

称号及び氏名 博士(獣医学) 西谷 巧太

学位授与の日付 2023年8月31日

論文名 抗ノロウイルス効果を有する天然抽出物のスクリーニング
およびブドウ種子抽出物の抗ノロウイルスメカニズムの解明

論文審査委員 主査 向本 雅郁
副査 山崎 伸二
副査 堀江 真行

論文要旨

緒言

ノロウイルス (NoV, norovirus, *Caliciviridae*) はエンベロープを有さない直径約 30 nm の粒子でゲノムとして約 7.5 kb の 1 本鎖 (+)RNA を持ち、現時点では簡便な培養方法が確立されていない。NoV はウイルス性胃腸炎の主要な病原であり、世界各地で大規模食中毒事件が発生し公衆衛生上の問題となっている。NoV による食中毒は多くの場合調理人の手指や調理器具を介して発生するが、NoV は一般的な消毒成分であるエタノールや界面活性剤では十分な消毒効果が得られないことが知られており、食中毒対策における課題となっている。

加熱処理および次亜塩素酸ナトリウム処理が NoV に対して有効な消毒方法として知られている。しかし、これらの処理は耐熱性および次亜塩素酸ナトリウムに対する耐食性のない材料には適さないため、多様な場面で使用できる汎用性のある消毒方法が求められている。

天然抽出物の持つ抗ウイルス効果が加熱処理および次亜塩素酸ナトリウム処理に代わる消毒方法として使用できる可能性が示唆されている。天然抽出物とは、主に植物の葉や種子などの特定部位または生薬から熱水やエタノールなどの溶媒で成分を抽出し噴霧乾燥などの手法で濃縮したものであり、原料に由来する特定の成分を含む。緑茶、ブドウ種子、柿、クランベリー、ブルーベリー、五倍子およびザクロを由来とする天然抽出物は抗 NoV 効果を有することが示唆されている。しかし、これらの抽出物に関する研究は代替的手法のみによる検討であり NoV に対する抗ウイルス効果は考察にとどまることが課題である。加えて、天然抽出物に含まれる抗ウイルス成分の詳細と抗ウイルスメカニズ

ムはいまだ不明であり、消毒薬として応用するためにはさらなる研究が必要である。

ネコカリシウイルス (FCV, feline calicivirus) をはじめとする NoV 代替ウイルスは NoV と性状が類似していることおよび株化細胞で培養できることから、代替的手法として抗 NoV 効果の評価へ汎用される。しかし、代替ウイルスと NoV の性状は完全に一致しておらず、NoV 代替ウイルスで得られた結果は NoV に適用できない可能性がある。NoV 代替ウイルス以外では NoV 様粒子 (NoV-VLP) が抗 NoV 効果評価に用いられる。NoV-VLP はバキュロウイルス発現系により作出され、元となった遺伝子型の NoV と抗原性および形態が類似しているため、抗 NoV 効果の評価へ応用することができる。

本研究では NoV に対する汎用性の高い消毒剤の開発を目的とした。第 1 章では、天然抽出物の抗 NoV 効果評価方法として NoV-VLP 結合阻止試験方法の検討を行った。第 2 章では、天然抽出物 63 種類および天然由来の生理活性物質 63 種類を対象として FCV 不活化試験および NoV-VLP 結合阻止試験により抗 NoV 効果を有する素材のスクリーニングを行った。第 3 章では、第 2 章で抗 NoV 効果が認められたブドウ種子抽出物 (GSE) の抗 NoV メカニズムを解明するため、NoV-VLP および患者由来の NoV を用いた評価を行った。

第 1 章 NoV-VLP を用いた抗 NoV 効果評価方法の検討

腸管上皮細胞上に発現している組織血液型抗原 (HBGA, histo-blood group antigens) は NoV と結合することで NoV の感染を促進することから、NoV と HBGA の結合を阻止する成分は NoV に対する消毒効果が期待できる。NoV-VLP は NoV と同様に HBGA に結合し、この結合は酵素免疫測定法に基づく NoV-VLP 結合試験により測定することができる。したがって、NoV-VLP 結合試験を応用して被験試料の作用により HBGA に結合できなくなった NoV-VLP を測定できると考えられた。

A 型、B 型および O 型の HBGA に対する NoV GII.4 Sydney VLP (GII.4 VLP) の結合を HBGA 結合試験により測定した。その結果、GII.4 VLP はすべての HBGA に対して結合した。また、測定値は GII.4 VLP 濃度 (0.10–0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$) の対数値に比例したことから、HBGA に結合した GII.4 VLP 量は 0.10 から 0.01 $\mu\text{g}/\text{well}$ の間で定量できることが示された。したがって、被験試料の作用により HBGA との結合が阻止された GII.4 VLP 量の割合 (阻止率) を求めることができると考えられた。

