

- たノロウイルス食中毒事例の解析.
第 58 回日本ウイルス学会学術集
会、2010 年 11 月 7 日～9 日、徳島
- (8) 高木弘隆、北島正章、遠矢幸伸、
岡智一郎、片山浩之、片山和彦、
杉山和良. マウスノロウイルス
(MNV) のマウス由来培養細胞での
増殖性についての検討. 第 58 回
日本ウイルス学会学術集会、2010
年 11 月 7 日～9 日、徳島
- (9) 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、
片山和彦. 「熊本県における感染
性胃腸炎の起因病原体調査とサポ
ウイルス genogroup の年次変化」.
第 58 回日本ウイルス学会学術集
会、2010 年 11 月 7 日～9 日、徳島
- (10) 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、
片山和彦、田中智之、野田衛. 食
品検体のノロウイルス検査のため
のパンソルビン・トラップ法の開
発と拡大適用. 第 58 回日本ウイ
ルス学会学術集会、2010 年 11 月 7
日～9 日、徳島
- (11) 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、
松田幹、片山和彦. ノロウイルス
のヒト腸管由来細胞への結合様式
の解析. 第 58 回日本ウイルス学
会学術集会、2010 年 11 月 7 日～9
日、徳島
- (12) 北島正章、岡智一郎、原本英司、
武田直和、片山和彦、片山浩之. 国
内の下水および河川水からの
GenogroupIV ノロウイルスの検出
および遺伝子解析. 第 58 回日本
ウイルス学会学術集会、2010 年 11
月 7 日～9 日、徳島
- (13) 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、
村上耕介、脇田隆字、片山和彦. ネ
コカリシウイルスの新規リバー
ジェネティクス系の構築. 第 58
回日本ウイルス学会学術集会、
2010 年 11 月 7 日～9 日、徳島
- (14) 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、
灘野大太、宇理須厚雄、岡智一郎、
片山和彦、松田幹「母乳に含まれ
るヒトノロウイルス感染抑制因子
の探索」日本農芸化学会中部支部
第 159 回例会 2010 年 10 月 30 日
名古屋
- (15) Kitajima M, Oka T, Haramoto E,
Takeda N, Katayama K, Katayama H.
Genetic diversity of human
noroviruses and sapoviruses in
river water, Japan. Fourth
International Conference on
Caliciviruses. October 16-19,

- 2010, Santa Cruz, Chile
- (16) Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. Structural Insight into Substrate Recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like Protease. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (17) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (18) Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K. Analysis of Mechanism of Human Norovirus Binding to Caco-2 Cells. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
- (19) Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development Fourth International Conference on Caliciviruses. State-of-the Art October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile.
- (20) Hnasman, G.S. Chen, L. Georgeiv, I. McLellan, J.S. Katayama, K. Kwong, P.D. Crystal Structures of a rare Norovirus P-Domain in Complex with Histo-Blood Group Antigens. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
- (21) Sharp, T.M., GUIX, S., Katayama, K., Crawford, S.E., Estes, M.K. Inhibition of Cellular Protein Secretion by Norwalk Virus Nonstructural Protein P22 requires a Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export Signal. 4th International Conference on Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct 16-19, 2010.
- 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。

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）
研究分担報告書

標準的ウイルス分離法を用いたノロウイルス分離の試み

研究分担者 田中 智之（堺市衛生研究所）
研究協力者 中村 雅子（福井県衛生環境研究センター）
内野 清子（堺市衛生研究所）

研究要旨 ノロウイルスの分離培養を目的に、11種の株化細胞、保存状態の違った便検体、感染ノロウイルス量、トリプシン処理の必要性、6代までの blind passage 等について検討した。その結果、いずれの検討においてもノロウイルスの細胞内増殖は認められなかった。分離できなかった要因の詳細な解析により、ノロウイルス分離のさらなる検討が求められている。

A: 研究目的:

ノロウイルスは急性胃腸炎の主たる原因ウイルスである。秋季下旬から初春にかけて流行が見られ、感染力の強さ、環境におけるウイルスの安定性から罹患患者数は他の病原性微生物に比べ突出している。ノロウイルスの細胞培養は現時点では出来ていない。従ってワクチンによるノロウイルス感染症予防には至っていない。消毒剤の選択も不可能である。基本的なウイルス感染予防に基づいた手指消毒や食材の加熱処理などがノロウイルス感染予防の選択肢である。ノロウイルス感染症予防を目的とした細胞培養によるノロウイルス分離を試みた。

B: 研究方法

1) 糞便材料

材料は 2009/10 シーズンのノロウイルス (NV) GII/4 陽性糞便、T2: 2010年2月15日採取 (5.98×10⁴ copy/well)、T7:

2010年2月16日採取 (7.10×10⁷ copy/well) を用いた。さらに 2010/2011 シーズンに採取された比較的新鮮な材料、Mi (3.9×10⁶ copy/グラム), To (GII.4 3.2×10⁵ copy/グラム) を用いた。Mi は NV GI.2 および GII.13 が混合した検体である。

2) 糞便材料の調製

① 糞便 10g に MilliQ100mL を加え 10% 乳剤とし、3,000rpm、10分間および 8,500rpm、30分間粗遠心した後、その上清を 36,000rpm、2時間 (4℃) 超遠心した。Mi, To については 10,000rpm で沈渣後、上清を 36,000rpm、60分遠心した。沈渣を PBS(-) 約 2mL に suspend し、1.2μ, (0.6μ), 0.45μ の Millipore filter を用いてろ過した。
② ①で得られた NV T2 および T7 濃縮サンプル 300μL にアセチルトリプシン (SIGMA 社) 20μg/ml of PBS(-) を等量加え、37℃、30分インキュベートした。(対照には PBS(-) を等量加えた。) Mi, To につ

いては酵素処理は行わなかった。

③ ②のサンプルについて、リアルタイム RT-PCR にて NV の遺伝子量を確認した。

④ PBS(-)で②の希釈系列 (10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5) を作成し、接種材料とした。

