

201234049A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

ヒトノロウイルス培養細胞の探索と
食品からのノロウイルス検出に関する研究

平成 24 年度 総括研究報告書

研究代表者 上間 匡

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

ヒトノロウイルス培養細胞の探索と
食品からのノロウイルス検出に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 上間 匡

平成25（2013）年 3月

目次

総括研究報告

ヒトノロウイルス培養細胞の探索と 食品からのノロウイルス検出に関する研究 上間 匡	・・・・・・・・・・ 1
---	--------------

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ヒトノロウイルス培養細胞の探索と食品からのノロウイルス検出に関する研究
総括研究報告書

研究代表者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

ノロウイルス (NV) は、最も重要な食中毒原因物質の一つであり、毎年発生する食中毒事件数の約3割、患者数の半数以上（1万人以上/年）がNVによる。特に、2006/07および2012/13シーズンはGII/4遺伝子型のノロウイルスが大流行を記録するなど、その対策の重要性は非常に高い。しかしながら、NVには培養細胞や実験動物を利用した感染・増殖系が無いために、環境中のNVの動態や、食品・環境からの検出、感染性NVの不活化処理についての研究は近縁ウイルスであるネコカリシウイルス (FCV) やマウスノロウイルス (MNV)、感染性の無いウイルス様分子VLP等で行われ、実際の感染性NVの検出や不活化、制御等に関する詳細は不明であり、NV制御に向けた、感染・増殖系の確立が世界的に望まれている。本研究は、プラスミドベースのFCV再構築系を導入してNVのカプシド蛋白を持つNV様組換えFCVを作成し、NV感受性細胞の網羅的スクリーニングによるNVの感染・培養系の確立を目指すと同時に、様々な食品由来ウイルスへの応用へつながる開発を目指すものである。

初年度のH24年度では、FCV及び、感染性胃腸炎大流行の大きな要因であるGII/4遺伝子型NVのウイルスゲノム全長の効率的なクローニング法の検討と組換えFCVの再構築系の確立を行った。その結果、これまでは断片的に増幅していた約7.6kbの全長のウイルスゲノムのワンステップRT-PCRによる増幅条件を見出し、糞便検体等からの効率的なNVゲノム全長検出系の開発へつながる成果を得た。更に、これまで制限酵素を利用した組換えゲノムプラスミドの作成方法に、In-Fusion法を用いることで制限酵素を使用しないPCRベースの組換えゲノム作成方法を導入した。引き続き、組換えFCVの再構築系の開発と、NV様組換えFCVの作出について検討を行い、次年度のNV感受性細胞探索へと継続する予定である。

またウイルスゲノムの全長増幅PCRを他の遺伝子型のNVや食品由来ウイルスへ

と応用したウイルス検出系の開発につなげる予定である。

A. 研究の目的

ノロウイルス (NV) は、最も重要な食中毒原因物質の一つであり、2006/07 および2012/13シーズンはGII/4遺伝子型のノロウイルスが大流行を記録した。厚生労働省の食中毒統計によれば、図1に示すように平成10年移行食中毒発生事件数は減少傾向を示しているのと対照的に、ウイルスによる食中毒事件数は増加傾向を示している。ノロウイルスによる食中毒、感染性胃腸炎が大流行した平成18年、24年はウイルスを原因とする食中毒患者数も突出している。ウイルスによる食中毒のほとんどはノロウイルスを原因とするものであり、その対策の重要性は非常に大きくなっている。

インフルエンザウイルスなどと異なり、エンベロープを持たないNVはエタノール等の一般消毒薬や乾燥に強い抵抗性を示し、患者の排泄物に大量に含まれるNVによる二次感染が非常に起こりやすく、特に学校や福祉施設では、食中毒事件一件あたりの患者数が他の食中毒事件よりも格段に多い傾向がある。またNVは、患者排泄物・下水・下流海域の食用二枚貝・消費者といった環境循環を繰り返していることとされ、排泄物や下水の適切な処理、NV汚染された二枚貝の検出といった

方策で環境循環を断つことでNV食中毒を根本的に防ぐことができると考えられる。

しかし、NVには培養細胞や実験動物を利用した感染・増殖系が無いために、環境中のウイルス動態や、食品・環境からのウイルス検出や感染性ウイルスの不活化処理についての研究は代替のネコカリシウイルス (FCV) やマウスノロウイルス (MNV) やバキュロウイルス発現系を用いた、感染性の無いウイルス様分子VLP等で行われており、実際の感染性NVの検出や不活化、制御等に関する詳細は不明であり、NV制御に向けた、感染・増殖系の確立が世界的に望まれている。

