

氏名(本籍)	高木 弘 隆 (東京都)
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	乙第 30 号
学位授与年月日	令和 4 年 7 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids (胆汁酸存在下でのヒト由来細胞株によるヒトサポウイルス増殖)
論文審査委員	(主査) 古 畑 勝 則 (副査) 栗 林 尚 志 三 宅 司 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

サポウイルス (sapovirus) は、カリシウイルス属に含まれる non-envelope、単鎖 (+) RNA ウィルスである。ヒトサポウイルス (human sapovirus; HuSaV) は 18 種類の遺伝子型 (GI.1~7、GII.1~8、GIV.1 および GV.1~2) を有し、ヒトノロウイルス (human norovirus; HuNoV) と同属で、かつ急性下痢症を引き起こすため、伝播・兆候・主訴などは集団下痢症事案においてノロウイルスと共に考慮すべき起因ウイルスとなる。実際には幼児や小児などでの集団発生例が多いが、成人での集団発生や食中毒事案の報告も相当数存在する。

一方、人工的な増殖方法の研究において、HuNoV では Caco-2 細胞や B 細胞のような汎用細胞株や、enteroid といった幹細胞により、一部の臨床株での培養報告はあるが、HuSaV では発見から 40 年以上経過しても培養増殖に成功していない。また、これまでヒト急性下痢症の起因ウイルスにおいて、in vitro での汎用性が高く、多様な genotype あるいは血清型の増殖を担保する方法もない。しかしながら、これらの手法を確立することは当該下痢症の発症解明、伝播様式解析、および感染制御手段の研究において非常に重要であり、同様の症状を呈する HuNoV への本手法の将来的な転用・応用の可能性も高い。加えて公衆衛生学上はもちろん、食の安全性確保の観点からも、これまで不可能であったリスクプロファイリングなど実効性の高いオペレーションが可能となるため、非常に重要である。

今回、一部の HuNoV や唯一株化に成功した豚サポウイルス (porcine sapovirus; PoSaV) の報告において、培養時に胆汁酸要求性を示すことから、これに基づき各種胆汁酸適応濃度といくつかの細胞株との組み合わせから HuSaV 増殖系確立の研究を開始した。またウイルス RNA 検出系、既存抗血清を用いた抗原検出 ELISA や蛍光抗体法による感染細胞の解析についても併せて検討した。本研究の概

要は以下のとおりである。

### 1. HuSaV 細胞培養における胆汁酸要求性

ヒト精巣腫瘍由来細胞 NEC8 (JCRB0250)、腸管癌細胞由来 HuTu80 (HTB-40) および HCT-8 (CCL-244) の3種類の細胞株を用いて、4種類の胆汁酸(コール酸ナトリウム (CA)、デオキシコール酸ナトリウム (DCA)、グリココール酸ナトリウム (GlyCA)、グリコケノデオキシコール酸ナトリウム (GCDCA)) および Bile を細胞障害性試験に基づいた各最大許容濃度に従い添加した。

接種1日後(1 dpi)に洗浄および培養液交換を行い、7日間培養した。培養上清中のウイルス RNA を抽出し、RT-PCR にて検出した。HuSaV GI.1 については NEC8、HuTu80 では GlyCA および GCDCA で明瞭な増幅シグナルが検出された。HCT-8 ではいかなる培養条件でも不検出となった。この結果より HuTu80 を用いて HuSaV GII.3 の培養検討を行ったところ、GlyCA、GCDCA および Bile にて明瞭な増幅シグナルが検出された。NEC8 および HuTu80 に共通して GlyCA 含有条件でのシグナルが強いことから、以降の培養検討には GlyCA (1 mM) を用いることとした。

