

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300141

研究課題名（和文） マウスノロウイルス感染症に関する総合的研究

研究課題名（英文） Comprehensive studies on murine norovirus infections in mice

研究代表者

久和 茂 (KYUWA SHIGERU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30177943

研究成果の概要(和文)：マウスノロウイルス(MNV)は2003年に報告された新規マウス病原体で、まだ不明な点が多い。血清あるいは分子遺伝学的方法を用いた疫学調査により、日本の実験用マウスコロニーにおいて MNV の感染がなり拡がっていることが見出された。診断法の改良として、組換え VP1 タンパク質を用いた ELISA 法の基盤を構築し、また簡便さ、速さ、検出感度に優れている RT-LAMP 法を開発した。近年動物実験施設の衛生管理に多用されている弱酸性次亜塩素酸水が MNV の不活化作用を持つことを見出した。デキストラン硫酸塩(DSS)誘発炎症性大腸炎モデル、あるいはマウス肝炎ウイルス(MHV)感染症モデルの実験結果を MNV 感染は修飾することが示された。

研究成果の概要(英文)：Murine norovirus (MNV) is a new murine pathogen reported in 2003, and there remains much to be clarified. It was found that MNV infection has spread to laboratory mouse colonies in Japan by the epidemiologic survey using serological and molecular genetical methods. To improve diagnostic methods, we developed the basis of the ELISA system using recombinant VP1 protein as antigen, and also an RT-LAMP method which was simple, speedy, and highly sensitive. Moreover, we demonstrated that hypochlorite-based disinfectants, which were commonly used in hygiene program for laboratory animal facilities in Japan, were effective in inactivation of MNV in vitro even in the presence of feces. It was shown that MNV infection modified the experimental results of dextran sulfate (DSS)-induced inflammatory bowel disease model as well as those of mouse hepatitis virus (MHV) infection model in mice.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：マウスノロウイルス、マウス、動物実験成績の修飾、微生物コントロール、疫学調査、弱酸性次亜塩素酸水、ウイルス遺伝子検出

1. 研究開始当初の背景

(1) マウスノロウイルス(MNV)は 2003 年に初めて報告された新しいマウスの病原体であり、ヒトノロウイルス(HNV)と同じカリシウイルス科ノロウイルス属に属する RNA ウイルスである。最初に分離されたウイルス株はマウスノロウイルス 1 型(MNV-1)と命名され、その後 MNV-2、MNV-3、MNV-4 などのウイルス株が分離されている。わが国においても、MNV-S7 株などが分離されている。

(2) MNV の疫学に関して、1) 北米の実験用マウスコロニーの血清サンプル中の 22.1% に MNV-1 に反応する抗体が検出されている。2) ヨーロッパで MNV は高い有病率を示し、ウイルスも分離されている。3) 我が国でマウス糞便を用いた RT-PCR 法により、実験用マウスコロニーにおける MNV 汚染が報告されている。4) 申請者らも MNV-S7 株を用いた ELISA システムを最近構築し、コンベンショナル環境で飼育されている国内の実験用マウスの血清を調べ、MNV の有病率がマウス肝炎ウイルス(MHV)や肺マイコプラズマよりも高いことを明らかにした。

(3) MNV はインターフェロン系の機能不全マウスにおいて致死的な感染を起こす。それらのマウスでは肝炎、間質性肺炎、腹膜炎、胸膜炎などが認められている。一方、免疫学的に正常なマウスでは不顕性感染である。動物個体内での MNV の持続感染性については、すぐに排除されるウイルス株(MNV-1)と持続するウイルス株(MNV-2, MNV-3, MNV-4)があると報告されている。MNV の主要な標的臓器は腸管膜リンパ節、腸管、脾臓などであり、それらの臓器のマクロファージや樹状細胞でよく増殖する。

(4) 診断法は ELISA 法、間接蛍光抗体法などの血清学診断が一般的であり、RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出も有効である。上述の如く、通常マウスでは不顕性感染であるため特徴的な臨床症状はなく、臨床所見による診断はできない。また病理組織学検索による診断も容易ではないとされている。

(5) MNV の動物実験成績への影響に関する報告はまだあまり多くない。Mdr1a 欠損マウスに *Helicobacter bilis* を感染させる炎症性大腸炎 (IBD) モデルがあるが、MNV 感染がこの IBD モデルの病態を増悪することが報告されている。MNV 感染による免疫系の変調が関係しているのではないかと疑われている。一方、MNV はマウスのインフルエンザウイルス感染症の病態に影響しなかったと報告されている。

