

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04939

研究課題名（和文）環境中の感染性ノロウイルスの即時現場検出を実現する高感度アプタセンサー技術の創出

研究課題名（英文）Exploiting sensitive aptasensor technologies for rapid on-site detection of infectious norovirus in the environment

研究代表者

北島 正章 (Kitajima, Masaaki)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30777967

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,400,000円

研究成果の概要（和文）：環境中の感染性ノロウイルスの現場即時検出を実現する電気化学センサーの開発に関して、電気化学測定条件を最適化し、高感度にノロウイルスを検出できる電気化学測定条件を特定した。最適化した測定条件で、マウスノロウイルスに対して良好な直線性を示す検量線が得られた。また、マウスノロウイルスをモデルとして下水処理水中のウイルス検出への電気化学アプタセンサー技術の適用可能性を評価したところ、ウイルス濃度に応じた電流値の低下が認められた。本研究で開発した電気化学アプタセンサー技術をウイルス濃縮法と組み合わせることで、下水処理水中の1個/Lのノロウイルスを検出可能であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノロウイルスの感染リスクを抑制するためには、その存在を現場で迅速・高感度に検出し、許容レベル以上のノロウイルス汚染が認められた場合には即座に対策を講じる必要がある。本研究で開発した電気化学アプタセンサー技術は、アプタマー（人工機能性核酸）を検出対象に合わせて変更するだけで任意の病原ウイルスに適用可能であるため、今後、新型コロナウイルスを含むあらゆる病原ウイルスの検出技術に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, an electrochemical aptasensor for on-site detection of infectious norovirus in the environment was developed by optimizing the electrochemical measurement condition and identifying the measurement condition that enables sensitive norovirus detection. A standard curve with a good linear relationship between the electrochemical signal and murine norovirus concentration was obtained under the optimized measurement condition. Applicability of the electrochemical aptasensor technology to the detection of virus in treated wastewater was evaluated using murine norovirus as a model virus, which demonstrated a decrease of peak current depending on virus concentration. The results of this study indicated that our electrochemical aptasensor technology could detect norovirus of as low as 1 virus/L in treated wastewater in combination with a virus concentration method.

研究分野：環境工学

キーワード：ノロウイルス 感染性 アプタセンサー 下水 電気化学

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルス感染症は、現代においても十分には制御できていない社会的に重要な課題である。環境水試料中のノロウイルスの検出には分子生物学的手法 (PCR 法等) が主に使用されるが、(1)試料を実験室に持ち帰る必要があり、(2)試料採取から結果の判定までに時間を要し、(3)ウイルスの感染性を評価できないことが大きな欠点である。ノロウイルスによる水系感染リスクを抑制するためには、その存在を現場で迅速・高感度に検出し、許容レベル以上のノロウイルス汚染が認められた場合には即座に対策 (例えば水道の場合には取水停止や処理・消毒強化、親水の場合には遊泳禁止など) を講じることができる体制を整えることが理想である。

そこで研究代表者は、ノロウイルスの水系感染リスク抑制に貢献する技術として人工機能性核酸である DNA アプタマーを用いたバイオセンサー (アプタセンサー) に着目し、実用化のための研究開発に取り組んできた。センサーの小型・高感度化を実現するための技術として微小電気機械システム (MEMS, Micro Electro Mechanical Systems) に着目し、MEMS チップを基盤とした新規アプタセンサーの開発に成功している。アプタマーは、特徴的な立体構造をとることで標的に特異的に結合する人工機能性核酸 (DNA または RNA) であり、下記のような特長を備えているため抗体等に代わるバイオセンサーの標的認識分子として有望視されている: (1) 標的への高い結合力と特異性, (2) 熱安定・可塑性 (熱変性後再利用可能), (3) 化学分子修飾が容易, (4) 低コストでの合成が可能。また、アプタマーと標的分子との結合を電気シグナルに変換する手段として、迅速・高感度検出には電気化学測定が適しているとされる。以上の背景から、水環境中のノロウイルスを現場で監視するための電気化学アプタセンサー技術の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MEMS アプタセンサーの感染性ウイルスの選択的検出能と実環境試料中のノロウイルス検出への適用可能性を実証し、社会的ニーズに応えることである。本研究では、環境水中の感染性ノロウイルスの迅速・高感度検出のための MEMS アプタセンサーの開発と実用可能性の実証を目指し、具体的には以下の研究課題に取り組むこととした。

