

2. ウイルス第二部

部長 宮村 達男

概要

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、A、B型肝炎ワクチン、経口生ポリオワクチンを検定、検査対象としている。

第1室の最重要課題は経口生ポリオワクチンの検査、検定である。本年は小分製品1件の検定をおこなった。また喫緊の課題となっている不活化ポリオワクチン導入に向けて、基礎実験を含めポリオワクチンの免疫学的研究を行なった。わが国では生ワクチンとして用いられているセービン株を原材料とした全く新しい不活化ポリオワクチンが検討されている。

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。また全国地研との連携が確立し、感染研は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。又、新たな下痢症ウイルスであるサポウイルスの研究も大いに進んだ。わが国でのウイルス下痢症の散発例では重要な役割を果たしている。

E型肝炎ウイルスの研究が大いに進んだ。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。研究班が成立し、野生動物での感染が全国レベルで調査された。イノシシ、マングースにおいては抗体保有率が高く、これらがリザーバーのひとつではないかと考えられるデータも得られた。

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。課題はまだナイジェリア、北インドなど地球上の一部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。野生株の伝播は中々断ち切れないうちであるが、根絶計画はいよいよ最終段階に入った。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エビデンスに基づいた提言を世界に発している。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室及び第4室のHCVの研究は着実に進んでいる。培養系でのHCV増殖の系が安定化し、RNA複製、ウイルス粒子産生に至るウイルスのライフサイクルの詳細な解析が進んでいる。

第5室の最重要課題はA型及び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2件、B型肝炎ワクチン10件の検定を行った。またA型肝炎ウイルスの粒子構造解析が進行している。

各室で以下のような国際的技術協力を行った。

(1) 鄭 小凡(中国・浙江省血液センター) <日中笹川医学研究者制度> 平成17年4月1日~18年3月31日、ヒトの血液型とウイルス感染の分子基盤について。

(2) 呉 芳姿(台湾・疾病予防センター) <台湾疾病予防センターフェロー> 平成17年9月12日~17年10月14日、下痢症ウイルスの同定と診断。

(3) 林 思鳳(台湾・疾病予防センター) <台湾疾病予防センターフェロー> 平成17年10月1日~17年10月14日、E型肝炎ウイルスの同定と診断。

(4) 童 文彬(中国・四川省疾病予防管理センター) <JICAフェロー> 平成16年7月30日~17年6月3日、ポリオウイルス分子学診断技術研修

(5) 張 勇(中国・中国疾病予防センター) <WHOフェロー> 平成17年3月22日~17年4月28日、ポリオウイルスワクチン由来株の病原性の解析

(6) 田 炳均(中国・雲南省疾病予防控制中心) <笹川フェロー> 平成17年4月8日~18年3月31日、エンテロウイルス分子学診断技術研修

(7) Nguyen Thi Thanh Thao (Pasteur Institute, Viet Nam) <JSPSフェロー> 平成17年10月4日~17年10月31日、エンテロウイルス感染症の血清疫学および分子疫学に関する研究

(8) 張 斌(中国・上海中医薬大学) <上海中医薬大学フェロー> 平成16年11月1日~17年10月31日、C型肝炎ウイルスの増殖機構に関する研究

人事面では、Grant S. Hansmanが平成17年6月1日に第1室研究員として採用された。宮村達男部長は平成18年3月をもってウイルス第二部長を退職、4月から所長に昇任した。後任部長は東京都立神経研の脇田隆字副参事研究員が就任する。

カリフォルニア大学サンフランシスコ医学校に出張していた染谷雄一主任研究官が平成17年12月帰国、職務

に復帰した。片山和彦主任研究官は平成 17 年 6 月より米国ペイラー大学に出張し、ノロウイルスの分子生物学の研究を行なっている。鈴木亮介研究員はフラビウイルスの感染増殖機構の研究の為、平成 17 年 10 月より米国テキサス大学ガルベストーン校に出張している。下池貴志主任研究官は平成 17 年 5 月より HCV の翻訳開始機構を構造解析する為、米国スタンフォード大学に出張している。

業績 調査・研究

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) ノロウイルス (NoV) と血液型物質との結合の解析

NoV は血液型抗原を認識して結合する。しかし、すべてのウイルス株が同じ血液型抗原を認識するわけではなく、その結合パターンは株により様々である。近年、遺伝学的に近縁の株は共通の血液型抗原を認識することが示唆された。しかし、同じジェノグループに属する株に共通性が存在するかは明らかになっていない。そこで、NoV 14 株の VLPs を用い、Carbohydrate-VLP binding assay により H, A, B, Le^a, Le^b 型抗原との結合を検討した。その結果、クラスターによって結合パターンに違いはあるものの、GI では共通して A 型抗原に結合しやすく、GII では B 型抗原に結合しやすいことが明らかとなった。さらに詳細な解析を行うことにより、血液型抗原上のウイルス結合部位を明らかにしたい。

[白土東子、小川智子、鎌田公仁夫 (デンカ生研)、武田直和]

(2) 昆虫細胞発現系を用いた NoV 粒子形成の試み

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 3' 末端にリボザイムを組み込み、完全長の NoV ゲノムが転写されるようにした組換えバキュロウイルスを用いて細胞内にゲノムを供給したところ、NoV の蛋白質合成が認められ、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。さらに構造蛋白質発現バキュロウイルスを同時に感染させ、形成される粒子に生じる変化を調べたところ、比重 1.32, 1.36, 1.4 g/cm³ 付近にウイルス様粒子が確認された。現在、これらの粒子の特徴を調べている。

[片山和彦、グラント・ハンスマン、岡智一郎、宮下佳

奈、小川智子、武田直和、宮村達男、永田典代、田中恵子 (感染病理部)]

(3) 昆虫細胞及び哺乳類細胞を用いた NoV 粒子形成機構の解析

NoV U201 株の VLPs を発現するために作製した組換えバキュロウイルスにクローニングされた ORF2 からゲノム末端までの塩基配列を、PCR direct sequence で得られた天然型配列と比較すると、ORF2(VP1)領域に 2 カ所、ORF3 (VP2)領域に 1 カ所、合計 3 カ所のアミノ酸変異を伴う塩基配列の違いが認められた。昆虫細胞 (Tn5) では、天然型もクローン型もともに VLP を発現するが、哺乳類培養細胞では、天然型のみ VLPs を発現することが明らかとなった。点突然変異を導入し、両発現系においてどの部分のアミノ酸配列変化が VLP 形成に影響を及ぼすかを調べたところ、バキュロウイルス発現系はいずれの変異も容認し、VLP を産出した。

[宮下佳奈、グラント・ハンスマン、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代 (感染病理部)]

(4) 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。昨年までの研究の結果、P 領域の 1 アミノ酸残基 (N 末端より 404 番目)の変異が VLP の産生能を決定していることを見いだした。キャプシド蛋白質の立体構造予測解析の結果、この残基は VLP の外周部の突起を支える支柱に位置すると予想された。点突然変異を導入したアミノ酸置換実験の結果、アミノ酸がアルギニンの場合、VLP 作出能力が著しく低下することを見いだした。免疫電子顕微鏡観察で両クローンの ORF2 蛋白質の細胞内局在を調べたところ、両者とも ORF2 蛋白質は細胞内全体に存在していたが VLP 産生クローンの場合は粒子状構造物のある密度の高いベジクルが強く染色された。VLP は ORF2 蛋白質がベジクルに集まり、自己集合して形成されている可能性がある。

[高井 聡、グラント・ハンスマン、片山和彦、武田直和、宮村達男、永田典代 (感染病理部)]

(5) NoV 複製機構の研究

NoV には培養細胞を用いた増殖系や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

ウイルス第二部

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ヒト培養細胞内に導入した。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たところ、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。しかし、この系では 3A-VPg 間の切断効率が悪く、構造蛋白質の発現を検出できなかった。弱毒化ワクチニアウイルスを用いてワクチニアの細胞毒性を軽減し、3A-VPg 間の切断効率を増加させることを試みたが、切断効率に変化は認められなかった。現在、ワクチニアウイルスの影響を排除するため、インビトロで合成した RNA を直接細胞に導入する方法および、EF-1 α プロモーターによる NoV ゲノムの発現を行い、感染性粒子の形成を試みている。

[片山和彦、岡智一郎、石井孝司、グラント・ハンスマン、小川智子、宮村達男、武田直和]

(6) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの立体構造解析

ノロウイルス Chiba 407 株由来の 3C 様プロテアーゼを大腸菌で大量発現、精製の後、結晶化し、X 線結晶構造解析によりその 3 次元立体構造を解明した。全体構造はキモトリプシンに類似し、そのスーパーファミリーの一員であることを示している。先に部位特異変異導入解析で示唆された His30 と Cys139 に加えて Glu54 が活性中心を形成していることが明らかにされた。また、同じく部位特異変異導入解析で示された重要残基のほとんどが活性中心の周辺に位置し、全体構造の維持に関与していることが示された。さらに、基質ペプチドを活性中心付近に置いたモデルから、プロテアーゼの基質特異性に関する情報が得られた。

[染谷雄一、武田直和、宮村達男、中村健太郎(東工大)、熊坂崇(東工大)、田中信夫(東工大)]

(7) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの生化学的性状

精製したノロウイルス Chiba 407 株由来の 3C 様プロテアーゼによる 3C/3D 間の切断部位を含むタンパク質の切断反応を *in vitro* で行い、SDS-PAGE にて切断断片を分離し、3C 様プロテアーゼの生化学的性状について解析した。その結果、プロテアーゼ活性の至適 pH は 8.6、至適温度は 37 °C であった。高濃度 (100 mM) の Na⁺あるいは K⁺は反応を阻害した。また、Mg²⁺及び Ca²⁺は反応に影響なかったが、Zn²⁺あるいは Hg²⁺は反応を著しく阻害した。いくつかの SH 基阻害剤も反応を阻害し、プロテアーゼ活性に Cys 残基が関わっていることと一致する。

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(8) ノロウイルス非構造タンパク質の細胞内局在

ノロウイルス非構造タンパク質を動物細胞内で発現させたとき、その中の N 末端領域がゴルジ体に分布し、タンパク質の細胞内送達に関与することがすでに報告されている。Chiba 407 株由来の 6 種の非構造タンパク質 (N 末端領域, 2C, 3A, 3B VPg, 3C 様プロテアーゼ, 3D RNA ポリメラーゼ) を動物細胞で発現させたところ、2C が細胞質内に小胞状に分布した。その一部はゴルジ体のマーカータンパク質と共存した。さらに、N 末端領域と 2C を同時に発現させると、それらの一部は同じ小胞に分布した。N 末端領域と同様に 2C もまたタンパク質の細胞内送達に関与することが示唆される。

[染谷雄一、武田直和、宮村達男]

(9) Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005.

Noroviruses are a major health burden and are responsible for the majority of outbreaks of gastroenteritis in the world. Human noroviruses can be genetically divided into two main genogroups (GI and GII) and subdivided into many genotypes. Stool specimens collected from 12 outbreaks of gastroenteritis in Taiwan were screened for viral agents, between the 23rd of November 2004 and 9th of March 2005. Noroviruses were detected in all outbreaks. We detected six different norovirus genotypes GI/11, GI/14, GII/3, GII/4, GII/6, and GII/18. Noroviruses belonging to the GII/4 were dominant, 49 of 60 (82%) sequences, and were detected in 10 of 12 outbreaks. Furthermore, the norovirus GII/4 strains were detected throughout Taiwan, demonstrating their widespread distribution. We also found that three outbreaks had noroviruses from multiple genotypes. Our results have shown for the first time that noroviruses are an important cause of gastroenteritis in Taiwan.

[Wu FT, Oka T, Katayama K, Ogawa S, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, Takeda N, Hansman GS]

(10) 紫外線照射によるノロウイルス不活化の検討-3

昨年と同様、患者便材料から高度に濃縮したノロウイルスを用いて紫外線照射による不活化実験を行い Real time PCR 法で検討した。Primer & Probe は、GI: COG1F/R, Ring G1-TP (a) & TP (b), GII: CoG2F/R, Ring 2-TP, 定量のために NVG1 あるいは NVG2 (10*6) を希釈し標準として用いた。高濃度のノロウイルス検体は未処理で 10⁹ copies/ml であったが、紫外線を 1000mJ/cm² 照射するこ

ウイルス第二部

とで $3\log_{10}$ 低下させることが出来た。今回の検体は高度に濃縮したノロウイルスを使用した。紫外線照射により不活化が可能であった。一方、河川水、海水他に検出されるノロウイルスは年平均で 80 copies/ml 程度と低いために、以前検討したアストロウイルス感染実験からの結果をもとに紫外線照射量は $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ で良いと考える。
[宇田川悦子]

2. サポウイルス (SaV) に関する研究

(1) Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles.

Human sapovirus (SaV) strains are agents of gastroenteritis. They cannot be grown in cell culture. Constructs containing SaV N- and C-terminal-deleted recombinant capsid proteins (rVP1) were expressed in a baculovirus expression system to allow us to better understand the sequence requirements for the formation of virus-like particles (VLPs). Only proteins derived from N-terminal-deleted rVP1 constructs that began 49 nucleotides downstream assembled into VLPs, which included both small and native-size VLPs. Our results were similar to those reported in a rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) N- and C-terminal-deleted rVP1 expression study but were distinct from those reported in a norovirus N- and C-terminal-deleted rVP1 expression study, suggesting that SaV and RHDV may have similar expression requirements.

[Hansman GS, Matsubara N, Oka T, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Katayama K]

(2) Characterization of polyclonal antibodies raised against sapovirus genogroup five virus-like particles.

Sapovirus (SaV), a member of the family *Caliciviridae*, is an etiological agent of gastroenteritis. SaV strains were recently divided into five genogroups (GI to GV). We characterized novel polyclonal antibodies raised against SaV GV virus-like particles (VLPs) by Western blot analysis, and both antibody and antigen enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Our results have indicated SaV GI and GV VLPs were antigenically distinct by Western blotting and ELISAs. These reagents may be useful for genogroup specific detection of SaV.

[Hansman GS, Natori K, Ushijima H, Katayama K, Takeda N]

(3) Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens.

Human sapovirus (SaV) strains are etiological agents of mild and/ or acute gastroenteritis in children and adults. We describe the development of a novel antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection system that was based on hyperimmune rabbit and guinea pig antisera raised against SaV genogroup I (GI) virus-like particles. The ELISA had 100% specificity, and sensitivities of 60% and 25% when compared to single-round PCR and nested PCR, respectively. Our results have shown the ELISA was useful in detecting SaV GI antigens in clinical stool specimens collected two days after the onset of illness.

[Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N]

(4) Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia.

Sapovirus was detected in 7 of 95 stool specimens from children with gastroenteritis of unknown etiology in Sydney, Australia, between August 2001 and August 2002, and between February 2004 and August 2004 using reverse transcriptase-PCR. Sequence analysis of the N-terminal capsid region revealed the presence of all human sapovirus genogroups.

[Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA]

(5) サポウイルス粒子形成メカニズムの解析

サポウイルスの構造タンパク質は ORF1 上にそのほかの非構造タンパク質とともにコードされている。これまでに構造タンパク質をコードする遺伝子領域を昆虫細胞で発現させることで、virus-like particles (VLPs)の発現に成功しているが、ORF1 のポリプロテインから自己のプロテアーゼによって切断された構造タンパク質が VLPs を形成することができるのか検討した例はない。サポウイルスの粒子形成メカニズムを検討するため、昆虫細胞で効率的に VLP を形成することが可能な GI Mc114 株について新たに全長 cDNA clone を作製し、site-directed mutagenesis によって、プロテアーゼ、ポリメラーゼモチーフに変異を導入したコンストラクトをそれぞれ作製した。現在、この cDNA clone を鋳型に昆虫細胞用のコンストラクトを作製し、発現産物の解析を行っている。

[岡智一郎, Hansman S. Grant, 小川智子, 宮下佳奈, 片山和彦, 山本真民, 武田直和]

(6) サポウイルス核酸検出系の構築

サポウイルスはヒト、およびブタの急性感染性胃腸炎

ウイルス第二部

のウイルスで5つの genogroup (GI-GV)に分類される。このうちヒトから分離されるのはGI, GII, GIV, GVである。ヒト由来のサポウイルス核酸検出系を確立する目的で、TaqMan リアルタイム PCR 系の構築を試行した。スタンダード plasmid を用いた検討によりサポウイルス GI, GII, GIV, GV 株を1ウェルで検出可能であることを確認し、さらに現在、糞便サンプルを用いた反応性、特異性の確認を行っている。

[岡智一郎、片山和彦、影山 努 (ウイルス3部)、小川智子、Hansman S. Grant、武田直和]

(7) 部位特異的変異導入法を用いたサポウイルス 3C-like プロテアーゼの活性部位の同定

SaV Mc10 株のプロテアーゼの活性発現に必要な領域の検索、および活性発現に重要なアミノ酸を同定するため、7株の SaV ORF1 のアミノ酸配列のアライメントおよび他のカリシウイルス (RHDV およびノロウイルス) のプロテアーゼの活性発現に重要とされるアミノ酸を考慮して、SaV Mc10 株のゲノム全長の cDNA clone を鋳型として、11箇所のアミノ酸 (H, E, もしくは D) を site-directed mutagenesis 法によって A に置換した clone を作製した。これらを鋳型に in vitro coupling transcription/translation system を用いて ORF1 全長領域を発現させ、発現産物の泳動パターンを解析した。その結果、SaV プロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸として、すでに明らかにしている C¹¹⁷¹ に加え、新たに H¹⁰⁸⁶, E¹¹⁰⁷, H¹¹⁸⁶ を同定した。

[山本真民、岡智一郎、小川智子、片山和彦、Hansman S. Grant、武田直和]

(8) 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、血液型抗原との結合についても報告がない。そこで、SaV GI 1株、GV 1株のVLPsを用い、Saliva-VLP binding assay, Carbohydrate-VLP binding assay により血液型抗原との結合を検討した。その結果、どちらの株も血液型抗原には結合しなかった。カリシウイルス科 *Lagovirus* 属のウサギ出血病ウイルスは血液型抗原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 株も血液型抗原を認識する。血液型抗原が、カリシウイルス科に共通の結合因子として働いているのか、さらなる検討が必要である。

[白土東子、Grant S. Hansman、小川智子、武田直和]

3. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) 部位特異的変異導入法を用いたネコカリシウイルス 3C-like プロテアーゼの活性部位の同定

ヒト由来のノロウイルス、サポウイルスは培養細胞での増殖系がないが、同じカリシウイルスに属するネコカリシウイルスは細胞での増殖が可能である。そのため、ネコカリシウイルスはカリシウイルス複製機構の解析、ウイルスの機能性タンパク質の活性検討、ウイルス増殖制御のための薬剤スクリーニングなどに有用性が期待される。CRFK 細胞で増殖させた FCV-F4 株から RNA を抽出し、新たに full-length cDNA クローンを作成した。現在、FCV-F4 株のプロテアーゼ活性の発現に重要な領域、およびアミノ酸残基を検討している。

[岡智一郎、山本真民、片山和彦、宮下佳奈、小川智子、高木弘隆 (バイオセーフティー)、Hansman S. Grant、遠矢幸伸 (東大院獣医)、武田直和]

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付した。2005年度は、ポリオウイルス標準株1セット、エンテロウイルス単味抗血清28種類、プール抗血清EP95を13セット、コクサッキーA群同定用CF腹水1セット、ポリオウイルス標準抗血清5セット、標準細胞株5株を配布した。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株であった。

(2) ポリオ実験室診断技術研修会(JICA)の開催

第15回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。研修期間は2006年1月24日~2月18日、研修参加者は、バングラディッシュ、コートジボアール、ケニア、ミャンマー、パキスタン、フィリピン、トルコから各1名の計7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 Polio Laboratory (GSL)としての活動

ア) 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。本年度はカンボジア265検体およびラオス107検体のAFP由来糞便検体からポリオウイルスの分離および

ウイルス第二部

同定を行った。

イ) WHO GSL として、おもにカンボジア、ラオス、ベトナム、韓国、香港、オーストラリア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。カンボジアの AFP 症例 2 名から分離されたポリオウイルスが 3 型 VDPV と同定された。また、ナイジェリアからシンガポールに渡航した AFP 患者から 1 型野生株ポリオウイルスが分離された。他のポリオウイルス分離株は、すべてワクチン株であることを明らかにし、西太平洋地域における野生株ポリオフリーを確認した。

ウ) 中国 CDC および WHO/WPRO との共同研究により、中国貴州省で 2005 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、病原性等ウイルス学的性状について解析した。

エ) 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。

オ) 2005 年 7 月 15 日 - 8 月 17 日に中国 CDC(北京)で行われた中国省級ポリオ実験室技術研修会(WHO/CCDC 主催)に講師として参加した。

[西村順裕、清水博之]

カ) 2005 年 8 月 30 - 9 月 1 日に行われた WHO ポリオ実験室担当者非公式会議(ジュネーブ)に参加した。

[清水博之]

キ) 2006 年 3 月 7 日 - 3 月 11 日、カンボジアにおいて、3 型ワクチン由来ポリオウイルスに対するサーベイランスについての現地調査を実施した。

[西村順裕、清水博之、上野久美(感染症情報センター)]

(4) 環境ウイルスサーベイランス手法に関するワークショップ開催

富山県衛生研究所、国立国際医療センターとの共催にて、2006 年 3 月 21-25 日に技術研究会を富山県にて開催した。参加者は中国から 2 名 (CCDC,北京市 CDC) が参加した。

[吉田 弘、帖佐 徹 (IMCJ)、岩井雅恵、松浦久美子、滝澤剛則 (富山県衛生研究所)]

(5) 日本におけるポリオウイルス実験室封じ込めについて周知徹底を図るため、WHO global action plan for laboratory containment of wild polioviruses (second edition) 全編の翻訳を行った。

[清水博之、吉田 弘、宮村達男]

2 . 西太平洋地域の 2004 年のウイルス分離状況

2005 年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の 372 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。10 株のポリオウイルスが分離され、野生株ポリオウイルスは検出されなかった。125 検体から非ポリオエンテロウイルスが分離された。カンボジアの AFP 患者 2 例より分離された 3 型ポリオウイルスは、型内鑑別および塩基配列解析の結果、3 型 VDPV と同定されたため、追加サーベイランスを実施したが、2006 年 2 月以降、3 型 VDPV は分離されなかった。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 . 世界ポリオ根絶計画に沿ったポリオウイルスに関する研究

(1) カンボジアにて分離された 3 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

カンボジアの野生株分離報告は 1997 年が最後でこれ以降 WPRO 領域はポリオフリーとなっている。2005 年 11 月に急性弛緩性麻痺(AFP)を呈した 1 歳児より、3 型ワクチン由来ポリオウイルス(circulating VDPV (cVDPV))を分離した。さらに 2006 年 1 月には別の地域の AFP 患者からも 3 型 cVDPV を分離した。ポリオウイルスと同定された全ての分離株について、VP1 遺伝子シーケンス、PCR-RFLP, mAb により型内鑑別を行った。cVDPV については更にゲノム全領域についてダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。カンボジア全土での 2005 年 OPV 接種率は 82%と比較的高いが、接種率の低い地域も存在していた。そのような地域で潜在的な OPV 感染が持続した結果、病原性を回復した cVDPV が出現し、AFP を起こしたものと推測される。

[西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、* 遠田耕平、* 小島和暢、宮村達男、清水博之、脇田隆字 (* WHO)]

(2) ラオスの AFP 患者および接触者から分離された 2 型ワクチン由来ポリオウイルスの解析

2004 年 10 月 AFP を呈したラオスのワクチン未接種 1 歳児より 2 型ワクチン由来ポリオウイルス(VDPV)が分離された。VP1 領域の塩基配列解析によると、Sabin 2 株と比較して 1.1 %以上の変異があったため VDPV と判定された。その後の疫学調査により、AFP 患者由来の VDPV

ウイルス第二部

と高い相同性を有する VDPV が 2 名の健常児から分離され、2004 年 10 月から翌年 1 月にかけて、同地域で VDPV が伝播していたことが明らかとなった。

[西村順裕、有田峰太郎、吉田 弘、清水博之、宮村達男、小島和暢 (WHO)]

(3) シンガポールの AFP 患者から分離された 1 型野生株ポリオウイルスの解析

ナイジェリアからシンガポールに渡航した AFP 患者から、2006 年 5 月に 1 型野生株ポリオウイルスが分離された。至急分離ウイルスを感染研に送付し塩基配列解析を行ったところ、現在ナイジェリア北部で伝播している 1 型野生株ポリオウイルスと高い相同性を有することが明らかとなった。患者周辺のサーベイランスでは、AFP 症例および野生株ポリオウイルスの伝播は認められなかったが、ポリオフリーの地域においても野生株ポリオウイルス伝播のリスクがあることが再確認された。

[西村順裕、清水博之、脇田隆字、小島和暢 (WHO)、Olen Kew (CDC)]

(4) ポリオウイルスレプリコンを用いたポリオ様麻痺マウスモデルの解析

ポリオ様麻痺のマウスモデルを確立することを目的として、ポリオウイルス (PV) のレプリコンを trans encapsidation させた疑似粒子を用いて、PVR 発現トランスジェニックマウスの脊髄内で一過性に複製させることを試みた。その結果、PV 疑似粒子を脊髄内接種したマウスは、投与した疑似粒子の量に依存して、軽度な麻痺から重篤な弛緩性麻痺を示した。PV レプリコンの示すルシフェラーゼ活性および病理解析により、マウスにおける重篤なポリオ様麻痺は、腰髄内の運動神経細胞の 1.4% が破壊されることにより生じることが示された。

[有田峰太郎、脇田隆字、清水博之、永田典代 (感染病理部)、佐多徹太郎 (感染病理部)]

(5) 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

これまで報告された 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 (TgPVR21) に脳内接種した場合、野生株と同等の神経毒力を示し顕著な毒性復帰が認められる。cVDPV の in vivo における病原性および伝播能の違い比較検討するために、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、フィリピンおよびヒスパニオラで

分離された cVDPV は強毒株である Mahoney 株と同等の病原性を有していた。接種後 2 ~ 3 日後のウイルス排泄は 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唆された。

[清水博之、西村順裕、宮村達男、永田典代 (感染病理部)]

(6) 経鼻接種モデルによるポリオウイルスワクチンの有効性評価

ポリオウイルスワクチンの in vivo における有効性評価モデルとして、ポリオレセプター発現トランスジェニックマウス (TgPVR21) への経鼻接種によるポリオウイルス感染防御系の評価を行った。Sabin 株由来不活化ポリオウイルスワクチンによる皮下免疫後、ポリオウイルス 1 型強毒株を経鼻接種し、神経病原性の発現および血中中和抗体価を測定した。生死および麻痺の発現による比較では、免疫群では有意な発症予防効果が認められ、本モデルはワクチンの有効性評価に応用可能であることが示された。

[永田典代 (感染病理部)、西村順裕、宮村達男、清水博之]

(7) 中国貴州省で分離された 1 型 VDPV の病原性の解析

2004 年 6 月から 9 月にかけて、中国貴州省において 2 例の AFP 症例および 4 名の接触者から計 9 株の 1 型 VDPV が分離された。VP1 領域の塩基配列解析によると、それぞれの VDPV 分離株は、共通の塩基置換を有しており、ワクチン接種後 1 年程度伝播した VDPV であることが示唆された。貴州省で分離された VDPV は、非組換え 1 型ポリオウイルスで、5'-UTR の reversion (480-G) が認められない等、これまで報告されている VDPV と異なるウイルス学的特徴を有していた。TgPVR21 マウス脳内接種による神経病原性解析によると、AFP 患者から分離された VDPV 株は、Mahoney 株と同等以上の強い病原性復帰が認められた。

[Zhang Yong、Xu Wenbo (中国 CDC)、西村順裕、清水博之、宮村達男]

(8) 静岡県におけるポリオウイルス 1 型ワクチン株の家族内伝播

2005 年 5 月 30 日、9 ヶ月児がポリオ予防接種を受け、便の処理を行った父親が発熱および全身倦怠感の臨床症状で発病した。ウイルス分離、ウイルス同定および PCR - RFLP 法を用いたポリオウイルスの型内株鑑別を試み

ウイルス第二部

たところ、9ヶ月児の糞便および父親の咽頭拭い液からウイルスが分離され、ウイルス同定検査の結果、ポリオウイルス型であることが確認された。分離されたポリオウイルスは、PCR-RFLP法により Sabin 1 株と同定された。本事例は、乳幼児がポリオワクチン接種を受け、5日後に父親が感染したケースと思われ、ポリオワクチン接種後は十分な注意が必要と思われる。

[杉枝正明(静岡県環境衛生科学研究所) 吉田 弘、清水博之]

(9) 不活化ポリオワクチンの免疫原性試験に関する研究

不活化ポリオワクチンの免疫原性試験は、検体をラットに筋肉内注射し、血清中に誘導される中和抗体価を測定する方法で行なわれる。しかし、試験ごとのバラツキに関するデータはない。低温凍結では長期にわたり極めて性状が安定である弱毒ポリオ株が試験のキャリアレーターに使えるかを検討した。

[白土東子、李 天成、小川智子、小西恭子、岡智一郎、片山和彦、染谷雄一、宇田川悦子、武田直和、堀内善信(細菌第二部)、須崎百合子、網 康至(動物管理室)]

(10) 不活化ポリオワクチンプロフィシェンシー試験

現行の経口生ポリオワクチンに用いられているセービン株を不活化して不活化ポリオワクチン sIPV が開発されている。sIPV および現行の DTP と混合して作製した DTP-sIPV について、ラット免疫原性試験に関してプロフィシェンシー試験を行なった。各機関の習熟度を評価し、同時に sIPV 参照品の評価を行うことが目的である。

[白土東子、李 天成、小川智子、小西恭子、岡智一郎、片山和彦、染谷雄一、宇田川悦子、武田直和、堀内善信(細菌第二部)、須崎百合子、網 康至(動物管理室)]

