

1. ヒトサポウイルス培養法の開発

高木 弘隆¹⁾, 岡 智一郎²⁾

1) 国立感染症研究所 安全実験管理部第7室

2) 国立感染症研究所 ウイルス第二部

ヒトサポウイルス (Human sapovirus; HuSaV) の発見から約 40 年以上を経て, ヒト十二指腸腫瘍由来細胞 HuTu80 と supplement として胆汁酸を加えることにより, HuSaV 培養系を確立するに至った. 一般的な細胞株に加え, クラシカル培地の使用や培養スケールアップも容易であるなど汎用的な手法となったが, ここに至るに十分なウイルス力価を得るための培養日数や供試サンプル選定のためのウイルス遺伝子保存性確認, HuTu80 細胞の継代方法などが重要であった. 現在 15 種の genotype について増殖・ストック作製に成功しており, 研究のためのリソースとして安定的確保に至った. これに続き精製抗原による抗血清の作成やその解析, 不活性化条件評価を進められるようになった. 本稿では培養細胞や胆汁酸の選択経緯や発表後のトピックを紹介するとともに, 細胞変性の顕在化や糞便由来 HuSaV の UV-C 低感受性に関する解明など, 今後の課題も提起する.

プロローグ

サポウイルス (Human sapovirus, HuSaV) は「*Caliciviridae* 科」-「*Sapovirus* 属」-「*Sapporo virus* 種」に分類され, その名前は「札幌」に由来する^{1,2)}. カリシウイルス科に属するノロウイルスと同様に, 一本鎖 RNA ウイルスであり, ウイルス粒子は直径約 40nm でエンベロープを有さない. ウイルスゲノムは約 7500 塩基で, 3' 末端に polyA 配列を有している. 2 つの open reading frame (ORF) があり, ORF1 は非構造タンパク (NS1 ~ 7) と構造タンパク (VP1) を, ORF2 は別の構造タンパク (VP2) をコードしている³⁾. ヒトおよびチンパンジー, 豚, イノシシ, 犬, ミンク, アシカ, ドブネズミ, コウモリの糞便, 腸内容物からの検出報告があるが, ヒトと豚以外での病原性は明確でない. サポウイルスは 19 の genogroup に, 各 genogroup はさらに複数の genotype に分類される⁴⁾. ヒトから検出されている

サポウイルスは VP1 領域配列により 4 種類の genogroup (GI, GII, GIV, GV) に分かれ, 各々さらに genotype (GI.1-7, GII.1-8, not assigned (NA), GIV.1, GV.1-2) として分類可能である⁴⁾. チンパンジーからのみヒトと同じ遺伝子型株 (GI.1) の検出報告がある⁵⁾.

HuSaV が病原因子として明確に認知されたきっかけは 1977 年に発生した札幌の乳児院における集団胃腸炎であった^{2,6)}. 現在では HuSaV がノロウイルスと同様, 世界中で年齢を問わず散発, 集団感染事例を引き起こしていること, 食中毒疑い事案も多数確認されていること, 浄水場流入下水からほぼ通年で検出されることから^{3,7-16)}, ヒトの腸管ウイルスとして循環・定着していると考えられる.

HuSaV の検出報告は核酸検出系の整備, 改良, さらに次世代シーケンサーの普及により世界的に増加しており^{3,17-24)}, 我が国の小児科定点においてノロウイルスより多く検出されている年がある実態も明らかとなってきた²⁵⁾. 我々は 2019 年に培養系の根幹たるウイルス感受性細胞を発見し 2020 年 12 月に PNAS にて報告した²⁶⁾. HuSaV 発見から 40 年以上, 今回は本ウイルスの培養系確立に至るまでの経緯や解決すべき課題等について紹介したい.

供試サンプルの収集とその選定

HuSaV 感染症の検査は現在でも限定的に実施されている状況で, ノロウイルス・ロタウイルスおよびアデノウイルスなどが不検出になった原因不明検体に対して実施され

連絡先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 村山庁舎

TEL: 042-561-0771 (代表)

E-mail: htakagi@niid.go.jp (高木)

oka-t@niid.go.jp (岡)

