

(21) 消毒における水中RNAウイルスの損傷の検出

Detection of Damage on RNA Viruses Accompanied with Water Disinfection

中村みやこ* 片山浩之* 李錫憲** 大垣眞一郎*

NAKAMURA Miyako*, KATAYAMA Hiroyuki*, LEE Seockheon**, and OHGAKI Shinichiro*

Abstract; Disinfecting characteristics of viruses in water treatment with chlorine and TiO_2 photocatalyst were studied. RNA coliphage Q β and poliovirus type 1 were used as model viruses. Viral inactivation was measured using plaque assay technique. Two kinds of RT-PCR methods combined with the MPN method were used to determine viral RNA damage. The SDS-PAGE was applied to determine the degradation of viral protein molecules. According to RT-PCR values, the viral RNA was damaged with 0.9 mg Cl/l free chlorine but not significantly damaged with 0.3 mg Cl/l combined chlorine concentration. Though RT-PCR results for both of Q β and poliovirus showed no damage with a combined chlorine concentration of 0.3 mg Cl/l, according to plaque assay results, Q β was inactivated 1log in 20min. The results of SDS-PAGE showed that Q β protein molecules were degraded only with 400 mg Cl/l free chlorine concentration but not with 400 mg Cl/l combined chlorine concentration. By TiO_2 photocatalyst combined with UV irradiation, the results of RT-PCR for Q β showed 1log decrease in 3min, but showed no decrease even in 12min with UV irradiation alone.

Key words; chlorine, TiO_2 photocatalyst, RT-PCR, SDS-PAGE, RNA coliphage Q β , poliovirus

1. はじめに

近年、水の再利用など水資源の多様化が進んでおり、水処理消毒システムにおける病原性ウイルスの制御が必要になってきている。塩素消毒は我が国で最も広く行われている消毒法であるが、塩素によるウイルスの不活化については未解明な部分が多い¹⁾。残留塩素が生態系に与える影響や、トリハロメタンなどの消毒副生成物の問題から、様々な代替消毒手法の研究が盛んに行われている²⁾。代替消毒手法の一つであり、薬品添加を必要としない二酸化チタン光触媒消毒についても、ウイルスの不活化に関する研究例は少なく不明な点が多い。本研究では、塩素および二酸化チタン光触媒消毒が、ウイルスを構成する核酸およびタンパクに与える損傷を実験的に調べた。ウイルスと消毒剤の相互作用は、ウイルスの種類により異なると考えられるため³⁾、モデルウイルスとしてF特異大腸菌RNAファージQ β 、およびポリオウイルスワクチン株の2種類を用いた。消毒後のウイルス濃度をブラック法で、ウイルスRNA濃度をRT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction; 逆転写PCR)法で測定した。RT-PCR法は、試料希釈列の検出結果にMPN法(最確数法)を適用して最確数を得た。またウイルスを構成するタンパク分子の分子量を、SDS-PAGE(SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)で測定した。

* 東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻

(Department of Urban Engineering, Faculty of Engineering, The University of Tokyo)

** Department of Environmental Science and Engineering, College of Engineering,

Ewha Womans University, Korea

2. 実験方法

2.1 モデルウイルス

モデルウイルスにはF特異大腸菌RNAファージQ β 、およびワクチン由来のポリオウイルスI型弱毒株(Lsc, 2ab株)を用いた(表1)。Q β は、大きさが23nmの正二十面体であること、エンベロープをもたないこと、RNA一本鎖をゲノムとすることなど、水系感染性腸管系ウイルスの多く(特にピコルナウイルス科)と共通する性質を有している。また実験に際して安全であり、培養法による測定を短時間で容易に行うことができる。Q β 高濃度液は片山らの既報⁴⁾に従って調製した(約 10^{10} ~ 10^{11} PFU/ml)。ポリオウイルス高濃度液は、宿主にBGM細胞(アフリカミドリザルの腎細胞由来)を用い、他は矢野らの既報⁵⁾に従い、細胞維持液をリン酸緩衝食塩液に交換したものを調製した(約 10^7 PFU/ml)。

表1. 大腸菌ファージQ β とポリオウイルスの構造

	大腸菌ファージQ β ¹²⁾¹³⁾¹⁷⁾	ポリオウイルス ¹²⁾¹³⁾¹⁸⁾
ウイルス粒子の大きさ	直径23nm 分子量 4.2×10^6	直径27~28nm 分子量 $8 \sim 9 \times 10^6$
核酸	一本鎖RNA; 4217bp	一本鎖RNA; 約7500bp
外套タンパクの形態	正二十面体, エンベロープなし	正二十面体, エンベロープなし
外套を構成するタンパク質	1種類のタンパク質が、180個で外套を構成。タンパク分子量は約18000(アミノ酸残基数とアミノ酸平均分子量の積から推定)。	VP1,2,3,4の4種類のタンパク質が、1ウイルス粒子あたりそれぞれ60個存在し、計240個で外套を構成。ただしVP4は、粒子の内側にある。それぞれのタンパク分子量(Da)は、VP1=34000, VP2=30000, VP3=26000, VP4=7000である。
吸着部位(宿主レセプター認識部位)の数	1箇所	12箇所
宿主への感染方法	ウイルスは宿主細菌に吸着した後、みずからRNAを宿主内に送り込む。吸着部位には、吸着用の特殊タンパク(A2;約57000Daと推定)が1分子存在し、これはさらに溶菌作用も示す。ウイルスRNAはA2タンパクとともに宿主内に侵入する。A2タンパクのほかに、吸着およびウイルス粒子形成に関与するA1タンパク(約45000Daと推定)が、ウイルス内部に数分子含まれている。	宿主細胞にウイルスが吸着すると、宿主が能動的にウイルスを取り込む(動物ウイルスに共通の食作用)。

