

研 究 報 告

令和 8 年 3 月 31 日

公益財団法人 前田記念工学振興財団

理 事 長 岸 利 治 殿

研究代表者

所 属 : 北海道大学 大学院工学研究院

氏 名 : 白崎 伸隆

研究課題名 : ヒト iPS 由来腸管上皮細胞を活用した
浄水消毒工程におけるノロウイルスの未知動態の解明

助成金額 : 100 万円

研究実施期間 : 自 令和 7 年 4 月 1 日 ~ 至 令和 8 年 3 月 31 日

ヒト iPS 由来腸管上皮細胞を活用した

浄水消毒工程におけるノロウイルスの未知動態の解明

Evaluation of inactivation efficiencies of human norovirus

in drinking water disinfection processes by using human iPS cell-derived intestinal epithelial cell

北海道大学 准教授 白崎 伸隆

（研究計画ないし研究手法の概略）

1. はじめに

ノロウイルスによる感染症は、衛生状態が改善された日本を含む先進諸国においても未だ大きな社会問題となっている。実際に、ノロウイルスを原因とする胃腸炎発症者数は世界全体で年間 7 億人、経済的損失は年間 600 億ドルにも上ることが試算されている (Bartsch *et al.*, 2016)。また、ノロウイルスは、水系感染症を引き起こす主要な原因ウイルスとして WHO 飲料水水質ガイドライン (WHO, 2022) 及び USEPA 飲料水汚染物質候補リスト (USEPA, 2022) に共通して挙げられており、水道水を介した感染事例も世界中で数多く報告されている (Moreira and Bondelind, 2017)。従って、ノロウイルスによる水系感染症を制御していくためには、浄水処理におけるノロウイルスの処理性を詳細に把握することが極めて重要である。しかしながら、ノロウイルスは、ヒト生体外での汎用的且つ安定的な培養法が未確立であり、培養法を活用した感染力評価法も確立されていないことから、浄水消毒工程におけるノロウイルスの感染力の消長、すなわち、不活化特性に関する知見はほとんど得られていない。このような中で、近年、入手が容易で操作性・安定性に優れたヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いることにより、生体外でノロウイルスを増殖できることが見出された (Sato *et al.*, 2019)。そこで、本研究では、ノロウイルスを増殖可能な当該汎用細胞を活用することにより、ノロウイルスの感染力の評価が可能であるかを判断すると共に、代表的な浄水消毒工程である塩素処理におけるノロウイルスの不活化特性を把握することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 使用したウイルスとその定量法

本研究では、PCR 法によりノロウイルスが陽性となったヒト糞便検体を一般検査機関から提供して頂き、ウイルス源として実験に使用した。ヒト糞便検体は、10% (w/v) 乳剤に調製された状態で提供されたことから、攪拌・遠心分離し、上澄みをメンブレンフィルター（酢酸セルロース、膜孔径 0.45 μm ）にてろ過した後実験に使用した。ノロウイルスの定量には、ウイルス内部の核酸を標的とするリアルタイム定量 PCR 法及びウイルスの外殻タンパク質を標的とする ELISA 法を用いた。また、感染力を有するノロウイルスの定量には、ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いた培養とリアルタイム定量 PCR 法及び ELISA 法を組み合わせた手法を構築し、適用した。なお、ノロウイルスの培養においては、市販のヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞を使用可能な状態になるまで 16 日間成熟させた後、ろ過したノロウイルスの乳剤を接種すると共に、市販の胆汁酸を添加した後に 5 日間培養した。細胞に接種したノロウイルスが感染力を有する場合、培養日数の経過と共に細胞内でウイルスが

増殖することから，培養前後，すなわち，培養 0 日目及び培養 5 日目のノロウイルス濃度をリアルタイム定量 PCR 法及び ELISA 法にて測定することにより，ノロウイルスの感染力を評価した．

2.2 熱処理実験

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いたノロウイルス増殖系を活用することにより，ノロウイルスの感染力の評価が可能であるかを判断するため，熱処理実験を実施した．ろ過したノロウイルスの乳剤をサーモブロックを用いて 90 °C にて 5 分間熱処理した後，4 °C にて 10 分間以上急冷した．熱処理前後の試料を採水し，それぞれの試料のノロウイルスの感染力を細胞培養と PCR 法及び ELISA 法を組み合わせた手法にて評価した．

