

令和 6 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18817

研究課題名（和文）汎用細胞増殖系を活用した浄水処理工程におけるサポウイルスの未知動態の解明

研究課題名（英文）Evaluation of reduction efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system

研究代表者

白崎 伸隆（Shirasaki, Nobutaka）

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、水系感染症を引き起こす主要な病原体の一つであるヒトサポウイルスについて、ヒトサポウイルスを増殖可能な汎用細胞を活用することにより、添加実験の実施に必要なヒトサポウイルス量を確保可能な高濃度精製ストック調製法を構築すると共に、浄水処理におけるヒトサポウイルスの感染性の消長を定量的に評価可能な感染性評価手法を構築することに成功した。また、構築した手法を駆使することにより、ヒトサポウイルスの浄水処理工程における動態、すなわち、凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理における除去特性、塩素処理、オゾン処理における不活化特性を詳細に把握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

水道水を媒体とする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、効果的かつ効率的な処理を施すことが重要となる。本研究では、水系感染症を引き起こすヒトサポウイルスについて、ヒトサポウイルスの高濃度精製ストック調製法及び感染性評価手法を新たに構築し、これらの手法を駆使することにより、ヒトサポウイルスの浄水処理性を世界に先駆けて詳細に把握することに成功した。従って、本研究で得られた知見は、ウイルスに関する水道水質管理の枠組みの構築に資するものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）： We produced purified solutions of human sapovirus containing virus concentrations high enough to conduct virus-spiking experiments, and developed an integrated cell culture-polymerase chain reaction assay to quantify the infectivity of human sapovirus, by applying an in vitro cell-culture system for human sapovirus. We then successfully evaluated the removal efficiencies of human sapovirus in coagulation-sedimentation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration as well as the inactivation efficiencies of human sapovirus in free-chlorine disinfection and ozone disinfection by applying the purified solutions of human sapovirus and the developed infectivity assay for human sapovirus.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：病原ウイルス ヒトサポウイルス マウスノロウイルス トウガラシ微斑ウイルス 細胞培養増殖系
ウイルス精製法 感染性評価手法 浄水処理

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトサポウイルス (HuSaV) は、ヒトノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するウイルスであり、幅広い年齢層に感染し、激しい嘔吐や下痢を伴う胃腸炎を引き起こす。また、水を介して伝播する水系感染症を引き起こすことから、水系感染症の主要な原因ウイルスの一つとして世界保健機関の飲料水水質ガイドラインに挙げられている。しかしながら、HuSaV は、札幌の児童福祉施設における集団食中毒で初めて「サッポロウイルス」として報告されてから 40 年以上が経過しているにも関わらず、ヒト体内以外での効率的な培養法、すなわち、入手・取り扱いが容易な汎用細胞を用いた培養法が未確立であったことから、ウイルスの浄水処理性を把握する際に広く行われている添加実験を実施することが難しく、結果として、浄水処理性に関する知見は全く得られていない状況にある。このような中で、2020 年に、公的機関から入手可能な汎用細胞の一種であるヒト十二指腸癌由来細胞 (HuTu 80 細胞) を胆汁酸存在下で用いることにより、生体外で HuSaV を増殖できることが見出された。

2. 研究の目的

本研究では、HuSaV を増殖可能な汎用細胞を活用することにより、添加実験の実施に必要な HuSaV 量を確保可能な高濃度精製ストック調製法を構築すると共に、浄水処理における HuSaV の感染性の消長を定量的に評価可能な感染性評価手法を構築し、これらを駆使することにより、HuSaV の浄水処理工程における動態、すなわち、凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理における除去特性、塩素処理、オゾン処理における不活化特性を詳細に把握することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HuSaV の培養・精製法及び定量法

