

## 2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆 宇

### 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定、検査並びに、ワクチン株であるサーベイン株由来不活化ポリオワクチン（sIPV）の開発推進および検定法の開発である。本年は経口生ポリオワクチンの小分製品1件の検定をおこなった。WHO世界ポリオ根絶計画が進展し、国産不活化ポリオワクチンの早期臨床導入のためにDTP-sIPVの混合ワクチンとして開発が進んでいる。本ワクチンの開発推進にかかる業務として、国内参照品の開発及び安定性試験、検定方法の開発を行った。しかし、当面の間生ポリオワクチン検定も続くことが予想されるため、今後も総力をあげて対応していく。

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に関しては、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。ノロウイルスの流行は前年度に引き続き、本年度も爆発的な流行は観察されなかったが、引き続き警戒が必要である。また、カリシウイルスの研究が進展した。ノロウイルスのリバーシジェネティクス実験系は、NoVウイルスの病原性発現機構の研究、ウイルスの増殖制御の研究に応用されつつあり、さらなる進展が期待される。

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、ポリオ世界特別専門ラボラトリーとして、また西太平洋地域のポリオ地域レファレンスラボラトリー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。今年度も西太平洋地域におけるポリオフリーの維持を確認した。さらに、第2室がまとめた野生株ポリオウイルス実験室封じ込め

第一段階調査報告書がWHO西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会で承認され、西太平洋地域の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了が宣言された。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。

エンテロウイルス71は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を併発することがある。このエンテロウイルス71の感染受容体としてヒトPSGL-1を同定した。受容体の同定により、ウイルスの病原性に関する研究が今後大いに進展することが期待できる。

第3室及び第4室ではB型およびC型肝炎ウイルスの研究をおこなった。特にC型肝炎ウイルス研究ではウイルスの感染複製増殖に関与する宿主因子の研究が進んだ。また、C型肝炎ウイルスの粒子形成機構解明が進み、脂質や非構造蛋白質の関与が明らかとなった。肝炎対策として肝炎研究7ヶ年戦略に基づく研究推進が厚生労働省から謳われ、ウイルス第二部では国際医療センターと協力して肝炎研究を推進する必要がある。

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9件の検定をおこなった。肝炎ワクチン接種のユニバーサル化に関する議論のために、基礎的データの集積が求められている。

E型肝炎研究はウイルス培養が可能となり、ウイルス学的解析が進行した。今後の進展が期待される。

各室で以下のような国際的技術協力をおこなった。  
Nguyen Thi Thanh Thao（ベトナム、パスツール研究所）〈JSPSフェロー〉平成21年2月25日～平成21年3月24日、エンテロウイルス71感染症の分子疫学に関する研究  
Wang Dong Yan（中国、中国疾病予防制御センター）〈JICAフェロー〉平成21年1月13日～平成21年4

月 11 日, ポリオウイルス実験室診断に関する技術研修

Rifqiyah Nur Umami (インドネシア, RIPI) < JSPS フェロー > 平成 20 年 10 月 6 日 ~ 平成 21 年 1 月 31 日, インドネシアで伝播しているエンテロウイルスの検出・同定法の研究

Yang Dong Mei (中国, 中国疾病予防制御センター) < JICA フェロー > 平成 20 年 1 月 21 日 ~ 平成 20 年 4 月 18 日, ポリオウイルスおよびエンテロウイルス実験室診断および分子疫学解析に関する技術研修

李 津, 王 寧 (中国生物製品研究所) 平成 20 年 4 月 15 日 ~ 平成 20 年 7 月 15 日, E 型肝炎ウイルス様粒子の作製及び精製技術の習得

劉 蘭軍 (中国, 成都市疾病予防制御センター) < 笹川フェロー > 平成 20 年 3 月 6 日 ~ 平成 20 年 3 月 31 日, E 型肝炎ウイルスの分子ウイルス学とワクチン研究

Claire Gondeau (フランス, INSERM U632) 平成 21 年 3 月 14 日 ~ 28 日, C 型肝炎ウイルス病原性の研究

人事面では武田直和第 1 室長が平成 21 年 3 月末をもって定年退官となった。武田先生の研究および検定におけるこれまでの感染研に対する貢献にウイルス第二部一同深謝したい。また、平成 20 年 7 月 1 日付けで東芝病院研究部より加藤孝宣が第 3 室長として着任した。ハンスマン・グラント研究員は、平成 20 年 8 月より、ウイルスゲノムの組換え、および粒子構造の解析のため米国国立癌研究所, NIH に長期出張した。

## 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) 2007-2008 シーズンに流行したノロウイルスのゲノム解析

2006 年のノロウイルス genogroup II/genotype 4 (GII/4) に属する株の大流行を受けて、19 の地方衛生研究所と国立感染症研究所でノロウイルスサーベイランスチームを発足させ、2006 年以降、ノロウイルスゲノムの変化を継続的に解析している。新たに 80 株の

全長ウイルスゲノムの配列情報を収集し、構造蛋白質コード領域のノロウイルスゲノム塩基配列の系統樹解析により、2007 年から 2008 年は 2006 年と同様に、GII/4 の中でも 2006b というクラスターに属する株 (75/80) が 93.8% 検出されたものの、一部に新たなクラスターに属する株が出現していることが明らかとなった。このようなクラスター変化が数年おきに起こる爆発的なノロウイルス感染の引き金となる可能性があるため、来年度も引き続き同様の解析を行う。

[本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 神田忠仁, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (2) 調理従事者を対象としたノロウイルス検出調査

2007 年 1 月 ~ 2008 年 3 月の間、ノロウイルスによる急性胃腸炎が発生した全国 240 の施設から調理従事者 5587 名の糞便をリアルタイム PCR 法でスクリーニング検査し、1150 名 (20.6%) からノロウイルスを検出した。このうち、ノロウイルス RNA 量が 1 反応あたり 100 コピー以上だった検体は 352 検体 [内訳 (GI 12 (3.4%), GII 340 (96.6%)) であった。このうち 63 名 (18%) は不顕性感染者であった。これら 352 検体についてさらに 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/2, 3, 4, 8, 10 に、GII は GII/2, 3, 4, 6, 13, 16, 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 (89%) であった。有症者、不顕性感染者に固有の遺伝子型は存在せず、両群ともに GII/4 が主流であった。

[小澤一弘 (中部衛生検査センター), 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 横山 勝, 中村浩美, 守 宏美, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター), 武田直和]

(3) 河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握

糞便中に排泄されたノロウイルスは下水を通じ、一部が河川水中に流入していると考えられている。下水処理水を受容する河川水を網羅的に解析することで、流域に

おける流行株を検出することができる。2003年4月～2004年3月の間に、関東平野を流れる多摩川の上流から下流5地点において河川水を毎月1回採水し、濃縮後、real-time RT-PCRおよびnested RT-PCR法によりノロウイルスRNAを検出した。real-time RT-PCRの結果、河川水中にはgenogroup I, genogroup IIともに急性胃腸炎患者が多い10月から3月にかけて、ノロウイルスRNA量が増加していた。nested RT-PCR法で検出された株はGIがGI/1, 2, 4, 5, 8, 9, 11, GIIがGII/2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 16と多様であった。河川からは急性胃腸炎患者では稀なGI株が、高濃度かつ高頻度に検出されたことから、流域には急性胃腸炎患者として報告されない多数のGI感染者が存在する可能性が示唆された。本研究では河川下流にいくほどノロウイルスRNAの汚染度が高いことも示された。

[北島正章(東大院工学), 岡智一郎, 片山和彦, 原本英司(国立保健医療科学院水道工学), 片山浩之(東大院工学), 武田直和, 大垣眞一郎(東大院工学)]

(4) ノロウイルス・ウイルス様粒子(VLPs)のヒト腸上皮様Caco-2細胞への結合様式とウシ初乳のVLPs結合抑制効果

ノロウイルスのレセプターの探索を目指し、培養細胞へのノロウイルスVLPsの結合、細胞への取り込みを蛍光免疫染色法、共焦点レーザー顕微鏡観察、継時的なウエスタンブロッティングによって検出した。ノロウイルスVLPは分化したCaco-2細胞に結合することが示された。しかし、ノロウイルスとの結合因子として報告されている組織血液型分子とノロウイルスVLPの局在は必ずしも一致せず、ノロウイルスVLPが結合するのは組織血液型分子のみではない可能性が示された。共焦点レーザー顕微鏡観察において、微絨毛の細胞内部、細胞基底面近傍の細胞内部にVLPsのシグナルが検出され、VLPsの細胞内侵入が示唆された。VLPs添加後6時間おきの継時的なウエスタンブロッティングでは、VLPsの形成する約60kDaのキャプシド蛋白質が細胞への侵入後、時間経過に伴って分解され低分子量化することが観察された。また本研究では、ウシの初乳添加によってCaco-2細胞への

ノロウイルスVLPの結合が阻害されることが明らかとなった。

[村上耕介, 鈴木さやか, 岡島徹也, 灘野大太, 松田幹(名古屋大生命農・応生化), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

(5) ノロウイルスプロテアーゼの基質との結合モデルの構築

ノロウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムを検討するため、統合計算化学システムMOEを用いてノロウイルスプロテアーゼドメインの分子モデルを構築後、ASEDock2005を用いてORF1ポリプロテイン切断部位のうち、2箇所(P4-P4')に対応する8残基とプロテアーゼドメインのドッキングモデルを作成して、基質認識に重要と考えられるプロテアーゼドメイン内部のアミノ酸残基を同定した。

[横山 勝, 佐藤裕徳, 神田忠仁(病原体ゲノム解析センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

(6) ユニークなゲノム末端配列を有するノロウイルス株HK299の解析

キャプシドN/S領域を用いた分子系統解析で、新たなゲノグループクラスターに分別されたノロウイルス株HK299(旧名称Sa299)は、マウスノロウイルスと同じアミノ酸配列MRMをゲノム末端、キャプシド末端に有するユニークな株である。更に詳細なゲノム組換えの解析の結果HK299は、ノロウイルスにおけるゲノグループ間組換えの可能性を持つ初めての株であること、組換えがORF1とORF2のジャンクション領域およびORF2とORF3のジャンクション領域で起きていることが示唆された。HK299の抗原性を調べるため、HK299のORF2からゲノム末端までをバキュロウイルスに組込、VLPの発現を試みている。

[片山和彦, 鈴木善幸(国立遺伝学研), ハンスマン・グラント, 岡智一郎, 小澤一弘(中部衛生検査センター), 武田直和]

(7) ノロウイルス(NoV) GII/3 U201株のリバーシジ

エネティックスシステムを用いたレポーター遺伝子内包  
シュードウイルスの改良

昨年度、構築に成功した、ヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA を用いたリバースジェネティックスシステムを利用し、非構造蛋白質領域 (NTPase と 3A-like protein) の間に GFP 遺伝子を組み込んだコンストラクト pKSF203 を作成し、GFP 遺伝子を内包したシュードウイルス粒子の作成に成功した。しかし、pKSF203 のシュードウイルス産生効率は、ワイルドタイプと比較して極めて低かった。そこで、GFP の両端に配したノロウイルスプロテアーゼが認識するアミノ酸配列の長さを延長し、効率よくプロテアーゼによる切断が起きるように改良したコンストラクト pKSF205 を作製した。本コンストラクトのシュードウイルス産生量は、ワイルドタイプの 1/10 程度にまで向上した。シュードウイルスは NoV の細胞への侵入機構の解析、レプリケーションのモニターに有用である。

[片山和彦, 岡智一郎, 武田直和]

#### (8) ノロウイルスの細胞傷害性の解析

非構造蛋白質領域 (NTPase と 3A-like protein) の間に GFP 遺伝子を組み込んだ改良型コンストラクト pKSF205 を用いてノロウイルス非構造蛋白質の細胞内発現を 48 時間のタイムラプスを行って観察した。非構造蛋白質の発現は、pKSF203 トランスフェクション後 12 時間から観察された。非構造蛋白質の高発現が認められた細胞には強い CPE が誘導され、発現後約 8 時間で細胞死に至った。細胞傷害性に関与する非構造蛋白質の部位を明らかにするため、6 種類の非構造蛋白質を EF1 $\alpha$  プロモーター下流にクローニングした発現プラスミドを作成し、個別に細胞内に導入して細胞傷害性を観察した。Protease, N-terminal protein, NTPase, 3A-like protein にも細胞傷害誘導能が存在した。これらの蛋白質による細胞死誘導は主に Caspase の活性上昇を伴うアポトーシスによることが明らかになった。

[片山和彦, 岡智一郎, 武田直和]

#### (9) カリシウイルスファミリーのサブデータベースの

構築

世界 3 大データベース上からノロウイルス、サボウイルスを含むカリシウイルスファミリーを網羅したサブデータベースを構築し、カリシウェブ (CaliciWeb site, <http://teine.cc.sapmed.ac.jp/~calici/modules/news/>) 上にアップした。本サブデータベースは、世界 3 大データベースを検索するオートパイロットプログラムを登録しており、毎日自動アップデートされる。本年度は、システムの安定化、速度の向上などサブデータベースの機能を改良した。

[片山和彦, 三瀬敬治 (札幌医大), 染谷雄一, 武田直和]

#### (10) 1997 年から 2000 年迄に収集した非細菌性嘔吐下痢症患者便のウイルス学的検討

1997 年から 2000 年に収集した患者検体について電顕観察により小型球形ウイルス粒子を検出し、ウイルス粒子陽性検体 200 検体を選択した。次に、これらの検体について現在汎用されているプライマーを用いて RT-PCR, また PCR 産物のダイレクトシーケンスによる遺伝子型別, Real-time PCR, 同じプライマーを用いた HRM 法による遺伝子型別の比較を行なった。

[宇田川悦子, 原 正幸, 渡辺まゆみ (北里衛生科学センター), 高橋邦明 (日本ロシユ)]

#### (11) 陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ抽出法の濃縮処理水量におけるウイルス回収率の影響に関する評価

NV が下水処理場などで除去されなかった場合、河川から海に流れ込みカキなどの二枚貝に蓄積し貝類が汚染され、これらの汚染された貝類を生食することで食中毒事件が発生する。二枚貝の汚染防止には、汚染された可能性のある環境水や下水処理水等から NV を除去滅菌処理することが有効な手段であると考えられる。NV は環境水中あるいは下水処理水中などに非常に低濃度で存在する。これらの試料から NV を検出する為に、陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ抽出法が高いウイルス回収率があるとの報告がある。我々は、濃縮処理前水量を変化させてウイルス濃縮し、Q $\beta$  phage

及び NV の回収率を比較することで、濃縮処理前水量が与えるウイルス回収率の影響について検討した。

[宇田川悦子, 原 正幸 (北里環境科学センター) ]

(12) ノロウイルス 3C 様プロテアーゼにおける酵素-基質相互作用

ノロウイルスプロテアーゼの Glu54 は触媒残基のひとつとされるが必須ではない。E54L 変異酵素の基質特異性は厳密であり、基質切断部位上流の P4 及び P2 部位に大きな疎水性側鎖を要求することが明らかになった。また、3A/3B 切断部位 (<sup>198</sup>ATSE/G) の S200F 変異により、野生型酵素と変異 C 末端との間に強い相互作用が生じた。この相互作用は周辺残基の変異の影響を受け変化した。以上の結果は反応過程において酵素と基質が相互に感知していることを示唆する。

[染谷雄一, 武田直和]

(13) ノロウイルス様中空粒子の立体構造解析

遺伝子型 GI/1 に属する Norwalk 株のウイルス様中空粒子の三次元立体構造が明らかにされている。遺伝子型により異なる血液型抗原結合パターンを示すことから、ウイルス粒子表層の構造がそれぞれの遺伝子型により異なることが示唆される。このことを明らかにするために、GI/4 型に属する Chiba407 株のウイルス様中空粒子を昆虫細胞で発現させ、精製の後、X 線結晶構造解析のための結晶化に供した。

[染谷雄一, 武田直和, 長谷川和也 ((財)高輝度光科学研究センター), 熊坂 崇 ((財)高輝度光科学研究センター) ]

(14) NoV と血液型抗原との結合 : Lewis 抗原への結合の解析

血液型抗原は末端の構造によって ABO 型, Lewis 型に区別され, さらに内部の linkage によってタイプ 1, 2 に区別される。腸管上皮には主にタイプ 1 抗原が, 赤血球上には主にタイプ 2 抗原が発現しているとされる。昨年度までに, NoV が ABO 抗原において, タイプ 1, 2 構造の識別を行っていることを明らかに

した。今年度は, Lewis 抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別が行われているかを明らかにするため, Virus-like particles (VLPs)を用い, Biacore により Lewis 抗原との結合パターンを検討した。その結果, Lewis 抗原においてもタイプ 1, 2 構造の識別が行われていることが明らかとなった。タイプ 1, 2 構造を識別することによって, NoV は自らの組織特異性を決定している可能性がある。

[白土東子, 熊谷安希子, 武田直和, 石井孝司, 脇田隆字]

(15) NoV と血液型抗原との結合 : X 線結晶構造解析による結合解析

プロトタイプ Norwalk/68 (NV/68) (GI/1) 株は  $\alpha 1,2$  フコース (Fuc) 転移酵素遺伝子活性型の分泌型個体で感染が成立するが, 不活性型の非分泌型個体では感染が成立しないことから, NoV と血液型抗原との結合には  $\alpha 1,2$  Fuc が不可欠と言われている。一方,  $\alpha 1,2$  Fuc を含まず  $\alpha 1,4$  Fuc を含むルイス a 抗原 (Le-a) のみを腸管上皮に発現する非分泌型個体にも感染する NoV 株が存在することが知られているが, 詳細は明らかではない。NoV の Le-a 認識機構を明らかにするため, Le-a 結合能を有する 258 (GI/2) 株のキャプシド P ドメインと Le-a 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果,  $\alpha 1,4$ Fuc 認識は 258 株特有の構造に起因していることが明らかとなった。

[熊谷安希子, 久保田智巳 (産総研), 伊藤浩美 (産総研), 成松 久 (産総研), 武田直和, 石井孝司, 染谷雄一, 脇田隆字, 白土東子]

(16) NoV と血液型抗原との結合 : 組織切片を用いた解析

血液型抗原の発現は, 組織だけでなく, 細胞種によっても異なる。小腸においては陰窩における発現は弱く, 絨毛先端においては強く発現されているといわれているが, 詳細は明らかでない。一方, NoV は下痢症発症の際, 腸絨毛に強くダメージを与えることが知られて

いるが、そのメカニズムは明らかになっていない。NoV の組織特異性に血液型抗原が関与するかどうかの検討を行うため、ヒト小腸切片を用いた免疫組織化学染色を行い、Lewis 抗原の発現分布を解析した。今後さらに連続切片上で VLP の Binding assay も行い、その相関性を検討する予定である。

[白土東子，永田典代（感染病理部），池原譲（産総研），成松 久（産総研），橋本康弘（福島県立医科大），武田直和，石井孝司，脇田隆字]

## 2. サポウイルス (SaV) に関する研究

### 急性胃腸炎病原因子の解析

(1) 小児科外来患者糞便中の病原因子の解析(熊本) 下痢症起因ウイルスには、ノロウイルス (NoV) をはじめ、アデノウイルス (AdV) ，ロタウイルス (RV) ，サポウイルス (SaV) ，アストロウイルス (AstV) ，アイチウイルス (AiV) ，エンテロウイルス (EntV) などがある。これらの内、NoV はほとんどの地方衛生研究所で検査が行われ、AdV と RV は簡易検査キットが市販されている。しかし、SaV, AstV, AiV 及び EntV はそれほど検査が行われていないため、その発生動向については不明な部分が多い。2002 年 4 月から 2007 年 12 月に熊本県内の 3 つの小児科に急性胃腸炎の症状で受診した外来患者糞便 639 検体について、急性胃腸炎を引き起こすウイルス、および細菌の検索を行った。糞便 687 検体中 458 検体 (66.7%) から原因物質が検出された。内訳は NoV G I が 25 検体、NoV G II が 255 検体、SaV が 81 検体、AstV が 9 検体、AiV が 1 検体、GARV が 62 検体、GCRV が 1 検体、AdV が 23 検体、EntV が 13 検体、細菌性が 14 検体であった。この中の 27 検体は混合感染であった。今回の解析により、小児科外来患者において、解析期間を通じてノロウイルスが最も多く検出されたこと、2005 年以降はサポウイルスがノロウイルスに次いで 2 番目に多く検出されていることが明らかとなった。従来、サポウイルスの検出は少ないとされてきたが、本研究により、サポウイルスが急性胃腸炎の病原因子として以前想定されていたより多く存在することが判明した。

