

フィルターで濾過した後、ヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 に接種した。細胞を継代せず、三日ごとに培地の更新によって細胞を維持した。経時的に培養上清中の rat HEV RNA, 構造蛋白を RT-PCR, ELISA 法で測定し、rat HEV の増殖を確認した。さらに培養上清を超速心で濃縮し、電子顕微鏡でウイルス粒子を観察した。感染細胞内のウイルス抗原の局在は間接蛍光免疫染色法で検証した。感染細胞培養上清をヌードラットに接種することにより産生されたウイルスの感染性を確認した。

また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 作製をするため、rat HEV ドイツ株 (GU345042) の全長配列に基づき、T7 promoter プラス DcHEV 全長配列を含む cDNA を合成し、ベクター pUC19 にクローニングし、プラスミド pUC19-ratHEV を作製した。pUC19-ratHEV を制限酵素 XbaI で切断し、mMESSAGE mMACHINE T7 kit を用いて Cap 付きの ratHEV RNA を合成した。Cap 付きの全長 rat HEV RNA をヌードラット (Long Evans-run/run) 肝臓に直接接種した。接種後、経時的に採血、採便し、血中および便中の Rat HEV RNA を RT-PCR 法により測定し、ウイルス増殖の有無により、全長 rat HEV RNA の感染性を評価した。また、感染ヌードラット糞便を 10% 便乳剤にして、濾過除菌した後、PLC/PRF/5 細胞、またはヌードラットに接種することによりウイルスの感染性を確認した。

C. 研究結果

Rat HEV を接種したラット肝細胞 RLN-B2、ラット肝癌細胞 dRLh-84 から接種後 3 ヶ月までウイルスが検出されなかった。それに対して、Rat HEV を接種した PLC/PRF/5 細胞培養上清に接種後 15 日から rat HEV RNA が検出され、21 日からウイルス構造蛋白が検出された。その後、ウイルス量が経時的に増加していた。ウイルス構造蛋白は接種後 4 週の培養上清中から検出され、6 週目にピークに到達しその後も高いレベルを維持していた。構造蛋白は細胞質に分布していた。培養上清を濃縮後、電子顕微鏡で観察したところ、直径 35nm のウイルス粒子が観察された。

10 週目の培養上清をヌードラットに静脈接種し、経時的に糞便中、血液中の HEV RNA を測定した結果、ヌードラット体内での増幅を確認した。この結果は PLC/PRF/5 細胞で増殖された rat HEV が感染性を有することが示された。

一方、ヌードラット肝臓に rat HEV RNA を直接接種した二週間後、rat HEV RNA が血中および便中から検出された。さらに便中のウイルスは PLC/PRF/5 細胞およびヌードラットに接種した後、ウイルスの増殖が認められた。この結果はリバーシジェネティクス法によって感染性を持つ rat HEV を獲得したことが証明された。

D. 考察

PLC/PRF/5 は rat HEV に感受性を有し、この細胞で増幅したウイルスは感染性を持つことが明らかになった。Rat HEV 培養系が樹立できたことから、今後 rat HEV 複製のメカニズムの解明が可能となり、rat HEV に関する新知見が大いに期待出来る。また、リバーシジェネティクス法による rat HEV 作製が成功した。これは cDNA への特定の突然変異の導入やウイルス感染のトロピズムなどの研究に非常に有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Li TC, Yang T, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takaji W, Johne R. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2015 Jan 29.

2) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tingting Yang, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. *Intervirology.* 2015, *In press.*

3) Tian-Cheng Li, Kenji Iwasaki, Harutaka Katano, Michiyo Kataoka, Noriyo Nagata,

Kazumi Kobayashi, Tetsuya Mizutani, Naokazu Takeda, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki Characterization of Self-assembled Virus-like Particles of Merkel Cell Polyomavirus. PLOS ONE, 2015, In Press.

レットE型肝炎ウイルスの病原性とE型肝炎動物モデル。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月横浜。

4) Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, Li TC, Suzuki A, Oshitani H. Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines. BMC Vet Res. 2015 Jan 27;11(1):11.