4. エンテロウイルスに関する研究

(1) 中国雲南省で急性弛緩性麻痺例から分離された非ポリオエンテロウイルス

AFP サーベイランスのもと中国雲南省で分離された未解析の 1997-2000 年及び 2004 年の 5 年間で利用可能な 210 株の NPV について同定及び分子系統的に解析を行った。210 株の内 HEV-A, B, C 群に属する分離株は各 5, 158, 32 株であった。また HEV-A, B, C 群には各々 5, 34, 5 血清型が含まれていた。なお B 群に属する判別不能株は 2 株、C 群に属する判別不能株は 5 株だった。なお D 群に属するウイルスは分離されなかった。エンテロウイルス以外にアデノウイルス 12 株が分離され、3 株は同定不

能株であった。雲南省では AFP サーベイランス下では B 群の分離が最も多く、しかも 34 血清型以上存在していることが明らかになった。また比較的ポリオウイルスと系統的に近い C 群も多様に富んで存在していた。更に日本では報告のない血清型 (EV81,83,96 など) も見られる。臨床像の詳細な検討及び検出法の設定など今後の課題である。

[吉田 弘、田 炳均、清水博之、宮村達男]

(2) エンテロウイルス 71 結合レセプターの探索

当室にてエンテロウイルス 71 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、エンテロウイルス 71 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) 抗エンテロウイルス 71 抗体を介して、エンテロウイルス 71 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、様々な cDNA ライブラリーを用いてクローニングを試みている。

[西村順裕、清水博之、宮村達男]

(3) エンテロウイルス 71 に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析

バキュロウイルス系を用いてエンテロウイルス 71 キャプシド蛋白質と 3CD プロテアーゼを大量発現し、ウイルス様粒子を作製した。これを用いることにより、当室にて作製されたエンテロウイルス 71 粒子に特異的なモノクローナル抗体のエピトープ解析が可能になると思われる。

[西村順裕、清水博之、宮村達男]

(4) エンテロウイルス 71 弱毒株の抗原性に関する解析

エンテロウイルス 71(EV71)の弱毒株である S1-3'株の抗原性を解析した。S1-3'株をカニクイザルに静脈内接種し、接種後 4 日目から 66 日目まで血液を採取し、得られたサル血清中の EV71 分離株 (genogroup A, B1, B2 および C2) に対する中和活性を測定した。その結果、S1-3'株の感染で誘導されるサルの血清は、genogroup A に対して最も強い中和活性を示し、genogroup B4 および C2 に対しては弱い中和活性を示した (genogroup A に対する中和活性の 3~25%)。今後、カニクイザルに中和抗体を誘導するために有効な S1-3'株の接種経路および力価を検討する予定である。

ウイルス第二部

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

(5) エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルの解析
ヒトにおける EV71 の病原性を反映する感染動物モデルの確立を目的として、これまでに NOD/SCID マウスへの EV71 の感染系を確立し、NOD/SCID マウスにアダプトした EV71 変異株を分離した。今回は、分離された EV71 変異株の解析を行った。その結果、NOD/SCID マウスへの感染に必要とされる変異は VP1 内の 1 アミノ酸残基であること、またレプリコンを用いた解析から、この変異は培養細胞における脱殻の効率を低下させることが示された。今後、NOD/SCID マウスにおける EV71 感染について、さらに解析を進める予定である。

[有田峰太郎、網 康志(動物管理室)、清水博之]

(6) 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。マレーシア、台湾、日本を含めた多くの地域で、genogroup B および C の EV71 が同時に伝播している。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。日本では従来、genogroup C3 を除く、ほぼすべての genogroup の EV71 が分離されているが、比較的多く分離される遺伝子型は genogroup B4 および C2 であった。当初中国で認められた genogroup C4 は、2002 年以降、中国、日本および台湾で多く分離されている。

[清水博之、宮村達男、Chen Li (中国 CDC)、Napa Onnimala、Yaowapa Pongsuwanna(NIH、Thailand)]

(7) ベトナムで分離された 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患者の多発が報告されており、ベトナムにおいても小児を中心とした原因不明の急性脳炎の流行が報告されている。主として、ベトナム南部において、手足口病および急性脳炎を発症した小児から分離されたエンテロウイルスの同定を行い、13 症例に由来する 18 株の EV71 を検出した。これらの EV71 の分子系統解析を行ったところ、多くの分離株は genogroup C に属するベトナム固有の新たな subgenogroup である C5 に属することが明らかとなった。

[Nguyen Thi Thanh Thao、Phan Van Tu (Pasteur Institute、Viet Nam)、西村順裕、清水博之、宮村達男]

(8) ベトナムにおける EV71 血清疫学調査

手足口病等エンテロウイルス感染症の疾患サーベイランスおよび実験室診断システムが確立されていないベトナムでは、手足口病流行および EV71 感染の実態がこれまで明らかでなかった。ベトナム南部地域において、手足口病患者や健常児から採取した血清検体を用いて EV71 血清疫学に関する予備的調査を実施した。4 才以上の年齢群における EV71 中和抗体陽性率は 50% 強であり、他のアジア地域における、これまでの報告と同様の結果であった。ベトナムにおいても、EV71 感染は、一般的なエンテロウイルス感染症のひとつであることが示唆された。

[Nguyen Thi Thanh Thao、Phan Van Tu (Pasteur Institute、Viet Nam)、西村順裕、清水博之、宮村達男]

(9) エンテロウイルス 90 の遺伝子および血清疫学的解析

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 HEV-A に属する、エンテロウイルス 90 (EV90) であることが、明らかとなった。カンボジアの EV90 分離株は、オランダの EV90 分離株と 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、世界の広い地域での EV90 の伝播が示唆された。しかし、ベトナムで採取された血清を用いた血清疫学調査において、EV90 中和抗体保有率は 1% 程度であり、少なくともこの地域では一般的なエンテロウイルス感染症ではないことが示唆された。

[Nguyen Thi Thanh Thao、Phan Van Tu (Pasteur Institute、Viet Nam)、Peter van den Broek (Primagen Holding)、清水博之、宮村達男]

5. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

(1) 日本におけるポリオウイルス野生株保有調査

WHO で進めている GAP-I に基づいた予備的調査において、野生株ポリオウイルスは、31 施設で保管されていた。一方、厚生労働省による、生物テロで使用される恐れがある病原微生物の保有及び現状調査で判明した野生株ポリオウイルス保有施設は 25 であった。更に、1990 ~ 2005 年 3 月までにわが国におけるポリオウイルスについての関連論文は、約 350 編あることがわかった。また、

ウイルス第二部

野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する WHO 世界的行動計画 (WHO global action plan (GAP) for laboratory containment of wild polioviruses (IInd ed.)) の全編の日本語訳を行い、雑誌「ウイルス」に掲載することにより、ポリオウイルス実験室封じ込めの重要性について周知を図った。

[宮村達男、清水博之、吉田 弘、小松俊彦(バイオメディカルサイエンス研究会)]

(2) ポリオウイルス野生株保有に関するアンケート調査

「病原微生物の取扱におけるバイオセーフティの強化及びバイオセキュリティシステムの構築に関する研究」研究班による、地方衛生研究所へのアンケート調査における追加調査項目として、ポリオウイルス実験室封じ込めについてのアンケートを作成し、各地方衛生研究所宛に送付した。アンケート内容についての問い合わせが、数カ所の各地方衛生研究所担当者から寄せられ、電話や電子メール等により個別に回答した。今後、調査結果についてのとりまとめを実施する。

[清水博之、吉田 弘、宮村達男、安藤秀二(ウイルス第一部)]

(3) 病原体管理システムについての調査

日常的にウイルス検査を行っている実験室における、バイオセキュリティシステムの強化のため、世界的なレベルで病原体管理の必要性が求められているポリオウイルス野生株管理について、現実的かつ導入可能な病原体管理システムについて調査検討を行った。

[清水博之、宮村達男、杉山和良(バイオセーフティ管理室)]

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) LAMP法によるHAVの迅速診断法の確立

RT-LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法を利用してA型肝炎の迅速診断法を確立した。HAVの5'非翻訳領域の塩基配列を元にプライマーを作成し、感染価約 10^8 /mLの3B型、1B型、1A型のHAVからRNAを調製した。RT-LAMP kit(栄研化学)を用いて62.5度で45-60分間反応を行い、比濁法によるリアルタイム検出を行った。感染価の測定法とほぼ同じ鋭敏な感度で各々の遺伝子型のHAVを検出した。迅速簡便なことから、臨床検体や医薬品のバリデーションへの適用が期待できる。

[米山徹夫、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子、太田嘉則

(栄研化学)]

(2) A型肝炎の血清疫学調査

日本全国から集められた血清2430検体(血清バンク供与)について抗HAV抗体検査を行い、年齢別、男女別、地域別の抗体保有率を調査した。全体の抗体保有率は12.2%で男女別、地域別の差は認められなかった。抗体保有率は年齢とともに上昇するが、50歳以下では1.68%であり、ほとんどの人がHAVに感受性であることが明らかになった。

[清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、下池貴志、米山徹夫]

(3) 抗HAV抗体固相化磁気ビーズによるHAVの回収とLAMP法の検討

抗HAV抗体を固相化した磁気ビーズでHAVを回収し、イムノフォーカス法とLAMP法で定量した。二つの定量法の相関、検出限界を検討中である。

[清原知子、戸塚敦子、米山徹夫]

(4) PolybreneによるHAVの感染増強作用の検討

いくつかのウイルスではPolybreneを添加することで細胞への感染効率が上昇することが報告されている。接種用HAV溶液中、もしくは接種後の培養液中にPolybreneを添加し、増殖したHAV量を無添加の場合と比較した。HAVの増殖はPolybreneの存在に影響されなかった。

[清原知子、米山徹夫]

(5) 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

これまでに無血清培地VP-SFMでA型肝炎ワクチン作製用細胞GL37細胞、およびこの細胞でA型肝炎ウイルス(HAV)が増殖することを見いだした。今年度は無血清培地VP-SFM及びOptiPro SFMでのHAVの増殖性をウイルス接種濃度、FBSの濃度、培地のpHを変え、ワクチン製造用の10%FBS入りMEM培地と比較した。その結果、VP-SFM, OptiPro SFM(OptiPro SFMはVp-SFMよりは優れたウイルス増殖性を示した)では少量のウイルスからの増殖時や感染初期において、ウイルスの増殖が血清無添加のMEMよりも悪い傾向を示した。細胞の増殖に伴う培地のpH低下を抑制するため重曹を添加したが、無血清培地でのウイルス増殖には効果はなかった。無血清培地をMEMで希釈して使用した場合も、ウイルスの増殖はMEMを超えなかった。今後、無血清培地に加える添加物の検討、無血清培地でHAVの増殖の良い

ウイルス第二部

細胞の樹立、無血清培地馴化細胞でよく増殖する HAV の分離などが課題である。

[戸塚敦子、下池貴志、田代真人(ウイルス第三部)、宮村達男]

(6) 安全な血液製剤を確保するための A 型肝炎ウイルス除去・不活化法の研究

重要性が認識されつつも対策が取られていなかったウイルスのひとつ、HAV に対する各種除去・不活化法の効果を研究した。HAV 感染価(FFU/ml)はイムノフォーカス法にて測定した。結果は、Solvent/Detergent 処理では、HAV KRM238 株は不活化されなかった。25%Albumin 中 60 度 10 時間加熱では、株間で不活化効果に差があり、感染価が KRM238 株(3B 型)と TKM005 株(1B 型)では約 $3\log_{10}$ 、KRM003C 株(3B 型)と KRM031 株(1A 型)では約 $5\log_{10}$ 低減した。血液製剤のバリデーションにおける試験ウイルス株の選定には注意を要することが示唆された。[嶋崎典子(北里環境科学センター)、戸塚敦子、清原知子、米山徹夫、岡田義昭(血液安全性研究部)]

2. B 型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

(1) ヒト肝細胞癌症例における HBV DNA の MLL4 遺伝子への組み込み

HBV 持続感染者では染色体へのウイルス DNA 特に HBX 遺伝子領域の組み込みが高頻度に観察される。Cyclin A, hTERT の場合のように HBV DNA が組み込まれた近傍の細胞遺伝子が活性化される場合もあることが報告されている。西郷らは最近、B 型肝炎患者の肝組織において HBX 遺伝子が proto-oncogene の MLL4 遺伝子に組み込まれ、HBx-MLL4 融合蛋白が発現することを見出した。本研究では、肝癌組織及び非癌部からゲノム DNA を調製しサザンプロット法によって組み込み様式の解析を行った。

[鈴木哲朗、勝二郁夫、*西郷健一、宮村達男(*国立がんセンター東病院)]

3. C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) HCV NS5A 蛋白質と Amphiphysin II の相互作用

HCV の NS5A 蛋白質は細胞内で小胞状膜構造を形成し、その膜上に局在する。Amphiphysin II は脂質二重膜の湾曲度センサーとして機能する蛋白質で、エンドサイトーシスでの小胞形成に関与する。両蛋白質は、NS5A のプロリンが豊富な領域と Amphiphysin 2 の SH3 ドメインで相互作用することが報告されている。この相互作用の生物学的意義について解析を行っている。

[西村順裕、岡本 徹(阪大微研)、森石恆司(阪大微研)、松浦善治(阪大微研)]

(2) HCV コア蛋白と結合する宿主因子の検索

HCV コア蛋白質の新規機能を解明する目的で、MEF-tag 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い、質量分析法で同定し、7つの新規結合因子を得た。これらとコア蛋白の結合を免疫沈降法で確認した。HCV による病原性、ウイルス複製との関連について解析を進めている。

[勝二郁夫、白倉雅之、下地 徹、福田浩一郎、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男; 市村 徹(首都大学東京)、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘(細胞化学)、水本清久(北里大薬)]

(3) E6AP による HCV コア蛋白の分解調節機構の解析

コア蛋白の新規結合因子として E3 コピキチンリガーゼ E6-associated protein (E6AP) を同定した。E6AP 依存性コア蛋白分解の分子機構について解析した。E6AP (WT) との共発現では、Core 蛋白のコピキチン化および分解が促進され、E6AP (dn) との共発現では、コピキチン化および分解が抑制された。また、siRNA で E6AP の発現を抑制したところ Core 蛋白の分解が阻害された。コア蛋白の E3 コピキチンリガーゼが E6AP であることを明らかにした。

[白倉雅之、勝二郁夫、下地 徹、福田浩一郎、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男; 市村 徹(首都大学東京)]

(4) HCV コア蛋白と E6AP の結合領域の解析

E6AP によるコア蛋白の認識機構を明らかにするために、コア蛋白および E6AP の各種欠損変異体を発現するプラスミドを作製した。これらを用いて GST-pull down 法、免疫沈降法などで結合部位を解析した。E6AP との結合にはコア蛋白の N 末側に重要な領域が存在することが分かった。また、E6AP 側は HECT domain 近傍に重要な領域が存在することが明らかとなった。更に詳細に結合部位を解析中である。

[福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、下地 徹、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、水本清久(北里大薬)]

