

- 肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
49. 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
 50. 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
 51. 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C 型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
 52. Tingting Yang, 李天成. スペインからの E 型肝炎輸入感染症例の解析. 第 54 回日本臨床ウイルス学会, 2013 年 6 月, 岡山.
 53. 李天成, Tingting Yang, Wei Li, Daiwei Guan, Ling Fang. Juan Su, Changwen Ke, 武田直和, 脇田隆字中国における Rat HEV の感染調査. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜.
 54. 李天成, 楊ていてい, 片岡紀代, 網康至, 須崎百合子, 岸田典子, 白倉雅之, 今井正樹, 浅沼秀樹, 武田直和, 脇田隆字. フェレット E 型肝炎ウイルス様粒子の作製およびその応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月神戸.
 55. 清水健太, 濱口杉大, 李天成, 吉松組子, 有吉紅也, 有川二郎. ラット E 型肝炎ウイルスは人獣共通感染症の病原体か? 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月神戸.

G. 知的所有権の取得状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告

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
分担研究報告書

ノロウイルス感染、複製機構の研究
カリシウイルスのリバースジェネティクス

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 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
研究協力者 朴 英斌 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 研究員
研究協力者 戸高 玲子 国立感染症研究所 ウイルス第二部第一室 非常勤職員

研究要旨 ヒトノロウイルス (HuNoV) の感染、複製機構研究のため、すでにリバースジェネティクス (RGS) が稼働している GII. 3 U201 株の他に、HuNV GII. 4/3 chimera virus TCH04-577 株、HuNV GII. 4 Saga1 株、HuNV GI. 1Norwalkvirus (NV68) 株の全長 cDNA を EF-1 alpha promoter vector に組み込んで細胞内での蛋白質発現を観察した。また、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)、ネコカリシウイルス (FCV) を HuNoV の RGS のモデルとするため、HuNoV と全く同様の MuNoV のリバースジェネティクスシステムを構築した。MuNoV のリバースジェネティクスシステムは、感受性細胞であるマウス RAW264. 7 細胞は勿論、ヒト細胞株 HEK293T を用いて muNoV の感染性粒子を作出することが可能であった。MNV の RGS を用いて遺伝子改変感染性ウイルスを作出し、感染性粒子の性状解析、VPg, VP2 の機能解析を行った。

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 のリバースジェネティクスシステムは、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、225cm² 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 10⁵⁻⁹ 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。我々の開発した、HuNoV のリバースジェネティクスシステム (RGS) は、株化細胞内に HuNoV のゲノムを発現させ、ウイルス蛋白質の合成、ゲノムの複製、新生ウイルス粒子産生までを再現できるシステムである。しかし、新生ウイルス粒子の感染性は、HuNoV 感受性細胞が無い場合、検証することができない。完全 RGS を構築するためには、HuNoV に近縁で、感受性細胞の存在するマウスノロウイルス (MNV) もしくは、ネコカリシウイルス (FCV) を代替ウイルスとして用いて研究を進め、その結果を HuNoV に反映させるとよい。そこで、本年度は、MNV-S7 株の cDNA、FC-F4 株の cDNA を EF-1 alpha promoter vector に組み込み HuNoV と全く同様なプラスミドコンストラク

トを構築し、RGS の検証を行った。さらに、MNV の RGS を用いて、遺伝子改変感染性ウイルスを作出し、感染性粒子の性状解析、VPg, VP2 の機能解析を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2002 年現遠矢幸伸日本大学教授（元東京大学大学院農学生命研究科准教授）によってマウスより分離された MuNoV-S7 株を MNV として用いた。マウス RAW264.7 細胞、ヒト HEK293T 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（ α Nterm, α NTPase, α VPg, α RdRp, α VP1, α 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 (α dRNA MoAb) を用いた。

FCV は同様に遠矢幸伸教授より分与を受けた F4 株を用いた。FCV の抗体は、上記と同様の方法にて、作製した。中和抗体は、遠矢教授より分与を受けた。

2. MuNoV、FCV リバースジェネティクス

HuNoV pKS-U201F (RGS に用いるプラスミドコンストラクト) を骨格として、HuNoV U201 genome 部分を MNV genome cDNA, FCV genome cDNA に InFusion cloning system を用いて置き換え、pKS-MNV-F, pKS-FCV-F を構築した。株化細胞 (293T, COS7) を 6 well ディッシュに 90%コンフルエントになるように培養し、4ug の pKS-MNV-F または pKS-FCV-F をトランスフェクションした。上清を回収し、感受性細胞 (RAW: MNV, CRFK: FCV) に感染させ TCID50 を測定することで、上清に含まれる感染性ウイルス titer を定量した。

3. 遺伝子エンジニアリング

感染性粒子の構成成分を確認するため、MNV の VPgコード領域にメチオニン(Met)を導入するための変異を挿入した。これで、 ^{35}S -Metでのラベルを可能とした。また、VP2の機能ドメインスキャンのためにTetra cysteine tagを導入した。

4. ウイルス蛋白質のアイソトープラベル

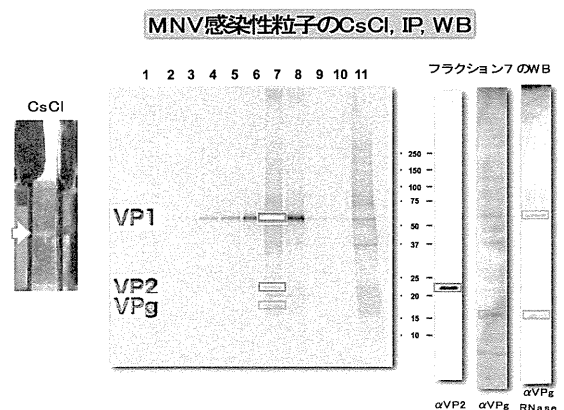
MNV 感染性粒子を構成する成分として、予測されているのは、VP1, VP2, VPg, RNA である。ウイルス蛋白質のラベルには、 ^{35}S -Met, ^{35}S -Cys 混合液を用いた。VP1 (Met:10, Cys:8), VP2 (Met:5, Cys:0), VPg (Met : 1, Cys:0) を含むので、RNA を除く全ての粒子構成成分がラベルできる。MNV 感染 6 時間培養し、その後、Met, Cys minus DMEM で洗浄した後、 ^{35}S -Met, ^{35}S -Cys 混合液を含む Met, Cys minus DMEM で 30 時間培養した。

5. ウイルス粒子の精製

塩化セシウム浮上密度勾配遠心法によって、ウイルスを精製し、分取したフラクションを α VP1 抗体と α ウサギ IgG マグネティックビーズを用いて免疫沈降し、SDS-PAGE により解析した。

