

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発	
武田 直和-----	1
II. 分担研究報告書	
1. E 型肝炎ウイルス イムノクロマトキット開発の可能性	
田中 智之-----	11
2. E 型肝炎ウイルスの豚での日齢感受性ならびに中空粒子を用いた ELISA 法と IFA 法との相関性	
恒光 裕-----	19
3. HBV, HCV 中空粒子を利用した新規診断系の開発	
勝二 郁夫-----	23
4. 培養細胞における E 型肝炎ウイルスの増殖	
李 天成-----	27
5. HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と性状解析	
石井 孝司-----	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 35

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 直和

平成 20 (2008) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発

主任研究者 武田 直和 国立感染症研究所ウイルス第二部第一室長

研究要旨 E型肝炎ウイルス（HEV）保有野生動物のサーベイランスを行い、Genogroup III HEV 遺伝子を検出した。HEV 伝播の要因を解析する目的で野生イノシシの mtDNA、核 GPIIP 遺伝子型を検索した結果、家畜ブタとの交雑は認められなかった。イムノクロマトグラフによる迅速診断キット開発の目処がついた。ノトバイオート豚を用いて HEV 投与実験を行った。経口投与では 30 日齢の豚は 3 日齢の豚に比べて糞便ならびに血清中の HEV RNA の検出期間は短く、検出量も少なかった。一方、静脈内投与では、3 日齢と 30 日齢の豚間では HEV RNA の検出時期や検出量に大きな違いは認められなかった。HEV 抗体の検出法である間接蛍光抗体法とウイルス様粒子を用いた ELISA 法を比較検討した結果、相関係数ならびに一致率のどちらも良好であった。種々の遺伝子型の B 型肝炎ウイルス（HBV）クローンを用いて HBs 抗原分泌機構を解析した結果、ヨーロッパ型の genotype A（HBV-Ae）は本邦に多い genotype C（HBV-CA）より複製効率は低いものの、上清中への分泌効率が高かった。HCV J6/JFH1 株の継代培養により従来より感染価の高いウイルス産生細胞を樹立することを試み、従来より 10-100 倍感染価の高いウイルス産生系の樹立に成功した。HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に JFH-1 株の構造蛋白を trans に供給し、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV の virus-like particles を作製した。

分担研究者

田中 智之 堺市衛生研究所
恒光 裕 動物衛生研究所
勝二 郁夫 神戸大学
李 天成 国立感染症研究所
石井 孝司 同上

するウイルス抗原の産生は極めて困難であり、診断における特異性と感度を低下させる一因になっている。この意味で、ウイルス様中空粒子（virus-like particles, VLP）が大量に産生できれば、ワクチン開発と診断試薬の性能向上の両面において格段の進展が期待できる。

本研究では、以下を研究目的とする。

A. 研究目的

ワクチンによる予防が可能になっている A 型肝炎、B 型肝炎を除き、C 型肝炎、E 型肝炎に対する予防法は未だ整備されていない。酵母発現 HBs 蛋白等をワクチンとする B 型肝炎も、抗体獲得率は必ずしも高くない。これは、効率よくウイルスを増殖させる手段が未だ確率されておらず、大量のウイルス抗原を調製することができないことが主たる原因である。また、ネイティブなウイルスと同様な形態と抗原性を有

(1) 1 から 4 までの 4 つの E 型肝炎ウイルス（HEV）遺伝子型（G1-G4）について、VLP（HEV-LP）を作製する。

(2) HEV-LP を抗原とする迅速、高感度抗体検出系、および特異抗体を用いた抗原検出系を確立する。

(3) G1-G4 HEV-LP の免疫原性を比較し、E 型肝炎ワクチン候補 VLP を選択する。

(4) HEV-LP を経粘膜接種し、その免疫原性ならびに E 型肝炎粘膜ワクチンとしての有効性を

評価する。

(5) HEV-LP に対する単クローン抗体、高度免疫血清を作製し、免疫磁気ビーズによるウイルス濃縮精製法を確立し、抗原検出、遺伝子検出法を確立する。

(6) 発症ウイルス量を把握するためキメラマウス感染実験モデルを構築する。

(7) マーカー遺伝子を人工的に導入した組換え粒子を作製し、ウイルス不活化の条件を検討する。

(8) 各遺伝子型 B 型肝炎ウイルス (HBV) 由来の中空粒子を利用して遺伝子型特異的な HBV 抗原診断法の開発を目指す。

(9) C 型肝炎ウイルス (HCV) 構造蛋白遺伝子の強制発現細胞系で中空粒子を産生させ、精製法を確立する。得られた中空粒子を用いて新たな HCV 診断法の開発を目指す。

