

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

加熱変性リゾチームのノロウイルス不活化製剤としての応用性と不活化機構に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-06-17 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 迪子 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1765

博士学位論文

加熱変性リゾチームの
ノロウイルス不活化製剤としての応用性と
不活化機構に関する研究

平成 30 年度

(2019 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

高橋 迪子

目次

序論	1
第1章 加熱変性リゾチーム（DL）の新規ウイルス不活化剤としての応用	5
第1節 DL の非加熱喫食食品への応用	6
第2節 DL の A 型肝炎ウイルスに対する不活化効果の検証	17
小括	26
第2章 DL によるノロウイルス不活化機構の解明	28
第1節 DL がノロウイルス不活化効果を強く発揮する pH 条件の探索	30
第2節 DL のノロウイルスに対する作用ステージの検証	45
第3節 DL におけるウイルス不活化ドメインの探索	52
小括	63
総括	65
参考文献	68
付表	74

序論

ノロウイルス (Human norovirus) はカリシウイルス科に属する 1 本鎖 RNA (+) ウイルスである。その歴史は浅く、初めて検出されたのはわずか 50 年前である (Kapikian *et al.*, 1972)。1968 年 米国オハイオ州ノーウォークの小学校で集団発生した急性胃腸炎患者から初めて検出され、地名にちなみノーウォークウイルスと命名された。その後、ノーウォークウイルスは形態的特徴から Small Round Structured Virus (SRSV) と呼称された (Kapikian *et al.*, 1972)。これにより、従来原因不明の急性胃腸炎とされてきた事例が SRSV によるものであることが明らかになり、世界各地で SRSV の感染事例が報告されるようになった。現在では、ノロウイルス属にノーウォークウイルスが 1 属 1 種として分類されており、慣例的にノロウイルスと呼称されている。

ノロウイルスは感染者あるいは飲食物を介して経口感染する。感染後、24~48 時間で発症し、激しい嘔吐や下痢、発熱を引き起こす。現在、日本国内で 1 年間に報告されている、食中毒患者数の半数以上はノロウイルスによるものである (厚生労働省, 2017)。また、世界では毎年 2.6 億人がノロウイルス食中毒を発症し、死者は 20 万人を超えることから、ノロウイルスは最も深刻な被害をもたらす食水系感染症ウイルスとして認識されている (Patel *et al.*, 2008)。

ノロウイルス食中毒の主な原因食品は二枚貝であり (Koopmans *et al.*, 2004)、特にカキの喫食による感染事例が多数報告されている (Wang *et al.*, 2015; Westrell *et al.*, 2010)。これは、カキなどの二枚貝が海水に含まれるプランクトン類を濾過摂食する際に、ノロウイルスがカキ体内に蓄積されるためである。これまでに、ノロウイルスは河口に近い沿岸域の海水中において高頻度に検出されるほか、沿岸域の汽水中において高い生残性を示すことが報告されている (Gentry *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2016)。

このほか、近年では二枚貝以外にサラダや惣菜などの非加熱喫食食品を原因とした感染事例が世界各国で多数発生している。これは、栽培環境での土壌や水の汚染のほか、食品製造現場における感染者の手指を介した二次汚染が原因であることが報告されている(Baert *et al.*, 2011; Maritschnik *et al.*, 2013)。

日本国内では、2014年に静岡県浜松市の小学校で給食パンを原因とした大規模な食中毒事例が発生し、当時1200人以上が発症した(土屋ら, 2015)。このほか、2016年には学校給食の刻み海苔を原因とした食中毒事例が各地で発生し、患者数は総計2000人にも上った(野田ら, 2017)。パンや海苔はいずれも水分活性が低い食品であるため、細菌性食中毒のリスクとして認識されていないが、ノロウイルス食中毒はこのような食品であっても感染源になりうることが明らかになった。

ノロウイルスはエンベロープを持たないため、エタノールでは不活化しない。そのため、次亜塩素酸がノロウイルスの不活化手法として最も一般的な方法と言える(Koopmans *et al.*, 2004)。ところが、次亜塩素酸は特異な塩素臭により使用できる場面が限られているほか、食品や吐しゃ物などの有機物存在下でその効果が著しく減少することが報告されている(Takahashi *et al.*, 2011)。そのため、これまでにノロウイルスの不活化法が数多く開発されてきた。その不活化法は加熱処理や紫外線照射、高静水圧処理等の物理的な手法から、食品由来成分を用いた化学的な手法など多岐にわたる(Bozkurt *et al.*, 2014; Grove *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2015; Koopmans *et al.*, 2004)。しかし、これらの手法には食品の味や外観を劣化させるなどの問題点がある。したがって、食品中で利用可能なノロウイルスの不活化手法の開発は食品衛生における重要な課題と言える。

リゾチームは129のアミノ酸から成る1本鎖ポリペプチドであり、酵素反応としてグラム陽性菌の細胞壁を加水分解する(Fig. S1)(Hughey *et al.*, 1989)。リゾチームは涙や唾液などの分泌液や卵白に含まれており、ニワトリ卵白から工業的に抽出され、食品添加物や医薬品の原料として広く利用されている。このリゾチームを加熱

変性することで、ノロウイルスに対して不活化効果を示すことが発見された (Takahashi *et al.*, 2015)。

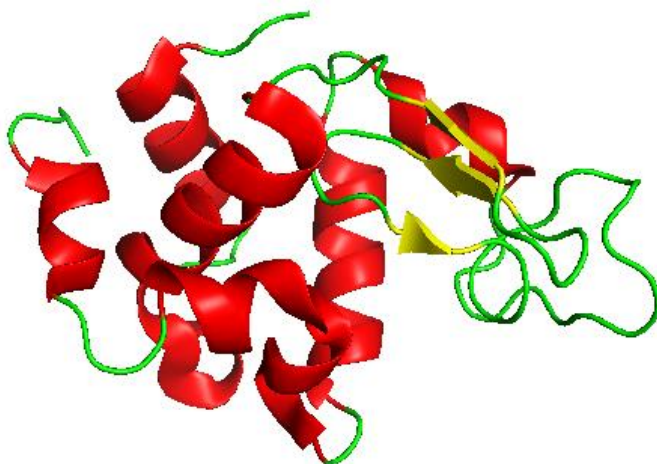


Fig. S1 3D image of Lzm (PDB: 6bo2). Ribbon model was colored red, green, and yellow as helix, loop, and sheet, respectively. Figure was prepared using Pymol (www.pymol.org).

リゾチームは食品由来成分として既に広く利用されている、安全性の高い物質である。また、リゾチーム粉末は白色で無味無臭であり、食品の風味や外観に影響しない。食品由来成分であるリゾチームに特定の処理を施すことで、新たな効果を見出した点は非常にインパクトがあり、産業・学問の両面において価値があるといえる。しかし、加熱変性リゾチームをノロウイルス不活化製剤としてどのように応用できるか、また、加熱変性リゾチームのノロウイルスに対する不活化作用機序については明らかになっていない。

本研究では、上述の問題点を解決するため、加熱変性リゾチーム (Denatured lysozyme: DL) のノロウイルス不活化製剤としての応用性を拡大するとともに、DLによるウイルス不活化機構を明らかにすることを目的とした。本論文は2章構成とし、第1章ではDLのノロウイルス不活化製剤としての応用性に関する検討を行った。具体的には、第1節でDLによるノロウイルス不活化効果が非加熱喫食食品中においても発揮されるか検討した。第2節では、DLがノロウイルス以外の食水系感染症ウイルスに対しても効果を示すのか、A型肝炎ウイルスを用いて検証した。続

く第2章では、DLによるノロウイルス不活化機構の解明を目的とした。第1節では、DLがノロウイルス不活化効果を強く発揮する条件を探索し、第2節では、DLのノロウイルスへの作用ステージを検証した。第3節では、DLにおけるウイルス不活化作用ドメインを探索した。

なお、本論文の内容の一部は、以下の通り公表済みもしくは公表予定である。

【学術論文】

1. **Michiko Takahashi**, Yuka Yasuda, Hajime Takahashi, Akira Takeuchi, Takashi Kuda, Bon Kimura. “Inactivating effect of heat-denatured lysozyme against murine norovirus in bread fillings” *Food Hygiene and Safety Science*, Japanese Society for Food Hygiene and Safety, 59, pp.89–92, 2018.
2. **Michiko Takahashi**, Yumiko Okakura, Hajime Takahashi, Minami Imamura, Hiroyuki Shidara, Takashi Kuda, Bon Kimura. “Heat-denatured lysozyme could be a novel disinfectant for reducing hepatitis A virus and murine norovirus on berry fruit” *International Journal of Food Microbiology*, 266, pp. 104–108, 2018.

【学会発表】

1. ○**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 “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” 第114回日本食品衛生学会学術講演会、広島、2018年11月
2. ○**Michiko Takahashi**, Hajime Takahashi, Tomoki Tsuchiya, Ryota Matsumoto, Takashi Kuda, Bon Kimura. “Inactivation effect of heat-denatured lysozyme against norovirus in vegetable salads.” Foodmicro2016, PO2-FV-155, Dublin, Ireland, July 2016.
3. ○**高橋迪子**、高橋肇、岡倉優美子、今村みなみ、武内章、設楽弘之、久田孝、木村凡 “加熱変性リゾチームを用いたA型肝炎ウイルスの不活化と食品媒介性ウイルス汚染ベリーの洗浄” 第112回日本食品衛生学会学術講演会、函館、2016年10月

第 1 章

加熱変性リゾチーム（DL）の新規ウイルス不活化剤としての応用

リゾチームは卵白から工業的に安定して生産されている物質であり、このリゾチームに特定の処理（加熱）を施すことで、新たな機能を見出した点(Takahashi *et al.*, 2015)は価値があるといえる。また、無味無臭で食品の味や外観に影響しないことから、様々な食品中におけるノロウイルス制御に DL を利用できる可能性がある。しかし、具体的に DL がどのような食品に、どのように使えるか応用性に関しては十分な知見がない。また、DL によるノロウイルス以外の食水系感染症ウイルスに対する不活化効果の報告はまだない。そこで、本章では DL をノロウイルスの新規ウイルス不活化剤として利用拡大できるか、その応用性を検討することとした。さらに、DL の A 型肝炎ウイルスに対する不活化効果についても検証した。

第 1 節

DL の非加熱喫食食品への応用

近年、サラダなどの非加熱喫食食品を原因とするノロウイルス食中毒事例が世界各国で相次いで発生している(Baert *et al.*, 2011; Bouwknecht *et al.*, 2015)。2014 年には日本国内で給食パンを原因とする大規模ノロウイルス食中毒も発生した(土屋ら, 2015)。これらの事例における共通点は、調理工程で作業従事者を介した二次汚染が原因であったことである。サラダは加熱工程を伴わず、ノロウイルスが混入した後になんらかの制御法を講じることは難しい。また、パン類は焼成して作られるが、ジャムやクリームなどのフィリングはパン生地の焼成後に充填されるため、サラダと同様に以降の工程に加熱調理が存在しない。これらの食品にノロウイルスが混入した場合、どのような生残挙動を取るのかは明らかになっていない。あわせて、DL によるノロウイルス不活化効果がこれら食品中においても発揮されれば、有効なウイルス不活化剤になり得ると考えられた。本節では、4 種類のサラダおよび 2 種類のパンフィリングを用いて、ノロウイルスの生残性ならびに DL による不活化効果を検討した。

実験材料および方法

供試ウイルスおよび細胞

現在、Human norovirus は安定した細胞培養系が確立されていないため、代替ウイルスとして遺伝的に近縁な Murine norovirus strain 1 (MNV-1) を供試ウイルスとして用いた(Karst *et al.*, 2003)。

宿主であるマウスマクロファージ細胞 (RAW 264.7) は 5% FBS + DMEM (以下、

培地および試薬の組成は付表に記載)に播種し、37°C 5% CO₂ 条件下で培養した。コンフルエントになった RAW 264.7 に MNV-1 を MOI (Multiplicity of infection) が 0.1 となるよう接種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 日間インキュベートした。細胞変性を確認した後、4 回の凍結融解に供し、8,000 ×g で 20 分間遠心分離した。得られた上清を MNV-1 液として以降の実験に使用することとし、実験に供するまで -80°C で保存した。

食品サンプル

本研究では 4 種類のサラダ (コールスロー、サウザンアイランドサラダ、ヴィネグレットサラダ、タマゴサラダ) および 2 種類のパンフィリング (チョコレートクリーム、マーマレード) を供試した。

マヨネーズ (キューピー株式会社)、サウザンアイランドドレッシング (キューピー株式会社)、チョコレートクリーム (ソントン株式会社)、マーマレード (ソントン株式会社) は小売店で購入したものを使用した。ヴィネグレットドレッシングは小売店で購入したオリーブオイルと酢を 3:1 の割合で混合したものを使用した。

コールスローは小売店で購入したキャベツ (*Brassica oleracea*) 1 玉を滅菌した包丁で芯を除いてから 5~10cm 角に切り、55°C の湯に 10 秒間くぐらせた。これをフードプロセッサーで 5 mm 角に細断し、2%の食塩水に 1 分間浸漬した。キャベツの水分を除いた後、キャベツの重量に対して 20% (w/w) のマヨネーズを添加し、マヨネーズが全体に行き渡るまで混ぜた。

サウザンアイランドサラダは小売店で購入したレタス (*Lactuca sativa*) 1 玉を滅菌した包丁で 3~5 cm 角に切り、水道水にくぐらせた。レタスの水分を切った後、サウザンアイランドドレッシングをレタスの重量に対して 20% (w/w) 添加し、ドレッシングが全体に行き渡るまで混ぜた。

ヴィネグレットサラダはサウザンアイランドサラダと同様の手順でレタスを切っ

て水道水にくぐらせた後、水分を除いた。その後、前述で作製したヴィネグレットドレッシングをレタスの重量に対して 20% (w/w)添加し、ドレッシングが全体に行き渡るまで混ぜた。

タマゴサラダは小売店で購入した鶏卵 10 個を 100°C の湯で 20 分間茹でた後、殻を剥いた。これをエッグスライサーで 5 mm 角に細断し、タマゴの重量に対して 20% (w/w)のマヨネーズを添加し、マヨネーズが全体に行き渡るまで混ぜた。

なお、これら食品サンプルの pH は pH メーター (HM-25R、東亜ディーケーケー) を用いて測定した。

DL の調製

卵白リゾチーム (キューピー株式会社) を蒸留水に 5% (w/v)となるよう溶解し (pH 6.5 ± 0.2)、孔径が 0.20 μm のセルロースアセテート (CA) フィルタでろ過滅菌した。これを 100°C のオイルバスで 40 分間加熱した後、ただちに氷冷したものを DL とした。

食品中における DL の MNV-1 不活化効果の検討

前述で調製した 5% DL を 4 種類のサラダ (コールスロー、サウザンアイランドサラダ、ヴィネグレットサラダ、タマゴサラダ) および 2 種類のパンフィリング (チョコレートクリーム、マーマレード) 各 10 g に終濃度が 1% (v/w)となるよう添加した。これに感染価がおおよそ 5~6 log Plaque forming units (PFU)/mL の MNV-1 を 1 mL 接種し、4°C で保存した。なお、サラダ・パンフィリングのいずれも DL を添加していないサンプルを調製し、前述と同様に MNV-1 を接種した。

サラダサンプルの回収は保存開始から 0 (MNV-1 接種直後)、1、2、3、4、5 日目に、パンフィリングサンプルの回収は 0、1、3、5 日目に行った。回収は、食品サンプル 10 g に 90 mL の PBS(-)を添加し、230 rpm で 30 秒間ストマッカー処理した。こ

れを $8,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、得られた上清を $0.20 \mu\text{m}$ CA フィルタでろ過した。得られたサンプルは DMEM で 10 倍ずつ段階希釈し、プラークアッセイに供するまで -80°C で保存した。

プラークアッセイによる MNV-1 の感染価測定

MNV-1 の感染価は Gonzalez-Hernandez *et al.* (2012) の方法を参考にしてプラークアッセイで測定した。

RAW 264.7 を 5% FBS + DMEM に $6 \log \text{ cells/mL}$ となるよう懸濁し、6 ウェルプレート (Falcon) に 2 mL/well ずつ播種した。プレートを 37°C 、5% CO_2 条件下で 18 時間インキュベートした後、プレートの培地を除去してサンプルを $500 \mu\text{L}$ ずつ接種、室温で 1 時間振とうさせた (20 r/min)。その後、接種したサンプルをプレートから除去し、1.5% SeaPlaque agar (ロンザジャパン株式会社) を 2 mL/well 重層した。これを 37°C 、5% CO_2 で 48 時間インキュベートした後、プレートに Neutral red solution を 2 mL/well 添加した。これを 37°C 、5% CO_2 条件下で 1 時間インキュベートした後、プラーク数を計測した。

統計処理

実験はすべて $n=3$ で行い、結果はその平均値±標準偏差で示した。同一回収日におけるリゾチーム添加区・非添加区の有意差検定は、Microsoft Excel を用いたダネット法により実施した。

結果

MNV-1 を 4 種類のサラダに接種して 4°C で 5 日間保存したところ、MNV-1 の感染価はいずれのサラダにおいても接種時の感染価を維持し、5 日間ほとんど減少し

