

- Katayama, Kazuyoshi Murata, and Peter D. Kwong. Structural Basis for Broad Detection of Genogroup II Noroviruses by a Monoclonal Antibody That Binds to a Site Occluded in the Viral Particle *Journal of virology* vol. 86, 3635-3646, 2012.
3. Seiya Harada, Tomoichiro Oka , Eisuke Tokuoka, Naoko Kiyota, Koichi Nishimura, Yasushi Shimada, Takehiko Ueno, Shigeru Ikezawa, Takaji Wakita, Qihong Wang, Linda J. Saif, and Kazuhiko Katayama. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-012-1387-7, 2012 online.
 4. Matsuhira, T., Kaji, C., Murakami, S., Maebashi, K., Oka, T., Takeda, N. and Katayama, K. Evaluation of four antiseptics using a novel murine norovirus. *Exp Anim.* vol. 61, 35-40, 2012.
 5. Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T., and Katayama, K. Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol.*, vol157, 349-52, 2012.
 6. Tyler M Sharp, Sue E Crawford, Nadim J Ajami, Frederick Neill, Robert L Atmar, Kazuhiko Katayama, Budi Utama, Mary K Estes. Secretory pathway antagonism by calicivirus homologues of Norwalk virus nonstructural protein p22 is restricted to noroviruses. *Virology Journal* 2012, 9:181 (3 September 2012)
 7. Yoshiki Fujii, Takashi Shimoike, Hirotaka Takagi, Kosuke Murakami, Reiko Todaka-Takai, YoungBin Park and Kazuhiko Katayama. Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction . *Microbiol Immunol.* 56: 630-638, 2012.
 8. Masaru Yokoyama, Tomoichiro Oka, Hirotatsu Kojima, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tadahito Kanda and Hironori Sato. Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 312, 1-10, 2012
 9. Motohiro Miki and Kazuhiko Katayama. *In silico* 3D structure analysis accelerates the solution of a real viral structure and antibodies docking mechanism. *Frontiers in Microbiology* 3: Article 387, 1-6, 2012
 10. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, Miyoshi T, Tanaka T. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol Immunol.* 56(11):760-770, 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 仲 浩臣 和歌山県環境衛生研究センター
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：ノロウイルスは未だに分離培養されていないウイルスの一つである。ヒトの小腸細胞でのみ増殖すると考えられている。これまで腸管系細胞のみならず人由来の培養細胞を用いてノロウイルス分離を試みてきた。今回、CaCo-2 細胞、PANC-1 細胞を用い、トリプシン、ペプシン等の消化系酵素添加による検討を行い、加えて新鮮な臨床検体を用いた。しかし、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の経時的ノロウイルス遺伝子量を測定したが、継代培養においては減少の一途であった。今年度も通常の細胞培養によるノロウイルスの分離は出来なかった。

A. 研究目的

ノロウイルス感染は様々な環境の中でいくつかの感染経路、すなわち経口感染として食中毒、あるいは接触感染、飛沫(塵埃)感染として通常の感染症と類似の経路で発症させる。これらの感染動態は冬季を主とした感染症であるが夏季の発生も珍しくはない。特に 2012/13 シーズンではノロウイルスの抗原性の変化により過去二番目の大きな流行を招来した。また、発症時期も 2006/07 の一番大きな流行時に比べ 2 週間も早い流行の開始であった。その流行パターンも初期は幼稚園・保育園から流行が始まり次第に成人、高齢者に移行するパターンを示した。流行後半には高齢者介護施設、社会福祉施設等での流行が約四分の三を占めた。その影響で感染症状の一つである嘔吐による嚥下性肺炎や窒息といった合併症が原因で全国で 42 名(H23. 1. 24 現在)の患者、入居者が亡くなった。

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。従って分離株によるワクチン開発の道のりは極めて遠く、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。遺伝子操作を駆使した方法においても持続的な増殖には至っていない。

ヒトノロウイルスはヒトの腸管でしか増殖しない。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ヒト由来の株化細胞を用いてウイルス分離を過去数年にわたり試みているが成功に至っていない。

今年度は一昨年度から課題となっている方法を改良しつつ、改めて標準的なウイルス分離方法で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

ノロウイルス流行事例から得られた新鮮な検体を材料とした。検体の精製法は昨年度に準じた。すなわち、

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℃) 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 $1.2\mu\text{m}-0.65\mu\text{m}-0.45\mu\text{m}$ 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) ①、②で得られた NV 濃縮サンプル $300\mu\text{L}$ にアセチルトリプシン (SIGMA 社) $20\mu\text{g/ml}$ 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) ペプシン処理及び接種材料の調整

超遠心後の沈渣に MilliQ2ml を加えて作製した NV 浮遊液の内、 $450\mu\text{l}$ に 1%Pepsin 溶液 (0.1M HCL) $50\mu\text{l}$ を添加し、 37°C で 10 分間加温した後、 0.5M NaHCO_3 を $80\mu\text{l}$ 添加し、ペプシン処理済み液とした。陰性対照は、1% Pepsin 溶液及び 0.5M NaHCO_3 の代わりに PBS (-) を同量使用した。さらに、双方に 0.4% 牛血清アルブミン (BSA) 加 Dulbecco (D) MEM 培地を $580\mu\text{l}$ 添加した後、孔径 $0.22\mu\text{m}$ の Millipore filter で濾過滅菌を行った。接種材料には、濾過滅菌後の試料 (原液) と 0.4%BSA 加 D-MEM を用いて 10 倍希釈した 2 種類を使用した。

上記のトリプシン、ペプシンは種々の濃度でウイルス処理を行った。

3) 細胞の種類

使用細胞はヒト膵臓癌由来 PANC-1 及びヒト大腸癌由来 CaCo-2 細胞を使用した。維持液は、CaCo-2 細胞では、トリプシン $1.25\mu\text{g/ml}$ を添加した 0.1%BSA 加 Eagles MEM 培地と 2% 牛胎児血清 (FBS) 加 Eagles MEM 培地を、PANC-1 細胞ではトリプシン $0.3125\mu\text{g/ml}$ を添加した 0.1%BSA 加 DMEM 培地と 2%FBS 加 DMEM 培地を使用した。

