

2. ウイルス第二部

部長 宮村達男

概要

平成14年4月の組織再編により、当部は旧ウイルス製剤部の腸内ウイルスワクチン室および不活化ワクチン室の業務を引き継ぎ、人員も配置転換となった。対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、また検定、検査対象となるワクチンはA、B型肝炎ワクチン、ポリオ生ワクチンである。

第1室の最重要課題はポリオ経口生ワクチンの検査、検定である。本年は全く新しい人員体制で小分製品1件、中間段階製品1件の検定を無事おこなった。また不活化ワクチンの特別審査をふくめ、ポリオワクチンの免疫学的研究をスタートした。

当グループでは従来からの下痢症ウイルスの研究を継続させている。特にわが国の食中毒の多くの原因となっているノロウイルスの研究が大きく進展した。レセプターの検索、ウイルスプロテアーゼの構造と機能に関する地道な研究も進んだ。また全国地研との連携も良くいき、レファレンスセンターとしての機能を良く果たしている。

またE型肝炎ウイルスの研究が着実に進行している。ウイルス中空粒子を用いた、感度の良い診断系の開発、ワクチン開発という応用研究が進む一方、構造解析によるウイルス粒子形成メカニズムの地道な研究へと発展している。

第2室では総力を挙げてWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析をおこなった。課題はまだ地球上に残る野生株ウイルスの解析と、ワクチンの変異株によるポリオ流行の解析である。根絶計画はいよいよ最終段階にはいり、もっとも重大で困難な局面を迎えた。また国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしてレファレンス活動、依頼検査を行なった。

第3室ではヒト腫瘍に関わると考えられているヒト乳頭腫ウイルス、パポウイルス、B、C型肝炎ウイルスそしてポックスウイルスを研究対象としている。中で、ヒト乳頭腫ウイルスの発癌メカニズムにかかる研究、発現ベクターとしてのポックスウイルス、BKウイルスの粒子解析などの研究が進展をみせた。

第4室のC型肝炎ウイルスの研究は、着実にすすんでいる。とくに懸案であった培養細胞系でのウイルス増殖が確立し、感染性を持つ粒子産生をみたことが大きい。“アダプト”したクローンが採れて、増殖の効率が高まればブレイクスルーとなる。

第5室では、旧ウイルス製剤部の不活化ワクチン室の業務を引き継

ぎ、不活化A型肝炎ワクチン、組み換え沈降B型肝炎ワクチンの検定、検査をおこなっている。これらのワクチンの品質管理について国際的の和合についての調査を開始した。またA型肝炎ウイルスの粒子構造解析研究が始まった。

各室で国際的な共同研究が継続している。これらが従来の技術移転から真の共同研究へと発展することを期待している。

1) Berhane Beyene and Anjelo Asha Adlo(エチオピア、保健栄養研究所)、<JICAフェロー> 平成15年3月16日~4月25日、ポリオウイルスおよびエンテロウイルスの実験室診断。

1) Nguyen Thi Thanh Thao(ベトナム、パスツール研究所)、<WHO/JSPSフェロー> 平成15年3月16日~3月28日、同上。

1) Nguyen Binh(ベトナム、国立衛生疫学研究所)、<WHOフェロー> 平成15年3月16日~3月28日、同上。

1) Sarijlou Mahboobeh(イラン、テヘラン医科大学)、<WHOフェロー> 平成15年3月16日~3月28日、同上。

1) Napa Onvimala(タイ、国立衛生研究所)、<JICAフェロー> 平成14年9月30日~12月19日、エンテロウイルスの実験室診断研修。

1) Chen Li(中国、中国疾病予防センター)、<JICAフェロー> 平成14年12月16日~平成15年11月14日、ポリオウイルス分子学診断技術。

研究費としては経常研究費の他に、厚生労働科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス振興財団、ウイルス肝炎研究財団、文部省科学研究費、医薬品機構等の援助を受けた。

人事面では、勝二郁夫がウイルス第3室長として着任(平成14年4月1日)、米山徹夫主任研究官がウイルス第5室室長に昇任した(平成14年7月1日)。また有田峰太郎がウイルス第2室研究員(平成14年4月1日)、岡智一郎がウイルス第1室研究員(平成14年7月1日)、李天成がウイルス第1室主任研究官として(平成14年10月1日)それぞれ採用された。相崎英樹主任研究官がC型肝炎ウイルスの分子生物学的研究の為、南カリフォルニア大学医学部 M.Lai 研究室に長期出張している(平成14年5月より)。

研究業績

1. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス(NV)に関する研究

(1)チバウイルス3C様プロテアーゼの生化学的性状

ノロウイルス属に属するチバウイルスが有する3C様プロテアーゼを精製し、3C/3D切断部位を含むタンパク質を基質として酵素反応を行った。チバウイルス3C様プロテアーゼの至適pHは8.6付近で、生理的pHよりもアルカリ側にあった。至適温度は37度であった。Na⁺あるいはK⁺イオンにより活性が阻害されたが、Mg²⁺およびCa²⁺イオンには非感受性であった。Zn²⁺およびHg²⁺イオンにより完全に活性が阻害された。また種々のSH修飾試薬感受性であり、プロテアーゼ活性にCys残基が必須であることが示された。これらのデータは治療薬開発に有用な情報になると期待される。

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(2)チバウイルス3C様プロテアーゼの結晶構造解析

精製したチバウイルス3C様プロテアーゼより3次元結晶を作成した。この結晶と、これに重金属試薬を浸潤させた結晶を用いて、X線結晶構造解析を行った。その結果、3程度の解像度のデータを得ることができた。さらなる解像度向上のため、結晶化条件の詳細な検討を行っている。3次元立体構造の解明はコンピュータを用いた理論的な治療薬開発に有用である。(東京工業大学生命理工学部田中信夫教授との共同研究)

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(3)ノロウイルス(NV)と型物質との結合

NVが糖鎖である型物質をレセプターとして用いるとの報告がなされている。しかし、プロトタイプであるNorwalk virusのみ、またはそれを含むほんの数株でしか解析が行われていない。そこで、型物質が全てのウイルス株に共通のレセプターであるかどうかを検討するため、NV16株のウイルス様中空粒子(VLPs)と唾液中の型物質との結合を解析した。その結果、11株のVLPsはdose-dependentに唾液と結合した。型物質量の少ない唾液への結合量は低かったことから、これらの株の結合に型物質が関与していることが示唆された。一方、唾液中に全く結合しないウイルスが4株、また、その結合量が唾液中の型物質量と相関しない株が1株認められ、結合に型物質以外の因子

を必要とするウイルス株の存在が示唆された。

[白土東子、名取克郎、鎌田公仁夫(デンカ生研)、影山努(BML)、小川智子、宮村達男、武田直和]

(4)NVの吸着しない細胞と吸着する細胞の細胞表面分子の比較

NVは細胞株が由来する動物種、臓器にかかわらずほとんど全ての培養細胞に吸着する。これまでに吸着しない細胞の同定はなされていない。そこで、NVの吸着しない細胞の同定、解析を行うため、NVとの結合について報告のないヒトリンパ球細胞(MOLT-4、MT-2、Jurkat、U937)とVLPsとの結合をBinding assayにより検討した。その結果、MT-2以外の細胞にはほとんど結合しなかった。つぎに、136種類の抗CD抗体を用いて、NVの吸着しないMOLT-4と吸着するMT-2の細胞表面分子の発現をFlow cytometryにより比較検討した。その結果、MT-2で発現の高い分子が36種類選択されてきた。これらの中にはNVの結合に関与する分子が含まれる可能性がある。今後、抗体によるVLPs結合阻害実験などを行い結合に関与する分子を絞り込み、糖鎖以外の因子の関与についても検討していきたい。

[白土東子、名取克郎、宮村達男、武田直和]

(5)NV粒子形成機構の解析

NVのゲノムには3つのORFが存在する。ORF2は構造蛋白質をコードしており、本領域をバキュロウイルスで発現させるとウイルス様粒子VLPを作出することができる。ORF3は、ウイルス粒子を形成する構造蛋白質ではないかと考えられている。また、ORF1にはVPgがコードされており、核酸に結合して粒子内に取り込まれると考えられているが、詳細は明らかにされていない。本研究ではORF1、ORF2、ORF3を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、これらを共感染させることで、昆虫細胞内に各種ORF蛋白質を供給し、粒子形成にどのような影響を与えるかを検討した。

[松原尚子、片山和彦、白土東子、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

(6)NV VLP産生機構の解析

NVのORF2を組換えバキュロウイルスで発現すると、VLPを作出することができる。しかし、同じ株から作出した組換えバキュロウイルスでも、VLPを大量に産生するクローンと、細胞内にはORF2蛋白質を大量に発現するがVLPは産生しないクローンが存在する。我々は、これらクローンの塩基配列を解析し、わずかに数アミノ酸残基の変異がこの差を生み出していることを見いだした。現在、VLP産生クロー

ウイルス第二部

ンと非産生クローンのキメラを作製し、どのアミノ酸がどのような機構で VLP 産生に影響を与えるのかを調べている。

[高井 聡、松原尚子、白土東子、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

(7) NV の病原性に関する研究

NV は非細菌性食中毒の主要な原因であるが、その病原性発現機構については調べられていない。我々は、NV 蛋白質が真核生物の細胞に与える影響を昆虫細胞を用いて調べた。ORF1、ORF2、ORF3 を発現する組換えバキュロウイルスを作製し、これらを昆虫細胞に感染させてそれぞれの ORF にコードされる NV 蛋白質を発現させた。感染細胞における細胞の増殖速度、アポトーシスおよびネクローシス誘導能について正常細胞と比較して調べ、どの ORF が細胞に対する毒性を有するかを検討した。

[林 薫、松原尚子、白土東子、片山和彦、宮村達男、武田直和]

(8) NV の分子系統解析

我々は NV のゲノム全塩基配列を複数本決定し、それらを用いた分子遺伝学的解析により、構造蛋白質領域の遺伝子配列を用いた NV のタイピング法を構築した。NV には、2003 年現在、GI に 14 種類、GII に 17 種類のゲノタイプが存在することを明らかにした。現在、これらのデータを日本全国の衛生研究所などで疫学調査に利用できるよう、データベースを構築している。

[片山和彦、名取克郎、影山努(BML)、福士秀悦(BML)、宮村達男、武田直和]

(9) NV 複製機構の研究

NV には培養細胞を用いた増殖系、実験動物系が構築されていない。NV の複製機構を解明するため、T7 RNA ポリメラーゼプロモーター配列下流に、NV ゲノム全長を組み込んだプラスミドクローンを作製し、T7 RNA ポリメラーゼを用いてゲノム RNA を大量に細胞内に供給した。5'末端をキャッピングした RNA を供給した場合、ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が翻訳され、それぞれ機能を有する蛋白質に切断された。特にウイルス RNA ポリメラーゼは供給した(+)鎖ゲノム RNA より、(-)鎖 RNA を合成し、かつ約 2.6 Kb のサブゲノム RNA を合成することが明らかになった。

[片山和彦、岡智一郎、小川智子、小嶋慈之(BML)、宮村達男、武田直和]

(10) NV RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RdRp)の研究

NV の ORF1 にはポリ蛋白がコードされており、その C 末端側に位置する 57 KDa の蛋白質は、アミノ酸モチーフから RdRp であると考えられている。我々は、本酵素のコード領域を大腸菌及び組換えバキュロウイルスで発現させ RdRp の性状を調べた。大腸菌で発現させた RdRp はポリ A よりも、NV3'末端領域にポリ A を含む鋳型に強く反応し、(-)鎖を伸張した。RdRp の活性中心である YGDD モチーフを壊すと、RdRp の活性は消失した。この結果はバキュロウイルスで発現させた RdRp でも同様であった。

[片山和彦、岡智一郎、小川智子、小嶋慈之(BML)、高井玲子(BML)、宮村達男、武田直和]

