

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）
「食品中のウイルスの制御に関する研究」班
分担研究報告書

豚での E 型肝炎ウイルス遺伝子型 4 の実験感染ならびに牛での本ウイルスの浸潤調査

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：イノシシ由来 E 型肝炎ウイルス（HEV）遺伝子型 4 の豚における感染性を明らかにする目的でノトバイオート豚 2 頭を用いた実験感染を実施した。HEV 接種後 7 日（7 PID）より糞便ならびに血清中で HEV RNA が検出され、糞便中の HEV RNA 量は解剖時（35-48 PID）まで高値を示した。また、血清中 HEV IgG 抗体は 28-35 PID より検出された。次に、養牛と養豚の両方を実施している農場から牛血清 91 例を採取して HEV 抗体検査ならびに HEV RNA 検査を行った。牛血清の ELISA 抗体価（OD 値）は一峰性分布を示した。OD 値が 0.2 以上を示した血清 15 例中 2 例のみが HEV 抗原による吸収操作により OD 値の減少（減少率 40%以上）が認められた。いずれの血清からも HEV 遺伝子は検出されなかった。以上の結果より、イノシシ由来遺伝子型 4 の HEV は豚で感染性を有すること、また、牛が HEV の主要な保有宿主ではない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）

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。本年度の研究では、イノシシ由来遺伝子型 4 HEV の豚における感染性を実験感染により明らかにするとともに、牛での HEV の浸潤実態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子型 4 の HEV を実験感染に使用した。当該ウイルス株は愛知県において野生のイノシシの糞便より検出され、国立感染症研究所においてサルで継代されたウイルスである。国立感染症研究所の李天成博士より分与を受けた。3 日齢のノトバイオート豚 2 頭に当該ウイルスを含むサル糞便 10%乳剤 1ml を静脈内接種し、ウイルス接

種後 5-7 週間、臨床像の確認とともに、糞便ならびに血清中の HEV RNA 量をリアルタイム PCR 法で、血清中の HEV IgG 抗体を ELISA 法で測定した。なお、HEV IgG 抗体測定 ELISA 法においては、Li らの報告した遺伝子型 1 のウイルス様粒子（VLP）を抗原とし、血清材料を 200 倍希釈して使用した。また、ウイルス接種後 5-7 週目で解剖検査を実施し、臓器中の HEV RNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。

次に、養牛と養豚の両方を実施している 2 農場から牛血清 91 例を採取し、ELISA 法による HEV IgG 抗体検査ならびに nested RT-PCR 法による HEV RNA 検査を行った。なお、HRPO 標識抗牛 IgG 抗体は KPL 社の製品を用いた。OD が高値を示した血清の一部については、予め VLP（100 ug/ml；陽性抗原）あるいは同濃度の昆虫細胞由来蛋白（陰性抗原）と 37C で 1 時間反応させた後、ELISA 法を実施した（吸収試験）。

（倫理面への配慮）

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

HEV 接種後 7 日（7 PID）より実験豚の糞便ならびに血清中で HEV が検出された。糞便中の HEV 量は解剖時（35-48 PID）ま

で高値を示した。血清中 HEV IgG 抗体は 28-35 PID より検出された (図 1)。臓器中のウイルス RNA は、肝臓、胆汁、SIC (小腸内容)、LIC (大腸内容)、結腸、回腸、肺、筋肉等多くの臓器から検出され、特に、胆汁、肝臓、回腸および LIC で高値の HEV RNA が検出された (図 2)。

一部の牛血清で高い ELISA OD 値が認め

られたが、ELISA OD 値の分布は 0.1 以上 0.2 未満をピークとする一峰性分布を示した (図 3)。OD 値が 0.2 以上を示した血清 15 例について吸収操作を実施した。その結果、13 例の血清は OD 値の顕著な減少 (減少率 40%以上) は認められなかった (図 4)。いずれの血清からも HEV RNA は検出されなかった。