2.2 塩素消毒

(1) ブラック法とRT-PCR法に供するウイルス試料の塩素消毒

ファージQ β の消毒は、宿主菌(*E.coli* K12 F⁺(A/ λ))の培地を含むQ β 溶液を、次亜塩素酸ナトリウム水溶液が入った反応容器に入れ、よく接触させた。反応容器には、塩素消費物質を除去した250ml滅菌ねじ口ガラスビンまたは1.5ml滅菌ポリプロピレン製チューブを用いた。添加塩素濃度は、遊離塩素0.9mg Cl₂/lおよび遊離塩素0.4mg Cl₂/lである。また、10mg Cl₂/l次亜塩素酸ナトリウム水溶液100mlに2mgの塩化アンモニウムを添加して十分接触させ、結合塩素溶液(pH6.8)をつくり消毒を行った。この条件で生成する結合塩素は、ほぼ全てモノクロラミンである⁹⁾。

ポリオウイルスの消毒は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液が入った反応容器に、ポリオウイルス溶液と、Q β 消毒

における遊離・結合塩素の経時変化に合わせる目的で Q β の宿主菌培地を入れ、よく接触させた。反応容器には、塩素消費物質を除去した 250ml 滅菌ねじロガラスビンを用いた。添加塩素濃度は遊離塩素 0.9 mg Cl/I および遊離塩素 0.4 mg Cl/I である。

ウイルス消毒一定時間後、残留塩素濃度を DPD 法またはオルトトリジン法で測定した。また、残留塩素をチオ硫酸ナトリウムで中和後、ウイルス試料をブラック法および RT-PCR 法に供した。

(2) SDS-PAGE に供するウイルス試料の塩素消毒

モデルウイルスにはファージ Q β を用いた。検出感度の都合上、Q β 高濃度液を希釈せずに消毒実験に供した。Q β 溶液 100 μ l に、10000 mg Cl/I 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を 10 μ l または 200 μ l 加え約 40 分間接触させた。反応容器には、1.5ml 滅菌ポリプロピレン製チューブを用いた。残留塩素をチオ硫酸ナトリウムで中和後、ウイルス試料を SDS-PAGE に供した。

2.3 二酸化チタン光触媒消毒

滅菌 Milli-Q 水 30ml と粉末二酸化チタン光触媒(Degussa 製 P25)1000mg/l の入った滅菌ガラスシャーレにウイルス溶液を入れ、波長 254nm 低圧紫外線ランプを光源としてマグネチックスターラーでよく攪拌しながら消毒を行った。反応液の水深は約 1cm、反応液面の紫外線線量率は 0.4mW/cm² である。消毒後の二酸化チタンを含む試料を遠心分離し (10,000g 10 分 4℃)、上澄みを各試験に供した。なお、遠心分離によるウイルスの不活化や収率の低下は起こらないことを確認した。また対照実験として、二酸化チタンを加えない紫外線のための消毒を行った。

2.4 ブラック法

ファージ Q β 濃度のブラック法による測定には、宿主菌に *E.coli* K12 F⁺ (A/ λ)を用いた。基本的には片山らの既報⁴⁾と同じ方法(ウイルス試料 0.1ml および 1ml の場合)により、重層寒天法で行った。Q β 濃度が低いときは 10ml の試料を用い、上層寒天培地と成分比率は同じで 2 倍濃度の寒天培地を 10ml 調製し、単層寒天法で測定した。

ポリオウイルス濃度のブラック法による測定は、宿主に BGM 細胞を用い、衛生試験法⁷⁾に従った。

2.5 RT-PCR 法

(1) Q β RNA 濃度の測定

本実験では 2 種類の RT-PCR 法を行った(図 1)。1 つは、Q β RNA(ssRNA=4217bp)を特異的かつ高感度で検出することを目的としたもので、これを normal RT-PCR 法と呼ぶ。もう 1 つは逆転写領域が通常の約 10 倍の長さ(1909bp)のもので、これを long RT-short PCR 法と呼ぶ。long RT-short PCR 法は normal RT-PCR 法と比較して検出感度がやや低いものの、RNA の長い領域の損傷を調べることができる⁴⁾。

各 RT-PCR 法において、試料はすべて 0.5ml マイクロチューブ中で反応に供した。温度制御には Thermal Cycler model PJ2000 (Perkin Elmer 社製)を用いた。

1) プライマー

プライマーは片山らの既報⁴⁾と同じものを使用した。各 RT-PCR 法で用いたプライマーは、Q β RNA 複製酵素をコードしている領域の 3'末端近傍(normal RT-PCR)または 5'末端近傍(long RT-short PCR 法)を増幅する。この Q β RNA 複製酵素は、F 特異 RNA 大腸菌ファージのグループ III に特異的である⁸⁾。normal RT-PCR では 1stPCR

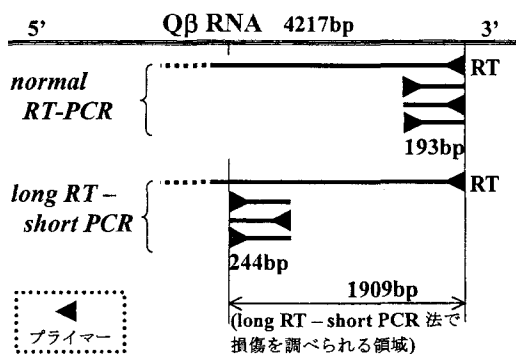


図 1. Q β RNA 検出に用いた 2 種類の RT-PCR 法

で 193bp、2ndPCR でその内側の 102bp を増幅する。long RT – short PCR 法では 1stPCR で 244bp、2ndPCR で 141bp を増幅する。

