

## VLPs を用いたヒトノロウイルスの凝集沈殿-MF 膜ろ過処理性評価

北海道大学大学院 正会員 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一

### 1. はじめに

病原性ウイルスの中でもヒトノロウイルスは、その感染事例が世界中で年々増加している重要な病原体であり、水道水を含む飲料水を媒体としたヒトノロウイルスによる水系感染症の報告もなされている。従って、ヒトノロウイルスによる水系感染症を引き起こさないためには、ヒトノロウイルスの浄水処理性を評価し、確実に除去、あるいは不活化する必要がある。しかしながら、ヒトノロウイルスは未だ効率的な細胞培養系が確立されていないことから、添加実験による浄水処理性の評価を行うために必要なウイルス量を確保することが極めて困難であるため、培養可能な病原性ウイルスと比べて浄水処理性の評価がほとんどなされておらず、研究が格段に遅れているのが現状である。その一方で、ヒトノロウイルス遺伝子の構造タンパク質領域をバキュロウイルスに取り込み、昆虫細胞で発現させることによって、野生のヒトノロウイルスと構造的・抗原的に等しいヒトノロウイルスの外套タンパク粒子 (rNV-VLPs; recombinant Norovirus-Virus Like Particles) を多量に得る技術が確立されている。そこで、本研究では、これまでほとんど議論されてこなかったヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性を、rNV-VLPs を用いて詳細に検討することを目的とし、凝集沈殿-MF 膜ろ過処理における処理性を評価した。なお、本研究は、ヒトノロウイルスの物理的な浄水処理性評価に rNV-VLPs を用いた世界で初めての試みである。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用した rNV-VLPs, 大腸菌ファージ

本研究では、我が国で分離されたヒトノロウイルス (Chiba virus, Genogroup I, 直径 35–39 nm) の rNV-VLPs を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成し、実験に使用した。また、水系感染症を引き起こす病原性ウイルスの代替指標ウイルスとして広く用いられている大腸菌ファージ Q $\beta$  および MS2 (直径 24–26 nm) を使用し、rNV-VLPs との処理性比較を行った。なお、rNV-VLPs の定量には、ノロウイルス抗原キット (NV-AD II, デンカ生研) を用い、大腸菌ファージの定量には、リアルタイム定量 RT-PCR 法を用いた。

#### (2) 凝集沈殿-MF 膜ろ過処理

本研究では、凝集沈殿-MF 膜ろ過処理による rNV-VLPs および大腸菌ファージの処理性を評価した。精製した rNV-VLPs を  $10^{11}$  VLPs/mL, Q $\beta$  および MS2 を  $10^8$  PFU/mL になるように同時添加した豊平川河川水 (北海道札幌市; pH 7.2, DOC 0.8 mg/L, 濁度 0.6 NTU) を原水とし、ピーカーに 400 mL 添加した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (PACl, 多木化学), 硫酸バンド (Alum, 多木化学) のいずれかを 0.54 あるいは 1.08 mg-Al/L になるように添加し、直ちに HCl あるいは NaOH にて pH を 6.8 に調整した。これを攪拌翼を用いて G 値  $200\text{ s}^{-1}$  にて 2 分間急速攪拌,  $20\text{ s}^{-1}$  にて 28 分間緩速攪拌し, 20 分間静置した。その後、静置後の上澄水 350 mL を用いて MF 膜ろ過処理を行った。上澄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、ポンプを用いて流速  $2.0\text{ m/day}$  にてアクリル製のケーシングに収納されたセラミック MF 平膜 (膜孔径  $0.1\ \mu\text{m}$ , 有効膜ろ過面積  $0.0007\text{ m}^2$ , 日本ガイシ) に通水し、デッドエンドろ過方式にてろ過を行った。原水および膜ろ過水を経時的 (15, 30, 60, 90, 120 分後) に採取し、それぞれの rNV-VLPs, Q $\beta$ , MS2 濃度を定量した。

### 3. 実験結果と考察

#### (1) 発現した rNV-VLPs の基本特性

遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成した rNV-VLPs の電子顕微鏡写真を図-1 に示す。図より、粒子状に自己組織化された rNV-VLPs が確認された。また、観察された rNV-VLPs の中から 10 粒子を無作為に抽出し、写真上で直径を測定したところ、 $35.7\text{ nm} \pm 3.2\text{ nm}$  であり、野生のヒトノロウイルスの直径 35–39 nm と同程度であった。従って、作成した rNV-VLPs の構造は野生のヒトノロウイルスと同等であると判断した。

#### (2) 凝集沈殿-MF 膜ろ過処理における rNV-VLPs の処理性

凝集剤として PACl を用いた場合の凝集沈殿-MF 膜ろ過処理における rNV-VLPs の除去率を図-2 に示す。図の縦軸は  $\text{Log}[C/C_0]$  ( $C_0$ : 原水の rNV-VLP 濃度,  $C$ : 膜ろ過水の rNV-VLPs 濃度) にて表記した。図より、凝集剤を添加しない場合、

