

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26249075

研究課題名(和文) グライコムクス情報を活用した下水処理水再利用における胃腸炎ウイルス制御の新展開

研究課題名(英文) New approach to control gastroenteritis viruses in wastewater reclamation and reuse by taking advantage of glycomics information

研究代表者

佐野 大輔 (Sano, Daisuke)

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：80550368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胃腸炎ウイルスの糖鎖認識を活用した下水処理過程における胃腸炎ウイルス制御方法を確立することを目的とした。平成26年度には、糖鎖マイクロアレイを用いてノロウイルス粒子が認識可能な糖鎖を検索した。平成27年度には、ノロウイルス粒子の糖鎖認識プロファイルをもとにGD1a陽性細菌を単離した他、HBGA陽性細菌を用いてノロウイルスの精密膜ろ過実験を行った。平成28年度には、下水処理過程におけるHBGA陽性細菌の動態を調査するためにHBGA合成遺伝子の同定を行った他、HBGAを認識するロタウイルスHAL1166株を用い、HBGA陽性細菌との共存状態での膜ろ過によるウイルス除去性能を評価した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to find a new approach to control gastroenteritis viruses in wastewater treatment processes by taking advantage of glycan-recognition of viruses. Firstly, glycans that can be captured by norovirus particles were identified by glycan microarray. Based on the glycan microarray results, GD1a positive bacteria were isolated from environmental water samples. Microfiltration of norovirus in the presence of HBGA-positive bacteria was then performed. HBGA-producing genes were identified to track HBGA-positive bacteria in wastewater treatment processes. Finally, the removal of rotavirus HAL1166, which and recognize HBGA, with microfiltration membrane was investigated.

研究分野：衛生環境工学

キーワード：胃腸炎ウイルス ノロウイルス 糖鎖 相互作用 ノロウイルス吸着性細菌 膜分離

1. 研究開始当初の背景

上下水道における衛生工学的管理の目的の一つは、飲料やレクリエーション用途を含む様々な形態の水利用を通じて感染性胃腸炎等の水系感染症が発生する確率を一定値以下に保つために、水中病原体の濃度を適正な水準で制御することであると言い換えられる。現行では、大腸菌濃度等の衛生指標微生物濃度を軸とした各種水質基準により水中病原体濃度が制御されているが、それによって様々な病原体に起因する水系感染症の発生が抑制されていることは疑いようのない事実である。かつて江戸末期から明治初期に年間10万人超の死者を度々出したコレラ等による水系感染症の発生件数が、当時とは比較にならないほど激減していることはその証左と言えよう。それに対し、ノロウイルスに代表される胃腸炎ウイルスは、向上した衛生環境及び発達した医療技術の恩恵を享受しているはずの先進諸国においても、ほとんど制御不可能であるのが現状である。日本国内におけるノロウイルス分離数の年次推移は、2000年代前半以降急激に増加し、現在では1年当たり2000~5000件程度の分離数が報告されている。先進国においてこれほどまでに胃腸炎ウイルス感染症が蔓延する理由を明らかにし、有効な対応策を打ち出すことが現在強く求められている。

特に胃腸炎ウイルスの適正な制御が強く求められている分野が、「下水処理水再利用」である。下水処理水中の病原体濃度は、放流前であれば「放流水の水質の技術上基準」、放流後であれば「生活環境の保全に関する環境基準」、再利用であれば「下水処理水の再利用水質基準等マニュアル」による管理が求められる。しかしながら、これらの各種水質基準における衛生指標として用いられている大腸菌もしくは大腸菌群は、ウイルスの指標としては必ずしも適さないことが報告されている (McQuaig et al., 2012. Appl. Environ. Microbiol., 78(18), 6423-6432)。また、ウイルスの種や遺伝子型によって浮遊懸濁物質への吸着特性が異なるため (da Silva et al., 2008. Environ. Sci. Tech., 42(24), 9151-9157) ある特定の指標ウイルスを下水処理水中の胃腸炎ウイルス制御を目的として使用することにも困難が伴う。理想的には、下水処理過程における胃腸炎ウイルスの挙動を精査し、下水処理水への流出特性を把握することが望ましいであろう。すなわち、下水処理再生水中の胃腸炎ウイルス制御に関しては、個々の重要なウイルスに関して下水処理過程における挙動特性を見極めた上で、下水処理水への流出制御を講ずることが必要である。

