

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04064

研究課題名(和文) 遺伝子組換えで発現した外套タンパクを用いた培養不可能なウイルスの浄水処理性の評価

研究課題名(英文) Evaluating removal of waterborne human-infective viruses during drinking water treatment

研究代表者

松下 拓 (Matsushita, Taku)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30283401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、培養が困難であったウイルスを含む水系ヒト感染性ウイルスの浄水処理性を、室内実験と実浄水処理場での調査を組み合わせることにより調べたものである。室内実験により、トウガラシ微斑ウイルスが、4種の水系ヒト感染性ウイルスの浄水処理性指標となり得ることを示した。また、浄水処理場での調査により、凝集-沈殿-砂ろ過工程でトウガラシ微斑ウイルスが1.6 log除去されることが分かった。これらより、実浄水場における凝集-沈殿-砂ろ過工程にて、1.6 log程度の水系ヒト感染性ウイルスの除去が期待できると推察された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, removal of waterborne human-infective viruses (WHIVs) during drinking water treatment processes were estimated by a combination of lab-scale batch experiments and field-survey in an actual drinking water treatment plant. The lab-scale experiments revealed that pepper mild mottle virus (PMMoV) could be an indicator of 4 WHIVs (adenovirus, coxsackievirus, hepatitis A virus, and murine norovirus) during coagulation-sedimentation-sand filtration (CSF) processes. The field-survey showed that 1.6-log removal of PMMoV, on average, was achieved during the CSF in the actual treatment plant. Therefore, we concluded that 1.6-log removal could be also expected for the WHIVs in the CSF in the actual treatment plant.

研究分野：土木環境システム

キーワード：土木環境システム 浄水処理 ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスは、近年その感染事例が世界的に年々増加していることより、社会的に注目を集めている。しかしながら、ノロウイルスは、これまで多くの努力が払われてきたにも関わらず、未だ細胞を用いた簡単な培養法が確立されておらず、ウイルスの大量培養ならびに添加実験が極めて難しい状況にある。これが主因となり、社会的な大きい注目にも関わらず、ノロウイルスなどの培養が困難な水系ヒト感染性ウイルスの浄水処理性は未だ明らかでないのが現状である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ノロウイルス(2016年に培養可能との論文が発表されたが、その手法は極めて困難であり、現段階でも通常の方法による培養は極めて難しいと考えられる)や腸管アデノウイルスなどの培養が困難なウイルスなどの浄水処理性を実験的に調べたことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理における水系ヒト感染性ウイルスの処理性評価

精製したアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスを $10^{2-3}$  PFU/mLになるように、また、トウガラシ微斑ウイルスを $10^3$  lesions/mLになるように同時添加した水道原水 A~H(凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理を実施している全国8箇所の浄水処理場原水)を実験原水とし、角型ピーカーに2L添加した。ここに、凝集剤として従来から広く用いられている塩基度が50%のポリ塩化アルミニウム(PACl)を1.08~2.70 mg-Al/L(水道原水採水時の各浄水処理場における凝集剤添加濃度)になるように添加し、直ちに(予備試験の結果を用いて)HClあるいはNaOHにてpHを7に調整した。これをG値 $200\text{ s}^{-1}$ にて1分間急速攪拌し、さらにG値 $20\text{ s}^{-1}$ にて10分間緩速攪拌した後、60分間静置した。原水および静置後の上澄水を採取し、それぞれの試料のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法(トウガラシ微斑ウイルスについては感染性評価手法も実施)にて定量することにより、ウイルスの凝集沈殿処理性を評価した。加えて、上澄水を120 m/dのろ速にて珪砂を充填した砂ろ過カラム(ろ層厚さ: 10 or 20 cm)に10分間、あるいは15分間通水した。経時的にろ過水のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法(トウガラシ微斑ウイルスについては感染性評価手法も実施)にて定量することにより、凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理におけるウイルスの処理性を評価した。

