

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02272

研究課題名(和文)水循環システムに起因する水系感染症ウイルスの環境適応進化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Environmental adaptive evolution of waterborne viruses under water recycling systems

研究代表者

大村 達夫 (Omura, Tatsuo)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルス、ヒトロタウイルスとしてサルロタウイルスを用い、遊離塩素への繰返し曝露がもたらすウイルス集団の適応進化に関する研究を行った。その結果、両方のウイルスに関し、遊離塩素への繰返し曝露により遊離塩素耐性集団を得ることに成功した。マウスノロウイルスに関しては外殻タンパク質遺伝子配列、サルロタウイルスに関しては全ゲノム配列の解析を行ったところ、遊離塩素への繰返し曝露により、ある特定の形質を有する株の優占が生じることが明らかとなった。以上の結果から、水処理によく用いられる遊離塩素処理が、胃腸炎ウイルスへの淘汰圧として働いていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the adaptive evolution of gastroenteritis viruses under the repeated disinfection with free chlorine. Murine norovirus (MNV) and Rhesus rotavirus (RRV) were used as surrogates for human norovirus and rotavirus. As a result, resistant populations of these viruses to free chlorine were successfully acquired by the repeated treatment with free chlorine. The single nucleotide polymorphisms revealed that specific mutations were found in outer capsid proteins of these viruses, which implied that some mutations in structural proteins may contribute to the virion stability and lead to the change in free chlorine susceptibility. Based on these results, it was concluded that the free chlorine disinfection can be regarded as a selection pressure on gastroenteritis viruses.

研究分野：環境水質工学

キーワード：水系感染症ウイルス 消毒剤耐性 ノロウイルス ロタウイルス 遊離塩素

1. 研究開始当初の背景

胃腸炎ウイルスによる水系感染症の問題に積極的に対処していくためには、ウイルスが有していると考えられる生存戦略を明らかにし、その戦略の成立要件を崩すことが有効と考えられる。それではその水系感染症ウイルスが有する生存戦略とはどのようなものなのか。研究代表者のグループは、その生存戦略は高い変異速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環境適応による進化に依存していると考えた。感染者から排出された水系感染症ウイルスが次の宿主に達するまで感染能力を保持するためには、ウイルスの生活環で重要な位置を占める水環境中において、様々な環境ストレス(日光照射など)を乗り越えるために一定以上のウイルス粒子安定性が求められる。一方で、水系感染症ウイルスは病原細菌等の他の病原体と比べて著しく高い突然変異速度を有していることから、ウイルス集団の中には多様な変異個体(遺伝的多様性)が生じている(quasispecies、図1)。最も個体数の多い遺伝子配列(master sequence)も重要であるが、個体数の少ないminor sequencesが共存しているウイルス集団の方が、適応価が高く集団全体としての存続には有利であるとの知見もある。つまり、生活環の中で環境ストレスに曝されることにより、環境ストレス耐性を有する変異個体が出現する確率が高まると考えられる。ここで水処理プロセスにおける消毒処理を胃腸炎ウイルスに対する環境ストレスの1つと考え、消毒処理を繰り返し受けることにより耐性を保持する方向に極めて早い速度で集団全体が適応進化する可能性がある。言い換えると、水系感染症ウイルスは水循環システムを含む高度な社会資本によって特徴付けられる文明社会に適應するために、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。ここにこそ、先進諸国において水系感染症ウイルスが蔓延する際のアドバンテージが存在すると考えた。

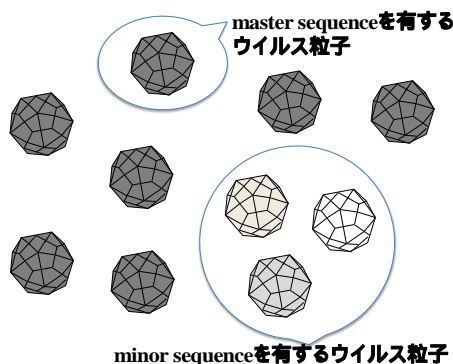


図1. Quasispecies概念図.

