

200931014A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成22（2010）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 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 3
鈴木 哲朗

II. 分担研究報告

1. 野生イノシシにおける HEV 保有状況調査とその応用 -200 13
田中 智之
2. 豚における E 型肝炎ウイルス中空粒子の 1~2 回投与による感染防御効果の
検討 19
恒光 裕
3. B 型肝炎ウイルス粒子分泌機構の解析 C 型肝炎ウイルス中和抗体価測定法
の開発 23
勝二 郁夫
4. 大きな粒子形成に必要な領域および重要なアミノ酸同定 29
李 天成
5. HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と性状解析 33
石井 孝司

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

- IV. 研究成果の刊行物・別冊 45

I . 総括研究報告

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 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究要旨 E型肝炎ウイルス（HEV）：1）従来のウイルス様粒子（VLP）はC末端側が欠損しており、本来のHEV粒子より小型であったが、今回、genotype 3のHEVからネイティブ粒子と同一サイズのVLP作製に成功した。このネイティブサイズ粒子は小型粒子と異なりHEV RNAを内包していた。さらに、その粒子形成に重要なアミノ酸残基を同定した。2）ノトパイオートブタによるHEV感染モデルにおいて、HEV-LP（小型粒子）投与による感染防御効果を解析した。ウイルス接種2〜3週前にHEV-LPを1回あるいは2回経鼻投与することにより感染防御が可能であることが示された。HEV-LPが高い免疫原性を有することが確認され、単回経鼻投与によりワクチン効果が期待できることを明らかにした。3）自然界におけるHEVの浸淫実態を明らかにするため、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。今年度はHEV抗体／遺伝子の検出は認められなかった。昨年度までに採取したHEV感染イノシシ材料の解析から、HEV遺伝子はIgG抗体上昇後にも検出されることが示された。4）HEV-LPを免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、genotype 1及び3に交叉反応する抗体を取得した。検査法開発への応用を検討中である。

C型肝炎ウイルス（HCV）：1）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、感染性のHCV-LPを形成させることに成功した。2）HCV J6/JFH-1感染系を用いてC型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。

B型肝炎ウイルス（HBV）：HBV分泌効率を規定する遺伝子領域を決定するため、分泌効率の異なるgenotype AとCのキメラプラスミドを作製し、HBs抗原分泌を解析した。preS1-preS2領域にもS抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示され、preS1領域から発現させることにより、各遺伝子型のS抗原を効率良く分泌させることができる可能性が示された。

新規ポリオーマウイルス（MCV）：2008年に同定されたメルケル細胞ポリオーマウイルスMCVのVLP作製と精製に成功した。このMCV-LPを使った抗MCV抗体測定系を開発し我が国健常者における同抗体保有率を明らかにした。

研究分担者

田中 智之 堺市衛生研究所 所長

恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長

勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授

石井 孝司 国立感染症研究所 室長

李 天成 国立感染症研究所 主任研究官

A. 研究目的

本研究は、従来不可能であったウイルス抗原の VLP としての大量調製を基礎に、ワクチンの開発と診断検査法の向上を目指す。

中空の VLP はその内部に核酸を持たないことから、外来性遺伝子を取り込ませることが可能である。抗原抗体診断系への利用だけでなく、組織特異的な遺伝子治療用ベクター、あるいは多価ワクチンとしての可能性も秘めており、医療・福祉への貢献度も極めて高い。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、肝炎ウイルス感染症の予防と制圧に直接かかわることが期待できる。

HEV については、VLP ワクチン開発向け感染動物モデル系で感染防御効果を評価する。また、ネイティブ粒子に近似した VLP を作り構造解析を行う。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の作製を目指す。野生動物における感染実態を把握する。HCV については、粒子産生の効率上昇、VLP 作製技術の確立などを行う。HBV については、粒子分泌効率の向上を図る。

B. 研究方法

1. HEV

1-1. VLP の作製：HEV ORF2 の全長、および部分欠損または置換変異体の組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞 Sf9 に MOI:10 で感染後、感染細胞と培養上清から構造蛋白分画を回収し、シヨ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。

1-2. 感染防御実験：ノトバイオート豚計 10 頭を使用し、VLP 経口投与 2 処理群 (0.5 mg/dose の 1 回投与ならびに 2 回投与；各群 2 頭)、VLP 経鼻投与 2 処理群 (0.5 mg/dose の 1 回投与ならびに 2 回投与；各群 2 頭)、非投与対照群 (2 頭) に区分した。VLP は 3 日齢より 1 週間隔で 1

回あるいは 2 回投与し、VLP の最終投与 2-3 週間後 (24 日齢) 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 IgM 抗体、また、糞便中の HEV IgA 抗体を ELISA 法で、HEV RNA を nested RT-PCR 法で検査した。

1-3. 野生動物における HEV 保有動向調査：平成 21 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 30 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、血清中の HEV IgG 抗体を ELISA 法で測定した。

