

令和元年5月7日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06103

研究課題名(和文) 遺伝子型の差異を考慮した培養不可能なウイルス及び消毒耐性ウイルスの浄水処理性評価

研究課題名(英文) Evaluation of removal of non-cultivable viruses and disinfectant-resistant viruses during drinking water treatment processes

研究代表者

白崎 伸隆 (Nobutaka, Shirasaki)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高い塩素耐性を有するコクサッキーウイルスB5型を含む水系感染症を引き起こす病原ウイルスの浄水処理性を詳細に評価することに成功した。また、病原ウイルスの凝集沈澱-急速砂ろ過処理性及び凝集-膜ろ過処理性を評価する上での代替指標として、植物ウイルスの一種であるトウガラシ微斑ウイルスが有効であることを明らかにした。加えて、実浄水処理場の原水及び処理工程水に含まれるトウガラシ微斑ウイルスを対象とし、新規のウイルス濃縮法を適用することにより、凝集沈澱-急速砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水処理場におけるウイルスの処理性を評価することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水道原水中には多種多様な病原ウイルスが存在していることが明らかとなっている。このような状況の中で、病原ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、浄水処理における病原ウイルスの処理性を詳細に把握し、適切な処理を施すことが重要となる。本研究では、消毒耐性ウイルスを含む代表的な病原ウイルスの物理的な浄水処理性を明らかにしたと共に、病原ウイルスの代替指標としての植物ウイルスの有効性を明らかにした。また、実浄水処理場におけるウイルスの処理性についても評価することに成功したことから、本研究で得られた知見は、浄水処理による病原ウイルスの制御に寄与するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We evaluated the removal of representative human enteric viruses including free-chlorine-resistant virus, coxsackievirus B5, by coagulation, coagulation-rapid sand filtration, and coagulation-microfiltration, through laboratory-scale experiments, and confirmed that a plant virus, pepper mild mottle virus (PMMoV), appears to be a suitable surrogate for human enteric viruses for the assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration to remove viruses. In addition, virus removal efficiency of coagulation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration at actual drinking water treatment plants were successfully evaluated by using a novel virus concentration method and PMMoV as a process indicator.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：水系感染症 病原ウイルス 消毒耐性ウイルス ウイルス様粒子 トウガラシ微斑ウイルス 室内添加実験 実浄水処理場 ウイルス濃縮

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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いる。このような中で、健全な水循環を今後も持続するためには、これまで使用されなかった劣化した水をも水道原水として利用（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病原ウイルスによる汚染レベルも高いことから、浄水処理における病原ウイルスの処理性を詳細に把握した上で、効果的かつ効率的な処理を施し、病原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。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いる。また、アデノウイルス 40 型やコクサッキーウイルス B5 型等、高い消毒耐性を有する特定の遺伝子型の病原ウイルス（消毒耐性ウイルス）の存在も報告されていることから、凝集やろ過等の物理的な浄水処理の重要性が再認識されてきている。

2. 研究の目的

本研究では、組織細胞による培養が困難であることから、浄水処理性に関する知見がほとんど得られていないノロウイルス及びサポウイルスについて、野生ウイルスと構造的・抗原的に等しいウイルス様粒子（Virus-Like Particles: VLPs）と VLPs の高感度定量法を併用することにより、ウイルスの粒子としての物理的な浄水処理性を詳細に評価することを目的とした。また、培養法及び感染性評価手法の確立に伴い、高い消毒耐性を有する遺伝子型であることが明らかとなったアデノウイルス 40 型、コクサッキーウイルス B5 型等の消毒耐性ウイルスについて、感染性評価手法と遺伝子定量法を併用したアプローチにより、物理的除去と凝集剤による不活化効果を区別した浄水処理性を詳細に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) VLPs の作製

本研究では、培養困難なヒトノロウイルス GI.4 型の VLPs 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、VLPs の高感度定量を目的に、PCR 法にて定量可能な外来遺伝子（人工合成遺伝子）を封入した遺伝子封入 VLPs の作製を試みた。作製した VLPs は、野生のヒトノロウイルス粒子と同じ外殻タンパク質により構成されていることから、VLPs にキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）及び還元剤であるジチオトレイトール（DTT）を加えることにより、VLPs を構成する外殻タンパク質のアミノ酸間のジスルフィド結合を切断し、VLPs の粒子構造を一時的に崩壊した。ここに、人工合成遺伝子を添加した後、塩化カルシウム（CaCl₂）を加え、アミノ酸間のジスルフィド結合を再生（粒子構造の再合成）させることにより、人工合成遺伝子を封入した遺伝子封入 VLPs の作製を試みた。