(1) MEMS アプタセンサーの作製と性能評価・測定条件最適化

本研究の大きな特色は、MEMS 技術を利用して、電気化学測定に必要な電極を搭載した小型チップを作製しセンサー基板として用いることである。この MEMS チップを用いることで電気化学測定の際の感度向上およびセンサーの小型化が可能となると期待できる。ヒトノロウイルスは細胞培養が極めて困難であるため、モデルウイルスとして培養可能なマウスノロウイルス (MNV) を使用し、作製したセンサーの性能 (感度・定量性・反応時間) を評価する。

(2) 感染性ウイルス粒子選択的検出能の評価

アプタマーはカプシド蛋白表面の立体構造を認識して結合することから、アプタセンサーは、カプシド蛋白に損傷がなく潜在的に感染性を有するウイルス粒子のみを選択的に検出 (すなわち感染リスクをより正確に評価) することができることと期待される。

(3) 環境試料に適用する際の測定条件の最適化と下水処理水中のノロウイルスの検出

MNV を添加した環境水試料を用いてイオン濃度や夾雑物による検出阻害や非特異反応などの測定結果への影響を明らかにした上で、環境水試料に適用する上での最適測定条件 (電極のブロッッキング方法や電気化学測定パラメータ等) を決定する。また、最適測定条件を用いて下水処理水中のノロウイルスの電気化学アプタセンサーによる検出を試みる。

3. 研究の方法

A) ウイルスと細胞

細胞培養が困難なヒトノロウイルスの代替として、細胞培養可能なマウスノロウイルス (MNV-1) を実験に使用した。MNV-1 を RAW264.7 細胞で培養後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、プラークアッセイにより感染価を測定した (10^6 PFU/ml)。

B) アプタマーの結合能評価

Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay (ELASA) により MNV-1 とアプタマーの結合能を確認した。アプタマーとして、MNV-1 および HuNV GII.4 2006b 株のそれぞれをリガンドとして開発された AG3 および M6-2 を使用した。

C) 電極の修飾

Screen printed gold electrode (SPGE, 作用電極: Au, 対極: Pt, 参照電極: Ag/AgCl) を電極として使用した。アプタマーの修飾は、 $1 \mu\text{M}$ アプタマー溶液を作用電極にのみ滴下し、 4°C で一晩静置して固定化した。その後、電極表面への非特異吸着を防ぐために、 $1 \mu\text{M}$ 6-Mercapto-1-hexanol (MCH) を電極表面に滴下して 4°C で 2 時間静置することで固定化した。

D) 電気化学測定

アプタマー修飾した SPGE にウイルス溶液を $100 \mu\text{l}$ 滴下した。室温で 30 分静置した後、 4 mV

M K₃[Fe(CN)₆] (酸化還元体) と 0.1 M NaCl (支持電解質) を含んだリン酸緩衝液が入った測定セルに SPGE を浸漬して、電気化学アナライザーを用いて矩形波ボルタンメトリー (SWV) 測定を行った。

E) 下水処理水への適用

MNV-1 を 1 L の創成川下水処理場の放流水に添加して、0 ~ 100 PFU/L の模擬環境試料を調製した。水試料を陽イオン吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法による 1 次濃縮に供した後に、Centriprep YM-50 (Millipore) を用いた 2 次濃縮を行った。

F) 不活化ノロウイルスの定量

ウイルスの不活化メカニズムに応じたアプタセンサーの反応を評価するために、塩素消毒あるいは UV 消毒を施した MNV-1 をアプタセンサーと PCR およびブラクアッセイによって測定し、残存率 (= 不活化処理後の測定値 / 不活化処理前の測定値) を算出した。アプタセンサーの測定値については、各試料における SWV ピーク電流値を検量線に代入して濃度を求めた。

塩素消毒: 10³ PFU/ml の MNV-1 (100ml) に対して、初期遊離塩素濃度 0.1 mg/L となるように NaClO 溶液を添加して室温で攪拌し、Ct 値 (mg/L · min) が 0 ~ 2.0 になるように所定時間経過後に 5 ml を採取し、速やかに Na₂S₂O₃ と混合して残留塩素を中和した。

UV 消毒: 10³ PFU/ml に調整した MNV-1 をシャーレに 3 ml 分注し、UV 照射装置 (波長: 254 nm, 照射強度: 4.5 mW/cm²) を用いて照射線量が 0, 10, 20, 40, 80, 200 mJ/cm² になるように UV 処理を行った。