2) 使用細胞

T2およびT7にはCaco-2細胞を用いた。6well プレートに上記④を各 300 μ L 接種し、37°C、5.0%CO₂ で培養を行なった。維持培地にはイーグル MEM (ニッスイ) にアセチルトリプシン 2 μ g/mL 加えたものを用いた。

T2: 各 well に維持培地 3mL 入れておいたところに、サンプルを 300 μ L 接種した。

T7: サンプル 300 μ L 接種し、37°C 40 分吸着後、サンプルを取り除き維持培地を 3mL 加えた。2~3 日後に維持培地を交換し (T7 のみ)、1 週間観察した。1 週間後に上清およびかきとった細胞を回収し、-80°C で凍結・融解を 4~5 回繰り返し、5,000rpm、5 分遠心した上清を継代した。また、この上清から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR にて遺伝子量を確認した。この操作は 6 代まで継代した。

一方、Mi および To 検体には CFRK 細胞を用いた。検体接種 4 日後に凍結・融解し細胞粉砕後、10,000rpm 遠心上清を再接種した。この操作を 4 代継代培養した。

3) RNA 抽出は EZ1 Virus Mini kit v2.0 (QIAGEN) を用い、検体 200 μ L から 60 μ L の抽出液を得た。RT 反応は SuperScript III (invitrogen) を用いた。リアルタイム RT-PCR は QuantiTect Probe PCR (QIAGEN) を用い、定法どおりに行なった。

(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

いずれの方法においても、観察期間中に細胞変性効果 (CPE, Cytopathic effect) は観察できなかった。培養上清中のウイルス遺伝子量は速やかに減少した。時間的経緯の結果を表 1a, 1b に示す。一方、To 検体は、ウイルス接種後速やかにノロウイルス遺伝子の減少がみられた。凍結・融解し粉砕後再接種した。4 代まで同様の操作を行い Blind passage したが、CPE は観察出来なかった。また、ウイルス遺伝子量は減少の一途であった。

D: 考察

これまで色々な株化された 13 種類の細胞を用いてノロウイルスの分離を試みてきた。さらにノロウイルスの濃度、トリプシン処理の有効性などについても検討した。感染成立有無の一つの指標として、もし、細胞変性効果 (CPE) が見られれば、ノロウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法を視野に置いて、培養液中のノロウイルス遺伝子量および感染を試みた細胞粉砕による遺伝子量をそリアルタイム RT-PCR 法で測定した。しかし、CPE の発現も認められず培養液中のノロウイルス遺伝子量の増加の証は見られなかった。むしろ遺伝子量の啓示的測定では 4 poi では 2~3log の減少が見られた。また、6 代の Blind passage においては検出されなくなった。著者はノロウイルス感染ヒトから経時的に採取された空腸組織を用い

てノロウイルス特異的抗体免疫組織学的染色を行い、lamina propria で macrophage あるいは dendritic cell と思われる細胞で陽性所見を得た。この結果から Estes らは macrophage 系あるいは dendritic 系培養細胞を用いてノロウイルスの分離を積極的に試みたが陽性所見は得られなかった(J. Virol)。

一般的にウイルス分離にはウイルス・細胞双方のレセプターの一致をみななければいけないが、今年度の実験結果は、第一にノロウイルスのレセプターを正確に認識できる細胞を見つけることが出来なかったことを意味する。また第二には我々が感染に用いた材料のノロウイルス量はリアルタイム RT-PCR でウイルス遺伝子量を測定しており、摂取材料の中に感染性のあるウイルス粒子の有無が確認出来ていなかったことによる陰性結果として推察された。

Live なウイルス粒子を確認してからの感染実験が次の課題と思われる。また、新鮮な材料を求めるか否かの検討では、frozen samples では遺伝子量の劣化は早いと思われるが、前述のように live ウイルス粒子の存在の有無の確認で結論が得られると考える。次年度は感染実験の最も基礎である infectious viral particles の確認から再チャレンジを行う予定である。

E: 結語

色々な株化細胞を用いた普遍的なノロウイルス分離の試みは不成功であった。使用する株化細胞、接種検体の処理方法等を含めた培養条件の再検討が求められた。

F: 健康危機情報
なし

G: 研究発表

1. 論文発表

(1) Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hirotaka Ode, Hiromi Nakamura, Hiromi Moril, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Sat1*, and the Norovirus Surveillance Group of Japan
Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. J. Virol, 2010.

(2) Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko 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 Outbreak at a Wedding Hall. J. Med. Virol. 2010, 82:720-726

(3) 田中智之. 院内感染予防におけるノロウイルス迅速診断法の活用
感染対策 ICT ジャーナル. 2010. 5(4), 427-433

(4) 田中智之. ノロウイルス食中毒.
食品微生物学辞典. 中央法規出版株式会社. P188-189, 2010年4月1日

発行

2. 学会発表
なし

H: 知的財産の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1a. 実験 No. 1 (T2 を使用)

細胞観察		F1	F2	F3	F4	F5	F6
原液		inh +++	inh -'	-	-	-	-
トリプシン+	×10	-	-	-	-	-	-
	×100	-	-	-	-	-	-
原液		inh +++	inh -'	-	-	-	-
対照 (PBS+)	×10	-	-	-	-	-	-
	×100	-	-	-	-	-	-

単位: copy/well

リアルタイムRT-PCR		F1	F2	F3	F4	F5	F6	
原液		1.83E+05	9.60E+03	5.35E+02	3.45E+00	9.96E+00	(-)	①
トリプシン+	×10	2.18E+04	1.1E+03	4.93E+01	1.13E+01	(-)	(-)	②
	×100	1.40E+03	1.18E+02	2.0E+00	(-)	(-)	(-)	③
原液		1.94E+05	1.31E+04	6.16E+02	1.85E+01	(-)	(-)	④
対照 (PBS+)	×10	1.87E+04	1.43E+03	3.32E+01	(-)	(-)	(-)	⑤
	×100	1.46E+03	8.71E+01	3.15E+00	(-)	(-)	(-)	⑥

