

Study on Quantitative Analysis of Small Round-Structured Virus in Water and Degradation of those Virus by Photocatalytic Ultraviolet Disinfection

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-09-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00064518

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



■ 論文 ■

小型球形ウイルス (SRSV) 対策技術としての光触媒/紫外線消毒法

加藤 敏 朗*
柴田 敏 幸**

三 木 理***

要 旨：近年，食中毒の主要な原因微生物として注目されているSRSV（小型球形ウイルス）は，汚染された水域に生息する魚貝類によって濃縮され，かかる魚貝類を生食することで発症することから水系感染症であるといわれている。SRSVによる水域汚染の原因のひとつとして下水等の流入による可能性が推定されているものの，水系のSRSVを検出する標準法が確立していないため，環境水中のウイルス存在状況の把握や対策技術の検討が困難な状況にある。本報告では，下水処理放流水を対象にSRSV検査方法を検討すると共に，SRSV対策技術としての光触媒/紫外線消毒の適用可能性について検討し，本消毒法にてSRSV粒子を分解できる可能性が推定された。

キーワード：SRSV，遺伝子検査，紫外線，光触媒，消毒

1. はじめに

近年，食中毒の原因病原体として小型球形ウイルス（以下，SRSV；但し，国際的には“ノロウイルス”に呼称統一）が問題視されている。SRSVは，他のウイルス同様に水中において自律的に増殖することではなく，また，魚貝類の体内で増殖することがないと考えられており，したがって，魚貝類の体内にSRSVが検出されるということは，生育水域が何らかの理由でSRSVにて汚染されていることを意味する。例えば，水域へのSRSV流入経路のひとつとして下水経路が推定され，下水放流水中のSRSVを除去する技術が切望されている。

SRSVは，ウイルス粒子の形態から命名されたウイルス群であり，分類学的には未分類のウイルスをも含んだ多種のウイルスによって構成されている。本ウイルス群については，確立した定量

評価手法がないことや感染性を判定する動物実験法等がないことなどが対策技術開発上の障害となっている。

流入下水中のSRSVは下水処理過程で汚泥への吸着などによって物理的に除去されるものの，一部は放流水中に残存する可能性がある。一般にウイルスは塩素消毒によって不活化されにくいといわれ，紫外線消毒の適用が期待されている。しかしながら，紫外線消毒によってSRSVの不活化は達成できたとしてもウイルス粒子自体は残存するため，環境中に放出された場合，魚貝類の体内にウイルス粒子が蓄積・保持される可能性がある。したがって，食品衛生検査においてウイルス遺伝子検査を行った場合，食中毒としての危険性がないにも関わらず“SRSV陽性”の判定が下される可能性が懸念される。SRSVの感染性や食中毒性を簡便に判定する技術がない現状を鑑みると，食品衛生上，高感度は遺伝子検査法を使用せざるを得ないと考えられ，このため，下水処理における

SRSVの根本的な対策としてSRSVの不活化を目的とするばかりでなく、ウイルス粒子を分解することが可能な消毒技術の確立が必要となると思われる。

SRSV対策技術を提示するためには、水中のSRSVの検査方法を考案することが必要不可欠であると考え、本論文では、まず水中からのウイルス濃縮手法およびSRSV検査手法について検討した。SRSVの検出方法については遺伝子検査法が食品分野を中心に数多くの報告²⁾があるが、下水中のウイルス濃度は、必ずしも高くないことが予想されるため、検出操作に先立って何らかの手法によってウイルスを濃縮する必要がある。これまで、膜ろ過捕捉法^{3)~4)}、凝集法⁵⁾、カラム吸着法⁶⁾など様々な濃縮方法が報告されているが、いずれの方法についても一長一短があり、本論文では、従来の手法を組み合わせた新たなカラム吸着法の考案を試みた。すなわち膜ろ過法で採用されている陰イオン交換セルロースを粉末剤として用い、凝集法の特徴である懸濁状態にて供試水と接触させる、新たなカラム吸着法を検討した。

