

(49) 遺伝子組換えノロウイルス外套タンパク粒子 (rNV-VLPs)を用いた ヒトノロウイルスの浄水処理性評価

白崎 伸隆^{1*}・松下 拓¹・松井 佳彦¹・
大芝 淳¹・浦崎 稔史¹・大野 浩一¹

¹北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp

本研究では、細胞培養系が確立されていないヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を、ヒトノロウイルスの外套タンパク粒子 (rNV-VLPs) を用いることによって評価した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQ β 、MS2との処理性比較を行った。凝集沈澱処理におけるrNV-VLPsの除去率は、40 μ M-Alのポリ塩化アルミニウム (PACl) 添加濃度を用いた場合、約1 logであった。また、得られたrNV-VLPsの除去率は、MS2の除去率よりも低く、Q β の除去率と同程度であった。従って、MS2に比べてQ β がヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を検討する際の指標と成り得る可能性が示唆された。

Key Words : bacteriophages, drinking water treatment, ELISA, norovirus, virus-like particles

1. はじめに

近年、その感染事例が世界中で年々増加しているヒトノロウイルスに代表される水系感染症を引き起こす可能性のあるウイルスは100種以上を数える¹⁾。これら病原性ウイルスの中でも、ヒトノロウイルスを含むカリシウイルス科のウイルスおよびピコルナウイルス科のA型肝炎ウイルスは、将来水道水質基準に組み込むべき項目として米国環境保護局 (USEPA) の汚染物質候補リスト (Contaminant Candidate List 3) に挙げられている²⁾。A型肝炎を引き起こすA型肝炎ウイルスは、細胞培養系が確立されているため、古くから様々な浄水処理実験が行われており³⁾、数多くの知見が蓄積されている。その一方で、非細菌性急性胃腸炎を引き起こすヒトノロウイルスに関しては、未だ効率的な細胞培養系が確立されていないため⁴⁾、添加実験による浄水処理性の検討を行うために必要なウイルス量を確保することが極めて困難であり、また、塩素等の消毒処理における処理性、すなわち感染力価の低下を定量することもできない。そのため、培養可能な病原性ウイルスと比べて浄水処理性の検討がほとんどなされていないのが現状である。こういった問題から、同じカリシウイルス科に属し、細胞培養系が確立さ

れているマウスノロウイルス⁵⁾、ネコカリシウイルス^{6,7)}、イヌカリシウイルス¹⁰⁾等がヒトノロウイルスの代替指標として提案され、主に塩素、オゾン、紫外線照射といった消毒処理実験に使用されている。しかしながら、これら代替ウイルスとヒトノロウイルスとの間に、浄水処理における挙動の相関がどの程度あるかは明らかになっていない。

その一方で、ヒトノロウイルスRNAの構造タンパク質領域をバキュロウイルスに取り込み、昆虫細胞で発現させることによって、ヒトノロウイルスの外套タンパク粒子 (rNV-VLPs: recombinant Norovirus-Virus Like Particles) を多量に得る技術が確立されている¹⁰⁾。rNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと構造的あるいは抗原的に等しいため¹⁴⁾、抗原・抗体反応を利用したELISA (酵素免疫測定法) によるヒトノロウイルスの定量法も確立され¹⁵⁾、培養法に頼らないヒトノロウイルス粒子の簡便かつ迅速な検出が可能となった。

本研究では、このrNV-VLPsを用いることで、これまでほとんど明らかにされてこなかったヒトノロウイルス粒子の物理的な浄水処理性について詳細に検討することを目的とし、凝集沈澱処理における処理性を評価した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられて

いる大腸菌ファージQ β , MS2との処理性比較も行い、これら大腸菌ファージのヒトノロウイルス粒子に対する代替指標としての可能性を検討した。なお、先にも記述したように、nNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと構造的あるいは抗原的に等しいため、表面電位など浄水処理性に大きく寄与するであろう特性も同等と考えられる。また、内部にRNAを持たず感染性がないため、特別な施設を必要とせず安全にヒトノロウイルス粒子の浄水処理性について検討することが可能となる。

これまで、nNV-VLPsを土壌浸透の研究に使用した例¹⁶⁾はあるが、水処理分野に応用した例はない。従って、本研究は、ヒトノロウイルスの浄水処理性評価にnNV-VLPsを使用した世界で初めての試みである。