(5) E6AP 発現による HCV 複製系への影響

コア蛋白の分解機構を調節している E6AP が HCV 複製

ウイルス第二部

系にどのような影響を及ぼしているかについて検討した。その結果、感染 7 日目では E6AP の発現による細胞内 HCV-RNA 量の変化は見られなかった。しかしながら、細胞内コアタンパク量及び培養上清中への HCV 粒子産生量は E6AP を発現した場合にはコントロールと比べ、約 1/2 に減少していた。これらの結果は E6AP によるコア蛋白の分解が HCV 粒子形成に影響を及ぼしていることが示唆された。現在 E6AP のウイルス粒子形成過程における分子機能について詳細な検討を行っている。

[村上恭子、白倉雅之、福田浩一郎、下地 徹、阿部克俊、鈴木亮介、鈴木哲朗、勝二郁夫、宮村達男]

(6) HCV コア蛋白及び E6AP の細胞内局在の検討

HCV コア蛋白は核、脂肪滴、ミトコンドリア、ER に局在する。そこで、HCV 感染細胞及び HCV コア蛋白発現 Huh7 細胞を用いて E6AP と HCV コア蛋白との共局在について検討した。E6AP 発現細胞ではコア蛋白が分解されており、局在の検討が困難であった。そこで、E6AP の不活性型変異体を用いて検討したところ、E6AP 及び HCV コア蛋白は perinuclear に共局在することが分かった。

[村上恭子、白倉雅之、下地 徹、福田浩一郎、阿部克俊、鈴木亮介、鈴木哲朗、勝二郁夫、宮村達男]

(7) HCV コア蛋白のコピキチン化部位の解析

HCV NIHJ1 株のコアタンパク質は 7 カ所の Lys 残基を有する。コピキチン化される Lys 残基の部位を site directed mutagenesis 法により一カ所だけ残した mutant core を作製し、コピキチン化される Lys 残基の位置を解析している。

[勝二郁夫、下地 徹、福田浩一郎、阿部克俊、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(8) HCV コア蛋白のコピキチン化機構の解析

コピキチンがポリコピキチン鎖を形成する際に K48 が分解のシグナルとして、K63 が局在化のシグナルとして機能することが知られている。また、近年、K29 が分解のシグナルとして利用されることが報告されている。E6AP が HCV コアのポリコピキチン化する際にコピキチン内のどの Lys 残基を介してポリコピキチン鎖を形成するか明らかでない。そこで、コピキチン内のどの Lys 残基がポリコピキチン鎖形成に重要であるかを解析している。

[勝二郁夫、下地 徹、福田浩一郎、阿部克俊、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

(9) HCV genotype と E6AP 依存性コア蛋白分解

HCV コア蛋白は各 genotype 間で高度に保存されている。HCV コアと E6AP の相互作用部位をマッピングしたところ HCV コアの aa 58-71 が相互作用に重要であることが分かった。この領域は各 genotype 間で高度に保存されている。そこで、E6AP 依存性のコア蛋白分解をすべての genotype のコアについて検討した。他の genotype のコアでも E6AP 依存性に分解されることから、E6AP 依存性 HCV コア蛋白分解は genotype によらない共通の機構であり、HCV の life cycle に重要であることが示唆された。

[福田浩一郎、勝二郁夫、下地 徹、阿部克俊、村上恭子、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、水本清久 (北里大薬学部)]

(10) HCV core-E6AP による宿主因子のコピキチン依存性分解

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 をコピキチン化し、分解を促す。同様な機構で HCV core-E6AP 複合体が E3 コピキチンリガーゼとして機能する可能性が考えられる。そこで、HCV コア蛋白と結合する蛋白として MEF-tag 精製法及び質量分析法により同定された宿主蛋白を標的蛋白として HCV core-E6AP による分解制御の可能性を検討し、候補因子が得られた。

[阿部克俊、下地 徹、白倉雅之、村上恭子、福田浩一郎、勝二郁夫、宮村達男、深澤征義 (細胞化学部)、小池和彦 (東大感染症内科)]

(11) HCV コア蛋白と結合する宿主因子 ftp-3 の解析

コア蛋白と結合する宿主因子として ftp-3 を同定した。この蛋白は主に核内に存在する RNA 結合蛋白であり、スプライシング等への関与が報告されている。現在、バキュロウイルス発現系を用いて発現し、アフィニティー精製した蛋白によりコア蛋白との結合を詳細に解析している。

[阿部克俊、村上恭子、高橋由利絵、下地 徹、福田浩一郎、勝二郁夫、小池和彦 (東大感染症内科)、宮村達男]

(12) HCV 非構造蛋白と結合する宿主因子の解析

HCV がコードする非構造領域蛋白は酵素活性を有し、ウイルス複製に必須である。ウイルスが複製する際には宿主の複製機構を巧みに利用していると推定されるが、

ウイルス第二部

どの宿主因子を利用しているかは明らかになっていない。そこで、MEF-tag affinity 精製法と質量分析法で HCV 非構造蛋白と結合する宿主因子のスクリーニングを行い、ウイルス複製を規定する宿主側因子の同定を進めている。[勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地 徹、福田浩一郎、宮村達男、市村 徹(都立大) 水本清久(北里大薬)]

(13) HCV 粒子複製系の効率化

HCV RNA レプリコン細胞(RCYM1 細胞)の三次元培養系で HCV 様粒子が産生され、細胞外へ分泌されることを見いだした。ウイルス産生効率を向上させるために、宿主細胞としてセンダイウイルス C 蛋白発現により IFN 非感受性となった Huh7 細胞、IFN 等によりレプリコンを除去した cured Huh7 細胞等を用いて genotype 1b および genotype 2a 型のダイシストロニック HCV-RNA を維持した細胞株を樹立した。現在、これらの細胞を三次元培養し HCV 粒子産生効率を比較検討している。

[村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男]

(14) HCV-IRES IIIc 領域に結合する宿主因子の影響

HCV 5'非翻訳領域内の IIIc 領域にはコア蛋白が結合すること、及びコア蛋白が HCV-IRES 依存的翻訳を抑制することが報告されている。翻訳抑制の機構として IIIc 領域に結合する宿主因子とコア蛋白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、いくつかの宿主因子が同定された。また、免疫沈降法-イムノプロット法により Huh7 細胞及び 293T 細胞内で HCV コア蛋白と結合することを確認した。現在これらの因子による翻訳制御への影響、粒子形成等を検討している。

[村上恭子、福田浩一郎、下池貴志、高橋由利絵、松田麻未、鈴木哲朗、勝二郁夫、宮村達男]

(15) 血球系細胞での HCV 複製系の検討

HCV は主に肝細胞で増殖すると考えられているが、肝細胞外、特に血球系細胞での複製を示唆する報告が多くなされている。そこで血球系細胞での HCV 複製の可能性を検討するため、様々な血球系株化細胞を用いた HCV 複製系、および HCV 粒子産生系の樹立を試みている。HCV 感染による肝外病変としてクリオグロブリン血症等が報告されており、樹立した血球系細胞での HCV 複製系を用いて病原性発現の機構を解析する予定である。

[村上恭子、勝二郁夫、宮村達男]

(16) Pol I システムを用いた感染性 HCV 産生系の確立

RNA polymerase I プロモーター/ターミネーター (Pol I システム) はリボゾーム RNA の発現調節を担っており、転写に伴って 5' cap 構造、3' poly A tail が付加されない。Pol I システム支配下で HCV JFH1 クローン全長遺伝子を Huh7 細胞で一過性発現させたところ、細胞内で HCV ゲノム RNA の合成及びウイルス蛋白の発現が確認され、その培養上清中には導入後 3-10 日目に HCV コア蛋白の分泌が認められた。この培養上清を Huh7.5.1 細胞に添加することにより HCV の伝搬が観察されることから、プラスミド導入細胞は感染性 HCV を産生することが示された。またその感染性は CD-81 抗体で抑制された。

[鈴木亮介、政木隆博、松田麻未、*松浦善治、**脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男(*大阪大学微研、**都神経研)]

(17) 感染性 HCV の持続的産生細胞株の樹立と抗 HCV 薬評価への応用

HCV 感染性粒子を恒常的に産生する細胞株を樹立するため、ゼオシン耐性遺伝子を持つ Pol I 発現ベクターを作製し、Huh7 細胞または Huh7.5.1 細胞へ導入した。ゼオシン耐性細胞を選択し、更に培養上清へのコア蛋白分泌を ELISA 法でスクリーニングし HCV 高産生細胞株を樹立した。得られた細胞株が安定的に(少なくとも3ヶ月以上)感染性ウイルスを産生することを確認した。この細胞株が抗 HCV 薬のスクリーニング系として有用であることを示した。

[鈴木亮介、政木隆博、松田麻未、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男(*都神経研)]

(18) 構造蛋白質のキメラ・変異体を用いた HCV 粒子形成機構に関する研究

HCV JFH-1 株の全長 HCV cDNA を培養細胞に導入することにより、感染性ウイルスの培養上清中への放出を検出した。エンベロープ蛋白 E1/E2 の欠損及び p7 領域の点変異は細胞内での HCV ゲノム複製には影響を及ぼさなかったが、細胞外へ放出されるコア蛋白量を減少させた。遺伝子型 1a (H77c) 及び 1b (NIH-J1) の構造領域と JFH-1 の非構造領域とのキメラ HCV ではウイルス粒子の分泌量が減少した一方で、遺伝子型 2a 同士のキメラ (J6/JFH-1) では分泌量が上昇した。この実験系はウイルス複製や粒子形成の研究のみならず、抗ウイルス薬の開発や予防的、治療的ワクチンの開発に有用である。

[政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男(*都神経研)]

ウイルス第二部

(19) HCV レプリコンを持つ細胞での HCV 構造蛋白のウイルスベクターによる発現と粒子形成

HCV レプリコンを持つ細胞に HCV 構造蛋白を供給することで、レプリコン RNA をパッケージングした粒子を形成できる可能性があると考えられる。HCV レプリコン細胞株 (5-15) に、HCV の構造蛋白領域 (JFH1 株) を発現する組換え DI_s 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、HCV レプリコン RNA は同一の画分に存在した。この画分をヘパリンカラムにかけたところ、カラム結合画分にコアとレプリコン RNA が存在し、0.5M NaCl で溶出された。このことから、コア、E1/E2、HCV RNA が何らかの構造体を形成している可能性が強く示唆された。

[張 斌、石井孝司、鈴木亮介、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研)]

(20) HCV レプリコンを持つ細胞での HCV 構造蛋白の恒常的発現と粒子形成

HCV レプリコン細胞株 (5-15, IH4-1) に HCV の構造蛋白領域を発現するプラスミドを導入し、薬剤選択によって、構造蛋白及びレプリコン RNA を恒常的に発現する細胞株を選択した。1 週間培養後の上清を分画して調べたところ、蔗糖密度勾配で構造蛋白、HCV レプリコン RNA は組み換えワクチニアウイルスを用いた上記の報告と同様に同一の画分に存在した。また、この画分はヘパリンカラムによる部分精製が可能であった。

[石井孝司、張 斌、鈴木亮介、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研)]

(21) HCV 粒子作成におけるコア蛋白塩基性アミノ酸クラスターの役割

これまでに、コア蛋白のセルフアセンブリー、RNA パッケージングには N 末端側に 3 カ所存在する塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が重要であることを見出している。現在、各塩基性アミノ酸クラスターに変異を入れたコア蛋白と HCV RNA の結合能の解析を行うとともに、これらのコア変異が感染性クローン (JFH1 株) からの HCV 産生へ及ぼす影響を解析している。

[松田麻未、坂本真一郎、鈴木亮介、*脇田隆字、**松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研、**大阪大学微研)]

(22) HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割

HCV NS5A 蛋白の C 末端領域に GFP 等を挿入させてもウイルス RNA 複製に影響を与えないことが知られている。我々は、NS5A 領域の C 末端側の部分欠損またはセリン残基の点変異によって、RNA 複製は維持されるものの粒子形成が抑制されることを見出した。これは NS5A の C 末端側が粒子形成に重要な役割を担うとする新しい知見である。NS5A 蛋白がゲノム RNA のパッケージングに関与する可能性を考え、NS5A とコア蛋白の相互作用の解析を行っている。

[政木隆博、鈴木亮介、松田麻未、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研)]

(23) 脂質が HCV 粒子形成または HCV 感染性に与える影響

一般にエンベロープウイルスでは、脂質あるいは脂質代謝がウイルスの粒子形成や感染性に重要な役割を果たしていることが知られている。さらに最近では、多くのウイルスが脂質ラフトを介して膜構造から発芽してくることも報告されている。我々は HCV JFH-1 の感染増殖系を用いて、HCV 粒子形成や感染性に脂質、特に脂質ラフトが果たす役割について解析している。

[相崎英樹、*脇田隆字、**マイケル・ライ、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研、**南カルフォルニア大学)]

(24) HCV 遺伝子型 1b の感染性分子クローンの構築

チンパンジーで感染性を示した感染性クローン H77 (遺伝子型 1a) から作製したレプリコン RNA は長期培養中にその塩基配列に数カ所に適応性変異が認められており、それらの変異を導入した全長の HCV cDNA から合成した RNA からは、培養細胞系で HCV 粒子が産生されることが報告されている。そこで、我々はこれらの適応性変異を日本人で最も多い遺伝子型 1b 株へ導入することにより、培養細胞での効率の良い HCV 粒子産生系の構築を目指している。

[相崎英樹、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研)]

(25) 温度感受性ゲル TGP 三次元培養細胞の HCV 粒子産生系による抗 HCV 薬の評価

TGP 三次元培養細胞を用いた HCV 粒子産生系が新規薬剤評価系として有用であることをインターフェロン、リバビリンをモデルとして示した。新たな抗ウイルス薬を探索するため、サブゲノミック レプリコン RNA の複製阻害作用を有する海洋生物 (海綿) 由来新規化合物の HCV 粒子産生阻害作用の評価を行っている。

ウイルス第二部

[鈴木哲朗、村上恭子、スス・ムエー、勝二郁夫、*小林淳一、宮村達男（*北海道大学）]

（ 2 6 ）プロテオーム解析による HCV 複製調節因子の検索（ 1 ）

HCV ゲノム複製に必要な宿主因子を同定し、複製メカニズムを明らかにするため、HCV レプリコン細胞（遺伝子型 1b）と Huh7 細胞から界面活性剤不溶性画分を、ウイルス複製活性を維持したまま粗精製し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法により各蛋白の量的比較を行った。約 1500 個の蛋白が検出され、2 倍以上蛋白量が増加している 60 個の蛋白は、Heat shock protein, Chaperone, Receptor signaling complex, Ubiquitin proteasome system protein などに分類された。

[相崎英樹、松田麻未、井上 寧、*マイケル・ライ、鈴木哲朗、宮村達男（*南カルフォルニア大学）]

（ 2 7 ）プロテオーム解析による HCV 複製調節因子の検索（ 2 ）

HCV 複製複合体画分（レプリコン細胞の界面活性剤不溶性画分）で増加の認められた上記の蛋白群のうち、特に再現性が高いもの 10 種類について、その siRNA をレプリコン細胞内に導入し、ウイルス複製に与える影響を調べた。Hsc70, Cathepsin D, Creatine kinase, Glucose regulated protein, Glutathione S transferas, Hsp70, Tumor rejection antigen gp96, Hydroxymethylglutaryl CoA synthase, Valosin containing protein で遺伝子ノックダウンによって HCV RNA 複製が 50%以上低下した。

