

200829029A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 直和

平成 21 (2009) 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. 野生イノシシにおける E 型肝炎ウイルス保有状況サーベイランス	田中智之	13
2. E 型肝炎ウイルス感染防御を示す中空粒子の最小有効量の検討	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	29
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	33
6. B 型肝炎ウイルスの粒子形成機構、新規ヒトポリオーマウイルスのウイルス様粒子の作製	鈴木哲朗	39
III. 研究成果の刊行に関する一覧		43
IV. 研究成果の刊行物・別刷		47

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 武田 直和

平成 21 (2009) 年 4 月

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

研究代表者 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、イノシシから Genogroup III HEV 遺伝子を検出した。イムノクロマトグラフによる迅速診断キット開発を加速する。ノトバイオート豚を用いて HEV 粘膜免疫実験を行った。HEV ウイルス様粒子（VLP）を1週間隔で3回投与した時のVLPの最小感染阻止量を明らかにした。C型肝炎ウイルス（HCV）を効率よく産生させるため、継代を繰り返し HCV J6/JFH-1 適応変異株を得た。ウイルス遺伝子変異を解析し HCV の細胞への侵入効率を向上させる変位を明らかにした。ヒト肝ガン由来 PLC/PRF/5 細胞による HEV 培養系を確立した。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。A, B, C 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、A および B 型は本邦に多い C 型より複製効率は低いものの、上清中への分泌効率が高いことが明らかになった。

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
鈴木 哲朗	同上

協力研究者

三好 龍也	堺市衛生研究所
北元 憲利	兵庫県立大学
宮崎 綾子	動物衛生研究所
鈴木 孝子	同上
山田 学	同上
服部 奈千子	同上
劉 蘭軍	国立感染症研究所

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、以下を研究目的とした。

- (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98穴マイクロプレートをコーティングし、動物血清をこのマイクロプレート上で2倍階段希釈した。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

ノトバイオート豚で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をノトバイオー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。

・わが国のイノシシ、豚から分離されたG3、およびG4ウイルス株をもちいたVLP作製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

・培養系の確立

ヒト肝ガン由来PLC/PRF/5細胞によるHEV培養系を確立した(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питオプの同定など、免疫学的性状を解析する

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。

サルについて解析中。

- ・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。

イノシシのサーベイランスを行い、Genogroup III HEV 遺伝子を検出した。HEV 遺伝子から VLP を作製し、イムノクロマト法などの簡便な診断方法の構築し、野生株ウイルスの抗原解析等への応用を図る(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口、経鼻で 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。

HEV VLP をノトパイオット豚に 1 週間隔で 3 回投与した時の VLP の最小感染阻止量は、経口ならびに経鼻投与いずれにおいても 0.5 mg/dose であることが明らかとなった(恒光 裕 分担研究報告書)。

- ・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

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 および B は genotype C 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。(鈴木哲朗 分担研究報告書)

- ・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の変異体を作製し、最も産生、分泌効率のよい発現ベクターを選択する。

HCV J6/JFH-1 株が感染した Huh-7.5 細胞を 3-4 日ごとに passage させ、適応変異を有したウイルス株を得た。ウイルス遺伝子変異を解析し HCV の細胞への侵入効率を向上させる変位を明らかにした。(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を示した(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 HCV 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

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 ウイルス様粒子の産生は困難と思われる。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。

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。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。

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

ノトバイオート豚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。経口、経鼻実験で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、A 型 HBV 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 感染阻止を誘導する VLP 量を決定した。
- HCV の適応増殖変異を規定するアミノ酸座

位を同定した。

- HEV 培養系を確立した。
- 感染性を有する HCV subgenomic replicon を作製した。
- HBV A および B 型は遺伝子型 C より上清中への分泌効率が高かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka. Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into boar populations. *Mammal Study* 33:43-49, 2008

Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S. 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*, 148, 174-181, 2008.

Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., and Shoji, I. Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *Journal of General Virology*, 89, 1587-92, 2008.

Sasase, N., Kim, S. R., Kim, K. I., Taniguchi, M., Imoto, S., Mita, K., Hotta, H., Shoji, I., El-Shamy, A., Kawada, N., Kudo, M., and Hayashi, Y. Usefulness of a new immunoradiometric assay of HCV core antigen to predict virological response during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral load of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 51, 70-5, 2008.

Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K.,

- Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondria-mediated, Caspase-3-dependent pathway. *Journal of Virology*, 82, 10375-85, 2008.
- Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Shoji, I., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., and Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by dual mechanisms, ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *Journal of Virology*, [epub ahead of print], 2008.
- Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., and Shoji, I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *Journal of Cellular Biochemistry*, in press.
- Wang CY, Miyazaki N, Yamashita T, Higashiura A, Nakagawa A, T-C Li, Takeda N, Xing L, Hjalmarsson E, Friberg C, Liou DM, Sung YJ, Tsukihara T, Matsuura Y, Miyamura T, Cheng RH. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2008 Apr 1;64(Pt 4):318-22. Epub 2008 Mar 29.
- Yamamoto H, Li TC, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N. Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim*. 2008 Jul;57(4):367-76.
- Gran S, Hansman, Tmoichiro Oka, T-C Li, Osamu Nishio, Mamoru Noda, and Naokazu Takeda. Detection of Human Enteric Viruses in Japanese Clams. *Journal of Food Protection*. 2008 Aug; 71(8): 1689-95.
- T-C Li, Yuriko Suzuki, Yasushi Ami, Hiroshi Tsunemitsu Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection The *Journal of Veterinary Medical Science* . 2008. Dec;70(12):1359-62.
- Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li TC. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol*. Nov 9, 2008.
- Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li TC, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A, Hasan M. Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Dec 1.
- Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiology and Immunology* in press.
- Akazawa D., Date T., Morikawa K., Murayama A., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Ishii K., Suzuki T., Mizokami M., Mochizuki H. and Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 747-751 (2008)
- Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Zheng X., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. and Takeda N. Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology* 82: 10756-10767 (2008)
- Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T. and

- Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology* 82: 7964-7976 (2008)
- Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008)
- Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* (in press)
- Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
- Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
- Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBPS interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
- Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
- Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis*. 13: 929-937 (2008).
- Aizaki H, and Suzuki T. RNA Replication of Hepatitis C Virus. Cheng RH, and Miyamura T in *Structure-based Study of Viral Replication*, World Scientific, Singapore, 2008, pp151-172.
- 田中 智之. ノロウイルス胃腸炎の診断と予防指針 総合臨床 2008, 57:2002-2003
- 田中 智之. 各種迅速診断法 消化管の感染症 2) ウイルス性胃腸炎 2008, Medical Technology 36;1393-1399.
- 金守良, 井本勉, 婦木秀一, 金啓二, 谷口美幸, 長野基子, 堀田博, 勝二郁夫, 寒原芳浩, 前川陽子, 工藤正俊, 林祥剛. 1b 型高ウイルス量高齢者 C 型慢性肝炎に対する PEG IFN α -2 b/リバビリン治療 (併用療法) の検討. *肝臓*, 49, 145-152, 2008.
- 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
- 清原知子, 石井孝司, 脇田隆宇 A 型肝炎 臨床と微生物 35: 645-650 (2008)
- 李 天成, 石井孝司, 武田直和 E 型肝炎と豚肉, 鹿肉, 猪肉の安全性 臨床とウイルス 36: 298-304 (2008)
- 白土東子, 武田直和, 石井孝司 ノロウイルスと血液型抗原との結合 遺伝子医学 MOOK 11: 192-198 (2008)
- 石井孝司 遺伝子組換え生ワクチン 日本臨床 66: 1903-1907 (2008)

2. 学会発表

- Shoji, I., Osaki, M., Fukuda, K., Murakami, K., Hotta, H., Suzuki, T., Wakita, T., and Miyamura T. Molecular mechanism of E6Ap-mediated regulation of hepatitis C virus production. *Keystone Symposia, Cell Biology of Virus Entry, Replication and Pathogenesis*, Victoria, Canada, 2008.