(11) NV の中空粒子の発現と血清学的解析

昨年までに、遺伝子型 I (GI) で 5 株、遺伝子型 II (GII) で 15 株のウイルス様中空粒子 (VLPs) は発現に成功した。これらは血清学的には 13-14 に分類された。しかし遺伝子の解析からノロウイルスはまだ多くの血清型が存在することが考えられる。本年度は、GI に属す 1 株の VLP 発現に成功し、さらに GII の 3 株で発現を試みている。昨年度に発現した GI 株および今回の GI 株は共に新しい血清型に分類された。また、同様に Alphatron 株は血清学的にも GI、GII とは異なっていた。この株は GII の 2 株とやや強い交叉反応を示したが、このことによって Alphatron 株が GII グループに属するか、または新たな GIII として分類できるかどうかはまだ断定できない。Alphatron ウイルスの血清疫学の結果は低抗体保有率を示した。他のノロウイルス株と異なって Alphatron 株はあまり浸潤していないと考えられた。

[名取克郎、片山和彦、白土東子、瀬戸祥介(大阪市立大)、永田典代、松尾恵子(感染病理部)、武田直和、宮村達男]

(12) 連続発生集団胃腸炎事例からの NV 遺伝子の検出と遺伝子配列の解析

2001 年 4 月に修学旅行生徒、教員 100 名中 81 名発症した食中毒事例(A 事例)と同年 5 月 S 市近郊の N 小学校で生徒、教員、調理従事者 117 名中 70 名発症の食中毒(B 事例)について病原体検索を行い NV 遺伝子を検出した。A 事例では患者便 21 検体、吐物 3 検体、旅館従業員及び調理従事者 51 検体、1 施設の検食、また B 事例では患者便 13 検体、吐物 2 検体、調理従事者便 7 検体の検体について電子顕微鏡(EM)、RT-PCR、EIA 検査を行った。さらに、A 事例では検出遺伝子 2 検体をプローブにしてサザンブロットハイブリダイゼーション検査、また B 事例では検出遺伝子のダイレクトシーケン

スを行った。

[石川和子、筒井理華、三上稔之、大友良光、宇田川悦子]

(13) NV が結合する細胞表面分子の検索

NVが結合する細胞表面分子を同定するために、様々な結合阻害剤を用いた結合阻害効果を調べた。実験には³⁵Sで標識したUeno virus (UEV) の中空粒子およびIntestine 407 細胞株を用いた。その結果、ヘパリン、スラムン、プロタミン硫酸、およびポリリジンで顕著な阻害効果が観察され、³⁵S-UEVが細胞表面のグリコサミノグリカンと結合することが推測された。

[田村 克(東京大学大学院)、名取克郎、宮村達男、武田直和]

(14) NV が結合する細胞表面分子の同定

グリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、およびヒアルロン酸を用いて³⁵S-UEVの結合阻害効果を調べた。その結果、ヒアルロン酸以外の3種類のグリコサミノグリカンで顕著な結合阻害効果が認められた。そこで、Intestine 407 におけるUEV結合性細胞表面分子を特定するために、ヘパリナーゼI、III、およびコンドロイチナーゼABCでそれぞれ細胞表面を処理し、³⁵S-UEVの吸着を観察した。その結果、ヘパリナーゼIおよびIIIで処理した場合のみ濃度依存的に顕著な結合阻害効果が認められた。以上の結果から、細胞表面のヘパラン硫酸が特異的にNVの結合分子として働くことが示された。

[田村 克(東京大学大学院)、名取克郎、宮村達男、武田直和]

2. サボウイルスに関する研究

(1) サボウイルス(SV)がコードするポリペプチドの網羅的発現

SV は2つのオープンリーディングフレーム(ORF)をコードする。ORF1 については翻訳後、ウイルス自身のプロテアーゼによって複数の機能タンパク質に切断されると考えられている。SV のポリペプチドの切断様式について検討するための第一段階として、SV(チェンマイ株)のORF1 の83%、ORF2 の100%の領域に対応する9種類のリコンビナントタンパク質を発現、精製し、SV ゲノムのほぼ全域にわたり部位特異抗体を作製した。

[岡 智一郎、小川智子、Grant S. Hansman、片山和彦、宮村達男、武田直和]

(2) SV 遺伝子の解析

SV の全塩基配列はデータベース上にわずか3株しか報告され

ておらず、現状ではSV 遺伝子の特徴及び多様性を十分に解析できない。そこで、新たに4株のSV 全塩基配列を決定し、解析を行った。SV で最も保存された領域は、近縁のノロウイルス(NV)と同様、RdRp コード領域3 側から構造蛋白質コード領域5 側に存在した。この領域の塩基配列はゲノグループ内はもとより、ゲノグループを超えて保存されており、NVと同様にSV でもゲノムの組換えが、この配列を起点に起きている可能性がある。今後、この領域をターゲットにしたリアルタイムPCR 検出系を構築する予定である。

[片山和彦、Grant S. Hansman、岡智一郎、宮村達男、武田直和]

(3) SV VLP 作出の試み

SV の遺伝子解析の進展に伴い、SV でもNV 同様複数のゲノグループとそれらに内包されたゲノタイプの存在が示唆されている。つまり、SV にもNV 同様抗原性の異なる複数の株が存在する可能性がある。我々は、SV の構造蛋白質領域上流約80 塩基からゲノム末端までをクローニングし、幾つかの欠失ミュータントクローンを作製して、バキュロウイルス発現系を用いたVLP 作出を試みた。構造蛋白質開始コドンからゲノム末端までを組み込んだ組換えバキュロウイルスは、表面構造を持ったVLP を作出したが、その収量はNV の場合と比較し1/10 にも満たなかった。現在、VLP の発現量をコントロールする方法を検討中である。

[Grant S. Hansman、片山和彦、小川智子、名取克郎、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

3. 疫学等に関する研究

(1) 小児科外来における小型球形ウイルス散発事例—1

昨年に引き続き、2001年3月から2002年2月までに埼玉県春日部厚生病院小児科外来へ来院し非細菌性ウイルス性下痢症と診断された小児患者由来便89例について、従来検査されている下痢症ウイルス検出法に加え電顕法、RT-PCR 法により小型球形ウイルス(ノロウイルス、サボウイルスおよびアストロウイルス)の検出を行った。昨年と同様ノロウイルスGII 型(85%)が一番多く検出されており例年の傾向と一致していた。

[宇田川悦子、藤田靖子(春日部厚生病院小児科)]

(2) 小児科外来における小型球形ウイルス散発事例—2

昨年に引き続き、2001年3月から2002年2月までに大阪府中野子供病院小児科外来へ来院し非細菌性ウイルス性下痢症と診断された小児患者由来便50例について、従来検査されている下痢症ウイルス検出法に加え電顕法、RT-PCR 法により小型球形ウイルス(ノロウイルス、サボウイルスおよびアストロウイルス)の検出を行った。電顕検査できた33例中ウイルス陽性は51%、PCR(P1/P2,3 プライマ

ウイルス第二部

一)検査可能であった48例中陽性は21%(GII型のみ)、電顕及びPCRとも陽性は13%であった。電顕陽性でPCR陰性の検体がまだ多く存在している事が明らかである。今後は種々のプライマーで検出率の比較を検討する。

[宇田川悦子、園府寺美(中野こども病院小児科)]

(3)電子顕微鏡(EM)を用いた小型球形ウイルス・サーチ画像処理技術開発

小型球形ウイルス粒子は電子顕微鏡観察で多様な形態を示す。夫々に特徴的な表面構造を有するウイルス粒子を画像として蓄積し、実際の観察時に照合することで、従来から懸案の電子顕微鏡観察における小型球形ウイルスの高感度検出・高速処理、および検査法の簡素化を目指す。実際に電子顕微鏡下で検出され、遺伝子検査等で分類がなされたロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルスの典型的な粒子画像を高感度カメラで収集する。ウイルス粒子画像の微細な特徴を解析する画像処理法を用いて、電子顕微鏡像からウイルス粒子の検出及び種類同定を高速高感度で自動的に行う。これに必要な高解像度カメラシステムと画像取り込みインターフェースを研究開発する。

[宇田川悦子]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. レファレンス活動

(1)国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保有し、要望に応じて地研等に配付した。2002年は、ウイルス標準株10株、抗血清46種類、プール抗血清EP95を30セット、コクサッキーA群同定用CF腹水を4セットを配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別の検査は行政検査として実施され、検査したポリオウイルスすべてがワクチン由来株であった。

(2)ポリオ実験室診断技術研修会の開催

第12回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。本年度は、新たに完成した村山庁舎新6号館研修施設において研修を行った。研修期間は2002年2月24日～3月14日、研修参加者は、バングラディッシュ、ラオス、ミャンマー、パキスタン、イランから各1名、ベトナムおよびエチオピアからそれぞれ2名の計9名であった。ポリオウイルスの分離・同定・型内鑑別等に関する技術研修およびポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義を行った。

(3)WHO Global Specialized Laboratoryとしての活動

ア) ナショナル・ポリオラボラトリーが存在しないラオス・カンボジアのナショナル・ラボラトリーとして実験室診断を行った。AFP由来検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

イ) WHO Global Specialized Laboratoryとして、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム・モンゴルで分離されたポリオウイルスについて型内鑑別を行った。すべてのポリオウイルスがワクチン由来株であることを明らかにし、この地域における野生株ポリオフリーを確認した。

ウ) フィリピンで2001年に分離された1型ポリオウイルスが一定期間同地域で伝播していたワクチン由来株(VDPV)であることを、フィリピンRITM、オーストラリアVIDRL等との共同研究で明らかにし、ウイルス学的解析を行った。過去のエジプトのポリオ流行から分離された2型ポリオウイルスが、同様の病原性復帰したVDPVであることをCDCとの共同研究により明らかにした。

エ) ポリオ根絶過程で重要性が増しているVDPVのスクリーニング法の検討を行った。PCR-RFLPに加え、ELISA法・モノクローナル抗体法等について、検出精度の評価を行なっている。

オ) 東アジア地域における非ポリオエンテロウイルス感染症のサーベイランスおよび実験室診断を行った。特にエンテロウイルス71の実験室診断法についての研究を行った。

2. 西太平洋地域の2002年のウイルス分離状況

2002年にラオス、カンボジアから送付されたAFP症例255例由来の糞便検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。3株のポリオウイルスが分離され、すべてワクチン由来株であった。非ポリオエンテロウイルスは74検体から分離された。その他、ベトナム、香港、ニュージーランド、韓国等でAFPおよび非AFP検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別および塩基配列の解析を行なった。

[清水博之、米山徹夫、吉田弘、有田峰太郎、名取克郎、宮村達男]

3. 世界ポリオ根絶計画に沿ったポリオウイルスの分子疫学

(1)環境から分離された1型ポリオウイルスの性状解析

環境より分離された13株の1型ポリオワクチン由来株についてMAPREC法を用いて神経毒性を推定するとともにmAbを用いて抗原解析を行った。抗Sabin-mAb、抗Mahoney-mAbを用いて中和抗

ウイルス第二部

価を測定したところ、4/13 株は抗 Sabin-mAb に対し難中和性を示し、かつ MAPREC の結果は強毒変異タイプだった。易中和性を示した 5 株は MAPREC の結果強毒変異タイプだった。即ち抗原的に Sabin 株と類似していても神経毒性の異なる 2 つのタイプが存在していることを示した。一方抗 Sabin-mAb に対し難中和の株は抗 Mahoney-mAb で中和できたこと、逆に易中和性を示した株には抗 Mahoney-mAb が反応しなかったことを示した。mAb を用いた抗原解析及び MAPREC の結果は、VP-1 領域における塩基置換は 1% に満たなくとも、抗原性、神経毒性が変化することを示した。

[吉田 弘、宮村達男、堀江均(日本ポリオ研究所)、松浦久美子(富山県衛生研究所)]

(2) フィリピンで分離された 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

フィリピンで分離された 4 株の 1 型 cVDPV の全塩基配列を、他のポリオおよびクラスタ C コクサッキー A ウイルス(C-CAV)と比較解析した。フィリピンの 1 型 VDPV のカプシド領域の塩基配列はワクチン株由来であるがワクチン株との相同性は 97%程度であり、ワクチン投与から 1.5 から 2 年程度伝播していた可能性が高い。非構造蛋白質領域の P3 領域は、クラスタ C コクサッキー A ウイルス(C-CAV)の多くと相同性が高く、P2 領域は CAV-13,17,18,20 等と、特にアミノ酸レベルでの相同性が高かった。cVDPV の組み換え対象のエンテロウイルスは、いまだに不明であるが、CAV-13, 17, 18, 20 等一部の C-CAV とポリオウイルスが組み換えを起こす可能性は高いと考えられる。

