

ウイルスは公衆衛生上最も重要な食中毒原因物質の一つであると考えられる。また、ノロウイルス食中毒の一事件あたりの患者数は 53.8 人で大規模食中毒を起こし易いことが知られている。

ノロウイルスは培養細胞や実験動物での増殖法が発見されていないが 1990 年にノロウイルスのプロトタイプである Norwalk/68/US のウイルスゲノムが単離されて以後相次いでノロウイルス株のウイルスゲノムが単離された。ノロウイルスはカリシウイルス科ノロウイルス属に分類されエンベロープを有さず、ウイルスゲノムは 3 ‘末端に polyA を持つ 1 本鎖 (+) RNA (約 7,700nt) で 3 つの翻訳領域 (ORF1、ORF2、ORF3) をコードしている。ORF1 は解裂して 6 つの非構造蛋白質となる複合蛋白質をコードしている。ORF2 はウイルス構造蛋白質 (VP1) をコードしている。ORF3 はウイルスゲノムのパッケージングに関与する可能性が報告されている VP2 をコードしている。遺伝子組み換えによりノロウイルスの ORF2 をバキュロウイルス等に組み込んで発現することによりウイルス様中空粒子の作出が可能である事が知られている (Jiang et al., Science, 1990)。一般に RNA ウイルスの抗原性が多様であることが知られているように、ノロウイルスにおいても遺伝的多様性および抗原性の多様性が報告されている。現在、ノロウイルスは ORF2 の塩基配列を基に 5 つの遺伝子群 (GI~GIV) からなる 25 種類以上の遺伝学的クラスター (遺伝子型) が存在することが知られている。ノロウイルスの外殻は抗原性を規定している単一の構造蛋白質 (カプシド) からなり、カプシド領域の分子系統解析によりノロウイルスは少なくとも 31 種類の遺伝子型に型別可能である事を報告されている。遺伝子組換えにより作出したウイルス様中空粒子を用いて作製した特異抗体とウイルス様中空粒子との反応性から、遺伝子型は抗原型に相当すると考えられた。これまでに作製されたノロウイルスに対する特異抗体は、遺伝子組換えにより作出したウイルス様中空粒子を用いて作製されており、抗体を作製するためにはウイルス遺伝子の単離・発現が必要であり抗体作製までに多くの時間を必要とし、得られた抗体は遺伝子型 (抗原型) に特異的なため多種類の遺伝子型 (抗原型) に対応するにはそれぞれ遺伝子型 (抗原型) のウイルス遺伝子の単離・発現が必要であった。

ノロウイルスのカプシドの構造は、Norwalk/68/US のウイルス様中空粒子の X 線結晶構造解析によるとカプシド蛋白二量体を形成しカプシドの基本分子となっており、土台として粒子形成にかかわる shell 領域 (50-225 番アミノ酸)、粒子表面に突出

した P1 領域 (226-278 番および 406-520 番アミノ酸)、さらにウイルスの抗原性を規定していると考えられている P2 領域 (279-405 番アミノ酸) の 3 つの領域からなる。研究代表者は大阪市立環境科学研究所および大阪市立大学医学部におけるこれまでの調査・研究において大阪市内において検出されたノロウイルスの分子系統解析を実施し、25 種類 (GI : 9 種類、GII : 16 種類) の遺伝子型に分類される事を報告してきた。小児のノロウイルス感染症およびノロウイルス食中毒事件から最も多く検出されたノロウイルス Bristol 型 (GII.4) をモデルにノロウイルスに対する抗ペプチド抗体の作製および有用性を検討した。ノロウイルス Bristol 型 (GII.4) のカプシド領域の予測アミノ酸配列を基にペプチドを化学合成し、ウサギおよびマウスに免疫し、ウサギ高度免疫抗体 (IgG 分画) およびマウスモノクローナル抗体 (特許出願第 318752 号) を作製した。また、ノロウイルスのカプシド予測アミノ酸配列の解析から、GI および GII 各遺伝子群特異的に相同性の高いアミノ酸配列を shell 領域に見出した。この GI ノロウイルスにおける遺伝子群特異的相同配列を基にペプチドを化学合成し免疫源として、同様にウサギおよびマウスに免疫し、ウサギ高度免疫抗体 (IgG 分画) およびマウスモノクローナル抗体 (特許出願第 188847 号) を作製した。これらの抗体を用いてサンドイッチ ELISA 法にて反応性を検討したところ、約 10^5 個のウイルス粒子があれば検出可能であることが判った。