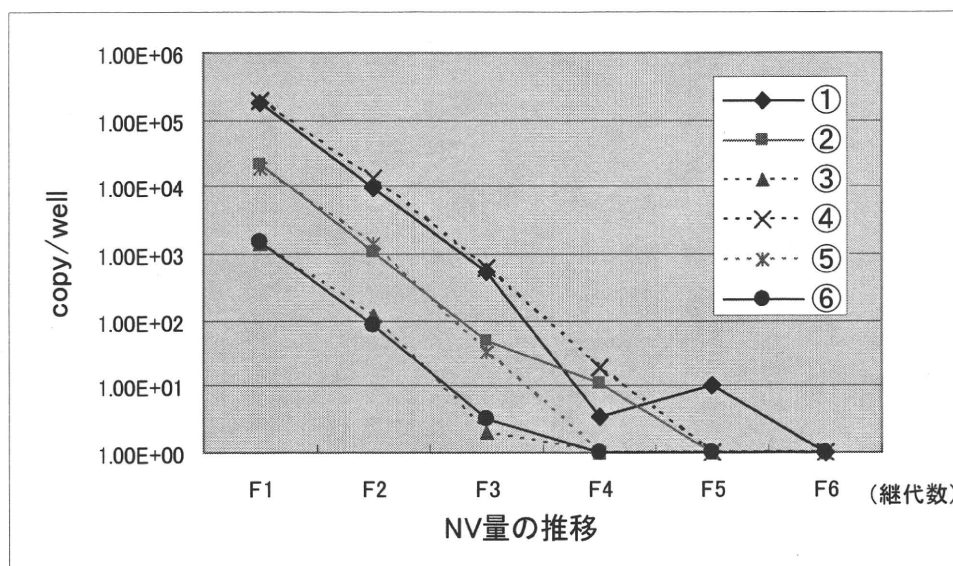
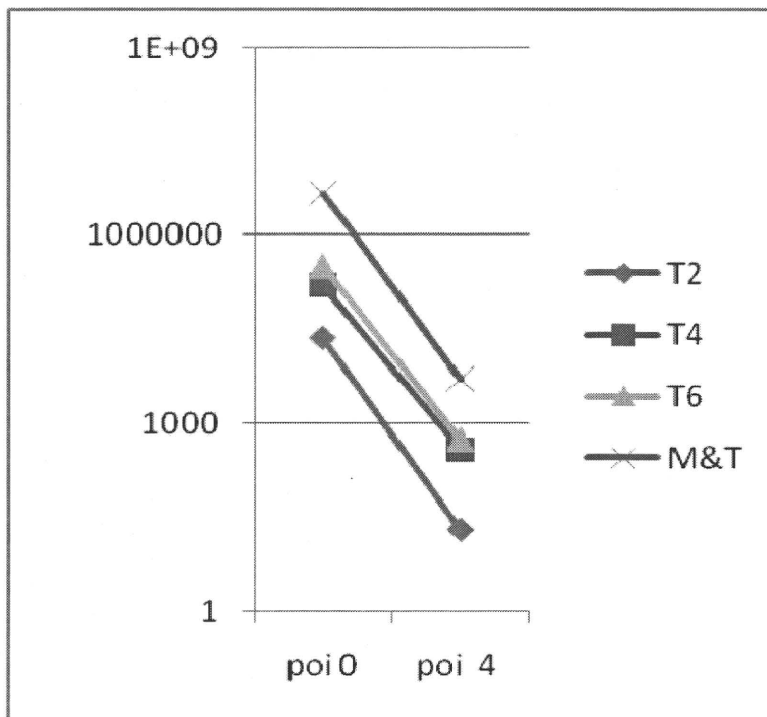


表 1b. 実験 No. 2 (T7 を使用)

細胞観察		F1	F2	F3	F4	F5	F6
トリプシン+	原液	—	—	—	—	—	—
	×10	—	—	—	—	—	—
	×10 ²	—	—	—	—	—	—
	×10 ³	—	—	—	—	—	—
	×10 ⁴	—	—	—	—	—	—
	×10 ⁵	—	—	—	—	—	—
対照(PBS+)	原液	—	—	—	—	—	—
	×10	—	—	—	—	—	—
	×10 ²	—	—	—	—	—	—
	×10 ³	—	—	—	—	—	—
	×10 ⁴	—	—	—	—	—	—
	×10 ⁵	—	—	—	—	—	—

表 2 ノロウイルス接種後 4 日目の培養上清中のノロウイルス遺伝子量
(4 継代培養においても CPE は見られていない)



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）
研究分担報告書

ノロウイルス感染症における宿主応答と周期的流行機序の解明

研究分担者 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 本研究は、ヒト集団内でのノロウイルス周期的流行の解明を目的とし、ノロウイルス中空粒子を抗原に用いて、感染者糞便試料中にある、過去に流行したノロウイルス GII/4 亜株に対する特異的 IgA 抗体について解析する。今年度は、カイコ蛋白質発現系を用いて、GII/4 2006a 亜株、2006b 亜株の中空粒子作製を試みた。(1) カイコ蛹磨砕液で、1.322g/ml~1.329g/ml に相当する分画に白いバンドが見られた。(2) 2006a 亜株、2006b 亜株共に、電子顕微鏡所見で、径 38-42nm の均一なドーナツ状の粒子が得られた。(3) 一部、径 32-35nm の感染性粒子に近い構造をもつ粒子が認められた。

A. 研究目的

ノロウイルスのなかで、Group II の中の 4 型（以下 GII/4）株は、感染性胃腸炎の世界的な流行をおこすウイルスとして注目されている。1990 年代後半以降、少なくとも 4 回（1995/96、2002/03、2004/05、2006/07）、世界的な大流行をきたしたことが知られている。これらの流行では、例外無く新型 GII/4 株が出現していた。直近では、2006/7 秋冬期に新型 GII/4 亜株（2006a 亜株、2006b 亜株）が流行し、日本を含めた世界の感染性胃腸炎の個別事例と集団発生事例が激増した。我々は、ノロウイルス周期的流行の解明には、宿主側の要因探索（ヒト集団免疫）とウイルス側の要因探索（進化、変異、構造解析）が必要であると考えている。ノロウイルス中空粒子を作製し、感染者糞便試料中にある、過去に流行したノロウイルス株に対する免疫の動態について解析したい。