[清水博之、有田峰太郎、Andi Utama, 吉田 弘、田野良夫、宮村達男、Fem J. Paladin(RITM, the Philippines), Bruce Thorley (VIDRL, Australia)]

(3) エジプトで分離された 2 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

1988 年から 1993 年にかけて、エジプトで広範囲に発生したポリオ流行において分離された 2 型ポリオウイルス解析を行い、この流行が野生株ポリオでなく cVDPV によることを明らかにした。VP1 領域の遺伝子解析によると親株からの変異は、3~7%程度であり、OPV ウイルスが 10 年近くにわたり伝播し、ポリオ流行に関与していた可能性が示された。分離された 2 型 cVDPV は、抗原性、温度感受性および Tg マウスにおける神経毒力試験等において野生株と類似したウイルス学的特徴を有していた。また、長期間にわたる伝播の過程で、Sabin 株以外のエンテロウイルスとの間で複数回の組み換えを起こしていたことが示唆された。

[Chen-Fu Yang, Mark Pallansch, Olen Kew (CDC), 清水博之、米山徹夫、宮村達男]

(4) カンボジアにおける AFP 症例から分離された組み換えポリオウイルスの解析

2002 年度のカンボジアにおける AFP 症例から分離されたポリオウイルスの解析を行ったところ、非構造タンパク質をコードする領域に未知の配列を持った Sabin 3 型ワクチン株由来の組み換えウイルスが見いだされた。Sabin 3 型ワクチン由来の配列中の変異が少ないことから(親株とのホモロジーが 99.5%)、組み換えが生じた後短期間に分離されたウイルスであることが示唆された。現在、非構造タンパク質領域の相同性解析により、ポリオウイルスと組み換えを起こしたエンテロウイルスの同定を進めている。

[有田峰太郎、吉田弘、清水博之、米山徹夫、宮村達男]

(5) エンテロウイルス試験管内組み換えシステムの確立

ポリオウイルスと組み換えを起こしうるエンテロウイルスを同定するためには様々な組み換えウイルスを作製する必要がある。そのため、Long PCR 法を用いた効率の良い組み換えウイルスの作製系を確立した。始めにフィリピンで流行を起こしたワクチン由来ポリオウイルス(PJ156)と Sabin 1 型との組み換えウイルス(PJ156/Sabin 1)を作製した。各ウイルス RNA を鋳型にして逆転写酵素で目的 cDNA を増幅した。これらの cDNA 断片を DNA polymerase で繋ぎ合わせ、最後に PCR により full-length cDNA を増幅させた。full-length cDNA を RNA に転写した後、HEp-2 細胞にトランスフェクションしウイルス増殖を確認した。CPE 出現を観察したところ、24 時間後に僅かな CPE が観察され、48 時間後に全ての細胞が CPE を発現し死滅した。ウイルスを回収し、再度 HEp-2 細胞に感染させ、ウイルスの感染性を確認した。同様な方法で作製した PJ156/Sabin 2、PJ156/Sabin 3 及び PJ156/Mahoney も回収できたことより、この系は組み換えウイルスの作製に有用であることを確認した。

[Andi Utama, 清水博之、宮村達男]

(6) ポリオウイルスと組み換えを起こすエンテロウイルスの同定

試験管内組み換えシステムを用いて、PJ156 とクラスタ C に属するコクサッキー A ウイルス(CAV11, CAV13, CAV17, CAV18, CAV21)との組み換えウイルスの作製を試みた。この実験では組み換え部位は 2C 領域に設定した。試験したウイルスのうち、CAV11 と CAV17 との組み換えウイルス(PJ156/CAV11 と PJ156/CAV17)を回

ウイルス第二部

収できたのに対し、他のウイルスとの組み換えウイルスを回収できなかった。また、組み換え部位を2C領域の3末端にするとCAV18との組み換えが起こることも明らかになった。CAV11及びCAV17の2Bまたは2Cの遺伝子を解析すると、ポリオウイルスとアミノ酸レベルでの相同性が高いことが分かった。それに対して、他のCAVはポリオウイルスと異なるグループに属していた。また、2C領域の3末端のアミノ酸配列は全てのコックスッキーAウイルスではポリオウイルスとほぼ同じことから、ポリオウイルスは非構造タンパク質のアミノ酸配列がポリオウイルスと高い相同性をもつコックスッキーAウイルスと自然界で組み換えを起こすことが示唆された。

[Andi Utama, 清水博之, 宮村達男]

(7) IPV 導入後のニュージーランドにおける OPV 分離株の解析

2002年2月にIPVを導入したニュージーランドにおいてIPV導入後に分離されたOPVについて解析を行い、OPVからIPVにワクチンを変更した後のOPV伝播について検討した。小児科入院患者、エンテロウイルス、AFPおよび環境中の各サーベイランスより分離されたポリオウイルスを解析した。小児科入院患者、エンテロウイルスおよびAFPサーベイランスからは、IPV導入後比較的速やかにOPVが検出されなくなったが、環境中サーベイランスからはOPVが継続して分離された。しかし、分離ウイルスの遺伝子解析により、ニュージーランドで伝播しているウイルスもしくは長期排泄者に由来するウイルスではないことが示唆された。オーストラリア等OPV使用国からの輸入ウイルスであると考えられるが、今後もサーベイランスを継続する予定である。

[Sue Huang (IESR, New Zealand), 清水博之, 宮村達男, Mark Pallansch (CDC)]

(8) 台湾における免疫不全患者から分離された VDPV の神経毒力

免疫不全患者等に認められるポリオウイルス長期排泄者から排泄されるポリオウイルスによるポリオ流行のリスクをいかにして減らしていくかは、ポリオ根絶後の重要な課題となっている。2001年、台湾において確認された免疫不全ポリオウイルス長期排泄者から継続的に分離された1型ポリオウイルスの神経毒力をポリオウイルスレセプター発現 Tg マウスを用いて検討した。持続感染者の麻痺発症後、5, 17, 52, 337 日後に分離されたウイルスについて検討したところ、いずれのウイルスも Sabin 1 型と比較して病原性復帰が認められた。しかし、発症後1ヶ月以内に分離されたウイルスは、それ以降に分離されたウイルスと比較してより強い神経毒性を示したことから、持続感染に

よる変異の蓄積は単純に神経毒力の上昇につながらないことが示唆された。

[楊 志元, 陳 豪勇 (TCDC, Taiwan), 清水博之, Andi Utama, 有田 峰太郎, 宮村達男, Olen Kew (CDC)]

(9) 中国の2型ポリオワクチン関連麻痺の解析

中国雲南省・貴州省における2型ポリオワクチンウイルスの伝播の可能性を疫学的および分子疫学的に解析した。対象地域には麻痺患者の集中発生を推測させる事例が存在したが、分離されたウイルスの遺伝子解析によると、ほとんどの2型ウイルス分離株のVP1領域の変異は1%以下であり、1年以上の期間2型ポリオワクチンウイルスが伝播しポリオ流行に関与していた可能性は低いものと考えられた。また、分離株間の分子疫学的関連性も認められなかったため、多くの症例は孤発のワクチン麻痺症例であることが示唆された。

[千葉靖男, 帖佐 徹(国際医療センター), 山本悌司(福島医大), 許 分波, 張 礼壁(中国疾病予防センター), 清水博之]

(10) 中国四川省の2型ポリオワクチン株の解析

2002年に中国四川省において2型ポリオワクチンによる麻痺患者の集中発生を推測させる事例が発生した。3例のAFP症例および3例のコンタクトから分離された2型ワクチン由来ウイルスを解析したところ、4株はSabin2/Sabin3の組み換えウイルス、2株はSabin2/Sabin1型の組み換えウイルスであった。VP1全領域の塩基置換は、ワクチン株と比較して3カ所のみであり長期間伝播していた可能性は低いが、6株すべてが共通の部位に塩基置換を有しており、分離株間の関連性が示唆された。現在、神経毒力等ウイルス学的特徴についての比較解析を行っている。

[陳 立, 許 分波(中国疾病予防センター), Andi Utama, 清水博之, 宮村達男]

4. ポリオウイルスの分子生物学

(1) ポリオウイルスの神経毒性発現の解析

ウイルスタンパク合成を下げたポリオウイルスの一連の変異株を作製し、Tg21 マウスを用いて神経毒力を測定した。その結果、親株のウイルスタンパク合成能の20%以下に下げた変異株では弱いながらも弱毒化が認められた。この変異株は、脳から脊髄への感染経路においては不安定であるが、脊髄内では比較的安定に増殖することが観察された。今後、ウイルス複製においてウイルスタンパク合成の低

ウイルス第二部

下が重要となる脳内の部位を同定する予定である。

[有田峰太郎、清水博之]

(2) Sabin-IPV の抗原性に関する研究

弱毒ポリオウイルス Sabin 株を用いた不活化ポリオワクチン (Sabin-IPV) を日本ポリオ研究所が開発した。ホルマリン不活化工程でどのエピトープ構造が変化するかについて、抗原認識部位特異的モノクローナル抗体 (MAb) を用いた ELISA 法により調べた。Sabin 1 では site 1 を認識する MAb による、ELISA 反応が低下していたことから、ホルマリン不活化によって site 1 の構造変化が起きたことが示唆された。Sabin 2 ではホルマリン不活化によって大きな抗原性変化は認められなかった。Sabin 3 ではいくつかのモノクローナル抗体に対してホルマリン不活化後に反応性が失われており、一部の抗原認識部位がホルマリン不活化によって変化したと考えられる。今回の実験は、Sabin-IPV の有効性を評価する D 抗原価測定改良や、さらに効果的なワクチンを開発する上で役に立つと考えられる。

[田野良夫 (ポリオ研)、清水博之、宮村達男、Javier Martin (NIBSC)]

5. エコーウイルスに関する研究

(1) エコーウイルス 30 型のゲノタイプに関するモニタリング

日本ではほぼ 7・8 年周期でエコー 30 型による無菌性髄膜炎の流行が見られ、ウイルスのゲノタイプが異なっていることをこれまでに明らかにしてきた。前回の流行は 1997-98 年であり、次の流行予測のために、1998 年に以降分離された株の分子系統解析を行った。その結果 2001 年に新潟で分離された株は過去の流行株と若干の塩基置換が見られるものの同一のクラスターに属していた。一方 2002 年に広島にて分離された株は過去国内で報告された株と別のクラスターを形成した。しかし標準抗血清により中和可能であり、大きな抗原変異は伴っていないと考えられた。

[吉田 弘、高尾信一 (広島県保健環境センター)、渡辺香奈子 (新潟県保健環境科学研究所)]

6. エンテロウイルス 71 (EV71) に関する研究

(1) モノクローナル抗体を用いた EV71 抗原性の解析

EV71 粒子構造および抗原性決定部位を解析するために、特異的モノクローナル抗体 (Mab) を作製した。ホルマリン不活化 EV71 (1095/Shiga 株) を抗原とし、アジュバントとともに BALB/C マウス 2

匹に免疫し、最終的に、ELISA 活性の高い 5 クローンと中和活性を有する 2 クローンのハイブリドーマを樹立した。得られた Mab による中和活性は、EV71 分離株型特異的中和反応性を示した。中和 Mab による抗原認識部位を同定するため Mab 存在下で、エスケープミュータントを選択し、アミノ酸置換部位を同定した。他のエンテロウイルスのカプシド蛋白質とのホモロジーによりカプシド蛋白質の立体構造を推測すると、アミノ酸置換の多くは VP1 の NAg-1 およびその周辺に位置することが示唆された。

[田野良夫、清水博之]

(2) EV71 温度感受性株のカニクイザルにおける神経毒力の解析

前年度までに作製した EV71 温度感受性株をサルに接種し、神経毒性の解析を行った。その結果、ポリオウイルスのワクチン株の弱毒性変異を導入した変異株では、接種したサルの脊髄からのみウイルスが分離され、脳内からは分離されなかった。一方、親株である BrCr 株を接種したサルでは、回収した脳内の各組織及び脊髄からウイルスが分離された。今後さらに強い弱毒性を持った EV71 を作製する予定である。

[有田峰太郎、清水博之、永田典代 (感染病理部)、網 康至、須崎百合子 (動物管理室)、岩崎琢也 (長崎大学)]

