



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する指標性と実浄水工程における処理性
Author(s)	白川, 大樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15377号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15377
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91445
Type	doctoral thesis
File Information	Daiki_Shirakawa.pdf



トウガラシ微斑ウイルスの水中病原ウイルスに対する
指標性と実浄水工程における処理性

白川 大樹

北海道大学 大学院工学院 環境創生工学専攻

目次

第 1 章 序論	1
1.1 ウイルスの水系感染症.....	1
1.2 水環境におけるウイルスの存在実態.....	1
1.2.1 PCR 法による調査.....	1
1.2.2 感染性評価手法による調査.....	2
1.2.3 Viability-PCR 法による調査.....	2
1.3 浄水処理におけるウイルスの処理性.....	3
1.3.1 ウイルスの水道水質基準等.....	3
1.3.2 室内添加実験.....	4
1.3.3 多段バリアアプローチ.....	4
1.4 トウガラシ微斑ウイルス.....	5
1.5 ヒトカリシウイルス（ヒトノロウイルスおよびヒトサポウイルス）.....	6
1.5.1 ヒトサポウイルス.....	6
1.5.2 ヒトノロウイルス.....	6
1.6 本研究の目的.....	7
1.7 本論文の構成.....	8
参考文献.....	8
第 2 章 水道原水におけるウイルスの存在実態調査	15
2.1 本章の目的.....	15
2.2 実験方法.....	16
2.2.1 使用したウイルスの培養法.....	16
2.2.2 対象としたウイルスの定量法.....	18
2.2.3 陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法の構築.....	19
2.2.4 全国 10 カ所の水道原水におけるウイルスの存在実態調査.....	25
2.2.5 水道原水におけるウイルス濃縮法の有効性評価.....	25
2.2.6 濃縮試料水におけるリアルタイム定量（RT-）PCR 法の阻害性評価.....	25
2.2.7 濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性評価.....	27
2.2.8 水道原水におけるウイルスの生残性評価試験.....	28
2.3 実験結果と考察.....	29
2.3.1 陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法の構築.....	29
2.3.2 水道原水および下水放流水におけるウイルス濃縮法の有効性.....	32
2.3.3 濃縮試料水におけるリアルタイム定量（RT-）PCR 法の阻害性.....	33

2.3.4	濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性.....	36
2.3.5	全国 10 カ所の水道原水におけるウイルスの存在実態.....	41
2.3.6	水道原水におけるウイルスの生残性.....	46
2.4	本章のまとめ	56
	参考文献	56

第 3 章 実浄水工程におけるウイルスの処理性評価..... 63

3.1	本章の目的	63
3.2	実験方法	63
3.2.1	実浄水場の処理フローおよび採水ポイント	63
3.2.2	実浄水場における採水および濃縮.....	68
3.2.3	原水および浄水処理工程水におけるウイルス濃縮法の有効性評価.....	68
3.2.4	濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性評価.....	69
3.2.5	実浄水場の凝集沈殿-急速砂ろ過処理を模した添加実験.....	69
3.2.6	実浄水場の凝集-MF 膜処理を模した添加実験.....	70
3.3	実験結果と考察.....	71
3.3.1	原水および浄水処理工程水におけるウイルス濃縮法の有効性.....	71
3.3.2	濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性.....	72
3.3.3	実浄水場における PMMoV の処理性.....	79
3.3.4	実浄水場を模した添加実験における PMMoV の処理性.....	83
3.4	本章のまとめ	87
	参考文献	88

第 4 章 ヒトカリシウイルスの物理的な浄水処理性評価..... 90

4.1	本章の目的	90
4.2	実験方法（ヒトサポウイルス）	91
4.2.1	使用した HuSaV および AstV の培養法.....	91
4.2.2	凝集沈澱-急速砂ろ過処理実験.....	92
4.2.3	凝集-MF 膜処理実験.....	93
4.2.4	電気移動度測定.....	93
4.3	実験結果と考察（ヒトサポウイルス）	94
4.3.1	HuSaV の高濃度精製ストックの調製.....	94
4.3.2	凝集沈澱-急速砂ろ過処理における HuSaV および AstV の除去特性.....	95
4.3.3	凝集-MF 膜処理における HuSaV および AstV の除去特性.....	97
4.3.4	HuSaV, AstV, MNV および PMMoV の表面電位特性.....	100
4.4	実験方法（ヒトノロウイルス）	101

4.4.1	使用した VLPs の発現法と定量法.....	101
4.4.2	VLPs の分解・再合成法の構築.....	101
4.4.3	VLPs 内部への金ナノ粒子の封入.....	102
4.4.4	VLPs 内部への人工合成遺伝子の封入.....	102
4.4.5	VLPs 内部への遺伝子結合金ナノ粒子の封入.....	104
4.4.6	電子顕微鏡観察.....	104
4.4.7	塩化セシウム平衡遠心法.....	104
4.5	実験結果と考察（ヒトノロウイルス）	105
4.5.1	VLPs の分解・再合成法の構築.....	105
4.5.2	VLPs 内部への金ナノ粒子の封入.....	107
4.5.3	VLPs 内部への人工合成遺伝子の封入.....	108
4.5.4	VLPs 内部への DNA-AuNPs の封入	112
4.6	本章のまとめ	113
	参考文献	114
第 5 章 結論.....		117
5.1	本研究で得られた知見.....	117
5.2	本研究の課題と今後の展望.....	118
	参考文献	120
	謝辞	121

第1章 序論

1.1 ウイルスの水系感染症

水系感染する可能性のある病原ウイルスは、主にヒトおよび動物の腸管上皮、または腸管上皮周辺の組織で増殖し、糞便中に排泄される性質を有しており、腸管系ウイルスと総称される (WHO, 2011). 腸管系ウイルスは 140 種以上を数えるとされており、その症状は、胃腸炎のみならず、髄膜炎、小児麻痺、肝炎等の重篤な急性疾患を引き起こすことも知られている (Health Canada, 2017). これら腸管系ウイルスの中でも、アデノウイルス (AdV; AdenoVirus), エンテロウイルス (EVs; EnteroViruses), ヒトノロウイルス (HuNoV; Human NoroVirus), ヒトサポウイルス (HuSaV; Human Sapovirus), アストロウイルス (AstV; AstroVirus), A 型肝炎ウイルス (HAV; Hepatitis A Virus), E 型肝炎ウイルス (HEV; Hepatitis E Virus), パレコウイルス (PeV; ParechoVirus), ロタウイルス (RV; RotaVirus) は、飲料水を介して伝播する病原体として、世界保健機関 (WHO; World Health Organization) の飲料水水質ガイドラインに掲載されている (WHO, 2017). また、AdV, EVs, HuNoV, HuSaV については、米国環境保護庁 (USEPA; United States Environmental Protection Agency) の飲料水汚染物質候補リスト (CCL5; Drinking Water Contaminant Candidate List 5) にも掲載されている (USEPA, 2022).

1.2 水環境におけるウイルスの存在実態

1.2.1 PCR 法による調査

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるウイルス定量技術の発展に伴い、水環境におけるウイルスの存在実態調査が広く行われるようになった。その結果、水道原水を含む環境水中においても、水系感染症を引き起こす病原ウイルスが広く存在していることが周知の事実となってきた。Haramoto et al. (2018) の総説によれば、表流水においては、最大 10^{2-5} copies/L 程度の病原ウイルスが存在しており、中でも、AdV および HuNoV が最大 10^{4-5} copies/L 程度の高濃度で存在していることが明らかとなっている。また、日本の水道原水においては、AdV が 10^{2-4} copies/L, HuNoV が 10^{2-5} copies/L, HuSaV が 10^{2-3} copies/L, RV が 10^{4-6} copies/L 程度の濃度で存在していることが明らかとなっている (Haramoto et al., 2012; Miura et al., 2019). しかしながら、PCR 法による定量においては、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を定量の標的としていることから、ウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質が損傷を受けることにより感染力が失われた (不活化した) ウイルス、あるいは、遺伝子のうち PCR 法の標的外の領域が損傷を受けることにより不活化したウイルスについても、定量されることになる。従って、PCR 法による定量を実施する場合、リスク評価において重要となる感染力を保持したウイルスに関する情報が得られないという問題がある (Fuster et al.,

2016; Lee et al., 2018; Leifels et al., 2015; Parshionikar et al., 2010; Prevost et al., 2016). これらのことから、水環境に存在する病原ウイルスの感染リスクを評価する上では、感染力を保持したウイルスの濃度を選択的に定量可能な手法を適用することが重要となる。

1.2.2 感染性評価手法による調査

感染力を保持したウイルスの濃度を選択的に定量するための手法として、細胞を用いた感染性評価手法、中でも、ウイルスの感染による細胞の形態変化 (CPE; CytoPathic Effect) の発現に基づく PFU (Plaque-Forming Unit) 法や TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) 法が広く用いられている。オランダにおいては、PFU 法を用いた水環境におけるウイルスの存在実態調査が行われており、EVs が 10⁻³⁻⁰ PFU/L 程度、RV を含むレオウイルスが 10⁻³⁻¹ PFU/L 程度で検出されたことが報告されている (Lodder and de Roda Husman, 2005; Lodder et al., 2010)。しかしながら、これら細胞を用いた感染性評価手法には、(1) 労力と時間がかかること、(2) ひとつの種類の細胞に対して複数種のウイルスが感染する可能性があることから、ウイルスの特異的な定量が難しいこと、(3) 汎用細胞を用いた効率的な培養法が確立されていないウイルスには適用できないこと、等の欠点がある (Health Canada, 2017)。

1.2.3 Viability-PCR 法による調査

ウイルスの感染力の有無を決定づける主要な要因のひとつとして、カプシドタンパク質の完全性が挙げられる (Wigginton et al., 2012; Torrey et al., 2019)。近年、カプシドタンパク質の完全性の観点から感染力を保持したウイルスと不活化したウイルスを識別可能なウイルス定量法として、Viability-PCR 法が提唱されている (Canh et al., 2021, 2022; Fuster et al., 2016; Karim et al., 2015; Lee et al., 2018; Leifels et al., 2015, 2021; Parshionikar et al., 2010; Prevost et al., 2016; Randazzo et al., 2016; Shirasaki et al., 2020)。Viability-PCR 法においては、分子量の小さい光反応性色素である EMA (Ethidium MonoAzide; 420 Da) や PMA (Propidium MonoAzide; 511 Da) 等を用いた前処理を実施することにより、これらの色素がカプシドタンパク質のわずかな損傷からウイルス粒子内部に浸透した後、遺伝子に結合し、PCR 法による遺伝子の増幅を阻害する。一方、これらの色素は、カプシドタンパク質に損傷のないウイルス粒子内部には浸透することができないため、光反応性色素を用いた前処理による遺伝子の増幅阻害の有無に基づき、カプシドタンパク質に損傷のないウイルス (感染力を保持している可能性のあるウイルス) とカプシドタンパク質に損傷のあるウイルス (不活化したウイルス) を識別することが可能となる。これまで、培養したウイルスを添加した実験原水を用いた室内規模のウイルス消毒処理実験 (熱処理や遊離塩素処理) においては Viability-PCR 法が広く適用されてきているものの (Leifels et al., 2015; Prevost et al., 2016; Shirasaki et al., 2020)、水環境、特に、表流水におけるウイルスの存在実態調査においては、Viability-PCR 法の適用事例が非常に限定されている状況にある (Prevost et al., 2016; Canh et al., 2021)。

1.3 浄水処理におけるウイルスの処理性

1.3.1 ウイルスの水道水質基準等

1.2 に記述したように、感染力を保持したウイルスに関する知見は十分に得られていないものの、水道原水と成り得る環境水中においても、病原ウイルスが広く存在していることは周知の事柄となってきた。病原ウイルスに汚染されたこれらの環境水を水道原水として取水する場合、仮に浄水処理が不十分であれば、供給される水道水中に病原ウイルスが混入する可能性は十分に考えられる。従って、水道水を介した病原ウイルスによる水系感染症を制御するためには、水道水中の病原ウイルス濃度を詳細に把握し、ウイルスの除去および不活化に効果的な浄水処理を実施することが重要となる。

米国等の諸外国においては、ウイルスを対象とした水道水質管理の枠組みが構築されている。例えば、米国では、National Primary Drinking Water Regulations において、表流水および地下水を水道原水に用いる場合、ろ過および消毒処理によって、病原ウイルスを 4-log_{10} 除去あるいは不活化することを規定している (USEPA, 2001)。カナダの飲料水質ガイドライン (Guidelines for Canadian Drinking Water Quality) においても、病原ウイルスを 4-log_{10} 以上除去あるいは不活化するという処理目標ガイドライン値が示されている (Health Canada, 2017)。また、オランダでは、塩素消毒処理に頼ることなく、定量的微生物リスク評価に基づく先進的な病原ウイルスのリスク管理を実施している。実際、The Dutch Drinking Water Act of 2001 は、10,000 人あたりの年間感染を 1 人未満 (水道水中の病原ウイルス濃度として 1 個/1,000,000 L 程度) とする規制目標を設定している (Anonymous, 2001)。また、オーストラリアの飲料水ガイドライン (Australian Drinking Water Guidelines) においては、ウイルスに関するガイドライン値は設定されていないものの、ウイルスに対する水道水の安全性を確保するためには、水道水 1,000 L あたりの病原ウイルス数を 1 個未満にすることが望ましいとの記述がある (NHMRC, 2011)。WHO の飲料水水質ガイドラインにおいては、ロタウイルスを参照病原体とした定量的微生物リスク評価に基づく飲料水中の病原ウイルス濃度の許容値として 1 個/100,000 L が示されている (WHO, 2011)。これに対し、日本では、微生物に関わる水道水質基準項目にウイルスは規定されていない。現在、細菌については、一般細菌 (1 mL の検水で形成される集落数が 100 以下) と大腸菌 (検出されないこと) に関する項目が規定されており、原虫 (クリプトスポリジウム) については、ろ過水の濁度を 0.1° 以下とする対策指針が定められている。しかしながら、これらの指標微生物は、病原ウイルスに比べて浄水処理に対する耐性が低いことから、これらの指標微生物が検出されない水道水であっても、病原ウイルスが存在している可能性は否定できないとされている (WHO, 2011)。従って、水道における病原ウイルスの感染リスク管理においては、水道水中の病原ウイルス濃度を直接モニタリングすることが重要となる。

しかしながら、上述したガイドライン値のような極低濃度 (1 個/100,000 L 等) の病原ウイルスを直接定量することは、事実上不可能である。実際、1,000 L 以上の浄水処理工程水を数 mL 以下に濃縮した場合においても、病原ウイルス濃度が PCR 法の定量下限値以下と

なる場合がほとんどであることが報告されている (Albinana-Gimenez et al., 2009; Prevost et al., 2016; Sylvestre et al., 2021; Varughese et al., 2018). これに対し、水道原水中の病原ウイルス濃度を定量し、浄水処理工程における病原ウイルスの低減率を評価することができれば、両者から浄水 (水道水) 中の病原ウイルス濃度を算出することが可能となる。従って、微生物学的な水道水の安全性を担保する上では、水道原水における病原ウイルスの存在実態および浄水処理工程における病原ウイルスの処理性を詳細に把握することが重要となる。

1.3.2 室内添加実験

上述したように、浄水処理工程水中の病原ウイルス濃度は極めて低く、直接の定量が困難であることから、浄水処理における病原ウイルスの処理性を評価する際には、対象とする病原ウイルスを多量に培養し、これを添加した実験原水を用いた室内規模の浄水処理実験 (添加実験) が広く実施されている (Abbaszadegan et al., 2007; Cromeans et al., 2010; Mayer et al., 2008; Nwachuku et al., 2005; Shirasaki et al., 2017, 2018). 添加実験においては、実際の浄水場では変更不可能な処理フローや処理条件 (凝集 pH, 凝集剤の種類や添加濃度, ろ材の種類等) を自由に変更できることから、これらの処理条件がウイルスの処理性に与える影響を評価することが可能である。実際、培養が容易な病原ウイルスについては、添加実験が広く実施されており、様々な処理条件における処理性に関する知見が集積されている (Abbaszadegan et al., 2007; Cromeans et al., 2010; Mayer et al., 2008; Nwachuku, 2005; Shirasaki et al., 2017, 2018). 一方、添加実験が実浄水工程を模擬できているかどうかを判断することは難しいことから、添加実験から得られた結果を実浄水工程に適用する場合には注意が必要である。実際、複数の研究における微生物の浄水処理性評価の結果に基づいて各浄水処理工程における Log Credit を決定する際には、それぞれの研究の規模の重み (室内添加実験 or 実浄水場における調査) を考慮することが推奨されている (Hjinen and Medema, 2010).

1.3.3 多段バリアアプローチ

浄水処理におけるウイルスの低減は、(1) 凝集沈澱-急速砂ろ過処理や膜ろ過処理等の物理的な浄水処理によるウイルスの除去、並びに (2) 遊離塩素処理、オゾン処理および紫外線処理等の消毒処理によるウイルスの不活化の 2 要素からなる。消毒処理による病原ウイルスの不活化に関する研究はこれまでに数多くなされており、その有効性が示されている一方、これらの消毒処理に高い耐性を有する病原ウイルスが存在することも明らかとなっている。例えば、遊離塩素処理、オゾン処理および紫外線処理においては、それぞれコクサッキーウイルス (EV 属, CV ; CoxsackieVirus) B5 型, HAV および AdV 40 型が高い耐性を有することが報告されている (Cromeans et al., 2010; Health Canada, 2017; Nwachuku, 2005). 従って、物理的な浄水処理と消毒処理を組み合わせた多段バリアアプローチを適用することにより、消毒処理によるウイルスの不活化のみならず、物理的な浄水処理においても、ウイルスを効果的に除去することが求められる (Shannon et al., 2008; WHO, 2011).

1.4 トウガラシ微斑ウイルス

メタゲノム解析技術の発展に伴い、ピーマンやトウガラシを宿主とする植物ウイルスであるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV; Pepper Mild Mottle Virus) が、ヒト糞便中に最も高濃度で存在する RNA ウイルスであることが明らかとなった (ヒト糞便 1 g あたり 10^9 個; Zhang et al., 2006). PMMoV を高濃度に含む排水は、主に下水処理場において処理されるものの、下水処理による除去率が病原ウイルスよりも低いことから (Kitajima et al., 2014), 下水処理水 (放流水) を介して放流先の環境水に PMMoV が混入することになる。実際、水道原水と成り得る環境水中においても、PMMoV が高濃度で存在していることが明らかとなっている (Hamza et al., 2011; Haramoto et al., 2018; Kitajima et al., 2018; Symonds et al., 2018)。従って、適切なウイルス濃縮法を適用すれば、浄水処理工程水中の PMMoV 濃度を定量できる可能性があることから、PMMoV を対象とすることにより、実浄水工程におけるウイルスの処理性を直接評価できるものと考えられる。これに加えて、我々の研究グループが実施した添加実験においては、凝集沈澱-急速砂ろ過処理および膜ろ過処理における PMMoV の除去率が、代表的な病原ウイルスである AdV, CV, HAV の除去率と同程度、あるいはやや低いことが明らかとなっている (Shirasaki et al., 2017, 2018)。このことは、PMMoV が、これらの物理的な浄水処理工程における病原ウイルスの挙動指標と成り得ることを示唆している。従って、実浄水工程における PMMoV の処理性を直接評価することができれば、その処理性評価結果から、病原ウイルスの処理性を推定できるものと考えられる。

これまでに、凝集沈澱-急速砂ろ過処理 (原水: 表流水), 精密ろ過 (MF; microfiltration) 膜単独処理 (原水: 地下水), 緩速砂ろ過処理 (原水: 表流水) を実施している浄水場を対象とし、実浄水工程における PMMoV の処理性が評価されている (Asami et al., 2016; Canh et al., 2019; Kato et al., 2018)。これらの既往研究においては、原水および浄水処理工程水中の PMMoV 濃度の定量に先立ち、水試料の濃縮が実施されている。これまでに、水中のウイルスを濃縮するために、いくつかのウイルス濃縮法が構築されており、これらのウイルス濃縮法の有効性はウイルスの物理化学的な特性に影響されることが知られている (Haramoto et al., 2018; Shi et al., 2017)。しかしながら、病原ウイルス (球状) と PMMoV (桿状) の形状は大きく異なるにも関わらず、PMMoV に対する有効性が十分に検討されないまま、既存のウイルス濃縮法が水中の PMMoV の濃縮に適用されているのが現状である (Asami et al., 2016; Canh et al., 2019; Kato et al., 2018)。

また、水道原水における病原ウイルス、特に、1.1 に記述した 9 種類の病原ウイルスと PMMoV の存在濃度の関係性は、ほとんど把握されていない状況にある。これに加えて、これらの病原ウイルスと PMMoV の物理的な浄水処理性の関係性についても、十分な知見は蓄積されていないのが現状である。従って、PMMoV が、これらの病原ウイルスの挙動指標と成り得るかどうかについては、未だ議論の余地があるといえる。

1.5 ヒトカリシウイルス（ヒトノロウイルスおよびヒトサポウイルス）

1.5.1 ヒトサポウイルス

1.1 に記述したように、HuSaV は、飲料水を介して伝播する病原体として WHO の飲料水水質ガイドライン（WHO, 2017）に掲載されており、更に、USEPA の飲料水汚染物質候補リスト（USEPA, 2022）にも掲載されている重要な病原体である。PCR 法による調査においては、水道原水中から HuSaV が検出されたとの報告がなされていることから（Haramoto et al., 2012; Sano et al., 2011; Sylvestre et al., 2021）、仮に浄水処理における HuSaV の低減が不十分であれば、水道水を介した HuSaV による水系感染症が発生する恐れがある。実際、水道管の破損による配水系への下水の混入が原因ではあるものの、水道水を介した HuSaV の集団感染が発生したとの報告もなされている（Kauppinen et al., 2019）。従って、水道水を介した HuSaV による水系感染症の発生を抑止するためには、浄水処理における HuSaV の処理性を詳細に把握することが非常に重要である。

しかしながら、HuSaV は、その発見から 40 年もの間、汎用細胞を用いた効率的な培養法が確立されてこなかったことから、添加実験の実施に必要なウイルス量を確保すること自体が難しく、浄水処理性に関する知見が全く得られていない状況にあった。従って、HuSaV については、PMMoV が物理的な浄水処理工程における挙動指標と成り得るかどうかに関する知見が全く得られていないのが現状である。このような中、ごく最近、汎用細胞を胆汁酸存在下で用いることにより、HuSaV を効率的に増殖できることが見出された（Takagi et al., 2020）。従って、この汎用細胞増殖系を活用することにより、添加実験の実施が可能となれば、HuSaV の浄水処理性が評価可能となるものと考えられる。

1.5.2 ヒトノロウイルス

HuNoV は、HuSaV と共に、WHO の飲料水水質ガイドライン（WHO, 2017）および USEPA の飲料水汚染物質候補リスト（USEPA, 2022）に掲載されている重要な病原体である。1.2.1 に記述したように、他の病原ウイルスに比べて水道原水（表流水）中に高濃度で存在していることから、水道水を介した HuNoV による水系感染症の発生を抑止するためには、浄水処理における HuNoV の処理性を詳細に把握することが非常に重要である。

しかしながら、HuNoV は、HuSaV と同様に、その発見から 50 年もの間、汎用細胞を用いた効率的な培養法が確立されてこなかったことから、添加実験の実施に必要なウイルス量を確保することが難しく、浄水処理性の評価がほとんどなされていないのが現状である。これまでに、HuNoV に感染したボランティアの糞便試料から抽出した HuNoV を用いた添加実験を実施することにより、HuNoV の凝集沈殿処理性（Shin and Sobsey, 2015）、遊離塩素処理性（Kitajima et al., 2010; Shin and Sobsey, 2008）、オゾン処理性（Shin and Sobsey, 2003）の評価がなされてきている。しかしながら、これらの既往研究においては、(1) 糞便試料から抽出した HuNoV が感染力を保持した完全体の粒子であるかを判断できないこと、(2) 糞便試料が貴重であることから、実験条件の範囲や実施した実験回数が非常に限定的であるこ

と、(3) HuNoV の消毒処理性を評価しているにもかかわらず、PCR 法による定量しか実施できないことから、HuNoV の感染力の消長を議論できないこと、(4) 結果として、消毒処理における HuNoV の RNA の消長しか議論できないことから、HuNoV の消毒処理性が過小評価されている可能性が十分に考えられること、等の課題があった。

また、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ネコカリシウイルスやマウスノロウイルス (Vinjé et al., 2019) が HuNoV の代替指標として提案され、浄水処理性の評価に用いられている (Abbaszadegan et al., 2007; Cromeans et al., 2010; Kahler et al., 2010; Mayer et al., 2008)。しかしながら、これらの代替指標ウイルスと HuNoV 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。

このような中、近年、ヒト腸管エンテロイド (HIE; Human Intestinal Enteroid) を用いることにより、HuNoV の培養に成功したとの報告がなされた (Ettayebi et al., 2016)。しかしながら、この培養法には、(1) 汎用細胞を培養する場合に比べて、HIE の培養に格段に労力と時間がかかること、(2) 糞便試料中の HuNoV は培養できるものの、HIE を用いて培養した HuNoV の継代培養が困難であること (4 回目以降の継代培養には成功していない)、等の短所がある (Estes et al., 2019)。従って、HIE を用いた培養法は効率的とは言い難く、HuNoV は、未だ糞便試料が入手できなければ培養できない状況にある。以上のことから、現時点においても、HuNoV を用いた添加実験を実施することは、非常に困難であるといえる。

一方、我々の研究グループは、遺伝子組換え技術を駆使することにより、HuNoV のカプシドタンパク質から構成される HuNoV のウイルス様粒子 (VLPs; Virus-Like Particles) を多量に発現し、これを添加実験に用いることにより、培養法の確立を待つことなく HuNoV の物理的な浄水処理性 (凝集沈澱-急速砂ろ過処理性および膜ろ過処理性) を評価してきた (Shirasaki et al., 2010; Matsushita et al., 2013)。これらの既往研究においては、VLPs の定量に、タンパク質を標的とする ELISA 法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 法) および免疫 PCR 法が用いられてきた。しかしながら、これらの定量法は、定量感度が低かったことから (ELISA 法 10^{11} VLPs/L, 免疫 PCR 法 10^{8-9} VLPs/L), 実際の水道原水における HuNoV 濃度 (最大 10^5 copies/L; Miura et al., 2019) に比べて極端に高い添加濃度 (10^{13-14} VLPs/L) で添加実験を実施せざるを得ず (Shirasaki et al., 2010; Matsushita et al., 2013), VLPs を用いて評価された HuNoV の浄水処理性が、実浄水工程における処理性を反映していない可能性が常に考えられた。これらのことから、実際の水道原水に近い低濃度域における HuNoV の浄水処理性を、VLPs を用いて評価するためには、高感度に定量可能な新たな VLPs の創製が必要であると考えられる。

1.6 本研究の目的

このような背景から、本研究では、病原ウイルスと同時に PMMoV を効果的に回収・濃縮可能な新規ウイルス濃縮法を構築し、これを適用することにより、全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルス (1.1 に記述した 9 種類) および PMMoV の存在実態を調査すると共

に、Viability-PCR 法による定量を実施することにより、カプシドタンパク質の完全性の観点から、水道原水におけるウイルスの感染力の有無を議論することを目的とする。また、構築したウイルス濃縮法を適用することにより、PMMoV を対象とし、実浄水工程におけるウイルスの処理性を評価することを目的とする。これらに加えて、ごく最近確立された HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、これまで全く明らかにされてこなかった HuSaV の物理的な浄水処理性を評価することを目的とする。更に、培養困難な HuNoV の物理的な浄水処理性の評価に向けて、高感度に定量可能な新たな VLPs を創製することを目的とする。

1.7 本論文の構成

本論文は、以下の 5 章からなる。なお、各章毎に研究背景、目的、実験方法、結果、考察および結論を記述した。

第 1 章では、研究背景と目的について論じた。

第 2 章では、水道原水および浄水処理工程水中の病原ウイルスおよび PMMoV を効果的に回収・濃縮可能な新規ウイルス濃縮法を構築し、これを適用することにより、全国 10 カ所の水道原水における上述した 9 種類の病原ウイルスおよび PMMoV の存在実態を調査する。更に、Viability-PCR 法による定量を実施することにより、カプシドタンパク質の完全性の観点から、水道原水におけるウイルスの感染力の有無についても議論する。

第 3 章では、第 2 章で構築したウイルス濃縮法を適用することにより、水道原水中に病原ウイルスに比べて高濃度で存在することが明らかとなった PMMoV を対象とし、実浄水工程におけるウイルスの処理性を評価する。

第 4 章では、ごく最近確立された HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、HuSaV の物理的な浄水処理性を評価すると共に、PMMoV が HuSaV の挙動指標と成り得るかを議論する。また、培養困難な HuNoV の物理的な浄水処理性の評価に向けて、高感度に定量可能な外来遺伝子を封入した VLPs（遺伝子封入 VLPs）の創製についても取り組む。

第 5 章では、本研究で得られた知見をまとめ、結論とする。

参考文献

Abbaszadegan, M., Mayer, B.K., Ryu, H., Nwachuku, N., 2007. Efficacy of Removal of CCL Viruses under Enhanced Coagulation Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 41, 971–977.

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calqua, B., Huguet, J.M., Matia, L., Girones, R., 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. *Water Res.* 43 (7), 2011–2019.

- Anonymous, 2001. Decision of January 9, 2001 to amend the Drinking Water Decree in connection with the Directive on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the Kingdom of the Netherlands. 31, 1–53 (in Dutch).
- Asami, T., Katayama, H., Torrey, J.R., Visvanathan, C., Furumai, H., 2016. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation–sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Res.* 101, 84–94.
- Canh, V.D., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Removal of pepper mild mottle virus by full-scale microfiltration and slow sand filtration plants. *npj Clean Water*, 2, 18.
- Canh, V.D., Torii, S., Furumai, H., Katayama, H., 2021. Application of capsid integrity (RT-)qPCR to assessing occurrence of intact viruses in surface water and tap water in Japan. *Water Res.* 189, 116674.
- Canh, V.D., Liu, M., Sangsanont, J., Katayama, H., 2022. Capsid integrity detection of pathogenic viruses in waters: Recent progress and potential future applications. *Sci. Total Environ.* 827, 154258.
- Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R., 2010. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (4), 1028–1033.
- Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, K., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A.R., Burrin, D., Graham, D.Y., Ramani, S., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 353 (6306), 1387–1393.
- Estes, M.K., Ettayebi, K., Tenge, V.R., Murakami, K., Karandikar, U., Lin, S.-C., Ayyar, B.V., Cortes-Penfield, N.W., Haga, K., Neill, F.H., Opekun, A.R., Broughman, J.R., Zeng, X.-L., Blutt, S.E., Crawford, S.E., Ramani, S., Graham, D.Y., Atmar, R.T., 2019. Human Norovirus Cultivation in Nontransformed Stem Cell-Derived Human Intestinal Enteroid Cultures: Success and Challenges. *Viruses*, 11 (7), 638.
- Fuster, N., Pinto, R.M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., Guix, S., 2016. Propidium monoazide

RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res.* 101, 226–232.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., Wilhelm, M., 2011. Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Res.* 45 (3), 1358–1368.

Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., 2012. Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms. *Food Environ. Virol.* 4 (3), 93–101.

Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., 2013. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (23), 7413–7418.

Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168–186.

Health Canada, 2017. Guidelines for Canadian drinking water quality: guideline technical document—Enteric Viruses in Drinking Water. Water and Air Quality Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada.

Hijnen, W.A.M., Medema, G.J., 2010. Elimination of Micro-organisms by Drinking Water Treatment Processes: A Review. IWA Publishing, London, UK.

Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., Hill, V.R., 2010. Effects of source water quality on 647 chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (15), 5159–5164.

Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J. Virol. Methods* 219, 51–61.

Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation–sedimentation, rapid

- sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. *Water Res.* 132, 61–70.
- Kauppinen, A., Pitkänen, T., Al-Hello, H., Maunula, L., Hokajärvi, A.-M., Rimhanen-Finne, R., Miettinen, I.T., 2019. Two drinking water outbreaks caused by wastewater intrusion including sapovirus in Finland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16 (22), 4376.
- Kitajima, M., Tohya, Y., Matsubara, K., Haramoto, E., Utagawa, E., Katayama, H., 2010. Chlorine inactivation of human norovirus, murine norovirus and poliovirus in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* 51 (1), 119–121.
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes — Identification of potential viral indicators. *Sci. Total Environ.* 488–489, 290–296.
- Kitajima, M., Sassi, H.P., Torrey, J.R., 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *npj Clean Water*, 1, 19.
- Lee, H.W., Lee, H.M., Yoon, S.R., Kim, S.H., Ha, J.H., 2018. Pretreatment with propidium monoazide/sodium lauroyl sarcosinate improves discrimination of infectious waterborne virus by RT-qPCR combined with magnetic separation. *Environ. Pollution* 233, 306–314.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *Int J Hyg Environ Health* 218 (8), 686–693.
- Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., Sirikanchana K., 2021. Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – a systematic review. *Water Res.* X 11, 100080.
- Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2005. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (3), 1453–1461.
- Lodder, W.J., Van den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., de Roda Husman, A.M., 2010. Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (17), 5965–5971.

- Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y., 2013. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and pre-coagulation–microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Res.* 47 (15), 5819–5827.
- Mayer, B.K., Ryu, H., Abbaszadegan, M., 2008. Treatability of U.S. Environmental Protection Agency contaminant candidate list viruses: removal of coxsackievirus and echovirus using enhanced coagulation. *Environ. Sci. Technol.* 42 (18), 6890–6896.
- Miura, T., Gima, A., Akiba, M., 2019. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food Environ Virol* 11 (1), 9–19.
- NHMRC, 2011. Australian Drinking Water Guidelines 6. National Health and Medical Research Council, Canberra, Australia.
- Nwachuku, N., Gerba, C.P., Oswald, A., Mashadi, F.D., 2005. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9), 5633–5636.
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4318–4326.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Res.* 91, 68–76.
- Randazzo, W., Lopez-Galvez, F., Allende, A., Aznar, R., Sanchez, G., 2016. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* 229, 1–6.
- Sano, D., Pérez-Sautu, U., Guix, S., Pintó, R.M., Miura, T., Okabe, S., Bosch, A., 2011. Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat River catchment, Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (3), 1111–1114.
- Shannon, M.A., Bohn, P.W., Elimelech, M., Georgiadis, J.G., Marinas, B.J., Mayes, A.M., 2008. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452 (7185), 301–

- Shi, H., Pasco, E.V., Tarabara, V.V., 2017. Membrane-based methods of virus concentration from water: a review of process parameters and their effects on virus recovery. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 3, 778–792.
- Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2003. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7), 3975–3978.
- Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res.* 42 (17), 4562–4568.
- Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2015. Removal of norovirus from water by coagulation, flocculation and sedimentation processes. *Water Sci. Technol.: Water Supply*, 15 (1), 158–163.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Ohno, K., 2010. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Res.*, 44 (5), 1307–1316.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., 2017. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Res.* 115, 29–39.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., 2018. Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation–rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Res.* 129, 460–469.
- Sylvestre, É., Prévost, M., Burnet, J.-B., Pang, X., Qiu, Y., Smeets, P., Medema, G., Hachad, M., Dorner, S., 2021. Demonstrating the reduction of enteric viruses by drinking water treatment during snowmelt episodes in urban areas. *Water Res.* X 11, 100091.
- Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2018. Pepper mild mottle virus: a plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water Res.* 144, 1–12.
- Takagi, H., Oka, T., Shimoike, T., Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M.,

- Wang, Q., Saif, L.J., Noda, M., 2020. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (50), 32078–32085.
- Torrey, J., von Gunten, U., Kohn, T., 2019. Differences in viral disinfection mechanisms as revealed by quantitative transfection of echovirus 11 genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (14), e00961-19.
- USEPA, 2001. National primary drinking water regulations. EPA 816-F-01-007. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- USEPA, 2022. Drinking Water Contaminant Candidate List 5. EPA-HQ-OW-2018-0594. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Varughese, E.A., Brinkman, N.E., Anneken, E.M., Cashdollar, J.L., Fout, G.S., Furlong, E.T., Kolpinc, D.W., Glassmeyer, S.T., Keely, S.P., 2018. Estimating virus occurrence using Bayesian modeling in multiple drinking water systems of the United States. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1330–1339.
- Vinje, J., Estes, M.K., Esteves, P., Green, K.Y., Katayama, 722 K., Knowles, N.J., L'Homme, Y., Martella, 723 V., Vennema, H., White, P.A., ICTV Report Consortium, 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: 724 Caliciviridae. *J. Gen. Virol.* 100 (11), 1469–1470.
- WHO, 2011. Guidelines For Drinking-Water Quality, 4th ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2017. Guidelines For Drinking-Water Quality, 4th ed. incorporating the 1st addendum. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46 (21), 12069–12078.
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y.J., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.*, 4 (1), 108–118.

