

ヒト感染コロナウイルスの浄水処理性の評価 ：凝集ろ過分離性及び消毒不活化性の把握

Assessment of the efficacy of drinking water treatment processes

to remove and inactivate human coronaviruses

北海道大学 大学院工学研究院 准教授 白崎 伸隆

（研究計画ないし研究手法の概略）

1. はじめに

現在、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による急性呼吸器疾患（COVID-19）が世界中で大流行しており、多数の感染者・死者が出ていることに加え、様々な社会経済活動に甚大な損害を与えている。SARS-CoV-2 の主な伝播経路はヒト-ヒト間の飛沫/接触感染である一方で、水環境で問題となるヒト腸管系ウイルスの場合と同様に、感染者の糞便からも感染性を有する SARS-CoV-2 が大量に排出される（Xiao *et al.*, 2020）。実際に、糞便が集積する下水処理場においては、流入水のみならず、処理後の放流水からも SARS-CoV-2 が検出されている（Giacobbo *et al.*, 2021）。そのため、放流水が混入する環境水を水道原水として利用している状況下（都市河川、非意図的な水の再利用）においては、水道原水中に SARS-CoV-2 が存在する可能性が否定できない。また、将来に渡っては、SARS-CoV-2 とは別の新たなコロナウイルスによる感染症が大流行する可能性も十分に考えられる。従って、水道水の安全性の担保のためには、ヒト感染コロナウイルスの浄水処理性を詳細に把握した上で、適切な処理（除去・不活化）を実施することが重要となる。しかしながら、コロナウイルスの浄水処理性に関する知見は非常に限定されているのが現状である。そこで、本研究では、培養したヒト感染コロナウイルスを用いた室内添加実験を実施することにより、様々な処理/処理条件下におけるコロナウイルスの浄水処理性を詳細に把握することを目的とする。

2. 実験方法

2.1 使用したウイルスとその定量法

SARS-CoV-2 は、取り扱いにバイオセーフティレベル（BSL）3 の実験施設が必要であることから、本研究では、研究代表者が所属する研究室（BSL2 の実験施設）での取り扱いが可能な 2 種類のヒト感染コロナウイルス（CoV-229E 及び CoV-OC43）を実験に使用した。CoV-229E は、SARS-CoV-2 とは異なる α コロナウイルス属のウイルスであるのに対し、CoV-OC43 は、SARS-CoV-2 と同じ β コロナウイルス属のウイルスであることから、これら 2 種類のコロナウイルスを実験に用いることにより、分類特性の差異による浄水処理性の差異の有無を議論することが可能となる。CoV-229E 及び CoV-OC43 は、それぞれの宿主細胞である MRC-5 細胞（ヒト胎児肺細胞）及び HCT-8 細胞（ヒト回盲腺癌細胞）を用いて培養した。また、CoV-229E 及び CoV-OC43 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（van Elden *et al.*, 2004）を用いた。一方、感染性を有する CoV-229E 及び CoV-OC43 の定量には、MRC-5 細胞及び HCT-8 細胞を用いたブラック形成法を用いた。

2.2 凝集沈澱-砂ろ過処理実験

培養・精製した2種のコロナウイルスを 10^{6-7} copies/mL になるように同時添加した環境水（凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水場にて採水した水道原水，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．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，凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (PACl) を 0.54, 1.08, 1.62 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， 20 s^{-1} にて 10 分間緩速攪拌し，60 分間静置した．この後，静置後の上澄み水 1.5 L を用いて，急速砂ろ過処理を実施した．上澄み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，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）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．原水及び急速砂ろ過処理水を採取し，それぞれの試料水中のコロナウイルス濃度を PCR 法にて定量することにより，凝集沈澱-砂ろ過処理におけるコロナウイルスの除去率（Log 除去率（ $\text{Log}[C_{r0}/C_r]$ ； C_{r0} : 原水のコロナウイルス濃度， C_r : 処理後のコロナウイルス濃度））を算出した．

