

201123032A

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

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の  
開発と予防診断法に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の  
開発と予防診断法に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 哲朗

平成24 (2012) 年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と  
予防診断法に関する研究

鈴木 哲朗 . . . . . 1

### II. 分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の解析

片山 和彦 . . . . . 11

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

田中 智之 . . . . . 15

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

本村 和嗣 . . . . . 19

ブタB群ロタウイルスの非構造タンパク質に関する遺伝子解析および病原性解析

恒光 裕 . . . . . 23

新規ヒトポリオーマウイルス構造タンパク質の発現およびその応用

李 天成 . . . . . 27

E型肝炎ウイルス粒子の感染性を規定する因子の解析

石井 孝司 . . . . . 31

マウスノロウイルスの培養細胞での増殖馴化に伴う遺伝子配列変化の解析、  
および新規ヒトポリオーマウイルスの感染増殖系探索にむけたレポーターシステムの開発

中西 章 . . . . . 37

B型肝炎ウイルスS抗原の分泌機構の研究

子宮頸癌の治療薬を目指した特殊ペプチドによるE6AP阻害剤の開発

勝二 郁夫 . . . . . 43

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別冊

# I. 総括研究報告書

## 培養細胞感染系の確立されていない病原体の実験技術の開発と予防診断法に関する研究

研究代表者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

**研究要旨** ノロウイルス：リバーズジェネティクスシステムによるヒトノロウイルス (HuNoV) 産生系及びマウスノロウイルス (MuNoV) 感染増殖細胞系についてノロウイルス増殖諸過程を経時的に比較解析し、近似性、差異を明らかにした。MuNoV の増殖馴化に関与する遺伝子変異を同定した。食中毒事例等由来の新鮮糞便検体を用いて各種培養細胞株への HuNoV 感染感受性を解析した。次世代シーケンサーを用いて、感染者における HuNoV 準種の実態、動態を解析し、ヒト-ヒト間での感染に伴い NoV 株の淘汰選択が行われ、伝播によって亜型、準種の変化が生じることを示した。

ロタウイルス：多株遺伝子解析、分子系統樹解析から、B 群ロタウイルス (RoV) の遺伝子型分類基準を確立した。ノトパイオトブタ感染系による B 型 RoV 病態モデルを確立し、RoV 株間での病原性の違いを示した。

ポリオーマウイルス：新規ウイルス KIPyV, WUPyV のウイルス様粒子を作製、精製し、抗体検出系を確立。我が国健康人における抗体保有率を明らかにした。KIPyV, WUPyV のシュードビリオンを作出し感染支持細胞を取得した。JCV, BKV と糖脂質糖鎖との相互作用解析を行い、糖鎖結合の共通性、相違を明らかにした。

E 型肝炎ウイルス (HEV)：新規 HEV 感染性クローンを取得。ヒト肝がん細胞株のリクローン化から、HEV 吸着侵入感受性の異なる細胞クローン種を単離。増殖関連宿主因子の存在が示唆された。

B 型肝炎ウイルス (HBV)：HBV S 粒子の分泌効率決定基が PreS2 翻訳開始域に点在することを証明。

パピローマウイルス (HPV)：子宮頸癌特異的治療薬の開発を目指し、HPV E6/E6AP による癌化を阻害する分子を探索し、p53 のユビキチン化を阻害する E6AP 結合性ペプチドを見出した。

### 分担研究者

片山 和彦 国立感染症研究所 室長  
田中 智之 堺市衛生研究所 所長  
本村 和嗣 国立感染症研究所 主任研究官  
恒光 裕 動物衛生研究所 研究チーム長  
李 天成 国立感染症研究所 主任研究官  
石井 孝司 国立感染症研究所 室長  
中西 章 国立長寿医療研究センター 室長  
勝二 郁夫 神戸大学医学研究科 准教授

ためにウイルス学的研究に制約があり、その感染症対策が十分でないウイルスについて、1) ウイルス様粒子 (VLP) を利用した抗原抗体診断法の開発と血清疫学解析、2) 実験モデルの開発とウイルス生活環の解析、3) 宿主免疫応答の解析とワクチン開発の基盤研究を包括的に行う。

### B. 研究方法

#### 1. ノロウイルス

1-1. マウスノロウイルス (MuNoV) 感染増殖モ

#### A. 研究目的

培養細胞での感染増殖系が確立されていない

デル：

マウスノロウイルス (MuNoV) は、遠矢幸伸准教授 (東京大学大学院農学生命研究科) により分離された MuNoV-S7 株を用いた。RAW264.7 細胞は、ATCC より購入した。MuNoV S7 株の各タンパク質を大腸菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して抗 MuNoV 血清を作製した ( $\alpha$ Nterm,  $\alpha$ NTPase,  $\alpha$ VPg,  $\alpha$ RdRp,  $\alpha$ VP1,  $\alpha$ VP2)。複製中間体の検出には、抗二本鎖 RNA 抗体 ( $\alpha$ dRNA MoAb) を用いた。感染実験には RAW264.7 細胞を用いた。MuNoV ゲノム RNA 合成は、アクチノマイシン D 処理下での BrUTP 取り込みによって観察した。

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS53R MNV S7 の EF- $\alpha$  プロモーター部分を T7 プロモーター配列に交換した pT7 MNVS7 を作製した。この cDNA より作製した試験管内転写物の 5' 末端に ScriptCap system (Epicentre) により Cap 構造を付加した。Lipofectamin2000 (Invitrogen) あるいは TransIT mRNA transfection kit (Takara) により 293T 細胞にトランスフェクションして組換えウイルスを作製した。トランスフェクション後 24 時間にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させた。

1-2. ヒトノロウイルス (HuNoV) のリバーシジェネティクス：

HEK293T 細胞へ HuNoV プラスミド pKS-U201F をトランスフェクションし、6 時間または 12 時間にアクチノマイシン D 処理を行い、さらに 24 時間後にプラスコごと  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結した。細胞並びに細胞上清に含まれる新生ウイルス粒子は、3 回の凍結解凍後、 $10000\text{g}$  にて 20min の遠心操作で得られた上清から抽出精製した。

