

## 9. ヒト赤血球等を用いたノロウイルス粒子の濃縮 及び食品からの高感度検索法の検討

○門馬直太(福島県衛生研究所)

五十嵐郁美(福島県衛生研究所)、柏原尚子(福島県衛生研究所)

廣瀬昌子(福島県衛生研究所)、三川正秀(前福島県衛生研究所)

### 1. 目的

ノロウイルス(以下“NV”)は食中毒の起因ウイルスで、その効果的な対策は地域公衆衛生行政において喫緊の課題である。当所はノロウイルス食中毒の行政検査において発症者便および調理従事者便からウイルス遺伝子の検出を行っている。しかし、感染経路を確定するために必要な食品からの NV の検出は、検査感度の問題により二枚貝を除いて極めて困難な状況にある。その原因は NV の培養細胞を用いた効率的な増殖法が未だ開発されていないためであり、現状では NV をごく少量含む溶液を効率的に濃縮することが、検出感度を向上させる唯一の効果的な方法と考えられる。現在一般的に用いられている NV の濃縮法は、超遠心やポリエチレングリコールを用いた物理的な濃縮であるが<sup>1)</sup>、夾雑物による影響を受けやすく、大量の溶液の濃縮が困難なため個々の食品等への応用が難しい。この問題を解決する有用な方法として、物質と物質の特異的な相互作用を利用したアフィニティクロマトグラフィーがあげられる。近年、NV の集団発生時における疫学調査からヒト血液型によって発症率が大きく異なることが見いだされ<sup>2)</sup>、ヒト血液型抗原(糖鎖)が特異的なレセプターの一つであることが報告されている<sup>3)</sup>。そこで、血液型抗原を表面に持つヒト赤血球と NV との親和性を解析し、併せてヒト赤血球を用いた NV の効率的な濃縮が可能かどうか検討した。

### 2. 材料

#### (1)ヒト赤血球及びヒト赤血球ゴースト

各血液型(A、B、O型)被験者からヘパリン採血し、DGV(Dextrose-Gelatin-Veronal)で2回遠心洗浄したものをヒト赤血球(以下“hRBC”)とした。また遠心洗浄した赤血球を低張溶液で溶血させ、遠心した沈殿物をヒト赤血球ゴースト(以下“ghost”)とした。

#### (2)NV 溶液

食中毒事例においてNV陽性となった便検体をPBSで10%乳剤化し、14,000rpm 10分間遠心した上清をNV溶液として用いた。用いたNV陽性検体の遺伝子型は genotype G1(G1/4)、genotype G1(G1/7)、genotype G2(G2/4)の3種類であり、それぞれ遺伝子解析により確認を行った。

### 3. 方法

#### (1) NV の赤血球凝集反応

hRBC を PBS (0.01 M sodium phosphate, 0.15 M NaCl) で 0.5% (v/v) に調整し、段階希釈した NV 溶液と等量混合し、4°C または室温で 2 時間インキュベーションした後、凝集活性を測定した。

#### (2) hRBC を用いた NV 濃縮

hRBC または ghost を PBS で 10% に調整し、それぞれ 100  $\mu$ L、1 mL ずつ希釈した NV 溶液 50 mL に加え、4°C で 2 時間インキュベーションした後、hRBC および ghost を 3,000 rpm、5 分間の遠心で回収した。

#### (3) NV 遺伝子の検出

NV を濃縮、回収した検体から QIAamp Viral RNA minikit (QIAGEN) により RNA を抽出し、DNase 処理後、逆転写反応により cDNA を作製し、PCR またはリアルタイム PCR<sup>1)</sup> を実施した。PCR はプライマー G2-SKF、G2-SKR を用いて約 350bp の断片を増幅し、アガロースゲル電気泳動により確認した。

#### (4) NV の添加回収試験

サラダ用キャベツ (千切り) 5 g に NV 溶液 100  $\mu$ L を添加し、5 倍容量の PBS を加え、30 分間室温で放置し表面を洗うように 2 回抽出した。抽出液に hRBC、ghost を加え、4°C で 2 時間インキュベーションし、遠心回収した hRBC、ghost から NV 遺伝子の検出を行った。

