

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02269

研究課題名(和文) 遺伝的多様性を考慮した水道原水中に存在する病原ウイルスの浄水処理性評価

研究課題名(英文) Evaluating the efficacy of drinking water treatment processes to remove and inactivate diversified human enteric viruses present in drinking water sources

研究代表者

白崎 伸隆 (Nobutaka, Shirasaki)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、PCR法に加えて、ウイルスの外殻タンパク質の損傷を捉えることが可能なPMAXX-Enhancer-PCR法を適用することにより、水道原水における病原ウイルスの存在実態を詳細に把握した。また、凝集-MF膜ろ過処理を実施している実浄水処理場における病原ウイルスの処理性と病原ウイルスの代替指標として期待されているトウガラシ微斑ウイルスの処理性を比較することに成功した。加えて、金ナノ粒子に遺伝子を複数結合させた遺伝子結合金ナノ粒子を用いることにより、PCR法にて高感度に定量可能な遺伝子封入ウイルス様粒子(遺伝子封入VLPs)の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、水道原水における病原ウイルスの存在実態、並びに実浄水処理場における病原ウイルスの処理性を詳細に把握し、効果的且つ効率的な処理を施すことが重要となる。本研究では、水系感染症を引き起こすことが知られている9種の病原ウイルスの水道原水における存在実態を明らかにすると共に、代表的な浄水処理技術の一つである凝集-膜ろ過処理を実施している実浄水場における病原ウイルスの処理性を明らかにすることに成功したことから、本研究で得られた知見は、水道水利用における病原ウイルスのリスク管理・制御の枠組みの構築に資するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the occurrence of human enteric viruses in drinking water sources by using PCR and PMAXX-Enhancer-PCR which can detect damage to viral capsids. We then successfully evaluated the reduction efficiencies of a human enteric virus and pepper mild mottle virus, a potential surrogate for human enteric viruses to assess virus removal by coagulation-microfiltration, in an actual drinking water treatment plant employing coagulation-microfiltration. In addition, DNA-encapsulated virus-like particles that can be quantified by PCR were successfully constructed by using DNA-conjugated gold nanoparticles.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：病原ウイルス ロタウイルス ノロウイルス トウガラシ微斑ウイルス ウイルス様粒子 水道原水
浄水処理 Viability-PCR法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスに代表される病原ウイルスによる感染症は、先進諸国においても未だ大きな問題となっている。実際に、ノロウイルスによる感染症に限定した場合であっても、胃腸炎発症者数は世界全体で年間 7 億人、経済的損失は年間 600 億ドルにも上ることが試算されている。また、近年の気候変動や人口増加に伴う世界的な水不足の顕在化により、水資源を質的・量的に安定して確保することが困難な状況となっている。このような中で、健全な水循環を今後も持続するためには、これまで使用されなかった低水質の環境水や排水をも新たな水道原水として利用（再利用）する必要がある。このような水は、病原ウイルスによる汚染レベルも高いことから、浄水処理における病原ウイルスの処理性、すなわち、物理的処理における除去特性、並びに消毒処理における不活化特性を詳細に把握した上で、効果的且つ効率的な処理を施し、水道水由来の病原ウイルスによる感染症（水系感染症）を制御していくことが重要となる。

2. 研究の目的

本研究では、水道原水における病原ウイルスの存在実態、並びに実浄水処理場における病原ウイルスの処理性を詳細に把握すると共に、培養困難なノロウイルスについて、水道原水中に優占的に存在する複数の遺伝子型・株のノロウイルスのウイルス様粒子（VLPs）を人工的に作製し、VLPs の高感度定量法と併用することにより、遺伝子型、更には株の差異にまで踏み込んだノロウイルスの物理的な浄水処理性を、培養法に頼ることなく詳細に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 水道原水中のウイルス濃度の定量