C. 研究結果・考察

塩化セシウム浮上密度勾配遠心後、Top から Bottom にむけ 11 フラクションに分取された MNV を α VP1 で免疫沈降して SDS-PAGE にて泳動した (図 1)。フラクション 7 (密度 1.36 g/cm³) を中心に VP1 のバンドが検出された。各フラクションに検出されたバンドは、 α VP1, VP2, VPg によってウエスタンブロッティング (WB) して確認した。VP2 は約 23kDa, VPg は、17, 25, 37, 45, 60, 75, 130 kDa に検出された。VPg に RNA が結合しているために複数のバンドが検出されたと仮定し、RNase で処理した後 WB を行うと、17, 60 kDa にのみバンドが検出された。WB には示さないが、VP1 も 60 kDa のバンドであることが確認された。



(図 1)

フラクション 7 を VP1 抗体で免疫沈降し、加熱

変性後、RNase で処理を行い、SDS-PAGE にてウイルス粒子に含まれる蛋白質を分離した。³⁵S のシグナルをイメージングプレートにて読み取り、イメージクアントで PSL を測定し、分子数の定量を試みた。測定値は、バンドを囲むエリアを設定し、そこからバックグラウンドを除いた PSL 値とした。VP1:50258791.8, VP2:3300086.8, VPg: 6970795.5 の PSL 値を示した。各蛋白質に含まれる Met, Cys の分子数でノーマライズし、VP1 を 1 感染性粒子当たり 180 分子とすると、VP2 は、12 分子、VPg は 24 分子内包されていることが示唆された(図 2)。

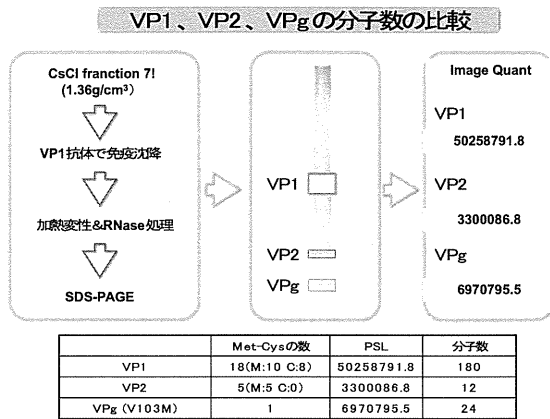


図 2.

これまで、感染性ウイルス粒子に内包されているウイルス蛋白質は、ウイルス様中空粒子の研究結果から、VP1 が 180 分子、VP2 が 1-2 分子、VPg が 1 分子内包されるのではないかと予想されていた。しかし、本研究により、VP2, VPg とともに複数分子が内包されており、粒子の骨格を構築している可能性が示された。

次に、内包されている VPg のどのアミノ酸残基に RNA との結合に関与しているかを調べるため、RNA との結合が予測されているチロシン (Y) 残基をフェニルアラニン (F) に置き換えたクローンを作製し、感染性粒子産出に与える影響を調べた(図 3)。

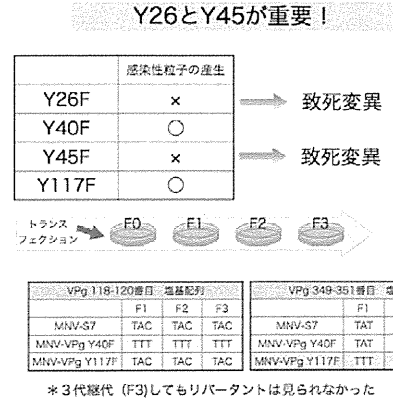


図 3.

Y26, Y45 は感染性粒子産生能が消失した。つまり、Y26, Y45 に RNA との結合部位があることが示唆された。Y40, Y117 は、感染性粒子放出が認められ、3 継代してもリバータントは認められなかった。

次に VP2 の機能ドメイン検索を行った。VP2 のアミノ酸配列から 2 次構造を予測し、ベータシート、αヘリックスなどをターゲットに、Tetracycline tag (TCtag) を挿入したミュータントクローンを 7 種類作製した。各種ミュータントクローンは、VP2 のアミノ酸残基 9 番目と 10 番目の間に TCtag を挿入したミュータントを 9TCtag10 のように表記した。図 4 に示した合計 7 つのクローンをそれぞれ細胞にトランスフェクションし、上清に放出される感染性ウイルスを検出することで TCtag 挿入が感染性粒子産生に与える影響を評価した(図 4)。

MNV-S7 VP2 の構造変化が粒子形成に与える影響の検討

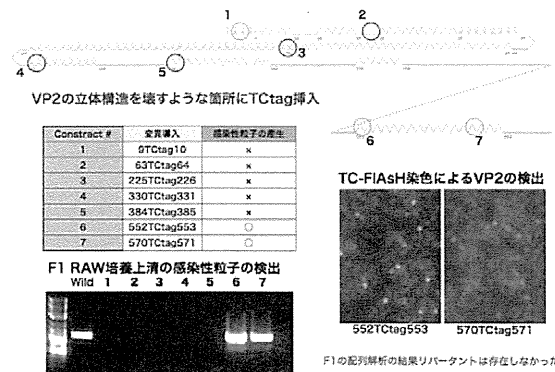


図 4.

感染性粒子の産生が認められたのは、クローン 6

と7のみであった。クローン6, 7から産生されたウイルスは、RAW 細胞に感染、増殖可能で有り、感染細胞は TC-F1AsH により緑色の蛍光を発した。また、F1 の配列解析において、リバータントは存在しなかった。以上の結果から、VP2 の C 末端に予想されたベータシート以外は、VP2 の機能に関与している可能性がある。

D. 結論

HuNoV と MNV, 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。MNV をモデルとして、感染性粒子を構成するウイルス蛋白質が VP1, VPg, VP2 であることを示した。VPg と VP2 は、従来の報告とは異なり、1 ウイルス粒子に複数パッケージングされていることが示唆された。VPg, VP2 の機能解析の結果、VPg にはチロシン残基に RNA が結合している可能性があること、VP2 の c 末端側のベータシートを除き、他の構造は感染性ウイルス粒子産生に必須である事を明らかにした。この結果は、HuNoV の性状を考察する上で、興味深い知見である。

E. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. Harada S, Tokuoka E, Kiyota N, Katayama K, Oka T. Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(5):454-7
2. Minami-Fukuda F, Nagai M, Takai H, Murakami T, Ozawa T, Tsuchiaka S, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Nishiura N, Sassa Y, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Tsunemitsu H, Fujii Y, Katayama K, Mizutani T. Detection of Bovine Group A Rotavirus Using Rapid Antigen Detection

Kits, RT-PCR and Next-Generation DNA Sequencing. *J Vet Med Sci.* 2013 Dec 30;75(12):1651-5. Epub 2013 Aug 2.

