

薬品洗浄によるフラックスの回復に着目すると、pH制御を行った場合には、硫酸、シュウ酸による酸洗浄よりも、水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ洗浄した膜のフラックスの回復が良好であった。一方、pH制御を行わなかった場合、酸洗浄を行った膜のフラックスの回復がやや良好という結果となった。

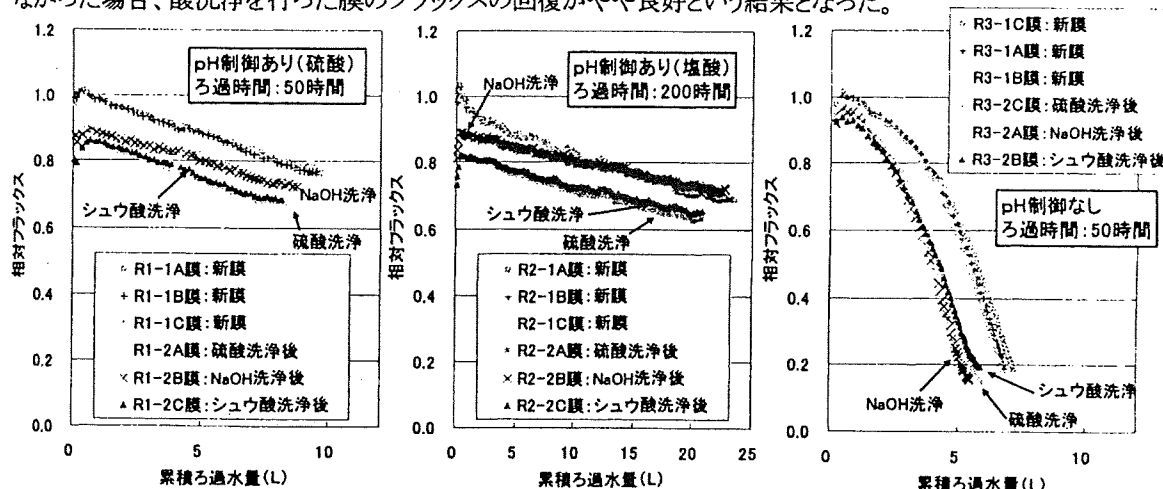


図2 相対フラックスの変化 (洗浄前の初期フラックスを1とする)

3.2 膜洗浄溶出液分析

分析は、金属類とTOCについて行い、溶出液を0.45 μmフィルタでろ過した試料と、ろ過しない試料を用意した。RUN1,2の洗浄溶出液中には、目視では沈殿物を確認出来なかったが、RUN3の溶出液中には、沈殿物が見られた。金属類の溶出は、アルカリ洗浄に比べて酸洗浄が多く、鉄の溶出は、硫酸洗浄に比べ、シュウ酸洗浄が全てのRUNにおいて、多い結果となった。一方、RUN3については、シュウ酸洗浄溶出液に比べて、硫酸洗浄溶出液中のカルシウム濃度が明らかに高い結果となった。(図3)

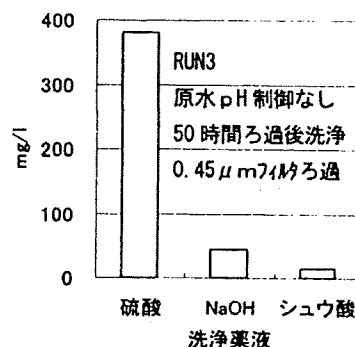


図3 薬品洗浄溶出液中のカルシウム濃度

3.3 シュウ酸洗浄溶出液中の白色沈殿物の検証

RUN3において沈殿物が見られたが、硫酸や水酸化ナトリウム洗浄溶出液中の沈殿物が粒子状であったことに対して、シュウ酸洗浄溶出液中には板状の結晶のような状態で白色の沈殿物が確認された。シュウ酸洗浄溶出液中にのみ存在することや、この溶出液中のカルシウム濃度が硫酸洗浄溶出液中の濃度と比べて低いこと、実験原水のカルシウム濃度が高いことなどから、この沈殿物の大半もしくは一部が、シュウ酸カルシウムであることが予想された。そこで、硝酸を用いて沈殿物を溶解させ、シュウ酸イオン濃度、カルシウム濃度を測定した結果、シュウ酸カルシウムのシュウ酸とカルシウムの分子量比と試料中の濃度の比がほぼ等しくなった。このことや沈殿物の乾燥重量の測定結果から、沈殿物の大半がシュウ酸カルシウムであったと推測される。

4. まとめ

- ・ 金属類の除去には、アルカリ洗浄に比べ、酸洗浄が有効で、鉄の除去には、シュウ酸が有効であった。
- ・ NF濃縮水を原水とした今回の実験では、原水のpH制御は、フラックスの低下の抑制に有効であり、制御した場合には有機物が、無制御の場合にはカルシウムが、ファウリングの主要因物質であったと思われる。
- ・ カルシウムスケールが析出した膜の洗浄にシュウ酸を用いた場合、シュウ酸カルシウムが生成される可能性があることが示唆された。

参考文献

- 1) 伊藤、国包: 半回分式試験によるナノろ過膜の評価方法、水道協会雑誌、第68巻第11号、1999

(6-7) 給水装置の構造・材質基準に係る試験方法に関する検討

○林田 武志(国立保健医療科学院) 伊藤 雅喜(国立保健医療科学院)
早瀬 久司(八戸圏域水道企業団) 洲澤 俊綱(堺市上下水道局)

1. 背景及び目的

平成9年に「給水装置の構造及び材質の基準に関する省令(厚生省令第14号)」及び「給水装置の構造及び材質に係る試験(厚生省告示第111号)」が制定され、従来の給水装置の型式承認・検査制度が廃止され、水道法に基づく性能基準化が図られた。これに伴い、当院では、市販されている給水装置の同省令に基づく基準適合性試験を毎年度実施している。主な目的としては、基準不適合情報(苦情や事故情報)による当該給水装置の性能確認、厚生労働省の給水装置データベースが提供する基準適合情報の信頼性確保、省令制定時に想定していなかった新たな給水装置に対する省令基準の適合確認及び告示の試験方法が当該装置の使用条件及び構造等から適正であるかの検討である。今回、これまで行ってきた市販給水装置の基準不適合事例等から試験方法に関するいくつかの検討を行ったので、これらを報告したい。

2. 試験方法

当院に設置された各種給水装置試験設備を用いて、告示に定められた試験方法に従い、各種試験を実施した。試験に当たっては、試験対象製品が一般的に使用される状況を想定し、同条件が得られるよう配慮した。

3. 基準不適合事例に関する考察

これまで行ってきた市販給水装置の基準適合性試験のうち、以下の基準不適合事例等について詳細な検討を行った。

1) ダイアフラム式ボールタップ

ダイアフラム式ボールタップは、浮き玉の設計がコンパクトに出来るなどの理由から採用されてきている。構造としては、図1に示すように、ボールタップの浮き玉が下がると空気孔が開放され、圧力室の圧力が低下し、圧力室を構成するダイアフラムによる吐水管への閉止力が給水圧力を下回り、タンクへの給水が開始されるものである。本方式のボールタップを有する給水装置に対し、負圧破壊試験を実施した。負圧破壊試験では、ボールタップの浮き玉を押下げる等により止水機構を全開として実施するが、参考試験として閉条件でも行った結果、いずれの条件でも逆流が認められ、閉条件では試験水位よりも低水位で逆流が認められた。

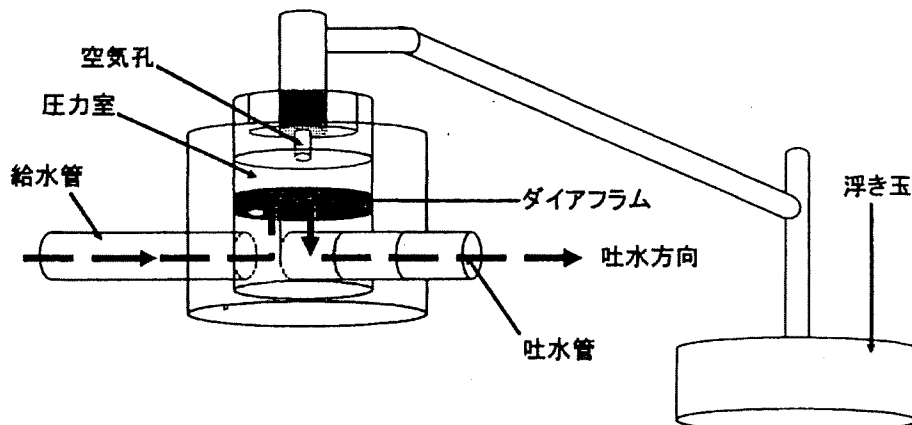


図1 ダイアフラム式ボールタップ模式図

これは、一般的にはより安全側であると考えられる閉条件の方が負圧時には危険側であることを示すものであり、通常の使用状態では止水機構が閉条件となっていることを想定すると負圧発生時におけるダイヤフラム式ボールタップの現象解明を行うとともにより適切な試験方法の検討が必要と考えられる。なお、本不適合事例については製造者により製品改善等の措置が図られると共に、厚生労働省からも第三者認証機関等を通じて類似の製品の確認を行うよう要請し、同様のものがないことを確認している。

2) 空気吸入シート面

空気吸入シート面は、負圧破壊装置における空気吸込み面と考えられるが、図2に示すように吐水管水没型のボールタップを有する給水装置において空気吸込み面が給水管よりも上部にあるものがあつた。このため、このような器具では試験方法をそのまま適用すると水面と空気吸入シートの距離の1/2まで水位上昇がなければ適合となるが、実際には、その間に給水管があるため逆流が発生してしまう場合がある。このような場合には空気吸入シート面の位置により試験方法の区別を行う必要があると考える。なお、本不適合事例は、1)と同製品であり同様の措置が行われた。

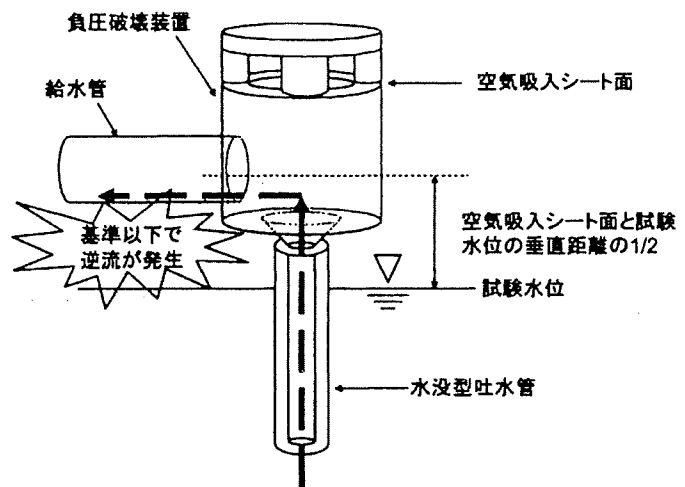


図2 空気吸入シート面が給水管上部に位置する負圧破壊装置模式図

3) オーバーフロー管を有する給水装置

ロータンク等のオーバーフロー管を有する給水装置は、設置される場所の給水圧に対応できるようにボールタップの浮き玉位置を設定し、給水圧によらず止水面を一定にすることが可能となっている。このようなボールタップ式止水機構の耐圧試験において、圧力を上昇させたところ、ボールタップの位置が通常使用のところでは、止水機構からタンク内への水漏れ、さらにはタンクからオーバーフロー管への排水により圧力が1.75MPaに達しないものがあつた。しかし、これは正常な排水系統への装置内部での水漏れであり、給水装置としての水漏れではない。本来耐圧試験は、通常の使用状態における水圧にウォーターハンマーによる水撃圧等を考慮されたものである。このため、一般論としては1.75MPaの水圧に対する変形、破損、その他の異常がないことの要件は必須であると考えられるが、止水機構からのタンク内またはオーバーフロー管等の排水系統への水漏れは、給水装置の性能としては異常ではないものと考えられる。今後試験項目として、構造上規定の水圧に達しないような製品は、どのような試験条件を用いて適合を判断するかを明確にすることが必要と考える。

4. まとめ

現在、様々な給水装置が新たに開発されており、これまで行ってきた市販されている給水装置の基準適合試験の結果から、現行の試験方法では想定していないものが新しく開発されてきている。これらの新たに開発された給水装置については、現行の試験方法で評価することは可能であるが、より適切な試験方法について検討することも必要であると考えられる。また、逆止弁の経年劣化による逆流事故等、給水装置における事故防止に対する課題は未だ多く残されており、安心・快適な給水の確保のため、今後も引き続き、基準適合試験等から新たな課題の抽出や対応策の検討を行いたい。

Experimental investigation of drinking water treatment using high basicity PACl in a pilot-scale plant,

by Yusei KOBAYASHI, Masaki ITOH, Toshiro YAMADA (National Institute of Public Health), Noriyuki MINAKATA (Wakayama City Waterworks Bureau),
 Shuichi HORINO (Hachinohe Regional Water Supply Authority), Kenichiro SATO (Kanagawa Water Supply Authority) and Yoshihiko MATSUI (Hokkaido Univ.)

