

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21012

研究課題名（和文）リバースジェネティクス法を用いたウイルス野生株・流行株の塩素消毒不活化特性の把握

研究課題名（英文）Characterization of chlorine disinfection resistances of wild and epidemic strains of human enteric viruses applying a reverse genetics system

研究代表者

白崎 伸隆（Nobutaka, Shirasaki）

北海道大学・工学研究院・准教授

研究者番号：60604692

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いとされるコクサッキーウイルスに加えて、塩素処理性に関する知見がほとんど得られていなかったヒトコロナウイルスの塩素処理耐性を詳細に把握することに成功した。また、コクサッキーウイルスの高不活化率（8～9 logの不活化率）を達成するために必要な塩素処理条件（CT値）を実験的に明らかにした。加えて、コクサッキーウイルスから抽出した完全長RNAを宿主細胞であるBGM細胞に人工的に導入（トランスフェクション）することにより、感染性ウイルスを合成することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凝集-ろ過-塩素消毒から成る現行の浄水処理においては、ウイルス低減の大部分を塩素消毒に依存している。このような中で、水道水を媒体とする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、病原ウイルスの塩素処理性を詳細に把握することが極めて重要である。本研究では、ヒトコロナウイルスを含む病原ウイルスの塩素処理性を明らかにすると共に、高い塩素処理耐性を有するコクサッキーウイルスを高度に不活化するために必要な塩素処理条件を明らかにすることに成功したことから、本研究で得られた知見は、水道水利用における病原ウイルスのリスク管理・制御の枠組みの構築に資するものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）： We investigated the inactivation of a free-chlorine-resistant virus, coxsackievirus, and representative human coronaviruses by free-chlorine disinfection. We then experimentally elucidated the free-chlorine disinfection conditions (i.e., CT values) required for 8-9 log inactivation of coxsackievirus. In addition, infectious clones of coxsackievirus were successfully produced from the transfected BGM cells contained the complete genomic RNA of coxsackievirus.

研究分野：水環境工学，水処理工学

キーワード：病原ウイルス コクサッキーウイルス コロナウイルス 浄水処理 塩素処理 ウイルス濃縮 高不活化率 テーリング現象

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

塩素消毒は、水道水の微生物学的な安全性の担保のための最終バリアとして位置付けられており、世界的に広く実施されている。また、凝集-ろ過-塩素消毒から成る現行の浄水処理においては、凝集-ろ過によるウイルス低減は 1-2 log 程度と限定的であることから、水道水の安全性確保のためのウイルス低減の大部分 (最大 9 log) を塩素消毒に依存している状況にある。その一方で、2005 年の次世代シーケンサーの登場以降、水環境中に存在する病原ウイルスの遺伝子塩基配列データが世界中で広く集積されるようになり、その遺伝的多様性が極めて高いことが明らかとなっている。また、ごく最近、同種のウイルスであっても、市販の分離株と下水から発見された野生株では、塩素消毒における処理性、すなわち、不活化特性が大きく異なり、野生株の中には、米国環境保護庁が示す塩素処理条件では十分に不活化できない塩素耐性株が存在することが報告されている。このような中で、水道水を媒体とする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、株の差異にまで踏み込んだ病原ウイルスの塩素処理性を詳細に把握することが極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験を実施することにより、病原ウイルスの高不活化率の達成に必要な塩素処理条件を把握すると共に、病原ウイルスの遺伝子塩基配列データとウイルス人工合成技術を併用することにより、塩基配列データから病原ウイルスの野生株・流行株の感染性ウイルスを人工合成し、得られたウイルス株を処理実験に用いることにより、株の差異にまで踏み込んだ病原ウイルスの塩素処理性を詳細に把握可能な新たな枠組みを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用したウイルス

本研究では、病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いことが報告されているコクサッキーウイルス B5 型 (CV) に加え、塩素処理性に関する知見がほとんど得られていなかったヒトコロナウイルス 229E (CoV-229E) 及び OC43 (CoV-OC43) についても研究対象とし、実験に使用した。CV, CoV-229E, CoV-OC43 は、それぞれの宿主細胞である BGM 細胞, MRC-5 細胞, HCT-8 細胞を用いて培養した。

