

市販のヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を用いたヒトノロウイルス分離培養方法の検討

横田 翔太^a, 浅倉 弘幸^a, 赤瀬 悟^a, 根岸 あかね^a, 伊藤 仁^a, 黒木 絢士郎^a, 小泉 美優^a, 岩崎 直哉^a,
北村 有里恵^a, 磯貝 まや^a, 九澤 香織^a, 林 志直^a, 長島 真美^a, 貞升 健志^b
(外部機関査読者: 蕪木 康郎^c)

感染性胃腸炎の主要な原因ウイルスであるヒトノロウイルス (HuNoV) は培養系が確立されていなかったが, 近年, ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞 (iPS-DIEC) を用いた HuNoV 分離培養の成功事例が報告されている. 現在, iPS-DIEC は国内でも市販されており, iPS 細胞の培養や, 目的とする細胞への分化処理に関する技術に習熟していなくても, 簡便に iPS-DIEC を利用することが可能となっている. 本研究では, HuNoV 陽性の糞便検体を分離材料として, 市販の iPS-DIEC に HuNoV を接種し, 分離培養を試みた. その結果, HuNoV 遺伝子型別にみると RNA コピー数ベースで, 最大 HuNoV GII.2[P16]は約300倍, GII.3[P12]は約20倍, GII.6[P7]は約700倍, GII.7[P7]は約1,000倍, GII.4[P16]は約3.8倍, GII.17[P17]は約1.5倍に増加した. また HuNoV 陽性の糞便検体を, 85°C で5分間加熱して培養が可能か調べたところ, 加熱処理により増殖が抑制されることを確認した. 以上の結果から, 市販の iPS-DIEC は, 簡便な取り扱いで HuNoV の培養が可能であり, 加熱処理等の HuNoV 不活化試験等に応用できることが示唆された.

キーワード: ヒトノロウイルス, ウイルス分離, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞

はじめに

ヒトノロウイルス (HuNoV) は, 嘔吐や下痢等を主症状とする急性胃腸炎の主要な原因ウイルスであり, 食中毒や, 保育園, 医療機関, 高齢者施設等における胃腸炎の集団発生を引き起こす¹⁾.

しかしながら, HuNoVの感染様式や増殖メカニズムには不明な点が多く, 有効なワクチンや治療薬開発には至っていない²⁾. またHuNoVの加熱処理や消毒剤による不活化試験についても, ネコカリシウイルスやマウスノロウイルス等の代替ウイルスを用いて行われてきたのが現状である^{3,4)}. その理由としてHuNoVの培養系が確立されていなかったことが挙げられる^{2,5)}.

長年, 培養が困難とされていたHuNoVであるが, 近年, ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 (iPS-DIEC) を用いた, HuNoV分離培養の成功事例が報告されている⁶⁾. 通常, ヒトiPS細胞の継代培養や, 目的とする細胞への分化処理には高度な技術を要するが, いくつかの国内メーカーからiPS-DIECが市販されるようになり, 製造元のプロトコルに従うだけで, iPS-DIECを簡便に利用することが可能となっている⁷⁾.

そこで本研究では, 市販のiPS-DIECと, 食中毒事例で当センターに搬入されたHuNoV陽性の糞便検体を使用し, これまで困難とされていたHuNoVの分離培養を試みたので報告する.

実験方法

1. 供試材料

1) iPS-DIEC

本研究では, 富士フイルム和光純薬より販売されている iPS-DIEC (製品名 F-hiSIEC) を使用した. F-hiSIECの培養は製造元のプロトコルに従った. すなわち, マトリゲル (Corning) をコートした 96 well plate 上に F-hiSIEC を播種し, F-hiSIEC 専用培地 (以下, 培地とする) を1日おきに交換しながら 37°C, 5% CO₂ の条件下で, 10日間培養して F-hiSIEC を使用可能な状態まで成熟させた (図1). また 96 well plate 内の保湿のため, 96 well plate 上の細胞培養に使用しない well に PBS を 200 µl ずつ加えた.

2) HuNoV 陽性の糞便検体

2023年4月から2024年5月までに, 当センターに食中毒検体として搬入され, HuNoV陽性となった糞便検体のうち, HuNoV GII.2[P16]を6検体, GII.3[P12]を1検体, GII.4[P16]を6検体, GII.6[P7]を3検体, GII.7[P7]を9検体, GII.12を1検体, GII.17[P17]を1検体の合計27検体を選定して, HuNoV分離培養に供試した.