1-3. 細胞培養によるノロウイルス分離：

本年度は、新鮮な糞便材料 (G II. 4、G II. 13、G I. 4) を用い、10% 乳剤化後、 $3,000\text{rpm}$ 、10 分間および  $8,500\text{rpm}$ 、30 分間粗遠心した後、上清を 30% ショ糖液に重層し、 $36,000\text{rpm}$ 、2 時間超遠心した。沈渣を PBS(-) に suspend し、 $0.80\mu$

$+0.45\mu$  filter にてろ過した。また、遠心処理、ろ過条件の異なる調製も試みた。さらに、これらのウイルス検体にアセチルトリプシンを加え  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分インキュベートした検体を調製した。感染実験には、昨年度から用いている CaCo-2 細胞、RD 細胞に加え、新たに MRC-5 細胞、INT407 細胞を検討した。

1-4. HuNoV 感染症における宿主応答と周期的流行機序の解析：

次世代シーケンサーを用いた網羅的なノロウイルス遺伝子解析には、2010 年 12 月、HuNoV が、親子間、幼児から母親へ感染伝播した家族内感染事例を対象とした。糞便中の NoV の shell 領域の 5' 末端領域の配列を FLX 454 (Roche) により解析した。

HuNoV 中空粒子を作出するため、各種組換えバキュロウイルスベクターを作製した。組換えバキュロウイルスは、カイコ幼虫、蛹へ感染させた。HuNoV 中空粒子は、カイコ幼虫体液、蛹磨砕液中より、スクロース密度勾配遠心法及び塩化セシウム平衡密度勾配遠心法によって精製した。

2. ロタウイルス

2-1. ブタ B 群ロタウイルス (RoV) の NSP1 及び NSP2 に関する遺伝学的解析：

国内の 11 農場より採取した B 群ロタウイルス陽性ブタ糞便 28 検体のうち、PB-93-I5 および PB-107-G16 株について single primer amplification 法により NSP1 および NSP2 遺伝子の全塩基配列を決定した。次いで、それら 2 株の塩基配列を基に特異的プライマーを設計し、残りの株について RT-PCR 法で遺伝子検出を行った。得られた PCR 産物はダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

2-2. ノトバイオートブタを用いた感染実験：

PB-93-I5 および PB-107-G16 株を同量ずつノトバイオートブタに接種し、腸管を部位ごとに分けて経時的に採取し、両者が引き起こす病原性の相違を組織学的に比較・検討した。

### 3. ポリオーマウイルス

#### 3-1. ウイルス様粒子の作製：

ポリオーマウイルス WUPyV, KIPyV の構造タンパク質 VP1 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。形成されたウイルス様粒子を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。

#### 3-2. ヒトポリオーマウイルスレポーターシステムの開発：

研究分担者中西が開発した pseudovirion system により、WUPyV, KIPyV のカプシドをもつ pseudovirion を以下の方法で作製した。3種類のプラスミド：(1)pCAG WUV 又は pCAG KIV、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 pseudovirion を回収した。

### 4. E 型肝炎ウイルス

PLC/PRF/5 に E 型肝炎ウイルス (HEV) を感染させ、抗 HEV 抗体を用いて蛍光抗体染色を行うと、長期間培養後も HEV に感染していない細胞が見られ、この細胞株はヘテロな集団であることが推測された。そのため、single cell cloning を行い、得られた多数の細胞株について HEV の感染増殖性を Real-time PCR 法および ELISA 法で解析した。

### 5. B 型肝炎ウイルス

B 型肝炎ウイルス (HBV)-Aeus, HBV-Cat 株 (国立国際医療センター、溝上センター長より供与) の PreS1, PreS2, S 領域の変異体を作製し、Huh-7 細胞へトランスフェクトした後、上清中

の HBs 抗原および細胞内での HBs 抗原の発現をウェスタンブロット法で解析した。細胞上清中への HBs 抗原分泌効率は ELISA 法で解析した。

### 6. ヒトパピローマウイルス

フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法と、mRNA 鋳型依存的に天然物様特殊ペプチドライブラリーを合成する技術とその網羅的探索技術 RaPID (the random non-standard peptides integrated discovery) system で E6AP の HECT ドメインに結合する特殊ペプチド(環状 N-メチルペプチド)を作製した。得られた特殊ペプチドと E6AP HECT ドメインとの結合を SPR 法にて解析し、特殊ペプチドの E6AP 阻害活性を Prx1 および p53 を基質にして in vitro ユビキチン化アッセイで検討した。

#### (倫理面への配慮)

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。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理保存する。

### C. 研究結果

#### 1. ノロウイルス

##### 1-1. MuNoV 感染モデルの確立と増殖機構の解析：

MuNoV 感染後 6 時間ほどで細胞内に非構造タンパク質が発現し、その後、構造タンパク質の発現が認められた。感染後 6 時間から培養上清中のウイルス RNA タイターが上昇し、48 時間後

まで上昇は続いた。以上から、ウイルスの増殖サイクルは6~8時間であることが明らかとなった。MuNoVのRNA複製中間体は複製複合体とともに感染初期に細胞質全体に広がるが、感染6時間後には、複製複合体とともに核周辺に共局在した。さらにウイルス粒子にパッケージングされる一本鎖ゲノムRNAは、粒子を構成する構造タンパク質VP1と細胞周辺部に移動し、共局在することが明らかになった。

MuNoVの培養細胞での増殖馴化に伴う遺伝子配列変化を以下のように解析した。MuNoV 7型S7株感染細胞の継代2(P2)、3(P3)、13代(P13)からそれぞれRNAを抽出し、ウイルス塩基配列を同定した。P13のMuNoV配列は、pKS53R MNV S7 DNAのMuNoV配列と完全に一致したが、P2、P3の配列では、ゲノム配列全体で44-59の塩基配列が異なった。pKS53R MNV S7と比較してP2/P3のMuNoV配列共通に見られるアミノ酸変化を伴う塩基配列の違いは7、silent mutationは22見られた。これらの変異の意味を探索するため、変異を持つ合成RNAを作成、キャップ構造を付加し、293T細胞に導入して組換え変異MuNoVを作製した。各ウイルスの増殖性を解析した結果、ウイルスゲノムの後半部分、4680位-6996位(XhoI - BstBI)を交換したもの、そしてP2ウイルスストック由来のMNoVでは、RAW264.7細胞での増殖性は低下していた。P13のゲノム配列と4680位-6996位(XhoI - BstBI)で異なる塩基配列のなかで、アミノ酸配列変化を伴うものはMuNoV 6158位のT→C (Vp1 301 I→T) 6638位のC→T (Vp1 368 V→A)であり、この遺伝子変化はP2・P3に共通で見られた。