2) RNA 抽出法

0.5ml マイクロチューブにウイルス試料 100 μ l をとり、90℃10 分間の直接加熱法で RNA を抽出した。

3) 逆転写反応

ウイルス RNA 試料 3 μ l を 17 μ l の逆転写反応液に加え、その上を約 40 μ l のミネラルオイルで覆い、42℃30 分で逆転写反応を行った後、99℃で 5 分間加熱した。逆転写反応液の組成（ウイルス RNA 試料 3 μ l を含む総量 20 μ l 中）を以下に示す。

10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 5.25mM MgCl₂, 1.0mM dNTPs, 1.0 μ M primer – および 0.375U/ μ l AMV Reverse Transcriptase XL

4) 1stPCR 反応

逆転写反応後のそれぞれのチューブに、PCR 反応液 80 μ l を加え 1stPCR を行った。反応温度は、95℃で 2.5 分維持した後、95℃30 秒、50℃30 秒、72℃30 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル行ない、さらに 72℃で 7 分維持した後に 4℃で保存した。1stPCR 反応液の組成（逆転写反応後の試料 20 μ l を含む総量 100 μ l 中）を以下に示す。

9.5mM Tris-HCl (pH 8.3), 47.5mM KCl, 2.175mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.2 μ M primer –, 0.2 μ M primer + および 0.025U/ μ l Taq polymerase

5) 2ndPCR 反応

Q β RNA の検出感度を高めるため、1stPCR 反応につづき 2ndPCR 反応を行った。新しいマイクロチューブに、2ndPCR 反応液を 50 μ l ずつ分注した。それぞれのチューブに 1stPCR 反応後の試料を 5 μ l ずつ入れ、その上を約 30 μ l のミネラルオイルで覆い、1stPCR 反応と同じ温度条件で 2ndPCR を行った。ただしサイクル数は 25 である。2ndPCR 反応液の組成（1stPCR 反応後の試料 5 μ l を含む総量 55 μ l 中）を以下に示す。

8.7mM Tris-HCl (pH 8.3), 43.6mM KCl, 1.27mM MgCl₂, 0.14mM dNTPs, 0.36 μ M primer –, 0.36 μ M primer + および 0.018U/ μ l Taq polymerase

6) 増幅産物の検出および定量化

PCR 反応産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色と紫外線照射により Q β RNA を検出した。試料希釈列の検出結果に、MPN 法⁹⁾（10 倍希釈 3 段階 5 本法）を適用して最確数を得た。

(2) ポリオウイルス RNA 濃度の測定

1) プライマー

プライマーは Jaykus らの既報¹⁰⁾ と同じものを用いた。このプライマーはエンテロウイルスに共通であり、5'末端付近の NCR(Non Coded Region)の一部を増幅する。ポリオウイルス 1 型に用いた場合の増幅産物の長さは 197bp である。

2) RNA 抽出

0.5ml マイクロチューブにウイルス試料 100 μ l をとり、99℃5 分間の条件で直接加熱法で RNA を抽出した。

3) 逆転写反応

ウイルス RNA 試料 1 μ l を 9 μ l の逆転写反応液に加え、42℃60 分で逆転写反応を行ったあと 95℃で 5 分間加熱した。逆転写反応およびこれに続く PCR 反応の温度制御には GeneAmp PCR system model 9600 (Perkin Elmer 社製)を用い、96 穴プレート(容量 0.2ml/tube)中で反応に供した。逆転写反応液は TaqMan Reverse Transcription Reagents (Perkin Elmer 社, No. N808-0234)を用いて、以下の組成（ウイルス RNA 試料 1 μ l を含む総量 10 μ l 中）になるように調製した。

1X TaqMan RT-Buffer, 5.5mM MgCl₂, 0.5mM dNTPs, 0.5 μ M primer –, 0.4U/ μ l RNase Inhibitor および 1.25U/ μ l MultiScribe Reverse Transcriptase

4) PCR 反応

逆転写反応後のそれぞれのチューブに、PCR 反応液 40 μ l を加え PCR 反応を行った。反応温度は、95°C 10 分のあと、95°C 1 分、55°C 1 分、72°C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクルの温度変化を与え、続いて 72°C で 6.5 分間維持した後に 4°C で保存した。PCR 反応液は TaqMan PCR Core Reagent Kit (Perkin Elmer 社, No. N808-0228) を用いて、以下の組成（逆転写反応後の試料 10 μ l を含む総量 50 μ l 中）になるように調製した。

1X TaqMan Buffer A, 5.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.2 μ M primer-, 0.2 μ M primer+ および 0.025U/ μ l AmpliTaq Gold DNA Polymerase

5) 増幅産物の検出および定量化

PCR 反応産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、エチジウムブロマイド染色と紫外線照射によりポリオウイルス RNA を検出した。試料希釈列の検出結果に、MPN 法⁹⁾（10 倍希釈 3 段階 3 本法）を適用して最確数を得た。