(2) 使用したウイルスの培養及び定量法

本研究では、米国環境保護局（USEPA）の汚染物質候補リスト（Contaminant Candidate List 4: CCL4）に挙げられている水系感染症を引き起こす病原ウイルスとして、培養可能なアデノウイルス 40 型（AdV）、コクサッキーウイルス B5 型（CV）、A 型肝炎ウイルス IB 型（HAV）を実験に使用した。また、培養困難なヒトノロウイルスの代替として広く用いられているマウスノロウイルス 1 型（MNV）、病原ウイルスの代替候補ウイルスとして広く用いられている大腸菌ファージ MS2 及び φX174 に加え、水道原水中に病原ウイルスよりも高濃度で存在することが明らかとなったトウガラシ微斑ウイルス（PMMoV）を実験に使用し、病原ウイルスの浄水処理性を評価する上での代替指標としての有効性を評価した。

AdV、CV、HAV、MNV、大腸菌ファージ、PMMoV は、それぞれ A549 細胞、BGM 細胞、FRhK-4 細胞、RAW264.7 細胞、宿主大腸菌、宿主植物を用いて培養し、感染性評価手法及びリアルタイム定量 PCR 法にて濃度を定量した。

(3) 凝集沈澱-砂ろ過処理及び凝集-膜ろ過処理

本研究では、凝集沈澱-砂ろ過処理及び凝集-膜ろ過処理の室内添加実験を実施することにより、ウイルスの処理性を詳細に評価した。精製した AdV、CV、HAV、MNV をそれぞれ 10²⁻³ PFU/mL になるように、MS2 及び φX174 をそれぞれ 10⁵⁻⁷ PFU/mL になるように、また、PMMoV を 10³ lesions/mL になるように同時添加した環境水（浄水処理場原水）を実験原水とした。凝集沈澱-砂ろ過処理においては、実験原水を硫酸バンド（alum）、塩基度 50% 硫酸含有の既存のポリ塩化アルミニウム（PACl: 50s）、塩基度 70% 硫酸含有の PACl（70s）、塩基度 70% 硫酸無の PACl（70ns）、塩基度 80% 硫酸無の PACl（80ns）のいずれかの凝集剤を用いて凝集沈澱処理（凝集 pH 7、凝集剤添加濃度 1.08-2.70 mg-Al/L、急速攪拌 1 分、緩速攪拌 10 分、静置 60 分）した後、上澄水を 120 m/d のろ速にて珪砂（有効径 0.6 mm、均等係数 1.27）を充填した砂ろ過カラム（ろ層厚さ 10 cm）に通水した。原水（C₀）及び砂ろ過水（C）のウイルス濃度を定量することにより、凝集沈澱-砂ろ過処理におけるウイルスの処理性を評価した。一方、凝集-膜ろ過処理においては、実験原水を上述したいずれかの凝集剤を用いてインライン凝集（凝集 pH 7、凝集剤添加濃度 0.54-1.08 mg-Al、攪拌 1 分）した後、親水性 PVDF 膜（孔径 0.1 μm）

に通水した。原水 (C_0) 及び膜ろ過水 (C) のウイルス濃度を定量することにより、凝集-膜ろ過処理におけるウイルスの処理性を評価した。

(4) 新規ウイルス濃縮法の構築と水道原水及び浄水処理水への適用

本研究では、水道原水におけるウイルスの存在実態の把握、並びに実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価を目的に、ナノセラム陽電荷膜とタンジェタルフローUF膜を併用した新規のウイルス濃縮法を検討した。後述する試料水を専用ハウジングに収容したナノセラム陽電荷膜(孔径 2 μm)に通水することにより、試料水中のウイルスを膜に吸着させた。通水後、ハウジング内に残った試料水を破棄し、ここに、膜に吸着したウイルスを脱着させるウイルス溶出液として pH 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス溶液 (0.05 M グリシン含有) 350 mL を添加し、浸漬させた。この後、未使用のビーフエキス溶液 150 mL を膜に通水することにより、ハウジング内のビーフエキス溶液と共に回収した。この溶出操作を未使用のビーフエキス溶液を用いて更に 3 回繰り返し、合計 2 L のビーフエキス溶液にウイルスを濃縮した。

ウイルスを濃縮したビーフエキス溶液の pH を 3.5 に調整した後、攪拌することにより、溶液中のビーフエキスを凝集した。これを遠心分離することにより、上澄水と凝集フロックを分離し、上澄水については、タンジェタルフローUF膜(分画分子量 300 kDa)を用いて 20 mL まで精製・濃縮した。一方、凝集フロックについては、pH 9 の 0.15 M リン酸バッファを添加することにより、凝集フロックを溶解した後、pH を 7.0 に調整することにより 20 mL まで精製・濃縮した。これらの精製・濃縮試料をウイルス濃度の定量に供し、得られた結果を基に、濃縮前の試料水中のウイルス濃度を算出した。

