

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、当部が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。本年は小分製品1件の検定をおこなった。また不活化ワクチン導入への基礎実験をふくめ、ポリオワクチンの免疫学的研究をおこなった。

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進展した。遺伝子型の解析、レセプターの検索、ウイルス様粒子の形成、ウイルス複製に関する地道な研究も進んだ。また全国各地研との連携が確立し、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。本年度は日本固有の E 型肝炎ウイルス株がみつかり、更に人畜共通伝染病としての E 型肝炎についての研究が進んだ。ウイルス中空粒子を用いた、感度の良い診断系の確立が大きく貢献した。ワクチン開発という応用研究が進む一方で、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。また計画達成前後の国内及び世界レベルのワクチン戦略について提言を行っている。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、パポバウイルス、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 (HPV) 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。本年度は特にウイルスの構成蛋白であるコア蛋白の多岐にわたる機能について、その修飾、局在、安定性、産生量、サイトカイン誘導の面から詳細に調べ、発癌や持続感染への役割をしらべた。

第5室の最重要課題は不活化 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、検査である。本年は A 型肝炎ワクチン1件、B型肝炎ワクチン7件の検定を行った。これらのワクチンの品質管理について国際的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が着々と進んだ。

各室で以下のような国際的技術協力をおこなった。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) 陳 立(中国、中国疾病予防センター) <JICA フェロー>
平成 14 年 12 月 16 日ー平成 15 年 11 月 14 日、ポリオウイルスの分子学診断技術研修
- (2) 祝 双利(中国、中国疾病予防センター) <JICA フェロー>
平成 15 年 11 月 10 日ー平成 16 年 5 月 1 日、ポリオウイルスの分子学診断技術研修
- (3) 柯 昌文(中国、広東省疾病予防センター) <日中医学笹川フェロー> 平成 15 年 4 月 1 日ー平成 16 年 3 月 31 日、E 型肝炎ウイルスの分子生物学的研究
- (4) Ratigorn Guntapong(タイ国立衛生研究所) <JICA フェロー>
平成 15 年 9 月 1 日ー平成 15 年 11 月 30 日、ノロウイルスの分子生物学的研究
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、文科省科学研究費、医薬品機構等の援助を受けた。

人事面では、田中幸江研究員が感染症情報センターへ配置換えとなった(平成 15 年 10 月 1 日)。新型 HPV を次々に発見し、子宮頸癌のウイルス学的診断法の確立に心血を注いだ松倉俊彦主任研究員が定年退職した(平成 16 年 3 月 31 日)。白土東子がウイルス第1室研究員(平成 13 年 10 月 1 日)、西村順裕がウイルス第2室研究員(平成 15 年 10 月 1 日)、村上恭子がウイルス第3室研究員(平成 16 年 4 月 1 日)としてそれぞれ採用された。相崎英樹主任研究員が 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に(平成 14 年 5 月より)、染谷雄一主任研究員がノロウイルスの下痢発症メカニズムの分子生物学的研究の為、カリフォルニア大学サンフランシスコ医学校に(平成 15 年 5 月より)それぞれ長期出張している。

研究業績

I. 下痢症ウイルスに関する研究

1. ノロウイルス(NoV)に関する研究

(1) NoV と血液型物質との結合の解析

NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株が血液型物質である H、Leb 型物質を認識することが報告された。しかし、NoV に属するすべてのウイルス株が同じ血液型物質を認識するわけではなく、NoV 全体の総合的な結合パターンは理解されているとは言いがたい。そこで、NoV 14 株の中空粒子(VLP)を用い、Saliva-VLP binding assay により唾液中の血液型物質との結合を検査した。さらに、唾液に含まれる H、A、B、Lea、Leb 型物質の定量を行い、各ウイルス株が認識する血液型物質を解析した。その結果、同じクラスターに属するウイルス株は同じ結合パターンを示した。クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、Genogroup I (GI)では共通してB型唾液への結合が低く、GIIではB型唾液への結合が高かった。

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

(2) ノロウイルス(NoV)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

NoV 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とが知られており、これまで吸着しない細胞の同定はなされていなかった。そこで、NoV の吸着しない細胞の同定を Binding assay により行い、ヒトリンパ球細胞系の細胞株にはほとんど結合しないことを明らかにした。つぎに、136 種類の抗 CD 抗体を用いて、NoV が吸着しない細胞株と吸着する細胞株の表面分子の発現を Flow cytometry により比較検討し、吸着する細胞株で発現の高い分子を 36 種類選択した。これらの中には NoV の結合に関与する分子が含まれる可能性がある。現在、抗体による VLP 結合阻害実験を行い、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検討している。

[白土東子、名取克郎、小川智子、武田直和、宮村達男]

(3) NoV 粒子形成機構の解析

NoV ゲノムに存在する3つの ORF のうち、構造蛋白質(VP1)をコードする ORF2 をバキュロウイルスで発現させるとウイルス様粒子 VLP を作出できる。ORF3 は、粒子の安定性に関与する構造蛋白質(VP2)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可能性がある。本研究では ORF1、ORF2、ORF3 をそれぞれ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、各

種蛋白質が VLP 形成にどのように関与しているのかを調べている。

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

(4) 昆虫細胞を用いた NoV 粒子作成の試み

NoV の ORF2 を組換えバキュロウイルスで発現して作製した VLP は中空である。この発現系に、NoV ゲノム全長を供給すると、VLP へのゲノムパッケージが起きる可能性がある。NoV ゲノムの 5' 末端と 3' 末端コリボザイムを組み入れた組換えバキュロウイルスを作製し、細胞内に完全長の NoV ゲノムを供給できるようにした。NoV ゲノム供給用バキュロウイルスと、ORF2 組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させ、作製した VLP を浮上密度勾配遠心法、沈降密度勾配遠心法で分析したところ、中空の VLP よりも比重の重い分画にシフトした粒子が存在することが確認できた。現在、比重の異なる粒子の解析を進めている。

[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、田中恵子(感染病理部)]

(5) NoV VLP 産生機構の解析

NoV 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。これらクローン間には5つのアミノ酸残基の違いがあったが、VLP 産生クローンと非産生クローンのキメラを比較検討した結果、P 領域の1アミノ酸残基の変異が VLP の産生能を決定していることを見いだした。現在、この変異が細胞内の VLP 局在に与える影響を免疫電子顕微鏡観察で調べている。

[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、田中恵子(感染病理部)]

(6) NoV の病原性に関する研究

NoV は非細菌性食中毒の主要な原因であると考えられているが、その病原性発現機構については調べられていない。NoV 蛋白質が真核生物の細胞に与える影響を調べるため ORF1、ORF2、ORF3 を、それぞれ発現する3種類の組換えバキュロウイルスを作製し、これらの感染が昆虫細胞に与える影響を調べた。感染細胞における細胞の成長速度、アポトーシスには違いが認められなかったが、ORF1 発現細胞のネクローシス誘導は他に比べ有意に高かった。ORF1 に細胞毒性のある因子が存在することが示唆された。

[林 薫、松原尚子、白土東子、片山和彦、宮村達男、武田直和]

(7) NoV の分子系統解析

NoV のゲノム全塩基配列の分子遺伝学的解析により、構造蛋白質領域の約 250 塩基の遺伝子配列を用いた NoV のタイプング法を構築した。NoV には、2003 年現在、GI に 14 種類、GII に 17 種類の Genotype (遺伝

子型)が存在する。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、分子系統解析のガイドムービー、データファイルを公開し配布するとともに、NoV データベースの構築を進めている。

[片山和彦、名取克郎、影山 努(BML)、宮村達男、武田直和]

(8)NoV 複製機構の研究

NoV 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。NoV 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、NoV ゲノム全長を組み込んだプラスミドクローンを作製しヒト培養細胞内に導入した。同時に組換えワクチニアウイルスの共感染により T7 RNA ポリメラーゼを細胞内で発現させ、5' 末端がキャッピングされた NoV ゲノム RNA を大量に細胞内に供給した。ORF1 にコードされるウイルス蛋白質が転写翻訳され、(+)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。しかし、この系では 3A-VPg 蛋白質の切断が不完全で、合成されたサブゲノム RNA から翻訳されると推定されている構造蛋白質が翻訳されず、NoV の粒子形成ができないことが明らかになった。

[片山和彦、岡智一郎、小嶋慈之(BML)、宮村達男、武田直和]

(9)NoV VLP の発現と血清学的解析

昨年度に VLP が発現できたアルファトロン株の分類上の位置付けは、遺伝学的にも血清学的にも GII に分類されることが妥当と考えられた。本年度は新たに GI に属す 1 株、GII の 2 株で VLP 発現に成功し、現在所有する VLP 発現ができた株の総計は GI で 6 株、GII で 22 株となった。これらの株の遺伝学および血清学的分類結果は完全一致し、GI は 14 のうちの 6 遺伝子型で、GII では 17 のうちの 13 遺伝子型で NoV VLP 抗原および抗血清が作製できたことになる。また抗原、抗血清の分与体制も整い、国内の NoV の血清診断や血清疫学研究に使われている。

[名取克郎、片山和彦、小林真一(愛知衛研)、Grant Hansman(東大大学院)、永田典代、田中恵子(感染病理部)、宮村達男、武田直和]

2. サポウイルス(SaV)に関する研究

(1)SaV ORF1 のプロセッシング産物の同定と切断地図の作製

SaV Mc10 株の ORF1 のプロセッシング産物を同定するため、in vitro で³⁵S 標識 ORF1 タンパク質を発現させ、部位特異抗体を用いた免疫沈降法で各切断産物を同定した。その結果、SaV Mc10 ORF1 の切断地図が NH₂-p11-p28-p35 (NTPase)-p32-p14 (VPg)-p70 (Pro-Pol)-p60 (VP1)-COOHであることを明らかにした。また、プロテアーゼの GDCC モチーフに変異を導入した結果、ORF1 のプロセッシングは全く観察されず、SaV ORF1 のプロセッシングが自己のプロテアーゼによって行なわれることも明らかになった。

[岡智一郎、小川智子、Grant Hansman(東大大学院)、影山 努(BML)、

片山和彦、武田直和、宮村達男]

(2)SaV 遺伝子の解析

SaV 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 SaV 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 10 株の SaV 全塩基配列を決定し、解析を行った。データベース上の配列を含め SaV は GI, GII, GIII, GIV, GV の 5 つのグループに分別できることが明らかになった。さらに、各グループはそれぞれ幾つかの遺伝子型に分別可能であることが明らかになった。GII-c に分別された SakaiC12 株にはゲノムの組換えが認められた。組換えの基点は SaV ゲノムで最も高度に保存された 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。SaV でも NoV と同様ゲノムの組換えが起きていることが明らかになった。

[片山和彦、Grant Hansman(東大大学院)、岡智一郎、田中智之(堺市衛研)、宮村達男、武田直和]

(3)SaV VLP の作出

SaV の遺伝子解析の進展に伴い、SaV でも NoV 同様複数の Genogroup (遺伝子群)とそれらに内包された遺伝子型の存在が示された。SaV の遺伝子群 GI に属する Mc114 株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、幾つかの欠変異体を作製して、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。さらに GII に属する SakaiC12 株、GV に属する NK24 株を用いて VLP を作出することに成功した。Mc114 株の VLP は、クライオ電子顕微鏡観察を用いて粒子構造を詳細に解析する予定である。

[Grant Hansman(東大大学院)、片山和彦、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)]

(4)SaV VLP を用いた抗原 ELISA システムの構築

作出に成功した 3 種類の遺伝子群の VLP のうち、GI の Mc114 株、GV の NK24 株の VLP は、ウサギ及びモルモットの免疫に十分な発現量が得られた。まず GI の VLP を抗原としてウサギおよびモルモットに免疫し、抗体を作出した。GI 抗体は GI VLP のみを特異的に認識し、GV VLP には反応しなかった。SaV は、遺伝子群が異なり互いに異なる抗原性を有することが示唆された。GI の抗体を用いてサンドイッチ ELISA による SaV 抗原検出システムを構築し、下痢症患者糞便検体を用いた検討を行った。本検出系は NoV、ロタウイルス、エンテロウイルスなどには全く反応せず、RT-PCR で GI の SaV 陽性を呈した検体のみを検出可能であった。今後、GV の抗体をテストするとともに、GII, GIII, GIV の VLP 作出と抗体の作製を試みる予定である。

[Grant Hansman(東大大学院)、名取克郎、片山和彦、永田典代、田中恵

子(感染病理部)、宮村達男、武田直和]

(5) SaV と血液型物質との結合の解析

SaV のレセプター分子は明らかにされておらず、血液型物質との結合についても報告がない。そこで、SaV GI の VLP を用い、Saliva-VLP binding assay により血液型物質との結合パターンを検査した。その結果、SaV は全く唾液中に結合しないことが明らかになった。カリシウイルス科 Lagovirus 属のウサギ出血病ウイルスは H 型物質に結合することが知られている。また、NoV のプロトタイプ Norwalk/68 株も H 型物質を認識する。しかし、SaV は血液型物質に結合しない可能性があり、カリシウイルス科に共通の特徴ではないことが示唆された。血液型物質がカリシウイルスの単なる結合因子として働いているのか、侵入にも関与するレセプターであるのかさらなる検討が必要である。

[白土東子、名取克郎、Grant Hansman(東大大学院)、武田直和、宮村達男]