次いで考案した検査方法を用いて、ウイルス分解技術としての光触媒/紫外線消毒技術の適用可能性に関する検討を行った。

2. 実験方法

2-1 ウイルス検査方法

(1) ウイルスの濃縮

供試水に濁質がある場合は必要に応じてカラム吸着に先立って予め定量ろ紙No.5Bにてろ過した。吸着カラムは、活性化処理した粉末DEAEセルロース (Sigma) 1 g (乾燥重量) を容量50mlのガラス製カラムに充填して作成した。DEAEセルロースの活性化処理は、1 N塩酸処理、1 N水酸化ナトリウム処理の後、純水で洗浄することで行った。供試水 5 l をカラム内部で充填剤が浮遊状態となるようにカラム下部より流速 5 ~ 10 l/h で通水した。充填剤に吸着した成分はアルカリ溶出液 (50 mM グリシン, 0.5% 肉エキス, pH9.5) 30ml にて溶出させ、溶出液 (以下、DEAEカラム溶出液) を回収した。

回収した溶出液は、ポリエチレングリコール沈殿によって再濃縮した。すなわち、溶出液にポリエチレングリコール (平均分子量8,000; 終濃度12.5%) および塩化ナトリウム (終濃度0.2M) を添加した後、4℃にて一晩静置し、遠心分離 [12,000×g; 30min; 4℃] してウイルス粒子を沈降分離させた。沈殿物をトリス緩衝液 (10 mM Tris・HCl, 5mM KCl, pH8.0) 1 ml に溶解してウイルス濃縮液を得た。なお、カラムからのアルカリ溶出とそれに続くポリエチレングリコール沈殿についてはGreenらの報告²⁾に記載の方法に準拠した。

(2) ウイルスの濃縮効率の検討

上述のウイルスの濃縮方法の濃縮効率等を判断するには、目的とするウイルスの濃度を指標とした定量評価が必要であるが、SRSVの濃度を簡便に測定することができないため、代替指標として大腸菌ファージに着目した。すなわち、供試水、前ろ過水、カラム通過液、DEAEカラム溶出液等の大腸菌ファージ濃度を、大腸菌 *Escherichia coli* K12株を宿主菌としたプラーク形成法⁷⁾によって測定した。

(3) SRSV濃縮性の検討

供試水中のSRSVがウイルス濃縮液中に回収できていることを確認するために、SRSVを含んだ下水二次処理水 5 l を供試水として一連のカラム吸着操作を実施して得たDEAEカラム溶出液のほかに、カラム吸着に先立って実施したろ過の残渣からの誘出液 (以下、前ろ過残渣誘出液)、アルカリ溶出後の充填剤からの抽出液 (以下、DEAE残渣抽出液) をそれぞれ回収し、ポリエチレングリコール沈殿によって再濃縮した後、後述のRT-PCRを行った。なお、ろ過残渣誘出液はろ過膜をアルカリ溶出液30mlに浸漬し、1時間室温で振盪した後の溶液を回収した。また、DEAE残渣抽出液は、充填材をアルカリ溶出液30mlに懸濁し、等量の溶媒 (chloroform : buthanol (1 : 1)) を添加して振盪混和後、遠心分離して水相部を回収した。

(4) RT-PCR

ウイルス濃縮液からRNAを抽出し (QIAGEN; QIAamp Viral RNA MINI Kit), RT-PCR法に

表-1 SRSV遺伝子増幅に用いたPCRプライマーの塩基配列

プライマー セット	配列名	塩基数	塩基配列*
A	G1	17	TCNGAAATGGATGTTGG
	G2	18	AGCCNTNGAAATNATGGT
	SM31	19	CGATTTTCATCATCACCATA
B	N1	21	GAATTCCATCGCCCACTGGCT
	E3	17	ATCTCATCATCACCATA

*) N=A,C,G,T

表-2 PCR反応条件

PCR 反応	反応条件
RT-PCR	50℃/30min→94℃/2min→
	95℃/1min→40℃/1min→72℃/1min (30 サイクル)
	→72℃/10min→4℃
リアルタイム PCR	50℃/10min→95℃/30sec→
(RT-PCR)	94℃/30sec→40℃/30sec→72℃/30sec (50 サイクル)

