

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19760368

研究課題名（和文） ウイルス外套タンパク粒子を用いたノロウイルスの浄水処理性の検討

研究課題名（英文） Removal of norovirus during drinking water treatment: Application of recombinant virus-like particles

研究代表者

松下 拓 (MATSUSHITA TAKU)

北海道大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30283401

研究成果の概要：遺伝子組換え技術によりノロウイルス VLPs を発現させることに成功した。発現された VLPs を電子顕微鏡により観察することにより、その形状および大きさ (35.7 ± 3.2 nm) が野生のノロウイルス粒子とほぼ同一であることを確認した。この粒子を用い、凝集(PACI)－沈澱処理における除去性を調べたところ、十分な凝集剤添加条件下 (> 1.08 mg-Al/L) において、2 log 程度の除去が可能であることが示された。また、VLPs の除去率は、同時添加した大腸菌ファージ Q β や大腸菌ファージ MS2 に近かった。このことは、凝集沈澱処理では、これらの大腸菌ファージがノロウイルスの指標ウイルスとして使える可能性を示している。本研究では、発現されたノロウイルス VLPs を用いることにより、これまで評価ができていなかったノロウイルスの浄水処理性が評価できることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：浄水処理

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：ノロウイルス, VLPs, 凝集沈澱処理, 急速砂ろ過, 不活化, 大腸菌ファージ

1. 研究開始当初の背景

微生物（原虫，細菌，ウイルスなど）を用いた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が確立されておらず、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。従って、社会的ニーズが

極めて高いにも関わらず、ノロウイルスの浄水処理性は現段階で全く不明である。

2. 研究の目的

近年、培養不能なノロウイルスの構造や抗原性を調べるため、ウイルス外套タンパク (VLPs: Virus Like Particles) を遺伝子組換え生物を用いて発現させる手法が確立された。また、発現された VLPs を用いることによりノロウイルスの酵素免疫測定法が開発され、現

在では検出キットが市販されるようになった。本研究では、VLPs を用いてノロウイルスの室内浄水処理実験を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子組換え技術により、ノロウイルスのVLPs を発現させ、発現させたVLPsの粒子形状、サイズを把握し、野生のノロウイルスと比較した。また、これらのVLPsを用いて水処理実験を行った。その際、腸管系ウイルスの指標としてよく用いられる大腸菌ファージを共存させ、ノロウイルスと挙動を比較した。

4. 研究成果

(1) 発現ノロウイルスVLPsの形状と大きさ
遺伝子組換え技術によりノロウイルスVLPs を発現させることに成功した。発現されたVLPsを電子顕微鏡により観察することにより、その形状および大きさ (35.7 ± 3.2 nm) が野生のノロウイルス粒子とほぼ同一であることを確認した。

(2) VLPs と大腸菌ファージの同時添加凝集沈澱処理における除去性の比較

凝集沈澱処理後のNV-VLPs と大腸菌ファージの除去率を図1に示す。なお、図の縦軸は $\text{Log}[C_0/C]$ (C_0 ; 原水のVLPsあるいはファージ濃度, C ; 処理水のNV-VLPsあるいはファージ濃度) にて表記し、大腸菌ファージ濃度はRT-PCR法にて定量した。図に示すように、凝集剤添加濃度を上げることにより、VLPs, Q β , MS2 共に除去率が向上し、0.54 mg-Al/L (ポリ塩化アルミニウム, PACl にて添加) の凝集剤添加濃度では0.5 log以下の除去率であったのに対し、1.62 mg-Al/Lの凝集剤添加濃度においては2 log程度の除去率が得

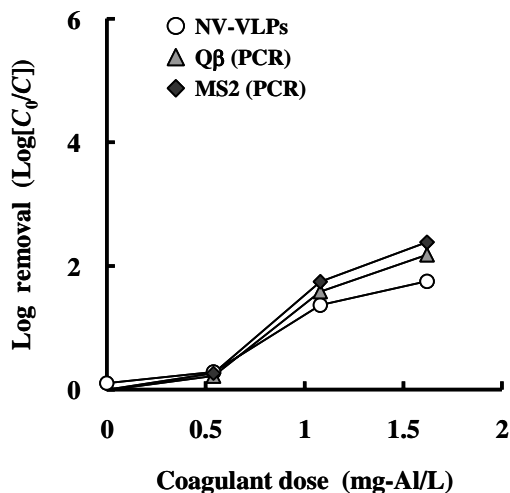


図1. 凝集沈澱処理におけるNV-VLPsと大腸菌ファージの除去性の比較

られた。また、図2に示すように、凝集処理に影響を与える因子の一つと考えられる表面電位特性は、VLPs と大腸菌ファージで異なる結果となったにも関わらず、凝集沈澱処理におけるVLPsの処理性はQ β , MS2 とほぼ同程度となった。従って、VLPs と大腸菌ファージの粒子サイズの違いなど、表面電位特性以外の因子も凝集処理性に寄与し、結果として除去率が同程度となった可能性が考えられた。

