

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24-25年度 総合研究報告書

研究代表者 上間 匡

平成26(2014)年 3月

目次

総合研究報告

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	・・・・・・・・・・ 1
---	--------------

平成24年度

総括報告	・・・・・・・・・・ 10
------	---------------

平成25年度

組換えヒトノロウイルス，組換えネコカリシウイルス， およびカプシドタンパク発現組換えネコカリシウイルス再構築 のためのゲノムプラスミドの作成	・・・・・・・・・・ 22
--	---------------

組換えヒトノロウイルス再構築の検討	・・・・・・・・・・ 28
-------------------	---------------

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	・・・・・・・・・・ 32
--	---------------

平成 24 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」
総合研究報告（平成 24-25 年度）

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

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

毎年発生する食中毒事例の患者数の半数以上の原因となるノロウイルス (NV) は、食中毒の防止・制御の上で最も重要な原因物質の一つであるが、未だに培養細胞や実験動物を用いた感染・培養系が存在しないために、NV そのものの感染性を評価することが出来ない。そのため、NV の環境動態や、消毒剤による不活化、食品等からの NV 検出については、代替ウイルスであるネコカリシウイルスを用いた感染性評価、あるいは NV 遺伝子検出による遺伝子検査に頼らざるを得ず、NV そのものの感染性を評価していない現状があり、NV の感染・培養系の確立は世界的にも望まれている。

本研究では、NV の代替ウイルスで培養可能、かつリバーシジェネティクス系の報告されているネコカリシウイルスを用いて、NV カプシドをもつ組換えネコカリシウイルスを作製し、NV 感受性細胞の探索および培養系の開発を行い、将来的に NV の制御に向けた研究に貢献することを目的としている。

組換えウイルス作成に向け、組換えウイルスのゲノムプラスミドの作成を行い、最終的に組換え NV および NV カプシド保有 FCV のゲノムプラスミドを得たが、組換え FCV のゲノムプラスミドは作成出来なかった。さらに NV カプシド保有 FCV のゲノムプラスミドにはフレームシフト変異が必発し、大腸菌を用いたクローニング法がカリシウイルスのリバーシジェネティクス系に適さないことが示唆された。

組換えウイルスの再構築を DNA トランスフェクション法にて試みたが、いまだに成功せず、ウイルス再構築にはウイルス因子の供給等が必要であることが示唆された。

ウイルス因子の細胞への供給法として、タンパク質トランスフェクション法を検討したところ、FCV 非感受性細胞において FCV の RNA の増幅、感染価の上昇が起きることを見出し、タンパク質トランスフェクション法が、非感受性細胞へのウイルス因子導入および、非感受性細胞を用いたウイルス増殖法の開発へ応用できる可能性を見出した。

本研究で目標としていた NV カプシド保有 FCV の作出は成功せず、NV 感受性細胞の

探索は出来なかったが、構築成功した組換えウイルスゲノムプラスミドと、タンパク質トランスフェクション法の応用について、カリシウイルス再構築系の開発についてさらなる検討が必要である。また、タンパク質トランスフェクション法を利用した、非感受性細胞でのウイルス増殖法については NV 以外のウイルスにも広く応用できる可能性がある。

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。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年以降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

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、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/NV, pEF1aFCV-NV を作成した。

5) 組換え NV 再構築条件の検討

細胞へ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 NV の再構築を行った。ランスフェクション条件の最適化を検討した。

6) 組換えウイルス再構築のためのウイルス因子導入法の検討

組換え NV の再構築に向け，ゲノムプラスミドを細胞へ導入する際に，ウイルスのゲノムおよびウイルス粒子複製に必要と思われるウイルス因子を，細胞へ導入する方法としてタンパク質ランスフェクション法を用いた。

7) 非感受性細胞を用いたウイルス増殖法の検討

6) のタンパクランスフェクション法を用いて，非感受性細胞に FCV をタンパクとしてランスフェクションし，RNA の増幅および感染価の上昇を検討した。

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 (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

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。ウイルス再構築に使用可能と思われるゲノムプラスミドは pEF1a/NV のみが作出に成功した。pEF1aNV-FCV は ORF1 領域に点変異が必発し，そのままではフレームシフトが起きると考えられた。またフレームシフトのないプラスミドは大腸菌を用いたクローニング法では作成出来なかった。pEF1a/FCV については，

PCR でゲノム全長を増幅できるものの、完全長のゲノムプラスミドは作成出来なかった。

FCV ゲノムプラスミドに関しては、フルゲノムプラスミド作成途中の段階で ORF1-ORF2 ジャンクション領域を含む約 3.7kb のプラスミドを作製し、これを食品等からのウイルス検査法でのリアル・タイム PCR の標準プラスミドとして使用できることを確認した。

