

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22686049

研究課題名(和文)腸内細菌由来糖鎖を活用したノロウイルスの水環境中動態解明に関する研究

研究課題名(英文)Elucidation of the fate of noroviruses in water environment by means of polysaccharides from enteric bacteria

研究代表者

佐野 大輔 (SANO, DAISUKE)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80550368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円、(間接経費) 5,940,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではノロウイルス粒子を特異的に捕捉する組織血液型決定抗原(histo-blood group antigen: HBGA)類似糖鎖を保持するヒト腸内細菌を分離・同定することを試みた。その結果、HBGA様物質を保持する腸内細菌Enterobacter sp. SENG-6を単離することに成功した。さらに、この腸内細菌は細胞外物質としてA型様抗原を分泌していることを確認し、このA型様抗原を介してノロウイルス粒子を特異的に捕捉可能であることを確認した。以上の結果は、HBGA陽性細菌がノロウイルス粒子を捕捉することで、その生活環に大きな影響を与えていることを示す重要な成果であると言える。

研究成果の概要(英文)：Human norovirus is one of the leading causes of infectious gastroenteritis worldwide. Infections of human noroviruses are not controllable, and there are no effective prevention measures. In this study, I hypothesized that there are some enteric bacteria which can specifically capture norovirus particles through HBGA-like substances. As a result, I successfully isolated an enteric bacterial strain, Enterobacter sp. SENG-6, as an HBGA-positive bacteria. The binding between this strain and norovirus-like particles (NoVLPs) were confirmed by transmission electron microscopy (TEM). I also confirmed that Enterobacter sp. SENG-6 is excreting A-like substances as extracellular polymeric substances. These results revealed that HBGA-positive bacteria can affect the fate of human noroviruses by capturing via HBGA-like substances.

研究分野：衛生環境工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：ノロウイルス 腸内細菌 水環境中動態 吸着

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスによる感染性胃腸炎の流行を防ぐためには、ノロウイルスの生活環を解明し、人間社会における存在分布を把握した上で感染経路を遮断することが有効であると考えられる。しかしながら、環境中でのノロウイルスの存在形態およびその挙動は未だ十分には解明されていないのが現状である。本研究では、環境中におけるノロウイルスの動態に大きな影響を与える因子として、組織血液型決定抗原 (histo-blood group antigen: HBGA) 様物質を保持するヒト腸内細菌に着目した。HBGA は、ヒトノロウイルスが小腸上皮細胞に感染する際のレセプターとして知られているが、その一方である種のヒト腸内細菌が HBGA 様物質を細胞外に保持していることがこれまでの研究により明らかとなっている。この HBGA 様物質陽性菌体とヒトノロウイルス粒子の吸着親和性が十分に高いものであれば、ウイルス粒子が感染性胃腸炎患者の体外に排出された後、一定期間以上菌体に吸着した状態で環境中に存在することが期待されることから、この HBGA 様物質陽性ヒト腸内細菌の存在はノロウイルスの生活環を決定する重要な要因となりうる。

## 2. 研究の目的

本研究では、HBGA 様物質を保持するヒト腸内細菌を単離し、その腸内細菌が HBGA 用物質を介してヒトノロウイルス粒子を特異的に捕捉することが可能であることを証明し、ノロウイルスの生活環に大きな影響を与えうることを確認することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 腸内細菌のスクリーニング及び培養

血液型決定抗原類似多糖を有する腸内細菌を探索するために、抗原抗体反応を利用したスクリーニングを行った。まず、抗 HBGA 抗体を固定化した 96 穴プレートに、腸内細菌のソースとして健常者由来糞便懸濁液を注入した。その後、健常者由来糞便懸濁液を捨て、PBS で 3 回洗浄した後、腸内細菌用液体培地を注入して 37°C で微好気培養を行うことで増菌した。