#### (5) Cellfine Sulfate を用いた NV 濃縮

PBS で 10% に調整した Cellfine Sulfate (CHISSO、以下“CS”) を、希釈した NV 溶液 50 mL に 100  $\mu$ L 加え、室温で 2 時間インキュベーションした後、CS を遠心で回収し、0.1% SDS 溶液 50  $\mu$ L で 2 回ウイルス粒子の抽出を行い、同様に NV 遺伝子の検出を行った。

#### (6) 倫理面の配慮

本研究は、福島県衛生研究所倫理規定 (人を対象とする研究) に基づき、2008 年 10 月 8 日に福島県衛生研究所倫理委員会において承認を受けた。研究協力者からの採血は文書を用いて研究内容を説明し、同意を得た上で行った。

### 4. 結果および考察

#### (1) NV の赤血球凝集反応

Huston らは、昆虫の培養細胞を用いて人工的に作成された NV (virus-like particles、以下“VLPs”) が hRBC を血液型抗原に依存して凝集させることを報告している<sup>4)</sup>。そこで、ヒト糞便由来の NV が VLPs と同様に赤血球凝集活性 (以下、“HA 活性”) を有するかどうか、反応条件を 4°C および室温で検討した。その結果、ヒト糞便由来の NV についても各血液型の赤

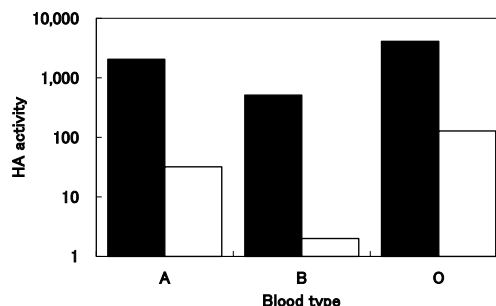


図1 NVの血液型別HA活性

50 $\mu$ LのNV溶液 (G2/4) と0.5% hRBCを混合し、4°C (■) および室温 (□) で2時間インキュベーションした後、凝集活性を測定。(A, B, O ともにN=1)

血球に対して、温度に依存した HA 活性が認められた(図 1)。O 型が各血液型の中で最も HA 活性が高く、続いて A 型、B 型の順に HA 活性が認められた。このことから、NV がヒト赤血球膜上に存在する血液型抗原を認識している可能性が示唆された。Houston らが低温における HA 活性の上昇を報告<sup>4)</sup>しているのと同様に、各血液型とも低温条件下で HA 活性の増加が見られた。メカニズムは不明だが、低温において NV と hRBC の親和性が上昇する可能性が考えられたため、この後の濃縮検討は 4℃で行うこととした。

## 2 hRBC を用いた NV の濃縮

上述した HA 活性が、糞便由来の夾雑物ではなく NV との結合によるものかどうか確認するため、NV 溶液と hRBC をインキュベーションし、遠心回収した hRBC から直接 NV 遺伝子の検出を試みた。また、hRBC は長期間の保存で溶血することから、予め hRBC を低張溶血させ保存性を高めた赤血

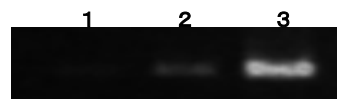


図2 hRBC, ghostによるNVの濃縮

NV溶液(G2/4)100 $\mu$ Lを 50mL PBSで希釈し(500倍), 10% hRBC 100 $\mu$ L, または10% ghost 1mLを加え, 4℃で2時間インキュベーションした後, 遠心回収したものからNV遺伝子を検出.

lane1;濃縮前NV溶液, lane2;hRBC, lane3;ghost.

