

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06407

研究課題名(和文) ノロウイルスの再感染に関する研究—動物疾患モデルを用いた検討—

研究課題名(英文) Study of feline-norovirus-infected cats after reinfection with the same strain.

研究代表者

高野 友美 (Takano, Tomomi)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：20525018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒトノロウイルスの感染動物モデルとしてネコノロウイルス感染猫を用いて解析した。ネコノロウイルスに対する抗体はその感染および胃腸炎の発症予防に重要であることが確認された。また我々はネコノロウイルスの発症予防に関わる抗体が認識する部位を特定した。さらにヒトのノロウイルス検査キットがネコノロウイルスを検出できることが確認された。今後はノロウイルスのウイルスの感染中和に関わるエピトープが実際に存在するか否かを検討するとともに、様々なノロウイルスに対して有効性を示すユニバーサルワクチンの開発に向けて研究を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノロウイルスは感染性胃腸炎の原因の一つである。世界では年間約7億人がノロウイルス感染症に罹患しており、約20万人が死亡している。ノロウイルス感染症の流行に伴う経済的損失は約7兆円であり、社会的・経済的に大きな問題となっている。現在、ノロウイルスに対する有効な治療法および予防法は実用化されていない。本研究ではネコノロウイルスを用いた発症動物モデルにおいて抗体がノロウイルス感染症の発症に重要か否かを解析した。その結果、ある特定の領域を認識する抗体がノロウイルス感染症の発症を抑制する可能性が明らかとなった。本研究は、ヒトおよび伴侶動物のウイルス性胃腸炎を理解する上で重要な研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed feline norovirus-infected cats as an animal model of human norovirus infection. In this study, we confirmed that antibodies against feline norovirus are important for its infection and prevention of gastroenteritis. We were also able to identify the sites recognized by antibodies involved in the prevention of feline norovirus infection. Furthermore, it was confirmed that the human norovirus test kit was able to detect feline norovirus. In the future, we plan to investigate whether or not the epitopes involved in the infection neutralization of norovirus viruses actually exist and to develop a universal vaccine that shows efficacy against a variety of noroviruses.

研究分野：獣医感染症学、ウイルス学

キーワード：ノロウイルス 感染性胃腸炎 動物モデル 再感染 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

ノロウイルスは感染性胃腸炎の原因の一つである。世界では年間約 7 億人がノロウイルス感染症に罹患しており、約 20 万人が死亡している。ノロウイルス感染症の流行に伴う経済的損失は約 7 兆円であり、社会的・経済的に大きな問題となっている。日本国内では、2021-2022 シーズンにおいてノロウイルスに関連する感染性胃腸炎の報告数が増加しており、その動向が注視されている。日本国内では、病院、学校、介護施設、災害時の避難施設などでノロウイルス感染症が発生しており、最近では新型コロナウイルス感染症の陽性者宿泊療養施設において感染性腸炎が確認された。2022 年 3 月現在、ノロウイルスに対する有効な治療法および予防法は実用化されていない。

ノロウイルス感染症から回復した宿主は中和抗体の存在により再感染が防御されることが示唆されている。しかし、これらの知見は成人ボランティアを使用した感染実験に基づくものである。即ち、ノロウイルスに感染しやすい乳幼児、高齢者および免疫不全疾患の患者については再感染するか否かは不明である。また、ノロウイルス感染症は消化器系の局所感染症であるため、防御免疫が賦与されにくいと考えられる。実際に、局所感染症である RS ウイルス感染症は初回感染後において防御免疫が賦与されにくいいため、再感染が生じやすい。我々は GVI ネコノロウイルス感染ネコにおけるウイルスの再感染の有無について検討した。血中の抗ネコノロウイルス IgG 量はネコノロウイルスの再感染に対する抵抗性と相関し得ることが示唆された。しかし、抗ネコノロウイルス抗体を保有する猫であってもネコノロウイルスの感染を完全に防ぐことは出来なかった。即ち、宿主はノロウイルス同一株の再感染を許容し得ることが強く示唆された。

2. 研究の目的

ネコノロウイルス感染猫はウイルスの再感染を許容し得る。再感染のメカニズムを知ることは、ヒトを含むノロウイルス感染症のワクチン開発において重要な項目である。本研究では、ネコノロウイルス感染予防における抗体の重要性について確認するとともに、ネコノロウイルス粒子における抗体誘導に関わる領域の存在を解析した。さらに、本実験を円滑に遂行するために、市販のヒトノロウイルス検査キットをネコノロウイルスの検出に応用できるか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) GVI ネコノロウイルス抗体を受身免疫した猫におけるウイルス再感染

