

2. ヒトノロウイルスの *in vitro* 培養系

佐藤 慎太郎^{1,2)}

1) 和歌山県立医科大学・薬学部・病態生理学研究室

2) 大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野

ヒトノロウイルス (HuNoV) は感染性胃腸炎の半数以上を占める感染症ウイルスであるが、その感染様式や宿主内での増殖メカニズムなどはほとんど明らかにされておらず、現状、HuNoV 感染症に対して使用可能なワクチンや特異的治療薬が存在しない。その理由として、HuNoV の *in vitro* 培養、増殖系が確立されていなかったことが挙げられる。それ故に、ノロウイルスのウイルス学的解析は、HuNoV に最も近縁と考えられ、培養可能なマウスノロウイルスを用いて行われてきた。近年になり、ヒト腸管上皮細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 培養が複数の研究室から報告されており、今後は実際に HuNoV を用いた解析が進んでいくものと考えられる。本稿では HuNoV *in vitro* 増殖系についての現状を紹介させて頂く。

ヒトノロウイルス *in vitro* 培養の試み

ノロウイルスは、1968年に米国オハイオ州ノーウォークで発生した集団胃腸炎の患者糞便中から発見され、1972年に電子顕微鏡観察によりその原因ウイルスとして同定された¹⁾。ノロウイルスの詳細な疫学的、ウイルス学的知見に関しては、本号の牛島先生の総説などを参照していただきたい。2002年の国際ウイルス学会で正式に *Norovirus* と命名され、発見以来50年以上が経過しているが、ヒトに感染し症状を呈すヒトノロウイルス (HuNoV) に関してはウイルス学的解析がほとんど進んでいない。これは、ウイルス学研究には欠かせない、対象ウイルスの *in vitro* 培養が長い間不可能であったことに起因している。HuNoV はヒトの体内 (腸管) で増えることが予想されていたため、ヒト大腸腺ガン由来の腸管上皮細胞株である Caco-2 や HT-29、また、ヒト胎児の空腸一回腸由来初代

培養腸管上皮細胞とされている INT407 を用いた増殖法が試された²⁻⁸⁾。中には100倍程度の増殖を認めたと報告しているものもあるが、現在では再現性のないものとされている。

2014年に Jones らは、HuNoV が血液型抗原の存在下で B 細胞株に感染し、増殖しうることを報告した⁹⁾。翌年にはこの実験プロトコルの詳細についても報告され¹⁰⁾、ついに HuNoV の *in vitro* 培養が可能になったと沸き立ったが、限られた遺伝子型ウイルスのみが増殖可能であることに加えて、他の研究室ではうまく再現が取れていない。

HuNoV に最も近いとされているマウスノロウイルスの *in vitro* 培養は、マウスマクロファージ株を用いることで可能になったことから¹¹⁾、ヒトマクロファージや樹状細胞などの貪食細胞を用いた HuNoV の *in vitro* 増殖が試みられたが、これらに関してもほとんど増殖することはなかった¹²⁾。

腸管上皮細胞の初代培養の成功

HuNoV は酸に強い耐性を持っており、胃酸の影響をほぼ受けずに小腸に到達し、上述したように腸管内で爆発的に増殖すると考えられている。そこで、正常なヒト小腸上皮細胞が用意できれば HuNoV を *in vitro* で増殖させることができるようになるのではないかと、多くの研究者が予想していた。しかし、腸管上皮細胞の初代培養は、ヒトはもちろん、実験動物であるマウスやラットを用いても樹立

連絡先

〒640-8156

和歌山県和歌山市七番丁 25-1

和歌山県立医科大学薬学部 病態生理学研究室

TEL: 073-498-8305

FAX: 073-488-1946 (代表)