よってSRSV遺伝子を増幅し、さらにアガロース電気泳動にてPCR増幅DNA断片を観察した。なお、PCRプライマー²⁾は、表-1に記載のプライマーセットAまたはBを用いた。プライマーセットAを用いた場合、SRSVの2つの遺伝子型(I, II)についてそれぞれ192塩基対、267塩基対のDNA断片が得られる。一方、プライマーセットBは、両遺伝子型の共通配列を標的とし、113塩基対のDNA断片が得られる。RT-PCR反応はTaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)を用い、表-2に記載したPCR反応条件でそれぞれ実施した。

(5) リアルタイムPCR

反応液はTaKaRa Real Time One Step RNA PCR Kitを用いて調製し、DNA検出用蛍光試薬としてSYBR Green I (TaKaRa)を用い、米Cepheid社製リアルタイムPCR装置(モデルSmart Cycler II)を用い、に表-2に示した反応条件でRT-PCR反応を行い、DNA増幅量を計測した。なお、PCRプライマーは、2つの遺伝子型のSRSVの含量を判定するために表-1に記載のプライマーセットBを用いた。

SRSV遺伝子の増幅効率を検定するために、SRSV遺伝子の一部を保持したRNA試料(米

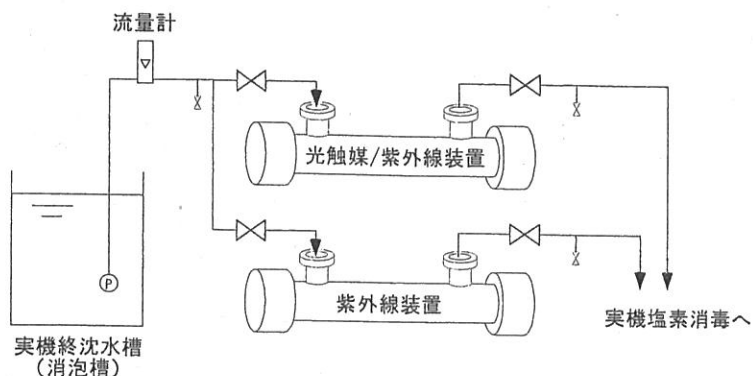


図-1 紫外線照射実験装置のフロー

表-3 紫外線照射実験装置の主な仕様

系列	定格流量	紫外線ランプ	備考
I系	毎時 16m ³	400W 中圧水銀ランプ	光触媒被箔を内張り
II系	毎時 6m ³	65W 低圧水銀ランプ	比較用

Ambion社製Armored RNA, Norwalk Virus Genogroup II) に関して、前記した同条件にてリアルタイムPCRを行った。

2-2 消毒実験方法

実験装置フローを、図-1に示した。実験装置は光触媒を搭載した開発法(I系)の他に比較用として光触媒を搭載していない紫外線消毒装置(II系)とで構成されている。実験装置の仕様は表-3に示すとおりであり、定格流量における紫外線照射量はI系、II系ともおよそ15mJ/cm²とした。I系装置においては表面にイオンプレーティング法で酸化チタン被膜を形成させたステンレス波箔⁸⁾を装置内の流水部内壁に内張りし、紫外線源として400W中圧水銀ランプを用いた。一方、II系装置では65W低圧水銀ランプを用いた。実設備の二次処理水を処理原水として装置に供給した。なお、比較のため塩素処理(2mg/l×2h)についても併せて分析を行った。

消毒実験に供した下水二次処理水は、pH7.4、SS14mg/l、紫外外部吸収0.12/cmであり、また、微生物濃度は、大腸菌群23 MPN/ml、一般細菌7,700cfu/mlであった。

3. 実験結果および考察

3-1 ウイルス検査方法

(1) ウイルスの濃縮効率

実下水処理場の二次処理水を供試水として、定量ろ紙No.5Bによる前ろ過操作、DEAEセルロースカラム吸着操作、アルカリ溶出操作、ポリエチレングリコール沈殿操作を実施し、大腸菌ファージ濃度を指標として各操作におけるウイルスの回収効率を検討した。結果を図-2に示す。図中●印は前ろ過通過率を示し、□印はカラム充填剤への吸着率を示している。