(2) 塩素処理

本研究では、塩素処理の室内添加実験を実施することにより、CV, CoV-229E, CoV-OC43 の不活化特性を評価した。約 5°C に調整した pH 7.0 の 0.01 M リン酸バッファーに、培養・精製した CV, CoV-229E, あるいは CoV-OC43 を 10^{4-5} PFU/mL, あるいは 10^{2-3} PFU/mL 程度になるように添加 (ウイルス種毎に培養・精製状態を考慮して添加濃度を決定) したものを実験原水とし、予め塩素消費物質を除去したガラス製の三角フラスコに 300 mL 添加した。ここに、初期遊離塩素濃度が 0.2 mg-Cl₂/L 程度になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、直ちに攪拌子を用いて 400 rpm にて攪拌した (塩素処理終了時まで攪拌を継続した)。塩素添加前の原水及び塩素添加後の塩素処理水を経時的に採水し、塩素処理水については、チオ硫酸ナトリウムにより残留塩素を中和した後、それぞれの試料水中の感染性を有するウイルス濃度をブラック形成法にて定量することにより、塩素処理におけるウイルスの不活化率 (Log 不活化率 (Log[N₀/N]; N₀: 原水の感染性を有するウイルス濃度, N: 処理水の感染性を有するウイルス濃度)) を算出した。なお、チオ硫酸ナトリウム自体がウイルス定量に及ぼす影響を排除するため、原水にもチオ硫酸ナトリウムを添加した後にウイルス定量を実施した。

(3) 大容量の塩素処理

本研究では、ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験系を構築することにより、ウイルスの高不活化率の達成に必要な塩素処理条件を実験的に把握した。約 5°C に調整した pH 7.1-7.2 の砂ろ過水 (凝集沈澱-砂ろ過処理を実施している実浄水処理場において採水した塩素処理が実施される水) に、培養・精製した CV を 10^{4-5} PFU/mL 程度になるように添加したものを実験原水とし、予め塩素消費物質を除去したプラスチック製の角型タンクに 70 L 添加した。ここに、初期遊離塩素濃度が 0.9-1.1 mg-Cl₂/L 程度になるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、直ちに 2 台の攪拌機 (攪拌翼) を用いてそれぞれ 150 rpm にて攪拌した (塩素処理終了時まで攪拌を継続すると共に、タンクの側面及び底面を保冷材で覆うことにより低水温条件を維持した)。塩素添加前の原水及び塩素添加後の塩素処理水を経時的に採水し、塩素処理水については、チオ硫酸ナトリウムにより残留塩素を中和した後、必要に応じてタンジェントルフロー UF 膜 (膜材質 再生セルロース, 分画分子量 1,000 kDa) を用いて 70 mL まで濃縮し、それぞれの試料の感染性を有するウイルス濃度をブラック形成法にて定量することにより、塩素処理におけるウイルスの不活化率 (Log 不活化率 (Log[N₀/N]; N₀: 原水の感染性を有するウイルス濃度, N: 処理

水の感染性を有するウイルス濃度))を算出した。なお、チオ硫酸ナトリウム自体がウイルス定量に及ぼす影響を排除するため、原水にもチオ硫酸ナトリウムを添加した後にウイルス定量を実施した。また、塩素処理水の濃縮を実施した場合には、不活化率の算出の際に濃縮による感染性を有するウイルスの回収率を考慮した。