### 2. 培養細胞間における HuSaV の経時的増殖性比較

HuSaV GI.1 について、NEC8 および HuTu80 を用いて 1 mM GlyCA 含有下で各細胞を T25 フラスコにて単層シート化したものに、陽性検体を  $7\log_{10}$  copies of viral RNA を上限 ( $20\mu\text{L}$ ) として接種した。接種から一晚培養後に上清を取り除き、洗浄用培地にて2回洗浄して維持培地に交換してから経時的増殖性を比較検討した。NEC8 については接種1、3、5および7日目まで、HuTu80 については接種1、3、5、7、10および14日目まで、培養上清  $100\mu\text{L}$  中のウイルス RNA コピー数を定量した。NEC8 では7日目まででウイルス RNA は  $2\log_{10}$  copies に止まった。加えて NEC8 は7日を超える維持培養が困難なことから、これ以上の増殖は期待できなかった。一方 HuTu80 では培養3日後で  $6.6\log_{10}$  copies となり、5日目には  $7.4\log_{10}$  copies に到達し、14日目まで維持された。

この結果から GI.1 の増殖率は初期値(1dpi)から約  $3.9\log_{10}$  倍となり、これを踏まえて同様に HuSaV GII.3 の経時的増殖性を確認したところ、GII.3 は GI.1 よりも若干緩やかに増幅するものの、10日目でピークとなる  $7.7\log_{10}$  copies に達し、初期値(1dpi)から約  $3.6\log_{10}$  倍で GI.1 とほぼ同等となった。

さらに GI.2 1株および GII.3 2株を用いた HuTu80 での10日間培養における経時的増殖性検討においても明瞭な増殖性が認められた。以上の結果から HuTu80 は少なくとも3つの genotype の HuSaV 増殖をサポートすることが明らかになった。

### 3. HuTu80 における HuSaV の細胞内動態と virion、子孫ウイルス増幅の確認

HuTu80 細胞における HuSaV の挙動に関して、dsRNA、非構造タンパク NS1-2 および VP1 の経時的シグナルと動態について検討した。すなわち、細胞に感染させてから1、5、10日目に、各々の特異抗体を用いて IF 法により確認した。1日目ではシグナル非検出であったが、5日目及び10日目で対

象とするすべてのシグナルが確認された。dsRNAに基づく陽性率 (n=3) は、GI.1において5日目で5.6-8.2% (平均7.6%)、10日目で10.4-14.3% (平均12.3%) であり、GII.3においては5日目で6.4-8.0% (平均6.5%)、10日目で7.1-11.1% (平均8.7%) となった。また、すべての感染細胞において細胞変性効果は認められなかった。加えて両 genotype での各段階の培養上清中のウイルス RNA コピー数は  $3\text{-}4\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L (1日目) から5日目以降  $9\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L を超えた。

次に、精製 HuSaV サンプルの透過電子顕微鏡観察によりウイルス様粒子 (virion) を捕捉することができ、その平均粒径 (各 n=15) は GI.1 で  $44.1\pm 1.5$  nm、GII.3 で  $41.0\pm 1.9$  nm であった。各粒子の回収率について、培養上清の超遠心処理前後の RNA コピー数を比較したところ、GI.1 で 56.8%、GII.3 で 16.8% であった。そして陽性検体の培養で得られたウイルスサンプル (P0) を2世代まで各10日間の継代培養を繰り返し、各培養上清について RNA コピー数と VP1 検出 ELISA シグナルを測定したところ、RNA コピー数は P1 および P2 共に10日目で  $9\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L を超え、VP1 検出 ELISA では P1 から P2 にかけて共にシグナル増大が認められた。以上の事象から、HuSaV は GlyCA 存在下で virion が継代培養できていることが確認された。

#### 4. HuSaV 分離のためのウイルス RNA 必要量と加熱および紫外線に対する感受性評価

HuSaV GI.1 および GII.3 陽性検体の10倍段階希釈 ( $5.3\log_{10}\sim 1.3\log_{10}$ 、 $2\times 1$  RNA copies/100  $\mu$  L) を行い、各々を HuTu80 細胞に接種して10日間後の培養上清ウイルス RNA 量を測定したところ、共に  $2.3\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L を下回ると検出限界以下となることから、分離に要する RNA 量は  $2.3\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L 以上と考えた。

