

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05689

研究課題名(和文) E型肝炎ウイルスにおいて宿主細胞への侵入に関わる部分配列の合成的研究

研究課題名(英文) Synthetic studies of partial peptide sequences designed from hepatitis E virus capsid proteins that are expected to be involved in immune response and invasion into host cells

研究代表者

奥 浩之 (Oku, Hiroyuki)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：20301749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では2010年頃からHEV(E型肝炎ウイルス)によるE型肝炎の患者報告数が急増している。我々は太田市八王子丘陵と金山丘陵に生息するニホンイノシシのHEV感染状況のモニタリングやエピトープ配列の探索を目的として、ウイルス蛋白から設計したペプチド配列とイノシシ血清の反応性に注目することで検討を行った。特にORF2構造蛋白から設計したいくつかの短鎖ペプチドを用いて、1G(エチレングリコールジメタクリレート)と2G(ジエチレングリコールジメタクリレート)を用いた高分子微粒子材料を作成してラテックス凝集試験による抗体検出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E型肝炎は地球規模の感染症であり、WHOによると年間2,000万人の感染者と330万人の急性患者が発生し、およそ44,000人の死亡者数が推定されている。わが国でも患者報告数が急増しており、2019年は過去最高(493件)を記録。現在は、その他のA・B・C型ウイルス性肝炎と比較しても、最大の届出数を占めるようになってきている。このように世界的に早急な対策が求められているが、E型肝炎ウイルスの効率的な培養が難しいため、感染や増殖メカニズムにも不明な点が多い。そこで我々は、これまでの合成ペプチドを用いたワクチン・検査キット・感染メカニズムの研究方法を生かして、化学的な視点から研究を実施した。

研究成果の概要(英文)：Latex agglutination (LA) test is a simple immunoassay system and only needs microplate and antigen-coated nano-spheres to measure antibody levels, such as, compared to the cutting-edge microarray technologies, which usually requires a good laboratory facility. Previously, we have reported LA materials aiming for the antibody level diagnosis in the case of malaria infection using Diethylene Glycol Dimethacrylate (2G) and Methacryloyl Succinimide Ester (MA-OSu) copolymerized micro-spheres and immobilization of the synthetic peptides designed from parasite proteins. In this research grant, we conducted mainly sero-epidemiological and structural studies of hepatitis E virus (HEV) using 96 wild boars (*Sus scrofa*) captured in Hachioji & Kanayama hilly area located in Ota city, Gunma prefecture from August 2018 to July 2020.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ペプチド 検査キット 抗体 E型肝炎 感染症 エピトープ イノシシ 群馬県太田市

## 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は地球規模で患者が発生しており、WHOの報告によると年間2,000万人の感染者と330万人の急性患者が発生し、およそ56,600人の死亡者数が推定されている感染症である。一方で隠れた感染者も多いと考えられ、わが国でも患者数が急速に増加しており、2019年は過去最高の報告数(493症例)を記録した。すなわち世界的に早急な対策が求められているが、E型肝炎ウイルスは培養細胞による増殖法が樹立されていないため、ワクチン用弱毒株の作成が進んでいない。研究用にはブタやサルを用いた大がかりな感染モデルも用いられている。そのため感染や増殖メカニズムには不明な点が多い。



感染を制御する方法として中国で開発されてきたウイルス外殻蛋白粒子(VLP)によるワクチンを用いることもできるが、安全性・免疫原性・有効性に関する十分な情報が得られていないことから、現在でもWHOはワクチンの集団接種や定期接種を推奨していない。

このように、E型肝炎対策のためには、感染・防御メカニズムの解明に向けた新しい研究方法や、新しい視点によるワクチンの開発が求められている。



## 2. 研究の目的

我々は、これまでに行ってきた、合成ペプチドを用いたマラリアワクチン・検査キット・感染メカニズムに関する独創的な研究方法を生かして、E型肝炎ウイルスに代表される病原微生物に応用し、化学的な視点からワクチン・検査キット・感染メカニズムについての研究実施を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (3-1) E型肝炎ウイルス(HEV)蛋白の部分ペプチドを合成