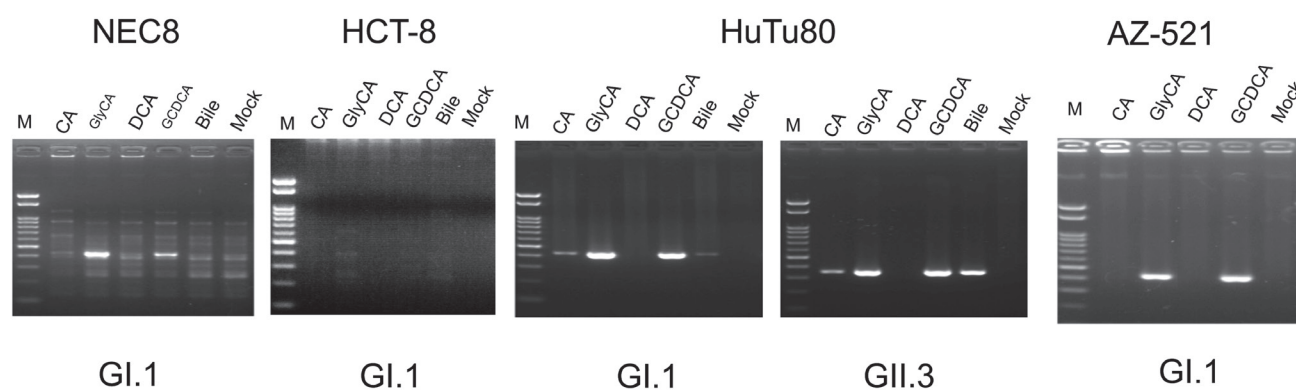


図1 各細胞株での胆汁酸種における HuSaV 増殖性検討

Takagi & Oka at el. PNAs 2020 より抜粋・改変

ることも少なくない。そのため当該ウイルスの培養系検討には、ウイルスの保存性が高く、供試可能な十分量の陽性サンプル確保が最も重要な課題であった。

供試ウイルスの粒子保存性、すなわちウイルス核酸の保存性の確度を担保するため、HuSaV-RNA のスクリーニングは 3' 末端 (polyA 領域) から cDNA を合成し、検出領域は NS7 (RdRp) -VP1 junction 領域から各遺伝子グループ VP1 特異領域を増幅する系²⁶⁻²⁹⁾を用いた。これにより、供試サンプル中の含有グループおよび培養上清中の増殖性を捕捉できるようにした。

NEC8 細胞に至る過程 サプリメントとしての コール酸毒性チェックと選定

豚腎由来 LLC-PK1 と胆汁酸 (コール酸) を用いる豚サポウイルス (PoSaV) 培養系³⁰⁾を参考として、感受性細胞候補として哺乳類由来腎臓細胞 (Vero, VeroE6 など) やヒトでの主たる増殖部位が腸管と想定し、ヒト大腸 (Caco-2, DLD-1) や回盲部 (HCT-8) などのがん細胞株をメインとして検討を始めた。しかしながら供試培養細胞に対するコール酸の毒性が高いこと、手持ちで使用可能なコール酸が少ないことから、選定が振出しに戻った。

各コール酸の特徴、腸管内での代謝など考慮しつつ、ナトリウム塩を用い、毒性や溶解性条件の改善を試みるも、増殖を示すウイルス核酸シグナルの経時的増大は確認できなかった。

PoSaV 培養系のさらなる検討過程で豚精巣由来細胞 (ST) による増殖・細胞変性発現が確認された (未発表データ)。このことから HuSaV 培養系にヒト精巣由来細胞導入の可能性について検討を開始し、ヒト精巣腫瘍由来細胞 NEC8 に GI.1 とグリココール酸ナトリウム (GlyCA) もしくはグリコケノデオキシコール酸ナトリウム (GCDCA) を添加し、7 日間継続培養することにより、明瞭なウイルス核酸のシグナル増大が認められた (図 1)²⁶⁾。しかしながらこの細胞株では継続培養 (細胞維持) は 7 日間が限界

で (図 2)²⁶⁾、培養スケールアップや継代培養による HuSaV 核酸シグナル上昇や virion 獲得はできなかった。

NEC8 から HuTu80 へ

感受性細胞検索もさることながら、供試サンプルの手詰まり感もあり、厚生労働省科学研究班 (食品の安全性確保推進研究事業 研究代表者 野田 衛; 元国立医薬品食品衛生研究所) での HuSaV 陽性検体提供協力を呼びかけ、数か所の自治体衛生研究所から提供を受ける運びとなった。このころ感受性細胞についても HuSaV の臨床症状³¹⁾から見直し、嘔吐反射を考慮して十二指腸由来細胞である HuTu80 を導入、培地成分の改変により約 14 日間の連続培養を可能とした (図 2)²⁶⁾。

疫学的にも検出例の多い GI.1 と GII.3 を供試サンプルとして比較的細胞毒性の低いコール酸塩 4 種類とウシ胆汁末液を添加し、培養を実施した。各遺伝子型で遺伝子シグナル増大のパターンは異なるものの、いずれも GlyCA もしくは GCDCA を添加し、7 日間継続培養することで、ウイルス核酸の明瞭なシグナル増殖が確認された (図 1)²⁶⁾。その後 GlyCA を添加し、最大 14 日までのウイルス増殖性を経時的に捕捉した (図 2A)²⁶⁾。

さらに HuTu80 細胞による HuSaV の継代培養も成功し、ウイルスストックの確保に至るとともに、精製培養上清中の virion も電子顕微鏡観察で捕捉できた²⁶⁾。また、HuSaV GI.1 と GII.3 精製 virion に VP1 に加え、VP2 が存在することもはじめて確認できた³²⁾。