2004 年 3 月から 4 月に大阪市内で流行したノロウイルス (GII.2) が、それまでに検出された GII.2 株と遺伝的に異なることを見出した。1976 年から 2005 年の間に、大阪市内およびオランダで検出された GII.2 型のノロウイルス 31 株の ORF2 全領域の塩基配列を決定し GeneBank に登録されている 5 株とともに系統解析を行ったところ、1994 年から 2005 年の GII.2 株は 1~3 年間の流行期間に相応して 5 つの遺伝的グループに分類され、予測アミノ酸配列から 5 箇所のアミノ酸 (245 番、342 番、344 番、364 番、440 番 ; P1 領域 2 箇所、P2 領域 3 箇所) がこれらの流行期 (あるいは株) に対応して順次置換し、さらに 1 箇所のアミノ酸 (345 番) が絶えず置換していることを見出した。さらに、コンピュータによる分子モデルの解析から 5 箇所のアミノ酸置換部位はカプシド表面に位置していた。これらのアミノ酸置換は免疫学的選択圧によるものと考えられた。また、同様のアミノ酸置換が 2006/2007 年流行株 (GII.4) の解析においても認められている。

2. 研究の目的

ノロウイルスは、世界各地において全年齢層

に及ぶ急性胃腸炎の主要な病原因子であり、国内においても毎年冬季にノロウイルスによる急性胃腸炎が流行している。しかしながら、ノロウイルスの培養方法が確立されていないことなどから、その病原性等について不明な点が多く残されている。本課題では、ノロウイルスのカプシッド領域のアミノ酸置換がもたらす抗原変異およびその病原性とノロウイルスの周期的流行の関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

各種遺伝子型ノロウイルス様中空粒子をバキュロウイルス発現系を用いて作出し、実験動物に免疫し、高度免疫血清を作製する。同様にマウスモノクローナル抗体の作出を試みる。

ノロウイルス GII.2 型については、回顧的疫学調査の結果に基づいて、周期的な各流行期に相当するよう部位特異的変異体を作成し、各種モノクローナル抗体との結合性を検討し抗原変異の有無を明らかにする。各流行期相当ウイルス様中空粒子を用いて、組織血液型抗原結合能を調べる。

ノロウイルス GII.6 型は、3つの遺伝学的クラスターに分類され、各クラスターでアミノ酸置換を伴う変異が集積しており、さらに連続した3アミノ酸の欠失・挿入が認められることから、これらの変異 GII.6 株のウイルスゲノムを単離しバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子を作成し、高度免疫血清およびマウスモノクローナル抗体の作製を行い、抗原変異の可能性について明らかにするとともに、組織血液型抗原結合能を調べる。

唾液中の組織血液型抗原をノロウイルス中空粒子の捕獲用に用いて、各種モノクローナル抗体との反応性を調べ抗原変異にあわせて組織血液型抗原結合能を検討する。

ノロウイルスの検出・分子系統解析を実施し(連携協力者)、特徴的な流行を示す遺伝子型を監視し、ノロウイルスの抗原変異の可能性について検討する。

4. 研究成果

ノロウイルス遺伝子型 GII.2、GII.3 および GII.4 の分離株からウイルス様中空粒子を作成し、これらを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。GII.2 ウイルス様中空粒子を免疫原として6クローン、GII.3 ウイルス様中空粒子から19クローン、GII.4 ウイルス様中空粒子から12クロンのモノクローナル抗体が得られた。これらのモノクローナル抗体は、免疫原用いたウイルス様中空粒子にのみ特異的に結合するクローン、免疫原に用いたウイルス様中空粒子および他の遺伝子型のウイルス様中空粒子に交叉反応を示すクローンが得られた。これらのことから、少なくとも免疫原に用いた遺伝子型 GII.2、GII.3 および GII.4 のノロウイルスには、そ

れぞれ遺伝子型特異抗原と共通抗原が存在することが示唆された。

ノロウイルス遺伝子型 GII.2 は、1999年/2000年、2001年-2003年、2004年、2008年に周期的に流行し、これらの GII.2 株は流行期毎にカプシッド領域にアミノ酸置換を蓄積していた。各流行期(99/00、01-03、04、08)に相当するウイルス様中空粒子を作成し、99/00 ウイルス様中空粒子および08 ウイルス様中空粒子に対するモノクローナル抗体を作製し、各流行期ウイルス様中空粒子との反応性を調べた。99/00VLP 免疫マウスから得られたモノクローナル抗体と各種ウイルス様中空粒子との結合性は、99/00 ウイルス様中空粒子特異的、99/00 ウイルス様中空粒子と01-03 ウイルス様中空粒子、08以外のウイルス様中空粒子、4流行期のウイルス様中空粒子に結合する4つのグループに分かれた。GII.2 株ではHBGA 結合部位のアミノ酸配列は保存されていたが、その周囲にアミノ酸置換の集積が認められたが、いずれの株もB型のHBGA とのみ結合した。このことから流行期毎の変異は抗原変異を伴っており、これらの株は抗体逃避変異体である可能性が示唆された。

