

ノロウイルスの水環境中動態解明に用いる ノロウイルス様中空粒子 (Norovirus-Like Particle: NoVLP) の合成

東北大学 学生員 西牧 宏尚
東北大学 正会員 佐野 大輔
東北大学 正会員 ○大村 達夫

1. はじめに

ノロウイルス (Norovirus: NoV) は感染性胃腸炎を引き起こす水系感染症ウイルスの一種である。NoV は経口感染後、1~2 日の潜伏期間を経て突然の嘔吐及び下痢を発症させる。NoV による感染症被害報告は近年増加傾向にあるが、特に平成 18 年度下半期のシーズンにおいては、例年と比べて約 3 倍の感染症被害事例件数が報告された。通常、このような大規模な NoV 感染症被害の発生には、NoV 罹患者から健常者に直接伝播するヒト-ヒト感染 (二次感染) が大きな役割を果たしていると考えられている。それに対して、最初の被感染者への感染ルート、つまり一次感染ルートに関しては未だ不明な点が多い。NoV による汚染海域で養殖したカキの生食等による一次感染が報告されているが、それも NoV による被害の一部を説明しているにすぎない。NoV 感染症の問題に取り組む際には、この一次感染ルートの解明が最も肝要であると考えられる。

ヒトを宿主とする NoV は、ヒト体内で増殖した後、感染能力を保持した状態で糞便と共に体外へ排出される。日本の都市域のように下水道網が発達した地域では、糞便を含む家庭排水は下水処理場へ流入するが、従来の下水処理過程では十分な NoV 除去・不活化が困難であるため、下水処理水に混入した状態で河川や海等の水環境中へ放出されている¹⁾。すなわち被感染者の糞便に由来する NoV は、次の感染機会を得るまで水環境中にある程度の期間存在している可能性が高い。つまり NoV による一次感染ルートを解明する上で、NoV の水環境中動態を把握することは非常に重要であると言える。

そこで本研究では、NoV の水環境中動態解明に用いる目的で、NoV 様中空粒子 (Norovirus-Like Particle: NoVLP) に着目した。NoVLP は感染・増殖能力を保持していないが、NoV 感染粒子と同じ形をしており、その物理化学的性質は NoV 感染粒子と同等である。すなわち、この NoVLP の吸着特性は NoV 感染粒子のそれと同じと考えることができ、NoVLP を用いた実験により得られた知見は、そのまま NoV 感染粒子に関する知見として考える事ができるものである。本研究では NoV 被感染者からの排泄物が集まる下水処理場から NoV 遺伝子を得て、それを用いて NoVLP を合成した。以下に、NoV 遺伝子の取得から NoVLP 合成に至るまでの内容をまとめる。

2. 実験方法

2. 1 NoV 構造タンパク質遺伝子の取得

NoV の中でもヒトに感染する株は Genogroup I (GI) と Genogroup II (GII) の 2 つの遺伝子群に分類される。本研究では、GI 及び GII の NoVLP をそれぞれ作成する事を目指した。NoV GI 遺伝子については、国立感染症研究所・武田直和博士にご提供して頂いた。NoV GII 遺伝子については、宮城県内の下水処理場から得られた流入下水サンプルから取得した。まず、RNA 抽出キット (Qiagen) を用いてサンプルからウイルス RNA を抽出し、SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) 及びポリチミンプライマーを用いて RT を行うことにより cDNA を得た。次に、PCR Master Mix (Roche) を用いて NoV 構造タンパク質遺伝子の PCR 増幅を行った。1st PCR におけるプライマーとしては G2SK-F²⁾ (5'-CNTGGGAGGGCGATCGCAA-3') 及び NovORF2-R (5'-TTATAAAGCACGTCTACGCCCCGTT-3', 本研究で設計) を用いた。また 2nd PCR におけるプライマーとしては、G2N1(R-C)-F (5'-GAATGAAGATGGCGTCGAATGAC-3', 本研究で設計) と NovORF2-R を用いた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動及びエチジウムブロマイド染色によって確認した。次に電気泳動後の PCR 産物をゲルから切り出して精製し、pGEM-T Easy Vector (Promega) 及び *E. coli* DH5 α Competent Cell (Takara) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