3. その他の研究

(1) 排水処理施設の小型球形ウイルス UV 不活化の条件検討

排水処理施設の消毒は従来下水中の細菌類の不活化が中心であり、小型球形ウイルスを含めたウイルス対策は技術的な検討がなされてきていない。そこで、培養可能なアストロウイルスを用いて紫外線照射量および照射実験条件を検査した。時計皿に 10^6 PFU/ml のアストロウイルス 2 型を入れ、上部より紫外線ランプを照射し不活化する。紫外線の照度は事前に照度計により測定し、照射量はシャッターの開閉により照射時間を変えた。予備実験で、従来報告されている腸管系ウイルスより高い紫外線照射量(60mJ/cm²)で不活化された。

[宇田川悦子]

(2) 電子顕微鏡によるウイルス診断の世界レベルでの品質評価研究

(External Quality Assessment of EM Virus Diagnostics: EQA-EMV13)

昨年に引き続き、本研究所を含む世界各国【26カ国93施設(独:39、EU内:32、極東 EU:4 とその他 18)】に対し不活化標準ウイルスが頒布された。我々はその検体について電子顕微鏡観察でウイルスの確定診断を行い、研究班へ報告した。結果として、分与された 6 検体中 5 検体の結果が一致したが、残る 1 検体は検体送付中の影響によると考えられるウイルス粒子の破壊が著しく、観察不能であった。総ての結果は他の研究所の結果と良く一致した。

[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管し、要望に応じて地研等に配布した。2003 年は、エンテロウイルス標準株 10 株、ポリオウイルス標準株 2 セット、エンテロウイルス抗血清 77 種類、プール抗血清 EP95 を 26 セット、コクサッキー A 群司定用 CF 腹水 2 セット、ポリオウイルス標準抗血清 2 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検査を行政検査として行った。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(JICA)の開催

第 13 回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。研修期間は 2004 年 2 月 16 日～3 月 5 日、研修参加者は、アルジェリア、バングラディシュ、ケニア、ミャンマー、タイ、ザンビアから各 1 名、タンザニアおよびエチオピアからそれぞれ 2 名の計 10 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 (GSL)としての活動

i) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。AFP 由来糞便検体からポリオウイルスの分離および同定を行った。

ii) WHO GSL として、おもにカンボジア・ラオス・ベトナム・韓国、香港等で分離されたポリオウイルスについて型内鑑別あるいは塩基配列解析を行った。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。

iii) 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(cVDPV)であることを明らかにし、病原性等詳細なウイルス学的性状について、他の地域で分離された cVDPV との比較を行った。

iv) 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。特に遺伝子解析による非ポリオエンテロウイルスの実験室診断法についての研究を行った。

v) 2003 年 9 月 3-9 月 10 日に行われた WHO ワクチン由来株に関する専門家会議および Global Polio LabNet 会議に参加した。[清水博之]

vi) 2003 年 11 月 17-11 月 18 日に行われた WHO による中国国家ラポレビューに参加した。[清水博之]

vii) 2003 年 11 月 30-12 月 6 日に行われた WHO 細胞培養ワークショップに講師として参加した。[清水博之]

viii) 2003 年 12 月 18-19 日に実施したモンゴル国家ラポレビューに

ウイルス第二部

参加した。[吉田 弘]

ix) 2004年4月22-23日に実施したポリオ実験室GSL代表者会議に参加した。[清水博之]

x) 2004年7月に実施したCCDC/JICA/WHO共催中国ポリオラボ新人研修会に参加した。[有田峰太郎、吉田 弘]

2. 西太平洋地域の2003年のウイルス分離

2003年にラオス、カンボジアから送付されたAFP症例234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。6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59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株鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。[清水博之、吉田 弘、有田峰太郎、西村順裕、和田純子、宮村達男]

3. JICA 中国EPIプロジェクトへの協力

(1) 2003年8-9月に実施した省級ラボレビュー(甘肅、黒龍江、青海、湖北、江蘇、新疆、広西、江西)に参加した。

[宮村達男、吉倉 廣、吉田 弘、有田峰太郎、清水博之]

(2) 2003年8-9月に実施したWHO/JICA/CCDC中国ポリオ実験室トレーニングコースに講師として参加した。

[吉田 弘、有田峰太郎、清水博之]

(3) 2004年3月に開催された中国ポリオラボネットワーク会議に出席するとともに省級ラボレビュー(上海、重慶、雲南)に参加した。

[吉田 弘]

4. 根絶計画にかかわるポリオウイルスの研究

(1) 2002-2003年富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測

富山県では過去3回河川水のウイルス汚染調査を行ってきた。第4回目は02-03年に実施した。河川定点から採水後濃縮処理し、ウイルス分離を行った。調査期間中E4,7,11,13,CB2,3,4型、ポリオウイルス2型、Reo1,2型が分離された。ポリオ2型は11月に採取した河川水から1定点で分離され、ITDの結果ワクチン由来のウイルスだった。E11、13型は、全国的に2002年夏に無菌性髄膜炎等の患者からよく検出されており、富山県においても河川水調査の結果と相関している。過去の結果と第4回目の調査結果を比較すると、検出されるウイルスの種類や頻度は少なくなっている。ポリオウイルスに関しては、第1-2回の調査ではポリオ生ワクチン投与時期に必ず分離されていたが、最近の調査では検出数が少なくなっている。これは、第1回調査時1979年頃の富山県における下水

道普及率が約30%で生活排水のほとんどが河川に流入している状態であったが、その後下水道普及率が上昇(2002年63.1%)したことによると考えられる。

[岩井雅恵、松浦久美子(富山県衛生研究所)、吉田 弘]

(2) カンボジアにおけるAFP症例から分離されたC群エンテロウイルスの解析

昨年度、カンボジアにおけるAFP症例から新たなポリオウイルス組換え体が分離された。今年度は、カンボジアにおけるAFP症例から分離されたC群エンテロウイルスの解析を行い、ポリオウイルス組換え体のゲノム中の未知の配列を与えた親株のウイルスの同定を試みた。その結果、2ABC領域はカンボジアのCAV17株に近縁であり、3D領域はカンボジアのCAV18株に近縁であることが明らかとなった。これらの配列は、プロトタイプCAV17もしくはCAV18とは異なっていた。これらのことから、分離されたポリオウイルス組換え体ゲノムの未知の配列は、カンボジアで蔓延しているC群エンテロウイルスに由来するものであることが強く示唆された。

[有田峰太郎、祝双利、吉田 弘、清水博之、米山徹夫、宮村達男]

(3) 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。環境中サーベイランスからはOPVが継続して分離されたが、他のサーベイランス由来のOPVは、IPV導入後比較的速度やかに検出されなくなった。分離ポリオウイルスの遺伝子解析により、OPV使用国からの輸入ウイルスであることが示唆された。OPV接種停止後は、出来るだけ複数のサーベイランスによりポリオ伝播の停止を確認する必要があることが示された。

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

(4) 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の全塩基配列を比較解析した。フィリピンの1型cVDPV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2年以上伝播していた可能性が高い。cVDPVは、親株であるSabin 1株と比較すると、病原性復帰に関わると考えられる多くの塩基およびアミノ酸置換が認められた。その結果、AFP由来のcVDPV 3株は、温度感受性および神経毒力の復帰が認められた。一方、接触者由来株は他の株と共通した塩基置換が認められるのにもかかわらず、ポリオウイルス強毒株の性状を示さなかった。

ウイルス第二部

[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)、Mark Pallansch、Olen Kew (CDC)]

(5) 1型ワクチン由来ポリオウイルスの病原性および伝播能の解析

フィリピンおよびヒスパニオラで分離された1型cVDPVの多くは、ポリオレセプター発現トランスジェニックマウス(TgPVR)に脳内接種した場合、野生株と同等の神経毒力を示し、Sabin 1株からの顕著な毒性復帰が認められる。Sabin 1とcVDPVのin vivoにおける病原性および伝播能の違いをより詳細に検討するために、経鼻接種による神経病原性の発現および便中に排泄されるウイルス量の比較解析を行った。経鼻接種による生死および麻痺の発現による比較では、cVDPVは概ね強毒株であるMahoney株と同等の病原性を有していた。便中へのウイルス排泄もSabin 1と比較すると顕著に増加しており、伝播能においても野生型と同等の性状を有することが示された。

[清水博之、Andi Utama、西村順裕、宮村達男、永田典代(感染病理部)、岩崎琢也(長崎大学)]

(6) ポリオウイルスと近縁なコクサッキーA群ウイルス(CAV)の同定

ワクチン由来ポリオウイルスの伝播過程で、自然界に伝播しているエンテロウイルスと組換えを起こし、病原性・伝播力を再獲得することによりポリオ流行を起こす可能性が指摘されている。ポリオと分子系統学的に近縁なウイルスを同定するため、CAV標準株の塩基配列を解析し、CA-11, 15, 17, 20はポリオウイルスと相同性が高い領域を非構造蛋白質領域全域に、CA-13, 18等は、P3領域に有することを確認した。

[Andi Utama、清水博之、宮村達男]

(7) ヨーロッパで分離されたVDPVの病原性の解析

ヨーロッパで分離された疫学的背景が不明なVDPVについて遺伝子解析および神経病原性の解析を行った。2002年にエストニアで下水から分離された3型ポリオウイルスEst02/252は、VP1領域の塩基配列において、親株であるSabin 3と比較して、13%の変異が認められ孤発例由来VDPVと同定された。TgPVR脳内接種による神経病原性の比較解析によると強毒型Leon株と同等以上の強い病原性復帰が認められた。スロバキアの環境サーベイランスから分離された一連の2型VDPVは、塩基配列解析から持続感染者由来であることが強く示唆された。そのうちの2株について神経毒力の解析を行ったところ、Sabin 2株と比較すると病原性復帰が認められたものの、2型野生株(MEF-1株)との比較では低い病原性を示した。野生株ポリオ根絶およびOPV接種停止を念頭においた精度の高いサーベイランスにより、多様な性状を有するVDPVが分離されることが明らかとなった。

[清水博之、Andi Utama、宮村達男、Merja Roivainen、Tapani Hovi (KTL, Finland)]

(8) 中国江蘇省の1型ポリオ分離株の解析

1996-1998年に中国江蘇省においてAFP患者から分離された1型ポリオウイルスは、VP1領域の塩基配列がSabin 1株と大きく異なることから、cVDPVである可能性が認められた。より詳細なゲノム塩基配列の解析の結果、非構造蛋白質領域においてもSabin 1株との相同性が低いことが明らかとなった。しかし、VP1領域の塩基配列が1型野生型標準株であるBrunhilde株と高い相同性を示したため、他のゲノム領域についての塩基配列の比較を行った。その結果、江蘇省の1型ポリオウイルスはBrunhilde標準株由来することが確認された。どのような経緯で標準株が分離同定されたかは、今のところ不明であるが、野生株標準株の実験室封じ込めには、今後特に留意する必要がある。

[Chen Li、Hou Xiaohui、Xu Wenbo (中国疾病予防センター)、清水博之、宮村達男]

5. ポリオウイルスに関する基礎研究

(1) ポリオウイルスの神経毒性発現の解析

ポリオウイルスのワクチン株は、神経細胞特異的にウイルスタンパク合成が低下しているために、弱い神経毒力を示すと考えられてきた。本研究では、ポリオウイルスのタンパク合成を低下させた一連の変異株を作製し、Tg2IPVRマウスを用いて神経毒力を測定した。その結果、親株のタンパク合成の28%のタンパク合成を持つ変異株は強い神経毒力を維持しており、17%のタンパク合成能を持つ変異株でもわずかに神経毒力の低下が認められるのみであった。この変異株は、脳から脊髄への感染経路では低下したタンパク合成のためにウイルスの複製が不安定であったが、脊髄内では安定に増殖できることが見出された。このことは、ポリオウイルスワクチン株の弱毒化においてはウイルスタンパク合成の低下は主要な機構ではないこと、また脊髄組織には、タンパク合成もしくは他の段階で、ウイルスの複製を促進する機構があることを強く示唆する。

[有田峰太郎、清水博之、宮村達男]

(2) ポリオウイルスタンパク質2C、2BCと相互作用する宿主因子の探索

ポリオウイルスの複製は感染細胞に特異的に形成される滑面小胞上で行われる。これまで、この滑面小胞の形成にはポリオウイルスタンパク質2Cもしくはその前駆体である2BCが関与することが報告されている。この滑面小胞の生成機序に関して手がかりを得るため、HeLa細胞由来のcDNAライブラリーを対象に、酵母ツーハイブリッド法(split-ubiquitin system)を用いて、ポリオウイルスタンパク質2C、2BCと相互作用する宿主因子の探索を試みた。

[岡智一郎、片山和彦、武田直和、宮村達男]

6. ポリオワクチンに関する研究

(1) Sabin-IPV の抗原性に関する研究

日本ポリオ研究所が開発した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) は、現在実用化へ向けての研究が進められている。ホルマリン不活化工程でエピトープ構造の変化について、抗原認識部位特異的モノクローナル抗体 (MAb) を用いた ELISA 法および中和試験により調べた。Sabin 1 および Sabin 2 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が、全体的には大きな抗原性変化は認められなかった。Sabin 3 では site-1 および site-3 の抗原認識部位がホルマリン不活化によって変化した。ホルマリン処理過程での部分的抗原性の変化は認められたものの、Sabin-IPV の全体的な中和抗原性には大きな影響がないことが示唆された。