#### 1-2. HuNoVのリバースジェネティクス：

HuNoVのリバースジェネティクスにおいて、プラスミドからのmRNAの合成をアクチノマイシンDによって停止させ、MuNoVで観察された、ウイルスタンパク質による自己制御を誘導した。トランスフェクション後12時間でのアクチノマイシン処理では、新生ウイルス粒子の精製画分に新生ウイルス粒子は認められなかったが、6時間でのアクチノマイシン処理では、電子顕微

鏡観察により、ウイルス粒子が確認された。T75フラスコ1枚から、電子顕微鏡で観察可能なレベルのウイルス粒子産生に成功した。アクチノマイシン処理を行わない場合、電子顕微鏡で粒子を確認するためには、T225フラスコ20枚の培養細胞が必要である。本年度の研究により、HuNoVのリバースジェネティクスにおいて、225 x 20/75=60倍のウイルス産生効率の向上に成功した。

#### 1-3. 細胞培養によるノロウイルス分離：

どのウイルス材料また細胞とも4代から6代の継代接種でHuNoV遺伝子量は消滅した。また、この間にはCPEも認められなかった。

2) RD細胞にHuNoV GI.4を接種した場合にCPE変化様に見える変性細胞が存在したが蛍光抗体法でHuNoV陽性所見は見られなかった。ウイルス遺伝子量は二週間を超えて消失した。

#### 1-4. HuNoV感染症における宿主応答と周期的流行機序の解析：

ダイレクトシーケンシング法で1感染者から1つのゲノム全長の配列情報を得た。幼児はORF1がGII.12、ORF2-3がGII.3のキメラウイルス、母親はGII.4の2006亜株であり、遺伝子型が不一致であった。キャプシド遺伝子シェル領域の網羅的な遺伝子解析の結果、幼児では、得られた配列のうちGII.3が99.9%を占めており、GII.4が0.02%、GII.2が0.004%検出された。一方、母親では、GII.4が67.6%、GII.2が32.3%、GII.3が0.005%検出された。(v)母子間で配列の検出割合は異なるが、検出された各遺伝子型の配列はほぼ一致していた。

2006年以降、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わかっている。このうち5種類の2004/05亜株、2006a亜株、2006b亜株、2007a亜株、2009a亜株のVLP作製は成功した。2008a亜株のVLPは作製できなかった。

## 2. ロタウイルス

2-1. ブタB群RoVのNSP1及びNSP2に関する遺伝学的解析：



ブタ B 群 RoV 15 株の NSP1 遺伝子は他の動物由来 B 群 RoV と同様に、2 つの ORF 領域（ペプチド 1 および 2）を有した。NSP1 ペプチド 1 および 2 アミノ酸配列の一致率はブタ B 群 RoV 株間と既知の他動物由来株との間で大きく異なった。一方、NSP2 タンパク質のアミノ酸配列の比較を行った結果、全ての株で共通するヒスチジン領域が C 末端部保存されていた。系統樹解析の結果、NSP1 ペプチド 1 および 2 は共に由来動物種で明確に区別され、それぞれ 7 つの遺伝子型に分類された。特に、ブタ B 群 RoV 株はそれらの遺伝的多様性を反映していずれも 3 遺伝子型に分類された。NSP2 はブタ B 群 RoV 株は 3 遺伝子型に分類された。

## 2-2. ノトバイオトブタを用いた感染実験：

B-93-I5 および PB-107-G16 株接種群共に感染 2 日後、特に空腸で顕著な絨毛萎縮が認められた。PB-107-G16 接種ブタではそれに加えて、粘膜上皮細胞の壊死・脱落や合胞体形成が特異的に認められると共に、病変が十二指腸から回腸にかけて広範囲で観察された。B-93-I5 接種ブタに比べ、病変の発現期間が長かった。PB-107-G16 接種ブタの一部の個体は衰弱し、死に至った。本実験に用いた両株は遺伝学的相違に加えて、病原性においても顕著な相違を示すことが明らかとなった。

## 3. ポリオーマウイルス

### 3-1. ウイルス様粒子の作製：

WUPyV または KIPyV の VP1 組換えバキュロウイルスを Sf9, Tn5 細胞へ感染させ 3 日後に 41 kDa の VP1 タンパク質を検出した。しかしその発現レベルはこれまでのポリオーマウイルス (JCV, BKV, MCPyV) に比べかなり低かった。感染細胞の培養上清からは 41 と 39 kDa のタンパク質が得られた。41 kDa タンパク質は 1.30 g/cm<sup>3</sup> 分画に分布し、直径約 50nm の球形粒子が観察された。39 kDa タンパク質は 1.29 g/cm<sup>3</sup> 分画に分布し、直径約 22nm から 50nm まで数種類の直径の異なる粒子が存在した。KIPyV-LP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人における

KIPyV に対する抗体保有率を調査した。その結果、若年層から高い抗体保有率を示し、健常成人の約 53% が抗体を有することが明らかとなり、乳幼児の約 20% で KIPyV 感染歴を有する可能性が示された。

### 3-2. 新規ヒトポリオーマウイルスの感染増殖系探索にむけたレポーターシステムの開発：

pCMV-Gluc2 をパッケージする WUPyV、KIPyV psudovirion を、それぞれ 15cm ディッシュ 20 枚分の 293T 細胞から作製、精製した。SDS-PAGE / 銀染色から、Vp1 (~40Kd), Vp3 (~30kDa), ヒストンコアタンパク質 (~20kDa) が認められた。各バンドの濃さとおおよその予想される DNA コピー数とは矛盾しない比率であった。293T, TC7, Vero 細胞について psudovirion の導入効率を比較した。293T, TC7 への導入では SV40 psudovirion には及ばないものの、WUPyV、KIPyV 共にいずれの細胞にも与えたコピー DNA 量の増加に沿ってシグナルの増加が検出された。一方、Vero 細胞への導入では、WUPyV、KIPyV psudovirion による pCMV-Gluc2 の導入は SV40 psudovirion によるものとほぼ同程度の Gluc 発現誘導がみられ、WUPyV、KIPyV は Vero 細胞で比較的良好に感染できる可能性が示唆された。