第2章 水道原水におけるウイルスの存在実態調査

2.1 本章の目的

水環境におけるウイルスの存在実態調査に広く用いられている PCR 法は、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を定量の標的としていることから、感染力を保持したウイルスと不活化したウイルスを識別できないという問題がある (Fuster et al., 2016; Lee et al., 2018; Leifels et al., 2015; Parshionikar et al., 2010; Prevost et al., 2016)。一方、感染力を保持したウイルスを選択的に定量可能な感染性評価手法 (PFU 法や TCID₅₀ 法) については、労力と時間がかかる、効率的な培養法が未確立なウイルスには適用できない、等の欠点がある (Health Canada, 2017)。近年、カプシドタンパク質の完全性の観点から感染力を保持したウイルスと不活化したウイルスを識別可能な定量法として、光反応性色素を用いた前処理と PCR 法を組み合わせた Viability-PCR 法が提唱されている (Canh et al., 2021, 2022; Fuster et al., 2016; Karim et al., 2015; Lee et al., 2018; Leifels et al., 2015, 2021; Parshionikar et al., 2010; Prevost et al., 2016; Randazzo et al., 2016; Shirasaki et al., 2020)。光反応性色素である PMA を用いた Viability-PCR 法の中でも、我々の研究グループは、その改良試薬 PMA_{xx} と反応促進試薬 PMA Enhancer を併用した PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法が、熱処理および遊離塩素処理により不活化したウイルスと感染力を保持したウイルスを最も効果的に識別可能であることを報告している (Shirasaki et al., 2020)。そこで、本章では、この PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法を水道原水における病原ウイルスの存在実態調査に適用することにより、カプシドタンパク質の完全性の観点から、水道原水における病原ウイルスの感染力の有無を議論することを目的とする。

一方、環境水中においては、植物ウイルスである PMMoV が高濃度で存在することが明らかとなってきている (Kitajima et al., 2018; Symonds et al., 2018)。従って、PMMoV を病原ウイルスの挙動指標として活用することにより、実浄水工程におけるウイルスの処理性を直接評価できる可能性が考えられる。しかしながら、水道原水における病原ウイルスと PMMoV の存在濃度の関係性は、ほとんど把握されていない状況にある。仮に水道原水中に病原ウイルスが PMMoV よりも高濃度で存在していれば、PMMoV が病原ウイルスの挙動指標となる場合 (浄水処理工程における PMMoV の除去率が病原ウイルスと同程度 or やや低い場合) においても、浄水処理工程水中に病原ウイルスが PMMoV よりも高濃度で存在する可能性が否定できない。このような場合には、病原ウイルスの除去を保証する指標として、PMMoV を活用することができないという問題が生じることから、水道原水における病原ウイルスと PMMoV の存在濃度の関係性を把握することが重要となる。

これまで、日本の水道原水においては、AdV, HuNoV GI および HuNoV GII がそれぞれ最大 10⁴, 10⁴, 10³ copies/L 程度の濃度で存在しているのに対し、PMMoV は最大 10⁶ copies/L 程度の濃度で存在していることが明らかとなっている (Haramoto et al., 2013)。しかしなが

ら、WHO の飲料水水質ガイドラインには、AdV および HuNoV 以外の 7 種類の病原ウイルスについても、飲料水を介して伝播する病原体として掲載されているにも関わらず (WHO, 2017)、これらの病原ウイルスに比べて、PMMoV が水道原水中に高濃度で存在するかどうかについては、全く知見が得られていないのが現状である。

水道原水における PMMoV の存在実態調査、並びに実浄水工程における PMMoV の処理性評価においては、原水および浄水処理工程水中の PMMoV 濃度の定量に先立ち、水試料の濃縮が必要となる。現在、水中のウイルスの濃縮には、膜を用いたウイルス濃縮法が広く用いられている (Shi et al., 2017)。中でも、既往研究においては、負に帯電した膜 (陰電荷膜) を用いたウイルス濃縮法が、原水および浄水処理工程水中の PMMoV 濃度の定量に適用されている (Asami et al., 2016; Canh et al., 2019; Kato et al., 2018)。一方、ウイルス濃縮工程におけるウイルスの回収率は、ウイルス濃縮法、ウイルスの種類や物理化学的な特性、サンプル容量および水質に影響されることが知られている (Haramoto et al., 2018; Shi et al., 2017)。しかしながら、病原ウイルス (球状) と PMMoV (桿状) には大きな形状の差異があるにも関わらず、既存のウイルス濃縮法が PMMoV を効果的に回収・濃縮可能かどうかは、十分に検討されていないのが現状である。

近年、USEPA は水中の EVs およびノロウイルスを効果的に回収・濃縮するために、正に帯電した膜 (陽電荷膜) を用いたウイルス濃縮法 (Method 1615) を構築している (Fout et al., 2014)。陰電荷膜を用いたウイルス濃縮法においては、水試料の通水前に、多価の陽イオンを添加する必要があるのに対し、陽電荷膜を用いたウイルス濃縮法は、このような前処理を必要としないことから、大容量の水試料を容易に濃縮できるという利点がある。しかしながら、Method 1615 についても、PMMoV に対する有効性は全く検討されていない。

本研究で、PMMoV に対する Method 1615 の有効性を評価したところ、PMMoV の回収率が著しく低いことが明らかとなった (PMMoV を添加した脱塩素水道水 1,000 L を 20 mL に濃縮した場合の回収率 0.7% ; 2.3.1 参照)。そこで、本章では、Method 1615 を基に、大容量の水試料から PMMoV を効果的に回収・濃縮可能な新規ウイルス濃縮法を構築することを目的とする。この後、構築したウイルス濃縮法を適用することにより、全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルス (WHO の飲料水水質ガイドラインに掲載されている 9 種類) および PMMoV の存在実態を調査し、存在濃度の関係性を明らかにすることを目的とする。

2.2 実験方法

2.2.1 使用したウイルスの培養法

2.2.1.1 使用した病原ウイルスおよびマウスノロウイルスの培養法

本研究では、病原ウイルスとして、American Type Culture Collection (ATCC) から分譲された AdV 40 型 Dugan 株 (ATCC VR-931)、CV B5 型 Faulkner 株 (ATCC VR-185)、HAV IB 型 HM175/18f 株 (ATCC VR-1402)、A 群 RV Wa 株 (ATCC VR-2018) を、ヒトカリシウイル

スの代替として、ATCC から分譲されたマウスノロウイルス (MNV ; Murine NoroVirus) 1 型 CW1 株 (ATCC PTA-5935) を実験に使用した。AdV, CV, HAV および NV は、それぞれの宿主細胞である A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞), BGM 細胞 (アフリカミドリザル腎臓基底上皮細胞), FRhk-4 細胞 (アカゲザル胎児腎臓基底上皮細胞) および RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ細胞) を用いて培養し、タンジェンタルフロー限外ろ過 (UF ; ultrafiltration) 膜 (1,000 kDa, 再生セルロース ; Pellicon XL, Millipore) にて精製した。培養および精製は、Shirasaki et al. (2016, 2017a) の方法に従って行った。

RV は、宿主細胞である MA104 細胞 (アフリカミドリザル腎臓基底上皮細胞) を用いて培養した。RV の高濃度ストック (後述) をブタ膵臓由来トリプシン (Sigma-Aldrich) にて処理した (10 μ g/mL, 37 °C, 30 min)。75 cm² フラスコ内にて 90% コンフルエントとなった MA104 細胞にトリプシン処理した高濃度ストックを 1 mL 接種し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした (37 °C, 60 min)。この後、L-glutamine (Life Technologies) を 2 mM, Penicillin (Life Technologies) を 100 U/mL, Streptomycin (Life Technologies) を 100 μ g/mL, NaHCO₃ を 1.125 g/L, ブタ膵臓由来トリプシンを 5 μ g/mL になるように添加した EMEM 培地 (Eagle's minimum essential medium 培地 ; 日水製薬) をフラスコに 20 mL 添加し、5% CO₂ インキュベーター内にて 4 日間インキュベートした (37 °C)。この後、-83 °C にて凍結、37 °C にて融解する操作を 3 回繰り返す、ウイルスを細胞から抽出した。このウイルス抽出液を遠心分離 (2,000 \times g, 10 min) し、メンブレンフィルター (0.2 μ m, 酢酸セルロース ; Dismic-25CS, Advantec) にてろ過したものを、RV の高濃度ストックとした。添加実験においては、細胞・培地由来の不純物 (有機物) の持ち込みが浄水処理性に大きく影響することから (Dunkin et al., 2017), これを低減するために、高濃度ストックを、タンジェンタルフローUF 膜 (1,000 kDa) にて精製した。

2.2.1.2 使用した大腸菌ファージの培養法

本研究では、大腸菌ファージとして、(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジーセンター (NBRC) から分譲された MS2 (NBRC 102619) を実験に使用した。MS2 は、宿主大腸菌である *Escherichia coli* を用いて培養し、遠心式フィルターユニットにて精製した。培養および精製は、Shirasaki et al. (2016) の方法に従って行った。

2.2.1.3 使用した植物ウイルスの培養法

本研究では、植物ウイルスとして、(国研) 農業生物資源研究所ジーンバンクから分譲された PMMoV pep 岩手八幡 1 株 (MAFF 104099), スイカ緑斑モザイクウイルス (CGMMV ; cucumber green mottle mosaic virus) SH 株 (MAFF 260018) を実験に使用した。PMMoV は、宿主植物である *Nicotiana benthamiana* を用いて培養した。培養は、Shirasaki et al. (2018) の方法に従って行った。CGMMV についても、PMMoV と同様の方法にて培養した。

2.2.2 対象としたウイルスの定量法

2.2.2.1 リアルタイム定量 (RT-) PCR 法

感染力を失ったウイルスを含めた全ウイルス濃度の定量には、それぞれのウイルスの遺伝子の特異的に定量可能なリアルタイム定量 PCR 法およびリアルタイム定量 RT-PCR (Reverse-transcription PCR) 法を用いた。QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて、試料水 200 μ L 中のウイルスの DNA および RNA を 20 or 50 μ L に抽出した。この後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems Japan) を用いて、抽出したウイルスの RNA を cDNA に逆転写させた。なお、逆転写反応は、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice Model TP600, タカラバイオ) を用いて、Shirasaki et al. (2020) の条件に従って行った。その後、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems Japan), プライマー (HQ-SEQ グレード, タカラバイオ), プローブ (TaqMan probe or TaqMan MGB probe, Applied Biosystems Japan), DNase/RNase フリー滅菌蒸留水 (ニッポンジーン) を用いて、抽出したウイルスの DNA および逆転写反応により合成した cDNA を増幅させた。使用したプライマーおよびプローブの塩基配列を表 2-1 に示す。なお、PCR 反応は、リアルタイム定量 PCR システム (Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System or QuantStudio 3, Applied Biosystems Japan) を用いて、Shirasaki et al. (2020) の条件に従って行った。検量線は、それぞれのウイルスの遺伝子に対する PCR 標的領域を含む濃度既知の遺伝子 (表 2-2) を滅菌蒸留水にて段階希釈することにより作成した。

2.2.2.2 PMAxx-Enhancer-PCR 法

カプシドタンパク質の完全性の観点からウイルスの感染力の有無を議論するために、我々の研究グループが構築した Viability-PCR 法の一つである PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した。定量は、Shirasaki et al. (2020) の方法に従って行った。

2.2.2.3 PFU 法

感染力を保持した AdV, CV, RV, MNV の定量には、それぞれの宿主細胞を用いた PFU 法を用いた。AdV および CV の PFU 法は、それぞれ Shirasaki et al. (2016) および Shirasaki et al. (2017a) の方法に従って行った。

MNV の PFU 法は、Shirasaki et al. (2017a) の方法に、以下に示す若干の修正を加えて行った。Shirasaki et al. (2017a) の方法においては、MNV の宿主細胞である RAW264.7 細胞の継代培養の周期は 3 日間であった。しかしながら、ウシ胎児血清 (FBS ; Fetal Bovine Serum) のロット番号の変更に伴い、細胞の増殖速度が速まったことから、継代培養の周期を 2 日間に変更した。また、同様の理由から、上層寒天培地に用いる FBS の非働化の条件を「56 $^{\circ}$ C にて 30 分間加熱すること」から「60 $^{\circ}$ C にて 90 分間加熱すること」に変更した。

RV の PFU 法は、以下のように実施した。75 cm^2 フラスコ内にて 90%コンフルエントとなった MA104 細胞を 6 ウェル細胞培養プレートに播種し、6 ウェルプレート内の細胞が 90%

コンフルエントとなった後（4日後）、実験に使用した。定量に先立ち、RVを含む試料水をブタ膵臓由来トリプシンにて処理した（10 µg/mL, 37°C, 30 min）。これを、L-glutamine を 2 mM, Penicillin を 100 U/mL, Streptomycin を 100 µg/mL, NaHCO₃ を 1.125 g/L になるように添加した 1X EMEM 培地にて 10 倍希釈、あるいは、L-glutamine を 4 mM, Penicillin を 200 U/mL, Streptomycin を 200 µg/mL, NaHCO₃ を 2.25 g/L になるように添加した 2X EMEM 培地にて 2 倍希釈した。6 ウェルプレート内の細胞に希釈した試料水を 1 mL 接種し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした（37°C, 90 min）。インキュベート後、プレートを反転させることにより、接種液を破棄した。この後、L-glutamine を 4 mM, Penicillin を 200 U/mL, Streptomycin を 200 µg/mL, NaHCO₃ を 2.25 g/L になるように添加した 2X EMEM 培地と 1.2% (w/v) アガロース (Agar-EPI, ナカライテスク) を等量混合し、ここに、ブタ膵臓由来トリプシンを 0.5 µg/mL になるように添加した上層寒天培地を、各ウェルに 3 mL ずつ添加した。添加後、5% CO₂ インキュベーター内にて 4 日間インキュベートした（37°C）。インキュベート後、0.15 g/L ニュートラルレッド溶液を各ウェルに 1 mL ずつ添加し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした（37°C, 3 h）。インキュベート後、プレートを反転させることにより、余剰の染色液を破棄し、各ウェルに生じたブラック数を計数した。なお、計数は染色当日および翌日に実施し、得られた最大のブラック数を採用した。各試料を 6 ウェルプレートに 3 ウェルずつ播種し、各ウェルのブラック数の平均値から感染力を保持した RV 濃度 (PFU/mL) を算出した。

2.2.2.4 局部病斑計数法

感染力を保持した PMMoV の定量には、宿主植物である *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc* を用いた局部病斑計数法 (Local Lesion Count Assay) を用いた。定量は、Shirasaki et al. (2020) の方法に従って行った。

2.2.3 陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法の構築

2.2.3.1 ウイルス濃縮法

大容量の試料水から病原ウイルスおよび PMMoV を効果的に回収・濃縮するために、陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用した新規ウイルス濃縮法を構築した。後述する試料水を、マグネティックポンプを用いて 2–6 L/min の初期流束にて専用ハウジングに収容されたナノセラム陽電荷膜 (P2.5-5DP or VS2.5-5; Argonide) に通水した。通水後、ハウジング内に残った試料水を破棄し、ここに、膜に吸着したウイルスを脱着させるウイルス溶出液として pH 9.0 or 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス (Becton, Dickinson and Company) 溶液 (0.05 M グリシン含有) 350 mL を添加し、1 分間浸漬させた。この後、未使用のビーフエキス溶液 150 mL を、ペリスタルティックポンプを用いて膜に通水することにより、ハウジング内のビーフエキス溶液と共にウイルスを回収した。この溶出操作を未使用のビーフエキス溶液を用いて更に 3 回繰り返し (2 回目の溶出における浸漬時間は 15 分, 3 回目およ

表 2-1 プライマーおよびプローブの塩基配列

ウイルス		塩基配列	領域	参考文献
AdV	Forward primer	AAC TTT CTC TCT TAA TAG ACG CC	30372–30394	Ko et al., 2005
	Reverse primer	AGG GGG CTA GAA AAC AAA A	30489–30471	
	TaqMan probe	FAM-CTG ACA CGG GCA CTC TTC GC-TAMRA	30405–30424	
EVs	Forward primer	CCT CCG GCC CCT GAA TG	449–465	Shieh et al., 1995
	Reverse primer	ACC GGA TGG CCA ATC CAA	643–626	
	TaqMan probe	FAM-CCG ACT ACT TTG GGT GTC CGT GTT TC-TAMRA	542–567	Katayama et al., 2002
HuNoV GI	Forward primer	CGY TGG ATG CGI TTY CAT GA	5291–5310	Vega et al., 2011
	Reverse primer	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	5375–5354	
	TaqMan probe	FAM-AGA TYG CGI TCI CCT GTC CA-TAMRA	5340–5321	
HuNoV GII	Forward primer	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	5003–5028	Vega et al., 2011
	Reverse primer	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100–5080	
	TaqMan probe	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA	5048–5067	
HuSaV	Forward primers	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	5078–5098	Oka et al., 2006
		TTG GCC CTC GCC ACC TAC	700–717	
	Reverse primer	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	5181–5163	
	TaqMan MGB probe	FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGB-NFQ	5118–5105	

表 2-1 プライマーおよびプローブの塩基配列（続き）

ウイルス		塩基配列	領域	参考文献
AstV	Forward primer	CAG TTG CTT GCT GCG TTC A	4168–4186	Liu et al., 2011
	Reverse primer	CTT GCT AGC CAT CAC ACT TCT	4339–4319	
	TaqMan probe	FAM-CAC AGA AGA GCA ACT CCA TCG C-TAMRA	4278–4299	
HAV	Forward primer	GGT AGG CTA CGG GTG AAA C	393–411	Jothikumar et al., 2005
	Reverse primer	AAC AAC TCA CCA ATA TCC GC	481–462	
	TaqMan probe	FAM-CTT AGG CTA ATA CTT CTA TGA AGA GAT GC-TAMRA	414–442	
HEV	Forward primer	GGT GGT TTC TGG GGT GAC	5261–5278	Barnaud et al., 2012
	Reverse primer	AGG GGT TGG TTG GAT GAA	5330–5313	
	TaqMan MGB probe	FAM-TGA TTC TCA GCC CTT CGC-MGB-NFQ	5284–5301	
PeV	Forward primer	CTG GGG CCA AAA GCC A	435–450	Benschop et al., 2008
	Reverse primer	GGT ACC TTC TGG GCA TCC TTC	577–557	Oberste et al., 1999
	TaqMan MGB probe	FAM-AAA CAC TAG TTG TAW GGC CC-MGB-NFQ	535–554	Benschop et al., 2008
RV	Forward primers	ACC ATC TAC ACA TGA CCC TC	964–983	Pang et al., 2004
		ACC ATC TTC ACG TAA CCC TC	978–997	Pang et al., 2011
	Reverse primer	GGT CAC ATA ACG CCC C	1050–1035	Pang et al., 2004
	TaqMan MGB probe	FAM-TG AGC ACA ATA GTT AAA AGC -MGB-NFQ	985–1017	Miura et al., 2018

表 2-1 プライマーおよびプローブの塩基配列 (続き)

ウイルス		塩基配列	領域	参考文献
MNV	Forward primer	CCG CAG GAA CGC TCA GCA G	5028–5046	Kitajima et al., 2010
	Reverse primer	GGY TGA ATG GGG ACG GCC TG	5156–5137	
	TaqMan MGB probe	FAM-ATG AGT GAT GGC GCA-MGB-NFQ	5062–5076	
MS2	Forward primer	GTC GCG GTA ATT GGC GC	632–648	O'Connell et al., 2006
	Reverse primer	GGC CAC GTG TTT TGA TCG A	708–690	
	TaqMan probe	FAM-AGG CGC TCC GCT ACC TTG CCC T-TAMRA	650–671	
PMMoV	Forward primer	GAG TGG TTT GAC CTT AAC GTT TGA	1878–1901	Haramoto et al., 2013
	Reverse primer	TTG TCG GTT GCA ATG CAA GT	1945–1926	Zhang et al., 2006
	TaqMan MGB probe	FAM-CCT ACC GAA GCA AAT G-MGB-NFQ	1906–1921	
CGMMV	Forward primer	GCA TAG TGC TTT CCC GTT CAC	6285–6305	Hongyun et al., 2008
	Reverse primer	TGC AGA ATT ACT GCC CAT AGA AAC	6385–6362	
	TaqMan probe	FAM-CGG TTT GCT CAT TGG TTT GCG GA-TAMRA	6316–6338	

表 2-2 検量線の作成に使用した抽出遺伝子および人工合成遺伝子

		ウイルス	製品名・製品コード	販売元
抽出	DNA	AdV	ATCC VR-931D	ATCC
	RNA	RV	ATCC VR-2018DQ	ATCC
人工合成		HuNoV GI	ATCC VR-3234SD	
		HuNoV GII	ATCC VR-3235SD	
	RNA	HuSaV	ATCC VR-3237SD	ATCC
		AstV	ATCC VR-3238SD	
		HEV	ATCC VR-3258SD	
		EVs		
		HAV		
		PeV		
	cDNA	MNV	GeneArt Strings DNA Fragments	Thermo Fisher Scientific
		MS2		
	PMMoV			
	CGMMV			

び4回目の溶出における浸漬時間は15 or 30分), 合計2Lのビーフエキス溶液にウイルスを回収・濃縮した。ウイルスを濃縮したビーフエキス溶液のpHをHClにて3.5に調整した後, マグネティックスターラーを用いて400 rpmにて30分間攪拌することにより, 溶液中のウイルスとビーフエキスタンパク質を凝集した。これを2,500×gにて15分間遠心分離することにより, 上澄水と凝集フロックを分離した。上澄水については, pHをNaOHにて7.0に調整した後, タンジェンタルフローUF膜(300 kDa, 再生セルロース; Pellicon XL, Millipore)を用いて20 mLまで精製・濃縮し, 更にメンブレンフィルター(0.45 μm, 酢酸セルロース; Dismic-25CS, Advantec)にてろ過した(上澄み濃縮試料)。一方, 凝集フロックについては, pH 9.0の0.15 Mリン酸バッファーを添加し, 160–170 rpmにて10分間振とうすることにより, 凝集フロックを再溶解した。これを4,000×gにて10分間遠心分離した後, 上澄水20 mLのpHをHClにて7.0に調整し, 更にメンブレンフィルター(0.45 μm, 酢酸セルロース; Dismic-25CS, Advantec)にてろ過した(フロック濃縮試料)。上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料中のウイルス濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量し, その合計値を濃縮試料水中のウイルス濃度とした。

2.2.3.2 陽電荷膜の種類, ビーフエキス溶液のpH, 浸漬時間の影響評価

陽電荷膜の種類, ビーフエキス溶液のpH, 浸漬時間の影響を評価するために, 以下に示

すウイルスの添加回収試験を行った。試料水には、培養した PMMoV を 10^8 copies/mL になるように単独添加した脱塩素水道水 100–2,000 L (残留塩素は終濃度 5 mg/L のチオ硫酸ナトリウムの添加により中和)、並びに培養した PMMoV および精製した MNV をそれぞれ 10^{10} copies/mL, 10^7 copies/mL になるように同時添加した脱塩素水道水 100 L を用いた。これらの試料水を、上述のウイルス濃縮法を適用することにより、20 mL の上澄み濃縮試料および 20 mL のフロック濃縮試料に濃縮した。なお、本試験においては、上澄み濃縮試料は、メンブレンフィルターによるろ過を行わなかった。

濃縮前水、陽電荷膜における透過水、ビーフエキス溶出液、上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより、陽電荷膜におけるウイルスの捕捉率、溶出工程におけるウイルスの溶出率、濃縮工程におけるウイルスの回収率を算出した (式 1–3)。なお、リアルタイム定量 RT-PCR 法における阻害性を完全に緩和するために、ビーフエキス溶出液、上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料については、滅菌蒸留水にて 100 倍希釈した後に定量した。

$$R_r = (N_0 - N_f) / N_0 \times 100\% \quad (1)$$

R_r : 陽電荷膜におけるウイルスの捕捉率 (%)

N_0 : 濃縮前水中のウイルス濃度 (copies)

N_f : 陽電荷膜における透過水中のウイルス濃度 (copies)

$$R_e = N_e / (N_0 - N_f) \times 100\% \quad (2)$$

R_e : 溶出工程におけるウイルスの溶出率 (%)

N_e : ビーフエキス溶出液中のウイルス濃度 (copies)

$$R_t = (N_{cs} + N_{cf}) / N_0 \times 100\% \quad (3)$$

R_t : 濃縮工程におけるウイルスの回収率 (%)

N_{cs} : 上澄み濃縮試料中のウイルス濃度 (copies)

N_{cf} : フロック濃縮試料中のウイルス濃度 (copies)

2.2.3.3 ビーフエキスの凝集工程におけるウイルスの挙動評価

ビーフエキスの凝集工程における病原ウイルスおよび PMMoV の挙動、すなわち、これらのウイルスが凝集フロックに吸着あるいは捕捉されるかどうかを調べるために、以下に示すウイルスの添加回収試験を行った。pH 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス溶液 250 mL に培養した PMMoV および CGMMV、並びに精製した AdV, CV, HAV, MNV, MS2 をそれぞれ 10^{8-9} copies/mL, 10^{7-8} copies/mL, 10^7 copies/mL, 10^{7-8} copies/mL, 10^6 copies/mL, 10^{7-8} copies/mL, 10^{10} copies/mL になるように同時添加した。上述した方法にてビーフエキスを凝集し、遠心分離した後、pH 9.0 の 0.15 M リン酸バッファー 2.5 mL に凝集フロックを溶解し

た。凝集前水，フロック濃縮試料，上澄水（UF膜による濃縮は実施せず）中のウイルス濃度をリアルタイム定量（RT-）PCR法にて定量することにより，フロック濃縮試料および上澄水におけるウイルスの回収率を算出した（式4-5）。

$$R_f = N_{cf} / N_{b0} \times 100\% \quad (4)$$

R_f ：フロック濃縮試料におけるウイルスの回収率（%）

N_{b0} ：凝集前水中のウイルス濃度（copies）

$$R_s = N_s / N_{b0} \times 100\% \quad (5)$$

R_s ：上澄水におけるウイルスの回収率（%）

N_s ：上澄水中のウイルス濃度（copies）

2.2.4 全国10カ所の水道原水におけるウイルスの存在実態調査

全国10カ所の水道原水 a-j を対象とし，2018年2月，2018年7-8月，2019年1-2月に計3回の採水を実施した。また，下水放流水 x についても研究対象とし，2019年1月に計1回の採水を実施した。採水した水道原水および下水放流水の水質を表2-3-5に示す。2.2.3にて構築したウイルス濃縮法を適用することにより，これらの水道原水および下水放流水40Lを20mLの上澄み濃縮試料および20mLのフロック濃縮試料に濃縮した。

2.2.5 水道原水におけるウイルス濃縮法の有効性評価

水道原水および下水放流水におけるウイルス濃縮法の有効性を以下のように評価した。上述の水道原水および下水放流水40Lに，培養したPMMoVおよびCGMMV，並びに精製したMNVおよびMS2をそれぞれ 10^{7-8} copies/mL， 10^{5-6} copies/mL， 10^{6-7} copies/mL， 10^{7-8} copies/mLになるように同時添加した後，2.2.3にて構築したウイルス濃縮法を適用することにより，20mLの上澄み濃縮試料および20mLのフロック濃縮試料に濃縮した。濃縮前水，上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR法にて定量することにより，濃縮工程におけるウイルスの回収率（ R_t ）を算出した（式3）。なお，リアルタイム定量 RT-PCR法における阻害性を完全に緩和するために，上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料については，滅菌蒸留水にて100倍希釈した後で定量した。また，得られた回収率は，濃縮試料水中のウイルス濃度の補正には用いなかった。

2.2.6 濃縮試料水におけるリアルタイム定量（RT-）PCR法の阻害性評価

濃縮試料水におけるリアルタイム定量（RT-）PCR法の阻害性を以下のように評価した。無希釈の濃縮試料水，あるいは滅菌蒸留水にて10 or 100倍希釈した濃縮試料水（上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料）200 μ Lに，精製したAdV，RV，MNV，MS2，並びに培養したCGMMVを 10^6 copies/mLになるように同時添加した。一方，滅菌蒸留水200 μ Lにつ

表 2-3 採水した水道原水の水質 (2018 年 2 月)

	採水日	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)
a	2018/2/15	7.3	0.8	1.0	0.022	16.0
b	2018/2/28	6.9	2.8	0.9	0.016	20.0
c	2018/2/28	7.5	14.5	4.2	0.052	80.0
d	2018/2/21	7.6	3.7	1.7	0.023	42.0
e	2018/2/13	7.6	3.8	1.3	0.027	28.0
f	2018/2/13	7.6	9.5	1.1	0.014	36.0
g	2018/2/23	7.5	4.5	1.8	0.052	36.0
h	2018/2/7	7.5	2.5	1.7	0.027	46.0
i	2018/2/14	7.3	0.7	0.8	0.013	18.0
j	2018/2/9	7.5	2.9	0.8	0.013	42.0

表 2-4 採水した水道原水の水質 (2018 年 7-8 月)

	採水日	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)
a	2018/7/13	7.6	4.3	1.3	0.032	16.0
b	2018/8/22	6.9	1.7	1.1	0.031	18.0
c	2018/8/22	8.0	54.6	3.7	0.098	86.0
d	2018/8/24	7.9	8.3	1.1	0.023	53.0
e	2018/8/30	7.1	33.2	1.9	0.058	16.0
f	2018/8/31	7.5	-	0.8	0.023	36.0
g	2018/8/14	7.7	3.4	1.7	0.030	32.0
h	2018/8/13	7.3	8.5	1.9	0.073	38.0
i	2018/8/21	7.2	0.5	0.7	0.172	20.0
j	2018/8/31	7.4	3.5	0.9	0.025	50.0

-: not determined.

表 2-5 採水した水道原水の水質（2019年1-2月）

	採水日	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)
a	2019/2/22	7.1	1.3	0.9	0.019	14.0
b	2019/1/16	7.3	2.1	0.7	0.016	22.0
c	2019/1/26	7.6	13.1	3.0	0.043	78.0
d	2019/2/15	7.6	2.7	1.2	0.019	44.0
e	2019/1/21	7.3	8.2	0.8	0.019	20.0
f	2019/1/11	7.6	2.4	0.5	0.010	38.0
g	2019/1/22	7.7	4.2	1.3	0.020	36.0
h	2019/1/29	7.8	0.9	1.1	0.025	50.0
i	2019/1/29	7.4	0.5	0.5	0.010	18.0
j	2019/1/22	7.7	2.9	0.5	0.012	44.0
x	2019/1/31	7.0	6.3	3.4	0.064	46.0

いても、これらのウイルスを同様に同時添加し、リアルタイム定量（RT-）PCR 法における阻害性のないコントロール試料水とした。それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量（RT-）PCR 法にて定量することにより、濃縮試料水におけるウイルスの定量効率を算出した（式 6）。なお、得られた定量効率は、濃縮試料水中のウイルス濃度の補正には用いなかった。

$$E_q = C_q / C_{q0} \times 100\% \quad (6)$$

E_q ：濃縮試料水におけるウイルスの定量効率（%）

C_q ：濃縮試料水中のウイルス濃度（copies/mL）

C_{q0} ：滅菌蒸留水中のウイルス濃度（copies/mL）

2.2.7 濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性評価

濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性を以下のように評価した。精製した AdV の DNA、並びに精製した RV, MNV, MS2 の RNA を、QIAamp MinElute Virus Spin Kit（2.2.2.1 参照）を用いて抽出した。抽出したウイルス DNA および RNA、更に、CV の PCR 標的領域を含む人工合成 cDNA（表 2-2）を 10⁷ copies/mL になるように、無希釈の濃縮試料水、あるいは滅菌蒸留水にて 10 or 100 倍希釈した濃縮試料水（上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料）200 μL に添加した。一方、滅菌蒸留水 200 μL についても、これらの遺伝子を同様に同時添加し、PMAxx-Enhancer 処理における阻害性のないコントロール試料水とし

た。PMAxx-Enhancer 処理前後の試料水を採取し、それぞれの試料水中の遺伝子濃度をリアルタイム定量 (RT-) PCR 法にて定量することにより、PMAxx-Enhancer 処理によるこれらの遺伝子の低減率 (Log 低減率 ($\log_{10}[C_{n0}/C_n]$; C_{n0} : PMAxx-Enhancer 処理前の遺伝子濃度, C_n : PMAxx-Enhancer 処理後の遺伝子濃度)) を算出した。なお、阻害性の評価結果は、濃縮試料水中のウイルス濃度の補正には用いなかった。

2.2.8 水道原水におけるウイルスの生残性評価試験

環境水に混入したウイルスは、カプシドタンパク質や遺伝子に損傷を受け、徐々に不活化していく。このような環境水中におけるウイルスの不活化には、水温、懸濁物質に対する吸着、微生物による捕食等が影響することが知られている (Health Canada, 2017)。そこで、環境水中におけるウイルスの生残性を、感染力・カプシドタンパク質・遺伝子の消長の観点から議論するために、以下に示すウイルスの生残性評価試験を実施した。

試料水には、 Na_2HPO_4 および NaH_2PO_4 を Milli-Q 水 (Milli-Q Advantage, Millipore) に溶解して調整した 0.01 M PBS (Phosphate-Buffered Saline; pH 7.0), 2018 年 8 月に採水した水道原水 d および g を用いた。精製した AdV, CV, RV, MNV, 並びに培養した PMMoV を 10^{2-3} PFU/mL, 10^4 PFU/mL, 10^2 PFU/mL, 10^{2-3} PFU/mL, 10^4 lesions/mL になるように添加した試料水を実験原水とし、メディウム瓶に 300 mL に添加した。これを、マグネティックスターラーを用いて 70 rpm にて攪拌しながら、暗所、所定の水温 (4, 20, 37 °C) にて最大 30 日間インキュベートした。経時的に採取した試料水中のウイルス濃度を、感染性評価手法、PCR 法、PMAxx-Enhancer-PCR 法にて定量することにより、PBS および水道原水におけるウイルスの低減率 (Log 低減率 ($\log_{10}[C_{i0}/C_{it}]$; C_{i0} : 0 日目におけるウイルス濃度, C_{it} : t 日目におけるウイルス濃度)) を算出した。また、ウイルスの低減が擬一次反応に従うと仮定し (式 7), それぞれの条件におけるウイルスの低減速度を比較した。なお、擬一次ウイルス低減速度定数 k の算出においては、上述した 3 種類の定量法のいずれかで定量下限値以下となったインキュベート日数の値は除外した。

$$C_{it} = C_{i0} \times \exp(-kt) \quad (7)$$

k : 擬一次ウイルス低減速度定数 (day^{-1})

2.3 実験結果と考察

2.3.1 陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法の構築

はじめに、表 2-6 に示す濃縮法 1 を適用することにより、PMMoV を単独添加した脱塩素水道水 1,000 L を 20 mL のフロック濃縮試料に濃縮した。このとき、濃縮工程全体における PMMoV の回収率 (R_t) は 0.7% と非常に低い値であった。PMMoV の捕捉率 (R_r) および溶出率 (R_e) はそれぞれ 95%, 28% と高い値であったことから、溶出以降の濃縮工程、すなわち、ビーフエキスの凝集工程に PMMoV の回収率が低かった要因があるものと考えられた。

そこで、2.2.3.3 に記述した添加実験を実施することにより、ビーフエキスの凝集工程において、病原ウイルスおよび PMMoV が凝集フロックに吸着あるいは捕捉されるかどうかを調べた。結果を図 2-1 に示す。AdV, CV, HAV, MNV および CGMMV は凝集フロックに吸着あるいは捕捉されたのに対し、PMMoV および MS2 は上澄水に残留することが明らかとなった。従って、タンジェンタルフローUF膜による上澄水の濃縮を伴わない濃縮法 1 において PMMoV の回収率が低かった要因は、ビーフエキスの凝集工程において PMMoV がほとんど回収されなかったためであることが示された。ビーフエキスタンパク質は、pH 3.5 付近において自己凝集し、この際、ウイルスが凝集フロックに吸着あるいは捕捉されることが報告されている (Katzenelson et al., 1976)。PMMoV (3.2, Shirasaki et al., 2017b) および MS2 (2.2, Shirasaki et al., 2016) の等電点は 3.5 以下であるのに対し、AdV, CV, HAV, MNV (3.6–3.8, Shirasaki et al., 2016, 2017a) および CGMMV (4.3, Sano et al., 1978) の等電点は 3.5 以上であることが報告されている。従って、等電点が 3.5 以下のウイルスと 3.5 以上のウイルスでは、pH 3.5 における電気移動度等の表面電位特性が異なっているものと推察される。本研究においては、pH 3.5 のビーフエキス溶液中におけるウイルスの電気移動度は測定していないが、表面電位特性の差異が、ウイルスが凝集フロックに吸着あるいは捕捉されるのか、上澄水に残留するのかを決定づける可能性が示唆された。

表 2-6 脱塩素水道水中の PMMoV の濃縮における陽電荷膜の種類、ビーフエキス溶液の pH、浸漬時間、タンジェンタルフローUF膜濃縮の影響

濃縮法	陽電荷膜	pH	浸漬時間 (min)				UF	捕捉率 R_r (%)	溶出率 R_e (%)	回収率 R_t (%)
			1回目	2回目	3回目	4回目				
1	P2.5-5DP	9.0	1	15	15	15	なし	94.8	27.5	0.7
2	P2.5-5DP	9.0	1	15	30	30	あり	99.6	32.1	48.8
3	P2.5-5DP	9.5	1	15	30	30	あり	98.8	59.6	78.4
4	VS2.5-5	9.5	1	15	30	30	あり	96.8	74.1	80.3

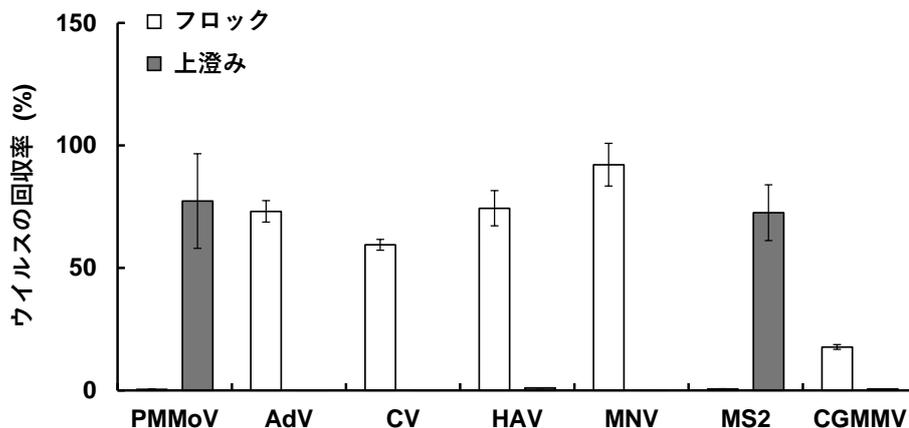


図2-1 ビーフエキスの凝集工程におけるウイルスの挙動：
各値は3回の実験結果の平均値および標準偏差にて表示。

以上の検討を踏まえ、上澄水に残留する PMMoV を効果的に回収・濃縮するために、タンジェントフローUF膜にて上澄水を濃縮することとした。本研究で用いたUF膜の分画分子量は300 kDaであり、PMMoVの分子量 (40×10^3 kDa, Adams et al., 2017) に比べて非常に小さかったことから、PMMoVは効果的に回収されるものと推察された。実際、UF膜による濃縮工程を加えることにより、PMMoVの回収率は0.7%から49-80%に大きく向上した(表2-6, 濃縮法2-4)。更に、PMMoVの溶出率は、ビーフエキス溶液のpHを9.0から9.5に上げることにより、28%(表2-6, 濃縮法1)から60%(表2-6, 濃縮法3)に向上した。従って、ビーフエキス溶液のpHがウイルスの溶出率に影響することが確認された。一方、pH9.0の条件においては、3回目および4回目の溶出における浸漬時間が30分間の場合のPMMoVの溶出率は32%(表2-6, 濃縮法2)であり、15分間の場合の溶出率(28%, 表2-6, 濃縮法1)と大差なかった。また、pH9.5の条件においては、陽電荷膜の種類に依らず、PMMoVの捕捉率は一定であった(表2-6, 濃縮法3および4)。これは、2種類の陽電荷膜が共に同じ有効ろ過面積(0.129 m²)を有するためであると考えられた。従って、陽電荷膜の種類、並びに3回目および4回目の溶出における浸漬時間は、ウイルスの回収率に影響しないことが示唆された。以上の検討から、VS2.5-5がウイルス濃縮に特化した滅菌済みの陽電荷膜であることを踏まえ、本研究においては、濃縮法4を採用することとした。

実浄水工程におけるPMMoVの処理性を評価することを念頭に、大容量の浄水(水道水)からPMMoVを効果的に回収・濃縮可能かどうかを調べるために、陽電荷膜におけるろ過量がPMMoVの回収率に与える影響を調べた。結果を図2-2に示す。ろ過量に依らず、PMMoVの捕捉率は非常に高い値(94-100%)を維持した。また、ろ過量が100Lの場合においては、108%のPMMoVの回収率が得られた。従って、100Lの脱塩素水道水を濃縮する場合においては、試料水中のPMMoVを完全に回収できるものと考えられた。更に、ろ過量を500-2,000Lに増加させた場合においては、PMMoVの回収率はやや低下したものの、依然として33-

42%の回収率が維持された。従って、1,000 Lを超える大容量の浄水（水道水）を濃縮する場合においても、試料水中の PMMoV を効果的に回収・濃縮可能であることが示唆された。なお、ろ過量が 100–2,000 L の範囲においては、PMMoV の溶出率 (>87%) およびビーフエキス凝集後の上澄水における PMMoV の回収率 (>73%) は、ろ過量に依らず高い値が維持されたのに対し、ろ過量を 100 L から 500–2,000 L に増加させた場合においては、UF 膜濃縮における PMMoV の回収率が、150%から 39–56%に低下した。従って、ろ過量の増加に伴う PMMoV の回収率の低下は、UF 膜濃縮における PMMoV の回収率の低下に起因するものであると考えられた。

図 2-1 に示したように、PMMoV は主に上澄み濃縮試料に回収される一方、病原ウイルスは主にフロック濃縮試料に回収される。そこで、構築したウイルス濃縮法が、PMMoV のみならず、病原ウイルスについても効果的に回収・濃縮可能かどうかを調べるために、病原ウイルスの代替として、MNV の回収率を評価した。PMMoV および MNV を同時添加した脱塩素水道水 100 L を 20 mL に濃縮したところ、PMMoV については 106%，MNV については 30%の回収率が得られた。Cashdollar et al. (2013) は、Method 1615 を適用した場合の MNV の回収率について、以下に示す結果を報告している：(1) 地下水 1,500–1,900 L の後に MNV を添加した地下水 10 L を通水した場合には 30%，(2) 表流水 80 L の後に MNV を添加した表流水 10 L を通水した場合には 6%，(3) MNV を添加した滅菌蒸留水 10 L を通水した場合には 0.6–8%。本研究において得られた MNV の回収率は、この既往研究において得られた MNV の回収率と同程度、あるいはやや高かったことから、構築したウイルス濃縮法は、上澄み濃縮試料に回収される PMMoV のみならず、フロック濃縮試料に回収されるウイルスについても、大容量の浄水（水道水）から効果的に回収・濃縮可能であることが示唆された。

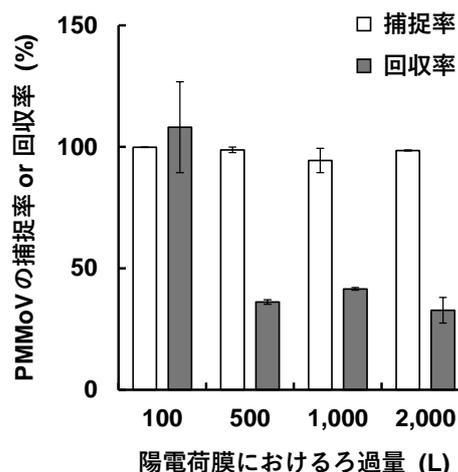


図2-2 脱塩素水道水中の PMMoV の濃縮におけるろ過量の影響：各値は 2 回の実験結果の平均値およびデータ範囲または 3 回の実験結果の平均値および標準偏差にて表示。

2.3.2 水道原水および下水放流水におけるウイルス濃縮法の有効性

2.3.1 に記述したように、本章にて構築したウイルス濃縮法は、大容量の脱塩素水道水から PMMoV および MNV を効果的に回収・濃縮可能であることが明らかとなった。しかしながら、ウイルス濃縮工程におけるウイルスの回収率には、対象とする試料水の水質が大きく影響することが知られている (Haramoto et al., 2018)。そこで、水道原水および下水放流水におけるウイルス濃縮法の有効性を評価するために、これらの試料水 40 L を対象に、ウイルスの添加回収試験を行った。それぞれの試料水におけるウイルスの回収率を図 2-3 に示す。いずれの試料水においても、添加した PMMoV の回収率は 30% 以上であり、他の 3 種類のウイルスについても、28% 以上の回収率が得られた。従って、本章にて構築したウイルス濃縮法は、広範な水質の試料水に適用可能であり、上澄み濃縮試料 (PMMoV, MS2) およびフロック濃縮試料 (MNV, CGMMV) のどちらに回収されるウイルスについても (図 2-1)、効果的に濃縮・回収可能であることが示された。

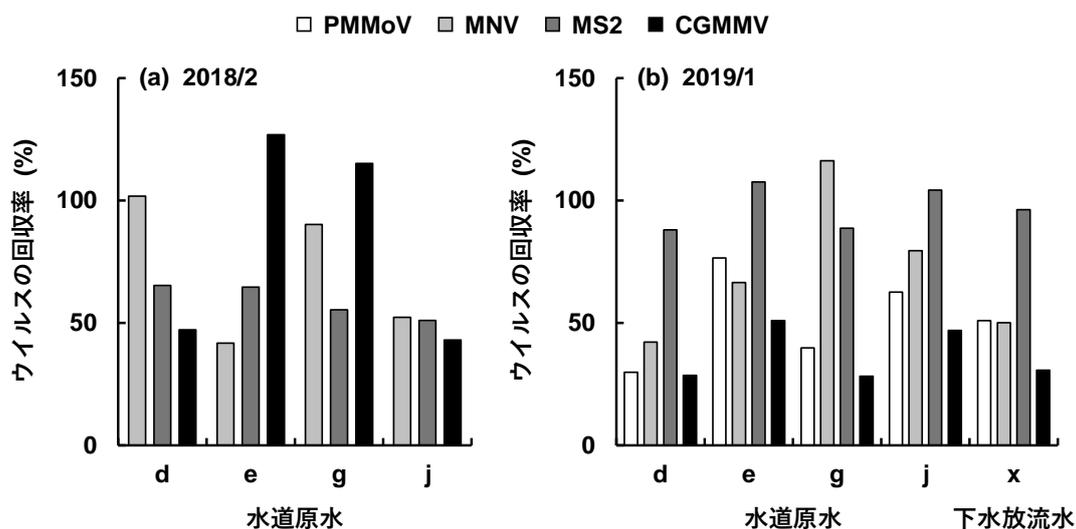


図2-3 水道原水および下水放流水における新規ウイルス濃縮法の有効性：各値は1回の実験結果。

2.3.3 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害性

環境水中にはリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害物質が存在することから、ウイルス濃縮工程においては、これらの阻害物質がウイルスと同時に濃縮され、結果として、リアルタイム定量 (RT-) PCR 法によるウイルス定量が阻害されることが懸念される (Haramoto et al., 2018). そこで、濃縮試料水に人工的に AdV, RV, MNV, MS2, CGMMV を添加することにより、濃縮試料水におけるリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害性、すなわち、遺伝子抽出工程・逆転写反応・PCR 反応における阻害性を評価した。それぞれのウイルスの定量効率 (E_q) を表 2-7 に示す。AdV (二本鎖 DNA ウイルス) については、濃縮試料水を希釈せずに評価した場合、定量効率が 10% 以下となる場合があった (表 2-7 灰色部)。これらの濃縮試料水については、滅菌蒸留水にて 10 倍希釈することにより、定量効率が向上し、23% 以上の値が得られた。従って、本研究においては、AdV 濃度の定量における阻害の影響は小さい場合が多いこと、仮に阻害が確認された場合においても、滅菌蒸留水にて 10 倍希釈することにより、阻害の影響を十分に緩和することができることが示唆された。一方、RV (二本鎖 RNA ウイルス)、MNV, MS2, CGMMV (すべて一本鎖 RNA ウイルス) については、濃縮試料水を希釈せずに評価した場合であっても、13% 以上の定量効率が得られた。また、上澄み濃縮試料とフロック濃縮試料の間には、定量効率の大きな差異は確認されなかった。従って、本研究においては、上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料のどちらに回収される RNA ウイルスについても、ウイルス濃度の定量における阻害の影響は小さいものと判断された。以上の結果から、本章で構築したウイルス濃縮法は、水道原水中に存在するリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害物質をほとんど濃縮することなく、ウイルスを選択的に回収・濃縮可能であることが示された。

更に、滅菌蒸留水にて濃縮試料水を 100 倍希釈した場合、CGMMV 以外のすべてのウイルスについて、定量効率が向上し、上澄み濃縮試料では 60–130%、フロック濃縮試料では 50–140% 程度の高い値が得られた。従って、滅菌蒸留水にて 100 倍希釈することにより、ウイルス濃度の定量における阻害の影響を完全に緩和できるものと考えられた。このことから、ウイルス添加回収試験 (2.2.3.2 および 2.2.5) において、ウイルス濃度の定量直前に濃縮試料水を 100 倍希釈していたことは、ウイルス濃度の定量における阻害の影響を緩和する上で妥当であるものと判断された。