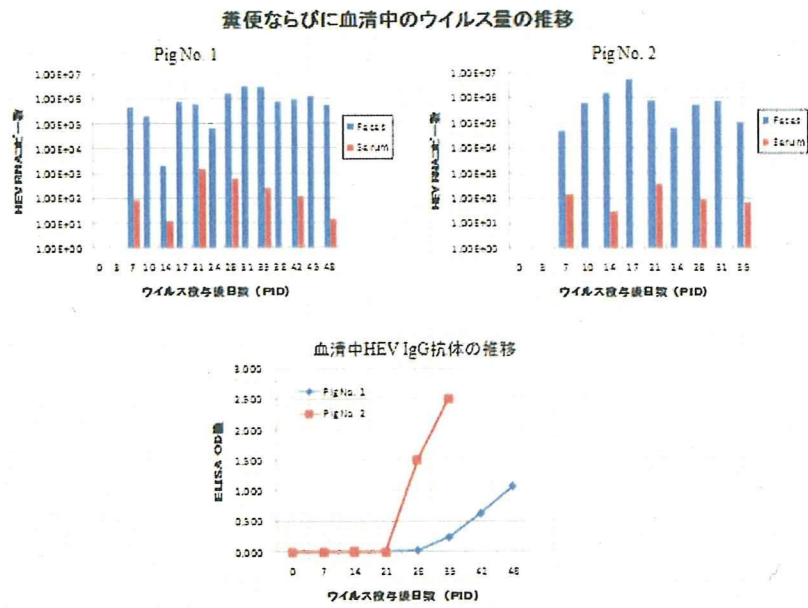


図 1. HEV 遺伝子型 4 のノバイオート豚における感染性

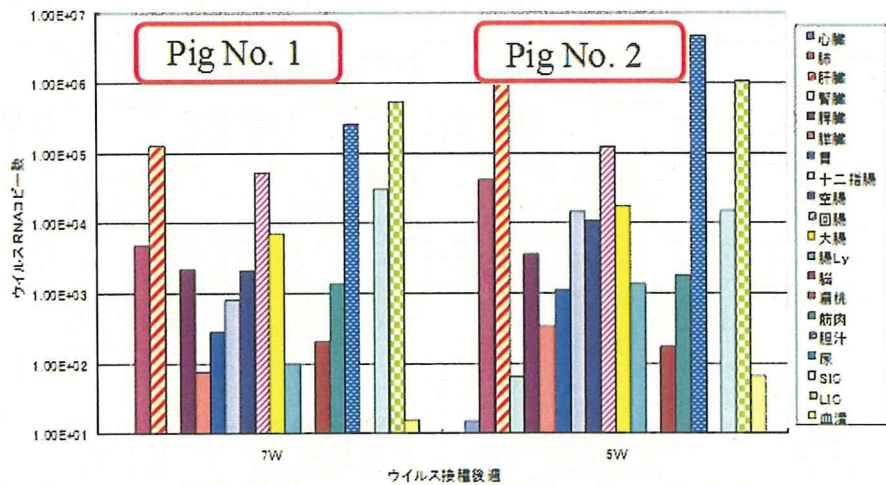


図 2. 臓器中のHEV RNA量

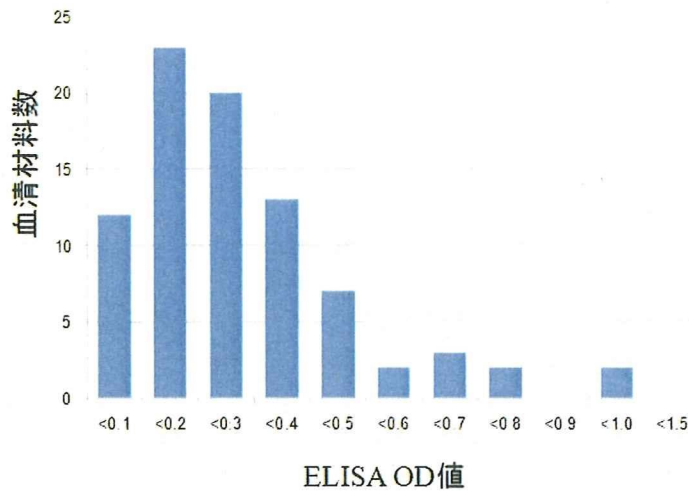


図3. 牛血清91例のHEV抗体測定ELISA OD値の分布

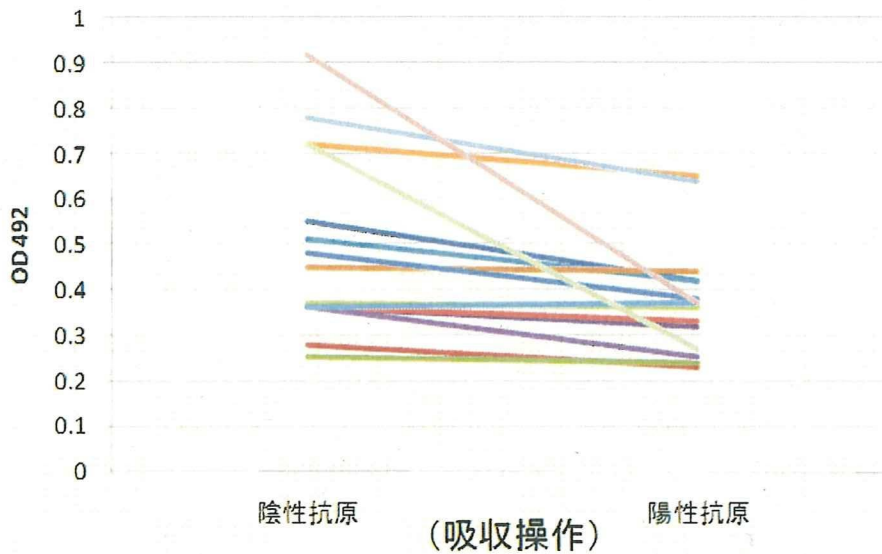


図4. 吸収操作によるELISA法での特異性確認

D. 考察

HEVは4つの遺伝子型に区別され、この中で遺伝子型3と4が動物とヒト両方に感染することが知られている。豚においても遺伝子型3と4のHEV感染が報告されているが、日本の豚からの検出例の大多数は遺伝子型3であり、我々が知る限り、北海道以外において遺伝子型4のHEVが豚から検出された報告はみあたらない。今回、

愛知県のイノシシから検出された遺伝子型4 HEVの豚における感染性を検討した。その結果、7 PID から HEV RNA が糞便ならびに血清から検出され、HEV 抗体は28-35 PID から検出された。また、解剖検査により多くの臓器から HEV RNA が検出された。これら糞便、血清および臓器中の HEV RNA 量、また、抗体応答が確認された時期は、我々が以前に実施した遺伝子型

3のHEVを用いた実験感染の成績と大きな違いは認められなかった。これらのことから、豚は今回実験に使用した遺伝子型4のHEVに対して高い感受性を有することが明らかとなった。興味深い点として、当該ウイルス株は国立感染症研究所においてサルでの感染性が確認され、今回の接種材料は実験感染サルの糞便であることが上げられる。すなわち、当該ウイルス株においてイノシシ-サル-豚間で感染が容易に成立することが推測され、これら動物とヒト間での感染も起こり得ると考えられた。

牛におけるHEV感染の有無については抗体検査による成績が多数報告されている。しかし、抗体陽性率は報告により様々であり、牛がHEV保有宿主であるか否かははっきりしていない。一方、豚は主要なHEV保有宿主であり、多くの豚は2-3ヶ月齢までにHEVに感染すると考えられている。もし、牛がHEVに高い感受性を有するならば、豚と牛を一緒に飼養している農場において牛の感染率は高くなる可能性がある。そのため、今回、豚舎と牛舎を両方保有する農場において牛でのHEV感染を調査した。その結果、一部ELISA抗体価の高い血清が存在したが、吸収試験の結果からそれらの大多数は非特異反応であると考えられた。また、いずれの血清材料からもHEV RNAは検出されなかった。これらのことから、牛は主要なHEV保有宿主ではなく、牛由来畜産物のHEV汚染リスクは無いあるいは極めて低いと推測された。

E. 結論

今回の研究によって以下のことが確認された。

1. 今回実験に使用した遺伝子型4のHEVは豚で感染性を有する。
2. 牛血清からHEV RNAは検出されず、HEV抗体も多くの牛血清は陰性であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

和文解説

なし

誌上発表

なし

H. 知的財産権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

分担者研究報告書

分担研究課題：ノロウイルス GII/4 の新たな単系統群の発生とゲノム組換え体の同定

分担研究者：本村和嗣（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官）

研究要旨：本研究では、自然界でのGII/4の分子進化機序を明らかにすることを目的とし、直近3年間に全国各地で発生した計199のGII/4感染症例について、ウイルスゲノム全長の配列情報を取得し、ゲノム配列の進化系統、ゲノム構造を調べた。解析の結果、少なくとも7種のGII/4単系統群亜株（2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bと命名）を同定し、その中で、2007a, 2008a, 2008bゲノムのORF2の前後に推定組換え点が存在した。6種のサブグループは、全て、キャプシド表面（P2ドメイン）に複数の変異を持ち、キャプシド表面の変異の数は、2006bで最多（7カ所）であった。国内では、常時、キャプシド表面に複数の特徴的な変異セットをもつウイルスが発生していること、キャプシド表面の変異数が多いと流行規模が大きいこと、キャプシド表面の変異セットはゲノム組換えで獲得した可能性が高いこと、が示唆された。