### HBGA 陽性腸内細菌の同定

菌の増殖を確認後、寒天培地上で画線培養を行うことでコロニーを作成し、各コロニーをピックアップして液体培地で増菌した。得られた菌体を血液型検査キットに供することで、その細菌が HBGA 様物質を有することを確認した。HBGA 陽性腸内細菌が得られた場合には、16s rRNA 遺伝子配列解析により腸内細菌の同定を行った。

### HBGA 陽性菌体へのノロウイルス吸着実験

HBGA 陽性菌体へのノロウイルス粒子の吸着を確認するため、ノロウイルス様粒子と菌体を混合し、4°C で 1 時間攪拌後、電子顕微鏡観察を行った。

### HBGA 様物質発現部位の確認

HBGA 様物質の発現部位を確認するために、HBGA 陽性細菌の凝集体を固定して超薄切片を作成し、免疫電子顕微鏡法による HBGA 様物質の検出を行った。

### 細胞外物質の HBGA 活性確認

PBS (pH6.5) で総タンパク質濃度 20 $\mu$ g/mL に調整した NoVLP GII.3 および GII.6 溶液 40 $\mu$ L を ELISA 用プレートに固定化し、5% BSA/PBS でブロッキングを行った。その後、EPS 試料、抗 A マウス IgM 抗体、及び HRP 標識抗マウス IgM ヤギ抗体を 40 $\mu$ L ずつ順に作用させた。各ステップの間では PBS でウェルを 2~4 回洗浄した。OPD 発色基質溶液を作用させ、2M 硫酸で反応を止めた後、プレートリーダー (ARVO MX) を用いて波長 490nm、0.1 秒での吸光度を測定した。

### HBGA 陽性細胞外物質の分子量推定

ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた限外ろ過 (MWCO: 300kDa) を行うことで抽出 EPS の分画を行い、ろ液中に含まれる抽出 EPS が保持する A 型抗原量を定量した。

### NoVLP と細胞外物質の相互作用力評価

総タンパク質濃度 20 $\mu$ g/mL に調整した NoVLP GII.6 溶液 50 $\mu$ L を水晶発振子に固定化し、0.1% BSA/PBS でブロッキングを行った。Single-Q 0500 の反応槽に水晶発振子を取り付け、PBS で満たし、装置内温度 37°C、攪拌速度 300rpm の条件で運転を開始した。振動数が安定した後、既知の濃度のサンプルを一定量ずつ添加し、振動数変化を記録した。実験データを元に吸着等温線を作成し、吸着平衡定数 ( $K_a$  [ $M^{-1}$ ]) を算出した。

#### 4. 研究成果

##### HBGA 陽性腸内細菌の単離

健常者糞便より、HBGA 活性が最も高い菌株として *Enterobacter* sp. SENG-6 (*E. cloacae* ATCC 13047<sup>T</sup> に近縁) を単離することに成功した。

##### 菌体からの細胞外物質抽出

HBGA 陽性細菌として *Enterobacter* sp. SENG-6 を、SENG-6 より HBGA 活性の低い株として *E. coli* K12 を、HBGA 活性を示さない株として *S. epidermidis* ATCC 35984 をそれぞれ培養し、EPS を抽出した。EPS の抽出効率 は TOC により評価した。

抽出 EPS の TOC 値を測定したところ、*Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS は  $0.239 \pm 0.056$  mg/mL、*E. coli* K12 由来 EPS は  $0.155 \pm 0.008$  mg/mL、*S. epidermidis* ATCC 35984 由来 EPS は  $0.147 \pm 0.03$  mg/mL であった。

##### 抽出細胞外物質の HBGA 活性確認

*Enterobacter* sp. SENG-6 および *E. coli* K12 由来 EPS 両方の測定において、NoVLP GII.3 および GII.6 と吸着した A 抗原様物質の存在を示すシグナルが確認された。よって、これらのヒト腸内細菌は EPS 中に A 抗原様物質を有しており、ノロウイルス粒子の吸着サイトとなりうることが示唆された。

