

に分離の道はないと考える。

F. 研究発表

論文発表

- 1) 田中 智之. 消化器症候群 ノロウイルス、ウイルス感染症の検査・診断スタンダード. 田代真人、牛島廣治監修. 羊土社発行. p129-133, 2011

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。

(CaCo-2)

G II.4

細胞観察		F1	F2	F3	F4	F5	F6
①	原液	inh +++	inh +++	—	—	—	—
②	トリブシン+ ×10	inh +++	inh ++	—	—	—	—
③	×100	inh +++	inh ++	—	—	—	—
④	原液	inh +++	inh +++	—	—	—	—
⑤	対照(PBS+) ×10	inh +++	inh +	—	—	—	—
⑥	×100	inh +++	inh +	—	—	—	—

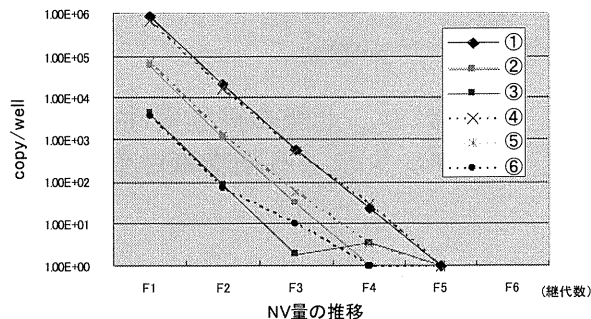
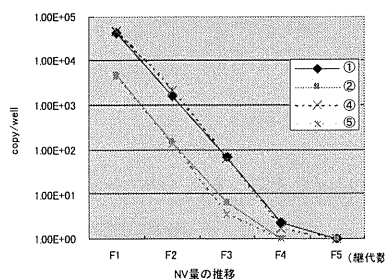


図1 CaCo-2細胞を用いたGII.4ノロウイルス分離の試み

(MRC-5)

G II.13

細胞観察	F1	F2	F3	F4	F5
①	原液	—	—	—	—
②	トリブシン ×10	—	—	—	—
③	×100	NT	NT	NT	NT
④	原液	—	—	—	—
⑤	対照(PBS) ×10	—	—	—	—
⑥	×100	NT	NT	NT	NT



G II.4

細胞観察	F1	F2	F3	F4	F5
①	原液	—	—	—	—
②	トリブシン ×10	—	—	—	—
③	×100	NT	NT	NT	NT
④	原液	—	—	—	—
⑤	対照(PBS) ×10	—	—	—	—
⑥	×100	NT	NT	NT	NT

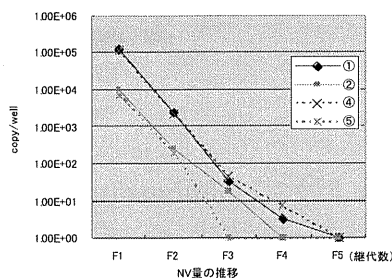


図2 MRC-5細胞を用いたGII.13及びGII.4ノロウイルス分離の試み

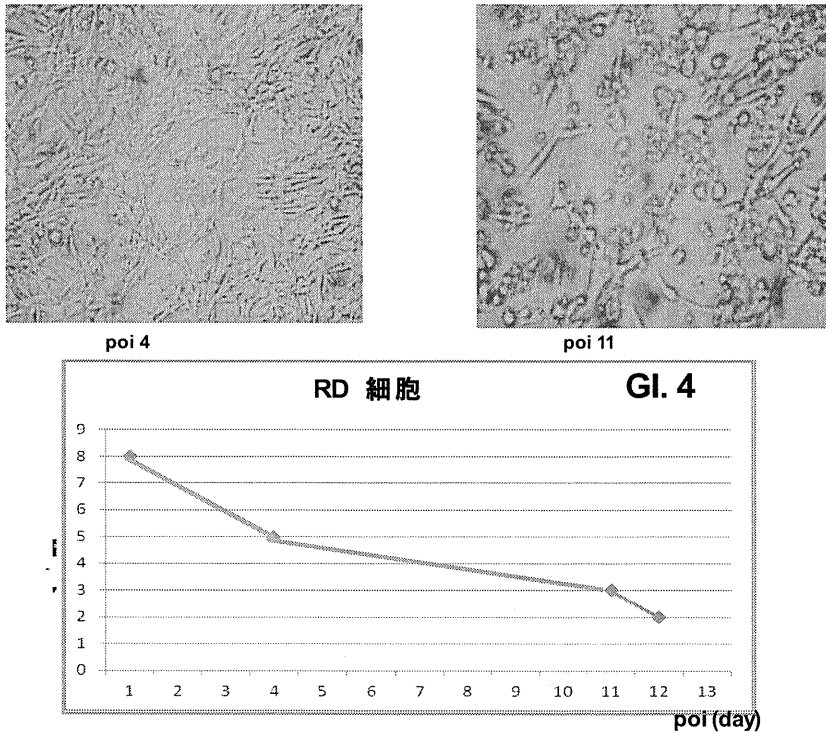


図3 RD細胞を用いたGI.4ノロウイルス分離の試み。上記の細胞変性様形態はノロウイルス特異抗体を用いた蛍光抗体法では陰性。トリプシンによる細胞毒性効果と判定された。