2.6 SDS-PAGE

1) 試料の調製

ウイルス試料を 0.5ml マイクロチューブに入れ、4 倍量のサンプルバッファーを加えてサーマルサイクラーで 95°C 5 分加熱し、タンパクを還元して分子レベルまで分解した。サンプルバッファーの組成は、62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 12.5%W/V glycerin, 2.0%W/V SDS, 5%V/V 2-Mercaptoethanol である。

2) 電気泳動

泳動槽に泳動バッファーを注ぎ、総モノマー濃度 15%のミニブレイカストゲル(BIO-RAD 社)に 1)の試料を 45 μ l ずつ供し、200V で 35 分間泳動を行った。泳動バッファーの組成は、25mM Tris (pH8.3), 0.192M Glycine, 0.1%W/V SDS である。

3) ゲルの染色および撮影

タンパク染色蛍光試薬には SYPRO Orange (Molecular Probes 社)を用い、紫外線を照射して FluorImager 595 (Molecular Dynamics 社製)で画像撮影を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 塩素消毒におけるウイルスの不活化と核酸の損傷の測定

(1) Q β の不活化と核酸の損傷の測定結果

Q β の塩素消毒を行い、Q β 濃度をブラック法で、RNA 濃度を normal RT-PCR 法および long RT – short PCR 法で測定した。結果を図 2,3,4,5,6 に示す。

添加遊離塩素濃度 0.9mg Cl₂/l の消毒では、遊離塩素濃度は接触開始 0.5 分間で 0.5mg Cl₂/l 低下し（図 2 の▲印）、同時に結合塩素が 0.45mg Cl₂/l 生成した（□印）。接触開始時に消費された遊離塩素のほとんどは、宿主菌培地との反応により結合塩素に変化したと考えられる。接触終了時(60 分後)の遊離塩素濃度は 0.05mg Cl₂/l、結合塩素濃度は 0.3mg Cl₂/l であった。消毒の進行に伴う総残留塩素濃度の低下は、主に遊離塩素が宿主菌培地と反応して消費され、塩素イオンに変化したことによると考えられる。Q β 生残数は接触 1 分間で 4log 減少し(図 3 の×印 ブラック法)、normal RT-PCR 法による Q β RNA 濃度測定値は 30 分間で 3log、60 分間で 4log 減少した(○印)。添加遊離塩素濃度 0.4 mg Cl₂/l のとき、遊離塩素は接触開始 1 分間でほぼ消費され、同時に結合塩素が 0.35mg Cl₂/l 生成した(図 4)。結合塩素は接触終了時(60 分後)も 0.25mg Cl₂/l 残存した。結合塩素の反応性は低いため、消毒の進行に伴う結合塩素濃度の低下が小さかったと考えられる。Q β 生残数は接触 1 分間で 1.5log、30 分間で 7log 減少した(図 5 の×印)。一方、normal RT-PCR 法（図 5 の○印）および long RT – short PCR 法（●印）による RNA 濃度測定値の減少は MPN 値の 95%信頼区間内であり、有意差は認められなかった。

図6の結合塩素消毒において、添加結合塩素濃度は9.6 mg Cl/l、接触終了時の240分後は8.9 mg Cl/lであった。Q β 生残数は180分で7log減少した。一方、normal RT-PCR法測定値は接触終了時まで変化せず、減少しなかった。

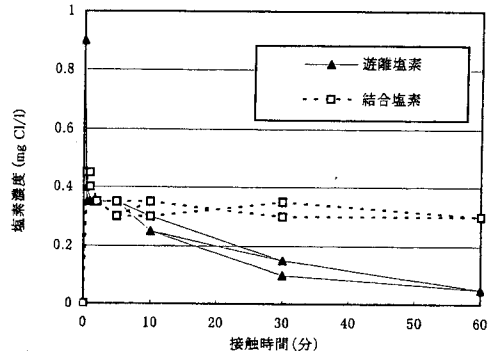


図2 塩素濃度測定結果 (遊離塩素0.9mg Cl/l添加の系)

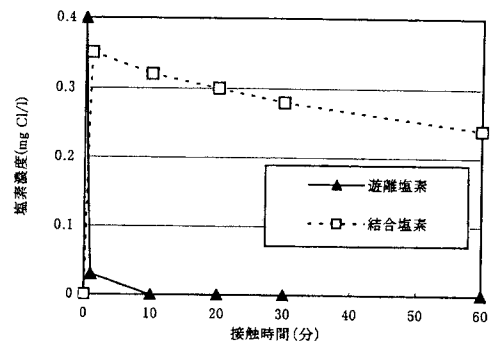


図4 塩素濃度測定結果 (遊離塩素0.4mg Cl/l添加の系)

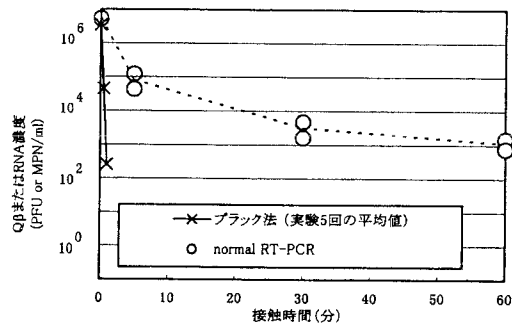


図3 Q β およびRNA濃度測定結果 (遊離塩素0.9mg Cl/l添加の系)

