

B-25 ウイルス様粒子とImmuno-PCR法を併用した ノロウイルスの膜ろ過処理性評価及び 処理メカニズムの解明

○白崎 伸隆^{1*}・田附 雄一¹・松下 拓¹・松井 佳彦¹

¹北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門（〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目）

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

1. はじめに

ノロウイルスは、感染性急性胃腸炎を引き起こすウイルス性食中毒の主要な病原体であり、その感染事例が世界中で年々増加しているため、社会的な注目を集めている。また、水道水を媒体としたノロウイルスによる水系感染症の報告もなされている。従って、浄水処理過程におけるノロウイルスの挙動を詳細に把握し、除去/不活化に効果的な処理を施すことは、ノロウイルスによる水系感染症を制御する上で非常に重要である。しかしながら、ノロウイルスは、生体外での効率的な培養法が未確立であることから、培養可能な水系感染症ウイルスに比べて浄水処理性に関する知見がほとんど得られていないのが現状である。その一方で、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、粒子形状が保証されたノロウイルス様粒子（rNV-VLPs: recombinant Norovirus-Virus Like Particles）を培養法の確立を待つことなく多量に得る技術が確立されている¹⁾。また、タンパク質量の高感度化を目的に、抗原抗体反応の反応特異性とPCR法の高感度性を組み合わせたImmuno-PCR法が開発されている²⁾。そこで、本研究では、カイコ細胞を用いたタンパク質発現法によりrNV-VLPsを作製すると共に、rNV-VLPs定量のためのImmuno-PCRを新たに構築し、それらを併用することにより、次世代の浄水処理技術として期待される膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を詳細に評価することを目的とする。rNV-VLPsは、野生のノロウイルスと構造的・抗原的に同等であるため³⁾、表面電位等の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を持たず感染性が無いため、特別な施設を必要とせず安全にノロウイルス粒子の浄水処理性を評価することが可能である。

2. 実験方法

(1) rNV-VLPsの作製及び定量

本研究では、我が国で分離されたノロウイルス（Chiba virus, Genogroup I）のrNV-VLPs（直径35-39 nm）を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコ細胞を用いたタンパク質発現法によって作製し、実験に使用した。

rNV-VLPsの定量には、本研究で新たに構築したImmuno-PCR法を用いた。rNV-VLPsのIgM抗体をマイクロプレートに固定化し、ここに、抗原であるrNV-VLPsを含む試料を添加することにより、試料中のrNV-VLPsとIgM抗体を反応させた。その後、ビオチン化したIgG抗体を添加し、rNV-VLPsと反応させ、IgM抗体-rNV-VLPs-ビオチン化IgG抗体の複合体を形成させた。更に、ビオチンと強固に結合する性質を有するストレプトアビジンを添加し、ここに、ビオチン化したDNAタグを添加することにより、ストレプトアビジンを介してビオチン化IgG抗体とビオチン化DNAタグを結合させた。制限酵素を用いて複合体のDNAタグを切断した後、DNAタグ濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量した。

(2) 膜ろ過処理

本研究では、精密ろ過膜（MF膜）処理、限外ろ過膜（UF膜）処理、凝集-MF膜処理におけるrNV-VLPs、水系感染症ウイルスの代替指標ウイルスとして広く用いられている大腸菌ファージQB及びMS2の処理性を評価した。精製したrNV-VLPsを 10^{10-11} VLPs/mL、QB及びMS2を 10^8 PFU/mLになるように同時添加した豊平川河川水（北海道札幌市）を実験原水とした。実験原水をpH 6.8に調整した後、MF膜（膜材質：PVDF、PTFE、混合セルロース（MC）、膜孔径：0.1 μ m）あるいはUF膜（膜材質：再生セルロース（RC）、分画分子量：1k、10k、100kDa）

に通水した。また、実験原水をスタティックミキサーを用いたインライン凝集にて処理 (pH 6.8, 凝集剤; PACl, 添加濃度; 0.27, 0.54, 1.08 mg-AI/L) した後, セラミックMF膜 (膜孔径; 0.1 μm) に通水した。実験原水及び膜処理水を採取し, それぞれのrNV-VLPs, Q β , MS2濃度を定量することにより, 除去率を算出した。なお, rNV-VLPs濃度の定量にはImmuno-PCR法を, Q β 及びMS2濃度の定量にはリアルタイム定量RT-PCR法を用いた。