B. 研究方法

(1) HEV 抗体検出 ELISA

E 型肝炎検査マニュアル (地方衛生研究所全国協議会、国立感染症研究所監修) に従い、精製した HEV 中空粒子 (VLPs) を抗原として 96 マイクロプレートにコーティングし、動物血清をこのマイクロプレート上で 2 倍段階希釈した。基質 OPD の吸光度を測定し、カットオフ値を示す最高希釈倍数の逆数を血清抗体価とした。抗体保有率の測定には被検血清は 200 倍希釈して使用した。血清材料で非特異反応が確認されたものは、抗原固相化ウエルと抗原非固相化ウエルの両方を用い、両者の OD 値の差を正味の OD 値として表した。

(2) RT-PCR による HEV 遺伝子の増幅

E 型肝炎検査マニュアルに従い HEV 遺伝子の検出を行った。First PCR には HEV-F1 および HEV-R2 プライマーを、Second PCR には HEV-F2 および HEV-R1 を用いた。

(3) 交雑種と野生イノシシの識別

Haplotypes、すなわち mitochondrial DNA (mtDNA) の検索、また、Genotypes すなわち nuclear glucosephosphate isomerase-processed pseudogene (*GPIP*) の検

索によった。

(4) ブタを用いた HEV 感染実験

ノトバイオト豚で 2 代継代した豚由来 HEV Highland 株 (遺伝子型 3) を含む肝臓乳剤 [10 (6) 50%豚感染量/ml] を使用した。1ml をノトバイオト豚に静脈内投与した。定期的に採取した血清、便に含まれる RNA、IgG、IgA を検出した。HEV 抗体の測定は、Li らの報告したウイルス様粒子 (VLP) を抗原とした ELISA 法で実施し、血清材料を 200 倍希釈して使用した。

(5) HBs 抗原分泌効率の比較

pUC19 にクローニングした様々な遺伝子型の HBV クローンを Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中の HBs 抗原および細胞内での HBV 複製を ELISA 系および real time PCR 法で測定した。

(6) JFH-1 株の構造遺伝子領域を恒常的に発現する哺乳動物細胞株の取得

Zeocin 耐性遺伝子を持つ pEF4 ベクターを用い、目的蛋白を恒常的に発現する哺乳動物細胞株を作成した。本ベクターの EF プロモーターの下流に JFH-1 株の構造遺伝子領域を挿入し、エレクトロポレーション法で Huh7 細胞に導入し、Zeocin でスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。具体的には、各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存した。そのデータについて個人が特定されないよう配慮した。動物実験に関しては「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律及び基準の他、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号) の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。また感染研における動物実験指針に基づき、用いる動物の数は最小限とし、採血時には麻酔を施し動物愛護の精神のもとに実

験を行った。

C. 研究結果

1) 組換えバキュロウイルスを用いた G2、G3、G4 HEV-LP の作製

- ・ G2 HEV 遺伝子の入手は困難であることから、化学合成によって構造蛋白領域を構築し、クローン化する。

継続中。

- ・ G3、および G4 はわが国のイノシシ、豚から分離されたウイルス株を使用する

小さな粒子作製方法はほぼ完成し、ネイティブな粒子と同じ大きさの粒子作製が進行中

培養細胞による G3 の増殖に成功した (李 天成 分担研究報告書)。

- ・ 種々の長さを有する構造蛋白領域を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、産生される HEV-LP の生化学的、物理化学的性状を解析する。

継続中

- ・ 単クローン抗体を作製し、中和エピトープの同定など、免疫学的性状を解析する

G1、G2、G3 のそれぞれの VLP に対する単クローン抗体を作製した (田中智之 分担研究報告書)。

- ・ 経粘膜ワクチン候補 HEV-LP を選択する。

継続中

2) HEV-LP を用いた検査診断法の開発

- ・ イノシシと豚は、わが国における HEV のリザーバーであることが明らかになってきている。しかしながら、様々な動物から HEV 抗体が検出され、HEV 伝播にイノシシと豚以外の動物がどの程度関与しているか、評価が定まっていない。イノシシと同じ生息を有するマングース、シカについて、引き続き詳細な抗体調査を行い、リザーバーとしての役割を明らかにする。

マングース、シカはリザーバーではないことを明らかにした (李 天成 分担研究報告書)

- ・ 地域ごとにイノシシ、豚、牛、めん羊、山

羊、馬等について E 型肝炎の抗体を調査する。必要があれば PCR 法により E 型肝炎ウイルス遺伝子を検出し、感染を確認する。検出された E 型肝炎ウイルス遺伝子の塩基配列を定め、型を同定する。

保有野生動物のサーベイランスを行い、Genogroup III HEV 遺伝子を検出した。HEV 伝播の要因を解析する目的で野生イノシシの mtDNA、核 GPIIP 遺伝子型を検索した結果、家畜ブタとの交雑は認められなかった (田中智之 分担研究報告書)。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜 E 型肝炎ワクチンの開発

- ・ 粘膜アジュバントと共に経鼻に HEV-LP を接種し、誘導させる抗体を追跡する。また、産生される抗体の性状をヒト型肝臓を有するキメラマウスで検証する。

継続中

- ・ HEV-LP は核酸を持たない中空粒子である。解離と再構成の条件、さらに大きな緑色蛍光蛋白遺伝子をリポーターとして、外来遺伝子の取り込み効率を検討し、再構成された HEV-LP の遺伝子導入効率を各種培養細胞に接種して検討する。