HuTu80 細胞での増殖性・細胞内局在性

HuTu80 細胞における HuSaV GI.1 および GII.3 の細胞内局在性について検討したところ、一部の細胞内でのみ dsRNA, VP1 および NS1-2 シグナルが確認された (図 3)²⁶⁾。しかしながらこの時点では培養上清からの GI.1 と GII.3 の virion 回収率が大きく乖離する要因についてはわからなかった²⁶⁾。その後の検討で GII の多くは virion を細胞内に蓄積するこ

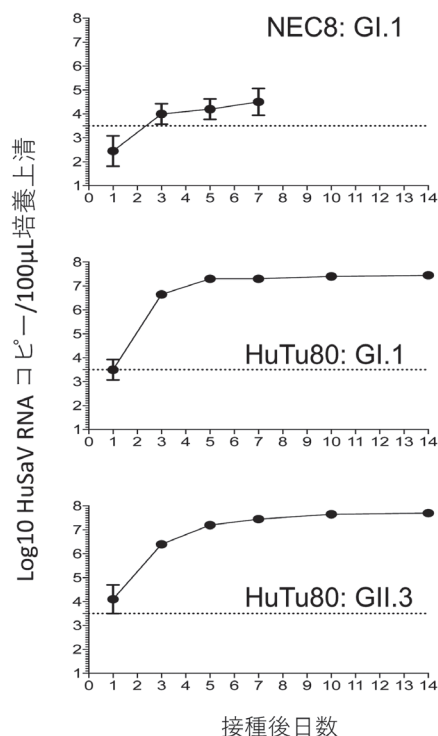


図 2A HuSaV GL.1/NEC8 及び HuSaV GL.1&GII.3/HuTu80 における GlyCA 共存下での経時的増殖性
Takagi & Oka at el. PNAs 2020 より抜粋・改変

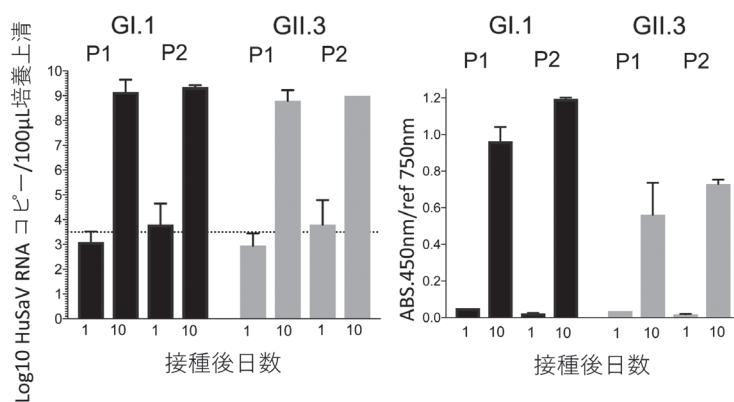


図 2B Serial passage による HuSaV 増殖性
Takagi & Oka at el. PNAs 2020 より抜粋・改変

とが明らかとなり、HuSaV GL.3 の収量問題は感染細胞内に virion が蓄積することが原因であることもわかった (data not shown).

ウイルス抗原の ELISA 検出

ウイルス RNA コピー数でウイルス増殖をトレースするだけでなく、ウイルス構成タンパク VP1 検出 ELISA を用いることでウイルス増殖確認のハイスループット化を目指した。過去に調製した HuSaV-VLP を用いて作成されたウ

サギおよびモルモットの各抗血清^{33,34)} による antigen-ELISA を再構築し、HuSaV GL.1 および GL.3 の HuTu80 細胞での増殖確認に用いたところ、経時的ウイルス増殖を捕捉することが可能となった (図 2B)²⁶⁾。