##### 抽出細胞外物質の分子量推定

限外ろ過 (MWCO:300kDa) 後、*Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS ではろ液中の A 抗原様物質の存在を示すシグナルが有意に低下した。また、SENG-6 由来 EPS は、限外ろ過後に TOC 値が 50% 減少した。これらの結果から、SENG-6 の EPS には分子量 300kDa 以上の成分にノロウイルスとの吸着に関わりうる A 抗原様物質が多く含まれると考えられた。

##### NoVLP と細胞外物質の相互作用力評価

EPS は粘着性の高い物質であるため、全ての菌由来の EPS においてセンサーに対する非特異的な沈着が生じ振動数が減少したが、*Enterobacter* sp. SENG-6 の場合には、NoVLP 存在下で振動数の有意な減少が見られた。よって、この有意に減少した振動数分の EPS 吸着量 ( $\Delta\Delta F = [\text{NoVLP 固定化センサーを用いた場合の } \Delta F] - [\text{NoVLP 未固定センサーを用いた場合の } \Delta F]$ ) が NoVLP との特異的吸着分に相

当すると考え、Langmuir モデルを用いて吸着能解析を行った (図 1 及び 2)。解析の結果、NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS の間の吸着平衡定数  $K_a$  は  $3.1 \times 10^6 [\text{M}^{-1}]$  以上と推定された。この値は、SENG-6 由来 EPS の分子量を 300kDa 以上として算出したものである。一般的に、抗原抗体反応における吸着平衡定数値は  $10^6 - 10^9$  であることが知られているため、NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS 間の吸着は、一般的な抗原抗体相互作用と同程度の親和性を有すると言える。

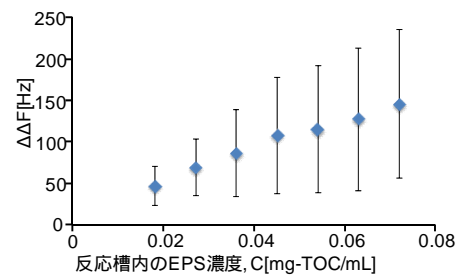


図 1 . NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS との相互作用を示す吸着等温線 .

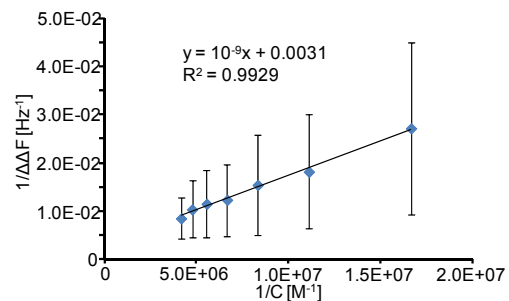


図 2 . Langmuir プロット .

以上に示した結果より、HBGA 陽性細菌が確かに存在し、HBGA を介した特異的相互作用によりノロウイルスを捕捉することが可能であることが示されたことから、当初計画が十分に達成されたものと言える。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

(1) Takayuki Miura, Daisuke Sano, Atsushi Suenaga, Takeshi Yoshimura, Miyu Fuzawa, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi

Okabe. Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. *Journal of Virology*, 2013, 87(17), 9441-9451.

(2) 佐野大輔 .生活用水に潜むウイルス対策 .  
バムサジャーナル、2013、25(4)、8-13.

(3) 三浦尚之、佐野大輔 . 水環境中の病原ウイルス分析手法 .水環境学会誌、2013、36(5)、151-155.

(4) 佐野大輔 . 感染性胃腸炎と上下水道の衛生工学的管理 . 化学療法の領域、2011、4、82-88.

(5) 佐野大輔 . 水系管理によるノロウイルス感染症の制御の可能性 .感染対策 ICT ジャーナル、2010、5(4) 、421-426.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Daisuke Sano. Norovirus-binding enteric bacteria: significance in the environmental dissemination of gastroenteritis viruses. The 2nd Global Leadership Initiative Special Workshop on Water Virology. Kusatsu, Gunma, Japan. January 21, 2014.