1. はじめに 日本の浄水処理では、アルミニウム系の凝集剤が広く使用されており、中でもポリ塩化アルミニウム(PAC)は、全体使用量の90%以上を占めている。その一方で水道水中のアルミニウムは、着色の観点から基準強化が検討されており、平成21年水道水質基準改正において、水質管理目標設定項目としてアルミニウム0.1mg/Lが追加されている。このことから、凝集剤由来で水道水中に残留するアルミニウムの低減が課題となっている。そこで本研究では、残留アルミニウム低減を目的に試作された高塩基度 PAC(B70%PAC)を用いて、凝集沈澱、砂ろ過、膜ろ過プロセスを有するパイロットスケールプラントにて浄水処理実験を行い、残留アルミニウム濃度と濁度、運転管理に関わる項目として砂ろ過損失水頭及び膜差圧挙動について、従来型 PAC(B50%PAC)と比較した。

2. 実験方法 実験は当院内浄水実験プラント(15m³/日×2系統)にて行った。実験フロー及び主な実験条件を図1に示す。系統毎で凝集沈澱水を砂ろ過(ろ層厚60cm,ろ過継続時間24時間)と膜ろ過(酢酸セルロース製UF膜,分画分子量150,000,内圧全量ろ過,物理洗浄間隔3時間)に分岐するフローとした。実験原水には、原水調整槽で地下水と濁度成分のカオリン(和光純薬製)を混合したものをを使用した。凝集剤は、1系にB50%PAC(塩基度50%)、2系にB70%PAC(塩基度70%)を使用し、凝集pHはともにpH7(pH6.9~7.1で制御)とした。それ以外の運転条件は統一した。時間経過と共に、原水濁度(5、30、300度)、凝集剤注入率(30、60mg/L)を変更した。

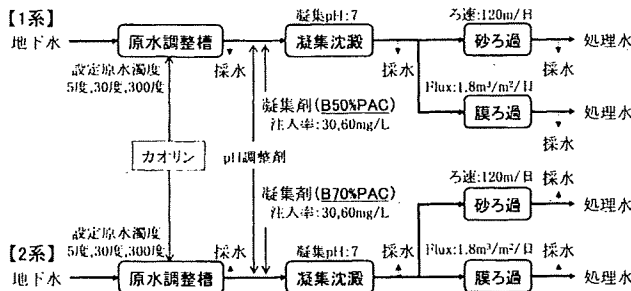


図1 実験フローと主な運転条件

3. 結果と考察 濁度の結果を図2に示す。原水濁度は、1系、2系とも設定原水濁度付近で調整できた。沈澱水濁度は、1系、2系とも、凝集剤注入率30mg/Lにおいて、設定原水濁度5度で約1度、設定原水濁度30度で約3度、設定原水濁度300度で約10度となったが、凝集剤注入率60mg/Lにすることで、設定原水濁度300度で約6度となった。このように原水濁度の変動及び凝集剤注入率の変更に對し、1系と2系の沈澱水には大きな差異が認められず、同等の除濁性が得られた。一方で、砂ろ過水濁度は、1系より2系が、ろ過池洗浄直後からろ過継続時間とともに濁度の低下が早くなる傾向を示し、1系と2系に差異が認められた。この傾向は、原水濁度や凝集剤注入率の変更によらず、全ての条件で見られたことから、凝集剤の違いによる影響と考えられ、沈澱水濁度が同程度であったことから、凝集沈澱池か

ら漏出したブロックにおける濁度以外の因子が影響しているものと考えられる。また砂ろ過損失水頭は1系より2系が早く上昇する傾向を示し、膜ろ過水濁度は、1系、2系とも高感度濁度計の検出限界以下で、差異は認められなかったが、1回の物理洗浄間で上昇する膜差圧については、1系より2系が小さい傾向を示した。

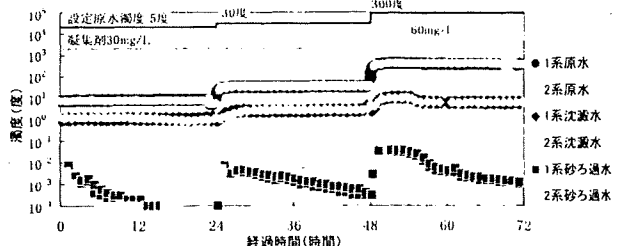


図2 原水濁度と沈澱水濁度、砂ろ過水濁度

沈澱水中及び砂ろ過水中の総アルミニウム(総Al)濃度と溶解性アルミニウム(溶解性Al)濃度(0.45µmメンブレンフィルターでろ過したもの)の関係を図3に示す。総Alと溶解性Alは、ばらつきはあるものの原点を通る直線で近似できることから、存在比は一定である傾向を示した。沈澱水中溶解性Alは、1系では概ね20~70µg/Lの分布に対し、2系では概ね10µg/L以下で分布し、1系と2系に差異が認められた。残留Al低減を目的に試作されたB70%PACの効果が現れているものと考えられる。沈澱水中総Alは、1系、2系とも、概ね100~500µg/Lで同程度分布しているが、沈澱水濁度の影響を受けたものと考えられる。砂ろ過水中の総Alは溶解性Alと同程度となり、砂ろ過により濁質と共に懸濁態のAlが除去されたものの、溶解性Alは沈澱水と同程度残留している。さらに、砂ろ過水中溶解性Al濃度と膜ろ過水中溶解性Al濃度の関係を図4に示すが、膜ろ過水中からも砂ろ過水中と同程度のアルミニウムが検出されたことから、水道水中Al濃度の低減には、凝集沈澱池におけるコントロールが不可欠であることが改めて示された。

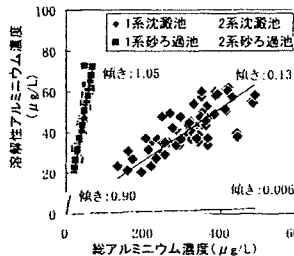


図3 沈澱水中及び砂ろ過水中のアルミニウム存在形態

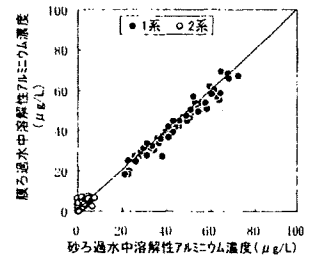


図4 膜ろ過水中及び砂ろ過水中の溶解性アルミニウム濃度

4. まとめ 検討の結果、B50%PACを用いた場合とB70%PACを用いた場合では、溶解性Alや砂ろ過水濁度、ろ過池損失水頭及び膜差圧等で異なる傾向を示した。この原因には、ブロック性状の影響が考えられるため、今後詳細な調査が必要と考えている。

Y107

塩素消費量低減の視点からの浄水処理工程の評価

(広工大)O(学)林 祐輝*・(正)奥田 哲士・(正)中井 智司・(正)西嶋 渉・(正)岡田 光正

1. 緒言

水道水中の残留塩素濃度は、給水栓において 0.1mg-Cl/L 以上と定められているが、おいしい水を供給する観点からは 0.1~0.4mg-Cl/L の範囲でコントロールすることが求められている。しかし、浄水処理工程で処理しきれない残留溶存有機物質などにより、残留塩素が配水中に消費されるため、上記の範囲内でコントロールすることは難しい。この有機物に関しては、分子量や構造により塩素との反応性が異なると考えられる。また、残留塩素と高い反応性をもつ溶存有機物質がどの浄水処理法、またどのような条件で除去されやすいかは明らかになっていない。

そこで本研究では、水源の違いや浄水処理工程の違いによる残留溶存有機物質の違いと、配水中の塩素消費量の関係を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

三つの水源を対象に、異なる日に試料を採水し、処理条件を変えて凝集沈殿処理、活性炭処理を行った処理水を実験に用いた。本研究では溶存有機物質に焦点を置いているため、上記の処理水を 1 μ m の孔径でろ過した水を実験に供した。

塩素消費量の測定には、実際の浄水場からの配水日数を参考にして 3 日後の残留塩素濃度が 0.2~0.4mg-Cl/L になるように塩素を添加することとした。

DOC、および構造の二重結合の指標である UV254 の測定を行い、塩素消費量の関係を検討した。

3. 実験結果と考察

既往の研究**では、DOC、UV254 と塩素消費量に相関があるとの報告もある。また、初期には残留塩素の減少量が多いことも報告されているが、管理の面からは配水池を出た後が問題である。そこで、塩素添加後の浄水場内の反応時間を想定した 3 時間後の UV254 と 3 時間後から 3 日目までの塩素消費量の関係を図 1 に示す。結果、0.88 の高い相関係数が得られた。これは、DOC との関係で評価した場合にも同様の結果であった。しかしながら、図 1 において 3 時間後の UV254 が 0.3 付近のみの点に着目すると、同程度の UV254 の値であっても 0.5mg-Cl/L 以上の差が見られ、予測に使うには範囲が大きすぎるため、数日間の塩素消費量を単に UV254 で予測することは困難である。

次に、浄水処理工程・処理条件の違いによる塩素消費量の低減効果の違いを検討した。表 1 に代表的な原水(3 サンプル)、凝集沈殿処理水、活性炭処理水の 3 時間後の UV254 と 3 時間後から 3 日目までの塩素消費量、およびそれらの比である単位 UV254 当たりの塩素消費量を示す。原水と比較して凝集沈殿処理水は単

位 UV254 当たりの塩素消費量が低く、活性炭処理水は高くなっていることが分かる。このことは、原水に比べ凝集沈殿処理後の水には同程度の UV254 値でも塩素を消費しにくい有機物質種が多いこと、すなわち凝集沈殿処理によって、塩素と反応性の高い有機物質が選択的に除去された可能性を示唆する。同様に活性炭処理では、塩素と反応性の低い有機物質が選択的に除去された可能性がある。またこのことは、同程度の DOC 濃度(2.5mg-C/L)になるような処理条件で凝集沈殿処理と活性炭処理を行なった水の塩素消費量を比較した結果、凝集沈殿処理のほうが塩素消費量が少なくなっていたことから分かる。

4. 結論

- ・ 数日間の塩素消費量を UV254 のみで予測すると 30%程度の誤差があるため、別の指標も必要である。
- ・ 凝集沈殿処理では塩素と反応性の高い物を除去し、活性炭処理では低いものを除去していると考えられる。

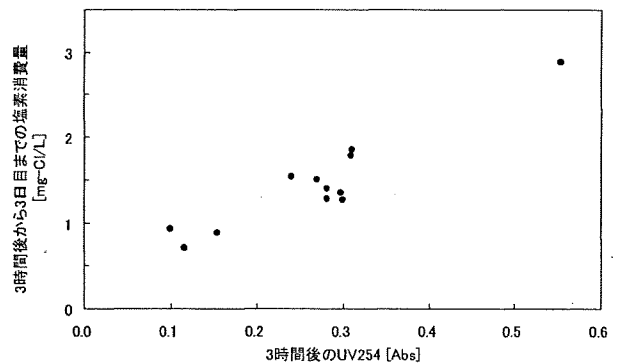


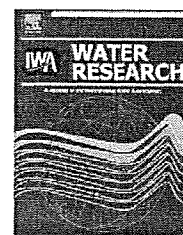
図1 ろ過水の3時間後のUV254と塩素消費量(3h~3d)の関係

表1 種々の浄水処理と単位UV254当たりの塩素消費量の関係

		3時間後のUV254 (-)	3時間以降の塩素消費量 (mg-Cl/L)	単位UV254当たりの塩素消費量 (mg-Cl/L)
原水		0.281	1.39	4.9
		0.309	1.78	5.8
		0.310	1.85	6.0
凝集沈殿処理	凝集剤添加量 (mg-Al/L)			
	2	0.202	0.94	4.7
	4	0.171	0.71	4.2
	4	0.172	0.76	4.4
	6	0.163	0.69	4.2
	6	0.162	0.78	4.8
活性炭処理	活性炭添加量 (mg/L)			
	7	0.173	1.17	6.8
	7	0.172	1.18	6.9
	7	0.169	1.30	7.7

* M093177@hiroshima-u.ac.jp

参考文献)** Disinfectant demand prediction using surrogate parameters—a tool to improve disinfection control 2006 Journal of Supply 55.6

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Estimation of norovirus removal performance in a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs

N. Shirasaki*, T. Matsushita, Y. Matsui, A. Oshiba, K. Ohno

Division of Built Environment, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, N13W8, Sapporo 060-8628, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2009

Received in revised form

2 October 2009

Accepted 29 October 2009

Available online 4 November 2009

Keywords:

Bacteriophages

Coagulation

ELISA

Norovirus

Rapid sand filtration

Virus-like particles

ABSTRACT

Norovirus (NV) is an important human pathogen that causes epidemic acute nonbacterial gastroenteritis worldwide. Because of the lack of a cell culture system or an animal model for this virus, studies of drinking water treatment such as separation and disinfection processes are still hampered. We successfully estimated NV removal performance during a coagulation–rapid sand filtration process by using recombinant NV virus-like particles (rNV-VLPs) morphologically and antigenically similar to native NV. The behaviors of two widely accepted surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q β and MS2, were also investigated for comparison with that of rNV-VLPs. Approximately 3-log₁₀ removals were observed for rNV-VLPs with a dose of 40 μ M-Al or -Fe, as polyaluminum chloride at pH 6.8 or ferric chloride at pH 5.8, respectively. Smaller removal ratios were obtained with alum and ferric chloride at pH 6.8. The removal performance for MS2 was somewhat larger than that for rNV-VLPs, meaning that MS2 is not recommended as an appropriate surrogate for native NV. By comparison, the removal performance for Q β was similar to, or smaller than, that for rNV-VLPs. However, the removal performances for rNV-VLPs and Q β differed between the coagulation process and the following rapid sand filtration process. Therefore, Q β also is not recommended as an appropriate surrogate for native NV.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Norovirus (NV), which has been previously termed Norwalk-like virus or small round structured virus, is an important human pathogen that causes epidemic acute nonbacterial gastroenteritis worldwide. This virus belongs to the genus *Norovirus* in family *Caliciviridae* (Zheng et al., 2006). On the basis of the molecular characterization of complete gene sequences, the *Norovirus* genus has been classified into seven distinct genogroups (GI to GVII) (Phan et al., 2007). Among the seven genogroups, the GI, GII, GIV, GVI, and GVII strains are found in humans (Phan et al., 2007).

