

研 究 報 告

令和 7 年 3 月 31 日

公益財団法人 前田記念工学振興財団

理 事 長 岸 利 治 殿

研究代表者

所 属 : 北海道大学 大学院工学研究院

氏 名 : 白崎 伸隆

研究課題名 : サポウイルスに対する浄水消毒処理の有効性評価
: *In vitro* 細胞培養増殖系の活用

助成金額 : 100 万円

研究実施期間 : 自 令和 6 年 4 月 1 日 ~ 至 令和 7 年 3 月 31 日

サポウイルスに対する浄水消毒処理の有効性評価 ： *In vitro* 細胞培養増殖系の活用

Evaluation of inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water disinfection processes by applying an *in vitro* cell-culture system

北海道大学 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

サポウイルス（札幌で最初に集団感染が起きたことに因んでサポ [サッポロ] ウイルスと命名）は、ノロウイルスと同じカリシウイルス科に属するウイルスであり、水系感染症を引き起こす主要な原因ウイルスの一つとして WHO 飲料水水質ガイドライン（WHO, 2011）及び USEPA 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。しかしながら、サポウイルスは、ヒト生体外での効率的な培養法が未確立であったため、ウイルスの浄水処理性を把握する際に広く行われている添加実験を実施することが極めて難しく、浄水処理性に関する知見は全く得られていなかった。このような中で、2020 年に、市販の汎用細胞と胆汁酸を用いた生体外でのサポウイルス増殖系が見出されたことから（Takagi *et al.*, 2020）、研究代表者は、当該増殖系を活用することにより、添加実験に必要なサポウイルスの高濃度ストック調製法及びサポウイルスの感染力評価法を新たに構築し、これらを適用することにより、浄水粒子除去工程である凝集沈澱-砂ろ過処理、凝集-膜ろ過処理におけるサポウイルスの除去特性を世界で初めて詳細に把握することに成功しており（Shirakawa, Shirasaki *et al.*, 2023）、これらの処理によるウイルス低減は必ずしも高くはない（1 log [90%] 程度の場合有）ことを明らかにしてきた（Shirakawa, Shirasaki *et al.*, 2022, 2023）。従って、ろ過と消毒から成る現行の浄水処理においては、水道水の安全性確保のためのウイルス低減の大部分を消毒に依存（最大 9 log [99.9999999%] の低減が必要）しているものと考えられる。その一方で、高度浄水処理を実施している浄水場においては、臭気原因物質等の分解を主目的に導入されているオゾン処理による副次的な効果として、病原ウイルスの不活化も期待できることが示されているものの（Sobsey, 1989 ; Morrison *et al.*, 2022）、オゾン処理におけるサポウイルスの不活化特性に関する知見は全く得られていない。そこで、本研究では、研究代表者が構築したサポウイルスの高濃度ストック調製法及び感染力評価法、更には、研究代表者が培ってきたウイルス濃縮技術を駆使することにより、オゾン処理におけるサポウイルスの不活化特性を詳細に把握することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 使用したウイルスとその定量法

本研究では、ヒトに感染するサポウイルス（GI.1 型 AK20 株）を実験に使用した。また、水系感染症を引き起こす代表的な病原ウイルスであるコクサッキーウイルス（B5 型 Faulkner 株）についても実験に使用した。サポウイルス、コクサッキーウイルスは、それぞれの宿主細胞である HuTu 80 細胞（ヒト十二指腸癌由来細胞）及び BGM 細胞（アフリカミドリザル腎細胞）を用いて培養した。また、感染性を有するサポウイルスの定量には、宿主細胞である HuTu 80 細胞による培養とリアルタイム定量 PCR 法を組み合わせた ICC-PCR 法（Shirakawa,