E型肝炎ウイルス蛋白配列を参考にしてエピトープペプチド配列を合成した。初めに、宿主細胞への感染や防御免疫に関わると考えられるORF2蛋白P-domain(145残基)について既知のエピトープ部位を参考に合成を行った(ORF2A, ORF2B, ORF2C, ORF2D)。各配列は血清抗体検出用ELISAプレートへの固相化を均一にさせるため、Lys残基をC末端に付与した。

### (3-2) 発疹チフス群リケッチア蛋白の部分ペプチドを合成

本研究に関連してブタやイノシシに寄生するマダニを介してヒトへ感染することが知られ

ている発疹チフス群リケッチアについて、試験的に Omp-B 蛋白の配列をもとにして 14 残基ペプチド配列 (KV14, KL14) の合成を行った。

(3-3) 日本脳炎ウイルス (JEV) 蛋白の部分ペプチドを合成

本研究に関連してブタやイノシシに感染することが知られている JEV について、試験的に NS-1 蛋白の配列をもとにして 12 残基ペプチド配列 (TL12) の合成を行った。

(3-4) 豚流行性下痢ウイルス (PEDV) 蛋白の部分ペプチドを合成

本研究に関連してブタやイノシシに感染することが知られている PEDV について、試験的に N 蛋白と S 蛋白の配列をもとにして 14 残基と 16 残基のペプチド配列 (QK14, SE16) の合成を行った。

(3-5) 豚熱ウイルス (CSFV) 蛋白の部分ペプチドを合成

本研究に関連してブタやイノシシに感染することが知られている CSFV について、試験的に NS2 と E<sup>rns</sup> 蛋白の配列をもとにして 13 残基と 14 残基のペプチド配列 (CSFV3, CSFV4) の合成を行った。

(3-6) 抗体価測定に用いる高分子微粒子を合成

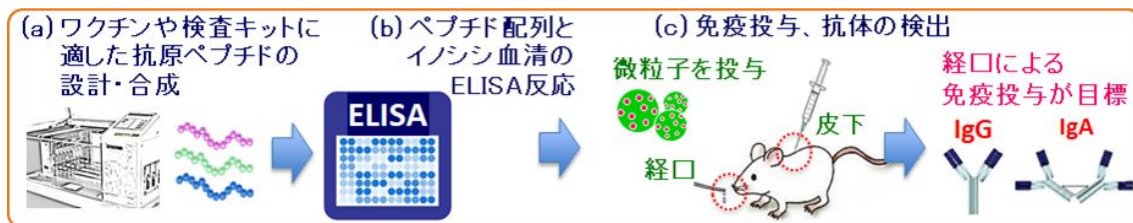
イノシシのように野生動物から野外で採取された血清は必ずしも清潔ではない場合が多い。ELISA 法は高感度である反面、夾雑物の混入による非特異反応を起こしやすい。そこでラテックス凝集法による抗体価測定を行うために 1G (エチレングリコールジメタクリレート) または 2G (ジエチレングリコールジメタクリレート) とメタクリル酸スクシンイミドエステル (MA-OSu) を共重合させた微粒子を作成した。得られた微粒子はペプチド溶液と混合することで微粒子表面への化学修飾を行った。

(3-7) 合成ペプチドとイノシシ血清の反応

合成された様々なペプチド配列とイノシシ血清の反応性を ELISA 法とラテックス凝集法により比較と解析を行った。血清中の IgG と強く反応するペプチド配列 (血清抗体価の高い配列) について検証を行った。

(3-8) 経口ワクチンに用いる微粒子の作成

ペプチド抗原を皮下や経口で免疫投与するために用いる高分子微粒子について、W/O/W エマルジョン法によって作成した。



#### 4. 研究成果

(4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5) 様々な病原微生物に由来するペプチド配列の合成

各ペプチド配列の合成を行い、精製後は HPLC 測定と質量分析法によって目的物であることを確認した。

(4-6) 抗体価測定に用いる高分子微粒子を合成

合成した各ペプチド配列を微粒子表面への化学修飾を行った。微粒子表面に担持されたペプチド量について HPLC 測定などにより検証を行った。1mg の微粒子におよそ 3-4ug のペプチド鎖が担持されていると明らかとなった。

