

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
平成 26 年度分担研究報告書

Rat HEV の細胞培養およびリバースジェネティクス法による Rat HEV の作製

分担研究者 李 天成 国立感染症研究所 ウイルス第二部主任研究官

研究協力者 国立感染症研究所ウイルス第二部 吉崎佐矢香 石井孝司 脇田 隆字

国立感染症研究所病理部 片岡 紀代

国立感染症研究所動物管理室 網康至 須崎百合子

Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany. Reimar Johne

研究要旨 Rat HEV は人由来 HEV の遺伝子構造と類似する新しい E 型肝炎ウイルスである。ドイツにおいて初めて rat HEV が検出されて以後、アメリカ、ベトナム、インドネシアからも部分あるいは全長 rat HEV 遺伝子が確認されたことから、rat HEV が世界範囲に広がっていることが示唆された。しかしながら、これらのウイルスの増殖できる培養細胞系が樹立されていないため、ウイルスの感染性や病原性などの評価が困難である。本研究では我々はヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 細胞に接種し、Rat HEV が増殖できる細胞培養系を樹立した。また、in vitro で合成した完全長の rat HEV RNA をヌードラット肝臓に直接接種したことにより、感染性をもつ Rat HEV を獲得した。Rat HEV 培養系の樹立は rat HEV 複製のメカニズムの解明に有用である。

A. 研究目的

E 型肝炎は黄疸を主症状とする急性肝炎である。原因ウイルスは E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus, HEV) である。先進国において E 型肝炎は輸入感染症と考えられてきたが、全く海外渡航歴のない患者が見つかること、ブタやイノシシからヒト由来 HEV と同一の HEV がみつかることなど人獣共通感染症として注目されている。HEV はプラス一本鎖 RNA を遺伝子に持つ小型球形ウイルスで、1~4 型まで 4 つの遺伝子型 (G1~G4) が知られている。また、ヒト以外の動物から従来ヒト由来 HEV と異なる新型 HEV が多数分離されている。これらのウイルスの病原性などはほとんど解明されていない。Rat HEV は野生ラットから分離された遺伝子構造上ではヒト

HEV と類似するウイルスであり、その病原性などに関する情報が少なく、その増殖、感染のメカニズムは明らかではない。ウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には細胞培養系もまた欠かせない手法である。本研究では rat HEV をヒト肝癌由来 PLC/PRF/5 細胞に接種し、ウイルスの増殖と産生されたウイルスの感染性等について検討した。また、in vitro で合成した全長 rat HEV RNA をヌードラット (Long Evans-run/run) 肝臓に直接接種し、ウイルスの獲得を試みた。

B. 研究方法

Rat HEV を感染したヌードラット (Long Evans *rnu/rnu*) の便材料を PBS で希釈し、10% 便乳剤を作製した。遠心分離後、その上清を 45 μ m フ

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遠心で濃縮し、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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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。

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。

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

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

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.

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.

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。