

VII-1

バイオポリマーによる小児麻痺ウイルスの吸着

東北大学 学生員○加藤 聖 東北大学 正会員 福士謙介
東北大学 正会員 熊谷幸博 東北大学 正会員 大村達夫

1. はじめに

近年クリプトスポリジウムや病原性大腸菌O-157の集団感染による被害からコレラや赤痢に代わる新しい水系感染症への警告が発せられているが、その中で病原ウイルスの検出・同定技術の向上により判明した水系感染症の病原微生物の中に占める病原ウイルスの割合が高いことは注目に値する事実である。極めて低濃度であっても感染力をもつ病原ウイルスを含んだ下水処理として現在は塩素消毒が主流であるが、下水処理施設で塩素消毒処理された下水処理水からは不活化されていない感染力のある病原ウイルスが検出されたことが報告されており、加えて塩素による消毒の処理はトリハロメタンなどの副生成物を生成する危険性や、下水処理水中の塩素による河川生物への悪影響が指摘されている。そこでウイルス除去材として安価で使いやすい固形のウイルス吸着材があれば、塩素のように有害物質を副生成することも、残留して生物への悪影響を与えることもないことから本研究ではそのような吸着材の開発を試みた。

浄水処理における緩速ろ過で、ウイルスを99.9～99.99%除去する能力があると評価されている生物膜や、約80%の検出率でウイルスが検出されている活性汚泥中の生物フロックの主要な構成要素は微生物が産出するバイオポリマーである。この事実からバイオポリマーによるウイルス吸着の可能性が示唆される。従って、本研究では定量的な実験によりこの可能性を検討し、その性能を改良することで、環境へのインパクトが少ない生物由来の病原ウイルス吸着材を開発する事を最終目標として据え、本研究では下水中の細菌が産出したバイオポリマーによって、小児麻痺ウイルスの回分式吸着除去実験を行った。以下にその吸着能力の評価を行った結果を報告する。

2. 実験方法

使用したウイルス：ワクチン株の弱毒小児麻痺ウイルス I 型 (Lsc,2 ab 株) を用いた。

ウイルス検出方法：アフリカミドリザルの腎細胞 (BGM 細胞) を用いてブラック形成試験 (PFU 試験) を行いウイルス感染価を計測する。

バイオポリマー：細菌が産出するバイオポリマーは、産出を誘因する硝酸銀を 5 mg / ℓ、産出のエネルギー補給のため ATP の前駆物質の β -glycerophosphate を 50 mg / ℓ 添加した普通ブイヨン培地に、下水処理場の一次処理水を 10 mg / ℓ 注入し集積培養することにより得る。

培養した細菌細胞を遠心分離し (2270 g, 3 分, 10℃)、水に不溶性の沈殿部分を乾燥 (37℃恒温器) させ、滅菌 (オーブン, 110℃, 1 時間) した後、粉末状にする。

吸着実験: バイオポリマーを量り、エッペンドルフチューブにいれ、小児麻痺ウイルスの入ったリン酸緩衝液 (pH7.3～7.6) を注入した。ウイルスを吸着させるため攪拌した後、通常 10 分間静置した。その後、遠心分離 (670 g, 10 分) し、上澄を 0.2 μ m のフィルターでろ過した。そのろ過液を用いて PFU 試験を行った。

実験は P2 レベル実験設備で室温 24℃ の一定条件で行い、下記の実験を行った。但し PBS で希釈したウイルス液を Control, それにバイオポリマーを添加したものを Test とする。

ウイルスの吸着能力の有無を評価する実験

10^7 (PFU / ml) で冷凍保存してある小児麻痺ウイルスを解凍し、PBS で 10^4 (PFU / ml) に希釈したウイルス液を Control, Test に注入したものを静置した。静置時間は 10 分とした。