しかしながら、ヒト体内における宿主免疫

圧への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ほとんど報告されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、特に水系感染症ウイルスの感染能力へ直接的な影響を与えることでウイルス学的適応を惹起することが予想される上下水道処理における消毒処理に着目し、「水処理過程における消毒処理が水系感染症ウイルス感染ルートの中で選択圧の1つとして働き、ウイルス学的適応進化が生じている」という独自の仮説を立て、それを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、消毒剤として遊離塩素を、テストウイルスとしてマウスノロウイルス(murine norovirus: MNV)およびサルロタウイルス(rhesus rotavirus: RRV)を用いた。

(1) MNVの遊離塩素感受性試験

MNV S7-PP3株に対し、培養-遊離塩素処理(遊離塩素初期濃度 50ppm、反応時間 2分)-培養を繰り返すテスト系と、遊離塩素処理を行わずに培養-希釈-培養を繰り返すコントロール系を設定して10回のサイクルを行った。遊離塩素処理に対する感受性を各サイクルごとに確認した他、サイクルを1回、5回及び10回繰り返した後におけるMNV集団遺伝子構造を、カプシド遺伝子配列の次世代シーケンス結果をもとに分析した。

(2) RRVの遊離塩素感受性試験

RRVに対し、遊離塩素消毒のCT値を5.45 mg・min/Lに設定し、遊離塩素消毒 培養 遊離塩素消毒のサイクルを5回繰り返した(テスト系)。また、遊離塩素消毒の代わりに希釈 培養 希釈のサイクルを5回繰り返す系をコントロール系とした。遊離塩素による各サイクルの不活化効率を比較し、テスト系とコントロール系において有意差が生じるか検証した。また、遊離塩素処理に対する感受性を各サイクルごとに確認し、各サイクル後におけるRRV集団遺伝子構造を、全ゲノム配列の次世代シーケンス結果をもとに分析した。

4. 研究成果

(1) MNVの遊離塩素感受性試験

MNVに対して塩素消毒処理を施さないコントロール系においては、遊離塩素処理により約4.0 logの感染価低下が10回のサイクルを通じて見られ、MNVの遊離塩素への感受性に有意な変化は生じなかった。それに対しテスト系においては、サイクルが進むごとに遊離塩素感受性が低下し、10回目のサイクル後には感染価低下が3.3 logに留まった。このことは、遊離塩素への繰り返し曝露により、遊離塩素感受性の低い(遊離塩素耐性の)

MNV 集団が得られたことを意味する。遊離塩素への繰返し曝露実験は2回行なったが、2回とも同じ傾向の結果が得られたことから、遊離塩素耐性 MNV 集団の出現は再現性を有することが明らかとなった。

遊離塩素への繰返し曝露実験により得られた MNV 集団に対し、外殻タンパク質遺伝子 (ORF2 及び ORF3) を対象とした次世代シーケンス解析を行い、各領域における遺伝的多様性を Shannon Index (SI) により評価した。その結果、コントロール系ではサイクルを経るにしたがって SI の値が上昇したのに対し、テスト系では減少することが観察された。この結果は、遊離塩素への繰返し曝露は MNV の遺伝的多様性を低下させる効果があることを示している。

次に、外殻タンパク質遺伝子中の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) を確認したところ、VP2 (ORF3) の C 末端近くの領域にのみ、テスト系とコントロール系の間で優占配列の入れ替わりが観察された。テスト系における優占配列では、VP2 において Phe200Ser の非同義変異が認められた。これらの結果は、遊離塩素への繰返し曝露により、特定の株の優占が生じたことを示している。