(3) EV71 の神経毒性の発現機序の研究

EV71 は、非ポリオエンテロウイルスの中では、中枢神経合併症を引き起こしやすいウイルスとして知られている。近年、東アジアで多くの死亡例を含む手足口病重症例が多発し、EV71 感染による中枢神経症状が重篤化の主因であると考えられている。EV71 感染動物モデルとして唯一確立されているカニクイザル感染系を用いて EV71 の神経病原性を解析した。静注感染による EV71 の神経病原性をポリオウイルスと比較したところ、EV71 による病変およびウイルス増殖部位は、ポリオと比較してより広い範囲の中枢神経組織に認められた。EV71 感染による広い範囲の中枢神経病変は、EV71 感染重症例に認められる麻痺以外の多様な中枢神経症状の発現に関与すると考えられる。

[永田典代 (感染病理部)、清水博之、有田峰太郎、網 康至、須崎百合子 (動物管理室)、岩崎琢也 (長崎大学)]

(4) 東アジアの EV71 の分子疫学解析

近年東アジア諸国では、大規模な手足口病流行の際に死亡例を伴う重篤な中枢神経疾患の多発が報告されている。その多くは

ウイルス第二部

EV71 流行によるものであることが示されているが、手足口病あるいはエンテロウイルス感染症に対する適切なサーベイランスおよび実験室診断が行われていない国における EV71 伝播の実態は明らかではなかった。そこで、いままで EV71 分離の報告が無かったタイおよび系統解析が行われていなかった中国の EV71 分離株の分子系統解析を行った。VP1 領域の解析の結果、タイの分離株はマレーシア等で報告されている subgenogroup C1 に属しており、中国本土の分離株は、これまで報告されていない新たな subgenogroup である C4 に分類されることが示された。

[清水博之、Andi Utama、宮村達男、Napa Onnimala、Yaowapa Pongsuwanna (NIH, Thailand)、張 礼壁、陳 立(中国疾病予防センター)]

7. A 群エンテロウイルスに属する新規エンテロウイルスの遺伝子解析

2002 年にカンボジアの AFP 患者から分離された非ポリオエンテロウイルスの同定および遺伝子解析を行ったところ、カプシド領域 (VP4 および VP1) の分子系統解析により、4 株のエンテロウイルスは既知のエンテロウイルスとは独立した単一のクラスターを形成することが明らかとなった。4 株のエンテロウイルスは、cluster A エンテロウイルスに分類されるが、既知のヒト由来の cluster A エンテロウイルスとの相同性は低く、むしろ一部のサル由来エンテロウイルスとの関連性が認められた。新規ヒトエンテロウイルスであることが強く示唆されるが、今後、他の領域の遺伝子解析および抗原性解析により確認する必要がある。

[陳 立、清水博之、Andi Utama、宮村達男]

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルス (HAV) に関する研究

(1) HAV の細胞感染を阻害する抗イディオタイプ抗体について

抗 HAV 中和抗体をマウスに免疫して得た抗イディオタイプ抗体 Ab2:94-7 は HAV 感受性細胞 GL37 への HAV 感染を阻害した。Ab2:94-7 は既知の抗 HAV レセプター抗体と GL37 細胞の結合を競合抑制した。この結果から Ab2:94-7 が細胞表面の HAV レセプターに結合して HAV の感染を阻害すると推察された。また、Ab2:94-7 は GL37 細胞以外の HAV 感受性細胞 CMK、Huh7、Vero いずれにも

結合し、感受性細胞に共通の HAV レセプターに対するリガンドである可能性が示唆された。Ab2:94-7 の可変領域のアミノ酸配列を解析し、感染阻害能のない Ab2:94-2 の配列と比較したところ、H鎖、L鎖ともに相補性決定領域(CDR)3 に差が認められた。

[清原知子、戸塚敦子]

(2) 細胞培養 HAV 粒子の精製

クリオ電顕法による HAV 粒子の構造解析を目的とした協力研究を Karolinska Institute の Dr. Holland Cheng と行っている。当室は素材となる A 型肝炎ウイルス粒子の精製を担当した。

[清原知子、戸塚敦子、Holland Cheng (Karolinska Institute、スウェーデン)]

(3) 単クローン抗体とその中和抵抗性変異株を用いた HAV の抗原構造の解析

遺伝子 1A 型、1B 型、3B 型免疫によって今までに作製した 39 種類の抗 HAV 単クローン抗体 (mAb) を用いた。遺伝子 3B 型 KRM003Gp72 株を各 mAb で中和継代することによって 42 種類の抵抗性変異株を得て、構造蛋白部位遺伝子塩基配列を調べ、置換アミノ酸を同定した。さらに変異導入株 4 株も用いて、競合抑制型の ELISA 反応により変異株の mAb 抵抗性パターンを調べた。大部分の変異株は作製に用いた以外の一群の mAb に対しても抵抗性となっており、4 群への分類がほぼ可能であった。変異株によっては、別の群の単クローン抗体との結合性の変化 (主として低下でまれに増強) も多少認められた。A 群変異株は VP1 の 217 と 221 のアミノ酸置換を主とするが、VP2-178 の置換も VP1-217 置換と同様な抵抗性を獲得した。また継代中に両方の変異株が混在することから、両アミノ酸は立体構造上非常に近い位置にあると考えられた。VP2-178 の置換は C 群の VP2-189、VP2-198 の置換とは抗原的に関連していなかった。B 群は VP1 の 100 および 170 位付近のアミノ酸置換をもち、D 群は VP3 の 65 から 74 に変異を認めた。こうした研究は HAV 粒子立体構造の解明に有用となる。

[戸塚敦子、清原知子、佐藤知子]

(4) 無血清培地を用いた培養細胞による A 型肝炎ワクチン製造の開発

A 型肝炎ワクチン作製には培養細胞を用いる。この細胞の培養に用いる FBS を通して、ワクチンにプリオンが混入する可能性を取り除くため、ウイルス増殖に用いる細胞を無血清で培養する手法の確立

ウイルス第二部

を試みた。その結果、無血清培地 VP-SFM でこの細胞は増殖し、更にこの培地で HAV が増殖することが明らかとなった。しかし、ウイルス増殖は FBS 入り培地に比べ良くなかったので、VP-SFM 培地に欠けている何らかの細胞増殖、また、ウイルス増殖に必要な因子の同定を進めている。

[下池貴志、戸塚敦子、武田直和、田代真人(ウイルス第三部)]

2. B型肝炎ウイルス(HBV)に関する研究

(1) B型肝炎ワクチン参照品素材としての精製 HBs 抗原の作製(継続)

中間段階精製 HBs 抗原プールを限外濾過で濃縮、バッファー置換後、ショ糖濃度勾配遠心法で更に精製し、約650mgのHBs抗原を得た。総タンパク量に対する HBs 抗原の含有率は 54%と低く、SDS-PAGE でも夾雑タンパクのバンドが認められた。現在、夾雑タンパクの除去方法を検討中である。

[清原知子、下池貴志、戸塚敦子、米山徹夫]

(2) 国際参照沈降B型肝炎ワクチン(International Reference Reagent for adsorbed Hepatitis B Vaccine)の力価測定

「海外において製造・使用されているワクチンの品質評価に関する研究班」の一環として、国内参照沈降B型肝炎ワクチンと NIBSC から提供されている国際参照沈降B型肝炎ワクチンを比較した。平成 14 年 9 月と平成 15 年 2 月に国際参照沈降B型肝炎ワクチンを輸入し、生物学的製剤基準に準拠した方法で力価を測定した。平成 14 年 9 月に輸入したワクチンの力価は adr: 2.79, adw: 2.42 であった。一方平成 15 年 2 月に輸入したワクチンは adr: 7.04, adw: 5.64 と、いずれも同じロットでありながら異なる結果となった。これが輸入の際の温度管理の不備等によるアクシデントなのか製剤の性質なのかを特定するため、平成 15 年度に温度管理下でワクチンを輸入し、再評価することにした。

[清原知子、下池貴志、戸塚敦子、佐藤知子、米山徹夫]

3. C型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) HCV コア蛋白質による HCV RNA の翻訳抑制機構の解析

これまでに、HCVのコア蛋白質が自身の5'非翻訳領域(5'UTR)内の stem-loop IIIid 領域に相互作用し5'UTR 依存的翻訳を抑制することを見出した。更にこの翻訳抑制は stem-loop IIIid の loop 領域の構造が重要であることを示唆する結果を得た。今回我々はコア蛋白質の

N 末端の 57 アミノ酸領域が翻訳抑制に重要であることを示唆する結果を得た。更に、この 57 アミノ酸領域内のどのアミノ酸が重要な同定を進めている。また、昨年に続きこの翻訳抑制に重要な細胞因子の同定も進めている。

[下池貴志、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男]

(2) バイオリアクター (RFB) 三次元培養肝細胞による HCV 感染系の改良

感染実験に適した HCV 血清を選抜するため、複数の患者血清を同一ウイルス濃度に混合し RFB 培養系に感染させた。経時的に培養上清中の RNA、抗原を測定したところ、感染後、3, 9, 19, 33 日目をピークとする間欠的なウイルスの増減が認められた。各ピーク時の HCV 遺伝子配列を決定した結果、感染初期からウイルスクローンが選択され、33 日目では1クローンに収束することが明らかとなった。

[村上恭子、小俣和彦、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男]

(3) RFB 三次元培養肝細胞を用いた HCV 粒子の作製と性状解析

HCV 全遺伝子と薬剤耐性マーカーを持つダイシストロニック RNA レプリコンを、ヒト肝癌由来細胞 Huh7 に導入して、HCV RNA 複製細胞(RC-YM1)を作製した。この RC-YM1 細胞を単層培養した場合、細胞内でウイルス RNA の複製と抗原発現は認められるが、ウイルス粒子形成は観察されていない。そこで、RC-YM1 細胞を RFB で培養し上清から HCV 粒子の回収を試みた。ショ糖密度勾配遠心の結果、約 1.1 及び 1.2g/mL の分画にウイルス RNA、構造蛋白のピークを観察した。

[村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男]

(4) HCV RNA 複製に関与する Huh7 細胞因子の検索

あらかじめサブクローン化しておいた種々の Huh7 細胞株に対して RNA レプリコンを導入し複製効率が最大 50 倍程度異なる細胞株を得た。cDNA マイクロアレイ法により各細胞株の遺伝子発現プロファイリングを比較し、HCV 複製効率に相関する遺伝子を数十種類同定した。特に細胞周期関連遺伝子群が特徴的であり、複製効率の高い細胞株では、S 期から G2 期を正に制御する cyclinA, cdc2 及び G1 初期を負に制御する p18ink6 等の発現がそれぞれ亢進していることが明らかとなった。

[村上恭子、染谷友美、石井孝司、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

ウイルス第二部

(5) FLC4 を用いた HCV 遺伝子複製に関わる因子の検索

FLC4 細胞のサブクローン 10 種について HCV レプリコンを導入し、コロニー形成能で複製活性を評価した。その結果、1 種のみが HCV 遺伝子を複製でき、ウェスタンブロットングで HCV タンパク質が検出された。定量的 PCR で HCV RNA 量を定量したところ、Huh7 株での複製量に匹敵した。この FLC4 サブクローンと、HCV 遺伝子を複製できないサブクローンとの間で発現量の差がある遺伝子を、マイクロアレイ解析で調べた。これらのうち実際に HCV 遺伝子複製に関わっている因子を、RNAi 等を用いて同定する。

[染谷友美、村上恭子、石井孝司、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

(6) HCV 遺伝子型 2b 由来 RNA レプリコンの作製

現在、遺伝子型 1b 以外の HCV クローンをを用いた HCV レプリコンは報告されていない。1b 型に比べ IFN に対する感受性の高い 2b 型由来レプリコンの作製を試みた。RNA 導入細胞を G418 処理し薬剤耐性細胞株を選択した。得られた細胞株に 2b 型 HCV 遺伝子が維持されていることを IRES 領域の遺伝子解析から確認した。現在、Adaptive mutation の存在を検討するため、全遺伝子配列の解析を行っている。

[江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(7) HCV IRES IIIc 領域に結合する宿主因子の検索

HCV 5' 非構造領域内の IIIc 領域にはコア蛋白質が結合すること、及び同蛋白質が HCV IRES 依存的翻訳を抑制する事が報告されている。翻訳抑制の機構として IIIc に結合する宿主因子とコア蛋白質の拮抗作用が考えられた。そこで、IIIc 領域特異的に結合する宿主因子を検索したところ、p54-nrb、hnRNP-H、PSF 等が同定された。現在これらの蛋白質が HCV-IRES 依存的翻訳効率に及ぼす影響、及び、HCV 複製過程に与える影響を検討している。