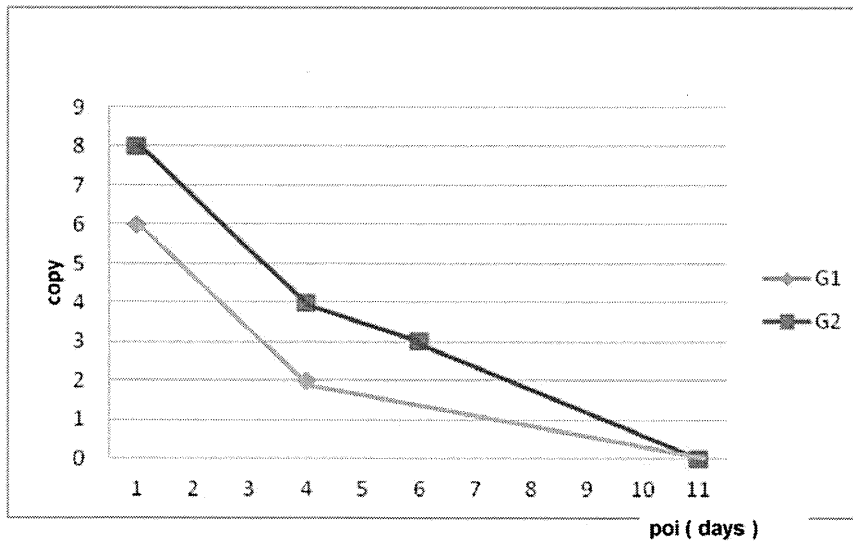


図4 RD細胞を用いたGenogroup I及びGenogroup II混合検体を持ちいたノロウイルス分離の試み。接種後11日には液成分、細胞成分いずれかもノロウイルス遺伝子は消失した。

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）
分担研究報告書（平成23年度）

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

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：今年度は、ノロウイルス周期的流行の解明のため、次世代シーケンサーを用いてウイルス側の要因探索、微小準種の役割について検討した。(i) キャプシド遺伝子シェル領域の配列情報（合計;81821配列）を取得した。(ii) 幼児では、得られた配列のうちGII.3が99.9% (44995/45007) 占めていた。GII.4が0.02% (10/45007)、GII.2が0.004% (2/45007) 検出された。(iii) 母親では、多い順に、GII.4が67.6% (24910/36814)、GII.2が32.3% (11904/36814)、GII.3が0.005% (2/36814) 検出された。(iv) 親子間で検出された各遺伝子型の配列は、ほぼ一致していた。今回の解析により、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。

A. 研究目的

ヒトノロウイルス (NoV) は、周期的に流行することが知られている。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。2006b亜株は、2006-2010年、過去4シーズンにわたって、日本で優勢な流行株であった。しかし、占有率は年々減少している。集団免疫の強化に因る可能性が考えられる。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。我々は、ノロウイルス周期的流行の解明のため、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。今年度は、次

世代シーケンサーを用いて解析し、微小準種の役割について検討した。

B. 研究方法

1) 2010年12月、ノロウイルスが、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'末端領域の配列を解析した。糞便より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、HIV RNAを抽出した後、特異的逆転写プライマーを用いてcDNAを合成した。cDNAをtemplateにして、COG2F~G2SKR 領域をPCRにより増幅した。FLX 454 (Roche) を用い、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した。

2) 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11000×g、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。

3) 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。

4) 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、26000×g、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

(A) (i) 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亜株であった。遺伝子型が不一致であった。(ii) キャプシド遺伝子シェル領域の配列情報(合計;81821配列)、約 3.0×10^7 塩基の配列情報を取得した。(iii) 幼児では、得られた配列のうちGII.3が99.9%(44995/45007)占めていた。GII.4が0.02%(10/45007)、GII.2が0.004%(2/45007)検出された。(iv) 母親では、多い順に、GII.4が67.6%(24910/36814)、GII.2が32.3%(11904/36814)、GII.3が0.005%(2/36814)検出された。(v) 親子

間で検出された各遺伝子型の配列は、ほぼ一致していた。

(B) 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作成は成功した。2008a亜株のVLPは作成できなかった。

D. 考察

個体内におけるノロウイルスGII準種の実態について解析した。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。

E. 結語

ヒトノロウイルスが新たな流行発生に寄与する他の要因として、集団免疫が推察される。ヒト社会では、特に直近に流行したヒト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。しかしながら、ヒト集団内の中和抗体保有率の解析は行われていない。また、感染動物モデルも開発されていないため、感染防御に局所免疫がどのように関わるのか不明である。今後、 capsid 蛋白質から成るウイルス様粒子(VLP; Virus Like Particle)を用いて、様々な遺伝子型のVLPに対する糞便試料中のIgA抗体を測定する。ヒト集団における抗 capsid 抗体の分布や反応特異性、それらの経時推移について解析する予定である。これにより、集団免疫がヒ

トノロウイルスの流行発生にどのように関与するのかを明らかに出来ると期待している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1). 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. 2011 Jan;27(1):97-102

2). **本村和嗣** “ノロウイルスの生き残り戦略” Medico Vol. 42 No.2 p. 32-35: 2011年2月号, 協和企画

3). **本村和嗣** “ノロウイルス感染症” 臨床とウイルス Vol 39 p. 115-p. 122: 2011年7月

4). 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、佐藤 彩、今井正樹、小田切孝人、田代真人、**本村和嗣**、横山 勝 柊元 巖、佐藤裕徳、小口晃央、山崎秀司、藤田信之 “2010/11シーズンの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. 32 p. 317-323: 2011年 11月号

2. 学会発表

1). 岡智一郎、横山勝、**本村和嗣**、村上耕介、脇田隆字、佐藤裕徳、片山和彦 “Role of conserved amino acid residues

in the protease among different genera of Caliciviruses” 第131回 日本薬学会 2011年3月28-31日 静岡

2). **本村和嗣**、横山勝、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、佐藤裕徳

“ゲノミクスと計算科学の手法によるノロウイルスGII/4 進化様式の解析” 第85回日本感染症学会総会 ワークショップ 2011年4月21-22日 東京

3). **Motomura, K.**, Yokoyama, M., Oka, T., Katayama, K., Noda, M., Tanaka, T., Sato, H., Norovirus Surveillance Group of Japan. “Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature” 15th International Union of Microbiological Sciences, Virology Division 2011 Sep. 12th-16th Sapporo