なかった (Fig. 1)。一方、1% DL を添加したすべてのサラダにおいて、MNV-1 の感染価は接種直後の時点 (保存 0 日目) で非添加区と比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。具体的には、コールスローでは接種直後から MNV-1 の感染価が $3.0 \log \text{PFU/g}$ 減少し、5 日目における感染価も接種量と比較して $2.6 \log \text{PFU/g}$ 減少した (Fig. 1A)。サウザンアイランドサラダでは保存開始 2 日目を除くすべての回収日において、ヴィネグレットサラダでは MNV-1 を接種した直後から保存 5 日目まで、MNV-1 の感染価が当該試験系の検出限界である $1.0 \log \text{PFU/g}$ を下回っていた (Fig. 1B, 1C)。しかし、タマゴサラダでは保存 0 日目においては DL 非添加区と比べて添加区における MNV-1 の感染価が有意に減少したものの ($p < 0.01$)、以降添加・非添加区間における感染価の有意差は保存 2 日目 ($p < 0.05$) を除いて認められなかった (Fig. 1D)。

次に、2 種類のパンフィリングに MNV-1 を接種し 4°C で 5 日間保存したところ、MNV-1 の感染価はサラダの場合と同様に、いずれのパンフィリングにおいても保存期間中ほとんど減少せず、接種レベルを維持していた (Fig. 2)。一方、1% DL を添加したパンフィリングを 5 日間保存した場合、MNV-1 感染価はチョコレートクリームでは $1.6 \log \text{PFU/g}$ 、マーマレードジャムでは $0.9 \log \text{PFU/g}$ 減少した。保存 0、1、3、5 日目のいずれにおいても、DL 添加区における MNV-1 の感染価は非添加区と比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。

考察

MNV-1 は 2003 年に分離された、マウスを宿主とする 1 本鎖 RNA(+) ウイルスである。Human norovirus とは感染時の症状が異なり、正常免疫をもつマウスが MNV-1 に感染しても、下痢等の臨床症状は呈さない。しかし、塩基配列の相同性の高さから、Human norovirus と同様に *Caliciviridae* 科 *Norovirus* 属に分類されており (後藤

ら、2009)、現在では細胞培養系が確立されていない Human norovirus の代替ウイルスとして用いられている。

Fig. 1 および Fig. 2 より、MNV-1 はサラダやパンフィリングに混入すると長期にわたり生残することが示された。MNV-1 は一般的な細菌とは異なり、低 pH や低温などに対して耐性をもつことが報告されている(Cannon *et al.*, 2006)。また、MNV-1 のみならず Human norovirus の構造タンパク集合体である Virus-like particle (VLP) が pH3~7 の範囲においてきわめて安定した構造を保つことも明らかになっている(Ausar *et al.*, 2006)。本研究で使用した食品の中で pH の低かったものはヴィネグレットサラダ (pH 3.76) とマーマレードジャム (pH 3.21) であったが (Table 1)、いずれの食品中においても MNV-1 の感染価は保存期間中維持されていた (Fig. 1C, 2B)。これより、製造段階でサラダやパンフィリング中にノロウイルスが混入した場合、流通の過程で死滅していく可能性は低いと考えられた。

これまでの *in vitro* 試験から、MNV-1 の感染価は 1% DL に 1 分間曝露することで 4.5 log PFU/mL 減少することが確認されている(Takahashi *et al.*, 2015)。そのため、食品への DL の添加濃度も 1%が妥当であると判断した。実験の結果、DL を添加した 3 種類のサラダ (コールスロー、サウザンアイランドサラダ、ヴィネグレットサラダ) 中において MNV-1 の感染価は 2.6~4.0 log PFU/g 減少した (Fig. 1A-1C)。しかし、タマゴサラダでは、MNV-1 の感染価減少量は 0.3 log PFU/g にとどまった (Fig. 1D)。チョコレートクリームとマーマレードジャムにおいても感染価の減少はみられたものの、その減少量は 0.8~1.6 log 程度と、食品の種類によって不活化効果に差異があった (Fig. 2)。

既報では、MNV-1 は DL に曝露することで膨張し、外殻を構成するキャプシドタンパクが破壊されるものと推察されている (Takahashi *et al.*, 2015)。食品中においても同様の現象によって MNV-1 が不活化しているものと考えられるが、タマゴサラダやパンフィリングの場合、何らかの食品成分が MNV-1 の粒子に保護的に働いた

ために、DLによる不活化効果が認められなかったものと考えた。

上述の結果を受けて、特に DL のノロウイルス不活化効果が減少したタマゴサラダ中における阻害物質を検討した。アルブミンは卵白の 54%を占めるタンパク質であり（西成, 2007）、作製したタマゴサラダの中で最も含有量の多いタンパク質であると判断した。そこで、0.5% (w/v) アルブミン（富士フィルム和光純薬株式会社、100°C で 40 分間加熱）存在下において感染価 5 log PFU/mL の MNV-1 を 1% DL に 1 分間曝露した。アルブミン無添加条件下では MNV-1 の感染価は 4.5 log PFU/mL 減少した一方、0.5% アルブミン添加条件下では MNV-1 の感染価はほとんど減少しなかった（データ記載なし）。

食品成分によるウイルス粒子への保護作用は、これまでも複数の報告がある。Takahashi *et al.* (2011) はステンレス平板上における MNV-1 の生残性を調査するため、ステンレス平板に MNV-1 を単独あるいはキャベツや挽き肉の残渣と合わせて接種した。その結果、MNV-1 は食品成分存在下でより長期にわたり生残することが明らかになった。また、加熱や次亜塩素酸、電子ビームなどの手法を用いて MNV-1 を不活化する際にも、食品成分の存在によってその効果が妨げられているという報告もある(Jarke *et al.*, 2013; Predmore *et al.*, 2015; Takahashi *et al.*, 2011)。

実験結果より、DLによるノロウイルス不活化効果はコールスローなど比較的 pH の低い食品 (pH 3.76, Table 1) や油脂を含む食品中においても発揮されることがわかった。一方、一部の食品中において十分に発揮されなかったという課題に対しては、DLの添加方法を工夫するなどの改良が必要といえる。具体的には、DLはタンパク質を比較的多く含む食品中 (Fig. 1D) においてはその効果が十分に発揮されない可能性があるため、DLの効果が阻害される条件を検討する必要があると考えられる。また、DLによるノロウイルス不活化機構を明らかにすることも、DLの応用性拡大の上で重要である。

リゾチームは食品の品質や抽出コストの問題がなく、既に広く利用されていると

いうメリットがあり、DL が汎用性の高いノロウイルス不活化剤になり得ると期待できる。今後は、DL がどのようなウイルスに対して不活化効果を示すのか精査するとともに、どのようなメカニズムでノロウイルスを不活化しているのか詳細に検討する必要がある。

图表

Table 1 pH value of salads and bread fillings used in this study

Food sample	pH
Coleslaw	4.33
Egg salad	6.27
Vinaigrette salad	3.76
Thousand island salad	3.95
Chocolate cream	6.53
Marmalade jam	3.21

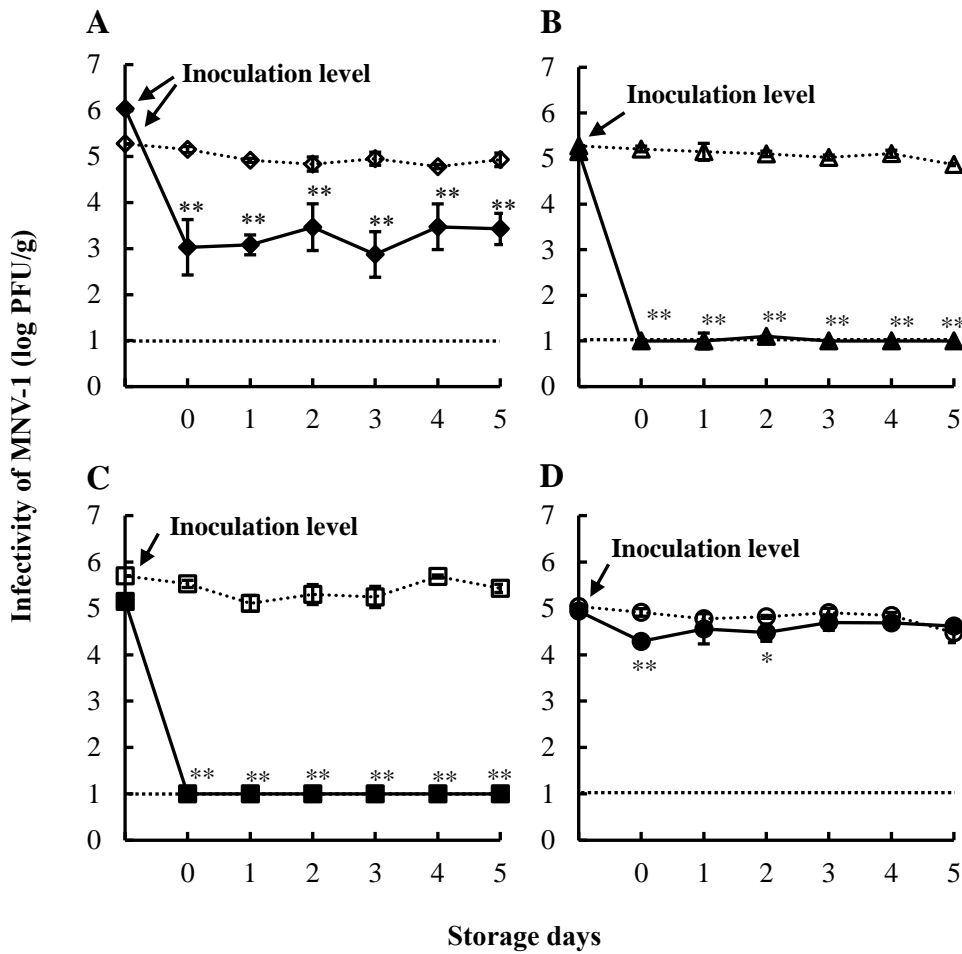


Fig. 1 Survival of MNV-1 in different types of salads; coleslaw (A), thousand island salad (B), vinaigrette salad (C), and egg salad (D). These salads were inoculated with MNV-1 at the infectivity of approximately 5~6 log PFU/g (as shown “Inoculation level”) after added with (closed symbol) or without (opened symbol) 1% of heat denatured Lzm (DL) and then stored at 4°C for 5 days. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). The dashed line means detection limit of plaque assay for MNV-1. Significant difference between control (without DL) and sample (with DL) on the same day was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

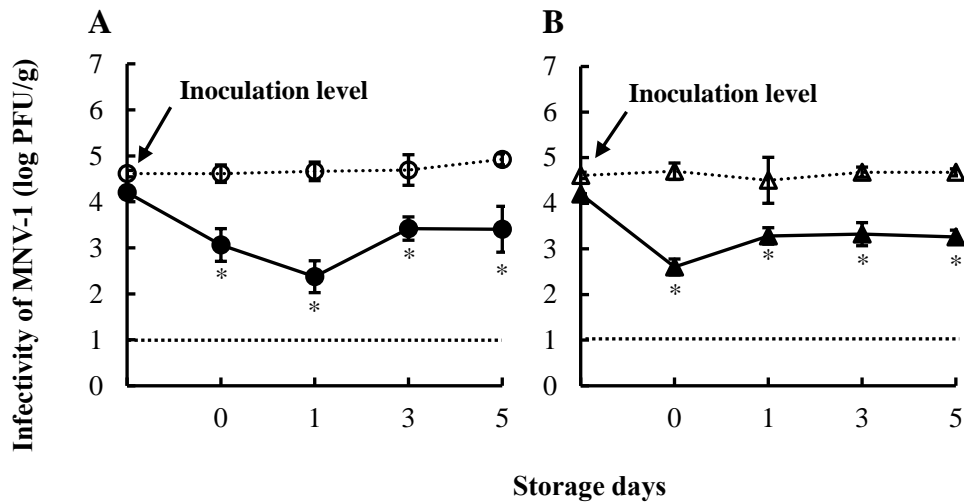


Fig. 2 Survival of MNV-1 in different types of bread fillings; chocolate cream (A), and marmalade jam (B). Bread fillings were inoculated with MNV-1 at approximately 4.5 log PFU/g (as shown “Inoculation level”) after added with (closed symbol) or without (open symbol) 1% of DL and then stored at 4°C for 5 days. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). The dashed line means detection limit of plaque assay for MNV-1. Significant difference between control (without DL) and sample (with DL) on the same day was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

第 2 節

DL の A 型肝炎ウイルスに対する不活化効果の検証

前節では、DL が複数の食品中においてもノロウイルスに対して不活化効果を示すことを確認した。本節では、DL がノロウイルス以外の食水系感染症ウイルスに対しても効果を示すのか検証した。具体的には、ノロウイルスと同様に食水系感染症ウイルスである A 型肝炎ウイルス (Hepatitis A virus, HAV) を用いて、DL による不活化効果の有無を検証した。

HAV はピコルナウイルス科ヘパトウイルス属に分類される、1 本鎖 RNA ウイルスである(Koopmans *et al.*, 2004)。ノロウイルスと同様に、汚染された水や食品の喫食により経口感染し、発熱や吐き気、腹痛、黄疸などの症状を引き起こす。近年、欧州を中心にベリー類を原因とした HAV の大規模食中毒が相次いで発生している(Koopmans *et al.*, 2004)。特に冷凍ベリー類は、加熱せずに喫食する場合もあり、原料が HAV で汚染されていた場合、感染源となる。本節では、DL によるウイルス不活化効果が HAV に対しても示されるか検証した。あわせて、HAV 食中毒の原因食品として問題となっているベリー類の洗浄に DL が有効か検討した。

実験材料および方法

供試ウイルスおよび細胞

供試ウイルスとして、前述で使用した MNV-1 に加えて HAV HM175/18f (ATCC® VR-1402)、HM175 uncloned (ATCC® VR-2093)、HAS15 (ATCC® VR-2281) (American Type Culture Collection) を使用した。

HAV は宿主細胞であるアカゲザル腎由来細胞 (FRhK-4, ATCC[®] CRL-1688) を用いて増殖させた。10% FBS + DMEM に FRhK-4 を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。コンフルエントの FRhK-4 に HAV を接種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 日間インキュベートした。細胞変性を確認後、凍結融解を 4 回行い、8,000 ×g で 20 分間遠心分離した。得られた上清を HAV 液として以降の実験で使用した。

DL の調製

卵白リゾチーム (富士フィルム和光純薬株式会社) を蒸留水に 1%あるいは 2% (w/v)となるよう溶解し 1N NaOH で pH を 6.5 ± 0.2 に調整した。これを 0.20 μm CA フィルタでろ過滅菌した後、100°C のオイルバスで 40 分間加熱、氷冷することで DL を調製した。

HAV に対する DL の不活化効果の検証

1%、2%の DL と、感染価およそ 5 log MPN/mL の HAV HM175/18f を 30 μL ずつ等量混和した。このとき、DL の終濃度は 0.5%および 1%とした。これを室温で 1 分間あるいは 60 分間静置した後、10% FBS + DMEM で 10 倍希釈することで反応を止めた。なお、コントロールとして滅菌蒸留水と HAV を 30 μL ずつ、等量混和し室温で 60 分間置いた後、同様に 10% FBS + DMEM で 10 倍希釈した。

次に、複数株の HAV に対する DL の不活化効果を検証した。2% DL と HAV HM175/18f、HM175 uncloned、HAS15 を 30 μL ずつ等量混和することで、DL の終濃度を 1%とした。このとき、滅菌蒸留水についても前述と同様に 3 株の HAV と等量混和した。これを室温で 1 分間あるいは 60 分間置いた後、10% FBS + DMEM で 10 倍希釈することで反応を止めた。得られたサンプルは速やかに感染価測定に供した。

DL を用いた食水系感染症ウイルス汚染ベリーの洗浄

小売店で購入したブルーベリー (*Vaccinium corymbosum*) 10 g またはミックスベリー (イチゴ (*Fragaria × ananassa*)、ラズベリー (*Rubus idaeus*)、ブルーベリーの3種を含む) 20 g を感染価およそ 5~6 log MPN or PFU/mL に調整した HAV HM175/18f あるいは MNV-1 各 200 mL に 2 分間浸漬し、ベリーの表面をウイルスで汚染させた。汚染ベリーはそれぞれ滅菌蒸留水、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウム、1% DL 各 100 mL に 1 分間浸漬することで、洗浄した。その後、PBS (-) 10 mL でベリーの表面に付着したウイルスを洗い出した後、0.20 µm CA フィルタでろ過した。得られたサンプルは 8,000 ×g で 10 分間遠心分離し、10% FBS + DMEM で 10 倍ずつ段階希釈した後、以降の感染価測定へ供した。なお、MNV-1 の感染価は前節に記したプラークアッセイで、HAV の感染価は次項に記す MPN 法を用いて測定した。

Most probable number (MPN) 法による HAV の感染価測定

FRhK-4 を 96 ウェルプレート (Falcon) に 5 log cells/mL となるよう播種し、37°C 5% CO₂ 条件下で 7 日間インキュベートした。FRhK-4 がコンフルエントになっていることを確認した後、サンプルを 200 µL/well ずつ接種した。その後、プレートは 37°C 5% CO₂ 条件下で HAV による細胞変性効果が認められるまでインキュベートした (HAV ATCC VR-1402 は 2 週間、ほか 2 株は 3 週間程度)。なお、インキュベート 7 日目の時点で新しい DMEM を 50 µL/well 添加した。