(3) 膜ファウリングの影響評価

膜ろ過処理の経過に伴う物理的に可逆な膜ファウリングの進行 (ケーキ層の形成) がウイルス除去に与える影響を評価するため, ウイルスを添加していない豊平川河水を上記したインライン凝集 (添加濃度; 1.08 mg-AI/L) にて処理した後, セラミックMF膜に30, 60, 120分間通水することにより膜表面をアルミニウムフロックにてプレコートした。この後, rNV-VLPs, Q β , MS2を同時添加した河水をプレコートしたMF膜に直接通水した (凝集剤の添加無し)。実験原水及び膜処理水を採取し, それぞれのrNV-VLPs, Q β , MS2濃度を定量することにより, 除去率を算出した。

ケーキ層の形成の影響に加え, 膜ろ過処理の経過に伴う物理的に不可逆な膜ファウリングの進行 (膜細孔の目詰まり) がウイルス除去に与える影響を評価するため, ウイルスを添加していない豊平川河水をpH 6.8に調整した後, セラミック膜に2日間通水することによりファウリング物質を膜に蓄積させた。なお, 膜表面に形成されたケーキ層を除去するため, 通水1日後及び2日後に逆圧洗浄を実施した。この後, rNV-VLPs, Q β , MS2を同時添加した河水をファウリングが進行したMF膜に直接通水した (凝集剤の添加無し)。実験原水及び膜処理水を採取し, それぞれのrNV-VLPs, Q β , MS2濃度を定量することにより, 除去率を算出した。

3. 結果と考察

(1) rNV-VLPsの特性とImmuno-PCR法による定量

作製したrNV-VLPsを透過型電子顕微鏡にて観察したところ, 粒子状に自己組織化されたrNV-VLPsが確認された。また, 観察されたrNV-VLPsの粒径は35-39 nmであり, 野生のノロウイルスの粒径と同程度であった。作製したrNV-VLPsの濃度を新たに構築したImmuno-PCR法にて定量したところ, 従来の酵素免疫測定法 (ELISA) に比べ, 検出感度が100-1,000倍程度向上し, 10^{5-6} VLPs/mL程度まで定量可能となった (図-1)。以上の結果から, 本研究で作製したrNV-VLPsと新たに構築したImmuno-PCR法を併用することにより, 膜ろ過処理におけるノロウイルス

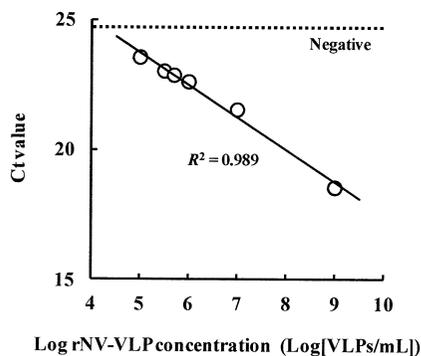


図-1. 新たに構築したImmuno-PCR法によるrNV-VLPsの定量

粒子の処理性を詳細に評価可能であると判断した。

(2) 膜ろ過処理におけるウイルスの処理性

膜ろ過処理におけるrNV-VLPsの除去率を図-2に示す。図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 : 原水のウイルス濃度, C : 膜処理水のウイルス濃度) にて表記した。図より, MF膜処理では, いずれの材質のMF膜を用いた場合であっても, rNV-VLPsの除去率は0.5 log以下であった。膜ろ過処理を行ったpH 6.8におけるrNV-VLPsの粒径分布を測定したところ, rNV-VLPsは単分散していることが確認され, また, rNV-VLPs及びMF膜の表面電位はいずれも負に帯電していることが明らかとなったことから, rNV-VLPsの粒径 (約40 nm) がMF膜の膜孔径 (0.1 μm) よりも小さく, また, rNV-VLPsとMF膜表面の間に作用する電気的相互作用によるrNV-VLPsの吸着除去効果が小さいことにより, MF膜処理単独ではrNV-VLPsをほとんど除去できなかったものと考えられた。これに対し, UF膜処理においては, 分画分子量10及び100 kDaの膜を用いた場合, 約2 logのrNV-VLPsの除去率が得られた。また, 1 kDaの膜を用いた場合においては, 米国環境保護局の要求値である4 log (99.99%) の除去率が達成された。加えて, セラミックMF膜処理の前処理としてインライン凝集処理を導入することにより, MF膜処理単独では除去できなかったrNV-VLPsを効果的に除去することができ, 0.54 mg-AI/L以上の凝集剤添加濃度においては, UF膜処理 (1 kDa) と同等以上の高い除去率が得られた。これは, 前段の凝集処理によってMF膜の膜孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され, フロックに吸着, あるいは捕捉されたrNV-VLPsが, 後段のMF膜処理によって効果的に抑止されたためであると推察された。以上の結果から, インライン凝集-セラミックMF膜処理は, ノロウイルス粒子の除去に有効であることが示唆された。