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

(2) ポリオワクチン接種状況

全国 1347 か所の市区町村に調査依頼し、2003 年秋のワクチン接種状況をアンケート調査した。平成 15 年度に満 3 歳に達した小児におけるポリオ生ワクチン 1 回目の累積接種率は 92.5%、2 回目のそれは 88.8% という高い値であった。

[宮村達男、高山直秀 (都立駒込病院)、加藤達夫 (聖マリアンナ医大)]

7. ポリオワクチンの品質管理に関する研究

(1) 国内標準抗血清の整備

これまでに国立感染症研究所で作製されてきた型特異的標準サル血清を整理し、冷凍保管した。1、2、3 型凍結乾燥品のそれぞれの本数は 222 本、499 本、631 本である。1ml に溶解したときの抗体価はそれぞれ 900、4500、3000 単位であった。経口生ワクチン、不活化ワクチン両方の検定検査に有用な資源である。

[小西恭子、武田直和、宮村達男]

8. 非ポリオエンテロウイルスに関する研究

(1) 1999-2003 年に分離されたエコーウイルス 30 型の分子系統解析

日本において 1982-98 年に分離された E30 は大まかに 2 つのゲノタイプが存在していた。98 年以降分離された株を解析することにより、次の流行株のゲノタイプおよび抗原変異を予測することを目的とした。99-03 年に岡山、新潟、広島で主に無菌性髄膜炎患者より分離、同定された 35 株の E30 について VP1 の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。また抗血清を用いて分離株に対する中和反応性を調べた。その結果 99-03 年期の分離株は従来から存在していたゲノタイプ以外のクラスターを形成するタイプも見出された。このグループは過去の分離株と塩基

ベルで約 19% (アミノ酸で約 5%) 異なっていた。標準抗血清とはやや難中和であるが、過去の分離株で作成した抗血清とは易中和性を示しており大きな抗原変異は起こっていないと考えられた。E30 の流行が約 7-8 年おきであることを考えると、前回 97-98 年期の流行から 7 年経過しており、04-05 年は E30 の流行に対し監視を強めておく必要がある。

[吉田 弘、椛 清美、濱野雅子 (岡山県環境保健センター)、渡辺香奈子 (新潟県保環研)、高尾信一 (広島県保健環境センター)、清水博之、宮村達男]

(2) 培養細胞に馴化したエンテロウイルス 71 (EV71) の解析

培養細胞における EV71 分離株の増殖は、同じエンテロウイルス属のポリオウイルスと比べ、著しく遅かつウイルスの力価も低い。そこで、培養細胞における増殖速度もしくはウイルス力価を決定している因子を同定することを目的に、EV71 の標準株である BrCr 株を Hep-2c 細胞に馴化することを試みた。その結果、Hep-2c 細胞に馴化した EV71 変異株を分離し、ウイルスゲノム上にいくつかの変異を見いだすことに成功した。今後、これらの変異株を用いて、マウス細胞に馴化した変異株を分離する予定である。

[有田峰太郎、清水博之、宮村達男]

(3) EV71 特異的レセプターの探索

当室にて EV71 粒子に特異的なモノクローナル抗体が作製された。そのモノクローナル抗体を用いて、EV71 結合レセプターの同定を試みている。その手順は以下の 4 ステップである。1) エンテロウイルス非感受性細胞に、感受性細胞由来ライブラリーを発現。2) 抗 EV71 抗体を介して、EV71 粒子をシャーレに固定。3) 1) のライブラリー発現細胞を 2) のプレートでパンニング。4) プレートに残った細胞から cDNA を単離・同定。現在、各種細胞の EV71 感受性について解析している。

[西村順裕、有田峰太郎、清水博之、宮村達男]

(4) EV71 の神経毒性の発現機序の研究

EV71 は、中枢神経合併症を引き起こす頻度が高い非ポリオエンテロウイルスとして知られている。近年、東アジアで死亡例を含む手足口病重症例が多発し、EV71 の中枢神経感染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我々が確立したカニクイザル感染モデルを用いて EV71 の神経病原性を解析した。EV71 標準株とポリオウイルス 1 型強毒株 (PV1) 感染カニクイザルは、いずれも、中枢神経症状の発現が認められた。PV1 感染は弛緩性麻痺が中心で、EV71 感染サルは、より多様な神経症状を呈し、ヒト EV71 感染における臨床症状との類似性が認められた。中枢神経における病変およびウイルス増殖部位の比較解析により、EV71 感染サルでは、PV1 感染サルと比較して運動神経への局在化が弱い傾向が認められた。

[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)

(5) 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。この地域では近年 genogroup B および C の EV71 が同時に伝播しており、マレーシア、台湾、日本を含めた多くの地域で、2種類の genogroup が混在している。それぞれの genogroup をより詳細に分類した subgenogroup の分布によると、1990 年代後半以降、genogroup B3 および B4、また、genogroup C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されている。1997 年のマレーシア、および 1998 年の台湾における EV71 脳炎をとまう手足口病流行においては、それぞれ、genogroup B3 および genogroup C2 が主要な流行株であった。日本では、1970 年代から 2000 年代にかけて、genogroup C3 を除く、ほぼすべての genogroup の EV71 が分離されているが、最近多く分離される遺伝子型は、genogroup B4 および genogroup C2 である。東アジア地域では、多様な遺伝子型を有し、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。他のエンテロウイルスと同様、EV71 においても地域固有のウイルス伝播は例外で、広範囲な多くの地域間で頻繁にウイルス伝播が起きていることが示唆される。

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

(6) HEV-A 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同定不能な非ポリオエンテロウイルスの遺伝子解析を行ったところ、カプシド領域の分子系統解析により、4 株のエンテロウイルスが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。これらのエンテロウイルスは、species Human enterovirus A (HEV-A) に分類されるが、既知のヒト由来の HEV-A との相同性は比較的低く、むしろ HEV-A に属する一部のサルエンテロウイルスとの関連性が認められた。このうち 1 株の全塩基配列解析を行ったところ、非構造蛋白質領域においても既知の HEV-A と独立したクラスターに属するユニークな新規エンテロウイルスであることが明らかとなった。

[陳立(中国疾病予防センター)、清水博之、Andi Utama、宮村達男]

(7) オランダで同定された EV90 とカンボジアで分離された新規エンテロウイルスとの分子疫学的相同性の解析

前項で示したカンボジアの AFP 由来の新規エンテロウイルスは、オランダの HIV-1 陽性者糞便検体から、培養細胞によるウイルス分離を経ずに直接 RT-PCR により検出同定された新規エンテロウイルスと VP1 領域の塩基配列において高い相同性を示した。カンボジアおよびオランダの新規エンテロウイルスは、分子系統解析により同一の genotype に属す

ることが明らかとなり、暫定的にエンテロウイルス 90 (EV90) と命名された。代表的な 2 株は、5'UTR、カプシド、非構造蛋白質等すべてのゲノム領域において高い相同性を示し、HEV-A に属する新たなヒトエンテロウイルスであることが確認された。EV90 の 5'UTR は、既知の HEV-A 株と異なる系統関係を示し、HEV-C および HEV-D と高い相同性を有していた。

[陳立、清水博之、Andi Utama、宮村達男、Peter van den Broek (Primagen Holding)]

III. 肝炎ウイルスに関する研究

1. A 型肝炎ウイルスに関する研究

(1) 抗イディオタイプ抗体をプローブとした HAV 表面構造の解析

抗 HAV 単クローン抗体(Ab1)KF94 を免疫して抗イディオタイプ抗体(Ab2)94-2 と 94-7 を作製した。いずれの Ab2 も KF94 と HAV の結合を阻害した。94-7 は GL37 細胞への HAV の感染を阻害したことなどから HAV のレセプター結合部位を模倣した構造を持つと推察された。一方の 94-2 は感染阻害には関与しないことから HAV の抗体結合部位を模倣していると考えられた。Ab2:94-2 と 94-7 の交差反応から抗体結合部位とレセプター結合部位が独立した構造で、ウイルス表面に並ぶような形で近接していることがわかった。

[清原知子、戸塚敦子]

(2) 合成 siRNA による A 型肝炎ウイルスの増殖抑制

HAV、KRM003 株のゲノム全体の塩基配列から小分子干渉 RNA (siRNA) の候補部位を 10 箇所余り選び、siRNA を合成した。Lipofectamine2000 とともにアフリカミドルザルの株化腎細胞 GL37 にトランスフェクションし、HAV の感染価を比べて siRNA の効果を検証した。5' と 3' の非翻訳領域の塩基配列から作成したものは増殖効果が殆どなかったが、VP3 領域から選んだ siRNA は非常に効果的にウイルスの増殖を抑制した。siRNA の効果が HAV の配列特異的であることは、遺伝子型の違う株やミスマッチをいれた siRNA などの実験から明らかであった。

[米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子]

(3) A 型肝炎ウイルス培養細胞馴化株の遺伝子解析

同一の野生株から AGMK 細胞および HEL 細胞で独立に分離継代した遺伝子 III B 型 HAV 株 6 種類の全遺伝子を解析して、野生株からの置換部位を同定し、I A、I B 遺伝子型の培養細胞馴化株で報告されている遺伝子置換と比較検討した。もともと馴化に関係しているとされており、ウイルス RNA 複製に関与している非構造蛋白 2B、2C、3A に、III B 型馴化株では 4 から 8 個のアミノ酸置換が認められた。株固有のアミノ酸置換が半数以上を占めたが、2B の 216 と 226、3A の 5 と 65、3C の 142 など

ウイルス第二部

多くの馴化株で共通したアミノ酸置換部位も存在した。

[戸塚敦子、吉井孝男(ウイルス第三部)、米山徹夫]

(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用細胞GL37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、細胞を無血清で培養する手法の確立を目指している。これまでの研究よりGL37、更にGL37内でHAVは無血清培地VP-SFMで増殖可能であることを明らかとした。しかし、その増殖はこれまで用いていた10% FBS入りMEM培地の場合に比べ悪い。本年度はコラーゲン処理プレートを用いることでVP-SFM培地でGL37細胞の増殖をこれまで用いたプレートの場合より約13%良くすることが出来た。今後、VP-SFM培地に欠ける細胞増殖に必要な因子を探索することや、3次元培養法を用いることを検討したい。

[下池貴志]

(5) HAV粒子構造の解析

HAV粒子は結晶化出来ないため、その構造は未だに明らかにされていない。そこで我々はアフリカミドリザル腎臓由来細胞GL37を用いてHAVを大量に増殖させ、この細胞内のHAVをショ糖密度勾配遠心分離法などを用いて高度に精製し、低温電子顕微鏡法を用いて、精製HAV粒子の立体構造を世界にさきがけ決定した。更に、中和抗体と結合したHAV粒子構造を決定し、この抗体との結合部位を同定した。これらの結果より、HAVは同じピコルナウイルス科のウイルスとは構造的にも違いが大きいことが明らかとなった。現在HAV粒子構造を更に詳しく解析中である。

[戸塚敦子、清原知子、米山徹夫、下池貴志、宮村達男、Li Xing、Holland Cheng (Karolinska Institute)]

2. B型肝炎ウイルスに関する研究

(1) 国際参照沈降B型肝炎ワクチン(International Reference Reagent for adsorbed Hepatitis B Vaccine)を用いたB型肝炎ワクチンの力価試験法の検討

国際参照沈降B型肝炎ワクチンの*in vivo*試験、*in vitro*試験を行った。また、総タンパク量を測定し、推定抗原回収率(*in vitro*抗原量/総タンパク量×100)を算出した。国際参照沈降B型肝炎ワクチンの推定抗原回収率は104.1%、国内参照沈降B型肝炎ワクチンの推定抗原回収率は36.4%であった。推定抗原回収率は製造法に寄って異なるが、同一製造法のワクチンの抗原回収率は一定していた。また、*in vitro*力価と*in vivo*力価の再現性もそれぞれ確認された。現在は国内で流通しているワクチンを使った抗原回収率の比較、*in vitro*試験の検討を行っている。

[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) ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB) 三次元培養肝細胞を利用したHCV感染モデルにおけるvirus quasispeciesのダイナミクス

6種類のC型肝炎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。2回の独立した実験から、感染後、第3-33日間に3回のピークを示す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5'-UTRおよびHVRについて決定した結果、感染時と10数種類認められたウイルスクローンが、感染後3日目以降、2種類の株に選択されることがわかった。

[井上 寧、村上恭子、Su Su Hmwe、小俣和彦、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男]

(2) RFB/HCV感染系による抗ウイルス薬の評価

RFBを用いたヒト肝細胞三次元培養系はHCVの感染からウイルス複製までの観察が可能である。この系を用いた抗HCV薬の評価法を確立するため、抗HCV効果が広く知られているinterferon(IFN)を用いて検討した。患者血清感染直後から、100 IU/mlのIFN-αを1ヶ月間添加した場合、無添加と比較して明らかに培養上清中のHCV-RNA量は減少していた。この時、明確な肝機能への影響は認められなかった。今後、リビリン等を用いてさらなる検討を行う予定である。

[村上恭子、井上 寧、小俣和彦、Su Su Hmwe、石井孝司、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男]