遺伝子の構築が進行中

- ・ 再構成 HEV-LP を経口あるいは経鼻投与し、消化器や呼吸器系の粘膜における in vivo での遺伝子導入効率を検討する。同様の手法で血球系や呼吸器系の細胞をターゲットとした遺伝子導入を試みる。

ワクチンの効果判定にはウイルス増殖のマーカーを感度よく検出する系を確立しておくとともに、あらかじめそれらの経時変化を知っており必要がある。HEV の感染実験でこれらを明らかにした。また、検出方法を検討した (恒光 裕 分担研究報告書)。

4) HBs 粒子および HCV 粒子の作製と検査診断への応用

- ・ HBV の遺伝子型 A、B、C それぞれのウイルス

ゲノムを基に、各遺伝子型の HBs 粒子産生系を作製する。一過性発現実験により、培養上清への HBs 分泌を確認した後、持続産生細胞株を樹立する。

HBV genotype A 株 (HBV-Ae) は genotype C 株 (HBV-CA) に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高いことが明らかとなった。HBV-Ae の HBs 抗原粒子を持続発現する Huh-7 細胞株を樹立した。(勝二郁夫 分担研究報告書)

- 培養液より粗精製した HBs 粒子をマウスに免疫し各遺伝子型 HBs 抗原に対するモノクローナル抗体を作製する。

抗原準備中

- 遺伝子型特異的に抗原を認識する抗体を使って抗原検出 ELISA 法を作製する。得られた ELISA 系を使って種々の B 型肝炎患者血清中の HBV 抗原を測定し、その抗原レベルと臨床病態、治療効果との関連性を検討する。

準備中

- HCV の構造蛋白遺伝子を発現する組換えバキュロウイルス及びワクチニアウイルスを作製する。現在、HCV 中空粒子が効率よく細胞外へ分泌する発現系は確立されていない。そこで、HCV クローンの選択をおこなうとともに、粒子形成、分泌効率を最適化するため種々の部位特異的変異体を作製し、最も産生、分泌効率のよい発現ベクターを選択する。

HCV J6/JFH1 株の継代培養により従来より感染価の高いウイルス産生細胞を樹立することを試み、従来より 10-100 倍感染価の高いウイルス産生系の樹立に成功した。(勝二郁夫 分担研究報告書)

HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を trans に供給することにより、HCV

様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。(石井孝司 分担研究報告書)

- 組換えウイルス発現細胞の培養上清 (または細胞抽出物) から、密度勾配遠心分画、ヘパリンアフィニティクロマトグラフィ等を組み合わせて中空粒子精製法を確立する。得られた中空粒子を抗原として抗体検出 ELISA 法を作製する。

抗原準備中

- HCV キャリア、感染既往例血清中の抗体価を測定し、既存の抗体診断法の成績と比較することにより本検査法の有用性を考察する。

準備中

D. 考察

- 1) 組換えバキュロウイルスを用いた G2、G3、G4 HEV-LP の作製

G2 HEV 遺伝子の入手は困難であることから、化学合成によって構造蛋白領域を構築しクローン化し、組換えバキュロウイルスで発現したがウイルス様粒子の産生は見られなかった。他の遺伝子型に比べ、G2 の一次配列に関する情報は極端に少ない。HEV の血清型は一つであることから、ワクチン開発における G2 の重要性を再評価する必要があるのかもしれない。

- 2) HEV-LP を用いた検査診断法の開発

野生イノシシの HEV 保有状況には地域的偏りが推測され、HEV 保有イノシシが局在する要因を示唆する遺伝子学的な特徴が認められたが、今後多くの症例検討が必要であると考える。偏在する汚染地域、HEV 保有イノシシを考察しつつ、野生イノシシによる E 型肝炎感染予防を広く還元、周知していかなければならない。HEV 抗体の検出法である間接蛍光抗体法 (IFA) はウイルス様粒子を用いた ELISA 法と相関係数は 0.94、判定の一致率は 89% であり相関係数ならびに一致率のどちらも良好であった。ELISA に加え、新たな抗体検出系が確立できたことから、ワクチンの効果判定にも有用な手段を手にしたと

いえる。

3) ウイルス様粒子を用いた経粘膜 E 型肝炎ワクチンの開発

HEV の *in vivo* 増殖は、ノトバイオート豚という特殊な環境下で生育する必要がある系を用いなければならない。しかしながら、この系を用いることによって他の動物では不可能である経口投与で感染が成立する系である。これまでの実験では安定した実験結果が得られており、*in vivo* でのワクチン評価には有効な手段といえる。また、*in vitro* での増殖にも成功したことから、容易に中和抗体価を測定することが可能である。ワクチン開発に一層の弾みが期待できる。