[相崎英樹、井上 寧、松田麻未、*マイケル・ライ、鈴木哲朗、宮村達男（*南カルフォルニア大学）]

（ 2 8 ）プロテオーム解析による HCV 複製調節因子の検索（ 3 ）

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全長のレプリコン細胞からそれぞれ複製複合体を含む膜分画を分離し、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、それらの宿主蛋白を同定した。対数増殖期の複製複合体分画に分子シャペロンが多く含まれるという特徴が見出された。

[井上 寧、松田麻未、村上恭子、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男]

（ 2 9 ）HCV 複製に分子シャペロン TRiC および Hsc70 が与える影響

HCV ゲノム複製機構に關与する宿主蛋白として、分子シャペロン TRiC の subunit である CCT5 および Hsc70 を同定した。レプリコン細胞では細胞内で新規に合成される HCV RNA や NS 蛋白は CCT5 と共局在した。さらに、免疫沈降法により、CCT5 は NS5B 蛋白と特異的に結合することを見出した。CCT のすべてのサブユニットの強制発現により HCV 複製は亢進したが、CCT5 のみの強制発現や siRNA による CCT5 の発現抑制では HCV 複製は低下した。さらに、無細胞複製活性系において CCT5 や Hsc70 の抗体は複製活性を抑制した。

[井上 寧、村上恭子、松田麻未、相崎英樹、白倉雅之、下地 徹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男]

（ 3 0 ）HCV の複製および翻訳に対する Pin1 の影響

Peptidyl-prolyl isomerase である Pin1 はリン酸化蛋白に結合し、その蛋白を異性化させる。細胞周期や癌化に重要な役割を担う事が報告されている。Pin1 が HCV の翻訳または複製へ関与している可能性について解析したところ、dicistronic reporter assay 系において Pin1 の過剰発現による HCV IRES の翻訳効率の上昇が認められた。NS5A 蛋白に Pin1 結合モチーフが存在するため、GST pull-down 法により相互作用を解析したが、Pin1-NS5A 結合は認められなかった。

[鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男]

（ 3 1 ）HCV NS5A 蛋白のリン酸化がウイルス RNA 複製における役割

NS5A 蛋白 ISDR 領域の N 末端側に存在する高リン酸化部位を点変異させた HCV RNA レプリコンを用いた解析から、この領域のセリン残基のリン酸化が HCV 複製に影響することを見いだしている。NS5A 変異によって、その結合蛋白であり複製複合体形成に關与する VAP との相互作用が変化し HCV 複製が低下する可能性を考え、各変異体と VAP との結合を解析したが、これまでのところリン酸部位の変異による VAP 結合能の変化は観察されていない。

[相崎英樹、坂本真一郎、根岸英雄、鈴木亮介、村上恭子、*松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男（*大阪大学微研）]

ウイルス第二部

(3 2) ユビキチン非依存的な HCV コア蛋白分解機構

HCV コア蛋白はポリユビキチン化依存的に分解されるとともに、ユビキチン非依存的に分解される機構も存在することを示してきた。siRNA によるノックダウンまた強制発現実験、さらには変異コア蛋白を用いた相互作用解析から、ユビキチン非依存的なコア蛋白分解には、プロテアソーム活性化因子 PA28 γ との結合が重要であることが示された。一般に、ユビキチン非依存的蛋白分解機構は不明な点が多い。その分子機構にプロテアソーム活性化因子が介在しうることが明らかとなった。

[鈴木亮介、*森石恆司、石井孝司、白倉雅之、勝二郁夫、*松浦善治、鈴木哲朗、宮村達男 (*大阪大学微研)]

(3 3) HCV NS2 結合宿主因子の探索

HCV NS2 蛋白は前駆体蛋白のプロセシングに関与しているがその機能について不明な点が多い。NS2 蛋白と宿主細胞との相互作用を明らかにするため、Flag-tag 付加 NS2 蛋白発現細胞を用いて結合因子を探索した。NS2-宿主因子複合体を調製し、NS2 結合宿主因子を MALDI-TOF/MS により同定したところ、 α -tubulin および ANT(Adenine Nucleotide Translocase)2/3 であった。これらの蛋白と NS2 との相互作用は免疫沈降—ウエスタンブロッティングで確認した。ANT2/3 の生理活性への NS2 蛋白の影響を検討中である。

[鈴木亮介、松田麻未、鈴木哲朗、宮村達男]

(3 4) HCV 遺伝子型 1b 及び 2a genomic RNA の発現に伴う細胞蛋白質の量的変動の解析

HCV 複製が宿主細胞へ及ぼす影響を調べる為に、HCV 遺伝子型 1b 又は 2a の fullgenomic RNA 発現細胞と非発現細胞で蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法により比較プロテオーム解析を行った。両ゲノム RNA の複製に伴い発現量が減少する細胞蛋白は、Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MTCBP1), Keratin 19 であり、発現量が亢進する蛋白は Vimentin であった。

[松田麻未、*脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男 (*都神経研)]

(3 5) HCV NS3/4A および 5A 発現トランスジェニックマウスの作製

我々はコア、エンベロープ発現トランスジェニックマウスを作製し、それぞれの HCV 蛋白の病原性を解析した(Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, Nat Med. 1998)。次に、全ての非構造蛋白を発現する NS2-5B 発現トランスジェ

ニックマウスを作製したものの、蛋白発現が弱いこともあり、明らかな病態も示さなかった。そこで、NS3/4A および 5A 蛋白をそれぞれ発現するトランスジェニックマウスを作製し、HCV 蛋白の生体に与える影響を調べることにした。HBV のプロモーター/エンハンサー支配下に各 HCV 遺伝子を発現するベクターを作製した。

[相崎英樹、*小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男 (*東京大学)]

(3 6) HCV NS5A 蛋白による染色体の不安定化誘導

HCV 全蛋白または非構造蛋白領域を発現するヒト肝癌細胞株では非発現細胞に比べ、細胞あたりの染色体数の増加が観察された。個々の非構造蛋白の発現により、この染色体不安定化が NS5A 蛋白によって誘発されることが明らかとなった。また、この染色体不安定化が細胞の分裂周期異常と関連することが示された。

[鈴木哲朗、*Chang-Woo Lee、宮村達男 (*Sungkyunkwan Univ.)]

(3 7) ヒト B 細胞株を用いた HCV 病原性機構の解析: コア蛋白による B 細胞表面抗原発現調節

HCV 感染が B 細胞系へ及ぼす影響を明らかにするため、HCV コア蛋白発現 B 細胞株及び一過性のコア蛋白発現系を使って HCV コア蛋白の発現に伴う B 細胞表面分子変化を検索した。102 種類の表面抗原のうち、接着分子で CD2 の主要リガンドである CD48 抗原の発現低下が最も顕著であった。更に、コア蛋白の発現量依存的な CD48 プロモーター活性の抑制効果が明らかとなった。コア蛋白による CD48 遺伝子発現調節に関わる CD48 プロモーター領域、転写因子の解析を行っている。

[町田早苗、鈴木亮介、小俣和彦、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(3 8) C 型肝炎治療薬に対する耐性ウイルスの解析

現在、C 型肝炎に対する標準的な治療法は、インターフェロンとリバビリンの併用療法であるが、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、遺伝子型 1b (Con1)及び 2a (JFH1)の HCV レプリコン細胞にリバビリンを数ヶ月間処理したところ、JFH1 レプリコン細胞がリバビリン耐性を獲得することを見出した。この耐性細胞から調製した total RNA を naïve な細胞へ導入したところ、同様にリバビリン耐性を獲得した。更にこの耐性細胞で特徴的な HCV 遺伝子変異を同定した。

[スス・ムエー、村上恭子、*脇田隆字、**小池和彦、鈴

ウイルス第二部

木哲朗、宮村達男（*都神経研、**東京大学）]

（39）HCV RNA 結合ペプチドの探索と評価

抗 HCV 薬の創製を目指して、HCV RNA に特異的に結合しウイルス増殖を阻害するペプチドの探索と評価を行った。RNA 結合ペプチドのスクリーニングには、ユニークな細胞内 RNA-ポリペプチド相互作用検出系である KAN (Kanamycin Antitermination) システムを用いた。これまでに HCV 3'非翻訳領域 RNA に対して特異的に陽性を示す 4 配列を得た。HCV レプリコンを安定発現する細胞株内でこのうち 1 配列を強制発現させたところ、ウイルス増殖の抑制を示唆する結果が得られた。

[鎌田麻利江、石井孝司、*原田和雄、**脇田隆字、鈴木哲朗、宮村達男（*東京学芸大学、**都神経研）]

（40）HCV コア抗原パネルの作製及びコア抗原検出試薬の評価

体外診断薬として C 型肝炎の診断に利用されているコア抗原検出試薬の性能点検に供するため、種々の HCV 遺伝子型由来コア抗原の組み換え蛋白を調製する。遺伝子型 1a, 1b, 2a, 2b, 3a 各々のコア蛋白を FLAG タグとの融合蛋白の形で哺乳動物細胞で発現させ、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロット法により発現レベルを標準化した。今後、HCV 遺伝子型の違いによって抗原検出試薬の感度に差が生じるかを検討する。

[鈴木亮介、近藤円香、*水落利明、鈴木哲朗、宮村達男（*血液・安全性研究部）]

（41）歯科診療における院内感染対策ガイドラインの作成

近年、歯科医療における診療技術の高度化、多様化に伴って院内感染対策を組織的、体系的に整備することが求められている。歯科における院内感染対策ガイドラインの作成に向けて、患者-患者間、医療従事者-患者間の感染リスクをシステムティックに評価するため、コクランライブラリーを利用して網羅的な情報収集を行った。また、ガイドラインの作成にあたり、関連する病原微生物についての概説を担当するため、関連情報の収集を行うとともに肝炎ウイルスについて概説作成を行った。

[鈴木哲朗、*佐藤田鶴子、宮村達男（*日本歯科大学）]

（42）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

IIIId (IIIId) 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示唆する結果を得た。今回ゲルシフトアッセイを用いて、コア蛋白質は IIIId と 40S リボソームサブユニットとの結合を阻害することを示唆する結果を得た。IIIId 領域は 40S リボソームサブユニット (40S) が結合し、翻訳の開始に重要な領域であり、コア蛋白質は IIIId 領域と 40S との相互作用を阻害することにより、HCV 5'UTR による翻訳開始を阻害すると考えられる。[下池貴志、鈴木哲朗、鈴木亮介、村上恭子、松浦善治（阪大微研）、宮村達男]

4 . E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

（1）遺伝子 1 型 (G1), G3 及び G4 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、ウイルス様粒子 (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。また、遺伝子型特異的な単クローン抗体が得られた。これらの単クローン抗体を用いて、遺伝子型を識別できる抗原および抗体検出法の樹立を進めている。また、G4 の VLP に対する単クローンを作成中である。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

（2）E 型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須な領域の同定

N 末端から 111 アミノ酸を欠失させた HEV 構造蛋白を組換えバキュロウイルスで発現すると、直径約 23-24nm の VLP が産生される。アミノ酸配列解析によって、この粒子蛋白は N 末端の 111 個のアミノ酸以外に C 末端から 52 個のアミノ酸が欠失していた。構造蛋白の N 末端、あるいは C 末端、さらに両端を欠失した種々のクローンを発現し、VLP 形成に必須な領域の同定を試みた結果、VLP 形成に必須な領域は 126-601 アミノ酸であることを確認した。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

（3）大きなサイズをもつ G1, G3 および G4 VLP の作製およびウイルス遺伝子との結合

G3 HEV の ORF2 全長を発現することによって、直径約 35-38nm の粒子を作製することに成功した。この粒子

ウイルス第二部

は形状、サイズとも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。クリオ電顕で三次構造を解析した結果、この大きな粒子はこれまで作製した小さい粒子と異なる三次構造を示した。また、この粒子の中には約 2k bp の ORF2 RNA が取り込まれていた。HEV 全長遺伝子を含む組み換えバキュロウイルスと ORF2 全長の組み換えバキュロウイルスを共感染し、HEV 全長遺伝子を大きい粒子に取り込めるかどうかを検討していると同時に、G1 および G4 の大きな粒子の作成を検討している。

[李 天成、恒光 裕 (動衛研) 武田直和、宮村達男]

(4) G4 HEV の構造蛋白の発現及び抗原性の解析

イノシシからヒトの HEV と極めて類似の HEV が分離されている。イノシシの HEV 抗体保有率は高く、リザーバーの一つではないかと考えられている。急性 E 型肝炎患者血清から 2 株、イノシシ糞便から 10 株の G4 HEV 遺伝子を検出し、構造蛋白全長、及び N 末端から 13 アミノ酸を欠失した領域を RT-PCR 法で増幅した。定法どおり組み換えバキュロウイルスを作製し、VLP 形成を電子顕微鏡で観察した。大きな VLP ウイルス様粒子形成は見られていないが、小さいウイルス様粒子を作製した。この粒子をマウスに免疫して単クローンを作成し、抗原性の相違を比較している。

[李 天成、宮村達男、武田直和、栄 賢司、伊藤 雅 (愛知衛研)]

(5) マングースの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況と HEV 遺伝子の検出

HEV のリザーバーを同定する目的で、沖縄島の野生マングース 199 匹を捕獲し、血清抗体および HEV 遺伝子の保有状況を調べた。組換えウイルス様粒子をマイクロプレートに固相化し、酵素標識抗ネコ IgG および IgM を二次抗体とした ELISA 法を確立した。抗体の有無はウエスタン法で確認した。また、血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって構造蛋白領域の一部を増幅した。この結果、44 匹 (22.1%) が IgG 抗体陽性で、12,800 倍の抗体価を有する個体がいた。この個体は IgM 抗体も陽性であった。IgG 抗体保有率は体重、身長とともに増加する傾向が見られた。HEV 遺伝子の増幅は成功していない。

[李 天成、宮村達男、武田直和、斉藤美加、小倉 剛 (琉球大学)]

(6) シカの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況と HEV 遺伝子の検出

日本全国で捕獲したシカ 976 頭の血清を用い、血清抗体および HEV 遺伝子の保有状況を調べた。組換えウイルス様粒子をマイクロプレートに固相化し、酵素標識抗シカ IgG を二次抗体とした ELISA 法を確立した。抗体の特異性をウエスタン法で確認した。また、血清から RNA を抽出し、RT-PCR 法によって構造蛋白領域の一部を増幅した。この結果、25 頭 (2.56%) が IgG 抗体陽性であったが、いずれも、低い抗体価を示した。88 検体のシカ糞便および 212 検体血清では HEV 遺伝子が増幅されていない。これらはシカが HEV のリザーバーである可能性が低いことを示唆する。

[李 天成、宮村達男、武田直和、松浦友紀子、高島郁夫、有川二郎 (北海道大学) 恒光 裕 (動物衛生研究所)]