3. Murakami K, Kurihara C, Oka T, Shimoike T, Fujii Y, Takai-Todaka R, Park Y, Wakita T, Matsuda T, Hokari R, Miura S, Katayama K. Norovirus binding to intestinal epithelial cells is independent of histo-blood group antigens. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6):e66534. doi: 10.1371/journal.pone.0066534. Print 2013.
4. Kroneman A, Vega E, Vennema H, Vinjé J, White PA, Hansman G, Green K, Martella V, Katayama K, Koopmans M. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Arch Virol.* 2013 Oct;158(10):2059-68. doi: 10.1007/s00705-013-1708-5. Epub 2013 Apr 25.
5. Iizuka S, Takai-Todaka R, Ohshiro H, Kitajima M, Wang Q, Saif LJ, Wakita T, Noda M, Katayama K, Oka T. Detection of multiple human sapoviruses from imported frozen individual clams. *Food Environ Virol.* 2013 Jun;5(2):119-25. doi: 10.1007/s12560-013-9109-1. Epub 2013 Mar 23.

(邦文)

1. 片山和彦 ノロウイルスについて 健康教室 vol.710 p74-79, 2010
2. 片山和彦 ノーウォークウイルスの特徴と予防対策 食品機械装置 vol.50, p52-59, 2013.
3. 片山和彦 ノロウイルス感染症、ノロウイルスの流行のメカニズム 感染症 vol. 253, p12-13, p19-21, 2013.
4. 片山和彦 ノロウイルス感染のメカニズム 食と健康 10月号 p9-17, 2013.
5. 片山和彦 増加傾向にあるサポウイルス食中毒 食と健康 11月号 p16-19, 2013.

6. 片山和彦 ノロウイルスの感染予防 小学
保険ニュース p1, 2014年1月18日号

2. 学会発表
(国際学会)

1. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. Japan-Taiwan joint meeting. Shinjuku, Tokyo, JAPAN.
2. Sato H, Yokoyama M, Motomura K, Nakamura H, Oka T, Katayama K, Takeda N, Noda M, Tanaka T, and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Selective constraints on changes of a norovirus pandemic lineage GII.4_2006b. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
3. Motomura K, Ode H, Yokoyama M, Nakamura H, Sato A, Katayama K, Noda M, Takeda N, Tanaka T, Sato H and the Norovirus Surveillance Group of Japan. Deep Sequencing-based analysis of minor variants in norovirus infection cases with acute gastroenteritis. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
4. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Sato H. Structural basis of substrate specificity in murine norovirus protease suggested by molecular dynamics simulation. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
5. Kazuhiko Katayama^{1,2}, Reiko Takai-Todaka², Akira Nakanishi³, Kosuke Murakami^{1,2}, Tomoichiro Oka², Susana Guix¹, Tyler M. Sharp¹, Robert L. Atmar¹, Sue E. Crawford¹, and Mary K. Estes¹ A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing

reporter tagged infectious genomic RNA. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

6. Kosuke Murakami¹, YoungBin Park¹, Chie Kurihara², Tomoichiro Oka¹, Takashi Shimoike¹, Reiko Takai-Todaka¹, Takaji Wakita¹, Tsukasa Matsuda³, Ryota Hokari² and Katayama Kazuhiko¹ Study of histo-blood group antigen-independent mechanism of norovirus-cell binding. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.
7. YoungBin Park, Reiko Takai-Todaka, Kosuke Murakami, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013. The Fifth International Calicivirus Conference, October 12- 15, 2013, Beijing, China.

(国内)

1. 藤井克樹¹、村上耕介¹、戸高玲子¹、中込とよ子²、中込治²、片山和彦¹ ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学基盤構築 第54回日本臨床ウイルス学会 平成25年6月7日 岡山県倉敷市
2. 村上耕介、藤井克樹、戸高玲子、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズムの解析 第54回日本臨床ウイルス学会 平成25年6月7日 岡山県倉敷市
3. 佐藤裕徳、横山勝、本村和嗣、中村浩美、岡智一郎、片山和彦、武田直和、野田衛、田中智之. ノロウイルスGII.4_2006bのカプシドと酵素に働くアミノ酸変化の制約. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日(火-木)、神戸.
4. 横山 勝、岡 智一郎、片山和彦、佐藤裕徳. 分子動力学法によるマウスノロウイルスプロテアーゼの基質認識機構の解析.

