

2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆 字

概 要

平成18年4月1日に宮村達男前部長の後任として脇田隆字が部長に着任した。また、Grant S. Hansmanが研究員として平成18年10月1日に採用された。

ウイルス第二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定、検査である。本年は小分製品1件の検定をおこなった。また、WHO世界ポリオ根絶計画の進展に伴い、わが国では不活化ポリオワクチン導入が喫緊の課題である。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おり、その免疫原性について研究をおこなった。

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。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。平成18年末から19年にかけての大流行は記憶に新しい。ノロウイルスは食品を介する伝播のみならず、ヒト-ヒトの伝播が可能なウイルスであることが明らかとなってきた。また、新たな下痢症ウイルスであるサボウイルスの研究も進んだ。

E型肝炎ウイルスの研究が進んだ。ウイルス中空粒子を用いた感度の良い診断系の確立により、人畜共通感染症として位置づけられたE型肝炎ウイルスの野生動物における感染状況の調査が進んだ。また、感染モデルの開発が進みつつあり、その解析が期待される。

第2室は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レファレンス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続けた。ポリオウイルスの根絶計画はいよいよ最終段階だが、ナイジェリアなどの国でいまだに伝播する野生株ウイルスの解析と、ワクチン変異株の解析をおこなっている。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。さらに、ポリオウイルス根絶後の野生株実験室封じ込めに関する準備をおこなっている。また、国内エンテロレファレン

スセンターとしてレファレンス活動、依頼検査をおこなった。

第3室及び第4室ではC型肝炎ウイルスの研究をおこなった。ウイルス培養系を用いた研究が進み、ウイルスのライフサイクルの詳細な解析をおこなった。また、予防的ワクチンの開発のための基礎研究が進んだ。

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1件、B型肝炎ワクチン8件の検定をおこなった。また、A型肝炎ウイルスに関する研究が進行している。

また、平成19年3月6日から7日、感染研において「3rd Expert Working Group Meeting on Hepatitis B」を主催し、西太平洋地域におけるB型肝炎ワクチン接種について議論した。

各室で以下のような国際的技術協力をおこなった。

1. Rowena Bull (オーストラリア、ニューサウスウェールズ大学) <ニューサウスウェールズ大学フェロー> 平成18年4月1日~平成18年7月31日、ノロウイルスの分子生物学的研究
2. Nguyen Thi Thanh Thao (ベトナム、パスツール研究所) <JSPS フェロー> 平成18年12月2日~平成18年12月29日、エンテロウイルス71感染症の血清疫学および分子疫学に関する研究
3. Ong Kien Chai (マレーシア、マラヤ大学) <マラヤ大学フェロー> 平成18年9月20日~平成18年10月18日、エンテロウイルス71 マウス分離株の塩基配列解析
4. 凌 華(中国、重慶市疾病予防控センター) <笹川フェロー> 平成18年4月6日~平成19年3月31日、C群エンテロウイルスの血清型の解析
5. 李 津(北京生物製品研究所) <日中笹川医学研究者制度第28期研究者> 平成18年4月1日~平成19年3月31日、C型肝炎ウイルス粒子形成機構及びワクチン開発に関する基盤研究

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、文科省科学研究費等の援助を受けた。

片山和彦主任研究官は平成17年6月よりノロウイル

スの分子生物学の研究のため米国ベイラー大学に、鈴木亮介研究員は平成 17 年 10 月よりフラビウウイルスの感染増殖機構の研究のため米国テキサス大学ガルベトン校に、下池貴志主任研究官は平成 17 年 5 月より C 型肝炎ウイルスの翻訳開始機構を解析するため米国スタンフォード大学に出張している。

業 績

調査・研究

1. 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) 組換え粒子 (VLPs) を用いた消毒薬の評価系の構築
ノロウイルスに対する不活化剤の探索、効果検証を行うための評価法について検討する目的で、昆虫細胞で発現させたノロウイルス VLP と市販塩素系消毒剤を異なる濃度、時間で反応させた後、電子顕微鏡で VLP の形態を観察し、VLP 粒子の崩壊と粒子数の減少の程度から不活化効果の半定量的解析が可能であることが示された。本手法による評価の結果、市販の塩素系薬剤に加え、炭酸 Na などのアルカリ剤も有効であることが示唆された。

[継国孝司、久保田浩美、徳田 一、日置祐一(花王株式会社)、小川智子、岡智一郎、Hansman S. Grant、武田直和]

(2) 国内の調理従事者糞便中に検出されるノロウイルス株の分析

2005 年 11 月～2006 年 12 月の間、ノロウイルスの散発および集団発生があった 55 事例について、調理従事者(調理人、ウェイター、ウェイトレス等) 2376 名の糞便をリアルタイム PCR 法でスクリーニング検査し、449 名(19%)からノロウイルスを検出した(内訳 GI 26(5.8%)、GII 423(94.2%)。これら陽性サンプルについてさらに RT-PCR 法によって構造蛋白領域の一部を増幅し、塩基配列を解読した。その遺伝子型別を行ったところ、GI は GI/3、GI/4、GI/8 および GI/14 に、GII は GII/1、GII/2、GII/3、GII/4、GII/5、GII/6、GII/7、GII/8、GII/9、GII/10、GII/14、GII/new に分類された。調理従事者の糞便中に検出された株は GII/4 が主流(53%)であったが、GII/3 など他の多くの株も検出され、しかも同一人物で異なる株が検出される混合感染例も認められた。GII/4 株以外の遺伝子群や遺伝子型も広くヒトに感染している。ウイルス排泄量の平均値は糞便 1 グラムあたり GI が 2.79×10^7 コピー、GII が 3.81×10^8 コピーであった。なお、国内で主流の GII/4 と他の GII 株とのウイルス排泄量の違いは認められなかった。調理従事者からは症状の有無にか

かわらず、同コピー数のノロウイルス(核酸)が糞便中に検出されている事例もあり、無症状の調理従事者が感染源となりうる可能性が示唆された。

[小澤一弘(中部衛生検査センター)、Hansman S. Grant、岡智一郎、武田直和]

(3) 2006-2007 シーズンに流行したノロウイルスのゲノム解析

ノロウイルスは冬季に流行するが、2006 年は例年より早く 10 月中旬から流行した。従来報告されていたノロウイルス株との違いの有無を検討する目的で、11 の地方衛生研究所を通じて糞便検体の提供を受けた。国立感染症研究所の病原体ゲノム解析センターとの共同研究により、55 検体のノロウイルス構造タンパク質領域の遺伝子塩基配列解析を試み、そのうち 43 検体について構造タンパク質領域の塩基配列を決定した。その結果、昨年末に我が国で流行したノロウイルス GII/4 株は昨年までのものとは変化していることが明らかとなった。2006 年に日本および諸外国(香港、EU、英国)で検出された GII/4 株について比較を行うため、系統樹解析を行ったところ、分離地域が異なるにもかかわらず、これらの株がほぼ同一のクラスターに分類されることが示された。2006/07 シーズンの GII/4 は大きく 3 つのクラスターに分けられ、そのうちのひとつは昨シーズンまでは検出されていないヨーロッパ 2006b とよばれる新型のタイプであった。いずれの地研でもこの新型が主流であった。2 番目も新型でヨーロッパ 2006a とよばれるタイプであった。残りの一つは 2004/2005 年にわが国の高齢者介護施設で死亡した患者から検出されたウイルスと同じクラスターに分類された。現在ゲノム全長塩基配列の決定、解析を継続中である。

[本村和嗣、横山 勝、神田忠仁、佐藤裕徳(病原体ゲノム解析センター)、岡智一郎、Hansman S. Grant、武田直和]

(4) ノロウイルスの培養細胞への結合の解析

ノロウイルスの細胞結合因子の探索、および結合阻害物質の検索を目指し、まず培養細胞へのノロウイルス VLPs の結合を蛍光免疫染色法で検出した。ノロウイルス VLP は分化した Caco2 細胞に結合することが示された。現在、サポウイルス VLPs についても同様に結合性を検討している。

[村上耕介、松田 幹(名古屋大)、Hansman S. Grant、岡智一郎、片山和彦、武田直和]

(5) 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 Chiba407 株由来の 3C 様プロテアーゼを精製後、基質ペプチドと共に結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、基質ペプチドが、3C 様プロテアーゼの Lys108 残基側鎖及び Gln110 残基側鎖により保持されていることが明らかになった。また、3B(VPg)-3C 様プロテアーゼ前駆体の構造解析を試みたところ、結晶化には成功したものの、X 線照射で得られた情報には、3C 様プロテアーゼは含まれるが、VPg の情報はなかった。すなわち、VPg は 3B(VPg)-3C 前駆体において特定の構造を形成していなかった。

[染谷雄一、武田直和、熊坂崇(財)高輝度光科学研究センター]

(6) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼ Glu54 残基の役割

ノロウイルス 3C 様プロテアーゼの結晶構造解析により、活性中心は、変異導入解析で同定された 2 残基(His30、Cys139)に加え、Glu54 の関与が示唆された。しかし、Glu54 の Ala 変異体は顕著な活性低下を示さなかった。そこで、Glu54 に対して更なる変異導入解析を行ったところ、139 位が Cys であるとき 54 位残基はプロテオリシスに関与しないが、139 位が Ser であるときは 54 位残基側鎖の水素結合能が重要であった。この結果は、野生型酵素は Cys139 残基 SH 側鎖と His30 残基イミダゾール側鎖とイオニックな相互作用をし、パパイン様の反応機構を採るのに対し、Ser139 変異体は典型的なトリプシン様反応機構を採り、プロテオリシスには 54 位側鎖の援助が必要であると考えられる。

[染谷雄一、武田直和]

(7) ノロウイルス ORF1 ポリプロテインの開始コドンの探索

ノロウイルスゲノムの 5' 末端には VPg が共有結合しているとされる。また、eIF4E や eIF3 など翻訳開始因子との相互作用が報告されている。ゲノムの 5' 非翻訳領域は GUGA の 4 残基と短く、その直後に AUG が 3 つ繰り返され、ORF1 が翻訳される。以上より、VPg は翻訳開始に積極的な役割を担っていることが示唆される。また、3 回繰り返される AUG のうちの AUG が真の開始コドンとして機能しているかはわかっていない。そこで、CMV プロモーター支配下に 5' -GGUGAAUGAUGAUG... で mRNA 合成が開始されるようにし、レポーターとして EGFP を in-frame で融合したプラスミドを構築した。それぞれの AUG を AAG に変異させ、EGFP 発現をトランスフェクトした細胞で比較した。その結果、2 番目が 3 番目の AUG が

開始コドンとして用いられ得ることが示唆された。

[染谷雄一、武田直和]

(8) ノロウイルス 3B(VPg)の翻訳開始における役割

T7 プロモーター支配下に、5' -GUGAAUGAUGAUG... で RNA 合成が開始されるようにし、その直後に Firefly luciferase 遺伝子を置き、更に IRES を介して Renilla luciferase 遺伝子を置いたプラスミドを構築した。このプラスミドより in vitro で合成した 5' 末端の Cap 構造を持たない RNA をノロウイルス VPg を発現するプラスミドと共に細胞に導入し、それぞれの luciferase 活性を測定した。その結果、合成 RNA からの Firefly luciferase 活性は VPg が細胞内に存在することにより有意に上昇したが、Renilla luciferase の活性には変化はなかった。このことは、VPg は IRES 依存のタンパク質翻訳には影響を及ぼさないが、Cap 非依存のタンパク質翻訳に有意の影響を及ぼすことを示している。このことはノロウイルスタンパク質の翻訳が VPg に依存していることを示唆している。

[染谷雄一、下池貴志、武田直和]

(9) ノロウイルスと血液型抗原との結合：ウイルス株毎の結合パターンの違いの解析

ノロウイルス(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。そこで、NoV 16 株の VLPs を用い、Saliva-VLP binding assay、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、同じ遺伝子型に属するウイルス株は同じ結合パターンを示すことが明らかとなった。カプシド蛋白上で糖鎖結合に関与する残基が明らかにされている。これらの残基は同じ遺伝子型に属するウイルス株間で保存されていることが多く、私達の得た結果とこの事実は互いに矛盾のない結果となっている。

[白土東子、石井孝司、小川智子、脇田隆字、武田直和]

(10) ノロウイルスと血液型抗原との結合：ウイルスとの結合に重要な糖鎖構造の解析

血液型抗原はそのコア構造によってタイプ 1、2、3、4 に分類される。組織によって発現されるタイプが異なることから、ノロウイルス(NoV)の組織特異性に関与している可能性もある。そこで、H type 1-、H type 2-、H type 3-trisaccharides と NoV との結合を Carbohydrate-VLP binding assay により検討した。その結果、GI の 4 株、

GII の 4 株がいずれかの H 抗原を認識した。さらに、8 株中 6 株は、血液型抗原のタイプ毎に異なる結合強度を示し、これら糖鎖の構造の差を認識していることが明らかとなった。残り 2 株 (GI/1 株、GII/4 株) はいずれのタイプにも強く結合したが、その結合も、H-disaccharides(コア構造を持たない合成糖鎖)において失われ、前述の 6 株同様、タイプ間の糖鎖構造の差を認識していることが示唆された。以上の結果をさらに検討するため、現在、A type 1-、B type 1-、A type 2-、B type 2- pentasaccharides への結合を Biacore にて解析中である。

[白土東子、石井孝司、小川智子、脇田隆字、武田直和、伊藤浩美、亀山昭彦、成松久(産総研)]

(11) 患者糞便中ノロウイルス粒子に含まれるゲノム RNA の感染性

ヒトノロウイルスはヒト以外に感染しないことに加え、培養細胞を用いた効率の良いウイルス増殖システムが構築されておらず、ウイルスの感染性、病原性など基礎的な研究が遅れている。この障害を取り除くため、ノロウイルスの増殖がウイルスライフサイクルのどの段階で阻害されているのかを明らかにする必要がある。ノロウイルスプロトタイプ NoV GI/1 (NV68/US) が感染した患者の糞便材料から得たノロウイルス粒子から NoV ゲノム RNA を抽出して培養細胞に導入し、自己増殖能力を調べた。

細胞内で、ノロウイルス蛋白質の発現が認められた。培養上清中のノロウイルスゲノム RNA 濃度は 0 から 10^{6-8} copies/ml に上昇した。培養上清には、ウイルス様粒子が観察された。ノロウイルスのゲノム RNA には自己複製、粒子産生能力があった。ノロウイルスの培養細胞での増殖は、ウイルスの細胞への侵入からウイルスゲノムの放出までのいずれかの段階で阻害されていると考えられた。

[スサーナ・ギックス、片山和彦、タイラー・シャープ、メアリー・エステス(米国ベ일러大学)]

(12) ノロウイルス GI/3 U201 株を用いたリバーシジェネティックシステムの構築

ヒトに感染するノロウイルスの感染機構や病原性を研究するには、ウイルス遺伝子を培養細胞内部で転写し、ウイルス粒子を作出する技術、リバーシジェネティックシステムの構築が有用である。効率よく感染性ウイルス粒子を作出するため、哺乳類細胞のプロモーター-EF-1 を用いたリバーシジェネティックシステムの構築を試みた。

U201 遺伝子を導入した細胞は、ウイルスの非構造蛋白質および構造蛋白質を効率よく発現した。細胞内部には自己増殖した U201 株プラス鎖 RNA 分子、複製中間体であるマイナス鎖 RNA 分子が検出された。さらに、構造蛋白質をコードするサブゲノム RNA の合成も確認された。培養上清には遺伝子導入 48 時間後に約 10^8 copies/ml のウイルスゲノムを内包した粒子が観察された。ウイルス粒子はウイルス蛋白質 VPg を内包していた。培養上清中のウイルス粒子から抽出したゲノム RNA を培養細胞に導入したところ、ウイルス蛋白質の合成が観察された。本システムは、ヘルパーウイルスを必要とせず、完全なノロウイルスの複製を観察可能である。

[片山和彦、スサーナ・ギックス、タイラー・シャープ、メアリー・エステス(米国ベ일러大学)]

(13) 紫外線照射による Noroviruses 不活化の検討-4

昨年までは患者便材料から高度に濃縮した Noroviruses を用いて紫外線照射による不活化実験を行い Real time PCR 法で検討し不活化に最低限必要な紫外線照射量を $50\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上とした。そこで、実際に終末処理施設に実機を装備し、紫外線照射による野外実験を行い Noroviruses の不活化を試みた。I 県 Y 町の漁業集排水施設に紫外線照射装置を設置し実際の排水を使用して紫外線照射の Noroviruses 不活化効果を Real time PCR 法で検査した。流入水中の Noroviruses 遺伝子レベルは 200copies/L と低レベルであったが、紫外線照射後は全く検出されず不活化できたことを示した。今後も同地域での再現性を検討中である。

[宇田川悦子]

2. サポウイルス (SaV) に関する研究

(1) Enhancement of Sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells

We have found that inclusions of short foreign nucleotide sequences inserted directly upstream from the predicted capsid protein AUG start codon lead to increased yield of sapovirus virus-like particles. This method allowed us to express a sapovirus capsid protein, which could not have been expressed to measurable or practical levels otherwise.

[Hansman S. Grant, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

(2) Expression and Self-Assembly of Virus-Like Particles from a Full-Length Sapovirus Genome in Insect Cells

ウイルス第二部

In order to better understand sapovirus virus-like particle formation we expressed the full-length genome in insect cells. Virus-like particles (VLPs) were produced from the full-length construct and these were morphologically and antigenically similar to the VLPs that were expressed from a subgenomic-like construct. These novel findings indicated that human sapovirus VLPs can be produced from either the cleavage of the translated ORF1 polyprotein or by the translation from the subgenomic-like construct.