これらの糞便検体は, PBSで10%乳剤に調製し, 10,000 gで20分遠心後, 得られた上清を0.22 µmフィルターでろ過除菌して使用した.

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

^c さいたま市健康科学研究センター

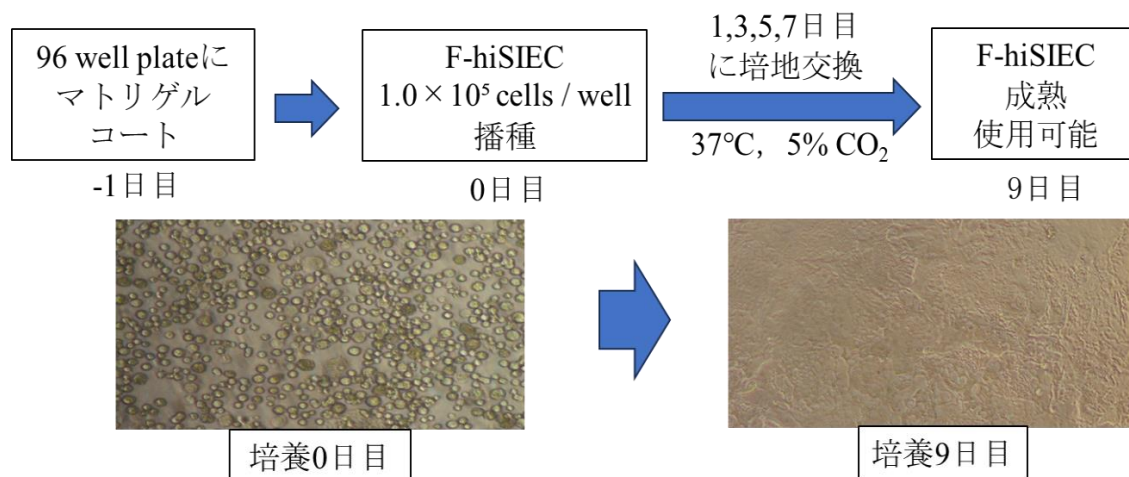


図1. F-hiSIECの培養フロー

2. HuNoV分離培養方法とウイルス定量

1) HuNoV 分離培養方法

製造元のプロトコルに従い、使用可能な状態まで96 well plate上で培養した市販のiPS-DIECから、培地を除去し、PBSで1回洗浄した。

200 μ l中に、HuNoVのRNAコピー数ベースで約 $2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ コピー相当になるように、ろ過除菌した糞便乳剤を、培地で希釈して各wellのiPS-DIECに接種した。さらに佐藤らの報告⁶⁾を参考に、各wellのiPS-DIECに対し0.03%の濃度になるようにブタ胆汁 (Sigma-Aldrich) を加えた。

37°C, 5% CO₂の条件下で、3時間HuNoVをiPS-DIECに吸着させた後、PBSで2回洗浄し、2回目の洗浄液を回収して、HuNoV増殖前の比較対象 (0 days postinfection : dpi) とした。その後、0.03 %ブタ胆汁入りの培地を200 μ l加えて、37°C, 5% CO₂の条件下で5日間培養後、培養上清を回収しHuNoV培養検体 (5 dpi) とした (図2)。

2) 加熱処理した糞便乳剤からの HuNoV 分離培養

HuNoVの分離培養において、分離材料として使用可能であることを確認した糞便乳剤について、HuNoV RNAコ

ピー数ベースで 5×10^6 copies相当を採り、85°C, 5分間の加熱処理に供した。加熱処理にはサーマルサイクラーを使用した。その後、0.03 %ブタ胆汁入りの培地で希釈し、培養したiPS-DIECでの、HuNoV培養が可能か検討を行った。