キーワード: MF 膜ろ過処理, VLPs, 凝集処理, 大腸菌ファージ, ヒトノロウイルス

連絡先: 〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目 北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

rNV-VLPs の除去率は0.2 log 以下であった。これは、rNV-VLPs の直径が MF 膜の膜孔径よりも小さいためであると考えられた。また、本研究で使用した MF 膜においては、rNV-VLPs と MF 膜表面との電気的相互作用、あるいは疎水性相互作用による rNV-VLPs の吸着除去は無視し得ることが分かった。これに対し、凝集処理を前処理として導入した凝集沈澱-MF 膜ろ過処理においては、0.54 mg-Al/L の PACI 添加濃度では約 1-2 log の rNV-VLPs の除去率が得られた。これは、凝集処理によって膜孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され、フロックに吸着、あるいは取り込まれた rNV-VLPs が後段の MF 膜によって効果的に抑止されたためであると推察された。また、PACI 添加濃度を上げることで、rNV-VLPs の除去率が向上し、1.08 mg-Al/L 以上の PACI 添加濃度では 3 log 以上の除去率が得られた。

(3) PACI と Alum の処理性比較

凝集剤添加濃度として 1.08 mg-Al/L を用いた場合の凝集沈澱-MF 膜ろ過処理における rNV-VLPs, Qβ, MS2 の除去率を図-3 に示す。図の縦軸は  $\text{Log}[C_0/C]$  ( $C_0$ : 原水の rNV-VLP 濃度, あるいは大腸菌ファージ濃度,  $C$ : 膜ろ過水の rNV-VLPs 濃度, あるいは大腸菌ファージ濃度) にて表記した。ここで、膜ろ過水中の rNV-VLPs 濃度は、いずれの凝集剤を用いた場合であっても、ノロウイルス検出キットの定量下限値 (約  $10^8$  VLPs/mL) を下回ったことから、遠心式フィルターユニット Amicon Ultra-15 (分画分子量 30,000, 再生セルロース, Millipore) を用いて膜ろ過水中の rNV-VLPs を濃縮した後に定量した。なお、この方法により得られた濃縮率は約 10 倍であった。図より、凝集剤として PACI を用いた場合 4 log 以上の rNV-VLPs の除去率が得られた。従って、凝集沈澱-MF 膜ろ過処理を用いることにより、米国環境保護局が要求する 4 log の腸管系ウイルスの除去率が達成し得ることが示唆された。一方、Alum を用いた場合、rNV-VLPs の除去率は約 3 log となり、PACI を用いた場合の除去率よりも低くなった。従って、凝集沈澱-MF 膜ろ過処理においては、PACI を用いることにより、Alum を用いる場合に比べて効果的に rNV-VLPs を除去できることが分かった。

rNV-VLPs, Qβ, MS2 の除去率を比較すると、いずれの凝集剤を用いた場合でも、Qβ および MS2 の除去率は、rNV-VLPs の除去率よりも低くなった。従って、凝集沈澱-MF 膜ろ過処理においては、Qβ, MS2 共にヒトノロウイルスの安全側の指標と成り得る可能性が考えられた。

4. 結論

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) rNV-VLPs を用いることにより、ヒトノロウイルスの凝集沈澱-MF 膜ろ過処理性を評価することができた。
- (2) 凝集沈澱-MF 膜ろ過処理において、凝集剤として PACI を用いた場合、4 log 以上の rNV-VLPs の除去率が得られた。
- (3) Qβ および MS2 の除去率は、rNV-VLPs の除去率よりも低かったため、凝集沈澱-MF 膜ろ過処理においては、Qβ, MS2 共にヒトノロウイルスの安全側の指標と成り得る可能性が考えられた。

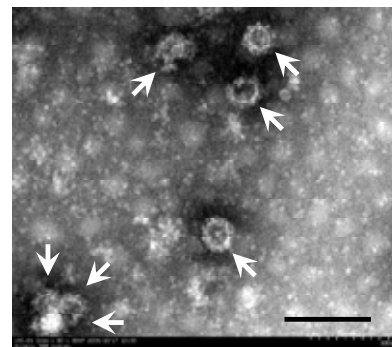


図-1. 作成した rNV-VLPs の電子顕微鏡写真: Scale bar 100 nm

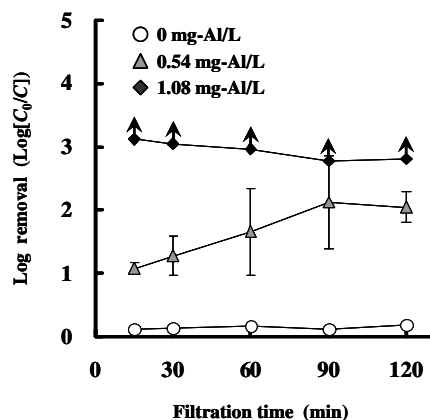


図-2. PACI を用いた凝集沈澱-MF 膜ろ過処理における rNV-VLPs の除去率: 図中の矢印は定量下限値以下を示す

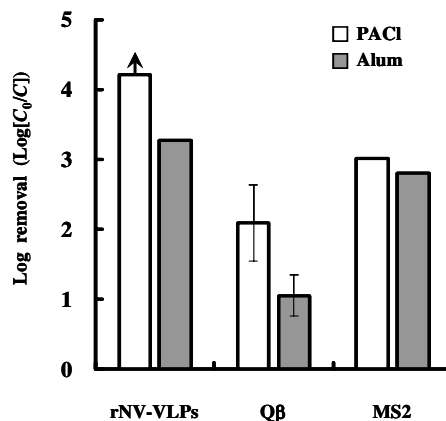


図-3. PACI と Alum の処理性比較: 膜ろ過時間 120 分後、凝集剤添加濃度 1.08 mg-Al/L, 図中の矢印は定量下限値以下を示す