

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

北海道大学大学院 正会員 ○白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦

1. はじめに

低圧膜ろ過処理は、高い処理性が得られることに加え、維持管理が容易であること、また、省スペース化が期待できること等から、従来から広く用いられている凝集沈殿-急速砂ろ過処理に替わる次世代の浄水処理技術として世界中で導入が積極的に進められている。低圧膜ろ過処理に用いられる膜の中でも、セラミック膜は、有機膜に比べ、耐圧性・耐薬品性等の点で優れており、高い膜ろ過流速での運転が可能であること、膜の物理洗浄（逆圧洗浄）を高圧で実施できること、また、膜の薬品洗浄に強酸・強アルカリを使用可能であること等から、我が国の浄水処理場においても広く導入されてきている。

セラミック膜を用いた膜ろ過処理においては、処理水質の向上や膜の目詰まり（膜ファウリング）の低減等を目的に、凝集処理を前処理として導入した凝集-膜ろ過処理が実施されている。前凝集に用いられる凝集処理法の中でも、インライン凝集処理は、従来の機械攪拌凝集処理に比べ、凝集剤使用量及び凝集時間の低減化、また、省スペース化・省エネルギー化が期待できること等から、近年注目を集めている¹⁾。

そこで、本研究では、インライン凝集処理とセラミック膜を用いた膜ろ過処理を組み合わせたインライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を評価した。水系感染症ウイルスの代表的なウイルスであるノロウイルスは、生体外での効率的な培養法が未確立であることから²⁾、培養可能な病原性ウイルスの浄水処理性の評価に広く用いられる添加実験を行う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に比べて浄水処理性に関する知見がほとんど得られていないのが現状である。そのため、本研究では、遺伝子組換え技術とカイコ細胞を用いたタンパク質発現法により、野生のノロウイルスと構造的・抗原的に同等であるノロウイルス様粒子（rNV-VLPs）を作製し、添加実験に用いることにより、インライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を詳細に評価した。また、rNV-VLPsの定量には、従来から広く用いられている酵素免疫測定法（ELISA）に比べ、検出感度の飛躍的な向上が見込めるImmuno-PCR法を新たに構築し、使用した。

2. 実験方法

(1) rNV-VLPsの作製

本研究では、我が国で分離されたノロウイルス（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細胞を用いたタンパク質発現法により作製し、実験に使用した。

(2) Immuno-PCR法の構築

本研究では、抗原抗体反応の特異性とPCR法の高感度性を組み合わせたImmuno-PCR法を構築し、rNV-VLPsの定量に使用した。rNV-VLPsのIgM抗体をマイクロプレートに固定化し、ここに、抗原であるrNV-VLPsを含む試料を添加することにより、試料中のrNV-VLPsとIgM抗体を反応させた。その後、ビオチン化したIgG抗体を添加し、rNV-VLPsと反応させ、IgM抗体-rNV-VLPs-ビオチン化IgG抗体の複合体を形成させた。更に、ビオチンと強固に結合する性質を有するストレプトアビジンを添加し、ここに、ビオチン化したDNAタグを添加することにより、ストレプトアビジンを介してビオチン化IgG抗体とビオチン化DNAタグを結合させた。制限酵素を用いて複合体のDNAタグを切断した後、DNAタグ濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量した。

(3) インライン凝集-セラミック膜ろ過処理

本研究では、インライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるrNV-VLPs、水系感染症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Qβ及びMS2の処理性を評価した。精製したrNV-VLPsを 10^{10} VLPs/mL、Qβ及び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）を実験原水とした。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム（PACl, 凝集pH 6.8）、硫酸バンド（almu, 凝集pH 6.8）、あるいは塩化第二鉄（FeCl₃, 凝集pH 5.8）を10, 20, 40 μM-Al or Feになるように添加し、インライン凝集処理としてスタティックミクサーを用いた攪拌を行った。これを、モノリス型セラミック膜モジュール（公称膜孔径 0.1 μm, 有効膜ろ過面積 0.043 m²）に定流速（2.0 m/day）にて通水し、デッドエンド方式でろ過した。経時的に原水及び膜ろ過水のウイルス濃度を定量し、除去率を求めた。なお、rNV-VLPs濃度の定量にはImmuno-PCR法を用い、Qβ及びMS2濃度の定量にはRT-PCR法を用いた。

キーワード: Immuno-PCR法, インライン凝集処理, セラミック膜ろ過処理, 大腸菌ファージ, ノロウイルス様粒子

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院環境創生工学部門 E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

3. 実験結果と考察

(1) 作製した rNV-VLPs の特性と Immuno-PCR 法による定量

作製した rNV-VLPs を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、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 の直径は約 40 nm であり、野生のノロウイルスの直径と同程度であった³⁾。作製した rNV-VLPs の濃度を、新たに構築した Immuno-PCR 法にて定量したところ、ELISA を用いた場合に比べ、検出感度が 100 倍程度向上し、 10^6 VLPs/mL 程度まで定量可能となった。以上の結果から、本研究で作製した rNV-VLPs と、新たに構築した Immuno-PCR 法を併用することにより、インライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を評価可能であると判断した。