(7) 野生動物の HEV 感染状況調査

イノシシ、野ウサギ、サル、猫、犬の HEV 感染状況を知る目的で、血清から HEV RNA 検出および HEV-IgG 抗体保有調査を行った。野ウサギの血清 31 検体からは抗体は検出されなかった。イノシシ血清 169 検体では 84 検体 (49.7%) が IgG 抗体陽性であった。サル、猫、犬などからも抗体が検出された。この抗体と HEV 感染との関連を明らかにする調査が進行中である。

[李 天成、武田直和、宮村達男、棚林 清、山田章雄 (獣医科学部)]

(8) 免疫不全症モデルマウス (TSN KO) における E 型肝炎ウイルスの感受性

Translin 遺伝子を欠損した免疫不全症モデルマウス (TSN KO) では、末梢血リンパの著しい減少が幼年期に観察され、コロナウイルス感染に対する抵抗性が有意に低下していることが明らかになっている。また、生後 10 ヶ月を経た TSN KO が骨髄不全症を発症する。E 型肝炎ウイルスを TSN KO マウスに接種し、各組織におけるウイルスの増殖と感染性について検討している。

[李 天成、武田直和、宮村達男、葛西正孝 (免疫部)]

(9) RFB 三次元培養システムを利用した HEV 感染増殖系作製の試み

RFB を利用した Huh7 細胞の三次元培養系が、HEV の感染増殖実験系として有用であるかを検討した。RFB 培養細胞に HEV 感染サルの糞便材料を感染させた後、経時的に培養上清を回収し RT-PCR により HEV RNA の検出を行った。その結果、感染後 7 日目までは培養上清から HEV RNA が検出されたが、8 日目以降は検出限界

ウイルス第二部

以下となった。

[吉崎佐矢香、石井孝司、李 天成、村上恭子、武田直和、鈴木哲朗、宮村達男]

5. GB ウイルス (GBV) に関する研究

(1) タマリンを用いた慢性肝炎モデル作製の試み： FK506 投薬による GBV-B 感染への影響

昨年度に確立した GBV-B 感染によるタマリン急性肝炎モデルを用いて、慢性肝炎モデルを検討した。タマリンに免疫抑制剤 FK506 を投与し、GBV-B 感染が持続するかどうか検討したが、ウイルス接種前後に関わらず、FK506 投薬により血中ウイルス量および動態 (viremia 期間) は影響されなかった。現在、ウイルス接種前からの投与及び投与量の増加を検討中。

[石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男、*飯島沙幸、*木村展之、*明里宏文、**森 健一、**榎 昇 (*医薬基盤研、**先端生命科学研)]

(2) GBV-B 慢性感染マーマセットモデルの確立

マーマセットへの GBV-B 接種時に、ある特定の配列を持つ siRNA を同時に投与したところ、GBV-B の生体内での増殖が大きく遅延し、その後ウイルスは排除されず慢性感染に移行した。GBV-B での慢性感染モデルは本邦で初の例であり、慢性感染を惹起するメカニズムについて詳細に解析を行っている。感染後 1 年時のウイルスゲノムをクローニングして配列を決定したところ、元のゲノムと比較して 10 ヶ所程度のアミノ酸変異を伴う変異が見出された。この変異の意義についても検討中。

[石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達男、*飯島沙幸、*明里宏文、**山口健次郎、**榎 昇 (*医薬基盤研、**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 をコピキチン化し、分解され、不活化する。E6AP は単独でもコピ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、MEF-tag 精製法、質量分析法を用いて解析し、新規 E6AP 結合蛋白 p23 を同定した。得られた結合蛋白は新規基質蛋白の可能性が考えられ、現在、E6AP の新規機能を解析中である。

[勝二郁夫、下地 徹、宮村達男；市村 徹 (首都大学

東京)]

(2) E6AP と annexin A1 の相互作用と機能解析

子宮頸癌細胞株 C33A 細胞から GST-pull down 法により E6AP 新規結合蛋白として annexin A1 を同定した。in vitro において E6AP は annexin A1 と Ca²⁺ 依存性に結合した。また、E6AP と annexin A1 を共発現させたところ、annexin A1 の蛋白レベルが減少した。siRNA で E6AP の発現を抑制したところ annexin A1 の分解が阻害された。さらに、内在性 annexin A1 がコピキチン化されることが示された。以上のことから、annexin A1 は E6AP のコピキチン化の基質である可能性が示された。

[下地 徹、勝二郁夫、松田麻未、村上恭子、宮村達男]

2. ヒトポリオーマウイルス BK に関する研究

(1) ヒトポリオーマウイルス BK の VP1C 末端領域と DNA との結合および粒子形成に及ぼす影響

ヒトポリオーマウイルス BK の構造タンパク VP1 に関し、C 末端のプラスチャージアミノ酸残基をアラニンに置換し、(R281A, R285A, K288A, R290A, R292A, K293A, R294A および K297A)、それぞれ組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞に感染させ、粒子形成および DNA との結合に対する影響を検討した。その結果は Arg292, Arg294 および Lys297 は DNA との結合および粒子の形成に重要であることが明らかになった。

[李 天成、武田直和、宮村達男、柯 昌文 (中国広東省 CDC)、Nilsson J.、Cheng HR (カロリンスカ研究所)]

V. SARS コロナウイルス (SARS-CoV) に関する研究

(1) 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 構造蛋白の Spike protein である S を発現する組換え DIs を接種されたマウス群では、SARS-CoV を経鼻接種した場合に感染から完全に防御された。いずれの場合も肺洗浄液中の IgA 濃度は上昇しておらず、IgG 濃度が上昇しており、防御の主体は肺に滲出した IgG であることが強く示唆された。本組換え DIs は SARS ワクチンの候補として有望であると考えられる。

[石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、*横田恭子、*大西和夫、**長谷川秀樹、**永田典代、***水谷哲也、***森川茂、****田口文広、****田代真人 (*免疫部、**感染病理部、***ウイルス第一部、****ウイルス第三部)]

ウイルス第二部

VI. その他の研究

(1) バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理・1

厚生労働科学研究の一環として、今井俊介奈良県保健環境研究センターを主任研究者、小倉肇岡山県環境保健センター所長を分担研究者とする「バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理」が発足した。小倉肇岡山県環境保健センター所長の要請で各地の地方衛生研究所が参加している。本年度は、ノロウイルス VLP をウイルス第二部から分与を受け、各地方衛生研究所へ電子顕微鏡観察用標準品としてそのまま、ホルマリン不活化済み、陰性コントロール〔蒸留水〕の3種類を準備し、ブラインド番号を付けて各地へ送付した。各衛研では、この3種類のサンプルを電子顕微鏡で観察し報告する。研究班は結果を集計して評価検討する。

[宇田川悦子、小倉 肇(岡山県環境保健センター)]

(2) 超遠心器を使用した電顕観察用ウイルスサンプルの作成

通常使用している電顕サンプル作成法では、高度に濃縮した材料を使用するとウイルス粒子の濃縮は出来るが、他方検体中の夾雑物も濃縮されてしまい観察が困難となることがしばしば起こる。そこで、通常検査法の提要に指示されて作成したサンプルを支持膜張りグリッドと一緒に100,000xg 15分4 で超遠心することにより特異的なウイルス粒子の濃縮が可能となっている(Air fuge 超遠心機使用時)。しかし、現在ではこの超遠心機は廃盤となっている。そこで、日立ハイテクノロジーズとの共同研究で現在使用可能な日立超遠心機に使用可能なアダプターの試作を行なっている。

[宇田川悦子、森田正隆(日立ハイテクノロジーズ)]

(3) 昆虫細胞におけるノダウイルスの潜伏感染

昆虫細胞 Tn5 は組換えバキュロウイルス発現システムでよく利用される細胞である。組換えバキュロウイルスに感染した昆虫細胞からノダウイルス(Nodavirus)を分離した。正常の Tn5 細胞からもノダウイルスの全遺伝子を増幅できたことからこの細胞にはノダウイルスが潜伏感染していることが推測された。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

(4) ヒトライノウイルス(HRV)に関する研究

ア) HRV に関する臨床研究および HRV RNA 定量法の開発

感冒の原因である呼吸器ウイルス感染症、特に頻度が

高い HRV は、慢性呼吸器疾患患者において、しばしば急性増悪の契機になると考えられている。そこで気管支喘息および慢性閉塞性肺疾患患者における急性増悪時の HRV 感染の寄与について前向き多施設研究で検討を行っている。現在までに、目標 200 例中 62 例を登録し、2 例の HRV による急性増悪を確認した。RT-PCR 法では、患者喀痰より定性検査が可能であり、現在、Real-Time RT-PCR 法による virus RNA 定量法の確立を試みている。これまでに、 10^3 copy/Sample までの定量が可能となった。さらに定量限界をあげるため、新たな primer & probe の set を試行中である。

[沼田尊功、井上 寧、*佐藤哲夫、鈴木哲朗、宮村達男(*東京慈恵会医科大学)]

イ) HRV RNA 複製細胞の樹立と複製メカニズムの解析

HRV の構造蛋白遺伝子を Luciferase 遺伝子に置き換えた HRV レプリコンの高複製株 (P1Luc cre) を用いて HRV RNA 複製細胞系の構築を行っている。レプリコン RNA を Huh7 に導入した後、Luciferase 活性にてその複製活性を評価する。現在、細胞の培養温度などの HRV RNA 複製の至適条件の検討を行っている。さらに、日本で多い遺伝子型の HRV の RNA を用いて同様にレプリコン及びその複製細胞系の作製を目指す。

[井上 寧、沼田尊功、*佐藤哲夫、相崎英樹、鈴木哲朗、宮村達男(*東京慈恵会医科大学)]

(5) 温度感応性高分子 TGP を用いて三次元培養したヒト肝癌細胞の形態学的解析

TGP で三次元培養し、スフェロイドを形成した Huh7 細胞、HepG2 細胞の微細構造を調べるため、透過型および走査型電子顕微鏡による観察を行った。細胞表面では単層培養に比べ、微絨毛の発達が見られた。また、細胞間でも微絨毛の発達が見られ、さらにデスモゾーム様またはタイトジャンクション様の構造及び微小胆管様構造の形成も観察された。これらの結果からヒト肝癌細胞を三次元培養化することにより生体肝組織に近い特徴を示すことが示された。

[吉崎佐矢香、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(6) TGP 三次元培養肝細胞における FABP1 発現誘導の分子機構

プロテオーム解析の結果、TGP 三次元培養肝細胞では単層培養系に比べ脂肪酸輸送に関わる fatty acid binding protein (FABP) 1 の発現上昇が認められた。この時、FABP1 mRNA レベルも上昇していたため、FABP の転写活性調

ウイルス第二部

節に関わる転写因子 PPAR α 及び β の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定し、TGP 培養での両因子の発現亢進、特に肝細胞で主に発現する PPAR α の顕著な発現変化 (HepG2 細胞では単層培養の 10 倍以上) が認められた。
[吉崎佐矢香、松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(7) TGP 三次元培養ヒト肝癌細胞における脂肪酸の取り込み

前項のように、TGP で三次元培養化したヒト肝癌細胞 (HepG2 及び Huh7) では、単層培養系に比べ FABP 1 の発現上昇が認められる。そこで TGP 培養系と単層培養系では細胞内への脂肪酸取り込み能に違いがあるかを Huh7 細胞を使って検討を行っている。脂肪酸にはパルミチン酸を用い、取り込みの経時的変化の測定を試みている。現在、培養条件を詳細検討中である。

[吉崎佐矢香、*深澤征義、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男 (*細胞化学部)]

(8) TGP 三次元培養におけるチトクローム P450 の発現と機能解析

TGP 三次元培養肝細胞を用いて肝臓分化機能の発現を解析している。本年度は、肝臓での薬物代謝において最も重要な役割を果たしているチトクローム P450 CYP3A4 について解析を行なった。Huh7 細胞を TGP 培養すると単層培養と比較して CYP3A4 の薬物代謝活性が顕著に増加した。この時、CYP3A4 の遺伝子発現が亢進し、また PXR, RXR 等 CYP3A4 発現調節に関わる転写因子群の発現の亢進も認められた。肝由来細胞株では形態変化に伴って、種々の転写因子の発現が変動し肝臓分化機能の発現誘導に繋がる可能性が示唆された。

[柴田佳美、相崎英樹、吉崎佐矢香、*岩堀 徹、**平野俊彦、鈴木哲朗、宮村達男 (*東京医科大学、**東京薬科大学)]

(9) TGP 三次元培養細胞を用いたチトクローム P450 活性測定系の薬剤評価への応用

通常の単層培養細胞系では、デキサメサゾン等で誘導する場合を除き内在性のチトクローム P450 CYP3A4 の活性は極めて低レベルであり測定が難しい。前項のように、TGP 培養の場合、誘導剤未処理の状態でも CYP3A4 活性の検出が可能である。そこで Huh7 細胞の TGP 培養系が、薬剤の CYP3A4 活性へ及ぼす影響の評価法として有用であるかをエリスロマイシンをモデルとし検討した。その結果、エリスロマイシンの濃度依存的に CYP3A4 活

性は阻害され、IC50 は約 0.1 mM であった。高い CYP3A4 活性を有する本培養系は薬剤の副作用評価系として有用であることが示された。

[吉崎佐矢香、柴田佳美、相崎英樹、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男]

(10) ATRA によるアルブミンの発現調節

All-trans retinoic acid (ATRA) によるアルブミン遺伝子の発現調節には転写開始点上流の nt -367/-167 領域が重要であることを見出した。この領域への liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP) の結合能が ATRA により上昇することを EMSA で確認した。LIP は ATRA に反応して早期に発現が亢進する唯一の C/EBP β アイソフォームであり、ATRA によるアルブミンの発現調節において中心的な役割を担うものと考えられた。さらに、LIP は他のアイソフォームの転写活性化作用に対して競合阻害的に働き、アルブミンの遺伝子発現を負に制御することが強制発現系で分かった。レチノイン酸によるアルブミンの発現調節機構において、C/EBP β の dominant-negative isoform, LIP の働きが重要であることが初めて示された。

[政木隆博、鈴木哲朗、*松浦知和、**岡崎 勳、**渡辺哲、宮村達男 (*東京慈恵会医科大学、**東海大学)]

(11) Human ICAD の遺伝子発現調節機構の解析

Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) はアポトーシスを抑制的に調節する因子であり、HCV コア蛋白によって発現が誘導されることを見出しているが、ICAD の遺伝子発現機構は十分に明らかではない。human ICAD 遺伝子をクローニングし、転写調節機構を解析し、ICAD の転写調節には転写開始点の上流 nt -145 ~ -90 領域が重要であることを見出した。更に、この領域に転写因子 Myc が結合すること、c-Myc または N-Myc の強制発現により ICAD の発現が亢進し siRNA により低下することを明らかにした。

[小俣和彦、鈴木亮介、政木隆博、*佐藤田鶴子、鈴木哲朗、宮村達男 (*日本歯科大学)]

< 別 > 検査業務

第 1 室 :

行政検査

E 型肝炎確認検査 1 件、4 検体

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1 件

ウイルス第二部

第2室：

行政検査

平成17年度は6件(計29検体)の行政検査依頼があり、PCR-RFLP法あるいはELISA法による型内株鑑別試験の結果、すべてポリオウイルスワクチン株と同定された。