猫に投与する IgG は GVI ネコノロウイルス感染猫の血漿から精製した。精製した IgG (0.4mg/head) を SPF 猫 3 頭に受身免疫(皮下投与)し、その 1 日後に GVI ネコノロウイルスを経口接種した。毎日臨床状態(体温測定含む)を観察するとともに、便やおう吐物がある場合はそれらを回収した。便やおう吐物はウイルス遺伝子量の測定に供試した。また、1 週間おきに採血を行い、採血した血液から得られた血漿を用いて抗 GVI ネコノロウイルス IgG を測定した。本動物実験の実験手順は、北里大学動物実験委員会の判断に基づき北里大学学長の承認を得ている(承認番号 18-104)。サンプルサイズは、過去の FNoV 感染モデルの経験に基づいて決定し、最小限の数のネコを使用した。

(2) GVI ネコノロウイルスの抗体結合線形エピトープの解析

GVI FNoV M49-1 株 (GVI FNoV M49-1 株: GemBank アクセッション番号 LC011950) の P ドメインを含む 24 個のオーバーラップ 20 mer ペプチドを合成した。過去の実験で採取した GVI FNoV 感染猫の回復期血漿 7 検体および SPF 猫の血漿 10 検体をペプチドベースの ELISA でスクリーニングした。ペプチドベースの ELISA は、以下の通りである; ELISA プレートに各ペプチドでコーティングした。ブロッキングバッファーでブロッキングした後、血漿サンプル希釈液 100 μ L をプレートに塗布し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。結合した抗体は、HRP 標識ヤギ抗猫 IgG で検出し、その後 o-フェニレンジアミン基質溶液でシグナルを検出した。反応は停止液で停止させ、ELISA リーダーで吸光度を測定した。GVI FNoV M49-1 の VP1 のホモロジーモデル構築は、GII.2 HNoV の VP1 の結晶構造 (PDB アクセッションコード: 60UC) をテンプレートとして、SWISS-MODEL homology-modelling server (<https://swissmodel.expasy.org/>) を使用した。

(3) 市販のヒトノロウイルス検査キットを用いたネコノロウイルスの検出

GVI.2 FNoV M81 株を実験的に接種した猫 2 頭から GIV FNoV 陽性の糞便サンプル 30 個を採取した。GIV FNoV 陽性糞便サンプルの 30 個は、前述のように GVI.2 FNoV に感染した猫から採取したものである。ノロウイルス陰性対照として、SPF ネコの糞便サンプルおよび FCV 陽性野外糞便サンプルを使用した。本動物実験の実験手順は、北里大学動物実験委員会の判断に基づき北里大学学長の承認を得ている(承認番号 17-032)。NoV 陽性対照として GII ヒト NoV 陽性糞便サンプルおよび GI ヒト NoV-陽性糞便サンプルを使用した。野外糞便サンプルは 2016 年から 2018 年にかけて日本の動物病院および動物保護施設の猫から収集されたものを使用した。サンプルからの RNA の単離は市販のキットを用いて製造者の説明書に従って糞便サンプルから Total RNA を単離した。糞便サンプルから分離した全 RNA を ReveTra Ace Reverse Transcriptase (TOYOBO,

