

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21360251

研究課題名（和文） 活性炭による病原ウイルスの吸着能と吸着されたウイルスの生残性変化に関する研究

研究課題名（英文） Adsorption Capacity of Pathogenic Virus by Activated Carbon and Its Infectivity Change after Adsorption

研究代表者

李 富生 (LI FUSHENG)

岐阜大学・流域圏科学研究センター・教授

研究者番号：10332686

研究成果の概要（和文）：水中の微量有機物を除去することを主な目的として導入される活性炭吸着プロセスによるウイルスの吸着容量と吸着後のウイルスの生残性の変化を明らかにするため、活性炭によるモデルウイルスの吸着容量実験、吸着後のウイルスの誘出実験、実活性炭処理施設に対する調査実験を行い、ウイルスの吸着容量と生残性に対する活性炭細孔分布や共存有機物の影響を検討した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the adsorption capacity of viruses onto activated carbon, which is normally used for removal of trace organic components contained in drinking water sources, and the infectivity changes of adsorbed viruses inside activated carbon pores, adsorption experiments, desorption experiments and field studies were conducted, and based on the obtained results, the effects of pore size distribution of activated carbon and coexisting organic matter were investigated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：工学

研究費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：用排水システム・病原ウイルス・活性炭吸着・有機物・水質リスク

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原ウイルスは、細菌と比較し浄水処理過程において不活化・除去されにくく、細菌よりも長時間生残することが知られている。こうした病原ウイルス関連研究の更なる強

化の必要性が国内外で訴えられ、注目されている。

(2) ウイルスと水道水質の安全性に関する既往の研究はウイルスの存在濃度の調査、高度

な検出方法の開発、膜ろ過技術による除去性や一般の浄水処理工程による除去性の評価、紫外線照射などによる不活化などに集中している。一方、活性炭吸着は主に、凝集・沈殿・砂ろ過からなる従来の浄水処理システムに付加して、水中に存在する有害有毒な微量有機物を除去することを目的として導入される高度な浄水処理プロセスである。活性炭の細孔分布によってはウイルスの吸着が考えられる。しかしながら、吸着されたウイルスの寿命（生残性）によっては活性炭は副次的リスクの発生源となりえる。これを診断・解明することは学術と応用の両面において大変重要と考えられる。

(3) 数十 nm のサイズを有するウイルスの活性炭による吸着容量と吸着後のウイルスの生残性は活性炭の細孔分布、吸着サイトを競合するフミン質といった分子が大きい水中共存有機物の種類と濃度、吸着操作条件などによって異なると考えられる。これらの因子の影響を把握し、影響の機構を解明することは極めて重要であると考えられ、関係した研究が大変少ないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 活性炭によるウイルスの吸着能（平衡吸着量と吸着速度）を診断し、活性炭の細孔分布や共存フミン質などの影響と影響機構を解明する。

(2) 活性炭に吸着されたウイルスの感染性的変化を培養法と分子生物学的手法により主に生残性の角度から評価し、生残性に与える活性炭細孔分布や共存フミン質などの影響を明らかにする。

(3) 実験結果と数値解析結果に基づき、活性炭吸着におけるウイルスの挙動と生残性を評価する手法を提案するとともに、実活性炭吸着処理施設におけるウイルスの除去性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験用活性炭とウイルスの選定及びウイルスの定量方法

① 活性炭

表 1 に示されているように、細孔分布が異なる 4 種類の石炭系活性炭を選定し実験に用いた。

② ウイルスとウイルスの定量方法

実験対象ウイルスとして、大きさと表面性状が病原ウイルスと類似していること、消毒プロセスに対して病原ウイルスと同様に強

表 1 活性炭の細孔分布

細孔径 (nm)	細孔容積(cm^3/g)			
	Carbon A	Carbon B	Carbon C	Carbon D
0-2	0.35	0.46	0.18	0.18
2-10	0.08	0.09	0.2	0.26
>10			0.02	0.11
表面積 (m^2/g)	1,290	1,047	1,060	1,080

