

**F. 研究発表**

1. 論文発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

本年度該当無し

2. 学会発表

国内会議

国際会議

いずれも本年度該当無し

**G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## ノロウイルスのホストトロピズムの研究、モデル動物の研究

担当責任者 中西 章 国立長寿医療研究センター  
老化制御研究部遺伝子治療研究室 室長

### 研究要旨

培養が出来ないヒトノロウイルス（HuNoV）に代えて、培養細胞 RAW264.7 でよく増殖するマウスノロウイルス（MNV）を用い、細胞継代に伴って発生する遺伝子割合変化を次世代シーケンスで解析した。マウス糞便より RAW264.7 細胞で分離培養されて間もないウイルス株には、複数の遺伝子型が共存していた。RAW264.7 細胞での継代によりウイルスの遺伝子配列割合は予想以上にダイナミックに変化しており、複雑な遺伝子変異ネットワークの存在が示唆された。今後は、カプシドタンパク質 P domain での変異に焦点をあて、個々の遺伝子変異の意味を細胞での増殖性、そして個体への感染性の解析を行う。

### A. 研究目的

遺伝子変異がもたらすノロウイルスの病原性や感染性の変化、ワクチンからの逃避などをモニターすることをめざした実験系を作出する。培養が出来ないヒトノロウイルス（HuNoV）に代えて、培養細胞 RAW264.7 でよく増殖するマウスノロウイルス（MNV）を用い、感染に伴う遺伝子変化を解析する実験系の構築を行う。本年度は、分離間もないマウスノロウイルスにおいて、細胞での継代においてウイルス感染増殖過程で発生する個々の遺伝子変化について次世代シーケンスで網羅的に解析した。

### B. 研究方法

マウス糞便より RAW264.7 細胞で分離培養され間もない MNV S7 株（日本大学遠矢幸伸先生、国立感染症研究所高木弘隆先生、片山和彦より分与）を用い、MOI=0.01 であるいは MOI=5 で RAW264.7 細胞に感染継代を 8 代にわたって行った。各継代の培養上清を低速遠沈で細胞片等

を除いた後、SW50.1 rotor、45000rpm、1.5 時間の超高速遠沈でウイルスをペレットとして採取した。ペレットより QAmp viral RNA mini kit (Qiagen) で RNA を抽出し、Superscript III (Invitrogen) により poly-dT をプライマーとして cDNA を作成し、cycle sequencing 解析あるいは、次世代シーケンサー（Illumina, MiSeq）により遺伝子配列を解析した。

### C. 研究結果

Reference 配列として MNV S7 PP3(Genbank AB435515.1)を用い、分離間もない MNV S7 株の配列を cycle sequence によって解析すると、consensus sequence として、54 箇所の配列に相違が見られ、12 箇所ではコードするアミノ酸が変化していた。一方次世代シーケンサーでの解析では、High MOI での継代では 89 箇所、Low MOI での継代では 101 箇所で配列の相違があった。その中で 20 箇所が non-synonymous 変異であった。Reference 配列と異なる配列は全体の

31.7%から 100%のものであって、その割合は一定では無かった。この結果から、分離間もない MNV S7 株には複数の遺伝子配列が混在すること、そしてその割合も様々であることが明らかになった。このような遺伝子プールから出発し RAW264.7 細胞での継代を繰り返すと、細胞増殖に適した配列が選択されてくる可能性がある。High MOI で RAW264.7 細胞にて継代を繰り返した際、各継代での遺伝子プールの割合の変化は最大で 50%の振幅が見られたが、大きくは変わらなかった。継代につれえ明らかに増加傾向にあったのは MNV 2209 位の C から T へ、6652 位の T から A の移行で有り、それぞれ ORF1 3A-like Gly 30 が Val へ、VP1 Leu533 が Met へ変わる変異であった。また、2370 位の T→C→T の変化により、3A-like Leu84 から Val そしてまた Leu へといった一過的な変化も見られた。一方 Low MOI の継代では、遺伝子配列割合の大きな変動がみられ、45 箇所では reference type に集約、18 箇所では reference type が著しく減少、28 箇所は振幅があるものの遺伝子割合は大きく変化しなかった。また、6 箇所の配列は既にほぼ 100%が non-reference タイプであって継代による変動は見られなかった。特に、VP1 コード領域では、Pro259 が Leu へ、Asn261 が Lys へ、Ile286 が Val へ、Arg346 が Lys へ、Ser400 が Gly へ、Phe525 が Tyr へと、多くの配列変動が見られた。Non-synonymous 変異の中で、High MOI・Low MOI での継代で共通のものは無かった。ORF2 領域では reference 配列と異なる計 10 箇所の Non-synonymous 変異がみられたが、そのうち 7 箇所は継代によって大きく割合が変動していた。我々は以前、MNV 6158 位の C→T (Vp1 The300 から Ile)への変異は、培養細胞での馴化に必須と考えて研究を行ってきたが、今回は MNV 6158 位の配列は初回の継代からほぼ 100%が C であり、VP1 The300 のままであった。

#### D. 考案

MNV S7 株の分離間もないウイルスストックには複数のゲノム配列が混在していること、そして RAW264.7 細胞での培養を経ることによりその遺伝子配列割合はダイナミックに変化することが明らかになった。しかし今回の解析では、明確な遺伝子配列の収束は見られず、配列の混在状態は継代終了まで持続していた。特に、以前の我々の解析から、RAW264.7 細胞での増殖に必要な adaptive mutation とされた MNV 6158 位の C から T への変異 (Vp1 301 T から I へ)は、今回は観察されなかった。前回採用した cycle sequence と次世代シーケンスとの配列割合決定の精度は比べるべくもないが、今回の解析では、比較的多くの遺伝子バリエーションが保存されていたことから、もし VP1 300 位の Ile への変異が細胞馴化に重要だったとしても他の部位の変異が補完し、この変異は必要としなかったのかもしれない。実際、S7 株と異なり自然免疫不全マウス (Stat1<sup>-/-</sup>マウス) に強毒性を示す MNV-1 株での研究でも、RAW264.7 細胞での継代開始からしばしば VP1 300 位の Ile への変異が観察されている (Kolawole et al. J.Virol.2014)。一方 S7 と同様にマウス腸管の持続感染株として単離された MNV-3 のマウス感染時に観察される遺伝子変化は、VP1 300 位の Ile から Thr の変異が優性になっていることが報告されている (Arias et al. J.Gen.Virol., 2012)。MNV-1, MNV-3 それぞれマウス個体への感染病理は異なるが、同じ VP1 301 位でアミノ酸変異が観察されていることは興味深い。また、MNV-1 では 301 位の Thr・Ile の変化は細胞増殖性に影響無いとされているが (Kolawole et al. J.Virol.2014)、MNV-1 の P2 domain 配列とは 11 のアミノ酸の相違がある S7 株においては、301 位の Thr・Ile の変化の意味は MNV-1 と同義とは一概には考えられないかもしれない。興味深いことに、MNV-1 で報告されている quasi-

species と分離間もない S7 株で見られる遺伝子変異と同一なものは VP1 301 位のみであり、他の 10 アミノ酸残基の変異に対応するものは見つかっていない。