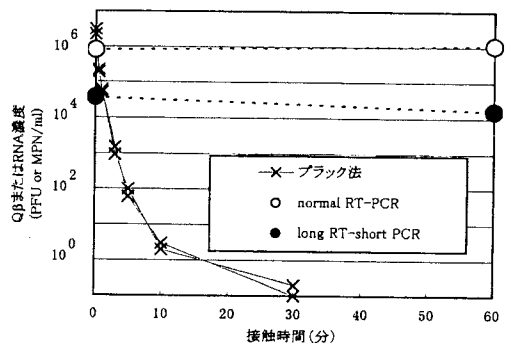


図5 Q β およびRNA濃度測定結果 (遊離塩素0.4mg Cl/l添加の系)

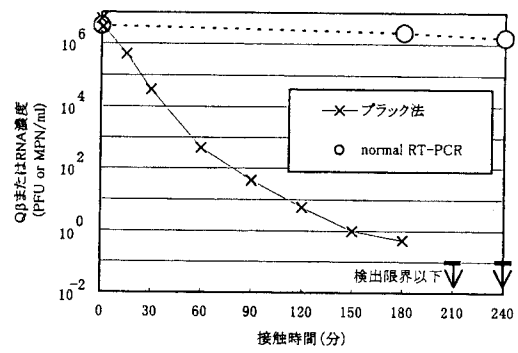


図6 Q β およびRNA濃度測定結果 (結合塩素9.6mg Cl/l添加の系、終了時実測値8.9mg Cl/l)

(2) ポリオウイルスの不活化と核酸の損傷の測定結果

ポリオウイルスの塩素消毒を行い、ウイルス濃度をブラック法で、RNA 濃度を RT-PCR 法で測定した。結果を図 7,8,9,10 に示す。

塩素の消費速度が図 2,図 4 と合うように設定するため、Q β の宿主菌培地を加えてポリオウイルスの消毒を行った。その結果を図 7 と図 9 に示す。Q β とポリオウイルスの塩素消毒における、遊離塩素 (▲印) および結合塩素 (□印) の経時変化は、概ね同じであることがわかる。つまりポリオの消毒条件を、Q β の消毒条件とほぼ同じに設定できたと言える。添加遊離塩素濃度 0.9 mg Cl/l の消毒では、ほぼ接触終了時まで遊離塩素が残存した(図 7)。添加遊離塩素濃度 0.4 mg Cl/l のとき、遊離塩素は接触開始 1 分後にほぼ消費され、結合塩素だけが残存した(図 9)。

添加遊離塩素濃度 0.9 mg Cl/l の消毒では、ポリオウイルス生残数は、接触 1 分間で 4log 減少し(図 8 の×印 ブラック法)、RT-PCR 法測定値は 30 分間で 2.5log 減少した(○印)。添加遊離塩素濃度 0.4 mg Cl/l の消毒では、ウイルス生残数は接触 1 分間で 2log 減少したが、その後の結合塩素だけが残存する状態では生残数はほとんど減少しなかった (図 10)。また RT-PCR 法測定値は接触終了時まで変化せず、減少しなかった。

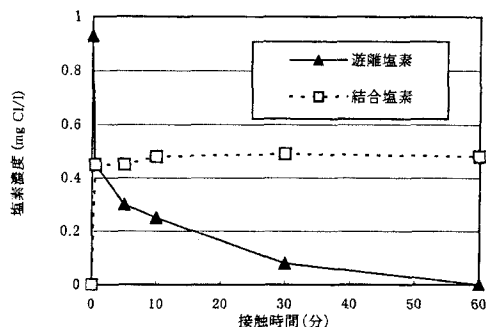


図7 塩素濃度測定結果
(遊離塩素0.9mg Cl/l添加の系)

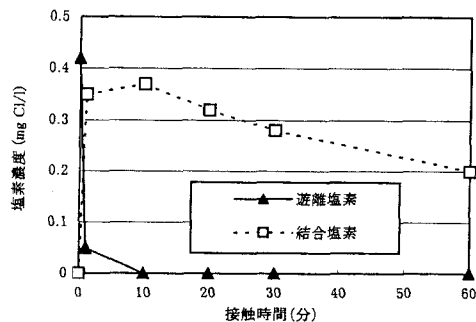


図9 塩素濃度測定結果
(遊離塩素0.4mg Cl/l添加の系)

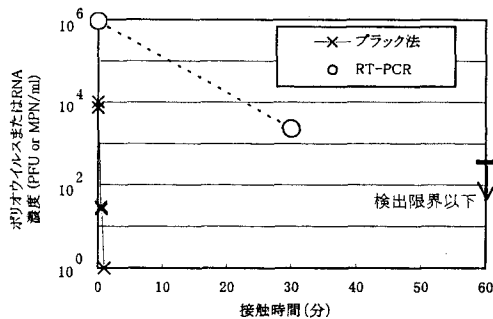


図8 ポリオウイルスおよびRNA濃度
測定結果 (遊離塩素0.9mg Cl/l添加の系)

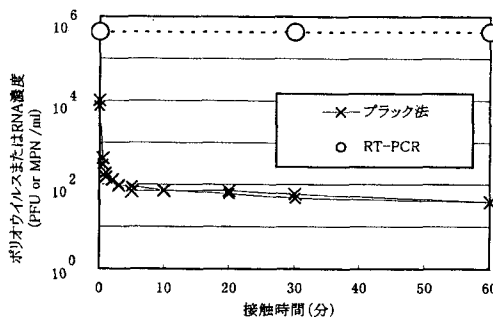


図10 ポリオウイルスおよびRNA濃度
測定結果 (遊離塩素0.4mg Cl/l添加の系)

