

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360211

研究課題名(和文) VLPsを用いた培養不可能なウイルスの浄水処理性評価

研究課題名(英文) Estimating removal of unculturable waterborne virus during drinking water treatment by using VLPs

研究代表者

松下 拓 (Matsushita, Taku)

北海道大学・工学(系)研究科(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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子組み換え技術により発現させたノロウイルス外套タンパクと、ヒト水系感染症ウイルスを、全国の浄水場から送付いただいた水道原水に添加し、回分式凝集沈澱処理実験より浄水処理性を調べた。その結果、通常の浄水処理における凝集沈澱処理でのノロウイルスVLPsを含むヒト感染ウイルスの除去率は0～2.5 log程度であることが分かった。また、大腸菌ファージMS2はヒト感染ウイルスの代替指標として使うのは難しく、大腸菌ファージ X174の方が代替指標として適する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recombinant norovirus VLP and some waterborne pathogenic viruses (poliovirus and adenovirus) were artificially added to a wide variety of raw water for drinking water that were obtained from actual drinking water treatment plants in Japan, and virus removal during conventional coagulation-sedimentation treatment was investigated. The removals of the waterborne pathogenic viruses were found to be 0-2.5 logs, which were lower than that of bacteriophage MS2 but higher than that of bacteriophage phiX174. The observations suggest that not MS2 but phiX174 could be a conservative surrogate of the waterborne pathogenic viruses. However, further study is still required for the suggestion by using a wide variety of treatment conditions.

研究分野：衛生環境工学

キーワード：土木環境システム 水質汚濁・土壌汚染防止・浄化 ウイルス 浄水処理

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つつある。さらには、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)法の発展に伴い、環境水、下水、あるいは水道水中からのノロウイルスの検出報告が相次いだことも、社会的注目を大きくした一因となっている。通常、微生物(原虫、細菌、ウイルスなど)を用いた水処理実験を行う際には、実験に先立ち、対象微生物を培養し、大量のストックソリューションを作成する必要がある。ところが、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、未だ細胞を用いた培養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のが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、社会的ニーズが高いにも関わらず、ヒト体外での培養が不可能なため、実験が難しかったノロウイルスに代表される培養不可能なウイルスの浄水処理性を、遺伝子組換え生物を用いて発現させたウイルス外套タンパク (virus-like particles: VLPs)を用いることにより調べることを目的とする。

VLPs は構造的にも抗原的にも野生ウイルスと等しいため、VLPs により調べられた浄水処理性から野生ウイルスの浄水処理性を議論することが可能となる。ノロウイルスの浄水処理性を調べる研究は、(研究代表者グループの先行研究を除き)これまで世界的にも例がなく、本申請で提案する培養不可能なウイルスの浄水処理性の評価法は、世界初の、極めてオリジナリティーの高いものである。

3. 研究の方法

(1) ノロウイルス VLPs 高感度定量法の開発

ノロウイルス VLPs の高感度定量法として、従来の ELISA 法における発色部分を DNA タグに置き換え、定量 PCR 法による DNA タグ定量により、抗原抗体反応の成立を定量的に解析する immuno-PCR 法を構築することを試みた (詳しくは、Matsushita *et al.* (2013) *Water Research*, **47**, 5819-5827 を参照)。

(2) 膜処理法によるノロウイルス処理性

河川水 (豊平川) にノロウイルス VLPs を 10^{11} VLPs/mL、大腸菌ファージ Q β 及び MS2 を 10^8 PFU/mL となるように同時添加し、HCl または NaOH を用いて pH を 6.8 に調整したものを実験原水とした。これを、4 種の MF 膜 (いずれも公称孔径 0.1 μ m; PVDF, PTFE, MCE, PC) あるいは UF 膜 (分画分子量 1, 3, 10, 30, 100 kDa; 再生セルロース) を用いてろ過し、ろ過前後のウイルス濃度を定量した。さらに、実験原水をインライン凝集 - MF 膜ろ過装置を用いて処理し (凝集 - MF 膜処理) 処理前後のウイルス濃度を定量した。

