

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25709044

研究課題名(和文) 培養不可能な水系感染症ウイルスの浄水処理性評価とウイルス処理技術の高度・高効率化

研究課題名(英文) Evaluation of non-culturable waterborne virus removal in drinking water treatment processes and innovation of virus removal technology

研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI, NOBUTAKA)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス様粒子と新規のImmuno-PCR法を併用することにより、培養不可能なノロウイルス粒子の膜ろ過処理性を評価することに成功した。また、ウイルス処理に有効な新規のアルミニウム系凝集剤の開発にも成功すると共に、新規凝集剤をインライン凝集-MF膜処理に適應することにより、中性のpH領域のみならず、従来のアルミニウム系凝集剤では処理が困難であった弱アルカリ性のpH領域においても、アデノウイルスやノロウイルス等の水系感染症ウイルスを4 log (99.99%)以上除去できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We were able to successfully evaluate norovirus removal performance as particles during membrane filtration processes by using recombinant norovirus virus-like particles and the immuno-PCR method developed in the present study. In addition, a novel aluminum-based coagulant for effective virus removal was also successfully developed in the present study. A combination of coagulation pretreatment with the novel coagulant and microfiltration can provide effective removal of waterborne viruses including adenovirus and norovirus (more than 4 log) over a broader pH range than is possible with commercially available aluminum-based coagulant.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：水系感染症 水系感染症ウイルス ウイルス様粒子 新規Immuno-PCR法 新規凝集剤 アルミニウム多量体 インライン凝集 膜ろ過処理

1. 研究開始当初の背景

近年の気候変動や人口増加に伴う世界的な水不足の顕在化により、水資源を質的・量的に安定して確保することが困難な状況となってきた。このような中で、健全な水循環を今後も持続していくためには、これまで使用されてこなかった低水質の環境水や排水をも水道水源として利用(再利用)する必要がある。このような原水は、社会的注目度の高いノロウイルスに代表される水系感染症ウイルスによる汚染レベルも高いことから、浄水処理における水系感染症ウイルスの処理性を詳細に把握した上で、効果的且つ効率的な処理を施し、ウイルスによる水系感染症を制御していくことが重要となる。しかしながら、ノロウイルス、サポウイルス等の一部の水系感染症ウイルスは、生体外での効率的な培養法が未確立であることから、培養可能な水系感染症ウイルスに比べて浄水処理性に関する知見がほとんど得られていないのが現状である。その一方で、トリハロメタンに代表される消毒副生成物による健康影響が指摘され、水系感染症制御の観点から消毒剤注入量を容易に増加させることが困難な状況となってきたことから、消毒処理における負荷低減を目的とした物理的な浄水処理技術の高度化・高効率化が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、ノロウイルスに代表される培養不可能なウイルスのウイルス様粒子(Virus-Like Particles: VLPs)を作製し、作製したVLPsの高感度定量法を開発することにより、培養不可能なウイルスの物理的な浄水処理性、特に次世代の浄水処理技術として導入が進められている膜ろ過処理における処理性を、培養法の確立を待つことなく詳細に把握することを目的とした。また、ウイルス処理に有効な新規凝集剤を開発し、凝集-精密ろ過(Microfiltration: MF)膜処理に適用することにより、ウイルス処理の高度化・高効率化を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) VLPsの作製及び定量法

本研究では、我が国で分離されたノロウイルス(Chiba virus株, GI.4型)のVLPs(直径35-39nm, 図1)を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコ細胞を用いたタンパク質発現法により作製し、実験に使用した。また、抗原抗体反応の反応特異性とPCR法の高感度性を組み合わせたImmuno-PCR法を新たに構築することにより、VLPsの高感度定量を実現した。なお、Immuno-PCR法に使用したIgM抗体及びIgG抗体は、VLPsをマウスに経口摂取することにより作製した。

IgM抗体をマイクロプレートに固定化し、ここに、抗原であるVLPsを含む試料を添加することにより、試料中のVLPsとIgM抗体

を反応させた。その後、ビオチン化したIgG抗体を添加し、VLPsと反応させ、IgM抗体-VLPs-ビオチン化IgG抗体の複合体を形成させた。更に、ビオチンと強固に結合する性質を有するストレプトアビジンを添加し、ここに、ビオチン化したDNAタグを添加することにより、ストレプトアビジンを介してビオチン化IgG抗体とビオチン化DNAタグを結合させた。制限酵素を用いて複合体のDNAタグを切断した後、DNAタグ濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量した。

