

(50) ウイルスのアルミニウム系凝集剤への不可逆的吸着

Irreversible adhesion of virus particles to polyaluminum species generated during coagulation

松下 拓*, 小塚信幸*, 中務 誠*, 角田裕樹*, 松井佳彦**
Taku MATSUSHITA*, Nobuyuki KOZUKA*, Makoto NAKATSUKASA*,
Yuki TSUNODA*, Yoshihiko MATSUI**

ABSTRACT; In order to investigate the change in the infectivity of virus (bacteriophage Q β) after dosing of polyaluminum coagulant (PACl), virus concentrations were measured by plaque forming unit (PFU) method and polymerase chain reaction (PCR) method after dissolving aluminum floc which had been formed during coagulation process and would have adsorbed/entrapped virus. The drop of infectious virus concentration after coagulation could not be explained by simple aggregation of infectious virus particles alone, suggesting that the loss of infectivity of virus caused by the PACl could partly account for the drop. The irreversible adhesion of virus to the polyaluminum species was enhanced by adding NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ to the virus containing water before dosing PACl, while it was reduced by adding NaHCO₃. The addition of NaCl, MgCl₂ and CaCl₂ decreased the surface charge of the virus so that they might decrease the irreversible adhesion. NaHCO₃ increased the surface charge of the virus, and this might decrease the irreversible adhesion.

KEYWORDS; Coagulation; Inactivation; Virus; Aluminum coagulant; Polymerase chain reaction (PCR).

1. はじめに

金属塩凝集剤の添加による凝集処理は、自重沈降できない微小な粒子やコロイド成分の除去に広く用いられている。負に帯電して水中で安定に懸濁している微粒子は、凝集剤の添加によりその表面電位が中和され、自重沈降可能なサイズへと凝集粗大化して沈殿除去される。ウイルスもこのような微小粒子に含まれ、凝集処理による除去が期待される。アルミニウム系凝集剤などの無機凝集剤が水に添加されると、正に帯電した様々な中間ポリマーが生成され、これらのポリマーが粒子の荷電中和に大きく寄与する。凝集処理過程において、ウイルスはこれらのポリマーへと吸着され、最終的に形成されるアルミニウムフロックへと取り込まれることにより除去されると考えられる。

我々の研究グループは、アルミニウム系凝集剤を用いたウイルスの処理性について実験を行い、以下を報告している¹⁾。(1) アルミニウム系凝集剤の添加により生成されるアルミニウムフロック中にウイルスが捕捉され、水相のウイルス濃度が減少した。(2) 生成されたアルミニウムフロックを溶解し、フロック中に捕捉されたウイルスも含めて定量したにも関わらず、ウイルス濃度は凝集処理前の濃度まで回復しなかった。(3) これより、アルミニウム系凝集剤にウイルス不活化作用があるのではないかと考察した。ところが、上記の研究にてウイルス濃度の測定に用いられたブラック形成法 (PFU 法) では、いくつかのウイルス粒子が集まって形成される凝集塊が1つのブラックを形成する場合があります、その際、実際のウイルス数に対して PFU

*岐阜大学工学部社会基盤工学科 (Department of Civil Engineering, Gifu University)

**北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (Division of Built Environment, Hokkaido University)

法での測定値が小さく評価される可能性が指摘されている²⁾。よって、ここで示されたウイルス濃度の低下が、このような凝集塊形成により生じた可能性が考えられた。

そこで本研究では、凝集剤によるウイルス濃度の低下が凝集塊形成によるものか否かを判断することを目的とし、パッチ式の凝集処理実験を行った。また、凝集剤添加によるウイルス濃度の低下に及ぼす無機塩類の影響についても調べた。

2. 実験方法

2.1 用いたウイルス

本研究ではウイルスとして大腸菌ファージ Q β (NBRC 20012) を用いた。Q β は直径約23 nm であり、遺伝子として1本鎖 RNA を持つウイルスである。本研究では、宿主として *Escherichia coli* F⁺ (NBRC 13965) を用いて Q β を実験直前に増殖させ、直ちに遠心分離式精製キット (セントリプラス-100, 分画分子量100,000, ミリポア製) により精製し、実験に用いた。