2. 実験方法

(1) 使用したnNV-VLPs, 大腸菌ファージ

a) nNV-VLPsの作成, 精製, 定量法

本研究では、我が国で分離されたヒトノロウイルス (Chiba virus, Genogroup I, AB042808) の外套タンパクを組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成し、実験に使用した。

Chiba virusは直径約38 nmの正20面体構造を有しており、一本鎖RNA (7,697 bases) を遺伝子として持つ¹⁷⁾。nNV-VLPsの作成に先立ち、RNAの構造タンパク質領域であるORF (Open Reading Frame) 2, ORF3および非翻訳領域である3'UTR (Untranslated Region) の5,346-7,697 bases部分 (2,352 bases) の両末端に制限酵素認識部位 (*Eco*RIおよび*Pst*I) を付加した2,422 basesからoligo DNAを合成し、連結、伸長させることで二本鎖DNA全長断片 (人工合成遺伝子断片) を作成した。これをGateway BP反応によりドナーベクターpDONR221 (Invitrogen) にクローニングした後、改めてトランスファーベクターpMONHT4 (片倉工業) に挿入した。得られたpMONHT4とバキュロウイルスとをカイコ細胞 (BmN細胞, 片倉工業) に同時挿入することにより遺伝子組換えバキュロウイルスを作成し、新たに遺伝子組換えバキュロウイルスをカイコ (*Bombyx mori*, 片倉工業) に感染させることでChiba virusのnNV-VLPsを発現させた。

nNV-VLPsを発現したカイコを磨砕処理した後、遠心分離し、上清をニッケルカラムを用いて精製した。その後、透析処理を行い、Milli-Q水にバッファー置換することでnNV-VLPsの高濃度保存液を得た。なお、ニッケルカラムによるnNV-VLPsの精製に先立ち、発現タンパク質にHisタグの導入を行った。精製後のHisタグの切り離しは行っていないが、導入したHisタグの分子量 (約1

kDa) は、nNV-VLPsを構成する発現タンパク質 (約58 kDa) に比べて非常に小さいため、HisタグがnNV-VLPの凝集沈殿処理性に影響する可能性は極めて小さいと考えられた。

nNV-VLPsの定量には、野生のヒトノロウイルス検出に用いられる抗原キット (NV-AD II, デンカ生研) を用い、ELISAにより行った。なお、マイクロプレートの吸光度 (主波長450 nm, 副波長630 nm) の測定には、マイクロプレートリーダー (MTP-300, コロナ電気) を用いた。

b) 大腸菌ファージの培養, 精製, 定量法

本研究では、(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジー分野 生物遺伝資源部門 (NBRC) から分譲された大腸菌ファージQ β (NBRC 20012) およびMS2 (NBRC 102619) を使用した。レビウイルス科に属する大腸菌ファージQ β およびMS2は、直径約24 nmの正20面体構造を有しており、一本鎖RNAを遺伝子として持つ¹⁸⁾。この構造がA型肝炎ウイルスやポリオウイルスと類似しているため、水系感染症ウイルスの代替指標として広く用いられている。なお、大腸菌ファージQ β の外套タンパクの疎水性は、MS2の外套タンパクに比べて高いことが知られている¹⁹⁾。

大腸菌ファージは、F繊毛大腸菌 (NBRC 13965) を用いて37℃のシェイキングバス内にて22-24時間振とう培養した後、2,000 $\times$ gにて10分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルター (膜孔径 0.45 μ m, 酢酸セルロース, Advantec) にて滅菌ろ過することにより高濃度保存液を得た。得られた高濃度保存液中の有機物の持ち込みを低減させるため、実験に先立ち、遠心式フィルターユニットAmicon Ultra-15 (分画分子量 100,000, 再生セルロース, Millipore) を用いて、12 mLの高濃度保存液を5,000 $\times$ gにて20分間遠心濃縮し、得られた約100 μ Lの濃縮液に12 mLのMilli-Q水を加えることでバッファー置換した。

