

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03792

研究課題名(和文) ノロウイルス感染症制御を可能とする水インフラの実現

研究課題名(英文) Development of novel water infrastructure able to control human norovirus prevalence

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・名誉教授

研究者番号：30111248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトノロウイルスの代替モデルウイルスとして使用したマウスノロウイルスにおいて、遊離塩素およびアルカリ処理による消毒がマウスノロウイルス集団が消毒耐性を獲得する適応進化を起していることを明らかにした。この結果は、下水処理で行われる消毒試験において、消毒への感受性がより高い(つまり、消毒耐性がより低い)ウイルス株を使って消毒効率を推定した場合、実際の下水処理過程で生み出される感受性の低い(耐性の高い)ウイルス株の不活性化効率を誤って評価している可能性が高いことを示唆している。消毒試験において感受性の低いウイルス株を用いる必要性を示す発見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水処理場はヒトを感染症から守る重要な水インフラであるが、下水処理過程で行われる消毒処理が、ノロウイルス等の病原体への消毒耐性を獲得させる進化圧となっている可能性がある。本研究は、培養細胞を使った実験室レベルのウイルス進化実験を行い、水インフラ環境に起因する病原体の適応進化を示す証拠を示した。この知見は、下水処理により除去/不活化されにくいノロウイルスの遺伝系統を見極め、それらを不活化するために十分な消毒剤の添加量を定めるための基礎的知見として活用される。

研究成果の概要(英文)：In mouse noroviruses used as surrogate model viruses for human noroviruses, we found that disinfection with free chlorine and alkaline treatment caused adaptive evolution in which the mouse norovirus population acquired disinfection resistance. These results suggest that the use of virus strains with higher susceptibility to disinfection (i.e., lower disinfection resistance) in disinfection tests performed in sewage treatment is likely to introduce bias in the assessment of viral strain inactivation efficiency. This finding indicates the need to use less susceptible virus strains in disinfection testing.

研究分野：水質工学

キーワード：ノロウイルス 水インフラ 消毒剤耐性 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスによる感染症被害が世界中で発生している。ノロウイルスが遺伝的な進化により人間社会に被害をもたらし続ける生存戦略を有していること、ノロウイルス感染症が先進国における上下水道システム等の衛生工学施設の導入や個人の衛生レベルでの対処(手洗い等の徹底)のみでは制御することが困難であること、などが影響していると考えられる。ワクチンや特效薬が存在しないノロウイルスの感染症を制御するためには、河川環境など水環境中での動態を含むノロウイルスの生活環を十分に理解した上で、ノロウイルスの進化を最小限に抑えることが可能な水インフラを提案し、先進国・途上国を問わず導入していくことが求められる。

ノロウイルスの進化に関する従来の議論では、ノロウイルスがヒトに感染し増殖する際に遺伝子複製エラーにより生じる「遺伝子変異」、ヒト体内で抗体などの免疫機構に曝されることにより免疫を回避する方向に進化した遺伝的系統が生存する効果である「免疫ストレスに起因する選択」、及び糞便と共に体外に排出されたノロウイルスが水環境中で希釈され、排出されたもののうちほんの一部しか次の宿主(ヒト)まで辿り着かないために生じる生存に関する偶然性の効果である「遺伝的浮動」の計3つが進化速度(単位期間当たりの変異速度)を決める主なファクターとして扱われてきた(Cotten et al., 2014, *Journal of Virology*, 88(19), 11056-11069)。このうち「遺伝子変異」は遺伝的多様性を上昇させるものであり、病原性が増した遺伝系統が発生するのもこの「遺伝子変異」によるものである。それに対し、「選択」と「遺伝的浮動」は共に遺伝的多様性を低下させるものであり、それによって病原性が増した遺伝系統が定着する可能性を減じる効果がある。しかしながら、これら3つのファクターのみでは人間社会に被害をもたらし続けるノロウイルスの進化を十分に説明するには至っておらず、全く新しい視点の導入が待たれている状況にある。