A. 研究目的

ノロウイルス GII/4 は、世界各地で集団食中毒を引き起こしている。直近では、2006/7 秋冬期に世界的に大流行した。医療施設、高齢者施設、飲食施設、ホテルなどで集団発生し、甚大な社会被害をもたらす。このため、近年、厚生労働省、国立感染症研究所、都道府県衛生研究所等が協力して、流行の実態把握に努めている。我々は、我が国に流行するノロウイルスゲノム全長の配列情報を継続的に蓄積し、データベース化する作業を2007年1月より開始した。我々は、収集したゲノム情報をもとに、日本で流行する GII/4 のゲノムを包括的に解析し、流行株の（1）種類、分布、動態、（2）特異的変異、（3）構造の特徴、（4）発生機構を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のおそくみを検討し、ノロウイルス感染症の予防と監視に役立てることをめざしている。

B. 研究方法

2006年05月15日から2009年02月17日の間に、20の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にてノロウイルス感染症と確定した247症例を対象

とした。糞便中のノロウイルスゲノムRNAを抽出した。糞便にPBSを加え10%懸濁液を作成し、11000×g、20分間遠心の後、その上清をRNA抽出液とした。このRNA抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を使って、ノロウイルスRNAを抽出した後、G2SKFとOligo dT₃₀SXN (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.)を用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、4種のGII/4特異的プライマーを用いて相互に重複するNoVゲノムcDNA断片2種（約5.3kb, 2.5kb）をPCR増幅した。ABI3730 (Applied Biosystems) を使い、direct sequence法により、塩基配列を調べた。199の糞便試料について、GII/4ゲノム全長（約7.5 kbps）の塩基配列を得た。ゲノム配列の進化系統を近隣接合法、最尤法により推定した。ゲノム構造を、クローン化断片のbootscanning plots法、探索的系統分析法、情報部位分析法により解析した。

（倫理面からの配慮について）

なし

C. 研究結果

我々は、現在、2006年から2009年までの3年間に日本で流行したノロウイルス流行株のゲノム全長の解析を行っている。これまでに国立感染症研究所ウイルス二部と全国各地の衛生研究所の協力を得て、計199株の全ゲノム情報（約 9×10^5 塩基）を取得した。

系統樹解析の結果、7つの単系統群に分かれ、199株中177株約89%は、2006b亜株であった。

(i) 少なくとも7種のGII/4単系統群亜株（2004/05, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bと命名）を同定した。(ii) 興味深いことに、我々が調査を開始した2006/07秋冬期以来、世界的流行株2006bは、常に優勢なサブグループ（177/199配列）として全国各地で検出された。2007/08にはGII/4-2007a亜株、GII/4-2007b亜株の存在が確認されたが局地的流行に留まっていた（図1）。(iii) EU-2006bは複製タンパク質とcapsidタンパク質に計26箇所の特異的変異をもち、それらの変異を保ちつつ現在も国内の感染の主因となっていた。

(iv) 系統樹解析の結果、他に7種の単系統の新型GII/4亜株が流行し、このうち少なくとも5種はゲノム組換えで発生した可能性が高いことがわかった。更に、クローン化断片のゲノム構造を調べるために、bootscanning plots法、探索的系統分析法、情報部位分析法の解析の結果、2004/05, 2007a, 2007b, 2008a, 2008bゲノムのORF2の前後に推定組換え点が存在した。（図2）(v) 2007b、2008bゲノムは、2006b由来のキャプシド（ORF2）をコードしていた。

D. 考察

我々の研究により、世界で初めて、世界的な大流行の原因となったGII/4 EU-2006b株の全ゲノム配列が明らかになった。この情報をもとに、キャプシド領域および他の領域に過去の流行株では観察されない特徴的変化が明らかになった。GII/4 EU-2006b株は、1年のうちに、それ

ぞれの地域に存在する多様なノロウイルス変異集団と置き換わった。2007-2009年までGII/4単系統群亜株は検出されているが、GII/4 EU-2006b株がいまだに流行を形成している主要な亜株であった。ヒトで効率的に広がるための性質を獲得した変異株と推測される。このことから、ゲノム情報の総合的な変化により、免疫逃避能力と高い感染・増殖能力をバランスよく獲得したウイルスが世界に広がると推察している。ゲノム構造を調べた結果、ノロウイルスは、2007年以降出現している4種のGII/4単系統群において、直近で流行した亜株同士でゲノム組換えを頻繁におこなっていることがわかった。全て推定ゲノム組換え点は、ORF2の前後に存在していた。効率的に抗原性と感染・増殖能を変化させ、ヒト集団で感染を持続する能力を維持している可能性が示唆される。

E. 結論

今後も継続的に、ノロウイルス流行株のゲノム解析を実施し、流行時に発生する変異の種類と意義を解析していく予定である。ゲノム解析情報と、日々進展するノロウイルスの生物学情報を解析することにより、ノロウイルス感染症の流行発生のメカニズムについて理解を深めたい。そして、得られた知見をノロウイルス感染症の対策に役立てて行きたい。その延長上に、新型流行株の出現を予測し、ワクチン開発が可能になると期待している。

謝辞

糞便試料の収集に、以下の先生にご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

田中智之先生（堺市衛生研究所）、野田衛先生（国立医薬品食品衛生研究所）、吉澄志磨先生（北海道立衛生研究所）、三上稔之先生（青森県環境保健センター）、斉藤博之先生（秋田県健康環境センター）、蛇口哲夫先生（岩手県環境保健研究センター）、植木洋先生（宮城県保健環境センター）、田村務先生（新潟県保健環

境科学研究所)、滝澤剛則先生(富山県衛生研究所)、篠崎邦子先生(千葉県衛生研究所)、吉田徹也先生(長野県環境保全研究所)、小林慎一先生(愛知県衛生研究所)、東方美保先生(福井県衛生環境研究センター)、内野清子先生(堺市衛生研究所)、入谷展弘先生(大阪市立環境科学研究所)、福田伸治先生(広島県立総合技術研究所保健環境センター)、飯塚節子先生(島根県保健環境科学研究所)、山下育孝先生(愛媛県立衛生環境研究所)、船津丸貞幸先生(佐賀県衛生薬業センター)、岩切章先生(宮崎県衛生環境研究所)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) **Motomura K.** “Analysis of genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2” Jpn. J. Infectious Disease. 2009 Mar;83(2):81-93.
- 2) Sahbandar IN, Takahashi K, Djoerban Z, Firmansyah I, Naganawa S, **Motomura K.** Sato H, Kitamura K, Pohan HT, Sato S. “Current HIV type 1 molecular epidemiology profile and identification of unique recombinant forms in Jakarta, Indonesia.” AIDS Res Hum Retroviruses. 2009 Jul;25(7):637-46.
- 3) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, **Motomura K.** Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. “Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins.” Virology. 2009 Sep 9. [Epub ahead of print]
- 4) 本村和嗣, 横山勝, 佐藤裕徳 “ヒトノロウイルス 2006年株”; 臨床と微生物 2009年5月号 p205-p209; 近代出版

