

もカキの採取を行った。定点 A および B への流入に関わる下水処理場を、それぞれ処理場 a および b とした。

2. 検査材料

(1) カキ

2004年9月から2005年2月にかけて、毎月1回採取した。カキ1個分の中腸腺を1検体として、定点 A、B は4検体、定点 C は2~3検体について検査を行った。

(2) 海水

2004年9月から2005年2月にかけて、毎月1回採水した。20リットルを1検体として、各定点につき1検体ずつ検査を行った。

(3) 下水

2004年5月から2005年1月にかけて、毎月1回採水を行った。処理場 a は流入水および放流水を、処理場 b は流入水、流調槽水、余剰汚泥、塩素処理水およびレキろ過水(放流水)を検査材料とした。流入水、流調槽水および余剰汚泥上清は50ml、処理場 a の放流水と塩素処理水は200ml、レキろ過水は500mlを1検体とした。

3. 方法

カキの中腸腺は、PBS で10%乳剤を作製し、10,000rpm、20分間遠心した後、上清をHCFC141-bで処理し、9,000rpm、20分間遠心した。その上清をポリエチレングリコール法により濃縮し、ペレットにDEPC処理水200 μ lを加えて再浮遊した後、10,000rpm、20分間遠心した上清140 μ lをRNA抽出に用いた。海水はそのまま、下水は塩化マグネシウムを最終濃度50mMになるように加えたものを、それぞれ陰電荷フィルター法を用いて濃縮し、さらに限外ろ過により濃縮したものをRNA抽出に用いた。

RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN) を用いて抽出し、

DNaseI(TaKaRa)で処理した後、random hexamerを用いてcDNA合成を行った。

全ての検体についてNVのnested PCRを行った。1st PCRにはCOG1F/G1-SKR、COG2F/G2-SKRを、nested PCRにはそれぞれG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRを用いた。PCR産物についてはダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。複数混合している場合はクローニングを行った。

NVについては全検体、HAVについては海水とカキについて、Universal PCR Master Mix(ABI)を用いたリアルタイムPCRによりウイルスコピー数の測定を行った。NVについては、プライマーにCOG1F/COG1R、COG2F/COG2R、プローブにそれぞれRING1-TPa および RING1-TPb、RING2AL-TPを、HAVについては、プライマーにHAV+449/HAV-557、プローブにHA+482-P-FAMを使用した。

C. 研究結果

1. 下水からのNV検出

下水処理場aにおけるNV検出状況を図1に示した。流入水からは、検査を行ったほとんどの期間においてNVが検出されたが、夏季はウイルスコピー数の減少が見られた。放流水からは6~9月の間NVは検出されなかった。流入水中のウイルスコピー数が多い時期は、流入から放流の過程でNV量の減少がほとんど認められなかった。

下水処理場bにおけるNV検出状況を図2に示した。流入水、放流水ともに、おおむね7月から10月にかけてNVの検出が認められなかったが、流入水からNVが検出されなかった月でも、流調槽水および余剰汚泥上清からは 10^3 コピー/L以上のNVが検出された。流入水もしくは流調槽水から塩素処理水までの過程で、 10^{-1} ~ 10^{-3} 程度のNV量の減少が見られた。また、塩素処理水をレキろ過することに

より、さらに 10^{-1} 程度の NV の減少が認められた。

2. 海水からの NV および HAV 検出

海水からの NV および HAV 検出状況を表 1 に示した。2004 年 9 月から 2005 年 1 月までは、RT-PCR およびリアルタイム PCR で NV は検出されなかったが、2 月の定点 B-1 の海水から、GI および GII の NV 遺伝子が検出された。HAV は、検査を行った全期間において検出されなかった。

3. カキからの NV および HAV 検出

カキからの NV および HAV 検出状況を表 2 に示した。検査を行った全期間において、NV、HAV ともにカキからは検出されなかった。

4. 下水、海水から検出された NV の遺伝子型

検出された NV の遺伝子型を表 3 に、系統樹を図 3 および 4 に示した。流入水からは 1 検体中に複数の遺伝子型の NV が検出され、放流水からはそのうちの一部の遺伝子型の NV が検出される傾向にあった。GI では Chiba 類似株がもっとも多く検出され、GII では 5~10 月にかけては Bristol 類似株が、11 月からは Mexico 類似株が多く検出された。定点 B-1 の海水からは、同じ時期の下水において優勢株であった Mexico 類似株が検出された。

D. 考察

下水処理場 a と下水処理場 b では、ともに夏季の放流水中の NV は検出限界以下であった。しかし、流入水中の NV 量が多かった春季および冬季における NV 処理能力(流入水から放流水までの NV 減少率)は、処理場 a はおおむね 10^{-1} 以下とほとんど減少が見られなかったのに対し、処理場 b では 10^{-3} 以上減少しており、2 施設間で大きな差が認められた。この理

由として、1 日当たりの下水処理量の違いと処理方法の違いが考えられた。2 施設の 1 日当たりの下水処理量は、処理場 a が約 600 m^3 、処理場 b が約 160 m^3 であり、処理場 a の方が多い。さらに、処理場 a は合流式であるため、降水量が増加すると 1 日当たりの処理水量が増加する。一方、処理方法は、2 施設とも活性汚泥法で、流入から放流までの処理時間もともに 1 日程度である。塩素処理は、どちらもタブレットの上を通して最終塩素濃度 0.1~0.05ppm にし、処理場 a は 1~2 時間程度置いて放流、処理場 b は直ちにレキろ過して放流している。ただし、検査は輸送の関係上採水から約 1.5 日後に行っているため、その間塩素処理され続けていることになり、両者ともほぼ同条件となる。処理場 b は塩素処理後レキろ過の過程が追加されるが、流入水から塩素処理水までの NV 除去率も処理場 b の方が高い。これらのことから、処理能力の違いは 1 日当たりの下水処理量に関係しているのではないかと考えられた。

下水処理場における塩素処理濃度は 0.1ppm 程度であり、この濃度では NV は不活化されないと考えられる。しかし、下水の流入から放流までに NV 量が減少することは、すでに多数報告されているところである。今回、処理場 b において、流入水から NV が検出されない夏季においても、余剰汚泥からはその上清でさえ毎月大量の NV が検出された。このことから、下水処理場における NV の減少は化学的に「処理」されているからではなく、「吸着および沈殿」によって物理的に減少することが主な原因なのではないかと考えられた。また、レキろ過により 10^{-1} 程度の NV 量の減少がみられたが、これも、レキ間に形成されたバイオフィルムに NV が吸着したからではないかと考えられた。吸着・沈殿しているだけならば、その NV は長期間感染性を保っている