4) HBs 粒子および HCV 粒子の作製と検査診断への応用

HBV では、分泌効率が異なるクローンを同定することができ、これらのクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較することで、どの遺伝子領域が HBs 抗原粒子分泌を制御しているか明らかにできる可能性が示された。また、HBV-Ae を持続的に発現する Huh-7 細胞株を樹立し、HBs 抗原の分泌効率が低いクローンを選択することができた。今後の展開が楽しみである。HCV では、J6/JFH1 株感染 Huh-7.5 細胞を継代培養したところ、継代に応じて感染力価は P-1 株に比べて 10-100 倍上昇した。P-47 株感染細胞は持続感染状態を維持し高い感染力価のウイルスを産生し続けることが示された。この現象に関与する遺伝子変異が興味深い。また、培養上清に産生される発現蛋白は HCV 粒子様構造を取っていることが示唆され、また、細胞株が subgenomic replicon を保持している場合、ウイルス様粒子中には subgenomic replicon RNA が含まれていることも示唆された。感染性の有無に興味を湧く。

E. 結論

- HEV 保有率の高い家畜ブタとイノシシの交雑の可能性は低い。
- HEV の経口感染において豚の日齢が進むにつれて感受性が低下した。

- VLP を用いた HEV 抗体検出用 ELISA 法は有効な方法である。
- ヨーロッパ型の genotype A (HBV-Ae) は本邦に多い genotype C (HBV-CA) より複製効率は低いものの、上清中への分泌効率が高かった。
- HCV の subgenomic replicon を保持する細胞に HCV の構造蛋白を *trans* に供給することにより、HCV 様粒子が培養上清中に放出されることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.*, 2007, 42: 411-423.
- Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system., 2008, *J Virol Methods.*, 148, 174-181.
- Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, Li TC, 2007. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-81.
- Li TC, Miyamura T, Takeda N, 2007. Detection of hepatitis e virus RNA from the bivalve *yamato-shijimi* (*corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-2
- Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H, 2006.

- Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-4.
- Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Itoh K, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mori S, Satoh H, Ohsawa K, Ibuki K, Lee S, Kita M, Takeda N. Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Japan. 2008. *Exp. Animals. In press*
- Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods in press*
- Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 411-423 (2007).
- Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J. -J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007).
- Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007)
- Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007).
- Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y. -J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007).
- Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007).
- Ishiguro N, Inoshima Y, Suzuki K, Tanaka T, Miyoshi T. Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into wild boar populations (投稿中)
- 田中智之、武田直和 ノロウイルスの現状と院内感染対策。 *感染症* 37 (3) : 94-104, 2007
- 田中智之、奥田真珠美 ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。 *小児科診療* 70 (6) : 985-990, 2007
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 院内発生時における感染拡大防止対策 -ノロウイルス
月刊薬事 49 (11) : 37-42, 2007
- 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和 調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒食と健康 10: 6-14, 2007
- 田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和 ノロウイルス迅速抗原検査 検査と技術 36 (3) : 235-239, 2007

恒光 裕. E 型肝炎. 人獣共通感染症、養賢堂 39-45, 2007.

石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中 (2007)

石井孝司、李 天成、武田直和 E 型肝炎 感染・炎症・免疫 37: 58-59 (2007)

2. 学会発表

Virological characterization of HCV JFH-1 strain in B-lymphocytes. Murakami K, Shoji I, Hamamoto I, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. 14th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Glasgow, UK, September 9 - 13, 2007

Shoji I, Murakami K, Fukuda K, Osaki M, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein.

AASLD, Boston, November 2-6, 2007.

Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Ishii K., Wakita T. The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.

Akari H., Ishii K., Iwasaki Y., Iijima S., Maki N., Mori K., Katakai Y., Kimura N., Yoshizaki S., Ageyama N., Yokota T., Suzuki T., Miyamura T. Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, 2007.

Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 8th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Washington

DC, USA, May 27-31, 2007.

福田伸治、三好龍也、内野清子、中村 武、吉田永祥、田中智之. 28 回衛生微生物技術協議会第 9 研究 岡山市 2007 年 7 月

田中智之 ノロウイルス食中毒と二次感染 第 28 回日本食品微生物学会学総会 ランチオンセミナー 2007 年 9 月 東京都

田中智之、田尻 仁. ノロウイルス迅速検査キットの開発 第 56 回日本感染症学会東日本地方会 東京都 2007 年 10 月

中村 武、三好龍也、内野清子、福田伸治、田中智之. 市販ノロウイルス検査キットの評価 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌市 2007 年 10 月

北元憲利、三好龍也、内野清子、Grant S. Hansman、武田直和、田中智之. サポウイルスに対する単クローン抗体の樹立とその交叉性 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 札幌市 2007 年 10 月

太田真紀子、中長摩利子、木村定美、最上友紀子、鈴木保宏、中山雅弘、田中智之、位田 忍. ノロウイルス腸炎に関連した Rey 症候群を発症した乳児クローン病の一例 第 34 回日本小児栄養消化器肝臓学会 仙台市 2007 年 10 月

血球系細胞における HCV JFH-1 株の感染および複製の検討. 村上恭子、勝二郁夫、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 11 月 21-23 日、札幌。