2.学会発表

- 1) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, Hansman Grant, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 星野和彦, 蒔本恭, 秋山美穂, 木村博一, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan “ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序”, 第83回 日本感染症学会総会, 東京(2009.4)
- 2) 本村和嗣, 横山勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守宏美, 片山和彦, 田中智之, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan “2006-2008 秋冬期までに流行したノロウイルス GII/4 株のゲノム解析”, 第30回, 衛生微生物技術協議会, シンポジウム “ウイルス性下痢症”, 大阪(2009.7)
- 3) 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, 田中智之, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan “下痢症ウイルスの生き残り戦略 ノロウイルス GII/4 の変異”, 第21回 下痢症研究会, 特別企画, 東京(2009.10)
- 4) 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, 田中智之, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan “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 日本ウイルス学会総会, ワークショップ, 東京(2009.10)
- 5) Ivo N Sah Bandar, 高橋清実, 本村和嗣, 長縄 聡, 北村勝彦, 佐藤裕徳, 佐藤成大 ”Near full length sequence analysis of CRF33_01B among Indonesian patients” 第23回日本エイズ学会総会, 名古屋(2009.11)
- 6) 本村和嗣 “ウイルス感染症の実態”, 平成21年度下期協同組合中央接骨師会 学術講習会, 講演 東京(2009.12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得 | なし |
| なし | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | |

図1 日本におけるGII/4亜株の年次推移

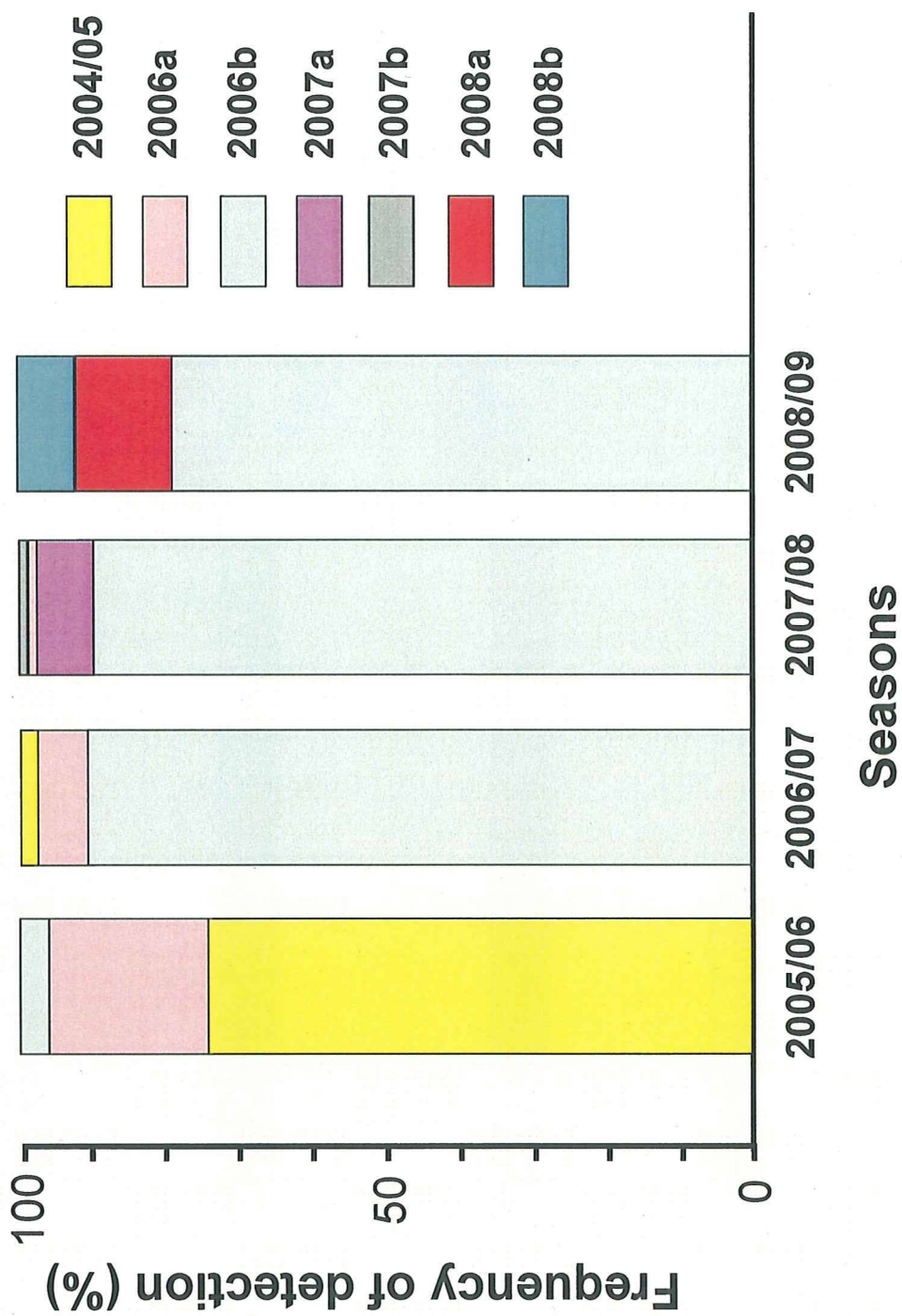
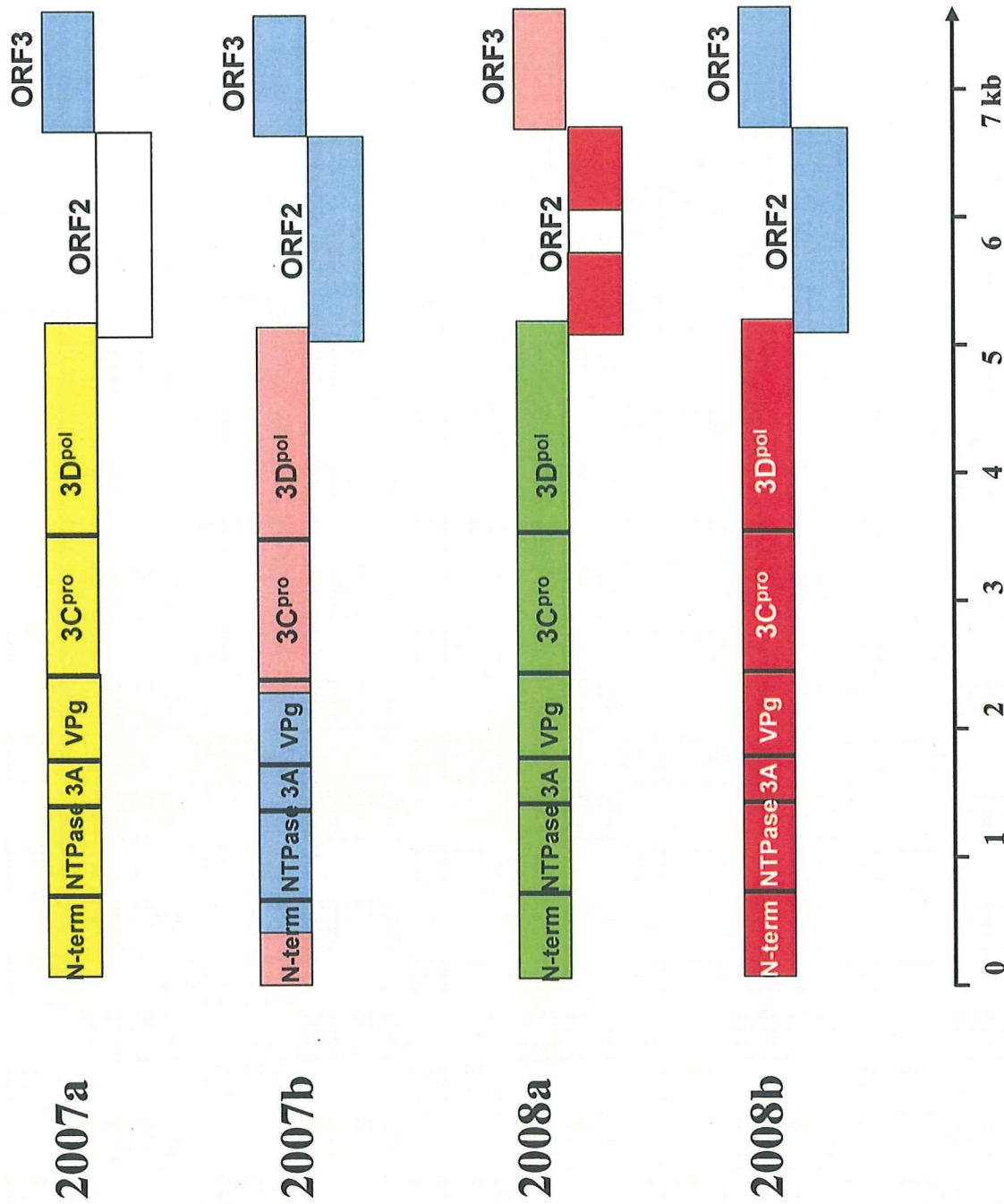
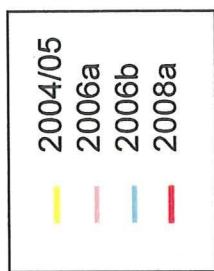