[Hansman S. Grant、岡智一郎、片山和彦、武田直和]

(3)リアルタイム RT-PCR 法によるサポウイルス核酸検出系の構築

サポウイルスは5つの genogroup (GI-GV)に分類され、遺伝的に極めて多様である。このうちヒトからはGI, GII, GIV, GV 株が分離されている。これらのヒト由来サポウイルス株を検出するスクリーニング系を確立することを目的として、近年我々自身が解析したサポウイルスゲノム情報と公的データベース情報から、サポウイルスゲノム中の高度保存領域 (polymerase-capsid junction 領域) を見いだした。この領域をターゲットに、ヒト由来のサポウイルスGI, GII, GIV, GV 株を1ウェルで検出可能な MGB TaqMan リアルタイム RT-PCR 系を世界に先駆けて構築した。

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

(4)サポウイルス集団発生事例の解析 (秋田)

2006年2月から3月に秋田県内の幼稚園で発生したサポウイルス集団発生事例の解析を行った。検出されたサポウイルスは Genogroup I で、ウイルス排泄量は糞便1g中 5.8×10^5 ~ 2.2×10^9 コピーであった。また、構造タンパク質コード領域の全塩基配列を決定した。昆虫細胞での Virus-like particles (VLPs)の発現にも成功し、他の genogroup、genotype に属するサポウイルスVLPsとの交差反応性を検討したところ、サポウイルスがノロウイルスと同様、genogroup 間だけでなく、genotype 間でも抗原性が異なる株が存在することを初めて見いだした。

[斉藤博之(秋田県健康環境センター)、Hansman S. Grant、岡智一郎、武田直和]

(5)サポウイルス集団発生事例の解析 (北海道)

2000年と2005年に北海道で発生したサポウイルス集団発生事例の解析を行った。2000年に検出されたサポウ

イルスは Genogroup IV で、ウイルス排泄量は糞便1g中 5.4×10^5 ~ 7.5×10^9 コピーであった。また、2005年に検出されたサポウイルスは Genogroup II で、ウイルス排泄量は糞便1g中 1.1×10^9 ~ 5.4×10^{10} コピーであった。サポウイルスの集団感染事例における糞便中排泄量はノロウイルスと同様、極めて高濃度であることが示された。[石田勢津子(北海道立衛生研究所)、Hansman S. Grant、岡智一郎、武田直和]

(6)環境水からのサポウイルスの検出

環境水中のサポウイルスの存在の有無を検討するため、河川、海水中のサポウイルス核酸の検出を試みた。その結果、日本国内の河川水においてGI、GV株のサポウイルス核酸を検出した。海水からはサポウイルス核酸は検出されなかった。本研究は環境中からサポウイルスを検出した初めての例である。

[Hansman S. Grant、岡智一郎、武田直和、植木 洋(宮城県保健環境センター)、佐野大輔(東北大)]

(7)食用貝からのサポウイルスの検出

サポウイルスの感染経路はまだまだ不明な点が多い。今回我々は、シジミからサポウイルス核酸を検出した。なお、今回解析した国内のカキからはサポウイルスは検出されなかった。

[Hansman S. Grant、岡智一郎、武田直和、岡本玲子、西田知子(山口県環境保健研究センター)、野田 衛(広島市衛生研究所、現国立医薬品食品衛生研究所)、植木洋(宮城県保健環境センター)、佐野大輔(東北大)、西尾 治・木村博一(感染症情報センター)]

(8)サポウイルスGV株の全長クローンの作製

我々はこれまでにヒト由来の異なる遺伝子群 (genogroup) の株 (GI Mc114 株、GII Mc10 株) について全長クローンを作製した。ORF1 ポリプロテインのプロセッシング産物の解析および、非構造タンパク質 (プロテアーゼ、ポリメラーゼ等) の活性の比較等を検討する目的で、新たにGV NK24 株の全長クローンを作製した。現在、これら異なる3つの genogroup 間のサポウイルス株についてプロテアーゼ活性の特異性の比較検討を行っている。

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

(9)サポウイルスプロテアーゼの切断点認識に重要な周辺アミノ酸残基の解析

ウイルス第二部

サボウウイルスのプロテアーゼによる ORF1 ポリプロテインの切断は特定のグルタミンもしくはグルタミン酸の直後でおこる。切断部位認識に重要なアミノ酸残基として、我々は各切断点上流 4 番目 (P4) に高度に保存されているアミノ酸 (F もしくは Y) を明らかにしてきた。今回、サボウウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムをより詳細に調べることを目指し、ProPol/VP1 間の切断点周辺の上流下流各 4 アミノ酸残基の重要性を再度検討し、少なくともこの切断部位においては P4 と P1 以外のアミノ酸残基は切断点認識に影響しないことを明らかにした。[山本真民、岡智一郎、小川智子、片山和彦、Hansman S. Grant、武田直和]

(10) サボウウイルスポリメラーゼ活性の検討

サボウウイルスのポリメラーゼ活性を検出する目的で、プロテアーゼポリメラーゼのうち、我々が同定した Mc10 株のプロテアーゼドメインを除いた領域をポリメラーゼ領域として大腸菌で発現させ、GI Mc114、GII Mc10、GV NK24 株について可溶性のポリメラーゼの発現、および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの活性検出に成功した。現在、各株由来のポリメラーゼについて詳細な酵素活性の比較を行っている。

[Rowena A. Bull、Peter A. White(ニューサスウェールズ大学)、岡智一郎、Hansman S. Grant、武田直和]

3. ネコカリシウイルスに関する研究

(1) ネコカリシウイルス (FCV) プロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の同定

FCV F4 株のプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸を同定するため、13 株の FCV 株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 (ノロウイルス、サボウウイルス、および RHDV) 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、FCV F4 株のゲノム全長の cDNA clone を鋳型として、12 箇所のアミノ酸 (H、E、C 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 (1763 アミノ酸) 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、FCV プロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸として、C¹¹⁹³、H¹¹¹⁰、E¹¹³¹、H¹²⁰⁸ を同定した。

[岡智一郎、山本真民、宮下佳奈、小川智子、片山 和彦、武田直和、Hansman S. Grant、高木弘隆 (バイオセーフティー管理室)、遠矢幸伸 (東大院獣医)、横山 勝、佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター)]

4. カリシウイルスに関する研究

(1) カリシウイルスプロテアーゼの構造機能解析

サボウウイルス Mc10 株、ネコカリシウイルス F4 株、ノロウイルス U201 株の全長 cDNA clone を鋳型として、カリシウイルスプロテアーゼの活性中心である GDCG モチーフ周辺で、1 次配列上も統合計算化学システム MOE による立体構造モデル上も保存されている Thr, Pro, Tyr をそれぞれ Ala 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 がコードするタンパク質を発現させ、発現産物の泳動パターンからプロテアーゼ活性への影響を検討した。その結果、ノロウイルス、サボウウイルス、ネコカリシウイルスのいずれにおいても、GDCG モチーフ周辺の Thr, Tyr の変異体ではプロテアーゼ活性が低下し、これらのアミノ酸が活性発現に重要であることが明らかとなった。

[岡智一郎、山本真民、宮下佳奈、小川智子、Hansman S. Grant、片山和彦、武田直和、高木弘隆 (バイオセーフティー管理室)、遠矢幸伸 (東大院獣医)、横山 勝、佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター)]

. 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、要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2006 年度は、エンテロウイルス単味抗血清 30 種類、パレコウイルス抗血清 4 種類、プール抗血清 EP95 (あるいは EP-2001) を 7 セット、コクサッキー A 群同定用 CF 腹水 1 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実施した。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 16 回ポリオ実験室診断技術研修会を開催した。研修期間は 2007 年 1 月 23 日 ~ 2 月 17 日、研修参加者は、スーダン、ニジェール、エチオピア、ザンビア、ケニア、ミャンマー、イエメンから各 1 名の計 7 名 (他に個別研修からの参加者 1 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・

ウイルス第二部

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 215 検体およびラオス 88 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。2005～2006 年にかけてカンボジアの AFP 症例 2 名から分離されたポリオウイルスは 3 型 VDPV と同定された。また、2006～2007 年にかけて、シンガポールおよびオーストラリアで分離された 1 型野生株ポリオウイルスは、それぞれ、ナイジェリアおよびパキスタンで伝播している地域固有の野生株ポリオウイルスであることを塩基配列解析結果から明らかにした。他のポリオウイルス分離株は、すべてワクチン株であり、西太平洋地域における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) 2006 年 5 月 29 日 - 6 月 19 日に中国 CDC (北京) で実施さ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。[有田峰太郎、清水博之]

カ) 2006 年 6 月 27 - 6 月 29 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、ポリオ根絶およびポリオ実験室診断について情報交換を行った。[清水博之]

キ) 2006 年 8 月の中国 CDC と国立感染症研究所間の研究協力に関わる覚書 (MOU) 締結に際し側面支援を行った。[吉田 弘]

ク) 2006 年 12 月より開始した VPDs プロジェクトの後方支援 (協力計画策定、研修受け入れ) を実施すると共に、2007 年 8 月 6-17 日に中国 CDC で実施したポリオ実験室診断研修会に講師として参加した。[吉田 弘]

ケ) 2007 年 1 月に開催された第 120 回 WHO 執行理事会に参加し、天然痘、マラリア、ポリオ、麻疹、鳥インフルエンザについて政府代表団への技術支援を行った。また 4 月には鳥インフルエンザリファレンスラボ

TOR 会議に出席し、政府代表団への技術支援を行った。5 月に開催された第 60 回 WHO 総会にも参加し上記感染症分野に関する技術支援をおこなうと共に情報収集に努めた。[吉田 弘]

2. 西太平洋地域の 2006 年のウイルス分離状況

2006 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 303 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。野生株ポリオウイルスは検出されなかった。2005 年 12 月～2006 年 1 月にかけて、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、2006～2007 年にかけて 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、脇田隆字]

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) カンボジアの AFP 患者から分離された 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 cVDPV を分離した。これら VDPV の病原性を、ポリオウイルスレセプター発現トランスジェニックマウスにより解析した。その結果、カンボジア VDPV は、野生株ポリオウイルスと同程度の神経毒性をもつことが明らかとなった。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 3 型 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 (WHO)、小島和暢 (WHO)、宮村達男、脇田隆字、清水博之]

(2) 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。分離ウイルスの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。他の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)]

(3) オーストラリアで分離された1型野生株ポリオウイルスの解析

オーストラリアに滞在しているパキスタン人留学生が、パキスタンに一時帰国後AFPを発症し、2007年7月、オーストラリアRRLにおいて1型野生株ポリオウイルスが分離された。オーストラリアRRLおよび感染研において塩基配列解析を行ったところ、現在パキスタンで伝播している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、ポリオ流行地からのAFP患者の渡航による野生株ポリオウイルス伝播の可能性について留意する必要がある。

[西村順裕、清水博之、脇田隆字、Bruce Thorley (VIDRL)]

(4) 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1型組換えcVDPVは強毒株であるMahoney株と同等の病原性を有しており、糞便中へのウイルス排出から、ウイルス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)]

(5) Sabin株由来不活化経粘膜ポリオワクチンの有効性評価

Sabin株由来IPVの経粘膜ワクチンへの応用の可能性について検討を行うため、TgPVR21マウスに対しSabin1株由来IPV(IP-110)を3週間隔で経鼻免疫した。免疫にはIP-110単独あるいはコレラトキシンB subunitをア

ジュバントとして加えたものを用いた。最終免疫3週後に、PV1-Mahoney株を経鼻接種し、麻痺発症率、PV特異的Ig抗体価の測定と鼻腔における局所の免疫反応について組織学的に検討した。強毒株接種後14日以内に、非免疫群では100%が弛緩性麻痺を発症し、IP-110単独免疫群は70%、アジュバント添加IP-110免疫群では10%が発症した。また、免疫群はいずれも感染後3日目の血中PV特異的Ig抗体と鼻腔分泌液中の特異的IgAの上昇がみられ、アジュバント添加群の血中IgM、IgGおよび鼻腔分泌液中IgAが有意に高かった。さらに、免疫組織学的にアジュバント添加群の鼻腔粘膜上皮においてIgG、IgA抗原強陽性の形質細胞、上皮細胞が検出された。

[永田典代、長谷川秀樹、佐多徹太郎(感染病理部)、清水博之]

(6) Sabin-IPVの抗原性に関する研究

日本ポリオ研究所が開発している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)におけるホルマリン不活化工程でのエピトープの変化について、抗原認識部位特異的モノクローナル抗体(MAb)を用いたELISA法により調べた。Sabin1ではsite1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site1の構造変化が起きたことが示唆された。Sabin2ではホルマリン不活化によって大きな抗原性変化は認められなかった。Sabin3ではいくつかのモノクローナル抗体に対する反応性がホルマリン不活化後により失われており、一部の抗原認識部位がホルマリン不活化によって変化したと考えられる。ホルマリン不活化によるSabin-IPVの抗原性変化は、Sabin-IPVの有効性を評価するD抗原価測定の改良や、Sabin-IPVの抗原性・免疫原性を他のIPVと比較する上で重要である。

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

(7) ポリオ生ワクチン接種率全国累積調査

全国から5,000人の3歳児を無作為に抽出し、居住する市区町村に麻疹、風疹、ポリオ生ワクチンを接種した月齢の調査を依頼し、回収された調査票をもとに2006年度における全国累積接種率を推計した。ポリオ生ワクチンの累積接種率は1回目の接種も2回目の接種も良好であり、調査年度ごとの差はほとんどみられなかった。将来的な不活化ポリオウイルスワクチン導入に向けて、複数の異なる調査手法によるワクチン接種率調査を継続する必要がある。

[高山直秀 (都立駒込病院)、清水博之、宮村達男]

(8) 開発途上国における環境ウイルスサーベイランス手法導入に関する研究

ポリオ野生株が根絶された地域におけるサーベイランス、集団免疫状況の Quality 調査を行うため中国 CDC と協力して環境ウイルスサーベイランス導入妥当性の研究を開始した。今年度は 8 省を対象に技術導入を図った。今後ハイリスクエリアを中心にサーベイランスを行う予定である。

[吉田弘、帖佐徹(国立国際医療センター)、岩井雅恵(富山衛研)]

4. エンテロウイルスに関する研究

1. ポリオウイルスに関する研究

(1) 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。低温凍結で長期にわたり性状が極めて安定である弱毒ポリオ株が試験のキャリブレーターとなりうるかを検討した。

[白土東子、李 天成、小川智子、小西恭子、岡 智一郎、染谷雄一、宇田川悦子、武田 直和、須崎百合子、網 康至(動物管理室)]

(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、宮村達男、脇田隆字、清水博之]

(3) 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) 標準株 (BrCr 株, genogroup A) に由来する弱毒株である S1-3 株の抗原性および免疫原性を解析した。S1-3 株をカニクイザルに静脈内接種し、EV71 分離株 (genogroup A, B1, B4, C2,

C4) に対する血清中和抗体価を測定した。その結果、S1-3 株感染で誘導されるサル血清は、試験したすべての EV71 株に対する中和活性を有していたが、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、比較的弱い中和活性を示した (A > B1 > C4 > B4 > C2)。

[有田峰太郎、永田典代、網康志、須崎百合子、岩崎琢也、佐多徹太郎、脇田隆字、清水博之]

(4) エンテロウイルス擬似粒子を用いた抗エンテロウイルス薬の探索

ポリオウイルス (PV) およびエンテロウイルス 71 (EV71) の感染増殖を阻害する化合物の探索を目的として、Sigma LOPACK¹²⁸⁰ ドラッグライブラリーを用いて、各々の擬似粒子感染によるルシフェラーゼ活性発現を指標とした阻害剤スクリーニングを行った。その結果、擬似粒子感染細胞のルシフェラーゼ活性を顕著に低下させた薬剤 3 種類および同定した薬剤の構造類似化合物中から抗 EV71 活性を有する 1 種類の薬剤を同定した。同定した薬剤のうち、1 種類は PV および EV71 の感染をともに抑制したが、3 種類は EV71 感染のみを特異的に抑制した。今後、同定した薬剤の作用およびその機序に関する解析を進める予定である。

[有田峰太郎、脇田隆字、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

エンテロウイルス 71 (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 変異株を分離およびアダプトに必要とされる変異を同定した。今回、マウスにアダプトした EV71 株にポリオウイルス Sabin 1 株の持つ弱毒化変異を導入し、変異株のマウスにおける組織特異性および弱毒化について解析を行った。その結果、ポリオウイルス Sabin 1 株の弱毒化変異により、EV71 は NOD/SCID マウスにおいても弱毒化されること、弱毒化には導入した弱毒化変異の協調的な作用が必須であることが明らかとなった。ただし、変異株の組織特異性は、ヒトおよびサルにおけるものと大きく異なることが見いだされた。

[有田峰太郎、網康志(動物管理室)、脇田隆字、清水博之]

(6) カンボジアおよびラオスで分離された C 群エンテロウイルスの解析

ポリオウイルス (PV) ワクチン由来株 (cVDPV) は、ワクチ

ン接種率の低い国において小児麻痺の流行をもたらすために問題となっている。興味深いことに cVDPV は高い頻度で C 群エンテロウイルス (HEV-C) と組換えを生じている。そのため、cVDPV と組換えを生じた HEV-C の同定を目的として、カンボジアおよびラオスの急性弛緩性麻痺症例から HEV-C を分離し、解析を行った。その結果、カンボジアとラオスでは異なる血清型の HEV-C が伝播していることが明らかとなった。また、カンボジアとラオスで共通に伝播している株についての解析を行い、ウイルス遺伝子の 2BC 付近の配列が、カンボジアおよびラオス固有の HEV-C を推定するために有用であることを見いだした。

