

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590613

研究課題名（和文） E型肝炎ウイルスの増殖機構の in vitro での解析と E型肝炎治療薬への応用  
 研究課題名（英文） In vitro analysis of the replication system of hepatitis E virus and application for anti-hepatitis E drugs.

研究代表者

石井 孝司 (Koji Ishii)

国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

研究者番号 40280763

研究成果の概要：

E型肝炎ウイルス(HEV)は、近年日本でもブタやイノシシの肉を食べることによる感染が多発し、早急な対策が望まれてきている。本研究では、ブタ肝臓より HEV を分離し、培養細胞系で増殖できるシステムを確立した。また、本クローンをカニクイザルに接種することにより肝炎を発症させることにも成功した。本クローンをを用いた培養システムは抗 HEV 剤のスクリーニングにも応用可能であり、E型肝炎の治療法の確立に役立つと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,200,000	0	2,200,000
20年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：7101

キーワード：食品衛生、ウイルス、肝臓病、ワクチン、治療薬

## 1. 研究開始当初の背景

E型肝炎は HEV が糞口感染することによって引き起こされる急性肝炎である。近年、HEV はブタ、イノシシなどの動物にも感染することが明らかになってきた。また、ウイルス血症の時期に感染者が献血した場合には輸血によって伝搬することも明らかになり、E型肝炎は水媒介性肝炎（water-borne hepatitis）、食品媒介性肝炎（food-borne hepatitis）だけではなく、輸血後肝炎（blood-borne hepatitis）の原因ウイルスであることが判明してきている。また、疫学的調査も近年精力的に進められており、HEV は我が国に土着したウイルスであることも明ら

かになってきている。もはや E型肝炎は希少な輸入感染症とは言えず、日本でも予防、治療研究への真剣な取り組みが必要になってきていると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では HEV のの生体内での複製メカニズムの解明を目指した。HEV を効率よく増殖させる細胞系を樹立することができれば、この系を用いて簡便な in vitro の阻害剤のスクリーニング系を構築することができ、急性 E型肝炎の治療薬の開発が可能となると考えられた。

### 3. 研究の方法

ブタ肝臓懸濁液をヒト肝癌由来細胞に接種し、HEVが増殖してきたサンプルより増殖性株を樹立した。本株からRT-PCR法を用いて全長のcDNAをクローニングし、接続して全長クローンを作成した。全塩基配列を決定し、この情報より定量PCR装置を用いた高感度HEV RNA測定系の検討を行った。一方、感染細胞の培養上清およびウイルスRNAをカニクイザルに接種し、本クローンの動物モデルへの感染性の検討を行った。

### 4. 研究成果

培養細胞系で増殖することができるHEVの全長cDNAをクローニングした。定量PCR装置を用いた高感度HEV RNA測定系の確立にも成功した。一方、感染細胞の培養上清をカニクイザルに接種し本クローンの動物モデルへの感染性の検討を行ったところ、サル便中に粒子の放出が確認され、本クローンがサルに感染性であることが証明された。また、培養上清中の粒子からウイルスRNAを精製しヒト肝臓由来細胞にトランスフェクションしたところウイルスの増殖と粒子の培養上清中への放出が確認され、RNAも感染性であることが示された。現在本クローンよりRNAを合成し、培養細胞に導入して感染性を示すかどうかの確認を行っており、クローンの感染性が確認できれば、reverse geneticsの手法を用いてHEVの増殖に重要な領域を調べることが可能になる。また、全長クローンの構造蛋白をコードする領域を薬剤耐性遺伝子に置換したレプリコンを作成し、RNAを合成して培養細胞に導入して薬剤耐性細胞の樹立に成功した。HEV増殖阻害剤のスクリーニングを本細胞を用いて行なうことができ、簡便に阻害剤のスクリーニングが行なえると考えられる。

