

Sw32-Ti ローターを用いて、4℃で 32,000rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブにそれぞれ 300  $\mu$ l の ExCell-405 を加え、4℃で 1 晩静置した。その後、溶液を 4℃で 10000 $\times$ g、30 分間遠心し沈殿残渣を除去し、上清を Beckman Coulter 社の TLA55 ローターにセットし、4℃で 50,000rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに 200  $\mu$ l の ExCell-405 を加え、4℃で 1 晩静置溶解後、4℃で 10000 $\times$ g、5 分間遠心し沈殿残渣を除去した。MilliQ 水に 2.1 g の塩化セシウムを溶解し、VLP を含む ExCell-405 溶液約 200  $\mu$ l を加え、合計 5mL とした後、Beckman Coulter 社の Sw55-Ti ローターにセットし、4℃で 35,000rpm、24 時間超遠心を行った。超遠心後、250  $\mu$ l $\times$ 20 本の分画を回収した。各分画 10  $\mu$ l を 40  $\mu$ l の PBS で希釈後、SDS-PAGE を行い、サポウイルス構造タンパク質に相当する約 60kDa のバンドが存在する分画を確認し、VLPs 分画としてプールした。このプール分画を ExCell-405 で希釈後、Beckman Coulter 社の TLA55 ローターにセットし、4℃で 50,000rpm、2 時間、超遠心を行った。上清を除去後、各遠心チューブに 25  $\mu$ l の ExCell-405 を加え、4℃で 1 晩静置した。得られた溶液 (50  $\mu$ l) を用いて VLP の濃度の確認と、VLPs の電子顕微鏡観察を行った。これらの操作をそれぞれ、サポウイルス GI Nichinan 株、GII D1711 株、もしくは GII 20082029 株について行った。

## 2. カイコでのサポウイルス VLPs の発現

SaV GII Mc10 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 をトランスファーベクター pM01 (片倉工業株式会社) にクローニングした。その

後、片倉工業株式会社に組換えバキュロウイルスの作成、組換えバキュロウイルスのカイコ成虫、もしくはサナギへの接種および、カイコ成虫体液、サナギ破碎液の回収を依頼した。サポウイルス VLPs を回収するため、カイコ成虫体液、サナギ破碎液を ExCell-405 で希釈し、Beckman Coulter 社の Sw32-Ti ローターにセットし、10℃で 31,000rpm、3 時間、超遠心を行った。上清を除去後、遠心チューブに 1mL の Ex-Cell 405 を加え、4℃で 1 晩静置した。その後、Ex-Cell-405 に 1.9g の塩化セシウムを溶解し、VLP を含む ExCell-405 溶液 1mL を加えて、合計 5mL とした後、Beckman Coulter 社の Sw55 ローターにセットし、4℃で 35,000rpm、48 時間超遠心を行った。

その後、VLPs に相当するバンドをシリンジで回収し、ExCell-405 で希釈後、Beckman Coulter 社の TLA55 ローターにセットし、4℃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  $\mu$ l の ExCell-405 を加え、4℃で 1 晩静置した。このプール分画 1  $\mu$ 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。

### (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

昆虫細胞発現系を用いて新たに 3 株 (GI Nichinan 株、GII D1711 株、および GII 20082029 株) のサポウイルス VLP 発現に成功

した。電子顕微鏡観察により、これら VLP はサポウイルスに特徴的な形態を有していた。VLP の収量は T75 フラスコ 10 枚あたり、GI Nichinan 株が 75 µg、GII D1711 および GII 20082029 株がそれぞれ 3 µg であった。

また、昆虫細胞を用いた発現系ではサナギ破碎液に SaV VLPs の発現が認められた。一方でカイコ体液には SaV VLPs が認められなかった。

#### D. 考察

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) のサポウイルス VLPs の発現に成功している。しかし、その発現量はノロウイルスと比較して約 1/10 以下である。

これまでの検討では GI および GV 株と比較して GII、GIV 株の VLP の発現成功率が低く、また収量も低い傾向があるが、本研究においても同様に、GI 株と比較して、GII 株の収量は 1 桁少なかった。また、カイコを用いた系でも GII 株の VLP の生成は認めたが、収量の大幅な改善は認められていない。

急性胃腸炎患者の糞便からは、GI、GII ともに今なお新たな遺伝子クラスターに属する SaV 株が見つかってきているため、高精度な SaV 抗原検出系を確立するためには、さらなる抗原パネルの作製と、これらに対する特異抗体セット、あるいは共通エピトープを認識するモノクローナル抗体の確立が求められる。その際、遺伝的多様性があり、しかも昆虫細胞発現系における VLP の収量が特に低い SaV GII 株については、すでに我々が確立している哺乳動物培養細胞を用いた VLP 発