本研究では、HuTu 80 細胞内での増殖が確認された HuSaV GI.1 型を実験に使用した。HuSaV は、宿主細胞である HuTu 80 細胞を用いて胆汁酸存在下で培養し、HuTu 80 細胞の培養日数、HuSaV の接種量/濃度、HuSaV の培養日数等の条件を最適化した。その後、最適化した条件にて培養した HuSaV の培養液を UF 膜にて精製することにより、培養液中に含まれる培地由来の有機物成分を除去し、HuSaV の高濃度精製ストックを調製した。HuSaV 濃度の定量においては、既存のリアルタイム定量 PCR 法に加え、汎用細胞を用いたウイルス培養とリアルタイム定量 PCR 法による遺伝子定量を組み合わせた Integrated cell culture-PCR 法 (ICC-PCR 法) を新たに構築し、塩素処理、オゾン処理における HuSaV の感染性の消長を定量的に評価した。加えて、本研究では、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)、病原ウイルスの浄水処理性評価指標としての活用が期待されているトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV)、水系感染症を引き起こす病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いとされているコクサッキーウイルス B5 型 (CV) を実験に使用した。MNV、PMMoV、CV は、それぞれの宿主細胞/植物である RAW264.7 細胞、*Nicotiana benthamiana*、BGM 細胞を用いて培養した。ウイルス濃度の定量においては、既存のリアルタイム定量 PCR 法を用いた。また、CV については、ICC-PCR 法、あるいはブラック形成法を用いることにより、塩素処理、オゾン処理における CV の感染性の消長を定量的に評価した。

(2) 凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理

本研究では、凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理の添加実験を実施することにより、HuSaV の除去特性を評価した。また、上述した処理における HuSaV の除去率と MNV 及び PMMoV の除去率を比較した。

凝集沈澱-砂ろ過処理においては、培養・精製した HuSaV を 10^{5-6} copies/mL、培養・精製した MNV 及び培養した PMMoV を 10^{7-8} copies/mL になるように同時添加した環境水 (凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場にて採水した水道原水、実験終了時まで水温を約 20 °C に維持) を原水とし、プラスチック製角型ピーカーに 2 L 添加した。ここに、凝集 pH を 7.0 に調整するため、原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (PACl) を 0.54-5.40 mg-Al/L になるように添加した。これを攪拌翼を用いて G 値 200 s^{-1} にて 1 分間急速攪拌、 20 s^{-1} にて 10 分間緩速攪拌し、60 分間静置した。その後、静置後の上澄み水 1.5 L を用いて、急速砂ろ過処理を実施した。上澄み水をマグネティックスターラーを用いて 200 rpm にて攪拌しながら、ポンプを用いて 120 m/d の定流速にて珪砂 (有効径 0.6 mm、均等係数 1.3 以下) を充填した単層砂ろ過ミニカラム (充填厚さ 10 cm) に通水した。原水及び急速砂ろ過処理水を採取し、それぞれの試料水中のウイルス濃度を PCR 法にて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除去率 ($\text{Log 除去率} (\text{Log}[C_0/C])$; C_0 : 原水のウイルス濃度、 C : 処理後のウイルス濃度) を算出した。

凝集-膜ろ過処理においては、培養・精製した HuSaV を 10^{5-6} copies/mL、培養・精製した MNV 及び培養した PMMoV を 10^{7-8} copies/mL になるように同時添加した試料水 (凝集-MF 膜ろ過処理を実施している実浄水場にて採水した凝集-MF 膜ろ過前水、実験終了時まで水温を約 20 °C に

維持)を原水とし、プラスチック製角型ビーカーに 500 mL 添加した。ここに、凝集 pH を 7.0 に調整するため、原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後、凝集剤として PACl を 0.27–1.08 mg-Al/L になるように添加した。これを攪拌翼を用いて G 値 200 s^{-1} にて 1 分間急速攪拌した後(膜ろ過処理終了時まで急速攪拌を継続)、ポンプを用いて 1.0 m/d の定膜ろ過流束、並びに定クロスフロー流速(膜ろ過流量の 2 倍の流量)にてペンシル型 MF 膜モジュール(材質 PVDF、膜孔径 $0.1 \mu\text{m}$)に通水した。原水及び MF 膜ろ過処理水を採取し、それぞれの試料水中のウイルス濃度を PCR 法にて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除去率(Log 除去率($\text{Log}[C_0/C]$; C_0 : 原水のウイルス濃度, C : 処理後のウイルス濃度))を算出した。

(3) 塩素処理, オゾン処理

本研究では、塩素処理, オゾン処理の添加実験を実施することにより, HuSaV の不活化特性を評価した。また, 上述した処理における HuSaV の不活化率と CV の不活化率を比較した。

