

代替ウイルスを用いないウイルス不活性化評価
— ヒトサポウイルス培養系開発の試み —

研究分担者	高木 弘隆	国立感染症研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	小林 孝行	福岡県保健環境研究所
	岡 智一郎	国立感染症研究所

研究要旨

食品媒介性/介在性ウイルスのひとつであるヒトサポウイルス(hSaV)の培養系について、ブタサポウイルスの培養系を応用する形で試みた。その結果、いくつかの培養細胞/コール酸類の組合せで、培養上清中のウイルス RNA のシグナル増加、及び RNA コピー数の経時的増加が認められた。今後 second-culture でのウイルス粒子回収や感染価による評価系への応用に向けて、引き続き検討を行う。

A. 研究目的

本研究班における筆者の主要分担研究課題は「代替ウイルスによる不活性化評価」の道標たるガイドラインを設けることであるが、同時に代替ウイルスを用いない、すなわちヒトノロウイルスあるいはヒトサポウイルスを直接培養・増殖する方法の確立を目指すことは、不活性化評価のみならず、食品の汚染状況やヒト介在の場合の汚染拡散状況を把握し、そのリスク解析や感染防御の上で多大な貢献をもたらす。今回 Chang らの報告¹⁾にあるブタサポウイルス増殖系を応用して、従来とは異なる細胞/コール酸類を用いて当該ウイルスの増殖系の構築を試みた。

B. 研究方法

1. 材料

- 患者由来サポウイルス陽性材料(処理済み):
秋田より 20 検体、福岡より 7 検体

・培養細胞:

ヒト由来培養細胞 4 種類(sub-clone 1、市販 2、取扱中止品 1)、動物由来細胞 sub-clone 1 種類

・培地:

クラシカル培地より自家変法調製した。

・コール酸類:

胆汁末を含めた 5-6 種類を各培養細胞に合わせて調製した。

・RNA 抽出:

Roche High Pure Total RNA isolation kit

・RT kit:

ReverTra Ace®(TOYOBO)

・PCR kit:

KAPA2G Fast-HS(KAPA Bioscience)

・Real-time RT-PCR:

Oka らの手技による^{2),3)}

- #### 2. 方法 1 培養細胞への検体接種・培養
- 各細胞を 12well あるいは 24well-plate

に播種し、90-100%シートを形成したところで、コール酸類含有培地に交換し、処理済みサポウイルス陽性便上清 5-10 μ l/well で接種し、吸着後 2 回洗浄した。培地を交換して 5-8 日間培養し、その培養上清を回収した。

3. 方法 2 培養上清からの RNA 抽出・RT-PCR

培養上清 100 μ l より RNA として 70 μ l を抽出した。これを 5 μ l、pdN7、ReverTra Ace 30U, RNase inhibitor を含む反応液 10 μ l を調製した。これを 30°C・10 分、42°C・30 分、95°C・5 分で反応させ、cDNA 合成した。

この cDNA を template として 2 μ l、forward・reverse primer 10 μ M を各 1 μ l、KAPA2G Fast-HS 2×mix を含む反応液 20 μ l を調製した。これをまず 95°C・3 分で変成させ、95°C・20 秒、52°C・20 秒、72°C・5 秒の反応を 35 回繰り返す、最後に 72°C・2 分の伸長反応を行った。PCR 産物を 2.3% agarose gel に 7 μ l/lane で接種し、電気泳動を行って geno-specific product の確認とシグナル強度を確認した。使用した primer set は別表に示した^{4),5)}。

4. 方法 3 接種材料のウイルス RNA 保存性チェック

サポウイルスは IC キットなどの簡易検査キットが存在しないため、陽性検体中のウイルス粒子の存在状況について接種前に確認するための暫定的な方法として、前記方法 2 のうち、cDNA 合成過程において、pdT₃₀_primer を使用し、ウイルス RNA の 3'end から cDNA 合成を行い、その後方法 2 と同様の PCR・agarose 電気泳動により、その保存性をチェックすることとした。