本研究では、水道原水におけるウイルスの存在実態を把握するため、ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法を適用し、水道原水中のウイルス濃度を定量した。全国 10 カ所の実浄水処理場において採水した水道原水各 40 L を、ポンプを用いて 5-6 L/min の初期流束にて専用ハウジングに収容されたナノセラム陽電荷膜（膜孔径 2 μm ）に通水することにより、水道原水中の負に帯電したウイルスを正に帯電した陽電荷膜に吸着させた。通水後、ハウジング内に残った水道原水を破棄し、ここに、膜に吸着させたウイルスを脱着させるウイルス溶出液として pH 9.5 の 1.5% (w/w) ビーフエキス溶液（0.05 M グリシン含有）350 mL を添加し、1 分間浸漬させた。その後、未使用のビーフエキス溶液 150 mL をポンプを用いて膜に通水することにより、ハウジング内のビーフエキス溶液と共に回収した。この溶出操作を未使用のビーフエキス溶液を用いて更に 3 回繰り返す（2 回目の溶出時の浸漬時間は 15 分、3 回目及び 4 回目の溶出時の浸漬時間は 30 分）、合計 2 L のビーフエキス溶液にウイルスを濃縮した（一次濃縮）。

ウイルスを濃縮したビーフエキス溶液の pH を HCl にて 3.5 に調整した後、攪拌子を用いて 400 rpm にて 30 分間攪拌することにより、溶液中のビーフエキスを凝集した。これを 2,500 \times g にて 15 分間遠心分離することにより、上澄水と凝集フロックを分離した。上澄水については、タンジェンタルフローUF膜（膜材質 再生セルロース、分画分子量 300 kDa）を用いて 20 mL まで精製・濃縮し、更にメンブレンフィルター（膜材質 酢酸セルロース、膜孔径 0.45 μm ）にてろ過した（二次濃縮[上澄み]）。一方、凝集フロックについては、pH 9.0 の 0.15 M リン酸バッファを添加し、マルチシェイカーを用いて 160 rpm にて 10 分間振とうすることにより、凝集フロックを溶解した。これを 4,000 \times g にて 10 分間遠心分離した後、上澄水の pH を HCl にて 7.0 に調整することにより 20 mL まで精製・濃縮し、更にメンブレンフィルター（膜材質 酢酸セルロース、膜孔径 0.45 μm ）にてろ過した（二次濃縮[フロック]）。二次濃縮後の試料水（二次濃縮[上澄み]及び二次濃縮[フロック]）中のウイルス濃度を定量し、得られた結果を基に、濃縮前の水道原水中のウイルス濃度を算出した。

ウイルス濃度の定量においては、リアルタイム定量 PCR 法に加え、ウイルスの外殻タンパク質の損傷を捉えることが可能な Viability-PCR 法の一つである PM_{Axx}-Enhancer-PCR 法を用いた。二次濃縮後の試料水に、DNA/RNA に対して高い親和性を持つ光反応性色素であるプロピジウムモノアジド（PMA）の改良高純度試薬である PM_{Axx}（最終濃度 200 μM ）及び PMA の反応向上試薬である PMA Enhancer for Gram Negative Bacteria（最終濃度 1X）を添加し、室温・暗所にて緩やかに攪拌しながら 10 分間インキュベートした。これを PMA-Lite LED 光照射装置に供することにより、強い可視光を 15 分間照射し、PM_{Axx} から生じるナイトレンラジカルとウイルス DNA/RNA を反応させた。その後、PCR 法を実施することにより、ウイルスの外殻タンパク質の損傷が無いウイルスのみを選択的に定量した。

(2) 実浄水処理場の処理工程水中のウイルス濃度の定量

本研究では、凝集-MF 膜ろ過処理を実施している実浄水処理場におけるウイルスの処理性を評価するため、前述したナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用したウイルス濃縮法を適用し、原水及び凝集-MF 膜ろ過処理水中のウイルス濃度を定量した。実浄水場内