今後は VP1 301 も含め、分離間もない S7 株に見つかる遺伝子配列について、マウスにおける病原性を司ることが近年示された(Strong et al. J.Viro. 2012) VP1 P domain コード配列に焦点をあて、個々の遺伝子変異の意味を細胞での増殖性、そして個体への感染性を解析する予定である。

## E. 結論

培養が出来ない HuNoV に代えて、培養細胞 RAW264.7 でよく増殖する MNV を用い、細胞継代に伴って発生する遺伝子割合変化を次世代シーケンスで解析した。ウイルスの遺伝子配列割合は予想以上にダイナミックに変化していたが、殆どの遺伝子変異は、培養細胞での増殖に機能的な差異は無いことが示唆された。今後は、カプシドタンパク質 P domain での変異を中心に解析を行う。

## F. 研究発表

1. 論文発表 (発表誌名巻号・頁・発行年記入)  
Katayama K, Murakami K, Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK. Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 111: E4043-E4052 (2014)
2. 学会発表  
国内会議
  1. 中西 章、山本真由子. ポリオーマウイルスの細胞感染効率はVp2/3が関与する細胞内移

行ステップに影響される. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月12日 横浜

2. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、朴英斌、中西 章、脇田隆字、片山和彦. レポーター遺伝子を内包したノロウイルス感染性粒子作製の試み. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月11日 横浜

3. Zhou Y, Tasaki H, Nakanishi A. Examination of intracellular processes that associate with formation of astroviral replication complexes. 第37回日本分子生物学会 2014年11月27日 横浜

## 国際会議

1. Nakanishi A, Tange S, Tasaki H, Zhou Y. Association of autophagic process during human astroviral infection. *American Society for Virology* (2014) June 22, Fort Collins, Colorado, United States
2. Yoshida K, Zhou Y, Takai-Todaka R, Katayama K, and Nakanishi A. Functional complementation of VP2 in murine norovirus. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (2015) Jan. 29. Taipei, Taiwan

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## インシリコモデリング・スクリーニング

担当責任者 横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

### 研究要旨

ノロウイルスの抗ウイルス薬は未だ実用化されていないため、抗ウイルス薬の実用化が望まれている。本研究では、計算機を用いて、ノロウイルスなどカリシウイルスの蛋白質をターゲットとする抗ウイルス薬の探索を行う。本年度は、ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングに用いる構造を構築するために、分子動力学シミュレーションを行った。核酸類似体のインシリコスクリーニングに必要である活性中心の構造を明らかにした。

### A. 研究目的

ノロウイルスやサポウイルスはウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスである。これらのウイルスの抗ウイルス薬は未だ実用化されていないため、抗ウイルス薬の実用化が望まれている。本研究では、計算機を用いて、ノロウイルスなどカリシウイルスの蛋白質をターゲットとする抗ウイルス薬の探索を行う。

本年度は、ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングに用いる構造を構築するために、分子動力学シミュレーションを行った。

### B. 研究方法

#### 1. 分子動力学シミュレーション

ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングを行うために、RNA 合成する時の構造を分子動力学計算により構築した。

分子動力学シミュレーションに用いる初期構造は、X線結晶構造解析法により決定されたノロウイルス GII.3 U201 のポリメラーゼ（国立感染症研究所ウイルス第2部朴英斌博士提供）に、テンプレート/プライマー、基質、 $Mn^{2+}$ イオンを加えた構造（以後 RdRp+P/T+ATP+Mn とす

る）である。今回は基質として ATP を用いた。また、動的性質や構造の比較のために、ポリメラーゼのみ（以後 RdRp とする）、およびポリメラーゼにテンプレート/プライマーを加えた構造（以後 RdRp+P/T とする）においても、分子動力学シミュレーションを行った。

分子動力学シミュレーションには Amber11 プログラムパッケージの pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN を用いた。ATP および  $Mn^{2+}$ イオンの力場は AMBER parameter database より取得した。計算条件は 1 気圧、37°C、150 mM NaCl、シミュレーション時間は 100 ns とした。

#### 2. 動的性質の解析

分子動力学シミュレーションにより得られたトラジェクトリーを用いて、AmberTools の ptraj モジュールにより、シミュレーション開始時の構造からの RMSD（Root Mean Square Deviation: 平均二乗偏差）、および平衡構造に達してからの  $C\alpha$  の RMSF（Root Mean Square Fluctuation: 根平均二乗揺らぎ）を計算した。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

## C. 研究結果

### 1. ノロウイルスポリメラーゼの平衡構造の決定

ノロウイルスポリメラーゼが分子動力学シミュレーションにより、平衡構造に達することを確認するために、シミュレーション開始時の構造からの RMSD を計算した。RdRp では、数 ns までに RMSD は急激に増加し、10 ns からほぼ RMSD は一定となり、それ以降で平衡構造に達していると考えられる。RdRp+P/T では、数 ns までの RMSD の急激な立ち上がりは RdRp と同様である。RdRp と異なることは、RMSD が 20 ns まで緩やかな増加である。約 50 ns 以上で一定となり、平衡構造に達する。RdRp+P/T+ATP+Mn では、他の 2 つと同様に、数 ns まで RMSD は急激に増加する。その後、大きな構造変化が 20 ns 付近まで続いている。他の 2 つに比べて、RMSD は大きく変動しながら一定となる。約 50 ns 以上で平衡構造に達していると考えられる。

次に、25 ns、50 ns、75 ns、100 ns におけるスナップショットを調べた。RdRp、RdRp+P/T、RdRp+P/T+ATP+Mn のどの構造でも、大きな構造変化は見られない。ゆえに、得られた構造は平衡構造であると考えられる。

3 つの構造 (RdRp、RdRp+P/T、RdRp+P/T+ATP+Mn) の違いを知るために、75 ns におけるスナップショットを重ね合わせた。Thumb ドメインの配置に違いが見られた。