現系の使用、あるいは、免疫用抗原の調製という目的に特化して大腸菌発現系などで SaV 構造タンパク質を発現させるなど様々な手法の組み合わせを考慮する必要がある。

#### E. 結論

本研究で、新たな SaV GI、GII 株について VLP を作成することに成功した。今後、すでに作成している SaV VLP に対するモノクローナル抗体の反応性評価を行い、抗原性の違いが認められた場合は、これら SaV VLP を大量作成し、分担研究者の協力のもと、新たな株の VLP を免疫抗原とした特異抗体の作成、モノクローナル抗体の作成に取り組む。

ノロウイルスの場合、VLP パネルの蓄積、継続的な抗体取得、評価に 10 年以上の年月を要した。SaV も、継続的な VLP 発現、抗体作成の取り組みによって、食品や臨床検体に対する実用的な SaV 抗原検出系の開発が進むことが期待される。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

(1) 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. *In Press*.

(2) 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.

(3) 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.

(4) Bull RA, Hyde J, Mackenzie JM, Hansman GS, Oka T, Takeda N, White PA. Comparison of the replication properties of murine and human calicivirus RNA-dependent RNA polymerases. Virus Genes. 2010 Oct 20. [Epub ahead of print]

(5) 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.

(6) Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Seasonal distribution and genetic diversity of genogroups I, II, and IV noroviruses in the Tamagawa River, Japan. Environ Sci Technol. 2010 Sep 15;44(18):7116-22.

(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.

(8) 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.

(9) 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.

(10) 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

(11) 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.

(12) 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

(1) 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

(2) 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

(3) 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

(4) 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ピン・トラップ法の開発

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

第 31 回日本食品微生物学会総会、2010 年 11 月 11 日-12 日、滋賀

(5) 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

(6) 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

(7) 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

(8) 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

(9) 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

(10) 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

(11) 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 Genogroup IV  
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

(12) 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パーシジェネテ  
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

(13) 岡智一郎

「カリシウイルスの新知見」

ウイルス性下痢症研究会第22回学術集会  
2010.11.6. 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

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

神戸市および長野県で検出された A 型肝炎ウイルスの遺伝子解析

研究分担者	石井孝司	国立感染症研究所・ウイルス第二部
研究協力者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部
研究協力者	飯島義雄	神戸市環境保険研究所
研究協力者	吉田徹也	長野県環境保全研究所

研究要旨：2010 年に報告された A 型肝炎事例のうち、神戸市と長野県の食中毒事例において検出された A 型肝炎ウイルス 2 株については、ゲノムのほぼ全長の塩基配列を決定することができた。ゲノムの一部を用いた系統解析に加えて、ゲノム全長の比較による A 型肝炎ウイルスの変異の動向について解析したところ、エンテロウイルス等と異なり、遺伝子型間での組換えはいまのところ確認されなかった。

A. 研究目的

A 型肝炎ウイルス (HAV) の分子疫学は現在、主に現行法の遺伝子検出検査における RT-PCR によって増幅される約 280bp の領域の相同性比較によって行われているが、HAV のゲノム全長は約 7.5kbp あり、HAV と同じくピコルナウイルス科に属するエンテロウイルスに見られるような遺伝子型間の組換えなど、ウイルスの変異動向や、病原性との関連についての解析を行うためにはゲノム全長データによるウイルス株間の比較が必要である。2010 年に報告された A 型肝炎事例のうち、神戸市と長野県において検出された HAV 2 株は、ゲノムのほぼ全長の塩基配列を決定することができた。これまでの 280bp を基にした系統解析に加えてゲノム全長を、すでに報告されている他の HAV 株と

比較することで HAV の変異動向について解析を試みるとともに、現在行われている HAV 遺伝子検出法の高感度化に向けて検討を開始した。

B. 研究方法

神戸市および長野県において検出された HAV 2 株の RT-PCR による遺伝子増幅産物をクローニングし、ダイレクトシーケンシングによりゲノムのほぼ全長の塩基配列を決定した。

これら 2 株のゲノム塩基配列と、データベースに登録されている HAV のゲノム情報を用いて、HAV 遺伝子産物 P0 および、VP1、ポリメラーゼ領域 3D について、ClustalW を用いてゲノムの相同性解析と、系統解析を行った。

倫理面への配慮：取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われる。各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は適切な申請を行い承認を受ける。

### C. 研究結果

神戸市および長野県で検出された HAV 2 株は、HAV ゲノムの 5' 末端、3' 末端の非翻訳領域を含む約 7.5kbp について塩基配列を決定することができた。

