

平成 25 年度 厚生労働化学研究費補助金

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」

タンパク質トランスフェクション法による

非感受性細胞へのウイルス導入の検討

研究代表者 上間 匡 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 主任研究官

研究要旨

ヒトノロウイルスには、現在有効な培養系が存在しないため、環境中や食品における感染性ノロウイルスの評価が出来ない。確実なノロウイルス殺菌方法の確立や、感染性胃腸炎・および大規模な食中毒の防止・制御のためにもヒトノロウイルスの感受性細胞の探索と培養系の開発は世界的にも重要な課題である。

本研究では、組換え NV の再構築系において、ゲノムプラスミドに加えて、ウイルス因子を細胞へ導入する手段として、タンパク質トランスフェクション法の検討を行った。

ネコカリシウイルス (FCV) を非感受性細胞である 293T, HeLa 細胞へタンパク質トランスフェクション法を用いて導入し、ゲノム RNA の増加、ウイルス感染価を評価したところ、293T 細胞において、導入後 24 時間でゲノム RNA の増加と、感染価上昇が確認できた。

ウイルス因子の導入方法としてタンパク質トランスフェクション法が利用できることが示唆された。

A. 研究目的

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。

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。

FCV のリバーシジェネティクス系を応用し組換え NV の再構築の際に、ゲノムプラスミドに加えて、ウイルス因子

を導入する手段としてタンパク質トランスフェクション法を検討した。

B. 研究方法

1) NV の代替ウイルスとして利用されるネコカリシウイルスを用いた。

2) FCV 非感受性細胞である HeLa 細胞, 293T 細胞を用いた。

3) タンパク質トランスフェクション試薬

ViroMag (OZ Biosciences)

Xfect Protein Transfection Reagent (TAKARA)

Profect P2 (Targeting Systems)

Pro-Ject Protein Transfection Reagent (Thermo Scientific, Pierce)

について、使用説明書に従い、FCV とタンパク質トランスフェクション試薬の混合液を培養細胞に加えて、導入後 24 時間あるいは 48 時間のウイルス RNA の増加、FCV 感染価を評価した。

C. 研究結果

1) タンパク質トランスフェクション試薬の比較

HeLa 細胞, 293T 細胞を用いて、FCV のトランスフェクション効率をもとに、各試薬の比較を行った。

導入効率の比較は、FCV 導入後のウイルス RNA の増加をリアル・タイム PCR の検出サイクル数で判定した。その結果、HeLa 細胞, 293T 細胞共に Pro-Ject Protein Transfection Reagent と Profect P2 を用いた場合に導入後 24 時

間で RNA の増加が確認できた(図 1)。

特に、293T 細胞へ Pro-Ject Protein Transfection Reagent を用いた場合にもっとも RNA の増加が大きかった。

2) トランスフェクション条件の検討
293T 細胞へ Pro-Ject Protein Transfection Reagent を用いた場合に最も効率がよいと考えられたので、トランスフェクション条件を検討した。

その結果、Pro-Ject 試薬を 2.5 μ l または 5 μ l と FCV を混合し、導入後 24 時間で RNA の増加が確認できた。

3) トランスフェクション後のウイルス力価

トランスフェクション後 24 時間における FCV の力価を TCID50 法で測定したところ、トランスフェクション試薬を用いない場合には 24 時間で力価が低下するのに対して、Pro-Ject 試薬を混合した場合に、FCV の力価上昇が確認できた(図 1)。

4) トランスフェクション後の細胞変性効果

図 2 に示すように、FCV F9, F4 株ともに FCV のみを HeLa 細胞へ感染させた時は細胞変性効果は認められないのに対して、トランスフェクション試薬である ProFect を持ちいた場合に、細胞変性効果が確認できた。

図 3 に示すように 293T 細胞に Pro-Ject を用いて FCV-F9 を導入後 24 時間では、RNA、ウイルス力価共に増加しているにもかかわらず、HeLa 細