B. 研究方法

1) バキュロウイルスベクター構築

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 11000xg、20 分間遠心の後、その上清を RNA 抽出液とした。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 を鋳型にして、GII/4 特異的プライマーを用いて NoV ゲノム cDNA 断片 1 種（約 2.5kb）を PCR 増幅した。この遺伝子増幅産物とバキュロウイルスベクターを連結させ、組換え DNA 分子を作製した。

2) カイコ幼虫、蛹へ感染

カイコ幼虫、蛹へ感染実験は、片倉工業株式会社へ委託した。

3) ノロウイルス中空粒子精製

30% スクロース液にカイコ幼虫体液、蛹磨砕液を重層させ、26000xg、3 時間の超遠心後、沈降画分を得た。EX-CELL 405 培養液で溶解後、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法を用いて、12 分離画分を得た。その中で、白いバンドが見られた分画を抽出した。この分画のうち 20 μ l を、電子顕微鏡を用いて、酢酸ウラン染色、50000 倍の条件下で観察した。

(倫理面からの配慮について)
なし

C. 研究結果

初年度、我々は、2006/07 秋冬季に世界で流行した、2006a 亜株と 2006b 亜株で、カイク蛋白質発現系による中空粒子を試みた。2006a 亜株、2006b 亜株共に、(1) カイク蛋白質発現系による分画泳動の結果、カイク蛹磨砕液で、分画 4-7 のところに 55-60KDa のバンドが見られた。分画 4-7 の密度は 1.322g/ml~1.329g/ml に相当していた。一方で、カイク幼虫体液の方では、VP1 蛋白質に相当するバンドは検出されなかった。(2) 電子顕微鏡所見で、径 38-42nm の均一なドーナツ状の粒子が得られた。2006a 亜株が 2006b 亜株より多く粒子が認められた (図)。(3) 一部、径 32-35nm の感染性粒子に近い構造をもつ粒子が認められた (図)。

D. 考察

初年度は、カイク蛋白質発現系を用いて、2006a 亜株と 2006b 亜株の中空粒子を作成した。

カイク蛋白質発現系-カイク蛹-を用いて精製された中空粒子は、既存の方法より、サイズの均一性、量ともに優れていた。幼虫と蛹では、蛋白質発現パターンが異なるため、蛹で優位に発現している因子が、中空粒子構築に寄与している可能性が示唆される。

電子顕微鏡所見では、38-42nm と実際の感染性粒子より大きく、キャプシド蛋白質の最外郭部周辺の構造が正確に反映されていない可能性がある。ノロウイルス感染時の免疫動態について、いくつか報告されているが未だ結論が出ていない。(1) 未だ、ノロウイルスの細胞増殖系が開発されていないため、中和抗体活性の測定がで

き、または、(2) 抗原である中空粒子の純度が低いことが考えられる。よって、正確な免疫動態を理解するためには、感染性粒子を反映する中空粒子を用いる必要がある。

次年度以降は、感染者の糞便試料中にある特異的 IgA 抗体を正確に検出するために、感染性粒子を反映する中空粒子の作成に取り組む。ウイルス RNA や蛋白質の有無で形態の変化がおきるかどうか検討する。また、分画の違いで、分別できるか検討する。作成できれば、中空粒子の特性について解析したい。

E. 結論

ヒト社会では、特に直近に流行したノロウイルス変異株に対する集団免疫が形成されている可能性が高い。キャプシド P2 領域に多数の変異をもち、抗原性が大きく変化したウイルスが出現すれば、ヒト社会の中で感染が広がり易いと考えられる。さらに、血清疫学的手法などの解析アプローチにより、ノロウイルスの周期的流行のしくみについて理解を深めたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H, and the Norovirus Surveillance Group of Japan "Divergent Evolution of Norovirus GII/4 By Genome recombination over 2006-2009 in Japan" Journal of Virology;84(16):8085-97 ; 2010 Aug.

2). Ivo N. SahBandar, Kiyomi Takahashi, Kazushi Motomura,

Zubairi Djoerban, Iman Firmansyah, Katsuhiko Kitamura, Hironori Sato, Herdiman T. Pohan, Shigehiro Sato "The Indonesian Variants of CRF33_01B: Near-Full Length Sequence Analysis" AIDS Res Hum Retroviruses. ;27(1): 97-102 ; 2011 Jan

3). 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、氏家誠、小渕正次、小田切孝人、本村和嗣、佐藤彩、横山勝、柗元巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、田代真人 "2009/10 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析" 病原微生物検出情報月報 Vol. 31 p. 253-260: 2010年9月号

4). 田村務、田澤崇、渡邊香奈子、渡部香、昆美也子、三好龍也、内野清子、吉田永祥、松尾光子、西口智子、田中智之、北元憲利、本村和嗣、佐藤裕徳 "ノロウイルス GII/4 の2008a 亜株の動向とイムノクロマト法の改良" 病原微生物検出情報月報 Vol. 31 p. 316-317: 2010年11月号

2. 学会発表

1). 本村和嗣、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group of Japan "ノロウイルス GII/4 の生き残り戦略", 第84回 日本感染症学会総会、ワークショップ、京都 2010年4月5-6日

2). 本村和嗣 "ノロウイルスのゲノム組換えと抗原性変異", 第20回 国立感染症研究所シンポジウム、シンポジウム、東京 2010年5月21日

3). 本村和嗣 "ノロウイルスのゲノム解析", 第1回新興・再興感染症拠点ゲノムセミナー、講演、仙台 2010年5月31日

4). 田中智之、本村和嗣 "ノロウイルス", 第51回 日本臨床ウイルス学会、シンポジウム、香川 2010年6月19-20日

5). Motomura, K. Yokoyama, M. Ode, H. Oka, T. Katayama, K. Noda, M. Tanaka, T. Sato, H. Norovirus Surveillance Group of Japan. "EVOLUTION OF NOROVIRUS GII/4 IN JAPAN BY GENOME RECOMBINATION" Fourth International Calicivirus Conference, Santa Cruz, Chili., Oct. 19 - 22, 2010