図2 GII/4亜株の遺伝子構造



平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

研究分担報告書

2004 年~2009 年に国内で流行したノロウイルス GII/4 の キャプシド蛋白質分子モデル

研究分担者

横山 勝

国立感染症研究所

病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

ウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスの流行株の変化の特徴を知るために、今年度は 2004 年~2009 年に国内で流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルを構築し、世界的に大流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質における特徴的な残基の役割を検討した。世界的に大流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質の特徴的な残基は、キャプシド蛋白質の外側表面に多く位置し、感染受容体や抗体と直接相互作用できる位置にあった。抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスであるノロウイルスの、世界で流行する遺伝子型は GII/4 が主流である。ノロウイルスの世界的な大流行は新型 GII/4 の出現と平行している。日本では 2006-07 年のシーズンに GII/4 が大流行した。このとき流行したノロウイルス GII/4 の多様性解析により、特に VP1 (キャプシド) にアミノ酸変異が蓄積されていた。このキャプシド蛋白質は感染受容体と相互作用すると考えられる。したがって、キャプシド蛋白質は感染受容体との相互作用を保つために、キャプシド蛋白質のアミノ酸変異には規則性があると考えられる。

本研究は 2004 年~2009 年に国内で流行したノロウイルス GII/4 キャプシド蛋

白質分子モデルを構築し、世界的に大流行したノロウイルス GII/4 で特徴的な残基の役割を検討することを目的として行った。

B. 研究方法

1. 分子モデルの構築

ノロウイルス GII/4 キャプシド蛋白質分子モデルは、統合計算化学システム MOE (CCG 社、カナダ) を用いて、ホモロジーモデリング法により構築した。ターゲット配列として 2004/05、2006a、2006b、2007a、2008a のそれぞれ 1 株を、鋳型として GII/4 VA387 株のキャプシド蛋白質 P ドメイン構造 (PDB code : 2OBS) を用いて、キャプシド蛋白質 P ドメイン単量体を構築した。得られた立体構造を Norwalk virus キャプシド蛋白質多量体構造 (PDB

code : 1IHM) に重ね合わせることで、キャプシド蛋白質 P ドメイン二量体分子モデルを構築した。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. GII/4 における特徴的な残基

はじめに過去 5 年間に国内で流行したノロウイルス GII/4 (2004/05、2006a、2006b、2007a、2008a) で特徴的な残基を抽出した。ここで、特徴的な残基とは、これまで流行したノロウイルス GII/4 では見られず、過去 5 年間に国内で流行したノロウイルス GII/4 のそれぞれで保存されている残基である。いずれの GII/4 でも特徴的な残基は N-term と VP1 (キャプシド) において多く見出され、VPg、3C^{pro} では少なかった。

次に世界的大流行した 2006b のキャプシド蛋白質における特徴的な残基に注目した。2006b のキャプシド蛋白質には 7 つ (L306、Y352、A356、P357、E372、H378、N412) の特徴的な残基が見出された。この 7 つの特徴的な残基の経時変化を知るために、保存されているアミノ酸の検出頻度を、2006/2007、2007/2008、および 2008/2009 シーズン間で比較した。7 つのうち 5 つ (L306、Y352、A356、E372、H378) はいずれのシーズンにおいても検出頻度はほぼ 100% であり、ほぼ保存されていた。残りの 2 つ (P357、N412) では 2006/2007 から 2007/2008、2008/2009 シーズンとなるに従い、その検出頻度を減少していた。

2. 特徴的な残基のキャプシド蛋白質での位置

過去 5 年間に国内で流行したノロウイルス GII/4 (2004/5、2006a、2006b、2007a、2008a) のキャプシド蛋白質に特徴的な残基の P ドメイン二量体構造上での配置を調べた。はじめに世界的大流行した 2006b に特徴的な残基の位置をみると、7 つの特徴的な残基のうち 6 つ (Y352、A356、P357、E372、H378、N412) はキャプシド蛋白質二量体の外側表面に位置し、1 つ (L306) は側面に位置することが明らかになった。(図 1) また、外側表面に位置する残基はフコース結合部位には見られず、離れた部位において多く見られる。(図 1)

次に、2004/05、2006a、2007a、2008a の特徴的な残基の位置をみると、特徴的な残基のうち、それぞれ 7 つ、2 つ、4 つ、5 つがキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側表面に位置することが明らかになった。(図 2) また、2004/05、2007a の D372 および 2004/05 の D357 は、2006b と保存されているアミノ酸は異なるが、その位置は 2006b と同一である。