現状とこれからの課題 (1) HuSaV 各種遺伝子型のウイルスストックと抗血清作成

本手法を用い、当研究所で自治体衛生研究所より核酸解析用に提供された残余微量検体からの各種遺伝子型培養ト

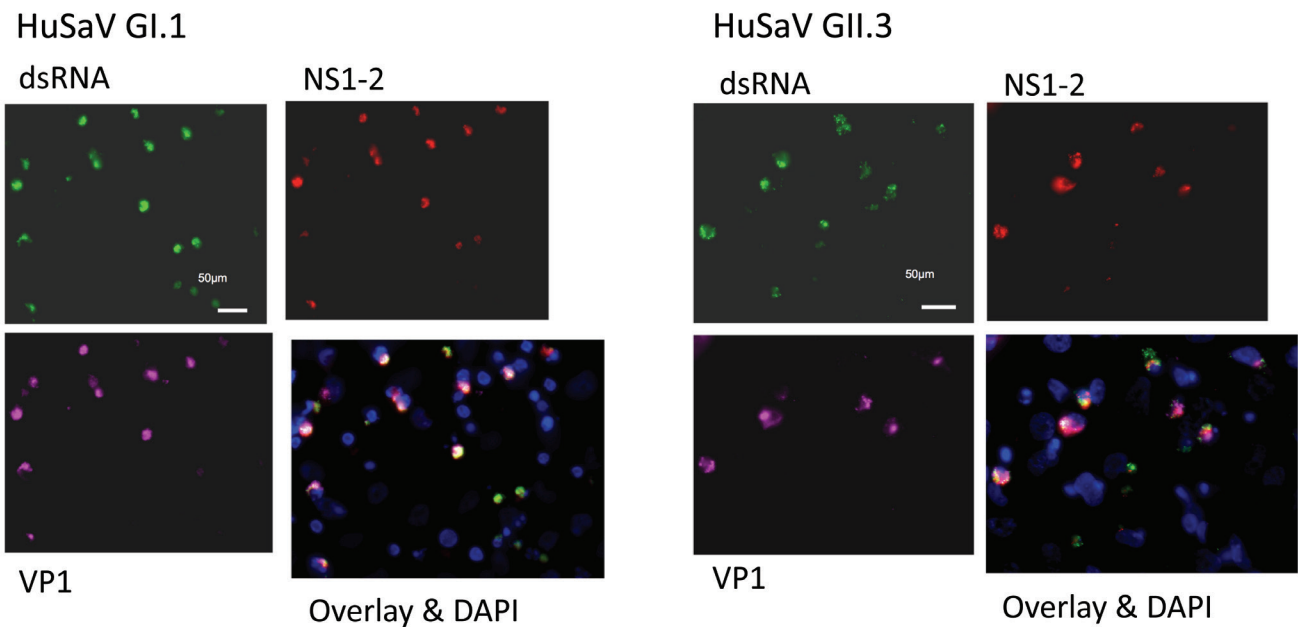


図3 HuTu80 細胞での HuSaV 増殖局在性

Takagi & Oka at el. PNAs 2020 より抜粋・改変

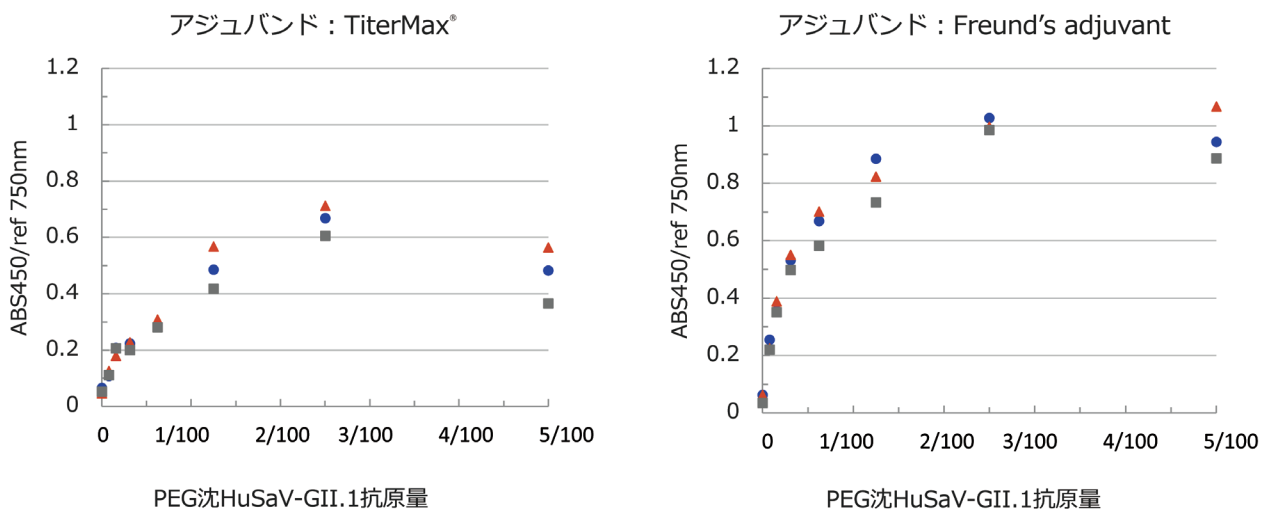


図4 抗血清作成におけるアジュバンドの影響

固相：抗 HuSaV-GII.1 ウサギ血清 1/2000 倍

2 次抗体：抗 HuSaV-GII.1 モルモット血清 1/200 ～ 1/800 倍

○：1/200x △：1/400x □：1/800x

ライアルを開始した。その結果現在までに HuSaV GI が 7 種 (GI.1~GI.7), GII が 6 種 (GII.1~GII.5, GII.8), および GV が 2 種 (GV.1, GV.2), 培養増殖とウイルスストック作成に成功している³⁵⁾。GII.6, GII.7 および GIV については現在も検討中である。また一部の遺伝子型については精製 virion による抗血清作成を実施しているが、この際アジュバンドの影響がかなり大きいことが判明し、現在ではフロイントアジュバンドを使用することとした (図 4)。

現状とこれからの課題 (2) HuTu80 細胞の継代による HuSaV の増殖性・CPE 発現という変化

2020 年の PNAS 発表時, HuSaV-GI.1 および GII.3 感染・増殖過程において細胞変性効果 (CPE) は認められていなかった。しかしながら他の遺伝子型について分離トライアルを重ねてゆく中で, GI.6, GII.2 など CPE を発現するものがいくつか確認された。また、これとは異なり HuTu80 細胞の継代数が多くなるに従い, HuSaV の増殖性が向上