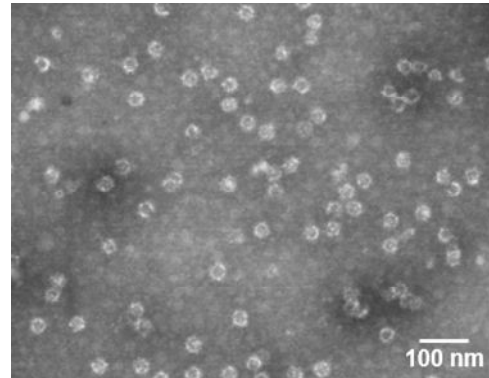


図1. ノロウイルスVLPsの電子顕微鏡画像

(2) 使用したウイルスの培養及び定量法

本研究では、代表的な水系感染症ウイルスであるアデノウイルス(AdV, Dugan株, 40型, 直径80-100nm)、コクサッキーウイルス(CV, Faulkner株, B5型, 直径20-30nm)、A型肝炎ウイルス(HAV, HM175/18f株, IB型, 直径20-30nm)に加え、培養不可能なヒトノロウイルスの代替として広く用いられている培養可能なマウスノロウイルス(MNV, CW1株, 1型, 直径30-40nm)を実験に使用した。AdV, CV, HAV, MNVは、それぞれA549細胞, BGM細胞, FRhK-4細胞, RAW264.7細胞を用いて培養し、ブラック形成法及びリアルタイム定量PCR法にて濃度を定量した。

(3) 膜ろ過処理

本研究では、MF膜処理、限外ろ過(Ultrafiltration: UF)膜処理、凝集-MF膜処理におけるVLPsの処理性を評価した。精製したVLPsを 10^{10-11} VLPs/mLになるように添加した河川水を実験原水とした。実験原水をpH 6.8に調整した後、MF膜(膜材質PVDF, PTFE, 混合セルロース(MC), 膜孔径0.1 μ m)あるいはUF膜(膜材質再生セルロース(RC), 分画分子量1k, 10k, 100kDa)に通水した。また、実験原水をスタティックミキサーを用いたインライン凝集にて処理(凝集pH 6.8, 凝集剤塩基度50%の硫酸を含む従来型のPACl, 凝集剤添加濃度0.27, 0.54, 1.08mg-Al/L)した後、MF膜(膜材質セラミック, 膜孔径0.1 μ m)に通水した。実験原水及

び膜ろ過水を採取し、それぞれの VLPs 濃度を Immuno-PCR 法にて定量することにより、除去率を算出した。

(4) 膜ファウリングの影響評価

膜ろ過処理の経過に伴う物理的に可逆な膜ファウリングの進行(ケーキ層の形成)が VLPs の処理性に与える影響を評価するため、VLPs を添加していない河川水を上述したインライン凝集(凝集剤添加濃度 1.08 mg-Al/L)にて処理した後、MF 膜(膜材質 セラミック、膜孔径 0.1 μm)に 30, 60, 120 分間通水することにより膜表面をアルミニウムフロックにてプレコートした。その後、VLPs を添加した河川水をプレコートした MF 膜に直接通水した(凝集剤の添加無し)。実験原水及び膜ろ過水を採取し、それぞれの VLP 濃度を定量することにより、除去率を算出した。

ケーキ層の形成の影響に加え、膜ろ過処理の経過に伴う物理的に不可逆な膜ファウリングの進行(膜細孔の目詰まり)が VLPs の処理性に与える影響を評価するため、VLPs を添加していない河川水を pH 6.8 に調整した後、MF 膜(膜材質 セラミック、膜孔径 0.1 μm)に 2 日間通水することによりファウリング物質を膜に蓄積させた。なお、膜表面に形成されたケーキ層を除去するため、通水 1 日後及び 2 日後に逆圧洗浄を実施した。その後、VLPs を添加した河川水をファウリングが進行した MF 膜に直接通水した(凝集剤の添加無し)。実験原水及び膜ろ過水を採取し、それぞれの VLPs 濃度を定量することにより、除去率を算出した。

(5) 新規凝集剤を適用した凝集-MF 膜処理

本研究では、アルミニウム系凝集剤の作製段階において、塩基度、硫酸の有無、加熱温度、加熱時間を変化させることにより、含まれるアルミニウム種の組成や荷電中和力等の特性が大きく異なる複数の凝集剤を作製し、それらのウイルス処理への有効性を評価した。その結果、塩基度が高く、硫酸を含まない凝集剤がウイルスの処理に有効であることが明らかとなったことから、塩基度 70% の硫酸を含まない新規凝集剤を凝集-MF 膜処理に適用し、ウイルス処理の高度化・高効率化を図った。