さらに人結腸癌由来細胞 Co α -1 を用いた。維持液は 5%FCS を含んだ RPMI 培養液にて培養した。

4) 培養条件

培養は 5%CO₂ chamber で行い、 37°C の chamber

と共に、腸内温度を想定した 35°C で細胞管理した。

5) ウイルスの遺伝子型

今年度はノロウイルス GII.4 にのみを対象ウイルスとした。

6) 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細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE が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。すなわち、Viral RNA Mini Kit (Qiagen) を用い、各細胞培養液の上層及び下層液 $140\mu\text{l}$ から $60\mu\text{l}$ の RNA 抽出液を得た。逆転写反応は Prime Script[®] II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を使用し、リアルタイム RT-PCR は、通知法に従い実施した。

C. 研究結果

1) 3 種類の細胞、PANC-1 細胞、CaCo-2 細胞および Co α -1 細胞にノロウイルス検体を接種し経時的にウイルス量の検出結果をそれぞれ示す (図 1, 図 2)。いずれも 5 代まで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) Co α -1 にノロウイルス GII.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。14 日後の細胞形態は CPE 様変化に見えた。ノロウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法では、胞体内に封入体様の蛍光がみられた。しかし、この細胞は回収し、細胞相、培養液相に分けて real-time PCR 法にてウイルス量を測定した。

しかし、接種材料が 2.3×10^8 copy であるのに対し、細胞層で 8.5×10^4 copy, 液相で 2.5×10^6 copy と、決してウイルス量の増加を示す所見は得られなかった (図 3)。この系は現在も継続して培養中である。

D. 考察

ノロウイルスはヒトの小腸で増殖している。つまり、ヒト小腸細胞にノロウイルスとの受容体が存在していると考えられる。従って培養細胞を用いたノロウイルスの分離はヒト小腸細胞あるいは腸管という観点に立てば大腸由来の細胞を用いなくては分離培養の可能性は少ない。しかし、これまで CaCo-2 等の人腸管由来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受容体との結合をスムーズに行わせるといわれている検体のトリプシン処理や今回のペプシン処理においても効果が見られなかった。

また、培養の温度も変化させてみたが効果は見られなかった。

前年度の報告でも述べたが、ノロウイルスの吸着にはヒト血液型物質が 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。また、分泌型物質陽性のヒトはノロウイルスに感染しやすいという報告も見られる。

ウイルス分離に用いる株化細胞がどのような性質を有しているのかは知る由もない。

分子生物学的なウイルスのレセプターの解析が今後に残された唯一のウイルス分離への方法かもしれない。

E. 結論

これまでの成績を含めて、様々なヒト腸管系由来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。ウイルスと細胞の接合性を含めた分子生物学的見地から、再度レセプター解析が必要である。

F. 研究発表

論文発表

1). Noritoshi Kitamoto, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Yoji Kato, Tatsuya Miyoshi and Tomoyuki Tanaka: Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human

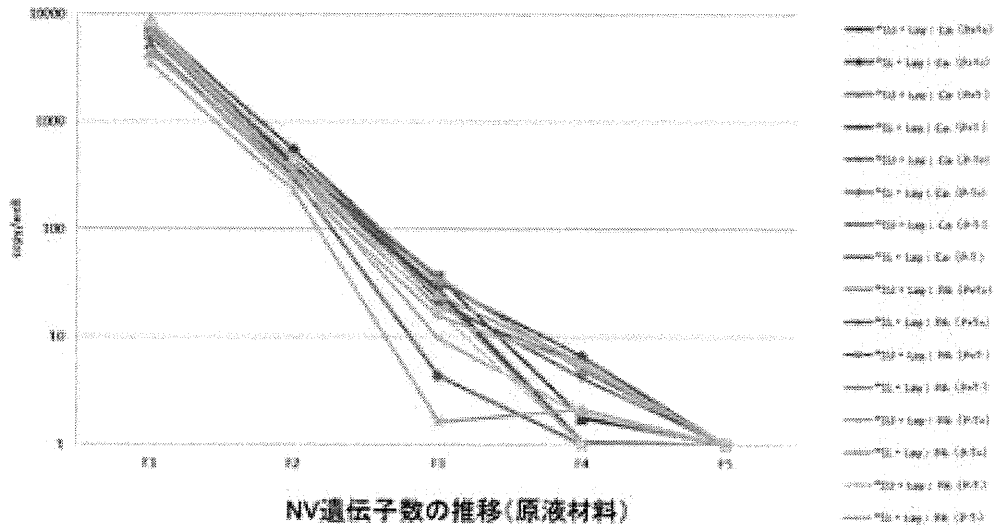
recombinant sapovirus-like particles. Microbiol. Immunol. 56; 760-770, 2012

- 2). 田中智之. 三好龍也、内野清子吉田永祥 感染症迅速診断キットの有用性と限界 -ノロウイルス- 小児科 53(4), 437-442, 2012
- 3). 田中智之、小林尚明、豊田 茂、佐藤雅久、佐野康子、竹田弘、柏井健作、家永信彦、中田修二、宇加江進、佐藤 勇、原錬太郎、中野 徳、田中敏博、五十嵐隆夫、水澤一郎、田尻 仁. ノロウイルス抗原迅速診断試薬クイックナビ™ -ノロ2の評価. 医学と新薬 68(6), 1033-1039, 2012
- 4). 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, Norovirus Surveillance Group of Japan ノロウイルスのゲノム解析と流行発生のしくみ. 感染症学雑誌: 86: 563-568, 2012
- 5). 田中 智之. 新規に保険収載された検査法 ノロウイルス抗原迅速定性検査 モダンメディア: 58(11); 337-341, 2012

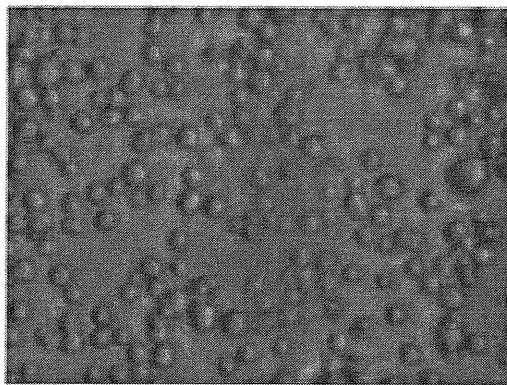
G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし

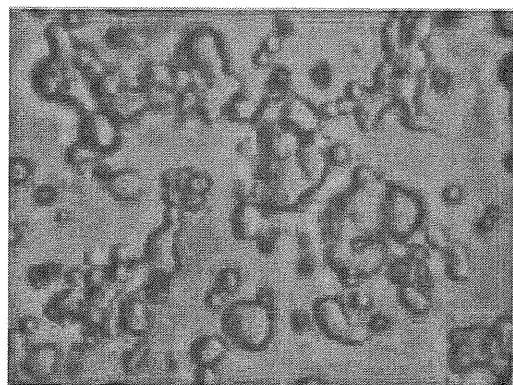
図1. ノロウイルス接種CaCo-1, PANC-1細胞培養液中のウイルス遺伝子の変化



凡例の表記
 (例) *1U-Lay:Ca (P+T+)
 *1: *1サンプル, U-Lay:Upper Layer, Ca:CaCo-2, (P+T+):Pepsin処理有, Trypsin処理有



Before inoculum

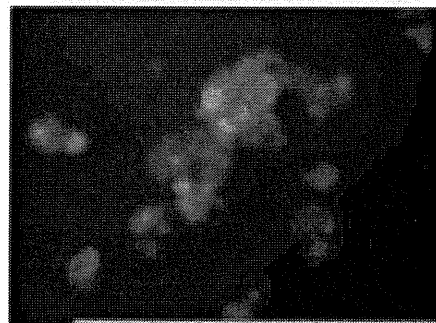


Two weeks after inoculum

Cell: Co α-1
 Inoculum: V344(81L4) 2.3×10^8 copy/g
 Pepsin treated

Crit. No detect
 Infected: sample diluted $\times 10$

Liquid phase: 2.5×10^6 /ml
 Cell phase: 8.5×10^4 /ml



IF: αNV MAbs NS24, NV1392

図2. 接種後の細胞の形態的变化

次世代シーケンサーを用いたノロウイルスの混合感染の解析

分担研究者：本村 和嗣 国立精神・神経医療研究センター臨床開発部 室長

研究要旨：今年度は、ノロウイルス混合感染の実態の解明のため、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。(i) 本症例は、2年間にわたり、ノロウイルスに5回感染していた。(ii) キャプシド遺伝子シェル領域の配列情報（合計；186869配列）、約 4.75×10^7 塩基の配列情報を取得した。(iii) 一年以内に、頻回に、GII.2_GII.15、GII.4 2006b亜株に感染していた。(iii) 臨床症状は、一回目感染時は、発熱、嘔吐、下痢の典型的急性胃腸炎症状を呈したが、二回目以降、症状は軽減傾向になっていた。感染者には、しばしば異なる遺伝子型のノロウイルスが混合感染していることがわかった（3/5症例）。(iv) 今回、明らかなキメラウイルスは検出できなかった。次世代シーケンサーによる解析は、感染時の混合感染の解析に有効な手法かもしれない。

A. 研究目的

ノロウイルスは自然環境（河川中、二枚貝など）、生活環境（ドアノブ、コンピューターのキーボード）に普遍的に多様な遺伝子型、亜型が混在していると考えられる。ノロウイルス感染者体内では、混合感染していれば重感染がおき、キメラウイルス新生の危険度が高まる。我々は、これまでの研究成果より、複製能と免疫逃避能に優れたキメラウイルスが新生すれば、ヒト社会の中で流行を引き起こすと考えている。

感染者体内の準種の種類や動態を解析する系はない。既存の技術では、血清中に 20% 未満存在するウイルスを検出することは困難である。我々は、次世代シーケンサーの大容量配列情報収集能力に着目した。感染者体内に 1%以上存在する準種の種類や動態を包括的に解析することで、混合感染を理解する手がかりを得たい。我々は、高速、大容量解析可能な次世代シーケンサーを用いて、ノロウイルス キャプシド遺伝

子シェル領域（280bps）の配列情報を網羅的に収集し、ヒト個体内で存在するウイルス準種の実態を解析した。

B. 研究方法

1) 研究対象

2010年3月より2012年3月までの2年間で、5回にわたり、ノロウイルスに感染し胃腸炎症状をきたした、成人女性を対象とした。免疫機能を低下させる基礎疾患は罹患していない。

2) 臨床試料を用いた解析

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。これを鋳型として、DNAライブラリーを作成し、FLX 454

(Roche) を用いて、増幅産物の塩基配列を網羅的に取得した。

(倫理面からの配慮について)

ヒト由来臨床材料を使う研究は、関連機関の倫理審査会の承認を得て、提供者本人に十分な説明を行い、承諾を得た上で行った。

C. 研究結果

(i) 本症例では、2年間にわたり、ノロウイルスに5回感染していた。(ii) キャプシド遺伝子シェル領域の配列情報(合計: 186869配列)、約 4.75×10^7 塩基の配列情報を取得した。(iii) 各々の感染時の遺伝子型、亜株の分布状況であるが、一回目は、多い順に、GII.2_GII.15が86.2%、GII.4 2006b亜株が7.0%、GII.3_GII.12が6.8%であった。二回目は、GII.4 2006b亜株が67.6%、GII.2_GII.15が32.3%であった。三回目は、GII.2_GII.15が99.8%、GII.4 2006b亜株が0.2%であった。四回目、五回目は、共に、GII.4 2006b亜株が100%であった。(iii) 一年以内に、頻回に、GII.2_GII.15、GII.4 2006b亜株に感染していた。(iv) 臨床症状は、一回目感染時は、発熱、嘔吐、下痢の典型的急性胃腸炎症状を呈したが、二回目以降、症状は軽減傾向になっていた。

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。感染者には、しばしば異なる遺伝子型のノロウイルスが混合感染していることがわかった(3/5症例)。今回、明らかなキメラウイルスは検出できなかった。ヒトは1年間に頻回にノロウイルスに感染することがわかった。感染した5回の主要な遺伝子型、亜株は、同じ傾向にあり、GII.2_GII.15とGII.4 2006b亜株に感染していた。この2種類の

ウイルスが複製能、増殖能が優れているためか、宿主側がノロウイルス易感染性を示す遺伝的背景があるのか、現時点では不明である。五回感染していたが、そのうち、二回目以降は、症状が軽減しており、抗体による防御反応が示唆される。また、二回目以降は、不顕性感染と考えられる。通常の場合、病院を受診せず、ウイルスを排出しながら、活発に活動する。不顕性感染者が、ヒト-ヒト間でウイルスを媒介する存在となり、ヒト集団内で感染拡大する要因になる。次世代シーケンサーを用いる事で、不顕性感染時にも混合感染が認められることがわかった。