2.2 凝集処理実験

500 mL ビーカーに Milli-Q 水を500 mL 入れた。無機塩がウイルス凝集に与える影響を調べた実験時には、ここに無機イオン (NaHCO₃, NaCl, CaCl₂, MgCl₂) を添加した。そこに精製後の Q β を10⁶~10⁷ pfu/mL もしくは10¹⁰ pfu/mL 程度になるように添加し、ウイルス初期濃度を測定した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (PACl, 塩基度 62.5%, 住友化学製) を1 mg-AI/L あるいは10 mg-AI/L になるように添加し、直ちに水酸化ナトリウムにて pH を7.0に調整した。これを、パドル式攪拌装置にて110 rpm (G 値 194 s⁻¹) で2分間急速攪拌し、その後27 rpm (G 値 23 s⁻¹) で28分間緩速攪拌し、凝集処理を行った。処理時間終了後に、攪拌を継続しつつビーカーの中央部より試料を駒込ピペットにて20~30mL 採取し、ウイルス濃度を測定した。

2.3 アルミニウムフロックの溶解法 (高 pH 処理)

凝集処理後の試料には、凝集処理で生じたアルミニウムフロックが含まれている。これらのフロックにはウイルス粒子が取り込まれており、このままの状態ではフロック中に取り込まれたウイルス濃度が測定できない。そこで、本研究では、試料の pH を上げることでフロックを溶解し、その後にウイルス濃度を測定することにより、フロック中に取り込まれていたウイルスを含めた定量を行った¹⁾。以下にその手法を示す。Milli-Q 水に肉エキス (Difco あるいは極東化学製) を24% (w/v) になるように添加し、オートクレーブ滅菌後に水酸化ナトリウムにて pH 9.5に調整した。試料5 mL に、この肉エキス溶液5 mL を添加し、vortex 式攪拌装置にて5時間激しく攪拌した。アルミニウムは両性金属であるため、このような高 pH との接触によりフロックの溶解が期待できる。

また、アルミニウムフロック溶解の過程を観察するために、vortex 攪拌中の試料を経時的に採取し、孔径 0.45 μ m のメンブランフィルタでろ過した後、ろ液のウイルス濃度を測定した。

2.4 ウイルスの定量法

本研究では、以下に示す2種類の手法によりウイルス濃度を定量した。すなわち、感染性のあるウイルス濃度をプラック形成法 (PFU 法) にて測定し、全ウイルス粒子数をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。

PFU 法では、Adams の方法³⁾に従い *E. coli* F⁺ を宿主としてウイルス濃度を定量し、試料1 mL 当たりのプラック形成数 (pfu/mL) でその濃度を表した。PCR 法では、共存肉エキスが PCR 反応を阻害すると報告されているため^{4,5)}、測定前に試料を Milli-Q 水にて10倍希釈した。10倍希釈後の肉エキス濃度は1.2% (w/v) であるが、この濃度の肉エキス共存下では Q β の RT-PCR 検量線の直線性が保たれることを予め確認している。10倍希釈後の試料を90 °C で10分間加熱することにより、ウイルスカプシドを熱変成させ、ウイルス RNA を抽出した。この抽出液を、TaqMan RT-PCR プロトコルに従い、リアルタイム RT-PCR 法にて濃度を測定した。

PCR には2種類のプライマー (5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3', 5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3')と、TaqMan プローブ (5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3')を用いた⁹⁾。また、PCR 反応は、Prism 7000 (Applied Biosystems Japan 製)を用いて行った。本研究での、PFU 法と PCR 法によるウイルス濃度測定時の変動係数はそれぞれ、16%と44%であった。なお、ウイルス濃度測定時の希釈液中で、アルミニウム種による再凝集が生じないことは予め確認している。

2.5 ウイルスの電気移動度の測定

Milli-Q 水に無機イオン (NaHCO₃, NaCl, CaCl₂, MgCl₂)をそれぞれ添加した。これを NaOH あるいは HCl にて pH 7.0に調整し、精製後の Qβを10¹⁰ pfu/mL 程度添加した。これを孔径0.45 μm のメンブランフィルタにてろ過し、レーザーゼータ電位計 (ELS 6000, 大塚電子製) にて Qβの電気移動度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 フロック溶解に伴うウイルス濃度の増加