- 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日（火-木）、神戸.
5. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、佐藤彩、岡智一郎、片山和彦、野田衛、武田直和、田中智之、佐藤裕徳. ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日（火-木）、神戸.
 6. 下池貴志、高木弘隆、岡智一郎、村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、脇田隆字、片山和彦 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 7. 村上耕介、戸高玲子、朴英斌、藤井克樹、下池貴志、脇田隆字、栗原千枝、穂苅量太、松田幹、片山和彦 ノロウイルスの小腸上皮細胞への結合メカニズム 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸
 8. 藤井克樹、下池貴志、戸高玲子、片山和彦 ゲノム遺伝子型構成解析による網羅的ロタウイルス分子疫学研究 (2012年) 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年
 9. 戸高玲子、村上耕介、岡智一郎、高木弘隆、朴英斌、下池貴志、藤井克樹、脇田隆字、中西章、片山和彦 カリシウイルスのリバーシジェネティックシステムを用いた感染性粒子の研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月、神戸1月、神戸
 10. Youngbin Park, Kazuhiko Katayama. Development of a novel norovirus RT-PCR amplification system corresponding to a consensus norovirus nomenclature 2013, 2013. 61th annual meeting of the Japanese society for virology. Kobe, Japan, 2013
 11. 長井 誠、南-福田 藤子、小原潤子、小池新平、赤松裕久、土赤 忍、片山幸枝、大場真己、佐々悠木子、大松 勉、古谷哲也、片山和彦、白井淳資、水谷哲也、糞便を材料とした次世代シーケンスによるウシA群ロタウイルスの遺伝子型別、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013年9月、岐阜
 12. 片山和彦 レファレンスセンター会議 ノロウイルス 衛生微生物技術協議会 平成25年7月11日、12日
3. その他
(講演会・シンポジウムなど)
 1. 片山和彦 平成 25 年 12 月 9 日月曜日 第 42 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「新しい作用機構の抗ウイルス薬開発への取り組み-ウイルス感染症に挑む-」ノロウイルスたんぱく質構造と抗ウイルス薬
 2. 片山和彦 平成 26 年 1 月 18 日土曜日 第 13 回東北臨床感染症研究会 勝山館4階「貴賓室」宮城県仙台市青葉区上杉2丁目1-50「腸管感染症」“ノロウイルス”
 3. 片山和彦 平成 25 年 5 月 23 日 日本食品工業クラブ講演会 ノロウイルス感染症
 4. 片山和彦 平成 25 年 6 月 4 日 関東労災病院主催 講演会 (川崎市) ノロウイルス感染症
 5. 片山和彦 平成 25 年 6 月 18 日 シラバス・知の広場 (感染研戸山庁舎共用第一会議室) ウイルス性食中毒
 6. 片山和彦 平成 25 年 7 月 6 日 武田薬品工業主催 ノロウイルスセミナー (東京メトロポリタン丸の内) ノロウイルスの基礎
 7. 片山和彦 平成 25 年 7 月 13 日 北里セミナー (北里大学白金キャンパス薬学部コンベンションホール) ノロウイルス感染症
 8. 片山和彦 平成 25 年 10 月 18 日 「地域保健総合推進事業」地方衛生研究所地域専門家会議の講師 (秋田県秋田市中通 6-1-3 イヤタカ) 下痢症ウイルスの基礎と分子疫学
 9. 片山和彦 平成 25 年 11 月 5 日 郡山市主催講演会 ノロウイルス食中毒発生防止対策及び感染症発生防止対策について (福島県産業交流館 ビッグパレットふくしま)
 10. 片山和彦 平成 25 年 12 月 4 日 社団法人福島県食品衛生協会主催 講習会 ノロウイルス食中毒の予防と対策 (福島県福島市三河南町 1-20 コラッセ福島 4 階ホール)

(新聞) 指導、監修

1. 週間 ホテルレストラン 猛威をふるった
ノロウイルスを検証p57-60, 2月8日号,
2013.
 2. 日経メディカル ニュース追跡 ノロウイ
ルス変異株が猛威 p33, 1月号, 2013.
 3. 片山和彦 冬の食中毒、ノロウイルスの感染
予防対策 健康ふしぎ発見ニュース から
だの不思議 12月号, p12-6, 2013. 健学
社.
 4. 片山和彦 しっかり手洗いで防ぐノロウイ
ルス 健康の広場 第1775号 平成24年1月
11日号 4面 株式会社 法研
 5. 片山和彦 ノロウイルス対策 心と体 保
険総合大百科 保険ニュース・心の健康ニュー
ース 縮刷活用版 2011年 少年写真新聞
社 ISBN978-4-87981-361-9
 6. 医薬品の品質管理とウイルス安全性 第7章
新しいウイルス検出法、ウイルス診断法、ウ
イルス試験 総論 (執筆;片山和彦) 日
本医薬品等ウイルス安全性研究会
ISBN978-4-8306-0331-0
 7. 朝日新聞 2014年2月22日土曜日 夕刊 1
面「ノロ感染まだ要警戒・寒い首都圏 続く
発生」
 8. 朝日小学生新聞 2013年12月20日金曜日
日刊 1面「手洗いで予防ノロウイルス」
 9. 朝日新聞 2013年11月27日水曜日 日刊
37面 「ノロウイルス流行の兆し」
 10. 読売新聞 2014年1月22日水曜日 日刊 25
面 ノロウイルス食中毒 全国流行 トイ
レで飛散、感染に注意
 11. 朝日新聞 2013年12月1日日曜日 日刊 16
面 ノロウイルス手洗いで撃退
 12. 少年写真新聞社 ほけん通信 2014年1月18
日号 ノロウイルスの性質を知って、流行の
広がりを防ごう
 13. 少年写真新聞 2014年1月18日号 知ってい
ますか?ノロウイルスの通り道
 14. 朝日小学生新聞 2014年1月18日土曜日
日刊 1面「ノロウイルス?905人欠席・静
岡・浜松の14項 下痢やはき気」
 15. AERA 2014年2月3日 #5 ノロウイルスを
無自覚でまき散らす脅威「激しい突然変異
で拡散」 p58-59
 16. 朝日新聞 2014年1月28日火曜日 夕刊
10面 ノロ流行続く
 17. 共同通信社 2014年2月4日 あなたも感染
源に? ノロウイルス、意識変えて 経路多
く、症状ない人も
 18. 時事通信社 ノロウイルス流行拡大=自覚
症状無くても感染源に-手洗い徹底を
 19. 日本経済新聞 2014年2月25日火曜日 日
刊 18面 ノロウイルス攻略に道
 20. (テレビ放送) 出演、指導、監修
 21. 2013年11月25日 ワイド!スクランブル
 22. 2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノ
ロウイルス見えない感染を防げ
 23. 2014年1月17日 NHK ノロ対策「塩素系漂
白剤で消毒を」
 24. 2013年12月6日 日本テレビ ニュースエ
ブリー
 25. 2014年1月14日 読売テレビ 朝生ワイド
す・またん!
 26. 2014年1月20日 日本テレビ NEWS ZERO
 27. 2014年1月20日 NHK NEWSWEB
 28. 2014年1月23日 日本テレビ スッキ
リ!!
 29. 2014年1月28日 NHK ニュースセブン ノ
ロウイルスの流行状況
 30. (ラジオ番組) 出演
 31. 2014年1月23日 垣花正あなたとハッピー
“ノロウイルスの流行について”
 32. 2014年1月28日 NHKラジオ第一 NHKジャ
ーナール
- 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。

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

ノロウイルス複製機構の解明を目指して

研究分担者 染谷 雄一 国立感染症研究所・ウイルス第二部

ヒトノロウイルスは培養細胞や実験動物では増殖させることができないので、その遺伝子複製機構、粒子複製機構は明らかになっていない。これらを解明するひとつの手段として、ノロウイルス非構造タンパク質を発現する RNA レプリコンを選択し、候補遺伝子を作成した。また、構造タンパク質を恒常的に発現する細胞株樹立を目指して、細胞に導入するための発現プラスミドを作成した。

A. 研究目的

ヒトに感染して嘔吐下痢症を引き起こすノロウイルスは培養細胞や実験動物を用いて増殖させることができない。そのためノロウイルスの生活環の大部分は未だ解明されていない。ノロウイルス遺伝子複製機構および粒子複製機構を解明することを目指し、RNA レプリコンの作成とキャプシドタンパク質を安定に恒常的に発現する細胞株の樹立を試みた。