[有田峰太郎、凌華、脇田隆字、清水博之]

(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、エンテロウイルス 71 およびコクサッキー-A16 を検出した。エンテロウイルス 71 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)、西村順裕、清水博之、宮村達男]

(8) 家族内感染による成人 EV71 脳炎の解析

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、その多くは EV71 急性脳炎症例であると考えられている。EV71 脳炎は 5 歳以下の小児に高頻度に認められ、成人における EV71 重症例の報告は、きわめてまれである。本事例においては、母親が EV71 急性脳炎を発症し、同時期に手足口病を発症した 3 人の子供からも EV71 が検出された。分離ウイルスの遺伝子解析により、家族内感染が強く示唆され、近年日本で多く分離されている subgenogroup C4 に属する EV71 による家族内感染であることが明らかとなった。

[浜口 毅 (金沢大学)、西村順裕、清水博之]

(9) 日本におけるパレコウイルス抗体保有状況の解析

ヒトパレコウイルス (HPeV) は、我が国では、HPeV1 型、3 型、4 型、6 型が分離されており、急性胃腸炎や呼吸器

症患者からの報告が比較的多いが、脳炎や髄膜炎患者からの分離も報告されている。我が国における、各 HPeV 血清型の伝播状況および特定疾患と関連性については明らかにされておらず、血清疫学解析は重要である。そのため、年齢別健康人血清を用いたマイクロ中和法により、HPeV1 ~ 6 型の抗体保有状況調査を実施している。

[町田早苗 (埼玉医大)、西村順裕、清水博之]

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-1 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。また、日本で発表されたポリオウイルスに関わる研究論文について網羅的に解析するため、検索対象資料として医学中央雑誌等のデータベースを用い、検索キーワードとして、「ポリオウイルス」等による検索を行い、施設、論文形式、論文内容等の各項目について年度ごとに集計した。電話聞き取り調査によって 22 施設中 6 施設が、アンケート調査によって回答 58 施設中 9 施設が、野生株ポリオウイルスあるいは野生株ポリオウイルスを含む可能性のある材料を保有していることが明らかとなった。アンケート回収 58 施設中 15 施設が、過去、他のルートによる保有調査を受けた経験がないと回答したことから、本調査は全体的な調査の精度向上に寄与すると考えられた。

[宮村達男、清水博之、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実施した。アンケート調査の回収率はきわめて高く、日常的に臨床検体や病原体を取扱う専門家におけるポリオウイルス実験室封じ込めに対する理解度について、精度の高い調査が可能であった。野生株ポリオウイルスを保有している可能性のある施設の割合は 20% 程度であったが、VDPV を含めると約 40%、OPV 株を含めると約 70% の施設がポリオウイルスを保有している可能性が明らかとなった。施設内の感染症部門

以外に対する調査の徹底や野生株ポリオウイルス封じ込めに必要とされるバイオセーフティ等について、今後も関連情報の提供を継続していく必要がある。

[清水博之、宮村達男、安藤秀二、杉山和良(バイオセーフティ管理室)]

6. その他

(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) ネコ CD62L cDNA のクローニング

L-selectin (CD62L) 分子のネコ相同体をコードする cDNA をクローニングした。ネコ CD62L 分子の細胞外領域には、C 型レクチンドメイン、表皮成長因子様ドメイン、Sushi ドメインが保存されていた。組換えバキュロウイルスを用いて発現した組換えネコ CD62L 分子は抗ヒト CD62L 抗体 (Leu8) にて認識されるエピトープを保持していた。

[西村順裕、下島昌幸(東大医科研)、遠矢幸伸(東大農学部)、宮沢孝幸(京大ウイルス研)]

・ 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) A 型肝炎ワクチンの接種回数と抗体価の基礎的検討

日本で認可されている A 型肝炎ワクチンの接種回数は初回免疫と、その 1 ヶ月後、6 ヶ月後の 3 回と決められている。一方、外国で使われている A 型肝炎ワクチンは初回免疫とその 6 ヶ月後の 2 回接種である。日本のワクチンが外国のワクチンと同じスケジュールによる 2 回接種で十分な抗 HAV 抗体を誘導するかどうか、ボランティアを募って検討した。この検討は 2007 年度に終了予定である。

[清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、米山徹夫、脇田隆字]

(2) 抗 HAV IgM 抗体の in-house 検出系の確立

実験室内で簡便に抗 HAV IgM 抗体を測定するため、安定供給を見込まれる市販の抗体を組み合わせる in-house ELISA を作製した。抗ヒト IgM 抗体を固相化したプレートに検体

(患者血清) を加える。感作後洗浄し不活化 HAV 抗原を加え、標識抗 HAV 抗体で検出する。抗 HAV IgM 抗体パネルを測定してカットオフ値を設定した。

[清原知子、佐藤知子]

(3) 検定試薬の変更

検定で使用する ELISA の試薬 (抗原、標識抗体) を切り替えるため、いくつかの候補品を比較した。もっとも感度が良く、特異性も高い試薬について反応条件を検討した。現在、各社のワクチン数ロットについて従来の ELISA と新しい試薬を用いた ELISA を同時に行い、結果の相関を確認している。

[清原知子、佐藤知子、戸塚敦子、米山徹夫]

(4) LAMP 法による HAV 遺伝子検出法の評価

遺伝子型の異なる実験室株を使って確立した HAV の RT-LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を WHO の HAV-NAT 国際標準品と比較して、その評価をした。その結果、HAV の RT-LAMP 法は一般的に使われている RT-PCR 法とほぼ同等の検出感度であった。今後は、臨床検体を使って LAMP 法の応用を計る予定である。

[米山徹夫、清原知子、戸塚敦子、佐藤知子、嶋崎典子(北里環境科学センター)]

(5) 無血清培地で長期増殖する細胞及び、馴化 A 型肝炎ウイルス (HAV) 株の樹立

これまでワクチン製造用細胞 GL37 は HAV の増殖を損なわず無血清培地 OptiProSFM で数代継代出来た。今回無血清培地で長期増殖する細胞株の樹立を試み、GL37 を OptiProSFM で 5 代継代後にコロニー純化法により 4 種類のクローン細胞を得た。これらの細胞は 13 代 (1 種類)、14 代 (3 種類) の長期継代まで良好な細胞増殖性と HAV 増殖能を保持することが明らかとなった。しかしながら上記で得た細胞で HAV を継代したが、増殖の良い馴化 HAV 株はまだ得られていない。

[戸塚敦子、下池貴志、田代真人(ウイルス第三部)、脇田隆字]

(6) HAV の加圧不活化の検討

病原体を幅広く不活化する新規な方法として血液製剤の安全性確保に期待される加圧法を HAV の実験室株で検討した。5% Albumin 中、300MPa 以下の加圧では全く不活化されなかったが、420MPa では株により 3log₁₀ から 5log₁₀ 不活化された。既報の加熱不活化の結果とあわせると、加熱と加圧の其々で不活化され易い株とされ難い

株があり、ウイルス安全性バリデーション試験に適切な株としては、其々の処理で不活性化され難く、細胞で良く増殖する KRM238 株が適切であると考えられた。

[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。西郷らは 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 adaptor-ligation/suppression PCR 法により見出した。そこで、肝癌患者検体からゲノム DNA を調製しサザンブロット法により組み込み様式の解析を行った。その結果、MLL4 遺伝子の中に HBV ゲノムが組み込まれた肝癌組織を見出した。

[鈴木哲朗、勝二郁夫、西郷健一(国立がんセンター東病院)、宮村達男]

(2) HBV 粒子高産生細胞系の構築

HBV の生活環研究また抗ウイルス剤探索を進める上では効率のよい HBV 産生細胞系の確立が重要である。B 型肝炎患者血清から単離した遺伝子型 A, B, C の各 HBV クローンを Huh-7 細胞へ導入して一過性の HBV 粒子産生を観察し、各クローンから導入後 10 日間以上に亘ってウイルスが産生されることを確認した。特に遺伝子型 A クローンでは従来の HBV 産生細胞株 (Hep2.2.15) に比べ数十倍以上の高産生を示すことを見出した。

[鈴木哲朗、清原知子、松田麻未、田中靖人・溝上雅史(名古屋市立大学)、脇田隆字]

3 . C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) E6AP による HCV 粒子産生の制御

コア蛋白質のコピキチン依存性分解を調節している E6AP が HCV 粒子産生に及ぼす影響について検討した。E6AP を過剰発現すると感染細胞内コアタンパクおよび HCV 粒子産生量が有意に低下し、内在性 E6AP を siRNA でノックダウンしたところ細胞内コア蛋白および上清中の HCV 粒子産生量が有意に増加した。これらの結果から E6AP によるコア蛋白質量が調節され、HCV 粒子産生を制御している可能性が示された。

[村上恭子、勝二郁夫、福田浩一郎、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2) E6AP による HCV コアのコピキチン化部位の解析

HCV core 蛋白には 7 つのリジン残基が存在する。それぞれのリジン残基一つのみを残し、他のリジン残基をアラニン残基に置換した変異体を作製し、いずれのリジン残基がコピキチン化に重要であるか解析を行っている。

[勝二郁夫、大崎一直、村上恭子、奈須純一、下地 徹]

(3) 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 aa58-71 が重要であることが分かった。さらに詳細に解析したところ aa58-66 が E6AP と結合するのに必要十分であることが分かった。この領域はすべての genotype で保存されており、実際、E6AP が他の genotype のコア蛋白質のコピキチン依存性分解を促進することが示された。

[福田浩一郎、勝二郁夫、下地 徹、村上恭子、宮村達男、水本清久(北里大学薬学部)]

(4) HCV コア蛋白質と結合する新規宿主因子 hnRNPH1, H2, F の解析

heterogeneous ribonucleoprotein H1(hnRNPH1), hnRNPH2 および hnRNP F を HCV コア蛋白質と結合する新規宿主因子として同定した。HCV コア蛋白質を 293T 細胞にて強制発現し、免疫沈降法によって細胞内でこれらの蛋白質が HCV コアと結合していることを確認した。また、バキュロウイルス発現系にて発現、精製した蛋白質を用いて免疫沈降法および GST-pull down 法により hnRNPH1, H2, F と HCV コア蛋白質が直接結合していることを示した。

[阿部克俊、勝二郁夫、村上恭子、市村徹(首都大学東京)、高橋由利絵、奈須純一、下地 徹、小池和彦(東大感染症内科)、脇田隆字]

(5) HCV コア蛋白質および hnRNPH1, F の結合部位の同定

hnRNPH1, F による HCV コア蛋白質の認識機構を明らかにするためにコア蛋白質および hnRNPH1, F の各種変異欠損体をバキュロウイルス発現系および大腸菌発現系で発現させた。これらの発現蛋白を用いて GST-pull down 法、免疫沈降法などで結合部位を解析した。hnRNPH1, F との結合にはコア蛋白質 1-43aa および 58-111aa の領域が重要であることがわかった。また、core 蛋白質との結合部位は hnRNPH1, F の N 末側 RNA recognition motif (RRM) が関与していることが示された。

[阿部克俊、勝二郁夫、村上恭子、高橋由利絵、高宮智史、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(6) HCV コア蛋白質および hnRNPH1, F の結合に対する RNA の影響

hnRNPH1, F による HCV コア蛋白質の結合部位はそれぞれの RNA 結合領域を含んでいる。このことから、HCV コア蛋白質と hnRNPH1, F の結合に RNA が影響する可能性が考えられた。His タグ融合 hnRNPH1, F に RNaseA または yeast t-RNA を加えた後、GST 融合 HCV コア蛋白質を加え、GST-puII down 法により検討したところ、RNaseA 処理を行った場合には hnRNPF, H1 と HCV コア蛋白質の結合が増強され、yeast tRNA を加えた場合には両者の結合が减弱した。以上より、hnRNPH1, F と HCV コア蛋白質の結合は蛋白質間の直接結合で、両者の結合に RNA が抑制的に作用する可能性が示された。

[阿部克俊、勝二郁夫、村上恭子、高橋由利絵、高宮智史、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(7) HCV コア蛋白質および hnRNPH1, F の結合を阻害する RNA の配列特異性の検討

hnRNPH1, F と HCV コア蛋白質の結合に RNA が抑制的に作用している可能性が示唆された。hnRNPH1, F に結合する RNA motif については既に報告がある。同様の配列が HCV コア蛋白質の結合部位である HCV-IRES (internal ribosomal entry site) 内 IIIId 領域に存在している。また、HCV IRES IIIId 領域に結合する宿主因子として我々は hnRNPH1 を同定しており、hnRNPH1, F と HCV コア蛋白質の結合が HCV-RNA により強く阻害される可能性が考えられた。現在、HCV-IRES 領域の RNA および IIIId 領域を欠損した RNA を作製し、hnRNPH1, F とコア蛋白質との結合に及ぼす影響を検討している。

[村上恭子、阿部克俊、勝二郁夫、高橋由利絵、高宮智史、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(8) hnRNPH1, F の HCV 複製に及ぼす影響の解析

hnRNPH1, F が HCV 複製効率に及ぼす影響について HCV JFH-1 感染系を用いて検討した。pCAG-FLAG-hnRNPH1, F を感染細胞に導入した。24-48 時間後の培養上清中の HCV ウイルス産生量を測定した。その結果、hnRNPF を発現させた場合、コントロールと比較して培養上清中の HCV 粒子量が有意に減少していた。一方、hnRNPH1 を発現させた場合にはコントロールと比較してやや上清中の HCV 粒子量は増加していたものの有意差はみられなかった。現在 HCV 粒子複製のどの段階に hnRNPH1, F が影響を及ぼし

ているか解析している。

[村上恭子、阿部克俊、勝二郁夫、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(9) HCV コア蛋白質および hnRNPH1, H2, F の細胞内局在の検討

hnRNPH1, H2, F は HCV コア蛋白質との細胞内局在について検討した。FLAG-core と HA-hnRNPH1, H2, F を Huh7 細胞内で強制発現させ、タグの抗体で染色し細胞内局在を検討した。その結果、hnRNPH1, H2 は核および核周囲に強く局在し、HCV コア蛋白質とは核周囲で共局在していた。一方、hnRNPF は単独で発現させた場合、細胞質内と核内の両方に局在しているが、コア蛋白質と共発現させた場合には細胞質内の hnRNPF の染色は弱くなり、核内に強く局在した。HCV JFH-1 感染細胞を用いた実験でも同様の結果が得られた。

[村上恭子、勝二郁夫、阿部克俊、高橋由利絵、高宮智史、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(10) HCV コア蛋白質および hnRNPH1, H2, F の安定性および細胞内分画の検討

hnRNPF の細胞内局在が HCV コア蛋白質の有無により変化した。この原因として細胞質内の hnRNPF の分解および核内への輸送促進の両方の可能性が考えられた。そこで、細胞をプロテアソーム阻害剤で 4-8 時間処理したのち、細胞質、膜成分、核、細胞骨格に分画し、各分画に含まれる hnRNPF および core 蛋白質の安定性について検討した。その結果、hnRNPF を単独で発現させた場合、プロテアソーム阻害剤処理を行うと細胞骨格分画中の hnRNPF が安定化するが、HCV コア蛋白質と共発現した場合安定性の変化はほとんどみられなかった。現在、詳細な機構について解析している。

[村上恭子、勝二郁夫、阿部克俊、小池和彦(東大感染症内科) 脇田隆字]

(11) 血球系細胞への HCV JFH-1 株感染性の検討

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、特に血球系細胞への感染および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 JFH-1 の感染の可能性を検討した。Huh7 細胞で産生した HCV JFH-1 感染性粒子を Raji 細胞等様々な血球系株化細胞に加え、0-8 日間培養後、細胞内 HCV コア蛋白質量を定量した。その結果、コントロールとして用いた Huh7 細胞では細胞内 HCV コア蛋白質が有意に増加し、感染および HCV 複製が確認できたのに対し、血球系株化細胞で

はいずれの細胞株でも HCV コア蛋白質の増加はみられなかった。

[村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(1 2) HCV JFH-1RNA を維持した血球系細胞樹立の検討

HCV JFH-1 の感染実験により、血球系株化細胞では HCV JFH-1 の感染に必要な receptor の発現または HCV 複製が不十分である可能性が示された。後者の可能性を検討するため、GFP とネオマイシン耐性遺伝子をレポーターとしてもつ subgenomic replicon RNA を導入し、G418 選択と GFP 蛍光の両方で replicon 維持細胞が樹立できるか否か検討を行った。Huh7 細胞では day3 から 50% 程度の細胞で GFP の蛍光が観察され、G418 耐性の細胞がえられたのに対して、血球系株化細胞では day3 で 1% 以下の細胞にごく弱い GFP 蛍光がみられたものの、G418 耐性細胞は得られなかった。

[村上恭子、勝二郁夫、石井孝司、脇田隆字]

(1 3) 血球系細胞での HCV JFH-1RNA 複製の検討

HCV JFH-1 株の subgenomic replicon RNA を各種血球系株化細胞に導入し、day0-day3 の Firefly Luciferase (F-Luci) 活性を測定し、HCV-RNA の複製効率について検討した。その結果、Huh7 細胞では day1-3 で F-Luci 活性が day0 と比較し 100-1000 倍まで増加するのに対して、血球系株化細胞ではいずれの細胞も増加が観察されなかった。これらの結果より、血球系細胞では HCV RNA 複製できないことが示唆された。

[村上恭子、勝二郁夫、脇田隆字]