その後、プレートからサンプルを除去し、メタノールを 50 µL/well 添加して室温で 1 分間置くことで FRhK-4 を固定した。メタノールを除去した後、CV solution を 50 µL/well 加え、1 分間置くことで FRhK-4 を染色した。その後、CV solution を除去し、プレートを水洗した後、陽性 (HAV に感染した) の well 数から HAV の感染価を算出した。

統計処理

試験はすべて3回ずつ独立して試行し、結果をその平均値±標準偏差で示した。コントロール区と試験区における有意差検定は、Microsoft Excel を用いたダネット法により行った。

結果

HAV に対する DL の不活化効果の検証

HAV HM175/18f を DL に 60 分間曝露した結果、HAV の感染価は 0.5% DL の場合 1.5 log MPN/mL、1% DL の場合 2.6 log MPN/mL 減少した (Fig. 3)。DL による HAV 不活化効果は作用濃度および接触時間に依存的であり、1% DL に HAV を 60 分間曝露した場合、HAV の感染価はコントロール (滅菌蒸留水曝露区) と比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。

次に、複数株の HAV に対する DL の不活化効果を検証した。1% DL に 60 分間曝露することで HAV HM175 は 2.3 log MPN/mL、HAS15 は 2.1 log MPN/mL 減少した (Fig. 4)。本研究で使用したすべての HAV が 1% DL に 60 分間曝露することでコントロールと比べて有意に減少した ($p < 0.01$)。

DL を用いた食水系感染症ウイルス汚染ベリーの洗浄

HAV をブルーベリー、あるいはミックスベリーに付着させ、各種洗浄液に 1 分間浸漬することで洗浄した。ブルーベリーの場合、HAV の感染価は滅菌蒸留水による洗浄で 1.0 log MPN/g、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 1% DL による洗浄で 3.6 log MPN/g 減少した (Fig. 5A)。ミックスベリーの場合、HAV の感染価は滅菌蒸留水による洗浄では 1.0 log MPN/g、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 1% DL

による洗浄では 3.1 log MPN/g 減少した。100 ppm 次亜塩素酸あるいは 1% DL で洗浄したブルーベリー、ミックスベリーにおける HAV 感染価は、コントロール（滅菌蒸留水洗浄区）と比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。

同様の試験を MNV-1 でも行った結果、ブルーベリーの場合、MNV-1 の感染価は滅菌蒸留水による洗浄では 1.8 log PFU/g、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 1% DL による洗浄では 3.9 log PFU/g 減少した (Fig. 5B)。ミックスベリーの場合、MNV-1 は滅菌蒸留水による洗浄では 1.6 log PFU/g、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムあるいは 1% DL による洗浄では 4.1 log PFU/g 減少したであった (Fig. 5B)。HAV と同様に、MNV-1 の場合も 100 ppm 次亜塩素酸洗浄区および 1% DL 洗浄区における感染価はコントロールと比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。また、すべてのサンプルにおいて、1% DL による洗浄効果は 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄効果と同等であった (Fig. 5)。

考察

HAV 食中毒の主な原因食品は二枚貝などの魚介類のほか、野菜、ジュース、ベリー類である (Fitzgerald *et al.*, 2014)。HAV の感染事例数は、先進国に限れば減少傾向にあるものの (Cuthbert, 2001)、近年では冷凍ベリーを原因とする HAV およびノロウイルスの感染事例が年々増加しているという報告もある (Tavoschi *et al.*, 2015)。

ベリーのような生鮮食品の場合、出荷までに加熱などウイルスを不活化する工程がない。そのため、ベリーによる HAV 食中毒を防ぐためには、生産段階から消費段階に至るまで HAV の混入を注視していく必要がある。あるいは、混入してしまった HAV の確実な不活化が必要である。そこで、本節では DL による HAV 不活化効果を検証するとともに、HAV などの食水系感染症ウイルスで汚染されたベリーの洗浄

に DL が有効かどうか検討することとした。

Fig. 3 より、1% DL に 60 分間曝露することで HAV は最大 2.6 log MPN/mL 減少した。DL による HAV に対する不活化効果は、DL の作用濃度と接触時間に依存的であった。また、DL の HAV 不活化効果は遺伝子型の異なる複数株に対しても確認されたことから (Fig. 4)、DL の HAV に対する不活化効果は限定的でないことも示唆された。

これまでに DL による不活化効果が確認されていたウイルスは、MNV-1 と human norovirus GII.4 であったが (Takahashi *et al.*, 2015)、これら 2 種は遺伝的に近縁なウイルスであり、挙動も近いとされている (Wobus *et al.*, 2006)。一方、HAV はノロウイルスとはまったく異なる系統群に分類される遠縁のウイルスである。DL がノロウイルス以外のウイルスに対して不活化効果を示し、さらに複数の遺伝子型に対しても不活化効果を示したという事実から (Fig. 4)、DL のもつ不活化スペクトルがある程度広範なものであることが示唆された。

次に、食水系感染症ウイルスで汚染させたベリーの洗浄効果を滅菌蒸留水、1% DL、100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで比較した。その結果、1% DL は 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムと同様に 3 log MPN or PFU/g 以上の洗浄効果を示した (Fig. 5)。Baert *et al.* (2009) は、食品に付着したウイルスを原因とする食中毒を防ぐには、感染価を 3 log 以上減少させることが推奨している。また、ベリー類のノロウイルス陽性サンプルにおいて、その汚染量は平均 2~3.5 log genome copies/g であったという報告もある (Baert *et al.*, 2011)。DL による洗浄効果はベリー類におけるウイルスの汚染量平均値ならびに推奨されている不活化効果を満たしているといえる。

ベリーのサプライチェーンにおいて HAV が混入し得るポイントとして、生産、収穫、加工、検品などあらゆる段階が想定される。Maunula *et al.* (2013) は欧州各国のベリーサプライチェーン内の複数のポイント (灌漑用水、農場の動物の糞便、従事者の手指、農場内のトイレ、加工工程のベルトコンベアほか) を対象に、ノロウイ

ルスや HAV などの腸管系ウイルスの分布率を調査した。その結果、特に分布率が高かったポイントは従事者の手指と生産工程で使用される水であった。生産工程で使用される水のうち、特にベリーを包装する直前の洗浄に DL を使用することで、HAV の不活化が可能であると考えられた。具体的な洗浄方法として、試験で実施した浸漬のほかに噴霧での利用も期待できると考えられる。

ベリーに付着した HAV の不活化手法のうち、物理的な手法としては加熱処理、高静水圧処理が挙げられる(Araud *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016)。しかし、生食として出荷する場合には加熱処理はできず、高静水圧処理も果実の形態が崩れてしまうため、適切な不活化手法とはいえない。また、化学的な不活化手法として広く利用されているのが次亜塩素酸ナトリウムであるが、二次生成物としてトリハロメタンを生成するほか、有機物存在下で本来の効果が低下する(McDonnell *et al.*, 1999)。本節では食品由来成分から調製された DL がベリー類の洗浄に有効であることが明らかになったことで、DL の新規ウイルス不活化剤としての有効性が示唆された。

图表

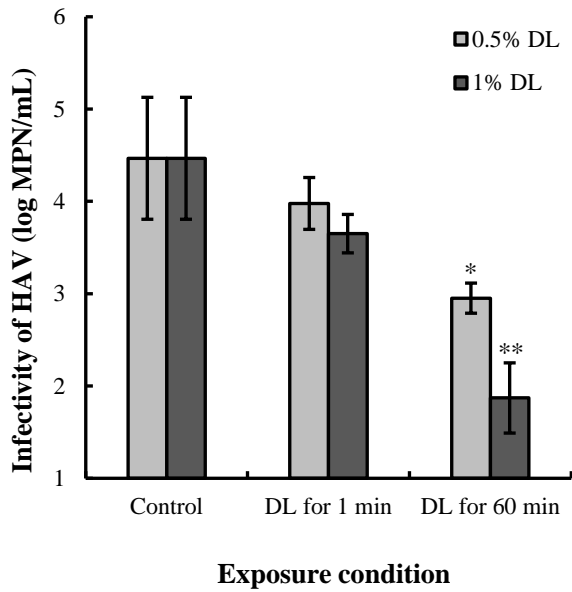


Fig. 3 Infectivity of hepatitis A virus (HAV) after exposure to DL at 0.5, 1%. HAV HM175/18f was exposed to distilled water (Control) for 60 min, DL at the final concentration of 0.5% and 1% for 1 min and 60 min. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant difference between control and sample exposed to DL was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

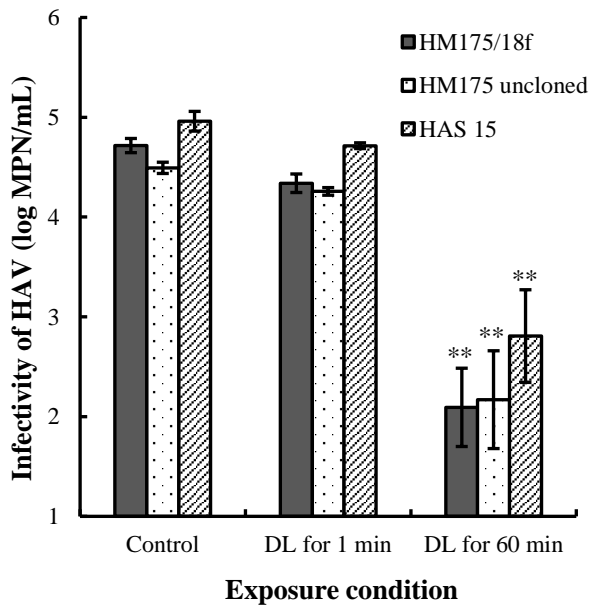


Fig. 4 Infectivity of various strains of HAV after exposure to DL. HAV HM175/18f, HM175 uncloned, and HAS15 were exposed to distilled water (Control) for 60 min, and DL at the final concentration of 1% for 1 min and 60 min. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant difference between control and sample exposed to DL was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

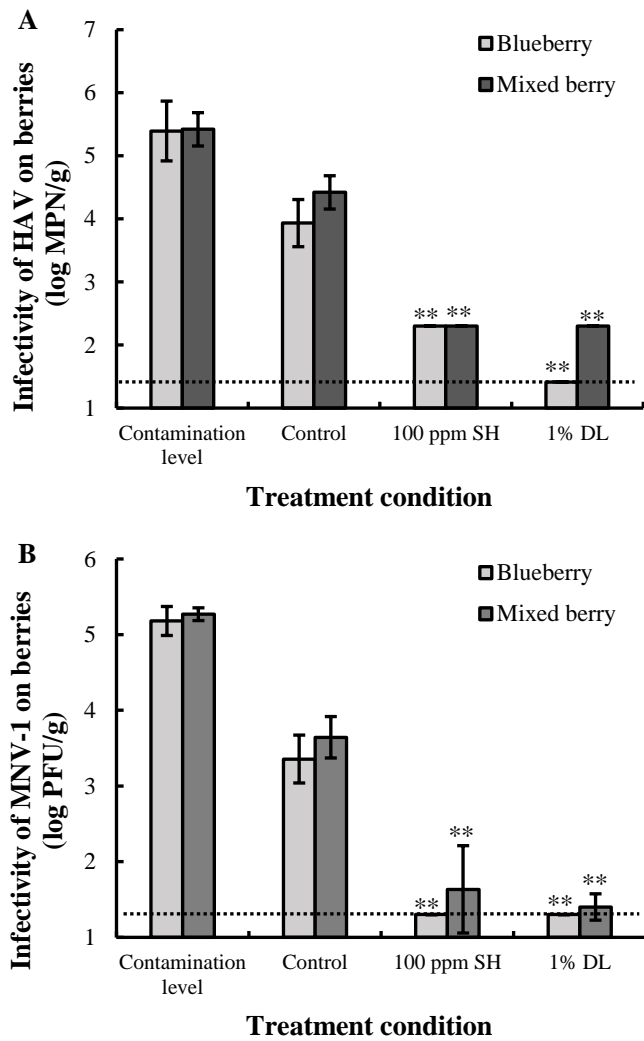


Fig. 5 Infectivity of HAV (A) and MNV-1 (B) on berry surfaces after 1 min of contact with various reagents. Blueberry and mixed berry were contaminated with HAV or MNV-1 at the infectivity of approximately 5~5.5 log MPN or PFU/g as shown “Contaminated level”, then soaked in distilled water (control), 100 ppm of sodium hypochlorite (SH), or 1% of DL for 1 min. Values are expressed as mean \pm SD ($n=3$). Dashed line shows detection limit of infectivity measurement. Significant difference between control and sample (soaked in 100 ppm SH or 1% DL) was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

第1章 小括

本章では、DL をノロウイルスの新規ウイルス不活化剤としての応用性を検討することを目的として、第1節ではDLの非加熱喫食食品中におけるノロウイルス不活化効果を、第2節ではノロウイルス以外の食水系感染症ウイルスとしてHAVに対する不活化効果を検証した。

第1節より、DLは複数のサラダおよびパンフィリング中においてMNV-1に対して不活化効果を示すことが明らかになった。加熱工程を伴わず、従事者の手指による取り扱いが比較的多い食品であるサラダやパンフィリングにおいてもDLによる不活化効果が発揮されたことから、DLを食品に添加できるウイルス不活化剤として利用できる可能性が示唆された。しかし、DLによる不活化効果には食品の種類によって差異があり、タマゴサラダなど一部の食品ではDLによる不活化効果が十分に発揮されなかった。この現象は、食品成分がMNV-1に保護的に働いたことによるものであると推察されたが、DLによるウイルス不活化機構が判然としていないことから、その解明が必要である。

第2節より、ノロウイルスに対して不活化効果を示すDLが系統学上遠縁なHAVに対しても効果を発揮したことが明らかになった。DLが遺伝子型の異なる複数株のHAVに対しても不活化効果を示したことから、DLによる不活化スペクトルは特定の種や型に限定的ではないことが示唆された。さらに、HAV食中毒で世界的に問題となっているベリー類の洗浄剤として、DLが次亜塩素酸ナトリウムと同様に高い不活化効果を示すことも確認された。HAVやノロウイルスなどの食水系感染症ウイルスがベリーに混入しやすいポイント(生産に使用される水や作業従事者の手指)に応じてDLを利用することで、ベリーに付着したウイルスを効果的に洗浄できるものと考えられた。

以上の結果より、DL の新規ウイルス不活化剤としての可能性が示唆された。しかし、前述したように DL を製剤として汎用性を高めるうえで、このような応用性の検討のほか DL によるウイルス不活化機構の解明は必須である。次項に続く第 2 章では、DL によるノロウイルス不活化機構を明らかにするため、詳細な解析を行うこととした。

第 2 章

DL によるノロウイルス不活化機構の解明

これまでの研究から、DL によるノロウイルス不活化機構として大きく 2 点が明らかになっている。1 点目は、DL に曝露した MNV-1 を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、MNV-1 の粒径が膨大していたことである(Takahashi *et al.*, 2015)。通常の粒径と比較して、およそ 120%粒径が大きくなっていた。この傾向は、MNV-1 のみならず Human norovirus の VLP でも同様に確認されている(データ記載なし)。

2 点目は、DL に曝露した MNV-1 を核酸結合試薬である Propidium monoazide (PMA) 処理し、RT-qPCR に供した結果、PMA が MNV-1 のゲノムに結合したことである(Takahashi *et al.*, 2015)。PMA は光酸化によって選択的かつ不可逆的に 2 本鎖 DNA に結合し、DNA 合成酵素を阻害する。この場合、PMA は外的ストレス等によってウイルス粒子からゲノムが漏出したとき、あるいはウイルスの粒子構造が膨張・破壊したときにウイルスゲノムに結合することとなる。そのため、DL に曝露することで MNV-1 の粒子構造は破壊に向かうことが示唆されている(Takahashi *et al.*, 2015)。

しかし、これら 2 点の知見にはそれぞれ疑問が生じる。1 点目の疑問は、DL に曝露した際の MNV-1 の膨大は果たして真なのかである。約 35 nm の粒子が膨大しているのか、周囲に DL が吸着しているのかを最大分解能 0.3 nm の TEM (JEOL JEM 1200EX, Jeol) だけで判断するのは難しく、DL が MNV-1 粒子に吸着、まとわりついているに過ぎないという仮説を反証するには弱いといえる。

2 点目は、既報で実施された PMA-PCR による定量値とプラークアッセイによる定量値が完全には一致しておらず、ウイルス粒子が破壊されているのか断定しがたい点である。DL に曝露した MNV-1 のゲノムに PMA が結合したという現象は、ウイルス粒子の破壊を示唆するものではあるが、1 点目と同様にウイルス粒子の破壊

を断定するのは難しい。

そこで、本章では3つのアプローチを行うことで、DLによるノロウイルス不活化機構を明らかにすることとした。第1節では、DLがノロウイルスに対して不活化効果を強く発揮するpH条件を精査した。第2節では、DLによるノロウイルス不活化がいつ、どのステージで起きているのか宿主細胞におけるサイトカインの発現解析により明らかにした。第3節では、DLによるノロウイルス不活化効果を支持する領域がリゾチーム配列中に存在するという仮説のもと、リゾチーム配列におけるウイルス不活化作用ドメインを探索した。