#### (2) 凝集 - MF膜ろ過処理における水系ヒト感染性ウイルスの処理性評価

精製したアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウ

イルスをそれぞれ $10^{2-3}$  PFU/mL、大腸菌ファージ MS2 および  $\phi$ X174 をそれぞれ $10^{5-6}$  PFU/mLになるように同時添加した河川水(浄水場原水)を実験原水とした。凝集処理後の膜ろ過水のpHを7に調整するため、実験原水にあらかじめHClあるいはNaOHを添加した後、送液ポンプを用いて定流量にてインライン凝集装置に導入した。ここに、PAClを0.54, 1.08, 2.16 mg-Al/Lになるように添加し、スタティックミキサーおよびタイゴンチューブリアクター(凝集時間1分)にてインライン凝集を行った。これを、親水性のPVDF膜(公称孔径 $0.1\ \mu\text{m}$ )に通水した。その際、凝集処理水50 mLを吸引ポンプを用いて $-0.05\ \text{MPa}$ の条件下で通水し、ろ過開始直後の10 mLを破棄した後、残りの40 mLを採水した。実験原水および膜ろ過水を採水し、それぞれ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、凝集-MF膜ろ過処理におけるウイルスの除去率を算出した。なお、膜ろ過水のウイルス濃度がリアルタイム定量PCR法の定量下限値以下であった場合は、遠心式フィルターユニット(分画分子量100 kDa)を用いてウイルスを濃縮した後、改めてリアルタイム定量PCR法にて濃度を定量した。

#### (3) 実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性評価

実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価するため、本研究で構築したナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を組み合わせたウイルス濃縮法を適用し、浄水場Aの原水と浄水処理工程水100~1,500 Lにおけるトウガラシ微斑ウイルスの濃度を定量した。2017年に浄水場A内において原水100-250 L、沈殿水100-500 L、チオ硫酸ナトリウムのインライン添加により残留塩素を中和した砂ろ過水100-1,000 L、あるいは浄水100-1,500 Lを、ポンプを用いてナノセラム陽電荷膜に通水した。これを構築したウイルス濃縮法にて一次濃縮、二次濃縮した後、それぞれの試料のウイルス濃度を定量することにより、浄水場Aにおけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理における水系ヒト感染性ウイルスの処理性

まず、凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理におけるアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去性を評価した。なお、砂ろ過処理においては、ろ層厚さ20 cmの場合の除去率も評価したが、ろ層厚さの違いによる除去率の差異は見られず、また、除去率の経時的な変化も見られなかったことから、ろ層厚さ10 cmの場合の通水5分後および10分後の除去率の平均値で議論することとした。凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理により、PCR法にて評価したアデノウ

ルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率は、それぞれ 1.4-2.4 log, 0.9-2.7 log, 0.8-2.4 log, 0.8-2.0 log となった。一方、凝集剤を添加しない場合は、いずれのウイルスも除去できなかったことから、凝集沈殿処理によって分離しきれなかったウイルスを含むマイクロフロックが、後段の砂ろ過処理によって効果的に抑止されたために凝集沈殿処理に比べて除去率が向上したものと推察された。

次に、トウガラシ微斑ウイルスの水系感染症ウイルスに対する代替指標としての有効性について議論するため、凝集-沈殿-砂ろ過処理におけるトウガラシ微斑ウイルスの除去率と、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率を比較した。その結果、PCR法にて評価したトウガラシ微斑ウイルスの除去率と、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率の間には高い正の相関関係が認められた。また、トウガラシ微斑ウイルスの除去率は、水系ヒト感染性ウイルスの除去率と同程度であった。以上の結果から、トウガラシ微斑ウイルスは、水系ヒト感染性ウイルスの凝集-沈殿-砂ろ過処理性を評価する上で有効な代替指標と成り得る可能性が示唆された。なお、トウガラシ微斑ウイルスは、水道原水を含む水環境中に水系感染症ウイルスよりも大幅に高い濃度で存在していると報告されていることから、水道原水中に含まれるトウガラシ微斑ウイルスを水系感染症ウイルスの代替として用いることにより、処理水中の水系感染症ウイルスの濃度を定量する際に必要となる処理水の大量濃縮を行うことなく、実浄水場における水系感染症ウイルスの処理性を比較的容易に推定できるものと期待された。

また、トウガラシ微斑ウイルスの除去率と、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率が同程度となった理由について議論するため、Milli-Q 水中におけるアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルス、トウガラシ微斑ウイルスの電気移動度を測定したところ、いずれのウイルスも、等電点(表面電位が0となるpH)は同程度の値であり、pH7付近においては負に帯電していることが確認された。従って、ウイルス粒子の表面電位特性の類似性により、トウガラシ微斑ウイルスの除去率とアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率が同程度となった可能性が考えられた。