2. HCV

2-1. プラスミドトランスフェクションによる HCV-LP の作製：HCV JFH-1 株の core から NS2 領域の cDNA を pCAGGS に組み込んだ pCAG C-NS2 および、E2、p7、NS2 にそれぞれ変異 (N417S、N765D、Q1012R) を導入した pCAG C-NS2 mut を作製した。また JFH-1 株のサブゲノムレプリコン cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入し、pHH JFH1 SGR-Fluc を作製した。これらのプラスミドを Huh-7 細胞へトランスフェクションし、その培養上清をさらに naïve な Huh-7 細胞に感染させ、3 日後の細胞のルシフェラーゼ活性を測定する事により、上清中の感染価を評価した。

2-2. フォーカス形成阻害アッセイ：HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、血清中の focus 形成阻止活性を測定し、中和抗体価を算出した。

3. HBV

HBV-Aeus, HBV-Cat 株 (国際医療センター、溝上教授から供与) の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えた AAA, CAA, CCA, ACA, CCC, ACC, AAC, CAC 型を PCR 法で作製し、pSV プラスミド

にサブクローニングした。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 HBs 抗原の発現をウエスタンブロット法で確認した。細胞上清中への HBs 抗原分泌効率を ELISA 法で解析した。

4. MCV

MCV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。VP1 遺伝子 (423 アミノ酸長) を組み込んだバキュロウイルストランスファーベクターを作製、昆虫細胞 SF9 にトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えバキュロウイルスを取得した。組み換えウイルスを Tn5 細胞へ感染させ、7 日後の培養上清を集め、塩化セシウム平衡遠心により VLP 分画を分離、精製した。

(倫理面への配慮)

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「実験動物の飼養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」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第 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。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後実施した。

C. 研究結果

1. HEV

1-1. ネイティブ様粒子の作製と性状解析

種々の genotype 3 由来株について ORF2 発現組換えバキュロウイルスを作製、昆虫細胞 Tn5 に感染させ、感染細胞内および培養上清に分泌された抗原量や粒子の形成を比較した。ネイティブ様粒子形成の効率は株間で違いが認められた。ネイティブ様粒子を形成しない T 株の 39 番目のセリンをグリシンに置換することにより、

S 株と同様大きな粒子の形成が可能となった。また、S 株のグリシンをセリンへ置換することによって大きな粒子の形成ができなくなった。この結果、39 番目のアミノ酸はネイティブ様 HEV-LP の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

1-2. HEV-LP による感染防御効果

ノトバイオート豚に 1 週間隔で 1-2 回、VLP 0.5 mg/dose を経口あるいは経鼻投与し、最終投与 2-3 週後に HEV で攻撃した。VLP を 1 回あるいは 2 回経鼻投与したノトバイオート豚ではいずれも HEV 攻撃後において糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。一方、VLP の経口投与豚では 1 回ならびに 2 回投与のどちらにおいても 2 頭中 1 頭に HEV の感染が認められた。今回、感染阻止を示した豚はいずれも HEV 攻撃前に血清中 HEV IgG 抗体が検出されたのに対し、ウイルス排泄が認められた豚はすべて HEV 攻撃後に血清中 HEV IgM 抗体が検出された。

1-3. 野生動物における HEV 保有状況解析

イノシシ全 30 頭の血液中の HEV 抗体は全て陰性であった。また、遺伝子検出についても肝臓、血液から HEV 遺伝子は検出されなかった。昨年度までに採取した HEV 感染イノシシを詳細に解析したところ、肝臓では、 $3.6 \times 10^7 \sim 6.1 \times 10^8$ copy/g-sample、血液では、 $9.6 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^5$ copy/ml-sample の HEV 遺伝子が検出された。その内 2 頭の血中抗体価は、非常に高値であった。

1-4. HEV モノクローナル抗体作製

HEV-VLP 免疫マウスから、2 クローンのモノクローナル抗体が得られた。2 クローンとも genotype 1、genotype 3 の VLP と同程度の反応性を示し、両遺伝子型間を交差反応する抗体と考えられた。

2. HCV

HCV core-NS2 発現プラスミド及びレプリコンプラスミドを同時にトランスフェクションすることにより、HCV のレプリコンゲノムが packaging された感染性粒子が産生されることを見出した。また適応変異となりうる変異を導入した構造蛋白質発現プラスミドを用いた群では、野生型に比べ、より高いレポーター活性が認められたことから、これらの変異は感染性粒子の産生効率の向上に寄与するものと考えられた。さらにこの感染はHCVと同様に抗CD81抗体により阻害されたことから、この粒子の感染様式はHCVと同様のメカニズムによる事が示唆された。

構造領域を発現するプラスミドを core から p7 までと NS2 に分割することにより、NS2 への変異導入による機能解析が簡便に行えるものと考えられる。この方法を用いて NS2 領域に変異を導入した場合の感染性 HCV-LPs の形成についての検討を行った。NS2 のプロテアーゼ活性中心や、リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成能に影響しなかったが、NS2 の N 末端側の膜貫通領域や C 末端のアミノ酸を欠損させると、感染性粒子の産生は認められなかった。

一方、C 型肝炎患者血清中の中和抗体測定法の開発を試みた。HCV J6/JFH1 株を用いて focus reduction neutralization assay を行い、中和抗体価の算出が可能であることを示した。EVR, SVR の患者では non-EVR, non-SVR の患者に比し、中和抗体価が有意に高かった。

