

タは爆発的に増加すると考えられ、それにもとない系統樹の信頼性が低下すると考えられるが、大量の配列データから効率良く遺伝子組み換えを検出できる方法の開発を目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 方法論

解析に用いられる配列の数が多いときでも統計的有意性を保証しながら遺伝子組み換えを検出するために、4株を抽出してその系統関係を領域間で比較する。これは、4配列は系統樹作成上の最小単位であり、3つの相互に相容れない樹形のうちの1つが支持されるからである。それぞれの領域で作成された系統樹が統計的に有意に支持されたときのみ、領域間で樹形を比較し、樹形が異なれば遺伝子組み換えが起こったと推測される。さらに、系統樹において遺伝子組み換えが起こった場所は外部枝に存在すると考えられる。

### 2. 材料

方法の有用性を検証するために、インフルエンザA型ウイルスH1N1亜型782株、H3N2亜型1663株のゲノム配列をInfluenza Virus Resourceから取り出して解析した。このウイルスのゲノムは8本の分節からなり、分節単位での組み換え（遺伝子再集合）が起こることが知られていることから、方法の有用性の検証に適していると考えられた。

### 3. 方法

H1N1、H3N2それぞれについて、8本の分節の塩基配列それぞれの多重整列をMUSCLEを用いて作成し、ギャップや塩基配列が決定されていない塩基座位を除いた。

それぞれの分節について、全ての配列の系統樹をp distanceと近隣結合法を用いて作成した。

H1N1、H3N2それぞれについて、4株を取り出す場合の数は15,462,460,585通り、317,533,644,065通りあるが、全てを解析することは時間的に不可能なので、10,000,000組の4株をランダムに抽出して遺伝子組み換えの検出を行った。

4株の組み合わせのそれぞれについて、8本の分節それぞれの系統樹をp distanceと近隣結合法を用いて作成し、100回のブートストラップリサンプリングによって樹形の信頼性を評価した。全ての分節の樹形が95%以上のブートストラップ確率で支持されたときに、分節間で樹形を比較した。樹形が異なる場合には、その外部枝を全配列の系統樹に重ね合わせてマップすることにより組み換えが起こった系統樹上の位置を推定した。

### (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. H1N1、H3N2両方において、8本の分節の全てのペアにおいて系統樹の樹形に相違が認められ、進化の過程で遺伝子組み換えにおいてつねに連鎖する分節のペアはないことが明らかになった。

2. 遺伝子組み換えが検出された4株の組み合わせについて、8本の分節が支持する系統樹の樹形を分類したところ、H1N1については分節(1,3,4,6)と(2,5,7,8)が異なる樹形を支持することが多かった。この遺

伝子組み換えが起こった系統樹上の位置を推定したところ、2005-2007年あるいは2008-2009年に分離された株が組み換え体であると推測された。実際、2008-2009年に分離された株は組み換え体であるという報告が過去にあった。

H3N2については分節(1,2,3,5,6,7,8)と(4)が異なる樹形を支持することが多かった。2003年あるいは2004-2008年に分離された株が組み換え体であると推測され、実際2003年に分離された株は組み換え体であるという報告が過去にあった。

#### D. 考察

結果1より、H1N1においてもH3N2においても分節間の組み換えは頻繁に起きていることが分かる。

結果2より、この方法で遺伝子組み換えが起こった系統樹上の位置を信頼性良く推定できることが示唆された。

#### E. 結論

開発された方法はインフルエンザA型ウイルスにおいて遺伝子組み換えが起こったことならびにその系統樹上での位置を信頼性良く推定できることが分かった。今後は、この方法をノロウイルスにおける遺伝子組み換え検出に応用し、遺伝子型分類システムの開発に役立てたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yoshiyuki Suzuki: A phylogenetic approach to detecting reassortments in viruses with segmented genomes. *Gene*, 2010,

464:11-16.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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（食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究）