前ろ過操作においてはろ過残渣として捕捉され

るファージの割合は供試水のファージ濃度によらず概ね20%程度であり、80%以上がろ液中に残留していた(図中●印)。一方、カラム吸着においては供試水のファージ濃度が高いほど回収率が高い傾向が観察され、1,000pfu/ml以上では80%程度、100pfu/mlでは50%以下であった(図中□印)。また、データは示さないがDEAEセルロースからのアルカリ溶出では80~90%程度が溶出液中に回収でき、ポリエチレングリコール沈殿では概ね80%以上のファージを回収することができた。これらの結果から前ろ過、カラム吸着分離、ポリエチレングリコール沈殿からなる一連の濃縮操作を実施した場合の大腸菌ファージ回収率は、30~50%程度と算出され、従来法^{4)~5)}と同程度の回収率であった。

大腸菌ファージを指標として検討した範囲では、供試水5 lからウイルス濃縮液1 mlを得た場合、回収率を考慮した濃縮効率は1,500~2,500倍程度であるものと推定された。

(2) SRSVの検出

検討したウイルス濃縮工程で得た各種溶出液、すなわち、前ろ過残渣溶出液、DEAEカラム溶出液、DEAE残渣抽出液についてRT-PCRを行った

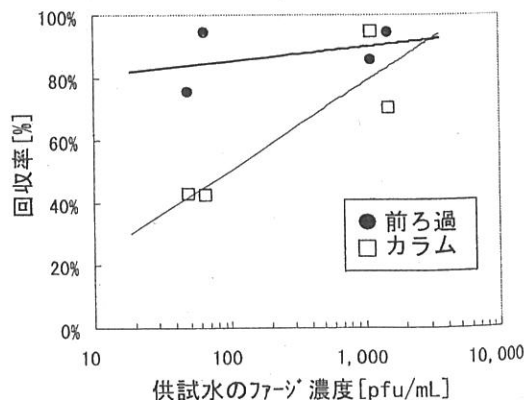


図-2 濃縮過程での回収率

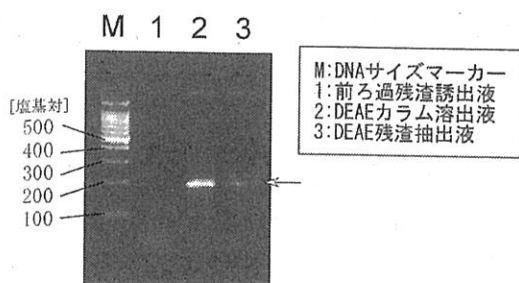


図-3 各回収画分についてのRT-PCR結果 (アガロースゲル電気泳動像)

結果を図-3に示す。DEAEカラム溶出液 (図中レーン2) について遺伝子型Iに相当する200bp程度の増幅断片が得られ、本溶出液中にSRSVが回収できたことを確認した。また、同様のバンドはDEAE残渣抽出液 (図中レーン3) についてわずかに観察されたことから、検討したアルカリ溶出条件では完全な溶出はできなかったものと推定された。これに対して前ろ過残渣誘出液 (図中レーン1) においてはDNA増幅断片が全く観察されなかった。このことから、供試水中のSRSVは、前ろ過操作にて捕捉されず、カラム内に吸着保持されアルカリ溶出液にて溶出されることを示しており、本濃縮法の有効性が確認できた。

(3) 標準試料に関するリアルタイムPCR結果

ウイルス濃度が既知の溶液を標準試料として、リアルタイムPCR法を行い、ウイルス濃度と増幅曲線の関係から検量線を作成すれば、それに基づいて未知試料中のウイルス濃度を推計することができる。しかしながら、SRSVについては濃度既知の標準試料を入手することが困難であったこ