3) リアルタイム RT-qPCR による HuNoV RNA 定量

供試検体140 μ lを用いて、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により核酸抽出を行った。抽出した核酸を鋳型とし、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて、QuantStudio 12K (Thermo Fisher Scientific) によるリアルタイムRT-qPCRを行った。反応条件は、50°C 30分、95°C 15分の後、94°C 15秒および56°C 1分15秒を45回繰り返した。HuNoV GII検出用プライマーはCOG2F (CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG) / COG2R (TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA)、プローブはRING2-TP (FAM-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-TAMRA) を使用した⁸⁾。HuNoV GII RNAスタンダードサンプル (10^2 - 10^7 copies) から検量線を作成し、糞便乳剤および、0 dpiと5 dpiの検体中のHuNoV RNAコピー数を算出した。

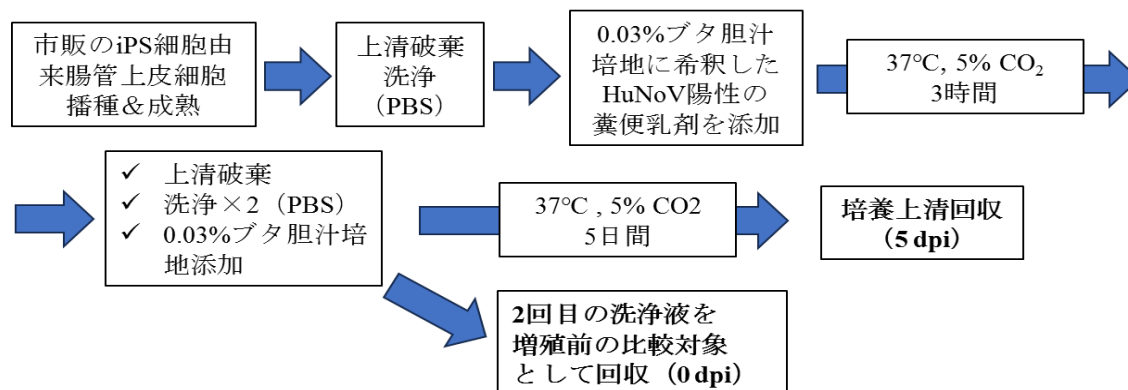


図2. iPS-DIECを使用したHuNoV培養フロー

結果及び考察

1. HuNoVの分離培養方法の検討

HuNoV分離培養の成否については、iPS-DIECへのHuNoV吸着後に得た2回目の洗浄液をHuNoV増殖前の比較対象（0 dpi）として、37°C、5% CO₂の条件下で5日間培養し、得られた上清（5 dpi）に含まれるHuNoV RNAコピー数を、リアルタイムRT-qPCRにより比較して評価を行った。その結果27検体中18検体で、iPS-DIECに接種したHuNoV RNA コピー数を上回る量ではないが、HuNoV吸着後に得た2回目の洗浄液と比較して、HuNoV RNA コピー数の増加を確認した（表1）。

HuNoVの遺伝子型別にみると、HuNoV RNAコピー数ベースで0 dpiと比較して、5 dpiでは5日間の培養により、最大で、HuNoV GII.2[P16]は約300倍、GII.3[P12]は約20倍、GII.6[P7]は約700倍、GII.7[P7]は約1,000倍、GII.4[P16]は約3.8倍、GII.17[P17]は約1.5倍に増加した（図3）。GII.4[P16]、GII.17[P17]型は他の遺伝子型に比べて増加量が少なかったが、この傾向が遺伝子型によるものか、ある

いは選定した糞便検体中の感染性粒子の量に影響されたかについては不明であり、さらなる検討が必要である。

吸着に使用したウイルス量に着目すると、吸着反応に使用するウイルス入り培地に含まれるHuNoV RNAコピー数が 1×10^6 copiesを下回っている場合、HuNoVの増殖が確認できなかった。一方、HuNoV RNAコピー数ベースで 1×10^6 copies以上を吸着させた場合でも、28% (7/25)の割合でHuNoVの増加を確認できなかったことから、必ずしもHuNoV RNA量が十分であってもHuNoV感染性粒子が含まれているとは限らないことが推察された。

またHuNoV培養5日目に細胞変性効果（CPE）について観察を行ったところ、HuNoV未接種のiPS-DIECと比較して、形状の違いはみられず、CPEは確認されなかった。

今回の検討では、HuNoV GII.17[P17]が、最大で約1.5倍、GII.7[P7]が最大で約1,000倍と、HuNoVの遺伝子型によって増加量に差がみられたことから、HuNoVの遺伝子型は、HuNoV分離培養の成否における重要な要素であることが推察された。