Shirasaki *et al.*, 2023) を用いた。一方、感染性を有するコクサッキーウイルスの定量には、宿主細胞である BGM 細胞による培養を応用したブラック形成法を用いた。更には、オゾン処理に伴うウイルス遺伝子の損傷の程度、並びにウイルス外殻タンパク質の損傷の程度を評価するため、ウイルス粒子内部の遺伝子の一部を標的とするリアルタイム定量 PCR 法に加えて、光反応性色素を用いた前処理とリアルタイム定量 PCR 法を組み合わせた PMAxx-Enhancer-PCR 法 (Shirasaki *et al.*, 2020) についても実施した。

2.4 オゾン処理実験

培養・精製したサポウイルス、コクサッキーウイルスのいずれかを 10^2 – 10^3 MPN/mL あるいは 10^4 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 あるいは 20 °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、初期オゾン濃度が 0.2 mg- O_3 /L 程度になるように別途作製した高濃度オゾン溶液を添加し、直ちに攪拌子を用いて 400 rpm にて攪拌した (オゾン処理終了時まで攪拌を継続)。オゾン添加前の原水に加え、オゾン添加後の処理水を経時的に採水し、チオ硫酸ナトリウムにより残留オゾン进行中和した後、それぞれの試料水中の感染性を有するウイルス濃度を ICC-PCR 法あるいはブラック形成法にて定量することにより、オゾン処理におけるウイルスの不活化率 (Log 不活化率 ($\text{Log}_{10}[N_{i0}/N_i]$; N_{i0} : 原水の感染性を有するウイルス濃度, N_i : 処理後の感染性を有するウイルス濃度)) を算出した。また、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 PCR 法及び PMAxx-Enhancer-PCR 法にて定量することにより、オゾン処理に伴うウイルス遺伝子の損傷の程度 (Log 低減率 ($\text{Log}_{10}[N_{g0}/N_g]$; N_{g0} : 原水のウイルス濃度, N_g : 処理後のウイルス濃度)), 更には、ウイルス外殻タンパク質の損傷とウイルス遺伝子の損傷を合わせた損傷の程度 (Log 低減率 ($\text{Log}_{10}[N_{cg0}/N_{cg}]$; N_{cg0} : 原水のウイルス濃度, N_{cg} : 処理後のウイルス濃度)) を算出した。なお、サポウイルスについては、ガラス製のメディウム瓶に 1,000 mL 添加した実験 (実験手順は、ガラス製の三角フラスコに 300 mL 添加した実験と同様) も実施した。所定の接触時間到達後、直ちにメディウム瓶内の 1,000 mL のオゾン処理水にチオ硫酸ナトリウムを添加し、残留オゾン进行中和した後、タンジェンタルフローUF 膜 (再生セルロース, 分画分子量 1,000 kDa) を用いて 10 mL まで濃縮し (100 倍濃縮), 原水及び濃縮水中の感染性を有するウイルス濃度を ICC-PCR 法にて定量することにより、Log 不活化率を算出した。

(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 サポウイルスの不活化特性

水温 20 °C, pH 7.0 のオゾン処理におけるサポウイルスの不活化率を ICC-PCR 法により評価した。結果を図-1 に示す。接触時間 3 s 後、すなわち、CT 値 (C : 残留オゾン濃度 $\times T$: 接触時間) 約 0.5 mg- O_3 ·s/L において、サポウイルス濃度は定量下限値以下となり、3.1 log 以上不活化することが確認された。一方、UF 膜を用いたウイルス濃縮を組み合わせた場合においては、オゾン処理後の感染性を有するサポウイルス濃度が ICC-PCR 法の定量範囲内となり、接触時間 3–5 s 後、すなわち、CT 値約 0.4–0.7 mg- O_3 ·s/L において、サポウイルスは 3.8–4.8 log 不活化することが確認された。なお、ウイルス濃縮を組み合わせた場合の不活化率の算出においては、予備検討により評価した濃縮におけるサポウイルスの回収率 59%を考