[原田誠也，八尋俊輔，西村浩一，松尾 繁，中島龍一（熊本県保健環境科学研），岡智一郎，片山和彦，武田直和]

### (2) 2002 年から 2007 年の間に熊本県内で検出されたサポウイルス株の解析

2002 年 6 月から 2007 年 12 月に熊本県内の 3 つの小児科に急性胃腸炎の症状で受診した外来患者糞便 639 検体について、multiplex RT-PCR, RT-PCR, universal nested RT-PCR 法, genogroup specific RT-PCR 法および real-time RT-PCR 法によるサポウイルスの検出、解析を行い、81 検体 (12.7%) でサポウイルス陽性となった。それぞれの検出率は 27.2%, 100%, 95.1%, 100%, 97.5% であり、ポリメラーゼ領域をターゲットとした primer を含む multiplex RT-PCR 法以外はいずれもほぼ同様の検出効率を示した。検出されたサポウイルスは ggenogroup I が 17 株, genogroup II が 10 株, genogroup IV が 51 株, genogroup V が 3 株で、限られた地域において年度毎に異なった genogroup に属するサポウイルス株が検出される傾向にあった。サポウイルス排泄量は糞便 1g 中  $1.32 \times 10^5$  ~  $1.07 \times 10^{11}$  コピーであった。今回の解析により 2007 年には 9 月から 11 月にかけて、genogroup IV に属するサポウイルス株が熊本県内 10 市町に及ぶ範囲で流行していたことを明らかにした。

[原田誠也，八尋俊輔，西村浩一，松尾 繁，中島龍一（熊本県保健環境科学研），岡田峰幸，篠崎邦子（千葉衛生研），岡智一郎，片山和彦，武田直和]

### (3) 散発胃腸炎患者糞便中のサポウイルスの解析

愛媛県内で発生した散発性胃腸炎患者糞便から検出されたサポウイルスの解析を行ったところ、2007 年の愛媛県内においては、他の県と同様、主に genogroup IV に属する株が検出されることを明らかにした。また、これらの株のゲノム 3' 側約 2.3kb を増幅し、塩基配列解析を行った結果、これら genogroup IV に属する株が発生時期、場所が異なるにもかかわらず、極めて類似した塩基配列を有することも示した。

[大塚有加, 近藤玲子, 市川高子, 山下育孝, 大瀬戸光明, (愛媛県立衛生環境研), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (4) サポウイルス集団発生事例の解析および不顕性感染者の検出

2004年6月および2007年7月に長野県内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それぞれ genogroup I と genogroup IV で、ウイルス排泄量は糞便 1g 中  $10^6$ ~ $10^{11}$  コピーであった。いずれの事例も疫学調査の結果から、ヒト-ヒト感染によるものと考えられた。さらに、今回の解析では無症状であるにもかかわらず、糞便中に発症者と同レベル(糞便 1g 中  $10^7$ ~ $10^{10}$  コピー)のサポウイルス RNA を排泄している成人の存在が初めて示された。

[吉田徹也, 粕尾しず子, 畦上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石崇(長野県環境保全研), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (5) サポウイルス糞便中排泄期間の解析

サポウイルス集団感染事例の患者糞便中のサポウイルス RNA の定量的解析および変異解析を行い、サポウイルス RNA が発症後数日から約2週間、長い例では約1ヶ月間にわたって検出されることを明らかにした。さらに、約1ヶ月間にわたってサポウイルスが体内に存在した場合、サポウイルスの構造タンパク質コード領域にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が生じることが初めて見いだした。サポウイルスは遺伝的に極めて多様であるが、このように体内で変異を生じることがウイルスの多様性を生み出す1つのメカニズムである可能性がある。

[岩切 章, 山本正悟(宮崎県衛生環境研), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (6) 牡蠣が原因と疑われた食中毒事例の患者糞便中ウイルスの検出

従来、生牡蠣の原因ウイルスの検索はノロウイルス

のみに注目して行われてきた。本研究では他の下痢症ウイルスの存在の有無を検索する目的で牡蠣が原因と疑われた食中毒事例の患者糞便中について、ノロウイルス、サポウイルス、アストロウイルス、アイチウイルス RNA の検出を nested RT-PCR 法で行い、ノロウイルス以外にサポウイルスやアイチウイルスが同時に検出される例があることを報告した。本研究では、牡蠣そのものの検討ができなかったが、牡蠣にはノロウイルスだけでなく、サポウイルスやアイチウイルスなど、他のウイルスも濃縮されている可能性が示唆された。

[中川玲子(山口県環境保健センター), 有田知子(日本スポーツ振興センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (7) 牡蠣からのサポウイルスの検出

河川中に垂下した牡蠣にサポウイルス RNA が濃縮されること、市場に流通する牡蠣にもサポウイルス核酸が検出されること、検出された配列は急性胃腸炎患者糞便から検出されるものと極めて類似することを示した。本研究は牡蠣による食中毒事例ではないが、食用の牡蠣からサポウイルス RNA を検出した初めての例であり、環境に混入したサポウイルスが牡蠣にも取り込まれていること、牡蠣の喫食によってサポウイルス感染が引き起こされる可能性を示す。

[植木 洋, 庄司美加(宮城県保健環境センター), 山本美和子, 阿部勝彦, 伊藤文明, 池田義文(広島市衛生研), 西尾 治, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛(国立医薬品食品衛生研)]

#### (8) アサリを原因とするノロウイルス、サポウイルス食中毒事例の解析

サポウイルスの感染経路はノロウイルスと同様と考えられているが、原因食材が特定された例はいまだない。本研究では加熱不十分のアサリが原因と考えられた食中毒事例において患者糞便と原因と推定されたアサリから nested RT-PCR によってサポウイルス、ノロウイルスの検出を行った。その結果、サポウイルス、ノロウイルスともに患者糞便と原因と疑われた食材と

同一ロットのアサリから極めて類似した（約99%以上）塩基配列を検出した。特にサポウイルスについては患者糞便と原因食材とで100%解析した塩基配列が一致したものもあった。この結果から、ノロウイルスだけでなく、サポウイルス感染が貝の喫食によって引き起こされることを証明した。本事例はサポウイルス感染における原因食材を特定した世界で初めての事例である。

[飯塚節子（島根県保健環境科学研），岡智一郎，片山和彦，武田直和，野田衛（国立医薬品食品衛生研）]

#### （9）結婚式場で発生したサポウイルスによる集団食中毒事例の解析

2007年に愛媛県の結婚式場で発生したサポウイルスの集団感染事例について解析し、感染者が年齢に限局されず発症すること、喫食時間から推定した発症までの潜伏時間が14.5～99.5時間（平均38時間）であることを明らかにした。今回の事例では原因食材や施設内の汚染源の特定にはいたらなかった。このことは極めて微量のサポウイルスが集団感染を引き起こす可能性を示唆する。この事例は食中毒事例として扱われ、今後はノロウイルスだけでなく、サポウイルスも食中毒事例の病原因子として検索対象に加える必要性が示唆された。

[大塚有加，近藤玲子，市川高子，山下育孝，大瀬戸光明（愛媛県立衛生環境研），関谷安正，上田哲郎，芝信明（松山市保健所），岡智一郎，片山和彦，武田直和]

#### （10）サポウイルスサブゲノム遺伝子領域増幅方法の確立

サポウイルスのゲノム解析は主にnested RT-PCR法で増幅されたポリメラーゼコード領域もしくは構造蛋白質コード領域の数百塩基の配列によって解析されている。しかし、近年の研究により、サポウイルスの構造蛋白質コード領域の配列は極めて多様であることが明らかになってきており、その情報蓄積が急務である。従来は株ごとに個別のプライマーを設計して、構造蛋

白質全長に対応する遺伝子領域の塩基配列決定が行われてきたが、共通の方法で増幅ができるように、検出に広く使用されているプライマーと oligodT primer を組み合わせ、nested RT-PCR法による、構造蛋白質コード領域からゲノム末端までの遺伝子領域増幅方法を構築した。

（岡智一郎，片山和彦，武田直和）

#### （11）河川水からのサポウイルスの検出

河川中のサポウイルスの存在の有無を検討するため、リアルタイム RT-PCR法による核酸検出を試みた。その結果、関東地方の河川水において急性胃腸炎患者の増加する冬期にサポウイルス RNA 量が増加することが明らかとなった。現在、河川中のサポウイルスの塩基配列解析を行っている。

[北島正章（東大院工学），岡智一郎，片山和彦，原本英司（国立保健医療科学院水道工学），片山浩之（東大院工学），武田直和，大垣眞一郎（東大院工学）]

#### （12）サポウイルス Virus-like particle 発現効率増加法の検討

ヒト由来のサポウイルスは培養細胞での増殖が出来ないが、構造蛋白質コード領域を昆虫細胞、あるいは哺乳動物細胞を用いて発現させると、構造的に native のウイルスと同様のウイルス様中空粒子（VLP）を調製することが出来る。現在までに複数のサポウイルス株について VLP 発現に成功し、抗原性の評価や、抗原検出系開発のためのポリクローナル、モノクローナル抗体の作成を行ってきた。これまでの検討により、昆虫細胞発現系において、発現コンストラクトの開始コドン直前への3塩基の挿入によって、VLPの収量が増加した例があったため、哺乳動物細胞発現系においても同様に検討し、株によってはVLPの収量が約1.5倍に増加することを確認した。

[岡智一郎，Hansman S. Grant，片山和彦，武田直和]

#### （13）サポウイルスプロテアーゼによる切断効率を制御する因子の同定



サポ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、我々はこれまでに6箇所中、5箇所、切断部位上流4番目のアミノ酸が芳香族アミノ酸（フェニルアラニンもしくはチロシン）であり、これらをアラニンに置換すると切断効率が顕著に低下することを明らかにしてきた。一方で残りの1箇所の切断部位は上流4番目のアミノ酸がアルギニンであり、切断効率が非常に低いことから、本研究では、このアルギニンを芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンに置換したところ、この切断部位の著しい切断効率の亢進を認めた。この結果から、切断部位上流4番目の残基がサポウイルス ORF1 ポリプロテインの切断効率を制御していることを証明した。特定の部位の切断効率の抑制は、サポウイルスの複製、増殖に何らかの重要な意味を有すると考えられる。

[岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (14) サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析

サポウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムを検討するため、統合計算化学システム MOE を用いてサポウイルスプロテアーゼドメインの分子モデルを構築後、ASEDock2005 を用いて ORF1 ポリプロテイン切断部位6箇所それぞれの上流下流4残基 (P4-P4') に対応する8残基とプロテアーゼドメインのドッキングモデルを作成した。この結果、基質認識に重要と考えられるプロテアーゼドメイン内部のアミノ酸残基として T30, H31, E52, Y101, K112, R113 を同定し、アミノ酸変異導入により、ポリプロテイン切断活性への影響を証明した。

サポウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムとして、サポウイルスプロテアーゼドメイン内の正に帯電したアミノ酸の側鎖にかこまれた領域と切断部位上流1番目のアミノ酸 (P1 残基) の静電相互作用、さらに切断部位上流4番目のアミノ酸 (P4 残基) と Y101 との芳香環を介する  $\pi$ - $\pi$  相互作用、あるいは疎水相

相互作用によるスタッキング構造の形成が重要であることが示唆された。

[横山 勝, 佐藤裕徳, 神田忠仁 (病原体ゲノム解析センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

### 3. マウスノロウイルスに関する研究

#### (1) マウスノロウイルスの環境安定性と消毒剤感受性の検討

2003年に同定された培養細胞で増殖可能なマウスノロウイルスと、従来、モデルとして使用されてきたネコカリシウイルスを用い、同時に環境安定性、塩素耐性について検討した。マウスノロウイルス、ネコカリシウイルスは水中で、室温72時間にわたり安定であった。また NaClO 125~500ppm に対する感受性を検討し、マウスノロウイルスがネコカリシウイルスより塩素消毒に対して抵抗性を示すことを明らかにした。本研究で得られた知見はヒト由来ノロウイルスの不活化条件の推定と、動物実験施設内におけるマウスノロウイルスの感染伝播制御方法の確立に有用である。

[高木弘隆, 杉山和良 (バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸 (東大院獣医), 片山和彦, 岡智一郎, 武田直和]

#### (2) 完全長マウスノロウイルスゲノムのクローニング

2006年に日本国内のマウスの糞便から初めて分離されたマウスノロウイルス S7 株を RAW 細胞で増殖させ、ウイルス粒子を精製した。精製粒子よりゲノム RNA を抽出し、ゲノム全長の塩基配列を決定した。今後、完全長ゲノム cDNA をプラスミドベクターに組み込み、インフェクシャスクローンの構築を試みる。

[片山和彦, 岡智一郎, 遠矢幸伸 (東大院獣医), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 武田直和]

#### (3) マウスノロウイルス検出抗体の作成

マウスノロウイルスのゲノム全長を含むクローンを鋳型に各機能蛋白質、構造蛋白質に対応する遺伝子領域をそれぞれ大腸菌で発現させ、ウサギおよびモルモットに免疫し、感染細胞の免疫染色に使用可能な部位

特異抗体を作成した。

[岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (4) マウスノロウイルス核酸検出系の構築

公的データベースには40株以上のマウスノロウイルスのフルゲノム塩基配列が登録されているが、これらの株をすべて検出できる核酸検出系は構築されていない。そこでマウスノロウイルスゲノム中、高度に保存された領域を検索し、nested RT-PCR用に複数のプライマーを設計した。現在、検出系の構築を進めている。

[北島正章(東大院工学), 岡智一郎, 片山和彦, 遠矢幸伸(東大院獣医), 武田直和]

### 4. 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検出抗体の作成

ネコカリシウイルスのゲノム全長を含むクローンを鋳型に各機能蛋白質、構造蛋白質に対応する遺伝子領域をそれぞれ大腸菌で発現させ、ウサギに免疫し、ウイルス感染細胞の免疫染色に使用可能な部位特異抗体を作成した。

[岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (2) ネコカリシウイルスプロテアーゼの基質との結合モデルの構築

ネコカリシウイルスプロテアーゼの基質認識メカニズムを検討するため、統合計算化学システム MOE を用いてネコカリシウイルスプロテアーゼドメインの分子モデルを構築後、ASEDock2005 を用いて構造蛋白質前駆体の切断部位1箇所の上流下流4残基(P4-P4')に対応する8残基とプロテアーゼドメインのドッキングモデルを作成して、基質認識に重要と考えられるプロテアーゼドメイン内部のアミノ酸残基を同定した。

[横山 勝, 佐藤裕徳, 神田忠仁(病原体ゲノム解析センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和]

#### (3) BRET を用いたネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築

多くのカリシウイルスは培養細胞で増殖させることが出来ないが、ネコカリシウイルス (FCV) はネコ腎臓由来細胞 (CRFK 細胞) で増殖可能である。カリシウイルスの増殖阻害物質のスクリーニングを行うため、ウイルスプロテアーゼによる切断部位を含む FCV 構造蛋白質前駆体コード領域の一部を Green Fluorescence Protein (GFP) と Renilla luciferase (rLuc) 間にクローニングし、Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) を利用した FCV プロテアーゼ活性検出系の構築を行った。今後のスクリーニング操作を考慮し、BRET コンストラクトを安定発現する細胞株を確立している。

[岡智一郎, 高木弘隆(バイオセーフティ管理室), 遠矢幸伸(東大院獣医), 片山和彦, 武田直和]

### 5. ラゴウイルスに関する研究

#### (1) 兎出血病ウイルスのプロテアーゼ発現に重要なアミノ酸残基の解析

カリシウイルスに属し、ウサギに高い致死性を示す兎出血病ウイルス (RHDV) のプロテアーゼ活性発現に重要なアミノ酸残基を他のカリシウイルス (ノロウイルス, サボウイルス, ネコカリシウイルス) と比較することを目的に、国内で分離された RHDV のゲノム全長の cDNA clone を鋳型として、4箇所のアミノ酸 (H, D, C および H) 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 (2344 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、RHDV プロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸として、H<sup>1135</sup>, D<sup>1152</sup>, C<sup>1212</sup>, H<sup>1227</sup> を同定した。この結果から、カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要な基本残基が共通することが確認された。

[岡智一郎, 恒光 裕 (動物衛生研), 片山和彦, 武田直和]

### 6. カリシウイルスに関する研究

#### (1) カリシウイルスのポリプロテイン切断部位認識

に重要な切断部位上流アミノ酸の解析

カリシウイルスは4つの属（サポウイルス、ノロウイルス、ベジウイルス、ラゴウイルス）に分類される。カリシウイルスの複製、増殖には open reading frame 1 にコードされているウイルス自身のプロテアーゼが必須である。カリシウイルスプロテアーゼはいずれもポリプロテイン中の特定のグルタミン酸もしくはグルタミンの直後を切断する。この切断部位認識について検討するため、サポウイルスの ORF1 切断部位 1 箇所、ノロウイルス 2 箇所、ラゴウイルス 1 箇所、ベジウイルス 1 箇所の切断部位上流 4 残基をそれぞれアミノ酸置換し、切断への影響を検討したところ、サポでは上流 4 番目と 1 番目、ノロ、ラゴでは 4 番目、2 番目、1 番目、そしてベジでは 4 番目、3 番目、1 番目が切断部位認識に影響することを見いだした。これらの結果からカリシウイルスの切断部位認識には共通して切断部位上流 4 番目のアミノ酸が重要であることが示された。

[岡智一郎, 横山 勝, 本村和嗣, 守 宏美, 中村浩美, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター) 恒光 裕 (動物衛生研), 片山和彦, 武田直和]

(2) カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析

カリシウイルス科の4つ属（サポ、ノロ、ベジ、ラゴ）のうち3つに対応する Sapporo virus (SaV), Norwalk virus (NoV), および feline calicivirus (FCV) のプロテアーゼと基質が結合した分子モデルを構築し、カリシプロテアーゼの基質認識メカニズムを詳細に解析した。基質の P1 残基は E または Q であり、プロテアーゼの正電荷を持つアミノ酸の側鎖に囲まれていた。P1 残基とプロテアーゼ内部アミノ酸との静電気相互作用が基質認識に重要であると考えられた。P4 残基はプロテアーゼ内部の疎水性のアミノ酸の近傍に配置されたことから、P4 残基が疎水性であると、基質とプロテアーゼの親和性が高まると考えられた。P4 残基周辺の疎水性の強さは SaV > FCV > NoV であった。P4 残基の疎水度の寄与は、SaV で最も高いと推定され

た。

[横山 勝 (病原体ゲノム解析センター), 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 佐藤裕徳 (病原体ゲノム解析センター) ]

7. その他

(1) 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6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6検体中6検体でウイルス粒子が確認され、この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, Lars Moller (Robert Koch-Institute)]

II. エンテロウイルスに関する研究

1. 実験室診断およびレファレンス活動

(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。2008年度は、エンテロウイルス同定用パネル血清 EP95 を 11 セット、エンテロウイルス単味抗血清 67 種類、コクサッキーA 群同定用 CF 腹水 4 セットを配布した。ポリオウイルスの同定および型内株鑑別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 共催) の開催  
第 18 回ポリオ実験室診断技術研修会を実施した。研修期間は 2008 年 1 月 19 日～2 月 6 日、研修参加者は、エチオピア、ナイジェリア、パキスタンから各 1 名、ベトナムから 2 名の計 5 名の他、個別研修として中華人民共和国からの参加者 1 名の計 6 名であった。WHO

ポリオ実験室ネットワークにおける国家ポリオ実験室に必要とされる、急性弛緩性麻痺サーベイランスにより得られた糞便検体からのポリオウイルス分離・同定に必要な技術習得のための講義及び実習を実施した。また、ポリオ根絶の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。本年度はとくに、ポリオ実験室診断の迅速化について、WHO 専門家を交えた情報交換および討議を実施した。また、麻疹を中心とした他のワクチン予防可能疾患に関する講義・実習を実施した。

(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 148 検体およびラオス 114 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・ベトナム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。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の維持を確認した。