精製した AdV, CV, HAV, MNV を 10^{2-3} PFU/mL になるように同時添加した河川水を実験原水とした。実験原水をスタティックミキサーを用いたインライン凝集にて処理(凝集 pH 7 あるいは 8, 凝集剤 塩基度 50% の硫酸を含む従来型の PACl あるいは塩基度 70% の硫酸を含まない新規凝集剤、凝集剤添加濃度 1.08, 2.16 mg-Al/L)した後、MF 膜(膜材質 PVDF、膜孔径 0.1 μm)に通水した。実験原水及び膜ろ過水を採取し、それぞれの AdV, CV, HAV, MNV 濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量することにより、除去率を算出し

た。なお、凝集処理において、VLPs の除去率と MNV の除去率は同程度であったことから、新規凝集剤を適用した凝集-MF 膜処理においては、MNV をヒトノロウイルスの代替として使用した。

4. 研究成果

(1) 膜ろ過処理における VLPs の処理性

膜ろ過処理における VLPs の除去率を図 2 及び図 3 に示す。図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 : 原水の VLPs 濃度, C : 膜ろ過水の VLPs 濃度)にて表記した。図より、MF 膜処理では、いずれの材質の MF 膜を用いた場合であっても、VLPs の除去率は 0.5 log 以下であった。膜ろ過処理を行った pH 6.8 における VLPs の粒径分布を測定したところ、VLPs は単分散していることが確認され、また、VLPs 及び MF 膜の表面電位はいずれも負に帯電していることが確認されたことから、VLPs の粒径 (35-39 nm) が MF 膜の膜孔径 (0.1 μm) よりも小さく、また、VLPs と MF 膜表面の間に作用する静電的相互作用による VLPs の吸着除去効果が小さいことにより、MF 膜処理単独では VLPs をほとんど除去できなかったものと考えられた。これに対し、UF 膜処理においては、分画分子量 10 k 及び 100 kDa の膜を用いた場合、約 2 log の VLPs の除去率が得られた。また、1 kDa の膜を用いた場合においては、米国環境保護局 (U.S. Environmental Protection Agency) の要求値である 4 log (99.99%) の除去率が達成された。加えて、MF 膜処理の前処理としてインライン凝集処理を導入することにより、MF 膜処理単独では除去できなかった VLPs を効果的に除去することができ、0.54 mg-Al/L 以上の凝集剤添加濃度においては、UF 膜処理 (1 kDa) と同等以上の高い除去率が得られた。これは、前段の凝集処理において MF 膜の膜孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され、フロックに吸着あるいは捕捉された VLPs が、後段の MF 膜処理により効果的に抑止されたためであると推察された。以上の結果から、インライン凝集-MF 膜処理は、ノロウイルス粒子の除去に有効であることが示された。

(2) 膜ファウリングが処理性に与える影響

膜ファウリングの進行した MF 膜による VLPs の除去率を図 4 に示す。図より、物理的に可逆なファウリング物質が蓄積した膜、すなわち、ケーキ層が形成された膜においては、VLPs の除去率はプレコート時間の経過と共に向上し、120 分間のプレコートを行った場合、約 2 log の除去率が得られた。同様に、物理的に不可逆なファウリング物質が蓄積した膜、すなわち、細孔が目詰まりした膜においても、約 1 log の除去率が得られた。従って、膜ろ過処理の経過に伴う膜ファウリングの進行は、VLPs の処理性に影響を与え、除去率が向上することが明らかとなった。以

上の結果から、インライン凝集-MF膜処理においては、フロックの形成のみならず、ケーキ層の形成や膜細孔の目詰まりもノロウイルス粒子の除去に寄与していることが明らかとなった。

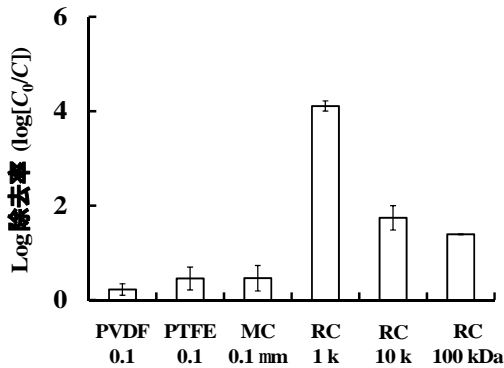


図2. MF膜処理及びUF膜処理におけるVLPsの処理性 (pH: 6.8, 各値は3回の実験結果の平均値及び標準偏差にて表記)