慮した。

オゾン処理においては、水温がウイルスの不活化に影響し、低水温条件では常温条件に比べて不活化効果が低減（不活化に必要な CT 値が増加）することが知られていることから（USEPA, 1991）、低水温条件、すなわち、水温 5℃、pH 7.0 のオゾン処理におけるサポウイルスの不活化率についても評価した。結果を図-2 に示す。水温 20℃ の場合と同様に、接触時間 3 s 後、すなわち、CT 値約 0.6 mg-O₃·s/L において、サポウイルス濃度は定量下限値以下となり、2.3 log 以上不活化することが確認された。また、UF 膜を用いたウイルス濃縮を組み合わせた場合においては、接触時間 3-5 s 後、すなわち、CT 値約 0.5-0.9 mg-O₃·s/L において、サポウイルスは 4.2 log あるいはそれ以上不活化することが確認された。従って、サポウイルスは、常温条件のみならず、オゾン処理による不活化効果が低減するとされている低水温条件においても、速やかに不活化することが明らかとなった。USEPA は、水温 20℃ におけるウイルスの 2 log, 3 log, 4 log 不活化に必要な CT 値をそれぞれ 15, 24, 30 mg-O₃·s/L (0.25, 0.4, 0.5 mg-O₃·min/L)、水温 5℃ においてはそれぞれ 36, 54, 72 mg-O₃·s/L (0.6, 0.9, 1.2 mg-O₃·min/L) としている（USEPA, 1991）。上述したように、水温 20℃ 及び 5℃ におけるサポウイルスの 4 log 不活化に必要な CT 値は、最大でも約 0.9 mg-O₃·s/L であったことから、USEPA が示す CT 値（30 mg-O₃·s/L あるいは 72 mg-O₃·s/L）により、サポウイルスの 4 log 不活化は十分に達成可能であると判断された。

水温 20℃、pH 7.0 のオゾン処理において、上述した ICC-PCR 法による評価に加え、オゾン処理に伴うウイルス遺伝子の損傷の程度、並びにウイルス外殻タンパク質の損傷の程度をリアルタイム定量 PCR 法及び PMAXx-Enhancer-PCR 法にて評価した。結果を図-3 に示す。いずれの定量法においても、CT 値の増加と共に、不活化率あるいは低減率の増加が確認された。しかしながら、リアルタイム定量 PCR 法及び PMAXx-Enhancer-PCR 法にて評価した低減率は、ICC-PCR 法にて評価した不活化率に比べて 2 log 程度低い値となった。従って、オゾン処理によるサポウイルスの不活化は、遺伝子の損傷や光反応性色素が透過可能な程度の外殻タンパク質の損傷のみでは説明できず、リアルタイム定量 PCR 法及び PMAXx-Enhancer-PCR 法による評価は、オゾン処理におけるサポウイルスの不活化効果を過小評価することが示された。一方、リアルタイム定量 PCR 法にて評価した低減率と PMAXx-Enhancer-PCR 法にて評価した低減率は同程度であったことから、オゾン処理によりサポウイルスの外殻タンパク質が損傷した場合、ウイルス粒子内部の遺伝子も速やかに損傷することが示唆された。

3.2 コクサッキーウイルスの不活化特性

水温 20℃、pH 7.0 のオゾン処理におけるコクサッキーウイルスの不活化率をブラック形成法により評価した。結果を図-4 に示す。接触時間 3 s 後、すなわち、CT 値約 0.7 mg-O₃·s/L において、コクサッキーウイルスは 4.1 log 不活化することが確認され、サポウイルスの場合と同様の結果であった。従って、サポウイルスのオゾン処理耐性は、コクサッキーウイルスと同程度であることが示された。また、リアルタイム定量 PCR 法及び PMAXx-Enhancer-PCR 法にて評価したコクサッキーウイルスの低減率についても、サポウイルスの場合と同様の傾向が確認された（図-4）。