6). Tanaka T., Moromura K., Uchino K., Yoshida H., Miyoshi T., Matsuo M., Sato H., "Genetic characteristics of double infection of Noroviruses not related to oyster consumption" Fourth International Calicivirus Conference, Santa Cruz, Chili., Oct. 19 - 22, 2010

7). 本村和嗣 "ゲノミクスと計算科学の手法に基づくノロウイルス進化の研究", 第58回 日本ウイルス学会シンポジウム、徳島 2010年11月7-9日

8). 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、江島美穂、金南希、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、網康至、須崎百合子、小口晃央、山崎秀司、藤田信之、小渕正次、氏家誠、田代真人、小田切孝人、全国地方衛生研究所 "2009/10 シーズンのインフルエンザ流行株と平成22年度のワクチン株" 第58回 日本ウイルス学会 徳島 2010年11

月 7-9 日

9). 高下恵美、江島美穂、藤崎誠一郎、金南希、岸田典子、徐紅、菅原裕美、伊東玲子、土井輝子、本村和嗣、佐藤彩、佐藤裕徳、氏家誠、小淵正次、田代真人、小田切孝人

全国地方衛生研究所 “2009/10 シーズンにおける抗インフルエンザ薬剤耐性 pandemic A/H1N1 株の検出と新規薬剤ペラミビルに対する交叉耐性” 第 58 回 日本ウイルス学術集会 徳島 2010 年 11 月 7-9 日

10). 田中智之、本村和嗣、内野清子、三好達也、松尾光子、西口智子、佐藤浩徳、吉田永祥“食中毒事例におけるノロウイルス

ス重感染

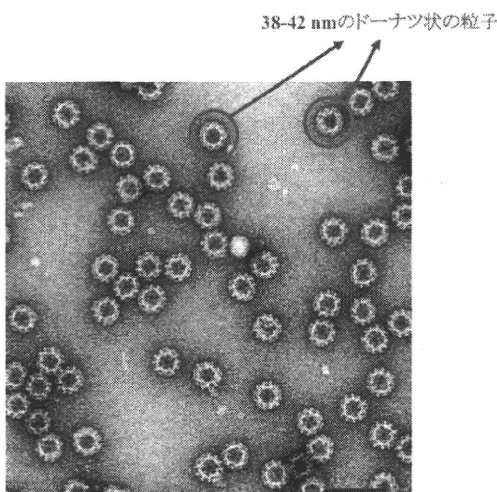
のウイルス遺伝子学的解析” 第 31 回日本食品微生物学会学術集会 2010 年 11 月 11-12

H. 知的財産権の出願・登録状況

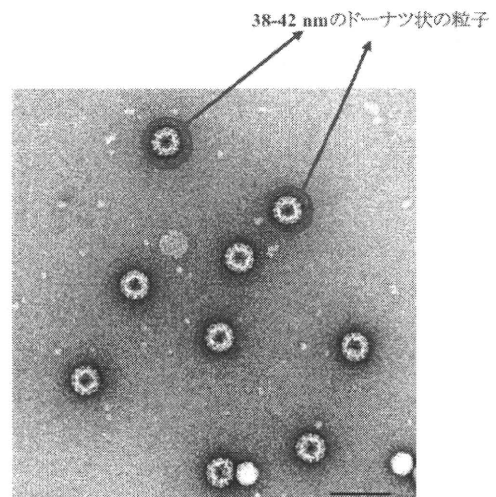
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

GII/4 中空粒子 電顕写真

GII/4_2006a 亜株



GII/4_2006b 亜株



(酢酸ウラン染色:50000倍)

B 群ロタウイルスの構造蛋白質の解析および VLP の作出

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 チーム長

研究協力者 鈴木 亨 動物衛生研究所ウイルス病研究チーム

久我 和史 動物衛生研究所ウイルス病研究チーム

研究要旨 ブタ GBR における主要カプシド蛋白質 VP6 について遺伝学的解析および抗原学的解析を実施した。国内農場由来の 10 株について、VP6 の全塩基配列を解読した結果、ブタ GBR は遺伝的多様性を有することが明らかとなった。さらに、アミノ酸配列に基づく系統樹解析並びに各種組換え VP6 蛋白質と抗血清の組み合わせによる間接蛍光抗体法、間接 ELISA 法により GBR は少なくとも複数の亜群に分類される可能性が示された。また、ウシ由来 GBR Nemuro 株のコア蛋白質 VP2 に関して組換えバキュロウイルスを作製し、既知の VP6、VP7 組換えバキュロウイルスとの組合せ（VP2/6 および VP2/6/7）による VLP の粒子形成を検討した。しかしながら、いずれにおいても VLP の収量は極めて少なく、また各種蛋白質の発現も VP6 を除き著しく低かったため、引き続き検討していく必要がある。

A. 研究目的

ロタウイルスは若齢動物や乳児の重症性下痢症の主要原因となる新興感染症ウイルスである。現在までに A-G 群に分類されており、それらのうち A-C 群はヒト以外にウシ、ブタなどの家畜を含む動物種からもウイルスが検出されることから、公衆衛生上においても関心が集まっている。B 群ロタウイルス（GBR）は培養細胞系や感染動物モデルがほとんど確立されていないことから、本ウイルスの性状に関して不明な点が多く残されている。さらに、GBR の検出は RT-PCR 法による遺伝子検査が主体であったが、近年本ウイルスは遺伝的に多様であることが明らかにされてきたため、既存の遺伝子検査法で GBR を広範囲に検出することは困難となってきた。その一方で、B 群ロタウイルス

