

金属塩凝集剤の DNA ウイルス不活化効果

岐阜大学工学部		田島 章
同上	正会員	松下 拓
同上	正会員	松井 佳彦
同上	正会員	井上 隆信

1.はじめに

本来、凝集の目的は、ブラウン運動をしていて沈降しないコロイド粒子を、凝集粗大することにより沈降できる大きさまで成長させ、沈降除去することである。しかし、昨年、本研究室で行った実験から凝集剤がウイルスを不活化させることがわかった。ウイルスの不活化は、塩素などの酸化剤については、多くの研究がなされているが、金属塩凝集剤による報告は未だない。そこで、本研究では DNA ウイルスに対する金属塩凝集剤の不活化効果を調べることを目的とする。

2.実験概要

2-1 用いたウイルス

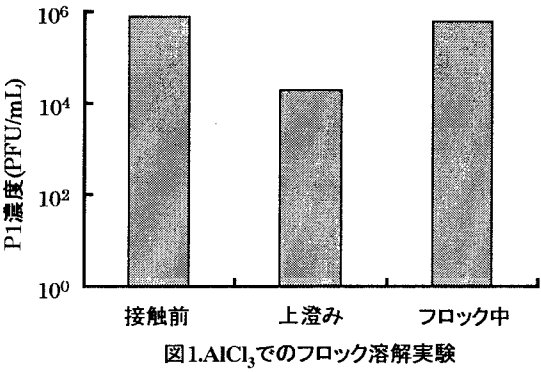
本研究では、DNA ウイルスとして、大腸菌ファージ P1 を用いた。P1 は、遺伝子として 2 本鎖 DNA を持ち、エンベロップを有する。大きさは、頭部が 65nm×65nm で尾部が 12nm×150nm である。

2-2 実験方法

2-2-1 フロック溶解法の選定

凝集剤を水に添加すると、フロックが形成され、ウイルスがフロック中に捕捉される。本研究では、凝集剤のウイルスの不活化効果を調べるため、フロック中のウイルスも計測する必要がある。アルミニウムフロックは通常 pH9 以上で溶解するが、このフロック溶解のための pH 操作でウイルスが不活化される可能性がある。そこで、フロックに取り込まれたウイルスに影響を与えずフロックを溶解する方法を検討した。

1 L の Milli-Q 水に 30mgAl/L になるよう AlCl₃ を添加し、Na₂CO₃ で pH8.0 に調整した。この溶液を 19 日間攪拌してフロックを形成し、そこに P1 を添加して、6 時間緩速攪拌(29rpm)で接触させた。接触後サンプルを採取し、遠心分離を行い、上澄み（非吸着部）とフロック中の P1 濃度（吸着部）を測定した。なお、フロック中の P1 は、沈殿に pH9.5 に調整したビーフエキスイ溶液を 6% になるように添加し、フロックを溶解して測定した。



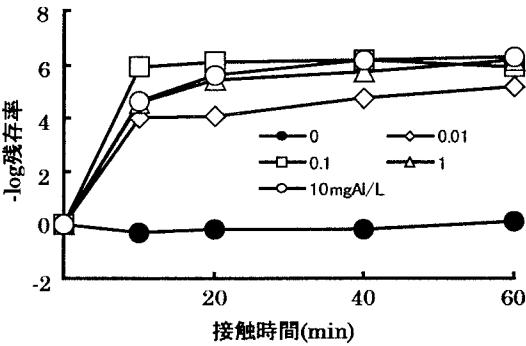
2-2-2 アルミニウム系凝集剤による不活化実験

500mL の Milli-Q 水または河川水に P1 を添加し、アルミニウム濃度 0, 0.1, 1, 10mg/L で凝集剤(硫酸バンド, Al₂(SO₄)₃, PAC, AlCl₃)を添加した。凝集剤添加 0, 10, 20, 40, 60 分後に P1 濃度を測定した。

3.実験結果と考察

3-1 フロック溶解法の選定

図 1 で示すように、接触前の P1 濃度が約 10⁶PFU/mL に対して、上澄み（非吸着部）は約 10⁴PFU/mL となり、99%以上の P1 がフロック中に捕捉された。また、フロックを溶解した場合は、約 10⁶PFU/mL となり、ビーフエキスを共存させることによりほぼ 100%の P1 を回収できる



ことが確認された。今後、本方法によりフロックを溶解してウイルス濃度を測定する。

3-2 Milli-Q 水中および河川水中でのウイルスの不活化

一例として図 2 に Milli-Q 水中での PAC による不活化実験結果を示す。不活化は PAC 添加後の短時間で急激に起こった。0.01mgAl/L の添加では 10 分間の接触で -log 残存率が 4.0 になり、0.1~10mgAl/L では約 5 となった。その後は不活化効果は緩やかに進行し、0.01mgAl/L では接触 60 分での -log 残存率が 5.1、0.1~10mgAl/L では約 6 となった。