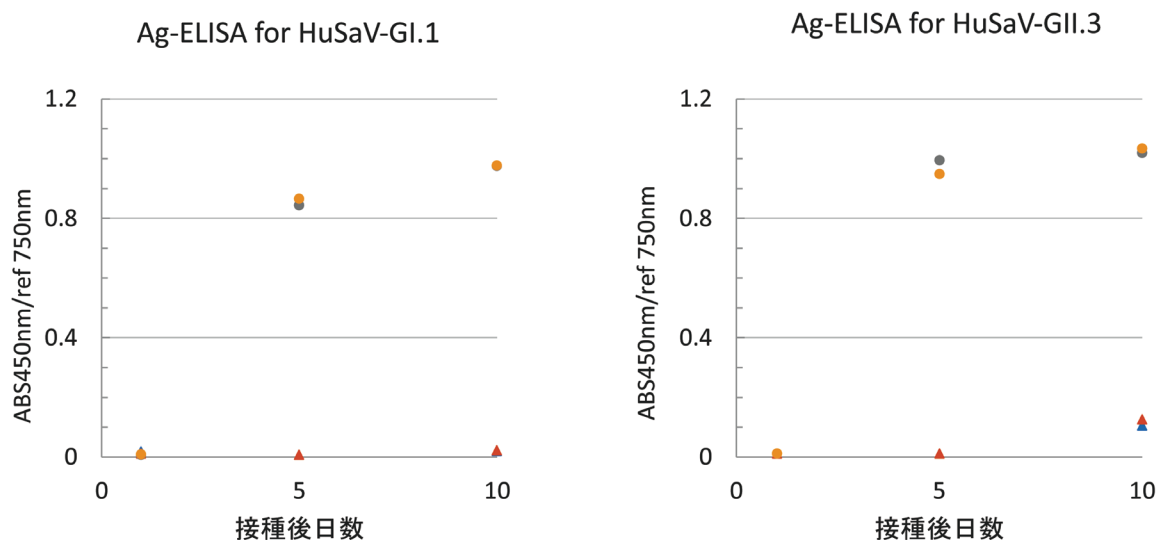


図5 HuTu80 細胞の継代数による HuSaV 増殖効率比較 Ag-ELISA による培養上清中 VP1 検出
△は 40 継代、○は 141 継代

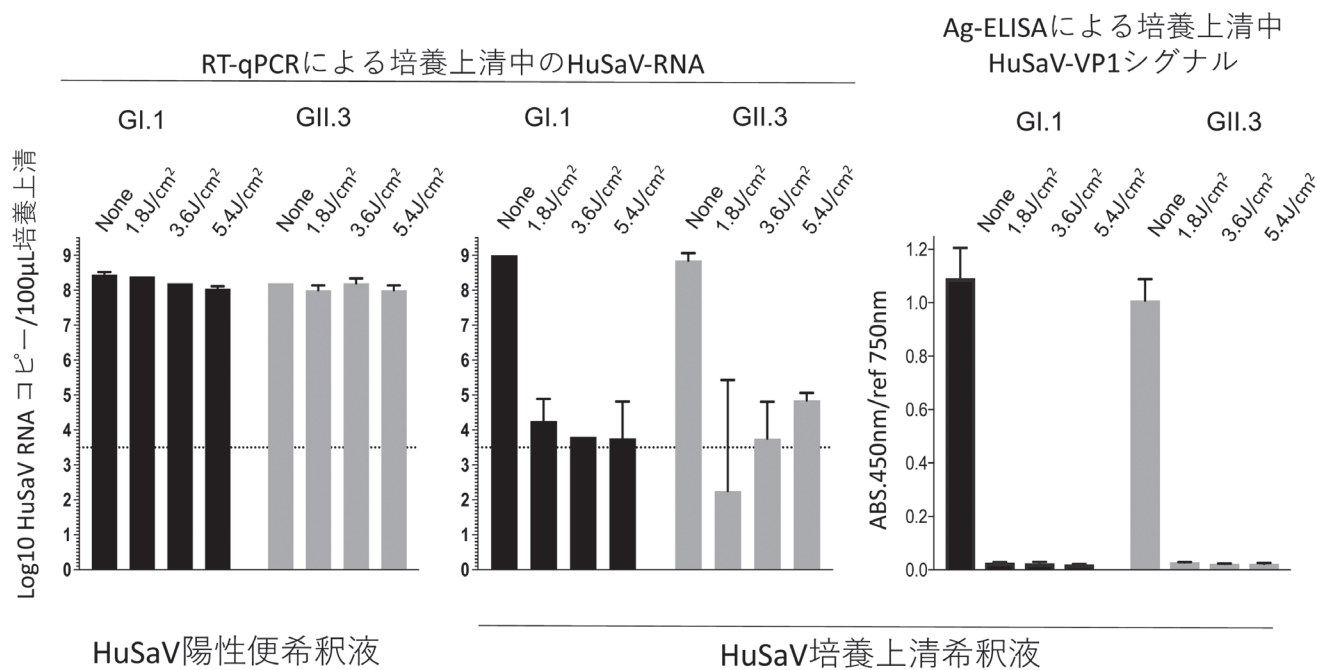


図6 紫外線 (UV-C) による HuSaV 不活性化

Takagi & Oka et al, PNAS 2020 より抜粋・改変

し、継代数 40 台と 100 継代を超える場合とでは、HuSaV 収量に顕著な差が生じることが明らかになった (図 5)³⁵⁾。先に示した一部の細胞のみに感受性があること (図 3)、さらに HuTu80 のサブクローンとされる AZ-521 細胞では HuTu80 と比べ、コール酸種による増殖パターンの相違があり (図 1)、増殖効率も低かったこと (未発表データ) を踏まえると、継代条件により何らかの選択圧がかかり、その結果 HuSaV 感受性細胞が優位になったと考察してい

る。直近で HuTu80 による HuSaV 増殖はフランス・アメリカのグループ^{36,37)} やスウェーデンのグループ³⁸⁾ も確認している。いずれのグループも小腸由来オルガノイドと HuTu80 細胞での増殖比較を発表しているが、HuTu80 での増殖効率が勝ること、さらには HuTu80 同士の増殖比較では我々よりも大幅に低いいため、両グループともウイルスストック調製に成功していないとのことである。

現状とこれからの課題 (3) 陽性便由来 HuSaV と 培養上清 HuSaV における UV 感受性の相違

培養系とウイルスストック調製法が概ね確立されたことで、HuSaV 感染制御に関する検討がある程度可能となり²⁶⁾、水処理分野でもこれらを活用した結果が示されている³⁹⁾。

一方紫外線 (UV-C) に対する感受性については、陽性便由来ウイルスと培養上清由来ウイルスでその感受性に顕著な差が認められることを報告した (図 6)²⁶⁾。これについては便由来ウイルスそのものに紫外線の影響を減衰させる因子等の存在が考えられ、今後の不活化評価のためにも、その解明が急務と考える。このような実態は培養評価系が確立されたことで、その一部が明らかになっており、引き続き本評価系による検証は重要な位置づけであることは確かである。

まとめ

ウイルス発見から 40 年以上を経て、HuSaV 培養系の確立に至り、病原体リソースとしてのウイルスストック整備やヒト由来試料に依存しない研究推進が可能となった。しかしながら分離・検出の感度や細胞壊死を指標とした感染力価測定系においては、未だ課題が残されていること、ヒトにおいて複数の HuSaV 遺伝子型に同時感染するケースがあること¹²⁾ など、疫学的知見との整合性を踏まえた実用的な研究も求められてゆくと考える。今後細胞クローニングや受容体解析を経て、HuSaV 感染・発症の実態に迫れることを期待したい。

利益相反

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

倫理審査承認

本研究に関して、国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査により承認を受理している (承認番号 675, 952 および 1249)

謝 辞

本研究に際し、HuSaV 陽性検体を提供いただいた秋田県健康環境センター、岩手県環境保健研究センター、千葉県衛生研究所、長野県環境保全研究所、名古屋市衛生研究所、島根県保健環境科学研究所、福岡県保健環境研究所および熊本県保健環境科学研究所の各先生方および国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部第 4 室 野田衛元室長、(以下敬称略) HuSaV の増殖系確立に関する研究およびその後の研究を進めるにあたり、ご協力いただいた国立感染症研究所 ウイルス第二部の下池貴志、李天成、感染病理部 片岡紀代、安全実験管理部の網康至、米満研三、

須崎百合子、感染症危機管理研究センターの Yen Hai Doan, オハイオ州立大学 Linda J. Saif, Qiuhong Wang の各先生方にあらためて深謝いたします。