分担者研究報告書

分担研究課題：国内で流行するノロウイルスゲノムの包括的解析

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277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、（1）遺伝情報の異なる8種類のGII/4亜株が日本で流行したこと、（2）その中でも特定の株（2006b亜株）が、4シーズンにわたって、日本国内で大流行したこと（222/277:80%）、などがわかった。（3）2009/2010秋冬期に新しくGII/4 2009a変異亜株が出現していた。2009a変異亜株は、New Orleans\_2009\_USと単系統群を形成しており、2009/10年秋冬期に33.7%（26/77）を占めていた。2006bの占有率は年々減少していた。集団免疫の強化に因るものかもしれない。本年度以降に、主要流行株の遺伝子型、あるいは遺伝子亜型の置換が起こる可能性がある。

A. 研究目的

ノロウイルスは、わが国においては秋冬季に流行する感染性胃腸炎の原因ウイルスである。人の密集する閉鎖空間で集団食中毒を発生させる。その結果、食品産業、医療施設、高齢者施設、米国ではクルージング客船内での発生が報告されており、甚大な被害をもたらす。近年、厚生労働省、国立感染症研究所、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しくみを検討し、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2010年03月03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335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 dT<sub>30</sub>SXN (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として、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) を用い、direct sequence法により、塩基配列を調べた。277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。

（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2010年までの4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 277 株の全ゲノム情報（約  $21 \times 10^5$  塩基）を取得した。

系統樹解析の結果、(1) 遺伝情報の異なる 8 種類の GII/4 亜株が日本で流行したこと（図 1、色付きの楕円で囲んだ株）、(2) その中でも特定の株（2006b 亜株）が、4 シーズンにわたって、日本国内で大流行したこと（222/277:80%）、などがわかった。(3) 2009/2010 秋冬期に新しく GII/4 2009a 変異亜株が出現していた。2009a 変異亜株は、New Orleans\_2009\_US と単系統群を形成しており、2009/10 年秋冬期に 33.7% (26/77) を占めていた。(4) 2009a 亜株の 8 種の蛋白質には、過去の流行株には認められない特徴的なアミノ酸置換が 5 箇所生じ、その中で 1 箇所の変異は、ウイルス粒子を形成するタンパク質の最外郭に位置するキャプシド蛋白質 P2 ドメイン領域に存在していた。(5) 2009a について、モザイクゲノム形成は確認されなかった。

#### D. 考察

2006/07年に日本を含め世界で大流行した 2006b 亜株は、2007/8年秋冬期以降も、主要な国内流行株であった。4年間全体の 80.7% (222/277) を占めていた。一方で、2006b の占有率は年々減少している。2006b は、過去 4 シーズンにわたり、ヒト集団内で大流行しているため、集団免疫の強化に因る可能性がある。本年度以降に、主要流行株の遺伝子型、あるいは遺伝子亜型の置換がおこる可能性があるかもしれない。2009/2010 秋冬期に新しく出現した 2009a 亜株は 2009/10 年秋冬期に 33.7% (26/77) を占めていた。特徴的なアミノ酸置換は 5 箇所、キャプシド P2 の変異は 1 箇所のみであった。しかし、文献では、マウスノロウイルスでは、1 箇所のキャプシド P2 の変異は、中和抗体からの逃避能を高める変異であった。そのため、全国的に流行が広がったのかもしれない。

抗原変異による集団免疫からの逃避だけではなく、別の選択的優位性が存在するのかもしれない。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ヒト集団内で広がったと推察している。

#### E. 結論

初年度は、2009/2010 秋冬期のノロウイルス GII/4 流行株のゲノム配列情報を収集しゲノム解析を実施した。次年度以降は、GII/4 株の特徴を浮かび上がらせるために、2010/2011 秋冬期に流行している GII/2、GII/3 株のゲノム配列情報を収集したい。ノロウイルス GII/4 の優位性、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いきたい。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考えている。

#### 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., 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、小淵正次、小田切孝人、本村和嗣、佐藤彩、横山勝、終元巖、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., Motomura 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 日本ウイルス学術集会 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、小淵正次、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 日本ウイルス学術集会 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



## ノロウイルスカプシド蛋白質の抗原部位・機能部位の 新しい解析法の検討

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、ノロウイルス GII/4 カプシド蛋白質の抗原部位および機能部位の推定を、1D-3D プロファイル比較法により行った。解析には 2004 年～2009 年に国内で流行したノロウイルス GII/4 2006b のカプシド全長のアミノ酸配列 ( $n = 220$ ) を用いた。はじめに抗原部位の検出を試みると、カプシド P ドメイン表面に抗原部位と推定される部位を見出した。次に、機能部位の検出を試みると、血液型抗原結合部位周辺、カプシド二量体化の相互作用表面、近接するドメイン間の境界面、およびカプシド底辺部に機能部位と推定される部位が見出された。以上より、1D-3D プロファイル比較法により、ノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と推定される部位が明らかになった。