(4) 感染性ウイルスの人工合成

本研究では、ウイルス由来遺伝子を宿主細胞に人工的に導入(トランスフェクション)することにより、感染性ウイルスを人工合成することが可能かを検討した。QIAamp MinElute Virus Spin Kitを用いて培養・精製したCVから完全長RNAを抽出した(付属のcarrier RNAは使用せず、最終的なRNA溶出には滅菌蒸留水を用いた)。Opti-MEM培地を用いて希釈したCVの完全長RNA(最終濃度0.02 µg/µL)とOpti-MEM培地を用いて希釈調整したトランスフェクション試薬であるLipofectamine MessengerMAXを1:1の容積比で混合した後、室温にて5分間インキュベートした。これをEMEM培地と混合し、CVの宿主細胞であるBGM細胞にトランスフェクションした後、37°C、5%のCO₂インキュベーター内にて4日間静置培養した。培養2日後及び4日後の細胞培養液を採取し、それぞれの試料中のウイルス遺伝子濃度をリアルタイム定量PCR法にて定量することにより、CVのRNAの合成の有無を評価した。また、感染性を有するウイルス濃度をブラック形成法にて定量することにより、感染性を有するCVの合成の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 塩素処理におけるウイルス種間の不活化特性の比較

室温条件(約20°C)に比べて塩素消毒効果が低減することが知られている低水温条件(約5°C)での塩素処理におけるCV、CoV-229E、CoV-OC43の不活化特性を評価したところ、CVについては、CT値(C:遊離塩素濃度×T:接触時間)の増加と共に不活化率の増加が確認され、CT値1 mg-Cl₂·min/Lで約1 log、CT値2 mg-Cl₂·min/Lで約2 logの不活化率が得られた。一方、CoV-229E及びCoV-OC43については、CT値0.02 mg-Cl₂·min/Lで3 log程度以上(ブラック形成法の定量下限値以下)の不活化率が得られた。従って、CoV-229E及びCoV-OC43は、病原ウイルスの中で塩素処理耐性が高いとされるCVに比べて塩素処理耐性が著しく低い(塩素処理に対する感受性が極めて高い)ことが示された。また、CoV-229EとCoV-OC43の間の不活化特性には、大きな差異はないものと考えられた。

(2) ウイルスの高不活化率が達成可能な塩素処理条件の把握

前述したように、CVは、ヒトコロナウイルスと比べても高い塩素処理耐性を有していることが明らかとなったことから、病原ウイルスの塩素処理性を把握する際の参照病原体(参照病原ウイルス)としてCVを用い、ウイルス濃縮法を組み合わせた大容量の塩素処理実験を実施することにより、ウイルスの高不活化率の達成に必要な塩素処理条件を実験的に検討した。砂ろ過水を用いた場合においても、前述したリン酸バッファーを用いた場合と同様に、CT値1 mg-Cl₂·min/Lで約1 log、CT値2 mg-Cl₂·min/Lで約2 logのCVの不活化率が得られた。また、CT値4 mg-Cl₂·min/Lでは約3 logの不活化率が得られた。一方、CT値5-8 mg-Cl₂·min/Lでは4 log以上の不活化率が得られ、塩素処理水中のCV濃度がブラック形成法の定量下限値以下となった。これに対し、ウイルス濃縮法を組み合わせた場合においては、4 log以上の高不活化率が得られる塩素処理条件においても、不活化率の評価が可能であり、20 mg-Cl₂·min/L程度のCT値で7-8 log、40 mg-Cl₂·min/L程度のCT値で8-9 logのCVの不活化率が得られることが明らかとなった。

3-4 log程度までのCVの不活化率が確認された塩素処理条件においては、CVのlog不活化率とCT値の間に直線的な関係が見られ、不活化速度は概ね一定であった。これに対し、7 log程度以上のCVの高不活化率が確認された塩素処理条件においては、CT値の増加と共に不活化速度が低下する現象、すなわち、テーリング現象が確認された。テーリング現象の一因として塩素処理の進行によるウイルス粒子表面特性の変化に伴うウイルス粒子同士の凝集塊形成の可能性が考えられたことから、CT値の増加に伴うウイルス粒子径の変化を評価したところ、塩素処理前後におけるウイルス粒子径の明確な変化は見られず、CT値の増加に伴う凝集塊形成は確認されなかった。一方、8 log程度のCVの高不活化率が得られた塩素処理後に生残したウイルスを単離・培養し、塩素処理における不活化特性を評価したところ、塩素処理後に生残したウイルス集団は、塩素処理前のウイルス集団に比べて高い塩素消毒耐性を有していることが明らかとなった。従って、塩素処理に供したウイルス培養液内において、塩素消毒耐性の異なるウイルス株が存在(細胞を用いたウイルス培養の繰り返しにより、変異を有するウイルス株が出現)している可能性が示唆され、このことがテーリング現象の一因であるものと考えられた。