なお本文中の PoSaV はオハイオ州立大学 Linda J. Saif 先生から分与されたものである。

引用文献

- 1) 武田直和, 白土東子, 岡智一郎, 片山和彦, 宇田川悦子, 名取克郎, 宮村達男. カリシウイルスの命名変更について. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 24:311-2, 2003.
- 2) Chiba S., Nakata S., Numata-Kinoshita K., Honma S. Sapporo virus: history and recent findings. J Infect Dis 181 Suppl 2:S303-8, 2000.
- 3) Oka T., Wang Q., Katayama K., Saif L. J. Comprehensive review of human sapoviruses. Clin Microbiol Rev 28:32-53, 2015.
- 4) Nagai M., Wang Q., Oka T., Saif L. J. Porcine sapoviruses: Pathogenesis, epidemiology, genetic diversity, and diagnosis. Virus Res 286:198025, 2020.
- 5) Mombo I. M., Berthet N., Bouchier C., Fair J. N., Schneider B. S., Renaud F., Leroy E. M., Rougeron V. Characterization of a genogroup I sapovirus isolated from chimpanzees in the republic of congo. Genome Announc 2, 2014.
- 6) Chiba S., Sakuma Y., Kogasaka R., Akihara M., Hori-no K., Nakao T., Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. Journal of medical virology 4:249-54, 1979.
- 7) Hotta C., Fujimura Y., Ogawa T., Akita M., Ogawa T. Surveillance of wastewater to monitor the prevalence of gastroenteritis viruses in Chiba prefecture (2014-2019). Journal of Epidemiology advpub, 2023.
- 8) 塚田竜介, 水澤哲也, 西澤佳奈子, 加茂奈緒子, 藤井ますみ, 竹内道子, 中沢春幸, 小野諭子, 和田純子. 2021. 長野県内の下水処理施設の下水流入水における下痢症ウイルス遺伝子の検出と年変化 長野県環境保全研究所 .pp.39-46.
- 9) 中沢春幸, 粕尾しず子, 嶋崎真実, 小林広記, 内山友里恵, 藤田暁. サボウイルスに感染した調理従事者の糞便中へのウイルス排泄期間と検出ウイルスの解析. 日本食品微生物学会雑誌 31:160-6, 2014.
- 10) 牛水真紀子, 関根雅夫, 毛利淳子, 勝見正道, 相原健二, 長谷川純男. 2012 ~ 2017 年度の仙台市におけるサボウイルスの検出状況について. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 39:127-8, 2018.
- 11) 原稔美, 酒井悠希子, 大石沙織, 阿部冬樹, 神田隆, 太田真由美, 土屋壯一, 鈴木香代子, 永井しづか. 小学校で発生したサボウイルスによる集団感染性胃腸炎事例—静岡県. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 40:108-9, 2019.
- 12) 高橋知子, 藤森亜紀子, 梶田弘子, 高橋雅輝, 高木弘隆, 岡智一郎. 感染性胃腸炎患者糞便検体を対象としたサボウイルス genogrouping PCR 法の適用. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance

- Report (IASR) 43:189-91, 2022.
- 13) 小林孝行, 中村麻子, 上田紗織, 芦塚由紀, 岡智一郎, 高木弘隆. 福岡県内の終末処理場流入水および胃腸炎患者検体からのヒトサポウイルス検出率向上に向けた取り組み. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 42:124-6, 2021.
 - 14) 小林慎一, 藤原範子, 水谷恵美, 安達啓一, 伊藤雅, 安井善宏, 山下照夫, 平松礼司, 下岸協, 皆川洋子, 大寫誠司, 林克巳, 野田耕平, 丹羽哲久, 子安春樹. 給食弁当を原因としたサポウイルスによる大規模食中毒事例 - 愛知県. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 31:322-3, 2010.
 - 15) Kitajima M., Haramoto E., Phanuwat C., Katayama H. Genotype distribution of human sapoviruses in wastewater in Japan. *Appl Environ Microbiol* 77:4226-9, 2011.
 - 16) 辰己智香, 三田哲朗, 山田直子, 藤澤直輝, 熱田純子, 柳俊徳. 自校調理施設を有する中学校でのサポウイルス食中毒事例 - 島根県. 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 40:90-1, 2019.
 - 17) 末井真菜, 伊藤彩乃, 重本直樹. 2022. 多様なサポウイルスを検出するための下痢症ウイルス検出用蛍光マルチプレックス RT-PCR 法 Ver.2.2 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告 :pp.7-13.
 - 18) Oka T., Yamamoto S. P., Iritani N., Sato S., Tatsumi C., Mita T., Yahiro S., Shibata S., Wu F. T., Takagi H. Polymerase chain reaction primer sets for the detection of genetically diverse human sapoviruses. *Arch Virol* 165:2335-40, 2020.
 - 19) Oka T., Iritani N., Yamamoto S. P., Mori K., Ogawa T., Tatsumi C., Shibata S., Harada S., Wu F. T. Broadly reactive real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of human sapovirus genotypes. *J Med Virol* 91:370-7, 2019.