本研究では、ノロウイルスの進化を説明する新たな視点として、「水インフラ環境に起因する選択」を導入する。糞便に混入した形で体外に排出されたあと、次の宿主に至るまでのプロセスにおいては、「遺伝的浮動」のみが作用するというのが一般的な認識である。しかしながら、浄水・下水処理の際の消毒処理など、ノロウイルスの除去/不活化に寄与する水インフラが存在する場合、これらの除去/不活化ファクターに対する耐性が高い遺伝系統の生残確率が高くなる可能性がある。この場合、外界では「遺伝的浮動」に加え「選択」の効果が存在することになる。上述の消毒処理の有無は、その地域の水インフラの成熟度に依存するので、この外界での選択は「水インフラ環境に起因する選択」と表現することができる。上述したように「選択」は遺伝的多様性を減少させるものである。病原性が増した胃腸炎ウイルスの遺伝系統を発生させる確率を低下させるには、この選択が生じるような水インフラに転換することが重要である。しかしながら、現在に至るまで「水インフラ環境に起因する選択」は実証されていない。

以上の背景のもと、本研究では、「ノロウイルスの進化に水インフラ環境に起因する選択が寄与しているか否か」を学術的「問い」とする。

2. 研究の目的

ノロウイルスの進化に「水インフラ環境に起因する選択」が寄与している場合、水インフラ環境の違いによってノロウイルスの進化速度が異なることになる。そこで本研究では、上述の学術的「問い」に答えるため、「水インフラ環境が異なる地域間でノロウイルスの進化速度が異なる」との仮説を立て、その実証を行うことを目的とする。この仮説は、研究代表者が長年携わってきた水中病原ウイルスに関する研究実績を基盤として独自に立てられたものであり、世界中のどこを見渡しても存在しないものであることから、その学術的独自性は著しく高い。

本研究により「水インフラ環境に起因する選択圧」がノロウイルスの進化におけるファクターの1つであることが示されれば、ノロウイルスの進化を抑制するために必要な水インフラの整備が可能となる。具体的には、水処理により除去/不活化されにくいノロウイルスの遺伝系統を見極め、それらを不活化するために十分な消毒剤の添加量を定めることができるようになる。同時に、ノロウイルスの進化の方向性を予測する試みを通じて得られる知見から、ワクチン開発などに繋げることが出来れば、感染症制御に多大な貢献となるワクチン開発を土木工学の立場から行うことが可能と考えられる。以上のことは、本研究の成果が大きな波及効果を秘めることを意味していることから、本研究は高い創造性を有するものと言える。

3. 研究の方法

ヒトノロウイルスの代替となるマウスノロウイルスを用いた消毒処理による環境選択実験により、消毒剤耐性を有するマウスノロウイルスの遺伝系統を取得すること、及び下水・汚水由来のノロウイルス遺伝子取得を目的とした実験を行った。この選択実験は、仙台市内で採取した下水処理水にマウスノロウイルス S7-PP3 株を添加し、実験室条件下において遊離塩素を用いた消毒処理を行った。消毒処理後、生残したマウスノロウイルスを RAW264.7 細胞に接種して増殖させた。この「消毒 増殖 消毒」のサイクルを 10 回繰り返すことで、遊離塩素により不活化されにくいマウスノロウイルスの遺伝系統を得た。得られた遊離塩素耐性マウスノロウイルス集団、および遊離塩素を用いずに希釈と培養のみを繰り返した対照マウスノロウイルス集団に

対し全ゲノム解析を行った。それぞれの集団からマウスノロ遺伝子抽出・逆転写処理後に次世代シーケンシング (Next generation sequencing: NGS) 技術により全長配列 (約 7000 塩基) を確定した。また、仙台市内の下水処理場で採取した未処理下水から得られたノロウイルス遺伝子配列も取得した。

オンサイトのサニテーション施設で糞便汚泥の消毒剤として使用されることがある消石灰 (水酸化カルシウム) によるアルカリ処理に対して比較的抵抗性の高いマウスノロウイルス集団の取得を試みた。ウイルスは石灰処理によって不活性化されるが、RNA ウイルスが石灰処理に適應するかどうかはまだ分かっていない。そこで、上で説明した遊離塩素を用いた環境選択実験と同じ手順で、マウスノロウイルスが石灰処理により連続継代で高い耐性を獲得することを示す実験を行った (図 1)。このマウスノロウイルス集団に対して次世代シーケンシング技術を適用することで、アルカリ処理抵抗性の高いマウスノロウイルス集団に特異的に見られた遺伝子変異を同定した。