この標準プラスミドを利用して、感染性ウイルス粒子推定法の開発を行った。

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 NV の再構築

作成した組換えゲノムプラスミドを細胞へトランスフェクションし、組換えウイルスの再構築を試みた。トランスフェクション試薬には、ポリエチレンジアミン(PEI, ナカライテスク)や TransIT (TAKARA)を用いて検討した。残念ながら現在のところ組換えウイルス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。ウイルス再構築のためには、ゲノムプラスミドのみならず、ウイルス因子の細胞への導入について検討する必要があると考えられた。

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 Bisystem 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、スミアの泳動像となり、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

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。

8) タンパク質トランスフェクション法の検討

ウイルス因子の導入法として、複数のタンパク質トランスフェクション試薬について検討を行った結果、遺伝子トランスフェクションでも効率が良くとされる 293T 細胞や HeLa 細胞において、タンパク質トランスフェクションも効率が良いことが示唆された。

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。

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ミアが確認され、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と比較して、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シングを行うことで、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。

NV GII4 のウイルスゲノムプラスミド作成に比較し、FCV ゲノムは EF1a プロモータ、CMV プロモータなど、プロモータ変更及び、形質転換に用いる大腸菌を変更しても作成することが出来なかった。FCV ゲノムプラスミドの作成は困難であることが考えられ、今後 NV カプシドを発現する組換えウイルスを再構築する上では、同じウイルス科のネコカリシウイルスやマウスノロウイルス等を利用するのか、またはウイルス科は異なるがウイルス構造が似通っているエンテロウイルスなどのウイルス再構築系を応用するのか検討していく必要がある。

また、組換え NV の再構築は成功しなかったが、再構築過程においてゲノムだけでなくウイルス由来因子(ポリメラーゼやカプシド等のウイルスタンパク)が必要である可能性は否定出来ない。このことから、ウイルス因子の細胞への導入法として、タンパク質トランスフェクション法を検討した。

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。

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入り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。

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。
- ・FCV ORF1 (ポリメラーゼ)-ORF2 (カプシド) 領域を含む約 3.7kb のプラスミドを食品等からのウイルス遺伝子検出リアル・タイム PCR 法の標準プラスミドとして作成し、感染性推定遺伝子検査法の開発等を行った。
- ・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。

- ・作成した pEF1a/NV について遺伝子トランスフェクション法にてウイルスの再構築を試みたが、再構築には至らなかった。
- ・ウイルス再構築時の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を検討した。
- ・タンパク質トランスフェクション法により、FCV を非感受性細胞へ導入し、ゲノム RNA の増加、感染力価の上昇を確認した。
- ・タンパク質トランスフェクション法が、感受性細胞のないウイルスの増殖方法として利用できる可能性が示唆された。
- ・タンパク質トランスフェクション法が、ウイルス高感受性細胞の探索に応用出来る可能性が示唆された。
- ・医薬品デリバリーシステムに用いられる膜透過ペプチドを用いた修飾による、ウイルスの細胞導入法について検討開始した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

平成 24 年度
無し

平成 25 年度

学会発表

溝口嘉範, 磯田美穂子, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺

伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22

上間 匡，三元昌美，青沼えり，野田 衛 (2013) ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22

上間 匡，三元昌美，青沼えり，柴原慶隆，野田 衛 (2013) ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用，第 34 回日本食品微生物学会学術総会，江戸川区，10/3

三元昌美，上間 匡，柴原慶隆，野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22

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 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と考え、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、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、ポリエチレンジアミン(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 Bisystem 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 ゲノムのカプシド遺伝子をすべて NV GII4 のカプシド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、今後はカプシド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ミアが確認され、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。