(3) 大腸菌ファージQ β とMS2の凝集沈澱処理における除去性の比較

凝集沈澱処理過程における大腸菌ファージQ β とMS2の除去率を図3に示す。なお、各大腸菌ファージ濃度はRT-PCR法とプラック形成法にて定量した。また、凝集剤の添加濃度は1.08 mg-Al/Lとした。図に示すように、大腸菌ファージの感染性に関わらず全ファージ数が定量できるRT-PCR法にて求められ

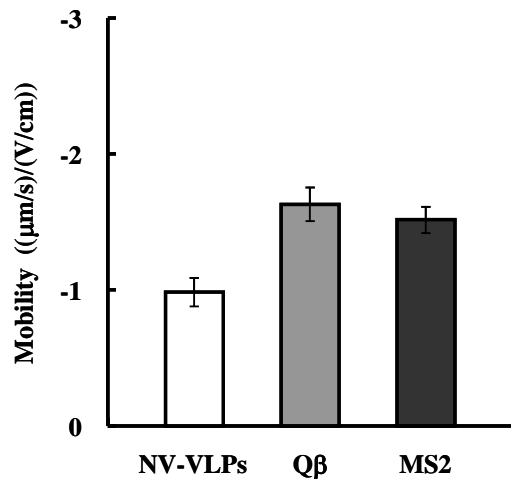


図2. NV-VLPsと大腸菌ファージの表面電位の比較

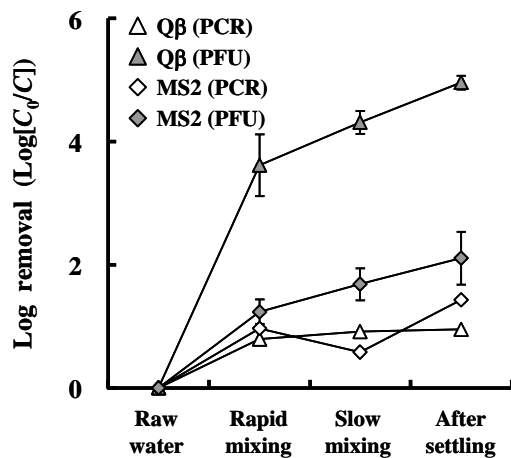


図3. 凝集沈澱処理における大腸菌ファージの除去性の比較

た除去率は、Qβと MS2 の間でほぼ同程度となり、1-1.5 log 程度の除去率となった。これら 2 つのファージは共に直径 24-26 nm の正 20 面体構造であり、図 2 に示したように、河川水中における両ファージの表面電位特性もほぼ等しいため、凝集沈澱処理過程で同程度の除去率となったと推察される。これに対し、感染性ファージのみが定量できるブラック形成法にて求められた除去率は、凝集沈澱処理後に MS2 が 2 log 程度であったのに対し、Qβは 5 log 程度と約 3 log の差が生じた。従って、凝集沈澱処理における感染性ファージの処理性は Qβと MS2 で大きく異なることが示唆された。また、RT-PCR 法と PFU 法間の除去率の違いは Qβで大きくなった。先に記述したように、RT-PCR 法では全ファージ数が定量されるのに対し、ブラック形成法では感染性ファージのみが定量されるため、これら 2 つの定量法によって得られた結果の差は、感染性のないファージ数を示すと考えられる。このことから、凝集沈澱処理において、Qβの不活化が大きく進行することが示唆された。また、Qβは MS2 に比べて、凝集沈澱処理における不活化効果に対する感受性が大きいと考えられた。