最後にアルカリ処理抵抗性の高いマウスノロウイルス集団をリバースジェネティクス法により人工的に創生することを試みた。アルカリ処理抵抗性の高いマウスノロウイルス集団において特異的に見られた外殻タンパク質中のアミノ酸変異を人工的に合成した。さらに、得られた変異株 (インフェクシャスクローン) について消毒剤感受性を評価し、どの遺伝子変異がどの程度消毒剤耐性に貢献していたかを調査した。

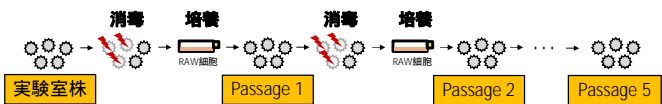
4. 研究成果

マウスノロウイルスを用いた消毒処理による環境選択実験により、遊離塩素に対し有意な耐性を保持する集団の取得に成功した。得られた遊離塩素耐性マウスノロウイルス集団、および遊離塩素を用いずに希釈と培養のみを繰り返した対照マウスノロウイルス集団に対し次世代シーケンサーでウイルスの全ゲノムを解読し、マウスノロウイルスゲノムのオープンリーディングフレーム 2 (ORF2) と ORF3 を解析したところ、マイナーカプシドタンパク質 VP2 をコードする ORF3 のヌクレオチド (nt) 7280 にユニークな非同義変異 (フェニルアラニンからセリンへの変化に対応) が、両方の試験の塩素暴露集団で検出された。また、塩素処理した集団のクローンは、いずれも対照集団のクローンに比べて遊離塩素に対する感受性が低いことが確認された。以上の結果から、遊離塩素への曝露による適応的進化により、マウスノロウイルス粒子の安定性が向上しているものと推測された。

得られたアルカリ処理耐性マウスノロウイルス集団、及びアルカリ処理を用いずに希釈と培養のみを繰り返した対照マウスノロウイルス集団に対し全ゲノム解析を行った。ウイルスゲノムの 3 つのオープンリーディングフレームの同義および非同義塩基多様性を比較したところ、石灰処理の連続継代の過程でウイルス集団が自然選択を受けていることが明らかになった (図 2)。石灰処理への適應は、主要カプシド蛋白質 VP1 の 345 位のリジンからアルギニンへのアミノ酸置換 (K345R) と一致し、その割合は 90% 以上であった。プラスミドを用いた逆転写法により作製した K345R を持つ感染クローンは、石灰液でより大きな耐性を示したことから、この特定のアミノ酸置換が石灰処理におけるウイルスの耐性に単独で関与していることが示唆された。

アルカリ処理抵抗性の高いマウスノロウイルス集団をリバースジェネティクス法により人工的に創生したマウスノロウイルス粒子のアルカリ処理感受性は、当該アミノ酸変異を持たないマウスノロウイルス粒子に比べ、有意に高いアルカリ処理