2. 研究の目的

(1) MNV に関する情報は漸増しつつあるが、病因、疫学、臨床症状、病理、診断法、感染防御

対策および動物実験成績への影響に関する情報はまだ不足している。1) これまで分離された MNV は弱毒であるが、強毒の MNV は存在しないのか。2) 国内のバリア環境で飼育されているマウスの MNV 感染に関する調査は不十分である。3) 野性マウスは MNV に感染しているのか。4) 幼弱マウスの MNV に対する感受性は報告されていない。5) MNV に対する感受性の系統差は不明である。6) MNV の動物個体における持続感染性を決定している機序は不明である。7) MNV の宿主細胞を決定している因子はまだ明らかにされていない。8) 血清学診断と遺伝子診断の相関に関する検討は十分ではない。9) MNV の動物実験成績への影響に関する報告は少なく、いろいろな実験系において検討しデータを積み上げていく必要がある。

(2) 本研究ではこれらの疑問点、問題点を解決すべく多角的なアプローチによる MNV 研究を行う。主なものとして、1) MNV の疫学調査、新規 MNV の分離、2) マウスにおける MNV 感染症の病態解析および動物実験成績への影響の評価などを行う。そこから得られる情報により MNV 感染症を総合的に理解に基づく MNV の微生物統御法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MNV の疫学調査を行うために、その材料となるマウス血清、マウス糞便を収集した。マウス血清は ELISA 法、蛍光抗体法などの血清診断に、マウス糞便は RT-PCR 法などのウイルス遺伝子の検出に用いた。

(2) 診断・検出法の改良という観点から、MNV のウイルス構成タンパク質 VP1 の組換えタンパク質を抗原とする ELISA 法の開発、ならびに RT-LAMP 法による MNV 遺伝子の検出について検討した。

(3) MNV の病原性を調べるために実験感染を行った。マウスは C57BL/6J マウスなどの近交系マウス、および遺伝子改変動物 (IFN- γ 欠損マウス、IRF-3/7 欠損マウスなど) を用いた。接種経路は自然感染のルートと考えられる経口感染を主に用いたが、腹腔内接種、脳内接種なども一部行った。肝臓や腸管、腸間膜リンパ節などを採材し、病理組織学的検索を行うとともに免疫組織化学法により、ウイルスタンパク質の発現を検討した。

(4) 実験動物施設で近年良く用いられている弱酸性次亜塩素酸水の MNV 不活化作用について、*in vitro* および *in vivo* の実験系を用いて検討した。

(5) MNV の動物実験に対する影響について、2 つの実験系について検討した。1 つは DSS 誘

発炎症性大腸炎モデルであり、2 つ目はマウス感染ウイルス感染症モデルである。

4. 研究成果

(1) 国内の実験動物施設のマウス血清について抗 MNV 抗体の有無を血清学的検査により検討したところ、コンベンショナルマウスでは約 30%、バリア区域で飼育されていたマウスでは約 3%の割合で抗 MNV 抗体が検出された。糞便からのウイルス遺伝子の検出を行ったところ、やはり高率に陽性反応が得られた。VP1 および VP2 の遺伝子配列を検索したところ、国内にも多様なウイルスが存在することが明らかとなった。しかし、分子遺伝学的に既存の MNV から大きく離れたウイルスは見つかっていない。

(2) 大腸菌でのコールドショック発現とシャペロン共発現を併用した pCold TF ベクターを用いて、MNV VP1 の可溶性タンパク質の大量発現系を作成した。SDS-PAGE により約 110kDa の目的とする単一のバンドを確認した。抗 MNV 免疫血清や感染 MNV 血清を用いたウェスタンブロッティング解析により、特異的な反応が得られた。精製 VP1 タンパク質を抗原とする ELISA の系を確立する予定である。また、GenBank に登録されている 71 株の MNV の塩基配列をもとに RT-LAMP 法を開発した。簡便さ、速さ、検出感度に優れているので、最も実用的な MNV 検査法になることが期待される。

(3) MNV-S7 株を経口接種、腹腔内接種、脳内接種を行ったが、いずれの接種経路においても何らかの臨床症状を示すマウスはいなかった。死亡マウスもいなかった。腸管や肝臓などの主要臓器の病理組織学検索を行ったが、MNV-S7 株の感染による病変は見いだせなかった。IFN- γ 欠損マウスや IRF-3/7 欠損マウスに接種したが、やはり臨床症状は見られず、また病理組織学的変化はほとんど見いだせなかった。抗 VP1 抗体を用いた免疫組織化学法によりウイルスタンパク質の発現を検討したところ、I 型インターフェロンの産生が抑制される IRF-3/7 欠損マウスの腸間膜リンパ節には多数のウイルス抗原が認められたが、野生型および IFN- γ 欠損マウスにはウイルス抗原がほとんど検出されなかった。