において、原水 4–80 L、あるいはチオ硫酸ナトリウムのインライン添加により残留塩素を中和した凝集–MF 膜ろ過処理水 100–1,000 L を、ポンプを用いて 4–5 L/min の初期流束にて専用ハウジングに収容されたナノセラム陽電荷膜に通水した。その後、前述した手順により、ウイルスの回収・精製・濃縮を実施した。原水及び凝集–MF 膜ろ過処理水の二次濃縮後の試料水（二次濃縮 [上澄み] 及び二次濃縮 [フロック]）中のウイルス濃度を定量し、得られた結果を基に、濃縮前の原水中及び凝集–MF 膜ろ過処理水中のウイルス濃度を算出した。また、実浄水場におけるウイルスの低減率（Log 除去率（ $\text{Log}[C_0/C]$ ； C_0 : 原水のウイルス濃度、 C : 処理水のウイルス濃度））を算出した。

(3) 高感度に定量可能な VLPs の作製

本研究では、培養困難なノロウイルス GI.4 型の VLPs を実験に使用し、VLPs 内部に人工合成遺伝子を結合させた遺伝子結合金ナノ粒子を封入することにより、高感度に定量可能な VLPs の作製を試みた。VLPs に還元剤であるジチオトレイトール (DTT) 及びキレート剤であるグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) を添加し、室温にて 30 分間インキュベートすることにより、VLPs を構成するタンパク質のアミノ酸間のジスルフィド結合を還元 (切断) し、VLPs の粒子構造を一時的に崩壊させた。ここに、リアルタイム定量 PCR 法にて定量可能なチオール化した人工合成遺伝子 (人工合成 DNA) を金ナノ粒子 (粒子径 5 nm) に結合させた遺伝子結合金ナノ粒子を添加し、UF 膜 (膜材質 再生セルロース、分画分子量 12–14 kDa) を用いた透析による精製を実施した後、塩化カルシウム (CaCl_2) を添加し、室温にて 1 時間インキュベートすることにより、アミノ酸間のジスルフィド結合を再形成させ、VLPs の粒子構造を再構成させた。その後、核酸分解酵素であるベンゾナーゼを添加し、室温にて 1 時間インキュベートすることにより、VLPs の内部に封入されなかった余剰の外来遺伝子及び VLPs の表面に吸着した外来遺伝子を分解した。その後、塩化セシウムを用いた平衡密度勾配遠心法を 4°C にて実施し、VLPs、遺伝子封入 VLPs、人工合成遺伝子を比重の差により分画すると共に、分画した各画分の VLPs 濃度、遺伝子濃度をそれぞれ ELISA、PCR 法にて定量することにより、VLPs 内部への遺伝子封入状態を確認した。

4. 研究成果

(1) 水道原水における病原ウイルスの存在実態

感染性胃腸炎の流行期とされる冬季に採水した全国 10 カ所の水道原水におけるアデノウイルス (AdV)、アストロウイルス (AstV)、ヒトノロウイルス GI (HuNoV GI)、ヒトノロウイルス GII (HuNoV GII)、ヒトサボウイルス (HuSaV)、E 型肝炎ウイルス (HEV)、エンテロウイルス (EV)、パレコウイルス (PeV)、A 型肝炎ウイルス (HAV)、ロタウイルス (RV)、並びにトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV) の濃度を PCR 法にて評価したところ、AstV、HuNoV GII、RV の陽性率が高く、RV については、採水した 10 カ所の水道原水の内、7 カ所で濃度が PCR 法における定量下限値を上回り、陽性となった (陽性率 70%)。また、対象とした病原ウイルスの中で、RV の陽性率が最も高く、陽性となった試料水中の RV 濃度は $10^{2.3-3.3}$ copies/L であった (図 1)。HuNoV については、遺伝子グループ間で陽性率に差異が見られ、HuNoV GI の陽性率は 20% であったのに対し、HuNoV GII の陽性率は 60% であった。一方、PMMoV については、採水した 10 カ所の水道原水全てにおいて濃度が PCR 法における定量下限値を上回り、陽性となった (陽性率 100%)。また、陽性となった試料水中の PMMoV 濃度は $10^{5.2-6.5}$ copies/L であった (図 2)。