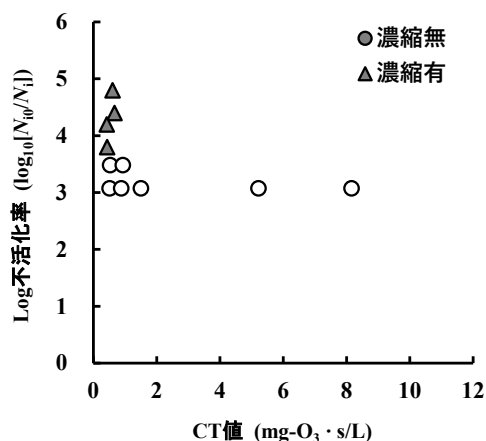


図-1. 水温20℃のオゾン処理におけるサポウイルスの不活化特性 (ICC-PCR法にて定量, 白抜きの値は定量下限値以下)

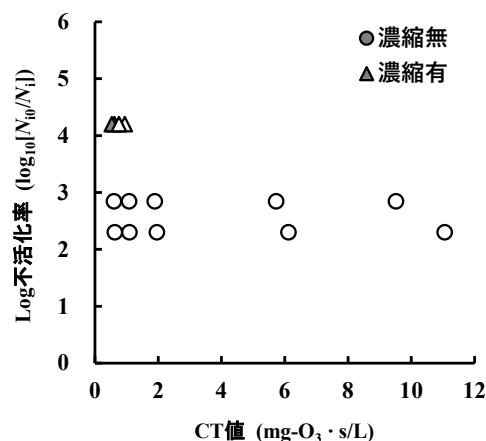


図-2. 水温5℃のオゾン処理におけるサポウイルスの不活化特性 (ICC-PCR法にて定量, 白抜きの値は定量下限値以下)

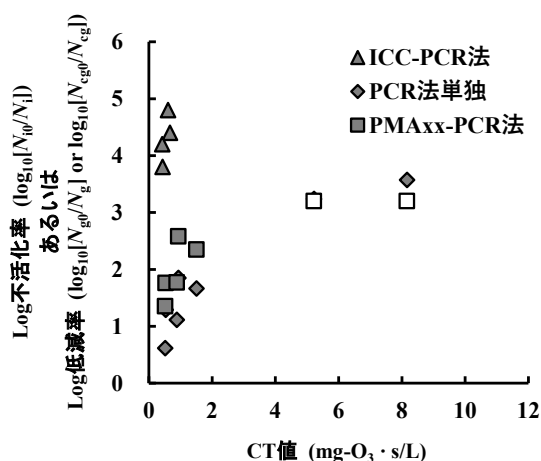


図-3. 水温20℃のオゾン処理におけるサポウイルスの不活化率及び低減率の比較 (白抜きの値は定量下限値以下)

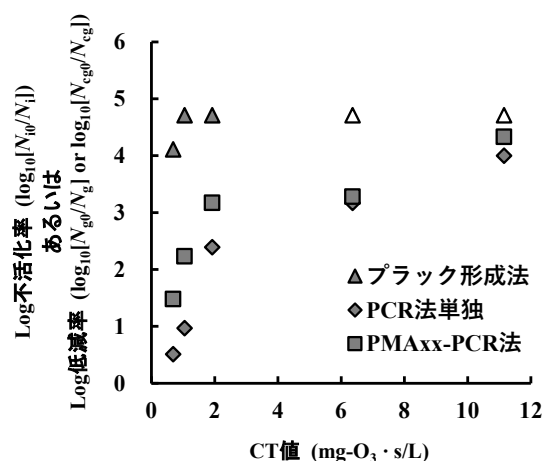


図-4. 水温20℃のオゾン処理におけるコクサッキーウイルスの不活化率及び低減率の比較 (白抜きの値は定量下限値以下)

3.3 既往研究との比較

オゾン処理における水系感染症を引き起こす病原ウイルスの不活化特性に関する研究はこれまでに数多くなされており, 添加実験により評価されている (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003 ; Vaughn *et al.*, 1990 ; Young *et al.*, 2020) .

