

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03872

研究課題名(和文)加熱変性リゾチームを用いた水系感染症ウイルスの新規不活化法の開発

研究課題名(英文) Development of new inactivation method for waterborne virus using heat-denatured lysozyme

研究代表者

高橋 肇 (Takahashi, Hajime)

東京海洋大学・学術研究院・准教授

研究者番号：40413116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：先の研究において、申請者らは加熱変性したリゾチーム(DL)に抗ノロウイルス効果があることを発見した。リゾチームは細菌に作用する溶菌酵素であるが、加熱変性することによりペプチドとしての作用を持つようになり、これがウイルスを不活化すると考えている。本研究では、DLによるノロウイルス不活化機構とその応用性について研究を行い、加熱変性時のpHとウイルスの不活化能との関係を明らかにし、ペプチド中の任意のアミノ酸を置換することで効果が変化することも見出した。また、塩溶液中で凝集するという特徴がDLの応用の妨げとなっていたが、シクロデキストリンを利用することで溶解性を改善し、幅広く応用が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではペプチドとして働くリゾチームの性質に着目し、リゾチームの加熱条件とノロウイルスに対する不活化効果の関係、不活化効果が高くなる変性条件、また、製剤化を目指し加熱変性リゾチームの溶解性の向上など様々な項目について研究を行ってきた。

結果、様々な水系感染症ウイルスへその用途を示すことができ、食品製造の現場で使用可能な新たなウイルス不活化剤の開発へとつなげることができた。さらに、養殖や畜養、食品原料の洗浄など新たな応用法となりうることも示した。また、活性部位を同定し、効果増強が可能な方法を見出したことにより、安定的にペプチド製剤として生産できる可能性も示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, we found that heat-denatured lysozyme (DL) had an anti-norovirus effect. Lysozyme is a lytic enzyme that acts on bacteria. We believe that heat denaturation of lysozyme causes it to act as a peptide, which inactivates the virus. In this study, we investigated the inactivation mechanism of norovirus by DL and its applicability. We found that the pH during heat denaturation was related to the virus inactivating ability, and also found that the effect was changed by substituting any amino acid. Moreover, although the phenomenon of aggregation in salt solution hindered the applicability of DL, the solubility was improved by using cyclodextrin.

研究分野：食品微生物 食品衛生学

キーワード：ノロウイルス リゾチーム 不活化法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水系感染症ウイルスは、飲料水などや水産物を介して下痢や腹痛といった感染症を引き起こすウイルスであり、ノロウイルスや肝炎ウイルス、ロタウイルスなど複数のウイルスが知られている。なかでも、ノロウイルスは、日本において冬季に感染が多く報告されており、社会的問題となっている。

ヒトノロウイルスは、カリシウイルス科の非エンベロープウイルスであり、非細菌性胃腸炎の原因としてはトップクラスの病原体である。本ウイルスに汚染された生もしくは加熱不十分な食品の喫食、感染者の糞便や嘔吐物への接触、または空気中に飛び散ったウイルスを吸い込むことによる飛沫感染により感染する。

ノロウイルス食中毒の主な原因としては、カキなどの二枚貝が多く報告されてきたが、これに加えて、近年ではサラダや総菜などの非加熱喫食食品を原因食品とする食中毒事例も多く報告されている。日本で報告されているウイルス性食中毒のほとんどは、ノロウイルスであり、細菌性食中毒を含む全ての微生物による食中毒事例中、患者数においてはノロウイルスがトップである。

本ウイルスは環境耐性が高いことが報告されており、申請者らの研究では、食品や食品残さが付着した器具表面上で長期にわたり生残することを明らかにしている (**PLoS ONE, 6(8), e21951**)。そのため、ノロウイルスの感染拡大を防止するためには、確実にノロウイルスを死滅させることができる不活化剤が必要である。

現在、食品製造現場で多く用いられているエタノールは、ノロウイルスの不活化には効果が小さいとされており、ノロウイルスの不活化に最も効果的とされている次亜塩素酸ナトリウムは、食品成分の影響により効果が低減することが知られている。また、次亜塩素酸ナトリウムは、薬剤の特性、特に独特のにおいにより、使用できる場面が限られる。そのため、これらに代わる効果の高い不活化剤の開発が急務である。

2. 研究の目的

これまでの研究において、我々は加熱変性したリゾチームに抗ノロウイルス効果があることを発見した。リゾチームはグラム陽性菌の細胞壁を構成する多糖類(ペプチドグリカン)を加水分解する酵素である。リゾチームは主に卵白から抽出、精製され、食品添加物や医薬品などに用いられている。食品添加物としては日持ち向上剤として、すでに多くの加工品に使用されている。