大腸菌ファージQ β およびMS2の定量には、ブラック形成法およびリアルタイム定量RT-PCR法を用いた。なお、ブラック形成法は、Adams²⁰⁾の方法に従って行った。一方、リアルタイム定量RT-PCR法においては、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて大腸菌ファージのRNAを抽出し、これをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いて逆転写させ、cDNAを合成した。このcDNAをTaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems), プライマー (最終濃度 400 nM, タカラバイオ), プロブ (最終濃度 250 nM, Applied Biosystems), Distilled waterと混合した後、ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) に供した。本研究

表-1. プライマーとプローブの塩基配列

Coliphage		Oligonucleotide sequences	Positions	References
Q β	Forward primer	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'	49-71	21)
	Reverse primer	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'	187-208	
	TaqMan probe	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'	147-169	
MS2	Forward primer	5'-GTC GCG GTA ATT GGC GC-3'	632-648	22)
	Reverse primer	5'-GGC CAC GTG TTT TGA TCG A-3'	690-708	
	TaqMan probe	5'-AGG CGC TCC GCT ACC TTG CCC T-3'	650-671	

で使用したプライマーおよびプローブの塩基配列を表-1に示す。なお、PCR反応は、50℃で2分間および95℃で10分間の加熱を行った後、95℃で15秒間と60℃で1分間から成るサイクルを40回繰り返した。なお、本研究で行ったブラック形成法には、大腸菌ファージQ β およびMS2の宿主であるF絨毛大腸菌(NBRC 13965)を用いたため、後述する同時添加試料中のQ β およびMS2濃度を判別定量することができなかった。そのため、判別定量が可能なりアルタイムRT-PCR定量法にて同時添加試料中のQ β およびMS2濃度を定量した。

(2) 凝集沈澱処理実験

本研究では、回分式凝集沈澱処理によるnNV-VLPs、大腸菌ファージの処理性を評価した。精製したnNV-VLPsを 10^{11} VLPs/mL、大腸菌ファージQ β およびMS2を 10^8 PFU/mLになるように同時添加した北海道札幌市豊平川河川水(札幌市水道局藻岩浄水場原水: pH 7.2, DOC 0.8 mg/L, OD₂₆₀ 0.019 cm⁻¹, 濁度 0.6 NTU, アルカリ度 172 mg-CaCO₃/L)を原水とし、ピーカーに400 mL添加した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム(PACl, 多木化学)、硫酸バンド(Alum, 多木化学)、塩化第二鉄(FeCl₃, 和光純薬)のいずれかを20 μ M (0.54 mg-A/L or 1.12 mg-Fe/L)、40 μ M (1.08 mg-A/L or 2.24 mg-Fe/L)、60 μ M (1.62 mg-A/L or 3.36 mg-Fe/L)になるように添加し、直ちにHClもしくはNaOHにてpHを5.8あるいは6.8に調整した。これを攪拌翼を用いてG値200 s⁻¹にて2分間急速攪拌、20 s⁻¹にて28分間緩速攪拌し、20分間静置した。なお、静置後のpH変化が最大で0.2程度であったため、凝集反応時のpH調整は行わなかった。試料は、原水、急速攪拌後、緩速攪拌後、静置後に採取し、nNV-VLPsあるいは大腸菌ファージの濃度を定量した。

(3) 電子顕微鏡観察

作成したnNV-VLPsの粒子形状を確認するために、ネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡観察を行った。精製したnNV-VLPs溶液10 μ Lをコロジオン膜貼付銅製グリット(400メッシュ、日新EM)に添加し、1分間静置することでnNV-VLPsをグリットに吸着させた。余剰のnNV-VLPs溶液をろ紙を用いてグリット上から排除した。

後、染色液として2%リンタンングステン酸(pH 5.5) 10 μ Lをグリットに添加し、45秒間静置することでグリット上のnNV-VLPsを染色した。余剰の染色液をろ紙を用いてグリット上から排除した後、グリットを透過型電子顕微鏡(TEM, H-7650, 日立ハイテック)に供し、nNV-VLPsの構造を観察した。

(4) 塩化セシウム平衡遠心法

作成したnNV-VLPsの比重を測定するために、塩化セシウム平衡遠心法を行った。滅菌済み塩化セシウム溶液(1.6 g/cm³)をMilli-Q水にて段階希釈し、1.2-1.6 g/cm³の塩化セシウム溶液を作成した。なお、nNV-VLPsは、1.2 g/cm³の塩化セシウム溶液に 10^{12} VLPs添加した。それぞれの塩化セシウム溶液を遠沈管に充填し、密度勾配を作成した後、冷却超遠心機(CP80MX, 日立工機)に供し、100,000 $\times$ gにて18時間超遠心を行った。その後、試料をシリンジを用いて約1 mLずつに分画し、各画分のnNV-VLPs濃度を定量した。また、各画分の比重を電子天秤(AG245, メトラー・トレド)を用いて秤量した。