### 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 23 件)

1. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. Neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model *Microbiology and Immunology* in press. (査読有)
2. Shirato H., Ogawa S., Ito H., Sato T., Kameyama A., Narimatsu H., Zheng X., Miyamura T., Wakita T., Ishii K. and Takeda N. Noroviruses distinguish type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *Journal of Virology* in press. (査読有)
3. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *Journal of Virology* 82: 7964-7976 (2008) (査読有)
4. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008) (査読有)
5. Murakami K., Kimura T., Osaki M., Ishii K., Miyamura T., Suzuki T., Wakita T. and Shoji I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytes. *Journal of General Virology* 89: 1587-1592 (2008) (査読有)
6. Murakami K., Inoue Y., Hmwe S., Omata K., Hongo T., Ishii K., Yoshizaki S., Aizaki H., Matsuura T., Shoji I., Miyamura T. and Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *Journal of Virological methods* 148: 174-181 (2008) (査読有)
7. Li T.C., Suzaki Y., Ami Y., Tsunemitsu H., Miyamura T. and Takeda N. Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection *The Journal of Veterinary Medical Science* in press
8. Hansman G.S., Oka T., Li T.C., Nishio O., Noda M. and Takeda N. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot.* 71: 1689-1695 (2008) (査読有)
9. Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., Arikawa J., Yagami K., Asano M., Tezuka H., Suzuki N., Kurosawa T., Furuya M., Mohri S., Sato H., Ohsawa K., Ibuki K. and Takeda N. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp Anim.* 57: 367-376 (2008) (査読有)
10. Wang C.Y., Miyazaki N., Yamashita T., Higashiura A., Nakagawa A., Li T.C., Takeda N., Xing L., Hjalmarsson E., Friberg C., Liou D.M., Sung Y.J., Tsukihara T., Matsuura Y., Miyamura T. and Cheng R.H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of recombinant hepatitis E virus-like particle. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64: 318-322 (2008) (査読有)
11. Suzuki T., Ishii K., Aizaki H. and Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59: 1200-1212 (2007) (査読無)
12. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Ageyama N., Chen Y., Lee J.-J., Nishina K., Maki N., Mizusawa H. and Akari H. Efficient regulation of viral replication by siRNA in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361: 294-300 (2007) (査読有)

13. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto N., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M. and Wakita T. NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *Journal of Virology* 81: 8030-8040 (2007) (査読有)
  14. Mizutani T., Fukushi S., Kenri T., Sasaki Y., Ishii K., Endoh D., Zamoto A., Saijo M., Kurane I., and Morikawa S. Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Archives of Virology* 152: 1019-1025 (2007) (査読有)
  15. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007) (査読有)
  16. Mizutani T., Endoh D., Shirato K., Shimizu H., Fukushi S., Saijo M., Sakai K., Kwang L., Ito M., Nerome R., Takasaki T., Ishii K., Suzuki T., Kurane I., Morikawa S. and Nishimura H. System for rapid determination of viral RNA sequence by ligation-mediated amplification and direct sequencing technology for emerging viral infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 322-324 (2007) (査読有)
  17. Li T.C., Scotti P.D., Miyamura T. and Takeda N. Latent infection of a new alphanodavirus in an insect cell line. *J Virol.* 81: 10890-10896 (2007) (査読有)
  18. Matsuura Y., Suzuki M., Yoshimatsu K., Arikawa J., Takashima I., Yokoyama M., Igota H., Yamauchi K., Ishida S., Fukui D., Bando G., Kosuge M., Tsunemitsu H., Koshimoto C., Sakae K., Chikahira M., Ogawa S., Miyamura T., Takeda N. and Li T.C. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol.* 152: 1375-1381 (2007) (査読有)
  19. Li T.C., Miyamura T. and Takeda N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 170-172 (2007) (査読有)
  20. 清原知子、石井孝司、脇田隆字 A型肝炎 臨床と微生物 35: 645-650 (2008)
  21. 李 天成、石井孝司、武田直和 E型肝炎と豚肉、鹿肉、猪肉の安全性 臨床とウイルス 36: 298-304 (2008)
  22. 白土東子、武田直和、石井孝司 ノロウイルスと血液型抗原との結合 遺伝子医学MOOK 11: 192-198 (2008)
  23. 石井孝司 遺伝子組換え生ワクチン 日本臨床 66: 1903-1907 (2008)
- [学会発表] (計 27 件)
1. Omi N., Akazawa D., Takahashi H., Morikawa K., Date T., Ishii K., Suzuki T. and Wakita T. Inactivated recombinant HCV particle (JFH1 strain) immunization of mice could induce antibody response. 2nd Vaccine Congress, Boston, December 7-9, 2008
  2. Ishii K. Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, November 1, 2008
  3. Li T.C., Ishii K. and Takeda N. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, October 6, 2008
  4. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
  5. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Li J., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, USA, October 5-9, 2008.
  6. Ishii K., Hasegawa H., Nagata Y., Ami Y., Fukushi S., Taguchi F. and Tsunetsugu-Yokota Y. SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
  7. Ami Y., Ishii K., Tsunetsugu-Yokota Y., Nagata Y., Hasegawa H. and Taguchi F. Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, June 22-27, 2008
  8. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Ishii K. and Wakita T. The important regions for RNA replication and infectious virus particle formation of JFH-1. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, September 11-15, 2007.
  9. Akari H., Ishii K., Iwasaki Y., Iijima S., Maki N., Mori K., Katakai Y., Kimura N., Yoshizaki S., Ageyama N., Yokota T., Suzuki T. and Miyamura T. Development of chronic GBV-B infection in marmosets with smoldering plasma viremia. 14th International Meeting on HCV and Related Viruses, Glasgow, Scotland, September 11-15, 2007.