このことを踏まえ、陽性検体希釈サンプルを用いたドライバスによる加熱処理 (50°C、60°C および 70°C) と紫外線 (波長 254 nm) 照射による GI.1 および GII.3 の経時的感染価減衰を評価したところ、両 genotype にて 70°C・30分処理で RNA シグナルは検出限界以下となり、50°C・30分ではシグナル減衰は認められなかった。60°C 処理では genotype 間での相違が顕著で、GII.3 で熱抵抗性が強いことが示された。また紫外線照射に対する感受性は、陽性検体では両 genotype とともに  $5.4$  J/cm<sup>2</sup> の照射でも感染価減衰は認められなかった。一方、両 genotype とともに P1 培養上清を同試験に用いたところ、 $1.8$  J/cm<sup>2</sup> の照射で RNA および VP1 検出 ELISA の両シグナルともに検出されず、照射サンプルに同時にスパイクした Feline calicivirus も  $1.8$  J/cm<sup>2</sup> の照射でわずかに検出されるにとどまった。

以上のように、まずヒト精巣由来細胞と2種類のヒト腸管由来細胞 (十二指腸および回盲部) を HuSaV 増殖の検討に使用した。その根拠は PoSaV-Cowden 株の増殖が LLC-PK1 細胞以外の精巣細胞で成立すること、幼豚での in vivo 実験で小腸部位に増殖が認められることによる。その結果、抱合型胆汁酸である GlyCA あるいは GCDCA の存在が HuTu80 細胞での HuSaV 増殖をサポートすることを確認した。ヒト体内における胆汁成分の合成・分泌および再吸収といった一連の代謝から、十二指腸付近の胆汁酸比率は抱合型が主体となることから、ヒト体内の生理を反映した増殖を示唆してい

ると考える。このことはヒトウイルス性胃腸炎の *in vitro* における病態生理が模倣され、その発症機構解析や制御手法開発などにも非常に有用である。

続いて HuTu80 細胞による HuSaV 感染粒子 (virion) の増殖が世界で初めて確認でき、GI.1 および GI.3 では接種 5-10 日で培養上清中の RNA コピー数がピークとなる一方、IF の結果では HuSaV 感受性細胞は限局的であり、VP1 検出 ELISA の結果からも継代培養の繰り返しによるシグナル増加が示されたことからウイルス RNA とウイルス粒子作出にある種の time-lag の発生が示唆された。このことは HuSaV 株間での増殖速度や virion 回収の検証において非常に重要な情報となった。

HuSaV の *in vitro* 複製はウイルス RNA および VP1 抗原共に非常に高いレベルに到達しており、継代培養による感染性ウイルスのストック作製が可能となった。これまでヒト胃腸炎ウイルスのほとんどが陽性検体 (糞便) をリソースとして使用していることから、有限性、virion 含量が不確定なためのリソース不均一性と研究結果の確度への影響、医学研究倫理の制約などから解放され、ヒトノロウイルス研究と比較しても非常に重要なブレイクスルーとなった。さらに同様の strategy による汎用培養法への研究転換のきっかけともなり得るため、海外の関連研究者も注目している。

HuSaV はヒトノロウイルス同様に集団感染事例や食品媒介を疑うアウトブレイク報告がある一方で、その季節性や感染経路、最小感染量や発症者からの複数 genotype 検出の要因などが解明されていない。また今回の著者らの検出法により、近年生活排水から通年検出される実態が明らかになり、常に一定数の感染者あるいはウイルス排出者の存在が示唆されている。今回の研究成果により、これまでの遺伝子検出や遺伝子定量といった「ウイルスの痕跡トレース」のみならず、感染力を有するウイルスの存在や感染価を導くことが可能となるため、より精度の高いウイルス動態が解明されるとともに、リスクプロファイリングに基づく実効的な感染制御対策立案が可能となった。

さらに、加熱に対する感受性は 60°C・30 分で完全な不活化には至らず、60°C・15 分で不活化されるヒトノロウイルスに対する対策では不十分であることが判明した。また UV 照射については HuSaV 陽性糞便希釈検体と、培養した HuSaV では感受性に大きな相違が確認された。こうした結果も公衆衛生における HuSaV 制御において、きわめて重要な要因となった。

