

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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などの RNA ウィルスは、増殖と死滅のサイクルの中で集団の構造を変えることで、環境やストレスに適応し、生き延びている。都市における胃腸炎ウイルスの蔓延は、水インフラで制御されており（図 1）、特に消毒は、ウイルスを酸化・分解し、感染力を喪失させる（不活化）重要なプロセスである。ノロウイルスは、ウイルスゲノム RNA と外殻タンパク質から成り、いずれかの部位に致命的な損傷を受けることで不活化する。

これまでの研究により、消毒はウイルスの進化にも関与することがわかつてき。水処理に用いられる塩素消毒やアルカリ消毒は、ノロウイルスの進化に選択圧として作用することが解明されている。選択されたウイルス集団は環境中に放出され、その中でも自然に死滅せずに残存した集団は、飲み水や環境水、食品を介してヒトに感染し、増殖を経て、新たな集団を構成する（図 1）。このようなサイクルの結果生じる新たなウイルス集団は、感染力や環境ストレスへの耐性、及び消毒への耐性が進化する前とは異なる可能性があり、ウイルスの進化を想定せずに設計された消毒施設では、十分に不活化されない可能性があり、ヒトへの感染リスクが懸念される。ウイルス進化に対してレジリエントな社会に向けては、ウイルスをヒトへの脅威となる方向には進化させないような消毒の使い方を見出す必要がある。しかしながら、都市の中でも水インフラに関わる環境での死滅と増殖を通して、ウイルスがどのように適応進化し、その結果生じる子孫集団がどれほどの消毒耐性や病毒性を発現しうるのかについて未解明である。

以上の背景を踏まえ、本研究は、ウイルス粒子の構造の進化に着目し、消毒低感受性の獲得メカニズムを解明するとともに、消毒方法ごとに異なるウイルスの不活化メカニズムに着目し、出現しうる消毒低感受性ウイルスの特徴を明らかにすることを目的とした。

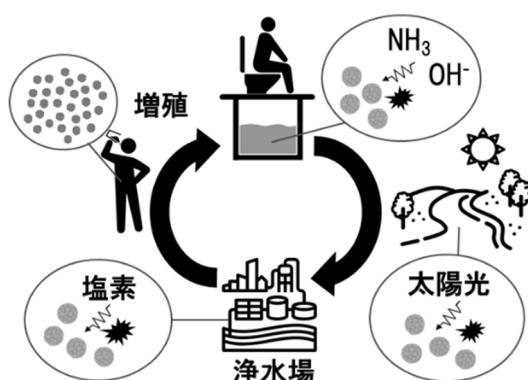


図 1. 都市における胃腸炎ウイルスの進化と水インフラによる制御

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 2 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、培地で希釀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。

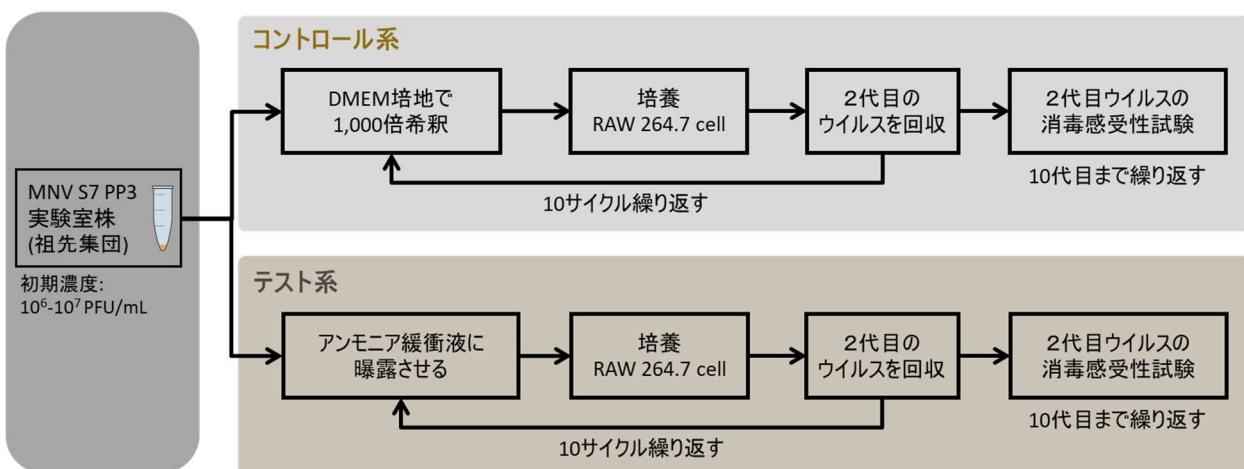


図 2. 実験進化のフロー

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。

5 層フラスコに培養した RAW264.7 に対して、石灰消毒低感受性集団を感染させた (MOI=0.001)。細胞変性効果を確認後に回収し、スクロースクッショング法と塩化セシウム浮上密度勾配遠心により、濃縮、及びタンパク質画分との完全分離を行って粒子精製を行った。