10. Ishii K., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. 8th International Symposium on Positive-Strand RNA Viruses, Washington DC, USA, May 27-31, 2007.
11. 渋谷悠子、尾見法昭、中村紀子、石井孝司、脇田隆字：細胞培養系で作成したC型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の正常解析、第12回日本ワクチン学会、平成20年11月、熊本。
12. 清原知子、徳永英治、石井孝司、脇田隆字：A型肝炎ワクチンの*in vitro* 力価試験の検討、第12回日本ワクチン学会、平成20年11月、熊本。
13. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、村山麻子、伊達朋子、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCV粒子形成におけるNSSA蛋白の役割、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
14. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、森川賢一、伊達朋子、加藤孝宣、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生されたキメラ HCV ウイルス株およびJFH1株の免疫の検討、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
15. 赤澤大輔、森川賢一、尾見法昭、高橋 仁、中村紀子、深澤秀輔、伊達朋子、加藤孝宣、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：無血清培養による HCV 粒子の作成と精製工程の検討、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
16. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、佐藤隆、亀山昭彦、成松 久、脇田隆字、石井孝司、武田直和：ノロウイルスによる血液型抗原の識別、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
17. 石井孝司、村上恭子、ススムエー、張 斌、李 津、白倉雅之、森川賢一、鈴木亮介、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCVのsubgenomic repliconを持つウイルス様粒子の形成と放出、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
18. 町田早苗、西村順裕、吉崎佐矢香、石井孝司、清水博之：カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルスの検出とその分子疫学、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
19. 岩崎優紀、森 健一、榎 昇、石井孝司、飯島沙幸、吉田友教、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-B長期持続感染サルウイルスゲノム解析、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
20. 白土東子、熊谷安希子、伊藤浩美、佐藤隆、亀山昭彦、成松 久、脇田隆字、石井孝司、武田直和：ノロウイルスによる血液型抗原タイプ1、2構造の識別、第28回日本糖質学会、平成20年8月、つくば
21. 政木隆博、鈴木亮介、村上恭子、相崎英樹、石井孝司、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗：HCVの粒子形成におけるNSSA蛋白の役割、第44回日本肝臓学会総会、平成20年6月、松山
22. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI<sub>s</sub>の組換えSARS ワクチンとしての検討、第11回日本ワクチン学会、平成19年12月、横浜。
23. 尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、森川賢一、伊達朋子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字：細胞培養系により産生されたHCV ウイルスの免疫原性に関する検討、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。
24. 石井孝司、横田恭子、長谷川秀樹、永田典代、森川 茂、福士秀悦、水谷哲也、鈴木哲朗、田代真人、田口文広：高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DI<sub>s</sub>の組換えSARS ワクチンとしての検討、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。
25. 岩崎優紀、石井孝司、飯島沙幸、榎 昇、森 健一、吉崎佐矢香、木村展之、片貝祐子、揚山直英、鈴木哲朗、神奈木真理、宮村達男、明里宏文：C型肝炎サロゲート霊長類モデル：GBV-Bは新世界ザルに潜伏感染する、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。
26. 村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：HCV JFH-1株の複製および感染性ウイルス粒子形成に重要な領域の解析、第55回日本ウイルス学会、平成19年10月、札幌。
27. 伊達朋子、村山麻子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、野本明男、鈴木哲朗、脇田隆字：遺伝子型2a/2b間でのキメラウイルスの作製および性状解析、第55回

日本ウイルス学会、平成19年10月、  
札幌。

〔図書〕(計1件)

1. 石井孝司、李天成、武田直和 E型肝炎 食品由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

2007-167916 石井孝司他3名、UVによるC型肝炎ウイルスの不活化方法、2007年6月26日出願

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 孝司

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長  
研究者番号 40280763

### (2) 研究分担者

李 天成

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官  
研究者番号 90370957

武田 直和

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長  
研究者番号 90132894

### (3) 連携研究者

なし