Acute gastroenteritis is one of the leading causes of morbidity and mortality in children in the developing countries, and NV is known to be present in a large fraction of stool samples from diarrhea hospitalizations (Ramani and Kang, 2009). NV outbreaks are caused mainly by consumption of contaminated food (Daniels et al., 2000; Fankhauser et al., 2002), or they can be spread person-to-person (Fankhauser et al., 2002). NV outbreaks due to contaminated drinking water have also been reported (Kukkula et al., 1999; Nygård et al., 2003; Maunula et al., 2005). The presence of NV in drinking water sources is a public health concern owing to the potential for widespread NV outbreaks. However, because of the lack of a cell culture system or an

* Corresponding author. Tel.: +81 11 706 7281; fax: +81 11 706 7279.

E-mail address: nobutaka@eng.hokudai.ac.jp (N. Shirasaki).

0043-1354/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.watres.2009.10.038

animal model for NV (Parker et al., 2005; Zheng et al., 2006), studies of drinking water treatments such as separation and disinfection processes are still hampered. Accordingly, the removal performance of NV in the coagulation–rapid sand filtration process, which is commonly used in drinking water treatment facilities, has not been investigated fully.

Feline calicivirus (FCV) has been widely used as an NV surrogate in studies of drinking water treatment processes to predict the treatability of NV (Thurston-Enriquez et al., 2003, 2005; Duizer et al., 2004; Abbaszadegan et al., 2007; Mayer et al., 2008), because FCV has a similar genome organization and capsid architecture to NV and it can be easily grown in cell cultures (Thurston-Enriquez et al., 2003). However, FCV belongs to the genus *Vesivirus*, family *Caliciviridae*, and it causes respiratory illness (Hashimoto et al., 1999); thus, FCV is unlike an enteric virus that is spread by the fecal–oral route. More recently, murine norovirus (MNV), genus *Norovirus*, family *Caliciviridae*, has been successfully propagated in cell culture (Karst et al., 2003). MNV is an enteric virus, and some researchers have reported MNV to be more suitable as a surrogate for NV than FCV in the aquatic environment (Cannon et al., 2006; Bae and Schwab, 2008). However, the suitability of MNV as a surrogate for NV in physical removal processes such as coagulation and filtration processes has not been investigated.

On the other hand, expression of the NV genome in a baculovirus expression system has made possible the production of recombinant NV virus-like particles (rNV-VLPs) (Jiang et al., 1992) that are morphologically and antigenically similar to native NV (Jiang et al., 1992; Green et al., 1993). Because the native NV source is the stools of human volunteers infected with NV, it is difficult to obtain a large amount of NV for spiking experiments of drinking water treatment processes, but the baculovirus expression system can produce enough rNV-VLPs to conduct spiking experiments. In addition, because rNV-VLPs lack RNA, which is necessary for infection and replication in host cells, they are harmless to humans during experiments, so they are easy to handle without any special facilities. In fact, rNV-VLPs have been used with the sandy aquifer treatment process to estimate the behavior of native NV (Redman et al., 1997). On the other hand, the fate of infectivity of NV in the treatment process, especially in response to disinfection processes such as chlorination, ozonation, and UV radiation, cannot be studied by using rNV-VLPs because of their lack of RNA. Thus, we can only discuss the fate of NV as particles.

Here, we used rNV-VLPs to investigate the removal performance of NV as particles during laboratory-scale coagulation–rapid sand filtration. We also experimentally investigated the behaviors of the F-specific RNA bacteriophages Q β and MS2 for comparison with those of rNV-VLPs and to assess the suitability of these bacteriophages as surrogates for NV. This study represents the first attempt to apply rNV-VLPs to estimate the removal of native NV in a drinking water treatment process.

2. Materials and methods

2.1. Source water, coagulants, and filter media

River water was sampled from the Toyohira River (Sapporo, Japan, water quality shown in Table 1) on 12 June 2008. The

Table 1 – Water quality of the Toyohira River.

pH	7.2
DOC (mg/L)	0.76
OD260 (cm ⁻¹)	0.019
Turbidity (NTU)	0.63
Alkalinity (mg-CaCO ₃ /L)	17.2

coagulants used for the coagulation process were two commercial aluminum coagulants, polyaluminum chloride (PACl) (PACl 250A; 10.5% Al₂O₃, relative density 1.2 at 20 °C; Taki Chemical Co., Ltd., Hyogo, Japan) and alum (8.1% Al₂O₃, relative density 1.3 at 20 °C; Taki Chemical Co., Ltd.), and one laboratory-made ferric chloride solution, which was prepared by dilution of reagent-grade iron (III) chloride (FeCl₃, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) dissolved in Milli-Q water (Milli-Q Advantage, Millipore Corp., Billerica, MA, USA). Silica sand (effective size 0.6 mm, uniformity coefficient <1.3; Nihon Genryo Co., Ltd., Kanagawa, Japan) was used as the filter medium for the rapid sand filtration process.

2.2. rNV-VLPs

rNV-VLPs were produced by a baculovirus in silkworm, *Bombyx mori* (Katakura Industries Co. Ltd., Saitama, Japan). Subgenomic cDNA fragments of Chiba virus (AB042808, GI/4, Chiba407/1987/JJ) genome were artificially synthesized and used for the expression of Chiba virus rNV-VLPs. Chiba virus, a Japanese strain in genogroup I of genus *Norovirus*, family *Caliciviridae*, was first identified as the cause of an oyster-associated outbreak of gastroenteritis that occurred in Chiba Prefecture, Japan, in 1987 (Kasuga et al., 1990). Someya et al. (2000) have determined the complete nucleotide sequence of the Chiba virus genome. Chiba virus has a positive-sense, single-stranded RNA of 7697 bases composed of a 5' untranslated region (UTR), three open reading frames (ORFs), and a 3'UTR; the large 5'-terminal ORF (ORF1) encodes a polyprotein with 1785 amino acids that is likely processed into functional proteins. ORF2 encodes the capsid protein with 544 amino acids, and the small 3'-terminal ORF (ORF3) encodes a basic protein with 208 amino acids (Someya et al., 2000). Because Bertolotti-Ciarlet et al. (2003) reported that expression levels of NV capsid protein are enhanced by the presence of ORF3 and 3'UTR in recombinant baculovirus, compared with expression in the absence of ORF3, 3'UTR, or both, we synthesized 2352 (positions 5346–7697) bases of Chiba virus genome containing ORF2, ORF3, and 3'UTR with attB1, EcoRI, attB2, and PstI restriction sites (total 2422 bases). The synthesized cDNA fragment was inserted into the vector (pDONR221, Invitrogen Japan K. K., Tokyo, Japan) by the Gateway BP reaction. After EcoRI and PstI digestion of the plasmid, the digested cDNA fragment was ligated into the baculovirus transfer vector (pMONHT04, Katakura Industries Co. Ltd.). The transfer vector was co-transfected with the linearized genomic DNA of baculovirus (*B. mori* nucleopolyhedrovirus; CPd strain, Suzuki et al., 1997) into the *B. mori*-derived cell line (BmN, Maeda, 1989) to generate the recombinant baculovirus, and then the recombinant baculovirus was injected into silkworm pupae to express the rNV-VLPs. Six days after

inoculation, the expressed rNV-VLPs were separated from the pupal homogenate by centrifugation and dialysis to prepare the rNV-VLP stock solution.

2.3. Bacteriophages

F-specific RNA bacteriophages Q β (NBRC 20012) and MS2 (NBRC 102619) were obtained from the NITE Biological Research Center (NBRC, Chiba, Japan). The bacteriophages Q β (Dowd et al., 1998; Matsui et al., 2003; Matsushita et al., 2004; Shirasaki et al., 2009) and MS2 (Nasser et al., 1995; Redman et al., 1997; Dowd et al., 1998; Abbaszadegan et al., 2007; Mayer et al., 2008; Shirasaki et al., 2009) are widely used as surrogates for pathogenic waterborne viruses in the coagulation, coagulation–rapid sand filtration, and sandy aquifer treatment processes because of their morphological similarities to hepatitis A viruses and polioviruses, which are important to remove during the treatment of drinking water. Q β is the prototype member of the genus *Allolevivirus* in the virus family Leviviridae, and MS2 is the prototype member of the genus *Levivirus* in the Leviviridae. The genomes of these two bacteriophages contain a single molecule of linear, positive-sense, single-stranded RNA, which is encapsulated in an icosahedral protein capsid with a diameter of 24–26 nm (The Universal Virus Database of the International Committee on the Taxonomy of Viruses). Each bacteriophage was propagated for 22–24 h at 37 °C in *Escherichia coli* (NBRC 13965) obtained from NBRC. The bacteriophage culture solution was centrifuged (2000 \times g, 10 min) and then passed through a membrane filter (pore size 0.45 μ m, hydrophilic cellulose acetate; Dismic-25cs, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan). The filtrate was purified by using a centrifugal filter device (molecular weight cutoff 100,000, regenerated cellulose; Amicon Ultra-15, Millipore Corp.) to prepare the bacteriophage stock solution.

2.4. Coagulation experiments

Batch coagulation experiments were conducted with 400 mL of rNV-VLPs and bacteriophage-spiked river water in glass beakers at 20 °C. The rNV-VLPs (see Section 2.2) and the stock solutions (see Section 2.3) of both bacteriophages were simultaneously added to the beaker at approximately 10^{11} VLPs/mL and 10^8 plaque-forming units (PFU)/mL, respectively, and mixed with an impeller stirrer. PACl, alum, or FeCl₃ was injected into the water as a coagulant at 20 μ M (0.54 mg-Al/L or 1.12 mg-Fe/L), 40 μ M (1.08 mg-Al/L or 2.24 mg-Fe/L), or 60 μ M (1.62 mg-Al/L or 3.36 mg-Fe/L). In the PACl and alum experiments, the pH of the water was immediately adjusted to, and maintained at, 6.8 using hydrochloric acid or sodium hydroxide. In contrast, in the FeCl₃ experiments, the pH was adjusted to one of three levels, 5.8 (minimum pH level established by drinking water quality standards in Japan), 6.3, or 6.8. The water was stirred rapidly for 2 min ($G = 200 \text{ s}^{-1}$, 77 rpm) and then slowly for 28 min ($G = 20 \text{ s}^{-1}$, 17 rpm). The water was then left at rest for 20 min to settle the floc particles generated. Samples were taken from the beaker before coagulant dosing (C_{c0}) and after settling (C_{cs}) for quantification of the rNV-VLP, Q β , and MS2 concentrations. Statistical analysis by t-test (two-tailed) based on a 0.05 level of significance was performed to determine whether the removal performances of rNV-VLPs, Q β , and MS2

differed when the conditions of the coagulation process were different. Because of the absence of experimental replication for any coagulation condition with FeCl₃, statistical analysis could not be performed for FeCl₃.

2.5. Rapid sand filtration experiments

After the coagulation experiments, filtration experiments were carried out with a glass column (diameter 0.8 cm, length 20 cm) packed with silica sand. Silica sand was washed with Milli-Q water and dried at 105 °C for 1 h. The cleaned silica sand was gradually added into the glass column to achieve a 10 cm filter depth. Next, to saturate the filter media, Milli-Q water was pumped through the column by a peristaltic pump for 15 min, and then the excess Milli-Q water was drained off from the column just before the filtration experiment. Approximately 350 mL of the supernatant of the settling sample (see Section 2.4) was withdrawn from the beaker by the peristaltic pump, and transferred to another glass beaker as raw water for the sand filtration experiments. The raw water was continuously mixed with a magnetic stirrer at 200 rpm during the filtration experiment, and it was fed into the column at a constant flow rate (120 mL/day) by the peristaltic pump. Samples were taken from the beaker (C_{r0}) and column filtrate (C_{rf}) after 15 and 30 min of filtration time for quantification of the rNV-VLP, Q β , and MS2 concentrations. Statistical analysis as described above was also performed on the results of the coagulation–rapid sand filtration process.

2.6. rNV-VLP assay

rNV-VLPs were detected by using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (NV-AD (II), Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Optical densities at wavelengths of 450 nm and 630 nm in a 96-well microplate were measured with a microplate reader (MTP-300, Corona Electric Co., Ltd., Ibaraki, Japan).