本研究は、FCVのリバースジェネティクス系を応用しNVのカプシド蛋白を持つ組換えFCVを作成し、NV感受性細胞の網羅的スクリーニングを行い、NVの感染・培養系の確立を目指すものである。図2に示すように、プラスミドベースの組換えウイルスゲノムプラスミドを作製し、細胞へトランスフェクションを行うことで、培養上清中にNV様組換えFCVを産生させ、それを用いてNV培養細胞のスクリーニングを行うことを目指している。組換えFCVはNV由来カプシドを持つために環境中での動態や感染時の細胞侵入な

どのウイルス性状が感染性NVに近似することが予想され、従来の代替ウイルスと比較してよりNVの実態に近い環境中動態や、ウイルス不活化方法について検証することが可能になり、NV食中毒リスク低減や、食品におけるウイルス規格基準の策定への貢献が期待できる。

また、NVはいまのところ、感染患者排泄物から回収するしか無いため、研究目的の均一なウイルスの大量調整がほぼ不可能だったが、組換えFCVは実験室内で大量調整が期待でき、NV感受性細胞の網羅的スクリーニングを効率的に行うことができるだけでなく、食中毒患者や医療関係者その他の人的負担や倫理的配慮の煩雑さを大幅に軽減することで、NV制御に向けた研究の進歩に大いに貢献できると期待される。

B. 研究方法

1) 組換え FCV 作成のための対象ウイルス

組換え FCV 再構築系の確立に向け、NV 検出法や、不活化処理のコントロールとして国際的にも広く利用されているネコカリシウイルス F9 株と、国内分離株の F4 株を選定した。CRFK 細胞でウイルスを増殖させた培養上清より抽出した RNA を用いた。また、ヒトノロウイルスとして、GII/4

遺伝子型のヒトノロウイルスを選定し、ヒトノロウイルス GII/4 遺伝子型が検出された糞便検体より抽出した RNA を用いた。

RNA 抽出には、QIAamp viral mini kit (QIAGEN)を用いた。

2) 逆転写反応

抽出した RNA の逆転写反応は、SuperScript II (Invitrogen)により行った。キット添付のプロトコールに従い、dT プライマーを用いて cDNA の作成を行った。

3) ウイルスのゲノム全長増幅 PCR とクローニング

TAKARA 社、TOYOBO 社、Invitrogen 社等の市販 PCR キットを用いてゲノム全長の増幅を試みた。

2) で合成した cDNA をテンプレートにしてキット添付のプロトコールに従い反応液を調整し、サーマルサイクラーで PCR 増幅を行った。

アニーリング温度、伸長時間等の比較を行った。

PCR 産物を常法に従い、クローニングベクターへクローニングした。

4) 組換え FCV ゲノムプラスミドの作成

3) で作成した FCV および NV ゲノムプラスミドのウイルスゲノム上流

へ EF-1a プロモータを導入した、pEF1a/FCV, pEF1a/NV, pEF1aFCV-NV を作成した。

5) 組換え FCV 再構築条件の検討

CRFK 細胞へ FCV 組換えゲノムプラスミドをトランスフェクションし、組換え FCV の再構築を行った。トランスフェクション条件の最適化を検討した。

C. 研究結果

1) PCR プライマーの比較

表 1 に示すプライマーを設計し FCV のゲノム全長のワンステップ RT-PCR での増幅を試みた。

まず、培養細胞で容易に増殖、調整が可能な FCV を用いて、ウイルスゲノムの増幅条件を検討した。

PCR の酵素は TAKARA 社の EXTAq, LA Taq を用いた。

当初、PCR の常法に従い、プライマーの長さを 25 塩基程度に設定して (F9+1-26 / F9-7690-7666)ゲノムの増幅を試みたが、増幅は見られなかった。様々な長さのプライマーを検討した結果、40 塩基程度の長さに (F9+1-40 / F9-7690)設計したところ、増幅が確認された (図は示さず)。

同様の長さのプライマーを NV GII4 にも設計し、複数の NV GII4 株にて増幅を確認した。

2) PCR 条件の検討

PCR 酵素のプロトコールは現在 2 ステップサイクルと 3 ステップサイクルが主に用いられており、これを比較した。

多くのキットで長鎖 PCR の第一選択として推奨される 2 ステップサイクルではゲノム全長の増幅は確認できず、3 ステップサイクルを行うことでゲノム全長を増幅することが確認できた。