精製した PMMoV あるいは MNV を添加した水道原水、脱塩素水道水に上述した濃縮法を適用し、PMMoV あるいは MNV の回収率を評価することにより、構築した濃縮法の有効性を評価した。また、全国の複数の水道原水、並びに凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水処理場の処理工程水に上述した濃縮法を適用することにより、水道原水におけるウイルスの存在実態を把握すると共に、実浄水処理場におけるウイルスの処理性を評価した。

4. 研究成果

(1) VLPs の高感度定量

作製した VLPs の高感度定量を目的に、遺伝子封入 VLPs の作製を試みたところ、VLPs の粒子構造の一時的な崩壊に必要な EGTA 及び DTT の濃度、粒子構造の再合成に必要な CaCl_2 の濃度に加え、各試薬との反応時間を最適化することにより、VLPs の分解・再合成が可能となった。構築した VLPs の分解・再合成条件を基に、分解処理後の試料に 590 bp の人工合成 DNA を添加し、再合成処理を行ったところ、VLPs の再合成が電子顕微鏡観察により確認された。一方、再合成された VLPs を塩化セシウム密度勾配遠心法により分画・精製した後、人工合成 DNA の封入状態をタンパク質及び DNA の定量により確認したところ、VLPs 内への人工合成 DNA の明確な封入は確認できなかった。従って、遺伝子封入 VLPs の作製のためには、封入する遺伝子の長さや塩基配列の最適化といった更なる検討が必要であることが明らかとなった。

(2) 凝集沈澱-砂ろ過処理及び凝集-膜ろ過処理におけるウイルスの処理性

高い紫外線耐性を有する AdV、高い塩素耐性を有する CV に加え、感染性評価手法が確立されている HAV、MNV について、感染性評価手法であるブラック形成法と PCR 法を併用することにより、物理的除去と凝集剤による不活化効果を区別した凝集沈澱処理性を評価した。凝集剤として PACl を用いた場合、AdV、CV、MNV については、凝集剤による不活化は確認されなかった。一方、HAV については、PACl により不活化された可能性が示唆されたことから、物理的除去のみならず、凝集剤による不活化効果が処理性に寄与しているものと考えられた。

凝集沈澱-急速砂ろ過処理の室内添加実験における上述したウイルスの除去性を PCR 法にて評価したところ、使用する原水によって除去率は異なるものの、いずれのウイルスについても約 2 log の除去率が得られた。また、凝集剤の種類がウイルスの除去性に影響することが確認され、凝集剤として PACl の 70ns 及び 80ns を用いた場合に高い除去率が得られることが明らかとなった。一方、凝集-膜ろ過処理の室内添加実験においては、凝集剤添加濃度を最適化することにより、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。また、凝集沈澱-急速砂ろ過処理の場合と同様に、凝集剤として PACl の 70ns 及び 80ns を用いた場合に高い除去率が得られることが明らかとなった。以上の結果から、塩基度が高く、硫酸を含まない PACl を凝集処理に用いることにより、後段の砂ろ過処理、膜ろ過処理におけるウイルスの除去率を向上できることが示された。

凝集沈澱-急速砂ろ過処理及び凝集-膜ろ過処理における AdV、CV、HAV、MNV の除去率と代替指標候補ウイルスである MS2、 ϕX174 、PMMoV の除去率を比較したところ、PMMoV の除去率と AdV、CV、HAV、MNV の除去率の間に高い相関関係が認められたと共に、PMMoV の除去率は、AdV、CV、HAV、MNV の除去率と同程度、あるいはやや低い除去率であったことから(図 1 及び図 2)、PMMoV は、病原ウイルスの凝集沈澱-急速砂ろ過処理性及び凝集-膜ろ過処理性を評価する上での代替指標として有効であることが示された。一方、これまで代替指標候補として広く使用されてきた MS2 については、病原ウイルスの除去率に比べて高い除去率となる傾向が確認されたことから、代替指標としては適さない可能性が示唆された。