(3) 凝集沈澱処理によるウイルス処理性

精製したアデノウイルス、ポリオウイルスのいずれかを 10^{2-3} PFU/mL になるように、また、MS2 及び Q β を 10^{5-6} PFU/mL になるように同時添加した水道原水 A ~ M (凝集沈澱 - 砂ろ過処理を実施している全国 13 箇所の浄水処理場原水) を実験原水とし、角型ビーカーに 300 mL 添加した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウムあるいは塩化第 II 鉄を 40-200 μ M-Al or -Fe (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 HCl あるいは NaOH にて pH を 7 に調整した。急速攪拌 + 緩速攪拌した後、静置を 60 分間実施した。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 PFU 法及びリアルタイム定量 PCR 法にて定量することにより、ウイルスの凝集沈澱処理性を評価した。

4. 研究成果

(1) immuno-PCR 法の構築

immuno-PCR 法により、従来の ELISA 法の定量下限であった 10^8 VLPs/mL 程度を、 $10^{5.7}$ VLPs/mL 程度まで低下することに成功し、高感度なノロウイルス VLPs の定量法を確立することができた。この手法を適用することにより、従来の ELISA 法では低濃度であるが故に評価ができなかった、膜処理後のノロウイルス VLPs の定量が可能となり、膜処理によるノロウイルスの処理性が評価できるようになった。

(2) 膜処理法によるノロウイルス処理性

上で構築した immuno-PCR 法を膜処理後のノロウイルス VLPs の定量に適用することにより、膜処理におけるノロウイルスの処理性を評価した。

単独ではウイルスを除去できない孔径 0.1 μ m の MF 膜であっても、前処理として凝集処理を導入することで、ノロウイルスも他のウイルス (大腸菌ファージ Q β と MS2) も除去できることが分かった。凝集 - MF 膜処理におけるノロウイルスの除去率は 4 log 以上であると推定され、この除去率は、分画分子量 1 kDa の UF 膜と同程度であった。また、いずれの実験条件下でも、ノロウイルス VLPs の除去率は、Q β と MS2 の除去率より小さかったことから、ノロウイルスの膜ろ過処理性を、Q β や MS2 などの大腸菌ファージを用いて評価することは困難であると示唆された。

(3) 凝集沈澱処理によるウイルス処理性

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のに対し、凝集剤 (ポリ塩化アルミニウム、塩基度 50%) を添加した場合、PFU 法にて評価したアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率は、それぞれ 0.1-1.4 log, 0.5-2.4 log となった。なお、いずれの水道原水を用いた場合であっても、濁度の除去率は 76-99% であったのに対し、

アデノウイルスの除去率については、0.1 log 程度に留まる水道原水も見られた。従って、通常の凝集沈澱処理により、アデノウイルス及びポリオウイルスを除去することは可能であるものの、それぞれの除去率は、水道原水の水質によって大きく異なることが確認された。また、アデノウイルスの除去率は、ポリオウイルスの除去率に比べて低い傾向にあることが明らかとなった。

大腸菌ファージのアデノウイルス及びポリオ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、凝集沈澱処理における大腸菌ファージ MS2 及びφX174 の除去率とアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率を比較した。なお、PFU 法にて評価した除去率は、解析に用いた共分散分析の前提条件を満たさなかったことから、PCR 法にて評価した除去率についてのみ分析を実施した。その結果、PCR 法にて評価した MS2 の除去率は、アデノウイルスの除去率よりも大きい傾向にあることが示された。ポリオウイルスの除去率と比較した場合についても同様の傾向が見られた。また、MS2 の除去率とアデノウイルス、あるいはポリオウイルスの除去率の間には相関関係は認められなかった。以上の結果から、MS2 をアデノウイルス及びポリオウイルスの安全側の代替指標として使用することは適切ではないことが示された。これに対し、PCR 法にて評価したφX174 の除去率は、アデノウイルスの除去率と同程度、あるいは低い傾向にあることが示された。ポリオウイルスの除去率と比較した場合についても同様の傾向が見られた。従って、φX174 は、アデノウイルス及びポリオウイルスの凝集沈澱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。一方、(PFU 法の)φX174 の除去率とアデノウイルス、あるいはポリオウイルスの除去率の間には相関関係は認められなかった。本研究で実施した凝集沈澱処理における X174 の除去率は 0-2 log 程度であり、他のウイルスに比べて得られたデータの範囲が狭かったが、本研究では MS2 ファージよりは指標として適していると考えられた可能性が示唆された。しかしながら、今後より広範な水道原水や凝集剤を用いることにより、相関関係についての議論をおこない、φX174 の代替指標としての有効性についての更なる議論が必要であると考えられた。