### 3-3. ヒトポリオーマウイルスと糖脂質糖鎖との結合解析：

組み換えバキュロウイルスにより JCV, BKV のウイルス様粒子を作製した。13 種類の糖脂質糖鎖との結合性を SPR 法によって解析した。その結果、JCV は、GM1, GM2, GD1b, GD2, GD3, GD1a, GT1a, GT1b, GQ1b, Fucosyl GM1 と極めて高い親和性、GM3 と中程度の親和性を示し、Asialo GM2, Gb3 とは結合しなかった。それに対し、BKV は、JCV と同様に GD1b, GD2, GD3, GD1a, GT1a, GT1b, GQ1b, Fucosyl GM1 とは高親和性、GM3 と中親和性を示し、Asialo GM2, Gb3 とは結合しなかったが、JCV と異なり、GM1, GM2 との結合は認められなかった。JCV と BKV で糖脂質糖鎖結合能の共通性、差異が明らかとなった。

#### 4. E型肝炎ウイルス

PLC/PRF/5細胞のsingle cell cloningにより約100 subcloneを取得した。それぞれの細胞にHEV 83-2株を接種し、約2ヶ月程度の長期培養を行い、培養上清中のHEV抗原量を測定したところ、一部の細胞株は2ヶ月後にもHEV抗原の分泌が観察されず、HEVが感染増殖できないことが示唆された。しかしながらこれらの細胞株も、感染性のHEV RNAをトランスフェクションするとHEV抗原が分泌されることから、細胞内でのウイルス増殖能には問題がないことが示唆された。

#### 5. B型肝炎ウイルス

HBV-Aeus株 pSV-AAA, HBV-Cat株 pSV-CCC およびPreS1, PreS2, S領域を組換えた変異体プラスミド pSV CCC-MT1 から pSV CCC-MT13 まで作製した。HBsAgの上清中への分泌量はpSV-AAAと比較してpSV CCC-MT9, pSV CCC-MT13が最も高値となり、day 4で約80ng/mLとpSV-AAAの2倍、genotype CのpSV-CCCの約4倍まで分泌効率が向上していた。Aeus株PreS2ではATGCAGTGGAAAT (MQWN), CAT PreS2ではATGCAATGGAAC (MQWN), CAT PreS2-MT9ではATGCAACTCCAC (MQLH), CAT PreS2-MT13ではATGCAGTGGAAAC (MQWN)という配列になっており、同義置換でも分泌効率が異なることから、開始コドン周囲の塩基配列が分泌効率に関与する可能性が示された。

#### 6. ヒトパピローマウイルス

ヒトパピローマウイルス(HPV)感染に起因する子宮頸癌に対する治療薬を目指して特殊ペプチドによるE6AP阻害剤の開発を行なった。まず、RaPID systemにより、E6AP HECT domainと結合する環状N-メチルペプチドを数種得た。特殊ペプチドとE6AP HECTドメインの詳細な結合解析の結果、KdはCM<sub>11</sub>-1で0.602 nM, LM<sub>11</sub>-1で180nM, CP<sub>11</sub>-1で>1000 nMとなり、環状でNメチル化されたCM<sub>11</sub>-1が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状LM<sub>11</sub>-1やNメチル化されていないCP<sub>11</sub>-1では結合力が弱かった。CM<sub>11</sub>-1は

E6APの基質Prx1のユビキチン化を効率良く阻害した。また、HPV16E6/E6APによるp53のユビキチン化も抑制することが示された。

#### D. 考察

##### 1. ノロウイルス

株化細胞を用いたHuNoVの感染増殖システムは確立されていない。そのため、ウイルスの病原性、感染増殖機構の解析が遅れており、未だ有効な抗ウイルス剤、感染制御方法の開発に至っていない。本研究では、近縁のMuNoVの感染増殖系におけるウイルスタンパク質合成、RNA合成の細胞内局在の経時的变化を追跡し、HuNoVのリバースジェネティクスシステムとの比較検討を行った。

MuNoVは、感染後の時間経過に応じて、発現するウイルスタンパク質の局在が変化していた。このことは、MuNoVの自然感染、複製増殖では、新生されたウイルスタンパク質が、新生mRNAの転写、ORF1タンパク質の転写などを自己制御していることを示唆した。つまり、ウイルス自身が複製の行程を制御し、さらに宿主細胞のタンパク質輸送などもコントロール下に起き、効率の良い自己複製を行っている可能性がある。HuNoVのリバースジェネティクスシステムでは、通常、断続的に新生mRNAがプラスミドから供給される。本研究では、プラスミドからの新生mRNAの合成を一定時に停止させ、HuNoVの自然感染を模倣することを試みた。その結果、トランスフェクション後6時間にRNA依存的RNA合成を停止されることにより、非制御時に比べ約60倍の新生ウイルス粒子産生が認められた。また、HuNoVにおいてもウイルスの複製サイクルは6時間以上、12時間未満であると考えられた。

MuNoVが培養細胞で増殖馴化する過程を解析した。その結果、増殖馴化の過程でゲノム遺伝子配列の変化がみられ、そしてその変化は元々あった遺伝子配列プールの中から特定の配列への収束を伴うものであることが示唆された。またこの変化は細胞内増殖に適したゲノム配

列が選択されていることが一因である可能性が考えられた。

HuNoV は、免疫応答、周期的流行機序は十分に明らかにされていない。今年度、個体内における HuNoV GII 準種の実態について解析した。親子間で亜株、遺伝子型の種類と頻度が異なっていたことから、複製能と免疫逃避能に優れたウイルスが、ヒト個体内で優位に存在することが示唆された。また、ヒトは 1 年間に何回もノロウイルスに感染することが示唆された。感染した 3 回の主要な遺伝子型、亜株は、異なっていた。抗体の交差反応が期待できない可能性がある。ノロウイルスがヒト-ヒト間で感染する場合に、ウイルス粒子の安定性、ウイルスの複製能、ウイルスの病原性、免疫淘汰圧からの逃避能、何れかの因子に優位性のあるウイルスが選択されて、ヒト集団内で感染拡大する可能性がある。