(4-7) 合成ペプチドとイノシシ血清の反応

合成された様々なペプチド配列とイノシシ血清の反応性を ELISA 法とラテックス凝集法により比較した。溶血の進んだ血清においては ELISA 法よりもラテックス凝集法が適していると明らかになった。血清中の IgG と強く反応するペプチド配列 (血清抗体価の高い配列) を決定するために必要なネガティブコントロール配列として CSFV3・CSFV4 ペプチドは適していることが明らかとなった。(2022 年現在では CSF 感染が群馬県まで進行しているため、新しい配列が必要。) 予備的な実験ではあるが、JEV と PEDV のウイルス粒子と反応性を比較したところペプチド鎖の反応性と良い相関が得られることが明らかとなった。

(4-8) 経口ワクチンに用いる微粒子の作成

ペプチド抗原を内包させた高分子微粒子を、皮下投与による予備実験であるが、IFA アジュバントと同程度の抗体価を得ることができた。

(4-9) 今後の展望

本研究課題について、様々なペプチド鎖を設計・合成することで当初予期していないような配列でも反応することが明らかとなった。また、微粒子を用いた抗体価測定は野外で採取された血清に適していることが明らかとなった。今回例示した病原体についてイノシシへの感染の有無については、血清とペプチド鎖の反応のみで結論することはできない。今後の様々な方法で慎重に検証する必要はあるが、当初予期していない新しい知見を得ることも期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 奥 浩之・中山大地・芝尾穂高・片山 豪	4. 巻 26
2. 論文標題 群馬県太田市と桐生川において採取したニホンイノシシ ( <i>Sus scrofa leucomystax</i> ) の糞を用いたDNAバーコーディングによる植物食性の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 群馬県立自然史博物館研究報告	6. 最初と最後の頁 137-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 奥 浩之・中山大地・芝尾穂高・片山 豪	4. 巻 25
2. 論文標題 群馬県太田市吉沢町におけるニホンイノシシ ( <i>Sus scrofa leucomystax</i> ) の植物食性についてDNAメタバーコーディングによる解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 群馬県立自然史博物館研究報告	6. 最初と最後の頁 111-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Oku, Kaito Takeda, Yuya Tatsumi, and Yuko Oku.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Peptide Conjugated Microspheres Newly Designed from Hepatitis E Virus Capsid Protein to Improve Their Reactivity Against Sera from Wild Boars	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 143-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Oku, Yusuke Hori, Minoru Yamaji, and Yuko Oku	4. 巻 2020
2. 論文標題 Synthetic Peptides Designed from Hepatitis E Virus Capsid Protein and Their Reactivity Against Sera from Wild Boars in Gunma Prefecture, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中島彩奈・奥 浩之・茂木和弘・白石洋一	4. 巻 9
2. 論文標題 深層学習と動体検出を組み合わせた動画からの害獣認識手法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 産業応用工学会論文誌	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12792/jjiaae.9.1.38	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 奥 浩之・山路 稔・中沢信明・白石洋一・茂木和弘	4. 巻 2020
2. 論文標題 太田市内に生息するニホンイノシシの調査	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 国立大学法人群馬大学 環境報告書 2020	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 奥 浩之・山路 稔・片山 豪	4. 巻 24
2. 論文標題 群馬県太田市八王子丘陵・金山丘陵に生息するニホンイノシシ (Sus scrofa leucomystax) の腸内容物を用いたDNAメタバーコーディングによる食性解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 群馬県立自然史博物館研究報告	6. 最初と最後の頁 69-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hotaka Shibao, Daichi Nakayama, Minoru Yamaji, Yuko Oku, Hiroyuki Oku	4. 巻 2019
2. 論文標題 Development of Peptide Immobilized Nano-Spheres and Detection of Antibodies to Japanese Encephalitis Virus in the Wild Boars in Gunma Prefecture, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 163-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中島彩奈・奥浩之・茂木和弘・白石洋一
2. 発表標題 害獣認識システムにおける天候対応可能な検出手法の検討
3. 学会等名 エレクトロニクス実装学会第36回春季講演大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥 浩之・堀 祐輔・山路 稔・奥 裕子
2. 発表標題 E型肝炎ウイルスORF2 Capsid Proteinのアミノ酸配列から設計した抗体検査材料とニホンイノシシ血清との反応性について
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥 浩之
2. 発表標題 研究紹介
3. 学会等名 第34回群馬大学理工学企業懇談会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 (13)奥 浩之・立見祐哉・武田海大・長谷川諒・片山 豪
