

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450419

研究課題名(和文) フェレットHEV分子生物学とフェレットを動物モデルとしたE型肝炎発症機序の解析

研究課題名(英文) Molecular biology of ferret HEV and development of animal model for hepatitis E

研究代表者

李 天成 (Li, Tiancheng)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではフェレットHEVの抗体検査法を樹立し、実験用およびペットとして飼われたフェレットにおけるフェレットHEVの感染状況を調査した。その結果はフェレットHEVの感染は広い範囲で広がっていることが分かった。ただし、サルを用いた感染実験ではフェレットHEVは霊長類への感染可能性が非常に低いことが明らかになった。さらにフェレットHEVの全長配列を解析した上、フェレットHEVの細胞培養方法を樹立した。フェレットHEVの病原性の研究ではフェレットHEVに感染されたフェレットでは急性肝炎あるいは持続感染が引き起こされることを明らかにした。フェレットは肝炎の動物モデルとして可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study we using ferret HEV-LPs as antigen to examine ferret HEV-specific IgG and IgM antibodies and found that the wide distribution of ferret HEV infection in laboratory and pet ferrets and its likely introduction into Japan through importation. The complete genome of ferret HEV from laboratory ferrets imported from the United States was identified. A cell culture system for ferret HEV was established by using PLC/PRF/5 cells, and this system may be useful for understanding the mechanisms of replication, infection, immunization and virion morphogenesis of ferret HEV.

We also confirmed that that monkeys and rats are not susceptible to ferret HEV Infection, suggesting that the ferret HEV is not transmissible to humans. In addition, we confirmed that the ferret HEV infection induced acute hepatitis and persistent infection in ferrets, suggesting that the ferrets are a candidate animal model for immunological as well as pathological studies of hepatitis E.

研究分野：農学

キーワード：動物モデル 人獣共通感染症 フェレットHEV E型肝炎

1. 研究開始当初の背景

フェレット HEV はごく最近発見された新しい E 型肝炎ウイルスであるが、ウイルスの遺伝子配列以外の情報はほとんど知られていない。最近、我々はアメリカから輸入された実験用動物フェレットからフェレット HEV を検出することに成功した。フェレット HEV RNA が陽性である個体は ALT が高値を示すことから、感染フェレットでは肝炎が引き起こされていることが示唆された。さらに一部のフェレットではフェレット HEV の持続感染が観察されている。フェレットを動物モデルとしてその感染様式、持続感染の原因を解析できれば、ヒト HEV の感染および肝炎の発生機序解明、ワクチンの開発に大いに有用であると考えられる。

フェレットはペットとして飼育されており、インフルエンザウイルス等の実験動物モデルとして研究に使われている。したがって、フェレットの輸入とともにフェレット HEV も日本に輸入される可能性が高い。現時点では、フェレット HEV がヒトや他の動物に感染するかどうかはまだ不明である。実験動物における本ウイルスの病原性の有無を明らかにすることは国民の健康管理、実験動物および飼育者の衛生管理にとって重要である

2. 研究の目的

フェレット E 型肝炎ウイルス(HEV)はごく最近発見された新しい HEV であるが、その遺伝子情報、疫学、トロピズムなどについてはいまだ明らかにされていない。本研究では、フェレット HEV の遺伝子、分子生物学の性質を明らかにし、ウイルスの細胞培養系を樹立する。また、フェレット HEV の感染経路、感染宿主を同定し、人獣共通感染症としてのリスクを客観的に評価する。さらにフェレットを動物モデルとして、フェレット HEV による肝

炎発症機序、病理病態、持続感染および慢性肝炎の原因を明らかにし、ヒト HEV のモデルとして研究に必須な基礎データを提供する。

3. 研究の方法

(1) フェレットにおけるフェレット HEV の感染実態調査

実験動物やペットなどとして飼育されているフェレットの血清および糞便を集め、抗体検出 ELISA 法および RT-PCT 法を用いて、フェレットにおけるフェレット HEV の感染実態を明らかにする。

(2) アメリカ由来フェレット HEV の全長遺伝子配列の解析

フェレット HEV が陽性であるフェレット糞便からウイルス遺伝子を抽出し、RT-PCR 法を用いてウイルスゲノム全長遺伝子を増幅し、その遺伝子配列を同定する。フェレットに感染するフェレット HEV の遺伝子型の違いの有無を明らかにする。さらに感染後、一過性感染を呈するケースと持続感染するケースのウイルス遺伝子配列を比較し、持続感染する重要な遺伝子を同定する。