(5) 電気移動度測定

河川水中におけるnNV-VLPsおよび大腸菌ファージQ β 、MS2の表面電位特性を把握するために、電気移動度の測定を行った。分画分子量100,000のUF膜(YM-100, 再生セルロース, Millipore)にてろ過した豊平川河川水を、HClを用いてpH 6.8に調整した後、精製したnNV-VLPsを 10^{10} VLPs/mL、あるいはQ β 、MS2を 10^{10} PFU/mLになるように添加した。これらの試料の電気移動度をレーザーゼータ電位計(Zetasizer Nano ZS, Malvern)にて測定した。

3. 結果と考察

(1) ELISAによるnNV-VLPsの定量

ELISAによるnNV-VLPsの定量範囲を把握するため、作成したnNV-VLPsの高濃度保存液(濃度既知)を豊平川河川水を用いて 10^6 - 10^{11} VLPs/mLに希釈した後、ELISAにより定量した。結果を図-1に示す。図より、 $10^{7.5}$ VLPs/mL以下の濃度および $10^{9.5}$ VLPs/mL以上の濃度にお

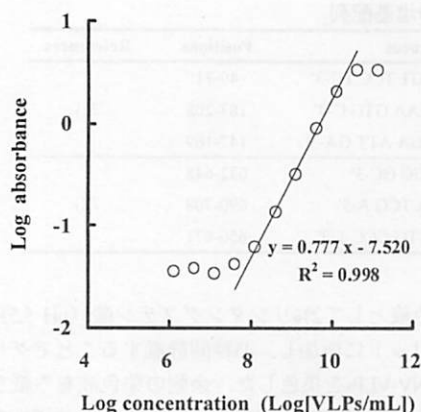


図-1. ELISAによるrNV-VLPsの検量線

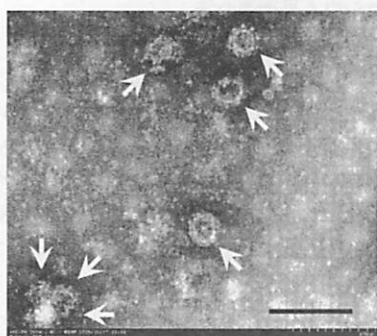


図-2. 作成したrNV-VLPsの電子顕微鏡写真:
Scale bar 100 nm

いては、濃度依存性なく吸光度は同程度であった。従って、本研究で使用したヒトノロウイルス検出キットでは、 10^8 - 10^{10} VLPs/mLの濃度範囲においてrNV-VLPsの定量が可能であると判断された。また、図に示すように、 10^8 - 10^{10} VLPs/mLの濃度範囲においてrNV-VLPs濃度と吸光度の間に高い直線性が得られた。以上の結果から、作成したrNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと同等の抗原性を有し、ELISAによって定量することが可能であると判断された。なお、 10^{10} VLPs/mLを超える試料においては、豊平川河川水にて適宜希釈した後にELISAによって定量した。

(2) 発現したrNV-VLPsの基本特性

組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成したrNV-VLPsの電子顕微鏡写真を図-2に示す。図より、粒子状に自己組織化されたrNV-VLPs (矢印にて表示) が確認された。また、観察されたrNV-VLPsの中から10粒子を無作為に抽出し、写真上

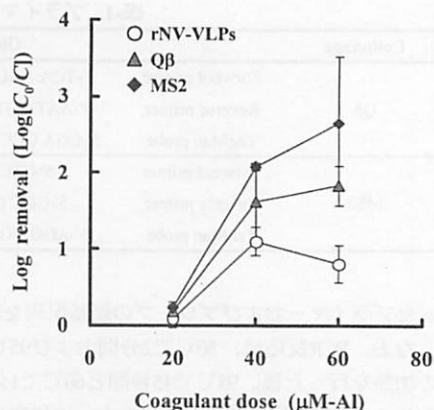


図-3. PACIを用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率: pH 6.8, 各値は2-3回の実験結果の平均値と標準偏差にて表示