- Murakami, K., Abe, K., Shoji, I., Takamiya, S., Kimura, T., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Wakita, T. Identification of hnRNP1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. International Union of Microbiology 2008, Istanbul, Turkey, 2008.
- Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Murakami, K., Shoji, I., Miyamura, T., Wakita, T., and Suzuki, T. Involvement of creatinine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Hamamoto, I., Murakami, K., Suzuki, T., Tanaka-Taya, K., Okabe, N., Wakita, T., and Shoji, I., ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- El-Shamy, A. M., Apichartpiyakul, C., Kim, S.R., Adachi, T., Shoji, I., and Hotta, H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance-determining region (IRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/rivavirin combination therapy. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Abe, K., Murakami, K., Takamiya, S., Suzuki, T., Miyamura, T., Koike, K., Wakita, T., and Shoji, I. Identification of hnRNP1 and hnRNP70 as binding partners for HCV core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. HCV infection induces Bax-triggered, mitochondria-mediated, caspase-3-dependent apoptosis. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Hotta, H., Kitayama, K., Yabuki, R., Deng, L., Nagano-Fujii, M., and Shoji, I. HCV induces nucleolar enlargement of the host cell that is associated with anti-apoptotic status and cell cycle progression during the chronic persistent phase of infection. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Shoji, I., Osaki, M., Murakami, K., Suzuki, T., Miyamura, T., Wakita, T., and Hotta, H. Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein. 15th International symposium on hepatitis C virus & related viruses., San Antonio, USA, 2008.
- Li T-C, Miyamura T, Wakita T, Takeda N: Characterization of recombinant virus-like particles of genotype 3 hepatitis E viruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology. Tokyo. Jun1-3, 2008.
- Li TC, Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T. Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. XIV international Congress of Virology. Turkey. Istanbul, 10-15 August 2008.
- Omi N., Akazawa D., Takahashi H., Morikawa K., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Inactivated recombinant HCV particle (JFH1 strain) immunization of mice could induce antibody response. 2nd Vaccine Congress, Boston, December 7-9, 2008
- Ishii K. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, November 1, 2008
- Li T. C., Ishii K. and Takeda N. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, October 6, 2008
- Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki

- H., Ishii K., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
- Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Li J., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
- Ishii K., Hasegawa H., Nagata Y., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
- Ami Y., Ishii K., Tsunetsugu-Yokota Y., Nagata Y., Hasegawa H. and Taguchi F. Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
- 加藤大介、三好龍也、内野清子、鎌田公仁夫、高橋幸三、武田直和、田中智之。改良 Immunochromatography 法によるノロウイルス抗原検出 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市
- 原弘道、相崎英樹、松田麻未、村上恭子、勝二郁夫、松浦善治、宮村達男、脇田隆宇、鈴木哲朗、creatine kinase B は C 型肝炎ウイルス NS4A との相互作用によりウイルスゲノム複製複合体へ運ばれエネルギー供給に働く、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- Lin Deng, 足達哲也、北山喜久美、分玉泰彰、北澤荘平、石戸聡、勝二郁夫、堀田博、C 型肝炎ウイルス感染によるアポトーシスの分子機序の解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 堀田博、北山喜久美、矢吹玲子、Lin Deng、長野基子、勝二郁夫、C 型肝炎ウイルスの持続感染は宿主細胞の核小体肥大、アポトーシス感受性低下及び細胞周期進行を誘導する、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 浜本いつき、村上恭子、鈴木哲朗、多屋馨子、岡部信彦、脇田隆宇、勝二郁夫、C 型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- エルシャーミーアメード、足達哲也、犬伏祥子、勝二郁夫、堀田博、ペグインターフェロン/リパズイン併用療法における HCV core および NS5A の多様性による SVR 予測因子と Non-SVR 予測因子の検討、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 内海孝子、ルシダマリア、長野基子、笹山美紀子、勝二郁夫、堀田博、インドネシア・パプア州の B 型肝炎ウイルス (HBV) の分子系統樹解析と新規 subgenotype の同定、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008.
- 勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆宇、堀田博、C 型肝炎ウイルスコア蛋白のユビキチン化シグナル、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.
- 村上恭子、阿部克俊、高宮智史、木村敬郎、鈴木哲朗、宮村達男、小池和彦、脇田隆宇、勝二郁夫、HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNPH1/H2 の HCV 生活環における役割、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008.
- 山下哲生、宮崎 直幸、森 嘉生、森石恆司、李 天成、宮村達男、武田直和、月原富武、吉村政人、松浦善治：分析能 3.5Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008. 10. 26-28.
- 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治：E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008. 10. 26-28.

李 天成, 恒光 裕, 宮村達男, 脇田 隆宇, 武田直和: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス (HEV) の増殖. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008. 10. 26-28.