第3室、第4室：

行政検査：C型肝炎ウイルスの遺伝子解析検査 2件

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) 4件

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg* 74: 932-936, 2006.
- 2) Oka T, Hansman GS, Katayama K, Ogawa S, Nagata N, Miyamura T, Takeda N: Expression of sapovirus virus-like particles in mammalian cells. *Arch Virol* 151: 399-404, 2006.
- 3) Wu FT, Oka T, Katayama K, Wu HS, Donald Jiang DS, Miyamura T, Takeda N, Hansman GS: Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005. *Arch Virol* 151: 1319-1327, 2006.
- 4) Katayama K, Hansman GS, Oka T, Ogawa S, Takeda N: Investigation of norovirus replication in a human cell line. *Arch Virol* 151: 1291-1308, 2006.
- 5) Hansman GS, Takeda N, Katayama K, Tu ET, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA: Genetic diversity of Sapovirus in children, Australia. *Emerg Infect Dis* 12: 141-143, 2006.
- 6) Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 87: 909-919, 2006.
- 7) Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N: Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch Virol* 151: 551-561, 2006.
- 8) Abe K, Li TC, Ding X, Win KM, Shrestha PK, Quang VX, Ngoc TT, Taltavull TC, Smirnov AV, Uchaikin VE, Luengrojanakul P, Gu H, El-Zayadi AR, Prince AM, Kikuchi K, Masaki N, Inui A, Sata T, Takeda N: International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37: 90-95, 2006.
- 9) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Ushijima H, Miyamura T, Takeda N: Proteolytic processing of sapovirus ORF1 polyprotein. *J Virol* 79: 7283-7290, 2005.
- 10) Oka T, Katayama K, Ogawa S, Hansman GS, Kageyama T, Miyamura T, Takeda N: Cleavage activity of the sapovirus 3C-like protease in *Escherichia coli*. *Arch Virol* 150: 2539-2548, 2005.
- 11) Nakamura K, Someya Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Sato T, Takeda N, Miyamura T, Tanaka N: A norovirus protease structure provides insights into active and substrate binding site integrity. *J Virol* 79: 13685-13693, 2005.
- 12) Li TC, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y, Wang JC, Engvall H, Hammar L, Xing L, Cheng RH: Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. *J Virol* 79: 1299-3006, 2005.
- 13) Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 11: 1958-1960, 2005.
- 14) Kamata K, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kobayashi S, Sakae K, Oseto M, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Katayama K, Tanaka T, Takeda N, Taniguchi K: Expression and antigenicity of virus-like particles of norovirus and their application for detection of noroviruses in stool samples. *J Med Virol* 76: 129-136, 2005.
- 15) Hansman GS, Takeda N, Oka T, Oseto M, Hedlund KO, Katayama K: Intergenogroup recombination in sapoviruses. *Emerg Infect Dis* 11: 1916-1920, 2005.
- 16) Hansman GS, Natori K, Ushijima H, Katayama K, Takeda N: Characterization of polyclonal antibodies

ウイルス第二部

- raised against sapovirus genogroup five virus-like particles. *Arch Virol* 150: 1433-1437, 2005.
- 17) Hansman GS, Matsubara N, Oka T, Ogawa S, Natori K, Takeda N, Katayama K: Deletion analysis of the sapovirus VP1 gene for the assembly of virus-like particles. *Arch Virol* 150: 2529-2538, 2005.
- 18) Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 151: 1635-1641, 2006.
- 19) Tsugawa T, Numata-Kinoshita K, Honma S, Nakata S, Tatsumi M, Sakai Y, Natori K, Takeda N, Kobayashi S, Tsutsumi H: Virological, serological, and clinical features of an outbreak of acute gastroenteritis due to recombinant genogroup II norovirus in an infant home. *J Clin Microbiol* 44: 177-182, 2006.
- 20) Someya S, Takeda N, Miyamura T: Characterization of the norovirus 3C-like protease. *Arch Virol* 110: 91-96, 2005.
- 21) Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. *FEBS Lett* 580: 4047-50, 2006.
- 22) Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzuki Y, Sata T, Iwasaki T, Miyamura T: Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *J Gen Virol* 86: 1391-1401, 2005.
- 23) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama T, Miyamura T, Shimizu H: A Sabin 3-derived poliovirus recombinant contained a sequence homologous with indigenous human enterovirus species C in the viral polymerase coding region. *J Virol* 79: 12650-12657, 2005.
- 24) Hansman GS, Kuramitsu M, Yoshida H, Katayama K, Takeda N, Ushijima H, Surenkhand G, Gantolga D, Kuroiwa C: Viral gastroenteritis in Mongolian infants. *Emerg Infect Dis* 11: 180-182, 2005.
- 25) Huang QS, Greening G, Baker M, Grimwood K, Hewitt J, Hulston D, Webber L, Fitzsimons A, Garrett N, Graham D, Lennon D, Shimizu H, Miyamura T, Pallansch M: Persistence of oral polio vaccine virus after its removal from the immunisation schedule in New Zealand. *Lancet* 366: 394-396, 2005.
- 26) Kuramitsu M, Kuroiwa C, Yoshida H, Miyoshi M, Okurmura J, Shimizu H, Narantuya L, Bat-Ochir D: Non-polio enterovirus isolation among families in Ulaanbaatar and Tov province, Mongolia: prevalence, intrafamilial spread, and risk factors for infection. *Epidemiol Infect* 133: 1131-1142, 2005.
- 27) Yang CF, Chen HY, Jorba J, Sun HC, Yang SJ, Lee HC, Huang YC, Lin TY, Chen PJ, Shimizu H, Nishimura Y, Utama A, Pallansch M, Miyamura T, Kew O, Yang JY: Intratypic recombination among lineages of type 1 vaccine-derived poliovirus emerging during chronic infection of an immunodeficient patient. *J Virol* 79: 12623-12634, 2005.
- 28) Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai MM, Miyamura T, Moriishi K, Matsuura Y: Human VAP-B is involved in hepatitis C virus replication through interaction with NS5A and NS5B. *J Virol* 79: 13473-13482, 2005.
- 29) Ishikura Y, Kato H, Hashimoto T, Nishimura Y, Iwata H: Production and characterization of monoclonal antibodies against porcine interleukin-4. *J Vet Med Sci* 67: 503-508, 2005.
- 30) Iwai M, Nakayama T, Matsuura K, Hasegawa S, Ando S, Obara M, Nagai Y, Yoshida H, Horie H: Assessment of efficacy of a live oral poliovirus vaccine for virulent Sabin-like poliovirus 1 strains in Japan. *Acta Virol* 50: 139-143, 2006.
- 31) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, Nagai Y: Molecular epidemiology of Echovirus type 11 and 13 as determined with environmental surveillance in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* (in press).
- 32) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* (in press).
- 33) Arita M, Nagata N, Shimizu H, Sata T, Miyamura T: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by poliovirus replicon. *J Gen Virol* (in press).
- 34) Polyak SJ, Klein KC, Shoji I, Miyamura T, Lingappa JR: Assemble and interact: pleiotropic functions of the HCV core protein hepatitis C viruses. *Genomes Mol Biol* (Seng-Lai Tan ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 89-119, 2006.

ウイルス第二部

- 35) 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* 79: 1271-1281, 2005.
- 36) Ishikawa T, Fukushima Y, Shiobara Y, Kishimoto T, Tanno S, Shoji I, Suzuki T, Matsui T, Shimada Y, Ohyama T, Nagai R, Miyamura T.: Outbreak of hepatitis C virus infection in an outpatient clinic. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 1087-1093, 2005.
- 37) Suzuki T, Omata K, Satoh T, Miyasaka T, Arai C, Maeda M, Matsuno T, Miyamura T.: Quantitative detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in saliva and gingival crevicular fluid of HCV-infected patients. *J Clin Microbiol* 43: 4413-4417, 2005.
- 38) Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Tsutsumi T, Shinzawa S, Makuuchi M, Kokudo N, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Moriya K, Koike K.: Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression. *J Hepatol* 43: 757-763, 2005.
- 39) Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway JB, Prendergast GC, Komuro K, Fukazawa H.: Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 572-578, 2005.
- 40) Shimoike T, Koyama C, Murakami K, Suzuki R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T.: Down-regulation of the internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation of the hepatitis C virus: critical role of binding of the stem-loop III_d domain of IRES and the viral core protein. *Virology* 345: 434-445, 2006.
- 41) Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, Braet F.: Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J Gastroenterol* 12: 1881-1888, 2006.
- 42) Baek KH, Park HY, Kang CM, Kim SJ, Jeong SJ, Hong EK, Park JW, Sung YC, Suzuki T, Kim CM, Lee CW.: Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol* 359: 22-34, 2006.
- 43) Masaki T, Matsuura T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, Suzuki T.: All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBPβ-LIP. *Biochem J* 397: 345-353, 2006.
- 44) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T.: Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392, 2006.
- 45) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T, Tsunetsugu-Yokota Y. Induction of protective immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection using highly attenuated recombinant vaccinia virus DIs. *Virology* 351: 368-380, 2006.
- 46) Aizaki H, Choi KS, Liu M, Li YJ, Lai MM.: Polypyrimidine-tract-binding protein is a component of the HCV RNA replication complex and necessary for RNA synthesis. *J Biomed Sci* 469-480, 2006.
- 47) Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M.: Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J Biochem* 139: 921-930, 2006.

2. 和文発表

- 1) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 武田直和: ノロウイルス. *治療学* 40: 197-200, 2005.
- 2) 李 天成, 武田直和: E 型肝炎. *日本臨床* 63: 2221-2227, 2005.
- 3) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 北元憲利, 鎌田公仁夫, 榮 賢司, 大瀬戸光明, 武田直和: ノロウイルス感染症の診断. *病原微生物検出情報* 26: 334-335, 2005.
- 4) 江藤良樹, 石橋哲也, 世良暢之, 千々和勝己, 倉田賢生, 篠原裕治, 李 天成, 武田直和, 宮村達男: 野生イノシシ肉からの E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染事例. *病原微生物検出情報* 26: 265-266, 2005.
- 5) 李 天成: E 型肝炎検査法. *病原微生物検出情報* 26: 263-264, 2005.
- 6) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎ウイルス研究の現状と課題. *食品衛生研究* 55: 7-13, 2005.

ウイルス第二部

- 7) 李 天成, 武田直和, 宮村達男: E 型肝炎の新しい側面. 医薬ジャーナル 2005.
 - 8) 李 天成, 武田直和: E 型肝炎. 遺伝 59: 59-62, 2005.
 - 9) 武田直和: E 型肝炎. BioScan 4: 8, 2005.
 - 10) 武田直和: ノロウイルス. Clinical Engineering 16: 598, 2005.
 - 11) 武田直和: ウイルス性胃腸炎. 感染症マニュアル 山崎修道 (監修), 小早川隆俊 (編) スパイラル出版. 189-192, 2005.
 - 12) 白土 (堀越) 東子. 誰もが感染の危機!! ノロウイルス. 「食と健康」, 49: 53-57, 社会法人 日本食品衛生協会, 2005.
 - 13) 白土 (堀越) 東子, 李 天成, 米山徹夫, 武田直和. 食品産業従事者のためのウイルス基礎知識. 「ジャパンフードサイエンス」, 45: 28-37, 日本食品出版株式会社, 2006.
 - 14) 白土 (堀越) 東子. ノロウイルス: 感染様式と食中毒. 「遺伝別冊: 食の安全科学」, 19: 34-39, 株式会社エヌ・ティー・エス, 2006.
 - 15) 片山和彦: ノロウイルス感染症, Medical Practice 22: 863-865, 2005.
 - 16) 白土 (堀越) 東子: ノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生. 生活と環境, (財)日本環境衛生センター, 50: 8-13, 2005.
 - 17) 白土 (堀越) 東子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: ノロウイルス研究の最近の動向. 感染・炎症・免疫 35, 2005.
 - 18) 宮村達男: B型肝炎. Progress in Medicine, ライフ・サイエンス 25: 265-266, 2005.
 - 19) 高尾信一, 吉田智子, 豊嶋千俊, 吉田 弘, 清水博之. 2003~2005年シーズンに分離された EP95 にて同定困難なエンテロウイルス, 病原微生物検出情報 26: 238, 2005.
 - 20) 若月紀代子, 岩切 章, 高尾信一, 濱野雅子, 藤本嗣人, 山崎謙治, 岩井雅恵, 宗村徹也, 嶋 貴子, 篠原美千代, 渡邊香奈子, 吉田 弘, 清水博之. エンテロウイルスの遺伝子解析に関する諸問題, 病原微生物検出情報 26: 237-238, 2005.
 - 21) 清水博之: ヒトエンテロウイルスの分類と命名法. 臨床とウイルス 33: 211-219, 2005.
 - 22) 岩井雅恵, 松浦久美子, 長谷川澄代, 小原真弓, 堀元栄詞, 永井美之, 田中有易知, 吉田 弘, 清水博之: ポリオ流行予測調査感染源調査においてワクチン由来ポリオウイルスが検出された一例について. 富山県衛生研究所年報 28: 80-84, 2005.
 - 23) 清水博之: ポリオウイルス感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7, 377-381, 2005.
 - 24) 清水博之: 非ポリオエンテロウイルス感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7, 382-385, 2005.
 - 25) 清水博之, 武田直和: 急性出血性結膜炎の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7, 386-388, 2005.
 - 26) 清水博之: エンテロウイルス 71 感染症の実験室診断. 日本臨床 63, Suppl 7, 389-392, 2005.
 - 27) 清水博之, 吉田 弘, 宮村達男 (訳), 野生株ポリオウイルスの実験室封じ込めに関する WHO 世界的行動計画. ウイルス 55: 161-178, 2005.
 - 28) 清水博之, 武田直和: ポリオワクチン. 化学療法の領域 22, 45-50, 2006.
 - 29) 杉枝正明, 足立 聡, 稲吉 恵, 三輪好伸, 増田高志, 坪田皆利, 真野穂積, 岩間真人, 村上吉男, 吉田 弘, 清水博之: ポリオワクチン株ウイルスの家族内感染-静岡県. 病原微生物検出情報 27: 104, 2006.
 - 30) 永森静志, 小田裕昭, 宮崎正博, 秋山一郎, 細川正清, 千葉 寛, 相崎英樹, 村上恭子, 鈴木哲朗: 「バイオ人工肝-実用化のための基本的な条件」肝胆膵第 51 巻第 1 号 p107-120, 2005.
 - 31) 清原知子, 米山徹夫: A 型肝炎の疫学 —感染症と公衆衛生環境—. 獣疫学雑誌. 9: 57-59, 2005.
 - 32) 米山徹夫, 宮村達男: トラベラーズワクチンの現状と課題, A 型肝炎・B 型肝炎, Progress in Medicine: ライフ・サイエンス, 26: 43-48, 2006.
 - 33) 米山徹夫: 問題となるウイルスの種類と生物学的特徴. 水道の病原微生物対策 (金子光美編著), 丸善, 183-194, 2006.
- ## II. 学会発表
- ### I. 国際学会
- 1) Toshiyuki Goto, Hajime Ogura, Mitsuaki Oseto, Naomi Sakon and Etsuko T. Utagawa. Electron Microscopic Diagnosis in Japan. Microscopy Conference, DAVOS, Switzhzerland, 28 August - 2 September, 2005.
 - 2) Arita M, Zhu SL, Yoshida H, Yoneyama H, Miyamura T, Shimizu H. A type 3 poliovirus recombinant contains a sequence highly homologous with indigenous Human Enterovirus species C in viral polymerase coding region. EUROPIC 2005 XIIIth Meeting, Lunteren, Netherlands, May 23-29, 2005.
 - 3) Shimizu H, Utama A, Nishimura Y, Miyamura T.