考えられ、下水処理場での NV の不活化について、実用的な方法を検討する必要があるだろう。

下水から検出された NV の遺伝子型は、GI は Chiba 類似株、GII は Bristol 類似株と Mexico 類似株の 3 タイプが多かった。11～12 月の下水からは、例年であれば数種類の遺伝子型が混合して検出されていたが、今年度は Mexico 類似株が優勢であった。この時期は、今回定点をおいたカキ養殖海域周辺の小学校および幼稚園で Mexico 類似株の NV が流行しており、集団発生事例と下水から検出された NV の遺伝子型が一致した。1 月からは老人福祉施設や病院で Bristol 類似株の流行がみられたが、1 月以降に下水から検出された NV の遺伝子型は、クローニングが未実施であるため確認できなかった。全道においても、11～12 月に保育園、幼稚園、小学校において Mexico 類似株が、12 月以降は老人福祉施設を中心に、全ての施設において Bristol 類似株が流行している。

1L 当たり 10^3 コピー以上の NV を含む下水が放流される時期であっても、海水は 1 検体から NV が検出されたのみであり、カキからは NV は検出されなかった。現在の検査法では、カキからの NV 検出感度は高いとはいえ、RT-nested PCR やリアルタイム PCR で陰性となったカキであっても、食中毒の原因にならないとは断言できない。安全なカキを提供するためには、検出感度の向上を目指して検査法を改良していくとともに、カキの NV 低濃度汚染の指標となる検査対象について検討する必要があると考えられた。

E. 結論

処理場における NV 除去率は、流入水中の NV 量が多かった春季および冬季で、処理場 a では 10^{-1} 程度、処理場 b では 10^{-3} 以上であり、処理施設により大きく異なる

っていた。処理能力の違いは 1 日当たりの下水処理量に関係しているのではないかと考えられた。また、処理場 b において、流入水から NV が検出されない夏季においても、余剰汚泥の上清から NV が検出されたことから、下水処理場における NV の減少は、「吸着および沈殿」によって物理的に減少することが主な原因なのではないかと考えられた。

下水から検出された NV の遺伝子型は、GI では Chiba 類似株がもっとも多く検出され、GII では 5～10 月にかけては Bristol 類似株が、11 月以降は Mexico 類似株が多く検出された。海水からは 2 月に 1 定点から NV が検出され、遺伝子型は同じ時期の下水において優勢株であった Mexico 類似株であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

吉澄志磨、三好正浩、石田勢津子、奥井登代；ノロウイルスによる胃腸炎集団発生について—北海道、2003/04 シーズン—、北海道立衛生研究所報、54:37-42、2004

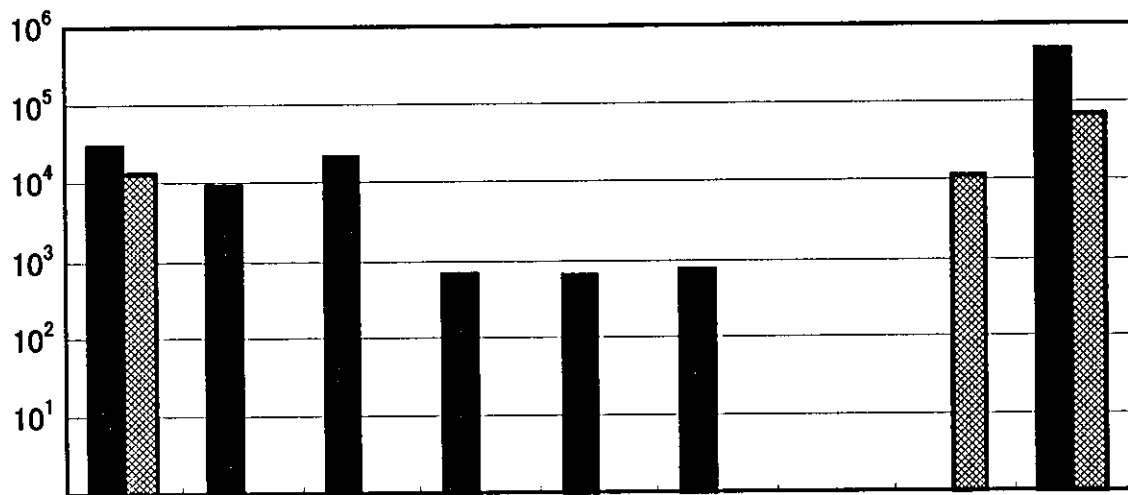
西尾 治、吉澄志磨、野田 衛；ウイルス性食中毒について—特にノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス—、日本食品微生物学会雑誌、21(3):179-186、2004

2. 学会発表

西田知子、野田衛、三上稔之、篠原美千代、大瀬戸光明、入谷展弘、植木洋、吉澄志磨、岩田祐之、西尾治；3 シーズンにおける国内産食用カキのノロウイルスおよび A 型肝炎ウイルス汚染状況、第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004 年 11 月 21-23 日

(copies/L)

G I



(copies/L)