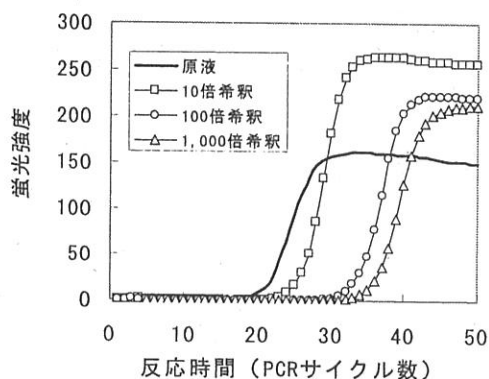


図-4 リアルタイムPCRにおける増幅曲線

とから、本研究においてはSRSV遺伝子の一部を保持したRNAを比較的高濃度で含んだ試料 (但し濃度不詳) を用いて、リアルタイムPCR法によって相対濃度の判定を試みた。

前記したRNA試料について、10倍希釈4段階の希釈試料を調製し、それぞれリアルタイムPCRを実施した。結果を図-4に示した。本図はDNA増幅曲線を表し、横軸にPCR反応サイクル数を、縦軸にDNA増幅量を反映した蛍光強度をそれぞれ示している。希釈度が高まると反応液中の標的遺伝子の量が少なくなることから、DNA増幅の立ち上がりが遅れる傾向が期待され、図-4に示したようにその傾向が確認された。また、希釈倍率とDNA増幅に要するPCR反応サイクル数を比較するため、図-4の増幅曲線のデータから蛍光強度の二次微係数を算出し、図-5に

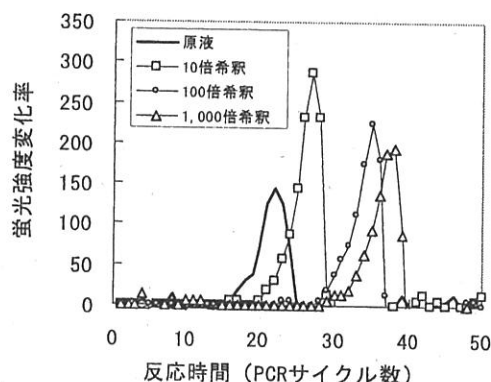


図-5 リアルタイムPCRにおける増幅曲線解析例

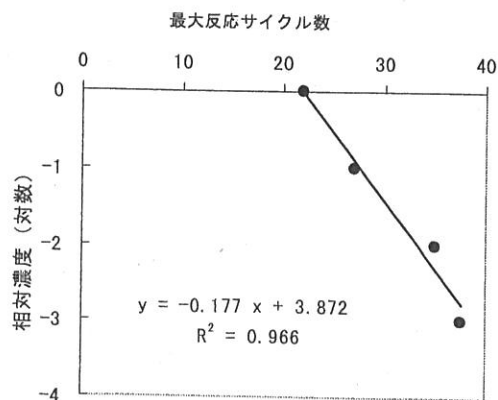


図-6 相対濃度に関する検量線例

示した。図-5における縦軸はDNA増幅反応の変化率を示しており、そのピーク値を与えるPCR反応サイクル数をそれぞれの試料中の標的遺伝子の濃度を特徴付ける固有値（以下、最大反応サイクル数という）として以降の解析に供した。希釈倍率に基づく相対濃度とそれぞれの最大反応サイクル数との関係を図-6に示した。PCR反応においてDNA増幅は指数関数的に生じるため、反応サイクル数とその時の相対濃度対数値との間に比例関係のあることが予想され、今回の検討では図-6中に示したように直線関係が得られた。濃度が既知の標準試料について同様の解析を実施すれば検量線を作成することができるが、本研究においては、図-6の結果に基づいて相対濃度を判定するための係数を導出した。すなわち、希釈倍率の対数値と反応サイクル数との間の近似式より、PCR反応1サイクル当たりのDNA増幅倍率を算出したところ、 $(10^{0.177}) = 1.50$ 倍/サイクルの係数を得た。PCR反応は理想的には1反応サイクル当たりのDNA増幅効率は2倍になるが、実際には、標的遺伝子とPCRプライマーとの会合効率、反応溶液中の阻害物質の共存など様々な理由により増幅効率は影響を受けると考えられ、今回の条件下では1.50倍となった。

図-6で得られたDNA増幅効率の値を用い、比較したい試料について得られたPCR反応サイクル数の差より、相対濃度を推算することができる。例えば、PCR反応サイクル数の差が5であった場合、両者の濃度比は $1 : 1.50^5 = 1 : 7.7$ となる。