HCV コア蛋白と結合する新規宿主因子 hnRNP1/H2 の同定と相互作用解析. 阿部克俊、村上恭子、市村徹、高宮智史、大崎一直、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆字、勝二郁夫. 第 55 回日本ウイルス学会、2007 年 11 月 21-23 日、札幌。

李天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和、2007. 10. シジミからの E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌。

李天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和、2007. 10. キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルスの複製. 第 55 回日本ウイルス学会学

術集会。札幌。

加藤花名子、佐藤幸代、宮崎綾子、吉井雅晃、土屋公幸、仲谷淳、鈴木和男、樹金森弘、李天成、武田直和、恒光裕、池田秀利、2007.9. 野生動物における抗E型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査。第144回日本獣医学会学術集会。江別市

石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第11回日本ワクチン学会、平成19年12月、横浜。

尾見法昭、赤澤大輔、高橋仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生されたHCVウイルスの免疫原性に関する検討、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs の組換え SARS ワクチンとしての検討、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

岩崎優紀、石井孝司、飯島沙幸、楨昇、森健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B は新世界ザルに潜伏感染する、第55

回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：HCV JFH-1 株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：遺伝子型2a/2b間でのキメラウイルスの作製および性状解析、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2007-167916・石井孝司他3名・UVによるC型肝炎ウイルスの不活化方法・2007年6月26日出願

2005-287825・石井孝司他6名・新規ヒトC型肝炎ウイルス粒子とその生産方法・2005年9月30日出願、同海外出願

2005-287646・石井孝司他6名・感染性C型肝炎ウイルス粒子産生系・2005年9月30日出願、同海外出願

2005-300350・石井孝司他4名・新規RNA結合ペプチド・2005年9月6日出願

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

中空粒子を用いたウイルス性肝炎の新しい検査・予防法の開発

平成 19 年度 分担研究報告書

田中 智之

恒光 裕

勝二 郁夫

李 天成

石井 孝司

平成 20 (2008) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルス イムノクロマトキット開発の可能性

分担研究者 田中智之 堺市衛生研究所 所長

研究要旨 E型肝炎ウイルス保有野生動物のサーベイランス研究においては、紀伊半島における野生動物、特に野生イノシシのHEV保有状況について調査研究を継続して行なった。その結果、過去五年間通して、同一地区から Genogroup III HEV 遺伝子が検出された。HEV 伝播の要因を解析する目的で野生イノシシの mtDNA, 核 GPIP 遺伝子型を検索した結果、家畜ブタとの交雑は認められなかった。しかし、同一地区の野生イノシシには、mtDNA に変異がみとめられ、HEV 感染伝播に関与するものか否かは今後の研究課題となった。E型肝炎ウイルスのイムノクロマトグラフによる迅速診断キット開発では、既にイムノクロマトグラフによるノロウイルス抗原診断キットが開発されている。その手法を追従することにより構築可能であることが考えられた。

研究協力者

石黒直隆（岐阜大学）
李 天成（国立感染症研究所）
武田直和（国立感染症研究所）
三好龍也（堺市衛生研究所）
吉田永祥（堺市衛生研究所）
内野清子（堺市衛生研究所）

[I] E型肝炎ウイルス保有野生動物
のサーベイランス研究の継続

A. 研究目的

これまで、紀伊半島を中心として、とくに野生イノシシのE型肝炎ウイルス(HEV)の保有状況について、疫学的研究を続けてきた。その結果、HEV保有イノシシは限られた地区に存在し

ていることが判明した。

野生イノシシは集団生活することが知られている。また、HEVはブタに高率に検出されることも報告されている。特定の地区でのHEV保有が、集団生活の中でウイルス伝播が行なわれているのか、あるいはHEV保有陽性ブタとの交雑(いわゆるイノブタ)によるものかを把握しておくことは、HEV肝炎予防に一知見を与えるものと思われる。そこで、野生イノシシの遺伝子学的解析を行いその要因について交雑種の関与も検討した。

B. 研究方法

紀伊半島の3定点地区を設け、野生イノシシの肝臓、血清からHEV遺伝子

の検出を試みた。今年度はこれまで HEV 保有イノシシが獲られた A 定点地区の野生イノシシ 3 頭について HEV 遺伝子の検出を試みた。A 定点地区はハンターの高齢化に伴い十分な検体が得られなかった。また、B 定点、C 定点はこれまでの成績から HEV 保有イノシシが検出されなかったことから、今年度の検体採集は控えた。

肝臓、血液からの HEV 遺伝子検出、および系統樹解析は、これまでの報告と同じ手法で行なった。HEV 抗体の測定も同様に行った。

交雑種と野生イノシシの識別は、Haplotypes、すなわち mitochondrial DNA (mtDNA) の検索、また、Genotypes すなわち nuclear glucosephosphate isomerase-processed pseudogene (GPIP) の検索によった。この分析は共同研究者の石黒が行なった。この検索には、平成 15 年から平成 19 年に採集された A 地区～C 地区の野生イノシシ 21 検体の肝組織を用いた。