(3) フェレット HEV の感染実験

フェレット HEV が陽性であるフェレット糞便から 10%便乳剤を作製し、フェレットに経口および静脈接種する。経時的に採血採便し、血液中および便中のウイルス抗原、抗体、ウイルス遺伝子を測定しウイルスの感染の有無によってウイルスの感染経路を同定する。また、血中の ALT/AST、 γ GTP を測定することによりウイルスの病原性を推定する。さらに血清学、病理学および生化学、ウイルス排泄期間等を観察してウイルスの感染様式を明らかにする。以上の結果を総合判断し、フェレットの HEV の動物モデルとしての可能性を評価する。

また、フェレット HEV をラットやサルに接種

し、ウイルスの宿主を同定する。

(4) フェレット HEV 株を多種類の細胞に接種して、ELISA 法、WB 法、FA 法、RT-PCR 法、電子顕微鏡などを用いて、ウイルスの増殖を確認する。さらにウイルスの増殖能、ウイルスの細胞内の局在などを解析する。培養細胞および培養上清からウイルス遺伝子を抽出し、RT-PCR 法を用いて、ウイルスゲノム全長遺伝子を増幅し、その遺伝子配列を同定する。増殖した HEV の遺伝子配列を接種したウイルスの配列と比較し、ウイルス遺伝子の変異を確認し、細胞での増殖に關与する遺伝子を同定する。

4 . 研究成果

(1) フェレット HEV のウイルス様粒子を用いて抗体検査法を樹立し、実験用フェレットおよびペットとして飼われたフェレットにおけるフェレット HEV の感染状況を調査した結果、フェレット HEV が広い範囲で感染することを明らかにした。

(2) サルとラットを用いた感染実験ではフェレット HEV はカニクイザル及びラットに感染しないことが明らかになった。この結果はフェレット HEV の宿主が限られていて、霊長類への感染可能性も非常に低いことが示唆された。

(3) アメリカの二つのフェレットファームから輸入してきたフェレット HEV の全長配列を解析した。その結果はフェレット HEV の遺伝子の多様性を示した。

(4) フェレット HEV の細胞培養方法を樹立した。細胞培養法の樹立によってフェレット HEV の感染、複製の機序の解析に非常に有用である。

(5) フェレット HEV の病原性の研究ではフェレット HEV に感染されたフェレットでは急性肝炎あるいは持続感染が引き起こされることを明らかにした。フェレットは肝炎の動物モデルとして可能性が示唆された。

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) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Michiyo Kataoka, Yen Hai Doan, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tomofumi Nakamura, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Determination of the Ferret Enteric Coronavirus Genome in Laboratory Ferrets. *Emerg Infect Dis. In press*

(2) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Michiyo Kataoka, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Yen Hai Doan, Kei Haga, Koji Ishii, Naokazu Takeda, and Takaji Wakita. Genetic and physicochemical analyses of a novel ferret hepatitis E virus, and clinical signs of infection after birth. *Infect, Genet Evol.* 2017 Jul;51:153-159. doi: 10.1016/j.meegid.2017.03.026.

(3) Tian-Cheng Li, Yang T, Sayaka Yoshizaki, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. *Vet Microbiol.* 2016 Feb 1;183:30-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.014.

(4) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Tingting Yang, Kataoka M, Tomofumi Nakamura, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5. *Virus Res.* 2016 Feb 2;213:283-8. doi:10.1016/j.virusres.2015.11.027.

(5) Tian-Cheng Li, Sayaka Yoshizaki, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Tingting Yang, Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Monkeys and rats are not susceptible to

ferret hepatitis E virus infection.
Intervirology. 2015 Apr 30;58(3):139-142.
(6) Tian-Cheng Li, Kenzo Yonemitsu,
Yutaka Terada, Naokazu Takeda, Wakita
Takaji and Ken Maeda. Ferret hepatitis E
virus infection in Japan. JJID
2015.68(1).60-62.
(7) Tian-Cheng Li, Tingting Yang, Yasushi
Ami, Yuriko Suzaki, Masayuki Shirakura,
Noriko Kishida, Hideki Asanuma,
Naokazu Takeda, and Wakita Takaji. Full
Genome of Ferret Hepatitis E Virus from
Laboratory Ferrets. Emerg Infect Dis.
2014.20 (4),709-712.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 李天成、網康至、須崎百合子、浅沼秀樹、
白倉雅之、武田直和、脇田隆字。フェレット
HEV の病原性と E 型肝炎動物モデル。第 6 2
回日本ウイルス学会、2014.11.横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：平成 年 月 日
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：平成 年 月 日
取得年月日：平成 年 月 日
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李天成 (LI Tiancheng)

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

(2) 研究分担者

石井 孝司 (Ishii Koji)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長
研究者番号：40280763

研究分担者

網 康至 (Ami Yasushi)

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：10202699

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()