E. 結論

本研究班では、初年度: VLPの作成、次年度次世代シーケンサーを用いて、糞便試料から、一回の解析で、NoV混合感染の数十万種類の配列(平均長450塩基)を取得する系の作成、最終年度: 次世代シーケンサーを用いて混合感染の実態がわかった。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抗体を測定したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣 “ヒトノロウイルス流行の基礎知識と検査法” 日本臨床 Vol.70(8) p.1272-1276: 2012年8月号; 日本臨床社
- 2) Motomura K., YOKOYAMA M., , OKA T., , KATAYAMA K., , NODA M., , TANAKA T., SATO H., “A Mechanism of Norovirus Pandemic Based on Comprehensive Genome

Analysis” Jpn. J. Infectious Disease. 2012 Sep;86 (5):563-568.

3) 本村和嗣、大石和徳 “ノロウイルス感染症” からだの科学 2012年 12月号 日本評論社

2. 学会発表

(1). 本村和嗣 “ Structural dynamics of norovirus GII.4 genome in nature ” 長崎大学 医学部 大学院医学系研究科 分子疫学研究室大学院セミナー 2012年3月2日 長崎

(2). 本村和嗣、横山勝、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group of Japan “ 2010-2011年に国内で流行したノロウイルス全長解析 “ 第86回 日本感染症学会総会 2012年4月24-25日 長崎

(3). 本村和嗣、片山和彦、佐藤彩、中村浩美、佐藤裕徳 “ 次世代シーケンサーを用いた家族内感染例におけるノロウイルスの準種解析 “ 第 86 回日本感染症学会総会 2012年 4月 24-25日 長崎

(4). 本村和嗣 “ノロウイルス流行発生のしくみ” 第53回 日本臨床ウイルス学会教育セミナー 2012年6月17日 大阪

(5). 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” RCC-ERI Seminar 2012 July 13th Bangkok, Thailand

(6). 本村和嗣 “先端技術を用いたノロウ

イルス感染症の理解” CREST 「持続可能な水利用する革新的な技術とシステム」

「迅速、高精度、網羅的な病原微生物検出による水監視システムの開発」 シンポジウム 2012年8月21日 仙台

(7). 本村和嗣、大出裕高、佐藤彩、中村浩美、佐藤裕徳 “ 次世代シーケンサーを用いた家族内感染例におけるノロウイルスの準種解析 “ 第 60 回日本ウイルス学会総会 2012年 11月 15日 大阪

(8). 佐藤裕徳、本村和嗣、横山勝、椎野禎一郎、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、野田衛、田中智之、Norovirus Surveillance Group “ パンデミックノロウイルスの発生と進化の機構 “ 第 60 回日本ウイルス学会総会 2012年 11月 15日 大阪

(9). 三好龍也、内野清子、本村和嗣 佐藤裕徳、田中智之 “ 堺市におけるキメラ型ノロウイルスの検出状況 “ 第 60 回日本ウイルス学会総会 2012年 11月 15日 大阪

(10). 本村和嗣 “ 先端技術を用いたノロウイルス感染症の理解 “ 微研セミナー 2012年 11月 19日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

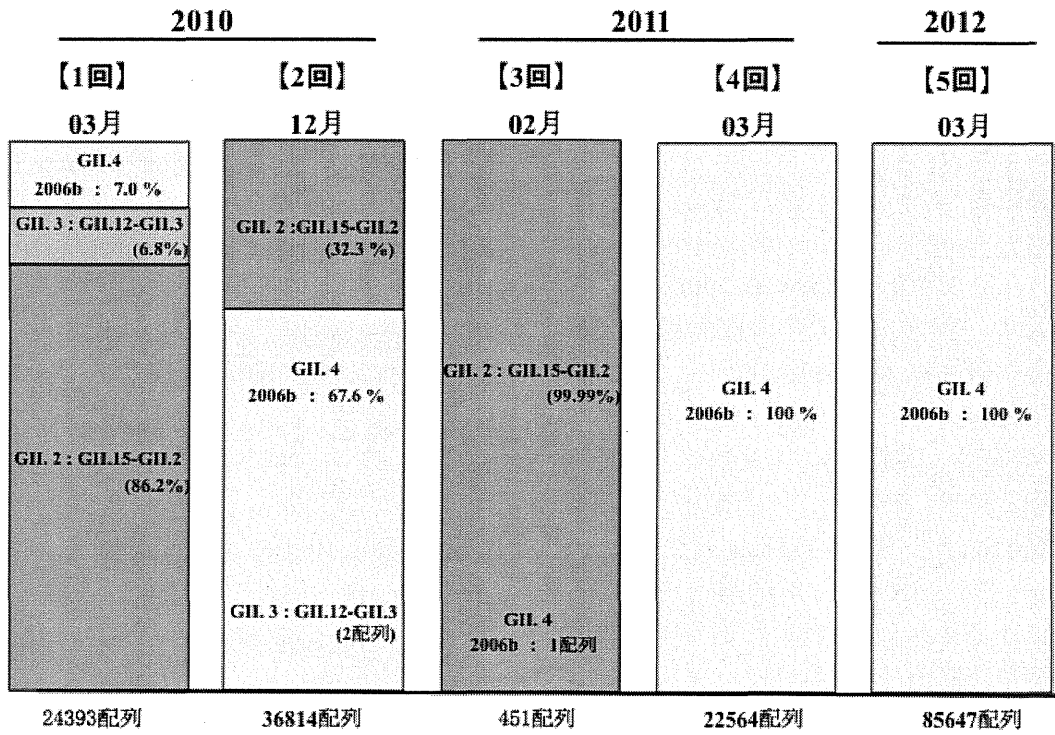
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

個体内におけるノロウイルスGII準種の推移 (37歳, 女性)



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中和抗体検定法の開発

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。増殖馴化の過程では、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することが観察され、この遺伝子変化には細胞内増殖に適したゲノム配列が選択と、特定の配列の adaptive mutation が関与していることが示唆された。