(3) RFBによるHCVレプリコン細胞三次元培養系でのHCV粒子作製

HCV全蛋白を発現し、HCV-RNA複製が確認されているHCVレプリコン細胞(RCYM1)をRFBにて培養し、上清中のHCV遺伝子産物を解析した。濃縮した培養上清をショ糖密度勾配遠心で分画したところ、コア蛋白及びHCV-RNAは1.18 g/ml画分をピークとして1.15-1.2 g/mlに検出された。また、NP40処理によりHCV-RNAのピークは1.23 g/mlにシフトした。1.18 g/mlの画分中には電子顕微鏡により30-60 nmのHCV様粒子が観察された。

[村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男]

(4) 新規三次元培養システムによるHCV粒子作製

RFBを用いた三次元培養により、RCYM1細胞培養上清からHCV様粒子が検出された。より簡便な三次元培養システムであるMebiolGel(後述)を用いて、同様に培養上清からHCV様粒子が観察されるかを検討した。培養上清を濃縮し、ショ糖密度勾配遠心で分画したところコア蛋白およびHCV-RNAは1.18 g/mlをピークとして検出され、電子顕微鏡により30-60nmの粒子様構造物が観察された。免疫電顕により、この構造物は抗エンベロープ抗体に反応することが確認された。

[村上恭子、石井孝司、吉崎佐矢香、*田中恵子、相崎英樹、*佐多徹太郎、勝二郁夫、宮村達男、鈴木哲朗、(*感染病理部)]

(5) HCV レプリコン細胞からの複製複合体の調製: detergent 処理条件の検討

HCV 非構造蛋白と宿主因子からなる HCV ゲノム複製複合体は、lipid rafts や caveolae など detergent resistant membrane に内包されていると考えられている。複製複合体の調製法を改良するため detergent 処理の条件および効果を調べた。その結果、4% Triton X-100 処理より 0.5% Brij 96 処理の方が、蛋白の選択性は高いものの、ウイルス複製に関わる特に親水性の因子が除かれている可能性が考えられ、また detergent 処理しない場合に比べ精製度の再現性が欠ける傾向が認められた。

[井上 寧、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

(6) プロテオーム解析による HCV 複製関連因子の検索

HCV ゲノム複製機構を明らかにするため、RC-YM1 細胞から lipid rafts/caveolae 分画を粗精製し性状解析を行った。また、HCV ゲノム複製と細胞増殖との相関を調べ、細胞が対数増殖期にあるとき複製活性が高いことを見出した。これらの知見を基に、HCV ゲノム複製を調節する宿主因子を同定するため、対数増殖期及び定常期の RC-YM1 細胞からそれぞれ複製複合体を分離し二次元電気泳動により各蛋白の量的比較を行い、約 10 種類の蛋白スポットに有意差を認めた。

[井上 寧、村上恭子、松田麻未、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

(7) Huh7 細胞サブクローン間の HCV RNA 複製効率の検討

サブクローン化しておいた各 Huh7 細胞株に RNA レプリコンを導入し 2 週間後に細胞内 HCV-RNA を定量したところ、サブクローン間で RNA 量が最大 50 倍程度異なることを見出した。サブクローン間での複製効率の違いをさらに詳しく解析するため、各レプリコン導入細胞を G418 選択しコロニー形成能を比較したが、Huh7 サブクローン間で、コロニー形成能に有意な差は認められなかった。各群から約 20 コロニー選択し HCV-RNA 量を測定したところ、同一の親株から得られたコロニーにおいても最大 103 コピー程度のばらつきがコロニー間で存在することが判明した。

[井上 寧、村上恭子、宮村達男、鈴木哲朗]

(8) HCV 複製に関連する宿主因子の解析: Toll-like receptor (TLR) 3 mRNA 定量法の開発

自然免疫の担い手である TLR family のうち、TLR3 は二本鎖 RNA を認識し、IRF3 を介して IFN を誘導することにより、ウイルス排除に関わっている。細胞間での HCV 複製効率の違いが TLR3 発現と関連する可能性を考え、TLR3 mRNA の定量法を開発した。HCV RNA 複製活性が認められる Huh7 細胞は、複製活性の低い HepG2 系細胞に比べ TLR3 発現は

低かった。Huh7 細胞サブクローン間では、poly I:C および IFN で刺激しても TLR3 発現に有意な差は認められなかった。

[井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗]

(9) HCV genotype 2b 型レプリコン維持細胞の解析

現在報告されている HCV レプリコンの大部分は genotype 1b 由来であり、他には genotype 1a、2a について報告されている。そこで、IFN 感受性の異なる genotype 2b 由来のレプリコンを作製し、Huh7 細胞に導入して維持細胞株を樹立した。HCV 遺伝子の adapted mutation の存在を検討するため、非構造蛋白領域の塩基配列を部分的に検討したところ、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異が複数可観察された。これらには、genotype 1b レプリコンについて報告されている変異は含まれていなかった。

[江川隆太郎、村上恭子、鈴木哲朗、宮村達男]

(10) 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 HCV 5' 非翻訳領域(5' UTR)内の stem-loop III d 領域に HCV コア蛋白質が相互作用し 5' UTR 依存的翻訳を抑制することを見出した。更に stem-loop III d の loop 領域の構造がこの翻訳抑制に重要であることを示唆する結果を得ている。昨年に引き続き、翻訳抑制に重要なコア蛋白質領域を調べた結果、コア蛋白質の N 末端 24-58 番目の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 35 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、この翻訳抑制に重要な細胞因子の同定を進めている。

[下池貴志、鈴木哲朗、松浦善治、宮村達男、(阪大微研)]

(11) HCV IRES III d 領域に結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白は、HCV IRES 依存的翻訳を抑制することが報告されている。この翻訳抑制の機序として、HCV 翻訳を調節する宿主因子とコア蛋白との拮抗作用による翻訳抑制の可能性が考えられる。そこで、IRES III d 領域特異的に結合する宿主因子を検索したところ、RNA プロセシングに関わる p54-nrb、hnRNP-H、PSF 等が同定された。このうち、p54-nrb はコア蛋白存在下で III d 領域への結合が促進されることを確認した。また、免疫沈降法により、コア蛋白と p54-nrb の結合が示唆された。

[村上恭子、下池貴志、松田麻未、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男]

(12) HCV 様粒子の作成

種々の HCV 遺伝子の構造蛋白質領域(C-E1-E2-p7)を哺乳動物細胞で発現させ、その培養上清からシロ糖密度勾配遠心法により HCV 様粒子(HCV-LP)の精製を行なった。密度が約 1.18-1.2 g/ml のフラクションにコア蛋白質のピークが存在した。この密度に収束したサンプルについて、電子顕微鏡による観察を行っている。

[鈴木亮介、*田中恵子、鈴木哲朗、宮村達男(*感染病理部)]

(13) 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 コア蛋白質からなるヌクレオキャプシドの形成機構は明らかになっていない。コア蛋白遺伝子(genotype 1b)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てコア蛋白質のピークが検出された 1.2 g/ml 分画をネガティブ染色し電子顕微鏡観察したところ、直径約 30-40 nm の粒子構造が観察された。また、この粒子構造は免疫電子顕微鏡観察からコア粒子であることが明らかとなった。現在コア蛋白質と RNA との結合がウイルスの粒子形成に及ぼす影響について検討している。

[坂本真一郎、白木和子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(14) HCV コア蛋白質の細胞内局在化機構の解析

HCV コア蛋白発現細胞の細胞分画/ウェスタンブロット法及び免疫電子顕微鏡観察により、コア蛋白質が、小胞体、ミトコンドリア及び核に存在することを確認した。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-GFP 融合蛋白を用いた解析から、小胞体およびミトコンドリアへの局在には aa 112-152 領域が、核への局在には N 末端側の 2 つの塩基性アミノ酸クラスターが重要であることを明らかにした。

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

(15) HCV コア蛋白質の核における機能の解明

HCV は細胞質で複製するが、コア蛋白質の一部は核内に存在する。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って等電点が変化する蛋白質として TGF- β receptor interacting protein 1 (TRIP1) と Enhancer of Rudimentary Homologue (ERH) を同定した。前者は TGF 応答に関わり、後者は転写調節に働く可能性がある。

[鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男]

(16) HCV コア蛋白質に結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白の新たな機能を同定する目的で、アフィニティタグ精製法、および GST-pull down 法を用いてコア蛋白に特異的に結合する宿主因子のスクリーニングをおこなった。特異的な結合蛋白を SDS-PAGE ゲルより回収し、質量分析法で解析し、同定したところ、複数の新規結合因子を得ることができた。これらの新規結合因子がウイルス増殖や病原性に与える影響について解析を進めている。

[勝二郁夫、白倉雅之、松田麻未、下地 徹、泉水早智子、宮村達男、市村 徹(東京都立大学)、山河芳夫、西島正弘(細胞化学部)、水本清久(北里大薬学部)]

(17) HCV コア蛋白質の分解を制御するユビキチンリガーゼの解析

HCV コア蛋白質の C 末端側がプロセシされるとユビキチン依存性にプロテアソームにより分解される。ユビキチン化の分子機構を明らかにするために HCV コアと結合する因子を探したところ、ユビキチンリガー

ゼを結合蛋白として同定した。このユビキチンリガーゼをコア蛋白と共発現することにより、コア蛋白質の分解が促進した。これより、HCV コアユビキチン化を担うユビキチンリガーゼであると考えられた。現在、ユビキチン化機構、結合領域、病態生理学的意義の解析を進めている。

[白倉雅之、勝二郁夫、下地 徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、市村徹(東京都立大学)]

(18) HCV コア蛋白質の分解メカニズム

C 末端側をプロセシされた HCV コア蛋白質はユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。そこでリジン/アルギニン変異体を使ってコア蛋白質中のユビキチン化部位の同定を行ったところ、7カ所のリジン残基のうち特定の1カ所がユビキチン化されるのではないこと、N 末端側の4カ所のリジン残基が修飾を受けやすいことが明らかとなった。一方、ユビキチン化を受けないリジンレスのコア蛋白質変異体も、PA28 γ の過剰発現により分解が促進されることから、ユビキチン非依存性の分解経路が存在する可能性が示唆された。

[鈴木亮介、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(19) HCV コア蛋白質発現トランスジェニック(TG)マウスにおけるアルコール摂取の影響

C 型肝炎患者はアルコール摂取によって肝炎の増悪、発癌率の上昇を引き起こすことが臨床的に知られているが、その分子機序は解明されていない。エタノール含有食を与えた HCV コア蛋白 TG マウスを用いて、肝臓内のシグナル伝達系に対するコア蛋白とエタノールの協調的影響を解析した。その結果、正常食の場合に比べ、肝臓中の p38 MAPK, ERK が活性化され、その下流の転写因子である ATF-2, Elk-1 が結合する CRE, SRE の活性化も認められた。

[堤 武也、鈴木哲朗、宮村達男、*小池和彦(*東京大)]

(20) HCV コア蛋白質による IL-8 の発現調節機構の解析

HCV コア蛋白質によって IL-8 のプロモーター活性が増強され、実際に内因性 IL-8 の発現が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 プロモーターおよびコア蛋白質の変異体(置換、欠損)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、コア蛋白質による IL8 の転写活性化には、コア蛋白質の細胞質局在が重要であること、NF- κ B 及び ER ストレス応答によって活性化される転写因子 ATF6 が positive regulator として関与していることが示唆される成績を得た。

[友部 賢、堤 武也、鈴木哲朗、宮村達男]

(21) HCV コア蛋白質による転写因子 ATF6 の活性化

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、特に ATF6 の活性化に関与する可能性が示唆された。ATF6 は、

前駆体蛋白が小胞体で切断され活性化型となって、核へ移行し転写因子として働く。ウエスタンブロッティングから、コア蛋白質の発現により、ATF6 前駆体のプロセッシングが促進されることを見出した。更に、ATF6 により発現調節される転写因子 XBP-1 の発現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、宮村達男、鈴木哲朗(*京都大)]

(22) IL-8 発現と遺伝子多型との相関

IL-8 の発現レベルが異なることが知られている6種類のヒト肝癌細胞株について IL-8 遺伝子の多型解析を行った。エクソン領域には遺伝子多型は認められなかったが、非翻訳領域40 位に G または A 型の一塩基多型(SNP)が存在することがわかった。しかしながら、IL-8 の発現量とこの SNP とは必ずしも相関せず、TNF α 、IL1 β による発現誘導を含む IL-8 の発現調節機構には、翻訳後修飾など、転写調節以外の未同定のメカニズムが関与しているのかもしれない。

[友部 賢、堤 武也、*神代正道、宮村達男、鈴木哲朗(*久留米大)]

(23) HCV E1 タンパク質の膜ポロジ

HCV のエンベロープ蛋白質 E1 については、従来、I 型膜蛋白質であるとされてきたが、我々は、E1 の中央部と C 末端の疎水性領域が膜を貫通し、その間に存在する親水性領域が細胞質ループを形成する新しいモデル(polytopic topology)を提唱してきた。今回、genotype 1a, 1b の E1 について N-糖鎖結合部位の点変異体を使った詳細な解析から、E1 蛋白質はこれら2種類のトポロジー(type I および polytopic) が混合した形で存在している可能性が示された。

[染谷友美、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*松浦善治(*大阪大)]

(24) HCV NS5A 蛋白のウイルス RNA 複製における役割

リン酸化非構造蛋白質である HCV NS5A は、他の非構造蛋白質とともに、HCV RNA 複製複合体に含まれている可能性が高いが、HCV 複製に果たす役割は不明である。NS5A を部分欠損またはリン酸化部位を点変異させた HCV RNA レプリコンを作製し、細胞のコロニー形成能とレシフェラーゼアッセイを行った結果、ウイルス複製に影響する NS5A 領域が明らかになった。現在、これらの NS5A 変異が他の HCV 蛋白との相互作用や、複製複合体の活性測定を行っている。