G II

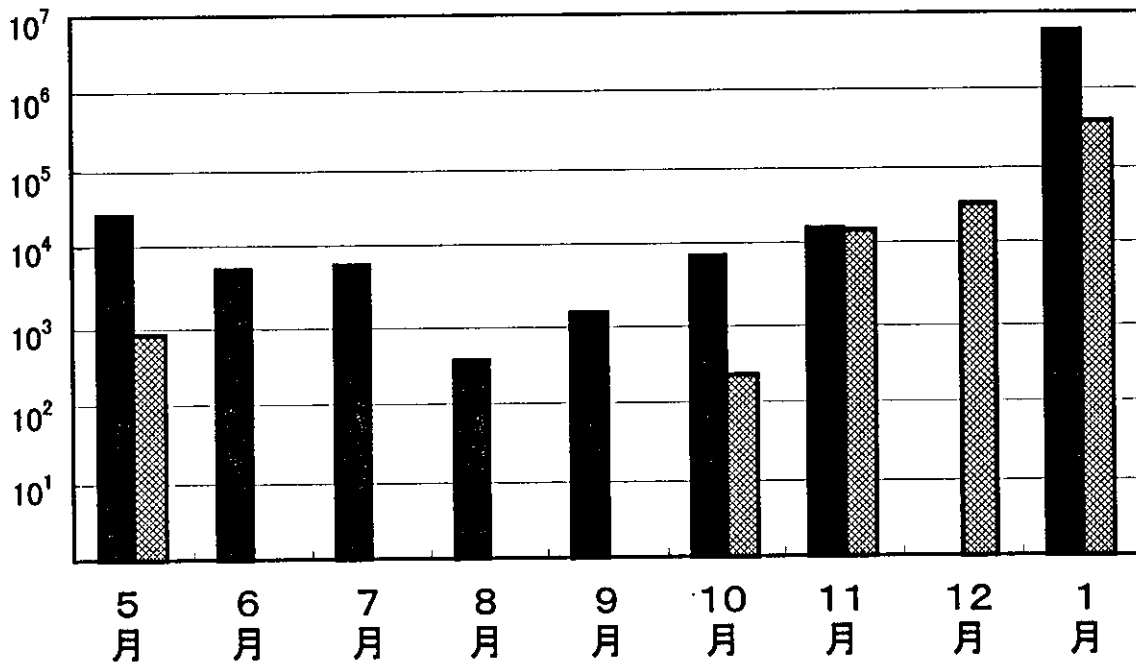
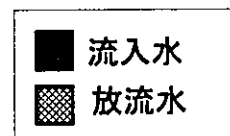
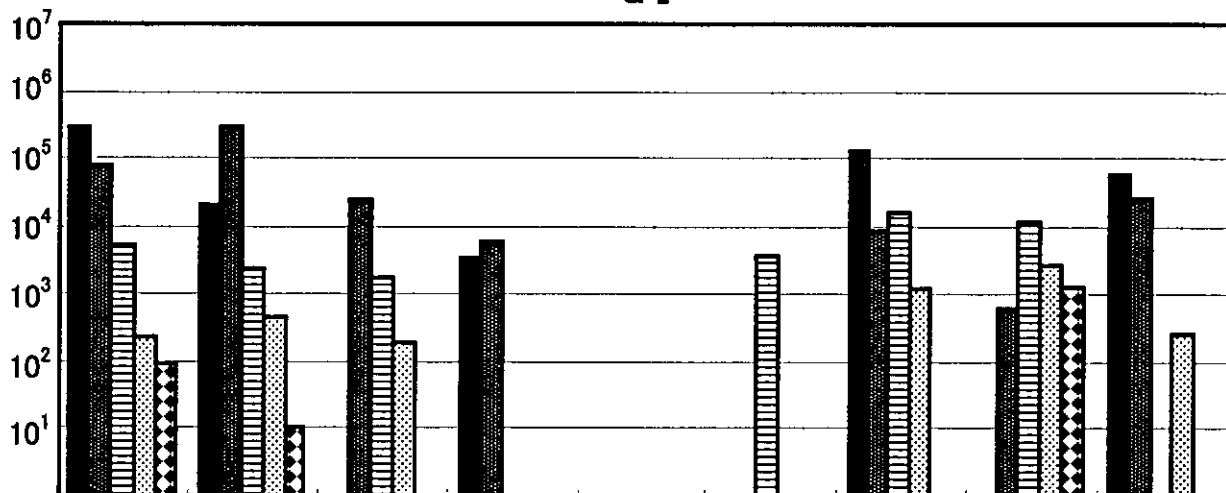


図1 下水処理場 a におけるNV検出状況
(2004年5月～2005年1月)



(copies/L)

G I



(copies/L)

G II

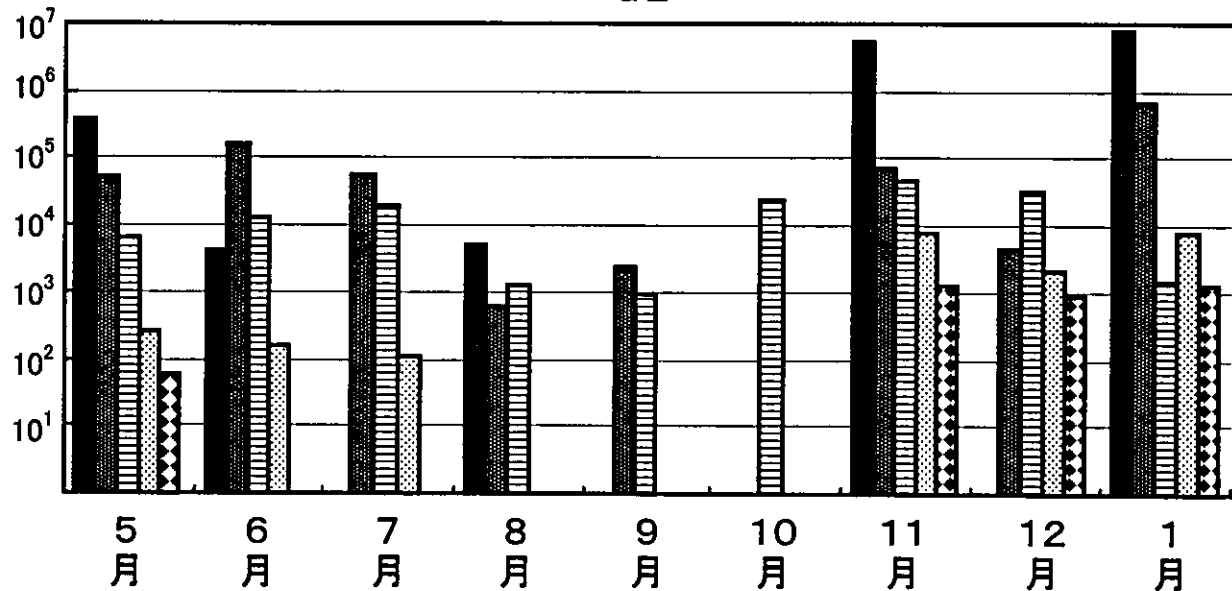


図2 下水処理場 b におけるNV検出状況
(2004年5月~2005年1月)

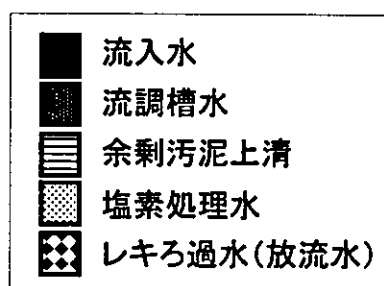


表1 海水からの NV および HAV 検出状況

採取日	調査定点	検体量 (L)	[NV]			[HAV]
			Realtime PCR (copies/L)		RT-PCR	Realtime PCR (copies/L)
			G1 平均	G2 平均		
2004.09.29	A	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	20	0.0	0.0	-	0.0
2004.11.01	A	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	20	0.0	0.0	-	0.0
2004.11.15	A	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	20	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	20	0.0	0.0	-	0.0
2005.01.31	C	20	0.0	0.0	-	0.0
2005.02.15	A	20	NT	NT	-	NT
	B-1	20	NT	NT	G1/G2	NT
	B-2	20	NT	NT	-	NT
	C	20	NT	NT	-	NT