3. HBV

HBV-Aeus, HBV-Cat 株の PreS1, PreS2, S 領域をそれぞれ組換えたキメラ HBs 粒子発現プラスミドを作製し、粒子産生、分泌効率を比較した。以下の結果を得た。(1) HBsAg の上清中への分泌量は genotype A の方が genotype C より高かった。(2) preS1-preS2 を genotype A 型に置換したところ、genotype C の S 抗原分泌が充

進した。

(3)逆に preS1-preS2 を genotype C 型に置換したところ、genotype A の S 抗原分泌が減少した。

4. MCV

MCV VP1 発現組換えバキュロウイルスを感染させた細胞では、予想される分子量 (47 kDa) の MCV VP1 蛋白が産生され、培養上清に放出された。培養上清を塩化セシウム密度勾配遠心法で精製し、電子顕微鏡観察したところ、比重 $1.29 \sim 1.32 \text{ g/cm}^3$ 分画に直径約 20nm また 50nm の二種類の球形粒子構造が認められた。精製 VLP をラットに接種し抗 MCV 抗血清を作製し、抗原性をヒトポリオマウウイルス BKV、JCV と比較した結果、MCV 抗体は BKV、JCV と交差反応しないことが示された。この VLP を用いて MCV 抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人における抗体保有率を解析した。男女ともに若年層では加齢とともに保有率は上昇し 1~70 歳の保有率は 43%であった。男女差、地域差は認められなかった。各世代の MCV 抗体保有率は BKV に比べ低い傾向であった。

現在、HEV 抗原検出には、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法が用いられている。今後、この抗体を用いた特異性の高い ELISA 法などの検査診断法の開発への応用を試みる。

D. 考察

1. HEV

最近、培養細胞での HEV 増殖が可能となったがその産生レベルは低く、ウイルス構造解析、診断法開発に利用することは依然として困難である。今回、得られたネイティブ様 VLP は構造解析等に極めて有用と考えられる。また、これまでの小型 VLP には HEV 遺伝子は取り込まれていなかったが、今回の VLP 内部には HEV 配列が取り込まれていることを見出した。このこと

から、本ネイティブ様 VLP を利用することにより、HEV のゲノムパッケージングなどウイルス複製機構の研究が進展するものと期待される。

ワクチン開発の基盤研究として、ノトパイオート豚を用いた HEV の実験感染モデルを作出し、このモデル系において HEV-LP の経鼻投与あるいは経口投与により感染防御効果が認められることを明らかにしてきた。今回、0.5 mg/dose の VLP を 1 または 2 回投与した場合においても、経鼻投与群で 100%、経口投与群で 50% に感染防御効果が認められた。このことから、HEV の感染防御を図る上で VLP の経粘膜投与は非常に有効な方法であると考えられた。

野生動物における HEV 保有状況に関するこれまでの調査研究から、調査地域では HEV 抗体、HEV 遺伝子共に陽性のイノシシが捕獲されており、この地域で HEV が流行していると考えられている。しかし、本年度のイノシシ調査では、昨年度の HEV 抗体保有率 41%、HEV 遺伝子保有率 7% に比べ、30 頭の検査にも関わらず HEV 抗体、HEV 遺伝子いずれも検出されなかった。検出されなかった理由は不明であるが、サンプリングの問題、HEV の自然淘汰などが推測される。この地域でのイノシシの生活環や集団の状況なども考慮する必要があると思われる。

HEV genotype 1 及び 3 に交叉反応するモノクローナル抗体を取得した。現在、HEV 抗原検出には、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法が実用化されている。今後、このモノクローナル抗体を用いた特異性の高い検査診断法の開発への応用を試みる。

2. HCV

2 または 3 種類のプラスミドを同時導入することで、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV-LP の作製法を確立した。この系を用いれば、種々の HCV 遺伝子型の粒子形成についても迅速な評価が可能となるものと考えられる。またこ

のシステムは、HCV の生活環の中でも、HCV のゲノムパッケージングや粒子形成等のステップを解明するのに有用であるばかりでなく、薬剤のスクリーニングにも利用可能であると考えられる。さらに今回の HCV 様粒子作製法の確立は、安全性が高く、CTL の誘導が可能なワクチン開発へ道を拓くものと期待される。また、外来遺伝子を細胞内へ導入し発現させるベクターとしても応用可能である。

3. HBV

今回用いた HBV genotype A 株と C 株では、これまでに S 領域の分泌に関与することが知られているアミノ酸は完全に保存されていた。また両クローンの HBV 配列を比較したところ、S はアミノ酸レベルで 92.9% homology で 10 個、PreS1 は 91.6% homology で 11 個、PreS2 は 80% homology で 15 個の違いが存在した。

本研究により、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御する配列が存在する可能性が示され、preS1 領域から発現させることにより、各遺伝子型の S 抗原を効率良く分泌させることができる可能性が示された。HBV subviral particle の細胞外への放出の分子機構を解析し、組み換え HBs 抗原粒子を効率よく細胞外へ分泌させる技術を確立するためには preS1-preS2 のどの領域が重要であるかを明らかにする必要がある。