研究代表者のグループは、胃腸炎ウイルスの下水処理過程における挙動特性を考慮する上で非常に重要な知見をこれまでに得ている。すなわち、ノロウイルスは人の腸管上皮細胞上に発現している血液型決定抗原 (Histo-blood group antigen: HBGA) と呼ばれ

る糖鎖を認識することが報告されているが、この HBGA に良く似た糖鎖を細胞外に保持する腸内細菌が存在し、これらの腸内細菌が HBGA 様糖鎖を介してノロウイルスを特異的に捕捉しているという事実である (Miura et al., 2013. J. Virol., 87(17), 9441-9451)。腸内細菌種は糞便中の細菌及び活性汚泥細菌の重要な構成種であることから、我々が見出した事実は、糖鎖認識様式によって下水処理過程における胃腸炎ウイルスの挙動が大きく異なることを予見させるものである。しかしながら、この「胃腸炎ウイルスの糖鎖認識様式」は、本研究開始当初においては十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、胃腸炎ウイルスと活性汚泥細菌由来糖鎖間の特異的相互作用に着目し、網羅的解析により得られたグライコミクス情報を活用して、下水処理過程における全く新しい胃腸炎ウイルス制御方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、代表的な胃腸炎ウイルスとしてノロウイルスに着目し、ノロウイルスの複数遺伝子型に関する糖鎖認識様式の網羅的解析を糖鎖マイクロアレイを用いて行った。続いて、糖鎖マイクロアレイ解析により見出された糖鎖を保持する細菌を下水中から単離することを試みた。単離の際には、下水処理場から得られたサンプルを抗糖鎖抗体及び蛍光標識二次抗体で処理後、セルソータに投入し、蛍光標識された菌体を単離した。単離された細菌株については、16s rRNA 遺伝子解析による属同定を行った。

また、細菌とウイルス間の特異的相互作用が膜ろ過によるウイルス除去効率に影響を与えることを示すために、2つの実験を行った。1つは HBGA 陽性細菌である *Enterobacter* sp. SENG-6、及びリポ多糖中に B 型抗原を有する *Escherichia coli* O86 を用いたノロウイルスの精密膜ろ過実験である。これらの菌株とノロウイルスの混合液を精密膜によりろ過し、ろ液中のノロウイルス粒子を ELISA により検出した。2つ目は、トリプシン処理を施すことで HBGA 認識能を発現するロタウイルス HAL1166 株を用いた膜ろ過実験である。トリプシン処理 HAL1166 株と非トリプシン処理 HAL1166 株をそれぞれ *Enterobacter* sp. SENG-6 と混合し、0.2 μ m PTFE 膜を用いてクロソフローろ過を行った。

4. 研究成果

研究初年度である平成26年度には、まず糖鎖マイクロアレイを用いて、ノロウイルス粒子が認識可能な糖鎖を検索した。その結果、遺伝子型 GII.4 では Heparin 系 GAG、GM3、GM1a 及び Gb4 で、GII.6 では Heparin、GM1a、GT1a 及び Forssman antigen で有意なシグナルが検

出された。このうち GII.4 への GM1a と Gb4、GII.6 への Heparin、GM1a、GT1a 及び Forssman antigen の吸着は、これまでに吸着親和性に関する報告が行われていないものであった。

統合計算化学システム MOE を用いて Heparin 及び HBGA のノロウイルス外殻タンパク質に対する相互作用解析を行ったところ、GII.4 に対しては、A 抗原よりも Heparin の方が吸着親和性が高いという結果であった。GII.6 との相互作用に関しては、Heparin は鎖の長さが 4 糖以上で、かつ正荷電を有する領域に強い親和性を有することが示唆された。

研究 2 年目である平成 27 年度は、研究初年度に得られたノロウイルス粒子の糖鎖認識プロファイルをもとに、複数の遺伝子型のノロウイルス粒子への結合が認められた GD1a に着目し、GD1a 陽性細菌を単離することを試みた。単離の際には、下水処理場から得られたサンプルを抗 GD1a 抗体及び蛍光標識二次抗体で処理後、セルソータに投入し蛍光標識された菌体を単離した。その結果、計 256 株が単離され、そのうち 13 株が実際に GD1a を保持していることをドットプロット法により明らかにした。得られた 13 株から菌体外糖鎖を抽出してウェスタンブロットティングを行ったところ、3 株から GD1a が検出された。この 3 株のうち 2 株は *Aeromonas* 属、1 株は *Stenotrophomonas* 属であった。これらの結果は、非常に少数ではあるが GD1a を保持する細菌が環境中に存在することを示している。