B. 研究方法

すでに全塩基配列が解明されているノロウイルスチバ株 (GI.4) を用いた。また、RNA レプリコン候補遺伝子作成のため、C 型肝炎ウイルス (HCV) JFH-1 株由来の IRES 支配下に置かれたネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) 断片、GFP 融合 Neo 断片、分泌型 NanoLuc (secNLuc) 遺伝子断片は国立感染症研究所・ウイルス第二部 石井孝司

室長より分与された。その他、自身が所有するホタルルシフェラーゼ遺伝子 (FLuc)、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (RLuc) を用いた。

C. 研究結果

国立感染症研究所・ウイルス第二部 石井孝司室長らは HCV IRES 支配下の Neo 遺伝子を導入することにより、E 型肝炎ウイルス (HEV) の RNA レプリコンの作出に成功している。また、IRES を伴わず secNLuc を導入することでも RNA レプリコンの作出が可能であった。これらの結果を受けて、以下の作業を行った。

1. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 1

チバ株全遺伝子を T7 プロモーター支配下に置いた pT7CVORF1,2,3-Tt に対して ORF2 (VP1) の N 末端に相当する領域に Aor51HI 部位、ORF3 (VP2) の C 末端に

相当する領域に MluI 部位を導入し、HCV IRES-Neo、および、HCV IRES-GFPNeo をそれぞれ PCR で 5'末端に Aor51HI 部位、3'末端に MluI 部位を導入して増幅し、挿入した。それぞれ、

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo-Tt …①

pT7CVORF1-HCVIRES-GFPNeo-Tt …②

とした。更に、①に対して Neo の N 末端に相当する領域に AscI 部位および Bsp119I 部位を導入し、

pT7CVORF1-HCVIRES-Neo2-Tt …③

とした。FLuc、RLuc、および、NLuc (secNLuc のシグナル配列部分を除去) をそれぞれ PCR で 5'末端に AscI 部位、3'末端に Bsp119I 部位 (FLuc は ClaI 部位) を導入して増幅し、③に挿入した。これにより、

pT7CVORF1-HCVIRES-FLucNeo-Tt …④

pT7CVORF1-HCVIRES-RLucNeo-Tt …⑤

pT7CVORF1-HCVIRES-NLucNeo-Tt …⑥

を得た。

2. ノロウイルスチバ株 RNA レプリコン候補遺伝子の作成 2

secNLuc 遺伝子を PCR で 5'末端に Aor51HI 部位、3'末端に Bsp119I 部位を導入して増幅し、③の対応する領域と置換し、pT7CVORF1-secNLucNeo-Tt …⑦ を得た。しかし、この遺伝子から発現する secNLucNeo 融合タンパク質は細胞外へ放出されることになり、細胞に Neo 耐性を付与することはできない。HEV の RNA レプリコンで secNLuc の導入のみで成功した事例を考えると、secNLuc をコードする塩基配列が重要であることが考えられる。そこで

シグナル配列に対応する塩基配列を残しつつ NLuc 本体のみを発現するよう新たな開始コドンが付与した、

pT7CVORF1-dsNLucNeo-Tt …⑧

を作成した。この遺伝子からは非分泌型の NLucNeo 融合タンパク質が発現することになるので、細胞に Neo 耐性を与えることができる。

3. ノロウイルスチバ株構造タンパク質発現プラスミドの作成

和光純薬より購入した pEBMulti-Bsd および pEBMulti-Ble は EB ウイルス由来の遺伝子を含み、細胞に導入した際エピゾームとして複製するので、目的遺伝子が発現する細胞株を簡便に樹立することが可能である。これらのプラスミドにチバ株 ORF2 (VP1 タンパク質) および ORF3 (VP2 タンパク質) を含む遺伝子断片を挿入し、

pEBAgCVORF2,3-Bsd …⑨

pEBAgCVORF2,3-Ble …⑩

を作成した。

4. マウスノロウイルス RNA レプリコン候補遺伝子の作成

マウスノロウイルスは培養細胞で増殖が可能であるので、その遺伝子を利用して複製可能な RNA レプリコンを作り出すことが可能であると期待される。また、ヒトノロウイルスの RNA レプリコン作成において良い対照となると思われる。

マウスノロウイルス MNV1 株の非構造タンパク質領域をコードする遺伝子は Biomatik 社に依頼し合成した。

pBMH-MNV1-NS …⑪

⑪には ORF1 上流に T7 プロモーターが存在するが、MNV1 由来遺伝子との間に余分な配列が介在するので、それを除去し、

pBMT7-MNV1-NS …⑫

を作成した。⑫には更に MNV1 の 3'非翻訳領域を導入し、

pBMT7-MNV1-NS-T …⑬

とした。⑬の ORF1 直後には *EheI* 部位と *MreI* 部位が導入されている。上記①および②から PCR で 5'末端に *EcoT22I* 部位、3'末端に *MreI* 部位を導入して増幅し、⑬の *EheI* 部位と *MreI* 部位に挿入し、それぞれ、
pBMT7MNV1NS-HCVIRES-Neo-Tt …⑭
pBMT7MNV1NS-HCVIRES-GFPNeo-Tt …⑮
とした。

D. 考察

以上作成した RNA レプリコン候補遺伝子が動作するかは、今後 *in vitro* で RNA を合成し、細胞に導入して Neo で選択することにより、コロニーを形成するかどうかを確かめなければならない。HEV の RNA レプリコンはヒト肝がん由来の PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞で成功しているので、まずこの細胞を試す予定である。またこのほか、Huh-7 (ヒト肝がん由来)、Caco-2 (ヒト結腸がん由来)、COLO-320 (ヒト結腸がん由来)、HeLa (ヒト子宮頸がん由来)、HEK293 (ヒト胎児腎由来) 等を試す。

E. 結論

ノロウイルスチバ株の RNA レプリコン候

補遺伝子を作成した。その対照としてマウスノロウイルスの RNA レプリコン候補遺伝子も作成した。

ノロウイルスチバ株の構造タンパク質を安定に発現する細胞株を得るために、エピゾームとして複製可能な発現プラスミドを作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Kyoko Higo-Moriguchi, Haruko Shirato, Yuichi Someya, Yoshikazu Kurosawa, Naokazu Takeda, and Koki Taniguchi (2013) Isolation of cross-reactive human monoclonal antibodies that prevent binding of human noroviruses to histo-blood group antigens. *J. Med. Virol.* 86(4), 558-567.

