

平成 29 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」
研究協力報告

流入水中ノロウイルスの定量および 抗ノロウイルス活性のある化合物の探索

研究協力者	小林 孝行	福岡県保健環境研究所
研究協力者	吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
研究協力者	中村 麻子	福岡県保健環境研究所
研究協力者	芦塚 由紀	福岡県保健環境研究所
研究協力者	梶原 淳睦	福岡県保健環境研究所
研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ノロウイルス (NoV) の流行状況を把握するため、環境検体である終末処理場流入水からの NoV 検出を行った。2016/17 シーズンは、2016 年 11 月から NoVGII の検出値が増加し始め、2017 年 1 月にピークを示した。また、感染性胃腸炎の報告数は 2016 年 12 月にピークを示し、両者の動態に関連が認められた。

抗ノロウイルス活性を持つ化合物の探索を目的に、ネコカリシウイルス (FCV) 及びマウスノロウイルス (MNV) を用いたスクリーニング系を導入し、化合物の評価を行った。評価を行った 120 化合物のうち、14 化合物において FCV または MNV に対する抗ウイルス活性が認められた。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) は主に冬季に流行し、食中毒や感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスとして知られている。NoV の生活環の一つとして、感染者の腸管で増殖したウイルスが便とともにトイレに排出された後、下水から海水に至り、貝類に蓄積し、再びヒトに感染する一連の循環が知られている。そのため下水中の NoV の動態の迅速な把握は感染拡大の防止や二枚貝の汚染防止に寄与すると考えられる。

そこで本研究では、終末処理場流入水からの NoV 検出状況や感染性胃腸炎の発生状況の解析を行った。

また、NoV による食中毒の予防には手指や調理器具の洗浄、あるいは糞便や嘔吐物によって汚染された環境の消毒が重要である。NoV を不活化させるには次亜塩素酸ナトリウムが推奨されているが、人体への影響から手指等への使用が難しく、より安全かつ効果の高い消毒剤が望まれている。NoV は培養が困難であることから、

NoV に対する薬剤の不活化評価を行うには培養可能な NoV 代替ウイルスが使用されている。薬剤に対する感受性はウイルスの種類等により異なることから複数

種の代替ウイルスを使用することが推奨されている。そこで、NoV 代替ウイルスであるネコカリシウイルス (FCV) 及びマウスノロウイルス (MNV) を用いたスクリーニング系により、抗ノロウイルス活性を有する化合物の探索を行った。

今回、感染性胃腸炎の発生状況と終末処理場流入水の NoV 量との関連性を解析すること、並びに NoV の消毒剤や治療薬として寄与する化合物を探索することで感染予防対策に資することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

1. 材料

終末処理場流入水は 2016 年 11 月から 2017 年 10 月までの期間に、都市部にある A 終末処理場および非都市部にある B 終末処理場から毎月 1 回採取した流入水合計 24 検体を用いた。

抗ノロウイルス活性を評価する化合物として、天然生理活性物質ライブラリー (Sigma-Aldrich) を購入し、120 化合物について評価を行った。NoV 代替ウイルスとして FCV-F9 株および MNV を使用し、それらのウイルスを接種する細胞として CRFK 細胞および RAW264.7 細胞をそれぞれ用いた。

2. 終末処理場流入水からの NoV 検出法

流入水中のウイルス濃縮は国立感染症研究所が示す「ポリオウイルス感染症の実験室診断マニュアル」に準拠した。即

ち、流入水 1L を良く混和し、4°C で 3000rpm、30 分間遠心し、上清に塩化マグネシウムを添加、pH3.5 に調整後、陰電荷フィルターにウイルスを吸着させ、10mL の 3%ビーフエキストラクト存在下で誘出し、これをウイルス濃縮液とした。NoV 検出は、厚生労働省通知法に準拠し、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出を行い、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてリアルタイム PCR 法により NoV を定量した。プライマーには COG1F/COG1R および COG2F/COG2R セットを使用した。

3. 抗ノロウイルス活性の評価方法

NoV 代替ウイルスを用いた化合物の評価は Ohba らの方法 (J. Antibiotics, 70, 443-447, 2017.) に基づいて行った。即ち、評価を行う化合物を 100 μ M、10 μ M、1 μ M および 0.1 μ M の 4 段階に細胞培地を用いて希釈し、100TCID₅₀/50 μ l に調整した FCV または MNV と等量混合 (化合物の反応溶液の終濃度はそれぞれ半分となる) し、37°C、5%CO₂ 条件下で 30 分間静置した。CRFK 細胞または RAW264.7 細胞を播種した 96 穴プレートに混合液を 120 μ l/well ずつ接種し、同条件下で 1 時間培養した。培養後、PBS(-)で洗浄し、5%FBS 加 EMEM (CRFK 細胞) または 5%FBS 加 DMEM (RAW264.7 細胞) を 150 μ l/well ずつ加えて培養・観察を行った。抗ウイルス活性の評価は細胞変性効果 (CPE) の有無により判断した。即ち、化合物非処理のウイルス液を入れたウェルを用意し、そのウェルに CPE が現れた段階で全てのウェルを確認し、CPE が現れなかった化合物を抗ウイルス活性あり、CPE が現れたものを抗ウイ

