

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630220

研究課題名(和文) 先進国社会における胃腸炎ウイルス適応進化による消毒剤耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of disinfection resistance of gastroenteritis viruses

研究代表者

佐野 大輔 (Daisuke, Sano)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80550368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ノロウイルスの塩素消毒耐性獲得メカニズムを解明することを目的とした。その結果、繰り返し遊離塩素に曝露することで、マウスノロウイルスの集団が塩素耐性を獲得することが可能であり、それはある特定の株が優占することによって生じる現象であることが確認された。なお、本研究の成果は計3つの学会で発表されたが、そのうち第55回臨床ウイルス学会において本研究の先駆性が認められ、研究代表者は若手奨励賞を受賞した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the mechanism of acquiring free chlorine-resistance of noroviruses. As a result, it was confirmed that a population of murine norovirus acquired the relatively high resistance against free chlorine treatment by repeatedly exposing to free chlorine, owing to the dominance of free chlorine-resistant mutants in the population. Based on these results, the project leader was honored (Encouraging Award for Young Researchers) in the 55th Conference of Japanese Society of Clinical Virology.

研究分野：土木環境システム

キーワード：胃腸炎ウイルス 消毒 耐性 水処理

1. 研究開始当初の背景

発展途上国のみならず、衛生状態が比較的良好とされる先進国社会においてもノロウイルスによる感染症が数多く発生している。このことは、ノロウイルスが個人の衛生レベルでの対処や地域社会における従来の上下水道設備によっては制御しがたい性質を有していることに起因すると考えられる。ノロウイルスは感染者の糞便中に大量（糞便 1g あたり 10^{10} 粒子以上）に存在しているため、先進諸国の都市部のように下水道が発達した地域では、生活排水に混入した状態で下水処理場に流れ込む。しかしながら、ノロウイルスの除去・不活化が下水処理場において十分に行われず、水環境中に放出されているのが現状である。水環境中に放出されたノロウイルスは、飲料水や養殖カキ、及びレクリエーション水などを通して再び人に感染するというライフサイクルを有していると考えられている。従って、このサイクルを断切するためには、下水処理過程において十分に除去・不活化を行うことが重要である。

下水処理場でのノロウイルス除去・不活化において重要な役割を果たすのが消毒処理である。下水処理場で施される消毒法には、塩素系消毒剤による処理、紫外線照射、及びオゾン処理等が存在するが、最も広汎に採用されている方法は遊離塩素処理である。しかしながら、ノロウイルスは大腸菌等の細菌と比べて高い塩素耐性を有することが知られており、下水処理過程において十分な不活化処理が行われているとは言い難い。また、ノロウイルスに塩素耐性をもたらす機構については、現段階で全く明らかにされていないのが現状であることから、どのレベルの消毒処理がノロウイルスの不活化において十分であるかについても明確な回答は得られていない状況にある。

遊離塩素はノロウイルスの外殻タンパク質（カプシドタンパク質）に直接作用して損傷を与え得ることから、ノロウイルスの粒子安定性に大きな影響を与えられ、従って、塩素処理を受けた際にノロウイルスが感染能力を保持するためには、一定以上のウイルス粒子安定性が求められる。このウイルス粒子安定性とは、粒子外殻を構成するカプシドタンパク質の構造的安定性であり、それはカプシド遺伝子配列によって保存され、遺伝子配列の変異により変化するものである。すなわち、ノロウイルスは高い変異速度と組換え頻度に代表されるウイルス学的性質と、そこから派生するウイルス粒子自体の物理化学的性質の進化による適応から成る生存戦略を有していると考えられる。塩素消毒を受けたノロウイルス集団のうち無傷であった一部が次の宿主に到達して増殖するというサイクルを経ることにより、ウイルス学的応答として遺伝子配列変異が生じ、その結果として消毒耐性を獲得することは十分に考えられる。言い換えると、ノロウイルス