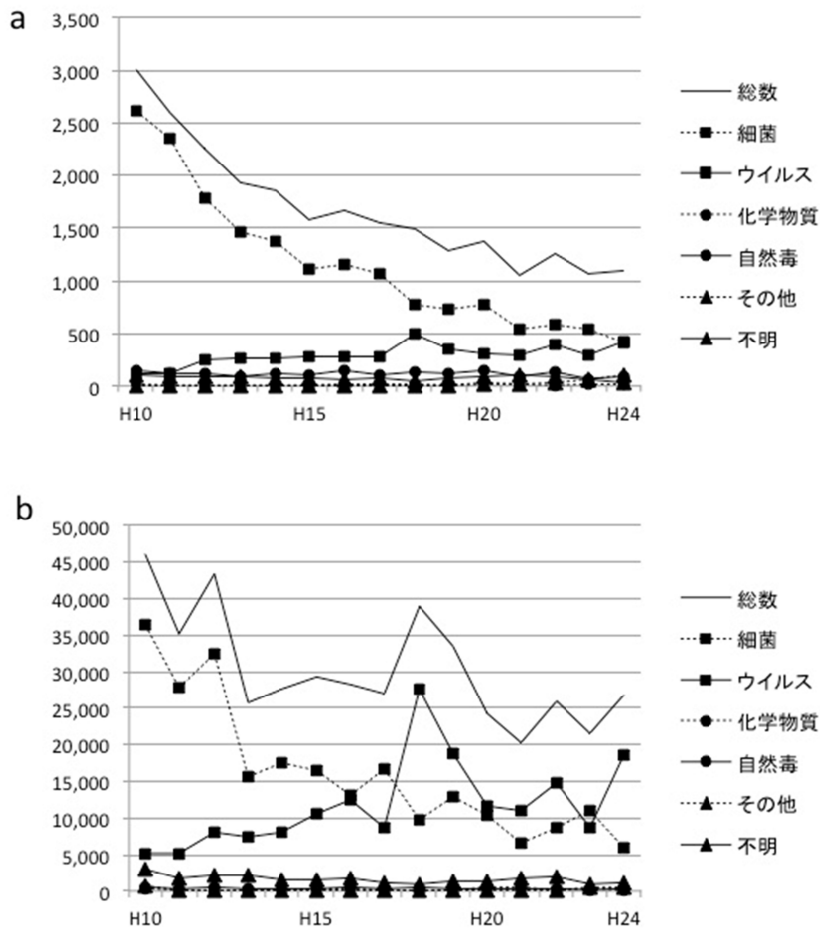
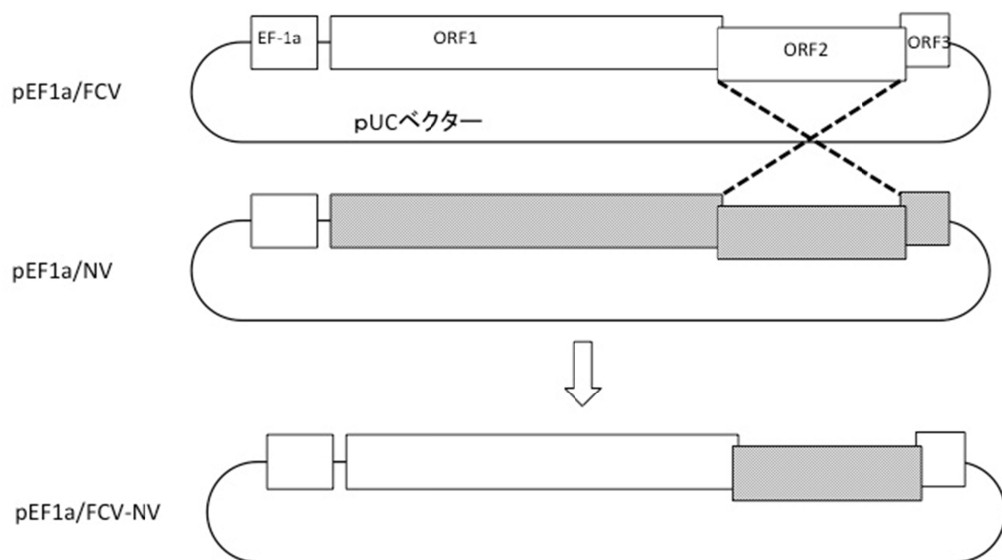


図1：食中毒発生事件数と患者数の平成10年から24年までの推移 a：事件数 平成24年は細菌性とウイルス性がほぼ同数の報告であった。 b：患者数 ノロウイルスが大流行した平成18年と24年の患者数は突出して多い。厚生労働省 食中毒統計より作成