ウイルスの吸着能力は下記の (1) 式, (2) 式を用いて評価した。さらに併せて有意水準 0.01 における Control と Test の母平均の差の検定を行った。

key words バイオポリマー 弱毒小児麻痺ウイルス I 型 (Lsc,2 ab 株) β -glycerophosphate
東北大学工学部土木工学科 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 TEL 022(217)7483

$$A = 1000 \times \frac{P_c - P_t}{C} \quad (1)$$

但し、A: バイオポリマー1 gあたりの
小児麻痺ウイルス吸着能力 (PFU/g)
Pc: PBS で希釈したウイルスから得られる
ブラック数 (PFU/ml)
Pt: 吸着実験後のウイルスにより得られる
ブラック数 (PFU/ml)
C: バイオポリマーの濃度 (g / l)

$$R = 100 \times \frac{P_c - P_t}{P_c} \quad (2)$$

R: ウイルス除去率

表-1 ウイルス初期濃度 3.0×10^4 (PFU/ml) での
バイオポリマーのウイルス吸着能力評価

ウイルス除去能力 (PFU/g)	2.2×10^3 (3.3×10^3)
ウイルス除去率 (%)	57.9 (8.59)
有意水準0.01におけるControl とTestの母平均の差の検定	有意差あり

表中の () 内は標準偏差

3. 結果と考察

表-1の結果からバイオポリマーは 10^4 PFU/ml という希薄なウイルス初期濃度の領域で有意な小児麻痺ウイルス吸着能力を示すことが分かった。

上記の結果から活性汚泥と同様に、乾燥精製したバイオポリマーにも、細菌の生死に関わらず小児麻痺ウイルスを吸着する能力があることがわかった。バイオポリマーによる吸着機構としては、本来自然環境中のウイルスやバイオポリマーは陰荷電していることから、電気的引力による吸着は考えにくい。バイオポリマーの組成としてはタンパク質、多糖類、核酸が主要な構成成分であり、この成分が複雑に絡み合いマトリクスを形成している。今回のバイオポリマー生成促進物質を添加した場合にはタンパク質の吸着能力の改善が認められることが知られているので、このことから不溶性タンパク質の疎水性力や物理的にポリマーマトリクス中に入り込み取り込まれていること、ファンデルワールス力、水素結合などの引力が今回のウイルスの吸着機構の要因ではないかと考えられる。

本研究でバイオポリマーがウイルスを吸着することが分かったがその吸着能力はさらに改善することが可能であると思われる。今後はこの吸着能をさらに増強していく必要があり、今回は混合培養の細菌を用いたが、単離菌の培養とそのバイオポリマー吸着実験により増殖速度や吸着性能を検討し、よりウイルス吸着に効果的な細菌を検索する必要がある。バイオポリマー産出に関してもより効果的な誘因剤を使用する余地があり、タンパク質の陰荷電を陽荷電にすることも考えられる。また今回の実験においてはウイルスのみが水中に存在する単純な実験系であったが、実際の水中にはウイルス以外の様々な物質が存在する。ウイルス吸着を目的とするバイオポリマーであっても、低濃度のウイルスと他の高濃度の水中にある他の物質(フミン質、シリカ等)でその吸着サイトをめぐって競合するのが単に濃度確率によるものであれば、ウイルスを吸着する前に他の物質が吸着してしまい、本来のウイルス吸着という目的をバイオポリマーは果たすことができないと思われる。現在までポリオウイルスの吸着については土粒子や金属、活性汚泥フロック、膜、ピリジニウム型高分子樹脂による吸着実験が行われている。最も吸着能の高いピリジニウム型高分子では陽荷電した樹脂と陰荷電したウイルスが主要な働きをしているものと思われるが、陰イオン交換樹脂とは異なる吸着機構が示唆されていることから荷電相互作用以外の効果も考慮する必要があるものと思われる。ウイルスの吸着を目指すためには何らかの選択的吸着の可能性を検索していく必要があると思われる。

<謝辞>

本研究を進めるにあたりご援助いただいた(財)科学技術振興事業団に感謝いたします。

<参考文献>

- 1) 矢野一好他, 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 -第1報- 下水のウイルス学的実態調査-用水と廃水. 第27巻, 第5号, p39~45(1985)
- 2) K.Fukusi, Heavy Metal Removal by Microbial Biopolymers., Ph.D.dissertation, Univ. of Utah., (1996).
- 3) N.Kawabata et al. Removal of pathogenic human viruses by insoluble pyridinium-type resin. Epidemiol. Infect., 105, 633-642 (1990).