

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦	…… 589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字	…… 636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子	…… 656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴	…… 671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	…… 680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行	…… 691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治	…… 707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹	…… 720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治	…… 728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広	…… 740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人	…… 761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子	…… 772
KH51054	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	武田直和	…… 783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂	…… 795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾	…… 814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	…… 826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二	…… 836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江	…… 839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫	…… 919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明	…… 939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一	…… 951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘	…… 966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

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。「正常粒子数の減少の程度」および「変形・崩壊粒子数の変化」という2種のパラメータと「薬剤濃度」および「処理時間」との間に相関関係がみられ、消毒薬のVLP に対する影響は電子顕微鏡 (TEM) で評価できることが明らかになった。NoV 流行株の遺伝子解析から GII/4 VLP を用いた薬剤評価の有用性が確認された。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所 岡智一郎
- (2) 東海大学 小沼博隆
- (3) 花王 (株) 徳田一
- (4) 花王プロフェッショナルサービス (株) 日置祐一
- (5) (株) 中部衛生検査センター 小澤一弘

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。近年、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ている。NoV 感染は例年11月頃から感染者の報告が増加し始め年末から年始にピークを形成し、4月ごろまで持続するのが常であるが、昨年は10月半ばから患者数が増加し未曾有の大流行となった。SaV については感染の実態があまり明らかにされていないが散発性のウイルス性嘔吐下痢症の主因であると考えられている。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遺伝子群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。したがってヒトに感染する NoV と SaV の効

果的な治療法、予防法は未だ見出されていない。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薬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

- 1) 核酸を内包する NoV 様粒子の作出
GII/3 NoV U201 株の全長ゲノムの上流に EF1 α promoter 配列を、下流にリボザイム配列を挿入したコンストラクトを作製した。COS7 を形質転換し産生されるウイルス蛋白、およびウイルス遺伝子を生化学、免疫学的手法で検出した。また、細胞を破碎して平衡密度勾配遠心法で分離しウイルス様粒子を電子顕微鏡で検索した。
- 2) ネコカリシウイルスを用いた消毒剤感受性試験
CRFK 細胞におけるプラーク形成能を指標に NaClO、80%エタノール及び過酸化水素について感受性を検討した。
- 3) 電子顕微鏡観察による消毒薬の評価
VLP に不活化剤を加え一定時間反応した。不活化剤を中和して VLP の数と形態を観察し、薬剤の効果を4種類の判定基準で評価した。

4) マウスノロウイルスの分離と性状解析

正常マウスの 10% 糞便浮遊液をろ過後 RAW264.7 細胞に接種して CPE を観察した。またこの浮遊液から RNA を抽出し、定法に従って構造蛋白領域を PCR で増幅してその産物の塩基配列を解析した。

5) NoV 流行株の遺伝子解析とウイルス様中空粒子 (VLP) の作製

199 の NoV 陽性検体 (GI が 19 検体、GII が 180 検体) についてウイルス性下痢症診断マニュアル (第 3 版) に記載されている方法で遺伝子型の解析を行なった。定法に従って NoV、SaV 構造蛋白を発現する組換えバキョロウイルスを作製し、昆虫細胞に接種して上清から VLP を回収した。

C. 研究結果

1) 核酸のパッケージング方法の検討

サル由来培養細胞 COS7 に、NoV ゲノム全長をコードする pKS-201F を transfect した細胞についてウイルスゲノム、構造蛋白の翻訳を解析した。培養細胞抽出分画を塩化セシウム密度勾配超遠心でしたところ比重 1.40g/cm³ の分画に VLP を電子顕微鏡観察で検出した。さらに、この VLP が核酸を内包していることを確認するため RT-PCR で核酸の有無を調べたところ、VLP はノロウイルスゲノムを内包することが示唆された。

2) FCV の薬剤感受性

NaClO に対しては FCV9 株中 3 株が低感受性を示した。またこれら低感受性株に対してエタノール感受性及び 42℃ 加熱感受性を調べた結果、エタノールに対して有効な感受性はほとんど認められず、42℃ 加熱では 120 分加熱で最大 2log₁₀ の感染価減少に留まった。また過酸化水素に対しては F9 及び臨床株 5 株を用いて検討したところ、1.5%、40 分以上の反応で 4log₁₀ の感染価減少が認められたが、NaClO とは異なる感受性パターンを示した。