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

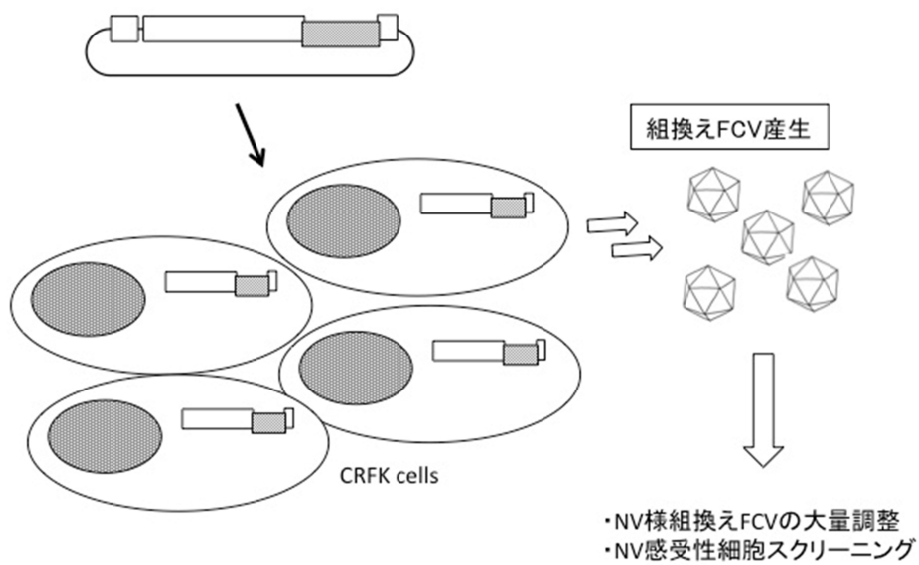


図2：研究の流れ

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	gtaaagaaattgagacaatgtctc	26
F9-7690	ccctggggttaggcgaggtcggca	26
F9+1-40	gtaaagaaattgagacaatgtctcaactctgagcttc	39
F9-7690-	ttttccctggggttaggcgaggtcggcagcccaaagg	40
NVGI14+1	gtgaatgaag atggcctcta acgacgcttc cgctgccg	39
NVGI14-7537	gataatcaatttgtctttcacattatgccgtgactc	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 GI/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。

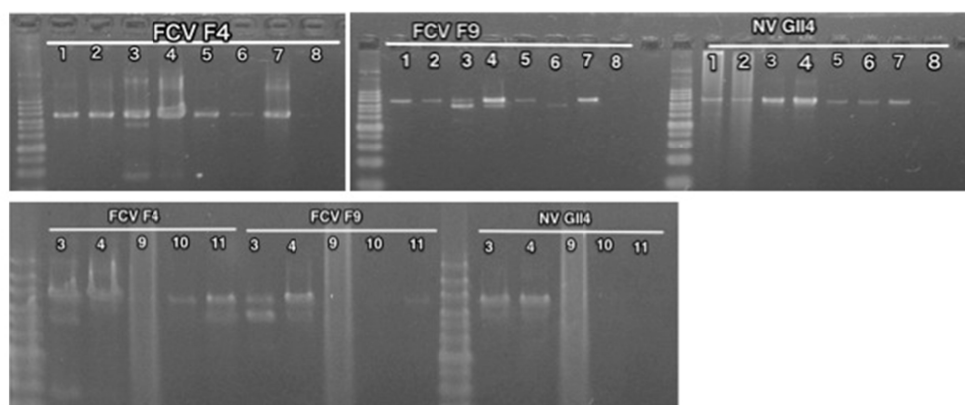


図 3 : 表 2 に上げた酵素によるPCR増幅結果 レーン番号は表 2 の番号に一致
TOYOBO社の酵素が非特異的なバンドが少なく、効率よく増幅された。
FCV F4は陽性コントロールとしてテンプレートにpFCV-F4を用いた。