胞で見られたような明らかな細胞変性効果は確認出来なかった。

D. 考察

タンパク質トランスフェクション試薬を用いることで、HeLa 細胞や293T 細胞といった FCV 非感受性細胞で FCV ゲノム RNA の増加と感染性ウイルスの増殖を確認できた。タンパク質トランスフェクション法は、ウイルス因子の導入法として利用できることが示唆された。

更に、タンパク質トランスフェクション法によって、非感受性細胞でウイルスが増殖することから、NV の感染性を検討する方法としても応用できる可能性を見出した。また、これを用いたウイルス増殖系開発の可能性が示唆された。

導入する際の FCV の最小力価や、検出限界についてはさらに検討する必要があるが、培養方法がなくても、ゲノムの増殖の有無を判定することで、感染性ウイルスについて判定出来ることが期待出来る。

糞便由来の精製 NV 粒子や、FCV 以外のウイルスについても同様の効果が認められるかはさらに検討する必要がある。

タンパク質トランスフェクション試薬は遺伝子トランスフェクション試薬に比べて、販売会社や試薬の種類

が少ないために、国内では入手しにくい欠点があるが、今後抗体医薬等の発達にともない状況が改善する可能性が高く、今後さらに効率のよいウイルス導入法としての開発が期待出来る。また、医薬品デリバリーシステム(DDS)として研究が進む、膜透過性ペプチド等を用いたタンパク質修飾についても、これをウイルスに応用できる可能性があり、今後 DDS 分野との研究開発について検討を行っていくことで、新たなウイルス増殖系の開発につながることを期待できる。

E. 結論

- ・タンパク質トランスフェクション法により、非感受性細胞へ FCV の導入を試みた。

- ・HeLa 細胞, 293T 細胞において FCV の RNA 増幅とウイルス力価の上昇を確認した。

- ・リバーシジェネティクスによるウイルス再構築に置いて、細胞へのウイルス因子導入法としてタンパク質トランスフェクション法が利用できる可能性が示唆された。

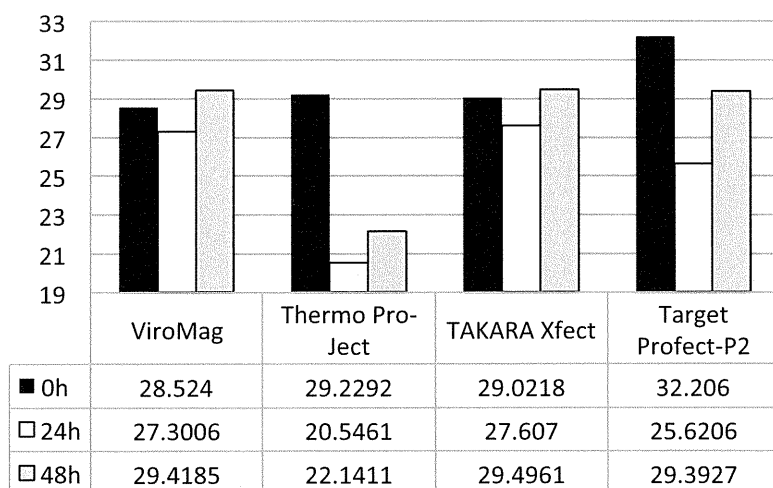
F. 健康危険情報

特になし

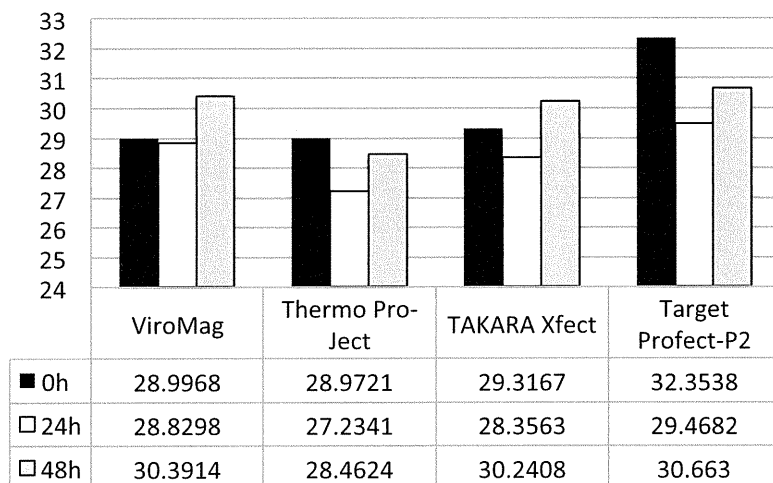
G. 研究発表

なし

F9 RNA replication cycle in 293T



F9 RNA replication cycle in HeLa



FCV titer in 293T(Pro-Ject)