10^{10.6} pfu/mL の Qβを10 mg-Al/L の PACI で凝集処理した。処理後の試料を2.3に示した処理を施し、アルミニウムフロックの溶解を試みた。アルミニウムフロック溶解過程でのウイルス濃度の経時変化を図1に示す。凝集処理後のウイルス濃度は、高 pH 処理によるフロック溶解を行わなかった場合、PCR 法による測定値で10^{8.1} 個/mL となった。このことは、初期添加の99.7%のウイルスが、フロック中に取り込まれ、PCR 法で検出されなくなったことを意味する。ところが、高 pH 処理を施すことにより、PCR 法による測定値は増加し、20分間の高 pH 処理によりほぼ初期値まで回復した。このことは、高 pH 処理によりアルミニウムフロックが溶解し、その中に捕捉されていたウイルスが解放され、PCR 法により検出されたことを意味する。20分間程度の高 pH 処理により、凝集処理により生じたアルミニウムフロックは溶解することが分かった。この後、210分まで高 pH 処理を継続したが、PCR 法での測定値は変化しなかった。

一方、凝集処理後の PFU 法での測定値は、高 pH 処理を行わなかった場合に10^{4.0} pfu/mL まで減少した。その後の20分間の高 pH 処理によるアルミニウムフロック溶解に伴い、PFU 法での測定値は10^{7.1} pfu/mL まで増加した。ところが、既にアルミニウムフロックが溶解したにも関わらず、さらに高 pH 処理を継続すると PFU 法での測定値は増加し、120分の処理で10^{8.9} pfu/mL となった。その後、210分まで高 pH 処理を継続しても、PFU 法での測定値は変化しなかった。このことから、高 pH 処理20分の段階では存在していたウイルス凝集塊がさらなる高 pH 処理の継続により分散し、それぞれがブラックを形成するようになった可能性がある。あるいは、ウイルスの吸着タンパクなどに結合することにより宿主への感染を妨げていたアルミニウム種が、さらなる高 pH 処理の継続により溶解し、ウイルスの感染性が回復した可能性も想像し得る。

3.2 フラクタル次元から判断される凝集塊形成の可能性

図1に示すように、凝集処理後に高 pH 処理を施した試料のウイルス濃度は、高 pH 処理に要する時間に関わらず、PCR 法での測定値が、PFU 法での測定値より大きくなった。すなわち、試料中に含まれるそれぞれのウイルス粒子が、必ずしも1つのブラックを形成したわけではないと判断された。ここで、本実験で観察された PCR 法と PFU 法の測定値の差が、ウイルス凝集塊形成により生じた可能性について以下のように検討した。本実験では、高 pH 処理を施した試料を孔径0.45 μm のメンブランフィルタにてろ過した後、ウイルス

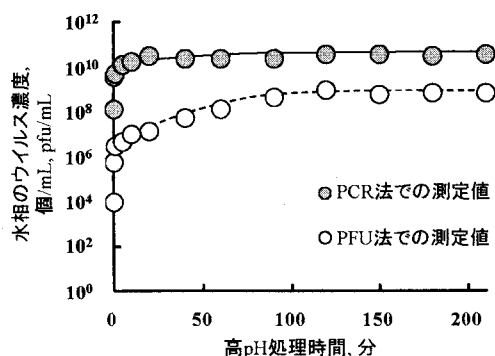


図1 フロック溶解に伴う水相のウイルス(Qβ)濃度の増加

濃度を測定している。よって、PCR 法と PFU 法の測定値の差が凝集塊形成で説明できるとした場合、生じた凝集塊の大きさは $0.45 \mu\text{m}$ 以下でなければならない。仮に、凝集塊が隙間なくウイルス粒子でのみ生じているとした場合（フラクタル次元 $D_f=3.0$ ）、大きさ $0.45 \mu\text{m}$ の凝集塊中には $(0.45/0.023)^3 \cong 7490$ 個のウイルス粒子が存在することになり、この凝集塊の形成により PFU 法の測定値は PCR 法の測定値より $3.9 \log (\log(7490))$ 小さい値になるはずである。逆に、 $3.9 \log$ の差を、 $0.45 \mu\text{m}$ 以下の凝集塊形成のみで説明するためには、フラクタル次元が 3.0 以上となる必要がある。

