

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

Fundamental study about the mechanism of acquiring free chlorine-resistibility of norovirus

北海道大学工学部環境社会工学科 学正員 富岡哲史 (Akifumi Tomioka)
愛媛大学工学部環境建設工学科 正員 渡辺幸三 (Kozo Watanabe)
北海道大学大学院工学研究院 正員 岡部 聡 (Satoshi Okabe)
北海道大学大学院工学研究院 ○正員 佐野大輔 (Daisuke Sano)

1. 研究背景

発展途上国のみならず、比較的衛生状態が良い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多量（糞便 1g あたり 10^{10} 粒子以上）に存在しているため¹⁾、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。流出した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、環境中に放出されているのが現状である。環境中に放出されたノロウイルスは、飲料水や養殖牡蠣、レクリエーション水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。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、オゾン処理、超音波及び熱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による処理である²⁾。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いるが、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。

遊離塩素はカプシドタンパク質に直接作用して損傷を与えることから、ノロウイルスの粒子安定性に大きな影響を与える。従って、塩素処理を受けた際に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

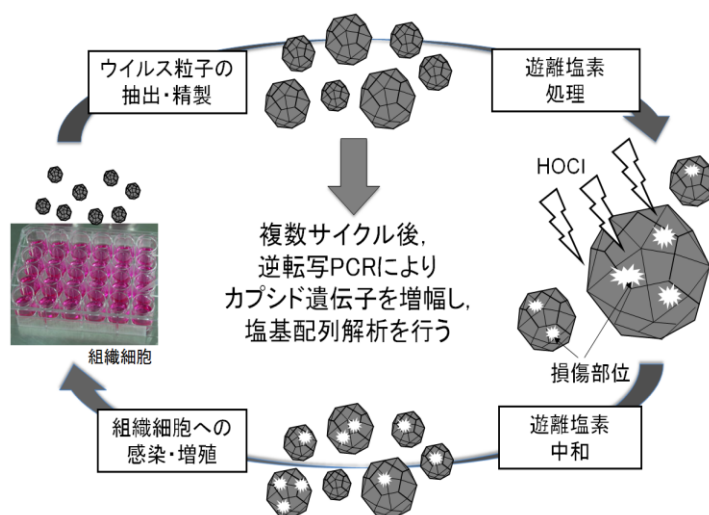


図-1 塩素耐性ウイルス株取得方法概念図

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継代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塩素処理に起因することを確認することを試みた（図-1）。

3.1 MNV 培養細胞の継代

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

アージ由来)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℃、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、継代を行った。

3.2 MNV の感染・増殖・抽出

フラスコ内に培養された RAW264.7 細胞 MNV 保存株を細胞に接種し、MNV を感染させた。その後インキュベータ内(CO₂ 濃度 5%、温度 37℃)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を計 3 回繰り返した。フラスコ内のウイルス培養液を 50 mL 遠沈管に移し、4℃、10,000×g、30 分の条件で遠心分離を行い、上清をシリンジと孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過を行った。ろ過後のウイルス培養液を 2mL チューブに分注して、ウイルス懸濁液を得た。

3.3 遊離塩素処理

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 Ct 値は 200 (mg・min/L)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。

3.4 MNV の感染価の測定(プラーク法)

MNV の感染価を RAW264.7 細胞を宿主に用いたプラーク法により定量した。塩素消毒前の感染価(PFU)塩素消毒後の感染価(PFU)それぞれ求め、感染価比の対数を取ることで感染価対数減少値(Log reduction)を求めた。

3.5 定量 RT-PCR による MNV の定量

定量 RT-PCR により遊離塩素処理前後のマウスノロウイルスの遺伝子数を測定した。定量 RT-PCR により測定した塩素消毒前のウイルス遺伝子数と塩素消毒後のウイルス遺伝子数から Log reduction を算出した。

3.6 塩素処理後の MNV の増殖

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。3.2～3.6 までの操作を 1 サイクルとし、サイクルを複数回繰り返した。

4. 結果及び考察

遊離塩素への繰り返し曝露によるマウスノロウイルスの塩素耐性獲得過程を感染価の変化により評価した結果を図-2 に示した。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(CT 値は 200 mg・min/L)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

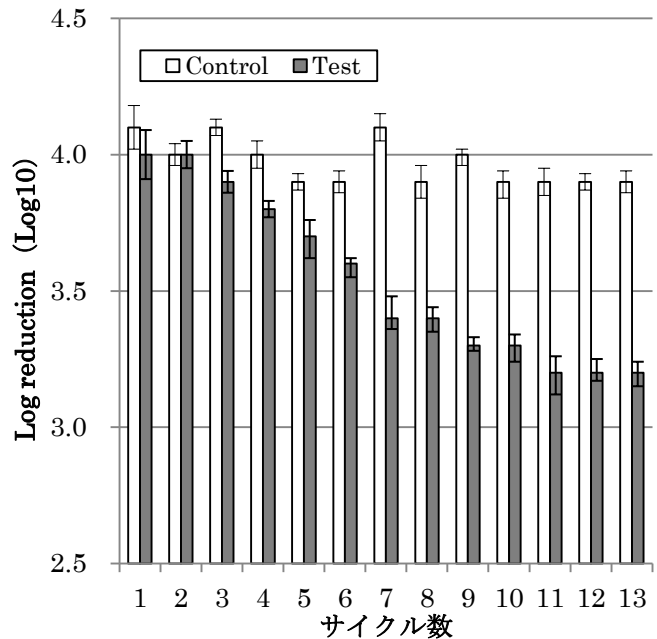


図-2 遊離塩素への繰り返し曝露によるマウスノロウイルスの塩素耐性獲得過程。

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。この Log reduction の値は、サイクルを 13 回繰り返すことによって 3.2 まで低下したが、これは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マウスノロウイルス株が優占してきたものと考えられた。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ことから、遺伝子ではなくカプシドタンパク質の塩素感受性に変化が生じていることが推測された。

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、3 カ所に変異が入っていることが確認された。このうち 1 カ所は同義変異であったが、その他の 2 カ所は非同義変異であったことから、この 2 カ所のアミノ酸変異がカプシドタンパク質の安定性及び塩素耐性に影響を与えたことが示唆された。

5. 結論

遊離塩素への繰り返し曝露により、比較的高い塩素耐性の高いマウスノロウイルス集団を取得することに成功した。塩素耐性の高いマウスノロウイルス集団には、カプシドタンパク質遺伝子に 3 つの変異が入っており、これらのうち非同義変異をもたらした 2 つの変異が、カプシドタンパク質の安定性及び塩素耐性に影響を与えたことが示唆された。

参考文献

- 金子光美 (2001) : 水の微生物リスクとその評価, 技報堂出版, pp25-47.
- 松本順一郎 (1999) : 水環境工学, 朝倉書店, pp87-90.