

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2018～2021
課題番号：18H03790
研究課題名（和文）培養に頼らないウイルスの浄水処理性評価手法と高効率浄水ウイルス処理システムの構築

研究課題名（英文）Developing cell-culture-independent evaluation method for elucidating virus removal during drinking water treatment and advanced treatments enabling efficient virus removal

研究代表者
松下 拓（Matsushita, Taku）
北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：30283401
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 33,800,000円

研究成果の概要（和文）：予め外来DNAを金ナノ粒子に修飾することにより、ノロウイルスVLPsにDNA封入することに成功した。作製したVLPsを用いた室内実験の結果、凝集-沈澱処理でのノロウイルスの除去率はPMMoVと同程度であることが分かった。一方、実浄水場における調査の結果、凝集-沈殿-砂ろ過でのPMMoVの除去率は0.9～2.7 logであった。従って、実浄水場におけるノロウイルスの除去率も0.9～2.7 log程度であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で構築した手法は、いかなる「培養困難な水系ヒト感染性ウイルス」に対しても適用可能であるため、これまで浄水処理性を調べることができなかった他の多くの培養困難な水系ヒト感染ウイルスの浄水処理性の評価が可能となり、大きな波及効果が期待できる。本研究の成果は、実処理場の技術者にも大きなインパクトを与えるとともに、ウイルスの水道水質基準への組み込みについての議論にも大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：DNA encapsulation in norovirus VLPs was successfully achieved by modifying foreign DNA onto gold nanoparticles in advance. Laboratory-scale experiments with the VLPs revealed that the removal of norovirus was comparable to that of PMMoV. Surveys at full-scale drinking water treatment plants showed that the removal of PMMoV during coagulation, sedimentation, and sand filtration processes was 0.9-2.7 logs, suggesting that the removal of native norovirus at the full-scale plants is expected to be 0.9-2.7 logs.

研究分野：水道工学

キーワード：土木環境システム ウイルス 浄水処理

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスやサポウイルスは、近年その感染事例が世界的に年々増加していることより、社会的に注目を集めている。さらには、定量に用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法の発展に伴い、環境水、下水、あるいは水道原水中からのこれらのウイルスの検出報告が相次いだことも、社会的注目を大きくした一因となっている。

このように、社会的に大きく注目されているにも関わらず、わが国の水道水質基準にはウイルスに関する基準がなく、制度の整備についての議論がようやく始まったところである。基準の策定の際、現有の処理法にてその基準が達成可能である必要があるが (達成法のない基準値は設定できない) 実浄水場におけるウイルスの処理性については知見がほとんどないのが現状である。これは、環境水中における水系ヒト感染性ウイルス濃度が極めて低く、処理水 (すなわち水道水) 中での濃度が検出下限値以下となるため、浄水処理にてどの程度の除去ができたのか (すなわち除去率) を算定することができないからである。

通常、微生物 (原虫、細菌、ウイルスなど) を用いた室内水処理実験を行う際には、実験に先立ち、対象微生物を培養し、大量のストックソリューションを作成する必要がある。ところが、ノロウイルスやサポウイルスは、これまで多くの努力が払われてきたにも関わらず、未だ細胞を用いた培養法が確立されておらず (2016年にノロウイルスが培養可能との論文が発表されたが、その手法は極めて困難であり、現段階では通常の方法による培養は極めて難しいと考えられる) ウイルスの大量培養ならびに添加実験が極めて難しい状況にあるのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、浄水処理性が全く分かっていない「培養困難」な水系ヒト感染性ウイルスの浄水処理性を、実浄水場におけるフィールド調査と室内実験を組み合わせることにより明らかにするものである。本研究の大きな特徴は、培養困難なウイルスの外套タンパク粒子 (VLPs) を遺伝子組み換え技術により発現させ、そこに臨床医学分野にて開発が進む非ウイルスベクター作製技術を応用して外来 DNA を封入することにより DNA 封入 VLPs を作製し、これを室内浄水処理実験に用いることにより、培養に頼らないウイルスの浄水処理性の評価法を創造することにある。このようなアプローチによるウイルス浄水処理性の評価はこれまで世界的に例がなく、極めてオリジナリティーの高いものである。