このように、PCR 法と PFU 法の測定値の差を 0.45

μm 以下の凝集塊形成のみで説明するために要するフラクタル次元 (RD_f) を計算し、高 pH 処理時間に対してプロットしたものが図2である。この値は、ウイルス凝集塊の大きさが $0.45 \mu\text{m}$ 以下の場合における、フラクタル次元の最小値を示している。高 pH 処理時間に伴い RD_f は減少する傾向にあるが、高 pH 処理20分までは RD_f は 2.5 以上の大きい値であった。凝集塊のフラクタル次元は、凝集塊を形成する物質や凝集条件により異なる。Logan は、様々な凝集塊のフラクタル次元についてまとめており、無機コロイドで 1.8–2.1、バクテリア (*Zoogloea ramigera*) で 1.8 ± 0.3 などとしている⁷⁾。これらの値はいずれもウイルス凝集塊のフラクタル次元ではなく、必ずしも値の直接比較ができるわけではないが、本実験で得られた高 pH 処理20分までの RD_f はこれらの凝集塊のフラクタル次元より大きかった。すなわち、PCR 法と PFU 法の測定値の差は、凝集塊形成のみでは説明できないと判断された。このことより、少なくとも20分までの高 pH 処理では、凝集剤がウイルスの感染性を低下させていた可能性が示された。また、図1において PFU 法での測定値が高 pH 処理時間に伴い増加したのは、ウイルスに付着したアルミニウムが脱着することにより感染性が回復したことによる可能性が考えられた。

さらに高 pH 処理時間を延長すると RD_f は減少し、120分以降は約 1.3 で一定となった。この値は、先に示した報告例と比べて小さかった。しかし、図1における感染性の回復がアルミニウムの脱着によるものであるとすれば、アルミニウムの一部が高 pH 処理後にもなお不可逆的に吸着しウイルスの感染性を失活させている可能性も否定できない。もちろん、210分間の高 pH 処理にも関わらず PFU 法での測定値が初期値まで回復しなかった原因が、一部のウイルスの凝集塊形成によるものである可能性も否定できないが、少なくとも20分の高 pH 処理によりブロックが完全に溶解した段階では、凝集塊形成以外のメカニズムが PFU 法での測定値の低下に寄与していることが示されており、210分間の高 pH 処理後にもこのようなメカニズムが寄与している可能性も想像できる。今後、より孔径の小さい分離膜によるろ過を行い、フラクタル次元からの考察を加えることにより、凝集塊形成以外に、ウイルス感染性を低下させた要因の存在の有無を示すことができると考えている。本研究では、感染性ウイルス濃度（PFU 法での測定値）が210分間に渡るブロック溶解後にも初期値まで回復しない原因が、ウイルス凝集塊の形成によるものであるのか、それ以外の効果であるのかについては明らかにすることはできなかった。しかし、その原因が凝集塊の形成であれそれ以外の効果であれ、210分という長時間の高 pH 処理を施しても分離できないウイルスのアルミニウム種への不可逆的な吸着が、ウイルスの感染性を低下させている要因であろうと考えている。なお、本研究では凝集塊形成という物理化学的な側面に焦点を絞った検討を行ったが、ブラック形成時にウイルスや宿主細胞に対し、アルミニウムが増殖阻害などの影響を与えた可能性も考えられる。しかし、測定時の希釈倍率を考えると、ブラック形成時にウイルスや宿主細胞が曝露されるアルミニウム濃度は 0.001mg/L 以下であり、これらの与える影響は少ないと判断された。