4. MCV

今後、種々の疾患患者における抗体保有率調査を含め詳細な血清疫学解析を行うと共に、精製 VLP を用いた MCV の粒子構造解析等を進める予定である。

E. 結論

本年度、以下の研究成果を得た。

(1) HEV

1) ネイティブ粒子と同一サイズの VLP 作製に成功した。小型 VLP では認められなかった HEV 遺伝子パッケージングが観察された。

2) ノトバイオトブタ感染モデルで、VLP が高い免疫原性を有することを確認し、単回経鼻投与によりワクチン効果が期待できることを明らかにした。

3) 野生イノシシを対象に HEV 保有調査の結果、今年度は HEV 抗体/遺伝子の検出は認められなかった。昨年度までに採取した感染材料の解析から、HEV 遺伝子は IgG 抗体上昇後にも検出されることが示された。

4) VLP を免疫原としてモノクローナル抗体を作製し、genotype 1 及び 3 に交叉反応する抗体を取得した。

5) 2 または 3 種類のプラスミドを同時導入することで、一過性の感染はおこるが増殖はしない HCV-LP の作製法を確立した。

6) HCV J6/JFH-1 感染系を用いて C 型肝炎患者血清中の中和抗体を測定する系を樹立した。

7) HBV 粒子の分泌を制御する配列が preS1-preS2 領域にも存在する可能性を示した。

8) MCV の VLP 作製と精製に成功し、これを使った抗 MCV 抗体測定系を開発し我が国健常者における同抗体保有率を明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (研究代表者分)

論文発表

1. Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MMC, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the

viral NS4A protein. J Virol 5137-5147 5137-5147, 2009.

2. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. J Virol 83: 2389-2392, 2009.

3. Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y: Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. J Virol 83: 7959-7969, 2009.

4. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. Hepatology 50: 378-386, 2009.

5. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. J Virol 83: 10427-10436, 2009.

6. Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I: Identification of Annexin A1 as a novel substrate for

- EGAP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 16: 1123-1135, 2009.
7. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
8. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol.* 175: 1515-241, 2009.
9. 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* 383: 319-27, 2009.
10. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 47: 4141-4143, 2009.
11. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

II. 分担研究報告

野生イノシシにおける HEV 保有状況調査とその応用 - 2009 年 -

研究分担者 田中 智之 堺市衛生研究所
研究協力者 三好 龍也、内野清子、吉田永祥 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 国立感染症研究所ウイルス第二部

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。しかし、今回の調査では、HEV 抗体、遺伝子とも検出されなかった。この理由は不明であるが、サンプリングの問題、HEV の自然淘汰などが推測された。

HEV に感染したイノシシの肝臓で $10^7 \sim 10^8$ /g-sample、血液で $10^4 \sim 10^5$ /g-sample の HEV 遺伝子が検出された。血中の IgG 抗体上昇後にも HEV が検出されること考えると HEV に感染したイノシシは長期間にわたりウイルスを保有、排泄していると推測され、感染源として環境汚染に関わると考えられる。

HEV-VLPs を用いて遺伝子型 I、遺伝子型 III の HEV に交差反応するモノクローナル抗体が作製できた。今後、この抗体を用いた ELISA 法などの検査診断法の開発への応用を試みる。

A. 目的

輸入感染症の一つと考えられていた E 型肝炎が、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感染事例として報告されている。血清疫学では、イノシシなどの野生動物から E 型肝炎ウイルス (HEV) 遺伝子や抗 HEV 抗体の検出も多数報告されている。

我々は、過去 6 年間にわたり紀伊半島（大阪府南部～和歌山県）において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 保有調査を行った。野生イノシシのみが HEV 保有動物であり、保有状況には地域差があることを報告した。イノシシが自然界における重要な

リザーバーと考えられた。

今回、野生イノシシにおける 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、狩猟された野生イノシシを対象に HEV 保有調査を継続して行った。また、イノシシ体内でのウイルス量についても考察を行った。

HEV 診断法開発に寄与するために各遺伝子型を共通に認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。

B. 材料と方法

1. 材料

(1) HEV 保有調査対象材料

平成 21 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 30 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 HEV-VLPs を用いて抗 HEV 抗体測定を行った。

(2) HEV 遺伝子定量用のための材料

平成 15~20 年度の調査において捕獲されたイノシシのうち、HEV 遺伝子 (Genotype III : G III) 陽性のイノシシ 5 頭 (平成 15 年度 : 1 頭、平成 16 年度 : 1 頭、平成 19 年度 : 1 頭、平成 20 年度 : 2 頭) の肝臓及び血液を用いた。

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。血清希釈液のウエルの吸光度差 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 遺伝子検出の RT-PCR 法は、前述の検査マニュアルに準じた。

(3) HEV 遺伝子定量法

前述の遺伝子検出法と同様に検体から RNA を抽出し、Jothikumar N. らの Taq Man リアルタイム PCR 法 (J Virol Methods 131(1):65-71, 2006) に準じて HEV 遺伝子の定量を行った。

(4) HEV モノクローナル抗体の作製

バキュロウイルス発現 HEV-VLPs を抗原として、定法に従いモノクローナル抗体の作製を行った。上述の HEV 抗体測定法を用いて、作製した抗体の評価を行った。