新規ポリオーマウイルス、WUPyV、KIPyV のカプシドをもち、レポターDNA をパッケージした psudovirion と、Vero 細胞を用いて、中和抗体検定系を作成した。ヒト血清中の中和抗体価を図ることによって WUPyV、KIPyV の感染病理に関してより詳細な検討を加えることが可能になった。

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 (HuNoV) 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 (MuNoV) 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。MuNoV の増殖馴化の過程はヒトノロウイルスの細胞増殖馴化への糸口を提供できる可能性がある。よく研究されている MuNoV 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 MuNoV 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 MuNoV S7 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。前年度の研究で、(1)分離間もないウイルスストックには複数の配列が存在すること、(2)RAW264.7 細胞での増殖に伴い、この遺伝子配列のバリエーションは単一の配列、MuNoV S7-PP3 (Genbank AB435515.1: 以下 RAW 馴化配列)として登録されている配列、に収束していくことが明らかになった。本年度は、RAW264.7 細胞での MuNoV S7 株の継代過程で RAW 馴化配列への収束に関わるウイルス配列の選択機構について解析を行った。

B. 研究方法

MuNoV S7 株（日本大学遠矢幸伸先生）を RAW264.7 細胞で 2 代 (PP2)、3 代 (PP3) 継代した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 mini 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 cDNA を前年度作成した pT7 MNVS7 の MNV ゲノムの一部と交換した。また MuNoV 6158 位の C→T (Vp1 301 T→I)、6638 位の T→C (Vp1 368 A→V) の各点変異を導入した。これら cDNA をコードする pT7 MNV S7 プラスミドより試験管内転写によって作成した各 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 MuNoV の RNA コピー数は、培養上清より抽出した RNA をもとに作成した cDNA からの real-time PCR で定量した。また、PCR 断片からの変異配列を簡易的に定量するために、MNV 2250-2280 FW - MNV 2880-2850 RV プライマーセット、MNV 5821-5845 FW - MNV 7012-6982 RV プライマーセットを用いて PCR 断片を作成後、PvuII 制限酵素で切断、アガロースゲル電気泳動にて、表れるバンド数・長によって PCR 断片中の PvuII サイト数を解析した。

C. 研究結果

MuNoV S7 株の RAW264.7 細胞継代 2 代目 (PP2)、3 代目 (PP3)、そして 3 代目を更に 10 代継代した (PP13) 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。PP13 の MuNoV 配列は、RAW 馴化配列と完全に一致したが、RAW 馴化配列と比較して PP2/3 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 12 箇所、silent mutation は 42 箇所見られた。これらの変異の意味を探るため、RAW 馴化配列をコードする pT7 MNVS7 の MuNoVcDNA 配列 (7382bp) のうち、MuNoV 前半の配列 242 位-4680 位 (MluI-XhoI)、後半の配列 4680 位-6996 位 (XhoI - BstBI) を PP2/3 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成した。これらのコンストラクトを利用して

試験管内転写により RNA を作成、キャップ構造を付加し、293T 細胞に導入して各種組換えウイルス、(1) RAW 馴化配列をもつもの、(2) MuNoV 前半の配列 242 位-4680 位 (MluI-XhoI) が PP2/3 配列由来のもの、(3) 後半の配列 4680 位-6996 位 (XhoI - BstBI) が PP2/3 配列由来のもの、を作成した。PP2/3 配列をもつ組換えウイルスは RAW264.7 細胞での増殖性が低いことを予想し、RAW 馴化配列をもつ組換えウイルスと共感染すると増殖性が劣るために、数代の継代後には消失してしまうかもしれない。この予想を検証するために、PP2/3 配列をもつ組換えウイルスと RAW 馴化配列から作成した組換えウイルスと RNA コピー数から計算して 1 : 1 の割合で混合し、RAW 細胞に共感染した。8 代継代したところで、細胞より RNA を抽出し、cDNA を作成後 PCR 断片より配列を決定したところ、すべての組み合わせで RAW 馴化配列のみ検出された。この継代の過程で採取した RNA から MuNoV 2250-2880 位、5821-7012 位の PCR 断片を作成し、PP2 配列特異的な PvuII サイトを目印にして、継代前 (0 代)、継代 2、4、8 代での PP2 配列由来の RNA の比率を検討すると、継代 2 代目ですでに RAW 馴化配列が優勢になっていた。同様に、分離間もない MuNoV ウイルスストック、PP2、PP3 を RAW264.7 細胞で継代する過程でも、PvuII サイト数の変化による解析で、継代 2 代目ですでに RAW 馴化配列が優勢になっていることが明らかになった。一方、PP2 配列をもつ各種組換えウイルスを単独で RAW264.7 細胞に感染させ 8 代継代してもその配列は殆ど変化せず、上記の RAW 馴化配列への収束は選択過程であることが示唆された。しかし、PP2 配列をもつ組換えウイルスの中で唯一 MuNoV 6158 位の C→T (Vp1 301 T→I) の変化が確認できた。また RAW 馴化配列の中で MuNoV 6158 位のチミン (T) をシトシン (C) に変異させた組換えウイルスを RAW264.7 細胞に感染させ、増殖したウイルスの配列をみると同配列がチミン (T) に戻ったもののみ検出できた。他のポイントミュータントではこのような強制的な変異はみられなかったため、MuNoV 6158 位の C→T

(Vp1 301 T→I) の変化は RAW264.7 細胞での MuNoV S7 株の増殖に必須であることが示唆された。

D. 考察

以上の結果により、MuNoV S7 株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された。このゲノム変異の収束には、RAW264.7 細胞での増殖性で、大きな差はないものの、相対的に有利な配列が選択されていること、そして RAW264.7 細胞での増殖に必要な adaptive mutation, MuNoV 6158 位の C→T (Vp1 301 T→I), が関与することが示唆された。比較的良く研究されている MuNoV 1 型については培養継代後に Vp1 296K が E に変わること、マウス個体感染時の病原性が消失することが報告されている (Bailey et al. 2008)。この変化は 1 型にとっては増殖性に必須な変化ではないようであるが、S7 株にとっては重要な変異であることが今回の実験で示唆された。今後は、次世代シーケンサーなどの利用によって RAW264.7 細胞継代に伴うより詳細な遺伝子プールの変化を解析することにより、MuNoV の細胞馴化の過程の全容を明らかにすることが必要である。これらの知見は HuNoV の細胞培養系開発への糸口となることが期待される。