2.7. Bacteriophage assay

Viral RNA of bacteriophages was quantified by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. This method detects viruses regardless of their infectivity. For quantification of bacteriophages in the samples, viral RNA was extracted from 200 μ L of sample with a QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen K. K., Tokyo, Japan) to obtain a final volume of 20 μ L. The extracted RNA solution was added to a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems Japan Ltd., Tokyo, Japan) for the reverse transcription (RT) reaction, which was conducted at 25 °C for 10 min, 37 °C for 120 min, and 85 °C for 5 s, followed by cooling to 4 °C in the thermal cycler (Thermal Cycler Dice Model TP600, Takara Bio Inc., Shiga, Japan). The cDNA solution was then amplified by a TaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems Japan Ltd.), 400 nM of each primer (HQ-SEQ grade, Takara Bio Inc.), and 250 nM of TaqMan probe (Applied Biosystems Japan Ltd.). The oligonucleotide sequences of the primers and the probes are shown in Table 2. Amplification was conducted at 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and

Table 2 – Oligonucleotide sequences of the primers and probes used in real-time RT-PCR quantification of Q β and MS2.

Viruses		Oligonucleotide sequences	Positions	References
Q β	Forward primer	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'	49–71	Katayama et al., 2002
	Reverse primer	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'	187–208	
	TaqMan probe	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'	147–169	
MS2	Forward primer	5'-GTC GCG GTA ATT GGC GC-3'	632–648	O'Connell et al., 2006
	Reverse primer	5'-GGC CAC GTG TTT TGA TCG A-3'	690–708	
	TaqMan probe	5'-AGG GCG TCC GGT ACC TTG CCC T-3'	650–671	

then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min in an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Japan Ltd.).

The standard curve for the real-time RT-PCR method was based on the relationship between the infectious bacteriophage concentration of a freshly prepared stock solution measured by the plaque-forming unit (PFU) method (Adams, 1959) and the number of cycles of PCR amplification.

2.8. Electron microscopy

Negative-stain electron microscopy was used to analyze the presence, integrity, and morphology of the rNV-VLPs. Ten microliters of rNV-VLP stock solution (see Section 2.2) was put on a 400-mesh copper grid with collodion membrane (Nissin EM Corp., Tokyo, Japan) and adsorbed to the grid for 1 min. Excess solution on the grid was drained from the side of the grid with filter paper, and rNV-VLPs were negatively stained with 10 μ L of 2% phosphotungstic acid (pH 5.5) for 45 s. After the excess stain was drained off, the grid was examined with a transmission electron microscope (TEM, H-7650, Hitachi High-Technologies Corp., Tokyo, Japan). The particle diameter of rNV-VLPs was expressed as the mean and standard deviation of 10 randomly chosen particles on the electron micrograph.

2.9. Cesium chloride density gradient

The densities of rNV-VLPs and bacteriophages were analyzed in a cesium chloride (CsCl) density gradient. rNV-VLPs and both bacteriophages were simultaneously suspended at approximately 10^{12} VLPs/mL and 10^8 PFU/mL, respectively, in a 1.2-g/cm³ CsCl solution using the stock solutions (see Sections 2.2 and 2.3), and layered on top of a 1.3–1.6-g/cm³ CsCl gradient. The gradient including rNV-VLPs and bacteriophages was ultracentrifuged ($100,000 \times g$, 18 h) in a preparative centrifuge (CP80MX, Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a P28S swing rotor, and then divided into 1-mL fractions. The density of each fraction was measured with an electronic balance (Mettler-Toledo AG245 Balance, Mettler-Toledo K. K., Tokyo, Japan), and rNV-VLP and bacteriophage (Q β and MS2) concentrations were quantified by ELISA and real-time RT-PCR method, respectively.

2.10. Electrophoretic mobility

The electrophoretic mobility of rNV-VLPs and bacteriophages was measured in filtered river water. River water in a stirred ultrafiltration cell (Model 8400, Millipore Corp.) was filtered through an ultrafiltration membrane (molecular weight cutoff

100,000, regenerated cellulose; Ultrafiltration Disks, YM-100, Millipore Corp.) to exclude the large particles, and the pH was adjusted to 6.8 with HCl. The river water samples were kept for 1 day at 20 °C to stabilize the pH. Just before the measurement of electrophoretic mobility, the rNV-VLPs and each bacteriophage were suspended at approximately 10^{10} VLPs/mL or 10^{10} PFU/mL in the filtered river water using the stock solution (see Sections 2.2 and 2.3). The electrophoretic mobility of the rNV-VLPs and both bacteriophages was measured with an electrophoretic light-scattering spectrophotometer (Zetasizer Nano ZS; 532 nm green laser, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at 25 °C and at a 17° measurement angle.

3. Results and discussion

3.1. Characteristics of the produced rNV-VLPs

Fig. 1 shows an electron micrograph of rNV-VLPs produced by the baculovirus–silkworm expression system. The presence of particles was confirmed on the electron micrograph, and rNV capsid proteins spontaneously self-assembled into VLPs during expression. The rNV-VLP particle diameter was 35.7 ± 3.2 nm, measured on 10 randomly chosen particles on the electron micrograph. This value roughly corresponds to the particle diameter (approximately 38 nm) previously reported for native NV (Someya et al., 2000).

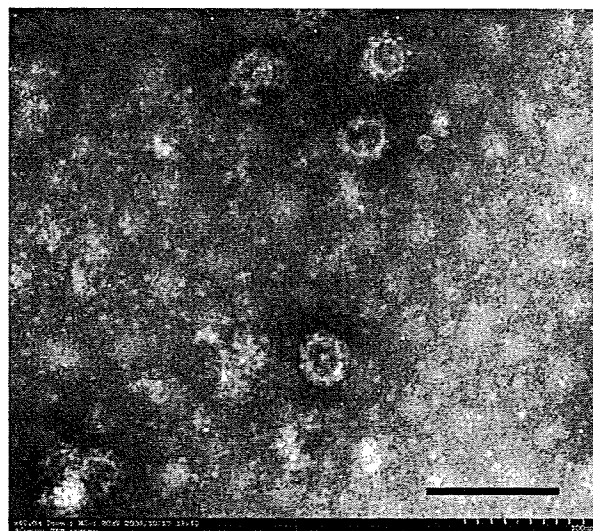


Fig. 1 – Negatively stained electron micrograph of rNV-VLPs. The scale bar corresponds to 100 nm.

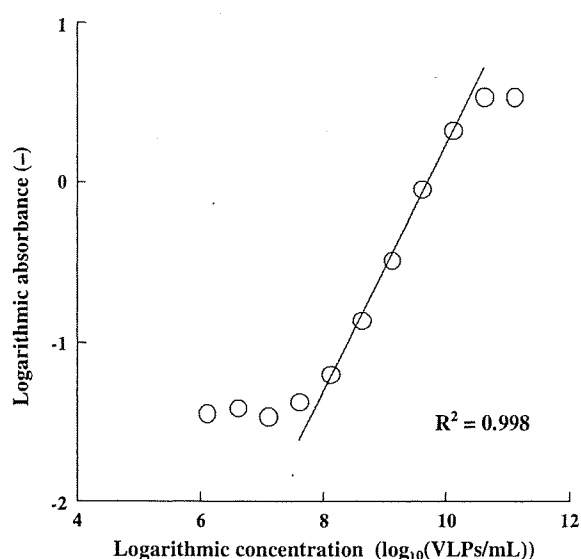


Fig. 2 – Sensitivity of the ELISA kit for the detection of rNV-VLPs.

A commercially available ELISA kit was used for quantification of rNV-VLPs. The sensitivity of the ELISA kit was determined by using 0.5- \log_{10} -fold serial dilutions of the rNV-VLP stock solution (see Section 2.2) with river water (Fig. 2). An excellent linear correlation between the rNV-VLP concentration and absorbance was observed in the range from 10^8 to 10^{10} VLPs/mL. The rNV-VLP quantification limit with the ELISA kit was approximately 10^8 VLPs/mL (Fig. 2). This result suggests that the rNV-VLPs produced here could be quantified by the commercially available ELISA kit.

The CsCl density of the fraction with the highest rNV-VLP concentration, quantified by ELISA, was 1.28 g/cm^3 (Fig. 3), meaning that the rNV-VLPs produced had a density of 1.28 g/cm^3 . Although this value was somewhat smaller than that of native NV (1.38 g/cm^3 , Jiang et al., 1992; 1.36 – 1.37 g/cm^3 , Utogawa et al., 1994), probably owing to the lack of RNA, it is similar to the previously reported values for rNV-VLPs (1.31 g/cm^3 , Jiang et al.,

1992; 1.27 g/cm^3 , Katayama et al., 2006). In addition, the density of rNV-VLPs was smaller than that of either bacteriophage: the CsCl densities of the fractions with the peak Q β and MS2 concentrations, quantified by real-time RT-PCR method, were 1.42 and 1.40 g/cm^3 , respectively, roughly corresponding to the densities previously reported for Q β (1.46 g/cm^3 , Engelberg-Kulka et al., 1979) and MS2 (1.38 g/cm^3 , Kuzmanovic et al., 2003).

These results suggest that rNV-VLPs were successfully produced by the baculovirus–silkworm expression system, and that the produced rNV-VLPs were morphologically similar to native NV. Accordingly, it is possible to estimate removal performance for NV as particles of the coagulation–rapid sand filtration process by using the rNV-VLPs produced here.

3.2. Simultaneous removal of rNV-VLPs and bacteriophages in the coagulation process

Fig. 4 shows the removal ratios ($\log_{10}[C_c/C_{cs}]$) of the model viruses (rNV-VLPs, Q β , and MS2) after settling in the coagulation process with PACl at pH 6.8 (the measurement errors were less than $0.1\text{-}\log_{10}$ for rNV-VLPs, Q β , and MS2). Because of the small sizes of the model viruses and the stability resulting from electrical repulsion in the river water, no removal ($<0.1\text{-}\log_{10}$) of rNV-VLPs or either bacteriophage was observed in the absence of a coagulant. Even with $20 \mu\text{M-Al}$ of PACl, no removal was observed. In contrast, the coagulation process removed model viruses at PACl doses of 40 and $60 \mu\text{M-Al}$. This result indicated that the stably monodispersed model viruses in the river water were destabilized by the addition of PACl and became adsorbed to/entrapped in the aluminum floc particles generated during the coagulation process, and then the aluminum floc particles with the adsorbed/entrapped model viruses settled from suspension by gravity during the settling process. The removal ratios of rNV-VLPs were only $<0.3\text{-}\log_{10}$ at a PACl dose of $20 \mu\text{M-Al}$, whereas with a dose of $40 \mu\text{M-Al}$ or more the removal ratios significantly ($P < 0.05$) increased to approximately $1\text{-}\log_{10}$ for rNV-VLPs. Increasing PACl dose to more than $40 \mu\text{M-Al}$ also increased the removal ratios of Q β and MS2 to approximately $2\text{-}\log_{10}$, although no

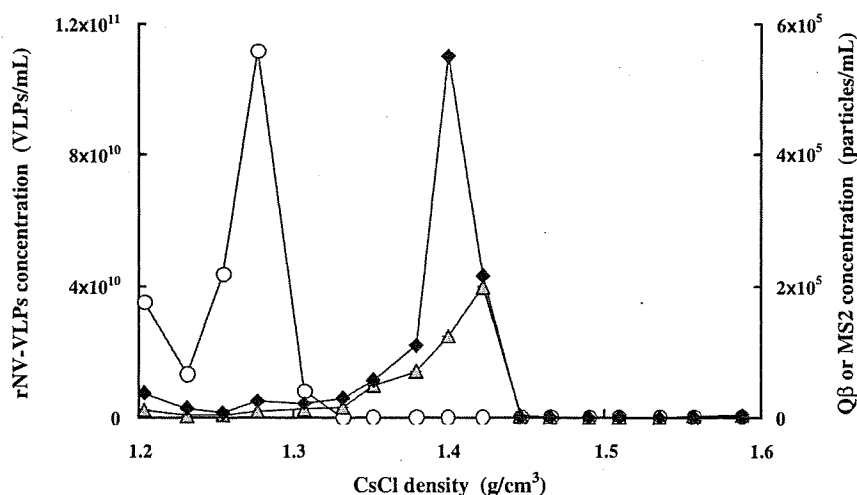


Fig. 3 – Densities of rNV-VLPs, Q β , and MS2 analyzed by CsCl density gradient. Circles, triangles, and diamonds represent rNV-VLPs, Q β , and MS2, respectively.