第 1 節

DL がノロウイルス不活化効果を強く発揮する pH 条件の探索

DL によるノロウイルス不活化効果は、リゾチームの加熱温度ならびに加熱時間に依存的であることが既報で明らかになっているが(Takahashi *et al.*, 2015)、このほかにも DL の効果を作用する条件があると推察された。その過程で、加熱時のリゾチーム溶液の pH によって、DL のウイルス不活化効果に差異があることが複数回の試行から判明した。そこで、本節では DL がノロウイルスに対して不活化効果を強く発揮する条件を精査するため、DL の加熱変性時の pH、ならびにウイルスと反応する際の pH によるノロウイルス不活化効果の差異を検証した。あわせて、不活化効果に差異のある DL 間でどのような変化があるのか複数の解析手法を用いて明らかにすることとした。

実験材料および方法

供試ウイルスおよび細胞

供試ウイルスの MNV-1 ならびに宿主細胞の RAW264.7 は前章と同様の手順で調製した。

DL の調製

卵白リゾチーム（富士フィルム和光純薬株式会社）を蒸留水に 0.2%、1.0%、2.0% となるよう溶解し、それぞれの溶液 pH を 1N NaOH で pH 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5 に調整した。これを 0.2 μm CA フィルタでろ過滅菌した後、100°C のオイルバスで 40 分間加熱した。加熱後、速やかに氷冷したものを DL として以降の実験に使用した。

異なる pH で加熱調製した DL の MNV-1 に対する不活化効果の検証

前項で調製した DL と感染価が約 6 log PFU/mL の MNV-1 を 500 μ L ずつ等量混和した。このとき、0.2%、1.0%、2.0% DL の終濃度はそれぞれ 0.1%、0.5%、1.0%とした。反応時間は DL の終濃度が 0.1%および 0.5%の場合 60 分間、1.0%の場合 1 分間とし、所定時間室温で静置した。この時、コントロールとして MNV-1 500 μ L と滅菌蒸留水 500 μ L を混和し、60 分間反応させた。反応終了後、ただちに DMEM で 10 倍ずつ段階希釈した。得られたサンプルは、プラークアッセイ（第 1 章第 1 節に記載）に速やかに供した。

異なる pH 条件下における DL の MNV-1 に対する不活化効果の検証

上述で調製した 1.0% DL のうち pH 未調整 (pH 3.7) あるいは pH 6.5 の 2 種類各 500 μ L を 3 種類の標準液 (フタル酸塩 (pH 4.01)、中性リン酸塩 (pH 6.86)、ホウ酸塩 (pH 9.18)、いずれも東亜ディーケーケー株式会社) 450 μ L とそれぞれ混和した。これに、感染価が約 6 log PFU/mL の MNV-1 を 50 μ L ずつ接種し、室温で 60 分間静置した。コントロールとして、滅菌蒸留水 500 μ L と各種 pH 標準液 450 μ L を混和したものに MNV-1 を 50 μ L 接種し、室温で 60 分間静置した。反応後、ただちに DMEM で 10 倍ずつ段階希釈し、プラークアッセイ（第 1 章第 1 節に記載）に供した。

DL の表面疎水度測定

前述で調製した DL の表面疎水度を、Protein stability and aggregation (PSA) assay kit (Profoldin) により測定した。各種 DL を 0.5 mg/mL になるよう蒸留水で希釈し、これに 1,000 \times PSA を 1 \times となるよう添加した。これをプロトコールに記載された所定時間静置した後、96 ウェル黒色プレートに分注した。その後、蛍光プレートリーダー

ー（コロナ電気）を用いて励起波長 550 nm、測定波長 610 nm の条件で吸光度測定を行った。

DL のチオール基測定

前述で調製した DL を 0.1%、0.5%、1%になるよう蒸留水で希釈した。希釈した DL 200 μ L をイオン交換水 192 μ L、1M Tris-HCl (pH 7.0) 8 μ L、エルマン試薬（付表に記載） 2.8 μ L と混和し、室温暗所で 60 分間静置した。その後、反応液を 96 ウェルプレートに分注し、マイクロプレートリーダーを用いて、測定波長 412 nm における吸光度を測定した。

DL の円偏光二色性（CD）スペクトル測定

DL を 100 μ g/mL となるよう蒸留水で希釈し、円二色性分散計 (J-720、日本分光) を用いた CD スペクトル測定に供した。方法はプロトコールに倣い、測定条件は測定波長を 190~250 nm、走査速度を 100 nm/min、バンド幅を 1 nm、積算回数を 10 とした。

MNV-1 の大量培養および濃縮

RAW264.7 を前章と同様の手順で T225 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) にコンフルエントになるまで培養した。このフラスコから培地 (5% FBS + DMEM) を全量除去し、PBS (-) 10 mL で 3 回ウォッシュした後、フラスコ底面に接着した RAW264.7 を剥がさないよう Serum-free DMEM を 45 mL 加えた。これに、RAW264.7 に前章と同様の手順で調製した MNV-1 を MOI=1 となるよう接種し、37°C 5% CO₂ 条件下で 2 日間インキュベートした。インキュベート後、フラスコを 4 回の凍結融解に供し、8,000 \times g で 20 分間遠心分離した。

別途 RAW264.7 をコンフルエントになるまで培養した T225 フラスコ (5% FBS +

DMEM で培養) から前述と同様に PBS (-) でウォッシュ、Serum-free DMEM に入れ替えた後、先ほどの遠心上清である MNV-1 を 1 mL 接種した。接種後、37°C 5% CO₂ 条件下で 2 日間インキュベートし、凍結融解、遠心分離を同様の手順で行った。この操作を 6 回繰り返すことで、MNV-1 液に含まれる FBS 含量を減少させた。

6 回継代して得られた遠心上清を RAW264.7 がコンフルエントの T225 フラスコに 1 mL 接種し、37°C 5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートした。その後、フラスコ内の溶液を全量除去し、フラスコ底面を PBS (-) で 3 回ウォッシュした。これに Serum-free DMEM 10 mL を加え、スクレイパー (Thermo Fisher Scientific) で底面に付着した細胞を回収した。回収液は 4 回の凍結融解に供した後、8,000 ×g で 20 分間遠心分離した。

最後に、得られた上清を限外ろ過に供した。上清 9 mL を Vivaspin® Turbo 15 (100K MWCO、Sartorius) にアプライし、4,000 ×g で 55 分間遠心分離することでおよそ 120 μL に濃縮した。濃縮液における MNV-1 の感染価がおよそ 9 log PFU/mL であることをプラークアッセイ (第 1 章第 1 節に記載) で確認した後、濃縮 MNV (cMNV) として次項に示すバイオアナライザーによる解析に使用した。

バイオアナライザーによる MNV-1-DL 反応物の解析

cMNV-1 2 μL と 2% の DL (pH 6.5) 3 μL を混和し、室温で最大 60 分間反応させた (DL の終濃度 : 1.2%)。このほか、cMNV-1 2 μL と滅菌蒸留水 3 μL の混和物、95°C で 20 分間加熱処理した cMNV-1 2 μL と滅菌蒸留水 3 μL の混和物も用意した。cMNV-1 を DL に反応させた後、ただちにすべてのサンプルを High sensitivity protein 250 kit (Agilent Technologies) の Pico labeling protocol に倣って Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies) に供した。

統計処理

試験は3回ずつ独立して試行し、結果を平均値±標準偏差で示した。DLのCDスペクトル (Fig. 10) は3回ずつ測定したプロットの平均値で示した。

有意差検定はMicrosoft Excelを用いたダネット法により行い、具体的にはDLによるMNV-1不活化試験 (Fig. 6, 7) およびバイオアナライザーによる解析 (Fig. 11) ではコントロール区と試験区を、DLの表面疎水度ならびにチオール基測定 (Fig. 8, 9) では非加熱区と加熱区を比較した。

結果

異なるpHで加熱調製したDLのMNV-1に対する不活化効果の検証

pHを4.5~8.5に調整した1% (終濃度) のDLにMNV-1を1分間曝露した結果、MNV-1の感染価はpH 3.7 (未調整) の場合0.6 log PFU/mL、pH 4.5の場合1.4 log PFU/mL、pH 5.5の場合0.9 log PFU/mL、pH 6.5、7.5、8.5の場合4.6 log PFU/mL減少した (Fig. 6A)。pH4.5~8.5のDLに曝露した際のMNV-1の感染価は、コントロール (滅菌蒸留水曝露区) と比べて有意に低かった ($p < 0.01$)。また、pH 6.5~8.5のDLに曝露した結果、MNV-1の感染価は当該試験系の検出限界である1.0 log PFU/mLを下回った。

0.1%、0.5% DLに60分間曝露した際も同様に、MNV-1の感染価はDLのpHが高いほど減少する傾向にあり、pH 6.5、7.5、8.5の0.1% DLあるいはpH 5.5、6.5、7.5、8.5の0.5% DLに曝露した場合、MNV-1の感染価はコントロールと比べて有意に低かった ($p < 0.01$) (Fig. 6B)。具体的には、0.5% DLにMNV-1を60分間曝露することで、感染価はpH 6.5の場合2.0 log PFU/mL、pH 7.5の場合3.3 log PFU/mL、pH 8.5の場合3.7 log PFU/mL減少した。

異なる pH 条件下における DL の MNV-1 に対する不活化効果の検証

pH 未調整 (3.7) および pH 6.5 で調製した 0.5% (終濃度) の DL を pH 4.01、pH 6.86、pH 9.18 の緩衝液と混和し、MNV-1 を 60 分間反応させた。中性である pH 6.86 の緩衝液中において、MNV-1 の感染価は pH 6.5 の DL に曝露した場合のみコントロール (滅菌蒸留水曝露区) と比べて 1.6 log PFU/mL 有意に低かった ($p < 0.05$, Fig. 7)。

弱酸性である pH 4.01 緩衝液中で MNV-1 の感染価が減少したのは pH 3.7 の DL を用いた場合のみであり、その減少量は 0.6 log PFU/mL であった。

弱塩基性である pH 9.18 の緩衝液中で MNV-1 の感染価は DL 調製の pH に関わらずコントロールと比べて有意に減少し ($p < 0.01$)、その減少量は pH 3.7 の DL の場合 1.3 log PFU/mL、pH 6.5 の DL の場合 2.3 log PFU/mL であった (Fig. 7)。最も MNV-1 の感染価が減少した条件は、弱塩基性条件下 (pH 9.18 の緩衝液混和) における pH 6.5 で調製した DL に曝露した場合であった。

DL の表面疎水度測定

各種 DL および pH 4.5~8.5 で調製した非加熱リゾチーム (Native Lzm) の表面疎水度を測定した (Fig. 8)。いずれの pH においても、DL の蛍光値は Native Lzm より有意に高かった ($p < 0.01$)。特に、DL の蛍光強度は pH が高いほどより強くなった。蛍光強度の強さと表面疎水度は相関しており、DL の調製時の pH を上げるほど表面疎水度が上昇したことを意味している。

DL のチオール基測定

DL および Native Lzm における遊離チオール基を吸光度により測定した (Fig. 9)。いずれの pH においても DL の吸光度は Native Lzm と比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。チオール基の測定結果も前述の表面疎水度と同様に、DL の pH を上げるほど

高い傾向にあった。

DL の円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

DL および Native Lzm の CD スペクトルを測定した。まず、Native Lzm の CD スペクトルにおいて、 α ヘリックスに由来する 208 nm および 222 nm 付近における負の極大と、191~193 nm 付近における正の極大が確認できた (Fig. 10A)。

Native Lzm と DL (pH 6.5) を比較したところ、Native Lzm の CD スペクトルに存在する α ヘリックス由来の 208 nm および 222 nm 付近における負の極大が、DL においては認められず、DL における α ヘリックス含量の減少が認められた (Fig. 10A)。また、異なる pH に調整した DL 同士でピークを比較すると、pH 3.7、4.5、5.5 の DL では 208 nm および 222 nm における負の極大がある一方、pH 6.5、7.5、8.5 の DL では認められず、 α ヘリックス含量が減少していた (Fig. 10B)。

バイオアナライザーによる MNV-1-DL 反応物の解析

cMNV-1 の総タンパク量が 12,269 pg/ μ L であったのに対し、加熱処理した cMNV-1 の総タンパク量は 401 pg/ μ L、cMNV-1-1.2% DL 反応物では 4,472 pg/ μ L に減少した (Fig. 11)。cMNV-1-0.6% DL 反応物の総タンパク量と、コントロール (Untreated cMNV-1) の総タンパク量間における有意差は認められなかったが、加熱処理した cMNV-1 および cMNV-1-1.2% DL 反応物の総タンパク量はいずれもコントロールと比べて有意に減少した (前者では $p < 0.01$ 、後者では $p < 0.05$) (Fig. 11)。

考察

これまでの研究から判明した、リゾチームは加熱変性して初めて効果を示すという事実から、DLの不活化効果には加熱変性にともなうリゾチームの立体構造の変化が大きく寄与していることが推察された。そこで、本節では加熱時のDLのpHを調整した際のMNV-1に対する不活化効果を検証した。その結果、pHによってDLの不活化効果は大きく異なり、終濃度1%のDLでは最大3.9 log PFU/mLの差異が認められた (Fig. 6)。加熱時のpHを高めるほど、DLの不活化効果は高まった。

これに加えて、弱酸性、中性、弱塩基性条件下におけるDLの不活化効果を検討した結果、同一pHに調整したDLであっても、反応時のpHによってその効果に差異が認められた。pH 6.5の0.5% DLにMNV-1を曝露した場合、感染価は中性条件下で1.6 log PFU/mL、弱塩基性条件下で2.3 log PFU/mL減少した一方、弱酸性条件下では減少しなかった (Fig. 7)。

これらの結果から、DLの持つウイルス不活化効果は加熱変性時のpHに左右されること、さらにpHを調整したDLであっても、反応時のpHによって効果に差異があることが明らかになった。そこで、リゾチームが変性することでどのような変化が生じるのか検討するため、DLの表面疎水度、チオール基、CDスペクトルを測定した。Fig. 6の不活化効果と同様に、DLの表面疎水度およびチオール基は溶液のpHが高まるほど増大した (Fig. 8, 9)。

リゾチームは129のアミノ酸から成る、等電点11のタンパクである。高いpH (pH 6.5~8.5) で調製したリゾチームは、正負の電荷の総和 = 0の状態に近づいている状態といえる (有坂ら, 2004)。正の電荷を持つリゾチームにおいて、等電点に近づけるように調整された溶液中ではタンパク質分子間の引力が最も大きくなり、結果として加熱などの外的条件によって立体構造がゆらぎやすい (ほぐれやすい) と考えられた。つまり、リゾチームを加熱する際にpHを高く調整することが、加熱変性

時の立体構造のほぐれを引き起こすきっかけといえる。

上述の考察は、pH を高めるほど DL の表面疎水度が增大するという結果 (Fig. 8) とも整合性が取れる。タンパク質の立体構造は共有結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用、水素結合などによって物理化学的に安定な状態が保たれている。しかし、加熱変性によってタンパクの立体構造が崩れ、内部に畳まれていた疎水性アミノ酸が露出する。リゾチームも同様に、加熱変性することで疎水性アミノ酸が露出しており、溶液の pH が高いほど疎水性アミノ酸の露出が多かったことが Fig. 8 より確認された。

チオール基の測定には、DL におけるジスルフィド結合の開裂を確認する狙いがあった。Fig. 9 では溶液の pH を高く調整するほど、加熱変性時の DL におけるチオール基が増加することが確認された。リゾチームは分子量の割にジスルフィド結合が多いという特徴がある。ジスルフィド結合は2つのシステインのチオール基が共有結合することで形成される (萩原ら, 2010)。リゾチーム分子にはジスルフィド結合を形成するシステインの近傍に複数の疎水性アミノ酸が存在する (Fig. S2)。これより、加熱変性によってリゾチームのジスルフィド結合が開裂し、近傍の疎水性アミノ酸が露出したものと考えられた。

DL の表面疎水度、チオール基測定結果から推察された加熱変性時のリゾチームの性状変化は、Fig. 7 で異なる pH 条件下における DL の不活化効果に差異が現れた結果と関連していると考えられる。加熱変性によって疎水性度が高まったことで、周囲の pH によって凝集しやすくなる。実際に、弱塩基性である pH 9.18 の緩衝液に DL を混和しても反応物は透明であったのに対して、酸性である pH 4.01 の緩衝液に pH 6.5 の DL を混和した際、混和物は白濁した (データ記載なし)。これより、DL によるウイルス不活化効果はリゾチームが加熱変性する際の疎水性残基などの露出によって発揮されるものであり、その状態が阻害されるような条件下 (低 pH など) においては不活化効果を示さないものと考えられた。

さらに、DLのCDスペクトルを測定した。CDスペクトルは左右の円偏光の吸光係数の差をプロットしたものであり、タンパク質の二次構造の解析に用いられる。本研究では測定波長を190~250 nmとした。これは、スペクトル測定中に高電子倍増管にかかるエネルギー（HT値）が低波長ほど高くなり、ノイズとしてスペクトルパターンに影響を及ぼすからである。Fig. 10のスペクトル測定中におけるHT値をプロットしたデータをFig. S3に示した。200 nm以下の波長ではHT値が500 Vを超えていたため、測定波長の設定は190 nm以上とした。なお、190~200 nmにおけるCDスペクトルパターンにノイズの影響がなかったことはローデータから確認済みである。