反応サイクルは 94 度 2 分を 1 回、94 度 15 秒、58 度 15 秒、68 度 8 分を 25 回、10 度固定というサイクルで増幅された (図は示さず)。

3) 組換えウイルス ゲノムプラスミドの作成

図 2 に示すように、プロモーターに EF-1a を導入した組換えウイルスのゲノムプラスミドを作成した。

4) In-Fusion 法の導入

FCV 株間、FCV-NV 間の遺伝子組換えには In-Fusion 法を導入し、制限酵素サイトの挿入等の余分な配列をウイルスゲノムに挿入することなく、PCR ベースの組換えが可能となった。

5) 組換え FCV の再構築

作成した組換え FCV ゲノムプラスミドを CRFK 細胞へトランスフェクシ

ョンし、組換え FCV の再構築を試みた。トランスフェクション試薬には、ポリエチレンイミン(PEI, ナカライテスク)や TranIT (TAKARA)を用いて検討した。残念ながら現在のところ組換え FCV の再構築は確認できておらず、引き続き再構築条件の検討を行なっている状況である。

6) 市販 PCR 酵素の比較

FCV F4 株をクローニングした pFCV-F4, FCV-F9 株および NV GII/4 より抽出した RNA より逆転写を行った cDNA をテンプレートに、ウイルスゲノム全長(7.7kb)のワンステップ RT-PCR に用いる酵素の比較を行った。TAKARA 社, TOYOBO 社, Invitrogen 社, KAPA Biosystem 社, Greiner 社の酵素を比較した。用いた酵素の一覧と増幅結果を表 2 に示す。

1) での結果から, TAKARA 社の EX Taq および LA Taq が汎用できると考えられたが, NV GII4 においては, スメアの泳動像となり, 非特異反応が起きやすいことが考えられた。一方 TOYOBO 社の KOD Plus Neo および KOD FX Neo は特異性, 増幅効率ともに他の酵素よりも優れていることが示された。KAPA BIOSYSTEMS 社の KAPA Taq Extra も KOD と同等であった。Finnzyme 社, Greiner 社の酵素は

いずれも FCV F9 株, NV GII4 のウイルスゲノムを増幅することが出来なかった (図 3)。

比較した酵素のうち, 特異性が高く, 増幅効率がよいのは TOYOBO 社の KOD FX Neo であった。

7) ゲル染色試薬の比較

図 4 に示すように EtBr および GelRed にてアガロースゲルの染色を行い, 泳動像の比較を行った。

図 4 a は GelRed をサンプルローディングバッファーと共に PCR 産物に混合して泳動を行った (泳動前染色)。その結果, PCR 産物は各レーンで同一サイズであるにも関わらず, 泳動距離に大きなばらつきが生じた。図 4 b はサンプルを泳動後に泳動バッファーに GelRed を希釈した染色液にてゲルを染色した (泳動後染色)。泳動後染色では, PCR 産物の濃度に関わらず, 正しく泳動された。図 4 c は従来から用いられている EtBr と GelRed を泳動後染色で比較した。KOD Plus Neo あるいは KOD FX Neo で pFCV-F4, FCV F9, NV GII4 を増幅し, 同一ゲルにて泳動後, ゲルを分割して染色した。GelRed による染色ではバックグラウンドが低く, EtBr では不明瞭なバンドもはっきりと確認することが出来た。

D. 考察

NV 様組換え FCV のリバーシジェネティクス系の確立に向けて、FCV および NV GII4 遺伝子型のウイルスゲノム全長のクローニング及び、組換えウイルスゲノムプラスミドの構築を進め、組換えウイルスゲノムプラスミドの構築法、および遺伝子組み換え方法については、TOYOBO 社の KOD ポリメラーゼや TAKARA 社の In-Fusion 法の導入により、効率的なクローニングおよび組換えゲノムプラスミドの構築法が確立出来た。しかしながら、リバーシジェネティクス法による組換えウイルスの作出条件については、いまだに最適条件が見いだせず、組換えウイルスの作出には至っていない。当初は FCV ゲノムの capsid 遺伝子をすべて NV GII4 の capsid 遺伝子へと組替えたウイルスを作出することを目標として来たが、今後は capsid の部分的な組換え等についても検討し、組換えウイルスの作出を試みる予定である。