岩崎優紀, 森 健一, 榎 昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 吉崎佐矢香, 片貝祐子, 鈴木哲朗, 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 長期持続感染サルウイルスゲノム解析, 第 45 回日本肝臓学会総会, 平成 21 年 6 月, 神戸

岩崎優紀, 森 健一, 榎 昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 吉崎佐矢香, 片貝祐子, 鈴木哲朗, 神奈木真理, 宮村達男, 明里宏文: マーモセットを用いた C 型肝炎サロゲートモデルの開発, 第 56 回実験動物学会総会, 平成 21 年 5 月, 大宮

渋谷悠子, 尾見法昭, 中村紀子, 石井孝司, 脇田隆宇: 細胞培養系で作成した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の正常解析, 第 12 回日本ワクチン学会, 平成 20 年 11 月, 熊本.

清原知子, 徳永英治, 石井孝司, 脇田隆宇: A 型肝炎ワクチンの *in vitro* 力価試験の検討, 第 12 回日本ワクチン学会, 平成 20 年 11 月, 熊本.

政木隆博, 鈴木亮介, 村上恭子, 相崎英樹, 石井孝司, 村山麻子, 伊達朋子, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

尾見法昭, 赤澤大輔, 高橋 仁, 森川賢一, 伊達朋子, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: 細胞培養系により産生されたキメラ HCV ウイルス株および JFH1 株の免疫の検討, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

赤澤大輔, 森川賢一, 尾見法昭, 高橋 仁, 中村紀子, 深澤秀輔, 伊達朋子, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: 無血清培養による HCV 粒子の作成と精製工程の検討, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松 久, 脇田隆宇, 石井孝司, 武田直和: ノロウイルスによる血液型抗原の識別, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成

20 年 10 月, 岡山.

石井孝司, 村上恭子, ススムエー, 張 斌, 李 津, 白倉雅之, 森川賢一, 鈴木亮介, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

町田早苗, 西村順裕, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 清水博之: カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルスの検出とその分子疫学, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

岩崎優紀, 森 健一, 榎 昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 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 長期持続感染サルウイルスゲノム解析, 第 56 回日本ウイルス学会, 平成 20 年 10 月, 岡山.

白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松 久, 脇田隆宇, 石井孝司, 武田直和: ノロウイルスによる血液型抗原タイプ 1, 2 構造の識別, 第 28 回日本糖質学会, 平成 20 年 8 月, つくば

政木隆博, 鈴木亮介, 村上恭子, 相崎英樹, 石井孝司, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV の粒子形成における NS5A 蛋白の役割, 第 44 回日本肝臓学会総会, 平成 20 年 6 月, 松山

A. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 - 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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
 - 4) 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 20 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
鈴木 哲朗

平成 21 (2009) 年 4 月

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」
分担研究報告書

野生イノシシにおける E 型肝炎ウイルス保有状況サーベイランス

分担研究者 田中 智之 (堺市衛生研究所)
研究協力者 三好 龍也 (堺市衛生研究所)
北元 憲利 (兵庫県立大学 環境人間学部)
李 天成、武田 直和 (国立感染症研究所ウイルスⅡ部)

研究要旨:

自然界における E 型肝炎ウイルス (HEV) の浸淫実態などの疫学調査を目的とし、過去に HEV の検出があった大阪南部地域において、野生イノシシを対象に HEV 保有調査を行った。調査対象 29 頭中 2 頭から GenotypeⅢ (GⅢ) の HEV 遺伝子が検出された。抗 HEV 抗体検査では、29 頭中 12 頭 (14%) から抗体が検出された。今回検出された 2 株の Capasid 領域における遺伝子解析の結果、平成 15 年度、16 年度に検出された株との相同性は 98%以上の近縁なウイルスである事が判明した。

以上の結果よりほぼ同地域には、非常に近縁な HEV が長期間にわたり浸淫していることが考えられた。

抗体検査では、GⅠと GⅢの VLP を用いて測定されたが、GⅢの方が高い OD 値を示す傾向であった。この地域ではこれまで GⅢの HEV が検出されていることから、ホモロジーの高い GⅢ-VLP に高い反応を示したと推測された。

A. 目的

野生イノシシ、シカ、さらにはブタ肉などの喫食が原因と考えられる E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染事例が報告されている。血清疫学では、イノシシなどの野生動物から HEV 遺伝子や抗 HEV 抗体の検出も多数報告され、イノシシが自然界における HEV のリザーバーとして重要であると考えられている。