い抵抗性を示すこと、測定方法が確立されていること、及び人体に対する危険がないことなどから、大腸菌を宿主とする F 特異 RNA フェージ Q β および MS2 を用いた。

感染性のあるウイルスの濃度は、宿主菌として *Escherichia coli* K12F+ もしくは *Salmonella typhimurium* WG49 を用いたプラック形成法により定量した。一方、活性を失ったウイルスを含めた全ウイルスの濃度は、それぞれ対象ウイルスに対応したプライマーセットを用いた Real-time PCR 法によって定量した。

(2) ウイルスの吸着ポテンシャルの評価

50mL の供試水を注入したそれぞれの吸着反応器に、活性炭濃度が異なるように 47 μm 以下に粉碎した活性炭を加え、それに Q β を 108PFU/mL となるよう加えた。その後、12 時間振とうし、ウイルスを活性炭に吸着させた。吸着実験後に、混合液を 2mL チューブに分注し、12,000g で 10 分間の遠心分離により活性炭を分離し、上澄み中の Q β 濃度を Real-time PCR 法により定量した。

なお、供試水としては、有機物を含有しない Mill-Q 水、天然有機物 (NOM) を含有する泥炭地水、微生物の代謝物などのバックグラウンド有機物 (BOM) を含有する生活污水の生物処理後水を用いた。実験に先立ち、底泥地水と生活污水の生物処理後水は 0.2 μm のフィルターによってろ過した。ナノ粒子分析機器による Q β と供試水に含まれる NOM 及び

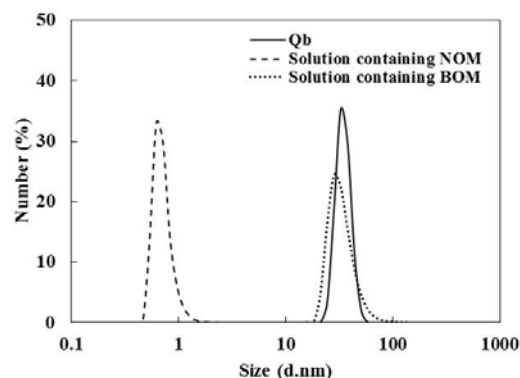


図 1 Q β 及び供試水の粒径分布

BOMの分析結果を図1に示す。

(3) 活性炭吸着後のウイルス生残性の評価

① 誘出方法の検討

100mLのMill-QにCarbon Aが1g/L、Qβが10⁸PFU/mLとなるようにそれぞれ加え、12時間の振とうによりウイルスを活性炭に吸着させた。その直後、2mLチューブに混合液を分注し、12,000gで10分間の遠心分離により活性炭と上澄みに分離し、分離後の上澄みを取り除いた。チューブの底に残った活性炭にMill-Qを加え、攪拌、遠心分離、上澄み除去の操作を3回繰り返すことによって、活性炭表面に付着したウイルスを洗い出した。その後、活性炭に誘出液を加え、100rpmで30分もしくは60分間緩やかに振とうすることによってウイルスを誘出させた。誘出後に遠心分離により活性炭と上澄みを分離し、上澄みに対して培養法とReal-time PCR法による定量をそれぞれ行った。

誘出液には、pH調整による電気的斥力と、有機高分子による競合吸着による誘出効果を期待したpH9のBeef Extract (3%, 6%)、pH9の尿素アルギニンリン酸バッファー

(46mL Mill-Qに2mLの0.2M Na₂HPO₄, 2mLの0.5M アルギニン, 4.5g 尿素を添加, 以下UAPBと表記)、界面活性剤による界面張力の低下を期待した非イオン性界面活性剤 Tween 20 (1%, 5%)、電気的斥力のみを期待したpH9の炭酸緩衝液(0.1M 炭酸水素ナトリウムと0.05M 炭酸ナトリウムを9:1で混合、以下CABと表記)をそれぞれ使用した。また、ブランクとしてMill-Qを用いた。Qβの生残性に対するそれぞれの誘出液が与える影響、吸着・誘出操作が与える影響についても、ウイルス濃度を数段階に調整した試料水による回分式実験によって評価を行った。