(2) 凝集-MF膜ろ過処理における水系ヒト感染性ウイルスの処理性

凝集-MF膜ろ過処理における病原ウイル

スの除去率を評価した。MF膜ろ過処理(凝集処理無し)のみでは、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率はいずれも0.2 log以下であったのに対し、前凝集処理を実施した場合においては、MF膜ろ過処理単独に比べて除去率が向上した。これは、前凝集処理によってMF膜の孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され、フロックに捕捉、あるいは吸着されたウイルスが、後段のMF膜ろ過処理によって効果的に抑止されたためであると推察された。凝集pH7、凝集剤添加濃度0.54 mg-Al/Lの条件においては、ウイルスの除去率は凝集剤の種類によって大きく異なり、alum及び塩基度50のPAClを用いた場合0.5-2 logの除去率であったのに対し、高塩基度PACl(塩基度70,80)を用いた場合においては、1-4 log以上の除去率が得られた。特に、硫酸を含まない高塩基度PAClを用いた場合においては、アデノウイルスは4.3 log以上、A型肝炎ウイルスは3.5 log以上、マウスノロウイルスは3.3-3.6 logの除去率が得られた。凝集剤添加濃度を0.54 mg-Al/Lから1.08 mg-Al/Lに上げた場合には、ウイルスの除去率は大きく向上し、いずれの凝集剤を用いた場合においても、アデノウイルス、A型肝炎ウイルス、マウスノロウイルスの除去率は3.9 log以上となった。また、硫酸を含まない高塩基度PAClを用いた場合では、いずれのウイルスについても4 log以上の高い除去率が得られた。

一方、凝集pHを8にすると、凝集剤添加濃度1.08 mg-Al/Lの条件においては、alum、塩基度50の通常PACl、硫酸を含む高塩基度PAClを用いた場合、凝集pH7で処理を行った場合に比べてウイルスの除去率が著しく低下した。また、凝集剤添加濃度を1.08 mg-Al/Lから2.16 mg-Al/Lに上げた場合であっても、ウイルスの除去率の向上はほとんど見られなかった。これに対し、硫酸を含まない高塩基度PAClを用いた場合においては、いずれのウイルスについても凝集pH7の場合と同等の4 log以上の高い除去率が得られた。以上の結果から、凝集剤の種類、凝集pH、凝集剤添加濃度は凝集-MF膜ろ過処理における水系ヒト感染性ウイルスの処理性に大きく影響することが明らかとなった。また、硫酸を含まない高塩基度PAClを用いた前凝集処理をMF膜ろ過処理に適用することにより、ウイルスの直径(22-90 nm)よりも大きな孔径(0.1 μm)を有するMF膜であっても、中性のpH領域のみならず、弱アルカリ性のpH領域においても、米国環境保護局(USEPA)の要求値である4 logの除去率を達成できることが明らかとなった。

アルミニウム系凝集剤の基本特性をコロイド滴定法により分析した本研究グループの既往研究においては、硫酸を含まない高塩

基度 PACI は、その他の凝集剤に比べてコロイド荷電量が大きかったことから、凝集剤の塩基度を高めること、また、凝集剤中に硫酸を含めないことにより、凝集剤の荷電中和力が増加し、結果としてウイルスの除去率が向上した可能性が示唆された。

(3) 実浄水場におけるトウガラシ微斑ウイルスの処理性と水系ヒト感染性ウイルスの除去率の推定

構築したウイルス濃縮法を浄水場 A に適用し、トウガラシ微斑ウイルスの処理性を評価した。原水、沈殿水、ろ過水、塩素処理後の浄水におけるトウガラシ微斑ウイルスの濃度は平均値でそれぞれ  $10^{1.3}$  copies/mL,  $10^{0.4}$  copies/mL,  $10^{-0.3}$  copies/mL,  $10^{-0.5}$  copies/mL であり、これらの定量結果から算出された凝集 - 沈殿処理、砂ろ過処理によるトウガラシ微斑ウイルスの除去率はそれぞれ 0.9 log, 0.7 log であり、凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理トータルとして 1.6 log 程度の除去が期待できると判断された。また、塩素処理によるトウガラシ微斑ウイルスの減少率は 0.2 log であった。