ウ) WHO Enterovirus Collaborating Center として、西太平洋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。2008 年の 3-6 月を中心として、中国本土で大規模な手足口病流行が発生し、とくに安徽省では、短期間に 20 名以上の急性死症例が報告され、中国ポリオ RRL から、感染研へ検査方法と検査試薬に関する照会がなされた。同時に、西太平洋地域の他のポリオネットワーク実験室から、手足口病の検査試薬等の供給について、WHO 地域事務局を介しての依頼があり、中国、ベトナム、モンゴルのネットワーク実験室に対して、同定用抗血清、病理組織免疫染色用抗体、遺伝子解析用プライマー等の送付を行った。

[吉田弘, 西村順裕, 有田峰太郎, 清水博之]

エ) 2008 年モンゴルにおける大規模な手足口病流行の際、モンゴル National Polio Laboratory は、エン

テロウイルス同定の経験に乏しかったことから、一部の臨床検体を受け入れて、ウイルス分離同定・遺伝子解析を行った。その結果、2008 年のモンゴルの手足口病の主要な原因ウイルスは EV71 であり、EV71 遺伝子型は、中国本土で多く検出されている subgenogroup C4 ではなく C2 であることが明らかとなった。

[西村順裕, 吉田 弘, 有田峰太郎, 清水博之]

オ) 2008 年 6 月 24-27 日に、WHO 本部(ジュネーブ)で行われた The 14th Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network および *Ad Hoc* Small Working Group to discuss the development and evaluation of a range diagnostic reagents に参加し、世界ポリオ根絶計画の現状およびポリオ実験室診断技術開発に関する情報交換を行った。

[清水博之]

カ) 2009 年 3 月 24-3 月 26 日に、オランダ RIVM で行われた *Ad hoc* Small Working Group discussion on development and evaluation of new diagnostic reagents and approaches to testing に参加し、ポリオ実験室診断技術開発に関する情報交換を行った。

[清水博之]

キ) 2006 年 12 月より開始した V P D s プロジェクトの後方支援(協力計画策定, 研修受け入れ)に関与すると共に、中国 CDC より 1 名、3 ヶ月間の研修を行った。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 清水博之]

ク) 2008 年 10 月 15-10 月 21 日に行われた中国省級ポリオ実験室レビュー(青海省, 陝西省)に JICA 専門家として参加し、レビューの結果を WHO および JICA に報告した。

[清水博之]

2. 西太平洋地域の 2008 年のポリオウイルス分離状況

2008 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 262 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。カンボジア、ベトナム、モンゴルにおいて 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。野生株ポリオウイルスおよび VDPV は検出されなかった。

[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関わる研究

(1) オーストラリアで分離されたポリオウイルスの病原性解析

オーストラリアで、AFP 患者等から分離されたポリオウイルスについて、TgPVR21 マウスを用いた神経病原性解析試験を実施した。ポリオウイルス分離株を TgPVR21 マウス(1 群 6 匹)に脳内接種し、弛緩性麻痺等、神経症状の発現および致死的症状についての観察を、接種後 14 日間行った。各群投与群について、麻痺等の神経症状および死亡したマウスの匹数を確認し、PD<sub>50</sub> 値を算出した。その結果、横断性脊髄炎患者由来の 3 型ポリオウイルスは、ワクチン株と比較すると高い病原性を有しており、OPV 投与による横断性脊髄炎発症の可能性が示唆された。

[西村順裕, 清水博之, Bruce Thorley (VIDRL)]

(2) 新規ポリオウイルス検査法の開発

世界ポリオ実験室ネットワークによるウイルス学的診断では、培養細胞を用いたウイルス分離同定に基づくポリオウイルス検査を基本としているが、検査の迅速化には限界がある。そのため、糞便検体から、直接ポリオウイルスを検出同定する新たな検査手法が検討されているが、検体からのポリオウイルス直接検出には、検査感度・精度に関する技術的課題が多く残されている。そのため、高価な機器あるいは高度な技術を要する検査手法を用いることなく、技術レベルの異なる多くのネット出来るだけ多くの実験室への導入が可能な簡便なポリオウイルス検出法(RT-LAMP 法, PA 法等)に関する基礎的な技術開発を試みている。

[有田峰太郎, 清水博之]

(3) 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]

(4) 中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

中国は 10 年以上ポリオフリーであるが、インド, パキスタンといった野生株流行地に隣接することで輸入リスクを有する。また大都市部は流動人口を抱え疾患サーベイランスは困難な状況である。広東省広州市, 山東省済南市をパイロットエリアとして、環境サーベイランスによるポリオ/エンテロウイルスの地域流行像を把握することを目的とする研究を行った。2008 年 4 月から 2009 年 2 月までの流入下水, 河川水調査を行ったところ、様々な腸管系ウイルスの流行を示唆しており、血清型, ゲノタイプなど詳細な解析が進行中である。

[吉田 弘, 帖佐 徹 (九州産業衛生協会)]

(5) 不活化ウイルスを用いたポリオウイルス核酸検査標準品の評価

ポリオウイルス実験室ネットワークでは、RT-PCR や塩基配列解析試験の精度管理・品質管理のために、標準ウイルスや合成 RNA 断片等が用いられているが、海外への病原体送付の規制の厳格化にともない、長期間安定な非感染性核酸標準品が必要とされている。ポリオウイルスワクチン株(Sabin I, II および III 株)を材料として、不活化ポリオウイルス NATatrol 標準品を作成して、ウイルス不活化の validation を行った。

各種条件での安定性等についての評価を実施している。

[清水博之]

#### 4. エンテロウイルスおよび他の腸管ウイルスに関する研究

##### (1) エンテロウイルス 71 結合受容体の探索

エンテロウイルス 71 結合受容体の同定を試みた。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。様々な cDNA ライブラリーを用いてクローニングを試み、Jurkat 細胞 cDNA ライブラリーから EV71 受容体候補分子を特定した。

[西村順裕, 下島昌幸 (東大医科研), 脇田隆宇, 清水博之]

##### (2) エンテロウイルス 71 とヒト PSGL-1 との結合の解析

パンニングを用いた発現クローニングにより、エンテロウイルス 71 に結合する宿主蛋白質として、P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) を同定した。PSGL-1 をほとんど発現していない 293T 細胞に PSGL-1 を一過性に発現させると、293T 細胞にエンテロウイルス 71 が結合するようになった。また、この結合は抗 PSGL-1 抗体で阻害された。したがって、PSGL-1 とエンテロウイルス 71 が特異的に結合することが示された。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

##### (3) ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞の樹立

ヒト PSGL-1 がエンテロウイルス 71 の細胞侵入に関わる受容体かどうかを解析するために、ヒト PSGL-1 を安定的に発現するマウス L929 細胞株 (L-PSGL-1.1 細胞) を樹立した。エンテロウイルス 71-1095 株を

L-PSGL-1.1 細胞に感染させたところ、感染後 4 日後に L-PSGL-1.1 細胞は細胞変性効果を示した。また、感染した L-PSGL-1.1 細胞質内にはエンテロウイルス 71 キャプシド抗原が検出された。さらにこれらの現象は、抗 PSGL-1 抗体で阻害された。したがって、ヒト PSGL-1 はエンテロウイルス 71-1095 株の侵入にも関わる受容体であることが示された。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

##### (4) 白血球細胞株、非白血球細胞株におけるエンテロウイルス 71 増殖の解析

各種細胞株を用いて、エンテロウイルス 71 受容体である PSGL-1 の発現と、エンテロウイルス 71 増殖の関連を解析した。PSGL-1 は Jurkat 細胞等の白血球細胞株に発現していたが、RD 細胞、Vero 細胞など非白血球細胞株にはほとんど発現していなかった。また、抗 PSGL-1 抗体は、エンテロウイルス 71 の Jurkat 細胞での増殖を阻害したが、RD 細胞や Vero 細胞での増殖を阻害しなかった。したがって、RD 細胞、Vero 細胞は PSGL-1 以外のエンテロウイルス 71 受容体を発現していることが示唆された。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

##### (5) Jurkat 細胞における、エンテロウイルス 71 分離株の増殖性の解析

エンテロウイルス 71 受容体である PSGL-1 を発現している Jurkat 細胞を用いて、エンテロウイルス 71 分離株 (8 株) の増殖を解析した。8 株のうち 5 株の増殖は抗 PSGL-1 抗体で阻害され、PSGL-1 依存的増殖が示された。さらにこれら 5 株は、可溶性 PSGL-1 と結合した。しかし、他の 3 株は可溶性 PSGL-1 に結合せず、Jurkat 細胞においても PSGL-1 依存的増殖を示さなかった。したがって、エンテロウイルス 71 は PSGL-1 に結合する株と結合しない株に分類されることが明らかとなった。

[西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

##### (6) ヒト PSGL-1 発現マウス L929 細胞におけるエン

#### テロウイルス 71 増殖の解析

ヒト PSGL-1 を安定的に発現するマウス L929 細胞株 (L-PSGL-1.1 細胞) における, エンテロウイルス 71 分離株の増殖を解析した. 分離株にはエンテロウイルス 71-1095 株を含む 5 株を用いた. RD または Vero 細胞で増殖させたエンテロウイルス 71-1095 株を L-PSGL-1.1 細胞に感染させたところ, 4 日後には細胞変性効果を示した. しかし, その他の 4 株は 4 日後では明瞭な細胞変性効果を示さず, 十分な細胞変性効果発現には 1 週間程度の培養を要した. この表現型の違いの原因を探るため, L-PSGL-1.1 細胞での増殖前後における, エンテロウイルス 71 ゲノム変異の比較解析を行っている.

[宮村紘平, 西村順裕, 脇田隆宇, 清水博之]

#### (7) ヒト中枢神経組織におけるエンテロウイルス 71 受容体発現の解析

PSGL-1 等エンテロウイルス 71 受容体分子の局在・分布と神経病変との関連性を解析することにより, アジア太平洋地域で発生しているエンテロウイルス 71 脳炎死亡例を含む手足口病流行におけるエンテロウイルス 71 神経病原性発現の分子機構を明らかにすることを目的として, 急性エンテロウイルス 71 脳髄膜炎患者の中枢神経組織における, 特異的エンテロウイルス 71 受容体分子の組織分布の解析を実施している. エンテロウイルス 71 脳炎患者および対照例に由来する中枢神経組織を用いて, エンテロウイルス 71 抗原, 組織病変とエンテロウイルス 71 受容体分子の分布・局在および病理学的特徴を比較解析する.

[Wong Kum Thong (マラヤ大学), 西村順裕, 清水博之]

#### (8) RD 細胞におけるエンテロウイルス 71 受容体の解析

エンテロウイルス 71 感受性である RD-A 細胞のゲノム DNA を非感受性であるマウス由来 L929 細胞に導入することで, EV71 感受性を持つ L929 細胞 (L051 細胞) を樹立した. L929 細胞および L051 細胞から Total RNA をそれぞれ精製し, マイクロアレイの結果から, L051

細胞における mRNA 発現が L929 細胞よりも多いとされたヒトの遺伝子 523 個の中から上位 5 つの膜蛋白質を選んだ. それらの遺伝子に対応するヒト由来ゲノムが L051 細胞のゲノムに存在するかを PCR で確認した. 5 つの候補遺伝子のうち 1 つの遺伝子の全長ゲノムが L051 細胞のゲノム中に導入され L051 細胞にエンテロウイルス 71 感受性をもたらすことを確認した.

[山吉誠也, 小池 智(東京都臨床医学総合研), 清水博之]

#### (9) 抗エンテロウイルス活性を持つ宿主細胞キナーゼ阻害剤の解析

ポリオウイルスおよびエンテロウイルス 71 の感染を阻害する Raf-1 阻害剤 GW5074 の活性を増強する細胞のキナーゼ阻害剤の探索を行い, MEK1/2 阻害剤, Akt1/2 阻害剤, およびチロシンキナーゼ阻害剤を同定した. CPE の観察により耐性ウイルスが分離されなかった GW5074 について, ウイルスゲノムの複製を確認したところ, 選択 4 回目でウイルス複製が部分的な耐性を示した. ウイルスタンパク質 3A の同一の変異が, チロシンキナーゼ阻害剤 Flt3 Inhibitor II と GW5074 の阻害活性に耐性を示したため, これらの細胞のキナーゼ阻害剤はウイルススタンパク質 3A を標的とする阻害活性を持つことが示唆された.

[有田峰太郎, 脇田隆宇, 清水博之]

#### (10) エンテロウイルス 71 マウス感染モデルの解析

エンテロウイルス 71 マウス感染モデルを樹立するため, 2 週齢のマウスに病原性を示すマウスアダプト株 2 株を分離した. マウスアダプトエンテロウイルス 71 株の遺伝子変異および培養細胞でのウイルス学的性状を解析したところ, 1 株については温度感受性変異を有することが示された. 現在, 遺伝子解析および感染性クローンの作製により, *in vivo* および *in vitro* におけるウイルス学的性状を規定するウイルスゲノム部位の同定を行っている.

[Ong Kien Chai, Wong Kum Thong (マラヤ大学), 西

村順裕, 有田峰太郎, 清水博之]

(11) インドネシアに伝播しているエンテロウイルス検出および同定法の研究

熱帯地方で伝播している腸管ウイルス病原体サーベイランスシステムの構築のため、エンテロウイルス病原体サーベイランス手法についての基礎的検討を実施した。糞便検体から、直接エンテロウイルス遺伝子を高感度に検出・同定するVP1 CODEHOP PCR により、インドネシア国内由来82 検体の解析を行った。用いた190検体から、HEV-A (11.05%), HEV-B (24.21%), およびHEV-C (11.05%)が同定可能であった。塩基配列および相同性解析によるエンテロウイルス同定の結果、多様な血清型のエンテロウイルスが同定された。また、ヒト以外の類人猿由来糞便検体からエコー12型が高頻度に検出された。CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定は、腸管感染症の病原体サーベイランス手法として有用であり、ウイルス分離同定の設備が整備されていない研究室にも比較的容易に導入可能であった。また、インドネシアでは、多様な血清型・遺伝子型のエンテロウイルスが伝播していることが明らかとなった。

[Andi Utama (LIPI), Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

(12) 上気道炎患者由来検体からの高感度エンテロウイルス検出法に関する検討

従来、エンテロウイルスの検出・同定手法として、組織培養による分離・同定が広く用いられてきた。しかし、検査に長時間を要し、さらに、培養細胞で分離困難なウイルスが存在するなどの問題点がある。培養細胞で分離困難なウイルス、特にコクサッキーウイルスAに属するウイルスは、乳呑みマウスを用いて分離同定が行われてきたが、培養細胞を用いた方法よりさらに煩雑である。上気道炎患者からの咽頭拭い液検体から直接RNAを抽出してCODEHOP-PCR法を用いた高感度検出法によりエンテロウイルス遺伝子検出を試みた。用いた213検体のうち、46検体(22%)についてエンテ

ロウイルス同定可能であり、coxsackievirus A16 (59%), coxsackievirus A5 (15%), coxsackievirus A3 (11%), coxsackievirus A6 (7%), coxsackievirus B5 (4%), および enterovirus B (4%)が検出された。ウイルス同定の精度と感度について、培養法との比較を実施している。

[吾郷昌信(長崎県環境保健研究センター), Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

(13) 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。ベトナム全土において、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。2003-2008年にかけてベトナムで分離されたエンテロウイルス71の分子系統解析を行ったところ、ベトナムのEV71分離株の多くは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が、2006年の分離株の一部はsubgenogroup C4に分類された。

[Nguyen Thi Thanh Thao, Phan Van Tu (Pasteur Institute), Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE), 西村順裕, 清水博之]

(14) セレン欠乏マウスモデルによるエンテロウイルス71病原性の解析

必須微量元素の一つであるセレンの欠乏条件下でのウイルス遺伝子変異誘導による病原性発現の可能性を検証するため、セレン欠乏マウスモデルにおけるエンテロウイルス71感染モデルの樹立を試みた。妊娠マウスの妊娠初期よりセレン充足あるいは欠乏餌(特注市販品)を与えて飼育し、仔の出生後、通常に離乳し、離乳後も親と同じ餌で給餌を続ける。中枢神経組織を含めた各種臓器におけるセレン濃度およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性、脱ヨード酵素活性等を測定



してマウスモデルにおける欠乏状態を評価する。セレン欠乏状態が確認された場合、エンテロウイルス 71 感染による病原性発現へのセレン欠乏の影響を解析する。

[小林紗弥加, 渡辺知保(東大医学系研究科), 清水博之]

#### (15) カプシド領域塩基配列を用いたエンテロウイルス同定法の比較

ヒトエンテロウイルス同定法として、カプシド領域の遺伝子解析に基づく塩基配列データを用いた手法が、現在広く用いられている。VP1 領域の配列に基づく解析が、血清型同定の精度の上からはもっとも妥当性があると考えられているが、比較的簡便に解析可能な VP4 領域解析を用いた同定の妥当性については評価が分かれる。今回、アジアの広範な地域で分離されたエンテロウイルス分離株を用いて、VP4, VP2 および VP1 領域の塩基配列を用いた同定法の妥当性を比較評価した。その結果、HEV-B および HEV-C については、VP1 領域を用いた同定の妥当性が高いが、HEV-A 分離株に関しては、どの領域を用いてもエンテロウイルスの同定が可能であることが明らかになった。

[David Perera, Mary Cardosa (Universiti Malaysia Sarawak), 石古博明(三菱化学メディエンス), 吉田 弘, 清水博之]

#### (16) カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルスの解析

ヒトパレコウイルスは、急性胃腸炎、呼吸器症状患者等、多様な臨床症状を有する患者から分離されるが、臨床症状との関連性は、ほとんど明らかにされていない。カンボジアの AFP 患者由来糞便 256 検体から RNA を抽出し、random 6 mer で RT 反応を行った。Benschop らの方法 (J Clin Virol, 2008) に基づいた 5' NTR 領域の primer, probe を用いた Real Time-PCR により、HPeV1-6 型の検出を行った。Real-Time PCR 陽性サンプルは、VP1 領域の PCR 法を施行し血清型の同定を行い、その塩基配列を決定した。Real Time-PCR 法での

HPeV 陽性検体は 256 検体中 17 検体であった。陽性の 17 検体中 9 検体では、EV11, EV14, EV71, EV88, CA2 などのエンテロウイルスが同一糞便検体から検出された。

[町田早苗(埼玉医大), Rifqiyah Nur Umami, 西村順裕, 清水博之]

#### (17) コクサッキーウイルス A16 による手足口病に合併した間質性肺炎症例の解析

手足口病の原因は、大部分が EV71 とコクサッキーウイルス A16 (CA16) である。EV71 は中枢神経合併症を起こしやすいことが知られている一方、CA16 による重症例の報告は極めて稀である。症例は 58 歳男性。骨外性粘液型軟骨肉腫の手術を施行後、多発肺内転移を認め、高熱、乾性咳嗽、呼吸困難が出現した。胸部 CT により肺炎が疑われ、同時に手足口病を疑う皮膚所見を認めた。さらに手足口病に罹患した娘との接触が確認されたため、各種ウイルスの検索を行ったところ、皮疹部位皮膚生検組織、咽頭ぬぐい液、直腸ぬぐい液、血痰より CA16 が分離・検出された。血痰等の材料から、CA16 が分離・検出されたことから、間質性肺炎発症の原因として CA16 感染が関与している可能性が高いと考えられた。

[福元伸一, 平賀博明(北海道がんセンター), 長谷川秀樹(感染病理部), 西村順裕, 清水博之]

#### (18) CA16 による手足口病に合併した菱脳炎症例の解析

手足口病の原因は、大部分が EV71 と CA16 である。EV71 は中枢神経合併症、特に菱脳炎を起こしやすいことが知られている一方、CA16 による菱脳炎の報告はない。発熱および発疹により手足口病と診断された女兒は、嘔吐・体幹の震え・眼の揺れ・立位不能等が出現し、神経学的所見として、異常眼球運動(オプソクローヌス)、頭部・体幹・上肢のミオクローヌス、筋力・筋トーンの減弱、体幹・四肢の失調を認め、オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群の症状を呈していた。便からのウイルス分離で CA16 が検出され、血清

抗体価は、EV71 は感度以下であったのに対し CA16 は 64 倍と上昇していた。髄液のウイルス分離・エンテロウイルス PCR はいずれも陰性であった。本症例は、CA16 による手足口病に菱脳炎を合併した最初の報告である。CA16 による手足口病の流行の際にも、菱脳炎等の中枢神経合併症に注意する必要があると考えられる。