E-mail: shintas@wakayama-med.ac.jp

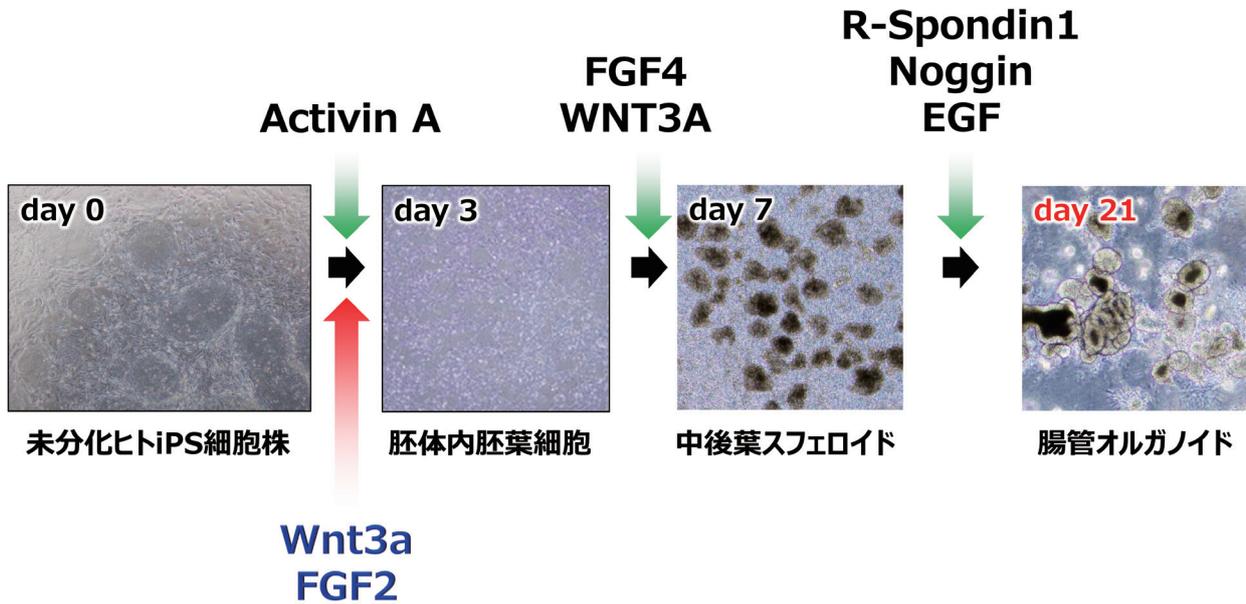


図1 ヒト iPS 細胞株からの腸管オルガノイド分化誘導の概要

することができなかった。これは、腸管上皮細胞のターンオーバーがヒトでも5～7日間と、非常に短命であることが原因と考えられる。

この状況を打破したのが、2007年に報告された腸管上皮幹細胞マーカー、Lgr5の同定である¹³⁾。この発見を皮切りに、腸管上皮幹細胞がすべての腸管上皮細胞の元になっていることや、培地にサイトカインなどを添加することで、腸管上皮幹細胞が自己増殖できるような三次元培養法が確立されていった^{14,15)}。2011年にはヒト組織由来、またヒト多能性幹細胞由来の腸管上皮細胞の三次元培養法が報告された^{16,17)}。

ヒト腸管上皮細胞を用いたHuNoV増殖の成功

ヒト腸管上皮細胞の初代培養法の報告から5年後の2016年に、ヒト小腸組織から調製した腸管上皮細胞を用いたHuNoVの*in vitro*増殖法がアメリカのグループから報告された¹⁸⁾。三次元培養した腸管上皮細胞を破碎し、マトリゲルコーティングを施した培養プレート上で単層化させて終末分化を誘導した後に、HuNoV感染患者の糞便懸濁液を加えて数日培養するだけで、例年の最大流行型であるGII.4型ウイルスが数百倍程度の増殖を見せた。異なる遺伝子型であるGII.3型ウイルスはほとんど増殖できなかったが、細胞培地に胆汁を添加することで数十倍の増殖を見せることが示された。胆汁の添加により、GII.4型ウイルスの増殖効率も上昇した。その後の研究から、胆汁の効果は胆汁酸によるものであり、エンドサイトーシスを活性化することに起因していることが明らかにされている¹⁹⁾。この手法は、技術移転された他の研究室においても再現され、

アメリカ疾病予防管理センター(CDC)の研究グループは、17種類の異なる遺伝子型を含む80検体のHuNoV陽性便を用いて、少なくともGII.1, GII.2, GII.3, GII.4(3つの亜型を含む)、GII.14, GII.17が*in vitro*で50～1000倍に増殖できたことを報告している²⁰⁾。HuNoVは十二指腸から空腸上部で感染し増殖するとされていたが、少なくとも*in vitro*の系では、十二指腸、空腸、回腸由来のいずれの上皮細胞でもHuNoVが増殖できることも確認されている¹⁸⁾。

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の樹立

ヒト組織由来の小腸上皮細胞を用いることで、HuNoVの*in vitro*増殖系が確立されたが、ヒトの組織を必要とすることから、その使用に当たり倫理承認を受ける必要があり、また、そもそも組織の入手自体が困難である場合が多い。大腸組織は、大腸がん患者などの切除検体のがん化していない部位から調製する事ができるため、新たな侵襲を必要とせずに入手可能であるが、小腸組織を摘出する外科手術は大腸組織に比べて頻度が極めて少ないため、HuNoVが増殖できる小腸上皮細胞を含む組織を入手する場合は、新たな侵襲を含む正常部位のバイオプシーによることが多い。そこで筆者らは、非侵襲であり、倫理的制約をほとんど受けず、遺伝的背景の情報が入りやすいヒトiPS細胞株から腸管上皮細胞を樹立することを考えた。