D. 考察

世界的に大流行した 2006b のキャプシド蛋白質において、2006/2007 から 2007/2008、2008/2009 シーズンとなるに従い、P357、N412 の検出頻度は減少していた。このことから P357、N412 は抗体などの選択圧を受けていることが考えられる。P357、N412 の位置をキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体で見ると、これらの

残基はキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側のループに位置している。この位置は抗体などのアクセスが可能である位置であり、P357、N412 がシーズンとともに検出頻度が減少していることと一致する。

特徴的な残基がキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側表面に位置していた。その数は、世界的な大流行した 2006b や 2004/05 において最も多い。このことは、外側表面に位置する特徴的な残基が、抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性を示唆する。特に、2006b の P357 と E372 は、2004/05 (D357、D372) においても見られ、これらの残基が抗原性や感染受容体との結合様式の制御に中心的な役割を果たしていることが考えられる。

E. 結論

世界的な大流行した 2006b や 2004/05 において、最も多くの特徴的な残基がキャプシド蛋白質 P ドメイン二量体の外側表面に位置していることから、外側表面に位置する特徴的な残基が、抗原性や感染受容体との結合様式を調節している可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. 2009. Structural and Biological Constraints on Diversity of Regions Immediately Upstream of Cleavage Sites in Calicivirus Precursor Proteins. *Virology* 394: 119-129 (The first two authors contributed equally)

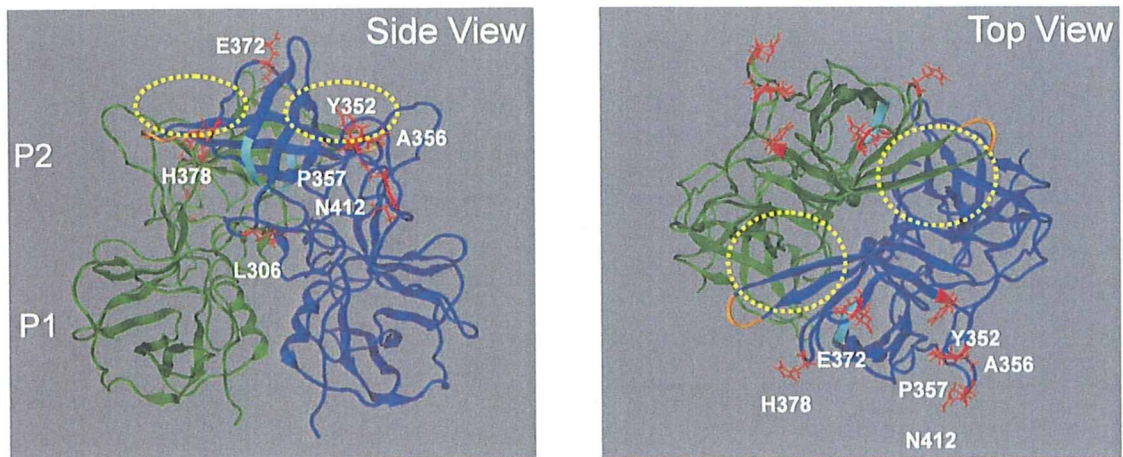
2. 学会発表

(1) 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, 東京, 2009年10月.

(5) 横山 勝、岡智一郎、片山和彦、遠矢幸伸、神田忠仁、武田直和、佐藤裕徳. マウスとヒトのノロウイルスの酵素の構造類似性. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009年10月.

G. 知的財産権の出願・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



Yellow dot circles: the fucose ring binding sites.
 Cyan: an RGD motif .
 Orange: an additional RGD-like KGD motif.

図 1. 2006b で特徴的な残基の位置とウイルスのエントリーのための機能部位の位置.

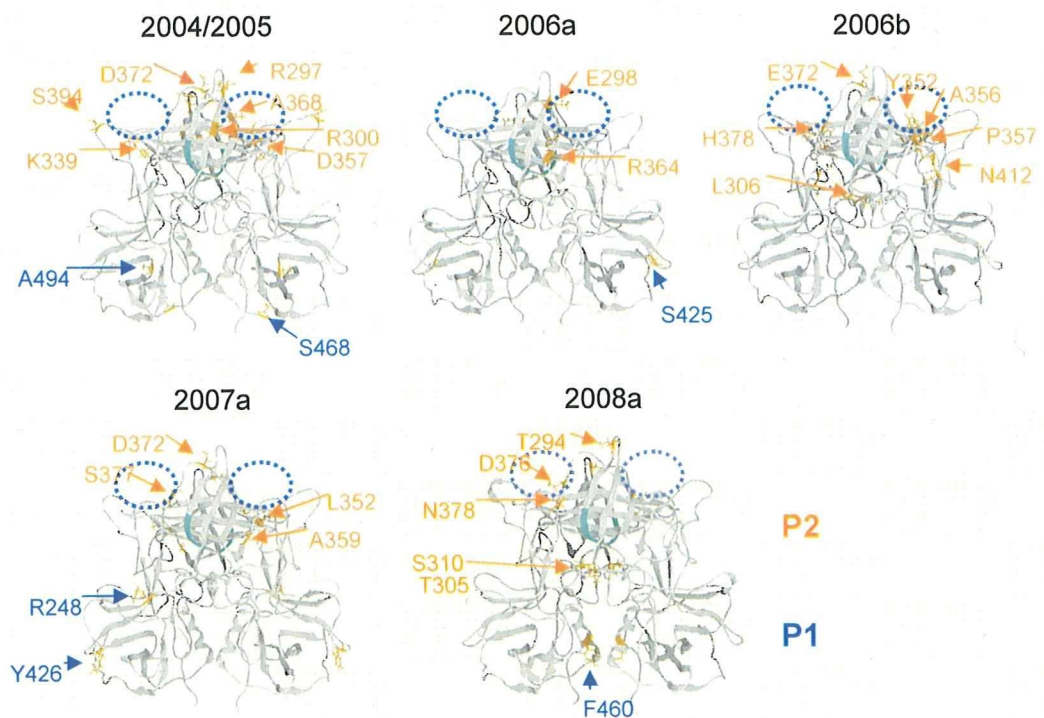


図 2. 2004 年～2009 年に国内で流行したノロウイルス GII/4 の capsid 蛋白質 P ドメイン二量体における特徴的な残基の位置.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）

食品中のウイルスの制御に関する研究

分担研究報告書

E型肝炎ウイルス遺伝子型間の安定性の比較

分担研究者 李天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には欠かせない手法である。これまでに、我々はブタから分離した遺伝子型3(G3)に属するHEV株をPLC/PRF/5細胞に接種し、HEVの増殖できるウイルス株を確立し、それを用いて3型HEVの安定性を検討した。本年度、我々は4型を培養細胞に増殖させることに成功し、4型HEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、異なる遺伝子型間の安定性を比較した。