また、これまでに得られている HBGA 陽性細菌である *Enterobacter* sp. SENG-6、及びリポ多糖中に B 型抗原を有する *Escherichia coli* O86 を用い、ノロウイルスの精密膜ろ過実験を行った。ノロウイルス粒子の直径は精密膜の孔径より十分に小さいため、精密膜による除去率は著しく低いが、*Enterobacter* sp. SENG-6 が共存した場合において除去率が有意に上昇した。また *Escherichia coli* O86 に関しても、細胞外物質を除去しリポ多糖が露出した状態にしてノロウイルスと混合した場合において、ノロウイルス除去率が有意に上昇した。これらの結果は、ノロウイルス吸着性糖鎖である HBGA によりノロウイルスが菌体に捕捉されることで、精密膜ろ過による除去が可能であることを示している。

平成 28 年度には、下水処理過程における HBGA 陽性細菌の動態を調査するために、HBGA 合成遺伝子を同定することを試みた。HBGA 陽性細菌である *Enterobacter* sp. SENG-6 の全ゲノムを解析し、さらにプロテオーム解析を行った。その結果、全ゲノム配列より *Enterobacter* sp. SENG-6 は *Enterobacter cloacae* に属する株であることが判明した他、約 20kDa の分子量を有するタンパク質が HBGA を保持する糖タンパク質候補として挙げられた。この遺伝子を標的とした定量 PCR 系を構築し、生物処理槽中の当該遺伝子

量を追跡することが可能となった。また、トリプシン処理を施すことにより HBGA と結合するロタウイルス HAL1166 株を用い、HBGA 陽性細菌との共存状態での膜ろ過によるウイルス除去性能を評価した。その結果、HBGA 陽性細菌存在下においては、ろ液中のトリプシン処理 HAL1166 株の濃度が経時的に減少したのに対し、非トリプシン処理 HAL1166 株の場合には、経時的な減少は明確に得られなかった。これらの結果は、HBGA 陽性細菌とウイルス粒子間の特異的相互作用により、膜ろ過によるウイルス除去を効率的に行うことが可能であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

(1) Daisuke Sano, Mohan Amarasiri, Akihiko Hata, Toru Watanabe and Hiroyuki Katayama. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. *Environment International*, 91, 220-229, 2016. doi: 10.1016/j.envint.2016.03.001

(2) Mohan Amarasiri, Satoshi Hashiba, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Satoshi Ishii, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Bacterial histo-blood group antigens contributing to genotype-dependent removal of human noroviruses with a microfiltration membrane. *Water Research*, 95, 383-391, 2016. doi: 10.1016/j.watres.2016.04.018

(3) Satoshi Ishii, Amarasiri Mohan, Satoshi Hashiba, Peiyi Yang, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Genome sequence of *Enterobacter cloacae* strain SENG-6, a bacterium producing histo-blood group antigen-like substances that can bind with human noroviruses. *Genome Announcements*, 4, e00893-16, 2016. doi: 10.1128/genomeA.00893-16

(4) 門屋俊介、伊藤寿宏、佐野大輔 . ノロウイルスの新知見 . 膜協会ジャーナル, 23, 7-15, 2016.

(5) 伊藤寿宏、押木守、小林直央、加藤毅、瀬川高弘、幡本将史、山口隆史、原田秀樹、北島正章、岡部聡、佐野大輔 . 下水再生処理におけるヒト腸管系ウイルスの目標除去効率の算定法 . 土木学会論文集 G(環境), 72(7), III_305-III_313, 2016.

(6) Toshihiro Ito, Tsuyoshi Kato, Makoto Hasegawa, Hiroyuki Katayama, Satoshi Ishii, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Evaluation of virus removal efficiency in unit processes directly applicable to multiple-barrier system for wastewater reclamation. *Journal of Water and Health*, 14, 879-889, 2016. doi:

(7) 佐野大輔．環境と胃腸炎ウイルス：ウイルス吸着性細菌との関わり．ウイルス, 66, 179-186, 2016.

