

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 10 日現在

機関番号：27103

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23880026

研究課題名（和文） カキ培養細胞を用いたノロウイルス濃縮法の開発

研究課題名（英文） Investigating the establishment of cell culture from oyster hepatopancreas tissues for the concentration of norovirus

研究代表者

小林 弘司（KOBAYASHI HIROSHI）

福岡女子大学・国際文理学部・講師

研究者番号：00610255

研究成果の概要（和文）：

ノロウイルスを濃縮するための手段として、カキ中腸線細胞培養の培養条件を検討した。その結果、LDF 培地（50% D-MEM, 35% F-12, 15% L-15）に、10% FBS, 10 µg/ml インシュリン, 10 nM 亜セレン酸ナトリウム, 5.5 µg/ml トランスフェリン, 2 mM GlutaMax, 0.1 x MEM 非必須アミノ酸を添加することにより、中腸線由来の細胞は培養容器に接着し増殖することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

Cell culture from oyster hepatopancreas tissue was examined for the development of concentration method of norovirus. The cells derived from oyster hepatopancreas tissue survived and grew well in LDF medium (50%D-MEM, 35% F-12, 15% L-15) supplemented with 10% FBS, 10 µg/ml insulin, 10 nM sodium selenite, 5.5 µg/ml Transferrin, 2 mM GlutaMax, 0.1x MEM-non essential amino acid, and 50 ng/ml FGF or EGF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：応用微生物学

キーワード：ノロウイルス, カキ細胞培養, 濃縮

## 1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスを原因物質とする食中毒は近年急増している。日本においてノロウイルスによる食中毒は、平成 21 年の食中毒発

生状況をみると、事件数では総事件数 773 件のうち 194 件、患者数では総患者数 14416 名のうち 7233 名と、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ (276 件, 1692 名) に次いで発生件数が多く、患者数では第 1 位となっ

ている。また、食中毒以外にも、病院や高齢者施設などで、ヒトを介した集団感染の報告が増加しており、その感染力の強さ 臨床症状の激しさから、社会的な問題となっている。

ノロウイルスが原因と疑われる食中毒が発生した場合、感染経路ならびに原因食品の特定、被害拡大防止のためには、迅速確実なノロウイルスの検出が必要である。ウイルスの検査は動物細胞を用いた増殖試験に行われるが、ヒトに感染するノロウイルスに関しては様々な試みが行われているに関わらず、培養に成功した例はない (Lay et al., Virology 2010)。

このため、ノロウイルス検査は電子顕微鏡による検査が主流であったが、近年は多数のノロウイルス臨床株のゲノムの全塩基配列が決定され、詳細に解析されたことにより、RT-PCR 法による検査が主流となっている。しかし、現在はノロウイルスの遺伝子型 (GI, GII) に対応し、それぞれ異なるプライマーセットを用いて別々に検査を行なう必要があり、操作が煩雑である。また、原因食品に含まれるウイルス粒子数が少ないことや食品由来の反応阻害物質などの影響から、食品のノロウイルス検査は困難で、原因食品を特定出来る事例が少ない。

## 2. 研究の目的

カキなど二枚貝のノロウイルスによる汚染は、濾過摂食性である二枚貝が 1 時間に 10 L もの海水を濾過・補食する際に、海水中に漂っていたノロウイルスを消化器官である中腸線に濃縮することにより起こると考えられているが、その濃縮機構は明らかになっていない。

カキなど二枚貝が海水をろ過する際、粒子径  $1 \mu\text{m}$  以下の物質の保持率は 10%以下であることが報告されており (Ward and Kacha, *Marine Environ Res* 2009), 粒子径 30-35 nm のノロウイルスの保持率はさらに低いと考えられる。このため、カキなど二枚貝の中腸線にはノロウイルスと親和性の高い細胞があるのではないかと考えられた。カキの各組織の細胞培養を行い培養細胞とノロウイルスとの親和性を評価すれば、ノロウイルスと親和性の高い細胞あるいはタンパク質のスクリーニングが可能であり、ノロウイルス濃縮法の開発に大きく貢献すると期待される。

本研究は、ノロウイルス濃縮法について、ノロウイルスを体内で濃縮すると考えられ

ているカキ (*Crassostrea gigas*) の中腸線由来の培養細胞株の樹立を試み、さらにその細胞を用いたノロウイルス濃縮法を開発することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 1) カキ飼育法の検討

試料として用いたカキは、福岡県唐泊漁業組合の販売所から購入した。試料となるカキは 11 月~3 月までしか入手できないため、1 年を通して試料が入手できるよう、実験室内での飼育方法について、海水の種類、エサの種類についての検討を行なった。

### 2) カキ初代培養法の検討

カキから中腸線を取り出し初代培養を試みた。培地は、Dulbecco-modified medium (D-MEM) 培地, L-15 培地および Ham's F-12 培地を基礎培地として、その混合割合について検討行なった。さらに、FBS 濃度や増殖因子についての検討を行なった。