4). **本村和嗣** “2006-2011年シーズンに国内で流行したノロウイルスの全長ゲノム解析” 平成23年度 地方衛生研究所全国協議会近畿支部 ウイルス部会研究会 教育講演 2011年9月30日 奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

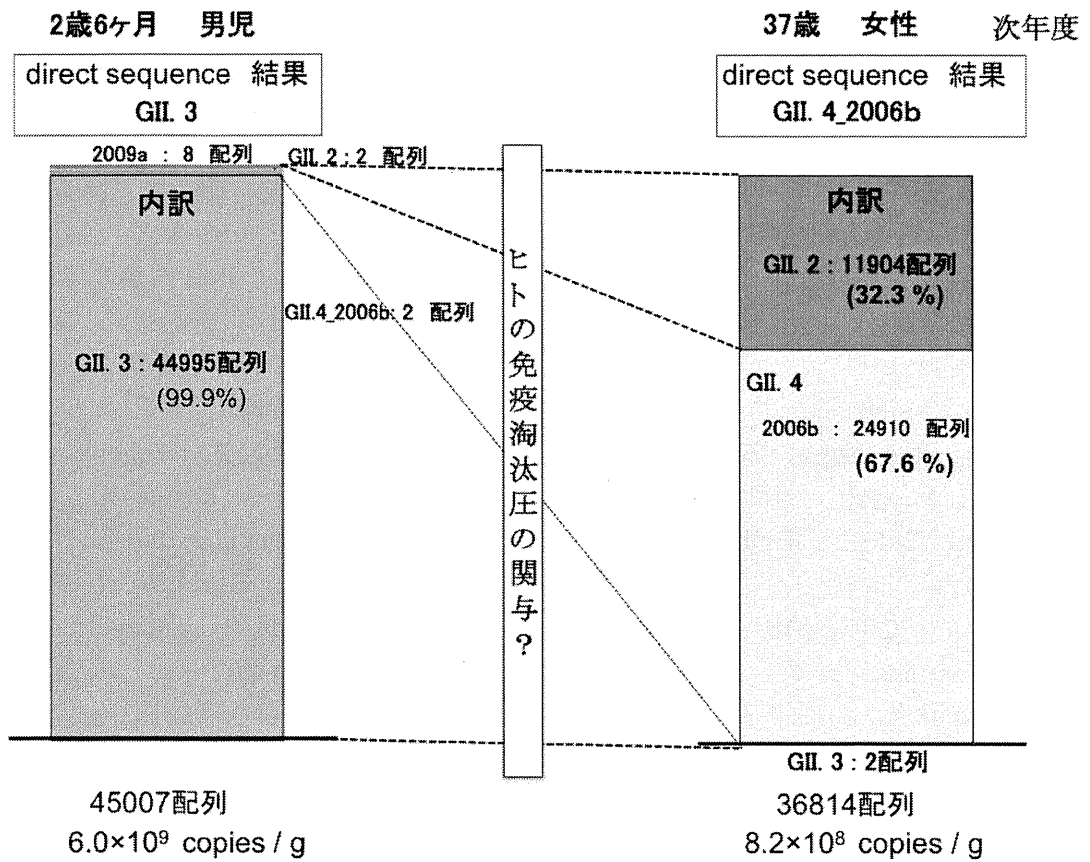
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他



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）
分担研究報告書（平成 23 年度）

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

研究分担者 恒光 裕 動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域 領域長
研究協力者 鈴木 亨 動物衛生研究所ウイルス・疫学研究領域

研究要旨 培養細胞感染系が確立されていないため、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 群ロタウイルスについて、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。また今回明らかとなったブタ B 群ロタウイルス株に既知の他動物由来 B 群ロタウイルスの遺伝子情報を加えて系統樹解析を行った結果、NSP1 は由来動物種毎に 7 つの遺伝子型に分類され、また NSP2 は 4 つの遺伝子型に分類された。中でも、ブタ B 群ロタウイルスはそれぞれの遺伝子に関して少なくとも 3 つの遺伝子型に分類されたことから、ブタ B 群ロタウイルスは遺伝的に多様であることが示唆された。また、遺伝学的および抗原学的に VP6 遺伝子において相違が認められたブタ B 群ロタウイルス 2 株をそれぞれノトバイオトブタに接種し、感染後の病態を経時的に観察・比較した結果、両株は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。

A. 研究目的

ロタウイルスは幼若動物や乳幼児の重症性下痢の主要原因の一つである新興感染症病原体である。ロタウイルスはまた、同じあるいは異なる動物種由来のウイルス間で種間伝播あるいは遺伝子再集合し、新たなウイルスを生み出して下痢流行を繰り返している人獣共通感染症病原体でもある。現在までに A-G 群の血清群が存在するが、中でも A-C 群はヒト以外にウシ、ブタなどの家畜からもウイルスが検出されるため、公衆衛生上高い関心を集めている。また加えて、B 群ロタウイルス感染によるヒトや家畜の下痢発生報告は年々アジア各国で増大し

ている。しかしながら、B 群ロタウイルスは培養細胞感染系が確立されていないため、本ウイルスの遺伝学的性状や病原性等に関して不明な点が多く残されている。そこで本研究では、国内の複数農場から検出したブタ B 群ロタウイルス株について、これらウイルスの各遺伝子情報を明らかにし、さらに既知のヒトおよび他の動物種由来 B 群ロタウイルス株の遺伝子情報を加えて系統発生的分類を実施した。特に、本年度はこれまで未解明であった非構造タンパク質の NSP1 および 2 について遺伝子解析および系統樹解析を実施した。また一方で、遺伝学的および抗原学的性状の異なるブタ B 群