2.3 塩素処理実験

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いたノロウイルス増殖系を活用することにより，塩素処理におけるノロウイルスの不活化特性を評価した．約 20 °C に調整した pH 7.0 の 0.01 M リン酸バッファーに，ろ過したノロウイルスの乳剤を 10⁷ copies/mL 程度（1,000 倍希釈）になるように添加したものを実験原水とし，三角フラスコに 50 mL 添加した．ここに，初期塩素濃度が 0.8–0.9 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，攪拌子を用いて 300 rpm にて攪拌した（塩素処理終了時まで攪拌を継続）．塩素添加前の原水に加え，塩素添加後の塩素処理水を経時的に採水し，チオ硫酸ナトリウムにより残留塩素を中和した後，塩素処理水（中和後）については，予め乳タンパク質にてブロッキング処理した遠心式限外ろ過フィルターユニット（再生セルロース，分画分子量 100 kDa）を用いて濃縮し（約 240 倍濃縮），それぞれの試料のノロウイルスの感染力を細胞培養と PCR 法及び ELISA 法を組み合わせた手法にて評価した．

（実験調査によって得られた新しい知見）

3. 結果と考察

3.1 熱処理におけるノロウイルスの不活化特性

ろ過したノロウイルスの乳剤について，熱処理の有無が培養 0 日目及び培養 5 日目のノロウイルスの RNA 濃度，並びに外殻タンパク質濃度に与える影響を PCR 法及び ELISA 法にて評価した．結果を図-1 に示す．熱処理を実施しない場合（熱処理無し），ノロウイルスの RNA 濃度については，培養 0 日目において 10⁶ copies/mL 程度であったのに対し，培養 5 日目においては 10⁷ copies/mL 程度まで濃度が増加した．同様に，ノロウイルスの外殻タンパク質についても，5 日間の培養により濃度が増加した．一方，90 °C，5 分間の熱処理を実施した場合（熱処理有り）においては，5 日間の培養によるノロウイルスの RNA 濃度，並びに外殻タンパク質濃度の増加は見られなかった．従って，ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いることにより，一般検査機関から提供して頂いたノロウイルス陽性ヒト糞便検体中のノロウイルスを増殖できることが確認された．また，ウイルスの不活化に有効とされる熱処理を実施した場合においては，ノロウイルスの増殖は確認されなかったことから，ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いたノロウイルス増殖系を活用することにより，ノロウイルスの感染力の評価が可能であると判断した．

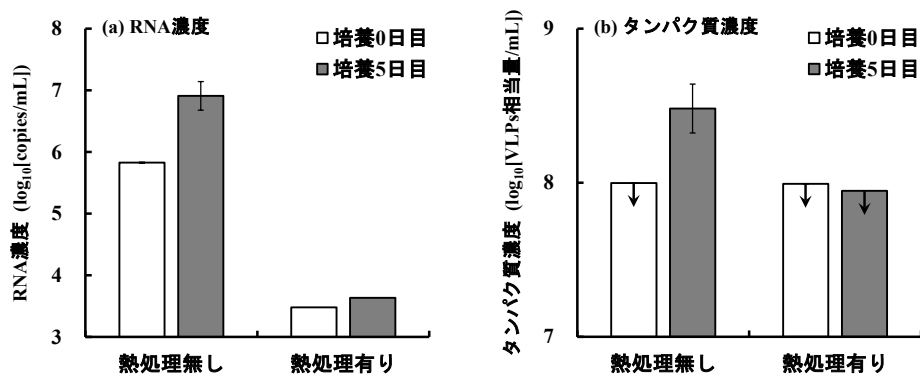


図-1. 熱処理の有無が培養0日目及び培養5日目のノロウイルスのRNA濃度 (a) 及び外殻タンパク質濃度 (b) に与える影響 (図中の矢印は定量下限値以下)

3.2 塩素処理におけるノロウイルスの不活化特性

ろ過したノロウイルスの乳剤を pH 7.0 のリン酸バッファーに添加した実験原水について、塩素処理の条件が培養 0 日目及び培養 5 日目のノロウイルスの RNA 濃度、並びに外殻タンパク質濃度に与える影響を PCR 法及び ELISA 法にて評価した。結果を図-2 に示す。塩素処理を実施しない場合（塩素処理無し）、ノロウイルスの RNA 濃度については、培養 0 日目において 10^6 copies/mL 程度であったのに対し、培養 5 日目においては 10^7 copies/mL 程度まで濃度が増加した。同様に、ノロウイルスの外殻タンパク質についても、5 日間の培養により濃度が増加した。また、初期塩素濃度 0.8–0.9 mg-Cl₂/L 程度、接触時間 5 s 及び 10 s の塩素処理を実施した場合においては、塩素処理を実施しない場合に比べてノロウイルスの RNA 濃度の増加の程度は小さかったものの、増加が確認された。一方、ノロウイルスの外殻タンパク質については、5 日間の培養による濃度の増加は見られなかった。これに対し、接触時間 30 s の塩素処理を実施した場合においては、5 日間の培養によるノロウイルスの RNA 濃度及び外殻タンパク質濃度の増加は見られなかった。従って、ノロウイルスは、初期塩素濃度 0.8–0.9 mg-Cl₂/L 程度、接触時間 30 s 後、すなわち、CT 値（C: 遊離塩素濃度 × T: 接触時間）約 0.2 mg-Cl₂・min/L で不活化することが示唆された。