※NT: not tested

表2 カキからの NV および HAV 検出状況

採取年月日	調査定点	中腸腺		[NV]			[HAV]
		個 数	重量 (g)	Realtime PCR (copies/個)		RT-PCR	Realtime PCR (copies/個)
				G1 平均	G2 平均		
2004.09.29	A	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.5	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.6	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.4	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.6	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.6	0.0	0.0	-	0.0

採取年月日	調査定点	中腸腺		[NV]			[HAV]
		個数	重量 (g)	Realtime PCR (copies/個)		RT-PCR	Realtime PCR (copies/個)
				G1 平均	G2 平均		
2004.11.01	A	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
2004.11.15	A	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	A	1	0.5	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	1.1	0.0	0.0	-	0.0
	B-1	1	0.9	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.8	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	B-2	1	1.0	0.0	0.0	-	0.0
2005.01.31	C	1	0.7	0.0	0.0	-	0.0
	C	1	0.5	0.0	0.0	-	0.0
	C	1	0.5	0.0	0.0	-	0.0
2005.02.15	A	1	0.5	NT	NT	-	NT
	A	1	1.0	NT	NT	-	NT
	A	1	0.8	NT	NT	-	NT
	A	1	0.7	NT	NT	-	NT
	B-1	1	0.9	NT	NT	-	NT
	B-1	1	0.9	NT	NT	-	NT
	B-1	1	0.7	NT	NT	-	NT
	B-1	1	0.6	NT	NT	-	NT
	B-2	1	0.5	NT	NT	-	NT
	B-2	1	0.9	NT	NT	-	NT
	B-2	1	0.8	NT	NT	-	NT
	B-2	1	0.7	NT	NT	-	NT
2005.02.17	C	1	0.9	NT	NT	-	NT
	C	1	1.0	NT	NT	-	NT

※NT: not tested

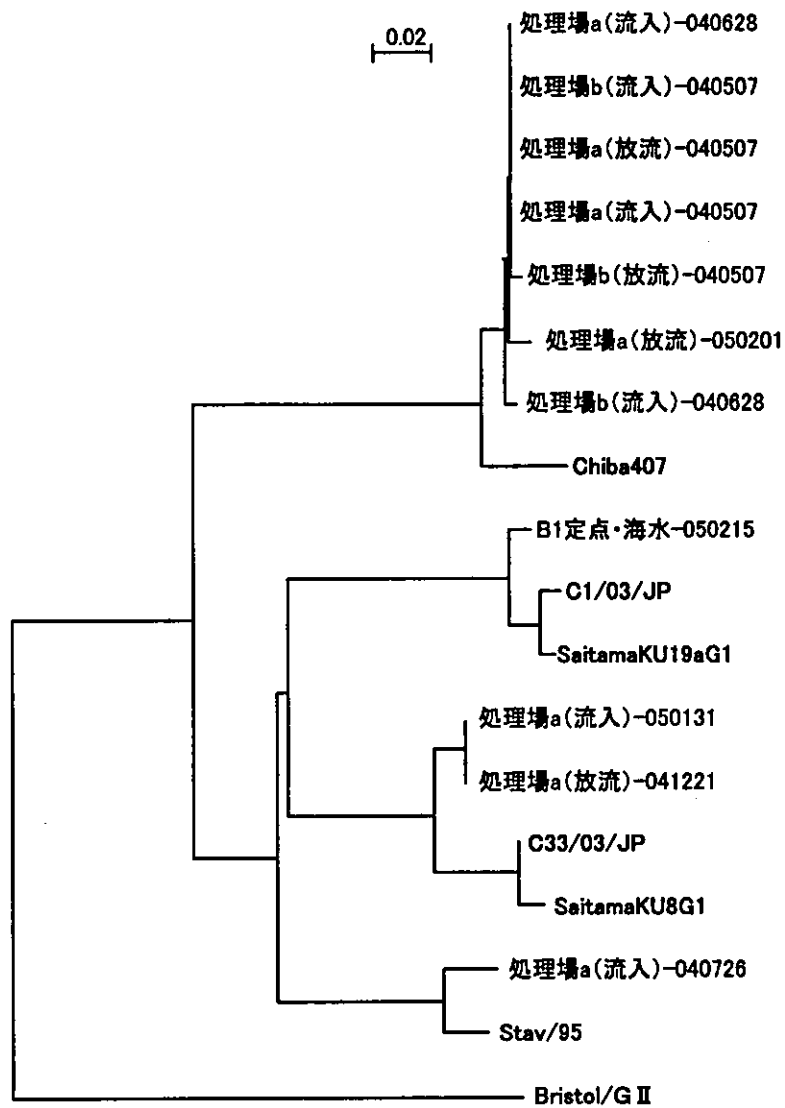


図3 検出されたNVの系統樹解析(G I)