表1. 各遺伝子型のHuNoV分離培養結果

検体番号	遺伝子型	吸着に使用したHuNoV量 (HuNoV RNA copies / well)	培養前サンプル中のHuNoV量 (0 dpi HuNoV RNA copies / well)	5日間培養後のHuNoV量 (5 dpi HuNoV RNA copies / well)	増加量 (5 dpi / 0 dpi)
1	GII.2[P16]	9.4×10^4	N.D.	N.D.	増加せず
2	GII.2[P16]	4.0×10^6	N.D.	N.D.	増加せず
3	GII.2[P16]	2.0×10^6	5.4×10^3	2.1×10^3	増加せず
4	GII.2[P16]	2.0×10^6	1.8×10^5	8.6×10^5	4.8倍
5	GII.2[P16]	2.0×10^6	2.8×10^4	1.7×10^5	6.1倍
6	GII.2[P16]	4.0×10^6	5.2×10^3	1.7×10^6	327倍
7	GII.3[P12]	6.0×10^6	1.1×10^5	2.3×10^6	20.9倍
8	GII.4[P16]	2.0×10^7	N.D.	N.D.	増加せず
9	GII.4[P16]	2.0×10^6	N.D.	N.D.	増加せず
10	GII.4[P16]	2.0×10^7	4.5×10^4	2.7×10^4	増加せず
11	GII.4[P16]	2.0×10^7	2.5×10^5	3.2×10^5	1.3倍
12	GII.4[P16]	2.0×10^7	2.0×10^5	5.2×10^5	2.6倍
13	GII.4[P16]	6.0×10^6	2.0×10^5	7.5×10^5	3.8倍
14	GII.6[P7]	2.0×10^6	4.3×10^4	6.8×10^5	15.8倍
15	GII.6[P7]	2.0×10^6	6.7×10^3	3.2×10^4	4.8倍
16	GII.6[P7]	1.0×10^6	N.D.	7.0×10^4	700倍※
17	GII.7[P7]	3.5×10^6	N.D.	N.D.	増加せず
18	GII.7[P7]	2.0×10^6	6.0×10^4	6.0×10^4	増加せず
19	GII.7[P7]	2.0×10^6	3.0×10^5	8.1×10^5	2.7倍
20	GII.7[P7]	2.0×10^6	6.4×10^4	2.3×10^5	3.6倍
21	GII.7[P7]	4.0×10^6	3.1×10^4	5.5×10^5	17.7倍
22	GII.7[P7]	3.7×10^6	N.D.	8.6×10^3	86倍※
23	GII.7[P7]	2.0×10^7	1.1×10^3	1.2×10^5	109倍
24	GII.7[P7]	4.4×10^6	N.D.	8.7×10^4	870倍※
25	GII.7[P7]	3.0×10^6	N.D.	1.0×10^5	1000倍※
26	GII.12	5.0×10^5	2.9×10^3	N.D.	増加せず
27	GII.17[P17]	2.0×10^6	2.4×10^4	3.6×10^4	1.5倍