C. 研究結果

3 頭の野生イノシシのうち一頭から HEV 遺伝子および HEV 抗体が検出された。塩基配列の結果、従来の報告と同様に HEV Genogroup III に分類された。

一方、野生イノシシの肝臓から抽出された mtDNA は二ホンイノシシ遺伝子で、2 種類検出された。日本に広く分布している型 J10 と J10 の 572bp 中で 1 箇所塩基置換がみられた遺伝子型であった。後者は A 定点地域すなわち

和歌山県から大阪府にかけて分布している地方集団と推察されている。一方、核 GPIP 遺伝子型に関しては、GPIP1 と GPIP3a の対立遺伝子が検出されたが、総べてホモでした。この対立遺伝子は二ホンイノシシに多く検出されるもので、家畜ブタ（ヨーロッパ系）の対立遺伝子である GPIP4 や GPIP4a は今回のイノシシサンプルからは検出されなかった。つまり、近隣の家畜ブタとの交雑種ではないと考えられた。

A 地区の野生イノシシには mtDNA の変異が示唆されたが、HEV 保有に特徴的な変異であるか否かについては結論には至らなかった。今後の研究特徴的な遺伝子は検出されなかった。また、従来の研究成果に加えて新たな 5 つの異なる haplotypes が見つかった（石黒, Mammal Study 投稿中）。

D. 考察

紀伊半島に 3 定点地区を設定し、過去 5 年間に亘り、野生イノシシを中心とした野生動物の HEV 遺伝子、抗体の保有状況について調査研究を行なった。併せて、ハンターの HEV 抗体保有状況や近隣の E 型肝炎散発発生例について、野生動物との関連性を検討してきた。その結果、紀伊半島南部には HEV 保有野生動物の可能性は極めて少なく、HEV 保有野生イノシシは大阪府・和歌山県境に存在していること、ハンターの HEV 抗体保有も同地区からのみ検出されたこと、さらに、野生イノシシとの 100% の相同性ではないことが

判明したが、県境に隣接した和歌山市内での散発患者の HEV 遺伝子は Genogroup III であった。

以上の点から、今年度は、A 定点地区に生息する HEV 保有野生イノシシの HEV 保有要因について検討した。他の 2 地区の野生イノシシの mtDNA と異なり、A 地区の野生イノシシには、遺伝子の変異が認められた。これが HEV 保有と関連性を有するか否かの結論は導くことはできなかったが、可能性は否定できなかった。しかし、HEV 保有率の高い家畜ブタとの交雑の可能性は低いことが考えられた。

イノシシの肉は現在では高級食品の部に入る。多くは加熱料理で喫食されるが、中には生食を好む人もある。E 型肝炎の感染予防には、生肉食の習慣を絶たなければならない。野生イノシシの HEV 保有状況を調査し、その成果を還元することは人の E 型肝炎予防に重要な疫学研究といえる。これまでの研究成果も含め、生肉食への警鐘をさらに強めたいと考える。

HEV 保有野生イノシシに特徴的な遺伝子が存在しているかの検討は、今回の調査研究からは十分な結論を出すに至らなかった。しかし、HEV がいまだに組織培養にて分離できていない状況を鑑みると、このような基礎研究は何らかの形で継続しなければならないと考える。

E. 結論

紀伊半島における HEV の疫学調査では、野生イノシシの HEV 保有状況には

地域的偏りが推測された。野生イノシシの遺伝子検討では、HEV 保有イノシシが局在する要因を示唆する遺伝子学的な特徴が認められたが、今後多くの症例検討が必要であると考える。

偏在する汚染地域、HEV 保有イノシシを考察しつつ、野生イノシシによる E 型肝炎感染予防を広く還元、周知していかなければならない。

【II】 迅速 E 型肝炎ウイルス イムノクロマトキット開発の可能性

A. 研究目的

現時点での E 型肝炎の診断法は RT-PCR 法による HEV 遺伝子検出、HEV ウイルス様粒子 (VLPs) を用いた抗体検出法である。ノロウイルスも当初は類似の検査方法でノロウイルス遺伝子の検出や VLPs を用いた ELISA 法が開発され、さらに、イムノクロマト法の開発も試みてきた。昨年、イムノクロマトグラフ (IC) 法が、本研究班との協力によって開発され、11 月に厚生労働省から「ノロウイルス抗原体外診断医薬品」として認定された。IC 法は簡便、低コスト、多検体処理能力に富む方法で、多くの利点を有している。感度、特異性さらに RT-PCR 法との一致率も改善されてきた。

ノロウイルス診断 IC kit の完成を報告すると共に E 型肝炎ウイルスの IC 法による診断キット開発の可能性について、問題点、還元度等について報告する。

B. 研究方法

1) 特異的モノクローナル抗体の作製:

IC kit の構築には GI, GII ノロウイルス蛋白を広範囲に認識するモノクローナル抗体が必要で、これまで作製されたモノクローナル抗体に加えて、新たな抗体を作製した。