2. 発表標題 群馬県太田市におけるアライグマ・ハクビシン・ニホンイノシシの調査
3. 学会等名 ぐんまの自然の「いま」を伝える報告会（群馬県立自然史博物館）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥 浩之・中山大地・芝尾穂高・武田海大・立見祐哉・山路 稔・関口雄紀・中沢信明・片山 豪
2. 発表標題 群馬県太田市に生息するニホンイノシシの調査
3. 学会等名 ぐんまの自然の「いま」を伝える報告会（群馬県立自然史博物館）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口雄紀・中沢信明・奥 浩之
2. 発表標題 オプティカルフローを用いた動画像からの小動物の検出
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス 講演会 2020 in Kanazawa
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Oku
2. 発表標題 Proposal of peptide-containing nano/micro-spheres and their immunological application for vaccines and the diagnostic material
3. 学会等名 生化工程国家重点実験室特別報告（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 浩之・山路 稔，太田市
2. 発表標題 太田市内でのイノシシ食害や血液の化学的な研究
3. 学会等名 産官学連携の推進事業 受託報告シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotaka Shibao, Daichi Nakayama, Minoru Yamaji, Yuko Oku, Hiroyuki Oku
2. 発表標題 Development of peptide immobilized nano-spheres and detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Ota city.
3. 学会等名 4th International Conference on Advanced Engineering and Its Education in 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daichi Nakayama, Hotaka Shibao, Minoru Yamaji, Yuko Oku, Hiroyuki Oku
2. 発表標題 Ticks and serosurvey of anti-Rickettsia spp. antibodies in wild boars (Sus scrofa) of Ota City.
3. 学会等名 4th International Conference on Advanced Engineering and Its Education in 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotaka Shibao, Daichi Nakayama, Minoru Yamaji, Yuko Oku, Hiroyuki Oku,
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF PEPTIDE IMMOBILIZED NANO-SPHERES AND DETECTION OF ANTIBODIES TO JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS IN THE WILD BOARS IN GUNMA PREFECTURE, JAPAN
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川 諒・武田海大・立見祐哉・奥 浩之・奥 裕子
2. 発表標題 インフルエンザウイルスの部分ペプチド配列を用いた抗体検査材料およびニホンイノシシ血清との反応性
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 武田海大・立見祐哉・奥 浩之・奥 裕子
2. 発表標題 E 型肝炎ウイルスの部分ペプチド配列を用いた抗体検査材料およびニホンイノシシ血清との反応性
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立見祐哉・武田海大・奥 浩之・奥 裕子
2. 発表標題 PEDV ウイルス蛋白・部分ペプチドを用いた抗体検査材料およびニホンイノシシ血清との反応性
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝尾 穂高・中山 大地・山路 稔・奥 裕子・奥 浩之
2. 発表標題 太田市にて捕獲されたニホンイノシシ血清を用いた日本脳炎ウイルス抗体の検出
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 大地・芝尾 穂高・山路 稔・奥 裕子・奥 浩之
2. 発表標題 太田市にて捕獲されたニホンイノシシ血清を用いたリケッチア抗体の検出
3. 学会等名 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 浩之・中山 大地・芝尾 穂高・山路 稔・片山 豪
2. 発表標題 群馬県太田市八王子丘陵・金山丘陵に生息するニホンイノシシ ( <i>Sus Scrofa leucomystax</i> ) のDNAバーコーディング法による食性解析
3. 学会等名 ぐんまの自然の「いま」を伝える報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関口雄紀・中沢信明・奥浩之
2. 発表標題 害獣用監視カメラの録画映像の自動分類
3. 学会等名 安全安心まちづくりセミナー in 桐生 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関口雄紀・中沢信明・奥浩之
2. 発表標題 オプティカルフローを用いた動画からの小動物の検出
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス 講演会 2020 in Kanazawa
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「太田市内に生息するニホンイノシシの調査」国立大学法人群馬大学 環境報告書2020 p.8 <a href="https://www.gunma-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/12/environmental_report_2020.pdf">https://www.gunma-u.ac.jp/wp-content/uploads/2020/12/environmental_report_2020.pdf</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
バングラデシュ	国立ダッカ大学薬学部			
中国	中国科学院過程工程研究所			