

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05789

研究課題名(和文) 抗ノロウイルス卵黄抗体を用いた牡蠣中腸腺内ノロウイルスの不活化に関する検討

研究課題名(英文) Inactivation of Norovirus in midgut gland of oyster using anti Norovirus IgY

研究代表者

勢戸 祥介 (Seto, Yoshiyuki)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70270759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：牡蠣加工現場で安全・簡便で安価なノロウイルス浄化法を開発することが求められている。本課題において、実験水槽内でノロウイルス代替ネコカリシウイルスを牡蠣に取り込ませる手技を確立し、実験用浄化槽内で浄化中の牡蠣に抗ネコカリシウイルス卵黄抗体を取り込ませ中腸腺内のネコカリシウイルスの不活化をできることを確認した。ノロウイルス様中空粒子を用いた実験においても牡蠣中腸腺内に蓄積したノロウイルス様中空粒子と抗ノロウイルス卵黄抗体が結合していることが確認できたことから、浄化水槽に抗ノロウイルス卵黄抗体を添加することにより牡蠣中腸腺内ノロウイルスを不活化することが可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題において、生食用牡蠣の浄化水槽内に抗ノロウイルス卵黄抗体を添加することで、牡蠣中腸腺内に蓄積したノロウイルスを不活化の可能性が認められた。さらに、浄化水槽に抗ノロウイルス卵黄抗体で浄化中の牡蠣の中腸腺内のノロウイルスの不活化に合わせて、むき身作業中のノロウイルス汚染の予防に役立つと考えられた。本課題において、実験室水槽において牡蠣にウイルス等を取り込ませる手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：To develop a safe, simple, and inexpensive norovirus inactivation method for raw oyster. In this study, we established a technique for ingesting norovirus virus like particle and feline calicivirus into oysters in an experimental tank, and confirmed that we could inactivate feline calicivirus in the digestive gland by anti-feline calicivirus egg yolk antibodies into oysters. In the experiment using norovirus VLP, it was confirmed that the norovirus- VLP accumulated in the digestive gland were bound to the anti-norovirus egg yolk antibody. Therefore, it was considered possible to inactivate norovirus in the oyster the digestive gland by adding anti-norovirus egg yolk antibody to the purification facilities.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 養殖牡蠣 卵黄抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生食用牡蠣の加工場において高圧処理等様々なノロウイルス浄化の取り組みがなされているが効率良くノロウイルスを浄化する方法は開発されていない。そこで、牡蠣浄化中の浄化水槽に抗ノロウイルス卵黄抗体を添加し、浄化水槽中の牡蠣に卵黄抗体を取り込ませることにより、牡蠣中腸腺内のノロウイルスを不活化できると考えた。また、卵黄抗体は産卵鶏を免疫することで卵から精製回収できるため、安全かつ安価であると考えられた。

我々は、ノロウイルス genogroup II genotype 4 (GII.4) 様中空粒子(virus like particle:VLP)で免疫した産卵鶏の鶏卵から卵黄を回収し卵黄抗体を精製した。この抗ノロウイルス GII.4 卵黄抗体はノロウイルス GII 群の各種遺伝子型および GIV.1 型の VLP と結合し、抗ノロウイルス卵黄抗体と結合したノロウイルス VLP 複合体は HBGA 結合能を消失していたことから、抗ノロウイルス卵黄抗体がノロウイルスの標的細胞への感染を防御できる、すなわちノロウイルスを不活化できると考えている。さらに、ノロウイルス GI.5VLP で免疫した産卵鶏の卵から回収した卵黄抗体が GI 群の各遺伝子型 VLP と結合することを確認している。抗ノロウイルス卵黄抗体とノロウイルス VLP の抗原抗体反応はまた海水程度の食塩濃度(3%)においても正常に起こることを確認している。これらの結果から、抗ノロウイルス卵黄抗体を用いて浄化水槽中の牡蠣中腸腺内のノロウイルスを浄化できると考えた。