表 2-7 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害性

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)		定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)	
			2018/2	2019/1	2018/2	2019/1
AdV	上澄み	無希釈	25 (1/4)	100 (2/2)	25.5 (7.0-79.1)	11.2 (11.1-11.3)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	48.3 (32.1-83.9)	30.5 (25.1-35.9)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	79.5 (66.4-103.9)	97.8 (97.8-97.9)
	フロック	無希釈	25 (1/4)	50 (1/2)	6.4 (0.1-15.6)	29.2 (6.4-52.0)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	38.7 (23.4-60.0)	83.4 (82.1-84.7)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	63.1 (51.1-73.8)	88.0 (81.0-95.0)
RV	上澄み	無希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	72.0 (62.0-89.4)	72.7 (71.5-73.8)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	80.2 (71.6-96.6)	82.4 (80.7-84.2)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	86.9 (81.0-96.4)	96.3 (91.1-101.4)
	フロック	無希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	76.5 (67.9-85.9)	79.6 (73.2-86.1)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	89.4 (59.6-107.5)	102.1 (101.0-103.3)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (2/2)	102.6 (82.0-112.6)	104.7 (97.5-111.9)
MNV	上澄み	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	60.9 (35.1-81.8)	62.7 (39.7-80.1)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	73.6 (49.5-106.4)	86.3 (74.8-113.8)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	88.0 (63.4-130.7)	97.1 (75.6-118.7)
	フロック	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	65.1 (37.5-94.6)	58.8 (38.1-70.3)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	92.8 (66.1-120.8)	83.7 (72.1-100.7)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	97.5 (72.3-126.8)	92.9 (78.6-128.9)

表 2-7 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 (RT-) PCR 法の阻害性 (続き)

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)		定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)	
			2018/2	2019/1	2018/2	2019/1
MS2	上澄み	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	67.9 (20.2-82.5)	75.7 (39.2-96.2)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	77.5 (28.2-95.8)	94.9 (74.2-109.5)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	101.7 (76.0-110.5)	106.0 (87.6-128.4)
	フロック	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	75.0 (49.9-104.4)	78.5 (69.9-84.4)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	95.7 (86.7-103.9)	97.9 (91.9-109.0)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	100.7 (90.7-113.5)	103.1 (97.7-107.7)
CGMMV	上澄み	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	91.0 (28.7-146.8)	135.8 (74.2-174.4)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	106.8 (47.1-147.9)	101.1 (41.6-187.1)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	95.6 (73.1-123.3)	101.9 (86.6-114.6)
	フロック	無希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	74.8 (12.5-127.3)	82.0 (56.8-145.3)
		10 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	118.7 (48.4-194.4)	93.7 (32.2-145.2)
		100 倍希釈	100 (10/10)	100 (5/5)	95.3 (71.8-140.1)	85.2 (60.7-120.8)

2.3.4 濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性

リアルタイム定量 (RT-) PCR 法の場合と同様に、ウイルスと同時に濃縮される環境水中の物質が Viability-PCR 法の前処理を阻害する可能性が指摘されている (Canh et al., 2022)。そこで、濃縮試料水に人工的に抽出遺伝子および人工合成遺伝子 (理論的には PCR 法による増幅が PMAxx-Enhancer 処理により完全に阻害される状態) を添加することにより、濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害性を評価した。

まず、PMAxx-Enhancer 処理前の濃縮試料水中の遺伝子濃度を定量したところ、AdV の抽出遺伝子 (二本鎖 DNA)、MNV および MS2 の抽出遺伝子 (一本鎖 RNA) については、滅菌蒸留水中の遺伝子濃度に比べて、 1-log_{10} 以上低い値が得られる場合があった (表 2-8 灰色部)。特に、濃縮試料水を希釈せずに評価した場合、この傾向が顕著であった。一方、CV の人工合成遺伝子 (二本鎖 DNA) および RV の抽出遺伝子 (二本鎖 RNA) については、このような低減は確認されなかった。AdV については、2.3.3 に記述したように、リアルタイム定量 PCR 法における阻害性が確認される場合があったことから、この低減は遺伝子抽出 (精製) 工程・PCR 反応における阻害性に起因するものと考えられた。これに対し、MNV および MS2 については、2.3.3 に記述したように、リアルタイム定量 RT-PCR 法における阻害性が確認されなかったことから、この低減は遺伝子抽出 (精製) 工程・逆転写反応・PCR 反応における阻害性には起因せず、他の要因が存在するものと考えられた。本検討においては、PMAxx-Enhancer 処理が 20°C にて 30 分間程度の時間を要することから (Shirasaki et al., 2020)、PMAxx-Enhancer 処理を実施しない場合においても、濃縮試料水に遺伝子を添加した後、 20°C にて 30 分間静置した後にリアルタイム定量 RT-PCR 法による定量を実施している。このことから、MNV および MS2 については、この 30 分間に、添加した遺伝子が分解された可能性が考えられた。そこで、2018 年 2 月に採水した水道原水 d、2019 年 1 月に採水した水道原水 d および e、下水放流水 x の濃縮試料水について、MNV および MS2 の抽出遺伝子を添加し、 20°C にて 16 時間静置した後の遺伝子濃度を、滅菌蒸留水の場合と比較した。その結果、濃縮試料水中の遺伝子濃度は、滅菌蒸留水中の遺伝子濃度に比べて、 $1.5\text{-} >4.3\text{-log}_{10}$ 低い値であった。従って、濃縮試料水中においては、裸の状態の一本鎖 RNA が速やかに分解されることが示唆された。更に、上澄み濃縮試料については、タンジェントフロー UF 膜濃縮に 2 時間以上を要し、フロック濃縮試料については、フロック溶解および遠心分離に 20 分程度を要することから、リスク評価において問題とならない裸の状態の一本鎖 RNA は、ウイルス濃縮工程中に分解されている可能性が考えられた。

濃縮試料水に添加した遺伝子の PMAxx-Enhancer 処理による低減率を表 2-9 に示す。AdV の抽出遺伝子については、濃縮試料水を希釈せずに評価した場合、 $3.1\text{-} >4.7\text{-log}_{10}$ の低減率が得られた。この値は、滅菌蒸留水の低減率 (3.9-log_{10}) と同程度であった。また、CV の人工合成遺伝子および RV の抽出遺伝子についても、同様の傾向が確認された。MNV、MS2 の抽出遺伝子については、上述したように、添加した遺伝子が速やかに分解されてしまうことから、PMAxx-Enhancer 処理による低減率を正確に評価できない場合があった (表 2-9 灰色

表 2-8 PCR 法単独による抽出遺伝子および人工合成遺伝子の定量結果

				遺伝子の log 濃度 C _{n0} (log ₁₀ [copies/L])				
				AdV	CV	RV	MNV	MS2
蒸留水				7.4	6.5	6.8	6.5	6.8
2018/2	d	フロック	無希釈	6.3	5.8	6.7	4.9	4.5
			10 倍希釈	7.1	6.4	6.7	4.8	5.0
			100 倍希釈	7.3	6.5	6.8	6.3	6.2
		上澄み	無希釈	-	6.4	-	5.7	6.1
			10 倍希釈	-	6.7	-	6.1	6.5
	e	フロック	無希釈	6.4	6.0	6.7	4.9	4.7
			10 倍希釈	6.9	6.4	6.8	5.5	5.2
			上澄み	無希釈	-	6.6	-	6.1
10 倍希釈				-	6.7	-	6.2	6.8
f	フロック	無希釈	6.8	6.3	6.6	5.5	5.1	
		10 倍希釈	7.1	6.5	6.7	6.9	6.4	
		上澄み	無希釈	-	6.4	-	5.6	6.0
			10 倍希釈	-	6.6	-	6.1	6.4
g	フロック	無希釈	6.5	6.1	6.6	5.0	4.7	
		10 倍希釈	7.3	6.5	6.6	5.2	5.2	
		上澄み	無希釈	-	6.3	-	5.4	5.9
			10 倍希釈	-	6.6	-	5.9	6.3
j	フロック	無希釈	-	6.5	-	5.1	4.8	
		10 倍希釈	-	6.5	-	5.9	5.6	
		上澄み	無希釈	-	6.5	-	5.6	6.0
			10 倍希釈	-	6.6	-	5.9	6.2

-: not determined.

部). このような場合を除けば, 濃縮試料水を希釈せずに評価した場合においても, 滅菌蒸留水 (MNV, >3.3-log₁₀; MS2, 2.6-log₁₀) と同程度の低減率が得られた (MNV, >2.9-log₁₀; MS2, 2.3-3.5-log₁₀). 従って, 本研究においては, 様々な形態の遺伝子について, 濃縮試料水における PMAxx-Enhancer 処理の阻害の影響は小さいものと判断された.

表 2-8 PCR 法単独による抽出遺伝子および人工合成遺伝子の定量結果（続き）

				遺伝子の log 濃度 C _{n0} (log ₁₀ [copies/L])				
				AdV	CV	RV	MNV	MS2
蒸留水				7.4	6.5	6.8	6.5	6.8
2019/1	d	フロック	無希釈	-	6.0	-	<2.6	3.5
			10 倍希釈	-	6.5	-	6.0	5.6
		上澄み	無希釈	-	6.4	-	5.4	5.8
			10 倍希釈	-	6.6	-	6.1	6.6
	e	フロック	無希釈	6.8	6.0	6.7	3.8	4.1
			10 倍希釈	7.3	6.5	6.7	5.3	5.2
		上澄み	無希釈	-	6.2	-	4.8	5.1
			10 倍希釈	-	6.6	-	6.1	6.4
	f	フロック	無希釈	7.3	6.5	6.7	4.8	4.4
			10 倍希釈	7.3	6.5	6.8	6.5	5.9
		上澄み	無希釈	-	6.4	-	5.6	6.1
			10 倍希釈	-	6.5	-	5.7	6.1
g	フロック	無希釈	-	6.0	-	4.7	4.5	
		10 倍希釈	-	6.5	-	4.9	4.5	
	上澄み	無希釈	-	6.3	-	5.3	5.7	
		10 倍希釈	-	6.6	-	5.8	6.3	
j	フロック	無希釈	-	6.2	-	4.9	4.3	
		10 倍希釈	-	6.6	-	6.4	5.9	
	上澄み	無希釈	-	6.4	-	5.4	5.9	
		10 倍希釈	-	6.5	-	5.9	6.3	
x	フロック	無希釈	6.4	6.2	6.6	>2.6	>2.7	
		10 倍希釈	7.3	6.4	6.7	4.1	3.9	
	上澄み	無希釈	-	6.4	-	>3.1	3.7	
		10 倍希釈	-	6.6	-	6.1	6.3	

-: not determined.

表 2-9 PMAxx-Enhancer 処理による抽出遺伝子および人工合成遺伝子の低減率

				遺伝子の log 低減率 ($\log_{10}[C_{n0}/C_n]$)				
				AdV	CV	RV	MNV	MS2
蒸留水				3.9	>3.5	3.5	>3.3	2.6
2018/2	d	フロック	無希釈	>3.7	>2.8	3.1	>2.3	>1.9
			10 倍希釈	>4.6	>3.4	3.1	>2.2	1.8
			100 倍希釈	>4.7	>3.5	3.3	>3.7	2.3
		上澄み	無希釈	-	>3.3	-	>3.2	3.5
			10 倍希釈	-	>3.7	-	>3.6	2.9
	e	フロック	無希釈	>3.9	>2.9	3.4	>2.3	>2.1
			10 倍希釈	4.3	>3.3	3.1	>2.9	2.5
		上澄み	無希釈	-	>3.6	-	>3.6	2.3
10 倍希釈			-	>3.7	-	>3.7	3.7	
f	フロック	無希釈	>4.2	>3.3	4.0	>2.9	>2.5	
		10 倍希釈	>4.6	>3.4	4.1	>4.3	3.7	
	上澄み	無希釈	-	>3.4	-	>3.1	3.3	
		10 倍希釈	-	>3.6	-	>3.6	2.9	
g	フロック	無希釈	>4.0	>3.1	3.0	>2.4	>2.1	
		10 倍希釈	>4.8	>3.4	4.0	>2.6	2.5	
	上澄み	無希釈	-	>3.2	-	>2.9	2.8	
		10 倍希釈	-	>3.6	-	>3.4	2.8	
j	フロック	無希釈	-	>3.4	-	>2.5	>2.2	
		10 倍希釈	-	>3.5	-	>3.3	>3.1	
	上澄み	無希釈	-	>3.5	-	>3.1	3.3	
		10 倍希釈	-	>3.6	-	>3.4	2.9	

-: not determined.

表 2-9 PMAxx-Enhancer 処理による抽出遺伝子および人工合成遺伝子の低減率（続き）

				遺伝子の log 低減率 ($\log_{10}[C_{n0}/C_n]$)				
				AdV	CV	RV	MNV	MS2
蒸留水				3.9	>3.5	3.5	>3.3	2.6
2019/1	d	フロック	無希釈	-	>2.9	-	n/a	>0.9
			10 倍希釈	-	>3.4	-	>3.4	>3.0
		上澄み	無希釈	-	>3.4	-	>2.3	3.0
			10 倍希釈	-	3.5	-	>2.9	3.4
	e	フロック	無希釈	>4.3	2.8	4.2	>1.2	>1.5
			10 倍希釈	>4.8	>3.5	4.5	>2.7	>2.6
		上澄み	無希釈	-	>3.2	-	>1.7	2.1
			10 倍希釈	-	>3.5	-	>2.9	3.3
	f	フロック	無希釈	>4.7	>3.4	4.0	>2.2	1.7
			10 倍希釈	>4.7	>3.5	4.4	>3.9	>3.3
		上澄み	無希釈	-	>3.4	-	>3.1	2.6
			10 倍希釈	-	>3.5	-	>3.2	>3.6
g	フロック	無希釈	-	>3.0	-	>2.1	>1.9	
		10 倍希釈	-	>3.4	-	>2.3	>1.9	
	上澄み	無希釈	-	>3.3	-	>2.8	>3.2	
		10 倍希釈	-	>3.6	-	>3.3	2.7	
j	フロック	無希釈	-	>3.2	-	>2.3	>1.7	
		10 倍希釈	-	>3.5	-	>3.8	3.2	
	上澄み	無希釈	-	>3.4	-	>2.9	>3.4	
		10 倍希釈	-	>3.5	-	>3.4	2.8	
x	フロック	無希釈	3.1	>3.1	3.1	n/a	n/a	
		10 倍希釈	4.1	>3.4	3.5	>1.5	>1.3	
	上澄み	無希釈	-	>3.3	-	n/a	>1.2	
		10 倍希釈	-	>3.6	-	>3.0	3.3	

-: not determined. n/a: not applicable.

2.3.5 全国 10 カ所の水道原水におけるウイルスの存在実態

全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルスおよび PMMoV の存在実態を表 2-10 に示す。PCR 法単独による定量を実施した場合、HuSaV, HAV, HEV はいずれの水道原水からも検出されなかったのに対し ($<10^{2.2}$ copies/L), その他の 7 種類の病原ウイルスは, 少なくとも 1 カ所以上の水道原水から検出され, $10^{1.7-4.4}$ copies/L の濃度で存在していた。このうち, RV 以外の 6 種類の病原ウイルスは, 2018 年 2 月あるいは 2019 年 1-2 月に採水した水道原水からは検出されたのに対し, 2018 年 7-8 月に採水した水道原水からは検出されなかった。一方, RV は, 2018 年 2 月あるいは 2019 年 1-2 月に比べて陽性率・濃度が幾分低下したものの, 2018 年 7-8 月に採水した水道原水からも検出され, 対象とした病原ウイルスの中では, 最も陽性率が高かった。近年, 日本水道原水において, HuNoV GII は主に感染性胃腸炎の流行期とされる冬季に高濃度で存在しているのに対し, RV は非流行期とされる夏季においても高濃度で存在していることが報告されており (Miura et al., 2019), 本研究の調査結果と一致した。PMMoV は, いずれの採水期間においても, すべての水道原水から検出され, $10^{3.9-6.9}$ copies/L の濃度で存在していた。日本水道原水においては, 10^{3-6} copies/L 程度の PMMoV が存在しているとの報告がなされており (Haramoto et al., 2013)。本研究で得られた水道原水中の PMMoV 濃度は, この既往研究の値と同程度であった。

PCR 法単独による定量において病原ウイルスが検出された水道原水を対象とし, PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した。PMAxx-Enhancer 処理そのものがウイルスを不活化させる可能性が考えられたため, 定量に先立ち, 実験室で培養・精製した RV および MNV について, PMAxx-Enhancer 処理による不活化の程度を確認した。それぞれのウイルスの宿主細胞を用いた PFU 法による定量の結果, PMAxx-Enhancer 処理によるウイルスの不活化は無視できる程度 (不活化率 $\leq 0.3\text{-log}_{10}$) であることが確認された (図 2-4)。また, 我々の研究グループは, AdV, CV, PMMoV についても, PMAxx-Enhancer 処理による不活化が無視できる程度 (不活化率 $\leq 0.4\text{-log}_{10}$) であることを確認している (Shirasaki et al., 2020)。以上の結果から, PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用することにより, 水道原水中の病原ウイルスの感染力の有無を議論できるものと判断された。

PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した場合, AdV, HuNoV GI, PeV, RV については, ほとんどの試料水で定量下限値以下となった (表 2-10, 図 2-5a, c, f, g)。また, PMAxx-Enhancer 処理による低減率は, それぞれ $>0.4\text{-}>0.7\text{-log}_{10}$, $>0.1\text{-}>1.1\text{-log}_{10}$, $>0.1\text{-log}_{10}$, $>0.6\text{-}>1.6\text{-log}_{10}$ であった。従って, これらの病原ウイルスについては, PMAxx がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じて

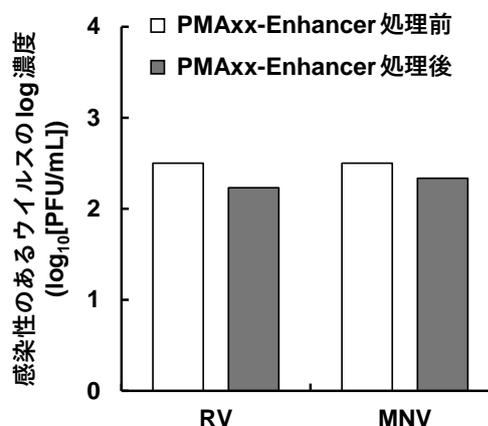
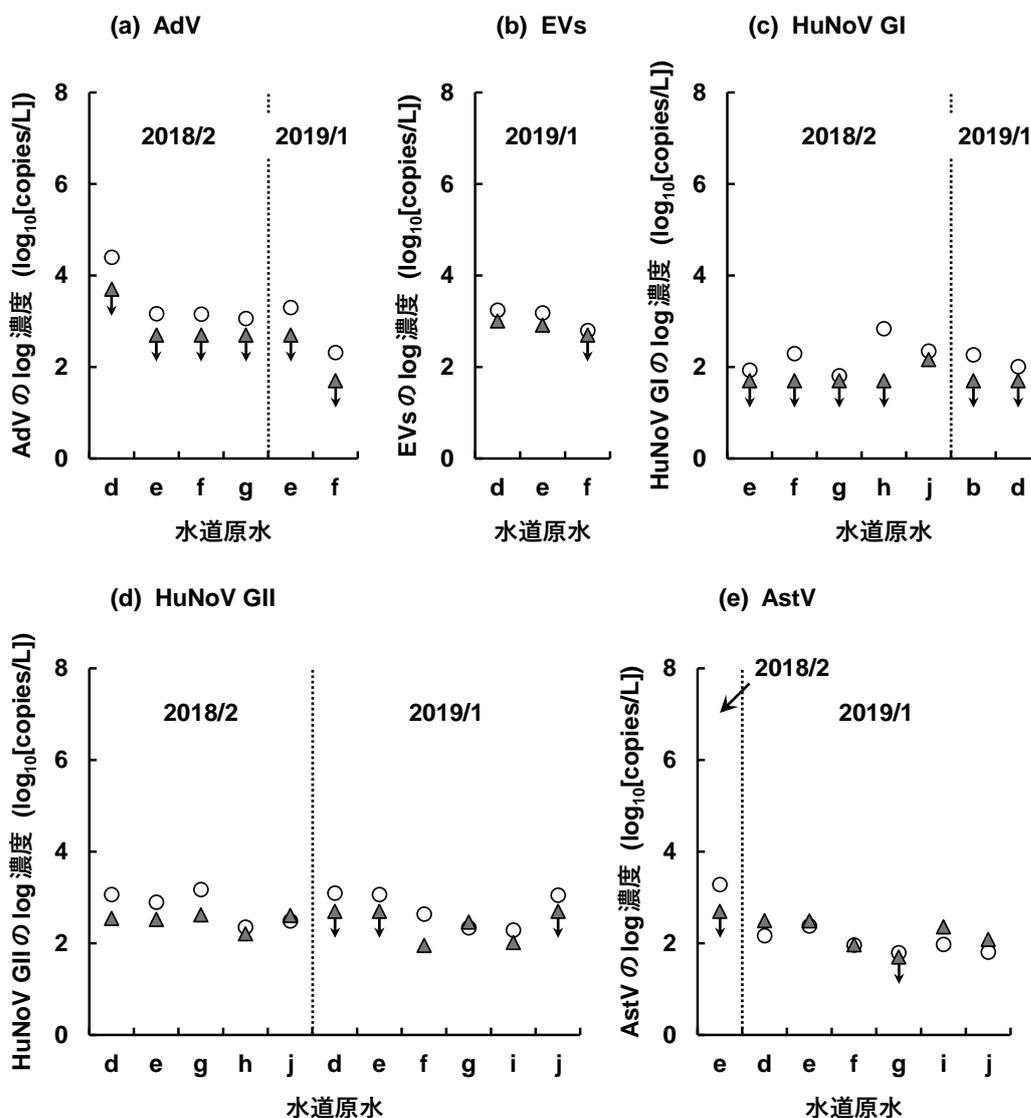


図2-4 PMAxx-Enhancer 処理による RV および MNV の不活化：各値は 1 回の実験結果にて表示。

おり、水道原水中に不活化した状態で存在している可能性が示唆された。一方、EVs, HuNoV GII, AstV については、PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した場合においても、ほとんどの試料水で PCR 法単独による定量を実施した場合と同程度の陽性率・濃度が得られた (表 2-10, 図 2-5b, d, e)。また、PMAxx-Enhancer 処理による低減率は、それぞれ $>0.1-0.3-\log_{10}$, $-0.1-0.7-\log_{10}$, $-0.4->0.6-\log_{10}$ であった。従って、これらの病原ウイルスについては、PMAxx がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷は生じておらず、水道原水中に感染力を保持した状態で存在している可能性が示唆された。PMMoV についても、PCR 法単独による定量を実施した場合と PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した場合は、同程度の陽性率・濃度が得られた (表 2-10, 図 2-5h)。また、PMAxx-Enhancer 処理による低減率は $0.0-0.3-\log_{10}$ であった。従って、PMMoV は水道原水中に感染力を保持した状態で存在している可能性が示唆された。



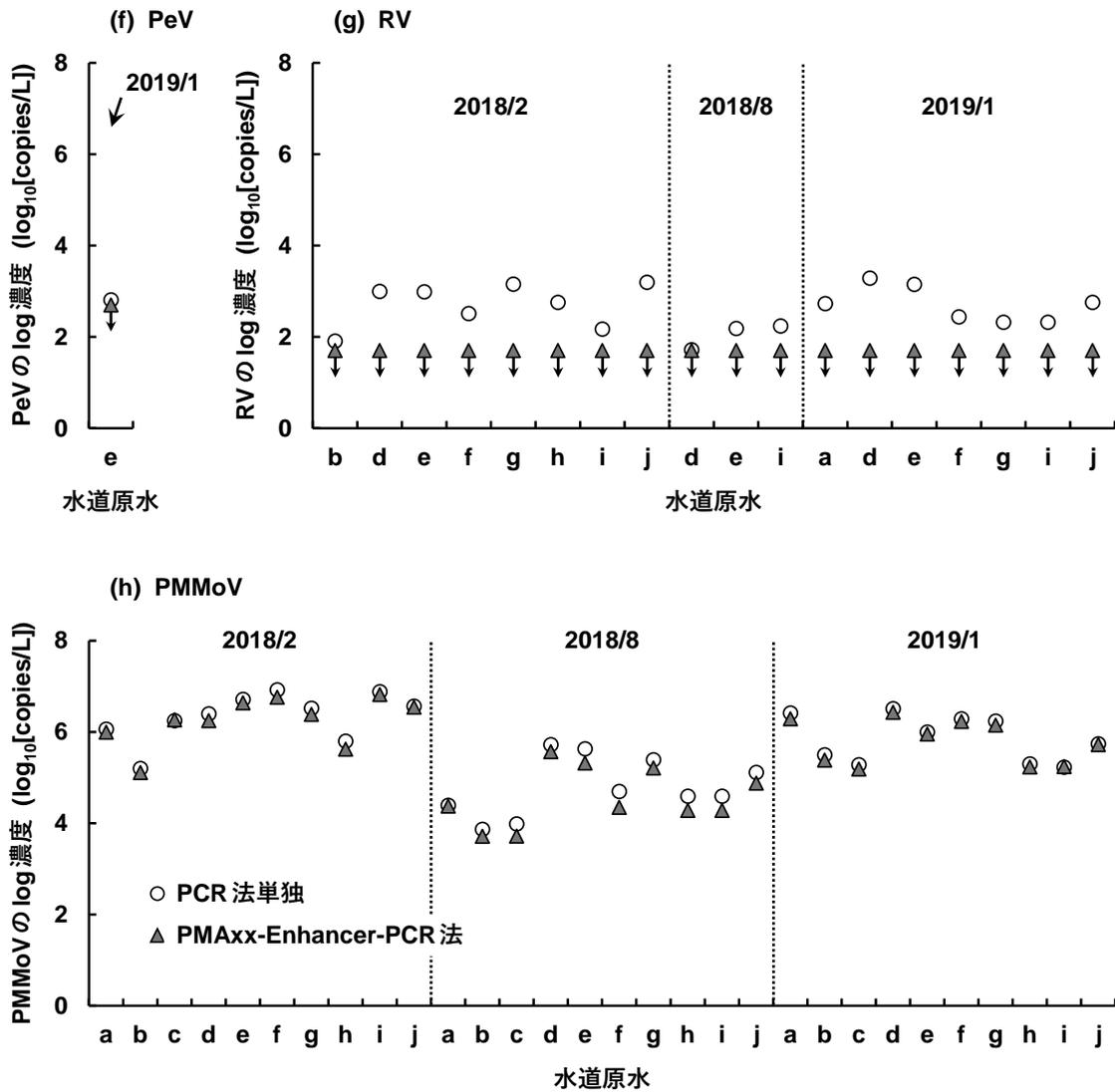


図2-5 水道原水におけるウイルスの存在実態：
PCR法単独において陽性となった試料の定量結果のみ表示。

水道原水における病原ウイルスおよび PMMoV 濃度の相関性を図 2-6 に示す。PCR 法単独あるいは PMAx-Enhancer-PCR 法のいずれによる定量を実施した場合においても、本研究で対象としたいずれの病原ウイルスに比べても、PMMoV が 100 倍以上高い濃度で水道原水中に存在することが明らかとなった。従って、浄水処理工程における病原ウイルスの除去を保障するための指標としての PMMoV の有効性が支持された。

表 2-10 水道原水におけるウイルスの存在実態

		陽性率 (%)			ウイルスの log 濃度 (log ₁₀ [copies/L]) ^a		
		2018/2	2018/8	2019/1	2018/2	2018/8	2019/1
AdV	PCR 法単独	40 (4/10)	0 (0/10)	20 (2/10)	3.4±0.6	-	2.8±0.7
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
EVs	PCR 法単独	0 (0/10)	0 (0/10)	30 (3/10)	-	-	3.1±0.2
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	20 (2/10)	-	-	3.0±0.1
HuNoV GI	PCR 法単独	50 (5/10)	0 (0/10)	20 (2/10)	2.2±0.4	-	2.1±0.2
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	10 (1/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	2.2	-	-
HuNoV GII	PCR 法単独	50 (5/10)	0 (0/10)	60 (6/10)	2.8±0.4	-	2.7±0.4
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	50 (5/10)	0 (0/10)	30 (3/10)	2.5±0.2	-	2.1±0.3
HuSaV	PCR 法単独	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
AstV	PCR 法単独	10 (1/10)	0 (0/10)	60 (6/10)	3.3	-	2.0±0.2
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	50 (5/10)	-	-	2.3±0.2

-: not detected. ^a 各値は陽性試料の平均値および標準偏差にて表示.

表 2-10 水道原水におけるウイルスの存在実態（続き）

		陽性率 (%)			ウイルスの log 濃度 (log ₁₀ [copies/L])		
		2018/2	2018/8	2019/1	2018/2	2018/8	2019/1
HAV	PCR 法単独	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
HEV	PCR 法単独	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
PeV	PCR 法単独	0 (0/10)	0 (0/10)	10 (1/10)	-	-	2.8
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
RV	PCR 法単独	80 (8/10)	30 (3/10)	70 (7/10)	2.7±0.5	2.0±0.3	2.7±0.4
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	-	-	-
PMMoV	PCR 法単独	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	6.3±0.5	4.8±0.6	5.9±0.5
	PMAxx-Enhancer-PCR 法	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	6.2±0.5	4.8±0.6	5.8±0.5

-: not detected. ^a 各値は陽性試料の平均値および標準偏差にて表示.

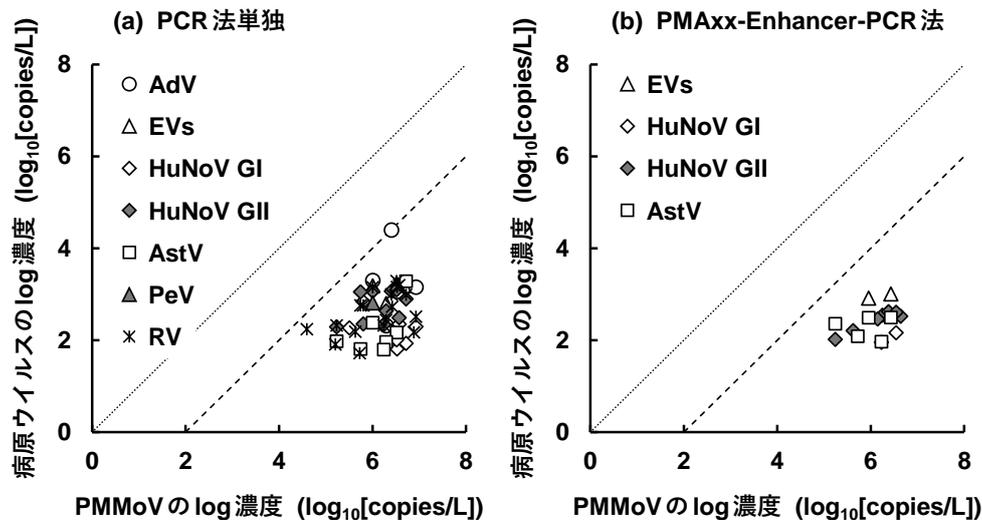


図2-6 水道原水における病原ウイルスとPMMoVの濃度比較：定量下限値以下の値は除外。

2.3.6 水道原水におけるウイルスの生残性

2.3.5 に記述したように、PCR 法による定量に加えて、PMMax-Enhancer-PCR 法による定量を実施したところ、本研究で対象とした全国 10 カ所の水道原水においては、AdV, HuNoV GI, PeV, RV は不活化した状態で、EVs, HuNoV GII, AstV, PMMoV は感染力を保持した状態で存在している可能性が示唆された。一方、下水放流水 x (2019 年 1 月採水) においては、AdV および HuNoV GI についても、PCR 法単独あるいは PMMax-Enhancer-PCR 法のいずれによる定量を実施した場合でも、同程度の濃度が得られた (図 2-7)。また、RV についても、PMMax-Enhancer 処理を実施することにより、幾分濃度は低下したものの、その低減率は 1.1-log_{10} であり、水道原水で得られた低減率 ($>0.6\text{-}1.6\text{-log}_{10}$) の方が大きい場合があった (図 2-7)。これらのことから、下水放流水においては、病原ウイルスはカプシドタンパク質に損傷のない状態で存在しているか、水道原水に比べてカプシドタンパク質の損傷が軽微な状態で存在しており、環境水の流下過程において、カプシドタンパク質に損傷が生じている可能性が示唆された。そこで、2.2.8 に記述した添加実験を実施することにより、環境水中におけるウイルスの生残性を議論した。なお、RV については、精製直後の高濃度ストックに PMMax-Enhancer 処理を実施した場合においても、PCR 法の定量下限値を下回る結果が得られたことから、PMMax-Enhancer-PCR 法による定量は実施しなかった。

PBS を用いた場合、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ においては、AdV および RV のみ、徐々に不活化していくことが確認された (図 2-8a-c, 図 2-10a-c)。 20 or $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ においては、CV および MNV についても、徐々に不活化していくことが確認された (図 2-9b-c, 図 2-11b-c)。また、これら 4 種類のウイルスの不活化速度は、水温が高いほど速く、RV の不活化速度が最も速かった (表 2-11)。これら 4 種類のウイルスについて、PCR 法単独による定量を実施したところ、ほとんど濃度の低減が確認されなかった (図 2-8-11 a-c)。これに対し、PMMax-Enhancer-PCR 法に

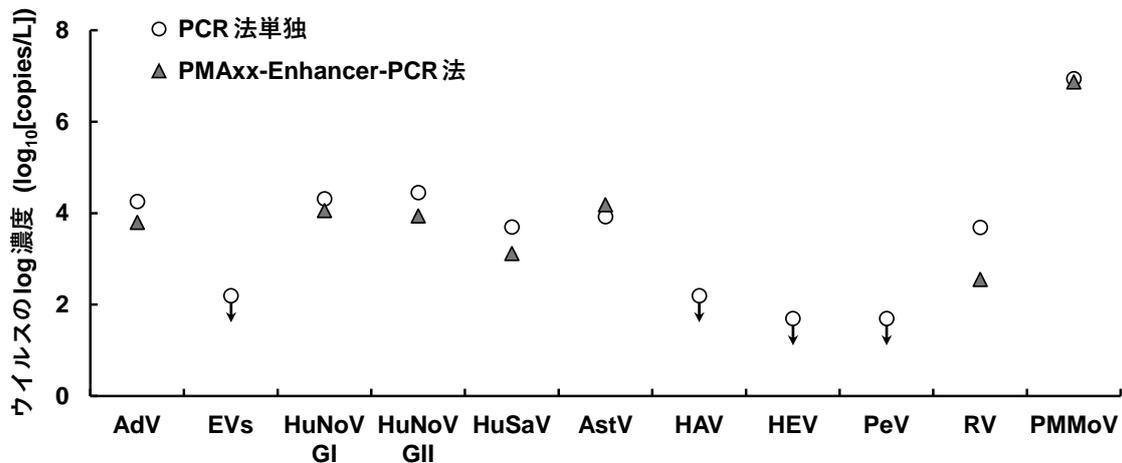


図2-7 下水放流水xにおけるウイルスの存在実態

よる定量を実施したところ、AdVは4, 20, 37℃において、CVおよびMNVは37℃において、濃度の低減が確認された(図2-8a-c, 図2-9c, 図2-11c)。また、これら3種類のウイルスの低減速度は、特に37℃において、感染性評価手法 > PMAxx-Enhancer-PCR法 > PCR法単独の順に、高い値を示した(表2-11)。これらのことから、高水温下においては、ウイルス粒子内部の遺伝子は損傷を受けることなく、PMAxxがウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じることにより、AdV, CV, MNVが不活化しているものと考えられた。一方、PMMoVについては、いずれの水温においても、いずれの定量法を適用した場合においても、ほとんど濃度の低減がみられなかった(図2-12a-c)。従って、PMMoVは、高水温下であっても、高い生残性を示すことが明らかとなった。

水道原水dおよびgを用いた場合、4℃においては、AdV, CV, RVが徐々に不活化していくことが確認された(図2-8d-i, 図2-9d-i, 図2-10d-i)。20 or 37℃においては、MNVについても、徐々に不活化していくことが確認された(図2-11e-f, 図2-11h-i)。また、これら4種類のウイルスの不活化速度は、PBSに比べて速く、水温が高いほど速く、RVの不活化速度が最も速かった(表2-11)。ウイルスは、微生物存在下で不活化が促進され、その要因として、水道原水中に存在する微生物に由来する酵素の影響が報告されている(Ward et al., 1986)。従って、水道原水においては、タンパク質分解酵素によるカプシドタンパク質の損傷が生じることによりPBSに比べて高い不活化速度が得られ、水温の上昇に伴い、タンパク質分解酵素の活性が高まることにより、不活化速度が増大したことが示唆された。

AdV, CV, MNV, RVについて、PCR法単独による定量を実施したところ、AdV, CV, MNVについては、不活化が確認された水温(それぞれ4-37℃, 4-37℃, 20-37℃)下で濃度の低減が確認されたのに対し(図2-8d-i, 図2-9d-i, 図2-11e-f, 図2-11h-i)、RVについては、37℃のみ、濃度の低減が確認された(図2-10d-i)。PMAxx-Enhancer-PCR法による定量を実施した場合においても、AdV, CV, MNVについては、不活化が確認された水温

表 2-11 PBS および水道原水におけるウイルスの低減速度の比較

		水温 (°C)	擬一次ウイルス低減速度定数 k (day ⁻¹)		
			感染性評価手法	PCR 法単独	PMAxx-Enhancer-PCR 法
PBS	AdV	4	0.20±0.05	0.07±0.09	0.23±0.07
		20	0.25±0.05	0.03±0.04	0.21±0.08
		37	0.39±0.17	0.00±0.06	0.23±0.12
	CV	4	0.02±0.02	-0.07±0.08	-0.13±0.06
		20	0.14±0.04	-0.03±0.06	-0.02±0.05
		37	2.23±0.52	0.01±0.34	1.03±0.91
	RV	4	0.21±0.06	0.05±0.03	-
		20	0.33±0.05	0.09±0.14	-
		37	3.76	0.00	-
MNV	4	0.06±0.04	0.05±0.04	0.06±0.08	
	20	0.10±0.02	-0.01±0.05	0.03±0.08	
	37	1.11±0.31	0.01±0.14	0.26±0.19	
PMMoV	4	0.00±0.01	0.02±0.06	0.03±0.09	
	20	0.00±0.02	0.02±0.06	0.02±0.08	
	37	0.03±0.02	0.01±0.03	0.02±0.05	

∴ not determined

(それぞれ 4–37 °C, 4–37 °C, 20–37 °C) 下で濃度の低減が確認された (図 2-8d–i, 図 2-9d–i, 図 2-11e–f, 図 2-11h–i)。また, これら 3 種類のウイルスの低減速度は, 感染性評価手法 > PCR 法単独 = PMAxx-Enhancer-PCR 法の順に, 高い値を示した (表 2-11)。これらのことから, 上述したように, 水道原水においては, タンパク質分解酵素によるカプシドタンパク質の損傷が生じることにより AdV, CV, MNV が不活化し, 水道原水に晒されたウイルス粒子内部の遺伝子は, 速やかに分解されるものと考えられた。上述したように, PBS を用いた場合には, PCR 法単独により定量した AdV, CV, MNV 濃度の低減は確認されなかった (遺伝子の分解は確認されなかった)。従って, ウイルスの不活化だけでなく, 遺伝子の分解についても, 水道原水中に存在する微生物に由来する酵素 (核酸分解酵素) が寄与しているものと推察された。すなわち, 水道原水においては, タンパク質分解酵素により, PMAxx に比べて分子量の大きい核酸分解酵素 (10⁴ Da) がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じ, 結果として, ウイルスが不活化すると, 直ちにウイルス粒子内部の遺伝子が分解されるものと考えられた。

PMMoV については, 上述したように, PBS を用いた場合には, ほとんど不活化しなかつ

表 2-11 PBS および水道原水におけるウイルスの低減速度の比較 (続き)

		水温 (°C)	擬一次ウイルス低減速度定数 k (day ⁻¹)		
			感染性評価手法	PCR 法単独	PMAXx-Enhancer-PCR 法
水道原水 d	AdV	4	0.27±0.13	0.41±0.08	0.23±0.15
		20	1.55±1.17	1.88±0.16	1.66±0.44
		37	2.18±0.51	1.66±1.48	1.23±1.19
	CV	4	0.23±0.03	0.11±0.03	0.08±0.06
		20	1.30±0.11	1.21±0.37	1.18±0.38
		37	5.88	5.57	5.09
	RV	4	0.29±0.07	0.08±0.07	-
		20	2.17±2.56	0.25±1.35	-
		37	4.97	0.25	-
	MNV	4	0.07±0.02	0.07±0.02	0.05±0.03
		20	0.50±0.16	0.13±0.05	0.10±0.04
		37	0.58±0.18	0.51±0.29	0.49±0.29
	PMMoV	4	0.00±0.00	0.02±0.02	0.01±0.05
		20	0.25±0.18	0.18±0.07	0.18±0.07
		37	0.28±0.20	0.21±0.23	0.20±0.24

-: not determined

たのに対し、水道原水 d および g を用いた場合には、20 or 37 °C において、徐々に不活化していくことが確認された (図 2-12e-f, 図 2-12h-i)。これらの水温において、PCR 法単独および PMAXx-Enhancer-PCR 法による定量を実施したところ、濃度の低減が確認された。また、その低減速度は、感染性評価手法 > PCR 法単独 = PMAXx-Enhancer-PCR 法の順に、高い値を示した (表 2-11)。これらのことから、AdV, CV, MNV に加えて、PMMoV についても、水道原水においては、タンパク質分解酵素により、核酸分解酵素がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じ、結果として、ウイルスが不活化すると、直ちにウイルス粒子内部の遺伝子が分解されるものと考えられた。

上述したように、本研究で対象とした水道原水においては、AdV および HuNoV GI については、PCR 法単独による定量結果と PMAXx-Enhancer-PCR 法による定量結果に差異が確認された。しかしながら、本節で記述した生残性評価試験においては、これらの定量法により評価した AdV および MNV の低減速度に差異は確認されなかった。従って、AdV および HuNoV GI については、水温や微生物に由来する酵素以外の要因 (太陽光; Bosshard et al., 2013; Romero et al., 2011; Wigginton et al., 2012) により水道原水中で不活化し、PMAXx が浸

表 2-11 PBS および水道原水におけるウイルスの低減速度の比較（続き）

		水温 (°C)	擬一次ウイルス低減速度定数 k (day ⁻¹)		
			感染性評価手法	PCR 法単独	PMAxx-Enhancer-PCR 法
水道原水 g	AdV	4	0.34±0.06	0.21±0.09	0.24±0.14
		20	1.29±0.32	0.83±0.26	0.74±0.18
		37	1.26±0.37	0.46±0.19	0.74±0.54
	CV	4	0.21±0.06	0.16±0.10	0.21±0.04
		20	1.00±0.21	1.32±0.22	1.32±0.31
		37	6.24	5.48	5.46
	RV	4	0.32±0.04	0.06±0.15	-
		20	1.86±0.97	0.02±0.22	-
		37	5.04	-0.16	-
	MNV	4	0.09±0.02	0.06±0.04	0.03±0.03
		20	0.44±0.14	0.08±0.03	0.08±0.09
		37	1.15±0.17	0.79±0.81	0.88±0.61
	PMMoV	4	0.00±0.01	0.01±0.02	0.02±0.02
		20	0.25±0.11	0.26±0.14	0.27±0.12
		37	0.28±0.18	0.21±0.17	0.21±0.18