(4) ウイルスとファージの除去性の違い

アデノウイルス及びポリオウイルスの除去率と大腸菌ファージの除去率に差が生じた原因について議論するため、各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、pH 6 及び 7 の水道原水中において負に帯電しており、電気移動度の絶対値はφX174 > MS2 > アデノウイルス > ポリオウイルスの順で大きい結果となった。一方、ウイルスの除去率は、MS2 > ポリオウイルス >

アデノウイルス > φX174 の順で高かったことから、ウイルス粒子の表面電位の大きさの差異のみでは凝集沈澱処理におけるウイルスの除去率の差異を説明できないことが示された。

各ウイルスの電気移動度の測定に加え、表面疎水度の差異を BATH 法により評価したところ、アデノウイルス及びφX174 は、いずれの炭化水素と混合した場合においても、水相にウイルスが残存した。一方、ポリオウイルス及び MS2 は、n-オクタン、p-キシレン、トルエンを用いた場合に一部のウイルスが溶媒相に移動した。また、MS2 の方がポリオウイルスに比べて移動の割合が大きかった(水相における残存が小さかった)ことから、表面疎水度は、MS2 > ポリオウイルス > アデノウイルス > φX174 の順で大きいことが明らかとなった。これらの結果がウイルスの除去率の大きさの順序と一致したことから、ウイルス粒子の表面疎水度の差異が、凝集沈澱処理におけるウイルスの処理性に影響している可能性が示唆された。

(5) 凝集処理によるウイルスの不活化

PCR 法にて評価した MS2 の除去率は、アデノウイルス及びポリオウイルスの除去率よりも大きい傾向にあったのに対し、PCR 法にて評価したφX174 の除去率は、アデノウイルスの除去率と同程度、あるいは低い傾向にあった。また、PFU 法にて評価した場合においても、PCR 法にて評価した場合と同様の傾向が見られ、特に、塩基度 50% のポリ塩化アルミニウムを用いた場合においては、MS2 の除去率は、アデノウイルス及びポリオウイルスの除去率に比べて著しく大きくなった。この原因について議論するため、各ウイルスについて、PFU 法にて評価した除去率と PCR 法にて評価した除去率を比較したところ、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、ポリオウイルス、φX174 では、両法で評価した除去率は同程度となったのに対し、MS2 においては、両法で評価した除去率に差が見られ、PFU 法にて評価した除去率の方が PCR 法にて評価した除去率に比べて高い値となった。2 つの定量法によって得られた結果に差が生じた原因として、感染力を失ったウイルス、すなわち、不活化したウイルスの存在と、幾つかの感染性のあるウイルスによって形成される凝集塊をブラック形成法にて評価した場合に生じる除去率の過大評価の 2 つが考えられた。なお、Kreisselらは、ポリ塩化アルミニウムを用いた凝集沈澱処理によって MS2 が不活化すると報告している。従って、ポリ塩化アルミニウムを用いた凝集沈澱処理においては、PFU 法にて評価した場合においては、凝集塊の形成のみならず、MS2 の不活化により、MS2 の除去率がアデノウイルス及びポリオウイルスの除去率に比べて高い値となった可能性が示唆された。これに対し、アデノウイルス、ポリオ