### 2. 研究の目的

毎年冬季に多発するノロウイルスによる食中毒事件の約 10~20%が二枚貝特に牡蠣の喫食に伴うものである。牡蠣の養殖・蓄養海域がノロウイルスに汚染されることにより海水とともに牡蠣体内に取り込まれたノロウイルスが中腸腺に蓄積し、この牡蠣を喫食したヒトがノロウイルス食中毒患者となる。生牡蠣加工現場においては、清浄海水や滅菌海水を用いた牡蠣の浄化が行われ細菌数等は低減しているがノロウイルスを浄化(不活化)するには至っていない。本課題では、牡蠣加工現場において安全・簡便で安価なノロウイルス浄化法を開発することを目的に、抗ノロウイルス卵黄抗体を用いた牡蠣中腸腺内に蓄積したノロウイルスの不活化方法について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 牡蠣の蓄養

市販の実験用マガキあるいは殻付き生牡蠣を購入し実験に供した。購入した牡蠣は人口海水(MARINE ART AF1)中で2~3日間呼吸活動の見られたもの(生存)判定し一群5個使用した。また、蓄養中は適宜餌料用プランクトンを水槽に添加した。蓄養中の牡蠣を小型円筒水槽(25L)に移し、ウイルス添加後18時間蓄養した後卵黄抗体添加小型水槽に牡蠣を移し22時間取り込ませた。

#### (2) 添加ウイルス

ノロウイルス VLP は、バキュロウイルス発現系を用いて発現し精製したのものを用いた。ノロウイルス代替ネコカリシウイルスはネコ腎細胞(CRFK)を用いて増殖させた後、培養液を高速遠心した上清を粗精製ウイルス液とした。ネコカリシウイルスのウイルスカ価は、CRFK細胞を用いて50%組織培養感染量(TCID50)を算出した。

#### (3) 中腸腺破碎液の作製

牡蠣から中腸腺を摘出し、中腸腺1個を滅菌3mmステンレスピースおよび2mの注射用滅菌水を含む5mLチューブに移し、細胞破碎機(Micro Smash、トミー精工、MS-100)で4,500 rpm、15秒間の破碎を2回実施した。中腸腺破碎液の遠心上清(10,000 x g, 10分)を0.45 μmの滅菌フィルターでろ過し、各種実験に供した。

#### (4) リアルタイムPCR法によるネコカリシウイルス遺伝子量の算出

中腸腺破碎液からRNA抽出キット(Qiamp viral RNA mini kit)を用いてRNAを抽出し、One step real time mixture (Thermo)を用いて、逆転写後TaqMan Probe法でリアルタイムPCRを行った。

#### (5) fJAMAを捕獲用抗原としたELISA

リコンビナントfJAMAを96穴Assay Plate (IWAKI)の各穴に吸着させ捕獲用抗原とした。中腸腺破碎液を加えて37℃で1時間反応させた後5回洗浄、抗ネコカリシウイルス兔血清を加え37℃で1時間反応後5回洗浄、HRPO標識抗IgG抗体を加え37℃で1時間反応後5回洗浄、発色基質を加えた後、各穴の吸光度を測定した。

#### (6) ノロウイルス検出用ELISA

ノロウイルス V L P を含む試料を 0.01M 炭酸バッファー (9.2) を用いて 10 倍段階希釈系列を作成し 96 穴 Assay Plate に吸着させ抗原とした。抗ノロウイルス GII.4 モノクローナル抗体あるいは卵黄抗体を加え 37 °C で 1 時間反応後 5 回洗浄、H R P O 標識抗マウス Ig G 抗体あるいは H R P O 標識抗ニワトリ Ig G 抗体を加え 37 °C で 1 時間反応後 5 回洗浄、発色基質を加えた後、各穴の吸光度を測定した。

#### (7) H B G A 結合試験

組織血液型抗原(hist-blood groupe antigen:HBGA)を含む唾液を吸着させた 96 穴 Assay Plate に V L P 溶液あるいは中腸腺破碎液を添加し 37 °C で 1 時間反応させた後 5 回洗浄、H R P O 標識抗マウス Ig G 抗体あるいは H R P O 標識抗ニワトリ Ig G 抗体を加え 37 °C で 1 時間反応後 5 回洗浄、発色基質を加えた後、各穴の吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 蓄養牡蠣におけるウイルスの取り込み