-: not determined

透可能ではあるが核酸分解酵素が浸透不可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じている可能性が示唆された。また、RV については、PMAxx-Enhancer-PCR 法による生残性の評価ができなかったものの、生残性評価試験を実施したウイルスの中では、最も不活化速度が速かったのに対し、PCR 法で評価される遺伝子の低減速度は最も遅いことが明らかとなった。このような RV の特徴が、本研究で対象とした水道原水において、PCR 法単独による定量を実施した場合には最も陽性率が高かったのに対し、PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した場合には、すべての試料水で定量下限値以下となった（2.3.5 参照）主要な要因であるものと考えられた。

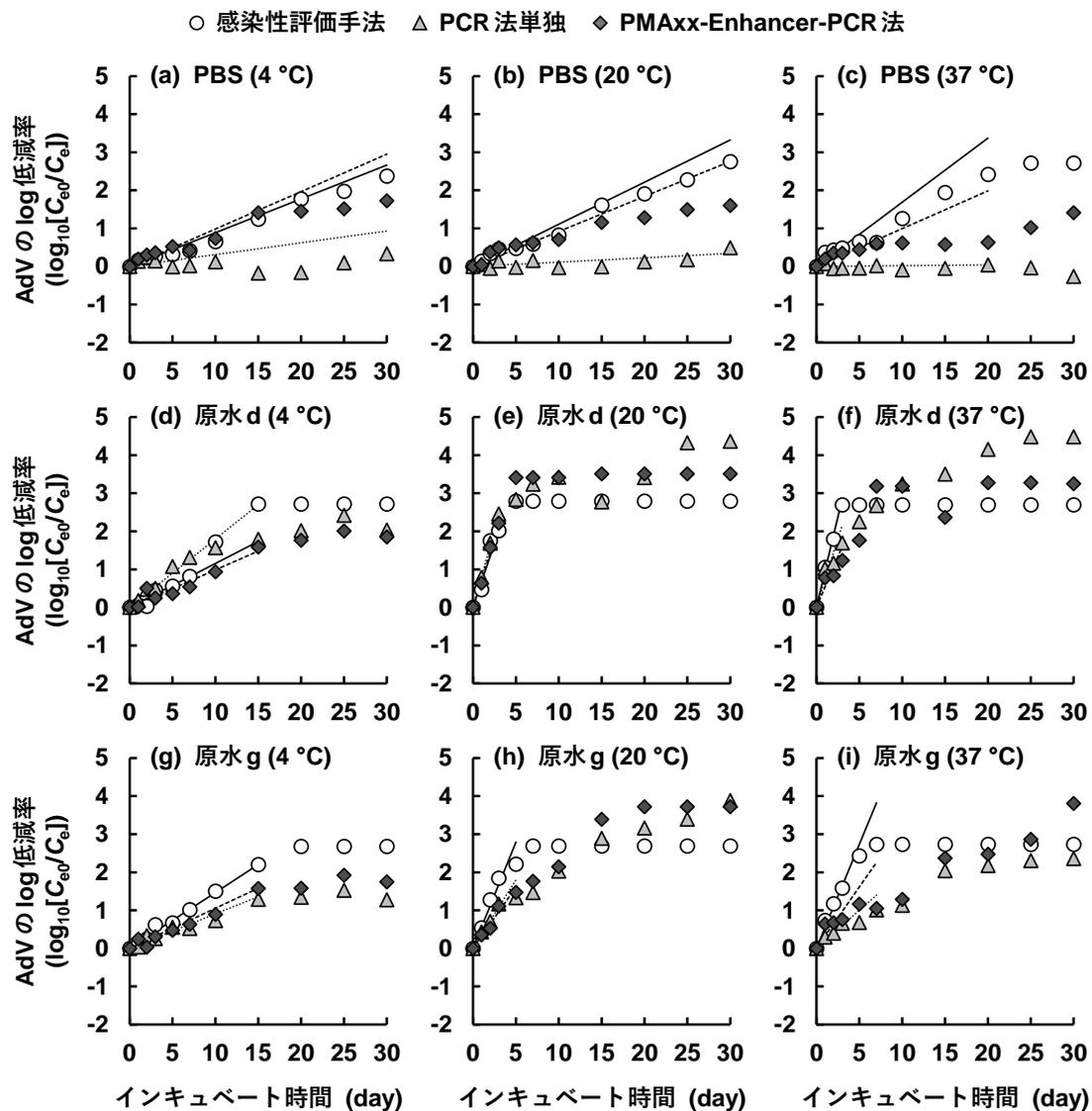


図2-8 生残性評価試験におけるAdVの低減率

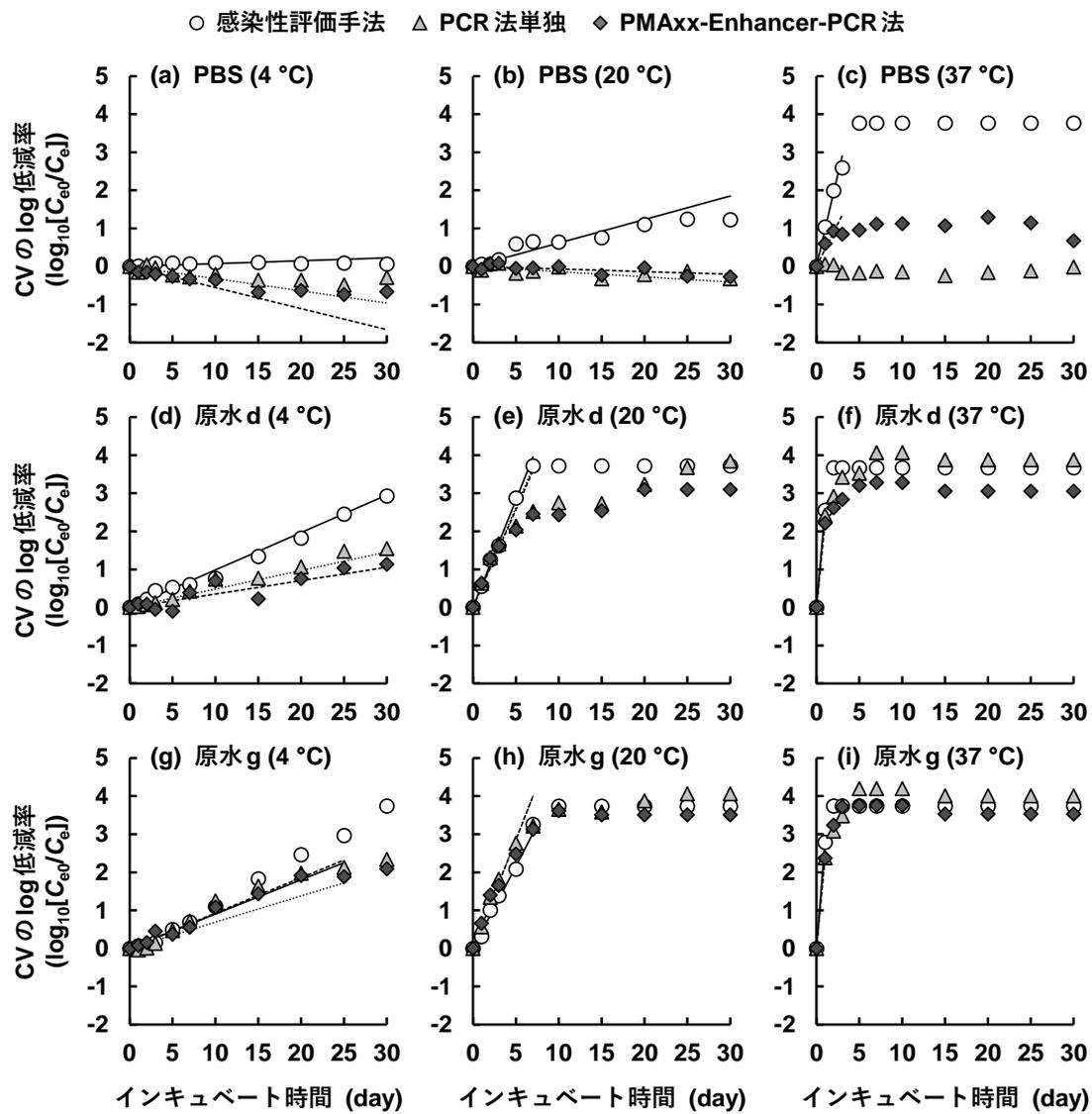


図2-9 生残性評価試験におけるCVの低減率

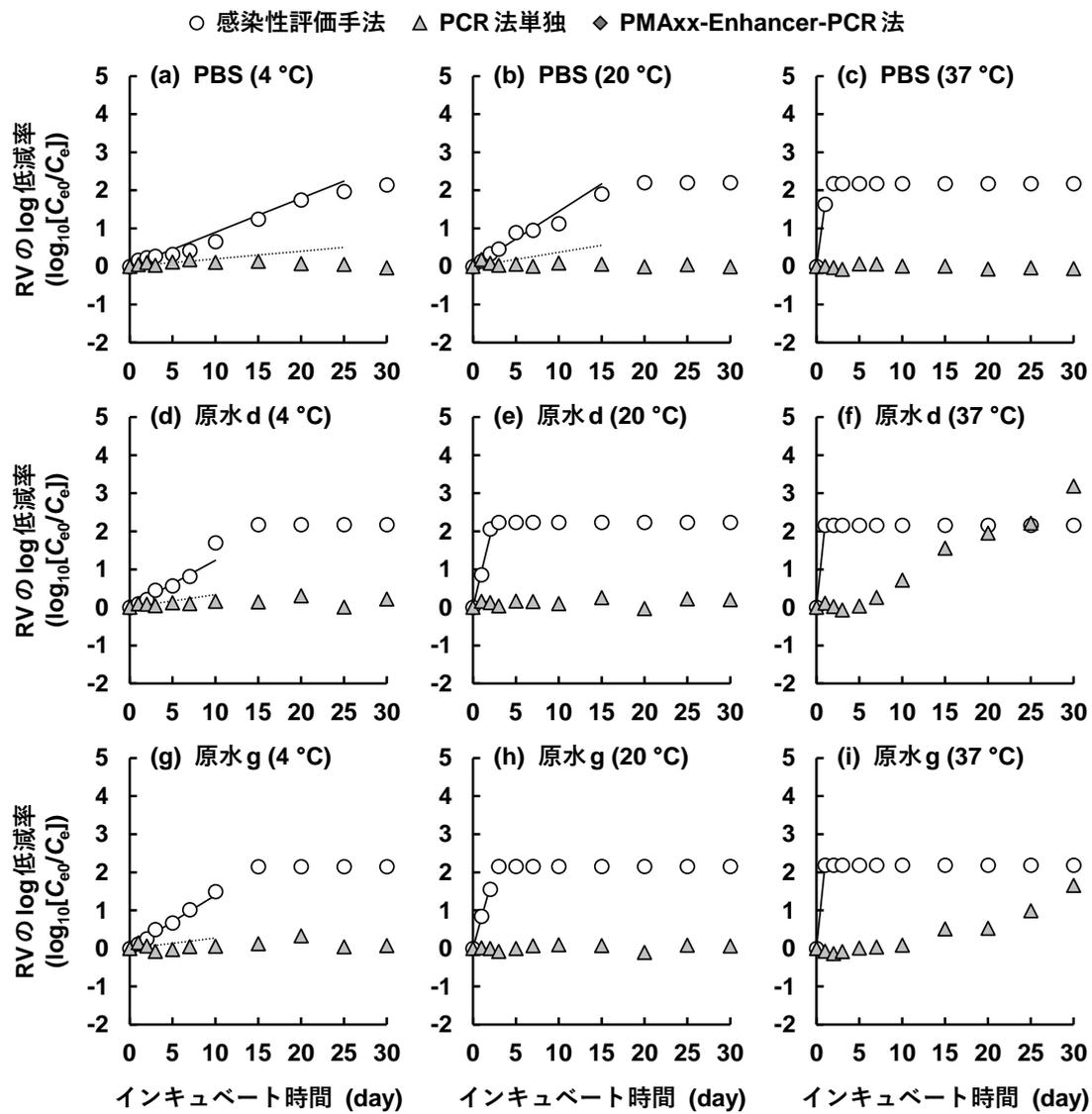


図2-10 生残性評価試験におけるRVの低減率

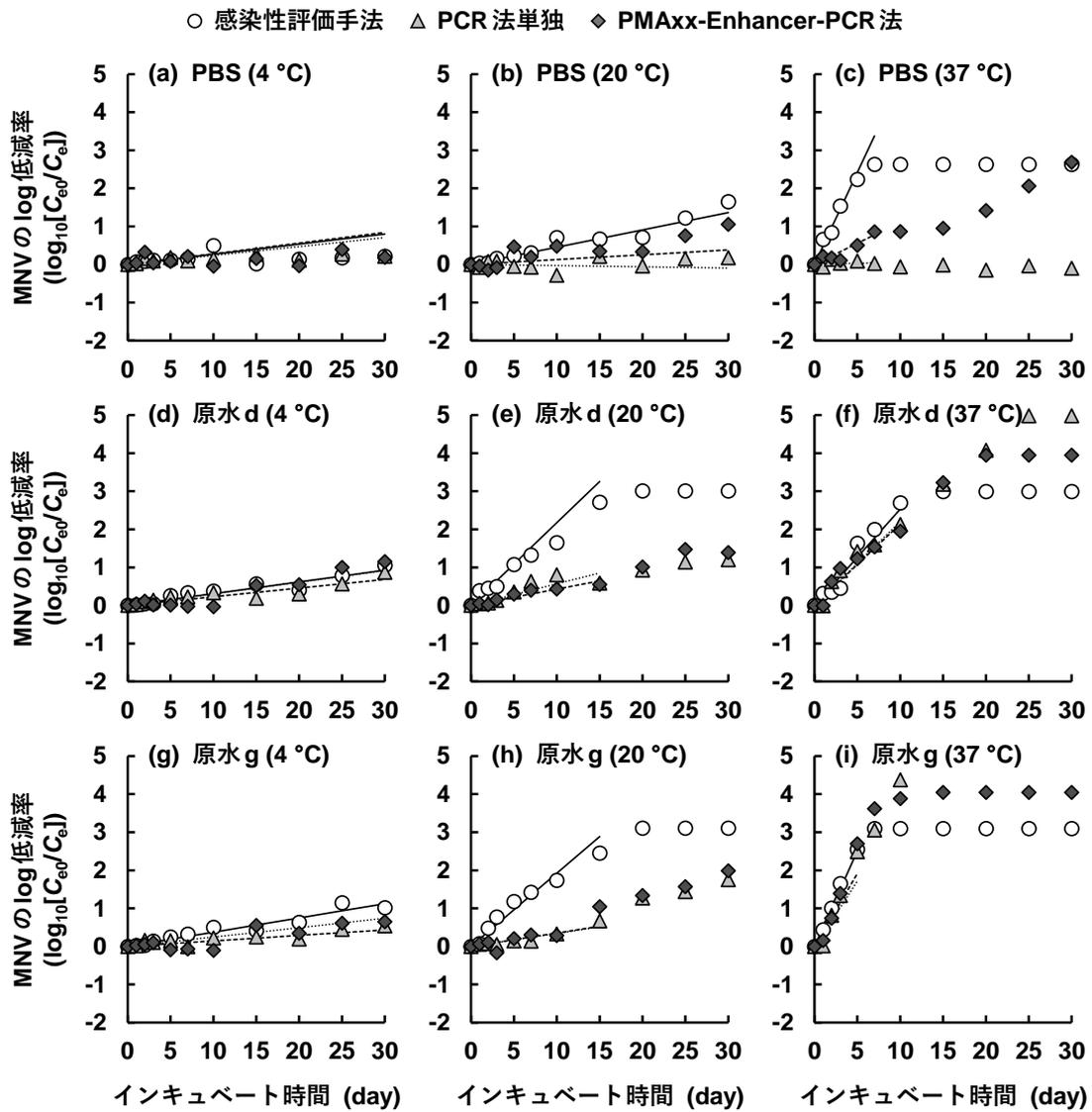


図2-11 生残性評価試験におけるMNVの低減率

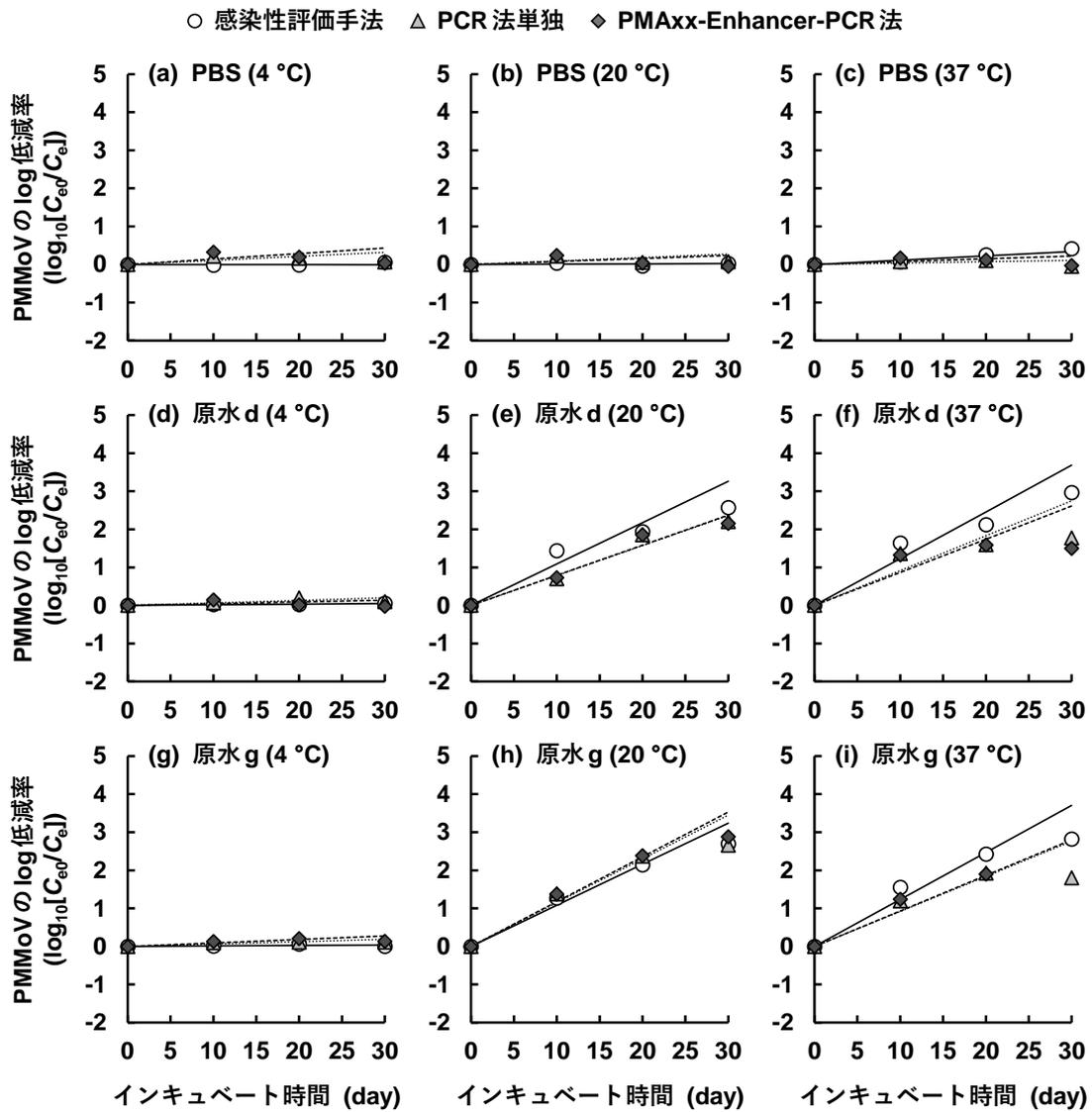


図2-12 生残性評価試験におけるPMMoVの低減率

2.4 本章のまとめ

本章では、水道原水および浄水処理工程水中の病原ウイルスおよび PMMoV を効果的に回収・濃縮可能な新規ウイルス濃縮法を構築し、これを適用することにより、全国 10 カ所の水道原水における病原ウイルスおよび PMMoV の存在実態を調査した。加えて、PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施することにより、カプシドタンパク質の完全性の観点から、水道原水におけるウイルスの感染力の有無についても議論した。本章で得られた知見を以下にまとめる。

1. 陽電荷膜とタンジェンタルフローUF 膜を併用した新規ウイルス濃縮法は、大容量の試料水から病原ウイルスおよび PMMoV を効果的に回収・濃縮可能であることが示された。特に、PMMoV については、濃度既知の PMMoV を添加した 40 L の水道原水および 2,000 L の脱塩素水道水を濃縮する場合においても、30%以上の高い回収率が得られることが明らかとなった。
2. PMAxx-Enhancer-PCR 法による定量を実施した結果、AdV, HuNoV GI, PeV, RV については、PMAxx がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じており、水道原水中に不活化した状態で存在している可能性が示唆された。一方、EVs, HuNoV GII, AstV については、PMAxx がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷は生じておらず、水道原水中に感染力を保持した状態で存在している可能性が示唆された。
3. 水道原水を用いた生残性評価試験においては、ウイルスの低減速度は、感染性評価手法 > PCR 法単独 = PMAxx-Enhancer-PCR 法の順に、高い値を示した。従って、水道原水においては、タンパク質分解酵素により、核酸分解酵素がウイルス粒子内部の遺伝子まで透過可能な程のカプシドタンパク質の損傷が生じ、結果として、ウイルスが不活化すると、直ちにウイルス粒子内部の遺伝子が分解されるものと考えられた。
4. PCR 法単独あるいは PMAxx-Enhancer-PCR 法のいずれによる定量を実施した場合においても、本研究で対象としたいずれの病原ウイルスに比べても、PMMoV は 100 倍以上高い濃度で水道原水中に存在することが明らかとなった。従って、浄水処理工程における病原ウイルスの除去を保証するための指標としての PMMoV の有効性が示唆された。

参考文献

- Adams, M.J., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane, S.A., Wong, S.-M., Melcher, U., Ratti, C., Ryu, K.H., ICTV Report Consortium, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae. *J. Gen. Virol.* 98 (8), 2017.
- Asami, T., Katayama, H., Torrey, J.R., Visvanathan, C., Furumai, H., 2016. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation–sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Res.* 101, 84–94.
- Barnaud, E., Rogée, S., Garry, P., Rose, N., Pavioa, N., 2012. Thermal Inactivation of Infectious Hepatitis E Virus in Experimentally Contaminated Food. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (15), 5153–5159.
- Benschop, K., Molenkamp, R., van der Ham, A., Wolthers, K., Beld, M., 2008. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J. Clin. Virol.* 41, 69–74.
- Bosshard, F., Armand, F., Hamelin, R., Kohn, T., 2013. Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (4), 1325–1332.
- Canh, V.D., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Removal of pepper mild mottle virus by full-scale microfiltration and slow sand filtration plants. *npj Clean Water*, 2, 18.
- Canh, V.D., Torii, S., Furumai, H., Katayama, H., 2021. Application of capsid integrity (RT-)qPCR to assessing occurrence of intact viruses in surface water and tap water in Japan. *Water Res.* 189, 116674.
- Canh, V.D., Liu, M., Sangsanont, J., Katayama, H., 2022. Capsid integrity detection of pathogenic viruses in waters: Recent progress and potential future applications. *Sci. Total Environ.* 827, 154258.
- Cashdollar, J.L., Brinkman, N.E., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Grimm, A.C., Parshionikar, S.U., Wymer, L., Fout, G.S., 2013. Development and evaluation of EPA Method 1615 for detection enterovirus and norovirus in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (1), 215–223.
- Dunkin, N., Weng, S., Jacangelo, J.G., Schwab, K.J., 2017. Minimizing bias in virally seeded water

treatment studies: evaluation of optimal bacteriophage and mammalian virus preparation methodologies. *Food Environ. Virol.* 9 (4), 473–486.

Fout, G.S., Brinkman, N.E., Cashdollar, J.L., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Karim, M.R., Grimm, A.C., Spencer, S.K., Borchardt, M.A., 2014. Method 1615: Measurement of Enterovirus and Norovirus Occurrence in Water by Culture and RT-qPCR, Version 1.3. EPA/600/R-10/181. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.

Fuster, N., Pinto, R.M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., Guix, S., 2016. Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Res.* 101, 226–232.

Haramoto, E., Kitajima, M., Kishida, N., Konno, Y., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., 2013. Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (23), 7413–7418.

Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168–186.

Health Canada, 2017. Guidelines for Canadian drinking water quality: guideline technical document—Enteric Viruses in Drinking Water. Water and Air Quality Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada.

Hongyun, C., Wenjun, Z., Qinsheng, G., Qing, C., Shiming, L., Shuifang, Z., 2008. Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of Cucumber green mottle mosaic virus. *J. Virol. Methods.* 149 (2), 326–329.

Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Sobsey, M.D., Robertson, B.H., 2005. Development and evaluation of a broadly reactive TaqMan assay for rapid detection of hepatitis A virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (6), 3359–3363.

Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *J. Virol. Methods* 219, 51–61.

- Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3), 1033–1039.
- Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation–sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. *Water Res.* 132, 61–70.
- Katzenelson, E., Fattal, B., Hostovesky, T., 1976. Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (4), 638–639.
- Kitajima, M., Oka, T., Takagi, H., Tohya, Y., Katayama, H., Takeda, N., Katayama, K., 2010. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods* 169 (2), 269–273.
- Kitajima, M., Sassi, H.P., Torrey, J.R., 2018. Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *npj Clean Water*, 1, 19.
- Ko, G., Jothikumar, N., Hill, V.R., Sobsey, M.D., 2005. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 127 (2), 148–153.
- Lee, H.W., Lee, H.M., Yoon, S.R., Kim, S.H., Ha, J.H., 2018. Pretreatment with propidium monoazide/sodium lauroyl sarcosinate improves discrimination of infectious waterborne virus by RT-qPCR combined with magnetic separation. *Environ. Pollution* 233, 306–314.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *Int J Hyg Environ Health* 218 (8), 686–693.
- Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., Sirikanchana K., 2021. Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – a systematic review. *Water Res.* X 11, 100080.
- Liu, J., Kibiki, G., Maro, V., Maro, A., Kumburu, H., Swai, N., Taniuchi, M., Gratz, J., Toney, D.,

- Kang, G., Houpt, E., 2011. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J. Clin. Virol.* 50 (4), 308–313.
- Miura, T., Schaeffer, J., LeSaux, J.-C., LeMehaute, P., LeGuyader, F.S., 2018. Virus type-specific removal in a full-scale membrane bioreactor treatment process. *Food and Environ. Virol.* 10 (2), 176–186.
- Miura, T., Gima, A., Akiba, M., 2019. Detection of norovirus and rotavirus present in suspended and dissolved forms in drinking water sources. *Food Environ Virol* 11 (1), 9–19.
- O’Connell, K.P., Bucher, J.R., Anderson, P.E., Cao, C.J., Khan, A.S., Gostomski, M.V., Valdes, J.J., 2006. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (1), 478–483.
- Oberste, M.S., Maher, K., Pallansch, M.A., 1999. Specific Detection of Echoviruses 22 and 23 in Cell Culture Supernatants by RT-PCR. *J. Med. Virol.* 58, 178–181.
- Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.-T., White, P.A., Takeda, N., 2006. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 78, 1347–1353.
- Pang, X.L., Lee, B., Boroumand, N., Leblanc, B., Preiksaitis, J.K., Yu Ip, C.C., 2004. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J. Med. Virol.* 72 (3), 496–501.
- Pang, X., Cao, M., Zhang, M., Lee, B., 2011. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*, 172 (1–2), 85–87.
- Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4318–4326.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Res.* 91, 68–76.

- Randazzo, W., Lopez-Galvez, F., Allende, A., Aznar, R., Sanchez, G., 2016. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int. J. Food Microbiol.* 229, 1–6.
- Romero, O.C., Straub, A.P., Kohn, T., Nguyen, T.H., 2011. Role of temperature and suwannee river natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environ. Sci. Technol.* 45 (24), 10385–10393.
- Shi, H., Pasco, E.V., Tarabara, V.V., 2017. Membrane-based methods of virus concentration from water: a review of process parameters and their effects on virus recovery. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 3, 778–792.
- Shieh, Y.S.C., Wait, D., Tai, L., Sobsey, M.D., 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain-reaction. *J. Virol. Methods*, 54 (1), 51–66.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T., Murai, K., 2016. Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and suitability of bacteriophages MS2 and ϕ X174 as surrogates for those viruses. *Sci. Total Environ.* 563, 29–39.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., Aochi, A., 2017a. Elimination of representative contaminant candidate list viruses, coxsackievirus, echovirus, hepatitis A virus, and norovirus, from water by coagulation processes. *J. Hazard. Mater.* 326, 110–119.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., 2017b. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Res.* 115, 29–39.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., 2018. Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation–rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Res.* 129, 460–469.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Koriki, S., 2020. Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Res.* 186, 116409.

- Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2018. Pepper mild mottle virus: a plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water Res.* 144, 1–12.
- Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., Vinjé, J., 2011. Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (8), 1389–1395.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R., Winston, P.E., 1986. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (3), 450–459.
- WHO, 2017. *Guidelines For Drinking-Water Quality*, 4th ed. incorporating the 1st addendum. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46 (21), 12069–12078.
- Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y.J., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.*, 4 (1), 108–118.

第3章 実浄水工程におけるウイルスの処理性評価

3.1 本章の目的

第2章においては、全国10カ所の水道原水における病原ウイルスおよびPMMoVの存在実態調査を実施し、PMMoVが病原ウイルスに比べて100倍以上高い濃度で存在していることが明らかとなった。従って、PMMoVを対象とすることにより、実浄水工程におけるウイルスの処理性を評価できるものと考えられる。実際、凝集沈澱-急速砂ろ過処理（原水：表流水）、MF膜単独処理（原水：地下水）、緩速砂ろ過処理（原水：表流水）を実施している浄水場を対象とし、実浄水工程におけるPMMoVの処理性の評価がなされている（Asami et al., 2016; Canh et al., 2019; Kato et al., 2018）。しかしながら、2.1に記述したように、これらの既往研究においては、PMMoVに対する有効性が十分に検討されないまま、既存のウイルス濃縮法が水中のPMMoVの濃縮に適用されているという課題がある。

低圧膜ろ過処理（MF/UF膜処理）は、高度な固液分離性、省スペース性、運転管理の容易性等の利点を有することから、日本の浄水場においても導入が進められている技術である。特に、低圧膜ろ過処理の導入の妨げとなる膜ファウリングを最も効果的に抑制可能な凝集処理を前段に組み合わせた凝集-低圧膜ろ過処理が、実浄水工程においても広く適用されている（Huang et al., 2009）。このような低圧膜ろ過処理の中でも、凝集-MF膜処理およびUF膜処理については、添加実験によるウイルスの処理性の評価がなされており、適切な処理条件下で 4-log_{10} 以上の高いウイルス除去率が得られることが報告されている（Fiksdal and Leiknes, 2006; Matsui et al., 2003; Matsushita et al., 2013; Shirasaki et al., 2017; Zhu et al., 2005）。しかしながら、実浄水工程におけるウイルスの凝集-MF膜処理性およびUF膜処理性は、これまで全く評価されてこなかった。従って、実浄水工程においても、添加実験と同様の高いウイルス除去率が得られるかどうかは、全く明らかになっていない。

そこで、本章では、第2章で構築したPMMoVを効果的に回収・濃縮可能なウイルス濃縮法を適用することにより、水道原水中に病原ウイルスに比べて高濃度で存在することが明らかとなったPMMoVを対象とし、実浄水工程におけるウイルスの凝集沈澱-急速砂ろ過処理性、凝集-MF膜処理性、UF膜処理性を評価することを目的とする。

3.2 実験方法

3.2.1 実浄水場の処理フローおよび採水ポイント

本研究では、凝集沈澱-急速砂ろ過処理を実施している浄水場AおよびB、凝集-MF膜処理を実施している浄水場CおよびD、UF膜処理を実施している浄水場Eを対象とした。浄水場Aは、河川水を原水とする処理能力 $5\text{-}10 \times 10^5 \text{ m}^3/\text{day}$ の浄水場であり、処理方式は凝

集沈殿-急速砂ろ過処理である。凝集剤には塩基度 50%のポリ塩化アルミニウム (PACl ; PolyAluminum Chloride) が使用されており、採水日における添加濃度は 1.2-1.9 mg-Al/L であった。また、中間塩素処理および後塩素処理が、それぞれ急速砂ろ過処理の前後に実施されている。2017年10月から2019年2月の間に、原水、沈澱水、砂ろ過水の採水を計7回実施した。ナノセラム陽電荷膜における通水量は、それぞれ 80-250 L, 100-550 L, 100-1000 L であった。

浄水場 B は、河川水を原水とする処理能力 $1-2 \times 10^6 \text{ m}^3/\text{day}$ の浄水場であり、処理方式は凝集沈殿-急速砂ろ過処理、オゾン処理、生物活性炭処理、急速砂ろ過処理である。凝集剤には塩基度 50%の PACl が使用されており、採水日における添加濃度は 0.9-1.2 mg-Al/L であった。また、12 or 1月から4月においては、凝集沈殿処理の前段に前塩素処理が実施されており、5月から11 or 12月においても、原水中アンモニア濃度が急増した場合には、前塩素処理が実施されている。更に、中間塩素処理および後塩素処理が、それぞれ後段の急速砂ろ過処理の前後に毎年実施されている。2017年11月から2019年2月の間に、原水、沈澱水、前段砂ろ過水の採水を計3回実施した。ナノセラム陽電荷膜における通水量は、それぞれ 40-230 L, 150-450 L, 500-1000 L であった。

浄水場 C は、伏流水を原水とする処理能力 $5-10 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{day}$ の浄水場であり、処理方式はマンガ接触ろ過、凝集-MF膜処理である。凝集剤には塩基度 50%の PACl が使用されており、採水日における添加濃度は 0.3-0.4 mg-Al/L であった。また、前塩素処理および中間塩素処理がマンガ接触ろ過の前段に、後塩素処理が凝集-MF膜処理の後段に実施されている。膜ろ過処理においては、中空糸 MF膜モジュール (PVDF, 膜孔径 0.1 μm) が導入されている。2018年5月から2019年7月の間に、原水、前塩素処理水、マンガろ過水、凝集-MF膜処理水の採水を計5回実施した。ナノセラム陽電荷膜における通水量は、それぞれ 100-200 L, 100-200 L, 100-400 L, 100-2000 L であった。2018年7月においては、2本の陽電荷膜に凝集-MF膜処理水を 2000 L ずつ通水し、それぞれの陽電荷膜から 2 L の溶出液にウイルスを溶出した。その後、ビーフェキス凝集後の上澄水を混合し、タンジェンタルフローUF膜にて 20 mL に濃縮した。一方、フロックについては、計 20 mL の 0.15 M リン酸バッファー (pH 9.0) に溶解した。以上の操作により、計 4000 L の凝集-MF膜処理水を 20 mL の上澄み濃縮試料および 20 mL のフロック濃縮試料に濃縮した。

浄水場 D は、河川水を原水とする処理能力 $5-10 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{day}$ の浄水場であり、処理方式は凝集-MF膜処理、マンガ接触ろ過である。凝集剤には塩基度 70%の PACl が使用されており、採水日における添加濃度は 0.4-0.6 mg-Al/L であった。また、前塩素処理が凝集処理の前段に、中間塩素処理および後塩素処理が、それぞれマンガ接触ろ過の前後に実施されている。更に、フミン質や有機物の吸着除去を目的に、粉末活性炭が前塩素処理の直後に添加されている。膜ろ過処理においては、浸漬型 MF膜モジュール (セラミック, 膜孔径 0.1 μm) が導入されている。2020年7月から2021年3月の間に、原水、凝集水、MF膜処理水の採水を計5回実施した。ナノセラム陽電荷膜における通水量は、それぞれ 4-80 L, 4-30

L, 100–1000 Lであった。

浄水場 E は、湖水を原水とする処理能力 $5\text{--}10 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{day}$ の浄水場であり、処理方式は凝集–繊維ろ過処理、UF 膜処理である。凝集剤には塩基度 50% の PAC1 が使用されており、採水日における添加濃度は 0.5 mg-Al/L であった。また、後塩素処理が UF 膜処理の後段に実施されている。膜ろ過処理においては、中空糸 UF 膜モジュール（酢酸セルロース、分画分子量 150 kDa ）が導入されている。2020 年 7 月から 2021 年 10 月の間に、原水、繊維ろ過水、UF 膜処理水の採水を計 5 回実施した。ナノセラム陽電荷膜における通水量はそれぞれ 4 L, 4 L, 100–2,000 L であった。以上、採水した試料水の水質を表 3-1–5 に示す。

表 3-1 採水した試料水の水質（浄水場 A）

		水温 (°C)	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm^{-1})	アルカリ度 ($\text{mg-CaCO}_3/\text{L}$)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
	原水	10.5	7.4	1.4	0.8	0.024	18.2	
2017/10	沈澱水	-	7.1	0.2	0.5	0.010	15.0	1.7
	砂ろ過水	-	7.1	0.13	0.5	0.007	15.6	
	原水	7.7	7.3	2.4	1.2	0.036	18.4	
2017/11	沈澱水	-	7.3	0.3	0.7	0.013	17.6	1.3
	砂ろ過水	-	7.4	0.10	0.7	0.010	17.0	
	原水	3.3	7.3	1.2	0.9	0.026	17.0	
2017/12	沈澱水	-	7.3	0.3	0.6	0.011	16.4	1.6
	砂ろ過水	-	7.2	0.11	0.5	0.008	16.0	
	原水	6.3	6.7	10.2	0.5	0.031	8.6	
2018/5	沈澱水	-	6.7	0.7	0.3	0.006	8.6	1.9
	砂ろ過水	-	6.7	0.13	0.3	0.004	8.4	
	原水	13.4	7.0	4.2	0.9	0.040	13.4	
2018/7	沈澱水	-	6.9	0.4	0.5	0.012	12.2	1.2
	砂ろ過水	-	6.8	0.12	0.6	0.008	12.2	
	原水	6.4	7.4	1.7	0.8	0.028	18.2	
2018/11	沈澱水	-	7.2	0.5	0.5	0.012	14.2	1.6
	砂ろ過水	-	7.3	0.12	0.5	0.007	14.6	
	原水	2.5	7.3	1.4	0.7	0.022	16.6	
2019/2	沈澱水	-	7.1	0.4	0.4	0.009	17.4	1.5
	砂ろ過水	-	7.1	0.11	0.4	0.006	16.4	

表 3-2 採水した試料水の水質（浄水場 B）

		水温 (°C)	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
2017/11	原水	10.4	7.7	7.1	0.8	0.018	50.4	
	沈澱水	-	7.3	0.5	0.7	0.012	39.2	0.9
	砂ろ過水	-	7.5	0.12	0.6	0.011	39.8	
2018/8	原水	26.2	7.2	9.6	1.0	0.024	49.0	
	沈澱水	-	6.8	0.6	0.6	0.011	33.0	1.0
	砂ろ過水	-	6.9	0.13	0.6	0.011	32.8	
2019/2	原水	5.1	7.3	3.1	1.4	0.024	44.8	
	沈澱水	-	6.9	0.7	1.3	0.013	38.8	1.2
	砂ろ過水	-	7.0	0.14	1.2	0.013	39.0	

表 3-3 採水した試料水の水質（浄水場 C）

		水温 (°C)	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
2018/5	原水	9.7	7.0	1.7	0.5	0.013	9.4	
	前塩素水	-	7.0	1.2	0.5	0.009	10.2	0.3
	マンガン水	-	6.9	1.5	0.5	0.009	10.0	
	凝集-MF 水	-	7.2	0.11	0.3	0.003	11.8	
原水	15.9	6.6	2.2	0.7	0.022	12.4		
2018/7	前塩素水	-	6.7	2.0	0.8	0.018	12.8	0.3
	マンガン水	-	6.8	1.6	0.8	0.016	12.6	
	凝集-MF 水	-	7.1	0.10	0.6	0.006	15.2	
	原水	8.0	6.8	1.0	0.9	0.025	12.8	
2018/11	前塩素水	-	6.8	1.1	0.9	0.022	13.0	0.3
	マンガン水	-	6.8	0.9	0.9	0.018	12.8	
	凝集-MF 水	-	7.2	0.10	0.6	0.008	17.2	
	原水	0.9	6.8	1.7	0.6	0.014	13.6	
2019/1	前塩素水	-	6.9	0.7	0.6	0.012	12.8	0.4
	マンガン水	-	6.8	0.9	0.6	0.013	14.0	
	凝集-MF 水	-	7.1	0.10	0.4	0.006	16.4	
	原水	0.9	6.8	1.7	0.6	0.014	13.6	

表 3-3 採水した試料水の水質（浄水場 C）（続き）

		水温 (°C)	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
2019/7	原水	20.0	7.1	0.6	1.1	0.027	19.0	0.3
	前塩素水	-	7.0	0.6	1.1	0.022	19.0	
	マンガン水	-	7.2	0.5	1.1	0.019	20.0	
	凝集-MF 水	-	7.2	0.11	0.8	0.011	24.0	

表 3-4 採水した試料水の水質（浄水場 D）

		水温 (°C)	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
2020/7	原水	17.7	7.0	8.7	1.6	0.044	27.0	0.4
	凝集水	-	7.0	8.8	1.2	0.021	27.8	
	MF 膜処理水	-	7.7	0.08	1.2	0.019	30.0	
2020/11	原水	8.3	7.3	2.8	1.9	0.056	49.0	0.4
	凝集水	-	7.3	9.1	1.7	0.037	55.0	
	MF 膜処理水	-	7.8	0.12	1.6	0.026	57.0	
2021/1	原水	0.6	7.7	5.0	1.5	0.036	64.2	0.4
	凝集水	-	7.6	7.8	1.2	0.020	63.0	
	MF 膜処理水	-	7.8	0.08	1.2	0.017	64.6	
2021/3/9	原水	0.6	7.8	10.1	1.7	0.047	51.8	0.6
	凝集水	-	7.7	15.5	1.2	0.021	52.0	
	MF 膜処理水	-	7.9	0.13	1.3	0.021	51.4	
2021/3/16	原水	1.9	7.5	70.0	1.8	0.053	34.0	0.6
	凝集水	-	7.4	75.1	1.4	0.027	33.2	
	MF 膜処理水	-	7.6	0.08	1.4	0.021	34.6	