### 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 (カプシド) にアミノ酸変異が蓄積されていた。このカ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、カプシド蛋白質は感染受容体との相互作用を保つために、カ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。

最近、産総研の藤らは蛋白質に作用し

ている制約を推定する、1D-3D プロファイル比較法を開発した。1D プロファイルとは、サイト  $i$  におけるアミノ酸  $j$  の出現しやすさ出現しにくさを表すスコアである。一方、3D プロファイルとは変異に対する構造の安定性を表すスコアである。1D プロファイルと 3D プロファイルの類似性が高ければ、アミノ酸配列に主に構造的制約が作用していると推定され、類似性が低ければ構造的制約以外の制約、たとえば、機能的制約が作用していると推定される。ウイルス蛋白質に機能的制約が作用している部位は、機能部位や抗原部位であることが考えられる。ゆえに、1D-3D プロファイル比較法を機能部位や抗原部位の推定に用いることができる。



本研究では、ノロウイルス GII/4 カプシド蛋白質の抗原部位や機能部位を予測するため、1D-3D プロファイル比較法による解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 解析に用いたアミノ酸配列

解析には、2004年～2009年に国内で流行し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで取得したノロウイルス GII/4 2006b のカプシド全長のアミノ酸配列 ( $n = 220$ ) を用いた。

### 2. 祖先型ノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質分子モデルの構築

2004年～2009年に国内で流行したノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質の祖先型のアミノ酸配列を最尤法により推定した。その推定したアミノ酸配列を用いて、祖先型のノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質分子モデルを構築した。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。

### 3. 1D-3D プロファイル

1D プロファイルはアミノ酸配列を用いて position-specific scoring matrix (PSSM) を求めた。3D プロファイルは Protein Data Bank に登録されている構造をもとに、とり得るアミノ酸の傾向を確率・統計的に算出することにより求めた。得られた 1D プロファイルと 3D プロファイルの相関係数を計算した。

### 4. 同義置換・非同義置換解析

米国ロスアラモス国立研究所の Bette Korber らにより開発された SNAP (Synonymous Non-synonymous Analysis

Program) を用いて、同義置換率、非同義置換同義置換率を求め、同義置換に対する非同義置換の比 ( $dn/ds$ ) を求めた。1D-3D プロファイルで求めた相関係数と比較した。

(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. 1D-3D プロファイル

1D-3D プロファイルにより得られた相関係数が 0.20 以上の部位は、主に構造的制約が作用しているとした。ノロウイルス GII/4 2006b のカプシド蛋白質 525 残基のうち、304 残基の相関係数が 0.20 以上であった。この 304 残基には主に構造的制約が作用していると考えられる。一方、相関係数が 0.20 未満の類似性が低い部位は、構造的制約以外の制約が作用しているとした。ノロウイルス GII/4 2006b のカプシド蛋白質 525 残基のうち、221 残基の相関係数が 0.20 未満であった。この 221 残基の中に、機能的制約や正の選択圧が作用している部位があると考えられる。

### 2. 抗原部位の候補

抗原部位には正の選択圧が作用していると考えられ、同義置換よりも非同義置換がより多く生じている。これまでの塩基配列情報のみで解析する方法では、正の選択圧が作用している部位の予測は未だ擬陽性が多い。1D-3D プロファイルで求めた相関係数と  $dn/ds$  を比較することで、正の選択圧が作用している部位の予測精度の向上を試みた。相関係数が 0.20

未満かつ  $dn/ds \geq 1$  である部位を、カプシド蛋白質分子モデルに示す。(図 1 A) 抗原部位の候補は、カプシド P ドメイン表面、カプシド二量体化の相互作用表面、およびカプシド底辺部に見られた。