図 3 に河川水中での PAC による不活化実験結果を示す。Milli-Q 水中に比べ、河川水中では不活化効果は抑制され、0.01、0.1mgAl/L では不活化されなかった。一方、1mgAl/L の添加では 60 分後で -log 残存率が 2.1、10mgAl/L では 3.2 であった。

3-3 凝集剤による不活化効果の差異

図 4 に Milli-Q 水中での 4 種類の凝集剤の実験開始 60 分後の -log 残存率を示す。0.01mgAl/L の添加では $AlCl_3$ 、硫酸バンド、 $Al_2(SO_4)_3$ ではほとんど不活化効果がなかったのに対し、PAC では 5.1 であった。 $Al_2(SO_4)_3$ 以外では 0.1mgAl/L 以上の添加量では添加アルミニウム量に関わらずほぼ同程度の残存率となり、PAC で約 6、 $AlCl_3$ で約 4、硫酸バンドでは約 3 であった。用いた凝集剤では PAC の不活化力が最も高かった。 $Al_2(SO_4)_3$ では、0.1mgAl/L の添加で最も不活化力は高くなったが、その理由は現段階では不明である。

図 5 は河川水中での実験開始 60 分後の -log 残存率を示す。どの凝集剤でも Milli-Q 水中より不活化効果が抑制され、0.1mgAl/L 以下ではすべての凝集剤で不活化効果がみられなかった。また $AlCl_3$ 、硫酸バンド、 $Al_2(SO_4)_3$ では 1mgAl/L 以上では不活化効果がほぼ同程度であり -log 残存率が約 1 であったのに対し PAC は 1mgAl/L の -log 残存率が約 2、10mgAl/L で約 3 となった。

4. おわりに

アルミニウム系凝集剤を用いて DNA ウイルスの不活化効果を調べ、以下の結果を得た。

- ①PAC による不活化効果は他の凝集剤に比べて大きかった。
- ②Milli-Q 水中での不活化効果は $Al_2(SO_4)_3$ 以外の凝集剤では 0.1mgAl/L 以上ではアルミニウム添加量に関わらずほぼ同程度だった。
- ③Milli-Q 水中に比べて河川水中では不活化効果が抑制された。

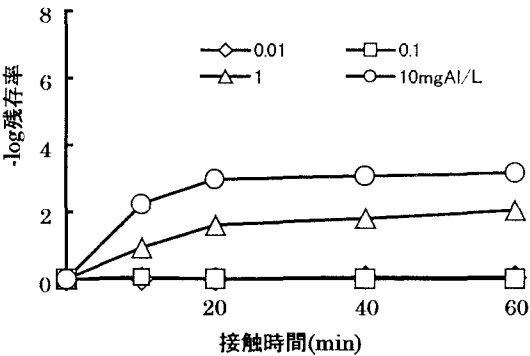


図3.PACでのP1の不活化(河川水中)

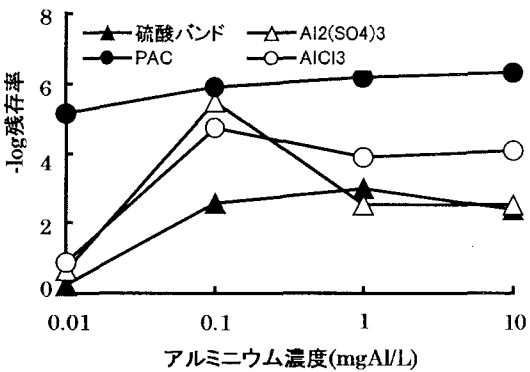


図4.様々な凝集剤での不活化実験(Milli-Q水中, 60分後)

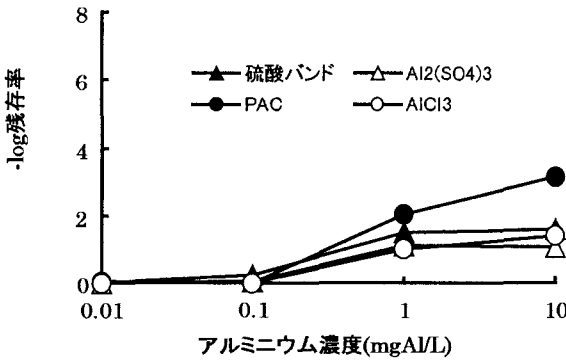


図5.様々な凝集剤での不活化実験(河川水中, 60分後)