我々は、過去 5 年間にわたり紀伊半島 (大阪府南部～和歌山県) においていくつかの定点地域を設け、狩猟期間中に狩猟された野生イノシシ、シカを対象として、HEV 保有調査を行ってきた。その結果、野生イノシシの HEV 保有状況には地域差があり、紀南地方

には殆ど検出されないことを報告した。

今回、過去に HEV の検出があった大阪南部地域において、主に狩猟期間中に狩猟された野生イノシシを対象に HEV 保有調査を行った。また、イノシシ由来の HEV の詳細な解析のため VLPs の作製を試み、簡便な E 型肝炎診断方法の構築について検討した。

B. 材料と方法

1.材料

平成 19 年 1 月から 12 月にかけて、大阪府南部地域において狩猟により捕獲されたイノシシ 29 頭を検査対象とした。捕獲されたイノシシより採取した肝臓と血液を用いて nested

RT-PCR により HEV 遺伝子の検出を行った。また、血液からは抗 HEV 抗体測定を行なった。

2.方法

(1)血清中の HEV 抗体測定法

抗体測定は、「E 型肝炎検査マニュアル」に準じて行った。即ち、国立感染症研究所、李らにより供与いただいた G I、G III の 2 種類のバキュロウイルス発現 E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV-VLPs) を抗原として用いて、96 well プレートに固相し、1:200 倍希釈血清と反応させた。血清希釈液のウェルの吸光度差 0.2 以上を抗体陽性とした。

(2) HEV 遺伝子検出法

肝臓からの HEV 検出には、20%肝組織乳剤を 10,000G、20 分間遠心した上清を用いて、RNA 抽出キット (Magtraion MagaZorb RNA common kit PSS 社製) にてウイルス RNA を抽出した。血清は無希釈で用い、同様の方法でウイルス RNA を抽出した。抽出した RNA から HEV 遺伝子検索の RT-PCR 法は、前述の検査マニュアルに準じた。

(3) Capsid 領域の遺伝子解析

HEV 遺伝子陽性の検体については、PrimeScript RTase、TaKaRa LA Taq (タカラバイオ) を用いて、Capsid 領域約 2100bp について RT-PCR を行った。得られた PCR 産物は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いたダイレクトシーケンスでその塩基配列を調べた。

(4) HEV-VLPs 発現クローニング

Capsid 領域約 2100bp について、RT-PCR により遺伝子を増幅し、Gateway PCR クローニングシステム (Invitrogen) を用いてクローニングを行った。得られたポジティブクローンから Bac-to-Bac バキュロウイルス発現システム (invitrogen) により、組換え

バキュロウイルスを得る。

C. 結果

(1) HEV 抗体測定

G I-VLP を用いた場合、採取された血液 29 検体中 12 件 (41%) が抗体陽性であった (表 1)。一方、G III-VLP を用いた場合、29 検体中 11 件が陽性判定であった。OD 値については、G III-VLP を用いたほうが高くなる傾向にあった。G I-VLP を用いた場合で陽性、G III-VLP の場合で陰性、という検体が 1 例 (H19A3) があった。これらの OD 値は、カットオフ値付近の、いわゆるグレーゾーンであった。この個体の肝臓からは HEV 遺伝子が検出されていることを考えると抗体の上昇期で、感染後まだ十分に IgG 抗体が上昇していなかった可能性も考えられた。

(2) HEV 遺伝子検出

調査対象 29 頭中 2 頭から HEV 遺伝子が検出された (1 頭は肝臓のみ)。検出されたウイルスは、両方とも G III であった (図 1)。Capsid 領域における遺伝子解析より、2 株は平成 15 年度、16 年度に検出された株との相同性は 98% 以上の近縁なウイルスであった。

(3) HEV-VLPs 発現クローニング

HEV 遺伝子陽性肝臓 (検体番号 H19A8L) から Capsid 領域遺伝子のクローニングを行った。ポジティブクローンを用いて組換え Bacmid を得た。現在、これを Sf-9 細胞に導入し、組換えバキュロウイルスを作製中である。