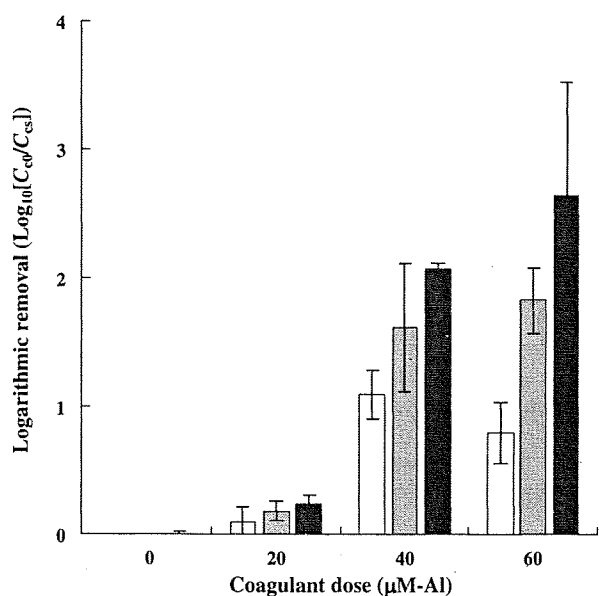


Fig. 4 - Effect of coagulant dose on rNV-VLP, Q β , and MS2 removals after settling in the coagulation process with PACl at pH 6.8. White, gray, and black columns represent rNV-VLPs, Q β , and MS2, respectively. Values are means and standard deviation of two or three replications.

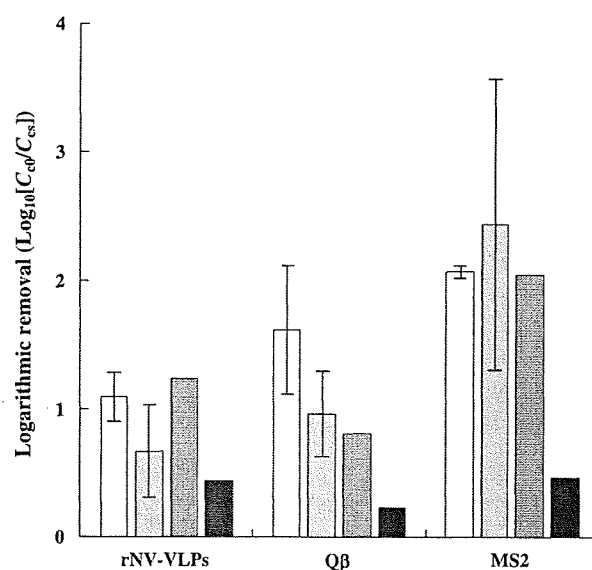


Fig. 5 - Effect of coagulant type on the removals of rNV-VLPs, Q β , and MS2 after settling in the coagulation process. White, light gray, dark gray, and black columns represent PACl (pH 6.8), alum (pH 6.8), FeCl₃ (pH 5.8), and FeCl₃ (pH 6.8), respectively. Values are means and standard deviation of two or three replications for PACl and three or four replications for alum. Values for FeCl₃ were determined from one experiment. Coagulant dose was 40 µM-Al or -Fe.

significance ($P = 0.06$) was observed for Q β (40 µM-Al) and MS2 (60 µM-Al). Accordingly, a PACl dose of 40 µM-Al is recommended to remove the model viruses in the present coagulation process. Similar trends were observed when alum and FeCl₃ were used as the coagulant (data not shown).

To investigate the effect of coagulant type on the removals of model viruses, the removal performances of the coagulation process with a coagulant dose of 40 µM-Al or -Fe were compared among rNV-VLPs, Q β , and MS2 after settling (Fig. 5). Because the optimal coagulation pH for FeCl₃ is generally lower than that for aluminum coagulants (American Water Works Association, 1990), the coagulation pH for FeCl₃ was adjusted to 5.8 and 6.3 (data not shown) as well as to 6.8. The coagulation processes with PACl and FeCl₃ (pH 5.8) obtained approximately 1-log₁₀ removals of rNV-VLPs. These removals are somewhat larger than those obtained with alum and FeCl₃ (pH 6.8) although no significant difference between PACl and alum was observed ($P > 0.05$). The efficacy of PACl for the removal of negatively charged colloids, including viruses, compared with that of alum is attributed to soluble polycationic species, which are abundant in PACl. Because the widely accepted mechanism of negatively charged colloid removal is by charge neutralization by soluble polycationic species such as Al₂(OH)₂⁴⁺, Al₃(OH)₄⁵⁺, and Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺ (Stewart et al., 2009), the difference in the abundances of polycationic species probably can explain the differences in the characteristics of the aluminum floc particles generated during the coagulation process between PACl and alum. In fact, Gregory and Dupont (2001) reported that aluminum floc particles formed with PACl are larger, stronger, and more readily separated by the settling process than those formed with alum. Accordingly, PACl could more effectively remove the rNV-VLPs than alum.

FeCl₃ (pH 5.8) also removed rNV-VLPs more effectively than alum in the present coagulation process. Rao et al. (1988) investigated the removal performance for hepatitis A virus and poliovirus during the coagulation process, and demonstrated that greater removals of both viruses were obtained with FeCl₃ than with alum. Chang et al. (1958) also reported effective removal of coxsackie virus with FeCl₃, and floc particles formed with FeCl₃ were more compact and settled more rapidly than those formed with alum. Therefore, the difference in the characteristics of the floc particles between FeCl₃ (pH 5.8) and alum led to the difference in rNV-VLP removal performances in the present coagulation process. However, FeCl₃ could not effectively remove rNV-VLPs at pH 6.8: the removal ratio of rNV-VLPs decreased as pH increased, with removal performance in the order pH 5.8 > 6.3 > 6.8. Abbaszadegan et al. (2007) and Mayer et al. (2008) investigated the effect of pH on the removal of five viruses, including FCV, during enhanced coagulation processes with FeCl₃; they reported that the removal ratios of these viruses were improved as pH decreased (optimum pH range 5–6). Our findings are consistent with these previous results.

The removal performance for Q β obtained with PACl was higher than that obtained with alum or FeCl₃. By comparison, approximately 2-log₁₀ removals of MS2 were achieved with all coagulant types except FeCl₃ (pH 6.8). Consequently, PACl more effectively removed the model viruses than alum or FeCl₃ in the present coagulation process. Additionally, it was difficult to remove the model viruses with FeCl₃ at pH 6.8, although the removal performances for rNV-VLPs and MS2 with FeCl₃ at pH 5.8 were equal to those with PACl.

Differences in the removal performances among rNV-VLPs, Q β , and MS2 were observed in the coagulation process: although the removal ratio of Q β was similar to that of rNV-VLPs at a coagulant dose of 40 μM -Al or -Fe, the removal ratio of MS2 was approximately 1- \log_{10} larger than that of rNV-VLPs (Fig. 5). In general, the surface charge on virus particles is often invoked to explain virus removal by physicochemical water treatment processes, including coagulation processes (Matsushita et al., 2004): more negatively charged viruses may resist aggregation, with the result that they are more difficult to destabilize and aggregate by charge neutralization during the coagulation process than less negatively charged viruses. However, rNV-VLPs were less negative than Q β or MS2 in the filtered river water at pH 6.8 (Fig. 6), a result that is not in accordance with a previous result in which rNV-VLPs were more negative than MS2 in a NaCl solution at around pH 7 (Redman et al., 1997), possibly owing to the difference in the electrolyte solution. The difference in electrophoretic mobility among the model viruses did not strongly affect removal performances in our study. We imagine that the differences in other characteristics of the model viruses, such as hydrophobicity, affected the removal performances of the coagulation process. Because the hydrophobic force contributes to the adsorption of protein on aluminum phosphate adjuvant (Al-Shakhshir et al., 1995), the difference in hydrophobicity among surface proteins of the model viruses might cause differences in the interaction between surface proteins and the floc particles generated during the coagulation process. Further investigation is needed.

Much discussion of possible surrogates for pathogenic waterborne viruses in the aquatic environment has not yet resulted in any overall agreement. MS2 has been widely used as a surrogate for pathogenic waterborne viruses in coagulation treatments (Nasser et al., 1995; Abbaszadegan et al., 2007; Mayer et al., 2008; Shirasaki et al., 2009), mainly because of its morphological similarities to those viruses. However, as

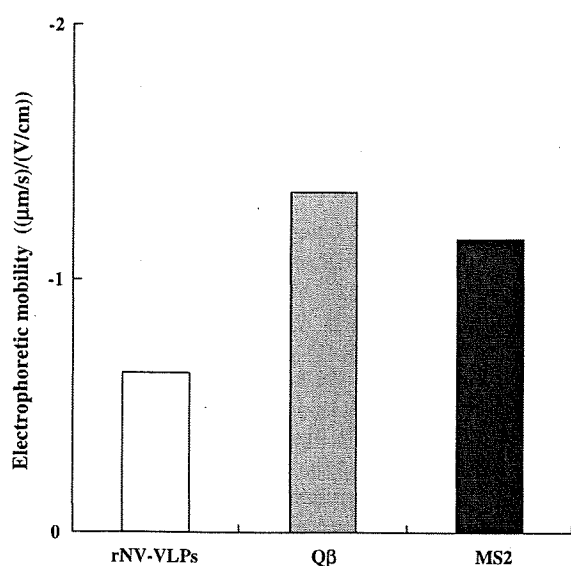


Fig. 6 – Electrophoretic mobility of rNV-VLPs, Q β , and MS2 in filtered river water.

described above, the removal performance for MS2 was approximately 1- \log_{10} larger than that for rNV-VLPs in the present coagulation process, meaning that the removal performances for native NV would be overestimated if MS2 were selected as a surrogate for native NV. Accordingly, MS2 is not recommended as an appropriate surrogate for native NV. By comparison, although the removal performance for Q β was similar to that for rNV-VLPs at a coagulant dose of 40 μM -Al or -Fe (Fig. 5), the removal performance for Q β was somewhat larger than that for rNV-VLPs at PACl dose of 60 μM -Al (Fig. 4). Therefore, Q β also is not recommended as an appropriate surrogate for native NV.

3.3. Simultaneous removal of rNV-VLPs and bacteriophages in the coagulation–rapid sand filtration process

Fig. 7 shows the removal ratios ($\log_{10}[C_{co}/C_{cs}] + \log_{10}[C_{rf}/C_{ri}]$) for model viruses in the coagulation–rapid sand filtration process with PACl at pH 6.8. Because the removal ratios of model viruses in the coagulation–rapid sand filtration process were almost constant during the filtration, the removal ratios in Fig. 7 are represented by the averages of the values after 15 and 30 min filtration. Even though the rapid sand filtration process was introduced after the coagulation process, no removal ($<0.1\text{-}\log_{10}$) of rNV-VLPs or either bacteriophage was observed in the absence of a coagulant. Even with the PACl dose of 20 μM -Al, no removal was observed. In contrast, improvement of removal ratios of the model viruses were observed in the rapid sand filtration process at PACl doses of 40 and 60 μM -Al compared with the coagulation process alone (Fig. 4). Therefore, the entrapped model viruses in the suspended aluminum floc particles were effectively removed

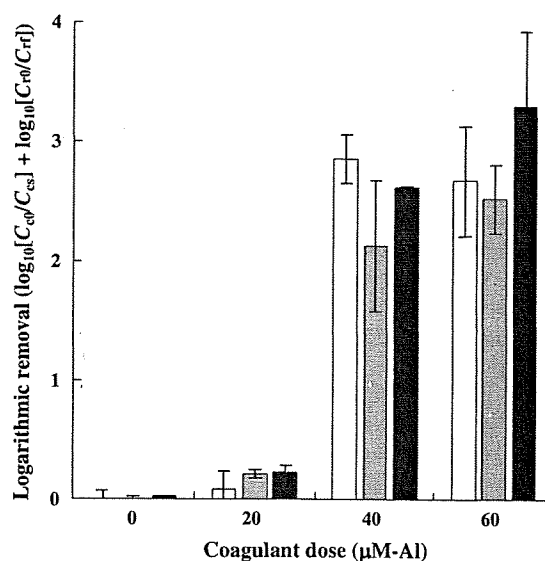


Fig. 7 – Effect of coagulant dose on rNV-VLP, Q β , and MS2 removals in the coagulation–rapid sand filtration process with PACl at pH 6.8. White, gray, and black columns represent rNV-VLPs, Q β , and MS2, respectively. Values are means and standard deviation of two or three replications.

by the subsequent rapid sand filtration process. Even mono-dispersed model viruses might have been adsorbed to the negatively charged sand surface by the electrostatic attractive force/van der Waals attractive force, because the surface charges of the model viruses probably changed from negative to neutral or positive by charge neutralization during the coagulation process. The removal ratio of rNV-VLPs was increased more by the introduction of the rapid sand filtration process than were those of Q β and MS2 at PACl doses of 40 and 60 μ M-Al: an approximately 2- \log_{10} improvement was obtained for rNV-VLPs, whereas approximately 0.5- \log_{10} improvements were obtained for the two bacteriophages. In the sandy aquifer treatment process, many factors affect virus adsorption. Dowd et al. (1998) demonstrated that the larger bacteriophages PRD1 and PM2 (60–63 nm) show greater retardation than the smaller bacteriophages Q β , MS2, and ϕ X174 (24–27 nm). Our findings agree with this previous result: the removal ratio of rNV-VLPs (35.7 ± 3.2 nm) was larger than those of Q β and MS2 (24–26 nm), as described above. Accordingly, a difference in the particle diameter between rNV-VLPs and the two bacteriophages possibly affected the removal performance in the present rapid sand filtration process. In addition, Redman et al. (1997) reported that the removal ratio of less negatively charged rNV-VLPs was higher than that of more negatively charged ones owing to the reduction of electrostatic repulsive interactions between rNV-VLPs and the negatively charged sand surface. Although the electrophoretic mobility of rNV-VLPs and both bacteriophages after the coagulation process was not measured, a difference in the surface charge between rNV-VLPs and the bacteriophages after the coagulation process also might have affected removal performance in the present rapid sand filtration process.

