

## 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名

東北大学

職名・氏名

助教 大石若菜 ㊞

### 1 研究テーマ

水インフラによる感染リスク制御のためのウイルス進化メカニズムの解明

### 2 研究の目的

感染性胃腸炎を引き起こすノロウイルスは進化速度が速いため、消毒の効かないウイルス株が出現する可能性がある。本研究は、ウイルスが消毒剤に適応し、進化するメカニズムを解明することで、将来出現しうる消毒耐性ウイルスの特徴を明らかにすることを目的とした。

### 3 研究の方法

#### 3. 1 マウスノロウイルスのアンモニアへの適応進化の検証

「ウイルスの消毒への適応過程は消毒方法によって異なり、損傷する部位の違いで説明できる」という仮説のもと、モデルウイルスとしてマウスノロウイルスを、消毒剤としてウイルスゲノム RNA を分解する遊離アンモニアを用いて、消毒と培養を繰り返す実験進化を行うことにより、マウスノロウイルスの遊離アンモニアへの適応可能性を検証した。

実験進化のフローを図 1 に示す。アンモニアへの曝露後に残存したウイルスを培養するテスト系と、消毒の影響を確認するための比較系として、培地で希釈し集団サイズをテスト系と同等まで減少させてから培養するコントロール系を用意し、それぞれ 10 サイクル実施した。なお、再現性の確認のため 2 回実施した。各サイクルで得られたウイルス集団をアンモニア緩衝液 (pH 9.6、遊離アンモニア濃度 328 mM) に曝露させたときのウイルス感染価の減少に基づき、ウイルス消毒感受性を評価した。なお、ウイルス感染価はプラークアッセイを用いて定量した。

#### 3. 2 マウスノロウイルスの立体構造の解明

石灰消毒に対する低感受性マウスノロウイルスの立体構造を明らかにするため、生体内での本来のタンパク質の立体構造を高解像度で捉えることのできるクライオ電子顕微鏡 (単粒子解析法) を用いてウイルスの構造解析を行うことを試みた。クライオ電子顕微鏡立体構造解析には高濃度ウイルス試料が必要であるため、今年度は消毒低感受性ウイルスの培養と濃縮・精製を行った。

### 留意事項

① 3 枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

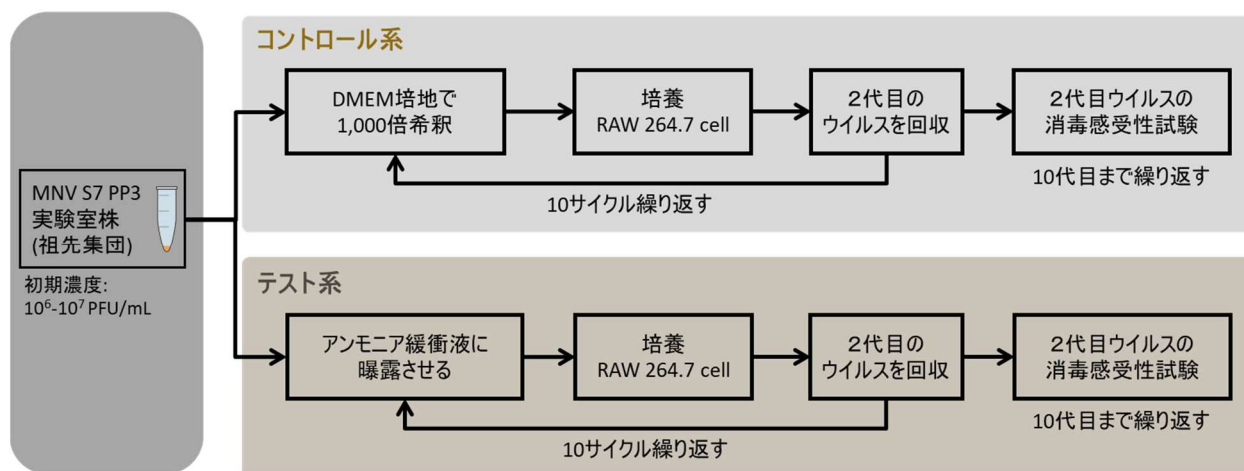


図 1. 実験進化のフロー

## 4 研究の成果

### 4. 1 マウスノロウイルスのアンモニアへの適応進化の検証

実験進化を実施し、テスト系から 20 集団、アンモニアに曝露させないコントロール系から 20 集団のウイルス集団が得られた。1 回目の実験進化で得られた 20 集団(テスト系 10 集団、及びコントロール系 10 集団)の不活化速度定数を図 2 に示す。コントロール系とテスト系の感受性に統計的に有意な差は確認できず、各集団間にも有意な差は確認されなかった。本研究の実験条件においては、マウスノロウイルス集団のアンモニア消毒に対する適応進化は確認されなかった。