近年になり、リゾチームを加熱処理することで、たんぱく質の立体構造が変化し、その抗菌スペクトルがグラム陰性菌などにも広がることが報告されている。これは、加熱により酵素としての働きは失活するものの、含有する特定のアミノ酸が影響し、抗菌ペプチドの働きを持つようになるためであると推測されている。我々はこのペプチドとして働くリゾチームの性質に着目し、これをウイルスの不活化にまでその応用範囲を拡大し、リゾチームの加熱条件とノロウイルスに対する不活化効果の関係、不活化効果が高くなる変性条件など様々な項目について解析を行ってきた。

現在までに、加熱変性リゾチームのノロウイルスに対する不活化効果を証明し、企業との連携により、この技術を用いたエタノール含有スプレー製剤やウェットティッシュを製品として販売している。しかし、学術的には、なぜノロウイルスの不活化効果を有するようになるのか?その活性部位はどこなのか?など明らかになっていない部分が多い。また、ウイルスがどのように不活化状態(死)となっているかについても判然としていない。このウイルスに対する不活化のメカニズムが明らかとなり、その活性部位を抽出することに成功すれば、様々な水系感染症ウイルスへその用途を広げることができ、食品製造の現場で使用可能な新たな不活化剤の開発につながるとともに、養殖や畜養、食品原料の洗浄などへの応用も可能になる。

また、活性部位を遺伝子組み換え技術等により安価に、安定的に生産することが可能となれば、ペプチド製剤としてのウイルス感染症の治療薬への可能性も見えてくると考えている。そのため、本研究では、加熱変性リゾチームにより不活化可能なウイルスを精査するとともに、その作用メカニズムを明らかにし、さらなる応用性を付加するため、畜養、養殖場などでも使用することを視野に入れつつ、溶解性、薬剤としての応用性に関する研究を行った。

3. 研究の方法

1) 各種水系感染症ウイルスに対する変性リゾチームの不活化効果の検証

ノロウイルスをはじめ、A型肝炎ウイルス、ロタウイルスなど各種水系感染症ウイルスを収集し、これらに加熱変性リゾチームを直接曝露し、その不活化効果を確認した。特に、新型のノロウイルス GII 17 については重点的に試験を行い、加熱リゾチームがどのタイプのウイルスに作用するのか、作用機序にウイルスタイプとの関連性があるのかを解析した。なお、ノロウイルス以外のウイルスにおいては、遺伝子手法による定量法が確立されていないものもあるため、先に死滅していないウイルスと死滅したウイルスの区別ができる定量手法を確立し実験を進めた。

2) 変性リゾチームの活性ドメインの決定およびウイルス表面との相互作用の解析

加熱変性リゾチームのウイルス不活化作用を明らかにするため、VLP と呼ばれる疑似ウイルス粒子を作成し、加熱変性リゾチームに暴露、両者の結合や VLP の電子顕微鏡観察によりその作用機構を解析した。ノロウイルスについては、キャプシドプロテインをバキュロウイルスを用いて人

工的に発現させることで、中身の無い疑似ウイルス粒子(VLP)を作成する技術が確立されている。この粒子の示す抗原性は本物のノロウイルスと変わらないため、これを用いて解析を進めた。この解析と同時に、リゾチームの配列を細かな断片に分け、それぞれの断片化したペプチドに対するウイルスや細菌の不活化、死滅挙動を解析した。先の研究ではリゾチームの大きく3つに分けたドメインの最初1つにマウスノロウイルスの不活化効果があることを掴んでおり、その部分のどの残基が有効なのかを把握するため、一部のアミノ酸を置換させ、配列と不活化能の関連性について考察を行った。

3) 抗ウイルス製剤としての応用性の拡大に関する検討

市場において水産物は氷漬け等で販売されるが、漬け水に加熱変性リゾチーム製剤を添加した場合の不活化能、水産物以外の食品、野菜やベリーなどの洗浄剤として本剤が有効であるか評価を行った。加熱変性リゾチームは塩により凝集を起こし、不活化効果が低下することが報告されており、水産物を取り扱うへの応用の妨げとなっていた。そこで、加熱変性リゾチームが塩存在中においても凝集しにくい条件を確立し、その条件におけるノロウイルス不活化効果について検証した。

4. 研究成果

1) 各種水系感染症ウイルスに対する変性リゾチームの不活化効果の検証

本研究では、ヒトノロウイルス、A型肝炎ウイルスを重点的に調査することとし、はじめにヒトノロウイルスの不活化をリアルタイムPCRによって解析する手法を検討した。先の研究でも使用していた核酸結合試薬であるPMAを前処理として使用し、不活化ウイルスの残存RNAの除去法を先に検討した後、加熱変性リゾチームによる不活化能力を評価した。