ウイルスゲノムのクローニングの過程において、FCV および NV GII4 のウイルスゲノム全長の効率的な増幅条件を見出すことが出来た。

厚生労働省よりすでに公開されている食品からのノロウイルスの検査法（平成 15 年 11 月 5 日付け食安監発第 1105001 号「ノーウォーク様ウイ

ルス (NLV) の RT-PCR 法について」)の中で RT-PCR で用いられていることから、Ex Taq(TAKARA 社)を用いたウイルスゲノム全長の増幅条件を検討し、FCV については Ex Taq でも良好な結果を得たが、NV GII4 では PCR 産物の電気泳動像でスメアが確認され、特異性の低さが懸念された。同様に TAKARA 社から 3kb 以上の長鎖 PCR 増幅に適しているとされている LA Taq でも NV GII4 では非特異反応が確認された。これを解決する目的で各社から販売されている PCR 酵素の比較を行った。各酵素の中で、FCV および NV GII4 で特異性が高く、PCR での増幅効率も優れていたのは TOYOBO 社の KOD ポリメラーゼであった。

通知法に従って行われる食品等からのノロウイルス検出は、ウイルスゲノム全長ではなく、ゲノムのごく一部の数百塩基であるため、KOD ポリメラーゼ等、感度の高い酵素を用いることで、さらにウイルス検出を高感度化できる可能性が考えられた。

また、プライマーの長さや PCR 条件をさらに検討することにより、臨床検体からウイルスゲノム全長を効率よく増幅できる可能性が見出された。ウイルスゲノム全長の増幅は、現在の数百塩基の断片的なゲノム増幅に比較して、より感染性ウイルス粒子から

の遺伝子検出を反映していることも考えられるため、これまで困難であった感染性ウイルスの検出方法の開発へと応用できる可能性が期待される。それと共に、ワンステップ RT-PCR によるウイルスゲノムの増幅とダイレクトシーケンスを行うことで、ウイルスの系統解析など詳細な疫学調査の迅速性が改善されると期待出来る。

また、食品由来ウイルスの多くはウイルスの形状およびゲノムの長さや構造が FCV や NV に比較的似ているため、NV GII4 だけでなく、NV 全般、A 型肝炎ウイルス、サポウイルス等、食品由来ウイルスに広く応用できるかの検討を重ねることで、様々なウイルスゲノムの検出方法の開発にもつながることが期待出来る。

PCR 後の電気泳動についても変異原性の高い EtBr に替えて、変異原性が低く、さらに検出感度の向上も期待できる GelRed 等の新規染色試薬の利用により、通知法の感度改善も期待できる結果となった。

E. 結論

- ・FCV および NV GII4 のウイルスゲノムのクローニングを行った。
- ・組換えウイルスのゲノムプラスミドの構築を行った。
- ・組換えウイルスのゲノムプラスミドの制限酵素を用いない、PCR ベースの

組換え法(In-Fusion 法)を導入した。

・FCV および NV GII4 についてはワンステップ RT-PCR によるウイルスゲノム全長の増幅条件を見出した。

・PCR 酵素の比較により、TOYOBO 社 KOD ポリメラーゼを用いることで高感度にウイルスゲノムを検出できる可能性を示した。

・従来の EtBr に比較して、GelRed による染色により、PCR 後の微弱バンドの確認に優れていることを示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

平成 24 年度はとくに無し

食品由来ウイルスのゲノム全長検出 PCR の条件については、FCV および NV GII4 に加えて、他の遺伝子型の NV や A 型肝炎ウイルス、サポウイルス等への応用も検討し、順次学会等で広く公表していく予定である。