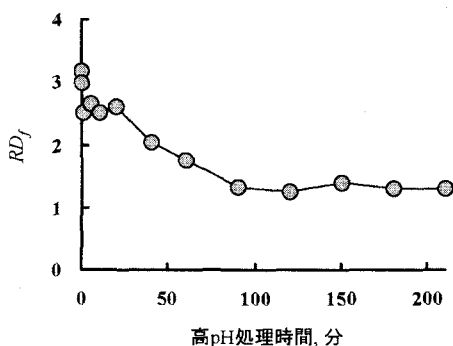


図2 PCR法とPFU法の測定値の差を $0.45 \mu\text{m}$ 以下の凝集塊形成のみで説明した場合に必要なとされるフラクタル次元

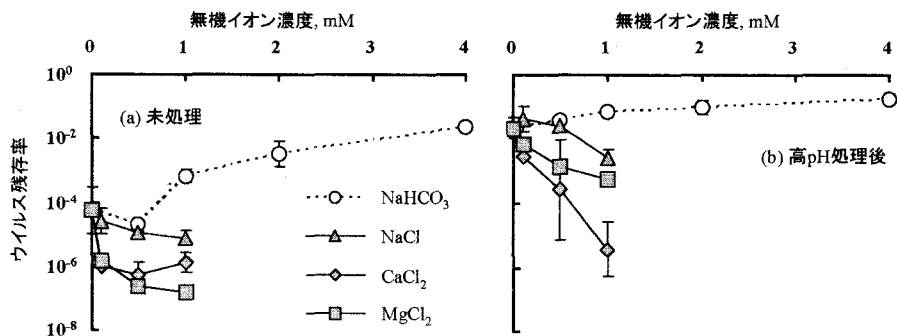


図3 無機イオンの添加がPACIによるウイルス(QB)の除去に与える影響(PACI添加濃度:1 mg-Al/L)

3.3 無機イオンの添加がPACIによるウイルスの不可逆的吸着に与える影響

図3に、無機イオンの添加がPACIによるウイルスの除去に与える影響を示す。なお、図中の縦軸は、いずれもPFU法での測定値から計算された残存率で示している。図3aは凝集処理後の試料を未処理のまま測定した値であり、ブロック中に捕捉されたウイルスは測定できていない。図3bは凝集処理後の試料を5時間の高pH処理によりブロックを溶解した後に測定した値である。

凝集後の未処理試料と高pH処理後試料のいずれのウイルス濃度も、NaCl, MgCl₂, CaCl₂の添加により用量依存的に低下した。特に、MgCl₂とCaCl₂はNaClに比べて添加時の残存率低下が大きかった。これに対し、NaHCO₃は用量依存的にウイルス残存率を増加させた。すなわち、NaCl, MgCl₂, CaCl₂の添加は、PACIによるウイルスの凝集作用のみならず、アルミニウム種への不可逆的吸着も促進し、反対にNaHCO₃はそれらを抑制するのではないかと考えられた。但し、中性域ではCaやMgは溶存していると考えられるが、高pH条件下では沈澱を形成する可能性が考えられる。高pH処理後の試料では、形成された沈澱中にウイルスが再捕捉されたことによりウイルス残存率が低下したのかもしれない。よって、MgCl₂, CaCl₂の添加により少なくとも凝集作用が促進されることは示唆されたが、それに伴うアルミニウム種への不可逆的吸着に対する影響についてはさらなる検討が必要であろう。

3.4 無機イオンの添加がウイルス表面電位に与える影響

これらの無機イオンの添加が、PACIによるウイルスの凝集性やアルミニウム種への不可逆的吸着に影響を与える原因を考察するために、これらの無機イオンがウイルスの表面電位に与える影響を調べた。本研究では、ウイルスの表面電位の大きさの指標として、ウイルスの電気移動度を測定した。図4に、無機イオンの添加がウイルスの電気移動度に与える影響を示す。図に示すように、NaCl, MgCl₂, CaCl₂はウイルスの電気移動度の絶対値を用量依存的に減少させ、特にMgCl₂, CaCl₂は大きく減少させた。これらの無機塩の添加により電気移動度の絶対値が減少するという事は、ウイルスの表面電位が中和の方向へと進んだことを意味する。表面電位の絶対値が小さくなったことにより、ウイルス粒子間の電気的反発力が減少し、その後のPACIの添加により、より容易に凝集反応が進行したのではないかと考えられた。よって、これらの無機塩の添加により、図3で示したようにウイルス残存率が低下し