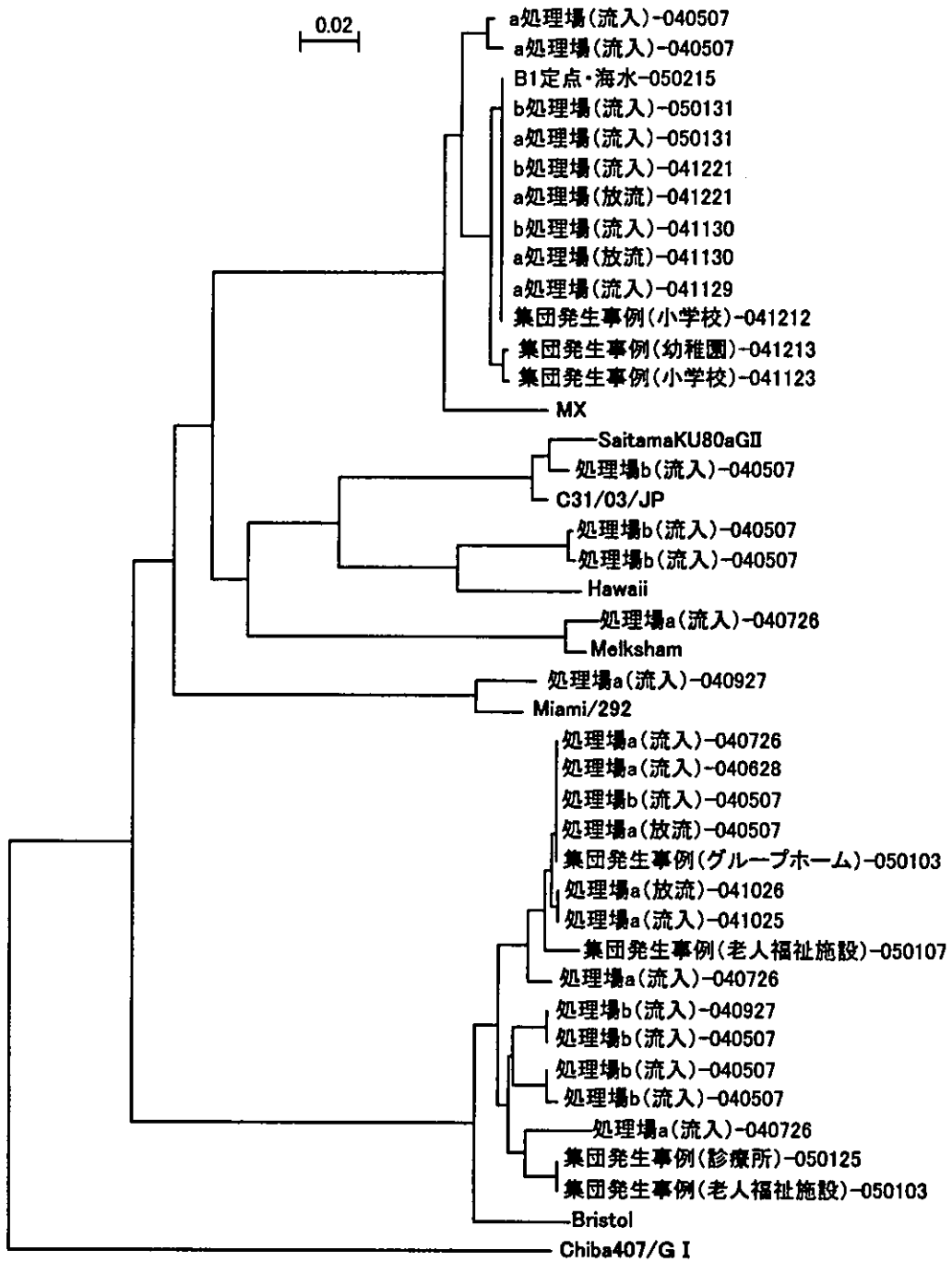


図4 検出されたNVの系統樹解析(G II)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性食中毒の予防に関する研究

分担研究項目：群馬県における感染性胃腸炎患者とシジミ (*Corbicula japonica*) から
検出されたノロウイルスの分子疫学に関する研究

分担研究者 西尾 治 国立感染症研究所感染症情報センター
研究協力者 木村 博一、齋藤 美香、長井 章、森田 幸雄、石岡 大成、小澤 邦壽
群馬県衛生環境研究所

研究要旨

感染性胃腸炎(GE)及びシジミ (*Corbicula japonica*)由来のノロウイルス(NV)キャプシド遺伝子領域の分子疫学に関する研究を行った。その結果、GEとシジミから検出されたNVの多くはキャプシド領域の遺伝子に関し遺伝学的に類似していた株が多かった。また、比較的多量かつ複数のgenogroupのNVが同一のシジミから検出された。GE患者とシジミ由来NVには疫学的な関連性があることが示唆された。

A. 研究目的

本邦で発生する感染性胃腸炎(GE)や食中毒患者の多くの事例がノロウイルス(NV)を原因物質とすることが最近の調査で明らかになりつつある。また、秋期から冬季にかけて発生する多くの感染性胃腸炎患者もNVが原因であることがわかってきた。ヒトの腸管で増殖したNVは下水・河川等に拡散し、流域に生息するシジミ等の淡水二枚貝に蓄積する可能性がある。したがって、淡水二枚貝に含まれるNVは河川流域周辺のGE流行に関与したウイルスと疫学的な関連性を示すことが推定される。しかし詳細については不明な点が多い。そこで、本研究はヤマトシジミ (*Corbicula japonica*)を淡水二枚貝のモデルとし、患者及びシジミ由来のNVの分子疫学調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

2003年11月～04年1月に本県F市に居住する感染性胃腸炎患者由来糞便10検体および03年11月～04年11月に採取した烏川(F地域)に生息するヤマトシジミ中腸腺76検体を材料とした。RT-PCRによってNVキャプシド遺伝子を増幅した。また、リアルタイムRT-PCR法によりNV遺伝子のコピー数も求めた。プライマーはキャプシド領域(1st PCR:G1:COG1F/G1SKR、G2:COG2F/G2SKR、ALPF/G2ALSKR、Nested PCR:G1SKF/G1SKR、G2:G2SKF/G2SKR、G2SKF/G2ALSKR)を用いた。検体処理、PCR、シーケンスは常法に従った。リアルタイムPCRはTaqManプローブを使用し、cDNA30 μ lを20倍希釈し、そのうちの5 μ lを鋳型として用いた。使用したプライマーとプローブはG1:COG1F/COG1R、G2:COG2F・ALPF/COG2Rを用い、Light CyclerによってNVゲノムコピー数を測定した。分子系統樹は近隣結合法(N-J法)によって作成した。

C. 研究結果および考察

GE患者およびシジミからRT-PCR法およびリアルタイムPCR法によって検出・定量されたNVを表1と2に示す。胃腸炎患者4検体(40%)からNVが検出され、その遺伝子型はG1が2例、G2が2例であった。また、シジミ76検体中、49検体(64.5%)がシーケンス可能であった(表2)。シジミでは、同一検体から2つの遺伝子型が検出された例もあった。いくつかのシジミからは、比較的多量(>

10^4 copies/g中腸腺)のNVゲノムが検出された。NV capsid遺伝子の分子系統樹を図1に示す。胃腸炎患者とシジミ由来のNVが系統樹上、同じクラスターに分類された例も多かった。NVによるGE患者からは比較的大量のNVが排泄され、下水や河川を經由してシジミを汚染し、蓄積されることが推察された。また、シジミに含まれるNVは感染性胃腸炎を引き起こしたNVと疫学的に関連性があることが推察された。

表1 感染性腸炎患者から検出されたNV

No.	年齢 (歳)	発病年月日	採取年月日	G1	G2	シーケンス 解析
HuGE3	5	03. 12. 22	03. 12. 22	-	+	G2
HuGE4	11	03. 12. 21	03. 12. 22	-	-	
HuGE5	3	03. 12. 21	03. 12. 22	-	+	G2
HuGE6	7	03. 12. 22	03. 12. 22	-	-	
HuGE7	3	04. 01. 14	04. 01. 14	-	-	
HuGE8	5	04. 01. 15	04. 01. 15	-	-	
HuGE9	8	04. 01. 15	04. 01. 15	-	-	
HuGE10	4		04. 01. 22	+	-	G1
HuGE11	1	04. 01. 21	04. 01. 22	-	-	
HuGE12	4	04. 01. 20	04. 01. 21	+	-	G1