4(1)にて述べたとおり、室内実験における凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理では、トウガラシ微斑ウイルスの除去率は、水系ヒト感染性ウイルスの除去率と同程度であったことから、浄水場 A においてトウガラシ微斑ウイルスが 1.6 log 除去された場合には、水系ヒト感染性ウイルスも 1.6 log 程度除去されるものと推察された。また、浄水場 A における塩素処理の塩素濃度と接触時間の積、すなわち、CT 値は約 20 mg-Cl<sub>2</sub>·min/L であり、塩素処理の室内実験により確認したトウガラシ微斑ウイルスの濃度が 0.2 log 減少 (PCR 法にて評価) するのに必要な CT 値 25 mg-Cl<sub>2</sub>·min/L と概ね一致した。加えて、同条件においては、水系ヒト感染性ウイルスの中でも高い塩素耐性を有するコクサッキーウイルスが 4.7 log 以上不活化 (PFU 法にて評価) されることが分かっている。以上の結果から、トウガラシ微斑ウイルスが凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理により 1.6 log 除去、また、塩素処理により 0.2 log 減少 (PCR 法にて評価) される浄水場 A においては、水系感染症ウイルスは凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理により 1.6 log 程度除去、また、塩素処理により少なくとも 4.7 log 以上不活化 (PFU 法にて評価) されるのではないかと推察された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. (2018) Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric コクサッキーウイルス iruses for assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration to remove those viruses, *Water Research*, **129**,

460–469, 査読あり。

2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. (2017) Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric コクサッキーウイルス iruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses, *Water Research*, **115**, 29–39, 査読あり。
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K. and Aochi, A. (2017) Elimination of representative contaminant candidate list viruses, coxsackievirus, echovirus, hepatitis A virus, and norovirus, from water by coagulation processes, *Journal of Hazardous Materials*, **326**, 110–119, 査読あり。
4. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T. and Murai, K. (2016) Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and suitability of bacteriophages MS2 and φX174 as surrogates for those viruses, *Science of the Total Environment*, **563–564**, 29–39, 査読あり。
5. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. (2016) Effect of coagulant basicity on virus removal from water by polyferric chloride, *Journal of Water Supply: Research and Technology–AQUA*, **65**(4), 322–329, 査読あり。
6. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. (2016) Effect of aluminum hydrolyte species on human enterovirus removal from water during the coagulation process, *Chemical Engineering Journal*, **284**, 786–793, 査読あり。
7. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K. (2015) Characterization of recombinant norovirus virus-like particles and evaluation of their applicability to the investigation of norovirus removal performance in membrane filtration processes, *Water Science and Technology: Water Supply*, **16**(3), 737–745, 査読あり。

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 山下玲菜, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018) 実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価: ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用した大容量濃縮法の適用, 第 52 回日本水環境学会年会, 札幌, 2018/3/15-17.
2. 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2018) 培養困難な水系感染症ウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入型ウイルス様粒子の創製, 札幌, 2018/3/15-17.
3. 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2017) トウガラシ微斑ウイルスと水系感染症ウイルスの塩素処理性の比較, 第 25 回衛生工学シンポジウム, 札幌, 2017/11/9-10.

4. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. (2017) Virus removal by coagulation-microfiltration with high-basicity polyaluminum chloride, 8th IWA Membrane Technology Conference & Exhibition for Water and Wastewater Treatment and Reuse, Singapore, 5–9 September 2017.
5. 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2017) トウガラシ微斑ウイルスと水系感染症ウイルスの塩素消毒耐性の比較: 感染性評価手法と PMA-PCR 法の併用による評価, 第 51 回日本水環境学会年会, 熊本, 2017/3/15-17.
6. 白崎伸隆, 村井一真, 松下拓, 松井佳彦 (2016) 膜ろ過処理による水系感染症ウイルスの除去, 日本水環境学会シンポジウム, 秋田, 2016/9/13-15.
7. 村井一真, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2016) 消毒耐性ウイルスの膜ろ過処理性評価および代替指標候補ウイルスとの処理性比較, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島, 2016/3/16-18.
8. 山下玲菜, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦 (2016) トウガラシ微斑ウイルスは水系感染症ウイルスの浄水処理性指標となるのか?: 凝集沈殿・砂ろ過における処理性比較, 第 50 回日本水環境学会年会, 徳島, 2016/3/16-18.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松下 拓 (MATSUSHITA, Taku)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 30283401

##### (2) 研究分担者

松井 佳彦 (MATSUI, Yoshihiko)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 00173790