[實藤雅文, 楠原浩一(九州大), 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

世界的ポリオ根絶達成およびその後の OPV 接種停止を視野に入れて、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めについて具体的な行動が必要とされている。WHO は全世界で統一された基準の下、ポリオウイルス野生株の実験室封じ込めを進めることを、すべての加盟国に求めている

2000-2008 年における野生株ポリオウイルス保有施設調査により得られた情報を、厚生労働省と国立感染症研究所により集計・評価し、野生株ポリオウイルス感染性材料・感染性を有する可能性のある材料を保有する可能性のある 82 施設をリストアップし、所管省庁の了解のもと各施設に対し確認調査を実施した。その結果、2008 年時点で、野生株ポリオウイルス感染性材料を保有する 14 施設が特定された。その後、新たに 1 施設が、他施設からの分与を受け野生株ポリオウイルスを保有したため、2008 年末時点で計 15 施設が野生株ポリオウイルス保有施設としてリストアップされた。2008 年 12 月、日本および中国は、現時点における野生株ポリオウイルス保有施設リストを含む、野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階最終評価報告書(Final quality assurance report of phase 1 wild poliovirus laboratory containment)を、WHO 西太平洋地域ポリオ根絶認定委員会第 14 回年次会議に提出した。西太平洋地域では、日本と中国以外のすべての加盟国は、すでに野生株ポリオ実験室封じ込め第一段階調査と外部評価を完了しており、今回の最終

報告書の提出と承認をもって、西太平洋地域全体の野生株ポリオウイルス実験室封じ込め第一段階調査完了が宣言された。

[小林一司(厚労省), 小松俊彦, ルナール純子, 斎藤真紀 (バイオメディカルサイエンス研究会), 宮村達男, 清水博之]

## 6. その他

平成 20 年度は 7 件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

## 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) A 型肝炎ウイルスの薬剤耐性試験

HAV の中和試験を改変した薬剤耐性試験をデザインした。至適濃度に調整した HAV と階段希釈した薬剤を混和し細胞に感作・薬剤除去後、維持培地を加えて 1 週間静置し増殖した HAV を ELISA で検出した。カットオフ値は【ウイルス除去効果：陰性コントロールの平均+3SD】、【ウイルス増殖阻害効果：陽性コントロールの平均-2SD】とした。数種類の薬剤について試験を実施したところ、ウイルス増殖阻害効果を示す薬剤が選択された。

[清原知子, 石井孝司]

#### (2) 不活化 A 型肝炎参照ワクチン (国内参照品) の標準化

品質管理の一環として、国際標準品に対する現行の不活化 A 型肝炎国内参照品[LotP1]の標準化を検討中である。NIBSC から供与された国際標準品と国内参照品を用いて、in vivo 力価試験及び in vitro 力価試験を行い国内参照品の国際単位を値付けする。平成 20 年度は国際標準品の輸入を行った。平成 21 年度に力価試験を予定している。

[清原知子, 下池貴史, 佐藤知子, 吉崎佐矢香, 石井孝司]

## 2. B型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

### (1) HBs 抗原陰性 B 型肝炎患者のウイルスゲノム遺伝子の解析

HBs 抗原陰性の劇症肝炎患者中の HBV のウイルスゲノムの解析を行った。患者血清より HBV を分離し、その全塩基配列を決定した。その結果、遺伝子型は C で、B 型肝炎の劇症化に關与するコアプロモータ変異、Pre-C stop 変異をともに認めた。また、S 領域の A-loop には保存された変異は検出されなかった。これらの結果より、この患者で HBs 抗原が陰性であったのはウイルス変異によるものではなく、感染後に劇症化する課程でセロコンバージョンがおこった結果と考えられた。

[加藤孝宣, 津田喜裕 (大阪府立中河内救命救急センター), 脇田隆字]

### (2) HBV と糖鎖の相互作用の解析

HBV は硫酸多糖類と結合することが知られているが、他の糖鎖との相互作用については十分に解析されていない。HBV の S プロモーターを利用して HBs 抗原発現プラスミドを作製し、これを導入した Huh7 細胞の培養上清を濃縮、ショ糖密度勾配遠心分画し HBs 粒子を精製した。電子顕微鏡観察により、小型球形粒子、長さ不均一の管状粒子を確認した。糖鎖との相互作用を糖鎖固定化金ナノ粒子、糖鎖アレイで解析したところ、HBs 抗原は GlcNAc, Mannose と結合しうることが示されたが、N-glycan との相互作用は認められなかった。

[松田麻未, 田中恵子 (感染病理部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

### (3) 蛋白輸送関連化合物が HBV 分泌に及ぼす影響

細胞内の蛋白輸送、分泌系の各過程、シグナル伝達を阻害する低分子化合物が HBV 粒子産生、細胞外への分泌にどのような影響を及ぼすかを調べた。Microtubule stabilizer である Paclitaxel 及び Rac I kinase inhibitor の NSC23766 で分泌阻害効果が認められた。チューブリン重合、再編成など微小管の形成にかかわる細胞内機構が HBV 粒子の成熟化、輸送に

重要な役割を果たす可能性が示唆された。

[Neetu Kapoor, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

### (4) HBs 抗原とチューブリン、微小管モーター蛋白との相互作用

HBV 遺伝子型 A, B, C の HBs 抗原ともチューブリン、キネシン軽鎖、キネシン重鎖との相互作用が認められた。また、HBV ゲノム発現細胞にキネシン軽鎖ドミナントネガティブを強制発現しておいた場合、このような HBs 抗原-キネシン相互作用が低下することも明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡観察により、HBV 発現細胞内において HBs 抗原とチューブリンが共局在することが観察された。一方、HBc 抗原はチューブリン、キネシンとの相互作用は認められなかった。

[Neetu Kapoor, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

### (5) HBV PreS1 抗原, virion-associated viral DNA とチューブリンとの相互作用

感染性 HBV 粒子の形成には HBs 抗原の他に large S 抗原が重要であることが知られている。HBV ゲノム発現細胞を抗チューブリン抗体で免疫沈降した後、抗 large S 抗体でウエスタン解析を行ったところ、チューブリン-large S 抗原の相互作用が認められた。また、同免疫沈降物から DNA を抽出し PCR 法を行った結果、HBV DNA が検出された。これらの結果より、微小管は、HBs 粒子だけでなく感染性粒子の産生、輸送にも関与している可能性が考えられた。

[Neetu Kapoor, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

### (6) HBV 感染増殖細胞系の作製

肝細胞様の形態を保持し高い薬物代謝酵素発現を示すヒト肝がん細胞株 HepaRG を使って HBV の感染増殖系の作製を行った。Huh7 細胞で産生させた HBV genotypoe C 株を感染させたところ、感染後少なくとも 13 日目まで HBs 抗原, HBe 抗原の産生が維持された。感染前に heparinase 処理した HepaRG 細胞では抗原産生は顕著に低下した。

[鈴木哲朗, Neetu Kapoor, 脇田隆字]

(7) B型肝炎ウイルスの薬剤耐性試験

HBVを産生する2.2.15細胞(HepG2由来)を薬剤含有培地で維持し、上清に分泌されたHBs抗原量をin-house ELISAで測定した。無処置群に対する薬剤添加群のHBs抗原産生阻害作用を算出し、有効薬剤のスクリーニングを行った。薬剤はLOPAC1280[SIGMA]、陽性対照はラミブジンを使用した。対象の1268薬剤から陽性対照以上のHBs抗原産生阻害作用を示した5薬剤を選択した。

[清原知子, 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字]

(8) B型肝炎ワクチンの試験管内試験法の検討

当室ではB型肝炎ワクチン国家検定で実施しているin vivo力価試験の代替法としてBinding ELISAによるin vitro試験を検討してきた。平成20年度はBinding ELISAに加えてInhibition ELISAによるin vitro試験の検討を開始した。

[清原知子, 佐藤知子, 吉崎佐矢香, 石井孝司]

3. C型肝炎ウイルス(HCV)に関する研究

(1) 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との結合領域はコア蛋白質1-43aaは共通であるが、C末端側の第二の結合領域については、hnRNPHおよびhnRNPFとで必要な部位がことなることが示唆された。

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

(2) 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HCV-RNAを加えた後、GST融合HCVコア蛋白質を加え、GST-pull down法により検討したところ、HCV-RNAを加えた場合には両者の結合が減弱した。以上より、hnRNPH1, FとHCVコア蛋白質の結合にはHCV-RNAが関与していることが示唆された。

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

(3) 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。flag-tagを付加した各蛋白を強発現した細胞のcrude S10を作製し、IIIId-RNAとの結合について検討した。その結果、コントロールであるIIIIdアンチセンスRNAには結合しなかったが、IIIId-RNAにはいずれの蛋白も結合することが確認できた。また、endogenous hnRNPsとの結合についても同様に確認した。

[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]

(4) 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。この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。このうち、ergic53, ergic63について詳細な検討を行った。これらの蛋白のノックダウンによりHCV-RNA複製効率が低下し、HCV複製効

率の調節に関与している可能性が示唆された。また、細胞染色によりこれらの蛋白は細胞内で NS 3 および HCV-RNA と共局在することが明らかとなった。  
[浜本いつき (感染症情報センター), 多屋馨子 (感染症情報センター), 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, 脇田隆字]

(5) HCV 粒子形成に関与する新規宿主因子の検索

HCV Con-1 からなる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。培養形態によって発現の異なる宿主因子のひとつである脂肪酸結合蛋白質 FABP のノックダウンにより培養上清の感染価が約 2 倍に増加した。三次元培養細胞では細胞内の FABP 量は上昇しているが培地中の FABP 量は減少しており、FABP が感染抑制に作用している可能性が示唆された。

[村上恭子, 勝二郁夫, 吉崎佐矢香, 松田麻未, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆字]

(6) NS5A との結合に必要なコア蛋白領域の同定

NS5A とコア蛋白の相互作用は感染性 HCV 粒子の形成に重要である。しかし、その結合様式や結合領域は明らかになっていない。そこで、NS5A との結合に必要なコア蛋白領域を同定するために、種々のコア蛋白欠損体を用いて解析を行った。精製蛋白を用いた pull-down 解析により、コア蛋白の aa 117-173 領域が NS5A との相互作用に重要であることが分かった。現在、細胞内での結合領域の解析を免疫沈降法により行っている。

[政木隆博, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(7) コア蛋白との結合に必要な NS5A 領域の同定

コア蛋白との相互作用に重要な NS5A 領域は、NS5A の C 末端側であることが示唆されている。コア蛋白との結合に必要な NS5A 領域をさらに詳細に解析するために、種々の NS5A 欠損体を用いて解析を行っている。

精製蛋白を用いた pull-down 解析により、NS5A の domain 3 (JFH-1 NS5A における aa 352-466) がコア蛋白と相互作用することを確認した。現在、細胞内での結合領域の解析を免疫沈降法により行っている。

[政木隆博, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(8) NS5A-コア蛋白間相互作用の生細胞イメージング

CoraHue®Fluo-chase Kit は、タンパク質断片コンプレメンテーション法を基にした、タンパク質間相互作用を蛍光シグナルとして検出するキットである。このシステムを用い、生細胞における NS5A-コア蛋白間相互作用をリアルタイムに解析した。蛍光タンパク質断片を融合した形で NS5A 及びコア蛋白を Huh-7 細胞に発現させ、蛍光顕微鏡でシグナルを解析した。その結果、野生型 NS5A 導入細胞において中等度の蛍光シグナルが観察されたのに対して、変異型 JFH-1 導入細胞では蛍光シグナルが減弱していた。

[政木隆博, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(9) NS5A とコア蛋白の相互作用に関与する宿主因子の解析

HCV の生活環はウイルス蛋白が様々な宿主因子と相互作用することによって維持されており、NS5A とコア蛋白間の相互作用にも宿主蛋白等の介在因子が関わっている可能性が考えられる。そこで、野生型 JFH-1 複製細胞と変異型 JFH-1 複製細胞における NS5A 結合因子を SDS-PAGE 後の銀染色で確認したところ、両細胞間の泳動プロファイルに差が認められた。現在、宿主因子の同定に向け解析を進めている。

[政木隆博, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(10) NS5A と相互作用するヒトプロテインキナーゼの探索

NS5A のリン酸化はウイルスゲノム複製だけでなく、感染性ウイルス粒子の形成にも重要である。そこで、NS5A と相互作用するヒトプロテインキナーゼを網羅的手法により探索した。その結果、400 種類超のヒト

プロテインキナーゼのうち、38種類においてNS5Aとの強固な相互作用が認められた。

[政木隆博, \*澤崎達也, \*遠藤弥重太, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字 (\*愛媛大無細胞生命工学研究センター) ]

(11) NS5A のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索

NS5Aと強く相互作用するヒトプロテインキナーゼを、それぞれ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在化で精製NS5Aと混和し、SDS-PAGE後オートラジオグラフィーによりNS5Aのリン酸化を解析した。その結果、4種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼがNS5Aをリン酸化する活性を有していた。うち1種類はNS5Aのリン酸化に関与することが既に報告されているカゼインキナーゼIIであった。[政木隆博, \*澤崎達也, \*遠藤弥重太, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字 (\*愛媛大無細胞生命工学研究センター) ]

(12) スフィンゴミエリン合成における protein phosphatase 2Cε (PP2Cε) の役割

PP2CεはVAP-Aとの結合依存的にCERTを活性化させ、ゴルジにおけるスフィンゴミエリン合成を亢進させることで知られている。これを確認するため、siRNAによりPP2Cε発現をノックダウンし、薄層クロマトグラフィーを用いてスフィンゴミエリン合成量を解析した。PP2Cε発現の約50%のノックダウンにより、細胞内のスフィンゴミエリン合成量が非ノックダウン細胞に比べ約50%減少した。

[政木隆博, 花田賢太郎 (細胞化学部), 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(13) HCV 生活環における PP2Cε の役割

PP2CεはVAP-Aと相互作用し、スフィンゴミエリン合成に関わるホスファターゼであるため、HCV生活環に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。HCV subgenomic replicon細胞, JFH-1感染細胞を用い、PP2Cεの発現制御がHCV生活環に与える影響を解

析した。PP2Cεの強制発現により高リン酸化型NS5Aの発現量が低下したが、HCV RNA複製, 粒子形成に対する有意な影響はみられなかった。PP2Cε発現のノックダウンにおいてもHCV RNA複製, 粒子形成に対する有意な影響はみられなかった。

[政木隆博, 花田賢太郎 (細胞化学部), 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(14) レポーター遺伝子を持った JFH-1 株の効率的な感染増殖系の樹立

簡便にHCV感染を検出する系の構築のため、GFP遺伝子をHCVゲノムに挿入し、細胞感染後にGFPを発現するレポーターウイルスの構築を試みた。JFH-1株におけるGFP挿入可能部位をNS5a領域に同定し、GFPを持ったウイルスの感染増殖系を作成したが、ウイルス生成効率, 感染効率ともに低く、簡便に感染を検出する系は得られなかった。そこでJFH-1株の長期培養により得られた適応変異をGFPウイルスに導入し、これらの変異による影響を検討した。その結果、変異を持ったGFPウイルスの感染ではより多くのGFP陽性細胞を認め、変異導入によりGFPウイルスの生成能と感染能が増強されたと考えられた。

[加藤孝宣, 脇田隆字]

(15) HCV1b 株感染増殖系における ISDR 変異の感染増殖への影響とインターフェロン感受性の検討

新たに開発したHCV-1b株の感染増殖系を用い、インターフェロン(IFN)治療に対する感受性への関与が報告されているISDRの変異がウイルス増殖に与える影響を検討した。われわれが使用しているHCV-1b株のISDRはmutantタイプであった。そこでこの株のISDRをワイルドタイプ(WT)の配列になるように変異を導入した株を作成し、培養細胞での増殖能を検討した。その結果、ISDRをWTに変化させた株の増殖能はmutantタイプの株に比べ低下し、IFNに対する感受性と培養細胞での増殖能は相反する関係に有った。今後この意義について検討していく予定である。

[加藤孝宣, 伊達朋子, 脇田隆字]

(16) JFH-1 患者血清感染チンパンジーで認めた変異が JFH-1 の培養細胞での増殖能に与える影響の検討

培養細胞で作製した JFH-1 ウイルスとその JFH-1 株が分離された患者血清をチンパンジーに接種し感染実験を行った。感染が成立した JFH-1 株に認めた変異を JFH-1 株に導入し、それらの変異が JFH-1 株の培養細胞での感染増殖に与える影響を検討した。その結果、これらの変異を導入すると JFH-1 株の培養細胞内での増殖は低下するが、ウイルス粒子の生成効率は亢進していた。これらの変異の JFH-1 株に与える影響は、HCV のチンパンジーでの感染に関与していると考えられた。

[Mohsan Saeed, 加藤孝宣, 脇田隆字]

(17) JFH-1 株培養細胞適応変異株の分離法の樹立

JFH-1 株を培養細胞に導入し長期培養を行うと、培養細胞での適応変異を得ることで強い増殖能を持つようになることが知られている。しかし、この適応変異の同定のため適応したウイルスのダイレクトシーケンスを行うと、得られた変異ではその適応ウイルスの増殖能を再現できないことが多い。そこで、適応ウイルスを限界希釈し、96 ウェルプレートに播いた細胞に再感染させることで、強い増殖能を持った適応ウイルスを分離した。この分離したウイルスの適応変異を同定し、得られた変異の JFH-1 株の感染増殖能に与える影響を検討中である。

[加藤孝宣, 脇田隆字]

(18) JFH-1 株で認めた培養細胞適応変異が他の株の感染増殖に与える影響の検討

生体内で認めた適応変異を JFH-1 株に導入したところ、この変異は JFH-1 株の培養細胞内での感染性ウイルス粒子の組み立てを亢進していた。そこで、この変異の普遍性を検討するため JFH-1 株の構造領域を J6CF 株に置換した J6/JFH-1 キメラ株にこの変異を導入し、培養細胞内でのウイルスの増殖を検討した。その結果、J6/JFH-1 キメラ株ではウイルス粒子形成効

率の亢進は認められず、この変異の効果は JFH-1 株の構造領域の配列に特異的なものであると考えられた。

[加藤孝宣, 脇田隆字]

(19) GFP 挿入全長遺伝子レプリコンのヒト肝細胞キメラマウスへの感染の検討

レポーター遺伝子を挿入した感染可能なウイルスの中で、J6/JFH-1 キメラ株の GFP 挿入全長遺伝子レプリコンが最も安定して感染性ウイルス粒子の作成が可能であった。そこでこの GFP 挿入全長遺伝子レプリコンをヒト肝細胞キメラマウスへ接種し感染が可能であるか、またキメラマウスの肝での感染細胞で GFP の観察が可能であるかを検討した。その結果、GFP 挿入全長遺伝子レプリコンの接種によりキメラマウスでの HCV の感染は確認し得たが、肝での GFP の観察は不可能であった。おそらく GFP 挿入全長遺伝子レプリコンウイルスがキメラマウスの肝細胞に感染後、GFP を排除して増殖しているものと考えられた。

[赤澤大輔, 加藤孝宣, 今村道雄\*, 茶山一彰\* (\*広島大分子病制御内科学), 石橋真理子\*\*, 江角真理子\*\* (日大医学部病理), 脇田隆字]

(20) HCV 感染における細胞表面脂質の役割

HCV 感染における標的細胞表面の脂質の役割を調べている。細胞表面上のコレステロールを除去、あるいはスフィンゴ脂質を加水分解しておいた細胞では HCV 感染性は有意に低下した。これらの処理により、HCV のレセプターである CD81, SR-BI は脂質ラフト分画から可溶性分画へ移行した。また、HIV や HTLV では標的細胞膜上の脂質ラフトが膜融合に影響を与えていることも知られており、HCV 感染における細胞表面の脂質ラフトの役割について解析している。また、感染過程における糖スフィンゴ脂質の関与についても解析中である。

[相崎英樹, 原 弘道, 森川賢一, 深澤征義 (細胞化学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 1) HCV粒子形成, 感染性に重要なコレステロール構造の解析

HCV粒子形成, ウイルス感染性に重要なコレステロール構造を明らかにするため, dihydrocholesterol, coprostanol, 25-hydroxycholesterol, 5-alpha-cholestane, lanosterol, 7-dehydrocholesterol, 4-cholestenoneなどコレステロール類縁体を用いて構造活性相関を解析した. 脂質ラフト状ドメインの構造維持に重要であると報告されているコレステロール環構造の3位のヒドロキシル基の存在と環構造の柔軟性がHCVの感染性と粒子構造の維持に重要であることが示唆された.