表2 シジミから検出されたNV

No.	採取年月	Nested G1	Nested G2	シーケンス解析	遺伝子コピー数
Cor 1		-	-		
Cor 2		-	+	G2	
Cor 3		-	+	G2	
Cor 4	03.11	+	+	G2	
Cor 5		-	-		
Cor 6		+	-	G1	
Cor 7		-	+	G2	
Cor 8		-	+	G2	
Cor 11		+	+	G1、G2	
Cor 12		-	+	G2	
Cor 13		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 14		-	+	G2	
Cor 15		-	+	G2	
Cor 16		+	+	G1、G2	
Cor 17	03.12	+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 18		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 21		+	+	G1、G2	
Cor 22		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 23		+	+	G2 (G1 不能)	
Cor 24		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 25		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 26		-	+	G2	
Cor 31		+	+	G1、G2	
Cor 32	04.01	-	+	G2 不能	
Cor 33		+	+	G1、G2	
Cor 41		-	+	G2	
Cor 42		+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 43	04.02	+	+	G1、G2	
Cor 44		-	+	G2	
Cor 45		+	+	G1、G2	
Cor 51		+	-	G1	
Cor 52		-	+	G2	
Cor 53	04.03	+	+	G1 (G2 不能)	
Cor 54		+	+	不能	
Cor 55		-	+	不能	1.3×10 ⁴

No.	採取年月	Nested G1	Nested G2	シーケンス解析	遺伝子コピー数
Cor 61		-	-		
Cor 62		-	+	G2	
Cor 63	04.04	-	+	G2	
Cor 64		+	-	G1	
Cor 65		+	-	G1	
Cor 71		+	+	G1、G2	
Cor 72		-	+	G2	
Cor 73	04.05	+	+	G1、G2	
Cor 74		-	-		
Cor 75		+	+	G1、G2	
Cor 81		-	+	G2	
Cor 82		-	-		
Cor 83	04.06	-	+	G2 不能	
Cor 84		-	-		
Cor 85		+	+	G1、G2	
Cor 91		-	+	G2	
Cor 92		-	+	G2	
Cor 93	04.07	+	+	不能	
Cor 94		-	+	G2	
Cor 95		-	+	G2	2.9×10 ⁴
Cor 101		-	+	G2	
Cor 102		-	-		
Cor 103	04.08	-	-		
Cor 104		-	+	G2	
Cor 105		-	-		
Cor 111		-	-		
Cor 112		-	-		
Cor 113		-	-		
Cor 114		-	-		
Cor 115	04.10	-	-		
Cor 121		-	-		
Cor 122		-	+	G2	
Cor 123		+	+	G1、G2	
Cor 124		-	+	G2	
Cor 125		-	-		

No.	採取年月	Nested G1	Nested G2	シーケンス解析	遺伝子コピー数
Cor 131		+	-	G1 不能	
Cor 132		-	-		
Cor 133	04. 11	+	-	G1	
Cor 134		+	+	G1、G2	
Cor 135		-	-		

D. 結論

GE患者とシジミから検出されたNVの多くはキャプシド領域の遺伝子に関し遺伝学的に類似していた株が多かった。また、比較的多量かつ複数のgenogroupのNVが同一のシジミから検出された。NVによる感染性胃腸炎患者からは比較的大量のNVが排泄され、下水や河川を經由してシジミを汚染し、蓄積されることが推察され、GE患者とシジミ由来NVには疫学的な関連性があることが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

Yasuhito Kondo, Yukio Morita, Atsushi

Yamada, and Hirokazu Kimura : A highly effective method for removing of water-suspended poliovirus using a positively-charged carbon felt electrode. *Microbiology and Immunology*, 48(8): 599-605, 2004

2. 学会発表

塚越博之、齋藤美香、木村博一、星野利得、西尾治：群馬県における感染性胃腸炎患者およびシジミから検出された *Norovirus* について、地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部ウイルス研究会、横浜市、2004年9月

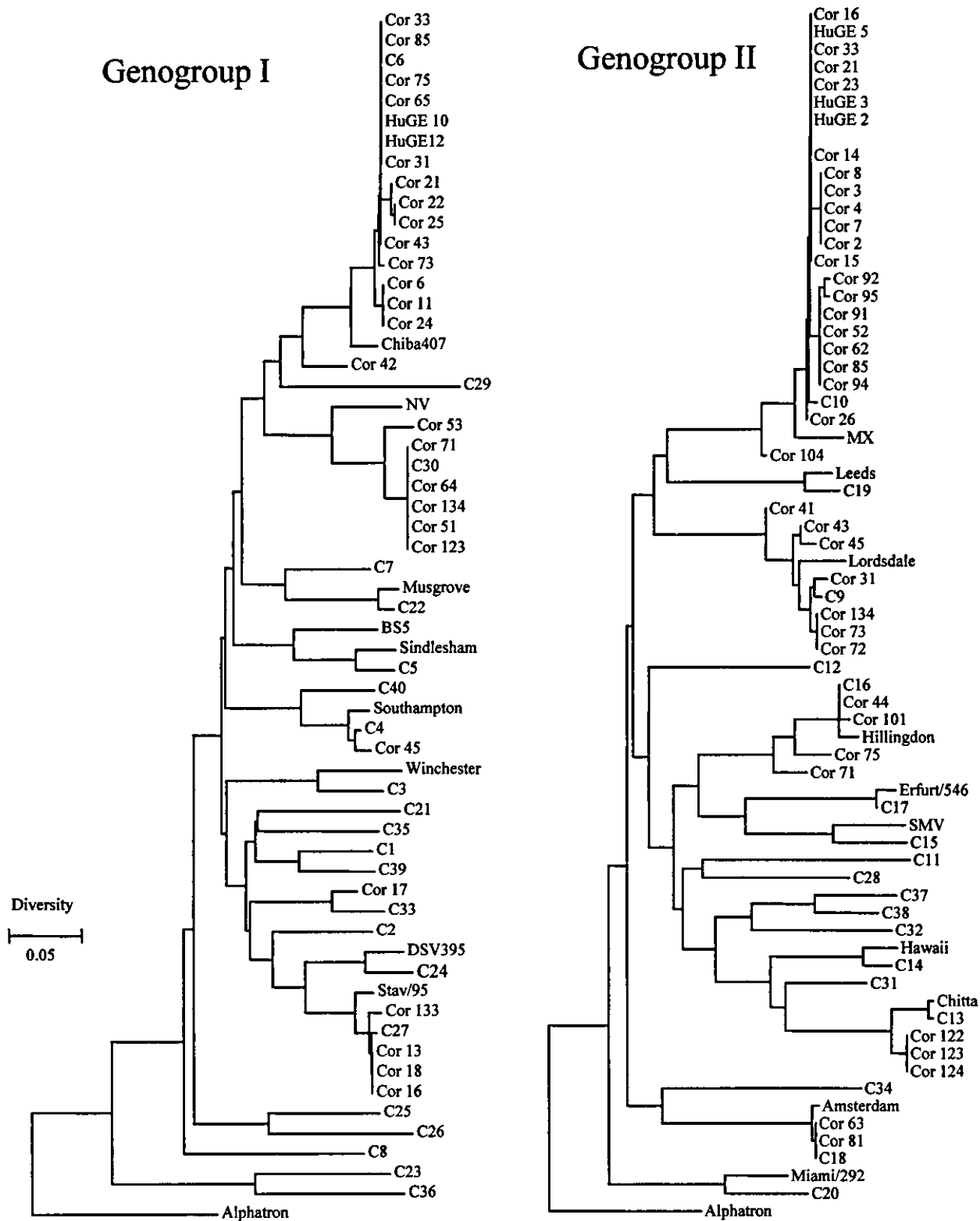


図1 GE及びシジミから検出されたNVの分子系統樹 (キャプシド遺伝子)