G) ウイルス選択性試験

センサーの特異性を評価するため、MNV-1 以外の水中病原性ウイルスに対する反応性を調べた。ウイルスとして、コクサッキーウイルス (CA10, CB4), エンテロウイルス (EV71), ロタウイルス (HAL, MO), アデノウイルス (AD) の 6 種類を MNV-1 と同様に希釈してアプタセンサーによる測定に供した。

4. 研究成果

ELASA の結果より、AG3 と M6-2 の両方が MNV-1 に対して結合能を示すことが分かった (図 1)。M6-2 は HuNoV の幅広い株に対しても結合能を有することが報告されており、HuNoV と同じノロウイルス属に属する MNV-1 に対しても結合能を示したと考えられる。M6-2 は AG3 よりも結合能が高いと判断されたため、本研究では M6-2 をアプタマーとして使用した。

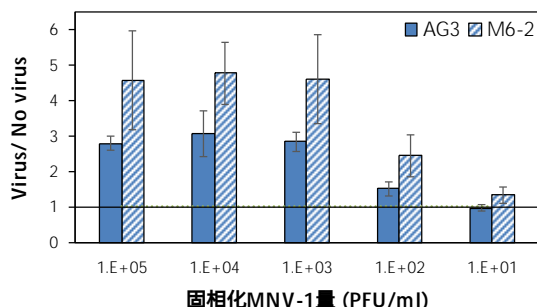


図 1 ELASA 結果 (縦軸はウイルス未添加試料に対するウイルス添加試料の比。1 以上で結合能を示す)

電気化学センサーの電極材質および支持電解質 (NaCl) 濃度を最適化するとともに、電気化学反応メディエーターとしての [Ru(NH₃)₆]Cl₃ の影響を評価し、最も高感度にノロウイルスを検出できる電気化学測定条件を特定した。ウイルス検出原理と本実験の概要を図 2 に示す。最適な測定条件は、作用電極としてスクリーンプリント金電極 (SPGE) を使用、1M NaCl を支持電解質とし、4mM K₃[Fe(CN)₆] を酸化還元体として使用する条件であることが明らかとなった。

この測定条件で、アプタマー修飾 SPGE に 0 ~ 10⁵ PFU/ml の MNV を滴下して SWV 測定を行ったところ、MNV 濃度に応じたピーク電流値の減少が確認された (図 3)。これは、MNV 濃度が増加すると、電極に固定化されたアプタマーが捕捉するウイルス粒子が増加し、流れる電流が減少したためである。すなわち、10¹ ~ 10⁵ PFU/mL の濃度範囲で良好な直線性を示す検量線が得られた。

下水処理水中のノロウイルス検出への電気化学アプタセンサー技術の適用可能性を評価するため、マウスノロウイルスを下水放流水に添加し、模擬環境水試料を作成した。この模擬環境水試料を陽イオン吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法による 1 次濃縮に供した後に、Centriprep YM-50 を用いた 2 次濃縮を行い濃縮した。この模擬ウイルス濃縮液を電気化学アプタセンサーによるマウスノロウイルスの検出に供したところ、下水処理水への添加ウイルス濃度に応じたピーク電流値の低下が認められた (図 4)。0 PFU/L と 1 PFU/L で電流値に差が認められたため、下水処理水中の 1 PFU/L の濃度の MNV を検出することに成功したと言える。本研究で開発した電気化学アプタセンサー技術をウイルス濃縮法と組み合わせることで、下水処理水中の 1 PFU/L のノロウイルスを検出可能であることを示唆する結果である。