C. 結果

(1) HEV 抗体測定及び遺伝子検出結果

イノシシ全 30 頭の血液中の HEV 抗体は全て陰性であった。また、遺伝子検出についても肝臓、血液から HEV 遺伝子は検出されなかった (表 1)。

(2) HEV 遺伝子定量結果

肝臓では、 $3.6 \times 10^7 \sim 6.1 \times 10^8$ copy/g-sample、血液では、 $9.6 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^5$ copy/ml-sample の HEV 遺伝子が検出された。その内 2 頭の血中抗体価は、非常に高い値であった (表 2)。

(3) HEV モノクローナル抗体作製

HEV-VLPs と反応するクローンが 2 つ得られた。2 クローンとも G I、G III 両方の VLPs と同程度の反応性を示し、G I、III の両遺伝子型間を交差反応する抗体と考えられた。

D. 考察

これまでの調査研究から、調査地域では HEV 抗体、HEV 遺伝子共に陽性のイノシシが捕獲されており、この地域で HEV が流行していると考えられている。しかし、今回のイノシシ調査では、昨年度の HEV 抗体保有率 41%、HEV 遺伝子保有率 7% に比べ、30 頭の検査にも関わらず HEV 抗体、HEV 遺伝子いずれも検出されなかった。検出されなかった理由は不明であるが、サンプリングの問題、HEV の自然淘汰などが推測される。この地域でのイノシシの生活環や集団の状況なども考慮する必要があると思われる。

HEV 陽性検体は HEV 遺伝子コピー数が肝臓で $10^7 \sim 10^8$ /g-sample、血液で $10^4 \sim 10^5$ /g-sample と高く、イノシシの体内に高濃度のウイルスが

存在していることが考えられた。この中には抗体価が非常に高い個体があり、血中の IgG 抗体上昇後も HEV が検出されること考えると HEV に感染したイノシシは長期間にわたりウイルスを保有、排泄していると推測される。便中への HEV 排泄を考えると環境汚染は強くヒトへの感染源の可能性が高く示唆される。

VLPs を用いたモノクローナル抗体作成では G I、GIII の HEV に交差反応する抗体が作製できた。現在、HEV 抗原検出には、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法が用いられている。今後、この抗体を用いた特異性の高い ELISA 法などの検査診断法の開発への応用を試みる。

E. 結論

イノシシを対象とした今年度の HEV の保有調査では、HEV は検出されなかった。この原因は不明である。HEV 感染イノシシでは、長期間にわたりウイルスを保有、排泄している可能性があり、自然界でのリザーバーであると共に環境汚染、感染源として調査研究を持続していくこと重要であると考えられる。

F. 今後の課題

今回の調査では HEV は検出されなかったが、過去の調査結果や野生イノシシの集団行動を考えると簡単に消滅したとは考えがたく、今後も継続して HEV 調査をする必要があると考えられる。HEV の保有状況、周辺住民の HEV 抗体調査、また HEV の変異株の出現の可能性やその病原性について調査が必要である。

作製したモノクローナル抗体を用いた ELISA 法など抗原検出法の開発も今後の課題として継続して検討を試みる。

G. 研究発表

1. 誌上発表

1) 田中智之、三好龍也、内野清子. ノロウ

イルス迅速診断法. 診断と治療, 2009: 97(9);1728-1731

- 2) 田中智之. 改良ノロウイルス抗原検出 EIA キットの評価. 医学と薬学. 2009:61(1); 93-98
- 3) Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Reiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda and Tomoichiro Oka. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis as a wedding hall. (J. Med. Virol. submission accepted)

2. 学会発表

- 1) Tomoyuki Tanaka, Daisuke Kato, Kunio Kamata, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Yamashita, Noritoshi Kitamoto and Naokazu Takeda. Improved Norovirus rapid diagnostic kit, immunochromatography (IC) kit -its advantages as a prophylactic tool- The 4th Bangladesh-Japan Joint International Conference on Microbiology, Food safety and Hygiene. 2009. 3 Nara, Japan
- 2) 本村和嗣、横山 勝、大出裕高、中村浩美、守 宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳. ノロウイルス GII/4 ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 東京都
- 3) 中田恵子、左近(田中)直美、入谷展弘、三好龍也、改田 厚、久保英幸、阿部仁一郎、後藤 薫、長谷 篤、内野清子、

高橋幸三、田中智之、山崎謙治、加瀬哲男、高橋和郎、織田 肇. 大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 2009年10月 東京都

- 4) 三好龍也、内野清子、李 天成、武田直和、北元憲利、田中智之. 野生イノシシのE型肝炎ウイルス保有状況調査. 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都
- 5) 東方美保、齋藤博之、白土東子、田中智之、野田 衛. パンソルビン・トラップ法により汚染食品から回収したノロウイルス遺伝子検出条件 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都
- 6) 齋藤博之、東方美保、白土東子、田中智之、野田 衛. 食品のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討. 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都
- 7) 田村 務、西川 眞、武田直和、田中智之、鈴木 宏. 新潟県における GII.4 ノロウイルス新変異株 [Apeldoorn317/2007/NL] に近縁なノロウイルスの検出動向. 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都
- 8) Tomoyuki Tanaka, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Nakayama, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Noritoshi Kitamoto, Daisuke Kato, Kunio Kamata and Naokazu Takeda. DEVELOPED NOROVIRUS ANTIGEN DETECTION IMMUNOCHROMATOGRAPHY (IC) KIT WITH ADVANTAGES OF PROPHYLACTIC TRIAGE IN PEDIATRIC WARDS. The 13th Asian Pacific Congress of Pediatrics and 3rd Asian Pacific Congress of Pediatric