協力研究者 劉 蘭軍（国立感染症研究所）、恒光 裕（動物衛生研究所）

A. 研究目的

E型肝炎ウイルス（Hepatitis E virus; HEV）はE型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。E型肝炎の一つの特徴は感染妊婦の死亡率が高いことで、実に20%に達するという報告もある。これまで先進国においてE型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性E型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。HEVが増殖できる培養細胞系は確立されておらず、ウイルス増殖、複製機序は未だに明らかにされず、ワクチン開発のための基盤的情報が不足しているため、HEVによる食中毒の対策を作る根拠が見いだしていない。昨年度、我々はブタから分離した遺伝子型3(G3) HEVをヒト肝癌細胞PLC/PRF/5に接種し、ウイルスの複製、増殖を経時的に培養上清中のHEV RNA、HEV抗原をRT-PCR、ELISA法にて確認し、培養出来る株を樹立した。この培養系を用いてHEVの熱に対する安定性、消毒剤や、紫外線などに対する抵抗性を検討し、ウ

イルスを不活かにする条件を検討した。今年度、我々はイノシシから分離した4型のHEVの増殖に成功し、これを用いて遺伝子間の安定性を比較した。

B. 研究方法

材料：ウイルス：G3 HEV G4 HEV；細胞：PLC/PRF/5。
方法：

一、熱安定性：培養細胞で増殖したG3およびG4 HEVを異なる温度（37℃～100℃）、異なる時間（1分から1時間まで）熱処理したあと、PLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

二、消毒剤に対する抵抗性：培養細胞にて増殖したG3およびG4 HEVを異なる濃度のNaClO（62.5ppm～1000ppm）と混合して室温30分間反応させたあと、PLC/PRF/5細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

三、紫外線に対する抵抗性：培養細胞にて増殖した G3 および G4 HEV をそれぞれ 10, 20, 30, 60, 120 分間 50uw 強度の紫外線照射したあと、PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を三、四日置きに採取した。細胞培養上清のウイルス抗原、およびウイルス遺伝子を測定し、ウイルスが増殖するかどうかによって感染性を評価した。

倫理面への配慮：本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

G3 HEV と同様、50uw 強度で 30 分間紫外線照射あるいは、125ppm 以上の濃度の消毒剤 NaClO で、30 分処理により、G4 HEV の PLC/PRF/5 細胞に対する感染性が無くなる。つまり以上の条件で HEV を不活化する可能性が示唆された。また、アルコール、クロロホルムに対する抵抗性も示した。ただし、温度の感受性に関して G3 HEV を 60°C10 分間、65°C5 分間以上の熱処理により失活することに対して、G4 HEV を失活させるには 60°C15 分間、65°C10 分間以上の熱処理が必要である。

D. 考察

現在、HEV には少なくとも四つの遺伝子型が存在している。遺伝子型によってウイルスの安定性が異なることから、HEV の不活化条件を検討するときに遺伝子型を考慮する必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

1) 李 天成、宮村 達男 武田 直和、脇田 隆字。培養細胞を用いた E 型肝炎ウイルスの安定性の検討。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

2) 李 天成、片野 晴隆、片岡 紀代、中村 智之、永田 典代、宮村 達男、佐多徹 太郎、脇田 隆字、鈴木 哲朗。メルケル細胞ポリオマウイルス (MCV) 様粒子の作製およびその

応用。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

3) 落合 晋、石古 博昭、李天成。イムノクロマト法による抗 Hpatitis E virus 抗体の測定。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

4) 山本 博、松田淳志、李 天成、鈴木樹理、田貴文、武田直和。サルにおける E 型肝炎ウイルスの感染。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

5) 三好 龍也、内野清子、李天成 武田直和 北本憲利、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。日本ウイルス学会、第 57 回学術集会 2009 年 10 月 東京

2. 論文発表

1. OYamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12986-91.

2. OSugitani 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. 2009 Apr;24(4):599-604.

3. OSugitani M, Sheikh A, Suzuki K, Kinukawa N, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li TC,

Takeda N, Ishaque SM, Roy PK, Raihan AS, Hasan M. Sero-epidemiology of sporadic acute hepatitis in Bangladesh: high prevalences of infection with type-B, type-E and multiple types of hepatitis virus. Ann Trop Med Parasitol. 2009 Jun;103(4):343-50.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「食品中のウイルスの制御に関する研究」

研究分担報告書

サポウイルス抗原検出法開発を目指したウイルス様中空粒子の作成

研究分担者 岡 智一郎 国立感染症研究所 ウイルス第2部

研究要旨

サポウイルス (Sapovirus; SaV) はヒト感染性胃腸炎の原因ウイルスとして公衆衛生上重要なウイルスである。SaV は構造遺伝子コード領域の塩基配列に基づき、少なくとも5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV) に、さらにGIおよびGIIは複数の genotype に分類される。我々はこれまでにウイルス様中空粒子 (virus-like particles; VLPs) を用いて、異なる genogroup に属する株間、さらにGIの異なる genotype に属する株間の抗原性が異なることを明らかにしてきた。本研究では、SaV の抗原性をより詳細に検討するため、GII の異なる genotype に属する SaV 株の VLPs を発現させ、これらの抗原性が異なることを明らかにした。

A. 研究目的

サポウイルス (Sapovirus; SaV) はヒトおよびブタに急性胃腸炎を引き起こす。SaV は構造遺伝子領域の塩基配列に基づき、現時点で少なくとも5つの genogroup (GI, GII, GIII, GIV, GV) に、さらにGIは5つの genotype (GI/1, 2, 3, 4, 5) に、GIIは6つの genotype (GII/1, 2, 3, 4, 5, 6) に分類される (Hansman et al., Reviews in Medical Virology 17, 133-141, 2007)。近年、遺伝的に極めて多様な SaV を高精度に検出可能な核酸検出系が確立され、臨床検体からの SaV 検出に効果を発揮している。SaV と同様、ヒトに急性胃腸炎を引き起こすノロウイルス (Norovirus; NoV) についても、核酸検出系が広く利用されているが、より迅速で安価な検

出が可能な抗原検出系も開発されている。NoV 抗原検出系の開発は、異なる genogroup, genotype に属する NoV 株の virus-like particles (VLPs) の網羅的作成、それらに対するポリクローナル、モノクローナル抗体の確立によって達成された。

ヒト由来の SaV (GI, GII, GIV, GV) も、ヒト由来の NoV と同様、培養細胞や実験動物を用いたウイルス増殖系が確立されていないが、研究分担者が所属する研究室では昆虫細胞発現系を用いてこれまでに6株 (GI/1 Mc114 株、GI/5 Yokote1 株、GII/3 Syd53 株、GIV Syd3 株、GIV SW278 株、GV NK24 株) の VLPs の大量発現に成功しており、このうち5株の VLPs を用い、異なる genogroup (GI, GII, GIV, GV) に属する株間では抗原性が異なること、さら