(3) Q β とポリオウイルスの不活化特性

Q β の塩素消毒において、結合塩素は Q β を不活化することを確認した (図 5 および図 6 の×印 ブラック法)。一方、結合塩素が RNA に与える損傷は、逆転写領域の長い RT-PCR 法を用いても検出できないほど少ないことがわかった (図 5 の●印 long RT - short PCR)。また、図 2 と図 4 の結合塩素濃度 (□印) はほぼ同じであることから、図 3 の RT-PCR 法測定値 (○印) の減少は酸化力の強い遊離塩素 (図 2 の▲印) の効果だと考えられ、Q β の RNA は遊離塩素により損傷を受けることがわかった。

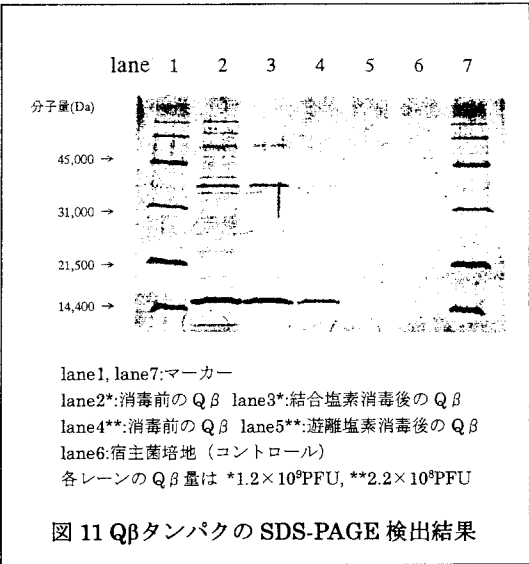
ポリオウイルスの塩素消毒において、結合塩素はポリオウイルスを不活化しにくく（図 10 の×印）、RNA にも損傷を与えにくいことが示された（○印）。一方、図 7 と図 9 の結合塩素濃度はほぼ同じであることから、図 8 の RT-PCR 法測定値の減少は遊離塩素の効果だと考えられ、ポリオウイルス RNA は遊離塩素により損傷を受けることがわかった。また図 8 および図 10 で、消毒開始時（接触 0 分）のポリオウイルスのブラック法測定値は RT-PCR 測定値より 2log 程度低いことから、ポリオウイルスは反応液中で凝集していることが示唆された。

添加遊離塩素濃度 0.9 mg ClI のとき、Q β （図 3）およびポリオウイルス（図 8）共に、ウイルス生残数は接触 1 分間で 4log 程度、RT-PCR 測定値は接触 30 分で 3log 程度減少し、同様の傾向を示した。添加塩素濃度 0.4 mg ClI の場合は、RT-PCR 測定値はどちらのウイルスも接触終了時まで変化せず減少しなかった（図 5、図 10）。しかしウイルス生残数については、結合塩素のみが存在する状態で Q β は減少したが（図 5）、ポリオウイルスは減少しなかった（図 10）。ポリオウイルスは Q β に比べ、結合塩素で不活化しにくいことが示された。その理由として、前述のようにポリオウイルスは反応液中で凝集化し、内部のウイルスが保護されて不活化への抵抗を示したことが考えられる。

塩素消毒によるウイルスの不活化は、核酸の損傷が原因とする説がある¹¹⁾。しかし Q β の結合塩素消毒においては、生残数は減少しても（図 5 および図 6 の×印）RT-PCR 測定値は減少せず（○および●印）、RNA は損傷を受けにくいことが実験で明らかになった。また、Q β の複製には少数の特殊なタンパクが関与していることや、外套タンパク上の宿主レセプター認識部位が 1 つしかないことなどから¹²⁾¹³⁾、結合塩素による Q β の不活化はタンパクの損傷が原因である可能性も否定できない。

3.2 SDS-PAGE による塩素消毒におけるウイルスタンパクの損傷の検出

ファージ Q β の塩素消毒を行い、Q β を構成するタンパク分子を SDS-PAGE で検出した。消毒開始時の塩素濃度は、遊離塩素 400 mg ClI（結合塩素 1100 mg ClI を含む）および結合塩素 400 mg ClI であった。図 11 に SDS-PAGE の結果を示す。消毒前の Q β 試料では、Q β を構成する 3 種類のタンパク分子のうち、Coat-protein（推定分子量 18,000Da）および A1-protein（推定分子量 45,000Da）と考えられるバンドを検出することができた（lane 2）。その他の薄いバンドは、宿主菌 *E.coli* K12 由来と考えられる。遊離塩素 400 mg ClI による消毒では Coat-protein のバンドが消えており、Coat-protein 分子が分解したことがわかった（lane 4 と lane 5 の比較）。一方、結合塩素 400 mg ClI による消毒では、消毒前後で Q β タンパクのバンドパターンは変化しなかった（lane 2 と lane 3 の比較）。結合塩素消毒では、ウイルスは十分に不活化していても、ウイルスを構成するタンパク分子は一次構造が壊れるような損傷を受けにくいことが示された。



3.3 二酸化チタン光触媒消毒におけるウイルスの不活化と核酸の損傷の測定

ファージ Q β の二酸化チタン光触媒消毒を行い、Q β 濃度をブラック法で、RNA 濃度を normal RT-PCR 法で測定した。対照実験の紫外線のみ系の測定結果を図 12 に、二酸化チタンを加えた系の測定結果を図 13 に示す。