N.D.: 検出限界以下

※検量線作成時に100 copies以下のHuNoV GII RNAスタンダードサンプルがリアルタイムRT-qPCRの検出限界を下回ったため、

検出限界以下となった培養前のHuNoV RNA量（0 dpi）については、RNA量を100 copiesとして増加量を算出した。

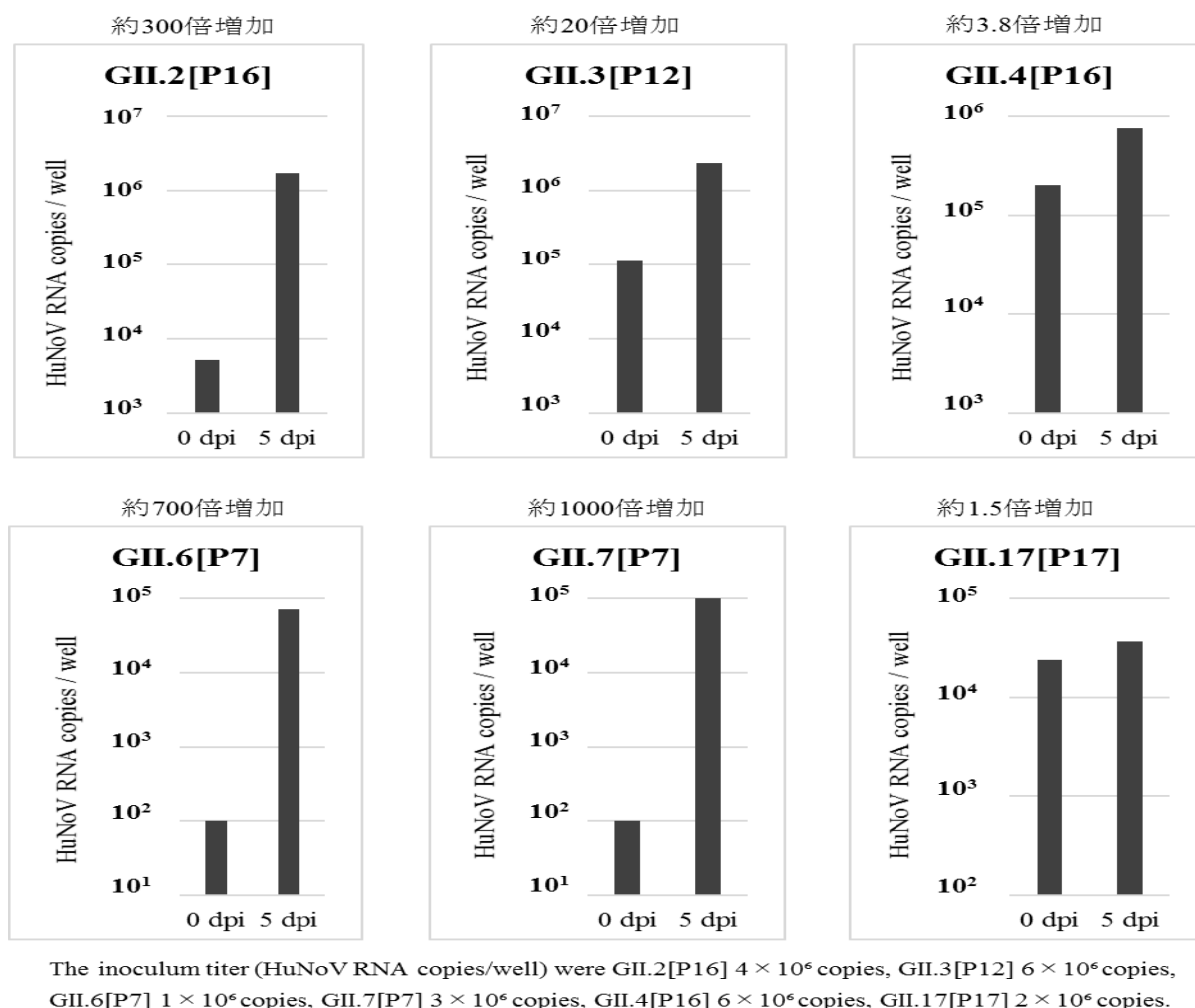


図3. 各遺伝子型ごとの最大増加量 (HuNoV RNA copies / well)

2. ブタ胆汁の添加がHuNoV増殖に与える影響

腸管ウイルスの中でも、コクサッキーウイルスA群やエンテロウイルス71、ヒトロタウイルスの分離培養では、培地への胆汁の添加は必要とされていないが^{9,10)}、腸管ウイルスのうち、ブタサポウイルスは、培養細胞を用いた培養系に胆汁が必須であることが報告されている¹¹⁾。加えて、iPS-DIECを用いたHuNoVの培養や、ヒト十二指腸由来細胞を用いたヒトサポウイルスの培養においても、培地への胆汁の添加の必要性が報告されている^{6,12)}。今回の検討でも、佐藤らの報告を参考にブタ胆汁を培地に添加した⁶⁾。

HuNoV GII.2[P16]についてHuNoV RNAコピー数ベースで 4×10^6 copies相当をiPS-DIECに接種し、0.03%ブタ胆汁添加条件と非添加条件でHuNoV分離培養を試みたところ、ブタ胆汁非添加条件では、HuNoVの増殖を確認できなかった(図4)。このことから、HuNoV分離培養はブタ胆汁の添加が必要であることが示唆された。