タンパクの二次構造はそれぞれ固有のスペクトルパターンおよびCD強度を有しており、 α ヘリックスは208 nm付近および222 nmに負の極大と192 nm付近に正の極大を、 β 構造は216 nm付近に負の極大と195~200 nm付近に正の極大を、ランダムコイルは190~200 nm付近に負の極大をもつ(Greenfield *et al.*, 1969)。

リゾチームの加熱の有無によるCDスペクトルを比較すると、非加熱区には α ヘリックスに由来208 nmおよび222 nm付近の負の極大、192 nm付近の正の極大が確認されたが、加熱区においてはこれらの極大が減少していた(Fig. 10A)。これより、加熱変性によって α ヘリックスの含量が減少していたと推察された。また、pHの異なるDLのスペクトル間で比較すると、MNV-1に対して高い不活化効果を示していたpH 6.5~8.5のDLはきわめて類似したピークを描いており、208 nmおよび222 nm付近の負の極大は非加熱区と比べて減少していた(Fig. 10B)。これより、MNV-1に対して十分な不活化効果を示すDLでは、加熱変性時に二次構造が大きく変化していることが明らかになった。

これらの結果から、リゾチームを加熱する際のpHを高く調整することで立体構造がよりほぐれ、タンパク内部に折り畳まれている疎水性アミノ酸が露出しているものと考えられた。言い換えれば、DLは加熱変性による構造変化によってMNV-

1 に対する不活化効果を獲得している可能性が示唆されたといえる。そこで、DL に曝露した MNV-1 がどのような状態なのか、Bioanalyzer (Agilent Technologies) を用いて追加検証を行った。cMNV-1 の総タンパク量が 12,269 pg/μL であったのに対し、加熱処理した cMNV-1 では 401 pg/μL、1.2% DL と 60 分間反応させた cMNV-1 では 4,472 pg/μL に減少した。DL-cMNV-1 反応物の総タンパク量は DL の濃度に依存的に減少していた (Fig. 11)。

12,269 pg/μL の cMNV-1 を DL と混和した際、もし不活化作用などが生じなければ、反応物の総タンパク量は 12,269 pg/μL 以上の値になると考えられる。しかし、反応物の総タンパク量が反応前の cMNV-1 よりも低い値になったという事実は、DL を MNV-1 に曝露することでウイルスの分解あるいは凝集が起きている可能性を示唆するものと言える。しかし、この結果単独から DL に曝露した MNV が分解しているとは断言できない。なぜならば、使用した High sensitivity protein 250 kit のタンパク測定範囲は 10~250 kDa であり、DL と MNV が反応、凝集塊を形成した場合ならびに、反応物が 10 kDa 未満に分解された場合には、すべてのタンパクのリジン基をラベル化できない可能性があるからである。

既報(Takahashi *et al.*, 2015) では、PMA-PCR によって DL に曝露した MNV-1 のキャプシドが破壊されている可能性が示唆されているが、DL に曝露した MNV-1 の粒子を TEM によって検鏡できている。これより、DL に曝露することですべての MNV-1 が破壊されるとは言い難いが、Bioanalyzer を用いた検証からも、DL に曝露した MNV-1 には分解、凝集の両方が生じている可能性を考慮する必要があるといえる。

图表

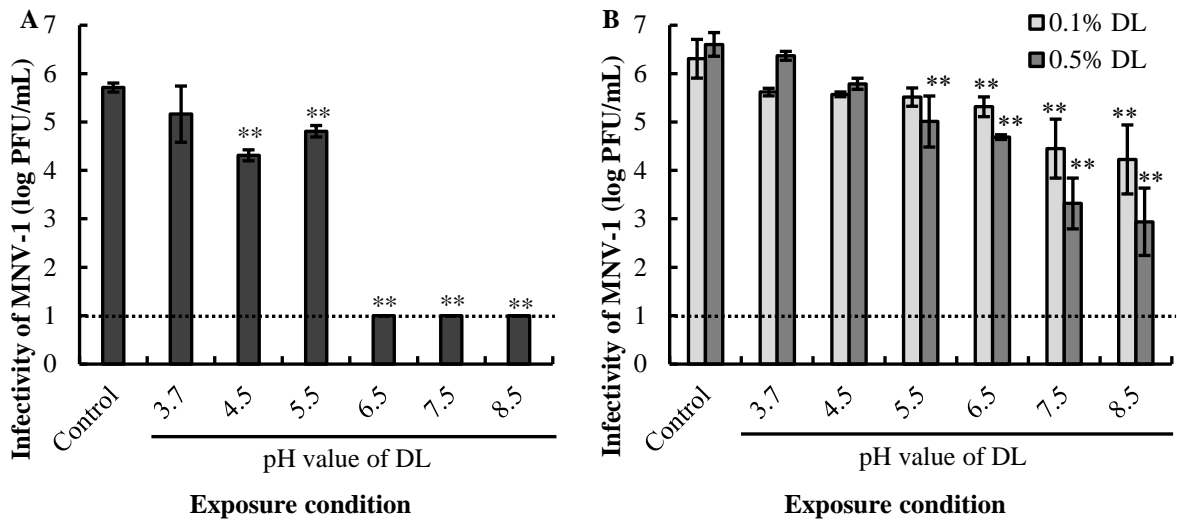


Fig. 6 Infectivity of MNV-1 after exposure to DL with different pH values. (A) MNV-1 was exposed to distilled water (Control) or 1% of DL for 1 min. (B) MNV-1 was exposed to distilled water (Control), 0.1%, or 0.5% of DL for 60 min. Values are expressed as mean \pm SD ($n=3$). Dashed line shows detection limit of plaque assay. Significant difference between control and sample (exposed to DL) was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

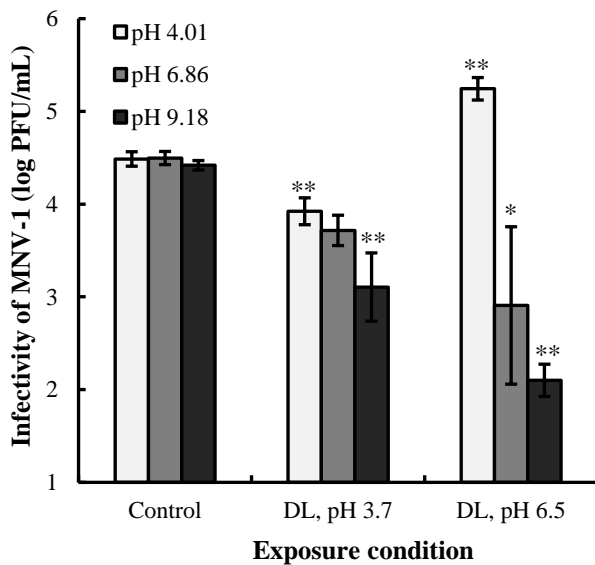


Fig. 7 Infectivity of MNV-1 after exposure to DL at pH 3.7 and 6.5 in buffer with different pH values. MNV-1 was exposed to distilled water (Control), 0.5% DL at pH 3.7, and 0.5% DL at pH 6.5 for 60 min. Before exposure, reagents (D.W. and DL) were diluted in pH standard buffer at pH 4.01, 6.86, and 9.18. Values are expressed as mean \pm SD ($n=3$). Significant difference between control and sample (exposed to DL) was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

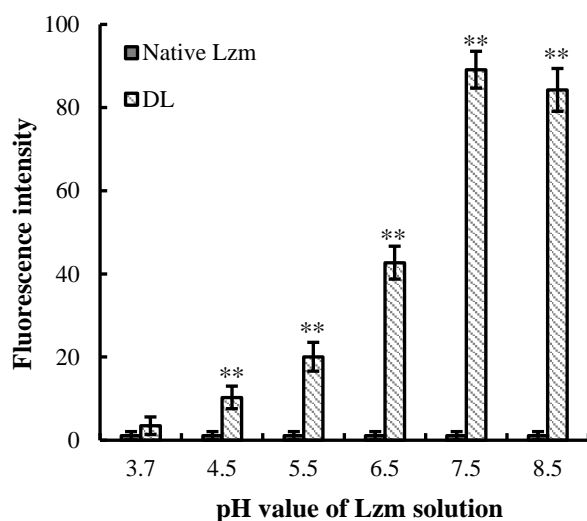


Fig. 8 Surface hydrophobicity of 1% lysozyme solution with different pH values. Native lysozyme (Native Lzm) was adjusted pH from 4.5 to 8.5 by using 1N NaOH. After denaturation at 100°C for 40 min at 1% (DL) were added with 1x PSA solution and measured fluorescence intensity ($\lambda_{EX} = 550 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 610 \text{ nm}$). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant difference between “Native Lzm” and “DL” at the same pH value was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

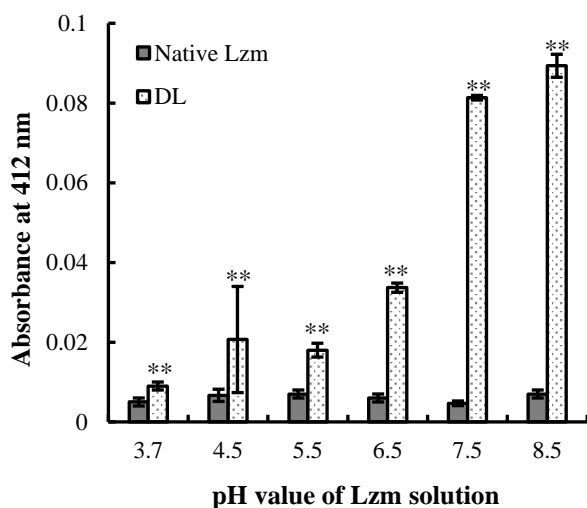


Fig. 9 Thiol group in 1% of lysozyme solution with different pH values. Native lysozyme (Native Lzm) was adjusted pH from 4.5 to 8.5 by using 1N NaOH. After denaturation at 100°C for 40 min at 1% (DL) were added with Ellman’s reagent and measured absorbance at 412 nm. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant difference between “Native Lzm” and “DL” at the same pH value was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

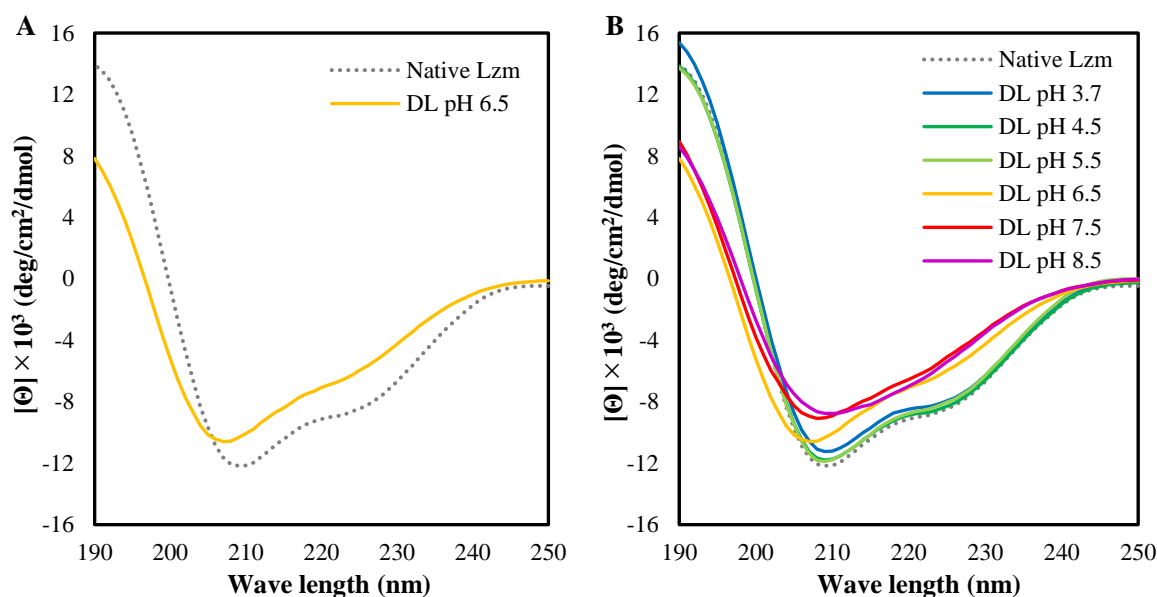
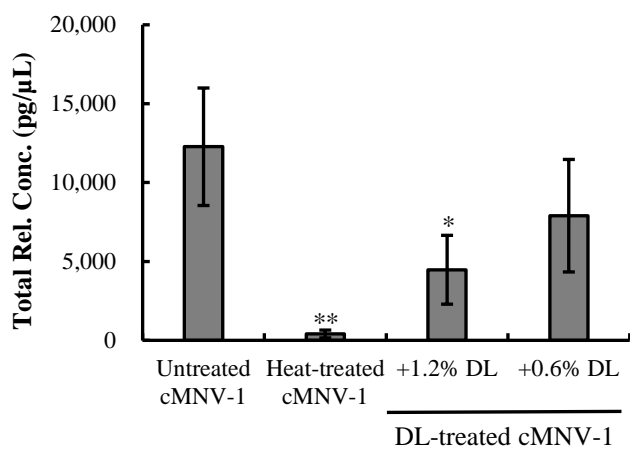


Fig. 10 Circular dichroism (CD) spectra of lysozyme solution. Native lysozyme (Native Lzm) was adjusted pH from 4.5 to 8.5 by using 1N NaOH. After denaturation at 100°C for 40 min at 1% (DL), CD spectra was measured. (A) Native lysozyme (Native Lzm) and DL at pH 6.5. (B) DL at pH 3.7, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, and 8.5. Values are expressed as average of measurement in triplicate.



Analyzed cMNV-1

Fig. 11 Total relative concentration of concentrated MNV (cMNV) determined by Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies). Two-μL of cMNV was heated at 95°C for 20 min (Heat-treated cMNV) or exposed to 3 μL of DL at the final concentration of 0.6, 1.2% 60 min (DL-treated cMNV). For negative control, 2 μL of cMNV was mixed with 3 μL of distilled water and heated at 95°C for 20 min (Heat-treated cMNV). Significant difference between control (Untreated cMNV-1) and each sample was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

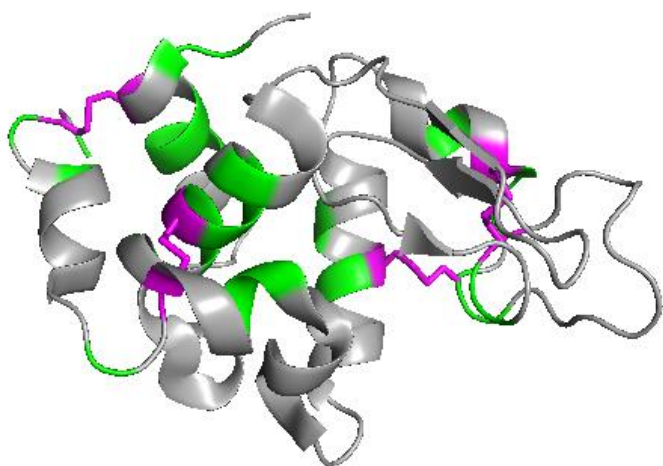


Fig. S2 3D image of Lzm (PDB: 6BO2). Disulfides were shown as magenta stick, and hydrophobic amino acids near disulfides were colored green. Figure was prepared using Pymol.

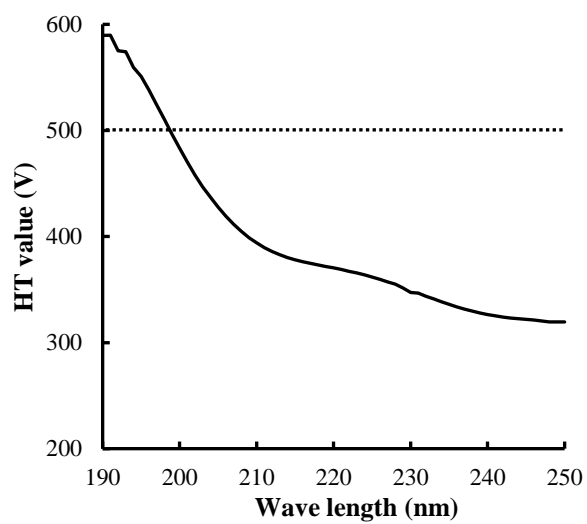


Fig. S3 HT value during measuring CD spectra of DL samples in Fig. 10. Values are expressed as average of all the measured samples ($n = 21$).