今回塩基配列を決定した HAV 2 株と、過去に報告されている国内外の 2 4 株について、一次遺伝子産物である P0 領域について系統解析を行った結果、神戸、長野の 2 株はともに、現行法に基づく VP1-2A 領域を用いた系統解析結果と同様に遺伝子型 1A に分類された (図 1)。

また、カプシド VP1 領域および、ポリメラーゼ 3D 領域についてそれぞれ系統解析を行ったところ、2 株ともに 1A 型に分類された (図 2)。

さらに、ゲノム全長を Clustal W を用いてアライメント解析し、各遺伝子型間で Similarity Plot 解析を行ったところ、2 株とも、ゲノム全長にわたって 1A と最も高い相同性を示した。

### D. 考察

今回神戸市、長野県の 2 株のゲノムのほぼ全長を用いた系統解析と現行法の VP1-2A 領域 280bp を用いた系統解析の結果が一致したことから、HAV の遺伝子型別は VP1-2A 領域のシーケンス解析で対応できることが考えられた。さらに、HAV の遺伝子型間ではエンテロウイルスなど

で報告されているような組換えは今のところ起きていないことが示唆された。

### E. 結論

分子疫学解析により、国内で検出される A 型肝炎の発生動向や HAV の感染経路の解明、流行阻止対策が前進することが期待できるが、現在の遺伝子検出検査で得られるゲノム情報は限られており、ウイルスの変異と流行や病原性との関連、将来の組換えウイルスの出現の可能性に対応するためにはゲノム全長の塩基配列情報を用いた解析は不可欠である。その点において、今回新たに HAV 2 株についてゲノムのほぼ全長の塩基配列を決定し、解析できた意義は大きく、今後 HAV の検出検査の高感度化や迅速化を進め、さらにこれまで蓄積されてきたゲノム情報を活用するために、今回新たに得られた神戸市、長野県の 2 株のゲノム情報をもとに、新たに HAV 検出用のプライマーの設計について検討し、高感度検出系の構築について解析を行いたいと考えている。

### F. 研究発表

1. 清原知子、石井孝司、脇田隆字：B 型肝炎ワクチンの *in vitro* 試験：Inhibition Assay、第 14 回日本ワクチン学会、平成 22 年 12 月、東京
2. 森山正樹、赤澤大輔、横川 寛、中村紀子、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字：培養細胞由来 HCV 粒子ワクチンの免疫誘導能と最適アジュバントの検討、第 14 回日本ワクチン学会、平成 22 年 12 月、東京
3. 石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、脇田隆字、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛：2010 年に日本で多発した A 型肝炎の分子疫学的解析、第 58 回日本ウイルス学会、平成 22 年 1 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、平成 22 年 11 月、徳  
 島
5. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、古  
 川早苗、成松 久、石井孝司、染谷雄  
 一、脇田隆字、久保田智巳：X 線結晶  
 構造解析によるノロウイルスと血液型  
 抗原の結合解析、第 58 回日本ウイル  
 ス学会、平成 22 年 11 月、徳島
  6. 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井  
 孝司、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗：  
 C 型肝炎ウイルスの *trans-packaging* 型  
 粒子を用いた感染機構の解析、第 58  
 回日本ウイルス学会、平成 22 年 11  
 月、徳島
  7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S.,  
 Shimada C., Nakamura N., Tada Y., Noda  
 M. and Wakita T. Epidemiological and  
 genetic analysis of a diffuse outbreak of  
 hepatitis A in Japan, 2010. Asian Pacific  
 Association for the Study of the Liver.  
 Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
  8. Ishii K. Surveillance of hepatitis A virus  
 in Japan. Research Forum for the  
 Tohoku-RITM Collaborating Research  
 Center for Emerging and Reemerging  
 Infectious Diseases. Manila, Philippines,  
 December 10, 2010.
  9. Yokokawa H., Akazawa D., Moriyama M.,  
 Nakamura N., Mochizuki H., Suzuki T.,  
 Kato T., Ishii K. and Wakita T.  
 Development of a purification method of  
 highly purified HCV virion for industrial  
 production. 17th International Meeting on  
 HCV and Related Viruses, Yokohama,  
 Japan, September 10-14, 2010.
  10. Moriyama M., Akazawa D., Yokokawa H.,  
 Nishimura K., Nakamura N., Mochizuki  
 H., Suzuki T., Kato T., Ishii K. and  
 Wakita T. The exploration of effective  
 adjuvant for HCV vaccine to induce  
 neutralizing immunoglobulin in mice. 17th  
 International Meeting on HCV and  
 Related Viruses, Yokohama, Japan,  
 September 10-14, 2010.
  11. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura  
 Y., Wakita T. and Suzuki T. Efficient  
 production of trans-complemented  
 hepatitis C virus particles: Use for study of  
 viral entry process. 17th International  
 Meeting on HCV and Related Viruses,  
 Yokohama, Japan, September 10-14,  
 2010.
  12. Li T.C., Liu R., Yoshizaki S., Ishii K.,  
 Miyamura T., Takeda N. and Wakita T.  
 The stability and inactivation of hepatitis  
 E virus grown in cell culture. 9th  
 International Symposium on  
 Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta,  
 USA, May 17-22, 2010.
  13. Suzuki R., Akazawa D., Ishii K., Matsuura  
 Y., Wakita T. and Suzuki T. Use of  
 trans-complemented hepatitis C virus  
 particles for study of viral entry process.  
 9th International Symposium on  
 Positive-Strand RNA Viruses, Atlanta,  
 USA, May 17-22, 2010.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
 なし