## 2. ロタウイルス

乳幼児下痢症の原因である RoV は、A 群以外には培養系が確立されていない。遺伝学的性状や病原性等に関してほとんど未解明なブタ B 群 RoV について、宿主の免疫制御に関わる NSP1 遺伝子および複製時のヌクレオチドのホメオスタシスに関わる NSP2 遺伝子の塩基配列を国内外を通じて初めて解読した。NSP1 および NSP2 共に、ブタ B 群 RoV 株間と既知の他動物由来 B 群 RoV 株との間でアミノ酸配列の一致率はそれぞれ大きく異なっていたことから、遺伝的に極めて多様であることが示唆された。

ノトバイオートブタによる感染実験から、PB-93-I5 株と PB-107-G16 株は異なる病原性を示すことが明らかとなった。次年度、さらに詳細に解析するため、両株間で特に顕著な病変の相違が観察された空腸、回腸を中心に、免疫組織学的手法によりウイルスの局在等を観察するとともに、電子顕微鏡を用いて組織内の微細構造レベルでの両株間における病原性の相違を観察・比較する。また、病原性の相違はウイルス遺伝子レベルの相違に起因することが予想されるため、未解明部分の遺伝子解析を行い、各々

ンパク質の配列・機能について比較・解析を行い、最終的に病原性の相違に関わる RoV 遺伝子を同定する。

## 3. ポリオーマウイルス

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて WUPyV と KIPyV のウイルス様粒子の作製に成功した。この粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立し、血清疫学解析法を確立した。この方法を利用して、呼吸器疾患患者における IgM 抗体の推移などの血清疫学解析を詳細に行うことにより、ヒトポリオーマ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。

新規ポリオーマウイルス WUPyV、KIPyV のカプシドをもち、レポーター DNA をパッケージした psudovirion は Vero 細胞へ効率に導入できた。このことは、WUPyV、KIPyV の感染増殖できる細胞として Vero 細胞が利用できる可能性を示している。

## 4. E 型肝炎ウイルス

HEV の感染性クローンを取得することができたため、今後は本クローンをを用いた reverse genetics の実験を行い、特に HEV の感染性を規定する領域の解析、感染細胞内でのウイルス複製機構の解析を行うことを予定している。

また、PLC/PRF/5 細胞のクローニングにより得られた多数の細胞株の HEV 感受性を調べ、感受性株、非感受性株を複数クローニングすることができた。また、これらの株に HEV が感染できない原因は、細胞内での HEV 複製ができないためではなく HEV の細胞への吸着、侵入過程に問題があるためであることが解析結果から示唆された。感染性を規定する宿主側の因子について現在探索を行っている。

## 5. B 型肝炎ウイルス

HBV genotype A の HBV-Aeus 株は genotype C の HBV-Cat 株に比べ HBs 抗原分泌効率が顕著に高い。分泌効率が異なるクローンのキメラ遺伝子を作製し、HBs 抗原分泌効率を比較したところ、preS1-preS2 領域にも S 抗原分泌を制御

する配列が存在する可能性が示された。そこで、更に詳細に解析するために13種類の変異プラスミドを作製し、HBs抗原分泌効率を比較検討した。その結果、preS2の遺伝子配列の違いでS抗原の上清への分泌量が著しく変化することが判った。MT9(ATCCTCAGGCCATGCAACTCCAC)ではpreS2の開始コドンより下流の+7-+10位に変異が導入されており、この変異によりpSV-CCCと比較して約4.4倍まで分泌量が向上した。また、MT13(ATCCTCAGGCCATGCAGTGGAAAC)では+6位へのひとつの塩基置換のみで分泌効率が約4.2倍に向上した。この二種類の変異を組み合わせると更に向上するかどうか更に検討すれば、高効率の分泌系を樹立できる可能性が示された。

## 6. ヒトパピローマウイルス

RaPID systemにより、E6AP HECT domainと結合する環状N-メチルペプチドを得た。ペプチドとE6AP HECTドメインの結合解析の結果、環状でNメチル化されたCM<sub>11</sub>-1が最も強固な結合力を有することが示された。直鎖状LM<sub>11</sub>-1やNメチル化されていないCP<sub>11</sub>-1では結合力が弱かった。CM<sub>11</sub>-1はE6APの基質Prx1のユビキチン化を効率良く阻害した。また、HPV16E6/E6APによるp53のユビキチン化も抑制することが示された。これらの結果からRaPID systemで環状N-メチルペプチドを作製する技術はE3リガーゼ阻害剤を作製するのに強力な技術となることが示された。

## E. 結論

急性胃腸炎、小児呼吸器感染症、肝疾患等の原因因子でありながら、培養細胞での感染増殖系が確立されていない病原ウイルス群について、近縁動物ウイルスモデル、シュードビリオン、ウイルス様粒子などを駆使して、ウイルス生活環に関する知見を蓄積させた。さらに、病態モデル、診断系の作出、阻害剤探索など感染症対策に資する種々の基盤的成果を得た。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表（研究代表者分）

### 論文発表

1. Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles. *J Biol Chem* 286: 37264-37273, 2011.
2. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 92: 2082-2087, 2011.
3. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* 29: 4821-4828, 2011.
4. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425-433, 2011.
5. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141: 128-140, 2011.
6. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T,

- Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol.* 54: 432-438, 2011.
7. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One.* 6: e15967, 2011.
8. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 407 : 135-140, 2011.
9. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.
10. Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y. J., Saito A., Funai H., Kimura N., Ageyama N., Yoshizaki S., Suzuki T., Yasutomi Y., Miyamura T., Kannnagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Front Microbiol.* 2: 240, 2011.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし。

## Ⅱ. 分担研究報告書

## ノロウイルス感染、複製機構の解析

分担研究者 片山 和彦 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室室長  
研究協力者 下池 貴志 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官  
研究協力者 村上 耕介 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室研究員