2. 2 NoVLP の精製

2.2.1 NoVLP の合成

NoVLP の合成には昆虫細胞-バキュロウイルス系を用いた。昆虫細胞を宿主にもつバキュロウイルスの遺伝子への NoV 構造遺伝子の導入は、BaculoDirect Baculovirus Expression System with Gateway Technology (Invitrogen)のプロトコルに従って行った。得られた組換えバキュロウイルスの濃度を昆虫細胞あたり 10(pfu/cell)に調整して接種し、5～6 日間培養した。その後、回収した組換えバキュロウイルスを新たに準備した昆虫細胞に接種し、2 日間培養した後に細胞溶液を回収した。

2.2.2 NoVLP 精製

2.2.1で回収した細胞溶液を遠心分離（10,000g, 30分間, 4℃）後、上清を回収した。上清からNoVLPを trichlorotrifluoroethane で抽出した。その抽出液に新しい培地を加え、超遠心（100,000g, 3時間, 10℃）で沈殿させた。超遠心で得られたペレットをCsCl (1.362 g/cm³)に溶解させ、超遠心（120,000g, 24時間, 10℃）を行った。さらにCsClを除去するために超遠心(100,000g, 2時間, 10℃)を行い、NoVLPを回収した。NoVLPの確認は透過型電子顕微鏡及びELISAにより行った。

3. 結果及び考察

図 1 に NoV 構造タンパク質遺伝子の PCR 増幅によって得られた産物の電気泳動結果を示した。NoV GII の構造タンパク質遺伝子の塩基長は 1620bp であることが知られているが、ほぼ同じ塩基長を有する PCR 産物が得られていることが図 1 から分かる。このバンドに含まれる PCR 産物をクローニングして塩基配列を決定したところ、GII genotype4 (GII.4) に属する NoV のカプシド遺伝子領域と高い相同性を有していた。NoV GII.4は世界中で感染症患者を発生させている NoV であり、日本においても大きな被害が報告されている。本研究の結果は、宮城県内においても NoV GII.4 と同じ遺伝子型に属する NoV による被感染者が存在していることを示している。今回得られた NoV GII.4 構造遺伝子は、バキュロウイルス-昆虫細胞系による NoVLP 合成に用いた。

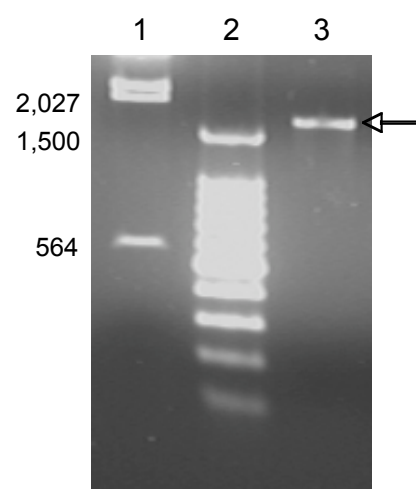


図 1. NoV 構造タンパク質遺伝子の PCR 増副産物電気泳動結果.

Lane1 : λ-HindIII, Lane2 : 100bp ladder, Lane3 : PCR 産物.

4. おわりに

近年、日本中で NoV による感染症被害が発生しているが、被感染者から周りの人間に伝播する二次感染のみに注目が集まっている状態であり、根本的な問題である一次感染の起こる原因について完全に把握されていないのが現状である。今回合成した NoVLP を用いて、SS 等の水中物質に対する NoVLP の吸着特性等を評価することによって、水環境中における NoV の動態に関する知見を得ることができると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ノロウイルス GI 遺伝子をご提供していただいた国立感染症研究所・武田直和博士に謝意を表します。

参考文献

- 1) Y. Ueki, D. Sano, T. Watanabe, K. Akiyama and T. Omura. 2005. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. Water Research, 39(18), 4271-4280.
- 2) T. Kageyama, S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, K. Kayatama. 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. Applied and Environmental Microbiology, 41, 1548-57.