(8) Takayuki Miura, Satoshi Okabe, Yoshihito Nakahara and Daisuke Sano. Removal properties of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process. Water Research, 75, 282-291, 2015. doi: 10.1016/j.watres.2015.02.046

(9) 佐野大輔．将来の社会システムにおける感染性胃腸炎リスク．最新医学, 70, 2415-2422, 2015.

(10) Toshihiro Ito, Tsuyoshi Kato, Kento Takagishi, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Bayesian modeling of virus removal efficiency in wastewater treatment processes. Water Science and Technology, 72, 1789-1795, 2015. doi: 10.2166/wst.2015.402

(11) Satoshi Ishii, Gaku Kitamura, Ayano Kobayashi, Takayuki Miura, Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Microfluidic quantitative PCR for simultaneous quantification of multiple viruses in environmental water samples. Applied and Environmental Microbiology, 80(24), 7505-7511, 2014. Doi: 10.1128/AEM.02578-14

(12) Takayuki Miura, Satoshi Okabe, Yoshihito Nakahara and Daisuke Sano. Removal property of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process. Water Research, 76, 33-42, 2015. Doi: 10.1016/j.watres.2015.02.046

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 佐野大輔．血液型決定抗原陽性細菌と胃腸炎ウイルス．第 3 回札幌微生物研究者合同セミナー．2016 年 12 月 12 日．北海道大学農学部食資源棟セミナールーム（北海道札幌市）

(2) 伊藤寿宏、押木守、小林直央、加藤毅、瀬川高弘、幡本将史、山口隆史、原田秀樹、北島正章、岡部聡、佐野大輔．下水再生処理におけるヒト腸管系ウイルスの目標除去効率の算定法．第 53 回環境工学研究フォーラム．2016 年 12 月 6 日～8 日．北九州国際会議場（福岡県北九州市）

(3) Mohan Amarasiri, Satoshi Hashiba, Satoshi Okabe, Tatsuya Miyoshi, Tomoyuki Tanaka and Daisuke Sano. Human glycan-positive bacteria as an adsorbent for norovirus. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 10 月 23 日～25 日．札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

市)

(4) Daisuke Sano, Mohan Amarasiri, Satoshi Hashiba, Takatomo Ohta, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Diversity of histo-blood group antigen-positive bacteria as a specific adsorbent for human noroviruses. 6th International Calicivirus Conference. 2016 年 10 月 9 日～13 日．Hyatt Regency (Savannah, USA)

(5) Toshihiro Ito, Tsuyoshi Kato, Satoshi Ishii, Takahiro Segawa, Masaaki Kitajima, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Log reduction of norovirus required in wastewater reclamation. 5th Food and Environmental Virology Conference . 2016 年 9 月 13 日～16 日．ホテル櫻井（群馬県草津町）

(6) Mohan Amarasiri, Daisuke Sano, Akihiko Hata, Toru Watanabe and Hiroyuki Katayama. A systematic review and meta-analysis on the virus removal efficiencies of wastewater treatment plant unit processes. 5th Food and Environmental Virology Conference . 2016 年 9 月 13 日～16 日．ホテル櫻井（群馬県草津町）

(7) 佐野大輔、羽柴聡、岡部聡．ヒトノロウイルス吸着性細菌の単離に関する研究．日本ウイルス学会北海道支部・第 50 回夏季シンポジウム．2016 年 7 月 23 日～24 日．北海道青少年会館コンパス（北海道札幌市）

(8) Mohan Amarasiri, Satoshi Hashiba, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Genotype dependent virus removal by microfiltration: Influence of bacterial histo-blood group antigens. 第 3 回環境水質工学シンポジウム．2016 年 5 月 21 日．愛媛大学工学部（愛媛県松山市）

(9) 羽柴聡、岡部聡、三好龍也、田中智之、佐野大輔．糖鎖認識プロファイル情報をもとにしたヒトノロウイルス吸着性細菌の単離に関する研究．第 50 回日本水環境学会年会．2016 年 3 月 16 日～18 日．アスティ徳島（徳島県徳島市）

(10) 小林直央、押木守、伊藤寿宏、瀬川高弘、幡本将史、井口晃徳、大久保努、上村繁樹、多川正、高橋優信、久保田健吾、原田秀樹、山口隆司、本山毅宜、荒木信夫、佐野大輔．DHS ((Downflow Hanging Sponge)) リアクターにおける病原ウイルスの除去効率．第 50 回日本水環境学会年会．2016 年 3 月 16 日～18 日．アスティ徳島（徳島県徳島市）