ヒトiPS細胞株から小腸オルガノイドへの分化は、胚体内胚葉細胞を介し、腸管マーカーであるCDX2陽性の中後腸スフェロイドを介して起こる。我々は複数のiPS細胞株を用い、まずは既報にしたがって分化の検証を行ったが、安定して腸管オルガノイドまで分化できることは希で、ま

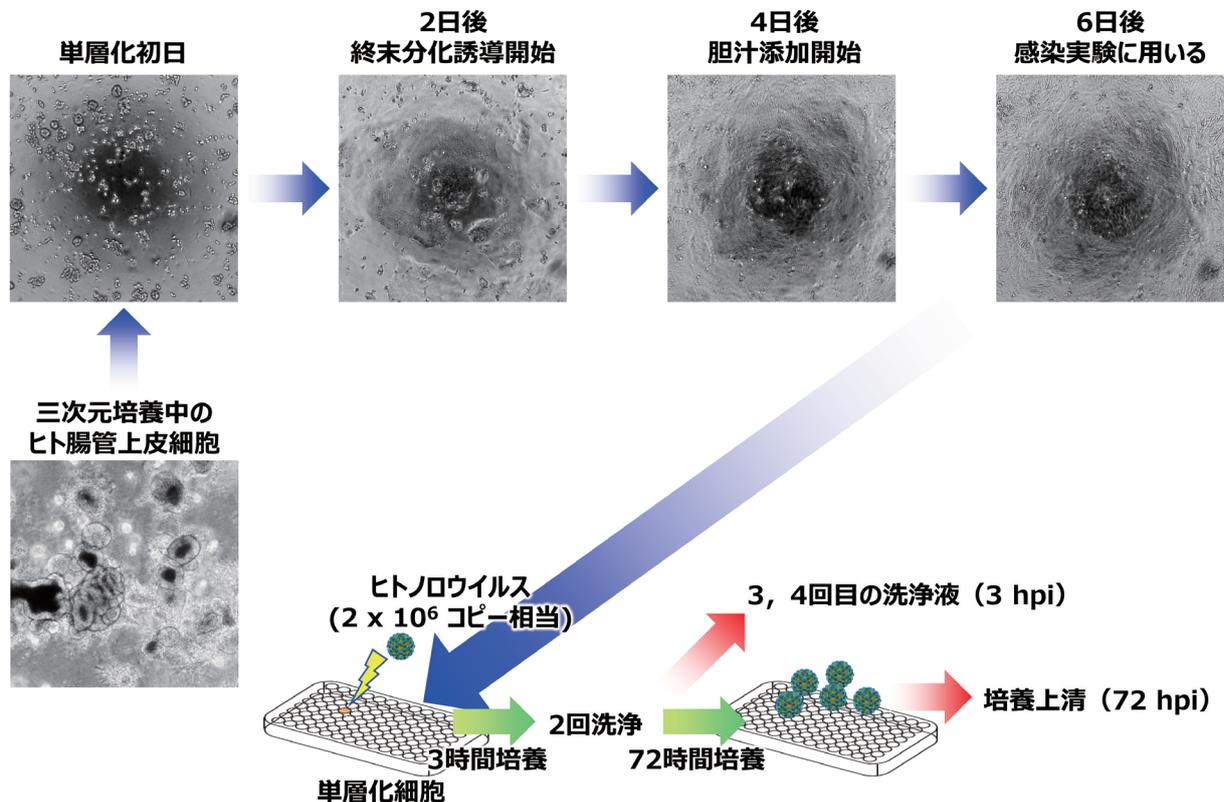


図2 HuNoV *in vitro* 増殖法の概要

マトリゲルの中で三次元培養を行い維持しているヒト腸管上皮細胞を、トリプシン処理により単細胞化し、マトリゲルコーティングした96-wellプレートに播種する(単層化初日)。2日後に、分化誘導培地に変えて、吸収上皮細胞などに終末分化しやすい状態にする。さらに2日後に胆汁(酸)を含む分化誘導培地に変更する(4日後)。そのさらに2日後にHuNoVを感染させる(6日後)。 2×10^6 コピー相当のウイルス液を細胞に添加し、3時間後にウイルス液を取り除く。培地で2回洗浄することで感染できなかったウイルス粒子を取り除く。その後、3, 4回目の洗浄液を混ぜて取り置く。これを増殖前のサンプルとする(3 hpi)。胆汁(酸)を含む培地を添加して、72時間程度まで培養を行う。培養後の培養上清と、細胞を培地で1回洗浄した液を混ぜて、増殖後のサンプルとする(72 hpi)。3 hpi, 72 hpiのサンプルからウイルスのゲノムRNAを抽出して、その量をリアルタイムPCRで定量化し、グラフ化する。