② 活性炭吸着後のウイルス生残性評価

吸着競合物質の影響と合わせて評価するため、Mill-Q, 河川水, 泥炭地水の3種類の供試水に対し、活性炭としてはCarbon BとCarbon Cを、ウイルスとしてはQβとMS2を用いた吸着実験を①と同様の方法で行い、吸着後のサンプルを10mLのガラスチューブに分注し、20°Cで静置した。吸着直後から120日経過まで定期的に3% Beef Extractによる誘出操作を行い、誘出液に対して培養法と

Real-time PCR法による定量を行い活性炭に吸着されたウイルスの生残性の変化を評価した。

(4) 実活性炭吸着施設に対する調査

河川水を原水としている、活性炭を付加した浄水場(A浄水場とB浄水場)において、処理プロセスごとの採水を行い、処理プロセスによるウイルスの除去性を評価した。なお、A浄水場はオゾン・活性炭による高度浄水処理システムであり、処理プロセスの順に、原水、凝集沈殿処理水、中オゾン処理水、急速砂ろ過水、後オゾン処理水、粒状活性炭(GAC)処理水、塩素処理水の計7カ所に対して2010年8月30日と11月25日の2度採水を行った。B浄水場は活性炭による高度浄水処理システムであり、処理プロセス順に、原水、凝集沈殿処理水、生物活性炭(BAC)処理水、中塩素処理水、急速砂ろ過水、後塩素処理水の計6カ所から2011年6月9-10日、9月14-15日、2012年2月16-17日の3回採水を行った。なお、B浄水場については凝集沈殿後にBAC処理を行うため活性炭による吸着に加え、ウイルスの存在形態によっては活性炭層がろ過層の役割を果たすことも考えられるため、すべてのサンプルに対して0.45μmフィルターでろ過したサンプルと、未ろ過のサンプルに対してウイルス濃度を測定し、浄水処理システムにおけるウイルスの存在形態の評価も行った。

調査項目としては、培養法とReal-time PCR法によるウイルス濃度に加え、微生物指標として一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌、大腸菌群を、溶存態有機物の指標としてDOC、UV260を用いた。

4. 研究成果

(1) ウイルスの吸着ポテンシャル

① 吸着後の残留濃度

各供試水における活性炭添加濃度とQβの残留濃度の関係を図2に示す。Qβの残留濃度が活性炭添加濃度の増加に伴って低下し、低下の割合は活性炭添加濃度1g/Lまでに顕著であった。吸着後の残留濃度は活性炭の種類によって異なるが、Milli-Q水(Single solute)の場合では1.6×10⁴~5.8×10⁴PFU/mL、NOM混合水の場合では4.8×10⁴~2.7

表2 QβのFreundlich係数の推定結果

AC type	Single solute			Mixture with NOM			Mixture with BOM		
	K	1/n	R ²	K	1/n	R ²	K	1/n	R ²
A	2.0x10 ⁷	0.66	0.899	2.3x10 ⁶	0.87	0.824	3.0x10 ⁶	0.74	0.825
B	7.0x10 ⁸	0.47	0.886	7.0x10 ⁷	0.65	0.876	2.0x10 ⁷	0.60	0.899
C	6.0x10 ⁶	0.76	0.893	8.9x10 ⁵	0.89	0.870	2.0x10 ⁷	0.60	0.855
D	4.0x10 ⁷	0.63	0.810	4.7x10 ⁵	0.87	0.802	4.0x10 ⁶	0.75	0.969