[村上恭子、松田麻未、下池貴志、宮村達男、鈴木哲朗]

(8) HCV の新たな翻訳調節機構の解明

HCV ゲノム RNA の 5' -UTR に存在する IRES 活性は、ウイルス蛋白質およびゲノム配列によって調節されていることが報告されているが、新たな翻訳調節機構が存在する可能性に着目し、検討を行なった。その結果、E1 領域遺伝子から cap 非依存的な翻訳が開始されること、その翻訳活性が NS2 蛋白質によって抑制されることが明らか

となった。

[鈴木亮介、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(9) レプリコンを持つ細胞への HCV 構造蛋白質の供給による粒子形成

HCV レプリコンを持つ細胞に構造蛋白質を供給することで、レプリコン RNA を中に持つ粒子を形成できる可能性があると考えられる。レプリコンを持つ Huh7 細胞である 9-13 株に、HCV の構造蛋白質領域を発現する組換えワクチニアウイルス DIs を感染させ、1 週間培養後上清及び細胞を分画して調べたところ、蔗糖密度勾配で構造蛋白質、HCV レプリコンは同一の画分に存在し、この RNA は RNase に抵抗性であったことから、レプリコン RNA を含む粒子形成が示唆された。

[石井孝司、村上恭子、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男]

(10) HCV コア蛋白質によるヌクレオキャプシド様粒子の作成

HCV コア蛋白質はウイルス RNA と結合しヌクレオキャプシドを構成すると考えられるが、粒子形成の分子機構は明らかにされていない。コア蛋白質遺伝子 (type 1b 及び 3a) を *in vitro* の転写翻訳系で発現させ、ショ糖密度勾配遠心にかけたところ、コア蛋白質は二つの密度 (約 1.1 と 1.2 g/mL) に収束した。それぞれをネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察したところ、特に 1.2 g/mL 分画で直径約 30—40 nm の粒子構造が観察された。現在、抗コア抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により確認を行っている。

[坂本真一郎、白木和子、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗]

(11) HCV コア蛋白質の細胞内局在化機構の解析

HCV コア蛋白質は細胞内で、ER、ミトコンドリア及び核に存在することを免疫電子顕微鏡法等で確認した。また protease protection assay より、ミトコンドリアでは外膜に存在する可能性が示された。これらの細胞内局在を規定するシグナルの同定を試み、コア蛋白質-GFP 融合蛋白質を用いた解析から、ER 局在には aa 112-152 領域が、ミトコンドリア局在には aa 112-123 領域がそれぞれ重要であることが明らかとなった。

[鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、下池貴志、松尾恵子 (感染病理部)、岩崎琢也 (長崎大)、鈴木哲朗、宮村達男]

(12) HCV コア蛋白質の核における機能の解明

HCV コア蛋白質は C 末端側の疎水性領域がプロセシングされると

ウイルス第二部

細胞質から核に移行する。コア蛋白質の核内での機能を明らかにするために、C 末端側の疎水性領域を欠損させたコア蛋白質を一過性に発現させ、核タンパク質のプロテオーム解析を行なった。その結果、コア蛋白質の発現に伴い、等電点が変化するタンパク質を同定した。またこの等電点の変化は、リン酸化によるものであることが明らかとなった。現在この核タンパク質の機能解析を行っている。

[鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男]

(13)HCV コア蛋白質によるアポトーシス抑制とその調節機構

Ecdysone 添加によってコア蛋白質を誘導発現する Hep191 細胞株は、肝炎患者肝組織と同レベルにコア蛋白質を産生する。Hep191 細胞では、抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスがコア蛋白質発現により抑制されるが、この時カスパーゼ 3 の活性化が抑制されること、アポトーシス抑制蛋白 ICAD の発現が増加することを見出している。今回、ルシフェラーゼレポーターを用いた解析から、コア蛋白質による ICAD promoter 活性の亢進作用を観察した。

[堤 武也、Rodolfo Sacco、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(14)HCV コア蛋白質発現トランスジェニック (TG) マウスを用いた遺伝子発現プロファイリング

マイクロアレイ、ドットプロット解析の結果、TG マウスの肝組織で発現が上昇する 16 遺伝子、低下する 15 遺伝子を同定した。発現が低下していた遺伝子群のうち IGFBP1 は細胞増殖に關する IGF の活性を調節すること、lipocalin は血液中でレチノールなどと結合し免疫反応や細胞のホメオスターシスに關すること、からこれらの遺伝子の発現低下が、HCV コア蛋白質による細胞増殖、細胞環境攪乱に寄与している可能性が考えられる。

[堤 武也、鈴木哲朗、小池和彦(東大感染症内科)、宮村達男]

(15)HCV コア蛋白質発現 TG マウスにおけるアルコール摂取の影響

コア蛋白質発現 TG マウスにエタノール含有食を与えると肝臓内の Reactive Oxygen Species が増加し、p38 MAPK、ERK 等の細胞内シグナル伝達系が活性化される。マイクロアレイ、TaqMan PCR 解析の結果、コア TG マウスで発現が亢進する遺伝子の中で、特に galectin-1 ではエタノール摂取によりさらに発現の上昇が認められた。逆に発現の低下する GST-P1 遺伝子はエタノール摂取によって低下傾向が顕著となった。

[堤 武也、鈴木哲朗、小池和彦(東大感染症内科)、宮村達男]

(16)HCV コア蛋白質とミトコンドリア蛋白 prohibitin との相互作用

コア蛋白質発現、及び非発現 HepG2 細胞よりミトコンドリアを抽出し、二次元電気泳動によりプロテオーム解析を行った。その結果、コア発現細胞で増加するミトコンドリア蛋白 14 種類、低下する蛋白 6 種類を同定した。発現の増加する蛋白の中で、chaperone として働き細胞増殖調節にも關与する prohibitin について更に解析した結果、コア蛋白質は prohibitin の翻訳後プロセスに作用すること、prohibitin の N 末端領域と直接結合しうることを見出した。

[堤 武也、松田麻未、宮村達男、鈴木哲朗]

(17)HCV コア蛋白質による IL-8 の発現調節機構の解析

IL-8 のプロモーター活性は、HCV コア蛋白質によって増強され、実際に内因性 IL-8 の発現も亢進することを見出している。その作用機構を検討するため、IL8 プロモーターの各転写因子結合部位の変異体(置換、欠損)を含む reporter を作製し、プロモーター活性に対するコア蛋白質の影響を検討した。その結果、NF- κ B 及び ER ストレス応答によって活性化される ATF6 の結合部位の変異体でそれぞれコア蛋白質によるプロモーター活性の増強が顕著に減少する傾向を示した。

[友部 賢、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗]

(18)HCV コア蛋白質による ER ストレスへの影響の解析

IL8 プロモーターの解析から、コア蛋白質が ER ストレスを介した転写調節系に影響を与えている可能性が示唆された。そこで、ATF6 の Western blotting を行ったところ、コア発現細胞では、ATF6 の前駆体から活性化型へのプロセシングが促進されていることが明らかとなった。更に、ATF6 により発現調節される GRP78 及び GRP94 遺伝子のプロモーター活性がコア蛋白質によって亢進することを見出した。

[友部 賢、堤 武也、森 和俊(京都大学)、宮村達男、鈴木哲朗]

(19)HCV E1 タンパク質の膜トポロジー

HCV のエンベロープタンパク質 E1 のトポロジー解析を行うため、E1 の 8 つの Cys 残基を全て Ala に置換した Cys-less mutant を構築し、これを基に、Cys 残基を 1 つずつ導入した Cys 走査変異体を作成した。いずれの変異体も野生型と変わらない発現を示した。従って、Cys 変異によりタンパク質構造に大きな影響が及んでいないと考えられる。今後、膜透過性及び膜不透過性の蛍光性 SH 修飾試薬を各変異体に作用させた後、修飾の有無を調べ、Cys 導入位置が小胞体

ウイルス第二部

膜の内側と外側のどちらに存在するかを決定していく。

[染谷友美、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、松浦善治]

(20) HCV NS5A 蛋白のリン酸化がウイルス RNA 複製へ及ぼす影響

HCV NS5A 蛋白はリン酸化蛋白であり、インターフェロンに対する感受性や細胞増殖制御に関与することなどが知られているが、HCV の複製増殖に果たす役割は不明である。これまでに、NS5A を部分欠損またはリン酸化部位を点変異させた HCV レプリコンを用いた解析から、ウイルス複製に影響する NS5A 領域が明らかにされつつある。現在、これらの NS5A 変異が他の HCV 蛋白との相互作用、あるいはウイルス翻訳効率へ及ぼす影響について検討を行っている。

[坂本真一郎、根岸英雄、鈴木亮介、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(21) HCV 蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析

HCV コア蛋白質は小胞体、核他にミトコンドリアに存在し、reactive oxygen species の蓄積などミトコンドリアの機能に影響を与えることが示されている。そこで、コア蛋白を持続発現する細胞株及び対照細胞株から調製したミトコンドリア画分について二次元電気泳動法によりプロファイリングを行った。再現性よく発現変化を認めたとスポットを質量分析に供したところ、電子伝達系、細胞周期調節、ストレス応答などに関連する蛋白群を同定することができた。現在、HCV 全蛋白発現細胞を用いて同様の解析を行っている。

[松田麻未、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗]

(22) B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析

HCV 患者の肝外病変のひとつにクリオグロブリン血症がある。これは、HCV 感染した B 細胞の異常増殖が原因とされている。HCV 抗原が B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア発現ヒト B 細胞株の表面分子変化を検索し、HCV コア蛋白発現細胞において CD48 抗原の発現が低下していることが判明した。リアルタイム RT-PCR でも RNA レベルの低下を確認した。一過性にコアを発現させた EBV-B cell line でも同様の結果を得た。CD48 promoter 活性に対するコア蛋白の影響を解析している。

[町田早苗、鈴木亮介、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(23) HCV 陽性糸球体腎炎腎組織における HCV 抗原発現の免疫組織学的検討

HCV 陽性糸球体腎炎患者の腎組織における HCV コア蛋白質の発現を、免疫電子顕微鏡法によって解析した。これまで 6 例検討し、内 5 例の腎組織でコア蛋白陽性であった。染色陽性部は、糸球体基底膜とメサンギウム領域であり、両者とも長径が約 50nm から 150nm の凝集状を呈していた。現在、症例数を増やし検討中である。

[岩堀 徹、中尾俊之(東京医大)、宮村達男、鈴木哲朗]

(24) ヒト不死化メサンギウム細胞(HMC)を用いた HCV 腎症の研究

HCV による腎臓への直接的な障害のメカニズムを調べるため、HMC に対する HCV コア蛋白質の影響を検討した。HMC では、endothelin-1 添加によって MAPK のリン酸化が亢進し、TGF- β 添加によって細胞外マトリックスの発現が誘導されるが、コア蛋白質の発現により、これらが増強されることを観察した。現在、HMC の細胞増殖、細胞死等への影響を検討中であるが、HCV コア蛋白質の発現によって、HMC はメサンギウム硬化性変化を来し、HCV が腎障害の病態形成へ直接関与する可能性が考えられる。

[岩堀 徹、宮村達男、鈴木哲朗]

(25) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs を用いた HCV 蛋白の発現と液性免疫誘導能の検討

ワクチニアウイルスは、その強い免疫誘導能から、組換え生ワクチンとしての応用が考えられており、弱毒化された DIs は安全性の面でも有望な候補である。HCV の構造蛋白領域を DIs に組み込み、培養細胞での HCV 蛋白の発現とプロセッシングを確認した。この DIs をマウスに静注あるいは腹腔投与したところ、コア、E1、E2 蛋白質に対する抗体の誘導が認められた。現在、非構造領域を組み込んだ数種の組換え DIs を作成し、それらの免疫誘導能の比較を行っている。

[石井孝司、町田早苗、鈴木亮介、赤塚俊隆(埼玉医大)、鈴木哲朗、宮村達男]