### 2. ノロウイルスポリメラーゼの動的性質の解析

ノロウイルスポリメラーゼの動的性質を知るために、平衡構造に達してからの各残基の C $\alpha$  の RMSF を計算した。結果を図 1 に示す。この RMSF は C $\alpha$  の平均変位を表しているため、RMSF が大きいことは、C $\alpha$  の変位が大きく揺らいでいること意味する。RdRp、RdRp+P/T、

RdRp+P/T+ATP+Mn の、どの構造でも大きく揺らいでいる部位はループであった。ポリメラーゼのドメイン間の揺らぎを比較すると、Thumb ドメインの揺らぎが大きく、Palm ドメインの揺らぎが小さいことが明らかになった。

次に、P/T、ATP および Mn<sup>2+</sup>イオン結合により揺らぎが変化する部位を知るため、RdRp、RdRp+P/T、RdRp+P/T+ATP+Mn の比較を行った。RdRp に P/T が結合すると揺らぎが減少し、さらに ATP および Mn<sup>2+</sup>イオンが結合するとさらに揺らぎが減少した。ATP および Mn<sup>2+</sup>イオンの結合により、特に Palm ドメインのアミノ酸残基の揺らぎが減少していたことから、ATP および Mn<sup>2+</sup>イオンの結合に Palm ドメインのアミノ酸残基が関与していることが示唆される。

### 3. ノロウイルスポリメラーゼの活性中心の構造

ノロウイルスポリメラーゼの阻害剤として、核酸類似体と非核酸類似体の 2 つが考えられる。核酸類似体の作用機序は、ポリメラーゼの活性中心に結合することやホスホジエステル結合後のトランスロケーションに影響を与えることで阻害する。そのため、活性中心において基質がどのように認識されているかを知ることが、核酸類似体のスクリーニングに必須である。活性中心の構造情報を得るために、ポリメラーゼの分子動力学シミュレーションにより平衡構造を得た。

はじめに、ポリメラーゼの活性発現に必要なある 2 つの Mn<sup>2+</sup>イオンの配置を調べた。(図 2 (A)) 2 つの Mn<sup>2+</sup>イオンは 3 つのアスパラギン酸 (Asp242、Asp343 および Asp344) に結合していた。

次に、基質である ATP の結合に関与するアミノ酸残基を調べた。(図 2 (B)) ATP と水素結合を形成するポリメラーゼのアミノ酸残基は、Lys200、Arg202、Arg245、Trp246、Asp247、Ser300 である。これらのうち、Lys200、Arg202、Ser300

は側鎖が ATP と水素結合を形成し、Arg245、Trp246、Asp247 は主鎖が ATP と水素結合を形成していた。基質の結合に関与するアミノ酸残基が特定された。

#### D. 考察

ノロウイルスポリメラーゼの動的性質の解析より、Palm ドメインの揺らぎが小さく、Thumb ドメインの揺らぎが大きいという結果が得られた。このドメインによって揺らぎの大きさが異なる理由について検討する。ポリメラーゼの活性発現に必要な2つの  $Mn^{2+}$  イオンは、Asp242、Asp343 および Asp344 に結合していた。これらのアミノ酸残基は Palm ドメインに位置し、これらのアミノ酸残基に安定に結合することが、ポリメラーゼの機能発現に重要である。そのため、Palm ドメインの揺らぎは小さくなったと考えられる。

一方、ポリメラーゼはホスホジエステル結合形成後、次の基質を取り込むためにはテンプレート/プライマーが移動する必要がある。その移動を行う機能を持つ部位が Thumb ドメインであり、そのために Thumb ドメインの揺らぎが大きくなったと考えられる。Fingers ドメインも Thumb ドメイン同様に揺らぐ必要があると考えられる。しかし、今回の結果では、N 末端ドメインが Fingers ドメインと結合していたため、Fingers ドメインの揺らぎが抑制されたと考えられる。

次に、ノロウイルスポリメラーゼの活性中心の構造から、その機能について検討する。ポリメラーゼの活性発現に必要な2つの  $Mn^{2+}$  イオンは Asp242、Asp343 および Asp344 に結合していた。この3つのアスパラギン酸のうち Asp343 と Asp344 は YGDD モチーフに含まれている。ゆえに、YGDD モチーフは、ポリメラーゼの活性発現に必要な2つの2価金属イオンを結合するために保存されていると考えられる。

基質はテンプレートの核酸と水素結合を形成することで基質認識しているが、ATP と水素結合を形成するポリメラーゼのアミノ酸残基も基質認識に寄与していると考えられる。Ser300 の側鎖が ATP の 2'位の OH 近傍にあるため、Ser300 はリボースを認識する働きがあると考えられる。Lys200 と Arg202 の側鎖が三リン酸と水素結合を形成しているため、Lys200 と Arg202 は三リン酸の配置の決定や三リン酸を認識する働きがあると考えられる。

#### E. 結論

ノロウイルスポリメラーゼ阻害剤のインシリコスクリーニングに用いる構造を構築するために、分子動力学シミュレーションを行い、ノロウイルスポリメラーゼの平衡構造を得た。核酸類似体のインシリコスクリーニングに必要である活性中心の構造を明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

国内会議

- (1) 横山 勝、中村浩美、佐藤裕徳. ノロウイルス GII.4 カプシドにおける共変異部位の推定. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.
- (2) 岡智一郎、横山 勝、高木弘隆、小島宏建、長野哲雄、岡部隆義、遠矢幸伸、片山和彦、佐藤裕徳. カリシウイルスプロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.
- (3) 佐藤裕徳、横山 勝、本村和嗣、中村浩美、田村 務、吉澄志磨、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田 衛、田中智之、Norovirus

Surveillance Group of Japan. ヒト集団におけるノロウイルス流行株の多様性と進化. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.

- (4) 佐藤 裕徳、本村 和嗣、横山 勝. 環境ウイルスとヒト集団の関わり. 第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.

国際会議

- (1) Sato H, Yokoyama M, Nakamura H, Motomura K. Strong constraints on changes in capsid protein of norovirus pandemic lineage GII.4\_2006b after the onset of outbreaks. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada, 2014.