(1 4) 血球系細胞での HCV JFH-1 翻訳活性の検討

血球系株化細胞で HCV RNA が複製しない原因を解析した。HCV IRES 依存的翻訳効率が不十分である、または HCV polyprotein の processing に問題のある可能性が考えられたため、前者の可能性を検討するため、F-Luci をレポーターとして持つ HCV JFH-1 株の subgenomic replicon RNA および internal control として cap を付加した Renilla Luciferase (R-Luci) を各種血球系株化細胞に導入後、4hr 後に細胞を回収し、F-Luci および R-Luci の活性を測定した。その結果、Bjab 細胞では Huh7 細胞とほぼ同様の HCV IRES 活性を示した。現在、他の血球株化細胞および EMCV IRES の活性検討を行っている。

[村上恭子、木村敬郎、勝二郁夫、脇田隆字]

(1 5) 血球系細胞での HCV JFH-1 polyprotein processing の検討

血球系株化細胞では HCV RNA は複製しないこと、また HCV IRES 依存的翻訳反応は起こっていることが示された。HCV RNA が複製しない原因として HCV の polyprotein の processing に問題のある可能性が考えられる。そこで、T7 プロモーター下流に Firefly Luciferase (F-Luci) をレポーターとして持つ HCV JFH-1 株の subgenomic replicon 配列を持つ plasmid を細胞に導入後、T7 polymerase を発現するワクシニアウイルスを感染させ、24 時間後に細胞を回収し、HCV NS3 および NS5A が processing させているかについて検討を行った。その結果、Bjab 細胞では NS3 および NS5A が Huh7 細胞と同様に正常に processing されていた。現在、他の細胞株についても同様の実験を行っている。

[村上恭子、木村敬郎、勝二郁夫、石井孝司、脇田隆字]

(1 6) HCV コア蛋白質の切断部位の検討

HCV コア蛋白質の切断部位については C 末側に宿主の signal peptidase および signal peptide peptidase によって二カ所切断されることが既に報告されているが、新規プロセシングの可能性を検討した。HCV コア蛋白質のアミノ酸配列中に既知の protease 切断 motif がないか検索したところ、アルブミン成熟過程で重要な酵素である furin の切断 motif が 5 カ所存在した。大腸菌で発現精製した GST-HCV core に furin を加えたところ、core 蛋白が切断された。現在、切断部位の同定、HCV 複製および感染過程への影響を解析している。

[村上恭子、勝二郁夫、脇田隆字]

(1 7) HCV 粒子形成に関する新規宿主因子の検索

HCV Con-1 株のダイシストロニック HCV RNA を維持した Huh7 細胞を温度感受性ゲルで三次元培養すると HCV 粒子が産生されることから、細胞の三次元化によって発現が変化する宿主因子が HCV 粒子形成に関与していることが考えられる。そこで、二次元培養および三次元培養した細胞をプロテオーム解析し、培養形態によって発現の異なる宿主因子を比較検討した。その結果、脂肪酸結合蛋白質 (FABP) などいくつかの蛋白の発現が三次元培養細胞で有意に増加していることがわかった。現在、これらの蛋白質が HCV 複製および粒子産生効率に及ぼす影響について検討を行っている。

[村上恭子、吉崎佐矢香、松田麻未、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字]

(1 8) 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、感染時に 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。また、IFN- γ 100IU/ml を培地に添加して同様の実験をおこなったところ、HCV-RNA の増加はみられなかった。

[村上恭子、井上寧、Su-Su Hmwe、小俣和彦、石井孝司、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗、宮村達男]

(1 9) HCV RNA レプリコン活性に関与する宿主因子の検索

近年、培養細胞における HCV RNA 複製系として報告されているダイシストロニック RNA レプリコンはヒト肝癌由来細胞 Huh7 以外での複製は報告されていない。我々はレプリコン活性に差があるいくつかの Huh7 細胞サブクローンを分離した。これらのサブクローン間における遺伝子発現レベルをマイクロアレイ法により比較検討した。その結果、約 8500 の遺伝子のうち、0.4%にあたる 36 の遺伝子で発現に有意差がみられた。

[井上 寧、村上恭子、Su-Su Hmwe、相崎英樹、勝二郁夫、鈴木哲朗]

(2 0) HCV NS3 ヘリカーゼと結合する宿主因子の探索と機能解析

HCV NS3 ヘリカーゼは RNA ヘリカーゼ活性を有し、HCV 複製に重要な役割を果たしている。しかし、その活性制御機構については不明な点が多い。そこで、HCV NS3 ヘリカーゼに結合する宿主因子を分離し、質量分析法で同定した。HCV NS3 ヘリカーゼ結合因子として新規結合因子を 8 つ同定した。現在、複製に及ぼす影響を解析中である。[浜本いつき、多屋馨子、岡部信彦(感染症情報センター)、勝二郁夫、村上恭子、鈴木哲朗]

(2 1) TAP 法による HCV 蛋白結合因子の同定と解析

Tandem affinity purification 法により HCV 蛋白と結合する因子を分離、精製し、質量分析法により同定を行っている。同定された因子について、HCV 蛋白の細胞内での機能、および宿主因子の HCV 複製調節機構を中心に解析を進めている。

[勝二郁夫、市村 徹(首都大学東京)、村上恭子、木村孝郎、大崎一直、高宮智史]

(2 2) HCV 感染感受性に関わる宿主因子の解析

HCV 感染感受性に関わる因子を調べるために、JFH-1 由来感染性 HCV に対して感染許容性の低い Huh7 細胞の単一クローニングを試み、得られたクローンの HCV 複製、感染性および細胞表面の HCV 受容体候補分子の発現を調べた。どの要素も細胞クローンによって異なっており、なかでも HCV 受容体候補分子 CD81 が細胞表面に発現していないクローンは感染許容性を示さないことが明らかとなった。

[赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆字]

(2 3) HCV 感染感受性の高い細胞株の樹立

感染性 HCV 粒子を効率よく産生する細胞を作製するために、Huh7 細胞から得られた単一細胞クローンのうち HCV 複製能の高いクローンを選出した。このクローンは細胞表面に HCV 受容体候補分子である CD81 を発現しておらず、HCV に対する感染感受性を示さなかった。そこで、CD81 をこの細胞クローンに導入し細胞表面に発現させたところ、高い HCV 複製能は保ったまま感染感受性を獲得した細胞が得られた。この細胞は HCV に感染させると持続的に感染し、培養上清中に感染性粒子を分泌することが確認された。

[赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、脇田隆字]

(2 4) ヒト肝由来培養細胞における感染性 HCV 粒子作製の検討

JFH-1 株由来の感染性 HCV 粒子は、現在のところ培養細胞では Huh7 由来に限られている。他の培養細胞での作製を試み、HCV 粒子の特徴に細胞間相違があるか否かを調べている。HepG2 および IMY-N9 細胞に JFH-1 全長レプリコン RNA を導入し、レプリコン細胞を得た。HepG2 および IMY-N9 由来のレプリコン細胞の培養上清は naïve Huh7 細胞に対して感染性を示し、これらの細胞においても感染性 HCV が作製できることが明らかとなった。現在、その性状解析を行っている。

[赤澤大輔、伊達朋子、森川賢一、村山麻子、加賀美奈子、尾見法昭、高橋 仁、白倉雅之、中村紀子・望月英典(東レ医薬研)、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 5) HCV 粒子の脂質解析

エンベロープウイルスでは粒子形成また感染過程に脂質が重要な役割を果たす例が報告されている。しかし、HCV 粒子に含まれる脂質成分については解析が進んでお

らず、その生理学的役割も不明である。Huh7 細胞で産生させた HCV 粒子を、培養上清から限外濾過法、シヨ糖密度勾配超遠心法、親和性クロマトグラフィ法により粗精製し、HCV 粒子に含まれる脂質を生化学的に解析したところ、コレステロール (Chol) / リン脂質モル比が細胞の膜分画に比べ有意に高値を示した。HCV 粒子形成過程において Chol がウイルスエンベロープとアソシエイトし粒子表面に濃縮されることが考えられる。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、齋藤恭子・深澤征義・花田賢太郎(細胞化学部)、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 6) HCV 粒子の脂質の感染における役割

前述のように、感染性 HCV 粒子では Chol が濃縮されていることがわかったので、次にこのウイルス粒子の膜脂質の役割を解析した。HCV 粒子表面から Chol を除去したところ、感染性が顕著に低下し、Chol を添加したところ感染性が回復した。またスフィンゴミエリン(SM)分解酵素で HCV 粒子を処理すると感染性が減弱した。これらのことは HCV genotype 1 のエンベロープを持つシュウドウイルスでも確認できた。以上から、ウイルス粒子表面の Chol と SM が感染に重要な役割を果たしていることが示された。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、谷英樹・松浦善治(大阪大微研)、齋藤恭子・深澤征義・花田賢太郎(細胞化学部)、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 7) 脂質の HCV 粒子形成における役割

Chol と SM は脂質ラフトの主要構成成分であり、脂質ラフトは細胞内シグナル伝達などを担っている。また、多くのウイルスにおいて粒子形成や感染に重要な役割を果たしていることが報告されている。HCV 感染細胞では、脂質ラフトの特徴である界面活性剤不溶性の膜分画にコア、E1、E2 蛋白が存在した。HCV 構造蛋白の強制発現系から、E1、E2 の膜貫通部位が、脂質ラフトとの結合に重要であることが示唆された。以上から、粒子形成に脂質ラフト構造が関与する可能性が示唆された。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 8) 脂質の HCV 感染初期過程における役割

HCV 粒子膜に含まれる Chol と SM が感染のどのステップに関与するのかを解析した。あらかじめ Chol 除去または SM 分解酵素処理を行った HCV 粒子の宿主細胞との接着性は未処理ウイルスと同等であった。一方、接着したウ

イルスの細胞内への取り込みを調べた Internalization assay ではこれらの前処理を施したウイルスでは細胞内レベルの顕著な低下が認められた。この結果、ウイルス粒子の膜の Chol や SM は標的細胞の硫酸多糖への結合後、レセプター分子とともに細胞内へ侵入する過程に関与することが示唆された。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(2 9) HCV 感染における細胞表面脂質の役割

一般的に、フラビウイルスでは標的細胞の膜の Chol や SM がウイルスの融合におけるエンベロープ蛋白と細胞の膜蛋白の結合に重要なことが知られているが、HCV の融合過程における細胞膜脂質の役割についての報告はない。そこで、HCV 感染における標的細胞の表面の脂質の役割を調べた。あらかじめ細胞表面から Chol や SM を除去しておき HCV を感染させるとその感染性は低下した。HCV と細胞膜との融合過程における脂質の役割を明らかにしていく。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 0) HCV 粒子の成熟化のメカニズム解析

HCV エンベロープは小胞体滞留シグナルを持つことなどから、HCV 粒子形成は ER で行われているものと推定されてきた。一方、我々は脂質ラフトが HCV 粒子形成に重要な役割を果たしていることを考えており、脂質ラフトがゴルジ以降にしか存在しないことと矛盾している。そこで、HCV 粒子の成熟化のメカニズム解析を目的に、精製 HCV 粒子に含まれる宿主蛋白、脂質の解析を行っている。さらに、感染細胞の各膜分画に存在する HCV 粒子の性状と感染性の解析を行っている。また、細胞内蛋白輸送系を阻害する薬剤やそれに関与する蛋白 Rab の発現をコントロールし、感染性ウイルス粒子産生のメカニズムを解析している。

[相崎英樹、原 弘道、森川賢一、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 1) JFH-1 株の効率よい RNA 複製に重要な領域の解析

遺伝子型 2a に属する HCV 株のうち、培養細胞で効率よく複製する JFH-1 株と、培養細胞では複製が見られない J6CF 株の間でキメラ RNA を作製し、ルシフェラーゼをレポーターとしたサブゲノミックレプリコンを用いて RNA 複製能を比較した。その結果、JFH-1 株の NS5B から 3 X

にかけての領域が JFH-1 株の複製に必須であり、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域は効率よい複製に重要であることが明らかとなった。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 2) JFH-1 株配列の挿入による J6CF 株の複製能獲得の解析

培養細胞での複製が見られない J6CF 株の NS3 ヘリカーゼ領域と NS5B から 3' X 領域を JFH-1 株と交換したキメラを作製し、複製能を獲得できるか検討した。サブゲノミックレプリコンを用いたルシフェラーゼアッセイでは、複製能が JFH-1 株と同レベルまで回復していた。次に、全長のキメラ遺伝子を作製し解析したところ、全長キメラ遺伝子は自律的に複製し、その培養上清に含まれるウイルス粒子は感染性を示した。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 3) JFH-1 株の複製および感染性粒子形成に重要な領域の解析

JFH-1 株の複製に重要である領域を、培養細胞では複製できない J6CF 株と置換したキメラウイルスを作製した。NS5B-3' X 領域を置換した場合、複製能を完全に失った。NS3 ヘリカーゼ領域を置換した場合は JFH-1 株と比べて複製能が低くなったが、JFH-1 株と同程度のコア蛋白の分泌が観察された。しかし、感染性は 100 分の 1 以下であった。以上より、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域は、複製だけでなく、感染性のウイルス粒子形成にも重要であることが明らかとなった。

[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 4) HCV 粒子形成に関わる NS5A 領域の解析

HCV NS5A の C 末端は遺伝子型間で相同性が低く、同部位への GFP などの挿入は HCV の複製に大きな影響を与えないことが知られている。この手法は生細胞におけるウイルス複製の視覚化を可能とするが、一方で 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。さらに、リン酸化の可能性が考えられる NS5A C 末端領域のセリンクラスターを変異させたところ、RNA 複製は変化せず HCV コア蛋白の分泌が低下した。NS5A C 末端のセリン残基が HCV の粒子形成過程に重要な役割を担うことが示唆された。

[政木隆博、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 5) HCV コア蛋白との結合に重要な NS5A C 末端領域の解析

HCV NS5A 蛋白は複製複合体の構成蛋白であるだけでなく RNA 結合蛋白でもあるため、RNA の複製からコア蛋白へのパッケージング過程において重要なメディエーターになることが推測される。そこで、NS5A とコア蛋白の相互作用を免疫沈降法で解析したところ、HCV の粒子形成を抑制する NS5A C 末端領域の変異が NS5A とコア蛋白の結合を減弱させることが分かった。この知見は HCV 粒子形成過程の解明に有用な情報を与えるものと期待される。

[政木隆博、鈴木亮介、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(3 6) Pol I プロモーター/ターミネーター系を用いて作製した感染性 HCV の解析

HCV 全長の cDNA を RNA polymerase I (pol I) プロモーター/ターミネーター間に挿入したプラスミドをヒト肝臓由来細胞に導入することにより、HCV RNA が複製しウイルス粒子が産生されることを見出している。5' 及び 3' RACE 法により、転写された HCV RNA の末端配列には変異が存在しないことが示された。また、産生された粒子中の全長 HCV RNA を解析し、通常の RNA 導入系に比べウイルスゲノム変異率が低いことを確認した。

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

(3 7) 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

レプリコンを持つ Huh-7 細胞に HCV の構造蛋白領域を発現するプラスミドを導入し、このプラスミドが保持する薬剤耐性遺伝子を用いて構造蛋白を恒常的に発現する細胞株を選択した。培養上清を蔗糖密度勾配で分画したところ、構造蛋白、HCV レプリコン RNA は同一の画分に存在し、この画分の HCV 蛋白と RNA はヘパリンカラムに結合し、0.5M NaCl で溶出された。このことから、HCV 構造蛋白と replicon RNA は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。本構造体が感染性粒子である場合には感染した細胞にはレプリコンが導入されると考えられるため、本画分を Huh-7 に感染させネオマイシン含有培地で培養し、コロニー形成能を検討している。

[李 津、石井孝司、張 斌、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(38) HCV 1b 型構造蛋白を持つキメラウイルスの作製
遺伝子型 1b の構造領域を 1b 型に置き換えた JFH-1 株キ
メラウイルス遺伝子を構築した。この遺伝子を導入した
Huh-7 細胞からは、感染性ウイルスが産生され培養上清
中に放出された。さらにウイルス感染細胞の継代培養を
続けた結果、ウイルス産生レベルは 2a 型 HCV (J6/JFH-1)
と同程度まで上昇した。そこで、培養上清中のウイルス
の遺伝子解析を行ったところ適応変異が認められた。
[白倉雅之、尾見法昭、赤澤大輔、高橋 仁、中村紀子・
望月英典(東レ医薬研)、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(39) 遺伝子型 2b/2a 間での全長キメラ遺伝子の複製
の解析

遺伝子型 2b に属する MA 株の構造蛋白領域と、遺伝子
型 2a に属する JFH-1 株の非構造領域を持ったキメラ遺
伝子を作製し、複製能、ウイルス分泌能、感染性を解析し
た。その結果、このキメラ遺伝子は一過性に自律的に複
製し、培養上清中にキメラ感染性ウイルス粒子を分泌で
きるようになった。しかし、感染価は JFH-1 株
と比較すると、非常に低い値であった。
[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、
鈴木哲朗、脇田隆字]

(40) 遺伝子型 2b/2a 間でのキメラウイルスの長期培
養の解析

遺伝子型 2b に属する MA 株の構造領域と、遺伝子型 2a
に属する JFH-1 株の非構造領域を持ったキメラ遺伝子を
培養細胞に導入し、長期培養によりウイルスの産生量、
感染性にどのような変化が生じるかを観察した。ウイルス
の分泌は RNA 導入後 1 週間程続いた後、徐々に低下し、3
週間後にはほとんど検出できなくなったが、継代を続け
た結果、急激に増加した。培養上清の感染性も、RNA 導
入 72 時間後の培養上清と比べて大幅に上昇していた。現
在ウイルスゲノムのシーケンスを解析中である。
[村山麻子、伊達朋子、赤澤大輔、森川賢一、石井孝司、
鈴木哲朗、脇田隆字]