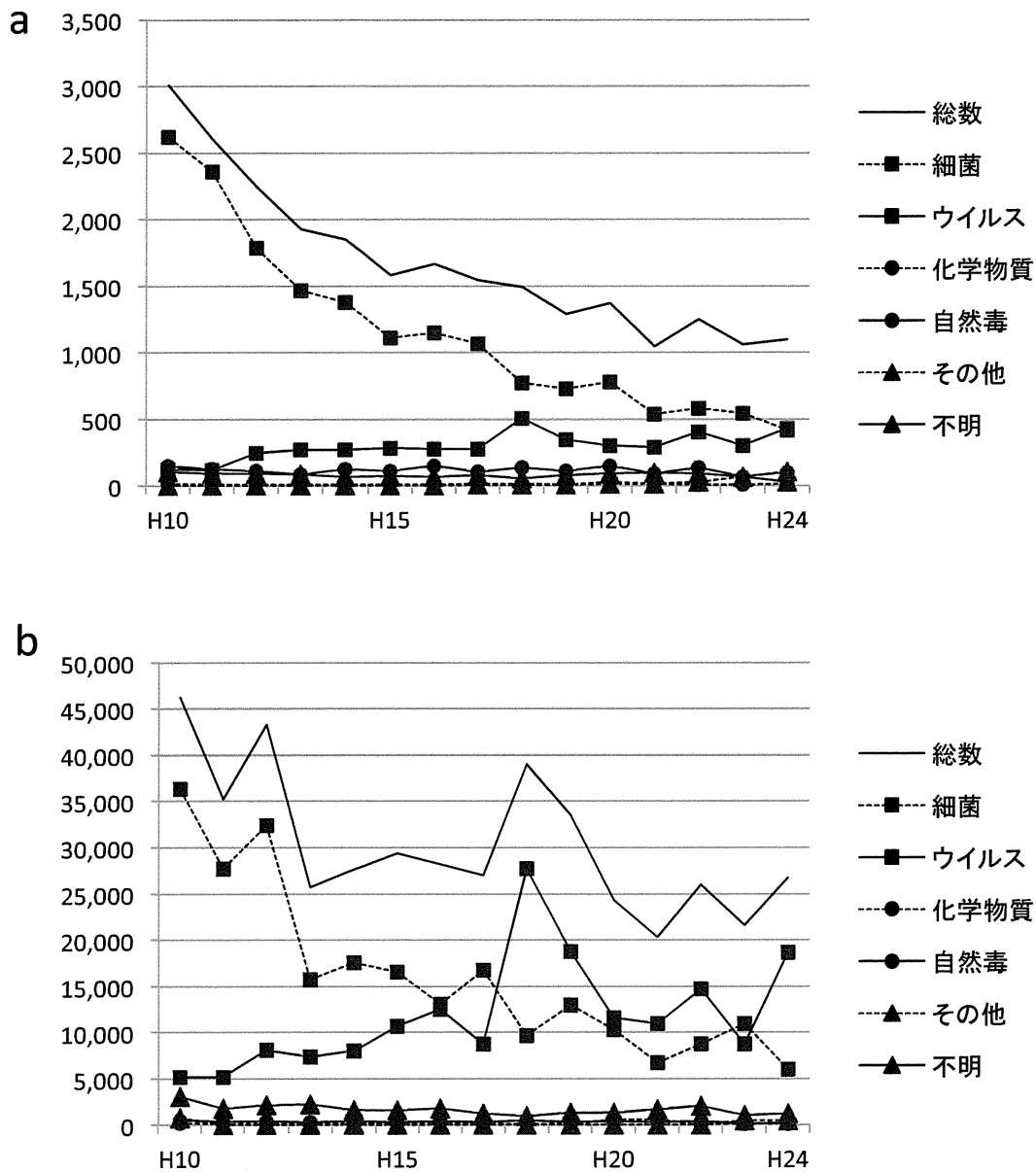
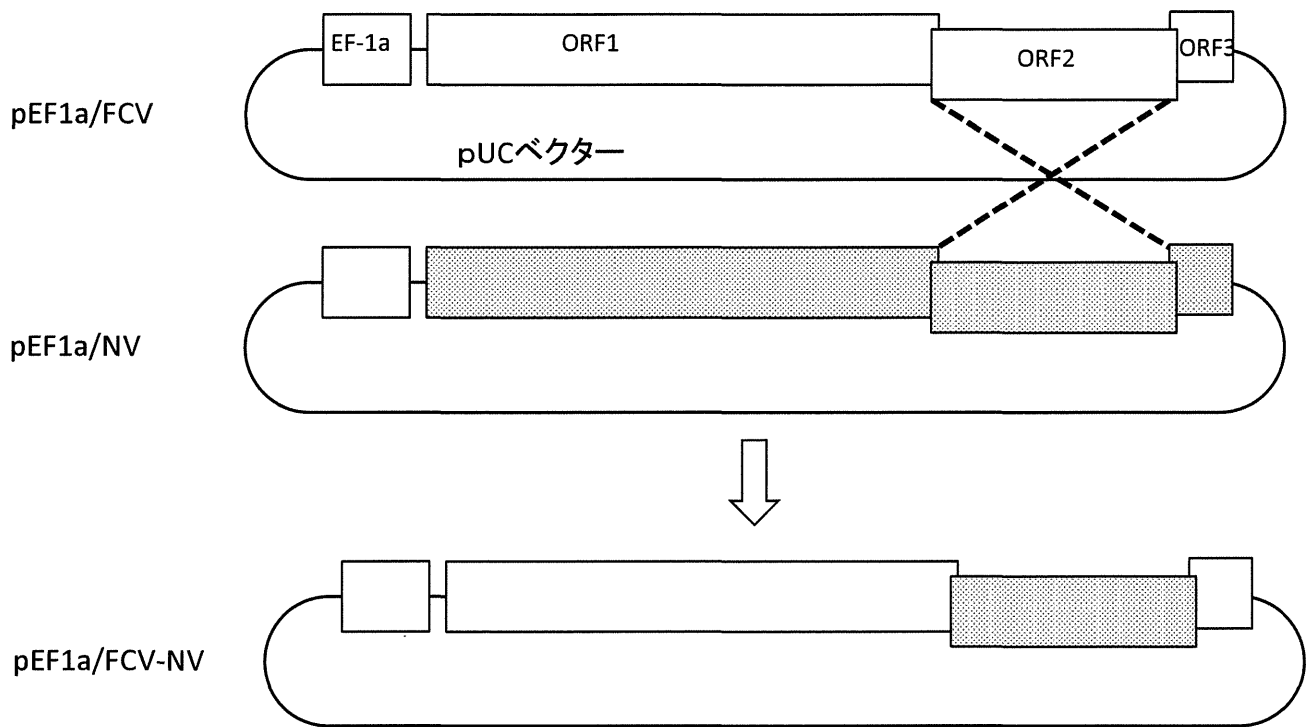