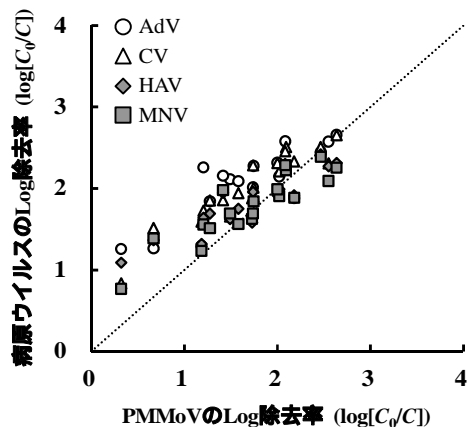


図1. 凝集沈澱-砂ろ過処理における病原ウイルスとPMMoVの処理性比較

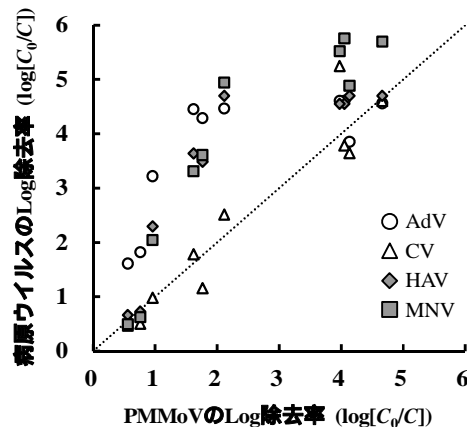


図2. 凝集-膜ろ過処理における病原ウイルスとPMMoVの処理性比較

(3) 水道原水におけるウイルスの存在実態及び実浄水処理場におけるウイルスの処理性

水道原水におけるウイルスの存在実態の把握，並びに実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価を目的に，ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用した新たなウイルス濃縮法を構築した．構築した濃縮法を濃度既知のウイルスを添加した水道原水，脱塩素水道水に適用したところ，いずれの試料水においてもウイルスを効果的に濃縮・回収可能であることが明らかとなった．特に，病原ウイルスの物理的な浄水処理性を評価する上での代替指標としての有効性が示されたPMMoVを濃縮する場合においては，2,000 Lの脱塩素水道水を20 mLに濃縮する場合においても，PCR法によるウイルス定量の際に問題となるPCR障害物質をほとんど濃縮することなくPMMoVを選択的に濃縮・回収可能であることが明らかとなった．

構築した濃縮法を適用し，全国10カ所の水道原水におけるノロウイルス，サポウイルスを含む病原ウイルス7種，並びにPMMoVの存在実態を評価したところ，対象とした水道原水においては，PMMoVが病原ウイルスに比べて10-100倍程度高い濃度で存在していることが明らかとなった．この結果を踏まえ，水道原水中に高濃度で存在するPMMoVを対象とし，凝集沈澱-砂ろ過処理，凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水処理場におけるPMMoVの除去性をPCR法にて評価したところ，凝集沈澱-砂ろ過処理においては $1.6 \pm 0.2 \log$ (6回の採水の平均値)，凝集-膜ろ過処理においては $1.3 \pm 0.4 \log$ (3回の採水の平均値)の除去率が得られることが明らかとなった．上述したように，実浄水処理場を模した室内添加実験においては，PMMoVの除去率は，AdV，CV，HAV，MNVの除去率と同程度，あるいはやや低い除去率であったことから，凝集沈澱-砂ろ過処理，凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水処理場において，PMMoVがそれぞれ1.6 log，1.3 log除去された場合には，高い消毒耐性を有するAdV，CVを含む病原ウイルスについてもそれぞれ1.6 log，1.3 log程度の除去率が得られるものと推察された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation-rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Research*, 査読有, 129: 460-469, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.043>

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Research*, 査読有, 115: 29-39, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.054>

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K. and Aochi, A. Elimination of representative contaminant candidate list viruses, coxsackievirus, echovirus, hepatitis A virus, and norovirus, from water by coagulation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 査読有, 326: 110-119, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.005>

〔学会発表〕(計10件)

高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. PMAx-Enhancer-PCR法による水道原水中の感染性ウイルスの選択的定量. 第53回日本水環境学会年会, 2019年3月8日, 山梨県甲府市.

松村拓哉, 高力聡史, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. トウガラシ微斑ウイルスを挙動指標とした膜ろ過浄水施設におけるウイルスの処理性評価. 第53回日本水環境学会年会, 2019年3月7日, 山梨県甲府市.

白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 培養困難なウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入ウイルス様粒子の創製. 第26回衛生工学シンポジウム, 2018年11月9日, 北海道

札幌市.

白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 浄水処理におけるウイルスの処理性評価と処理技術の高度・高効率化. 外力支援型バイオアッセイ技術コンソーシアム 第1回技術セミナー・技術交流会, 2018年6月8日, 東京都台東区, 招待講演

山下玲菜, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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, 2018年3月16日, 北海道札幌市.

白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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. 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月15日, 北海道札幌市.

高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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, 2017年11月10日, 北海道札幌市.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. Virus removal by coagulation-microfiltration with high-basiscity polyaluminum chloride. 8th IWA Membrane Technology Conference and Exhibition for Water and Wastewater Treatment and Reuse, 7 September 2017, Singapore.

高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 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, 2017年3月15日, 熊本県熊本市.

白崎伸隆, 村井一真, 松下拓, 松井佳彦. 膜ろ過処理による水系感染症ウイルスの除去. 第19回日本水環境学会シンポジウム, 2016年9月13日, 秋田県秋田市.

〔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

北海道大学 大学院工学研究院 環境創生工学部門 環境リスク工学研究室

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/risk/>

6. 研究組織

※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、研究者個人に帰属されます。