で直径を測定したところ、 $35.7 \text{ nm} \pm 3.2 \text{ nm}$ であった。この直径は、野生のヒトノロウイルスの直径 (約38 nm)¹⁷⁾と同程度であった。

加えて、塩化セシウム平衡遠心法を行った結果、作成したrNV-VLPsの比重は 1.28 g/cm^3 であった。この比重は、RNAを持たない分わずかに小さいものの、野生のヒトノロウイルスの比重 (1.36 - 1.37 g/cm^3)²³⁾と同程度であると判断された。また、この値は、既往のrNV-VLPsの比重 (1.27 - 1.31 g/cm^3)^{13,24)}と同程度であった。以上の結果から、作成したrNV-VLPsの構造は野生のヒトノロウイルスと同等であると判断された。

(3) PACIによる凝集沈澱処理

凝集剤としてPACIを用いた場合の凝集沈澱処理後 (静置後) のrNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率を図-3に示す。なお、図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 : 原水のrNV-VLP濃度、あるいは大腸菌ファージ濃度、 C : 処理水のrNV-VLPs濃度、あるいは大腸菌ファージ濃度) にて表記し、大腸菌ファージ濃度はリアルタイム定量RT-PCR法にて定量した。図より、 $20 \mu\text{M-Al}$ のPACI添加濃度において、rNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率はそれぞれ0.2 log以下であったのに対し、PACI添加濃度を上げることで、rNV-VLPs、Qβ、MS2共に除去率が向上し、 $40 \mu\text{M-Al}$ 以上のPACI添加濃度では約1-2 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率を比較すると、rNV-VLPsの除去率は、いずれのPACI添加濃度においてもQβ、MS2の除去率よりも低くなった。

凝集処理性に影響を与える因子の一つと考えられる表面電位特性を把握するために、電気移動度の測定を行ったところ、rNV-VLPs、Qβ、MS2の電気移動度はそれぞれ -0.630 、 -1.344 、 $-1.160 (\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$ となり、rNV-VLPsの

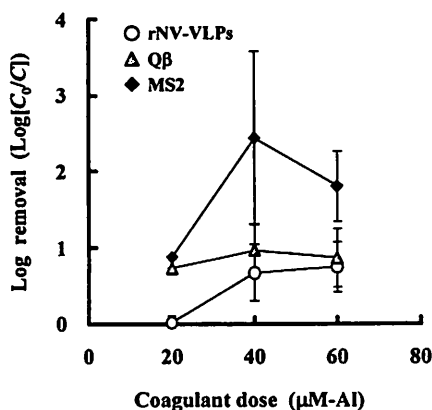


図-4. Alumを用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率: pH 6.8, 各値は1-4回の実験結果の平均値と標準偏差にて表示

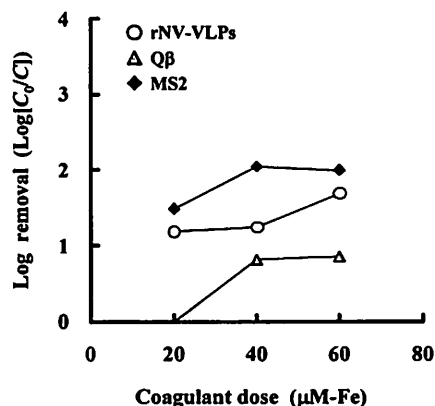


図-5. FeCl₃を用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率: pH 5.8, 各値は1回の実験結果

電気移動度の絶対値はQβ, MS2に比べて小さかった。電気移動度の絶対値が小さい粒子は、粒子間の電気的発効力が小さいため、凝集剤の添加により容易に凝集すると考えられるが、rNV-VLPsの除去率は、Qβ, MS2の除去率よりも低くなった。従って、rNV-VLPsと大腸菌ファージの粒子径の違いや外套タンパクの疎水性の違いなど、表面電位特性以外の因子も凝集処理性に寄与している可能性が考えられた。

(4) Alumによる凝集沈澱処理

凝集剤としてAlumを用いた場合の凝集沈澱処理後（静置後）のrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を図-4に示す。図より、20 μM-AlのPACI添加濃度において、rNV-VLPs,