図1：食中毒発生事件数と患者数の平成10年から24年までの推移 a：事件数 平成24年は細菌性とウイルス性がほぼ同数の報告であった。 b：患者数 ノロウイルスが大流行した平成18年と24年の患者数は突出して多い。厚生労働省 食中毒統計より作成

NV様組換えFCVゲノムプラスミドの作成



NV様組換えFCVの作出

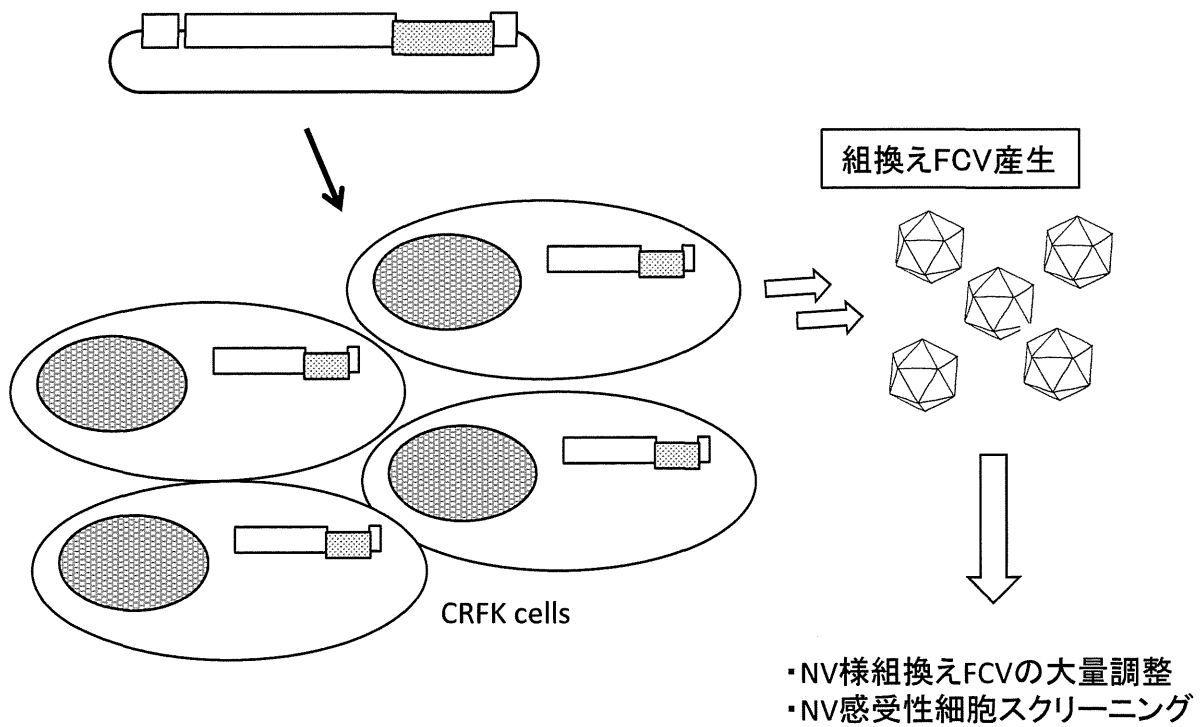


図 2 : 研究の流れ

表1：ウイルスゲノム増幅用プライマー

プライマー	配列	長さ
F9+1	gtaaaagaaattgagacaatgtctc	26
F9-7690	ccctggggtaggcgcaggtgcggca	26
F9+1-40	gtaaaagaaattgagacaatgtctcaaactctgagcttc	39
F9-7690-	ttttccctggggtaggcgcaggtgcggcagcccaaagg	40
NVGII4+1	gtgaatgaag atggcctcta acgacgcttc cgctgccg	39
NVGII4-7537	gataatcaattttgtcttttcacattatgccgtgactc	39

表 2 : 比較に用いたPCR酵素と増幅結果

	PCR酵素	メーカー	FCV F4 *1	FCV F9	NV GII/4