ルス活性なしと判断した。

(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. 終末処理場流入水からの NoV 検出

流入水からの NoV 検出結果を示した(図 1)。NoVGI は 2017 年 5 月の B 終末処理場からの検体でのみ検出され、検出値は 9.0×10^4 コピー/L であった。また、NoV GII は 2017 年 1 月に最も多く検出され、検出値は 9.6×10^7 コピー/L であった。

2. 抗ノロウイルス活性の評価

天然生理活性物質 120 化合物について抗ウイルス活性を評価した結果、14 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した(表 1)。このうち 11 化合物(Myricetin、beta-Carotene、Scutellarein、Gallic acid、Diosmetin、Ferulic acid、Ginkgolide B、Shikonin、(+/-)-Gossypol、(-)-Epicatechin、Caffeine)が FCV に対して、3 化合物(Melatonin、Cytisine、Asiatic acid)が MNV に対して抗ウイルス活性を示した。FCV に効果を示した化合物は全て $100 \mu\text{M}$ の希釈濃度で効果を示し、MNV に効果を示した化合物は、2 化合物(Melatonin、Asiatic acid)が $100 \mu\text{M}$ 、1 化合物(Cytisine)が $10 \mu\text{M}$ の希釈濃度で効果を示した。FCV および MNV 両方に効果を示す化合物は無かった。

D. 考察

2016/2017 シーズンの福岡県感染症発生動向調査における定点当たりの感染性

胃腸炎報告数は 2016 年 11 月ごろから増加し始め、2016 年 12 月(第 51 週)に一峰性のピークとなった。この 12 月におけるピークは流入水中の NoV 検出を開始した 2013 年 1 月からの調査期間中で最大の値(17.97)であった。また、今回の流入水調査においても NoV 量は 2016 年 11 月ごろから増加し始め、2017 年 1 月に一峰性のピークを示し、特に B 終末処理場における NoV GII の定量値は過去の調査期間中における最大値(9.6×10^7 コピー/L)を示した。よって、2016 年 12 月における感染性胃腸炎報告数の増加が 2017 年 1 月における流入水中の NoV 量の増加に反映されたものと考えられる。このことから感染性胃腸炎の報告数と流入水中の NoV 量には関連があり、流入水調査をすることで県内の NoV 流行状況を把握することができることが示唆された。終末処理場別にみると、両者の NoV GII の定量値は概ね同じ動態を示したことから、県内における NoV の流行状況に地域性はなかったものと考えられる。

天然生理活性物質 120 化合物について抗ノロウイルス活性の評価を行ったところ、14 化合物が抗ウイルス活性を示した。抗ノロウイルス活性を持つ化合物は種々の報告があり、柿抽出物や紅茶に含まれるテアフラビン類などのポリフェノール類が知られている。今回効果を示した Myricetin、Scutellarein、Diosmetin、(-)-Epicatechin はテアフラビン類と同じくフラボノイドの骨格を有するポリフェノールの一種である。既報の化合物と構造が類似していることから本研究のスクリーニングにより見出されたと推察さ

れた。その他の化合物は植物から単離される化合物であるが、類似の化合物の報告はなく、作用機序が不明であるため今後詳細な解析が必要である。本研究ではFCVおよびMNVを使用したか、両者に効果を示す化合物は見つからなかった。今後とも化合物のスクリーニングを継続し、抗ノロウイルス活性物質としての活用が期待される物質の探索を行う必要がある。

以上のことから、今後も流入水中のNoVの動態に注視すること、並びに抗ノロウイルス活性物質の検証を進めることでNoV感染防止につなげていくことが重要である。

E. 結論

・2016/17 シーズンにおける県内の感染性胃腸炎と NoV 量には相関があり、流入水調査の結果は NoV の流行を反映していた。

・FCV および MNV を用いたスクリーニング系により天然生理活性物質 120 化合物について抗ノロウイルス活性を評価したところ、14 化合物が FCV または MNV に対する抗ウイルス活性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 中村麻子, 吉富秀亮, 小林孝行, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 市販ノロウイルス検出イムノクロマトキットの遺伝子型別反応性評価, 第 64 回福岡県公衆衛生学会, 福岡市, 5 月 18 日, 2017