Ca(OH)₂水溶液で消毒後に培養



コントロール

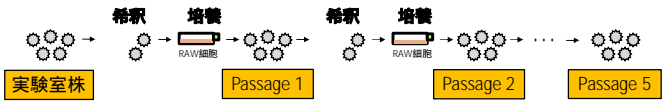


図 1 アルカリ処理と対照系におけるマウスノロウイルスの連続培養

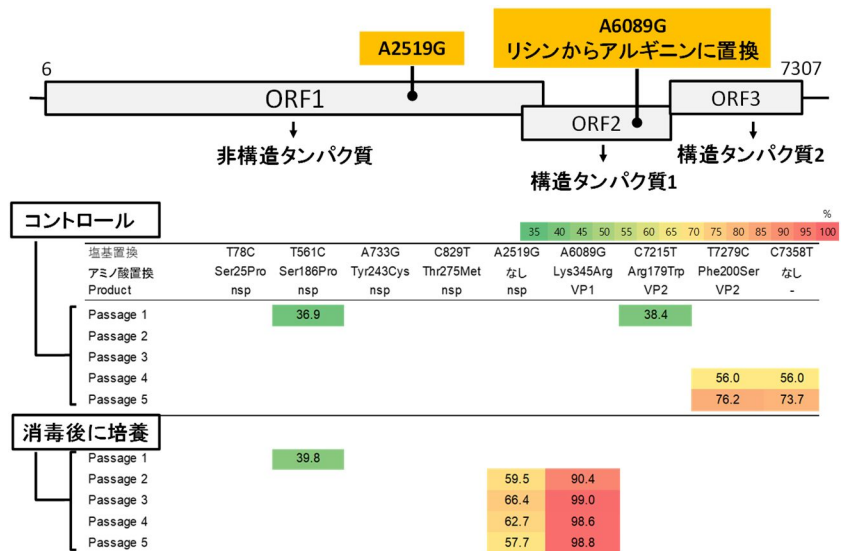


図 2 遊離塩素耐性マウスノロウイルス集団と対照集団のウイルスゲノムの 3 つのオープンリーディングフレームの比較

感受性を示した（図3）。このことから、今回マウスノロウイルス集団から見出されたアミノ酸変異がアルカリ処理抵抗性に関与していることが実験的に示された。

本研究は、遊離塩素消毒およびアルカリ処理がヒトノロウイルスの代替となるマウスノロウイルスに適応進化を起こす選択圧を起こしていることを明らかにした。下水処理などにおける消毒試験において、消毒への感受性がより高い（消毒耐性がより低い）ウイルス株を使って消毒効率を推定した場合、実際の下水処理過程で生み出さる感受性の低い（耐性の高い）ウイルス株の不活性化効率を誤って評価している可能性が高い。消毒試験における代表ウイルスとして感受性の低いウイルス株を用いる重要性を示す発見となった。