**研究要旨** ヒトノロウイルス (HuNoV) の複製機構研究のため、近縁のマウスノロウイルス (MuNoV) のタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、自然な MuNoV 感染増殖と HuNoV のリバーシジェネティックシステムとの比較検討を行った。MuNoV の RNA 複製中間体は複製複合体とともに感染初期に細胞質全体に広がるが、感染 6 時間後には、複製複合体とともに各周辺に移動し共局在することが明らかになった。さらにウイルス粒子にパッケージングされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子を構成する構造タンパク質 VP1 と細胞周辺部に移動し、共局在することが明らかになった。

### A. 研究目的

本研究は、培養細胞で増殖させることのできないヒトノロウイルス (HuNoV) を研究対象とし、培養細胞を用いた効率の良い HuNoV 増殖システム構築を行うことを目的としている。我々の構築した HuNoV のリバーシジェネティックシステムは、プラスミドに組み込んだ HuNoV の cDNA をほ乳類細胞に導入し、HuNoV ウイルスゲノムが内包されたウイルス粒子を産出することが可能である。しかし、電子顕微鏡で粒子を確認するには、225cm<sup>2</sup> の培養フラスコ 20 枚ほどのスケールを必要とする。HuNoV は、通常、感染者の糞便中に 10<sup>5-9</sup> 乗/g 程度の濃度で含まれており、自然宿主であるヒト体内では、非常に効率よく増殖していると考えられる。

初年度は、HuNoV がどのように細胞内で増殖し、自然な増殖がリバーシジェネティックシステムとどのように異なるのかを調べるため、培養細胞で増殖させることが可能な、マウスノロウイルス (MuNoV) の細胞内動態を調べた。本年度は、MuNoV のタンパク質合成、RNA 合成の細胞内局在の経時的変化を追跡し、自然な MuNoV

感染増殖と HuNoV のリバーシジェネティックシステムとの比較検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 材料

2002 年に東京大学大学院農学生命研究科の遠矢幸伸准教授によってマウスより分離された MuNoV-S7 株をウイルスとして用いた。RAW264.7 細胞は、ATCC より購入した。MuNoV S7 株の各種タンパク質、Nterminal protein, NTPase, VPg, RNA dependent RNA polymerase (RdRp), VP1, VP2 は、それぞれ標的領域を大腸菌で発現させ、精製後にウサギとモルモットに免疫して抗 MuNoV 血清を作製した ( $\alpha$ Nterm,  $\alpha$ NTPase,  $\alpha$ VPg,  $\alpha$ RdRp,  $\alpha$ VP1,  $\alpha$ VP2 と表記する。) 複製中間体である MuNoV2 本鎖 RNA の検出には、抗 2 本鎖 RNA 抗体 ( $\alpha$ dRNA MoAb) を用いた。

#### 2. MuNoV 蛋白質検出の検出

MOI 0.01 で RAW264.7 細胞に MuNoV-S7 株を感染させ、12 時間後に固定、もしくは以後の処理を行う事で、観察に用いた。MuNoV 蛋白質

とゲノム複製中間体である二本鎖 RNA の観察には、冷メタノール固定した細胞を用いた。また、MuNoV のゲノム RNA 合成を観察するためには、アクチノマイシン D 処理を行い、細胞の RNA 合成を止めた後、BrU を細胞にトランスフェクションし、MuNoV ゲノム RNA より RdRp にてトランスクリプションされる一本鎖 RNA に BrU を取り込ませた。その後、細胞を冷メタノール固定し、抗 BrU 抗体を用いた免疫染色を行った。

細胞の免疫染色は、一次抗体に標的物特異的抗血清、もしくはモノクローナル抗体を用い、二次抗体に一次抗体を認識する蛍光物質ラベル抗体を用いた。

免疫染色した細胞の観察は、蛍光顕微鏡を用いて行い、標的蛋白質、核酸の細胞内局在の解析にはオリンパス社の DSU ユニット IX-80 デコンボリューションシステムと、ツァイス社の共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

#### 4. MuNoV の real time RT-PCR

上清に放出される MuNoV の定量は、既報のリアルタイム RT-PCR に基づいて行った。

#### 3. HuNoV リバースジェネティクス

T75 フラスコに HEK293T 細胞を 70%コンフルエントになるように培養し、40ug の HuNoV pKS-U201F (リバースジェネティクスに用いるプラスミドコンストラクト)をトランスフェクションした。トランスフェクションから 6 時間後、または 12 時間にアクチノマイシン D 処理を行い、さらに 24 時間後にフラスコごと $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結した。細胞並びに細胞上清に含まれる新生ウイルス粒子は、3 回の凍結解凍後、10000g にて 20min の遠心操作で得られた上清から、以下の操作で抽出精製した。

新生ウイルスの抽出精製は、上記操作で得られた上清を、SW32Ti ローターにより 31000rpm, 3 時間の遠心を行い、ペレット得た後、ペレットを CsCl 浮上密度勾配遠心にかけて、密度  $1.36\text{--}40\text{g/cm}^3$  のフラクションを回収することで精製した。

#### 4. 電子顕微鏡観察

感染細胞は同様に調整し、感染後 12 時間でグルタルアルデヒド固定し、オスミウム染色後、樹脂に包埋した。その後、薄層切片を作成し、電子顕微鏡観察に用いた。電子顕微鏡観察は、国立感染症研究所感染病理部に依頼した。

#### C. 研究結果

マウスノロウイルスは、感染後 6 時間ほどで、細胞内に非構造タンパク質が発現し、その後、構造タンパク質の発現が認められた。ウイルスの増殖を培養上清のリアルタイム RT-PCR でモニターしたところ、感染後 6 時間からウイルス RNA タイターが上昇し、48 時間後まで上昇は続いた。以上から、ウイルスの増殖サイクルは 6~8 時間であることが明らかとなった。

MuNoV の RNA 複製中間体は複製複合体とともに感染初期に細胞質全体に広がるが、感染 6 時間後には、複製複合体とともに各周辺に移動し共局在することが明らかになった。さらにウイルス粒子にパッケージングされる一本鎖ゲノム RNA は、粒子を構成する構造タンパク質 VP1 と細胞周辺部に移動し、共局在することが明らかになった。