図 1

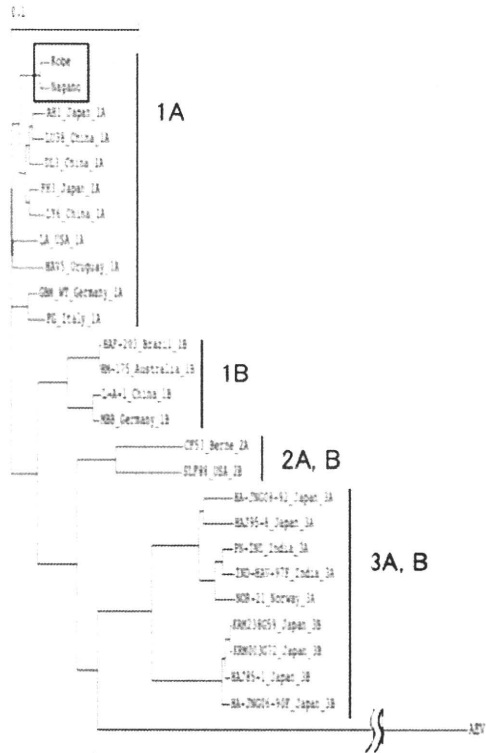
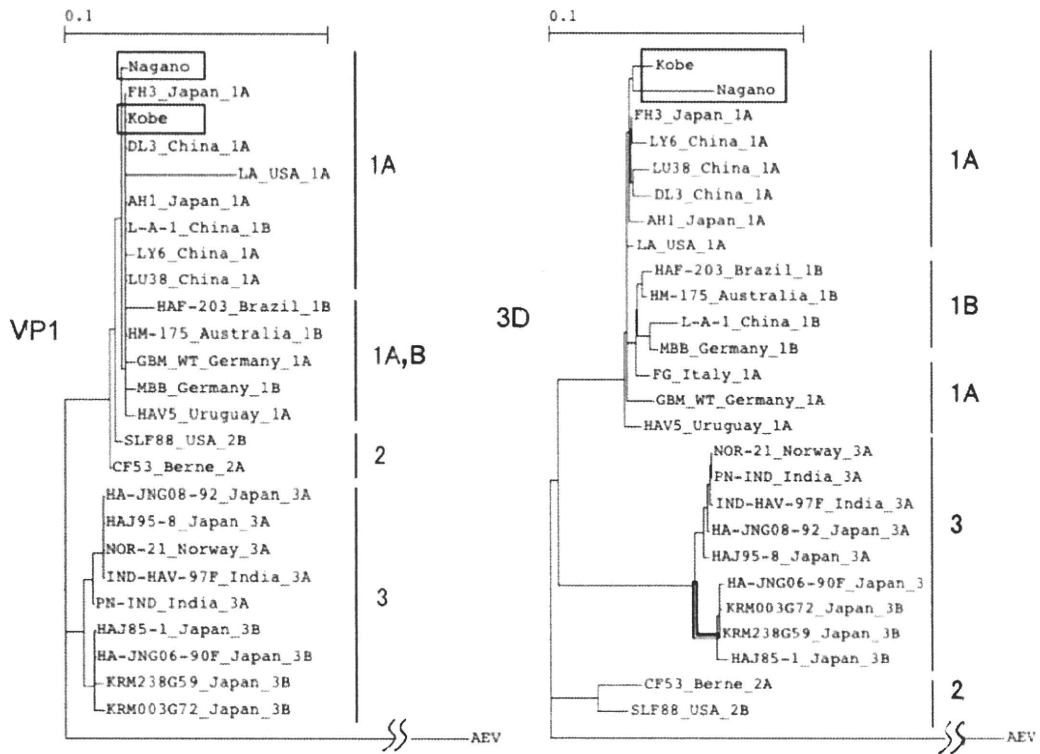


