

## 凝集剤のアルミニウム種によるウイルス不活化機構に関する検討

岐阜大学工学部

小塚 信幸

同上

正会員

松下 拓

同上

正会員

松井 佳彦

## 1.はじめに

ウイルスは塩素消毒に対する抵抗性が強く、除去しにくいいため、浄水処理過程で残存する可能性がある。そのため凝集処理過程での効果的なウイルス除去方法を考える必要がある。

我々の研究グループの研究により、アルミニウム系凝集剤には、ウイルスを不活化させる働きがあることがわかってきている。しかし、凝集剤によるウイルスの不活化のメカニズムは、解明されていない。そこで本研究では、アルミニウム系凝集剤を用いた実験を行い、以下の2点を明らかにすることを目的とする。(1)PCR法とブラック形成法を組み合わせることにより、不活化されたウイルスを定量的に把握する(2)凝集後の試料を凝集フロックと水相に分離し、それぞれのウイルス濃度を定量することにより、ウイルス不活化が凝集フロック内/水相のいずれにおいて進行しているのかを明確にする。

## 2.実験方法

## 2-1 アルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化実験

Milli-Q水200mLにウイルス(大腸菌ファージQβ)を $10^{10}$ PFU/mL程度になるように添加した。ここに凝集剤としてPAC(住友化学工業製、比重1.23、塩基度62.5%、 $Al_2O_3$ を重量比で10.3%含む)を1mg/LasAl添加し、pHを7.0に調整した。これをパドル型攪拌器にて5分間急速攪拌し、その後55分間緩速攪拌しウイルスと凝集剤を接触させた。

## 2-2 試料の分画方法

図1に試料の分画方法を示す。凝集処理後の試料中のウイルス濃度を測定した(a)。但しこの方法では、凝集フロック内に捕捉されたウイルスが定量できない。そこで、凝集処理後の試料5mLをビーフェキス水溶液(12%w/v)5mLと5時間激しく混合することにより凝集フロックを溶解し(高pH処理)、フロック内に捕捉されていたウイルスをも含んだ定量を行った(b)。

一方、凝集フロックと水相を分離するために、

凝集処理後の試料185mLをろ過した( $\phi=0.45\mu m$ , 酢酸セルロース)。得られたろ液中のウイルス濃度を、そのまま(c)、あるいは高pH処理後(d)に測定した。さらに、膜にて抑止された凝集フロック中のウイルスを定量するために、用いた膜を高pH処理しウイルス濃度を測定した(e)。

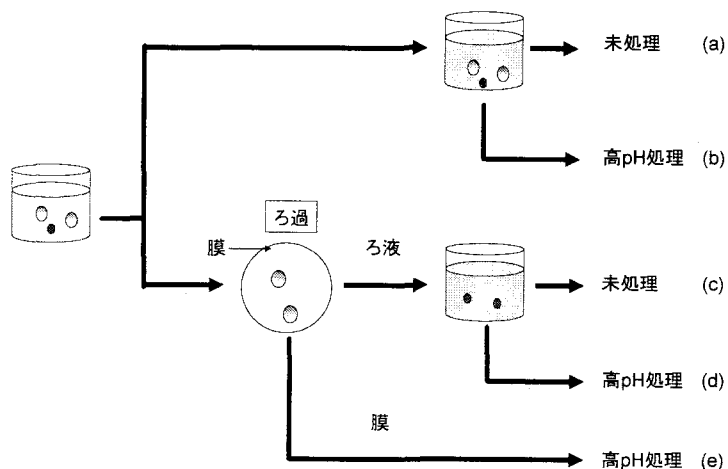


図1.試料の分画方法

## 2-3 感染性ウイルスの定量法

本研究では感染性のあるウイルスを測定するためにブラック形成法を行った。ウイルス存在下で宿主菌である大腸菌を寒天培地上に一面に増殖させると、ファージによって大腸菌が溶解された部分が、透明な溶菌斑(ブラック)となる。ブラック1つがウイルス1つに相当する。したがってブラック数を数えることによって、感染性のあるウイルスを定量することができる。