Osaka, Japan)で逆転写し、製造元の指示に従って一本鎖の cDNA を生成した。ORF1-ORF2 断片の PCR 増幅は、特定のプライマー (COG1F/COG1R および COG2F+ALPF/COG2R) を用いて行った。サーマルサイクラーを用い、98 °C で 1 分間、72 °C で 5 分間の最終伸長を行い、DNA を増幅させた。GIV FNoV 特異的または GVI FNoV 特異的な定量 RT-PCR は以下の通りである; RNA-direct Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて、特異的プライマーとプローブにより RNA を逆転写し、増幅した。反応は、Step One Real time PCR system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて、48 ウェル PCR プレートに総量 20 µL/ウェルで、90 30 秒、61 20 分、95 1 分、その後 90 15 秒、61 1 分を 45 サイクル行った。RNA コピー数は Fronhoffs らの手順に従って算出した。FNoV RNA の検出は、市販のヒトノロウイルス検出キット (TaKaRa® qPCR Norovirus (GI/GII) Typing Kit; TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan) を用いて、メーカーのプロトコルに従い実施した。GII, GIV, GVI 型ノロウイルスの VLP の発現と精製については、まず糞便から分離した Total RNA を ReveTra Ace Reverse Transcriptase (TOYOBO, Osaka, Japan)で逆転写し、製造元の指示に従って第一鎖の cDNA を生成した。成熟キャプシド遺伝子 (ORF2 遺伝子全体) の PCR 増幅は、オリゴヌクレオチドプライマーを用いて行った。PCR 産物を pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) に挿入し、次に製造者の指示に従って pDEST10 に挿入した。得られたプラスミド (pDEST10-wVP1) を、製造業者の指示に従って、大腸菌 DH10Bac コンピテントセル (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) への形質転換によってパキユロウイルスゲノムに組み換えた。すべての構築物 (プラスミドとバクミド) は配列決定により確認された。パキユロウイルス発現 VP1 タンパク質は、Cellfectin II 試薬 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて Sf-9 細胞にバクミドをトランスフェクションすることにより作製した。VLP の精製は、VP1 タンパク質を発現するハツカネズミの上清を P1 ウイルスストックとして回収し、さらに P2 ウイルスストックとして増幅し、VLP を精製した。VLP の精製は Huhti らの方法を参考に行った。Briefly, P2 ウイルスストックを接種して 7 日後の Sf-9 細胞培養 (計 120 mL) を 10,000 xg, 20 min at 4°C で遠心分離した。4 g/mL 塩化セシウム (CsCl) で懸濁したペレットを 100,000xg, 2h at 4°C で遠心分離した。精製 VLP を含むフラクションをプールした。VLP の全タンパク質量を測定したところ、100 µg/mL に調整した精製 VLP を実験に使用した。イムノクロマト法については、市販のキットを用いて、メーカーの説明書に従って検査した。テストラインとコントロールラインの両方に 2 本のバンドが存在する場合、陽性であることを示す。コントロールラインのみが存在する場合は、陰性であることを示す。

4. 研究成果

(1) GVI ネコノロウイルス抗体を受身免疫した猫におけるウイルス再感染

ヒトノロウイルス感染に対する防御には液性免疫の関与が報告されている。ヒトにおける疫学調査によると、血清中の抗ヒトノロウイルス抗体価が高い人は、その抗体価が低い人と比べて下痢を発症する確率が低いことが報告されている。また、チンパンジーにおけるヒトノロウイルス感染実験では、ノロウイルス抗体の量と糞便中のウイルス排出量は負の相関関係があることが報告されている。我々は、ネコノロウイルス IgG 陽性猫は IgG 陰性猫と比べて再感染後のウイルス排出量が低下するとともに胃腸炎症状も軽減されることを確認した。これらを踏まえ、本研究では GVI ネコノロウイルス感染猫由来精製 IgG を SPF 猫に受身免疫して IgG がネコノロウイルスの感染防御に有効か否かを検討した。猫に投与する IgG は GVI ネコノロウイルス感染猫の血漿から精製した。精製した IgG を SPF 猫 3 頭に受身免疫 (皮下投与) し、その 1 日後に GVI ネコノロウイルスを経口接種した。受身免疫した 3 頭中 2 頭 (CAT.P20-2 および CAT20-3) においてウイルス接種時に IgG の存在が確認された。これらのうち、CAT.P20-2 はウイルス感染 7 日後において IgG が増加するとともに、他の 2 頭と比較して感染初期のウイルス遺伝子量が低い傾向が認められた。なお、CAT.P20-2 は臨床スコアも低値を示した。以上の結果より、ネコノロウイルス IgG が体内に一定量存在するとネコノロウイルスの増殖を抑制するとともに、胃腸炎症状も抑制する可能性が示唆された。