によるヒトおよびウシやブタの下痢症に関する報告は近年アジア各国で増大している。本研究では主として国内で検出したウシおよびブタ由来ウイルス株のフルゲノム解析を実施する一方で、バキュロウイルス発現系によりウイルス様粒子（VLP）を作製して、本ウイルスの遺伝学的および抗原学的性状を明らかにし、新たな検査・予防法を確立することを目指している。それら研究の一端として、ブタ GBR における主要カプシド蛋白質 VP6 の塩基配列を解読し、遺伝学的解析および抗原学的解析を実施した。また、ウシ由来 GBR Nemuro 株のコア蛋白質 VP2 を解読し、既知の VP6、VP7 との組合せによる VLP 作製を試みた。

B. 研究方法

(1) ブタ GBR の主要カプシド蛋白質 VP6 に

関する遺伝学的解析

国内の9農場より採取したGBR陽性ブタ糞便10検体を材料に、既知のウシGBR VP6遺伝子の塩基配列を参照に設計した特異的なプライマーを用いてRT-PCR法により遺伝子検出を試みた。得られたPCR産物はダイレクトシーケンシング法および5'RACE法を用いて、VP6遺伝子の全塩基配列を決定した。既知の動物種由来ウイルス株を含めた分子系統樹解析を行い、本ウイルスの遺伝的多様性および系統発生について分類・考察した。シークエンス解析にはLasergene software、また系統樹解析にはMEGA 4 programを用いた。

(2) GBRの主要カプシド蛋白質VP6に関する抗原学的解析

ブタGBR Kyushu株およびPB-93-I5株について、バキュロウイルス発現系を用いて組換えVP6蛋白質を作製した。ノトバイオオートブタに対して豚GBR計5株を実験的に投与した後、感染耐過血清を回収して抗血清に用いた。間接蛍光抗体法を用いて、組換えVP6蛋白質と抗血清の組み合わせによる反応性の相違(抗体価)を定量・比較し、ブタGBR間における抗原性の相違を検討した。また一方で、ウシGBR Nemuro株由来の組換えVP6蛋白質および抗血清を用いた間接蛍光抗体法、さらに間接ELISA法によって、ブタGBR株との抗原学的関連性について検討した。

(3) ウシGBR Nemuro株のVLP作製

VLP作製にあたって、既知のウシGBR VP2遺伝子の塩基配列を参照に設計した特異的なプライマーを作出し、RT-PCR法により遺伝子検出を試みた。得られたPCR産物はダイレクトシーケンシング法を用いて、VP2遺伝子の蛋白質コード領域を決定した。

VP2、VP6、VP7それぞれについて組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞Tn5に感染させた後、感染細胞あるいは細胞上清を回収し、各種蛋白質の発現を確認した。次いで、それらを用いて、VP2/6および

VP2/6/7の組合せにおけるVLP粒子形成の可能性について検討した。

C. 研究結果

(1) ブタGBR 10株におけるVP6遺伝子の塩基数は1268-1272であり、いずれも391アミノ酸から成る蛋白質をコードした。ブタGBR株間におけるVP6遺伝子のアミノ酸配列一致率は65-99%、また他の動物種由来株とのアミノ酸配列一致率は67-83%であった。また他の動物由来種を含めたVP6アミノ酸配列の分子系統樹解析において、GBRはヒト、ラットおよび一部のブタ由来株を含む遺伝子群(G1)と、ウシおよび残りのブタ由来株を含む遺伝子群(G2)に大きく区別され、両群間のアミノ酸配列一致率は65-73%であった(図1)。

(2) G1由来のPB-kyushu株VP6蛋白質に対して、同一群(G1)由来の抗血清では極めて高い反応性が認められたが、異なる群(G2)由来の抗血清ではほとんど反応性が認められなかった(表1)。一方、G2由来のPB-93-I5株VP6蛋白質に対してはG1由来ではなく、G2由来の抗血清が高い抗体価を示した。以上のことから、ブタGBRは抗原学的にも少なくとも反応性が異なる2つの亜群に分類されることが示唆された。ウシGBR Nemuro株由来のVP6蛋白質を抗原とした間接蛍光抗体法および間接ELISA法を行った結果、遺伝学的解析においてウシGBRと同一群(G2)由来のブタ抗血清は両アッセイ法において高い反応性を示した(図2)。

(3) VLP作製に際して、ウシGBR Nemuro株VP2の塩基配列を解読したところ、937アミノ酸から成る蛋白質をコードしていた。VP2、VP6、VP7それぞれについて組換えバキュロウイルスを作出し、昆虫細胞Tn5感染3日後における感染細胞内の各種蛋白質の発現について検討した。その結果、VP2、VP6はそれぞれ分子量約100kDa、

45KDa の蛋白質を効率よく発現したが、VP7 は約 30KDa 付近において弱い発現が認められた。次いで、VP2/6 および VP2/6/7 の各種組合せにおける VLP の粒子形成を試みたが、いずれも収量は極めて少なく、また各種タンパクの発現も VP6 を除き著しく低かった。VLP 形成の有無においては電子顕微鏡法により現在確認中である。

D. 考察

GBR の VP6 は遺伝的多様性に富み、さらに遺伝学的にも抗原学的にも複数の群に分類されることが示唆された。しかしながら、そのデータが示す生物学的意義が同一種間内の多様性を意味するのか、あるいは別種であることを意味するのかについてはこれまで他のロタウイルスにおいて類似した報告がないため、更なる解析および検討を重ねた後に結論付ける必要がある。また GBR は A 群ロタウイルスのように科学的根拠に基づく分類法が確立されていないため、今後も継続的に詳細な解析を行い、確固たる分類基準を早急に整備する必要がある。少なくとも本研究はその方向性を示す一助となると考えられた。

GBR に関して未だ VLP 作製の報告がないため、今後も試行錯誤していく必要はあるが、まずは本来のウイルス粒子を正確に再現するよう遺伝子改変を含め個々の蛋白質の発現量を調節する必要があると考えられた。また、B 群ロタウイルスは pH に影響を受けやすいことから、分離・精製の過程においても詳細に条件検討を行い、改善していく必要があると考えられた。

E. 結論

本研究により、GBR は遺伝学および抗原学的に少なくとも複数の亜群に分類される可能性が示された。特に、ブタ GBR は遺伝的に多様であることが明らかとなった。これらの結果は今後 GBR を広範囲に検出する診断法を開発する上で重要な知見となる。

VLP の粒子形成については各種構造蛋白質の発現調節あるいは分離・精製過程における最適条件・手法等を検討し、完全 VLP 粒子の形成を試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

久我和史、鈴木 亨、井関 博、高木道浩、真瀬昌司、杉山 誠、宮崎綾子、恒光裕：豚 B 群ロタウイルス主要カプシド蛋白質 VP6 の遺伝学および血清学的解析第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010 年

Tohru Suzuki, Kazufumi Kuga, Ayako Miyazaki, Hiroshi Tsunemitsu: Genetic dissection of porcine group B rotavirus focusing on nonstructural protein NSP1. 5th Asian Pig Veterinary Society Congress, Thailand, 2011.