[山本真民, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 2) HCV E2 タンパク質の機能解析

分泌シグナル配列を付加した E2 (E2dTM) を 293GnTI(-), 293T 細胞に遺伝子導入し, 培養上清から精製を行い修飾糖鎖の異なる 2 種の E2dTM を得た. 糖鎖質量解析の結果, 修飾された N 型糖鎖はそれぞれ 293GnTI(-)では高マンノース型, 293T では複合型であった. 高マンノース型 E2dTM は 60 kDa の均一な分子量を示し, 複合型は 75 kDa を中心とした不均一な分子量を示した. これら 2 種の E2dTM を用いて CD81 分子との結合能, E2 抗体との結合能を解析し, 精製 E2dTM はともに CD81 分子と相互作用し, E2 抗体によって認識された.

[渡邊則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 3) HCV E2 タンパク質の結晶化

293GnTI(-)細胞の培養上清から精製を行い高マンノース型の E2dTM を得た. 精製した E2dTM はジスルフィド結合を介した多量体 (2 量体, 3 量体など) を形成しており, これを更にゲルろ過にて分画することで均一な単量体 E2dTM を得た. 結晶化を始めるにあたり, 単量体 E2dTM の性状分析を行った. 動的光散乱法, 質量分析にてその性状を分析したところ, 結晶化のスクリーニングに十分な性状であった. 1 度目のスクリー

ニングを行ったが, 現在のところ結晶を得るまでには至っていない. 現在, 新たな E2 タンパク質の作製を検討している.

[渡邊則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 4) HCV 粒子侵入過程における E1, E2 の糖鎖の役割

HCV の E1, E2 を有する pseudo-particle (HCVpp) を作成して, HCV の侵入過程における糖鎖の影響を解析した. 293GnTI(-)細胞 (高マンノース型) 及び, 293T 細胞 (複合型) を用いて, 異なる糖鎖を有する HCVpp を作成した. Real-time PCR 法で 2 種の HCVpp 中の RNA 量を測定することで粒子量の定量を行い, 感染後, 細胞中のルシフェラーゼ活性を測定することで比較検討した. その結果, 高マンノース型において活性の減少がみられた. 次に, 感染に必要とされている N 型糖鎖 (6 か所) のみに注目して, それ以外のアミノ酸に変異を導入して更なる解析を行う予定である.

[渡邊則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 5) HCV と硫酸多糖類との結合様式の解析

HCV感染初期過程において, 肝細胞表面の硫酸化多糖とウイルスの結合が深く関与していることが知られている. 硫酸化多糖の一種であるヘパリンを固定化した担体を用いて培養細胞由来HCVとの相互作用をみたところ効率よく結合することが示されたが, HCV陽性患者血清を用いた場合は, 培養細胞由来HCVに比べ, その相互作用に血清間で多様性が認められた. 血液成分またはHCVの多様性がこれらの相互作用に影響を及ぼしているものと推察された.

[高橋由佳, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(2 6) HCV JFH-1 株の配列の挿入による J6CF 株の複製能獲得の解析

HCV JFH-1 株は培養細胞内で効率的よく複製できる. J6CF 株は同じ遺伝子型に属する株であるが, 培養細胞



では複製できない。この2つの株間でのキメラを用いた解析の結果、NS3 ヘリカーゼ領域とNS5B 領域、3' UTR が、JFH-1 株の複製に重要であることが明らかとなっている。NS5B 領域では、C 末端側領域が複製に重要であり、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域と 3' UTR の存在下で、JFH-1 株の NS5B の C 末端側領域のみの置換で J6CF 株が複製できるようになった。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(27) HCV JFH-1 株の NS5B ポリメラーゼ活性の解析  
培養細胞で効率よく増殖できる HCV JFH-1 株と増殖できない J6CF 株の、ポリメラーゼをコードしている NS5B の RdRp 活性を *in vitro* で解析した。JFH-1 株の NS5B は高いポリメラーゼ活性を示し、一方 J6CF 株の NS5B は非常に低いポリメラーゼ活性を示した。この J6CF 株の NS5B に JFH-1 型の変異を導入して解析し、J6CF 株の NS5B のポリメラーゼ活性を上昇させる JFH-1 型の変異を同定した。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 豊田哲也 (上海巴斯ツール研), 脇田隆字]

(28) HCV J6CF 株への JFH-1 型 NS5B 変異導入の効果

培養細胞で効率よく増殖できる HCV JFH-1 株と増殖できない J6CF 株の、ポリメラーゼをコードしている NS5B 領域の変異を比較解析した。JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域と 3' UTR の存在下で、J6CF 株の NS5B 領域に数個の JFH-1 型アミノ酸変異を導入すると、RNA 複製およびウイルス分泌が上昇した。これらの JFH-1 型変異はポリメラーゼ活性を上昇させることにより RNA 複製能を高めていると考えられる。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(29) HCV JFH-1 株の NS5B 領域の変異が RNA 構造および RNA 複製に及ぼす影響

HCV ゲノムの NS5B コーディング領域の 3' 末端側には、高次構造をとり 3' UTR と相互作用することが知られている RNA 配列 (CRE) が存在する。この配列のすぐ近傍に、J6CF 株の複製能を上昇させる JFH-1 型変異を見いだした。解析の結果、この変異は報告されている RNA 配列上にはないものの、複製に重要な 3' UTR との相互作用に影響を与えていることが示唆された。JFH-1 株では、CRE の配列が他の株よりも長く、より強固な相互作用があると考えられる。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(30) HCV 3' UTR 内の可変領域の効率よい RNA 複製における重要性

培養細胞で増殖可能な HCV JFH-1 株と増殖できない J6CF 株の比較により、JFH-1 株の 3' UTR は効率の良い RNA 複製に重要であることが明らかとなっている。3' UTR は可変領域 (VR)、poly-U 領域、そして保存性の高い 3' X 領域からなるが、VR を JFH-1 型にするとゲノム複製が著しく上昇することが判明した。JFH-1 株と J6CF 株の VR の構造は予測上異なり、この構造変化を担う変異を同定した。VR の変異は RNA 二次構造を変化させることで複製に関与すると考えられる。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(31) HCV poly U 領域の長さが RNA 複製に及ぼす影響

培養細胞で増殖可能な HCV JFH-1 株と増殖できない J6CF 株の比較により、JFH-1 株の 3' UTR は効率の良い RNA 複製に重要であることが明らかとなっている。3' UTR の解析により、poly-U 領域を JFH-1 型にするとゲノム複製が上昇し、J6CF 型にすると、複製能が低下することが判明した。JFH-1 株の poly-U 領域は J6CF 株のものより 27 ヌクレオチド短い。J6CF 型の長い poly-U 領域は培養細胞内での複製には不利に働いていることが示唆された。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝

司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(32) HCV NS3 ヘリカーゼ領域のウイルス複製における役割の解析

JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼ領域は JFH-1 株の効率の良いゲノム複製に必要である。NS3 ヘリカーゼ領域内のどの部分がこれらの役割を担っているのかを調べるために、JFH-1 株と J6CF 株の間でキメラウイルスを複製し、解析した。その結果、JFH-1 株の NS3 ヘリカーゼの中央の領域が高い複製能に重要であることが明らかとなった。現在、この領域に含まれるアミノ酸変異について解析中である。

[村山麻子, 伊達朋子, 赤澤大輔, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(33) Creatine kinase B (CKB)による HCV 複製調節機構の解析

CKB は NS4A 蛋白と結合し複製複合体を構成すること、ノックダウン、阻害剤により HCV ゲノム複製が阻害されることを明らかにしている。さらに、セミインタクト細胞を用いた複製系において、CKB、基質 phosphocreatine を加えたとき高い HCV replicase 活性が認められること、CKB ノックダウン細胞の場合、複製能は低下することなどを新たに見出した。

[原 弘道, 相崎英樹, 松田麻未, 井上 寧, 勝二郁夫 (神戸大), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(34) HCV 遺伝子型に特徴的な RNA 複製メカニズムの解析

これまでに RNA 複製におけるスフィンゴ脂質要求性が HCV 遺伝子型間あるいは株間で異なることを報告しており、遺伝子型 1b 及び 2a 由来 HCV レプリコンの比較解析を進めている。複製に関与することが知られている宿主蛋白の NS5A 結合性の違いを見出しており、宿主因子依存性の詳細が不明な遺伝子型 2a レプリコンの複製メカニズムについても解析している。

[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 (細胞化学部), 深澤征義 (細胞化

学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(35) 分子シャペロン CCT/TRiC による HCV RNA 複製調節機構

HCV 複製複合体分画に含まれる宿主因子として分子シャペロン CCT/TRiC が同定され、さらにレプリコン細胞における高複製期と低複製期の比較解析から、HCV ゲノム複製機構に関与する宿主蛋白としても同定された。強制発現、ノックダウン解析から CCT/TRiC が HCV RNA 複製を正に調節すること、免疫沈降-ウエスタンブロット解析から、NS5B 蛋白は aa 71-591 領域を介して CCT/TRiC と相互作用することが見出された。更に、HCV 感染細胞系においても HCV 粒子産生が TRiC siRNA によって抑制されることが示された。

[井上 寧, 村上恭子, 松田麻未, 相崎英樹, 原 弘道, 勝二郁夫, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(36) HCV NS5A 蛋白と相互作用し HCV 複製を調節する宿主因子の同定

NS5A 発現細胞より免疫沈降法を用いて NS5A に結合する宿主蛋白質を精製し、質量分析法にて蛋白質を同定した。約 30 種類のヒト蛋白が同定され、未報告蛋白群について replicon 細胞及び HCV 感染細胞を用いて siRNA screening を行い、HCV 複製に関与しうる 3 種類の NS5A 結合蛋白を同定した。

[木村敬郎, 鈴木亮介, 勝二郁夫 (神戸大), 山越 智 (生物活性物質部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(37) Prohibitin 2 による HCV 複製調節

HCV replicon 細胞、感染細胞で Prohibitin 2 遺伝子をノックダウンすると HCV RNA レベルまたウイルス産生が有意に抑制されることを見出した。Prohibitin 2 は、replicon 細胞において内在性蛋白が NS5A と複合体を形成しその相互作用には NS5A の N 末端側領域が重要であることが示された。また、Prohibitin 2 は複製複合体分画でエンリッチされていた。

[木村敬郎, 鈴木亮介, 勝二郁夫 (神戸大), 山越 智

(生物活性物質部), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(38) HCV RNA 複製におけるスフィンゴ糖脂質の役割

HCV 遺伝子型 1b 由来サブゲノムレプリコン細胞にグルコシルセラミド合成阻害剤を添加すると HCV RNA 複製が有意に低下することを見出した。このとき、レプリコン細胞のメンブレンフローテーションアッセイを行ったところ、複製複合体が界面活性剤可溶画分へシフトすることが示された。

[山本真民, 相崎英樹, 原 弘道, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(39) HCV RNA を複製する肝星細胞株の樹立

慢性肝炎は発症とともに肝臓組織の線維化へと進行する。これは主に、細胞外マトリクスを調節する肝星細胞の活性化によって調節機構に異常が起こるためと考えられている。肝星細胞の活性化過程に HCV 因子が関与するかを解析するため、肝星細胞を用いて HCV RNA 複製系の樹立を試みた。JFH1 subgenomic replicon RNA を肝星細胞株 (TWNT-4 細胞) に遺伝子導入し G418 存在下で選択培養を行った。その結果、 $10^7$  copies/ug total RNA を示す replicon 細胞株を 2 クローン樹立した。

[渡邊則幸, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(40) 蛋白輸送阻害剤を用いた HCV 粒子成熟化のメカニズム解析

HCV 成熟過程の分子機構を明らかにするため、各細胞内輸送経路に対する種々の阻害剤を HCV 感染細胞に添加し、感染性ウイルス粒子形成に及ぼす影響を解析している。これまでのところ、Golgi の機能阻害剤 Cyclofenil diphenol, Nordihydroguaiaretic acid では感染性ウイルスの産生低下が認められたものの、ER から Golgi への輸送阻害剤 ADP-ribosylation factor inhibitory peptide, Brefeldin A では認められなかった。現在、阻害剤を処理した感染細胞の観察および生化学的解析を行っている。

[相崎英樹, 原 弘道, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(41) HCV 粒子形成に關与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

細胞内脂肪滴が HCV 粒子形成に重要であることが知られている。本研究では、脂肪滴周辺膜 (lipid droplet-associated membrane) のプロテオーム解析を行い、ウイルス粒子産生に關与する蛋白の同定を行った。45 種類の脂肪滴周辺膜蛋白が同定され、それらの蛋白のうち apolipoprotein E, dehydrocholesterol reductase, hydroxysteroid dehydrogenase 等をノックダウンするとウイルス粒子産生が著しく低下した。得られた宿主因子に關する詳細な機能解析は、HCV の粒子形成、細胞内移行の分子メカニズムの解明につながるものと期待される。

[相崎英樹, 後藤耕司, 山本真民, 深澤征義 (細胞化学部), 花田賢太郎 (細胞化学部), 脇田隆字, 鈴木哲朗]

(42) 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

HCV コア蛋白には 3ヶ所の塩基性アミノ酸クラスター (aa 6-14, 39-44, 59-72) が存在するが、感染性ウイルス産生系の解析から、aa 39-44 (CL2) または aa 59-72 (CL3) 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示された。CL2 または CL3 の変異体コアでは、RNA との結合能、RNA パッケージングの効率が低下するため、感染性粒子が正常に形成されないことが示唆された。

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

(43) HCV コア蛋白のプロテアソームによるユビキチン依存のおよび非依存的分解

HCV コア蛋白はプロテアソームによってユビキチン依存的に分解されるが、ユビキチン鎖が形成されない変異コア蛋白を用いてユビキチン非依存的な分解経路の存在を明らかにした。この機構には PA28g との結合が重要である事が明らかとなった。

[鈴木亮介, 森石恆司 (大阪大微研), 石井孝司, 白倉雅之 (ウイルス3部), 勝二郁夫, 松浦善治 (大阪大微研), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(44) HCV 生活環における小胞体関連蛋白分解機構の役割

HCV 感染に伴って, 小胞体ストレス応答に関与する XBP-1 のスプライシングが誘発され, その下流に位置する小胞体関連蛋白分解 (ERAD) 因子である EDEM1 の発現が誘導された. HCV 感染細胞に EDEM1 siRNA を導入することにより培養上清中の感染性ウイルスレベルが上昇することを見出した. HCV 粒子産生過程に ERAD 経路が関与することが示唆された.

[Saeed Mohsan, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 渡邊治雄]

(45) プラスミドトランスフェクションによる HCV *trans*-packaging システムの確立

HCV (JFH-1株) の core-NS2 発現プラスミド, および ルシフェラーゼ (Luc) 発現レプリコン cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入したレプリコンプラスミドを作製し, これら2つのプラスミドを Huh7.5.1細胞へ導入する事により, 感染性粒子の産生を Luc 活性で評価できる系を構築した.

[鈴木亮介, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(46) 感染性粒子形成における HCV NS2 蛋白の役割

Core-p7 発現プラスミド, NS2 発現プラスミド, さらにレプリコンプラスミドの3種類のプラスミドトランスフェクションにより, NS2 変異体の感染性粒子産生を評価した. NS2 の N 末端側の膜貫通領域または C 末端のアミノ酸を欠損させると, 感染性粒子の産生は認められなかった. 一方, NS2 のプロテアーゼ活性中心, リン酸化部位と推定されるセリン残基をアラニンに置換した変異体は粒子形成に影響しなかった.

[鈴木亮介, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(47) 分割ユビキチン法を利用した HCV NS2 と結合

する宿主因子の探索

分割ユビキチン法を利用した酵母 two hybrid システムにより, HCV NS2 と結合する宿主因子を, ヒト肝臓ライブラリーよりスクリーニングした. NS2 蛋白質に結合性を示した複数のクローンについて塩基配列を決定した.

[鈴木亮介, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(48) 遺伝子型 1a の外殻タンパク質を持つ効率の良い HCV 粒子産生系の構築

遺伝子型 1a である H77 株と JFH-1 株のキメラ HCV 遺伝子を作製し, 粒子産生能および感染性についての検討を行った. H77/JFH-1 RNA 導入細胞の長期継代を行うことにより, 培養上清中に感染性 HCV 粒子が産生されることが示された. 粒子産生能が向上した細胞中の HCV ゲノム配列を解析した結果, H77 株由来の NS2 領域である 835 番目と 838 番目のチロシン (Y) がシステイン (C) に変異している事が見出され, 特に 835 番目の変異が HCV 粒子産生増強に影響を与えることが判明した.

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

(49) 劇症肝炎患者から分離した新規 JFH-2.1 株を用いた HCV 粒子産生系の構築

劇症肝炎患者から分離した遺伝子型 2a の HCV である JFH-2.1 株を用いてウイルス粒子産生について検討を行った. JFH-2.1 株の NS5A 領域にあるアラニン (A) をセリン (S) へ置換することによりウイルス粒子の産生がみられ, JFH-2.1 HCV 粒子産生には AS 変異が重要であることが示された. 得られた JFH-2.1 HCV 粒子は感染性を有し, 抗 CD81 抗体により感染が阻害されることから JFH-1 ウイルス粒子と同じ経路で感染していることが示唆された.

[高橋 仁, 伊達朋子, 赤澤大輔, 尾見法昭, 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

朗, 石井孝司, 脇田隆字]

(50) 無血清培養による感染性 HCV 粒子の作製

Huh7 細胞で作製した感染性 HCV の精製を効率的に行うため、無血清条件での培養を試みた。培養液のウシ血清添加量を漸減すると培養液中へのウイルス産生量が減少するが、無血清に細胞を馴化した後にウイルス RNA を導入して作製すると効率良く作製できることが明らかとなった。この方法で作製した感染性 HCV は感染力価や浮遊密度プロファイルには変化がなかった。

[赤澤大輔, 森川賢一, 尾見法昭, 高橋 仁, 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 深澤秀輔 (生物活性物質部), 伊達朋子, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(51) 感染性 HCV 粒子の濃縮粗精製法の検討

感染性 HCV 粒子を用いたワクチン開発を視野に入れ、細胞培養 HCV 粒子の大量サンプルからの精製を検討している。初期の粗精製工程として効率良く除タンパク質が可能な限外濾過膜を選定し、排除分子量 500 kDa のホローファイバー (GE ヘルスケア製) を使用して濃縮・透析を行うことで大量サンプルからの初期精製が可能となった。

[赤澤大輔, 尾見法昭, 高橋 仁, 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 伊達朋子, 森川賢一, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(52) J6/JFH-1 キメラ HCV を用いたワクチンにおけるアジュバント検討

Huh7 細胞にて産生したキメラ HCV J6/JFH-1 を粗精製し、UV で不活化した後、各種アジュバントと混合して 5 週齢雌性 BALB/c マウスに隔週 4 回腹腔内投与した。免疫原性は組換え E1 および E2 タンパク質に対する EIA で確認した。アジュバントとして水酸化アルミニウムゲル、MPL および poly I:C が有効であることが示唆された。今後、さらに反応を高める組み合わせを調べていく。

[尾見法昭, 赤澤大輔, 高橋 仁, 森川賢一, 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 鈴木哲

(53) HCV 粒子ワクチンの感染中和活性の誘導

Huh7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV を限外濾過およびシヨ糖密度勾配超遠心で精製した。UV で不活化した HCV 粒子を、5 週齢雌性 BALB/c マウスに MPL をアジュバントして隔週 4 回腹腔内投与し、血清を採取して抗体価および *in vitro* 中和活性を調べた。HCV 粒子免疫マウスでは抗 E1 および E2 抗体の惹起が認められ、その血清は遺伝子型 2a だけではなく、1a および 1b の HCV 感染を *in vitro* で阻害した。

[赤澤大輔, 尾見法昭, 高橋 仁, 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字]

(54) HCV 粒子免疫マウスからの感染中和抗体の作製

Huh7 細胞で作製した J6/JFH-1 キメラ HCV を不活化し、5 週齢雌性 BALB/c マウスに MPL をアジュバントして隔週 4 回腹腔内投与した。抗体価が上昇したマウスにおいて、免疫 4 ヶ月後または 6 ヶ月後に脾臓を摘出して脾細胞をミエローマ細胞と融合させた。現在、モノクローナル抗体のスクリーニングを行っている。

[赤澤大輔, 渋谷悠子 (東レ医薬研), 中村紀子 (東レ医薬研), 望月英典 (東レ医薬研), 鈴木哲朗, 石井孝司, 脇田隆字]

(55) HCV J6/JFH-1 株感染増殖系に対する低分子阻害剤のスクリーニング

Huh-7.5.1 細胞に HCV J6/JFH-1 株を感染させ、培養上清中に放出されたウイルス由来の core タンパク量を測定する方法により、低分子化合物ライブラリーを用いた抗 HCV 剤スクリーニングを実施中である。

[朝長充則, 伊達朋子, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

(56) マンノシダーゼ阻害剤による HCV 産生調節機構の解析

各種糖鎖修飾酵素阻害剤の HCV 産生に及ぼす影響を

調べ, ER-mannosidase 阻害剤 Kifnensine 処理によって培養上清中のコア蛋白, 感染性ウイルスレベルが亢進することが示された. 同薬剤はゲノム複製には影響を与えず, 細胞内ウイルスレベルも大きな変化は認められなかった. 一方, HCV 感染関連因子の一つ SR-BI の糖鎖修飾パターンが Kifnensine によって影響を受けることを見出した. Kifnensine による HCV 産生上昇の作用機序の詳細を解析中である.