[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]

(25) ミトコンドリア蛋白のプロテオーム:HCV 全蛋白発現細胞の解析

HCV コア蛋白質は reactive oxygen species の蓄積などミトコンドリアの機能に影響を与えている。HCV 全蛋白を発現する HepG2 細胞株(Hep394)及び対照細胞株(Hepswx)からそれぞれミトコンドリア画分を調製しペプチドマスフィンガープリント法を行った。その結果、short/branched chain acyl-coA dehydrogenase (SBCAD) の有意な発現低下が明らかとなった。SBCAD は脂質代謝に関与する酵素として知られ

ており、HCV 感染による肝臓での脂質代謝異常の一因となる可能性が考えられる。

[松田麻未、堤 武也、宮村達男、鈴木哲朗]

(26) ミトコンドリア蛋白のプロテオーム:HCV コア蛋白質と prohibitin との相互作用

コア蛋白発現細胞を使ったミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析を行った。その結果、細胞増殖への関与やシャペロンとして働く prohibitin、antioxidant に関わる MnSOD、電子伝達系を担う complex III、ATP synthase などの発現変化が認められた。コア蛋白が細胞増殖やアポトーシスを調節すること、TG マウスにおいて oxidative stress を惹起することを支持する成績である。prohibitin について更に解析し、コア蛋白質は prohibitin の N 末端領域と直接結合し、翻訳後プロセスに作用していることを見出した。

[堤 武也、松田麻未、宮村達男、鈴木哲朗]

(27) B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析

HCV 抗原が B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア遺伝子を導入した B 細胞株(Bjab Core)の表面分子変化を検索し、CD48 抗原の発現の低下を認めた。この発現変化は、一過性にコア蛋白を発現させた EBV B cell line(EB-BCL Core)表面においても観察された。さらに、コア蛋白の発現によって、CD48 のプロモーター活性及び mRNA レベルが低下することも見出した。CD48 プロモーターの変異体を作製して、コア蛋白による CD48 の転写調節機構を解析している。

[町田早苗、鈴木亮介、小俣和彦、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(28) 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 の肝外病変に関する研究として腎炎との関わりを調べている。HCV 陽性糸球体腎炎患者について、腎生検標本を作製し、抗 HCV コア蛋白抗体で免疫染色を行った。一部の症例でメサンギウム増殖変化した領域に陽性所見が認められ、また尿細管や血管壁などが染色される症例も観察された。さらに、免疫電子顕微鏡解析から、HCV 蛋白がメサンギウム領域、糸球体上皮細胞、基底膜に存在することが示された。

[岩堀 徹、*中尾俊之、鈴木哲朗、宮村達男(*東京医大)]

(29) 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 の腎臓に対する病原性、障害発症の分子機構を調べるため、HMC に対する HCV コア蛋白質の影響を検証している。HMC では、TGF- β 添加による細胞外マトリックスの発現誘導が、コア蛋白質によって増強されることを観察した。また、腎炎形成にはメサンギウム細胞の migration が関わっていることが知られている。そこで、Migration assay を行った結果、コア蛋白の発現によって HMC の migration 能が上昇する

こと、またこの作用は TGF- β 処理と相乗的に上がることが示された。

[岩堀 徹、宮村達男、鈴木哲朗]

(30) 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

HCV 蛋白を発現する組換え DIs は、ウイルス蛋白に対する細胞性免疫を強く誘導する安全な組換えワクチンとして期待される。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後、マウスに皮下投与したところ、コア、E1、E2 蛋白に対する抗体の誘導が認められた。免疫したマウスの脾臓から T 細胞を分離し、overlapping peptides で刺激して Interferon- γ 分泌細胞数を測定したところ、E2 の C 末端部分が最も強く細胞性免疫を誘導することが明らかになった。

[町田早苗、石井孝司、鈴木亮介、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、*赤塚俊隆、宮村達男(*埼玉医大)]

(31) 高度弱毒化ワクチニアウイルス DIs を用いた HCV 非構造蛋白の発現と細胞性免疫誘導能の検討

HCV の非構造蛋白領域(NS3、NS5A)を DIs に組み込み、培養細胞での HCV 蛋白の発現を確認した後マウスに皮下投与したところ、いずれの蛋白に対しても特異抗体の誘導が認められた。また、免疫したマウスの脾臓から T 細胞を分離し、抗原で刺激して Interferon- γ 分泌細胞数を測定したところ、NS3 の C 末端部分が最も強く細胞性免疫を誘導することが明らかになった。

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

(32) 高ペプチド化型 HCV コア蛋白発現系による CTL 誘導の試み

一般に、HCV コア蛋白質に対しての CTL は誘導されにくいとされている。一方我々は、コア蛋白質の C 末端側疎水性領域がプロセス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見出している。この性質を利用して、高分解型のコア蛋白を発現させることにより、効率よくコア蛋白のエピトープに対する CTL を誘導しうかどうかを調べている。種々のコア蛋白発現プラスミドを作製し、マウスに DNA 免疫し、CTL 活性を解析している。

[鈴木亮介、石井孝司、吉崎佐矢香、町田早苗、鈴木哲朗、宮村達男]

(33) RNA 干渉技術を用いた HCV 複製阻害剤の検討

HCV 配列を元に 5' UTR 内及び NS3、NS5B 領域をターゲットとした siRNA 発現ベクターを作製し、HCV レプリコン細胞に導入し、ウイルス RNA 複製に及ぼす影響を検討した。作製した4種の siRNA ベクターのうち、5' UTR 内及び NS3 をターゲットとしたものについては、HCV-RNA 量が約1/2まで減少した。RNA 干渉効果は一塩基の違いによりその効果が大きく変わる可能性がある。今後、高い効果を示したこれらの領域を中心に、より効果的なターゲット配列を検討する予定である。

[江川隆太郎、村上恭子、宮村達男、鈴木哲朗]

(34) C 型肝炎治療薬に対する耐性ウイルスの解析

現在、C 型肝炎に対する治療法として最も効果が期待できるのは、IFN とリバビリンの併用療法である。IFN については、耐性を示す HCV クローンが同定されその耐性機序解析が進んでいるが、リバビリンに対する耐性ウイルスの出現については不明な点が多い。そこで、HCV レプリコン細胞に 10-100 mM のリバビリンを数ヶ月間処理することにより、薬剤耐性 HCV クローンが出現するかどうかを検査している。

[Su Su Hmwe、*小池和彦、宮村達男、鈴木哲朗(*東京大)]

(35) C 型肝炎の発症進展に関与する宿主遺伝子の解析

ウイルス肝炎の個別診断、治療法への応用を最終的な目標として、C 型肝炎の発症、進展に関連する遺伝子多型の解析を行っている。日本人健常者及び C 型肝炎患者についてアレレル特異的 SNP 検出プローブを用いて X、Y を除く全染色体こわって走査を行った。昨年、1 番および 2 番染色体で有意に偏りを示す部位を計 10 領域検出したが、今回新たに、7、10、17、18 番染色体こ C 型肝炎発症と強く連鎖する SNP を同定した。LOD 値が極大を示す領域こついて、更に詳細な SNP 解析を行う予定である。

[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]

(36) 歯科用器具器材の HCV 汚染除去に関する研究

歯科用器具こついて、洗浄方法を検討し以下の成績を得た。1) 技工用カーバイトバー、3-way シリンジ、技工用シリコンポイントは HCV 汚染直後にエタノール綿で拭き取るこにより十分除去可能だが、10 分間放置すると、除染は難しい。2) 注射筒および CR 充填器では風乾後こいてもエタノール綿での拭き取りが有効である。3) デンタルミラー、バキュームチップ、印象用トレイは薬液処理後の水洗が有効である。4) 塩化ビニルグローブ、ラテックスグローブは流水洗浄こよって汚染除去が可能である。

[小俣和彦、鈴木哲朗、*佐藤田鶴子、*古屋英毅(*日本歯科大)]

(37) C 型肝炎症例の口腔内滲出液中からの HCV の検出

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。血清中の HCV-RNA が陽性であった 21 例こおいては、19 例(90%)で歯肉溝滲出液中に HCV-RNA が検出された。また、唾液中では 8 例(38%)であった。また、血中 HCV レベルが中程度あるいはそれ以上(10^5 ~ 10^6 copies/ml)の症例群では、唾液中に 10^2 ~ 10^3 、歯肉溝滲出液中に 10^4 ~ 10^5 copies/ml 程度の HCV を観察した

[小俣和彦、鈴木哲朗、*佐藤田鶴子、*古屋英毅(*日本歯科大)]

(38) HCV NS5A 蛋白質と amphiphysin II の相互作用

HCV の NS5A 蛋白質は様々な宿主細胞蛋白質と相互作用することにより、インターフェロンに対する感受性や情報伝達系に影響を及ぼすことが報告されている。我々は、NS5A 蛋白質と相互作用する宿主細胞蛋白質として amphiphysin II を見出した。さらに、NS5A 蛋白質の SH3 ドメイン結合モチーフを含む領域と、amphiphysin II の N 末端および C 末端が相互作用することを明らかにした。NS5A 蛋白質の SH3 ドメイン結合モチーフの詳細な解析を行い、amphiphysin II との相互作用に重要な役割を演じている NS5A 蛋白質のアミノ酸残基を同定した。また、ヒト肝癌由来細胞株に、NS5A 蛋白質と相互作用しない amphiphysin II の splicing variants が存在することを確認した。HCV NS5A 蛋白質と amphiphysin II splicing variants との相互作用の生物学的意義について現在研究を進めている。[西村剛裕, 岡本 徹(阪大微研)、森石恒司(阪大微研)、松浦善治(阪大微研)]

4. E 型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

(1) 遺伝子型4(G4) HEV の遺伝子解析

E 型肝炎が人畜共通感染症であるかどうか注目されている。そこでイノシシから G4 に属する HEV を分離し、ヒトやブタから分離したものと比較した。イノシシの糞便から HEV RNA を抽出し、全長領域を網羅する遺伝子をクローニングし、全塩基配列を確定した。現在、この株とヒトやブタ由来株の比較を詳しく検討している。[李 天成、栄 賢治、伊藤 雅(愛知偉研)、宮村達男、武田直和]

(2) 遺伝子型3型(G3)および G4 HEV の構造蛋白の発現及びウイルス様中空粒子(VLP)に対する抗体の作製

現在、HEV には少なくとも4つの遺伝子型が存在する。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 G3 と G4 HEV 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。組換えバキュロウイルスを感染した昆虫細胞 Tn5 の培養上清から大量のウイルス様中空粒子(VLP)を得た。VLP をそれぞれウサギ、モルモットに免疫し、高力価の抗体を作製した。ウイルス様中空粒子を用いた抗体検出 ELISA 及び高力価の抗体を用いた抗原検出 ELISA を構築した。[李 天成、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子(感染病管理部)]

(3) 遺伝子型1(G1)、G3 及び G4 HEV VLP 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、G1、G3 及び G4 HEV の

ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を昆虫細胞で発現させ、VLP の作製に成功した。G1 と G3 の VLP 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それぞれの単クローン抗体を用い、G1、G3 型及び G4 VLP との反応の違いから抗原性を評価した。その結果、遺伝子型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、武田直和、宮村達男]

(4) 大きなサイズをもつ VLP の作製

これまで G1、G3 及び G4 HEV ORF2 の N 末端から 111 アミノ酸を欠失した領域を昆虫細胞で発現させ、VLP の作製に成功した。しかし、これらの VLP の直径は 23-24nm であって、ネイティブなウイルス粒子よりはるかに小さい。また、分子量や比重などもネイティブなウイルス粒子と異なっている。そこで組換えバキュロウイルスを用いて G3 HEV の ORF2 全長を発現したところ、感染 Tn5 細胞から直径約 35-38nm の粒子を得た。この粒子は形状ではネイティブなウイルス粒子と非常に類似の粒子であった。現在、クリオ電顕で三次構造の解析をおこなっている。

[李 天成、恒光 裕(動偉研)、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 の転写産物としては、共通の 5'-、3' 末端を有する3種類の spliced RNA (3.0-, 1.2-, 1.0-kb) が同定されているが、その転写調節機構はほとんど明らかとされていない。我々はこれまでに、TTV 非翻訳遺伝子内にコアプロモーター、エンハンサーおよびリプレッサー領域が存在することを示してきた。今回、ゲルシフト法、共発現実験などから、TATA box 配列を含む 113 塩基のコアプロモーターの活性調節には、転写因子 USF が最も大きく関わっていることが明らかとなった。

[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 の臨床的意義

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行っている。HBV、HCV、HEV とともに陰性の肝炎症例について、輸血によって 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 抗体価との関連を調べた。

[鈴木亮介、鈴木哲朗、李 天成、宮村達男]

6. GBウイルス(GBV)に関する研究

(1) GBV-B 蛋白を発現する組み換え DIs の作成と免疫誘導能の検討

GBV-B はタマリンに慢性肝炎を発症させるウイルスで、その構造の類似性から 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。GBV-B の構造蛋白の一部を組み込んだ組換え DLs を作成し、哺乳類細胞に感染させたところ目的の GBV 蛋白の発現が確認できた。この DLs をマウスに皮下投与したところ、GBV-B のコア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 DLs を作成し、それらの免疫誘導能の比較を行っている。