Ultimately, the removal ratios of model viruses were only $<0.3\text{-}\log_{10}$ at a PACl dose of 20 μ M-Al, whereas, with a dose of 40 μ M-Al or more, the removals significantly ($P < 0.05$) increased to approximately 2–3- \log_{10} for rNV-VLPs, Q β , and MS2 in the present coagulation–rapid sand filtration process. Accordingly, a PACl dose of 40 μ M-Al is recommended to remove the model viruses in this coagulation–rapid sand filtration process. Similar trends were observed when alum and FeCl $_3$ were used as the coagulant (data not shown).

To investigate the effect of coagulant type on the removals of model viruses, the removal performances for rNV-VLPs, Q β , and MS2 were compared in the coagulation–rapid sand process between a 40 μ M-Al and a 40 μ M-Fe of coagulant dose (Fig. 8). The coagulation–rapid sand filtration process with PACl and FeCl $_3$ (pH 5.8) achieved approximately 3- \log_{10} removals of rNV-VLPs, whereas the removal ratios of rNV-VLPs obtained with alum and FeCl $_3$ (pH 6.8) were smaller; in particular, only a 0.5- \log_{10} removal was observed with FeCl $_3$ (pH 6.8). In addition, a significant difference between PACl and alum was observed ($P < 0.05$). By comparison, the removal ratio of Q β with FeCl $_3$ (pH 5.8) was the highest obtained, followed by those obtained with PACl, alum, and FeCl $_3$ (pH 6.8). A similar trend was observed with MS2. Consequently, FeCl $_3$ (pH 5.8) more effectively removed model viruses than PACl or alum in the present coagulation–rapid sand filtration process, although a decreased coagulation pH is required when FeCl $_3$ is used as the coagulant compared with the use of PACl or alum.

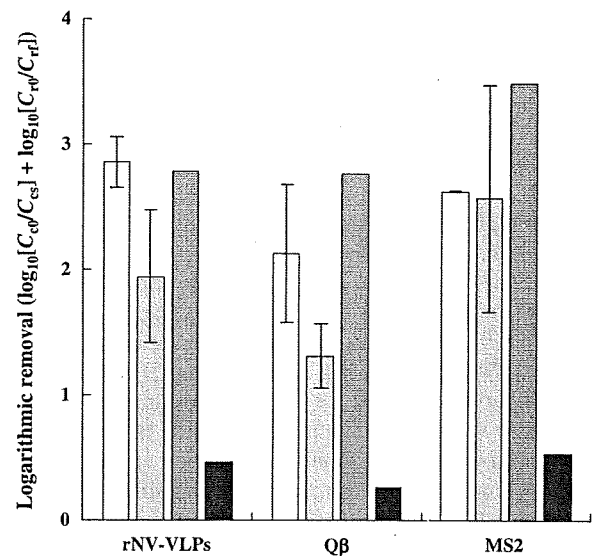


Fig. 8 – Effect of coagulant type on removal of rNV-VLPs, Q β , and MS2 in the coagulation–rapid sand filtration process. White, light gray, dark gray, and black columns represent PACl (pH 6.8), alum (pH 6.8), FeCl $_3$ (pH 5.8), and FeCl $_3$ (pH 6.8), respectively. Values are means and standard deviation of two or three replications for PACl and three or four replications for alum. Values for FeCl $_3$ were determined from one experiment. Coagulant dose was 40 μ M-Al or -Fe.

The removal performance for MS2 was somewhat larger than that for rNV-VLPs in the present coagulation–rapid sand filtration process. Accordingly, MS2 is not recommended as an appropriate surrogate for native NV. By comparison, the removal performance for Q β was similar to, or smaller than, that for rNV-VLPs at a coagulant dose of 40 μ M-Al or -Fe (Fig. 8). However, the removal performances for rNV-VLPs and Q β differed between each unit process, i.e., the coagulation process removed Q β rather than rNV-VLPs, while vice versa in the following rapid sand filtration process. Accordingly, Q β also is not recommended as an appropriate surrogate for native NV, even though its removal ratio in total unit process was similar to, or smaller than, that of rNV-VLPs at any condition. To propose appropriate surrogates, further investigation is needed.

According to the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) National Primary Drinking Water Standards (USEPA, 2001), enteric viruses must be removed or inactivated by 4- \log_{10} from source water by filtration, disinfection, or a combination of these technologies. This 4- \log_{10} removal ratio was not obtained for rNV-VLPs by the present coagulation–rapid sand filtration process alone. To achieve 4- \log_{10} removal or inactivation of native NV, further separation or disinfection processes will be required after coagulation–rapid sand filtration. On the other hand, virucidal activity of PACl during the coagulation process has been reported by our research group (Matsui et al., 2003; Matsushita et al., 2004; Shirasaki et al., 2009): an approximately 4- \log_{10} difference between the total (infectious + inactivated) concentration measured by real-time RT-PCR method and the infectious concentration

measured by the PFU method has been observed during the coagulation process (Shirasaki et al., 2009), indicating that some of the bacteriophages were probably inactivated by PACl. Because rNV-VLPs lack RNA, which is necessary for infection and replication in host cells, we cannot discuss the fate of infectivity of NV in the treatment process. If PACl exhibits virucidal activity for native NV as well as for bacteriophages, $>4\text{-log}_{10}$ removal (including inactivation) of native NV might be achieved during coagulation-rapid sand filtration.

4. Conclusions

- (1) Application of rNV-VLPs in laboratory-scale experiments enabled us to estimate the removal performance of the coagulation-rapid sand filtration process for NV as particles.
- (2) The coagulation-rapid sand filtration process with PACl and FeCl_3 (pH 5.8) at a coagulant dose of $40\ \mu\text{M}$ -Al or -Fe achieved approximately 3-log_{10} removals of rNV-VLPs—larger than those achieved with alum or FeCl_3 (pH 6.8).
- (3) The removal performance for MS2 was somewhat larger than that for rNV-VLPs in the coagulation-rapid sand filtration process. Accordingly, MS2 is not recommended as an appropriate surrogate for native NV. By comparison, the removal performance for Q β was similar to, or smaller than, that for rNV-VLPs. However, the removal performances for rNV-VLPs and Q β differed between the coagulation process and the following rapid sand filtration process. Therefore, Q β also is not recommended as an appropriate surrogate for native NV.

Acknowledgements

We thank Masatoshi Okamoto, Norikazu Isoda (Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University), and Daisuke Tomabechi (Department of Global Epidemiology, Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University), who instructed us in the methods of electron microscopic analysis and CsCl density gradient analysis. This research was supported in part by a Grant-in-Aid for the Encouragement of Young Scientists (no. 19760368, 2007) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; a Grant-in-Aid (no. 19310801, 2007) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan; the Hokkaido University Clark Memorial Foundation (2007); and a Kajima Foundation Research Grant (2007).

REFERENCES

- Abbaszadegan, M., Mayer, B.K., Ryu, H., Nwachuku, N., 2007. Efficacy of removal of CCL viruses under enhanced coagulation conditions. *Environmental Science and Technology* 41 (3), 971–977.
- Adams, M.H., 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers, New York, pp. 450–454.
- Al-Shakhshir, R.H., Regnier, F.E., White, J.L., Hem, S.L., 1995. Contribution of electrostatic and hydrophobic interactions to the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine* 13 (1), 41–44.
- American Water Works Association, 1990. In: Pontius, E.W. (Ed.), *Water Quality and Treatment: a Handbook of Community Water Supplies*, fourth ed. McGraw-Hill, New York, pp. 300–305.
- Bae, J., Schwab, K.J., 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2), 477–484.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S.E., Hutson, A.M., Estes, M.K., 2003. The 3' end of Norwalk Virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology* 77 (21), 11603–11615.
- Cannon, J.L., Papafragkou, E., Park, G.W., Osborne, J., Jaykus, L.A., Vinjé, J., 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection* 69 (11), 2761–2765.
- Chang, S.L., Stevenson, R.E., Bryant, A.R., Woodward, R.L., Kabler, P.W., 1958. Removal of coxsackie and bacterial viruses in water by flocculation: 1. Removal of coxsackie and bacterial viruses in water of known chemical content by flocculation with aluminum sulfate or ferric chloride under various testing conditions. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 48 (1), 51–61.
- Daniels, N.A., Bergmire-Sweat, D.A., Schwab, K.J., Hendricks, K.A., Reddy, S., Rowe, S.M., Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Atmar, R.L., Glass, R.I., Mead, P., 2000. A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of Infectious Diseases* 181 (April), 1467–1470.
- Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., Corapcioglu, M.Y., 1998. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2), 405–410.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (8), 4538–4543.
- Engelberg-Kulka, H., Israeli-Reches, M., Dekel, L., Friedmann, A., 1979. Q β -defective particles produced in a streptomycin-resistant *Escherichia coli* mutant. *Journal of Virology* 29 (3), 1107–1117.
- Fankhauser, R.L., Monroe, S.S., Noel, J.S., Humphrey, C.D., Bresee, J.S., Parashar, U.D., Ando, T., Glass, R.I., 2002. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like Viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 186 (July), 1–7.
- Green, K.Y., Lew, J.F., Jiang, X., Kapikian, A.Z., Estes, M.K., 1993. Comparison of the reactivities of baculovirus-expressed recombinant Norwalk virus capsid antigen with those of the native Norwalk virus antigen in serologic assays and some epidemiologic observations. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (8), 2185–2191.
- Gregory, J., Dupont, V., 2001. Properties of flocs produced by water treatment coagulants. *Water Science and Technology* 44 (10), 231–236.
- Hashimoto, M., Roerink, F., Tohya, Y., Mochizuki, M., 1999. Genetic analysis of the RNA polymerase gene of caliciviruses from dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 61 (6), 603–608.
- Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Estes, M.K., 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *Journal of Virology* 66 (11), 6527–6532.

- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H.W., 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 299 (5612), 1575–1578.
- Kasuga, K., Tokieda, M., Ohtawara, M., Utagawa, E., Yamazaki, S., 1990. Small round structured virus associated with an outbreak of acute gastroenteritis in Chiba. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 43 (4), 111–121.
- Katayama, H., Shimazaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of virus concentration method using negatively charged membrane by alkaline elution after acid rinse. *Journal of Japan Society on Water Environment* 25 (8), 469–475 (in Japanese).
- Katayama, K., Hansman, G.S., Oka, T., Ogawa, S., Takeda, N., 2006. Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Archives of Virology* 151 (7), 1291–1308.
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvenoinen, E., Bonsdorff, C.H., 1999. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like Viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 180 (December), 1771–1776.
- Kuzmanovic, D.A., Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C., Krueger, S., 2003. Bacteriophage MS2: molecular weight and spatial distribution of the protein and RNA components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Structure* 11 (11), 1339–1348.
- Maeda, S., 1989. Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori*, and their use for expression of foreign genes in insect cells. In: Mitsuhashi, J. (Ed.), *Invertebrate Cell System Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 167–181.
- Matsui, Y., Matsushita, T., Sakuma, S., Gojo, T., Mamiya, T., Suzuoki, H., Inoue, T., 2003. Virus inactivation in aluminum and polyaluminum coagulant. *Environmental Science and Technology* 37 (22), 5175–5180.
- Matsushita, T., Matsui, Y., Inoue, T., 2004. Irreversible and reversible adhesions between virus particles and hydrolyzing precipitating aluminum: a function of coagulation. *Water Science and Technology* 50 (12), 201–206.
- Maunula, L., Miettinen, I.T., Bonsdorff, C.H., 2005. Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases* 11 (11), 1716–1721.
- 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. *Environmental Science and Technology* 42 (18), 6890–6896.
- Nasser, A., Weinberg, D., Dinoor, N., Fattal, B., Adin, A., 1995. Removal of hepatitis A virus (HAV), poliovirus and MS2 coliphage by coagulation and high rate filtration. *Water Science and Technology* 31 (5–6), 63–68.
- Nygård, K., Torvén, M., Ancker, C., Knauth, S.B., Hedlund, K.O., Giesecke, J., Andersson, Y., Svensson, L., 2003. Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 9 (12), 1548–1552.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1), 478–483.
- Parker, T.D., Kitamoto, N., Tanaka, T., Hutson, A.M., Estes, M.K., 2005. Identification of genogroup I and genogroup II broadly reactive epitopes on the norovirus capsid. *Journal of Virology* 79 (12), 7402–7409.
- Phan, T.G., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Yamamoto, A., Sugita, K., Takanashi, S., Okitsu, S., Ushijima, H., 2007. Genetic heterogeneity, evolution, and recombination in noroviruses. *Journal of Medical Virology* 79 (9), 1388–1400.
- Ramani, S., Kang, G., 2009. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. *Current Opinion in Infectious Diseases* 22 (5), 477–482.
- Rao, V.C., Symons, J.M., Ling, A., Wang, P., Metcalf, T.G., Hoff, J.C., Melnick, J.L., 1988. Removal of hepatitis A virus and rotavirus by drinking water treatment. *Journal American Water Works Association* 80 (2), 59–67.
- Redman, J.A., Grant, S.B., Olson, T.M., 1997. Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. *Environmental Science and Technology* 31 (12), 3378–3383.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Ohno, K., 2009. Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q β and MS2, during the coagulation process. *Water Research* 43 (3), 605–612.
- 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.
- Stewart, T.A., Trudell, D.E., Alam, T.M., Ohlin, C.A., Lawler, C., Casey, W.H., Jett, S., Nyman, M., 2009. Enhanced water purification: a single atom makes a difference. *Environmental Science and Technology* 43 (14), 5416–5422.
- Suzuki, T., Kanaya, T., Okazaki, H., Ogawa, K., Usami, A., Watanabe, H., Kadono-Okuda, K., Yamakawa, M., Sato, H., Mori, H., Takahashi, S., Oda, K., 1997. Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. *Journal of General Virology* 78 (12), 3073–3080.
- The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses. <http://phene.cpmc.columbia.edu/index.htm> (accessed 17.04.08).
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2003. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7), 3979–3985.
- Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2005. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research* 39 (15), 3650–3656.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2001. National Primary Drinking Water Standards, Office of Water. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA816-F-01-007.
- Utagawa, E.T., Takeda, N., Inoue, S., Kasuga, K., Yamazaki, S., 1994. 3'-Terminal sequence of a small round structured virus (SRSV) in Japan. *Archives of Virology* 135 (1–2), 185–192.
- Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346 (2), 312–323.