(26) HCV 構造蛋白を発現する組み換え DIs による細胞性免疫の誘導

DIs は自身に対する免疫は誘導しないものの、組み込んだ外来蛋白に対する細胞性免疫を強く誘導することが知られており、組み換え DIs は高率に細胞障害性 T 細胞(CTL)を誘導するワクチン候補として期待される。HCV 構造蛋白を発現する組み換え DIs をマウスに免

ウイルス第二部

疫し、overlapping peptideを用いてELISPOT法と⁵¹Cr release assayでCTL活性を測定した。特にE2領域に相当するpeptideに対して強いCTL活性を認めた。

[町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、鈴木哲朗、赤塚俊隆(埼玉医科大学)、宮村達男]

(27)高ペプチド化型 HCV コア蛋白発現系による CTL 誘導の試み

これまでにコア蛋白質はC末端側の疎水性領域がプロセシングされると、ユビキチン-プロテアソーム系により選択的分解を受けることを明らかにした。一方でCTLの誘導には抗原のプロテアソームによる分解が必須であることから、コア蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系により選択的分解を受けるという性質が、効率的にコア蛋白質のエピトープに対するCTLを誘導しうるかどうかを調べる為に、組換えワクシニア DIs ウイルスを作成し、マウスに免疫し、そのCTL活性を解析している。

[鈴木亮介、町田早苗、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(28)RNA 干渉技術を用いた HCV 複製阻害剤の検討

近年 RNA 干渉を用いた gene silencing が報告されている。HCV は RNA ウイルスであり、RNAi による複製阻害も十分に可能であると考えられる。現在、いくつかのRNAiをデザインし、HCVレプリコン維持細胞を用いて RNA 複製におよぼす影響を検討している。

[江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(29)C 型肝炎の発症進展に関与する宿主遺伝子の解析

日本人健常者及びC型肝炎患者についてアレルトリプル SNP 検出プローブを用いて走査し、染色体1番にC型肝炎発症に関連すると思われる2領域を検出した。この領域に存在する遺伝子にはこれまで報告されてきたC型肝炎関連遺伝子は存在せず、新規関連遺伝子の検出の可能性が示唆された。2番染色体では有意に偏りを示す部位を8領域検出した。その分布状態は、2番染色体全体に散在しており、クラスターの形成は認められなかった。2番染色体にはC型肝炎発症に関与する宿主遺伝子が多数存在することが推察された。

[鈴木哲朗、亀岡洋祐(遺伝子資源室)、吉崎佐矢香、岩堀 徹、宮村達男]

(30)HCV 感染価評価法の開発

生物由来製品における HCV の除去、不活化の評価法となりうる

HCV 感染実験系の構築を目的とした。ヒト肝由来または非肝臓培養細胞に HCV 陽性血漿を感染させ、細胞に吸着、侵入した HCV 量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した。HeLa 細胞では細胞内 HCV は検出限界以下であったが、ヒト肝癌細胞 HepG2 では、感染2時間後の細胞内 HCV レベルは感染ウイルス量とよく相関していた。本法は、HCV の感染性を短時間で定量的に評価できる実験系であり、ウイルスリスク評価技術に資するものと考えられる。

[相崎英樹、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男]

(31)歯科用器具器材の HCV 汚染除去に関する研究

歯科診療において、印象採得時に印象材が HCV に汚染される可能性がある。印象採得物からの HCV 除去法について検討し以下の成績を得た。1) アルジネート印象採得物からは印象直後の水洗で約80%の付着 HCV が除去できる。2) 印象後のアルジネート材を、血清が風乾するまで放置し水洗処理を行うと洗浄効果が落ちる。3) アルジネート印象材に付着したウイルスを完全に除去するには流水のみによる物理的な洗浄処理では不十分である。4) ピニルシリコーン印象材の場合は流水処理が十分有効である。

[小俣和彦、鈴木哲朗、佐藤田鶴子(日本歯科大)、古屋英毅(日本歯科大)]

(32)C 型肝炎症例の口腔内滲出液中からの HCV の検出

HCVの院内感染予防対策の一環として、HCVキャリアの口腔内体液中にウイルスがどの程度存在しているのか把握する必要がある。本研究では、HCV抗体陽性者の歯科診療に際して、血液、唾液、歯肉溝滲出液を同時に採取し、各試料中のHCV遺伝子を定量した。血中ウイルスRNA濃度が 10^5 10^6 copies/mLの場合、唾液中に 10^2 10^4 、歯肉溝滲出液に 10^3 10^5 copies/mL程度のHCV RNAが存在する可能性が示された。

[小俣和彦、鈴木哲朗、佐藤田鶴子(日本歯科大)、古屋英毅(日本歯科大)]

4. E型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1)輸入感染症としての E 型肝炎

98例の非A非B非C型急性肝炎患者血清を用い、抗HEV-IgMおよびIgG抗体を測定した。ORF1とORF2の一部をRT-PCRで増幅後、塩基配列の解読及び系統解析により、HEVの遺伝子型を決定した。海外渡航歴がある56検体のうち17検体(30.4%)からIgM抗

ウイルス第二部

体が検出された。これに対してまったく渡航歴のない32検体のうち3検体(9.4%)からIgM抗体が検出された。塩基配列解析の結果、輸入感染からのHEVはGenotype IとGenotype IVに属し、渡航歴のない13例の遺伝子型は全てGenotype IIIであった。最近のわが国における散発的なE型肝炎は、大部分が輸入例であるが、国内感染と思われる例も検出されるようになってきた。E型肝炎の診断の強化、ワクチンの開発が急務である。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

(2) Genotype III (GIII) 及び Genotype IV (GIV) の構造蛋白の発現

現在、HEVには少なくとも四つのgenotypeが存在する。HEVの血清型は全て同一であろうと推測されているが、明確な実験データはない。HEVの血清型の違いの有無を確認することは、ワクチンの開発、ならびに高感度抗体検査法の樹立に有用である。急性E型肝炎患者血清中からGIIIとGIVの遺伝子を抽出し、構造蛋白をコードするORF2の全長及びORF2のN末端から111アミノ酸を欠失した領域をRT-PCR法で増幅し、定法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を感染して構造蛋白を発現した。現在、GIVのウイルス様中空粒子(VLP)の形成が確認されている。GIIIの発現が進行中である。

[李 天成、武田直和、宮村達男、永田典代、松尾恵子(感染病理部)]

(3) Genotype I (GI) と Genogroup IV (GIV) の構造蛋白の抗原性の比較

組換えバキュロウイルス発現システムを用い、GIとGIVの構造蛋白ORF2のN末端から111アミノ酸を欠失した領域を発現させ、ウイルス様中空粒子を作製した。GIのウイルス様中空粒子をマウスに免疫し、単クローン抗体を作製した。エピトープが同定された単クローン抗体を用い、それぞれ、GIとGIVのウイルス様中空粒子と反応させ、反応性の違いから抗原性を評価した。その結果、genotype間には抗原性の異なるエピトープが存在し、一部のエピトープは立体構造に依存する事が明らかになった。

[李 天成、落合 晋、石古博昭(三菱化学BCL)、武田直和、宮村達男]

5. TTウイルス(TTV)に関する研究

(1) TTVの転写調節機構

TTVの感染増殖における宿主指向性を規定するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。本研究では、種々の培養細胞株におけるTTV遺伝子の転写活性を比較検討し、TTVの転写活性には細胞選択性があること、サル、マウスなどの動物種、また腎臓などの非肝臓細胞でも高い活性を示す細胞が存在すること、を明らかにした。また、非翻訳遺伝子内にコアプロモーター及びエンハンサー領域を同定してきたが、さらにエンハンサーの上流に、転写活性を負に制御するリプレッサー領域が存在する可能性が示唆された。

[鈴木哲朗、鈴木亮介、李 天成、宮村達男]

(2) 輸血後肝炎におけるTTV抗体の臨床的意義

TTV ORF1蛋白に対するIgG抗体を測定するELISA系を確立した。このELISA法を用いて、16-66歳の健康成人血清中の抗TTV抗体を測定した結果、一般健常者でのTTV抗体保有率は1-2%と推定された。また、輸血後肝炎症例における肝機能変化とTTVマーカーとの相関解析を開始した。非B非C型肝炎例において、輸血によって新たにtransmitされたTTV遺伝子を同定するとともに、肝機能マーカーとTTV遺伝子量の変動、及びTTV抗体価との関連を明らかにしていく予定である。

[鈴木哲朗、李 天成、鈴木亮介、宮村達男]

IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. ヒト乳頭腫ウイルスに関する研究

(1) HPV16E6蛋白と結合する宿主蛋白E6APの新規標的蛋白の探索

ヒトパピローマウイルス16型(HPV16)E6蛋白は宿主蛋白であるE6APと複合体を形成しE3ユビキチンリガーゼとして機能し、p53をユビキチン化する。ユビキチン化されたp53はプロテアソームにより分解され、不活化される。E6APはE6非存在下でもE3ユビキチンリガーゼ活性を有する。E6非依存性の基質として、hHR23A、Blk、Cskなどがこれまでに同定されている。E6APの新規標的蛋白を同定するために、PD-MS(Pull down- Mass Spectrometry)法を用いて解析した。E6APに特異的に結合する蛋白として新たに2種類の蛋白を同定した。MALDI/TOFMS法による質量分析の結果、新規標的蛋白である可能性が考えられ、現在、詳細に検討中である。

[梶山裕一、松田麻未、勝二郁夫]

ウイルス第二部

(2) E6AP による Csk の認識機構の解析

Csk は Src ファミリーチロシンキナーゼの抑制性制御因子である。これまでに、E6AP は Csk をユビキチン化しプロテアソーム依存性に分解することを見いだしている。Hect ファミリー E3 ユビキチンリガーゼは基質と直接結合することが知られており、E6AP による Csk の認識機構を解析するために、各蛋白をバキュロウイルスベクターを用い GST または His-tag 融合蛋白として発現、精製し、GST-pull down assay を行った。E6AP と Csk は in vitro においても結合が確認され、直接的に結合するものと考えられた。各蛋白の欠失変異体を作製し、結合領域のマッピングを行っている。

[梶山裕一、勝二郁夫]

2. ヒトポリオ・マウウイルス BK に関する研究

(1) BK ウイルスのウイルス様粒子の三次構造解析

組換えバキュロウイルス発現システムを応用し、BK ウイルスの構造蛋白領域 (VP1) を発現し、BK ウイルス様粒子 (rBK-VLPs) を作成した。この rBK-VLPs は直径 45nm と 20nm 二種類あり、それぞれクライオ電子顕微鏡撮影と画像解析によって三次構造解析をおこない、直径が 45nm である粒子は T=7 であり、360 のサブユニットが集合して形成されていることを明らかにした。これは他のポリオ・マウウイルス SV40、PyV と類似する。直径 20nm の粒子は T=1 であった。

[李 天成, 武田直和, 宮村達男, R.H.Cheng (Karolinska Institute, スウェーデン)]

3. ポックスウイルスに関する研究

(1) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs の全塩基配列決定

DIs の塩基配列については、制限酵素消化パターンを親株と比較することにより、左端に約 15kbp の欠損が存在することをすでに明らかにしているが、他に小さな欠損や重複が存在する可能性がある。そのためゲノム DNA を精製後ショットガンクローニングを行い、約 190kbp のゲノム全配列の決定を行っている。その結果、左端の欠損以外はほぼ親株と同じであることが明らかとなり、DIs の弱毒化はこの大きな欠損のみに由来するものであることが判明した。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(2) DIs を用いた GBV-B 蛋白の発現

GBV-B はタマリンに慢性肝炎を発症させるフラビウイルスで、その

遺伝子構造の類似性から C 型肝炎のサロゲート動物モデルとしての応用が考えられている。本研究では、GBV-B の蛋白の一部を組み込んだ組換え DIs を作成し、タマリンに投与することで GBV-B に対する免疫を誘導することができるか、また、免疫を誘導することで GBV-B 感染を防御することができるかどうかの研究を行う。現在までに組換えウイルスを作成して目的蛋白の発現を確認した。

[石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、八木慎太郎(先端生命科学研)、明里宏文(霊長類センター)、鈴木哲朗、宮村達男]

(3) Yaba モンキー腫瘍ウイルス遺伝子の全塩基配列決定

全長 134,721 塩基対の Yaba モンキー腫瘍ウイルス遺伝子の塩基配列を決めた。すくなくとも 140 の ORF について、他のポックスウイルスと比較した。配列がよく保存されている領域にはプロモーター活性が証明された。