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

(2) GBV-B 感染動物モデルの確立

NIH, Dr. Bukh より供与された GBV-B の全長 cDNA を保持するプラスミドから GBV-B RNA を合成し、タマリンの肝臓に投与したところ急性肝炎症状を呈し、血中にウイルス RNA が高力価で存在することを確認した。またこの血清を他の健康タマリンに投与したところ、同様に急性肝炎症状とウイルス血症を発症することが確認され、GBV-B 感染動物モデルが確立できた。本モデルは C 型肝炎のサロゲートモデルとして有用であると考えられる。

[石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、宮村達男、鈴木哲朗、*岩田奈織子、*佐多徹太郎、**明里宏文、***八木慎太郎(*感染病理部、**霊長類センター、***先端生命科学研)]

(3) TaqMan RT-PCR 法を用いた GBV-B RNA 定量法の確立

GBV-B infectious RNA を接種したタマリンの生体内でのウイルス量を測定するため、TaqMan RT-PCR 法を用いて GBV-B RNA 量を定量する系の検討を行った。GBV-B のコア領域に TaqMan プローブとプライマーを設定し、感度の測定には標的領域をサブクローニングしたプラスミド DNA から in vitro transcription により作成した RNA を使用した。その結果、1000 copies/ml 以上で定量可能であった。

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

(4) GBV-B 感染動物の体内ウイルス分布の解析

GBV-B が感染したタマリンの各臓器を摘出し、GBV-B RNA 量を測定した。その結果、GBV-B は肝臓で最も多く、次いで脾臓・リンパ系、生殖器・泌尿器系の順に多かった。HCV の生体内でのウイルス分布を解析することは非常に困難であり、本実験は HCV の体内動態の解析に有用な情報を提供するものと思われる。

[石井孝司、町田早苗、吉崎佐矢香、宮村達男、鈴木哲朗、*岩田奈織子、*佐多徹太郎、**明里宏文、***八木慎太郎(*感染病理部、**霊長類センター、***先端生命科学研)]

IV. 腫瘍ウイルスに関する研究

1. ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) に関する研究

(1) HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規基質蛋白の検索

HPV16E6 蛋白は宿主蛋白である E6AP と複合体を形成し E3 コピ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 は単独でもユビキチンリガーゼ活性を有する。E6AP の新規基質蛋白を同定するために、Ettan-DIGE 法、MALDI/TOFMS 法を用いて解析し、新たに 2 種類の E6AP 基質候補蛋白を同定した。新規基質蛋白の可能性が考えられ、現在、検討中である。

[梶山裕一、松田麻未、下地 徹、勝二郁夫、宮村達男、瀬戸裕之(東京理科大学)]

(2) HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の調節蛋白の検索

E6AP の細胞内局在、活性化などの調節機構は依然として不明である。E6AP の調節因子を検索する目的で GST-pull down 法、MALDI-TOF/MS 法により E6AP に特異的に結合する細胞内因子を検索した。質量分析の結果、annexin A1 が E6AP 結合蛋白として同定された。in vitro において結合が確認され、現在、この結合の生理学的意義について解析中である。

[梶山裕一、松田麻未、下地 徹、勝二郁夫、宮村達男、瀬戸裕之(東京理科大学)]

(3) HPV と婦人科領域の腫瘍性病変の研究

子宮頸部および頸部の腫瘍性病変に存在する HPV を blot hybridization 法と PCR 法により比較した。blot hybridization 法では 79% (231/294 例) の扁平上皮癌に性器 HPV が検出された。多くの症例で 5 コピー以上の HPV ゲノムが検出された。PCR-direct sequence 法では 96% (240/250 例) で性器 HPV 遺伝子が検出された。12% (29/250 例) に複数の HPV 型が検出され、コピー数は 0.05 以下だった。この二つの解析方法間には顕著な差があることが明らかとなった。

[松倉俊彦、菅生元康(長野赤十字病院)]

2. ヒトポリオーマウイルス BK に関する研究

(1) BK ウイルス (BKV) VP1 のみで構成された T=1 の中空粒子の三次構造の解析

BKV はヒトポリオーマウイルスの一つである。BKV VP1 は主要な BKV 構造蛋白をコードする。BKV VP1 を発現する組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染し、大きさが異なる二種類の BKV 様粒子 (直径 20nm と 45nm) を得た。クライオ電子顕微鏡解析法による解析の結果、直径 45nm である粒子は T=7 であり、直径 20nm である粒子は T=1 であった。Ca⁺⁺濃度が粒子形成には重要な役割を果たしていた。

[李 天成、武田直和、宮村達男、Josefina Nilsson、Holland Cheng]

ウイルス第二部

(Kalorinska Institute)]

(2) BKV VP1 VLP の形成条件の検討

組換えバキュロウイルス発現システムを用いて BKV の主要構造蛋白 VP1 を発現すると、VLP が形成される。VP1 における陽電荷アミノ酸 281-297 (R281, R285, K288, R290, R292, R294 and 297) はウイルス粒子の形成および DNA との結合に重要な役割を果たしていると推定されている。これらのアミノ酸をアラニン(A)に置換して、各変異株を組換えバキュロウイルス発現システムで発現し、粒子の形成および DNA との結合を比較した。その結果、281 と 285 番目のアルギニンはウイルス粒子の形成に重要であり、288 番目のリジン、290、292 及び 294 番目のアルギニンは DNA との結合に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

[柯 昌文(中国広東省 CDC)、李 天成、武田直和、宮村達男]

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 の全配列決定

DIs は日本の種痘ワクチン株であった大連株の高度弱毒株である。近年ウイルスベクターとしての応用が研究されているため、全塩基配列の情報を得ておくことは重要であると考えられる。ショットガン法を用いて全長遺伝子を分割してサブクローニングし、全塩基配列を決定したところ、ゲノム左端にある大きな欠損以外ほぼ親株の大連株と同一であることが確認された。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

V. SARS コロナウイルス(SARS-CoV)に関する研究

(1) SARS-CoV 構造蛋白質のワクチニアウイルスでの発現

重症急性呼吸器症候群(SARS)は SARS-CoV 感染によって起こる疾患で、症状の重篤さと致死率の高さから人類に対する深刻な新たな脅威となっている。本疾患の高感度診断系およびワクチン開発を目的として、SARS-CoV の構造蛋白 4 種の cDNA を DIs 株に組み込み、組換えウイルスを哺乳類細胞に感染させたところ、目的の各蛋白が感染細胞で発現していることが確認できた。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*森川 茂、*水谷哲也、**田口文広、**小田切孝人、**田代真人(*ウイルス第一部、**ウイルス第三部)]

(2) SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換えワクチニアウイルスの免疫誘導能の検討

SARS-CoV 構造蛋白を発現する組換えウイルスをマウスに皮下及び経鼻投与したところ、いずれのマウスでも SARS-CoV に対する液性及び細胞性免疫が誘導された。Spike protein である S を発現する組換え DIs を投与された群では、誘導された抗体は SARS-CoV の細胞への吸着を阻止する能力もあった。S を発現する組換え DIs を経鼻投与された群で

は、鼻腔で SARS-CoV に対する粘膜免疫も誘導されており、本組換え DIs が SARS に対するワクチンとして使用できる可能性が示唆された。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*横田恭子、*大西和夫、*高須賀直美、**長谷川秀樹、**森川 茂、***田口文広、***田代真人(*免疫部、**感染病理科、***ウイルス第一部、***ウイルス第三部)]

VI. その他の研究

(1) RFB 三次元培養系を用いたヒト薬物代謝解析モデルの開発

チトクローム P450(CYP)3A4 は、肝臓薬物代謝の第一相反応に関与し、現使用薬物の約 30% の代謝を担っている。また、ヒト肝臓における CYP3A4 の発現誘導にはリファンピシン等の薬剤をリガンドとする PXR/RXR のヘテロダイマー形成が関与することが知られている。本研究では、リアルタイム RT-PCR、ゲルシフト法などによる解析から、FLC5 細胞の RFB 三次元培養系においては、単層培養系に比べ、CYP3A4 の顕著な発現上昇と薬剤刺激による発現誘導を示すこと、これには PXR/RXR および HNF-4a の活性化が関与していることが明らかとなった。

[岩堀 徹、相崎英樹、*松浦知和、鈴木哲朗(*慈恵医大)]

(2) 新規三次元マトリックス Mebiol Gel を用いた三次元培養肝細胞の組織化学的解析

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°C 以上でゲル化する性質を持つ。スフェロイド状に培養した Huh7 細胞について、細胞樹生形成に関与する蛋白質の発現、細胞内局在を調べた。Desmoglein、Connexin32 は細胞-細胞接着面全体に分布し、細胞間の接着に働くことが示唆された。一方、よりタイトな結合を担う Occludin、E-cadherin については、毛細管様構造の形成に関与することを示唆する局在が観察された。

[鈴木哲朗、吉崎佐矢香、*後藤康文、*眞鍋 昇、石井孝司、宮村達男(*京都大)]

(3) 三次元培養肝細胞のプロテオーム解析

スフェロイド状に三次元培養され樹生が形成されたヒト肝癌細胞において、発現レベルの変化する蛋白質群の同定を行っている。MebiolGel 培養および単層培養した HepG2、Huh7 細胞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。再現性よく発現の変化を認めたスポットを質量分析に供したところ、細胞骨格に関連する蛋白質群を同定することができた。

[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(4) 足場付カ型 MebiolGel による高分化型肝癌細胞の培養

ヒト肝癌細胞株のうち、HepG2、Huh7 細胞は MebiolGel 中で増殖スフ

ウイルス第二部

ェロイドが形成されたが、より高分化型細胞である FLC4 ではほとんど増殖が認められなかった。多くの正常細胞では、細胞外マトリックスの存在がその増殖、分化の制御に重要であることが知られている。そこで、MebiolGel に細胞接着関連因子を混合した種々の「足場付加型ゲル」を用いて FLC4 細胞の培養を試みた。これまでのところ、コラーゲンペプチドを 8%程度含有させたゲル中で細胞増殖とスフェロイド形成が観察された。

[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、宮村達男、鈴木哲朗]

(5) ネコ免疫不全ウイルス感染ネコ末梢血リンパ球における CD3 ϵ 発現低下

CD3 ϵ は T 細胞レセプター/CD3 複合体の一部であり、ヒト・マウスなどでは T 細胞のマーカーとして頻用されている。しかし、ネコ CD3 ϵ (fCD3 ϵ) の細胞外領域を認識し、ネコ生細胞のフローサイトメリーに適用できる抗 fCD3 ϵ 抗体は無く、ネコの T 細胞マーカーには fCD5 を使用しているのが現状であった。我々は fCD3 ϵ の細胞外領域を認識するモノクローナル抗体(NZM1)の作製に成功した。ネコ免疫不全ウイルス(FIV)感染ネコの末梢血リンパ球を解析したところ、fCD3 $\alpha + \beta$ -細胞特異的に fCD3 ϵ 発現量の低下が見いだされた。fCD3 ϵ の発現量により、FIV 感染ネコの免疫ステータスをモニターできる可能性を示した。

[西村順裕、下島昌幸(東大)、佐藤英次(フロリダ大)、泉屋吉宏(カリフォルニア大)、遠矢幸伸(東大)、見上彪(食品安全委員会)、宮沢孝幸(帯広畜産大学)]

(6) ナノバイオ構造用高速高精度解析用電子顕微鏡(TEM)の開発研究

最近の BSE や炭疽菌テロに代表されるように、各種感染症の増大が顕在化している。感染症原因であるウイルスやプリオン蛋白質の機能を解明するためにナノオーダーの微細構造解析が極めて重要で、数百 nm サイズの微小かつ微量なウイルスやプリオン蛋白質の微細構造を直接観察するには高分解能電子顕微鏡(TEM)が唯一のツールである。高コントラスト像検出系技術、ウイルス・蛋白質サーチ画像処理技術、試料前処理用マイクロマシン技術を開発し、それらを搭載したナノバイオ構造高速高精度解析用電子顕微鏡を開発することを目的としている。

[宇田川悦子]

<別> 検査業務

第1室:

行政検査

ノロウイルス確認検査 7 件、75 検体

E 型肝炎確認検査 11 件、13 検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1 件

第2室:

行政検査

平成15年度は6名の被験者から6株のポリオウイルスが分離・同定され、中和による同定試験、PCR-RFLP 法あるいは ELISA 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

B 型肝炎ウイルス遺伝子解析 1 件、16 検体

研究検査

TTV 遺伝子解析 2 件、43 検体

HGV 遺伝子解析 1 件、28 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 1 件

組換え沈降 B 型肝炎ワクチン(酵母由来) 3 件

沈降 B 型肝炎ワクチン(huGK-14 細胞由来) 4 件

行政検査

A 型肝炎ウイルスの遺伝子検出 1 件3 検体

発表業績一覧

誌上発表

1. 欧文発表

原著

1) Ding X, Li TC, Hayashi S, Masaki N, Tran TH, Hirano M, Yamaguchi M, Usui M, Takeda N, Abe K: Present state of hepatitis E virus epidemiology in Tokyo, Japan. *Hepatology Res* 27: 169-173, 2003.