球膜(ghost)について同様に検討を行った。その結果、濃縮前の低濃度 NV 溶液からはほとんど NV 遺伝子増幅産物が確認できないのに対し、hRBC または ghost を加えて遠心回収し濃縮した検体からは明瞭に NV 遺伝子増幅産物が確認された(図 2)。以上の結果は hRBC および ghost に NV が結合することを示していると考えられる。さらに NV 遺伝子増幅産物のバンドの濃さから ghost が NV の吸着剤としてより有用であることが示唆された。ghost がより有用である原因は赤血球の内容物である大量のヘモグロビン等のタンパク質がウイルス RNA 抽出時に阻害物質として作用することによるものと思われる。

## 3 食品からの NV の検出

hRBC および ghost が NV の吸着剤として利用できる可能性が示唆されたため、実際に NV で汚染された食品から NV 遺伝子が検出できるかどうか検討した。未加熱で喫食される単一食材で、デンプンや油脂を極力含まないことを考慮してキャベツの千切りを汚染食品のモデルとして用いた。また実際に想定される食材の汚染状況を極力再現するため、ごく少量のウイルス溶液を食品表面に滴下し、表面のみが汚染された状態の再現を試みた。汚染食品からのウイルス抽出方法を検討するため、5 倍量の PBS で穏やかに 2 回洗浄する方法と、10 倍量の PBS を加えた後、ストマッカーで均一化する 2 種類の方法について検討した。洗浄液およびストマッカーによる破碎液に ghost を加え、遠心回収後、NV 遺伝子の検出を試みたところ、表面洗浄液については食品を加えない条件(図 3-lane2)とほぼ同程度の NV 遺伝子増幅産物が確認されたが、破碎液からはほとんど増幅産物が確認されなかった(図 3)。NV は食品中では増殖せず、調理従事者の手指等を介し食品表面を汚染するため、表面洗浄がより効果的な抽出方法であると考えられる。一方、ストマッカー等を用いて食品を破碎すると食品細胞内の夾雑物により抽出効率が低下し、NV と ghost

との結合が阻害されることが推察される。NV は加熱に弱く、二枚貝以外の汚染食品としては、サラダや和え物など非加熱及び加熱後調理食品が食中毒の原因食品と想定されている<sup>5)</sup>。現在ノロウイルス食中毒事例の約7割は原因食品が特定されておらず<sup>5)</sup>、汚染経路の解明が必要である。今回は条件検討のため食品

に由来する阻害物質の影響を排除する目的でキャベツの千切りを汚染食品のモデルとして用いたが、デンプンや油脂等を多く含む食品についても今後検討していきたい。

#### 4 人工的な吸着剤の検討

hRBC および ghost が NV の吸着剤として利用できる可能性を示したが、吸着担体としての保存性や採血に伴う倫理面等今後解決すべき課題が多い。そこで、これらの課題を解決すべく、取扱いが容易で保存性、均一性に優れた人工担体について検討を行った。CS はアフィニティークロマトグラフィー用の担体でセルロースの多孔性・真球状の粒子に硫酸エステルを結合させたものであり、ウイルス精製にも用いられている<sup>6)</sup>。この CS を NV 溶液に加え、遠心回収後、0.1% SDS で結合物を溶出させ、その溶出液から NV 遺伝子の検出を行った。その結果、CS で濃縮を行った検体からも NV 遺伝子の増幅産物が確認された(図4-lane3)。またより低濃度に希釈した NV 溶液について同様に濃縮を試みたところ、わずかではあるが増幅産物が検出された(図4-lane4)。以上の結果から CS はより低濃度の NV 溶液から濃縮することが可能であり、保存性、均一性を有する吸着剤であることが示唆された。一方、異なる遺伝子型や複数の患者に由来する NV に対して CS は結合能を有したが、濃縮率及び回収率が低くそのままの実用化は困難と思われる。今後は硫酸エステルに代わるリガンドの選定が必要であり、その場合、NV のレセプターである血液型糖鎖は新たなリガンドの有力な候補物質のひとつと思われる。NV は様々な遺伝子型を有し、それぞれが認識する血液型抗原が異なるため、より多くの遺伝子型に対応する濃縮担体が必要である。3種類の NV 遺伝子型に対する各血液型 ghost の濃縮率を解析した結果、各血液型