はヒト体内での免疫圧力を受けているのみならず、上下水道設備といった高度な社会資本によって特徴付けられる文明社会に適応していくために、その高い進化能力を発揮することが可能であると考えられる。しかしながら、ワクチン等による医学的アプローチによって生じるウイルス学的応答については多くの研究が行われてきているものの、上下水道処理システムの存在により生じるウイルス学的応答の解析は、全世界を見渡しても全く行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、ノロウイルスの塩素消毒耐性獲得メカニズムを解明することを最終目的とし、繰り返し塩素に曝露することでノロウイルス集団が塩素耐性を獲得することが可能か否かを確認するための基礎的な研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、遊離塩素処理後のウイルスを再培養させるテスト系と、遊離塩素処理を行わずに希釈及び培養のみを行うコントロール系を設定することにより、テスト系で生じた遺伝子変異が遊離塩素処理に起因することを確認することを試みた。

本研究では、ヒトノロウイルスと同じカリシウイルス科ノロウイルス属に属し、なおかつ培養可能であるマウスノロウイルス（murine norovirus: MNV）を使用した。MNV 培養細胞として RAW264.7 細胞（マウスマクロファージ由来）を使用した。75 cm² フラスコを用いてインキュベータ内（温度 37°C、CO₂ 濃度 5%）で培養した。細胞密度が約 90% サブコンフルエント状態に達したことを顕微鏡で確認した後、細胞継代処理を行った。

フラスコ内に培養された RAW264.7 細胞に MNV を接種し、感染させた。その後インキュベータ内（CO₂ 濃度 5%、温度 37°C）で 3 日～5 日程度培養し、細胞変性効果（CPE）が現れたことを顕微鏡で確認した後、フラスコごと凍結・融解処理を計 3 回繰り返した。フラスコ内の培養液を 50 mL 遠沈管に移し、4°C、10,000×g、30 分の条件で遠心分離を行い、上清を採取して孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過を行った。ろ過後の培養液を 2mL チューブに分注して、ウイルス懸濁液を得た。

次亜塩素酸ナトリウム由来の遊離塩素により MNV を塩素処理したが、この際の初期遊離塩素濃度は 100 (mg/L) に設定し、処理時間は 2 分とした。遊離塩素の中和には 1% チオ硫酸ナトリウム溶液を用いた。

遊離塩素処理後の MNV の感染価を RAW264.7 細胞を用いたプラーク法により定量した。遊離塩素処理前後の感染価（PFU）をそれぞれ求め、感染価比の対数を取ることによって感染価対数減少値を求めた。さらに、遊離塩素処理前後のマウスノロウイルスの遺伝

子数を定量 RT-PCR により測定し、遊離塩素処理前後のウイルス遺伝子対数減少値を算出した。コントロール系においては遊離塩素処理前、テスト系においては遊離塩素処理後の MNV を RAW264.7 細胞で培養して個体数を増加させた。以上の培養-遊離塩素処理のサイクルを複数回繰り返した。

ウイルスゲノムの長さは原核細胞と比べて著しく短いとはいえ、MNV は 7400 程度の塩基長を有する。上述したように RNA ウィルスは様々な変異個体の集合体として存在していることから、配列解析は集団全体を対象として行う必要がある。本研究では、ウイルスゲノムの中から特に着目すべき領域を選択し、PCR により特異的に増幅後、様々な変異が混在する PCR 産物の配列情報を解析する。RNA ウィルスの消毒剤耐性メカニズムを議論する上でまず注意を払うべき遺伝子領域は、消毒剤と最初に接触する場であるカプシドタンパク質をコードする遺伝子である (~1,700bp) (図 1)。そこで MNV のカプシド遺伝子全長を増幅するプライマーを設計し、カプシド遺伝子を取得するための RT-PCR 系を構築した。当該遺伝子領域に関し、塩素処理 MNV 集団及び塩素無処理 MNV 集団について DGGE を行い、集団構成の変化を調査した。さらに、遊離塩素処理を繰り返し施した MNV 集団に対するアンプリコン解析において特異的に見出された遺伝子配列に関し、カプシド遺伝子の遺伝的多様度を算出した。

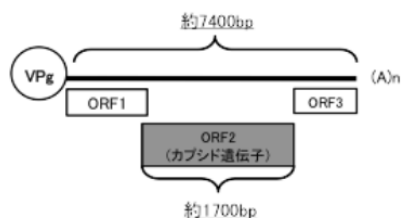


図 1 . マウスノロウイルスの遺伝子構造 .