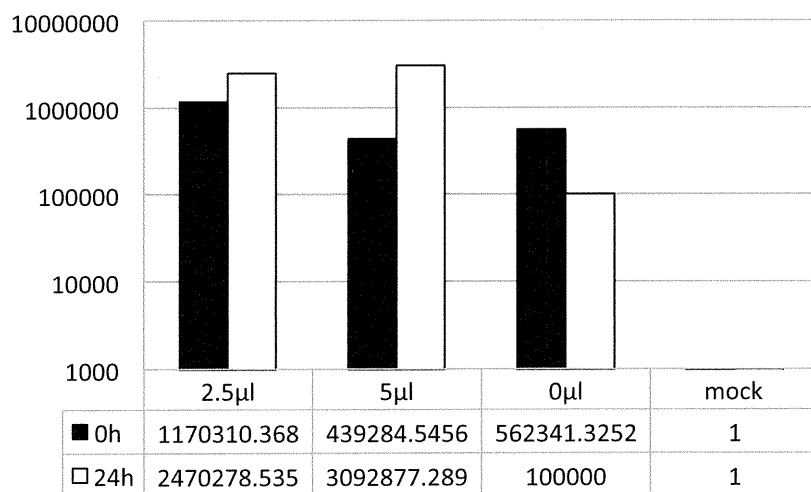


図1. タンパク質トランスフェクション試薬の比較と293T細胞へ導入後のウイルス力価の上昇

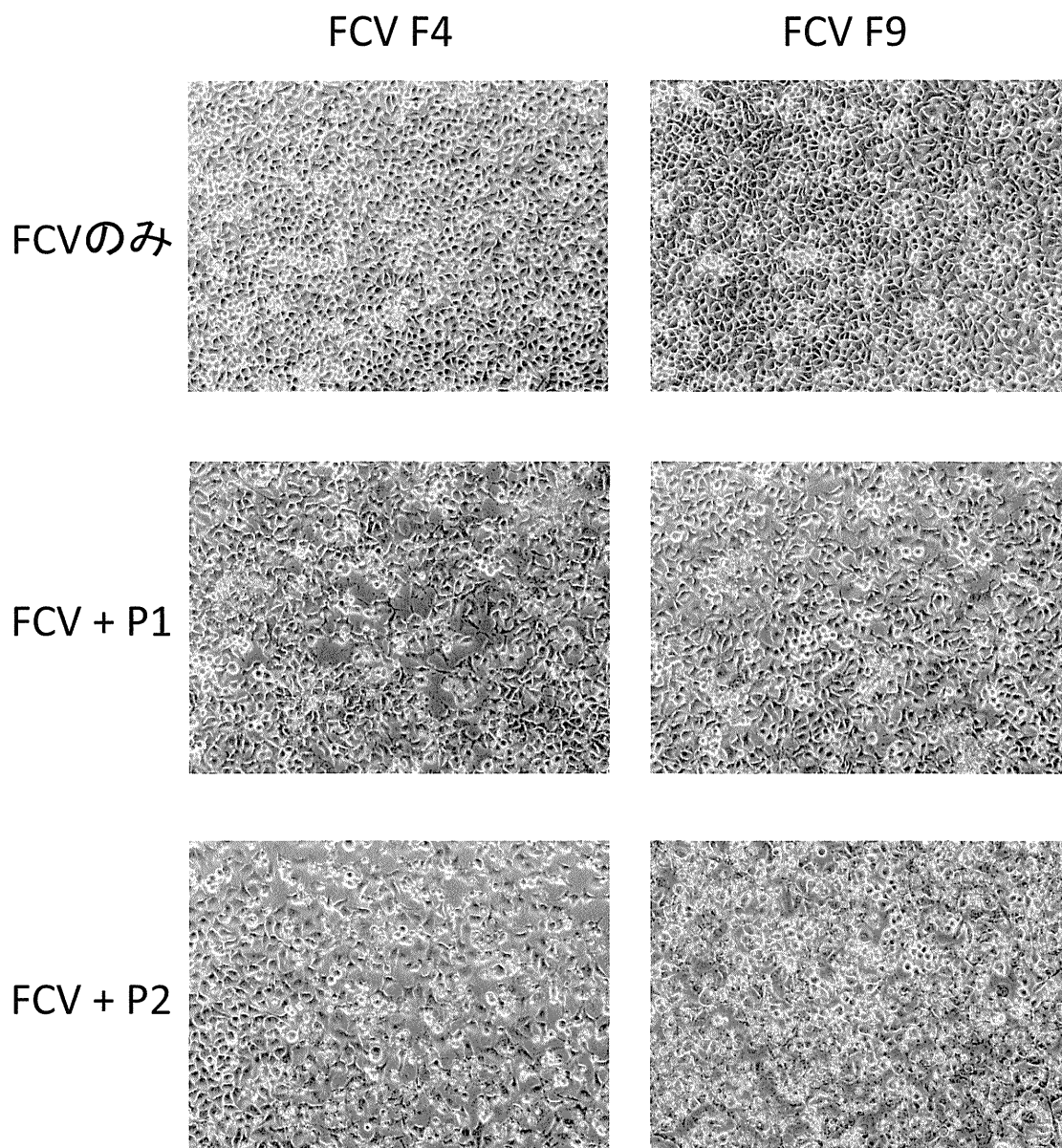