第 2 章 抗 NoV 効果を有する天然抽出物素材のスクリーニング

天然抽出物素材 63 種類および天然由来の生理活性物質 63 種類を水に溶解または分散させたものを被験試料として用い、第 1 章の結合試験を応用した GII.4 VLP 結合阻止試験および FCV 不活化試験を用いて抗 NoV 効果を有する素材をスクリーニングした。各試験において GII.4 VLP もしくは FCV の懸濁液と被験試料を等量混合して室温で 10 分間作用させた後、GII.4 VLP は HBGA に対する結合、FCV は生残ウイルス感染価を測定した。その結果、63 種類の天然抽出物のうち 24 種類の天然抽出物は FCV 不活性化効果または GII.4 VLP 結合阻止効果の少なくともどちらか一方の効果が認められた。さらに、そのうちの 14 種類は対数減少値 3.0 以上の FCV 不活化効果および 50.0%以上の GII.4 VLP 阻止率の両方が認められた。両試験方法で効果が認められた天然抽出物は NoV および FCV と宿主細胞

の結合を阻止することで抗ウイルス効果を発揮することが考えられ、消毒剤の成分として応用が期待できる。FCV 不活化効果および GII.4 VLP 結合阻止効果が認められた天然抽出物に含まれる成分に関して文献調査を行ったところ、プロアントシアニジンが複数の天然抽出物に含まれることを見出し、天然抽出物が有する抗 NoV 効果の有効性分であることが示唆された。なお、天然由来の生理活性物質は両試験方法で効果が認められたものがなかった。

第3章 プロアントシアニジンを主成分とするブドウ種子抽出物が有する抗 NoV 効果のメカニズム解析

ブドウ種子抽出物 (GSE, Grape Seed Extract) は第2章において FCV 不活化効果および GII.4 VLP 結合阻止効果が認められた。本研究で用いた GSE はプロアントシアニジンを 80%以上含有し、高濃度のプロアントシアニジンを含むことから抗 NoV メカニズムの解析を目的とした検討に適していた。

GSE が有する抗 NoV 効果の処理時間および濃度依存性を GII.4 VLP 結合阻止試験により評価したところ、GSE は処理時間と濃度に依存して GII.4 VLP と HBGA の結合を阻止した。GII.4 VLP 結合阻止試験の結果から GSE は GII.4 VLP に直接作用し、HBGA との結合を阻害することが考えられたため、透過型電子顕微鏡を用いて GSE で処理した GII.4 VLP の形態観察および画像解析による粒子径測定を行った。GSE で処理した GII.4 VLP は凝集および形が歪むような形態の変化が認められ、これらの形態変化は濃度依存的に増加していた。画像解析を行った結果、GSE で処理した GII.4 VLP は GSE 濃度に依存して膨化していることが示され、0.04% w/v GSE 水溶液で処理した GII.4 VLP は粒子径が約 17%上昇していた。この結果から、GSE は NoV に直接相互作用することで膨化をはじめとする形態変化を引き起こし、NoV と宿主細胞の結合を阻止することで抗 NoV 効果を生じることが示唆された。NoV 粒子の損傷を評価することを目的に、NoV 感染患者糞便由来の NoV を用いたリアルタイム PCR 法で評価を行った。プロピジウムモノアジド (PMA) は損傷し完全性を失った NoV 粒子の RNA と不可逆的に結合し PCR を阻害する。したがって PMA 処理とリアルタイム PCR 法を組み合わせた PMA-リアルタイム PCR 法は損傷のない正常な NoV のみを検出することができる。0.04% w/v GSE 水溶液を作用させた NoV を PMA-リアルタイム PCR 法により評価した結果、検出量が対照 (PBS) と比較して 39%へ低下した。この結果から NoV は GSE の作用により形態変化が起こり、このとき NoV は capsid に損傷が生じることが示された。

総括

- NoV-VLP を用いた天然抽出物の抗 NoV 効果の評価法として GII.4 VLP 結合阻止試験を用いることとした。
- 抗 NoV 効果を有する天然抽出物のスクリーニングを行った結果、24 種類の天然抽出物が GII.4 VLP 結合阻止効果あるいは FCV 不活化効果を有していた。

- スクリーニング結果および文献調査より、プロアントシアニジンが抗 NoV 効果の有効成分の 1 つであることが示唆された。
- プロアントシアニジンを含む GSE は処理時間および濃度に依存して抗 NoV 効果を発揮することが示された。また、GSE で処理した NoV-VLP は膨化および形態変化が生じた。
- GSE は NoV と相互作用することで宿主細胞との結合を阻止し、さらに NoV 粒子の損傷が起こることによって抗 NoV 効果を発揮すると考えられる。
- GSE をはじめとする天然抽出物は NoV 対策に向けた消毒剤の有効成分として応用が期待される。

審査結果の要旨

ノロウイルス (NoV) はウイルス性胃腸炎の主要な病原であり、世界各地で大規模食中毒事件が発生し公衆衛生上の問題となっている。NoV は一般的な消毒成分であるエタノールや界面活性剤では十分な消毒効果が得られず、食中毒対策における課題となっている。加熱処理および次亜塩素酸ナトリウム処理が NoV に対して有効な消毒方法として知られているが、汎用性の面では有効な消毒方法とはいえない。