2) 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚

由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内の食中毒事例から検出されたノロウイルス G I . Pc-G I . 5 の遺伝子解析, 第 38 回日本食品微生物学会, 徳島県, 10 月 5 日, 2017

3) 小林孝行, 吉富秀亮, 中村麻子, 芦塚由紀, 梶原淳睦, 野田衛: 福岡県内で発生したノロウイルス G I . Pc-G I . 5 による食中毒事例について, 第 43 回九州衛生環境技術協議会, 北九州市, 10 月 12 日, 2017

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

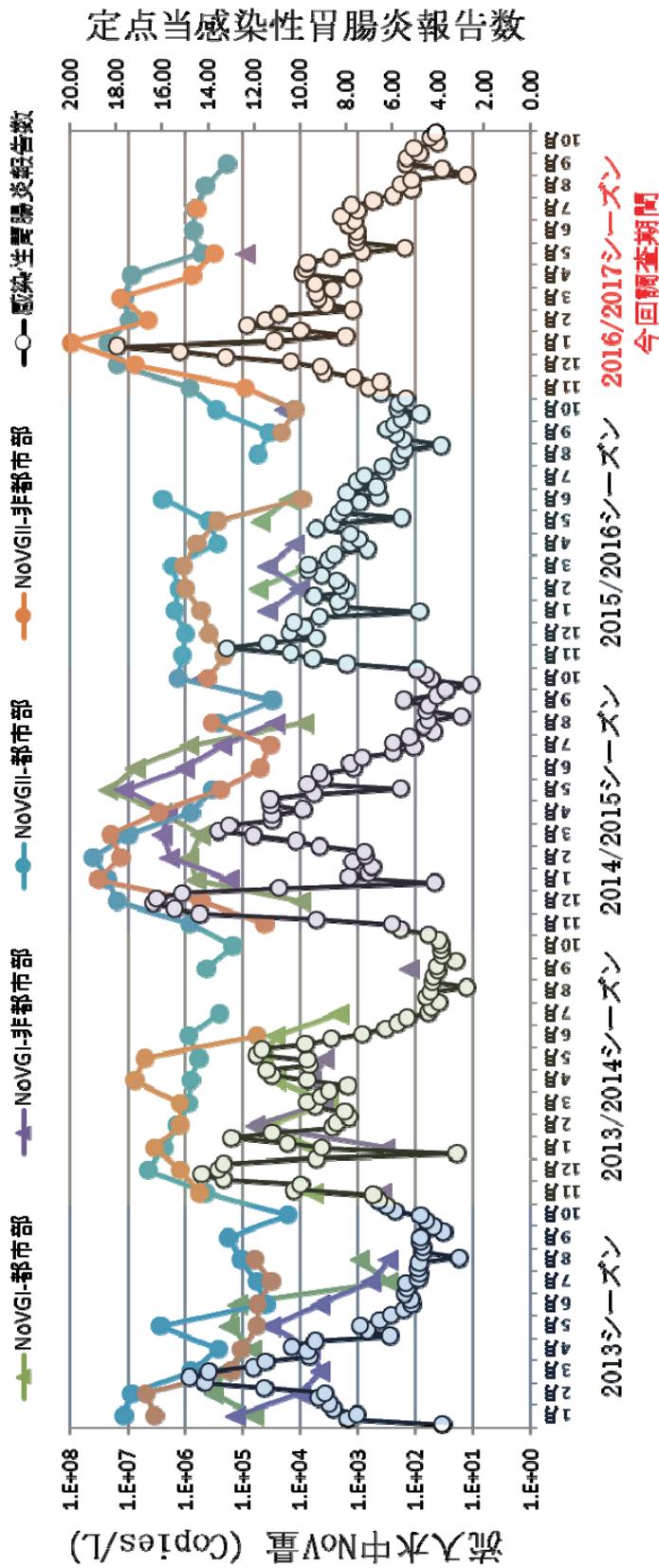


図1 流入水からのNoV遺伝子検出状況と感染性胃腸炎報告数

表1 天然生理活性物質ライブラリーの抗ノロウイルス活性スクリーニング結果

10	:効果濃度 10 μ M	100	:効果濃度 100 μ M	-	:効果なし
----	------------------	-----	-------------------	---	-------