HuNoV のリバースジェネティクスでは、断続的に新生 mRNA がプラスミドから供給される。従って、本システムでは、ORF1 タンパク質合成が中断なく行われ続ける。MuNoV ウイルスでは、感染後の時間経過に応じて、ウイルスタンパク質の局在が変化していた。このことは、MuNoV の自然感染、複製増殖では、新生されたウイルスタンパク質が、新生 mRNA の転写、ORF1 タンパク質の転写などを自己制御していることを示唆していた。そこで、HuNoV のリバースジェネティクスにおいて、プラスミドからの mRNA の合成をアクチノマイシン D によって停止させ、MuNoV で観察された自身のタンパク質による自己制御を誘導した。トランスフェクション後 12 時間のアクチノマイシン処理では、新生ウイルス粒子の精製画分に新生ウイルス粒子は認められなかった。しかし、トランスフェクション後 6 時間のアクチノマイシン処理



では、電子顕微鏡観察により、ウイルス粒子が確認された。T75 フラスコ1枚から、電子顕微鏡で観察可能なレベルのウイルス粒子産生に成功した。アクチノマイシン処理を行わない場合、電子顕微鏡で粒子を確認するためには、T225 フラスコ 20 枚の培養細胞が必要である。本年度の研究により、HuNoV のリバーシジェネティクスにおいて、 $225 \times 20/75=60$  倍のウイルス産生効率の向上に成功した。

#### D. 考察

MuNoV の自然なウイルス複製では、感染後の時間経過に応じて、ウイルスタンパク質の局在が変化していた。このことは、MuNoV の自然感染、複製増殖では、新生されたウイルスタンパク質が、新生 mRNA の転写、ORF1 タンパク質の転写などを自己制御していることを示唆していた。つまり、ウイルス自身が複製の行程を調整し、さらに宿主細胞のタンパク質輸送などもコントロール下に起き、効率の良い自己複製を行っている可能性がある。HuNoV のリバーシジェネティクスシステムでは、断続的に新生 mRNA がプラスミドから供給される。従って、本システムでは、ORF1 タンパク質合成が中断なく行われ続ける。本システムは、CPE が非常に強く観察され、通常、トランスフェクション後 48 時間後には、プラスミドが導入された細胞はほぼすべて、死滅する。本研究では、プラスミドからの新生 mRNA の合成を、アクチノマイシン D を用いることで、トランスフェクション後 6 時間、12 時間で完全に停止させ、HuNoV の自然感染を模倣することを試みた。トランスフェクション後 6 時間の制御は、非制御状態の約 60 倍の新生ウイルス粒子産生効率の向上が認められた。しかし、12 時間後の処理では、ウイルス粒子産生効率の向上は認められなかった。昨年度の研究から、MuNoV では、6 時間程度で1回のウイルス複製サイクルが完了すると考えられた。以上から、断続的に継続する新生 mRNA の供給は、HuNoV の非構造タンパク質の過剰発現を導くと同時に、様々なプレカーサータンパク質が、ウイルスの複製増殖に負の影響を与えている可能性がある。

さらに、MuNoV との比較から、HuNoV においてもウイルスの複製サイクルは 6 時間以上、12 時間未満であると考えられた。

#### E. 結論

MuNoV の自然な感染モデルと HuNoV のリバーシジェネティクスの比較を用いて、HuNoV のリバーシジェネティクスシステムの 60 倍の効率向上に成功した。来年度は、さらなる効率向上を目指し、MuNoV のリバーシジェネティクスシステムを構築し、自然感染とリバーシジェネティクスシステムの違いを詳細に検討し、HuNoV のリバーシジェネティクスシステムに反映させる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Murakami K, Suzuki S, Aoki N, Okajima T, Nadano D, Uchida K, Yamashita K, Oka T, Katayama K, Takeda N, Matsuda T. Binding of Norovirus virus-like particles (VLPs) to human intestinal Caco-2 cells and the suppressive effect of pasteurized bovine colostrum on this VLP binding. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 74(3): 541-547. 2010.
2. 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.
3. 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 Res.* vol. 90, 9-16, 2011.
4. Oka, T., Murakami, K., Wakita, T., Katayama, K. Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad

- in calicivirus proteases. *Microbiol Immunol.* Vol. 55, 108-14. 2011.
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. *Letters in applied microbiology.* Vol. 52, 181-4, 2011.
6. Hansman, G. S., Biertumpfel, C., Georgiev, I., McLellan, J. S., Chen, L., Zhou, T., Katayama, K., Kwong, P. D. Crystal structures of GII.10 and GII.12 norovirus protruding domains in complex with histo-blood group antigens reveal details for a potential site of vulnerability. *Journal of virology* vol. 85, 6687-701, 2011.
7. Hansman, G. S., Shahzad-Ul-Hussan, S., McLellan, J. S., Chuang, G. Y., Georgiev, I., Shimoike, T., Katayama, K., Bewley, C. A., Kwong, P. D. Structural basis for norovirus inhibition and fucose mimicry by citrate. *J of Virol.* Vol.86, 284-92, 2012.
8. Matsuhira, T. Kaji, C. Murakami, S. Maebashi, K. Oka, T. Takeda, N. Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* Vol.61, 35-40, 2012
9. Hansman G. S., Taylor D. W., McLellan J. S., Smith T. J., Georgiev I., Tame J. R. H., Park Sam-Yong., Yamazaki M., Gondaira F., Miki M., Katayama K., Murata K., Kwong P. D. Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle. *J. Virol.* published ahead of print 25 Jan.2012.
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし。
  2. 実用新案登録  
なし。
  3. その他  
なし