3. 研究の方法

3.1 DNA 封入 VLPs の作製

図1に、DNA 封入 VLPs の作製法を示す。

(1)還元剤添加により、ノロウイルス VLPs をいったんバラバラにした。(2)一方、金ナノ粒子と外来 DNA を修飾した複合体を作製した。(3)これらを混合したのち、塩化カルシウム添加により VLPs を再構成した。

また、作製した DNA 封入 VLPs の粒子形成状態を確認するため、透過型電子顕微鏡にて観察した。さらに、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にて比重を測定し、VLPs への遺伝子の封入を確認した。

3.2 室内実験による DNA 封入ノロウイルス VLPs と PMMoV の浄水処理性比較

白川浄水場 (札幌) 原水 4 L に、DNA 封入ノロウイルス VLPs を $10^{4.4}$ copies/mL、PMMoV を $10^{4.6}$ copies/mL となるように添加した。ここに凝集剤としてポリ塩化アルミニウムを 1.08 mg-Al/L となるように添加し、NaOH で pH を 7.0 に調整しつつ、急速攪拌 (G 値 200 s^{-1} で 1 分間) と緩速攪拌 G 値 20 s^{-1} で 10 分間) を行い、その後 60 分間静置した。凝集剤添加前の試料と、静置後の上澄み液を採取し、ノロウイルス VLPs と PMMoV の濃度を PCR 法にて定量した。

3.3 実浄水処理場における PMMoV の処理性の調査

凝集 - 沈殿 - 砂ろ過処理を行っている国内の 2 ヶ所の浄水場 A, B と、凝集 - MF 膜ろ過処理

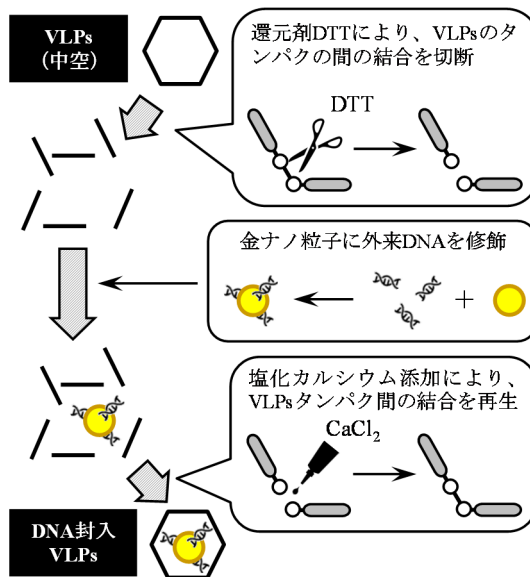


図1. VLPsへの外来DNAの封入

を行っている 2 か所の浄水場 C, D にて、原水と砂ろ過水あるいは MF 膜ろ過水を採取し、我々の研究グループで開発したナノセラム陽電荷膜法にて濃縮後に、PCR 法にて PMMoV 濃度を定量した。

4. 研究成果

4.1 DNA 封入 VLPs の作製とその確認

作製した DNA 封入ノロウイルス VLPs を電子顕微鏡で観察したところ、40 nm 程度の径を持つ粒子が生成されていることが確認された(図 2)。これは、野生のノロウイルスの粒子径である 38 nm と同程度であった。また、VLPs の中には金ナノ粒子が封入されていることも確認でき、あらかじめ金ナノ粒子に修飾した外来 DNA も VLPs に封入されている可能性が期待できた。

そこで、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法により封入作業後の試料の比重分布を調べたところ、ELISA 法によりタンパクとして定量した VLPs には 2 つのピーク(図 3, 赤丸)が存在することが分かった。一方、PCR 法により定量した DNA には 1 つのピークのみが確認され(黒菱形) そのピークはタンパクとして定量した VLPs の 2 つのピークのうちの一方と比重が一致した。このことより、タンパクとして定量した 2 つのピークのうち比重が小さい方は DNA が封入されなかった中空の VLPs であり、比重が大きい方は DNA が封入された VLPs であると判断された。すなわち、本研究で用いた手法により、外来 DNA を VLPs に封入することが可能であることが示された。

