

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21686049

研究課題名（和文）VLPを用いたノロウイルスの浄水処理性評価

研究課題名（英文）Evaluating removal of norovirus during drinking water treatment by using recombinant virus-like particles

研究代表者

松下 拓 (MATSUSHITA TAKU)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30283401

研究成果の概要（和文）：培養ができないことから明かではなかったノロウイルスの浄水処理性を、ウイルス外套タンパク粒子（VLPs）を用いることにより明らかにした。また、免疫 PCR によるノロウイルスの高感度検出系を確立し、VLPs と組み合わせることにより、より詳細なノロウイルスの浄水処理性を調べた。その結果、凝集を前処理として組み込んだ MF 膜処理は、分画分子量 1 kDa の UF 膜処理と同等のノロウイルス除去性を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：Removal of norovirus during drinking water treatment was investigated by using recombinant norovirus VLPs. To improve the detection method for norovirus VLPs, immuno-PCR method was developed. By a combination of norovirus VLPs and immuno-PCR method, removals of norovirus during drinking water treatments were revealed: the removal of norovirus with precoagulation-MF hybrid system was almost the same to that with UF having nominal molecular weight cutoff of 1 kDa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：

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：土木環境システム、水質汚濁・土壌汚染防止・浄化、ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ノロウイルスは、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つつある。さらには、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法の発展に伴い、環境水、下水、あるいは水道水中からのノロ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。

(2) 通常、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。

(3) 培養不能なノロウイルスの構造や抗原性を調べるため、その外套タンパク（virus-like particles: VLPs）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。この手法により安定した VLPs の供給が可能となり、それを用いることにより、ノロウイルスの酵素免疫測定法 (ELISA 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。発現された VLPs は、構造的にも抗原的にも野生のノロウイルスと全く等しい。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、VLPs を用いてノロウイルスのベンチスケール水処理実験を行うことを目的とした。VLPs は野生ノロウイルスと全く同じ構造かつ大きさであり、完全な粒子形状が保証されるため、PCR 法のみでは把握しきれなかったノロウイルス粒子の処理性を論じることが可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) ノロウイルス VLPs の発現

ノロウイルス VLPs の発現に必要な Chiba virus (GI/4, Taxonomy ID 99565, Chiba virus Hu/NLV/Chiba407/1987/JP) の塩基配列情報は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の GenBank (AB042808) より得た。なお、Chiba virus のゲノムは全長 7697 塩基から成り、ゲノム上には 3 つの ORF (Open Reading Frame) および非翻訳領域である 3'UTR (3'UnTranslated Region) が存在し、5'側の ORF1 (1785 のアミノ酸より構成) 上にはウイルスの複製に関与する RNA ポリメラーゼをはじめとする各種非構造タンパク質をコードする領域が、ORF2 (544 のアミノ酸より構成) 上には構造タンパク質 VP1 をコードする領域が、また、3'側の ORF3 (208 のアミノ酸より構成) 上には構造タンパク質 VP2 をコードする領域がある。

VLPs の作成に先立ち、Chiba virus のゲノムのうち、ORF2, ORF3, 3'UTR の 2352 塩基 (5346-7697) の両末端に制限酵素認識部位 (制限酵素 EcoRI および PstI の認識部位) を付加した 2422 塩基から oligoDNA 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。なお、ヒトノロウイルスのゲノムのうち、ORF2, ORF3, 3'UTR をバキュロウイルスに挿入することで、ORF2 のみを挿入する場合に比べて VLPs の発現量が増加することが報告されている。従って、本研究では、Chiba virus のゲノムのうち、ORF2, ORF3, 3'UTR を人工合成した。

人工合成した遺伝子断片を、Gateway BP 反応によりドナーベクター (pDONR221, Invitrogen) にサブクローニングした。遺伝子断片の制限酵素認識部位を制限酵素 EcoRI および PstI にて切断した後、改めてバキュロウイルストランスファーベクター (pM0NHT4, 片倉工業) に挿入した。得られたバキュロウ

イルストランスファーベクターとバキュロウイルス (Bombyx mori nucleopolyhedro-virus ; CPd 株) をカイコ細胞 (Bombyx mori 細胞) 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) に感染させた。感染後、遺伝子組換えバキュロウイルスをカイコ内で 6 日間培養させることで Chiba virus の rNV-VLPs を発現させた。なお、バキュロウイルスは、主に昆虫を宿主とする核多角体病ウイルスであり、タンパク質で構成される結晶性の多角体 (包埋体) に含まれている。バキュロウイルスのゲノムのうち、多角体タンパク質をコードする領域は強力なプロモーターを有しているため、バキュロウイルスが宿主細胞内で増殖する際に多角体タンパク質が多量に発現される。この特徴を利用し、多角体プロモーターの下流に目的タンパク質をコードする領域を挿入し、遺伝子組換えバキュロウイルスを作成した後、新たに遺伝子組換えバキュロウイルスを宿主細胞に感染させることで、多角体タンパク質の代わりに目的タンパク質が多量に発現させることが可能となる。