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 3 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消毒 (pH 12) での研究結果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され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。

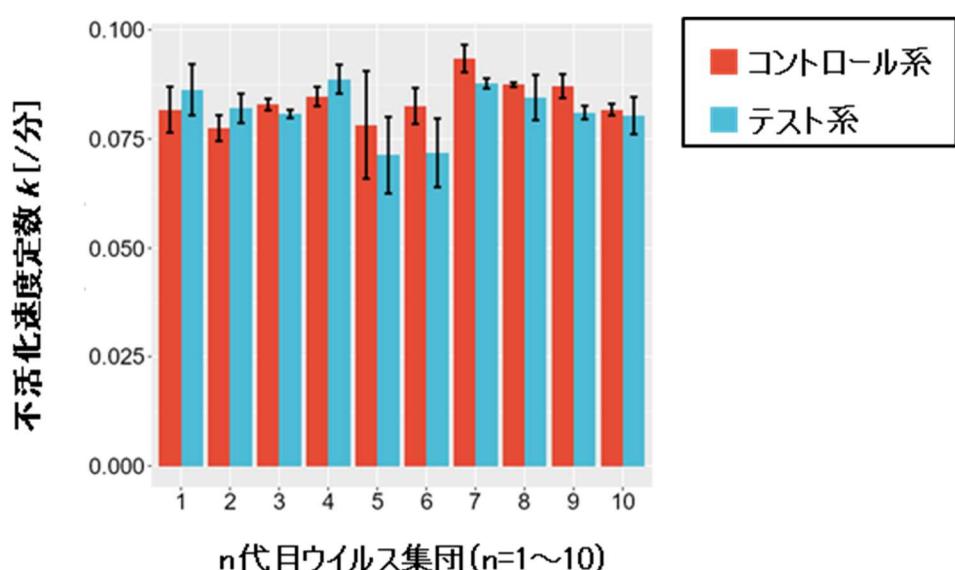


図 3. 実験進化で得られた各ウイルス集団のアンモニアに対する感受性

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ず、粒子構造を決定する段階まで進むことはできなかった。同時に、同じ方法を用いて、実験室株の濃縮及び精製を行ったところ、構造解析に十分な試料を用意できたことから、消毒低感受性集団は粒子産生効率が低いために十分なウイルス数を得られなかつたと考えられる（図4）。

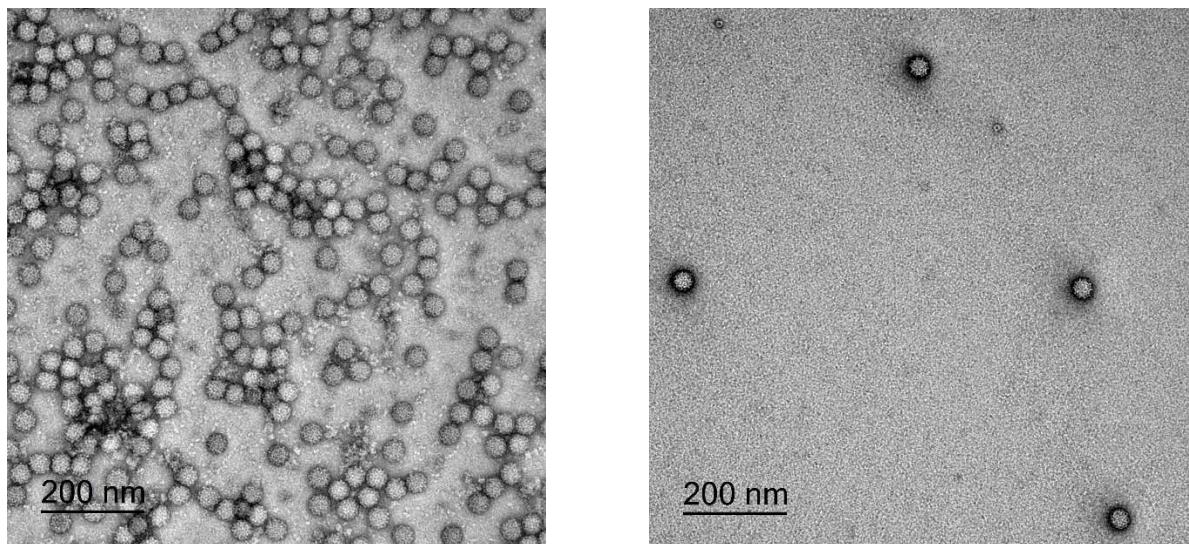


図4. 実験室株（左）と石灰消毒低感受性株（右）の電子顕微鏡像

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の違いがウイルス適応進化に与える影響とその原因について解明を進める。