### 3. 機能部位の候補

機能部位は、その機能を維持するために非同義置換は生じないと考えられる。相関係数が $-0.20$ 未満かつ  $dn/ds = 0$  である部位を、カプシド蛋白質分子モデルに示す。(図 1 B) 機能部位の候補は、カプシド先端部、カプシド二量体化の相互作用表面、近接するドメイン間の境界面、およびカプシド底辺部に見られた。

## D. 考察

抗原部位の候補として、カプシド P ドメイン表面、カプシド二量体化の相互作用表面、およびカプシド底辺部が検出された。これらが抗原部位であるかどうかを、立体構造での位置から検討する。はじめに、カプシド P ドメイン表面はウイルス表面に突出している部位であることから、抗原部位である可能性が高いと考えられる。次に、カプシド二量体化の相互作用表面は、カプシド蛋白質内部となるため抗原部位であるとは考えられない。同様に、カプシド底辺部もウイルス内部となるため、この部位も抗原部位であるとは考えられない。カプシド二量体化の相互作用表面およびカプシド底辺部は、抗原部位ではなく、機能制御に関わる部位であると考えられる。

機能部位の候補として、カプシド先端部、カプシド二量体化の相互作用表面、近接するドメイン間の境界面、および

カプシド底辺部が検出された。検出されたカプシド先端部は血液型抗原結合部位周辺であることから、受容体との結合を維持するために必要な役割を持つ部位であると考えられる。カプシド二量体化の相互作用表面に検出された部位は二量体形成に必要な役割を持つと考えられ、近接するドメイン間の境界面に検出された部位は、ドメインの配置の安定性に必要な役割を持つと考えられる。どちらも機能維持に必要な部位であると考えられる。カプシド底辺部に検出された部位は、ウイルス粒子内部に位置するため、現時点ではその役割は不明である。その役割を知るためには、ウイルス粒子内部における相互作用の情報が必要である。

## E. 結論

1D-3D プロファイル比較法により、ノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質の抗原部位や機能部位と予測される部位が明らかになった。

## F. 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, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. *J Virol*, 84:8085-8097, 2010.

### 2. 学会発表

(1) 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, Santa Cruz, Chile, 10/16-19/2010.

(2) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses, Santa Cruz, Chile, 10/16-19/2010.

(3) Chan-it Wisoot , 横山 勝 , Thongprachum Aksara, Khamrin Pattara, 小林正明, 沖津祥子, 牛島廣治. Emergence of a new Norovirus GII.6 Variant among Infants

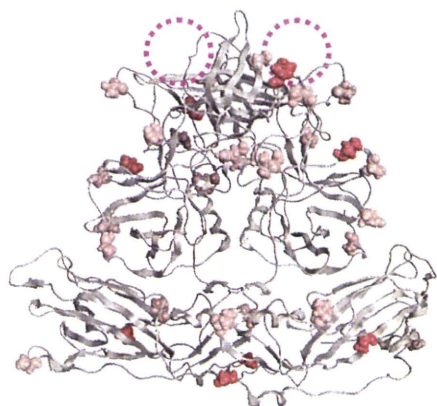
and Children with Acute Gastroenteritis in Shizuoka, Japan during 2008-2009. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 11/7-9/2010.

(4) 岡 智一郎, 横山 勝, 高木弘隆, 本村和嗣, 村上耕介, 佐藤裕徳, 脇田隆宇, 片山和彦. カリシプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 神戸, 12/7-10/2010.

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

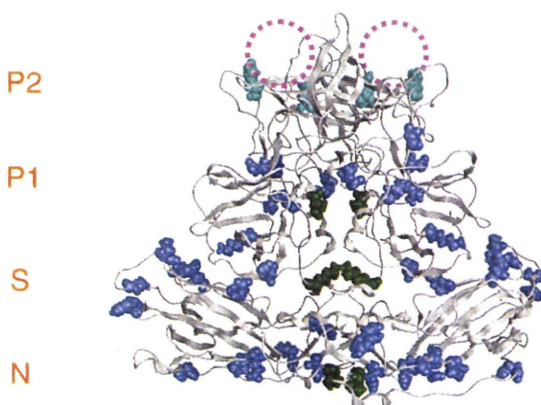
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