図 2



Genotype I HEV の細胞培養系樹立およびその安定性の検討

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。本研究では、我々はヒトから分離した遺伝子型 1 (Genotype 1) に属する HEV 株を PLC/PRF/5 細胞に接種し、HEV の増殖できる細胞培養系を樹立した。さらにこの培養系を用いて 1 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などを検討し、これまで樹立した 3 型および 4 型 HEV の安定性を比較し、HEV を不活化する条件を見いだした。

協力研究者 劉 蘭軍（国立感染症研究所）

**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、既知の四つの遺伝子型以外、イノシシやラットなどの野生動物から新たな遺伝子型のウイルスも発見された。E 型肝炎は途上国では多発しているし、HEV 感染妊婦の死亡率が高い。また、E 型肝炎は人獣共通感染症でもあり、HEV はすでに日本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。これまでに 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なく、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。これまでに我々はブタおよびイノシシから分離した遺伝子型 3 (G3) および遺伝子型 4 (G4) HEV の培養方法を樹立したが、本年度我々は Genotype I (G1) HEV をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種し、ウイルスの複製、増殖等の有無を観察し、さらに異なる培養条件下でのウイルス増殖を経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて測定し、HEV の増殖できる最適な培養条件を検討した。樹立した細胞培養系を用いて 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、異なる遺伝子型間の安定性を比較し、ウイルスを不活化にする最適な条件の検討を試みた。

**B. 研究方法**

材料：ウイルス：G1 HEV G3 HEV と G4 HEV；

細胞：PLC/PRF/5.

方法：

一、細胞培養系の樹立

G1 HEV 感染カニクイザル肝臓組織をすりつぶし、PBS(-)で 10%乳剤を作製した。ELISA 法および RT-PCR 法によってウイルス抗原と遺伝子を確認した。1 ml の肝細胞乳剤を PLC/PRF/5 細胞に接種し、培養上清を二、三日置きに採取した。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、培養細胞で増殖するかどうかを評価した。

二、熱安定性：培養細胞で増殖した G1, G3 および G4 HEV をそれぞれ 60℃, 5 分、60℃, 10、65℃, 5 分、65℃, 10 分間で熱処理したあと、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。

三、消毒剤に対する抵抗性：培養細胞にて増殖した G1, 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。

四、紫外線に対する抵抗性：培養細胞にて増殖した G1, 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

G1 HEV を感染した PLC/PRF/5 細胞の上清に 52 日目から HEV-RNA が検出され、89 日目から HEV 構造蛋白が検出された。その後、HEV 構造蛋白および HEV-RNA はコンスタントに培養上清から検出され、接種後 5 ヶ月が経った時点でも依然高いレベルを維持している。培養上清に分泌されたウイルスのアミノ酸配列は感染出発材料から分離したウイルスのアミノ酸配列と一致するので、HEV の培養細胞での複製、増殖が確認された。さらに培養上清を新しい細胞に接種しても、ウイルスの増殖が確認され、培養上清から分離したウイルスが感染性を有することが明らかになった。ウイルスの増殖速度はウイルスの継代と共に速くなる傾向が見られ、ウイルスは細胞にアダプトすることが推測される。

蛍光抗体を用いた免疫染色法では HEV 構造蛋白が細胞質に分布していることが示された。さらに構造蛋白をウェスタンブロット法で解析した結果、G3 および G4 HEV と同様、糖鎖修飾される

ことも示唆された。

G3 と G4 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、G1 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。温度の感受性に関して G3 HEV と同様、60℃10 分間、65℃5 分間以上の熱処理により失活した。また、ウイルスと血漿と混合して加熱処理する場合、ウイルスの不活化効果が影響される。

### D. 考察

遺伝子型が異なる G1, G3 および G4 HEV の増殖できる培養細胞系を確立した。培養細胞の樹立によって、各遺伝子型の安定性を培養細胞系で検討した。本研究から得られた HEV 安定性の情報は HEV による感染症や食中毒防止対策の有力な科学根拠となる。遺伝子型やウイルスと共存する物質などによってウイルスの安定性が異なることから、HEV を不活化するときこれらの要素を考慮する必要がある。

### F. 研究発表

#### 1. 学会発表

1) 李 天成、方 荅、王 澤均、宋士利 片岡 紀代、鈴木 哲朗、脇田 隆字。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、方荅、網康至、須崎百合子、武田直和、脇田隆字。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、方荅、片岡 紀代、宮村 達男 脇田 隆字。日本のブタから分離したブタエンテ

ロウウイルス 8 型の解析. 日本ウイルス学会、第 58 回学術集会 2010 年 10 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 study 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(1):202.