(41) HCV 遺伝子型に特徴的な RNA 複製メカニズムの
解析

genotype 1b の HCV では、脂質ラフトが存在する生体
膜上で複製複合体を作製し、ウイルス RNA の複製が行わ
れていることを既に見出している。しかしながら、脂質
ラフトを阻害する SM 合成阻害剤で genotype 1b の HCV
replicon 細胞を処理すると複製効率が低下したものの、
genotype 2a (JFH-1 株) replicon では RNA 複製の低下

は認められなかった。遺伝子型に特徴的な HCV RNA 複製
メカニズムが存在するのか、genotype 1b と 2a を比較し
ながら解析を進めている。

[相崎英樹、原 弘道、浜本いつき(感染症情報センター)、
斎藤恭子・深澤征義・花田賢太郎(細胞化学部)、宮村達
男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(42) HCV NIHJ1 株を用いた RNA レプリコンの作製

NIHJ1 株は、輸血後肝炎発症の原因となった供血者検
体から単離された HCV 分子クローンであり、その供血者
血清はチンパンジーにも感染性を有することが示されて
いる。NIHJ1 株の複製細胞系を構築するため、サブジェ
ノミックレプリコンの作製を試みた。持続的な HCV RNA
複製を認め、 $10^4 \sim 10^7$ copies/ug total RNA の HCV RNA
を保持する種々の Huh-7 細胞クローンを得た。最も HCV
RNA レベルの高い細胞株では、HCV NS5A 及び NS5B 領域に
アミノ酸変異を伴う多数の変異が観察された。

[Su-Su Hmwe、鈴木哲朗、相崎英樹、脇田隆字、宮村達男]

(43) HCV 粒子形成におけるコア蛋白塩基性アミノ酸
クラスターの役割

試験管内ヌクレオキャプシド産生系などから、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た。各
塩基性アミノ酸クラスターを変異させた JFH-1 全長遺
伝子を作製し Huh-7 細胞へ導入してウイルス発現を調べた
ところ、aa 39-44 または 59-72 領域の塩基性アミノ酸を
アラニンへ置換することにより粒子産生能が消失するこ
とが明らかとなった。

[松田麻未、坂本真一郎、鈴木亮介、松浦善治(大阪大微
研)、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字]

(44) HCV 複製複合体含有膜画分を用いたプロテオーム
解析による HCV 複製調節因子の検索

HCV RNA 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。複製複
合体画分で顕著に増加していた蛋白を選択し、それらの
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
等で 50%以下まで複製低下が観察された。これらの蛋白
について HCV 複製における役割を解析中である。

[相崎英樹、松田麻未、原 弘道、井上 寧、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(4 5) 分子シャペロン TRiC による HCV RNA 複製調節機構

HCV replicon 細胞における高複製期と低複製期の比較プロテオーム解析から、HCV ゲノム複製機構に関する宿主蛋白として、分子シャペロン TRiC の subunit である CCT5 を同定した。免疫沈降法により、CCT5 は NS5B 蛋白の AA 71-591 領域を介して結合することを見出した。TRiC は 8 サブユニット (CCT1~8) から構成されるが、全サブユニットの強制発現により HCV 複製は亢進し、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。TRiC は NS5B のフォールディング介助などに働くことによって HCV 複製調節に関与する可能性が考えられる。

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

(4 6) creatine kinase B による HCV 複製調節機構の解析

比較プロテオーム解析により HCV 複製複合体を構成する宿主因子として creatine kinase B (CKB) を同定した。CKB は細胞内の ATP 輸送に働き、ATP/ADP 濃度を一定に保つ役割を担っている。HCV 複製細胞において、CKB 遺伝子のノックダウン、dominant negative CKB の強制発現あるいは CKB 阻害剤 cyclocreatine 処理により HCV RNA 複製の有意な抑制が観察された。CKB は HCV RNA 複製調節に関与する可能性が示された。

[原 弘道、相崎英樹、松田麻未、井上 寧、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(4 7) creatine kinase B と HCV 非構造蛋白との相互作用

CKB は主に細胞質に存在するが HCV 複製複合体 (RC) 分画からも検出される。そこで、RC を構成する HCV 非構造蛋白が CKB と相互作用するかどうかを検討した。エピトープタグを付加した NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B をそれぞれ発現させた細胞を用いて免疫沈降 / ウェスタンブロット解析を行った結果、CKB は NS4A 蛋白と相互作用する可能性が示された。

[原 弘道、相崎英樹、松田麻未、井上 寧、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(4 8) HCV RNA 複製に関与する Huh-7 細胞因子の探索
Huh-7 細胞のサブクローン群には HCV RNA 複製効率のよいクローン (HuhTe6、HuhTe7) とそうでないクローン (HuhTe3、HuhTe4) が存在する。HuhTe6 と HuhTe4 について比較トランスクリプトーム解析を行い、2 クローン間で 2 倍以上発現レベルに差のある遺伝子を 36 種類同定した。HCV 複製調節に関与しうる候補因子として thioredoxin-interacting protein、Rab6B、sorting nexin、UDP-galactose:ceramide glycosyl transferase などが見出された。

[井上寧、村上恭子、Su-Su Hmwe、相崎英樹、宮村達男、鈴木哲朗]

(4 9) ユビキチン非依存的な HCV コア蛋白分解機構

コア蛋白のユビキチン化に必要なリジン残基をアルギニンへ置換した変異体を用いた解析から、コア蛋白の半減期は E6AP によるユビキチン化依存的分解経路とともにユビキチン非依存的な分解機構によっても調節される可能性を示してきた。今回、Huh-7 細胞におけるプロテアソーム活性化因子 PA28 のノックダウン、強制発現実験から全長コア蛋白のユビキチン非依存的蛋白分解に PA28 が重要な役割を果たすことが示された。

[鈴木亮介、福田浩一郎、森石恆司・松浦喜治(大阪大微研)、石井孝司、白倉雅之、村上恭子、勝二郁夫、鈴木哲朗、脇田隆字]

(5 0) HCV エンベロープ蛋白と糖鎖の相互作用の解析

HCV 感染の初期過程において細胞表面の多糖類とウイルスとの結合が重要であることが知られているが、エンベロープ蛋白と各糖鎖との相互作用についてはほとんど明らかになっていない。E1、E2 がどの糖鎖を認識するかを調べるため、Flag タグを付加した E1、E2 をそれぞれ発現する細胞株を取得した。得られた細胞株を大量培養し、E1、E2 のアフィニティ精製を行っている。糖鎖アレイ等を利用して精製エンベロープ蛋白質と糖鎖との相互作用を解析する予定である。

[松田麻未、石井孝司、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字]

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

我々はこれまでにコア、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)。しかしながら、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はウイルス蛋白の発現レベルが低く病態解析が困難であった。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の作製を試みた。現在、マウス組織における HCV 蛋白の発現を解析中である。

[相崎英樹、小池和彦(東京大)、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(5 2) HCV 感染に伴う経時的な遺伝子発現の解析

JFH1 HCV を感染させ細胞内の遺伝子発現の経時的な変化をマイクロアレイで解析したところ、CD19、IL11 遺伝子発現に大きな変化が認められた。これらの遺伝子が HCV 感染に与える影響を調べるため、siRNA で発現を抑制した細胞で感染効率の変化を解析中である。

[相崎英樹、各務伸一(愛知医大)、脇田隆字]

(5 3) 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

ヒト B 細胞由来 Bjab 細胞のコア蛋白発現系を用いて、コア蛋白発現に伴う 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。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り、また CD48 プロモーター部分欠損変異体を使った解析により、コア蛋白による CD48 遺伝子発現調節には転写開始点の上流 -871 ~ -591 領域が重要であることが示された。

[町田早苗、鈴木亮介、村上恭子、小俣和彦、石井孝司、勝二郁夫、宮村達男、鈴木哲朗]

(5 4) 培養細胞で作製した感染性 HCV 粒子のワクチン開発への応用：HCV RNA 複製及びウイルス粒子形成効率の検討

HCV RNA 複製やウイルス粒子形成効率に関して、実験に使用するウイルスゲノム構築および培養細胞を検討した。また、培養上清からウイルス粒子を効率よく精製するために血清濃度等の培養条件を検討した。この検討により現時点での高効率にウイルス粒子を産生するウイルスゲノム、培養細胞株、培養条件を確立することが出来た。

[森川賢一、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、脇田隆字]

(5 5) 培養細胞で作製した感染性 HCV 粒子のワクチン開発への応用：感染性 HCV 粒子の精製法の検討

培養細胞上清中に分泌されるウイルス粒子より夾雑物

を除去し精製度を高める為、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、分子篩クロマトグラフィー、しょ糖密度勾配超遠心等の方法を用いて、ウイルス粒子精製法を検討した。精製法の確立により、感染性 HCV 粒子を含んだ培養上清より約 2000 ~ 9000 倍の精製度を有したウイルス粒子の精製標品を得た。

[森川賢一、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、脇田隆字]

(5 6) 培養細胞で作製した感染性 HCV 粒子のワクチン開発への応用：ウイルス粒子の性状解析

電子顕微鏡、SDS-PAGE、Western-blotting 法、蛋白質量解析、脂質解析を行い、ウイルス粒子の性状を物理学的、生化学的に解析した。HCV 粒子は粒子単独ではなく、培養液中の添加物や培養細胞より分泌される蛋白質や脂質等の様々な物質と共存している可能性が示された。

[森川賢一、伊達朋子、赤澤大輔、村山麻子、松田麻未、鈴木哲朗、田中恵子・佐多徹太郎(感染病理部)、深澤征義(細胞化学部)、脇田隆字]

(5 7) HCV J6/JFH1 株によるワクチン開発：抗体誘導能の検討

HCV J6/JFH1 株ゲノム RNA を Huh-7 細胞に導入して産生した HCV を培養上清より精製した。抗体誘導能を検討するため、初回は精製ウイルスを FCA と懸濁したもの、2 週後に同量の HCV を FIA と懸濁したものをそれぞれ 6 週齢雌・BALB/c マウスに腹腔内投与した。免疫マウスの血清と HCV E1、E2 ペプチドとの反応性を EIA で解析した結果、精製 HCV 粒子をマウスに免疫することにより HCV 表面タンパク質に対する抗体が誘導されることが明らかとなった。

[尾見法昭、森川賢一、赤澤大輔、高橋 仁、白倉雅之、中村紀子・望月英典(東レ医薬研)、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字]

(5 8) HCV J6/JFH1 株によるワクチン開発：感染阻害能の検討

Huh-7 細胞にて産生した HCV JJ6/JFH1 株を免疫したマウス血清が HCV 感染阻害能を有するかを検討した。20 倍に希釈した同血清は、HCV J6/JFH1 株の Huh-7 細胞への感染評価系において特異的な感染抑制効果を示した。HCV 粒子の投与により惹起された免疫は、HCV の感染を阻害しうることが示唆された。HCV 粒子のワクチンとして開発の可能性を追求していくため、さらなる検討を行う予定である。

[尾見法昭、森川賢一、赤澤大輔、高橋 仁、白倉雅之、中村紀子・望月英典(東レ医薬研)、鈴木哲朗、石井孝司、脇田隆字]

(59) エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の作製

効率のよいウイルス精製法を樹立するため、J6/JFH-1 遺伝子の E2 HVR1 領域に FLAG タグ配列を挿入した組換え HCV 粒子の作製を試みた。この J6/JFH-1 (3×FLAG) RNA を Huh7 細胞へ導入したところ、培養上清中の HCV コア産生量は一旦減少したが、導入後 22 日目以降上昇する傾向が認められた。コア産生量が増加した細胞中の組換えウイルスのゲノム配列を解析したところ、E2 領域の糖鎖結合部位の一つであるアスパラギンがリジンに置換されていることが示された。

[高橋 仁、尾見法昭、赤澤大輔、白倉雅之、中村紀子・望月英典(東レ医薬研)、鈴木哲朗、脇田隆字]

(60) エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の精製

エピトープタグが付加された組換え HCV 粒子を産生する J6/JFH-1 (3×FLAG) RNA 導入後の培養上清からウイルス精製を試みた。Protein G Sepharose に抗 FLAG 抗体 (M2) を結合させ、培養上清と共に混合し、洗浄後、3×FLAG peptide を用いて担体に結合しているウイルスの溶出を行った。その結果、最大で約 13% のウイルスが回収された。精製したウイルス溶液の純度検定を行うために、精製サンプルおよび未精製の培養上清の SDS-PAGE を行い、銀染色を行ったところ、精製ウイルス検体ではほとんど夾雑蛋白は検出されなかった。

[高橋 仁、尾見法昭、赤澤大輔、白倉雅之、中村紀子・望月英典(東レ医薬研)、鈴木哲朗、脇田隆字]

(61) HCV 持続産生細胞株を用いた糖鎖修飾阻害剤の評価

ゼオシン耐性遺伝子を持つ PoI I 発現ベクターを Huh7 細胞または Huh7.5.1 細胞へ導入し、HCV 粒子持続産生細胞株を樹立した。この細胞株を用いて糖鎖修飾阻害剤の抗 HCV 効果を検討したところ、グルコシダーゼ阻害剤である n-nonyl-deoxynojirimycin は感染性 HCV 粒子の産生を低下させたのに対し、マンノシダーゼ阻害剤である Kifunensine は用量依存的に上昇させた。以上より、エンペロープ蛋白の糖鎖修飾が HCV 粒子の形成や感染性に重要であることが示唆された。

[政木隆博、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(62) HCV 持続産生細胞株を用いた p7 阻害剤の評価
アマンタジン、リマンタジンはインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス作用を有することが知られているが、HCV に対しては p7 蛋白のイオンチャンネル活性の抑制を介した抗ウイルス作用が期待されている。アマンタジン、リマンタジンの抗 HCV 効果を HCV 持続産生細胞株を用いて検討したところ、リマンタジンではウイルス産生を用量依存的に低下させることが明らかとなった。

[政木隆博、鈴木亮介、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(63) 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 粒子産生系で天然由来化合物の抗 HCV 効果を評価した。海綿由来新規化合物 EUDST-H が、高濃度 (100・M) であるが顕著な HCV RNA 複製効果を示しウイルス粒子産生も有意に阻害することを見出した。

[鈴木哲朗、村上恭子、Su-Su Hmwe、勝二郁夫、小林淳一(北海道大学)、宮村達男、脇田隆字]

(64) C 型肝炎治療薬リバビリンに対する耐性 HCV の解析

遺伝子型 2a (JFH-1) の HCV レプリコン細胞にリバビリンを数ヶ月間処理することにより、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。この耐性細胞中のレプリコン RNA では HCV 非構造蛋白領域にアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が 4 カ所認められた。これらの変異がリバビリン耐性に関与するかを明らかにするため、各変異を導入したレプリコンを作製し、リバビリンによる複製阻害効果を検討した。NS5B 領域 N 末端側に存在するアミノ酸変異が HCV JFH-1 株のリバビリン耐性獲得に寄与する可能性が示された。

[Su-Su Hmwe、村上恭子、小池和彦(東京大学)、宮村達男、鈴木哲朗、脇田隆字]

(65) HCV RNA ステムループ構造を標的とした抗 HCV ペプチドの探索と創薬化

学芸大の原田らによって確立された、立体構造を持つ RNA に結合するペプチドを効率よくスクリーニングする方法を用いて、HCV の RNA に結合するペプチドのスクリーニングを行った。HCV の 3 端に存在するステムループ構造に強く結合するペプチドが 3 種類見出され、これらの配列にはコンセンサスが存在した。これらと類縁のペプチド群からなるライブラリーを設計しより結合活性の

高いペプチドを探索するとともに、HCV 感染細胞系や HCV レプリコン保持細胞を用いてペプチドの HCV 増殖抑制効果の検討を行っている。

[鎌田麻利江、石井孝司、原田和雄(東京学芸大)、石橋正也(進化創薬)、鈴木哲朗、脇田隆字]

(66) HCV コア抗原パネルの作製及びコア抗原検出試薬の評価

遺伝子型 1a, 1b, 2a, 2b, 3a の各 HCV クローン由来コア蛋白を FLAG タグとの融合蛋白として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 HCV コア抗原パネルを作製した。このパネルを用いてコア抗原検出試薬の評価を行ったところ、蛍光酵素抗体法の診断薬で遺伝子型 2a (JFH-1) のコア抗原の検出感度が他のコア抗原に比べ顕著に低いことが見出された。診断薬作製に使われたペプチド抗体の抗原配列と各 HCV クローンのアミノ酸配列を比較し検出感度の差異の原因となりうるペプチド抗体を推定した。

[鈴木亮介、Saeed Mohsan、相崎英樹、水落利明(血液・安全性研究部)、鈴木哲朗、脇田隆字]

(67) 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。肝炎等克服緊急対策研究事業の一環として、研究班で診療ガイドライン「エビデンスに基づく一般歯科診療における院内感染対策」を作成した。関連する病原微生物 (HBV、HCV、ヒト免疫不全ウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、麻疹ウイルス、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、コアグラゼ陰性ブドウ球菌、結核菌、梅毒トレポネーマ) についての概説を担当した。関連情報を収集し概説作成を行った。

[鈴木哲朗、奈須純一、佐藤田鶴子(日本歯科大)]

(68) HCV IRES による PKR の自己リン酸化の誘導

HCV IRES は PKR の活性化を誘導した。活性化に重要な領域を同定した。In vitro 翻訳系で HCV IRES により PKR は活性化され cap 依存的翻訳は抑制されたが、HCV IRES 依存的翻訳は抑制されなかった。これは HCV 感染により PKR が活性化され宿主の翻訳が抑制されるが、HCV 自身の翻訳は抑制されず、HCV 感染による PKR の活性化は HCV の増殖に有利に働くことを示唆する。