本研究で使用した VLPs は、内部に RNA を持たず感染性がないため、凝集沈澱処理過程における感染性の消長については議論できないが、粒子としての挙動は、RT-PCR 法にて定量された大腸菌ファージ Qβ、MS2 と同程度であったため、凝集沈澱処理における物理的な浄水処理性は、Qβ、MS2 と同程度である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K. (2009) Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Qβ and MS2, during the aluminum coagulation process, *Water Research*, **43**(3), 605-612. 査読有
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K. (2009) Comparison of removal performance of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophage Qβ and MS2, in a coagulation-ceramic microfiltration system, *Journal of Membrane Science*, **326**, 564-571. 査読有
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K. (2008) Effects of reversible and irreversible membrane fouling on virus removal by a coagulation-microfiltration system, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, **57**(7), 501-506. 査読有
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Ohno, K. and Kobuke, M. (2007) Virus removal in a hybrid coagulation-microfiltration system—Investigating mechanisms of virus removal by a combination of PCR and PFU methods, *Water Science and Technology: Water Supply*, **7**(5-6). 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- Urasaki, T., Matsushita, T., Shirasaki, N., Oshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus VLPs in drinking water treatment process, Proceedings of The 3rd IWA-ASPIRE Conference, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan, 18–22 October 2009.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Oshiba, A., Urasaki, T., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus by a coagulation-ceramic MF hybrid system, Proceedings of Euromembrane 2009 Conference, CORUM Conference Centre, Montpellier, France, 6–10 September 2009.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Kobuke, M., Matsui, Y. and Ohno, K., Effective removal of virus by ceramic microfiltration with in-line coagulation pretreatment, Proceedings of Euromembrane 2009 Conference, CORUM Conference Centre, Montpellier, France, 6–10 September 2009.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., Oshiba, A. and Ohno, K., Evaluation of norovirus removal performance in a coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus VLPs, Proceedings of 5th IWA Specialised Membrane Technology Conference for Water and Wastewater Treatment, Beijing International Convention Center, Beijing, China, 1–3 September 2009.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A., Urasaki, T. and Ohno, K., Application of recombinant norovirus VLPs to evaluate norovirus removal performance in a coagulation-sedimentation-rapid sand filtration process, Proceedings of Nanoparticle and Particle Separation 2009, Duke University Durham, USA, 3–5 June 2009.
- 大芝淳, 白崎伸隆, 浦崎稔史, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理におけるノロウイルスの処理性評価, 第 60 回全国水

- 道研究発表会, 大宮ソニックシティ, さいたま, 2009/5/20-22.
7. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M., Urasaki, T. and Ohno, K., Coagulation–ceramic microfiltration hybrid system effectively removes virus that is difficult to remove in conventional coagulation–sedimentation–sand filtration process, Proceedings of ICOM2008, Sheraton Waikiki, Honolulu, Honolulu, Hawaii USA, 12–18 July 2008
 8. 白崎伸隆, 浦崎稔史, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, ノロウイルス外套タンパク(NV-VLPs)を用いたノロウイルスの浄水処理性評価, 第 45 回環境工学研究フォーラム, 大阪工業大学, 大阪, 2008/11/28-30.
 9. 浦崎稔史, 白崎伸隆, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理過程におけるバクテリオファージの処理性比較, 第 16 回衛生工学シンポジウム, 北海道大学, 札幌, 2008/11/13-14.
 10. Shirasaki, N., Kobuke, M., Urasaki, T., Matsushita, T., Matsui, Y., and Ohno, K., Difference in behaviors of two indicator bacteriophages for waterborne pathogenic viruses during drinking water treatment process, and their effective removals by using coagulation–ceramic microfiltration hybrid system, Proceedings of IWA regional conference–membrane technologies in water and waste water treatment, Crocus International Exhibition Centre, Moscow, Russia, 2–4 June 2008.
 11. 浦崎稔史, 白崎伸隆, 小泓誠, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 浄水処理におけるバクテリオファージの処理性の違い, 第 59 回全国水道研究発表会, 仙台国際センター, 仙台, 2008/5/23-25.
 12. 小泓誠, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 凝集 MF 膜処理によるウイルス除去に与えるファウリングの影響, 第 15 回衛生工学シンポジウム, 167-170, 北海道大学, 札幌, 2007/11/8-9.
 13. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Ohno, K., Effects of reversible and irreversible membrane fouling on virus removal by a coagulation–microfiltration system, Proceedings of IWA International Conference on Particle Separation (PS 2007), Universite Paul Sabatier, Toulouse, France, 9-12 July 2007.
 14. Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Ohno, K., Kobuke, M., Virus removal in a hybrid coagulation–microfiltration system— Investigating mechanisms of virus removal

by a combination of PCR and PFU methods, Proceedings of IWA 4th International Conference on Membranes for Water and Wastewater Treatment, Harrogate International Conference Centre, Harrogate, UK, 14-17 May 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 拓 (MATSUSHITA TAKU)
北海道大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：30283401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし