

核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究

所 属 国立感染症研究所ウイルス第二部
研究者 武田直和

研究要旨； NoV、SaV の効果的な不活化薬の検索と創薬、感染予防方法の構築を行い、新規約剤のスクリーニングおよび実用化を目指すため、NoV、SaV のウイルス様粒子(VLP)を作出した。また、その内部にレポーター遺伝子を組み込んだ疑似ウイルス粒子(ナノカプセル)の作出を試みた。消毒薬のVLPに対する影響の測定には、電子顕微鏡(TEM)が効果的であった。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所ウイルス第二部 片山和彦
- (2) 東海大学海洋学部 小沼博隆
- (3) 中部衛生検査センター 小澤一弘
- (4) 花王株式会社安全評価研究センター 徳田一
- (5) 花王プロフェッショナルサービス株式会社学術部 日置祐一

A. 研究目的

ノロウイルス(NoV)ならびにサポウイルス(SaV)は、非細菌性急性胃腸炎の原因ウイルスの一つとして知られている。昨年度から本年度にかけて NoV による集団急性胃腸炎が老人介護施設や保育園等で多発し、死亡例が報告される等、NoV 感染による問題がマスコミに取り上げられている。NoV 感染は、11月頃から感染者の報告が増加し始め、年末から年始を過ぎ4月になり春の声を聞くまでの期間にピークを形成する。我々感染症研究所の調査では、例年数千例以上に上る感染者が存在することが明らかになっている。SaV については、NoV に感染の実態があまり明らかにされていないが、NoV とは異なり、冬季に発生する散發性のウイルス性嘔吐下痢症の主因である可能性がある。これらウイルスの感染ルートは主に糞口感染であると考えられていたが、最近の疫学的研究から、感染者を発端としたヒト-ヒト感染の連鎖が集団発生の大きな原因を占めていることが明らかになってきた。これらのウイルスに起因する感染症は、公衆衛生の立場から見て脅威であるばかりか、医療費とそれに伴う経済損失は膨大

であり、早急な感染防御や予防衛生の対策が求められている。しかし、NoV、SaV とともに、動物に感染する一部のゲノグループを除いては、ヒト以外の動物に感染せず、培養細胞で増やすこともできないことが研究推進の足枷になっており、いまだ、ヒトに感染する NoV と SaV の効果的な治療法、予防法は無い。このような状況にもかかわらず、食品や飲料水、調理場、調理従事者からの NoV や SaV の除去に関する研究は、全く行われておらず、感染予防、防御に用いる薬剤の検討も進んでいない。本研究では、既存の消毒薬および、新規消毒薬を用いた NoV、SaV の効果的な不活化薬の検索と創薬、感染予防方法の構築を行うとともに、新規約剤のスクリーニングおよび実用化を目指した。

B. 研究方法

本年度は、主に NoV、SaV 粒子の代わりに、NoV、SaV の構造蛋白質(capsid)をコードする遺伝子領域をバキュロウイルスに組み込み、組換えバキュロウイルスを用いた昆虫細胞による蛋白質発現系によってウイルス様粒子(VLP: Virus like particle)を作出することを試みた。VLPs はウイルス粒子と同等の抗原性を有するなど、表面構造がほぼ等しく、ウイルス粒子のモデルとしてウイルス消毒薬の検討にも使用し得る。さらに、その内部にレポーター遺伝子を組み込んだ疑似ウイルス粒子(ナノカプセル)の作出を試みた。VLP を用いて既存の消毒剤および新規消毒薬の中から不活化剤の探索を行うに先立ち、不活化効果を評価するため透過電子顕微鏡(以下、TEM と略)を用いた観察を評価した。

C. 研究結果および考察

NoV はゲノグループ I, ゲノグループ II の 2 つのゲノグループに分別されている。それぞれのゲノグループはそれぞれ 14 種類、17 種類の互いに抗原性の異なるゲノタイプから構成されている。これらのゲノタイプは互いにウイルス粒子の不活化条件が異なる可能性がある。我々はすでに、これらゲノタイプのうちゲノグループ I に対しては 43%, ゲノグループ II に関しては 76% の VLPs の作出に成功している。本年度はゲノグループ I に関しては GI/4, ゲノグループ II に関しては GII/6 の VLP を大量に発現させ、VLP の安定性試験に供給することに成功した。また、共同研究者である中部検査センターでも、VLP の大量合成が出来るよう、技術指導及び移転を行った。GI/4 および GII/6 の VLP は、それぞれ約 1mg を作出し、粒子の安定性を測定する方法を検討するため、共同研究者である花王株式会社の研究部に供給した。花王株式会社では、これらの VLP を用いて粒子形状を測定する方法として TEM 観察を施行し、その有用性を確認した。

SaV については、ゲノグループが 5 種類報告されている。SaV も NoV と同様ゲノグループやゲノタイプによりウイルス粒子の不活か条件が異なる可能性がある。しかし、SaV の VLP 作出の報告は唯一ゲノグループ I の VLP があるのみで、続報は未だ無く作出に困難を極めることが予想された。本研究ではゲノグループ I, II, V の VLP 作出に取り組み、世界で初めて SaV のゲノグループ II と V の VLP の作出と精製に成功した。しかし、SaV の VLP の収量は NoV のそれに比べ 1/10 程度であり、現状では本研究の用途に使用するには十分ではない。今後、収量の増加を試みる必要がある。

VLP に核酸を内包する技術については、GII/3 に属する U201 株を用いて検討を行った。U201 株のゲノム塩基配列の上流にハンマーヘッド型リボザイム配列を、ゲノム末端のポリ A 配列下流にデルタ肝炎ウイルスのリボザイムを配置し、昆虫細胞内で完全長ゲノム RNA を転写出来るようにした U201 ゲノム供給用組換えバキュロウイルス、rBV-U201F-Ribo を作成した。次に U201 VLP を作出するための組換えバキュロウイルス rBV-U201ORF23 を作成した。rBV-U201ORF23 と rBV-U201F-Ribo を共感染させ、VLP の性状を調べた。その結果、U201

の VLP は多量に合成されたが、全て rBV-U201ORF23 を単独感染させた場合に得られる密度 1.30 g/cm³ の中空粒子であった。

D. 結論

NoV-VLP の供給体制は整い、供給を開始したが、SaV-VLP の供給には収量の改善が必須であった。また、核酸を内包したナノカプセルの作出には成功せず、さらなる検討の必要がある。現在、NoV 感染症がメディアに取り上げられ、社会的にも重要な感染症として位置づけられたことで、早急に感染予防対策を確立する必要に迫られている。本研究に用いるナノカプセルの作出に難航した場合、これに変わるウイルス粒子を使用することも考慮に入れる必要がある。来年度は、当初の予定に加え、カリシウイルス科のウイルスで NoV、SaV に近縁なネコカリシウイルス (FCV) の培養を行い、大量に供給する準備を行う予定である。

E. 研究発表 学会発表

- 1) Grant S. Hansman, Katsuro Natori, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima, Naokazu Takeda, and Kazuhiko Katayama : Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. 第 52 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成 16 年 11 月 21 日
- 2) 影山 努、小嶋 慈之、李 天成、片山 和彦、武田 直和 : 蛍光プローブを用いた HEV の高感度検出法および遺伝子型識別法の開発 第 52 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成 16 年 11 月 21 日
- 3) 岡 智一郎、小川 智子、Hansman Grant、影山 努、片山 和彦、宮村 達男、武田 直和 : サポウイルス ORF1 のプロセッシング産物の同定と切断地図の作製 第 52 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成 16 年 11 月 21 日
- 4) 松原 尚子、グラント ハンスマン、岡 智一郎、名取 克郎、武田 直和、片山 和彦 : サポウイルス粒子形成機構の解析 第 52 回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成 16 年 11 月 21 日
- 5) 片山和彦、白土 (堀越) 東子、岡智一郎、松原尚子、影山努、宮村達男、武田直和 : ノロウイルス (NoV) 全長 cDNA クロー

ンを用いた複製機構の解析 第52回日本ウイルス学会学術総会、横浜、平成16年11月21日

- 6) 片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、牛島廣治、三好達也、田中智之、宮村達男、武田直和：Sapovirus ゲノムの解析、衛生微生物技術協議会、さいたま、平成16年7月9日
- 7) 片山和彦：ノロウイルス食中毒と予防日本食品衛生セミナー、静岡、平成16年12月6日
- 8) Grant S. Hansman, Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Katsuro Natori, Satoko Ogawa, Hiroshi Ushijima and Naokazu Takeda: Expression of Human Sapovirus Virus-like Particles. The 7th Symposium on Positive-Strand RNA viruses. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 9) Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Satoko Ogawa, Grant S. Hansman, Hiroshi Ushijima, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: In vitro Proteolytic Processing of the Sapovirus ORF1 polyprotein. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 10) Kazuhiko Katayama, Tomoichiro Oka, Satoko Ogawa, Haruko Shirato-Horikoshi, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. Palace Hotel, San Francisco, CA. May 29, 2004
- 11) K. Katayama, T. Oka, S. Ogawa, H. Shirato, T. Miyamura, and N. Takeda: Study on Norovirus replication in vitro. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004.
- 12) G. S. Hansman, K. Natori, T. Oka, N. Takeda, and K. Katayama: Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Second International Calicivirus Conference. Dijon France. November 6-10 2004,

【1】Fukushi S, Kojima S, Kageyama T, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N and Katayama K. Analysis of the Enzymatic Activity of RNA-Dependent RNA Polymerase from Norovirus. *J of Virol.* 78: 3889-3896, 2004.

【2】Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N and Ushijima H. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J of Clin Micro* 42: 1305-1307, 2004.

【3】Hansman GS, Doan LT, Kgyuen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H. Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol* 149: 1673-1688, 2004.

【4】Kageyema T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, and Katayama K. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol.* 42: 2988-2995, 2004.

【5】Katayama K, Miyoshi T, Uchino K, Oka T, Tanaka T, Takeda N, and Hansman GS. Novel Recombinant Sapovirus. *Emerg Infect Dis* 10: 1874-1876, 2004.

【6】Guntapong R, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Kageyama T, Pongsuwanna Y, and Katayama K. Norovirus and Sapovirus Infection in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 57: 276-278, 2004.

【7】Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, Ushijima H, Takeda N, and Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Archives of Virology* 150: 21-36, 2005.

【8】Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C. *Viral*

gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11: 180-182, 2005.

【9】Hansman GS, Katayama K, Oka T, Natori K, Takeda N. Mutational study of sapovirus expression in insect cells. *Virology Journal* 2:13,

2005.

F. 知的財産権の出願・登録状況
特許および実用新案登録共になし。