Nursing. 2009.10. Shanghai, China

- I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

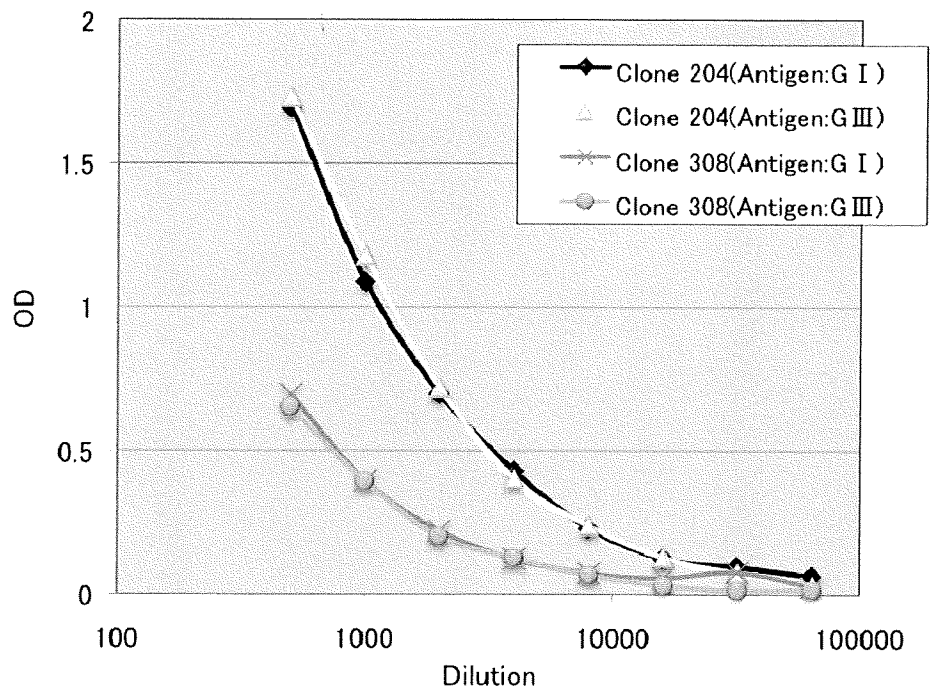


図1 HEVモノクローナル抗体の反応性(ELISA法)

