイルス濃縮方法の開発と水道水および水道水源調査への適用. *モダンメディア* **52**, 185-190 (2006).
- 13) Matsuura, K. et al. Assessment of poliovirus eradication in Japan: Genomic analysis of polioviruses isolated from river water and sewage in Toyama Prefecture. *Appl. Environ. Microbiol.***66**, 5087-5091 (2000).
- 14) Cliver, D. O. Factors in the membrane filtration of enteroviruses. *Appl. Microbiol.***13**, 417-31 (1965).
- 15) Wallis, C. & Melnick, J. L. Concentration of enteroviruses on membrane filters. *J. Virol.***1**, 472-7 (1967).
- 16) Sobsey, M. D. & Jones, B. L. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.***37**, 588-595 (1979).
- 17) Paul, J. H., Jiang, S. C. & Rose, J. B. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. *Appl. Environ. Microbiol.***57**, 2197-2204 (1991).
- 18) Hill, V. R. et al. Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples. *Appl.*

- Environ. Microbiol.***73**, 4218–4225 (2007).
- 19) Sarrette, B. A., Danglot, C. D. & Vilagines, R. A new and simple method for recuperation of enteroviruses from water. *Water Res.***11**, 355–358 (1977).
 - 20) Lucena, F., Bosch, A., Jofre, J. & Schwartzbrod, L. Identification of viruses isolated from sewage, river-water and coastal seawater in Barcelona. *Water Res.***19**, 1237–1239 (1985).
 - 21) Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G. & Vilaginès, R. Glass Wool for Virus Concentration at Ambient Water pH Level. *Water Sci. Technol.***27**, 299 LP-306 (1993).
 - 22) Bitton, G., Chang, L. T., Farrah, S. R. & Clifford, K. Recovery of coliphages from wastewater effluents and polluted lake water by the magnetite-organic flocculation method. *Appl. Environ. Microbiol.***41**, 93–96 (1981).
 - 23) Yano, K., Yoshida, Y., Shinkai, T. & Kaneko, M. A Practical Method for the Concentration of Viruses from Water Using Fibriform Cellulose and Organic Coagulant. *Water Sci. Technol.***27**, 295 LP-298 (1993).
 - 24) Schwab, K. J., De Leon, R. & Sobsey, M. D. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.***61**, 531–537 (1995).
 - 25) Katayama, H., Shimasaki, A., 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 Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal. *Appl. Environ. Microbiol.***68**, 1033–1039 (2002).
 - 26) Hata, A. *et al.* Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.***77**, 4336–4343 (2011).
 - 27) Prevost, B. *et al.* Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ. Int.***79**, 42–50 (2015).
 - 28) Katayama, H. *et al.* One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.***42**, 1441–1448 (2008).
 - 29) Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T. & Katayama, H. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environ. Int.***91**, 220–229 (2016).
 - 30) Haramoto, E. *et al.* Effects of rainfall on the occurrence of human adenoviruses, total coliforms, and *Escherichia coli* in seawater. *Water Sci. Technol.***54**, 225–230 (2006).
 - 31) Harder-Lauridsen, N. M., Kuhn, K. G., Erichsen, A. C., Mølbak, K. & Ethelberg, S. Gastrointestinal illness among triathletes swimming in non-polluted versus polluted seawater affected by heavy rainfall, Denmark, 2010–2011. *PLoS One***8**, 2010–2011 (2013).
 - 32) Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. & Ohgaki, S. Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.***71**, 2403–2411 (2005).
 - 33) Victoria, M. *et al.* Assessment of norovirus contamination in environmental samples from Florianópolis City, Southern Brazil. *J. Appl. Microbiol.***109**, 231–238 (2010).
 - 34) Liang, L. *et al.* Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment. *Appl. Environ. Microbiol.***81**, 850–860 (2015).
 - 35) Hamza, I. A. *et al.* Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res.***43**, 2657–2668 (2009).
 - 36) Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwat, C., Katayama, H. & Ohgaki, S. Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.***49**, 655–658 (2009).
 - 37) Haramoto, E., Katayama, H., Phanuwat, C. & Ohgaki, S. Quantitative detection of sapoviruses in wastewater and river water in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.***46**, 408–413 (2008).
 - 38) Mac Kenzie, W. R. *et al.* A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.***331**, 161–167 (1994).
 - 39) 伊藤禎彦. 下水処理水の飲用再利用におけるリスクの取り扱いについて. *水環境学会誌* **39**, 187–196 (2016).
 - 40) Teunis, P. F. M., Medema, G. J., Kruidenier, L. & Haveelaar, A. H. Assessment of the risk of infection by Cryptosporidium or Giardia in drinking water from a surface water source. *Water Res.***31**, 1333–1346 (1997).
 - 41) World Health Organization. Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management. (2016). doi:10.1002/9781118910030
 - 42) Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A. & Luthi, T. M. Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters: One-Year Monitoring of Three Brands. *Appl. Environ. Microbiol.***68**, 1925–1931 (2002).
 - 43) Lamothe, G. T., Putallaz, T., Joosten, H. & Marugg, J. D. Reverse Transcription-PCR Analysis of Bottled and Natural Mineral Waters for the Presence of Noroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.***69**, 6541–6549 (2003).
 - 44) Sanchez, G., Joosten, H. & Meyer, R. Letter to the Editor. **71**, 2203–2205 (2005).
 - 45) Colford, J. M. J. *et al.* A randomized, controlled trial of in-home drinking water intervention to reduce gastrointestinal illness. *Am. J. Epidemiol.***161**, 472–482 (2005).
 - 46) Sobsey, M. D. Inactivation of Health-Related Microorganisms in Water by Disinfection Processes. *Water Sci. Technol.***21**, 179–195 (1989).
 - 47) Microbiology, A. S. G. on H. R. W. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.***25**, 529–545 (1991).
 - 48) Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N. & Tanaka, H. Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters. *Appl. Environ. Microbiol.***82**, 4244–4252 (2016).
 - 49) Scott, T. M. *et al.* Microbial Source Tracking: Current

Methodology and Future Directions Microbial Source Tracking : Current Methodology and Future Directions †. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5796–5803 (2002).

Viruses in Water Environment

Hiroyuki KATAYAMA

Environmental Engineering Program, Vietnam-Japan University
Department of Urban Engineering
Graduate School of Engineering
The University of Tokyo

Development of PCR method had a great impact on studies on viruses in water environment, and now it makes possible to determine various kind of viruses from river, marine water and water/wastewater treatment systems, though there are still needs to improve accuracy of quantification. Now we know that river water may contain 1000copy/L of norovirus. The infectious risk management for recreational water has been left and not updated, hence we need develop better management system based on scientific knowledge.