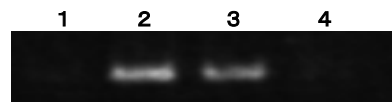


図3 汚染食品からのNVの抽出・濃縮

NV溶液(G2/4)100 μLをキャベツ5 gに添加し、50 mL PBSで抽出し、ghostを加え4°Cで2時間インキュベーションした後、遠心回収したもからNV遺伝子を検出。lane1;汚染食品抽出液, lane2;ghost濃縮(NV溶液;食品なし), lane3;ghost濃縮(表面洗浄液), lane4;ghost濃縮(破碎液)

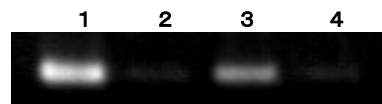


図4 CSIによるNVの濃縮

希釈されたNV溶液(G2/4)50 mLに10% CS(v/v)を100 μL加え、2時間インキュベーションした後、遠心回収したCSから0.1% SDSで溶出。lane1;100 μL NV溶液原液, lane2;濃縮前NV溶液(500倍希釈), lane3;CS濃縮(500倍希釈NV溶液から), lane4; CS濃縮(5000倍希釈NV溶液から)

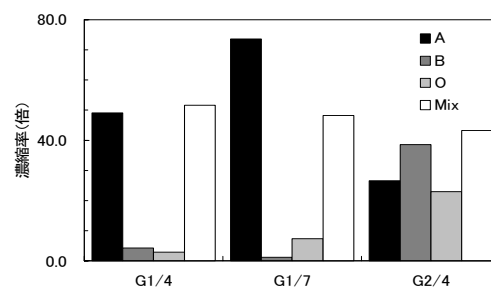


図5 NV 遺伝子型に対する血液型別濃縮率

希釈された各遺伝子型 NV 溶液 50 mL に 10% ghost(v/v) を 1 mL 加え、2 時間インキュベーションした後、回収された NV 遺伝子を定量し、希釈溶液の NV 遺伝子との比較から濃縮率を算定。各血液型を等量混合した ghost を Mix とした。

を等量混ぜ合わせた ghost が各遺伝子型と比較して安定した濃縮率を示した(図5)。このことから多種類の血液型抗原をリガンドとする人工担体を作成することで、多くの遺伝子型に対応し、より高い特異性と濃縮率を有する NV 吸着剤が可能になるものと推察される。

## 5 まとめ

我々はヒト糞便に含まれる NV が、ヒト赤血球に対し HA 活性を有する可能性を見出した。また、hRBC およびその細胞膜である ghost が、NV 溶液の濃縮および食品からの NV の検出に利用できる可能性を示した。さらにヒト赤血球などの生体成分を吸着剤とした場合の問題を解決するひとつの手法として、人工的な担体を用いた濃縮について検討した。今後はより詳細な検討を加え、長年の課題であったノロウイルス食中毒における感染経路の解明に寄与すべく、実用化にむけた開発を行なっていきたい。

## 文献

- 1) ノロウイルスの検出法について 食安監発第 0514004 号 平成 19 年 5 月 14 日
- 2) Anne M.Huston, Robert L. Atmar, David Y. Graham, et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. The journal of infectious disease 2002;185:1335-1337
- 3) Ming Tan, Rashmi. Hegde, Xi Jiang. The P domain of Norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. Journal of virology 2004:6233-6242.
- 4) Anne M. Huston, Robert L. Atmar, Donald M. Marcus, et al. Journal of virology 2003:405-415.
- 5) 厚生労働省 HP ノロウイルスに関するQ & A (最終改定:平成 19 年 12 月 20 日) <http://www.mhlw.go.jp/topiCS/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html#12>
- 6) P. F. O'neil, E. S. Balkovic. Virus Harvesting and affinity-based liquid chromatography. Bio/Technology 1993;11:173-178

## 経費使途明細

用途	金額
遺伝子抽出試薬	¥131,250
逆転写酵素、PCR試薬	¥247,690
アフィニティークロマト関係器材	¥107,100
消耗品(サンプルチューブ等)	¥18,900
計	¥504,940