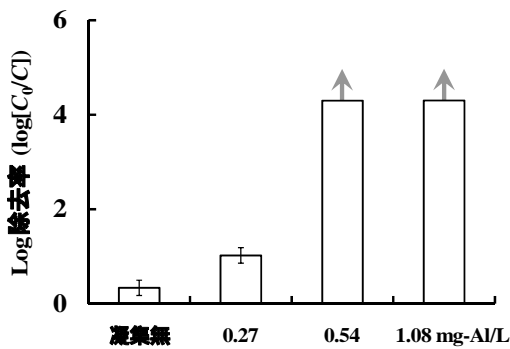


図3. インライン凝集-MF膜処理におけるVLPsの処理性 (凝集pH: 6.8, 凝集剤: 従来PACl, 膜材質: セラミック, 膜孔径: 0.1 μm, 各値は3回の実験結果の平均値及び標準偏差にて表記)

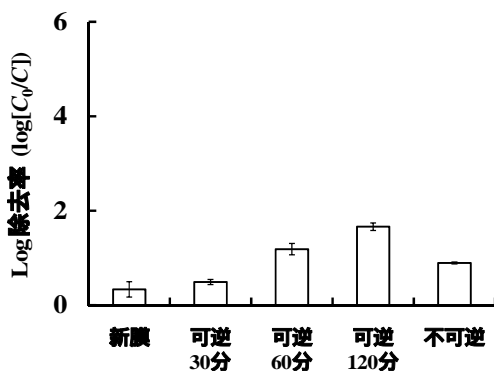


図4. 膜ファウリングがVLPsの処理性に与える影響 (pH: 6.8, 膜材質: セラミック, 膜孔径: 0.1 μm, 各値は3回の実験結果の平均値及び標準偏差にて表記)

(3) 新規凝集剤の適用による処理性の向上
新規凝集剤を適用した凝集-MF膜処理に

おける水系感染症ウイルスの除去率を図5に示す。図の縦軸は $\log[C_0/C]$ (C_0 : 原水のウイルス濃度, C : 膜ろ過水のウイルス濃度) にて表記した。図より, pH 7において, MF膜処理単独ではいずれのウイルスもほとんど除去できなかったのに対し, 従来 PACl を用いたインライン凝集-MF膜処理を実施した場合, CVの除去率は約2 logとなった。また, AdV, HAV, MNV においては, 4 log以上の除去率が得られた。加えて, 新規凝集剤を用いた場合には, いずれのウイルスにおいても, 4 log以上の除去率が達成された。これに対し, pH 8においては, 従来 PACl を用いた場合, pH 7で処理を実施した場合に比べてウイルスの除去率が著しく低下し, 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1-3 log程度の除去率となった。従って, 従来 PACl を用いたインライン凝集-MF膜処理においては, 弱アルカリ性のpH領域ではウイルスの効果的な除去が期待できないことが明らかとなった。一方, 新規凝集剤を用いた場合, 弱アルカリ性のpH領域においても4 log以上の高い除去率が得られた。従って, 塩基度を高めた硫酸を含まない新規凝集剤をインライン凝集-MF膜処理に適用することにより, 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, 凝集剤添加濃度を上げることなく効果的にウイルスを除去できることが示された。以上の結果から, 新規凝集剤を適用した凝集-MF膜処理は, 酸注入によるpH制御や凝集剤の多量注入に頼ることなく, 水系感染症ウイルスを高度且つ高効率に処理可能であることが明らかとなった。

従来 PACl 及び新規凝集剤に含まれるアルミニウム種を特定するため, ²⁷Al-NMR法による分析を行ったところ, 高いウイルスの除去率が得られた新規凝集剤には, アルミニウム30量体 ($[Al_{30}O_8(OH)_{56}(H_2O)_{24}]^{+18}$) が含まれていることが確認された(図6)。従って, アルミニウム30量体がウイルスの除去率向上に寄与している可能性が示唆された。

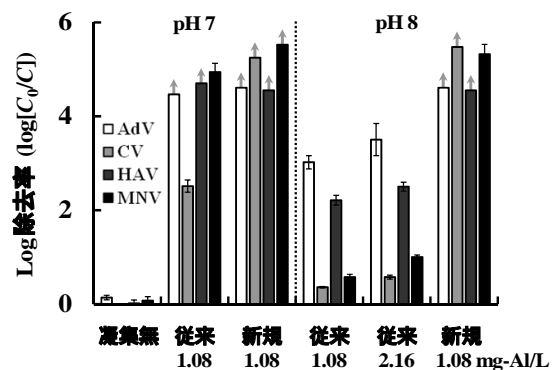


図5. 新規凝集剤を適用したインライン凝集-MF膜処理における水系感染症ウイルスの処理性 (膜材質: PVDF, 膜孔径: 0.1 μm, 各値は3回の実験結果の平均値及び標準偏差にて表記)