## 2-4 全ウイルス粒子定量法

本研究では、全ウイルス粒子数を測定するためにリアルタイム RT-PCR(reverse transcription-PCR)法を行った。反応装置は ABI Prism7000(Applied Biosystems 社)を用いた。RT 反応液および PCR 反応液の組成は、TaqMan Gold RT-PCR キットのプロトコルにしたがった。0.2mL のマイクロチューブにサンプルを 100 $\mu$ L 入れ、90 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し、4 $^{\circ}$ C で急冷することによりカプシドを破壊し、ウイルスの RNA を抽出した。48 $^{\circ}$ C 30 分加熱し逆転写反応を起こし c-RNA を合成し、次に 95 $^{\circ}$ C 10 分加熱し RNA 分解した。その後 95 $^{\circ}$ C 15 秒で DNA を変性し、60 $^{\circ}$ C 1 分でプライマーのアニーリングをした。このサイクルを 50 回繰り返すことによって RNA を増幅し、蛍光強度を測定した。表 1 に使用したプローブとプライマーの塩基配列を示す。

表1. 使用したプライマーとプローブの塩基配列

名称	塩基配列
QB <sup>+</sup> プライマー	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'
QB <sup>-</sup> プライマー	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'
TaqMan プローブ	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'

## 3.結果と考察

結果を図 2 に示す。未ろ過試料 (a)とろ過後試料(c)を比較すると、0.45 $\mu$ m の膜でろ過したにもかかわらず、全ウイルス粒子数には差は見られず、また感染性ウイルス数にも差は見られなかった。この結果は、0.45 $\mu$ m 以上のフロックがほとんど形成されていないことを意味している。さらに、ろ過の有無に関わらず高 pH 処理後の全ウイルス粒子数は 10<sup>10</sup>PFU/mL 程度であるのに対し、膜(e)によって抑止された凝集フロック中の全ウイルス粒子数は 10<sup>6</sup>PFU/mL 程度と極めて低かった。この結果も 0.45 $\mu$ m 以上のフロックがほとんど形成されていないという推測を支持することができる。

一方、高 pH 処理したろ過後試料の全ウイルス粒子数は高 pH 処理により増加した(c→d)。PCR 法ではフロック中に捕捉されたウイルス定量できないため、この試料中には 0.45 $\mu$ m 以下のマイクロフロックが存在していたことが示唆される。高 pH 接触に伴うマイクロフロックの溶解により、その中に捕捉されていたウイルスが定量できるようになったのであろう。また、高 pH 処理したろ過後試料(d)の感染性ウイルス数は全ウイルス粒子数より小さかった。この差は、凝集剤によるウイルスの不活化効果によるものではないかと考えている。ウイルス不活化の要因として、マイクロフロック、またはマイクロフロックが形成される過程においてウイルスを不活化させる働きがあるのではないかと考えている。さらに、ろ過に用いた膜の高 pH 処理後(e)の感染性ウイルス数も、全ウイルス粒子数より小さかった。このことから、フロック中でもウイルスの不活化がおきているのではないかと考えられる。

## 4.おわりに

本研究では、アルミニウム系凝集剤を用いたウイルス不活化実験を行い、以下の結果を得た。

1. PCR 法とブラック形成法を組み合わせることにより不活化されたウイルスを定量することができた。
2. それにより、フロック中のみならず、0.45 $\mu$ m 以下のマイクロフロック中でも不活化が進行したと考えられた。

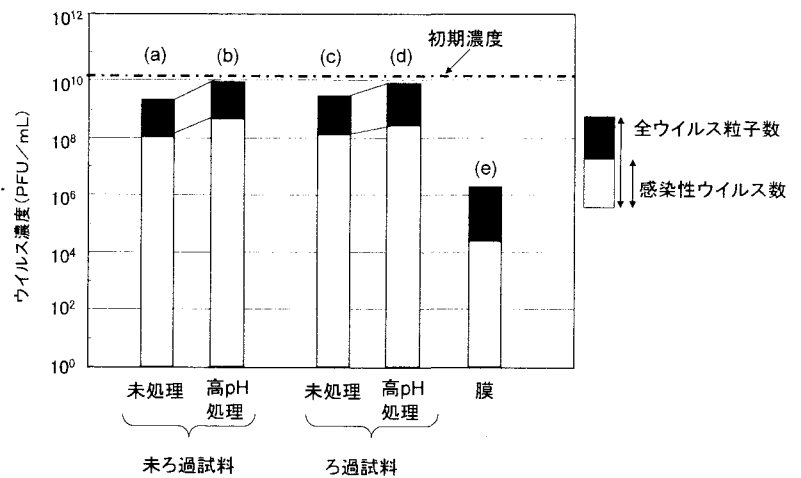


図2.ろ過の有無によるウイルス濃度の比較