ウイルス第二部

- Construction and characterization of chimeric polioviruses between a type 1 vaccine-derived poliovirus and species C enteroviruses. *ibid.*
- 4) Shimizu H, Surveillance, Epidemiology and Laboratory Diagnosis for Enterovirus Infections Emerging and Re-emerging Infectious Disease Symposium, Taipei, June, 2005.
 - 5) Shimizu H, Vaccine-derived polioviruses-Current understanding and the implication for laboratory diagnosis. Seminar on Eradication of Vaccine Preventable Diseases (II), Kumamoto, July, 2005.
 - 6) 宮村達男: 21世紀初頭における予防接種. 2nd International Workshop on Vaccinology: Current situation of Polio and polio vaccination in Japan, July 2, 2005.
 - 7) Shimizu H, Detection of vaccine-derived polioviruses in the Western Pacific Region 2004 - 2005 The 11th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network, Atlanta, USA, 30 August - 1 September, 2005.
 - 8) Shimizu H. Surveillance, Epidemiology and Genetic Analysis of Vaccine-derived Polioviruses, International Symposium on Emerging and Re-emerging Enteric Viral Diseases, Dec. 2005, Seoul, Korea.
 - 9) Shirakura M, Shoji I, Ichimura T, Suzuki R, Suzuki T, Fukuda K, Shimoji T, Murakami K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, and Miyamura T. Identification of E6AP as an E3 ubiquitin ligase for HCV core protein. 12th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses., Montreal, Canada, October 2-6, 2005.
 - 10) Murakami K, Ishihara Y, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Tanaka K, Kohara M, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Miyamura T and Suzuki T ; Thermoreversible gelation polymer-based three-dimensional culture system to produce HCV particles from cells harboring the genome-length viral RNA. *ibid.*
 - 11) Fukasawa M, Sato S, Osawa T, Yamakawa Y, Suzuki T, Shoji I, Suzuki R, Aizaki H, Miyamura T, and Nishijima M. Interaction of DEAD box protein 1 with hepatitis C virus core protein. *ibid.*
 - 12) Inoue Y, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Miyamura T, Suzuki T ; Possible involvement of molecular chaperones; T-complex polypeptide 1 ring complex and heat shock cognate protein 70, in the HCV RNA replication. *ibid.*
 - 13) Suzuki T, Moriishi K, Shirakura M, Shoji I, Matsuura Y, Miyamura T, and Suzuki R. Coordinated Regulation of degradation of the hepatitis C virus core protein through ubiquitylation and interaction with PA28gamma. *ibid.*
 - 14) Matsuura Y, Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Suzuki T, Koike K, Miyamura T.: Involvement of PA28gamma in the development of insulin resistance in the HCV core gene transgenic mice. *ibid.*
 - 15) Matsuura Y, Hamamoto I, Nishimura Y, Okamoto T, Aizaki H, Liu M, Mori Y, Abe T, Suzuki T, Lai M, Miyamura T.: Human VAP-B is involved in HCV replication through interaction with NS5A and NS5B. *ibid.*
 - 16) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Iwata N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Sata T, Miyamura T, Akari H.: GBV-B is a pleiotropic virus in vivo. *ibid.*
 - 17) Miyashi H, Moriya K, Shizawa S, Fujie H, Todoroki T, Tsutsumi T, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K.: Alteration in fatty acid enzyme activities induced by HCV core protein: analysis using hepG2 cells. *ibid.*
 - 18) Matsuura Y, Nakai K, Moriishi K, Lim CK, Okamoto T, Suzuki T, Nunberg J, Miyamura T.: Multimerization of HCV core protein is required for the interaction with the cytoplasmic region of E1 protein. *ibid.*
 - 19) Dagan S, Ben-Porath J, Aviel S, Stame D, Mishori E, Cohen N, Tzionas I, Zauberman A, Nagamori S, Miyamura T, Eren R.: A cell culture system for studying HCV infection and replication and for evaluating potential anti viral agents. *ibid.*
 - 20) Matsuura Y, Komada Y, Tani H, Lim CK, Suzuki K, Matsuo E, Tsuda Y, Moriishi K, Moriya K, Patel AH, Miyamura T.: Human fibroblast growth factor receptor 5 is a novel candidate entry receptor for HCV. *ibid.*
 - 21) Matsuura Y, Komada Y, Yamashita T, Suzuki K, Matsuo E, Hamamoto I, Tsuda Y, Lim CK, Moriishi K, Patel AH, Miyamura T, Tani H.: Cell tropism of pseudotype VSV bearing HCV envelope proteins expressed in different cell lines. *ibid.*
 - 22) Rapicetta M, Ruggieri a, Franco M, Gatto I, Harada T, Miyamura T, Kumar A.: Double-stranded RNA stimulation of human liver progenitor cells leads to complete inhibition of HCV replication through secreted component(s). *ibid.*

ウイルス第二部

- 23) 下池貴志: C型肝炎ウイルス, コア蛋白質による自身の翻訳抑制機構, LSJ セミナー, スタンフォード大学, カリフォルニア USA, 2005年12月.
- 24) 宇田川悦子: ウイルス性下痢症と電子顕微鏡. 江陵大学, 韓国江原道, 2005年5月26日.
2. 国内学会
- 1) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: VLP作製とE型肝炎研究. 第15回感染研シンポジウム.
- 2) 白土(堀越)東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 影山 努, 片山和彦, 宮村達男, 武田直和: ノロウイルスの最近の動向. 衛生微生物技術協議会第26回研究会, 2005年7月8日.
- 3) 宮村達男: ポリオ根絶への途. 衛生微生物技術協議会第26回研究会, 教育講演, 2005年7月8日.
- 4) 武田直和: ノロウイルスによる急性胃腸炎とわが国のE型肝炎について. 平成17年度第1回食品衛生監視委員等研修会, 宇都宮市, 2005年7月22日.
- 5) 久保田弘道, 堀越伸幸, 加瀬昌二, 宇田川悦子, 北村 清: 漁業集落排水処施設におけるノロウイルス対策について. 第18回日本沿岸域学会研究討論会, 金沢市, 2005年7月.
- 6) 高井 聡, 名取克郎, Hansman GS, 岡智一郎, 濱野國勝, 宮村達男, 武田直和, 片山和彦: ノロウイルス様中空粒子の形成に影響を与えるアミノ酸残基の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005年11月.
- 7) 李 天成, 宮村達男, 武田直和: E型肝炎ウイルス中空粒子形成に必須な領域の同定. 同上.
- 8) 李 天成, 斎藤美加, 小倉 剛, 宮村達男, 武田直和: 沖縄に生息するマングースのE型肝炎ウイルス抗体保有状況. 同上.
- 9) 本郷美那子, 李 天成, 栄 賢司, 伊藤 雅, 宮村達男, 武田直和: イノシシおよびヒト由来 Genotype 4 HEV の構造蛋白の発現及び抗原性の解析. 同上.
- 10) 岡智一郎, 山本真民, 片山和彦, Hansman GS, 小川智子, 宮村達男, 武田直和: サポウイルス ORF1 の切断点の解析. 同上.
- 11) 岡智一郎, Hansman GS, 片山和彦, 小川智子, 永田典代, 宮村達男, 武田直和: 哺乳動物細胞を用いたサポウイルス様中空粒子の発現. 同上.
- 12) 山本真民, 岡智一郎, 小川智子, 片山和彦, Hansman GS, 濱野國勝, 宮村達男, 武田直和: サポウイルスプロテアーゼの性状解析. 同上.
- 13) 宮下佳奈, 濱野國勝, Hansman GS, 片山和彦, 岡智一郎, 宮村達男, 武田直和: ノロウイルス粒子形成に必須なアミノ酸残基の同定. 同上.
- 14) 勢戸祥介, 宇田川悦子, 大瀬戸光明, 斎藤幸一, 岩崎達行: 紫外線照射によるノロウイルス・アストロウイルス不活化の検討. 同上.
- 15) Hansman GS, Shirato H, Ogawa S, Natori K, Oka T, Katayama K, Miyamura T, Takeda N: Cross-reactivity among 26 different genogroup I and genogroup II norovirus virus-like particles. 同上.
- 16) Hansman GS, Natori K, Oka T, Katayama K, Takeda N: Formation of sapovirus small virus-like particles. 同上.
- 17) 有田峰太郎, 清水博之, 永田典代, 網 康至, 須崎百合子, 佐多徹太郎, 岩崎琢也, 宮村達男: エンテロウイルス 71 温度感受性弱毒株の神経毒性および抗原性に関する研究. 同上.
- 18) 西村順裕, 有田峰太郎, 吉田 弘, 小島和暢, 清水博之, 宮村達男: ラオス AFP 症例より分離された2型ワクチン由来ポリオウイルス. 同上.
- 19) 岡本 徹, 西村順裕, 市村 徹, 鈴木哲朗, 宮村達男, 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルス NS5A と相互作用する新しい宿主因子の同定. 同上.
- 20) 浜本いつき, 岡本 徹, 相崎英樹, 西村順裕, 森嘉生, 阿部隆之, 鈴木哲朗, 宮村達男, 森石恆司, 松浦善治: C型肝炎ウイルスの複製における宿主因子 VAP-B の機能. 同上.
- 21) 村上恭子, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 相崎英樹, 田中恵子, 小原道法, 勝二郁夫, 佐多徹太郎, 宮村達男, 鈴木哲朗: 三次元肝細胞培養システムによる C型肝炎ウイルス (HCV) 粒子形成とその応用. 同上.
- 22) 下地 徹, 勝二郁夫, 梶山裕一, 松田麻未, 村上恭子, 宮村達男: HPV16E6-associated protein(E6AP)の新規結合因子の同定と機能解析. 同上.
- 23) 井上 寧, 相崎英樹, 松田麻未, 白倉雅之, 村上恭子, 勝二郁夫, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗: HCV-RNA 複製における T-complex polypeptide 1 ring complex 及び heat shock cognate protein 70 の役割. 同上.
- 24) 白倉雅之, 勝二郁夫, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 福田浩一郎, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男: C型肝炎ウイルス core 蛋白の E6AP 依存性分解. 同上.
- 25) 清原知子, 佐藤知子, 戸塚敦子, 下池貴志, 米山徹夫, 宮村達男: 日本における A型肝炎の血清疫学調査. 同上.
- 26) 岡智一郎, 片山和彦, Hansman GS, 武田直和: ノロ

ウイルス第二部

- ウイルス, サポウイルスに関する新知見. 第 17 回ウイルス性下痢症研究会, 東京, 2005 年 11 月.
- 27) 望月雅美, 大内敦夫, 川上和夫, 石田卓夫, 李 天成, 武田直和, 恒光 裕, 池田秀利: 犬と猫における E 型肝炎ウイルス疫学調査. In 第 140 回日本獣医学会学会学術集会, 鹿児島, 2005 年 9 月.
- 28) 恒光 裕, 賢 勝, 川島健司, 神山麻理子, 小野寺利幸, 庄司智太郎, 池田秀利, 宮崎綾子, 吉井雅晃, 李 天成, 武田直和: ノトパイオート豚での E 型肝炎ウイルスの実験感染. 第 140 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島, 2005 年 9 月.
- 29) 尹益哲, 小川洋介, 加藤健太郎, 遠矢幸伸, 片山和彦, 武田直和, 山下修一, 明石博臣: プタ腸管由来カリシウイルスの遺伝子検索と性状解析. 同上.
- 30) 宮崎綾子, 加藤花名子, 吉井雅晃, 天成 李, 武田直和, 恒光 裕, 池田秀利: イノシシにおける E 型肝炎ウイルス抗体保有状況. 同上.
- 31) 武田直和, 李 天成, 宮村達男: VLP 作製と E 型肝炎研究. 第 15 回感染研シンポジウム, 東京, 2005 年 5 月 23 日.
- 32) 久保田弘道, 堀越伸幸, 加瀬昌二, 宇田川悦子, 北村 清: 漁業集落排水処理施設におけるノロウイルス対策について. 第 18 回日本沿岸域学会研究討論会, 金沢, 2005 年 7 月.
- 33) 久保田弘道, 伊藤敏朗, 宇田川悦子: 漁業集落排水処理施設におけるノロウイルス対策について. 全国漁港漁場整備技術研究会, 指宿, 2005 年 10 月.
- 34) 清水博之, 宮村達男: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行. 第 79 回日本感染症学会, 名古屋, 2005 年 4 月.
- 35) 宮村達男, 清水博之: ポリオ根絶計画の進展とポリオワクチン戦略. 同上.
- 36) 吉田 弘: ポリオ根絶計画と環境ウイルスサーベイランス, 第 8 回マリンバイオテクノロジー学会, 熊本市, 2005 年 5 月.
- 37) 岩井雅恵, 松浦久美子, 永井美之, 吉田 弘: 2002 - 2003 年富山県内河川水から分離されたエコーウイルス 13 型について. 第 46 回日本臨床ウイルス学会, 福岡市, 2005 年 6 月.
- 38) 清水博之: カニクイザル感染モデルによるエンテロウイルス 71 神経病原性の解析. サルを用いた感染症研究の現状と今後, 京都, 2005 年 9 月.
- 39) 清水博之: ポリオ(小児麻痺)根絶の現状と今後. 科学技術週間 市民公開講座, 東京, 2006 年 4 月.
- 40) 吉田 弘, 田 炳均, 清水博之, 宮村達男: 中国雲南省で急性弛緩性麻痺例から分離された非ポリオエンテロウイルス. 第 47 回日本臨床ウイルス学会, 東京, 2006 年 6 月.
- 41) 吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之: ワクチン由来ポリオウイルスの分子疫学. 第 27 回衛生微生物技術協議会, シンポジウム III, 札幌, 2006 年 6 月.
- 42) 村上恭子, 石原陽介, 後藤康文, 石井孝司, 吉崎佐矢香, 相崎英樹, 田中恵子, 小原道法, 勝二郁夫, 真鍋 昇, 佐多徹太郎, 宮村達男, 鈴木哲朗: 三次元肝細胞培養システムによる C 型肝炎ウイルス産生系の樹立と組織学的解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月.
- 43) 下地 徹, 勝二郁夫, 梶山裕一, 松田麻未, 村上恭子, 宮村達男: AnnexinA1 の E6AP 依存性分解. 同上.
- 44) 勝二郁夫, 白倉雅之, 市村 徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 梶山裕一, 下地 徹, 村上恭子, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正弘, 宮村達男: C 型肝炎ウイルス core 蛋白の E6AP 依存性分解. 同上.