- (2) Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Oka T,

Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H. Deep Sequencing-based analysis of norovirus populations in individuals with acute Gastroenteritis. XVI International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2014 Congress), Montréal, Canada, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



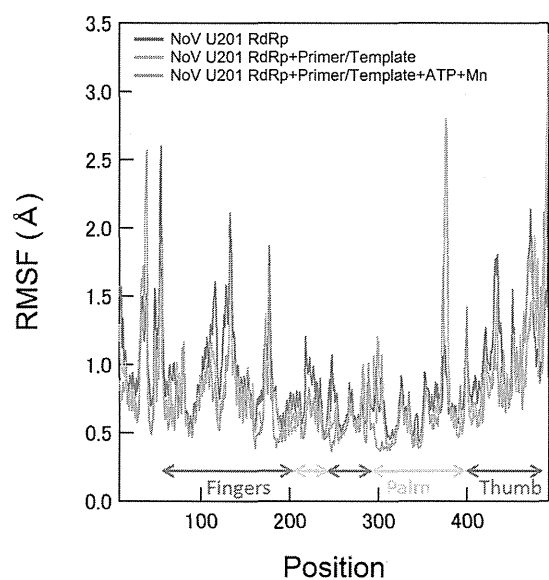


図1. ノロウイルスポリメラーゼの各残基の  $C\alpha$  の RMSF。RMSF は  $C\alpha$  の平均変位を表しているため、RMSF が大きいほど  $C\alpha$  が大きく揺らいでいることを意味する。

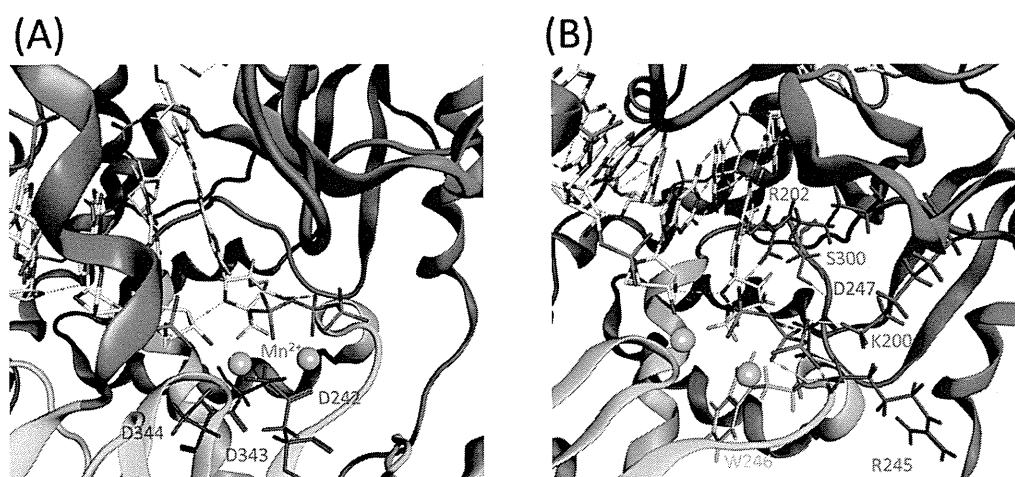


図2. ノロウイルスポリメラーゼの活性中心の構造。(A) ポリメラーゼの活性発現に必要である 2 つの  $Mn^{2+}$  イオンの配置。(B) ATP と水素結合を形成するポリメラーゼのアミノ酸残基

## ヒトノロウイルス代替 calicivirus による不活性化薬剤の探査と薬剤抵抗性獲得

担当責任者 高木 弘隆 国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室 研究員

### 研究要旨

ヒトノロウイルスの代替 calicivirus である feline calicivirus(FCV)と murine norovirus(MNV)を用いて不活性化薬剤とされる新規エタノール製剤 4 種類、クエン酸及びリンゴ酸、 $H_2O_2$  について不活性化効果を検討した。新規エタノール製剤は薬剤抵抗性株である FCV-ym3 に対し、速やかな不活性化効果を示したが、他のノンエンベロープウイルスでは十分な効果は認められなかった。2 種の有機酸では FCV で不活性化効果が認められたが、MNV に対しては全く認められなかった。エタノール高感受性の MNV は 40~50%エタノール処理を繰り返すことで抵抗性株の作出が示唆され、元株との核酸配列において 52 か所の塩基変異もみられた。2% $H_2O_2$  による不活性化効果はウイルス株及び種類により異なっており、FCV-ym3 や MNV では十分な効果は認められなかった。また  $H_2O_2$  に対する抵抗性株については供試ウイルスのうち、FCV-F9 のみでその作出が示唆された。

### A. 研究目的

ノロウイルス感染症は食品を介した集団事例のみならず、病院や介護施設での死亡者も伴うアウトブレイクも社会的な問題となっており、これらケースの感染制御は社会的に非常に重要となっている。しかしながら当該ウイルスは未だ人工的に培養・増殖することが困難であり、感染制御の要となる感染経路の解明や消毒剤等の直接的な効力評価は推定の域を脱していない。

こうした現状の中、「代替ウイルス」を用いた様々な評価が行われてきており、その結果を感染制御に応用されており、一部には実効性も認められている。またこれまで不得手としてきたノンエンベロープウイルスにも効果のある新規エタノール製剤も散見されている。一方で、こうした薬剤が上市されているにもかかわらず、感染制御に対する貢献性は見受けられないのもまた事実である。そして代替 calicivirus で

は薬剤処理後に残留したウイルスが同薬剤に対して抵抗性を示すケースも認められ、この現象の惹起はヒトノロウイルスにおいても否定できない。

よって新規薬剤および汎用剤による代替 calicivirus の不活性化を検討するとともに、汎用薬剤に対する抵抗性株の作出とその機構について検討した。

### B. 研究方法

(1)新規エタノール製剤による代替 calicivirus の不活性化効果検討

すでに市販されている 4 種類のエタノール製剤(表 1)を用いて、薬剤抵抗性の強い臨床分離株 FCV-ym3 による不活性化効果試験を行った。

#### ○材料及び方法

- ・供試ウイルス：  
FCV-ym3 (accession KJ551382)

・方法： ウイルス 1 容量(5%FBS 含有培地)と供試製剤 9 容量を混合後、一定の接触時間毎に一定量を採取し 7 倍段階希釈系列を作成した。これを CRFK 細胞プレートに接種し、時間毎の感染価(TCID<sub>50</sub>)を測定して感染価減衰を検証した。

## (2)二種類の有機酸による代替 calicivirus 不活性化効果の検討

一部の有機酸については calicivirus に対する不活性化あるいは感染阻止能が指摘されており、キレート効果による二価イオン奪取での粒子崩壊、あるいはレセプターポケットにはまり込むなどとされているが、明解なもの未だない。今回様々な製品に汎用され、キレート効果を有する二種類の有機酸（クエン酸とリンゴ酸）による FCV および MNV に対する感染価減衰を検討した。

### ○材料及び方法

・供試ウイルス：

FCV-F9(ATCC、VR-782)

MNV\_S7-03(2 継代ストック、03+2)