ロタウイルス 2 株を用いて、ノトバイオートブタでの感染実験を実施し、両株間における病原性の相違について検討・考察した。

B. 研究方法

(1) ブタ B 群ロタウイルスの NSP1 および NSP2 に関する遺伝子解析

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、初めに PB-93-I5 および PB-107-G16 株を用いて、和久田らが考案した single primer amplification 法に従って、それぞれの株における 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 株の塩基配列を比較・参照して、ORF 領域を解読するための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、今回解読したブタ B 群ロタウイルス 28 株に既知の他動物由来 B 群ロタウイルス株を加えて系統樹解析を行い、本ウイルスを系統発生的に分類・考察した。

(2) 遺伝学のおよび抗原学的性状の異なるブタ B 群ロタウイルスを用いたノトバイオートブタにおける感染実験

VP6 遺伝子において遺伝学のおよび抗原学的に相違が認められた PB-93-I5 および PB-107-G16 株を用いて、それぞれのウイルスを同量ずつノトバイオートブタに接種し、本ウイルスの主要感染部位である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。

C. 研究結果

(1) ブタ B 群ロタウイルス 15 株の NSP1 遺伝子は他の動物由来 B 群ロタウイルス株と同様に、2 つの ORF 領域（ペプチド 1 および 2 をコードする）を有した。今回解読した NSP1 ペプチド 1 および 2 におけるアミノ酸配列の一致率はブタ B 群ロタウイルス株間と既知の他動物由来 B 群ロタウイルス株との間で大きく異なった。ブタ B 群ロタウイルス 19 株間および既知の他動物由来 B 群ロタウイルス株との間で NSP2 タンパク質のアミノ酸配列の比較を行った結果、C 末端部において全ての株に共通するヒスチジン領域が保存されていた。今回新たに解読したブタ B 群ロタウイルス株に既知の他動物由来 B 群ロタウイルス株を加えて系統樹解析を行った結果、B 群ロタウイルスの 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 群ロタウイルス株はそれらの遺伝的多様性を反映していずれも 3 つの遺伝子型に分類された。一方、B 群ロタウイルスの NSP2 は大きく 4 つの遺伝子型に分類された。中でも、ブタ B 群ロタウイルス株は 3 つの遺伝子型に分類され、一部のブタ B 群ロタウイルス株はウシ B 群ロタウイルス株と同一のクラスターに分類された。

(2) PB-93-I5 および PB-107-G16 接種群共に感染 2 日後において特に空腸で顕著な絨毛萎縮が認められた。また PB-107-G16 接種ブタでは絨毛萎縮に加えて、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ることや病変の発現期間が長いことが判明した。さらに PB-107-G16 接種ブタの一部の個体は衰弱

し、死に至った。以上のことから、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。

D. 考察

(1) NSP1 および NSP2 共に、ブタ B 群ロタウイルス株間と既知の他動物由来 B 群ロタウイルス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たことから、ブタ B 群ロタウイルスは遺伝的に極めて多様であることが示唆された。既知の他動物由来 B 群ロタウイルス株に今回初めて解読したブタ B 群ロタウイルス株の遺伝子情報を加えて系統樹解析を行った結果、NSP1 では由来動物種毎に 7 つの遺伝子型に、NSP2 では 4 つの遺伝子型にそれぞれ分類された。中でもブタ B 群ロタウイルスは NSP1 および NSP2 のそれぞれにおいて、3 つの遺伝子型に分類された。それらの遺伝的多様性を考慮すると、ブタは本ウイルスの好適宿主である可能性が示唆された。また NSP1 は元来宿主免疫に対する抵抗性に関与しているウイルスタンパク質であることから、本結果は NSP1 が宿主の免疫環境に応じて特異的に進化してきたことを裏付けるものであると考えられた。一方、NSP2 では C 末端部において、A 群、B 群、C 群ロタウイルスに共通して保存されているヒスチジン領域の存在（この領域は NTPase をコードしていると考えられている）を確認した。従って、NSP2 は群に関係なく、少なくとも複製時のヌクレオチドのホメオスタシスに関しては同じ機能を有している可能性が示唆された。

(2) ノトバイオートブタにおける感染実験において、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。さらに詳細を観察・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、抗ウイルス抗体を用いた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。その一方で、それらの病原性の相違はおそらく遺伝子レベルでの相違に起因することが予想されるため、引き続き未解明な残りの遺伝子に関して、両株のフルゲノムを解読し、それぞれのタンパク質の配列・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ウイルス遺伝子を同定する。

E. 結論

ブタ B 群ロタウイルスの NSP1 および NSP2 遺伝子を初めて解読した。ブタ B 群ロタウイルスは異なる遺伝的性状を有する複数の株が存在することが示された。遺伝的性状の異なる株間はそれらの病原性において顕著な相違を示すことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Suzuki T, Kuga K, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of

species B. Journal of General Virology,
92: 2922-2929 (2011)

Suzuki T, Soma J, Kuga K, Miyazaki A,
Tsunemitsu H. Sequence and
phylogenetic analyses of nonstructural
protein 2 genes of species B porcine
rotaviruses detected in Japan during
2001-2009. Virus Research, (in press)

学会発表

Suzuki T, Kuga K, Miyazaki A,
Tsunemitsu H. Genetic analysis of
nonstructural protein NSP1 among
porcine group B rotavirus. XV
International Congress of Virology,
Sapporo, Sep. 11-16, 2011

Soma J, Suzuki T, Suzuki G, Kuga K,
Miyazaki A, Tsunemitsu H. Genetic
dissection for nonstructural protein 2
in porcine group B rotaviruses. XV
International Congress of Virology,
Sapporo, Sep. 11-16, 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