2) イムノクロマトキットの構築:

ニトロセルロース膜に、抗ノロウイルス抗体及び抗マウスグロブリン抗体を固相化した。作成された 10% 糞便乳剤を、2,000 xg, 5 分間遠沈後、上清 300 ul を検体浮遊チューブに移し、ラテックス標識抗ノロウイルス抗体と反応させた。その後このチューブに、上述のテストストリップを挿入し検体を吸収・反応させた。検体にノロウイルス抗原が含まれていればノロウイルス・ラテックス標識抗体複合物がストリップ上の固相抗体と反応しラテックスがラインとして可視できる。さらに未反応のラテックス標識モノクローナル抗体は固相化されている抗マウスグロブリンとも反応し、二本のラインが形成される。ノロウイルス抗原が含まれていなければコントロールのバンドのみが目視される。反応時間は 15 分である。

3) HEV 測定イムノクロマト法構築戦略

HEV は、ノロウイルス同様に、non-envelope, ssRNA ウイルスであり、Baculovirus 発現系を用いた VLPs の作成は容易になされている。また、モノクローナル抗体も既に作成されて

おり、ノロウイルス IC 診断法のノウハウを用いた HEV 診断 IC kit 作成の背景は既に整っていると考える。

C. 研究結果

ノロウイルス IC 法の検出率を RT-PCR 法と比較すると、一致率 89.3%、感度 81.1%、特異性 100%の成績であった。VLPs を用いた交差反応性を見ると、GI では 6 遺伝子型、GII では 13 遺伝子型と反応することが判明した。また、検出感度は、GI では 6.25~25.00 ng/ml、GII では 0.78~12.5 ng/ml である。便検体を用いたリアルタイム PCR 法で定量比較すると、 $10^4 \sim 10^5$ copy/g. stool のウイルス量が IC 法で検出できることが判明した。

D. 考察

ノロウイルス感染の場合、IC 法による診断のメリットは限りなく大きい。

感染性胃腸炎集団発生時には、検体搬入から検査結果が出るまで時間 30 分という従来の方法では対応できない迅速な診断が可能である。

その結果、発端者の隔離などが迅速に行なわれ感染拡大防止にも大きな貢献が出来る。また、IC 法は、 10^5 copy/ml 以上のウイルス量を検出できる点から、例えば、食品調理従事者の定期的検便に活用でき、事前の感染源対策、食材汚染対策も可能である。IC 法による E 型ウイルス性肝炎の診断の意義も同様と考える。RT-PCR 法による高価な、長時間の測定時間を必要とする診断方法よりは、簡便、経済的

さらに迅速な診断による感染拡大防止が大きな長所と言える。HEV 検出 IC kit の作成 Strategy は、構築されたノロウイルスイムノクロマト法の手法を踏襲すれば構築可能である。構築された IC 法について、測定対象、測定材料、材料採取時期など、今後検討しなければならない課題は多い。

E. 結論

迅速かつ簡便なノロウイルス診断 IC キットの構築を行った。RT-PCR 法との一致率は 89.3%、感度 81.1%、特異性 100%であった。この方法に基づいた HEV 検出 IC 法の構築は可能で近未来に作成予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

田中智之、武田直和

ノロウイルスの現状と院内感染対策。感染症 37(3): 94-104, 2007

田中智之、奥田真珠美

ウイルス性胃腸炎診断法の進歩と院内感染予防対策。

小児科診療 70(6): 985-990, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和

院内発生時における感染拡大防止対策 -ノロウイルス

月刊薬事 49(11): 37-42, 2007

田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和

調理従事者を介して起こるノロウイルス食中毒 食と健康 10:

6-14, 2007

田中智之、加藤大介、鎌田公仁夫、三好龍也、内野清子、吉田永祥、田尻 仁、奥田真珠美、中山佳子、平山吉郎、北元憲利、武田直和
ノロウイルス迅速抗原検査

検査と技術 36(3): 235-239, 2007

Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tomoyuki Tanaka, Tatsuya Miyoshi

Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into wild boar populations (Mammal Study 投稿中)