本研究で対象としたコクサッキーウイルスについては, 水温 22 °C, pH 6.5 のリン酸バッファーを用いた既往研究の評価結果 (Young *et al.*, 2020) に基づけば, 4 log 不活化に必要なオゾン処理の CT 値は 0.24 mg-O₃·s/L 程度であることが試算され, 本研究で評価した 4 log 不活化に必要な CT 値約 0.7 mg-O₃·s/L (水温 20 °C, pH 7.0) と同程度であることが確認された. オゾン処理においては, ウイルス溶液の精製の程度 (ウイルス添加に伴う培地由来の溶存有機物濃度の増加と溶存有機物濃度の増加に伴うオゾンの消費の程度) や CT 値算出の正確性 (経時的な残留オゾン濃度の変化をどの程度正確に把握できるか) 等が評価結果に影響することから, 同じウイルスを対象とした場合であっても, 評価結果にばらつきが生じる可能性があることに注意が必要であるものの, 上述した結果から, 本研究で実施したオゾン処理実験, 更には, 本研究で評価したウイルスの不活化特性は妥当であると判断した.

本研究で不活化特性が明らかとなったサポウイルスについては、4 log 不活化に必要なオゾン処理の CT 値は約 0.5–0.9 mg-O₃·s/L（水温 5 °C, pH 7.0）であり、代表的な病原ウイルスであるアデノウイルス（水温 5 °C, pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた場合における 3 log 不活化に必要な CT 値は 6.0 mg-O₃·s/L, Thurston-Enriquez *et al.*, 2003）、A 型肝炎ウイルス（水温 4 °C, pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた場合における 4 log 不活化に必要な CT 値は 24 mg-O₃·s/L, Vaughn *et al.*, 1990）に比べてオゾン処理耐性が低い、すなわち、オゾン処理に対する感受性が高いことが明らかとなった。

4. 結論

サポウイルスの高濃度ストック調製法及び感染力評価法、更には、UF 膜を用いたウイルス濃縮法を駆使することにより、オゾン処理におけるサポウイルスの不活化特性を詳細に把握することに成功した。サポウイルスは、水温約 20 °C 及び約 5 °C のいずれの条件においても、CT 値約 0.4–0.9 mg-O₃·s/L で 4 log 程度あるいはそれ以上不活化することが確認された。また、サポウイルスは、代表的な病原ウイルスであるアデノウイルス、A 型肝炎ウイルスに比べて、オゾン処理耐性が低いことが明らかとなった。

参考文献

1. Morrison, C.M., Hogard, S., Pearce, R., Gerrity, D., Wert, E.C. and von Gunten, U. Ozone disinfection of waterborne pathogens and their surrogates: a critical review. *Water Research* 214, 118206, 2022.
2. Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., Matsumura, T. and Koriki, S. Evaluation of reduction efficiencies of pepper mild mottle virus and human enteric viruses in full-scale drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration. *Water Research* 213, 118160, 2022.
3. Shirakawa, D., Shirasaki, N., Hu, Q., Matsushita, T., Matsui, Y., Takagi, H. and Oka, T. Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an *in vitro* cell-culture system. *Water Research* 236, 119951, 2023.
4. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Koriki, S. 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 Research* 186, 116409, 2020.
5. Sobsey, M.D. Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Water Science and Technology* 21(3), 179-195, 1989.
6. Takagi, H., Oka, T., Shimoike, T., Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M., Wang, Q.H., Saif, L.J. and Noda, M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117(50), 32078-32085, 2020.
7. Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and Gerba, C.P. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research* 39(15), 3650-3656, 2005.
8. U.S. Environmental Protection Agency. *Guidance Manual for Compliance with the Filtration*

and Disinfection Requirements for Public Water Systems Using Surface Water Sources. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 1991.

9. U.S. Environmental Protection Agency. *Drinking Water Contaminant Candidate List 5*. EPA-HQ-OW-2018-0594. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2022.
10. Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Novotny, J.F. and Strout, D. Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Canadian Journal of Microbiology* 36(8), 557-560, 1990.
11. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
12. Young, S., Torrey, J., Bachmann, V. and Kohn, T. Relationship between inactivation and genome damage of human enteroviruses upon treatment by UV, free chlorine, and ozone. *Food and Environmental Virology* 12(1), 20-27, 2020.

(発 表 論 文)

国際学術雑誌への投稿準備中