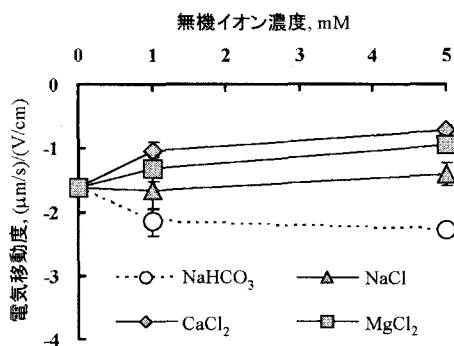


図4 無機イオンの添加がウイルス(QB)の電気移動度に与える影響

たのであろう。Taylor and Bosmann も、これらの無機塩の添加はウイルスの電気移動度の絶対値を減少させ、NaCl に比べ MgCl_2 、 CaCl_2 はより電気移動度の絶対値を減少させると報告しており⁸⁾、本研究の結果と一致する。

反対に、 NaHCO_3 は用量依存的にウイルスの電気移動度の絶対値を増加させた。すなわち、 NaHCO_3 の添加により、ウイルスの表面電位の絶対値が大きくなり、その荷電を中和するために多くの PACI を要するようになったのであろう。よって、 NaHCO_3 は PACI によるウイルスの凝集性や、不可逆的吸着を抑制したのではないかと考えられた。

4. おわりに

本研究で得られた知見を以下に示す。

- (1) ウイルスを含む水に PACI を添加すると、形成されたアルミニウムフロックに取り込まれてウイルス濃度は減少した。フロックを溶解した後にウイルス濃度を測定すると、全ウイルス粒子数 (PCR 法での測定値) に比べて、感染性ウイルス数 (PFU 法での測定値) が少なかった。
- (2) 20 分間の高 pH 処理によりフロックが溶解された段階では、全ウイルス粒子数と感染性ウイルス数の間の差はウイルス凝集塊の形成でのみでは説明できず、アルミニウムポリマーが吸着したことによりウイルスの感染性が低下したのではないかと推察された。一方、210 分間の高 pH 処理後の試料においてもアルミニウムポリマーがウイルスへ不可逆的に吸着したことにより感染性が低下した可能性はあるものの、このことを確実に示す証拠は得られなかった。
- (3) PACI 添加によるウイルスの感染性の低下の程度は、共存する無機イオンに影響を受けた。 NaCl 、 MgCl_2 、 CaCl_2 の添加は、ウイルスの表面電位の絶対値を小さくすることにより PACI の凝集効率を高め、その結果、アルミニウム種への不可逆的吸着を促進した可能性が示された。反対に、 NaHCO_3 はウイルスの表面電位の絶対値を大きくすることにより PACI の凝集効率を抑え、アルミニウム種への不可逆的吸着を抑制した可能性が示された。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 (課題番号 14350284) と日本ガイシ (株) から研究費補助を受けた。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Matsui, Y., Matsushita, T., Sakuma, S., Gojo, T., Mamiya, T., Suzuoki, H. and Inoue, T. (2003) Virus inactivation in aluminum and polyaluminum coagulation, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 5175–5180.
- 2) Grant, S. B. (1994) Virus coagulation in aqueous environments, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 928–933.
- 3) Adams, M. H. (1959) *Bacteriophages*, Interscience, New York, NY, USA, 450–454.
- 4) Abbaszadegan, M., Huber, M. S., Gerba, C. P. and Pepper, I. L. (1993) Detection of enteroviruses in groundwater with the PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1318–1324.
- 5) Schwab, K. J., De Leon, R. and Sobsey, M. D. (1995) Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk viruses by reverse transcription-PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 531–537.
- 6) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎 (2002) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発, 水環境学会誌, **25**, 469–475.
- 7) Logan, B. E. (1999) *Environmental transport processes*, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 466–504.
- 8) Taylor, D. H. and Bosmann, H. B. (1981) The electrokinetic properties of reovirus type 3: electrophoretic mobility and zeta potential in dilute electrolytes, *J. Colloid Interface Sci.*, **83**, 153–162.