4 . 研究成果

遊離塩素への繰り返し曝露による MNV の遊離塩素感受性が遷移する過程を感染価および遺伝子量の変化により追跡した。テスト系・コントロール系の両方において、サイクルを開始した直後は共に 4 log の感染価低下が見られた。その後サイクル数を増加させた際、コントロール系では Log reduction に大きな差は生じなかったが、テスト系では Log reduction が低下する現象が見られた (図 2)。この Log reduction の値は、サイクルを 15 回繰り返すことによって 3.2 まで低下したが、これは遊離塩素処理を繰り返し受けることにより、比較的高い塩素耐性を有する MNV 株が優占してきたためと考えられた。このような変化は定量 RT-PCR による遺伝子の定量

では見られなかった (図 3)。

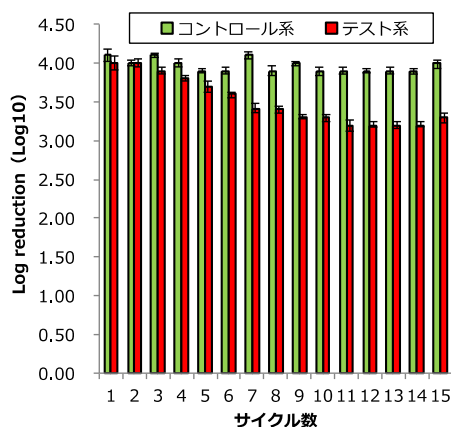


図 2 . 繰り返し遊離塩素処理によるマウスノロウイルスの感染価低下 .

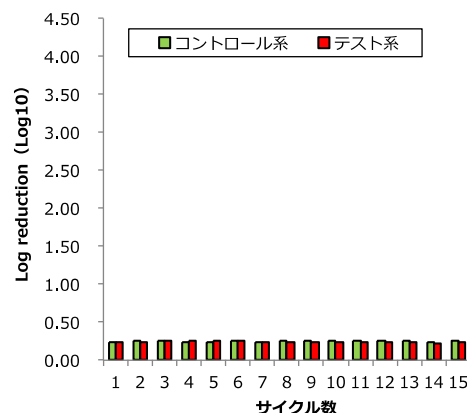


図 3 . 繰り返し遊離塩素処理によるマウスノロウイルスの遺伝子数低下 .

繰り返し遊離塩素処理の過程で MNV 集団の遺伝子型構成が変化していることを確認するために DGGE を行った (図 4)。その結果、遊離塩素処理を受けなかったコントロール集団においては遺伝子構成の変化が見られなかったものの、繰り返し遊離塩素処理を施された集団ではサイクルを重ねるに従って DGGE プロファイルが変化していることが観察された。この結果は、繰り返し遊離塩素処理によってある特定の遺伝子型の MNV が優占したことを示唆している。

Log reduction が 3.3 まで低下した 10 回目のサイクル後のサンプルについて、カプシドタンパク質遺伝子配列を解析したところ、10 カ所に変異が入っていることが確認された。このうち 4 カ所は同義変異であったが、その他の 6 カ所は非同義変異であった (図 4)。特に N/S 領域において比較的多い非同義変異 (5 カ所) が見られたことから、これらのアミノ酸変異がカプシドタンパク質の