 - 20) 食品衛生検査指針 微生物編 改訂第2版 サポウイルス 公益社団法人 日本食品衛生協会 :pp.683-91. 2018.
 - 21) 病原体検出マニュアル サポウイルス 国立感染症研究所 :pp.1-14. 2021.
 - 22) 稲崎倫子, 板持雅恵, 名古屋真弓, 佐賀由美子, 稲畑良, 滝澤剛則, 小渕正次. 次世代シーケンサーを用いた食中毒疑い事例からのサポウイルス GV.2 の検出. *日本食品微生物学会雑誌* 35:81-7, 2018.
 - 23) Shibata S., Sekizuka T., Kodaira A., Kuroda M., Haga K., Doan Y. H., Takai-Todaka R., Katayama K., Wakita T., Oka T., Hirata H. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc* 3, 2015.
 - 24) Doan Y. H., Yamashita Y., Shinomiya H., Motoya T., Sakon N., Suzuki R., Shimizu H., Shigemoto N., Harada S., Yahiro S., Tomioka K., Sakagami A., Ueki Y., Komagome R., Saka K., Okamoto-Nakagawa R., Shirabe K., Mizukoshi F., Arita Y., Haga K., Katayama K., Kimura H., Muramatsu M., Oka T. Distribution of Human Sapovirus Strain Genotypes over the last four Decades in Japan: a Global Perspective. *Jpn J Infect Dis*, 76:255-258, 2023.
 - 25) 楠原一, 小林章人, 北浦伸浩, 小掠剛寛, 岩出義人, 浅井隆治, 中井康博. 三重県におけるサポウイルスとノロウイルスの検出状況 (2017 ~ 2022 年). 病原体微生物検出情報 Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 44:62-4, 2023.
 - 26) Takagi H., Oka T., Shimoike T., Saito H., Kobayashi T., Takahashi T., Tatsumi C., Kataoka M., Wang Q., Saif L. J., Noda M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:32078-85, 2020.
 - 27) Kitajima M., Oka T., Haramoto E., Katayama H., Takeda N., Katayama K., Ohgaki S. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Appl Environ Microbiol* 76:2461-7, 2010.
 - 28) Okada M., Yamashita Y., Oseto M., Shinozaki K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Arch Virol* 151:2503-9, 2006.
 - 29) 高木弘隆, 岡智一郎. 汎用培養細胞によるヒトサポウイルスの培養法について. *食品衛生学雑誌 Food hygiene and safety science* 62:53-5, 2021.
 - 30) Chang K. O., Sosnovtsev S. V., Belliot G., Kim Y., Saif L. J., Green K. Y. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8733-8, 2004.
 - 31) 齊藤晃士, 石原正行, 高橋一平, 山本雅樹, 久川浩章, 森澤豊, 藤枝幹也. サポウイルス胃腸炎罹患後に胃十二指腸潰瘍を認めた2歳女児例. *小児感染免疫* 30:51-6, 2018.
 - 32) Li T. C., Kataoka M., Doan Y. H., Saito H., Takagi H., Muramatsu M., Oka T. Characterization of a Human Sapovirus Genotype GII.3 Strain Generated by a Reverse Genetics System: VP2 Is a Minor Structural Protein of the Virion. *Viruses* 14, 2022.
 - 33) Hansman G. S., Natori K., Oka T., Ogawa S., Tanaka K., Nagata N., Ushijima H., Takeda N., Katayama K. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol* 150:21-36, 2005.
 - 34) Oka T., Miyashita K., Katayama K., Wakita T., Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol Immunol* 53:417-20, 2009.
 - 35) Oka T., Li TC, Yonemitsu K., Ami Y., Suzuki Y., Oke-moto N., Kamura T., Kataoka M., Doan YH, Takagi H. Establishment and application of an efficient human sapovirus propagation method using HuTu80 cells. *The 8th International Calicivirus Conference at Rotterdam, Netherland*:PP126, 2023.
 - 36) Euller-Nicolas G., Le Mennec C., Schaeffer J., Zeng X. L., Ettayebi K., Atmar R. L., Le Guyader F. S., Estes M. K., Desdoutis M. Human Sapovirus Replication in Human Intestinal Enteroids. *J Virol* 97:e0038323, 2023.
 - 37) Desdoutis M., Euller-Nicolas G., Le Mennec C., Schaeffer J., Zeng X. L., Ettayebi K., Atmar R. L., Le