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

分担研究者 田中 智之 堺市衛生研究所 所長

研究協力者 中村 雅子 福井県衛生研究所 主任研究員

研究協力者 三好 龍也、内野 清子 堺市衛生研究所 主任研究員

研究要旨：これまで細胞培養によるノロウイルス分離を試みてきた。今回、CaCo-2 細胞、RD 細胞に加え、新たに MRC-5 細胞、INT407 細胞を用いた。臨床検体は出来るだけ新鮮なものを用い、また、検体精製後のトリプシン処理の有無についても検討を加えた。ウイルス増殖の目安となる細胞変性効果(CPE)は見られなかった。培養中および細胞成分を用いたノロウイルス遺伝子量は継代培養を重ねるにつれ消失し、細胞内でのウイルスの増殖は見られなかった。今年度も通常の細胞培養によるノロウイルスの分離は不成功に終わった。

A. 研究目的

ノロウイルスは食中毒事例のみならず通常の感染症と類似の感染経路を取る病原ウイルスである。ノロウイルスによる食中毒の発生頻度は減少する傾向は見えない。また、病院をはじめ各種医療施設、教育施設などでの集団感染事例も後を絶たず、休院・病棟閉鎖、休校等それに要する経済的損失は莫大である

ノロウイルスは細胞培養で分離・増殖が未だに出来ていないウイルスの代表である。

ノロウイルス類似の腸管小型ウイルスの多くは分離に成功し、感染症予防のためのワクチン開発に貢献したウイルスは少なくない。これまで世界中の多くの研究者がノロウイルス分離を試みているが、未だに成功に至っていない。遺伝子学的手法を駆使した方法においても持続的な増殖には至らず、その不成功の理由はベールに包まれたままである。

これまででも、一般的に施行されているウイルス分離の原点に基づいて、ノロウイルスの受容体を持つであろうと考えられている株化された培養細胞を用いてウイルス分離を試みているが

成功に至っていない。

そこで、今年度は昨年度に課題となった点を踏まえて、再度、標準的なウイルス分離方法を用いてノロウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

1) 検体調製法の変更

平成 22 年度は過去のサンプルを用いたので、今年度は新鮮な検体を材料とした。また、検体の精製法を若干変更し、いくつかの方法を選択した。

- 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 30%ショ糖液に重層し、36,000rpm、2 時間 (4°C) 超遠心した。沈渣を PBS(-)約 2mL に suspend し、 $0.80\mu + 0.45\mu$  の Millipore filter を用いてろ過した。
- ② PBS にて糞便 10%乳剤を作製後、遠心 35,000rpm、45 min. 行い、次いで重層 Millipore filter  $1.2\mu - 0.65\mu - 0.45\mu$  にてろ過し接種検体とした。

2) 接種検体のトリプシン前処理の有無

① ②で得られた NV 濃縮サンプル 300  $\mu$ L にアセチルトリプシン (SIGMA 社) 20  $\mu$ g/ml of PBS(-) を等量加え、37°C、30 分インキュベートした。さらにトリプシン処理の有無にかかわらず上記接種検体は原液および PBS(-) で 10 倍、100 希釈したものを接種材料とした。

## 2) 細胞の種類

昨年度から用いている CaCo-2 細胞、RD 細胞に加え、新たに MRC-5 細胞、INT407 細胞を検討した。

## 3) ウイルスの genotype :

昨年度検討したノロウイルス G II.4 に加え、G II.13、G I.4 を検討した。また、Genotype にこだわらず Genogroup I 及び II を混合した検体を作製した。

## 3) 感染成立の有無の確認

上記のノロウイルスを各細胞に接種し、その後の感染の有無すなわち目視で細胞変性効果 (CPE) 見られた時点でノロウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた間接的蛍光抗体法を用いた。また、経時的变化を知る目的で、継代ごとに培養上清及び粉碎細胞をリアルタイム PCR で検索し、接種ウイルス量の変化を調べた。

## C. 研究結果

1) CaCo-2 細胞および MRC-5 細胞にウイルス検体を接種し経時的にウイルス量をリアルタイム OCR 法で検出した結果をそれぞれ示す (図 1, 図 2)。いずれも 4 代から 6 代の継代接種でウイルス遺伝子量は消滅した。また、この間には CPE も認められなかった。

2) RD 細胞にノロウイルス GI.4 を接種し、細胞の経時的变化とノロウイルス遺伝子量の変化を示した。CPE 変化様に見える変性細胞には、蛍光抗体法で陽性所見は見られなかった。添加したトリプシンによる細胞毒性の変化と考えられた。また、ノロウイルス遺伝子量は二週間を超えて消失した (図 3)。

3) Genogroup I 及び II の臨床検体を RD 細胞に接種した経時的变化を示した。Genogroup 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR の経過を示す (図 4)。上記の単独遺伝子型接種の時と

類似の所見がみられ、ノロウイルスが細胞内で増殖しているエビデンスは見られなかった。

## D. 考察

昨年度同様に、異なった株化細胞を用いたノロウイルス分離の試みは不成功であった。各種のウイルス分離にしばしば使われる検体のトリプシン処理も効果が見られなかった。

細胞培養によるウイルス分離は、ウイルスレセプター、細胞レセプターの一致が基本であるが、ノロウイルスに関しては存在しているレセプターがどのようなものかの情報は見つからない。血液型物質が cell-to-cell binding に大きな役割を果たしているという数多くの報告がある。型物質の分泌型と非分泌型の差も大きく作用すると言われている。著者は、ノロウイルスボランティアスタディで得られた空腸の免疫組織学的手法でノロウイルスの局在を検討した。その結果空腸の lamina propria にノロウイルス抗原陽性細胞が確認された。その細胞形態からマクロファージあるいは樹状突起細胞が考えられ、その細胞でノロウイルスが増殖する可能性が考えられた。しかし、その後の外国の研究では、ウイルスが増殖しているのではなく貪食された状態にいる可能性が高くなってきている。

感染成立には血液型物質が大きく影響している。このボランティアスタディのように感染者の小腸細胞の初代培養が分離の一つの選択肢かもしれないが、不可能の域を出ない。市販の株化細胞がどのようなヒト由来細胞なのかの詳細な情報は得られ難い。

残された選択肢はこれ以上に様々な株化細胞を用いて分離を試みる手段が唯一のノロウイルス分離への近道かもしれない。来年度のもっとインテンシブに分離を試みなければならない。

## E. 結論

これまでの成績を含めて、様々な株化培養細胞を用いてノロウイルス分離を試みてきたが、不成功であった。今後もこの作業を試みる以外