2.3 凝集-MF 膜ろ過処理実験

培養・精製した2種のコロナウイルスを 10^{6-7} copies/mL になるように同時添加した試料水（凝集-MF 膜ろ過処理を実施している実浄水場にて採水した凝集-MF 膜ろ過前水，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．ここに，凝集 pH を 7.0 に調整するため，原水に予め HCl を添加した後，凝集剤として PACl を 0.27, 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（膜ろ過処理終了時まで急速攪拌を継続），ポンプを用いて 1.0 m/d の定膜ろ過流速，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（材質 PVDF，膜孔径 $0.1\ \mu\text{m}$ ）に通水した．原水及び MF 膜ろ過処理水を採取し，それぞれの試料水中のコロナウイルス濃度を PCR 法にて定量することにより，凝集-MF 膜ろ過処理におけるコロナウイルスの除去率（Log 除去率（ $\text{Log}[C_{m0}/C_m]$ ； C_{m0} : 原水のコロナウイルス濃度， C_m : 処理後のコロナウイルス濃度））を算出した．

2.4 塩素処理実験

培養・精製した2種のコロナウイルスのいずれかを 10^{2-3} PFU/mL になるように添加した 0.01 M リン酸バッファー（pH 7.0，実験終了時まで水温を約 5°C に維持）を原水とし，ガラス製三角フラスコに 300 mL 添加した．ここに，次亜塩素酸ナトリウムを初期遊離塩素濃度が $0.2\text{ mg-Cl}_2/\text{L}$ 程度になるように添加した後，直ちにスターラーを用いて 200 rpm にて攪拌した（塩素処理終了時まで攪拌を継続）．原水及び塩素添加後の塩素処理水を採水し，直ちにチオ硫酸ナトリウムを添加した後（塩素処理水については，残留塩素を中和した後），それぞれの試料水中の感染性を有するコロナウイルス濃度をブラック法にて定量することにより，塩素処理におけるコロナウイルスの不活化率（Log 不活化率（ $\text{Log}[N_{i0}/N_i]$ ； N_{i0} : 原水の感染性を有するコロナウイルス濃度， N_i : 処理後の感染性を有するコロナウイルス濃度））を算出した．また，それぞれの試料水中のコロナウイルス遺伝子濃度を PCR 法にて定量することにより，塩素処理におけるコロナウイルス遺伝子の低減率（Log 低減率（ $\text{Log}[N_{g0}/N_g]$ ； N_{g0} : 原水のウイルス遺伝子濃度， N_g : 処理後のウイルス遺伝子濃度））を算出した．

(実験調査によって得られた新しい知見)

3. 結果と考察

3.1 凝集沈澱-砂ろ過処理におけるコロナウイルスの除去特性

水温約 20 °C, 凝集 pH 7.0 の条件で実施した凝集沈澱-砂ろ過処理における CoV-229E 及び CoV-OC43 の除去特性を PCR 法により評価した。結果を図-1 に示す。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、いずれのコロナウイルスも全く除去されなかったのに対し、凝集剤を添加することにより、1-3 log 程度の除去率が得られた。また、CoV-229E 及び CoV-OC43 の除去率は同程度となった。加えて、凝集剤添加濃度はコロナウイルスの除去率に影響し、凝集剤添加濃度を 0.54 mg-Al/L から 1.08 mg-Al/L に上げることにより、CoV-229E 及び CoV-OC43 の除去率はそれぞれ 1.5 log, 1.5 log から 2.8 log, 2.4 log に向上した。一方、凝集剤添加濃度を 1.62 mg-Al/L に上げた場合においては、1.08 mg-Al/L の場合と同程度の除去率となった。研究代表者がこれまでに実施した凝集沈澱-砂ろ過処理の室内添加実験(凝集剤添加濃度 1.08-2.70 mg-Al/L)においては、水系感染症を引き起こす代表的なヒト腸管系ウイルスであるアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A 型肝炎ウイルス、更には、ヒトノロウイルスの代替として広く用いられているマウスノロウイルスについて、0.8-2.5 log の除去率が得られていることから (Shirasaki *et al.*, 2018)、コロナウイルスと代表的なヒト腸管系ウイルスの間の凝集沈澱-砂ろ過処理における除去特性には、大きな差異はないものと考えられた。