本研究において、HuSaV の汎用培養法を発見したことから、感染経路解明やその対策立案への道が開けたとともに、本研究のさらなる発展による、抗体保有などのヒト血清疫学解析、HuTu80 細胞を用いたウイルス受容体検索、抗ウイルス成分検索など幅広い研究展開が可能となった。

## 論文審査の結果の要旨

サポウイルス (sapovirus) は、カリシウイルス属に含まれる non-envelope、単鎖 (+) RNA ウイルスである。人工的な増殖方法の研究において、ヒトノロウイルス (human norovirus; HuNoV) では

Caco-2 細胞や B 細胞のような汎用細胞株、あるいは enteroid といった幹細胞により、一部の臨床株での培養報告はあるが、ヒトサポウイルス (human sapovirus; HuSaV) では発見から 40 年以上経過しても培養増殖に成功していない。また、これまでヒト急性下痢症の起因ウイルスにおいて、in vitro での汎用性が高く、多様な genotype あるいは血清型の増殖を担保する方法もない。

そこで、一部の HuNoV や唯一株化に成功した豚サポウイルス (porcine sapovirus; PoSaV) の報告において、培養時に胆汁酸要求性を示すことから、これに基づき各種胆汁酸適応濃度といくつかの細胞株との組み合わせから HuSaV 増殖系確立の研究を開始した。またウイルス RNA 検出系、既存抗血清を用いた抗原検出 ELISA や蛍光抗体法による感染細胞の解析についても併せて検討した。

まず、ヒト精巣腫瘍由来細胞 NEC8 (JCRB0250)、腸管癌細胞由来 HuTu80 (HTB-40) および HCT-8 (CCL-244) の 3 種類の細胞株を用いて、4 種類の胆汁酸 (コール酸ナトリウム (CA)、デオキシコール酸ナトリウム (DCA)、グリココール酸ナトリウム (GlyCA)、グリコケノデオキシコール酸ナトリウム (GCDCA)) および Bile を細胞障害性試験に基づいた各最大許容濃度に従い添加した。HuSaV GI.1 については NEC8、HuTu80 では GlyCA および GCDCA で明瞭な増幅シグナルが検出された。HCT-8 ではいかなる培養条件でも不検出であった。この結果より HuTu80 を用いて HuSaV GII.3 の培養検討を行ったところ、GlyCA、GCDCA および Bile にて明瞭な増幅シグナルが検出された。NEC8 および HuTu80 に共通して GlyCA 含有条件でのシグナルが強いことから、以降の培養検討には GlyCA (1 mM) を用いることとした。

次に、HuSaV GI.1 について、NEC8 および HuTu80 を用いて 1 mM GlyCA 含有下で各細胞を T25 フラスコにて単層シート化したものに陽性検体を  $7\log_{10}$  copies of viral RNA を上限 ( $20\ \mu\text{L}$ ) として接種した。接種から一晩培養後に上清を取り除き、洗浄用培地にて 2 回洗浄して維持培地に交換してから経時的増殖性を比較検討した。この結果から GI.1 の増殖率は初期値 (1dpi) から約  $3.9\log_{10}$  倍となり、これを踏まえて同様に HuSaV GII.3 の経時的増殖性を確認したところ、GII.3 は GI.1 よりも若干緩やかに増幅したものの、10 日目でピークとなる  $7.7\log_{10}$  copies に達し、初期値 (1dpi) から約  $3.6\log_{10}$  倍で GI.1 とほぼ同等となった。さらに GI.2 1 株および GII.3 2 株を用いた HuTu80 での 10 日間培養における経時的増殖性検討においても明瞭な増殖性が認められた。以上の結果から HuTu80 は少なくとも 3 つの genotype の HuSaV 増殖をサポートすることが明らかになった。