D. 考察

今回の調査では抗体陽性率が 41% (29 頭中 12) であった。以前の調査結果 (10%程度) と比べると高い陽性率であった。この陽性率の高い原因については、不明であるが、HEV の流行していたコミュニティのイノシシを捕獲した可能性やこの地域で流行

が拡大している可能性も考えられた。

今回検出された HEV 2 株は、平成 15 年度、16 年度に検出された株との相同性は 98%以上の非常に近縁なウイルスであった。抗体検査の結果と併せて考えると、この地域には、同一株もしくは近縁な HEV が長期間にわたり浸淫していることが考えられた。ウイルスの自然界での流行疫学を調査するためにも、今後も引き続き調査することが重要であると考えられる。

抗体測定に G I、G III の 2 種類の VLP を用いた。OD 値は G III-VLP を用いたほうが高くなる傾向にあった。HEV の遺伝子型は 4 つ存在するが、血清型は 1 つであると考えられている。しかし、同じ遺伝子型間のほうが血清学的に強い反応を示すことが予想される。この地域では、G III HEV が流行していると考えられるので、そのため G III の VLP への反応性が高くなったと思われる。この成績から HEV の抗体検出系では、genotype 特異的な抗体を用いるアッセイ系、或いは HEV genotype を広範囲に認識するモノクローナル抗体が必要と思われる。現在 genotype III VLPs を免疫源としてモノクローナル抗体の作製を試み、2 株が作製されている。このクローンの性状については今後の課題である。

イノシシより検出した HEV 遺伝子を用いて、VLP の作製を試みた。現在ウイルス遺伝子のクローニングが終了し、組換えバキュロウイルスの作製段階である。今後作製された野生株 VLP を用いてモノクローナル抗体の作製し、それを用いた簡便な HEV 抗原検出 IC キットの試作を試みる予定である。

E. 結論

イノシシを対象として HEV の保有

調査を行った。29 頭中 12 頭が抗体陽性、2 頭から HEV G III の遺伝子を検出した。以前の調査結果と併せると、長期間にわたり近縁のウイルスが浸淫していると考えられた。この野生 HEV 株を用いたウイルス様中空粒子の作製は進行中で、この同じ遺伝子型の中空粒子を用いた診断方法の開発、抗原解析は今後の課題として持ち越された。

F. 今後の課題

この調査地域において、継続して検出される HEV について、ウイルスの浸淫状況、ウイルス変異株の出現の可能性やその病原性についてさらに調査していく予定である。

また、検出された genotype III ウイルス遺伝子から VLP を作製し、イムノクロマト法などの簡便な診断方法の構築、野生株ウイルスの抗原解析等への応用を図りたいと考えている。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1) 誌上発表

- (1) Naotaka Ishiguro, Yasuo Inoshima, Kazuo Suzuki, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka.
Construction of three-year genetic profile of Japanese wild boars in Wakayama prefecture, to estimate gene flow from crossbred Inobuta into boar populations.
Mammal Study 33: 43-49 (2008)
- (2) 田中 智之. ノロウイルス胃腸炎の診断と予防指針
総合臨床 2880; 57(7), 2002-2003
- (3) 田中 智之. 各種迅速診断法
消化管の感染症 2) ウイルス性胃

腸炎
Medical Technology 36(13); 1393-1399,
(2008)