2) Shrestha SM, Shrestha S, Tsuda F, Nishizawa T, Gotanda Y, Takeda N, Okamoto H: Molecular investigation of hepatitis E virus infection in patients with acute hepatitis in Kathmandu, Nepal. *J Med Virol* 69: 207-214, 2003.

3) Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, 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.

- 4) 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.
- 5) Pelletier I, Ouzilou L, Arita M, Nomoto A, Colbere-Garapin F. Characterization of the Poliovirus 147S Particle: New Insights into Poliovirus Uncoating. *Virology* 305: 55-65, 2003.
- 6) Yang C-F, T. Naguib, S.-J. Yang E, Nasr J, Jorba N, Ahmed R, Campagnoli H, van der Avoort H, Shimizu T, Yoneyama T, Miyamura M, Pallansch A, Kew O: Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt, 1983 to 1993. *J Virol* 77: 8366-8377, 2003.
- 7) Kimura H, Saitoh M, Miyakubo H, Yoshida H, Kato M, Nagai A, Kozawa K. Keratoconjunctivitis caused by echovirus type 13 in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J* 22: 758-759, 2003.
- 8) Moriishi K, Okabayashi T, Nakai K, Moriya K, Koike K, Mutrata S, Chiba T, Tanaka K, Suzuki R, Suzulki T, Miyamura T, Matsuura Y: PA28g-dependent nuclear retention and degradation of HCV core protein. *J Virol* 77: 10237-10249, 2003.
- 9) Aizaki H, Nagamori S, Matsuda M, Kawakami H, Hashimoto O, Ishiko H, Kawada M, Matsuura T, Hasumura S, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T: Production and release of infectious virions from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. *Virology* 314: 16-25, 2003.
- 10) Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T: Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology* 38: 820-828, 2003.
- 11) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of virions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. *Arch Virol* 148: 1659-1670, 2003.
- 12) Chiba Y, Kobayashi M, Chosa T, Yamamoto T, Endo K, Shimizu H, Li L, Wen-Bo X, Li-Bi Z: Molecular epidemiology of type 2 vaccine-associated paralytic poliomyelitis in China. *Jpn J Infec Dis* 56: 181-183, 2003.
- 13) Brunetti CR, Amano H, Ueda Y, Qin J, Miyamura T, Suzuki T, Li X, Barrett JW, McFadden G: Complete genomic sequence and comparative analysis of the tumorigenic poxvirus Yaba monkey tumor virus. *J Virol* 77: 13335-13347, 2003.
- 14) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Anti-apoptotic regulation by hepatitis C virus core protein in the ecdysone-inducible system of human liver cells. *Virology* 317: 24-35, 2003.
- 15) Ruggieri A, Murdolo M, Harada T, Miyamura T, Rapicetta M: Cell cycle perturbation in a human hepatoblastoma cell line constitutively expressing Hepatitis C virus core protein. *Arch Virol* 149: 61-74, 2003.
- 16) Shimizu H, Yoshida H, Utama A, Nakayama T, Saito T, Watanabe K, Iizuka S, Noda S, Yoneyama T, Miyamura T: Surveillance of poliovirus-isolates in Japan, 2002. *Jpn J InfDis* 56: 218-219, 2003.
- 17) Suzuki T, Aizaki H, Tsutsumi T, Suzuki R, Miyamura T: Possible pathogenic roles of hepatitis C virus proteins. In: *Animal Frontier Sciences*. 253-259, 2003.
- 18) Takamura S, Niikura M, Li TC, Takeda N, Kusagawa S, Takebe Y, Miyamura T, Yasutomi Y: DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 11: 628-635, 2004.
- 19) Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Dhole TN, Miyamura T, Takeda N: Protection of cynomolgus monkeys against HEV infection by oral administration of recombinant hepatitis E virus-like particles. *Vaccine* 22: 370-377, 2004.
- 20) Kobayashi S, Natori, K Takeda N, Sakae K: Immunomagnetic capture RTR-PCR for detection of Norovirus from foods implicated in a foodborne outbreak. *Microbiol Immunol* 48: 201-204, 2004.
- 21) Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Kojima S, Takai R, Oka T, Takeda N, Katayama K: Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan. *J Clin Microbiol* 42: 2988-2995, 2004.
- 22) Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K: Isolation and identification of a Novel human parechovirus. *J Gen Virol* 85: 391-398, 2004.
- 23) Hansman GS, Doan LTP, Kguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Hansman GS, Katayama K, Maneekarn N, Peerakome S, Khamrin P, Tonusin S, Okitsu S, Nishio O, Takeda N, Ushijima H: Genetic diversity of norovirus and sapovirus in hospitalized infants with sporadic cases of acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Clin Microbiol* 42: 1305-1307, 2004.
- 24) Fukushi S, Kojima S, Takai R, Hoshino FB, Oka T, Takeda N, Katayama K, Kageyama T: Poly(A)- and primer-independent RNA polymerase of Norovirus. *J Virol* 78: 3889-3896, 2004.
- 25) Nishimura Y, Shimojima M, Sato E, Izumiya Y, Tohya Y, Mikami T, and Miyazawa T: Down-modulation of CD3 ϵ expression in CD8 α +

- β -T cells of feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Gen Virol* 85: 2585-2589, 2004.
- 26) Nagata N, Iwasaki T, Ami Y, Tano Y, Harashima A, Suzuki Y, Sato Y, Hasegawa H, Sata T, Miyamura T, Shimizu H: Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J Gen Virol* 85: 2981-2989, 2004.
- 27) Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Genogroup II noroviruses efficiently bind to heparan sulfate proteoglycan associated with the cellular membrane. *J Virol* 78: 3817-3826, 2004.
- 28) Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 46: 231-235, 2004.
- 29) Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, Shimizu H, Nathanson N, Pallansch MA: Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull WHO* 82: 16-22, 2004.
- 30) Gao L, Aizaki H, He J-W, and Lai M: Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J Virol* 7: 3480-3488, 2004.
- 31) Arita M, Shimizu H, Miyamura T: Characterization of in vitro and in vivo phenotypes of poliovirus type 1 mutants with reduced viral protein synthesis activity. *J Gen Virol* 85: 1933-1944, 2004.
- 32) Okamoto K, Moriishi K, Miyamura T, Matsuura Y: Intramembrane proteolysis and endoplasmic reticulum retention of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 78: 6370-6380, 2004.
- 33) Matsukura T, Sugase S: Human papillomavirus genomes in squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Virology* 324: 439-449, 2004.
- 34) Shimizu H, Thorley B, Paladin FJ, Brussen KA, Stambos V, Yuen L, Utama A, Tano Y, Arita A, Yoshida H, Yoneyama T, Benegas A, Roesel S, Pallansch M, Kew O, Miyamura T: Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J Virol* 78: 13512-13521, 2004.
- 35) Hansman GS, Doan LTP, Nguyen TA, Okitsu S, Katayama K, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Kato Y, Nishio O, Noda M, Ushijima H: Detection of norovirus and sapovirus infection among children with gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Arch Virol*, (in press).
- 36) Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li T-C, Matsuura Y, Mishiro M, Miyamura T: Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J Virol*, (in press).
- 37) Tanaka E, Matsumoto A, Takeda N, Li T-C, Umemura T, Yoshizawa K, Miyakawa Y, Miyamura T, Kiyosawa K: Age-specific antibody to hepatitis E virus stays constant during the past 20 years in Japan. *J Viral Hepatitis*, (in press).
- 38) Suzuki R, Sakamoto S, Tsutsumi T, Rikimaru A, Shimoike T, Mizumoto K, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T: Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein. *J Virol*, (in press).
- 39) Maloney BJ, Takeda N, Suzuki Y, Ami Y, Li TC, Miyamura T, Amntzen CJ, Mason HS: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine*, (in press).
- 40) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Kishimoto T, Tanno S, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, Miyamura T: An outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J Gastroenterol Hepatol*, (in press).

II. 和文発表

- 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. *病原微生物検出情報* 24: 311-312, 2003.
- 2) 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. *感染症発生動向調査週報(IDWR)* 5: 9-10, 2003.
- 3) 李 天成, 宮村達男, 武田直和: E型肝炎ウイルス感染と増殖のメカニズム. *Mebio* 20: 63-68, 2003.
- 4) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎ウイルス. *血液フロンティア* 13:605-612, 2003.
- 5) 武田直和: E型肝炎. *アニムス* 29: 37-41, 2003.
- 6) 武田直和: E型肝炎の基礎知識. *保健婦科誌* 59: 372-376, 2003.
- 7) 武田直和: ウイルス; 動物性食品の HACCP 研究班 (編): HACCP: 衛生管理計画の作成と実践 HACCP 実践データ集 東京, 中央法規出版株式会社 pp250-256, 2003.
- 8) 宇田川悦子: 病原因子・発症機序と検査法: 小型球形ウイルス食中毒. *臨床検査* 47: 483-494, 2003.
- 9) 宇田川悦子: 小型球形ウイルスと最新電子顕微鏡検査法. *WORLD FOCUS* 48: 1-2, 2003.
- 10) 吉田 弘: ヒトエンテロウイルス. *日本臨床*, 61: 463-467, 2003.
- 11) 清水博之: 手足口病. *総合臨床 増刊号* 52: 192-197, 2003.
- 12) 岩崎琢也, 清水博之, 永田典代: エンテロウイルス 71. *病理と臨床* 21: 110-114, 2003.
- 13) 千葉清男, 小林 誠, 帖左 徹, 山本悌司, 遠藤一博, 清水博之, 李 黎, 許 分波, 張 礼壁: 中国の 2 型ポリオワクチン関連麻痺の子疫学的検討. *臨床とウイルス* 31: 292-296, 2003.

ウイルス第二部

- 14) 遠田耕平, 清水博之, 宮村達男: インドのポリオ根絶の現状. 日本医事新報 41: 60-61, 2003.
- 15) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎ウイルスと抗体検出系. 科学療法領域 19: 57-63, 2003.
- 16) 白土(堀越) 東子, 片山和彦: ノーウォークウイルス. 日本臨床増刊号, 新世紀の感染症学(下)ーゲノム・グローバル時代の感染症アップデート, 61: 468-474, 2003.
- 17) 宮村達男: 急性灰白髄炎(ポリオ). 分子予防環境医学, 分子予防環境医学研究会編, 本の泉社 pp199-207, 2003.
- 18) 村上恭子, 鈴木哲朗: ウイルス研究における人工肝の役割. 細胞 35: 468-471, 2003.
- 19) 武田直和: 感染症の話「E型肝炎」. 感染症週報(IDWR)6: 8-11, 2004.
- 20) 田中智之, 岩上泰雄, 内野清子, 三好龍也, 吉田永祥, 北元憲利, 武田直和: ノロウイルス抗原検出 ELISA キットの評価. 医学と薬学 50: 709-714, 2004.
- 21) 武田直和: ノロウイルスの食中毒を知ろう.(食品衛生教育シリーズ) 第2版 日本食品衛生協会 2004.
- 22) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: 日本における E型肝炎. Medical Practice, 文光堂 21: 441-444, 2004.
- 23) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E型肝炎. からだの科学増刊「新興再興感染症 SARSの教訓」, 日本評論社 pp 61-66, 2004.
- 24) 勝二郁夫: C型肝炎. からだの科学増刊「新興再興感染症 SARSの教訓」, 日本評論社 pp58-60, 2004.
- 25) 清水博之, 武田直和, 宮村達男: 不活化ポリオワクチン. 総合臨床, 永井書店 53: 1860-1865, 2004.
- 26) 鈴木哲朗, 松浦善治: HCV 感染レセプター. 肝疾患 Review 2004, 日本メディカルセンター pp117-120, 2004.
- 27) 宮村達男: C型肝炎ウイルス発見まで. 日本臨床 増刊号, 日本臨床社 7: 7-9, 2004.
- 28) 相崎英樹, 鈴木哲朗: HCV-RNA 複製および増殖のメカニズム. 日本臨床 増刊号, 日本臨床社 7: 81-84, 2004.
- 29) 村上恭子, 鈴木哲朗: HCVの新たな感染系およびHCV-RNA複製系の開発動向. 日本臨床 増刊号, 日本臨床社 7:111-115, 2004.
- 30) 下池貴志: HAV 粒子の構造ウイルス性肝炎(下) 日本臨床 増刊 8号, 日本臨床社 62: 423-427, 2004.
- 31) 下池貴志: HAVゲノム(RNA)の構造と機能. ウイルス性肝炎(下) 日本臨床 増刊 8号, 日本臨床社 62: 428-432, 2004.
- 32) 高尾信一, 下蘭広行, 柏 弘, 松原啓太, 坂野 堯, 池田政憲, 岡本尚子, 吉田弘, 島津幸枝, 福田伸治: 本邦において初めて流行が確認された小児の human metapneumovirus 感染症の臨床的・疫学的解析. 感染症学雑誌 78: 129-137, 2004.
- 33) 勝二郁夫: HBV 粒子の構造と特徴. ウイルス性肝炎(下)ー基礎・臨床研究の進歩一, 日本臨床 増刊号, 日本臨床社 8, 2004.
- 34) 米山徹夫, 清原知子, 下池貴志, 森伸生, 岡部信彦: A型肝炎ー我が国の最近の発生動向を中心にー. 臨床とウイルス 32: 149-155, 2004.
- 35) 鈴木哲朗: HBVをヘルペスウイルスとする HDVの複製増殖機構の特殊性. ウイルス性肝炎(下) 日本臨床 増刊号 62: 393-397, 2004.
- 36) 鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスと肝発癌. 臨床とウイルス 32: 156-162, 2004.
- 37) 鈴木亮介, 鈴木哲朗: Non-A-E: TTVのウイルス学, 今までにわかったこと, 病因的意義. 臨床とウイルス 32: 179-183, 2004.