3-2 消毒実験

(1) RT-PCRによるSRSV検出結果

処理原水および各種処理水に関するRT-PCR

反応の結果を図-7に示す。プライマーセットBを用いたRT-PCRによって増幅されるSRSVのDNA断片のサイズ（約110塩基対）に一致した増幅DNA断片（図中矢印）は、処理原水、紫外線処理水、塩素処理水について観察された。これに対して、光触媒/紫外線処理水では同サイズの増幅DNA断片を確認できなかった。なお、データは割愛したが、別途実施したハイブリダイゼーション実験によっても本増幅DNA断片がSRSVの塩基配列に相当することを確認している。塩素処理と異なり、紫外線処理ではSRSVを不活化できている可能性が推定されるが、本結果は、紫外線処理のみではウイルスが分解されること無く残存することを示唆している。これに対して光触媒/紫外線処理によってSRSV粒子が分解され、その結果、RT-PCRによってもSRSV遺伝子を検出できなかった可能性が推定された。

(2) リアルタイムPCRによるSRSV相対濃度の推定

下水中のSRSVに対する確たる対策技術を提案するためには、下水中および処理水中のSRSV濃度を正確に定量評価する必要があるが、本研究で検討したリアルタイムPCRを用いることによってSRSV濃度を判定することができる。しかしながら、リアルタイムPCRにて定量評価するには、濃度が既知のSRSV含有試料を用いた検量線を作成する必要があるが、濃度が既知の試料を得ることができなかったことから、相対濃度の判定に留めた。

リアルタイムPCRを実施し、各処理水と処理原水の最大反応サイクル数との差に基づいて相対濃度を算出した結果を図-8に示した。データは2反復実施した結果の平均値と分散を示している。

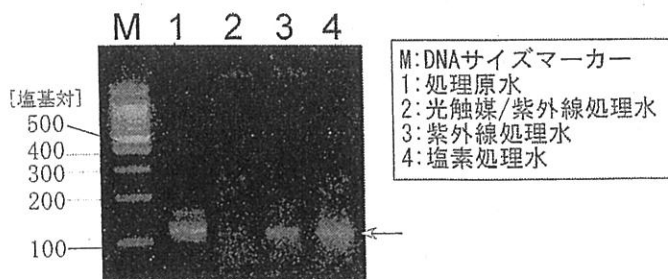


図-7 処理原水および紫外線処理水のRT-PCR結果例（アガロースゲル電気泳動像）

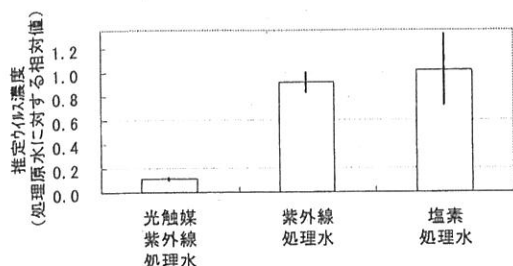


図-8 各種消毒後のSRSV相対濃度比較

処理原水のSRSV濃度を1とした場合、紫外線処理水は0.91、塩素処理水は1.02と推算され、これに対して光触媒/紫外線処理水は0.12と推算され、光触媒/紫外線処理によってSRSV濃度が低減している可能性が強く示唆された。

紫外線処理ではSRSVの遺伝子が損傷を受け、病原性は消失することが推定されるものの、PCR法等の遺伝子検査では検出される。これに対して、光触媒は紫外線照射により酸化力の強いヒドロキシルラジカルを生じる⁹⁾ことから、ヒドロキシルラジカルの作用でSRSVが分解される可能性が推定される。つまり、光触媒/紫外線処理は、紫外線の直接効果（遺伝子損傷に伴う不活化）と光触媒を介した間接効果（ヒドロキシルラジカルによる分解）によってSRSV対策技術として有望であると考えている。