2) 学会発表

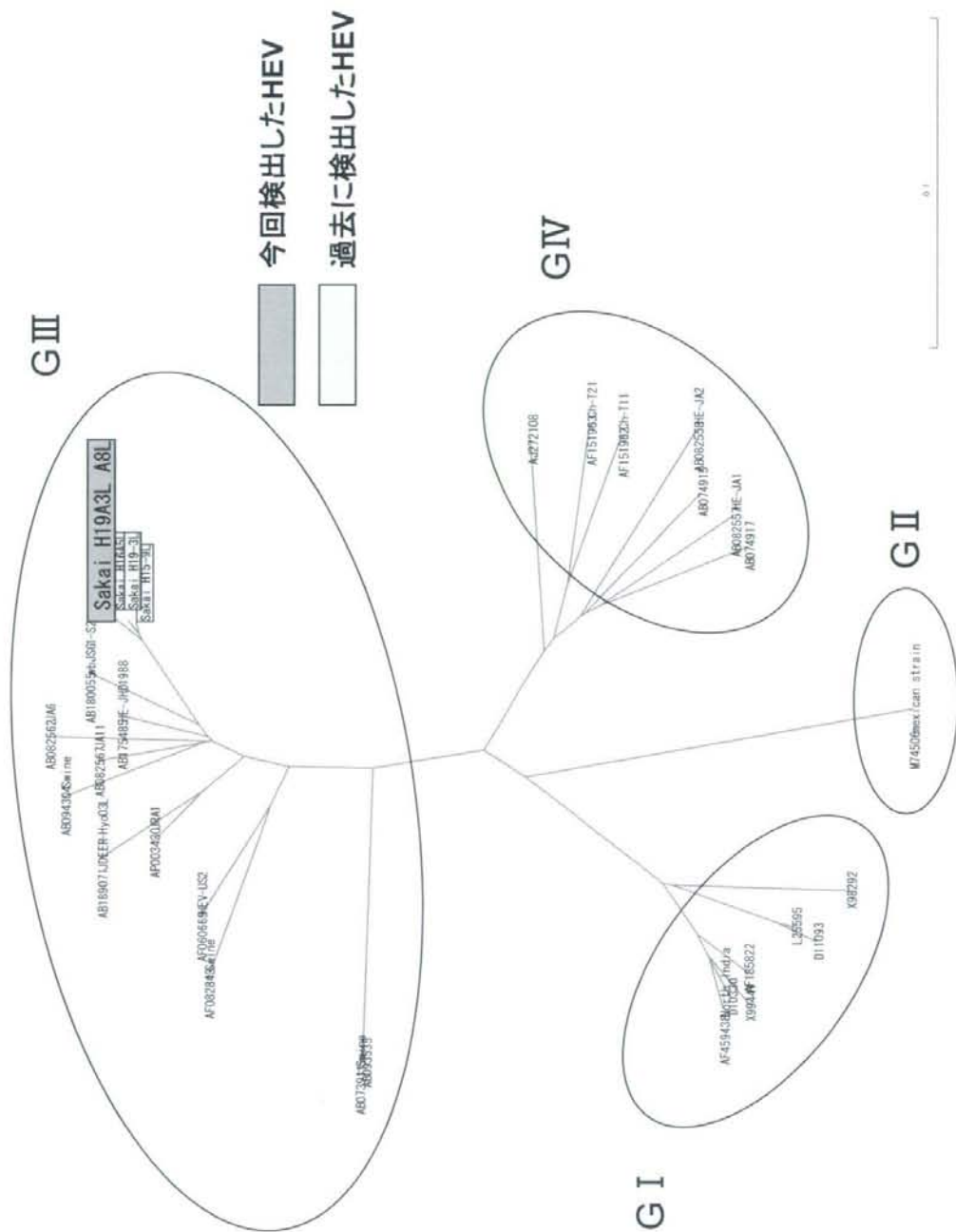
(1) 加藤大介、三好龍也、内野清子、
鎌田公仁夫、高橋幸三、武田直和、
田中智之
改良 Immunochromatography 法による
ノロウイルス抗原検出
第 56 回日本ウイルス学会学術集会
2008 年 10 月 岡山市