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 VLPs の高濃度保存液を得た。なお、ニッケルカラムによる 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、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 VLPs の処理性に影響する可能性は極めて小さいと考えられた。長期保存用として、VLPs の高濃度保存液を 1 mL の滅菌済みチューブに分注し、冷凍保存 (-80 °C) した。なお、VLPs の高濃度保存液は、解凍させた後、実験に使用した。

### (2) 免疫 PCR 法

免疫 PCR 法は 1992 年に Sano らによって報告された技術であり、PCR と抗原抗体を組み合わせ、抗原の濃度を定量する方法である。同じく抗原-抗体反応を利用する ELISA 法に比べると免疫 PCR 法は 100~10,000 倍感度が向上することが報告されている。

固定化一次抗体は、これまでの研究で構築の昆虫細胞発現系より得た、VLPs をマウスに経口投与し得られた抗体を使用した。二次抗体には VLPs をウサギに経口投与し得られた抗体を使用した。

免疫 PCR 法の標的増幅領域となるタグ配列と切断部位 (EcoRI) を組み込んだプラスミドを使用した (imTag(イムノ-PCR) 受託

サービス、ケアティス)。このプラスミドを鋳型に、一方をビオチン標識したプライマー (5' Biotin-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA, TAT TAC CGC CTT TGA GTG AG) で PCR を行い、ビオチン標識-切断部位-免疫 PCR 標的配列となる断片を DNA タグとして作成した。

実験に使用するアビジン、ビオチンは濃縮した状態で 4 °C にて保存し、実験に使用する際は PBS (phosphate buffered saline) またはブロッキング剤 (ブロックエース、DS ファーマバイオメディカル) にて希釈して使用した。

DNA タグの定量には、リアルタイム定量 PCR を用いた。

### (3) 膜処理によるノロウイルス除去評価

本研究では VLPs を約  $10^{11}$  VLPs/mL に、バクテリオファージ Q $\beta$  と MS2 (共に粒径約 25 nm) をそれぞれ約  $10^8$  PFU/mL になるように同時添加した札幌市豊平川河川水を実験原水とした。実験原水を pH6.8 に調整した後、膜孔径 0.1mm の PVDF 膜を用いた MF 膜処理、あるいは、分画分子量 1 kDa、10 kDa、100 kDa の再生セルロース膜を用いた UF 膜処理を実施した。また、実験原水をスタティックミキサーを用いて凝集処理させた後 (pH6.8、ポリ塩化アルミニウムを使用、添加濃度 1.62 mg-Al/L)、膜孔径 0.1 mm の PVDF 膜を用いてろ過した凝集-MF 膜処理を実施した。いずれの実験においても、実験原水とろ過水のウイルス濃度を定量することで、ウイルス除去率を求めた。VLPs の定量には免疫 PCR 法を用い、Q $\beta$  及び MS2 の定量には RT-PCR 法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ノロウイルス VLPs の発現

発現させた VLPs の電子顕微鏡写真より、粒子状に自己組織化された VLPs が確認された (図 1)。観察された VLPs の中から 10 粒子を無作為に抽出し、写真上で直径を測定したところ、 $35.7 \pm 3.2$  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) と同程度であった。従って、発現させた VLPs

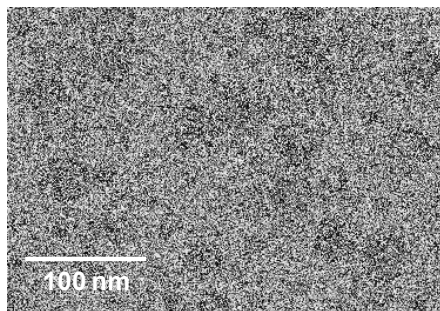


図1. ノロウイルスVLPsの電子顕微鏡写真

は野生のヒトノロウイルスと同等の粒子形状および直径を有していると判断された。

### (2) 免疫 PCR 法の構築

図 2 に、従来の ELISA 法と、本研究にて構築した immuno-PCR 法による VLPs の検量線を示す。従来の ELISA 法では、 $10^9$  particles/mL 以上の濃度にて濃度依存的に吸光度が増加した。すなわち、この濃度範囲では ELISA 法にて VLPs の定量が可能であることが分かった。しかしながら、 $10^8$  particles/mL 以下の濃度では、濃度依存的な吸光度の変化が観察されなかった。また、 $10^8$  particles/mL 以下の VLPs に対する吸光度は、ネガティブコントロールにおける吸光度と同程度であった。このことから、ELISA 法では  $10^9$  particles/mL 以上の濃度にて VLPs を定量可能であるが、 $10^8$  particles/mL 以下では定量できないと判断された。