表 3-5 採水した試料水の水質（浄水場 E）

		pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm ⁻¹)	アルカリ度 (mg-CaCO ₃ /L)	凝集剤添加濃度 (mg-Al/L)
2020/7	原水	7.3	0.6	0.6	0.018	12.0	
	繊維ろ過水	7.2	0.4	0.5	0.012	11.5	0.3
	UF 膜処理水	7.2	0.09	0.5	0.007	12.9	
2020/10	原水	7.1	1.4	0.9	0.032	11.0	
	繊維ろ過水	7.0	1.3	0.8	0.022	11.0	0.3
	UF 膜処理水	7.1	0.09	0.6	0.013	12.0	
2021/3	原水	7.2	0.5	0.5	0.015	14.0	
	繊維ろ過水	7.1	0.4	0.4	0.008	14.0	0.3
	UF 膜処理水	7.1	0.09	0.5	0.006	15.0	
2021/7	原水	7.2	2.3	0.5	0.014	10.2	
	繊維ろ過水	7.1	0.7	0.4	0.008	9.4	0.3
	UF 膜処理水	7.1	0.08	0.4	0.005	10.0	
2021/10	原水	7.1	2.8	1.1	0.033	12.0	
	繊維ろ過水	7.0	1.7	1.0	0.025	12.0	0.3
	UF 膜処理水	7.2	0.07	0.9	0.015	12.8	

3.2.2 実浄水場における採水および濃縮

各浄水場内において、マグネティックポンプを用いて、上述の試料水を 4-6 L/min の初期流束にて専用ハウジングに収容されたナノセラム陽電荷膜に通水した。なお、残留塩素を含む試料水（浄水場 A：砂ろ過水，浄水場 B：沈澱水，砂ろ過水（どちらも 2019 年 2 月），浄水場 C：前塩素処理水，マンガンろ過水，凝集-MF 膜処理水，浄水場 D：凝集水，MF 膜処理水，浄水場 E：UF 膜処理水）については、終濃度 50 mg/L のチオ硫酸ナトリウムのインライン添加により残留塩素を中和した後に、陽電荷膜に通水した。通水後の陽電荷膜は、4 °C にて研究室に輸送した後、第 2 章で構築した新規ウイルス濃縮法に供した。なお、輸送後直ちに濃縮法に供さない場合には、4 °C にて冷蔵保存した。また、濃縮法に供する際には、陽電荷膜を 20 °C に戻した後、直ちにウイルスの溶出を開始した。

3.2.3 原水および浄水処理工程水におけるウイルス濃縮法の有効性評価

一般に、ウイルス濃縮工程におけるウイルスの回収率は、水質の影響を受けることが知られていることから（Haramoto et al., 2018），本研究で対象とした各浄水場の原水および浄水処理工程水それぞれについて、ウイルスの回収率を評価することが必要となる。実浄水場内

でのウイルス濃縮工程におけるウイルスの回収率を評価する上では、実浄水場内において、原水および処理工程水にウイルスを添加することが理想的である。しかしながら、このような実験は、バイオセーフティーの観点から実施不可能である (Haramoto et al., 2018)。そこで、各浄水場内において採水した原水および処理工程水を研究室に輸送し、ここにウイルスを添加することにより、各試料水におけるウイルスの回収率を評価することとした。

上述の原水および処理工程水（浄水場 A：40 L，浄水場 B：20 L，浄水場 C：40 L，浄水場 D：10 or 20 L，浄水場 E：20 L）に、培養した PMMoV および CGMMV，精製した MNV および MS2 をそれぞれ 10^{7-8} copies/mL， 10^{5-6} copies/mL， 10^{6-7} copies/mL， 10^{7-8} copies/mL になるように添加した後，第 2 章で構築したウイルス濃縮法に供することにより，20 mL の上澄み濃縮試料および 20 mL のフロック濃縮試料に濃縮した。濃縮試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量し，ウイルス濃縮工程におけるウイルスの回収率 (R_t ；第 2 章) を評価した。なお，リアルタイム定量 RT-PCR 法における定量阻害を完全に緩和するために，濃縮試料水は滅菌蒸留水にて 100 倍希釈した後に定量した。また，本実験における陽電荷膜への通水量 (10–40L) は，実浄水場における通水量 (4–2000 L) に比べて非常に小さかったことから，得られたウイルスの回収率は，実浄水場における濃縮試料水中のウイルス濃度の補正には用いなかった。

3.2.4 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性評価

濃縮試料水中のウイルス濃度の定量におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性を，以下のように評価した。無希釈の濃縮試料水，あるいは滅菌蒸留水にて 10 or 100 倍希釈した濃縮試料水（上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料）200 μ L に，培養した CGMMV，精製した MNV および MS2 を 10^6 copies/mL になるように添加した。一方，滅菌蒸留水についても，3 種類のウイルスを同様に添加し，リアルタイム定量 RT-PCR 法における定量阻害のないコントロール試料水とした。各試料水について，添加した CGMMV，MNV および MS2 の濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量し，定量効率 (E_q ；第 2 章) を評価した。なお，得られた定量効率は，実浄水場における濃縮試料水中のウイルス濃度の補正には用いなかった。

3.2.5 実浄水場の凝集沈殿–急速砂ろ過処理を模した添加実験

浄水場 A および B の凝集沈殿–急速砂ろ過処理を模するために，これらの浄水場にて使用されている凝集剤（ノースパック：塩基度 50%，硫酸 2.4% [w/w]，北海道曹達；タイパック：塩基度 50%，硫酸 2.8% [w/w]，大明化学）を実験に使用した。また，凝集剤の種類が凝集沈殿–急速砂ろ過処理におけるウイルスの処理性に与える影響を調べるために，高塩基度 PACI (PACI 700A：塩基度 70%，硫酸 2.2–2.9% [w/w]，多木化学) および硫酸不含・高塩基度 PACI (非売品；塩基度 70%，多木化学) についても，実験に使用した。

浄水場 A および B にて採水した原水に，培養した PMMoV を 10^8 copies/mL になるように

添加したものを原水とし、プラスチック製角型ビーカーに添加した（浄水場 A：4 L，浄水場 B：2 L；実験終了時まで水温を約 20 °C に維持）。ここに、凝集 pH を 7.0 に調整するため、原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後、凝集剤を 0.54, 1.08, 1.62, 2.16 mg-Al/L になるように添加した。凝集剤添加濃度は、採水当日の浄水場 A（1.2–1.9 mg-Al/L）および浄水場 B（0.9–1.2 mg-Al/L）における値を考慮し、決定した。これを、攪拌翼を用いて G 値 200 s^{-1} にて 1 分間急速攪拌， 20 s^{-1} にて 10 分間緩速攪拌し，60 分間静置した。原水および静置後の上澄水を採取し，それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより，凝集沈殿処理におけるウイルスの低減率（Log 低減率（ $\log_{10}[C_{c0}/C_{cs}]$ ； C_{c0} ：原水のウイルス濃度， C_{cs} ：上澄水のウイルス濃度））を算出した。また，静置後の上澄水を用いて（浄水場 A：3 L，浄水場 B：1.5 L），急速砂ろ過処理を実施した。浄水場 A においては，急速砂ろ過処理の前段に中間塩素処理を実施していることから，浄水場 A にて採水した原水を用いた場合には，次亜塩素酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬）を上澄水に $0.7 \text{ mg-Cl}_2/\text{L}$ になるように添加した。このとき，砂ろ過水中の遊離塩素濃度は，浄水場 A の砂ろ過水と同程度の値（ $0.2 \text{ mg-Cl}_2/\text{L}$ ）となった。上澄水を，マグネティックスターラーを用いて攪拌しながら（浄水場 A：300 rpm，浄水場 B：150 rpm），ペリスタルティックポンプを用いて 120 m/d の定流速にて珪砂 or マンガン砂（有効径 0.6 mm，均等係数 1.3 以下，日本原料）を充填した単層砂ろ過ミニカラム（充填厚さ 60 cm）に通水した。原水および砂ろ過水を採取し，それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより，凝集沈殿–急速砂ろ過処理におけるウイルスの低減率（Log 低減率（ $\log_{10}[C_{c0}/C_{cs}] + \log_{10}[C_{r0}/C_{rf}]$ ； C_{r0} ：原水のウイルス濃度， C_{rf} ：砂ろ過水のウイルス濃度））を算出した。

3.2.6 実浄水場の凝集–MF 膜処理を模した添加実験

浄水場 C の凝集–MF 膜処理を模すために，この浄水場にて使用されている凝集剤（ノースパック）を実験に使用した。また，凝集剤の種類が凝集–MF 膜処理におけるウイルスの処理性に与える影響を調べるために，PACI 700A および硫酸不含・高塩基度 PACI についても，実験に使用した。更に，浄水場 C の凝集–MF 膜処理を模すために，この浄水場にて使用されている MF 膜モジュールと同じ孔径・材質のペンシル型 MF 膜モジュール（Microza；PVDF，膜孔径 0.1 μm ，旭化成）を実験に使用した。

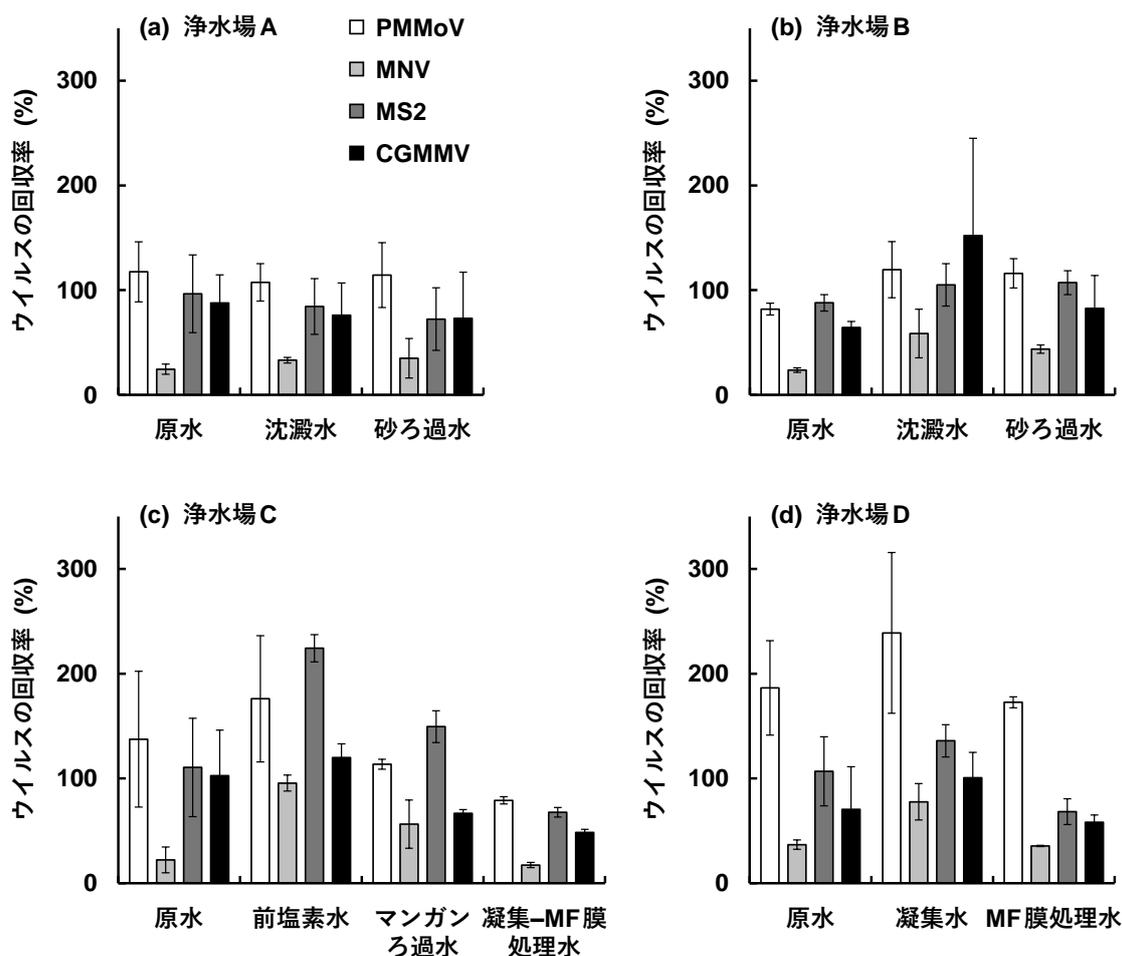
浄水場 C にて採水したマンガンろ過水，すなわち，凝集–MF 膜処理前水に，次亜塩素酸ナトリウムを $0.6 \text{ mg-Cl}_2/\text{L}$ （浄水場 C のマンガンろ過水中の遊離塩素濃度と同程度）になるように添加し，1 分間攪拌した。ここに，培養した PMMoV を $10^{7-8} \text{ copies/mL}$ になるように添加したものを原水とし，プラスチック製角型ビーカーに 500 mL 添加した（実験終了時まで水温を約 20 °C に維持）。ここに，凝集 pH を 7.0 に調整するため，原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後，凝集剤を 0.27, 0.54, 1.08 mg-Al/L になるように添加した。凝集剤添加濃度は，採水当日の浄水場 C（0.3–0.4 mg-Al/L）における値を考慮し，決定した。これ

を、攪拌翼を用いて G 値 200 s^{-1} にて 1 分間急速攪拌した後（実験終了時まで急速攪拌を継続）、ペリスタルティックポンプを用いて 1.0 m/day の定膜ろ過流束、並びに定クロスフロー流速（膜ろ過流量の 2 倍の流量）にて MF 膜モジュールに通水した。原水および MF 膜処理水を採取し、それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより、凝集-MF 膜処理におけるウイルスの除去率（Log 除去率 $(\log_{10}[C_{m0}/C_{mf}]$ ； C_{m0} ：原水のウイルス濃度， C_{mf} ：MF 膜処理水のウイルス濃度)）を算出した。

3.3 実験結果と考察

3.3.1 原水および浄水処理工程水におけるウイルス濃縮法の有効性

各浄水場内において採水した原水および浄水処理工程水を研究室に輸送し、ここにウイルスを添加することにより、水質がウイルス濃縮法に与える影響を評価した。結果を図 3-1 に示す。すべての試料水において、PMMoV の回収率は 79% 以上であり、CGMMV、MNV および MS2 についても、17% 以上の回収率が得られた。従って、水質によらず、ウイルスを効果的に濃縮・回収可能であることが示された。



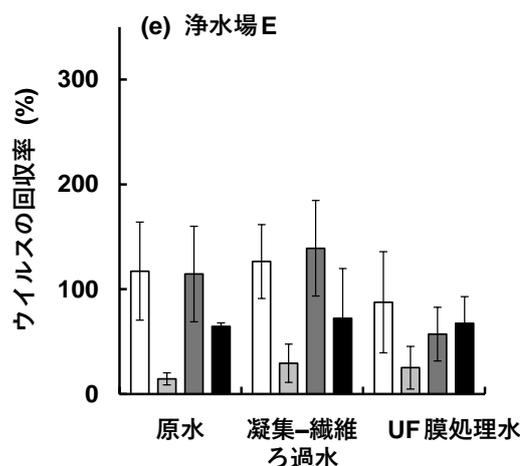


図3-1 実浄水処理場の原水および浄水処理工程水におけるウイルスの回収率：
各値は2回の実験結果の平均値およびデータ範囲または
3回の実験結果の平均値および標準偏差にて表示。

3.3.2 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性

濃縮試料水に CGMMV, MNV および MS2 を添加することにより、リアルタイム定量 RT-PCR 法における定量阻害性、すなわち、遺伝子抽出工程・逆転写反応・PCR 反応における阻害性を評価した。結果を表 3-6-9 に示す。主に PMMoV が回収される上澄み濃縮試料においては、無希釈にて評価した場合においても、定量効率が 10% を下回ることはなく、30% 以上の高い値となった。従って、本研究においては、PMMoV 濃度の定量における阻害の影響は小さいものと判断し、PMMoV 濃度については、無希釈による定量で得られた値を採用した。実際、濃縮試料水中の PMMoV 濃度を無希釈あるいは 10 倍希釈で定量したところ、両者の濃度差は 0.5-log_{10} 以下であった (図 3-2)。一方、主に病原ウイルスが回収されるフロック濃縮試料においては、無希釈にて評価した場合、定量効率が 10% を下回ることがあった (表 3-6, 表 3-8 灰色部)。一方、濃縮試料を 10 倍希釈に供することにより、これらの濃縮試料における定量効率は 42% 以上に向上した。従って、本研究においては、病原ウイルス濃度の定量における阻害の影響は小さい場合が多いこと、また、仮に阻害が確認された場合においても、濃縮試料を 10 倍希釈に供することにより、阻害を十分に緩和できることが示唆された。更に、濃縮試料を 100 倍希釈に供することにより、上澄み濃縮試料およびフロック濃縮試料における定量効率は、それぞれ 72% 以上、82% 以上の高い値となった。このことから、濃縮試料を 100 倍希釈に供することにより、阻害を完全に緩和できることが示唆された。以上の結果から、第 2 章で構築したウイルス濃縮法は、大容量 (最大 2,000 L) の試料水を濃縮した場合においても、リアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害物質をほとんど濃縮することなく、ウイルス (特に PMMoV) を選択的に回収・濃縮可能であることが示された。

表 3-6 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性（浄水場 A）

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
原水	上澄み	無希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	70.0 (52.9-81.7)	73.5 (53.7-93.2)	66.4 (52.7-88.4)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	84.9 (61.0-108.0)	85.5 (58.9-112.6)	88.3 (62.9-118.0)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	100.5 (69.4-121.6)	108.2 (72.7-137.4)	82.4 (56.8-103.6)
	フロック	無希釈	50 (2/4)	50 (2/4)	75 (3/4)	19.9 (0.5-43.2)	14.7 (0.2-28.6)	23.4 (0.2-39.5)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	79.0 (59.0-94.6)	80.6 (48.7-101.9)	80.8 (59.6-113.6)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	96.3 (78.0-112.6)	100.1 (84.1-121.4)	103.3 (51.3-137.9)
沈澱水	上澄み	無希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	84.6 (79.2-89.6)	83.0 (75.3-95.6)	80.1 (45.6-123.9)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	91.9 (62.3-111.1)	89.8 (65.1-108.1)	87.8 (59.5-128.9)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	108.5 (91.3-125.4)	108.9 (94.8-126.7)	104.8 (54.7-171.3)
	フロック	無希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	57.2 (39.3-79.7)	47.3 (14.6-84.9)	59.3 (36.9-75.6)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	88.2 (70.5-108.4)	89.7 (60.8-106.9)	108.7 (87.2-160.1)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	106.7 (86.9-119.2)	112.5 (98.5-125.7)	111.1 (71.8-159.4)
砂ろ過水	上澄み	無希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	76.9 (69.0-80.2)	76.7 (50.1-90.4)	68.2 (42.9-91.3)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	82.2 (67.7-91.3)	83.1 (61.5-97.3)	82.2 (47.1-110.3)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	102.9 (95.4-114.3)	100.9 (76.7-115.9)	98.6 (47.8-136.0)
	フロック	無希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	64.1 (59.4-71.3)	58.7 (48.6-83.1)	73.6 (47.4-100.1)
		10 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	100.6 (96.7-108.5)	106.5 (95.6-120.7)	96.1 (67.6-118.3)
		100 倍希釈	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)	116.3 (97.2-138.6)	118.2 (99.0-146.5)	113.2 (67.6-154.5)

表 3-7 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性 (浄水場 B)

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
原水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	47.1 (28.5-58.5)	52.9 (30.2-67.0)	76.2 (52.9-102.2)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	82.0 (72.7-98.4)	85.3 (71.2-93.9)	130.8 (109.8-158.5)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	106.7 (95.3-119.6)	105.9 (96.1-120.6)	104.0 (56.9-161.0)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	43.0 (27.3-53.3)	41.1 (17.9-55.5)	76.3 (34.9-131.8)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	91.4 (85.0-97.6)	99.9 (91.5-111.2)	126.9 (79.7-155.4)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	112.7 (101.0-134.5)	115.8 (107.2-132.2)	131.5 (114.5-151.6)
沈澱水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	62.4 (58.5-66.5)	68.8 (64.2-75.5)	100.1 (23.0-152.2)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	80.2 (60.9-100.5)	81.6 (66.8-95.5)	113.8 (40.7-172.0)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	92.0 (63.7-116.1)	90.4 (69.4-109.8)	103.1 (44.7-140.6)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	51.0 (42.6-58.0)	52.9 (43.4-58.2)	97.8 (42.6-143.0)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	79.2 (66.1-98.8)	93.4 (75.7-122.7)	104.7 (47.8-148.7)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	94.3 (72.1-127.9)	101.1 (83.1-130.7)	99.3 (59.6-146.1)
砂ろ過水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	53.4 (39.2-73.6)	61.8 (51.9-79.0)	84.8 (21.9-165.8)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	82.0 (75.5-87.5)	79.2 (69.0-91.2)	111.2 (27.9-167.2)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	85.9 (65.1-97.8)	89.5 (70.6-100.8)	94.1 (38.4-150.0)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	63.1 (43.4-88.3)	64.6 (42.2-109.1)	80.6 (14.3-155.3)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	88.9 (64.7-114.6)	93.5 (74.1-120.8)	101.6 (41.9-172.2)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	101.7 (71.1-138.8)	98.4 (78.0-120.4)	94.5 (47.1-148.4)

表 3-8 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性（浄水場 C）

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
原水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	59.8 (49.6-66.3)	71.3 (62.0-88.0)	73.8 (56.2-82.7)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	87.5 (72.0-113.3)	85.9 (73.8-100.0)	83.7 (77.5-89.8)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	115.3 (95.4-125.4)	105.6 (95.8-112.5)	108.6 (101.9-112.6)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	39.6 (24.1-57.6)	55.5 (30.0-92.8)	66.3 (29.9-114.1)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	92.8 (84.4-99.5)	95.6 (83.7-111.6)	103.0 (75.3-132.4)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	113.1 (99.8-121.7)	106.1 (102.8-108.0)	87.7 (75.9-95.0)
前塩素水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	54.2 (32.9-70.0)	61.9 (46.3-74.7)	80.9 (64.0-91.0)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	79.5 (65.1-97.0)	76.5 (67.9-88.5)	88.9 (80.3-105.7)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	113.3 (97.7-128.2)	101.6 (95.6-112.3)	83.1 (75.7-90.0)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	41.6 (28.2-59.2)	58.6 (32.3-74.9)	66.9 (27.4-100.6)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	94.1 (90.5-97.1)	96.2 (91.0-100.1)	97.6 (83.6-121.1)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	122.6 (107.5-134.1)	109.4 (106.2-115.1)	97.4 (75.8-112.7)
マンガン ろ過水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	46.5 (32.7-71.3)	51.4 (38.0-66.9)	50.5 (49.3-52.5)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	72.7 (54.1-99.8)	75.9 (66.2-95.2)	70.6 (61.0-76.4)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	100.4 (86.2-116.1)	99.5 (94.4-102.6)	97.6 (89.3-104.3)
	フロック	無希釈	67 (2/3)	67 (2/3)	67 (2/3)	42.1 (9.6-74.7)	39.9 (4.0-74.4)	27.7 (8.1-45.5)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	91.5 (80.1-109.8)	99.3 (89.4-107.1)	83.8 (73.3-101.9)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	110.2 (95.0-127.2)	115.8 (110.7-124.1)	96.0 (84.9-101.8)

表 3-8 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性 (浄水場 C) (続き)

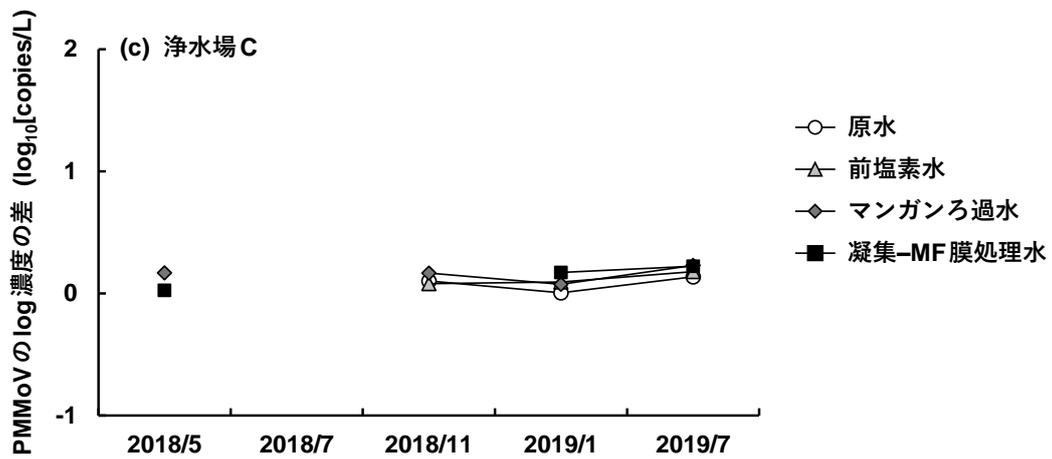
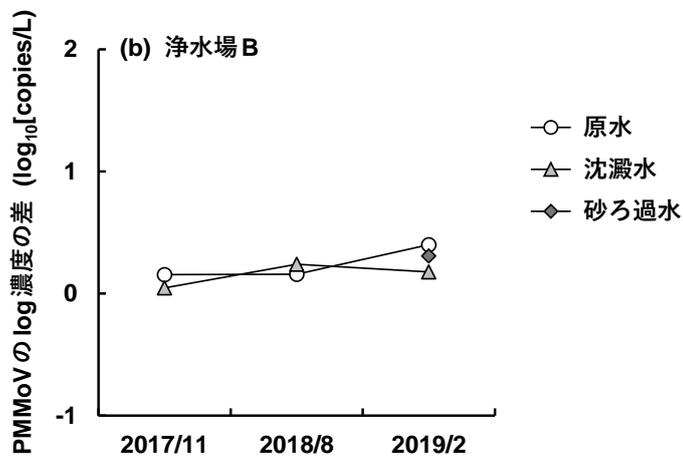
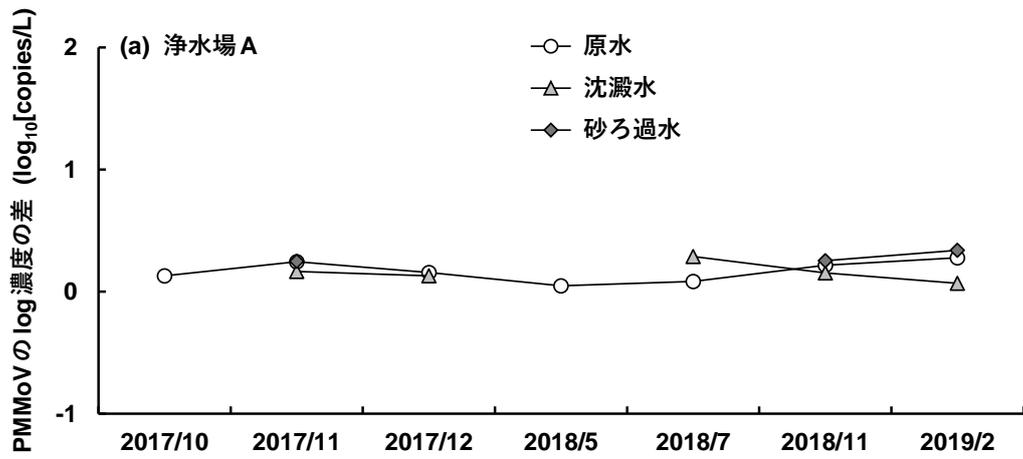
			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
凝集-MF 膜処理水	上澄み	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	68.8 (54.9-87.4)	74.7 (60.6-83.2)	62.5 (35.4-96.3)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	82.5 (63.2-96.2)	79.0 (64.9-93.3)	75.3 (63.6-91.6)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	95.5 (84.3-111.9)	95.0 (80.1-105.6)	99.5 (93.1-106.4)
	フロック	無希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	54.3 (44.0-65.2)	54.7 (28.3-68.7)	55.8 (53.1-59.9)
		10 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	93.7 (82.4-100.8)	109.6 (101.3-121.3)	87.1 (80.0-93.5)
		100 倍希釈	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)	110.6 (105.6-116.9)	109.2 (101.1-119.3)	116.2 (100.9-125.1)

表 3-9 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性 (浄水場 D)

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
原水	上澄み	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	63.4 (59.5-67.2)	65.0 (58.2-71.7)	33.8 (21.6-45.9)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	73.3 (72.0-74.7)	69.4 (69.3-69.5)	60.7 (48.8-72.5)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97.6 (95.6-99.7)	92.9 (91.6-94.1)	102.7 (99.6-105.8)
	フロック	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	41.2 (40.5-41.9)	44.6 (38.2-51.0)	38.8 (30.6-47.0)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	88.0 (74.3-101.8)	84.8 (74.5-95.2)	52.7 (36.5-69.0)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	123.5 (102.0-144.9)	122.0 (105.1-139.0)	97.0 (78.5-115.4)

表 3-9 濃縮試料水におけるリアルタイム定量 RT-PCR 法の阻害性 (浄水場 D) (続き)

			定量効率 10%以上の濃縮試料水の割合 (%)			定量効率 (平均値 [最小値-最大値]) (%)		
			MNV	MS2	CGMMV	MNV	MS2	CGMMV
凝集水	上澄み	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	50.5 (41.6-59.3)	51.2 (43.6-58.7)	30.0 (13.9-46.1)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	62.5 (62.0-63.0)	59.8 (55.3-64.2)	59.4 (28.5-90.3)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	92.5 (87.3-97.7)	80.1 (69.6-90.6)	82.9 (73.9-91.9)
	フロック	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	38.6 (30.6-46.6)	33.8 (22.4-45.3)	42.8 (31.8-53.9)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	81.1 (67.7-94.4)	76.4 (68.2-84.6)	44.3 (31.5-57.2)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	129.8 (110.9-148.7)	105.2 (92.0-118.3)	92.4 (89.0-95.8)
MF 膜処理水	上澄み	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	60.9 (60.1-61.7)	53.0 (50.9-55.1)	37.0 (20.1-54.0)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	65.5 (62.9-68.0)	54.4 (51.4-57.5)	49.1 (30.1-68.1)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	91.3 (85.1-97.5)	72.2 (69.3-75.1)	98.1 (96.3-99.9)
	フロック	無希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	44.1 (41.9-46.3)	30.9 (25.3-36.5)	33.8 (21.0-46.6)
		10 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	80.5 (78.8-82.2)	73.9 (71.2-76.5)	42.4 (31.6-53.2)
		100 倍希釈	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	108.6 (97.4-119.9)	96.5 (90.7-102.4)	82.2 (81.4-82.9)



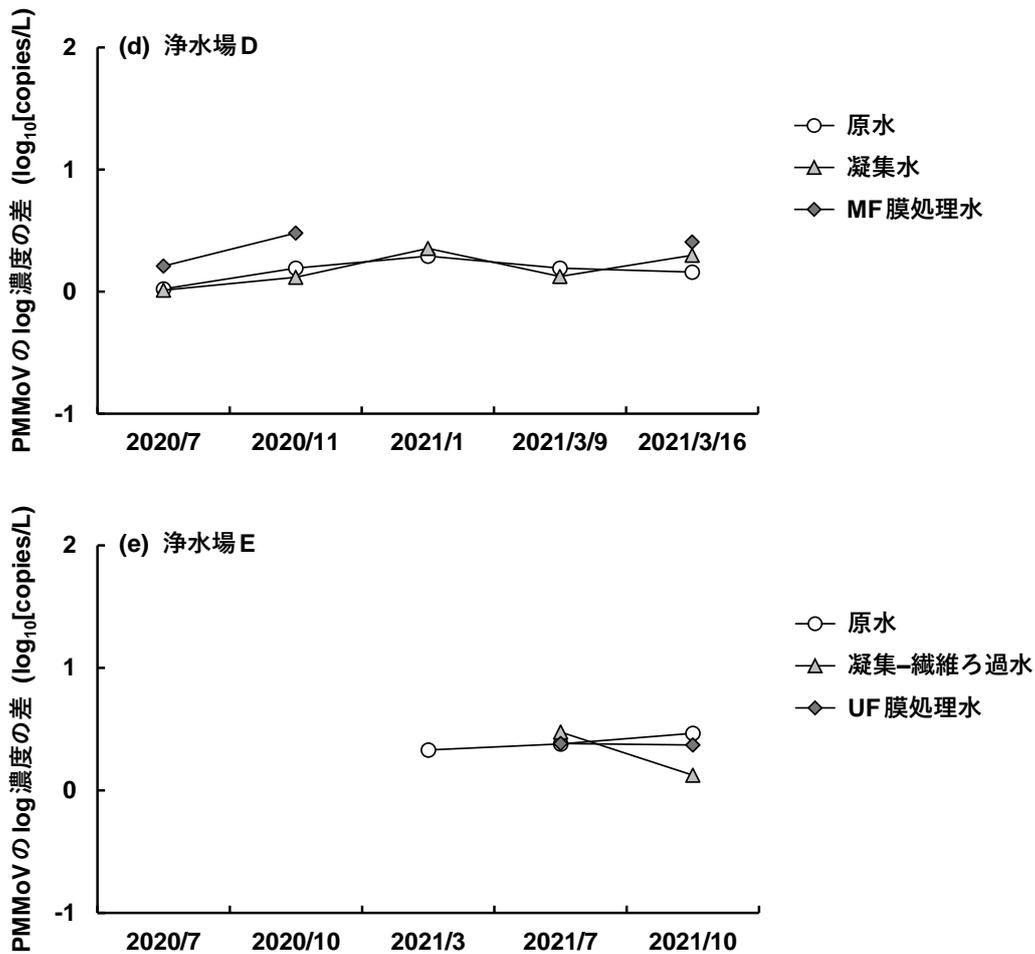


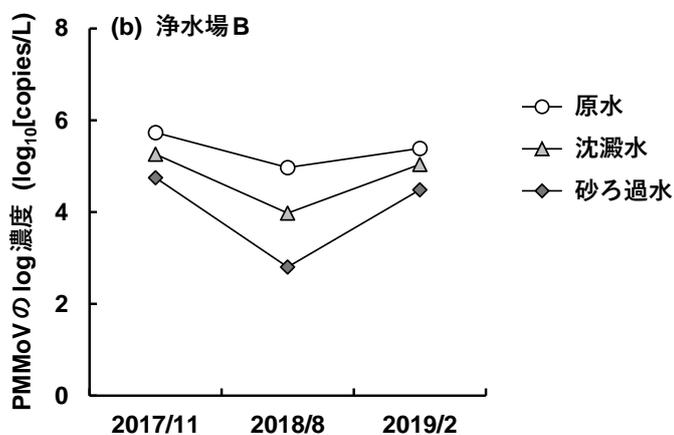
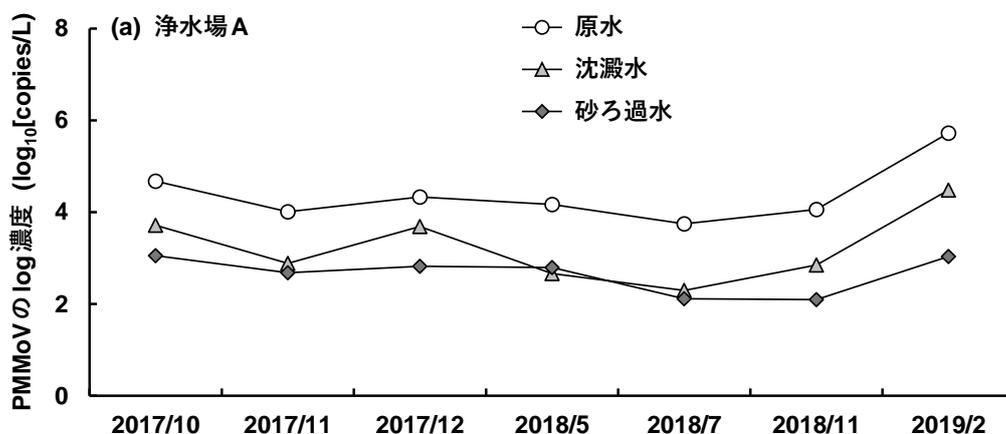
図3-2 無希釈および10倍希釈におけるPMMoVの濃度の差：
いずれかの希釈倍率について定量下限値以下の値は除外。

3.3.3 実浄水場におけるPMMoVの処理性

第2章で構築したウイルス濃縮法を適用することにより、実浄水場の原水および浄水処理工程水中のPMMoV濃度を定量し、実浄水場におけるPMMoVの処理性を評価した。結果を図3-3に示す。いずれの浄水場においても、原水および処理工程水中のPMMoV濃度は定量下限値を上回った、すなわち、これらの濃度を定量することに成功した。その結果、各浄水場におけるPMMoVの処理性を評価することにも成功した。浄水場AおよびBにおいては、凝集沈殿処理および急速砂ろ過処理におけるPMMoV濃度の低減が確認された。浄水場Aの凝集沈殿処理および急速砂ろ過処理におけるPMMoVの低減率は、それぞれ0.6–1.5- \log_{10} 、-0.1–1.4- \log_{10} であった。また、浄水場Bの凝集沈殿処理および急速砂ろ過処理におけるPMMoVの低減率は、それぞれ0.4–1.0- \log_{10} 、0.5–1.2- \log_{10} であった。これらのことから、浄水場AおよびBの凝集沈殿-急速砂ろ過処理においては、それぞれ1.3–2.7- \log_{10} 、0.9–2.2- \log_{10} のPMMoVの低減率が得られた。本研究において陽電荷膜を用いたウイルス濃縮法

を適用することにより評価した凝集沈殿-急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率 (0.9–2.7- \log_{10}) は、対象とした浄水場は異なるものの、既往研究において陰電荷膜を用いたウイルス濃縮法を適用することにより評価した凝集沈殿-急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率 (1.7–2.9- \log_{10} ; Asami et al., 2016, Kato et al., 2018) と同程度であった。従って、実浄水工程におけるウイルスの凝集沈殿-急速砂ろ過処理性は 1–3- \log_{10} 程度と考えられた。

浄水場 C においては、前塩素処理およびマンガン接触ろ過処理 (中間塩素処理を含む) における PMMoV 濃度の低減は確認されなかった。従って、これらの処理工程は、PMMoV の低減にほとんど寄与しないことが明らかになった。PMMoV は、病原ウイルスに比べて極めて高い塩素処理耐性を示し、CT 値 (遊離塩素濃度と接触時間の積) 80 mg-Cl₂-min/L 以下の塩素処理条件においては、PCR 法にて定量される遺伝子量が全く低減しないことが確認されている (Shirasaki et al., 2020)。採水当日の浄水場 C における前塩素処理および中間塩素処理の CT 値は、それぞれ 20, 30 mg-Cl₂-min/L 以下であったことから、前塩素処理および中間塩素処理における PMMoV 濃度の低減が確認されなかったことは、妥当であるものと判断された。一方、後段の凝集-MF 膜処理においては、PMMoV 濃度の低減が確認された。その低減率は 0.7–1.5- \log_{10} であった。



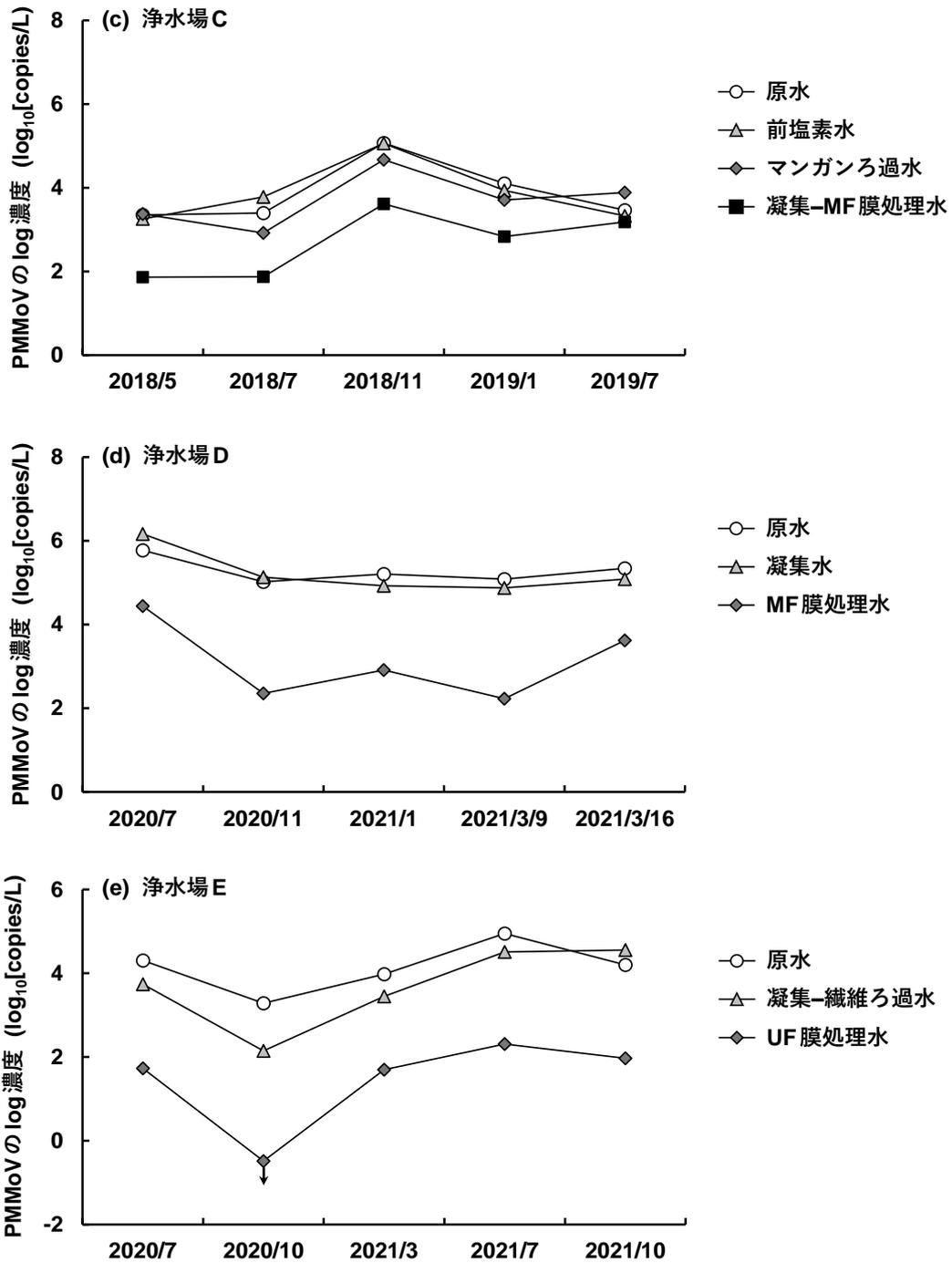


図3-3 実浄水処理場の原水および浄水処理工程水におけるPMMoVの濃度：
 図中の矢印は定量下限値以下を示す。

浄水場 D においては、前塩素処理、粉末活性炭処理および凝集処理における PMMoV 濃度の低減は確認されなかった。従って、前塩素処理および粉末活性炭処理は、PMMoV の低減にほとんど寄与しないことが明らかになった。採水当日の浄水場 D における前塩素処理