3.2 凝集-MF 膜ろ過処理におけるコロナウイルスの除去特性

水温約 20 °C, 凝集 pH 7.0 の条件で実施した凝集-MF 膜ろ過処理における CoV-229E 及び CoV-OC43 の除去特性を PCR 法により評価した。結果を図-2 に示す。前述した凝集沈澱-砂ろ過処理の場合とは異なり、凝集剤を添加しない場合、すなわち、MF 膜ろ過単独処理においても、CoV-229E 及び CoV-OC43 はそれぞれ 3.0 log, 1.9 log 除去された。一方、研究代表者がこれまでに実施した MF 膜ろ過単独処理の室内添加実験においては、代表的なヒト腸管系ウイルスはほとんど除去されなかった (Shirasaki *et al.*, 2017)。コロナウイルスの粒子径は 120-160 nm であり、代表的なヒト腸管系ウイルスの粒子径 22-90 nm よりも大きく、また、MF 膜の孔径 100 nm よりも大きいことから、コロナウイルスとヒト腸管系ウイルスの間の粒子径の差異が MF 膜ろ過単独処理における除去特性の差異の主な要因であると考えられた。凝集剤を添加した凝集-MF 膜ろ過処理においては、MF 膜ろ過単独処理に比べて除去率が向上し、凝集剤添加濃度 0.27 mg-Al/L における CoV-229E 及び CoV-OC43 の除去率はそれぞれ 3.8 log, 2.5 log となり、凝集剤添加濃度 0.54 mg-Al/L 及び 1.08 mg-Al/L においては、それぞれ 4.5 log 以上、4.3 log 以上の除去率が得られた。一方、研究代表者がこれまでに実施した凝集-MF 膜ろ過処理の室内添加実験(凝集剤添加濃度 0.54 mg-Al/L)においては、代表的なヒト腸管系ウイルスであるアデノウイルス、コクサッキーウイルス、A 型肝炎ウイルス、更には、ヒトノロウイルスの代替として広く用いられているマウスノロウイルスの除去率は 0.5-1.6 log であったことから (Shirasaki *et al.*, 2017)、コロナウイルスについては、MF 膜ろ過単独処理のみならず、凝集-MF 膜ろ過処理においても、代表的なヒト腸管系ウイルスに比べて高い除去率が期待できることが示唆された。なお、前述した凝集沈澱-砂ろ過の場合とは異なり、MF 膜ろ過単独処理及び凝集-MF 膜ろ過処理においては、CoV-229E と CoV-OC43 の間の除去率に明確な差異が確認されたことから、CoV-229E と CoV-OC43 の間の粒子構成

タンパク質の表面電位特性の差異や疎水性の差異等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。

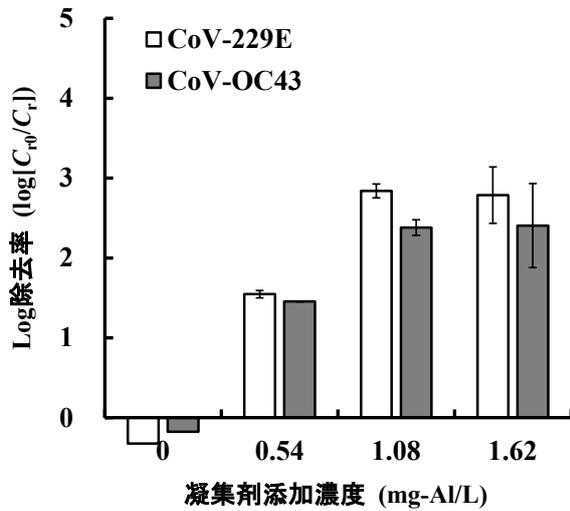


図-1. 凝集沈澱-砂ろ過処理におけるヒト感染コロナウイルスの除去特性 (PCR法にて定量)