人口海水中では牡蠣の活発な海水濾過(摂餌活動)が認められず海水中のウイルス取り込みは検出限界以下であったが、餌料用プランクトンを人口海水に添加することにより摂餌活動が活発になるとともに、中腸腺内にウイルスの蓄積が認められるようになった。小型水槽に 10,000 個/ml のネコカリシウイルスおよび餌料用プランクトンを添加し 18 時間蓄養することで中腸腺内に 1,000 個程度/牡蠣のウイルスを取り込んでいることが、細胞培養法及びリアルタイム P C R 法で確認できた。さらに人口海水に卵黄抗体を 160mg/ml になるよう添加した小型水槽内で牡蠣を 22 時間浄化したところ、中腸腺 1 個当たり 100~1,000 個のウイルスがリアルタイム P C R 法で検出されたが、細胞培養法では検出限界以下(10 個未満)に減少していた。このことから、小型水槽内の卵黄抗体が海水とともに牡蠣の体内に取り込まれ、中腸腺に蓄積したウイルスと結合し、ウイルスを不活化していると考えられた。

ノロウイルス V L P を 10ng/ml ( $5.5 \times 10^8$  個相当) 添加した人口海水中で牡蠣を蓄養した後、浄化水槽に抗ノロウイルス Ig Y を最終 80  $\mu$ g/ml になるよう添加し牡蠣を浄化した。牡蠣中腸腺からは  $10^7 \sim 8$  個相当のノロウイルス V L P が検出されたが、浄化後の牡蠣中腸腺からは抗ノロウイルス GII.4 モノクローナル抗体では V L P は検出されなくなった、さらに中腸腺破碎液をノロウイルス検出用市販イムノクロマトキットに試料として添加したところ、卵黄抗体添加前では検出可能であったが、卵黄抗体添加後では検出できなくなった。さらに、中腸腺破碎液を用いて H B G A 結合試験を行ったところ、牡蠣中腸腺からはノロウイルス V L P と H B G A の結合が検出されたが、浄化後の牡蠣中腸腺からはいずれの抗体でも検出されなくなった、このことは中腸腺内で V L P と卵黄抗体の抗原抗体複合物が形成され免疫学的手法で検出されなくなりさらには結合した卵黄抗体が H B G A との結合を阻害していると考えられた。

卵黄抗体の添加により牡蠣中腸腺内で、ウイルスと卵黄抗体の抗原抗体複合物が形成されていることを確認するために、上記ネコカリシウイルスと卵黄抗体を取り込ませた中腸腺破碎液スライドグラスに固定し、F I T C 標識抗ニワトリ Ig G 抗体を用いて蛍光顕微鏡下で抗原抗体複合物の検出を試みたが検出するに至らなかった。

### (2) 牡蠣加工現場での卵黄抗体使用の可能性について

牡蠣養殖業者あるいは稚牡蠣販売業者にこれまで得られた成果を開示し意見を求めた。いずれの業者も卵黄抗体によるノロウイルス不活化の意義は理解を示したものの、卵黄抗体添加にかかるコスト増に懸念を示した。今回精製卵黄抗体を使用したか、今後精製前卵黄を用いて同様の実験を行いコスト削減を達成し、牡蠣養殖産業の発展に役立てたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 田坂寛之・国武広一郎・西谷巧太・盛田隆行・勢戸祥介	4. 巻 36
2. 論文標題 ネコカリシウイルスに対する抗ウイルス活性を示す食品添加物および食品素材の探索	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本食品微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 100-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5803/jsfm.36.100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西谷巧太、国武広一郎、盛田隆行、勢戸祥介
2. 発表標題 ブドウ種子抽出物がノロウイルスに及ぼす影響
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷巧太、宮崎祥徳、盛田隆行、勢戸祥介
2. 発表標題 ノロウイルス中空様粒子と組織血液型抗原の結合を阻害する抗ノロウイルス成分の探索
3. 学会等名 日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------