2. 学会発表

福田伸治、三好龍也、内野清子、中村 武、吉田永祥、田中智之

28 回衛生微生物技術協議会第 28 回研究 岡山市 2007 年 7 月

田中智之

ノロウイルス食中毒と二次感染
第 28 回日本食品微生物学会学
総会 ランチオンセミナー
2007 年 9 月 東京都

田中智之、田尻 仁

ノロウイルス迅速検査キットの
開発 第 56 回日本感染症学会東
日本地方会 東京都 2007 年 10
月

中村 武、三好龍也、内野清子、福田伸治、田中智之

市販ノロウイルス検査キットの
評価 第 55 回日本ウイルス学会学

術集会 札幌市 2007年10月
北元憲利、三好龍也、内野清子、
Grant S. Hansman、武田直和、田中
智之

サポウイルスに対する単クロー
ン抗体の樹立とその交叉性

第55回日本ウイルス学会学術集
会 札幌市 2007年10月

太田真紀子、中長摩利子、木村定美、
最上友紀子、鈴木保宏、中山雅弘、
田中智之、位田 忍

ノロウイルス腸炎に関連した

Rey 症候群を発症した乳児クロ
ーン病の一例

第34回日本小児栄養消化器肝臓
学会 仙台市 2007年10月
市販ノロウイルス検査キットの
評価

G. 知的財産権の出願、登録状況
申請中

表1 平成15年度～平成19年度 紀伊半島におけるHEV保有野生動物

年度	動物種	狩猟地域	検体数	HEV遺伝子 陽性	抗体陽性
H15年度	イノシシ	A	4	1	1
		B	5	-	-
	シカ	A	-	-	-
		B	2	-	-
H16年度	イノシシ	A	19	1	2
		B	2	-	-
	シカ	A	-	-	-
		B	1	-	-
H17年度	イノシシ	A	17	-	-
		B	9	-	-
		C	10	-	-
	シカ	A	-	-	-
		B	7	-	-
		C	7	-	-
H18年度	イノシシ	A	2	-	-
		B	18	-	-
		C	1	-	-
	シカ	A	-	-	-
		B	6	-	-
		C	2	-	-
H19年度	イノシシ	A	3	1	1
		B	-	-	-
		C	-	-	-
	シカ	A	-	-	-
		B	-	-	-
		C	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルスの豚での日齢感受性ならびに中空粒子を用いた ELISA 法と
IFA 法との相関性

分担研究者 恒光 裕 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム長

研究要旨： ノトバイオート豚における E 型肝炎ウイルス（HEV）の日齢感受性を比較検討するため、3 日齢の豚 5 頭（2 頭は経口投与、3 頭は静脈内投与）ならびに 30 日齢の豚 5 頭（4 頭は経口投与、1 頭は静脈内投与）を用いて HEV の投与実験を行った。HEV の経口投与において、30 日齢の豚は 3 日齢の豚に比べて糞便ならびに血清中の HEV RNA の検出期間は短く、検出量も少なかった。HEV の静脈内投与では、3 日齢と 30 日齢の豚間では HEV RNA の検出時期や検出量に大きな違いは認められなかった。次に、HEV 抗体の検出法である間接蛍光抗体法（IFA）とウイルス様粒子を用いた ELISA 法との相関性を検討した。その結果、IFA 抗体価と ELISA OD 値の相関係数は 0.94、判定の一致率は 89%と、相関係数ならびに一致率のどちらも良好であった。

共同研究者

池田秀利（動物衛生研究所）
宮崎綾子（動物衛生研究所）
鈴木孝子（動物衛生研究所）
山田 学（動物衛生研究所）
服部奈千子（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎は E 型肝炎ウイルス（HEV）の感染に起因するヒトの急性肝炎である。近年、豚などの動物も HEV の保有宿主であることが明らかにされ、また、加熱不十分な豚や野生動物の内臓肉などの喫食による本病の発生例が報告されたことから、動物や食品サイドからの HEV の調査研究が望まれている。本課題では、豚集団における HEV の生態解明を行うとともに、HEV のウイルス様粒子（VLP）を用いて HEV 感染の制御技術を開発することを主な目的とする。平成 19 年度は、ノトバイオート豚における HEV の日齢感受性を 3 日齢と 30 日齢と比較検討するとともに、HEV 抗体の検出法である間接蛍光抗体法（IFA）と VLP を用いた ELISA 法との相関性を検討した。

B. 研究方法

3 日齢のノトバイオート豚 5 頭（2 頭は経口投与群、3 頭は静脈内投与群）ならびに

30 日齢の豚 5 頭（4 頭は経口投与群、1 頭は静脈内投与群）を用いて HEV の投与実験を行った。経口投与群においては、ウイルス投与 1 時間前に 2%重曹を 1ml 経口投与し、HEV（豚由来遺伝子型 3）含有豚肝臓 10% 乳剤 1ml を経口投与した。静脈内投与群は同量の HEV を静脈内投与した。HEV 投与後 2-4 週間、糞便材料を週 2 回、血清材料を週 1 回採取した。HEV RNA の定量は、TaqMan MGB プローブ法により実施した。プライマーならびにプローブは HEV Highland 株の ORF2 領域の塩基配列を元に以下の通り設計した；フォワードプライマー（5'-TCTGCACTTT-ACTGGTACGAATGG-3'）、リバープライマー（5'-GCCAAGAAGCGTATCAGCT-AGGTT-3'）、TaqMan MGB プローブ（TGTTAAGGCAATGCCAC-3'）。定量 PCR は、当該 ORF2 領域を含む PCR 産物（cDNA）のコピー数を算出してスタンダードとし、TaqMan EZ RT-PCR キット（Applied Biosystems）を用いてマニュアル通りに実施した。ELISA 法による HEV 抗体の測定は、Li らの報告したウイルス様粒子（VLP）を抗原とした ELISA 法で実施し、血清材料を 200 倍希釈して使用した。