以上の結果より、遊離塩素処理はノロウイルスに対する淘汰圧として作用すると結論付けられる。ノロウイルスは遺伝的に多様であるため、ほぼ毎年異なる遺伝系統のノロウイルスが流行しているが、ノロウイルスはトイレからの汚水に多く含まれていることから、下水処理場、浄化槽及び集落排水処理施設などで処理水を十分に消毒することで、水を介したノロウイルスの感染を防ぐのみならず、遺伝的な多様性を低下させて新型の出現確率を下げるのが可能と考えられる。また、本研究の成果は、適切な汚水処理施設が普及していない途上国が、新型ノロウイルスの出現現場となっていることを示唆するものである。持続可能な発展目標 (Sustainable Development Goals) にも設定されている「汚水処理施設の全世界的な普及」に積極的に取り組むことは、新型ノロウイルスの出現を防ぎ、日本国内への輸入感染発生の可能性を減じる効果があると言える。

(2) RRV の遊離塩素感受性試験

サイクル実験による RRV 不活化効率の推移を確認したところ、1 回目のサイクルで既にテスト系とコントロール系の不活化効率に有意差が見られ、3 回目以降のテスト系の不活化効率はコントロール系の約 0.55 倍となった。RRV に対する遊離塩素への繰返し曝露実験は2回行なったが、2回とも同じ傾向の結果が得られたことから、遊離塩素耐性 RRV 集団の出現は再現性を有することが明らかとなった。

図2にはテスト系の RRV 構造タンパク質上の変異アミノ酸残基の出現頻度の遷移を示した。テスト系において、外殻タンパク質 VP7 のアミノ酸番号 281 におけるトレオニン

からイソロイシンへの変異 (T281I) の顕著な増加が見られた。サイクル一回目までこの残基の頻度は検出限界以下であったが、サイクル一回目では約 10% に増加した。

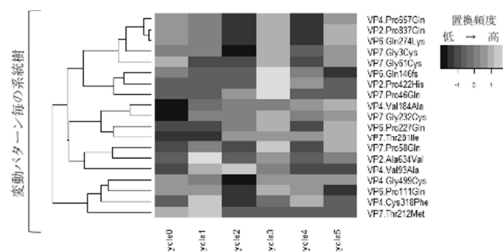


図2 . テスト系における変異アミノ酸残基の出現頻度

また、外殻タンパク質における T281I の頻度と不活化効率には高い相関が認められた ($r^2 = 0.78$)。イソロイシンは疎水性残基であり、外殻タンパク質に生じた変異による疎水性残基間の相互作用が外殻タンパク質に構造安定性をもたらしたことにより、RRV が遊離塩素耐性を獲得した可能性が考えられる。

本研究で特定したアミノ酸残基が実際に遊離塩素耐性に関与するかを実証するため、耐性株を単離し、塩素感受性を試験する必要がある。また、データバンクから取得可能な RRV 外殻タンパク質の立体構造に対して本研究で特定された変異残基のマッピングを行い、外殻タンパク質に与える荷電状態等の影響を確認する必要がある。

本研究により、遊離塩素の繰返し曝露実験により遊離塩素耐性 RRV 集団が出現することが示された。さらに、遊離塩素耐性 RRV 集団において、ある特定の变異を外殻タンパク質に有する株が顕著に増加したことが観察された。以上の結果より、遊離塩素処理がロタウイルスに対しても淘汰圧として作用しうると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Andri Taruna Rachmadi, Masaaki Kitajima, Kozo Watanabe, Satoshi Okabe, Daisuke Sano. Disinfection as a selection pressure on RNA virus evolution. *Environmental Science and Technology*. 52, 2434-2435, 2018.

Kozo Watanabe, Michael T Monaghan. Comparative tests of species-genetic diversity correlations in neutral and nonneutral loci in four species of stream insect. *Evolution*. 71, 1755-1764, 2017.

Wakana Oishi, Daisuke Sano, Loic Decrey, Syunsuke Kadoya, Tamar Kohn, Naoyuki Funamizu. Identification of the inactivating

factors and mechanisms exerted on MS2 coliphage in concentrated synthetic urine. Science of the Total Environment. 598, 213-219, 2017.