[Saeed Mohsan, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 渡邊治雄]

#### (57) NS4A アンタゴニストの HCV 複製阻害機構

HCV レプリコン複製阻害活性を有する NS4A アンタゴニストが, 感染細胞系でウイルス産生を顕著に阻害することを示した. さらに, この化合物が細胞内での NS4A と CKB との相互作用を濃度依存的に阻害することを見出した. NS4A アンタゴニストが NS3 プロテアーゼ阻害とともに複製複合体へのエネルギー供給阻害としても働く可能性が示された.

[原 弘道, 相崎英樹, 松田麻未, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (58) C 型肝炎治療薬リバビリンに対する耐性 HCV の解析

HCV JFH-1 レプリコン細胞へのリバビリン (RBV) 長期添加により, RBV 抵抗性の遺伝子型 2a HCV を見出した. この抵抗性 HCV が有する遺伝子変異のうち NS5A 及び NS5B 領域の点変異 (V2405A, Y2471H) が JFH-1 クローンの RBV に対する耐性獲得に関与することを見出した. この変異に伴って HCV RNA 複製効率が低下することから, RBV による HCV RNA 複製阻害作用からのエスケープに寄与する可能性が示された.

[Su-Su Hmwe, 村上恭子, 小池和彦 (東大感染症内科), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (59) HCV プロテアーゼ阻害剤に対する耐性 HCV の解析

HCV JFH-1 の持続感染細胞に HCV NS3 プロテアーゼ

阻害剤 BILN2061 を終濃度 100 nM で添加し継代培養を行った. 継代時に培養上清を回収しコア蛋白を測定したところ, 3 ヶ月培養によって感染細胞の薬剤耐性化が認められた. この培養上清を naïve 細胞に感染させた場合も BILN2061 に対する耐性が観察された. 現在, 薬剤耐性 HCV の詳細な解析を行っている.

[Su-Su Hmwe, 伊達朋子, 朝長充則, 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (60) HCV コア抗原検出試薬の評価

5 種類の HCV 遺伝子型 (1a, 1b, 2a, 2b, 3a) 由来コア抗原を現行の診断キットで測定したところ, 蛍光 EIA 法において遺伝子型 2a (JFH-1) コア抗原の検出感度が他に比べ顕著に低いことが見出され, この検出感度の違いにはコアの 48 番目アミノ酸が関与することが明らかとなった. さらに, 現行と異なる検出用コア抗体を用いることで 2a 型コア抗原も同等に測定することが可能となることが示された.

[Saeed Mohsan, 鈴木亮介, 相崎英樹, 水落利明 (血液・安全性研究部), 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆字, 渡邊治雄]

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

臨床学的知見から, コア蛋白の aa 70, 91 がインターフェロン療法の治療効果に影響することが報告されており, これらのアミノ酸を変異させたコア蛋白発現トランスジェニックマウスの作製を行っている. また, 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, トランスジェニックマウスの表現型の変化を観察中である.

[相崎英樹, 小池和彦 (東大感染症内科), 鈴木哲朗, 脇田隆字]

#### (62) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

我が国における肝炎ウイルス感染の予防, 肝炎ウイルスキャリア対策, 肝癌死亡の減少に貢献することを

目的として、肝炎診療をめぐる国内、海外の情報等の収集とデータベース構築、およびインターネット等による情報の提供をめざし、ホームページを立ち上げた。一般のヒト、患者、医療関係者、研究者等、それぞれのヒトに必要な情報を提供するシステムを構築している。

[相崎英樹, 田中純子 (広島大), 吉澤浩司 (広島大), 脇田隆字]

#### 4. E型肝炎ウイルス(HEV)に関する研究

##### (1) キメラマウスにおける E 型肝炎ウイルス(HEV)の複製

現在までサル以外に HEV 感染動物モデルは確立されておらず、HEV の増殖、感染のメカニズムには解明されていない点が多い。本研究ではヒト肝臓細胞に置換したキメラマウス (遺伝子型: uPA<sup>+/+</sup>/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、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。また、キメラマウスの体内で増幅された HEV をカニクイザルに接種したところ、その感染性が保たれていることが明らかになった。

[李 天成, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和]

##### (2) 培養細胞における HEV の増殖

HEV を効率よく増殖させる細胞培養系の確立はウイルスの複製、増殖、感染のメカニズムの解明には必須である。我々は遺伝子型の異なる複数の HEV 株をそれぞれ PLC/PRF/5 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 が増殖できる培養細胞系を樹立した。さらに PLC/PRF/5 細胞で増殖されたウイルスをカニクイザルに静脈接種し、ウイルスがサル体内で増幅することを確認した。現在、PLC/PRF/5 に感染したウイルス株の

性状および感染力の変化の有無を解析している。

[李 天成, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 宮村達男, 脇田隆字, 武田直和]

##### (3) 培養細胞を用いた HEV の安定性の検討

PLC/PRF/5 細胞で増殖した HEV を種々の条件下で加熱処理した後、PLC/PRF/5 細胞に接種した。経時的に培養上清中のウイルス抗原を ELISA 法で測定し、HEV の増殖の有無によりウイルスを失活させる温度を見いだした。消毒剤感受性については有効塩素濃度を 500 ~32ppm とした NaClO 溶液とウイルスを混合し、20 分後、チオ硫酸ナトリウムを用いて塩素を中和した後 PLC/PRF/5 細胞に接種し、経時的に培養上清中のウイルスを測定した。また、紫外線照射のウイルス感染性への影響、有機溶媒に対する抵抗性なども同じ方法を用いて検討した。本研究から得られた HEV 安定性の情報は HEV による感染症や食中毒の防止に有用である。

[李 天成, 武田直和, 宮村達男, 脇田隆字]

##### (4) 培養細胞で増殖した HEV を用いた不活化 E 型肝炎ワクチンの研究

上記の培養細胞を用いて増殖させた HEV が含まれる培養上清を 65°C, 15 分間熱処理してウイルスを失活させた後にラットとマウスに免疫したところ、抗体が効率よく誘導された。現在、誘導された抗体の中和活性を解析すると同時にサルにおける抗体誘導および感染防御効果を検討している。

[李 天成, 武田直和, 宮村達男, 脇田隆字]

##### (5) HEV の感染性 cDNA のクローニング

ブタ肝臓より得られた HEV 株 83-2 は一部の肝癌由来細胞で増殖する。本株の全長 cDNA を構築し、RNA を合成して上記細胞株に導入したが HEV 粒子の産生は見られなかった。再度クローニングを行い感染性クローンを構築している。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

##### (6) HEV 非構造蛋白のプロセッシングの解析

HEV の非構造蛋白をコードする ORF1 のプロセッシング解析を *in vitro translation* 法により行った。培養細胞での増殖が確認されたクローンを用い、ORF1 の全長および C 末端側を欠損させた変異体から発現を試みたところ、全長蛋白の他に 40KDa 付近に切断断片と予想される蛋白が検出された。また N 末端側を欠損させた変異体の発現から、その切断断片は N 末端を含むことが確認された。

[吉崎佐矢香, 石井孝司, 李 天成, 武田直和, 脇田隆字]

#### (7) HEV-ORF1 の切断配列の解析

HEV の ORF1 の切断配列を同定するために、大腸菌発現系を用いて切断断片の精製を試みた。ORF1 の N 末端から Proline-rich 領域までをサブクローニングし、C 末端側に His タグを付加したコンストラクトを作成した。抗 His 抗体によって発現を確認したところ、全長蛋白の他に 35KDa 付近に切断断片と思われる蛋白が検出された。そこで His タグを用いて切断断片を精製し、N 末端アミノ酸配列解析を試みた。Protease 領域内に切断配列が同定されたが、同定部位に変異を導入し大腸菌で発現させても変異前と切断パターンは同様となり、変異の効果は観察されなかった。

[吉崎佐矢香, 石井孝司, 李 天成, 武田直和, 脇田隆字]

#### (8) HEV-ORF1 の哺乳類細胞での発現

HEV の ORF1 のプロセッシング解析をするために、哺乳類細胞を用いて ORF1 の発現を試みた。HEV の感染増殖が確認されている PLC/PRF/5 細胞と vaccinia/T7 hybrid system を用いて発現を行い、各領域に対する抗体を用いたウエスタンブロット法により検出を行った。N 末および C 末側を欠損させた変異体蛋白を発現させたところ、全長蛋白と切断断片と思われる様々な分子量の蛋白の発現が検出された。現在、C 末端に His タグを付加したコンストラクトを作製し、切断断片の精製を試みている。

[吉崎佐矢香, 石井孝司, 李 天成, 武田直和, 脇田

隆字]

(9) HEV 蛋白がインターフェロニングナル応答に及ぼす作用の解析

肝炎ウイルスの主要な感染部位である肝臓は特に IFN 応答が強い場所であるため、ウイルス増殖の際にこの応答を阻害するメカニズムを有することが推定され、HAV や HCV では阻害メカニズムが明らかにされている。HEV にも阻害メカニズムがあるかどうかを検討するため、IFN- $\beta$  プロモーターの下流にレポーター遺伝子を挿入したプラスミドを作成し、数種の肝癌由来細胞に導入した細胞株を作成した。本細胞株をセンダイウイルスや二本鎖 RNA で刺激して IFN 応答を誘導するとレポーター活性が上昇することを確認した。この系で HEV 蛋白の効果を検析する予定。

[石井孝司, 吉崎佐矢香, 李 天成, 脇田隆字]

## 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, hDg1, hScrb1 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。E6AP の強制発現により PRDX1 発現量が低下することを明らかにした。また、E6AP の結合に必要な PRDX1 内の領域は一箇所ではない可能性が示唆された。

[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)]

(2) ヒトポリオマウイルス BKV, JCV の糖脂質結合の比較解析

BKV, JCV, SV40 などでは、シアル酸を含むガングリオシドを感染レセプターとすることが示されているが、感染様式の違いなど不明な点が多い。そこで、BKV と



JCVのウイルス様粒子(VLP)と糖脂質との結合様式の比較解析をSucrose floatation assay及び表面プラズモン共鳴(SPR)法によって行った。その結果、BKV-LPは、GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1bと、JCV-LPは、GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b, GQ1bとそれぞれ結合することが示された。

[松田麻未, 李 天成, 片野晴隆(感染病理部), 中村智之(感染病理部), 脇田隆宇, 鈴木哲朗]

#### (3) 新規ヒトポリオーマウイルス MCV と糖脂質との相互作用

昨年皮膚がんの一種メルケル細胞癌から発見された新規ヒトポリオーマウイルス MCV については感染過程の分子機構は全く不明である。MCV-LPと糖脂質との結合をSPR法で解析したところ、MCV-LPは多くのガングリオシドで相互作用を示さず、GM3, GD3と結合することが示された。メルケル細胞癌組織では、GM3, GD3が高い発現を示すことが報告されており、MCV感染の組織特異性を規定する要因として、ガングリオシドとの相互作用が重要である可能性が示唆された。

[松田麻未, 李 天成, 片野晴隆(感染病理部), 中村智之(感染病理部), 脇田隆宇, 鈴木哲朗]

#### (4) メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)様粒子の作製およびその応用

MCVは昨年メルケル細胞癌(MCC)からクローン化された新しいヒトポリオーマウイルスであり、MCVゲノムが一部の癌組織に組み込まれていることから新規癌ウイルスと考えられている。しかしながら、MCC以外の疾患との関連は不明な点が多く、また、増殖細胞系は確立されておらず、MCVの生活環、粒子構造などは全くと言ってよいほど明らかにされていない。今回われわれは組換えバキュロウイルス発現システムを用いてMCVのウイルス様粒子(VLP)の作製、精製を試みた。さらに得られたMCV VLPを用いて、MCV抗体保有率を調査し、血清疫学解析を行った。

[李 天成, 片野晴隆\*, 片岡紀代\*, 中村智之\*, 永

田典代\*, 宮村達男, 佐多徹太郎\*, 脇田隆宇, 鈴木哲朗(\*感染病理部)]

#### V. その他の研究

##### (1) CAV apoptinとTTV VP3の機能に関する検討

Human torque teno virus (TTV)の近縁のウイルスであるchicken anemia virus(CAV)のウイルス蛋白のひとつであるapoptinのCAV複製において必須であることを明らかにした。また、蛋白としての相同性についてはそれほど高くはないにもかかわらず、TTV-VP3がapoptinを欠損CAVの複製を相補した。

[Prasetyo AA(鳥取大医学部ウイルス学), 釜洞俊雄(鳥取大医学部ウイルス学), 黒石歩(鳥取大医学部ウイルス学), 村上恭子, 日野茂男(鳥取大医学部ウイルス学)]

##### (2) 1回感染型キメラフラビウイルスを用いたデングウイルス2型ワクチンの開発

Capsid 遺伝子の大部分を欠損したウエストナイルウイルスを用い、デングウイルス2型のprMおよびE遺伝子を持つ1回感染型キメラフラビウイルスを作製した。デング Capsid 蛋白発現細胞を用いて大量に調製したウイルスは、インターフェロンレセプターK0マウスにおいて安全性およびワクチン効果が認められた。

[鈴木亮介, Peter W. Mason(テキサス大)]

##### (3) 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、日本国内に広く浸淫しており、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-ORF2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-ORF2の融合蛋白を大量に発現し、

## ウイルス第二部

培養上清および感染細胞から目的蛋白を精製し、電子顕微鏡で粒子の形成を観察した。その結果、N末端に下記の6つのPCV2構造蛋白領域を連結した組換えバキュロウイルスで感染したTn5昆虫細胞及びその培養上清から直径23-24nmの粒子が多数観察された。現在、キメラ粒子の抗原性と免疫原性の解析を行っている。

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

(4) 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、ウエスタンブロット法、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28kDaの蛋白が産生され、顕微鏡で直接観察したところ、直径約20nm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淫していることが明らかになった。さらに、このVLPsをウサギとモルモットに免疫し、高力価の免疫血清を取得し、本免疫血清を用いてウイルス抗原検出方法を樹立した。

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

(5) 日本におけるブタおよびイノシシが保有するPCV2の遺伝子特徴調査

組換えバキュロウイルス発現系で作製した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結果、日本に生息している野生イノシシにおける抗PCV2抗体保有率は50%であり、これに対して6ヶ月例ブタにおける抗PCV2抗体保有率は100%である

ことが明らかになった。さらに一部の検体からPCR法を用いてPCV2遺伝子も検出された。これまで日本のブタからPCV2全長配列が分離された例は少なく、イノシシから全長配列が分離された例はない。これらの陽性サンプルの全長遺伝子を増幅し、その配列を解析し、イノシシとブタ由来PCV2の違いを比較する。

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

<別> 検査業務

第1室:

検定業務

経口生ポリオワクチン 小分製品 1件

第2室:

平成20年度は7件の行政検査依頼があり、ウイルス分離同定、塩基配列解析等による型内株鑑別試験等を実施した。型内鑑別あるいは塩基配列解析を行ったポリオウイルスは、すべてワクチン株と同定された。

第3室, 第4室:

行政検査

HBV及びHCVの遺伝子解析検査 1件

依頼検査

HBV核酸定量用キットの感度及び特異性試験 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) 9件

検査業務

E型肝炎確認検査 4件, 9検体

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 82: 5715-5724, 2008.
- 2) Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T: Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 747-751, 2008.
- 3) Arita M, Wakita T, Shimizu H: Characterization of pharmacologically active compounds that inhibit poliovirus and enterovirus 71 infection. *J Gen Virol* 89: 2518-2530, 2008.
- 4) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N: The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 82(19): 9639-9646, 2008.
- 5) Bingjun T, Yoshida H, Yan W, Lin L, Tsuji T, Shimizu H, Miyamura T: Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province, the People's Republic of China. *J Med Virol* 80: 670-679, 2008.
- 6) Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T: Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology* 48(1): 48-58, 2008.
- 7) Hamaguchi T, Fujisawa H, Sakai K, Okino S, Kurosaki N, Nishimura Y, Shimizu H, Yamada M: Acute encephalitis in an adult due to intrafamilial transmission of enterovirus 71. *Emerg Infect Dis* 14: 828-830, 2008.
- 8) Hansman GS, Oka T, Li TC, Nishio O, Noda M, Takeda N. Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot* 71 (8): 1689-1695, 2008.
- 9) Hansman GS, Oka T, Takeda N: Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res* 137(2): 261-265, 2008.
- 10) Ishida S, Yoshizumi S, Miyoshi M, Ikeda T, Okui T, Katayama K, Takeda N, Oka T: Characterization of sapoviruses detected in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 62(6): 504-506, 2008.
- 11) Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, Tsunetsugu-Yokota Y: Vaccine-induced neutralizing antibody against SARS-CoV Spike is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. *Microbiol Immunol* 53: 75-82, 2009.
- 12) Ishii K, Murakami K, Hmwe S, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 446-450, 2008.
- 13) Iwai M, Takizawa T, Nakayama T, Matsuura K, Yoshida H, Hasegawa S, Obara M, Horimoto E, Kurata T, 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* 40: 247-253, 2008.
- 14) Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N,

- Ito M: Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatol Res* 38(9): 909-918, 2008.
- 15) Kato T, Choi YK, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ: Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology* 48: 732-740, 2008.
- 16) Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 89(9): 2108-2113 2008.
- 17) Kondo Y, Machida K, Liu HM, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM: Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances fas-mediated apoptosis by down-regulating the expression of CD44 splicing variant 6. *J Infect Dis* 199(5): 726-736, 2009.
- 18) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: Arsenic trioxide inhibits hepatitis C virus RNA replication through modulation of the glutathione redox system and oxidative stress. *J Virol* 83(5): S2338-2348, 2009.
- 19) Lan L, Gorke S, Rau SJ, Zeisel MB, Hildt E, Himmelsbach K, Carvajal-Yepes M, Huber R, Wakita T, Schmitt-Graeff A, Royer C, Blum HE, Fischer R, Baumert TF: Hepatitis C virus infection sensitizes human hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis in a caspase 9-dependent manner. *J Immunol* 181(7): 4926-4935, 2008.
- 20) Li T-C, Suzaki Y, Ami Y, Tsunemitsu H, Miyamura T, Takeda N: Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J Vet Med Sci* 70: 1359-1362, 2008.
- 21) Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Nagata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Li T-C: Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *Arch Virol* 153: 2291-2295, 2008.
- 22) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol* 82: 7964-7976, 2008.
- 23) Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A: Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology* 376(2): 397-407, 2008.
- 24) Motomura K, Oka T, Yokoyama M, Nakamura H, Mori H, Ode H, Hansman GS, Katayama K, Kanda T, Tanaka T, Takeda N, Sato H, the Norovirus Surveillance Group of Japan: Identification of monomorphic and divergent haplotypes in the 2006-2007 norovirus GII/4 epidemic population by genomewide tracing of evolutionary history. *J Virol* 82(22): 11247-11262, 2008.
- 25) Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I: Virological characterization of the HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol* 89: 1587-1592, 2008.
- 26) Nagatsuma K, Hayashi Y, Hano H, Sagara H,

- Murakami K, Saito M, Masaki T, Lu T, Tanaka M, Enzan H, Aizawa Y, Tajiri H, Matsuura T: Lecithin: retinol acyltransferase protein is distributed in both hepatic stellate cells and endothelial cells of normal rodent and human liver. *Liver Int* 29: 47-54, 2009.
- 27) Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML: Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 47(5): 1437-1445, 2008.
- 28) Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T: Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis* 62(1): 63-66, 2009.
- 29) Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. ; Cellular vimentin content regulates the protein level of hepatitis C virus core protein and the hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383(2): 319-327, 2009.
- 30) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N: Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol Immunol* 53(1): 49-52, 2009
- 31) Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M, Takeda M, Suzuki T, Moriichi K, Matsuura Y: Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J Virol* 82: 8349-8361, 2008.
- 32) Omata K, Suzuki R, Masaki T, Miyamura T, Satoh T, Suzuki T: Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis* 13: 929-937, 2008.
- 33) Prasetyo AA, Kamahora T, Kuroishi A, Murakami K, Hino S: Replication of chicken anemia virus (CAV) requires apoptin and is complemented by VP3 of human torque teno virus (TTV). *Virology* 365(1): 85-92, 2009.
- 34) Shimasaki N, Kiyohara T, Totsuka A, Nojima K, Okada Y, Yamaguchi K, Kajioka J, Wakita T, Yoneyama T: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sang* 96(1): 14-19, 2009.
- 35) Shinkawa N, Noda M, Yoshizumi S, Tokutake Y, Shiraishi T, Arita-Nishida T, Nishio O, Oka T, Hansman GS, Takeda N, Kimura H: Molecular epidemiology of noroviruses detected in food handler-associated outbreaks of gastroenteritis in Japan. *Intervirology* 51(6): 422-426, 2008.
- 36) Shirato H, Ogawa S, Ito H, Sato T, Kameyama A, Narimatsu H, Xiaofan Z, Miyamura T, Wakita T, Ishii K, Takeda N: Noroviruses distinguish between type 1 and type 2 histo-blood group antigens for binding. *J Virol* 82: 10756-10767, 2008.
- 37) Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH: Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology* 48(4): 1054-1061, 2008.
- 38) Someya Y, Takeda N, Wakita T: Saturation mutagenesis reveals that Glu54 of norovirus 3C-like protease is not essential for the proteolytic activity. *J Biochem* 144(6), 771-780, 2008.

