

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14325

研究課題名(和文)カプシドタンパクの精密質量分析によるウイルス消毒不活化・消毒耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of virus disinfection mechanism and disinfection resistance mechanism by analysis of viral capsid protein with mass spectrometry

研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI, NOBUTAKA)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消毒処理におけるウイルスの不活化メカニズム並びに消毒耐性メカニズムについて、ウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質の損傷を捉えることにより解明することを試みた。その結果、熱処理においては、カプシドタンパク質の損傷がアデノウイルス、コクサッキーウイルス、トウガラシ微斑ウイルスの不活化の主要因であることが明らかとなった。一方、塩素処理においては、カプシドタンパク質の損傷のみならず、損傷を生じない程度の酸化や塩素化もこれらのウイルスの不活化に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to elucidate the virus disinfection mechanism and the disinfection resistance mechanism by analysis of damage of viral capsid protein constituting virus particles. As a result, it was revealed that the damage of the capsid protein is the main cause of inactivation of adenovirus, coxsackievirus and pepper mild mottle virus in heat treatment. In contrast, it was suggested that not only the damage of the capsid protein but also mild oxidation and/or chlorination of the capsid protein probably contribute to inactivation of those viruses in chlorine treatment.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：水系感染症ウイルス 消毒耐性ウイルス 熱処理 塩素処理 感染性評価手法 PCR法 PMAx-Enhancer-PCR法 消毒不活化メカニズム

1. 研究開始当初の背景

ウイルス検出/定量研究の進展に伴い、水道原水と成り得る水環境中に水系感染症を引き起こす病原ウイルスが存在していることは周知の事実となっている。従って、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、浄水処理における病原ウイルスの処理性及び処理メカニズムを詳細に把握することが重要となる。浄水処理、特に消毒処理におけるウイルスの処理性評価はこれまでに数多く行われており、ポリオウイルス等の培養可能なウイルスについては、感染性評価手法が確立されているため、処理過程における感染性の消長が詳細に把握されているものの、不活化メカニズムについては未だ不明な点が多い状況にある。また、同じ種のウイルスであっても、遺伝子型の差異により消毒耐性が大きく異なり、極めて高い耐性を有する遺伝子型が存在することが報告されているものの、消毒耐性メカニズムについては全く明らかになっていない。加えて、ノロウイルス等の培養不可能なウイルスに関しては、感染性評価手法が未確立であることから、感染性の消長ですら把握されていない。このような状況から、消毒処理過程におけるウイルスの感染性の消長、消毒不活化・消毒耐性メカニズムについて、培養法に頼ることなく詳細に把握可能な新規の評価手法の確立が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究では、未だ不明な点が多い消毒処理におけるウイルスの不活化メカニズムについて、ウイルス粒子を構成し、ウイルスの感染性を決定づけるカプシドタンパク質の変性を捉えることにより解明することを目的とした。また、複数種のウイルスを消毒処理実験に用い、ウイルスの種間での変性の有無を確認することにより、消毒耐性メカニズムについても議論することを目的とした。

当初の予定では、カプシドタンパク質の変性を精密質量分析で捉えることを想定していたが、分析に際し、高濃度且つ高純度のウイルス試料が必要となることが明らかとなったことから、精密質量分析に比べて高感度にウイルスのカプシドタンパク質の損傷を捉えることが可能な光反応性色素であるプロピジウムモノアジド (PMA) を用いた前処理と PCR 法による遺伝子定量を組み合わせた PMA-PCR 法による分析を実施することにより、ウイルスの不活化メカニズム並びに消毒耐性メカニズムについて議論することとした。

PMA は、遺伝子に対して高い親和性を有する光反応性色素であり、PMA が遺伝子にインターカレートしたところに強い可視光を照射すると、PMA から生じるナイトレンラジカルと遺伝子が反応して共有結合を形成することから、PCR 法による遺伝子増幅が阻害される。感染性を有する完全体のウイルス、す

なわち、ウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質に損傷が無いウイルスにおいては、PMA がウイルス粒子内部に透過しないことから、PCR 法による検出・定量が可能である。一方、ウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質に損傷が生じたウイルスにおいては、PMA がウイルス粒子内部まで透過し、遺伝子を化学的に修飾することから、PCR 法による検出・定量ができなくなる。従って、PCR 法と PMA-PCR 法を併用することにより、カプシドタンパク質の損傷の有無を議論することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 使用したウイルス

本研究では、代表的な水系感染症ウイルスであるアデノウイルス (AdV, Dugan 株, 40 型) に加え、高い塩素耐性を有することが知られているコクサッキーウイルス (CV, Faulkner 株, B5 型) を実験に使用した。また、浄水処理工程における水系感染症ウイルスの挙動指標としての有効性が示されつつあるトウガラシ微斑ウイルス (PMMoV, pepIwate-Hachiman1 株) を実験に使用した。AdV, CV, PMMoV は、それぞれ A549 細胞, BGM 細胞, *Nicotiana benthamiana* を用いて培養した。