学会発表

I. 国際学会

- 1) Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, Jan 11-13m, 2003.
- 2) 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.*
- 3) Tanaka T, Miyoshi T, Kitamoto N, Iwagami Y, Uchino K, Natori K, Kamata K, Jiang X, Estes MK, Takeda N: Immunoreactive proteins in human feces may cause nonspecific reactions in a Norwalk virus antigen detection ELISA; 37th Joint Working Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Houston, USA, August 18-20, 2003.
- 4) Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Oka T, Miyamura T, Takeda N: Analysis of Norovirus replication using full-length genome. *ibid.*
- 5) Li T-C: Expression and characterization of hepatitis E virus-like particles. Structural Forum 2003, Virus-Cell Interaction: Structure to Function, Stockholm, August 8-11, 2003.
- 6) Shimizu H: Another neurotropic enterovirusーcharacterization and pathogenicity of enterovirus 71ー. *ibid.*
- 7) Shimizu H: Circulation of type 1 Vaccine-Derived Polioviruses in the Philippines. WHO Informal Consultation on identification and management of vaccine-derived polioviruses, Geneva, September, 2003.
- 8) Takeda N, Katayama K, Hansman G, Shirato H, Oka T, Ogawa S, Utagawa E, Natori K, Miyamura T: Genetic and antigenic diversity of Noroviruses. Workshop on Emerging Enteric Viral Diseases, Seoul, November 20, 2003.

ウイルス第二部

- 9) Suzuki R, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T: Potential mechanism of cap-independent translation conferred by E1 region of the HCV genome. 10th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, December 2-6, 2003.
 - 10) Sakamoto S, Shiroy K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T: In vitro particle assembly of HCV core protein. *ibid.*
 - 11) Murakami K, Inoue Y, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Suzuki T, Miyamura T: Dynamics of HCV replication in the three-dimensional radial flow bioreactor system. *ibid.*
 - 12) Utama A, Shimizu H, Miyamura T: Construction and characterization of chimeric viruses between polio and coxsackie A viruses. 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, December 7-10, 2003.
 - 13) Huang QS, Greening G, Baker M, Grimwood K, Webber L, Fitzsimons A, Gerret N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Pallansch M: Investigating the circulation and evolution of oral polio vaccine strains in New Zealand. *ibid.*
 - 14) Sanekata T, Chan X, Utagawa ET.: Characterization of human Rotaviruses isolated in Indonesia. *ibid.*
 - 15) Takeda N, Suzaki Y, Ami Y, Li T-C, Mason HS, Amtzen CJ, Miyamura T: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. Plant-Derived Vaccines And Antibodies: Potential And Limitations. Veyrier du Lac, France, March 21-24, 2004.
 - 16) Yokota Y, Yamazaki K, Sakon N, Yoshida T, Ohuchi Y, Hayashi K, Tatsumi H, Yoshida H, Yamada A: Characterizing echovirus type 4 in an outbreak in Shiga. JAPA, 5th Japan-China International Congress of Virology, Osaka, June, 2004
- II. 国内学会
- 1) 北村 清, 宇賀神義宣, 宇田川悦子. 下水処理におけるSRSV対策. 平成15年度日本水産工学会学術講演会, 藤沢市, 2003年5月.
 - 2) 武田直和. E型肝炎にまつわる最近の話題. 第15回ウイルス性下痢症研究会, 京都, 2003年10月.
 - 3) 武田直和. E型肝炎ウイルス中空粒子の作製と応用. 第2回動物衛生研究所人獣共通感染症談話会, つくば, 2003年9月25日
 - 4) 入谷展弘, 久保英幸, 勢戸祥介, 青木孝祐, 西尾 治, 武田直和, 村上 司, 藪城昇次, 改田厚, 綾田 稔, 小倉 壽. 平成14年度に大阪市で検出されたNorwalk virusのプロープ型別および遺伝子型別. 平成15年度地研近畿支部ウイルス部会研究会, 和歌山, 2003年9月12日.
 - 5) 勢戸祥介, 綾田 稔, 小倉 壽, 入谷展弘, 久保英幸, 青木孝祐, 名取克郎, 武田直和. Alphron type NOVについて. 衛生微生物技術協議会第24回研究会, 福岡, 2003年7月10-11日.
 - 6) 武田直和, 李 天成, 宮村達男. E型肝炎ウイルスについて: 輸入感染症としてのE型肝炎. 同上
 - 7) 阿部賢治, 平野 真, 丁 欣, Tran TT Huy, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄, 角坂照貴, 後藤郁夫, 増沢俊幸, 中村正治, 平良勝也, 黒木俊郎, 谷川 力. E型肝炎ウイルスの動物宿主を探る (1) 日本に生息する野ネズミ類における疫学調査と感染流行の実態. 第39回日本肝臓学会総会, 福岡, 2003年5月.
 - 8) 平野 真, 丁 欣, Tran TT Huy, 岩城陽子, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 中村 伸, 阿部賢治. E型肝炎ウイルスの動物宿主を探る (2) 各種霊長類における疫学調査とニホンザルにおける感染流行. 同上
 - 9) 丁 欣, 平野 真, Tran TT Huy, 伊藤玲子, 早川依里子, 佐多徹太郎, 李 天成, 武田直和, 山口真理, 薄井 貢, 正木尚彦, 林 茂樹, 阿部賢治. 東京地域におけるHEV感染の実態と予防対策の必要性. 同上
 - 10) 玉田陽子, 弘 八, 福田実可, 矢野公土, 学 大, 石橋大海, 矢野右人, 小松達司, 天成 李, 宮村達男, 武田直和, Ahmad N, Khan M: わが国のE型肝炎感染に関する免疫学的および分子系統学的解析. 同上
 - 11) 岩井雅恵, 松浦久美子, 吉田 弘. 富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測. 第62回日本公衆衛生学会, 京都, 2003年10月.
 - 12) 田中智之, 三好龍也, 岩上康雄, 内野清子, 北元憲利, 鎌田公仁夫, 名取克郎, 武田直和. ノロウイルス抗原検出ELISA法における非特異的反応の解析. 日本ウイルス学会, 第51回学術集会, 京都, 2003年10月.
 - 13) 石古博昭, 三浦里香, 島田康司, 山崎修道, 武田直和, 田川義継, 青木功喜, 大野重昭. 2002年, アジアで急性出血性結膜炎の大流行を引き起こしたエンテロウイルスの分子診断と分子疫学. 同上
 - 14) 片山和彦, Hansman Grant, 岡智一郎, 牛島廣治, 宮村達男, 武田直和. 新たに全塩基配列を決定し得た Sapovirus (SV) 4株を用いたゲノム塩基配列の解析. 同上
 - 15) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和: Genetic classification and expression of a novel sapovirus genotype. 同上
 - 16) Hansman Grant, 片山和彦, 牛島廣治, 武田直和: Molecular characterization of a novel recombinant norovirus. 同上
 - 17) 岡智一郎, 小川智子, Hansman Grant, 牛島廣治, 福士秀悦, 影山 努, 高井玲子, 白土(堀越) 東子, 片山和彦, 武田直和, 宮村達男: サポウイルス(SV)がコードするポリペプチドの網羅的発見. 同上
 - 18) 影山 努, 小嶋滋之, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 篠原美千代, 内田和江, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦: Norovirusの多様性およびその疫学的意義について. 同上
 - 19) 高井玲子, 福士秀悦, 影山 努, 小嶋滋之, 星野文則, 名取克郎,

ウイルス第二部

- 武田直和, 片山和彦. Norovirus 濃縮法の検討. 同上
- 20) 白土(堀越)東子, 名取克郎, 鎌田公仁夫, 影山 努, 岡智一郎, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和. Norovirus と血液型物質との結合. 同上
- 21) 福士秀悦, 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 星野文則, 岡智一郎, 武田直和, 片山和彦. Norovirus の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発現と酵素活性について. 同上
- 22) 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 星野文則, 福士秀悦, 武田直和, 片山和彦. Norovirus VLP の遺伝子デリバリーベクター化への試み. 同上
- 23) 片山和彦, 岡智一郎, 白土東子, 小嶋滋之, 影山 努, 高井玲子, 福士秀悦, 宮村達男, 武田直和. Norovirus (NV) Full-length cDNA クローンをを用いた複製機構の解析. 同上
- 24) 李 天成, 落合 晋, 石古博昭, 武田直和, 宮村達男. 輸入感染症としてのE型肝炎. 同上
- 25) 李 天成, 落合 晋, 永田典代, 石古博昭, 武田直和, 宮村達男. HEV Genotype IV の構造蛋白の発現及び抗原性の解析. 同上
- 26) 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減少におけるウイルスタンパク質合成の役割. 同上
- 27) Andi Utama, 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男. ポリオウイルスとコクサッキーAウイルスの組換えウイルスの作製. 同上
- 28) 有田峰太郎, 清水博之, 宮村達男. 新たに分離されたポリオウイルス組換え体とコクサッキーウイルス野生株の解析. 同上
- 29) 永田典代, 清水博之, 吉河智城, 波多野いづみ, 原嶋綾子, 佐藤由子, 佐多徹太郎, 倉田 毅, 野本明男, 岩崎琢也. ポリオウイルスレセプター導入トランスジェニックマウス (TgPVR21) の粘膜免疫モデル. 同上
- 30) 相山裕一, 勝二郁夫, 松田麻未, 瀬戸裕之, 宮村達男. HPV16E6 蛋白と結合する宿主蛋白 E6AP の新規標的蛋白の解析. 同上
- 31) 森石恒司, 岡本貴世子, 中村理加, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 小池和彦, 宮村達男, 松浦善治. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の成熟・分解の分子機構. 同上
- 32) 坂本真一郎, 根岸英雄, 鈴木亮介, 瀬戸裕之, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白のリン酸化が HCV 複製に及ぼす影響. 同上
- 33) 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルス Core 蛋白によるB細胞表面分子の発現変化. 同上
- 34) 鈴木亮介, 村上恭子, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスの新たな翻訳抑制機構. 同上
- 35) 石井孝司, 町田早苗, 鈴木亮介, 吉崎佐矢香, 鈴木哲朗, 赤塚俊隆, 宮村達男. 高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DLs のウイルスベクターとしての応用. 同上
- 36) 村上恭子, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 井上 寧, 小俣和彦, Su Su Hmwe, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男. 三次元培養肝細胞を用いた感染 HCV クローンの経時的変化の解析. 同上
- 37) 清原知子, 戸塚敦子, 米山徹夫, 宮村達男, 伊藤壽啓. A型肝炎ウイルスの抗イディオタイプ抗体の作出とその機能解析. 同上
- 38) 下池貴志, 戸塚敦子, 米山徹夫, 宮村達男. 無血性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. 同上
- 39) 宮村達男. 世界ポリオ根絶計画の最終ステージ: 野生株ウイルスの封じ込め. 第3回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会, 東京, 2003年11月14, 15日.
- 40) 宮村達男. C型肝炎ウイルスと肝発癌. 第14回臨床肝臓カンファレンス, 東京, 2003年11月15日.
- 41) 松倉俊彦. ヒト乳頭腫ウイルス感染症の臨床, 病理, 基礎研究. 日本性感染症学会第16回学術大会, 長野, 2003年12月6日.
- 42) 勝二郁夫, 松田麻未, 相山裕一, 宮村達男. 蛍光標識二次元ディスプレイ電気泳動法を用いた E6AP の新規標的蛋白の同定. 第26回日本分子生物学学会, 神戸, 2003年12月10-13日.
- 43) 武田直和. わが国における E 型肝炎とリスクファクター. 平成15年度食肉衛生技術研修会, 東京, 2004年1月.
- 44) 武田直和. わが国の E 型肝炎. 平成15年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2004年2月.
- 45) 小俣和彦, 鈴木哲朗, 佐藤田鶴子, 前田宗宏, 荒井千明, 松野智宣, 宮坂孝弘, 北原和樹, 宮井崇宏. C 型肝炎症例の口腔内からの HCV 検出について. 第58回日本口腔科学会, 横浜, 2004年5月7-8日.
- 46) 吉田 弘, 椋 清美, 濱野雅子, 渡辺香奈子, 高尾信一, 清水博之, 宮村達男. 1999-2003年に分離されたエコーウイルス30型の分子系統解析. 第45回日本臨床ウイルス学会, 2004年6月.
- 47) 片山和彦, グラント・ハンスマン, 岡智一郎, 牛島廣治, 三好達也, 田中智之, 宮村達男, 武田直和. Sapovirus ゲノムの解析. 衛生微生物技術協議会第25回研究会, さいたま市, 2004年7月8-9日.
- 48) 李 天成, 武田直和, 宮村達男. HEV 感染の現状と検査法. 同上
- 49) 清水博之, アンディ・ウタマ, 有田峰太郎, 宮村達男. エンテロウイルスの分子進化とゲノム遺伝子組換え. 同上
- 50) 有田峰太郎, 祝 双利, 清水博之, 宮村達男. C 群エンテロウイルスの分子疫学. 同上
- 51) 宇田川悦子. 下痢症ウイルスほか. 教育講演: 最近話題のウイルス感染症, 長野市, 2003年11月.