た、細胞株によっては全く分化できないものも存在した。様々な検討の結果、胚体内胚葉細胞までの分化の過程で、Wnt3aとFGF2(fibroblast growth factor 2)を添加することで、腸管オルガノイドへの分化効率が顕著に上昇することを見いだした(図1)。この手法を用いることで、既報に則った場合では分化できなかったiPS細胞株からもオルガノイドを得ることができた²¹⁾。本方法は、分化効率の低いiPS細胞株から腸管上皮オルガノイドを得る必要がある場合に特に有用であると考えられるが、血球系細胞から樹立されたiPS細胞株からの腸管オルガノイド樹立は若干効率が悪い。いかにして手持ちのヒトiPS細胞株を高品質な胚体内胚葉細胞へ分化誘導するかが重要であると考えている。現在はいろいろな手法による多能性幹細胞からの胚体内胚葉細胞、および腸管オルガノイド樹立が報告されて

おり、中には分化誘導培地キットとして市販されているものもある。腸管オルガノイドまで分化ができれば、腸管上皮幹細胞を含む腸管上皮細胞系列として凍結保存することが可能であるため、腸管上皮細胞を得るという目的のためならば分化誘導方法を1つに固定して、複数のヒトiPS細胞株を用いて分化誘導してみることが成功の可能性が高いと考えられる。

ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を用いたHuNoV増殖の成功

我々がヒトiPS細胞株から腸管上皮細胞を作製し、安定して継代培養が行えるようになり、HuNoVの感染実験を開始してまもなく、前述した、ヒト小腸組織由来の腸管上皮細胞を用いたHuNoV *in vitro* 増殖法が報告された¹⁸⁾。我々もこの報告に則ってHuNoVの増殖を行ってみたが、

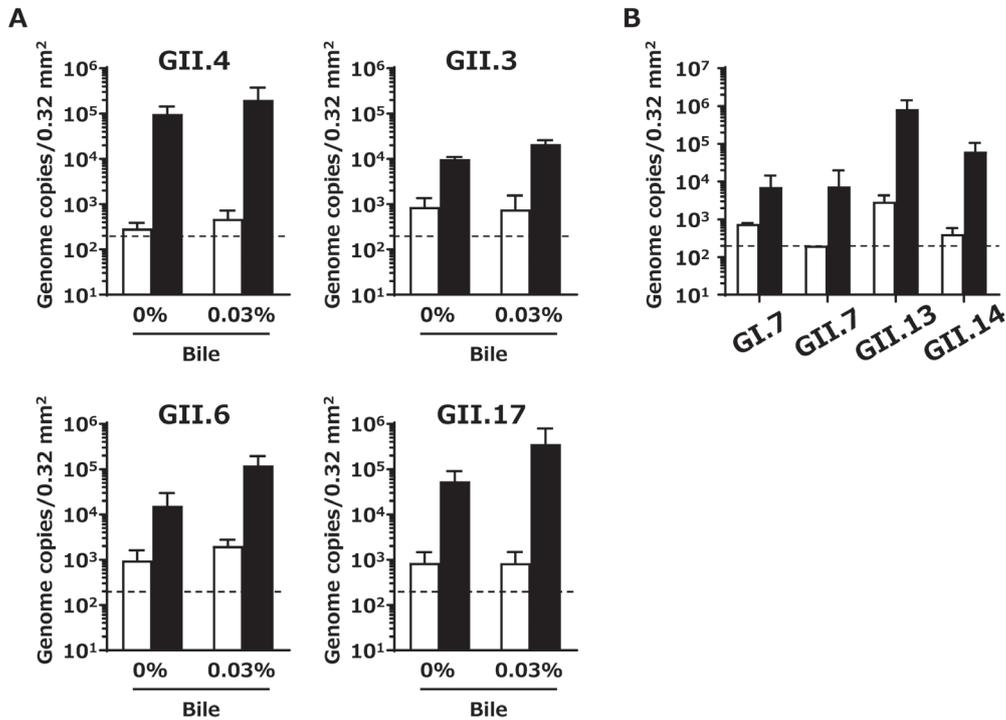


図3 ヒト iPS 細胞株由来の腸管上皮細胞における、種々の遺伝子型 HuNoV の *in vitro* 増殖

(A) 細胞の単層化4日後からブタ胆汁を0.03%で含む培地と含まない培地で培養した場合の結果。先行論文とは異なり、GII4型以外にも、GII3, GII6, GII17型の増殖が胆汁非添加群でも認められた。(B) 胆汁添加細胞におけるその他の遺伝子型 HuNoV の増殖。白カラムの値(3 hpi)から黒色カラムの値(72 hpi)までウイルスが増殖したことを表している。リアルタイム PCRでのゲノムコピー数の検出限界を破線で示している。