ウイルス, φX174 は、いずれの凝集剤を用いた場合においても、両法で評価した除去率は同程度であったことから、凝集剤による不活化は生じないものと考えられた。以上の結果からも、大腸菌ファージ MS2 をアデノウイルス及びポリオウイルスの安全側の代替指標として使用することは適切ではないことが示された。

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 6 件)

1. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Kimura, M. and Ohno, K. (2014) Virus removal by an in-line coagulation-ceramic microfiltration process with high-basicity polyaluminum coagulation pretreatment, *Water Science and Technology: Water Supply*, **14**(3), 429-437 (査読あり)。
 2. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Marubayashi, T. and Sato, S. (2014) Improved virus removal by high-basicity polyaluminum coagulants compared to commercially available aluminum-based coagulants, *Water Research*, **48**, 375-386 (査読あり)。
 3. Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y. and Matsui, Y. (2013) Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation-microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR, *Water Research*, **47**, 5819-5827 (査読あり)。
 4. Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K. (2013) Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon, *Separation and Purification Technology*, **107**, 79-84 (査読あり)。
 5. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳 (2012) ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, *土木学会論文集 G (環境)*, **68**(7), III_41-50 (査読あり)。
 6. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K. (2012) Difference in behaviors of F-specific DNA and RNA bacteriophages during coagulation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration processes, *Water Science and Technology: Water Supply*, **12**(5), 666-673 (査読あり)。
- [学会発表](計 15 件)
1. Shirasaki, N., Marubayashi, T., Matsushita, T., Matsui, Y. and Oshiba, A., Development of novel high-basicity polyaluminum chloride for effective virus removal, IWA World Water Congress, Lisbon (Portugal), 21–26 September 2014.
 2. Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y., Tatsuki, Y. and Oshiba, A., Evaluating norovirus removal during drinking water treatment by using recombinant norovirus virus-like particles, 2nd International Doctoral Symposium with Partner Universities, Hokkaido University, Sapporo (Japan), 24–26 October 2013.
 3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Tatsuki, Y., Estimating norovirus removal performance in an in-line coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus VLPs and immuno-PCR method, IWA Membrane Technology Conference (IWA-MTC 2013), Toronto (Canada), 25–29 August 2013.
 4. Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui, Y., Virus removal by a coagulation-microfiltration process, The 4th IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference 2012, Miraikan, Tokyo (Japan) 7–10 December 2012.
 5. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Sato, S., Effective removal of virus by high-basicity polyaluminum coagulation treatment, Particle Separation Conference, Berlin (Germany), 18–20 June 2012.
 6. 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, 山梨大学(山梨県・甲府市), 2014/12/20-22.
 7. 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, 北海道大学(北海道・札幌市), 2014/11/21.
 8. 村井一真, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 腸管アデノウイルスの凝集処理性, 第 65 回全国水道研究発表会, ポートメッセなごや(愛知県・名古屋市), 2014/10/23-25.
 9. 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, 東北大学(宮城県・仙台市), 2014/3/17-19.
 10. 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, 北海道大学(北海道・札幌市), 2013/11/19-21.
 11. 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, 第 68 回土木学会年次学術講演会, 日本大学(千葉県・千葉市), 2013/9/4-6.
 12. 丸林拓也, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系及び鉄系凝集剤の塩基度がウイルスの処理性に与える影響, 第 47

- 回日本水環境学会年会, 大阪工業大学(大阪府・大阪市), 2013/3/11-13.
13. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳, ウイルス処理に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, 第 49 回環境工学研究フォーラム, 京都大学(京都府・京都市), 2012/11/28-30.
 14. 白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦, ウイルス様粒子と新規イムノ PCR 法を併用したヒトノロウイルスの膜ろ過処理性評価, 第 67 回土木学会年次学術講演会, 名古屋大学(愛知県・名古屋市), 2012/9/5-7.
 15. 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの処理性に与える影響, 第 63 回全国水道研究発表会, くにびきメッセ(島根県・松江市), 2012/5/16-18.

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