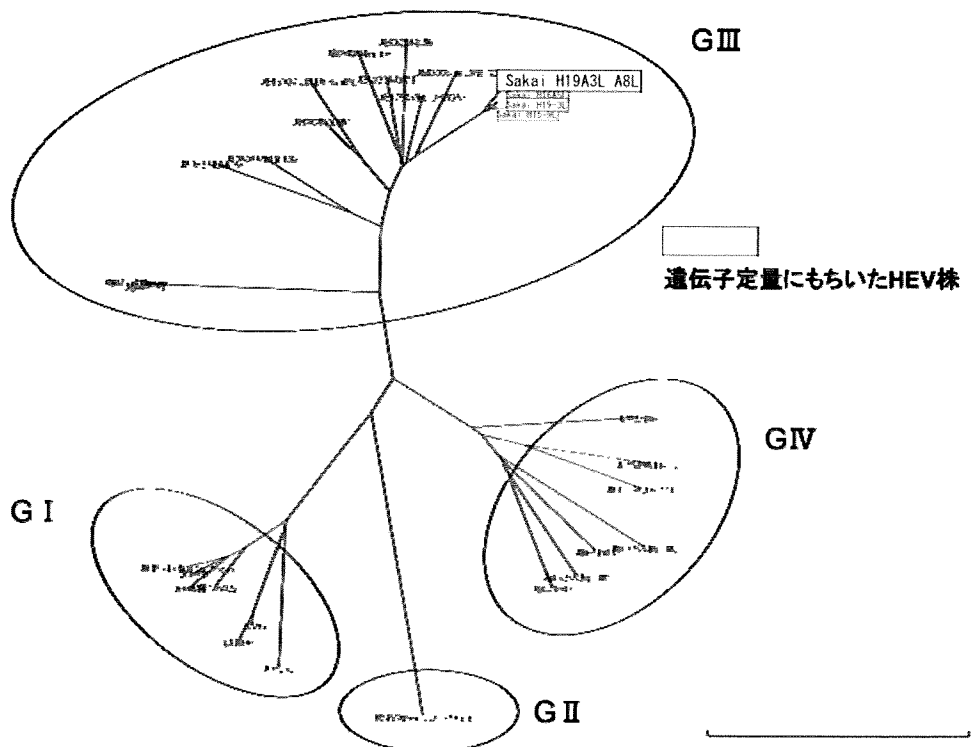


図2 HEV遺伝子系統樹解析結果

豚における E 型肝炎ウイルス中空粒子の 1~2 回投与による 感染防御効果の検討

研究分担者 恒光 裕 動物衛生研究所ウイルス病研究チーム

研究要旨 豚における E 型肝炎ウイルス (HEV) の実験感染モデルにおいて HEV の中空粒子 (VLP) を少回数経鼻投与あるいは経口投与した時の感染防御効果を明らかにする目的で、ノトバイオート豚に 1 週間隔で 1~2 回、VLP 0.5 mg/dose を経口あるいは経鼻投与し、最終投与 2~3 週後に HEV で攻撃した。VLP を 1 回あるいは 2 回経鼻投与したノトバイオート豚ではいずれも HEV 攻撃後において糞便ならびに血清中から HEV RNA は検出されなかった。一方、VLP の経口投与豚では 1 回ならびに 2 回投与のどちらにおいても 2 頭中 1 頭に HEV の感染が認められた。今回、感染阻止を示した豚はいずれも HEV 攻撃前に血清中 HEV IgG 抗体が検出されたのに対し、ウイルス排泄が認められた豚はすべて HEV 攻撃後に血清中 HEV IgM 抗体が検出された。これらの結果より、ノトバイオート豚に対して 1~2 回と少回数の VLP の経粘膜投与によって HEV に対する感染防御効果が得られ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
山田 学 動物衛生研究所
服部奈千子 動物衛生研究所
久我 和史 動物衛生研究所

の実験感染において、HEV の攻撃前に 0.5 mg/dose 以上の VLP を 1 週間隔で 3 回経口あるいは経鼻投与により感染防御効果を示すことを明らかにした。H21 年度は、0.5 mg/dose の VLP を 1~2 回の少回数経鼻あるいは経口投与し、HEV に対する感染防御効果の有無を検討した。

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、HEV のウイルス様粒子 (VLP) を用いて豚における HEV 感染の制御技術を開発することを主な目的とする。これまで、ノトバイオート豚を用いた HEV

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 10 頭を使用し、VLP 経口投与 2 処理群 (0.5 mg/dose の 1 回投与ならびに 2 回投与; 各群 2 頭)、VLP 経鼻投与 2 処理群 (0.5 mg/dose の 1 回投与ならびに 2 回投与; 各群 2 頭)、非投与対照群 (2 頭) に区分した。VLP は 3 日齢より 1 週間隔で 1 回あるいは 2 回投与し、VLP の最終投与 2~3 週後 (24 日齢) 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 IgM 抗体、また、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 ELISA 法で実施し、血清材料を 200 倍希釈して使用した。

C. 研究結果

対照群において、糞便中の HEV RNA はいずれの豚も HEV 攻撃 3 日後より攻撃 17 日後まで検出された。血清中の HEV RNA は 2 頭中 1 頭が HEV 攻撃 7 日後に検出された。VLP を経鼻投与した豚では、1 回投与ならびに 2 回投与のいずれの群においても HEV 攻撃後に糞便中ならびに血清中に HEV RNA は全く検出されなかった。VLP を経口投与した豚では、1 回投与群ならびに 2 回投与群いずれにおいても各群 2 頭中 1 頭で糞便

中に HEV RNA が HEV 攻撃 7~10 日後より攻撃 14~17 日後まで検出された。血清中の HEV RNA は VLP の経口 1 回投与群で HEV の攻撃 14 日後に検出された (表 1)。

HEV に対する抗体応答において、今回、感染阻止を示した豚はいずれも HEV 攻撃前に血清中 HEV IgG 抗体が検出された (図 1)。すなわち、VLP 経鼻投与群の全ての豚ならびに経口投与群の半数において、VLP の初回投与 2~3 週後から血清中に HEV IgG 抗体が検出された。一方、糞便中にウイルス排泄が認められた豚はいずれも HEV 攻撃 14 日後より血清中に HEV IgM 抗体が検出された (図 2)。糞便中の HEV IgA 抗体は、VLP 投与群の一部で抗体上昇が確認されたが、他の豚においては観察期間中ほとんど検出されなかった。

表 1. RT-PCR 法による糞便ならびに血清中の HEV RNA 検出成績

処 理		HEV 攻撃後日数											
		-21	-14	-7	0	3	7	10	14	17	21	24	28
対 照	糞便	0/2	0/2	0/	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	1/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2
VLP 経鼻1回 投与	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2
VLP 経鼻2回 投与	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2
VLP 経口1回 投与	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	NT	0/2	N/T	1/2	N/T	0/2	N/T	0/2
VLP 経口2回 投与	糞便	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	血清	0/2	0/2	0/2	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2	N/T	0/2