最初はウイルスの増殖を確認することができなかった。後からわかったことであるが、当初使用していた糞便検体には、HuNoVゲノムは十分に検出されるものの、感染性粒子が含まれていないようであった。ウイルスソースとして、患者由来の糞便検体を用いる必要がある現状では、ウイルスの増殖が見られなかった場合に、細胞を含む実験系に問題があるのか、糞便検体の方に問題(感染性粒子がほとんど存在しない、糞便懸濁液中に細胞毒性を示すものや感染を阻害する物質が含まれる、など)があるのかわからないままひたすら感染実験を行う必要がある。新たに HuNoV の *in vitro* 増殖を行う場合は、初めはあるウイルスが増殖できるとわかっている細胞か、ある細胞では増殖できるとわかっている糞便検体を用いて実験されることを推奨する。

暗中模索のまま感染実験を繰り返すこと数ヶ月、30倍程度と低い割合であったものの、初めて「増殖した」と思える細胞と糞便検体の組み合わせに当たった。この感染性粒子を含むと信じられる検体を用いて、最も増殖を示す細胞と、その調製法を細かく最適化していった。先行論文で報告された手法と大きな相違はなかったが、個人的には単

層化に供する細胞塊(オルガノイド)をいかに素早く、ダメージを与えずにシングルセルにできるかどうかが重要と考えている。結果的に、我々が樹立したヒト iPS 細胞株由来腸管上皮細胞においても、GII4, GII3, GII6, GII17, GI7が感染し、増殖しうることを確認できており^{22,23)}(図3)、また、GII7, GII13, GII14型 HuNoV の増殖も確認している(佐藤ら未発表データ, 図3B)。我々のアッセイ系でも胆汁の添加によりウイルスの増殖効率は増強されたが、先行論文での結果とは異なり、少なくとも GII3, GII6, GII17型の増殖に関しては、GII4型の場合と同様に胆汁(もしくは胆汁酸)を添加せずとも認められた(図3A)。iPS細胞を含む多能性幹細胞から分化させた腸管上皮細胞は、胎児の小腸上皮細胞に近い遺伝子発現パターンを示すことが報告されていることから²⁴⁾、我々が用いている細胞や胎児由来の小腸上皮細胞では、HuNoVの細胞への接着や、その後のエンドサイトーシスの活性化を誘導する胆汁酸要求性が低い可能性がある。このことは、組成が不明な胆汁や、種々の作用を考慮する必要のある胆汁酸の添加無しに HuNoV *in vitro* 増殖系を適応したい場合における、iPS細胞由来の腸管上皮細胞を用いる利点の一つと考えられる。

ヒト腸管上皮細胞以外の細胞を用いた HuNoV *in vitro* 増殖法

ゼブラフィッシュは脊椎動物モデルとして、特に発生研究でよく使用される実験動物であるが、この幼生（3日齢まで）の卵黄に HuNoV を含む糞便懸濁液をインジェクションすると、少なくとも GII.2, GII.3, GII.4, GII.6, GI.7 型が胆汁の添加を必要とせず、数十倍から数千倍増殖することが報告された²⁵⁾。接種したウイルスを洗い落とすという行程がないものの、その増殖効率はヒト腸管上皮細胞を用いたものに匹敵していた。興味深いことに、ゼブラフィッシュの幼生にマウスノロウイルスを接種しても、全く増殖が確認できない。この結果は、マウスノロウイルスが HuNoV とは似て非なるものであることを改めて示唆している。ゼブラフィッシュの飼育設備とマイクロコンピューターを必要とするため、ゼブラフィッシュを扱っていない研究室では実験手技も含めハードルが高いが、すでにこれらの設備が整っている研究室ではヒト腸管上皮細胞を用いるよりも簡便に HuNoV を増やすことができる方法かもしれない²⁶⁾。なぜ魚類であるゼブラフィッシュの体内で、他の哺乳類では増えることのできない HuNoV が増殖できるのか、その解明が待たれる。