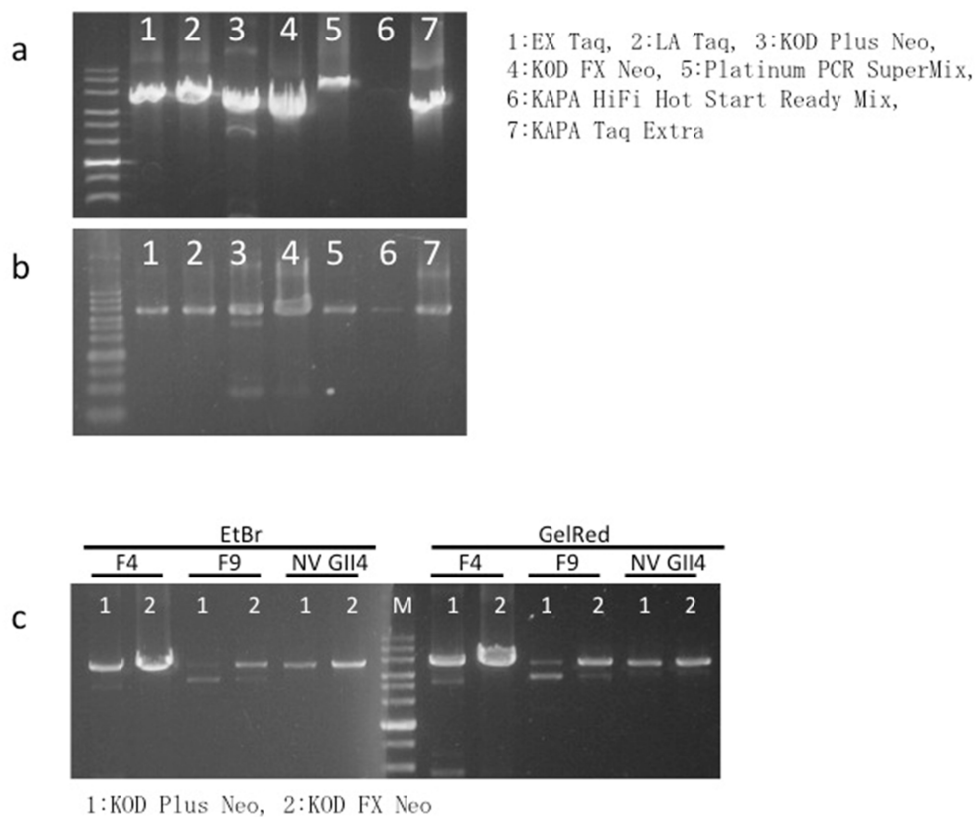


図4： 染色試薬の比較。

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。

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」

組換えヒトノロウイルス，組換えネコカリシウイルス，
およびカプシドタンパク発現組換えネコカリシウイルス再構築
のためのゲノムプラスミドの作成

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，NV の代替ウイルスで培養可能，かつリバースジェネティクス系の報告されているネコカリシウイルスを用いて，NV カプシドをもつ組換えネコカリシウイルスを作製するために，ネコカリシウイルス及び，近年の大流行において主要な原因となっている NV GII4 遺伝子型株のゲノム全長をクローニングし，組換えヒトノロウイルス，組換えネコカリシウイルス作出のための組換えゲノムプラスミドの作成を行った。

NV GII4 遺伝子型株については，EF1a プロモータ下流にゲノム全長をクローニングしたゲノムプラスミドの作製に成功した。一方，ネコカリシウイルスについては，PCR によりゲノム全長の増幅は可能であったが，組換えゲノムプラスミドの作製は成功せず，大腸菌を用いたゲノムプラスミドの作製は困難であることが示唆された。

また，NV カプシドタンパク発現組換え FCV については，ORF1 にフレームシフト変異が入るものの，EF1a プロモータ下流にゲノムをクローニングすることに成功した。

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の作製に向けて、図1に示す3種類の組換えゲノムプラスミド (pEF1a/FCV, pEF1a/NV, pEF1a/FCV-NV)の作製を試みた。

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

KOD Plus Neo (TOYOBO) を用いてゲノム全長の増幅し、クローニングを行った。

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/NV, pEF1a/FCV-NV を作成した。

C. 研究結果

1) FCV ゲノムプラスミドの作成

PCR でゲノム全長を増幅できるものの、完全長のゲノムプラスミド pEF1a/FCV の作成に至らなかった。但し、ゲノムプラスミド作成段階に置いて、ORF1-ORF2 ジャンクション領域を含むウイルスゲノム後半約 3.7kb の断片のクローニングは成功した。これを食品等からのウイルス検査法でのリアル・タイム PCR の標準プラスミドとして使用できることを確認した。

この標準プラスミドを利用して、感染性ウイルス粒子推定法の開発を行った。

2) NV ゲノムプラスミドの作成

EF1a プロモータ下流に NV GII4 遺伝子型のゲノム全長をクローニングしたゲノムプラスミド pEF1a/NV の作成に成功した。

3) NV カプシド発現 FCV ゲノムプラスミドの作成

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。

図 2 に示すように pEF1aNV-FCV は ORF1 領域に点変異が必発し、そのままではフレームシフトが起きると考えられた。

また、ORF2 領域にも、塩基の欠損が生じていた。

さらに、フレームシフトのないプラスミドは大腸菌を用いたクローニング法では作成出来なかった。

D. 考察

NV カプシド発現組換え 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、組換えゲノムプラスミドの構築法が確立出来た。

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ミアが確認され、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。

NV GII4 のウイルスゲノムプラスミド作成に比較し、FCV ゲノムは EF1a プロモータ、CMV プロモータなど、プロモータ変更及び、形質転換に用いる大腸菌を変更しても作成することが出来なかった。FCV ゲノムプラスミドの作成は困難であることが考えられ、今後 NV カプシドを発現する組換えウイルスを再構築する上では、同じウイルス科のネコカリシウイルスやマウスノロウイルス等を利用するのか、またはウイルス科は異なるがウイルス構造が似通っているエンテロウイルスなどのウイルス再構築系を応用するのか検討していく必要がある。