2) 塩田智之、李天成、吉崎佐矢香、西村順裕、清水博之、下島昌幸、西條政幸、脇田隆字、石井孝司。E型肝炎ウイルス感染性規定因子候補に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月横浜。

5) Tian-Cheng Li, Kenzo Yonemitsu, Yutaka Terada, Naokazu Takeda, Wakita Takaji and Ken Maeda. Ferret hepatitis E virus infection in Japan. JJID 2015. 68(1). 60-62.

3) 李天成、米満研三、寺田豊、片岡紀代、網康至、須崎百合子、岸田典子、白倉雅之、浅沼秀樹、前田健、武田直和、脇田隆字、Ferret HEV抗体検出系の樹立およびその疫学調査、第157回日本獣医学会、2014年9月 北海道

6) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, Ishii K. Establishment of Hepatitis E virus infection-permissive and -nonpermissive human hepatoma PLC/PRF/5, subclones. Microbiol Immunol. 2014 Dec 10.

4) バキュロウイルスによるブタサーコウイルス2型(PCV2)カプシド蛋白の発現、中江優貴、岸塚慎吾、久保田智江、青木博史、池田秀利、鈴木孝子、李天成、福士秀悦、第157回日本獣医学会、2014年9月 北海道

7). Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura, Noriko Kishida, Hideki Asanuma, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis. 2014. 20 (4), 709-712.

5) Reimar Johne, Tingting Yang, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Koji Ishii, Kei Haga, Tomofumi Nakamura, Susumu Ochiai, Wakita Takaji, Tian-Cheng Li. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology, 18-21 March 2015 in Bochum, Germany.

8) Ling Fang, Zejun Wang, Shili Song, Michiyo Kataoka, Changwen Ke, Tetsuro Suzuki, Takaji Wakita, Naokazu Takeda, and Tian-Cheng Li. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. J Virol Methods, Oct; 207:38-44, 2014

6) Tian-Cheng Li, Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T. Characterization of Self-Assembled Virus-Like Particles of Ferret Hepatitis E Virus Generated by Recombinant Baculoviruses. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014) July 27-Augst 1, 2014, Canada.

2. 学会発表

1) 李天成、網康至、須崎百合子、浅沼秀樹、岸田典子、白倉雅之、武田直和、脇田隆字。フェ

7) Tian-Cheng Li, Kaori Ochiai, Tingting

Yang, Sayaka Yoshizaki, Koji Ishii, Naokazu Takeda and Takaji Wakita. Characterization of a case of hepatitis E that imported from Spain. The 10st Asia Pacific Travel Health Conference (APTHC 2014 Conference). May 8-10, 2014. Vietnam.

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

無し

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., <u>Ishii K.</u> , Haga K., Nakamura T., Ochiai S., Wakita T. and John R.	Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus.	Journal of General Virology	In press		2015
Shiota T., Li T.C., Yoshizaki S., Kato T., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Establishment of Hepatitis E Virus Infection-Permissive and -Nonpermissive Human Hepatoma PLC/PRF/5 Subclones.	Microbiology and Immunology	In press		2015
Jiang X., Kanda T., Wu S., Nakamoto S., Saito K., Shirasawa H., Kiyohara T., <u>Ishii K.</u> , Wakita T., Okamoto H. and Yokosuka O.	Suppression of La Antigen Exerts Potential Antiviral Effects against Hepatitis A Virus.	PLOS One	9	e101993	2014
Li T.C., Yang T., Shiota T., Yoshizaki S., Yoshida H., Saito M., Imagawa T., Malbas F., Lupisan S., Oshitani H., Wakita T. and <u>Ishii K.</u>	Molecular detection of hepatitis E virus in rivers in the Philippines.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,	90	764-766	2014
石井孝司	A型肝炎、E型肝炎	臨床と微生物	41	72-78	2014
<u>Katayama K.</u> , Murakami K., Sharp TM, Guix S, Oka T, Takai-Todaka R, Nakanishi A, Crawford SE, Atmar RL, Estes MK.	Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA.	Proc Natl Acad Sci U S A.	111	E4043-52	2014
Sato G, Ido H, Kiuchi M, Kataoka M, <u>Katayama K</u> and <u>Tohya Y.</u>	Characterization of St-Valerien-Like Virus Genome Detected in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	76	1045-50	2014
Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Huang JC, Wu HS.	Epidemiology and Molecular Characteristics of Norovirus GII.4 Sydney 2012 Gastroenteritis Outbreaks in Taiwan, January 2012–December 2013.	Arch Virol		In press	2015
片山和彦	ノロウイルス感染症とその対策	救命救急	17	12-15	2014
片山和彦	質疑応答臨床一般 夏場にノロウイルスによる胃腸炎や食中毒が発生する可能性	日本医事新報	4723	12-15	2014