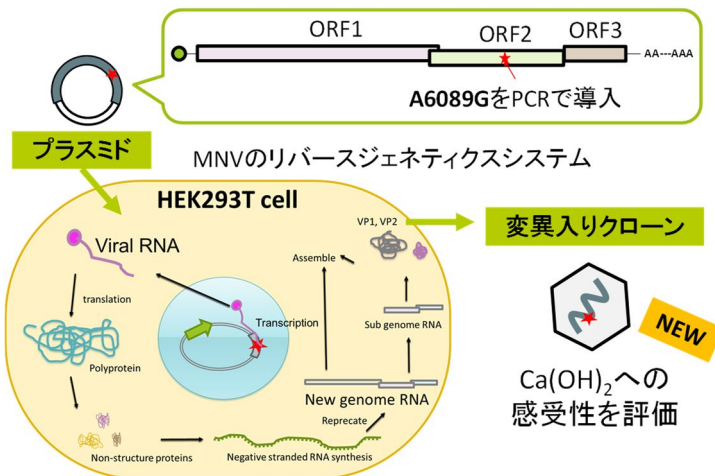


図3 リバースジェネティクス法により人工的に創生したマウスノロウイルス粒子を使ったアルカリ処理感受性試験

重要性を示す発見となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito, E., J. Pu, T. Miura, S. Kazama, M. Nishiyama, H. Ito, Y. Konta, G. T. Nguyen, T. Omura, T. Watanabe	4. 巻 8
2. 論文標題 Weekly Variation of Rotavirus A Concentrations in Sewage and Oysters in Japan, 2014-2016	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens8030089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Oishi Wakana, Sato Mikiko, Kubota Kengo, Ishiyama Ryoka, Takai-Todaka Reiko, Haga Kei, Katayama Kazuhiko, Sano Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 Experimental Adaptation of Murine Norovirus to Calcium Hydroxide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 848439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.848439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Vu Duc CANH, Hiroaki FURUMAI and Hiroyuki KATAYAMA	4. 巻 76 (7)
2. 論文標題 EFFECT OF VIRAL GENOME PROPERTY ON THE EFFICIENCY OF VIABILITY (RT-)qPCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 土木学会論文集G（環境）	6. 最初と最後の頁 111_189-111_196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Andri Taruna Rachmadi, Masaaki Kitajima, Kozo Watanabe, Sakiko Yaegashi, Joeselle Serrana, Arata Nakamura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Kazuhiko Katayama, Satoshi Okabe, Daisuke Sano	4. 巻 84
2. 論文標題 Free chlorine disinfection as a selection pressure on norovirus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00244-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00244-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jian Pu, Takayuki Miura, Shinobu Kazama, Yoshimitsu Konta, Nabila Dhyani Azraini, Erika Ito, Hiroaki Ito, Tatsuo Omura, Toru Watanabe	4. 巻 284
2. 論文標題 Weekly variations in Norovirus genogroup II genotypes in Japanese oysters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 48-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Erika Ito, Masateru Nishiyama, Jian Pu, Shinobu Kazama, Yoshimitsu Konta, Hiroyuki Kato, Tatsuo Omura, Toru Watanabe
2. 発表標題 Norovirus accumulation in wild estuarine bivalves and its relationship with gastroenteritis epidemics
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erika Ito, Masateru Nishiyama, Jian Pu, Shinobu Kazama, Yoshimitsu Konta, Hiroyuki Kato, Tatsuo Omura, Toru Watanabe
2. 発表標題 Norovirus accumulation in wild estuarine bivalves as an indicator of gastroenteritis epidemics: Comparison between oysters and clams (<i>Nuttallia japonica</i>)
3. 学会等名 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuminari Miura, Toru Watanabe, Kozo Watanabe, Masateru Nishiyama, Erika Ito, Miina Yanagihara, Kensuke Fukushi
2. 発表標題 Effect of personal hygiene on norovirus transmission within and among households
3. 学会等名 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erika Ito, Pu Jian, Takayuki Miura, Masateru Nishiyama, Toru Watanabe
2. 発表標題 Contamination of cultured oysters with wild-type Rotavirus A and its relationship with gastroenteritis epidemic
3. 学会等名 20th International Symposium on Health-Related Water Microbiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部徹, 三浦郁修, 西山正晃, 伊藤絵里香, 大住英俊, 加藤裕之, 大村達夫
2. 発表標題 下水中ノロウイルスのモニタリングと情報発信による感染性胃腸炎流行対策：仙台市における実証試験
3. 学会等名 第56回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Savira Ekawardhani, Hesti Lina Wiraswati, Lia Faridah, Kozo Watanabe
2. 発表標題 Contributing Factors to Childhood Stunting in Indonesia: Water Quality and Diarrhea
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erika Ito, Hiroaki Ito, Jian Pu, Toru Watanabe
2. 発表標題 Seasonal variation of rotavirus concentration in cultured oysters in Japan
3. 学会等名 IWA World Water Congress & Exhibition 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fuminari Miura, Toru Watanabe, Kozo Watanabe, Akihiko Hata, Kesuke Fukushi
2. 発表標題 Statistical forecasting of norovirus concentration in sewage as an indicator of future incidence
3. 学会等名 IWA World Water Congress & Exhibition 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Erika Ito, Hiroaki Ito, Jian Pu, Masateru Nishiyama, Toru Watanabe
2. 発表標題 Temporal variation of rotavirus in cultured oysters and its relation to gastroenteritis epidemics in Japan
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference (WET2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤絵里香, 西山正晃, 今田義光, 大村達夫, 渡部徹
2. 発表標題 下水処理水放流先に自生する二枚貝中のノロウイルス量と周辺地域の感染症流行との関連
3. 学会等名 平成30年度土木学会東北支部技術研究発表会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片山 浩之 (Katayama Hiroyuki) (00302779)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡部 徹 (Watanabe Toru) (10302192)	山形大学・農学部・教授 (11501)	
研究分担者	李 玉友 (Ri Gyokuyu) (30201106)	東北大学・工学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	渡辺 幸三 (Watanabe Kozo) (80634435)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授 (16301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐野 大輔 (Sano Daisuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関