遺伝子組換えノロウイルス外套タンパク粒子 (rNV-VLPs)を用いた ヒトノロウイルスの浄水処理性評価

白崎 伸隆^{1*}・松下 拓¹・松井 佳彦¹・
大芝 淳¹・浦崎 稔史¹・大野 浩一¹

¹北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻 (〒060-8628北海道札幌市北区北13条西8丁目)

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

本研究では、細胞培養系が確立されていないヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を、ヒトノロウイルスの外殻タンパク粒子 (rNV-VLPs) を用いることによって評価した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられている大腸菌ファージQ β 、MS2との処理性比較を行った。凝集沈澱処理におけるrNV-VLPsの除去率は、40 μ M-Alのポリ塩化アルミニウム (PACl) 添加濃度を用いた場合、約1 logであった。また、得られたrNV-VLPsの除去率は、MS2の除去率よりも低く、Q β の除去率と同程度であった。従って、MS2に比べてQ β がヒトノロウイルスの凝集沈澱処理性を検討する際の指標と成り得る可能性が示唆された。

Key Words : bacteriophages, drinking water treatment, ELISA, norovirus, virus-like particles

1. はじめに

近年、その感染事例が世界中で年々増加しているヒトノロウイルスに代表される水系感染症を引き起こす可能性のあるウイルスは100種以上を数える¹⁾。これら病原性ウイルスの中でも、ヒトノロウイルスを含むカリシウイルス科のウイルスおよびピコルナウイルス科のA型肝炎ウイルスは、将来水道水質基準に組み込むべき項目として米国環境保護局 (U.S.EPA) の汚染物質候補リスト (Contaminant Candidate List 3) に挙げられている²⁾。A型肝炎を引き起こすA型肝炎ウイルスは、細胞培養系が確立されているため、古くから様々な浄水処理実験が行われており³⁾、数多くの知見が蓄積されている。その一方で、非細菌性急性胃腸炎を引き起こすヒトノロウイルスに関しては、未だ効率的な細胞培養系が確立されていないため⁴⁾、添加実験による浄水処理性の検討を行うために必要なウイルス量を確保することが極めて困難であり、また、塩素等の消毒処理における処理性、すなわち感染力価の低下を定量することもできない。そのため、培養可能な病原性ウイルスと比べて浄水処理性の検討がほとんどなされていないのが現状である。こういった問題から、同じカリシウイルス科に属し、細胞培養系が確立さ

れているマウスノロウイルス⁷⁾、ネコカリシウイルス⁸⁾、イヌカリシウイルス¹⁰⁾等がヒトノロウイルスの代替指標として提案され、主に塩素、オゾン、紫外線照射といった消毒処理実験に使用されている。しかしながら、これら代替ウイルスとヒトノロウイルスとの間に、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。

その一方で、ヒトノロウイルスRNAの構造タンパク質領域をバキュロウイルスに取り込み、昆虫細胞で発現させることによって、ヒトノロウイルスの外殻タンパク粒子 (rNV-VLPs: recombinant Norovirus-Virus Like Particles) を多量に得る技術が確立されている¹³⁾。rNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと構造的あるいは抗原的に等しいため¹⁴⁾、抗原・抗体反応を利用したELISA (酵素免疫測定法) によるヒトノロウイルスの定量法も確立され¹⁵⁾、培養法に頼らないヒトノロウイルス粒子の簡便かつ迅速な検出が可能となった。

本研究では、このrNV-VLPsを用いることで、これまでほとんど明らかにされてこなかったヒトノロウイルス粒子の物理的な浄水処理性について詳細に検討することを目的とし、凝集沈澱処理における処理性を評価した。また、病原性ウイルスの代替指標として広く用いられて

いる大腸菌ファージQ β , MS2との処理性比較も行い、これら大腸菌ファージのヒトノロウイルス粒子に対する代替指標としての可能性を検討した。なお、先にも記述したように、rNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと構造的あるいは抗原的に等しいため、表面電位など浄水処理性に大きく寄与するであろう特性も同等と考えられる。また、内部にRNAを持たず感染性がないため、特別な施設を必要とせず安全にヒトノロウイルス粒子の浄水処理性について検討することが可能となる。

これまで、rNV-VLPsを土壌浸透の研究に使用した例¹⁶⁾はあるが、水処理分野に応用した例はない。従って、本研究は、ヒトノロウイルスの浄水処理性評価にrNV-VLPsを使用した世界で初めての試みである。

2. 実験方法

(1) 使用したrNV-VLPs, 大腸菌ファージ

a) rNV-VLPsの作成, 精製, 定量法

本研究では、我が国で分離されたヒトノロウイルス (Chiba virus, Genogroup I, AB042808) の外套タンパクを組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成し、実験に使用した。

Chiba virusは直径約38 nmの正20面体構造を有しており、一本鎖RNA (7,697 bases) を遺伝子として持つ¹⁷⁾。rNV-VLPsの作成に先立ち、RNAの構造タンパク質領域であるORF (Open Reading Frame) 2, ORF3および非翻訳領域である3'UTR (Untranslated Reasion) の5,346-7,697 bases部分 (2,352 bases) の両末端に制限酵素認識部位 (*EcoRI*および*PstI*) を付加した2,422 basesからoligo DNAを合成し、連結、伸長させることで二本鎖DNA全長断片 (人工合成遺伝子断片) を作成した。これをGateway BP反応によりドナーベクターpDONR221 (Invitrogen) にクローニングした後、改めてトランスファーベクターpMONHT4 (片倉工業) に挿入した。得られたpMONHT4とバキュロウイルスとをカイコ細胞 (BmN細胞, 片倉工業) に同時挿入することにより遺伝子組換えバキュロウイルスを作成し、新たに遺伝子組換えバキュロウイルスをカイコ (*Bombyx mori*, 片倉工業) に感染させることでChiba virusのrNV-VLPsを発現させた。

rNV-VLPsを発現したカイコを磨砕処理した後、遠心分離し、上清をニッケルカラムを用いて精製した。その後、透析処理を行い、Milli-Q水にバッファー置換することでrNV-VLPsの高濃度保存液を得た。なお、ニッケルカラムによるrNV-VLPsの精製に先立ち、発現タンパク質にHisタグの導入を行った。精製後のHisタグの切り離しは行っていないが、導入したHisタグの分子量 (約1

kDa) は、rNV-VLPsを構成する発現タンパク質 (約58 kDa) に比べて非常に小さいため、HisタグがrNV-VLPの凝集沈澱処理性に影響する可能性は極めて小さいと考えられた。

rNV-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抗原キット (NV-AD II, デンカ生研) を用い、ELISAにより行った。なお、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 (MTP-300, コロナ電気) を用いた。

b) 大腸菌ファージの培養, 精製, 定量法

本研究では、(独) 製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジー分野 生物遺伝資源部門 (NBRC) から分譲された大腸菌ファージQ β (NBRC 20012) およびMS2 (NBRC 102619) を使用した。レビウイルス科に属する大腸菌ファージQ β およびMS2は、直径約24 nmの正20面体構造を有しており、一本鎖RNAを遺伝子として持つ¹⁸⁾。この構造がA型肝炎ウイルスやポリオウイルスと類似しているため、水系感染症ウイルスの代替指標として広く用いられている。なお、大腸菌ファージQ β の外套タンパクの疎水性は、MS2の外套タンパクに比べて高いことが知られている¹⁹⁾。

大腸菌ファージは、F繊毛大腸菌 (NBRC 13965) を用いて37°Cのシェイキングバス内にて22-24時間振とう培養した後、2,000 \times gにて10分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルター (膜孔径 0.45 μ m, 酢酸セルロース, Advantec) にて滅菌ろ過することにより高濃度保存液を得た。得られた高濃度保存液中の有機物の持ち込みを低減させるため、実験に先立ち、遠心式フィルターユニットAmicon Ultra-15 (分画分子量 100,000, 再生セルロース, Millipore) を用いて、12 mLの高濃度保存液を5,000 \times gにて20分間遠心濃縮し、得られた約100 μ Lの濃縮液に12 mLのMilli-Q水を加えることでバッファー置換した。

大腸菌ファージQ β およびMS2の定量には、ブラック形成法およびリアルタイム定量RT-PCR法を用いた。なお、ブラック形成法は、Adams²⁰⁾の方法に従って行った。一方、リアルタイム定量RT-PCR法においては、QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) を用いて大腸菌ファージのRNAを抽出し、これをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems) を用いて逆転写させ、cDNAを合成した。このcDNAをTaqMan Universal PCR Master Mix with UNG (Applied Biosystems), プライマー (最終濃度 400 nM, タカラバイオ), プローブ (最終濃度 250 nM, Applied Biosystems), Distilled waterと混合した後、ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) に供した。本研究

表-1. プライマーとプローブの塩基配列

Coliphage		Oligonucleotide sequences	Positions	References
Q β	Forward primer	5'-TCA AGC CGT GAT AGT CGT TCC TC-3'	49-71	21)
	Reverse primer	5'-AAT CGT TGG CAA TGG AAA GTG C-3'	187-208	
	TaqMan probe	5'-CGA GCC GCG AAC ACA AGA ATT GA-3'	147-169	
MS2	Forward primer	5'-GTC GCG GTA ATT GGC GC-3'	632-648	22)
	Reverse primer	5'-GGC CAC GTG TTT TGA TCG A-3'	690-708	
	TaqMan probe	5'-AGG CGC TCC GCT ACC TTG CCC T-3'	650-671	

で使用したプライマーおよびプローブの塩基配列を表-1に示す。なお、PCR反応は、50°Cで2分間および95°Cで10分間の加熱を行った後、95°Cで15秒間と60°Cで1分間から成るサイクルを40回繰り返した。なお、本研究で行ったブラック形成法には、大腸菌ファージQ β およびMS2の宿主であるF絨毛大腸菌(NBRC 13965)を用いたため、後述する同時添加試料中のQ β およびMS2濃度を判別定量することができなかった。そのため、判別定量が可能なリアルタイムRT-PCR定量法にて同時添加試料中のQ β およびMS2濃度を定量した。

(2) 凝集沈殿処理実験

本研究では、回分式凝集沈殿処理によるrNV-VLPs、大腸菌ファージの処理性を評価した。精製したrNV-VLPsを 10^{11} VLPs/mL、大腸菌ファージQ β およびMS2を 10^8 PFU/mLになるように同時添加した北海道札幌市豊平川河川水(札幌市水道局藻岩浄水場原水: pH 7.2, DOC 0.8 mg/L, OD₂₆₀ 0.019 cm⁻¹, 濁度 0.6 NTU, アルカリ度 172 mg-CaCO₃/L)を原水とし、ビーカーに400 mL添加した。ここに、凝集剤としてポリ塩化アルミニウム (PACl, 多木化学), 硫酸バンド (Alum, 多木化学), 塩化第二鉄 (FeCl₃, 和光純薬) のいずれかを20 μ M (0.54 mg-Al/L or 1.12 mg-Fe/L), 40 μ M (1.08 mg-Al/L or 2.24 mg-Fe/L), 60 μ M (1.62 mg-Al/L or 3.36 mg-Fe/L) になるように添加し、直ちにHClもしくはNaOHにてpHを5.8あるいは6.8に調整した。これを攪拌翼を用いてG値200 s⁻¹にて2分間急速攪拌, 20 s⁻¹にて28分間緩速攪拌し, 20分間静置した。なお、静置後のpH変化が最大で0.2程度であったため、凝集反応時のpH調整は行わなかった。試料は、原水、急速攪拌後、緩速攪拌後、静置後に採取し、rNV-VLPsあるいは大腸菌ファージの濃度を定量した。