- 39) Sugitani M, Tamura A, Shimizu YK, Sheikh A, Kinukawa N, Shimizu K, Moriyama M, Komiyama K, Li T-C, Takeda N, Arakawa Y, Suzuki K, Ishaque SM, Roy PK, Raihan A Hasan M: Detection of hepatitis E virus RNA and genotype in Bangladesh. *J Gastroenterol Hepatol* 24: 599-604, 2008.
- 40) Suzuki R, Fayzuln R, Frolov I, Mason PW: Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes: use in safer propagation of a novel vaccine candidate. *J Virol* 82: 6942-6951, 2008.
- 41) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T: Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J Virol* 83: 2389-2392, 2009.
- 42) Suzuki R, Winkelmann ER, Mason PW: Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus vaccine candidate that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *J Virol* 83: 1870-1880, 2009
- 43) Tajiri-Utagawa E, Hara M, Takahashi K, Watanabe M, Wakita T: Development of a rapid high-throughput method for high-resolution melting analysis for routine detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol.* 47(2): 435-440, 2009.
- 44) Wakatsuki K, Kawamoto D, Hiwaki H, Watanabe K, Yoshida H: Identification and characterization of two strains of human parechovirus 4 isolated from two clinical cases in Fukuoka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46: 3144-3146, 2008.
- 45) Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. In: *Hepatitis C Methods and Protocols Second Edition* (ed. by Hengli Tan). *Methods Mol Biol*, Human Press, 510: 305-327. 2009.
- 46) Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF: Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 14(7): 1169-1171, 2008.
- 47) Yamamoto H, Li T-C, Koshimoto C, Ito K, Kita M, Miyashita N, Arikawa J, Yagami K, Asano M, Tezuka H, Suzuki N, Kurosawa T, Shibahara T, Furuya M, Mohri S, Sato H, Ohsawa K, Ibuki K, Takeda N: Serological evidence for hepatitis e virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Experimental Animals* 57: 367-376, 2008.
- 48) Yao X, Han Q, Song J, Liang C, Wakita T, Yang R, Chen X: Baculovirus mediated production of infectious hepatitis C virus in human hepatoma cells stably expressing t7 RNA polymerase. *Mol Biotechnol* 40(2): 186-194, 2008.

## 2. 和文発表

- 1) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 宮澤衣鶴, 小林正人, 白石 崇, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和. 長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の2事例 IASR Vol. 29 p. 129-132: 2008. 5.
- 2) 大塚有加, 近藤玲子, 市川高子, 山下育孝, 大瀬戸光明, 関谷安正, 上田哲郎, 芝 信明, 岡 智一郎, 片山和彦, 武田直和. 結婚式場におけるサポウイルスを原因とする食中毒事例-愛媛県, IASR Vol. 29 p. 198-200: 2008. 7.

- 3) 原 正幸, 宇田川悦子. Real time PCR を用いた  
ノロウイルスの遺伝子定量比較. 感染症学雑誌  
vol. 82. No. 4, 2008. 7.
- 4) 北島正章, 遠矢幸伸, 松原康一, 原本英司, 宇田  
川悦子, 片山浩之, 大垣眞一郎. 新たな代替指標  
としてマウス分離株を用いた水道水中のノロウ  
イルスの塩素耐性の解明. 環境工学研究論文集.  
45: 361-370, 2008.
- 5) 染谷雄一. ノロウイルス感染症, 産業保険ハンド  
ブック VI 職場の感染症対策 pp. 287-290 財  
団法人 産業科学振興財団 2008.
- 6) 白土東子, 武田直和, 石井孝司: ノロウイルスと  
血液型抗原との結合 遺伝子医学MOCK 11 2008 :  
192-198.
- 7) 片山和彦. ノロウイルス感染症を予防するには  
2008 婦人の友 1267 2008 年.
- 8) 片山和彦. ウイルス感染症-最新の動向 ノロウ  
イルス感染症, 臨床検査 53, 2009. 1.
- 9) 片山和彦. 特集=感染症をめぐるトピックス ノ  
ロウイルス感染症の対策と治療, MEDICAMENT  
NEWS 1969号, 2009.
- 10) 片山和彦, 本村和壽, タ&Eye, 産経新聞夕刊,  
2008. 9. 16.
- 11) 片山和彦. 感染を避け!! ノロウイルス, 産経新  
聞日刊, 2008. 11. 5.
- 12) 清水博之: 不活化ポリオワクチン開発の現状. 臨  
床と微生物 36: 35-40, 2009.
- 13) 清水博之: 東アジアにおけるエンテロウイルス 71  
型感染症の流行. 病原微生物検出情報 30:9-10,  
2009.
- 14) 吉田 弘, 清水博之: エンテロウイルスの実験室  
診断の現状と問題点. 病原微生物検出情報 30:  
10-12, 2009.
- 15) 西村順裕, Rifqiyah Nur Umami, 吉田 弘, 清水  
博之: CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定.  
病原微生物検出情報 30: 12-13, 2009.
- 16) 宗村徹也, 藤本嗣人, 近平雅嗣, 木村博一, 西尾 治,  
吉田 弘, 岡部信彦, 辻 勉: エンテロウイルス遺  
伝子診断法における市販 RNA 抽出キット選択の影  
響. 感染症学雑誌 82: 55-57, 2008.
- 17) 清水博之: 急性灰白髄炎. 総合臨床 57:  
335-336, 2008.
- 18) 清水博之: ポリオワクチン接種後のワクチン関連  
麻痺. 日本医事新報 4376: 114, 2008.
- 19) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之, 宮村達男, 加藤  
達夫, 梅本 哲: 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポ  
リオ生ワクチン全国累計接種率 : 2007 年度調査  
報告. 日本医師会雑誌 137: 1486-1491, 2008.
- 20) 清水博之, 武田直和: 不活化ポリオワクチン導入  
の必要性と問題点. 日本臨床 66:1950-1955,  
2008.
- 21) 清水博之: 急性灰白髄炎 (ポリオ). 総合臨床  
57(増刊号):335-336, 2008.
- 22) 清水博之: ポリオワクチン. VIRUS REPORT 5:  
56-64, 2008.
- 23) 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. 臨床とウイルス 26:  
149-158, 2008.
- 24) 清水博之: ポリオ・コクサッキー・エコーウイル  
ス. バイオセーフティの辞典, 263-265, みみず  
く舎, 2008.
- 25) 政木隆博, 鈴木哲朗: HCV の分子生物学. 肝癌. 日  
本臨床 67 (suppl. 3): 134-137, 2009.
- 26) 加藤孝宣, 高橋和明: Overview : E 型ウイルス性  
肝炎. メディカルテクノロジー 26: 971-974,  
2009.
- 27) 加藤孝宣, 三代俊治: わが国の A 型・E 型肝炎の発  
症率と抗体保有率はどれくらいか? 肝臓病診療  
Q&A 5-9, 中外医学社 2009.
- 28) 鈴木哲朗, 政木隆博, 相崎英樹: C 型肝炎ウイル  
スの感染粒子形成機構. ウイルス 58: 199-206,  
2008.
- 29) 相崎英樹, 鈴木哲朗, 多田有希, 岡部信彦, 脇田  
隆字: C 型肝炎に関する最近の情報. 結核予防会  
機関誌「複十字」 21-23, 2008.
- 30) 石井孝司, 李 天成, 武田直和 E 型肝炎 食品

由来感染症と食品微生物 中央法規出版 印刷中  
(2009)

- 31) 清原知子, 米山徹夫 A型肝炎ウイルス食中毒とは 食品安全の事典 (日本食品衛生学会編集) : 171-174, 2009.
- 32) 清原知子, 石井孝司, 脇田隆字: A型肝炎. 臨床と微生物 35: 645-650, 2008.
- 33) 李 天成, 石井孝司, 武田直和: E型肝炎と豚肉, 鹿肉, 猪肉の安全性. 臨床とウイルス 36: 298-304, 2008.
- 34) 石井孝司 遺伝子組換え生ワクチン. 日本臨床 66: 1903-1907, 2008.

## II. 学会発表

### 国際学会

- 1) Oka T, Iwakiri A, Yamamoto S, Katayama K, Wakita T, Takeda N: Sequential analysis of fecal sapovirus shedding, 第14回国際ウイルス学会, トルコ, 2008. 8. 10-15.
- 2) Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, and Takeda N. Role of amino acid residues located upstream from cleavage site on sapovirus, ORF1 polyprotein processing. *ibid.*
- 3) Katayama K, Hansman GS, Oka T, Suzuki Y, Wakita T, Takeda N: The newly identified human Norovirus strain HK299 may be recombinant between genogroup. *ibid.*
- 4) Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Tsunemitsu H, Wakita T, Sato H, Takeda N: Substrate specificities of calicivirus-encoded 3C-like proteases. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Viet Nam, 2008. 10. 6.
- 5) Arita M, Wakita T, Shimizu H: A RAF-1 inhibitor GW5074 inhibits poliovirus and enterovirus 71 replication independently of the RAF-1 signaling pathway. Meeting of the European Study Group on the Molecular Biology of Picornaviruses (EUROPIC 2008), Sitges, Spain. 2008. 5.
- 6) Shimizu H: Mouse and Non-human Primate Models for EV71 disease. 13th International Congress on Infectious Diseases, Kuala Lumpur, Malaysia. 2008. 6.
- 7) Ong K, Shimizu H, Nishimura Y, Arita M, Shamala D, Cardoso M, Wong K: Phenotypic and genotypic characterization of two mouse adapted enterovirus 71 strains that showed differences in murine CNS infection. 13th International Congress on Infectious Diseases, Kuala Lumpur, Malaysia, 2008. 6.
- 8) Shimizu H: Molecular basis of the pathogenicity of enterovirus 71 in experimental animal models. 20th Anniversary Symposium of Department of Pediatric National Cheng-Kung Hospital, Tainan, Taiwan. 2008. 7.
- 9) Umami RN, Dhenni R, Jajuli A, Shimizu H, Utama A: Detection and identification of human enteroviruses among healthy children in Antajaya, Bogor. Bogor, Indonesia. The 4th Indonesian Biotechnology Conference, 2008. 8.
- 10) Kelly H, Shimizu H, Nishimura Y, Thorley B: Oral poliovirus vaccine causes transverse myelitis. Public Health Association of Australia conference, Brisbane, Australia, 2008. 9.
- 11) Shimizu H: Current Knowledge on the Molecular Pathogenesis of Enterovirus 71. Beijing International Symposium on Hand, foot and Mouth Disease, Beijing, China, 2009. 1.
- 12) Shoji I, Osaki M, Fukuda K, Murakami K, Hotta H, Suzuki T, Wakita T, Miyamura T: Molecular mechanism of E6AP-mediated regulation of



- hepatitis C virus production. Keystone Symposia. Vancouver, Canada, 2008. 4.
- 13) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: The C-terminal serine cluster of NS5A is critical for the production of hepatitis C virus particles. *ibid.*
- 14) Murakami K, Abe K, Shoji I, Takamiya S, Kimura T, Ishii K, Suzuki R, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T: Identification of hnRNPH1 as a binding partner of hepatitis C virus core protein and the IRES IIIId region of viral RNA. IUMS2008. Istanbul, Turkey 2008. 08.10-15.
- 15) Prasetyo AA, Kamahora T, Murakami K, Hino S: Requirement of Apoptin for CAV replication. *ibid.*
- 16) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Suzuki R, Tani H, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T, Critical roles of virion-associated cholesterol and sphingolipids in the viral infectivity. *ibid.*
- 17) Suzuki R, Fayzuln R, Mason PW: Identification of mutated cyclization sequences that permit efficient replication of West Nile virus genomes. *ibid.*
- 18) Li T-C, Liu LJ, Suzuki T, Tsunemitsu H, Kataoka M, Ngata N, Takeda N, Wakita T, Miyamura T: Efficient production of type 2 porcine circovirus-like particles by a recombinant baculovirus. *ibid.*
- 19) Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: The C-terminal serine cluster of NS5A is a determinant of NS5A-core protein interaction and HCV production. 15<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio, USA, 2008. 10. 5-9.
- 20) Hamamoto I, Murakami K, Suzuki T, Taya K, Okabe N, Wakita T, Shoji I: ERGIC-53 regulates the HCV RNA replication through interaction with the viral NS3 protein. *ibid.*
- 21) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding protein partners for HCV core protein. *ibid.*
- 22) Shoji I, Osaki M, Murakami K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Hotta H: Ubiquitylation signal of hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 23) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Murakami K, Shoji I, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *ibid.*
- 24) Takahashi H, Omi N, Akazawa D, Nakamura N, Mochizaki H, Suzuki T, Wakita T: Biological properties of purified recombinant HCV particles with the epitope-tagged envelope. *ibid.*
- 25) Uenishi R, Hakamata W, Nohtomi K, Liao H, Hase S, Suzuki T, Wakita T, Takebe Y: Identification of novel small molecule HCV entry inhibitor that acts through CD81. *ibid.*
- 26) Fukasawa M, Nakamura S, Nitahara-Kasahara Y, Shimotohno K, Suzuki T, Wakita T, Nishijima M, Mashino T: Anti-HCV activity of novel Fullerene Derivatives. *ibid.*
- 27) Watanabe N, Murayama A, Akazawa D, Tomonaga M, Date T, Kato T, Suzuki T, Wakita T: Purification and structural analysis of HCV E2 protein. *ibid.*
- 28) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. *ibid.*

- 29) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T: A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV. *ibid.*
- 30) Suzuki R, Winkelmann E and Mason PW : Construction and characterization of a single-cycle chimeric flavivirus that protects mice against lethal challenge with dengue virus type 2. *ibid.*
- 31) Ishii K, Murakami K, Hmwe S, Li J, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T: Trans-encapsidation of HCV subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *ibid.*
- 32) Omi N, Akazawa D, Takahashi H, Nakamura N, Morikawa K, Date T, Wakita T: Analysis of immunogenicity of cell culture-grown hepatitis C virus in the mouse. 2<sup>nd</sup> Vaccine Congress, Boston, USA 2008.12.7-9.
- 33) Suzuki T: Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. The 50th Anniversary Meeting of the International Association for the Study of the Liver. San Francisco, USA 2008.10.31-11.4.
- 34) Koike K, Tsutsumi T, Matsuda M, Hideki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *ibid.*
- 35) Braconi C, Meng F, Huang N, Suzuki T, Taccioli C, Crane C, Patel T: Hepatitis C virus proteins can modulate microRNA expression and chemotherapeutic responses in hepatocellular carcinoma (HCC). *ibid.*
- 36) Mason PW, Widman D, Ishikawa T, Bourne N, Suzuki R, Winkelmann E, Frolov I, Carrion R, Konishi E: Engineering third-generation vaccines for West Nile encephalitis, Japanese encephalitis, and dengue. Pan-American Dengue Research Network Meeting, Recife, Brazil, 2008.7.
- 37) Ishii K: Highly attenuated vaccinia virus DIs as a potential SARS vaccine. Novel Strategies for Viral Infection Control. Taipei, Taiwan, 2008.11.1.
- 38) Li TC, Ishii K, Takeda N: Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. The Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Viet Nam, 2008.10.6.
- 39) Ishii K, Hasegawa H, Nagata Y, Ami Y, Fukushi S, Taguchi F, Tsunetsugu-Yokota Y: SARS-CoV Spike-reactive neutralizing antibody is highly effective for the protection of mice in the murine SARS model. XIth International Symposium on Nidoviruses, Oxford, UK, 2008.6.22-27.
- 40) Ami Y, Ishii K, Tsunetsugu-Yokota Y, Nagata Y, Hasegawa H, Taguchi F: Fatal exacerbated pneumonia of mice induced by co-infection of respiratory bacterium and SARS-CoV. *ibid.*
- 41) Li T-C, Miyamura T, Wakita T, Takeda N: Characterization of recombinant virus-like particles of genotype 3 hepatitis E viruses. The 7th Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan, 2008.6.1-3.
- 42) Miyamura T, Li T-C, Takeda N: Hepatitis E virus. The 18<sup>th</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Seoul,

- Korea, 2008. 3. 23-26.
- 43) T Wakita: HCV culture system and antiviral development. 21<sup>st</sup> International Conference on Antiviral Research (ICAR), Montreal, Quebec, Canada, 2008. 4.
- 44) T Wakita: HCV replication and virus particle formation. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, 2008. 9.
- 45) T Wakita: Development of HCV culture system, Workshop/Hepatitis, The 7<sup>th</sup> Japan-China International Conference of Virology, Tokyo, Japan, 2008. 6.
- 46) T Wakita: Hepatitis C virus replication and virus particle formation: Symposium: Emerging Viruses and the Control of Viruses, XIVth International Congress of Virology, IUMS, Istanbul, Turkey, 2008. 8. 15.
- 47) M Saeed, T Kato, T Wakita: In vitro replication efficiencies of hepatitis C virus JFH-1 strain with mutations emerged in chimpanzee, The Hyogo Prefecture Awaji Yumebutai International Conference Center, 2008. 9. 7-11.
- 48) Munakata T, Wakita T, Nomoto A: Induction of hepatic TLR3 by E2F1 during hepatitis C virus infection. 15th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. San Antonio TX, USA, 2008. 10. 5-9.
- 49) Zeisel MB, Hoffmann M, Jilg N, Stoll-Keller F, Wakita T, Barth H, Henneke P, Baumert TF: Sensing of hepatitis C virus core by toll-like receptor 2 is shielded in enveloped viral particles. *ibid.*
- 50) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M, A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. *ibid.*
- 51) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Wakita T: Production and purification of HCV particles from serum-free culture. *ibid.*
- 52) Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR: Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. *ibid.*
- 53) Ariumi Y, Kuroki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: The vacuolar protein sorting pathway is essential for HCV budding. *ibid.*
- 54) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N: Cyclophilins A and B mediate the anti-HCV activity of cyclosporine A in 1b/2a chimeric replicon-harboring cells. *ibid.*
- 55) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N: Arsenic trioxide inhibits HCV RNA replication through modulation of oxidative stress. *ibid.*
- 56) Murayama A, Date T, Akazawa D, Kato T, Suzuki T, Nomoto A, Wakita T: A single amino acid mutation in core region is important for efficient infectious virus particle production in genotype 2b/2a chimeric HCV. *ibid.*
- 57) Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J: Ethanol enhances hepatitis c virus replication in human hepatoma cells supporting infectious virus production. *ibid.*
- 58) Sir D, Chen W-L, Wakita T, Yen TSB, Ou J-HJ: Perturbation of autophagic response by hepatitis c virus. *ibid.*
- 59) K Morikawa, D Akazawa, Imawari M, T Wakita: The structural analysis of highly purified infectious HCV particles produced in cultured