第 2 節

DL のノロウイルスに対する作用ステージの検証

これまでの研究では、DL に曝露した MNV-1 が宿主細胞である RAW264.7 に対して感染できるかどうか、プラークアッセイを用いて検証した。プラークアッセイで得られた結果は、DL による MNV-1 の不活化という現象を支持するものであるが、その不活化は DL が MNV-1 の周囲に吸着しているだけなのか、真に MNV-1 粒子の破壊に向かっているのかまでは定かでない。また、DL に曝露した MNV-1 がウイルス粒子として宿主細胞内へ侵入できるのかについても不明である。本節では、DL に曝露した MNV-1 を RAW264.7 に接種した際の RAW264.7 におけるサイトカインの発現を解析することで、DL のノロウイルスに対する作用ステージを明らかにすることを目的とした。

実験材料および方法

供試ウイルスおよび細胞

供試ウイルスの MNV-1 ならびに宿主細胞の RAW264.7 は前章と同様の手順で調製した。

各種 MNV-1 サンプルの RAW264.7 への接種

T25 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) に RAW264.7 をコンフルエントになるまで培養し、これに以下に示す 4 種類のサンプルを接種した。

1. MNV-1

第 1 節と同様の手順で作製した MNV-1 液を RAW264.7 に対して MOI = 0.01 となるよう接種した。

2. MNV-1 の不活化ウイルス

感染価 6 log PFU/mL の MNV-1 100 μ L を 100°C で 40 分間加熱し、不活化した。これを加熱前の感染価で換算して MOI=0.01 となるよう 5% FBS + DMEM で希釈し、RAW264.7 に接種した。

3. MNV-1 の DL 曝露産物

感染価 6 log PFU/mL の MNV-1 を第 1 節と同様の手順で調製した 2% DL (pH 6.5) と 100 μ L ずつ等量混和し、室温で 60 分間静置した。このとき、DL の終濃度は 1%とした。反応後、上述と同様に MOI = 0.01 となるよう 5% FBS + DMEM で希釈した後、RAW264.7 に接種した。

4. DL

2% DL 100 μ L を 5% FBS + DMEM で 3.と同一濃度になるよう希釈したものを RAW264.7 に添加した。

いずれのサンプルも接種後、RAW264.7 は 37°C 5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートした。

RNA 抽出、RT-qPCR

インキュベートしたフラスコからセルスクレイパー (Thermo Fisher Scientific) を用いて底面に接着した RAW264.7 を回収した。回収した細胞懸濁液 5 mL は 300 \times g で 5 分間遠心分離した。得られた沈査から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) のプロトコ

ールに倣い、Total RNA を抽出した。

次に、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を用いて cDNA 合成を行った。5× PrimeScript buffer 2 μL に PrimeScript RT Enzyme mix I を 0.5 μL、25 pmol の Oligo dT primer、50 pmol の Random 6mers に、Total RNA を 8 μL 添加した。逆転写反応は Thermal cycle GeneAmp PCR System 9700 (GE ヘルスケア) を用いて、37°C 15 分、85°C 5 秒の条件で行った。

逆転写反応の後、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus、タカラバイオ) を用いてリアルタイム PCR を行った。2× TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL に 0.4 μM のプライマー (Table 2 に記載)、滅菌精製水 8.5 μL に逆転写産物 2 μL を添加した。反応は QuantStudio 3 Realtime PCR system (Life Technologies) を用いて、95°C 30 秒に続き、95°C 5 秒、60°C 30 秒を 40 回繰り返した。

ΔΔCt 法によるサイトカインの発現解析

リアルタイム PCR で得られた蛍光データは、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとした ΔΔCt 法によりサイトカイン発現量の比較定量を行った。標的遺伝子の発現量は、以下の式の通りに算出した。

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Target gene}} - Ct_{\text{Reference gene}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Mock}}$$

$$\text{Expression level of target gene} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

統計処理

試験は 3 回ずつ独立して試行し、結果を平均値±標準偏差で示した。コントロール区 (Mock) と試験区における有意差検定は、Microsoft Excel を用いたダネット法

により行った。

結果

RAW264.7 に各種条件の MNV-1 を接種し、感染させた際のサイトカイン発現を qRT-PCR により解析した。MOI = 0.01 の MNV-1 を接種した場合、インターフェロン β 、インターロイキン 6 のいずれも非感染区 (Mock) と比べて有意に発現上昇した ($p < 0.01$, Fig. 12)。一方、加熱処理により死滅した MNV-1 を接種した場合には 2 種類のサイトカインは発現上昇せず、DL に曝露した MNV-1 を接種した場合も同様であった。

考察

一般に、ウイルスは宿主細胞の機能を利用することで、自己を複製し生存している。その中でも、宿主の転写制御機構はウイルスと宿主との相互作用を理解するうえで重要な機構であるが、Human norovirus は前述のように安定した細胞培養系がないために宿主の転写制御機構に関しては不明な点が多い。一方で、MNV-1 を用いた研究が進められており、宿主細胞内における挙動が明らかになりつつある。

Enosi Tuipulotu *et al.* (2017) は MNV-1 に感染した際の宿主における遺伝子発現変化を詳細に解析し、MNV-1 が自然免疫応答を強力に誘導することを報告している。よって、本節では DL に曝露した MNV-1 を接種した際の RAW264.7 において、主要サイトカインであるインターフェロン β ならびにインターロイキン 6 の発現上昇の有無を解析した。

感染価を有する MNV-1 を接種することで、RAW264.7 におけるインターフェロン β 、インターロイキン 6 のいずれも著しく発現上昇した。しかし、DL 処理した MNV-1 を接種した場合は、加熱死滅体を接種した場合と同様にこれらサイトカインの有意な発現が認められなかった。また、コントロールとして DL を単独で RAW264.7 に添加した場合も同様に、サイトカインの発現上昇は認められなかった (Fig. 12)。

MNV-1 の宿主細胞における感染機構とサイトカインの発現に関する図を Fig. S4 に描画した。MNV-1 はエンドサイトーシスにより細胞内へ侵入し、脱殻、1 本鎖 RNA(+)ウイルスを複製する。これをキャプシドタンパクへと翻訳し、ウイルス粒子として 1 本鎖 RNA をパッキングした後、細胞外へ放出される。この一連の感染機構において、ウイルス RNA がエンドソームに取り込まれ、Toll 様受容体などを介した細胞内シグナル伝達が生じる。これにより、インターフェロンやインターロイキンなどサイトカインが分泌される(Enosi Tuipulotu *et al.*, 2017)。

MNV-1 の加熱死滅体を接種した場合、MNV-1 は不活化しているため上述の感染挙動をたどることができず、結果として宿主細胞内におけるサイトカイン遺伝子の発現上昇も起こらない。DL に曝露した MNV-1 も加熱死滅体と同様に、宿主細胞内のサイトカイン発現を誘導しなかったことから、DL に曝露した MNV-1 は、ウイルス粒子として宿主細胞に認識されない状態といえる。

したがって、DL による MNV-1 に対する不活化作用は細胞外で起きており、DL 処理した MNV-1 は宿主細胞内に侵入できないものと考えられた。この結果は、DL による反応が不可逆的なものであることを支持しており、DL に曝露した MNV-1 が宿主細胞内に侵入、増殖することは不可能であることを意味しているといえる。

图表

Table 2 Primers used to analyze gene expression changes with MNV-1 infection in RAW264.7 (Enosi Tuipulotu *et al.*, 2017).

Gene ID	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IFN- β	TCCCTATGGAGATGACGGAG	ACCCAGTGCTGGAGAAATTG
IL-6	GATGGATGCTACCAAACCTGGA	TCTGAAGGACTCTGGCTTTG

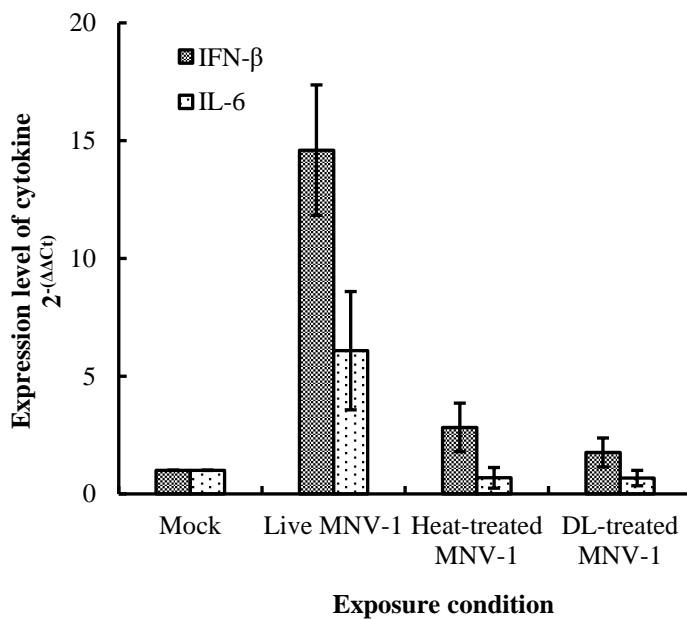


Fig. 12 Expression level of interferon β and interleukin 6 in murine macrophage cells (RAW264.7) after infection of MNV-1. RAW264.7 (Mock) was inoculated with MNV-1 at MOI = 0.01 (Live MNV-1), heat-inactivated MNV-1 at 100°C for 10 min (Heat-treated MNV-1), and MNV-1 after exposure to 1% DL for 60 min (DL-treated MNV-1). The expression level of IFN- β and IL-6 were estimated by RT-qPCR. Fold changes (relative to mock) were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Significant difference between the uninoculated sample (Mock) and each sample was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

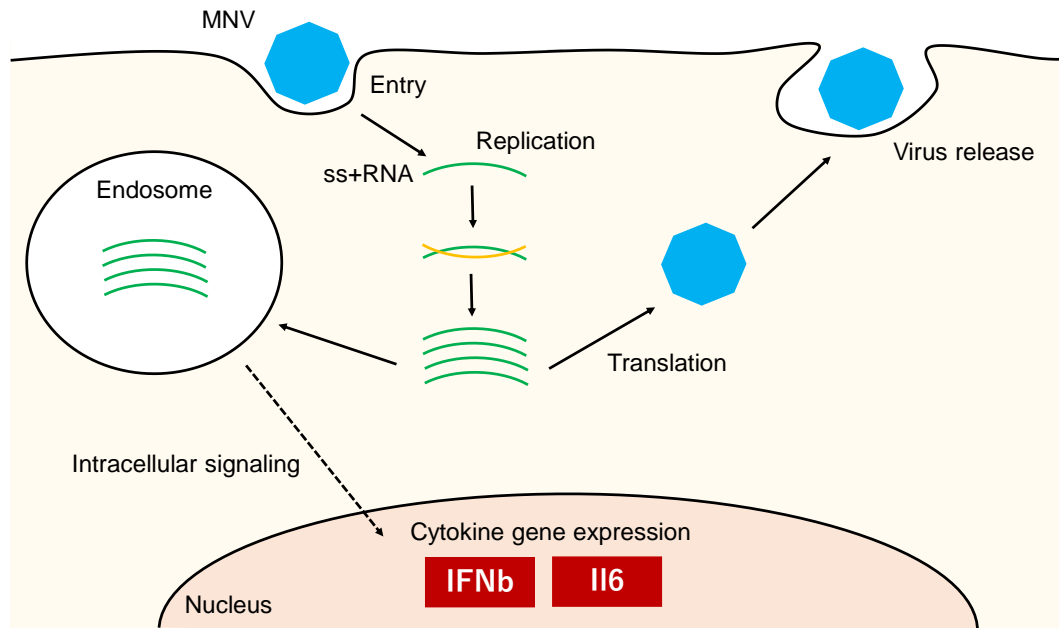


Fig. S4 Proposed roles of cytokine genes in mice macrophage cells (RAW264.7) induced by MNV-1. Genes colored in red, IFN β and IL6, are upregulated. Figure was modified from (Enosi Tuipulotu *et al.*, 2017).

第 3 節

DL におけるウイルス不活化ドメインの探索

第 1 節および第 2 節はリゾチームの全長を用いたアプローチであったが、第 3 節では、DL におけるウイルス不活化ドメインを探索することを目的とした。具体的には、既報で MNV-1 に対して不活化効果が確認されている領域に任意の置換を加えた際の不活化効果を検証した。

既報(Takahashi *et al.*, 2015)では、129 のアミノ酸から成るリゾチーム (Acc. No. AAL69327.1) のうち 5~39 番目のアミノ酸残基 (Lzm 5-39) が MNV-1 に不活化効果を示したことを確認している (Fig. S5)。Lzm 5-39 以外で供試した配列の加熱変性体では、MNV-1 に対する不活化効果が著しく減少したことから、DL におけるウイルス不活化ドメインはリゾチーム配列の前半部分であると考察している。

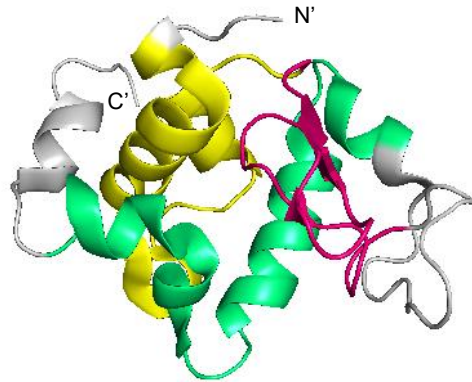


Fig. S5 3D image of Lzm (PDB: 6BO2) peptides used in Takahashi *et al.*, *Sci. Rep.* 5:11819 (2015). Amino acid residue 5 to 39, 40 to 63, and 80 to 114 are colored yellow, pink, and light green, respectively. N' and C' means termini of peptide sequence. Figure was prepared using Pymol.

本節では、リゾチームの疎水性ならびに表面電荷が DL のもつウイルス不活化効果になんらかの影響を及ぼしているという仮説の下、Lzm 5-39 に任意の置換を加えた 3 種類のペプチドを合成した。

実験材料および方法

リゾチーム配列に任意の置換を加えたペプチドの合成

リゾチーム (PDB ID: 6BO2) 配列に任意の置換を加えたペプチド (Table 3) を各種合成した (ユーロフィンジェノミクス株式会社)。

はじめに、既報(Takahashi *et al.*, 2015)で MNV-1 に対して不活化効果を示すことが確認された、リゾチームのアミノ酸配列における 5 残基目から 39 残基目の配列(Lzm 5-39) をもとに、3 種類の置換体 (R1~3) を合成した。Replacement 1 では Lzm 5-39 の電荷を正から負にするため、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸を同数になるよう置換した。Replacement 2 では、Lzm 5-39 の疎水性度を下げるため、配列上の芳香族側鎖をすべて中性・極性アミノ酸であるアスパラギンに置換した。Replacement 3 では、Lzm 5-39 の正電荷をさらに正寄りに高めるため、酸性アミノ酸をアスパラギンに置換した。

このほか、Lzm 5-39 以外の配列も合成した。Lzm 5-39 から 4 残基分 N 末端側にシフトした 35 アミノ酸残基 (Lzm 1-35) ならびに、C 末端側に存在する 3 つのヘリックス構造に相当する 38 残基 (Lzm 88-125) を合成した。

合成したペプチドの加熱変性体による MNV-1 不活化効果の検討

前述で合成したペプチドは、2% (w/v) リゾチーム (分子量 14,307) と同一のモル濃度になるよう、滅菌蒸留水に溶解させた後、オイルバスで 100°C 40 分間加熱、ただちに氷冷した。ペプチドの加熱変性体と感染価およそ 6 log PFU/mL の MNV-1 を 120 μ L ずつ等量混和し、室温で 60 分間静置した。このとき、ペプチドの終濃度は 1% リゾチーム (w/v) と同一モル濃度とした。反応後、すみやかに DMEM で 10 倍ずつ段階希釈し、プラークアッセイ (第 1 章第 1 節に記載) に供した。

合成したペプチドの CD スペクトル測定

合成したペプチドのうち、Lzm 5-39 の加熱変性体および非加熱体を CD スペクトル測定に供した。ペプチドのアミノ酸残基濃度が約 900 μM となるよう滅菌蒸留水で希釈し、前述と同様に 100°C で 40 分間加熱変性した。これを、円二色性分散計 (J-720、日本分光) を用いた CD スペクトル測定に供した。測定条件は測定波長を 190~250 nm、走査速度を 100 nm/min、バンド幅を 1 nm、積算回数を 10 とした。

統計処理

試験は 3 回ずつ独立して試行し、結果を平均値 \pm 標準偏差で (合成ペプチドの CD スペクトルは 3 回取得したピークの平均値で) 示した。各試験群におけるウイルス不活化効果の有意差は、Microsoft Excel を用いたテューキー法により検定した。

結果

合成したペプチドの加熱変性体による MNV-1 不活化効果の検討

卵白リゾチーム (pH 未調整) および Lzm 5-39 とその置換体 (Replacement 1~3) を加熱変性し MNV-1 に曝露した際の感染価の減少量を Fig. 13 に示した。MNV-1 の感染価減少量は終濃度 1% の卵白リゾチーム (pH 3.7) の加熱変性体 (Lzm 1-129) では 0.9 log PFU/mL、Lzm 5-39 の加熱変性体では 1.7 log PFU/mL であった。一方、Lzm 5-39 の電荷を負になるよう置換した Replacement 1 および芳香族側鎖を置換し疎水度を下げた Replacement 2 の場合、加熱変性体による MNV-1 不活化効果は失われた。しかし、Lzm 5-39 の正電荷をさらに正に高めた Replacement 3 の加熱変性体では、MNV-1 の感染価減少量は 2.0 log PFU/mL となり、置換を加えていない Lzm 5-39 およびリゾチーム全長よりも不活化効果が増強された (Fig. 13)。

Lzm 5-39 から 4 酸残基分 N 末端側にシフトした Lzm 1-35 の加熱変性体では、MNV-1 の減少量は Lzm 5-39 と同じ 1.7 log PFU/mL であった。リゾチームの N 末端側に存在する 3 つのヘリックス構造に相当する Lzm 88-125 の場合、MNV-1 の減少量は 0.2 log PFU/mL であった (Fig. 13)。

