

ことが明らかになった。しかし、感染性粒子は、非感受性細胞 HEK293T 細胞には感染できないことが明らかになった。

さらに pKS による RGS が、HuNoV, MuNoV だけでなく、カリシウイルスに対するユニバーサルな RGS となり得るか否かを検証するため、FCV のゲノム全長をクローニングした pKS-FCV-F を用いて、同様の検討を行った。以下、簡潔に結果を示す。pKS-FCV-F は感受性細胞へのトランスフェクションによって 10^8 TCID₅₀/mL 以上の感染性ウイルス粒子を産生した。非感受性細胞 HEK293T へのトランスフェクションでは、48 時間後に 10^{1-2} TCID₅₀/mL のウイルスを産生したが、ウイルス産生量は MuNoV の 1/10-1/100 程度であった。電子顕微鏡観察で HEK293T から産生されたウイルス粒子が確認された。このウイルス粒子は、中和抗体で中和可能であった。

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引き、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ックシステムでは、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 タンパク質合成が間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。また、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ることから、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。

Nterm, NTPase, VPg, RdRp と MuNoV の double stranded RNA が、各周辺部に共局在していた異から、これらが複製複合体であると思われた。VP2 は感染性粒子内部にも含まれていることが報告されており、VP1 の裏打ちをすることで粒子の安定性に寄与していると考えられている。しかし、免疫染色では、VP2 も複製複合体と共局在していた。VP2 は複製複合体上で RNA トランスポーターや、転写制御などに関わっている可能性、酵素としての何らかの活性を有する可能性などが考えられた。

細胞周辺部で一本鎖ゲノム RNA と VP1 の共局在が認められたが VPg、VP2 は細胞周辺部では検出されなかった。結果は示さないが、免疫沈降ではこれらが VP1 と共沈降することが明らかになった。以上から、細胞周辺に存在する VP2、VPg はすでに何らかの構造、たとえば VP1 との 4 次構造を形成しており、抗体がターゲット領域にアクセスできない状態であるため、検出できなかったのかもしれない。これらを明らかにするためには、タイムコースなどの詳細な検討が必要である。

MuNoV の RGS 用プラスミド pKS-MuNoV-F は、MuNoV 感受性細胞である RAW264.7 のみならず非感受性細胞 HEK293T 細胞でも感染性粒子を産生可能であった。pKS-FCV-F も同様の結果を示したことから、HuNoV の RGS に用いている pKS ベクターは、カリシウイルスのゲノムをユニバーサルにドライブ可能である事が示された。従って、HuNoV の RGS から産生される粒子には感染性がある可能性が強く示唆された。カリシウ

ウイルス増殖における種のバリアは、主に細胞への吸着から侵入、脱核までの一連の初期ステップに有り、それ以降のタンパク質合成からゲノム複製、パッケージング、粒子放出のステップには、あまり強い宿主依存性が無いと思われた。

HuNoV の RGS では、アクチノマイシン D でプラスミドからのゲノム供給を制御し、自然感染を模倣すると、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る。しかし、MuNoV の場合、感受性細胞の RAW 細胞は、アクチノマイシン D 処理に過敏で有り、調べることができなかった。非感受性細胞の HEK293T を用いたアクチノマイシン D 処理試験では、上清中のウイルス様粒子が 60 倍以上に増加したが、それらの感染性はほとんど無く、ゲノムを持たない中空粒子である事が明らかになった HuNoV の RGS においても、同様の結果を示す可能性がある。

pKS による RGS は、非感受性細胞から感染性粒子を作出することが可能である。このシステムは、ウイルス表面のレセプター結合部位を入れ替えたキメラウイルス作製、ディフェクティブなワンステップ感染性粒子作製 HuNoV, MuNov, FCV とのキメラウイルスの作製など、新たな遺伝子操作による感染性粒子構築を可能とするとともに、GFP, VENUS などの蛍光レポーターを組み込み、細胞の挙動観察を行うなど、多面的な応用が可能である。

HuNoV の推定上のレセプター結合部位を MuNOV のレセプター結合部位と入れ替えた感染性粒子の作出をこころみ、マウス感染モデル作製にも応用可能と考えられた。

E. 結論

MuNoV の自然な感染モデルと HuNoV の RGS の比較、MuNoV, FCV などの RGS との比較から、これらのウイルスの宿主特異性は、主に細胞への吸着侵入から脱核に至るまでの初期ステップにある事が示唆された。以上から、構造タンパク質部分をスワップしたキメラウイルスを作製すれば、マウスに感染する HuNoV が構築できる可能性が高い。3 年目の研究において、HuNoV と MuNoV,