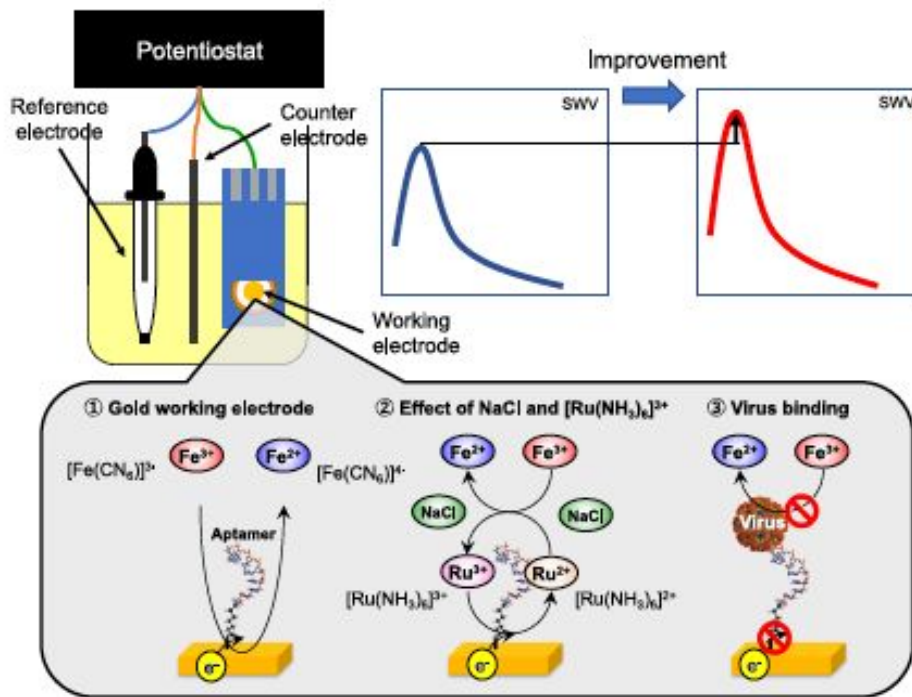


図 2 電気化学アプタセンサーによるウイルス検出原理と測定条件最適化実験の概要

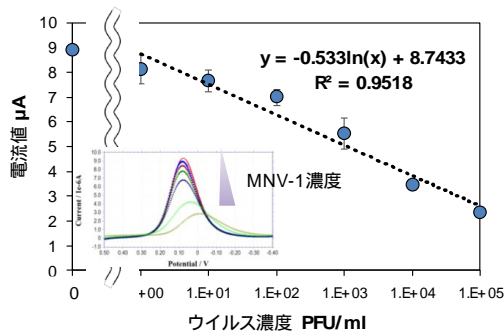


図 3 ウイルス濃度と SWV ピーク電流値との関係 (検量線)

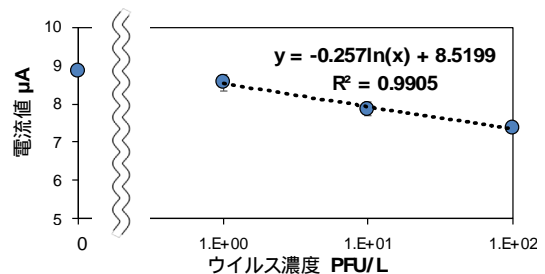


図 4 下水処理水中に添加した MNV の濃度と SWV ピーク電流値との関係

塩素消毒において、PCR では消毒強度を示す Ct 値に関わらず残存率はほぼ一定であったが、ブランクアッセイとアプタセンサーによる測定においては Ct 値が増加するにつれて残存率が低下した(図 5)。また、UV 消毒実験において、照射線量が増加するにつれてブランクアッセイにより測定した感染価は減少したが、アプタセンサーと PCR により測定した残存率は照射線量に関わらずほぼ一定であった(図 6)。これらの結果より、アプタセンサーの反応性は塩素消毒と UV 消毒の間の不活化メカニズムの違いを反映していると考えられる。すなわち、塩素消毒においてはまずカプシドが酸化損傷を受けることによって感染価を喪失するのに対し、UV 消毒においてはまず核酸が損傷を受けることで感染性を失う。アプタセンサーはカプシドを認識して検出するため、塩素消毒後の MNV-1 に対しては感染性の低下を反映した検出結果となるが、UV 消毒後の MNV-1 に対しては PCR と同様に感染性に関わらず検出してしまうため、不活化率を過小評価すると考えられた。

MNV-1 及び他の水中病原ウイルスを用いてアプタセンサーの選択性を調べた結果、MNV における SWV ピーク電流値低下が最も大きかった(図 7)。しかし、MNV 以外のウイルス(ロタウイルス MO 株を除く)に対してもピーク電流値低下が確認されたため、アプタマー-M6-2 が MNV-1 以外のウイルスを誤認識している可能性がある。