(2) Takeshi Yoshimura, Daisuke Sano, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Bacterial extracellular polymeric substances as the specific carrier for human norovirus particles. WaterMicro2013. Florianopolis island, Santa Catarina, Brazil. September 15-20, 2013.

(3) Mohan Amarasiri, Daisuke Sano, Takeshi Yoshimura, So Ishizaki, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Microfiltration of human noroviruses: Effects of the presence of human enteric bacteria on virus rejection. WET2013. Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan. Jun. 15-16, 2013.

(4) Daisuke Sano, Takayuki Miura, Takeshi Yoshimura, Miyu Fuzawa, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. A hidden relationship between norovirus and enteric bacteria: norovirus exploits histo-blood group antigen-like substances on bacterial cells for its better survival in nature? The 47th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan

Cooperative Medical Science Program. Mandarin Oriental Singapore, Singapore. Mar. 12-13, 2013.

(5) Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Microbiologically safe water management in membrane-based wastewater reuse. The 1st symposium on innovation of water monitoring system with rapid, highly precise and exhaustive pathogen detection technologies. Sendai, Miyagi, Japan. October 20, 2012.

(6) Takeshi Yoshimura, Daisuke Sano, Atsushi Suenaga, Takayuki Miura and Satoshi Okabe. Bacterial extracellular polymeric substances as a novel adsorbent for human norovirus. Japan and China Joint Symposium, Sustainable Sanitation and Environment and Human Health Risk Management. Sapporo, Hokkaido, Japan. October 15, 2012.

(7) Takayuki Miura, Daisuke Sano, Atsushi Suenaga, Takeshi Yoshimura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Enteric bacteria bearing histo-blood group antigen-like extracellular polymeric substances as environmental vehicles for human noroviruses. 3rd Food and Environmental Virology Conference. Lisbon, Portugal. October 7-10, 2012.

(8) Daisuke Sano. Human norovirus-binding enteric bacteria bearing histo-blood group antigen-like extracellular polymeric substances. The 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Beppu, Oita, Japan. June 19, 2012.

(9) Takayuki Miura, Atsuhiko Tsutsumi, Daisuke Sano and Satoshi Okabe. Fate of enteric viruses in a membrane bioreactor. The Young Researchers and Students Symposium of NSFC-JST Joint Research Program. Xi'an, China. March 4, 2011.

(10) Daisuke Sano, Atsushi Suenaga, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi and Satoshi Okabe. Human enteric bacteria that capture norovirus particles with a specific interaction through histo-blood group antigen-like moiety. The 2nd COST 929 Symposium, Istanbul, Turkey. Oct. 7-9, 2010.

(11) Daisuke Sano. Norovirus-binding bacteria: significance in the environmental dissemination of gastroenteritis viruses. The 44th Joint Working

Conference on Viral Diseases, US-Japan  
Cooperative Medical Science Program, Hokkaido  
University, Sapporo, Japan. June 28-30, 2010.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/water/index.html>

新聞報道

毎日新聞全国版(6月29日朝刊)

「ノロウイルス捕捉 腸内細菌を確認」

読売新聞北海道版(6月29日朝刊)

「ノロ捕まえる腸内細菌」

北海道新聞(7月2日朝刊)

「ノロ吸着する腸内細菌 北大グループ特定 治療薬開発に道」

北海道医療新聞(7月19日)

「ノロウイルス吸着腸内細菌を同定-感染予防開発へ期待 北大(工)佐野准教授ら」

TV ニュース

NHK・おはよう北海道・土曜プラス  
(6月29日)

NET ニュース

NHK NEWS WEB(6月29日)

ノロウイルスの性質解明 薬の開発に

<http://archive.today/QdyIk>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 大輔 (SANO DAISUKE)

北海道大学大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 80550368