(2) 消毒処理

本研究では、熱処理及び塩素処理におけるウイルスの処理性を評価した。精製した AdV, CV, あるいは PMMoV を 10^{3-4} PFU/mL, あるいは 10^4 lesions/mL になるように添加した PBS を実験原水とした。熱処理においては、実験原水をサーモブロックを用いて 45-90 にて 5 分間処理した後、処理水を採水した。一方、塩素処理においては、実験原水に次亜塩素酸ナトリウムを初期遊離塩素濃度 0.1 あるいは 0.5 mg-Cl₂/L になるように添加した後、攪拌し、経時的に処理水を採水した。なお、採水した処理水中の残留塩素は、チオ硫酸ナトリウムにて直ちに中和した。

(3) ウイルス濃度の定量法

本研究では、実験原水あるいは処理水のウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法にて定量した。また、PCR 法による定量に先立ち、PMA による前処理を実施した。PMA あるいは PMA の改良高純度試薬である PMA_{xx} を最終濃度 200 μM になるように、また、PMA の反応向上試薬である PMA Enhancer for Gram Negative Bacteria を最終濃度 1X になるように実験原水あるいは処理水に添加し、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、PMA から生じるナイトレンラジカルと遺伝子を反応させた後、ウイルス濃度を PCR 法にて定量した (PMA-PCR 法)。なお、AdV 及び CV については、それぞれの宿

主細胞である A549 細胞 ,BGM 細胞を用いたブラック形成法を実施し , 消毒処理による AdV 及び CV の感染性の失活とカプシドタンパク質の損傷の関連性を議論した . 一方 , PMMoV については , 宿主植物である *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc* を用いた感染性評価手法を構築し , トウガラシ微斑ウイルスの消毒処理性を評価すると共に , 消毒処理による PMMoV の感染性の失活とカプシドタンパク質の損傷の関連性について議論した .

4 . 研究成果

(1) PMA-PCR 法の最適化

光反応性色素の種類 (PMA , PMA_{xx}) 及び PMA の反応向上試薬 (Enhancer) の有無が PMA-PCR 法によるウイルス濃度の定量に与える影響を評価するため , PMA と反応し , PCR 法による遺伝子増幅が阻害されると考えられる濃度既知の AdV の抽出・精製 DNA , CV の抽出・精製 RNA , PMMoV の抽出・精製 RNA への PMA-PCR 法 , PMA_{xx}-PCR 法 , PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法の有効性を評価した . PMA による前処理を実施することにより , いずれの抽出遺伝子を用いた場合においても , PCR 法単独に比べて定量された抽出遺伝子濃度が減少した . 従って , ウイルス粒子内部の遺伝子が露出した状態においては , PMA による遺伝子の化学的修飾が生じ , 結果として PCR 法による遺伝子増幅が阻害されることが分かった . また , PMA と PMA の改良高純度試薬である PMA_{xx} を比較したところ , AdV 及び CV においては , PMA_{xx} を用いた PMA_{xx}-PCR 法の方が PMA を用いた PMA-PCR 法に比べて定量された抽出遺伝子濃度が減少することが明らかとなった . 加えて , AdV 及び CV においては , 反応向上試薬を用いた PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法の方が反応向上試薬を用いない PMA_{xx}-PCR 法に比べて定量された抽出遺伝子濃度が減少することが明らかとなった . 一方 , PMMoV においては , PMA-PCR 法 , PMA_{xx}-PCR 法 , PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法のいずれにおいても , 定量された抽出遺伝子濃度は同程度であった . 以上の結果から , PMA の改良高純度試薬である PMA_{xx} と PMA の反応向上試薬である PMA Enhancer を併用した PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法が , カプシドタンパク質の損傷の有無の識別には最も適しているものと判断された .

(2) 熱処理におけるウイルスの不活化

熱処理における AdV , CV , PMMoV の不活化率を宿主細胞を用いたブラック形成法 , あるいは宿主植物を用いた感染性評価手法にて評価したところ , いずれの処理条件においても , PMMoV の不活化率は , AdV 及び CV の不活化率に比べて低い値となった . 従って , PMMoV は , 代表的な水系感染症ウイルスである AdV 及び CV に比べて熱処理における耐性が高いことが示された . ウイルスの不活化

が確認された処理条件において , PCR 法単独及び PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法を適用し , AdV , CV , PMMoV の遺伝子濃度の低減率を評価したところ , PCR 法単独においては遺伝子濃度の低減が見られなかったのに対し , PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法においては , 遺伝子濃度の低減が確認された . また , 得られた低減率は , 宿主細胞を用いたブラック形成法 , あるいは宿主植物を用いた感染性評価手法にて評価した不活化率に比べて幾分低い値であったものの , PCR 法単独にて評価した低減率に比べて不活化率に近い値となった . 従って , 不活化が確認された熱処理条件においては , PMA_{xx} 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カプシドタンパク質の損傷により , ウイルスの感染性が失われた状態であることが分かった . 以上の結果から , 熱処理においては , カプシドタンパク質の損傷が不活化の主要因であることが明らかとなった . また , カプシドタンパク質の損傷の受けやすさの差異が , 熱処理におけるウイルス種間の耐性の差異に関連している可能性が示唆された .