×10⁴ PFU/mL、BOM 混合水の場合では 2.2×10⁵ ~3.6×10⁵ PFU/mL であった。Milli-Q 水と NOM 混合水の場合における残留濃度の差は僅かであったのに対し、BOM 混合水が 1 オーダー程度多く残留しており、BOM の吸着が Qβ の吸着に影響を与えていることが示唆された。

② 吸着容量特性係数

それぞれの吸着条件に対応した Qβ の平衡吸着容量と平衡濃度の関係を Freundlich 吸着等温線モデル ($q=K \cdot C^{1/n}$) に基づいて解析した。解析により得た Freundlich 定数 K と指数 $1/n$ 及び相関係数を表 2 に示す。土粒子やカオリンなどの吸着材を用いた既往の吸着

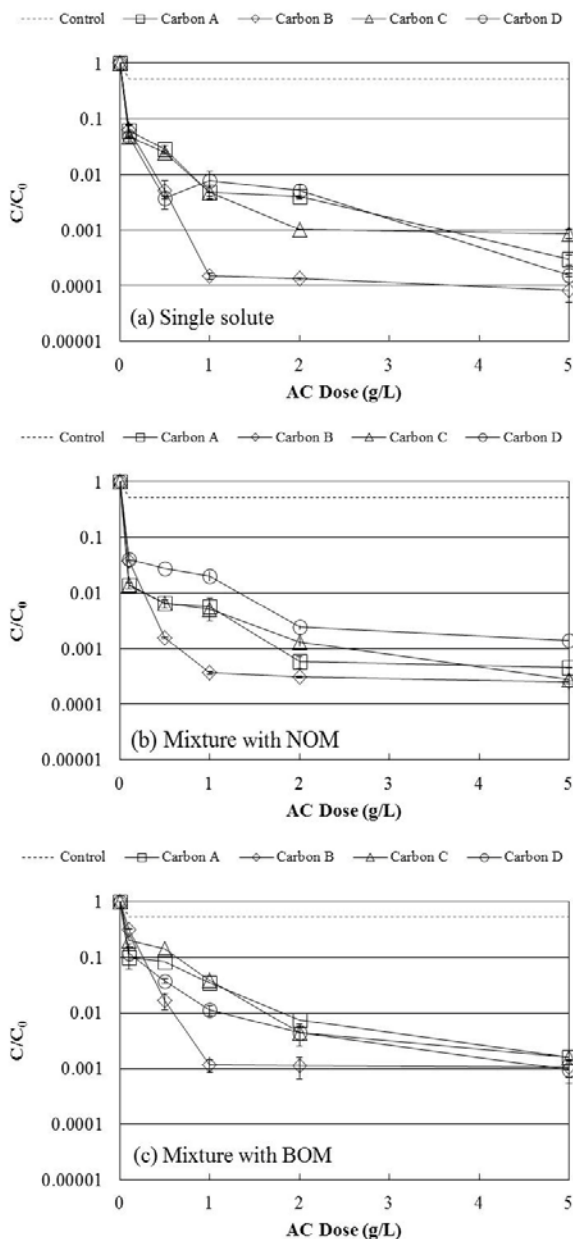


図 2 活性炭添加量に伴う Qβ 残留濃度の変化

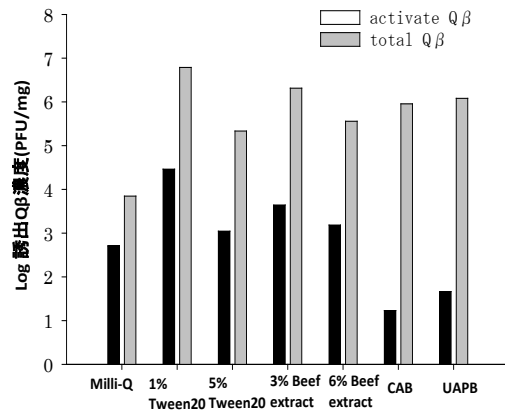


図 3 Qβ の誘出方法の比較 (10⁸ PFU/mg を吸着させた活性炭の場合)