3) ウイルス様中空粒子 (VLP) を用いた不活化剤の評価

NoV のモデルとして VLP を用いて NoV の不活化剤の探索・効果検証を行うための評価法について検討した結果、TEM 像における VLP 粒子の崩壊と粒子数の減少の程度から不活化効果の半定量的評価が可能となった。本手法による評価の結果、炭酸 Na などのアルカリ剤が有効であることが示唆された。

4) マウスノロウイルス (MuNoV) の分離とその

性状

RT-PCR による遺伝子検索で陽性になったマウスの便材料を RAW264.7 細胞に接種し MuNoV の分離に成功した。MuNoV は約 60 kDa の一種類の capsid 蛋白をもち、直径約 40 ナノメートルの表面に微細構造を有する球形ウイルス粒子であった。capsid 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列を比較したところ、日本株間では 99.1%、米国株とのそれは 95-96% であった。

5) Nov 流行株の遺伝子解析

現在流行している NoV の遺伝子型を把握することを目的として、過去 1 年間に検出された NoV の遺伝子解析を行なった。糞便検体 2367 について NoV の検出を行った結果、GI で 19 検体、GII で 180 検体、合計 199 検体がリアルタイム PCR で陽性であった。GI 19 株の遺伝子型は、GI/3 が 6 株、GI/4 が 6 株、GI/8 が 3 株、GI/14 が 4 株であった。また、GII 180 株の遺伝子型は、GII/1 が 6 株、GII/2 が 7 株、GII/3 が 35 株、GII/4 が 96 株、GII/5 が 13 株、GII/6 が 11 株、GII/7 が 2 株、GII/8 が 3 株、GII/9 が 1 株、GII/10 が 3 株、GII/14 が 2 株、型別不明が 1 株であった。

6) VLP の調製

NoV では GI/7、GI/12、GI/14、GII/13 の VLP を作製することができた。また GI/1、GII/4、GII/14 の VLP を大量に発現させ VLP の安定性試験に供した。SaV については GIV の VLP 作出に取り組んだ。GIV の SaV のゲノム全長の塩基配列を決定し、ORF を検索した。ゲノム RNA 上にコードされる 2 つの ORF のうち、ORF1 にコードされるアミノ酸配列の解析から、MEG の 3 アミノ酸残基で始まる構造蛋白質のモチーフを見いだした。このモチーフからゲノムの末端にあるポリ A 配列までを RT-PCR によってクローニングし SaV GIV の組換えバキョロウイルスを作製した。VLP を精製し高力価抗体を作製した。

D. 考察

ほぼ均一な比重、形態を有する核酸内包疑似 NoV ウイルスの作出に成功した。現時点では NoV の培養細胞増殖系がないため、本研究で生成した NoV 様粒子が実際に感染性を有するかどうかは評価ができない。また、発現量が低いため、現時点では依然薬剤評価に供給するのは困難である。薬剤評価のためには今後さらなる発現効率の改良と培養方法の改良が必要である。

VLP の TEM 像と処理の過酷度合いには相関関係が認められアルカリ処理時には次亜処理時に認められなかった VLP を凝集させる効果が認められた。これは崩壊後の再凝集である。凝集も崩壊と同様に評価した場合にはネコカリシウイルスの感染価の低減効果と VLP の TEM 像から得られた不活化効果には相関関係が認められ、アルカリ剤が NoV に対しても有効な不活化剤となりうるということが強く示唆された。一方 VLP を上記アルカリおよび次亜処理した際の ELISA 法による計測を行った結果、薬剤によってはカプソメアレベルで崩壊することにより感染力は消失していても構成タンパク質の変性がないレベルでは抗原性を有しているために ELISA 法では陽性と判断される場合があることが判った。

本年度はマウスのノロウイルスの分離に成功した。このウイルスが培養細胞で増殖可能である点は特筆すべき長所である。生物学的な性状はいまだあきらかではないが、培養不能なヒトノロウイルスの代替ウイルスとして不活化法や消毒薬の評価、抗ウイルス薬の開発等に貢献するものと期待される。