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

分担研究者 李天成（国立感染症研究所ウイルス第二部）

協力研究者 片岡 紀代（国立感染研病理部）

研究要旨 最近、新しい病原ウイルスが続々と発見されている。しかしながら、多くのウイルスが培養細胞では増殖できないため、効率よく組換え抗原を作製することはウイルス診断およびワクチン開発に重要である。ヒトポリオーマウイルス KIV と WUV は最近発見された病原体であり、呼吸器疾患の原因の一つだと推測されている。しかしながら、その詳細について未だ十分に解析されていない。また、増殖細胞系は確立されておらず、ウイルスの感染、複製の機序は不明である。抗体や抗原検出法が確立されず、疫学情報も不十分である。今年度、我々は組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトポリオーマウイルス（KIV, WUV）の構造タンパク質を発現しウイルス様粒子（VLP）の作製を試みた。また、VLP を用いて抗体検出方法を確立し、血清疫学解析を行った。

A. 研究目的

WUV と KIV はポリオーマウイルス属（*Polyomavirus*; クラス 2）に分類され、最近、呼吸器疾患の患者から発見された新規ヒトポリオーマウイルスである。既知のポリオーマウイルスと同じくポジティブ二本鎖 DNA ウイルスである。ウイルス遺伝子の全長は約 5300bp であり、主に Large T, small T、VP1、VP2、VP3 など 5 つの蛋白をコードする。VP1 はメジャーな構造蛋白、VP2、VP3 がマイナーな構造蛋白をコードする。これまで発見されたヒトポリオーマウイルス JC, BK, MCV とは異なって、主に呼吸器疾患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。しかし、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、ウイルスの複製、感染機序も未だ知られていない。抗体や抗原などの検出方法が樹立されていないので、これらのウイルスに

関する疫学調査も十分に行っていない。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 WU と KI 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、KI の血清疫学解析を行った。

B. 研究方法

MU と KI の構造蛋白領域 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、健常人における感染状況を調査した。

（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

昆虫細胞 Sf9 と Tn5 に MU KI VP1 を持つ組換えバキュロウイルスをそれぞれ感染し、構造蛋白の発現の確認および発現量を比較した。昆虫細胞 Tn5 と Sf9 では感染後 3 日に予想通り分子量が約 41 kDa の VP1 蛋白は産生された。ただし、JC, BK, MCV とは異なって、MU VP1 と KI VP1 の発現量はともに極めて少なかった。培養上清を超速心によって濃縮したあと塩化セシウム密度勾配遠心で精製した結果、Sf9 細胞培養上清から 41 と 39 kDa の二種類の蛋白が得られた。41 kDa の蛋白は比重 1.30 g/cm³ 分画に分布し、電子顕微鏡で直径約 50nm の球形粒子が観察された。39 kDa の蛋白は比重 1.29 g/cm³ 分画に分布し、電子顕微鏡観察したところ、直径約 22nm から 50nm まで数種類の直径の異なる粒子が存在する。KI-VLP を用いて抗体検出 ELISA を開発し我が国の健常人における KI 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、平均の健常成人の 52.8% が KI に対する抗体を有することが明らかとなり、約 20% のヒトは、乳幼児期に感染する可能性が考えられた。また、構造蛋白発現量を向上させるため、KI VP1 の N 末端から 9 個アミノ酸を欠損した組換えバキュロウイルスを作製し、同じ方法で構造蛋白を発現してみた。その結果、抗原発現量と粒子産生量は共に増加した。

D. 結論と考察

組換えバキュロウイルス発現システムを用いてヒトポリオーマウイルス WU と KI の構造蛋白を発現し中空粒子の作製が成功した。こ

の粒子を用いて抗体検出用 ELISA 法を樹立し、新規ヒトポリオーマウイルスの疫学調査に有効な検査方法を提供した。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い、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。今後、KI-VLP, WU-VLP をウサギに免疫し抗体を作製し、KI, WU, JC, BK, MCV などのヒトポリオーマウイルスの抗原性の比較によって、ウイルス抗原性を解明する予定である。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) Genotype 5 HEV 構造蛋白の発現および抗原性の解析、李 天成、高橋 和明、片岡 紀代、吉崎 佐矢香、網 康至、須崎 百合子、石井 孝司、脇田 隆字、三代 俊治。第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月 堺市

2) 田中聖一、山本博、万年和明、李天成。ニッポンザルにおける E 型肝炎ウイルス感染状況。第 152 回日本獣医学会学術集会 2011 年 9 月 堺市

3) Tian-cheng Li, Kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, and Takaji Wakita.

Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Rat Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculovirus cell culture. IUMS2011, XV international congress of virology. 2011. September, Sapporo.

4) Tian-Cheng Li, kumiko Yoshimatsu, Shumpei P. Yasuda, Jiro Arikawa, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki Tetsuro Suzhki, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Expression of rat HEV virus capsid protein and generation of the virus-like particles. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

5) Koji Ishii, Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tomoyuki Shioda, Takanobu Kato, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Cloning of oermissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. The 22th Conference of the Asian Pacific Association for the study of the liver. 2012. February 16-19. Taipei.

2. 論文発表

1. Tian-Cheng Li, Susumu Ochiai, Hiroaki Ishiko, Takaji Wakita, Tatsuo Miyamura, and Naokazu Takeda. A retrospective study on imported hepatitis E in Japan. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2012. *In press*.

2. Tian-cheng Li, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LT, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *Journal of General Virology* (2011), 92, 2830-2837.

3. Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N,

Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li TC, Takeda N, Ogasawara K, Torii R. Epidemiology of Hepatitis E Virus in Indoor-Captive Cynomolgus Monkey Colony. *J Vet Med Sci*. 2012. *in press*.