## 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



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

平成 22 年度 研究協力報告書

田中	智之	飯塚	節子
吉澄	志磨	北元	憲利
森	功次	山下	育孝
入谷	展弘	三上	稔之
吉田	徹也	小原	真弓
田村	務	内野	清子
阿部	勝彦	高橋	知子
植木	洋	増本	久人
篠原	美千代	小林	慎一
重本	直樹	原田	誠也

平成 23 (2011) 年 3 月

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」

研究協力者 総括報告書

研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	三上 稔之	青森県環境保健センター
	高橋 知子	岩手県環境保健研究センター
	植木 洋	宮城県保健環境センター
	篠原 美千代	埼玉県衛生研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	吉田 徹也	長野県環境保全研究所
	小原 真弓	富山県衛生研究所
	小林 慎一	愛知県衛生研究所
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	内野 清子	堺市衛生研究所
	北元 憲利	兵庫県立大学環境人間学部
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	重本 直樹	広島県立総合技術研究所・保健環境センター
	阿部 勝彦	広島市衛生研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所

研究総括

次の 5 項目の研究分野での報告がなされた。

1. 食中毒事例の病原ウイルスには、ノロウイルスを主たる起因ウイルスであるが、サポウイルス、アイチウイルス、アストロウイルス、ロタウイルスなども関与していることが判明してきた。これらのウイルス混合感染の意義について感染病態の変化が仮説として報告された。
2. 下水処理施設における流入水、放流水中の胃腸炎ウイルス遺伝子の検出状況について報告された。調査研究の設定方法ではウイルス性胃腸炎流行予測の可能であることが推測された。

3. これまで開発されてきたカキ、食品中の下痢症ウイルス検出方法、パンソルビントラップ法、に加えて新たな方法が勘案された。
4. 臨床検体をもちいたノロウイルスの遺伝子型解析から、いくつかの組み換え体ノロウイルス遺伝子(キメラ体)が検出された。
5. E型肝炎の流行疫学、ウイルスサーベイランスにより侵淫実態が明らかにされてきた。

#### A. 研究目的

これまで本研究の目的はウイルスを介した食中毒の予防に関する研究である。これまでノロウイルスによる食中毒事例が主流と考えられていたが、ノロウイルスの診断技術の向上や改善、ノロウイルスに対する国民の意識の向上により、他の食中毒原因ウイルスへの対応がなされるようになってきた。しかし依然として、感染経路の究明、食材への環境媒体の関与、ウイルス自身の感染力増強への変化は不明な点が多く、大きな課題として立ちまわっている。

食中毒の病原ウイルスによるリスク管理に関する研究として、北海道から九州に至る本邦 18 サーベイランス拠点から 18 名の研究協力者と共に、何よりも掘り下げたウイルス性食中毒の実態調査を基本とした。調査研究から派生する科学的な事実は予防対策への一助に向けたさらなる研究の礎とした。

研究協力者の研究内容は、次のカテゴリーに五大別できる。

- (1) 食中毒事例に関与するノロウイルス、サポウイルスと共にその他のウイルス関与の頻度、感染経路。
- (2) 環境中におけるノロウイルスの動向とヒト感染事例との関連性。
- (3) 臨床材料、食材等からノロウイルス、サポウイルスの検出方法の改良や迅速な診断方法の開発・改良。
- (4) ウイルスの変異等の角度からノ

ロウイルスの遺伝子学的特徴と解析。

- (5) E型肝炎ウイルスの疫学的調査。これらの5点の研究成果に焦点を合わせて総括してみる。

#### B. 研究材料と方法

研究材料には、散発・集団発生に関わらず食中毒事例あるいは急性胃腸炎事例時の感染者からの便を中心とした臨床材料、収去食材、またカキ等の食材では市販食材の購入品を用いた。また、動物由来材料は屠場等で処理される際の検体を材料とした。環境材料では下水関連の環境水を用いた。

研究方法の多くは、既述の定法に従った。ノロウイルス遺伝子の検出・定量・キャプシド、ポリメラーゼ領域の塩基配列の解析・系統樹作成を行い、遺伝子型別の決定、相同性を比較した。診断方法の改良にはウイルス中空粒子(VLPs)を用いた。さらに新たな検出方法の開発には独自の方法が開発されている(この項については、各報告書の参照が望まれる)。

(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。また、実験動物を用いる際には、当該施設での倫理基準に準じて対処した。