Qβ, MS2の除去率はそれぞれ0.0, 0.7, 0.9 logであったのに対し、Alum添加濃度を上げることににより、rNV-VLPs, Qβ, MS2共に除去率が向上し、40 μM-AlのAlum添加濃度ではそれぞれ0.7, 1.0, 2.4 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を比較すると、PACIを用いた場合と同様、rNV-VLPsの除去率は、いずれのAlum添加濃度においてもQβ, MS2の除去率よりも低くなった。

凝集剤として約50 μM-AlのAlumを用いた既往の凝集沈澱処理研究⁹⁾においては、A型肝炎ウイルスで0.9 log、ポリオウイルスで0.2 log、MS2で0.3 logの除去率が得られている。既往研究において、MS2の除去率がA型肝炎ウイルスの除去率よりも低く、ポリオウイルスの除去率と同程度であったことを考慮すると、Alumを用いた凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsはA型肝炎ウイルスやポリオウイルスに比べて除去し難い可能性が考えられた。

(5) FeCl₃による凝集沈澱処理

凝集剤としてFeCl₃を用いた場合の凝集沈澱処理後（静置後）のrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を図-5に示す。なお、一般的なFeCl₃の最適凝集pHは、PACIやAlumに比べて低いことが知られているため²⁹⁾、pH 5.8において凝集沈澱処理実験を行った。図より、20 μM-FeのPACI添加濃度において、Qβ, MS2の除去率はそれぞれ0.0, 1.5 logであったのに対し、FeCl₃添加濃度を上げることににより、QβおよびMS2の除去率は向上し、40 μM-FeのFeCl₃添加濃度ではそれぞれ0.8, 2.0の除去率が得られた。一方、rNV-VLPsの除去率は、20 μM-FeのFeCl₃添加濃度において1.2 logであり、FeCl₃添加濃度を40 μM-Feに上げた場合であっても除去率は向上しなかったものの、60 μM-FeのFeCl₃添加濃度では1.7 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を比較すると、PACIやAlumを用いた場合と異なり、rNV-VLPsの除去率は、いずれのFeCl₃添加濃度においてもQβの除去率よりも高くなり、MS2の除去率よりも低くなった。

本研究で用いた凝集剤添加濃度とは大きく異なるが、凝集剤として約250 μM-FeのFeCl₃を用いた既往の凝集沈澱処理研究（pH 5-6）²⁹⁾においては、アデノウイルスで2.6 log、ネコカリシウイルスで2.5 log、MS2で2.3 logの除去率が得られている。既往研究において、MS2の除去率がアデノウイルス、ネコカリシウイルスの除去率よりも低かったことを考慮すると、FeCl₃を用いた凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsはアデノウイルスやネコカリシウイルスに比べて除去し難い可能性が考えられた。

(6) 各凝集剤における除去率の比較

凝集剤添加濃度40 μMにおける凝集沈澱処理後（静置

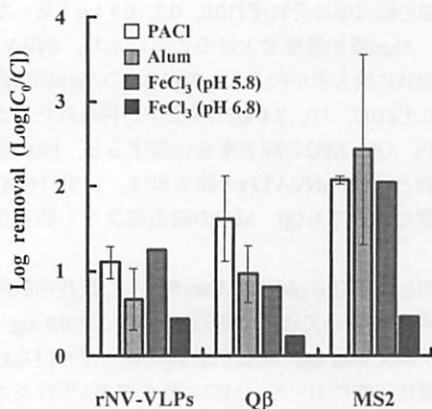


図-6. 各凝集剤におけるrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率比較: Coagulant dose 40 μM

後)のrNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を図-6に示す。比較のため、pH 6.8におけるFeCl₃を用いた実験結果についても示す。図より、rNV-VLPsにおいては、凝集剤としてPAClおよびFeCl₃ (pH 5.8)を用いた場合に1 log以上の除去率が得られた。一方、Alum, FeCl₃ (pH 6.8)を用いた場合の除去率はそれぞれ0.7, 0.4 logであった。Qβにおいては、PAClを用いた場合の除去率が1.6 logと最も高く、また、MS2においてはPACl, Alum, FeCl₃ (pH 5.8)のいずれにおいても2 log程度の除去率が得られた。この結果から、PAClが最も効果的にrNV-VLPs, Qβ, MS2を除去できることが分かった。

rNV-VLPs, Qβ, MS2の除去率を比較すると、FeCl₃ (pH 6.8)を用いた場合を除き、rNV-VLPsとQβは全体として約1 log程度の除去率であったのに対し、MS2は約2 log程度の除去率となった。欧米諸国においては、MS2が病原性ウイルスの代替指標として幅広く用いられているが、本研究で行った凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsの除去率はMS2の除去率よりも低く、Qβの除去率と同程度であったため、MS2に比べてQβがヒトノロウイルスの指標と成り得る可能性が考えられた。