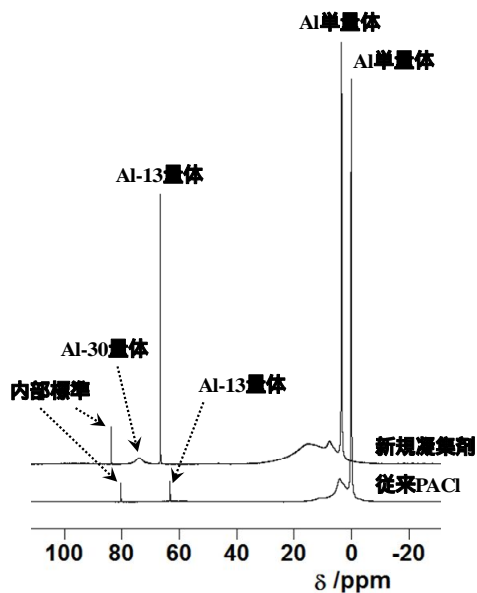


図6. 従来PACl及び新規凝集剤のNMRスペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T. and Murai, K. 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*, 査読有, 2016, 掲載確定.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. Effect of coagulant basicity on virus removal from water by polyferric chloride. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 査読有, 2016, 掲載確定.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K. 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*, 査読有, 2016, 掲載確定.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Marubayashi, T. Effect of aluminum hydrolyte species on human enterovirus removal from water during the coagulation process. *Chemical Engineering Journal*, 査読有, 284: 786-793, 2016.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Kimura, M. and Ohno, K. Virus removal by an in-line coagulation-ceramic microfiltration process with high-basidity polyaluminum coagulation pretreatment.

Water Science and Technology: Water Supply, 査読有, 14: 429-437, 2014.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Marubayashi, T. and Sato, S. Improved virus removal by high-basidity polyaluminum coagulants compared to commercially available aluminum-based coagulants. *Water Research*, 査読有, 48: 375-386, 2014.

Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y. and Matsui, Y. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Research*, 査読有, 47: 5819-5827, 2013.

Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K. Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon. *Separation and Purification Technology*, 査読有, 107: 79-84, 2013.

[学会発表](計10件)

村井一真, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下拓. 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, 2016年3月16日, 徳島県徳島市.

山下玲菜, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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? : 凝集沈澱・砂ろ過における処理性比較. 第50回日本水環境学会年会, 2016年3月16日, 徳島県徳島市.

Marubayashi, T., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Oshiba, A. Development of novel high-basidity polyaluminum chloride for effective virus removal. IWA World Water Congress and Exhibition, 23 September 2014, Lisbon, Portugal.

白崎伸隆, 丸林拓也, 村井一真, 松下拓, 松井佳彦. Contaminant Candidate Listに掲載された水系感染症ウイルスの凝集処理性評価. 第51回環境工学研究フォーラム, 2014年12月21日, 山梨県甲府市.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. ウイルスによる水系感染症の制御に向けた浄水処理技術の高度・高効率化. 第22回衛生工学シンポジウム, 2014年11月21日, 北海道札幌市.

村井一真, 白崎伸隆, 松井佳彦, 松下拓. 腸管アデノウイルスの凝集処理性. 平成26年度全国会議(水道研究発表会), 2014年10月31日, 愛知県名古屋市.

丸林拓也, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 全国の水道原水を用いた水系感染症ウイルスの凝集処理性評価及びウイルス処理性指標の模索. 第48回日本水環境学会年会, 2014年3月17日, 宮城県仙台市.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Tatsuki, Y. and

Matsui, Y. Estimating norovirus removal performance in an in-line coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus VLPs and immuno-PCR method. 7th IWA Specialised Membrane Technology Conference and Exhibition for Water and Wastewater Treatment and Reuse, 27 August 2013, Toronto, Canada.

白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス様粒子と Immuno-PCR 法を併用したノロウイルスの膜ろ過処理性評価及び処理メカニズムの解明. 第 50 回環境工学研究フォーラム, 2013 年 11 月 20 日, 北海道札幌市.

白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦. インライン凝集-セラミック膜ろ過処理によるノロウイルス粒子の効果的除去. 土木学会平成 25 年度全国大会, 第 68 回年次学術講演会, 2013 年 9 月 4 日, 千葉県習志野市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI NOBUTAKA)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 60604692