[下池貴志、Mckenna, SA., Lindhout, DA., Puglisi, JD.(スタンフォード大学)]

4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

(1) 遺伝子 1 型 (Genotype 1, G1), G3 及び G4 ウイルス様粒子 (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製中である。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

(2) E 型肝炎ウイルス様粒子 (HEV VLP) 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 E 型肝炎ウイルス (HEV) 遺伝子型 1 (Genotype 1, G1), G3 および G4 ウイルス様粒子 (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 HEV 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 の大きな粒子の作製を検討している。

[李 天成、恒光 裕(動衛研)、武田直和、宮村達男]

(4) E型肝炎ウイルス遺伝子型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。定法どおり組換えバキュロウイルスを作製し、ウイルス様粒子 (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 (HEV) 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あった。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 (HEV) 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 E 型肝炎ウイルス (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) シジミからの E 型肝炎ウイルス (HEV) 遺伝子の検出
ブタ、イノシシなどの動物は HEV のリザーバーであることが明らかになっている。HEV の汚染が野生動物から自然環境へ拡散しているか否かを検証する目的で、河川や湖などに生息しているシジミからの HEV RNA 検出を試みた。2005 年 12 月から 2006 年 3 月まで日本西部地域にある A, B, C, D, E, F, G および H の計八ヶ所の河、湖から採れた市販のヤマトシジミを入手した。中腸線を出発材料として RNA を抽出し、RT-PCR 法で HEV RNA の増幅を行い、増幅産物を直接塩基配列解析、あるいはクローニング後塩基配列解析を行った。シジミ二検体から HEV RNA が検出された。塩基配列を解析した結果、シジミから分離した HEV RNA の配列は日本で分離した株の配列ともっとも類似していた。また、陽性シジミの収穫時期はイノシシの猟期の後半であるので、イノシシなど野生動物の排泄物による汚染、あるいは猟期に捕獲されたイノシシなど野生動物の解体処理などが感染源と考えられた。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(9) 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 (HEV) 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。HEV 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)]

(10) キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルス(HEV)の複製

HEV が増幅できる培養系はいまだ樹立されておらず、サル以外の実験動物モデル確立されていない。したがって、HEV の増殖、感染のメカニズムはいまだに解明されていないといつてよい。本研究では人肝臓細胞に置換されたキメラマウス(遺伝子型: uPA^{+/+}/SCID)の HEV に対する感受性を検討した。キメラマウスに遺伝子型 1 および 4 の HEV を眼窩静脈叢経路で接種した。経時的に採血、採便を行い ELISA 法、RT-PCR を用いキメラマウスの血液、糞便中からウイルス抗原およびウイルス RNA を検出した。その結果、ウイルス抗原およびウイルス RNA の両方が検出され、キメラマウスの体内で HEV が持続感染していることが確認された。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(11) 培養細胞における E 型肝炎ウイルス(HEV)の増殖

HEV は増殖のための確実な細胞培養系が未だに樹立されていないウイルスである。細胞培養系はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明にはどうしても欠かせない手法である。我々は遺伝子型の異なる複数の HEV 株をそれぞれ PLC/PRF/5, A549, GL37 などの細胞に接種し、経時的に培養上清中の HEV RNA, HEV 抗原を RT-PCR, ELISA 法にて測定し、HEV の増殖できる細胞、あるいはこれらの細胞で増殖できるウイルス株を検索した。現在、PLC/PRF/5 に感染したウイルス株の性状を解析している。

[李 天成、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(12) HEV genotype3 全長 cDNA の構築

ブタ糞便より Genotype 3 の HEV 遺伝子を RT-PCR 法により増幅し、全長 cDNA を T7 promoter の下流に挿入したプラスミドを構築した。T7 polymerase を用いて HEV RNA を合成し、種々の肝臓由来培養細胞に導入して長期間培養を行ったところ、培養開始後 60 日後でも 10^6 copies/ml 程度の HEV RNA が培養上清から検出され、クローニングした HEV が感染性を有する可能性が示唆された。

[石井孝司、吉崎佐矢香、李 天成、武田直和、鈴木哲朗、脇田隆字]

(13) リアルタイム RT-PCR 法を用いた HEV RNA 定量系の構築

TaqMan RT-PCR 法を用いて HEV RNA 量を定量する系の構築を試みた。ORF2 領域を増幅するプライマーを用い、

テンプレートには上記のプラスミドから合成した RNA を使用した。その結果、検出限界 45.5 copies/ μ l 以上で定量可能な測定系を構築できた。

[吉崎佐矢香、石井孝司、李 天成、武田直和、鈴木哲朗、脇田隆字]

(14) HEV 非構造蛋白のプロセシングの解析

HEV には 3 つの ORF が存在し、ORF1 はウイルスの非構造蛋白をコードしている。前駆体蛋白から個々のウイルス蛋白がどのようにプロセスされるか解析を行うため、ORF1 の全長領域および C 末側を欠損させた変異体を発現するプラスミド、および同領域を増幅した PCR 産物をテンプレートとし、in vitro translation 法により発現を試みた。全長蛋白の発現とプロセスされたと思われる蛋白が確認された。現在、発現の経時的变化、プロテアーゼの活性中心に変異を導入し不活性化にした ORF1 の発現を解析中である。

[吉崎佐矢香、石井孝司、李 天成、武田直和、鈴木哲朗、脇田隆字]

5. GB ウイルス (GBV) に関する研究

(1) GBV-B 慢性感染モデルの確立

チンパンジーに代わる霊長類サロゲートモデルの開発を主題とし、HCV に最も近縁な GBV-B を用いて新世界ザルへの感染実験を進めている。HCV 感染における長期に渡る感染経過を考慮すると、GBV-B 感染においてもウイルスが排除されず潜伏感染経過を辿る可能性は否定できないため、GBV-B 急性感染期を経たタマリン個体について長期経過観察を行い、上記可能性について検討した。GBV-B 接種サル 9 頭中 7 頭において血中ウイルス RNA が検出された。これらの個体では、血中ウイルス RNA は低レベル (10^{2-3} GE/ml) ながら複数回観察され、また抗ウイルス抗体価も有意なレベルを 2 年以上維持していた。これらの結果より、GBV-B は HCV と同様に急性期以降も検出限界以下のウイルスレベルで長期潜伏感染し、何らかの原因でウイルスの再活性化が誘導されることが明らかとなった。

[石井孝司、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、脇田隆字、飯島沙幸・木村展之・明里宏文(霊長類センター)、森 健一・榎 昇(先端生命科学研)]

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因子 E6AP の新規標的蛋白の検索

HPV16E6 蛋白と結合する宿主因子 E6AP はユビキチンリガーゼ活性を有し、p53, hDgl, hScribなどをユビキチン化し、分解する。E6AP は単独でもユビキチンリガーゼ活性を有しており、細胞内蛋白の安定性調節に関与している。新規 E6AP 結合蛋白として PRDX1 を同定した。現在、E6AP による PRDX1 の機能の調節機構について解析を進めている。

[奈須純一、勝二郁夫、村上恭子、鈴木哲朗、佐藤多鶴子（日本歯科大学）]

(2) E6AP による annexin A1 の機能調節

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。E6AP は annexin A1 を Ca²⁺依存性に結合、およびユビキチン化することを明らかにした。E6AP の強制発現により annexin A1 タンパク量は著明に減少し、内在性 E6AP の siRNA による knock-down で annexin A1 タンパク量が増加することから、細胞内の annexin A1 の安定性は E6AP により制御されていることが明らかとなった。[下地徹、村上恭子、勝二郁夫、松田麻未]

・ 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

これまでに我々は、高度弱毒化ワクチニアウイルス株 DIs に SARS コロナウイルス (SARS-CoV) の構造蛋白を組み込んだ組換えウイルスを作製し、小動物に接種して免疫誘導能の確認を行ってきた。今回は田口らによって確立された Pasteurella と SARS-CoV の共感染により惹起されるマウス重症肺炎 (SARS) モデルを用いて、肺炎発症を阻止できるかどうかを検討した。S 蛋白を発現する組換え DIs を接種された群は全例が生存したのに対し、コントロール接種群では 5 日で約 80% が死亡した。また、体重減少でも組換え DIs 接種群には明らかなワクチン効果が認められた。本組換え DIs には SARS 発症を抑制する効果があることが示され、この組換えウイルスはワクチンとして有効であることが証明された。

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

・ 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-2

昨年に引き続き、厚生労働科学研究の一環として「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」(小倉肇分担研究班)を全国の 31 衛生研究所を対象として実際のウイルス試料を配布して精度管理を行なった。本年度は、インフルエンザウイルス、ワクチニアウイルス、SARS コロナウイルス、ヘルペスウイルス、陰性の 5 種類を使用した。各サンプルは一部大阪公衛研から分与を受け、電子顕微鏡観察用標準品としてパラフォルムアルデヒドで不活化を行い、ブラインド番号を付けて各地方衛生研究所へ送付した。各衛研では、この 5 種類のサンプルを電子顕微鏡で観察し報告する。昨年同様、研究班は結果を集計して各地方衛生研究所の評価を行なった。結果は、ワクチニアウイルス、SARS コロナウイルスの検出率が 50% と低かった。今まで観察したことが無かった経験不足が明らかとなった。

[宇田川悦子、小倉 肇(岡山県環境保健センター所長)]

(2) 超遠心器を使用した電顕観察用ウイルスサンプル作成法の検討

昨年に引き続き、日立ハイテッ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た。Airfuge に使用するアダプターと同じ傾斜角で電顕用グリッドを保持できるように設計したアダプター試作品 2 号は、高速遠心 (100,000 x g、15 分間) 中試作品 1 号と同様にグリッドがアダプターから離れて浮遊することがわかり、現在その弱点をカバーする改良試作品を検討中である。

[宇田川悦子、森田正隆(日立ハイテックノロジーズ)]

(3) 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-EMV)

前回に引き続き、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)】に対しホルマリン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下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 5 検体中 5 検体の結果が一致した。この検体中一検体はウイルス粒子が存在せず、確認したところ他の研究所でも同じであった。多分輸送中等の何らかのアクシデントによりウイルス粒子が破壊されたものと考えられる。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、Bannert N (Robert Koch-Institut)]

(4) 組換えバキュロウイルス感染によって誘導される

ノダウイルスの解析

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。このノダウイルスを Tn5 cell line virus と命名した。さらに組換えバキュロウイルスの感染により誘導されたウイルス粒子は感染性を有することを明らかにした。

[李 天成、武田直和、宮村達男]

(5) 豚サーコウイルス 2 型 (Porcine Circovirus type 2、PCV2) と E 型肝炎ウイルス (HEV) のキメラウイルス粒子の作製

離乳後多臓器発育不良症候群 (PMWS) は、衰弱、呼吸困難、リンパ節腫脹、下痢、黄疸など様々な臨床症状を呈し発育不良となる豚の消耗性症候群である。その主な病原因子の一つとして PCV2 の関与が指摘されている。PCV2 は、日本国内に広く浸潤しており、PMWS 防止対策として PCV2 ワクチンの開発が重要であると考えられる。PCV2 の ORF2 を HEV-ORF 2 の N 末端に挿入し、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて、PCV2-ORF2 と HEV-ORF 2 の融合蛋白を大量に発現し、キメラウイルス粒子作製が進行中である。

[李 天成、劉 蘭軍、恒光 裕 (動物衛生研究所)、宮村達男、脇田隆字、武田直和]

(6) バキュロウイルスを用いたブタサーコウイルス 2 型 (Porcine Circovirus type 2、PCV2) 組換え粒子の産生とその応用

日本で分離した PCV2 山形株を用い、構造蛋白領域をコードする ORF2 の全長を組換えバキュロウイルスで発現した。発現産物を塩化セシウムあるいはショ糖密度勾配遠心法で精製し、ウェスタンブロット法、ELISA 法、電子顕微鏡等で抗原性、産生量、ウイルス粒子形成等を解析した。PCV2 構造蛋白を昆虫細胞 Tn5 で発現した場合、予想される 28 kDa の蛋白が産生され、顕微鏡で直接観察したところ、直径約 20 nm のウイルス様粒子 (VLPs) が大量に産生されていた。この VLPs を抗原として抗体検出 ELISA を開発し血清疫学調査をおこなった。出荷豚の IgG 抗体保有率は 100%、野生イノシシのそれは 50% であり、PCV2 は飼育豚のみならず野生イノシシにも広く浸潤していることが明らかになった。

[李 天成、劉 蘭軍、恒光 裕 (動物衛生研究所)、宮

村達男、脇田隆字、武田直和]

(7) 温度感応性高分子 TGP を用いた三次元培養ヒト肝癌細胞における細胞接着因子の発現解析

Huh7 細胞は TGP を用いた三次元培養において、スフェロイドを形成しながら増殖し、微小胆管様構造や細胞間結合を再構築することが確認されている。そこで、極性の再構築された TGP 培養系において細胞接着因子の発現が変化するか、単層培養系と比較することによって検討を行った。接着結合を構成する E-cadherin は単層培養に比べ、遺伝子発現及び蛋白発現が亢進していることが明らかとなった。現在、種々の細胞接着因子の発現、細胞局在の解析を行っている。

[吉崎佐矢香、村上恭子、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(8) TGP 三次元培養ヒト肝癌細胞における脂肪酸の取り込み能の解析

プロテオーム解析により、TGP 三次元培養ヒト肝癌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 の発現上昇が見られた。そこで細胞内への脂肪酸取り込みに影響があるか、Huh7 細胞を用いて検討した。標識パルミチン酸の取り込みの経時的变化を測定したところ、7 日間 TGP 培養を行った細胞では総蛋白量あたりの脂肪酸の取り込み能は単層培養に比べ有意な亢進が見られた。

[吉崎佐矢香、深澤征義 (細胞化学部)、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(9) 足場付加型 TGP によるカニクイザル初代培養肝細胞の培養

TGP 三次元培養ヒト肝癌細胞は単層培養に比べて肝機能を示すことが示唆されているが、肝細胞の機能解析や肝臓モデルの構築としては、癌化していない、より正常に近い肝細胞の方が望ましい。多くの正常細胞が足場依存性の増殖を示すことから、細胞接着因子を付加した TGP を用いてカニクイザル初代培養肝細胞の三次元培養を試みた。細胞接着因子としてコラーゲンペプチドを用い、含量、付加方法、基材を変えて培養を行った。単層培養では増殖は見られたが、TGP では増殖が見られなかった。現在、培養条件を詳細検討中である。

[吉崎佐矢香、石井孝司、鈴木哲朗、脇田隆字]

(10) Human ICAD の遺伝子発現調節機構の解析

HCV コア蛋白によってアポトーシス抑制因子 Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) の発現が誘導されることを見出している。human ICAD の転写調節

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、この領域に転写因子 Myc が結合すること、Myc-DNA 結合に重要な E box 配列を変異させると転写活性が低下することが示された。さらに、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から、human ICAD の発現調節には Myc が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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

< 別 > 検査業務

第 1 室 :

行政検査

E 型肝炎確認検査 1 件、1 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 18 年度は 1 件(計 2 検体)の行政検査依頼があり、PCR-RFLP 法あるいは中和法による型内株鑑別試験の結果、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 : B 型肝炎ウイルスの遺伝子解析検査 1 件

依頼試験 : C 型肝炎体外診断薬 1 件

B 型肝炎体外診断薬 1 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 1 件

組換え沈降 B 型肝炎ワクチン(酵母由来) 3 件

組換え沈降 B 型肝炎ワクチン(huGK-14 細胞由来) 5 件

行政検査

A 型肝炎血清検査 1 件、20 検体

発表業績一覽

誌上発表

1. 欧文発表

1) Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, and Rouillé Y: Hepatitis C virus entry depends on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol* 80: 6964-6972, 2006.

- 2) Kanda T, Basu A, Steele R, Wakita T, Ryerse JS, Ray R, Ray RB: Generation of infectious hepatitis C virus in immortalized human hepatocytes. *J Virol* 80: 4633-4639, 2006.
- 3) Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, and Shimotohno K: Characterization of the replication sensitivity to cyclosporin A among strains of hepatitis C virus. *J Virol* 80: 4510-4520, 2006.
- 4) Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, White PA, and Takeda N: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med. Virol* 78: 1347-1353, 2006.
- 5) Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T. and Takeda N: Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J Gen Virol* 87: 3329-3338, 2006.
- 6) Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, and Tsunemitsu H: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec* 159: 853-854, 2006.
- 7) Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, and Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am J Trop Med Hyg* 75:1171-1177, 2006.
- 8) Obara Y, Nagai H, Yoshida H, and 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.
- 9) Iwai M, Yoshida H, Matsuura K, Fujimoto T, Shimizu H, Takizawa T, and Nagai Y: Molecular epidemiology of Echovirus type 11 and 13 as determined with environmental surveillance in Toyama Prefecture, 2002-2003. *Appl Environ Microbiol* 72: 6381-6387, 2006.
- 10) Sugieda M, Adachi S, Inayoshi M, Masuda T, Tsubota M, Mano H, Iwama M, Murakami Y, Yoshida H, and Shimizu H: Intrafamilial transmission of a Sabin 1-related poliovirus in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 59: 277-278, 2006.