E. 結論

MuNoV S7 型の RAW264.7 細胞への増殖馴化の過程で、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と考えられた。またこの変化には、大きな差はないものの RAW264.7 細胞での増殖性で有利な配列が選択されていること、そして RAW264.7 細胞での増殖に必要な adaptive mutation, MuNoV 6158 位の C→T (Vp1 301 T→I), が関与することが示唆された。

II. 新規ヒトポリオーマウイルスの中和抗体検

A. 研究目的

2007 年から今年 2011 年に至るまで、計 7 種の新たなヒトポリオーマウイルスが発見されている。ヒト皮膚がん (メルケル細胞がん) からは MCPyV、ヒト棘状毛胞異形成症からは、Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSPyV)、呼吸器疾患の患者から WUPyV、KIPyV、健康ヒト皮膚から HPyV6、HPyV7、免疫抑制患者からは HPyV9、そしてさらに HPyV10 が新たに見つかった。これらのウイルスの病原性については、その解析が端緒にすぎたばかりである。近年の報告ではこれら新規ポリオーマウイルスに対する抗血清をもつヒトの割合は MCPyV で 60-90%、TSPyV で 70% (成人)、WUPyV、KIPyV で 80-90%、HPyV9 で 47% などと報告されており、これらウイルスが無視できないほど高い割合で存在していることが明らかになっている。しかし、これらの新規ポリオーマウイルスの殆どは感染増殖が可能な細胞は知られていない。我々は、先に開発した surrogate capsid (psudovirion) system を利用して WUPyV、KIPyV の psudovirion を作成し、Vero 細胞へ効率に導入できることを見出した。今年度は当該粒子を用いて中和抗体検定法の作成を試みた。

B. 研究方法

本研究者が開発した psudovirion system により、WUPyV、KIPyV のカプシドをもつ psudovirion を以下の方法で作成した。3つのプラスミド、(1)pCAG WUV 又は pCAG KIV と (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 (Beckman SW50, 45, 000rpm, 3.5hours, 10°C) の連続密度勾配遠沈後、フラクションに分画し、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 psudovirion を回収した。Gluc 活性は Biolux assay kit (New England Biolab) で測定し、各 psudovirion の遺伝子導入性を検証した。サンプル中の DNA コピー数は、SV40 origin をターゲットとした定量 PCR により算定した。

C. 研究結果

WUPyV、KIPyV psudovirion を大量に作成・精製した。pCMV-Gluc2 をパッケージする WUPyV、KIPyV psudovirion を、それぞれ 15cm ディッシュ 10 枚分の 293T 細胞から作成し、2 回の 27-39% Optiprep 密度勾配遠沈によって分画精製し、そして psudovirion を含むフラクションを Amicon Ultra 15 (MWC0 100kDa, Millipore) で濃縮した。Vero 細胞あたり 1,000 コピー DNA にあたる WUPyV、KIPyV psudovirion を導入し、同時にヒト血清 (Sigma-Aldrich, H4522) あるいはウサギ血清の希釈系列を加え、48-60 時間後に細胞上清の Gluc の活性を測定した。この結果、WUPyV、KIPyV 共にヒト血清添加区で 1/40 希釈で Gluc の活性の低下が観察され、ヒト血清による感染阻害と考えられる効果がみられた。一方ウサギ血清では、同様の阻害効果はみられなかった。

D. 考察

今回の研究では、精製した WUPyV、KIPyV psudovirion を使用して Vero 細胞への pCMV-Gluc2 導入の際、ヒト血清存在下で感染(遺伝子導入) 阻害効果を観察することができた。ヒト血清中の中和抗体価を図ることによって WUPyV、KIPyV の感染病理に関してより詳細な検討を加えることが可能になった。今回の実験では 1/40 希釈のヒト血清でその効果を観察することができたが MCV の psudovirion を用いた過去の実験では、より高い希釈倍率での検出で成功している。この差異は、作成した psudovirion の中に pCMV-Gluc2 を含まない empty の混入が考えられるため、作成系の改良などでより鋭敏な中和抗体検定系の改良が必要と思われる。

E. 結論

Gluc 発現ベクターをパッケージした WUPyV、KIPyV の psudovirion の Vero 細胞へ導入後、Gluc 活性を測定する系に対し、ヒト血清の希釈系列を加えてその中和抗体活性を検出した。今後の課題として、より鋭敏な中和抗体検出系の作成のため、この検定系の改良が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells

Watanabe M, Phamduong E, Huang C-H, Itoh N, Bernal J, Nakanishi A, Rundell K, Gjoerup O, and Kasamatsu H

Journal of Virology *Accepted*

Initiation of human astrovirus type 1 infection was blocked by inhibitors of phosphoinositide 3-kinase

Tange S, Zhou Y and Nakanishi A

Virology Journal *Submitted*

2. 学会発表

1) 丹下正一郎、周妍、中西章

アストロウイルス感染に伴い活性化されるシグナル伝達経路

日本ウイルス学会 第 60 回 (2012) 11 月 15 日 大阪

2) 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木博隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦

カリシウイルスのユニバーサルなプラスミドベースリバースジェネティックスシステム

日本ウイルス学会 第 60 回 (2012) 11 月 15 日 大阪

3) Shoichiro Tange, Yan Zhou, Akira Nakanishi

Signaling pathways that involve in human
astroviral infection

第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 12
日 福岡

4) Reiko Todaka, Tomoichiro Oka, Kosuke
Murakami, Takashi Shimoike, Yoshiki Fujii,
Young Bin Park, Hiroataka Takagi, Takaji
Wakita, Akira Nakanishi, Kazuhiko
Katayama

Development of plasmid DNA
transfection-based reverse genetics system
for murine norovirus and feline calicivirus

第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 12
日 福岡

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

ノトバイオート豚を利用した B 群ロタウイルス感染モデルの確立と病態解析

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 培養細胞による感染系が確立されていないため、遺伝学的性状や病原性に関してほとんど不明な B 群ロタウイルスに関して、ノトバイオート豚を用いた実験感染モデルを作出した。