**A.  $dn/ds \geq 1$  (抗原部位)**



- $0 \leq$  相関係数  $\leq 0.20$
- 相関係数  $< 0$

**B.  $dn/ds = 0$  (機能部位)**



- 相関係数  $\leq -0.20$
- Near binding site of HBGAs
- Interface for dimerization
- Other site

Pink dot line: Binding site of HBGAs

図1. 1D-3D プロファイル比較法により検出した、ノロウイルス GII/4 2006b カプシド蛋白質の抗原部位候補と機能部位候補の位置。

ノロウイルス中空粒子および抗血清の作製、  
ウイルス定量システム法の開発

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	ハンスマン・グラント	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

### 研究要旨

ヒトに感染するノロウイルスは、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。食品から超高感度でノロウイルスを検出するには、ウイルスを抗血清で免疫沈降し、効率よく濃縮する必要がある。本研究では、免疫沈降に用いる抗ノロウイルス抗体、それを作製する抗原として、ウイルス様中空粒子を供給すること、さらに、ノロウイルス検出システムの開発と、それに用いる標準物質の開発を行っている。本年度は、ノロウイルスの遺伝的多様性を解析し、新たに作出するべき抗体、VLP を選択した。また、標準物質としてプラスミド DNA, 試験管内合成 RNA を作製した。

#### A. 研究目的

ノロウイルス(Norovirus; NoV)はヒト、ブタ、ウシ、マウスに感染する。ヒトノロウイルス(HuNoV)は、冬季ウイルス性胃腸炎、冬季に多発する非細菌性食中毒の原因ウイルスとして知られている。NoVは構造蛋白質(VP1)をコードする領域の塩基配列情報に基づき、5つのgenogroup(GI, GII, GIII, GIV, GV)に分別されることが知られている。このうち、ヒトに感染するのは、GI、GII、GIVである。GIIIはウシ、GVはマウスに感染するNoVである。NoV GI, GIIは、更に複数のgenotypeクラスターに分別可能であり、2010年現在、GIにはgenotypeが17以上、GIIにはgenotypeが19以上存在することが報告されている。そ

れぞれのgenotypeは、互いにVP1の抗原性が異なるとされている。2002年から2004年にかけて我々の開発したRT-PCRによるhNoV核酸検出法、リアルタイムRT-PCRによる核酸定量法は、これらのgenotypeほぼ全てを検出可能である。また、本方法は、テストチューブ中に10~100本のNoV-RNAが存在すれば検出可能なほど高感度である。故に本検出法はgolden standardグローバルに用いられている。しかし、食品からのNoV検出は、河川水などからのNoV検出以上に困難な要因がある。HuNoVはヒトの体内以外で増殖しないため、食品にわずかに付着したNoVを効率よく食品から遊離させ、更に濃縮した後にNoV RNAを抽出し、RT-PCRを行わなければ、検出できな

い。食品から遊離した HuNoV を選択的に沈降させ、濃縮するためには、HuNoV に特異的な抗体による免疫沈降が有効である。HuNoV には、前述のように複数の genotype が報告されており、これらそれぞれの抗原性が異なるため、HuNoV を網羅的かつ選択的に沈降させるためには、すべての genotype に対する抗体を作出するか、すべての genotype と反応する抗体を入手する必要がある。

我々は、全ての HuNoV genotype の約 70% に及ぶ特異抗体を作出してきた。本年度は、残り 30% の HuNoV に対する抗体の作出を開始するため、構造タンパク質領域の全塩基配列を決定することを目的とした。また、HuNoV に高頻度で認められる ORF1-2 junction region を break point としたキメリズム解析に対応した RT-PCR 新規プラスミドコントロール、RNA コントロールの作製を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

埼玉県衛生研究所より提供された HuNoV genotype 標準糞便パネルを便検体として用いた。

### 2. 構造タンパク質領域の全塩基配列の解析とウイルス様中空粒子作製、抗体作製

便検体 10% 乳剤より核酸を Viral RNA mini kit にて精製し、SK シリーズ F プライマーと Tx30SXN プライマーを用いて構造タンパク質領域約 2.6 Kb を RT-PCR で増幅した。増幅した DNA は、TOPO クローニングシステムとゲートウェイクローニングシステムを用いて、バキュロウイルストランスファーベクター pDEST8 に組み込み、DH10Bac 大腸菌にトランスフェクションして Bacmid を得た。Bacmid