ウイルス第二部

- 11) Arita M, Nagata N, Sata T, Miyamura T, and Shimizu H: Quantitative analysis of poliomyelitis-like paralysis in mice induced by a poliovirus replicon. *J Gen Virol* 87: 3317-3327, 2006.
- 12) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J* 25: 5015-5025, 2006.
- 13) Omatsu T, Nishimura Y, Bak EJ, Ishii Y, Tohya Y, Kyuwa S, Akashi H, and Yoshikawa Y: Molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the bat CD4. *Vet Immunol Immunopathol* 111: 309-313, 2006.
- 14) Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, Iwahori T, Suzuki T, and Braet F: Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. *World J Gastroenterol* 12: 1881-1888, 2006.
- 15) Baek K-H, Park H-Y, Kang C-M, Kim S-J, Jeong S-J, Hong E-K, Park J-W, Sung Y-C, Suzuki T, Kim C-M, and Lee C-W: Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol* 359: 22-34, 2006.
- 16) Fukasawa M, Tanaka Y, Sato S, Ono Y, Nitahara-Kasahara Y, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, and Nishijima M: Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *Biol Pharm Bull* 29: 1958-1961, 2006.
- 17) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y: Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol* 581: 593-596, 2006.
- 18) Suzuki T and Suzuki R: Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein. In: *Molecular Biology of the Flavivirus*. Horizon bioscience U.K. pp. 295-312, 2006.
- 19) Nakai K, Okamoto T, Kimura-Someya T, Ishii K, Lim CK, Tani H, Matsuo E, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Miyamura T, Nunberg JH, Moriishi K, and Matsuura Y: Oligomerization of hepatitis C virus core protein is crucial for interaction with cytoplasmic domain of E1 envelope protein. *J Virol* 80: 11265-11273, 2006.
- 20) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Tashiro M, Suzuki T, Taguchi F, Takemori T, Miyamura T, and Tsunetsugu-Yokota Y: Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. *Adv Exp Med Biol* 581: 593-596, 2006.
- 21) Matsuyama S, Ujike M, Ishii K, Fukushi S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi F: Enhancement of SARS-CoV infection by proteases. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 581: 253-258, 2006.
- 22) Ishii K: Vaccines for severe acute respiratory syndrome. SARS, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India, 2006.
- 23) Mizutani T, Fukushi S, Ishii K, Sasaki Y, Kenri T, Saijo M, Kanaji Y, Shiota K, Kurane I and Morikawa S: Mechanisms of establishment of persistent SARS-CoV-infected cells. *Biochem Biophys Research Commun* 347: 261-265, 2006.
- 24) Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T: Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nature Protocols* 1: 2334-2339, 2006.
- 25) Miyamaoto M, Kato T, Date T, Mizokami M, Wakita T: Comparison between subgenomic replicons of hepatitis C virus genotypes 2a(JFH-1) and 1b(Con1 NK5.1). *Intervirology* 49: 37-43, 2006.
- 26) Kato T, Date T, Miyamoto M, Wakita T: A novel virus culture system for hepatitis C virus. *Future Virology* 1: 519-525, 2006.
- 27) Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, and Liang TJ: Production of Infectious Hepatitis C Virus of Various Genotypes in Cell Culture. *J Virol* (Epub 2007 Feb 14).
- 28) Larrea E, Riezu-Boj JI, Gil-Guerrero L, Casares N, Aldabe R, Sarobe P, Civeira MP, Heeney JL, Wakita T, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, and Prieto J: Upregulation of indoleamine 2,3 dioxxygenase in hepatitis C virus infection. *J*

- Viol (Epub 2007 Jan 17).
- 29) Uprichard SL, Chung J, Chisari FV, and Wakita T: Replication of a hepatitis C virus replicon clone in mouse cells. *Virology J* 3: 89, 2006.
 - 30) Wagoner J, Austin M, Green J, Imaizumi T, Casola A, Brasier A, Khabar KS, Wakita T, Gale M Jr, and Polyak SJ: Regulation of CXCL-8 (Interleukin 8) induction by dsRNA signaling pathways during hepatitis C virus infection. *J Virol* 81(1): 309-318, 2007.
 - 31) Hansman GS, Sano D, Ueki Y, Imai T, Oka T, Katayama K, Takeda N, and Omura T: Sapovirus in water, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 133-135, 2007.
 - 32) Hansman GS, Saito H, Shibata C, Ishizuka S, Oseto M, Oka T, and Takeda N: Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus. *J Clin Microbiol* 45: 1347-1349, 2007.
 - 33) Hansman GS, Oka T, Okamoto R, Nishida T, Toda S, Noda M, Sano D, Ueki Y, Imai T, Omura T, Nishio O, Kimura H, and Takeda N: Human sapovirus in clams, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 620-622, 2007.
 - 34) Hansman GS, Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Oka T, and Takeda N: Recombinant sapovirus gastroenteritis, Japan. *Emerg Infect Dis* 13: 786-788, 2007.
 - 35) Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Wakita T, Takeda N, and Hansman GS: Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. *Arch Virol* 152: 457-461, 2007.
 - 36) Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Yokoyama M, Igota H, Yamauchi K, Ishida S, Fukui D, Bando G, Kosuge M, Tsunemitsu H, Koshimoto C, Sakae K, Chikahira M, Ogawa S, Miyamura T, Takeda N, and Li TC: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol* 152: 1375-1381, 2007.
 - 37) Li TC, Miyamura T, and Takeda N: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 76: 170-172, 2007.
 - 38) Hansman GS, Oka T, Katayama K, and Takeda N: Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev Med Virol* 17(2): 133-141, 2007.
 - 39) Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, and Nishimura H: A new system for rapid genome sequencing of emerging RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 13: 322-324, 2007.
 - 40) Nishimura Y, Shimojima M, Tohya Y, and Miyazawa T: Molecular cloning of a cDNA encoding the feline CD62L. *J Vet Med Sci* 69: 81-84, 2007.
 - 41) Takao S, Wakatsuki K, Yoshida H, Shimizu H, and Wakita T: Neutralization assays for echovirus 18 isolates in 2006. *Jpn J Infect Dis* 60: 65-66, 2007.
 - 42) Tuul R, Enkhtuya B, Nymadawa P, Kobune F, Suzuki K, Yoshida H, and Hachiya M: Measles outbreak after a post-honeymoon period in Mongolia, 2001. *Jpn J Infect Dis* 60: 198-199, 2007.
 - 43) Arita M, Nagata N, Iwata N, Ami Y, Suzaki Y, Mizuta K, Iwasaki T, Sata T, Wakita T, and Shimizu H: An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81: 9386-9395, 2007.
 - 44) Fujimoto T, Shinohara M, Ito M, Okafuji T, Okafuji T, Nishio O, Yoshida H, Shimizu H, Chikahira M, Phan GT, and Ushijima H: Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. *Clin Lab* (in press).
 - 45) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, and Horie H: Evaluation of a two-dose administration of live oral poliovirus vaccine for wild and virulent vaccine-derived poliovirus type 1, 2, 3 strains in Japan. *Scand J Infect Dis* (in press).
 - 46) Tano Y, Shimizu H, Martin J, Nishimura Y, Simizu B, and Miyamura T: Antigenic characterization of a formalin-inactivated poliovirus vaccine

- derived from live-attenuated Sabinstrains. Vaccine (in press).
- 47) Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, and Shoji I: E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81: 1174-1185, 2007.
- 48) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, and Matsuura Y: Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol* 81: 1727-1735, 2007.
- 49) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, and Matsuura Y: Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1661-1666, 2007.
- 50) Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, and Akari H: GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect* 9: 515-521, 2007.
- 51) Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, and Wakita T: Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 42: 411-423, 2007.
- 52) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Miyamoto M, Kaga M, Barth H, Baumert TF, Dubuisson J, and Wakita T. CD81 Expression is Important for Heterogeneous HCV Permissiveness of Huh7 Cell Clones. *J Virol* 81: 5036-5045, 2007.
- 53) Date T, Miyamoto M, Kato T, Morikawa K, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, Mizokami M, and Wakita T: An infectious and selectable full-length replicon system with hepatitis C virus JFH-1 strain. *Hepatol Res* 37: 433-443, 2007.
- 54) Morikawa K, Zhao Z, Date T, Miyamoto M, Murayama A, Akazawa D, Tanabe J, Sone S, and Wakita T: The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79: 714-723, 2007.
- 55) Mizutani T, Fukushi S, Kenri T, Sasaki Y, Ishii K, Endoh D, Zamoto A, Saijo M, Kurane I, and Morikawa S: Enhancement of cytotoxicity against Vero E6 cells persistently infected with SARS-CoV by *Mycoplasma fermentans*. *Arch Virol* 152: 1019-1025, 2007.
- 56) Kiyohara T, Sato T, Totsuta A, Miyamura T, Ito T, and Yoneyama T: Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003. *Microbiol Immunol* 51: 185-191, 2007.
- 57) Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Totsuka A, and Wakita T: Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* 145: 162-168, 2007.
- 58) McKenna SA, Lindhout DA, Shimoike T, and Puglisi JD: Biophysical and biochemical investigations of dsRNA activated kinase PKR. *Methods in Enzymology* 430: 373-376, 2007.

2. 和文発表

- 1) 脇田隆字: ウイルス性肝炎増刊号・ICPのためのウイルス学・臨床と微生物. 33(10) 611-615, 2006.
- 2) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字: HCV増殖機構の解明. 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3, II. 肝・胆・膵 143-146, 2006.
- 3) 脇田隆字: HCV発現細胞系の確立. 別冊・医学のあゆみ・消化器疾患 Ver.3, II. 肝・胆・膵 147-151, 2006.
- 4) 脇田隆字: JFH-1株を用いたC型肝炎ウイルス研究の進歩. 医学のあゆみ 218(10): 883-888, 2006.
- 5) 脇田隆字: C型肝炎ウイルス. 分子細胞治療 Vol.5, p364-367, 2006.
- 6) 脇田隆字: HCVレプリコンシステム. カレントセラピー, 24(8): 67, 2006.
- 7) 脇田隆字: 培養細胞で効率よく複製するC型肝炎ウイルス株. *BIO Clinica*, 21(4): 366-371, 2006.
- 8) 岡智一郎: 食中毒検査. 診療のコツと落とし穴「糞便検体からのカリシウイルス RNA抽出と検出」中

ウイルス第二部

- 山書店, 2006.
- 9) 李 天成: 食中毒検査. 診療のコツと落とし穴「E型肝炎診断のポイント」 中山書店, p113-115, 2006.
- 10) 宇田川悦子: 新しい臨床検査・未来の臨床検査・各論(5)感染症検査 19『ノロウイルス検査』, 『検査と技術』増刊号(第34巻10号)2006.
- 11) 宇田川悦子: 水中の健康関連微生物 6 自然災害による被害と感染症(特別編)モダンメディア Vol.52 No.9, p18-26, 2006.
- 12) 李 天成: E型肝炎ウイルスの最新知見. 臨床消化器内科 vol21, No.5, 553-560, 2006.
- 13) 田中智之, 三好龍也, 内野清子, 武田直和: 世界的に見たノロウイルスの現状. 臨床と微生物 33: 385-391, 2006.
- 14) 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.
- 15) ウイルス第二部 第二室, 感染症情報センター第三室, ポリオ, 平成 16 年度感染症流行予測調査報告書 8-47, 2006.
- 16) 清水博之: 経口生ポリオワクチンと薬剤の併用禁忌, 日本医事新報 4311: 98, 2006.
- 17) 清水博之, 武田直和: ポリオワクチン, 化学療法の領域 22: 1403-1408, 2006.
- 18) 李 天成, 石井孝司, 武田直和: E型肝炎ウイルス: 感染様式と食中毒. 生物の科学 遺伝別冊 19, 2006.
- 19) 石井孝司, 水谷哲也: SARSコロナウイルス研究の最前線. 医学のあゆみ 218: 839-844, 2006.
- 20) 石井孝司, 李 天成: 肝炎ウイルスVLPの作成と応用. 感染・炎症・免疫 36: 44-47, 2006.
- 21) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男, Michael M. C. Lai: C型肝炎ウイルスゲノムの脂質ラフトにおける複製. 生化学 78: 321-326, 2006.
- 22) 脇田隆字, 森川賢一, 村山麻子: HCV 粒子形成システム. 肝疾患レビュー 119-123, 2006.
- 23) 石井孝司, 李 天成, 武田直和: E型肝炎. 感染・炎症・免疫 37: 58-59, 2006.
- 24) 李 天成: 海外で罹る危険性のある感染症 Update. 公衆衛生 71(7)569-571, 2007.
- 25) 染谷雄一: ノロウイルス感染症とその対策 ファルマシア 43: 147-153 日本薬学会 2007.
- 26) 白土(堀越)東子: 冬の食中毒: ノロウイルス. 「保健ニュース」, 第 1356 号, 少年写真新聞社 2007.
- 27) 白土(堀越)東子: 冬の食中毒: ノロウイルス. 「小学保健ニュース」, 第 804 号, 少年写真新聞社 2007.
- 28) 宇田川悦子: バイオテロ等健康危機発生時電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金「健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究-2」小倉班研究報告書, 2007.
- 29) 李 天成: E型肝炎ウイルス. 食中毒予防必携(第二版) 日本食品衛生協会 2007 年 8 月.
- 30) 片山和彦, 岡部信彦: IDWR: 感染症の話. ノロウイルス感染症 2004 年第 11 週(3月8-14日)掲載, 2007 年 3 月 16 日改訂.
- 31) 武田直和: ノロウイルスの腸内感染メカニズム. 日本医事新報 4325: 96-97, 2007.
- 32) 清水博之: ポリオの疫学, J. Clin.Rehabilitation 16: 114-120, 2007.
- 33) 清水博之: エンテロウイルス感染症, 感染症 37: 117-126, 2007.
- 34) 清水博之: 手足口病, 日本臨床 65: 339-342, 2007.
- 35) 岩井雅恵, 吉田弘, 松浦久美子: 富山県内河川のウイルス汚染に関する定点観測 公衆衛生誌 54: 178-189, 2007.
- 36) 鈴木哲朗, 松浦善治: 肝炎ウイルス. 戸田細菌学改訂33版 839-851, 2007.
- 37) 鈴木哲朗: 歯科医院における院内感染対策に関連する病原微生物の概説. エビデンスに基づく一般歯科診療における院内感染対策 19-28, 2007.
- 38) 清原知子, 米山徹夫: 海外で罹る危険性のある感染症update- A型肝炎. 公衆衛生 71(7): 566-568, 2007.

学会発表

1. 国際学会

- 1) Wakita T: Production of infectious hepatitis particles in vitro. 2nd International Workshop on Clinical Pharmacology of Hepatitis Therapy. Vienna, Austria, 2006.4.25.
- 2) Wakita T: In vitro cultivation of hepatitis C virus. Current strategy of new drug development for HCV. Biomedical Engineering Research Laboratories, Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan, 2006.5.3.

ウイルス第二部

- 3) Wakita T: Development of an Infectious HCV system JFH-1, a Fulminant Hepatitis. 2006 ASV Medical Virology Club Satellite meeting. Madison WI, USA, 2006.7.1.
- 4) Wakita T: Production of Infectious Hepatitis C Virus in Cultured Cells. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Paris, France, 2006.7.1-5.
- 5) Li T-C, Tsunemitsu H, Li X, Cheng R.H, Nagata N, Miyamura T, and Takeda N: Characterization of self-assembled virus-like particles of genotype III hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *ibid.*
- 6) Sugitani M, Sheikh A, Tamura A, Shimizu YK, Shimizu K, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Suzuki K, Ishaque SM, Hasan M: Investigation of hepatitis E virus (HEV) RNA and genotype in sera of Bangladesh. *ibid.*
- 7) Shoji I, Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Suzuki T, Fukuda K, Shimoji T, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, and Miyamura M: E6AP-mediated ubiquitylation and degradation of HCV core protein. *ibid.*
- 8) Suzuki T, Inoue Y, Aizaki H, Matsuda M, Shirakura M, Murakami K, Shoji I, Matsuura Y, and Miyamura T: Role of chaperonin-containing TCP complex (CCT) and heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in the HCV RNA replication. *ibid.*
- 9) Miyamura T and Suzuki T: Production of infectious HCV particles in three-dimensional liver cultures. *ibid.*
- 10) Shoji I, Shirakura M, Ichimura T, Murakami K, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, and Miyamura T: E6-associated protein mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 11) Aviel S, Ben-Porath J, Mishori E, Stama D, Cohen N, Terkieltaub D, Zauberman A, Miyamura T, Suzuki T, Aizaki H, nagamori S, Safadi R, Galun E, Eren R, and Dagan S: A cell-based assay for evaluating potential antiviral agents against HCV. *ibid.*
- 12) T Wakita: HCV and cell culture-progress and problems. 13th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Cairns, Queensland, Australia, 2006.8.27-31.
- 13) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaeck D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Barth H, Baumert TF, and Blum HE: Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. *ibid.*
- 14) Machida M, Huang J, Wang CH, Kondo Y, Sung VMH, Wakita T, Lai MMC. Preferential lymphotropism vs. hepatotropism of different HCV isolates established through infectious full-length viral RNA studies. *ibid.*
- 15) Miyanari Y, Usuda N, Atsuzawa K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The analysis of HCV proteins around the lipid droplet-associated membrane in HCV-producing cells. *ibid.*
- 16) Fukuda K, Shoji I, Shirakura M, Murakami K, Suzuki T, Wakita T, Mizumoto K, and Miyamura T: Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 17) Ishii K, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T: Assembly and release of HCV-like particles in which the viral subgenomic replicon RNAs are encapsidated. *ibid.*
- 18) Masaki T, Suzuki R, Matsuda M, Miyamura T, Wakita T, and Suzuki T: Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *ibid.*
- 19) Aizaki H, Inoue Y, Matsuda M, Shimoji T, Lai MMC, Wakita T, Miyamura T, and Suzuki T: identification of molecular chaperones as regulators for HCV RNA replication through proteomics approaches. *ibid.*
- 20) Fukasawa M, Tanaka Y, Ono Y, Sato S, Suzuki T, Miyamura T, Hanada K, and Nishijima M: Enhancement of de novo fatty acid biosynthesis in hepatic cell line Huh7 expressing hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 21) Moriishi K, Moriya K, Miyamoto H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, and Matsuura Y: Critical role