2. 学会発表

(1) 染谷雄一、守口匡子、白土東子、武田直和、奥野良信、黒澤良和、谷口孝喜「ヒト型抗ノロウイルス抗体によるノロウイルス粒子-血液型抗原相互作用の阻害」第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月11-13日

(2) 白土東子、石田豊和、熊谷安希子、伊藤浩美、古川早苗、染谷雄一、石井孝司、脇田隆字、成松久、久保田智巳「結晶構造解析とQM/MM計算の組み合わせによるノロウイルスとルイス抗原の結合解析」第61回日本ウイルス学会学術総会、神戸、2013年11月10-12日

(3) 染谷雄一「ノロウイルスプロテアーゼの

基質特異性について」日本薬学会第 134
年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用登録新案

なし

3. その他

なし

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

遺伝子治療研究室 室長

研究要旨 現在ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス（MuNoV）を用い、その増殖に必要なシグナル伝達系の解析を行った。キナーゼ阻害剤パネルを用い、RAW264.7 細胞への MuNoV 感染に関与すると思われるプロテインキナーゼ、PI3K, mTOR, ATM を同定した。今後は、これらキナーゼの MuNoV の感染における作用点を解析し、その知見を HuNoV 感染増殖系確立へ応用することをめざす。また、Tn5 トランスポゾンを用いたランダム挿入を用いて、MuNoV ゲノム内で短い外来配列を挿入できる部位を ORF1 の NS3 コード領域内に同定した。今後はこの外来配列導入可能な部位を中心に遺伝子改変の許容性を調べ、MuNoV/HuNoV とのキメラウイルス作成などのアプローチを用いて、MuNoV の感染増殖系を利用した HuNoV 感染増殖モデルの確立をめざす。

A. 研究目的

ヒトノロウイルス（HuNoV）による集団感染の流行により毎年日本は甚大な人的、経済的な負担は余儀なくされている。特に高齢者への感染は、死亡につながる体力低下をしばしば引き起こすことから、高齢者医療にとってその感染予防・防御は不可欠である。しかしながら、HuNoV の感染増殖を支持する細胞が見つからないため、その感染制御・予防につながる基礎研究は遅れている。本研究では、現在ノロウイルスとして唯一培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルス（MuNoV）を用い、(1)その増殖に必要なシグナル伝達系の解析を行い、ノロウイルスに対する新規阻害剤の探索を行った。また、(2)MuNoV ウイルス遺伝子の改変を試み、増殖に対する影響を最小にとどめつつ改変できるウイルス遺伝子領域を特定し、この領域を利用して MuNoV と HuNoV と“キメラ化”することの可能性を検討した。

B. 研究方法

MuNoV S7 株（日本大学遠矢幸伸先生より分与）

を RAW264.7 細胞に感染させ、46 時間後の cytopathetic effect を培養液中に WST-1 を加え、さらに 2 時間培養した後、生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩（WST-1）のホルマザン色素への変換を指標に生細胞数を数値化して、cytopathetic effect を評価した。この実験系に対し、MuNoV 感染時からキナーゼ阻害剤（Sigma, プロテインキナーゼ阻害剤パネル）120 種類を加え、各阻害剤による細胞生存性そのものに対する影響、cytopathetic effect への効果を調べた。また、いくつかのサンプルでは 48 時間後の培養上清よりウイルス RNA 量を定量 RT-PCR により評価した。

MuNoV S7 株の全長 cDNA を組み込んだ pKS53R MuNoV 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 MuNoVS7 に対して、トランスポゾン Tn5 を用いてランダムに挿入変異を引き起こしたライブラリーを作成した。これらライブラリーより各所に Tn5 挿入変異をもつ MuNoVRNA を試験管内転写によって作成

し、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 24-48 時間にその培養上清を採取して RAW264.7 細胞に感染させ、増殖する組換えウイルスのうち、Tn5 配列をもつウイルスを RT-PCR で同定し、その挿入位置を配列決定した。

C. 研究結果

プロテインキナーゼ阻害剤 120 種類を用いて、ウイルス感染後の細胞障害性の阻害を指標にしてウイルス増殖阻害効果のあるものを、スクリーニングした。この結果、PI3K, mTOR, そして ATM の各キナーゼに対する複数の阻害剤でウイルス感染による細胞障害性に対する阻害が見られた。そのほかにも、EGF 受容体、polo-like kinase, p38MAPK などの阻害剤でも細胞障害性の抑制が観察された。一方、FLT3 kinase, c-MET, VEGF 受容体の阻害剤では、ウイルス感染による細胞死を促進する効果が観察された。同様な結果は、Aurora キナーゼ、Burton tyrosine キナーゼ阻害剤でも見られた。これらのウイルス感染による細胞障害性に対して阻害/抑制、促進効果が見られた際の細胞上清中ウイルス RNA 量は、抑制されている際には減少、促進されている際には増加していた。しかし細胞死が促進されている場合では、細胞死の速度が速すぎるためか、阻害剤抜きで通常感染の際の上清中ウイルス量には及ばなかった。

MuNoV S7 株全長を組み込んだ pT7 MuNoVS7 に対して、Tn5 トランスポゾンにより NotI 制限酵素サイトを両端に持つカナマイシン耐性遺伝子をランダムに挿入し、カナマイシン耐性株を選択することでトランスポゾン挿入クローンを選別した。約 5 万クローンを選別、プールした後プラスミド DNA を精製し、NotI 切断で 57base の Tn5 由来配列を残してカナマイシン耐性遺伝子領域を除き、この DNA から試験管内転写、5' キャッピングで感染性ウイルス RNA を作成し、

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。その 293T 細胞上清を RAW264.7 細胞に感染させ、48 時間後にその細胞上清中のウイルス RNA を抽出し、Tn5 配列特異的プライマーと各種 MuNoV プライマーとの組み合わせ 16 種類で RTPCR を行い、増幅断片が観察できるプライマーの組み合わせを調べた。増幅断片が得られたプライマーセットの組み合わせからおおよそその Tn5 組み込み位置を決め、その周辺配列を RT-PCR で増幅し、その断片を配列決定することにより、感染増殖に影響の無い Tn5 配列の挿入位置、MuNoV nt# 2513 を同定した。この位置は、ORF1 の NS3 コード領域内で、NS3 の 131 番目アミノ酸残基 Lys と 132 番目の Thr の間に挿入されていた。このクローンは、野生型と同程度の増殖が認められた。しかしながらこの部位に Venus 蛍光タンパク質配列 (714bp) あるいはブラストサイジン耐性遺伝子配列 (393bp) を挿入した場合は、増殖クローンを得ることはできなかったため、長い配列の挿入は難しいと考えられた。