また最近、不死化したヒト唾液腺細胞株を用いることで、腸管上皮細胞に匹敵する HuNoV の *in vitro* 増殖が認められ、4回程度の継代もできたことが報告された²⁷⁾。この報告により、感染患者の吐瀉物や糞便の中に含まれるウイルス粒子の手指を介して起こる糞口感染に加えて、口づけや、くしゃみなどの唾液の飛沫による HuNoV 感染経路の重要性が示唆されている。

克服すべき問題点

HuNoV の再現性ある *in vitro* 増殖法は確立されたと言ってもいいが、現状はまだ克服すべき問題点が多い。第一に、現在までに報告されているいずれの *in vitro* 増殖系でも、一度に 1000 倍程度の増殖しか起こらず、また継代培養が困難であることが挙げられる。この増殖効率は、一度に 10 万から 100 万倍程度の増殖を示すロタウイルスやマウスノロウイルス、インフルエンザウイルスなどと比較すると極めて低い。これは、他のウイルスの *in vitro* 増殖や、ヒト体内における HuNoV の増殖と異なり、*in vitro* で一度増殖した Progeny HuNoV が細胞に繰り返し感染することができないことによるものと思われる。一方で、近年問題となっている呼吸器感染症ウイルスである SARS-CoV-2 が、ヒト肺胞上皮細胞以上にヒト腸管上皮細胞で 1 万倍から 10 万倍程度増殖できることが知られている²⁸⁾。このことは、ヒト腸管上皮細胞自身に十分なウイルス複製能が備わっていることを示唆するものであり、Progeny HuNoV が繰り返し細胞に再感染できない要因はウイルス側の性質

にあることを物語っているように思える。さらに、ウイルスの継代培養が確立できない限り、HuNoV の臨床分離株を得ることができず、ウイルスソースとして毎回ウイルス粒子を含むと考えられる糞便検体を使用する必要があり、同一検体（ウイルス）を用いた実験の継続が困難になる危険を含んでいる。

第二に、ウイルスの感染力価を定量的に表すことが出来ないことである。この算出には感染細胞の形態変化や CPE を必要とする。HuNoV はノンエンベロープウイルスであるので、一般的には細胞を変性させて外に放出されるものと思われたが、現在のところ、HuNoV の *in vitro* 感染、増殖において、細胞変性効果を呈するという報告はない。ヒト唾液腺細胞株を用いて HuNoV の *in vitro* 増殖を検討したグループは以前、患者糞便中には、ロタウイルスやノロウイルスが細胞外小胞に包まれたクラスターとして存在しているものもあることを報告している²⁹⁾。*in vitro* における HuNoV の感染、増殖効率は、この細胞外小胞で包まれた状態のウイルス粒子の方が、フリーのウイルス粒子よりも高いことが示唆されており、クラスター化した HuNoV を用いることで増殖効率が改善されるかもしれない。

第三の課題として、少なくともヒト腸管上皮細胞を用いる場合、その維持には未だにコストと煩雑で複雑な手技を要することが挙げられる。筆者らは、腸管上皮細胞の維持培地に欠かせない高価なサイトカイン類を一度に、それぞれが至適濃度の 4 倍の濃度で培地中に放出するコンディショニングメディウム産生細胞を樹立した^{21,30)}。このコンディショニングメディウムと、細胞外基質としてコラーゲンを用いることで、リコンビナントタンパク質とマトリゲルなどの市販の細胞外基質を用いた場合に比べて、百分の一程度までコストダウンすることができている。マウスノロウイルスのタンパク質レセプターは同定されており、ウイルスの増殖が見られない一般細胞株にこの分子を強制発現させると、ウイルスの感染が成立し、*in vitro* で増殖できるようになることが報告されている^{31,32)}。この分子のヒトホモログは HuNoV のレセプターではないことが報告されており³³⁾、HuNoV のタンパク質レセプターは未だ同定されていない。HuNoV のタンパク質レセプターを同定し、それを発現する一般細胞株を樹立し利用することで、実用的なレベルでの HuNoV の *in vitro* 増殖が確認できれば、様々な問題が解決されるものと思われる。

HuNoV *in vitro* 増殖法の応用

上述したように、現在の HuNoV *in vitro* 増殖法は、臨床分離株として HuNoV を得る目的として使用するには解決すべき問題が多いが、HuNoV の増殖を指標としたウイルスの不活化研究は十分に行える。これまではマウスノロウイルスとネコカリシウイルスを用いて検討されていた、放射線照射や加熱、次亜塩素酸ナトリウムによる不活化に関して、