の CT 値は 70 mg-Cl₂·min/L 以下であったことから、前塩素処理における PMMoV 濃度の低減が確認されなかったことは、妥当であるものと判断された。一方、粉末活性炭処理においては、粉末活性炭を含む凝集水を陽電荷膜に通水したことから、粉末活性炭に吸着された PMMoV が、後段のウイルス溶出工程にて粉末活性炭から脱着する可能性が考えられた。この場合、凝集水中の PMMoV 濃度を過大評価し、粉末活性炭処理による PMMoV の低減効果を過小評価する恐れがある。そこで、粉末活性炭処理による PMMoV の低減が確認されなかったことが妥当かどうかを判断するため、粉末活性炭を含む凝集水を遠心分離（4,000 × g, 10 min）し、液相から粉末活性炭を分離した後、粉末活性炭の分離前後における液相中の PMMoV 濃度を、リアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量した。なお、図 3-3d に示すように、凝集水中の PMMoV 濃度は高濃度（10⁵⁻⁶ copies/L 程度）であったことから、第 2 章で構築したウイルス濃縮法を適用することなく、PMMoV 濃度の定量を実施した。結果を図 3-4 に示す。液相中の PMMoV 濃度は、粉末活性炭の分離によらず同程度であった。従って、PMMoV は粉末活性炭には吸着しておらず、粉末活性炭処理による PMMoV の低減が確認されなかったことは、妥当であるものと判断された。一方、後段の凝集-MF 膜処理においては、PMMoV 濃度の低減が確認された。その低減率は 1.3-2.9-log₁₀ であった。

浄水場 E においては、凝集処理および繊維ろ過処理における PMMoV 濃度の低減はほとんど確認されなかった（2020 年 10 月除く）。従って、凝集-繊維ろ過処理による PMMoV の除去は、ほとんど期待できないか、限定的なものと考えられた。一方、後段の UF 膜処理においては、PMMoV 濃度の低減が確認された。その低減率は 1.7-2.6-log₁₀ であった。

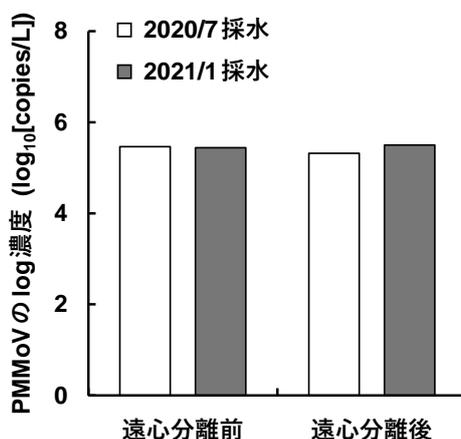


図3-4 粉末活性炭の遠心分離前後における凝集水の液相中の PMMoV の濃度

MF 膜処理は、急速砂ろ過処理に比べて高度な固液分離性を有することから、凝集-MF 膜処理においては、凝集沈殿-急速砂ろ過処理に比べて高い PMMoV の低減率が得られるものと予想された。しかしながら、浄水場 C の凝集-MF 膜処理における PMMoV の低減率（1.0

$\pm 0.3\text{-log}_{10}$) は、浄水場 A の凝集沈殿-急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率 ($1.7 \pm 0.5\text{-log}_{10}$) に比べて統計学的に有意に ($P < 0.05$) に低く、浄水場 B の凝集沈殿-急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率 ($1.4 \pm 0.7\text{-log}_{10}$) に比べても低い傾向にあった。一般に、凝集沈殿-急速砂ろ過処理と凝集-MF 膜処理における凝集条件は、大きく異なることが知られている。凝集沈殿-急速砂ろ過処理においては、主に濁度低減の観点から凝集条件が決定されているのに対し、凝集-MF 膜処理においては、前凝集処理を伴わない場合においても完全な濁質の除去が達成されることから、主にファウリング制御の観点から凝集条件が決定されている。既往の凝集-MF 膜処理の添加実験においては、凝集条件がウイルスの処理性に大きく影響することが明らかとなっている。一般に、ウイルスの粒径は MF 膜の公称孔径に比べて小さいことから、前凝集処理を伴わない場合や凝集条件が不適切な場合においては、限定的なウイルス除去 ($< 1\text{-log}_{10}$)にとどまる一方、凝集条件が適切な場合においては、 $> 4\text{-log}_{10}$ の高いウイルス除去率が期待できることが示されている (Fiksdal and Leiknes, 2006; Matsui et al., 2003; Matsushita et al., 2013; Shirasaki et al., 2017; Zhu et al., 2005)。以上のことから、凝集沈殿-急速砂ろ過処理と凝集-MF 膜処理の間の凝集条件の差異が、浄水場 C の凝集-MF 膜処理における低い PMMoV の低減率をもたらしたものと考えられた。同じ凝集-MF 膜処理においても、浄水場 D における PMMoV の低減率 ($2.2 \pm 0.6\text{-log}_{10}$) は、浄水場 C における PMMoV の低減率に比べて統計学的に有意に ($P < 0.05$) に高かった。浄水場 C および D における MF 膜の公称孔径は共に $0.1 \mu\text{m}$ であったことから、これらの浄水場における凝集条件の差異が、PMMoV の低減率の差異をもたらしたものと考えられた。

3.3.4 実浄水場を模した添加実験における PMMoV の処理性

浄水場 A および B にて採水した原水に PMMoV を添加したものを実験原水とし、浄水場 A および B の凝集沈殿-急速砂ろ過処理を模した添加実験を実施した。結果を図 3-5a および図 3-5b に示す。2018 年 7 月に浄水場 A で採水した原水を用いた場合、採水当日の浄水場 A と同程度の凝集剤添加濃度 (1.08 mg-Al/L) においては、浄水場 A で評価された PMMoV の低減率 (1.6-log_{10}) に比べて高い PMMoV の低減率 (2.9-log_{10}) が得られた。一方、2019 年 2 月に浄水場 A で採水した原水を用いた場合、採水当日の浄水場 A と同程度の凝集剤添加濃度 (1.62 mg-Al/L) においては、浄水場 A で評価された PMMoV の低減率 (2.7-log_{10}) と同程度の PMMoV の低減率 (3.6-log_{10}) が得られた。従って、2019 年 2 月に浄水場 A で採水した原水を用いた場合については、浄水場 A の凝集沈殿-急速砂ろ過処理におけるウイルス除去を、添加実験により再現できたものと判断された。また、2018 年 8 月に浄水場 B で採水した原水を用いた場合、採水当日の浄水場 B と同程度の凝集剤添加濃度 (1.08 mg-Al/L) においては、浄水場 B で評価された PMMoV の低減率 (2.2-log_{10}) と同程度の PMMoV の低減率 (2.9-log_{10}) が得られた。従って、浄水場 B の凝集沈殿-急速砂ろ過処理におけるウイルス除去を、添加実験により再現できたものと判断された。

浄水場 A (2019 年 2 月) を模した凝集沈殿-急速砂ろ過処理実験において、凝集剤添加濃

度を 1.62 mg-Al/L から 0.54 mg-Al/L に減少させると、PMMoV の低減率は 3.6-log_{10} から 0.5-log_{10} に大幅に低下した (図 3-5a). 一方、凝集剤添加濃度が 1.08–2.16 mg-Al/L の範囲においては、PMMoV の低減率は概ね一定であった (3.6–4.0 mg-Al/L). また、浄水場 B を模した凝集沈殿–急速砂ろ過処理実験においても、同様の傾向が確認された (図 3-5b). これらのことから、凝集剤添加濃度が凝集沈殿–急速砂ろ過処理におけるウイルスの処理性に大きく影響し、ウイルスの効果的な除去のためには、1.08 mg-Al/L 以上の凝集剤を添加する必要があるものと推察された. 本研究の調査日においては、浄水場 A, B における凝集剤添加濃度はそれぞれ 1.2–1.9, 0.9–1.2 mg-Al/L であったことから、ウイルス除去の観点からも適切な量の凝集剤が添加されていたものと判断された.

浄水場 C にて採水したマンガンろ過水 (凝集–MF 膜処理前水) に PMMoV を添加したものを実験原水とし、浄水場 C の凝集–MF 膜処理を模した添加実験を実施した. 結果を図 3-5c に示す. 採水当日の浄水場 C と同程度の凝集剤添加濃度 (0.27 mg-Al/L) においては、浄水場 C で評価された PMMoV の低減率 ($0.7\text{-}1.1\text{-log}_{10}$) と同程度の PMMoV の低減率 ($0.5\text{-}1.1\text{-log}_{10}$) が得られた. 従って、浄水場 C の凝集–MF 膜処理におけるウイルス除去を、添加実験により再現できたものと判断された. 以上のことから、この添加実験系を用いることにより、凝集条件がウイルスの凝集–MF 膜処理性に与える影響、更に、浄水場 C の凝集–MF 膜処理における PMMoV の低減率が低かった理由および浄水場 D の凝集–MF 膜処理における PMMoV の低減率が高かった理由を詳細に検討することとした.

凝集剤添加濃度を 0.27 mg-Al/L から 0.54 mg-Al/L 以上に増加させると、PMMoV の低減率は $0.5\text{-}1.1\text{-log}_{10}$ から $2.8\text{-}4.5\text{-log}_{10}$ に大幅に向上した. 従って、凝集剤添加濃度が凝集–MF 膜処理におけるウイルスの処理性に大きく影響し、採水当日の浄水場 C における凝集剤添加濃度は、ウイルス除去の観点からは低いものであり、このことが浄水場 C において PMMoV の低減率が低かった主要な要因であるものと考えられた.

凝集–MF 膜処理においては、同等の凝集剤添加濃度 (0.54 mg-Al/L) を適用した場合、凝集沈殿–急速砂ろ過処理に比べて、高い PMMoV の低減率が得られた. その一方、上述した通り、凝集–MF 膜処理においては、ファウリング制御の観点から凝集剤添加濃度が決定されているため、低い凝集剤添加濃度が適用されている. このため、既往の凝集–MF 膜処理の添加実験にて得られているような高いウイルス除去性は、実浄水工程においては、必ずしも期待できないものと考えられた. 従って、実浄水工程においても高いウイルス除去性を達成するためには、凝集剤添加濃度を含む凝集条件の制御が重要であることが示唆された.

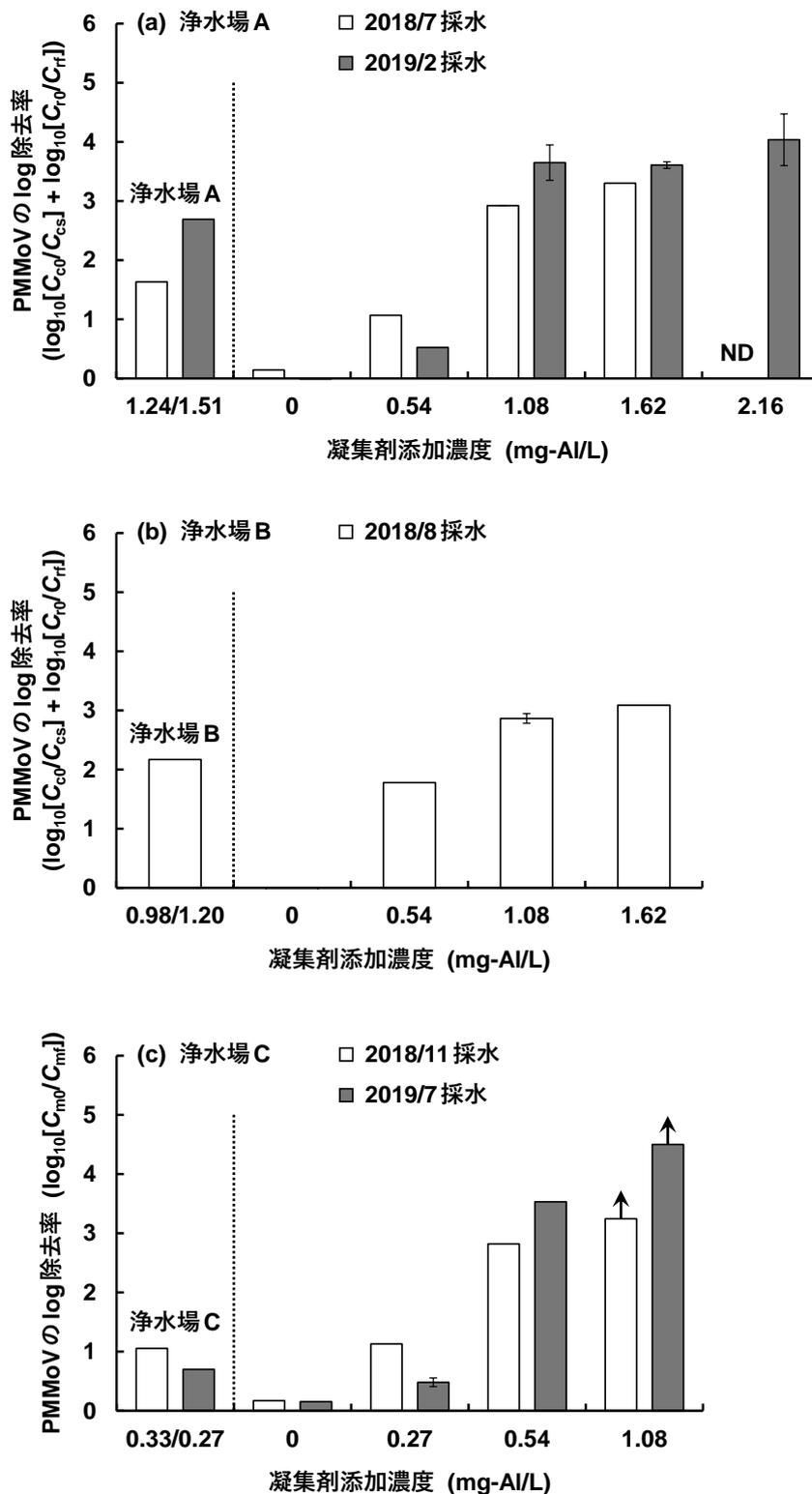


図3-5 凝集剤添加濃度がPMMoVの凝集沈殿-急速砂ろ過処理性，凝集-MF膜処理性に与える影響：
 各値は1回の実験結果，2回の実験結果の平均値およびデータ範囲，
 3回の実験結果の平均値および標準偏差にて表示，図中の矢印は定量下限値以下を示す。

浄水場 C および D は同じ公称孔径 (0.1 μm) の MF 膜を使用しており、採水当日の凝集剤添加濃度も同程度 (それぞれ 0.3–0.4, 0.4–0.6 mg-Al/L) であったにもかかわらず、浄水場 D の凝集–MF 膜処理における PMMoV の低減率は、浄水場 C にて得られた PMMoV の低減率に比べて高かった。一方、浄水場 C においては塩基度 50% の PACl が使用されていたのに対し、浄水場 D においては塩基度 70% の高塩基度 PACl が使用されていた。そこで、凝集–MF 膜処理によるウイルス除去における凝集剤の塩基度の影響を評価した。結果を図 3-6b に示す。上述の添加実験系においては、塩基度 50% の PACl の代わりに塩基度 70% の高塩基度 PACl を使用することにより、PMMoV の低減率が $0.5\text{--}1.1\text{-log}_{10}$ から $1.6\text{--}3.5\text{-log}_{10}$ に向上した。従って、凝集剤の塩基度が凝集–MF 膜処理におけるウイルスの処理性に大きく影響し、塩基度 70% の高塩基度 PACl を使用していたことが、浄水場 D において PMMoV の低減率が高かったことの要因である可能性が示唆された。

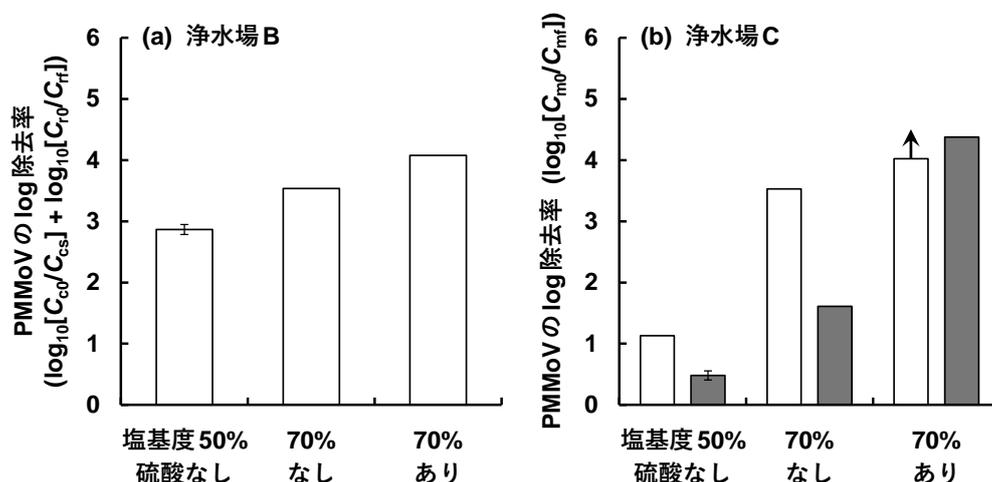


図3-6 凝集剤の種類がPMMoVの凝集沈殿–急速砂ろ過処理性、凝集–MF膜処理性に与える影響：各値は1回の実験結果または2回の実験結果の平均値およびデータ範囲にて表示。図中の矢印は定量下限値以下を示す。

更に、凝集剤の種類の影響を詳細に評価した。結果を図 3-6 に示す。凝集沈殿–急速砂ろ過処理においては、塩基度 70% の高塩基度 PACl および硫酸不含・高塩基度 PACl を使用することにより、PMMoV の低減率が向上した。従って、凝集剤の種類が凝集沈殿–急速砂ろ過処理におけるウイルスの処理性に大きく影響することが確認された。また、凝集–MF 膜処理においても、塩基度 70% の硫酸不含・高塩基度 PACl を使用することにより、PMMoV の低減率が向上した。従って、凝集剤が硫酸を含んでいるかどうか、凝集–MF 膜処理におけるウイルスの処理性に大きく影響することが確認された。塩基度 70% の硫酸不含・高塩基度 PACl は、凝集–MF 膜処理におけるファウリング制御能が高いことが報告されている (Kimura et al., 2015)。従って、この凝集剤を用いることにより、ファウリングを効果的に

抑制しながら、高いウイルス除去性が期待できるものと推察された。

一方、3.2.1 に記述したように、浄水場 D においては、前塩素処理の直後に粉末活性炭が添加されている。我々の研究グループは、凝集-MF 膜処理において、粉末活性炭を添加することにより、形成されるアルミニウムフロックのサイズが顕著に大きくなることを報告している (Matsui et al., 2009)。本研究では、フロックのサイズは実測していないものの、粉末活性炭が添加されている浄水場 D においては、粉末活性炭が添加されていない浄水場 C に比べて、大きなフロックが形成されている可能性が考えられた。一般に、フロックのサイズが大きいく程、フロックは MF 膜分離にて除去されやすいものと考えられる。従って、浄水場 D の凝集-MF 膜処理においては、共存する粉末活性炭の影響により粒径が大きくなったフロックが MF 膜にて効果的に除去されたため、浄水場 C の凝集-MF 膜処理に比べて、高い PMMoV の低減率が得られたものと考えられた。粉末活性炭を添加することにより、実際に凝集-MF 膜処理におけるウイルスの処理性が向上するのかどうかについては、更なる検討が必要である。

3.4 本章のまとめ

本章では、第 2 章で構築したウイルス濃縮法を適用することにより、水道原水中に病原ウイルスに比べて高濃度で存在することが明らかとなった PMMoV を対象とし、実浄水工程におけるウイルスの凝集沈殿-急速砂ろ過処理性、凝集-MF 膜処理性、UF 膜処理性を評価した。本章で得られた知見を以下にまとめる。

1. 第 2 章で構築したウイルス濃縮法を適用することにより、実浄水工程における PMMoV の凝集沈殿-急速砂ろ過処理性、凝集-MF 膜処理性、UF 膜処理性を評価することに成功した。凝集沈殿-急速砂ろ過処理、凝集-MF 膜処理、UF 膜処理における PMMoV の低減率は、それぞれ $0.9-2.7\text{-log}_{10}$ 、 $0.7-2.9\text{-log}_{10}$ 、 $1.7\text{-}2.6\text{-log}_{10}$ であった。
2. MF 膜処理は、急速砂ろ過処理に比べて高度な固液分離性を有するにもかかわらず、浄水場 C の凝集-MF 膜処理における PMMoV の低減率 ($1.0 \pm 0.3\text{-log}_{10}$) は、浄水場 A および B の凝集沈殿-急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率 (それぞれ $1.7 \pm 0.5\text{-log}_{10}$ 、 $1.4 \pm 0.7\text{-log}_{10}$) に比べて低かった。浄水場 C の凝集-MF 膜処理を模した添加実験を実施したところ、ファウリング制御の観点から決定されている浄水場 C における凝集剤添加濃度は、ウイルス除去の観点からは低いものであり、このことが低い PMMoV の低減率が得られた主な要因であることが示唆された。
3. 浄水場 D の凝集-MF 膜処理における PMMoV の低減率 ($2.2 \pm 0.6\text{-log}_{10}$) は、MF 膜の公称孔径および凝集剤添加濃度が同程度にもかかわらず、浄水場 C の凝集-MF 膜処

理における PMMoV の低減率に比べて高かった。上述の添加実験系においては、塩基度 50% の PACl (浄水場 C にて使用) の代わりに塩基度 70% の高塩基度 PACl (浄水場 D にて使用) を使用することにより、PMMoV の低減率が約 1-log_{10} から約 $2\text{-}4\text{-log}_{10}$ に向上することが確認された。従って、高塩基度 PACl を使用していたことが、浄水場 D における高い PMMoV の低減率をもたらしたものと考えられた。

参考文献

- Asami, T., Katayama, H., Torrey, J.R., Visvanathan, C., Furumai, H., 2016. Evaluation of virus removal efficiency of coagulation–sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in Bangkok, Thailand. *Water Res.* 101, 84–94.
- Canh, V.D., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Removal of pepper mild mottle virus by full-scale microfiltration and slow sand filtration plants. *npj Clean Water*, 2, 18.
- Fiksdal, L., Leiknes, O., 2006. The effect of coagulation with MF/UF membrane filtration for the removal of virus in drinking water. *J. Membr. Sci.* 279 (1–2), 364–371.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Res.* 135, 168–186.
- Huang, H., Schwab, K., Jacangelo, J.G., 2009. Pretreatment for low pressure membranes in water treatment: a review. *Environ. Sci. Technol.* 43 (9), 3011–3019.
- Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation–sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. *Water Res.* 132, 61–70.
- Kimura, M., Matsui, Y., Saito, S., Takahashi, T., Nakagawa, M., Shirasaki, N., Matsushita, T., 2015. Hydraulically irreversible membrane fouling during coagulation-microfiltration and its control by using high-basicity polyaluminum chloride. *J. Membr. Sci.* 477, 115–122.
- Matsui, Y., Matsushita, T., Inoue, T., Yamamoto, M., Hayashi, Y., Yonekawa, H., Tsutsumi, Y., 2003.

Virus removal by ceramic membrane microfiltration with coagulation pretreatment. *Water Sci. Technol.: Water Supply*. 3 (5), 93–99.

Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y., 2013. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and pre-coagulation–microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Res.* 47 (15), 5819–5827.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., 2017. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Res.* 115, 29–39.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Koriki, S., 2020. Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Res.* 186, 116409.

Zhu, B., Clifford, D.A., Chellam, S., 2005. Virus removal by iron coagulation–microfiltration. *Water Res.* 39 (20), 5153–5161.

第4章 ヒトカリシウイルスの物理的な浄水処理性評価

4.1 本章の目的

1.6に記述したように、ヒトカリシウイルス (HuNoV および HuSaV) は、水系感染症を引き起こす重要な病原体として WHO の飲料水水質ガイドライン (WHO, 2017) および USEPA の飲料水汚染物質候補リスト (USEPA, 2022) に共通して挙げられているにも関わらず、汎用細胞を用いた効率的な培養法が確立されてこなかったことから、添加実験の実施に必要なウイルス量を確保すること自体が難しく、浄水処理性に関する知見がほとんど得られていない。結果として、これらヒトカリシウイルスについては、PMMoV が浄水処理工程における挙動指標と成り得るかどうか、ほとんど明らかになっていない状況にある。

このような中、HuSaV については、ごく最近、汎用細胞と胆汁酸を用いた効率的な細胞増殖系が確立された (Takagi et al., 2020)。この汎用細胞増殖系を用いて HuSaV を増殖させたウイルス培養液には、上清 1 mL あたり 10^{8-9} copies の HuSaV が含まれていることが報告されている (Takagi et al., 2020)。既往の添加実験においては、 10^{5-7} copies/mL 程度のウイルス添加濃度が用いられていることから (Frohnert et al., 2015; Yin et al., 2015)、この汎用細胞増殖系を活用することにより、添加実験の実施に必要な量の HuSaV を確保できるものと考えられる。一方、添加実験を実施する際には、ウイルスと同時に持ち込まれる細胞あるいは培地由来の不純物 (有機物) が、凝集剤や消毒剤を消費する等の理由から、浄水処理性に大きく影響することが知られている (Dunkin et al., 2017)。従って、持ち込み有機物の影響を排除するためには、添加実験の実施に先立ち、ウイルスの精製を実施する必要がある。2.2.1.1 に記述したように、我々の研究グループは、タンジェンタルフローUF膜を用いることにより、多様な病原ウイルスの精製を実施してきた (Shirasaki et al., 2016, 2017)。従って、この精製法を適用することにより、HuSaV についても、ウイルス濃度を低減することなく有機物濃度のみを低減させることができるものと考えられる。そこで、本章では、ごく最近確立された HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、添加実験の実施に必要な HuSaV の高濃度精製ストックを調整し、これを添加実験に用いることにより、これまで全く議論されてこなかった HuSaV の物理的な浄水処理性 (凝集沈殿-急速砂ろ過処理性および凝集-MF膜処理性) を詳細に把握することを目的とする。更に、これらの処理工程における HuSaV と PMMoV の処理性を比較することにより、PMMoV が、これらの処理工程における HuSaV の挙動指標と成り得るかどうかを議論することを目的とする。

一方、HuNoV については、未だ効率的な培養法が確立されていないことから、VLPs を用いた添加実験を実施することにより、物理的な浄水処理性の評価がなされてきた (Shirasaki et al., 2010; Matsushita et al., 2013)。しかしながら、VLPs は内部に RNA をもたないため、粒子を構成するタンパク質を標的とする低感度な定量法を用いて定量せざるを得ず、実際の

水道原水における HuNoV 濃度とはかけ離れた高濃度で添加実験を実施せざるを得ないという問題があった。このような中、ヒトカリシウイルスと同様に汎用細胞を用いた効率的な培養法が確立されていないヒトパピローマウイルスにおいては、VLPs をベクターにしたワクチン開発が精力的に行われており、VLPs 内部に DNA ワクチンを封入する技術が確立されている (Touze and Coursaget, 1998 ; Kawana et al., 1998)。また、水系感染症を引き起こす重要な病原体の一種である HEV についても、この技術を応用することにより、VLPs 内部に DNA ワクチンを封入することに成功したとの報告がなされている (Takamura et al., 2004)。従って、この技術を応用することにより、HuNoV の VLPs 内部に外来遺伝子を封入できる可能性があり、封入した外来遺伝子を PCR 法にて定量することにより、VLPs の定量感度を大幅に向上できる可能性が考えられる。そこで、本章では、実際の水道原水に近い低濃度域における HuNoV の浄水処理性の評価に向けて、PCR 法にて高感度に定量可能な外来遺伝子を封入した VLPs (遺伝子封入 VLPs) の創製に挑戦する。

4.2 実験方法 (ヒトサポウイルス)

4.2.1 使用した HuSaV および AstV の培養法

本研究では、ヒト糞便から単離された HuSaV GI.1 型 AK20 株を実験に使用した。HuSaV は、宿主細胞である HuTu 80 細胞 (ヒト十二指腸基底上皮腺癌細胞) を用いて培養した。75 cm² フラスコ内にて 90% コンフルエントとなった HuTu 80 細胞を 6 ウェルプレートに播種した。6 ウェルプレート内の細胞が 90% コンフルエントとなった後、非働化 (60 °C, 90 min) した FBS を 3% (v/v), L-glutamine を 2 mM, Penicillin を 100 U/mL, Streptomycin を 100 µg/mL になるように添加した IMDM 培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium 培地) を各ウェルに 1 mL ずつ添加し、細胞表面を洗浄した。ここに、グリココール酸ナトリウム (GlyCA; glycocholic acid sodium salt, ナカライテスク) を 1 mM になるように添加した 3% (v/v) FBS 含有 IMDM 培地を 3 mL 添加し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした (37 °C, 60 min)。インキュベート後、HuSaV の高濃度ストック (後述) を細胞に 20 µL 接種し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした (37 °C, 12 h)。インキュベート後、プレートを反転させることにより、接種液を破棄した。この後、非働化した FBS を 2% (v/v), L-glutamine を 2 mM, Penicillin を 100 U/mL, Streptomycin を 100 µg/mL になるように添加した IMDM 培地を各ウェルに 1 mL ずつ添加し、細胞表面を洗浄する操作を 2 回繰り返した。ここに、GlyCA を 1 mM になるように添加した 3% (v/v) FBS 含有 IMDM 培地を 3 mL 添加し、5% CO₂ インキュベーター内にて最大 10 日間インキュベートした (37 °C)。この後、ウイルス培養液を遠心分離 (2,000 × g, 10 min) し、メンブレンフィルター (0.2 µm, 酢酸セルロース; Dismic-25CS, Advantec) にてろ過したものを、HuSaV の高濃度ストックとした。添加実験における細胞・培地由来の有機物の持ち込みを低減するために、高濃度ストックを、タンジェンタルフローUF 膜 (1,000 kDa, 再生セルロース; Pellicon XL) にて精製した。

また、AstV は、飲料水を介して伝播する病原体として WHO 飲料水水質ガイドラインに掲載されており (WHO, 2017), 水道原水中に存在することが報告されているにも関わらず (Sylvestre et al., 2021), 物理的な浄水処理性に関する知見が全く得られていないことから、研究対象に加えた。本研究では、ATCC から分譲された AstV 1 型 Oxford 株を実験に使用した。AstV は、宿主細胞である Caco-2 細胞 (ヒト結腸基底上皮腺癌細胞, ATCC) を用いて培養した。AstV の高濃度ストック (後述) をブタ膵臓由来トリプシンにて処理した (10 µg/mL, 37 °C, 30 min)。75 cm² フラスコ内にて 90% コンフルエントとなった Caco-2 細胞にトリプシン処理した高濃度ストックを 1 mL 接種し、5% CO₂ インキュベーター内にてインキュベートした (37 °C, 60 min)。この後、L-glutamine を 2 mM, Penicillin を 100 U/mL, Streptomycin を 100 µg/mL, NaHCO₃ を 1.125 g/L, ブタ膵臓由来トリプシンを 5 µg/mL になるように添加した EMEM 培地をフラスコに 20 mL 添加し、5% CO₂ インキュベーター内にて 4 日間インキュベートした (37 °C)。この後、-83 °C にて凍結、37 °C にて融解する操作を 3 回繰り返す。ウイルスを細胞から抽出した。このウイルス抽出液を遠心分離 (2,000 × g, 10 min) し、メンブレンフィルター (0.2 µm, 酢酸セルロース; Dismic-25CS, Advantec) にてろ過したものを、AstV の高濃度ストックとした。添加実験における細胞・培地由来の有機物の持ち込みを低減するために、高濃度ストックを、タンジェンタルフローUF 膜 (1,000 kDa, 再生セルロース; Pellicon XL) にて精製した。

4.2.2 凝集沈澱-急速砂ろ過処理実験

精製した HuSaV, AstV, MNV および培養した PMMoV をそれぞれ 10⁵⁻⁶ copies/mL, 10⁵⁻⁶ copies/mL, 10⁷⁻⁸ copies/mL, 10⁷⁻⁸ copies/mL になるように同時添加した環境水 (凝集沈澱-急速砂ろ過処理を実施している浄水場 A および G にて採水した河川水, 実験終了時まで水温を約 20 °C に維持) を原水とし、プラスチック製角型ビーカーに 2 L 添加した。使用した河川水の水質を表 4-1 に示す。ここに、凝集 pH を 7.0 に調整するため、原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後、凝集剤として、河川水 A については、ノースパック (Al₂O₃ 含有量 10.2%, 塩基度 50%, 比重 1.2, 北海道曹達) を 0.54, 1.08, 1.62 mg-Al/L になるように、河川水 G については、タイパック (Al₂O₃ 含有量 10.1-10.4%, 塩基度 50%, 比重 1.2, 大明化学工業) を 3.24, 4.32, 5.40 mg-Al/L になるように添加した。凝集剤添加濃度は、採水当日の浄水場 A (1.4 mg-Al/L) および浄水場 G (4.1 mg-Al/L) における値を考慮し、決定した。これを、攪拌翼を用いて G 値 200 s⁻¹ にて 1 分間急速攪拌、20 s⁻¹ にて 10 分間緩速攪拌し、60 分間静置した。原水および静置後の上澄水を採取し、それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより、凝集沈殿処理におけるウイルスの除去率 (Log 除去率 (log₁₀[C₀/C_s]; C₀: 原水のウイルス濃度, C_s: 上澄水のウイルス濃度)) を算出した。また、静置後の上澄水 1.5 L を用いて、急速砂ろ過処理を実施した。上澄水を、マグネティックスターラーを用いて 200 rpm にて攪拌しながら、ペリスタルティックポンプを用いて 120 m/d の定流速にて珪砂 (有効径 0.6 mm, 均等係数 1.3 以下, 日本原料)

を充填した単層砂ろ過ミニカラム（充填厚さ 10 cm）に通水した。原水および急速砂ろ過処理水を採取し、それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより、凝集沈澱-急速砂ろ過処理におけるウイルスの除去率（Log 除去率（ $\log_{10}[C_{c0}/C_{cs}] + \log_{10}[C_{r0}/C_{rf}]$ ； C_{r0} ：原水のウイルス濃度， C_{rf} ：急速砂ろ過処理水のウイルス濃度））を算出した。

表 4-1 使用した河川水および凝集-MF 膜処理前水の水質

	採水日	pH	濁度 (NTU)	DOC (mg/L)	UV260 (cm^{-1})	アルカリ度 (mg- CaCO_3/L)
A	2021/10/5	7.5	1.7	1.1	0.030	19.6
C	2021/10/25	6.7	1.4	1.4	0.037	13.4
G	2021/11/5	7.1	12.1	2.5	0.060	38.6

4.2.3 凝集-MF 膜処理実験

精製した HuSaV, AstV, MNV および培養した PMMoV をそれぞれ 10^{5-6} copies/mL, 10^{5-6} copies/mL, 10^{7-8} copies/mL, 10^{7-8} copies/mL になるように同時添加した試料水（凝集-MF 膜処理を実施している浄水場 C にて採水した凝集-MF 膜処理前水，実験終了時まで水温を約 20 °C に維持）を原水とし，プラスチック製角型ビーカーに 500 mL 添加した。使用した膜ろ過前水の水質を表 4-1 に示す。なお，浄水場 C においては，凝集-MF 膜処理の前段に前塩素処理および中間塩素処理を実施しているため（3.2.1 参照），残留遊離塩素が消費されたことを確認した後に，凝集-MF 膜処理前水を実験に使用した。ここに，凝集 pH を 7.0 or 7.5 に調整するため，原水に予め HCl あるいは NaOH を添加した後，凝集剤としてノースパックを 0.27, 0.41, 0.54, 1.08 mg-Al/L になるように添加した。これを，攪拌翼を用いて G 値 200 s^{-1} にて 1 分間急速攪拌した後（実験終了時まで急速攪拌を継続），ペリスタルティックポンプを用いて 1.0 m/d の定膜ろ過流束，並びに定クロスフロー流速（膜ろ過流量の 2 倍の流量）にてペンシル型 MF 膜モジュール（Microza；PVDF，膜孔径 0.1 μm ，旭化成）に通水した。原水および MF 膜処理水を採取し，それぞれの試料水中のウイルス濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて定量することにより，凝集-MF 膜処理におけるウイルスの除去率（Log 除去率（ $\log_{10}[C_{m0}/C_{mf}]$ ； C_{m0} ：原水のウイルス濃度， C_{mf} ：MF 膜処理水のウイルス濃度））を算出した。

4.2.4 電気移動度測定

Milli-Q 水中における HuSaV および AstV の表面電位特性，河川水および凝集-MF 膜処理前水中における HuSaV, AstV, MNV および PMMoV 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。Milli-Q 水は， NaHCO_3 を用いてアルカリ度 20 mg- CaCO_3/L ，HCl

あるいは NaOH を用いて pH 2-9 に調整した後、精製した HuSaV および AstV をそれぞれ 10^{7-8} copies/mL, 10^9 copies/mL になるように単独添加した。一方、河川水 A, G および凝集-MF 膜処理前 C 水は、濁度成分を取り除くために UF 膜 (PLHK; 再生セルロース, 分画分子量 100 kDa, Millipore) にてろ過し, HCl あるいは NaOH を用いて pH 7.0 or 7.5 に調整した後、精製した HuSaV, AstV, MNV および培養した PMMoV をそれぞれ 10^{7-8} copies/mL, 10^9 copies/mL, 10^{10} copies/mL, 10^{10} copies/mL になるように単独添加した。これをメンブレンフィルター (Dismic-25HP; 親水性 PTFE, 膜孔径 0.2 μ m, Advantec) を用いてろ過した後、試料の電気移動度をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Zetasizer Nano ZS; レーザー 532 nm, Malvern Instruments) にて測定した (測定温度 25 $^{\circ}$ C, 測定角度 17 $^{\circ}$)。

4.3 実験結果と考察 (ヒトサポウイルス)

4.3.1 HuSaV の高濃度精製ストックの調製

はじめに, HuTu 80 細胞と胆汁酸を用いた HuSaV の培養における最適な培養時間を検討した。培養した HuSaV を HuTu 80 細胞に接種し, 細胞培養液の水相中の HuSaV 濃度をリアルタイム定量 RT-PCR 法により定量した。結果を図 4-1 に示す。培養 1 日後に $10^{5.0}$ copies/mL であった HuSaV 濃度は, 培養 3 日後に $10^{7.6}$ copies/mL に急増し, 培養 7 日後に最大濃度 $10^{8.9}$ copies/mL に達した。また, 培養 10 日後においても, この濃度は保持された。この結果は, HuSaV 濃度が培養 5-10 日後に最大濃度 10^{8-9} copies/mL に達した後, 培養 14 日後においても, この濃度が保持されたとする既往の報告 (Takagi et al., 2020) と一致した。従って, HuSaV の培養には 10 日間の培養が最適であると判断した。

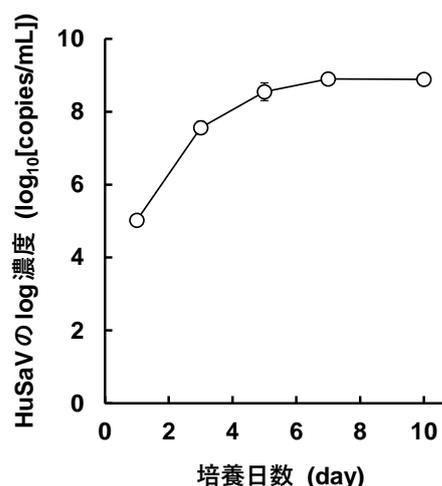


図4-1 HuTu 80 細胞を用いた HuSaV の培養における培養日数の影響: 各値は 3 ウェルの実験結果の平均値および標準偏差にて表示。

更に, 培養した HuSaV を凝集沈殿-急速砂ろ過処理実験および凝集-MF 膜処理実験に使用するに先立ち, タンジェンタルフローUF 膜を用いた精製を実施した (4.2.1 参照)。精製前の培養液における HuSaV 濃度は $10^{9.4}$ copies/mL であり, DOC 濃度は 6,300 mg/L であった。精製後の培養液においては, HuSaV 濃度はほとんど低減しなかったのに対し ($10^{9.3}$ copies/mL), DOC 濃度は 440 mg/L に低減した。以上のことから, 添加実験の実施が可能となる HuSaV の高濃度精製ストックを調製できたものと考えられた。凝集沈殿-急速砂ろ過処理実験および凝集-MF 膜処理実験においては, 精製した HuSaV を 10^{5-6} copies/mL になるように添加した。このとき, HuSaV の高濃度精製ストックは約 2,000-3,000 倍希釈されるた

め、ストック添加由来の DOC 成分の持ち込みは、0.2 mg/L 以下に低減される。

4.3.2 凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV および AstV の除去特性

水温約 20℃、凝集 pH 7.0 の条件で実施した凝集沈殿処理における HuSaV および AstV の除去特性をリアルタイム定量 RT-PCR 法により評価した。結果を図 4-2 に示す。いずれの河川水についても、凝集剤を添加しない場合、すなわち、凝集剤添加濃度 0 mg-Al/L においては、HuSaV は全く除去されなかった ($<0.0\text{-log}_{10}$)。これは、本章で使用した pH 7.0 の河川水中においては、HuSaV は負に帯電しており (4.3.4 参照)、負に帯電した HuSaV が粒子間の電的反発力によって安定的に単分散しているためであると考えられた。一方、凝集剤を添加することにより、いずれの河川水についても、 $1.5\text{-}2.1\text{-log}_{10}$ の HuSaV の除去率が得られた。これは、安定的に単分散していた HuSaV が、凝集剤の添加によって不安定化され、アルミニウムフロックに吸着、あるいは捕捉された後、水相から分離除去されたためであると考えられた。加えて、凝集剤添加濃度を、河川水 A については、0.54 mg-Al/L から 1.62 mg-Al/L に、河川水 G については、3.24 mg-Al/L から 5.40 mg-Al/L に上げることで、HuSaV の除去率はそれぞれ 1.5-log_{10} 、 1.5-log_{10} から 1.8-log_{10} 、 2.1-log_{10} に向上した。従って、凝集剤添加濃度が HuSaV の除去率に影響することが確認された。また、AstV についても、凝集剤を添加しない場合には全く除去されなかったのに対し ($<-0.1\text{-log}_{10}$)、凝集剤を添加することにより、 $1.6\text{-}2.9\text{-log}_{10}$ の除去率が得られた。更に、凝集剤添加濃度が除去率に影響することが確認された。

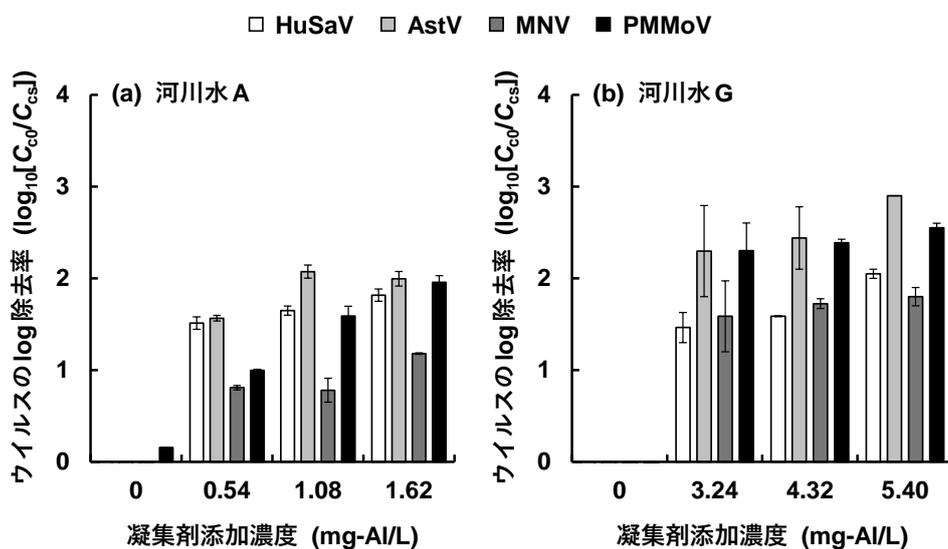


図4-2 凝集沈殿処理における HuSaV および AstV の除去特性：
各値は 1 回の実験結果または 2 回の実験結果の平均値およびデータ範囲にて表示。

水温約 20℃、凝集 pH 7.0 の条件で実施した凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV お