安定性及び遊離塩素耐性に影響を与えたことが示唆された。

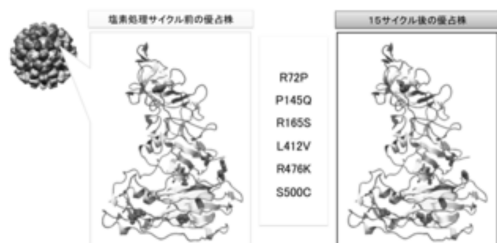


図4．遊離塩素繰返し暴露集団から得られた変異株における非同義変異．

以上の結果は、遊離塩素への繰返し暴露により、比較的塩素耐性の高い MNV 集団が得られることを示している。しかしながら、このような現象が再現性を有しているか否かについては、同条件で繰返し実験を行うことで確認する他ない。そこで、新たな MNV 集団に対して遊離塩素繰返し暴露実験を再度行った。

図5には、10回の遊離塩素繰返し暴露による感染価低下を示している。サイクル開始時には4 log 程度の感染価低下が見られていたが、10回のサイクルにより3.2 log 程度まで感染価低下幅は減少した(図6)。それに対し、遺伝子量の低下は10回のサイクルで見られなかった。これらの結果は1回目の試行とほぼ同じであったことから、遊離塩素への繰返し遊離塩素暴露により遊離塩素耐性集団が得られる現象が再現されたと言える。

続いて、遊離塩素繰返し暴露前と10サイクル後の MNV 集団から20個の株をランダムに単離し、それぞれからカプシドタンパク質遺伝子の PCR 産物を得た。その遺伝子配列を解析したところ、ある特定の配列が遊離塩素繰返し暴露後に優占していることが明らかとなった(図6)。この結果も、遊離塩素への繰返し遊離塩素暴露によりある特定の株が優占する現象が再現性あるものであることを示している。

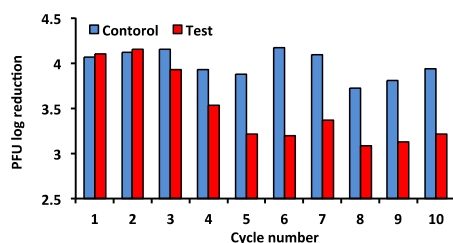


図5．繰返し遊離塩素処理によるマウスノロウイルスの感染価低下(2回目の試行)。

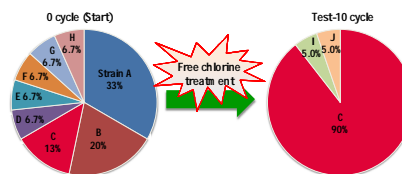


図6．遊離塩素繰返し暴露前と10サイクル後のマウスノロウイルス集団における遺伝子型構成．

以上の成果より、遊離塩素への繰返し暴露により、ノロウイルス集団が塩素耐性を獲得することが可能であり、それはある特定の株が優占することによって生じる現象であることが確認された。

なお、本研究の成果は計3つの学会で発表されたが、そのうち第55回臨床ウイルス学会において本研究の先駆性が認められ、研究代表者は若手奨励賞を受賞した。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) 佐野大輔．生活用水に潜むウイルス対策．バムサジャーナル、25、8-13、2013、査読無し。

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 佐野大輔、富岡哲史、渡辺幸三、中込とよ子、中込治、岡部聡．遊離塩素処理を受けたノロウイルスの自然選択に関する基礎的研究．第55回日本臨床ウイルス学会．2014年6月14日～15日、ロイトン札幌、北海道札幌市．
- 2) 佐野大輔、富岡哲史、渡辺幸三、中込とよ子、中込治、岡部聡．上下水道処理における消毒処理により胃腸炎ウイルスの選択は生じるか．第1回日本水環境学会年会．2014年5月9日、東北大学・青葉記念会館、宮城県仙台市．
- 3) 富岡哲史、渡辺幸三、岡部聡、佐野大輔．ノロウイルスの塩素消毒耐性獲得メカニズム解明に関する基礎的研究．土木学会北海道支部・平成25年度年次技術研究発表会、2014年2月2日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市．

〔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〕

○受賞（計1件）

第55回日本臨床ウイルス学会、若手奨励賞
（佐野大輔）

6．研究組織

(1)研究代表者

佐野 大輔（DAISUKE SANO）
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80550368

(2)研究分担者

渡辺 幸三（KOZO WATANABE）
愛媛大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：80634435