(2) GVI ネコノロウイルスの抗体結合線形エピトープの解析

我々は SPF 猫を用いてネコノロウイルス感染症の病態を研究している。この研究において、血中のネコノロウイルス IgG が上昇するとウイルス排出量が減少するとともに臨床症状も抑制されることを明らかにした。ネコノロウイルス IgG に関して、IgG 量の測定には VP1 の P1 domain と P2 domain の一部から成る組換えタンパク質 (VP1-2) を使用した。VP1-2 に反応する IgG にはネコノロウイルスの感染を中和する抗体が含まれる可能性をふまえると、VP1-2 にはウイルス中和に関するエピトープが存在することが推察される。そこで、VP1-2 のアミノ酸配列を基に 24 個の over-lapping peptide (20mer) を作製し、それらに対する血中ネコノロウイルス IgG の反応性を調べた。過去のネコノロウイルス感染猫由来血漿を用いて解析したところ、VP1pep-10 および VP1pep-20 とそれらの前後の peptide に対して IgG の反応が認められた。ネコノロウイルスの VP1 を SWISS-MODEL を用いて立体構造解析を実施したところ、これらの peptide がコードするアミノ酸は P2 domain のループ状の部分に位置していた。すなわち、ヒトノロウイルスにおいて中和抗体が反応する領域とほぼ一致することが確認された。

(3) 市販のヒトノロウイルス検査キットを用いたネコノロウイルスの検出

ネコノロウイルス感染猫における宿主免疫応答を解析する実験において、我々はウイルス遺伝子およびウイルス抗原の検出の標準法を設定することを検討した。すなわち、我々以外の研究グループもしくは臨床検査機関においても再現可能なネコノロウイルスの検出方法を確立することにした。これまで、ネコノロウイルスの検出方法として universal *Caliciviridae* primers (P289d/P290d) を用いた遺伝子検出法が主に実施されていた。残念ながら、この方法には三つの欠点がある。第一に、この方法は FNoVs だけではなく、FNoVs と同じ *Caliciviridae* に所属する vesivirus (feline calicivirus: FCV) の遺伝子も検出する。第二に、この方法で使用する these primers は rotaviruses の遺伝子を検出することが示唆されている。第三に、ウイルス以外の遺伝子を非特異的に検出しやすい。我々は、ヒトノロウイルスの検出において一般的に使用されている定量的 RT-PCR 法をネコノロウイルスの検出に応用できるか否かを調べた。さらに医療現場において使用されている市販のヒトノロウイルス検出用イムノクロマトキットでネコノロウイルス粒子を検出可能か否かについて検討した。我々が開発したネコノロウイルス遺伝子測定用の定量的 RT-PCR (FNoV qRT-PCR) と市販のヒトノロウイルス遺伝子測定用 qRT-PCR (HNoV qRT-PCR, TaKaRa) の遺伝子量の相関関係を調べた。なお、HNoV qRT-PCR には GII ヒトノロウイルスの検出に用いる primer/probe を使用した。2 頭の GVI ネコノロウイルス感染猫から得られた糞便サンプル (n=30) または 8 頭の GIV ネコノロウイルス感染猫から得られた糞便サンプル (n=30) をランダムに選択して qRT-PCR でウイルス量を測定した。GIV ネコノロウイルス感染猫から得られた糞便サンプルのウイルス量は FNoV qRT-PCR と HNoV qRT-PCR との間で強い相関関係が認められた ($r^2=0.8659$)。GVI ネコノロウイルス感染猫から得られた糞便サンプルにおいても同様の結果が認められた ($r^2=0.8538$)。ヒトノロウイルス検出用イムノクロマトキットはヒトノロウイルスの迅速診断法として応用されている。我々はこのキットで FNoV を検出できるか否かを調べた。最初にそれぞれのウイルス様粒子 (VLP) を作製し、それらに対する反応を調べた。ヒトノロウイルスおよびネコノロウイルス VLP のいずれもイムノクロマトキットで陽性反応を示した。一方、ノロウイルスと同じカリシウイルス科のウイルスであるネコカリシウイルス (精製ウイルス; $>10^7$ TCID₅₀/mL) はイムノクロマトキットにおいて陰性反応を示した。ネコノロウイルス陽性糞便サンプルに対するイムノクロマトキットの反応性を調べたところ、qRT-PCR でウイルス量が $>10^7$ copies/mL と判定された 2 つの糞便サンプルにおいて陽性の結果が認められた。SPF 猫の糞便サンプルおよび猫カリシウイルス感染猫糞便サンプルでは陰性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TAKANO Tomomi, WATANABE Haruna, DOKI Tomoyoshi, KUSUHARA Hajime	4. 巻 83
2. 論文標題 Detection of feline norovirus using commercial real-time RT-PCR kit for the diagnosis of human norovirus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 805-808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0703	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------