最近、天然抽出物が有する抗ウイルス効果が加熱処理および次亜塩素酸ナトリウム処理に代わる消毒方法として注目されている。天然抽出物とは、主に植物の葉や種子などの特定部位または生薬から熱水やエタノールなどの溶媒で成分を抽出し噴霧乾燥などの手法で濃縮したものであり、原料に由来する特定の成分を含む。緑茶やブドウ種子等を由来とする天然抽出物は抗 NoV 効果を有することが示唆されている。しかし、現時点では NoV の簡便な培養方法が確立されておらず、これらの抽出物に関する研究はネコカリシウイルス (FCV) をはじめとする NoV 代替ウイルスが用いられている。代替ウイルスの性状は NoV と完全に一致していないため NoV 代替ウイルスで得られた結果は NoV に適用できない可能性がある。NoV 代替ウイルス以外ではカプシドタンパク質のみからなる NoV 様粒子 (NoV-VLP) が抗 NoV 効果評価に用いられる。NoV-VLP は元となった遺伝子型の NoV と抗原性および形態が類似しているため、抗 NoV 効果の評価へ応用することができる。本研究では NoV-VLP を応用した抗 NoV 効果評価法により天然抽出物から抗 NoV 効果を有する素材をスクリーニングし、汎用性の高い消毒剤の開発を目的とし、以下の成果を得た。

第 1 章では、天然抽出物の抗 NoV 効果評価方法として NoV-VLP 結合阻止試験方法の検討を行った。腸管上皮細胞上に発現している組織血液型抗原 (HBGA) は NoV と結合することで NoV の感染を促進することから、NoV と HBGA の結合を阻止する成分は NoV に対する消毒効果が

期待できる。A型、B型およびO型のHBGAに対するNoV GII.4 Sydney VLP (GII.4 VLP) の結合を酵素免疫測定法に基づくHBGA結合試験により測定した。その結果、GII.4 VLP はすべてのHBGAに対して結合した。また、HBGAに結合したGII.4 VLP量は0.10から0.01 µg/wellの間で定量できることが示された。したがって、被験試料の作用によりHBGAとの結合が阻止されたGII.4 VLP量の割合(阻止率)を求めることが可能となった。

第2章では、天然抽出物素材および天然由来の生理活性物質それぞれ63種類を被験試料として、第1章の結合試験を応用したGII.4 VLP結合阻止試験およびFCV不活化試験を用いて抗NoV効果を有する素材をスクリーニングした。その結果、14種類の天然抽出物においてFCV不活化効果およびGII.4 VLP阻止率の両方が認められた。これらの天然抽出物の多くにプロアントシアニジンが含まれており、プロアントシアニジンが抗NoV効果の有効成分であることが示唆された。なお、天然由来の生理活性物質は両試験方法で効果が認められたものは存在しなかった。

第3章では、第2章で抗NoV効果が認められた天然抽出物の中でプロアントシアニジンを多く含むブドウ種子抽出物(GSE)を用いて、抗NoVメカニズムを解明した。GSEは処理時間と濃度に依存してGII.4 VLPとHBGAの結合を阻止した。GII.4 VLP結合阻止試験の結果からGSEはGII.4 VLPに直接作用し、HBGAとの結合を阻害することが考えられたため、透過型電子顕微鏡を用いてGSEで処理したGII.4 VLPの形態観察および画像解析による粒子径測定を行った。GSEで処理したGII.4 VLPは凝集および形が歪むような形態の変化が認められ、これらの形態変化は濃度依存的に増加していた。画像解析を行った結果、GSEで処理したGII.4 VLPはGSE濃度に依存して膨化していることが示された。この結果から、GSEはNoVに直接相互作用することで膨化をはじめとする形態変化を引き起こし、NoVと宿主細胞の結合を阻止することで抗NoV効果を生じることが示唆された。次に、プロピジウムモノアジド(PMA)処理とリアルタイムPCR法を組み合わせたPMA-リアルタイムPCR法を用いてNoV粒子の損傷の程度を評価した。本法は損傷のない正常なNoVのみを検出することができ、GSE処理により対照(PBS)と比較して検出量が39%に低下した。この結果からNoVはGSEの作用により形態変化が起こり、さらにカプシドに損傷を生じさせることが示された。

以上、本研究により天然抽出物に含まれるプロアントシアニジンが抗NoV効果の有効成分の1つであることが示唆された。プロアントシアニジンを含むGSEは処理時間および濃度に依存して抗NoV効果を発揮することが示された。また、GSEで処理したNoV-VLPは膨化および形態変化が生じたことから、GSEはNoVと相互作用することで宿主細胞との結合を阻止し、さらにNoV粒子の損傷が起こることで抗NoV効果を発揮すると考えられる。本研究による成果はGSEをはじめとする天然抽出物のNoV対策をはじめとする様々な病原体に対する感染症対策への応用が期待され、獣医公衆衛生学および食品衛生学の発展に貢献するものである。本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。