1	EX Taq	TAKARA	○	○	△
2	LA Taq	TAKARA	○	○	△
3	KOD Plus Neo	TOYOBO	○	○	○
4	KOD FX Neo	TOYOBO	○	○	○
5	Platinum PCR SuperMix High Fidelity	Invitrogen	○	○	○
6	KAPA HiFi Hot Start Ready mix(2x)	KAPA BIOSYSTEMS	○	×	○
7	KAPA Taq Extra	KAPA BIOSYSTEMS	○	○	○
8	Phusion High fidelity	Finnzymes	×	×	×
9	Taq standard	Greiner	△	×	×
10	Taq High yield	Greiner	○	×	×
11	Pfu-X	Greiner	○	×	×

*1: 陽性コントロールとしてPCRのテンプレートにクローニングしたpFCV-F4を用いた。

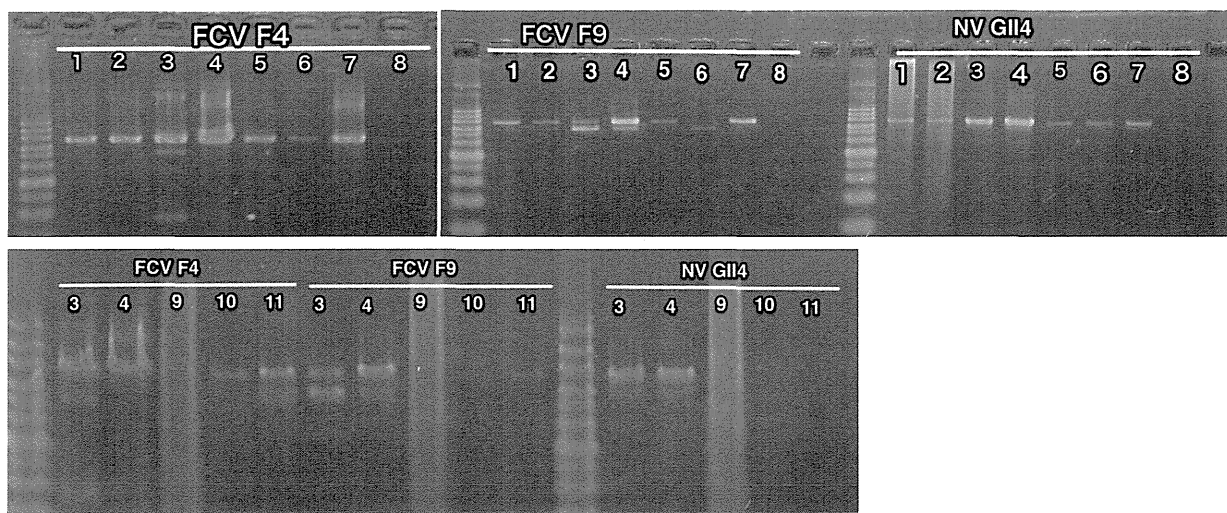


図 3 : 表 2 に上げた酵素によるPCR増幅結果 レーン番号は表 2 の番号に一致
 TOYOBO社の酵素が非特異的なバンドが少なく、効率よく増幅された。
 FCV F4は陽性コントロールとしてテンプレートにpFCV-F4を用いた。