(3) 塩素処理におけるウイルスの不活化

塩素処理における AdV , CV , PMMoV の不活化率を宿主細胞を用いたブラック形成法 , あるいは宿主植物を用いた感染性評価手法にて評価したところ , 熱処理の場合と同様に , いずれの処理条件においても , PMMoV の不活化率は , AdV のみならず , 高い塩素耐性を有するとされる CV の不活化率に比べて低い値となった . 従って , PMMoV は , 代表的な水系感染症ウイルスである AdV 及び CV に比べて塩素処理における耐性が高いことが示された . ウイルスの不活化が確認された処理条件において , PCR 法単独及び PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法を適用し , CV 及び PMMoV の遺伝子濃度の低減率を評価したところ , 不活化率が 4 log 程度以下であった処理条件においては , PCR 法単独及び PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法にて評価した低減率は同程度となり , 1 log 未満であった (図 1) . 従って , 4 log 程度以下の不活化率が得られるような塩素処理条件においては , PMA_{xx} がウイルス粒子内部に透過できない状態 , すなわち , ウイルス粒子を構成するカプシドタンパク質の損傷がない状態であることが分かった . 以上の結果から , カプシドタンパク質の損傷を生じない程度の酸化や塩素化等 , 直接的な損傷以外の要因が不活化に寄与している可能性が示唆された . また , カプシドタンパク質の酸化・塩素化のし易さの差異が , 塩素処理におけるウイルス種間の耐性の差異に関連している可能性が示唆された . 一方 , 不活化率が 5 log 程度以上であった処理条件においては , PMA_{xx}-Enhancer-PCR 法にて評価した低減率は , PCR 法単独にて評価した低減率に比べて不活化率に近い値となった (図 1) . 従って , 5 log 程度以上の不活化率が得ら

れるような塩素処理条件においては、カプシドタンパク質の損傷が不活化に大きく寄与していることが明らかとなった。

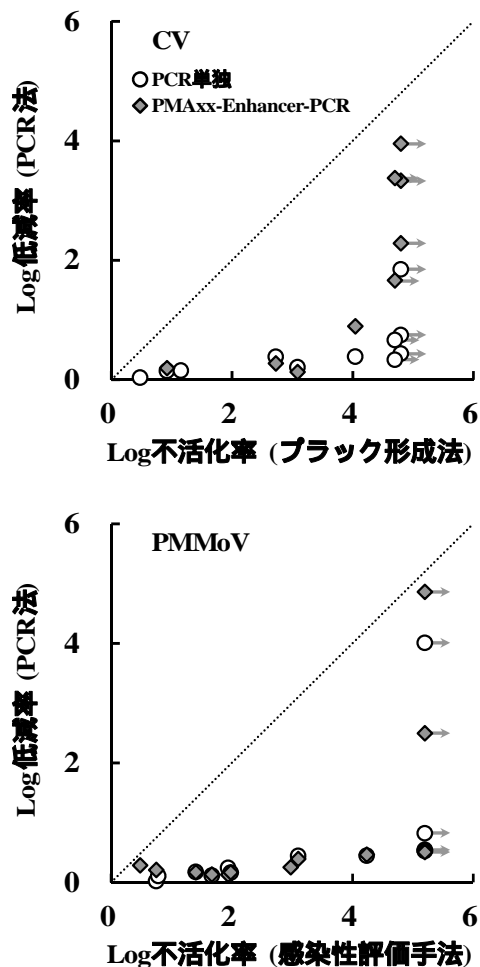


図1. 塩素処理におけるウイルスの不活化率と遺伝子濃度の低減率の比較

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

山下玲菜, 高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. 実浄水処理場におけるウイルスの処理性評価: ナノセラム陽電荷膜とタンジェンタルフローUF膜を併用した大容量濃縮法の適用. 第52回日本水環境学会年会, 2018年3月17日, 北海道札幌市.

高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦. トウガラシ微斑ウイルスと水系感染症ウイルスの塩素処理性の比較. 第25回衛生工学シンポジウム, 2017年11月10日, 北海道札幌市.

高力聡史, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦.

トウガラシ微斑ウイルスと水系感染症ウイルスの塩素消毒耐性の比較: 感染性評価手法とPMA-PCR法の併用による評価. 第51回日本水環境学会年会, 2017年3月15日, 熊本県熊本市.

白崎伸隆, 村井一真, 松下拓, 松井佳彦. 膜ろ過処理による水系感染症ウイルスの除去. 第19回日本水環境学会シンポジウム, 2016年9月13日, 秋田県秋田市.

〔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

白崎伸隆 (SHIRASAKI NOBUTAKA)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 60604692