D. 考察

プロテインキナーゼ阻害剤パネルを用いてウイルス増殖阻害効果のあるものを、スクリーニングした結果、PI3K, mTOR, そして ATM の各キナーゼに対する複数の阻害剤でウイルス感染による細胞障害性に対する阻害が見られた。PI3K と mTOR は Akt を介して機能的にリンクしているため、阻害剤によるウイルス増殖阻害の作用機序は類似している可能性がある。過去の研究ではウイルス RNA ポリメラーゼ (RdRP) の活性には Akt によるリン酸化が関わるという報告も有るため (J Virol. 2011, 85: 10894-8.)、PI3K/mTOR の機能はこの部分に必要なのかもしれない。一方、ATM は一般的には DNA ダメージ応答に関わるキナーゼであり、細胞質で増殖する RNA ウイルスとの繋がりが薄いようにも見える。しかしながら C 型肝炎ウイルスでは ATM 機能がウイルス増殖に必要であることが示されており (J Virol. 2008, 82:9639-46; Virology. 2008, 70:295-309.)、MuNoV での増

殖に ATM 関連の機能がどのように関わるか今後の解析が必要である。これらの阻害剤の作用点を詳細に解析することにより、新規の抗ノロウイルス薬剤開発の糸口が見つければと考えている。また、ウイルス感染による細胞死を見かけ上促進したように見えるキナーゼ阻害剤については、培養細胞を HuNoV 増殖に誘導できるような薬剤スクリーニング系の開発を視野に入れつつ、その作用点について引き続き解析を行う予定である。

Tn5 トランスポゾンを用いたランダム挿入により作成したライブラリーより単離した増殖クローンは、MuNoV ゲノム 2513 番目塩基 (ORF1, NS3 コード領域) へ Tn5 配列が挿入されていた。Tn5 配列挿入によるウイルス増殖への影響は見られなかったため、この領域は遺伝子改変に比較的寛容であると考えられる。同じ Tn5 トランスポゾン挿入を利用して、Thorne らは我々と同様に NS3 領域とさらに ORF3 コード領域に短い遺伝子配列であればウイルス増殖を阻害せずに挿入できることを示している (J. Virol. 2012, 86:11441-56.)。また我々の結果と同様、これらの位置に対してでも長い配列の挿入による増殖性クローンの単離はできなかったことから、挿入によるウイルス遺伝子機能の機能不全がこの原因と考えられる。また、MuNoV はゲノム全体での RNA 二次構造をとることが知られているため、長い配列の挿入によるこの二次構造の破壊も、ウイルス増殖に影響を与えうることも可能性として考えることもできる。大きな遺伝子挿入は難しいが、NS3 と VP2 のコード領域がある程度遺伝子改変に耐性があることが明らかになったため、これらの領域の改変を中心に、MuNoV の HuNoV 化のアプローチを模索している。

E. 結論

MuNoV の感染増殖に関わるシグナル伝達系を解析する目的で、キナーゼ阻害剤パネルを用い、RAW264.7 細胞への MuNoV 感染に関与すると思われるプロテインキナーゼを同定した。今後は、MuNoV の感染に必要なシグナル伝達系の解析と、その知見を HuNoV 感染増殖系確立への応用を視

野に解析を続けていく。また、Tn5 トランスポゾンを用いたランダム挿入を用いて、MuNoV ゲノム内で短い外来配列を挿入できる部位を同定した。今後はこれらの外来配列導入可能な部位を中心に遺伝子改変の許容性を調べ、MuNoV/HuNoV とのキメラウイルス作成などのアプローチを用いて、MuNoV の感染増殖系を利用した HuNoV 感染増殖モデルの確立をめざす。

F. 研究発表

論文発表

1. Watanabe M, Phamduong E, Huang CH, Itoh N, Bernal J, Nakanishi A, Rundell K, Gjoerup O, Kasamatsu H.

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

J.Virol. 87:5053-64 (2013)

2. Tange S, Zhou Y, Nagakui-Noguchi Y, Imai T, and Nakanishi A

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

Viol. J. 10:153 (2013)

3. Diotti RA, Nakanishi A, Clementi N, Mancini N, Criscuolo E, Solfrosi L, and Clementi M

JC Polyomavirus (JCV) and Monoclonal Antibodies: Friends or Potential Foes?

Clin. Develop. Immunol. Vol.2013, Article ID 967581, (2013).

学会発表

1. Nakanishi A, Takagi H, Murakami K, Oka T, Todaka R, Tohya Y, and Katayama K

Adaptive mutation of murine norovirus S7 strain important for growth in RAW264.7 cells.

American Society for Virology (2013) July 22, State College, Pennsylvania, United States

2. Katayama K, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Murakami K, Oka T, Guix S, Sharp TM, Atmar RL, Crawford SE, and Estes MK

A plasmid based reverse genetics system can drive human and murine norovirus genome replication and produce progeny virus containing reporter tagged infectious genomic RNA

5th International Calicivirus Conference Oct. 12, (2013) Beijing, China

3. 中西 章、丹下正一郎、野口裕子、周妍
アストロウイルス感染とオートファジー

第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 12 日 神戸

4. Nakanishi A, Tange S, Noguchi Y, Zhou Y
Association of autophagic process during human astroviral infection

第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 5 日 神戸

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

野ネズミ由来ノロウイルスの検出と培養細胞での分離の試み

分担研究者 遠矢 幸伸 日本大学 生物資源科学部 教授

研究協力者 佐藤 豪 日本大学 生物資源科学部 助手

研究要旨 動物由来新規ノロウイルス (NoV) の分離を目標として、各種野ネズミの糞便または腸管内容物 222 検体から RNA を抽出し、逆転写 (RT) -PCR 法でウイルスゲノムの検出を試みた。韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物 4 検体に NoV のゲノムが検出された。得られた塩基配列を用いた系統樹解析では、実験用マウス由来 NoV とは独立した野ネズミ由来の NoV の枝を形成し、新規 NoV であることが示された。実験用マウス由来の NoV が増殖可能である株化細胞 (RAW264.7) を用いて、RT-PCR 陽性検体からのウイルス分離を試みたが、CPE の発現及びウイルス RNA 量の増加も認められなかった。