に、同じ genogroup 内でも異なる genotype に属する株間 (GI/1 と GI/5) では抗原性が異なることを明らかにしてきた (Hansman et al., *Emerging Infectious Diseases* 13 (10), 1519-1525, 2007)。しかしながら、G II については 1 株の VLP 大量発現に成功したのみであり、GII 内の異なる genotype に属する株間での抗原性の評価が実施できなかった。これまでに研究分担者らは昆虫細胞発現系で VLP 作成が困難であった GII/2 Mc10 株について、哺乳動物細胞を用いて VLPs を発現可能であることを報告した (Oka et al. *Archives of Virology* 151 (2), 399-404, 2006.)。

そこで本研究では哺乳動物培養細胞を用いて G II 内の異なる genotype に属する Mc10 株および C12 株の VLPs の大量発現、精製、および特異抗血清の作成を試み、これら 2 株の VLPs の抗原性の差異を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. サボウイルス VLPs 発現用プラスミドの作製

サボウイルス (Sapovirus; SaV) GII/2 Mc10 株 (Genbank accession No. AY237420) もしくは GII/3 C12 株 (Genbank accession No. AY603425) の cDNA を鋳型として、SaV 構造遺伝子の開始コドンからゲノム末端までの領域約 2.3kb を、5'側に制限酵素認識配列と T7 promoter 配列および開始コドン直前に 3塩基の非翻訳配列を付加したセンスプライマーと、3'側にポリ A 配列と制限酵素認識配列を付加したアンチセンスプライマーを用いて PCR 法

によって増幅し、PCR 増幅断片を制限酵素処理後、クローニングベクター pUC19 (Toyobo) に挿入し、大腸菌 DH5 α (Toyobo) に導入した。作製した plasmid は DNA シークエンスにより、目的通りの塩基配列を有することを確認した。

2. 哺乳動物培養細胞でのサボウイルス VLPs の発現

6 ウェルプレートにサブコンフルエントとなるように培養した COS7 細胞 (サル由来: 理化学研究所細胞銀行より購入) を Phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) で 2 回洗浄し、各ウェルに multiplicity of infection (MOI) 1.0 に相当する T7 RNA Polymerase 遺伝子を保有する組み換えワクチニアウイルス (Dr. B. Moss より分与) を添加後、37°C、1 時間保持した。その後、組み換えワクチニアウイルスを含む無血清培地 OPTI-MEM (Invitrogen) を除去し、培地を加え、Effectene Transfection Reagent (QIAGEN 社) を用い、各ウェルに SaV VLPs 発現 plasmid を 1 μ g ずつトランスフェクトし、37°C で 48 時間培養した。その後、培養上清を除去し、各ウェルに 300 μ l ずつ OPTI-MEM を加え、セルスクレーパーで細胞を剥がした。回収した細胞は -80°C と室温での凍結融解を 3 回繰り返して細胞を破壊したのち、4°C で 2300 \times g、5 分間、遠心し、細胞破砕物を沈殿させた。その後、VLPs を回収するため、Beckman Coulter 社の Sw32-Ti ローターにセットし、10°C で 31,000rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに 500 μ l の OPTI-MEM を加え、4°C で 1 晩静置した。その後、4°C で 2300 \times g、5

分間、遠心し沈殿残渣を除去し、上清を 5～30% (wt/vol) のスクロースのグラディエント溶液に重層、Beckman Coulter 社の Sw41 ローターにセットし、10°C で 25,000rpm、2.5 時間超遠心を行った。その後、遠心チューブ内の溶液を約 500 μ l づつ、24 のフラクションに分画し、Beckman Coulter 社の TLA55 ローターにセットし、4°C で 45,000rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに 20 μ l の PBS を加え、4°C で 1 晩静置した。各分画 1 μ l を用いて SDS-PAGE /クマシー染色を行い、構造タンパク質の存在する分画をプールした。このプール分画 1 μ l を用いて電子顕微鏡観察を行い、VLP の存在および形態を確認した。

3. 精製 VLPs に対する抗体の作製

SaV GII/2 Mc10 株 VLPs および GII/3 C12 株 VLPs に対する抗血清を調製するため、ウサギ 1 羽およびモルモット 1 匹につき、それぞれ精製した各 VLPs 10 μ g を含む PBS 溶液 (500 μ l) と等量の完全アジュバンドの混合液を皮下投与した。1 か月後、4°C に保存しておいた VLPs 10 μ g を含む PBS 溶液 (200 μ l) をウサギは静脈内に、モルモットは皮下にそれぞれ投与し、2 週間後、採血を行い、SaV GII/2 Mc10 株 VLPs および GII/3 C12 株 VLPs に対する抗血清を得た。ウサギへの免疫および採血は株式会社ケアリーで、モルモットへの免疫および採血は有限会社ジャパンラムにて行った。得られた抗血清の力価は精製した GII/2 Mc10 VLPs もしくは GII/3 C12 株 VLPs を 50ng/ウェルづつ固相した 96 ウェルプレートを用

いて、段階希釈した抗血清を添加、その後、酵素標識抗ウサギ抗体、もしくは酵素標識抗モルモット抗体を用いた ELSIA 法 (Hansman et al., Emerging Infectious Diseases 13 (10), 1519-1525, 2007) によって検出した。免疫前ウサギ/モルモット抗血清の OD 値 (492nm) \pm 3SD をカットオフとして、それ以上の OD 値を示した免疫後抗血清の希釈倍率を力価と定義した。

4. VLPs の抗原性の評価

SaV GII/2 Mc10 株と GII/3 C12 株の VLPs の抗原性を評価するため、抗原 ELISA を行った。PBS で 4,000 倍希釈した抗 SaV GII /2 Mc10、GII /3 C12 VLPs ウサギ抗血清を 96 ウェルプレート (Thermo Immulon[®] Microtiter[®] Plates: Daigger Lab Equipment&Supplies 社) 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ添加し 4°C で一晩静置した。その後、抗体溶液を除去し、5% スキムミルク PBS 溶液を 1 ウェルあたり 200 μ l ずつ滴下し 4°C で一晩静置した。その後、PBS-0.05% Tween20 (PBS-T) でウェルを洗浄し、VLPs 溶液 100 μ l (100ng 相当) を加え、室温で 3 時間静置して抗原を一次抗体に捕捉させた後、各ウェルを洗浄し、二次抗体として PBS-T で 16,000 倍希釈した抗 SaV GII /2 Mc10 VLPs モルモット抗体 もしくは SaV GII /3 C12 VLPs モルモット抗体を 1 ウェルあたり 100 μ l ずつ添加し、37°C の CO₂ インキュベーターで 1 時間インキュベートした。その後、各ウェルを洗