を Sf9 細胞にトランスフェクションして、recombinant Baculovirus (rBaculovirus) を作製し、プラーク純化した後、 $10^8$ /mL の力価のシードウイルスを作製して、ウイルス様中空粒子 (VLP) の作製に用いた。VLP は、Hi5 細胞を用いて作製した。作製した VLP を培養上性から分離精製し、ウサギに免疫して抗 VLP ウサギ血清を得、抗体として保存した。

### 3. 新規プラスミドコントロールの作製

NV68 GI/1 プロトタイプ配列 (M87661 Norwalk virus, position 4265-5814)、Saga-1 GII/4 2006b 配列 (AB447456 saga1, position 4167-5621) にそれぞれ T7 RNA polymerase promoter を付加して合成し、pUC19 ベクターに組み込み pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 を作製した。これらを Stb12 大腸菌にトランスフェクションし、pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 を大量に精製して、OD 値より  $10^{10}$  copies/mL の用液を調整した。pT7NV4265-5814, pT7Saga4167-5621 の最終濃度はリアルタイム RT-PCR によって確認した。

### (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。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

## C. 研究結果、考察

昆虫細胞発現系を用いて新たに HuNoV GI/13, GII/5, GII/7, GII/4 2006a, 2006b, 2008a の VLP 発現に成功した。これらの VLP を用いて抗 VLP ウサギ血清の作製に成功した。

HuNoV の新たな遺伝子型は、現在もなお報告されつつあるが、本年度の追加により、我々の手元には、これまでの蓄積も含め約 80% の遺伝子型の VLP とそれに対応する抗体が存在する。主要流行株としては、2000 年以降 GII/4 が流行しており、抗原性の genetic drift が懸念されていたが、2006a, b, 2008a の発現と、抗血清によって genetic drift にも対応できると考えられる。従って、これらの抗体を用いれば、現在流行している主要流行株はもちろん、それ以外の HuNoV も免疫沈降によって濃縮が可能となる。今後、残る 20% の VLP 作製と抗体の作製を継続する予定である。

旧 RT-PCR, リアルタイム RT-PCR 用スタンダードプラスミドは、ORF1-2 ジャンクション下流約 300 塩基をカバーするプラスミドであった。それに対し、新たな標準プラスミドは、RdRp 領域から Capsid N/S 領域に至る約 1600 塩基をカバーし、HuNoV の遺伝子組み換えの起こるホットスポットである ORF1-2 ジャンクションを挟んだ領域を有する。本プラスミドコントロールを用いることで、リアルタイム RT-PCR はもちろん、分子疫学における HuNoV キメリズム解析にもスタンダードとして用いることが可能となった。今後、近年頻発することが明らかとなった HuNoV 遺伝子組み換えに用いるため、RdRp 領域から Capsid N/S 領域にまたがる約 1 Kb の HuNoV フラグメントを増幅するためのプライマーデザインを行い、導入を試みる予定である。

さらに、本プラスミドより、T7 RNA polymerase を用いて in vitro 合成を行ったスタンダード RNA は、RT-PCR 反応における逆転写行程をモニターすることが可能であり、新たなスタンダードとして期待できる。

## D. 結論

HuNoV VLP 作出と、抗体の作製が進行し、約 80% の HuNoV genotype をカバーできるようになった。

新たなプラスミドスタンダードの作製と供給体制が整った。本プラスミドコントロールにより、従来の RT-PCR, リアルタイム RT-PCR はもちろん、キメリズム解析にも対応できる。

逆転写行程をモニターできる新たなスタンダード RNA の合成に成功し、これらスタンダードの供給体制を整えた。

## F. 研究発表

論文発表

- (2) Oka T, Takagi H, Tohya Y, Murakami K, Takeda N, Wakita T, Katayama K. Bioluminescence technologies to detect calicivirus protease activity in cell-free system and in infected cells. Antiviral Research. [Epub ahead of print]
- (3) 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. PLoS ONE 5(10) e13130, 2010.
- (4) Oka T, Murakami K, Wakita T, Katayama K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases Microbiol Immunol. 2011.Feb; 55 (2): 108-114.