紫外線のみでは、 $Q\beta$ 生残数は紫外線照射 2 分間で 2log 減少した (図 12 の×印 ブラック法)。また、RT-PCR 法測定値は 12 分間でも減少しなかった (図 12 の○印)。一方、二酸化チタン光触媒消毒では、 $Q\beta$ 生残数は紫外線照射 2 分間で 3.5log 減少し、紫外線の場合より不活化速度が速いことがわかった (図 13 の×印)。さらに、RT-PCR 法測定値も 3 分間で 1log の減少が認められた (図 13 の○印)。

紫外線による微生物の不活化は、核酸の塩基が二量体を形成することにより生じると考えられている²⁾。しかし RNA ウィルスに紫外線を照射し、ウラシルダイマー等の二量体が形成されても、RT-PCR 法の逆転写反応はそこで停止せず、ウィルス RNA を陽性として検出するという報告がある⁴⁾。今回の実験でもこれと同じ結果が得られた (図 12 の○印)。一方光触媒のもつ酸化力は、主に OH ラジカルや活性酸素種によるものだといわれている¹⁴⁾。同じく OH ラジカルや活性酸素種が関与するオゾン消毒では、ウィルスの核酸が断片化されるという報告もある¹⁵⁾。RT-PCR 法測定結果の比較から (図 12 および図 13 の○印)、紫外線を光源とした二酸化チタン光触媒消毒は、二量体の形成のみではなく、RT-PCR 法の逆転写反応ができなくなるような損傷をウィルス RNA に与えることがわかった。

今回の実験結果から、光触媒は新たな消毒法としての可能性をもつ。例えば、細菌を紫外線消毒した後に可視光を照射すると、細菌のもつ光回復酵素の働きでピリミジン二量体が修復され、核酸が蘇生して細菌が光回復する²⁾¹⁶⁾。この細菌の光回復を防ぐ消毒法として、光触媒を利用することも期待できる。

3.4 各消毒実験結果のまとめ

本研究で行った各消毒実験の結果を表 2 にまとめた。○印は損傷が認められたことを、×印は認められなかったことを示す。○印の下に数字は、ウィルスまたは RNA 濃度測定値の消毒 1 分あたりの減少を示し、 $(\log N_1/N_0)/T$ で求めた。T は算定する期間 (消毒を開始してから最初の測定を行うまでの期間) [分]、 N_0 ははじめの濃度、 N_1 は T 分後の濃度である。ただし、結合塩素 9.6mg Cl/l の消毒は塩素濃度の経時変化が小さいため、算定期間を長くすることによって誤差を小さくすることができるので、ウィルスが一次反応的に不活化している 60 分間を算定期間とした。表中の結合塩素 0.35 mg Cl/l とは、添加遊離塩素濃度 0.4 mg Cl/l の消毒における接触開始 10 分後 (遊離塩素が残存しないことを確認した時間) の結合塩素濃度であり、この時点をおよ 0.35 mg Cl/l 結合塩素消毒開始時とし、20 分間を算定期間とした。それぞれの消毒手法により $Q\beta$ とポリオウィルスが受ける損傷についての考察は、3.1, 3.2, 3.3 に示した通りである。

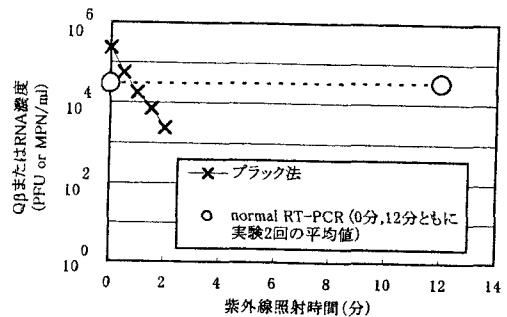


図12 紫外線消毒における $Q\beta$ および RNA 濃度測定結果

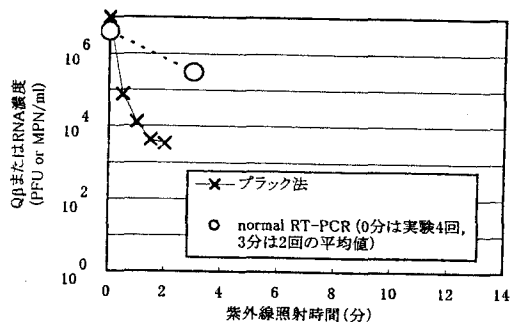


図13 光触媒消毒における $Q\beta$ および RNA 濃度測定結果

表 2 各消毒手法によりウイルスが受ける損傷の比較

			Q β			ポリオ	
			不活化	RNA の 損傷	タンパ ク分子 の損傷	不活化	RNA の 損傷
塩素消毒	遊離塩素	0.4 mg Cl/I	○ -2.2log	×		○ -2.8log	×
		0.9 mg Cl/I	○ -3.8log	○ ^{*2} -0.11log		○ -5.0log	○ -0.09log
		400 mg Cl/I			○		
	結合塩素	0.35 mg Cl/I ^{*1}	○ -0.06log	×		×	×
		9.6 mg Cl/I	○ -0.07log	×			
		400 mg Cl/I			×		
二酸化チ タン光触 媒消毒	紫外線のみ		○ -1.3log	×			
	紫外線+光触媒		○ -4.2log	○ -0.37log			