図2. HeLa細胞へProFectを用いてFCVを導入後24時間刊の細胞変性効果

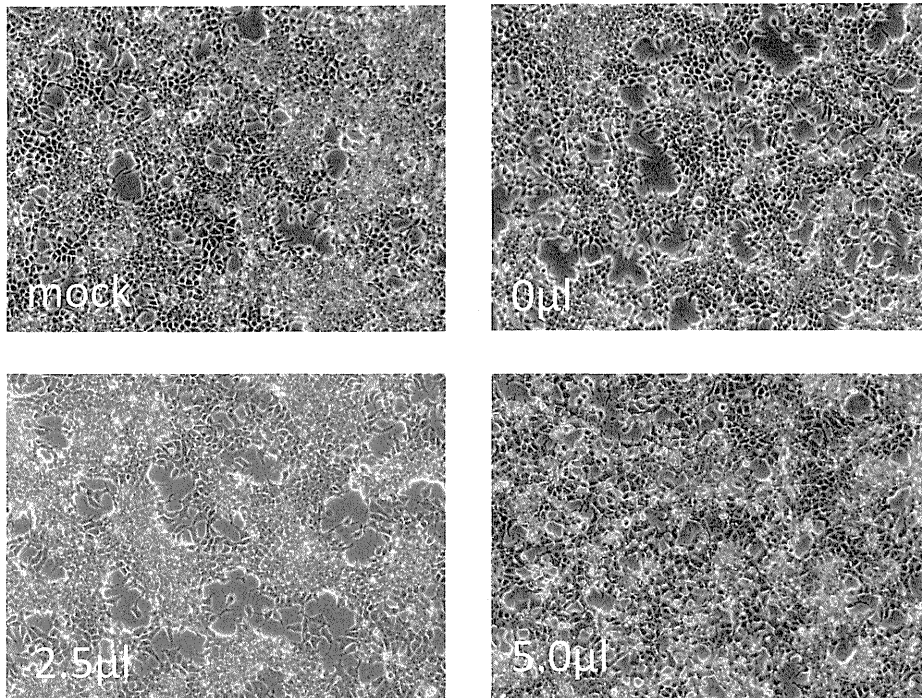


図3. 293T細胞へPro-Jectを用いてFCV F9を導入した際の細胞変性効果