A. 研究目的

ヒト NoV は培養細胞での増殖が不可能であるが、実験用マウス由来の NoV は培養細胞での増殖が可能であるため、実験モデルとして活用されている。一方、マウス以外の野生げっ歯類にも遺伝学的に異なる NoV が存在することが新たに報告され、マウス由来 NoV とは宿主特異性なども異なる可能性が示唆されている。そこで、動物由来新規ノロウイルス (NoV) の分離を目標として、逆転写 (RT) -PCR 法によるウイルスゲノムの検出と塩基配列の決定並びに培養細胞でのウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

各地で捕獲されたアカネズミ、ハタネズミ、クマネズミ、ドブネズミなどを含む計 222 検体の野ネズミ由来糞便または腸管内容物を用いた。PBS を用いて各検体を 10%乳剤とし、15,000 rpm、5 分間遠心した上清から QIAmp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した。RT-PCR は ORF3 内の保存領域をもとにデザインしたプライマーペアを用い、PrimeScript One

Step RT-PCR Kit (TAKARA) を使用して行った。その後、アガロースゲル (1.5%または 2%) 電気泳動を行い、増幅産物を SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen) で染色、観察した。増幅産物が得られた場合は、DNA バンドを精製し、塩基配列を常法に従い決定した。

RT-PCR 及び遺伝子解析により、NoV ゲノムが検出された検体については、乳剤の遠心上清を $\phi 0.1 \mu\text{m}$ のミリポアフィルターでろ過し、RAW264.7 細胞に接種した。接種後、5 日間、CPE の出現の有無を観察し、3 代まで盲継代を行った。各培養上清を採取して前述の方法で RNA の抽出および RT-PCR を行い、ウイルス RNA の検出を行うことにより、ウイルス増殖の有無を検討した。

C. 研究結果

韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミの腸管内容物 4 検体から NoV のゲノム由来と考えられる 392bp の増幅産物が検出された。その塩基配列を決定し、系統樹を作製したところ、実験用マウス由来 NoV とは独立した野

ネズミ由来の NoV の枝をヨーロッパモリネズミ由来 NoV とともに形成し、新規 NoV であることが示された。

実験用マウス由来の NoV が増殖可能である株化細胞 (RAW264.7) を用いて、RT-PCR 陽性であった 4 検体からのウイルス分離を試みたが、CPE の発現並びにウイルス RNA 量の増加も認められなかった。

D. 考察

計 222 検体の野ネズミ由来の糞便または腸管内容物を用いて、RT-PCR により NoV を検索したところ、韓国の済州島で捕獲されたチェジュセスジネズミ 4 検体から新しい NoV が検出された。実験用マウス由来 NoV が増殖することが知られている、マウスマクロファージ由来の株化細胞である RAW264.7 細胞での分離はできなかったが、今後、全ゲノム塩基配列の決定に加えて、チェジュセスジネズミまたは近縁のネズミ由来の器官や組織を用いた組織培養法を開発し、新しい NoV 培養系並びに動物モデルの開発が期待される。

E. 結論

新規動物 NoV をチェジュセスジネズミから検出した。培養細胞での分離はできなかったが、今後、新たな NoV 感染の動物モデルとして有用と考えられる。

F. 研究発表

論文発表

1. Takimoto K, Taharaguchi M, Sakai K, Takagi Y, Tohya Y, Yamada Y. Effect of hypochlorite-based disinfectants on inactivation of murine norovirus and attempt to eliminate or prevent infection in mice by addition to drinking water. *Exp Anim.* 62; 237-45, 2013
2. Shimizu-Onda Y, Akasaka T, Yagyu F, Komine-Aizawa S, Tohya Y, Hayakawa S, Ushijima H. The virucidal effect against murine norovirus and feline calicivirus as surrogates for human norovirus by ethanol-based sanitizers. *J Infect Chemother.* 19; 779-81, 2013

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。

厚生労働科学研究費補助金（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） 分担者研究報告書

分担研究課題：ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態

分担研究者：本村和嗣（大阪大学微生物病研究所 日本一タイ新興再興感染症共同研究センター）

研究要旨

我々は、これまでノロウイルスの組換えウイルスの発生は頻繁に発生し、しばしば新たな流行に結びつくことを明らかにしてきた。組換えウイルスの発生には、種々の遺伝子型の混合感染が必要である。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、感染者体内に存在するノロウイルス配列を包括的に解析した。混合感染は、24検体中9検体で検出された。また、混合感染は、感染経路に依存せず、頻繁に観察される事象であることがわかった。様々な感染経路で、混合感染が頻繁に生じている可能性が示唆された。組換えウイルスの発生機構、病態、持続感染などを解析して行く上で基盤となる知見と考えられる。

A. 研究目的

河川や水中生物などの自然環境、汚染食材などの生活環境中には、多様な遺伝子型が混在していることが報告されている。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、これまでノロウイルス流行株の全ゲノム解析により、種々の亜株や遺伝子型が国内で局地的流行を引き起こすこと、それらの大半は ORF1 と ORF2 に組換え点をもつゲノム組換えウイルスであることを明らかにしてきた。組換えウイルスの発生はしばしば新たな流行に結びつくと考えられる。組換えウイルスの発生には、種々の遺伝子型の混合感染が必要である。しかし、従来法では検出感度に限界があるため、混合感染の実態には不明な点が多い。

本研究では、ノロウイルス感染者体内における混合感染の実態を調べるために、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 (330bps, 24 検体) の配列情報を収集し、感染者体内に存在する亜株、遺伝子型の種類と頻度を解析した。

個体内における遺伝子型や亜株の種類、分布、動態を明らかにする。これらの解析をもとに流行発生のしくみを検討し、流行

株の検出、サーベイランス、リスク評価、創薬やワクチン開発等に幅広く役立つ重要な科学基盤を提供すると考えている。

B. 研究方法

2006 年 05 月 15 日から 2013 年 03 月 10 日の間に、20 の道府県で発生し、各道府県の衛生研究所にて 2006 年 05 月～2011 年 03 月の間に全 20 カ所の衛生研究所で収集され、全ゲノム情報が判明した 395 検体のうち、ヒトーヒト感染が疑われる症例：4 例、集団食中毒事例：5 例、散发食中毒事例：15 例、計 24 例を無作為に抽出し、カプシド遺伝子シェル領域配列を調べた。糞便試料を出発材料とし、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。この RNA 抽出液より、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使って、ノロウイルス RNA を抽出した後、G2SKR (Katayama K et. al; Virology. 2002 Aug 1;299(2):225-239.) を用いて cDNA を合成した。cDNA を template にして、カプシド遺伝子シェル領域を PCR で増幅した。Roche GS 454 FLX Titanium を用いて、遺伝子増幅産物の配列情報を取得した。配列集団の系統関係の解析は最尤法により解析した。in-house の配