大阪市内で検出されたノロウイルスの回顧的分子疫学的調査から、GII.4 型ノロウイルスが4つの遺伝的クラスターに細分可能であることを明らかにした。

1997年~2009年に大阪市内で検出された GII.6 型 46 株のカプシッド NS 領域の分子系統解析により3つの遺伝的クラスター(C1~C3)に細分され、2008/2009 流行期に多発した施設内集団発生由来 15 株中 13 株は C2 に属していた。各クラスターの遺伝学的変異と抗原変異を明らかにするために、各クラスター2株以上(計8株)のカプシッド領域を単離しバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子を作成し、マウスに腹腔内投与により免疫するとともにノロウイルスの受容体候補である組織血液型抗原(HBGA)との結合性について検討した。GII.6 型8株のカプシッドのアミノ酸配列の相同性は88.8~98.9%でアミノ酸置換の部位は各クラスター内において類似していた。いずれの株も組織血液型抗原結合部位は保存されていたが、C2 および C3 株において組織血液型抗原結合部位近傍に連続するアミノ酸3残基の欠失が認められた。C2 由来ウイルス様中空粒子に対するマウス高度免疫血清を用いて各種ウイルス様中空粒子との反応性を調べたところ各クラスターにおいて抗原性に差が認められた。抗原性を詳細に解析するために、各種ウイルス様中空粒子に対するモノクローナル抗体を用いたサンドウィッチ ELISA 法を検討したが確立には至らなかった。そこで唾液中の組織血液型抗原を捕獲用に用いた

ELISA 法では、検出抗体にモノクローナル抗体を用いた場合ウイルス様中空粒子を検出するに至らなかったが、高度免疫血清を用いることによりウイルス様中空粒子が検出可能となった。各クラスター由来 VLP は、ABO 血液型の各組織血液型抗原に結合できない株(C1)、ABO 血液型の各組織血液型抗原と結合できる株(C2)、血液型 A および B の組織血液型抗原と結合できる株(C3)に分かれ、各遺伝的クラスターで HBGA 結合能が異なっていた。各クラスター由来ウイルス様中空粒子の組織血液型抗原結合能を詳細に検討するために、部位特定変異導入により組織血液型抗原結合部位近傍のアミノ酸配列を入れ替えたキメラウイルス様中空粒子の作出を試みた。各キメラ変異体は、バキュロウイルス発現系を用いて VLP を作出できたことから、導入した変異は粒子形成に影響を及ぼさないと考えられた。これらキメラ変異体 VLP を用いた抗原性および HBGA 結合能の解析は期間内に終了しなかった。

ノロウイルスの分子系統解析により、検出数は少ないながら遺伝子群 I においてノロウイルス GI.7 型や GI.9 型、遺伝子群 IV 遺伝子型 1 (GIV.1) においても数年間隔で周期的な流行像が認められた。これらの株についても患者材料よりカプシド領域を含む遺伝子を単離しバキュロウイルス発現系を用いてウイルス様中空粒子を作出した。これらの遺伝子型についても抗血清を作製し、組織血液型抗原結合能を含めた各種性状を調べていく予定である。

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 5 件)

- ① Nakamura K, Kohda T, Seto Y, Mukamoto M, Kozaki S., Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins. *Veterinary Microbiology*, 162, 881-890, 2013 (査読有)
- ② Iritani N, Kaida A, Abe N, Sekiguchi J, Kubo H, Takakura K, Goto K, Ogura H, Seto Y., Increase of GII.2 Norovirus infection during the 2009-2010 season in Osaka city, Japan. *Journal of medical Virology*, 84, 517-525, 2012. (査読有)
- ③ Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S., The stability of toxigenicity in proteolytic *Clostridium botulinum* type B upon

serial passage. *Microbiology and Immunology*, 56, 338-341, 2012. (査読有)

- ④ Iritani N, Kaida A, Kubo H, Abe N, Goto K, Ogura H, Seto Y., Molecular epidemiology of Noroviruses detected in seasonal outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis in Osaka city, Japan, from 1996 - 1997 to 2008 - 2009., *Journal of Medical Virology*, 82, 2097-2105, 2010. (査読有)
- ⑤ Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S, A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A gene cluster typing. *Microbiology and Immunology*, 54, 308-312, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 大阪市内で検出された Norovirus GII.6 の抗原性および組織血液型抗原結合能について(第 60 回日本ウイルス学会総会、2012、大阪)
- ② ノロウイルスに効果のある食品添加物・食品素材の探索(第 3 回日本食品微生物学会学術総会、2011、福岡)
- ③ 抗菌複合における抗ウイルス効果(第 3 回日本食品微生物学会学術総会、2011、福岡)
- ④ 2009/10 シーズンに大阪市内で認められた GII.2 型ノロウイルスの流行(第 58 回日本ウイルス学会総会、2010、徳島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：ウイルス不活化組成物
発明者：國武広一郎、勢戸祥介
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2011-149576
出願年月日：平成 23 年 7 月 5 日
国内外の別：国内

名称：殺ウイルス組成物
発明者：田坂寛之、勢戸祥介
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2011-186419
出願年月日：平成 23 年 8 月 29 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
勢戸 祥介 (SETO YOSHIYUKI)
大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・

准教授
研究者番号：70270759

(2) 連携研究者
入谷 展弘 (IRITANI NOBUHIRO)
大阪市立環境科学研究所 研究員
研究者番号：70300994