FCV の RGS の稼働に成功したことで、それぞれの機能タンパク質の性状研究、病原性発現機構の研究の大幅な加速が期待できる。さらに、キメラウイルスを RGS で作製し、それらを用いた HuNoV 感染モデル動物の開発の可能性も見えてきた。

F. 研究発表

英文論文発表

1. 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. *Journal of virology* vol. 86, 284-92, 2012..
2. Grant S. Hansman, David W. Taylor, Jason S. McLellan, Thomas J. Smith, Ivelin Georgiev, Jeremy R. H. Tame, Sam-Yong Park, Makoto Yamazaki, Fumio Gondaira, Motohiro Miki, Kazuhiko 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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
 23. 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.
- 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、主としてヒトの小腸細胞で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種々の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。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、ペプシン等の消化系酵素添加による検討を行った。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。本研究期間には、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之三を占めた。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。

本研究では、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°C) 超遠心した。沈渣を PBS(-) 約 2mL に suspend し、0.80 μ +

0.45 μ m 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 μ m-0.65 μ m-0.45 μ 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 μ L にアセチルトリプシン (SIGMA 社) 20 μ 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 μ l に 1% Pepsin 溶液 (0.1M HCL) 50 μ l を添加し、37°C で 10 分間加温した後、0.5M NaHCO₃ を 80 μ 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 NaHCO₃ 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 μ l 添加した後、孔径 0.22 μ 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 μ 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 μ 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 CaCo 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 μ l から 60 μ 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

11 種の細胞株に HuNoV 検体を接種し経時的観察を行った。保存状態の違った便検体、感染ウイルス量、ウイルス材料のトリプシン前処理の必要性等を検討した。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。いずれの場合もウイルス遺伝子量は二週間を超えて消失した。消化系酵素によるウイルスの感染性向上の可能性を考えトリプシン、ペプシン処理を試みた。しかし、ウイルス増殖の目安となる細胞変性効果はいづれの実験条件下でも見られなかった。培養上清中および細胞内の HuNoV 遺伝子量を測定したが、継代培養において遺伝子レベルは減少の一途であった。Co-1 細胞への GII.4 検体の接種例において、封入体様の構造が蛍光抗体法で観察された。

D. 考察

HuNoV はヒトの小腸で増殖する。つまり、ヒト小腸細胞に HuNoV に対する受容体が存在していると考えられる。従って、ウイルス分離に用いる培養細胞としてはヒトの腸管由来細胞が適当と考えられる。しかし、これまで CaCo-2 等のヒト腸管由来細胞を用いた HuNoV 分離の試みは不成功であった。細胞への HuNoV 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

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

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

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

3. 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

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

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

Kazushi Motomura, Masaru Yokoyama, Hiroataka Ode, Hiromi Nakamura, Hiromi Moril, Tadahito Kanda, Tomoichiro Oka, Kazuhiko Katayama, Mamoru Noda, Tomoyuki Tanaka, Naokazu Takeda, Hironori Satl and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Divergent Evolution of Norovirus GII/4 by Genome Recombination over 2006-2009 in Japan. J.Virol, 2010.

Yasutaka Yamashita, Yuka Ootsuka, Meiko Kondo, Mitsuaki Oseto, Mitsunori Doi, Takeshi Miyamoto, Tetsuroo Ueda, Hirokazu Kondo, Tomoyuki Tanaka, Takaji Wakita, Kazuhiko Katayama, Naokazu Takeda, and Tomoichiro Oka. Molecular Characterization of Sapovirus Detected in a Gastroenteritis Outbreak at a Wedding Hall. J.Med.Virol. 2010, 82:720-726

田中智之。院内感染予防におけるノロウイルス迅速診断法の活用感染対策 ICT ジャーナル。2010.5(4), 427-433

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

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、
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：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詳細に検討した。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。

ノロウイルス混合感染の実態の解明のため、2年間にわたり、ノロウイルスに5回感染歴のある症例について網羅的に解析した。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。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 カプシド遺伝

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、また、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。

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

家族内感染例の解析

(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エル領域の配列情報(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。

混合感染の解析

(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エル領域の配列情報(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、カプシド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
- 4) 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

5) 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

6) 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

7) 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、柗元巖、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