## C. 研究結果

### 結果(1)

ウイルス性胃腸炎の起因ウイルスはノロウイルスのほか、サポウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス等がある。これらのウイルスの感染頻度について疫学調査を行った。サポウイルス単独食中毒事例では給食弁当を原因食とする大規模な広域感染事例があり、655名(喫食者の17.1%にSV GI. 2が検出)の患者数であった。原因食材の特定には到っていない(小林)。生カキ原因食材の食中毒事例では、アイチウイルスとノロウイルスが同時検出されたが、ノロウイルス陰性検体でアイチウイルスのみ検出、また同一事例の非発症者ではノロウイルス陰性者にアイチウイルスのみが検出された(田村)。食中毒事例213事例での解析では、ノロウイルスの関与は91.5%、サポウイルス(4.2%)、ロタウイルス(2.8%)、サポウイルス+ロタウイルス(0.5%)、アストロウイルス+アデノウイルス(0.5%)であった(森)。同様にカキ関連食中毒事例はノロウイルス(89.7%) アイチウイルス(17.2%)、サポウイルス(10.3%)の関与であった(入谷) 二枚貝関連食中毒患者便からノロウイルス以外にサポ(17.1%)、アイチ(14.3%) また、原因食材として疑われた同一ロットカキからノロウイルス以外にアイチ(4/10)、アストロ(4/10)が検出された(吉田)。腸管係ウイルスが検出された食中毒42事例から、ノロウイルス40事例(95.2%)、

アイチウイルス14事例(33.3%)、サポウイルス13(31.0%)、アストロウイルス3(7.1%)、エンテロウイルス2(4.8%)が検出された。検体ごとに見るとそれぞれ72.3%, 14.3%, 10.7%, 3.3%, 1.0%である(吉澄)。また、腸管内混合感染についての言及もみられ、ウイルス増殖の優劣によって発症に差が見られるとの仮説も報告されている(吉澄)。

結果(2) 下水処理施設における流入水、放水についてノロウイルス汚染状況を調査した(三上、高橋、小原、内野)。しかし、検出されたウイルス遺伝子はノロウイルスのみならず、サポウイルス、エンテロウイルス、アイチウイルス、アデノウイルス、A群ロタウイルスが検出された。これらのウイルス遺伝子は流入水に多く検出されたが、流入水で検出された遺伝子が放流水では検出されない場合も存在した(高橋)。検出されノロウイルス遺伝子コピー数は元の採水量に換算すると、GIでおよそ $3.6 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3/\ell$ 、GIIで $7.9 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^5/\ell$ になる(三上)。ノロウイルスでは多くの遺伝子型が検出されるが(内野、小原)流行状況の把握は難しい場合が多い。しかし、同一遺伝子型が連続して検出される場合は上流での流行が示唆されるという仮説を報告している(高橋)。これらの放流水中の遺伝子がカキ等の二枚貝に与える影響であるが、市販カキでの検索ではノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、A型肝炎ウイルスは検出されなかった(三上)。

一方、下水からのノロウイルス以外のウイルスでは、アイチウイルス、アストロウイルス、サポウイルス遺伝子がほぼ通年に亘って検出されている(内野)。

**結果(3)** 新たに食材からノロウイルス遺伝子を検出する試みが3施設から報告された(篠原、植木、重本)。非晶性リン酸カルシウム微粒子を用いたウイルス濃縮法(篠原)、ノロウイルス濃縮行程で $\alpha$ -アミラーゼの使用(植木)、蛍光マルチプレックス RT-PCR法による下痢症ウイルス(ノロウイルス GI, GII, サポウイルス, アストロウイルス)の検出系を構築(重本)である。

ネコカリシウイルスを用いた添加回収実験ではいずれの食品からも効率良くウイルスを回収することができ、特に、キャベツ、レタス、ハムでは10gあたり $10^3$ コピーの添加ウイルス回収率であった(篠原)。カキでは従来のノロウイルス濃縮法のPEGと比較しその検出効率が高かった(植木)。蛍光マルチプレックス RT-PCR法では反応産物における標識蛍光色素の目視による検出で、ウイルス既知の検体と比較したところ一致率96.4%であった。検出感度は $10^2 \sim 10^3$ コピー/反応であった(重本)

サポウイルス検出効率を上げるために構築された新規の RT-PCR 法の比較検討がなされ、その結果、患者材料に差は見られなかったが、食品・アサリからは高い検出率を示し(飯塚)。一方、患者検体からサポウイルス検出 ELISA