結果と比べると、本研究で用いた活性炭の方が K の値が高く、 $1/n$ が低い。つまり、多孔性構造を有した活性炭によるウイルスの吸着容量が多く、ウイルスとの親和性が強いことが明らかになった。

(2) 吸着されたウイルスの生残性

① 吸着されたウイルスの誘出率

Qβ を 10⁸ PFU/mg に吸着した場合における各誘出方法による誘出濃度を図 3 に示す。本研究で比較検討を行った誘出液では吸着されたウイルスのうち誘出されたのは 2log 程度であった。また 10⁶ PFU/mg に吸着にした場合では、Beef extract と Tween20 を用いた場合のみ誘出が確認された。10⁴ PFU/mg を吸着させた場合は、いずれの誘出液でも誘出は確認できなかった。また、これまでに吸着操作により 2log 程度の不活化も確認されていることから、活性炭のような多孔性の吸着材からウイルスを誘出する場合、誘出液は 1% Tween20 と 3% Beef extract が比較的好いであることが考えられる。誘出効率がより高い方法を探るため、今後も検討を重ねることが重要と考える。

② 吸着されたウイルスの生残性変化

活性のないウイルスも含むウイルス総濃度に対する活性のあるウイルス濃度の割合をウイルスの感染率と定義した。図 4 に一部の結果を例としてプロットした。感染率は活性炭表面に付着した形で存在するウイルスより細孔内に吸着されたウイルスの方がやや高く、概して 60 日後も生残していることが示唆された。また、生残性は有機物の存在や活性炭及びウイルスの種類によって異なることも示唆された。

(3) 実活性炭吸着施設によるウイルスの除去性

表 3 活性炭吸着を付加した B 浄水場におけるウイルスの除去性

site name	活性のあるF-RNAファージ			Total Q β			Total MS2		
	6月	9月	2月	6月	9月	2月	6月	9月	2月
原水	0.08	0.02	0.02	-	-	0.06	-	0.71	6.52
凝集沈殿	-	-	-	-	0.29	-	-	-	16.53
BAC吸着	-	-	-	0.01	-	-	-	-	-
中間塩素	0.38	-	-	-	-	-	0.03	-	-
急速砂ろ過	-	-	-	0.02	0.34	-	0.01	-	-
浄水	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(PFU/mL)

-は未検出

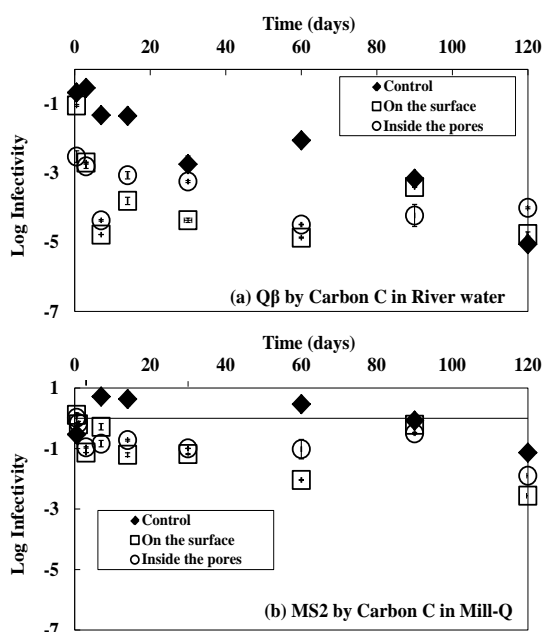


図 4 時間経過に伴うウイルスの生残性変化

B 浄水場における指標ウイルスの調査結果を表 3 に示す。活性のある形で原水から検出され、そのほとんどが凝集沈殿処理後には未検出となった。生物活性炭処理以降のプロセスにおいては、活性のある指標ウイルスの検出も一度あったので、活性炭吸着施設から活性を有したウイルスが流出していることが示された。ただし、これは吸着されずに吸着施設を通過したことによるものか、細孔内に吸着され、その後の吸着施設の操作運転条件や処理対象水の性状に対応して変化する吸着履歴に伴って脱着したことによるものかについては、今後の継続検討によって解明されるべきであると考えられる。