Kazufumi Kuga, Tohru Suzuki, Ayako Miyazaki, Hiroshi Iseki, Michihiro Takagi, Masaji Mase, Makoto Sugiyama, Hiroshi Tsunemitsu: Genetic and serological distinction of the major capsid protein VP6 between porcine group B rotaviruses. 5th Asian Pig Veterinary Society Congress, Thailand, 2011.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

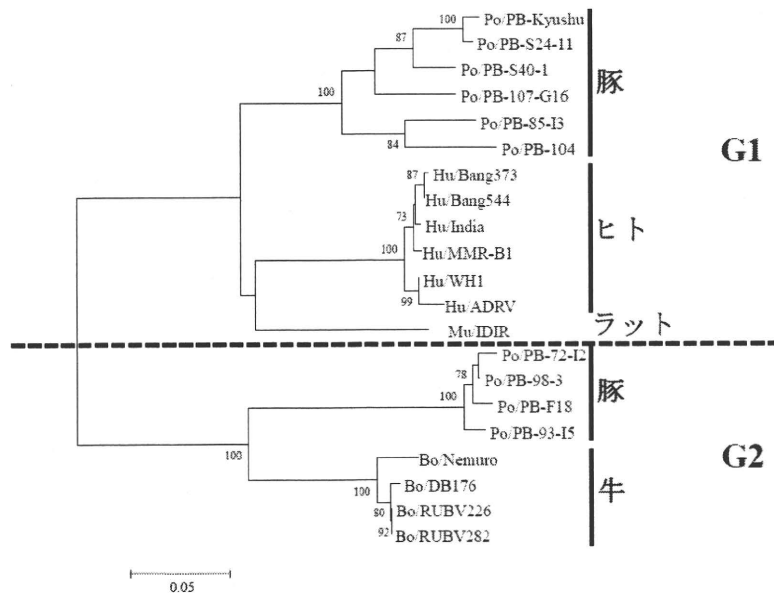


図1. GBR VP6のアミノ酸配列系統樹

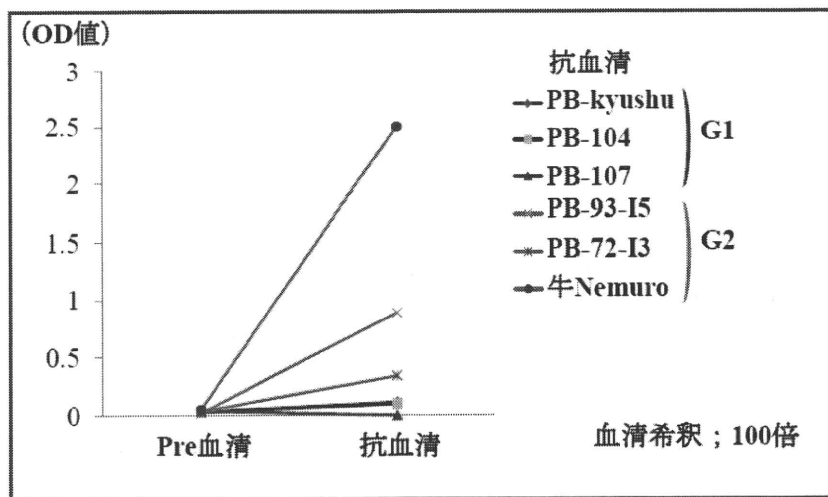


図2. 牛Nemuro株VP6の間接ELISA法における抗体価

表1. 間接免疫抗体法における抗体価

抗血清 抗原	G1			G2		
	抗PB-Kyushu	抗PB-104	抗PB-107	抗PB-93-I5	抗PB-72-I2	抗Nemuro
PB-Kyushu	640	640	640	<10	<10	<10
PB-93-I5	<10	<10	<10	5120	640	320<
牛Nemuro	10	10	10	320	80	320

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）
研究分担報告書

組換えバキュロウイルスを用いたヒトボカウイルス構造蛋白の発現および
その応用

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 ヒトボカウイルス（Human Bocavirus; HBoV）はパルボウイルス科の一種で、小児下気道感染症から検出された新しい直鎖一本鎖 DNA ウイルスである。最近、さらに三種類の近縁ウイルス（HBoV2、HBoV3、HBoV4）が発見され、さまざまな小児呼吸器疾患や腸管感染症など関連していると推測されている。しかしながら、その詳細はについて未だ十分に解析されていない。抗体や抗原の検出法が確立されていないため疫学情報も不十分である。また、増殖細胞系は確立されておらず、ボカウイルスの感染、複製の機序は不明である。今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトボカウイルスのウイルス様粒子（VLP）の作製を行った。さらに得られた VLP を用いて、抗体検出方法を確立し、ヒトボカウイルスの血清疫学解析を行った。

A. 研究目的

ヒューマンボカウイルスはパルボウイルス科（Parvoviridae）、ボカウイルス属（Bocavirus、クラス2）に属する直鎖一本鎖 DNA ウイルスである。この属名も最初この属にいるウイルスの宿主名から由来したものである。ウイルス遺伝子の全長は約5300bp であり。主にNS1、NP1、VP1、VP2 という四つの蛋白をコードする。VP2がメジャーな構造蛋白、VP1マイナーな構造蛋白をコードする。現在、四種類のヒューマンボカウイルスが発見されていた。HBoVは2005年、呼吸器疾患小児患者から分離されたものでHBoV2, 3, 4. それぞれ下痢などの患者糞便から分離された。いずれにして、ヒトボカウイルスは小児下気道感染症や腸管感染症などの病気の発症とは関連すると考えられているが、これらの疾患との明確的関連は未だ確認されていない。