・供試製剤：

クエン酸(和光 038-06925)

リンゴ酸(和光 139-00565)

各々精製水にて 0.372M に調整後、φ 0.2 μ m フィルターにて濾過滅菌した。

・中和剤： 3%FBS 及び 0.375%bicarbonate 含有イスコフ変法培地

・方法： ウイルス 1 容量に対し各有機酸 4 容量を混合後、一定の接触時間毎に一定量を採取し中和剤で 7 倍希釈し、さらに細胞培養培地にて 7 倍希釈系列を作成した。これを CRFK 細胞 (FCV)、RAW264.7 細胞 (MNV) プレートに接種し、時間毎の感染価(TCID<sub>50</sub>)を測定して感染価減衰を検証した。

(3)汎用剤としてのエタノール及び過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)による抵抗性株の作出と一部の特性について検討した。

汎用剤であるエタノールに対する calicivirus の感受性は様々で、FCV の場合には株によっても異なる。そして FCV の特定株についてエタノール処理後に残留するウイルスを回収・培養し再度エタノール処理を行うことを繰り返すとエタノールに対し抵抗性を示すことを見出した。同様の現象がエタノールに対して感受性の高い MNV で起こりえるか否かを検証した。また雑品の酸化剤成分として汎用される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対し、同様の抵抗性獲得現象が起こりえるかを FCV 数株にて検証した。

### ○方法及び材料

・供試ウイルス：

MNV\_S7-03+2

FCV-F9、FCV-ym3、

FCV-Gon (accession KJ551380)

FCV-ITO (accession KJ551381)

・供試製剤：

①エタノール液 99.5%原液と滅菌精製水により用時調製した。

②2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液 30%原液を滅菌精製にて 15 倍希釈し用時調製した。

・中和剤(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>用)： 5%FBS、40 μ g/ml カタラーゼ、0.05M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含有イスコフ変法培地

・方法： ①供試 MNV1 容量とエタノール液 9 容量を混合(終濃度 40%)後、一定の接触時間毎に一定量を採取し、細胞培養培地にて 7 倍希釈系列を作成した。これを RAW 細胞プレートに接種し、時間毎の感染価(TCID<sub>50</sub>)を測定し、かつ最大接触時間の残存 MNV を回収した。同様の方法で終濃度 50%となるエタノール液と混合し、採取サンプルを RAW へ接種・残存 MNV

回収という操作を2回繰り返した。こうして得られた2株と元株であるS7-03+2と共に終濃度50%となるエタノール液に対する感受性を比較した。

②各供試FCV1容量と2% $H_2O_2$ 液4容量とを混合後、一定の接触時間毎に一定量を採取し中和剤で7倍希釈し、これより細胞培養培地にて7倍希釈系列を作成した。これら希釈系列をCRFK細胞プレートに接種して時間毎の感染価(TCID<sub>50</sub>)を測定し、かつ最大接触時間の残存FCVを回収した。これをCRFK細胞にて1継代増殖したものについて、2% $H_2O_2$ に対する感受性を検証した。

## C. 研究結果

### 結果

(1)新規エタノール製剤によるFCV-ym3株の不活性化効果

4種類の新規エタノール製剤については、どれも薬剤抵抗性株であるym3に対して速やかな不活性化効果を示し、接触20秒で $4\log_{10}TCID_{50}$ 以上感染価が減衰した(表2)。各製剤で細胞に対する傷害性が異なるため、減衰感染価は若干異なるが、環境用である製品Wspが最も細胞傷害性が小さかった。

(2)クエン酸及びリンゴ酸によるFCV-F9およびMNV\_S7-03+2の不活性化効果

0.372Mクエン酸によるFCV-F9の不活性化は速やかに進み、接触30秒で $4\log_{10}TCID_{50}$ 以上感染価が減衰した。一方0.372Mリンゴ酸ではクエン酸よりもやや緩やかではあるが、顕著な感染価減衰が認められた。MNV\_S7-03+2に対しては両有機酸とも不活性化効果をほとんど示さなかった(図1及び2)。

(3)①MNVにおけるエタノール抵抗性の出現と

### 抵抗性株の作出

40%エタノール5分間処理で残存したMNVを回収し、これを50%エタノールにて1及び2回処理を行い培養増殖したものをER-MNV(+2)及びER-MNV(→3)として、元株を含め50%エタノール液に対する感受性を比較したところ、エタノール処理を重ねるごとにエタノールに対する感受性が低下し、ER-MNV(→3)に至っては初発感染価が低いにも関わらず、3分間接触後も $1\log_{10}TCID_{50}$ 程度の感染価減衰にとどまった(図3)。

②2% $H_2O_2$ によるFCVs及びMNVの不活性化効果、FCVにおける $H_2O_2$ 抵抗性株作出の可能性について

臨床分離株を含めたFCV4株に対する2% $H_2O_2$ の不活性化効果はF9およびGonで接触60分まではほぼ直線的に感染価減衰するという類似した傾向を示した(図4-a)、-b))。しかし他のITO株、ym3株において感染価減衰の傾向は全く異なり、ym3株では接触60分においても $2\log_{10}TCID_{50}$ 程度の減衰にとどまった(図4-c)、-d))。一方MNVに対する2% $H_2O_2$ の不活性化効果はFCV-ym3株とその傾向が類似しており、接触60分において、 $3\log_{10}TCID_{50}$ の感染価減衰にとどまった(図5)。またFCV-ITO株を除く3株について接触60分後の残存ウイルスを回収・培養し、これらに対する2% $H_2O_2$ の感受性変化をみたところ、F9株において元株より接触40分以降の残存ウイルスが増加する傾向が認められた(図6)。

## D. 考案

対ウイルス用に開発された新規エタノール製剤については、消毒剤抵抗性の高いFCV-ym3株において、速やかな不活性化効果を示しており、「手指消毒」という使用目的からも感染制御に対し、有効に活用できる可能性が示唆され

た。しかしながら一方で「ノンエンベロープタイプのウイルスにも有効」とされていながら、毎年流行がみられるエンテロウイルスに対しては、どの製剤においても「速やかな感染価減衰」は認められず(図 7)、今後評価方法も含めて、さらなる検証は必要である。