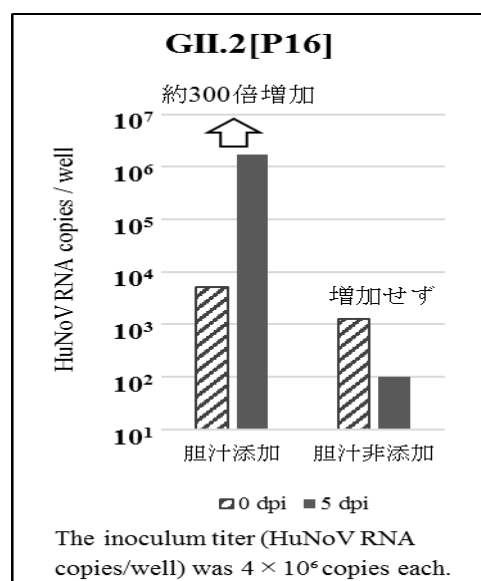


図4. 胆汁非添加条件におけるHuNoV増加の比較

3. 加熱処理がHuNoV増殖に与える影響

HuNoVの分離培養において、分離材料として使用可能であることを確認したHuNoV GII.7[P7]陽性の糞便検体を用いて、加熱処理がHuNoV増殖に与える影響について検討した。HuNoV RNAコピー数ベースで 5×10^6 copies相当の糞便乳剤100 μ lを、非加熱の状態ないし、85°C、5分間の加熱処理後、0.03 %ブタ胆汁入りの培地で希釈した。その後、iPS-DIECに接種することで、加熱処理がHuNoV増殖に与える影響を比較検討した。その結果、非加熱の検体はHuNoV RNAコピー数ベースで5日間の培養により約154倍に増加したが、加熱処理を行った検体のHuNoVの増加は認められなかった(図5)。

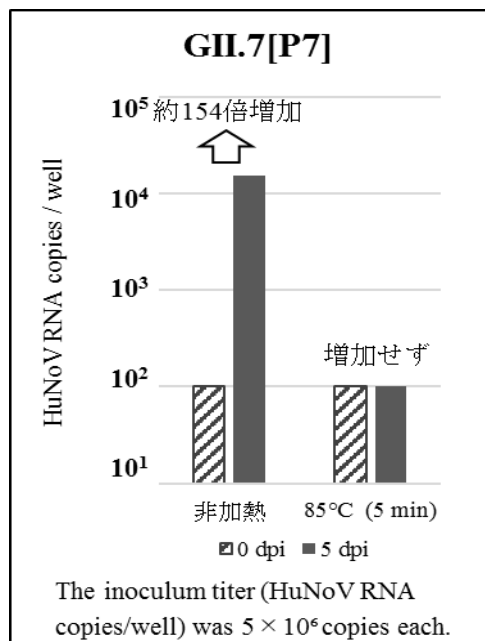


図5. 非加熱および加熱処理したHuNoV増加の比較

厚生労働省は、HuNoV汚染の恐れがある二枚貝における、HuNoVの不活化条件について、二枚貝を中心温度85°C~90°Cで90秒間加熱することを提唱しているが¹³⁾、今回の実験結果においても、同様の条件での加熱により、HuNoVは感染力を失うことが示唆された。今回の検討はHuNoV GII.7[P7]を含む糞便乳剤を使用した検討であることに留意する必要があるものの、HuNoVの加熱処理や消毒剤による不活化試験等の検討に、市販のiPS-DIECを使用したHuNoV培養系が応用可能であることが示唆された。

ま と め

市販のiPS-DIECとHuNoV陽性の糞便検体を使用し、これまで困難とされていたHuNoVの分離培養を試みた。HuNoV陽性の糞便検体を分離材料として市販のiPS-DIECにHuNoVを接種し、0.03%ブタ胆汁添加条件下でHuNoVを5日間培養したところ、HuNoVの遺伝子型によって差が見られたが、最大で約1,000倍のHuNoV増加を確認した。

HuNoVの遺伝子型によって増加量に差がみられたことから、HuNoVの遺伝子型が分離培養の重要な要素であることが示唆された。

また、CPEについて確認を行ったところ、HuNoV未接種のiPS-DIECと比較して、CPEは確認されなかった。

さらに、HuNoV陽性の糞便乳剤について、85°C、5分間の加熱処理を行った後、本研究で用いたHuNoV培養系に供したところ、HuNoVの増加は確認されなかった。