これに対し、immuno-PCR 法では、 $10^9 \sim 10^{11}$  particles/mL の範囲において、リアルタイム PCR の Ct 値に、VLPs 濃度に対する大きな濃度依存性が確認された。さらに、 $10^9$  particles/mL 以下の濃度範囲でも、傾きが小さくなるものの、 $10^5 \sim 10^6$  particles/mL 程度まで濃度依存性が確認された。途中で折れ曲がっているところなど検討の余地はあるかもしれないが、再現性良くこのような線が引けた。また、これらの Ct 値は、ネガティブコントロールの Ct 値よりも小さな値であった。以上より、immuno-PCR 法を用いることにより、 $10^5 \sim 10^6$  particles/mL 程度まで VLPs を定量できることが示された。すなわち、immuno-PCR 法を構築することにより、ELISA 法での定量下限値の 1/1,000~1/10,000 程度まで VLPs が定量できるようになった。

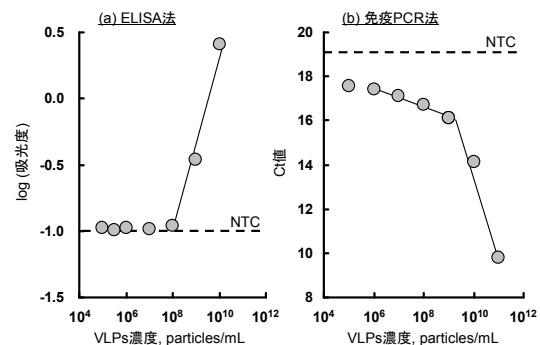


図2. 従来のELISA法と本研究で構築した免疫PCR法によるVLPsの検量線の比較 (NTC: ネガティブコントロール)

### (3) ノロウイルスの膜処理による除去

UF 膜、MF 膜または凝集-MF 膜処理における各ウイルスの除去率を図 3 に示す。MF 膜では VLPs がほとんど除去できなかったのに対し、分画分子量 100 kDa、10 kDa

のUF膜を用いることにより100 kDaでは約1.5 log、10 kDaでは約2 log程度VLPsを除去できた。更に、分画分子量1 kDaのUF膜を用いた場合においては、米国環境保護局の要求値である4 log以上除去率が得られた。また、MF膜処理の前処理としてインライン凝集を導入することにより、MF膜であっても、分画分子量1 kDaのUF膜と同等の高い除去率を期待できることが示唆された。

膜処理におけるVLPsと大腸菌ファージの除去率を比較したところ、いずれの膜処理においてもNV-VLPsの除去率はQβとMS2の除去率よりも低かった。すなわち、これらのバクテリオファージを膜ろ過処理におけるノロウイルス粒子に対する指標性とするのは、難しい可能性が示唆された。

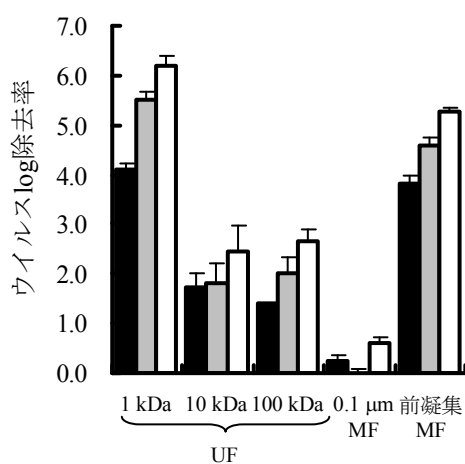


図3. 膜処理におけるウイルスの除去性 (黒 VLPs, 灰色 Qβ, 白 MS2)

#### 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 8 件)

- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K., Difference in behaviors of F-specific DNA and RNA bacteriophages during coagulation-rapid sand filtration and coagulation-microfiltration processes, *Water Science and Technology: Water Supply*, accepted. 査読有り
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y. and Ohno, K., Virus inactivation during coagulation with aluminum coagulants, *Chemosphere*, **85**(4), 571-576, 2011. 査読有り
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K., Feasibility of in-line coagulation as a pretreatment for ceramic microfiltration to remove viruses, *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, accepted. 査読有り

- 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 virus-like particles, *Water Science and Technology*, **61**(8), 2027-2034, 2010. 査読有り
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Oshiba, A. and Ohno, K., Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs, *Water Research*, **44**(5), 1307-1316, 2010. 査読有り
- 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳, 浦崎稔史, 大野浩一, 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, *環境工学研究論文集*, **46**, 415-422, 2009. 査読有り
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K., 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, 2009. 査読有り
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Kobuke, M. and Ohno, K., 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, 2009. 査読有り