4. ま と め

下水処理水におけるSRSV対策技術の開発を目的として供試水中のSRSV濃縮分離方法を検討すると共に、光触媒/紫外線処理法の適用可能性を検討した結果、

- ① DEAEセルロースを用いたカラム吸着法でウイルスを吸着分離することが可能であり、大腸菌ファージを指標とした場合、供試水の濃度にもよるが調査した範囲内では概ね30～50%程度を回収できた。
- ② 塩素処理や紫外線処理ではSRSV粒子は分解されず、遺伝子検査法にて検出されるが、光触媒/紫外線処理では遺伝子検査法で検出されないことから、SRSV粒子が分解されている可能性が推定された。

- ③ リアルタイムPCR法を用いて試料中のSRSVを定量評価することが可能であり、それを用いて処理水のSRSVの相対濃度を推定したところ、実験を行った範囲では、光触媒/紫外線処理によってSRSV濃度を低減できる可能性が強く示唆された。

下水におけるSRSVの挙動は必ずしも明確にされておらず、放流水中のSRSV濃度の把握、リスク評価、処理目標値設定等の検討が必要と考えている。

- 1) 矢野一好：SRSV（小型球形ウイルス：Small Round Structures Virus）による水系汚染，水環境学会誌，Vol.26，No.1，pp.8～13，2003.
- 2) Green, et al. : A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish, Appl. Environ. Microbiol., Vol.64, No.3, pp.858～863, 1998.
- 3) Jothikumar et al. : Elution and reconcentration of coliphages in water from positively charged membrane filters with urea-arginine phosphate buffer, J. Virol. Meth., Vol.65, pp.281～286, 1997.
- 4) 片山浩之ほか：陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発，水環境学会誌，Vol.25，No.8，pp.469～475，2002
- 5) 矢野一好ほか：セルロース吸着・凝集法による水中ウイルス試験方法の検討，水道協会雑誌，Vol.60，No.5，pp.10～23，1991.
- 6) Vilagin et al. : Glass wool for virus concentration at ambient water pH level, Wat. Sci. Tech. Vol.27, No.3～4, pp.299～306, 1993.
- 7) Kamiko and Ohgaki : RNA coliphage Q β as a bioindicator of the ultraviolet disinfection efficiency, Wat. Sci. Tech., Vol.21, No.3, pp.227～231, 1989.
- 8) 田村元紀，加藤敏朗：ステンレス波箔への高

活性TiO₂光触媒の成膜，表面技術，Vol.53，
No.5，pp.357-358.

9) 加藤敏朗ほか：光触媒—紫外線法における殺

菌効果の把握とヒドロキシルラジカル発生量の
推定，第34回日本水環境学会年会，2000

(16.1.28 受付)



* (かとう としあき)
新日本製鐵(株)技術開発本部先端
技術研究所エネルギー・環境基盤
研究部主任研究員



*** (みき おさむ)
新日本製鐵(株)技術開発本部先端
技術研究所エネルギー・環境基盤
研究部主幹研究員



** (しばた としゆき)
新日本製鐵(株)鉄構海洋エネルギー
事業部水処理施設部課長代理

Abstract

Study on Quantitative Analysis of Small Round-Structured Virus in Water and Degradation of those Virus by Photocatalytic Ultraviolet Disinfection

Toshiaki KATO, Toshiyuki SHIBATA, Osamu MIKI

Small round-structured viruses (SRSVs) are known to be one of the major pathogenic viruses implicated in outbreaks of gastroenteritis caused by feeding of seafood. It is supposed that SRSVs would be emitted into water environment through sewage and the shellfish growing in polluted water environment would enrich with contaminated virus particles in their body. The conventional disinfection process such as chlorination is not effective to inactivation of viruses. Ultraviolet irradiation is the attractive disinfection means for inactivation of virus. However, virus particles in the effluent would remain after UV-irradiation and then inactivated virus would be detected in shellfish body by genetic analysis. In this study, we elucidate the procedure for quantitative determining method of SRSVs in the effluent and the possibility of virus-degrading disinfection method. We evaluate that a real-time PCR procedure becomes to a powerful tool for determination of SRSVs concentration in water samples. Then, we describe that photocatalytic ultraviolet disinfection (TiO₂/UV) could be suggested to decompose virus particles and then the concentration of SRSVs could be reduced after TiO₂/UV disinfection.