- Guyader F. S., Estes M. K. Human sapovirus replication in human intestinal enteroids. The 8th International Calicivirus Conference at Rotterdam, Netherland:OP009, 2023.
- 38) Neijd M Nordgren J, Hammas B Albert J, Svensson L, Hagbom M. Sapovirus replication in human jejunal enteroids. The 8th International Calicivirus Conference at Rotterdam, Netherland:PP057, 2023.
- 39) Shirakawa D., Shirasaki N., Hu Q., Matsushita T., Matsui Y., Takagi H., Oka T. Investigation of removal and inactivation efficiencies of human sapovirus in drinking water treatment processes by applying an in vitro cell-culture system. Water Res 236:119951, 2023.

Establishment of human sapovirus culture method

Hiroataka TAKAGI¹⁾, Tomoichiro OKA²⁾

1) Management Department of Biosafety, Laboratory Animal and Pathogen Bank, National Institute of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Diseases

2) Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Diseases

More than 40 years after the discovery of human sapovirus (HuSaV), we have established a HuSaV culture system in which HuTu80 cells derived from the human duodenum adenocarcinoma cell line are cultured together with the addition of bile acid as a supplement. In addition to being a common cell line, this system using HuTu80 cells is a versatile method because classical culture media are available, and it is easy to scale-up for culture. However, the number of culture days required to obtain sufficient viral titer, the confirmation of viral gene conservation for sample selection, and the method for passaging of HuTu80-cells were crucial. So far, 15 genotypes have been successfully propagated and stocked, and stable supply as research resources has been achieved. Due to the above efforts, we can now proceed with the production and analysis of antisera using purified antigens and the evaluation of inactivation conditions. This manuscript introduces the background for selection of the cell line and bile acids, and the topics that have been discussed since the publication, as well as future issues that were raised such as the expression of cytopathicity and elucidation of low UV-C sensitivity of fecal-derived HuSaV.