膜ろ過処理におけるrNV-VLPs, Q β , MS2の除去率を

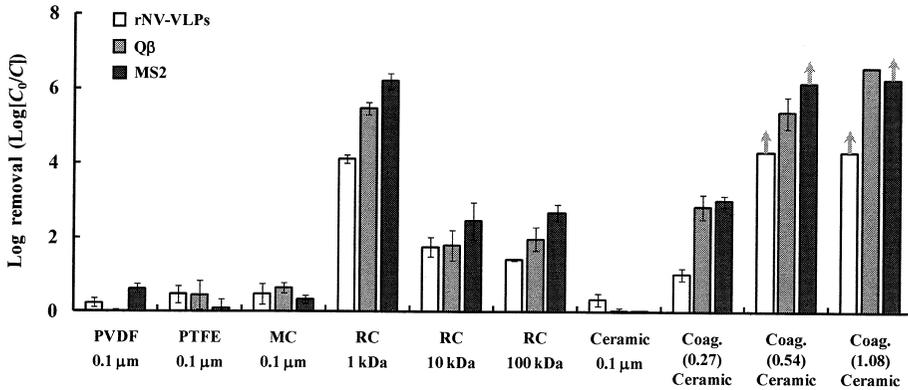


図-2. MF膜処理, UF膜処理, インライン凝集-セラミックMF膜処理におけるrNV-VLPs, Qβ, MS2の処理性

比較したところ, いずれの膜ろ過処理においても, rNV-VLPsの除去率は, Qβ及びMS2の除去率よりも低かった。従って, 大腸菌ファージQβ及びMS2をノロウイルス粒子の代替指標ウイルスとして用いる場合は, 処理性の差異を考慮する必要があることが示された。

(3) 膜ファウリングがウイルスの処理性に与える影響

膜ファウリングの進行したセラミックMF膜によるrNV-VLPsの除去率を図-3に示す。図より, 物理的に可逆なファウリング物質が蓄積した膜, すなわち, ケーキ層が形成された膜においては, rNV-VLPsの除去率はプレコート時間の経過と共に向上し, 120分間のプレコートを行った場合, 約2 logの除去率が得られた。同様に, 物理的に不可逆なファウリング物質が蓄積した膜, すなわち, 細孔が目詰まりした膜においても, 約1 logの除去率が得られた。従って, 膜ろ過処理の経過に伴う膜ファウリングの進行は, rNV-VLPsの処理性に影響を与え, 除去率が向上することが示された。以上の結果から, インライン凝集-セラミックMF膜処理においては, フロック形成のみならず, ケーキ層の形成や膜細孔の目詰まりもノロウイルス粒子の除去に寄与していることが明らかとなった。なお, 大腸菌ファージQβ及びMS2においても, rNV-VLPsの場合と同様の傾向が見られた。

4. まとめ

本研究では, ウイルス様粒子と新規のImmuno-PCR法を併用することにより, 膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子の処理性を詳細に評価し, 以下の知見を得た。

- (1) UF膜処理 (1 kDa) 及びインライン凝集-セラミックMF膜処理 (0.54 mg-AI/L以上) により, 4 logあるいはそれ以上のノロウイルス粒子の除去率が得られた。
- (2) インライン凝集-セラミックMF膜処理によるノロウ

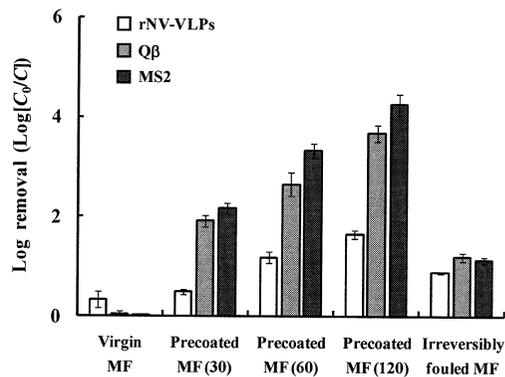


図-3. 膜ファウリングがrNV-VLPs, Qβ, MS2の処理性に与える影響

イルス粒子の除去には, フロック化による除去のみならず, ケーキ層の形成や膜細孔の目詰まりが影響していることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 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.
- 2) Sano T., Smith C.L. and Cantor C.R.: Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates, *Science*, Vol. 258, No. 5079, pp. 120-122, 1992.
- 3) Redman J.A., Grant, S.B., Olson T.M., Hardy M.E. and Estes M.K.: 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.