我が国の水道水質基準には、微生物に関する項目として一般細菌、大腸菌が規定されているが、ウイルスに関する基準は現在のところない。一方、U.S.EPAは、浄水処理(ろ過および消毒)によって表流水、地下水の腸管系ウイルスを4 log除去あるいは不活化することを規定している²⁷⁾。本研究で行った凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsの除去率は最大で1.7 log (FeCl₃, 60 μM-Fe, pH 5.8)であったことから、ヒトノロウイルスを4 log除去あるいは不活化するためには、後段にろ過処理、消毒処理等を組み合わせる必要があると考えられる。

4. 結論

本研究では、細胞培養系が確立されていないヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を、粒子形状が保証されたヒトノロウイルスの外殻タンパク粒子(rNV-VLPs)を用いることによって評価した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQβ, MS2との処理性比較を行った。

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) rNV-VLPsを用いることにより、ヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を評価することができた。
- (2) 凝集沈澱処理におけるrNV-VLPsの除去率は、凝集剤添加濃度40 μMにおいて0.4-1.2 logであり、PACl, FeCl₃ (pH 5.8)を用いた場合に1 log以上の除去率が得られた。
- (3) 凝集沈澱処理におけるrNV-VLPsの除去率は、MS2の除去率よりも低く、また、Qβの除去率と同程度であった。従って、MS2に比べてQβがヒトノロウイルスの指標と成り得る可能性が考えられた。

謝辞：本研究は、科学研究費補助金 若手研究(B)「ウイルス外殻タンパク粒子を用いたノロウイルスの浄水処理性の検討」(平成19-20年度、課題番号 19760368、代表 松下拓)ならびに厚生労働科学研究費補助金「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(平成19-21年度、課題番号 19310801、主任研究者 松井佳彦)により行われた。記して感謝の意を表す。

参考文献

- 1) Havelaar A.H., Olphen M.V. and Drost Y.C.: F-specific RNA bacteriophage are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, No. 9, pp. 2956-2962, 1993.
- 2) U.S. Environmental Protection Agency: Drinking Water Contaminant Candidate List and Regulatory Determinations, Contaminant Candidate List 3 (CCL3), U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 2008.
- 3) Grabow W.O., Gauss-Müller V., Prozesky O.W. and Deinhardt F.: Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 46, No. 3, pp. 619-624, 1983.
- 4) Herbold, K., Flehmig B. and Botzenhart K.: Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 11, pp. 2949-2953, 1989.