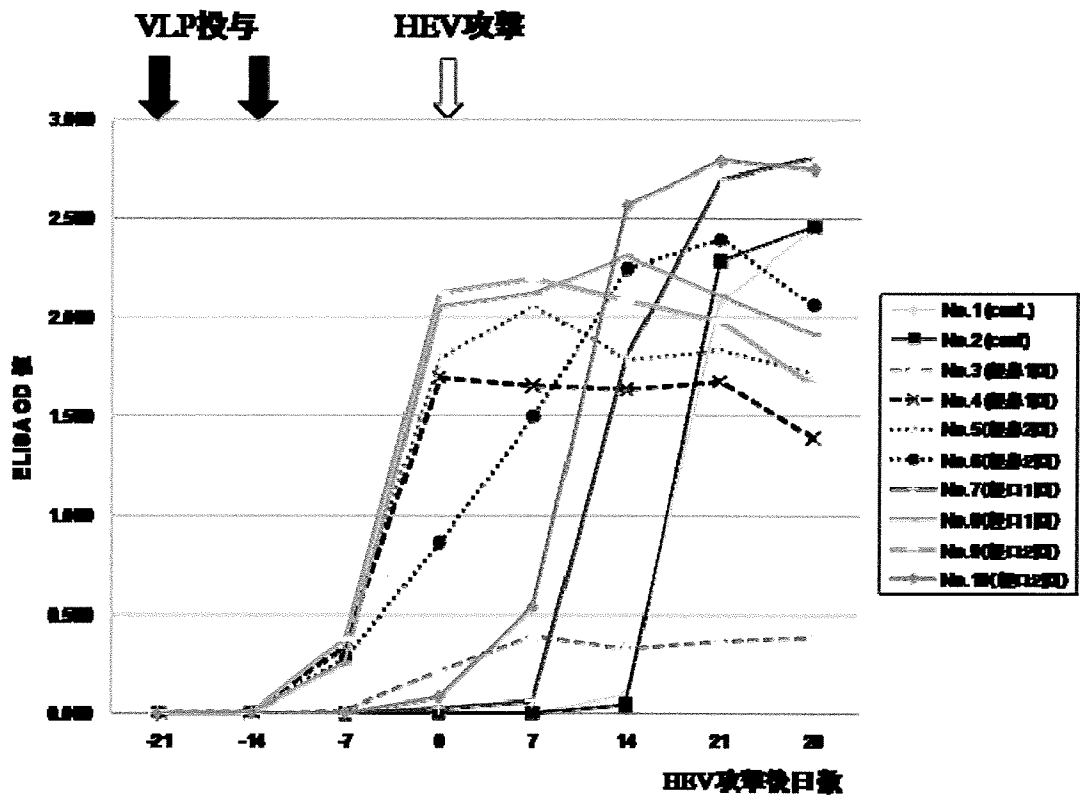


図1. 血清中HEV IgG抗体の推移

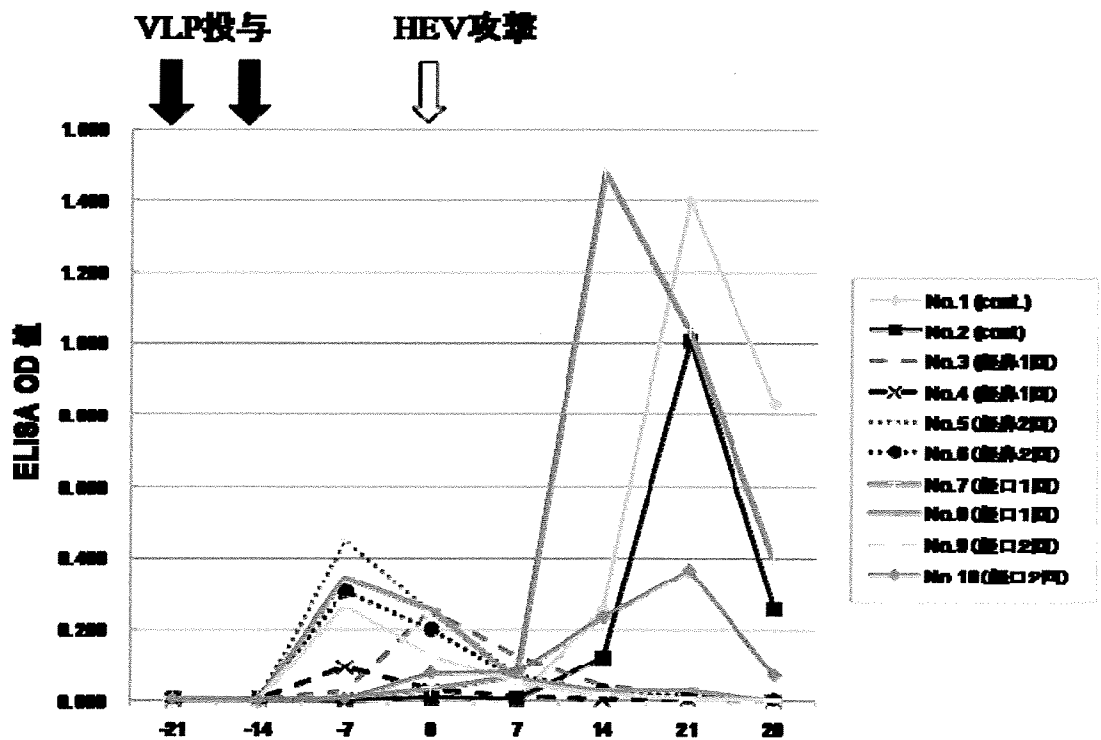


図2. 血清中HEV IgM抗体の推移