(3) ウイルス抽出遺伝子を用いた感染性ウイルスの人工合成

培養・精製したCVから完全長RNAを抽出した後、完全長RNAをCVの宿主細胞であるBGM細胞にトランスフェクション試薬を用いて導入することにより、ウイルス抽出RNAから感染性ウイルスを人工合成することを試みた。抽出した完全長RNAをトランスフェクション試薬を用いずに宿主細胞に添加した場合においては、培養日数の経過に伴うCVのRNA濃度の増加は見られなかった(図1)。また、感染性を有するCV濃度は、いずれの培養日数においても定量下限

値以下となった(図1)。これに対し、トランスフェクション試薬を用いた場合においては、培養日数の経過に伴うCVのRNA濃度の増加が確認された(図1)。また、ブラック形成法にて定量可能な感染性を有するCVの存在、並びに培養日数の経過に伴う感染性を有するCV濃度の増加が確認された(図1)。従って、CVの抽出RNAを宿主細胞にトランスフェクションすることにより、細胞内でCVのRNAが効率良く合成されること、更には、ブラック形成法にて定量可能な感染性を有するCVが効率良く合成されることが明らかとなった。以上の結果から、CVについては、遺伝子塩基配列データから人工合成した流行株・野生株の完全長RNAを用いることにより、感染性を有するCVの流行株・野生株を人工合成できる可能性が示唆された。

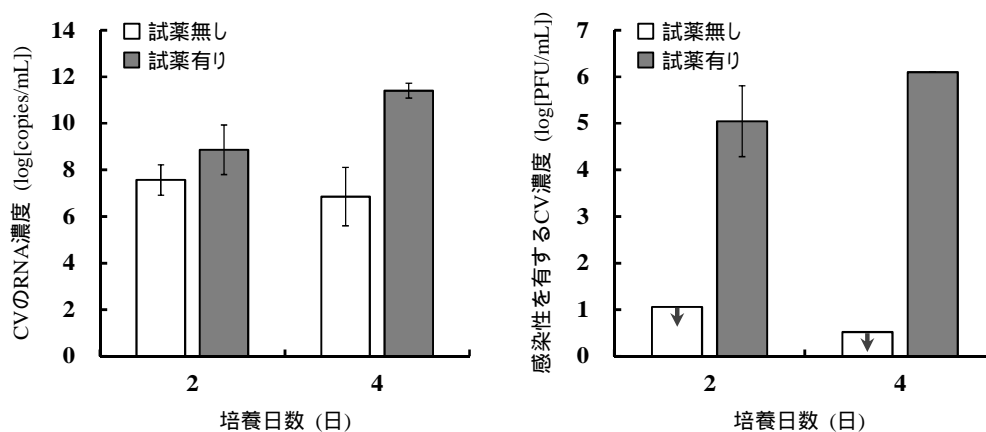


図1. 培養日数の経過に伴うCVのRNA濃度(左)及び感染性を有するCV濃度(右)の変化(図中の矢印は定量下限値以下を示す)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hu, Q., Shirakawa, D., Shirasaki, N., Takagi, H., Oka, T., Matsushita, T. and Matsui, Y.
2. 発表標題 Evaluating the efficacy of drinking water treatment processes to remove and inactivate human sapovirus: Application of in vitro cell-culture method
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会（オンライン開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋大河, 松村拓哉, 白崎伸隆, 松下拓, 松井佳彦
2. 発表標題 ウイルスの水道水質基準制定に向けた塩素処理の有効性評価：ヒト腸管系ウイルスおよびヒトコロナウイルスの不活化特性の把握
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会（オンライン）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院工学研究院 環境工学部門 環境リスク工学研究室 ホームページ https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/risk/
--

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

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
---------	---------