以上から、入手しやすく、また簡便に使用可能な市販のiPS-DIECはHuNoV培養ツールとして使用でき、またHuNoV制御を目的とした加熱実験や消毒剤の効果検討に応用できると考えられる。

文 献

- 1) 東京都保健医療局：食品衛生の窓、ノロウイルス、<https://www.hokeniryo.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/micro/noro.html> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) Hayashi, T., Murakami, K., Hirano, J., et al.: *mSphere* 6:e00623–21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00623-21> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 厚生労働省：平成27年度 ノロウイルスの不活化条件に関する調査報告書、<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentu/0000125854.pdf> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) 清水優子：ヒトノロウイルスの代替としてマウスノロウイルスを用いた消毒薬による不活化効果、*環境感染誌*, 24, 388–394, 2009.
- 5) 国立感染症研究所：ノロウイルス感染症とは、<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/452-norovirus-intro.html> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) Sato, S., Hisaie, K., Kurokawa, S., et al.: *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 7, 686–688.e5, 2019
- 7) 富士フイルム：ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞 F-hiSIEC™, <https://www.fujifilm.com/jp/ja/business/regenerative/ips-cells/f-hisiec> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) 国立感染症研究所：病原体検出マニュアル ノロウイルス (第1版), 令和元年6月, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Norovirus20190611.pdf> (2024年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) 篠原美千代：エンテロウイルス・アデノウイルス分離におけるMRC-5細胞の有用性, *感染症学雑誌*, 76, 432–438, 2002.

- 10) 谷口考喜：培養細胞によるヒトロタウイルスの分離および分離株の性状に関する研究，札幌医誌，**51**, 455-474, 1982.
- 11) Kyeong-Ok, C., Stanislav, V.S., Gael, B., *et al.* : *PNAS*. **101**, 8733–8738, 2004.
- 12) Takagi, H., Oka, T., Shimoike, T., *et al.* : *PNAS*. **117**, 32078–32085, 2020.
- 13) 厚生労働省：ノロウイルスに関するQ&A,
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/kanren/yobou/040204-1.html#17
(2024年7月12日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性はある)

**Study of Human Norovirus Culture Method Using Commercially Available
Human iPS Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells**

Shota YOKOTA^a, Hiroyuki ASAKURA^a, Satoru AKASE^a, Akane NEGISHI^a, Hitoshi ITO^a, Kenshiro KUROKI^a,
Miyu KOIZUMI^a, Naoya IWASAKI^a, Yurie KITAMURA^a, Maya ISOGAI^a, Kaori KUZAWA^a, Yukinao HAYASHI^a,
Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a
(Reviewed by Yasuo KABURAGI^b)

Human norovirus (HuNoV) is a major pathogen of food poisoning and infectious gastritis worldwide. The lack of the appropriate culture method for HuNoV inhibits the development of the HuNoV vaccine and treatment. Recent advances in human iPS cell study have resulted in the establishment of human iPS cell-derived intestinal epithelial cells (iPS-DIEC), and the successful case of HuNoV culture has been reported by research groups used a method of infecting iPS-DIEC with HuNoV. Recently, iPS-DIEC has become commercially available, and it is possible to use iPS-DIEC simply by following the manufacturer's protocol, even without the techniques for culturing iPS cells and induction of differentiation into target cells. In this study, a commercially available iPS-DIEC was used to examine culture HuNoV isolates from food poisoning patients. The results revealed that, the propagation of HuNoV was successful. Particularly, HuNoV GII.2 [P16] increased about 300-fold, GII.3 [P12] about 20-fold, GII.6 [P7] about 700-fold, GII.7 [P7] about 1,000-fold, GII.4 [P16] about 3.8-fold, and GII.17 [P17] about 1.5-fold, respectively. We also examined the culture of inoculation with heated for 85°C 5 min or non-heated HuNoV. The heat treatment was confirmed to inhibit the propagation of HuNoV. These results indicate that the commercially available iPS-DIEC can be applied to the HuNoV culture method to test for inactivation in the future.

Keywords: Human Norovirus, Virus culture, Human iPS cells, Human iPS cell-derived intestinal epithelial cells

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Saitama City Institute of Health Science and Research