合成したペプチドの CD スペクトル測定

Lzm 5-39 の加熱体および非加熱体の CD スペクトルを測定した結果、Lzm 5-39 の非加熱体で確認された α ヘリックス由来の 208 nm および 222 nm 付近における負の極大が、加熱体においてはいずれも減少していた (Fig. 14)。

考察

はじめに、Lzm 5-39 の置換体を 3 種類合成した。Lzm 5-39 は酸性アミノ酸 3 残基、塩基性アミノ酸 6 残基、非極性側鎖アミノ酸 16 残基、極性無電荷アミノ酸 10 残基の計 35 残基から成る。Lzm 5-39 の電荷ならびに疎水性がウイルス不活化効果に関係しているという仮説をもとに、以下に示す置換体を合成した (Table 3)。

Replacement 1 では Lzm 5-39 の疎水性はそのままに、電荷を正から負に変えることとし、塩基性アミノ酸 6 残基のうち 2 残基 (15 残基目のヒスチジン、33 残基目のリシン) を酸性アミノ酸のグルタミン酸に置換した。これにより、Replacement 1 の電荷は以下のように計算できる。

$$K + R + H - (D + E) = 4 - 5 = -1 \quad \text{※置換前の Lzm 5-39 の電荷は+3}$$

Replacement 2 では Lzm 5-39 の電荷を変えず、疎水性度を下げることとし、芳香族側鎖をもつアミノ酸 (28 残基目のトリプトファン、34、38 残基目のフェニルアラニン) を中性・極性アミノ酸であるアスパラギンに置換した。タンパク質の疎水性

指標として Hydropathy index や分配係数 Log P などが用いられるが (Branden *et al.*, 1992)、Replacement 2 の Hydropathy index の総和は-18.2 から-33.2 となった。

Replacement 3 では Lzm 5-39 の疎水性を変えず、電荷をさらに正に高めるために酸性アミノ酸 3 残基すべてを中性・極性アミノ酸のアスパラギンに置換した。これにより、Replacement 3 の電荷は前述と同様に計算すると+6 であった。

これらの置換体および Lzm 5-39、リゾチーム全長を加熱変性し MNV-1 に曝露した結果、不活化効果が最も高かったペプチドは、Lzm 5-39 の Replacement 3 (2.0 log PFU/mL)、次いで Lzm 5-39 (1.7 log PFU/mL) であった。リゾチーム全長による MNV-1 不活化効果は Lzm 5-39 よりも低かったほか、Replacement 1、Replacement 2 では Lzm 5-39 のもつ不活化効果が失われた (Fig. 13)。

リゾチーム全長よりも Lzm 5-39 の方が MNV-1 に対する不活化効果が高かった理由として、2 章 1 節の考察と同様にリゾチームを加熱変性する際の立体構造のほぐれ方が不活化効果に寄与していることが考えられた。本節ではリゾチーム全長を加熱変性する際、溶液の pH を調整しなかった (pH 3.7)。そのため、加熱時に Lzm 5-39 のような領域が露出しにくくなっていたものと推察された。この結果から、DL がリゾチームの立体構造として働いていることが示唆された。

Lzm 5-39 の置換体のうち、電荷を負に変えた Replacement 1 と疎水性度を下げた Replacement 2 では MNV-1 に対する不活化効果が失われたこと、および電荷をさらに正に高めた Replacement 3 では不活化効果が著しく増強されたことから、リゾチーム配列における疎水性度と正電荷が DL の不活化効果に寄与していることが明らかになった。

一般に、ウイルス粒子は負に帯電している (Gerba, 1984)。よって、負に帯電しているウイルスに対して、正に帯電している DL が吸着しやすいものと考えられた。Replacement 3 のように、ペプチドの電荷をさらに正に高めることで MNV-1 に対する不活化効果が高まったのも、加熱変性体がウイルス粒子により吸着しやすい状態

になったものと推察できる。

第1章第1節において、複数のサラダ中における DL の MNV-1 不活化効果を検討した結果、タマゴサラダにおいては DL のもつ不活化効果が発揮されなかった (Fig. 1D)。タマゴに著量に含まれる卵白アルブミンは、等電点 4.5~4.7 の陰性荷電タンパクである。このほか、タマゴの構成タンパクの等電点は、オボアルブミンでは 4.7~4.8、コンアルブミン (オボトランスフェリン) では 5.8~6.1、オボムコイドでは 4.3~4.5、オボムミンでは 4.5~5.0 であり、負の電荷をもつタンパクが多い (ExPASy, Compute/pI tool, http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)。これらのタンパクに DL が消費されたため、MNV-1 に対する不活化効果が発揮されなかったことが推察された。

ノロウイルスの構造タンパクで表層に相当する P ドメインのうち、露出しているループ領域には複数の疎水性アミノ酸が存在する (Fig. S6)。これらの疎水性アミノ酸とリゾチーム 配列における疎水性アミノ酸が相互作用することで、MNV-1 の不活化につながったものと考えられた。

このほか、Lzm 5-39 以外の領域を用いて MNV-1 に対する不活化効果を検討した。Lzm 1-35 は Lzm 5-39 から 4 残基分 N 末端側にシフトした配列である。シフトした 4 残基はランダムコイルに相当する領域であり、4 残基中 3 残基 (VFG) に疎水性アミノ酸を含む (Table 3)。そのため、Lzm 1-35 の方が Lzm 5-39 よりも MNV-1 に対する不活化効果が高いのではと予想した。しかし、結果として Lzm 1-35 による MNV-1 不活化効果は Lzm 5-39 と同等であった (Fig. 13)。これまでの結果から、リゾチームにおける疎水性が DL のウイルス不活化効果に寄与しているものの、一次構造としての疎水性よりも、立体構造における疎水性が重要であることが示唆された。

Lzm 1-35 のほか、Lzm 88-125 についても同様の検証を行った。Lzm 88-125 はリゾチームの C 末端側に存在する 3 つのヘリックス構造に相当する 38 残基である (Fig. S7)。リゾチームは N 末端側の 2 つのヘリックス (Lzm 5-39) から始まり、ランダムコイルを経て、C 末端側の 3 つのヘリックス (Lzm 88-125) が折り畳んだような構

造をしている (Fig. S7)。加熱変性によってタンパクの立体構造がほぐれる場合、N 末端あるいは C 末端のいずれかからほぐれると考えられ、C 末端側の折り畳み構造 (Lzm 88-125) が MNV-1 に対して不活化効果を示すか検証した。その結果、Lzm 88-125 の加熱変性体に曝露した際の MNV-1 の感染価減少量は 0.2 log PFU/mL であり、リゾチーム全長による減少量 (0.9 log PFU/mL) よりも低かった (Fig. 13)。

したがって、DL におけるウイルス不活化ドメインはリゾチーム配列の前半に存在しており、一次構造ではなく立体構造として働いていること、また、その疎水性と正電荷が不活化効果に寄与していると考えられた。Lzm 5-39 の加熱変性体では非加熱体と比べて α ヘリックス含量が減少していたという結果も (Fig. 14)、この推察を支持しているものと考えられた。

本来のリゾチームは、細胞壁を構成するペプチドグリカンに含まれる N-アセチルグルコサミンと N-アセチルムラミン酸間における β -1,4 結合を分断するムラミダーゼと呼ばれる酵素として働くことで、グラム陽性菌に対して溶菌作用をもたらす (Ko *et al.*, 2009)。過去の研究では、80°C で 30 分間加熱処理したリゾチームがグラム陰性菌に対して不活化効果を示すことが報告されている (Ibrahim *et al.*, 1996)。加熱変性したリゾチームがグラム陰性菌に効果を示した理由として、著者らはリゾチームのもつムラミダーゼとしての酵素活性ではなく、加熱変性に伴い露出した疎水性アミノ酸残基がグラム陰性菌の細胞外膜と高い相互作用を起こし、損傷を与えたものと考察している (Sugahara *et al.*, 2002)。

上述の現象ならびに考察は、本節で導かれた考察と整合性が取れる。しかし、ノロウイルスにはグラム陰性菌のような細胞外膜がなく、DL の疎水性残基とノロウイルス外殻のタンパクが疎水性作用していたものと考えられた。また、著者らはリゾチームが加熱変性によって 46-61 残基間、62-68 残基間、98-112 残基間が脱アミド化し、一価および二価のカチオンと結合しやすくなることから、これらの領域が抗菌活性部位として働いていると推察している (Ibrahim *et al.*, 1997)。本節では 5-39 残

基が MNV-1 に対して不活化効果を示した一方、88-125 残基は不活化効果を有していなかったという結果から (Fig. 13)、加熱変性したリゾチームによるノロウイルス不活化機構は、グラム陰性菌に対する不活化機構との共通項 (疎水性アミノ酸) はあるものの、基本的には異なる機構であるものと推察された。

图表

Table 3 Peptides sequences used in this study

Peptide name	Amino acid sequence	Residues	Molecular weight
Lzm 5-39	RCELAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFN	35AA	3993.47
Lzm 5-39 R1	RCELAAMKRE <u>GLD</u> NYRGYSLGNWVCAAE <u>F</u> ESNFN	35AA	3986.36
Lzm 5-39 R2	RCELAAMKRHGLDNYRGYSLGN <u>N</u> VCAAK <u>N</u> ESN <u>N</u> N	35AA	3855.22
Lzm 5-39 R3	RC <u>N</u> LAAAMKRHGL <u>N</u> NYRGYSLGNWVCAAK <u>F</u> NSNFN	35AA	3962.46
Lzm 1-35	KVFGRCELAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFE	35AA	3962.54
Lzm 88-125	ITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIR	38AA	4220.82

* Amino acids replaced from the original sequence (Lzm 5-39) in Lzm 5-39 Replacement (R)1, R2, and R3 are shown in bold and underlined.

* Molecular weight is theoretical.

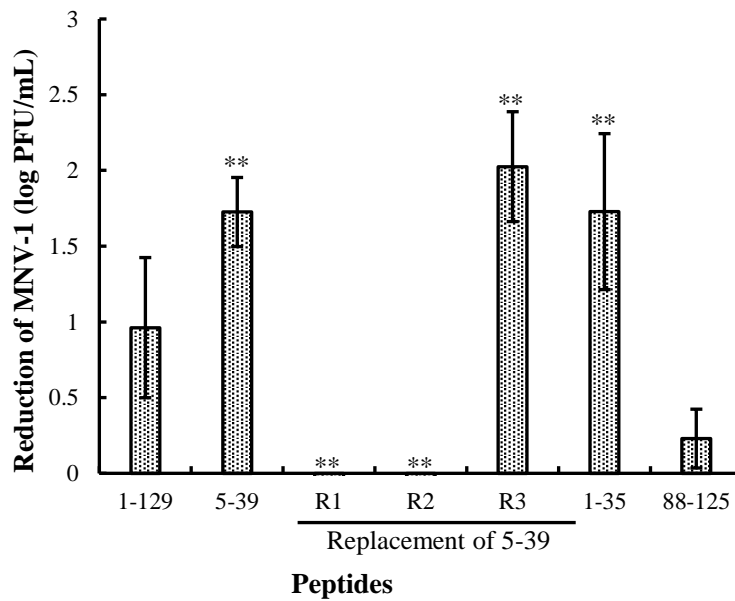


Fig. 13 Inactivation effect of Lzm peptides after heat denaturation against MNV-1. Lysozyme peptides residue 5 to 39 (5-39), replacements of 5-39 (R1, R2, R3), residue 1 to 35 (1-35), and 88 to 125 (88-125) were artificially synthesized. All the lysozyme peptides and lysozyme (1-129) at the same molar concentration as 1% (w/v) lysozyme were heat denatured at 100°C for 40 min. MNV-1 were exposed to heat-denatured lysozyme (DL, 1% (w/v), pH 3.7) and lysozyme peptides for 60 min. Values are expressed as mean average of log reduction of MNV-1 \pm SD ($n = 3$). Significant difference between the reduction of “1-129” and that of each sample was shown as ** ($p < 0.01$) or * ($p < 0.05$).

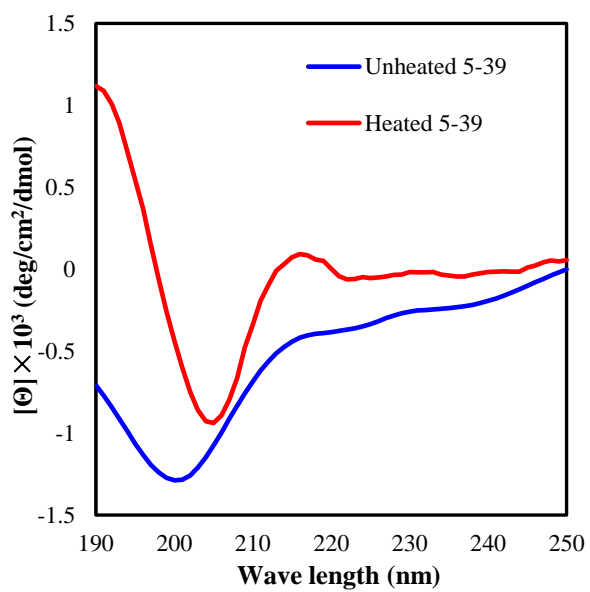


Fig. 14 CD spectra of lysozyme peptide residue 5 to 39 (Lzm 5-39). Lzm 5-39 was adjusted 900 μ M and heat denaturated at 100°C for 40 min (Heated 5-39) or not (Unheated 5-39). Values are expressed as average of measurement in triplicate.

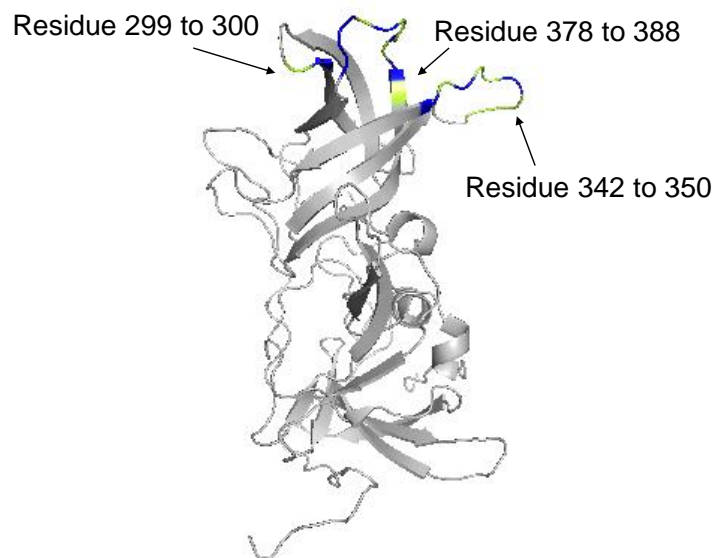


Fig. S6 Structure of MNV-1 P domain monomer (PDB: 3LQE (Taube *et al.*, 2010)). Surface-exposed loops (Residue 299 to 300, 342 to 350, and 378 to 388) are colored light green. Hydrophobic amino acids in surface-exposed loops are colored blue. Figure was prepared using Pymol.

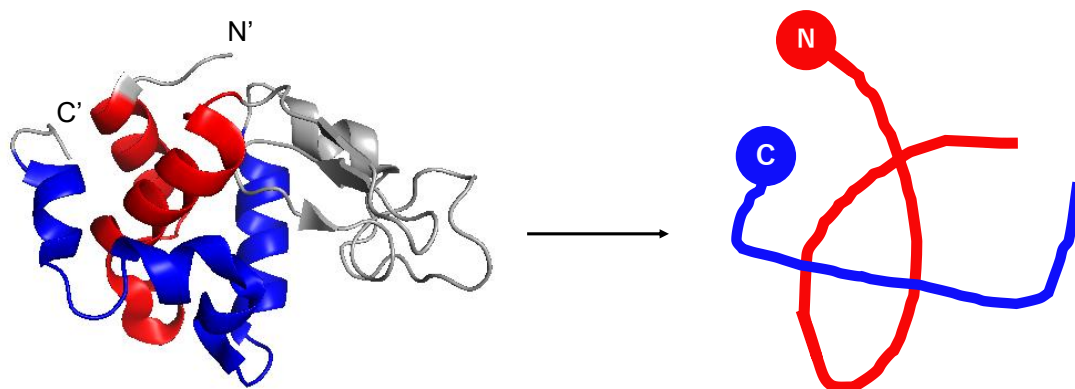


Fig. S7 3D image of Lzm (PDB: 6BO2). The peptides named as “Lzm 5-39” and “Lzm 88-125” were colored red, and blue, respectively. Figure was prepared using Pymol.