ヒトノロウイルスを用いた実験では、検査センター等よりノロウイルス患者便を入手し、加熱変性リゾチームの処理前後におけるウイルス数をリアルタイムPCRにより測定することで効果の検証を行い、複数の患者便中に含まれる異なる遺伝型のノロウイルスを不活化できることを明らかにした。本内容に関しては、国内外の学会において発表を行った。

A型肝炎ウイルスを用いた実験では、ウイルスと加熱変性リゾチームの直接曝露による不活化効果の検証と合わせて、ベリー類に付着させたA型肝炎ウイルスの不活化効果も確認した。その結果、加熱変性リゾチームは複数株のA型肝炎ウイルスに対し、不活化能を有することを明らかにした。本内容に関してはInt. J. Food Microbiolに投稿し、掲載された。

2) 変性リゾチームの活性ドメインの決定およびウイルス表面との相互作用の解析

VLPと呼ばれるヒトノロウイルス疑似ウイルス粒子を作成し、加熱変性リゾチームと任意の時間曝露、透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、曝露に伴い、VLPの粒子径が増大するけいこが認められた。このことから、加熱変性リゾチームはヒトノロウイルス粒子に対しても作用し、キャプシドプロテインに影響を与えることで、不活化作用を有することが推察された。

次に、リゾチーム溶液のpHとウイルス不活化効果との関係を検証するため、pHを4.5から8.5に調整した卵白リゾチーム溶液を用い、MNV-1に対する不活化効果を確認したところ、不活化効果は溶液pHの上昇に伴って増大し、加熱変性リゾチームの表面疎水度は、溶液のpHが高くなるにつれて上昇することが明らかになった。また、リゾチーム配列におけるウイルス不活化領域を探索するために、断片化試薬を用いてリゾチームを断片化し、その加熱変性体をMNV-1に曝露した。その結果、V8プロテアーゼあるいはリシルエンドペプチダーゼで断片化することで、不活化効果が著しく減少することが明らかとなった。これらのことから、リゾチームから加熱変性リゾチームとしてウイルス不活化能を持つように変性させるには初期のpHが重要であることが明らかになり、また、構成するアミノ酸配列のうち特定の配列が作用していることが明らかになった。

さらに、リゾチームの前半部分の配列に任意の変異を加え、加熱変性した際のMNV-1不活化効果を検証したところ、電荷または疎水性に関わるアミノ酸を置換するとMNV-1に対する不活化効果が失われた。以上より、加熱変性リゾチームによるウイルス不活化効果には、加熱によるリゾチームの立体構造のほぐれに伴う表面疎水性の上昇と表面電荷が関与していることが示唆された。なお、この内容に関しては食品衛生学会にて発表を行った。

3) 抗ウイルス製剤としての応用性の拡大に関する検討

はじめに、加熱変性リゾチームの凝集が抑制される条件について検証した。凝集の抑制には過去の研究より、凝集を抑制する効果があると報告されている β -シクロデキストリン(β -CD)を使用した。加熱変性リゾチームに β -CDを任意の濃度にて添加し、これを人工海水と等量混和し、凝集を確認した。結果として、 β -CDを240mM以上添加することで人工海水中での加熱変性リゾチームの凝集を完全に抑制できることが明らかとなった。次に、塩存在下における β -CD添加加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化効果を検証した。加熱変性リゾチームに β -CDを任意の濃度添加したものを用意し、代替ノロウイルスを含む海水と等量で1分間曝露した後、プラー

クアッセイにより感染価を求めた。結果として、 β -CD 添加加熱変性リゾチームと曝露したした場合、代替ノロウイルスは検出限界以下まで減少することが明らかとなり、畜養や洗浄等の現場で幅広く応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Michiko Takahashi, Yuka Yasuda, Hajime Takahashi, Akira Takeuchi, Takashi Kuda, Bon Kimura	4. 巻 59
2. 論文標題 Inactivating effect of heat-denatured lysozyme on murine norovirus in bread fillings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Food Hygiene and Safety	6. 最初と最後の頁 89-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Michiko, Okakura Yumiko, Takahashi Hajime, Imamura Minami, Takeuchi Akira, Shidara Hiroyuki, Kuda Takashi, Kimura Bon	4. 巻 266
2. 論文標題 Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 104 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 1件）

1. 発表者名 高橋迪子、中條弥生、岡倉優美子、市川将弘、仲沢萌美、高橋肇、久田孝、木村凡
2. 発表標題 加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化機構に関する基礎的研究
3. 学会等名 第114回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satomi Kanagawa, Hajime Takahashi, Chihiro Ohshima, Michiko Takahashi, Kiyofumi Ohkusu, Moemi Nakazawa, Akira Takeuchi, Hiroyuki Shidara, Masaaki Kunou, Takashi Kuda, Bon Kimura
2. 発表標題 Inactivation of human norovirus using heat-denatured lysozyme
3. 学会等名 European Federation of Food Science and Technology 31st International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----