2種類の有機酸による FCV 及び MNV の不活性化について、当初%濃度で検討を始めたが、作用の比較が思わしくなくモル濃度での評価に変更した(供試濃度を%に換算するとクエン酸は 7.8%、リンゴ酸は 5%となる)。その効果同モルでクエン酸のほうより速やかに不活性化を起こすことがわかったが、2つのウイルスにおける効果が劇的に異なることも認められた。FCV においては ym3 株において電子顕微鏡で確認不可能なほどに感染粒子が分解されることが観察されている(データは示さず)ため、FCV に対しては粒子破壊的作用による不活性化が起こっていると考えられるが、MNV についてはそうした作用が及んでおらず、calicivirus 全般に同様の効果が期待できるとは考えにくい。また反応停止条件にもあるが、pH を中性にしまうと FCV においても不活性化は起こらない。薬剤の性質上「環境除染向き」であるが、組成や使用用途については、熟考する必要がある。

MNV のエタノール抵抗性獲得については、今回の検討でその可能性はより高くなったと考える。これまで「MNV はエタノールに対して高感受性である」とされてきたが、十分な濃度・時間で接触されなければ、ウイルスが残存し、これがホストに感染して増殖すれば、抵抗性株が作出・放出される可能性は十分考えられる。またこの抵抗性株と元株について、ほぼ全長に及ぶ遺伝子配列を比較した速報値においては、塩基の変異が 52 か所存在すること、その約 8 割が ORF1 にあることがわかってきた。これらの変異が感染粒子の性質にどのように

関わるのか、そして薬剤抵抗性に重要な変異がどの領域であるのかは、引き続き検討が必要である。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は日常品に「酸化剤」もしくは「漂白剤」として広く使用されており、感染制御の際に、色物衣料やカーペットなど強い消毒剤が使用できない場合に推奨している。これより先んじて過炭酸塩による FCV 及び MNV の不活性化は検討しており、10~20 分の接触で十分な効果があることを確認している。今回中和剤の若干の改良により細胞毒性を減弱できたため、より確かな検証に至ったが、FCV においてはやはり株間における感受性差が認められ、ym3 株のように非常に感受性の低い存在も否定できない、また MNV も過炭酸塩に比べ、感受性が低いため単独使用での効果は期待できないであろう。

FCV については供試 3 株中 F9 株のみで H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抵抗性の上昇傾向が認められており、他の株も含め、引き続き抵抗性株の作出及びその機構については検討してゆく。興味深い現象として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理残存ウイルスのエタノールに対する感受性が上昇していた(F9、Gon で確認、データは示さず)。抵抗性獲得機構の解明の一端を担える可能性があるかもしれない。

## E. 結論

(1)新規エタノール製剤による代替 calicivirus の不活性化は速やかであり、主な用途たる手指消毒に関しては、感染制御上、一定の効果は期待できるであろう。ただし一部のエンテロウイルスにおいては効果が乏しく、評価方法を含め今後検証が必要である。

(2)有機酸による FCV 及び MNV の不活性化については、前者は速やかに不活性化されるが、後者には全く効果がなく、二者の間で不活性化効果が極端に異なる結果であった。作用機序を含めてその処方や使用方法について検討が必要となった。

(3)MNV におけるエタノール抵抗性株の作出が認められ、核酸配列上も 52 か所の塩基変異が確認された。また H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する FCV 及び MNV の感受性は様々で、抵抗性株の作出は供試株のうち FCV-F9 株のみで示唆された。引き続き抵抗性獲得機構の解析を行っていく。

※エタノール製剤の検証にあたり、エンテロウイルス株を分与いただきました国立感染症研究所ウイルス第2部 清水博之先生に深謝いたします。

※※参考文献： 高木弘隆 アルコール系消毒剤のノロウイルスに対する効果 感染対策 ICT ジャーナル Vol.9 No.4 2014 p342-347

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
国内会議 なし  
国際会議 なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1 検証用アルコール製剤 一覧

製品 (略称)	VS	VK	RS	Wsp
使用目的		手指消毒		環境用
Ethanol (vol%)	76.9-81.4	約 79	76.9-81.4	約 83
他の成分	リン酸	リン酸	Zn クエン酸	Zn クエン酸・乳酸*
備考	第 3 類医薬品		指定医薬部外品	-