第2章 小括

本節では、DLによるノロウイルス不活化機構を明らかにするため、

- ① DLがどのような条件でノロウイルスに対して不活化効果を強く発揮するのか
- ② DLがいつノロウイルスに対して作用しているのか
- ③ DLにおけるどこがノロウイルスに対して不活化作用を示しているのか

これらの疑問に対するアプローチを第1節から第3節で行った。

第1節では、DLの加熱時におけるpHを調整することで、MNV-1に対する不活化効果に大きな差異が現れることを実証した (Fig. 6)。等電点が高く、塩基性アミノ酸を多く含むリゾチームの溶液pHを高めて調整することで、加熱変性時に立体構造がよりほぐれやすくなることが示唆された。また、リゾチームのpHを6.5以上に調整することで、加熱によるジスルフィド結合の開裂ならびに疎水基の露出が増加することが明らかになった (Fig. 8, 9)。

第2節では、DLに曝露したMNV-1を宿主細胞であるRAW264.7に接種した際のサイトカインの発現解析を行った。DL処理したMNV-1は死滅体と同様、サイトカインの発現上昇を誘導しなかったことから、DLによる作用が細胞外で起きていたことが明らかになった (Fig. 12)。これは、DLに曝露されたMNV-1がウイルス粒子として宿主細胞に侵入できなかったことを示唆している。

第3節では、DLにおけるウイルス不活化ドメインを探索するため、既報でMNV-1に対して不活化効果を示すことが確認されたリゾチーム配列における35残基 (Lzm 5-39) に任意の置換を加えた際の、MNV-1不活化効果の変化を検討した。Lzm 5-39の正電荷を負電荷に、あるいは疎水性を下げることで、MNV-1に対する不活化効果が著しく減少した。一方、Lzm 5-39の正電荷をさらに正に高めると、MNV-1に対する不活化効果は本来のLzm 5-39よりも増強された (Fig. 13)。

さらに、Lzm 5-39 以外の領域として、N 末端側の 35 残基 (Lzm 1-35) および C 末端側の 3 つのヘリックス (Lzm 88-125) の加熱変性体による MNV-1 不活化効果についても検討した。Lzm 5-39 より疎水性アミノ酸が多い Lzm 1-35 による不活化効果は、Lzm 5-39 と同等であった。一方、Lzm 88-125 は MNV-1 に対する不活化効果をほとんど有していなかった (Fig. 13)。

これらの結果より、3 つの疑問に対して以下の考察がなされた。

- ①加熱時のリゾチーム溶液の pH を 6.5 以上に高く調整することで、DL の不活化効果は強く発揮された
- ②DL は MNV-1 に対して細胞外で作用しており、その後 MNV-1 はウイルス粒子として宿主細胞内に侵入できなかった
- ③DL は立体構造としてウイルスに作用しており、前半領域の立体構造が重要であった。また、リゾチームの疎水性と正電荷が不活化効果に寄与していた

総括

本研究では、DL のノロウイルス不活化剤としての応用性を拡大するとともに、DL によるウイルス不活化機構を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では DL の応用性を検討するため、第 1 節において DL を用いた食品中における MNV-1 の不活化を実証した。具体的には、非加熱喫食食品であるサラダ、パンフィリング中において DL が MNV-1 に対して不活化効果を示すことを明らかにした。第 2 節では DL がノロウイルスとは異なる食水系感染症ウイルスに対しても不活化効果を示すことを、HAV を用いて実証した。また、近年 HAV の大規模アウトブレイクが発生し、問題となっているベリー類の洗浄に DL が有効であることについても明らかにした。

続く第 2 章では、DL のノロウイルス不活化機構を明らかにすることを目的とした。第 1 節では、DL が MNV-1 に対して不活化効果を強く発揮する条件を探索し、加熱時の pH を 6.5 以上に調整することで DL の不活化効果が増大することを示した。加熱変性によってリゾチームのジスルフィド結合が開裂し、近傍に位置する疎水性アミノ酸が露出することでウイルスに対して不活化効果を示すようになるが、加熱時の pH がリゾチームの構造変化をもたらすきっかけであることが示唆された。第 2 節では、DL がどのステージでウイルスに対して作用しているのか明らかにするため、DL 曝露した MNV-1 を接種した際の宿主細胞におけるサイトカインの発現解析を行った。DL 処理した MNV-1 は粒子として宿主細胞内に侵入できず、サイトカインの発現を誘導しなかったことから、DL のウイルスに対する不活化作用は細胞外で起きていることが明らかになった。第 3 節では、DL におけるウイルス不活化ドメインを探索するため、はじめに断片化試薬を用いて断片化したリゾチームの加熱変性体による MNV-1 不活化効果を検討した。DL は構造タンパクとして

働いており、細断したリゾチームの加熱変性体では不活化効果が失われることが明らかになった。次に、既報で MNV-1 に対して不活化効果を示すことが確認された領域 (Lzm 5-39) に任意の置換を加えた際の不活化効果について検討した。その結果、DL による不活化効果には疎水性アミノ酸ならびに正電荷が寄与していることが明らかになった。さらに、Lzm 5-39 以外の領域による不活化効果についても検討したが、C 末端側の存在する 3 つのヘリックス構造 (Lzm 88-125) に相当する領域は、MNV-1 に対する不活化効果を有していなかった。よって、リゾチーム配列の N 末端寄りに存在する 2 つのヘリックス構造が不活化効果に重要であることが示唆された。

次亜塩素酸ナトリウムに代わるノロウイルスの不活化製剤の開発が求められている現在、既に安定的に供給されているリゾチームを原料とする DL がノロウイルスに対して不活化効果を示したという事実は、非常に意義深いといえる。本研究では DL を用いて複数の食品中においてノロウイルスに対して不活化効果を示すこと、さらにその不活化機構として、リゾチームの前半領域における立体構造と、疎水性アミノ酸ならびに正電荷が重要であることが示唆された。これより、DL をノロウイルスの不活化製剤として利用拡大していくための様々な工夫が可能になると考えられる。

例えば、加熱時の pH を高く調整することで DL のウイルス不活化効果が高まったという事実から、製剤として利用する際に pH を高く調整することで、少ない添加量で高い不活化効果を得ることが可能となる。リゾチームは既に工業的に抽出されているものではあるが、不活化効果を維持しながら添加量を減らすことができれば、費用対効果の高い製剤を開発することができる。

このほか、DL の原料をリゾチーム全長から、部分配列のみを大量に合成したものに代えることも可能となる。不活化効果に最も重要な領域のみを合成することで、

加熱変性時に他の陰性電荷タンパクとの会合を防げる可能性がある。これにより、より幅広い食品に対して DL を利用できるものと考えられる。

ノロウイルスは他の食中毒病原体と比べて歴史が浅いものの、わずかなウイルス数で甚大な被害をもたらす食水系感染症ウイルスである。現在、ノロウイルスに関する規格基準等は存在しないが、事前に十分な対策をとることで感染を防げる可能性がある。今後は、DL を新規ウイルス不活化製剤として汎用するための実用的な研究が望まれる。

参考文献

- Araud, E., DiCaprio, E., Ma, Y., Lou, F., Gao, Y., Kingsley, D., Hughes, J. H., Li, J. (2016). Thermal inactivation of enteric viruses and bioaccumulation of enteric foodborne viruses in live oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 2086–2099.
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., Middaugh, C. R. (2006). Conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles: Effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 19478–19488.
- Baert, L., Debevere, J., Uyttendaele, M. (2009). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 83–94.
- Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M. (2011). Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? *International Journal of Food Microbiology*, 151, 261–269.
- Bouwknegt, M., Verhaelen, K., Rzezutka, A., Kozyra, I., Maunula, L., von Bonsdorff, C. H., Vantarakis, A., Kokkinos, P., Petrovic, T., Lazic, S., Pavlik, I., Vasickova, P., Willems, K. A., Havelaar, A. H., Rutjes, S. A., de Roda Husman, A. M. (2015). Quantitative farm-to-fork risk assessment model for norovirus and hepatitis A virus in European leafy green vegetable and berry fruit supply chains. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 50–58.
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H., Davidson, P. M. (2014). A comparison of the thermal inactivation kinetics of human norovirus surrogates and hepatitis A virus in buffered cell culture medium. *Food Microbiology*, 42, 212–217.
- Branden, C., Tooze, H. : 膜タンパク質, タンパク質の構造入門, 勝部幸輝・松原央・松原謙一監修, 教育社, 201–215, 1992.
- Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L.-A., & Vinjé, J. (2006).

- Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2761–2765.
- Cuthbert, J. A. (2001). Hepatitis A: Old and New Hepatitis A: Old and New. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 38–58.
- Fitzgerald, M., Thornton, L., O’Gorman, J., O’Connor, L., Garvey, P., Boland, M., ... O’Flanagan, D. (2014). Outbreak of hepatitis A infection associated with the consumption of frozen berries, Ireland, 2013--linked to an international outbreak. *Euro Surveillance*, 19, 20942.
- Gentry, J., Vinjé, J., Guadagnoli, D., Lipp, E. K. (2009). Norovirus distribution within an estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5470–5480.
- Gerba, C. P. (1984). Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces. *Advances in Applied Microbiology*, 30, 133–168.
- Gonzalez-Hernandez, M. B., Bragazzi Cunha, J., Wobus, C. E. (2012). Plaque assay for murine norovirus. *Journal of Visualized Experiments*, 66, e4297.
- Greenfield., N., Fasman, G. D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8, 4108–4116.
- Grove, S. F., Lee, A., Lewis, T., Stewart, C. M., Chen, H., Hoover, D. G. (2006). Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *Journal of Food Protection*, 69, 957–968.
- Huang, R., Ye, M., Li, X., Ji, L., Karwe, M., Chen, H. (2016). Evaluation of high hydrostatic pressure inactivation of human norovirus on strawberries, blueberries, raspberries and in their purees. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 17–24.
- Hughey, V. L., Johnson, E. A., Wilger, P. A. (1989). Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods. *Appl Environ Microbiol*, 55, 631–638.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T. (1996). A structural

- phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1416–1423.
- Ibrahim, H. R., Higashiguchi, S., Sugimoto, Y., Aoki, T. (1997). Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 89–94.
- Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J.-I., Yamamoto, S. P., Goto, K., Tanaka, T., Noda, M. (2014). Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka city, Japan. *Journal of Med*, 86, 2019–2025.
- Jarke, C., Petereit, A., Fehlhaber, K., Braun, P. G., Truyen, U., Albert, T. (2013). Impact of sodium chloride, sucrose and milk on heat stability of the murine norovirus and the MS2 Phage. *Food and Environmental Virology*, 5, 135–143.
- Joshi, S. S., Su, X., D'Souza, D. H. (2015). Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions. *Food Microbiology*, 52, 1–10.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., Chanock, R. M. (1972). Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, 10, 1075–1081.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., Herbert W. Virgin IV. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299, 1575–1578.
- Ko, K. Y., Mendoncam, A. F., Ismail, H., Ahn, D. U. (2009). Ethylenediaminetetraacetate and lysozyme improves antimicrobial activities of ovotransferrin against *Escherichia coli* O157:H7. *Poultry Science*, 88, 406–414.
- Koopmans, M., & Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: An emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 23–41.
- Koromyslova, A. D., White, P. A., Hansman, G. S. (2015). Treatment of norovirus particles with citrate. *Virology*, 485, 199–204.

- Maritschnik, S., Kanitz, E. E., Simons, E., Höhne, M., Neumann, H., Allerberger, F., Schmid, D., Lederer, I. (2013). A Food handler-associated, foodborne norovirus GII.4 Sydney 2012-outbreak following a wedding dinner, Austria, October 2012. *Food and Environmental Virology*, 5, 220–225.
- Maunula, L., Kaupke, A., Vasickova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., van der Poel, W. H., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K. A., Moloney, R., D'Agostiono, M., de Roda Husman, A. M., von Bonsdorff, C. H., Rzezutka, A., Pavlik, I., Petrovic, T., Cook, N. (2013). Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 177–185.
- McDonnell, G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance, 12, 147–179.
- Patel, M. M., Widdowson, M. A., Glass, R. I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U. D. (2008). Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 1224–1231.
- Predmore, A., Sanglay, G., Li, J., Lee, K. (2015). Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology*, 50, 118–125.
- Sugahara, T., Yamada, Y., Yano, S., Sasaki, T. (2002). Heat denaturation enhanced immunoglobulin production stimulating activity of lysozyme from hen egg white. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572, 19–24.
- Takahashi, H., Nakazawa, M., Ohshima, C., Sato, M., Tsuchiya, T., Takeuchi, A., Kuda, T., Kimura, B. (2015). Heat-denatured lysozyme inactivates murine norovirus as a surrogate human norovirus. *Scientific Reports*, 5, 11819.
- Takahashi, H., Ohuchi, A., Miya, S., Izawa, Y., Kimura, B. (2011). Effect of food residues on norovirus survival on stainless steel surfaces. *PLoS ONE*, 6, 8–11.
- Takahashi, H., Takahashi, M., Ohshima, C., Izawa, Y., Uema, M., Kuda, T., Kimura, B., Noda, M. (2016). Differences in the viability of murine norovirus in different aquatic

- locations. *Marine Pollution Bulletin*, 112, 313–317.
- Taube, S., Rubin, J. R., Katpally, U., Smith, T. J., Kendall, A., Stuckey, J. A., Wobus, C. E. (2010). High-resolution x-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain. *Journal of Virology*, 84, 5695–5705.
- Tavoschi, L., Severi, E., Niskanen, T., Boelaert, F., Rizzi, V., Liebana, E., Gomes Dias, J., Nichols, G., Takkinen, J., Coulombier, D. (2015). Food-borne diseases associated with frozen berries consumption: A historical perspective, European Union, 1983 to 2013. *Eurosurveillance*, 20(29), 1–11.
- Tuipulotu, D. E., Netzler, N. E., Lun, J. H., Mackenzie, J. M., White, P. A. (2017). RNA sequencing of Murine norovirus-infected cells reveals Transcriptional alteration of genes important to Viral recognition and antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, 8, 959.
- Wang, Y., Zhang, J., Shen, Z. (2015). The impact of calicivirus mixed infection in an oyster-associated outbreak during a food festival. *Journal of Clinical Virology*, 73, 55–63.
- Westrell, T., Dusch, V., Ethelberg, S., Harris, J., Hjertqvist, M., da Silva, N. J., Koller, A., Lenglet, A., Lisby, M., Vold, L. (2010). Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Eurosurveillance*, 15, 19524.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B., Virgin, H. W. (2006). Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of Virology*, 80, 5104–5112.

有坂文雄：7・6 蛋白質の滴定曲線と等電点，バイオサイエンスのための蛋白質科学入門，186–189，裳華房，2004。

厚生労働省，平成29年（2017年）食中毒発生状況

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html（2018/10/20アクセス）

後藤一雄：わが国の実験用マウスにおけるマウスノロウイルスの汚染状況，マウス

- ノロウイルスの状況と研究, LABIO 21, 38, 9-13, 2009.
- 土屋祐司, 佐原篤, 神保達也, 中野哲志, 加藤和子, 小粥敏弘, 小杉国広: パンを原因としたノロウイルス集団食中毒事例, 日本食品微生物学会雑誌, 32, 153-158, 2015.
- 西成勝好: 食品ハイドロコロイドの開発と応用, CMC出版, 2007.
- 野田衛: 刻み海苔を介したノロウイルス食中毒事件が教えてくれたこと, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 135, 6-12, 2017.
- 萩原義久: 蛋白質の構造安定性にジスルフィド結合が及ぼす熱力学的影響, 熱測定 37, 73-80, 2010.

付表

本文中の引用順で記載した。

5% FBS + DMEM

DMEM (044-29765, Wako)	500 mL
Fetal bovine serum (FBS)	5%
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

1.5% SeaPlaque agar

SeaPlaque agarose (ロンザジャパン) 1.5%
5% FBS + DMEM に溶解し加温溶解

NR solution

Neutral red (0.33%) 10%
PBS (-)に溶解

PBS (-)

Dulbecco's PBS- (フナコシ)
9.6 g
D.W. 1 L
オートクレーブ処理し、室温保存

10% FBS + DMEM

DMEM (044-29765, Wako)	500 mL
FBS	10%
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

FBS は 56°C 30 分間非働化した後フィルター滅菌した

CV solution

Crystal violet	0.3%
PBS (-)	500 mL

Ellman's reagent

5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	39.6 mg
Tris buffer (pH 7.0)	10 mL

Serum-free DMEM

DMEM (044-29765, Wako)	500 mL
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL

謝辞

当研究室で過ごした6年間、ご指導ご鞭撻を賜りました東京海洋大学食品微生物学研究室 木村 凡教授、久田 孝准教授、高橋 肇准教授に心より感謝申し上げます。木村教授には研究遂行に際して大局的なご意見を、久田准教授には研究方針に関する貴重なご助言を、高橋准教授には丁寧なご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、ご高閲ならびにきめ細かいご指摘を賜りました東京海洋大学 黒瀬 光一教授に心より御礼申し上げます。また、修士課程から博士課程2年次までの間、副査としてご高閲ならびに貴重なご助言を賜りました、新潟食料農業大学 長島 裕二教授に感謝申し上げます。

研究の遂行にあたって、キューピー株式会社 市川 将弘氏、仲沢 萌美氏、武内 章氏、設楽 弘之氏、笹原 亮氏には技術的なご支援を賜りました。謹んで謝意を表します。

共同実験者である東京海洋大学食品微生物学研究室 岡倉 優美子氏には3年間多くの時間を共にし、多大なるご協力を賜りました。同じチームメンバーである安田 祐加氏、中條 弥生氏、山口 奈月氏、戸嶋 大輝氏、築館 加奈子氏、土也 知輝氏、松元 良太氏、今村 みなみ氏をはじめ、研究室の皆様には多くのご協力を賜りました。心より感謝いたします。

最後に、自分の決めた道を進むことを温かく見守り、献身的に支えてくださった両親、妹、友人に深い感謝の意を表して謝辞といたします。

なお、本研究の一部は日本学術振興会 特別研究員奨励費(17J05482)の助成を受けたものです。