4.2 室内実験による DNA 封入ノロウイルス VLPs と PMMoV の浄水処理性比較

このようにして作製した DNA 封入ノロウイルス VLPs と PMMoV を用い、室内実験にて凝集沈澱処理における除去率を調べたところ、DNA 封入ノロウイルス VLPs の除去率は、PMMoV の除去率と同程度であることが分かった(図 4)。

4.3 実浄水処理場における PMMoV の処理性の調査とノロウイルスの処理性の推定

国内の 4 か所の浄水場にて PMMoV の処理性をそれぞれ複数回調べたところ、凝集 - 沈澱 - 砂ろ過処理では 0.9 ~ 2.7 log、凝集 - MF 膜ろ過処理では 0.7 ~ 2.9 log の除去率であった。3.2 の検討より、ノロウイルスの凝集 - 沈澱処理での除去率が PMMoV と同程度であったことから判断すると、凝集 - 沈澱 - 砂ろ過処理におけるノロウイルスの除去率も、0.9 ~ 2.7 log 程度であるのではないかと推定された。

4.4 本研究の結論

1. 予め外来 DNA を金ナノ粒子に修飾することにより、ノロウイルス VLPs に DNA 封入することに成功した。
2. 作製した DNA 封入ノロウイルス VLPs を用いた室内実験の結果、凝集 - 沈澱処理でのノロウイルスの除去率は PMMoV と同程度であることが分かった。
3. 実浄水場における調査の結果、凝集 - 沈澱 - 砂ろ過での PMMoV の除去率は 0.9 ~ 2.7 log であった。従って、実浄水場におけるノロウイルスの除去率も 0.9 ~ 2.7 log 程度であるのではないかと推察された。