(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、また検体はすべてコード化され、個人情報との連結は絶たれている。同時に今回年齢・性別・地域といった個人特定につながる情報は一切必要としない。

C. 研究結果

1. 結果 1 hSaV 接種培養上清における hSaV 特異遺伝子のシグナルについて

供試した細胞とコール酸類の組合せにより、そのいくつかで培養上清よりウイルス RNA の強いシグナルが確認された。また別法により経時的な RNA コピー数も測定したところ経時的増加も認められ、増加率は $10^3 \sim 10^4$ 倍であった。これらは hSaV-GI、GII、および GIV で確認された。

2. 結果 2 接種材料中のウイルス RNA 保存性と RNA コピー数、接種・ウイルス RNA シグナル増加との関連性について

福岡由来 7 検体については保存性良好と考えられるものは 3 検体で、RNA コピー数は 10^5 copies/10 μ l のオーダーであった。秋田由来 24 検体については保存性良好と考えられたものが 17 検体、RNA コピー数は $10^4 \sim 10^8$ copies/10 μ l であった。

これらを方法 1 に従って培養細胞に接種した結果、培養上清中でのウイルス RNA シグナル増加が認められたのは、全て秋田由来検体であり、その RNA コピー数は 10^5 copies/10 μ l 以上のものであった。

D. 考察

今回 hSaV の培養系検討において、初めて培養上清中にウイルス RNA シグナル増加、およびコピー数の経時的増加を認めた。しかしながら second passage によるウイルス RNA 増加はまだ認めれておらず、primary-culture sup からの超遠心法によるウイルス回収やその電顕画像より考えられる要因を抽出し、現在検討に入っ

ている。

また検体からのウイルス増殖の可能性については現行の培養法ではその感度はあまり高くないと考えられるが、別の要因として、①検体中の感染性ウイルスの存在状態、②「感染粒子」とするトリガーの存在可否、などが挙げられる。

①については検体そのものの調製・保存状況でも明らかであり、今回福岡由来検体では、培養によるウイルス RNA シグナル増加は認められなかった。福岡由来検体と秋田由来検体の相違は保存液の組成であり、福岡では遺伝子検査・検出に特化して、陽性便懸濁を精製水で、一方の秋田では RS ウイルス検体保存用 medium をベースに modify した保存液を使用していた。

接種材料のウイルス RNA 保存性チェックにおいて同等の保存性シグナル・RNA コピー数を示したにも関わらず、RNA シグナル増加に大きな差出たことは、保存液の組成の差を要因とすることを認めない。同様にウイルスの安定性そのものが不明であるため、患者の状態・採取のタイミングなどの要因が感染粒子状況に関与することも認めず、今後更に検証する必要がある。

また②については感染・発症における侵入門戸を腸管とする場合、そこに至るまでの様々な消化管通過を考慮すると、その過程での作用により、「感染性粒子として仕立てられる」ことも大いに考えられる。新規培養系検討としてはこのように様々な因子を考慮してゆく必要があるだろう。

最後に現行手法では顕著な細胞変性などは認められないため、将来的に感染価による評価系を目指すのであれば、効率的な感染細胞検出手法も合わせて検討する必要がある。

E. 結論

今回 hSaV に関して、陽性検体を出発材料とした培養系の検討を行った。その結果、いくつかの供試培養細胞/コール酸類の組合せで、培養上清中にウイルス RNA シグナル、および経時的コピー数の増加が認められた。今後更に検討を進め、感染粒子の安定的回収や評価系への応用を試みる。

【謝辞】

本研究にあたり、培養上清中ウイルス粒子の撮影・観察にご協力いただきました国立感染症研究所 電顕室 片岡紀子様 に深謝いたします。

参考文献>>

- 1)Chang, et al, PNAS vol.101 NO.23 8733-8738
- 2)Oka et al, J Med Virology 2006 Oct; 78(10):1347-53
- 3)食品衛生検査指針 微生物編 2015 年版
- 4)Okada, et al, Arch virol(2006) 151: 2503-2509
- 5)Kitajima, et al, APPL.Environ.Microbiol, Apr. 2010, p 2461-2467

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
3. その他：なし