過去 1 年に検出されたノロウイルスの解析からは GI で 4 種類、GII で 12 種類の Nov を検出した。GII については 180 株中、GII/4 が 96 株と 53% を占め、次いで GII/3 が 35 株と約 20% を占めた。NoV 不活化のための薬剤評価に使用した VLP は GI/4 および GII/4 であり、現在国内で流行している GI および GII の遺伝子型が含まれていることを確認した。

SaV については遺伝子群が 5 種類報告されている。本研究では遺伝子群 IV の VLP 作出に取り組んだ。SaV GIV の VLP の収量は遺伝子群 I、II、V 同様 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十分でない。培養のスケールを NoV の 10 倍として VLP の作出を行い GIV の VLP を抗体作成に用いるレベルまで作出したが、消毒薬の検討やナノ粒子の応用への展開を考えるなら収量の増加の取り組みが必要がある。

E. 結論

核酸を内包したナノカプセルの作出にはさらなる条件検討が必要である。また、ネコカリシウイルスを用いて過塩素酸ソーダ、エタノール、および過酸化水素水感受性試験を行い、感受性において株間に差異があることを明らかにした。TEM 像における VLP 粒子の崩壊と粒子数の減少の程度から不活化効果の半定量的評価が可能と

なり、炭酸 Na などのアルカリ剤が有効であることが示唆された。NoV VLP の大量作製技術は確立したが、SaV VLP の実用化には収量の改善が必須である。

F. 研究発表

国際学会発表

1. Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006. 11.
2. Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. In 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006. 8.
3. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Expression and Self-Assembly of Virus-Like Particles from the Full-Length Sapovirus Genome in Insect Cells. In 40th Joint Working Conference on Viral Diseases. Sendai, Japan, 2006. 7.

国内学会発表

1. 白土東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析. In 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.
2. 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルス 3C 様プロテアーゼ Glu54 残基の役割. In 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.
3. 岡智一郎, 片山和彦, Hansman SG, 影山努, 小川智子, Wu F-T, White AP, 武田直和.: サポウイルス核酸検出系の構築. In 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.
4. 岡智一郎, 山本真民, 横山勝, 小川智子, Hansman SG, 片山和彦, 宮下佳奈, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 佐藤裕徳, 武田直和: ネコカリシウイルスのプロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基の同定. In 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.
5. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Expression and Self-Assembly of Virus-Like Particles from the Full-Length Sapovirus Genome in Insect Cells. In 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.

6. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of Sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. In 第54回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11.
 7. 武田直和, 白土東子, 宮村達男: ノロウイルス感染症. In 第80回日本感染症学会学術講演会. 東京, 2006. 4.
- 論文発表**
1. Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, Omura T: Detection of Sapovirus in water. *Emerg Infect Dis* 2007;13:133-135.
 2. Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, Takeda N: An outbreak of gastroenteritis due to Sapovirus. *J Clin Microbiol* 2007.
 3. Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, Takeda N: Detection of human sapovirus in clams from Japan. *Emerg Infect Dis* 2007:in press.
 4. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 2007;17:133-141.
 5. Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, Takeda N: Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis* 2007:in press.
 6. Wu FT, Oka T, Katayama K, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, Takeda N, Hansman GS: Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch Virol* 2006;151:1319-1327.
 7. Tsugawa T, Numata-Kinoshita K, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, Sakai Y, Natori K, Takeda N, Kobayashi S, Tsutsumi H: Virological, Serological, and Clinical Features of an Outbreak of Acute Gastroenteritis Due to Recombinant Genogroup II Norovirus in an Infant Home. *J Clin Microbiol* 2006;44:177-182.
 8. Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, Hansman GS: Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 2006.
 9. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
 10. Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N: Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 2006;87:3329-3338.
 11. Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, Takeda N: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006;78:1347-1353.
 12. Oka T, Hansman GS, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, Takeda N: Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch Virol* 2006;151:399-404.
 13. Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 2006;151:1291-1308.
 14. Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 2006;12:141-143.
 15. Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS Lett* 2006;580:4047-4050.
 16. Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
 17. Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y,

Natori K, Katayama K, Takeda N:
Development of an antigen ELISA to
detect sapovirus in clinical stool
specimens. Arch Virol
2006;151:551-561.

G. 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。

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル (小伝馬町駅前) 4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社