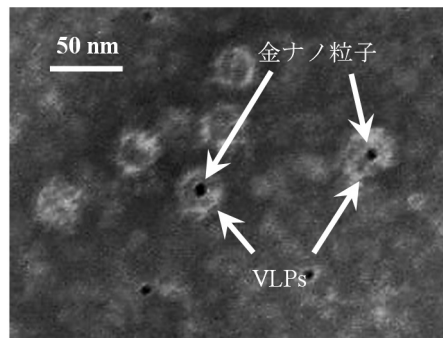


図2. DNA修飾した金ナノ粒子を封入後のVLPsの電子顕微鏡写真

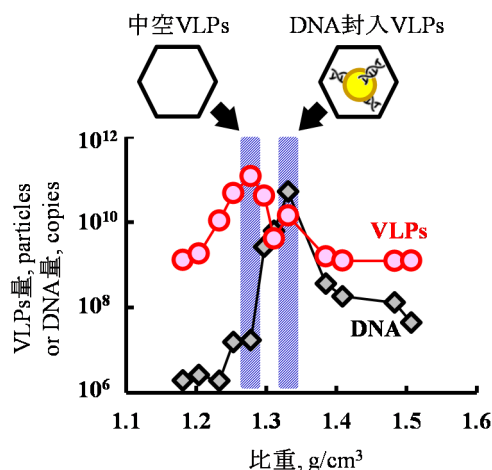


図3. 密度勾配遠心分離によるDNA封入VLPs作製の確認

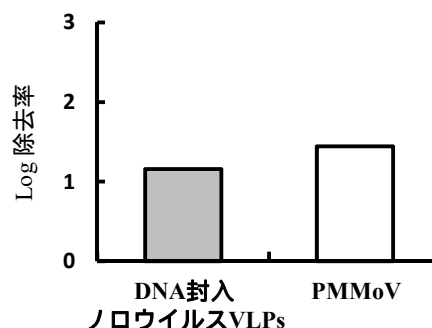


図4. 室内凝集沈澱処理でのDNA封入VLPsの処理性

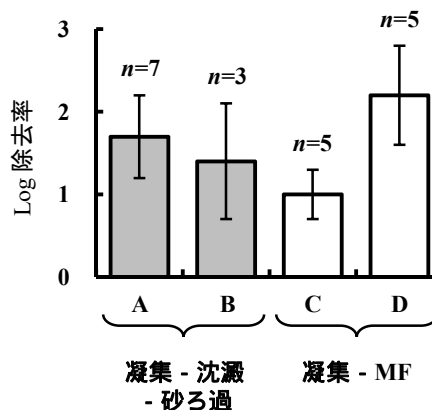


図5. 実浄水場におけるPMMoVの除去率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Koriki, S.	4. 巻 186
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 116409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2020.116409	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 -

1. 著者名 Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Yamashita, R., Matsumura, T. and Koriki, S.	4. 巻 213
2. 論文標題 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	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water Research	6. 最初と最後の頁 118160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.watres.2022.118160	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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shirakawa, D., Shirasaki, N., Matsumura, T., Koriki, S., Matsushita, T. and Matsui, Y.
2. 発表標題 Evaluation of virus reduction efficiency in coagulation-microfiltration by a full-scale study and lab-scale experiments
3. 学会等名 The Water and Environment Technology Conference 2020-Online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村拓哉, 白川大樹, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 低圧膜ろ過処理におけるウイルスの除去性：実浄水処理場における調査および室内添加実験の実施による評価
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白川大樹, 山下玲菜, 高力聡史, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 凝集沈澱-砂ろ過処理におけるウイルスの除去性 - 実浄水処理場における調査および室内添加実験の実施による評価 -
3. 学会等名 日本水道協会令和2年度全国会議 (水道研究発表会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白崎伸隆, 松村拓哉, 白川大樹, 高力聡史, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 膜ろ過浄水施設におけるウイルスの処理性評価: 陽電荷膜と限外ろ過膜を組み合わせたウイルス濃縮法の適用
3. 学会等名 第23回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shirakawa, D., Shirasaki, N., Yamashita, R., Koriki, S., Matsumura, T., Matsushita, T. and Matsui, Y.
2. 発表標題 Evaluation of virus removal efficiency in an actual drinking water treatment plant by using a novel virus concentration method and pepper mild mottle virus as a process indicator.
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 外来遺伝子を封入した人工合成ウイルス様粒子の創製: 培養困難なノロウイルスの浄水処理性評価への適用
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村拓哉, 高力聡史, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 凝集-膜ろ過処理を導入した実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価
3. 学会等名 第27回衛生工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 培養困難なウイルスの浄水処理性評価に向けた遺伝子封入ウイルス様粒子の創製
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 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 PMAxx-Enhancer-PCR 法による水道原水中の感染性ウイルスの選択的定量
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村拓哉, 高力聡史, 白川大樹, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 トウガラシ微斑ウイルスを挙動指標とした膜ろ過浄水施設におけるウイルスの処理性評価
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋大河, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 ウイルスの水道水質基準制定に向けた塩素処理の有効性評価: ヒト腸管系ウイルスおよびヒトコロナウイルスの不活化特性の把握
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qiuhan Hu, Daiki Shirakawa, Nobutaka Shirasaki, Hirotaka Takagi, Tomoichiro Oka, Taku Matsushita and Yoshihiko Matsui
2. 発表標題 Evaluating the efficacy of drinking water treatment processes to remove and inactivate human sapovirus: Application of in vitro cell-culture method
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shirakawa, D., Shirasaki, N., Yamashita, R., Matsumura, T., Koriki, S., Matsushita, T. and Matsui, Y.
2. 発表標題 Investigating virus reduction efficiencies in coagulation-sedimentation-rapid sand filtration or coagulation-microfiltration by a combination of full-scale studies and lab-scale experiments
3. 学会等名 IWA World Water Congress (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	松井 佳彦 (Matsui Yoshihiko) (00173790)	北海道大学・工学研究院・教授 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	白崎 伸隆 (Shirasaki Nobutaka) (60604692)	北海道大学・工学研究院・准教授 (10101)	

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