[学会発表] (計 26 件)

- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. and Sato, S., Effective removal of virus by high-basicity polyaluminum coagulation treatment, Proceedings of Particle Separation Conference, Berlin, Germany, 18-20 June 2012.
- 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの処理性に与える影響, 第 63 回全国水道研究発表会, 松江, 2012/5/16-18.
- 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, ウイルス除去に有効な新規アルミニウム系凝集剤の開発, 第 46 回日本水環境学会年会, 東京, 2012/3/14-16.
- 田附雄一, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 遺伝子組み換えにより発現したウイルス外套タンパク粒子と新規 immuno-PCR 法を用いたヒトノロウイルスの膜ろ過性の評価, 第 46 回日本水環境学会年会, 東京, 2012/3/14-16.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Tatsuki, Y. and

- Matsui, Y., A new approach to estimate norovirus removal performance in a membrane filtration process by using virus-like particles and immuno-PCR method, Proceedings of AWWA/AMTA 2012 Membrane Technology Conference & Exposition, Glendale, AZ, USA, 27 February–1 March 2012.
6. Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui, Y., Virus removal by adsorption on super-powdered activated carbon, Proceedings of the 4th IWA-ASPIRE Conference, Tokyo, Japan, 2–6 October 2011.
  7. 白崎伸隆, 佐藤翔太, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系凝集剤の高塩基度化によるウイルスの効果的除去, 第 66 回土木学会年次学術講演会, 松山, 2011/9/7-9.
  8. 佐藤翔太, 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 高塩基度ポリ塩化アルミニウムが示すウイルスの高い除去性, 第 62 回全国水道研究発表会, 大阪, 2011/5/18-20.
  9. 鈴木英明, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 安藤直哉, 超微粉化活性炭を用いたウイルスの吸着除去, 第 45 回日本水環境学会年会, 札幌, 2011/3/18-20.
  10. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, アルミニウム系凝集剤によるウイルスの不活化, 第 45 回日本水環境学会年会, 札幌, 2011/3/18-20.
  11. 大芝淳, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 凝集剤中のアルミニウム形態がウイルスの凝集沈殿処理に与える影響, 第 45 回日本水環境学会年会, 札幌, 2011/3/18-20.
  12. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, MALDI-TOF-MSを用いたアルミニウム系凝集剤によるウイルス不活化機構の検討, 第 47 回環境工学研究フォーラム, 高知, 2010/11/9-10.
  13. Matsushita, T., Shirasaki, N., Oshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Evaluating norovirus removal during drinking water treatment by using recombinant NV-VLPs, Proceedings of IWA World Water Congress, Montreal, Canada, 19–24 September 2010.
  14. 白崎伸隆, 大芝淳, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, VLPsを用いたヒトノロウイルスの凝集沈殿–MF膜ろ過処理性評価, 第 65 回土木学会年次学術講演会, 札幌, 2010/9/1-3.
  15. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 凝集沈殿処理によるウイルスの除去と不活化, 第 61 回全国水道研究発表会, 新潟, 2010/5/19-21.
  16. 鈴木英明, 安藤直哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 微粉化活性炭によるウイルス吸着除去, 第 61 回全国水道研究発表会, 新潟, 2010/5/19-21.
  17. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, 小泓 誠, インライン凝集–MF膜ろ過処理によるウイルスの効果的除去, 第 44 回日本水環境学会年会, 福岡, 2010/3/15-17.
  18. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大芝淳, 浦崎稔史, 大野浩一, 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, 第 46 回環境工学研究フォーラム, 高崎, 2009/11/27-29.
  19. 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, Taiwan, 18–22 October 2009.
  20. 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦, 大野浩一, ウイルス外套タンパクを用いたヒトノロウイルスの浄水処理性評価, 第 12 回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 2009/9/14-15.
  21. 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, Montpellier, France, 6–10 September 2009.
  22. 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, Montpellier, France, 6–10 September 2009.
  23. 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, China, 1–3 September 2009.
  24. 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, Durham, USA, 3–5 June 2009.
  25. Matsushita, T., Shirasaki, N., Urasaki, T., Oshiba, A., Matsui, Y. and Ohno, K., Removal of norovirus during conventional drinking water treatment process –application of recombinant NV-VLPs to laboratory-scale

experiments, Proceedings of 15th International Symposium of the Health-Related Water Microbiology Group, Naxos, Greece, 31 May–5 June 2009.

26. 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, さいたま, 2009/5/20-22.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)  
○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松下 拓 (MATSUSHITA Taku)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 30283401