- (5) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Phanuwat C, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic Diversity of Genogroup IV Noroviruses in Wastewater in Japan. *Lett Appl Microbiol.* 2011 Feb; 52 (2): 181-184.
- (6) Kitajima M, Oka T, Takagi H, Tohya Y, Katayama H, Takeda N, Katayama K. Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses. *J. Virol. Methods.* 2010 Nov;169(2):269-73.
- (7) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H.
- (8) Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan.
- (9) *Environ Sci Technol.* 2010 Sep 15;44(18):7116-22.
- (10) (7) Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Miura T, Sano D, Omura T. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol.* 2010 Aug;54(8):483-6.
- (11) Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Nakamura H, Mori H, Kanda T, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Takeda N, Sato H; Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent evolution of norovirus GII/4 by genome recombination from May 2006 to February 2009 in Japan. *J. Virol.* 2010 Aug;84(16):8085-97.
- (12) Iizuka S., Oka T., Tabara K., Omura T., Katayama K, Takeda N., Noda M. Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. *J. Med. Virol.* 2010 Jul;82(7):1247-54.
- (13) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K, Ohgaki S. Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2461-7
- (14) Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, Ueda T, Kondo H, Tanaka T, Wakita T, Katayama K, Takeda N, Oka T. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. *J. Med. Virol.* 2010 Apr;82(4):720-6.
- (15) 岡智一郎, 片山和彦, 小林慎一, 飯高順子, 野田衛 “愛知県と川崎市の食中毒事例から検出されたサポウイルス GI/2 の塩基配列の比較 “ 病原体微生物情報 (IASR) Vol. 31 No. 11 (No. 369), 2010 年 11 月号 p13-p14

学会発表

- (2) Harada S, Nishimura K, Kiyota N, Matsumoto K, Yahiro S, Okada M, Katayama K, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and genetic analysis of sapovirus strains between 2002 and 2009 in Kumamoto Prefecture, Japan 16<sup>th</sup> Federation of Asian Veterinary Associations Congress 2011 February 16-18, 2011. Cebu City, Phillipines
- (3) 岡智一郎、横山勝、高木弘隆、本村和嗣、村上耕介、佐藤裕徳、脇田隆字、片山和彦。カリシウイルスプロテアーゼ catalytic triad 形成残基のポリプロテイン切断活性への重要性。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会。2010年12月7～10日、神戸
- (4) 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培養細胞への結合様式。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会。2010年12月7～10日、神戸
- (5) 野田衛、片山和彦、石井孝司、岡智一郎、多田有希、山下和予、三瀬敬治、地方衛生研究所、中村奈緒美、島田智恵、岡部信彦。「塩基配列情報共有化の食品媒介ウイルス感染症の疫学調査への応用」第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
- (6) 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を目的としたパンソルビン・トラップ法の開発。第31回日本食品微生物学会総会、2010年11月11日～12日、滋賀
- (7) 北元憲利、岡智一郎、片山和彦、Hansman GS、三好龍也、田中智之。サポウイルスに対する単クローン抗体の解析。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) 野田衛、入谷展弘、中田恵子、斎藤博之、田中忍、西川篤、北堀吉映、三谷亜里子、三瀬敬治、山下和予、岡智一郎、片山和彦、岡部信彦。関西で同時多発的に発生し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
- (9) 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
- (10) 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



- (11) 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
- (12) 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
- (13) 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
- (14) 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シ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
- (15) 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
- (16) 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
- (17) 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
- (18) 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
- (19) 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
- (20) 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.

(21) 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.

(22) 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

平成 22 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)

「食品中の病原ウイルスのリスク管理に関する研究」

研究分担報告書

## バキュロウイルススタンパク質発現系を用いた サポ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
研究協力者	李 天成	国立感染症研究所 ウイルス第 2 部
	片山 和彦	国立感染症研究所 ウイルス第 2 部
	北元 憲利	兵庫県立大学
	田中 智之	堺市衛生研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	岩切 章	宮崎県衛生環境研究所 (現宮崎県日向食肉衛生検査所)