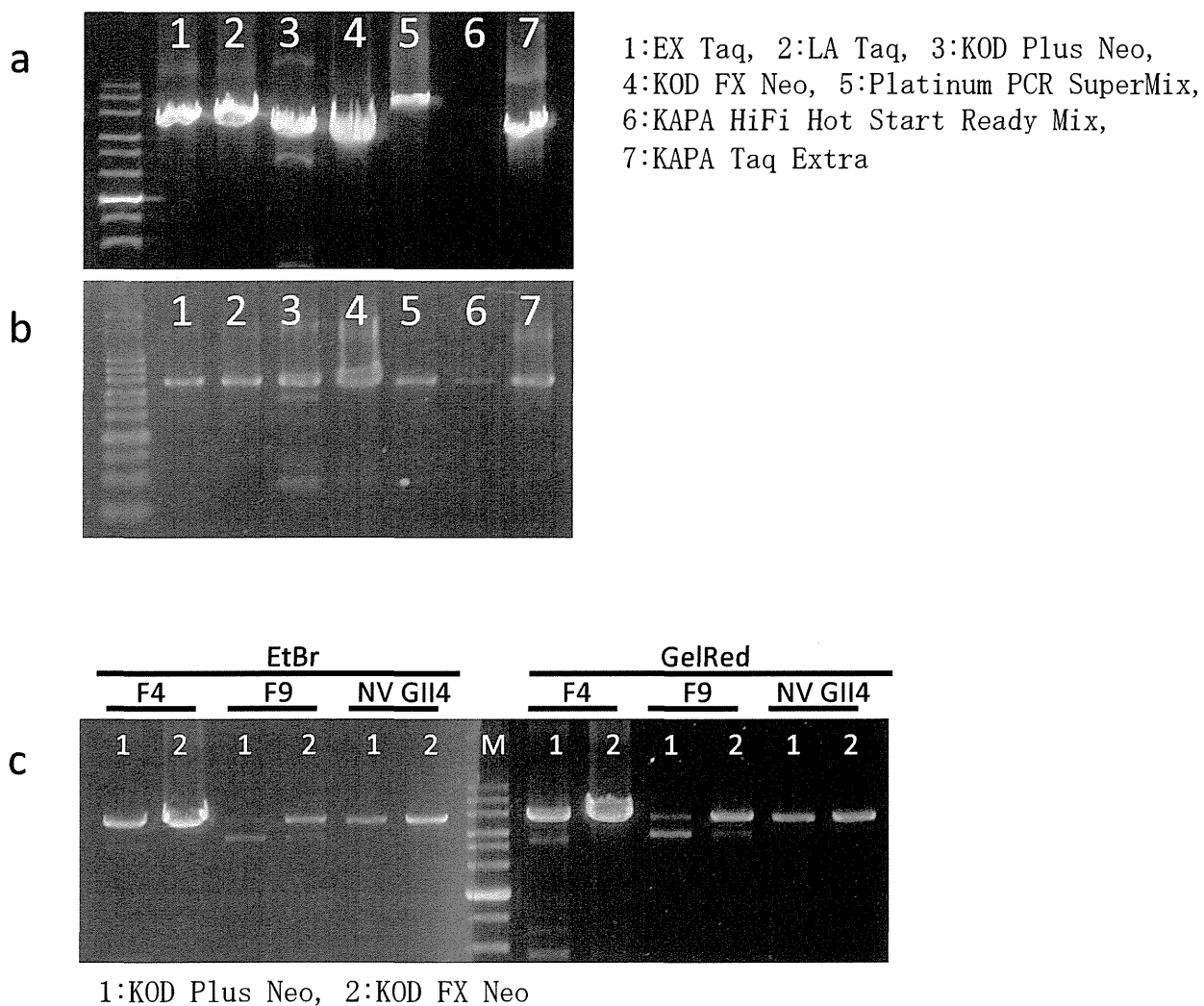


図4： 染色試薬の比較。

- a: PCRサンプルにGelRedを混合して泳動を行った。
- b: aと同じサンプルを泳動後にGelRedにてゲルを染色した。
- a, bはPCRテンプレートにpFCV-F4を用いた。
- c:泳動後にEtBrまたはGelRedにてゲル染色を行った。