3.3 塩素処理におけるノロウイルスとコクサッキーウイルスの不活化特性の比較

水系感染症ウイルスの中で塩素消毒耐性が高いとされるコクサッキーウイルス B5 型（Sobsey *et al.*, 1988 ; Cromeans *et al.*, 2010）を対象に、ノロウイルスの場合と同様の水温約 20 °C、pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた塩素処理実験を実施した。コクサッキーウイルスの宿主細胞である BGM 細胞（アフリカミドリザル腎細胞）による培養と PCR 法を組み合わせた手法にてコクサッキーの感染力を評価したところ、CT 値約 0.4 mg-Cl₂・min/L の条件で塩素処理を実施した場合においては、3 日間（BGM 細胞を用いた場合のコクサッキーウイルスの最適培養日数）の培養によりコクサッキーウイルスの RNA 濃度が増加した（図無し）。一方、CT 値約 1.0 mg-Cl₂・min/L の条件で塩素処理を実施した場合においては、3 日間の培養による濃度の増加は見られなかった（図無し）。従って、コクサッキーウイルスは、CT 値約 1.0 mg-Cl₂・min/L で不活化することが示唆された。上述したように、ノロウイルスの不活化に必要と考えられる CT 値は約 0.2 mg-Cl₂・min/L であり、コクサッキーの不活化に必要と考えられる CT に比べて小さい値であったことから、ノロウイルスは、水系感染症を引き起こす病

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比べて、耐性が低い可能性が示唆された。

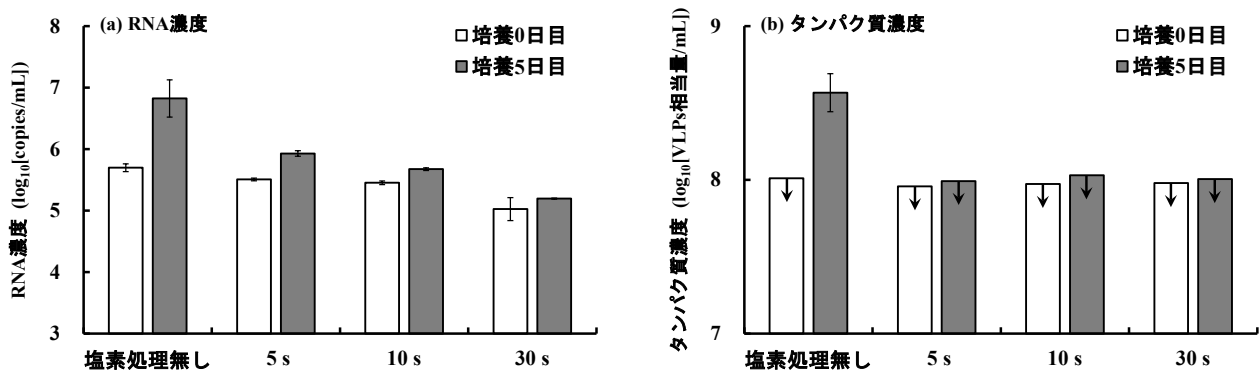


図-2. 塩素処理の条件が培養0日目及び培養5日目のノロウイルスのRNA濃度 (a) 及び外殻タンパク質濃度 (b) に与える影響 (図中の矢印は定量下限値以下)

4. 結論

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞と胆汁酸を用いたノロウイルス増殖系を活用することにより、代表的な浄水消毒工程である塩素処理におけるノロウイルスの不活化特性を評価することに成功した。ノロウイルスは、水温約 20 °C, pH 7.0 の条件においては、CT 値約 0.2 mg-Cl₂・min/L で不活化することが示唆された。また、ノロウイルスは、水系感染症を引き起こす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比べて、耐性が低い可能性が示唆された。

参考文献

1. Bartsch, S. M., Lopman, B. A., Ozawa, S., Hall, A. J. and Lee, B. Y. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. *PLoS ONE* 11, e0151219, 2016.
2. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality, 4th edition, incorporating the first and second addenda*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2022.
3. U.S. Environmental Protection Agency. *Drinking Water Contaminant Candidate List 5*. EPA-HQ-OW-2018-0594. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2022.
4. Moreira, N.A. and Bondelind, M. Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health* 15(1), 83-96, 2017.
5. Sato, S., Hisaie, K., Kurokawa, S., Suzuki, A., Sakon, N., Uchida, Y., Yuki, Y. and Kiyono, H. Human norovirus propagation in human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7(3), 686-688.e5, 2019.
6. Sobsey, M.D., Fuji, T. and Shields, P.A. Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Science and Technology* 20(11-12), 385-391, 1988.
7. Cromeans, T.L., Kahler, A.M. and Hill, V.R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and

murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 76(4), 1028-1033, 2010.

(発 表 論 文)

国際学術雑誌への投稿準備中