(2) セラミック膜ろ過処理における rNV-VLPs の処理性

インライン凝集-セラミック膜ろ過処理 (PACI) における rNV-VLPs の除去率を図-1 に示す。図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 ; 原水の rNV-VLPs 濃度, C ; 膜ろ過水の rNV-VLPs 濃度) にて表記した。セラミック膜ろ過処理単独では、rNV-VLPs の除去率は 0.6 log 以下であった。これは、rNV-VLPs の直径 (約 40 nm) が、セラミック膜の膜孔径 (0.1 μm) よりも小さく、また、rNV-VLPs と MF 膜表面の間に作用する電気的相互作用、あるいは疎水性相互作用による rNV-VLPs の吸着除去効果が小さいことによるものであると考えられた。これに対し、インライン凝集処理をセラミック膜ろ過処理の前処理として導入することにより、膜ろ過単独では除去できなかった rNV-VLPs を効果的に除去することができ、20 μM -Al 以上の PACI 添加濃度においては、米国環境保護局の要求値である 4 log (99.99%) の除去率が達成された (図-1)。これは、前段のインライン凝集処理によってセラミック膜の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、あるいは捕捉された rNV-VLPs が、後段のセラミック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。以上の結果から、インライン凝集-セラミック膜ろ過処理は、ノロウイルス粒子の除去に有効であることが示唆された。

凝集剤添加濃度 20 μM におけるインライン凝集-セラミック膜ろ過処理後 (膜ろ過時間 30 min) の rNV-VLPs, Q β , MS2 の除去率を図-2 に示す。rNV-VLPs においては、凝集剤として PACI 及び FeCl₃ を用いた場合に 4 log 以上の除去率が得られた。従って、PACI 及び FeCl₃ を用いたインライン凝集処理の導入により、ノロウイルス粒子を効果的に除去可能となることが示された。

インライン凝集-セラミック膜ろ過処理における rNV-VLPs, Q β , MS2 の除去率を比較したところ、少なくとも凝集剤として alum を用いた場合は、rNV-VLPs の除去率は、Q β 及び MS2 の除去率よりも低くなった (図-2)。従って、大腸菌ファージ Q β 及

び MS2 をノロウイルス粒子の代替指標ウイルスとして用いる場合には、処理性の差異を考慮する必要があることが示された。

4. 結論

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) rNV-VLPs と新規 Immuno-PCR 法の併用により、インライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を評価することができた。
- (2) インライン凝集-セラミック膜ろ過処理において、4 log 以上のノロウイルス粒子の除去率が得られた。
- (3) インライン凝集-セラミック膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の除去率は、大腸菌ファージ Q β 及び MS2 の除去率よりも低い可能性があることから、Q β 及び MS2 をノロウイルス粒子の代替指標ウイルスとして用いる場合には、処理性の差異を考慮する必要があることが示された。

参考文献

- 1) Oh *et al.*, *J. Membr. Sci.*, **254**(1-2), 39-47, 2005.
- 2) Donaldson *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**(Mar.), 231-241, 2010.
- 3) Shirasaki *et al.*, *Water Res.*, **44**(5), 1307-1316, 2010.

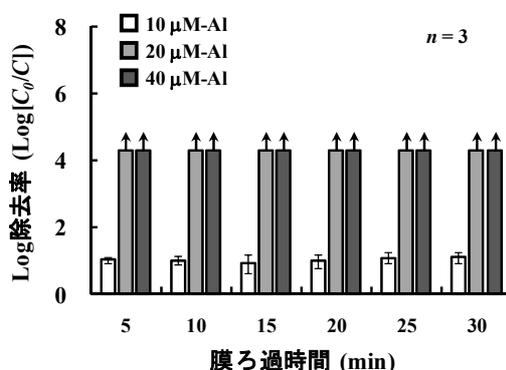


図-1. インライン凝集-セラミック膜ろ過処理における rNV-VLPs の処理性

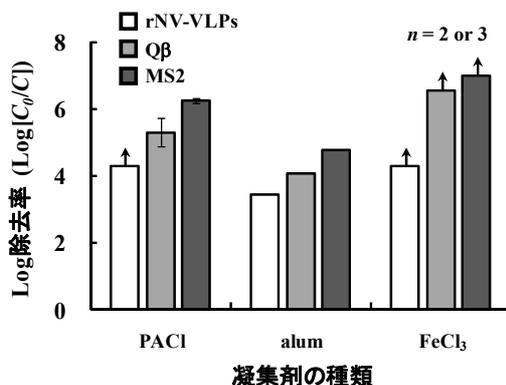


図-2. インライン凝集-セラミック膜ろ過処理における rNV-VLPs, Q β , MS2 の処理性比較