- cells. The 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, CA, USA, 10.31-11.4, 2008.
- 60) Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Suda G, Onuki Y, Yamamoto M, Wakita T, Watanabe M : Establishment and genetic analysis of cytopathogenic HCV-JFH1 mutants by plaque-forming assay. *ibid.*
- 61) Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, T Wakita, Krawczynski K, Liang TJ: Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzee is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *ibid.*
- 62) Machida R, Tong S, Heintges T, Wakita T, Wands JR, Li J: Interruption of hepatitis C virus particle formation by an intracellular antibody targeting the viral core protein. *ibid.*
2. 国内学会
- 1) 原田誠也, 八尋俊輔, 西村浩一, 松尾 繁, 岡田峰幸, 岡智一郎, 武田直和: PCR 法による集団及び散发下痢症事例の起因ウイルス調査. 公衆衛生獣医師協議会, 東京, 2008.9.5.
- 2) 岡智一郎: 第 14 回国際ウイルス学会の報告. ウイルス性下痢症研究会第 20 回学術集会, 岡山, 2008.10.25.
- 3) 赤澤大輔, 森川賢一, 尾見法昭, 高橋 仁, 中村紀子, 深澤秀輔, 伊達朋子, 加藤孝宣, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆字: 無血清培養による HCV 粒子の作製と精製工程の検討. 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.10.26-28.
- 4) 阿部健一, 池田正徳, 有海康雄, 團迫浩方, 脇田隆字, 加藤宜之, Cyclosporine A に対し抵抗性を示す 1b/2a キメラレプリコン, 同上.
- 5) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宜之, DNA 損傷センサー ATM および Chk2 と HCV NS5B との相互作用, 同上.
- 6) 有田峰太郎, 脇田隆字, 清水博之: GW5074 のエンテロウイルス複製阻害機構の関する解析. 同上.
- 7) 石井孝司, 村上恭子, ススムエー, 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.
- 8) 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組織に発現亢進する分子 OASL はウイルス制御分子か?, 同上.
- 9) 伊藤昌彦, 持田恵子, 村上恭子, 鈴木哲朗, 山口一成, 水落利明: HCV慢性感染患者におけるB細胞リンパ腫発症機序の解明: 末梢血B細胞でのHCV感染増殖およびAID (activation-induced cytidine deaminase) の発現上昇. 同上.
- 10) 飯塚節子, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田衛: サポウイルスとノロウイルスが検出された食中毒事例. 同上.
- 11) 岩切 章, 山本正悟, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: リアルタイム RT-PCR 法を用いた急性胃腸炎患者糞便中のサポウイルス排泄期間の解析. 同上.
- 12) 岩崎優紀, 森健一, 榎昇, 石井孝司, 飯島沙幸, 吉田友教, 吉崎佐矢香, 木村展之, 片貝祐子, 揚山直英, 鈴木哲朗, 神奈木真理, 宮村達男, 明里宏文: C 型肝炎サロゲート霊長類モデル: GBV-B 長期持続感染サルウイルスゲノム解析. 同上.
- 13) 宇田川悦子, 高橋邦明, 原 正幸: HRM 分析法によるノロウイルス遺伝子解析法の検討. 同上.
- 14) 小澤一弘, 岡智一郎, 片山和彦, 本村和嗣, 中村浩美, 守 宏美. 佐藤裕徳, 武田直和: 調理従事者を対象としたノロウイルスの網羅的検出調査. 同上.
- 15) 植木 洋, 庄司美加, 山本美和子, 阿部勝彦, 伊藤文明, 池田義文, 西尾 治, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 野田 衛: カキを用いたサポウイ

- ルスの環境調査. 同上.
- 16) 上西理恵, 廖華南, 袴田航, 納富香子, 長谷彩希, 赤澤大輔, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 武部豊: HCV JFH-1 infectivity assay を用いた低分子 HCV 阻害剤の探索とその評価, 同上.
  - 17) 岡智一郎, 横山 勝, 片山和彦, 恒光 裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 守 宏美, 中村浩美, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和: カリシウイルスプロテアーゼの基質認識に影響する切断部位上流アミノ酸残基の解析. 同上.
  - 18) 尾見法昭, 赤澤大輔, 高橋 仁, 森川賢一, 伊達朋子, 石井孝司, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: 細胞培養系により産生されたキメラ HCV ウイルス株および JFH1 株の免疫の検討. 同上.
  - 19) 片山和彦: ノロウイルスのリバースジェネティックシステムとその展望. 同上.
  - 20) 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆宇, 武田直和: リバースジェネティックスを利用したノロウイルスの病原性発現機構の解析. 同上.
  - 21) 加藤宜之, 森京子, 阿部健一, 團迫浩方, 有海康雄, 脇田隆宇, 池田正徳, 新しいヒト肝癌細胞株 Li23 を用いた HCV 生活環再現システム, 同上.
  - 22) 北島正章, 岡智一郎, 片山和彦, 原本英司, 片山浩之, 武田直和, 大垣眞一郎: 河川中のノロウイルスを指標にした地域流行株の把握. 同上.
  - 23) 黒木美沙緒, 有海康雄, 池田正徳, 團迫浩方, 脇田隆宇, 加藤宜之: 亜ヒ酸は酸化ストレスを介して HCV RNA の複製を顕著に阻害する, 同上.
  - 24) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松 久, 脇田隆宇, 石井孝司, 武田直和: ノロウイルスによる血液型抗原の識別. 同上.
  - 25) 下池貴志, SA McKenna, DA Lindhout, 脇田隆宇, JD. Puglisi: HCV IRES 依存的翻訳は eIF2 のリン酸化耐性である, 同上.
  - 26) 鈴木亮介, Evandro Winkelmann, Peter Mason: キメラシュードフラビウイルスを用いたデングワクチンの構築とその評価. 同上.
  - 27) 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆宇: ノロウイルス3C 様プロテアーゼ Glu54 残基変異の基質認識への影響. 同上.
  - 28) 高木弘隆, 遠矢幸伸, 片山和彦, 岡智一郎, 武田直和, 杉山和良: 国内で分離されたマウスノロウイルスの安定性および消毒剤に対する感受性の検討. 同上.
  - 29) 武部豊, 上西理恵, 納富香子, 廖 華南, 長谷彩希, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 袴田 航: CD81 を標的とする新しいクラスの低分子性 HCV エントリー阻害剤の同定, 同上.
  - 30) 浜本いつき, 村上恭子, 鈴木哲朗, 多屋馨子, 岡部信彦, 脇田隆宇, 勝二郁夫: C型肝炎ウイルス複製を制御する宿主因子 ERGIC-53 の機能. 同上.
  - 31) 原田誠也, 岡田峰幸, 岡智一郎, 八尋俊輔, 西村浩一, 松尾 繁, 中島龍一, 篠崎邦子, 片山和彦, 武田直和: サポウイルスによる散発性下痢症の地域流行-熊本-. 同上.
  - 32) 原 弘道, 相崎英樹, 松田麻未, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: creatine kinase B による NS4A を介する HCV RNA 複製調節の解明. 同上.
  - 33) 政木隆博, 鈴木亮介, 村上恭子, 相崎英樹, 石井孝司, 村山麻子, 伊達朋子, 松浦善治, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: HCV 粒子形成における NS5A 蛋白の役割. 同上.
  - 34) 町田早苗, 西村順裕, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 清水博之: カンボジア糞便検体中ヒトパレコウイルス検出とその分子疫学. 同上.
  - 35) 棟方 翼, 脇田隆宇, 野本明男: TLR3 は C 型肝炎ウイルス感染を抑制する, 同上.
  - 36) 村上恭子, 阿部克俊, 高宮智史, 木村敬郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦, 脇田隆宇, 勝二郁夫: HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNP1/H2 の HCV 生活環における役割. 同上.
  - 37) 村上裕子, 鈴木哲朗, 脇田隆宇, 深澤秀輔: 細胞感染系を用いたスクリーニングにより見いだされた新規標的を持つ抗 HCV 物質の作用機構解析.

- 同上.
- 38) 本村和嗣, 横山 勝, 岡智一郎, 中村浩美, 守 宏美, Hansman Grant, 片山和彦, 田中智之, 真崎宏則, 星野和彦, 蔦本 恭, 秋山美穂, 木村博一, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: ノロウイルスの免疫淘汰と周期的流行の分子機序. 同上.
- 39) 森 嘉生, 山下哲生, 嶋 亮一, 森石恆司, 李 天成, 武田直和, 松浦善治: E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製. 同上.
- 40) 山下篤哉, 松本武久, 高谷大輔, 上條加寿恵, 前川伸哉, 雨宮史武, 坂本直哉, 脇田隆宇, 梅山秀明, 横山茂之, 榎本信幸, 伊藤正彦: *In silico screening* による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索, 同上. ワークショップ 8 ウイルス感染症の診断と治療
- 41) 山下哲生, 宮崎直幸, 森 嘉生, 森石恆司, 李 天成, 宮村達男, 武田直和, 月原富武, 吉村政人, 松浦善治: 分析能 3.5A の E 型肝炎ウイルス様粒子の結晶化と X 線結晶構造解析. 同上.
- 42) 山吉誠也, 山下康子, 花方信孝, 箕輪貴司, 竹村太郎, 清水博之, 小池 智: エンテロウイルス 71 の感染性決定分子の同定. 同上.
- 43) 横山 勝, 岡智一郎, 片山和彦, 山本真民, 宮下佳奈, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: サポウイルスプロテアーゼの基質認識に関わるアミノ酸残基の解析. 同上.
- 44) 吉田徹也, 粕尾しず子, 畔上由佳, 内山友里恵, 薩摩林一代, 白石 崇, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和: 長野県内で発生したサポウイルスによる集団感染性胃腸炎の 2 事例. 同上.
- 45) 李 天成, 恒光 裕, 宮村達男, 脇田隆宇, 武田直和: 培養細胞における E 型肝炎ウイルス (HEV) の増殖. 同上.
- 46) 渡邊則幸, 村山麻子, 赤澤大輔, 朝長充則, 伊達朋子, 加藤孝宣, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: HCV E2 タンパク質の精製および機能, 構造の解析. 同上.
- 47) 脇田隆宇: ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルス研究, 同上, シンポジウム 4 C 型肝炎
- 48) 相崎英樹, 山本真民, 原弘道, 森川賢一, 谷 英樹, 松浦善治, 斎藤恭子, 深澤征義, 花田賢太郎, 宮村達男, 脇田隆宇, 鈴木哲朗: 脂質の C 型肝炎ウイルス感染における役割, 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008. 12. 9-12.
- 49) 石橋真理子, 脇田隆宇, 清水洋子, 江角真理子: 肝臓類洞内皮 C 型レクチン L-SIGN の C 型肝炎ウイルス受容体機能の解析. 同上.
- 50) 岡智一郎, 横山 勝, 片山和彦, 恒光 裕, 山本真民, 宮下佳奈, 本村和嗣, 脇田隆宇, 佐藤裕徳, 武田直和: カリシウイルスプロテアーゼの活性発現に重要なアミノ酸残基の解析. 同上.
- 51) 片山和彦, 岡智一郎, 脇田隆宇, 武田直和: ノロウイルスプロテアーゼを利用したノロウイルスリバーシジェネティックシステムの制御. 同上.
- 52) 勝二郁夫, 大崎一直, 村上恭子, 鈴木哲朗, 宮村達男, 脇田隆宇, 堀田 博: C 型肝炎ウイルスコア蛋白質のユビキチン化シグナル. 同上.
- 53) 高橋 仁, 尾見法昭, 赤澤大輔, 中村紀子, 望月英典, 鈴木哲朗, 脇田隆宇: エピトープタグを付加した組換え HCV 粒子の効率的な産生と性状解析. 同上.
- 54) 村上恭子, 阿部克俊, 高宮智史, 木村敬郎, 鈴木哲朗, 宮村達男, 小池和彦, 脇田隆宇, 勝二郁夫: HCV コア蛋白に結合する新規宿主因子 hnRNP1/H2 の HCV 生活環における役割. 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008. 12. 9-12.
- 55) 村上耕介, 鈴木さやか, 岡島徹也, 灘野大太, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 松田 幹: ノロウイルス・ウイルス様粒子 (VLPs) のヒト腸上皮様 Caco-2 細胞への結合様式とウシ初乳の VLPs 結合抑制効果. 同上.
- 56) 横山 勝, 岡智一郎, 片山和彦, 神田忠仁, 武田直和, 佐藤裕徳: カリシウイルスプロテアーゼ分子モデルによる基質認識の解析. 同上
- 57) 原田誠也, 八尋俊輔, 西村浩一, 松尾 繁, 岡田

- 峰幸, 岡智一郎, 武田直和: PCR 法による集団及び散発下痢症事例の起因ウイルス調査. 日本獣医学会学会年次大会 (日本産業動物獣医学会, 日本小動物獣医学会医及び日本公衆衛生学会合同年次大会), 岩手, 2009. 1. 22-24.
- 58) 北島正章, 原本英司, 岡智一郎, 片山和彦, 武田直和, 片山浩之, 大垣眞一郎: 多摩川河川水から検出されたノロウイルスの遺伝子解析. 第 43 回日本水環境学会年会. 山口, 2009. 3. 16-18.
- 59) 岡智一郎, 高木弘隆, 遠矢幸伸, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: BRET を用いたネコカリシウイルスプロテアーゼ活性検出系の構築. 日本薬学会第 129 年会, 京都, 2009. 3. 26-28.
- 60) 染谷雄一, 武田直和, 脇田隆字: ノロウイルスプロテアーゼ Glu54 残基の役割. 同上.
- 61) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松 久, 成松幾世, 脇田隆字, 石井孝司, 武田直和: ノロウイルスの結合する糖鎖構造. 第 12 回 日本神経ウイルス研究会学術集会, 鹿児島, 2008. 7. 17-19.
- 62) 白土東子, 熊谷安希子, 伊藤浩美, 佐藤 隆, 亀山昭彦, 成松 久, 脇田隆字, 石井孝司, 武田直和: ノロウイルスによる血液型抗原タイプ 1, 2 構造の識別. 第 28 回 日本糖質学会年会, つくば, 2008. 8. 18-20.
- 63) 片山和彦: ノロウイルスの感染症の基礎. 第 82 回日本感染症学会総会 シンポジウム, ノロウイルス感染症の最前線, 島根, 2008. 4.
- 64) 山吉誠也, 山下康子, 花方信孝, 箕輪貴司, 竹村太郎, 清水博之, 小池 智: エンテロウイルス 71 の感染受容体の同定. 第 12 回神経ウイルス研究会, 鹿児島. 2008. 7.
- 65) 福元伸一, 長岡健太郎, 中野浩輔, 須甲憲明, 原田眞雄, 平賀博明, 加藤直子, 西村順裕, 清水博之, 長谷川秀樹: コクサッキーウイルス A-16 による手足口病に合併した間質性肺炎の 1 例. 第 96 回日本呼吸器学会北海道地方会, 札幌市, 2008. 9. 20.
- 66) 實藤雅文, 楠原浩一, 後藤多奉, 吉良龍太郎, 清水博之, 鳥巢浩幸, 原 寿郎: コクサッキーウイルス A16 の手足口病に伴って菱脳炎を呈した一例. 第 13 回日本神経感染症学会総会, 東京都, 2008. 10. 10-11.
- 67) 加藤孝宣, 三代俊治, 脇田隆字: HCV JFH-1 株のチンパンジーへの感染実験: in vivo 適応変異の機能的解析. 第 44 回日本肝臓学会総会, 愛媛, 2008. 6. 5-6.
- 68) 政木隆博, 鈴木亮介, 村上恭子, 相崎英樹, 石井孝司, 宮村達男, 脇田隆字, 鈴木哲朗: HCV の粒子形成における NS5A 蛋白の役割. 同上.
- 69) 森川賢一, 脇田隆字: 培養細胞で作製した感染性 C 型肝炎ウイルス粒子の免疫原性の解析およびワクチン応用への可能性. 同上. ワークショップ 7 「肝炎ウイルスの感染・複製・排除のメカニズム」
- 70) 平賀伸彦, 今村道雄, 木村俊之, 畠山剛, 光井富喜子, 三木大樹, 森奈美, 柘植雅貴, 高橋祥一, 脇田隆字, 茶山一彰: HBV と HCV はインターフェロン感受性が異なる-ウイルス複製培養細胞および動物モデルを用いた検討-. 同上.
- 71) 鈴木亮介: ウエストナイルウイルスにおける複製効率の良い変異型 Cyclization sequence の同定とその応用. 第 15 回トガ・フラビ・ペスチ研究会, 岡山, 2008. 10.
- 72) 鈴木亮介: シュードフラビウイルスを用いた Dengue ワクチンの開発. 第 5 回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 湯河原, 2008. 8.
- 73) 脇田隆字, C 型肝炎ウイルス研究の最先端. 第 12 回日本肝臓学会大会, シンポジウム 1 「肝炎ウイルス研究のカットインエッジ: 基礎から臨床への贈り物」 東京, 2008. 10. 1.
- 74) 脇田隆字: C 型肝炎ウイルスのウイルス培養とワクチン開発. 第 67 回日本癌学会学術総会, シンポジウム 4 ウイルス発癌, 名古屋, 2008. 10. 28-30.
- 75) 有海康雄, 黒木美沙緒, 團迫浩方, 阿部健一, 池田正徳, 脇田隆字, 加藤宜之: ATM DNA 損傷センサーは C 型肝炎ウイルスの RNA 複製に必要であ

る。ワークショップ 3-4 HCV, 同上.

- 76) 渋谷悠子, 尾見法昭, 中村紀子, 脇田隆字: 細胞培養系で作製した C 型肝炎ウイルスにより誘導された抗体の性状解析, 第 12 回日本ワクチン学会学術集会, 熊本, 2008. 11. 8-9.
- 77) 清原知子, 徳永英治, 石井孝司, 脇田隆字: A 型肝炎ワクチンの *in vitro* 力価試験の検討, 同上.
- 78) 千代智子, 関口 敏, 松原明弘, 保富康宏, 脇田隆字, 志田壽利, 水野喬介, 村井 深, 小原道法: HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの作製とワクチンとしての検討. 同上.

Polio-free Status, Japan: WHO report, 2008.

- 9) 脇田隆字: C 型肝炎ウイルスのウイルス培養系とその応用. 第 28 回広島山口肝疾患研究会, 広島, 2009. 4. 4.
- 10) 脇田隆字: C 型肝炎ウイルスの細胞内粒子形成過程の解析. 「感染現象のマトリックス」横糸の会, 東京, 2008. 5. 29-30.
- 11) 相崎英樹, 脇田隆字: C 型肝炎ウイルスの生活環における脂質の役割に関する研究. 「感染現象のマトリックス」横糸の会, 西宮市, 2008. 6. 28-29.

### III. その他

- 1) 岡智一郎: 下痢症ウイルス II サポウイルス. 国立保健医療科学院主催 平成 20 年度短期研修ウイルス研修, 東京, 2008. 10. 9.
- 2) 片山和彦: ノロウイルス集団発生事例に対して感染症及び食品部が共同で実施する初期実地疫学調査及び微生物学的検査のポイント. 平成 20 年度神奈川県保健福祉部生活衛生課研修会, 2008. 2.
- 3) 片山和彦: 下痢症ウイルス(ノロウイルス・サポウイルス). 平成 19 年度希少感染症診断技術研修会, 2008. 2.
- 4) 片山和彦: ノロウイルス感染症 過去・現在・未来. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会ランチョンセミナー, 岡山, 2008. 10.
- 5) 片山和彦: ノロウイルスの新知見. ウイルス性下痢症研究会第 20 回学術集会, 岡山, 2008. 10.
- 6) 清水博之: 東アジアにおける重症エンテロウイルス 71 感染症の流行と分子疫学. アボット感染症アワー, ラジオ日経, (<http://radio848.rs.jp.net/abbott/html/20081031.html>), 2008. 10. 31. 放送.
- 7) Final quality assurance report of phase 1 wild poliovirus laboratory containment: WHO report, 2008.
- 8) Country Progress Report on Maintaining