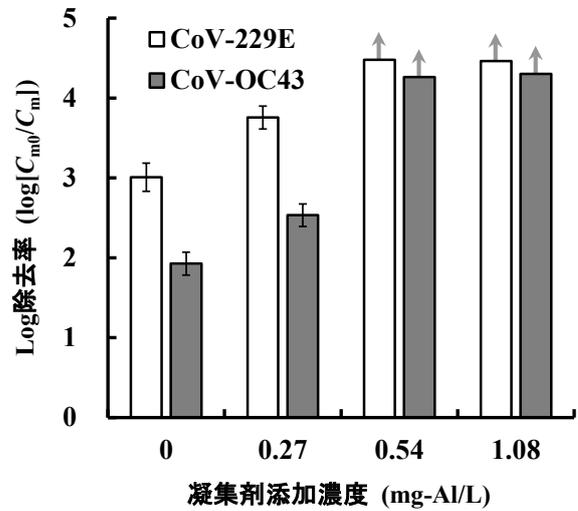


図-2. 凝集-MF膜ろ過処理におけるヒト感染コロナウイルスの除去特性 (PCR法にて定量, 図中の矢印は定量下限値以下を示す)

3.3 塩素処理におけるコロナウイルスの不活化特性

水温約 5 °C (20 °C に比べて塩素消毒効果が低減することが知られている低水温), pH 7.0 の条件で実施した塩素処理における CoV-229E 及び CoV-OC43 の不活化特性をブラック法により評価した. 結果を図-3 に示す. 初期遊離塩素濃度 0.2 mg-Cl₂/L, 接触時間 5 秒の条件である CT 値 (C: 遊離塩素濃度 × T: 接触時間) 0.02 mg-Cl₂·min/L においては, いずれのコロナウイルスも 3 log 程度以上 (ブラック法の定量下限値以下) の不活化率となった. 一方, 代表的なヒト腸管系ウイルスの 2 log 不活化に必要な塩素処理 (水温 5–15 °C, pH 6–7 の条件で実施) の CT 値は 0.01–12 mg-Cl₂·min/L (アデノウイルス 0.02–2.4 mg-Cl₂·min/L, ポリオウイルス 1.1–6 mg-Cl₂·min/L, コクサッキーウイルス 1.7–12 mg-Cl₂·min/L, A 型肝炎ウイルス 0.7–1.2 mg-Cl₂·min/L, ロタウイルス 0.01–0.05 mg-Cl₂·min/L) であることが報告されていることから (Health Canada, 2017), コロナウイルスについては, 塩素処理において, 代表的なヒト腸管系ウイルスに比べて高い不活化率が期待できることが示唆された. また, CoV-229E と CoV-OC43 の間の不活化特性には, 大きな差異はないものと考えられた.

上述したブラック法による評価に加え, 塩素処理における CoV-229E 及び CoV-OC43 の遺伝子 (RNA) の消長を PCR 法により評価した. 結果を図-4 に示す. 初期遊離塩素濃度 0.2 mg-Cl₂/L, 接触時間 30 分の条件である CT 値 2.3–2.4 mg-Cl₂·min/L であっても, いずれのコロナウイルスも 1.2 log 以下の低減率となり, ブラック法にて評価した感染性の消長とは大きく異なる結果となった. 従って, ウイルス遺伝子の一部を定量の標的とする PCR 法単独による評価は, 塩素処理における CoV-229E 及び CoV-OC43 の不活化効果を大きく過小評価することが確認され, ブラック法等の感染性評価手法の適用の重要性が再認識された.