- 5) Nasser A., Weinberg D., Dinor N., Fattal B. and Adin A.: Removal of hepatitis A virus (HAV), poliovirus and MS2 coliphage by coagulation and high rate filtration, *Water Science and Technology*, Vol. 31, No. 5-6, pp. 63-68, 1995.
- 6) Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I. and Monroe S.S.: Norovirus classification and proposed strain nomenclature, *Virology*, Vol. 346, No. 2, pp. 312-323, 2006.
- 7) Park G.W., Boston D.M., Kase J.A., Sampson M.N. and Sobsey M.D.: Evaluation of liquid- and fog-based application of sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human norovirus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, No. 14, pp. 4463-4468, 2007.
- 8) 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎: 新たな代替指標としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウイルスの塩素耐性の解明, 環境工学研究論文集, Vol. 45, pp. 361-370, 2008.
- 9) Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Riley K. and Gerba C.P.: Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 1, pp. 571-582, 2003.
- 10) Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J. and Gerba C.P.: Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 7, pp. 3979-3985, 2003.
- 11) Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., Groot A., Twisk F. and Koopmans M.: Inactivation of Caliciviruses, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 8, pp. 4538-4543, 2004.
- 12) Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J. and Gerba C.P.: Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone, *Water Research*, Vol. 39, No. 15, pp. 3650-3656, 2005.
- 13) Jiang X., Wang M., Graham D.Y. and Estes M.K.: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein, *Journal of Virology*, Vol. 66, No. 11, pp. 6527-6532, 1992.
- 14) White L.J., Ball J.M., Hardy M.E., Tanaka T.N., Kitamoto N. and Estes M.K.: Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines, *Journal of Virology*, Vol. 70, No. 10, pp. 6589-6597, 1996.
- 15) Parker T.D., Kitamoto N., Tanaka T., Huston A.M. and Estes M.K.: Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid, *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 12, pp. 7402-7409, 2005.
- 16) Redman J.A., Grant S.B. and Olson T.M.: Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions, *Environmental Science and Technology*, Vol. 31, No. 12, pp. 3378-3383, 1997.
- 17) Someya Y., Takeda N. and Miyamura T.: Complete nucleotide sequence of the chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*, *Virology*, Vol. 278, No. 2, pp. 490-500, 2000.
- 18) 植竹久雄: ウイルス学 (第4版), pp. 34, 理工学社, 1995.
- 19) Langlet J., Gaboriaud F., Duval J.F.L. and Gantzer C.: Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes, *Water Research*, Vol. 42, No. 10-11, pp. 2769-2777, 2008.
- 20) Adams M.H.: *Bacteriophages*, Interscience Publishers, New York, NY, USA, pp. 450-454, 1959.
- 21) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎: 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, Vol. 25, No. 8, pp. 469-475, 2002.
- 22) O'Connell K.P., Bucher J.R., Anderson P.E., Cao C., Khan A.S., Gostomski M.V. and Valdes J.J.: Real time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 1, pp. 478-483, 2006.
- 23) Utagawa E.T., Takeda N., Inouye S., Kasuga K. and Yamazaki S.: 3'-Terminal sequence of a small round structured virus (SRSV) in Japan, *Archive of Virology*, Vol. 135, No. 1-2, pp. 185-192, 1994.
- 24) Katayama K., Hansman G.S., Oka T., Ogawa S. and Takeda N.: Investigation of norovirus replication in a human cell line, *Archive of Virology*, Vol. 151, No. 7, pp. 1291-1308, 2006.
- 25) American Water Works Association, in: F.W. Pontius (Ed.), *Water Quality and Treatment, A Handbook of Community Water Supplies*, 4th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 300-305, 1990.
- 26) Abbaszadeh M., Mayer B.K., Ryu H. and Nwachuku N.: Efficacy of removal of OCL viruses under enhanced coagulation conditions, *Environmental Science and Technology*, Vol. 41, No. 3, pp. 971-977, 2007.
- 27) U.S. Environmental Protection Agency: National Primary Drinking Water Standards, EPA816-F-01-007, Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2001.

(2009. 5. 22 受付)

Evaluation of Removal Performance of Human Norovirus during Drinking Water Treatment Process by using Recombinant Norovirus VLPs

**Nobutaka SHIRASAKI¹, Taku MATSUSHITA¹, Yoshihiko MATSUI¹,
Atsushi OSHIBA¹, Toshifumi URASAKI¹ and Koichi OHNO¹**

¹Division of Built Environment, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

Norovirus (NV) is the prototype strains of a group of human caliciviruses responsible for epidemic outbreaks of acute gastroenteritis in the worldwide. As a result of the lack of a mammalian cell culture model for this virus, the studies on drinking water treatment such as separation and disinfection processes are still hampered. In the present study, we tried to investigate the removal performance of NV as particles during the coagulation–sedimentation process by using recombinant NV virus-like particles (rNV-VLPs) that are morphologically and antigenically similar to native NV. In addition, the behaviors of bacteriophage Q β and MS2 were also experimentally investigated to be compared with that of rNV-VLPs, and then to discuss the suitability of these bacteriophages as surrogates for NV. Approximately 1-log removal was observed for rNV-VLPs with 40 μ M-Al of polyaluminum chloride dosage in the coagulation–sedimentation process. In addition, the removal ratios of MS2 were approximately 1-log larger than that of rNV-VLPs and Q β . Accordingly, Q β is more suitable surrogates for native NV compared to the MS2 in the coagulation–sedimentation process.