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

E 型肝炎ウイルス粒子の感染性を規定する因子の解析

分担研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 室長 石井 孝司
共同研究者 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 主任研究官 李 天成
国立感染症研究所ウイルス第 2 部 研究員 塩田 智之

研究要旨 E 型肝炎ウイルス (HEV) は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことが研究を困難にしていたが、最近になって PLC/PRF/5 細胞を用いることによりウイルスを増殖させることができることが報告された。本研究では、PLC/PRF/5 細胞で増殖することができる HEV 株を取得し、本株からの感染性の全長 cDNA のクローニングと、感染能のよい細胞の分離を試みた。

A. 研究目的

E 型肝炎は、通常 HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。E 型肝炎はこれまでわが国ではあまり馴染みのない疾患であり、稀に散発的に見つかった症例はそのほとんどが海外旅行中に感染し帰国後に発症したケースであったため、これまでは輸入感染症と認識されてきた。しかしながら近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物に感染することが明らかになり、特に国産ブタでは幼少期にかなりの割合が HEV に感染していることが抗体保有調査から示され、我が国に土着したウイルスであることが判明してきている。これらの肉を生、あるいは加熱不十分なままで摂食することによって HEV に感染すると考えられる。

近年、HEV を培養細胞系で増殖させる系が確立されたが、ウイルスの増殖は非常に遅く、ウイルスの病原性やトロピズムを解明する上で、効率のよい HEV の増殖系を確立することが望まれている。

昨年度は、ヒト肝癌由来細胞株である PLC/PRF/5 で増殖できる HEV 株の取得と、この株からの感染性の cDNA のクローニングを行い、感染性クローンの取得に成功した。本年度はより効率のよい HEV の細胞培養での増殖系を確立するため、PLC/PRF/5 の single cell cloning を行ったところ、本細胞株は HEV が増殖できる細胞、増殖できない細胞が混在したヘテロな細胞の集合であることが判明した。

B. 研究方法

PLC/PRF/5 に 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、クローニングされた多数の細胞株について HEV の感染性を調べた。クローニングされた多数の細胞株に HEV 83-2 株を接種し、各細胞株での HEV の感染増殖を Real time PCR 法および ELISA 法を用いて比較した。また、合成した感染性の HEV RNA を各細胞にトランスフェクションし、細胞内でのウイルス増殖について検討した。

(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、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

クローニングした cDNA から合成した全長 RNA は細胞内で増殖することが確認された。また、この培養上清を naïve な PLC/PRF/5 細胞に添加したところ、2 週間目から培養上清

中に HEV 抗原蛋白の分泌が確認されたことから、本クローンは感染性を有することが確認できた。

PLC/PRF/5 細胞については、single cell cloning により約 100 株を取得した。それぞれの株に 83-2 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 (図 1)。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 (図 2)。

D. 考察

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。

E. 結論

HEV の感染性クローンを取得した。また、PLC/PRF/5 細胞をサブクローニングし、約 100 株を得た。これらの中には HEV 感染に対し感受性の株、非感受性の株があり、HEV の細胞内での増殖を規定する宿主因子が存在することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Nakashima K., Tada Y. and Noda M.

Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Journal of Clinical Virology*, in press.

2. 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., Kannagi M. and Akari H. Long-term persistent GBV-B infection and development of a chronic and progressive hepatitis C-like disease in marmosets. *Frontiers in Microbiology*, in press
3. Miyamura T., Ishii K., Kanda T., Tawada A., Sekimoto T., Wu S., Nakamoto S., Arai M., Fujiwara K., Imazeki F., Kiyohara T., Wakita T. and Yokosuka O. Possible widespread presence of hepatitis A virus subgenotype IIIA in Japan: recent trend of hepatitis A causing acute liver failure. *Hepatology Research*, in press
4. Akazawa D., Morikawa K., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Mochizuki H., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Production and Characterization of Hepatitis C Virus Particles from Serum-free Culture. *Vaccine*, 29: 4821-4828 (2011)
5. Yoshida T., Miyasaka T., Azegami Y., Uchiyama Y., Kasahara H., Ueda H., Nagase H., Fujita S., Ishii K. and Noda M. Investigation of epidemiology and HAV genomes regarding three hepatitis A infections that occurred in April-May, 2010-Nagano. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64: 260-261 (2011)
6. Li T. C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N., and Wakita T. A cell culture system for hepatitis E virus. *Hepatology International*. 5: 202 (2011)
7. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S.,