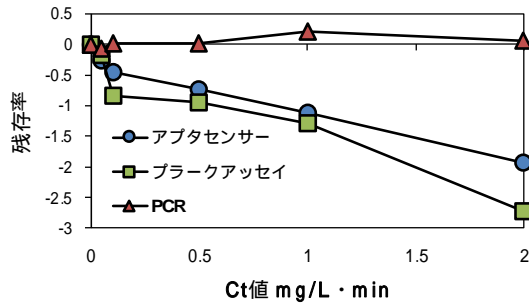


図 5 塩素消毒に伴う MNV の残存率の測定結果

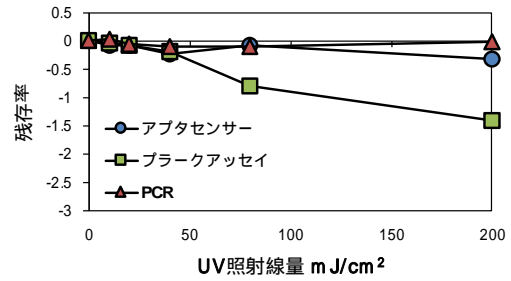


図 6 UV 消毒に伴う MNV の残存率の測定結果

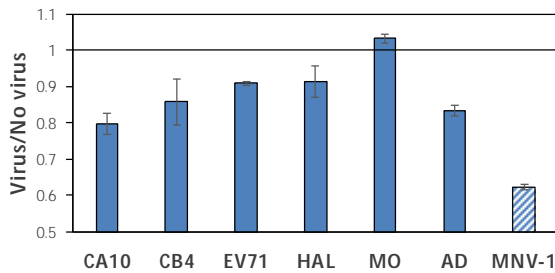


図 7 ウィルス選択性試験結果 (縦軸はウイルス未添加試料に対するウイルス添加試料の SWV のピーク電流値の比)

本研究では、アプタマー M6-2 を用いて MNV-1 に対する電気化学アプタセンサーを作製し、検量線を得ることに成功した。開発したアプタセンサーを用いて、模擬環境試料中に 1 PFU/L で存在する MNV を 30 分で測定することが可能であることを実証した。塩素および UV 消毒により不活化処理された MNV に対するアプタセンサーの反応性の違いを明らかにした。本研究では、環境中の感染性ノロウイルスの現場での迅速定量を実現するアプタセンサーの開発に向けた基礎的知見を得ることに成功したと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiya Hirano, Junki Saito, Tomoki Yukawa, Daisuke Sano, Akihiro Okamoto, Satoshi Okabe, Masaaki Kitajima	4. 巻 88
2. 論文標題 Improvement of Electrochemical Conditions for Detecting Redox Reaction of $K_3[Fe(CN)_6]$ toward the Application in Norovirus Aptasensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 205 ~ 209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5796/electrochemistry.20-00017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Masaaki Kitajima
2. 発表標題 Application of Biosensors for Water Quality Monitoring: An Overview
3. 学会等名 Singapore International Water Week（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯川智貴, 平野誠也, 真栄城正寿, 岡部 聡, 北島正章
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いたノロウイルス検出のための電気化学的アプタセンサーの開
3. 学会等名 第26回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北島正章
2. 発表標題 水環境中のウイルス
3. 学会等名 第26回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Kitajima, Seiya Hirano, Akihiro Okamoto, Daisuke Sano, Hisashi Satoh, Satoshi Okabe
2. 発表標題 Electrochemical and colorimetric DNA aptasensor technologies for rapid norovirus detection
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Kitajima
2. 発表標題 Electrochemical and colorimetric aptasensor technologies for rapid detection of viral contaminants in water
3. 学会等名 CENSAM 10th Annual Workshop
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平野誠也, 岡本章玄, 佐野大輔, 岡部 聡, 北島正章
2. 発表標題 水中病原ウイルスの高感度検出のための電気化学アプタセンサーの開発
3. 学会等名 第25回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北島正章
2. 発表標題 DNAアプタセンサー：ノロウイルスの迅速・高感度検出に適した新技術
3. 学会等名 平成29年度育志賞研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kitajima, M., Hirano, S., Satoh, H., Okabe, S.
2. 発表標題 Novel methods for rapid detection of viral pathogens in water
3. 学会等名 The 3rd International Forum on Asian Water Environment Technology (IFAWET) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitajima, M.
2. 発表標題 Virus removal by conventional wastewater treatment as monitored by qPCR
3. 学会等名 International Society for Food and Environmental Virology Conference 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitajima, M., Ohama, M., Sano, D., Okabe, S.
2. 発表標題 Specific detection of negative-strand viral RNA for determining norovirus infectivity
3. 学会等名 International Society for Food and Environmental Virology Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitajima, M.
2. 発表標題 Microbial risks in urban water cycle
3. 学会等名 2018 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kitajima, M., Ohama, M., Murakami, K., Sano, D., Okabe, S.
2. 発表標題 Determining Norovirus Infectivity Based on Specific Detection of Negative Strand Viral RNA
3. 学会等名 20th Symposium of the IWA-Health Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関