

病原ウイルスの死滅モデルに関する研究

東北大学建築社会環境工学科 学生会員 ○加藤 郁生

東北大学大学院工学研究科 正会員 稲葉 愛美

東北大学大学院工学研究科 非会員 AMARASIRI Mohan

東北大学大学院工学研究科 正会員 佐野 大輔

1. はじめに

2015年9月の国連サミットで採択された「持続可能な開発目標（Sustainable Development Goals: SDGs）」では、計17個のグローバル目標の6番目として、2030年までに全世界の人々が安全な水とトイレにアクセスできるようにすることを掲げている。当面は野外排泄を無くすために安価なトイレの導入が図られることになるが、複数人の排泄物が溜まるトイレは、適切に管理しなければ病原体による感染症の発生源となる可能性がある。

排泄物に含まれ感染症を引き起こすことが懸念される病原体には、細菌、原虫、ウイルス、寄生虫等が存在する。中でもウイルスは比較的高い環境中残留性を示すこと、また他の病原体よりも強い感染性・病原性を保持する場合があることから、排泄物を介した感染症の発生が懸念されている。

しかしながら、トイレ環境下でのウイルス自然死滅速度に関しては、信頼に足るデータが存在していないのが現状である。例えば、2014年に西アフリカでエボラウイルス感染症のアウトブレイクが生じたが、その際に世界保健機構（World Health Organization: WHO）は、医療機関からの感染者糞便に由来するエボラウイルスを十分に不活化するために、排泄物の投棄前に4週間静置するべきとするガイダンスを公表した。しかしながら、エボラウイルスの自然死滅速度に関するデータは存在しなかったことから、「4週間」という値は科学的根拠の薄いガイドライン値であった。その後、2015年に「4週間」から「7日間」にガイドライン値が更新されたが、この値もエボラウイルス自然死滅速度データに基づいたものではないことが批判を受けている²⁾。WHOのガイドラインは、データが少ない中で窮余の策として提示されたものであるから、問題はWHOの対応にあるのではなく、関連データ、本研究分野の場合は排泄物中の病原ウイルス自然死滅に関するデータが少ないことにあると言える。

排泄物中の病原ウイルス自然死滅に関するデータが少ない理由は、ウイルス死滅速度を決めるファクターが多岐に渡るために、一般性のある知見を得ることが著しく困難であることにある。ウイルス死滅速度を決

めるファクターとしては、温度やpH³⁾の他にウイルスの種類も存在することから⁴⁾、実験室で準備可能な指標ウイルスを用いて得たデータからでは、病原ウイルスの死滅速度を予測することが難しい。

そこで本研究では、様々な環境下で適用可能な、より一般性の高いウイルス死滅モデルを構築するために、サンプル中のタンパク質分解酵素の活性（プロテアーゼ活性）に着目し、プロテアーゼ活性の測定値によりモデルパラメータ値が一意的に決定されるウイルス死滅モデル構築の可能性を追求することとした。

2. 研究方法

試験ウイルスとしてはマウスノロウイルス（murine norovirus: MNV）を用いた。MNVは非エンベロープウイルスに分類されるが、エボラウイルスを含むエンベロープウイルスよりも環境残留性が高いことから、排泄物中のMNV量が安全なレベルまで低下すれば、エンベロープウイルスによる感染リスクも十分に低下するものと考えられる。

自然死滅模擬試験は、排泄物中に存在する可能性のあるプロテアーゼを添加した条件で行った。MNVはPBS（pH7.5）で5倍希釈し、そこへ終濃度が2 μ g/ml, 10 μ g/mlとなるようにプロテイナーゼKを加えた後、一定時間（3,6,12,24及び48h）、37℃でインキュベートした。インキュベート後、PBSで2倍希釈したものに0.5M フッ化フェニルメチルスルホニル

（phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF）を1/100倍量加えて4℃で保存した。プロテアーゼ陰性対照として、プロテアーゼを加えずにインキュベートしたサンプルも準備した。

インキュベートしたサンプルはブラック法でウイルス濃度を計測した。ブラック法の手順は次の通りである。まず、RAW264.7細胞が約90パーセントコンフルエント状態になった6ウェルプレートを準備し、細胞増殖液で10倍段階希釈したサンプルを各ウェルに1mlずつ接種した（1希釈段階につき2ウェル）。90分間インキュベート後、ウェル内の試料を捨て、寒天

キーワード：病原ウイルス 不活化 自然死滅モデル プロテアーゼ活性

連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06 東北大学大学院工学研究科 佐野大輔

電話番号：022-795-7481、アドレス：daisuke.sano.e1@tohoku.ac.jp

培地を1ウェルに2mlずつ分注し、寒天が凝固するまで20分程度室温で静置した。室温での静置後、37℃で48時間インキュベートした。細胞染色液を1ウェルに1mlずつ分注し、さらに37℃で3時間インキュベートした。細胞染色液により生細胞が赤色に染まっているため、染色されなかった透明な斑点（ブラック）を計測することで、サンプル中のMNV感染価（PFU/ml）を計測した。