[天野浩子、上田良昭、鈴木哲朗、宮村達男、Craig Brunetti, Grant McFadden(西オンタリオ大学、カナダ)]

V. その他の研究

1. RFB 三次元培養系を用いた肝臓特異的転写因子の検討

RFB で高機能肝細胞を培養するとチトクローム P450 (CYP) 3A4 mRNA の発現が単層培養に比べ最大約 100 倍まで増加した。CYP3A4 発現誘導に関する転写因子 PXR の mRNA も同様の傾向を示した。PXR/RXR、及び PXR の発現を調節する HNF-4 についてゲルシフトアッセイを行った結果、RFB 培養では、PXR/RXR、HNF-4 共、単層培養系に比べ大分子量の DNA-蛋白複合体の存在が明らかとなった。現在新規複合体構成因子の探索を進行中である。

[岩堀 徹、相崎英樹、松浦知和(慈恵医大)、鈴木哲朗]

2. 小型/簡易型バイオリアクターの開発

現行のバイオリアクター肝細胞培養系は 1) 多量の細胞を必要とする、2) 操作が煩雑である、3) 経時的に細胞を採取できない、などの問題点がある。そこで、これらの問題点を解決するため、バイオット社と共同で 5ml サイズの小型カラムを並列に連結した連結型リアクター、及び一体成型の担体の開発を行っている。現在、各カラムを用いて FLC4、Huh7 細胞が安定に長期培養可能かどうか、確認を行っている。

[村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達

ウイルス第二部

男]

3. 新規三次元マトリックス Mebiol Gel を用いた肝細胞三次元培養系の開発

Mebiol Gel は温度感応性疎水高分子と親水性高分子の共重合体であり、低温でゾル、25℃以上でゲル化する性質を持つ。HepG2、Huh7細胞は、このMebiol Gel中でスフェロイドを形成しながら増殖していることを見出した。形成されたスフェロイドでは単層培養に比べ、ギャップジャンクション構成蛋白 Connexin 32 の発現が亢進し、細胞膜への局在化がより顕著であった。現在、プロテオーム解析により Mebiol Gel 培養細胞で発現の変化する蛋白群の同定を行っている。[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗]

< 別 > 検査業務

第1室:

行政検査

ノロウイルス確認検査 3件、42検体

E型肝炎確認検査 13件、13検体

研究検査

E型肝炎検査 21件、21検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1件

同上 中間段階 1件

第2室:

行政検査

7名の被験者から分離された7株のポリオウイルスが検査され、中和による同定試験、PCR-RFLP法による型内株鑑別試験の結果、すべてワクチン株であった。

第4室:

依頼試験

B型肝炎ウイルス体外診断薬 1件

C型肝炎ウイルス体外診断薬 1件

行政検査

C型肝炎ウイルス遺伝子解析 1件、33検体

B型肝炎ウイルス遺伝子解析 1件、5検体

研究検査

TTV 遺伝子解析 1件、10検体

HGV 遺伝子解析 1件、10検体

第5室:

検定業務

乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2件

組換え沈降B型肝炎ワクチン(酵母由来) 6件

組換え沈降B型肝炎ワクチン(huGK-14細胞由来) 6件

依頼試験

A型肝炎ウイルス抗体検出用キットの感度・特異性試験 1件

A型肝炎ワクチン抗原含量試験・原液及び最終バルク 各1件

発表業績一覧

誌上発表

1. 欧文発表

原著

- 1) Sheikh S, Sugitani M, Kinukawa N, Moriyama M, Arikawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Ishaque SM, Hasan M, and Suzuki K: Hepatitis E virus infection in fulminant hepatitis patients and apparently healthy population in Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 721-724, 2002.
- 2) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojbori T, and Takeda N: Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. Virology 299: 225-239, 2002.

ウイルス第二部

- 3) Ishiko H, Miura R, Shimada Y, Hayashi A, Yamazaki S, and Takeda N: Human rhinovirus 87 identified as human enterovirus 68 by VP4-based molecular diagnosis. *Intervirology* 45: 136-141, 2002.
- 4) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimura S, Koike K, and Miyamura T: Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology* 304: 415-24, 2002.
- 5) Matsui M, Moriya O, Abdel-Aziz N, Matsuura Y, Miyamura T, and Akatsuka T: Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus. *Vaccine* 21: 211-220, 2002.
- 6) Ishii K, Moss B: Mapping interaction sites of the A20R protein component of the vaccinia virus DNA replication complex. *Virology* 303: 232-239, 2002.
- 7) Tano Y, Shimizu H, Shiomi M, Nakano T, and Miyamura T: Rapid serological diagnosis of enterovirus 71 infection by IgM ELISA. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55: 133-135, 2002.
- 8) Aizaki H, Otsuka M, Matsuda M, Li YW, Harada T, Kawakami H, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki T: Expression profiling of liver cell lines expressing entire polyprotein of hepatitis C virus. *Hepatology* 36: 1431-1438, 2002.
- 9) Nagata N, Shimizu H, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzaki Y, Sato Y, Miyamura T, Sata T, and Iwasaki T: Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of enterovirus 71 in cynomolgus monkeys. *J. Med. Virol.* 67: 207-216, 2002.
- 10) Hatsu M, Tanaka M, Utama A, Shimizu H, and Takamizawa K: A Japanese encephalitis virus NS3 inhibitor produced by *streptomyces* sp. *actinomycetologica* 16: 6-8, 2002.
- 11) Huang S, Greening G, Baker M, Grimwood K, Webber L, Fitzsimons A, Garret N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Pallansch M: OPV virus circulation and evolution investigated in New Zealand. *Polio Lab Network IX*, 2-3, 2003.
- 12) Matsuura Y, Burioni R, Mancini N, Tani H, Miyamura T, Valardo PE, and Clementi M: Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype. *J. Virol.* 76: 11775-11779, 2002.
- 13) Miyamura T, and Matsuura Y: Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection. In *Viral Hepatitis and Liver Disease*. (Margolis HS, Alter MJ, Liang TJ, and Dienstag JL. ed.), International Medical Press, Atlanta 289-293, 2002.
- 14) Horie H, Yoshida H, Matsuura K, Miyazawa M, Ota Y, Nakayama T, Doi Y, and Hashizume S: Neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from sewage in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 138-142, 2002.
- 15) Munemura T, Saikusa, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, and Miyamura T: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch. Virol.* 148: 253-263, 2003.
- 16) Pelletier I, Ouzilou L, Arita M, Nomoto A, and Colbere-Garapin F: Characterization of the poliovirus 147S particle: new insights into poliovirus uncoating. *Virology* 305: 55-65, 2003.
- 17) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, and Seki N: Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 443-7, 2003.
- 18) Ding X, Gu H, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li T-C, Sata T, and Abe K: Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 19-22, 2003.
- 19) Hirano M, Ding X, Tran HT, Li T-C, Takeda N, Sata T, Nakamura S, and Abe K: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 8-11, 2003.
- 20) Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, and Suzuki T: CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug "metabolism using a bioartificial liver". *Hepatology* 37: 665-673, 2003.
- 21) Uno-Furuta S, Matsuo K, Tamaki S, Takamura S, Kamei A, Kuromatsu I, Kaito M, Matsuura Y, Miyamura T, Adachi Y, and

ウイルス第二部

- Yasutomi Y: Immunization with recombinant Calmette-Guerin bacillus (BCG)-hepatitis C virus (HCV) elicits HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine* 21: 3149-3156, 2003.
- 22) Shi ST, Lee K, Aizaki H, Hwang SB, and Lai MMC: Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane rich in caveolin-2. *J. Virol.* 77: 4160-8, 2003.
- 23) Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba A, Ahmed N, Campagnoli R, Van der Avoort H, Shimizu H, Yoneyama T, Miyamura T, Pallansch M, and Kew O: Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol.* 77: 8366-8377, 2003.
- 24) Watanabe H, Saito T, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Saito K, Togashi H, Suzuki R, Hayashi M, Miyamura T, Matsuura Y, and Kawata S: Spontaneous elimination of serum hepatitis C virus (HCV) RNA in chronic HCV carriers: A population-based cohort study. *J. Med. Virol.* 71: 56-61, 2003.
- 25) Li T-C, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L, Cheng HR, and Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311: 115-124, 2003.
- 26) Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, and Katayama K: Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1548-1557, 2003.
- 27) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Suzuki T, and Miyamura T. Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein in the ecdysone-inducible system of human liver cells. *Virology* 317: 24-35, 2003.
- とウイルス 30: 329-335, 2002.
- 3) 染谷雄一: SRSV (Small Round-Structured Virus). *小児科* 2003 年第 44 巻 3 月増刊号.
- 4) 染谷雄一: ウイルス性腸炎. *診断と治療* 2003 年 91 巻 7 号.
- 5) 片山和彦: ノーウォークウイルス診断法の進歩. *ワールドフォーカス* 43: 1~2, 2003.
- 6) 片山和彦: 新世紀の感染症学: カリシウイルス. *日本臨床* 61 増刊号:3: 468~474, 2003.
- 7) 白土東子, 片山和彦: 新世紀の感染症学: ノロウイルス. *日本臨床* 61 増刊号 3: 475~479, 2003.
- 8) 武田直和: E 型肝炎騒動. *インフェクションコントロール* 12: 1, 2003.
- 9) 田中智之, 斎藤博之, 原みゆき, 東方美保, 武田直和: 嘔吐下痢症の対応と予防. *月刊健* 31: 42-44, 2003.
- 10) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ウイルス粒子と抗体検出系. *化学療法の領域*. 19: 327-333, 2003.
- 11) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎. *日本臨床* 61: 640-646, 2003.
- 12) 武田直和: ノーウォークウイルス (NV) 性下痢症の概要. *日本臨床* 60: 1138-1142, 2002.
- 13) 武田直和. 感染症の話: 急性出血性結膜炎. *感染症週報 (IDWR)* 4: 13-15, 2002.
- 14) 武田直和: ウイルス性胃腸炎. 山崎修道(監修), 小早川隆敏(編集) 新版・感染症マニュアル, スパイラル出版, pp 98-100, 2002.
- 15) 宮村達男: ポリオ(急性灰白髄炎) Poliomyelitis. *感染症マニュアル, スパイラル出版* pp 210-213, 2002.
- 16) 宮村達男: ポリオ根絶の戦略. *最新医学* 57: 23-29, 2002.
- 17) 宮村達男: ポリオワクチン. *からだの科学* 227: 102, 2002.
- 18) 清水博之: 手足口病. *総合臨床* 52: 192-197, 2003.
- 19) 遠田耕平, 清水博之, 宮村達男. インドのポリオ根絶の現状. *醫事新報(印刷中)* 2003.
- 20) 下池貴志: 知っていますか? 食べ物でおこる A 型肝炎. *食と健康* 561: 8-17, 2002.
- 21) 永森静志, 金井好克, 宮崎正博, 本間正充, 宮村達男, 鈴木哲朗, 相崎英樹, 梅田 誠, 田中憲穂, 佐々木澄志, 千葉 寛, 細川正清, 松浦知和, 小田裕昭, 吉田 彪: ヒト培養細胞の肝機能発現とその利用法 — バイオ人口肝の多角的な応用をめざして —. *細胞, ニュー・サイエンス社* pp 2-9, 2002.