また、HuTu80 細胞における HuSaV の挙動に関して、dsRNA、非構造タンパク NS1-2 および VP1 の経時的シグナルと動態について検討した。すなわち、細胞に感染させてから 1、5、10 日目に、各々の特異抗体を用いて IF 法により確認した。1 日目ではシグナル非検出であったが、5 日目および 10 日目で対象とするすべてのシグナルが確認された。GI.1 および GII.3 での各段階の培養上清中のウイルス RNA コピー数は  $3\text{--}4\log_{10}$  copies/ $100\ \mu\text{L}$  (1 日目) から 5 日目以降  $9\log_{10}$  copies/ $100\ \mu\text{L}$  を超えた。しかし、すべての感染細胞において細胞変性効果は認められなかった。一方、精製 HuSaV サンプルの透過電子顕微鏡観察によりウイルス様粒子 (virion) を捕捉することができ、その平均粒径 (各  $n=15$ ) は GI.1 で  $44.1\pm 1.5\text{nm}$ 、GII.3 で  $41.0\pm 1.9\text{nm}$  であった。各粒子の回収率について、培養上清の超遠

心処理前後の RNA コピー数を比較したところ、GI.1 で 56.8%、GII.3 で 16.8%であった。そして陽性検体の培養で得られたウイルスサンプル (P0) を 2 世代まで各 10 日間の継代培養を繰り返し、各培養上清について RNA コピー数と VP1 検出 ELISA シグナルを測定したところ、RNA コピー数は P1 および P2 共に 10 日目で  $9\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L を超え、VP1 検出 ELISA では P1 から P2 にかけて共にシグナル増大が認められた。以上の事象から、HuSaV は GlyCA 存在下で virion が継代培養できていることが確認された。

さらに、HuSaV GI.1 および GII.3 陽性検体の 10 倍段階希釈 ( $5.3\log_{10}$ ~ $1.3\log_{10}$ 、 $2\times 1$  RNA copies/100  $\mu$  L) を行い、各々を HuTu80 細胞に接種して 10 日間後の培養上清ウイルス RNA 量を測定したところ、共に  $2.3\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L を下回ると検出限界以下となることから、分離に要する RNA 量は  $2.3\log_{10}$  copies/100  $\mu$  L 以上と考えた。このことを踏まえ、陽性検体希釈サンプルを用いたドライバスによる加熱処理 (50°C、60°C および 70°C) と紫外線 (波長 254 nm) 照射による GI.1 および GII.3 の経時的感染価減衰を評価したところ、両 genotype にて 70°C・30 分処理で RNA シグナルは検出限界以下となり、50°C・30 分ではシグナル減衰は認められなかった。60°C 処理では genotype 間での相違が顕著で、GII.3 で熱抵抗性が強いことが示された。また紫外線照射に対する感受性は、陽性検体では両 genotype とともに  $5.4$  J/cm<sup>2</sup> の照射でも感染価減衰は認められなかった。一方、両 genotype とともに P1 培養上清を同試験に用いたところ、 $1.8$  J/cm<sup>2</sup> の照射で RNA および VP1 検出 ELISA の両シグナルともに検出されず、照射サンプルに同時にスパイクした Feline calicivirus も  $1.8$  J/cm<sup>2</sup> の照射でわずかに検出されるにとどまった。

以上のように、HuTu80 細胞による HuSaV 感染粒子 (virion) の増殖が世界で初めて確認でき、GI.1 および GII.3 では接種 5-10 日で培養上清中の RNA コピー数がピークとなった。このように HuSaV の *in vitro* 複製はウイルス RNA および VP1 抗原共に非常に高いレベルに到達しており、継代培養による感染性ウイルスのストック作製が可能となった。また、感染力を有するウイルスの存在や感染価を導くことが可能となるため、より精度の高いウイルス動態が解明されるとともに、リスクプロファイリングに基づく実効的な感染制御対策立案が実施できる。さらに加熱に対する感受性は 60°C・30 分で完全な不活化には至らず、60°C・15 分で不活化されるヒトノロウイルスに対する対策では不十分であることが判明した。また UV 照射については HuSaV 陽性糞便希釈検体と、培養した HuSaV では感受性に大きな相違が確認された。

このように、本学位申請論文では、HuSaV の汎用培養法を発見したことから、感染経路解明やその対策立案への道が開けた。このことは、HuSaV の微生物学および感染症学の発展に大きく貢献するものである。さらに、食品衛生学や公衆衛生学の分野にも寄与するところ大である。よって、本研究論文は博士 (学術) を授与するにふさわしい業績であると審査員一同判断した。