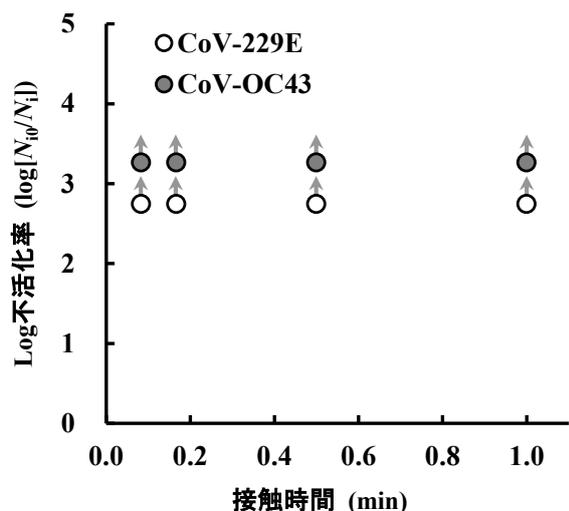


図-3. 塩素処理におけるヒト感染コロナウイルスの不活化特性（ブラック法にて定量，図中の矢印は定量下限値以下を示す）

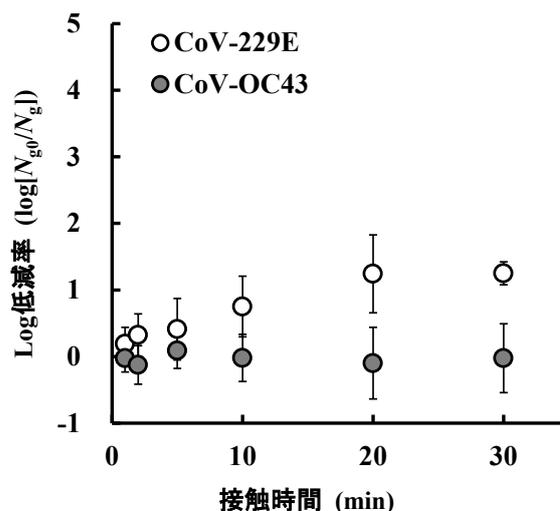


図-4. 塩素処理におけるヒト感染コロナウイルスの遺伝子の低減特性（PCR法にて定量）

4. 結論

代表的な浄水処理である凝集沈澱-砂ろ過処理，凝集-MF膜ろ過処理，塩素処理におけるヒト感染コロナウイルスの処理性を評価し，凝集沈澱-砂ろ過処理においては，水系感染症を引き起こす代表的なヒト腸管系ウイルスと同程度の除去率が期待できること，また，凝集-MF膜ろ過処理及び塩素処理においては，ヒト腸管系ウイルスに比べて高い除去率，あるいは，高い不活化率が期待できることが示唆された。

参考文献

1. Giacobbo, A., Rodrigues, M.A.S., Ferreira, J.Z., Bernardes, A.M. and de Pinho, M.N. A critical review on SARS-CoV-2 infectivity in water and wastewater. What do we know? *Science of the Total Environment* 774, 145721, 2021.
2. Health Canada. *Guidelines for Canadian drinking water quality: Guideline technical document—Enteric Viruses in Drinking Water*. Water and Air Quality Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada, 2017.
3. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Murai, K. 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 Research* 115, 29-39, 2017.
4. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Yamashita, R. 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 Research* 129, 460-469, 2018.
5. van Elden, L.J.R., van Loon, A.M., van Alphen, F., Hendriksen, K.A.W., Hoepelman, A.I.M., van Kraaij, M.G.J., Oosterheert, J.J., Schipper, P., Schuurman, R. and Nijhuis, M. Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Infectious*

Diseases 189(4), 652-657, 2004.

6. Xiao, F., Sun, J., Xu, Y.H., Li, F., Huang, X.F., Li, H.Y., Zhao, J.X., Huang, J.C. and Zhao, J.C. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerging Infectious Diseases* 26(8), 1920-1922, 2020.

(発 表 論 文)

国際学術雑誌への投稿準備中