また、増殖細胞系は確立されておらず、ヒトボカウイルスの複製、感染機序も未だ知られていない。今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトボカウイルスのウイルス様粒子（VLP）の作製を試みた。さらに得られたVLPを用いて、抗体検出方法を確立し、ヒトボカウイルスの血清疫学解析を行った。

B. 研究方法

三種類のヒトボカウイルス（HBoV, HBoV2, HBoV3）ゲノムの構造蛋白領域 VP2 遺伝子をもつ組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製し、昆虫細胞 Sf9 及び Tn5 で発現させた。ウイルス蛋白の発現、ウェスタンブロット法、粒子形成を透過型電子顕微鏡観察等で解析した。形成された粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。精製したウイルス

様粒子を抗原とした抗体 ELISA を確立し、健康人における感染状況を調査した。精製した粒子をウサギに免疫して三種類のヒューマンボカウイルスの抗原性を比較した。また、マイナー構造蛋白をコードする VP1 遺伝子も同方法を用いて組換えバキュロウイルスを作製し、VP2 の組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、VP1 と VP2 が共存するウイルス粒子の作製を試みた。

C. 研究結果

昆虫細胞 Sf9 及び Tn5 における HBoV VP2 の発現の違いを比較してみた。昆虫細胞 Tn5 では感染後二日に予想される分子量 (60.5 kDa) の VP2 蛋白が産生され、3日にピークとなり、6日からだんだん減っていく。これに対して、Sf9 細胞ではこれに相当するバンドはほとんど見られなかった。同じ昆虫細胞でも抗原発現量は相当違うことが明らかになった。組換えバキュロウイルス感染された Tn5 細胞では 60.5 kDa の VP2 蛋白が効率よく培養上清に放出された。培養上清を張遠心法で濃縮し、塩化セシウム密度勾配遠心法で精製した。電子顕微鏡観察したところ、比重 1.30 g/cm³ 分画に直径約 22nm の球形中空粒子構造が認められた。精製 VLP をウサギに接種し抗 HBoV-VP2, HBoV2-VP2, HBoV3-VP2 抗血清を作製し、三種類のボカウイルスの抗原性を比較した結果、異なる抗原性を示すものの、交叉反応も示された。これらの VLP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健康人におけるヒトボカウイルス抗体保有率を解析した。その結果、若年層から高い抗体保有率を示し、健康成人の約 90%がヒトボカウイルス抗体陽性であることが明らかとなり、多くの場合、乳幼児期に感染する可能性が考えられた。

ボカウイルスの構造蛋白 VP1 と VP2 を共発現

し、精製したウイルス粒子から分子量 75kDa の VP1 と 60.5kDa の VP2 蛋白が検出された。粒子には VP2 より VP1 の比率が少ないことから、VP1 はマイナー蛋白として粒子の形成にかかわっていることが示唆された。

D. 結論と考察

組換えバキュロウイルス発現システムでヒューマンボカウイルス構造蛋白を発現により中空粒子の作製が成功した。ボカウイルス構造蛋白の発現場合、Sf9 より、Tn5 細胞の発現効率は良い。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立した。今後、単クローン抗体を作製し、各ボカウイルス特異的な抗原診断法を樹立する。これを利用して、種々の疾患患者における抗原検出、IgM 抗体の推移など血清疫学解析を詳細に行い、ボカウイルス感染に起因する疾患を明らかにすることが期待される。さらに VP1 と VP2 の共発現により、ネーティブなボカウイルスとより類似する粒子の作製に成功し、マイナー蛋白とされる VP1 の機能解析も可能となった。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) 李 天成、方 苓、王 澤均、宋士利、片岡 紀代、鈴木 哲朗、脇田 隆宇。ヒトボカウイルス様粒子の作製およびその応用。日本ウイルス学会、第 58 回学術集会 2010 年 11 月 徳島

2) 李天成、方苓、網康至、須崎百合子、武田直和、脇田隆宇。不活化 E 型肝炎ワクチンの検討。日本ウイルス学会、第 58 回学術集会 2010 年 11 月 徳島

3) 李 天成、方苓、片岡 紀代、宮村 達男、脇田 隆宇。日本のブタから分離した

ブタエンテロウイルス 8 型の解析. 日本ウイルス学会、第58回学術集会 2010年11月 徳島

4) 石井 孝司、吉崎 佐矢香、杉山 奈央、加藤 孝宣、李 天成、武田 直和、脇田 隆字 E型肝炎ウイルスの感染性を規定する宿主側因子の探索第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月、徳島

5) Tian-cheng Li, Lanjun Liu, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Tatsuo Miyamura, Naokazu Takeda, Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grows in cell culture. The 9 th international symposium on positive strand RNA viruses. 2010. May 17-23. Atlant.

6) Tian-Cheng Li, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. The stability and inactivation of Hepatitis E virus grown in cell culture. The 21th Conference of the Asian Pacific Association for the studay of the liver. 2011. February 17-20. Bangkok.

7) Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. The 8th China-Japan International Conference of Virology. 2010. July 4-7. Harbing

2. 論文発表

1. Xing L, Wang JC, Tian-Cheng Li, Yasutomi Y, Lara J, Khudyakov Y, Schofield

D, Emerson SU, Purcell RH, Takeda N, Miyamura T, Cheng RH. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J Virol. 2011 Jan;85(2):1117-24.

2. Tian-Cheng Li, Xing L, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang CY, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway J Biol Chem. 2010 Oct 22;285(43):33175-83.

3. Tian-Cheng Li, Shili Song QiFa Yang, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. A cell culture system for hepatitis E virus. Hepatology International. 2011. March 5(3):202.

F. 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