よび AstV の除去特性をリアルタイム定量 RT-PCR 法により評価した。結果を図 4-3 に示す。凝集沈殿処理の場合と同様に、いずれの河川水についても、凝集剤を添加しない場合、すなわち、凝集剤添加濃度 0 mg-Al/L においては、HuSaV は全く除去されなかった ($<0.0\text{-log}_{10}$)。一方、凝集剤を添加することにより、いずれの河川水についても、 $1.8\text{-}3.5\text{-log}_{10}$ の HuSaV の除去率が得られた。これは、凝集沈殿処理で沈澱しきれなかった HuSaV を吸着、あるいは捕捉したアルミニウムフロックが、後段の急速砂ろ過処理によって効果的に除去されたためであると考えられる。加えて、凝集剤添加濃度を、河川水 A については、0.54 mg-Al/L から 1.62 mg-Al/L に、河川水 G については、3.24 mg-Al/L から 5.40 mg-Al/L に上げることに より、HuSaV の除去率はそれぞれ 1.8-log_{10} 、 2.3-log_{10} から 2.3-log_{10} 、 3.5-log_{10} に向上した。従って、凝集剤添加濃度が HuSaV の除去率に影響することが確認された。また、AstV についても、凝集剤を添加しない場合には全く除去されなかったのに対し ($<0.1\text{-log}_{10}$)、凝集剤を添加することにより、 $1.9\text{-}3.1\text{-log}_{10}$ の除去率が得られた。更に、凝集剤添加濃度が除去率に影響することが確認された。

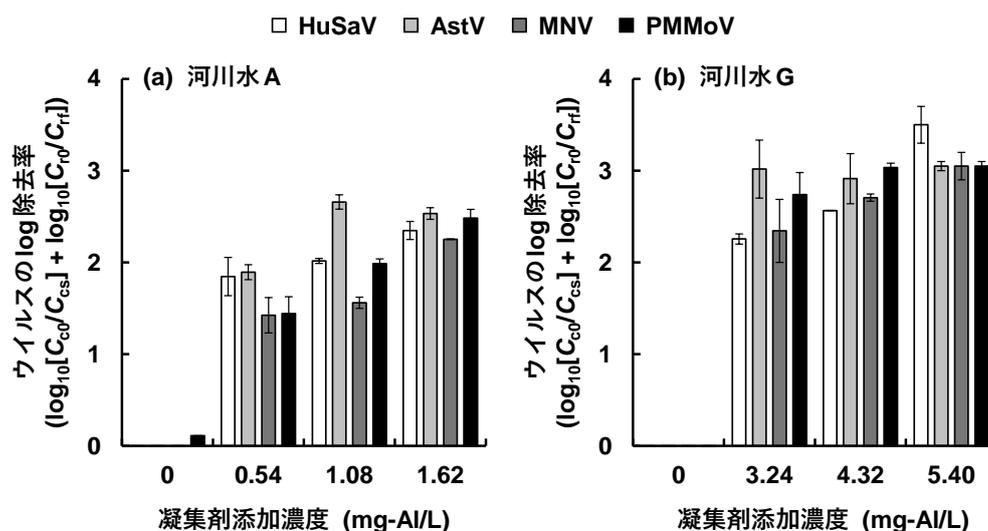


図4-3 凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV および AstV の除去特性：
各値は 1 回の実験結果または 2 回の実験結果の平均値およびデータ範囲にて表示。

MNV および PMMoV が凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV の挙動指標と成り得るかを議論するために、HuSaV の除去率と MNV および PMMoV の除去率を比較した。結果を図 4-4 に示す。HuSaV の除去率 ($1.6\text{-}3.7\text{-log}_{10}$) は、MNV の除去率 ($1.2\text{-}3.2\text{-log}_{10}$) と同程度であり、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.88$, $P<0.01$) が認められた。また、HuSaV の除去率は、PMMoV の除去率 ($1.3\text{-}3.1\text{-log}_{10}$) と同程度であり、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.77$, $P<0.01$) が認められた。従って、MNV および PMMoV は、凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV の挙動指標となることが示唆された。

また、PMMoV が凝集沈殿–急速砂ろ過処理における AstV の挙動指標と成り得るかを議論するために、AstV の除去率と PMMoV の除去率を比較した。結果を図 4-4b に示す。AstV の除去率 ($1.8\text{--}3.3\text{-log}_{10}$) は、PMMoV の除去率と同程度であり、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.86$, $P<0.01$) が認められた。従って、PMMoV は、凝集沈殿–急速砂ろ過処理における AstV の挙動指標となることが示唆された。

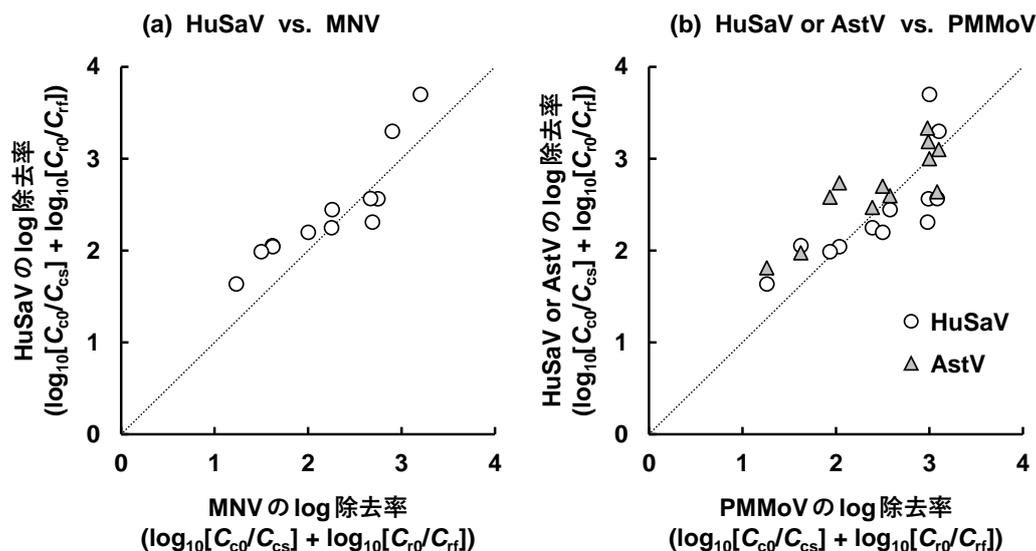


図4-4 凝集沈殿–急速砂ろ過処理における HuSaV および AstV と MNV および PMMoV の処理性能比較

以上のことから、これまで知見が得られていた AdV, CV, HAV に加えて (Shirasaki et al., 2018), これまで全く知見が得られていなかった HuSaV および AstV についても、PMMoV が凝集沈殿–急速砂ろ過処理における挙動指標となることが示唆された。従って、本研究で対象とした浄水場 A および B の凝集沈殿–急速砂ろ過処理における PMMoV の低減率は、それぞれ $1.3\text{--}2.7\text{-log}_{10}$, $0.9\text{--}2.2\text{-log}_{10}$ であったことから (3.3.3 参照), AdV, CV, HAV に加えて、HuSaV および AstV についても、浄水場 A および B の凝集沈殿–急速砂ろ過処理においては、それぞれ $1.3\text{--}2.7\text{-log}_{10}$, $0.9\text{--}2.2\text{-log}_{10}$ 以上の低減率が得られるものと推察された。

4.3.3 凝集–MF 膜処理における HuSaV および AstV の除去特性

水温約 20 °C, 凝集 pH 7.0 or 7.5 の条件で実施した凝集–MF 膜処理における HuSaV および AstV の除去特性をリアルタイム定量 RT-PCR 法にて評価した。結果を図 4-5 に示す。凝集剤を添加しない場合、すなわち、MF 膜処理単独においては、HuSaV の除去は限定的であった ($<0.7\text{-log}_{10}$)。HuSaV の粒子径は 40–45 nm であり (Li et al., 2022; Takagi et al., 2020), MF 膜の孔径 100 nm よりも小さいため、凝集塊を形成していない単独の HuSaV は MF 膜を通過すると考えられる。また、本章で使用した pH 7.0 or 7.5 の凝集–MF 膜処理前水中にお

いては、HuSaV は負に帯電しており (4.3.4 参照)、負に帯電した HuSaV が粒子間の電氣的反発力によって安定的に単分散していると考えられた。以上のことから、HuSaV が単分散した状態で存在していることが、凝集処理を伴わない場合、HuSaV をほとんど除去できなかった主要因であると推察された。一方、凝集剤を添加することにより、すなわち、凝集-MF 膜処理を実施することにより、pH 7.0 においては $1.2 \rightarrow 4.3\text{-log}_{10}$ 、pH 7.5 においては $1.6 \rightarrow 4.0\text{-log}_{10}$ の HuSaV の除去率が得られた。これは、凝集処理によって膜孔径よりも大きなアルミニウムフロックが形成され、これに吸着、あるいは捕捉された HuSaV が後段の MF 膜によって効果的に抑止されたためであると推察された。加えて、凝集剤添加濃度を 0.27 mg-Al/L から 0.41 mg-Al/L に上げることににより、HuSaV の除去率は、pH 7.0 においては $1.2\text{-}1.9\text{-log}_{10}$ から $>3.5\text{-log}_{10}$ に、pH 7.5 においては $1.6\text{-}1.9\text{-log}_{10}$ から $2.6\text{-}3.0\text{-log}_{10}$ に向上した。従って、凝集剤添加濃度が HuSaV の除去率に影響することが確認された。凝集剤添加濃度 0.41 mg-Al/L における HuSaV の除去率は、pH 7.0 に比べて、pH 7.5 において低かった。すなわち、凝集 pH についても、HuSaV の除去率に影響することが確認された。また、AstV についても、凝集剤を添加しない場合には除去は限定的であったのに対し ($<0.6\text{-log}_{10}$)、凝集剤を添加することにより、 $1.1\text{-}4.0\text{-log}_{10}$ の除去率が得られた。更に、凝集剤添加濃度および凝集 pH が除去率に影響することが確認された。

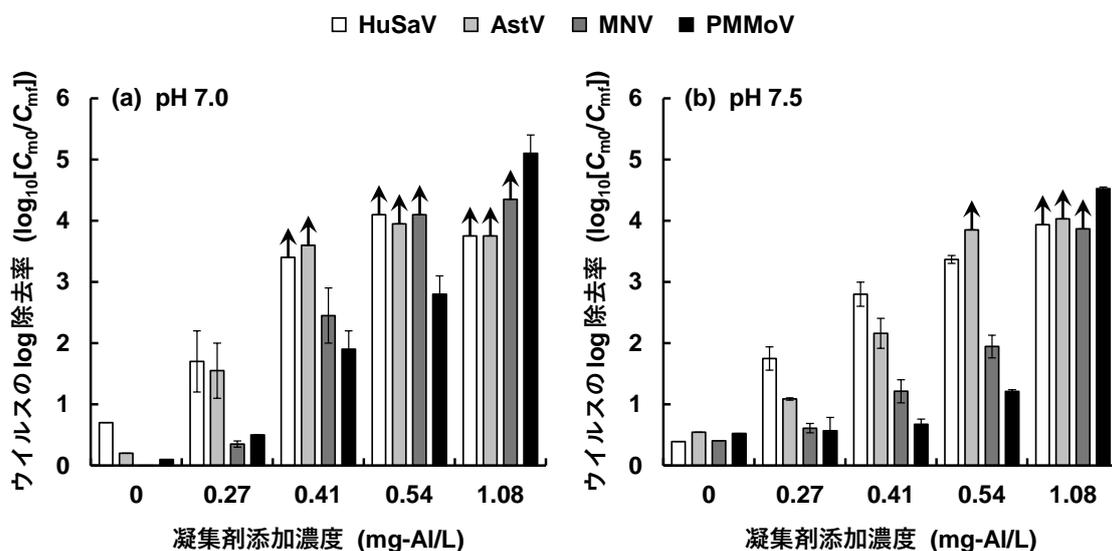


図4-5 凝集-MF膜処理におけるHuSaVおよびAstVの除去特性：
各値は1回の実験結果または2回の実験結果の平均値およびデータ範囲にて表示。
図中の矢印は定量下限値以下を示す。

MNV および PMMoV が凝集-MF 膜処理における HuSaV の挙動指標と成り得るかを議論するために、HuSaV の除去率と MNV および PMMoV の除去率を比較した。結果を図 4-6 に示す。なお、凝集-MF 膜処理水のウイルス濃度が定量下限値以下となったデータについて

は、以下の議論から除外した。HuSaV の除去率 ($1.2\text{--}3.4\text{-log}_{10}$) は、MNV の除去率 ($0.3\text{--}2.1\text{-log}_{10}$) に比べて $1\text{--}2\text{-log}_{10}$ 程度高く、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.94$, $P<0.01$) が認められた。また、HuSaV の除去率は、PMMoV の除去率 ($0.4\text{--}1.2\text{-log}_{10}$) に比べて $1\text{--}2\text{-log}_{10}$ 程度高く、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.72$, $P<0.05$) が認められた。従って、MNV および PMMoV は、凝集-MF 膜処理における HuSaV の安全側の挙動指標となることが示唆された。

また、PMMoV が凝集-MF 膜処理における AstV の挙動指標と成り得るかを議論するために、AstV の除去率と PMMoV の除去率を比較した。結果を図 4-6b に示す。AstV の除去率 ($1.1\text{--}2.4\text{-log}_{10}$) は、PMMoV の除去率に比べて $1\text{--}2\text{-log}_{10}$ 程度高く、両者の間には強い正の相関関係 ($r=0.86$, $P<0.05$) が認められた。従って、PMMoV は、凝集-MF 膜処理における AstV の安全側の挙動指標となることが示唆された。

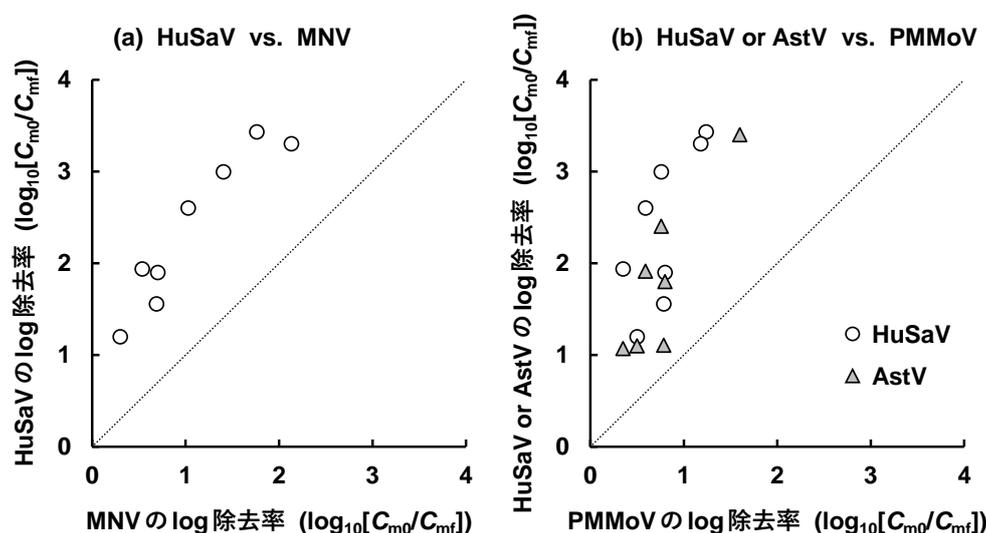


図4-6 凝集-MF膜処理におけるHuSaVおよびAstVとMNVおよびPMMoVの処理性比較：
定量下限値以下の値は除外。

以上のことから、これまで知見が得られていたAdV, CV, HAVに加えて (Shirasaki et al., 2017a), これまで全く知見が得られていなかったHuSaVおよびAstVについても、PMMoVが凝集-MF膜処理における安全側の挙動指標となることが示唆された。従って、本研究で対象とした浄水場CおよびDの凝集-MF膜処理におけるPMMoVの低減率は、それぞれ $0.7\text{--}1.5\text{-log}_{10}$, $1.3\text{--}2.9\text{-log}_{10}$ であったことから (3.3.3参照), AdV, CV, HAVに加えて, HuSaVおよびAstVについても、浄水場CおよびDの凝集-MF膜処理においては、それぞれ $0.7\text{--}1.5\text{-log}_{10}$, $1.3\text{--}2.9\text{-log}_{10}$ 以上の低減率が得られるものと推察された。

4.3.4 HuSaV, AstV, MNV および PMMoV の表面電位特性

凝集沈殿-急速砂ろ過処理 (Shirasaki et al., 2018) および凝集-MF 膜処理 (Shirasaki et al., 2017a; Tanneru and Chellam, 2012) におけるウイルスの除去特性の差異には、ウイルスのカプシドタンパク質の表面電位特性の差異が寄与している可能性が示唆されている。そこで、本章では、凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV, AstV, MNV および PMMoV の除去率が同程度であった理由、並びに凝集-MF 膜処理における HuSaV および AstV の除去率が MNV および PMMoV の除去率に比べて高かった理由について議論するため、これらのウイルスの電気移動度を測定した。

アルカリ度 20 mg-CaCO₃/L に調整した Milli-Q 水中における HuSaV および AstV の電気移動度を測定した。結果を図 4-7a に示す。HuSaV および AstV の等電点はそれぞれ 4.4, 3.4 であり、既往の MNV (3.8, Shirasaki et al., 2017b) および PMMoV の等電点 (3.2, Shirasaki et al., 2017a) と同程度であった。従って、本章で使用した pH 7.0 の河川水および pH 7.0 or 7.5 の凝集-MF 膜処理前水中においては、これらのウイルスは負に帯電しているものと推察された。

実際に、pH 7.0 に調整した河川水中における HuSaV, AstV, MNV, PMMoV の電気移動度を測定したところ、本章で使用した pH 7.0 の河川水中においては、いずれのウイルスも負に帯電していることが明らかとなった (図 4-7b)。また、電気移動度の絶対値は、いずれのウイルスも同程度であった。従って、凝集沈殿-急速砂ろ過処理における HuSaV, AstV, MNV および PMMoV の除去率が同程度であった要因として、pH 7.0 に調整した河川水中において、これらのウイルスの表面電位特性が同等であったことが考えられた。

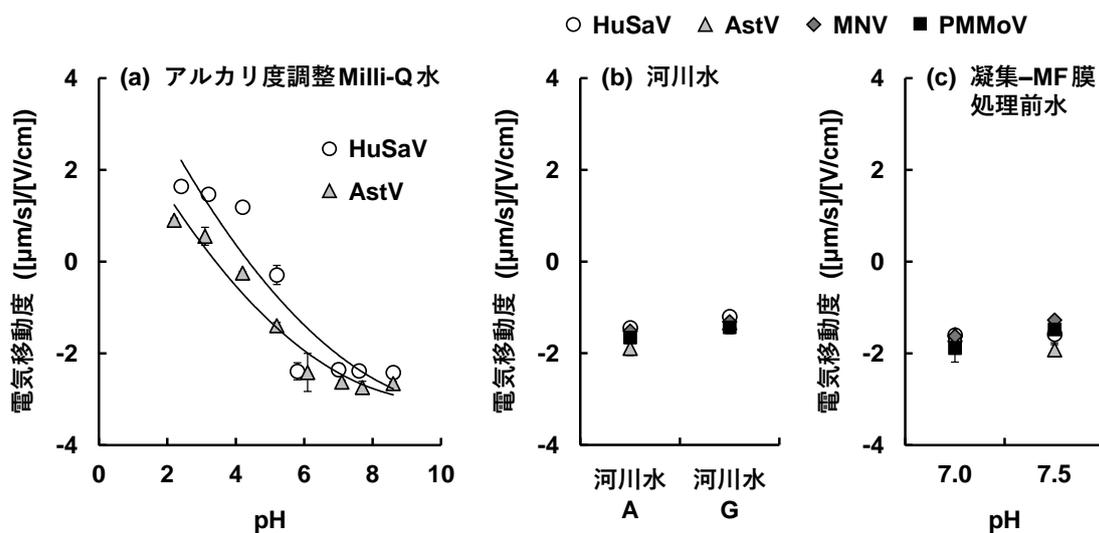


図4-7 HuSaV, AstV, MNV および PMMoV の表面電位特性：
各値は3回の実験結果の平均値および標準偏差にて表示。

また、pH 7.0 or 7.5 に調整した凝集-MF 膜処理前水中における HuSaV, AstV, MNV, PMMoV の電気移動度を測定したところ、本章で使用した pH 7.0 or 7.5 の凝集-MF 膜処理前水中においては、いずれのウイルスも負に帯電していることが明らかとなった (図 4-7c)。また、電気移動度の絶対値は、いずれのウイルスも同程度であった。従って、凝集-MF 膜処理における HuSaV および AstV の除去率が MNV および PMMoV の除去率に比べて高かったことは、pH 7.0 or 7.5 に調整した凝集-MF 膜処理前水中におけるこれらのウイルスの表面電位特性の類似性からは説明できなかった。以上のことから、これらのウイルス間のカプシドタンパク質の疎水性の差異等、他の因子が除去特性の差異に影響している可能性が示唆された。

4.4 実験方法 (ヒトノロウイルス)

4.4.1 使用した VLPs の発現法と定量法

4.4.1.1 使用した VLPs の発現法

本研究では、Chiba virus (Taxonomy ID 99565, Chiba virus Hu/NLV/Chiba407/1987/JP) の VLPs を発現させ、実験に使用した (Shirasaki et al., 2010)。VLPs の作成に先立ち、Chiba virus のゲノムのうち、ORF2, ORF3, 3'UTR の 2352 塩基 (5346-7697) からなる 2 本鎖 DNA 全長断片 (人工合成遺伝子断片) を作成した。人工合成した遺伝子断片を、バキュロウイルストランスファーベクターに挿入した後、これをカイコに感染させることで Chiba virus の VLPs を発現させた。VLPs を発現したカイコを磨砕処理した後、遠心分離・透析処理を行い、Milli-Q 水にバッファー置換することで VLPs の高濃度ストックを得た。

4.4.1.2 使用した VLPs の定量法

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ノロウイルス抗原キット (NV-EIA; デンカ生研) を用い、ELISA にて行った。なお、定量は付属のプロトコルに従い、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 (Infinite F200 PRO; TECAN) を用いた。また、VLPs の定量感度を向上させるために、抗原抗体反応増強用バッファー (IMMUNO SHOT Reagent 1 & 2; コスモ・バイオ) を併用した。

4.4.2 VLPs の分解・再合成法の構築

VLPs の分解・再合成および外来物質 (金ナノ粒子 or 外来遺伝子) の封入処理フローを図 4-8 に示す。150-750 mM NaCl, 1-5 mM EGTA, 20-600 mM DTT を含む 50-250 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に、700 µg/mL (4×10^{13} VLPs/mL) の VLPs を添加し、室温にて 30 分間インキュベートすることにより、粒子を構成するタンパク質の間のジスルフィド結合を還元し、VLPs の立体構造を分解させた。これを、UF 膜 (12-14 kDa, 再生セルロース; D-Tube

Dialyzer Mini, Millipore) にて透析した後, 終濃度 5–500 mM の Ca^{2+} を添加し, 室温にて 1 時間インキュベートすることにより, ジスルフィド結合を再形成し, 一度分解させた VLPs を再合成させた.

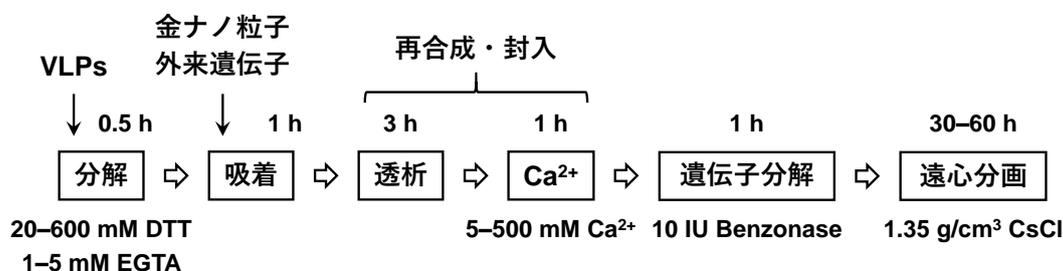


図 4-8 VLPs の分解・再合成および外来物質の封入処理フロー

4.4.3 VLPs 内部への金ナノ粒子の封入

構築した VLPs の分解・再合成法を適用することにより, VLPs 内部に外来物質を封入可能かどうか確かめるために, 透過型電子顕微鏡 (TEM; Transmission Electron Microscopy) にて容易に観察可能な金ナノ粒子 (直径 5 nm, Sigma Aldrich) の封入を検討した. Chen *et al.* (2006) は, ブロムモザイクウイルスの VLPs 内部に金ナノ粒子を封入する場合, カルボキシル基を有するテトラエチレングリコールにて金ナノ粒子をコーティングすることにより, 金ナノ粒子の封入が促進されることを報告している. *Caulobacter* ファージ ϕCb5 の VLPs についても, カルボキシル基を有するカルボキシ-EG6-ウンデカンチオール (MNHA) にて金ナノ粒子をコーティングすることにより, 同様の促進効果が得られたとの報告もなされている (Freivalds *et al.*, 2014). 従って, 本研究では, MNHA にて金ナノ粒子をコーティングした後, VLPs 内部に封入することとした.

Milli-Q 水にて 10 mg/mL になるように調整した MNHA 溶液と金ナノ粒子を, 体積比 1.6 : 100 の割合にて混合し, 室温にて 20 時間インキュベートすることにより, MNHA にて金ナノ粒子をコーティングした. これを, 分解後の VLPs 溶液に 0.02 mg/mL になるように添加し (VLPs と金ナノ粒子の個数比は 5 : 1), 1 時間インキュベートすることにより, VLPs に金ナノ粒子を吸着させた. この後, 4.4.2 に記述した手法にて VLPs を再合成させることにより, VLPs 内部に金ナノ粒子を封入した.

4.4.4 VLPs 内部への人工合成遺伝子の封入

本研究で使用した人工合成遺伝子の概略を表 4-2 に示す. CV Strings, HAV Strings, MNV Strings, MS2 Strings, HuNoV GI ssRNA については, リアルタイム定量 RT-PCR 法の検量線に使用した人工合成遺伝子である (2.2.2.1 参照). MS2 については, 直鎖 (Strings) に加えて, 環状 (Plasmid) の二本鎖 DNA の封入を検討した. HuNoV GI ssRNA については, 鎖長や塩基配列は公開されていないものの, ORF1 3'末端 (RNA ポリメラーゼ) および ORF2 5'

末端 (VP1) のジャンクション領域の断片が含まれていることが明らかとなっている。Chiba virus に関する 5 種類の人工合成遺伝子については、図 4-9 に示すように設計した。

表 4-2 使用した人工合成遺伝子の概略

ウイルス	製品名		販売元	
CV	CV Strings		Thermo Fisher Scientific	
HAV	HAV Strings			
MNV	MNV Strings			
MS2	MS2 Plasmid	GeneArt Gene Synthesis	Thermo Fisher	
	MS2 Strings	GeneArt Strings DNA Fragments	Scientific	
cDNA	NV chiba Plasmid	GeneArt Gene Synthesis		
	NV chiba Strings	150 bp		
	Chiba virus	NV chiba Strings	GeneArt StringsDNA Fragments	
		590 bp Center		
		NV chiba Strings		
590 bp Left				
NV chiba Strings	590 bp Right			
RNA	HuNoV GI	HuNoV GI ssRNA	ATCC VR-3234SD	ATCC

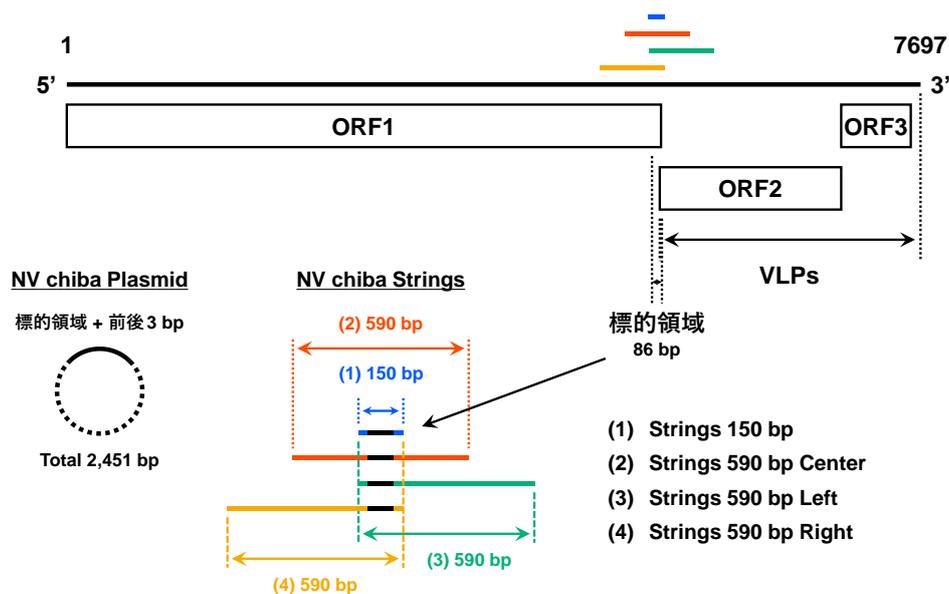


図 4-9 Chiba virus の人工合成遺伝子の概略図

人工合成遺伝子の封入法は、金ナノ粒子の場合（4.4.3）と同様である。分解後の VLPs 溶液に人工合成遺伝子を添加し（VLPs と人工合成遺伝子の個数比は 2:1）、1 時間インキュベートすることにより、VLPs に人工合成遺伝子を吸着させた。その後、4.4.2 に記述した手法にて VLPs を再合成させることにより、VLPs 内部に人工合成遺伝子を封入した。封入後、VLPs 内部に封入されず、VLPs 表面に吸着した遺伝子を分解するために、核酸分解酵素（Benzonase, Millipore）による遺伝子分解処理を実施した（10 IU, 1 h）。

4.4.5 VLPs 内部への遺伝子結合金ナノ粒子の封入

VLPs 内部に封入される遺伝子の個数を向上させるために、遺伝子を複数結合させた金ナノ粒子（遺伝子結合金ナノ粒子；DNA-AuNPs）を作成し、これを VLPs 内部に封入することを検討した。5'末端にチオール基を修飾した DNA を人工合成し、金ナノ粒子（直径 5 nm；OligoREADY, コスモ・バイオ）に結合させた。DNA については、Chiba virus の ORF1 のプロテアーゼ領域（NS6）あるいは ORF3 を対象とし、全長 65 nt の一本鎖 DNA を設計した。なお、DNA と金ナノ粒子の結合は、付属のプロトコルに従って行った。作成した DNA-AuNPs については、DNA 濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて、金ナノ粒子濃度を吸光度法（波長 520 nm；NanoDrop 2000c）にて定量し、1 金ナノ粒子あたりの DNA 結合数を算出した。

DNA-AuNPs の封入法は、金ナノ粒子単独の場合（4.4.3）と同様である。分解後の VLPs 溶液に DNA-AuNPs を添加し（VLPs と金ナノ粒子の個数比は 5:1）、1 時間インキュベートすることにより、VLPs に外来遺伝子を吸着させた。その後、4.4.2 に記述した手法にて VLPs を再合成させることにより、VLPs 内部に DNA-AuNPs を封入した。封入後、VLPs 内部に封入されず、VLPs 表面に吸着した遺伝子を分解するために、核酸分解酵素（Benzonase）による遺伝子分解処理を実施した（10 IU, 1 h）。

4.4.6 電子顕微鏡観察

分解・再合成処理および金ナノ粒子封入処理前後の 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 TEM 観察を行った。分解前、分解後、再合成後、金ナノ粒子封入後の VLPs 溶液 10 μ L をコロジオン膜貼付銅製グリッド（400 メッシュ、日新 EM）に添加し、1 分間静置することで VLPs をグリッドに吸着させた。余剰の VLPs 溶液をろ紙を用いてグリッド上から排除した後、染色液として KOH にて pH 5.5 に調整した 2% リンタングステン酸溶液 10 μ L をグリッドに添加し、45 秒間静置することでグリッド上の VLPs を染色した。余剰の染色液をろ紙を用いてグリッド上から排除した後、グリッド上の VLPs の構造を TEM（HD-2000, 日立ハイテク）にて観察した。なお、観察倍率は 100,000 倍とした。

4.4.7 塩化セシウム平衡遠心法

外来遺伝子を封入した VLPs（遺伝子封入 VLPs）の比重は、封入した外来遺伝子の分だ

け、中空の VLPs の比重に比べて増加するものと予想される。そこで、塩化セシウム平衡遠心法を行うことにより、中空の VLPs から遺伝子封入 VLPs を分離・回収した。遺伝子単独を封入した場合には、滅菌済み塩化セシウム溶液（比重 1.35 g/cm^3 ）を遠沈管に充填し、その最上部に遺伝子分解処理を実施した VLPs 溶液を添加した。DNA-AuNPs を封入した場合には、滅菌済み塩化セシウム溶液（比重 1.6 g/cm^3 ）を Milli-Q 水にて段階希釈し、 $1.2\text{--}1.5 \text{ g/cm}^3$ の塩化セシウム溶液を作成した。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、その最上部に遺伝子分解処理を実施した VLPs 溶液を添加した。これを、冷却超遠心機（CP60E, 日立工機）にて、 $200,000 \times g$, 30–60 時間 (4°C) 超遠心した。その後、試料を 1 mL ずつに分画し、各画分の VLPs 濃度を ELISA にて、DNA および RNA 濃度をリアルタイム定量 (RT-) PCR 法にて定量した。また、各画分の比重を電子天秤 (XS205, Mettler Toledo) にて秤量した。

4.5 実験結果と考察 (ヒトノロウイルス)

4.5.1 VLPs の分解・再合成法の構築

分解処理前の VLPs 溶液においては、粒子状に自己組織化された VLPs が多数観察された (図 4-10)。観察された VLPs の中から 10 粒子を無作為に抽出し、写真上で直径を測定したところ、 $33.0 \pm 3.0 \text{ nm}$ 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 , Someya *et al.*, 2000) および既往のヒトノロウイルスの VLPs の直径 ($35.7 \pm 3.2 \text{ nm}$, Shirasaki *et al.*, 2010) と同程度であった。これに対し、DTT および EGTA にて VLPs 溶液を処理した場合においては、VLPs はほとんど観察されなかった (図 4-11; 50 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl , 1 mM EGTA , 20 mM DTT)。従って、EGTA にてカルシウムイオンをキレートし、DTT にてジスルフィド結合を還元することにより、VLPs の立体構造を分解させることに成功した。また、分解後の VLPs 溶液から DTT および EGTA を除去した後、カルシウムイオンを添加することにより、一度分解した VLPs を再合成させることに成功した (図 4-12; 50 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl , 1 mM EGTA , 20 mM DTT , 50 mM Ca^{2+})。再合成された VLPs の中から 10 粒子を無作為に抽出し、写真上で直径を測定したところ、 $33.7 \pm 1.5 \text{ nm}$ であった。この直径は、分解前の VLPs の直径と同程度であった。

次に、分解・再合成処理における VLPs の再合成率を向上させるために、試薬濃度の最適化を試みた。はじめに、分解処理における試薬濃度の最適化を検討した。なお、再合成におけるカルシウムイオン濃度は、すべて 50 mM Ca^{2+} とした。TEM 画像 1 視野あたりの VLPs 数は、図 4-12 の条件においては 20 個程度であったのに対し、DTT および EGTA 濃度の増加に伴い、減少することが確認された。これは、高濃度の DTT および EGTA を添加した場合には、後段の透析処理にて両試薬を十分に除去できず、残留した DTT および EGTA が VLPs の再合成を阻害するためであると考えられた。従って、本研究においては、図 4-12 の条件が VLPs の分解処理における最適な試薬濃度であるものと判断した。

加えて、再合成処理における試薬濃度の最適化を検討した。TEM 画像 1 視野あたりの VLPs 数は、5 mM Ca^{2+} の条件においては 10 個程度であったのに対し、 Ca^{2+} 濃度の増加に伴い、増加することが確認された。特に、25 mM Ca^{2+} の条件においては、TEM 画像 1 視野あたりの VLPs 数の最大値 (30 個程度) が確認された (図 4-13)。従って、本研究においては、図 4-13 の条件、すなわち、50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 20 mM DTT, 25 mM Ca^{2+} の条件が VLPs の分解・再合成処理における最適な試薬濃度であるものと判断した。なお、この条件における VLPs の再合成率は、分解前および再合成後における TEM 画像 1 視野あたりの VLPs 数から、10–20% 程度と推定された。

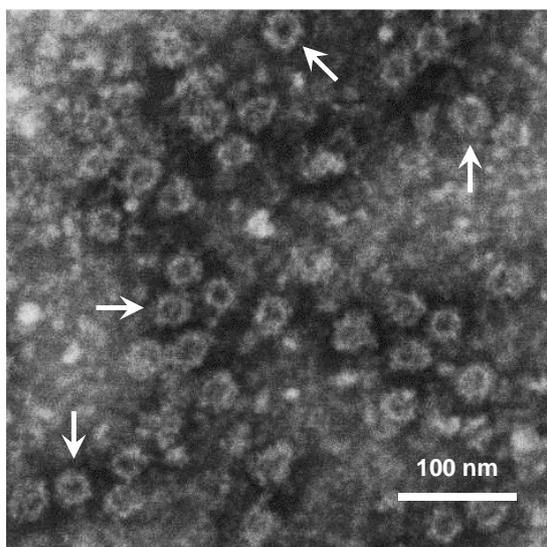


図4-10 分解前のVLPsのTEM画像

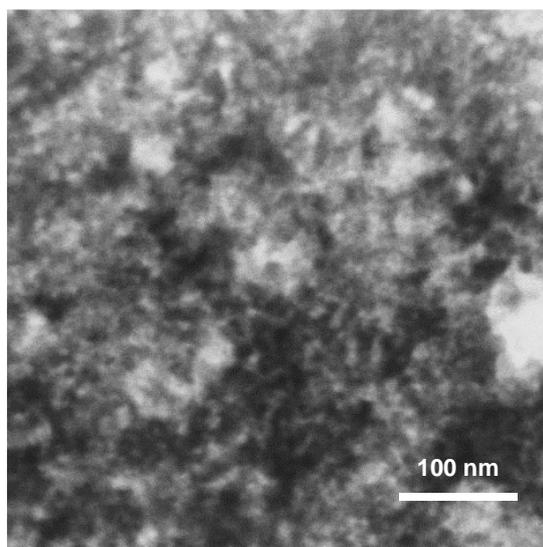


図4-11 分解後のVLPsのTEM画像

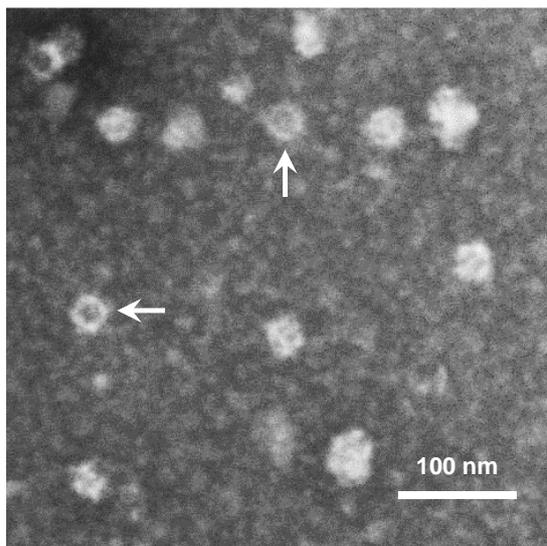


図4-12 再合成後のVLPsのTEM画像
(分解・再合成条件の最適化前)

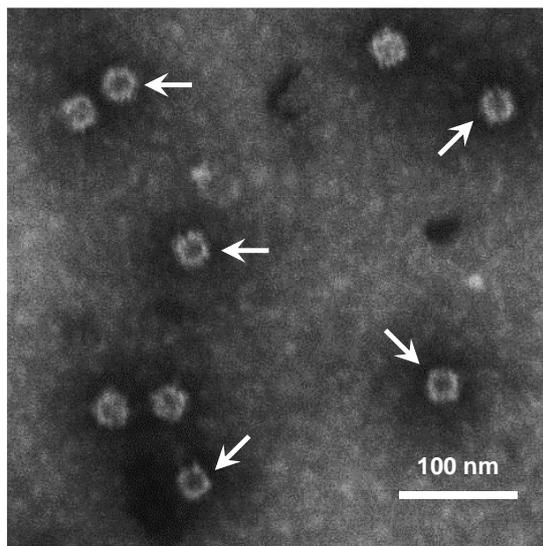


図4-13 再合成後のVLPsのTEM画像
(分解・再合成条件の最適化後)

4.5.2 VLPs 内部への金ナノ粒子の封入

金ナノ粒子は、TEM 画像上で黒色に観察される粒子であり、白色に観察される VLPs とは容易に区別することが可能である (図 4-14)。そこで、構築した VLPs の分解・再合成法を適用して VLPs を分解・再合成する際に、金ナノ粒子を共存させることにより、VLPs 内部に外来物質を封入できるかを視覚的に確かめることとした。分解前の VLPs と金ナノ粒子を混合した場合においては、金ナノ粒子は VLPs 表面に吸着したものの、VLPs 内部には 1 粒子も封入されなかった (図 4-15)。これに対し、一度分解した VLPs を再合成させる際に金ナノ粒子を共存させた場合においては、VLPs 内部に金ナノ粒子が封入されることが確認された (図 4-16)。また、再合成された VLPs のうち、金ナノ粒子が封入された VLPs の割