和文発表

- 1) 石川和子, 筒井理華, 三上稔之, 大友良光, 畑山一郎, 宇田川悦子: 修学旅行中に発生した Norwalk Virus による食中毒. *青森県環境保健センター所報*, 5-8, 2002.
- 2) 清水博之: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. *臨床*

ウイルス第二部

- 22) 石井孝司, 宮村達男: 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs 株のウイルス学的解析とウイルスベクターとしての応用. 感染 炎症 免疫, 医薬の門社, pp68-71, 2002.
- 23) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: E型肝炎ウイルス. 血液フロンティア, 13: 21-28, 2003.
- 24) 宮村達男: 世界ポリオ根絶計画と日本のワクチン戦略. バイオサイエンスとインダストリー 61: 192-198, 2003.
- 25) 岩崎琢也, 清水博之, 永田典代: 新興・再興感染症, 輸入感染症の臨床と病理: エンテロウイルス 71. 病理と臨床 21: 110-114, 2003.
- 26) 宮村達男: 新世紀の感染症学—その病態解明と治療に挑む: C型肝炎の問題と最新研究. 埼玉医科大学雑誌 30: 74-79, 2003.
- 6) Wakuda M, Sasaki J, Urasawa T, Urasawa S, Takeda N, Taniguchi K: Completenucleotide sequence of Otofuke-like virus, a member of Norwalk-like viruses in Caliciviridae, detected in Japan. *ibid.*
- 7) Ishii K, Moss B: III-1 mapping interaction sites of the A20R protein, a component of the vaccinia virus DNA replication complex. XIVth International Poxvirus and Iridovirus Workshop, Lake Placid, USA, Sep 20-25, 2002.
- 8) Shimizu H: Enterovirus surveillance and laboratory diagnosis - before and after the eradication of poliomyelitis -. Vietnamese-Japanese Seminar on Tropical Infectious, Hanoi, Viet Nam, Nov 28-30, 2002.
- 9) Yatsushashi H, Yano K, Koga M, Ishibashi H, M. Y, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Kahn M: Hepatitis E in Japan-incidence and comparison of HEV markers between Japan and Bangladesh -. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002, Taipei, Taiwan, Sept 26-29, 2002.
- 10) Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, Jan 11-13, 2003.
- 11) Yatsushashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan : National hospital report. *ibid.*
- 12) Suzuki T, Suzuki R, Matsuura Y. Miyamura T: Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein. *ibid.*
- 13) Miyamura T. HCV infection and hepatocellular carcinoma. 11th International Symposium on Viral Hepatitis & Liver Disease. Sydney, Australia, Apr 6-10, 2003.
- 14) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, and Miyamura T: An outbreak of hepatitis C in an outpatient clinic in Japan. *ibid.*
- 15) Miyamura T.: Global and national polio control: Vaccine strategy. International Symposium on Vaccination at the beginning of the 21st century, Tokyo, Japan, Jul 11-13, 2003.
- 16) Utagawa ET: New developed an automated particle search (ASS) system with TEM for the detection of Gastroenteritis viruses. Robert Koch Institute, Berlin, Garman Aug 2, 2002.

学会発表

国際学会

- 1) Kamata K, Kato D, Sato T, Gondaira F, Takasugi K, Sato S, Natori K, Kitamoto N, Miyamura T, Tanaka T, Takeda N: Development of an ELISA-based assay for the detection and genogrouping of Norwalk-like virus in stools using genogroup I and II-specific monoclonal antibodies. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, May 20-23, 2002.
- 2) Utagawa ET, Nakazawa E, Nagaoki I: Application of an automated particle search system to transmission electron microscopy for the detection of caliciviruses in clinical specimens. XIIth International Congress of Virology, Paris, France July 27-Aug 1, 2002.
- 3) Li TC, Takeda N, Xing L, Haag L, Nilsson JC, RH., Miyamura T: Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *ibid.*
- 4) Kobayashi S, Sakae K, Kamata K, Sato T, Natori K, Takeda T: Development of immunomagnetic capture RT-PCR for detection of "Norwalk-like viruses" in foods. *ibid.*
- 5) Katayama K, Horikoshi-Shirato H, Oka T, Natori N, Takeda N, Miyamura T: Genotyping of "Norwalk-like viruses" based on phylogenetic analyses of 18 full genome sequences. *ibid.*

ウイルス第二部

- 17) Miyamura T: Molecular epidemiology of non-polio enteroviruses. National Institute of Health, Thailand, Feb 19, 2003.
- 国内学会
- 小林慎一, 榮 賢司, 宮崎 豊, 田中智之, 名取克郎, 武田直和: Immunomagnetic capture RT-PCR 法による食品中のノーウォークウイルスの検出. 第 23 回衛生微生物技術協議会, 2002 年 7 月, 奈良.
 - 田中智之, 内野清子, 岩上泰雄, 吉田永祥, 鎌田公仁夫, 名取克郎, 武田直和: NLV 抗原検出 ELISA 法の普及とその意義. 同上.
 - 實方剛, 堀田博, 谷口孝喜, 和久田光毅, 宇田川悦子: インドネシアにおける A 群ロタウイルスの流行状況. 第 50 回日本ウイルス学会, 2002 年 10 月, 札幌市.
 - 李 天成, 武田直和, 宮村達男: HEV そのウイルス学. 宮川庚子記念研究財団ワークショップ: 日本の E 型肝炎, 2002 年 10 月, 横浜.
 - 高村史記, 新倉昌浩, 武田直和, 宮村達男, 保富康宏: HIV CTL エピトープ表出 E 型肝炎ウイルス様中空粒子の経口投与による粘膜面におけるエピトープ特異的細胞性免疫の誘導. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会, 2002 年 10 月 16-18 日, 札幌.
 - 石古博昭, 三浦里香, 島田康司, 山崎修道, 武田直和: VP4 塩基配列に基づく系統解析によって, ヒトラノウイルス 87 型はヒトエンテロウイルス 68 型に同定された. 同上.
 - 内野清子, 岩上泰雄, 三好龍也, 吉田永祥, 前田章子, 田中智之, 鎌田公仁夫, 北本憲利, 名取克郎, 武田直和: NLV 抗原検出 ELISA 法を用いた食中毒事例への対応と評価・問題点. 同上.
 - 影山 努, 小嶋慈之, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 白土東子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: Norwalk-like viruses を genogroup 特異的に認識するモノクローナル抗体の作製. 同上.
 - 勢戸祥介, 入谷展弘, 名取克郎, 武田直和, 久保英幸, 綾田稔, 小倉 壽, 青木孝祐: 大阪市内で検出した Alphatron type NV の遺伝子解析および抗原性の解析. 同上.
 - 植木 洋, 有田富和, 後藤郁男, 山木紀彦, 佐藤千鶴子, 渡邊 節, 沖村容子, 秋山和夫, 山本俊夫, 白石廣行, 武田直和: 感染性胃腸炎患者・河川水・養殖カキから検出した NV の遺伝子解析. 同上.
 - 入谷展弘, 勢戸祥介, 久保英幸, 青木孝祐, 名取克郎, 武田直和, 瀬戸俊之, 服部英司, 綾田 稔, 小倉 壽: 乳幼児における Norwalk virus 感染に対する免疫応答. 同上.
 - 白土(堀越)東子, 片山和彦, 田村 克, 名取克郎, 岡智一郎, 武田直和, 宮村達男: ノーウォーク様ウイルスの組織特異性を決定する因子の検討. 同上.
 - 片山和彦, 白土(堀越)東子, 岡智一郎, 小嶋慈之, 影山 努, 福士秀悦, 武田直和: Norwalk-like viruses の Full-length cDNA クローンを用いた複製機構の解析. 同上.
 - 李 天成, 武田直和, 宮村達男: BK ウイルス様中空粒子の三次構造の解析及び診断への応用. 同上.
 - 保富康宏, 高村史記, 新倉昌浩, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ウイルス (HEV) ウイルス様中空粒子 (VLP) をベクターとして用いた経口ワクチンの開発. 同上.
 - 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男: ポリオウイルスの神経毒性現象におけるウイルスタンパク質合成の役割. 同上.
 - 藤本嗣人, 近平雅嗣, 宗村徹也, 西尾 治, 吉田 弘: 脳症患者の咽頭ぬぐい液および髄液から検出されたコクサッキー A 群ウイルス. 同上.
 - 山崎謙治, 横田陽子, 左近直美, 吉田智子, 吉田 弘: 滋賀・大阪の無菌性髄膜炎患者から分離されたエコーウイルス 4 型の抗原性についての検討. 同上.
 - 勝二郁夫, Peter Howley: E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解. 同上.
 - 森石恒司, 岡林環樹, 中井康介, 鈴木亮介, 宮村達男, 松浦善治: HCV コア蛋白質の新しい核内移行・局在化機構. 同上.
 - 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男: 弱毒ワクチニアウイルス DIs を用いた C 型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 同上.
 - 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男: HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の検索. 同上.
 - 石井孝司, Bernard Moss: Clustered charge-to-alanine mutagenesis を用いたワクチニアウイルス蛋白 A20R の機能解析. 同上.
 - 林 昌宏, 谷 英樹, 鈴木健介, 菰田泰正, 森石恒司, 鈴木亮介, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: HCV エンベロープ蛋白質を持ったシュードタイプ VSV の感染初期過程の解析. 同上.

ウイルス第二部

- 25) 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 エンベロープタンパク質の小胞体における膜トポロジー. 同上.
- 26) 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.
- 27) 中井康介, 森石恒司, 染谷友美, 石井孝司, 宮村達男, 松浦善治: C型肝炎ウイルス E1 蛋白質とコア蛋白質との結合様式の解析. 同上.
- 28) 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 馨, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男: C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上.
- 29) 清原知子, 戸塚敦子: 抗イデオタイプ抗体を用いたA型肝炎ウイルス中和エッセイの研究. 同上.
- 30) 武田直和: Histo-blood group antigens とノーウォークウイルスに対する感受性, 第14回ウイルス性下痢症研究会, 2002年10月, 札幌.
- 31) 勝二郁夫, ハウリー ピーター: E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解. 第61回日本癌学会総会, 2002年10月, 東京.
- 32) 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男: C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における MAPK の活性化の検討. 同上.
- 33) 宮村達男: ポリオ根絶計画と野生株ウイルスの封じ込め. 第2回日本バイオセーフティー学会総会, 2002年11月, 東京.
- 34) 宮村達男: 新世紀の感染症学—その病態解明と治療に挑む. C型肝炎の問題と最新研究. 埼玉医科大学医学会総会公開シンポジウム 2002年11月, 埼玉県入間郡.
- 35) 片山和彦: ウイルスの遺伝子解析の現状と今後の展望. 衛生検査専門技術研修学術講演会, 学術講演, 2002年12月, 横浜.
- 36) 松原尚子, 片山和彦, 白土東子, 岡智一郎, 小川智子, 武田直和, 浜野国勝, 影山 努, 福士秀悦, 小嶋滋之, 影山 努, 高井礼子, 星野文則, 宮村達男: パキウイルス発現系を用いた Norwalk-like viruses タンパク質の発現. 第25回日本分子生物学会, 2002年12月, 横浜.
- 37) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Soluble histone molecules inhibit attachment of Norwalk-like viruses to mammalian cells. 同上.
- 38) 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治: PA28 によるC型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 同上.
- 39) 亀岡洋祐, Persad Amanda, 小池和彦, 堤 武也, 松浦知和, 須藤 勉, 井出達也, 田中一雄, 佐田通夫, 日野邦彦, 神代正道, 橋本雄之, 宮村達男, 鈴木哲朗: G型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索. 同上.
- 40) 勝二郁夫, Peter Howley. E6AP による Csk のユビキチン依存性蛋白分解. 同上.
- 41) 染谷雄一, 武田直和, 宮村達男: ノロウイルス(ノーウォーク様ウイルス)3C 様プロテアーゼの活性中心アミノ酸残基の同定と生化学的性状の解析. 日本薬学会第123年会, 2003年3月, 長崎市.
- 42) 染谷雄一: ノロウイルスタンパク質の構造と機能. 平成15年度日本生化学会関東支部シンポジウム, 独創的パイオニアによる生化学フロンティア研究, 2003年4月, 東京.
- 43) 宮村達男: C型肝炎ウイルスと肝臓がん. 第7回がん分子標的治療研究会総会, 2003年6月, 東京.
- 44) 黒岩宙司, 山中美紀, 宮沢美和子, 堀江 均, 吉田 弘: 根絶宣言前後のラオスにおけるポリオ抗体価の検討. 第44回日本臨床ウイルス学会, 2003年6月, 鹿児島.
- 45) 宗村徹也, 七種美和子, 川上千春, 野口有三, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 吉田 弘: 分子系統計学的手法によるエンテロウイルス同定のためのクラスタリング尺度の設定. 同上.
- 46) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: E型肝炎について: 輸入感染症としてのE型肝炎. 衛生微生物技術協議会第24回研究会, 2003年7月, 福岡市.
- 47) 瀬戸祥介, 綾田 稔, 小倉 壽, 入谷展弘, 久保英幸, 春木孝祐, 名取克郎, 武田直和: Alphatron type NV について. 同上.
- 48) 片山和彦: カリシウイルスの分子疫学. 同上.
- 49) 吉田弘: ポリオ根絶への長く困難な道. 第5回日本進化学会, 2003年8月, 福岡.