PCR 法にて陽性となった水道原水について PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用したところ、PCR 法単独にて定量された RV は全て定量下限値以下となった (図 1)。従って、PCR 法単独にて定量されたロタウイルスは、感染性を有する完全体の状態ではなく、PMAxx がウイルス粒子内部まで透過可能な状態、すなわち、ウイルス粒子を構成する外殻タンパク質の損傷により感染性を失った状態で水道原水中に存在している可能性が示唆された。PCR 法単独にて定量された HuNoV GI についても、PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用したところ、全て定量下限値以下となった。従って、HuNoV GI は、RV の場合と同様に、外殻タンパク質の損傷により感染性を失った状態で水道原水中に存在している可能性が示唆された。一方、HuNoV GII については、幾つかの水道原水において、PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用した場合に得られた濃度が PCR 法単独の場合に得られた濃度と同程度の値となった。従って、HuNoV GII は、HuNoV GI とは異なり、PMAxx がウイルス粒子内部に透過できない状態、すなわち、外殻タンパク質の損傷が無い状態で水道原水中に存在している場合があることが示唆された。PMMoV については、全ての水道原水において、PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用した場合に得られた濃度が PCR 法単独の場合に得られた濃度と同程度の値となった (図 2)。従って、PCR 法単独にて定量された PMMoV は、外殻タンパク質の損傷が無い状態で水道原水中に存在しているものと考えられた。

研究対象とした全国 10 カ所の水道原水においては、PMMoV は、PCR 法のみならず、PMAxx-Enhancer-PCR 法を適用した場合であっても、定量対象としたいずれの病原ウイルスよりも 100 倍以上高い濃度で存在していることが明らかとなった。従って、PMMoV は、水道原水における病原ウイルス汚染を評価するための指標ウイルスとして有効であることが示唆された。

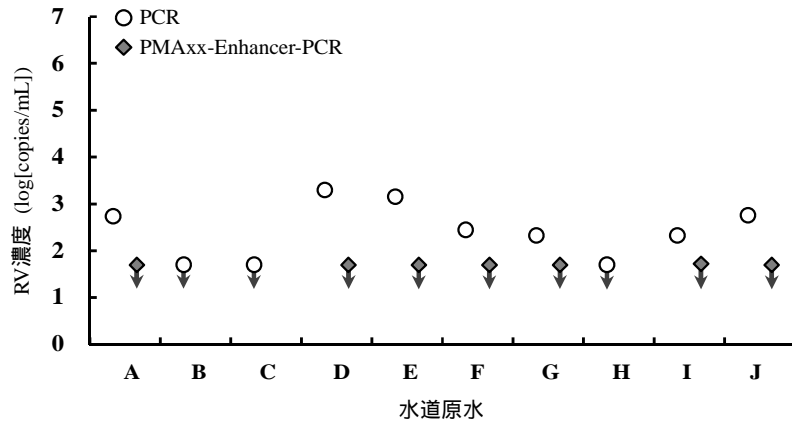


図1. 水道原水中のRVの定量結果 (図中の矢印は定量下限値以下を示す)