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

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レポーターシステムと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、レポーターDNA をパッケージした pseudovirion 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。この細胞系を用いて、中和抗体検定系を作製した。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

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 MuNoV cDNA 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様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レポーターシステムと中和抗体検定法の開発

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。WUPyV、KIPyV の psudovirion を利用して、これらの粒子が効率に導入できる細胞株を同定した。更に、当該粒子を用いて中和抗体検定法の作製を行った。

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、フラクションに分離し、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。Gluc活性は Biolum assay kit (New England Biolab)で測定し、各 pseudovirion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 pseudovirionを大量に作成・精製した。pCMV-Gluc2をパッケージするWUPyV、KIPyV pseudovirion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pseudovirionを含むフラクションをAmicon Ultra 15 (MWC0 100kDa, Millipore)で濃縮した。

pseudovirionがよく導入できる細胞を検索するため、293T, TC7, Vero細胞に対し、細胞あたり1, 10, 100, 1,000コピーDNAにあたるSV40, WUPyV, KIPyV pseudovirionを導入し、48-60時間後に細胞上清のGlucの活性を測定した。293T, TC7への導入ではSV40 pseudovirion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 pseudovirionによるpCMV-Gluc2の導入はSV40 pseudovirion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。

Vero細胞あたり1,000コピーDNAにあたるWUPyV, KIPyV pseudovirion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

WUPyV, KIPyV pseudovirionを精製しVp1, Vp3, ヒストンコアタンパク質とも考えられるバンドを銀染色で確認し、これまで他のポリオマウイルスカプシドから作製したpseudovirionの解析結果と類似したSDS-PAGE展開像を観察した。特異抗体あるいは質量分析などで確認は必須であるが、バンドの濃さから推定できるpseudovirionとしての構成比はOptiprep密度勾配遠沈でも示された物理化学的特性とも矛盾しない。過去の研究では、virionの構成比に異常が生じた場合、例えば通常より少量のVp2, Vp3で構成された粒子ではその感染性は著しく低下していた。もしpseudovirionの構成成分比が通常と異なっていた場合には、その導入効率は著しく低いことが予想できる。しかしながら今回の研究では、WUPyV, KIPyV pseudovirionによってVero細胞へ効率に導入できたため、各pseudovirionの構成成分比がvirionと大きく異なることはないとも考えることもできる。一方、この結果はWUPyV, KIPyVの感染増殖にVero細胞が使用できる可能性を示している。今後はVero細胞でWUPyV, KIPyVの分子クローンをトランスフェクションしてその増殖が確認できるかという点、そしてWUPyV, KIPyVのVero細胞への導入に関わる細胞側レセプター、利用されるエンドサイトーシス経路の同定といった点が次の課題である。

精製したWUPyV, KIPyV pseudovirion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pseudovirion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pseudovirionの中にpCMV-Gluc2を含まないemptyの混入が考えら

れるため、作製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

新規ポリオーマウイルス、WUPyV、KIPyV の pseudovirion を作製、Vero 細胞へ効率に導入できることが明らかになった。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。

WUPyV、KIPyV の pseudovirion 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製のため、この検定系の改良が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe M, Phamduong E, Huang C-H, Itoh N, Bernal J, Nakanishi A, Rundell K, Gjoerup O, and Kasamatsu H. Formation of covalently modified folding intermediates of simian virus 40 Vp1 in large T antigen-expressing cells. *Journal of Virology* (in press).

Mizutani, T., Sayama, Y., Nakanishi, A., Ochiai, H., Sakai, K., Wakabayashi, K., Tanaka, N., Miura, E., Oba, M., Kurane, I., Saijo, M., Morikawa, S., and Ono, S. Novel DNA virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology* 157:116-20. (2011)

Tange, S., Imai, T., Nakanishi, A. An SV40 mutant defective in Vp4 expression exhibit a temperature sensitive growth defect. *Virus Res.* 412:179-87. (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

ブタ B 群ロタウイルスの遺伝子解析及びノトバイオート豚を利用した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、遺伝学のおよび抗原学的に 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ートブタに接種し、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。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。

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。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学

的分類を実施した。更に、それらのウイルス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

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) ノトバイオートブタにおける感染実験

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

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

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) ノトバイオートブタにおける感染実験

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。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。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

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。

遺伝学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

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。

遺伝学および抗原学的に相違するブタB群ロタウイルス2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。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).
- 5) 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)
- 6) 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)

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
なし