合成 siRNA による HAV の増殖抑制

分担研究者：米山徹夫（国立感染症研究所 ウイルス 2 部）

共同研究者：下池貴志、清原知子、佐藤知子、戸塚敦子

研究要旨 A 型肝炎は食品を介して感染がヒトに伝播されるウイルス性の急性肝炎である。他の食中毒と違い潜伏期間が長いのが特徴である。潜伏期間のうちに感染が広がることもしばしば見受けられる。日本では患者報告数も年間数百人であるが、肝炎症状を呈し、療養に要する期間は数週間におよび治療法の確立の望まれる疾患である。siRNA (small interference RNA) はほ乳細胞の遺伝子発現を特異的かつ容易に行える技術として、注目を集めている。siRNA を使用したウイルス特異的治療薬の可能性を探るために、A 型肝炎ウイルス (HAV) の塩基配列に特異的な siRNA を合成し、HAV の増殖抑制効果を検討した。ウイルスタンパク質をコードしている領域を標的にして作成した siRNA が効率良く HAV の増殖を抑制し、新規な治療薬としての可能性を示すことができた。

A. 研究目的

ウイルス性疾患の治療薬を開発するにあたり、考慮すべき点は標的とするウイルスに特異的に作用すること。かつ、異なった遺伝子型の株にも有効であるという同じウイルス内での汎用性が求められることである。HAV は培養細胞に馴化し増殖性を獲得するが、一般に細胞変性効果 (CPE) を示さず、ウイルス増殖も遅い。しかし、感染性のウイルスを用いてウイルス阻害剤の効果を測定できるユニークな肝炎ウイルスとして位置づけられる。合成 siRNA が HAV 特異的に抑制作用を及ぼすかどうか、また遺伝子型の違う株についても抑制効果があるか検討した。

B. 研究方法

HAV (KRM003、genotype IIIB) ゲノム全体から siRNA の標的部位を 14 箇所選び (表 1)、3' 端に 2 塩基の突出部分 (dTdT-3') を持った 19 塩基対のウイルス特異的 siRNA を合成した (ニッポンジーン)。これらの siRNA をそれぞれ終濃度 50nM で Lipofectamine2000 とともにアフリカミドルザルの株化腎細胞 GL37 にトランスフェクションした。一夜後、1 ウエルあたり 300-400 感染価の HAV を接種し、感染後 7 日または 8 日目に免疫染色法で HAV の力価を測定した。siRNA 無処理感染細胞に対する相対力価を算出して siRNA の増殖抑制効果を比較した。

C. 研究成果

1. 調べた siRNA のうちで、VP3 領域の siRNA16 が最も強い HAV 増殖抑制効果を示し、終濃度 50nM で 90-95% の抑制がみられた。5' 非翻訳領域を標的にした siRNA は顕著な抑制効果を示さなかった (図 1)。
2. VP1 領域の siRNA26 はミスマッチのない KRM003 株では抑制効果が充分認められたが、ミスマッチが 5 箇所ある IB 型の TKM005 株では抑制効果は全くなかった (図 2)。VP3 領域の siRNA16 はミスマッチのない KRM003 株でも、遺伝子型が異なり 5' 端側に 1 箇所ミスマッチのある TKM005 株でも抑制効果が同じように認められた。
3. siRNA16 の中央部に 1 箇所ミスマッチをいれただけで、抑制効果を示さなくなった。一本鎖の RNA ではセンス鎖、アンチセンス鎖ともに、抑制効果は示さなかった (図 3)。
4. 一番抑制効果の認められた siRNA16 を処理した感染細胞ではウイルス RNA の合成量が顕著に減少していた (図 4)。また、HAV を感染させてから siRNA をトランスフェクションしても、同様にウイルス RNA の合成抑制がみとめられた。

D. & E. 考察と結論

合成 siRNA が GL37 細胞に感染させた HAV の増殖を抑制することが分かった。5' 非翻訳領域の siRNA が効果的に作用しないのは、この領域に結合する宿主因子や二次構造が siRNA の効果の発現に不利に働く可能性が考えられる。siRNA の効果が HAV の配列特異的であることは、遺伝子型の違う株やミスマッチをいれた siRNA などの実験から明らかであった。最も抑制効果のあった siRNA16 は他の遺伝子型間でも塩基配列が良く保存されている領域で、遺伝子型の異なる HAV にも効果が期待できる。siRNA が A 型肝炎の新規な治療薬になりうる可能性を示すことができた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 米山徹夫、清原知子、下池貴志、森伸生、岡部信彦：A 型肝炎、臨床とウイルス 32 巻、149-155、2004.

2. 学会発表

1. 米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、宮村達夫：合成 siRNA による HAV の増殖抑制、第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年.

H. 知的所有権の取得状況

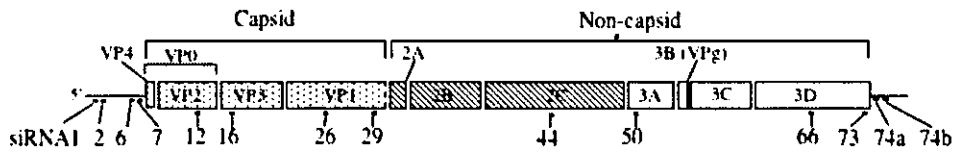
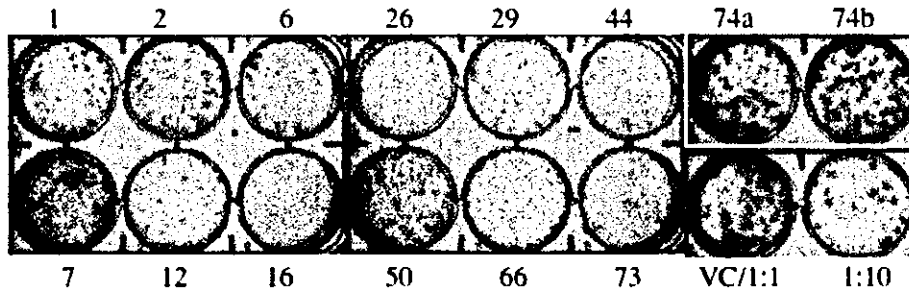
なし。