### 3) カキ細胞培養株の樹立

初代培養の条件で増殖した細胞は、何代までの継代培養が可能であるか検討した。

## 4. 研究成果

### 1) カキ飼育法の検討

研究室でのカキの飼育用海水について、濾過海水および人工海水について検討を行なった結果、福岡県東区香椎浜から採取し、定性濾紙 No. 2 を用いて濾過した濾過海水を用いた場合、カキは購入後 3 週間で死滅した。一方、リーフクリスタル (インスタントオーシャン社) を  $20^{\circ}\text{C}$  における比重が 1.025 になるように調製し、さらに、0.5 ml/L テトラアセーフ (重金属キレート剤, テトラ社) および 0.25 ml/L テトラパーフェクトウォーター (カルキ抜き剤, テトラ社) を添加した人工海水では、飼育したカキは 3 週間後もすべて生存していた。

また、エサとしては植物性プランクトンであるナノクロロプシス, テトラセルミスおよびイソクリシスを含むフィトプレックス (ケントマリン社) を 50 L 水槽に対して、2 日

間に 5 ml ずつ与えることにより、市販のカキは 6 ヶ月以上生存し、その間の個体の重量の現象も 5%程度であることを確認した。

## 2) カキ初代培養法の検討

カキの初代培養の基礎培地として LDF [50% D-MEM, 35% L-15, 15% F-12 (life technology 社)] 培地を決定した。LDF 培地に、10% FBS (HyClone 社), 10 µg/ml インシュリン (life technology 社), 10 nm 亜セレン酸ナトリウム (life technology 社), 5.5 µg/ml トランスフェリン, 2 mM GlutaMax (life technology 社), 0.1 x 非必須アミノ酸 (life technology 社) および 50 ng/ml Fibroblast growth factors: FGF (和光純薬) もしくは Epidermal Growth Factor: EGF (和光純薬) を添加することにより中腸線由来の細胞は、細胞培養器 [T-25 フラスコ, 6-well plate, 24-well plate (nunc 社)] に接着し、増殖することを確認した。特に、EGF および FGF の添加は細胞の安定性に重要であった。

その後の検討により、細胞培養器としては、コラーゲン I をコーティングした容器 (Iwaki 社) を用いることにより、接着率および生残率も上昇した。

また、カキ中腸線にはノロウイルス以外にも大腸菌やビブリオ属など種々の微生物が存在するため、初代培養中に培地に添加する抗生物質の濃度は、通常の細胞培養で使われる濃度 [ペニシリン 1,000 unit/ml, ストレプトマイシン 1,000 µg/ml, アンフォテリシン B 0.25 µg/ml (ナカライテスク)] の 10 倍量を添加することで、培養開始後のコンタミネーションを最低限にすることが可能であった。

また、本細胞は 18°C で培養するため、細胞がコンフルエントに達するまでの期間は、4~6 週間であった。

## 3) カキ細胞培養株の樹立

2) 項にて決定した培養条件にて、カキ中腸線由来の細胞がコンフルエントになった後、2 mg/ml collagenas (sigma-aldrich) および 0.2% トリプシン/1 mM EDTA (ベクトンディッキンソン) 処理し継代培養を行なった。その結果、3 継代までの継代を確認した。しかしながら、4 継代目培養中のコンタミネーションにより細胞が死滅してしまったため、現在は再度初代培養を行なっている。

現在は、新たに初代培養した細胞へのノロウイルスの付着を検討中であり、今後はノロウイルスと親和性の高いタンパク質を同定する予定である。

## 本研究のインパクト

ノロウイルスによる食中毒患者は年々増加しているにもかかわらず、培養法が確立されていないことから研究が遅れている。また、カキ等の二枚貝の中腸線に濃縮されることも知られているが、カキが補食のために取込んだ海水中に含まれるノロウイルスがどのように中腸線に濃縮されるのか、その挙動についても不明である。本実験で確立したカキ培養細胞により、ノロウイルスの付着挙動に対する知見が得られると期待される。

## 今後の展開

ノロウイルスと親和性の高いタンパク質の同定を行なう。培養細胞の中でノロウイルス親和性が高かった細胞について、ノロウイルスを添加し培養した細胞およびノロウイルスを添加せずに培養した細胞から全タンパク質の抽出を行い、蛍光二次元電気泳動により、ノロウイルスの付着・結合に関するタンパク質特定し、質量分析により同定を行う。蛍光二次元電気泳動解析が順調に進まなかった場合に備えて、培養細胞から抽出した全タンパク質を、疎水クロマトグラフィ等に供し、種々のフラクションに分け、それぞれのフラクションに対するノロウイルスの親和性を測定することにより、ノロウイルスと親和性の高いフラクションを検索する。

次に、上記の手法により同定したタンパク質あるいはノロウイルスと親和性の高いフラクションに含まれるタンパク質について、磁気ビーズ (Dynabeads Tosyl-activated 等) やカラム (HiTrap NHS-activated HP 等) に固定化し、ノロウイルスを捕捉・濃縮するためのプローブを作製する。作製したプローブに対して、まず、PBS に懸濁したノロウイルスを用いて、その捕捉率あるいは濃縮率を real time RT-PCR により算出し、性能の評価を行う。次に、実サンプル (カキあるいは青果物) をノロウイルスで汚染し、通常 (感染研推奨) 法と濃縮法を組み込んだ方法、それぞれのノロウイルスの検出下限を決め、本プローブの有効性についての検討を行う。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

小林弘司 ノロウイルス濃縮のためのカキ中腸線細胞培養条件の検討. 第25回 日本食品微生物学会学術総会 ポスター発表予定 (2013年10月, タワーホール船堀)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 弘司 (KOBAYASHI HIROSHI)  
福岡女子大学・国際文理学部・講師  
研究者番号: 00610255