

平成 28 年度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)
「ウイルスを原因とする食品媒介性疾患の制御に関する研究」
研究分担報告

ノロウイルスの培養に関する研究

研究分担者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	永田 文宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) については、2016 年にヒト腸管細胞由来のエンテロイドを用いた増殖系が新たに示されたが、用いる細胞の特殊性や培養に必要な試薬等のコストの面などから、実用化には程遠い。一方、ヒトノロウイルスの増殖には、組織血液型抗原を有する細菌や胆汁などが関与していることが示されている。本研究では、ヒト腸管由来の Caco-2 細胞および培養に関与するとされるそれらの関連物質を用いて、NoV 増殖系の構築を目指す。現在は Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっており、腸内細菌や、胆汁酸を培地に添加して腸内環境の再現を試みているところである。

A. 研究目的

2016 年 9 月に腸管幹細胞に由来するエンテロイドの単層培養によって複数のノロウイルス (NoV) 遺伝子型株の増殖に成功したとする Estes らのグループによる論文がサイエンス誌に報告された。用いる細胞の特殊性や培養に必要な試薬等のコストなどに課題があり、まだまだ実用化には程遠く、一般的な研究室で直ちに実施することは困難と思われる。

そこで本研究では、ヒトの腸管環境を再現することで増殖系を構築していることに着目し、ヒト結腸癌由来の株化細胞である Caco-2 細胞を用いて、NoV 増殖系の構築を目指す。Caco-2 細胞は VLP を用いた実験で、VLP を取り込むことが示され

ているほか、実験室培養で、腸上皮構造を形成するように分化させることが可能であり、試験管内で腸管環境を模することが可能と考えられる。

また、Jones らは、NoV の B 細胞への感染に、組織血液型抗原 (H 抗原) を発現する腸内細菌 (*Enterobacter cloacae*) が関与していると報告している。さらに、Estes らの系では、培養中の胆汁の存在が重要であることが示されている。そこで、まず、NoV 感染時の腸内環境を再現するため、Caco-2 細胞を培養する際に、培地に腸内細菌および、胆汁の主成分である胆汁酸を添加する等の条件検討を行った後、患者糞便材料の遠心上清を用いて、Caco-2 細胞での NoV の培養を試みる。

B. 研究方法

1. Caco-2 細胞 継代

継代用培地として、DMEM + 10%FBS + 1%NEAA + 100 U/ml Penicillin-100 µg/ml Streptomycin を用いる。

継代方法は、Caco-2 細胞フラスコ内の培地を除去し、10ml PBS (-) で洗浄した後、0.25% Trypsin-EDTA を 2ml 加え、37°C-5% CO₂ にて 1~3 分インキュベートし、細胞をはがす。4ml 培地で懸濁し、15ml チューブに移し、4°C で 1000rpm 5 分遠心分離する。上清を除去し、培地を 5ml 加えピペティングする。フラスコに培地を加え、細胞懸濁液を加える。37°C-5%CO₂ で培養する。

2. Caco-2 細胞 単層上皮細胞への分化

分化用培地として、Enterocyte Differentiation Medium + 0.08% MITO-Serum Extender を、分化用プレートは BioCoat Fibrillar Collagen Cell Culture Insert を用いる。

まず、分化用プレートへの Caco-2 細胞捲種を行う。インサート内に予め 37°C で温めておいた継代用培地 200µl を入れ、室温で 30 分放置する。Caco-2 細胞を継代と同様に処理し、培地 5ml に懸濁した段階で細胞数を計測する。インサート内の培地を除去し、インサート内に 4×10⁵ cells/ml の細胞懸濁液を 500µl ずつ加える。ウェル側に培地を 1000µl 加え、24 時間培養する。

分化誘導方法は、1 日目に、Millicel-ERS にて各ウェルの抵抗値を測定した後、ウェル側 (下) →インサート側 (上) の順で培地を除去する。分化用培地をウェル側に 1000µl、インサート側

に 500µl 加え 24 時間培養する。2 日目、3 日目も同様に分化誘導を行い、抵抗値が 800~1000 で分化完了となる。

(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. 研究結果および考察

NoV の培養に関する各種の論文を参考に、NoV の培養に関与する腸内細菌 (*Enterobacter cloacae*)、胆汁等を準備した。現在、Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっている。現在、腸内細菌の添加、胆汁酸等の添加条件の検討を行い、Caco2 細胞での腸内環境の再現を試みているところである。

D. 結論

今年度は、NoV の培養に関する情報収集を行い、Caco-2 細胞の培養に着手した。現在は Caco-2 細胞を用いて、安定的に上皮構造を形成させることが可能となっており、腸内細菌や、胆汁酸を培地に添加して腸内環境の再現を試みているところである。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
- その他：なし