A. 研究目的

ロタウイルスは幼若動物や乳幼児での重症性下痢の主要原因の一つであり、新興感染症病原体である。また、ロタウイルスは人獣共通感染症病原体でもあり、A-C 群はヒト以外にウシ、ブタなどの動物からもウイルスが検出され、公衆衛生上高い関心を集めている。B 群ロタウイルスによるヒトや動物の下痢発生数はアジア各国で増大しているが、本ウイルスは培養細胞感染系や実験感染モデルが確立されていないため、遺伝学的性状や病原性に関して不明な点が多く残されている。これまでの研究において、ブタ B 群ロタウイルスは遺伝学的に多様であり、異なる遺伝的背景を有する複数の株が存在することを明らかにしてきた。そこで本年度は、それらの株をノトバイオート豚に接種し、株間における病原性の相違を含めた B 群ロタウイルスの病理組織学的特徴、さらにはモデル動物としての有用性について解析・検討した。

B. 研究方法

B 群ロタウイルスの主要構造蛋白質である VP6 に関して、遺伝学的大約および抗原学的に相違が認められたブタ B 群ロタウイルス 2 株（93-I5 および 107-G16 株）をそれぞれノトバイオート豚（3 日齢）に同量を経口接種した。接種 1 日後から経時的に腸管および主要臓器を採取し、ウイルス学的検査および病理組織学的検査を実施した。特に、病理組織学的検査では、光学顕微

鏡および電子顕微鏡を用いて両株間における病原性の相違を比較・解析するとともに、他のロタウイルスとの病理学組織的な相違についても比較・解析した。

C. 研究結果

いずれの株接種群ともに、全ての個体で水様性下痢が認められ、特に 107-G16 株接種群では極度に衰弱する個体も認められた。いずれの株接種群ともに、接種後 1 日より、特に空腸で絨毛萎縮が認められた（表 1）。107-G16 株接種群では絨毛萎縮に加えて、粘膜上皮細胞の壊死・脱落や合胞体形成といった特異的な病変が十二指腸から空腸にかけて進行的に観察された（表 2）。一方、93-I5 接種群では接種後 2 日からすでに萎縮した絨毛の回復が観察された。

電子顕微鏡的検査において、107-G16 株接種群では接種後 1 日の十二指腸および空腸で、93-I5 株接種群では接種後 2 日の空腸でそれぞれウイルス粒子が観察され、それらは特に合胞体内部、絨毛の先端部及び頸部に存在していた。

D. 考察

遺伝学的大約および抗原学的に異なるブタ B 群ロタウイルス 2 株をノトバイオート豚に接種し、それらの個体が示す小腸組織の病変を比較した結果、107-G16 接種群は 93-I5 接種群に比べて、病変が強く、進行的かつ広範囲に広がっ

ていく傾向が観察された。さらに 107-G16 接種群においてのみ、顕著な合胞体形成が認められたことから、両株間は遺伝的背景のみならず、病原性においても異なることが示唆された。

電子顕微鏡的検査で認められた B 群ロタウイルスの病理組織学的特徴に関して、既報の A 群ロタウイルスのデータと比較した結果、ウイルス粒子の分布や動態に関して相違が認められた。これらのデータについては再度ノトバイオート豚を用いた接種試験を行い、両ウイルス間における明確な相違を裏付ける予定である。

E. 結論

本研究に用いたブタ B 群ロタウイルス 2 株は遺伝学および抗原学的相違に加えて、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。小腸組織内における B 群ロタウイルスの分布と病理組織学的特徴が明らかとなった。また、ノトバイオート豚は本ウイルスの病原性を探究する上で好適なモデル動物であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Soma J, Tsunamitsu H, Miyamoto T, Suzuki G, Sasaki T, Suzuki T. Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J Gen Virol*, 94; 128-135, (2013).
- 2) Suzuki T, Soma J, Miyazaki A, Tsunemitsu H. Phylogenetic analysis of nonstructural protein 5 (NSP5) gene sequences in porcine rotavirus B strains. *Infect, Genet, Evol*, 12: 1661-1668 (2012).
- 3) Marthaler D, Rossow K, Gramer M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, K Kuga, Suzuki T, Ciarlet M, Matthijnsens J. Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a

modified classification proposal for G genotypes. *Virology*, 433: 85-96 (2012).

- 4) Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H. Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal viruses in adult cattle. *Arch Virol* 157; 1063-1069 (2012).
2. 学会発表
 - 1) 藤本彩子, 山田学, 鈴木亨, 宮崎綾子, 久我和史, 山本佑, 中村菊保, 恒光裕: ノトバイオート豚を用いた実験的豚 B 群ロタウイルス感染症の病理学的解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手、2012 年 9 月
 - 2) 鈴木亨, 相馬順一, 久我和史, 宮崎綾子, 恒光裕: 実験感染豚における豚 B 群ロタウイルス株間での病原性の相違、第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手、2012 年 9 月
 - 3) 鈴木亨, 久我和史, 宮崎綾子, 中村菊保, 山本佑, 山田学, 恒光裕: ノトバイオート子ブタを用いたブタ B 群ロタウイルスの病原性解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月
 - 4) T. Suzuki, J. Soma, K. Kuga, A. Miyazaki, H. Tsunemitsu, Genetic dissection of nonstructural protein 5 (NSP5) from porcine rotaviruses of species B collected in Japan. 22nd International Pig Veterinary Society Congress, Jeju, Korea. Jun 10-13, 2012
 - 5) T. Suzuki, Unexpected genetic diversity of porcine rotavirus B. Emerging and re-emerging viral diseases in Asia, Oita, Japan, Jun 18-20, 2012
 - 6) T. Suzuki, H. Tsunemitsu, Molecular characterization of porcine rotavirus B. 11th

International symposium on double stranded
RNA viruses Program. San Juan, Puerto Rico,
Nov 26- Dec 2, 2012.

- なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

表1. 小腸病変の分布・程度の比較

群	PID	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸上部	回腸下部
93-I5	1	-	+	+	+	+	+
	1	-	+	+	+	+	+
	1	-	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+
	2	-	+	+	+	+	+
107-G16	1	++	++	+	+	+	+
	1	++	++	+	+	+	+
	1	++	++	+	+	+	+
	2	++	++	++	+	+	+
	2	++	++	++	+	+	+
	2	++	++	++	+	+	+
対照	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-

++: 腸絨毛消失もしくは重度の萎縮と粘膜上皮の壊死・剥離
+: 腸絨毛消失もしくは重度の萎縮と粘膜上皮の壊死・剥離のいずれか -: 著変なし

表2. 合胞体形成の分布・程度の比較

群	PID	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸上部	回腸下部
93-I5	1	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
107-G16	1	+	-	++	-	-	-
	1	++	+	++	-	-	-
	1	++	+	++	-	-	-
	2	-	++	++	-	-	-
	2	+	++	++	-	-	-
	2	++	++	++	-	-	-
対照	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-

++: 検索標本中に合胞体が3つ以上 +: 検索標本中に合胞体が3つ未満
-: 検索標本中に合胞体を認めず

E 型肝炎ウイルスレプリコンの構築およびレプリコン包埋 VLP 作成の検討

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っ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、昨年度に取得した感染性の全長 HEV cDNA からの各種レポーターを持つレプリコン構築と、本レプリコンを構造蛋白 VLP 中に包埋させる方法について検討した。

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。

本年度は、感染性の HEV cDNA クローンからのレプリコンの構築を試みた。また構築されたレプリコンを HEV VLP に包埋させた、一

過性の感染性粒子を取得することができるかどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

感染性の HEV クローン 83-2 (図 1) の構造蛋白領域をレポーター遺伝子で置換した cDNA を作成し (図 2)、本クローンの上流に挿入した T7 promoter を用いて RNA を作成した。本 RNA をヒト肝癌由来細胞 PLC/PRF/5 細胞にエレクトロポレーションにより導入し、レポーター遺伝子が機能するかどうか調べた。また、本細胞で構造蛋白を発現させ、さらにレプリコン RNA を導入することで、構造蛋白中にレプリコン RNA が包埋された形で粒子構造が形成されるかどうかを調べた。

(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

感染性クローン 83-2 の構造蛋白である ORF2 領域をレポーター遺伝子と置き換えることにより HEV レプリコンを構築した。しかしながら、レポーター遺伝子の上流に HCV IRES を挿入しなかった場合にはレプリコンは機能しなかった。また、Luciferase をレポーターとして用いた場合には HCV IRES を持つ場合にも機能しなかったが、サイズが小さい SecNanoLuc (分泌型の Luciferase) をレポーターとして導入した場合にはレプリコンは機能した (図 3~5)。

構造蛋白 (ORF2) を発現する細胞に、IRES-GFPNeo を持つレプリコンを導入した細胞を作成した (図 6)。その中には構造蛋白の分泌が比較的良好なクローンがあった。これらのクローンの培養上清を濃縮しショ糖遠心密度勾配で分析したところ (図 7)、構造蛋白は一定の密度に収束し、粒子構造をとっている可能性が示唆された。上記のフラクションを RNase A 処理後に RNA を抽出し、構造、非構造それぞれの領域の RT-PCR を行ったところ、本フラクションの RNA は RNase A 抵抗性であり、構造領域のみが PCR で増幅されたことから、レプリコンが包埋された粒子である可能性が示唆された (図 8)。

D. 考察

本研究で構築した HEV レプリコンでは、ORF2 をコードし発現する subgenomic RNA が作られていない可能性がある。しかしながら IRES を導入した場合は、genomic RNA が dicistronic に機能することによりレポーター遺伝子の翻訳が可能となったのではないかと推察される。Luciferase の場合は IRES を導入しても機能しなかったが、Neomycin との fusion protein である LucNeo が約 2.5kbp とサイズが大きいことが原因であるかもしれない。Luciferase 遺伝子として SecNanoLuc を使用した場合にはレポーター遺伝子が機能しているが、これは約 600bp 程度と小さいためである可能性がある。

今後、上記のレプリコンが包埋された可能性のある画分について、電子顕微鏡での観察と感染性の有無の確認を行う予定である。感染性が確認できれば、本粒子はトランスパッケージ型の 1 回のみ感染性の粒子として、HEV の感染過程の解析に有用であると考えられる。また、特に NanoLuc をレポーターとして持つ HEV レプリコンを用いたアッセイ系は簡便かつ感度がよく、複製機構の解析や増殖阻害物質の探索に有用と考えられる。

E. 結論

HEV のレプリコンの構築に成功した。また、PLC/PRF/5 細胞に構造遺伝子発現プラスミドとレプリコン RNA を導入することにより、レプリコンを包埋した粒子を取得できる可能性が示唆された。本レプリコンやレプリコン

を包埋した粒子は、HEV の感染、増殖過程の解析や阻害剤のスクリーニングに有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda T., Wu S., Kiyohara T., Nakamoto S., Jiang X., Miyamura T., Imazeki F., Ishii K., Wakita T. and Yokosuka O. Interleukin 29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry6. site-mediated translation. *Viral Immunology*, 25: 379-386 (2012)
2. Kubota T., Kumagai A., Ito H., Furukawa S., Ishii K., Wakita T., Takeda N., Someya Y., Narimatsu H. and Shirato H. Structural basis for the recognition of7. Lewis antigens by genogroup I norovirus. *Journal of Virology*, 86: 11138-11150 (2012)
3. Suzuki R., Saito K., Shirakura M., Akazawa D., Ishii K., Aizaki H., Kanegae Y., Matsuura Y., Saito I., Wakita T. and Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C8. virus particles as a versatile tool for the study of the virus assembly and9. infection. *Virology*, 432: 29-38 (2012)
4. Tominaga A., Kanda T., Akiie T., Komoda H., Ito K., Abe A., Aruga A., Kaneda10. S., Saito M., Kiyohara T., Wakita T., Ishii K., Yokosuka O. and Sugiura N. Hepatitis A outbreak associated with a revolving sushi bar in Chiba, Japan: application of molecular epidemiology. *Hepatology Research*, 42: 828-834 (2012)
5. 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*, 42: 248-253 (2012)
- Ishii K., Li T.C., Yoshizaki S., Shiota T., Kato T., Takeda N. and Wakita T. Cloning of permissive and nonpermissive human hepatoma cell lines for hepatitis E virus infection. *Hepatology International*. 6: 292 (2012)
- 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*, 53, 219-224 (2012)
- 石井孝司、清原知子 A型肝炎ワクチン *BIO Clinica* 28: 25-29 (2013)
- 石井孝司、脇田隆字 海外におけるA型肝炎集団発生 -わが国への警鐘- 化学療法の領域 28: 984-992 (2012)
- 石井孝司 2010年春季のA型肝炎の diffuse outbreak の分子疫学的解析 消化器内科 54: 233-238 (2012)

2. 学会発表