実際に HuNoV を用いた評価が行われている^{18,20,22,34)}。また、消毒用アルコールとしてよく用いられる 70% エタノールやイソプロパノールによる GII.4 型 HuNoV の不活化効果も検討されており、イソプロパノールでは全く不活化されないのに対して、エタノールで 5 分の処理では、完全ではないものの、80% 以上の不活化効果を示すことも報告されている²⁰⁾。筆者らもアルコール製剤の HuNoV 不活化効果に関して詳細に検討を行っている²³⁾。我々の検討では、GII.4 型 HuNoV は、70% エタノールのみならず、70% イソプロパノールによっても 90% 以上の不活化効果を認めしたが、検討した他の遺伝子型についてはいずれもその増殖に影響を及ぼさなかった。しかし、アルコール製剤の pH を中性域からずらすことで、いずれの遺伝子型 HuNoV もほぼ完全に不活化することが確認された。興味深いのは、ウイルスを 70% エタノールで 1 分以上処理すると、その後 *in vitro* で増殖が確認できるにもかかわらず、ウイルスのゲノム RNA が検出限界以下に減少する点である^{20,23)}。遺伝子型によっては逆に、検出されるゲノム RNA 量に変化がないにもかかわらず、*in vitro* では増殖できなくなる場合もあり、これらの結果は、リアルタイム PCR で検出するヒトノロウイルスのゲノム RNA 量と、感染性粒子の存在量には全く相関性がないことを示している。

HuNoV のウイルス様粒子 (VLP) を抗原とするワクチン開発が行われているが、その効果を判定するためには実際にヒトに投与して、かつ HuNoV を感染させる臨床試験が必要であった。したがって HuNoV の *in vitro* 増殖を指標とする評価系は、HuNoV に対するワクチン、特異的治療薬の開発にとって特に重要である。実際に我々は、GII.17 型 HuNoV の VLP をワクチン抗原とすると、例年最も広く流行する GII.4 型に対しても中和活性を有する抗体が誘導されることを示し、GII.17 型 VLP は少なくとも 2 価のワクチン抗原として機能することを報告している²²⁾。また、カイコ発現系を用いて作出した GII.4_2006b の VLP を抗原とすることで、GII.4_2012 に対しても中和活性を示す抗体が誘導されることも示している³⁵⁾。さらに、遺伝子工学を利用して作出した抗 HuNoV VHH 抗体で、当該遺伝子型 HuNoV の *in vitro* における増殖がほぼ完全に抑制されることも報告している³⁶⁻³⁸⁾。

おわりに

HuNoV *in vitro* 増殖法を用いた、ウイルス学的研究結果も報告され始めており³⁹⁾、HuNoV 研究の今後さらなる発展が期待される。また、増殖効率が飛躍的に増強された改良型、もしくは新規 *in vitro* 増殖法が開発されることで、HuNoV 研究の裾野が広がることを期待している。

謝辞

本稿を執筆する機会を与えて頂きました、京都大学医

物学研究所の野田岳志先生、大阪大学微生物病研究所の渡辺登喜子先生にお礼申し上げます。ヒトノロウイルス研究を行うに当たり、ウイルス検体を分与いただいております、大阪健康安全基盤研究所の左近直美先生、日本大学医学部の牛島廣治先生に深く感謝申し上げます。

利益相反の開示

本稿に関して、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Kapikian, A.Z., *et al.* Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* **10**, 1075-1081 (1972).
- 2) Duizer, E., *et al.* Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *J Gen Virol* **85**, 79-87 (2004).
- 3) Herbst-Kralovetz, M.M., *et al.* Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. *Emerg Infect Dis* **19**, 431-438 (2013).
- 4) Papafragkou, E., Hewitt, J., Park, G.W., Greening, G. & Vinjé, J. Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models. *PLoS One* **8**, e63485 (2014).
- 5) Straub, T.M., *et al.* Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. *J Water Health* **9**, 225-240 (2011).
- 6) Straub, T.M., *et al.* In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infect Dis* **13**, 396-403 (2007).
- 7) Straub, T.M., *et al.* Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. *Water Sci Technol* **67**, 863-868 (2013).
- 8) Takanashi, S., *et al.* Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Arch Virol* **159**, 257-266 (2014).
- 9) Jones, M.K., *et al.* Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* **346**, 755-759 (2014).
- 10) Jones, M.K., *et al.* Human norovirus culture in B cells. *Nat Protoc* **10**, 1939-1947 (2015).
- 11) Wobus, C.E., *et al.* Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, e432 (2004).
- 12) Lay, M.K., *et al.* Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. *Virology* **406**, 1-11 (2010).
- 13) Barker, N., *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003-1007 (2007).
- 14) Sato, T., *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262-265 (2009).
- 15) Ootani, A., *et al.* Sustained *in vitro* intestinal epitheli-