片山和彦	特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスとは	調剤と情報	20	10-12	2014
片山和彦	特集 ノロウイルス感染症 ノロウイルスの感染拡大を防ぐには	調剤と情報	20	14-19	2014
片山和彦	備えて立ち向かう感染性胃腸炎 ノロウイルス・ロタウイルス ノロウイルス感染症とは-ウイルスの特徴・流行変遷・臨床病態	感染症対策ICTジャーナル	9		2014
片山和彦	ノーウォークウイルス（ノロウイルス）の遺伝子型 2014年版	IASR	35	ノロウイルス特集号	2014
片山和彦	ノロウイルスの感染予防	少年写真新聞社 中学保健ニュース			2014
片山和彦	ノロウイルスの感染予防	少年写真新聞社 高校保健ニュース			2014
Endo Y., Noguchi S., Hara Y., Hayashi Y., Motomura K. , Murakami N., Tanaka S., Yamashita S., Goto Y., Matsumoto N., Nonaka I., Nishino I.	Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia by constitutive activation of store-operated Ca ²⁺ channel	Hum Mol Genet.	9	1-12	2014
Oka T, Takagi H, <u>Tohya Y.</u>	Development of a novel single step reverse genetic system for feline calicivirus.	J. Virol. Methods.	207	178-81	2014
Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, <u>Sato T.</u>	Modelling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids.	Nature Medicine		In press	2015
Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, <u>Sato T.</u> , Sato H, Taketo MM, Oshima M.	Suppressing TGFβ Signaling in Regenerating Epithelia in an Inflammatory Microenvironment Is Sufficient to Cause Invasive Intestinal Cancer.	Cancer Res	75	766-76	2015
Pin C, Parker A, Gunning AP, Ohta Y, Johnson IT, Carding SR, <u>Sato T.</u>	An individual based computational model of intestinal crypt fission and its application to predicting unrestrictive growth of the intestinal epithelium.	Integr Biol (Camb)	7	213-28	2015
Simmini S, Bialecka M, Huch M, Kester L, van de Wetering M, <u>Sato T.</u> , Beck F, van Oudenaarden A, Clevers H, Deschamps J.	Transformation of intestinal stem cells into gastric stem cells on loss of transcription factor Cdx2.	Nat Commun	5	5728	2014
Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, <u>Sato T.</u> , Taketo MM, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R.	KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells.	Cancer Res	74	2882-91	2014

Saigusa K, Hisamatsu T, Handa T, Sujino T, Mikami Y, Hayashi A, Mizuno S, Takeshita K, <u>Sato T</u> , Matsuoka K, Kanai T	Classical Th1 cells obtain colitogenicity by co-existence of ROR γ t-expressing T cells in experimental colitis.	Inflamm Bowel Dis	20	1820-7	2014
Mizuno S, Mikami Y, Kamada N, Handa T, Hayashi A, <u>Sato T</u> , Matsuoka K, Matano M, Ohta Y, Sugita A, Koganei K, Sahara R, Takazoe M, Hisamatsu T, Kanai T.	Cross-talk between ROR γ t+ innate lymphoid cells and intestinal macrophages induces mucosal IL-22 production in Crohn's disease.	Inflamm Bowel Dis	20	1426-34	2014
Mikami Y, Mizuno S, Nakamoto N, Hayashi A, Sujino T, <u>Sato T</u> , Kamada N, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Hibi T, Yoshimura A, Kanai T.	Macrophages and dendritic cells emerge in the liver during intestinal inflammation and predispose the liver to inflammation.	PLoS One	9	e84619	2014
<u>Suzuki T</u> , Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H.	Analysis of genetic divergence among strains of porcine rotavirus C, with focus on VP4 and VP7 genotypes in Japan.	Virus Research	197	26-34	2015
Mawatari T, Hirano K, Ikeda H, Tsunemitsu H, <u>Suzuki T</u> .	Surveillance of diarrhea-causing pathogens in dairy and beef cows in Yamagata Prefecture, Japan from 2002 to 2011.	Microbiology and Immunology	58	530-535	2015
<u>Suzuki T</u> , Hasebe A, Miyazaki A, Tsunemitsu H.	Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan.	Infection, Genetics and Evolution	26	223-227	2014
Marthaler D, <u>Suzuki T</u> , Rossow K, Culhane M, Collins J, Goyal S, Tsunemitsu H, Ciarlet M, Matthijnssens J.	VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs.	Veterinary Microbiology	172	359-366	2014
Mawatari T, Hirano K, Tsunemitsu H, <u>Suzuki T</u> .	Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan 2003-2010.	Journal of General Virology	95	1117-1125	2014
Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, <u>Suzuki T</u> .	Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production.	J Virol	88	7541-7555	2014
Saito K, Shirasago Y, <u>Suzuki T</u> , Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M.	Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus.	J Virol	89	2220-2232	2015
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, <u>Suzuki T</u> , Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol	95	2658-2667	2014

Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, <u>Suzuki T</u> , Wakita T, Takeda N, Li TC.	Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses	J Virol Method	207	38-44	2014
Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, <u>Suzuki T</u> , Lee J, Park EY.	Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection.	Biosens Bioelectron.	58	33-39	2014
Monjurul AM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liua G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, <u>Kukimoto I</u> , Muramatsu M.	APOBEC3A and 3C decreases human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity.	Biochem. Biophys. Res. Commun.		in press	2015
Taguchi A, Nagasaka K, Kawana K, Hashimoto K, Kusumoto-Matsuo R, Plessy C, Thomas M, Nakamura H, Bonetti A, Oda K, <u>Kukimoto I</u> , Carninci P, Banks L, Osuga Y, Fujii T.	Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using CAGE technology.	J. Virol.	89	2448-2452	2015
Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, Uenoyama A, Kondo K, Tsunoda H, Nagasaka K, Kawana K, Morisada T, Iwata T, Aoki D, <u>Kukimoto I</u> .	Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women.	Jpn. J. Clin. Oncol.	44	910-917	2014
Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, <u>Kukimoto I</u> , Muramatsu M.	APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation.	J. Virol.	88	1308-1317	2014
Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, <u>Shoji I</u> , Wilcox CS, Lai EY, Han F.	Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo.	Antioxidants & Redox Signaling	21	1-16	2014
Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, <u>Shoji I</u> , Deng L, Hotta H.	Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities.	PLoS One	9	e98877	2014
Ratnoglik SL, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Antiviral activity of extracts from Morinda citrifolia leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.	Microbiology and Immunology	58	188-194	2014
Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, <u>Shoji I</u> , Wahyuni T, Lusida M, Soetjipto S, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H.	Anti-hepatitis C virus compounds obtained from Glycyrrhiza uralensis and other Glycyrrhiza species.	Microbiology and Immunology	58	180-187	2014
<u>Li TC</u> , Yoshizaki S, Ami Y, Suzuki Y, Yang T, Takeda N, and Wakita T.	Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection.	Intervirology.		In press	2015

<u>Li TC</u> , Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda N, Wakita T, Suzuki T.	Suzuki Characterization of Self-assembled Virus-like Particles of Merkel Cell Polyomavirus.	PLOS ONE		In press	2015
Liu X, Saito M, Sayama Y, Suzuki E, Malbas FF, Galang HO, Furuse Y, Saito M, <u>Li TC</u> , Suzuki A, Oshitani H.	Seroprevalence and molecular characteristics of hepatitis E virus in household-raised pig population in Philippines.	BMC Vet Res.	11	In press	2015
<u>Li TC</u> , Yonemitsu K, Terada Y, Takeda N, Wakita T and Maeda K.	Ferret hepatitis E virus infection in Japan.	JJID	68	60-62	2015
<u>Li TC</u> , Yang T, Ami Y, Suzuki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, and Wakita T.	Full Genome of Ferret Hepatitis E Virus from Laboratory Ferrets.	Emerg Infect Dis.	20(4)	709-712	2014