法やIC法の構築が試みられている(北元)。検出系に用いるモノクローナル抗体の質がカギを握っていると考えられる。種々の材料からのノロウイルス検出は遺伝子検出であり感染性の有無は不明である。新しい試みとして、F フェージプラーク法を用いた感染性ウイルスの検出方法の試みがなされた(阿部)。カキ中の生きたノロウイルスの検出など実用性の高い研究と考えるが、今後の大きな発展に期待したい。

**結果(4)** シーズンの主流行株は GII. 4 であったが新しい 2008a, New Orleans 2009 株が検出された(山下)。GII. 4 につぐ GII. 3 株にポリメラーゼ領域とカプシド領域の組み換え株を持つキメラ(リコンビナント)株が検出された(山下)。カキの喫食歴のない患者から2株のノロウイルスが検出された(重感染)例の検討では、同様のポリメラーゼ領域 GII. 12、カプシド領域 GII. 3 のキメラ(リコンビナント)株の報告がある(田中)。

**結果(5)** 市場に流通する直前のブタに頻度は低い(0.32%)、E型肝炎ウイルス血症が検出された。また、野生イノシシでは9.4%の感染率であった(原田)。

#### D. 今後の課題

1. 二枚貝などの関連する食中毒事例では、ノロウイルス以外の食中毒起因ウイルスが検出される頻度が高くなってきている。ノロウイルス遺伝子の検出方法の向上につれてこ

これらのウイルスにも当てはまってきた結果と考える。これらのウイルスが病状に果たす役割は不明な点が多。NVの強い病原性との比較検討も必要である。今後、食中毒事例解析の際には幅広く、特にアイチウイルスやサポウイルスの、遺伝子型解析を行う必要がある。

2. 食中毒感染症情報を的確に入手しながら、短いインターバルで下水流入水のウイルス遺伝子検索を行えば、環境検体と臨床検体の相関についてはクリアな回答が期待できる。しかし、マンパワー、経費など、現時点では解決できる良薬はない。しかし、視野に入れた活動は大切である。
3. これまで食品中のノロウイルス遺伝子検出方法としてパンソルビントラップ法が推奨されている。今年度提起された新しい検出方法については、パンソルビン法との感度、操作性、コスト等について検討する必要がある。  
また、臨床検体検査ではIC法の改良が課題である。
4. 遺伝子型変異株の出現、解析は検査結果の注意深い解析、この班でのしっかりした連携と情報交換に努めることが重要であると考えられる。
5. E型肝炎も食を介するウイルス性感染性疾患として、とくに肉料理に伴う交差感染などの、感染予防の啓発を行うことが重要である。

## 二枚貝喫食事例を対象とした ノロウイルス以外の腸管系ウイルスの検索

研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
研究協力者	後藤 明子	北海道立衛生研究所
研究協力者	石田勢津子	北海道立衛生研究所
研究分担者	田中 智之	堺市衛生研究所

### 研究要旨

ノロウイルス(NV)以外の腸管系ウイルスが食中毒発生にどの程度関与しているかを明らかにするため、原因疑い食品に二枚貝が含まれていた集団胃腸炎 42 事例を対象に、NV 以外の腸管系ウイルスの検出を試みた。対象 40 事例から NV が検出され、その他の腸管系ウイルスとして、アイチウイルス(AiV)が 14 事例、サポウイルス(SV)が 13 事例、アストロウイルス(AstV)が 3 事例、エンテロウイルスが 2 事例から検出された。また、食中毒事例の原因食品と推定された二枚貝(原材料)からも AiV、SV、AstV が検出され、これらは二枚貝喫食による感染がより懸念されるウイルスであると考えられた。これらのウイルス感染が発症に関与しているかどうかを推測するため、ウイルスコピー数の測定を行った。PCR 法による SV 陽性患者糞便 33 検体では、7 検体が糞便 1g 当たり約  $10^9 \sim 10^{10}$  コピーという高い値を示し、これらの患者については SV による発症への関与が伺われた。しかし、多くの検体(26 検体)は  $10^7$  コピー～定量下限値未満という低い値を示した。他の腸管系ウイルス検出状況の確認では、SV 低コピー数の 26 検体中 25 検体からは NV(GII)も検出されていた。高コピー数の検体はすべて NV(GII)陰性であり、NV(GII)との混合感染時には SV の増殖が抑えられる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

食中毒疑い事例について腸管系ウイルスの検索を行う際、第一候補としてあげられるのはノロウイルス(NV)であり、NV が大多数の検体から検出された事例については、通常、その他のウイルスの検索

は行われていない。また、NV 検出率が低い場合や検出されなかった場合において、NV 以外の腸管系ウイルスの検索を行うか否か、どのウイルスを検査対象とするかについての統一された判断基準はなく、地方衛生研究所で取られる対応は様々で