塩素処理においては, 培養・精製した HuSaV を 10^{2-3} MPN/mL, あるいは培養・精製した CV を 10^{4-5} MPN/mL になるように添加した 0.01 M リン酸バッファー (pH 7.0, 実験終了時まで水温を約 20°C に維持)を原水とし, ガラス製三角フラスコに 300 mL 添加した。ここに, 次亜塩素酸ナトリウムを初期遊離塩素濃度が $0.2 \text{ mg-Cl}_2/\text{L}$ 程度になるように添加した後, 直ちにスターラーを用いて 200 rpm にて攪拌した(塩素処理終了時まで攪拌を継続)。原水及び塩素添加後の塩素処理水を採水し(塩素処理水については, 採水後直ちにチオ硫酸ナトリウムを添加することにより残留塩素を中和), それぞれの試料水中の感染性を有するウイルス濃度を ICC-PCR 法にて定量することにより, 塩素処理におけるウイルスの不活化率(Log 不活化率($\text{Log}[N_0/N]$; N_0 : 原水の感染性を有するウイルス濃度, N : 処理後の感染性を有するウイルス濃度))を算出した。

オゾン処理においては, 培養・精製した HuSaV を 10^{2-3} MPN/mL, あるいは培養・精製した CV を 10^4 PFU/mL になるように添加した 0.01 M リン酸バッファー (pH 7.0, 実験終了時まで水温を約 20°C に維持)を原水とし, ガラス製三角フラスコに 300 mL 添加した。ここに, 予め作製した高濃度オゾン溶液を初期オゾン濃度が $0.2 \text{ mg-O}_3/\text{L}$ 程度になるように添加した後, 直ちにスターラーを用いて 400 rpm にて攪拌した(オゾン処理終了時まで攪拌を継続)。原水及びオゾン添加後のオゾン処理水を採水し(オゾン処理水については, 採水後直ちにチオ硫酸ナトリウムを添加することにより残留オゾンを中和), それぞれの試料水中の感染性を有するウイルス濃度を ICC-PCR 法, あるいはブラック形成法にて定量することにより, オゾン処理におけるウイルスの不活化率(Log 不活化率($\text{Log}[N_0/N]$; N_0 : 原水の感染性を有するウイルス濃度, N : 処理後の感染性を有するウイルス濃度))を算出した。

いずれの処理においても, 必要に応じて, ガラス製角型メディウム瓶に原水を 1,000 mL 添加した実験(実験手順は, 上述したガラス製三角フラスコに原水を 300 mL 添加した実験と同様)も実施した。所定の接触時間到達後, 直ちにメディウム瓶内の 1,000 mL の塩素/オゾン処理水にチオ硫酸ナトリウムを添加し, 残留塩素/オゾンを中和した後, UF 膜を用いて 10 mL まで濃縮し(100 倍濃縮), 原水及び濃縮水中の感染性を有するウイルス濃度を定量することにより, Log 不活化率を算出した。

4. 研究成果

(1) HuSaV の高濃度精製ストックの調製及び感染価評価

HuSaV の培養条件を最適化し, HuSaV を HuTu 80 細胞を用いて胆汁酸存在下で 10 日間培養することにより, HuSaV の高濃度培養液が得られた。また, 高濃度培養液を UF 膜にて精製することにより, 添加実験の実施が可能な約 10^9 copies/mL の HuSaV の高濃度精製ストックを調製することに成功した。また, 試料水中の HuSaV 濃度が 10^4 copies/mL 以上であれば感染価の評価が可能な ICC-PCR 法を構築することに成功した。

(2) 凝集沈澱–砂ろ過処理, 凝集–膜ろ過処理における HuSaV の除去特性

調製した高濃度精製ストックを適用し, 凝集沈澱–砂ろ過処理における HuSaV の除去性を評価したところ, 除去率は $1.6\text{--}3.7 \text{ log}$ であった(図 1)。HuSaV の除去率と原水に同時添加した MNV 及び PMMoV の除去率を比較したところ, HuSaV の除去率は, MNV 及び PMMoV の除去率と同程度であり, HuSaV と MNV, HuSaV と PMMoV の除去率の間には強い正の相関関係が認められた(図 1)。従って, MNV 及び PMMoV は, 凝集沈澱–砂ろ過処理における HuSaV の除去性を把握する上での代替指標となることが示唆された。