\* Ethanol Enhanced Technology (EET) : 特許第 4163249 号

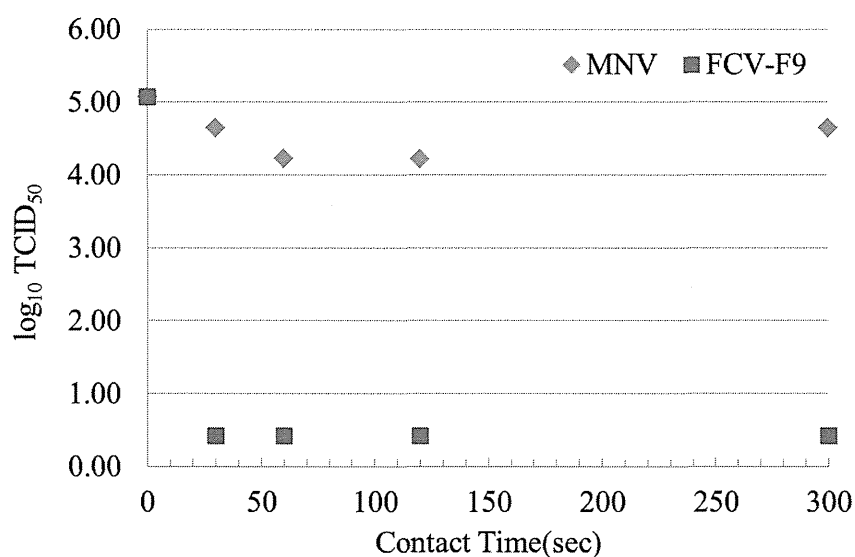
\*\* 上記製品はすべて危険等級 II 該当品である

表 2 FCV-ym3 株を用いた感染価減衰効果

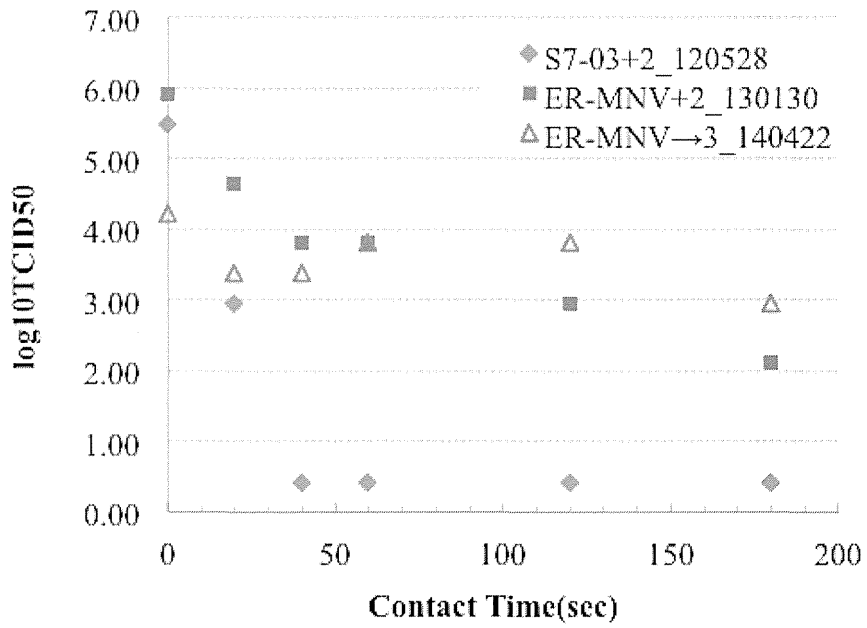
製品	接触時間 (秒)	20	40	60
VS		≥ 4.86	≥ 4.86	≥ 4.86
VK		≥ 4.23	≥ 4.23	≥ 4.23
RS		≥ 4.44	≥ 4.44	≥ 4.44
Wsp		≥ 5.28	≥ 5.28	≥ 5.28

初期感染価からの減衰値を示す (単位 :  $\log_{10}\text{TCID}_{50}$ )

図 1 Reduction curve of virus-disinfection by 0.372M Citric Acid (Contact ratio 1:4)



☒ 2 Reduction curve of virus-disinfection by 0.372M Malic Acid (Contact ratio 1:4)



☒ 3 Reduction curve of MNVs-disinfection by 50% Ethanol (Contact ratio 1:9)

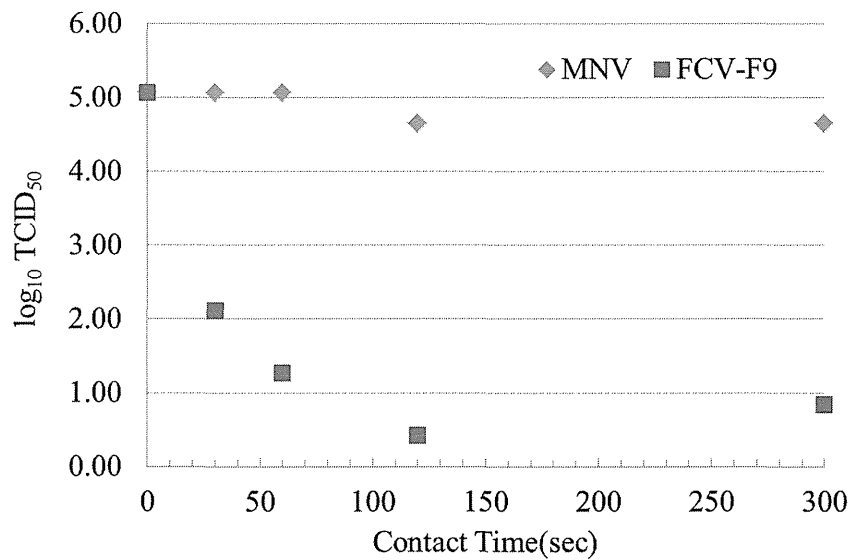
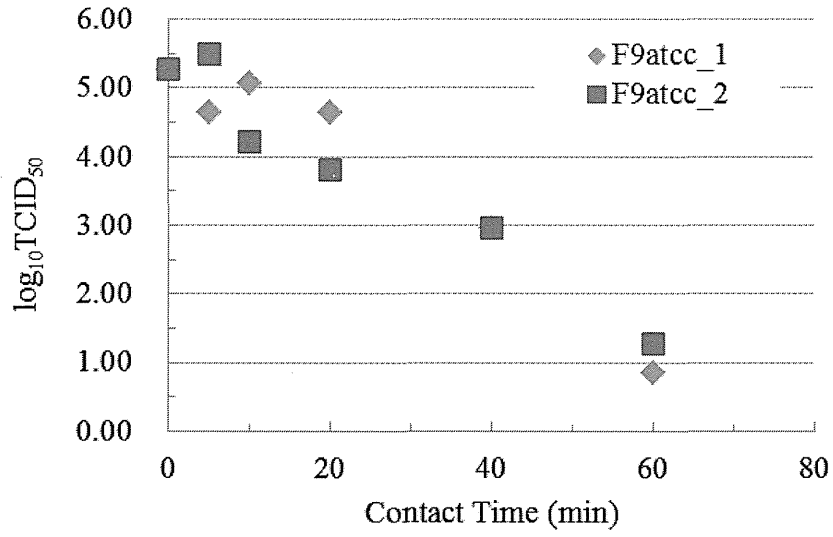


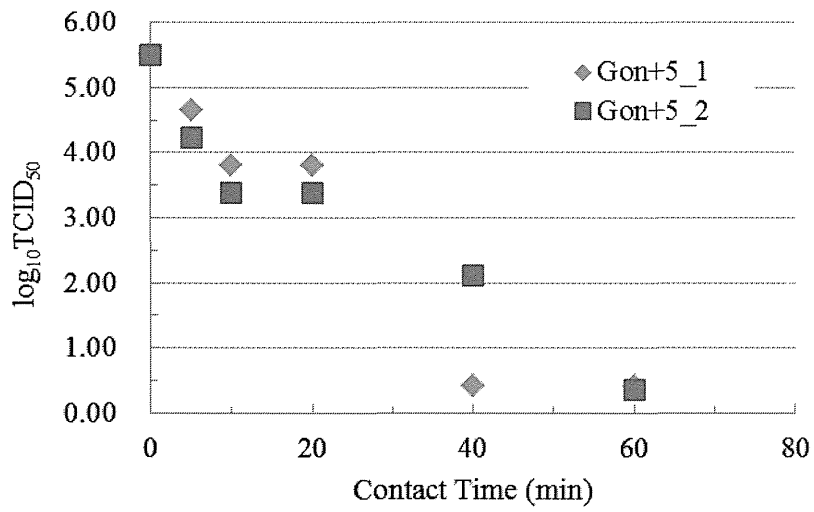


図 4 Reduction curve of FCVs-disinfection by 2% $H_2O_2$  (Contact ratio 1:4)