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。

・pEF1a/NV 及び ,変異はあるものの , pEF1a/FCV-NV を作製した。

・FCV のゲノムプラスミド作製は非常に困難であることが明らかになった。

・FCV ORF1 (ポリメラーゼ)-ORF2 (カプシド) 領域を含む約 3.7kb のプラスミドを食品等からのウイルス遺伝子検出リアル・タイム PCR 法の標準プラスミドとして作成し, 感染性推定遺伝子検査法の開発等を行った。

・FCV および NV GI4 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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

溝口嘉範, 磯田美穂子, 木田浩司, 濱野雅子, 藤井理津志, 岸本壽男, 安原広己, 上間 匡, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出

への応用, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22

上間 匡, 三元昌美, 青沼えり, 野田 衛 (2013) ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22

上間 匡, 三元昌美, 青沼えり, 柴原慶隆, 野田 衛 (2013) ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 江戸川区, 10/3

三元昌美, 上間 匡, 柴原慶隆, 野田 衛 (2013) 感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会, 宜野湾市, 11/22

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」

組換えヒトノロウイルス再構築の検討

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、作製した組換え NV ゲノムプラスミドを細胞へ遺伝子導入を行って、組換え NV の再構築を試みた。

細胞にはヒト由来細胞である CaCo-2, HEP-2, HeLa, 293, 293T 細胞の他、ネコカリシウイルスの培養細胞である CRFK 細胞を用いた。遺伝子導入試薬には、各社から販売されている試薬を用いて検討を行ったが、組換え NV の再構築には至らなかった。

今後組換え NV を再構築していく上で、ゲノム RNA のテンプレートとなるゲノムプラスミドのみを導入する方法に加えて、麻疹ウイルス等の再構築系で用いられているようなウイルス因子を同時に細胞へ導入するなどの検討が必要であると考えられた。

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。

NVのリバースジェネティクス系確立を目的として、作製した組換えNVゲノムプラスミドを培養細胞へ遺伝子トランスフェクションで導入し、組換えウイルスの再構築を試みた。

B. 研究方法

1) 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、EF1a プロモータ下流に NV ゲノム全長をクローニングした組換えゲノムプラスミド pEF1a/NV を用いた。

2) トランスフェクション法

トランスフェクション試薬として以下のものを用いた。

- ・ TransIT LT1 (TAKARA)
- ・ Fugene 6 (Promega)
- ・ Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

プラスミド濃度、試薬濃度等は試薬説明書に従った。

また、試薬を用いない遺伝子導入法として電荷帯電水滴を用いるエレクトロスプレー法^{1, 2}を用いた。

3) 細胞

293, 293T, HeLa, HEp-2, CRFK 細胞を用いた。

C. 研究結果

表に示すように、細胞と試薬の組み合わせを全て試したが、ウイルスのゲノム RNA の検出、ウイルス再構築は確認できなかった。

陽性コントロールとして GFP 発現プラスミドをトランスフェクションした場合は GFP が確認できた。

但し、エレクトロスプレー法では、GFP の発現は HeLa 細胞で確認できたが、効率が非常に悪かったため (10⁶ 細胞あたり 3-5 個程度) HeLa および 293T 以外の細胞ではテストしなかった。また、GFP 発現細胞もエレクトロスプレーによって、ダメージを受けて

正常細胞 (接着状態) とは異なる形態を示した。

D. 考察

組換え NV の再構築を組換えゲノムプラスミドの遺伝子導入により試みたが、入手した細胞、試薬の組み合わせではゲノム RNA の検出、ウイルス再構築は確認出来なかった。

陽性コントロールの GFP については発現確認出来ているので、試薬の使用条件は問題ないと思われる。

ウイルスの再構築の際に、すでに研究が進んでいる麻疹やインフルエンザなどでは、ゲノムプラスミドに加えて、幾つかのウイルスタンパクを補助因子として発現させている。これを考慮すると、組換え NV および組換え FCV の再構築にも、補助となるウイルス因子が必要である可能性は否定出来ない。

今回テストしたエレクトロスプレー法は、単三乾電池 2 本を用いる、ハンディタイプの装置を用いて実施したが、スプレー時に細胞がかなりのダメージを追うことが考えられ、遺伝子導入にはあまり適さないことが考えられた。

E. 結論

・組換え NV の再構築を試みたが、現在のところ成功していない。

・ウイルス再構築のためには、ゲノムプラスミドに加えてウイルス因子の導入が必要である可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

参考文献

1. 池本一人, 小池加奈子, 坂井貴文, エレクトロスプレーによる帯電液滴を利用した細胞への遺伝子導入 埼玉大学地域オープンイノベーションセンター紀要 1, 15-16, (2008)
2. Y. Okubo, K. ikemoto, K. Koike, C. Tsutsui, I. Sakata, O. Takei, A. Adachi,