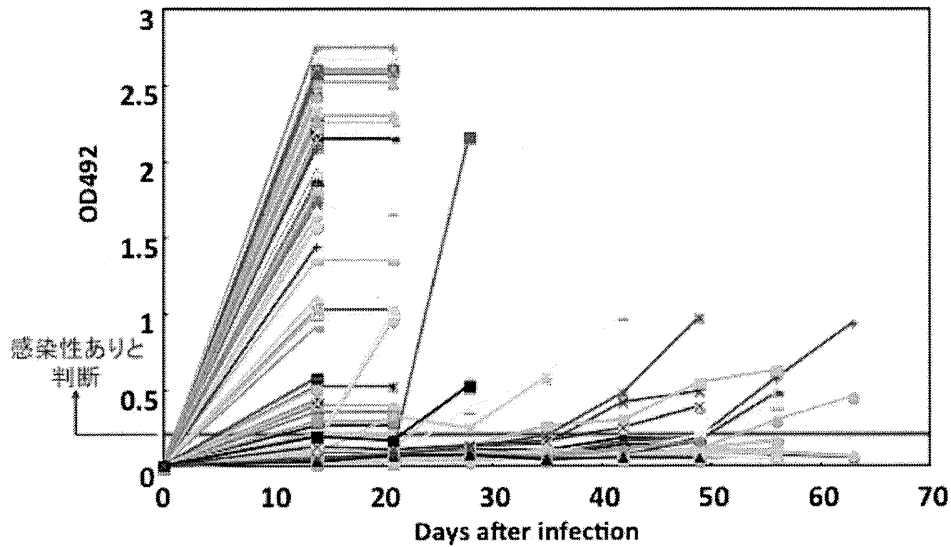
- Shimada T., Nakamura N., Tada Y., Noda M. and Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. *Hepatology International*. 5: 204-205 (2011)
8. 石井孝司 B型肝炎の現状とワクチン 愛知県小児科医会会報 94: 38-46 (2011)
 9. 石井孝司、清原知子 A型肝炎の血清保有状況と最近の流行状況 小児科 52: 1819-1825 (2011)
 10. 道免和文、小野原伸也、田中博文、春野政虎、下田慎治、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明 2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性 肝臓 52: 497-502 (2011)
 11. 石井孝司 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 69:559-565 (2011)
 12. 石井孝司、李 天成 E型肝炎 公衆衛生 75: 43-46 (2011)
2. 学会発表
1. Ishii K., Kiyohara T., Yoshizaki S., Wakita T., Shimada T., Nakamura N., Tada Y. and Noda M. Epidemiological and genetic analyses of a diffuse outbreak of hepatitis A in Japan, 2010. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 2. Noda M., Tada Y., Uema M., Nakashima K., Shimada T., Nakamura N., Kiyohara T. and Ishii K. Food hygienic investigation on hepatitis A cases in the spring of 2010, Japan. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 3. Akari H., Iwasaki Y., Mori K., Ishii K., Maki N., Iijima S., Yoshida T., Okabayashi S., Katakai Y., Lee Y. J. and Saito A. Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011.
 4. Uema M., Aoki N., Aoki S., Furuya Y., Nishio O., Shibata S., Kodaira A., Ishii K. and Noda M. Role of imported seafood as a vehicle of hepatitis A viruses. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 5. Someya Y., Shirato H., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Wakita T., Ishii K., Narimatsu H. and Kubota T. Structural basis for recognition of Lewis A antigen by norovirus. 15th International Congress of Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011
 6. 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.
 7. Li T.C., Song S., Yang Q., Ishii K., Takeda N. and Wakita T. The stability and inactivation of hepatitis E virus grown in cell culture. Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Thailand, February 17-20, 2011.
 8. Nakamura N., Shimada T., Tada N., Okabe N., Kiyohara T., Ishii K. and Noda M. Diffuse outbreak of hepatitis A suspected by national case based surveillance in Japan, 2010, International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2011), Vienna, Austria, February 17-20, 2011
 9. 道免和文、田中博文、春野政虎、姜 貞憲、石井孝司、高橋和明: 2010年A型肝炎ウイルス福岡株に対する分子疫学的検討-1999年ボルネオ(カリマンタン)島由来株との近縁性、第39回日本肝臓学会西部会、平成23年12月、岡山
 10. 上間 匡、石井孝司、小原真弓、田中俊光、増本久人、入谷展弘、斎藤哲也、吉

田徹也、山下育孝、柴田伸一郎、田中智之、内野清子、野田 衛：A 型肝炎ウイルス検出 PCR の高感度化の検証、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京

11. 野田 衛、多田有希、田中智之、石井孝司：2010 年の A 型肝炎の分子疫学と食品衛生上の原因究明、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
12. 山下育孝、青木紀子、青木里美、土井光徳、古屋由美子、西尾 治、石井孝司、野田 衛：A 型肝炎の国内発生における輸入生鮮魚介類の関与、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
13. 西村浩一、原田誠也、李 天成、石井孝司、田中智之、野田 衛：熊本県におけるイノシシ、ブタ及びシカの E 型肝炎ウイルス保有状況に関する実態調査、第 3 2 回日本食品微生物学会、平成 2 3 年 1 0 月、東京
14. 石井孝司、清原知子、島田智恵、中村奈緒美、多田有希、野田 衛、脇田隆字：2010 年春季の A 型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析、第 4 7 回日本肝臓学会総会、平成 2 3 年 6 月、東京

G. 知的所有権の取得状況
なし。

各クローンからのHEV抗原分泌

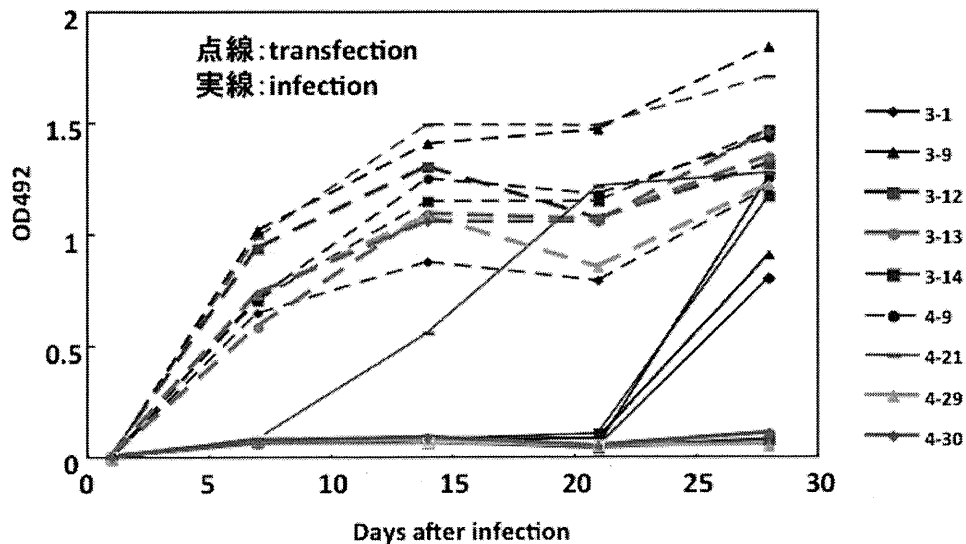


OD492が0.2を超える抗原分泌が観察された場合、感受性ありと判断
 →全94クローン中:76クローンが感受性あり

10クローンが2ヶ月の観察でも感受性見られず

図1

細胞内でのウイルス増殖能の検討



非感受性の細胞にもHEV RNAをtransfectionすると抗原は分泌される。

図2

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

分担研究者 中西 章（独）国立長寿医療研究センター老化制御研究部 室長

研究要旨 ヒトノロウイルスの細胞培養系開発への糸口とするため、マウスノロウイルス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。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。