凝集–膜ろ過処理における HuSaV の除去性を評価したところ, 除去率は $1.2\text{--}4.3 \text{ log}$ であった(図 2, 定量下限値以下である 3.5 log 以上の値は除外)。また, HuSaV の除去率と MNV 及び PMMoV の除去率を比較したところ, HuSaV の除去率の方が MNV 及び PMMoV の除去率に比べて高く, HuSaV と MNV, HuSaV と PMMoV の除去率の間に強い正の相関関係が認められた(図 2)。従って, MNV 及び PMMoV は, 凝集–膜ろ過処理における HuSaV の除去性を把握する上での安全側の代替指標となることが示唆された。

(3) 塩素処理, オゾン処理における HuSaV の不活化特性

調製した高濃度精製ストック, 並びに構築した ICC-PCR 法を適用し, 塩素処理における HuSaV の不活化性を評価したところ, CT 値(遊離塩素濃度 \times 接触時間) $0.02 \text{ mg-Cl}_2\text{-min/L}$ における不

活性化率は 3.8–4.0 log であった。一方、CV については、ICC-PCR 法にて評価した不活化率は、CT 値 0.4 mg-Cl₂·min/L において 1.3 log に留まった。従って、HuSaV の塩素処理耐性は、水系感染症を引き起こす病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いとされる CV に比べて著しく低いことが明らかとなった。以上の結果から、実際の浄水場で実施されている塩素処理により、HuSaV の 4 log の不活化は十分に達成可能であることが示唆された。

オゾン処理における HuSaV の不活化性を評価したところ、CT 値（残留オゾン濃度 × 接触時間）0.4–0.7 mg-O₃·s/L における不活化率は 3.8–4.4 log であった。また、CV については、プラック形成法にて評価した不活化率は、CT 値 0.5–1.0 mg-O₃·s/L において 3.5–4.7 log であった。従って、HuSaV のオゾン処理耐性は、CV と同程度であることが明らかとなった。

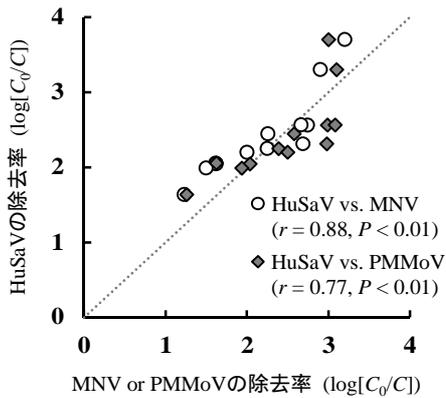


図1. 凝集沈澱-砂ろ過処理におけるHuSaV, MNV, PMMoVの除去率

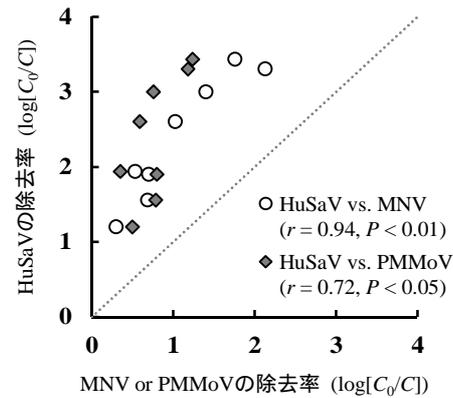


図2. 凝集-膜ろ過処理におけるHuSaV, MNV, PMMoVの除去率 (定量下限値以下の値は除外)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirakawa, D., Shirasaki, N., Hu, Q., Matsushita, T., Matsui, Y., Takagi, H. and Oka, T.	4. 巻 236
2. 論文標題 Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 119951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.watres.2023.119951	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口耕平, 白崎伸隆, 松下拓
2. 発表標題 感染力評価と外殻タンパク質損傷評価を併用したオゾン処理におけるヒトサポウイルスの不活化特性の把握
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理におけるヒトサポウイルスの除去・不活化特性の把握
3. 学会等名 第60回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 汎用細胞増殖系を活用した下痢症ウイルスの浄水処理性の評価
3. 学会等名 ウイルス性下痢症研究会第33回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白崎伸隆, 胡秋晗, 白川大樹, 高木弘隆, 岡智一郎, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 汎用細胞増殖系を活用した浄水処理工程におけるヒトサポウイルスの未知動態の解明
3. 学会等名 第29回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 環境リスク工学研究室 ホームページ
<https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/risk>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関