Fuminari Miura, Toru Watanabe, Kozo Watanabe, Kazuhiko Takemoto, Kensuke Fukushima. Comparative assessment of primary and secondary infection risks in a norovirus outbreak using a household model simulation. Journal of Environmental Sciences. 50, 13-20, 2016.

Miyu Fuzawa, Kang-Mo Ku, Sindy Paola Palma-Salgado, Kenya Nagasaka, Hao Feng, John. A. Juvik, Daisuke Sano, Joanna L. Shisler, Thanh H. Nguyen. Effect of leaf surface chemical properties on efficacy of sanitizer for rotavirus inactivation. Applied and Environmental Microbiology. 82, 6214-6222, 2016.

井原賢、稲葉愛美、佐野大輔．衛生環境工学におけるマイクロビーム研究．臨床と微生物．42(6), 21-25, 2015.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

Daisuke Sano. Genetic determinants of noroviruses for susceptibility to free Chlorin. Symposium for Risk Reduction of Infectious Diseases from Different Perspectives. 2018 年 3 月 20 日. 東北大学星陵キャンパス(宮城県仙台市)

門屋俊祐、浦山俊一、布浦拓郎、北島正章、岡部聡、佐野大輔．遊離塩素耐性ロタウイルスの変異遺伝子および耐性メカニズムの解明．第 54 回環境工学研究フォーラム．2017 年 11 月 18 日．岐阜大学(岐阜県岐阜市)

Syunsuke Kadoya, Syunichi Urayama, Takuro Nunoura, Masaaki Kitajima, Satoshi Okabe, Daisuke Sano. Genetic factors of rotavirus determining free chlorine-tolerance. Water and Environment Technology Conference 2017 年 7 月 22 日．北海道大学(北海道札幌市)

Andri Taruna Rachmadi, Arata Nakamura, Masaaki Kitajima, Satoshi Okabe, Daisuke Sano. A genetic factor of norovirus for resistance to free chlorine disinfection. Water and Environment Technology Conference. 2017 年 7 月 22 日．北海道大学(北海道札幌市)

Andri Taruna, Masaaki Kitajima, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Satoshi Okabe, Daisuke Sano. A Comprehensive study: Genetic factors of norovirus for determining free chlorine susceptibility. 第 4 回環境水質工学シンポジウム．2017 年 6 月 17 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)

門屋俊祐、浦山俊一、布浦拓郎、北島正章、岡部聡、佐野大輔．遊離塩素耐性に寄与するロタウイルス遺伝的ファクターの同定．第 4 回環境水質工学シンポジウム．2017 年 6 月 17 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)

門屋俊祐、浦山俊一、布浦拓郎、北島正章、岡部聡、佐野大輔．遊離塩素耐性ロタウイルスの変異遺伝子同定に関する研究．第 51 回日本水環境学会年会．2017 年 3 月 15 日、熊本大学(熊本県熊本市)

門屋俊祐、北島正章、岡部聡、佐野大輔．ロタウイルスの塩素消毒耐性獲得メカニズムに関する研究．第 24 回衛生工学シンポジウム．2016 年 11 月 15 日．北海道大学(北海道札幌市)

佐野大輔．遊離塩素処理がノロウイルスの遺伝的多様性に与える影響．第 57 回日本臨床ウイルス学会．2016 年 6 月 18 日．ホテル華の湯(福島県郡山市)

中村新、渡辺幸三、八重樫咲子、岡部聡、中込とよ子、中込治、佐野大輔．遊離塩素処理がノロウイルスの遺伝的多様性に与える影響．第 50 回日本水環境学会年会．2015 年 3 月 16 日、アスティとくしま(徳島県徳島市)

佐野大輔．衛生環境工学におけるゲノム解析技術の応用．第 157 回日本獣医学会学術集会．2015 年 9 月 7 日．北里大学獣医学部(青森県十和田市)

〔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〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

李玉友(YU-YOU LI)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30201106

佐野大輔(DAISUKE SANO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：80550368

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