サンプルのプロテアーゼ活性測定はAmplite™ Universal Fluorimetric Protease Activity Assay kitを用いて計測した。まずProtease SubstrateをPBSで25倍に希釈したものにサンプルを同量加え、37℃で30分間インキュベートした。その後、Nanodrop3300で蛍光値（ex490/em525）を測定した。陰性対照として、PBSで希釈したProtease Substrateに同量のPBSを加えたものについても測定し、各サンプルの蛍光値を陰性対照の蛍光値で除したものを当該サンプルのプロテアーゼ活性値とした。

ウイルス死滅モデルとしては、病原体消毒モデルの一つであるHomモデル⁵⁾を採用した（式(1)）。

$$\log \frac{N}{N_0} = -\frac{kk'tm}{m} \quad (1)$$

ここで N 及び N_0 はそれぞれ時刻 t 及び 0 におけるウイルス感染価、 k' は消毒剤の初期濃度を含む定数である。

3. 結果及び考察

図1にMNV感染価の経時変化を示した。縦軸は、時間 t の感染価とインキュベート開始時の感染価の比の常用対数値である。プロテイナーゼK無添加条件（プロテイナーゼK-）では48時間のインキュベートで1.5 logの感染価低下であったのに対し、終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ のプロテイナーゼK添加条件（プロテイナーゼK+ ($2 \mu\text{g/ml}$)) では48時間のインキュベートで2.4 logの低下であり、終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ のプロテイナーゼK添加条件（プロテイナーゼK+ ($10 \mu\text{g/ml}$)) では6時間のインキュベートで3.5 logの低下であった。これらの結果は、プロテイナーゼKの存在により死滅速度が増加していることを示している。

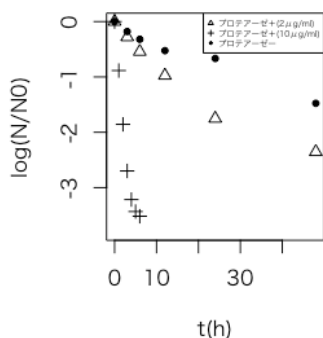


図1. MNV 死滅プロファイル

プロテイナーゼK-のプロテアーゼ活性値は2.14, プロテイナーゼK+ ($2 \mu\text{g/ml}$)におけるプロテアーゼ活性値は8.65, プロテイナーゼK+ ($10 \mu\text{g/ml}$)におけるプロテアー

ゼ活性値は12.2であった（表1）パラメータフィッティングにより得られたパラメータ推定値とプロテアーゼ活性値を表1に示した。

表1. Homモデルパラメータ推定値とプロテアーゼ活性値

プロテアーゼ終濃度	kk'	m	プロテアーゼ活性値
0 $\mu\text{g/ml}$	0.05	0.81	2.14
2 $\mu\text{g/ml}$	0.12	0.66	8.65
10 $\mu\text{g/ml}$	0.95	0.45	12.2

表1より、プロテアーゼ活性値の増加に従って kk' 値が増加していることが分かる。 m 値は死滅プロファイルで計測した時間に依存することから、死滅プロファイルデータの計測時間と m 値、及びプロテアーゼ活性値と kk' 値間の回帰式を得ることができれば、あるサンプルのデータ計測時間とプロテアーゼ活性値を得ることでHomモデルパラメータ値が一意的に定まり、当該条件下における死滅プロファイルを予測することが可能になると考えられる。

4. 結論

本研究の結果より、プロテアーゼ活性値とデータ計測時間からHomモデルパラメータ値を推測する回帰式を得ることにより、様々な環境下でのウイルス死滅速度を算定することが可能になると考えられた。

謝辞

本研究は総合地球環境学研究所・機関連携プロジェクト「サニテーション価値連鎖の提案—地域のヒトによりそうサニテーションのデザイナー（代表者：北海道大学・船水尚行教授）」により行われた。ここに謝意を記す。

参考文献

- 1) WHO : Rapid guidance on the decommissioning of Ebola care facilities, 2015
- 2) Julii, B., Katherine, P. and Paul, R.: Censored regression modeling to predict virus inactivation in wastewaters, Environment Science and Technology, vol.51, pp.1795-1801, 2017
- 3) Seo, K., Lee, J.E., Lim, M.Y. and Ko, G. : Effect of Temperature, pH, and NaCl on the inactivation Kinetics of Murine Norovirus, Journal of Food Protection vol.75, pp.533-540, 2011
- 4) Sobsey, M. D., and J. S. Meschke: Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin, Report for the world health organization. Geneva, Switzerland, 2003
- 5) Seymour, S. B: Disinfection, sterilization, and preservation, 5th ed. pp.74-77, 2001