I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 平成 19 年度イノシシ HEV 検査結果

番号	検体番号	体重(kg)	性別	狩猟日	RT-PCR		抗体 ELISA	
					肝臓	血液	G1 VLP	G3 VLP
1	WbH19A3	70	メス	1/30	陽性	陰性	0.203	0.149
2	WbH19A6	40	オス	2/12	陰性	陰性	0.047	0.000
3	WbH19A7	40	メス	3/21	陰性	陰性	1.397	1.953
4	WbH19A8	50	オス	3/21	陽性	陽性	0.859	0.732
5	WbH19A9	45	オス	3/21	陰性	陰性	0.000	0.055
6	WbH19A10	45	オス	2/12	陰性	陰性	0.000	0.074
7	WbH20A1	60	オス	9/7	陰性	陰性	0.000	0.121
8	WbH20A2	35	メス	9/8	陰性	陰性	1.321	1.539
9	WbH20A4	60	オス	9/6	陰性	陰性	0.036	0.000
10	WbH20A5	25	オス	9/5	陰性	陰性	0.004	0.027
11	WbH20A11	20	メス	9/5	陰性	陰性	0.001	0.000
12	WbH20A12	50	オス	9/5	陰性	陰性	0.000	0.000
13	WbH20A13	50	オス	10/21	陰性	陰性	0.000	0.050
14	WbH20A14	60	メス	10/22	陰性	陰性	0.107	0.122
15	WbH20A15	50	メス	12/12	陰性	陰性	0.000	0.059
16	WbH20A16	50	オス	11/17	陰性	陰性	2.376	2.457
17	WbH20A17	45	オス	10/24	陰性	陰性	0.000	0.050
18	WbH20A18	45	メス	12/2	陰性	陰性	0.156	0.088
19	WbH20A19	50	オス	10/28	陰性	陰性	0.671	0.919
20	WbH20A20	45	オス	11/10	陰性	陰性	2.471	2.541
21	WbH20A21	48	オス	10/21	陰性	陰性	0.069	0.040
22	WbH20A22	47	オス	10/26	陰性	陰性	0.616	0.818
23	WbH20A23	50	オス	10/24	陰性	陰性	0.046	0.000
24	WbH20A24	45	オス	10/21	陰性	陰性	0.000	0.000
25	WbH20A25	40	メス	12/5	陰性	陰性	0.000	0.000
26	WbH20Ta41	35	オス	-	陰性	陰性	0.510	0.571
27	WbH20Ta44	40	オス	-	陰性	陰性	0.406	0.445
28	WbH20Ta45	50	オス	-	陰性	陰性	0.457	0.636
29	WbH20Ta49	45	オス	-	陰性	陰性	0.460	0.611

図1 HEV遺伝子系統樹解析結果



平成 20 年度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」班
分担研究報告書

E 型肝炎ウイルス感染防御を示す中空粒子の最小有効量の検討

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）

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）の実験感染系において感染防御を示す中空粒子の最小有効量を検討するため、HEV の攻撃前に種々の濃度の VLP を経口投与あるいは経鼻投与して液性免疫応答ならびに感染防御効果の有無を調査した。ノトバイオート豚に 1 週間隔で 3 回、種々の濃度の VLP を経口あるいは経鼻投与し、最終投与 2 週後に HEV で攻撃した。VLP 経口投与による抗体応答において、5 mg/dose 群では血清中 HEV IgG 抗体ならびに糞便中 HEV IgA 抗体が検出された。0.5 mg/dose 群では抗体応答のプライミング効果が認められた。VLP 経鼻投与による抗体応答において、0.5 mg/dose+コレラトキシン群では血清中 HEV IgG 抗体が検出された。糞便ならびに血清中の HEV RNA は、VLP 非投与対照群では HEV 攻撃 7 日後より検出され、糞便中では攻撃 14-21 日後まで、血清中では攻撃 7-21 日後まで検出された。VLP 経口投与では、5 mg/dose 群と 0.5 mg/dose 群のいずれも糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。VLP 経鼻投与においては、0.5 mg/dose+CT 群ならびに 0.5 mg/dose 群はいずれも糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。以上の結果より、HEV VLP をノトバイオート豚に 1 週間隔で 3 回投与した時の VLP の最小感染阻止量は、経口ならびに経鼻投与いずれにおいても 0.5 mg/dose であることが明らかとなった。

共同研究者

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病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、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 20 年度は、ノトバイオート豚を用いた HEV の実験感染において、HEV の攻撃前に種々の濃度の VLP を経口投与あるいは経鼻投与し、感染防御効果を示す

VLP の最小有効量を検討した。

B. 研究方法

バキュロウイルス発現系により HEV 遺伝子型 3 の VLP を作出した。ノトバイオート豚計 18 頭を使用し、VLP 経口投与 3 処理群（5 mg/dose、0.5 mg/dose、0.05 mg/dose；各群 2 頭）、VLP 経鼻投与 4 処理群（0.5 mg/dose、0.5 mg/dose+コレラトキシン[CT；0.1 mg/dose]、0.05 mg/dose、0.05 mg/dose+CT；各群 2 頭）、非投与対照群（4 頭）に区分した。VLP は 3 日齢より 1 週間隔で 3 回投与し、VLP の最終投与 2 週後に経口的に HEV（豚由来遺伝子型 3）で攻撃した。血清中の HEV IgG 抗体ならびに糞便中の HEV IgA 抗体を ELISA 法で、HEV RNA を nested RT-PCR 法で検査した。ELISA 法による HEV 抗体測定は、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。