(4) 弱酸性次亜塩素酸水は 30 秒の反応で MNV を不活化した。有機物の影響を調べるために、マウス糞便乳剤存在下で検討したところ、ウイルス価は $2.3\log_{10}$ 減少した。しかし、反応時間を 5 分に延長したところ、ウイルス力価は $5\log_{10}$ 以上減少し、*in vitro* の実験系で弱酸性次亜塩素酸水は MNV 不活化作用を持つことが示された。弱酸性次亜塩素酸水を飲水として用いることで、MNV の感染を防御できるか検討したが、感染を阻止することはできなかった。

(5) 1.5%デキストラン硫酸塩 (DSS) を 16 日間 C57BL/6J マウスに経口投与するモデルにおいて、MNV 感染は炎症性大腸炎を抑制した。IRF-3/7 欠損マウスを用いて、同様の実験を行ったところ、やはり MNV 感染は炎症性大腸炎を抑制した。IRF-3/7 欠損マウスは I 型インターフェロンを産生が抑制されていることから、MNV 感染による炎症性大腸炎の抑制には I 型インターフェロン以外の要因が関与していることが示唆された。MHV-A59 株感染モデルに対する MNV 感染の影響を調べたところ、MNV 感染は MHV 感染を抑制することが示された。MNV 感染マウスにおいて抗 MHV 中和抗体の上昇が認められ、このことが MNV 感染マウスの MHV 感染の病態進展を抑制している 1 つのメカニズムとして考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Ishikawa H, Awano N, Fukui T, Sasaki H, Kyuwa S. The protective effects of lactoferrin against murine norovirus infection through inhibition of both viral attachment and replication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 (in press). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.013.

(2) Takimoto K, Sakai K, Takagi H, Tohya Y, Yamada, Y. Effect of Hypochlorite-based Disinfectants on Inactivation of Murine Norovirus and Attempt to Eliminate or Prevent Mice from Infection by Drinking Water. *Exp. Anim*. 2013 (in press).

(3) Hanaki K, Ike F, Hatakeyama R, Hirano N. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification for the detection of rodent coronaviruses. *J Virol Methods*. 2013 187:222-227. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.10.008.

(4) Aoki H, Kaneko A, Kajita A, Yamagata Y, Ike F, Kase H. "An On-Site Serology Monitoring System for Laboratory Mice Using a Multiplex Microfluidic Chip Fabricated by the Electrospray Deposition Method." *J Chem Eng Jap*. 2012. 45: 528-538. doi:10.1252/jcej.12we017.

(5) 久和茂、マウスにおけるマウスノロウイルス感染、*アニテクス*、2011、23 巻 27-28. doi:無し

(6) 池郁生、マウスノロウイルス、実験動物ニュース、2011、60:1-3. URL <http://jalas.jp/journal/60-1.pdf>

(7) 久和茂、マウスノロウイルス感染症、日本実験動物技術者協会九州支部会報、2010、34:1-6. doi:無し

[学会発表] (計 21 件)

(1) Kyuwa S. Murine norovirus infection in mice and its influence on animal experiments. 2013 KALAS International Symposium. Aug 23, 2013. Jeju, Korea.

(2) 滝本一広、田原口元子、酒井宏治、高木弘隆、山田靖子、塩素系消毒薬のマウスノロウイルス不活化効果と消毒薬の飲水による MNV 排除および MNV 感染防御の試み 第 60 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 15 日、つくば国際会議場、茨城県

(3) 酒井宏治、久和茂、池郁生、駒瀬勝啓、竹田誠、網康至、組換えマウスノロウイルス VP1 タンパク質を用いた血清学的検査法開発の試み、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 日、岩手大学(岩手県)

(4) 花木賢一、酒井宏治、池郁生、久和茂 RT-LAMP 法によるマウスノロウイルスの検出、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 14 日、岩手大学、岩手県

(5) Ike Fumio. Emerging microbiological contamination and its detection techniques in mice; Information from the quarantine at a mouse bank. 2012 KALAS International Symposium. Aug 23, 2012, Buyeo, Korea.