T. Sakai, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 1429-1431 (2008).

表.遺伝子導入による遺伝子発現（上段：GFP，下段：pEF1a/NV）

	293	293T	HeLa	HEp-2	CRFK
TranIT	×	×	×	×	×
FuGene6	×	×	×	×	×
Lipo2000	×	×	×	×	×
ElectroSpray	実施せず	×	×	実施せず	実施せず

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 2-4 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

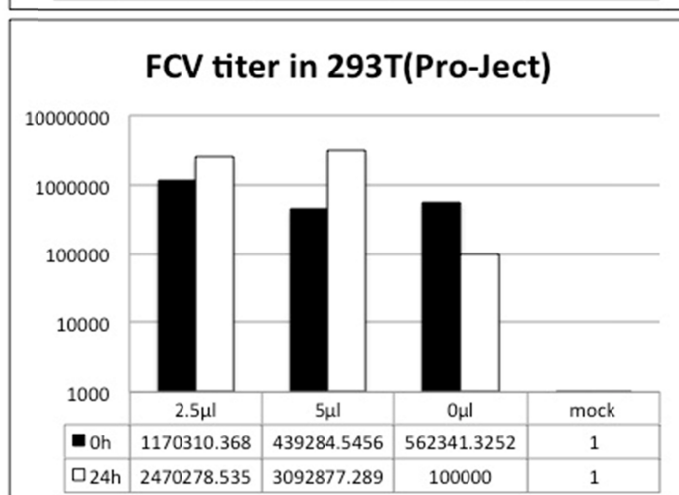
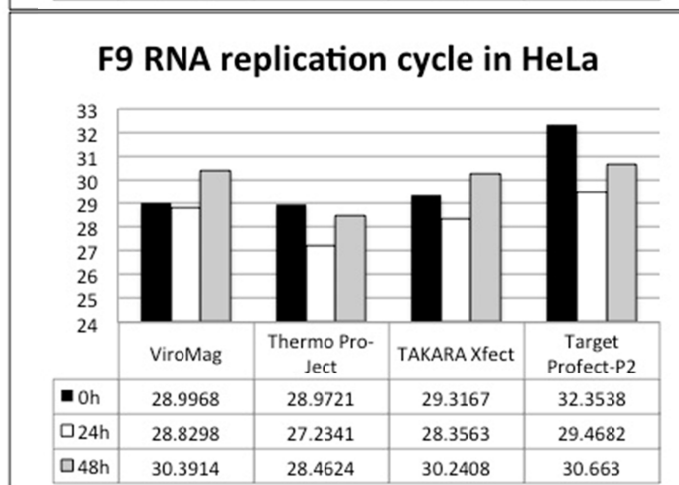
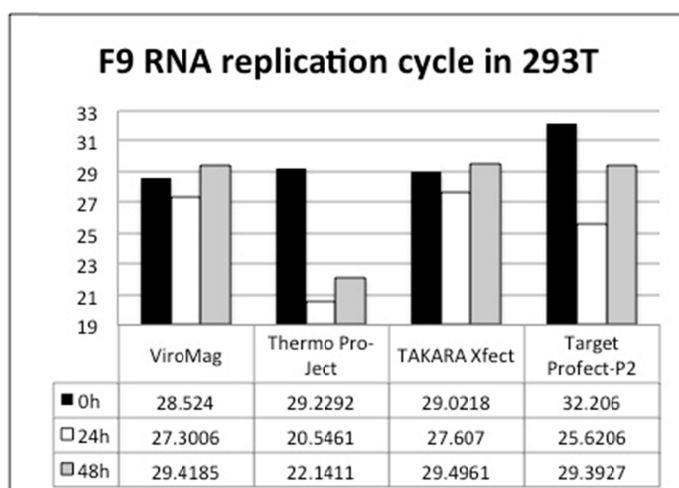