(11) 林祥一、岡部聡、中込とよ子、中込治、佐野大輔．共存細菌との結合が胃腸炎ウイルスの消毒効果に与える影響．第 50 回日本水環境学会年会．2016 年 3 月 16 日～18 日．ア

ステイ徳島（徳島県徳島市）

(12) Daisuke Sano, Takatomo Ohta, Amarasiri Mohan, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Diverse enteric bacteria can excrete histo-blood group antigens as adsorbents for human gastroenteritis viruses. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 . 2015 年 11 月 22 日～24 日 . 福岡国際会議場（福岡県福岡市）

(13) 羽柴聡、岡部聡、佐野大輔 . 下水中からのノロウイルス吸着性腸内細菌単離方法の確立 . 第 23 回衛生工学シンポジウム . 2015 年 11 月 12 日 . 北海道大学・フロンティア応用科学研究棟（北海道札幌市）

(14) Daisuke Sano. Estimation of pathogen density distribution in water based on left-censored dataset: Bayesian vs Maximum a posteriori. International Environmental Engineering Conference 2015. 2015 年 10 月 28 日～30 日 . BEXCO (Busan, Korea)

(15) Daisuke Sano, Takatomo Ohta, Amarasiri Mohan, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Diversity of histo-blood group antigen-positive enteric bacteria in water: possible environmental vehicle for human norovirus. WaterMicro2015. 2015 年 9 月 13 日～19 日 . The grand auditorium of Faculdade de Medicina Dentaria (Lisbon, Portugal)

(16) 佐野大輔、太田崇智、Mohan Amarasiri、三浦尚之、中込とよ子、中込治、岡部聡 . 下水中からの HBGA 陽性細菌の単離 . 第 2 回環境水質工学シンポジウム . 2015 年 5 月 9 日 . 山形大学農学部（山形県鶴岡市）

(17) 佐野大輔 . 胃腸炎ウイルスの感染制御に関する研究 . 第 3 回水環境科学・技術研修会 . 2015 年 4 月 10 日 . 高知大学農学部（高知県高知市）

(18) 佐野大輔 . 胃腸炎ウイルスと血液型決定抗原 . 第 49 回日本水環境学会年会・水中健康関連微生物研究委員会 . 2015 年 3 月 16 日 . 金沢大学（石川県金沢市）

(19) 太田崇智、岡部聡、中込とよ子、中込治、佐野大輔 . 下水からのノロウイルス吸着性腸内細菌の単離に関する研究 . 第 49 回日本水環境学会年会 . 2015 年 3 月 16 日～18 日 . 金沢大学（石川県金沢市）

(20) 佐野大輔 . 胃腸炎ウイルスの感染制御因子 . 第 11 回小児消化管感染症研究会 . 2015 年 2 月 7 日 . 大阪大学中之島センター（大阪府大阪市）

(21) Mohan Amarasiri, Takeshi Yoshimura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Genotype-dependent membrane separation of human noroviruses with bacterial histo-blood group antigen-like substances. 4th Food and Environmental Virology Conference. 2014 年 9 月 2 日～5 日 . Ionian Academy (Corfu town, Greece)

(22) Mohan Amarasiri, Takeshi Yoshimura, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Membrane separation of human noroviruses in combination with enteric bacteria bearing histo-blood group antigen (HBGA)-like substances. IWA Particle Separation Conference. 2014 年 6 月 15 日～18 日 . 北海道大学・学術交流会館（北海道札幌市）

(23) Mohan Amarasiri, Takeshi Yoshimura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Satoshi Okabe and Daisuke Sano. Norovirus removal with microfiltration in the presence of HBGA-like substances-bearing bacteria: A new approach to improve removal efficiency. 第 1 回環境水質工学シンポジウム . 2014 年 5 月 9 日 . 東北大学・青葉記念会館（宮城県仙台市）

〔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〕
特記事項なし

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

大村 達夫 (TATSUO OMURA)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授
研究者番号 : 30111248

中込 治 (OSAMU NAKAGOMI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
研究者番号 : 70143047

木村 克輝 (KATSUKI KIMURA)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号 : 10292054

加藤 毅 (TSUYOSHI KATO)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：40401236