- al culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* **15**, 701-706 (2009).
- 16) Sato, T., *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* **141**, 1762-1772 (2011).
 - 17) Spence, J.R., *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* **470**, 105-109 (2011).
 - 18) Ettayebi, K., *et al.* Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science* **353**, 1387-1393 (2016).
 - 19) Murakami, K., *et al.* Bile acids and ceramide overcome the entry restriction for GII.3 human norovirus replication in human intestinal enteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 1700-1710 (2020).
 - 20) Costantini, V., *et al.* Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerg Infect Dis* **24**, 1453-1464 (2018).
 - 21) Takahashi, Y., *et al.* A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids. *Stem Cell Rep* **10**, 314-328 (2018).
 - 22) Sato, S., *et al.* Human Norovirus Propagation in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **7**, 686-688.e685 (2019).
 - 23) Sato, S., Matsumoto, N., Hisaie, K. & Uematsu, S. Alcohol abrogates human norovirus infectivity in a pH-dependent manner. *Sci Rep* **10**, 15878 (2020).
 - 24) Fordham, R.P., *et al.* Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* **13**, 734-744 (2013).
 - 25) Van Dycke, J., *et al.* A robust human norovirus replication model in zebrafish larvae. *PLoS Pathog* **15**, e1008009 (2019).
 - 26) Van Dycke, J., *et al.* Infection of zebrafish larvae with human norovirus and evaluation of the *in vivo* efficacy of small-molecule inhibitors. *Nat Protoc* **16**, 1830-1849 (2021).
 - 27) Ghosh, S., *et al.* Enteric viruses replicate in salivary glands and infect through saliva. *Nature* **607**, 345-350 (2022).
 - 28) Lamers, M.M., *et al.* SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science* **369**, 50-54 (2020).
 - 29) Santiana, M., *et al.* Vesicle-Cloaked Virus Clusters Are Optimal Units for Inter-organismal Viral Transmission. *Cell Host Microbe* **24**, 208-220.e208 (2018).
 - 30) Takahashi, Y., *et al.* Drug cytotoxicity screening using human intestinal organoids propagated with extensive cost-reduction strategies. *Sci Rep* **13**, 5407 (2023).
 - 31) Orchard, R.C., *et al.* Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science* **353**, 933-936 (2016).
 - 32) Haga, K., *et al.* Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6248-e6255 (2016).
 - 33) Graziano, V.R., *et al.* CD300lf is the primary physiologic receptor of murine norovirus but not human norovirus. *PLoS Pathog* **16**, e1008242 (2020).
 - 34) Hayashi, T., *et al.* Evaluation of Heat Inactivation of Human Norovirus in Freshwater Clams Using Human Intestinal Enteroids. *Viruses* **14** (2022).
 - 35) Masuda, A., *et al.* High yield production of norovirus GII.4 virus-like particles using silkworm pupae and evaluation of their protective immunogenicity. *Vaccine* **41**, 766-777 (2023).
 - 36) Yuki, Y., *et al.* A heterodimeric antibody fragment for passive immunotherapy against norovirus infection. *J Infect Dis* (2020).
 - 37) Sasou, A., *et al.* Development of Antibody-Fragment-Producing Rice for Neutralization of Human Norovirus. *Front Plant Sci* **12**, 639953 (2021).
 - 38) Yuki, Y., *et al.* Lactobacilli as a Vector for Delivery of Nanobodies against Norovirus Infection. *Pharmaceutics* **15** (2022).
 - 39) Ayyar, B.V., *et al.* CLIC and membrane wound repair pathways enable pandemic norovirus entry and infection. *Nat Commun* **14**, 1148 (2023).

In vitro propagation system for human norovirus

Shintaro SATO^{1,2)}

1) Department of Microbiology and Immunology, School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University

2) Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Human norovirus (HuNoV) is an infectious virus that accounts for more than half of all cases of infectious gastroenteritis, but its mechanism of infection and multiplication within the host are largely unknown. Accordingly, there are no available vaccines or specific therapeutic agents applicable to HuNoV infection. The primary reason for this is the absence of an established *in vitro* culture and growth system for HuNoV. Therefore, virological analysis of HuNoV has been conducted using murine norovirus, which is most closely related to HuNoV and can be cultured in some cell-lines. Recently, several laboratories have reported successful *in vitro* cultivation of HuNoV using human intestinal epithelial cells, raising expectations for further advancements in HuNoV research. In this paper, we present recent findings regarding the *in vitro* propagation system of HuNoV.