(3) 電子顕微鏡観察

作成したrNV-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透過型電子顕微鏡観察を行った。精製したrNV-VLPs溶液10 μ Lをコロジオン膜貼付銅製グリット (400メッシュ, 日新EM) に添加し, 1分間静置することでrNV-VLPsをグリットに吸着させた。余剰のrNV-VLPs溶液をろ紙を用いてグリット上から排除した

後, 染色液として2%リンタングステン酸 (pH 5.5) 10 μ Lをグリットに添加し, 45秒間静置することでグリット上のrNV-VLPsを染色した。余剰の染色液をろ紙を用いてグリット上から排除した後, グリットを透過型電子顕微鏡 (TEM, H-7650, 日立ハイテク) に供し, rNV-VLPsの構造を観察した。

(4) 塩化セシウム平衡遠心法

作成したrNV-VLPsの比重を測定するために、塩化セシウム平衡遠心法を行った。滅菌済み塩化セシウム溶液 (1.6 g/cm³) をMilli-Q水にて段階希釈し, 1.2-1.6 g/cm³の塩化セシウム溶液を作成した。なお, rNV-VLPsは, 1.2 g/cm³の塩化セシウム溶液に 10^{12} VLPs添加した。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, 冷却超遠心機 (CP80MX, 日立工機) に供し, 100,000 \times gにて18時間超遠心を行った。その後, 試料をシリンジを用いて約1 mLずつに分画し, 各画分のrNV-VLPs濃度を定量した。また, 各画分の比重を電子天秤 (AG245, メトラー・トレド) を用いて秤量した。

(5) 電気移動度測定

河川水中におけるrNV-VLPsおよび大腸菌ファージQ β , MS2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。分画分子量100,000のUF膜 (YM-100, 再生セルロース, Millipore) にてろ過した豊平川河川水を, HClを用いてpH 6.8に調整した後, 精製したrNV-VLPsを 10^{10} VLPs/mL, あるいはQ β , MS2を 10^{10} PFU/mLになるように添加した。これらの試料の電気移動度をレーザーゼータ電位計 (Zetasizer Nano ZS, Malvern) にて測定した。

3. 結果と考察

(1) ELISAによるrNV-VLPsの定量

ELISAによるrNV-VLPsの定量範囲を把握するため、作成したrNV-VLPsの高濃度保存液 (濃度既知) を豊平川河川水を用いて 10^6 - 10^{11} VLPs/mLに希釈した後, ELISAにより定量した。結果を図-1に示す。図より, $10^{7.5}$ VLPs/mL以下の濃度および $10^{10.5}$ VLPs/mL以上の濃度にお

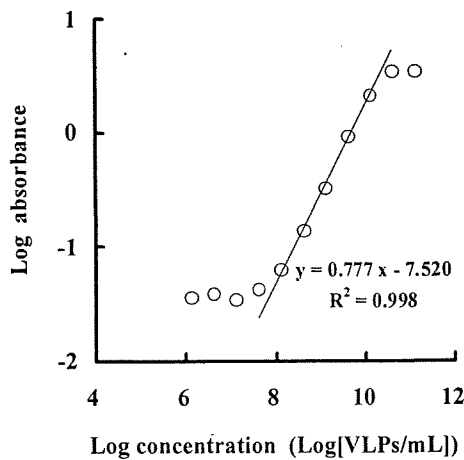


図-1. ELISAによるrNV-VLPsの検量線

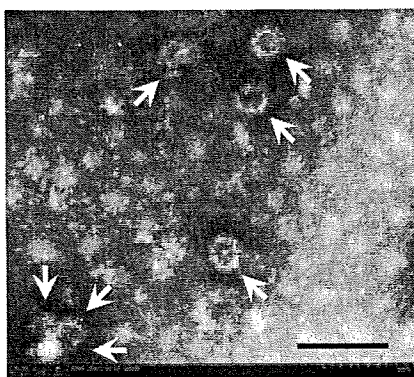


図-2. 作成したrNV-VLPsの電子顕微鏡写真:
Scale bar 100 nm

いては、濃度依存性なく吸光度は同程度であった。従って、本研究で使用したヒトノロウイルス検出キットでは、 10^8 - 10^{10} VLPs/mLの濃度範囲においてrNV-VLPsの定量が可能であると判断された。また、図に示すように、 10^8 - 10^{10} VLPs/mLの濃度範囲においてrNV-VLPs濃度と吸光度の間に高い直線性が得られた。以上の結果から、作成したrNV-VLPsは、野生のヒトノロウイルスと同等の抗原性を有し、ELISAによって定量することが可能であると判断された。なお、 10^{10} VLPs/mLを超える試料においては、豊平川河川水にて適宜希釈した後にELISAによって定量した。

(2) 発現したrNV-VLPsの基本特性

組換えバキュロウイルスとカイコを用いたタンパク質発現法によって作成したrNV-VLPsの電子顕微鏡写真を図-2に示す。図より、粒子状に自己組織化されたrNV-VLPs (矢印にて表示) が確認された。また、観察されたrNV-VLPsの中から10粒子を無作為に抽出し、写真上

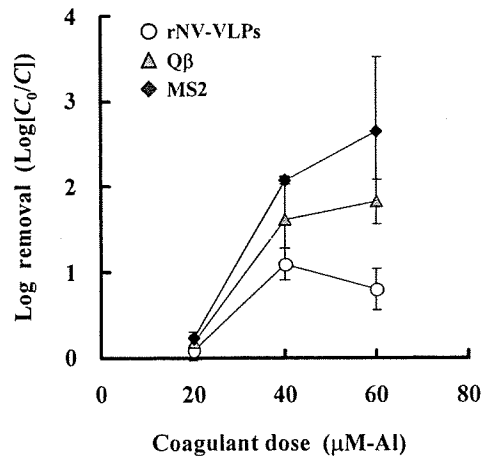


図-3. PACIを用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率: pH 6.8, 各値は2-3回の実験結果の平均値と標準偏差にて表示

で直径を測定したところ、 $35.7 \text{ nm} \pm 3.2 \text{ nm}$ 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)¹⁷⁾と同程度であった。

加えて、塩化セシウム平衡遠心法を行った結果、作成したrNV-VLPsの比重は 1.28 g/cm^3 であった。この比重は、RNAを持たない分わずかに小さいものの、野生のヒトノロウイルスの比重 (1.36 - 1.37 g/cm^3)²⁰⁾と同程度であると判断された。また、この値は、既往のrNV-VLPsの比重 (1.27 - 1.31 g/cm^3)^{13,20)}と同程度であった。以上の結果から、作成したrNV-VLPsの構造は野生のヒトノロウイルスと同等であると判断された。

(3) PACIによる凝集沈澱処理

凝集剤としてPACIを用いた場合の凝集沈澱処理後 (静置後) のrNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率を図-3に示す。なお、図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 : 原水のrNV-VLP濃度、あるいは大腸菌ファージ濃度、 C : 処理水のrNV-VLP濃度、あるいは大腸菌ファージ濃度) にて表記し、大腸菌ファージ濃度はリアルタイム定量RT-PCR法にて定量した。図より、 $20 \mu\text{M-Al}$ のPACI添加濃度において、rNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率はそれぞれ0.2 log以下であったのに対し、PACI添加濃度を上げることにより、rNV-VLPs、Qβ、MS2共に除去率が向上し、 $40 \mu\text{M-Al}$ 以上のPACI添加濃度では約1-2 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs、Qβ、MS2の除去率を比較すると、rNV-VLPsの除去率は、いずれのPACI添加濃度においてもQβ、MS2の除去率よりも低くなった。

凝集処理性に影響を与える因子の一つと考えられる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ところ、rNV-VLPs、Qβ、MS2の電気移動度はそれぞれ -0.630 、 -1.344 、 $-1.160 (\mu\text{m/s})/(\text{V/cm})$ となり、rNV-VLPsの

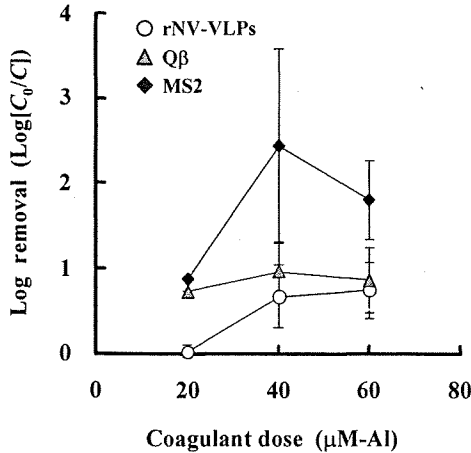


図-4. Alumを用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs, QB, MS2の除去率: pH 6.8, 各値は1-4回の実験結果の平均値と標準偏差にて表示

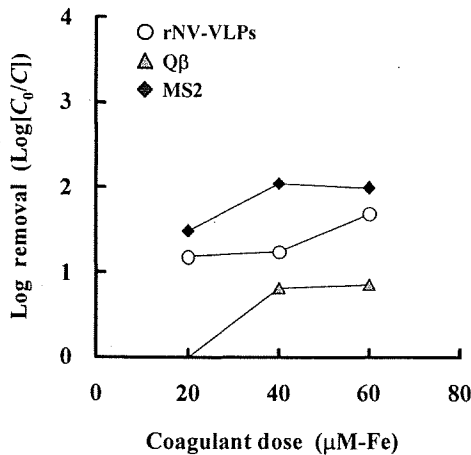


図-5. FeCl₃を用いた凝集沈澱処理におけるrNV-VLPs, QB, MS2の除去率: pH 5.8, 各値は1回の実験結果

電気移動度の絶対値はQB, MS2に比べて小さかった。電気移動度の絶対値が小さい粒子は、粒子間の電氣的反発力が小さいため、凝集剤の添加により容易に凝集すると考えられるが、rNV-VLPsの除去率は、QB, MS2の除去率よりも低くなった。従って、rNV-VLPsと大腸菌フエージの粒子径の違いや外殻タンパクの疎水性の違いなど、表面電位特性以外の因子も凝集処理性に寄与している可能性が考えられた。

(4) Alumによる凝集沈澱処理

凝集剤としてAlumを用いた場合の凝集沈澱処理後(静置後)のrNV-VLPs, QB, MS2の除去率を図-4に示す。図より、20 μM-AlのPACI添加濃度において、rNV-VLPs,

QB, MS2の除去率はそれぞれ0.0, 0.7, 0.9 logであったのに対し、Alum添加濃度を上げることにより、rNV-VLPs, QB, MS2共に除去率が向上し、40 μM-AlのAlum添加濃度ではそれぞれ0.7, 1.0, 2.4 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs, QB, MS2の除去率を比較すると、PACIを用いた場合と同様、rNV-VLPsの除去率は、いずれのAlum添加濃度においてもQB, MS2の除去率よりも低くなった。

凝集剤として約50 μM-AlのAlumを用いた既往の凝集沈澱処理研究⁵⁾においては、A型肝炎ウイルスで0.9 log, ポリオウイルスで0.2 log, MS2で0.3 logの除去率が得られている。既往研究において、MS2の除去率がA型肝炎ウイルスの除去率よりも低く、ポリオウイルスの除去率と同程度であったことを考慮すると、Alumを用いた凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsはA型肝炎ウイルスやポリオウイルスに比べて除去し難い可能性が考えられた。

(5) FeCl₃による凝集沈澱処理

凝集剤としてFeCl₃を用いた場合の凝集沈澱処理後(静置後)のrNV-VLPs, QB, MS2の除去率を図-5に示す。なお、一般的なFeCl₃の最適凝集pHは、PACIやAlumに比べて低いことが知られているため²⁹⁾, pH 5.8において凝集沈澱処理実験を行った。図より、20 μM-FeのPACI添加濃度において、QB, MS2の除去率はそれぞれ0.0, 1.5 logであったのに対し、FeCl₃添加濃度を上げることにより、QBおよびMS2の除去率は向上し、40 μM-FeのFeCl₃添加濃度ではそれぞれ0.8, 2.0の除去率が得られた。一方、rNV-VLPsの除去率は、20 μM-FeのFeCl₃添加濃度において1.2 logであり、FeCl₃添加濃度を40 μM-Feに上げた場合であっても除去率は向上しなかったものの、60 μM-FeのFeCl₃添加濃度では1.7 logの除去率が得られた。また、rNV-VLPs, QB, MS2の除去率を比較すると、PACIやAlumを用いた場合と異なり、rNV-VLPsの除去率は、いずれのFeCl₃添加濃度においてもQBの除去率よりも高くなり、MS2の除去率よりも低くなった。

本研究で用いた凝集剤添加濃度とは大きく異なるが、凝集剤として約250 μM-FeのFeCl₃を用いた既往の凝集沈澱処理研究 (pH 5-6)²⁹⁾においては、アデノウイルスで2.6 log, ネコカリシウイルスで2.5 log, MS2で2.3 logの除去率が得られている。既往研究において、MS2の除去率がアデノウイルス, ネコカリシウイルスの除去率よりも低かったことを考慮すると、FeCl₃を用いた凝集沈澱処理においては、rNV-VLPsはアデノウイルスやネコカリシウイルスに比べて除去し難い可能性が考えられた。

(6) 各凝集剤における除去率の比較

凝集剤添加濃度40 μMにおける凝集沈澱処理後(静置