○：損傷が認められた。数字は消毒 1 分あたりの測定値減少を示す。

×：損傷は認められない（ブラック法、RT-PCR 法測定値の減少が-0.01log 未満）。

なお、ウイルス不活化はブラック法で、RNA の損傷は(normal)RT-PCR 法で、タンパク分子の損傷は SDS-PAGE で検出した。

*1 添加遊離塩素濃度 0.4 mg Cl/I の消毒における、接触開始 10 分後（遊離塩素が残存しないことを確認した時間）の結合塩素濃度。

*2 ポリオウイルスとの比較のため、消毒 30 分のデータから算出した。

3.5 ウイルス RNA の損傷評価手法としての RT-PCR 法

Q β およびポリオウイルスの遊離塩素消毒において、0.4 mg Cl/I では RT-PCR の測定値は減少せず（図 5 および図 10 の○印と●印）、0.9 mg Cl/I では減少した（図 3 および図 8 の○印）。また、紫外線のみによる Q β の消毒では RT-PCR 測定値は減少せず（図 12 の○印）、二酸化チタン光触媒を加えると減少した（図 13 の○印）。このことから、RT-PCR 法はウイルス RNA の損傷の程度や機構を調べる手法として有効であることが明らかになった。

4. 結論

- (1) RT-PCR の測定結果より、遊離塩素はウイルスの RNA に損傷を与えるが、結合塩素は損傷を与えにくいことがわかった。またブラック法測定結果から、Q β はポリオウイルスに比べ結合塩素で不活化しやすいことがわかった。
- (2) SDS-PAGE の結果より、Q β のタンパク分子の一次構造は遊離塩素で分解するが、結合塩素では分解しにくいことを示した。
- (3) 紫外線を光源とした二酸化チタン光触媒消毒では、紫外線単独の場合と異なり、Q β の RNA は RT-PCR 法の逆転写反応ができなくなるような損傷を受けることがわかった。
- (4) 塩素消毒および二酸化チタン光触媒消毒の結果より、RT-PCR 法は、ウイルスの RNA が受ける損傷の機構や程度を調べるための有効な手法であることを明らかにした。

謝辞

本研究を行うにあたり、東京都立衛生研究所水質研究科の矢野一好博士には多大なる御協力をいただきました。

ここに謝意を表します。

なお、「3.3 二酸化チタン光触媒消毒におけるウイルスの不活化と核酸の損傷の測定」は、李ら¹⁹⁾が既に論文として発表している。また、既報(文献 19))には一部の図に誤りがあり(RT-PCR 測定値)、本論文では訂正後のデータ(図 12, 図 13)を掲載した。

参考文献

- 1) Thurman R. B. and Gerba C. P.; Molecular Mechanisms of Viral Inactivation by Water Disinfectants; *Advances in Applied Microbiology*, Vol.33 pp75-105, 1988
- 2) 神子直之; 特集/塩素代替消毒技術の現状と今後の課題 — 塩素代替消毒技術の必要性と今後の課題; 水環境学会誌 Vol.21 No.9 pp566-570, 1998
- 3) Harakeh M., and Butler M.; Inactivation of Human Rotavirus, SA11 and Other Enteric Viruses in Effluent by Disinfectants; *J. Hyg.*, 93, pp157-163, 1984
- 4) 片山浩之, 大瀧雅寛, 大垣眞一郎; UV 照射により不活化された RNA フェージの RT-PCR 法による定量; 土木学会 環境工学研究論文集, 第 34 巻 pp83-92, 1997
- 5) 矢野一好, 藪内清, 田口文章; 下水中のウイルスの消長とその不活化に関する研究 第 3 報 塩素によるポリオウイルスの不活化; 用水と廃水, Vol.27 No.7 pp45-50, 1985
- 6) 日本水道協会編; 上水試験方法 解説編, p259, 1993
- 7) 日本薬学会編; 衛生試験法・注解(追補), 4.1.1.6 ウイルス試験; 金原出版, 1995
- 8) Denteravanich S.; Application of Polymerase Chain Reaction for Health-Related Viral Indicators Detection in Wastewater; Doctoral dissertation, The Univ. of Tokyo, Tokyo, Japan, 1992
- 9) 日本水道協会; 上水試験方法, VII-7 微生物数の算出と結果の記載方法; 1993
- 10) Jaykus L., Leo R., and Sobbsy M. D.; A Viron Concentration Method for Detection of Human Enteric Viruses in Oysters by PCR and Oligoprobe Hybridization; *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.62 pp2074-2080, 1996
- 11) 河村 清史; 特集/水の消毒, その動向 — 塩素による消毒; 用水と廃水, Vol.32 No.4 pp298-306, 1990
- 12) 植竹久雄編; ウイルス学 第 4 版; 理工学社, 1992
- 13) 石浜明, 永井美之, 藤永蕙, 三浦謹一郎 編; 生命科学を推進する 分子ウイルス学; 共立出版, 1995
- 14) 渡部俊也; 特集/生活に身近な触媒 — 光触媒反応による微生物の殺菌とその応用; 化学工業, 1995 年 12 月号 pp978-982, 1995
- 15) Roy D., Wong P. K. Y., Engelbrecht R. S., and Chian E. S. K.; Mechanism of Enteroviral Inactivation by Ozone; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.41 No.3 pp718-723, 1981
- 16) Kelner A.; Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated Escherichia Coli, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation; *Journal of Bacteriology*, Vol.58 pp511-522, 1949
- 17) 神子直之, 大垣眞一郎; 環境微生物工学研究法 — ウイルス不活化手法の大腸菌フェージによる評価; 技報堂出版 土木学会編, pp233-236, 1993
- 18) 日本微生物協会編; 微生物学辞典; 技報堂出版, 1992
- 19) Lee S., Nakamura M., and Ohgaki S.; Inactivation of Phage Q β by 254nm UV Light and Titanium Dioxide Photocatalyst; *Journal of Environmental Science and Health, Part A* Vol.33 No.8 pp1643-1655, 1998