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 3 件)

- ① Shinta Indah, Hirotaka Tanaka, Fusheng Li, Kayako Hirooka, Michal Zielina, Behaviour of somatic and F-specific coliphages in slow sand filter, Journal of Water and Environment Technology, 査読有, Vol.10, No.1, 2012, pp.69-78, DOI: 10.2965/jwet.2012.69
- ② Shinta Indah, Fusheng Li, Keita Tanioka, Kayako Hirooka, Toshiro Yamada, Adsorption capacity of bacteriophage Q β onto activated carbons, 土木学会論文集 G (環境), 査読有, Vol.67, No.7, 2011, III_715-723.
- ③ Xuan Guo, Jiefeng Li, Fusheng Li, Adsorption behavior of estrogen and antibiotics in granular activated carbon columns, Environmental Engineering Research, 査読有, Vol.46, 2011, 155-163.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Shinta Indah, Hirotaka Tanaka, Fusheng Li, Kayako Hirooka, Behavior of somatic and F-specific coliphage in slow sand filter, The 4th IWA- ASPIRE Conference & Exhibition, p.144 in Abstract book, full paper in CD, 2011.10.
- ② Shinta Indah, 李富生, 田中大貴, 谷岡敬太, 廣岡佳弥子, 山田俊郎, Adsorption of bacteriophage onto activated carbons in the presence of natural organic matter, 第 62 回全国水道研究発表会講演集, pp.728-729, Osaka, 2011.
- ③ 田中大貴, 花田良浩, 谷岡敬太, 李富生, 廣岡佳弥子, 山田俊郎, 急速ろ過と緩速ろ過浄水処理システムにおけるウイルスの除去性に関する検討, 第 62 回全国水

- 道研究発表会, pp. 320-321, 2011.
- ④ 谷岡敬太, 田中大貴, 李富生, 廣岡佳弥子, 笠原伸介, 山田俊郎, 活性炭を付加した高度浄水処理プロセスにおける指標ウイルスと微生物の除去性評価, 第 62 回全国水道研究発表会講演集, pp194-195, 2011.
 - ⑤ 谷岡敬太, 田中大貴, 花田良浩, 稲毛秀敏, 廣岡佳弥子, 李富生, 笠原伸介, 活性炭を付加した高度浄水処理システムにおける指標ウイルスと微生物の除去—Real time PCR に基づく定量評価—, 土木学会中部支部平成 22 年度研究発表会講演概要集, pp. 607-608, 2011. 3.
 - ⑥ 田中大貴, 谷岡敬太, 廣岡佳弥子, 山田俊郎, 李富生, 緩速ろ過池砂層内における微生物と指標ウイルスの分布と構造に関する研究, 土木学会中部支部平成 22 年度研究発表会講演概要集, pp. 611-612, 2011. 3.
 - ⑦ Xuan Guo, Fusheng Li, Yuuki Tozaki, Residual adsorbability of GAC and BAC columns for removal of 17β -estradiol and natural organic matter, 第 62 回全国水道研究発表会講演集, pp. 732-733, 2011.
 - ⑧ 田中大貴, 山本真帆, 廣岡佳弥子, 李富生, 緩速ろ過システムによるウイルスの除去機能の評価, 土木学会中部支部平成 21 年度研究発表会講演概要集, pp. 619-620, 2010. 3.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 富生 (LI FUSHENG)

岐阜大学・流域圏科学研究センター・教授

研究者番号：10332686

(2) 研究分担者

吉村 千洋 (YOSHIMURA CHIHIRO)

東京工業大学・工学部・准教授

研究者番号：10402091

笠原 伸介 (KASAHARA SHISUKE)

大阪工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90309170