I. 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

A. 研究目的

ヒトノロウイルスが増殖できる培養細胞は知られておらず、その予防・治療法開発の障害となっている。マウスノロウイルス (MNoV) は、マウス腸管に感染増殖し、かつマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 で増殖可能である。ヒトノロウイルスの培養細胞への増殖馴化の糸口を探る目的で、MNoV の増殖馴化の過程を解析した。よく研究されている MNoV 1 型では、RAW264.7 への増殖馴化に伴い、カプシドタンパク質 Vp1 のアミノ酸配列が変異することが知られている。しかし MNoV 1 型は、脳組織での継代を経たウイルスであって、ヒトノロウイルスのように腸管で増殖したウイルスの分離を想定するような場合には参考になるかは不明である。この研究では、マウス糞便から分離された MNoV 7 型を例にとり、このウイルスで RAW264.7 細胞に感染増

殖・馴化の際におこる遺伝子配列変化を解析した。

B. 研究方法

MNoV 7 型 S7 株（日本大学遠矢幸伸先生）を RAW264.7 細胞で 2 代 (P2)、3 代 (P3) 継代したそれぞれのウイルスストックは、国立感染症研究所片山和彦先生、高木弘隆先生より分与を受けた。各ウイルスストックより、QAmp viral RNA kit (Qiagen) で RNA を抽出し、Superscript III (Invitrogen) または ReverTraAce (Toyobo) により poly-dT をプライマーとして cDNA を作成した。この際、cDNA 作成を 3 回行い、逆転写酵素反応中の塩基取込みエラーによる塩基配列決定の誤りを最小限に抑えるようにした。そして、ウイルスゲノム全長 cDNA 部分を 4 つに分けた PCR 断片を PrimeStar HD (Takara) により PCR 増幅した。この際、各 cDNA から triplicate で PCR 断片を作成し、計 36 断片を作成し、塩基配列を通常の Sanger 法による

sequencing で決定した。また、MNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS53R MNV S7 DNA(国立感染症研究所片山和彦先生より分与)の EF- α 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 を作成した。この cDNA より試験管内転写によって作成した RNA を ScriptCap system (Epicentre) により 5' 末端に Cap 構造を付加し、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成した。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。また MNoV の RNA コピー数は、cDNA からの real-time PCR で定量した。

C. 研究結果

MNoV 7 型 S7 株の RAW264.7 細胞継代 2 代目 (P2)、3 代目 (P3)、そして 3 代目を更に 10 代継代した (P13)各ウイルスストックから RNA を抽出し、RT-PCR によりウイルス塩基配列を同定した。P13 の MNoV 配列は、pKS53R MNV S7 DNA の MNoV 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 の塩基配列が異なり、各 PCR 断片単位でも相違が見られた。Sequencing の結果を精査すると、相違がみられる塩基のシグナルピークは複数有り、cDNA しておそらくは RNA そのもので、異なる配列が混在していることが示唆された。P13 あるいは pKS53R MNV S7 DNA の MNoV 配列と比較して P2/P3 の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るため、pT7 MNVS7 の MNoVcDNA 配列 (7382bp)のうち、MNoV 前半の配列 242 位-4680 位 (MluI-XhoI)、後半の配列 4680 位-6996 位(XhoI - BstBI)を P3 ウイルスストックよりの RT-PCR 断片に交換したコンストラクトを作出し、pT7 MNVS7 と共に試験管内転写により 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ウイルスを作成した。各組換えウイルスそして P2 の MNoV ウイルスストックについて、その RNA コピー数を定量

RT-PCR によって算出し、コピー数を合わせた後、RAW264.7 細胞への感染に用いた。感染後 48 時間で細胞を固定し、crystal violet 染色で感染による細胞障害性を評価した。また、感染後 24 時間に細胞より RNA を回収し、Northern blot によりウイルス RNA の増幅を解析した。この結果、242 位-4680 位 (MluI-XhoI)の領域を P3 由来の断片を交換したものでは、P13 あるいは MNoVcDNA クローン由来の配列をもつ組換えウイルスと同様の増殖性を示したが、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、crystal violet 染色での細胞障害性、Northern blot によるウイルス RNA 増幅量から判断して、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 MNoV 6158 位の T→C (Vp1 301 I→T) 6638 位の C→T (Vp1 368 V→A)であり、またこの遺伝子変化は P2・P3 に共通で見られた。これらの塩基配列の変化が MNoV の RAW264.7 細胞での増殖性に及ぼす影響について解析するため、各遺伝子変化を単独でもつ変異体を現在作成中である。

D. 考察

以上の結果により、MNoV7 型の分離間もないウイルスストックには複数のゲノム配列が混在していること、そして RAW264.7 細胞での培養を経ることにより単一ゲノム配列に収束していくことが示唆された。また収束の結果、RAW264.7 細胞での増殖が遅いものが消失していることから、培養細胞 RAW264.7 での増殖が良いものが選択的に生き残ったとも考えられる。今後の解析で明らかにしていく必要があるが、Vp1 301 位あるいは 368 位のアミノ酸残基の変異が RAW264.7 細胞での増殖性を規定しているのかもしれない。しかし何故他の遺伝子配列のバリエーションも消失した理由は明らかではない。今回用いたのは MNoV7 型であるが、1 型については培養継代後に Vp1 296K が E に