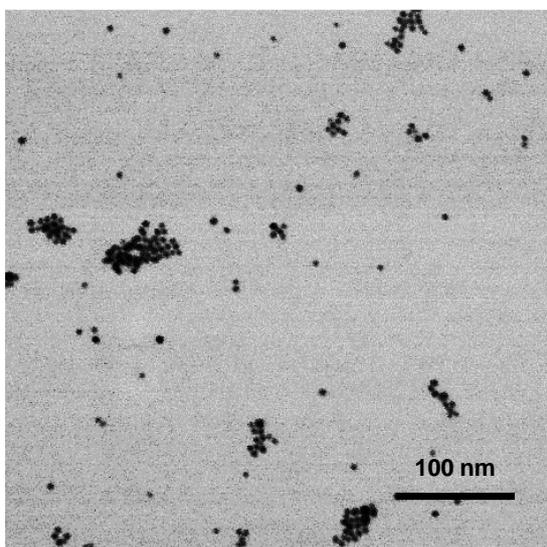


図4-14 金ナノ粒子のTEM画像

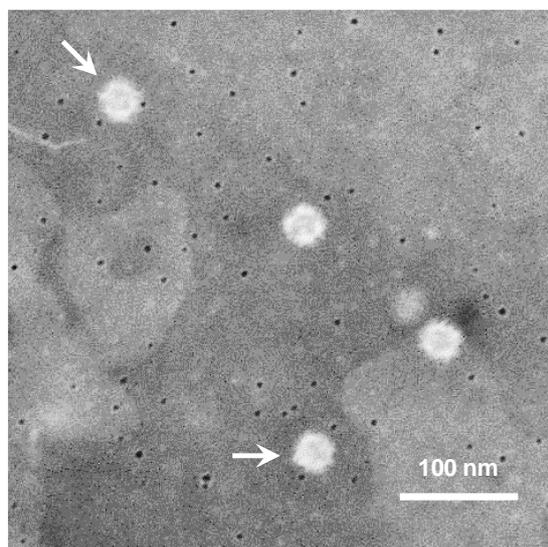


図4-15 分解前のVLPsと金ナノ粒子を共存させた場合のTEM画像

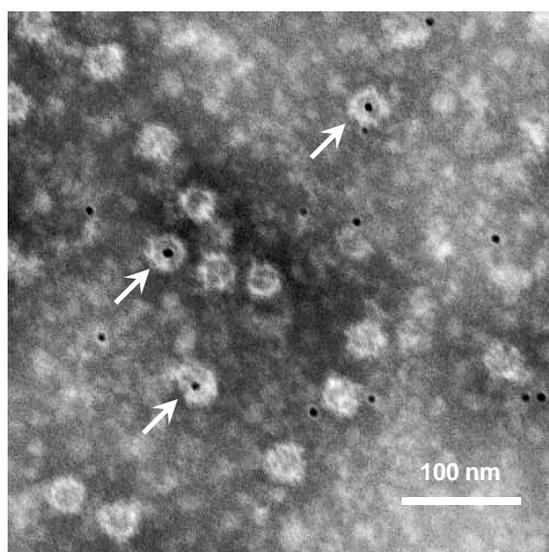


図4-16 金ナノ粒子を封入したVLPsのTEM画像

合は、10–20%程度であった。上述したように、VLPsの再合成率が10–20%程度であったことを考慮すると、分解前のVLPsのうち、1–5%程度のVLPs内部に金ナノ粒子が封入されたものと推定された。以上の結果から、VLPs内部に外来物質を封入可能なVLPsの分解・再合成法を構築できたものと考えられ、この方法を適用することにより、本来の目的である外来遺伝子をVLPs内部に封入し、遺伝子封入VLPsを創製できる可能性が示唆された。

4.5.3 VLPs内部への人工合成遺伝子の封入

4.5.1にて構築したVLPsの分解・再合成法を適用することにより、VLPs内部に外来遺伝子を封入することを試みた。はじめに、表4-2の人工合成遺伝子のうち、MS2 PlasmidおよびMS2 Stringsの封入を実施し、塩化セシウム平衡遠心法に供した。結果を図4-17に示す。遺伝子封入VLPsの比重は、中空のVLPsの比重(1.28 g/cm³, Shirasaki et al., 2010)に比べて大きく、野生のHuNoVの比重(1.38 g/cm³, Jiang et al., 1992; 1.36–1.37 g/cm³, Utagawa et al., 1994)に比べて小さくなることが予想される。また、VLPsおよび人工合成遺伝子の添加比を2:1としたことから、仮に1粒子のVLPに1 copyの遺伝子が封入された場合、ある画分におけるVLPs数と遺伝子数が同程度となることが予想される。しかしながら、比重1.25–1.35 g/cm³程度の画分におけるVLPs数とDNA数には、3-log₁₀以上の乖離が確認された。これは、封入処理に用いたMS2 PlasmidおよびMS2 StringsがVLPs内部にほとんど封入されておらず、遺伝子分解処理により分解されたためであると考えられた。

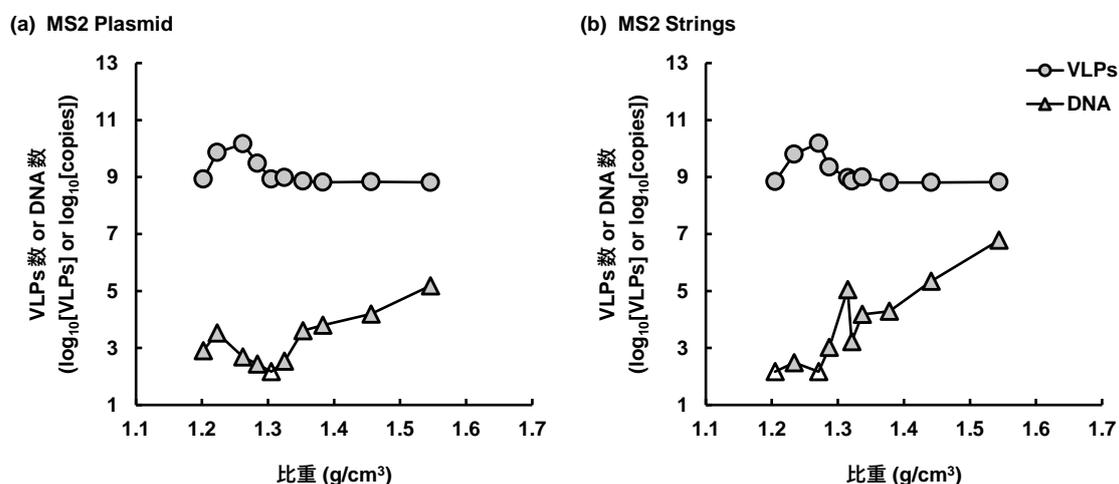


図 4-17 MS2 Plasmid および MS2 Strings を用いた場合の各画分における VLPs 数および DNA 数
(白抜き：定量下限値以下)

そこで、封入処理に用いた MS2 の塩基配列が HuNoV の VLPs には封入されにくかった可能性を考慮し、表 4-2 の人工合成遺伝子のうち、CV Strings, HAV Strings, MNV Strings, MS2 Strings の封入を実施し、塩化セシウム平衡遠心法に供した。結果を図 4-18 に示す。いずれ

の DNA を封入した場合においても、ほとんどの画分で VLPs が定量下限値以下となった。従って、比重 1.25–1.35 g/cm³ 程度の画分における VLPs 数と DNA 数の関係性を評価することができなかった。しかしながら、このような比重の画分における DNA 数の最大値は 10^{5.5} copies (HAV, 比重 1.36 g/cm³; 図 4-18b) であったことから、仮に遺伝子封入 VLPs が回収されていた場合においても、その収量は 10^{5.5} VLPs 以下であったものと推定された (1 粒子の VLP に 1 copy 以上の DNA が封入されるため、常に遺伝子封入 VLPs 数 < DNA 数が成り立つ)。本実験に供した VLPs 量は 10¹² VLPs であったことを考慮すると、遺伝子封入 VLPs の収率は 0.00003% 以下 (10^{5.5} VLPs / 10¹² VLPs × 100%) と、非常に低いものであると考えられた。以上のことから、MS2 以外 (CV, HAV, MNV) の塩基配列をコードする DNA についても、VLPs 内部にほとんど封入されなかったものと判断された。

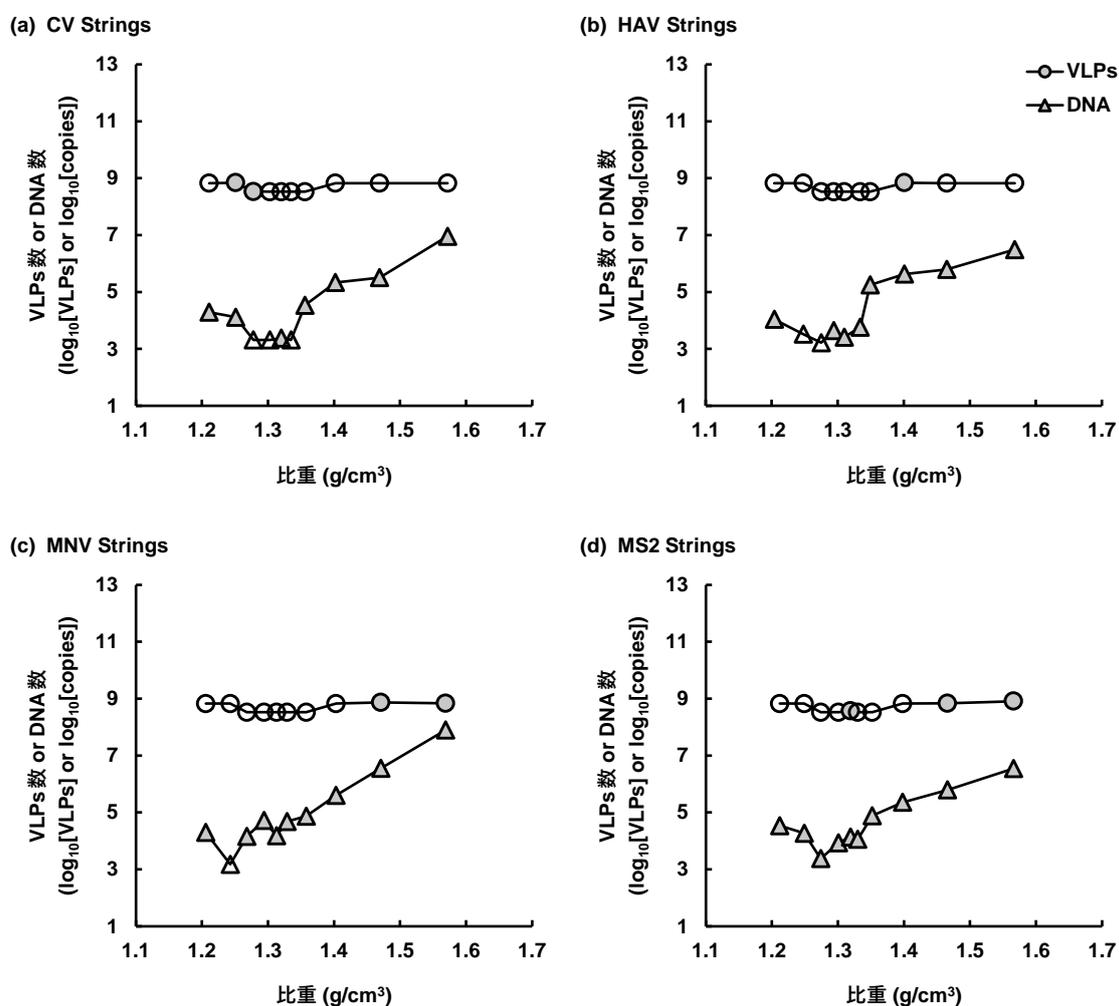
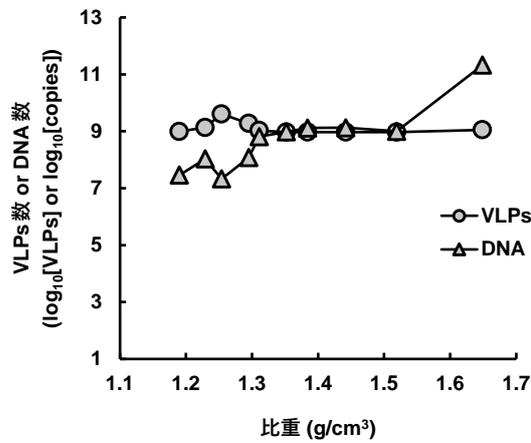


図 4-18 CV, HAV, MNV Strings を用いた場合の各画分における VLPs 数および DNA 数
(白抜き：定量下限値以下)

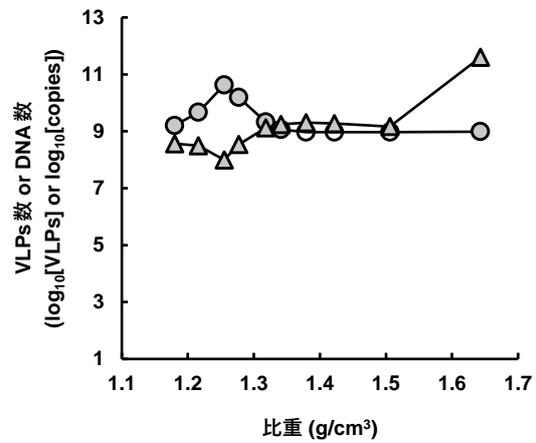
野生の HuNoV の複製においては、カプシドタンパク質が HuNoV の遺伝子 (RNA) の塩基配列を特異的に認識し、ウイルス粒子内部に遺伝子が封入されるものと予想されることから、本研究で VLPs を発現させた Chiba virus の塩基配列をコードする遺伝子を人工合成 (表 4-2) し、これを封入処理実験および塩化セシウム平衡遠心法に供した。結果を図 4-19 に示す。MS2 Plasmid および NV chiba Plasmid を用いた場合、比重 1.31–1.32 g/cm³ の画分において、VLPs 数と DNA 数が同程度となった (図 4-19a, b)。しかしながら、比重 1.25–1.26 g/cm³ の画分にみられるような VLPs のピークが確認されなかったこと、比重 1.3–1.5 g/cm³ 程度の画分において、DNA 数が一定であったことから、VLPs 内部に封入されず、塩化セシウム平衡遠心法により高精度に分離できなかった DNA が、偶然 VLPs 数と同程度の個数で検出された可能性が排除できなかった。従って、NV chiba Plasmid については、VLPs 内部に封入することに成功したかどうか、判断できなかった。一方、NV chiba Strings を用いた場合、比重 1.25–1.35 g/cm³ 程度の画分における VLPs 数および DNA 数には、1-log₁₀ 以上の乖離が確認された (図 4-19c–f)。すなわち、図 4-17 に対する議論と同様に、封入処理に用いた遺伝子の大部分が、VLPs 内部には封入されず、核酸分解酵素により分解されたものと考えられた。また、このような比重の画分における DNA 数の最大値は 10^{8.0} copies (NV chiba Strings 590 bp Right, 比重 1.28 g/cm³; 図 4-19f) であったことから、本実験に供した VLPs 量は 10¹² VLPs であったことを考慮すると、遺伝子封入 VLPs の収率は 0.01% 以下と、依然として非常に低いものであると考えられた。以上のことから、Chiba virus の塩基配列をコードする DNA についても、VLPs 内部にほとんど封入されなかったものと判断された。

野生の HuNoV は内部に DNA ではなく RNA をもつことから、HuNoV の VLPs についても、封入可能な遺伝子は RNA に限定される可能性が考えられた。そこで、Chiba virus が属する HuNoV GI の人工合成 ssRNA の封入を実施し、塩化セシウム平衡遠心法に供した。結果を図 4-20 に示す。なお、本実験においては、保有していた RNA 量の制約のため、VLPs は 10¹² VLPs 添加したのに対し、RNA は 10^{6.5} copies しか添加しなかった。このため、仮に遺伝子封入 VLPs が得られた場合においても、ある画分における VLPs 数と RNA 数は同程度とはならない。従って、比重 1.25–1.35 g/cm³ 程度の画分に RNA を確認できるかどうかという観点から、遺伝子封入 VLPs の有無を判断した。図 4-20 に示すように、ほとんどの画分で RNA は定量下限値以下となった。従って、HuNoV GI ssRNA については、VLPs 内部に封入することに成功したかどうか、判断できなかった。4.4.4 に記述したように、HuNoV GI ssRNA の塩基配列は公開されていないものの、ORF1 3'末端の RNA ポリメラーゼ領域および ORF2 の塩基配列をもつものと推定された。この領域は、本研究で Chiba virus の人工合成 DNA の設計に用いた領域であった。Chiba virus の人工合成 DNA および HuNoV GI ssRNA は、共に VLPs 内部への明確な封入が確認されなかったことから、ORF1 3'末端の RNA ポリメラーゼ領域および ORF2 は、HuNoV の遺伝子の封入に関わる領域ではない可能性が示唆された。従って、HuNoV の VLPs に外来遺伝子を封入するためには、他の領域の塩基配列をもつ外来遺伝子の封入を検討する必要があるものと考えられた。

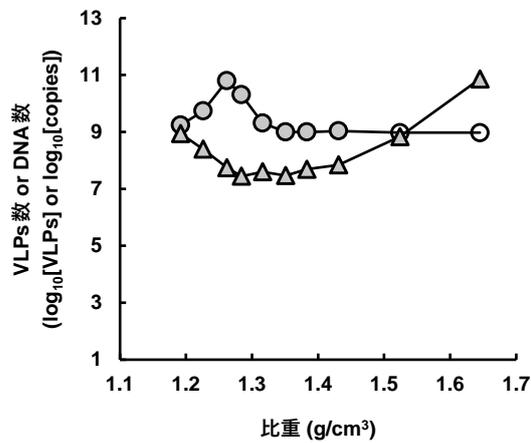
(a) MS2 Plasmid



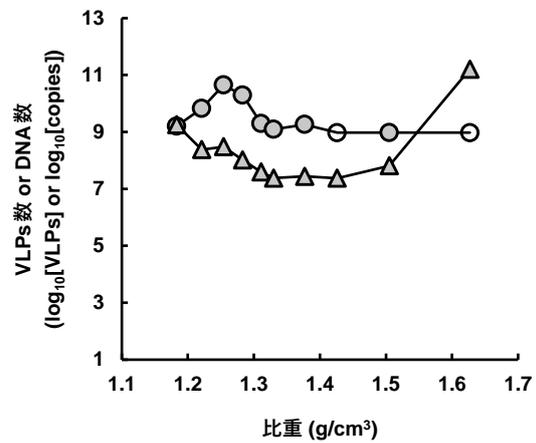
(b) NV chiba Plasmid



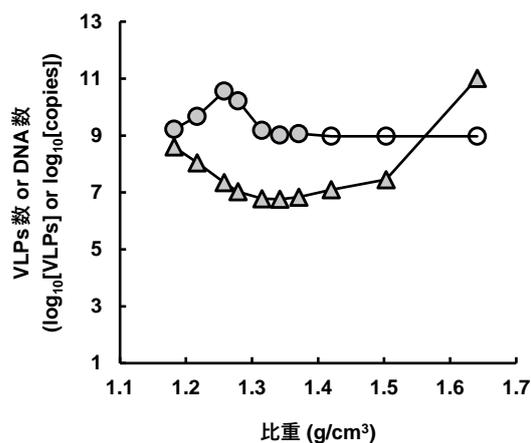
(c) NV chiba Strings 150 bp



(d) NV chiba Strings 590 bp Center



(e) NV chiba Strings 590 bp Left



(f) NV chiba Strings 590 bp Right

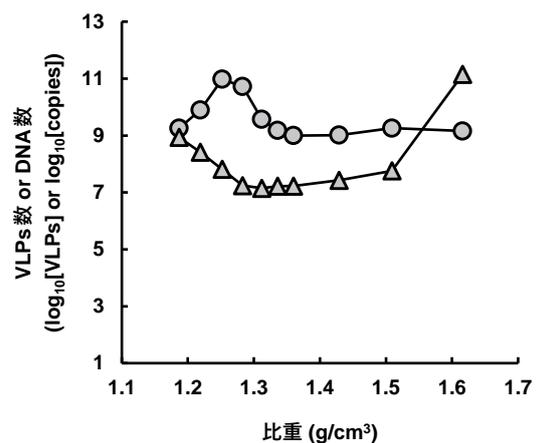


図 4-19 NV chiba Plasmid および Strings を用いた場合の各画分における VLPs 数および DNA 数 (白抜き: 定量下限値以下)

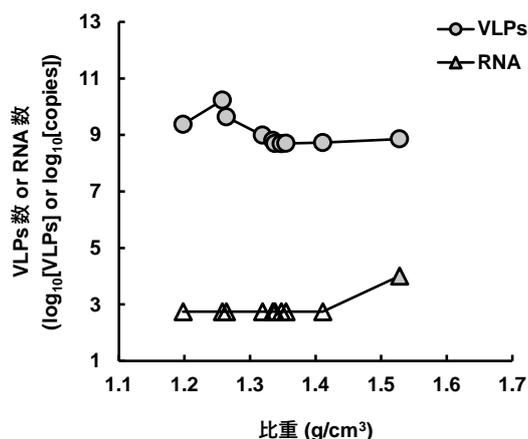


図 4-20 HuNoV GI ssRNA を用いた場合の各画分における VLPs 数および DNA 数
(白抜き：定量下限値以下)

4.5.4 VLPs 内部への DNA-AuNPs の封入

4.5.3 に記述した検討から、遺伝子そのものを VLPs 内部に直接封入することは困難である可能性が考えられた。一方、4.5.2 に記述したように、金ナノ粒子については、VLPs 内部に封入可能であることを、TEM 観察を実施することにより視覚的に確認した。そこで、この金ナノ粒子に遺伝子を結合させた後 (DNA-AuNPs)、得られた DNA-AuNPs を VLPs 内部に封入することにより、VLPs 内部に遺伝子を封入することを検討した。

はじめに、5'末端にチオール基を修飾した DNA と金ナノ粒子を結合可能かどうか評価した。作成した DNA-AuNPs について、DNA 濃度および金ナノ粒子濃度を定量することにより、1 金ナノ粒子あたりの DNA 結合数を算出した。その結果、NS6 および ORF3 領域を対象とした DNA について、それぞれ 1 金ナノ粒子あたり 6 copies, 4 copies の DNA が結合されていることが確認された。結合には 1 金ナノ粒子あたり 20 copies の DNA を用いたことから、添加した DNA のうち、20-30%程度が金ナノ粒子と結合したものと考えられた。従って、仮に 1 粒子の VLP あたり 1 金ナノ粒子が封入された場合においても、1 粒子の VLP あたり 4-6 copies の DNA が封入されることになることから、遺伝子そのものを封入する場合に比べて、定量感度の向上が期待できるものと考えられた。

得られた DNA-AuNPs の封入を実施し、塩化セシウム平衡遠心法に供した。結果を図 4-21 に示す。いずれの DNA-AuNPs を封入した場合においても、比重 1.28 g/cm³ の画分に VLPs のピークが確認された。これは、既往の VLPs の比重 (1.28 g/cm³, Shirasaki et al., 2010) と同程度であったことから、中空の VLPs のピークであると考えられた。この VLPs の比重および粒径 (35 nm 程度)、金ナノ粒子の比重 (19 g/cm³) および直径 (5 nm) から、1 粒子の VLP あたり 1 金ナノ粒子が封入された場合の比重を算出すると、1.34 g/cm³ 程度と推定された。NS6 および ORF3 領域を対象とした DNA について、それぞれ比重 1.33, 1.32 g/cm³ の画分において、小さな VLPs のピークが確認された。更に、これらの画分においては、DNA

数の最大値が観察された。これらの画分における VLPs 数と DNA 数の差は、それぞれ 0.5-log_{10} 、 1.1-log_{10} であり、1 粒子の VLP あたり 3–10 copies の DNA が封入されたものと考えられた。上述したように、封入処理に用いた DNA-AuNPs には、1 金ナノ粒子あたり 4–6 copies の DNA が結合されていたことから、この封入数は妥当であるものと判断された。以上の結果から、VLPs 内部に DNA-AuNPs が封入されたことが示唆された。

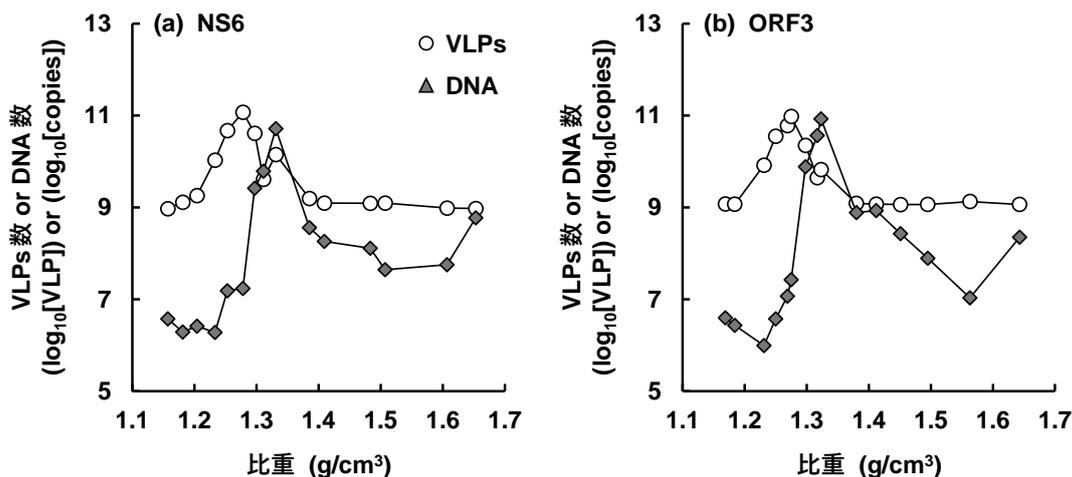


図4-21 DNA-AuNPs を用いた場合の各画分における VLPs 数および DNA 数

4.6 本章のまとめ

本章では、ごく最近確立された HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、HuSaV の物理的な浄水処理性を評価すると共に、PMMoV が HuSaV の挙動指標と成り得るかを議論した。また、培養困難な HuNoV の物理的な浄水処理性の評価に向けて、高感度に定量可能な遺伝子封入 VLPs の創製に取り組んだ。本章で得られた知見を以下にまとめる。

1. HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、添加実験の実施に必要な HuSaV の高濃度精製ストックを調整することに成功した。これにより、添加実験の実施が可能となり、HuSaV の凝集沈殿–急速砂ろ過処理および凝集–MF 膜処理における除去特性を明らかにした。
2. 凝集沈殿–急速砂ろ過処理における HuSaV の除去率は $1.6\text{-}3.7\text{-log}_{10}$ であった。この除去率は、MNV および PMMoV の除去率と同程度であり、HuSaV と MNV、HuSaV と PMMoV の除去率の間には強い正の相関関係が認められた。従って、MNV および PMMoV は、凝集沈殿–急速砂ろ過処理における HuSaV の除去特性を把握する上での挙動指標となることが示唆された。

3. 凝集-MF 膜処理における HuSaV の除去率は $1.2 \rightarrow 4.3 \cdot \log_{10}$ であった。この除去率は、MNV および PMMoV の除去率に比べて $1-2 \cdot \log_{10}$ 程度高く、HuSaV と MNV、HuSaV と PMMoV の除去率の間には強い正の相関関係が認められた。従って、MNV および PMMoV は、凝集-MF 膜処理における HuSaV の除去特性を把握する上での安全側の挙動指標となることが示唆された。
4. DTT, EGTA, CaCl_2 を用いた VLPs の分解・再合成法を構築し、これらの添加濃度を最適化することにより、VLPs 内部に外来物質を封入するための VLPs の分解・再合成法を構築することに成功した。また、構築した VLPs の分解・再合成法を適用することにより、外来物質である金ナノ粒子を VLPs 内部に封入することに成功した。
5. 遺伝子を結合した金ナノ粒子 (DNA-AuNPs) を作製し、VLPs 内部への封入を試みたところ、VLPs の比重の増加、更には、当該比重画分における DNA のピークが確認された。従って、VLPs 内部に封入可能な金ナノ粒子を介することにより、外来遺伝子を VLPs 内部に封入できる可能性が示唆された。

参考文献

- Chen, C., Daniel, M.-C., Quinkert, Z.T., De, M., Stein, B., Bowman, V. D., Chipman, P.R., Rotello, V.M., Kao, C.C., Dragnea, B., 2006. Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Letters*, 6, 611–615.
- Dunkin, N., Weng, S., Jacangelo, J.G., Schwab, K.J., 2017. Minimizing bias in virally seeded water treatment studies: evaluation of optimal bacteriophage and mammalian virus preparation methodologies. *Food Environ. Virol.* 9 (4), 473–486.
- Freivalds, J., Kotelovica, S., Voronkova, T., Ose, V., Tars, K., Kazaks, A., 2014. Yeast-expressed bacteriophage-like particles for the packaging of nanomaterials. *Mol. Biotechnol.* 56 (2), 102–110.
- Frohnert, A., Kreißel, K., Lipp, P., Dizer, H., Hamsch, B., Szewzyk, R., Selinka, H.-C., 2015. Removal of surrogate bacteriophages and enteric viruses from seeded environmental waters using a semi-technical ultrafiltration unit. *Food Environ. Virol.* 7, 173–182.

- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66 (11), 6527–6532.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., Kanda, T., 1998. In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J. Virol.* 72 (12), 10298–300.
- Li, T.-C., Kataoka, M., Doan, Y.H., Saito, H., Takagi, H., Muramatsu, M., Oka, T., 2022. Characterization of a human sapovirus genotype GII.3 strain generated by a reverse genetics system: VP2 is a minor structural protein of the virion. *Viruses* 14 (8), 1649.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y., 2013. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and pre-coagulation–microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Res.* 47 (15), 5819–5827.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Ohno, K., 2010. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Res.*, 44 (5), 1307–1316.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., 2017a. Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Res.* 115, 29–39.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Murai, K., Aochi, A., 2017b. Elimination of representative contaminant candidate list viruses, coxsackievirus, echovirus, hepatitis A virus, and norovirus, from water by coagulation processes. *J. Hazard. Mater.* 326, 110–119.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., 2018. Evaluation of the suitability of a plant virus, pepper mild mottle virus, as a surrogate of human enteric viruses for assessment of the efficacy of coagulation–rapid sand filtration to remove those viruses. *Water Res.* 129, 460–469.
- Someya, Y., Takeda, N., Miyamura, T., 2000. Complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome and functional expression of the 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Virology*, 278 (2), 490–500.
- Takagi, H., Oka, T., Shimoike, T., Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M.,

- Wang, Q., Saif, L.J., Noda, M., 2020. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117 (50), 32078–32085.
- Takamura, S., Niikura, M., Li, T.-C., Takeda, N., Kusagawa, S., Takebe, Y., Miyamura, T., Yasutomi, Y., 2004. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.* 11, 628–635.
- Tanneru, C.T., Chellam, S., 2012. Mechanisms of virus control during iron electrocoagulation–microfiltration of surface water. *Water Res.* 46 (7), 2111–2120.
- Touze, A., Coursaget, P., 1998. In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res.* 26 (5), 1317–1323.
- USEPA, 2022. Drinking Water Contaminant Candidate List 5. EPA-HQ-OW-2018-0594. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Utagawa, E.T., Takeda, N., Inouye, S., Kasuga, K., Yamazaki, S., 1994. 3'-Terminal sequence of a small round structured virus (SRSV) in Japan. *Arch. Virol.* 135 (1–2), 185–192.
- WHO, 2017. Guidelines For Drinking-Water Quality, 4th ed. incorporating the 1st addendum. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Yin, Z., Tarabara, V.V., Xagorarakis, I., 2015. Human adenovirus removal by hollow fiber membranes: Effect of membrane fouling by suspended and dissolved matter. *J. Membr. Sci.* 482, 120–127.

第5章 結論

5.1 本研究で得られた知見

本研究は、水道原水中に存在する病原ウイルスに対する PMMoV の指標性について議論すると共に、PMMoV を対象とすることにより、実浄水工程におけるウイルスの処理性を評価することを目的としたものである。以下、本研究で得られた知見を要約する。

第2章では、水道原水および浄水処理水中のウイルスを効果的に回収・濃縮するために、陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用した新規ウイルス濃縮法を構築した。構築した濃縮法を適用することにより、全国10カ所の水道原水における9種類の病原ウイルスおよびPMMoVの存在実態を調査した。更に、PCR法に加えて、ウイルスの感染力を決定づける主要な要因のひとつであるカプシドタンパク質の完全性を評価可能な Viability-PCR 法 (PM_{Axx}-Enhancer-PCR 法) を適用することにより、水道原水におけるウイルスの感染力の有無についても議論した。構築した濃縮法を濃度既知のウイルスを添加した水道原水および脱塩素水道水に適用したところ、いずれの試料水においてもウイルスを効果的に回収・濃縮可能であり、特に、PMMoV については、40 L の水道原水および2000 L の脱塩素水道水を20 mL に濃縮する場合においても、30%以上の回収率が得られることが明らかとなった。この濃縮法を全国10カ所の水道原水に適用したところ、対象とした水道原水においては、PMMoV が対象とした9種類の病原ウイルスに比べて100倍以上高い濃度で存在していることが明らかとなった。また、PM_{Axx}-Enhancer-PCR 法による定量結果から、AdV や RV については、カプシドタンパク質に損傷のある状態（不活化した状態）で存在している可能性が示唆された一方、EVs や HuNoV GII, PMMoV については、カプシドタンパク質に損傷のない状態で存在している可能性が示唆された。

第3章では、水道原水中に病原ウイルスに比べて高濃度で存在することが確認された PMMoV を対象とし、構築したウイルス濃縮法を適用することにより、実浄水工程におけるウイルスの処理性を評価した。その結果、凝集沈澱-急速砂ろ過処理（浄水場 A, B）においては $0.9-2.7\text{-log}_{10}$ 、凝集-MF膜処理（浄水場 C, D）においては $0.7-2.9\text{-log}_{10}$ の低減率が得られることが明らかとなった。MF膜処理は急速砂ろ過処理に比べて高度な固液分離性を有するにもかかわらず、浄水場 C の凝集-MF膜処理における PMMoV の低減率 ($0.7-1.5\text{-log}_{10}$) は、浄水場 A, B の凝集沈澱-急速砂ろ過処理における低減率 ($0.9-2.7\text{-log}_{10}$) よりも低かった。浄水場 C の凝集-MF膜処理を模した添加実験を実施したところ、凝集剤の添加濃度がウイルスの処理性に大きく影響し、MF膜のファウリング制御の観点から決定されている浄水場 C における凝集剤添加濃度は、ウイルス処理の観点からは低いものであり、このこと

が PMMoV の低減率が低かった主要な要因であるものと考えられた。

第 4 章では、ごく最近確立された HuSaV の汎用細胞増殖系を活用することにより、HuSaV の物理的な浄水処理性を評価した。また、培養困難な HuNoV の物理的な浄水処理性の評価に向けて、高感度に定量可能な外来遺伝子を封入した HuNoV の VLPs (遺伝子封入 VLPs) の創製についても取り組んだ。汎用細胞を胆汁酸存在下で用いることにより、添加実験の実施に必要な HuSaV の高濃度精製ストックを調整することに成功した。このストックを添加実験に用いることにより、凝集沈澱-急速砂ろ過処理および凝集-MF 膜処理における HuSaV の処理性を評価したところ、PMMoV と同程度、あるいはやや高い除去率が得られた。従って、PMMoV は、凝集沈澱-急速砂ろ過処理および凝集-MF 膜処理における HuSaV の挙動指標となることが示唆された。以上のことから、本研究で対象とした浄水場 A, B の凝集沈澱-急速砂ろ過処理および浄水場 C, D の凝集-MF 膜処理においては、これまでに PMMoV が挙動指標と成り得ることが示唆されていた AdV, EVs, HAV のみならず、HuSaV についても、 $1-3\text{-log}_{10}$ 以上の低減率が得られるものと推察された。一方、HuNoV の遺伝子封入 VLPs の創製については、VLPs 内部に外来遺伝子を封入するための VLPs の分解・再合成法の構築に成功し、この手法を適用することにより、外来物質である金ナノ粒子を VLPs 内部に封入可能であることを明らかにした。この金ナノ粒子を介することにより、外来遺伝子を VLPs 内部に封入できる可能性が考えられた。

5.2 本研究の課題と今後の展望

本研究では、PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用することにより、カプシドタンパク質の完全性の観点から、水道原水における病原ウイルスの感染力の有無について議論することができた。しかしながら、2.3.6 に記述したように、水道原水を用いた生残性評価試験においては、PMAxx-Enhancer-PCR 法で評価されたウイルスの低減率が、感染性評価手法で評価されたウイルスの低減率よりも小さかったことから、PMAxx-Enhancer-PCR 法は、水道原水における感染力を保持したウイルスの濃度を過大評価している可能性が考えられる。本研究では、水道原水における病原ウイルスの感染力の有無について、感染性評価手法を適用することにより直接議論するには至らなかった。水環境における病原ウイルスの存在実態の把握に広く用いられてきた PCR 法による病原ウイルスの定量結果が、感染性評価手法による病原ウイルスの定量結果とどの程度乖離があるのか (PCR 法で定量された病原ウイルスのうち、どの程度が感染力を保持しているのか) については、更なる検討が必要である。

実浄水工程における PMMoV の処理性評価については、凝集-MF 膜処理における低減率が、凝集沈澱-急速砂ろ過処理における低減率に比べて、低い場合があることを明らかにした。また、この要因について、実浄水場の凝集-MF 膜処理を模した添加実験を実施することにより、凝集剤添加濃度の観点から議論した。しかしながら、本研究で対象とした浄水場

A および B（凝集沈澱-急速砂ろ過処理）と浄水場 C（凝集-MF 膜処理）は原水水質が異なるため、水質の差異がウイルスの処理性に影響した可能性も否定できない。このことについては、現在、凝集沈澱-急速砂ろ過処理から凝集-MF 膜処理に施設を更新した実浄水場を対象とした調査を実施しており、更なる知見の集積を進めているところである。

また、本研究で対象とした 5 カ所の浄水場においては、凝集沈澱-急速砂ろ過処理、凝集-MF 膜処理、UF 膜処理による PMMoV の低減率は $1-3\text{-log}_{10}$ 程度であった。この低減率、日本の水道原水中の病原ウイルス濃度（最大 10^5 個/L；1.2.1 参照）および WHO が示す飲料水中の病原ウイルス許容濃度（ 10^{-5} 個/L）を考慮した場合、最大 9-log_{10} のウイルスの不活化を後段の塩素消毒により達成する必要があるものと考えられる。このことは、現在、日本の水道水の微生物学的な安全性の確保においては、塩素処理に大きく依存していることを示唆している。近年、我々の研究グループは、現在の日本の実浄水場においては、物理的処理の後段で実施されている塩素処理（CT 値）によって病原ウイルスの 9-log_{10} 不活化が達成されていることを明らかにしている。以上のような知見が集積されてきたことから、物理的な浄水処理工程においては、ウイルス除去を示す遺伝子マーカーとして PMMoV を、塩素消毒処理においては、水質・運転パラメータとして CT 値を活用した、水道におけるウイルスのリスク管理の枠組みが構築されつつある。具体的には、本研究で対象とした 5 カ所の浄水場においては、2020 年 7 月に浄水場 D で採水した凝集-MF 膜処理水を除けば、ろ過水中の PMMoV 濃度は常に 10^4 copies/L 以下であったことから、ろ過水（浄水）中の PMMoV 濃度の管理目標値として、 10^4 copies/L という値が提案されてきている。以上のことから、本研究で得られた研究成果は、科学的な根拠に基づき、水道におけるウイルスのリスク管理・制御の枠組みを構築することに資するものであると考えられる。

遺伝子封入 VLPs の創製については、VLPs 内部に封入可能な金ナノ粒子を介することにより、外来遺伝子を VLPs 内部に封入できる可能性が示唆された。しかしながら、第 4 章に示した遺伝子結合金ナノ粒子の封入については、再現性のある結果を得ることができなかった。この要因については、ELISA 法による VLPs の定量感度が低いために、遺伝子結合金ナノ粒子の封入率が低い場合には、遺伝子封入 VLPs のピークの検出が困難となることが挙げられる。このことについては、本研究で使用した HuNoV GI の VLPs に比べて、ELISA 法により高感度に定量可能な HuNoV GII の VLPs を使用することにより、対応可能であるものと考えられる。下水処理においては、水中の HuNoV 濃度が高いことから、実下水処理工程における HuNoV の処理性評価がなされており、HuNoV GI および GII の処理性が異なること、すなわち、遺伝子型の差異が HuNoV の処理性に影響することが報告されている (da Silva et al., 2007)。しかしながら、浄水処理においては、VLPs 単体を用いた既存の研究についても、単一の遺伝子型の HuNoV の処理性を評価するにとどまっており (Shirasaki et al., 2010)、遺伝子型の差異が HuNoV の処理性に与える影響は全く評価されていない。複数種の遺伝子型・株の HuNoV について、それぞれ異なる遺伝子を封入した遺伝子封入 VLPs を創製することができれば、これらの遺伝子封入 VLPs を PCR 法にて分別定量することが可

能となる。従って、これらを同時添加した添加実験を実施することにより、遺伝子型・株の差異がHuNoVの物理的な浄水処理性に与える影響を詳細に評価することができるものと考えられる。

参考文献

- da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (24), 7891–7897.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Ohno, K., 2010. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Res.*, 44 (5), 1307–1316.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究に関する様々なご指導を賜りました北海道大学大学院工学研究院環境工学部門教授 松井佳彦先生に心より深く感謝致します。松井先生には、申請書の作成や論文の執筆に際して、終始懇切丁寧なご助言を賜りました。松井先生のご指導のもと、本論文をまとめることができました。本当にありがとうございました。

本研究の遂行から本論文をまとめるに至るまで、数々のご指導を賜りました北海道大学大学院工学研究院環境工学部門准教授 白崎伸隆先生に心より深く感謝致します。白崎先生には、日々の研究のご指導だけでなく、研究者としての心構えなど、数々のご教示を賜りました。白崎先生のご指導のもと、数多くの貴重な経験をさせて頂いたと共に、様々な面で成長することができたものと感じております。本当にありがとうございました。

北海道大学大学院工学研究院環境工学部門教授 岡部聡先生、同部門准教授 北島正章先生には、本論文の副査を引き受けて頂き、懇切かつ貴重なご意見、ご助言を賜りました。深く感謝致します。

北海道大学大学院工学研究院環境工学部門准教授 松下拓先生には、ゼミなどを通して示唆に富んだご助言を賜りました。心より感謝の意を表します。

国立感染症研究所安全実験管理部主任研究官 高木弘隆先生、同研究所ウイルス第二部主任研究官 岡智一郎先生には、ヒトサポウイルスの物理的な浄水処理性の評価に関して多大なるご助言、ご協力を賜りました。深く感謝致します。

北海道大学電子科学研究所技術部 平井直美様、森有子様には、VLPsの透過型電子顕微鏡観察において多大なるご協力を賜りました。心より感謝致します。

北海道大学大学院医学研究院 栗山武志様には、VLPsの塩化セシウム平衡遠心において多大なるご協力を賜りました。心より感謝致します。

北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻修了生 山下玲菜さん、高力聡史さん、松村拓哉君、胡秋晗さんには、本論文のデータ採取に多大なるご協力を賜りました。心より感謝致します。

前北海道大学大学院工学研究院環境工学部門環境リスク工学研究室秘書 菊地敦子さん、同研究室秘書 鄭米芝さんには、研究費の管理や出張申請など、本研究を遂行するにあたり、数多くのご協力を賜りました。心より感謝の意を表します。

メタウォーター株式会社 齋藤俊博士には、博士課程における同期として公私に渡りお世話になりました。深く感謝の意を表します。

北海道大学大学院工学院環境創生工学専攻環境リスク工学研究室の多くの先輩、同輩、後輩の皆様には、様々な面で支えて頂きました。心より感謝致します。

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会令和2年度科学研究費補助金（特別研究員

奨励費)により行われました。ここに記して謝意を表します。

未筆ながら、これまでの学生生活を精神面、経済面から支え続けてくれた家族に心から感謝致します。

2023年2月 白川大樹