以上の結果は、これまでの研究で行った石灰 (pH 12) 消毒と異なるものであった。石灰消毒では 2 サイクル目までに消毒低感受性集団が出現し、石灰消毒はウイルス集団への選択圧として作用することが明らかとなったが、アンモニア消毒では低感受性集団は出現せず、アンモニアのウイルスの進化への影響は確認されなかった。このような適応メカニズムの違いは、石灰消毒では、数分間の曝露で 99%不活化するのに対し、アンモニア消毒では同等の不活化に 30 分間かかったこと、また、石灰消毒ではウイルスの外殻タンパクの変性が不活化を引き起こすと考えられるが、アンモニア消毒ではウイルスのゲノム RNA の分解によってウイルスが不活化されること等に起因していると考えられる。

アンモニアによるウイルスの不活化は、下水道施設未整備地域で使用する衛生システムにおいて、便槽内での一時的な貯蔵や長期間の貯蔵による排泄物の安定化の過程で起こる。本研究の結果から、排泄物の分解過程で発生するアンモニアによるウイルスの自然死滅を待つような衛生処理は、石灰を添加することで迅速に排泄物を消毒する石灰処理と比較すると、消毒剤の効きにくい集団が発生しにくい方法であることが明らかとなった。

### 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

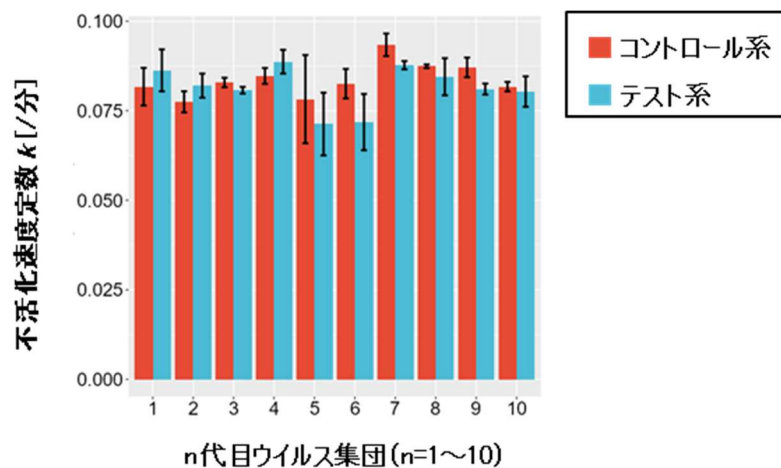


図 2. 実験進化で得られた各ウイルス集団のアンモニアに対する感受性

#### 4. 2 マウスノロウイルスの立体構造の解明

クライオ電子顕微鏡立体構造解析を行うために、石灰消毒低感受性ウイルスの培養と濃縮・精製を行った。しかしながら、単粒子構造解析に必要なウイルス数と高い精製度を満たす試料を得ることはできなかった。同じ方法を用いて、実験室株は十分な試料を用意できたことから、消毒低感受性集団の粒子産生効率が低いため、十分な収量を得られなかったと考えられる。

#### 5 今後の展望

本研究によって、消毒方法ごとに低感受性ウイルス集団の出現可能性が異なることが明らかとなった。今後は消毒強度による影響、及び損傷部位による影響に着目し、ウイルス不活化メカニズムがウイルス適応進化に与える影響とその原因を解明していく。

#### 6 研究成果の発信方法（予定を含む）

以下のシンポジウムにて、アンモニアへの適応進化についての研究発表を行った。また、令和7年度に行われる国際会議にて、その後得られた成果を発表予定である（査読中）。

##### 1. Murine norovirus inactivation and adaptation to ammonia

Putri Shafa Kamila

The 2nd Symposium for Human and Environmental Security

Tohoku University (Feb. 19, 2025)

##### 2. Murine norovirus inactivation and adaptation mechanism to ammonia

Putri Shafa Kamila, Wakana Oishi, Daisuke Sano

The 12th International Symposium on Water Environment Systems - with Perspective of Global Safety

Aoba Memorial Hall, Tohoku University (Nov. 22, 2024)

#### 留意事項

① 3枚程度で作成してください。

② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。