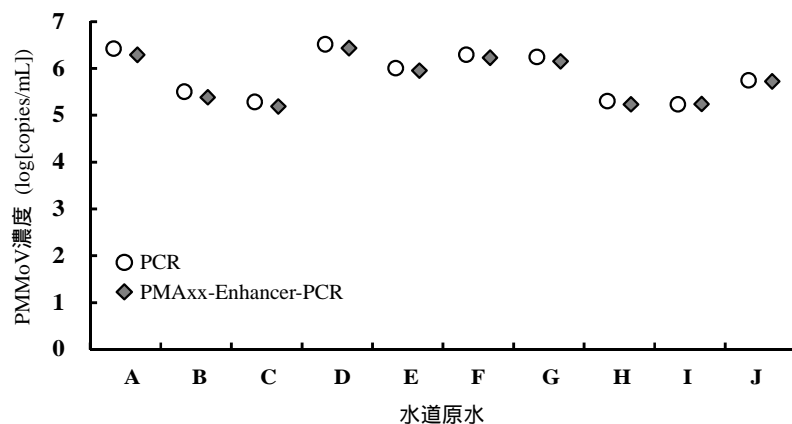


図2. 水道原水中のPMMoVの定量結果

(2) 実浄水処理場における病原ウイルスの処理性

水道原水において高頻度に検出されたRVを対象とし、凝集-MF膜ろ過処理を実施している実浄水処理場におけるRVの低減率をPCR法にて評価したところ、 $2.0 \log$ 以上(3回の採水は全て定量下限値以下)の低減率が得られることが明らかとなった。一方、PMMoVの低減率は $2.3 \pm 0.6 \log$ (3回の採水の平均値)であり、RVの低減率と同程度、あるいは低い値となった。従って、PMMoVは、凝集-MF膜ろ過処理を実施している実浄水場におけるRVの処理性を評価するための指標ウイルスとして有効であることが示唆された。

(3) VLPs内部への遺伝子封入

VLPs内部に封入可能であることが確認された金ナノ粒子を用い、金ナノ粒子に人工合成遺伝子を結合させた後、遺伝子結合金ナノ粒子をVLPs内部に封入することにより、金ナノ粒子を介したVLPs内部への外来遺伝子の封入を試みた。なお、金ナノ粒子にチオール化した人工合成DNAを結合させたところ、金ナノ粒子1粒子当たり5個程度の人工合成DNAの結合が確認された。粒子構造を一時的に崩壊させたVLPsに、遺伝子結合金ナノ粒子を5:1の個数比で添加し、粒子構造の再構成処理を実施した後、VLPs溶液を平衡密度勾配遠心法にて分画したところ、中空のVLPsの比重(1.28 g/cm^3)に比べて大きな比重(1.33 g/cm^3 : 1粒子のVLPs内部に金ナノ粒子が1粒子封入された場合の比重の計算値と一致)の画分においてVLPs量の増加が確認された(図3)。また、当該画分におけるDNA量の明確な増加も確認された(図3)。従って、金ナノ粒子を介することにより、VLPs内部に外来遺伝子を封入できることが明らかとなり、結果として、リアルタイム定量PCR法にて定量可能な遺伝子封入VLPsの作製に成功した。また、VLPs内部への封入に成功した遺伝子結合金ナノ粒子は、1粒子当たり5個程度の人工合成DNAが結合していることから、VLPs内部に1個の遺伝子を封入させた場合に比べてVLPsの検出感度を約5倍向上できるため、作製に成功した高感度に定量可能な遺伝子封入VLPsを浄水処理の室内添加実験に用いることにより、これまでの中空のVLPsとELISAによる定量では実現できなかった、実際の水道原水中のノロウイルス濃度に近い条件下における自由度の高い添加実験の実施が可能となるものと判断された。

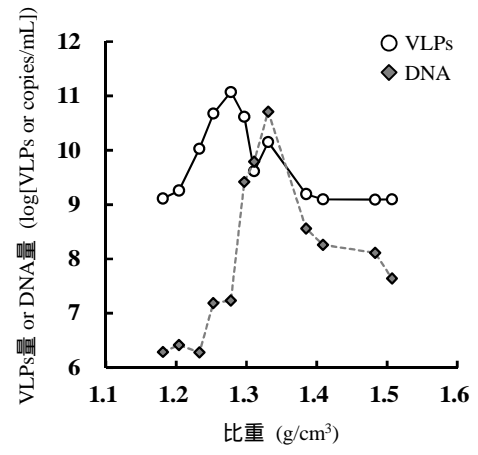


図3. 遺伝子封入処理後のVLPs溶液の比重分画結果

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 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 -

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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hu, Q., Shirakawa, D., Shirasaki, N., Takagi, H., Oka, T., Matsushita, T. and Matsui, Y.
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（オンライン開催）
4. 発表年 2022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（オンライン開催）
4. 発表年 2021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 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

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 Water and Environment Technology Conference Online 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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 令和2年度全国会議 (水道研究発表会) (紙面上発表)
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 (オンライン開催)
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 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 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 環境リスク工学研究室 ホームページ
<https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/risk/>

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)	
研究分担者	松下 拓 (MATSUSHITA TAKU) (30283401)	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