

小児麻疹ウイルスの吸着除去を目的としたバイオポリマーの創造

東北大学工学部 学生員 ○加藤 聖
 正会員 福士謙介
 正会員 大村達夫

1. はじめに

一昨年のクリプトスポリジウムによる集団感染は社会的に大いに問題となった。既往の技術により適切に消毒された水からも病原ウイルスが検出されたという報告も多数なされており¹⁾、水環境中の病原微生物による感染リスクは我が国においても必ずしも低くないことが証明された。そのような中、都市における再利用水の使用が進む現状では安全な水を供給するために病原微生物の除去技術が確立されるべきである。

微生物の生成するバイオポリマー (BP) は様々な物質を吸着することで知られている。病原ウイルスは緩速砂濾過中の微生物が生成するポリマーマトリクスに捕獲されることが知られており、下水の消化汚泥中の固形成分には大部分の腸管系ウイルスが付着していることが報告されている。²⁾ このことはバイオポリマーが病原ウイルスを吸着する可能性を示唆している。

本研究では下水中の微生物が生成するバイオポリマーのウイルス吸着能を調べた。これは病原ウイルスをより多く吸着するバイオポリマーを生成する可能性を考慮したためである。なお本研究ではテストウイルスとしてワクチン株の弱毒小児麻疹ウイルス I 型 (Lsc, 2 ab 株) を使用した。また本研究でいうバイオポリマーとは微生物が産出する重合体を指している。

2. 実験方法

バイオポリマーを産出させる細菌としては、仙台市H浄化センターの一次処理水を用いた、普通ブイヨン培地 (栄研, E-MC35) にバイオポリマー産出を促す誘因物質として硝酸銀 5 mg / ℓ, ポリマー産出に必要なエネルギー補給のため ATP の前駆物質である β -glycerophosphate (SIGMA, G-6251) を 50 mg / ℓ 添加した培地を用いて採取した細菌を集積培養する²⁾。培養した細菌細胞を遠心分離し (670 g, 10 分, 10℃) 不溶性の沈殿部分を乾燥 (37℃恒温室) させ、滅菌 (110℃ オープン, 1 時間) した後、小児麻疹ウイ

ルスの入ったリン酸緩衝液、小児麻疹ウイルスの入ったリン酸緩衝液にバイオポリマーを添加したものをエッペンドルフチューブに作成する。これによりバイオポリマーを含まない実験系を Control と呼び、バイオポリマーを含む実験系を Test と呼ぶこととした。なお Test 内のバイオポリマー濃度は 2.0 g / ℓ である。

小児麻疹ウイルスは冷凍保存しており、ウイルス感染価 3.0×10^7 (PFU/ml) のものを本実験では 10^{-6} に希釈して Control, Test に添加した。温度 25℃, pH 7.0 の条件で Control, Test をウイルスを吸着させるため攪拌した後、10 分間静置し、その後、遠心機 (670 g, 10 分) にかけて吸着実験を行った。吸着実験の後、アフリカミドリザルの腎細胞 (BGM) を用いてブラック形成試験を行い、ウイルスの感染価を知ることによりウイルスの吸着能を (1) 式を用いて評価する。

バイオポリマーの吸着能 (PFU/g)

$$= \frac{(\text{Test1のPFU}) - (\text{Test2のPFU})}{\text{バイオポリマー濃度}} \quad (1)$$

3. 結果

前述の実験方法により得られた結果を表2に示す。

表2 バイオポリマーによるウイルス除去能力
 (但し バイオポリマー濃度は 2.0 g / ℓ である)

	初期濃度 (PFU/ml)	吸着後の濃度 (PFU/ml)
Control	19	23
Test	19	12

上記の結果からバイオポリマーを用いたことにより Test のブラック数は Control の 53.3% に減少した。(1) 式を用いたバイオポリマーウイルス吸着能は 5200 (PFU / g) となった。1PFU は感染力のあるウイルス量を示す単位であり、1PFU を示す試料はウイルスが数百個程度存在する³⁾ こと

からバイオポリマー 1 g あたり 52 万個以上の小児麻痺ウイルスを除去する能力があることが分かった。

4. 考察

上記の結果から活性汚泥と同様に¹⁾、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²⁾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²⁾、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^{3)~7)}。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⁷⁾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) Wallis C. *et al.*, Concentration and Purification of Viruses by Adsorption to and Elution from Insoluble Polyelectrolytes., *Appl. Environ. Microbiol.*, **21**, 703-709, (1971)
- (4) Farrah SR *et al.*, Elution of Poliovirus adsorbed to membrane filters., *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 982-984, (1978).
- (5) Murray JP *et al.*, Degradation of Poliovirus by Adsorption on Inorganic Surfaces., *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 480-486, (1979).
- (6) Moore RS *et al.*, Poliovirus Adsorbed by 34 Minerals and Soils., *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 963-975, (1981)
- (7) N.Kawabata *et al.* Removal of pathogenic human viruses by insoluble pyridinium-type resin. *Epidemiol. Infect.*, **105**, 633-642 (1990).