表 1. 合成した siRNA の塩基配列

siRNA	Target		
	sequence	nt(based on HM175/wt)	nt(of KRM003)
1	5'-CCUGUGUUAUUGUAAAUAU-3'	117-150*	115-133
2	5'-UCCAGGGCUCUCCCCUUGC-3'	229-247	211-229
6	5'-GUUUGCCGCUGAGGUACUC-3'	679-687	661-679
7	5'-AUUUAGGUUUUCCUCAUC-3'	705-723	686-704
12	5'-GAUCCAUAGCUUCUCUGAC-3'	1210-1228	1191-1209
16	5'-UGCUCAGUUCCAUUJAAU-3'	1652-1670	1633-1651
26	5'-GAGGUCCUCUGGACUUAAC-3'	2620-2638	2601-2619
29	5'-AUUACAAUCAUUCUGAUGA-3'	2911-2929	2829-2847
44	5'-AUUAUGGUGUUGAGCCUGA-3'	4483-4501	4464-4482
50	5'-AUAAUGAUAGUGCAGUUGC-3'	5017-5035	4998-5016
66	5'-UGAUGCUAGUCUAGUCCA-3'	6692-6710	6677-6695
73	5'-CAGUGCUUUGUUUGUGACC-3'	7392-7410	7376-7394
74a	5'-UUUGUUUAAAUGAAUCUUC-3'	7419-7437	7403-7421
74b	5'-UUAAAUUUCUGAGGUUUG-3'	7438-7456	7422-7440

*:この領域のKRM003株は標準株のHM175株に対して15塩基の欠損がある。

☒ 1a. Efficiency of siRNAs against HAV replication



☒ 1b. Efficiency of siRNAs and GC contents

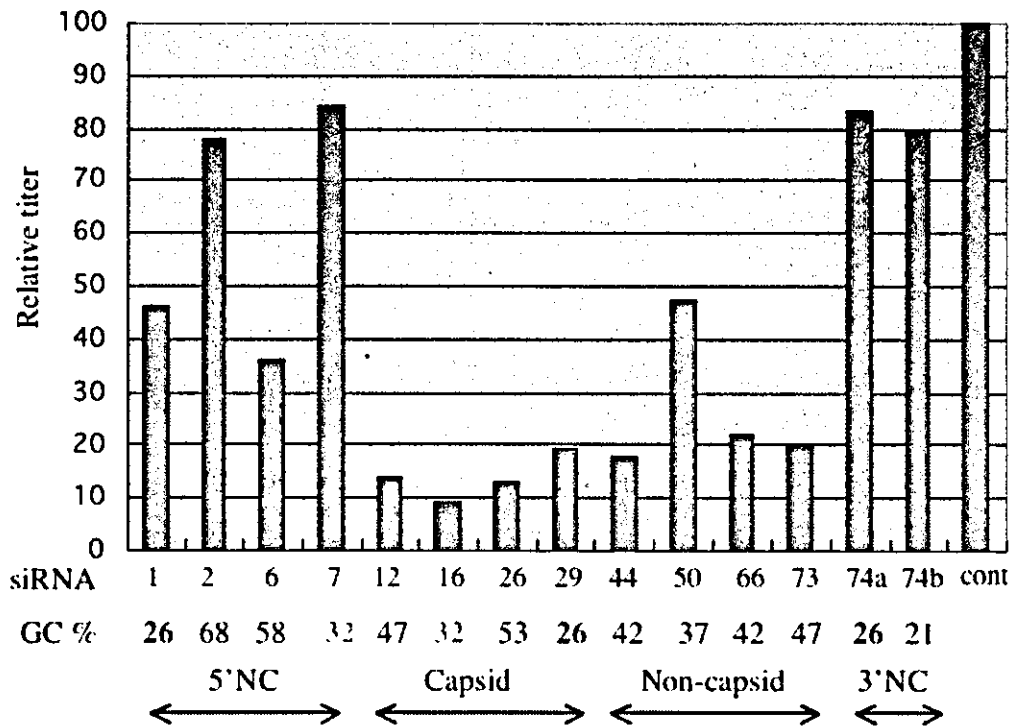
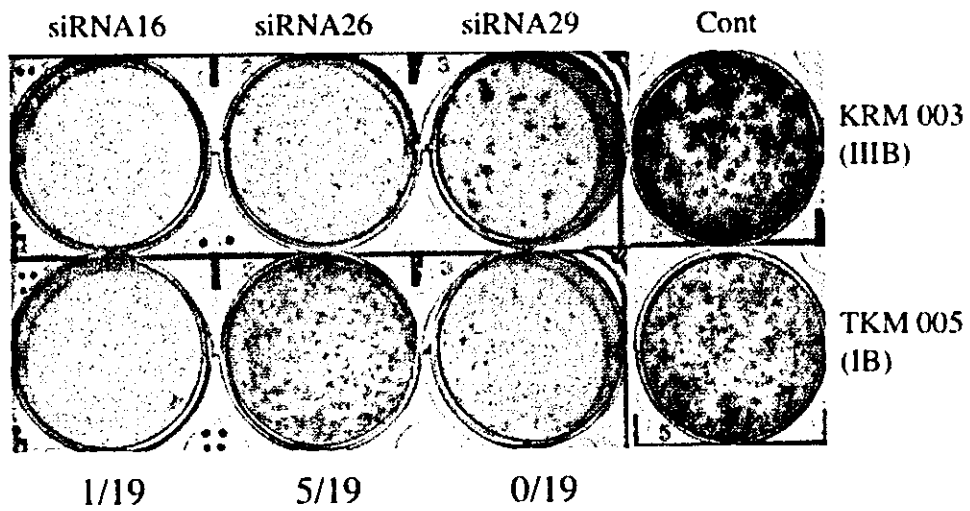


Figure 2a. Nucleotide alignment between used HAV strains

HAV	Mismatching
	siRNA16
KRM003	5'-UGCUCAGUUUCCAUUUAAU-3'
TKM005	...G.....
	siRNA26
KRM003	5'-GAGGUCCUCUGGACUUAAC-3'
TKM005G.....A..UC.G..
	siRNA29
KRM003	5'-AUUACAAUCAUUCUGAUGA-3'
TKM005

Figure 2b. Strain-specific inhibition of HAV by siRNAs



Mismatching number of nucleotides between two strains in target regions