(6) 石田智子、林元展人、亀田周子、田中舞、内田立樹、小澤碧、池郁生、許祐銘、呉銘芳、高倉彰、マウスノロウイルスとマウスアデノウイルス 2(K87 株)の抗体検査、第 59 回日本実験動物学会総会、2012 年 5 月 24 日、別府国際コンベンションセンター、大分県

(7) 池郁生、国内外の各研究機関から送られてきたマウスの汚染状況の実態とモニタリング検査項目の妥当性について、第 38 回国立大学法人動物実験施設協議会総会サテライトミーティング、2012 年 5 月 10 日、秋田キャッスルホテル、秋田県

(8) 池郁生、微生物コントロールに関する最近の動きについて、第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 28 日、大宮ソニックシティ、埼玉県

(9) 朴商鎮、豊島祐次郎、石井寿幸、久和茂、Progression of Mouse Hepatitis Virus Infection in C57BL/6J Mice is Altered by Coinfection with Murine Norovirus. 第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19 日、大阪府大、大阪府

(10) 池郁生、モニタリング対象微生物の生物学、第 108 回関西実験動物研究会、2010 年 12 月 10 日、みやこめっせ、京都府

(11) 久和茂、マウスノロウイルスについて、第 21 回東北実験動物研究会、2010 年 12 月 4 日、東北大学、宮城県

(12) Sakai K、Ike F、Ami Y、Suzaki T、Urano T、Yabuuchi T、Kurosawa T、Oka K、Katayama K、Yamada YK、Kyuwa S. Surveillance of murine norovirus in Japan. 4th AFLAS, Nov 9, 2010, Taipei, Taiwan.

(13) 田中志哉、北川洋大、朴商鎮、豊島祐次郎、石井寿幸、吉川泰弘、久和茂、マウスノロウイルス感染の DSS 誘発大腸炎モデルに対する影響、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 17 日、帯広畜産大学、北海道

(14) 久和茂、酒井宏治、田中志哉、北川洋大、朴商鎮、吉川泰弘、池郁生、浦野徹、藪内かおり、田島優、黒澤努、網康至、山田靖子、日本の実験用マウスコロニーにおけるマウスノロウイルスの感染状況、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 17 日、帯広畜産大学、北海道

(15) Ike F(他 8 名、1 番目) Microbiological status of mouse strains rederived at RIKAN BioResource Center in 2009. A Joint FELASA/Scand-LAS Symposium. Jun 14, 2010, Helsinki, Finland.

(16) 平岩典子、池郁生、目加田京子、長栄淳、伊集院麻衣子、梶田亜矢子、小澤雅司、岡本裕行、吉木淳、理研バイオリソースセンターにおける寄託マウスの清浄化とその効果、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日、京都テルサ、京都府

(17) 加藤花名子、國田智、池郁生、梶田亜矢子、Chiung-wen Liu、杉山文博、八神健一、組換え VP1 抗原を用いた蛍光マイクロビーズ法によるマウスノロウイルス抗体検査、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日、京都テルサ、京都府

(18) 國田智、加藤花名子、亀田周子、石田智子、高倉彰、後藤一雄、池郁生、有川二郎、大

(H23→H24)

沢一貴、杉山文博、八神健一、蛍光マイクロビーズ法によるマウス・ラット感染症のマルチプレックス抗体検査、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日、京都テルサ、京都府

(19) 酒井宏治、池郁生、浦野徹、中山博之、網康至、平井明香、須崎百合子、岡智一郎、片山和彦、山田靖子、迅速・簡便なマウスノロウイルス抗原検出方法の開発と分離株の分子系統学的解析、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日、京都テルサ、京都府

(20) 池郁生、マウス・ラット微生物検査の最近の話題、第 57 回日本実験動物学会総会・JALAM シンポジウム、2010 年 5 月 11 日、京都テルサ、京都府

(21) 久和茂、マウスノロウイルス感染症、第 33 回日本実験動物技術者協会九州支部総会、2010 年 4 月 17 日、熊本大学、熊本県

[図書] (計 1 件)

(1) 久和茂 (編著、共著)、朝倉書店、実験動物学、2013 年、191 頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/jitsudo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久和 茂 (KYUWA SHIGERU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 30177943

(2) 研究分担者

池 郁生 (IKE FUMIO)

(独) 理化学研究所・バイオリソースセンター・研究員

研究者番号: 40183157

酒井宏治 (SAKAI KOJI)

国立感染症研究所・ウイルス 3 部・研究員

研究者番号: 70515535

滝本一広 (TAKIMOTO KAZUHIRO)

国立感染症研究所・動物管理室・研究員

研究者番号: 70280766

(H23→H24)

山田靖子 (YAMADA YASUKO)

国立感染症研究所・動物管理室・室長

研究者番号: 10132846

(H23→H24: 連携研究者)

(3) 連携研究者

山田靖子 (YAMADA YASUKO)

国立感染症研究所・動物管理室・室長

研究者番号: 10132846