### 研究要旨

近年、急性胃腸炎の原因ウイルスとしてクローズアップされてきたサポウイルスは、いまだに培養細胞での増殖ができない。ウイルス様中空粒子を用いた我々の研究により、サポウイルスはノロウイルスと同様、多様な抗原性を有することが明らかになってきた。実用的なサポウイルス抗原検出系の開発および性能評価のためには、網羅的な抗原パネルの作成が鍵になる。そこで、本研究では、バキュロウイルススタンパク質発現系を用いて新たなサポウイルス株についてウイルス様中空粒子の作成を試みた。

### 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、GI, GII はさらに複数の遺伝子クラスターに分類される。近年、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)の場合、核酸検出系だけでなく、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は株間で多様な抗原性を示すため、実用的な NoV 抗原検出系の開発は、多様な 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作成、さらに共通エピトープを認識するブロードバンドモノクローナル抗体の確立によって初めて達成された。

ヒト由来の SaV 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いまだに確立されていない。

研究分担者が所属する研究室ではこれまでに昆虫細胞発現系を用いて6株 (GI Mc114株、GI Yokote1株、GII Syd53株、GIV Syd3株、GIV SW278株、GV NK24株)、さらに哺乳動物細胞を用いて2株 (GII Mc10株、GII C12株)のSaV VLPsの発現に成功している。これまでに我々は異なるgenogroup (GI, GII, GIV, GV)に属するSaV株間では抗原性が異なること (Hansman et al., *Emerging Infectious Diseases* 13 (10), 1519-1525, 2007)、さらに同じgenogroup内でも異なる遺伝子クラスターに属する株間では抗原性が異なることを明らかにしてきた (Hansman et al., *Journal of Clinical and Microbiology* 45 (4), 1347-1349, 2007, Oka et al., *Microbiology and Immunology* 53 (7), 417-420, 2009)。すでに本研究班の北元憲利 兵庫県立大学教授、田中智之 堺市衛生研究所所長らによって、サポウイルス GI Mc114株、GI Yokote1株、GII Syd53株、GIV Syd3株、GIV SW278株、GV NK24株 VLPを免疫抗原としたモノクローナル抗体が複数得られているが、実用的なサポウイルス抗原検出、濃縮系の開発および性能評価のためには、多様なSaV株を網羅した抗原パネルの作成と、多様な株を確実に検出できる抗体セット、あるいはブロードバンドモノクローナル抗体の作成が鍵になる。サポウイルスの場合、GIV、GV株と比較して、GIとGII株の塩基配列多様性が大きく、これらの株間で抗原性が異なる可能性が高い。そこで、本研究ではこれら2つのgenogroupに属する新たなSaV株についてVLPを作出することを主な目的とした。また、新たなSaV VLP発現系として、培養昆虫細胞ではなく、カイ

コを用いたSaV VLP発現も試みた。

## B. 研究方法

### 1. 材料

衛生研究所との共同研究によって国内の急性胃腸炎事例から検出されたSaV GI, GII株のうち、これまでにVLPs発現を行ったものとは異なる遺伝子クラスターに属する株を選択した。

### 2. 培養昆虫細胞でのサポウイルス VLPs の発現

バキュロウイルストランスファーベクター pVL1392 (Orbigen社)にサポウイルス GI Nichinan株、GII D1711株、もしくはGII 20082029株の構造タンパク質コード遺伝子の開始コドンからゲノム末端までの領域約2.3kbをクローニングした。

T75 フラスコに培養した Sf9 細胞を 6 ウェルプレートに移し、培地を ExCell-405 に置換した後、Lipofectine (Invitrogen)を用いて上記 plasmid と BaculoGold (BD Bioscience) を co-transfect し、一晚培養後、各ウェルに 8% FCS 添加 Grace medium 2mL を加え、7日間培養した。

この培養上清を別途 T75 フラスコに培養した Sf9 細胞に添加し、さらに7日間培養し、この培養上清をシードウイルス液とした。その後、T75 フラスコ10本に培養した Tn5 細胞に、上記シードウイルス液を 500  $\mu$ L づつ添加し (multiplicity of infection 10程度に相当)、7日後に培養上清を回収した。回収した培養上清を4℃で10000 $\times$ g、60分間遠心し、細胞破砕物およびバキュロウイルスを沈殿させた。その後、VLPsを回収するため、遠心上清 (約100mL)を Beckman Coulter 社の