図1. タンパク質トランスフェクション試薬の比較と293T細胞へ導入後のウイルス力価の上昇

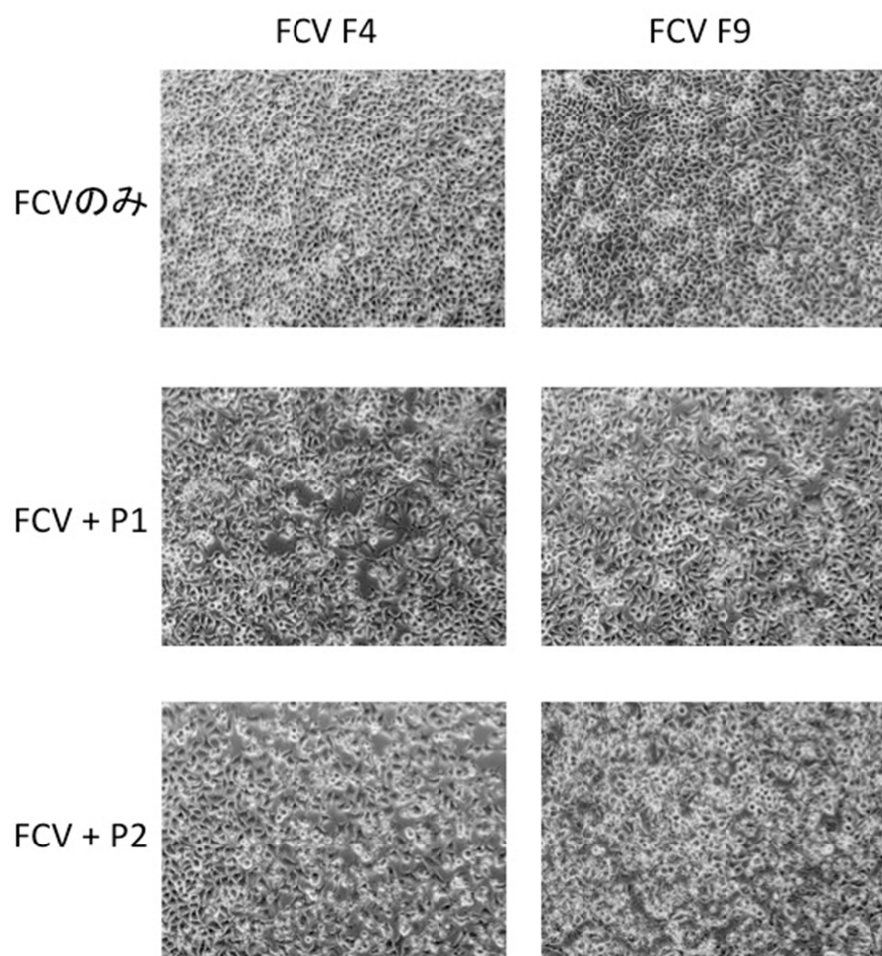


図2. HeLa細胞へProFectを用いてFCVを導入後24時間の細胞変性効果

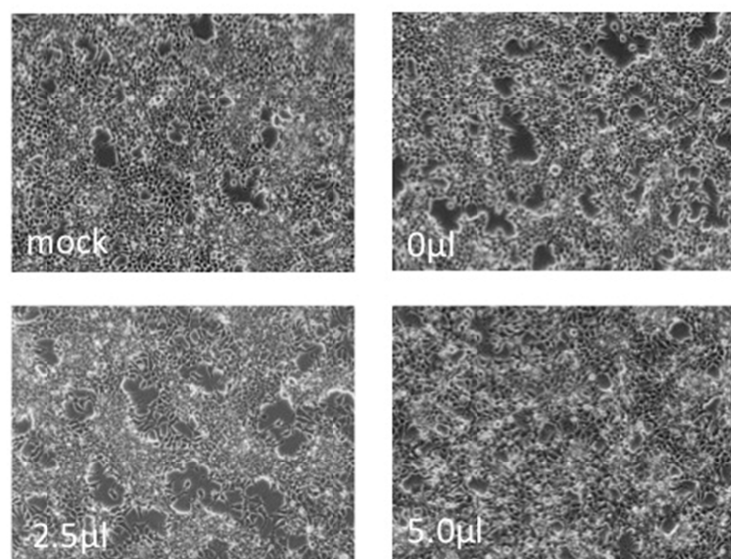


図3. 293T細胞へPro-Jectを用いてFCV F9を導入した際の細胞変性効果

平成 24 年度

無し

平成 25 年度

学会発表

溝口嘉範，磯田美穂子，木田浩司，濱野雅子，藤井理津志，岸本壽男，安原広己，上間匡，野田 衛 (2013)感染性推定遺伝子検査法の下水中のノロウイルス検出への応用，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22

上間 匡，三元昌美，青沼えり，野田 衛 (2013)ノロウイルスのリスク評価のための感染性推定遺伝子検査法の開発，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22

上間 匡，三元昌美，青沼えり，柴原慶隆，野田 衛 (2013)ノロウイルスの感染性推定遺伝子検査の開発と応用，第 34 回日本食品微生物学会学術総会，江戸川区，10/3

三元昌美，上間 匡，柴原慶隆，野田 衛 (2013)感染性推定遺伝子検査法を用いたノロウイルスの乾燥状態および液体中の生存性の推定，第 106 回日本食品衛生学会学術講演会，宜野湾市，11/22