ウイルス第二部

- of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *ibid.*
- 22) Okamoto T, Nishimura Y, Ichimura T, Suzuki K, Miyamura T, Suzuki T, Moriishi K, and Matsuura Y: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *ibid.*
- 23) Tsutsumi T, Tomobe K, Suzuki T, Mizumoto K, Miyamura T, and Koike K: HCV core protein transactivates IL-8 via ATF-6 pathway. *ibid.*
- 24) Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, and Wakita T: NS3 helicase and NS5B to 3' X regions are important for efficient JFH-1 replication in Huh7 cells. *ibid.*
- 25) Morikawa K, Date T, Murayama A, Kaga M, Akazawa D, and Wakita T: Characterizations of highly purified infectious HCV particles produced in cultured cells. *ibid.*
- 26) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Kaga M, Wakita T: CD81 expression is important for the heterogenous HCV permissiveness of Huh7 cell clones. *ibid.*
- 27) Kato T, Heller T, Matsumura T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, and Liang JT: Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell culture. The 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, MA, USA, 2006.10.27-31.
- 28) Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Tateno C, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Yoshizato K, and Chayama K: Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *ibid.*
- 29) Zeisel MB, Schnober EV, Haberstroh A, Lavilette D, Cosset FL, Wakita T, Jaek D, Royer C, Schuster C, Stoll-Keller F, Blum HE, Barth H, and Baumert TF. Scavenger receptor class B type I is a co-receptor for infection with cell culture-derived hepatitis C virus. *ibid.*
- 30) Morikawa K, and Wakita T: Infectious hepatitis C virus particle binding to the HUH7 cell surface is mediated by glycosaminoglycans and its internalization by CD81. *ibid.*
- 31) Wakita T: HCV replication Update. 17th Asian Pacific Association for the study of the Liver (APASL) Conference. Kyoto, Japan, 2007.3.27.
- 32) Li T-C, Miyamura T, and Takeda N: Recent topics on HEV: its omnipresence in our environment and vaccine development. APASL 2007 (Asian Pacific Association for the Study of the Liver), Kyoto, 2007.3.
- 33) Sugitani M, Sheikh A, Tamura A, Shimizu YK, Shimizu K, Moriyama M, Arakawa Y, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Suzuki K, Ishaque SM, Raihan ASMT, Hasan M: Hepatitis E virus genotype in Bangladesh. *ibid.*
- 34) Shoji I, Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, and Miyamura T: The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 35) Suzuki T, Aizaki H, Miyamura T, and Wakita T: Lipids and molecular chaperones: Critical factors for infection and replication of hepatitis C virus. *ibid.*
- 36) Goto T, Ogura H, Oseto M, Sakon N, and Utagawa E: Electron microscopic diagnosis in Japan. International Conference on Electron Microscopy, Sapporo, 2006.Aug28-Sep2.
- 37) Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Expression and self-assembly of virus-like particles from the full-length sapovirus genome in insect cells. Fortieth Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program, Sendai, 2006.7.
- 38) Miyoshi T, Tanaka T, Uchino K, Li T-C, Takeda N: Prevalence of hepatitis E virus in Wakayama and Osaka prefecture. China-Japan International Congress of Virology. Shanghai, 2006.6.
- 39) Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, and Takeda N: Development of a new ELISA for detection of noroviruses in stool specimens. American Society for Microbiology 106th General Meeting. Orlando, FL, 2006.

ウイルス第二部

- 40) Takeda N: Norovirus and sapovirus activities in Japan. 2006 International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006.11.
- 41) Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006.8.
- 42) Takeda N: Risk factors for hepatitis E virus infection. *ibid.*
- 43) Shimizu H: Global Polio Eradication-Remaining issues and new challenges- Capturing Opportunities through Biotechnology, Cibining, Indonesia, 2006.11.
- 44) Nishimura Y, Arita M, Yoshida H, Ling H, Toda K, Kojima K, Ueno K, Miyamura T, Shimizu H, and Wakita T: Characterization of the type 3 vaccine-derived poliovirus in Cambodia. XIV Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses, Inari, Finland, 2006.Nov26-Dec1.
- 45) Shimizu H: Emergence and Transmission of Vaccine-derived Polioviruses - Genetic Recombination and Prevalence of HEV-C- Emerging Infectious Disease Workshop, Taipei, 2007.8.
- 46) Fukuda K, Shoji I, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T, and Wakita T: E6AP-mediated ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. Keystone symposia-Ubiquitin and signaling, Montana, USA. 2.4-9.2006.
- 47) Matsuura T, Masaki T, Ohkawa K, Miyamura T, Okazaki I, Watanabe T, and Suzuki T: All-trans retinoic acid down-regulates human albumin gene expression through the induction of C/EBP beta-LIP. 2006 FASEB Summer Research Conferences RETINOIDS. Indian Wells, California. 2006.6.17-22.
- 48) Kiyohara T, Satoh T, Totsuka A, Miyamura T, and Yoneyama T: The shifting seroepidemiological pattern of hepatitis A in Japan, as of 2003. Fifth World Congress on Vaccines, Immunization and Immunotherapy, Canada, 2006.11.
- 49) Shimoike T, McKenna SA, Lindhout DA, Kim-Park I, Liu C, Aitken C, Fonville J, and Puglisi DJ: HCV IRES RNA-mediated PKR auto-phosphorylation. 9th Annual Retreat of Department of Structural Biology, Stanford University. Asilomar, CA/USA, 2006.11.
- 50) Lindhout DA, McKenna SA, Aitken C, Shimoike T, Kim-Park I, and Puglisi DJ: NMR studies of human double-stranded RNA-dependent Protein Kinase (PKR). *ibid.*
- ### 2. 国内学会
- 1) 脇田隆字: C型肝炎ウイルスの感染複製系の樹立とその応用. ランチョンセミナー, 日本ウイルス学会 第54回学術集会, 名古屋, 2006.11.19-21.
- 2) 棟方 翼, 脇田隆字, 野本明男: C型肝炎ウイルス (HCV) による自然免疫受容体 TLR3 の発現制御. 同上.
- 3) 森田奈央子, 野村知里, 石橋真理子, 楠美嘉晃, 杉谷雅彦, 脇田隆字, 高山忠利, 江角真理子: 類洞内皮C型レクチンL-SIGNとC型肝炎ウイルス. 同上.
- 4) 石橋真理子, 脇田隆字, 江角真理子: C型肝炎ウイルス量の多い肝臓で発現増強する遺伝子 *OASL* の機能解析. 同上.
- 5) Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Expression and self-assembly of virus-like particles from the full-length sapovirus genome in insect cells. 同上.
- 6) Hansman GS, Oka T, Katayama K, Takeda N: Enhancement of sapovirus recombinant capsid protein expression in insect cells. 同上.
- 7) 岡智一郎, 山本真民, 横山 勝, 小川智子, Hansman S. Grant, 片山和彦, 宮下佳奈, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 佐藤裕徳, 武田直和: ネコカリシウイルスのプロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基の同定. 同上.
- 8) 岡智一郎, 片山和彦, Hansman S. Grant, 影山努, 小川智子, 武田直和: サポウイルス核酸検出系の構築. 同上.
- 9) 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルス 3C様プロテアーゼ Glu54 残基の役割. 同上.
- 10) 白土 (堀越) 東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 脇田隆字, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析. 同上.
- 11) 李 天成, 宮村達男, 武田直和: 昆虫細胞 Tn5 (BTI-TN-5B1-4) におけるノダウイルスの潜伏感染. 同上.
- 12) 松浦友紀子, 李 天成, 吉松組子, 有川二郎, 恒光裕, 高島郁夫, 鈴木正嗣, 宮村達男, 武田直和: 日

ウイルス第二部

- 本に生息するシカの E 型肝炎ウイルス抗体保有状況. 同上.
- 13) 有田峰太郎, 永田典代, 佐多徹太郎, 脇田隆字, 清水博之: ポリオ様麻痺の発症に関する定量的解析. 第 54 回日本ウイルス学会, 名古屋市, 2006.11.
- 14) 有田峰太郎, 網 康至, 脇田隆字, 清水博之: エンテロウイルス 71 のマウス感染モデルに関する解析. 同上.
- 15) 西村順裕, 有田峰太郎, 吉田 弘, 小島和暢, 宮村達男, 清水博之, 脇田隆字: カンボジア AFP 症例より分離された 3 型ワクチン由来ポリオウイルス. 同上.
- 16) 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 型肝炎ウイルスの複製における FKBP8 の役割. 同上.
- 17) 岩井雅恵, 滝澤剛則, 吉田 弘, 松浦久美子, 長谷川澄代, 小原真弓, 堀元栄詞, 倉田 毅, 白木公康: 富山県における 2002 年のエコーウイルス 13 型検出と浸淫状況. 同上.
- 18) 水谷哲也, 福士秀悦, 石井孝司, 西條政幸, 緒方もも子, 酒井宏治, 遠藤大二, 座本 綾: SARS-coronavirus と Mycoplasma fermentans の共感染が細胞に及ぼす影響. 同上.
- 19) 明里宏文, 石井孝司, 飯島沙幸, 榎 昇, 森 健一, 吉崎佐矢香, 木村展之, 片貝祐子, 揚山直英, 岩崎優紀, 鈴木哲朗, 宮村達男: C 型肝炎のサロゲート霊長類モデル: GBV-B 長期持続感染マーマセットの解析. 同上.
- 20) 村山麻子, 伊達朋子, 森川賢一, 赤澤大輔, 加賀美奈子, 脇田隆字: HCV JFH-1 株の RNA 複製に必要な領域の同定. 同上.
- 21) 赤澤大輔, 伊達朋子, 森川賢一, 村山麻子, 脇田隆字: HCV 感染に関する宿主因子の探索. 同上.
- 22) 石井孝司, 張 斌, 李 津, 白倉雅之, 森川賢一, 鈴木亮介, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HCV の subgenomic replicon を持つウイルス様粒子の形成と放出. 同上.
- 23) 福田浩一郎, 勝二郁夫, 白倉雅之, 村上恭子, 下地徹, 阿部克俊, 奈須純一, 高橋由利絵, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 水本清久, 宮村達男: E6AP 依存性 HCV core 蛋白分解の分子認識機構の解析. 同上.
- 24) 笠原優子, 大内史子, 深澤征義, 佐藤慈子, 花田賢太郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 西島正広: C 型肝炎ウイルス (HCV) コア発現細胞における vimentin の減少. 同上.
- 25) 森石恆司, 森屋恭爾, 宮本大伸, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦, 松浦善治: HCV コア蛋白質による脂肪酸合成促進と肝細胞癌発症における PA28gamma の役割. 同上.
- 26) 木ノ本正信, 阿部賢治, 鈴木哲朗, 倉田 毅, 佐多徹太郎, 徳永研三: G 型肝炎ウイルス (GBV-C/HGV) 産生系の樹立. 同上.
- 27) 相崎英樹, 原 弘道, 井上 寧, 松田麻未, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HCV RNA 複製を調製する分子シャペロンの同定とその機能. 同上.
- 28) 政木隆博, 鈴木亮介, 松田麻未, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: RNA polymerase I promoter/terminator 系を用いた感染性 HCV 粒子の作成. 同上.
- 29) 米山徹夫, 清原知子, 下池貴志, 戸塚敦子: A 型肝炎ウイルス (HAV) の RT-LAMP 法による迅速診断. 同上.
- 30) 脇田隆字: C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系の開発とその応用. 第 13 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 東京, 2007.1.19.
- 31) 脇田隆字: 新任部長・センター長、研究の抱負を語る, 学友会セミナー, 感染研, 2006.7.19.
- 32) 脇田隆字, 相崎英樹, 鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの感染増殖とそれに関与する宿主因子の解析. 第 10 回日本肝臓学会大会, シンポジウム 6 「ウイルス肝炎進展因子の解明」札幌, 2006.10.11-12.
- 33) 森川賢一, 脇田隆字: 培養細胞で作製した感染性 C 型肝炎ウイルス (HCV) 粒子の精製法確立および精製ウイルス粒子の性状解析. 同上.
- 34) 関根裕子, 坂本直哉, 中川美奈, 田坂めぐみ, 櫻井幸, 井津井康浩, 陳正新, 榎本信幸, 脇田隆字, 渡辺 守: C 型肝炎ウイルス感染増殖系を用いた薬剤のウイルス増殖抑制効果の検討. 第 42 回日本肝臓学会総会, 京都, 2006.5.25-26.
- 35) 森川賢一, 脇田隆字: C 型肝炎ウイルス粒子の Huh7 細胞への感染における HSPG および CD81 の関与. 同上.
- 36) 横田隆徳, 石井孝司, 榎 昇, 矢野純一, 榎本信幸, 明里宏文: siRNA の静脈注射による C 型肝炎の遺伝子治療: サルを用いた C 型肝炎サロゲートモデルによる有効性の検討. 同上.
- 37) 岡智一郎, 山本真民, 横山 勝, 小川智子, Hansman S. Grant, 片山和彦, 宮下佳奈, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 佐藤裕徳, 武田直和: カリシウイルスプロテア

ウイルス第二部

- ーゼの構造機能解析. 日本薬学会第 127 年会, 富山, 2007.3.30.
- 38) 岡智一郎: ノロウイルス, サポウイルスに関する新知見. 第 18 回ウイルス性下痢症研究会, 東京, 2006.11.18.
- 39) 桂川 亮, 黒澤 馨, 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. 水環境研究会, 川崎市, 2006.10.
- 40) 桂川 亮, 宇田川悦子, 黒澤 馨: 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 19 回日本沿岸域学会研究討論会, 東京都, 2006.7.
- 41) 武田直和, 白土東子, 宮村達男: ノロウイルス感染症. 第 80 回日本感染症学会学術講演会, 東京, 2006.4.
- 42) 李 天成: E 型肝炎ウイルス. 平成 18 年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2007.2.15.
- 43) 李 天成: わが国における野生シカの HEV 感染状況. 宮川庚子記念研究財団肝炎ワークショップ札幌, 2006.10.13.
- 44) 宇田川悦子: ウイルス感染症学. 綾瀬市, 2006.2.
- 45) 宇田川悦子: 腸管感染症「ロタウイルス, アデノウイルス, カリシウイルス」. 日本臨床検査協会, 東京都, 2006.10.
- 46) 宇田川悦子: 下痢症ウイルス感染症. 臨床検査技師会東青支部学術懇話会, 青森市, 2006.10.
- 47) 宇田川悦子: 腸管系ウイルス感染症(ノロウイルス)に関して. 平成 18 年度漁村水環境研修会, 東京都, 2006.11.
- 48) 西村順裕, 下島昌幸, 遠矢幸伸, 明石博臣, 宮沢孝幸: ネコ末梢血における CD16 分子の発現. 第 142 回日本獣医学会, 山口, 2006.9.
- 49) 水谷哲也, 遠藤大二, 白土憲也, 岡本道子, 渡辺理恵, 福土秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 石井孝司, 鈴木哲朗, 清水博之, 高崎智彦, 森川茂, 西村秀一: 新興・再興感染症に備えた迅速な網羅的ウイルスゲノム検出方法(LAV 法). 日本獣医学会総会, 2006.
- 50) 永田典代, 清水博之, 武田直和, 長谷川秀樹, 佐多徹太郎, 倉田 毅: 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)を用いた Sabin 由来不活化ワクチンの免疫効果に関する研究. 日本ワクチン学会, 泉佐野市, 2006.10.
- 51) 吉田 弘: シンポジウム 「環境水系の感染症」環境水系の感染症: オーバービュー. 第 48 回臨床ウイルス学会, 富山市, 2007.6.
- 52) 清水博之: ポリオウイルスとエンテロウイルスにおけるゲノム遺伝子組換え. 同上.
- 53) 松浦善治, 森屋恭爾, 田中啓二, 宮村達男, 鈴木哲朗, 小池和彦, 森石恆司: C型肝炎ウイルスによる脂肪肝および肝癌発症におけるPA28gammaの役割. 第65回日本癌学会学術総会, 横浜, 2006.9.
- 54) 三好秀征, 森屋恭爾, 新澤靖子, 藤江 肇, 堤 武也, 新谷良澄, 四柳 宏, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦: C型肝炎ウイルスコア蛋白によるミトコンドリア障害とタクロリムスの保護作用. 同上.
- 55) 吉崎佐矢香, 松田麻未, 村上恭子, 相崎英樹, 石井孝司, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: 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機能的解析とプロテオーム解析. 日本分子生物学会2006フォーラム, 名古屋, 2006.12.
- 56) 小俣和彦, 政木隆博, 鈴木亮介, 佐藤田鶴子, 宮村達男, 鈴木哲朗: アポトーシス調節因子ICADの遺伝子発現調節機構の解析. 同上.
- 57) 勝二郁夫, 村上恭子, 白倉雅之, 市村徹, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 福田浩一郎, 下地徹, 佐藤慈子, 深澤征義, 山河芳夫, 西島正広, 宮村達男, 脇田隆字: E6AP依存性HCVコア蛋白分解によるウイルス産生調節機構. 同上.
- 58) 赤澤大輔, 伊達朋子, 森川賢一, 村山麻子, 加賀美奈子, 脇田隆字: HCV感染に関与する宿主因子の探索. 第2回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム, 広島, 2006.6.