No.	CHEM_NAME	Effective Concentration(μ M)		No.	CHEM_NAME	Effective Concentration(μ M)	
		FCV	MNV			FCV	MNV
1	Myricetin	100	-	61	Tanshinone IIA	-	-
2	beta-Carotene	100	-	62	Indole-3-carbinol	-	-
3	Scutellarein	100	-	63	Rosmarinic acid	-	-
4	Gallic acid	100	-	64	Silibinin	-	-
5	Diosmetin	100	-	65	Osthole	-	-
6	Ferulic acid	100	-	66	Naringenin	-	-
7	Ginkgolide B	100	-	67	Hesperidin	-	-
8	Shikonin	100	-	68	Phloretin	-	-
9	(+/-)-Gossypol	100	-	69	Cryptotanshinone	-	-
10	(-)-Epicatechin	100	-	70	Baicalein	-	-
11	Caffeine	100	-	71	Caffeic acid	-	-
12	Melatonin	-	100	72	Theobromine	-	-
13	Cytisine	-	10	73	Emodin	-	-
14	Asiatic acid	-	100	74	Retinol	-	-
15	Magnolol	-	-	75	Ellagic acid	-	-
16	OROXYLIN A	-	-	76	Chrysin	-	-
17	Fucoxanthin	-	-	77	Betulinic acid	-	-
18	NOBILETIN	-	-	78	Canthaxanthin	-	-
19	alpha-Mangostin	-	-	79	Neohesperidin dihydrochalcone	-	-
20	(-)-Galocatechin gallate	-	-	80	2-(4-Hydroxyphenyl)ethanol	-	-
21	Arbutin	-	-	81	Oxymatrine	-	-
22	Pelargonidin chloride	-	-	82	APIGENIN	-	-
23	Physcion	-	-	83	Aucubin	-	-
24	Galangin	-	-	84	Chlorogenic acid	-	-
25	(-)-Epicatechin gallate	-	-	85	L-Rhamnose monohydrate	-	-
26	Maslinic acid	-	-	86	Puerarin	-	-
27	Daunorubicin hydrochloride	-	-	87	Indole-3-butyric acid	-	-
28	p-Coumaric Acid	-	-	88	Taxifolin	-	-
29	Berberine Chloride	-	-	89	Palmitine chloride hydrate	-	-
30	Nordihydroguaiaretic acid	-	-	90	4-Methylumbelliferone	-	-
31	Matrine	-	-	91	Rutaecarpine	-	-
32	(-)-Bilobalide	-	-	92	naringin dihydrochalcone	-	-
33	ACACETIN	-	-	93	Xanthone	-	-
34	3,3'-Diindolylmethane	-	-	94	Sinomenine	-	-
35	Resveratrol	-	-	95	Fisetin	-	-
36	Luteolin	-	-	96	Hematoxylin	-	-
37	Daidzein	-	-	97	QUERCETIN DIHYDRATE	-	-
38	Forskolin	-	-	98	Kinetin	-	-
39	(+/-)-Octopamine hydrochloride	-	-	99	Sclareol	-	-
40	3-Hydroxytyrosol	-	-	100	Nalidixic acid	-	-
41	Parthenolide	-	-	101	Vanillylacetone	-	-
42	Evodiamine	-	-	102	Rhein	-	-
43	(-)-Epigallocatechin	-	-	103	Orotic acid	-	-
44	Genistein	-	-	104	Biochanin A	-	-
45	Retinoic acid	-	-	105	Stigmasterol	-	-
46	Echinacoside	-	-	106	(1H-INDOL-3-YLMETHYL)-DIMETHYL-AMINE	-	-
47	Yohimbine hydrochloride	-	-	107	BERGENIN MONOHYDRATE	-	-
48	Plumbagin	-	-	108	Colchicine	-	-
49	Rutin trihydrate	-	-	109	L-Carnitine hydrochloride	-	-
50	Oleanolic acid	-	-	110	18beta-Glycyrrhetic acid	-	-
51	Ursolic acid	-	-	111	Formononetin	-	-
52	Citrinin	-	-	112	Shikimic acid	-	-
53	(+/-)-Catechin hydrate	-	-	113	Hyodeoxycholic acid	-	-
54	Diosmin	-	-	114	Neohesperidin	-	-
55	Curcumin	-	-	115	Cinchonidine	-	-
56	(-)-Arctigenin	-	-	116	Hordenine	-	-
57	NARINGIN	-	-	117	CHRYSOPHANIC ACID	-	-
58	(+/-)-Taxifolin hydrate	-	-	118	Dihydroartemisinin	-	-
59	Honokiol	-	-	119	Baicalin	-	-
60	Tanshinone I	-	-	120	Piperine	-	-

*赤枠内は FCV または MNV に抗ウイルス活性を示した 14 化合物