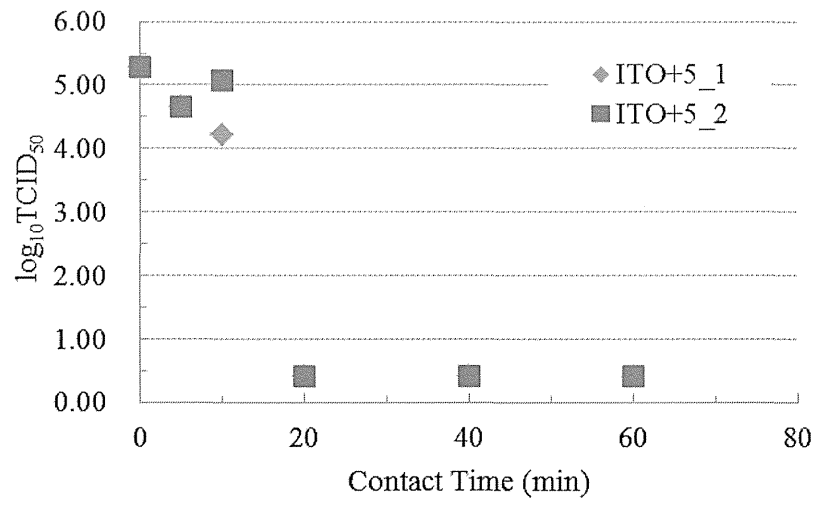
a)



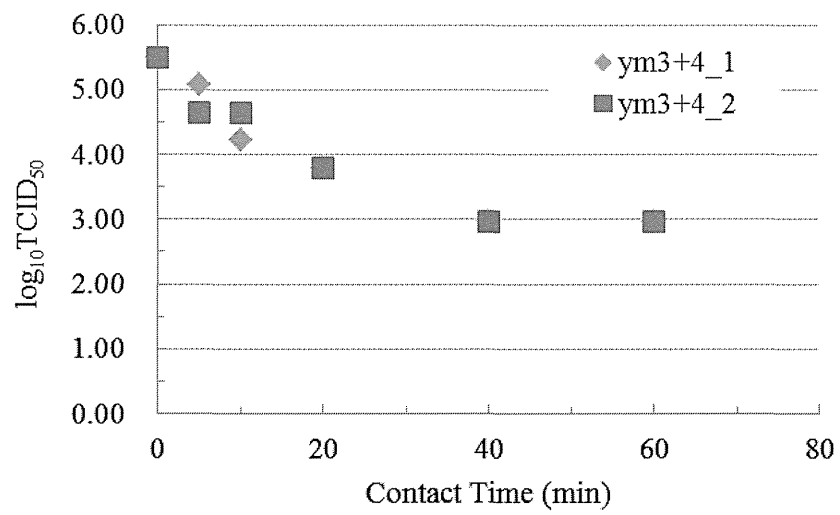
b)



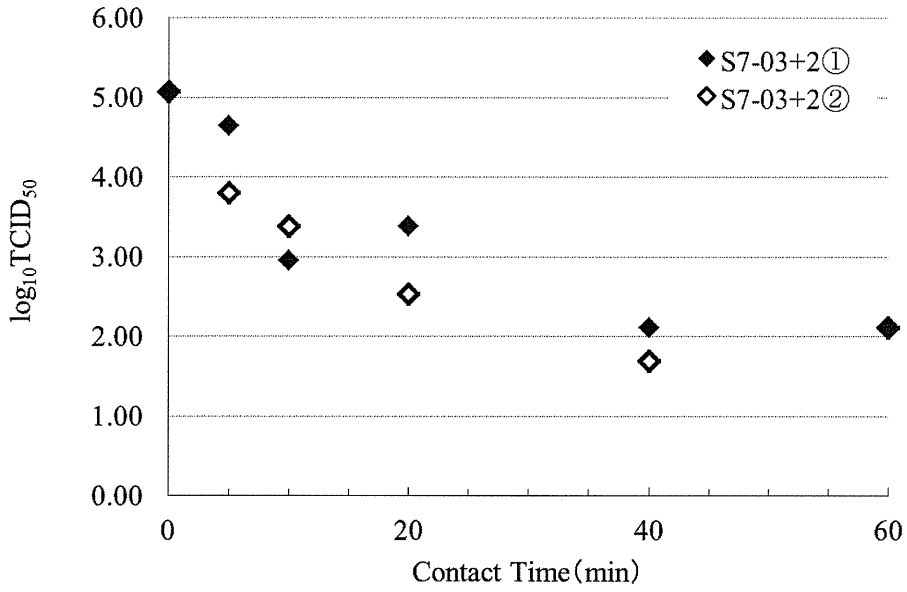
c)



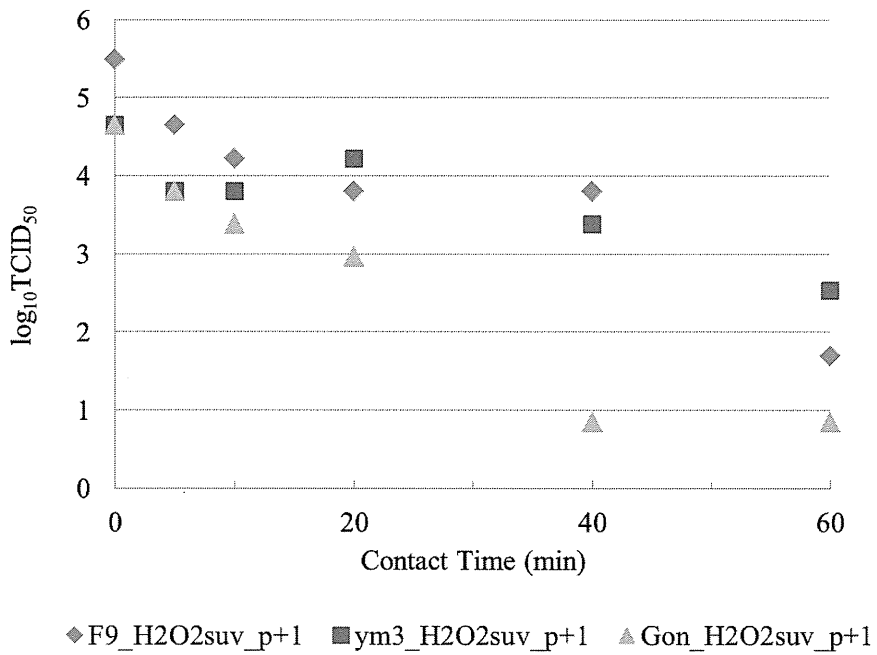
d)



☒ 5 Reduction curve of MNVs-disinfection by 2% $H_2O_2$  (Contact ratio 1:4)



☒ 6 Reduction curve of FCVs-disinfection by 2% $H_2O_2$   
(survival-isolation, Contact ratio 1:4)



☒ 7 Reduction curve of EV71-disinfection by ethanol-based compounds (Contact ratio 1:9)

